

This report contains the collective views of an international group of experts and does not necessarily represent the decisions or the stated policy of the World Health Organization, the International Labour Organization, or the United Nations Environment Programme.

Harmonization Project Document No. 4

PART 1: IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS AND CASE-STUDIES

PART 2: IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A NON-CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS

This project was conducted within the IPCS project on the Harmonization of Approaches to the Assessment of Risk from Exposure to Chemicals.

Published under the joint sponsorship of the World Health Organization, the International Labour Organization, and the United Nations Environment Programme, and produced within the framework of the Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals.

The **International Programme on Chemical Safety (IPCS)**, established in 1980, is a joint venture of the United Nations Environment Programme (UNEP), the International Labour Organization (ILO), and the World Health Organization (WHO). The overall objectives of the IPCS are to establish the scientific basis for assessment of the risk to human health and the environment from exposure to chemicals, through international peer review processes, as a prerequisite for the promotion of chemical safety, and to provide technical assistance in strengthening national capacities for the sound management of chemicals.

The **Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC)** was established in 1995 by UNEP, ILO, the Food and Agriculture Organization of the United Nations, WHO, the United Nations Industrial Development Organization, the United Nations Institute for Training and Research, and the Organisation for Economic Co-operation and Development (Participating Organizations), following recommendations made by the 1992 UN Conference on Environment and Development to strengthen cooperation and increase coordination in the field of chemical safety. The purpose of the IOMC is to promote coordination of the policies and activities pursued by the Participating Organizations, jointly or separately, to achieve the sound management of chemicals in relation to human health and the environment.

WHO Library Cataloguing-in-Publication Data

IPCS mode of action framework.

(IPCS harmonization project document ; no. 4)

1.Hazardous substances – toxicity. 2.Risk assessment – methods. 3.Risk management – methods. 4.Carcinogenicity tests. 5.Carcinogens. 6. Neoplasms – chemically induced.
I.International Programme on Chemical Safety. II.Series.

ISBN 978 92 4 156349 9

(NLM classification: QV 602)

© World Health Organization 2007

All rights reserved. Publications of the World Health Organization can be obtained from WHO Press, World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland (tel.: +41 22 791 2476; fax: +41 22 791 4857; e-mail: bookorders@who.int). Requests for permission to reproduce or translate WHO publications—whether for sale or for non-commercial distribution—should be addressed to WHO Press, at the above address (fax: +41 22 791 4806; e-mail: permissions@who.int).

The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city, or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

The mention of specific companies or of certain manufacturers' products does not imply that they are endorsed or recommended by the World Health Organization in preference to others of a similar nature that are not mentioned. Errors and omissions excepted, the names of proprietary products are distinguished by initial capital letters.

All reasonable precautions have been taken by the World Health Organization to verify the information contained in this publication. However, the published material is being distributed without warranty of any kind, either express or implied. The responsibility for the interpretation and use of the material lies with the reader. In no event shall the World Health Organization be liable for damages arising from its use.

TABLE OF CONTENTS

FOREWORD	1
 PART 1: IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS AND CASE-STUDIES	
<hr/>	
PREFACE	4
LIST OF CONTRIBUTORS	7
LIST OF ACRONYMS AND ABBREVIATIONS	8
IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS	10
<i>A.R. Boobis, S.M. Cohen, V. Dellarco, D. McGregor, M.E. Meek, C. Vickers, D. Willcocks, & W. Farland</i>	
THIAZOPYR AND THYROID DISRUPTION: CASE-STUDY WITHIN THE CONTEXT OF THE IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS	30
<i>V.L. Dellarco, D. McGregor, C. Berry, S.M. Cohen, & A.R. Boobis</i>	
4-AMINOBIIPHENYL AND DNA REACTIVITY: CASE-STUDY WITHIN THE CONTEXT OF THE IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS	44
<i>S.M. Cohen, A.R. Boobis, M.E. Meek, R.J. Preston, & D.B. McGregor</i>	
FORMALDEHYDE AND GLUTARALDEHYDE AND NASAL CYTOTOXICITY: CASE-STUDY WITHIN THE CONTEXT OF THE IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS	75
<i>D. McGregor, H. Bolt, V. Coglianò, & H.-B. Richter-Reichhelm</i>	
 PART 2: IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A NON- CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS	
<hr/>	
PREFACE	104
LIST OF CONTRIBUTORS	105
LIST OF ACRONYMS AND ABBREVIATIONS	106

IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A NON-CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS	107
<i>A.R. Boobis, J.E. Doe, B. Heinrich-Hirsch, M.E. Meek, S. Munn, M. Ruchirawat, J. Schlatter, J. Seed, & C. Vickers</i>	

FOREWORD

Harmonization Project Documents are a family of publications by the World Health Organization (WHO) under the umbrella of the International Programme on Chemical Safety (IPCS) (WHO/ILO/UNEP). Harmonization Project Documents complement the Environmental Health Criteria (EHC) methodology (yellow cover) series of documents as authoritative documents on methods for the risk assessment of chemicals.

The main impetus for the current coordinated international, regional, and national efforts on the assessment and management of hazardous chemicals arose from the 1992 United Nations Conference on Environment and Development (UNCED). UNCED Agenda 21, Chapter 19, provides the “blueprint” for the environmentally sound management of toxic chemicals. This commitment by governments was reconfirmed at the 2002 World Summit on Sustainable Development and in 2006 in the Strategic Approach to International Chemicals Management (SAICM). The IPCS project on the Harmonization of Approaches to the Assessment of Risk from Exposure to Chemicals (Harmonization Project) is conducted under Agenda 21, Chapter 19, and contributes to the implementation of SAICM. In particular, the project addresses the SAICM objective on Risk Reduction and the SAICM Global Plan of Action activity to “Develop and use new and harmonized methods for risk assessment”.

The IPCS Harmonization Project goal is *to improve chemical risk assessment globally, through the pursuit of common principles and approaches, and, hence, strengthen national and international management practices that deliver better protection of human health and the environment within the framework of sustainability*. The Harmonization Project aims to harmonize global approaches to chemical risk assessment, including by developing international guidance documents on specific issues. The guidance is intended for adoption and use in countries and by international bodies in the performance of chemical risk assessments. The guidance is developed by engaging experts worldwide. The project has been implemented using a stepwise approach, first sharing information and increasing understanding of methods and practices used by various countries, identifying areas where convergence of different approaches would be beneficial, and then developing guidance that enables implementation of harmonized approaches. The project uses a building block approach, focusing at any one time on the aspects of risk assessment that are particularly important for harmonization.

The project enables risk assessments (or components thereof) to be performed using internationally accepted methods, and these assessments can then be shared to avoid duplication and optimize use of valuable resources for risk management. It also promotes sound science as a basis for risk management decisions, promotes transparency in risk assessment, and reduces unnecessary testing of chemicals. Advances in scientific knowledge can be translated into new harmonized methods.

This ongoing project is overseen by a geographically representative Harmonization Project Steering Committee and a number of ad hoc Working Groups that manage the detailed work. Finalization of documents includes a rigorous process of international peer review and public comment.

**IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE
RELEVANCE OF A CANCER MODE OF ACTION FOR
HUMANS AND CASE-STUDIES**

PREFACE

Following publication of the International Programme on Chemical Safety (IPCS) Conceptual Framework for Evaluating a Mode of Action for Chemical Carcinogenesis (in animals),¹ an IPCS Cancer Working Group convened on 3–5 March 2004 in Arlington, Virginia, USA. The working group agreed that the issue of human relevance of animal tumours should be further explored with the goal of developing a unified IPCS Human Relevance Framework for use of mode of action information in risk assessment for regulatory and other purposes, and it provided initial guidance for this task. The members of this working group, including secretariat support and a representative of the Organisation for Economic Co-operation and Development, were as follows:

Professor Hermann Bolt, Institut für Arbeitsphysiologie, Germany
Professor Alan R. Boobis, Department of Health Toxicology Unit, Imperial College
London, United Kingdom
Dr John Bucher, National Institute of Environmental Health Sciences, USA
Dr Vincent Cogliano, Unit of Carcinogen Identification and Evaluation, International
Agency for Research on Cancer, France
Dr Samuel M. Cohen, Pathology and Microbiology, Havlik-Wall Professor of Oncology,
University of Nebraska Medical Center, USA
Dr William Farland, Office of Research and Development, Environmental Protection
Agency, USA
Dr Jun Kanno, Division of Cellular & Molecular Toxicology, National Institute of
Health Sciences, Japan
Dr Lois D. Lehman-McKeeman, Bristol-Myers Squibb, USA
Ms Bette Meek, Environmental Health Centre, Health Canada, Canada
Ms Laurence Musset, Environment, Health and Safety Division, Organisation for
Economic Co-operation and Development, France
Dr Jerry Rice, Consultant, USA
Ms Cindy Sonich-Mullin, International Programme on Chemical Safety, World Health
Organization, USA
Ms Carolyn Vickers, International Programme on Chemical Safety, World Health
Organization, Switzerland
Ms Deborah Willcocks, Existing Chemicals, National Industrial Chemicals Notification
and Assessment Scheme (NICNAS), Australia

Extending the Mode of Action Framework to include consideration of human relevance, taking into account guidance from the Arlington meeting, was the subject of an IPCS international workshop convened in Bradford, United Kingdom, from 21 to 23 April 2005. This workshop prepared draft text for an IPCS Human Relevance Framework, including updating the 2001 Mode of Action Framework. The workshop participants, including

¹ Sonich-Mullin C, Fielder R, Wiltse J, Baetcke K, Dempsey J, Fenner-Crisp P, Grant D, Hartley M, Knaap A, Kroese D, Mangelsdorf I, Meek E, Rice J, Younes M (2001) IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **34**:146–152.

secretariat support and representatives of the European Food Safety Authority and European Chemicals Bureau, were as follows:

- Dr Peter Abbott, Scientific Risk Assessment and Evaluation Branch, Food Standards Australia New Zealand, Australia
- Dr Antero Aitio, International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Switzerland
- Dr Diana Anderson, Department of Biomedical Sciences, University of Bradford, United Kingdom
- Professor Sir Colin Berry, United Kingdom
- Professor Hermann Bolt, Institut für Arbeitsphysiologie, Germany
- Professor Alan R. Boobis, Department of Health Toxicology Unit, Imperial College London, United Kingdom
- Dr Susy Brescia, Health and Safety Executive, United Kingdom
- Dr John Bucher, National Institute of Environmental Health Sciences, USA
- Dr Vincent Cogliano, Unit of Carcinogen Identification and Evaluation, International Agency for Research on Cancer, France
- Dr Samuel M. Cohen, Pathology and Microbiology, Havlik-Wall Professor of Oncology, University of Nebraska Medical Center, USA
- Dr Vicki Dellarco, Office of Pesticide Programs, Environmental Protection Agency, USA
- Ms Christine Dove, School of Life Sciences, University of Bradford, United Kingdom
- Dr Jun Kanno, Division of Cellular and Molecular Toxicology, National Institute of Health Sciences, Japan
- Dr Janet Kielhorn, Department of Chemical Risk Assessment, Fraunhofer Institute for Toxicology and Experimental Medicine, Germany
- Mrs Sandra Kunz, International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Switzerland
- Dr Christian Laurent, Scientific Expert Services, European Food Safety Authority, Italy
- Dr Douglas McGregor, Toxicity Evaluation Consultants, United Kingdom
- Ms Bette Meek, Environmental Health Centre, Health Canada, Canada
- Ms Sharon Munn, Toxicology and Chemical Substances, European Chemicals Bureau, Italy
- Dr R. Julian Preston, National Health and Environmental Effects Research Laboratory, Environmental Carcinogenesis Division, Environmental Protection Agency, USA
- Dr Jerry Rice, Consultant, USA
- Dr Hans-Bernhard Richter-Reichhelm, Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Germany
- Ms Carolyn Vickers, International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Switzerland
- Ms Deborah Willcocks, Existing Chemicals, National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme (NICNAS), Australia
- Dr William P. Wood, Risk Assessment Forum, Environmental Protection Agency, USA
- Dr Zheng Yuxin, Institute for Occupational Health and Poison Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, and WHO Collaborating Centre of Occupational Health, People's Republic of China

The draft was published on the Internet for public comment and sent to a number of WHO Collaborating Centres and IPCS Participating Institutions for peer review. An expert meeting that convened in London in December 2005 considered the comments received and finalized the framework. The expert meeting participants were as follows:

Professor Alan R. Boobis, Department of Health Toxicology Unit, Imperial College
London, United Kingdom (*Rapporteur*)

Dr Samuel M. Cohen, Pathology and Microbiology, Havlik-Wall Professor of Oncology,
University of Nebraska Medical Center, USA

Dr Vicki Dellarco, Office of Pesticide Programs, Environmental Protection Agency,
USA

Dr William Farland, Office of Research and Development, Environmental Protection
Agency, USA (*Chair*)

Dr Douglas McGregor, Toxicity Evaluation Consultants, United Kingdom

Ms Carolyn Vickers, International Programme on Chemical Safety, World Health
Organization, Switzerland

Ms Deborah Willcocks, Existing Chemicals, National Industrial Chemicals Notification
and Assessment Scheme (NICNAS), Australia

LIST OF CONTRIBUTORS

Sir Colin Berry

Emeritus Professor of Biology, Queen Mary, London, United Kingdom

Hermann Bolt

Institut für Arbeitsphysiologie, Dortmund, Germany

Alan R. Boobis

Experimental Medicine and Toxicology, Division of Medicine, Imperial College London, London, United Kingdom

Vincent Coglianor

Carcinogen Identification and Evaluation Unit, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France

Samuel M. Cohen

Department of Pathology and Microbiology and Eppley Institute for Cancer Research, University of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska, USA

Vicki Dellarco

Office of Pesticide Programs, Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA

William Farland

Office of Research and Development, Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA

Douglas McGregor

Toxicity Evaluation Consultants, Aberdour, United Kingdom

M.E. (Bette) Meek

Existing Substances Division, Safe Environments Programme, Health Canada, Ottawa, Ontario, Canada

R. Julian Preston

Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, North Carolina, USA

Hans-Bernhard Richter-Reichhelm

Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Berlin, Germany

Carolyn Vickers

International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, Switzerland

Deborah Willcocks

National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme, Sydney, Australia

LIST OF ACRONYMS AND ABBREVIATIONS

ADH	alcohol dehydrogenase
ANOVA	analysis of variance
bw	body weight
CAR	constitutively active receptor
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CoA	coenzyme A
CpG	cytosine and guanine separated by a phosphate
CYP	cytochrome P-450
dA	deoxyadenosine
dG	deoxyguanosine
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DPX	DNA–protein cross-links
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
HRF	Human Relevance Framework
IARC	International Agency for Research on Cancer
ILO	International Labour Organization
ILSI	International Life Sciences Institute
IPCS	International Programme on Chemical Safety
IU	International Units
JMPR	Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues
K_M	Michaelis-Menten constant
LOAEL	lowest-observed-adverse-effect level
MOA	mode of action
NAT	<i>N</i> -acetyltransferase
NOAEL	no-observed-adverse-effect level
NTP	National Toxicology Program (USA)
OAT	<i>O</i> -acetyltransferase
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PPX	protein–protein cross-linkage
RNA	ribonucleic acid
RSI	Risk Science Institute (ILSI)
rT3	reverse triiodothyronine
S9	9000 × <i>g</i> supernatant from rat liver
SCE	sister chromatid exchange
SHE	Syrian hamster embryo
T3	triiodothyronine
T4	thyroxine
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TGF	tumour growth factor
TSH	thyroid stimulating hormone
UDP	uridine diphosphate
UDS	unscheduled DNA synthesis
UGT	uridine diphosphate glucuronosyltransferase

ULLI	unit length labelling index
UNEP	United Nations Environment Programme
USA	United States of America
USEPA	United States Environmental Protection Agency
WHO	World Health Organization

IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS¹

Alan R. Boobis, Samuel M. Cohen, Vicki Dellarco, Douglas McGregor, M.E. (Bette) Meek, Carolyn Vickers, Deborah Willcocks, & William Farland

The use of structured frameworks can be invaluable in promoting harmonization in the assessment of chemical risk. The International Programme on Chemical Safety (IPCS) has therefore updated and extended its Mode of Action (MOA) Framework for cancer to address the issue of human relevance of a carcinogenic response observed in an experimental study. The first stage is to determine whether it is possible to establish an MOA. This comprises a series of key events along the causal pathway to cancer, identified using a weight-of-evidence approach based on the Bradford Hill criteria. The key events are then compared first qualitatively and then quantitatively between the experimental animals and humans. Finally, a clear statement of confidence, analysis, and implications is produced. The IPCS Human Relevance Framework for cancer provides an analytical tool to enable the transparent evaluation of the data, identification of key data gaps, and structured presentation of information that would be of value in the further risk assessment of the compound, even if relevancy cannot be excluded. This might include data on the shape of the dose–response curve, identification of any thresholds, and recognition of potentially susceptible subgroups, for example, the basis of genetic or life stage differences.

Fundamental to the evolution of cancer risk assessment over the last three decades has been our increasing understanding of the biology of cancer and the identification of key events in carcinogenesis. Through the mid-1980s, national and international assessments of human cancer hazard and risk depended primarily on lifetime assays in rodents of potentially carcinogenic agents. For few agents was there sufficient human evidence on which to base retrospective cancer assessments, and fewer still would be expected to be detected prospectively, given modern controls on general exposures in the workplace and in the environment generally. Inherent in rodent-based assessments was the assumption that the observation of tumours in laboratory animals could be meaningfully extrapolated to identify potential human carcinogens and, by the use of mathematical models, to provide upper-bound estimates of risk at human doses of regulatory significance. During the same period, the potential significance of mutagenesis in carcinogenesis was becoming accepted by the scientific community. Subsequently, it has become increasingly apparent that an appreciable number of chemicals cause cancer in laboratory animals by processes that do not involve direct interaction with DNA. These developments in our understanding of the biological basis of carcinogenesis in both laboratory animals and humans have benefited risk assessment processes by providing more data on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of suspect carcinogenic agents. Consideration of the biological processes involved in the carcinogenesis of specific compounds has led to the concept of mode of action (MOA).

¹ This article, to which WHO owns copyright, was originally published in 2006 in *Critical Reviews in Toxicology*, Volume 36, pages 781–792. It has been edited for this WHO publication and includes corrigenda.

A postulated MOA for carcinogenesis is a biologically plausible sequence of key events leading to an observed effect supported by robust experimental observations and mechanistic data. It describes key cytological and biochemical events—that is, those that are both measurable and necessary to the observed carcinogenicity—in a logical framework. MOA contrasts with mechanism of action, which generally involves a sufficient understanding of the molecular basis for an effect and its detailed description so that causation can be established in molecular terms.

In 2001, as part of its efforts to harmonize risk assessment practices, the International Programme on Chemical Safety (IPCS) (WHO/ILO/UNEP) published a framework for assessment of MOA for carcinogenesis in laboratory animals (animal MOA), based on Bradford Hill criteria for causality. The IPCS Human Relevance Framework (HRF) presented in this document updates this MOA Framework and extends it to consider human relevance. It is an analytical tool to provide a means of evaluating systematically the data available on a specific carcinogenic response to a chemical in a transparent manner. While it is envisaged that the framework will be of value to risk assessors both within and outside of regulatory agencies, it will also be a valuable tool to the research community. Among reasons for using the framework are:

- to provide a generic approach to the analysis of data to contribute to harmonization;
- to encourage transparency of the consideration and use of available data and reasons for the conclusions drawn;
- to provide guidance in the presentation of data;
- to identify critical data deficiencies and needs;
- to inform the quantitative assessment of carcinogenic risk to humans.

These and other topics will be discussed in more detail below.

THE ROLE OF IPCS IN DEVELOPING THE FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A CANCER MOA FOR HUMANS

IPCS has been leading an effort to harmonize approaches to cancer risk assessment as part of its larger project on the Harmonization of Approaches to the Assessment of Risk from Exposure to Chemicals. The first phase of this work resulted in the publication of the IPCS Conceptual Framework for Evaluating a Mode of Action for Chemical Carcinogenesis in experimental animals (Sonich-Mullin et al., 2001). As described in that publication, a major impediment to harmonization identified in the consideration of weight of evidence was the evaluation of MOA in animals. Sonich-Mullin et al. (2001) provided a framework for evaluating MOA of chemical carcinogenesis in animals and recognized the importance of moving on to the next step in the overall characterization of cancer hazard and risk in humans: the assessment of relevance of the MOA of animal carcinogenesis to humans. Adoption of the MOA Framework concept is proceeding through its incorporation in the revised United States Environmental Protection Agency (USEPA) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment (USEPA, 1999, 2005), and the framework is now commonly used by other regulatory agencies and international organizations. In the United Kingdom, the framework is being used for the assessment of pesticides and industrial chemicals. The United Kingdom

Committee on Carcinogenicity (2004) has noted the framework's value with regard to both harmonization between agencies and internal consistency in its latest guidelines. The framework has also been adopted and is being used by agencies in Australia and in Canada, in the evaluation of Existing Chemicals under the Canadian Environmental Protection Act. The European Union has incorporated the framework into its technical guidance documents on evaluating new and existing industrial chemicals and biocides, including carcinogenicity. With regard to international organizations, of particular note is the use of the framework by the Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR), for example, in its evaluation of pyrethrin extract and its incorporation into the resulting monograph.

The step to extend the MOA Framework to include consideration of human relevance has been undertaken by IPCS in cooperation with international partners. It was the subject of an IPCS international workshop convened in Bradford, United Kingdom, from 21 to 23 April 2005. This workshop prepared draft text for an IPCS HRF, including updating the 2001 MOA Framework. The draft was published on the Internet for public comment and sent to a number of WHO Collaborating Centres and IPCS Participating Institutions for peer review. An expert meeting convened in London in December 2005 considered the comments received and finalized the framework. The framework text and the steps leading to its development are discussed in detail in the following sections.

THE 2001 IPCS CONCEPTUAL MOA FRAMEWORK FOR EVALUATING ANIMAL CARCINOGENESIS

Purpose of the framework

The IPCS MOA Framework for evaluating carcinogenesis in animals (Sonich-Mullin et al., 2001) remains a fundamental basis for the IPCS Framework for Analysing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. The animal MOA Framework provides a generic approach to the principles commonly used when evaluating a postulated MOA for tumour induction in animals by a chemical carcinogen. Thus, the framework is a tool that provides a structured approach to the assessment of the overall weight of the evidence for the postulated MOA. In this context, a supported MOA would have evidence provided by robust experimental observations and mechanistic data to establish a biologically plausible explanation.

The framework is designed to bring transparency to the analysis of a postulated MOA and thereby promote confidence in the conclusions reached through the use of a defined procedure that encourages clear and consistent documentation supporting the analysis and reasoning and that highlights inconsistencies and uncertainties in the available data. The purpose of the framework is to provide a systematic means of considering the weight of the evidence for an MOA in a given situation; it is not designed to give an absolute answer on sufficiency of the information, as this will vary depending on the circumstance. It is not a checklist of criteria, but rather an analytical approach. However, the process can be greatly aided by the presentation of tabular summaries of comparative data on incidence of key events and tumours.

The animal MOA Framework analysis is an important step in the hazard characterization. It is envisaged that the animal MOA Framework will contribute to risk assessments of chemical

carcinogens across all sectors (drugs, industrial chemicals, pesticides, food additives, etc.). In the resulting risk assessment documentation, the framework analysis would be appropriately positioned within the hazard characterization section. In the absence of adequate epidemiological data, it may be regarded as an essential component in any discussion of human relevance, dose–response relationships, and risk characterization. It is also envisaged that the framework will be useful to both regulators and researchers in identifying research needs based on clear delineation of data gaps and inconsistencies.

MOA analysis can be used to establish either that a compound has an MOA that has been described previously or that it has a novel MOA. Thus, the output of an MOA analysis may serve to support the evaluation of a specific compound or contribute to the generation of a novel MOA. In the former, chemical-specific data play a vital role in the concordance analysis for human relevance. In the latter, it will be important to identify which events are key to the biological processes that represent the MOA.

Thus, an MOA comprising the same set of key events may apply to many different compounds. The evidence necessary to establish that a specific MOA is responsible for a given carcinogenic response will be substantial the first time such an MOA is proposed. As subsequent compounds are found to share this MOA, the “barrier” to acceptance will be lower, although it will always be necessary to establish rigorously that the key events comprising the MOA occur and that they fulfil the criteria described below. It will also be important to exclude other possible MOAs.

Scientific peer participation is a prerequisite for the development and acceptance of a novel postulated MOA. Peer participation includes both peer involvement in the development of an MOA and peer review by scientists who are independent of the process of development of the MOA. Publication in the scientific literature and presentation and discussion at scientific meetings and workshops constitute peer involvement that contributes to acceptance of an MOA by the scientific community.

While acceptance does not necessarily mean unanimity, most of the scientists reviewing an MOA analysis should agree that the relevant scientific information has been identified and appropriately analysed, that “key events” have been identified and are supported by the information presented, that their relationship to carcinogenesis has been clearly established in the hypothesized MOA, and that alternative MOAs have been considered and rejected.

As knowledge advances, the characterization of an MOA will change. Additional key events may be identified, and others may be refined or even dropped. Nevertheless, significant changes to the key events also need some general acceptance, through peer review, such as described above.

Update of framework guidelines

In development of the IPCS HRF, the 2001 animal MOA Framework text has been updated, and this revised version is presented here.

Introduction to framework analysis

This section describes the cancer end-point or end-points that have been observed and identifies which of these are addressed in the analysis. Prior to embarking on a framework analysis, there needs to be careful evaluation of the weight of evidence for a carcinogenic response in experimental animals. The nature of the framework is such that only one MOA is analysed at a time; hence, for example, different tumour types associated with chemical treatment, even if recorded in the same animals, will require separate framework analyses to discern each tumour's MOA. However, in considering the pathogenesis of a single type of tumour, it should be recognized that it is possible that a chemical could induce that tumour type by more than one MOA. Hence, it might be necessary to undertake an analysis of more than one MOA for the same tumour type for a single chemical. Consistent with species- and tissue-specific variation in metabolic activation and detoxication, there is often only poor site concordance for genotoxic carcinogens. This will need to be kept in mind when comparing animal and human data. In contrast, consistent with the observation that most carcinogens acting by a non-genotoxic MOA perturb physiological processes that tend to be site specific, site concordance is reasonably assumed, at least as an initial premise in the HRF.

1. Postulated mode of action (theory of the case)

This section comprises a brief description of the sequence of events on the path to cancer for the postulated MOA of the test substance. This explanation of the sequence of events leads into the next section, which identifies the events considered “key” (i.e. necessary and measurable), given the database available for the analysis.

2. Key events

This section briefly identifies and describes the “key events”—measurable events that are critical to the induction of tumours as hypothesized in the postulated MOA. To support an association, a body of experiments needs to define and measure an event consistently. Pertinent observations include, for example, tumour response and key events in the same cell type, sites of action logically related to event(s), increased cell growth, specific biochemical events, changes in organ weight and/or histology, proliferation, perturbations in hormones or other signalling systems, receptor–ligand interactions, effects on DNA or chromosomes, and impact on cell cycle. For example, key events for tumours hypothesized to be associated with prolonged regenerative proliferation might be cytotoxicity as measured histopathologically and an increase in labelling index. As another example, key events for induction of urinary bladder tumours hypothesized to be due to formation of urinary solids composed primarily of calcium phosphate might include elevated urinary free calcium, phosphate, and pH and formation of urinary solids, followed by irritation and regenerative hyperplasia of the urothelium.

3. Concordance of dose–response relationships

This section should characterize the dose–effect/response relationships for each of the key events and for the tumour response and discuss their interrelationships, in the context of the Bradford Hill criteria. Ideally, one should be able to correlate the dose dependency of the increases in incidence of a key event with increases in incidence or severity (e.g. lesion progression) of other key events occurring later in the process, and with the ultimate tumour incidence. Comparative tabular presentation of incidence of key events and tumours is often helpful in examining dose–response. In the case of complex data sets, this is almost essential.

It is important to consider whether there are fundamental differences in the biological response (i.e. dose transitions) at different parts of the dose–response curve for tumour formation (Slikker et al., 2004). If so, key events relevant to the different parts of the dose–response curve will need to be defined and used in the framework analysis.

4. Temporal association

This section should characterize the temporal relationships for each of the key events and for the tumour response. The temporal sequence of key events leading to the tumour response should be determined. Key events should be apparent before tumour appearance and should be consistent temporally with each other; this is essential in deciding whether the data support the postulated MOA. Observations of key events at the same time as the tumours (e.g. at the end of a bioassay) do not contribute to considerations of temporal association, but can contribute to analysis in the next section. Most often, complete data sets to address the criterion of temporality are not available.

5. Strength, consistency, and specificity of association of tumour response with key events

This section should discuss the weight of evidence linking the key events, precursor lesions, and the tumour response. Stop/recovery studies showing absence or reduction of subsequent events or tumour when a key event is blocked or diminished are particularly important tests of the association. Consistent observations in a number of such studies with differing experimental designs increase that support, since different designs may reduce unknown biases or confounding. Consistency, which addresses repeatability of key events in the postulated MOA for cancer in different studies, is distinguished from coherence, however, which addresses the relationship of the postulated MOA with observations in the broader database (see point 6). Pertinent observations include tumour response and key events in the same cell type, sites of action logically related to event(s), and results from multistage studies and from stop/recovery studies.

6. Biological plausibility and coherence

One should consider whether the MOA is consistent with what is known about carcinogenesis in general (biological plausibility) and also in relation to what is known for the substance specifically (coherence). For the postulated MOA and the events that are part of it to be biologically plausible, they need to be consistent with current understanding of the biology of cancer. However, the extent to which biological plausibility can be used as a criterion against which weight of evidence is assessed may be limited due to gaps in our knowledge. Coherence, which addresses the relationship of the postulated MOA with observations in the broader database—for example, association of MOA for tumours with that for other end-points—needs to be distinguished from consistency (addressed in point 5), which addresses repeatability of key events in the postulated MOA for cancer in different studies. For coherence, likeness of the case to that for structural analogues may be informative (i.e. structure–activity analysis). Information from other compounds that share the postulated MOA may be of value, such as sex, species, and strain differences in sensitivity and their relationship to key events. Additionally, this section should consider whether the database on the agent is internally consistent in supporting the purported MOA, including that for relevant non-cancer toxicities. Some MOAs can be anticipated to evoke effects other than cancer, such as reproductive effects of certain hormonal disturbances that are carcinogenic.

7. Other modes of action

This section discusses alternative MOAs that logically present themselves in the case. If alternative MOAs are supported, they need their own framework analysis. These should be distinguished from additional components of a single MOA that likely contribute to the observed effect, since these would be addressed in the analysis of the principal MOA.

8. Uncertainties, inconsistencies, and data gaps

Uncertainties should include those related to both the biology of tumour development and those for the database on the compound of interest. Inconsistencies should be flagged and data gaps identified. For the identified data gaps, there should be some indication of whether they are critical as support for the postulated MOA.

9. Assessment of postulated mode of action

This section should include a clear statement of the outcome with an indication of the level of confidence in the postulated MOA—for example, high, moderate, or low. If a novel MOA is being proposed, this should be clearly indicated. However, if the MOA is the same as that proposed for other compounds, the extent to which the key events fit this MOA needs to be stated explicitly. Any major differences should be noted, and their implications for the MOA should be discussed.

ADDRESSING THE ISSUE OF HUMAN RELEVANCE

In 2000, an IPCS Harmonization Project Cancer Planning Work Group convened in Carshalton, United Kingdom (IPCS, 2000). (This initial IPCS working group differed in membership from the subsequent IPCS working group convened to work on the human relevance project.) Among the recommendations of that meeting was the suggestion that IPCS and the International Life Sciences Institute (ILSI) move forward together and in parallel on the development of the extension of the IPCS MOA Framework towards addressing human relevance. It was recognized that ILSI could provide much help in technical workshops. In June 2001, the ILSI Risk Science Institute (RSI) with support from the USEPA and Health Canada formed a working group to examine key issues in the use of MOA information to determine the relevance of animal tumours. These efforts have resulted in several published reports that are described below. An IPCS Cancer Working Group, convened on 3–5 March 2004 in Arlington, Virginia, USA, agreed that these reports should form the starting point for further exploration of the issue of human relevance of animal tumours by IPCS with the goal of developing a unified IPCS HRF for use of MOA information in risk assessment for regulatory and other purposes (IPCS, 2004).

To address the issue of the human relevance of the MOAs determined in animals, ILSI/RSI charged its working group with expanding the IPCS MOA Framework to include evaluation of the human relevance of a cancer MOA determined in animals. The details of the process, the case-studies, and the framework were published as a series of papers in the November 2003 issue of *Critical Reviews in Toxicology* (Cohen et al., 2003; Meek et al., 2003). These articles describe the ILSI/RSI HRF and provide guidance for its application. In addition, references to specific examples on which the framework is based are included. Several iterations of case-studies of chemicals with generally well known MOAs were used to

develop the integrated framework. The intent was to provide guidance for a disciplined, transparent process evaluating the MOA in animals and each key event with respect to human relevance.

The ILSI/RSI HRF is based on three fundamental questions:

1. Is the weight of evidence sufficient to establish the mode of action (MOA) in animals?
2. Are key events in the animal MOA plausible in humans?
3. Taking into account kinetic and dynamic factors, are key events in the animal MOA plausible in humans?

Questions 2 and 3 involve qualitative and quantitative considerations, respectively, in a concordance analysis of human information in relation to the animal MOA and its key events.

These are followed by an explicit description of confidence in the evaluation, identification of specific data gaps, and the implications for risk assessment. It was emphasized by ILSI/RSI that use of this framework would form part of the hazard characterization step of the overall risk assessment process.

DEVELOPMENT OF AN IPCS HRF GUIDANCE DOCUMENT BASED ON THE IPCS MOA FRAMEWORK AND THE ILSI/RSI HRF

The 2004 IPCS Cancer Working Group discussed the type of document that would be produced as a result of its task to extend the IPCS MOA Framework to address human relevance. It was recognized that one integrated guidance document that worked as a whole would be needed to facilitate uptake and use by regulatory and other risk assessment bodies. The guidance could be supplemented by publication of the other materials generated through the process (e.g. issue papers and case-studies).

There was general agreement among working group members that the questions identified as the critical components of the ILSI/RSI HRF were important and in general appropriate for addressing the human relevance of an MOA determined in animals. However, several issues were identified that could benefit from additional clarification, development, or expansion.

These refinements of the ILSI/RSI HRF were developed through discussions of the IPCS Cancer Working Group and at a workshop convened for this purpose in Bradford, United Kingdom, on 21–23 April 2005 (IPCS, 2005). The resulting IPCS HRF is presented as an approach to answering a series of three questions, leading to a documented, logical conclusion regarding the human relevance of the MOA underlying animal tumours. The application of the guidance results in a narrative with four sections that may be incorporated into the hazard characterization of a risk assessment. The sections are as follows (see [Figure 1](#)):

1. Is the weight of evidence sufficient to establish a mode of action (MOA) in animals?
2. Can human relevance of the MOA be reasonably excluded on the basis of fundamental, qualitative differences in key events between experimental animals and humans?

3. Can human relevance of the MOA be reasonably excluded on the basis of quantitative differences in either kinetic or dynamic factors between experimental animals and humans?
4. Conclusion: Statement of confidence, analysis, and implications.

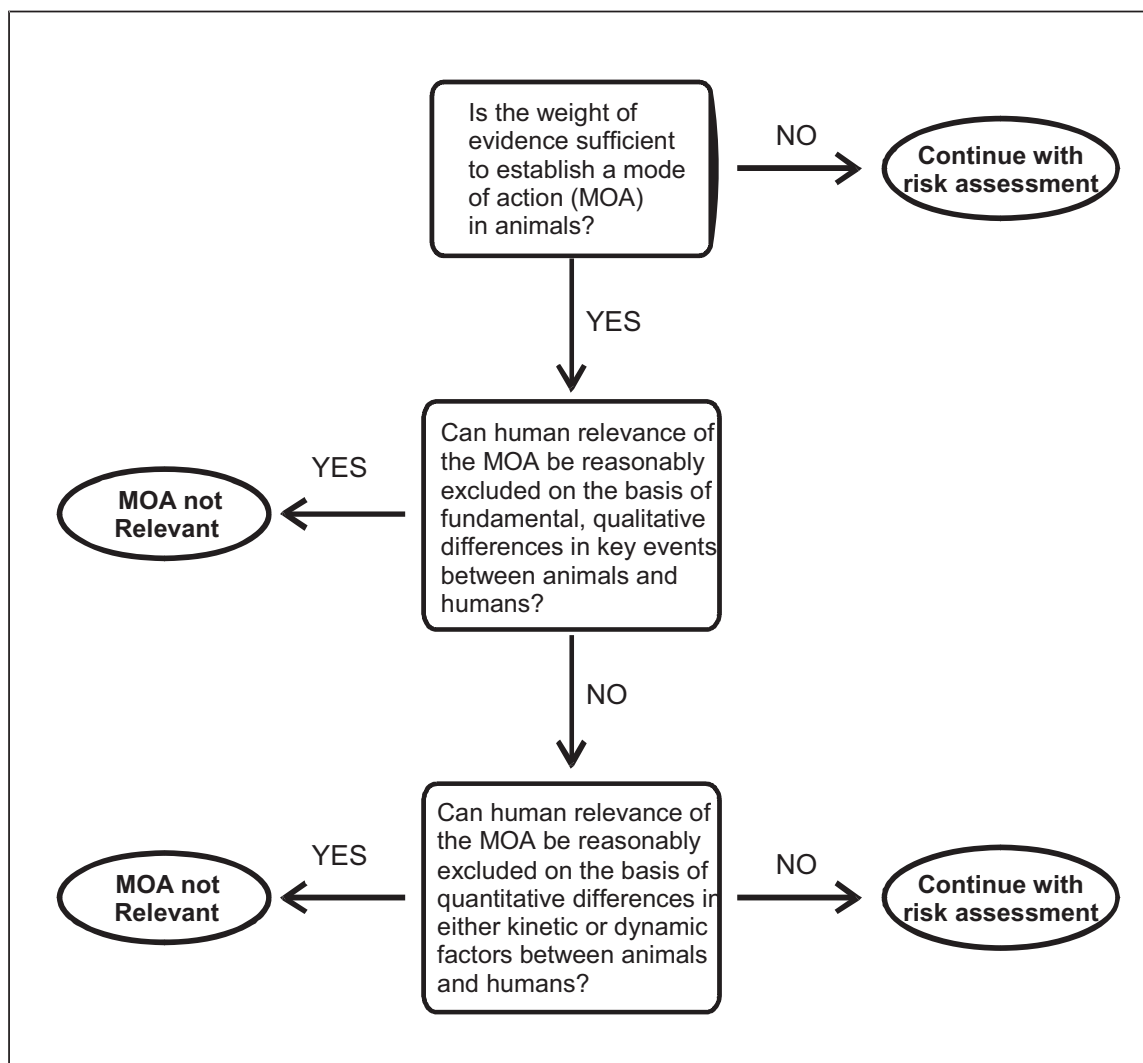


Figure 1. IPCS general scheme illustrating the main steps in evaluating the human relevance of an animal MOA for tumour formation. The questions have been designed to enable an unequivocal answer yes or no, but recognizing the need for judgement regarding sufficiency of weight of evidence. Answers leading to the left side of the diagram indicate that the weight of evidence is such that the MOA is not considered relevant to humans. Answers leading to the right side of the diagram indicate either that the weight of evidence is such that the MOA is likely to be relevant to humans or that it is not possible to reach a conclusion regarding likely relevance to humans, owing to uncertainties in the available information. In these cases, the assessment would proceed to risk characterization. It should be noted that only at this stage would human exposure be included in the evaluation.

In applying this framework for a given chemical, tumours of each animal target organ observed are evaluated independently, with the assumption that different MOAs are possible in different organs, although based on this analysis, MOAs in different tissues may be similar. Similarly, an evaluation of the likelihood of congruence between target organ(s) in different species and in humans needs to be made, based on the MOA analysis.

Is the weight of evidence sufficient to establish a mode of action (MOA) in animals?

Answering this first question in the IPCS HRF requires application of the (updated) IPCS MOA Framework described previously in this document. The steps in the MOA Framework, which are based on the Bradford Hill criteria for causality, are:

1. postulated MOA;
2. key events; associated critical parameters;
3. dose–response relationships;
4. temporal association;
5. strength, consistency, and specificity of association of key events and tumour response;
6. biological plausibility and coherence;
7. possible alternative MOAs;
8. uncertainties, inconsistencies, and data gaps;
9. conclusion about the MOA.

This process incorporates an evaluation of the weight of evidence for possible alternative MOAs at a given site and an evaluation of the overall strength of evidence supporting the MOA under consideration. Ultimately, a decision concerning the weight of evidence supporting the MOA and the level of confidence in that decision must be made. The process also identifies critically important data gaps that, when filled, would increase confidence in the proposed MOA. It is also necessary to establish whether the postulated MOA has already been described for other chemicals, in which case human relevance will already have been evaluated, or whether the proposed MOA is novel, in which case human relevance needs to be assessed *de novo*.

For a given chemical, the primary sources of information for evaluating an MOA are likely to be data generated for that specific chemical in the animal model in which tumours were produced. Obviously, data from other sources can and should also be used, as appropriate, along with data on chemicals with similar chemical structures, the same or similar MOAs, or both. If the MOA for a chemical is novel, considerably more data will be required to support the conclusion that it is related to the carcinogenic process of the tumours induced by that chemical than for subsequent examples of chemicals acting by the same MOA. The ILSI/RSI working group and the IPCS Bradford workshop did not address the issue of how many data are sufficient to support a specific MOA for a given chemical *per se*, except by way of example within the case-studies and recognition that acceptance of a novel MOA requires scientific consensus (described above). Consideration at this stage of the MOA analysis of potential variations between animals and humans also facilitates addressing subsequent steps in the framework.

Can human relevance of the MOA be reasonably excluded on the basis of fundamental, qualitative differences in key events between experimental animals and humans?

The wording of this question was changed from that in the ILSI/RSI HRF, following discussion at the IPCS workshop on the implications of a *yes* or a *no* answer to the original question. In answering the original question, only an unequivocal *no* would be sufficient to

permit the conclusion that the animal MOA was not relevant to humans. Also, it was recognized that translation of the word “plausible” into other languages could be problematic. The question was therefore reworded to enable a *yes/no* answer, but qualified by the descriptor “reasonably”, based on recognition that decisions about the adequacy of weight of evidence are not absolute but involve scientific judgement based on transparent analysis of the available data.

This step represents a qualitative assessment of the relevance of the MOA to human cancer potential. Listing the critical specific key events that occur in the animal MOA and directly evaluating whether each of the key events might or might not occur in humans facilitate consideration and transparent presentation of the relevant information. Presentation in tabular form, referred to as a concordance table, can be helpful in delineating the relevant information (for an example, see [Meek et al., 2003](#), case-study 6: kidney and liver tumours associated with chloroform exposure, Table 7; McGregor et al., current document, case-study on formaldehyde, [Table 3](#)). The key events (and possibly some of the critical associated processes) are listed with the information regarding these events for the animals in which the tumour was observed. It is intended that the information in these tables be brief, since a narrative explanation is expected to accompany the table. In the right-hand column, the effect on humans for each of the key events is evaluated. An additional column for the results in a different strain, species, sex, or route of administration that does not result in tumours can be useful if information is available for comparison with the model that leads to tumours. In addition, factors may be identified that, while not key themselves, can modulate key events and so contribute to differences between species or individuals. Such factors include genetic differences in pathways of metabolism, competing pathways of metabolism, and cell proliferation induced by concurrent pathology. Any such factors identified should be noted in a footnote to the concordance table.

The evaluation of the concordance of the key events for the MOA for a given chemical in humans is an evaluation of the MOA in humans, rather than an evaluation of the specific chemical. In general, details of the initial key events are likely to be more chemical specific—for example, the enzyme induction response by phenobarbital in rodent liver, or the formation of a cytotoxic metabolite from chloroform by specific cytochrome P-450 enzymes. Later events are more generic to the MOA—for example, pleiotropic stimulation of hepatic proliferation or regenerative hyperplasia. Information that can be utilized to evaluate the key events in humans can come from *in vitro* and *in vivo* studies on the substance itself, but also can involve basic information regarding anatomy, physiology, endocrinology, genetic disorders, epidemiology, and any other information that is known regarding the key events in humans. Information concerning an evaluation of the key event in humans exposed directly to the specific chemical is frequently unavailable.

As knowledge concerning the development of cancer evolves, it may become possible to combine some MOAs on the basis of the basic biology of the processes involved, thus relying less on chemical-specific information to reach a conclusion on the human relevance of a given MOA.

In evaluating the concordance of the information in humans to that in animals, a narrative describing the weight of evidence and an evaluation of the level of confidence for the human information need to be provided. Some specific types of information that are useful include the following:

1. cancer incidences at the anatomical site and cell type of interest, including age, sex, ethnic differences, and risk factors, including chemicals and other environmental agents;
2. knowledge of the nature and function of the target site, including development, structure (gross and microscopic), and control mechanisms at the physiological, cellular, and biochemical levels;
3. human and animal disease states that provide insight concerning target organ regulation and responsiveness;
4. human and animal responses to the chemical under review or analogues following short-, intermediate-, or long-term exposure, including target organs and effects.

Obviously, a substantial amount of information is required to conclude that the given MOA is not relevant to humans. If such a conclusion is strongly supported by the data, then chemicals producing animal tumours only by that MOA would not pose a cancer hazard to humans, and no additional risk characterization for this end-point is required. Since there is no cancer hazard, there is no cancer risk for the tumour under consideration.

The question of relevance considers all groups and life stages. It is possible that the conditions under which an MOA operates occur primarily in a susceptible subpopulation or life stage—for example, in those with a pre-existing viral infection, hormonal imbalance, or disease state. Special attention is paid to whether tumours could arise from early-life exposure, considering various kinetic and dynamic aspects of development during these life stages. Any information suggesting quantitative differences in susceptibility is identified for use in risk characterization.

Can human relevance of the MOA be reasonably excluded on the basis of quantitative differences in either kinetic or dynamic factors between experimental animals and humans?

The wording of this question was changed from that in the ILSI/RSI HRF, following discussion at the IPCS workshop on the implications of a *yes* or a *no* answer to the original question. In answering the original question, only an unequivocal *no* would be sufficient to permit the conclusion that the animal MOA was not relevant to humans. The question was therefore reworded to enable a *yes/no* answer, but qualified by the descriptor “reasonably”, based on recognition that decisions about the adequacy of weight of evidence are not absolute but involve judgement based on transparent analysis of the available data.

For purposes of human relevance analysis, if the experimental animal MOA is judged to be qualitatively relevant to humans, a more quantitative assessment is required that takes into account any kinetic and dynamic information that is available from both the experimental animals and humans. Such data will of necessity be both chemical and MOA specific and will include the biologically effective doses required to produce the relevant dynamic responses from which neoplasia can arise. Kinetic considerations include the nature and time course of

chemical uptake, distribution, metabolism, and excretion, while dynamic considerations include the consequences of the interaction of the chemical with cells, tissues, and organs. On occasion, the biologically effective dose that would be required to create these conditions would not be possible in humans. It may also be that quantitative differences in a biological process involved in a key event—for example, the clearance of a hormone—are so great that the animal MOA is not relevant to humans. However, the IPCS workshop recognized that only infrequently is it likely that it will be possible to dismiss human relevance on the basis of quantitative differences. As with the qualitative assessment, a tabular comparison of quantitative data from the experimental animals and humans can facilitate the evaluation (for example, see [Meek et al., 2003](#), case-study 5, thyroid tumours associated with exposure to phenobarbital, Table 6; Dellarco et al., current document, case-study on thiazopyr, [Table 4](#)). Useful comparisons can also be made with key events identified from studies of other compounds believed to induce effects by a similar MOA. For example, in the case of thiazopyr, information on the effects of phenobarbital in humans was particularly informative in evaluating the relevance of the MOA. As molecular and kinetic approaches continue to evolve, understanding of the similarities and differences of responses in animals and humans will be improved. It may become apparent that qualitative differences in a key event between an animal model and humans will be identified as being due to a specific quantitative difference, thus changing the answer to the second question (described above) to *no*.

As with question 2, if the conclusion to this question is *yes*, then chemicals producing animal tumours only by that MOA would not pose a cancer hazard to humans, and no additional risk characterization for this end-point is required.

Statement of confidence, analysis, and implications

Following the overall assessment of each of the three questions, a statement of confidence is necessary that addresses the quality and quantity of data underlying the analysis, consistency of the analysis within the framework, consistency of the database, and the nature and extent of the concordance analysis. An evaluation of alternative MOAs, using comparable analyses and rigour, is also essential. A critically important outcome of adequate consideration of the weight of the evidence for an overall MOA and the qualitative and quantitative concordance is the identification of specific data gaps that can be addressed experimentally in future investigations to increase confidence.

Infrequently, there may be conclusive epidemiological data on the cancer risk from a chemical that shares the MOA of the compound under consideration—that is, the compound does or does not cause cancer in humans. Obviously, such data would lend considerable weight to the conclusion of the human relevance evaluation. However, there may be occasions when, despite it being possible to establish an MOA in animals, there is insufficient information on the key events in humans to reach a clear conclusion on human relevance. In such circumstances, it might be possible to bridge this data gap by using epidemiological data. For example, the database on key events in humans for compounds that act like phenobarbital via activation of the constitutively active receptor (CAR) to induce hepatic tumours is incomplete. However, there are robust epidemiological data showing that exposure to phenobarbital for prolonged periods at relatively high doses does not cause cancer in humans. One possibility, therefore, is to “read across” from these findings with phenobarbital to any other

compound that shares its MOA in animals in inducing rodent liver tumours and to conclude that the tumours caused by such a compound are not relevant to the risk assessment of the compound in humans (Holsapple et al., 2006). Such a conclusion would be critically dependent on the reliability of the epidemiological data and the similarity between the MOA for the chemical under test to that of the compound for which there are epidemiological data available.

In applying the framework to case-studies, it is apparent that much current research does not address key questions that would facilitate an analysis of an animal MOA or its relevance to humans. Often this has been because of lack of transparent delineation of key data gaps based on consideration of the data in analytical frameworks such as that presented here. Thus, use of the HRF can be very informative to researchers from the outset in the design of their studies.

The output of formal human relevance analysis provides information that is useful for more than just determining whether or not an end-point in animals is relevant to humans. Rather, consideration of the relevant information in a transparent, analytical framework provides much additional information that is critically important in subsequent steps in the risk characterization for relevant effects. Based on a human relevance analysis for a proposed MOA for relevant effects, it may be possible to predict, for example, site concordance or not of observed tumours in animals to humans. Application of the HRF also often provides information on relevant modulating factors that are likely to affect risk, such as hepatitis B and aflatoxin B₁ (see [Cohen](#) et al., current document, case-study on 4-aminobiphenyl). Analysis often also provides an indication of those components of a proposed MOA that may operate only over a certain dose range. If a high experimental dose of a given compound is needed to result in an obligatory step in an MOA, then the relevance to human risk becomes a matter of exposure. Thus, the exposure assessment step of the subsequent risk characterization is critical to the proper evaluation of human cancer potential. In addition, information identified during the framework analysis can prove invaluable in hazard quantification based on the key events for the MOA.

Importantly, the human relevance analysis also contributes to identification of any special subpopulations (e.g. those with genetic predisposition) who are at increased risk and often provides information relevant to consideration of relative risk at various life stages. In some cases, this may be based not on chemical-specific information but rather on inference, based on knowledge of the MOA, as to whether or not specific age groups may be at increased or decreased risk.

The data and their analysis using the framework should be reported in a transparent manner, enabling others to determine the basis of the conclusions reached with respect to the key events, the exclusion of other MOAs, and the analysis of human relevance. As the specific form of presentation will vary with the type of data available, it is not helpful to be prescriptive on how the information should be reported. However, presentation should include sufficient details on the context and thought processes to ensure transparency of the conclusions reached. The use of appropriate tables can be helpful in presenting certain data, such as comparative analysis of key events in experimental animals and humans.

Dissemination of the framework

To assist in the dissemination and application of the IPCS HRF, a database of generally accepted MOAs and informative cases should be constructed and maintained. This would comprise a series of MOAs and their associated key events, for reference by those developing framework analyses for compounds that may act by similar MOAs. The case-studies would comprise worked examples that have been analysed using the framework, to provide an indication of the relevant level of detail of the analyses and nature of the weight of evidence required to support acceptance of a proposed MOA in causing the carcinogenic response. Such cases would be particularly valuable early in the development of a new MOA.

Application of the IPCS HRF to DNA-reactive carcinogens

Because of similarities in the carcinogenic process between rodents and humans and the comparable initial interactions with DNA by DNA-reactive carcinogens, it would be expected that, in general, DNA-reactive carcinogens would be assessed as progressing to the step of “yes, the key events in the animal MOA could occur in humans” in the ILSI/RSI HRF, as was the case for ethylene oxide (Meek et al., 2003), and “no” to the equivalent step in the IPCS HRF that asks the question, “Can human relevance of the MOA be reasonably excluded on the basis of fundamental, qualitative differences in key events between experimental animals and humans?”, as was the case for 4-aminobiphenyl (Cohen et al., current document). In a recent paper, Preston & Williams (2005) presented a set of key events for tumour development that provided a guide for the use of the ILSI/RSI HRF with DNA-reactive carcinogens. This guide supported the view that for most DNA-reactive chemicals, the animal MOA would be predicted to be relevant to humans. However, it was also argued that there could be exceptions and that the ILSI/RSI HRF would be a valuable tool for identifying these. Use of the ILSI/RSI HRF and the IPCS HRF can also assist in quantifying differences in key events between rodents and humans that may be of value in extrapolating risk to humans. Not all rodent DNA-reactive carcinogens have been established to be human carcinogens, as judged by the International Agency for Research on Cancer (IARC) review process. For some of these exceptions, this human–rodent difference in tumour response is attributable to lower exposure of humans to the agent or to the relative insensitivity of epidemiological studies to detect tumour responses at low exposure levels. However, there are other reasons for such differences that are based on biological considerations. For example, if a DNA-reactive carcinogen induces tumours *only* in a species-specific organ, it is possible that the animal MOA based on key events might not be relevant to humans, although available data on MOA would need to be considered to permit such a conclusion. Similarly, the generally more proficient DNA repair processes that occur in humans compared with rodents (Cortopassi & Wang, 1996; Hanawalt, 2001) or a unique pathway of bioactivation in rodents could result in there being *yes* answers to the steps in the IPCS HRF that address the queries “Can human relevance of the MOA be reasonably excluded on the basis of fundamental, qualitative differences in key events between experimental animals and humans?” and/or “Can human relevance of the MOA be reasonably excluded on the basis of quantitative differences in either kinetic or dynamic factors between experimental animals and humans?” Alternatively, the IPCS HRF could provide quantitative information on these processes for use later in the risk characterization step.

The need in applying the IPCS HRF for DNA-reactive carcinogens is to develop a set of key events that would clearly describe the cancer process and use these as the guide for establishing the human relevance of a rodent tumour MOA for any particular DNA-reactive carcinogen under consideration.

The IPCS HRF and risk assessment

Among the strengths of the framework are its flexibility, general applicability to carcinogens acting by any MOA, and the ability to explore the impact of each key event on the carcinogenic response. This includes determination of the nature of the dose–response curve, the identification and location of thresholds for individual key events, and their consequences for the overall tumour response curve. In addition, by considering the kinetic and dynamic factors involved in each key event, it may be possible to reach conclusions regarding the relevance or not of the carcinogenic response to specific subpopulations—for example, in early life, in those with particular diseases, or in those with specific polymorphisms. Alternatively, application of the framework can provide quantitative information on the differences between such groups. Application of the framework can also more generally inform the risk characterization of the chemical, even when it is concluded that the carcinogenic response per se is not relevant to humans.

As stated at the outset, MOA analysis and its human relevance counterpart are aspects of the hazard identification and characterization phases of risk assessment (National Research Council, 1983; Meek et al., 2003). Consistent with this paradigm, the human relevance case-studies referred to in the present report contribute to, but do not complete, a risk assessment for the chemicals under study. This is because a complete risk characterization requires not only evaluation of doses in the range of observations from experimental or occupational hygiene studies but also extrapolation to human exposure levels of interest in daily and lifetime activities.

Hazard characterization—and related MOA analysis—deals with the potential for harm in general terms, while the complete risk assessment puts this potential hazard into context with respect to exposure for decision-makers. Risk characterization seeks to describe the relationship between these effects and the doses to which humans are exposed in order to understand and estimate the nature and likelihood of effects in humans who are generally exposed at lower dose levels.

Understanding dose–response can have a profound effect on hazard characterization and therefore is an important component of the MOA analysis, particularly when non-linear processes or dose transitions are inherent in the relevant biology. Similarly, quantifying hazard in the context of dose informs the process of risk assessment by suggesting extrapolation models that are consistent with our understanding of the biology.

Estimating these generally lower human exposure levels is the task of the exposure analysis component of the risk assessment process. This usually involves extensive analysis of data collected from environmental media and plant and animal tissues, as well as those derived from pharmacokinetic models. This process also depends on analyses of human activity patterns and life stage and lifestyle factors that may bring about exposure. Ideally, based on

this information, a range of exposure scenarios is developed for different groups (men, women, children, infants, special groups, based, for example, on ethnicity or occupation) for use in identifying populations of concern. While hazard characterization, which is largely included in the framework analysis, involves quantification (dose–response analysis), estimating external exposures and contextualizing the hazard with respect to these estimates comprise subsequent steps in the risk assessment process. For example, in the case of melamine (Meek et al., 2003, case-study 7), it was concluded that the animal MOA was potentially relevant to humans. However, recognition that bladder carcinoma formation occurred only at very high doses carried forward to the subsequent stages of the risk assessment, exposure assessment, and risk characterization. The full risk assessment established that human exposures would not achieve levels necessary to produce bladder carcinomas, by a substantial margin.

CONCLUSIONS

This IPCS HRF has been developed based on experience gained from the original 2001 IPCS MOA Framework and consideration of the 2003 ILSI/RSI human cancer relevance framework. Many aspects of these frameworks have been adopted, but a number of changes have been made to improve clarity and to introduce some elements not previously considered (e.g. sensitive subpopulations). The utility and role of the framework as an analytical tool within hazard characterization and within the overall risk assessment/characterization paradigm—that is, informing human relevance and dose–response extrapolation—have been emphasized. A number of general points and conclusions follow from the development of this framework:

1. Prior to embarking on a framework analysis, there needs to be careful evaluation of the weight of evidence for a carcinogenic response in experimental animals.
2. Peer involvement and independent review are essential prerequisites for the general acceptance and scientific defensibility of a new MOA.
3. The framework is applicable to all MOAs for carcinogens, including DNA reactivity.
4. Although human relevance is likely to be assumed for most DNA-reactive carcinogens, the human relevance analysis is a valuable approach to enhance understanding, improve characterization of the hazard and risk, and identify exceptions.
5. When dealing with a chemical that may operate through a novel MOA, the analysis is focused on the chemical and entails a detailed evaluation via the HRF. However, when a specific chemical produces a tumour response consistent with an already established and peer-reviewed MOA through which other chemicals have been shown to operate, the analysis is then focused on the established MOA and a determination of whether the chemical produces its carcinogenic effect via the same key events established for the pathway.
6. When evaluating the human relevance of a tumour response found in experimental animals, the concordance analysis of key events is for the MOA and is not necessarily a chemical-specific evaluation. Chemical-specific and generic information relevant to the carcinogenic process can be valuable in the analysis. As knowledge advances, MOAs will become less chemical specific and will be based even more on the key biological

processes involved, allowing greater generalization of human relevance from one compound to another.

7. The biological understanding and significance of the key events can inform the approach to dose–response extrapolation for cancer risk, and thus understanding of the MOA can have a profound effect on the hazard and risk characterization, particularly when non-linear processes or dose transitions are inherent in the relevant biology.
8. It is recommended that a database of generally accepted MOAs and informative case-studies be established and maintained. It should provide examples that add to the existing case-studies developed by ILSI/RSI and IPCS and that are instructive in the application of the framework analysis. This database is particularly important as experience continues to evolve in the development of MOAs of carcinogens.
9. It is important to consider potentially susceptible subgroups and different life stages in the analysis.

In conclusion, the IPCS HRF provides a rigorous and transparent approach for judging whether data support a postulated mode of carcinogenic action for a chemical and for evaluating its relevance for humans. The scientific community is encouraged to use this approach as a means to increase the use of mechanistic information in cancer risk assessment and is encouraged to provide feedback, which may lead to additional refinements in the future. The framework is of value to both the risk assessment and research communities in furthering our understanding of carcinogenic processes, in identifying critical data gaps, and in informing the design of studies related to MOAs. When a carcinogenic response is considered potentially relevant to humans, information obtained on the key events during the analysis can prove invaluable in subsequent hazard quantification of the compound. It should be possible to extend the framework to non-cancer end-points, and further work on this is recommended. Thus, application of the IPCS HRF would be an invaluable tool for harmonization across end-points.

ACKNOWLEDGEMENTS

IPCS and the authors of this paper acknowledge the numerous experts involved in the scientific meetings and workshops leading to the development of this IPCS Human Relevance Framework for Analysing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. These were expert meetings and workshops convened and conducted in accordance with procedures of the IPCS/WHO. The outcomes, including this paper, contain the collective views of an international group of experts and do not necessarily represent the decisions or the stated policy of WHO. The work was funded by donations to IPCS from a number of Member States of the World Health Assembly.

REFERENCES

Cohen M, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003) The human relevance of information on carcinogenic modes of action: An overview. *Critical Reviews in Toxicology*, **33**:581–589.

Committee on Carcinogenicity (2004) *Guidance on a strategy for the risk assessment of chemical carcinogens*. London, Department of Health.

Cortopassi GA, Wang E (1996) There is substantial agreement among interspecies estimates of DNA repair activity. *Mechanisms of Ageing and Development*, **91**:211–218.

Hanawalt PC (2001) Revisiting the rodent repairadox. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **38**:89–96.

Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SM, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006) Mode of action in relevance of rodent livers to human cancer risk. *Toxicological Sciences*, **89**:51–56.

IPCS (2000) *Scoping meeting to address the human relevance of animal modes of action in assessing cancer risk, Carshalton, United Kingdom, 8–10 November 2000*. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (<http://www.who.int/ipcs/methods/harmonization/areas/cancer/en/index.html>).

IPCS (2004) *Report of the first meeting of the Cancer Working Group, Arlington, Virginia, USA, 3–5 March 2004*. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (<http://www.who.int/ipcs/methods/harmonization/areas/cancer/en/index.html>).

IPCS (2005) *Record of the Cancer Framework Workshop, Bradford, United Kingdom, 21–23 April 2005*. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (<http://www.who.int/ipcs/methods/harmonization/areas/cancer/en/index.html>).

Meek ME, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKeeman LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003) A framework for human relevance analysis of information on carcinogenic modes of action. *Critical Reviews in Toxicology*, **33**:591–653.

National Research Council (1983) *Risk assessment in the federal government. Managing the process*. Washington, DC, National Academy Press.

Preston JR, Williams GM (2005) DNA-reactive carcinogens: Mode of action and human cancer hazard. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:673–683.

Slikker W Jr, Andersen ME, Bogdanffy MS, Bus JS, Cohen SD, Conolly RB, David RM, Doerr NG, Dorman DC, Gaylor DW, Hattis D, Rogers JM, Setzer RW, Swenberg JA, Wallace K (2004) Dose-dependent transitions in mechanisms of toxicity: Case studies. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **20**:226–294.

Sonich-Mullin C, Fielder R, Wiltse J, Baetcke K, Dempsey J, Fenner-Crisp P, Grant D, Hartley M, Knaap A, Kroese D, Mangelsdorf I, Meek E, Rice J, Younes M (2001) IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **34**:146–152.

USEPA (1999) *Guidelines for carcinogen risk assessment (review draft)*. Washington, DC, United States Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum (NCEA-F-0644).

USEPA (2005) *Guidelines for carcinogen risk assessment*. Washington, DC, United States Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum (EPA/639/P-03/001F).

THIAZOPYR AND THYROID DISRUPTION: CASE-STUDY WITHIN THE CONTEXT OF THE IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS¹

Vicki L. Dellarco, Douglas McGregor, Sir Colin Berry, Samuel M. Cohen, & Alan R. Boobis

Thiazopyr increases the incidence of male rat thyroid follicular cell tumours; however, it is not carcinogenic in mice. Thiazopyr is not genotoxic. Thiazopyr exerts its carcinogenic effect on the rat thyroid gland secondary to enhanced metabolism of thyroxine leading to hormone imbalance. The relevance of these rat tumours to human health was assessed by using the 2006 International Programme on Chemical Safety Human Relevance Framework. The postulated rodent tumour mode of action (MOA) was tested against the Bradford Hill criteria and was found to satisfy the conditions of dose and temporal concordance, biological plausibility, coherence, strength, consistency, and specificity that fits with a well established MOA for thyroid follicular cell tumours. Although the postulated MOA could theoretically operate in humans, marked quantitative differences in the inherent susceptibility for neoplasia to thyroid hormone imbalance in rats allows for the conclusion that thiazopyr does not pose a carcinogenic hazard to humans.

A number of chemical substances have been shown to induce thyroid follicular cell tumours in rats through a mode of action (MOA) that involves perturbation of thyroid hormone homeostasis via reduction of circulating thyroid hormones (Hurley et al., 1998; Capen et al., 1999; IARC, 2001). Homeostatic responses to low thyroid hormone concentrations result in a compensatory increase in the release of thyroid stimulating hormone (TSH) from the pituitary gland, which in turn stimulates the thyroid gland to increase thyroid hormone synthesis and release. Persistent elevation of TSH levels leads to thyroid follicular cell hypertrophy and hyperplasia, which, if maintained (as a result of continuous exposure to the compound), can eventually lead to neoplasia. This neoplastic MOA in rats is well accepted by the scientific community, and both the International Agency for Research on Cancer (Capen et al., 1999; IARC, 2001) and the United States Environmental Protection Agency (USEPA, 1998) have established specific guidance or policies for evaluating the human relevance of rodent thyroid follicular cell tumours.

Thiazopyr, a herbicide that induces rat thyroid follicular cell tumours by its effect on thyroid homeostasis, was the case-study used to illustrate the original 2001 International Programme on Chemical Safety (IPCS) framework for mode of carcinogenic action analysis (Sonich-Mullin et al., 2001). Thiazopyr's MOA is revisited as a case-study here to illustrate the additional guidance provided in the 2006 IPCS Human Relevance Framework (HRF) for evaluation of a neoplastic MOA for humans. This updated case-study highlights how accumulating experience with a particular MOA can make subsequent analyses less difficult. Because this case-study is based on an established MOA in which the key events have been well defined, this analysis will focus on whether thiazopyr produces the biological effects

¹ This article, to which WHO owns copyright, was originally published in 2006 in *Critical Reviews in Toxicology*, Volume 36, pages 793–801. It has been edited for this WHO publication and includes corrigenda.

expected of this pathway. This case-study also emphasizes the importance of understanding the basic physiological processes underlying a toxicity pathway in animals and humans. For some compounds, chemical-specific data might be critical in evaluating the key events in humans. For others, the underlying biology is sufficient to allow interpretation of the human relevance of the carcinogenic MOA, both qualitatively and quantitatively. Thiazopyr is an example of the latter. Another MOA case-study of thyroid hormone disruption and the human relevance of rat thyroid follicular cell tumours is available for phenobarbital (Lehman-McKeeman & Hill, in Meek et al., 2003).

The present MOA analysis begins with a brief summary of the available information on the carcinogenicity of thiazopyr, followed by a discussion of the experimental biochemical and histopathological data considered for this thyroid disruption MOA. It is not intended to be a comprehensive assessment of the chemical per se.

CARCINOGENICITY DATA

Human epidemiological data on the carcinogenicity of thiazopyr are not available. Thiazopyr produces effects on liver and thyroid in various laboratory species, including mice, rats, and dogs. Thiazopyr was found to induce thyroid tumours in male rats only and appears to do so by increasing the hepatic metabolism and excretion of thyroid hormones.

Chronic dietary administration of thiazopyr to mice and rats resulted primarily in thyroid follicular cell tumours in male rats but not in female rats (Naylor & McDonald, 1992; Naylor & Raju, 1992). There were no significant increases in the incidences of any tumours in either sex in the chronic study of mice treated with thiazopyr at up to 800 mg/kg in the diet (128.4 mg/kg body weight [bw] per day in males and 215.9 mg/kg bw per day in females) (Naylor & Raju, 1992). In the rat carcinogenicity study, thiazopyr (technical, 94.8% pure) was administered to male and female Sprague-Dawley (SD) rats (60 per sex per group) at dietary concentrations of 0, 1, 10, 100, 1000, or 3000 mg/kg, providing dose levels of 0, 0.04, 0.4, 4.4, 44.2, or 136.4 mg/kg bw per day for males and 0, 0.06, 0.6, 5.6, 56.3, or 177.1 mg/kg bw per day for females (Naylor & McDonald, 1992). The incidences of thyroid follicular cell adenomas and carcinomas were increased in male rats of the 1000 mg/kg (44.2 mg/kg bw per day) and 3000 mg/kg (136.4 mg/kg bw per day) groups (Table 1). It should be noted that the increase in tumour incidence in male rats is primarily accounted for by benign tumours.

POSTULATED MOA FOR THE INDUCTION OF THYROID FOLLICULAR CELL TUMOURS IN RATS

The postulated MOA for thiazopyr-induced thyroid follicular cell tumours involves the perturbation of homeostasis of the pituitary–thyroid axis by an extrathyroidal mechanism. Specifically, thiazopyr induces hepatic thyroxine (T4)-uridine diphosphate (UDP) glucuronosyltransferase (UGT) activity, leading to enhanced metabolism of T4 by conjugation and increased biliary excretion of the conjugated hormone. The result of this enhanced liver metabolism is a decrease in serum T4 (and sometimes triiodothyronine, or T3) half-life. The pituitary gland responds to a decrease in circulating serum levels of T4 by enhancing the output and serum level of TSH. Prolonged elevation of circulating TSH levels stimulates the

thyroid gland to deplete its stores of thyroid hormone and continues to induce hormone production. Thus, the thyroid follicular cells enlarge (hypertrophy) and are induced to proliferate at an increased rate and to increase in number (hyperplasia). With chronic exposure, thyroid hyperplasia eventually progresses to neoplasia.

Table 1. Thyroid follicular cell tumour incidence in Sprague-Dawley male rats (2-year chronic study).

	<i>Dose (mg/kg bw per day)^a</i>					
	<i>0</i>	<i>0.04</i>	<i>0.4</i>	<i>4.4</i>	<i>44.2</i>	<i>136.4^b</i>
Adenomas	1/50	2/47	0/49	2/47	8/49	12/48
Carcinomas	1/50	1/47	0/49	0/47	1/49	4/48
Combined	2/50	3/47	0/49	2/47	9/49	14/48
%	(2)	(6)	(0)	(4)	(18)	(29)
<i>P</i>	0.000 ^c	0.470	0.253	0.668	0.024*	0.001**

Note: Tumour incidences were extracted from data submitted to the USEPA Office of Pesticide Programs (Naylor & McDonald, 1992). Significance: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (statistical analyses based on Fisher's exact test).

^a Doses in mg/kg bw per day were estimated.

^b Two animals in the 136.4 mg/kg bw per day or 3000 mg/kg diet dose group had both benign and malignant tumours.

^c For trend with dose.

KEY EVENTS IN EXPERIMENTAL ANIMALS

The sequence of key events in thiazopyr's mode of carcinogenic action includes:

- induction of hepatic UGT activity;
- increase in hepatic metabolism and biliary excretion of T4;
- decrease in serum T4 half-life and concentration;
- increase in circulating TSH concentration;
- cellular thyroid hypertrophy and follicular cell hyperplasia.

An evaluation follows to determine whether thiazopyr works via disruption of thyroid–pituitary status by increasing hepatic clearance of circulating thyroid hormone. Thus, based on the key events listed above, biological indicators of thiazopyr's MOA should include changes in liver metabolism, alterations in hormone levels, increases in thyroid growth, and lesion progression in the thyroid. These effects have been observed and measured in male rats in short-term and subchronic studies, and at interim and terminal sacrifices in a chronic study (Hotz et al., 1997). The dose–response and temporal analyses of the key events and tumour response are presented below.

DOSE–RESPONSE RELATIONSHIP AND CONCORDANCE

A summary of the no-observed-adverse-effect levels (NOAELs) and lowest-observed-adverse-effect levels (LOAELs) for the key effects in thiazopyr's MOA are provided in [Table 2](#). In the 56-day study by Hotz et al. (1997), male SD rats (20 per dose) were fed diets containing thiazopyr at 0, 10, 30, 100, 300, 1000, or 3000 mg/kg (doses not measured, but

estimated to be 0, 0.5, 1.5, 5, 15, 50, and 150 mg/kg bw per day) for 56 days and evaluated for the effects on liver (weights, T4-hepatic UGT activity, T4 biliary elimination), thyroid (weights, hypertrophy/hyperplasia), and hormones (serum levels of T4, T3, reverse T3, or rT3, and TSH). In this study, the effects on liver, thiazopyr's primary site of action, appear to be the most sensitive indicator of pituitary–thyroid homeostasis perturbation. Statistically significant increases in hepatic T4-UGT activity in the 50 and 150 mg/kg bw per day groups (approximately 3- and 6-fold increases in activity over controls when adjusted for liver weight, respectively) were found at the end of the 56-day treatment period. Consistent with the increase in T4-UGT activity, clearance of T4 from the blood and elimination in bile (40% increase in excretion of ¹²⁵I-labelled T4) were increased after 150 mg/kg bw per day of thiazopyr (only dose evaluated). Statistically significant increases in liver weight were found at 15, 50, and 150 mg/kg bw per day of thiazopyr in the 56-day study in male rats by Hotz et al. (1997). In the 2-year rat study (Naylor & McDonald, 1992), absolute liver weights were increased by 122% at 44.2 mg/kg bw per day and by 178% at 136.4 mg/kg bw per day relative to controls. There were also statistically significant increases in the incidence of liver hypertrophy at 44.2 and 136.4 mg/kg bw per day (47/61 and 52/60 versus 0/60 in controls, respectively) in the 2-year rat study.

Table 2. Summary of effects on liver, hormones, and thyroid from a 56-day study (Hotz et al., 1997) and the 2-year chronic study (Naylor & McDonald, 1992) in male rats.

Effect	NOAEL/LOAEL
Liver	
Induction of UGT	15/50 mg/kg bw per day (56-day study)
Increase in T4 biliary elimination	<150/150 mg/kg bw per day (only dose tested in 56-day study)
Increase in liver weight	5/15 mg/kg bw per day (56-day study) 44.2/136.4 mg/kg bw per day (2-year study)
Hepatocellular hypertrophy	4.4/44.2 mg/kg bw per day (2-year study)
Hormones	
Decrease in serum T4	50/150 mg/kg bw per day (56-day study)
Increase in serum TSH	50/150 mg/kg bw per day (56-day study)
Thyroid	
Increase in thyroid weight	15/50 mg/kg bw per day (56-day study) 44.2/136.4 mg/kg bw per day (2-year study)
Increase in thyroid hyperplasia	44.2/136.4 mg/kg bw per day (2-year study)
Increase in thyroid tumours	4.4/44.2 mg/kg bw per day (2-year study)

Consistent with the enhanced hepatic clearance of T4 described above, when Hotz et al. (1997) treated male SD rats with doses of thiazopyr, statistically significant ($P \leq 0.05$) decreases in serum T4 levels (by 30%) and increases in TSH (by 60%) were found after 56 days of treatment at the highest dose tested (Table 3). T3 serum levels were non-significantly lower at 1.5 mg/kg bw per day and statistically significantly higher at 150 mg/kg bw per day after 56 days of treatment. In general, hepatic microsomal enzyme inducers appear to affect T3 less than T4; thus, T4 and TSH tend to be more reliable indicators of altered pituitary–

thyroid homeostasis (Liu et al., 1995; Hurley et al., 1998; Hood et al., 1999). In the case of thiazopyr, there appears to be a poor correlation between the doses causing the T4 and TSH effects and those causing an increased incidence of thyroid follicular cell tumours. The lowest dose of thiazopyr producing a statistically significant ($P < 0.05$) increase in thyroid follicular cell tumours in male SD rats was 44.2 mg/kg bw per day in the 2-year study, whereas the NOAEL for effects on T4 and TSH was 50 mg/kg bw per day in the 56-day study (Table 2). Generally, effects on liver enzymes/weight and pituitary–thyroid hormone concentrations would be anticipated to occur at doses at least as low as those that produce thyroid weight changes and increases in thyroid tumour incidence, given that this thyroid disruption MOA is a threshold phenomenon. This apparent discrepancy is probably not real, because neither of the doses quoted is accurate. In the 2-year study, the milligrams per kilogram body weight doses were averaged estimates for the entire study, whereas the relevant doses for comparison with the 56-day mechanistic study are those for rats of 12–20 weeks of age. These doses would have been at least 2-fold higher than those that were readily available (so the real LOAEL for neoplasia would have been about 90 mg/kg bw per day). They would also have been more relevant for neoplasia, because the critical period for hormonal perturbations (e.g. prolonged elevation of TSH) to initiate pathological changes would be early, not late, in the 2-year study. The doses calculated for the 56-day study are also likely to be inaccurate, because food intake information was not available in the publication; the doses are estimates based on assumed intakes. Having acknowledged this uncertainty, it is observed that thyroid weights were increased significantly at 50 mg/kg bw per day and liver weights were increased at 15 mg/kg bw per day, which is consistent with the liver being the initial target in thiazopyr's MOA.

Table 3. Fifty-six-day study in male rats: Hormonal effects (Hotz et al., 1997).

	<i>Dose (mg/kg bw per day)^a</i>						
	<i>0</i>	<i>0.5</i>	<i>1.5</i>	<i>5</i>	<i>15</i>	<i>50</i>	<i>150</i>
T4 (µg/dl)	4.1 ± 0.2	4.3 ± 0.3	3.9 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.0 ± 0.2	4.0 ± 0.2	2.9 ± 0.1 ^a
T3 (ng/dl)	84 ± 3	82 ± 4	68 ± 2	84 ± 3	82 ± 3	91 ± 4	110 ± 6 ^a
TSH (ng/ml)	2.7 ± 0.2	3.5 ± 0.4	2.7 ± 0.1	3.1 ± 0.4	2.9 ± 0.3	3.1 ± 0.2	4.3 ± 0.4 ^a

Note: The mg/kg bw per day doses were estimated. Values are mean ± standard error of the mean; 19 or 20 animals per group.

^a Significantly different from control with Dunnett's test after analysis of variance (ANOVA) ($P \leq 0.05$).

As stated above, prolonged TSH stimulation leads to both hypertrophy and hyperplasia of the thyroid. In the 2-year rat study, there was a poor dose correlation between thyroid hyperplasia alone and tumour incidence. While tumour incidence was increased at 44.2 mg/kg bw per day, a statistically significant increase in the incidence of hyperplasia (8/58 versus 1/60 in controls) was found only at 136.4 mg/kg bw per day. Furthermore, in the 56-day rat study, where thyroid histology was reported as follicular cell hypertrophy and hyperplasia combined, there was a significant increase in the incidence of this diagnosis at 150 mg/kg bw per day but not at lower doses (Hotz et al., 1997). There was, however, a good dose correlation between increases in thyroid weights in the 56-day study and tumour incidence in the 2-year study. Statistically significant increases in thyroid weights of 46% were found at 150 mg/kg bw per day and 25% at 50 mg/kg bw per day (Hotz et al., 1997).

TEMPORAL RELATIONSHIP

If an event (or events) is an essential element of tumorigenesis, it must precede tumour appearance. Multiple exposure time data at 7, 14, 28, 56, and 90 days are available in which male SD rats were offered diets containing thiazopyr at 3000 mg/kg (150 mg/kg bw per day) (Hotz et al., 1997). Liver weights and hepatic T4-UGT activity were increased at all observation times from the earliest time of assessment on day 7. Biliary excretion of conjugated T4 was not measured in this experiment; however, serum T4 was reduced at all observation times. Increases in circulating TSH were observed at all sampling times, although the increase was not significant at 14 days after treatment began. Increases in thyroid weight were also observed at all sampling times. Histologically, there was a time-related increase in hypertrophy/hyperplasia beginning at 14 days. In the 2-year rat study, the first thyroid adenoma was observed at week 69 at a dose of 136.4 mg/kg bw per day. Thus, there is a logical temporal response for the key events in thiazopyr-induced thyroid follicular cell tumour formation in which all key events precede tumour formation.

STRENGTH, CONSISTENCY, AND SPECIFICITY OF ASSOCIATION OF THE TUMOUR RESPONSE WITH KEY EVENTS

Strength, consistency, and specificity of the association can be established from the studies described above. The quantifiable precursor events, fundamental to the proposed MOA, are relatively consistent with the emergence of thyroid follicular cell tumours. Observation of liver weight increase and induction of hepatic T4-UGT in rats receiving the thiazopyr in the diet would be consistent with perturbation of homeostasis of the pituitary–thyroid axis by an extrathyroidal mechanism. An increase in hepatic T4-UGT activity is a step occurring before the other key biochemical changes and before thyroid follicular cell hypertrophy and hyperplasia. Thiazopyr treatment clearly results in a decrease in circulating T4 and an increase in TSH following enhanced liver metabolism of T4. Furthermore, in subchronic studies, the increases in thyroid weight and the development of hypertrophy/hyperplasia were shown to appear to a statistically significant degree under the same conditions of dose and time as the appearance and reversal of changes in thyroid hormone levels and thyroid hormone metabolism. Stop/recovery studies (Hotz et al., 1997) showed that cessation of thiazopyr dosing was followed by a return of hormone levels to control values, as well as a reduction in liver and thyroid weights and reversal of hyperplasia of thyroid follicular cells. Early dosing withdrawal would be expected to result in a reversal of hypothyroidism and of lesion progression for this non-genotoxic MOA. The only sign that was slow to reverse was the increase in thyroid weight after the longest dosing period.

BIOLOGICAL PLAUSIBILITY AND COHERENCE

There are considerable data from studies in laboratory rodents demonstrating the relationship between sustained perturbation of the hypothalamic–pituitary–thyroid axis, prolonged stimulation of the thyroid gland by TSH, and the progression of thyroid follicular cells to hypertrophy, hyperplasia, and eventually neoplasia (McClain, 1995; Hard, 1998; Hurley et al., 1998; Capen et al., 1999; IARC, 2001). Increased secretion of TSH may result via several mechanisms, including increased hepatic clearance of T4, as is the case with thiazopyr.

Circulating levels of T4 are monitored by the thyrotropic cells of the pituitary gland that are responsible for the synthesis of TSH. In the pituitary gland, T4 is metabolized by 5'-deiodinase type II to T3, which then binds to specific receptors in the cell nucleus. A decrease in T3 receptor occupancy results in stimulation of TSH synthesis and secretion. Studies in vivo have shown that injection of rats with TSH leads to reductions in thyroid follicular cell nuclear stain, a non-proliferation-specific nuclear antigen, indicating that these cells were leaving the non-dividing state to resume the cell cycle (Bayer et al., 1992). This study showed that low, repeated doses of TSH (0.25 IU per rat twice daily) produced a cumulative response in nuclear stain levels over 10 days, which returned to normal resting levels within 5 days of cessation of TSH injections. Reduction in nuclear stain is also an early event that parallels the earliest known pinocytotic response to TSH. These data are consistent with increased TSH concentrations alone causing thyroid follicular cells of rats to enter a state of pre-proliferation. Therefore, the suggestion that thiazopyr causes thyroid follicular cell neoplasms in rats by initially inducing hepatic T4-UGT is coherent with the known physiology of the hypothalamus–pituitary–thyroid dynamic control system, at least to the stage of hypertrophy and hyperplasia.

Lastly, the tumour response elicited by thiazopyr is typical of a rodent thyroid carcinogen, in that thyroid follicular cell tumours are found in male rats but not in female rats or mice. Rats tend to be more sensitive to thyroid carcinogenesis than mice, and male rats are frequently found to be more sensitive than female rats with respect to the proportion of chemicals that induce thyroid tumours (Hurley et al., 1998). In keeping with this, TSH levels are typically higher in male rats than in females (Hill et al., 1989). In addition, male rats are sometimes more prone to hepatic enzyme induction than females of the same strain, but this depends on the enzyme in question, the dose of the inducing compound, and the age of the animals (Sundseth & Waxman, 1992; Agrawal & Shapiro, 1996; Oropeza-Hernandez et al., 2003).

OTHER MODES OF ACTION

Mutagenesis is always one possible MOA to consider, but no genetic toxicity has been demonstrated for thiazopyr in the following tests:

- mutation in four strains of *Salmonella typhimurium* (Bakke, 1989a);
- mutation at the *hgpt* locus of Chinese hamster ovary cells (Li & Myers, 1989);
- micronucleus induction in bone marrow cells of mice treated in vivo (Flowers, 1990);
- unscheduled DNA synthesis induction in hepatocytes of rats treated in vivo (Bakke, 1989b).

Therefore, the available evidence indicates that mutagenesis is not an alternative MOA for thiazopyr.

Additional effects on the hypothalamic–pituitary–thyroid axis and disruption of other pathways of thyroid hormone metabolism are other possibilities for altering thyroid homeostasis. These variations would not differ in any fundamental way from the one that has been proposed for thiazopyr, in that all would lead to prolonged TSH stimulation with continuous exposure.

UNCERTAINTIES, INCONSISTENCIES, AND DATA GAPS

There appears to be a lack of dose concordance for thyroid tumours and hormone changes, but this is likely to be due to inaccuracies in the milligrams per kilogram body weight doses compared—which either were estimated (versus calculated on the basis of food consumption and body weight data) and cover an early period in the life of rats or were averages for the whole duration of the experiment—as well as experimental variability.

ASSESSMENT OF POSTULATED MODE OF ACTION

The data presented are judged, with a moderately high degree of confidence, to be adequate to explain the development of thyroid follicular cell tumours in male rats following chronic dietary exposure to thiazopyr. Thiazopyr clearly increased liver weights (i.e. the initial target organ) at doses lower than those causing tumours and enhanced thyroid growth (i.e. increased thyroid weights) at the lowest tumorigenic dose.

Human applicability of the proposed MOA

The IPCS HRF, which was developed from the Risk Science Institute/International Life Sciences Institute “Human Relevance Framework” (Meek et al., 2003) and modified based on discussions by the IPCS Cancer Working Group (Boobis et al., current document), presents a four-part approach to addressing a series of three questions and leading to a documented, logical conclusion regarding the human relevance of the MOA underlying animal tumours.

1. Is the weight of evidence sufficient to establish a mode of action (MOA) in animals? As described in detail above, there is clear evidence that thiazopyr alters thyroid homeostasis by UGT induction, by reducing serum T4 levels and consequently elevating serum TSH.

2. Can human relevance of the MOA be reasonably excluded on the basis of fundamental, qualitative differences in key events between experimental animals and humans? The current understanding of the regulation of thyroid hormone homeostasis in humans and of the role of increased TSH levels (as a result of altered thyroid homeostasis) as a risk factor for thyroid cancer was considered in order to assess the human relevance of the key events in thiazopyr’s animal mode of carcinogenic action. Although there are substantial quantitative dynamic differences (discussed below), the fundamental mechanisms involved in the function and regulation of the hypothalamic–pituitary–thyroid axis in rats are qualitatively similar to those in humans (Bianco et al., 2002). Therefore, an agent that decreases T4 levels in rats could likewise reduce T4 in humans; this, in turn, could potentially lead to an increase in TSH levels. There are data showing that rodents and humans respond in a similar fashion to perturbations of pituitary–thyroid function. For example, it is well known that iodine deficiency, which readily leads to decreased thyroid hormone levels, stimulates thyroid cell proliferation in humans, leading to goitre. If left untreated, iodine deficiency may lead to tumour formation, albeit rarely (Thomas & Williams, 1999). Although there is no evidence of increased susceptibility to thyroid cancer, a number of pharmaceuticals (e.g. propylthiouracil, lithium, amiodarone, iopanoic acid) that disrupt thyroid homeostasis by acting directly on the thyroid gland (e.g. by inhibiting hormone synthesis or release or by blocking the conversion

of T4 to T3) are known to lead to hypothyroidism and increases in TSH in humans (Ron et al., 1987).

In contrast to rats, no increases in TSH levels have been found in humans following exposure to agents that induce hepatic microsomal enzymes and reduce circulating T4 levels (discussed in Lehman-McKeeman & Hill, in Meek et al., 2003). For example, the pharmaceutical compounds phenytoin, rifampin, and carbamazepine induce hepatic microsomal enzymes, including UGT, and reduce circulating T4 levels, but TSH levels are unchanged (Curran & DeGroot, 1991); agents that produce thyroid tumours in rats by increasing glucuronidation and biliary excretion of T4 at high experimental doses (e.g. omeprazole, lansoprazole, and pantoprazole) produce no changes in thyroid hormones at clinical doses in humans (Masubuchi et al., 1997). Thus, there appears to be a substantial difference in the dose–response relationship for altered homeostasis of the pituitary–thyroid axis in rats compared with humans. As discussed below, this observation is due to quantitative dynamic differences between rats and humans in the basic physiological processes underlying pituitary–thyroid function.

3. Can human relevance of the MOA be reasonably excluded on the basis of quantitative differences in either kinetic or dynamic factors between experimental animals and humans? Thiazopyr does not target the thyroid directly. Rather, its primary effect is on hepatic metabolizing enzymes, and the increase in metabolic activity indirectly increases the systemic clearance of T4, leading to the hypothyroid state and the compensatory increase in TSH found in rats. Although there are no chemical-specific data on the potential for thiazopyr to disrupt thyroid hormone homeostasis in humans, a number of other microsomal enzyme inducers have been extensively studied, such as phenobarbital (Lehman-McKeeman & Hill, in Meek et al., 2003). As discussed above, agents that produce hypothyroidism by altering hepatic clearance of T4 do not appear to result in elevated TSH levels in humans. Presumably, TSH is not increased because a critical reduction of T4 is not reached.

There are several important physiological and biochemical differences between rats and humans related to thyroid function. Rats have a smaller reserve capacity of thyroid hormones when compared with humans. The rat has a much shorter thyroid hormone half-life than humans. The half-life of T4 is about 12 h in rats compared with 5–9 days in humans (Dohler et al., 1979). The shorter half-life in rats is likely related to the absence of a high affinity binding globulin for T4 that is present in humans (Hill et al., 1989). In rats, the increased clearance contributes to the need for a higher rate of production of T4 (per unit of body weight) to maintain normal levels of T4. In contrast, in humans, the binding of thyroid hormone to this globulin accounts for a slower metabolic degradation and clearance, which in turn result in the thyroid gland being less active than in rats. The constitutive TSH levels are approximately 25 times higher in rats than in humans, reflecting the higher activity of the pituitary–thyroid axis in rats (Dohler et al., 1979; McClain, 1992). Therefore, humans are quantitatively less sensitive than rats to agents that reduce T4 and lead to elevated TSH. There is no increased risk of thyroid tumour development if TSH is not elevated.

Another difference of rats compared with humans is the histological appearance of the thyroid. This histological difference is related to the higher rate of production of T4 to

maintain a consistent serum concentration, thus making the rat thyroid more “functionally active” than that of primates, including humans (McClain, 1995). More of the follicular epithelium in the rat is stimulated to synthesize thyroglobulin, and therefore more of the follicular cells are tall cuboidal and appear to be active in synthesis. In contrast, more of the follicular cells in humans tend to be short cuboidal or almost squamous in appearance, suggesting they are quiescent. Because rat follicular cells are already generally active, under stimulation from TSH, they will respond with hyperplasia more readily than human follicular cells. Because of the greater storage capability of the human thyroid and the greater numbers of cells in a quiescent state, human thyroid follicular cells will be roused from their quiescent state to synthesize and secrete additional thyroid hormone without the need for a hyperplastic response to re-establish homeostasis. Therefore, the primary response in the human thyroid gland would be thyroglobulin reabsorption and cellular hypertrophy rather than hyperplasia. In short, there is much greater buffering capacity in the biochemistry of the human than the rat thyroid.

Even though certain agents can cause a reduction in thyroid hormone levels in humans, there is no clear evidence that these agents increase susceptibility to thyroid cancer (Ron et al., 1987). For example, epidemiological studies with phenobarbital do not show any increased risk of thyroid cancer (Olsen et al., 1993). Studies of individuals with conditions that would lead to elevated TSH (patients with Graves disease or goitre) indicate that the occurrence of thyroid cancer is rare in these circumstances (e.g. Mazzaferri, 2000; Gabriele et al., 2003). A study of environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals, using the nationwide Swedish Family-Cancer Database, found that the environment did not appear to play a principal causative role in thyroid cancer (Lichtenstein & Hemminki, 2002). The only known human thyroid carcinogen is radiation, a mutagenic exposure.

As summarized in [Table 4](#), there is sufficient evidence in the general literature on the biochemical and physiological differences in thyroid function to indicate differences in tumour susceptibility between rats and humans. In contrast to humans, rats are very susceptible to thyroid neoplasia secondary to hypothyroidism. In particular, modest changes in thyroid hormone homeostasis will promote tumour formation in rats. Thus, thyroid tumours induced by thiazopyr involving increased hepatic clearance of hormone and altered homeostasis of the pituitary–thyroid axis in rodents are considered not relevant to humans, based on quantitative dynamic differences.

4. Conclusion: statement of confidence, analysis, and implications. There is sufficient experimental evidence to establish a thyroid disruption MOA for thiazopyr-induced thyroid follicular cell tumours in rats. Although thiazopyr may potentially result in hypothyroidism in humans, there is sufficient quantitative evidence on the basic physiological processes in the general literature to conclude that thyroid tumours induced by a process involving increased hepatic clearance of thyroid hormone and altered homeostasis of the pituitary–thyroid axis in rodents is not likely to lead to an increase in susceptibility to tumour development in humans. Although there are no human data on thiazopyr, clinical data on other hepatic microsomal enzyme inducers were critical to this human relevance analysis. The general literature provided sufficient evidence to show that unlike in the rat, decreased T4 levels typically show no evidence of compensatory increases in TSH levels in humans. There is also cellular and

biochemical evidence that the rat pituitary–thyroid axis is much more sensitive than that in humans to such perturbations. This sensitivity is likely the result of the rapid turnover of T4 in rats coupled with the higher demand for TSH to maintain thyroid activity.

Table 4. A comparison of key events in rats and humans.

Key event	Evidence in rats	Evidence in humans
Increased hepatic clearance of T4	In short-term and chronic rat studies, the liver is found to be the most sensitive target, and evidence of increased T4 hepatic clearance is provided by studies on T4-hepatic UGT activity, T4 half-life, T4 biliary elimination, liver weights, and hypertrophy.	No data available for thiazopyr, but microsomal enzyme induction is plausible.
Decreased serum T4	Direct experimental evidence.	No data available for thiazopyr, but plausible given that other microsomal enzyme inducers have been shown to reduce T4 in humans.
Increased TSH levels	Direct experimental evidence.	No data available for thiazopyr, but other microsomal enzyme inducers have not been shown to increase TSH levels even when T4 is decreased.
Increased TSH increases thyroid cell proliferation and tumour formation	Direct experimental evidence.	Induction of thyroid follicular cell tumours secondary to hypothyroidism is remote in humans, given the quantitative differences in thyroid function/homeostasis. Occurrence of thyroid cancer is rare even in severely hypothyroid individuals.

IMPLICATIONS OF THE IPCS HRF

The thiazopyr example is an illustration of an induced tumour response consistent with an MOA that has been previously defined and established. Thus, addressing the first question in the framework analysis, “Is the weight of evidence sufficient to establish a mode of action (MOA) in animals?”, became a determination of whether the data set on the chemical conforms to the same key events defined for the pathway of interest. This example further demonstrates how data on the basic understanding of the biological processes involved in the MOA provide an important means to compare the rodent and human key events. Thus, this generic human information was essential to evaluating the qualitative and quantitative differences between experimental animals and humans in addressing the plausibility of the cancer MOA for humans (i.e. questions 2 and 3 in the HRF).

REFERENCES

- Agrawal AK, Shapiro BH (1996) Phenobarbital induction of hepatic CYP2B1 and CYP2B2: Pretranscriptional and post-transcriptional effects of gender, adult age, and phenobarbital dose. *Molecular Pharmacology*, **49**(3):523–531.
- Bakke JP (1989a) *Ames/Salmonella mutagenicity assay with MON 13200: Study No. ML-88-191/EHL No. 88124*. Testing facility: Monsanto's Environmental Health Laboratory, St. Louis, MO. Submitted by Monsanto, St. Louis, MO (MRID No. 42275535).
- Bakke JP (1989b) *Evaluation of MON 13200 to induce unscheduled DNA synthesis in the in vitro hepatocyte DNA repair assay in the male F-344 rat: Study No. SR-88-204/SRI No. LSC 6327*. Testing facility: SRI International, Menlo Park, CA. Submitted by Monsanto, St. Louis, MO (MRID No. 42275538).
- Bayer I, Mitmaker B, Gordon PH, Wang E (1992) Modulation of nuclear statin expression in rat thyroid follicle cell following administration of thyroid stimulating hormone. *Journal of Cellular Physiology*, **150**:276–282.
- Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR (2002) Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine Reviews*, **23**(1):38–89.
- Capen CC, Dybing E, Rice JM, Wilbourn JD, eds (1999) *Species differences in thyroid, kidney and urinary bladder carcinogenesis*. Lyon, International Agency for Research on Cancer (IARC Scientific Publications No. 147).
- Curran PG, DeGroot LJ (1991) The effect of hepatic enzyme-inducing drugs on thyroid hormones and the thyroid gland. *Endocrine Reviews*, **12**:135–150.
- Dohler KD, Wong CC, Von Zur Muhlen A (1979) The rat as a model for the study of drug effects on thyroid function: Consideration of methodological problems. *Pharmacology and Therapeutics*, **5**:305–318.
- Flowers LJ (1990) *Micronucleus assay with MON 13200: ML-88-390/EHL Study No. 88230*. Testing facility: Monsanto's Environmental Health Laboratory, St. Louis, MO. Submitted by Monsanto, St. Louis, MO (MRID No. 42275537).
- Gabriele R, Letizia C, Borghese M, De Toma G, Celia M, Izzo L, Cavalla A (2003) Thyroid cancer in patients with hyperthyroidism. *Hormone Research*, **60**(2):79–83.
- Hard GC (1998) Recent developments in the investigation of thyroid regulation and thyroid carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, **106**(8):1–21.
- Hill RN, Erdreich LS, Paynter OE, Roberts PA, Rosenthal SL, Wilkinson CF (1989) Thyroid follicular cell carcinogenesis. *Fundamental and Applied Toxicology*, **12**(4):629–697.

Hood A, Liu YP, Gattone VH 2nd, Klaassen CD (1999) Sensitivity of thyroid gland growth to thyroid stimulating hormone (TSH) in rats treated with antithyroid drugs. *Toxicological Sciences*, **49**:263–271.

Hotz KJ, Wilson AG, Thake DC, Roloff MV, Capen CC, Kronenberg JM, Brewster DW (1997) Mechanism of thiazopyr-induced effects on thyroid hormone homeostasis in male Sprague-Dawley rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **142**:133–142.

Hurley PM, Hill RN, Whiting RJ (1998) Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular-cell tumors in rodents. *Environmental Health Perspectives*, **106**(8):437–445.

IARC (2001) *Some thyrotropic agents*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 763 pp. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 79).

Li AP, Myers CA (1989) *CHO/HGPRST gene mutation assay with MON 13200: Study No. ML-88-382/EHL No. 88071*. Testing facility: Monsanto's Environmental Health Laboratory, St. Louis, MO. Submitted by Monsanto, St. Louis, MO (MRID No. 42275536).

Lichtenstein CK, Hemminki K (2002) Environmental and heritable cause of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database. *International Journal of Cancer*, **109**(2):260–266.

Liu J, Liu Y, Barter RA, Klaassen CD (1995) Alteration of thyroid homeostasis by UDP-glucuronosyltransferase inducers in rats: A dose–response study. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **273**:977–985.

Masubuchi N, Hokusui H, Okazaki O (1997) Effects of proton pump inhibitors on thyroid hormone metabolism in rats: A comparison of UDP-glucuronyltransferase induction. *Biochemical Pharmacology*, **54**(11):1225–1231.

Mazzaferri EL (2000) Thyroid cancer and Graves' disease: The controversy ten years later. *Endocrine Practice*, **6**:221–225.

McClain RM (1992) Thyroid gland neoplasia: Non-genotoxic mechanisms. *Toxicology Letters*, **64/65**:397–408.

McClain RM (1995) Mechanistic considerations for the relevance of animal data on thyroid neoplasia to human risk assessment. *Mutation Research*, **333**(1–2):131–142.

Meek ME, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKeeman LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003) A framework for human relevance analysis of information on carcinogenic modes of action. *Critical Reviews in Toxicology*, **33**(6):591–654.

Naylor MW, McDonald MM (1992) *Chronic study of MON 13200 administered in feed to albino rats. Project No. ML-88-247/EHL 88148*. Testing facility: Monsanto Company, The Agricultural Group, Environmental Health Laboratory, St. Louis, MO. Submitted by Monsanto Agricultural Company, St. Louis, MO (MRID No. 426197-24).

Naylor MW, Raju NR (1992) *Chronic study of MON 13200 administered in feed to albino mice. Project No. ML-88-248/EHL 88147*. Testing facility: Monsanto Company, The Agricultural Group, Environmental Health Laboratory, St. Louis, MO. Submitted by Monsanto Agricultural Company, St. Louis, MO (MRID No. 426197-23).

Olsen JH, Wallin H, Boice JD, Rask K, Schulgen G, Fraumaen FF Jr (1993) Phenobarbital, drug metabolism and human cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, **5**:449–452.

Oropeza-Hernandez LF, Lopez-Romero R, Albores A (2003) Hepatic CYP1A, 2B, 2C, 2E and 3A regulation by methoxychlor in male and female rats. *Toxicology Letters*, **144**(1):93–103.

Ron E, Kleinerman RA, Boice JD, LiVolsi VA, Flannery JT, Fraumeni JF Jr (1987) A population-based case–control study of thyroid cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **79**:1–12.

Sonich-Mullin C, Fielder R, Wiltse J, Baetcke K, Dempsey J, Fenner-Crisp P, Grant D, Hartley M, Knaap A, Kroese D, Mangelsdorf I, Meek E, Rice JM, Younes M (2001) IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **34**:146–152.

Sundseth SS, Waxman DJ (1992) Sex-dependent expression and clofibrate inducibility of cytochrome P450 4A fatty acid omega-hydroxylases. Male specificity of liver and kidney CYP4A2 mRNA and tissue-specific regulation by growth hormone and testosterone. *Journal of Biological Chemistry*, **267**(6):3915–3921.

Thomas GA, Williams ED (1999) Thyroid stimulating hormone (TSH)-associated follicular hypertrophy and hyperplasia as a mechanism of thyroid carcinogenesis in mice and rats. In: Capen CC, Dybing E, Rice JM, Wilbourn JD, eds. *Species differences in thyroid gland, kidney and urinary bladder carcinogenesis*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, pp. 45–59 (IARC Scientific Publications No. 147).

USEPA (1998) *Assessment of thyroid follicular cell tumors*. Washington, DC, United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Risk Assessment Forum (EPA/630/R-97/002; <http://cfpub.epa.gov/ncea/raf/recordisplay.cfm?deid=13102>; accessed 22 November 2004).

4-AMINOBIIPHENYL AND DNA REACTIVITY: CASE-STUDY WITHIN THE CONTEXT OF THE IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS¹

Samuel M. Cohen, Alan R. Boobis, M.E. (Bette) Meek, R. Julian Preston, & Douglas B. McGregor

The International Programme on Chemical Safety (IPCS) Human Relevance Framework (HRF) was evaluated for a DNA-reactive (genotoxic) carcinogen, 4-aminobiphenyl, based on a wealth of data in animals and humans. The mode of action (MOA) involves metabolic activation by *N*-hydroxylation, followed by *N*-esterification leading to the formation of a reactive electrophile, which binds covalently to DNA, principally to deoxyguanosine, leading to an increased rate of DNA mutations and ultimately to the development of cancer. In humans and dogs, the urinary bladder urothelium is the target organ, whereas in mice, it is the bladder and liver; in other species, other tissues can be involved. Differences in organ specificity are thought to be due to differences in metabolic activation versus inactivation. Based on qualitative and quantitative considerations, the MOA is possible in humans. Other biological processes, such as toxicity and regenerative proliferation, can significantly influence the dose–response of 4-aminobiphenyl-induced tumours. Based on the IPCS HRF, 4-aminobiphenyl would be predicted to be a carcinogen in humans, and this is corroborated by extensive epidemiological evidence. The IPCS HRF is useful in evaluating DNA-reactive carcinogens.

4-Aminobiphenyl is carcinogenic when administered to several species by a variety of routes (IARC, 1972, 1986, 1987). It was selected as a chemical for a case-study for the International Programme on Chemical Safety (IPCS) Human Relevance Framework (HRF) as a representative DNA-reactive carcinogen because of its established mode of action (MOA) in animal models, based on substantial data available evaluating its metabolic activation, DNA reactivity, genotoxicity, and carcinogenicity. It is also similar to numerous known animal and human carcinogens belonging to the chemical class of aromatic amines (structure–activity relationships), and there are extensive epidemiological, metabolic, and biochemical data in humans. This case-study illustrates the nature of data that are helpful in delineating MOAs for DNA-reactive carcinogens. Distinction between modulating factors and key events in an MOA analysis is also presented.

Based on the strong animal evidence and extensive epidemiological data, the International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified 4-aminobiphenyl as a known human carcinogen (IARC, 1972, 1987). Although initially identified as a human urinary bladder carcinogen in individuals exposed to high levels occupationally, it has subsequently been demonstrated as a major component of cigarette smoke, leading to an increased risk of urinary bladder cancer in cigarette smokers (Del Santo et al., 1991; Curigliano et al., 1996). Additional research has shown that it is a ubiquitous environmental chemical occurring naturally when organic material containing nitrogen undergoes combustion.

¹ This article, to which WHO owns copyright, was originally published in 2006 in *Critical Reviews in Toxicology*, Volume 36, pages 803–819. It has been edited for this WHO publication and includes corrigenda.

CARCINOGENICITY OF 4-AMINOBIIPHENYL IN ANIMALS

Experimental studies indicate that 4-aminobiphenyl is carcinogenic in mice, rats, rabbits, and dogs, although significant target tissue differences and susceptibility have been observed (IARC, 1972). By most routes of exposure, 4-aminobiphenyl is primarily a carcinogen of the liver and, to a lesser extent, the urinary bladder in mice, whereas in dogs (and humans), the urinary bladder appears to be the target organ. Many of the studies were conducted a number of years ago, and published accounts include only limited details. In addition, potential precursor lesions at interim periods were rarely documented, and none of the studies included protocols, such as stop/recovery, which might be informative in the context of MOA. Nonetheless, results indicate clear species and individual differences in response (e.g. Block et al., 1978), characteristic of MOAs entailing competing metabolic activation and deactivation processes (Table 1).

Table 1. Carcinogenicity studies of 4-aminobiphenyl in various species.

Species	Route/dose	Incidence	Comment	Reference
Mice	Gavage; 1 mg/week for 38 weeks	Bladder carcinomas in 2/12 mice surviving to 90 weeks		Clayson et al. (1965)
Mice	Gavage; 0 or 1.5 mg/week for 52 weeks	Bladder carcinomas in 1/21 exposed males vs 0/19 in controls; increased incidence of hepatomas in males and females		Clayson et al. (1967)
Mice	Subcutaneous injection of 200 µg for up to 52 weeks	Hepatomas in 19/20 males and 6/23 females after 48–52 weeks		Gorrod et al. (1968)
Mice (BALB/cStCrIfC3Hf/Nctr)	0–220 mg/l in drinking-water (males), 0–300 mg/l (females), for up to 96 weeks	Significant increases in urinary bladder carcinomas (males only), hepatocellular carcinomas (females only), and angiosarcomas (males and females)	Hyperplasia of the bladder in most mice of both sexes receiving 75 mg/l (females) and 55 mg/l (males) or greater, but none in controls	Schieferstein et al. (1985)
Mice (newborn B6C3F1)	Different regimens; injected prior to weaning	Liver tumours		Dooley et al. (1988, 1992); Von Tungeln et al. (1996); Parsons et al. (2005)
Rats	Subcutaneous injection in arachis oil of total dose of 3.6–5.8 g/kg bw	Mammary and intestinal tumours		Walpole et al. (1952)

Table 1 (Contd)

Species	Route/dose	Incidence	Comment	Reference
Rabbits	Oral administration of unspecified dose	Bladder papillomas in 1 animal and carcinomas in 3 animals	Earliest carcinoma observed 4 years after start of treatment	Bonser (1962)
Dogs (2)	Gelatin capsules 6 times weekly for life for a total dose of 30 or 34 g	Carcinoma of the bladders appeared in 33 months		Walpole et al. (1954)
Dogs	Gelatin capsules 0.3 g 3 times weekly (total dose: 94.5–144 g per dog)	Bladder carcinomas after 21–34 months		Deichmann et al. (1958)
Dogs (6)	1.0 mg/kg bw 5 times weekly for 34 or 37 months (total dose 5.5–7.0 g per dog)	3 bladder papillomas and 3 bladder carcinomas (transitional cell type)		Deichmann et al. (1965)
Dogs	Single dose	Ineffective in inducing bladder tumours over a 5-year period		Deichmann & MacDonald (1968)
Dogs (24 beagles)	Oral administration 5 days/week for 3 years	Negative or minimal disease in 4 dogs, with no neoplasia in 2; neoplasia developed slowly in 11 dogs, while a rapidly progressive pattern was observed in the remaining 9 dogs		Block et al. (1978)

bw, body weight

Following its oral administration by gavage (1 mg per mouse per week for 38 weeks), 2/12 mice surviving to 90 weeks developed bladder carcinoma (Clayson et al., 1965). In a separate but similar experiment, dosing mice with 1.5 mg of 4-aminobiphenyl for 52 weeks resulted in bladder carcinoma in 1/21 male mice as compared with 0/19 in controls. In this experiment, the frequency of hepatomas in both male and female mice was significantly higher than that in the controls (Clayson et al., 1967). Three subcutaneous injections of mice with 200 µg of 4-aminobiphenyl produced hepatomas in 19/20 males and 6/23 females after 48–52 weeks (Gorrod et al., 1968). Oral administration of 4-aminobiphenyl in drinking-water at concentrations of up to 220 and 300 mg/l to male and female BALB/cStCrIfC3Hf/Nctr mice, respectively, for up to 96 weeks induced dose-related, significant increases in angiosarcomas (males and females), urinary bladder carcinomas (males only), and hepatocellular carcinomas (females only). Hyperplasia of the bladder was observed in most of the mice of both sexes in groups of about 118 receiving concentrations of 75 mg/l (females) and 55 mg/l (males) or greater, whereas none was reported in the control groups of similar size (Schieferstein et al., 1985). In a number of experiments, newborn B6C3F1 mice were primarily susceptible to

liver carcinogenesis following 4-aminobiphenyl administration (Dooley et al., 1988, 1992; Von Tungeln et al., 1996; Parsons et al., 2005).

Daily subcutaneous injection of rats with 4-aminobiphenyl in arachis oil to a total dose of 3.6–5.8 g/kg body weight (bw) resulted in significant increases in the incidence of mammary gland and intestinal tumours (Walpole et al., 1952).

Among seven rabbits given commercial 4-aminobiphenyl orally (dose unstated), bladder papillomas were found in one and carcinomas in three animals. The earliest carcinoma was observed 4 years after the start of treatment (Bonser, 1962).

Two dogs fed 4-aminobiphenyl in gelatin capsules 6 times weekly for life (total dose per dog: 30, 34 g) developed carcinoma of the bladder in 33 months (Walpole et al., 1954). This was confirmed by similarly feeding capsules containing 4-aminobiphenyl (0.3 g per dog) 3 times weekly. Bladder carcinomas were observed after 21–34 months (total dose: 94.5–144.0 g per dog) (Deichmann et al., 1958). When the dose of 4-aminobiphenyl was reduced to 1.0 mg/kg bw and given to six dogs 5 times weekly for 34 months or 37 months (total dose: 5.5–7.0 g per dog), three bladder papillomas and three bladder carcinomas (transitional cell type) were observed (Deichmann et al., 1965). A single dose was not effective in inducing bladder tumours over a period of 5 years (Deichmann & MacDonald, 1968). Among 24 beagles that received 4-aminobiphenyl orally 5 days per week for 3 years, three basic patterns of bladder carcinogen responses were seen. Negative or minimal disease was seen in four dogs, of which two remained completely free of neoplasia. Neoplasia developed slowly in 11 dogs, while a rapidly progressive pattern was observed in the remaining 9 dogs (Block et al., 1978).

IS THE WEIGHT OF EVIDENCE SUFFICIENT TO ESTABLISH A MODE OF ACTION (MOA) IN ANIMALS?

The first question of the IPCS HRF is an evaluation of the animal MOA itself. This is based on the process delineated by the MOA Framework developed by IPCS and published in 2001 (Sonich-Mullin et al., 2001), which evolved from the Bradford Hill criteria for causality in epidemiology studies (Hill, 1965).

A. Postulated mode of action

4-Aminobiphenyl is metabolized by hepatic enzymes to *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl, which can be *N*-esterified (*N*-acetylated, *N*-glucuronidated, or *N*-sulfated) in hepatic and other tissues (Miller et al., 1961; Kadlubar et al., 1977, 1991; Miller & Miller, 1977; Delclos et al., 1987; Chou et al., 1995) (Figure 1). *O*-Esterification and ring hydroxylation are competing enzymatic reactions leading to detoxification. Tissue and species differences in the activity of these reactions dictate, at least in part, variations in susceptibility to the carcinogenic effects of 4-aminobiphenyl and differences in organ specificity in the development of tumours. Ultimately, a reactive electrophilic nitrenium ion is formed in the target tissue following *N*-esterification, and this is capable of forming DNA adducts. The principal DNA adduct is *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl (Talaska et al., 1990; Kadlubar et al., 1991; Flammang et al., 1992; Hatcher & Swaminathan, 1995, 2002). As a consequence of the

mutations that can result from these reactions at critical sites of critical genes, neoplastic cells eventually develop.

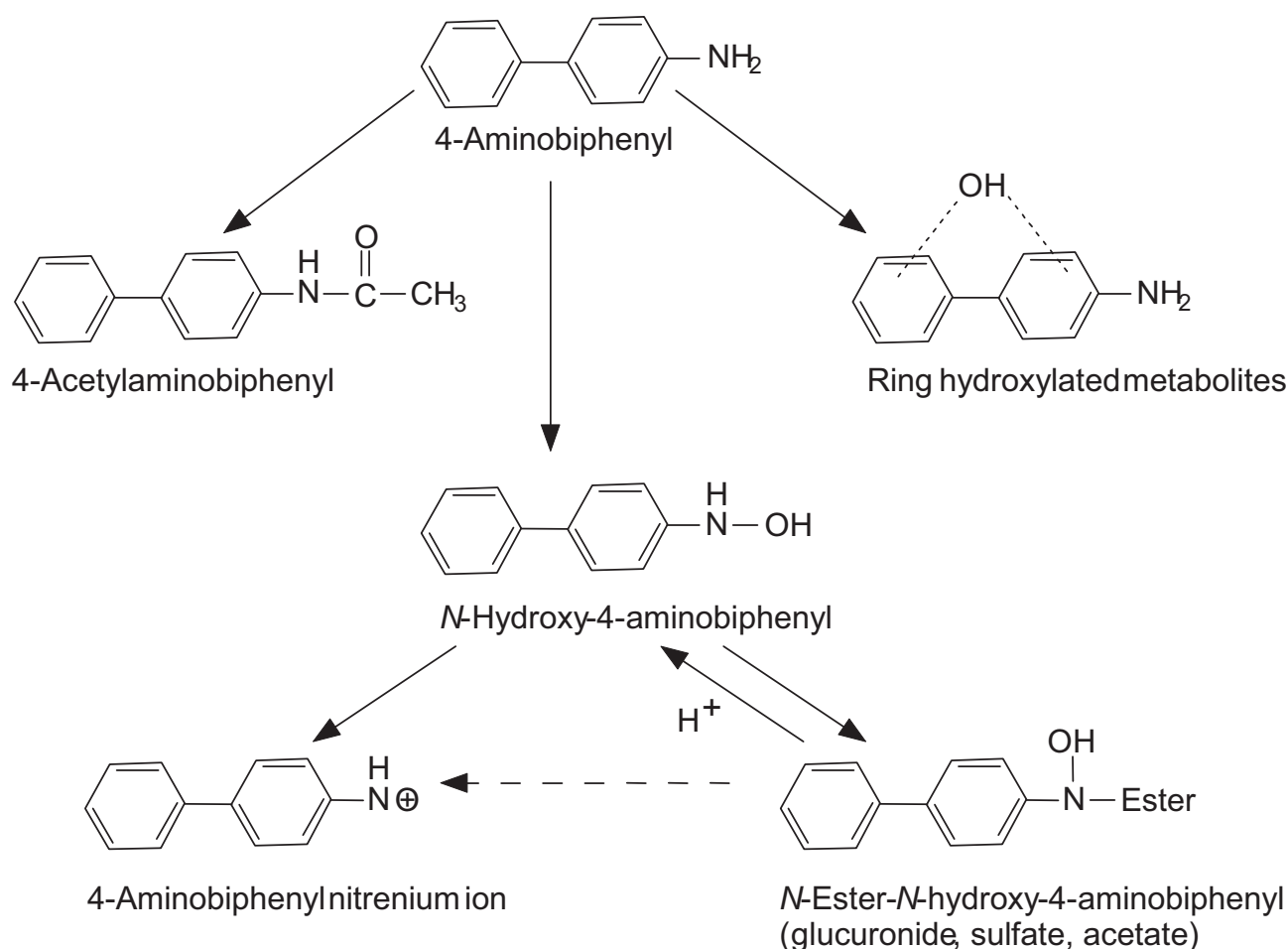


Figure 1. Metabolism of 4-aminobiphenyl

B. Key events

The major route of hepatic activation of 4-aminobiphenyl begins with its *N*-hydroxylation, catalysed, the balance of evidence indicates, by CYP1A2, at least in rats and humans (Butler et al., 1989b). In mice, there is evidence that CYP1A2 is not the only, or even the primary, form of cytochrome P-450 involved (Kimura et al., 1999). The *N*-hydroxylamine can also be produced by reaction with a variety of oxidases and peroxidases, such as by the prostaglandin synthase component of cyclo-oxygenase (Kadlubar et al., 1982). Whether any of these non-cytochrome P-450 reactions occur in vivo and are of toxicological significance remains unclear. The *N*-hydroxylamine undergoes *N*-acetylation by *N*-acetyltransferase-1 (NAT1) (Flammang & Kadlubar, 1986; Oda, 2004), resulting in an *N*-acetoxy ester that is unstable in acidic conditions, forming an aryl nitrenium ion that can react directly with DNA, forming a DNA adduct at the C-8 position of guanine (Hammons et al., 1985; Flammang & Kadlubar, 1986; Hatcher & Swaminathan, 2002). Additionally, the *N*-hydroxylamine generated in liver can serve as a substrate for uridine diphosphate (UDP) glucuronosyltransferase (UGT),

yielding an *N*-glucuronide conjugate that is transported to the urinary bladder (Kadlubar et al., 1977). The glucuronide can either be excreted in urine or, under acidic conditions, serve as an additional source of the *N*-hydroxylamine in the urinary bladder, following hydrolysis. There are a number of reactions that can compete with this reaction scheme, including *N*-acetylation of 4-aminobiphenyl by *N*-acetyltransferase-2 (NAT2), but the resulting arylacetamide is a poor substrate for CYP1A2, and it is considered to be primarily a detoxification reaction. As a consequence, *N*-acetylation of the parent amine is considered a deactivating process. Rates of acetylation can thus affect the balance between activation and deactivation. Humans phenotypically are either rapid or slow acetylators (Lower et al., 1979). Mouse strains exist that are analogous to human slow and rapid acetylators. Thus, C57BL/6 is a rapid acetylator strain, while A/J is a slow acetylator (Hein, 1988). Interest in these differences includes a possible explanation for interspecies, interstrain, and interindividual differences in response. As a consequence of the DNA adducts formed, mutations can be produced. The key events are summarized in Table 2.

Table 2. Key events in the carcinogenicity of 4-aminobiphenyl in animals.

-
1. Metabolic activation
 - a) *N*-Hydroxylation
 - b) *N*-Esterification (glucuronide, acetyl, sulfate)
 - c) Hydrolysis to nitrenium ion
 2. DNA adduct formation (dG-C8, dA-C8, dG-N2) in pluripotential cell of target organ
 3. DNA mutation in critical gene(s) leading to cancer
 4. Cancer
-

dA, deoxyadenosine; dG, deoxyguanosine

C. Dose–response relationship

In view of the fact that many of the relevant studies were conducted a number of years ago, data on concordance of dose–response for precursor lesions for tumours are restricted to hyperplasia in the mouse urinary bladder. Dogs do not develop bladder tumours after a single dose of 4-aminobiphenyl (Deichmann & MacDonald, 1968), and there do not appear to have been studies of dose–response relationships in this species following multiple exposures. In the only study in which information on the incidence of precursor lesions was reported, male BALB/c mice were treated with drinking-water containing 4-aminobiphenyl at concentrations of 0, 7, 14, 28, 55, 110, or 220 mg/l for up to 96 weeks (Schieferstein et al., 1985). These treatments were associated with bladder carcinoma incidences of 0/116, 1/117, 1/118, 0/118, 6/115, 5/118, and 23/118, respectively. The incidences in the 55 mg/l group and higher were statistically significantly higher than in controls. Female mice were exposed to drinking-water concentrations of 4-aminobiphenyl of 0, 7, 19, 38, 75, 150, and 300 mg/l. The corresponding incidences of bladder carcinomas were 0/118, 0/118, 0/119, 1/118, 0/118, 5/117, and 1/117. Incidences of hyperplasia were much higher, although severity was not indicated. In males, the incidences of hyperplasia were 0/116, 4/117, 9/118, 71/118, 108/115, 107/118, and 102/118 for doses of 0, 7, 14, 28, 55, 110, and 220 mg/l, respectively, and for females, 0/118, 0/118, 3/119, 53/119, 106/118, 97/117, and 83/117 for doses of 0, 7, 19, 38, 75, 150, and 300 mg/l, respectively. Thus, the dose–response curves for tumours and

hyperplasia were sigmoidal or hockey stick-shaped. In contrast, steady-state levels of urothelial C-8 guanine DNA adducts showed a linear dose–response (Poirier et al., 1995).

In this same study (Schieferstein et al., 1985), there was no increase in the incidence of liver tumours in the males, whereas in the females, the incidences of liver tumours (adenomas and carcinomas combined) were 0/117, 0/120, 2/120, 4/119, 11/119, 17/118, and 10/117 at doses of 0, 7, 19, 38, 75, 150, and 300 mg/l, respectively. The incidence of angiosarcomas of various tissues combined was also increased at the three highest doses in males and females, although the incidences were somewhat higher in females than in males.

D. Temporal relationship

Establishing time sequences for events in a carcinogenic process is partially, but to an important extent, dependent upon the sensitivity of the available methods for their measurement. Thus, tumours must attain a size allowing their histological detection, while the measurement of mutations and DNA adducts requires not only time but sufficient tissue. Consequently, the latter are more usually studied in liver than in urinary bladder, where the paucity of tissue available in the urothelium, particularly in rodents, causes technical difficulties that have no connection with the frequency of the biochemical and biological events. The metabolism and formation of DNA adducts are early events, which can be observed within a few minutes or hours in vitro and within a day following in vivo treatment with 4-aminobiphenyl (e.g. Kadlubar et al., 1991; Swaminathan & Reznikoff, 1992; al-Atrash et al., 1995; Hatcher & Swaminathan, 1995; Doerge et al., 1999; Tsuneoka et al., 2003). Many in vivo experiments, however, continue exposure for 3–4 weeks to allow an accumulation of adducts, achieve steady-state levels, and facilitate their detection (e.g. Talaska et al., 1990; Flammang et al., 1992; Poirier & Beland, 1992; Poirier et al., 1995; Underwood et al., 1997). Mutations can also be detected within a short time in vitro, but have generally not been detected in vivo in target tissues until after several weeks or months of exposure (e.g. *H-ras* in mouse liver; Parsons et al., 2002), although this comparatively long period may not be a true reflection of when mutations first arise. In one study, mutations were detected in a MutaTMMouse urinary bladder assay 14 days after a single dose of 4-aminobiphenyl (Fletcher et al., 1998). Carcinomas and hyperplasia of the urinary bladder are apparently late-occurring lesions in mice and dogs; however, time course changes have not been systematically evaluated. Although mice were killed at intervals beginning at 13 weeks in one 2-year study, and hyperplastic lesions were induced in the urinary bladder, their incidences at different times were not presented (Schieferstein et al., 1985). Tumours in the urinary bladder are commonly not discovered until after about 2 years in mice (Schieferstein et al., 1985) and longer in dogs (Walpole et al., 1954; Deichmann et al., 1958, 1965). However, neoplastic transformation of human urothelial cells (infected with SV40) treated in vitro with 4-aminobiphenyl followed by in vitro culture for 6 weeks was demonstrated upon their inoculation into nude mice (Bookland et al., 1992b).

E. Strength, consistency, and specificity of association of the tumour response with key events

Evidence in support of the association of the tumour response with key events comes only in part from studies on bladder; considerable evidence is provided by studies on liver. DNA adduct formation has been demonstrated in both tissues.

There is an abundance of studies that demonstrate that 4-aminobiphenyl is a mutagen, including positive mutagenicity with certain frameshift mutation and base pair substitution-sensitive strains (TA1538, TA98, and TA100) of *Salmonella typhimurium*, but only in the presence of rodent liver S9 metabolic activating preparations. The requirement for S9 metabolic activation clearly demonstrates the lack of DNA reactivity and mutagenicity of the parent amine. In addition, 4-aminobiphenyl induces unscheduled DNA synthesis in rat liver cells in vitro (United States Environmental Protection Agency Genetic Activity Profiles). These in vitro studies provide evidence that 4-aminobiphenyl can cause genetic damage following metabolic activation. Bacterial mutation studies have also been conducted comparing metabolic activation systems based on liver homogenates from Aroclor 1254-induced male Sprague-Dawley rats and C57BL/6 mice, using *S. typhimurium* TA100 tester strains that expressed different levels of *N*- and *O*-acetyltransferase (OAT) activity (Dang & McQueen, 1999). TA100 has a single copy of the NAT/OAT gene; YG1029 has multiple copies of the NAT/OAT gene, and TA100/1,8DNP₆ is NAT/OAT-deficient. Effects with mouse and rat S9 were similar (but the effects of Aroclor 1254 treatment were not examined). Using either 4-aminobiphenyl or 4-acetylaminobiphenyl as substrates, considerably more mutations were induced in YG1029 than in TA100 or TA100/1,8DNP₆, in which mutation induction was similar. This supports a role for high acetylation activity in mutation induction by the *N*-hydroxylamine in these bacteria.

The non-enzymatic step to an arylnitrenium ion in the mechanism of mutagenesis in vivo is supported by the observation that *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl mutagenesis in the high OAT-expressing *S. typhimurium* TG1024 strain is dependent on the pH of the medium, with an inverse relationship between mutant numbers and pH over the range 4.0–8.0 (Sarkar et al., 2002).

Administration of 4-aminobiphenyl in the drinking-water of BALB/c mice for 28 days resulted in higher levels of DNA adducts in liver than in urinary bladder of females, while the reverse occurred in males. Thus, in each sex, the DNA adduct level correlated with the susceptibility of the tissue to tumour induction by 4-aminobiphenyl (Poirier et al., 1995). However, the shape of the dose–response curve was linear for DNA adducts in both tissues (although it appears to saturate and is relatively flat in female mice), whereas the tumour dose–response curve was sigmoidal (Poirier et al., 1995).

Adduct levels were also highest in the urinary bladder of female Hsd:ICR(Br) mice that were dosed topically (the more usual exposure route in occupational settings) with 50 nmol 4-aminobiphenyl for 21 weeks. The principal adduct in all tissues examined (bladder, liver, lung, and skin) co-chromatographed with *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl (Underwood et al., 1997).

One study of mutagenesis in male MutaTMMouse transgenic mice (i.e. transgenic CD2F, [BALB/c × DBA/2]) treated orally with 4-aminobiphenyl at 10 mg/kg bw per day for 10 days reported that the mutation frequencies in urinary bladder, liver, and bone marrow were increased by 13.7-, 4.8-, and 2.4-fold, respectively (Fletcher et al., 1998).

Newborn B6C3F1 (C57BL/6 × C3H) mice responded to treatment with 4-aminobiphenyl by developing a high frequency of liver tumours, many of which carried H-*ras* codon 61 CAA → AAA mutations (Parsons et al., 2005). In vivo, the level of one major DNA adduct [*N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl] was present at 5 adducts/10⁶ nucleotides in newborn mice treated with 0.3 µmol 4-aminobiphenyl 24 h earlier. After 8 months, the CAA → AAA mutation was detected in 67% of the treated mice and 50% of the vehicle (dimethyl sulfoxide, or DMSO) controls, but the average mutant fraction in treated mice was 45×10^{-5} compared with only 2×10^{-5} in controls. After 12 months, liver tumours had developed in 79% of the treated mice and in 8% of the controls. These tumours are not those of the human target organ, but the results of this study support the general MOA proposed for bladder carcinogenesis (i.e. DNA adduct formation, followed by mutation in a key gene and the subsequent emergence of tumours).

Dogs (sex not stated) killed 24 h after a single oral dose of 4-aminobiphenyl (5 mg/kg bw) had 5.4 fmol DNA adducts/µg liver DNA and 4.8 fmol DNA adducts/µg urinary bladder DNA, whereas no DNA adducts were detected in either the liver or bladder of a dog whose bladder had been instilled with 4-aminobiphenyl. In contrast, a dog bladder instilled with the reactive intermediate *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl had 3.9 fmol DNA adducts/µg bladder DNA and no detectable adducts in liver DNA. Quantification was by an immunochemical method (Roberts et al., 1988). Examination of bitches treated with tritium-labelled 4-aminobiphenyl (per os, intravenously, or intraurethrally), *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl (intravenously or intraurethrally), or *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl *N*-glucuronide (intravenously) demonstrated (1) the presence of 4-aminobiphenyl–haemoglobin adducts in blood erythrocytes; (2) that after per os dosing with 4-aminobiphenyl, the major portion of total *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl entering the bladder lumen was free *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl (0.7%), with lower concentrations of the acid-labile *N*-glucuronide (0.3%); (3) that urothelial DNA adducts following intraurethral instillation of *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl were 60 times higher than after intraurethral instillation of 4-aminobiphenyl; and (4) that exposure to *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl and subsequent 4-aminobiphenyl–DNA adduct formation are directly dependent on the frequency of urination and, to a lesser extent, on urinary pH (Kadlubar et al., 1991). The urinary pH of dogs may vary from about 4.5 to 7.5, depending upon the diet (Merck, 1998), time after eating, time of day, and amount of water consumed; these are factors that might influence the carcinogenic response (Cohen, 1995). Studies in vitro with microsomal preparations from dog liver and bladder have shown the presence of transacetylation activities in both organs, so that *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl binding to RNA and DNA occurs in the presence of 4-acetylaminobiphenyl, *N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl, or acetyl coenzyme A (CoA) as acetyl donors, although the levels of binding were less with bladder than with hepatic microsomes (Hatcher & Swaminathan, 1992).

Examination of urothelial cells exfoliated into urine of dogs treated with 4-aminobiphenyl showed that DNA adducts were identical to those from DNA modified in vitro with *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl and from dog bladder urothelial DNA isolated from 4-aminobiphenyl-dosed dogs at autopsy. A dose-related increase in 4-aminobiphenyl–DNA adduct formation was demonstrated (Talaska et al., 1990).

F. Biological plausibility and coherence

The observations that 4-aminobiphenyl can form adducts with DNA and that it is mutagenic in organs in which tumours develop indicate, in general terms, that the proposed MOA is plausible (Fletcher et al., 1998). In addition, *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl is able to cause neoplastic transformation of non-tumorigenic SV40-immortalized human urothelial cells (Bookland et al., 1992b). The findings with 4-aminobiphenyl are also consistent with the vast literature regarding the metabolic activation, DNA adduct formation, mutagenesis, and urinary bladder carcinogenesis in several species (including humans) of several related aromatic amine chemicals (Kadlubar et al., 1977; Miller & Miller, 1977; Delclos et al., 1987). The lack of DNA adduct formation and mutagenicity of the parent amine in various in vitro systems without metabolic activation clearly demonstrates the requirement for metabolic activation. The same DNA adducts are identified in tissues after administration of the amine or following exposure to the *N*-hydroxyl metabolite, with the structure of the adducts having been chemically confirmed. The mutagenic potential of the specific C-8 guanine DNA adduct has also been demonstrated, although the specific biophysical aspects have been better demonstrated for structurally related aromatic amines such as 2-aminofluorene (Kriek, 1992).

G. Other modes of action

Alternatives of components of the already described MOA have been suggested. However, they do not detract from the overall described MOA but suggest either alternative specific aspects (such as other activating enzymes) or associative processes that could affect quantitative aspects. 4-Aminobiphenyl is oxidized by hepatic enzymes other than CYP1A2 (Kimura et al., 1999) to the *N*-hydroxylated metabolite that causes liver and urinary bladder toxicity and carcinogenesis, possibly including oxidases and peroxidases (Kadlubar et al., 1982, 1991). Although the specific enzymes involved in metabolic activation may vary, the ultimate sequence of generation of a reactive electrophile, DNA adduct formation, mutagenesis, and carcinogenesis is consistent. Furthermore, it is reasonable to believe that from this point in the MOA, the same sequence occurs as that involving CYP1A2-mediated activation, regardless of the activating enzyme.

In addition to bulky adducts, there is evidence to suggest that *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl causes oxidative damage in urothelial DNA, possibly involving endogenous peroxidases (Burger et al., 2001). The relevance of this for the carcinogenic activity of 4-aminobiphenyl is unknown.

N-Hydroxy-4-aminobiphenyl and its further activated forms are cytotoxic to urothelial and other cells in vitro (Reznikoff et al., 1986), but the role that this plays in its carcinogenic effects is unclear (see below for discussion of a potentiating role in urothelial carcinogenesis, rather than causative role). It is likely that this process alters the dose–response relationship, but does not alter the fundamental MOA described above.

H. Assessment of the postulated mode of action

The early steps in the proposed MOA are well supported by the available evidence, and it has been judged that there is good and sufficient evidence that 4-aminobiphenyl is a urinary bladder carcinogen in dogs and mice, and in other tissues (primarily the liver) in rodents. Thus, it is metabolized to products that can form DNA adducts in the liver and in other target

organs, and mutations have been demonstrated to arise. Although other organs can also be targets for 4-aminobiphenyl-induced neoplasia, the urinary bladder is the main target in dogs and in some strains of mice. Evidence for the intervening steps between general genotoxicity and the emergence of neoplasia is lacking. There is a notable lack of study of the effects of 4-aminobiphenyl on cell proliferation in the urinary bladder, but information on related aromatic amines and amides is available, particularly the analysis of the interaction between DNA reactivity (and mutagenesis) and cell proliferation induced by 2-acetylaminofluorene in mouse urinary bladder utilizing data from a megamouse, ED-01 study (Cairns, 1979; Gaylor, 1979; Littlefield et al., 1979). The reliance for mutagenicity on cell proliferation can provide an explanation for the sigmoidal shape of the tumour dose–response despite a linear dose–response for DNA adducts (Cohen & Ellwein, 1990). This link has significant implications for assessing potency and dose–response for 4-aminobiphenyl-induced urinary bladder cancer (see discussion below).

I. Uncertainties, inconsistencies, and data gaps

Bacterial mutation studies of 4-aminobiphenyl with metabolic activation have shown that most mutations are frameshifts, whereas a single study of sequence analysis of 4-aminobiphenyl-induced mutations in the *lacZ* gene in single-stranded DNA from a bacteriophage M13 cloning vector revealed exclusively base pair substitutions, with over 80% occurring at G sites: G → T transversions predominated, followed by G → C transversions and G → A transitions. The major DNA adduct, *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl, was then inserted within the M13 genome, and the mutational frequency and specificity were measured after *in vivo* replication. The targeted mutational efficiency was approximately 0.01%, and the primary mutation was G → C transversion. Thus, the observations are consistent with *in vivo* observations, but the mutagenic activity was weak (Verghis et al., 1997).

Most *in vivo* investigations have been in mice. Dogs, for understandable reasons, have received less attention, although this is the species that is more sensitive to bladder carcinogenesis. Mouse strain differences in response are evident: B6C3F1 and female BALB/cStCrIfC3Hf/Nctr are more susceptible to liver carcinogenesis, whereas male BALB/cStCrIfC3Hf/Nctr mice develop bladder tumours after exposure to 4-aminobiphenyl (Schieferstein et al., 1985; Dooley et al., 1988, 1992). Nevertheless, mouse strain effects have received relatively little attention in the available studies.

The enzyme considered as fundamental for the metabolism of 4-aminobiphenyl to a product that forms adducts with DNA in liver and bladder is CYP1A2 (Butler et al., 1989a, 1989b). However, comparison of responses in CYP1A2(+/+) wild-type mice with CYP1A2(–/–) knockout mice showed that, contrary to expectations, CYP1A2 expression was not associated with 4-aminobiphenyl-induced oxidative stress or with 4-aminobiphenyl–DNA adduct formation. Furthermore, prior treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), which increased hepatic CYP1A2 protein expression 5-fold along with expression of other phase I and phase II enzymes, either did not change or actually decreased the level of adducts in liver. The specific quantitative effects of such induction will depend on the balance of the enzymes induced. These results suggest either that CYP1A2 is not the major metabolic activator of 4-aminobiphenyl or that other enzymes in mice activate the compound in the absence of CYP1A2 (Tsuneoka et al., 2003). Based on studies with other aromatic amines,

additional activating enzymes might include other P-450 enzymes, oxidases, or peroxidases (Lakshmi et al., 1990; Smith et al., 1991; Hughes et al., 1992).

Another reaction considered to be important for carcinogenesis induced by 4-aminobiphenyl is acetylation. Acetylation plays several roles in 4-aminobiphenyl carcinogenesis. *O*-Acetylation and *N,O*-acetyltransfer of *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl are expected to increase risk in humans, whereas *N*-acetylation of 4-aminobiphenyl should reduce risk (Lower et al., 1979). Acetylation can be catalysed by NAT1 or NAT2, with the latter exhibiting a marked polymorphism within the population (Hein et al., 2000; Cascorbi et al., 2001). It is predicted that a slow acetylation phenotype will increase the risk of bladder cancer, since acetylation of the parent amine, 4-aminobiphenyl, is considered to be a detoxification process in humans, whereas a rapid acetylation phenotype should be associated with a decreased risk.

However, studies of acetylator phenotype in mice have produced conflicting results. In one study, male and female homozygous rapid acetylator or homozygous slow acetylator mice that were apparently identical in every other respect were administered 4-aminobiphenyl·HCl (55–300 mg/l) in drinking-water for 28 days. The levels of hepatic DNA adducts increased with dose in both sexes, with the levels being higher in females, but were independent of the mouse acetylator phenotype. In the urinary bladder, DNA adducts increased to a plateau at 100 mg/kg in male mice and were again independent of acetylator phenotype. In female mice, the DNA adduct levels were lower than in males and decreased at the highest dose; the DNA adduct levels were higher in the rapid acetylator phenotype, contrary to expectations (Flammang et al., 1992). These results were interpreted as suggesting that acetyltransferase activities are not rate determining for DNA adduct formation in mice. A similar conclusion that there was no correlation between murine *NAT2* alleles and 4-aminobiphenyl–DNA adduct levels was reached by McQueen et al. (2003), using C57BL/6, B6.A, and A/J mouse strains and the transgenic strains hNAT1:A/J and hNAT1:C57, which carry the human *NAT1* transgene. However, the differences in murine NAT2 activity were modest and probably not sufficient to affect 4-aminobiphenyl genotoxicity. Recent studies suggest that in humans, NAT1, not NAT2, is responsible for the *O*-acetylation of *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl (Oda, 2004).

There are also mouse strain-specific mutations that require explanation. Thus, in B6C3F1, 4-aminobiphenyl induces predominantly C → A mutations (reflecting G → T transversions in the non-coding strand) in *H-ras* codon 61, whereas in CD-1 mice, the predominant mutation in *H-ras* codon 61 was A → T transversion (Manjanatha et al., 1996).

Cell proliferation is also required for neoplasia, but there have been few studies that have investigated cell proliferation at an early stage of the carcinogenic process of 4-aminobiphenyl. It is also notable that in the carcinogenicity experiment described previously (Schieferstein et al., 1985), although urinary bladder carcinomas developed only in males, a high prevalence of hyperplasia was reported in both males and females. Apparently this observation has not been investigated further (discussed below).

In summary, the evidence is strong for the sequence of key events including metabolic activation, DNA adduct formation, and gene mutation as the MOA for 4-aminobiphenyl-induced

urinary bladder carcinogenesis. It is further strengthened by data from studies with structurally related aromatic amines. However, data gaps remain concerning details of the specific enzymes involved, the basis for differing organ specificity between species and details regarding potency, and the shape of the dose–response curve in humans. This is, perhaps, not unexpected in view of the complexity of the relevant competing metabolic pathways. While available data are considered sufficient to support the hypothesized MOA, the impact of these uncertainties needs to be considered quantitatively in the overall assessment (Table 3).

Table 3. Modulating factors affecting 4-aminobiphenyl urinary bladder carcinogenesis.

1.	Competing activities of esterification enzymes
2.	Genetic polymorphisms affecting enzymatic activation or inactivation (e.g. slow and fast acetylators)
3.	Urinary pH (mainly affected by diet) and possibly other urinary constituents
4.	Urothelial cell proliferation (induced by high doses of 4-aminobiphenyl or by co-administration with some other agent affecting urothelial proliferation)

CAN HUMAN RELEVANCE OF THE MOA BE REASONABLY EXCLUDED ON THE BASIS OF FUNDAMENTAL, QUALITATIVE DIFFERENCES IN KEY EVENTS BETWEEN EXPERIMENTAL ANIMALS AND HUMANS?

There is considerable evidence in humans and human cell systems supporting each of the key events for 4-aminobiphenyl-induced urinary bladder cancer. Metabolic activation to the *N*-hydroxylamine has been demonstrated, with several different enzymes being suggested for activation and several others that might potentiate or reduce the effects of *N*-hydroxylation, such as *N*-acetylation. Genetic polymorphisms significantly affect activities of these enzymes, producing variations in the population that can affect susceptibility to the urinary bladder carcinogenesis response to 4-aminobiphenyl exposures. DNA adducts identical to those detected in DNA from mice and dogs have been identified in human urothelial cells, and consequently they have a similar mutagenic potential. Furthermore, extensive epidemiological evidence demonstrates the urinary bladder carcinogenicity of 4-aminobiphenyl in humans.

Bladder cancer is associated with smoking and occupational exposures to 4-aminobiphenyl. 4-Aminobiphenyl was manufactured in the United States of America from 1935 to 1955 (Melick et al., 1955) and was used as a highly efficient rubber antioxidant, but it is apparently no longer commercially produced. In epidemiological studies, which were confined to one series of workers occupationally exposed to commercial 4-aminobiphenyl, a high incidence of bladder carcinomas was reported (Melick et al., 1955, 1971; Melamed et al., 1960; Koss et al., 1965, 1969). Among 503 workers, 59 cases with positive cytology were identified, among which 35 cases of carcinoma of the urinary bladder were histologically verified; 7 remained cytologically positive at the time of publication, while 7 died from other causes and 10 were lost to follow-up (Koss et al., 1969). In addition to cigarette smoke, there also appear to be other, ill-defined environmental sources of exposure, possibly from other sources of combustion of substances containing carbon and nitrogen (Skipper et al., 2003). Cigarette

smoking accounts for between 40% and 70% of the bladder cancer cases in the United States and Europe (IARC, 1986; Castelao et al., 2001). Black (air-cured) tobacco is a greater source of 4-aminobiphenyl than is blonde (flue-cured) tobacco (Bryant et al., 1988).

The key events demonstrated for 4-aminobiphenyl bladder carcinogenesis in mice and dogs have also been specifically evaluated for 4-aminobiphenyl in humans, primarily in individuals exposed to 4-aminobiphenyl in cigarette smoke, but also utilizing in vitro methods with human urothelial cells (see Table 4).

Table 4. Concordance evaluation of key events of 4-aminobiphenyl-induced urinary bladder carcinogenesis between species.

Key event	Mouse	Dog	Human
1. Metabolic activation to reactive electrophile	+	+	+
2. DNA adduct formation	+	+	+
3. Mutagenesis	+	+	+
4. Carcinoma	+	+	+

Absorbed 4-aminobiphenyl is *N*-oxidized in the liver by CYP1A2, which, in spite of its rather high homology with CYP1A1, has an essentially different substrate specificity and is found only in liver (Lang & Pelkonen, 1999). Other enzymes have been suggested to be capable of supporting metabolic activation to the *N*-hydroxylamine.

NAT1 and NAT2 each catalyse three types of acetylation: the *N*-acetylation of arylamines, the *O*-acetylation of *N*-hydroxylamines, and the *N,O*-acetyltransfer of arylhydroxamic acids (Flammang & Kadlubar, 1986; Mattano et al., 1989; Fretland et al., 1997; Hein et al., 2000). It is believed that *N*-acetylation by *N*-acetyltransferases has a protective effect regarding bladder carcinogenicity, primarily because the acetamide of 4-aminobiphenyl formed is significantly less potent as a substrate for *N*-hydroxylation compared with the amine. Two genes, *NAT1* and *NAT2*, code for the NAT isoforms, and allelic variation has been associated with susceptibility to urinary bladder cancer in humans (Hein et al., 2000). Most studies suggest that NAT2 slow acetylators are at increased risk of developing bladder cancer, whereas the contribution of the *NAT1* genotype to aromatic amine bladder carcinogenesis is less clear (Cartwright et al., 1982; Hein et al., 2000). Among smokers, there is a higher level of 4-aminobiphenyl–haemoglobin adducts associated with the slow acetylator phenotype (Vineis et al., 1990). Interactions of *NAT1* and *NAT2* have been suggested (Cascorbi et al., 2001). In a study of 425 German bladder cancer patients, Cascorbi et al. (2001) found that there is (1) a partial linkage of the *NAT1**10 genotype to the *NAT2**4 genotype, (2) a clear underrepresentation of *NAT1**10 genotypes among rapid *NAT2* genotypes in the cases studied, and (3) a gene–gene–environment interaction in that *NAT2**slow/*NAT1**4 genotype combinations with a history of occupational exposure were 5.96 (2.96–12.0) times more frequent in cancer cases than in controls without a risk from occupation ($P < 0.0001$). Hence, the data suggest that individuals with *NAT2**4 and *NAT1**10 are at a significantly lower risk for bladder cancer, particularly when exposed to environmental risk factors.

Polymorphisms in *CYP1A2* (Oscarson et al., n.d.) and *NAT2* (Hein et al., 2000) genes are associated with variations in the activities of these enzymes in human populations, although the extent to which variation in CYP1A2 activity is due to genetic factors has yet to be determined (Sachse et al., 2003). Moreover, expression of the *CYP1A2* gene is induced in cigarette smokers, leading to even higher CYP1A2 enzyme activities (Sesardic et al., 1988; Eaton et al., 1995). An individual exposed to 4-aminobiphenyl and expressing high levels of CYP1A2 and slow NAT2 activity would be expected to have increased levels of *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl and, therefore, higher levels of 4-aminobiphenyl–haemoglobin adducts and 4-aminobiphenyl–DNA adducts in liver and urinary bladder than an individual expressing low levels of CYP1A2 and rapid NAT2 activity.

The tumour suppressor genes *RB1* and *TP53* appear to be involved in bladder cancer, especially high-grade urothelial carcinomas rather than low-grade papillary tumours. Both genes are involved in the regulation of the cell cycle. In addition, *TP53* plays a role in response to DNA damage, cell death, and neovascularization (Hickman et al., 2002), and its gene product regulates the expression of multiple genes (Vousden & Lu, 2002). A strong association has been found between *RB1* inactivation and muscle invasion (Cairns et al., 1991; Ishikawa et al., 1991; Presti et al., 1991; Primdahl et al., 2000). In one study of 45 bladder cancers, seven of nine *TP53* mutations occurred in grade 3 tumours (i.e. invasion includes perivesicular tissue) (Martone et al., 1998). Inactivation of *RB1* occurs in 30–80% of muscle-invasive bladder cancers (Cairns et al., 1991; Logothetis et al., 1992; Wright et al., 1995; Ioachim et al., 2000), most frequently as a consequence of heterozygous 13q deletions in combination with mutation of the remaining allele (Cordon-Cardo & Reuter, 1997). In studies investigating at least 30 tumours, *TP53* mutations occurred in 40–60% of invasive bladder cancers (Tiguert et al., 2001; Lu et al., 2002). Although no specific mutational hot-spots were identified, more than 90% of the mutations occurred in exons 4–9. In a study of the binding spectrum of *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl in DNA fragments containing exons 5, 7, and 8 of *TP53*, preferential binding was identified at codon 285, a non-CpG site, and at codons 175 and 248, which are CpG sites, but only after C5 cytosine methylation had occurred (Feng et al., 2002). The authors concluded that the mutational spectrum in *TP53* in bladder cancer strongly suggests a role of 4-aminobiphenyl in the etiology of this neoplasm.

Exposure to tobacco smoke, an environmental source of 4-aminobiphenyl, is associated with increased levels of 4-aminobiphenyl–haemoglobin adducts, in both adults and fetuses. In a study of smoking ($n = 14$) and non-smoking ($n = 38$) women, 4-aminobiphenyl–haemoglobin levels were 183 ± 108 pg/g haemoglobin in smokers and 22 ± 8 pg/g haemoglobin in non-smokers, whereas the levels in their respective fetuses were 92 ± 54 pg/g haemoglobin and 17 ± 13 pg/g haemoglobin (Coghlin et al., 1991), a difference that has also been observed in adults in studies of tumour tissue DNA (Curigliano et al., 1996). Haemoglobin adduct levels (used as a surrogate for exposure levels and indicator for DNA adduct potential) have been associated with levels of exposure to tobacco as a source of 4-aminobiphenyl (black tobacco > blonde tobacco > non-smokers) in a male study population from Turin, Italy; the risk of bladder cancer followed the same pattern (Bryant et al., 1988). There is a substantial gap in information linking the presence of adducts, primarily an indication of exposure, and the emergence of cancer.

In humans, 4-aminobiphenyl has been associated only with urinary bladder cancer, whereas in mice, liver and urinary bladder tumours are induced. Although the specific reasons for these species differences in organ specificity are not known, they appear to be due to variations in competing *N*-esterification enzymatic activations. Sulfation appears to be primarily associated with liver carcinogenesis by aromatic amines, whereas *N*-glucuronidation appears to be more associated with bladder carcinogenesis. Acetylation has mixed effects, but in humans appears to be principally a detoxification process that can be influenced significantly by *N*-acetyltransferase polymorphisms that result in fast versus slow acetylation. Human tissues have been studied for their possible involvement in the metabolism of 4-aminobiphenyl and its metabolites. CYP1A2 is responsible for the metabolism of 4-aminobiphenyl to *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl by human hepatic microsomal fraction (Butler et al., 1989b). *N*-Hydroxy-4-aminobiphenyl can be metabolized to a product that binds covalently to calf thymus DNA by cytosolic sulfotransferases from human liver and, to a lesser extent, colon, but not from pancreas or urinary bladder. In view of this lack of sulfotransferase activity in bladder, it has been suggested that hepatic sulfotransferase may actually decrease the bioavailability of *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl in extrahepatic tissues and serve as a detoxification mechanism for the urinary bladder (Chou et al., 1995). On the other hand, *N*-acetyltransferases that are present in human urothelial cells (Frederickson et al., 1992; Swaminathan & Reznikoff, 1992) can metabolize *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl, as well as the acetylated compounds *N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl and *N*-acetoxy-4-acetylaminobiphenyl, to a DNA-reactive material. The major adduct co-chromatographs with *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl. ³²P-postlabelling analysis of the DNA from cytosol-mediated binding of *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl revealed four radioactive spots. Five adducts were found when intact human urothelial cells were used, two of which were the same as two found using cytosol. This suggests the possibility of an activation pathway or pathways in addition to acetylation.

Experiments similar to those performed with dog tissues have shown that human urothelial cell microsomes possess transacetylation activity, so that *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl binding to RNA and DNA occurs in the presence of 4-acetylaminobiphenyl, *N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl, or acetylCoA as acetyl donors (Hatcher et al., 1993). These authors also found that ³²P-postlabelling of DNA adducts formed after reaction with *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl, *N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl, and *N*-acetoxy-4-aminobiphenyl showed similar profiles, suggesting that the arylnitrenium ion, arising from *N*-acetoxy-4-aminobiphenyl, might be the common reactive species. The structures of the adducts have been identified as the 3',5'-bisphospho derivatives of *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl (dG-C8-aminobiphenyl), *N*-(deoxyadenosin-8-yl)-4-aminobiphenyl (dA-C8-aminobiphenyl) (Frederickson et al., 1992; Hatcher & Swaminathan, 1995), and *N*-(deoxyguanosin-*N*(2)-yl)-4-azobiphenyl (Hatcher & Swaminathan, 2002).

The results available comparing tobacco smokers with non-smokers support the relevance to humans of the hypothesized MOA. In a study of 46 T1 bladder cancer cases, mean relative staining intensity for 4-aminobiphenyl–DNA adducts was significantly higher in current smokers (275 ± 81 , $n = 24$) than in non-smokers (113 ± 71 , $n = 22$) (Curigliano et al., 1996). Similar results have been reported for laryngeal tissue (Flamini et al., 1998) and for mammary tissue (Faraglia et al., 2003). Using 4-aminobiphenyl–haemoglobin adducts as an

indicator of exposure, it was found that bladder carcinoma patients had higher levels than controls (Del Santo et al., 1991), whereas lung cancer patients did not (Weston et al., 1991). The basis for this difference is unknown.

In addition to the evidence of genotoxicity generated with non-human test systems, 4-aminobiphenyl can be metabolized by human urothelial cell microsomal preparations to a mutagen in *S. typhimurium* YG1024 (a derivative of TA98 with elevated *O*-acetyltransferase activity) but not in strain TA98 itself (Hatcher et al., 1993). No other species or other human tissues were examined in this study.

6-Thioguanine-resistant mutants can be induced in a non-tumorigenic, SV40-immortalized human urothelial cell line by exposure to 4-aminobiphenyl itself or exposure to *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl, *N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl, or *N*-acetoxy-4-acetylaminobiphenyl (Bookland et al., 1992a). No exogenous metabolic activation system was required for the observed activity. The lowest effective concentrations to produce a statistically significant increase in the mutant fraction were as follows: *N*-acetoxy-4-acetylaminobiphenyl, 2 µmol/l; *N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl, 5 µmol/l; *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl, 20 µmol/l; and 4-aminobiphenyl, 100 µmol/l. Three of these substances were also tested for tumorigenic transformation using the same human immortalized urothelial cells in an in vitro–in vivo assay in which the end-point was carcinoma development when treated cells were injected subcutaneously into nude mice (Bookland et al., 1992b). Transformation was demonstrated after all treatments, the lowest concentrations being as follows: *N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl, 0.5 µmol/l; *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl, 0.5 µmol/l; and 4-aminobiphenyl, 20 µmol/l. The lower concentrations required for transformation in comparison with those for mutation are noted, but how this should be interpreted is not clear. It is consistent with the transformation being independent of mutation and with the transformation assay having a higher sensitivity, or it could merely reflect a difference in sensitivity of the methods.

In summary, on a qualitative basis, the key events in the MOA are the same in mice, dogs, and humans: metabolic activation to the *N*-hydroxylamine with subsequent formation of a reactive electrophile (presumably the nitrenium ion), formation of guanine adducts, gene mutation, and the ultimate formation of cancer. The intervening events between gene mutation and cancer, such as which genes are mutated and how cancer is induced, are not known. The MOA, nevertheless, has been clearly demonstrated and is the same in the animal models and in humans.

CAN HUMAN RELEVANCE OF THE MOA BE REASONABLY EXCLUDED ON THE BASIS OF QUANTITATIVE DIFFERENCES IN EITHER KINETIC OR DYNAMIC FACTORS BETWEEN EXPERIMENTAL ANIMALS AND HUMANS?

As described in detail above, the metabolic activation, DNA adducts, and mutagenicity of 4-aminobiphenyl are qualitatively the same in mice, dogs, and humans, leading to the induction of urothelial tumours of the urinary bladder in these three species and other tumours in mice, rats, and rabbits. Although detailed aspects of absorption, distribution, and excretion have not been reported, similarity in the levels of DNA adduct formation in the urothelium occurring in mice, dogs, and humans suggests that kinetic differences are not significant between these

three species. Although similar enzymatic processes occur in the three species, quantitative differences are evident. These differences may explain some of the variations seen in target organ specificity among the species and might suggest possible quantitative differences in generation of the DNA adducts. Nevertheless, these differences do not negate the overall MOA for any of the species or the different target organs and are consistent with the complexity of the competing pathways for metabolic activation and deactivation.

Presumably there is a potential for repair of the different adducts, and quantitative differences might exist among species and even among tissues. However, the detection of relatively high numbers of adducts in all three species indicates that significant numbers of stable adducts are produced.

The target tissue common among mice, dogs, and humans, the urinary bladder urothelium, is similar morphologically (Pauli et al., 1983). The urothelium has a characteristic asymmetric unit membrane at the luminal surface that provides a major part of the barrier function to urine. It is composed of urothelium-specific proteins, the uroplakins, the sequence of which is highly conserved among species (Wu et al., 1994). In addition, the urothelium is metabolically active in all three species.

Modulating urinary factors have also been identified that can quantitatively affect the ultimate formation of urothelial DNA adducts, such as pH and frequency of urination (Cohen, 1995; Sarkar et al., 2002). Although the range of pH varies among species, the pH in mice, dogs, and humans readily reaches acidic and alkaline levels as well as neutral. Again, although quantitative differences occur, these do not preclude the existence of this MOA in humans.

There is no evidence implicating another MOA besides DNA reactivity. However, significant quantitative differences exist between species with regard to apparent potency of 4-aminobiphenyl with respect to urinary bladder carcinogenesis. It is clear, however, that metabolites of 4-aminobiphenyl interact with proteins (e.g. haemoglobin) as well as with DNA and that metabolites of 4-aminobiphenyl are cytotoxic (Schieferstein et al., 1985; Reznikoff et al., 1986; Kadlubar et al., 1991). Interaction with urothelial cellular proteins might be responsible for the cytotoxicity and regenerative proliferation seen in the mouse bladder at higher doses of 4-aminobiphenyl. The interaction of DNA reactivity and consequent mutagenicity and cell proliferation provide an explanation for the sigmoidal shape of the dose–response curve for tumours despite a linear dose–response for DNA adducts (Cohen & Ellwein, 1990). The high concentrations of 4-aminobiphenyl found in the urine of mice that can produce urothelial cytotoxicity are generally not attained in humans exposed to cigarette smoke. However, other (unknown) substances appear to produce urothelial hyperplasia in cigarette smokers (Auerbach & Garfinkel, 1989). This increased cell proliferation significantly potentiates the effects of 4-aminobiphenyl on the bladder, providing a significantly greater number of DNA-replicating cell targets on which to act in comparison with the small number present in the normal, slowly replicating urothelium. Thus, the apparent greater potency of 4-aminobiphenyl in humans compared with mice is unlikely, but represents the synergy of DNA reactivity and cell proliferation produced by a single substance, 4-aminobiphenyl, in mice, but by different substances in the complex mixture of cigarette smoke.

Occupational exposure to 4-aminobiphenyl presumably resulted in greater doses of 4-aminobiphenyl than did exposure to cigarette smoke, since the incidence of bladder cancer in such populations was considerably higher than in smokers. However, quantitative measurements of metabolite concentrations or DNA adduct levels in urothelial cells could not be determined at the time these occupational exposures occurred, and cigarette smoking history in those individuals was not assessed (Koss et al., 1965, 1969).

In summary, although quantitative differences among species exist, they do not exclude the same MOA in mice and dogs occurring in humans.

CONCLUSION: STATEMENT OF CONFIDENCE, ANALYSIS, AND IMPLICATIONS

The early steps in the proposed MOA are well supported by the available evidence, indicating that the key events of metabolic activation, DNA adduct formation, and mutation are the same qualitatively in mice, dogs, and humans. There is strong and sufficient evidence that 4-aminobiphenyl is a human urinary bladder carcinogen. Evidence for the intervening steps between mutation and cancer development is lacking. The associations described for adduct levels and *TP53* mutations are not compelling because these particular genetic alterations appear late in tumour progression and are often the result of endogenous causes (e.g. spontaneous depurination at methylated CpG sites). This aspect of *TP53* mutations in bladder cancer has been studied in a case-control study (Schroeder et al., 2003). In addition, most urothelial tumours in humans are low-grade papillary lesions, which generally do not have *TP53* mutations.

The mutational spectrum of *N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl has been studied in embryonic fibroblasts of the Big Blue mouse (Besaratina et al., 2002). Treatment of these cells for 24 h resulted in a dose-dependent increase in mutation frequency of the *cII* transgene of up to 12.8-fold over background. Single-base substitutions comprised 86% of the mutations in the treated cells and 74% of the mutations in the controls. Of these mutations, 63% and 36%, respectively, occurred at guanine residues along the *cII* gene. Whereas G → T transversions accounted for 47% of the mutations in the treated *cII* gene, the most common mutations in untreated cells were insertions, which accounted for 19% of the mutations. Mapping of the induced adducts established five preferred DNA adduction sites, of which four were major mutation sites for *N*-hydroxy-4-acetoxyaminobiphenyl, especially G → T transversions. In the *TP53* gene in human bladder cancer, however, G → A transitions predominate (53%) and are prevalent at all of its five mutational hotspots (codons 175, 248, 273, 280, and 285), three of which are at methylated CpG hotspots (175, 248, and 273). In *cII*, neither the preferred adduction sites nor the induced mutational hotspots are biased towards methylated CpG dinucleotides. It is concluded from this study that there is a serious discordance between the mutation pattern induced by *N*-hydroxy-4-acetoxyaminobiphenyl in the *cII* gene and the mutational pattern observed in *TP53* in human bladder cancer. However, the role of methylation status and transcriptional activity on the mutation spectrum induced by 4-aminobiphenyl has yet to be determined. It is also to be noted that the *TP53* mutation spectrum is a reflection of a selection process during tumour development.

Based on the preceding analysis, it is clear that the MOA for 4-aminobiphenyl carcinogenesis is known in the animal model, and the MOA is relevant to humans both qualitatively and quantitatively. The conclusion based on this evaluation, even without epidemiological evidence, is that 4-aminobiphenyl poses a cancer hazard to humans.

To perform a full risk assessment requires additional information regarding the dose–response and human exposures. Based on the information described above, it is clear that the data predict a cancer hazard for humans at expected exposures, at least for occupational (historical) and cigarette smoking exposures. Further analysis is required regarding the potential risk at ambient exposures in those who are not cigarette smokers. The MOA analysis provides the basis and foundation for such an assessment. The epidemiological evidence on 4-aminobiphenyl supports the conclusions suggested by the MOA HRF.

4-AMINOBIIPHENYL AND THE HUMAN RELEVANCE FRAMEWORK

4-Aminobiphenyl was evaluated using the proposed IPCS HRF based on an MOA analysis. The defined key events for this DNA reactivity MOA—metabolic activation, DNA adduct formation, mutagenicity, and cancer induction—clearly are the same in humans as in the animal (mice, dogs) models, indicating that 4-aminobiphenyl presents a cancer hazard for humans. The information for this MOA analysis provides a substantive foundation on which to build a complete cancer risk assessment for humans. For this chemical, there is also substantial epidemiological evidence to verify the conclusions derived from the HRF analysis.

The additional key events for this MOA—which genes are mutated and how do these genetic alterations lead to cancer—are not known for 4-aminobiphenyl. However, this does not detract from the conclusions, given the strength of evidence for the proposed MOA, based on the framework analysis presented here.

What data are necessary to conclude that a chemical produces cancer by a DNA-reactive MOA? Our suggestion is that at the very least there be a demonstration that DNA adducts are produced, preferably in the target tissue, and that the chemical is mutagenic (either with or without metabolic activation). Mutagenicity is used here in a more specific, restricted sense than the broader term genotoxicity. Demonstration of DNA adducts and mutagenicity in the target tissue after in vivo exposure increases confidence in the proposed MOA. Identification of the specific metabolic pathway and specific DNA adducts induced provides a significantly better basis for extrapolating between the animal model and humans.

This case demonstrates the potential utility of data on surrogate compounds in MOA analysis. However, the relevance of data on related compounds, whether in vivo or in vitro, needs to be adequately justified. Weight-of-evidence analysis of structure–activity relationships, which have been well developed for DNA reactivity and mutagenicity, should also contribute to framework analysis.

ACKNOWLEDGEMENTS

This paper has been reviewed in accordance with United States Environmental Protection Agency (USEPA) guidance but does not necessarily reflect USEPA policy. We thank Drs. Andrew Kligerman and Doug Wolf for their careful review of this paper.

REFERENCES

- al-Atrash J, Zhang YJ, Lin D, Kadlubar FF, Santella RM (1995) Quantitative immunohistochemical analysis of 4-aminobiphenyl-DNA cultured cells and mice: Comparison to gas chromatography/mass spectroscopy analysis. *Chemical Research in Toxicology*, **8**:747–752.
- Auerbach O, Garfinkel L (1989) Histologic changes in the urinary bladder in relation to cigarette smoking and use of artificial sweeteners. *Cancer*, **64**:983–987.
- Besaratinia A, Bates SE, Pfeifer GP (2002) Mutational signature of the proximate bladder carcinogen *N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl: Inconsistency with the *p53* mutational spectrum in bladder cancer. *Cancer Research*, **62**:4331–4338.
- Block NL, Sigel MM, Lynne CM, Ng AB, Grosberg RA (1978) The initiation, progress, and diagnosis of dog bladder cancer induced by 4-aminobiphenyl. *Investigative Urology*, **16**:50–54.
- Bonser GM (1962) Precancerous changes in the urinary bladder. In: Severi L, ed. *The morphological precursor of cancer*. Perugia, University of Perugia, p. 435.
- Bookland EA, Reznikoff CA, Lindstrom M, Swaminathan S (1992a) Induction of thioguanine-resistant mutations in human uroepithelial cells by 4-aminobiphenyl and its *N*-hydroxy derivatives. *Cancer Research*, **52**:1615–1621.
- Bookland EA, Swaminathan S, Oyasu R, Gilchrist KW, Lindstrom M, Reznikoff CA (1992b) Tumorigenic transformation and neoplastic progression of human uroepithelial cells after exposure in vitro to 4-aminobiphenyl or its metabolites. *Cancer Research*, **52**:1606–1614.
- Bryant MS, Vineis P, Skipper PL, Tannenbaum SR (1988) Hemoglobin adducts of aromatic amines: Associations with smoking status and type of tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**:9788–9791.
- Burger MS, Torino JL, Swaminathan S (2001) DNA damage in human transitional cell carcinoma cells after exposure to the proximate metabolite of the bladder carcinogen 4-aminobiphenyl. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **38**:1–11.
- Butler MA, Guengerich FP, Kadlubar FF (1989a) Metabolic oxidation of the carcinogens 4-aminobiphenyl and 4,4'-methylene-bis(2-chloroaniline) by human hepatic microsomes and by purified rat hepatic cytochrome P-450 monooxygenases. *Cancer Research*, **49**:25–31.

Butler MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Kadlubar FF (1989b) Human cytochrome P-450PA (P-450IA2), the phenacetin *O*-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and *N*-oxidation of carcinogenic arylamines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**:7696–7700.

Cairns P, Proctor AJ, Knowles MA (1991) Loss of heterozygosity at the *RB* locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma. *Oncogene*, **6**:2305–2309.

Cairns T (1979) The ED₀₁ study: Introduction, objectives, and experimental design. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, **3**:1–7.

Cartwright RA, Rogers HJ, Barham-Hall D, Glashan RW, Ahmad RA, Higgins E, Kahn MA (1982) Role of *N*-acetyltransferase phenotypes in bladder carcinogenesis: A pharmacogenetic epidemiological approach to bladder cancer. *Lancet*, **16**:842–846.

Cascorbi I, Roots I, Brockmoller J (2001) Association of *NAT1* and *NAT2* polymorphisms to urinary bladder cancer: Significantly reduced risk in subjects with *NAT1**10. *Cancer Research*, **61**:5051–5056.

Castelao JE, Yuan JM, Skipper PL, Tannenbaum SR, Gago-Dominguez M, Crowder JS, Ross RK, Yu MC (2001) Gender- and smoking-related bladder cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, **93**:538–545.

Chou HC, Lang NP, Kadlubar FF (1995) Metabolic activation of the *N*-hydroxy derivative of the carcinogen 4-aminobiphenyl by human tissue sulfotransferases. *Carcinogenesis*, **16**:413–417.

Clayson DB, Lawson TA, Santana S, Bonser GM (1965) Correlation between the chemical induction of hyperplasia and of malignancy in the bladder epithelium. *British Journal of Cancer*, **19**:297–310.

Clayson DB, Lawson TA, Pringle JAS (1967) The carcinogenic action of 2-aminodiphenylene oxide and 4-aminodiphenyl on the bladder and liver of C57 × IF mouse. *British Journal of Cancer*, **1**:755–762.

Coghlin J, Gann PH, Hammond SK, Skipper PL, Taghizadeh K, Paul M, Tannenbaum SR (1991) 4-Aminobiphenyl hemoglobin adducts in fetuses exposed to the tobacco smoke carcinogen in utero. *Journal of the National Cancer Institute*, **83**:274–280.

Cohen SM (1995) The role of urinary physiology and chemistry in bladder carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*, **33**:715–730.

Cohen SM, Ellwein LB (1990) Proliferative and genotoxic cellular effects in 2-acetylaminofluorene bladder and liver carcinogenesis: Biological modeling of the ED₀₁ study. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **104**:79–93.

Cordon-Cardo C, Reuter VE (1997) Alterations of tumor suppressor genes in bladder cancer. *Seminars in Diagnostic Pathology*, **14**:123–132.

Curigliano G, Zhang YJ, Wang LY, Flamini G, Alcini A, Ratto C, Giustacchini M, Alcini E, Cittadini A, Santella RM (1996) Immunohistochemical quantitation of 4-aminobiphenyl–DNA adducts and p53 nuclear overexpression in T1 bladder cancer of smokers and nonsmokers. *Carcinogenesis*, **17**:911–916.

Dang LN, McQueen CA (1999) Mutagenicity of 4-aminobiphenyl and 4-acetylbiphenyl in *Salmonella typhimurium* strains expressing different levels of *N*-acetyltransferase. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **159**:77–82.

Deichmann WB, MacDonald WE (1968) The non-carcinogenicity of a single dose of 4-aminobiphenyl in the dog. *Food and Cosmetics Toxicology*, **6**:143–146.

Deichmann WB, Radomski JL, Anderson WAD, Coplan MM, Woods FM (1958) The carcinogenic action of *p*-aminobiphenyl in the dog; final report. *Industrial Medicine and Surgery*, **27**:25–26.

Deichmann WB, Radomski JL, Glass E, Anderson WAD, Coplan M, Woods FM (1965) Synergism among oral carcinogens. Simultaneous feeding of four bladder carcinogens to dogs. *Industrial Medicine and Surgery*, **34**:640–649.

Delclos KB, Miller DW, Lay JO Jr, Casciano DA, Walker RP, Fu PP, Kadlubar FF (1987) Identification of C8-modified deoxyinosine and N2- and C8-modified deoxyguanosine as major products of the in vitro reaction of *N*-hydroxy-6-aminochrysene with DNA and the formation of these adducts in isolated rat hepatocytes treated with 6-nitrochrysene and 6-aminochrysene. *Carcinogenesis*, **8**:1703–1709.

Del Santo P, Moneti G, Salvadori M, Saltutti C, Delle RA, Dolara P (1991) Levels of the adducts of 4-aminobiphenyl to hemoglobin in control subjects and bladder carcinoma patients. *Cancer Letters*, **60**:245–251.

Doerge DR, Churchwell MI, Marques MM, Beland FA (1999) Quantitative analyses of 4-aminobiphenyl–C8-deoxyguanosyl DNA adducts produced in vitro and in vivo using HPLC–ES–MS. *Carcinogenesis*, **6**:1055–1061.

Dooley KL, Stavenuiter JF, Westra JG, Kadlubar FF (1988) Comparative carcinogenicity of the food pyrolysis product, 2-amino-5-phenylpyridine, and the known human carcinogen, 4-aminobiphenyl, in the neonatal B6C3F1 mouse. *Cancer Letters*, **41**:99–103.

Dooley KL, Von Tungeln LS, Bucci T, Fu PP, Kadlubar FF (1992) Comparative carcinogenicity of 4-aminobiphenyl and the food pyrolysates, Glu-P-1, IQ, PhIP, and MeIQx in the neonatal B6C3F1 male mouse. *Cancer Letters*, **62**:205–209.

Eaton DL, Gallagher EP, Bammler TK, Kunze KL (1995) Role of cytochrome P4501A2 in chemical carcinogenesis: Implications for human variability in expression and enzyme activity. *Pharmacogenetics*, **5**:259–274.

Faraglia B, Chen SY, Gammon MD, Zhang Y, Teitelbaum SL, Neugut AI, Ahsan H, Garbowski GC, Hibshoosh H, Lin D, Kadlubar FF, Santella RM (2003) Evaluation of 4-aminobiphenyl–DNA adducts in human breast cancer: The influence of tobacco smoke. *Carcinogenesis*, **24**:719–725.

Feng Z, Hu W, Rom WN, Beland FA, Tang MS (2002) *N*-Hydroxy-4-aminobiphenyl–DNA binding in human *p53* gene: Sequence preference and the effect of C5 cytosine methylation. *Biochemistry*, **41**:6414–6421.

Flamini G, Romano G, Curigliano G, Chiominto A, Capelli G, Boninsegna A, Signorelli C, Ventura L, Santella RM, Sgambato A, Cittadini A (1998) 4-Aminobiphenyl–DNA adducts in laryngeal tissue and smoking habits: An immunohistochemical study. *Carcinogenesis*, **19**:353–357.

Flammang TJ, Kadlubar FF (1986) Acetyl coenzyme A-dependent metabolic activation of *N*-hydroxy-3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl and several carcinogenic *N*-hydroxy arylamines in relation to tissue and species differences, other acyl donors, and arylhydroxamic acid-dependent acyltransferases. *Carcinogenesis*, **7**:919–926.

Flammang TJ, Couch LH, Levy GN, Weber WW, Wise CK (1992) DNA adduct levels in congenic rapid and slow acetylator mouse strains following chronic administration of 4-aminobiphenyl. *Carcinogenesis*, **13**:1887–1891.

Fletcher K, Tinwell H, Ashby J (1998) Mutagenicity of the human bladder carcinogen 4-aminobiphenyl to the bladder of MutaTMMouse transgenic mice. *Mutation Research*, **400**:245–250.

Frederickson SM, Hatcher JF, Reznikoff CA, Swaminathan S (1992) Acetyl transferase-mediated metabolic activation of *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl by human uroepithelial cells. *Carcinogenesis*, **13**:955–961.

Fretland AJ, Doll MA, Gray K, Feng Y, Hein DW (1997) Cloning, sequencing, and recombinant expression of NAT1, NAT2, and NAT3 derived from the C3H/HeJ (rapid) and A/HeJ (slow) acetylator inbred mouse: Functional characterization of the activation and deactivation of aromatic amine carcinogens. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **142**:360–366.

Gaylor DW (1979) The ED₀₁ study: Summary and conclusions. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, **3**:179–183.

Gorrod JW, Carter RL, Roe FJ (1968) Induction of hepatomas by 4-aminobiphenyl and three of its hydroxylated derivatives administered to newborn mice. *Journal of the National Cancer Institute*, **41**:403–410.

Hammons GJ, Guengerich FP, Weis CC, Beland FA, Kadlubar FF (1985) Metabolic oxidation of carcinogenic arylamines by rat, dog, and human hepatic microsomes and by purified flavin-containing and cytochrome P-450 monooxygenases. *Cancer Research*, **45**:3578–3585.

Hatcher JF, Swaminathan S (1992) Microsome-mediated transacetylation and binding of *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl to nucleic acids by hepatic and bladder tissues from dog. *Carcinogenesis*, **13**:1705–1711.

Hatcher JF, Swaminathan S (1995) Detection of deoxyadenosine-4-aminobiphenyl adduct in DNA of human uroepithelial cells treated with *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl following nuclease P1 enrichment and ³²P-postlabeling analysis. *Carcinogenesis*, **16**:295–301.

Hatcher JF, Swaminathan S (2002) Identification of *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-azobiphenyl by ³²P-postlabeling analyses of DNA in human uroepithelial cells exposed to proximate metabolites of the environmental carcinogen 4-aminobiphenyl. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **39**:314–322.

Hatcher JF, Rao KP, Swaminathan S (1993) Mutagenic activation of 4-aminobiphenyl and its *N*-hydroxy derivatives by microsomes from cultured human uroepithelial cells. *Mutagenesis*, **8**:113–120.

Hein DW (1988) Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, **948**:37–66.

Hein DW, Grant DM, Sim E (2000) *Arylamine N-acetyltransferase (NAT) nomenclature* (<http://louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html>).

Hickman ES, Moroni MC, Helin K (2002) The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Current Opinion in Genetics and Development*, **12**:60–66.

Hill AB (1965) The environment and disease: Association or causation? *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, **58**:295–300.

Hughes MF, Smith BJ, Eling TE (1992) The oxidation of 4-aminobiphenyl by horseradish peroxidase. *Chemical Research in Toxicology*, **5**:340–345.

IARC (1972) 4-Aminobiphenyl. In: *Some inorganic substances, chlorinated hydrocarbons, aromatic amines, N-nitroso compounds, and natural products*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, pp. 74–79 (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 1).

IARC (1986) *Tobacco smoking*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 421 pp. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 38).

IARC (1987) 4-Aminobiphenyl (Group 1). In: *Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, pp. 91–92 (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Supplement 7).

Ioachim E, Charchanti A, Stavropoulos NE, Skopelitou A, Athanassiou ED, Agnantis NJ (2000) Immunohistochemical expression of retinoblastoma gene product (Rb), p53 protein, MDM2, c-erbB-2, HLA-DR and proliferation indices in human urinary bladder carcinoma. *Histology and Histopathology*, **15**:721–727.

Ishikawa J, Xu HJ, Hu SX, Yandell DW, Maeda S, Kamidono S, Benedict WF, Takahashi R (1991) Inactivation of the retinoblastoma gene in human bladder and renal cell carcinomas. *Cancer Research*, **51**:5736–5743.

Kadlubar FF, Miller JA, Miller EC (1977) Hepatic microsomal *N*-glucuronidation and nucleic acid binding of *N*-hydroxy arylamines in relation to urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Research*, **37**:805–814.

Kadlubar FF, Frederick CB, Weis CD, Zenser TV (1982) Prostaglandin endoperoxide synthetase-mediated metabolism of carcinogenic aromatic amines and their binding to DNA and protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **108**:253–258.

Kadlubar FF, Dooley KL, Teitel CH, Roberts DW, Benson RW, Butler MA, Bailey JR, Young JF, Skipper PW, Tannenbaum SR (1991) Frequency of urination and its effects on metabolism, pharmacokinetics, blood hemoglobin adduct formation, and liver and urinary bladder DNA adduct levels in beagle dogs given the carcinogen 4-aminobiphenyl. *Cancer Research*, **51**:4371–4377.

Kimura S, Kawabe M, Ward JM, Morishima H, Kadlubar FF, Hammons GJ, Fernandez-Salguero P, Gonzalez FJ (1999) CYP1A2 is not the primary enzyme responsible for 4-aminobiphenyl-induced hepatocarcinogenesis in mice. *Carcinogenesis*, **20**:1825–1830.

Koss LG, Melamed MR, Ricci A, Melick WF, Kelly RE (1965) Carcinogenesis in the human urinary bladder. Observations after exposure to *para*-aminodiphenyl. *New England Journal of Medicine*, **272**:767–770.

Koss LG, Melamed MR, Kelly RE (1969) Further cytologic and histologic studies of bladder lesions in workers exposed to *para*-aminodiphenyl: Progress report. *Journal of the National Cancer Institute*, **43**:233–243.

Kriek E (1992) Fifty years of research on *N*-acetyl-2-aminofluorene, one of the most versatile compounds in experimental research. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **118**:481–489.

Lakshmi VM, Mattammal MB, Zenser TV, Davis BB (1990) Mechanism of peroxidative activation of the bladder carcinogen 2-amino-4-(5-nitro-2-furyl)-thiazole (ANFT): Comparison with benzidine. *Carcinogenesis*, **11**:1965–1970.

Lang M, Pelkonen O (1999) Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. *IARC Scientific Publications*, **148**:13–22.

Littlefield NA, Farmer JH, Gaylor DW, Sheldon WG (1979) Effects of dose and time in a long-term, low-dose carcinogenic study. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, **3**:17–34.

Logothetis CJ, Xu HJ, Ro JY, Hu SX, Sahin A, Ordonez N, Benedict WF (1992) Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **84**:1256–1261.

Lower GM Jr, Nilsson T, Nelson CE, Wolf H, Gamsky TE, Bryan GT (1979) *N*-Acetyltransferase phenotype and risk in urinary bladder cancer: Approaches in molecular epidemiology. Preliminary results in Sweden and Denmark. *Environmental Health Perspectives*, **29**:71–79.

Lu ML, Wikman F, Orntoft TF, Charytonowicz E, Rabbani F, Zhang Z, Dalbagni G, Pohar KS, Yu G, Cordon-Cardo C (2002) Impact of alterations affecting the p53 pathway in bladder cancer on clinical outcome, assessed by conventional and array-based methods. *Clinical Cancer Research*, **8**:171–179.

Manjanatha MG, Li EE, Fu PP, Heflich RH (1996) H- and K-*ras* mutational profiles in chemically induced liver tumours from B6C3F1 and CD-1 mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **47**:195–208.

Martone T, Airoidi L, Magagnotti C, Coda R, Randone D, Malaveille C, Avanzi G, Merletti F, Hautefeuille A, Vineis P (1998) 4-Aminobiphenyl–DNA adducts and p53 mutations in bladder cancer. *International Journal of Cancer*, **75**:512–516.

Mattano SS, Land S, King CM, Weber WW (1989) Purification and biochemical characterization of hepatic arylamine *N*-acetyltransferase from rapid and slow acetylators mice: Identity with arylhydroxamic acid *N,O*-acetyltransferase and *N*-hydroxyarylamines *O*-acetyltransferase. *Molecular Pharmacology*, **68**:599–609.

McQueen CA, Chau B, Erickson RP, Tjalkens RB, Philbert MA (2003) The effects of genetic variation in *N*-acetyltransferases on 4-aminobiphenyl genotoxicity in mouse liver. *Chemico-Biological Interactions*, **146**:51–60.

Melamed MR, Koss LG, Ricci A, Whitmore WF Jr (1960) Cytohistological observations on developing carcinoma of urinary bladder in man. *Cancer (Philadelphia)*, **13**:67–74.

- Melick WF, Escue HM, Naryka JJ, Mezera RA, Wheeler EP (1955) The first reported cases of human bladder tumors due to a new carcinogen—Xenylamine. *Journal of Urology (Baltimore)*, **74**:760–766.
- Melick WF, Naryka JJ, Kelly RE (1971) Bladder cancer due to exposure to *para*-aminobiphenyl: A 17-year follow-up. *Journal of Urology (Baltimore)*, **106**:220–226.
- Merck (1998) *Merck veterinary manual*. Whitehouse Station, NJ, Merck & Co., Inc.
- Miller JA, Miller EC (1977) Ultimate chemical carcinogens as reactive mutagenic electrophiles. In: Hiatt HH, Watson JD, Winsten JA, eds. *Origins of human cancer*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 605–627.
- Miller JA, Wyatt CS, Miller EC, Hartmann HA (1961) The *N*-hydroxylation of 4-acetylaminobiphenyl by the rat and dog and the strong carcinogenicity of *N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl in the rat. *Cancer Research*, **21**:1465–1473.
- Oda Y (2004) Analysis of the involvement of human *N*-acetyltransferase 1 in the genotoxic activation of bladder carcinogenic arylamines using a SOS/umu assay system. *Mutation Research*, **554**:399–406.
- Oscarson M, Ingelman-Sundberg M, Daly AK, Nebert DW (n.d.) *Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee* (<http://www.cypalleles.ki.se/>).
- Parsons BL, Culp SJ, Manjanatha MG, Heflich RH (2002) Occurrence of H-*ras* codon 61 CAA to AAA mutation during mouse liver tumor progression. *Carcinogenesis*, **23**:943–948.
- Parsons BL, Beland FA, Von Tungeln LS, Delongchamp RR, Fu P, Heflich RH (2005) Levels of 4-aminobiphenyl-induced somatic H-*ras* mutation in mouse liver correlate with potential for liver tumor development. *Molecular Carcinogenesis*, **42**:193–201.
- Pauli BU, Alroy J, Weinstein RS (1983) The ultrastructure and pathobiology of urinary bladder cancer. In: Bryan GT, Cohen SM, eds. *The pathology of bladder cancer, Vol. II*. Boca Raton, FL, CRC Press, pp. 41–140.
- Poirier MC, Beland FA (1992) DNA adduct measurements and tumor incidence during chronic carcinogen exposure in animal models: Implications for DNA adduct-based human cancer risk assessment. *Chemical Research in Toxicology*, **5**:749–755.
- Poirier MC, Fullerton NF, Smith BA, Beland FA (1995) DNA adduct formation and tumorigenesis in mice during the chronic administration of 4-aminobiphenyl at multiple dose levels. *Carcinogenesis*, **16**:2917–2921.
- Presti JCJ, Reuter VE, Galan T, Fair WR, Cordon-Cardo C (1991) Molecular genetic alterations in superficial and locally advanced human bladder cancer. *Cancer Research*, **51**:5405–5409.

Primdahl H, von der Maase H, Christensen M, Wolf H, Orntoft TF (2000) Allelic deletions of cell growth regulators during progression of bladder cancer. *Cancer Research*, **60**:6623–6629.

Reznikoff CA, Loretz LJ, Johnson MD, Swaminathan S (1986) Quantitative assessments of the cytotoxicity of bladder carcinogens towards cultured normal human uroepithelial cells. *Carcinogenesis*, **7**:1625–1632.

Roberts DW, Benson RW, Groopman JD, Flammang TJ, Nagle WA, Moss AJ, Kadlubar FF (1988) Immunochemical quantitation of DNA adducts derived from the human bladder carcinogen 4-aminobiphenyl. *Cancer Research*, **48**:6336–6342.

Sachse C, Bhambra U, Smith G, Lightfoot TJ, Barrett JH, Scollay J, Garner RC, Boobis AR, Wolf CR, Gooderham NJ, Colorectal Cancer Study Group (2003) Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (*CYP1A2*) in colorectal cancer patients and controls: Allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **55**:68–76.

Sarkar MA, Nseyo UO, Zhong B-Z (2002) Mutagenic outcome of the urinary carcinogen 4-aminobiphenyl is increased in acidic pH. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **11**:23–26.

Schieferstein GJ, Littlefield NA, Gaylor DW, Sheldon WG, Burgers GT (1985) Carcinogenesis of 4-aminobiphenyl in BALB/cStCrlfC3Hf/Nctr mice. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, **21**:865–873.

Schroeder JC, Conway K, Li Y, Mistry K, Bell DA, Taylor JA (2003) *p53* mutations in bladder cancer: Evidence for exogenous versus endogenous risk factors. *Cancer Research*, **63**:7530–7538.

Sesardic D, Boobis AR, Edwards RJ, Davies DS (1988) A form of cytochrome P450 in man, orthologous to form *d* in the rat, catalyses the *O*-deethylation of phenacetin and is inducible by cigarette smoking. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **26**:363–372.

Skipper PL, Tannenbaum SR, Ross RK, Yu MC (2003) Nonsmoking-related arylamine exposure and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, **12**:503–507.

Smith BJ, Curtis JF, Eling TE (1991) Bioactivation of xenobiotics by prostaglandin H synthase. *Chemico-Biological Interactions*, **79**:245–264.

Sonich-Mullin C, Fielder R, Wiltse J, Baetcke K, Dempsey J, Fenner-Crisp P, Grant D, Hartley M, Knaap A, Krose D, Mangelsdorf I, Meek E, Rice JM, Younes M (2001) IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **34**:146–152.

Swaminathan S, Reznikoff CA (1992) Metabolism and nucleic acid binding of *N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl and *N*-acetoxy-4-acetylaminobiphenyl by cultured human uroepithelial cells. *Cancer Research*, **52**:3286–3294.

Talaska G, Dooley KL, Kadlubar FF (1990) Detection and characterization of carcinogen–DNA adducts in exfoliated urothelial cells from 4-aminobiphenyl-treated dogs by ³²P-postlabelling and subsequent thin-layer and high-pressure liquid chromatography. *Carcinogenesis*, **11**:639–646.

Tiguert R, Bianco FJJ, Oskanian P, Li Y, Grignon DJ, Wood DPJ, Pontes JE, Sarkar FH (2001) Structural alteration of p53 protein in patients with muscle invasive bladder transitional cell carcinoma. *Journal of Urology*, **166**:2155–2160.

Tsuneoka Y, Dalton TP, Miller ML, Clay CD, Shertzer HG, Talaska G, Medvedovic M, Nebert DW (2003) 4-Aminobiphenyl-induced liver and urinary bladder DNA adduct formation in Cyp1a2(–/–) and Cyp1a2(+ / +) mice. *Journal of the National Cancer Institute*, **95**:1227–1237.

Underwood PM, Zhou Q, Jaeger M, Reilman R, Pinney S, Warshawsky D, Talaska G (1997) Chronic, topical administration of 4-aminobiphenyl induces tissue-specific DNA adducts in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **144**:325–331.

Verghis SBM, Essigmann JM, Kadlubar FF, Morningstar ML, Lasko DD (1997) Specificity of mutagenesis by 4-aminobiphenyl: Mutations at G residues in bacteriophage M13 DNA and G → C transversions at a unique dG^{8-ABP} lesion in single-stranded DNA. *Carcinogenesis*, **18**:2403–2414.

Vineis P, Caporaso N, Tannenbaum SR, Skipper PL, Glogowski J, Bartsch H, Coda M, Talaska G, Kadlubar FF (1990) Acetylation phenotype, carcinogen–hemoglobin adducts, and cigarette smoking. *Cancer Research*, **50**:3002–3004.

Von Tungeln LS, Bucci TJ, Hart RW, Kadlubar FF, Fu PP (1996) Inhibitory effect of caloric restriction on tumorigenicity induced by 4-aminobiphenyl and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridine (PhIP) in the CD1 newborn mouse bioassay. *Cancer Letters*, **104**:133–136.

Vousden KH, Lu X (2002) Live or let die: The cell's response to p53. *Nature Reviews. Cancer*, **2**:594–604.

Walpole AL, Williams MHC, Roberts DC (1952) The carcinogenic action of 4-aminodiphenyl and 3:2'-dimethyl-4-aminodiphenyl. *British Journal of Industrial Medicine*, **9**:255–263.

Walpole AL, Williams MHC, Roberts DC (1954) Tumours of the urinary bladder in dogs after ingestion of 4-aminodiphenyl. *British Journal of Industrial Medicine*, **11**:105–109.

Weston A, Caporaso NE, Taghizadeh K, Hoover RN, Tannenbaum SR, Skipper PL, Resau JH, Trump BF, Harris CC (1991) Measurement of 4-aminobiphenyl–hemoglobin adducts in lung cancer cases and controls. *Cancer Research*, **51**:5219–5223.

Wright C, Thomas D, Mellon K, Neal DE, Horne CH (1995) Expression of retinoblastoma gene product and p53 protein in bladder carcinoma: Correlation with Ki67 index. *British Journal of Urology*, **75**:173–179.

Wu XR, Lin JH, Walz T, Haner M, Yu J, Aebersold U, Sun TT (1994) Mammalian uroplakins. A group of highly conserved urothelial differentiation-related membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **269**:13716–13724.

FORMALDEHYDE AND GLUTARALDEHYDE AND NASAL CYTOTOXICITY: CASE-STUDY WITHIN THE CONTEXT OF THE IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS¹

Douglas McGregor, Hermann Bolt, Vincent Cogliano, & Hans-Bernhard Richter-Reichhelm

Formaldehyde and glutaraldehyde cause toxicity to the nasal epithelium of rats and mice upon inhalation. In addition, formaldehyde above certain concentrations induces dose-related increases in nasal tumours in rats and mice, but glutaraldehyde does not. Using the 2006 International Programme on Chemical Safety (IPCS) human framework for the analysis of cancer mode of action (MOA), an MOA for formaldehyde was formulated and its relevance tested against the properties of the non-carcinogenic glutaraldehyde. These compounds produce similar patterns of response in histopathology and in genotoxicity tests (although formaldehyde has been much more extensively studied). The MOA is based on the induction of sustained cytotoxicity and reparative cell proliferation induced by formaldehyde at concentrations that also induce nasal tumours upon long-term exposure. Data on dose dependency and temporal relationships of key events are consistent with this MOA. While a genotoxic MOA can never be ruled out for a compound that is clearly genotoxic, at least in vitro, the non-genotoxic properties fundamental to the proposed MOA can explain the neoplastic response in the nose and may be more informative than genotoxicity in risk assessment. It is not yet fully explained why glutaraldehyde remains non-carcinogenic upon inhalation, but its greater inherent toxicity may be a key factor. The dual aldehyde functions in glutaraldehyde are likely to produce damage resulting in fewer kinetic possibilities (particularly for proteins involved in differentiation control) and lower potential for repair (nucleic acids) than would be the case for formaldehyde. While there have been few studies of possible glutaraldehyde-associated cancer, the evidence that formaldehyde is a human carcinogen is strong for nasopharyngeal cancers, although less so for sinonasal cancers. This apparent discrepancy could be due in part to the classification of human nasal tumours with tumours of the sinuses, which would receive much less exposure to inhaled formaldehyde. Evaluation of the human relevance of the proposed MOA of formaldehyde in rodents is restricted by human data limitations, although the key events are plausible. It is clear that the human relevance of the formaldehyde MOA in rodents cannot be excluded on either kinetic or dynamic grounds.

INTRODUCTION

Formaldehyde and glutaraldehyde are aliphatic mono- and dialdehydes, respectively, that undergo reactions typical of aldehydes to form acetals, cyanohydrins, oximes, hydrazones, and bisulfite complexes. They are highly reactive chemicals and produce covalently cross-linked complexes with DNA and proteins. Their metabolism has some commonality in that they are both oxidized by aldehyde dehydrogenases. Several studies have demonstrated that inhalation exposure to formaldehyde causes nasal tumours in rats, whereas no nasal tumours were observed in the only 2-year inhalation study of rats exposed to glutaraldehyde.

¹ This article, to which WHO owns copyright, was originally published in 2006 in *Critical Reviews in Toxicology*, Volume 36, pages 821–835. It has been edited for this WHO publication and includes corrigenda.

Formaldehyde

Formaldehyde has been tested for carcinogenicity by the inhalation route in mice, rats, and Syrian hamsters, by oral administration (drinking-water) in rats, by skin application in mice, and by subcutaneous injection in rats. There is conclusive evidence from the inhalation studies that formaldehyde is a carcinogen in rats.

There is considerable evidence that prolonged inhalation exposure to formaldehyde induces highly non-linear dose-related increases in the incidence of tumours of the anterior and posterior lateral meatus of rats (Morgan et al., 1986; Feron et al., 1988; Woutersen et al., 1989; Monticello et al., 1996; Kamata et al., 1997; CIIT, 1999). There are sharp increases in tumour incidence at formaldehyde concentrations equal to and greater than 7.2 mg/m³. Exposure to concentrations of 2.4 mg/m³ and lower induced no malignant nasal tumours. Table 1 combines the data from two published rat studies (Kerns et al., 1983a; Monticello et al., 1996) conducted at the same laboratory and some additional information from one of these studies on a number of rats that had not been examined at the time of the publications (Schlosser et al., 2003). The majority of formaldehyde-induced neoplasms were squamous cell carcinomas.

Table 1. Combined incidence of nasal squamous cell carcinomas in rats exposed to formaldehyde.

<i>Formaldehyde concentration (mg/m³)</i>	<i>Number of rats at risk^a</i>	<i>Actual number of tumours^b</i>
0	122	0
0.84	27	0
2.4	126	0
7.2	113	3
12	34	22
18	182	157

Note: Adapted from Schlosser et al. (2003).

^a Rats at risk are those that survived to 2 years and were examined at that time plus those that died before 2 years in which tumours were found.

^b Rats in which tumours were found at or before 2 years.

In contrast, inhalation studies in Syrian hamsters showed no carcinogenic effect at a single dose of 12.3 mg/m³ (Dalbey, 1982), and one of two inhalation studies in mice showed no effect in females and squamous cell carcinomas in 2/17 males killed at 2 years at a high-dose concentration of 17.6 mg/m³ (Kerns et al., 1983a, 1983b), whereas the other was inadequate for evaluation (Horton et al., 1963).

Studies on rats using other routes of exposure produced no significant results in two of four drinking-water studies (Takahashi et al., 1986; Tobe et al., 1989), forestomach papillomas in one study (Til et al., 1989), and leukaemia and gastrointestinal tract tumours in another (Soffritti et al., 1989), but the interpretation of the last study has been questioned (Feron et al., 1990). Mouse skin application and subcutaneous injection studies were not suitable for evaluation. In no study in rodents was there a significant increase in nasal tumours other than in the five inhalation exposure studies in rats—that is, at the entry portal.

Glutaraldehyde

Glutaraldehyde has been tested for carcinogenicity by the inhalation route in mice and rats and by oral administration (drinking-water) in rats. Inhalation studies showed no carcinogenic effect in either B6C3F1 mice exposed to a single concentration of 400 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ for 78 weeks (Zissu et al., 1998) or multiple concentrations up to 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ for 2 years (NTP, 1999) or F344 rats exposed to concentrations of up to 3000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ for 2 years (NTP, 1999). In a drinking-water study in which male and female F344 rats were exposed to glutaraldehyde concentrations of up to 4000 mg/m^3 for 2 years, increased incidences of large granular cell lymphatic leukaemia were found in the spleen of females at all exposure concentrations (Ballantyne, 1995; Van Miller et al., 1995).

1. IS THE WEIGHT OF EVIDENCE SUFFICIENT TO ESTABLISH A MODE OF ACTION (MOA) IN ANIMALS?

A. Postulated mode of action

Prolonged exposure to formaldehyde above a critical concentration induces sustained cytotoxicity and cell proliferation. As a result of genetic changes within this proliferating cell population, neoplasia emerges. The genetic changes are postulated to be secondary to the cytotoxicity, metaplasia, and hyperplasia that are clearly induced by formaldehyde. Formaldehyde is a genotoxic substance in vitro and forms DNA–protein cross-links (DPX). DPX are a well established indicator of formaldehyde exposure, but it is not clear whether they are premutational lesions required to produce neoplasia (by initiating DNA replication errors, resulting in mutation). Apart from the abundance of DPX observations in rats, there is little evidence that formaldehyde is mutagenic to mammalian cells in vivo.

This postulated MOA is mainly based on observations of consistent, non-linear dose–response relationships for all three key events (sustained cell proliferation, DPX, and tumours) and concordance of incidence of these effects across regions of the nasal passages.

B. Key events

Formaldehyde

Limitation of damage to the entry portal following exposure to formaldehyde is clearly important, with metabolism playing a significant role in the process. The importance of the entry portal for formaldehyde-induced nasal tumours is supported by the observation that the principal non-neoplastic effect in rats exposed orally to formaldehyde solutions is the development of histological changes within the forestomach and glandular stomach (Til et al., 1989; Tobe et al., 1989).

Formaldehyde is an endogenous metabolic product of *N*-, *O*-, and *S*-demethylation reactions within cells (Hardman et al., 2001), and circulating concentrations of about 2.0–2.6 $\mu\text{g}/\text{g}$ blood are normal in unexposed mammals (Heck et al., 1982, 1985; Casanova et al., 1988). Exogenous formaldehyde is rapidly detoxified upon absorption. It has a half-life in plasma of about 1 min in rats exposed intravenously (Rietbrock, 1965), and it readily and spontaneously combines with reduced glutathione to form *S*-hydroxymethylglutathione, the substrate for alcohol dehydrogenase 3 (ADH3, also known as glutathione-dependent formaldehyde

dehydrogenase) (Uotila & Koivusalo, 1974; Koivusalo et al., 1989), to form *S*-formylglutathione, which is further metabolized to formic acid and reduced glutathione by *S*-formylglutathione hydrolase (Uotila & Koivusalo, 1997). The K_M for initial binding of hydroxymethylglutathione with ADH3 is about 0.004 mmol/l, and the concentration of free formaldehyde is likely to be even lower (Uotila & Koivusalo, 1997; Hedberg et al., 1998). It may be toxicologically significant that formaldehyde also combines with thiols such as cysteine and cysteinylglycine (Holmquist & Vallee, 1991). In addition to this efficient metabolic detoxification mechanism, the mucociliary apparatus provides protection of the underlying epithelium from gases and vapours. Thus, in order to attain free formaldehyde concentrations that may be cytotoxic to the target tissue, relatively high concentrations of formaldehyde vapour must be delivered to the target site to overcome these protective mechanisms. Mechanistic events of clear significance for carcinogenicity occur at dose levels where formaldehyde detoxification mechanisms are saturated in rats (Casanova & Heck, 1987).

The predominant non-neoplastic and preneoplastic events that have been measured and associated with nasal cancer formation following inhalation exposure of the nasal epithelium to formaldehyde include cytotoxicity, DPX formation, nasal epithelial cell regenerative proliferation, squamous metaplasia, and inflammation, which are site-specific, highly non-linear response processes in concordance with the incidence of nasal tumours.

The relative magnitude of an increase in cell proliferation is dependent upon the size of the target cell population within specific regions of the nasal cavity and not always directly related to the length of exposure, or total cumulative exposure (Swenberg et al., 1983, 1986; Monticello et al., 1991, 1996; Monticello & Morgan, 1994). These factors have been well defined and measured in a number of studies in rat, monkey, and human epithelial cells. In a 24-month carcinogenicity assay with interim sacrifices at 3, 6, 12, and 18 months, cell proliferation was demonstrated in rats exposed to 7.2, 12, and 18 mg/m³ at all times (Monticello et al., 1991, 1996).

An immunohistochemical technique was used to assess the presence of p53 protein, a marker of cell proliferation (proliferating cell nuclear antigen, or PCNA), and tumour growth factor (TGF)- α in the histopathological sections of the same tumours. In addition to the p53-positive immunostaining in squamous cell carcinomas, especially in cells with keratinization, p53-positive immunostaining was observed in preneoplastic hyperkeratotic plaques, while normal nasal mucosa did not stain. A correlation was found between the distribution of immunostaining of PCNA and that of p53 (Wolf et al., 1995).

The formation of DPX in rats is a non-linear function of concentration (Casanova & Heck, 1987; Casanova et al., 1989, 1994; Heck & Casanova, 1995) and correlates with the site specificity of tumours (Casanova et al., 1994). Cross-links were not detected in the olfactory mucosa or in the bone marrow of rats (Casanova-Schmitz et al., 1984; Casanova & Heck, 1987). DPX have been found in rhesus monkeys following inhalation exposure to formaldehyde, with the highest concentrations in the middle turbinates, followed by the anterior lateral wall septum and nasopharynx (Casanova et al., 1991).

Studies of rats, mice, Syrian hamsters, and rhesus monkeys exposed to formaldehyde for 13 (mice) or 26 weeks found that squamous metaplasia in the nasal turbinates developed in rats and rhesus monkeys at 3.7 mg/m^3 , but not in Syrian hamsters or, at 4.9 mg/m^3 , in mice (Rusch et al., 1983; Maronpot et al., 1986). Cell replication is also a feature of the more tumour-susceptible areas of the nasal epithelium of rats (Casanova et al., 1994).

Glutaraldehyde

Inhalation exposure to glutaraldehyde at $400 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ for 78 weeks resulted in non-neoplastic lesions in the nasal vestibule of female mice, consisting of hyperplasia of the squamous epithelium lining the dorsal wall and the lateral aspect of the atrioturbinate (Zissu et al., 1998).

In the United States National Toxicology Program (NTP) studies of glutaraldehyde, the nasal changes observed in male and female rats included the following:

1. In the squamous epithelium in the most rostral part of the nasal passage, behind the external nares, there were increased incidences of hyperplasia and inflammation. The hyperplasia was a minimal to marked change characterized by variable thickening of the epithelium due to an increase in the number of cell layers and, in the more severe cases, varying degrees of keratin accumulation.
2. In the respiratory epithelium, there was hyperplasia, minimal goblet cell hyperplasia (primarily along the nasal septum and ventral meatus), inflammation, and squamous metaplasia, with accumulation of keratin on the epithelial surface in the more severe cases.
3. In the olfactory epithelium of the dorsal meatus, there were slightly increased incidences of hyaline degeneration.

The glutaraldehyde-associated inflammation that was observed in the squamous epithelial and respiratory epithelial regions was a minimal to marked change consisting of multifocal to locally extensive infiltrates of neutrophils, lymphocytes, and plasma cells. Occasionally, there were a few macrophages within the lamina propria and, in severe cases, within the epithelium itself. In male and female mice of this same study, the lesions were qualitatively similar to those found in rats. Females were more severely affected than male mice.

Glutaraldehyde induced DPX in a TK6 human lymphoblast cell line (St. Clair et al., 1991). In vivo, glutaraldehyde induced cell proliferation (S-phase nuclei) in nasal cells in rats and mice exposed by inhalation (Gross et al., 1994) and nasal instillation (St. Clair et al., 1990). In a parallel nasal instillation study by the same authors, formaldehyde induced the same level of cell proliferation at 20-fold higher molar concentrations.

C. Dose–response relationship

Formaldehyde

Available data from rats exposed to formaldehyde show a highly non-linear dose–response pattern for the key events, with no observed effects at 2.4 mg/m^3 , a minimal response at 7.2 mg/m^3 , and a sharp increase at 12 and 18 mg/m^3 .

In rats exposed to formaldehyde, no increases in cell turnover or DNA synthesis were found in the nasal mucosa after subchronic or chronic exposure to concentrations of $\leq 2.4 \text{ mg/m}^3$ (Rusch et al., 1983; Zwart et al., 1988; Monticello et al., 1991; Casanova et al., 1994). Small, site-specific increases in the rate of cell turnover were noted at 3.7 mg/m^3 (6 h/day, 5 days/week, for 13 weeks) in Wistar rats (Zwart et al., 1988) and in the rate of DNA synthesis at 7.2 mg/m^3 in Fischer 344 rats exposed for a similar period (Casanova et al., 1994). At these concentrations, however, an adaptive response would seem to occur in rat nasal epithelium, since cell turnover rates after 6 weeks (Monticello et al., 1991) or 13 weeks (Zwart et al., 1988) are lower than those after 1–4 days of exposure. The unit length labelling index (ULLI) method was used to establish the proliferation in male Fischer 344 rats exposed to formaldehyde concentrations of 0, 0.84, 2.4, 7.2, 12, or 18 mg/m^3 for 6 h/day, 5 days/week, for 3, 6, 12, 18, or 24 months. Significant increases in ULLI were present only in the 12 and 18 mg/m^3 groups, with the greater increases on the anterior lateral meatus and the medial maxilloturbinate. Elevated ULLI in the anterior dorsal septum developed later in the course of the exposure. This belated elevation of ULLI may have been secondary to changes in airflow patterns and thus local formaldehyde concentrations associated with growth of lesions and distortion of the airspace in those areas of the nose more susceptible to neoplasia (Monticello et al., 1996).

The non-linear relationships for formaldehyde-induced DPX formation, epithelial cell proliferation, and subsequently nasal tumours are demonstrated in [Table 2](#). It is arguable that the designations of high- and low-tumour areas proposed by Casanova et al. (1994) are not the most appropriate, and consequently the truly high tumour incidence region DPX response may have been diluted by that of the intermediate tumour incidence (posterior lateral meatus) region.

Other studies showed that Fischer 344 rats exposed to 1.2 mg/m^3 (22 h/day, 7 days/week, for 26 weeks) developed no detectable nasal lesions, whereas at 3.6 mg/m^3 , the only histological change was squamous metaplasia in the nasal turbinates (Rusch et al., 1983). The development of mild squamous metaplasia was similarly demonstrated in the nasal turbinates of Fischer 344 rats exposed to 2.4 mg/m^3 (6 h/day, 5 days/week, for 24 months) (Kerns et al., 1983b). Epithelial dysplasia and rhinitis were also observed in these rats. The occurrence of squamous metaplasia appears to be the histological feature requiring the lowest formaldehyde concentration of any of the in vivo responses reported.

A rat, anatomically accurate computational fluid dynamics model was used to test whether the distribution of formaldehyde-induced squamous metaplasia was related to the location of high-flux regions posterior to the squamous epithelium. Squamous metaplasia was considered present when $\geq 50\%$ of a subsection was lined by squamous epithelium. No squamous metaplasia was present in sections of nose from rats exposed to 2.4 mg/m^3 or less. Squamous metaplasia was present on the lateral meatus after exposure to 7.2 mg/m^3 or more and on the lateral and medial walls of the airway after exposure to 12 or 18 mg/m^3 (Kimbell et al., 1997).

There is evidence that glutathione-mediated detoxification of formaldehyde within nasal tissues becomes saturated in rats at inhalation exposures above 4.8 mg/m^3 . This saturation of

formaldehyde metabolism may contribute to the non-linearity of the dose–response relationships for DPX, cell proliferation, and tumour incidence at exposures above this level (Casanova & Heck, 1987).

Table 2. Comparative effects of formaldehyde exposure upon cell proliferation, DNA–protein cross-linking, and tumour incidence.

Formaldehyde concentration (mg/m ³)	Cell proliferation ([³ H]thymidine-labelled cells/mm basement membrane) ^a			DNA–protein cross-link formation (pmol [¹⁴ C]-formaldehyde bound/mg DNA) ^b		Incidence of nasal carcinoma ^c			
	Anterior lateral meatus	Posterior lateral meatus	Anterior mid-septum	“High-tumour region”	“Low-tumour region”	All sites	Anterior lateral meatus	Posterior lateral meatus	Anterior mid-septum
0	10.11	7.69	6.58	0	0	0/90	0/90	0/90	0/90
0.84	10.53	7.82	8.04	5	5	0/90	0/90	0/90	0/90
2.4	9.83	11.24	12.74	8	8	0/96	0/96	0/96	0/96
7.2	15.68	9.96	4.15	30	10	1/90	1/90	0/90	0/90
12	76.79	15.29	30.01	–	–	20/90	12/90	2/90	0/90
18	93.22	59.52	75.71	150	60	69/147	17/147	9/147	8/147

^a Cell proliferation measured in three locations of the nasal epithelium in male F344 rats exposed to the indicated concentrations of formaldehyde, 6 h/day, 5 days/week, for 3 months (Monticello et al., 1996).

^b Extent of DNA–protein cross-link formation measured in two regions of the nasal cavity (respiratory mucosa) in male F344 rats exposed to the indicated concentrations of formaldehyde, 6 h/day, 5 days/week, for about 12 weeks; the complete lateral meatus was designated the “high-tumour region”; the “low-tumour region” comprised the medial aspects of naso- and maxilloturbinates, posterior lateral wall, posterior dorsal septum excluding olfactory region, and nasopharyngeal meatuses (Casanova et al., 1994). Data were derived from graphical representations in the reference cited.

^c Incidence of nasal tumours within the entire nasal cavity or the anterior lateral meatus, posterior lateral meatus, or anterior mid-septum in male F344 rats exposed to the indicated concentrations of formaldehyde, 6 h/day, 5 days/week, for 24 months (Monticello et al., 1996).

Glutaraldehyde

A series of repeated-dose experiments with rats and mice exposed to glutaraldehyde has been summarized by NICNAS (1994). Among these, the lowest concentration producing lesions of the nasal cavity of rats was 1000 µg/m³ (6 h/day, 5 days/week, for 13 weeks) (NTP, 1993). The most severe lesions occurred in the anterior portions of the nasal passages and involved both the respiratory and olfactory epithelium. Hyperplasia and squamous metaplasia were most commonly noted on the lateral wall of the nasal cavity and on the tips of the nasoturbinates. Lesions were most extensive in rats exposed to 4000 µg/m³, but were also noted in the 1000 and 2000 µg/m³ groups and in one male exposed to 500 µg/m³. In another study in rats, no nasal lesions were observed at concentrations up to 776 µg/m³ delivered for 14 weeks (Bushy Run, 1983).

Mice appeared to be more sensitive to glutaraldehyde inhalation in a 13-week study, with inflammation of the nasal cavity being observed in female mice even at the lowest concentration of 250 µg/m³ and in male mice at 1000 µg/m³. The species difference in

sensitivity is probably due to the smaller airways of mice being more prone to blockage by debris (NTP, 1993). Histopathological lesions in the respiratory tract were most severe in mice in the 4000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ group and consisted of minimal to mild squamous metaplasia of the laryngeal epithelium, suppurative inflammation in the anterior parts of the nasal cavity, and minimal squamous metaplasia on the tips of the nasoturbinates. Necrosis and inflammation were noted at lower concentrations, primarily in the anterior portion of the nasal passage.

In the NTP (1993) 13-week studies with glutaraldehyde, there were significant, exposure-related increases in ULLI in the squamous epithelium of the nasal vestibule and, to a lesser extent, the respiratory epithelium of the atrioturbinate of the dorsal meatus. The exposure-related increase in cell replication was generally greater in rats than in mice. Upon examining the results in individual mice, it was found that there was an increased rate of cell replication in the squamous epithelium of the nasal vestibule only of those mice in which there was also neutrophilic infiltration of the mucosa; however, the severity of the infiltrate did not correlate with the degree of cell proliferation. These observations were clearest at 13 weeks, particularly in female mice. In rats, in addition to increased replication in the squamous epithelium of the vestibule, there was an equally prominent increase in replication in the respiratory epithelium of the dorsal atrioturbinate, whereas in mice, the response in this area was weak.

D. Temporal association

Formaldehyde

A number of short-, medium-, and long-term studies of the effect of formaldehyde exposure on cell proliferation within the respiratory epithelium of rats have indicated a sustained increase in proliferation of nasal epithelial cells following exposure to concentrations greater than 2.4 mg/m^3 , irrespective of the exposure period. Cell proliferation was observed in rats exposed to formaldehyde for periods from as short as 3 days. In the ULLI study already described, the magnitude of increased cell proliferation generally decreased over time but remained significantly increased by approximately 2- to 10-fold over controls, for certain nasal locations, up to and including the 18-month observation period when this effect was last examined (Monticello et al., 1996).

Data relating to temporal associations for DPX are limited, as most formaldehyde inhalation studies of DPX formation are of short duration (i.e. exposure duration up to 1 day). Formaldehyde-induced DPX in the nasal epithelium of rats and rhesus monkeys was shown consistently in these studies (Casanova et al., 1991). However, a well conducted study investigating both acute and cumulative DPX yields in rats exposed to formaldehyde for about 12 weeks (Casanova et al., 1994) found that the acute DPX yield in the lateral meatus (a high tumour yield site) of previously exposed rats was about half that in naive rats at concentrations greater than 7.2 mg/m^3 , while there were no differences in the medial and posterior meatuses (low tumour yield sites). No significant accumulation of DPX occurred in previously exposed rats.

Regenerative cell proliferation following formaldehyde-induced cytotoxicity increases the number of DNA replications and thus increases the probability of DPX-initiated DNA

replication errors, resulting in mutations. This hypothesis is supported by the observed inhibition of DNA replication in the rat nose at elevated concentrations (Heck & Casanova, 1995) and increased p53 expression in preneoplastic lesions (Wolf et al., 1995). In 5 of 11 squamous cell carcinomas from rats exposed to 18 mg/m³ for up to 2 years, there were point mutations at the GC base pairs in the p53 complementary DNA (cDNA) sequence (Recio et al., 1992).

Glutaraldehyde

The study of cell replication in the 13-week rat and mouse inhalation studies with glutaraldehyde (NTP, 1993) showed that, in contrast to the results obtained for mice, the increased cell replication (ULLI) in the nasal vestibule of rats occurred early (within a few days) and either remained elevated or decreased slightly through the course of the study. Increases in ULLI in the nasal vestibule of mice tended to develop with time. In an inhalation study with mice (Zissu et al., 1994), the earliest lesions were observed in the respiratory epithelium of the septum and the naso- and maxilloturbinates after 4 days of exposure to 1.2 mg/m³. Severe histopathological changes were still observed 2 weeks after the end of the exposure to 4.0 mg/m³. No exposure-related histological abnormalities were detected in the trachea and lungs.

E. Strength, consistency, and specificity of association of tumour response with key events

Formaldehyde

There are extensive studies investigating formaldehyde-induced neoplasia. Available data revealed formaldehyde-induced DPX formation and increased epithelial cell proliferation within the upper respiratory tract in a range of species including rats and monkeys and a variety of rat and human cells in vitro. It was found that at similar levels of exposure, concentrations of DPX were approximately an order of magnitude lower in rhesus monkeys than in rats. Increased human epithelial cell proliferation following in situ exposure to formaldehyde was reported in a model system in which rat tracheae populated with human tracheobronchial epithelial cells were xenotransplanted into athymic mice.

There is good correlation between key events and regional tumour incidence and tumour sites. Cell proliferation, metaplasia, and increased DPX were seen in the regions of the nasal cavity where tumours have been observed. The highly non-linear dose–response relationships for DPX, cytotoxicity, cell proliferation, metaplasia, and tumours are consistent, with significant increases in metaplasia occurring at 2.4 mg/m³ in one study and all end-points being observed at concentrations of greater than 4.8 mg/m³. This is also in good correlation with the concentration at which mucociliary clearance is inhibited and glutathione-mediated metabolism is saturated—that is, 4.8 mg/m³. The study by Morgan et al. (1986) examining effects of inhaled formaldehyde on the nasal mucociliary apparatus in male rats also included 18-h recovery groups following days 1, 9, and 14 of exposure to concentrations of 2.4 mg/m³, 7.2 mg/m³, and 18 mg/m³. Inhibition of mucociliary clearance was progressively more extensive with increasing duration of exposure, but showed little or no evidence of recovery 18 h after cessation of exposure.

Mice appear to be less susceptible than rats to the development of nasal tumours following exposure to a given concentration of formaldehyde. However, it is well known that mice decrease their minute volume in response to inhalation of noxious chemicals (Brown et al., 1986, in CIIT, 1999).

Glutaraldehyde

In comparison with formaldehyde, the glutaraldehyde-induced lesions were located in a more anterior part of the nose, involving the squamous epithelium. Also, they were of a different character, with none of the focal hyperkeratosis and hyperplasia with cellular atypia and dysplasia found in animals receiving formaldehyde for 13 weeks (Monticello, 1990; Morgan & Monticello, 1990).

F. Biological plausibility and coherence

Formaldehyde

Evidence supporting the hypothesis that prolonged regenerative cell proliferation can be a causal mechanism in chemical carcinogenesis continues to accumulate (IPCS, 2002). This proposed MOA for formaldehyde-induced nasal tumours in animals exposed by inhalation is consistent with biological plausibility and the available data. Sustained increased cell proliferation has been observed in the nasal cavity in extensive short- and medium-term toxicity studies in rats and a few studies in other species. Histopathological effects in the nasal cavity (epithelial cell dysplasia and metaplasia) were consistent in a range of sub-chronic and chronic animal studies. It should be noted, however, that the respective roles of DPX, mutation, and cellular proliferation in the induction of nasal tumours in the rat have not been fully elucidated.

Glutaraldehyde

Effects of inhaled glutaraldehyde have not been as extensively studied as those of formaldehyde. In inhalation studies, glutaraldehyde did not induce nasal tumours in rats and mice. However, the same key events that are considered key events in the nasal carcinogenicity of formaldehyde—cytotoxicity and cell proliferation—have been demonstrated in rats and mice exposed to glutaraldehyde. This might appear to reduce the plausibility of these processes being important for formaldehyde.

G. Possible alternative modes of action

Formaldehyde

There is the possibility that mutagenicity could play a role in the development of formaldehyde-induced tumours. Evaluation of the available data indicates that formaldehyde is genotoxic in vitro, but is generally not genotoxic in standard in vivo assays, although there are many studies demonstrating that it produces DPX.

Formaldehyde has been extensively studied for genotoxicity in vitro, with positive results in studies with bacterial and mammalian cells (Ames test, gene mutation), and produced DNA single-strand breaks and DPX (reviewed in IARC, 2005). In vivo, formaldehyde has reproducibly induced mutations in *Drosophila*, but there is no convincing evidence of its genotoxic activity in rodent bone marrow cell tests. There is limited evidence that formaldehyde expo-

sure is associated with increased chromosomal aberration and micronucleus frequencies in human nasal and buccal cells and peripheral blood lymphocytes (reviewed in IARC, 2005; see [Appendix](#)).

It is unclear to what extent DPX contributes to the mutagenesis and carcinogenicity of formaldehyde (Recio, 1997; Merk & Speit, 1998; Speit et al., 2000; Liteplo & Meek, 2003). The presence of DPX has been considered mainly as an indicator of exposure, although some have also seen these lesions as premutagenic in character and therefore evidence of a direct genotoxic mechanism. DPX are, however, potentially damaging to the afflicted cell, and cell death is a likely outcome should they occur at high frequency. They also indicate that protein–protein cross-linkage (PPX) may occur, with potentially less serious effects for the cell. Should key proteins be involved in the PPX formation, this could have consequences on the regulatory machinery of the cell, including the regulation of differentiation. Such a change clearly occurs in the nasal epithelium of rats exposed to formaldehyde, since areas of metaplasia emerge. Neoplasia could be viewed as simply a different kind of metaplasia, unless there is compelling evidence for a genotoxic mode of action.

A different interpretation of the data has been offered by Gaylor et al. (2004), who analysed the concentration–response relationship for formaldehyde-induced cell proliferation in rats using statistical methods designed to identify J-shaped concentration curves. Cell proliferation data were used because there were insufficient quantal data on cancer incidence to perform the analysis. Their analysis supports the hypothesis that the threshold-type dose–response for nasal tumour incidence is the result of a minor genotoxicity at low dose that is superimposed by a J-shaped dose–response for cell proliferation at high cytotoxic dose levels (Lutz, 1998). At low doses, the effect of incremental DNA damage may be cancelled out by a reduction in cell proliferation; therefore, in spite of the apparent threshold, the data remain consistent with a genotoxic mechanism.

In rats exposed to formaldehyde, point mutations at GC base pairs in the cDNA sequence of the evolutionarily conserved regions II–V of the *p53* gene were found in 5 of 11 primary nasal squamous cell carcinomas (Recio et al., 1992). This observation may be interpreted to indicate genotoxic processes induced by formaldehyde in the carcinogenic process; however, the presence of specific mutations in the emergent tumour is not evidence that they were present in the early stages of neoplasia or that they were directly induced by the chemical. While there is the possibility of a direct mutagenic event occurring, it is also possible that these mutations arose indirectly of exposure as a result of functional changes in chromatin proteins induced by the chemical. At what stage in the life history of the tumour these observed mutations occurred is also open to speculation: they are relatively common events, it is clear, but it is also clear that they are not essential events (since they do not occur in all tumours that are apparently of the same type). The occurrence of these mutations indicates that a genotoxic mechanism has not been excluded, but this evidence does not necessarily support one.

Specific changes in gene expression have also been observed in vivo. The results indicated that exposure to formaldehyde can cause alteration in the expression levels of genes involved in several functional categories, including xenobiotic metabolism, cell cycle regulation, DNA synthesis and repair, oncogenes, and apoptosis (Hester et al., 2003). It is not clear at present

how specific these changes are to formaldehyde or what their role is, if any, in carcinogenicity.

Glutaraldehyde

Glutaraldehyde has been less extensively tested than formaldehyde for genotoxicity in vitro and in vivo. It produces weak and inconsistent positive findings in tests in vitro and is not active in the vast majority of in vivo studies. The genetic toxicity of glutaraldehyde has been recently reviewed (Zeiger et al., 2005).

Glutaraldehyde induced DNA repair systems in bacterial cells and was a weak mutagen in *Salmonella* and *Escherichia coli*. Unscheduled DNA synthesis (UDS), DPX, and double-strand breaks were seen in human cell lines, but not in primary rat cells. There were weak and inconsistent responses in chromosomal aberration and sister chromatid exchange (SCE) studies with mammalian cells, and glutaraldehyde did not induce transformation in cultured Syrian hamster embryo (SHE) cells.

In vivo, glutaraldehyde induced S-phase DNA synthesis in nasal cells in rats and mice following direct nasal administration. Glutaraldehyde did not produce DNA damage in rat liver or cross-links in rat testes DNA or sperm cells. Tests for induction of chromosomal aberration in bone marrow cells in rats and mice were generally negative. Glutaraldehyde did not induce micronuclei in bone marrow cells or dominant lethal mutations in mice. Thus, glutaraldehyde does possess genotoxic potential, and, although the database is not as extensive as it is for formaldehyde, it might be anticipated that site of contact genotoxicity would occur. Consequently, if genotoxicity is a major carcinogenic MOA for formaldehyde, it remains to be explained why glutaraldehyde is not active.

H. Uncertainties, inconsistencies, and data gaps

Formaldehyde

In most of the cancer bioassays for formaldehyde, data on intermediate end-points such as proliferative response as a measure of cytotoxicity and DPX are limited. Consequently, direct comparison of the incidence of intermediate lesions and tumours is restricted. Additionally, information on a direct relationship between DPX and mutation induction and the probability of converting a DPX into a mutation is desirable, while the mode by which regenerative cell proliferation is involved in the production of mutations required for tumour development needs to be determined.

Studies on the *hprt* mutation spectrum in formaldehyde-exposed human cells revealed that 50% of the mutations are deletions, whereas 50% are due to point mutation at the A:T base pair (Crosby et al., 1988; Liber et al., 1989). The finding of deletions as part of the formaldehyde mutation spectrum may explain the homozygous nature of base pair mutations observed in *p53* in formaldehyde-induced squamous cell carcinomas. However, there is an inconsistency with regard to the base pair that is mutated. It was found to be A:T in *hprt* in human and mammalian cell lines and G:C at *p53* in formaldehyde-induced squamous cell carcinomas (Recio, 1997). It is possible that, although mutations are induced by formaldehyde in vitro, these types of mutation may not be fundamental to its carcinogenicity.

Glutaraldehyde

Glutaraldehyde is clearly much more cytotoxic than formaldehyde, perhaps because it is a bifunctional alkylating agent. Intranasal instillation studies have demonstrated that, on a molar basis, glutaraldehyde is 10- to 20-fold more toxic than formaldehyde when delivered to the nasal mucosa as a single treatment in aqueous solution (St. Clair et al., 1990). Comparison of results from a 13-week inhalation study of glutaraldehyde (NTP, 1993) with similar inhalation studies with formaldehyde (Heck et al., 1990; Monticello, 1990; Monticello et al., 1991) shows that glutaraldehyde is about 20-fold more toxic than formaldehyde by this route also. Pulmonary damage and mortality occur at much higher glutaraldehyde concentrations. Cytotoxicity is manifest closer to the external nares in the case of inhaled glutaraldehyde, so the tissue primarily affected is not the same as in the case of inhaled formaldehyde. This difference in the site of toxic action may be particularly important because, if the only difference was toxic potency, then glutaraldehyde would be expected to produce effects similar to those of formaldehyde, although only at lower doses.

I. Assessment of postulated mode of action

Formaldehyde

From a weight-of-evidence point of view, the hypothesized MOA for formaldehyde-induced nasal tumours satisfies several criteria, including consistency, concordance of dose–response relationships across all key events, and biological plausibility and coherence of the database. Given the extensive experimental data that address and are consistent with the proposed MOA of formaldehyde in the induction of tumours in the nasal cavity, a high degree of confidence may be ascribed to it.

Glutaraldehyde

The key events of cytotoxicity, cell proliferation, and DPX formation (in vitro) have been demonstrated with exposure to glutaraldehyde. However, glutaraldehyde has not produced nasal tumours in rats and mice. Therefore, if the proposed MOA for formaldehyde is to be maintained, an explanation for this discrepancy is necessary. A reason for the difference has not been identified, but a hypothesis can be proposed. The dialdehyde function of glutaraldehyde is an important factor that may inhibit the macromolecules with which it reacts from further reaction within the cellular environment. Should these macromolecules be proteins involved in the maintenance of survival, then their immobility perhaps more likely leads to cell death than to a change in differentiation state. This immobilization of macromolecules by glutaraldehyde is the property that makes it a better fixative for high-resolution microscopy (e.g. electron microscopy) than formaldehyde. It almost certainly contributes to the very much higher toxicity of the dialdehyde. The monoaldehyde function of formaldehyde also causes cellular damage, but a proportion of proteins involved in cellular differentiation may be able to continue in that role, although with an altered outcome that may be the beginning of a path to neoplasia. If, on the other hand, these aldehydes react with nucleic acids (the evidence for glutaraldehyde reacting in this way is not substantial), then the repair of the alkylated nucleotides may be more difficult or even impossible in the case of glutaraldehyde, whereas repair does occur following formaldehyde interaction with DNA. Thus, irrespective of whether the mode of formaldehyde action in carcinogenicity is as proposed or is primarily due to genetic toxicity, the different response to glutaraldehyde exposure can be explained.

2. CAN HUMAN RELEVANCE OF THE MOA BE EXCLUDED ON THE BASIS OF FUNDAMENTAL, QUALITATIVE DIFFERENCES IN KEY EVENTS BETWEEN EXPERIMENTAL ANIMALS AND HUMANS?

A. Formaldehyde

In rhesus monkeys exposed to formaldehyde at 7.2 mg/m³ for between 1 and 6 weeks, formaldehyde-induced lesions were associated with increases in cell proliferation rates of up to 18-fold over controls and remained significantly elevated after 6 weeks of exposure. Histological lesions and increases in cell proliferation were most extensive in the nasal passages and were minimal in the lower airways, whereas the maxillary sinuses showed no evidence of a response to formaldehyde exposure. Based on the extent of lesions and cell proliferation data, it appeared that rhesus monkeys are more sensitive than rats to the acute and subacute effects of formaldehyde at 7.2 mg/m³ (Monticello et al., 1989). The absence of response in the maxillary sinuses in rhesus monkeys is an observation deserving special attention in the design of epidemiological studies (or, perhaps, in the reporting of tumour sites). Most epidemiological studies of sinonasal cancer have not distinguished tumours arising in the nose from those developing in the nasal sinuses. Thus, the risk for nasal cancer specifically would tend to be diluted if there was no corresponding risk for cancer in the sinuses and could go undetected through lack of statistical power.

Many epidemiological studies have investigated formaldehyde exposure and cancer of the respiratory tract. The strongest evidence of an association has been observed for nasopharyngeal cancers. A statistically significant excess of deaths from nasopharyngeal cancer has been observed in the largest cohort study of industrial workers (Hauptmann et al., 2004), with statistically significant exposure–response relationships for peak and cumulative exposure. An excess of deaths from nasopharyngeal cancer was observed in a proportionate mortality analysis of the largest cohort of embalmers in the United States (Hayes et al., 1990). An excess of cases of nasopharyngeal cancer was observed in a Danish study of proportionate cancer incidence among workers at companies that manufactured or used formaldehyde (Hansen & Olsen, 1995). Other cohort studies reported fewer cases of nasopharyngeal cancer than expected (Walrath & Fraumeni, 1983; Coggon et al., 2003; Pinkerton et al., 2004). Of seven case–control studies of nasopharyngeal cancer, five found elevations of risk for exposure to formaldehyde.

Several case–control studies have investigated the association between exposure to formaldehyde and sinonasal cancer. A pooled analysis of 12 studies showed an increased risk of adenocarcinoma in men and women thought never to have been exposed to wood dust or leather dust, with an exposure–response trend for an index of cumulative exposure (Luce et al., 2002). One other case–control study (Olsen & Asnaes, 1986) and a proportionate incidence study (Hansen & Olsen, 1995) showed an increased risk of sinonasal cancer, particularly squamous cell carcinoma. However, the three most informative cohort studies of industrial workers showed no excesses of sinonasal cancer (Coggon et al., 2003; Hauptmann et al., 2004; Pinkerton et al., 2004).

In evaluating this body of evidence, the International Agency for Research on Cancer (IARC) concluded that there was sufficient epidemiological evidence that formaldehyde causes

nasopharyngeal cancer in humans; only limited epidemiological evidence that formaldehyde causes sinonasal cancer in humans; and strong but not sufficient evidence for a causal association between leukaemia and occupational exposure to formaldehyde (Cogliano et al., 2005).

There are no publications describing DPX in nasal cells from formaldehyde-exposed personnel. Assessment of DPX in peripheral lymphocytes from formaldehyde-exposed workers demonstrated an association with overall exposure (Shaham et al., 2003). The single DPX study involved 399 workers from 14 hospital pathology departments, and formaldehyde exposure categories were low-level (mean 0.5 mg/m³, range 0.05–0.8 mg/m³) and high-level (mean 2.7 mg/m³, range 0.86–6.7 mg/m³). Adjusted mean DPX were significantly higher in the exposed groups. There appear to be some doubts regarding the sensitivity and reproducibility of the physical separation method used in this study (Heck & Casanova, 2004).

Some studies have investigated the histological changes within the nasal epithelium of workers occupationally exposed to formaldehyde; however, the extent to which nasal epithelial cell regenerative proliferation occurs is unresolved because the results are mixed and there was co-exposure to wood dust in some studies (Berke, 1987; Edling et al., 1988; Holmström et al., 1989; Boysen et al., 1990; Ballarin et al., 1992).

Mucociliary clearance in the anterior portion of the nasal cavity was reduced following exposure of volunteers to formaldehyde at 0.30 mg/m³ (Andersen & Møhlave, 1983).

The concordance of animal and human key events for formaldehyde is summarized in Table 3.

Table 3. Formaldehyde concordance table.

Key event	Evidence in animals	Evidence in humans
Cytotoxicity	Positive in vivo (target cells)	Plausible
Proliferation	Positive in vivo (target cells)	Plausible (some evidence but confounded by co-exposure)
Genotoxicity	DPX (target cells in vivo)	DPX (non-target cells, i.e. lymphocytes)
Mutations	Positive in vitro; unconvincing in vivo	Positive (? cells)
Nasal tumours	Positive (mainly anterior lateral meatus)	Positive (nasopharyngeal) ? (sinonasal)

B. Glutaraldehyde

There are few epidemiological studies for exposure to glutaraldehyde and human cancer. No increase in the number of cancer deaths was observed among 186 male glutaraldehyde production workers. The average time since first exposure to glutaraldehyde was 20.6 years, and the period of exposure was 3–7 years. During periods of monitoring exposure, glutaraldehyde concentrations in air ranged from 0.04 to 1.4 mg/m³ (NICNAS, 1994). Studies of embalmers, pathologists, and members of the American Association of Anatomists for possible effects of glutaraldehyde have all shown increases in risk of cancer; however, all of

these groups were also exposed to formaldehyde (Walrath & Fraumeni, 1983; Consensus Workshop on Formaldehyde, 1984; Stroup et al., 1986).

There are no studies examining glutaraldehyde exposure and DPX formation, cytotoxicity, and cell proliferation in human nasal tissues.

The concordance of animal and human key events for glutaraldehyde is summarized in Table 4.

Table 4. Glutaraldehyde concordance table.

Key event	Evidence in animals	Evidence in humans
Cytotoxicity	Positive	Plausible
Proliferation	Positive in vivo	Plausible
Genotoxicity	DPX in vitro	Unknown
Mutations	Positive in vitro	Unknown
Nasal tumours	Negative (no evidence at any site)	Unknown

3. CAN HUMAN RELEVANCE OF THE MOA BE EXCLUDED ON THE BASIS OF QUANTITATIVE DIFFERENCES IN EITHER KINETIC OR DYNAMIC FACTORS BETWEEN EXPERIMENTAL ANIMALS AND HUMANS?

A. Formaldehyde

Quantitative differences between experimental animals and humans for the postulated MOA will be a function of the concentration of formaldehyde at the target tissue. It is formaldehyde per se, and not its metabolites, that causes cytotoxicity. Exogenous inhaled formaldehyde is rapidly metabolized upon absorption, to formate, by a number of widely distributed cellular enzymes, particularly formaldehyde dehydrogenase. In addition to this efficient metabolic detoxification mechanism, the mucociliary apparatus provides protection of the underlying epithelium from gases and vapours. Thus, in order to attain free formaldehyde concentrations that may be cytotoxic to the target tissue, relatively high concentrations of formaldehyde vapour must be delivered to the target site to overcome these protective mechanisms. Mechanistic events of clear significance for carcinogenicity occur at dose levels where formaldehyde detoxification mechanisms are saturated in rats (Casanova & Heck, 1987).

It is critical to take dosimetry into consideration when considering quantitative species differences for formaldehyde-induced toxicity in the respiratory tract. Inhaled formaldehyde is predominantly deposited and readily absorbed in the regions of the upper respiratory tract with which it comes into initial contact, owing to its high reactivity with biological macromolecules (Heck et al., 1983; Swenberg et al., 1983). A complex relationship between nasal anatomy, ventilation, and breathing patterns (nasal or oronasal) determines where in the upper respiratory tract formaldehyde absorption occurs in species. In rodents, which are obligate nasal breathers, deposition and absorption occur primarily in the nasal passage. In contrast, primates are oronasal breathers; although absorption and deposition are likely to occur primarily in the oral mucosa and nasal passages, they can also occur in the trachea and

bronchus (Monticello et al., 1991). This hypothesis is supported by effects (histopathological changes, increased epithelial cell proliferation, and DPX formation) being observed farther along within the upper respiratory tract in monkeys.

Species differences in dosimetry have been taken into account in a two-stage clonal growth model that has been developed to predict the nasal carcinogenic risk of formaldehyde in humans (Conolly et al., 2004). The model also incorporates data on normal growth curves for rats and humans, cell cycle times, and cells at risk in the different regions of the respiratory tract.

Mice are better able to reduce both their respiratory rate and tidal volume upon repeated exposures; therefore, mice have less formaldehyde available for deposition than rats, resulting in less tissue damage and a lower rate of cell turnover in the nasal epithelium (Chang et al., 1981, 1983). These are characteristics that may help explain the lack of neoplastic response in the nose of mice.

Although there are likely to be quantitative differences between animal species and humans due to differences in dosimetry in the respiratory tract, there do not appear to be fundamental differences that would indicate that the proposed MOA does not occur in humans.

B. Glutaraldehyde

Much less is known of the kinetics of glutaraldehyde in experimental animals compared with formaldehyde. Inhalation studies do not appear to have been conducted. The terminal half-lives for elimination are long for both intravenous injection (rat 10 h, rabbit 15–30 h) and dermal application (rat 40–110 h, rabbit 20–100 h), probably due to the binding of glutaraldehyde to protein and the slow excretion of metabolites. The metabolites have not been identified, but it has been proposed that the metabolism of glutaraldehyde probably involves initial oxidation to the corresponding carboxylic acids by aldehyde dehydrogenase. The glutaric acid formed by oxidation is probably further metabolized by reaction with coenzyme A (CoA) to give glutaryl CoA, which is then oxidized by glutaryl CoA dehydrogenase to glutaconyl CoA, leading to its eventual degradation to carbon dioxide via acetate (Beauchamp et al., 1992; NTP, 1993; NICNAS, 1994; Ballantyne, 1995).

Glutaraldehyde reacts readily with proteins as a cross-linking agent, mainly between amino groups. The reaction is rapid and pH dependent (rate increases at pH >9), to give Schiff bases. Further reaction occurs to give a number of complex reaction products, with the mechanism of the cross-linking process not yet fully understood.

Little information is available on the interaction between glutaraldehyde and DNA, but it has been reported (Hopwood, 1975) that glutaraldehyde reacts with DNA only at >60 °C (summarized by NICNAS, 1994), and there are data implying that there is no reaction under physiological conditions (Sewell et al., 1984; Douglas & Rogers, 1998; Vock et al., 1999).

4. STATEMENT OF CONFIDENCE, ANALYSIS, AND IMPLICATION

A. Formaldehyde

Sustained cytotoxicity and cell proliferation are key events in the proposed MOA for the induction of several types of animal tumours. There are substantial data to support this postulated MOA for formaldehyde-induced nasal tumours in rats. Cytotoxicity, DPX formation, nasal epithelial cell regenerative proliferation, squamous metaplasia, and inflammation have been measured in rat studies and are site-specific, highly non-linear concentration–response processes in concordance with the incidence of nasal tumours.

Based on the weight of evidence, it is likely that the MOA is relevant to humans, at least qualitatively. Increased cell proliferation and DPX formation within epithelia of the upper respiratory tract have been observed in monkeys exposed to formaldehyde vapour. Increased human epithelial cell proliferation following in situ exposure to formaldehyde has also been observed in a model system in which rat tracheae populated with human tracheobronchial epithelial cells were xenotransplanted into athymic mice. Limited evidence on histopathological lesions in the nose of humans exposed primarily to formaldehyde in the occupational environment is consistent with a qualitatively similar response of the upper respiratory tract in experimental animals. In addition, several epidemiological studies have indicated an increased risk of nasal cancers with formaldehyde exposure.

Therefore, the MOA is considered relevant to humans, and animal nasal tumour and other supporting data should be taken forward to evaluate human risk. This process would include consideration of the data suggesting that formaldehyde induces tumours in a non-linear, dose-dependent manner. There may also be quantitative differences in response between species for the proposed MOA due to differences in dosimetry.

B. Glutaraldehyde

The epidemiological studies for glutaraldehyde are very limited and do not show an association with nasal tumours. In animal studies, glutaraldehyde has been shown to cause cytotoxicity, cell proliferation, and DPX production, but not nasal tumours, in inhalation studies in rats and mice. The fact that glutaraldehyde is clearly more toxic than formaldehyde should not constitute a reason for the difference in carcinogenic potential. Although, dose for dose, glutaraldehyde exposure may tend to result in more cell death than formaldehyde exposure, if glutaraldehyde is a carcinogen, this should be demonstrable at doses lower than those used for formaldehyde.

The MOA postulated for formaldehyde—that is, sustained cytotoxicity and cell proliferation—would appear to be relevant to glutaraldehyde, but tumour formation has not been demonstrated. It has been tentatively suggested here that the difference in pathological responses to these aldehydes is due to formaldehyde being a monoaldehyde whereas glutaraldehyde is a dialdehyde. This difference may result in a different form of cross-linking so that glutaraldehyde cross-link products are neither likely to retain any biological function nor likely to be repairable. The case-study highlights the difficulties in applying the HRF when the animal tumour data are inadequate.

REFERENCES

- Andersen I, Møhlave L (1983) Controlled human studies with formaldehyde. In: Gibson JE, ed. *Formaldehyde toxicity*. Washington, DC, Hemisphere Publishing, pp. 155–165.
- Ballantyne B (1995) *Toxicology of glutaraldehyde: Review of studies and human health effects*. Bound Brook, NJ, Union Carbide Corporation.
- Ballarin C, Sarto F, Giacomelli L, Bartolucci GB, Clonfero E (1992) Micronucleated cells in nasal mucosa of formaldehyde-exposed workers. *Mutation Research*, **280**:1–7.
- Beauchamp ROJ, St Clair MB, Fennell TR, Clarke DO, Morgan KT, Kari FW (1992) A critical review of the toxicology of glutaraldehyde. *Critical Reviews in Toxicology*, **22**:143–174.
- Berke JH (1987) Cytologic examination of the nasal mucosa in formaldehyde-exposed workers. *Journal of Occupational Medicine*, **29**:681–684.
- Boysen M, Zadig E, Digernes V, Abeler V, Reith A (1990) Nasal mucosa in workers exposed to formaldehyde: A pilot study. *British Journal of Industrial Medicine*, **47**:116–121.
- Burgaz S, Cakmak G, Erdem O, Yilmaz M, Karakaya AE (2001) Micronuclei frequencies in exfoliated nasal mucosa cells from pathology and anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde. *Neoplasma*, **48**:144–147.
- Burgaz S, Erdem O, Cakmak G, Erdem N, Karakaya A, Karakaya AE (2002) Cytogenetic analysis of buccal cells from shoe-workers and pathology and anatomy laboratory workers exposed to *n*-hexane, toluene, methyl ethyl ketone and formaldehyde. *Biomarkers*, **7**:151–161.
- Bushy Run (1983) *Glutaraldehyde vapour subchronic inhalation study on rats*. Export, PA, Bushy Run Research Center (Project Report 46-101).
- Casanova M, Heck Hd'A (1987) Further studies of the metabolic incorporation and covalent binding of inhaled [³H]- and [¹⁴C]formaldehyde in Fischer-344 rats: Effects of glutathione depletion. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **89**:105–121.
- Casanova M, Heck Hd'A, Everitt JI, Harrington WW Jr, Popp JA (1988) Formaldehyde concentrations in the blood of rhesus monkeys after inhalation exposure. *Food and Chemical Toxicology*, **26**:715–716.
- Casanova M, Deyo DF, Heck Hd'A (1989) Covalent binding of inhaled formaldehyde to DNA in the nasal mucosa of Fischer 344 rats: Analysis of formaldehyde and DNA by high-performance liquid chromatography and provisional pharmacokinetic interpretation. *Fundamental and Applied Toxicology*, **12**:397–417.

Casanova M, Morgan KT, Steinhagen WH, Everitt JI, Popp JA, Heck Hd'A (1991) Covalent binding of inhaled formaldehyde to DNA in the respiratory tract of rhesus monkeys: Pharmacokinetics, rat-to-monkey interspecies scaling, and extrapolation to man. *Fundamental and Applied Toxicology*, **17**:409–428.

Casanova M, Morgan KT, Gross EA, Moss OR, Heck Hd'A (1994) DNA–protein cross-links and cell replication at specific sites in the nose of F344 rats exposed subchronically to formaldehyde. *Fundamental and Applied Toxicology*, **23**:525–536.

Casanova-Schmitz M, Starr TB, Heck H (1984) Differentiation between metabolic incorporation and covalent binding in the labeling of macromolecules in the rat nasal mucosa and bone marrow by inhaled [¹⁴C]- and [³H]formaldehyde. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **76**:26–44.

Chang JCF, Steinhagen WH, Barrow CS (1981) Effects of single or repeated formaldehyde exposures on minute volume of B6C3F1 mice and F344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **61**:451–459.

Chang JCF, Gross EA, Swenberg JA, Barrow CS (1983) Nasal cavity deposition, histopathology and cell proliferation after single or repeated formaldehyde exposures in B6C3F1 mice and F-344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **68**:161–176.

CIIT (1999) *Formaldehyde: Hazard characterization and dose–response assessment for carcinogenicity by the route of inhalation*, rev. ed. Research Triangle Park, NC, Chemical Industry Institute of Toxicology.

Coggon D, Harris EC, Poole J, Palmer KT (2003) Extended follow-up of a cohort of British chemical workers exposed to formaldehyde. *Journal of the National Cancer Institute*, **21**:1608–1614.

Cogliano VJ, Grosse Y, Baan RA, Straif K, Secretan MB, El Ghissassi F (2005) Meeting report: Summary of IARC Monographs on formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-*tert*-butoxy-2-propanol. *Environmental Health Perspectives*, **113**(9):1205–1208.

Conolly RB, Kimbell JS, Janszen D, Schlosser PM, Kalisak D, Preston J, Miller FJ (2004) Human respiratory tract cancer risks of inhaled formaldehyde: Dose–response predictions derived from biologically-motivated computational modeling of a combined rodent and human dataset. *Toxicological Sciences*, **82**:279–296.

Consensus Workshop on Formaldehyde (1984) Report on the consensus workshop on formaldehyde. *Environmental Health Perspectives*, **58**:323–381.

Crosby RM, Richardson KK, Craft TR, Benforado KB, Liber HL, Skopek TR (1988) Molecular analysis of formaldehyde-induced mutations in human lymphoblasts and *E. coli*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **12**:155–166.

- Dalbey WE (1982) Formaldehyde and tumors in hamster respiratory tract. *Toxicology*, **24**:9–14.
- Douglas MP, Rogers SO (1998) DNA damage caused by common cytological fixatives. *Mutation Research*, **401**:77–88.
- Edling C, Hellquist H, Ödkvist L (1988) Occupational exposure to formaldehyde and histopathological changes in the nasal mucosa. *British Journal of Industrial Medicine*, **45**:761–765.
- Feron VJ, Bruyntes JP, Woutersen RA, Immel HR, Appelman LM (1988) Nasal tumours in rats after short-term exposure to a cytotoxic concentration of formaldehyde. *Cancer Letters*, **39**:101–111.
- Feron VJ, Til HP, Woutersen RA (1990) Letter to the editor. *Toxicology and Industrial Health*, **6**:637–639.
- Gaylor DW, Lutz WK, Connolly RB (2004) Statistical analysis of nonmonotonic dose–response relationships: Research design and analysis of nasal cell proliferation in rats exposed to formaldehyde. *Toxicological Sciences*, **77**:158–164.
- Gross EA, Mellick PW, Kari FW, Miller FJ, Morgan KT (1994) Histopathology and cell replication responses in the respiratory tract of rats and mice exposed by inhalation to glutaraldehyde for up to 13 weeks. *Fundamental and Applied Toxicology*, **23**:348–362.
- Hansen J, Olsen JH (1995) Formaldehyde and cancer morbidity among male employees in Denmark. *Cancer Causes and Control*, **6**:354–360.
- Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, eds (2001) *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*, 10th ed. The McGraw-Hill Companies, Inc., 2025 pp.
- Hauptmann A, Lubin JH, Stewart PA, Hayes RB, Blair A (2004). Mortality from solid cancers among workers in formaldehyde industries. *American Journal of Epidemiology*, **159**:1117–1130.
- Hayes RB, Blair A, Stewart PA, Herrick RF, Mahar H (1990) Mortality of U.S. embalmers and funeral directors. *American Journal of Industrial Medicine*, **18**:641–652.
- He J-L, Jin L-F, Jin H-Y (1998) Detection of cytogenetic effects in peripheral lymphocytes of students exposed to formaldehyde with cytokinesis-blocked micronucleus assay. *Biomedical and Environmental Sciences*, **11**:87–92.
- Heck H, Casanova M (1995). Nasal dosimetry of formaldehyde: Modelling site specificity and the effects of pre-exposure. In: Miller JF, ed. *Nasal toxicity and dosimetry of inhaled xenobiotics: Implications for human health*. Washington, DC, Taylor & Francis, pp. 159–175.

Heck H, Casanova M (2004) The implausibility of leukemia induction by formaldehyde: A critical review of the biological evidence on distant-site toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **40**:92–106.

Heck Hd'A, White EL, Casanova-Schmitz M (1982) Determination of formaldehyde in biological tissues by gas chromatography/mass spectrometry. *Biomedical Mass Spectrometry*, **9**:347–353.

Heck Hd'A, Chin TY, Schmitz MC (1983) Distribution of [¹⁴C]formaldehyde in rats after inhalation exposure. In: Gibson JE, ed. *Formaldehyde toxicity*. Washington, DC, Hemisphere Publishing, pp. 26–37.

Heck Hd'A, Casanova-Schmitz M, Dodd PB, Schachter EN, Witek TJ, Tosun T (1985) Formaldehyde (CH₂O) concentrations in the blood of humans and Fischer-344 rats exposed to CH₂O under controlled conditions. *American Industrial Hygiene Association Journal*, **46**:1–3.

Heck Hd'A, Casanova M, Starr TB (1990) Formaldehyde toxicity—new understanding. *Critical Reviews in Toxicology*, **20**:397–426.

Hedberg JJ, Strömberg P, Höög JO (1998) An attempt to transform class characteristics within the alcohol dehydrogenase family. *FEBS Letters*, **436**:67–70.

Hester SD, Benavides GB, Yoon L, Morgan KT, Zou F, Barry W, Wolf DC (2003) Formaldehyde-induced gene expression in F344 rat nasal respiratory epithelium. *Toxicology*, **187**:13–24.

Holmquist B, Vallee BL (1991) Human liver class III alcohol and glutathione dependent formaldehyde dehydrogenase are the same enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **178**:1371–1377.

Holmström M, Wilhelmsson B, Hellquist H, Rosén G (1989) Histological changes in the nasal mucosa in persons occupationally exposed to formaldehyde alone and in combination with wood dust. *Acta Oto-laryngologica*, **107**:120–129.

Hopwood D (1975) The reactions of glutaraldehyde with nucleic acids. *Journal of Histochemistry*, **7**:267–276.

Horton AW, Tye R, Stemmer KL (1963) Experimental carcinogenesis of the lung. Inhalation of gaseous formaldehyde or an aerosol of coal tar by C3H mice. *Journal of the National Cancer Institute*, **30**:31–43.

IARC (2005) *Formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tert-butoxypropan-2-ol*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 478 pp. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 88).

IPCS (2002) *Formaldehyde*. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Concise International Chemical Assessment Document No. 40).

Kamata E, Nakadate E, Uchida O, Ogawa Y, Suzuki S, Kaneko T, Saito M, Kurokawa Y (1997) Results of a 28-month chronic inhalation toxicity study of formaldehyde in male Fischer-344 rats. *Journal of Toxicological Sciences*, **22**:239–254.

Kerns WD, Pavkov KL, Donofrio DJ, Gralla EJ, Swenberg JA (1983a) Carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long-term inhalation exposure. *Cancer Research*, **43**:4382–4392.

Kerns WD, Donofrio DJ, Pavkov KL (1983b) The chronic effects of formaldehyde inhalation in rats and mice: A preliminary report. In: Gibson JE, ed. *Formaldehyde toxicity*. Washington, DC, Hemisphere Publishing, pp. 111–131.

Kimbell JS, Gross EA, Richardson RB, Conolly RB, Morgan KT (1997) Correlation of regional formaldehyde flux predictions with the distribution of formaldehyde-induced squamous metaplasia in F344 rat nasal passages. *Mutation Research*, **380**:143–154.

Koivusalo M, Baumann M, Uotila L (1989) Evidence for the identity of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and class III alcohol dehydrogenase. *FEBS Letters*, **257**:105–109.

Liber HL, Benforado K, Crosby RM, Simpson D, Skopek TR (1989) Formaldehyde-induced and spontaneous alterations in human *hprt* DNA sequence and mRNA expression. *Mutation Research*, **226**:31–37.

Liteplo RG, Meek ME (2003) Inhaled formaldehyde: Exposure estimation, hazard characterization, and exposure–response analysis. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **B6**:85–114.

Luce D, Leclerc A, Begin D, Demers PA, Gerin M, Orlowski E, Kogevinas M, Belli S, Bugel I, Bolm-Audorff U, Brinton LA, Comba P, Hardell L, Hayes RB, Magnani C, Merler E, Preston-Martin S, Vaughan TL, Zheng W, Boffetta P (2002) Sinonasal cancer and occupational exposures: A pooled analysis of 12 case–control studies. *Cancer Causes and Control*, **13**:147–157.

Lutz WK (1998) Dose–response relationships in chemical carcinogenesis: Superposition of different mechanisms of action, resulting in linear–nonlinear curves, practical thresholds, J-shapes. *Mutation Research*, **405**:117–124.

Maronpot RR, Miller RA, Clarke WJ, Westerberg RB, Decker JR, Moss OR (1986) Toxicity of formaldehyde vapor in B6C3F1 mice exposed for 13 weeks. *Toxicology*, **41**:253–266.

Merk O, Speit G (1998) Significance of formaldehyde-induced DNA–protein crosslinks for mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **32**:260–268.

Monticello TM (1990) *Formaldehyde induced pathology and cell proliferation: A thesis*. Durham, NC, Duke University.

Monticello TM, Morgan KT (1994) Cell proliferation and formaldehyde-induced respiratory carcinogenesis. *Risk Analysis*, **14**:313–319.

Monticello TM, Morgan KT, Everitt JI, Popp JA (1989) Effects of formaldehyde gas on the respiratory tract of rhesus monkeys. Pathology and cell proliferation. *American Journal of Pathology*, **134**:515–527.

Monticello TM, Miller FJ, Morgan KT (1991) Regional increases in rat nasal epithelial cell proliferation following acute and subacute inhalation of formaldehyde. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **111**:409–421.

Monticello TM, Swenberg JA, Gross EA, Leiniger JR, Kimbell JS, Seilkop S, Starr TB, Gibson JE, Morgan KT (1996) Correlation of regional and nonlinear formaldehyde-induced nasal cancer with proliferating populations of cells. *Cancer Research*, **56**:1012–1022.

Morgan KT, Monticello TM (1990) Formaldehyde toxicity: Respiratory epithelial injury and repair. In: Thomassen DG, Nettesheim P, eds. *Biology, toxicology, and carcinogenesis of the respiratory epithelium*. Washington, DC, Hemisphere Publishing, pp. 155–171.

Morgan KT, Jiang X-Z, Starr TB, Kerns WD (1986) More precise localization of nasal tumors associated with chronic exposure of F-344 rats to formaldehyde gas. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **82**:264–271.

NICNAS (1994) *Glutaraldehyde. Full public report*. Canberra, Australian Government Publishing Service, National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme, July (Priority Existing Chemical No. 3).

NTP (1993) *NTP technical report on toxicity studies on glutaraldehyde (CAS No. 111-30-8) administered by inhalation to F344/N rats and B6C3F1 mice*. Research Triangle Park, NC, National Institutes of Health, National Toxicology Program (NTP Toxicity Report No. 25; NIH Publication No. 93-3348).

NTP (1999) *Toxicology and carcinogenesis studies of glutaraldehyde (CAS No. 111-30-8) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies)*. Research Triangle Park, NC, National Institutes of Health, National Toxicology Program (NTP Technical Report Series No. 490; NIH Publication No. 99-3980).

Olsen JH, Asnaes S (1986) Formaldehyde and the risk of squamous cell carcinoma of the sinonasal cavities. *British Journal of Industrial Medicine*, **43**:769–774.

Pinkerton L, Hein M, Stayner L (2004). Mortality among a cohort of garment workers exposed to formaldehyde: An update. *Occupational and Environmental Medicine*, **61**:193–200.

- Recio L (1997) Oncogene and tumor suppressor gene alterations in nasal tumors. *Mutation Research*, **380**:27–31.
- Recio L, Sisk S, Pluta L, Bermudez E, Gross EA, Chen Z, Morgan K, Walker C (1992) *p53* mutations in formaldehyde-induced nasal squamous cell carcinomas in rats. *Cancer Research*, **52**:6113–6116.
- Rietbrock N (1965) [Formaldehyde oxidation in the rat.] *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, **251**:189–190 (in German).
- Rusch GM, Clary JJ, Rinehart WE, Bolte HF (1983) A 26-week inhalation toxicity study with formaldehyde in the monkey, rat, and hamster. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **68**:329–343.
- Schlosser PM, Lilly PD, Conolly RB, Janszen DB, Kimbell JS (2003) Benchmark dose risk assessment for formaldehyde using airflow modeling and a single-compartment, DNA–protein cross-link dosimetry model to estimate human equivalent doses. *Risk Analysis*, **23**:473–487.
- Sewell BT, Bouloukos C, von Holt C (1984) Formaldehyde and glutaraldehyde in the fixation of chromatin for electron microscopy. *Journal of Microscopy*, **136**:103–112.
- Shaham J, Bomstein Y, Gurvich R, Rashkovsky M, Kaufman Z (2003) DNA–protein crosslinks and *p53* protein expression in relation to occupational exposure to formaldehyde. *Occupational and Environmental Medicine*, **60**:403–409.
- Soffritti M, Maltoni C, Maffei F, Biagi R (1989) Formaldehyde: An experimental multipotential carcinogen. *Toxicology and Industrial Health*, **5**:699–730.
- Speit G, Schutz P, Merk O (2000) Induction and repair of formaldehyde-induced DNA–protein crosslinks in repair-deficient human cell lines. *Mutagenesis*, **15**:85–90.
- St Clair MB, Gross EA, Morgan KT (1990) Pathology and cell proliferation induced by intranasal instillation of aldehydes in the rat: Comparison of glutaraldehyde and formaldehyde. *Toxicologic Pathology*, **18**:353–361.
- St Clair MB, Bermudez E, Gross EA, Butterworth BE, Recio L (1991) Evaluation of the genotoxic potential of glutaraldehyde. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **18**:113–119.
- Stroup NE, Blair A, Erikson GE (1986) Brain cancer and other causes of deaths in anatomists. *Journal of the National Cancer Institute*, **77**:1217–1224.
- Swenberg JA, Gross EA, Martin J, Popp JA (1983) Mechanisms of formaldehyde toxicity. In: Gibson JE, ed. *Formaldehyde toxicity*. Washington, DC, Hemisphere Publishing, pp. 132–147.

Swenberg JA, Gross EA, Martin J, Randall HA (1986) Localization and quantitation of cell proliferation following exposure to nasal irritants. In: Barrow CS, ed. *Toxicology of the nasal passages*. Washington, DC, Hemisphere Publishing, pp. 291–300.

Takahashi M, Hasegawa R, Furukawa F, Toyoda K, Sato H, Hayashi Y (1986) Effects of ethanol, potassium metabisulfite, formaldehyde and hydrogen peroxide on gastric carcinogenesis in rats after initiation with *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine. *Japanese Journal of Cancer Research*, **77**:118–124.

Til HP, Woutersen RA, Feron VJ, Hollanders VHM, Falke HE (1989) Two-year drinking-water study of formaldehyde in rats. *Food and Chemical Toxicology*, **27**:77–87.

Titenko-Holland N, Levine AJ, Smith MT, Quintana PJ, Boeniger M, Hayes R, Suruda A, Schulte P (1996) Quantification of epithelial cell micronuclei by fluorescence in situ hybridization (FISH) in mortuary science students exposed to formaldehyde. *Mutation Research*, **371**:237–248.

Tobe M, Naito K, Kurokawa Y (1989) Chronic toxicity study on formaldehyde administered orally to rats. *Toxicology*, **56**:79–86.

Uotila L, Koivusalo M (1974) Formaldehyde dehydrogenase from human liver. Purification, properties, and evidence for the formation of glutathione thiol esters by the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, **249**:7653–7663.

Uotila L, Koivusalo M (1997) Expression of formaldehyde dehydrogenase and *S*-formylglutathione hydrolase activities in different rat tissues. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **414**:365–371.

Van Miller JP, Hermansky SJ, Neptun DA, Loscoa PE, Ballantyne B (1995) Combined chronic toxicity/oncogenicity study with glutaraldehyde (GA) in the drinking water of rats. *Toxicologist*, **15**:203 (abstract).

Vargová M, Janota S, Karellová J, Barancokova M, Šulcová M (1992) Analysis of the health risk of occupational exposure to formaldehyde using biological markers. *Analysis*, **20**:451–454.

Vock EH, Lutz WK, Ilinskaya O, Vamvakas S (1999) Discrimination between genotoxicity and cytotoxicity for the induction of DNA double-strand breaks in cells treated with aldehydes and diepoxides. *Mutation Research*, **441**:85–93.

Walrath J, Fraumeni JF Jr (1983) Mortality patterns among embalmers. *International Journal of Cancer*, **31**:407–411.

Wolf DC, Gross EA, Lycht O, Bermudez E, Recio L, Morgan KT (1995) Immunohistochemical localization of p53, PCNA, and TGF- α proteins in formaldehyde-induced rat nasal squamous cell carcinomas. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **132**:27–35.

Woutersen RA, van Garderen-Hoetmer A, Bruijntjes JP, Zwart A, Feron VJ (1989) Nasal tumours in rats after severe injury to the nasal mucosa and prolonged exposure to 10 ppm formaldehyde. *Journal of Applied Toxicology*, **9**:39–46.

Ying C-J, Yan W-S, Zhao M-Y, Ye X-L, Xie H, Yin S-Y, Zhu X-S (1997) Micronuclei in nasal mucosa, oral mucosa and lymphocytes in students exposed to formaldehyde vapor in anatomy class. *Biomedical and Environmental Science*, **10**:451–455.

Zeiger E, Gollapudi B, Spencer P (2005) Genetic toxicity and carcinogenicity studies of glutaraldehyde—A review. *Mutation Research*, **589**:136–151.

Zissu D, Gagnaire F, Bonnet P (1994) Nasal and pulmonary toxicity of glutaraldehyde in mice. *Toxicology Letters*, **71**:53–62.

Zissu D, Bonnet P, Binet S (1998) Histopathological study in B6C3F1 mice chronically exposed by inhalation to glutaraldehyde. *Toxicology Letters*, **95**:131–139.

Zwart A, Woutersen RA, Wilmer JWGM, Spit BJ, Feron VJ (1988) Cytotoxic and adaptive effects in rat nasal epithelium after 3-day and 13-week exposure to low concentrations of formaldehyde vapour. *Toxicology*, **51**:87–99.

Appendix: Summary of studies on micronuclei and chromosomal aberrations in humans exposed to formaldehyde (IARC, 2005).

Reference	Target tissue	End-point	Response (control vs exposed)	Comments and exposures
Vargová et al. (1992)	PBL	CA	3.6% vs 3.08%	$n = 20$; high frequency in controls; wood splinter manufacture; formaldehyde 8-h TWA 0.55–10.36 mg/m ³ 5–>16 years
Ballarin et al. (1992)	Nasal mucosa	MN	0.25 ± 0.22% vs 0.90 ± 0.47% ($P < 0.01$)	Concurrent exposure to wood dust; no dose–response
Burgaz et al. (2001)	Nasal mucosa	MN	0.61 ± 0.27% vs 1.01 ± 0.62% ($P < 0.01$)	Exposed, $n = 23$; non-exposed, $n = 27$; no dose–response
Burgaz et al. (2002)	Oral mucosa	MN	0.33 ± 0.30% vs 0.71 ± 0.56% pathology laboratory ($P < 0.05$) 0.33 ± 0.30% vs 0.62 ± 0.45% shoe factory ($P < 0.05$)	Exposed, $n = 22$ variable exposures; $n = 28$ exposed to formaldehyde; non-exposed, $n = 28$; correlation with duration of exposure
Titenko-Holland et al. (1996)	Oral mucosa	MN	0.6 ± 0.5% vs 2.0 ± 2.0% ($P = 0.007$)	Exposed, $n = 28$; pre- versus post-exposure; no details on smoking habits; formaldehyde concentrations:
	Nasal mucosa	MN	2.0 ± 1.3% vs 2.5 ± 1.3% (NS)	Oral: 1.2 mg/m ³ -h vs 18 mg/m ³ -h, 90 days Nasal: 2.4 mg/m ³ -h vs 20 mg/m ³ -h, 90 days
Ying et al. (1997)	Nasal mucosa	MN	1.20 ± 0.67 vs 3.84 ± 1.48 ($P < 0.001$)	Exposed, $n = 25$; pre- versus post-exposure; questions about controlling for age, sex, and smoking habits; formaldehyde concentrations
	Oral mucosa	MN	0.57 ± 0.32 vs 0.86 ± 0.56 ($P < 0.001$)	0.508 ± 0.299 mg/m ³ vs 0.012 ± 0.0025 mg/m ³
	PBL	MN	0.91 ± 0.39 vs 1.11 ± 0.54 (NS)	
He et al. (1988)	PBL	CA	3.40 ± 1.57% vs 5.96 ± 2.40% ($P < 0.01$)	Chromosomal aberrations included breaks and gaps, which renders interpretation difficult
		MN	3.15 ± 1.46% vs 6.38 ± 2.50% ($P < 0.01$)	

CA, chromosomal aberrations; MN, micronuclei; NS, not significant; PBL, peripheral blood lymphocytes; TWA, time-weighted average.

**IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE
RELEVANCE OF A NON-CANCER MODE OF ACTION
FOR HUMANS**

PREFACE

Following completion of the IPCS Framework for Analysing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans (see [Part 1](#)), an expert meeting was convened in Geneva in 2006 to explore the question as to whether the IPCS framework could be applied in chemical risk assessment generally (i.e. to develop a non-cancer framework). The participants at this expert meeting concluded that the framework should be applicable to all end-points and proceeded to author a draft publication out of session. The draft was sent for peer review by the members of the Harmonization Project Steering Committee and subsequently revised by the authors, taking into account the peer review comments received.

LIST OF CONTRIBUTORS

Alan R. Boobis

Section of Experimental Medicine and Toxicology, Division of Medicine, Imperial College London, Hammersmith Campus, London, United Kingdom

John E. Doe

European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC), Brussels, Belgium

Barbara Heinrich-Hirsch

Safety of Substances and Preparations, Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, Germany

M.E. (Bette) Meek

Existing Substances Division, Safe Environments Programme, Health Canada, Ottawa, Ontario, Canada

Sharon Munn

Toxicology and Chemical Substances, Institute for Health and Consumer Protection, Joint Research Centre, European Chemicals Bureau, Ispra, Italy

Mathuros Ruchirawat

Chulabhorn Research Institute (CRI), Lak Si, Bangkok, Thailand

Josef Schlatter

Nutritional and Toxicological Risks Section, Swiss Federal Office of Public Health, Zurich, Switzerland

Jennifer Seed

Risk Assessment Division, Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA

Carolyn Vickers

International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, Switzerland

LIST OF ACRONYMS AND ABBREVIATIONS

ACE	angiotensin-converting enzyme
CSAF	chemical-specific adjustment factor
EMS	eosinophilia-myalgia syndrome
HBOC	haemoglobin-based oxygen carriers
HRF	Human Relevance Framework
ILO	International Labour Organization
ILSI	International Life Sciences Institute
IPCS	International Programme on Chemical Safety
MOA	mode of action
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
RSI	Risk Science Institute (ILSI)
SLE	systemic lupus erythematosus
UNEP	United Nations Environment Programme
WHO	World Health Organization

IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A NON-CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS¹

Alan R. Boobis, John E. Doe, Barbara Heinrich-Hirsch, M.E. (Bette) Meek, Sharon Munn, Mathuros Ruchirawat, Josef Schlatter, Jennifer Seed, & Carolyn Vickers

Structured frameworks are extremely useful in promoting transparent, harmonized approaches to the risk assessment of chemicals. One area where this has been particularly successful is in the analysis of modes of action (MOAs) for chemical carcinogens in experimental animals and their relevance to humans. The International Programme on Chemical Safety (IPCS) recently published an updated version of its MOA Framework in animals to address human relevance (cancer Human Relevance Framework, or HRF). This work has now been extended to non-cancer effects, with the eventual objective of harmonizing framework approaches to both cancer and non-cancer end-points. As in the cancer HRF, the first step is to determine whether the weight of evidence based on experimental observations is sufficient to establish a hypothesized MOA. This comprises a series of key events causally related to the toxic effect, identified using an approach based on the Bradford Hill criteria. These events are then compared qualitatively and, next, quantitatively between experimental animals and humans. The output of the analysis is a clear statement of conclusions, together with the confidence, analysis, and implications of the findings. This framework provides a means of ensuring a transparent evaluation of the data, identification of key data gaps and of information that would be of value in the further risk assessment of the compound, such as on dose–response relationships, and recognition of potentially susceptible subgroups, for example, based on life stage considerations.

The framework described in this paper, a non-cancer Human Relevance Framework (HRF), was prepared by the International Programme on Chemical Safety (IPCS) (WHO/ILO/UNEP) project on the Harmonization of Approaches to the Assessment of Risk from Exposure to Chemicals. This global “Harmonization Project” aims to harmonize global approaches to chemical risk assessment through both increased consistency of risk assessment methodologies and development of international guidance documents. The project enables the achievement of commitments on harmonization of chemical risk assessment methodologies agreed by the United Nations Conference on Environment and Development (United Nations, 1992), the Intergovernmental Forum on Chemical Safety (1994), the World Summit on Sustainable Development (UNEP, 2002), and the Strategic Approach to International Chemicals Management (WHO, 2006). The project involves experts from the different sectors where chemicals are assessed, and hence the documents produced can be applied in the assessment of industrial chemicals, biocides, pesticides, veterinary chemicals, pharmaceuticals, cosmetics, natural toxicants, food additives, and environmental contaminants in food, water, air, and consumer products.

A main outcome of the Harmonization Project is the IPCS Conceptual Framework for Evaluating a Mode of Action for Chemical Carcinogenesis (Sonich-Mullin et al., 2001) and

¹ This article, to which WHO owns copyright, was published in 2008 in *Critical Reviews in Toxicology*, Volume 38, pages 87–96. It has been edited for this WHO publication.

its subsequent development into an IPCS Framework for Analysing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans (IPCS cancer HRF) (Boobis et al., 2006; see also [Part 1](#) of this document). The mode-of-action (MOA) analysis utilizes a weight-of-evidence approach based on the Bradford Hill criteria for causality (Hill, 1965). It aims to determine whether it is possible to establish an MOA for a carcinogenic response observed in an experimental animal study, through application of a weight-of-evidence approach that requires identification of key events along the causal pathway to cancer. When an MOA has been established in experimental animals, the cancer HRF provides an analytical tool to enable the transparent evaluation of the data in order to consider the human relevance of the MOA.

Following on from this, IPCS decided to consider whether the framework for cancer could be applied, with modifications, if necessary, to other end-points and their associated MOAs. Recognizing the work that the Risk Science Institute (RSI) of the International Life Sciences Institute (ILSI) had conducted in parallel to develop a similar framework and apply it to non-cancer risk assessment, IPCS convened an international meeting in Geneva in March 2006 to review and consider the ILSI publication (Seed et al., 2005), along with the IPCS cancer HRF (Boobis et al., 2006; see also Part 1 of this document), in order to explore the question as to whether the IPCS framework could be applied in chemical risk assessment generally. In summary, this IPCS meeting recognized that the framework should be applicable to all end-points, both cancer and non-cancer, and recommended further work to put this into practice, including documenting the rationale for application of the framework more generally, which appears in the present paper, and steps to facilitate uptake and use of the framework.

The IPCS meeting recognized that the non-cancer HRF would have multiple uses in chemical risk assessment:

- It would provide an internationally harmonized approach to the establishment of an MOA in experimental animals and its relevance to humans.
- It would generate criteria for the MOA against which subsequent cases could be considered—that is, to show whether a compound shares an established MOA.
- It would enable clarification of key information relating to the human relevance of the MOA, and this would inform the assessment of other chemicals that share the MOA.
- In general, application of the framework would enable critical data deficiencies and research needs to be identified and inform qualitative and quantitative assessment.

THE NEED FOR A NON-CANCER HUMAN RELEVANCE FRAMEWORK

The non-cancer HRF is a tool that provides a structured approach to the assessment of human relevance of a postulated MOA in animals in a weight-of-evidence context. Subsequently, it includes explicit consideration of the relevance of the proposed MOA to humans, often based on consideration of more generic information, such as anatomical, physiological, and biochemical variations among species. In this manner, the framework encourages maximum use of both chemical-specific and more generic information in a transparent and analytical fashion.

Pivotal to transparency in determining human relevance using the framework are the delineation and consideration of the nature of evidence in various species of key events—that is, those in a postulated MOA that are measurable and critical to the induction of the toxicological response. Evaluation of the concordance of key events based on explicit consideration of variations between experimental animals and humans constitutes the principal basis of transparency in consideration of weight of evidence for human relevance.

While principally relevant to hazard characterization, the non-cancer HRF additionally contributes more generally to transparency in risk assessment through explicit delineation and consideration of data on appropriate key events that are also relevant to subsequent dose–response analysis for MOAs deemed relevant to humans. If the MOA in experimental animals is judged to be qualitatively relevant to humans, a more quantitative assessment is required that takes into account any kinetic and dynamic information that is available from both the experimental animals and humans in order to determine whether human relevance might be precluded on this basis.

These same data are critical to subsequent dose–response analysis for MOAs considered relevant in considering the adequacy of, for example, available information as a basis for replacement of default uncertainty factors in the development of chemical-specific adjustment factors (CSAFs) (IPCS, 2005). This information could, for example, constitute an adequate basis to consider interspecies variation in rates of formation of reactive metabolites in the target tissue, for replacement of the default subfactor for interspecies differences in toxicokinetics with a CSAF (IPCS, 2005).

Use of this non-cancer HRF also promotes harmonization of approaches to risk assessment for all end-points, bridging previously distinct approaches on, for example, cancer and non-cancer effects. Harmonization in this context refers to a biologically consistent approach to risk assessment for all end-points, for which exploration of biological linkages is critical to ensuring maximal use of relevant information. Often, for example, organ toxicity is a critical key event in postulated MOAs for induction of tumours at the same site. The non-cancer HRF, then, sets the stage for identification of critical precursor non-cancer key events for which subsequent quantification of interspecies differences and interindividual variability in dose–response analysis is relevant. In other cases, a postulated MOA may lead to toxic effects in multiple organs, and these would be considered in the same non-cancer HRF analysis.

In addition, consideration in a transparent framework may identify factors that, while not themselves essential for the toxicological effect (and hence not key events), may modulate key events and, as a result, contribute to differences between species or individuals. Such factors include genetic differences in pathways of metabolism, competing pathways of metabolism, and cell proliferation induced by concurrent pathology.

Such an analysis may also provide an indication of those components of a proposed MOA that may operate only over a certain dose range. If a high experimental dose of a given compound is needed to result in an obligatory step in an MOA, then the relevance to human

risk becomes a matter of exposure. Thus, the exposure assessment step of the risk assessment is critical to a comprehensive evaluation.

Importantly, then, application of the non-cancer HRF contributes to identification of any specific subpopulations (e.g. those with genetic predisposition) who are at increased risk and provides information relevant to consideration of relative risks at various life stages. In many cases, this is based not on chemical-specific information but rather on inference, based on knowledge of the MOA, as to whether specific age groups may be at increased or decreased risk. This requires explicit consideration of comparative developmental and ageing processes and events in humans and animal models. These considerations are critical to determination of focus in the remaining stages of risk assessment, such as dose–response analysis.

The transparent delineation of the weight of evidence for postulated MOAs and their relevance to humans (requiring explicit consideration of the strengths and weaknesses of the available database, as well as highlighting qualitative and quantitative similarities and differences among species and related uncertainties) also identifies any inconsistencies in the available data and defines critical data gaps and research needs. This derives from the requirement in each step to explicitly assess confidence in the quality and quantity of data underlying the analysis, consistency of the analysis within the framework, consistency of the database—that is, that studies are not contradictory of each other—and the nature and extent of the concordance analysis.

Iterative application of the non-cancer HRF, even before all of the data are available, to the analysis of a postulated MOA and its relevance to humans are beneficial as a basis for developing and refining research strategies as additional information becomes available. In this context, the framework should prove helpful in facilitating discussion between risk assessors and research scientists in jointly understanding the nature of data that would support human relevance analysis of a postulated MOA in animals and defining next steps in data acquisition. Iterative consideration of MOA in designing research strategies is also expected to increase efficiency by focusing resources in critical areas in more tiered and targeted approaches.

As knowledge advances, MOAs will become less chemical specific and based even more on the key biological processes involved, allowing greater generalization of human relevance from one compound to another. The need for chemical-specific data for established MOAs will be less, although it will always be necessary to establish rigorously that the key events comprising the MOA occur.

The transparency in the human relevance of a postulated MOA that results from application of the non-cancer HRF should promote confidence in the conclusions reached, through the use of a defined procedure that encourages clear and consistent documentation supporting the analysis and reasoning, highlights inconsistencies and uncertainties in the available data, and identifies critically important data gaps that, when filled, would increase confidence in outcome. This transparency not only is anticipated to facilitate discussion between the risk assessment and research communities, but may also contribute to greater convergence among different regulatory agencies.

The non-cancer HRF also provides the basis for improved process and content for scientific peer input and peer review, specifying minimum criteria of clarity and transparency as a basis to acquire input and acceptance of postulated MOAs and their relevance to humans. Adherence to these criteria enables others to determine the basis of the conclusions reached with respect to the key events, the exclusion of other MOAs, and the analysis of human relevance.

WHEN WOULD THE NON-CANCER HRF BE APPLIED?

The non-cancer HRF provides a valuable tool to assess an MOA, but it requires significant amounts of effort and experimental work, so it is not something that would be used during the course of the assessment of every chemical. Its main purpose would be to determine whether to apply the default assumption that all effects seen in animals are relevant to humans. This question increases in importance when the application of the default assumption during the course of a risk assessment indicates that adverse effects are likely to occur—for example, where there is a low margin of exposure between the point of departure for the effect under consideration and the estimated human exposure, especially if the human exposure estimate has already been refined. It then becomes important to know whether risk management measures will be required. This is of most concern when new data emerge, such as those identifying a new effect, additional data on the dose–response relationship of the chemical, or changes in use pattern or exposure estimation, which change the risk assessment of a chemical that is already in use.

Use of the non-cancer HRF may also be of value in the situation where the effects in animals would have potentially serious consequences if they occurred in humans, such as neurotoxicity or teratogenesis. These effects are subject to very rigorous risk assessment procedures, so they comparatively frequently suggest the need for risk management measures.

Another situation in which use of the non-cancer HRF should be considered is where there are interspecies differences in either the type of effect or the dose levels at which an effect occurs. In these cases, it will be important to understand which species is the most appropriate upon which to base extrapolation to humans. This indication would also apply to differences between sexes or strains in the same species.

These situations indicate that further consideration is required, and the non-cancer HRF provides a way of doing this. The framework can be applied at any stage in the process of considering an effect. It should be applied in an iterative way during the course of investigating an effect to help guide the scientist. When an effect has first been observed and gives rise to concern, the framework allows the investigator to structure the work programme by prompting the questions to be addressed. As the investigation develops, it guides the investigator in assessing the data as they are generated and provides pointers in deciding whether and what other data would be required.

In situations where there is a large body of data, the framework allows the evaluator to weight the evidence according to its significance as well as its volume.

The non-cancer HRF can also be useful when a chemical is observed to cause an effect suspected of being caused by an MOA that has already been established using the framework or shares structural similarity to a chemical or class of chemicals with an established MOA. The earlier use of the non-cancer HRF to establish this MOA will have identified the key steps that need to be investigated in order to ascribe the MOA to the new chemical. This will prove valuable both in a prospective way in designing new research or testing programmes and retrospectively in evaluating a data set.

CONSIDERATION OF THE NON-CANCER HRF

The non-cancer HRF is an analytical tool that enables a structured approach to the assessment of the overall weight of the evidence for the postulated MOA and its relevance to humans. The framework is not designed to provide an absolute answer on sufficiency of the information, as this will vary, depending on the circumstance. It must be emphasized that it is not a checklist of criteria but an approach to data evaluation and presentation. The output from the application of the framework serves as the basis for the continuation of the risk assessment of the compound.

It is envisaged that the non-cancer HRF will be applicable to a wide range of toxicological end-points, encompassing changes in structure and function of organs, tissues, and cells, including physiological and neurobehavioural effects. The types of toxicity that could be addressed using the framework include, but are not limited to:

- *Organ toxicity*: Examples include benzene-induced haematotoxicity (aplastic anaemia), paraquat-induced lung toxicity, chloroquine-induced ocular toxicity.
- *Reproductive toxicity*: Examples include phthalate-induced male infertility, dioxin-induced dysregulation of female fertility.
- *Developmental toxicity*: Examples include methylmercury-induced developmental neurotoxicity, retinoid-induced teratogenesis.
- *Neurotoxicity*: Examples include lead-induced peripheral neuropathy, acrylamide-induced axonopathy, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced Parkinson disease.
- *Immunotoxicity*: Examples include organotin-induced immunosuppression, isoniazid-induced systemic lupus erythematosus (SLE)-like syndrome, contaminated L-tryptophan-induced eosinophilia-myalgia syndrome (EMS).

Introduction to MOA

Prior to embarking on a non-cancer HRF analysis, there needs to be careful evaluation of the weight of evidence for a toxicological response on exposure to a chemical in experimental animals. The nature of the non-cancer HRF is such that only one MOA is analysed at a time; hence, for example, different toxicological effects associated with chemical administration, even if observed in the same animals, will require separate framework analyses to discern the MOA for each effect. Consistent with species- and tissue-specific variation in metabolic activation and detoxication, there may be poor site concordance for some toxicants. This will need to be kept in mind when comparing animal and human data.

Postulated mode of action (theory of the case)

This comprises a brief outline of the sequence of events in the MOA postulated to be responsible for the toxicological effect of the test substance. This description leads into the next section, which identifies the events considered “key” (i.e. necessary and measurable) in the MOA.

Key events

The “key events” in the MOA are briefly identified and described. Key events are those events that are critical to the induction of the toxicological response as hypothesized in the postulated MOA and are also measurable. To support an event as key, there needs to be a body of experimental data in which the event is characterized and consistently measured. The types of information that might be relevant include, for example, toxicological response and relevant key events in the same cell type, sites of action logically related to the event(s), specific biochemical events, changes in the expression or activity of enzymes, receptor–ligand interactions, effects on cofactor levels, specific changes in histology, changes in cell proliferation (increased or decreased), perturbations in hormone homeostasis or other signalling pathways (either intracellular or extracellular), second messengers, or ion fluxes, increased degradation of macromolecules, and changes in membrane permeability or integrity.

Concordance of dose–response relationships

The dose–response relationships for each of the key events and for the toxicological response should be characterized and their interrelationships discussed with respect to the Bradford Hill criteria (Hill, 1965). Ideally, it should be possible to correlate the dose dependency of the increases in the magnitude (or frequency) of a key event with increases in the severity (e.g. lesion progression) of other key events occurring later in the process and with the ultimate toxicological response. Comparative tabular presentation of the magnitude of changes in key events and toxicological response is often helpful in examining dose–response concordance.

It is important to consider whether there are fundamental differences in the biological response (i.e. dose transitions) at different parts of the dose–response curve (Slikker et al., 2004). If so, key events relevant to the different parts of the dose–response curve will need to be defined and used in the framework analysis.

Temporal association

The temporal relationships for each of the key events and for the toxicological response should be characterized. Key events should be observable before toxicity is apparent and should be consistent temporally with each other; this is an essential step in deciding whether the data support the postulated MOA. Observations of key events at the same time as the toxicological response (e.g. at the end of a study) do not permit conclusions as to temporal association, but can contribute to the analysis described in the next section.

Strength, consistency, and specificity of association of toxicological response with key events

The weight of evidence linking the key events, any precursor lesions, and the toxicological response should be addressed (see [Weed \[2005\]](#) for a discussion of what is meant by weight of evidence). Stop/recovery studies showing absence or reduction of toxicity when a key

event is blocked or reduced are particularly useful tests of the association. Consistent observations in a number of studies, with different experimental designs, increase support for the MOA, since different designs can reduce any unknown bias or confounding. Consistency, which is the repeatability of the key events in the postulated MOA in different studies, is distinct from coherence, however, which addresses the relationship of the postulated MOA with observations more broadly (see next point). Observations that may be of value here include toxicological response and relevant key events in the same cell type, sites of action logically related to event(s), and results from stop/recovery studies.

Biological plausibility and coherence

One should consider whether the MOA is consistent with what is known about the biology of the target process/site in general (biological plausibility) and also in relation to what is known specifically about the overall biological effects of the substance (coherence). For the postulated MOA and its associated key events to be biologically plausible, they need to be consistent with current understanding of biology. However, when using biological plausibility as a criterion against which weight of evidence is assessed, it is important to consider the potential for gaps in our knowledge. Coherence, which addresses the relationship of the postulated MOA with chemical-specific observations more broadly—for example, association of the MOA for the toxicological response with that for other end-points—needs to be distinguished from consistency (addressed in the preceding point). In assessing coherence, information on structural analogues may be of value (i.e. structure–activity analysis). Information from other compounds that share the postulated MOA may also be helpful, such as sex, species, and strain differences in sensitivity and their relationship to key events. Additionally, this section should consider whether the database on the agent is internally consistent in supporting the proposed MOA.

Other modes of action

Alternative MOAs that logically present themselves should be considered. If alternative MOAs are supported, they will need a separate non-cancer HRF analysis. These should be distinguished from additional components of a single MOA, since these would be addressed as part of the MOA under consideration.

Uncertainties, inconsistencies, and data gaps

Uncertainties should be stated fully and explicitly. They should include those related to the biology of the toxicological response and those for the database on the compound being evaluated. Any inconsistencies should be noted and data gaps identified. It should be clearly stated whether the identified data gaps are critical in supporting the postulated MOA.

Assessment of postulated mode of action

There should be a clear statement of the outcome of the analysis, indicating the level of confidence in the postulated MOA—for example, high, moderate, or low. If a novel MOA is being proposed, this should be clearly indicated. However, if the MOA is the same as one previously described, the extent to which the key events fit this MOA needs to be stated explicitly. Any major differences should be noted and their implications for acceptance of the MOA discussed.

Life stage considerations

Since the response of an organism to a chemical exposure may vary through its lifespan, consideration of life stage is important for the MOA analysis of all toxic end-points. This is particularly true for effects that result from developmental exposures, since organ susceptibility may be restricted to critical periods of development, may depend on the ontogeny of key metabolic enzymes, or may depend on the interaction of the developing organism with its mother (see [Zoetis & Walls, 2003](#)). In addition, disruption of developmental processes may have downstream consequences.

Consideration of the ageing process is also important, for several reasons. First, developmental exposures can result in toxicities that are not detected until much later in life. In addition, there can be species-specific patterns of ageing for different organ systems. For example, reproductive senescence has a different etiology in rodents and humans and can even differ among different strains of rodents.

Human relevance

If it is possible to establish an MOA in animals for a toxicological effect, the next stage is to evaluate its relevance to humans. The IPCS non-cancer HRF is presented as an approach to answering a series of three (or four) questions, leading to a documented, logical conclusion regarding the human relevance of the MOA underlying the toxicological effect. The application of the guidance results in a narrative with four (or five) sections, which may be incorporated into the hazard characterization of a risk assessment.

1. Is the weight of evidence sufficient to establish a mode of action (MOA) in animals? This question is addressed by performing an MOA analysis as described above, the steps of which are based on the Bradford Hill criteria for causality (Hill, 1965). The weight of evidence for possible alternative MOAs needs to be considered and a conclusion reached on the overall strength of evidence supporting the MOA under consideration. The approach also identifies any critically important data gaps that, when filled, would increase confidence in the proposed MOA. If the postulated MOA has already been described for other chemicals, its human relevance will already have been evaluated. If the proposed MOA is novel, human relevance will need to be assessed de novo.

2. Can human relevance of the MOA be reasonably excluded on the basis of fundamental, qualitative differences in key events between experimental animals and humans? This step involves a qualitative assessment of the relevance of the MOA to humans. Listing the critical key events that occur in the animal MOA and directly evaluating whether or not each of the key events might occur in humans facilitate the evaluation and increase the transparency of the process. Presentation in tabular form, referred to as a concordance table, can be particularly useful. The information in such tables should be relatively brief, as a narrative explanation should always accompany the table. In one column, the effect on humans for each of the key events is evaluated. Another column for the results in a different strain, species, or sex or for a different route of administration that does not result in toxicity can be useful for comparative purposes. Factors may be identified that, while not key themselves, can modulate key events and so contribute to differences between species or individuals. Examples include genetic differences in pathways of metabolism, competing pathways of

metabolism, and effects induced by concurrent pathology. Any such factors identified should be noted in a footnote to the concordance table.

The evaluation of the concordance of the key events for the MOA for a given chemical in humans is an evaluation of the MOA in humans, rather than an evaluation of the specific chemical. In general, details of the initial key events are likely to be more chemical specific. Later events will be more generic to the MOA. While information for evaluating the key events in humans can come from in vitro and in vivo studies on the substance itself, basic information on anatomy, physiology, endocrinology, genetic disorders, epidemiology, and any other information that is known regarding the key events in humans can be of value.

In answering this question, a narrative describing the weight of evidence and an evaluation of the level of confidence for the human information should be prepared. Examples of specific types of information that can be useful include:

- where appropriate, background incidences of the effect at the anatomical site and cell type of interest, including age, sex, ethnic differences, and risk factors, including chemicals and other environmental agents;
- knowledge of the nature and function of the target site, including development, structure (gross and microscopic), and control mechanisms at the physiological, cellular, and biochemical levels;
- human and animal disease states that provide insight concerning target organ regulation and responsiveness;
- human and animal responses to the chemical under review or structural analogues following short-, intermediate-, or long-term exposure, including target organs and effects.

Obviously, a substantial amount of information is required to conclude that a given MOA is not relevant to humans. If such a conclusion is strongly supported by the data, exposure to chemicals producing toxicity only by that MOA would not pose a risk to humans, and no additional risk characterization for this end-point is required.

The question of relevance considers all groups and life stages. It is possible that the conditions under which an MOA operates occur primarily in a susceptible subpopulation or life stage—for example, in those with a pre-existing viral infection, hormonal imbalance, or disease state. Any information suggesting qualitative or quantitative differences in susceptibility is highlighted for use in risk characterization.

There are several aspects relating to life stage that should be considered in the non-cancer HRF analysis. First, the analysis should consider the comparative developmental processes and events that occur in humans and the animal model(s) (see [Zoetis & Walls, 2003](#)). This comparison will demonstrate the extent to which developmental processes are similar in humans and the animal model(s). In general, development is highly conserved; where this is the case, it would lead to a conclusion that the MOA in animals is also plausible in humans. However, there are some developmental processes that are unique to some species, which may therefore lead to a species-specific MOA that will not be plausible in humans.

Second, the analysis should consider the phase specificity or relative timing of the developmental processes or events in humans and the animal model(s). Critical developmental events may occur at different times during ontogeny. Some developmental events may occur early during the prenatal development of the animal and relatively late in human prenatal development. Other developmental events may occur prenatally in humans and postnatally in the animal, or vice versa. Differences in timing of the developmental events can have an impact on the dose metrics if there are substantial differences in placental versus lactational transfer. Similarly, a comparison of the ontogeny of key metabolic enzymes relative to the key developmental process may reveal substantial differences between humans and the animal model. Such considerations may lead to a conclusion that the animal MOA is not plausible in humans.

3. Can human relevance of the MOA be reasonably excluded on the basis of quantitative differences in either kinetic or dynamic factors between experimental animals and humans?

If the MOA in experimental animals cannot be judged to be qualitatively irrelevant to humans (no to question 2), a more quantitative assessment is undertaken, taking into account any kinetic and dynamic information that is available from experimental animals and humans. Such data will of necessity be both chemical and MOA specific and where possible should include the biologically effective doses required to produce the dynamic effects giving rise to the toxicity. Kinetic considerations include the rate and extent of absorption, tissue distribution, metabolism, and excretion. Differences in ontogeny can result in substantial species differences in placental and lactational transfers, which will affect the dose metrics. This may therefore result in a quantitative difference in the MOA between humans and experimental animals. Similarly, the differential ontogeny of key metabolic enzymes can result in substantial quantitative differences between humans and experimental animals. Dynamic considerations include the consequences of the interaction of the chemical with cells, tissues, and organs. Only infrequently is it likely that it will be possible to dismiss human relevance on the basis of quantitative differences. Since quantitative exposure assessment is part of the subsequent risk characterization rather than the HRF, the difference would have to be of such a magnitude that human exposure could not possibly be envisaged to reach such levels. In most cases, it will not be possible to reach such a conclusion without undertaking formal exposure assessment in the subsequent risk characterization. Hence, the answer to the question will be *no*, but it may still be concluded that the risk is negligible in the subsequent risk characterization. Melamine-induced urinary bladder carcinogenesis provides a useful case-study illustrating this point (Meek et al., 2003). Again, tabular comparison of the data from experimental animals and humans can help in the evaluation. Information from studies of other compounds acting by the same or a similar MOA can be of value. As understanding of the basis for differences in responses between experimental animals and humans improves, differences in key events thought to be qualitative may be shown to be due to specific quantitative differences.

While it may not be possible to conclude that the MOA for toxicity is not relevant to humans on the basis of quantitative differences, during the evaluation it may become apparent that the magnitude of those differences is sufficient to impact markedly on the risk assessment. Hence, it is particularly important that the narrative for the answer to this question be comprehensive and capture as much quantitative information as possible.

As with question 2, if the response to this question is *yes*, then exposure to chemicals producing toxicity only by this MOA would not pose a risk to humans, and no additional risk characterization is required.

The preceding three questions comprise a decision tree (see Figure 1).

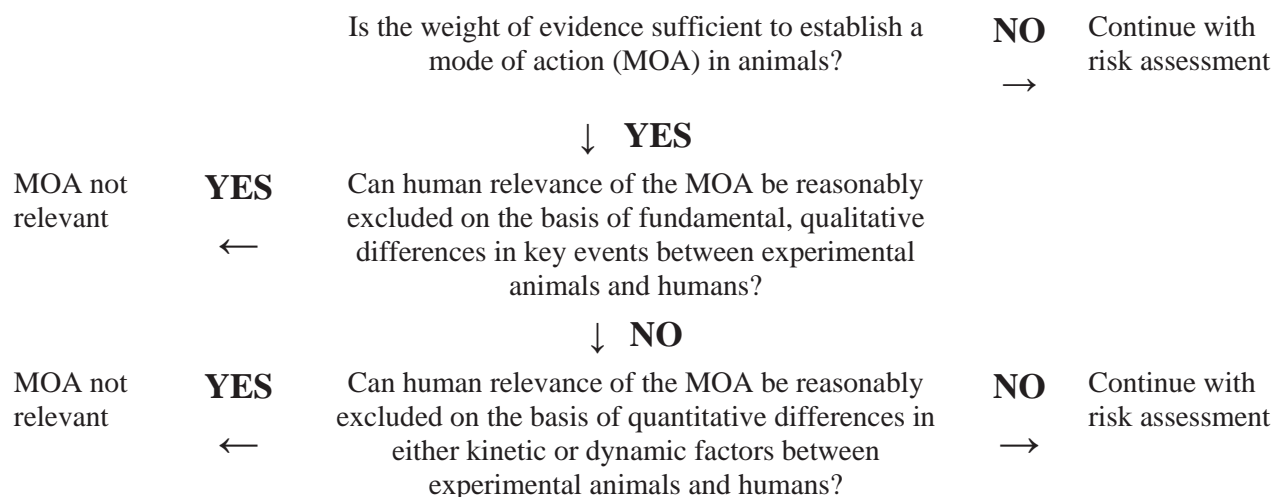


Figure 1. Decision tree for determining human relevance of an MOA for toxicity observed in experimental animals.

Potential implications for dose–response assessment

Should it not be possible to exclude human relevance of the MOA for toxicity prior to proceeding with the risk assessment, a further question should be addressed. This is: *4. Are there any quantitative differences in the key events such that default values for uncertainty factors for species or individual differences could be modified?* Such information, on either kinetics or dynamics, could be used to calculate a CSAF, in which one or more of the default values for species or interindividual differences in kinetics or dynamics are replaced by a value based on chemical-specific information (IPCS, 2005). The other components of the adjustment factor would retain their default values. Such information may lead to either an increase or a decrease in the adjustment factor relative to the normal default.

Published case-studies

In developing a framework for assessing the human relevance of MOAs for non-cancer endpoints, ILSI/RSI also developed a series of illustrative case-studies. These were on molinate-induced inhibition of spermatogenesis (Kavlock & Cummings, 2005a), renal and developmental effects of ethylene glycol (Corley et al., 2005), developmental neurotoxicity of nicotine (Slikker et al., 2005), phthalate ester effects on male reproductive development (Foster, 2005), vinclozolin-induced malformations (Kavlock & Cummings, 2005b), developmental effects of valproic acid (Wiltse, 2005), haemoglobin-based oxygen carriers (HBOC)-related congenital malformations (Holson et al., 2005), developmental effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors (Tabacova, 2005), developmental ototoxicity of polyhalogenated aromatic hydrocarbons (Crofton & Zoeller, 2005), and propylthiouracil-induced effects on neurological development (Zoeller & Crofton, 2005). While these cases

covered a range of end-points, most involved effects during development. Hence, there is a need for additional case-studies on other end-points, such as those indicated above. As experience is obtained in using this framework, some of the published cases could be further refined to provide valuable illustrative examples for training in the application of the framework.

In general, the cases have been very useful in highlighting a number of the key issues on which this non-cancer HRF is based. Examples include the importance of the concordance analysis, the value of quantitative information identified during the application of the framework when it is not possible to exclude human relevance, the need for a transparent and comprehensive narrative when reporting the conclusions of a framework analysis, the importance in identifying key data gaps (e.g. case-study on molinate and HBOC), identification of research needs (e.g. case-study on vinclozolin), the importance of understanding the formation of a specific metabolite, and the importance of establishing a robust MOA through the application of the Bradford Hill criteria (Hill, 1965) to the key events.

Statement of confidence, analysis, and implications

Following application of the non-cancer HRF and answering the three (or four) questions, a statement of confidence should be provided that addresses the quality and quantity of data underlying the analysis, the consistency of the analysis within the framework, the consistency of the database, and the nature and extent of the concordance analysis. Alternative MOAs should have been evaluated, when appropriate, with the same rigor. A critical outcome is the identification of specific data gaps that could be addressed experimentally to increase confidence in the analysis.

The output of the non-cancer HRF provides information that is useful for more than just determining whether or not the MOA for toxicity in experimental animals is relevant to humans. It can also provide much information that is critically important in subsequent steps in the risk characterization for relevant effects. For example, it may be possible to develop CSAFs on the basis of the information provided. Application of the framework can also provide information on relevant modulating factors that are likely to affect risk. In addition, it can identify those elements of a proposed MOA that operate only over a certain dose range. Where an obligatory step in an MOA occurs only following a high experimental dose of a compound, the relevance of the MOA to human risk is determined by the exposure. Thus, effective exposure assessment is particularly important to the evaluation of human risk from such toxicity.

The analysis also contributes to the identification of any specific subpopulations (e.g. those with genetic predisposition) who may be at increased risk and often provides information useful in considering relative risk at various life stages. This may be based not always on chemical-specific information but rather on inference, on the basis of knowledge of the MOA, as to whether the risk in specific age groups might be expected to differ.

The data and their analysis using the non-cancer HRF should be reported in a clear and comprehensive manner, so that others can determine the basis of the conclusions reached.

Although the specific form of presentation will vary with the type of data available, a structured report, including the key headings from the framework, should be provided where possible. Presentation should include sufficient details on the context and thought processes to ensure transparency of the conclusions reached. The inclusion of concordance tables is strongly encouraged. This increases transparency and facilitates peer engagement.

USE OF THE FRAMEWORK AND ITS OUTPUTS

The IPCS non-cancer HRF, which is based principally on robust concordance analysis of key events in postulated MOAs, is envisaged to be of value to both the risk assessment and research communities as a basis to contribute to harmonization in several areas, including:

- adequacy and nature of weight of evidence for postulated MOAs in animals and their relevance to humans;
- MOA integration across end-points;
- criteria for transparency to ensure sufficiency of peer input and review.

Among the strengths of the non-cancer HRF are its flexibility, transparency, and general applicability across end-points. This includes determination of the nature and shape of the dose–response curve, the identification and location of biological thresholds for individual key events, and their consequences. In addition, consideration of the kinetic and dynamic factors involved in each key event is informative regarding the relevance or not to specific subpopulations—for example, in early life, in those with particular diseases, or in those with specific polymorphisms. Alternatively, application of the framework can provide quantitative information on the differences between such groups. Human relevance analysis may also indicate that a species is inappropriate for evaluating a potentially relevant end-point because of dose limitations.

NEXT STEPS

To ensure effective adoption of the non-cancer HRF, there will be a need to train individuals in its application and in the interpretation of its outputs. Experience is being gained in the use of the cancer HRF, and the expertise gained would be applicable in the training of others in the use of the non-cancer HRF. Training would be facilitated by the availability of a number of suitable case-studies. Those published to date would be a sound basis for further development for this purpose (Seed et al., 2005). In addition, cases on a wider range of end-points need to be developed. It would be helpful if organizations with experience in non-cancer HRF analysis could develop courses and make the materials available to others with suitable expertise to help in training.

A database of generally accepted MOAs should be compiled and maintained, together with informative case-studies. Such a database would be of particular importance as experience continues to evolve in the development of MOAs and in determining whether the MOA for a compound is novel or has been described previously for other compounds.

The current non-cancer HRF, which arose out of the IPCS cancer HRF, is focused on non-cancer end-points. However, there are marked similarities in the philosophy and strategy to evaluating cancer and non-cancer effects. It is strongly recommended that one of the next steps in harmonization of risk assessment of chemicals should be the preparation of a unified HRF that is applicable to all toxicological end-points, including cancer. The integration of framework approaches into the risk assessment process should be further elaborated, in which illustrative examples would be of value. Some guidance on problem formulation before embarking on an HRF analysis should be included in such a framework document, as should guidance on the use of the outputs of HRF analysis in risk assessment. For example, during application of the framework, a much deeper understanding of dose–response relationships is often developed, which should be taken forward into hazard characterization. As indicated above, knowledge of any dose transitions is invaluable in interpreting exposure data. Identification of key events in the MOA can provide insight into the sources and magnitude of interspecies and interindividual differences.

REFERENCES

Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006) IPCS framework for analyzing the relevance of a cancer mode of action for humans. *Critical Reviews in Toxicology*, **36**:781–792.

Corley RA, Meek ME, Carney EW (2005) Mode of action: Oxalate crystal-induced renal tubule degeneration and glycolic acid-induced dysmorphogenesis—Renal and developmental effects of ethylene glycol. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:691–702.

Crofton KM, Zoeller RT (2005) Mode of action: Neurotoxicity induced by thyroid hormone disruption during development—Hearing loss resulting from exposure to PHAHs. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:757–769.

Foster PM (2005) Mode of action: Impaired fetal Leydig cell function—Effects on male reproductive development produced by certain phthalate esters. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:713–719.

Hill AB (1965) The environment and disease: Association or causation? *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, **58**:295–300.

Holson JF, Stump DG, Pearce LB, Watson RE, DeSesso JM (2005) Mode of action: Yolk sac poisoning and impeded histiotrophic nutrition—HBOC-related congenital malformations. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:739–745.

Intergovernmental Forum on Chemical Safety (1994) *The International Conference on Chemical Safety—Final report*. Geneva, World Health Organization (http://www.who.int/ifcs/documents/forums/forum1/en/FI-report_en.pdf).

IPCS (2005) *Chemical-specific adjustment factors for interspecies differences and human variability: Guidance document for use of data in dose/concentration–response assessment*.

Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Harmonization Project Document No. 2; http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241546786_eng.pdf).

Kavlock R, Cummings A (2005a) Mode of action: Reduction of testosterone availability—Molinate-induced inhibition of spermatogenesis. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:685–690.

Kavlock R, Cummings A (2005b) Mode of action: Inhibition of androgen receptor function—Vinclozolin-induced malformations in reproductive development. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:721–726.

Meek ME, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKeeman LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003) A framework for human relevance analysis of information on carcinogenic modes of action. *Critical Reviews in Toxicology*, **33**:591–653.

Seed J, Carney E, Corley R, Crofton K, DeSesso J, Foster P, Kavlock R, Kimmel G, Klaunig J, Meek E, Preston J, Slikker W, Tabacova S, Williams G (2005) Overview: Using mode of action and life stage information to evaluate the human relevance of animal toxicity data. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:663–672.

Slikker W Jr, Andersen ME, Bogdanffy MS, Bus JS, Cohen SD, Conolly RB, David RM, Doerr NG, Dorman DC, Gaylor DW, Hattis D, Rogers JM, Setzer RW, Swenberg JA, Wallace K (2004) Dose-dependent transitions in mechanisms of toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **201**:203–225.

Slikker W Jr, Xu ZA, Levin ED, Slotkin TA (2005) Mode of action: Disruption of brain cell replication, second messenger, and neurotransmitter systems during development leading to cognitive dysfunction—Developmental neurotoxicity of nicotine. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:703–711.

Sonich-Mullin C, Fielder R, Wiltse J, Baetcke K, Dempsey J, Fenner-Crisp P, Grant D, Hartley M, Knaap A, Kroese D, Mangelsdorf I, Meek E, Rice J, Younes M (2001) IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **34**:146–152.

Tabacova S (2005) Mode of action: Angiotensin-converting enzyme inhibition—Developmental effects associated with exposure to ACE inhibitors. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:747–755.

UNEP (2002) *Plan of implementation of the World Summit on Sustainable Development*. New York, NY, United Nations Environment Programme (http://www.un.org/esa/sustdev/documents/WSSD_POI_PD/English/WSSD_PlanImpl.pdf).

United Nations (1992) *Agenda 21: United Nations Conference on Environment and Development*. New York, NY, United Nations Division for Sustainable Development (<http://www.un.org/esa/sustdev/documents/agenda21/english/Agenda21.pdf>).

Weed DL (2005) Weight of evidence: A review of concept and methods. *Risk Analysis*, **25**:1545–1557.

WHO (2006) *Strategic Approach to International Chemicals Management (SAICM)*. Geneva, World Health Organization (http://www.who.int/ipcs/features/iccm_crp.pdf).

Wiltse J (2005) Mode of action: Inhibition of histone deacetylase, altering WNT-dependent gene expression, and regulation of beta-catenin—Developmental effects of valproic acid. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:727–738.

Zoeller RT, Crofton KM (2005) Mode of action: Developmental thyroid hormone insufficiency—Neurological abnormalities resulting from exposure to propylthiouracil. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:771–781.

Zoetis T, Walls I, eds (2003) *Principles and practices for direct dosing of preweaning mammals in toxicity testing and research. A report of the ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Direct Dosing of Preweaning Mammals in Toxicity Testing*. Washington, DC, ILSI Press.

THE HARMONIZATION PROJECT DOCUMENT SERIES

IPCS risk assessment terminology (No. 1, 2004)

Chemical-specific adjustment factors for interspecies differences and human variability:
Guidance document for use of data in dose/concentration–response assessment (No. 2, 2005)

Principles of characterizing and applying human exposure models (No. 3, 2005)

Part 1. IPCS framework for analysing the relevance of a cancer mode of action for humans and case-studies; Part 2. IPCS framework for analysing the relevance of a non-cancer mode of action for humans (No. 4, 2007)

*To order further copies of monographs in this series, please contact WHO Press,
World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland
(Fax No.: +41 22 791 4857; E-mail: bookorders@who.int).*

The Harmonization Project Documents are also available on the web at <http://www.who.int/ipcs/en/>.

本報告書は、国際的な特別作業部会の見解をまとめたものであり、必ずしも世界保健機関（WHO）、国際労働機関（ILO）、国連環境計画（UNEP）の決定や表明された方針を代表するものではない。

ハーモナイゼーションプロジェクト文書第4号

第1部：

発がん MOA のヒトへの関連性を解析するための IPCS フレームワーク及び事例研究

第2部：

非発がん MOA のヒトへの関連性を解析するための IPCS フレームワーク

本プロジェクトは、化学物質へのばく露によるリスク評価のアプローチの調和に関する IPCS プロジェクトの一環として実施された。

本文書は世界保健機関（WHO）、国際労働機関（ILO）、国連環境計画（UNEP）の共同支援のもとに出版され、化学物質の適正な管理に関する国際機関間プログラムのフレームワークの中で作成された。

国際化学物質安全性計画（International Programme on Chemical Safety: IPCS）は、1980年に設立された国連環境計画（UNEP）、国際労働機関（ILO）、世界保健機関（WHO）の共同事業である。IPCSの全体的な目的は、化学物質の安全性の向上のための必要条件として、国際的なピアレビューを通じて、化学物質へのばく露によるヒトの健康と環境へのリスクを評価するための科学的基盤を確立し、化学物質の健全な管理のために各国の管理能力を強化する技術支援を提供することである。

化学物質の適正な管理に関する国際機関間プログラム（IOMC）は、1992年の国連環境開発会議（UNCED）において表明された化学物質の安全性の分野での協力及び連携の強化を目的とした勧告に従い、UNEP、ILO、国連食糧農業機関（FAO）、WHO、国際連合工業開発機関（UNIDO）、国連訓練調査研究所（UNITAR）、経済協力開発機構（OECD）（以上参加機関）によって1995年に設立された。IOMCの目的は、ヒトの健康と環境に関連した化学物質の健全な管理を達成するために、参加機関が共同で、あるいは個別に遂行する政策と活動の連携を促進することである。

WHO ライブラリ出版物目録データ

IPCS MOA フレームワーク

（IPCS ハーモナイゼーションプロジェクト文書 ; no.4）

1. 有害物質-毒性 2. リスクアセスメント-方法 3. リスク管理-方法
4. 発がん性試験 5. 発がん物質 6. 腫瘍-化学的に誘発される腫瘍
- I. 国際化学物質安全計画 II. シリーズ

ISBN 978 92 4 156349 9 （NLM 分類 : QV 602）

© World Health Organization 2007

本書は著作権により保護されています。世界保健機関の出版物は、世界保健機関 WHO 出版部（住所: 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland (tel. +41 22 7912476, FAX: +41 22 791 4857; e-mail: bookorders@who.int) から入手可能です。WHO 出版物の複製または翻訳の許可を希望される場合は、販売目的であるか非商業的な配布であるかを問わず、WHO 出版部（上記の住所, FAX: +41 22 791 4806; e-mail: permissions@who.int) までご連絡ください。

本書に掲載されている名称や資料は、国、地域、都市、地域の法的地位や主権、あるいは国境等の境界線に関する世界保健機関の見解を表明するものではありません。地図上の点線は、境界線について未だ完全な合意が得られていない地域についてのおおよその境界線を表しています。

特定の企業や特定のメーカーの製品についての記載は、世界保健機関がそれら製品を類似の性質を持つ他社の製品と比較し、推奨していることを意味するものではありません。誤字脱字を除き、製品の固有名称はそれとわかるよう頭文字を大文字で表記しています。

世界保健機関は、本書に含まれる情報の信頼性を保証するために、可能な限りの合理的な予防措置を講じています。しかし、本書に掲載されている資料は、明示または黙示を問わず、いかなる種類の保証もなく頒布されているものです。本資料の解釈及び使用に関する責任は読者にあります。いかなる場合においても、世界保健機関はその使用から生じる損害に対して責任を負いません。

目次

序文	1
----------	---

第1部：発がんMOAのヒトへの関連性を解析するためのIPCSフレームワーク及び事例研究

序文	4
----------	---

貢献者リスト	7
--------------	---

頭字語と略語のリスト	8
------------------	---

発がんMOAのヒトへの関連性を解析するためのIPCSフレームワーク	10
---	----

A.R. Boobis, S.M. Cohen, V. Dellarco, D. McGregor, M.E. Meek, C. Vickers, D. Willcocks, & W. Farland

チアゾピルと甲状腺障害：発がんMOAのヒトへの関連性を解析するためのIPCSフレームワークを用いた事例研究	30
---	----

V.L. Dellarco, D. McGregor, C. Berry, S.M. Cohen, & A.R. Boobis

4-AminobiphenylとDNAの反応性：発がんMOAのヒトへの関連性を解析するためのIPCSフレームワークを用いた事例研究	44
---	----

S.M. Cohen, A.R. Boobis, M.E. Meek, R.J. Preston, & D.B. McGregor

ホルムアルデヒド及びグルタルアルデヒドの鼻腔内細胞毒性：発がんMOAのヒトへの関連性を解析するためのIPCSフレームワークを用いた事例研究	75
---	----

D. McGregor, H. Bolt, V. Coglian, & H.-B. Richter-Reichhelm

第2部：非発がんMOAのヒトへの関連性を解析するためのIPCSフレームワーク

序文	104
----------	-----

貢献者リスト	105
--------------	-----

頭字語と略語のリスト	106
------------------	-----

非発がん MOA のヒトへの関連性を解析するための IPCS フレームワーク	107
<i>A.R. Boobis, J.E. Doe, B. Heinrich k, S. Munn, M. Ruchirawat,</i>	
<i>J. Schlatter, J. Seed, & C. Vickers</i>	

序文

ハーモナイゼーションプロジェクト文書とは、国際化学物質安全性計画 (IPCS) (WHO/ILO/UNEP) のもと世界保健機関 (WHO) によって出版された出版物群である。ハーモナイゼーションプロジェクト文書は、化学物質のリスク評価方法に関する正式な文書として、環境保健クライテリア (EHC) の方法論シリーズ (黄表紙) を補完するものである。

有害化学物質の評価と管理に関する現在の国際的、地域的及び各国内の協調的な取り組みの主なきっかけは、1992 年の国連環境開発会議 (UNCED) にあった。UNCED アジェンダ 21 の第 19 章において、有害化学物質の環境的に健全な管理のための「青写真」が示されている。各国政府によるこのコミットメントは、2002 年の持続可能な開発に関する世界首脳会議で、さらに 2006 年の国際的な化学物質管理のための戦略的アプローチ (SAICM) でも再確認された。化学物質へのばく露によるリスク評価のアプローチの調和に関する IPCS プロジェクト (ハーモナイゼーションプロジェクト) は、このアジェンダ 21 第 19 章の下で実施されており、SAICM の実施に貢献している。特に、本プロジェクトは、SAICM の目標である「リスク低減」と SAICM 世界行動計画の活動である「リスク評価のための新たな調和された手法の開発と利用」に対応している。

IPCS ハーモナイゼーションプロジェクトの目的は、共通の原則とアプローチを追求することによって化学物質のリスク評価を世界的に改善し、持続可能性というフレームワークの中でヒトの健康と環境をより良く保護するための国内及び国際的な管理手法を強化することである。ハーモナイゼーションプロジェクトは、特定の問題に関する国際的なガイダンス文書を作成することを含め、化学物質リスク評価に対する世界各国のアプローチを調和させることを目的としている。このガイダンスは、化学物質のリスク評価を実施する際に各国や国際機関で採用され、使用することを目的としている。このガイダンスは、世界中の専門家の協力を得て作成されている。本プロジェクトは、まず各国の手法や慣行について情報を共有し、理解を深め、異なるアプローチの統一化が有益となる分野を特定した上で、調和のとれたアプローチの実施を可能にするガイダンスを作成するという段階的アプローチを用いて採用している。本プロジェクトでは、アプローチの調和を図る上で、特に重要なリスク評価の側面に焦点を当てたビルディングブロック法を採用している。

このプロジェクトにより、国際的に認められた手法を用いてリスク評価 (またはその構成要素) を実施することを可能にし、これらの評価を共有することで重複を避け、リスク管理のための貴重な資源を最適に利用することが可能となる。また、リスク管理の意思決定の基礎となる健全な科学を促進し、リスク評価の透明性を高め、不必要な化学物質の試験を減らすことができる。また、科学的知識の発展が新たな調和のとれた手法の開発へとつながりうる。

この進行中のプロジェクトは、各地域の代表的なハーモナイゼーションプロジェクト運営委員会と、詳細な作業を管理するいくつかの特別作業部会によって監督されている。最終的には、国際的なピアレビュー及びパブリックコメントといった厳格なプロセスが含まれている。

第 1 部

発がん MOA のヒトへの関連性を解析するための IPCS フレームワーク及び事例研究

序文

国際化学物質安全性計画 (IPCS) の (動物における)¹「化学物質の発がん作用機序の評価に関する概念的フレームワーク」の公表を受けて、2004 年 3 月 3 日から 5 日に米国バージニア州アーリントンで IPCS がんワーキンググループが開催された。このワーキンググループは、規制やその他の目的でリスク評価において作用機序に関する情報を利用するための統一された IPCS ヒト関連性フレームワークを開発することを目標に、動物における腫瘍のヒトへの関連性の問題をさらに検討する必要があることに合意し、この作業のための初期のガイダンスを提供した。このワーキンググループのメンバーは、事務局サポートと経済協力開発機構 (OECD) の代表者を含めて以下の通りである。

Hermann Bolt 教授 (ドイツ・生理学研究所)

Alan R. Boobis 教授 (インペリアル・カレッジ・ロンドン、健康毒性学部門、英国)

John Bucher 博士 (国立環境衛生科学研究所、米国)

Vincent Coglianò 博士 (国際がん研究機関 発がん物質同定・評価ユニット、フランス)

Samuel M. Cohen 博士 (病理学・微生物学、ハヴリック・ウォール腫瘍学教授、ネブラスカメディカルセンター大学、米国)

William Farland 博士 (環境保護庁研究開発局、米国)

Jun Kanno 博士 (独立行政法人国立医薬品食品衛生研究所 細胞分子毒性学研究部門、日本)

Lois D. Lehman-McKeeman 博士 (ブリストル・マイヤーズ スクイブ、米国)

Bette Meek 氏 (カナダ保健省環境衛生センター、カナダ)

Laurence Musset 氏 (経済協力開発機構 環境安全衛生部門、フランス)

Jerry Rice 博士 (コンサルタント、米国)

Cindy Sonich-Mullin 氏 (世界保健機関 国際化学物質安全性計画、米国)

Carolyn Vickers 氏 (世界保健機関 国際化学物質安全性計画、スイス)

Deborah Willcocks 氏 (国家工業化学品届出・評価スキーム (NICNAS)、既存化学品担当、オーストラリア)

2005 年 4 月 21 日から 23 日に英国のブラッドフォードで開催された IPCS 国際ワークショップにおいてアーリントン会議のガイダンスを考慮し、MOA フレームワークに人間への関連性を考慮した内容に拡張することが検討された。このワークショップでは、2001 年の MOA フレームワークの更新を含む IPCS ヒト関連性フレームワークの草案が作成された。

¹ Sonich-Mullin C, Fielder R, Wiltse J, Baetcke K, Dempsey J, Fenner-Crisp P, Grant D, Hartley M, Knaap A, Kroese D, Mangelsdorf I, Meek E, Rice J, Younes M (2001) IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **34**:146–152.

ワークショップの参加者は、事務局サポート、欧州食品安全局と欧州化学品局の代表者を含め、以下の通りである。

Peter Abbott 博士（オーストラリア・ニュージーランド食品基準、科学的リスク評価局、オーストラリア）
Antero Aitio 博士（世界保健機関、国際化学物質安全性計画、スイス）
Diana Anderson 博士（ブラッドフォード大学、生物医学科、イギリス）
Colin Berry 教授（イギリス）
Hermann Bolt 教授（生理学研究所、ドイツ）
Alan R. Boobis 教授（インペリアル・カレッジ・ロンドン、健康毒性学部門、英国）
Susy Brescia 博士（イギリス健康安全局、英国）
John Bucher 博士（国立環境衛生科学研究所、米国）
Vincent Coglianò 博士（国際がん研究機関 発がん物質同定・評価部門、フランス）
Samuel M. Cohen 博士（病理学・微生物学、ハヴリック・ウォール腫瘍学教授、ネブラスカメディカルセンター大学、米国）
Vicki Dellarco 博士（環境保護庁、農薬プログラム部、米国）
Christine Dove 氏（ブラッドフォード大学 生命科学部、英国）
Jun Kanno 博士（独立行政法人国立医薬品食品衛生研究所 細胞分子毒性学研究部門、日本）
Janet Kielhorn 博士（フラウンホーファー毒物実験医学研究所 化学リスク評価部、ドイツ）
Sandra Kunz 氏（世界保健機関、国際化学物質安全性計画、スイス）
Christian Laurent 博士（欧州食品安全機関、科学的専門家サービス、イタリア）
Douglas McGregor 博士（毒性評価コンサルタント、英国）
Bette Meek 氏（カナダ保健省、環境衛生センター、カナダ）
Sharon Munn 氏（欧州化学機関、毒物・化学物質担当、イタリア）
Julian Preston 博士（環境保護庁、環境発がん部門 国立健康・環境影響研究所、米国）
Jerry Rice 博士（コンサルタント、米国）
Hans-Bernhard Richter-Reichhelm 博士（連邦リスク評価研究所（BfR）、ドイツ）
Carolyn Vickers 氏（世界保健機関、国際化学物質安全性計画、スイス）
Deborah Willcocks 氏（国家工業化学品届出・評価スキーム（NICNAS）既存化学品担当、オーストラリア）
William P. Wood 博士（環境保護庁、リスクアセスメントフォーラム、米国）
Zheng Yuxin 博士（労働衛生・毒物管理機関、中華人民共和国疾病管理予防局、WHO 労働衛生協力センター、中国）

草案はパブリックコメントのためにインターネット上で公開され、ピアレビューのために多くの WHO 協力機関と IPCS 参加機関に送付された。2005 年 12 月にロンドンで開催された専門家会議では、寄せられたコメントを検討し、最終的にフレームワークが決定された。専門家会議の参加者は以下の通りである。

Alan R. Boobis 教授（インペリアル・カレッジ・ロンドン、英国）（報告者）

Samuel M. Cohen 博士（病理学・微生物学、ハヴリック・ウォール腫瘍学教授、ネブラスカメディカルセンター大学、米国）

Vicki Dellarco 博士（環境保護庁、農薬プログラム部、米国）

William Farland 氏（環境保護庁、研究開発局、米国）（座長）

Douglas McGregor 博士（毒性評価コンサルタント、英国）

Carolyn Vickers 氏（世界保健機関、国際化学物質安全性計画、スイス）

Deborah Willcocks 氏（国家工業化学品届出・評価スキーム (NICNAS)、既存化学品担当、オーストラリア）

貢献者リスト

Colin Berry 名誉教授（クイーン・メアリー、ロンドン、英国）

Hermann Bolt（産業生理研究所、ドイツ）

Alan R. Boobis（実験薬理学・毒性学、医学部、インペリアル・カレッジ・ロンドン、英国）

Vincent Cogliano（国際がん研究機関 発がん物質同定・評価部門、フランス）

Samuel M. Cohen（病理学・微生物学、エプリーがん研究所、ネブラスカメディカルセンター大学、米国）

Vicki Dellarco（環境保護庁、農薬プログラム部、米国）

William Farland（環境保護庁、研究開発局、米国）

Douglas McGregor（毒性評価コンサルタント、英国）

M.E. (Bette) Meek（カナダ保健省、安全環境計画、既存物質部門、カナダ）

R. Julian Preston（環境保護庁、米国）

Hans-Bernhard Richter-Reichhelm（連邦リスク評価研究所（BfR）、ドイツ）

Carolyn Vickers（世界保健機関、国際化学物質安全性計画、スイス）

Deborah Willcocks（国家工業化学品届出・評価スキーム（NICNAS）、既存化学品担当、オーストラリア）

頭字語と略語のリスト

ADH	アルコール脱水素酵素
ANOVA	分散分析
bw	体重
CAR	恒常的活性化受容体
cDNA	相補的デオキシリボ核酸
CoA	補酵素 A
CpG	シトシンとグアニンの 2 塩基配列
CYP	シトクロム P-450
dA	デオキシアデノシン
dG	デオキシグアノシン
DMSO	ジメチルスルホキシド
DNA	デオキシリボ核酸
DPX	DNA-タンパク質架橋
FAO	国連食糧農業機関
HRF	ヒト関連性フレームワーク
IARC	国際がん研究機関
ILO	国際労働機関
ILSI	国際生命科学研究機構
IPCS	国際化学物質安全性計画
IU	国際単位
JMPR	残留農薬に関する FAO/WHO 合同会議
KM	ミカエリス・メンテン定数
LOAEL	最小毒性量
MOA	Mode of Action (作用モード)
NAT	N-アセチルトランスフェラーゼ
NOAEL	無毒性量
NTP	米国国家毒性プログラム
OAT	O-アセチルトランスフェラーゼ
PCNA	増殖性細胞核抗原
PPX	蛋白質間架橋
RNA	リボ核酸
RSI	リスク科学研究所 (ILSI)
rT3	リバーストリヨードサイロニン
S9	9000g で遠心分離したラット肝臓上清 (肝ミクロソーム)
SCE	姉妹染色分体交換
SHE	シリアンハムスター胚
T3	トリヨードサイロニン
T4	チロキシン
TCDD	2,3,7,8-ジベンゾ-p-ダイオキシン
TGF	腫瘍成長因子
TSH	甲状腺刺激ホルモン
UDP	ウリジン二リン酸
UDS	不定期 DNA 合成
UGT	ウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素

ULLI	単位長及び標識指数
UNEP	国際連合環境計画
USA	アメリカ合衆国
USEPA	米国環境保護庁
WHO	世界保健機関

発がん MOA のヒトへの関連性を解析するための IPCS フレームワーク¹

Alan R. Boobis, Samuel M. Cohen, Vicki Dellarco, Douglas McGregor,
M.E. (Bette) Meek, Carolyn Vickers, Deborah Willcocks, & William Farland

体系化されたフレームワークの利用は、化学物質のリスク評価における調和を促進する上で非常に重要である。したがって、国際化学物質安全性計画（International Programme on Chemical Safety: IPCS）は、実験的研究で観察された発がん性反応のヒトへの関連性の問題に対処するために、発がん Mode of Action（MOA）フレームワークを更新し、拡張した。第一段階は、MOA を確立することが可能かどうかを判断することである。MOA は、Bradford Hill 基準に基づいたエビデンスの重み付けアプローチを用いて特定された発がんの原因経路に沿った一連の key events で構成されている。次に、実験動物とヒトの間で key events を定性的に、次に定量的に比較する。最後に、信頼性、解析的検討及び意義についての明確な報告書が作成される。IPCS 発がん性ヒト関連性フレームワークは、データの透明性のある評価、重要なデータギャップの特定及び関連性が排除できない場合であっても、化合物のさらなるリスク評価において価値のある情報の体系的な提示を可能にする解析ツールを提供するものである。この価値ある情報には、用量反応曲線の形状に関するデータ、閾値の特定及び遺伝的またはライフステージの違いなどに基づいた潜在的に感受性の高い集団を認知することが含まれる。

過去 30 年間のがんリスク評価の発展の基礎となったのは、がんの生物学的理解の深まりと発がんにおける key events の特定である。1980 年代半ばまでは、ヒトにおけるがんのハザードとリスクに関する国内及び国際的な評価は、主に発がん性のある物質のげっ歯類を用いた生涯試験に依存していた。後ろ向きがん研究の基礎となるに十分なヒトにおけるエビデンスが存在する薬剤はほとんどなく、職場や環境における一般的なばく露に対する現代の規制を考えれば、将来的に発がん性が検出される薬剤はさらに少ないと予想される。げっ歯類を用いた評価において、実験動物で観察された腫瘍は、潜在的にヒトに対して発がん性を有する物質を特定するために意味のある外挿が可能であり、数学的モデルを用いて規制上重要となるヒトにおけるリスクの上限推定値を提供することができるという前提があった。同時期に、発がんにおいて変異原性が重要な意義を有する可能性があるということが科学界に受け入れられつつあった。その後、かなりの数の化学物質が、DNA との直接的な相互作用を伴わないプロセスによって実験動物にがんを引き起こすことが次第に明らかになってきた。実験動物とヒトの両方における発がんの生物学的基盤に関する我々の理解を深めることは、発がん性が疑われる薬剤の薬物動態及び薬理作用に関するより多くのデータを提供することにより、リスク評価の過程を有益なものとした。特定の化合物の発がんに関与する生物学的プロセスを考察することは、Mode of action（以下、MOA）の概念につながっている。

¹ この論文は、WHO が著作権を有するものであり、元々は 2006 年に Critical Reviews in Toxicology, Volume 36, pages 781-792 に掲載されたものです。この論文は WHO の出版物のために編集されたもので、正誤表が含まれています。

推定される発がん MOA とは、試験で観察された影響につながる生物学的に妥当な key events の一連の流れであり、堅牢な実験観察とメカニズムデータに裏付けられ、重要な細胞学的及び生化学的事象、すなわち、観察された発がん性に必要かつ測定可能な事象を論理的なフレームワークで記述している。MOA は作用機序 (mechanism of action) とは対照的であり、作用騎乗では一般的に、効果の分子的基盤を十分に理解し、その詳細を記述することで、分子的観点から因果関係を確立することができる。

2001 年に、リスク評価手法の調和の一環として、国際化学物質安全性計画 (International Programme on Chemical Safety: IPCS) (WHO/ILO/UNEP) は、因果関係に関する Bradford Hill 基準に基づいた実験動物の発がん MOA (動物 MOA) 評価のためのフレームワークを発表した。本文書で紹介している IPCS ヒト関連性フレームワーク (HRF) は、この MOA フレームワークを更新し、ヒトとの関連性を考慮するために拡張したものである。これは、化学物質の特定の発がん性について利用可能なデータを透明性のある方法で体系的に評価する手段を提供する解析ツールである。フレームワークは、規制当局の内外のリスク評価者にとって価値のあるものであると同時に、研究者にとっても貴重なツールとなることを想定している。フレームワークを利用する理由には、以下のようなものがある。

- データ解析の一般的なアプローチを提供し、調和の推進に貢献する。
- 利用可能なデータの検討と使用及び導き出された結論の論拠の透明性を促進する。
- データの提示におけるガイダンスを提供する。
- 重要なデータの不足と必要な追加データを特定する。
- ヒトに対する発がん性リスクの定量的評価において情報を提供する。

これら及びその他のトピックについて、以下でより詳細に議論する。

発がん MOA のヒトへの関連性を解析するためのフレームワークを開発する上での IPCS の役割

IPCS は、化学物質へのばく露によるリスク評価のアプローチの調和に関するより大きなプロジェクトの一環として、発がんリスク評価への手法を調和させる取り組みを主導してきた。この作業の第一段階では、実験動物における化学物質の発がん MOA を評価するための「IPCS の概念的なフレームワーク」の公表につながった (Sonich-Mullin ら, 2001 年)。この出版物に記載されているように、エビデンスの重み付けを検討する際にみられる調和への障害は、主に動物 MOA の評価であった。Sonich-Mullin ら (2001 年) は、動物における化学物質の発がん MOA を評価するためのフレームワークを提供し、ヒトにおけるがんのハザードとリスクの総合的な判定の次のステップ、すなわち、動物における発がん MOA のヒトへの関連性の評価に進むことの重要性を認識した。MOA フレームワークの概念は、米国環境保護庁 (USEPA) 発がん物質リスク評価ガイドライン改訂版 (USEPA, 1999 年、2005 年) に盛り込まれており、MOA フレームワークは現在、他の規制当局や国際機関でも一般的に用いられている。英国では、このフレームワークが農薬や工業用化学物質の評価に利用されている。

英国発がん性委員会（2004 年）は、機関間の調和と最新のガイドラインにおける内部の整合性の両方の点でフレームワークの価値を指摘している。このフレームワークは、オーストラリアの機関でも採用され、カナダではカナダ環境保護法の下での既存化学物質の評価に用いられている。欧州連合（EU）は、新規及び既存の工業用化学物質及び殺生物剤のの評価について、発がん性を含む技術ガイダンス文書に本フレームワークを組み込んでいる。国際機関では、FAO/WHO 合同残留農薬専門家会議（JMPR）が、例えばピレスリン抽出物の評価やその結果として得られた研究論文に、このフレームワークを組み込んでいることが、特筆される。

MOA フレームワークを拡張し、ヒトへの関連性の考慮を含めるためのステップは、IPCS が国際的なパートナーと協力して実施されてきた。これは 2005 年 4 月 21 日から 23 日まで英国ブラッドフォードで開催された IPCS の国際ワークショップの議題であった。このワークショップでは、2001 年の MOA フレームワークの更新を含む IPCS HRF の草案が作成された。この草案はパブリックコメントのためにインターネット上で公開され、また、ピアレビューのために多くの WHO 協力機関と PCS 参加機関に送付された。2005 年 12 月にロンドンで開催された専門家会議では、受け取ったコメントが検討され、フレームワークが最終決定された。フレームワークの内容とその発展へとつながるステップについては、以下のセクションで詳述する。

2001 年の動物における発がん性評価のための IPCS 概念的 MOA フレームワーク

フレームワークの目的

動物における発がん性評価のための IPCS MOA フレームワーク（Sonich-Mullin ら、2001 年）は今もなお発がん MOA のヒトとの関連性を解析するための IPCS フレームワークの基本原則となっている。動物 MOA フレームワークは、発がん性化学物質による動物の腫瘍誘発に対して、想定される MOA を評価する際に一般的に適用される原則への汎用的アプローチを提供するものである。したがって、このフレームワークは想定される MOA に対する総合的なエビデンスの重み付けの評価に際して体系的なアプローチを提供するツールである。すなわち、この文脈では支持された MOA は、生物学的に妥当な説明を確立するためにしっかりとした実験的観察とメカニズムデータのエビデンスを持つことになる。

このフレームワークは、推定される MOA の解析に透明性をもたらし、その結果、明確にされた手法（解析と推論を裏付ける明確で一貫性のある文書化を促し、利用可能なデータの矛盾と不確実性を明らかにする手法）を用いることにより到達した結論の信頼性が増すように設計されている。フレームワークの目的は、特定の状況における MOA のエビデンスの重み付けを検討する体系的な手段を提供することであり、情報が十分か否かに関して絶対的な回答を与えるようには設計されていない。なぜなら情報は状況によって異なるためである。このフレームワークは基準のチェックリストではなく、むしろ解析的なアプローチである。しかし、key events 及び腫瘍の発生に関する比較データの表形式の要約はこのプロセスの大きな助けとなる。

動物 MOA フレームワーク解析は、ハザードの特性評価の重要なステップである。動物 MOA フレームワークは、すべての分野（医薬品、工業用化学物質、農薬、食品添加物など）にわたる発がん化学物質のリスク評価に貢献することが想定されている。

結果として得られるリスク評価文書では、フレームワーク解析はハザードの特性評価のセクション内に適切に配置されるであろう。適切な疫学データがない場合には、ヒトとの関連性、用量反応関係、リスクの特性を議論する上で、フレームワーク解析は不可欠な要素とみなされるかもしれない。また、このフレームワークは、データギャップや矛盾の明確な定義に基づいて研究の必要性を特定する上で規制当局と研究者の双方にとって有用であると考えられる。

MOA 解析は、化合物が以前に記述されている MOA を有すること、または新規の MOA を有することを確認するために用いることができる。したがって、MOA 解析の結果は、特定の化合物の評価に役立つこともあれば、新規の MOA の確立に貢献することもある。前者において、化学物質に特有のデータが、ヒトへの関連性を考慮した一致解析において重要な役割を果たす。後者においては、どのような事象が MOA を表す生物学的プロセスの鍵となるのかを特定することが重要になる。

このように、同様の一連の key events で構成された MOA は、多くの異なる化合物にも適用できる可能性がある。ある MOA が特定の発がん作用の原因であることを立証するために必要なエビデンスは、そのような MOA が初めて提示される場合には重要である。後発の化合物がこの MOA を共有することが発見される場合に、受け入れに対する「障壁」は低くなるが、MOA を構成する key events が発生すること、また、以下に説明する基準を満たしていることを厳密に立証する必要がある。また、他の可能性のある MOA を除外することも重要である。

科学的な専門家の関与は、新規に想定される MOA の確立と承認のための必要条件である。「専門家の関与」には、MOA の確立への専門家の関与と、MOA の研究プロセスから独立した科学者によるピアレビューの両方が含まれる。科学雑誌への発表、学会会議やワークショップでの発表や議論も、科学界が MOA を受け入れるための「専門家の関与」を意味する。

容認は必ずしも科学者全員が合意したことを意味するわけではないが、容認されたということは、MOA をレビューした科学者の大部分が、提示された MOA に関して関連する科学的情報が特定され適切に解析されていること、「key events」が特定され提示された情報によって支持されていること、発がんとの関係が仮説の MOA において明確に説明されていること及びその代替 MOA が検討され、それらが除外されていることに合意したということである。

知識の向上につれて MOA は変化するだろう。追加の key events が特定され、他の事象は見直されるか、あるいは取り除かれるかもしれない。しかしながら、key events に関する大きな変更は、上記のようなピアレビューを通してある程度一般に認められることも必要である。

フレームワークガイドラインの更新

IPCS HRF の発展において、2001 年の動物 MOA フレームワークの内容が更新されたので、その改訂版を以下に提示する。

序文

このセクションでは、観察された発がんエンドポイントまたはその他エンドポイントについて記述し、これらのうちのどれが解析で扱われているかを特定する。フレームワーク解析に着手する前に、実験動物における発がん性反応のエビデンスの重み付けを慎重に評価する必要がある。フレームワークの性質上、一度に 1 つの MOA のみが解析される。したがって、例えば、化学物質の投与に関連した異なる種類の腫瘍は、かりに同じ動物で記録されていても、各腫瘍の MOA を識別するために別々のフレームワーク解析が必要となる。しかしながら、あるひとつの腫瘍の病態を検討する際には、化学物質が複数の MOA によってそのタイプの腫瘍を誘発する可能性があることを認識しておくべきである。したがって、ある化学物質におけるひとつの腫瘍について複数の MOA の解析を行う必要があるかもしれない。遺伝毒性発がん物質の場合、代謝活性化と解毒における種や組織特異的な違いと同様に、発がん部位が異なることも多い。動物とヒトのデータを比較する際にはこのことについて留意する必要がある。対照的に、非遺伝毒性 MOA に則って作用するほとんどの発がん物質は、特異的な傾向のある生理学的プロセスに影響を及ぼすという観察結果から、少なくとも HRF の初期の前提として、部位の一致が合理的に想定されている。

1. 推定される MOA (事例における仮説)

このセクションでは、被験物質において推定される MOA について、腫瘍になるまでの一連の事象を簡単に説明している。この一連の事象の説明は、次のセクションにつながり、解析に利用可能なデータベースから、「鍵」と考えられる事象（すなわち、必要かつ測定可能な事象）を特定する。

2. Key events

このセクションでは、「key events」—推定される MOA において仮定された腫瘍の誘発に極めて重要な測定可能な事象について簡潔に特定し、説明する。関連性を裏付けるためには、一連の実験で事象を定義し、それを一貫して測定する必要がある。関連する観察項目には、例えば、同じ種類の細胞における発がん性と key events、事象に論理的に関連する作用部位、細胞増殖の増加、特定の生化学的事象、臓器重量や組織学的変化、増殖、ホルモンや他のシグナル伝達系の変動、受容体-リガンド相互作用、DNA や染色体への影響、細胞周期への影響などが含まれる。例えば、再生性増殖の延長と関連していると推定される腫瘍の発生における key events は、病理組織学的検索における細胞毒性の検出と標識指標の上昇であるかもしれない。別の例として、リン酸カルシウムを主成分とする尿固形物の形成が原因であると推定される膀胱腫瘍の誘発の key events には、尿中の遊離カルシウム、リン酸塩、pH の上昇と尿固形物の形成、それに続く尿路上皮への刺激及び再生性過形成が含まれる。

3. 用量反応関係の一致性

このセクションでは Bradford Hill 基準の観点から、それぞれの key events と発がんの用量-効果/反応関係の特徴づけ、それらの相互関係について議論するべきだろう。理想的には、key events の発生率の増加の用量依存性と、その後に発生する他の key events の発生率または重症度（病変の進行など）の増加及び最終的な腫瘍の発生率とを相関させることができるようにすべきである。Key events と腫瘍の発生率を表形式で比較表示することは、しばしば用量反応性を検討する上でしばしば有用である。複雑なデータセットの場合、これはほぼ必須である。

腫瘍形成に対する用量反応曲線の異なる部分において、生物学的反応（すなわち線量推移）に基本的な相違があるか否かを検討することが重要である（Slikker ら, 2004 年）。もしそうであれば、用量反応曲線の異なる部分に関連する **key events** を明らかにし、フレームワーク解析に用いる必要がある。

4. 時間的関連性

このセクションでは、それぞれの **key events** と腫瘍反応の時間的關係の特徴について述べなければならない。腫瘍反応に至る **key events** を時系列的に明らかにすべきである。**key events** は腫瘍の発現前に明らかにしなければならない、互いに時間的な整合性が取れていなければならない。すなわち、時間的関連性についてはデータが想定される **MOA** を支持しているかどうかを判断する上で不可欠である。腫瘍と同時に **key events** が観察された場合（例えば、バイオアッセイの終了時など）は、時間的関連性の検討には役立たないが、次のセクションに述べる解析に役立てることができる。多くの場合、時間的関連性についての基準を満たす完全なデータセットは入手できない。

5. 腫瘍反応とkey events との関連性の強さ、一貫性、特異性

このセクションでは、**key events**、前がん病変及び腫瘍反応を結び付けるエビデンスの重み付けについて議論しなければならない。**Key events** を遮断または低減した場合に、その後の事象または腫瘍が発生しない、または減少することを示す中止/回復試験は、関連性を検証する上で特に重要である。デザインが異なることによって未知のバイアスや交絡因子を減少させると考えられるため、異なる実験デザインの研究において一貫した結果が観察されることは、**key events** と腫瘍の関連性をより強く裏付けることになる。しかし、さまざまな研究で推定される **MOA** の **key events** の再現性で示される一貫性（consistency）は、より広範なデータベースでの結果と推定 **MOA** の相関性で示される整合性（coherence）とは区別される（6 参照）。関連する観察項目には、同じ種類の細胞における腫瘍反応と **key events**、事象に論理的に関連する作用部位並びに多段階試験及び中止/回復試験の結果が含まれる。

6. 生物学的妥当性及び整合性

その **MOA** が、一般的にがんの発生について一般的に知られていることと一致している（生物学的に妥当である）かどうか、また、その物質について知られていることと関連している（理論的な整合性がある）かどうかを検討しなければならない。推定される **MOA** とその一部である事象が生物学的に妥当であるとするためには、それらが現在のがんについての生物学的理解と一致している必要がある。しかしながら、我々の知識には限りがあるために生物学的妥当性についてエビデンスの重み付けを評価する際の基準として用いることができる範囲は限られているであろう。推定される **MOA** とより広範なデータベースの観測値との関係 — 例えば、発がん **MOA** と他のエンドポイントの **MOA** との関連性 — を扱う「整合性」は、異なる研究における推定される発がん **MOA** における **key events** の再現性を扱う「一貫性」（ポイント 5 参照）とは区別される必要がある。理論的な整合性については、構造的アナログにおける事例との類似性が参考になるかもしれない（すなわち、構造-活性解析）。推定される **MOA** を共有する他の化合物からの情報、たとえば、感度における性差、種差及び系統差や **key events** との関係に関するような情報は重要となるだろう。さらに、このセクションでは、その薬剤に関するデータベースが内部で一貫して関連している発がん以外の毒性を含めた **MOA** を支持しているかどうかを検討しなければならない。**MOA** の中には、発がんにつながるホルモン障害による生殖への影響のような、発がん以外の影響を引き起こすことが予想されるものがある。

7. その他のMOA

このセクションでは、事例の中で論理的に提示された代替 MOA について議論する。代替 MOA が支持されている場合は、それ自体のフレームワーク解析が必要である。これら代替 MOA は観察された影響に寄与していると考えられる推定される MOA の追加的な構成要素とは区別し、異なる独立した MOA として解析しなければならない。さもなくば、代替 MOA ではなく、元々の解析の対象であった MOA に関する解析になってしまう。

8. 不確実性、矛盾、データギャップ

不確実性には、腫瘍発生の生物学的知見に関連するものと、対象の化合物のデータベースに関連するものの両方を含まなければならない。矛盾点にはフラグを立て、データギャップについて特定しなければならない。特定されたデータギャップについては、推定される MOA の裏付けとして重要か否かを示すべきである。

9. 推定されるMOA の評価

このセクションには、推定される MOA の信頼度を示す指標と共に（例えば、高、中、低など）結果に関する明確な記述を含まなければならない。新規の MOA が推定されている場合は、新規であることを明確に示すべきである。しかし、MOA が他の化合物について提示されているものと同じである場合には、key events がこの MOA にどの程度合致しているかを明示する必要がある。大きな違いがあれば、それを明記し、MOA に対するその違いの意味合いについて議論すべきである。

ヒトへの関連性の問題

2000 年に、英国のカーシャルトンで IPCS ハーモナイゼーションプロジェクトがん計画ワーキンググループが招集された（IPCS、2000 年）（この最初の IPCS ワーキンググループは、ヒト関連性プロジェクトの作業のために招集されたその後の IPCS ワーキンググループとはメンバーが異なっていた）。この会議において、ヒトへの関連性への対応に向けて IPCS MOA フレームワークの拡張を IPCS と国際生命科学研究機構（ILSI）が協力して並行して進めていくことが提案された。ILSI は技術ワークショップにおいて多くの支援を提供できることが認識された。2001 年 6 月、ILSI リスクサイエンス研究所（RSI）は、USEPA とカナダ保健省の支援を受けて、動物における腫瘍とヒトとの関連性を判断するための MOA 情報の使用における重要な問題を検討するためのワーキンググループを結成した。これらの努力の結果、以下に記載されているいくつかの報告書が公表された。2004 年 3 月 3 日から 5 日に米国バージニア州アーリントンで開催された IPCS がんワーキンググループは、これらの報告書を出発点として、規制目的やその他の目的で MOA 情報をリスク評価に使用するための統一的な IPCS HRF を作成することを目標に、動物における腫瘍のヒトへの関連性の問題を IPCS がさらに調査することに合意した（IPCS、2004 年）。

動物で決定された MOA のヒトへの関連性の問題に対処するために、ILSI/RSI は同ワーキンググループに、動物で決定された発がん MOA のヒトへの関連性の評価を含めるために IPCS MOA フレームワークを拡張することを求めた。このプロセス、事例研究及びフレームワークの詳細は、Critical Reviews in Toxicology 誌の 2003 年 11 月号に一連の論文として発表された（Cohen ら、2003 年）。これらの論文では ILSI/RSI HRF を説明し、その適用のための指針を提供している。さらに、フレームワークが基づいた具体的な例への参照も含まれている。統合フレームワークを開発するために、一般的によく知られている MOA を有する化学物質を複数回にわたって繰り返し検討した事例研究が使用された。その意図は、動物での MOA と各 key event についてヒトへの関連性を

評価する規律ある透明なプロセスの指針を提供することであった。

ILSI/RSI HRF は 3 つの基本的な問いかけに基づいている：

1. 動物における Mode of action（動物 MOA）を確立するのにエビデンスの重み付けは十分か？
2. 動物の MOA に含まれる key events はヒトにおいて妥当であるか？
3. 動態的、薬力学的要因を考慮した上でも、動物の MOA における key events はヒトにおいて妥当か？

問 2 と 3 に関して、動物の MOA とその key events に関連したヒトでの情報の一致解析において、それぞれ定性的な検討と定量的な検討が必要となる。

これらに続いて、ILSI/RSI HRF は評価の信頼性、特異的なデータギャップの特定、それらのリスク評価の意味合いを明確に記述している。ILSI/RSI では、このフレームワークの利用が全体的なリスク評価プロセスのハザードの特性評価ステップの一部を形成することを強調した。

IPCS MOA フレームワークと ILSI/RSI HRF に基づく IPCS HRF ガイダンス文書の開発

2004 年の IPCS がんワーキンググループでは、ヒトへの関連性に対処するために IPCS MOA フレームワークを拡張する作業の報告書として作成される文書のタイプについて議論された。規制当局や他のリスク評価機関による採用と利用を促進するためには、全体を一つに統合されたガイダンス文書が必要であると認識された。ガイダンスは、発行論文や事例研究といったプロセスを経て作成された他の公表資料を追加することができる。

ワーキンググループのメンバー間では、ILSI/RSI HRF の重要な構成要素として特定された問いかけは重要であり、動物で決定された MOA のヒトへの関連性に対処するのに適切であるという点で概ね合意されていた。しかし、フレームワークの補足説明、進展、または拡大が有効と思われるいくつかの課題が明らかとなった。

ILSI/RSI HRF のこれらの改良は IPCS がんワーキンググループの議論と、2005 年 4 月 21 日から 23 日に英国ブラッドフォードで開催されたワークショップでの議論を経て進められた（IPCS、2005 年）。結果として得られた IPCS HRF は、動物の腫瘍における MOA のヒトへの関連性に関する文書化された論理的な結論へとつながる一連の 3 つの問いかけに答えるためのアプローチとして提示されている。このガイダンスを適用すると、リスク評価のハザードの特性評価に組み入れることができる 4 つのセクションからなるストーリーができあがる。これらのセクションは以下の通りである（図 1 を参照）。

1. 動物における Mode of action（動物 MOA）を立証するためにエビデンスの重み付けは十分か？
2. 実験動物とヒトとの間の key events の根本的、質的な違いに基づいて、MOA のヒトへの関連性を合理的に排除できるか？
3. 実験動物とヒトとの間の動態的または薬力学的要因のいずれかの量的な違いに基づいて、MOA のヒトへの関連性を合理的に排除できるか？
4. 結論：信頼性、解析的検討及び帰結の記述。

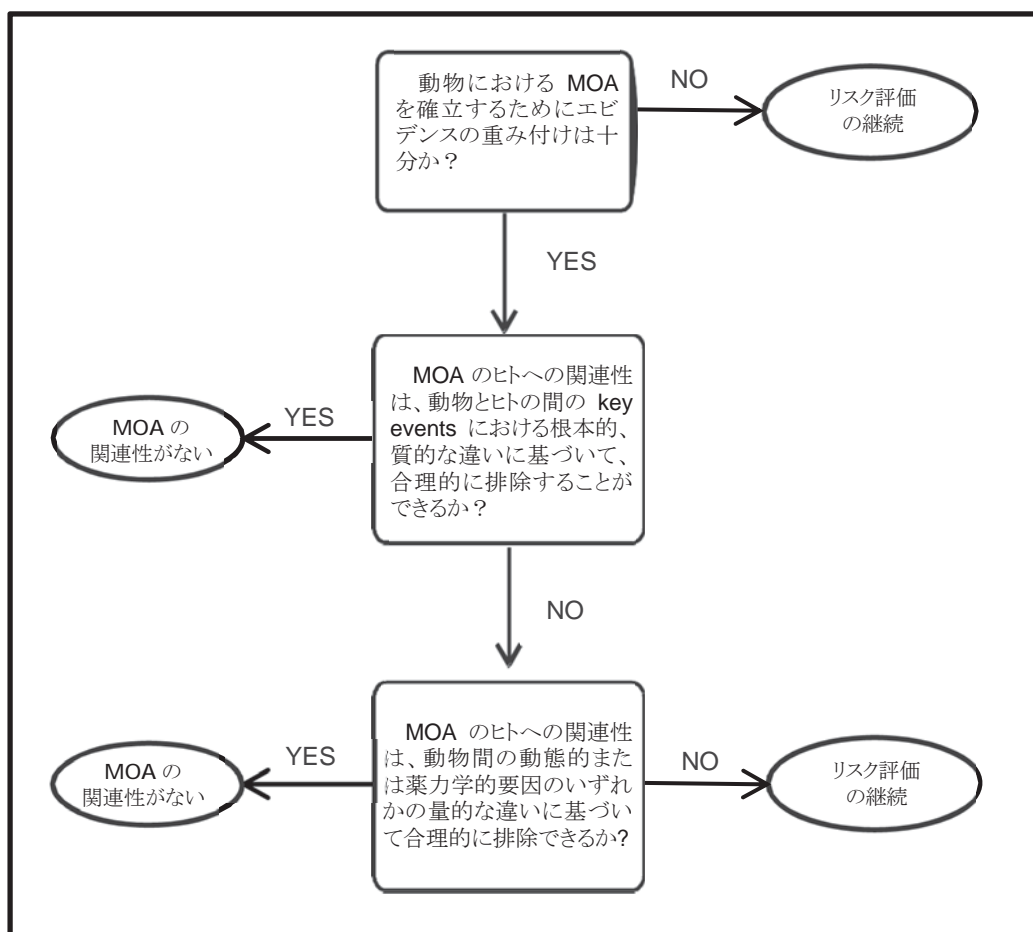


図 1. IPCS の一般的なスキーム:腫瘍形成に対する動物 MOA のヒトへの関連性を評価する際の主なステップを示す

質問は、Yes か No かを明確に答えられるように設計されているが、エビデンスの重み付けが十分であるかどうかを判断する必要がある。図の左側に示された回答は、エビデンスに十分な重みがあり MOA がヒトに関連するとは考えられないことを示している。図の右側の回答は、MOA がヒトに関連する可能性が高いと考えられるという十分に重みのあるエビデンスの存在を示しているか、利用可能な情報に不確実性があるため、ヒトへの関連性の可能性についての結論を出すことができないことを示している。このような場合、評価はリスクの判定に進むことになる。この段階でのみ、ヒトへのばく露評価が含まれることに留意すべきである。

このフレームワークをある化学物質に適用する場合、観察された各動物の標的臓器の腫瘍は、異なる臓器では異なる MOA が存在するという仮定の下、独立して評価される。しかし、この解析手法に基づいたとしても、異なる組織での MOA が類似している可能性はある。同様に、異なる種とヒトにおいて、標的臓器における MOA が一致する可能性についての評価も MOA 解析に基づいて行う必要がある。

動物における Mode of action (動物 MOA) を確立するのにエビデンスの重み付けは十分か

IPCS HRF のこの最初の問いかけに答えるためには、上述の（更新された）IPCS MOA フレームワークを適用する必要がある。因果関係を説明するための Bradford Hill 基準に基づいた MOA フレームワークのステップは、次のとおりである：

1. 推定される MOA
2. Key events ; 関連する重要なパラメータ
3. 用量反応関係
4. 時間的関連性
5. Key events と腫瘍反応との関連の強さ、一貫性、特異性
6. 生物学的妥当性と整合性
7. 可能性のある代替 MOA
8. 不確実なこと、矛盾すること及びデータギャップ
9. MOA に関する結論

このプロセスには、状況に応じた考え得る代替 MOA のエビデンスの重み付けの評価と、検討中の MOA を支持するエビデンスの全体的な強度の評価が組み込まれている。最終的には、MOA を支持するエビデンスの重み付けと、それに対する信頼度について決定しなければならない。また、このプロセスは、ギャップを満たすことで推定される MOA の信頼性を高めるであろう決定的に重要なデータギャップを特定する。また、推定される MOA が他の化学物質において既に記述された MOA であり、ヒトへの関連性について既に評価されているかどうか、または、新規の MOA であり、ヒトへの関連性について新たに評価する必要があるかどうかを確認することも必要である。

ある化学物質について、MOA を評価するための主な情報源は、腫瘍が発生した動物モデルにおけるデータである可能性が高い。当然、類似の化学構造を持つ化学物質に関するデータや、同じまたは類似の MOA に関するデータ、もしくはその両方のデータといった他の情報源からのデータも必要に応じて利用することができるし、利用すべきである。ある化学物質の MOA が新規である場合、その化学物質が誘発された腫瘍の発がんプロセスに関連しているという結論を裏付けるためには、同じ MOA で作用する後続の化学物質よりもかなり多くのデータが必要である。ILSI/RSI ワーキンググループと IPCS ブラッドフォードワークショップでは、対象の化学物質の MOA を支持するのに十分なデータの数はどのくらいかという問題に関して、事例研究の中で例を示し、新しい MOA を受け入れるには科学的コンセンサスが必要であるとの認識（上述）を示しているが、それら以外についての方針等は何ら表明していない。この段階における動物とヒトとの間の潜在的な違いについての MOA 解析の検討は、フレームワークにおける次のステップの対応を容易にする。

実験動物とヒトとの間の key events の根本的、質的な違いに基づいて、MOA のヒトとの関連性を合理的に排除することができるか

この質問の文言は、IPCS ワークショップにおける質問に対する回答の意味合いについての議論を受けて、ILSI/RSI HRF に記載されていた文言から変更された。元の質問への回答では、動物 MOA がヒトへの関連性を持たないという結論を出すには、はっきりとした「No」しか許容されていなかった。また、「plausible」という単語が他の言語に翻訳する際に問題になる可能性があることも

認識された。そのため、質問は Yes/No の回答を可能にするように書き換えられたが、エビデンスの重み付けの妥当性に関する決定は絶対的なものではなく、利用可能なデータの透明性のある解析に基づいた科学的判断が必要であるという認識に基づき、「合理的に」という語句が付け加えられた。

このステップでは、ヒトにおける発がんの可能性と MOA の関連性を定性的に評価することである。動物 MOA で発生する重要な特定の **key events** をリストアップし、それぞれの **key events** がヒトで発生するか否かを直接評価することで、関連する情報の検討と透明性のある提示が容易になる。一致表 (*concordance table*) と呼ばれる表形式での提示は、関連情報を明確にするのに役立つ (例として、事例研究 6:クロロホルムばく露に伴う腎臓及び肝臓の腫瘍、Meek ら、2003 年、表 7; 本書、ホルムアルデヒドに関する事例研究、McGregor ら、表 3 を参照)。腫瘍が観察された動物におけるこれらの事象に関する情報とともに、**key events** (及び重要と思われるいくつかの関連プロセス) がリストアップされる。これらの表の情報は簡潔にすることが意図されており、表には説明文が添付されることが予想される。右側の列では、各 **key events** についてヒトへの影響を評価している。追加の列として、腫瘍が発生しない別の系統、種、性、または投与経路での結果についての情報は、腫瘍が発生するモデルとの比較情報が得られる場合に有用である。さらに、それ自体は **key events** ではないが、**key events** を変化させ、種差または個体差に寄与する因子が同定されることがある。そのような因子には、代謝経路の遺伝的差異、競合する代謝経路及び同時進行する病態によって誘導される細胞増殖が含まれる。特定されたそのような要因はすべて、一致表の脚注に記載されるべきである。

ヒトにおけるある化合物の MOA の **key events** の一致性の評価は、その特定の化学物質の評価というよりは、ヒトにおける MOA の評価である。一般的に、初期の **key events** の詳細は化学物質に特異的である可能性が高い。例えば、げっ歯類の肝臓におけるフェノバルビタールによる酵素誘導反応や、特定のチトクローム P-450 酵素によるクロロホルムからの細胞毒性代謝物の生成などである。その後の事象は MOA においてより一般的なものであり、例えば、多面的な肝増殖刺激や再生性過形成などである。ヒトにおける **key events** の評価に利用できる情報は、化学物質の *in vitro* 及び *in vivo* 試験に由来するもののほか、解剖学、生理学、内分泌学、遺伝学、疫学、その他ヒトの **key events** に関する既知の情報などの基本的な情報が含まれる。特定の化学物質に直接ばく露されたヒトにおける **key events** の評価に関する情報は、入手できないことが多い。

がんの発生・進行に関する知見が蓄積されるにつれて、関与するプロセスの基本的な生物学的知見に基づいていくつかの MOA を組み合わせることが可能になるかもしれない。それにより、MOA のヒトへの関連性について結論付ける際に、その化学物質の特異的な情報への依存度が低くなるかもしれない。

ヒトの情報と動物の情報との一致性を評価する際には、エビデンスの重み付けを説明し、ヒトの情報の信頼度の評価をする必要がある。有用な情報の具体的な種類としては、以下のようなものがある。

1. 対象の解剖学的部位及び細胞の種類におけるがんの発生率：年齢、性別、人種及び化学物質やその他の環境因子などのリスク因子を含む。
2. 標的部位の性質と機能に関する知見：生理的、細胞的、生化学的レベルでの発生、構造（肉眼的、顕微鏡的）、制御機構を含む。
3. ヒト及び動物の疾患状態：標的臓器の調節及び応答性に関する洞察を提供する。
4. 短期、中期、または長期ばく露後の、対象となる化学物質または類似物質に対するヒト及び動物の反応：標的臓器及び影響を含む。

当然、対象の MOA がヒトに関連していないと結論づけるには、相当量の情報が必要である。そのような結論がデータによって強く支持されているならば、その MOA によってのみ動物の腫瘍を誘発される化学物質は、ヒトに対するがんに関するハザードを有さず、このエンドポイントに対するリスク判定を追加で行う必要はない。がんに関するハザードがないため、検討中の腫瘍に対する発がんリスクはない。

関連性の質問は、すべての集団とライフステージを考慮している。MOA が作用する状況は、例えばすでにウイルスに感染しているヒト、ホルモンバランスの不均衡のあるヒト、または病を患っているヒトなど、主に感受性の高い集団またはライフステージで起こる可能性がある。ライフステージの早期における発達に関する様々な動態的及び薬力学的側面を考慮して、腫瘍がライフステージの早期におけるばく露から発生するかどうか特別な注意が払われている。感受性の量的な違いを示唆するいかなる情報も、リスク判定に用いるために特定される。

実験動物とヒトとの間の動態的または薬力学的要因のいずれかの量的差異に基づいて、MOA のヒトへの関連性を合理的に排除することができるか

この質問の文言は、IPCS ワークショップにおける質問に対する回答の意味合いについての議論を受けて、ILSI/RSI HRF に記載されていた文言から変更された。元の質問への回答では、動物 MOA がヒトへの関連性を持たないという結論を出すには、はっきりとした「No」しか許容されていなかった。そのため、質問は Yes/No の回答を可能にするように書き換えられたが、エビデンスの重み付けの妥当性に関する決定は絶対的なものではなく、利用可能なデータの透明性のある解析に基づいた科学的判断が必要であるという認識に基づき、「合理的に」という語句が付け加えられた。

ヒトへの関連性解析の目的では、実験動物の MOA がヒトに定性的に関連性があると判断される場合には、実験動物とヒトの両方から得られるあらゆる動態的及び薬力学的情報を考慮して、より定量的な評価が必要である。このようなデータは、必然的に化学物質及び MOA に特有のものであり、腫瘍形成を起こしうる薬力学的反応を引き起こすために必要な生物学的影響を及ぼす用量を含むものである。動態的考察には、化学物質の取り込み、分布、代謝及び排泄の性質及び経時的变化が含まれ、一方、薬力学的考察には、化学物質と細胞、組織及び器官との相互作用の結果が含まれる。

時折、これらの条件を作り出すために必要とされる生物学的に影響を及ぼす用量が、ヒトにおいて不可能であることがある。また、ホルモンのクリアランスなど **key events** に関与する生物学的プロセスにおける定量的な違いが大きすぎるため、動物の **MOA** がヒトには関連しないということもあり得る。しかし、量的な差異に基づいて **MOA** のヒトへの関連性を否定することが可能になるのは、ごくまれであると **IPCS** ワークショップでは認識されている。定性評価と同様に、実験動物とヒトの定量データを表形式で比較することで、評価を容易にすることができる（例えば、事例研究 5、フェノバルビタールばく露に伴う甲状腺腫瘍、Meek ら、2003 年、表 6；チアゾピルに関する事例研究、Dellarco ら、本書、表 4 参照）。同様の **MOA** によって効果を誘導すると考えられている他の化合物の研究から同定された **key events** との比較も有用である。例えば、チアゾピルの場合、ヒトにおけるフェノバルビタールの効果に関する情報は、**MOA** の関連性を評価する上で特に有用であった。分子学的及び動態学的アプローチが進化し続けるにつれ、動物及びヒトにおける反応の類似性及び相違点の理解が向上するであろう。動物モデルとヒトとの間の **key events** における定性的な違いが、特定の定量的な違いによるものであることが明らかになるかもしれない。その場合、第 2 の問いかけ（上述）への回答を「No」に変更する。

問 2 と同様に、この問いかけへの結論が「Yes」であれば、その **MOA** によってのみ動物に腫瘍を誘発させる化学物質はヒトにがんに関するハザードをもたらさず、このエンドポイントにおける追加のリスク判定は必要ない。

信頼性、解析及び帰結の記述

3 つの問いかけのそれぞれの総合評価に続いて、解析の基礎となるデータの質と量、フレームワーク内での解析の一貫性、データベースの一貫性、一致解析の性質と程度についての信頼性についての記述が必要である。また、同等の解析法や厳密な評価を用いた代替的な **MOAs** の評価も不可欠である。全体的な **MOA** と質的・量的一致のエビデンスの重み付けを十分に考慮し、その結果として、**MOA** の信頼性を高めることができる将来の研究で実験的に特異的なデータギャップを特定することが極めて重要である。

まれに、検討中の化合物と共通する **MOA** を有する化学物質の発がんリスクに関する決定的な疫学的データ、すなわち、その化合物がヒトに発がん性を有するか否かのデータが存在することがある。当然、そのようなデータは、ヒトへの関連性評価の結論にかなりの重みを与えるであろう。しかし、動物では **MOA** を確立することが可能であるにもかかわらず、ヒトでの **key events** に関する情報が不十分であり、ヒトへの関連性について明確な結論を出すことができない場合がある。そのような場合には、疫学データを利用することで、このデータギャップを埋めることができるかもしれない。例えば、構成的活性化受容体（**CAR**）の活性化を介してフェノバルビタールと同様の作用をして肝腫瘍を誘発する化合物のヒトでの **key events** に関するデータベースは不完全である。しかし、比較的高用量のフェノバルビタールに長期間ばく露しても、ヒトでは発がんしないことを示す確固たる疫学的データがある。したがって、1 つの可能性としては、これらのフェノバルビタールに関する知見から、げっ歯類に肝腫瘍を誘導する動物 **MOA** を共有する他の化合物について「類推」し、そのような化合物によって引き起こされる腫瘍は、ヒトにおける化合物のリスク評価には関係ないと結論づけることである（Holsapple ら、2006 年）。

このような結論は、疫学的データの信頼性及び試験対象の化学物質の MOA と疫学的データが利用可能な化合物の MOA との類似性に極めて依存している。

このフレームワークを事例研究に適用すると、現在の研究の多くは、動物 MOA の解析及びヒトとの関連性の解析を容易にするような重要な問いに対処していないことは明らかである。多くの場合、このことは、ここで紹介したような解析フレームワークでのデータの検討に基づいて、主要なデータギャップを透明性をもって記述していないことが原因である。このように、HRF を用いることは試験設計の初期段階から研究者にとって非常に有益である。

統一された形式のヒト関連性解析の結果は、動物のエンドポイントがヒトに関連するかどうかを判断するだけでなく、それ以上に有用な情報を提供してくれる。むしろ、透明性のある解析的フレームワークの中で関連情報を検討することで、関連する影響のリスク判定における次の段階で多くの極めて重要な追加情報が提供される。推定される関連影響に関する MOA のヒト関連性解析に基づくことで、例えば、動物で観察された腫瘍がヒトにおいて発生部位が一致するかどうかを予測することが可能である。また、HRF を適用することで、B 型肝炎やアフラトキシン B₁ などのように、リスクに影響を与える可能性のある関連する調節因子に関する情報が得られることが多い (4- Aminobiphenyl に関する事例研究、Cohen ら、本書を参照)。解析はまた、推定される MOA の構成要素のうち、一定の用量以上でのみ作用する可能性のあるものについての指標を提供することが多い。MOA に必須なステップを引き起こすために対象の化合物の実験的高用量のばく露が必要とされる場合、ヒトのリスクとの関連性はばく露の問題となる。このように、その後のリスク判定におけるばく露評価ステップは、ヒトでの発がん性を適切に評価するために重要である。さらに、フレームワーク解析で特定された情報は、MOA の key events に基づくハザードの定量化において非常に貴重なものとなりうる。

重要なことだが、ヒト関連性解析は、リスクが増大している特別な集団（遺伝的素因を持つ集団など）を特定することにも寄与し、しばしば、様々なライフステージにおける相対リスクの検討に関連する情報を提供してくれる。場合によっては、これは化学物質固有の情報に基づくのではなく、特定の年齢層のリスクが増加しているか減少しているかについて、MOA の知識に基づいている場合もある。

フレームワークを用いたデータ及びその解析は、透明性のある方法で報告され、他の者が key events、他の MOA の除外及びヒトとの関連性の解析に関して到達した結論の根拠を判断できるようにすべきである。具体的な提示形式は利用可能なデータの種類によって異なるため、情報がどのように報告されるべきかを規定することに意味はない。しかし、到達した結論の透明性を確保するために、文脈や考察のプロセスに関して十分な詳細情報が含まれていなければならない。実験動物とヒトにおける key events の比較解析など、特定のデータを提示する際には、適切な表を使用することが有用である。

フレームワークの普及

IPCS HRF の普及と適用を支援するために、一般的に受け入れられている MOA と有益な事例のデータベースを構築し、維持する必要がある。これは、類似の MOAs で作用する可能性のある化合物のフレームワーク解析を進めている人が参照できるよう一連の MOAs とそれに関連した key events で構成されている。事例研究は、実際の事例で構成されており、それらは発がん性反応を引き起こす推定 MOA の受入れを支持するために必要な解析の詳細の関連度とエビデンスの重み付けの性質を示すために、フレームワークを用いて解析されている。そのような事例研究は、新しい MOA を開発する初期段階では特に貴重であろう。

DNA 反応性発がん物質への IPCS HRF の適用

げっ歯類とヒトの発がんプロセスに類似性があり、DNA 反応性発がん物質による DNA との初期相互作用が類似しているため、一般的に DNA 反応性発がん物質は、エチレンオキサイドの場合 (Meek ら、2003 年) のように ILSI/RSI HRF の「動物の MOA の key events はヒトで起こりうる」という質問に対し「Yes」のステップに進むと評価され、IPCS HRF における上記質問に相当する「実験動物とヒトとの間の key events の根本的、質的な違いに基づいて、MOA のヒトとの関連性を合理的に排除することができるか」の質問に対し 4-Aminobiphenyl の場合 (Cohen ら、本書) 「No」のステップへと進むと評価されると予想される。最近の論文では、Preston & Williams (2005 年) は、DNA 反応性発がん物質に対する ILSI/RSI HRF の使用の指針となる腫瘍発生の key events のセットを提示した。この指針は、ほとんどの DNA 反応性化学物質について、動物 MOA はヒトに関連すると予測されるという見解を支持した。しかし、例外がある可能性があり、ILSI/RSI HRF はこれらを特定するための貴重なツールになるとも指摘された。ILSI/RSI HRF と IPCS HRF を使用することは、ヒトへのリスクを外挿する際に価値があるであろうげっ歯類とヒトの間の key events の違いを定量化するのにも役立つ。国際がん研究機関 (IARC) のレビュープロセスで判断されたように、すべてのげっ歯類における DNA 反応性発がん物質がヒトの発がん物質であると確立されているわけではない。これらの例外のいくつかについては、発がん性におけるこのヒト-げっ歯類間の違いは、ヒトがその化合物へのばく露量が少ないこと、または低ばく露レベルでの発がん性を検出する疫学研究の相対的な感度の低さに起因している。しかしながら、このような違いの理由は他にも生物学的考察に基づくものがある。例えば、DNA 反応性発がん物質が種特異的な器官でのみ腫瘍を誘発する場合、MOA に関する利用可能なデータを考慮する必要があるが、この key events に基づく動物 MOA はヒトには関連がない可能性もある。同様に、ヒトではげっ歯類と比較して一般的に DNA 修復プロセスが発達している (Cortopassi & Wang、1996 年; Hanawalt、2001 年)、あるいはげっ歯類に特有の生体内活性化の経路があることから、IPCS HRF における「実験動物とヒトの間の key events の根本的、質的な違いに基づいて、MOA のヒトとの関連性は合理的に排除できるか」及び／または「実験動物とヒトの間の動態的または薬力学的な要因のいずれかの量的な違いに基づいて、MOA のヒトとの関連性は合理的に排除できるか」という問いに対し「Yes」のステップへと進む可能性がある。あるいは、IPCS HRF はこれらのプロセスに関するその後のリスク判定の段階で利用可能な定量的な情報を提供しうる。

DNA 反応性発がん物質に IPCS HRF を適用する際に必要なことは、発がん過程を明確に説明する一連の key events を開発し、検討中の DNA 反応性発がん物質に対するげっ歯類における発がん MOA のヒトへの関連性を確立するための指針としてこれらを使用することである。

IPCS HRF 及びリスク評価

このフレームワークの強みは、柔軟性、あらゆる MOA によって作用する発がん物質への広範な適用性及び発がん性反応における各 key event の影響を探索する能力といった点である。これには、用量反応曲線の性質の決定、個々の key event の閾値の存在の特定やその値の特定及びそれらの腫瘍の反応曲線全体への影響の特定が含まれる。さらに、各 key event に関与する動態的及び薬力学的な因子を考慮することで、特定の集団、例えば、幼若な人々、特定の疾患を持つ人々、または特定の遺伝子多型を持つ人々に対する発がん性反応の関連性の有無に関する結論に到達することが可能になるかもしれない。あるいは、フレームワークを適用することで、そのようなグループ間の違いに関する定量的な情報を得ることができる。フレームワークの適用はまた、発がん性反応自体がヒトには関連性がないと結論づけられた場合でも、化学物質のリスク評価に概ね有益なものになりうる。

冒頭で述べたように、MOA 解析とヒトへの関連性の解析は、リスク評価におけるハザードの特定と特性評価の段階の一側面である (National Research Council, 1983 年 ; Meek ら, 2003 年)。このフレームワークに沿って、本文書で言及しているヒトへの関連性に関する事例研究は、完全なものではないが、研究対象の化学物質のリスク評価に貢献する。これは、完全なリスク評価を行うためには、実験的研究や職業衛生研究で設定された範囲の用量を評価するだけでなく、日常生活や生涯の活動における対象化学物質のヒトへのばく露レベルへの外挿を必要とするからである。

ハザードの特性評価及び関連する MOA 解析は、一般的な用語で危害の可能性を扱うのに対し、完全なリスク評価は、意思決定者に対してこの潜在的なハザードをばく露に関する文脈で説明するものである。リスク評価は、一般的に低用量レベルで被ばくしているヒトにおける影響の性質と発生する可能性を理解し、推定するために、これらの影響とヒトへのばく露量との関係を記述しようとするものである。

用量反応関係を理解することは、ハザードの特性評価に大きな影響を及ぼす可能性があるため、MOA 解析の重要な要素であり、生物学的に非線形的なプロセスや種間における閾値の差が内在している場合には特に重要な要素である。同様に、用量に関連したハザードを定量化することは、生物学的理解と整合性のある外部モデルを提示することで、リスク評価のプロセスに役立つ。

これらの一般的に低いヒトばく露レベルを推定することは、リスク評価におけるばく露解析の課題である。これには通常、環境媒体、動植物組織、薬物動態モデルから得られたデータの広範な解析が含まれる。このプロセスはまた、ヒトの活動パターン、ライフステージや生活様式といったばく露をもたらす可能性のある要因の解析にも依存する。

理想は、この情報に基づいて懸念される集団を特定するために、異なる集団（男性、女性、子供、乳幼児、民族性や職業などに基づく特別な集団）を対象としたそれぞれのばく露量の範囲に関するシナリオが作成されることである。その大部分がフレームワーク解析に含まれているハザードの特性評価には定量化（用量反応解析）が含まれているが、外部ばく露量の推定及びこれらの推定ばく露量におけるハザードの説明は、リスク評価に含まれるその次のステップにおいて行われる。例えば、メラミンの場合（事例研究 7、Meek ら、2003 年）では、動物の MOA はヒトとの関連性が高いと結論づけられた。しかし、膀胱がんの形成は非常に高用量でしか起こらないという認識により、リスク評価、ばく露評価、リスク判定の次の段階へと解析が進められた。リスク評価全体として、メラミンのヒトへのばく露は膀胱がんの発生に必要なレベルを大きく下回るという評価が下された。

結論

この IPCS HRF は、2001 年の IPCS MOA フレームワークから得られた経験と 2003 年の ILSI/RSI ヒト発がん性関連フレームワークの検討に基づいて作成された。これらのフレームワークにおける概念の多くが採用されているが、明確性を向上させ、これまで考慮されていなかった要素（例えば、感受性の高い集団）を導入するために、多くの変更が加えられている。ハザードの特性評価及び全体的なリスク評価/判定のフレームワークにおける解析ツールとしてのフレームワークの有用性と役割、すなわちヒトへの関連性と用量反応性の外挿に役立つことが強調されている。このフレームワークの開発から得られた、多くの要点と結論は以下のとおりである。

1. フレームワーク解析に着手する前に、実験動物における発がん性反応のエビデンスの重み付けを慎重に評価する必要がある。
2. 専門家の関与及び第三者によるレビューは、新しい MOA が一般に受け入れられるため、また、科学的な正当性を得るための必須条件である。
3. フレームワークは、DNA 反応性を含むすべての発がん MOA に適用できる。
4. ほとんどの DNA 反応性発がん物質についてはヒトへの関連性が想定されると思われるが、ヒト関連性解析は、理解を深め、ハザードとリスクの特性評価/判定を改善し、例外を特定するための重要なアプローチである。
5. 新規の MOA を介して作用する可能性のある化学物質を扱う場合、解析はその化学物質に焦点を当て、HRF を介して詳細な評価を行うことが必要となる。しかし、ある化学物質が他の化学物質において既に確立され、専門家のピアレビューを経た MOA と一致した腫瘍反応をもたらす場合、解析は確立されている MOA と、その化学物質がその MOA の一連の流れにおいて確立されている key events と同じ key events を介して発がん作用を生み出すか否かに焦点を当てて行われる。
6. 実験動物で発見された腫瘍反応のヒトへの関連性を評価する場合、key events の一致解析は MOA に対するものであり、必ずしも化学物質に焦点を当てた評価ではない。発がんプロセスに関連する化学物質特有の情報や化学物質一般の情報は、解析において貴重なものとなり得る。知識の進歩に伴い、MOA は化学物質特有のものでなくなり、関連する重要な生物学的プロセスにより一層依拠することとなり、それにより、ある化合物におけるヒトとの関連性を別の化合物へと一般化することが可能になるであろう。

7. Key events の生物学的理解と生体における重要性は、発がんリスクの用量反応性の外挿性に関する解析に情報を提供することができる。そのため MOA の理解はハザードとリスクの判定に大きな影響を与えうる。特に非線形性のプロセスや種間の閾値の差が、関連する生物学的性質に内在する場合に顕著である。
8. 一般的に受け入れられている MOA と有益な事例研究のデータベースを構築し、維持することが推奨される。このデータベースは、ILSI/RSI 及び IPCS によって行われた既存の事例研究に加え、フレームワーク解析の適用において有益な事例を提供するものでなければならない。このデータベースは、発がん物質の MOA の研究において知見が蓄積し続ける中で特に重要である。
9. 解析において、潜在的に感受性の高い集団やさまざまなライフステージを考慮することが重要である。

結論として、IPCS HRF は、推定される化学物質の発がん MOA をデータが裏付けるかどうかを判断し、ヒトへの関連性を評価するための厳格で透明性のあるアプローチを提供している。科学界において発がんリスク評価における作用機序に関する情報の利用を増やす手段として、このアプローチを利用し、フィードバックを行うことが奨励されており、このことが将来的な更なる改良につながるだろう。このフレームワークは、発がんプロセスの理解を深め、重要なデータギャップを特定し、MOA に関連した研究の設計に有益な情報をもたらすという点で、リスク評価と研究の両方のコミュニティにとって価値がある。発がん反応がヒトに関連する可能性があると考えられる場合、解析中に key events について得られた情報は、その後の化合物のハザードの定量化において極めて貴重なものとなりうる。このフレームワークは発がん以外のエンドポイントにまで拡張できるようにするべきであり、このことに関する更なる研究が推奨される。したがって、IPCS HRF の適用は、エンドポイント間の調和のための貴重なツールとなるであろう。

謝辞

IPCS と本論文の著者らは、この発がん MOA のヒトとの関連性を解析するための IPCS フレームワークの開発につながった科学的な会議やワークショップに関与した多くの専門家に謝意を表します。これらは IPCS/WHO の手順に従って招集され、実施された専門家会議及びワークショップです。本文書を含む成果物は、国際的な特別作業部会の意見を集約したものであり、必ずしも WHO の決定や表明された方針を代表するものではありません。本事業は、世界保健総会の多くの加盟国からの IPCS への寄付金により資金提供された。

参考文献

Cohen M, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003) The human relevance of information on carcinogenic modes of action: An overview. *Critical Reviews in Toxicology*, 33:581–589.

Committee on Carcinogenicity (2004) Guidance on a strategy for the risk assessment of chemical carcinogens. London, Department of Health.

Cortopassi GA, Wang E (1996) There is substantial agreement among interspecies estimates of DNA repair activity. *Mechanisms of Ageing and Development*, 91:211–218.

Hanawalt PC (2001) Revisiting the rodent repairadox. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 38:89–96.

Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SM, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006) Mode of action in relevance of rodent livers to human cancer risk. *Toxicological Sciences*, 89:51–56.

IPCS (2000) Scoping meeting to address the human relevance of animal modes of action in assessing cancer risk, Carshalton, United Kingdom, 8–10 November 2000. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (<http://www.who.int/ipcs/methods/harmonization/areas/cancer/en/index.html>).

IPCS (2004) Report of the first meeting of the Cancer Working Group, Arlington, Virginia, USA, 3–5 March 2004. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (<http://www.who.int/ipcs/methods/harmonization/areas/cancer/en/index.html>).

IPCS (2005) Record of the Cancer Framework Workshop, Bradford, United Kingdom, 21–23 April 2005. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (<http://www.who.int/ipcs/methods/harmonization/areas/cancer/en/index.html>).

Meek ME, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKeeman LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003) A framework for human relevance analysis of information on carcinogenic modes of action. *Critical Reviews in Toxicology*, 33:591–653.

National Research Council (1983) Risk assessment in the federal government. Managing the process. Washington, DC, National Academy Press.

Preston JR, Williams GM (2005) DNA-reactive carcinogens: Mode of action and human cancer hazard. *Critical Reviews in Toxicology*, 35:673–683.

Slikker W Jr, Andersen ME, Bogdanffy MS, Bus JS, Cohen SD, Conolly RB, David RM, Doerrner NG, Dorman DC, Gaylor DW, Hattis D, Rogers JM, Setzer RW, Swenberg JA, Wallace K (2004) Dose-dependent transitions in mechanisms of toxicity: Case studies. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 20:226–294.

Sonich-Mullin C, Fielder R, Wiltse J, Baetcke K, Dempsey J, Fenner-Crisp P, Grant D, Hartley M, Knaap A, Kroese D, Mangelsdorf I, Meek E, Rice J, Younes M (2001) IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 34:146–152.

USEPA (1999) Guidelines for carcinogen risk assessment (review draft). Washington, DC, United States Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum (NCEA-F-0644).

USEPA (2005) Guidelines for carcinogen risk assessment. Washington, DC, United States Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum (EPA/639/P-03/001F).

チアゾピルと甲状腺障害： 発がん MOA のヒトへの関連性を解析するための IPCS フレームワークを用いた事例研究²

Vicki L. Dellarco, Douglas McGregor, Sir Colin Berry, Samuel M. Cohen, & Alan R. Boobis

チアゾピルは雄ラットの甲状腺濾胞細胞腫瘍の発生率を増加させるが、マウスに対して発がん性はないとされている。チアゾピルに遺伝毒性はない。チアゾピルは、チロキシンの代謝亢進によりホルモンバランスが崩れることにより二次的にラット甲状腺に発がん作用を及ぼす。これらのラットにおける腫瘍とヒトの健康への関連性は、2006 年の国際化学物質安全性計画ヒト関連性フレームワーク (IPCS HRF) を用いて評価された。推定されたげっ歯類における発がん MOA を Bradford Hill 基準に照らして検証したところ、用量と時間の一致、生物学的妥当性、整合性、強度、一貫性、特異性の条件を満たしており、甲状腺濾胞細胞腫瘍について確立されている MOA に適合していることがわかった。推定された MOA はヒトでも理論的には作用する可能性はあるが、甲状腺ホルモンの不均衡に対するラットの発がん性の感受性がヒトとは量的に顕著に異なることから、チアゾピルはヒトに対する発がんに関するハザードを有さないという結論が導き出された。

多くの化学物質が、循環甲状腺ホルモンの減少を介した甲状腺ホルモンのホメオスタシスのかく乱を伴う作用機序 (MOA) を介してラットの甲状腺濾胞細胞腫瘍を誘発することが示されている (Hurley ら、1998 年 ; Capen ら、1999 年 ; IARC、2001 年)。甲状腺ホルモンの低下に対しホメオスタシスを保とうとする反応は、下垂体からの甲状腺刺激ホルモン (TSH) の放出の代償的な増加をもたらし、その結果、甲状腺を刺激して甲状腺ホルモンの合成及び放出を増加させる。TSH レベルの持続的な上昇は、甲状腺濾胞細胞の肥大及び過形成へとつながり、(化合物への持続的なばく露の結果) 高い TSH レベルが維持された場合、最終的には腫瘍形成へとつながる。ラットにおけるこの腫瘍形成 MOA は、科学界では十分に受け入れられており、国際がん研究機関 (Capen ら、1999 年 ; IARC、2001 年) 及び米国環境保護庁 (USEPA、1998 年) は、げっ歯類における甲状腺濾胞細胞腫瘍のヒトへの関連性を評価するための独自のガイダンスまたは方針を確立している。

除草剤であるチアゾピルは、甲状腺ホルモンのホメオスタシスへ影響することによりラット甲状腺濾胞細胞腫瘍を誘発するが、これは発がん MOA 解析のための 2001 年の国際化学物質安全性計画 (International Programme on Chemical Safety: IPCS) のオリジナルフレームワークを示すために用いられた事例である (Sonich-Mullin ら、2001 年)。ここではチアゾピルの MOA を、事例研究としてここで再検討し、2006 年の IPCS ヒト関連性フレームワーク (HRF) で提供されたヒトの腫瘍形成 MOA 評価のための追加ガイダンスを説明した。この更新された事例研究では、ある特定の MOA での経験の蓄積が、その後の解析の難易度をどの程度下げられるのかについて強調している。この事例研究は、key events が十分に定義されている確立された MOA に基づいているため、この解析では、チアゾピルがこの経路で期待されている生物学的効果をもたらすか否かに焦

² この論文は、WHO が著作権を有するものであり、元々は 2006 年に Critical Reviews in Toxicology, Volume 36, pages 793-801 に掲載されたものです。この論文は、WHO の出版物のために編集されており、正誤表が含まれています。

点を当てている。この事例研究はまた、動物及びヒトにおける毒性発現の経路の基礎となる生理学のプロセスを理解することの重要性を強調している。いくつかの化合物では、化学物質特有のデータがヒトでの **key events** を評価する上で重要な場合があるかもしれないが、その他の化合物については、基礎となる生物学的知見があれば、発がん MOA のヒトへの関連性を定性的にも定量的にも解釈できる場合がある。チアゾピルは後者の例である。甲状腺ホルモンのかく乱とラット甲状腺濾胞細胞腫瘍のヒトへの関連性に関する他の MOA 事例研究としてフェノバルビタールについての事例研究がある (Lehman-McKeeman & Hill, in Meek ら、2003 年)。

本 MOA 解析は、チアゾピルの発がん性に関する利用可能な情報の簡単な要約から始まり、続いて、この甲状腺ホルモンかく乱 MOA で考察された生化学的及び病理組織学的な実験データの議論が行われる。本解析は化学物質そのものの包括的な評価を意図したものではない。

発がん性データ

チアゾピルの発がん性に関するヒトの疫学的データは得られていない。チアゾピルは、マウス、ラット及びイヌを含む様々な実験動物種において、肝臓及び甲状腺に影響を及ぼす。チアゾピルは雄ラットにおいてのみ甲状腺腫瘍を誘発することが確認されており、甲状腺ホルモンの肝代謝及び排泄を増加させることによってこれを引き起こすようである。

チアゾピルはマウス及びラットへの慢性的な混餌投与により、主に雄ラットに甲状腺濾胞細胞腫瘍を誘発したが、雌ラットでは誘発しなかった (Naylor & McDonald, 1992 年 ; Naylor & Raju, 1992 年)。チアゾピルを最大 800 mg/kg まで混餌投与したマウスの慢性試験 (雄では 1 日あたり 128.4 mg/kg 体重[bw]、雌では 1 日あたり 215.9 mg/kg bw) では、いずれの性においても腫瘍の発生率に有意な増加は認められなかった (Naylor & Raju, 1992 年)。ラット発がん性試験では、チアゾピル (原体、純度 94.8%) を雄及び雌の Sprague-Dawley ラット (SD ラット) (各群雌雄 60 匹ずつ) に 0、1、10、100、1000 または 3000 mg/kg の濃度で混餌投与し、雄では 1 日あたり 0、0.04、0.4、4.4、44.2、136.4 mg/kg bw、雌では 1 日あたり 0、0.06、0.6、5.6、56.3 または 177.1 mg/kg bw の用量を与えた (Naylor & McDonald, 1992)。甲状腺濾胞細胞腺腫及びがんの発生率は、1000 mg/kg (1 日あたり 44.2 mg/kg bw) 及び 3000 mg/kg (1 日あたり 136.4 mg/kg bw) 投与群の雄ラットで増加した (表 1)。なお、雄ラットにおける腫瘍発生率の増加は主に良性腫瘍によるものであったことに留意すべきである。

ラットにおける甲状腺濾胞細胞腫瘍の誘発において推定される MOA

チアゾピル誘発性甲状腺濾胞細胞腫瘍において推定される MOA は、甲状腺外における機序による下垂体-甲状腺軸のホメオスタシスの乱れを含むものであった。具体的な流れを以下に述べる。チアゾピルは肝臓におけるチロキシン (T4)-ウリジン二リン酸 (UDP) グルクロン酸転移酵素 (UGT) 活性を誘導し、抱合による T4 の代謝を促進し、ホルモンの抱合体の胆汁排泄を増加させる。この肝臓代謝の促進の結果として、血清 T4 及び時にはトリヨードサイロニン (T3) の半減期が減少する。下垂体は、TSH の放出及び血清レベルを高めることにより、T4 の循環血清レベルの低下に対応する。循環 TSH レベルの長期的な上昇は、甲状腺を刺激して甲状腺ホルモンの貯蔵を枯渇させ、ホルモン産生を誘導し続ける。

その結果、甲状腺濾胞細胞は大きくなり（肥大）、高い増殖率で細胞数を増やす（過形成）ように誘導される。慢性的なチアゾピルのばく露により、甲状腺過形成は最終的には腫瘍へと進行する。

表 1. Sprague-Dawley 雄ラットにおける甲状腺濾胞細胞腫瘍の発生率(2 年間の慢性試験)

	Dose (mg/kg bw per day) ^a					
	0	0.04	0.4	4.4	44.2	136.4 ^b
腺腫	1/50	2/47	0/49	2/47	8/49	12/48
がん腫	1/50	1/47	0/49	0/47	1/49	4/48
合計	2/50	3/47	0/49	2/47	9/49	14/48
%	(2)	(6)	(0)	(4)	(18)	(29)
P	0.000 ^c	0.470	0.253	0.668	0.024*	0.001**

注：腫瘍の発生率は、USEPA Office of Pesticide Programs (Naylor & McDonald, 1992 年) に提出されたデータから抽出した：有意差 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (フィッシャーの正確確率検定に基づく統計解析)

^a 1 日あたりの投与量を mg/kg bw で推定した。

^b 136.4mg/kg bw/日 (3000mg/kg) 混餌投与群の 2 匹の動物には、良性腫瘍と悪性腫瘍の両方が認められた。

^c 投与量に従って P 値が低下した。

実験動物における key events

チアゾピルの発がん MOA における一連の key events には、以下のものが含まれる。

- 肝 UGT 活性の誘導
- T4 の肝臓での代謝及び胆汁排泄の増加
- 血清 T4 の半減期及び濃度の低下
- 循環 TSH 濃度の上昇
- 甲状腺濾胞細胞肥大及び濾胞細胞過形成

次に、チアゾピルが、循環甲状腺ホルモンの肝クリアランスを増加させて甲状腺-下垂体軸を乱すことによって作用するかどうかを評価する。上記の key events に基づき、チアゾピルの MOA の生物学的指標は、肝臓代謝の変化、ホルモンレベルの変化、甲状腺の成長の増加及び甲状腺の病変の進行が挙げられることになる。これらの影響は、短期及び亜慢性試験さらに慢性試験における中間及び計画殺において、雄ラットで観察され、測定されている (Hotz ら、1997 年)。Key events 及び腫瘍反応の用量反応性を以下に示す。

用量反応関係及び一致性

チアゾピルの MOA における主要な影響について、無毒性量 (NOAEL) 及び最小毒性量 (LOAEL) の概要を表 2 に示す。Hotz ら (1997) による 56 日間の試験では、雄 SD ラット (各群 20 匹) に、チアゾピルを 0、10、30、100、300、1000、または 3000 mg/kg の濃度で (測定されていないが、チアゾピルの摂取量は 1 日あたり 0、0.5、1.5、5、15、50 及び 150 mg/kg bw と推定される) を 56 日間混餌投与し、肝臓 (重量、肝 T4-UGT 活性、T4 胆汁排泄)、甲状腺 (重量、肥大/過形成) 及びホルモン (T4、T3、リバース T3 (rT3) 及び TSH の血清レベル) に対する影響を評価した。この試験では、チアゾピルの主要作用部位である肝臓への影響が、下垂体-甲状腺のホメオスタシスのかく乱の最も敏感な指標であると考えられる。50 mg/kg bw/day 投与群及び 150 mg/kg bw/day 投

与群では、肝 T4-UGT 活性が 56 日間の投与期間終了時に統計学的に有意に増加した（肝重量で標準化したところ、対照群と比較してそれぞれ約 3 倍と 6 倍に活性が増加した）。T4-UGT 活性の増加と一致して、血中からの T4 のクリアランス及び胆汁中への排泄（125I 標識 T4 の排泄量）は、チアゾピルを 150 mg/kg bw/day 投与後に 40%増加した（150 mg/kg bw/day が評価された唯一の投与量）。Hotz ら（1997 年）による雄ラットを対象とした 56 日間の試験では、チアゾピルを 1 日あたり 15、50 及び 150 mg/kg bw 投与した場合に、肝重量の統計学的に有意な増加が認められた。ラット 2 年間の試験（Naylor & McDonald、1992 年）では、絶対肝重量は対照群と比較して、44.2 mg/kg bw/day 投与群で 122%、136.4 mg/kg bw/day 投与群で 178%増加した。また、このラットの 2 年間試験では、44.2 及び 136.4 mg/kg bw/day 投与群で肝肥大の発生率が統計的に有意に増加した（対照群の 0/60 に対してそれぞれ 47/61 及び 52/60）。

表 2. 雄ラットを対象とした 56 日間の試験(Hotz ら、1997) 及び 2 年間の慢性試験(Naylor & McDonald、1992)から得られた肝臓、ホルモン及び甲状腺に対する影響の概要

影響	NOAEL/LOAEL
肝臓	
UGT の誘導	15/50 mg/kg bw/day (56 日間試験)
T4 の胆汁排泄量の増加	<150/150 mg/kg bw/day (56 日間試験において 150 mg/kg bw/day のみ実施された)
肝臓重量の増加	5/15 mg/kg bw/day (56 日間試験) 44.2/136.4 mg/kg bw/day (2 年間試験)
肝細胞肥大	4.4/44.2 mg/kg bw/day (2 年間試験)
ホルモン	
血清 T4 の減少	50/150 mg/kg bw/day (56 日間試験)
血清 TSH の上昇	50/150 mg/kg bw/day (56 日間試験)
甲状腺	
甲状腺重量の増加	15/50 mg/kg bw/day (56 日間試験) 44.2/136.4 mg/kg bw/day (2 年間試験)
甲状腺過形成の増加	44.2/136.4 mg/kg bw/day (2 年間試験)
甲状腺腫瘍の増加	4.4/44.2 mg/kg bw/day (2 年間試験)

Hotz ら（1997）が雄 SD ラットにチアゾピルを投与したとき、上述した T4 の肝クリアランスの亢進と同様に、最高用量の投与 56 日後に血清 T4 濃度の統計学的に有意な ($P \leq 0.05$) 減少（30%減少）と TSH の増加（60%増加）が認められた（表 3）。T3 の血清レベルは、1.5 mg/kg bw/day では 56 日投与後に統計学的に有意ではないものの低下し、150 mg/kg bw/day では有意に上昇した。一般に、肝ミクロソーム酵素誘導剤による影響は T4 よりも T3 に影響を与えにくいようである。したがって、T4 及び TSH は、下垂体-甲状腺のホメオスタシスの変化の指標としてはより信頼性の高い傾向がある（Liu ら、1995 年、Hurley ら、1998 年、Hood ら、1999 年）。

チアゾピルの場合、T4 及び TSH に影響を及ぼす用量と、甲状腺濾胞細胞腫瘍の発生率の増加を引き起こす用量との間には、相関関係が乏しいようである。雄 SD ラットにおいて甲状腺濾胞細胞腫瘍の統計学的に有意 ($P<0.05$) な増加をもたらしたチアゾピルの最低用量は、2 年間の試験では 1 日当たり 44.2 mg/kg bw であったが、T4 及び TSH に対する影響の NOAEL は 56 日間の試験では 1 日当たり 50 mg/kg bw であった (表 2)。一般的に、肝酵素/肝重量及び下垂体-甲状腺ホルモン濃度への影響は、この甲状腺ホルモンかく乱 MOA が閾値を有する現象であることを考えると、少なくとも甲状腺の重量変化及び甲状腺腫瘍発生率の増加をもたらす用量と同程度の低用量で起こると予想される。引用された投与量のどちらも正確ではないので、この見かけの不一致はおそらく真ではない。2 年間の試験における体重 1 kg 当たりの投与量は、試験期間全体の平均的な推定値であったのに対し、比較に用いられた 56 日間のメカニズム試験での投与量は、12~20 週齢のラットにおけるものである。これらの投与量は、容易に算出可能な投与量よりも少なくとも 2 倍高かったと考えられる (したがって、腫瘍に対する実際の LOAEL は 1 日あたり約 90 mg/kg bw であったはずである)。また、ホルモンのかく乱 (例えば TSH の長期上昇) が病理学的変化をもたらし始める臨界期は、2 年間の試験において後期ではなく早期であったため、これらの投与量は腫瘍に対する関連性も高かったと考えられる。56 日間の試験で計算された投与量は公表された論文からは摂餌量の情報が入手できなかったため、摂餌量の推定値に基づいて計算された。そのためこれについても不正確である可能性が高い。この不確実性を認識した上で、1 日あたり 50 mg/kg bw で甲状腺重量が有意に増加し、1 日あたり 15 mg/kg bw で肝臓重量の増加が認められたが、これはチアゾピルの MOA では最初のターゲットが肝臓であることと一致している。

表 3. 雄ラットにおける 56 日間の試験:ホルモン作用 (Hotz ら、1997 年)

	<i>Dose (mg/kg bw per day) ^a</i>						
	<i>0</i>	<i>0.5</i>	<i>1.5</i>	<i>5</i>	<i>15</i>	<i>50</i>	<i>150</i>
T4 (µg/dL)	4.1 ± 0.2	4.3 ± 0.3	3.9 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.0 ± 0.2	4.0 ± 0.2	2.9 ± 0.1 ^a
T3 (ng/dL)	84 ± 3	82 ± 4	68 ± 2	84 ± 3	82 ± 3	91 ± 4	110 ± 6 ^a
TSH (ng/mL)	2.7 ± 0.2	3.5 ± 0.4	2.7 ± 0.1	3.1 ± 0.4	2.9 ± 0.3	3.1 ± 0.2	4.3 ± 0.4 ^a

注: 投与量 mg/kg bw/day は推定値である。値は平均値±標準誤差で表している; 1 群あたり 19 または 20 匹。

^a 分散分析 (ANOVA) 後の Dunnett の検定で対照群と統計学的に有意に異なる ($P\leq 0.05$)。

上述のように、長期の TSH 刺激は甲状腺の肥大と過形成の両方を引き起こす。ラットの 2 年間の試験では、甲状腺肥大のみと腫瘍発生率の間には用量相関性は見られなかった。腫瘍発生率は 44.2 mg/kg bw/day 投与群で増加したが、過形成の発生率の統計学的に有意な増加 (対照群 1/60 に対し 8/58) は 136.4 mg/kg bw/day 投与群でのみ認められた。さらに、ラットの 56 日間の試験では、組織学的に甲状腺濾胞細胞肥大と過形成が併発しており、150 mg/kg bw/day 投与群での発生率は統計学的に有意に増加したが、それ以下の用量では増加しなかったと報告されている (Hotz ら、1997 年)。しかし、56 日間の試験での甲状腺重量の増加と 2 年間の試験での腫瘍発生率の間には良好な用量相関性があった。150 mg/kg bw/day 投与群で 46%、50 mg/kg bw/day 投与群で 25% の統計学的に有意な甲状腺重量の増加が認められた (Hotz ら、1997 年)。

時間的関連性

ある事象が腫瘍形成の必須要素である場合、それは腫瘍の発生に先行して発現しなければならない。雄 SD ラットに 3000 mg/kg (1 日あたり 150 mg/kg bw) のチアゾピルを混餌投与した 7、14、28、56 及び 90 日後といった複数のタイミングにおけるデータが利用可能である (Hotz ら、1997 年)。肝重量増加及び肝 T4-UGT 活性上昇は、最も早く測定した 7 日目から全ての測定時期において認められた。この実験では抱合化 T4 の胆汁排泄は測定されなかったが、血清 T4 はすべての観察時期において減少した。循環 TSH の増加は、投与開始後 14 日目においては有意ではなかったが、すべてのサンプリング時期で観察された。甲状腺重量の増加もすべてのサンプリング時期で観察された。組織学的には、14 日目から肥大/過形成の経時的な増加が認められた。2 年間のラット試験では、1 日あたり 136.4 mg/kg bw を投与した 69 週目に最初の甲状腺腺腫が観察された。このように、チアゾピル誘発性甲状腺濾胞細胞腫瘍形成においては、すべての key events が腫瘍形成に先行するという論理的な経時的反応が認められた。

腫瘍反応と key events との関連性の強さ、一貫性及び特異性

この関連性の強さ、一貫性、特異性は、上述の試験から確立できる。推定される MOA の基礎となる定量可能な前駆事象は、甲状腺濾胞細胞腫瘍の発現と比較的一致している。チアゾピルを混餌投与されたラットにおいて、肝重量の増加及び肝 T4-UGT の誘導が観察されることから、甲状腺外の機序による下垂体-甲状腺軸のホメオスタシスのかく乱と一致しているようである。肝 T4-UGT 活性の上昇は、他の重要な生化学的変化や甲状腺濾胞細胞の肥大及び過形成の前に起こる段階である。チアゾピルの投与は肝臓における T4 の代謝が促進されるため、循環 T4 の減少及び TSH の増加が明らかである。さらに、亜慢性試験では、甲状腺重量の増加及び肥大・過形成の発生は、甲状腺ホルモン濃度及び甲状腺ホルモン代謝の変化の出現や回復と同じ用量及び時間の条件下で統計学的に有意な程度で現れることが示された。中止/回復試験 (Hotz ら、1997 年) では、チアゾピルの投与中止後、ホルモン値がコントロール値に戻り、肝臓と甲状腺の重量が減少し、甲状腺濾胞細胞の過形成が回復することが示された。早期に投与を中止することで、この非遺伝毒性 MOA における甲状腺ホルモンの低下と病変の進行が回復することが期待された。唯一回復が遅くなったのは、最も長い投与期間の後の甲状腺重量の増加であった。

生物学的妥当性及び整合性

実験用のげっ歯類を用いた研究から、視床下部-下垂体-甲状腺軸の持続的なかく乱、TSH による甲状腺への長期的な刺激及び甲状腺濾胞細胞の肥大、過形成、最終的な腫瘍への進行との関係を示すデータが数多く存在する (McClain、1995 年 ; Hard、1998 年 ; Hurley ら、1998 年 ; Capen ら、1999 年 ; IARC、2001 年)。チアゾピルの場合と同様に、TSH の分泌増加は、T4 の肝クリアランスの増加を含むいくつかのメカニズムを介して生じる可能性がある。

T4 の循環レベルは、TSH の合成を担う下垂体の甲状腺刺激細胞によってモニターされている。下垂体では、T4 は、5-dried-deio-dinase (ヨウ素ペルオキシダーゼ) II 型により T3 に代謝され、T3 は細胞核内の特定の受容体に結合する。T3 受容体の占有率が低下すると、TSH 合成と分泌が刺激される。ラットへの TSH の注射が、非増殖細胞特異的核抗原である甲状腺濾胞細胞核スタチンが減少し、これらの細胞が非分裂状態を脱して細胞周期を再開していることが生体内での研究で示されている (Bayer ら、1992 年)。この試験では、低用量の TSH を反復投与 (ラット 1 匹あたり 0.25 IU を 1 日 2 回) すると、核内スタチンレベルが 10 日間にわたって累積反応が生じ、TSH の注射を中止してから 5 日以内に正常な安静時のレベルに戻ることを示された。核内スタチンの減少もまた、TSH に対する最も早い反応として知られているピノサイトーシスと類似した初期の事象である。これらのデータは、TSH 濃度の増加だけでラットの甲状腺濾胞細胞を増殖前の状態になることと矛盾しない。したがって、チアゾピルが最初に肝 T4-UGT を誘導することでラットの甲状腺濾胞細胞腫瘍を引き起こすという指摘は、少なくとも肥大と過形成の段階までは視床下部-下垂体-甲状腺の動的な制御システムに関する既知の生理学的知見と一致している。

最後に、チアゾピルにより誘発される腫瘍反応はげっ歯類の甲状腺発がん物質の典型的なものであり、甲状腺濾胞細胞腫瘍は雄ラットにはみられるが、雌のラットやマウスには認められない。ラットはマウスよりも甲状腺発がん物質に対し感受性が高い傾向があり、さらに、雄ラットは雌ラットよりも甲状腺腫瘍を誘発する化学物質の割合が大きいことがよくみられている (Hurley ら、1998 年)。このことと一致して、TSH レベルは通常雄ラットの方が雌よりも高い (Hill ら、1989 年)。さらに、雄ラットは時に同系統の雌よりも肝酵素が誘導されやすいことがあるが、これは酵素の種類、酵素誘導を起こす化合物の用量や動物の年齢に依存する (Sundseth & Waxman、1992 年; Agrawal & Shapiro、1996 年; Oropeza-Hernandez ら、2003 年)。

その他の MOA

変異原性は常に考慮すべき可能性のある MOA の 1 つであるが、以下の試験においてチアゾピルの遺伝毒性は示されていない。

- ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) の 4 つの菌株を用いた突然変異試験 (Bakke、1989 年 a)。
- チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた突然変異試験 (hgpt 座位) (Li & Myers、1989 年)。
- マウスの骨髄細胞を用いた In vivo 小核試験 (Flowers、1990 年)。
- ラットの肝細胞を用いた In vivo 不定期 DNA 合成試験 (Backke、1989 年 b)。

したがって、利用可能なエビデンスは、突然変異誘発がチアゾピルの代替 MOA ではないことを示している。

その他の視床下部-下垂体-甲状腺軸への影響及び甲状腺ホルモン代謝における他の経路のかく乱は、甲状腺のホメオスタシスを変化させる可能性がある。しかし、これらの変化は、チアゾピルについて推定されているものと根本的には変わらず、すべて継続的なばく露による TSH 刺激の長期化につながっているであろう。

不確実性、矛盾、データギャップ

甲状腺腫瘍とホルモンの変化には用量の一致がみられないが、これは比較に用いられた体重 1 kg 当たりのミリグラム投与量（摂餌量と体重値から算出された）が不正確であること、比較した投与量が一方は若齢期のラットにおける平均値であり、もう一方が試験全体の平均値であったこと、また、試験間のばらつきなどに起因している可能性がある。

推定される MOA の評価

提示されたデータは、中程度に高い信頼度で、チアゾピルの混餌投与による慢性ばく露後の雄ラットにおける甲状腺濾胞細胞腫瘍の発生を説明するのに十分であると判断される。チアゾピルは、腫瘍を引き起こす用量よりも低い用量で明らかに肝臓重量を増加させ（すなわち、肝臓が最初の標的臓器である）、腫瘍を誘発させる中で最も低い用量で甲状腺の成長（すなわち、甲状腺重量の増加）を促進させた。

推定される MOA のヒトへの適用可能性

IPCS HRF はリスクサイエンス研究所/国際生命科学研究機構の「ヒト関連性フレームワーク」（Meek ら、2003 年）をもとに開発され、「IPCS がんワーキンググループ」の議論をもとに修正されたものであり（Boobis ら、本書）、一連の 3 つの問いかけに対処し、動物の腫瘍における MOA のヒトへの関連性に関する文書化された論理的な結論を導くための 4 つの部分からなるアプローチを提示している。

1. 動物 MOA を確立するのにエビデンスの重み付けは十分か？上で詳述したように、チアゾピルは UGT 誘導により血清 T4 レベルを低下させ、その結果として血清 TSH を上昇させることで、甲状腺ホルモンのホメオスタシスを変化させるという明確なエビデンスがある。
2. 実験動物とヒトとの間の *key events* の根本的、質的な違いに基づいて、MOA のヒトとの関連性を合理的に排除することができるか？ヒトにおける甲状腺ホルモンのホメオスタシスの調節に関する現在の理解と、（甲状腺ホルモンのホメオスタシスの変化の結果としての）TSH レベルの上昇が甲状腺がんのリスク因子として果たす役割について、チアゾピルの動物における発がん MOA の *key events* のヒトへの関連性を評価するために検討がなされた。ラットにおける視床下部-下垂体-甲状腺軸の機能と調節に関与する基本的なメカニズムは、量的な薬力学的差異（後述）はあるが、定性的にはヒトのそれと類似している（Bianco ら、2002 年）。したがって、ラットで T4 レベルを低下させる薬剤は、ヒトでも同様に T4 を低下させる可能性があり、その結果、TSH レベルの上昇につながる可能性がある。げっ歯類とヒトは、下垂体-甲状腺機能のかく乱に対して同様の反応を示すデータがある。例えば、甲状腺ホルモンのレベルを容易に低下させるヨウ素欠乏症は、ヒトでは甲状腺細胞の増殖を刺激して甲状腺腫を引き起こすことが知られている。ヨウ素欠乏症を放置すると、まれではあるが腫瘍形成につながることもある（Thomas & Williams, 1999 年）。甲状腺がんになりやすいというエビデンスはないが、甲状腺に直接作用して（例えば、ホルモン合成や放出を阻害する、T4 から T3 への変換を阻害する）甲状腺ホルモンのホメオスタシスを乱す多くの医薬品（プロピルチオウラシル、リチウム、アミオダロン、イオパノ酸など）は、ヒトでは甲状腺ホルモンの低下及び TSH の上昇につながることを知られている（Ron ら、1987 年）。

ラットとは対照的に、ヒトでは、肝ミクロソーム酵素が誘導され、循環 T4 レベルを低下させる薬剤にばく露されても TSH レベルの上昇は認められていない (Lehman-McKeeman & Hill, in Meekら、2003 年)。例えば、医薬品のフェニトイン、リファンピン、カルバマゼピンは、UGT を含む肝ミクロソーム酵素を誘導し、血中の T4 レベルを低下させるが、TSH レベルは変化しない (Curran & DeGroot、1991 年)。同様に、実験的に高用量で T4 のグルクロン酸抱合及び胆汁排泄を増加させることによりラットに甲状腺腫瘍を発生させる薬剤 (例えば、オメプラゾール、ランソプラゾール、パントプラゾール) は、ヒトにおいて臨床用量では甲状腺ホルモンに変化をもたらさない (Masu-buchi ら、1997 年)。このように、ラットにおける下垂体-甲状腺軸のホメオスタシスの変化の用量反応関係には、ヒトと比較してかなりの違いがあるように思われる。後述するように、この現象は、ラットとヒトでは下垂体-甲状腺機能の基礎となる生理学的プロセスの量的な薬力学的差異に起因している。

3. 実験動物とヒトとの間の薬力学的または動態的要因のいずれかの量的差異に基づいて、MOA のヒトへの関連性を合理的に排除することができるか？チアゾピルは甲状腺を直接標的とするものではない。むしろ、その主な作用は肝代謝酵素に対するものであり、代謝活性の亢進は間接的に T4 の全身クリアランスを増加させ、ラットでみられるような甲状腺機能低下状態と TSH の代償性の増加をもたらす。チアゾピルがヒトにおける甲状腺ホルモンの恒常性を乱す可能性については、チアゾピル特有のデータはないが、フェノバルビタール (Lehman-McKeeman & Hill, in Meekら、2003 年) のような他の多くのミクロソーム酵素誘導剤で広く研究されている。上述したように、T4 の肝クリアランスを変化させることで甲状腺機能減退症下を引き起こす薬剤は、ヒトでは TSH レベルの上昇をもたらさないようである。おそらく、T4 の減少が閾値まで達していないので、TSH は上昇しないのではないかと考えられる。

甲状腺機能に関連して、ラットとヒトの間にはいくつかの重要な生理学的及び生化学的相違がある。ラットはヒトに比べて甲状腺ホルモンの予備容量が小さい。ラットはヒトに比べて甲状腺ホルモンの半減期が非常に短く、T4 の半減期は、ヒトの 5~9 日に対し、ラットでは約 12 時間である (Dohler ら、1979 年)。ラットの半減期が短いのは、ヒトに存在する T4 の高親和性結合グロブリンが存在しないことに関係していると考えられる (Hill ら、1989 年)。ラットでは、クリアランスの増加によって正常な T4 レベルを維持するために、より高い体重あたりの T4 産生率を必要とする。対照的に、ヒトではこのグロブリンへ甲状腺ホルモンが結合することによって、ラットと比較して代謝的分解及びクリアランスが遅く、その結果、甲状腺はラットよりも活性が低い。恒常的な TSH レベルは、ラットではヒトよりも約 25 倍高く、ラットでは下垂体-甲状腺軸の活性が高いことを反映している (Dohler ら、1979 年；McClain、1992 年)。したがって、ヒトは、T4 を減少させ TSH の上昇をもたらす薬剤に対して、ラットよりも定量的に感受性が低い。TSH が上昇していなければ、甲状腺腫瘍発生のリスクが高まることはない。

ヒトとの比較においてラットのもう一つの違いは、甲状腺の組織像にある。この組織学的な相違は、ラットでは安定した一定の血清 T4 濃度を維持するための T4 のより高い産生速度と関連しており、これによりラットの甲状腺は、人間を含む霊長類のそれよりも"機能的に活性化"した状態となっている (McClain、1995 年)。

ラットの濾胞上皮の多くは、刺激を受けてサイログロブリンを合成するため、濾胞細胞の多くは背の高い立方体状をしており、活潑にホルモン合成しているように見える。対照的に、ヒトの濾胞細胞の多くは、短い立方体状またはほぼ扁平な外観を呈し、静止状態のように見える傾向がある。ラットの濾胞細胞はすでに全体的に活性化しているので、TSH による刺激を受けると、ヒトの濾胞細胞よりも容易に反応し過形成を生じる。ヒトの甲状腺は貯蔵能力が高く、休止状態にある細胞の数が多い。そのため、ヒトの甲状腺濾胞細胞は恒常性を回復するための過形成反応を必要とせずに、休止状態から覚醒して追加の甲状腺ホルモンを合成・分泌する。したがって、ヒト甲状腺における主要な反応は、過形成ではなくサイログロブリンの再吸収と細胞の肥大であろう。要するに、ラット甲状腺よりもヒト甲状腺の方が、生化学的な面においてははるかに大きな緩衝能力を持っているということである。

ある薬剤がヒトにおいて甲状腺ホルモンレベルの低下を引き起こす可能性があるとしても、これらの薬剤が甲状腺がんの感受性を高めるという明確なエビデンスはない (Ron ら、1987 年)。例えば、フェノバルビタールを用いた疫学研究では、甲状腺がんのリスクの増加は示されていない (Olsen ら、1993 年)。TSH が上昇するような状態にある人々 (バセドウ病または甲状腺腫の患者) を対象とする研究は、このような状況においても甲状腺がんの発生はまれであることを示している (例えば、Mazzzaferri、2000 年 ; Gabriele ら、2003 年)。全国規模のスウェーデンの家族がんデータベースを用いた 960 万人のがんの環境的及び遺伝的原因を調査した結果、環境が甲状腺がんの主な原因となる役割を果たしているようには見えないことが明らかにされた (Lichtenstein & Hemminki、2002 年)。唯一知られているヒト甲状腺の発がん物質は放射線であり、すなわち変異原性物質のばく露である。

表 4 に要約されているように、甲状腺機能の生化学的及び生理学的差異に関する一般的な文献には、ラットとヒトの間で腫瘍に対する感受性に違いがあることを示す十分なエビデンスがある。ヒトとは対照的に、ラットは甲状腺ホルモンの低下症に続発する甲状腺腫瘍に対して非常に感受性が高い。特に、甲状腺ホルモンの恒常性にわずかでも変化があるとラットでは腫瘍形成が促進される。したがって、げっ歯類におけるホルモンの肝クリアランスの増加と下垂体-甲状腺軸のホメオスタシスの変化を伴うチアゾピルによって誘発される甲状腺腫瘍は、量的な動態の違いからヒトへの関連性はないと考えられる。

4. 結論：信頼性、解析及び帰結の記述。ラットにおけるチアゾピル誘発性甲状腺濾胞細胞腫瘍に関して、甲状腺ホルモンかく乱 MOA を確立するのに十分な実験的エビデンスが存在する。チアゾピルはヒトにおいて甲状腺機能減退症を引き起こす可能性があるが、一般的な文献には、げっ歯類における甲状腺ホルモンの肝クリアランスの増加と下垂体-甲状腺軸のホメオスタシスの変化を伴うプロセスによって誘発される甲状腺腫瘍は、ヒトの腫瘍発生に対する感受性の増加にはつながらないと結論づけるのに十分な基本的な生理学的プロセスに関する定量的エビデンスがある。チアゾピルに関するヒトでのデータはないが、他の肝ミクロソーム酵素誘導剤に関する臨床データは、チアゾピルのヒトへの関連性の解析には不可欠であった。一般的な文献からは、ラットとは異なりヒトでは T4 レベルの低下が代償的に TSH レベルを上昇させることを示すエビデンスはないことを示すのに十分なエビデンスが得られた。また、ラットの下垂体-甲状腺軸がこのようなホルモンのかく乱に対してヒトよりもはるかに感受性が高いという細胞学的及び生化学的エビデンスもある。

この感受性の高さは、甲状腺の活動を維持するための TSH の需要が高いことと相まって、ラットにおける T4 の急速なターンオーバーが早いことに起因すると思われる。

表 4. ラットとヒトにおける key events の比較

Key events	ラットにおけるエビデンス	ヒトにおけるエビデンス
T4 の肝クリアランスの増加	ラットの短期及び慢性試験で、肝臓が最も感受性の高い標的であることが判明しており、T4 肝 UGT 活性、T4 半減期、T4 胆汁排泄、肝重量及び肥大に関する研究により、T4 肝クリアランスの増加のエビデンスが得られている。	チアゾピルについてのデータはないが、ミクロソーム酵素の誘導が起こっていると思われる。
血清 T4 の減少	直接的な実験的エビデンス。	チアゾピルのデータはないが、他のミクロソーム酵素誘導剤がヒトで T4 を減少させることが示されていることを考えると、チアゾピルについてもそうであると思われる。
TSH レベルの上昇	直接的な実験的エビデンス。	チアゾピルのデータはないが、他のミクロソーム酵素誘導剤において T4 が減少しても TSH レベルが上昇することは示されていない。
TSH の増加は甲状腺細胞の増殖と腫瘍形成を促進させる。	直接的な実験的エビデンス。	甲状腺ホルモンの低下に続発する甲状腺濾胞細胞腫瘍の誘発は、甲状腺機能/ホメオスタシスの齟齬類との量的な違いを考えると、ヒトでは起こりそうにない。 甲状腺ホルモンレベルがかなり低いヒトにおいても甲状腺がんの発生はまれである。

IPCS HRF の結果

チアゾピルの例は、過去に明確にされ、確立された MOA と一致する誘発された腫瘍反応について示したものである。したがって、フレームワーク解析の最初の質問である「動物 MOA を確立するのにエビデンスの重み付けは十分か」に対応することは、その化学物質に関するデータセットが対象となる経路に対して定義にされた同じ key events に適合しているか否かを判断する必要があった。この例は、MOA に関与する生物学的プロセスの基本的な理解に関するデータが、どのようにげっ歯類とヒトの key events を比較するための重要な手段となるかを示している。このように、実験動物とヒトの間の質的及び量的な差異を評価し、ヒトに対する発がん MOA の妥当性（すなわち、HRF の問 2 と 3）評価するためには、このヒトに関する一般的な情報は、不可欠であった。

参考文献

Agrawal AK, Shapiro BH (1996) Phenobarbital induction of hepatic CYP2B1 and CYP2B2: Pretranscriptional and post-transcriptional effects of gender, adult age, and phenobarbital dose. *Molecular Pharmacology*, **49**(3):523–531.

Bakke JP (1989a) *Ames/Salmonella mutagenicity assay with MON 13200: Study No. ML-88- 191/EHL No. 88124*. Testing facility: Monsanto's Environmental Health Laboratory, St. Louis, MO. Submitted by Monsanto, St. Louis, MO (MRID No. 42275535).

Bakke JP (1989b) *Evaluation of MON 13200 to induce unscheduledDNA synthesis in the in vitro hepatocyteDNA repair assay in the male F-344 rat: Study No. SR-88-204/SRI No. LSC 6327*. Testing facility: SRI International, Menlo Park, CA. Submitted by Monsanto, St. Louis, MO (MRID No. 42275538).

Bayer I, Mitmaker B, Gordon PH, Wang E (1992) Modulation of nuclear statin expression in rat thyroid follicle cell following administration of thyroid stimulating hormone. *Journal of Cellular Physiology*, **150**:276–282.

Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR (2002) Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine Reviews*, **23**(1):38–89.

Capen CC, Dybing E, Rice JM, Wilbourn JD, eds (1999) *Species differences in thyroid, kidney and urinary bladder carcinogenesis*. Lyon, International Agency for Research on Cancer (IARC Scientific Publications No. 147).

Curran PG, DeGroot LJ (1991) The effect of hepatic enzyme-inducing drugs on thyroid hormones and the thyroid gland. *Endocrine Reviews*, **12**:135–150.

Dohler KD, Wong CC, Von Zur Muhlen A (1979) The rat as a model for the study of drug effects on thyroid function: Consideration of methodological problems. *Pharmacology and Therapeutics*, **5**:305–318.

Flowers LJ (1990) *Micronucleus assay with MON 13200: ML-88-390/EHL Study No. 88230*. Testing facility: Monsanto's Environmental Health Laboratory, St. Louis, MO. Submitted by Monsanto, St. Louis, MO (MRID No. 42275537).

Gabriele R, Letizia C, Borghese M, De Toma G, Celia M, Izzo L, Cavalla A (2003) Thyroid cancer in patients with hyperthyroidism. *Hormone Research*, **60**(2):79–83.

Hard GC (1998) Recent developments in the investigation of thyroid regulation and thyroid carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, **106**(8):1–21.

Hill RN, Erdreich LS, Paynter OE, Roberts PA, Rosenthal SL, Wilkinson CF (1989) Thyroid follicular cell carcinogenesis. *Fundamental and Applied Toxicology*, **12**(4):629–697.

Hood A, Liu YP, Gattone VH 2nd, Klaassen CD (1999) Sensitivity of thyroid gland growth to thyroid stimulating hormone (TSH) in rats treated with antithyroid drugs. *Toxicological Sciences*, **49**:263–271.

Hood A らの文献が欠落

Hotz KJ, Wilson AG, Thake DC, Roloff MV, Capen CC, Kronenberg JM, Brewster DW (1997) Mechanism of thiazopyr-induced effects on thyroid hormone homeostasis in male Sprague-Dawley rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **142**:133–142.

Hurley PM, Hill RN, Whiting RJ (1998) Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular-cell tumors in rodents. *Environmental Health Perspectives*, **106**(8):437–445.

IARC (2001) *Some thyrotropic agents*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 763 pp. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 79).

Li AP, Myers CA (1989) *CHO/HGPRST gene mutation assay with MON 13200: Study No. ML-88-382/EHL No. 88071*. Testing facility: Monsanto's Environmental Health Laboratory, St. Louis, MO. Submitted by Monsanto, St. Louis, MO (MRID No. 42275536).

Lichtenstein CK, Hemminki K (2002) Environmental and heritable cause of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database. *International Journal of Cancer*, **1099**(2):260–266.

Liu J, Liu Y, Barter RA, Klaassen CD (1995) Alteration of thyroid homeostasis by UDP-glucuronosyltransferase inducers in rats: A dose–response study. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **273**:977–985.

Masubuchi N, Hokusui H, Okazaki O (1997) Effects of proton pump inhibitors on thyroid hormone metabolism in rats: A comparison of UDP-glucuronosyltransferase induction. *Biochemical Pharmacology*, **54**(11):1225–1231.

Mazzaferri EL (2000) Thyroid cancer and Graves' disease: The controversy ten years later. *Endocrine Practice*, **6**:221–225.

McClain RM (1992) Thyroid gland neoplasia: Non-genotoxic mechanisms. *Toxicology Letters*, **64/65**:397–408.

McClain RM (1995) Mechanistic considerations for the relevance of animal data on thyroid neoplasia to human risk assessment. *Mutation Research*, **333**(1–2):131–142.

Meek ME, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKeeman LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003) A framework for human relevance analysis of information on carcinogenic modes of action. *Critical Reviews in Toxicology*, **33**(6):591–654.

Naylor MW, McDonald MM (1992) *Chronic study of MON 13200 administered in feed to albino rats. Project No. ML-88-247/EHL 88148.*

Testing facility: Monsanto Company, The Agricultural Group, Environmental Health Laboratory, St. Louis, MO. Submitted by Monsanto Agricultural Company, St. Louis, MO (MRID No. 426197-24).

Naylor MW, Raju NR (1992) *Chronic study of MON 13200 administered in feed to albino mice. Project No. ML-88-248/EHL 88147.*

Testing facility: Monsanto Company, The Agricultural Group, Environmental Health Laboratory, St. Louis, MO. Submitted by Monsanto Agricultural Company, St. Louis, MO (MRID No. 426197-23).

Olsen JH, Wallin H, Boice JD, Rask K, Schulgen G, Fraumaen FF Jr (1993) Phenobarbital, drug metabolism and human cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, **5**:449–452.

Oropeza-Hernandez LF, Lopez-Romero R, Albores A (2003) Hepatic CYP1A, 2B, 2C, 2E and 3A regulation by methoxychlor in male and female rats. *Toxicology Letters*, **144**(1):93–103.

Ron E, Kleinerman RA, Boice JD, LiVolsi VA, Flannery JT, Fraumeni JF Jr (1987) A population-based case–control study of thyroid cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **79**:1–12.

Sonich-Mullin C, Fielder R, Wiltse J, Baetcke K, Dempsey J, Fenner-Crisp P, Grant D, Hartley M, Knaap A, Kroese D, Mangelsdorf I, Meek E, Rice JM, Younes M (2001) IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **34**:146–152.

Sundseth SS, Waxman DJ (1992) Sex-dependent expression and clofibrate inducibility of cytochrome P450 4A fatty acid omega-hydroxylases. Male specificity of liver and kidney CYP4A2 mRNA and tissue-specific regulation by growth hormone and testosterone. *Journal of Biological Chemistry*, **267**(6):3915–3921.

Thomas GA, Williams ED (1999) Thyroid stimulating hormone (TSH)-associated follicular hypertrophy and hyperplasia as a mechanism of thyroid carcinogenesis in mice and rats. In: Capen CC, Dybing E, Rice JM, Wilbourn JD, eds. *Species differences in thyroid gland, kidney and urinary bladder carcinogenesis*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, pp. 45–59 (IARC Scientific Publications No. 147).

USEPA (1998) *Assessment of thyroid follicular cell tumors*. Washington, DC, United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Risk Assessment Forum (EPA/630/R-97/002; <http://cfpub.epa.gov/ncea/raf/recordisplay.cfm?deid=13102>; accessed 22 November 2004).

4-Aminobiphenyl と DNA の反応性: 発がん MOA のヒトへの関連性を解析するための IPCS フレームワークを用いた事例研究¹

Samuel M. Cohen, Alan R. Boobis, M.E. (Bette) Meek, R. Julian Preston, &
Douglas B. McGregor

DNA 反応性 (遺伝毒性) 発がん物質である 4-Aminobiphenyl を例に、動物とヒトにおける豊富なデータに基づいて国際化学物質安全性計画 (International Programme on Chemical Safety: IPCS) のヒト関連性フレームワーク (Human Relevance Framework: HRF) を評価した。この Mode of action (MOA) は、*N*-水酸化による代謝的活性化、*N*-エステル化による反応性親電子物質の生成を経て、この親電子物質が DNA (主にデオキシグアノシン) と共有結合し、DNA の突然変異を促進させ、最終的にはがんの発生につながると考えられている。ヒトとイヌでは、膀胱が標的臓器であるのに対し、マウスでは膀胱と肝臓が標的臓器であり、他の種では他の組織が関与することもある。臓器特異性の違いは、代謝的活性化と不活性化の違いによるものと考えられている。定性的及び定量的な考察から、ヒトの MOA が可能である。毒性や再生性増殖などの他の生物学的プロセスは、4-Aminobiphenyl 誘発性腫瘍の用量反応に大きく影響する可能性がある。IPCS HRF によれば、4-Aminobiphenyl はヒトにおいて発がん物質であると予測され、これは広範な疫学的エビデンスによって裏付けられている。IPCS HRF は DNA 反応性発がん物質の評価に有用である。

4-Aminobiphenyl は、様々な経路で複数の種において発がん性が確認されている (IARC、1972 年、1986 年、1987 年)。4-Aminobiphenyl は、代謝的活性化、DNA 反応性、遺伝毒性、発がん性を評価した多くのデータに基づき、動物モデルにおける MOA が確立されていることから、代表的な DNA 反応性発がん物質として、国際化学物質安全性計画 (International Programme on Chemical Safety: IPCS) のヒト関連性フレームワーク (Human Relevance Framework: HRF) の事例研究対象化学物質に選定された。また、芳香族アミンに属する既知の動物及びヒト発がん物質と類似しており (構造活性相関)、ヒトにおける疫学的、代謝学的、生化学的データが豊富に存在している。この事例研究は、DNA 反応性発がん物質の MOA を明確にするのに役立つデータの性質を示している。MOA 解析における調節因子と key events の区別についても示されている。

動物における有力なエビデンスと広範な疫学的データに基づいて、国際がん研究機関 (IARC) は 4-Aminobiphenyl を既知のヒト発がん物質として分類した (IARC、1972 年、1987 年)。4-Aminobiphenyl は最初、職業的に高レベルにばく露されたヒトの膀胱発がん物質として同定された。その後、タバコの煙の主成分として実証され、喫煙者の膀胱がんのリスク増加につながるといわれている (Del Santo ら、1991 年 ; Curigliano ら、1996 年)。追加研究では、窒素を含む有機物が燃焼する際に自然に発生し、至る所に存在する環境化学物質であることが示されている。

¹ この論文は、WHO が著作権を有するものであり、元々は 2006 年に Critical Reviews in Toxicology, Volume 36, pages 803-819 に掲載されたものである。この論文は WHO の出版物のために編集されたもので、正誤表が含まれている。

動物における 4-Aminobiphenyl の発がん性

実験的研究では、標的組織と感受性には有意な差が認められているものの、4-Aminobiphenyl はマウス、ラット、ウサギ、イヌにおいて発がん性があることが示されている (IARC、1972 年)。4-Aminobiphenyl は、ほとんどのばく露経路において、マウスでは主に肝臓と、低頻度で膀胱に対して発がん性が認められるが、イヌ（及びヒト）では膀胱が標的臓器であると考えられる。これらの研究の多くが数年前に行われたものであり、詳細な情報は限られたものしか公表されていない。さらに、試験途中における潜在的な前駆病変はほとんど記録されておらず、どの研究にも MOA で参考となる中止/回復などの研究計画書は含まれていなかった。それにもかかわらず、研究結果には競合する代謝的活性化及び不活性化プロセスが競合する MOA に特徴的な反応における影響の種及び個体差（例えば、ブロックら、1978 年）が示されている（表 1）。

表 1. 各種種における 4-Aminobiphenyl の発がん性試験

動物種	投与経路/用量	発生率	コメント	参考文献
マウス	経口投与；1 mg/週を 38 週間投与	90 週まで生存した 2/12 匹に膀胱がん		Clayson et al. (1965)
マウス	経口投与；0 または 1.5 mg/週を 52 週間投与	対照群 0/19 匹に対し、雄 1/21 匹に膀胱がん；雌雄とも肝臓がんの発生率が増加		Clayson et al. (1967)
マウス	200 µg を最大 52 週間皮下注射	48～52 週後の雄 19/20 匹、雌 6/23 匹に肝臓がん		Gorrod et al. (1968)
マウス (BALB/cStCrI/fC3Hf/Nctr)	飲料水中 0-220 mg/L (雄)、0-300 mg/L (雌) を最大 96 週間投与	膀胱がん (雄のみ)、肝細胞がん (雌のみ)、血管肉腫 (雄雌) の有意な増加	75 mg/L (雌) 及び 55 mg/L (雄) 以上の投与では、雌雄ともほとんどのマウスで膀胱の過形成が認められたが、対照マウスでは認められなかった。	Schieferstein et al. (1985)
マウス (新生児 B6C3F1)	異なる投与用法；離乳前に注射された	肝臓腫瘍		Dooley et al. (1988, 1992); Von Tungeln et al. (1996); Parsons et al. (2005)
ラット	総量 3.6～5.8 g/kg bw のピーナッツオイルを皮下注射	乳腺腫瘍・腸管腫瘍		Walpole et al. (1952)

表 1. (続き)

動物種	投与経路/用量	発生率	コメント	参考文献
ウサギ	不定量の経口投与	1 匹に膀胱乳頭腫、3 匹に膀胱がん	投与開始から 4 年後に観察された最も早いがん	Bonser (1962)
イヌ(2)	ゼラチンカプセルを週 6 回終身投与、合計 30 または 34 g	膀胱がんが 33 ヶ月で出現		Walpole et al. (1954)
イヌ	ゼラチンカプセル 0.3 g を週 3 回 (総投与量: イヌ 1 匹あたり 94.5～144 g)	21～34 ヶ月後に膀胱がん		Deichmann et al. (1958)
イヌ(6)	1.0 mg/kg bw を週 5 回、34 ヶ月または 37 ヶ月間 (イヌ 1 頭あたりの総投与量 5.5～7.0 g)。	膀胱乳頭腫 3 匹、膀胱がん (移行上皮型) 3 匹		Deichmann et al. (1965)
イヌ	単回投与	5 年間にわたり膀胱腫瘍は誘発されなかった		Deichmann & MacDonald (1968)
イヌ (24、ビーグル)	経口投与週 5 回、3 年間	4 匹のイヌでは陰性または軽症 (2 匹で腫瘍なし) 11 匹では腫瘍はゆっくりと進行したが、残りの 9 匹では急速に進行		Block et al. (1978)

bw, 体重

経口投与 (マウス 1 週あたり 1 mg、38 週間) の後、90 週まで生存した 2/12 のマウスに膀胱がんが発生した (Clayson ら、1965 年)。別の実験では、マウスに 1.5 mg の 4-Aminobiphenyl を 52 週間投与したところ、対照群では 0/19 匹であったのに対し、1/21 匹の雄マウスで膀胱がんが発生した。この実験では、雄マウスと雌マウスの両方で肝臓がんの頻度が対照群よりも有意に高かった (Clayson ら、1967 年)。4-Aminobiphenyl 200 µg をマウスに 3 回皮下注射したところ、48～52 週後に 19/20 匹の雄及び 6/23 匹の雌で肝臓がんが生じた (Gorrod ら、1968 年)。4-Aminobiphenyl を、BALB/cStCrIfC3Hf/Nctr マウスの雄と雌に、それぞれ 220 mg/L と 300 mg/L までの濃度で飲水投与すると、投与量に相関して、血管肉腫 (雄と雌)、膀胱がん (雄のみ)、肝細胞がん (雌のみ) の有意な増加が認められた。膀胱の過形成は、75 mg/L (雌) 及び 55 mg/L (雄) 以上の濃度の投与を受けた約 118 匹の群では、両性のマウスのほとんどで観察されたが、対照群では報告されていない (Schieferstein ら、1985 年)。多くの実験において、新生児 B6C3F1 マウスは、4-Aminobiphenyl 投与後に、主に肝臓がん感受性があった (Dooley ら、1988 年、1992 年; Von Tungeln ら、1996 年; Parsons ら、2005 年)。

ピーナッツオイル中に 4-Aminobiphenyl を混入して合計 3.6～5.8 g/kg 体重 (bw) の用量をラットに毎日皮下注射すると、乳腺及び腸の腫瘍の発生率が有意に増加した (Walpole ら、1952 年)。

市販の 4-Aminobiphenyl を経口投与 (用量は記載なし) した 7 匹のウサギのうち、1 匹に膀胱乳頭腫が、3 匹に膀胱がんが認められた。最も早い発がんは投与開始から 4 年後に観察された (Bonser、1962 年)。

4-Aminobiphenyl をゼラチンカプセルで週 6 回投与し続けた 2 匹のイヌ (1 匹あたりの総投与量: 30、34 g) は、33 ヶ月で膀胱がんを発症した (Walpole ら、1954 年)。同様に 4-Aminobiphenyl を含むカプセル (イヌ 1 匹あたり 0.3 g) を週 3 回与えても、21～34 ヶ月後に膀胱がんが観察された (総投与量: イヌ 1 匹あたり 94.5～144.0 g) (Deichmann ら、1958 年)。4-Aminobiphenyl を 1.0 mg/kg bw に減量し、6 匹のイヌに週 5 回、34 ヶ月または 37 ヶ月間投与したところ (総投与量: 1 匹あたり 5.5～7.0 g)、それぞれ 3 例で膀胱乳頭腫及び膀胱がん (移行上皮型) が観察された (Deichmann ら、1965 年)。単回投与では、5 年間で膀胱腫瘍は誘発されなかった (Deichmann & MacDonald、1968 年)。4-Aminobiphenyl を週 5 日、3 年間経口投与した 24 匹のビーグル犬では、膀胱発がん物質の反応の基本的な 3 つのパターンが認められた。陰性または最小限の病変は 4 匹にみられ、そのうちの 2 匹には腫瘍が発生しなかった。腫瘍は 11 匹のイヌでゆっくりと進行したが、残りの 9 匹では急速に進行するパターンが観察された (Block ら、1978 年)。

動物 MOA を立証するのにエビデンスの重み付けは十分か

IPCS HRF の最初の問いかけは、動物 MOA そのものの評価である。これは、疫学研究における因果関係を説明するための Bradford Hill 基準 (Hill、1965 年) から発展し、IPCS が開発した、2001 年発表の MOA フレームワーク (Sonich-Mullin ら、2001 年) に示されている手順に基づいている。

A. 推定される MOA

4-Aminobiphenyl は、肝酵素によって *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl に代謝され、肝及び他の組織において *N*-エステル化 (*N*-アセチル化、*N*-グルクロン化、または *N*-硫酸化) される (Miller ら、1961 ; Kadlubar ら、1977 年、1991 年 ; Miller & Miller、1977 年 ; Delclos ら、1987 年 ; Chou ら、1995 年)

(図 1)。*O*-エステル化及び環状水酸化は、無毒化につながる競合する酵素反応である。これらの反応の活性における組織差や種差により、少なくとも部分的には、4-Aminobiphenyl の発がん作用に対する感受性の違いや、腫瘍の発生における臓器特異性に違いを生じさせる。最終的には、*N*-エステル化の後、反応性親電子ニトロニウムイオンが標的組織に形成され、これが DNA 付加体を形成しうる。主な DNA 付加体は、*N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl である (Talaska ら、1990 年 ; Kadlubar ら、1991 年 ; Flammang ら、1992 年 ; Hatcher & Swaminather、1995 年、2002 年)。

これらの反応が重要な遺伝子の重要な部位で起こることにより突然変異がおこり、その結果、最終的に腫瘍細胞が発生する。

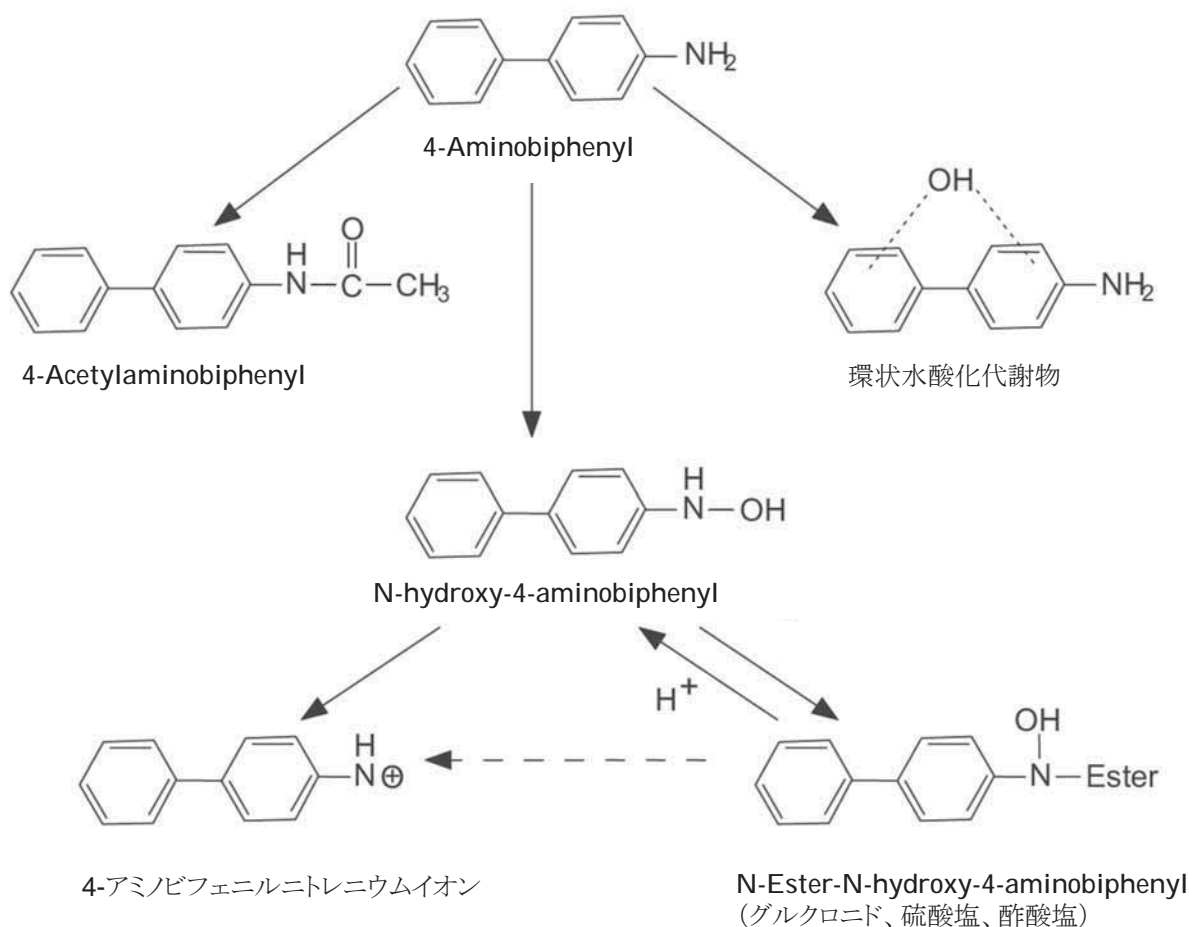


図 1. 4-Aminobiphenyl の代謝

B. Key events

4-Aminobiphenyl の肝活性化の主要経路は、少なくともラットとヒトでは CYP1A2 によって触媒される 4-Aminobiphenyl の *N*-水酸化から始まる (Butler ら、1989 年 b)。マウスでは、CYP1A2 やチトクローム P-450 が唯一もしくは主要に関与しているわけではないという報告がある (Kimura ら、1999 年)。また、*N*-hydroxylamine はシクロオキシゲナーゼのプロスタグランジン合成酵素 (Kadlubar ら、1982 年) のような様々なオキシダーゼ及びペルオキシダーゼとの反応によって生成される。これらの非チトクローム P-450 反応のいずれかが生体内で起こるが、毒性学的に意義があるかは不明なままである。*N*-hydroxylamine は、*N*-アセチルトランスフェラーゼ 1 (NAT1)

(Flammang & Kadlubar、1986 年 ; Oda、2004 年) による *N*-アセチル化を受け、酸性条件下では不安定な *N*-アセトキシエステルを生じ、DNA と直接反応し得るアリルニトロニウムイオンを形成し、グアニンの C-8 位に DNA 付加体を形成する (Hammons ら、1985 年 ; Flammang & Kadlubar、1986 年 ; Hatcher & Swaminathan、2002 年)。さらに、肝臓で生成された *N*-hydroxylamine は、ウリジン二リン酸 (UDP) グルクロン酸転移酵素 (UGT) の基質として機能し、*N*-グルクロニド抱合体を生じ、これが膀胱に運ばれる (Kadlubar ら、1977 年)。グルクロニドは尿中に排泄されるか、酸性条件下において、加水分解後に膀胱内の *N*-hydroxylamine の追加供給源として機能する。*N*-アセチルトランスフェラーゼ-2 (NAT2) による 4-Aminobiphenyl の *N*-アセチル化など、この反応と

競合する反応が多数存在するが、得られるアリルアセトアミドは、CYP1A2 にとって貧弱な基質であり、主に解毒反応であると考えられている。その結果、親アミンの *N*-アセチル化は不活性化反応と考えられている。アセチル化の速度は、活性化と不活性化のバランスに影響を与える。ヒトの表現型には、rapid acetylators と slow acetylators が存在する (Lower ら、1979 年)。ヒトのそれぞれのアセチレーターに類似したマウスの系統が存在し、C57BL/6 は rapid acetylators 系統であり、A/J は slow acetylators 系統である (Hein、1988)。これらの違いに対する研究は、種間、系統間、個体間での反応の違いを説明する。形成された DNA 付加体により、突然変異が生じる可能性がある。key events を表 2 にまとめた。

表 2. 動物における 4-Aminobiphenyl の発がん性における key events

1.	代謝的活性化
a)	<i>N</i> -ヒドロキシル化
b)	<i>N</i> -エステル化 (グルクロニド、アセチル、硫酸塩)
c)	加水分解してニトロニウムイオンにする
2.	標的臓器の多能性細胞における DNA 付加体形成 (dG-C8, dA-C8, dG-N2)
3.	がんにつながる重要な遺伝子の DNA 突然変異
4.	発がん

dA、デオキシアデノシン ; dG、デオキシグアノシン

C. 用量反応関係

関連する研究の多くが何年も前に実施されたという事実を考慮すると、腫瘍の前駆病変に対する用量反応の一致に関するデータは、マウスの膀胱過形成に限定されている。イヌでは、4-Aminobiphenyl の単回投与後に膀胱腫瘍が発生することはなく (Deichmann & MacDonald、1968 年)、複数回投与後の用量反応関係の研究は行われていない。前駆病変の発生率に関する情報が報告されている唯一の研究では、雄の BALB/c マウスに 0、7、14、28、55、110、220 mg/L の濃度の 4-Aminobiphenyl を含む飲料水を介して 96 週間まで処置したものがあつた (Schieferstein ら、1985 年)。これらの処置後の膀胱がん発生率は、それぞれ 0/116、1/117、1/118、0/118、6/115、5/118 及び 23/118 であつた。55 mg/L 以上の群の発生率は、対照群に比べて統計的に有意に高かつた。雌マウスに 4-Aminobiphenyl を濃度 0、7、19、38、75、150 及び 300 mg/L の飲料水を介してばく露させると、膀胱がんの発生率は、0/118、0/118、0/119、1/118、0/118、5/117 及び 1/117 であつた。重症度は示されていなかったが、過形成の発生率ははるかに高かつた。雄では、0、7、14、28、55、110 及び 220 mg/L の投与量で、過形成の発生率は 0/116、4/117、9/118、71/118、108/115、107/118 及び 102/118 であつた。雌では、それぞれ 0、7、19、38、75、150 及び 300 mg/L の用量で 0/118、0/118、3/119、53/119、106/118、97/117 及び 83/117 であつた。このように、腫瘍及び過形成の用量反応曲線は、シグモイド型またはホッケースティック型であつた。対照的に、尿路上皮細胞の C-8 グアニン DNA 付加体の平衡レベルは直線的な用量反応関係を示した (Poirier ら、1995 年)。

同研究 (Schieferstein ら、1985 年) では、雄では肝腫瘍の発生率の増加は認められなかったが、雌では、それぞれ 0、7、19、38、75、150 及び 300 mg/L の投与量で、肝腫瘍 (腺腫及びがんを合わせたもの) の発生率は 0/117、0/120、2/120、4/119、11/119、17/118 及び 10/117 であつた。様々な組織を合わせた血管肉腫の発生率は、雄と雌の高い 3 用量で増加したが、発生率は雄よりも雌の方がやや高かつた。

D. 時間的関連性

発がん過程における事象の順序を確立することは、その測定方法の感度に部分的ではあるが大いに依存する。したがって、腫瘍は組織学的に検出できる大きさに達していなければならない、一方で突然変異や DNA 付加体の測定には時間だけでなく十分な量の組織が必要である。その結果、後者は膀胱よりも肝臓で研究されるのが一般的だが、特にげっ歯類では尿道の組織が少ないため、生化学的・生物学的事象の頻度とは関係のない技術的な困難が生じている。DNA 付加体の代謝及び形成は初期の事象であり、4-Aminobiphenyl による *in vitro* 処理後、数分または数時間以内及び 1 日以内に観察される (Kadlubar ら、1991 年 ; Swaminathan & Reznikoff、1992 年 ; al-Atrash ら、1995 年 ; Hatcher & Swaminathan、1995 年 ; Doerge ら、1999 年 ; Tsuneoka ら、2003 年)。しかしながら、多くの *in vivo* 実験では、付加体を蓄積させ、平衡レベルに達し、検出を容易にするために、3~4 週間ばく露を継続する (例えば、Talaska ら、1990 年 ; Flammang ら、1992 年 ; Poirier & Beland、1992 年 ; Poirier ら、1995 年 ; Underwood ら、1997 年)。また、突然変異は *in vitro* では短時間で検出され得るが、生体内では数週間または数ヶ月のばく露後でないと検出されない (例えば、マウス肝臓における H-ras ; Parsons ら、2002 年)。この期間は、突然変異が最初に生じた時期を正確に反映しているとは限らない。ある研究では、4-Aminobiphenyl の単回投与から 14 日後に MutaTMMouse 膀胱アッセイで突然変異が検出された (Fletcher ら、1998 年)。膀胱のがんや過形成は、マウスやイヌでは明らかに遅発性の病変であるが、時間経過の変化は体系的に評価されていない。ある 2 年間の研究では、マウスを 13 週から一定間隔で安楽殺し、膀胱に過形成病変を誘導したが、異なる時期の発生率は示されていない (Schieferstein ら、1985)。膀胱の腫瘍は、一般的に、マウスでは約 2 年後 (Schieferstein ら、1985 年)、イヌではそれより長い時間が経過するまで発見されない (Walpole ら、1954 年 ; Deichmann ら、1958 年、1965 年)。しかし、ヒトの (SV40 に感染した) 尿道粘膜細胞を 4-Aminobiphenyl で *in vitro* 処理し、6 週間 *in vitro* 培養した後、ヌードマウスに接種した場合、腫瘍性の形質転換が認められた (Bookland ら、1992 年 b)。

E. 腫瘍反応と key events との関連性の強さ、一貫性、特異性

腫瘍反応と key events との関連性を支持するエビデンスは、膀胱に関する研究から得られたものがあるが、肝臓に関する研究からも有力なエビデンスが得られている。DNA 付加体の形成は両組織で実証されている。

4-Aminobiphenyl が変異原性物質であることを示す研究は豊富にあり、*S. typhimurium* 菌の特定のフレームシフト型突然変異及び塩基対置換感受性株 (TA1538、TA98 及び TA100) に対する陽性反応が、げっ歯類肝 S9 代謝的活性化製剤の存在下でのみ認められている。S9 による代謝的活性化が必要であるということは、親アミンの DNA 反応性及び変異原性の欠如を示している。さらに、4-Aminobiphenyl は、*in vitro* でラット肝細胞において不定期 DNA 合成を誘導する (米国環境保護庁遺伝的活性プロファイル)。これらの *in vitro* 研究は、4-Aminobiphenyl が代謝的活性化後に遺伝的損傷を引き起こす可能性があるというエビデンスを示している。また、細菌を用いた突然変異試験でも代謝的活性化システムの解析が行われている (Dang & McQueen, 1999)。Aroclor 1254 誘発雄 Sprague-Dawley ラット及び C57BL/6 マウスの肝臓ホモジネート及び、異なるレベルの *N*-及び *O*-アセチルトランスフェラーゼ (OAT) 活性を発現する *S. typhimurium* TA100 試験菌株が使用された。TA100 は NAT/OAT 遺伝子のシングルコピーを有し、YG1029 は NAT/OAT 遺伝子のマルチコピーを有し、TA100/1,8DNP6 は NAT/OAT 欠損株である。マウス及びラット S9 を用いた効果は類似していた (ただし、Aroclor 1254 処理の効果は調べなかった)。4-Aminobiphenyl または 4-Acetylamino-biphenyl を基質とした場合、YG1029 では TA100 または TA100/1,8DNP6 よりも多く突然変異が誘発された。このことは、これらの細菌における *N*-hydroxylamine による突然変異誘発には、高いアセチル化活性が関与していることを示唆している。

生体内での突然変異誘発機構におけるアリルニトロニウムイオンへの非酵素的ステップは、高 OAT-発現 *S. typhimurium* TG1024 株における *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl の突然変異誘発が培地の pH に依存し、4.0~8.0 の範囲で突然変異体数と pH との間に逆相関の関係が観察されたことによって支持される (Sarkar ら、2002 年)。

BALB/c マウスに 4-Aminobiphenyl を 28 日間飲水投与したところ、雌では膀胱よりも肝臓の方が DNA 付加体の量が多かったのに対し、雄では逆の結果が得られた。このように、各性において、DNA 付加体のレベルは、4-Aminobiphenyl による腫瘍誘導に対する組織の感受性と相関していた (Poirier ら、1995 年)。しかしながら、用量反応曲線の形状は、両組織の DNA 付加体では直線的であった (雌マウスでは飽和して比較的平坦) のに対し、腫瘍の用量反応曲線はシグモイド型であった (Poirier ら、1995 年)。

付加体の量は、50 nmol の 4-Aminobiphenyl を 21 週間にわたって局所投与した Hsd:ICR(Br)マウスの雌マウスの膀胱で最も高かった (一般的な職業的ばく露経路)。検査した全組織 (膀胱、肝臓、肺、皮膚) の主な付加体は、*N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl とのコクロマトグラフィーを用いて検査した (Under-wood ら、1997 年)。

雄の MutaTMMouse トランスジェニックマウス (すなわち、トランスジェニック CD2F、[BALB/c×DBA/2]) に 10 mg/kg bw/日の 4-Aminobiphenyl を 10 日間経口投与した突然変異誘発の研究では、膀胱、肝臓及び骨髄における突然変異頻度がそれぞれ 13.7 倍、4.8 倍及び 2.4 倍に増加したことが報告されている (Fletcher ら、1998 年)。

新生児 B6C3F₁(C57BL/6×C3H)マウスは、4-Aminobiphenyl の投与に反応して高頻度の肝腫瘍を発症し、その多くは *H-ras* 遺伝子のコドン 61 における CAA→AAA 突然変異であった (Parsons ら, 2005 年)。in vivo では、0.3 μmol の 4-Aminobiphenyl を 24 時間前に投与した新生児マウスにおいて、主要な DNA 付加 *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl 量は、5 adducts /10⁶ スクレオチドであった。8 ヶ月後、CAA→AAA 突然変異は、投与マウスの 67% 及び対照 (ジメチルスルホキシド、または DMSO) の 50% で検出されたが、投与マウスの平均突然変異率は 45×10^{-5} であったのに対し、対照ではわずか 2×10^{-5} であった。12 ヶ月後には、投与マウスの 79%、対照マウスの 8% に肝腫瘍が発生していた。これらの腫瘍はヒトの標的臓器の腫瘍ではないが、本研究の結果は、膀胱がんの発生において提示されている一般的な MOA (すなわち、DNA 付加体の形成、重要な遺伝子の突然変異、その後の腫瘍の出現) を支持するものである。

4-Aminobiphenyl (5 mg/kg bw) を単回経口投与してから 24 時間後に死亡したイヌ (性別は明記されていない) の DNA 付加体は、肝臓で 5.4 fmolDNA adducts /μg、膀胱で 4.8 fmolDNA adducts /μg であった。しかし、4-Aminobiphenyl を膀胱に投与したイヌの肝臓と膀胱では DNA 付加体は検出されなかった。一方、反応性中間体である *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl を膀胱に投与したイヌの膀胱では、3.9 fmol DNA adducts/μg の DNA 付加体が検出され、肝臓では付加体は検出されなかった。免疫化学的方法で定量を行った (Roberts ら、1988 年)。トリチウム標識された 4-Aminobiphenyl (経口、静脈内、または尿道内)、*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl (静脈内、または尿道内)、*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl *N*-glucuronide (静脈内) を投与された雌イヌの試験では以下のことが実証された。

(1) 血中赤血球中の 4-aminobiphenyl -ヘモグロビン付加体の存在 (2) 4-aminobiphenyl 投与後、膀胱内腔に入る *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl の大部分は遊離 *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl (0.7%) であり、酸溶性 *N*-グルクロニドは低濃度 (0.3%) であること (3) *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl を尿道内に注入した後の DNA 付加体量は、4-Aminobiphenyl を尿道内に注入した後と比較して 60 倍多かったこと、(4) *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl へのばく露及びそれに続く 4-Aminobiphenyl-DNA 付加体の形成は、排尿の頻度及び尿の pH に依存すること (Kadlubar ら、1991 年)。

イヌの尿中 pH は、食事内容 (Merck、1998 年)、食後からの時間、時間帯及び消費水量に依存して、約 4.5 から 7.5 まで変化することがあり、これらは発がん性に影響を及ぼす可能性のある因子である (Cohen、1995)。イヌの肝臓及び膀胱からのミクロソーム調製物を用いた in vitro の研究では、両臓器においてトランスアセチル化活性が存在することが示されており、そのため、4-Acetylamino-biphenyl、*N*-hydroxy-4-acetyl-aminobiphenyl、またはアセチルコエンザイム A (CoA) がアセチル供与体として存在する場合には、*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl の RNA 及び DNA への結合が起こるが、結合量は肝臓ミクロソームよりも膀胱ミクロソームの方が少なかった (Hatcher & Swaminathan、1992 年)。

4-Aminobiphenyl を投与したイヌの尿に含まれる尿膜細胞を調べたところ、*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl で in vitro で修飾した DNA や、4-aminobiphenyl を投与したイヌの剖検時に単離したイヌの膀胱尿路上皮細胞の DNA と同一の DNA 付加体が検出された。4-aminobiphenyl-DNA 付加体形成の用量依存的増加が示された (Talaska ら、1990 年)。

F. 生物学的妥当性及び整合性

4-Aminobiphenyl が DNA と付加体を形成し、腫瘍が発生する器官で変異原性を示すという結果は、一般的に提案されている MOA の妥当性を示している (Fletcher ら、1998 年)。さらに、*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl は、腫瘍化していない SV40 不死化ヒト尿細管細胞の腫瘍化を引き起こすことができる (Bookland ら、1992 年 b)。また、4-Aminobiphenyl に関する知見はいくつかの関連芳香族アミンの代謝的活性化、DNA 付加体形成、突然変異誘発及びいくつかの種 (ヒトを含む) における膀胱発がんに関する膨大な文献と一致している (Kadlubar ら、1977 年 ; Miller & Miller、1977 年 ; Delclos ら、1987 年)。代謝的活性化を伴わない様々な *in vitro* 系での親アミンの DNA 付加体形成及び変異原性の欠如は、代謝的活性化の必要性を明確に示している。アミンの投与後、または *N*-ヒドロキシル代謝物へのばく露後に組織内で同じ DNA 付加体が確認され、付加体の構造が化学的に確認されている。特定の生物物理学的側面は 2-aminofluorene のような構造的に関連する芳香族アミンの方がより明らかにされているが、C-8 グアニン DNA 付加体の変異原性についても明らかにされている、(Kriek、1992 年)。

G. その他の MOA

既に記載されている MOA の構成要素の代替的なものが提案されている。しかし、それらは MOA の全体的な説明を損なうものではなく、限局的側面 (他の活性化酵素など)、または定量的側面に影響を与える可能性のある過程のいずれかを示唆している。4-Aminobiphenyl は、CYP1A2 以外の肝酵素 (Kimura ら、1999 年) によって *N*-水酸化代謝物に酸化され、肝臓及び膀胱の毒性及び発がんを引き起こすが、これには酸化酵素及びペルオキシダーゼが関与している可能性がある (Kadlubar ら、1982 年、1991 年)。代謝的活性化に関与する酵素は異なるかもしれないが、反応性親電子物質の生成、DNA 付加体の形成、変異原性、発がんという順序は一貫している。さらに、MOA のこの時点から、活性化酵素にかかわらず、CYP1A2 を介した活性化と同じ順序で起こると考えるのが妥当である。

巨大な付加体に加えて、*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl は、内因性ペルオキシダーゼが関与している可能性があり、尿道粘膜 DNA に酸化的損傷を引き起こすことを示唆するエビデンスがある (Burger ら、2001 年)。このことと 4-Aminobiphenyl の発がん活性との関連性は不明である。

N-hydroxy-4-aminobiphenyl 及びその活性型は、*in vitro* で尿道粘膜及び他の細胞に対して細胞毒性を示す (Reznikoff ら、1986 年) が、これが発がん作用に果たす役割は不明である (原因ではなく、尿道粘膜発がんにおける増強的な役割については以下を参照のこと)。この過程で用量反応関係は変化するが、上述の基本的な MOA は変化しないと考えられる。

H. 推定される MOA の評価

推定される MOA の初期段階は、利用可能なエビデンスによって十分に裏付けられており、4-Aminobiphenyl はイヌやマウスでは膀胱発がん物質であり、げっ歯類では他の組織 (主に肝臓) での発がん物質である十分なエビデンスがあると判断されている。このように、肝臓や他の標的臓器では DNA 付加体を形成しうる生成物に代謝され、突然変異が生じることが実証されている。

他の臓器も 4-Aminobiphenyl 誘発性腫瘍の標的となりうるが、イヌやマウスの一部の系統では膀胱が主な標的となっている。一般的な遺伝毒性と腫瘍発生との間の段階についてのエビデンスは十分ではない。4-Aminobiphenyl の膀胱の細胞増殖への影響についての研究は著しく不足しているが、関連する芳香族アミンやアミドについての情報は入手可能であり、特にメガマウス ED-01 実験 (Cairns, 1979 年; Gaylor, 1979 年; Littlefield ら, 1979 年) のデータを用いたマウスの膀胱における 2-acetylaminofluorene によって誘導される DNA 反応性 (及び変異原性) と細胞増殖との間の相互作用の解析が行われている。変異原性が細胞増殖に依存していることは、DNA 付加体の用量反応が直線的であるにもかかわらず、腫瘍の用量反応がシグモイド型であることの説明を提供することができる (Cohen & Ellwein, 1990 年)。この関連性は、4-Aminobiphenyl 誘発性膀胱がんの発生と用量反応性を評価する上で重要な意味を持つ (以下の議論を参照)。

I. 不確実性、矛盾、データギャップ

4-Aminobiphenyl の代謝的活性化を伴う細菌を用いた突然変異試験では、ほとんどの変異がフレームシフトであることが示されているが、バクテリオファージ M13 クローニングベクターから得た一本鎖 DNA 中の lacZ 遺伝子の 4-Aminobiphenyl 誘発突然変異の配列解析を行ったところ、80% 以上が G 部位で生じる塩基対置換が明らかになった。G→T トランスバージョンが優勢で、次に G→C トランスバージョン、G→A トランジションが続いた。次に、主要な DNA 付加体である N-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl を M13 ゲノム内に挿入し、生体内複製後に変異頻度と特異性を測定した。目標とする突然変異率は約 0.01% であり、一次突然変異は G→C トランスバージョンであった。このように、in vitro での観察結果は in vivo での観察結果と矛盾しないが、変異原性は弱いものであった (Verghis ら, 1997 年)。

in vivo での研究のほとんどはマウスで行われている。無理からぬ理由ではあるが、イヌは膀胱発がんに対して感受性が高い種であるにもかかわらず、あまり注目されていない。反応におけるマウスの系統の違いは明らかである。B6C3F1 及び雌の BALB/cStCrIfC3Hf/Nctr マウスは、肝臓発がんに対してより感受性が高く、一方、雄の BALB/cStCrIfC3Hf/Nctr マウスは、4-Aminobiphenyl へのばく露後に膀胱腫瘍を発症する (Schieferstein ら, 1985 年; Dooley ら, 1988 年, 1992 年)。それにもかかわらず、利用可能な研究では、マウスの系統差による影響はあまり注目されていない。

4-Aminobiphenyl が代謝され、肝臓や膀胱で DNA と付加体を形成する基本的な酵素と考えられているのは CYP1A2 である (Butler ら, 1989 年 a, 1989 年 b)。しかし、CYP1A2(+/-)野生型マウスと CYP1A2(-/-)ノックアウトマウスの影響を比較すると、予想に反して、CYP1A2 の発現は、4-Aminobiphenyl 誘発性酸化ストレスまたは 4-Aminobiphenyl-DNA 付加体形成とは関連していないことが示された。さらに、他の第 1 相及び第 2 相反応の酵素の発現とともに肝 CYP1A2 タンパク質の発現を 5 倍に増加させた 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン (TCDD) は、肝臓における付加体量を変化させないか、または実際に減少させた。このような誘導の定量的効果は、誘導された酵素のバランスに依存するであろう。これらの結果は、CYP1A2 が 4-Aminobiphenyl の主要な代謝的活性化因子ではないか、CYP1A2 の非存在下でもマウスの他の酵素がこの化合物を活性化させていることを示唆している (Tsuneoka ら, 2003 年) 他の芳香族アミンを用いた研究に基づくと、活性化酵素は他にも、P-450 酵素、酸化酵素、またはペルオキシダーゼを含むかもしれない (Lakshmi ら, 1990 年; Smith ら, 1991 年; Hughes ら, 1992 年)。

4-Aminobiphenyl によって誘導される発がんにおいて重要であると考えられている別の反応は、アセチル化である。アセチル化は 4-Aminobiphenyl の発がんいくつかの役割を果たしている。*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl の *O*-アセチル化及び *N,O*-アセチル化は、ヒトではリスクを増加させると予想されるが、4-Aminobiphenyl の *N*-アセチル化はリスクを減少させるはずである (Lower ら、1979 年)。アセチル化は、NAT1 または NAT2 によって触媒され、後者は集団内で顕著な多型が存在する (Hein ら、2000 年 ; Cascorbi ら、2001 年)。親アミンである 4-Aminobiphenyl のアセチル化はヒトでは解毒過程と考えられているため、アセチル化が遅い表現型は膀胱がんのリスクを増加させると予測されている。それゆえ、アセチル化が速い表現型はリスクの減少と関連しているはずである。

しかし、マウスの *acetylator* の表現型の研究では、相反する結果が得られている。ある研究では、他のすべての点で明らかに同一であると思われるホモ接合性の *rapid acetylator* マウスまたはホモ接合性の *slow acetylator* マウスの雄雌に、4-Aminobiphenyl 塩酸 (55-300 mg/L) を 28 日間飲水投与した。肝 DNA 付加体のレベルは雌雄ともに投与量の増加とともに増加したが、*acetylator* の表現型とは無関係であった。膀胱では、DNA 付加体は雄マウスでは 100 mg/kg でプラトーに到達し、*acetylator* の表現型とは無関係であった。雌マウスでは、DNA 付加体量は雄マウスよりも低く、最高用量で減少したが、予想に反して *rapid acetylator* 表現型では DNA 付加体量が高かった (Flammang ら、1992 年)。これらの結果は、アセチルトランスフェラーゼ活性がマウスの DNA 付加体形成の速度を決定するものではないことを示唆していると解釈された。McQueen ら (2003 年) の研究では、C57BL/6、B6.A 及び A/J マウス株と、ヒト NAT1 トランス遺伝子を持つトランスジェニックマウス hNAT1:A/J 及び hNAT1:C57 を用いて、マウス NAT2 対立遺伝子と 4-Aminobiphenyl-DNA 付加体量との間には相関関係がないという同様の結論に達した。しかし、マウスの NAT2 活性の違いは軽微であり、おそらく 4-Aminobiphenyl の遺伝毒性に影響を与えるには十分ではなかった。最近の研究では、ヒトでは *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl の *O*-アセチル化には NAT2 ではなく NAT1 が関与していることが示唆されている (Oda、2004 年)。

また、説明が必要なマウスの系統特異的突然変異もある。例えば、B6C3F1 では、4-Aminobiphenyl は、*H-ras* 遺伝子のコドン 61 において主に C→A 突然変異 (非コード鎖の G→T トランスバージョンを反映) を誘発するのに対し、CD-1 マウスでは、*H-ras* 遺伝子コドン 61 における主な突然変異は A→T トランスバージョンであった (Manjanatha ら、1996 年)。

腫瘍の発生には細胞増殖も必要であるが、4-Aminobiphenyl の発がん過程の初期段階での細胞増殖を調べた研究は少ない。また、先に述べた発がん性試験 (Schieferstein ら、1985 年) では、膀胱がんの発生は雄のみであったが、過形成の発生率は雌雄ともに高いことが報告されている。しかしこのことについてはそれ以上調査されていない (後述)。

要約すると、4-Aminobiphenyl 誘発性膀胱がんの MOA は、代謝的活性化、DNA 付加体形成、遺伝子突然変異を含む一連の *key events* が関与していることが明らかになった。

このことは、構造的に関連のある芳香族アミンを用いた研究によってさらに強化されている。しかし、関与する特定の酵素の詳細、種間での臓器特異性の違いの根拠や効力の詳細、ヒトにおける用量反応曲線の形状については、データギャップが残っている。これは、競合する代謝経路の複雑さを考えれば、想定内である。利用可能なデータは仮説 MOA を支持するのに十分であると考えられるが、これらの不確実性の影響については総合的な定量的評価を考慮する必要がある（表 3）。

表 3. 4-Aminobiphenyl 膀胱発がん性に影響を与える調節因子

1	エステル化酵素の競合的活性
2	酵素の活性化または不活性化に影響を与える遺伝的多型（例：slow acetylator 及び rapid acetylator）
3	尿の pH（主に食事の影響を受ける）と他の尿成分
4	尿路粘膜細胞増殖（4-アミノビフェニルの高用量投与、または尿路粘膜増殖に影響を与える他の薬剤との併用投与により誘導される）

実験動物とヒトとの間の key events の根本的、質的な違いに基づいて、MOA のヒトとの関連性を合理的に排除することができるか

4-Aminobiphenyl 誘発性膀胱がんの key events それぞれを支持するヒト及びヒトの細胞系における有力なエビデンスがある。N-hydroxylamine への代謝的活性化が実証されており、活性化のためにいくつかの酵素が示されているほか、N-アセチル化など N-ヒドロキシル化の効果を増強または減少させる可能性のある他の酵素も示唆されている。遺伝的多型はこれらの酵素活性に大きく影響し、4-Aminobiphenyl ばく露に対する膀胱発がんの感受性に影響する変異を生じさせる。マウスやイヌの DNA から検出されたものと同一の DNA 付加体がヒトの尿路上皮細胞で確認されており、同様の変異原性を有することが明らかになった。さらに、広範な疫学的研究から、4-Aminobiphenyl のヒトにおける膀胱発がん性が証明されている。

膀胱がんは、喫煙や職業的ばく露といった 4-Aminobiphenyl の摂取と関連している。4-Aminobiphenyl は、1935 年から 1955 年まで米国で製造され（Melick ら、1955 年）、効率のいいゴム酸化防止剤として使用されていたが、現在では商業的には生産されていない。市販の 4-Aminobiphenyl に職業的にばく露された労働者の 1 系列に限定した疫学研究では、膀胱がんの発生率が高いことが報告されている（Melick ら、1955 年、1971 年；Melamed ら、1960 年；Koss ら、1965 年、1969 年）。503 人の労働者のうち、細胞診において 59 例が陽性、そのうち 35 例は組織学的に膀胱がんが確認された；公表時、7 例は細胞診において陽性のまま、7 例は他の原因で死亡し、10 例は追跡調査できていない（Koss ら、1969 年）。たばこの煙に加えて、炭素及び窒素を含む物質の燃焼で生じるものへのばく露や不明確な環境中の物質もあるようである（Skipper ら、2003 年）。

喫煙が原因とされているものは、米国とヨーロッパにおける膀胱がんの症例の 40%から 70%を占めている (IARC、1986 年 ; Castelaio ら、2001 年)。黒タバコ (自然乾燥) は、ブロンドタバコ (熱風乾燥) に比べて 4-Aminobiphenyl をより多く含んでいる (Bryant ら、1988 年)。

4-Aminobiphenyl の膀胱発がんにおけるマウスやイヌで示された key events は、主にタバコの煙中の 4-Aminobiphenyl にばく露されたヒトを対象に評価されているが、ヒトの尿路上皮細胞を用いた in vitro 評価法も利用されている (表 4 を参照)。

表 4. 4-Aminobiphenyl による尿路膀胱発がんの key events の種間一致性評価

key events	マウス	イヌ	ヒト
1. 反応性親電子物質への代謝的活性化	+	+	+
2. DNA 付加体の形成	+	+	+
3. 変異原性	+	+	+
4. 発がん	+	+	+

吸収された 4-Aminobiphenyl は、CYP1A2 によって肝臓で *N*-酸化される。CYP1A2 は CYP1A1 との相同性が高いために、異なる基質特異性を有しており、肝臓でのみ見出される (Lang & Pelkonen、1999)。他の酵素は、*N*-hydroxylamine への代謝的活性化をサポートする。

NAT1 及び *NAT2* はそれぞれ、3 種類のアセチル化を触媒する。すなわち、アリルアミンの *N*-アセチル化、*N*-hydroxylamine の *O*-アセチル化及びアリルヒドロキシサム酸の *N*, *O*-アセチル化である (Flammang & Kadlubar、1986 年 ; Mattano ら、1989 年 ; Fretland ら、1997 年 ; Hein ら、2000 年)。*N*-アセチルトランスフェラーゼによる *N*-アセチル化は、主に、形成された 4-Aminobiphenyl のアセトアミドがアミンに比べて *N*-ヒドロキシル化の基質として小さいために、膀胱発がん性に対して保護効果を有すると考えられている。*NAT* アイソフォームをコードする 2 つの遺伝子には、*NAT1* と *NAT2* があり、対立遺伝子の変異はヒトにおける膀胱がんの感受性と関連している (Hein ら、2000 年)。ほとんどの研究は、*NAT2* の slow acetylator が膀胱発がんのリスク増加を示唆しているが、芳香族アミン膀胱発がんに対する *NAT1* 遺伝子型の寄与は明らかではない (Cartwright ら、1982 年 ; Hein ら、2000 年)。喫煙者の間では、slow acetylator の発現に関連する 4-Aminobiphenyl-ヘモグロビン付加体がより多く存在する (Vineis ら、1990 年)。また、*NAT1* と *NAT2* の相互作用が示唆されている (Cascorbi ら、2001 年)。ドイツの膀胱がん患者 425 人を対象とした研究で、Cascorbi ら (2001 年) は、以下のことを明らかにした。(1) *NAT1**10 遺伝子型の *NAT2**4 遺伝子型への部分的な連鎖 (2) 調査した症例中の rapid *NAT2* 遺伝子型を有するヒトにおける、*NAT1**10 遺伝子型の発現量の低さ (3) 職業ばく露歴と *NAT2**slow/*NAT1**4 遺伝子型の組み合わせは、職業ばく露によるリスクのない対照群に比べて、がん症例は 5.96 倍 (2.96-12.0) の頻度であった ($P<0.0001$)。

したがって、特に環境リスク因子にばく露される場合、*NAT2*4* 及び *NAT1*10* を有する個体は、膀胱がんのリスクが有意に低いことが示唆される。

CYP1A2 (Oscarson ら、n.d.) 及び *NAT2* (Hein ら、2000 年) 遺伝子の多型は、ヒト集団におけるこれらの酵素活性の変動と関連しているが、*CYP1A2* 活性の変動が遺伝的要因によるものであるかはまだ明らかにされていない (Sachse ら、2003 年)。さらに、喫煙者に誘導される *CYP1A2* 遺伝子の発現は、*CYP1A2* 酵素活性を高める (Sesardic ら、1988 ; Eaton ら、1995 年)。4-Aminobiphenyl にばく露され、*CYP1A2* と高い *slow NAT2* 活性を発現する個体は、*CYP1A2* と低い *rapid NAT2* 活性を発現する個体よりも、*N-hydroxy-4-aminobiphenyl* のレベルが高い。したがって、肝臓と膀胱における 4-Aminobiphenyl -ヘモグロビン付加体と 4-Aminobiphenyl-DNA 付加体の高いレベルを有することが予測される。

腫瘍抑制遺伝子 *RB1* 及び *TP53* は、膀胱がん、特に低悪性度の乳頭腫瘍よりも高悪性度の尿路上皮がんに関与しているようである。両遺伝子は細胞周期の調節に関与している。さらに、*TP53* は、DNA 損傷、細胞死及び血管新生の役割を果たし (Hickman ら、2002 年)、その遺伝子産物は、複数の遺伝子の発現を調節する (Vousden & Lu、2002 年)。*RB1* の不活性化と筋肉内への浸潤に強い関連が見出されている (Cairns ら、1991 年 ; Ishikawa ら、1991 年 ; Presti ら、1991 年 ; Primdahl ら、2000 年)。45 例の膀胱がんを対象とした研究では、*TP53* 変異を有する 9 人のうち 7 人がグレード 3 の腫瘍 (周囲組織への浸潤を含む) であった (Martone ら、1998 年)。*RB1* の不活性化は、筋肉内浸潤性膀胱がんの 30~80% で発生し (Cairns ら、1991 年 ; Logothetis ら、1992 年 ; Wright ら、1995 年 ; Ioachim ら、2000 年)、多くの場合、ヘテロ接合性 13q 欠失と残りの対立遺伝子の突然変異の結果発生する (Cordon-Cardo & Reuter、1997 年)。少なくとも 30 の腫瘍を調査した研究では、浸潤性膀胱がんの 40~60% で *TP53* 突然変異が認められた (Tiguert ら、2001 年 ; Lu ら、2002 年)。特定変異のホットスポットは確認されなかったが、変異の 90% 以上はエクソン 4-9 に発生していた。*TP53* のエクソン 5、7 及び 8 を含む DNA 断片における *N-hydroxy-4-aminobiphenyl* の結合スペクトルの研究では、非 CpG 部位である 285 コドン及び CpG 部位である 175 及び 248 コドンに優先的に結合することが確認されたが、C5 シトシンメチル化が起こった後のみ確認された (Feng ら、2002 年)。著者らは、膀胱がんにおける *TP53* の変異スペクトルが、この腫瘍の原因である 4-Aminobiphenyl の役割を強く示唆していると結論づけた。

4-Aminobiphenyl の環境中ばく露の源であるタバコの煙へのばく露は、成人と胎児の両方で、4-Aminobiphenyl-ヘモグロビン付加体量の増加と関連している。喫煙者 ($n=14$) と非喫煙者 ($n=38$) の女性の研究では、4-Aminobiphenyl-ヘモグロビンレベルは、喫煙者では 183 ± 108 pg/g ヘモグロビン、非喫煙者では 22 ± 8 pg/g ヘモグロビンであったのに対し、それぞれの胎児のレベルは 92 ± 54 pg/g ヘモグロビンと 17 ± 13 pg/g ヘモグロビン (Coghlin ら、1991 年) であった。この差は、腫瘍組織 DNA の研究において成人でも観察されている (Curigliano ら、1996 年)。イタリア、トリノの男性における研究では、ヘモグロビン付加体量 (ばく露量の代用として、また DNA 付加体の可能性の指標として使用される) は、4-Aminobiphenyl の供給源であるタバコへのばく露量と関連しており (黒タバコ > 膀胱がんのリスクでも同様の傾向がみられた (Bryant ら、1988 年))。主にばく露の指標である付加体の存在とがん発生とを結びつける情報には大きなギャップがある。

ヒトでは、4-Aminobiphenyl は膀胱がんとのみ関連しているが、マウスでは肝臓と膀胱の腫瘍が誘発されている。臓器特異性におけるこれらの種差の具体的な理由は明らかにされていないが、競合する *N*-エステル化酵素の活性化の違いによるものと考えられる。硫酸化は芳香族アミンによる肝発がんと密接に関連しているようだが、*N*-グルクロン酸化は膀胱発がんに関連しているようである。アセチル化には様々な効果があるが、ヒトでは主に解毒プロセスであり、アセチル化が速いか遅いかを決定する *N*-アセチルトランスフェラーゼの型に大きく影響される。ヒトの組織が、4-Aminobiphenyl とその代謝物の代謝に関与しているかについて研究されてきた。CYP1A2 は、ヒト肝ミクロソーム分画による 4-aminobiphenyl から *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl への代謝に関与している (Butler ら、1989 年 b)。 *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl は、ヒト肝臓及びそれより程度は低い、結腸由来の細胞質性スルホトランスフェラーゼによって、牛胸腺 DNA と共有結合する生成物に代謝されるが、膵臓や膀胱由来のものによっては代謝されない。膀胱でのスルホトランスフェラーゼ活性の欠如を考慮すると、肝スルホトランスフェラーゼは肝外組織での *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl の生物学的利用能を低下させ、膀胱の解毒機構として機能する可能性が示唆されている (Chou ら、1995 年)。一方、ヒト尿路上皮細胞に存在する *N*-アセチルトランスフェラーゼ (Frederickson ら、1992 ; Swaminathan & Reznikoff、1992 年) は、*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl 及びそのアセチル化化合物 *N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl 及び *N*-アセトキシ-4-アセチルアミノビフェニルを DNA 反応性物質に代謝することができる。 *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl と主要な付加体はクロマトグラフされ、*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl のサイトゾル媒介結合で得た DNA を用いた ³²P-ポストラベリング法により、4 つの放射性スポットが明らかになった。健康なヒト尿路上皮細胞を用いた場合には 5 つの付加体が認められたが、そのうち 2 つはサイトゾルを用いた場合に認められた 2 つの付加体と同じであった。このことから、アセチル化以外の活性化経路の存在が示唆された。

イヌ組織を用いた実験と同様の実験により、ヒトの尿路上皮細胞ミクロソームがアセチル基転移活性を有していることが示されており、*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl の RNA や DNA への結合は、4-Acetylaminobiphenyl、*N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl、またはアセチル CoA をアセチル基供与体とした場合に起こることが示されている (Hatcher ら、1993 年)。また、*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl、*N*-acetoxy-4-acetylaminobiphenyl、*N*-acetoxy-4-aminobiphenyl と反応させて生成した DNA 付加体の ³²P-ポストラベリングは、類似のプロファイルを示し、*N*-acetoxy-4-aminobiphenyl から生じるアリルニトレニウムイオンが共通の反応種であることを発見した。この付加体の構造は、*N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl(dG-C8-aminobiphenyl) や *N*-(deoxyadenosin-8-yl)-4-aminobiphenyl(dA-C8-aminobiphenyl) の 3',5'-ビスホスホ誘導体 (Frederickson ら、1992 年 ; Hatcher & Swaminathan、1995 年) 及び *N*-(deoxyguanosin-*N*(2)-yl)-4-aminobiphenyl (Hatcher & Swaminathan、2002 年) として同定されている。

喫煙者と非喫煙者を比較した結果は、仮説 MOA のヒトへの関連性を支持するものである。T1 膀胱がん 46 例の研究では、4-Aminobiphenyl-DNA 付加体の平均相対染色強度は、非喫煙者 (113±71、*n*=22) よりも現在の喫煙者 (275±81、*n*=24) の方が有意に高かった (Curigliano ら、1996 年)。同様の結果が喉頭組織 (Flamini ら、1998 年) 及び乳腺組織 (Faraglia ら、2003 年) についても報告されている。4-Aminobiphenyl -ヘモグロビン付加体をばく露の指標として使用すると、膀胱がん患者は対照者よりも高いレベルであったのに対し (Del Santo ら、1991 年)、肺がん患者はそうではなかった (Weston ら、1991 年)。この違いの根拠は不明である。

ヒト以外の試験系で得られた遺伝毒性のエビデンスに加えて、4-Aminobiphenyl は、ヒト尿路上皮細胞のミクロソーム調製物によって、*S. typhimurium* YG1024 (*O*-アセチルトランスフェラーゼ活性の高い TA98 の派生株) の変異原性物質に代謝されることがあるが、TA98 株自体では代謝されない (Hatcher ら、1993 年)。この研究では、他の種または他のヒト組織は調べられていない。

6-チオグアニン耐性変異体は、4-Aminobiphenyl 自体へのばく露、または *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl、*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl、*N*-acetoxy-4-acetylaminobiphenyl へのばく露によって、非腫瘍性 SV40 不死化ヒト尿路上皮細胞株で誘導することができる (Bookland ら、1992 年 a)。観察された活性には、外因性代謝的活性化経路は必要とされなかった。変異体分画の統計的に有意な増加をもたらすための最小濃度は以下の通りであった。*N*-acetoxy-4-acetylaminobiphenyl、2 $\mu\text{mol/L}$; *N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl、5 $\mu\text{mol/L}$; *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl、20 $\mu\text{mol/L}$; 及び 4-Aminobiphenyl、100 $\mu\text{mol/L}$ 。また、これらの物質のうちの 3 つは処理した細胞をヌードマウスに皮下注射したときの発がんをエンドポイントとした *in vitro-in vivo* アッセイにおいて、同じヒト不死化尿路上皮細胞を使用した腫瘍性形質転換についても検討が実施された (Bookland ら、1992 年 b)。形質転換はすべての試験で示されたが、最小濃度は以下の通りであった。*N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl、0.5 $\mu\text{mol/L}$; *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl、0.5 $\mu\text{mol/L}$; 及び 4-Aminobiphenyl、20 $\mu\text{mol/L}$ 。突然変異と比較して形質転換に必要な濃度の方が低いことが指摘されているが、これをどのように解釈すべきかは明らかではない。それは、形質転換が突然変異に依存せず、形質転換アッセイがより高い感度を有しているか、または単に方法の感度の違いを反映している可能性がある。

要約すると、マウス、イヌ、ヒトにおいて、MOA の key events は定性的には同じである：*N*-hydroxylamine への代謝的活性化とそれに続く反応性親電子物質（おそらくニトレニウムイオン）の形成、グアニン付加体の形成、遺伝子突然変異及びがんの形成である。どの遺伝子に変異し、どのようにしてがんが誘発されるのかなど、遺伝子変異とがんとの間に介在する事象は明らかにされていない。それにもかかわらず、MOA は明確に示されており、動物モデルでもヒトでも同じである。

実験動物とヒトとの間の動態的または薬力学的要因のいずれかの量的差異に基づいて、MOA のヒトへの関連性を合理的に排除することができるか

以上詳述したように、4-Aminobiphenyl の代謝的活性化、DNA 付加体、変異原性は、マウス、イヌ、ヒトでは定性的に同じであり、これら 3 種では膀胱腫瘍を誘発し、マウス、ラット、ウサギではその他の腫瘍を誘発する。吸収、分布、排泄に関する詳細は報告されていないが、マウス、イヌ、ヒトで発生する尿路上皮における DNA 付加体形成量が類似していることから、3 種の間では速度論的な差異は有意ではないことが示唆されている。

3種の酵素の過程は類似しているが、量的な違いは明らかである。これらの違いは、種間で見られる標的臓器の特異性の違いの一部を説明し、DNA付加体の生成における定量的な違いを示唆している可能性がある。それにもかかわらず、これらの違いは、どの種でも、あるいは異なる標的臓器でも、全体的なMOAを否定するものではなく、代謝的活性化と不活性化のための競合する経路の複雑さと一致している。

おそらく、異なる付加体の修復能や種間、組織間における量的な違いが存在するだろう。しかし、3種すべてで比較的多くの付加体が検出されたことから、かなり多くの安定的な付加体が産生されていることがわかる。

マウス、イヌ、ヒトに共通する標的組織である膀胱の尿路上皮は、形態学的に類似している (Pauli ら、1983 年)。尿路上皮は、腔内表面の尿に対するバリア機能の大部分を担う特徴的な非対称性単位膜を有している。尿路上皮は、尿路上皮特異的タンパク質であるウロプラキンから構成されており、その配列は種間で高度に保存されている (Wu ら、1994 年)。さらに、尿路上皮は、3種すべての種において代謝的に活性化している。

また、尿 pH や排尿頻度など、尿路上皮 DNA 付加体の最終的な産生量に影響を与える因子も同定されている (Cohen ら、1995 年 ; Sarkar ら、2002 年)。pH の範囲は種によって異なるが、マウス、イヌ及びヒトの尿 pH は、容易に酸性及びアルカリ性、また中性に変動する。繰り返しになるが、量的な違いは生じるものの、これらはヒトにおける MOA の存在を排除するものではない。

DNA 反応性以外の MOA を示唆するエビデンスはない。しかし、4-Aminobiphenyl の膀胱発がんに対する見かけの影響に関しては、種間で量的な差が存在する。4-Aminobiphenyl の代謝物は DNA と同様にタンパク質 (ヘモグロビンなど) とも相互作用し、4-Aminobiphenyl の代謝物は細胞毒性を有することが明らかになっている (Schieferstein ら、1985 年 ; Reznikoff ら、1986 年 ; Kadlubar ら、1991 年)。4-Aminobiphenyl の高用量投与によるマウス膀胱の細胞毒性と再生性増殖には、尿路上皮細胞タンパク質との相互作用が関与している可能性がある。DNA の反応性と、相反する変異原性と細胞増殖の相互作用は、DNA 付加体の用量反応が直線的であるにもかかわらず、腫瘍の用量反応曲線がシグモイド型であることを説明している (Cohen & Ellwein、1990 年)。尿路上皮細胞毒性を生じる可能性があるマウスの尿中に見られる高濃度の 4-Aminobiphenyl は、一般的に受動喫煙者では達成されていない。しかし、他の (未知の) 物質は、喫煙者 (Auerbach & Garfinkel、1989 年) で尿路上皮の過形成を生成するように見える。この細胞増殖の増加は、標的となる DNA 複製細胞の数を大幅に増やし、正常にゆっくりと複製する少数の尿路上皮と比較して、膀胱に対する 4-Aminobiphenyl の影響を大幅に増強する。このように、マウスと比較してヒトの方が 4-Aminobiphenyl の明らかに大きな効力は考えにくい。しかし、マウスでは 4-Aminobiphenyl 単一の物質による DNA 反応性と細胞増殖の相乗効果がタバコの煙の複雑な混合物中の様々な物質によって引き起こることが示されている。

4-Aminobiphenyl への職業的ばく露は、たばこの煙よりも 4-Aminobiphenyl の用量が多いと考えられる。なぜなら、膀胱がんの発生率が喫煙者に比べて職業的にばく露される集団の方がかなり高かったためである。しかし、これらの職業ばく露が発生した時点では代謝物濃度や尿路上皮細胞内の DNA 付加体レベルを定量的に測定することができず、また、個人の喫煙歴を評価することはなかった (Koss ら、1965 年、1969 年)。

要約すると、種間での量的な違いは存在するが、マウスやイヌと同じ MOA がヒトにも当てはまることを排除するものではない。

結論：信頼性、解析及び帰結の記述

推定される MOA の初期段階は、代謝的活性化、DNA 付加体形成及び突然変異の key events が、マウス、イヌ及びヒトにおいて定性的に同じであることを示す。これは利用可能なエビデンスによって十分に支持されている。4-Aminobiphenyl がヒトの膀胱がん物質であるという強力かつ十分なエビデンスがある。しかし、突然変異とがんの発生との間に介在するステップについてのエビデンスは不足している。付加体量と TP53 突然変異との関連について説明したが、これらの特定の遺伝的変化は腫瘍の進行から遅れて現れ、しばしば内因性の原因 (例えば、メチル化された CpG 部位での脱プリン) であるため、説得力のあるものではない。膀胱がんにおける TP53 突然変異については、症例対照研究で研究されている (Schroeder ら、2003 年)。さらに、ヒトの尿路上皮腫瘍のほとんどは低悪性度の乳頭病変であり、一般に TP53 変異を有していない。

N-hydroxy-4-acetylamino-biphenyl の変異スペクトルは、Big Blue mouse の胚性線維芽細胞において研究されている (Bessaratina ら、2002 年)。これらの細胞を 24 時間処理すると、*cII* 遺伝子の突然変異頻度がバックグラウンドと比較して最大 12.8 倍の用量依存的な増加をもたらした。一塩基置換は、処理細胞では突然変異の 86%、対照細胞では突然変異の 74%を占めていた。これらの変異のうち、63%と 36%はそれぞれ *cII* 遺伝子に沿ったグアニン残基で発生した。処置細胞では *cII* 遺伝子の変異の 47%が G→T のトランスバージョンであったのに対し、対照細胞では最も一般的な変異は挿入であり、これは変異の 19%を占めていた。誘導された付加体のマッピングにより、5 つの DNA 付加体部位が確立された。そのうちの 4 つは N-hydroxy-4-acetylamino-biphenyl による主な変異部位であり、特に G→T トランスバージョンを生じていた。しかしながら、ヒト膀胱がんの TP53 遺伝子では、G→A トランジションが優勢 (53%) であり、その 5 つの変異ホットスポット (コドン 175、248、273、280、285) のすべてで優勢で、そのうちの 3 つはメチル化 CpG ホットスポット (175、248、273) にあった。*cII* 遺伝子では、誘導される突然変異ホットスポットも、メチル化 CpG ジヌクレオチドに偏っていない。この研究から、*cII* 遺伝子における N-hydroxy-4-acetylamino-biphenyl によって誘導される突然変異パターンと、ヒト膀胱がんにおける TP53 遺伝子で観察される突然変異パターンとの間には大きなギャップがあると結論づけられる。しかし、4-Aminobiphenyl によって誘導される突然変異スペクトルにおけるメチル化状態や転写活性の役割はまだ明らかにされていない。また、TP53 遺伝子の変異スペクトルは、腫瘍発生過程の選択を反映したものであることにも留意しなければならない。

以上の解析から、4-Aminobiphenyl 発がん MOA は動物モデルで知られており、その MOA は定性的にも定量的にもヒトに関連していることが明らかになった。この評価に基づく結論は、疫学的なエビデンスがなくても、4-Aminobiphenyl はヒトに対して発がんの危険性があるということである。

完全なリスク評価を行うためには、用量反応及びヒトへのばく露に関する追加情報が必要である。上記の情報に基づいて、職業的（過去の）ばく露と喫煙ばく露など予想されるばく露による発がんリスクを予測している。非喫煙者の環境ばく露における潜在的リスクについては、さらなる解析が必要である。MOA 解析は、そのような評価のための基礎と基盤を提供する。4-Aminobiphenyl に関する疫学的エビデンスは、MOA の HRF によって推定される結論を支持している。

4-Aminobiphenyl とヒト関連性フレームワーク

4-Aminobiphenyl は、提唱されている IPCS HRF を用いて MOA 解析に基づいて評価した。その結果、DNA 反応性 MOA の key events である代謝的活性化、DNA 付加体形成、変異原性、発がんは、ヒトにおいてもマウスやイヌなどの動物モデルと同様であり、4-Aminobiphenyl はヒトに対して発がんの危険性を示すことが明らかになった。この MOA 解析の情報は、ヒトに対する完全ながんリスク評価を構築するための実質的な基礎を提供するものである。この化学物質については、HRF 解析から導き出された結論を検証するための実質的な疫学的エビデンスも存在する。

この MOA では、どのような遺伝子が突然変異し、その遺伝子変化がどのようにして発がんにつながるのかという追加の key events は、4-Aminobiphenyl では知られていない。しかし、ここで提示されたフレームワーク解析に基づいて MOA のエビデンスの信頼性を考えると、このことは結論を損なうものではない。

ある化学物質が DNA 反応性 MOA によって発がんすると結論づけるには、どのようなデータが必要なのか？我々が提案するのは、少なくとも DNA 付加体が、標的組織で生成され、その化学物質に変異原性（代謝的活性化の有無にかかわらず）があることを実証することである。変異原性は、ここでは遺伝毒性という広い意味よりも、より具体的で限定的な意味で用いられている。in vivo ばく露後の標的組織における DNA 付加体及び変異原性が証明されれば、推定された MOA の信頼性が向上する。特定の代謝経路と誘導される特定の DNA 付加体を同定することにより、動物モデルをヒトに外挿するための優れた根拠が得られる。

この事例は、MOA 解析における代替化合物に関するデータの潜在的な有用性を示している。しかし、関連化合物に関するデータの妥当性は、in vivo であれば in vitro であれば、十分に正当化される必要がある。また、DNA 反応性や変異原性については、これまでに十分に開発されてきた構造活性相関に関するエビデンスの重み付け解析も、フレームワーク解析に貢献すべきである。

謝辞

この論文は、米国環境保護庁（USEPA）のガイダンスに基づいてレビューされているが、必ずしも USEPA の方針を反映したものではない。Andrew Kligerman 博士と Doug Wolf 博士の慎重なレビューに感謝する。

参考文献

- al-Atrash J, Zhang YJ, Lin D, Kadlubar FF, Santella RM (1995) Quantitative immunohistochemical analysis of 4-aminobiphenyl–DNA cultured cells and mice: Comparison to gas chromatography/mass spectroscopy analysis. *Chemical Research in Toxicology*, **8**:747–752.
- Auerbach O, Garfinkel L (1989) Histologic changes in the urinary bladder in relation to cigarette smoking and use of artificial sweeteners. *Cancer*, **64**:983–987.
- Besaratinia A, Bates SE, Pfeifer GP (2002) Mutational signature of the proximate bladder carcinogen *N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl: Inconsistency with the *p53* mutational spectrum in bladder cancer. *Cancer Research*, **62**:4331–4338.
- Block NL, Sigel MM, Lynne CM, Ng AB, Grosberg RA (1978) The initiation, progress, and diagnosis of dog bladder cancer induced by 4-aminobiphenyl. *Investigative Urology*, **16**:50–54.
- Bonser GM (1962) Precancerous changes in the urinary bladder. In: Severi L, ed. *The morphological precursor of cancer*. Perugia, University of Perugia, p. 435.
- Bookland EA, Reznikoff CA, Lindstrom M, Swaminathan S (1992a) Induction of thioguanine-resistant mutations in human uroepithelial cells by 4-aminobiphenyl and its *N*-hydroxy derivatives. *Cancer Research*, **52**:1615–1621.
- Bookland EA, Swaminathan S, Oyasu R, Gilchrist KW, Lindstrom M, Reznikoff CA (1992b) Tumorigenic transformation and neoplastic progression of human uroepithelial cells after exposure in vitro to 4-aminobiphenyl or its metabolites. *Cancer Research*, **52**:1606–1614.
- Bryant MS, Vineis P, Skipper PL, Tannenbaum SR (1988) Hemoglobin adducts of aromatic amines: Associations with smoking status and type of tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**:9788–9791.
- Burger MS, Torino JL, Swaminathan S (2001) DNA damage in human transitional cell carcinoma cells after exposure to the proximate metabolite of the bladder carcinogen 4-aminobiphenyl. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **38**:1–11.
- Butler MA, Guengerich FP, Kadlubar FF (1989a) Metabolic oxidation of the carcinogens 4-aminobiphenyl and 4,4'-methylene-bis(2-chloroaniline) by human hepatic microsomes and by purified rat hepatic cytochrome P-450 monooxygenases. *Cancer Research*, **49**:25–31.

Butler MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Kadlubar FF (1989b) Human cytochrome P-450PA (P-450IA2), the phenacetin *O*-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3- demethylation of caffeine and *N*-oxidation of carcinogenic arylamines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**:7696–7700.

Cairns P, Proctor AJ, Knowles MA (1991) Loss of heterozygosity at the *RB* locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma. *Oncogene*, **6**:2305–2309.

Cairns T (1979) The ED₀₁ study: Introduction, objectives, and experimental design. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, **3**:1–7.

Cartwright RA, Rogers HJ, Barham-Hall D, Glashan RW, Ahmad RA, Higgins E, Kahn MA (1982) Role of *N*-acetyltransferase phenotypes in bladder carcinogenesis: A pharmacogenetic epidemiological approach to bladder cancer. *Lancet*, **16**:842–846.

Cascorbi I, Roots I, Brockmoller J (2001) Association of *NAT1* and *NAT2* polymorphisms to urinary bladder cancer: Significantly reduced risk in subjects with *NAT1**10. *Cancer Research*, **61**:5051–5056.

Castelao JE, Yuan JM, Skipper PL, Tannenbaum SR, Gago-Dominguez M, Crowder JS, Ross RK, Yu MC (2001) Gender- and smoking-related bladder cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, **93**:538–545.

Chou HC, Lang NP, Kadlubar FF (1995) Metabolic activation of the *N*-hydroxy derivative of the carcinogen 4-aminobiphenyl by human tissue sulfotransferases. *Carcinogenesis*, **16**:413– 417.

Clayson DB, Lawson TA, Santana S, Bonser GM (1965) Correlation between the chemical induction of hyperplasia and of malignancy in the bladder epithelium. *British Journal of Cancer*, **19**:297–310.

Clayson DB, Lawson TA, Pringle JAS (1967) The carcinogenic action of 2-aminodiphenylene oxide and 4-aminodiphenyl on the bladder and liver of C57 × IF mouse. *British Journal of Cancer*, **1**:755–762.

Coghlin J, Gann PH, Hammond SK, Skipper PL, Taghizadeh K, Paul M, Tannenbaum SR (1991) 4-Aminobiphenyl hemoglobin adducts in fetuses exposed to the tobacco smoke carcinogen in utero. *Journal of the National Cancer Institute*, **83**:274–280.

Cohen SM (1995) The role of urinary physiology and chemistry in bladder carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*, **33**:715–730.

Cohen SM, Ellwein LB (1990) Proliferative and genotoxic cellular effects in 2- acetylaminofluorene bladder and liver carcinogenesis: Biological modeling of the ED₀₁ study. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **104**:79–93

Cordon-Cardo C, Reuter VE (1997) Alterations of tumor suppressor genes in bladder cancer. *Seminars in Diagnostic Pathology*, **14**:123–132.

Curigliano G, Zhang YJ, Wang LY, Flamini G, Alcini A, Ratto C, Giustacchini M, Alcini E, Cittadini A, Santella RM (1996) Immunohistochemical quantitation of 4-aminobiphenyl–DNA adducts and p53 nuclear overexpression in T1 bladder cancer of smokers and nonsmokers. *Carcinogenesis*, **17**:911–916.

Dang LN, McQueen CA (1999) Mutagenicity of 4-aminobiphenyl and 4-acetylbiphenyl in *Salmonella typhimurium* strains expressing different levels of *N*-acetyltransferase. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **159**:77–82.

Deichmann WB, MacDonald WE (1968) The non-carcinogenicity of a single dose of 4-aminobiphenyl in the dog. *Food and Cosmetics Toxicology*, **6**:143–146.

Deichmann WB, Radomski JL, Anderson WAD, Coplan MM, Woods FM (1958) The carcinogenic action of *p*-aminobiphenyl in the dog; final report. *Industrial Medicine and Surgery*, **27**:25–26.

Deichmann WB, Radomski JL, Glass E, Anderson WAD, Coplan M, Woods FM (1965) Synergism among oral carcinogens. Simultaneous feeding of four bladder carcinogens to dogs. *Industrial Medicine and Surgery*, **34**:640–649.

Delclos KB, Miller DW, Lay JO Jr, Casciano DA, Walker RP, Fu PP, Kadlubar FF (1987) Identification of C8-modified deoxyinosine and N2- and C8-modified deoxyguanosine as major products of the in vitro reaction of *N*-hydroxy-6-aminochrysene with DNA and the formation of these adducts in isolated rat hepatocytes treated with 6-nitrochrysene and 6-aminochrysene. *Carcinogenesis*, **8**:1703–1709.

Del Santo P, Moneti G, Salvadori M, Saltutti C, Delle RA, Dolara P (1991) Levels of the adducts of 4-aminobiphenyl to hemoglobin in control subjects and bladder carcinoma patients. *Cancer Letters*, **60**:245–251.

Doerge DR, Churchwell MI, Marques MM, Beland FA (1999) Quantitative analyses of 4-aminobiphenyl–C8-deoxyguanosyl DNA adducts produced in vitro and in vivo using HPLC–ES–MS. *Carcinogenesis*, **6**:1055–1061.

Dooley KL, Stavenuiter JF, Westra JG, Kadlubar FF (1988) Comparative carcinogenicity of the food pyrolysis product, 2-amino-5-phenylpyridine, and the known human carcinogen, 4-aminobiphenyl, in the neonatal B6C3F1 mouse. *Cancer Letters*, **41**:99–103.

Dooley KL, Von Tungeln LS, Bucci T, Fu PP, Kadlubar FF (1992) Comparative carcinogenicity of 4-aminobiphenyl and the food pyrolysates, Glu-P-1, IQ, PhIP, and MeIQx in the neonatal B6C3F1 male mouse. *Cancer Letters*, **62**:205–209.

Eaton DL, Gallagher EP, Bammler TK, Kunze KL (1995) Role of cytochrome P4501A2 in chemical carcinogenesis: Implications for human variability in expression and enzyme activity. *Pharmacogenetics*, **5**:259–274.

Faraglia B, Chen SY, Gammon MD, Zhang Y, Teitelbaum SL, Neugut AI, Ahsan H, Garbowski GC, Hibshoosh H, Lin D, Kadlubar FF, Santella RM (2003) Evaluation of 4-aminobiphenyl–DNA adducts in human breast cancer: The influence of tobacco smoke. *Carcinogenesis*, **24**:719–725.

Feng Z, Hu W, Rom WN, Beland FA, Tang MS (2002) *N*-Hydroxy-4-aminobiphenyl–DNA binding in human *p53* gene: Sequence preference and the effect of C5 cytosine methylation. *Biochemistry*, **41**:6414–6421.

Flamini G, Romano G, Curigliano G, Chiominto A, Capelli G, Boninsegna A, Signorelli C, Ventura L, Santella RM, Sgambato A, Cittadini A (1998) 4-Aminobiphenyl–DNA adducts in laryngeal tissue and smoking habits: An immunohistochemical study. *Carcinogenesis*, **19**:353–357.

Flammang TJ, Kadlubar FF (1986) Acetyl coenzyme A-dependent metabolic activation of *N*-hydroxy-3,2,4-dimethyl-4-aminobiphenyl and several carcinogenic *N*-hydroxy arylamines in relation to tissue and species differences, other acyl donors, and arylhydroxamic acid-dependent acyltransferases. *Carcinogenesis*, **7**:919–926.

Flammang TJ, Couch LH, Levy GN, Weber WW, Wise CK (1992) DNA adduct levels in congenic rapid and slow acetylator mouse strains following chronic administration of 4-aminobiphenyl. *Carcinogenesis*, **13**:1887–1891.

Fletcher K, Tinwell H, Ashby J (1998) Mutagenicity of the human bladder carcinogen 4-aminobiphenyl to the bladder of Muta \square Mouse transgenic mice. *Mutation Research*, **400**:245–250.

Frederickson SM, Hatcher JF, Reznikoff CA, Swaminathan S (1992) Acetyl transferase-mediated metabolic activation of *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl by human uroepithelial cells. *Carcinogenesis*, **13**:955–961.

Fretland AJ, Doll MA, Gray K, Feng Y, Hein DW (1997) Cloning, sequencing, and recombinant expression of NAT1, NAT2, and NAT3 derived from the C3H/HeJ (rapid) and A/HeJ (slow) acetylator inbred mouse: Functional characterization of the activation and deactivation of aromatic amine carcinogens. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **142**:360–366.

Gaylor DW (1979) The ED₀₁ study: Summary and conclusions. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, **3**:179–183.

Gorrod JW, Carter RL, Roe FJ (1968) Induction of hepatomas by 4-aminobiphenyl and three of its hydroxylated derivatives administered to newborn mice. *Journal of the National Cancer Institute*, **41**:403–410.

Hammons GJ, Guengerich FP, Weis CC, Beland FA, Kadlubar FF (1985) Metabolic oxidation of carcinogenic arylamines by rat, dog, and human hepatic microsomes and by purified flavin-containing and cytochrome P-450 monooxygenases. *Cancer Research*, **45**:3578–3585.

Hatcher JF, Swaminathan S (1992) Microsome-mediated transacetylation and binding of *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl to nucleic acids by hepatic and bladder tissues from dog. *Carcinogenesis*, **13**:1705–1711.

Hatcher JF, Swaminathan S (1995) Detection of deoxyadenosine-4-aminobiphenyl adduct in DNA of human uroepithelial cells treated with *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl following nuclease P1 enrichment and ³²P-postlabeling analysis. *Carcinogenesis*, **16**:295–301.

Hatcher JF, Swaminathan S (2002) Identification of *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-azobiphenyl by ³²P-postlabeling analyses of DNA in human uroepithelial cells exposed to proximate metabolites of the environmental carcinogen 4-aminobiphenyl. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **39**:314–322.

Hatcher JF, Rao KP, Swaminathan S (1993) Mutagenic activation of 4-aminobiphenyl and its *N*-hydroxy derivatives by microsomes from cultured human uroepithelial cells. *Mutagenesis*, **8**:113–120.

Hein DW (1988) Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, **948**:37–66.

Hein DW, Grant DM, Sim E (2000) *Arylamine N-acetyltransferase (NAT) nomenclature* (<http://louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html>).

Hickman ES, Moroni MC, Helin K (2002) The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Current Opinion in Genetics and Development*, **12**:60–66.

Hill AB (1965) The environment and disease: Association or causation? *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, **58**:295–300.

Hughes MF, Smith BJ, Eling TE (1992) The oxidation of 4-aminobiphenyl by horseradish peroxidase. *Chemical Research in Toxicology*, **5**:340–345.

IARC (1972) 4-Aminobiphenyl. In: *Some inorganic substances, chlorinated hydrocarbons, aromatic amines, N-nitroso compounds, and natural products*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, pp. 74–79 (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 1).

IARC (1986) *Tobacco smoking*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 421 pp. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 38).

IARC (1987) 4-Aminobiphenyl (Group 1). In: *Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, pp. 91–92 (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Supplement 7).

Ioachim E, Charchanti A, Stavropoulos NE, Skopelitou A, Athanassiou ED, Agnantis NJ (2000) Immunohistochemical expression of retinoblastoma gene product (Rb), p53 protein, MDM2, c-erbB-2, HLA-DR and proliferation indices in human urinary bladder carcinoma. *Histology and Histopathology*, **15**:721–727.

Ishikawa J, Xu HJ, Hu SX, Yandell DW, Maeda S, Kamidono S, Benedict WF, Takahashi R (1991) Inactivation of the retinoblastoma gene in human bladder and renal cell carcinomas. *Cancer Research*, **51**:5736–5743.

Kadlubar FF, Miller JA, Miller EC (1977) Hepatic microsomal *N*-glucuronidation and nucleic acid binding of *N*-hydroxy arylamines in relation to urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Research*, **37**:805–814.

Kadlubar FF, Frederick CB, Weis CD, Zenser TV (1982) Prostaglandin endoperoxide synthetase-mediated metabolism of carcinogenic aromatic amines and their binding to DNA and protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **108**:253–258.

Kadlubar FF, Dooley KL, Teitel CH, Roberts DW, Benson RW, Butler MA, Bailey JR, Young JF, Skipper PW, Tannenbaum SR (1991) Frequency of urination and its effects on metabolism, pharmacokinetics, blood hemoglobin adduct formation, and liver and urinary bladder DNA adduct levels in beagle dogs given the carcinogen 4-aminobiphenyl. *Cancer Research*, **51**:4371–4377.

Kimura S, Kawabe M, Ward JM, Morishima H, Kadlubar FF, Hammons GJ, Fernandez-Salguero P, Gonzalez FJ (1999) CYP1A2 is not the primary enzyme responsible for 4-aminobiphenyl-induced hepatocarcinogenesis in mice. *Carcinogenesis*, **20**:1825–1830.

Koss LG, Melamed MR, Ricci A, Melick WF, Kelly RE (1965) Carcinogenesis in the human urinary bladder. Observations after exposure to *para*-aminodiphenyl. *New England Journal of Medicine*, **272**:767–770.

Koss LG, Melamed MR, Kelly RE (1969) Further cytologic and histologic studies of bladder lesions in workers exposed to *para*-aminodiphenyl: Progress report. *Journal of the National Cancer Institute*, **43**:233–243.

Kriek E (1992) Fifty years of research on *N*-acetyl-2-aminofluorene, one of the most versatile compounds in experimental research. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **118**:481–489.

- Lakshmi VM, Mattammal MB, Zenser TV, Davis BB (1990) Mechanism of peroxidative activation of the bladder carcinogen 2-amino-4-(5-nitro-2-furyl)-thiazole (ANFT): Comparison with benzidine. *Carcinogenesis*, **11**:1965–1970.
- Lang M, Pelkonen O (1999) Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. *IARC Scientific Publications*, **148**:13–22.
- Littlefield NA, Farmer JH, Gaylor DW, Sheldon WG (1979) Effects of dose and time in a long-term, low-dose carcinogenic study. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, **3**:17–34.
- Logothetis CJ, Xu HJ, Ro JY, Hu SX, Sahin A, Ordonez N, Benedict WF (1992) Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **84**:1256–1261.
- Lower GM Jr, Nilsson T, Nelson CE, Wolf H, Gamsky TE, Bryan GT (1979) *N*-Acetyltransferase phenotype and risk in urinary bladder cancer: Approaches in molecular epidemiology. Preliminary results in Sweden and Denmark. *Environmental Health Perspectives*, **29**:71–79.
- Lu ML, Wikman F, Orntoft TF, Charytonowicz E, Rabbani F, Zhang Z, Dalbagni G, Pohar KS, Yu G, Cordon-Cardo C (2002) Impact of alterations affecting the p53 pathway in bladder cancer on clinical outcome, assessed by conventional and array-based methods. *Clinical Cancer Research*, **8**:171–179.
- Manjanatha MG, Li EE, Fu PP, Heflich RH (1996) H- and K-*ras* mutational profiles in chemically induced liver tumours from B6C3F1 and CD-1 mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **47**:195–208.
- Martone T, Airoidi L, Magagnotti C, Coda R, Randone D, Malaveille C, Avanzi G, Merletti F, Hautefeuille A, Vineis P (1998) 4-Aminobiphenyl–DNA adducts and p53 mutations in bladder cancer. *International Journal of Cancer*, **75**:512–516.
- Mattano SS, Land S, King CM, Weber WW (1989) Purification and biochemical characterization of hepatic arylamine *N*-acetyltransferase from rapid and slow acetylators mice: Identity with arylhydroxamic acid *N,O*-acetyltransferase and *N*-hydroxyarylamines *O*-acetyltransferase. *Molecular Pharmacology*, **68**:599–609.
- McQueen CA, Chau B, Erickson RP, Tjalkens RB, Philbert MA (2003) The effects of genetic variation in *N*-acetyltransferases on 4-aminobiphenyl genotoxicity in mouse liver. *Chemico-Biological Interactions*, **146**:51–60.
- Melamed MR, Koss LG, Ricci A, Whitmore WF Jr (1960) Cytohistological observations on developing carcinoma of urinary bladder in man. *Cancer (Philadelphia)*, **13**:67–74.

Melick WF, Escue HM, Naryka JJ, Mezera RA, Wheeler EP (1955) The first reported cases of human bladder tumors due to a new carcinogen—Xenylamine. *Journal of Urology (Baltimore)*, **74**:760–766.

Melick WF, Naryka JJ, Kelly RE (1971) Bladder cancer due to exposure to *para*-aminobiphenyl: A 17-year follow-up. *Journal of Urology (Baltimore)*, **106**:220–226.

Merck (1998) *Merck veterinary manual*. Whitehouse Station, NJ, Merck & Co., Inc.

Miller JA, Miller EC (1977) Ultimate chemical carcinogens as reactive mutagenic electrophiles. In: Hiatt HH, Watson JD, Winsten JA, eds. *Origins of human cancer*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 605–627.

Miller JA, Wyatt CS, Miller EC, Hartmann HA (1961) The *N*-hydroxylation of 4-acetylamino-biphenyl by the rat and dog and the strong carcinogenicity of *N*-hydroxy-4-acetylamino-biphenyl in the rat. *Cancer Research*, **21**:1465–1473.

Oda Y (2004) Analysis of the involvement of human *N*-acetyltransferase 1 in the genotoxic activation of bladder carcinogenic arylamines using a SOS/umu assay system. *Mutation Research*, **554**:399–406.

Oscarson M, Ingelman-Sundberg M, Daly AK, Nebert DW (n.d.) *Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee* (<http://www.cypalleles.ki.se/>).

Parsons BL, Culp SJ, Manjanatha MG, Heflich RH (2002) Occurrence of H-*ras* codon 61 CAA to AAA mutation during mouse liver tumor progression. *Carcinogenesis*, **23**:943–948.

Parsons BL, Beland FA, Von Tungeln LS, DeLongchamp RR, Fu P, Heflich RH (2005) Levels of 4-aminobiphenyl-induced somatic H-*ras* mutation in mouse liver correlate with potential for liver tumor development. *Molecular Carcinogenesis*, **42**:193–201.

Pauli BU, Alroy J, Weinstein RS (1983) The ultrastructure and pathobiology of urinary bladder cancer. In: Bryan GT, Cohen SM, eds. *The pathology of bladder cancer, Vol. II*. Boca Raton, FL, CRC Press, pp. 41–140.

Poirier MC, Beland FA (1992) DNA adduct measurements and tumor incidence during chronic carcinogen exposure in animal models: Implications for DNA adduct-based human cancer risk assessment. *Chemical Research in Toxicology*, **5**:749–755.

Poirier MC, Fullerton NF, Smith BA, Beland FA (1995) DNA adduct formation and tumorigenesis in mice during the chronic administration of 4-aminobiphenyl at multiple dose levels. *Carcinogenesis*, **16**:2917–2921.

Presti JCJ, Reuter VE, Galan T, Fair WR, Cordon-Cardo C (1991) Molecular genetic alterations in superficial and locally advanced human bladder cancer. *Cancer Research*, **51**:5405–5409.

Primdahl H, von der Maase H, Christensen M, Wolf H, Orntoft TF (2000) Allelic deletions of cell growth regulators during progression of bladder cancer. *Cancer Research*, **60**:6623–6629.

Reznikoff CA, Loretz LJ, Johnson MD, Swaminathan S (1986) Quantitative assessments of the cytotoxicity of bladder carcinogens towards cultured normal human uroepithelial cells. *Carcinogenesis*, **7**:1625–1632.

Roberts DW, Benson RW, Groopman JD, Flammang TJ, Nagle WA, Moss AJ, Kadlubar FF (1988) Immunochemical quantitation of DNA adducts derived from the human bladder carcinogen 4-aminobiphenyl. *Cancer Research*, **48**:6336–6342.

Sachse C, Bhambra U, Smith G, Lightfoot TJ, Barrett JH, Scollay J, Garner RC, Boobis AR, Wolf CR, Gooderham NJ, Colorectal Cancer Study Group (2003) Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (*CYP1A2*) in colorectal cancer patients and controls: Allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **55**:68–76.

Sarkar MA, Nseyo UO, Zhong B-Z (2002) Mutagenic outcome of the urinary carcinogen 4-aminobiphenyl is increased in acidic pH. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **11**:23–26.

Schieferstein GJ, Littlefield NA, Gaylor DW, Sheldon WG, Burgers GT (1985) Carcinogenesis of 4-aminobiphenyl in BALB/cStCrIFC3Hf/Nctr mice. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, **21**:865–873.

Schroeder JC, Conway K, Li Y, Mistry K, Bell DA, Taylor JA (2003) *p53* mutations in bladder cancer: Evidence for exogenous versus endogenous risk factors. *Cancer Research*, **63**:7530–7538.

Sesardic D, Boobis AR, Edwards RJ, Davies DS (1988) A form of cytochrome P450 in man, orthologous to form *d* in the rat, catalyses the *O*-deethylation of phenacetin and is inducible by cigarette smoking. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **26**:363–372.

Skipper PL, Tannenbaum SR, Ross RK, Yu MC (2003) Nonsmoking-related arylamine exposure and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, **12**:503–507.

Smith BJ, Curtis JF, Eling TE (1991) Bioactivation of xenobiotics by prostaglandin H synthase. *Chemico-Biological Interactions*, **79**:245–264.

Sonich-Mullin C, Fielder R, Wiltse J, Baetcke K, Dempsey J, Fenner-Crisp P, Grant D, Hartley M, Knaap A, Krose D, Mangelsdorf I, Meek E, Rice JM, Younes M (2001) IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **34**:146–152.

- Swaminathan S, Reznikoff CA (1992) Metabolism and nucleic acid binding of *N*-hydroxy-4-acetylamino-biphenyl and *N*-acetoxy-4-acetylamino-biphenyl by cultured human uroepithelial cells. *Cancer Research*, **52**:3286–3294.
- Talaska G, Dooley KL, Kadlubar FF (1990) Detection and characterization of carcinogen–DNA adducts in exfoliated urothelial cells from 4-aminobiphenyl-treated dogs by ³²P- postlabelling and subsequent thin-layer and high-pressure liquid chromatography. *Carcinogenesis*, **11**:639–646.
- Tiguert R, Bianco FJJ, Oskanian P, Li Y, Grignon DJ, Wood DPJ, Pontes JE, Sarkar FH (2001) Structural alteration of p53 protein in patients with muscle invasive bladder transitional cell carcinoma. *Journal of Urology*, **166**:2155–2160.
- Tsuneoka Y, Dalton TP, Miller ML, Clay CD, Shertzer HG, Talaska G, Medvedovic M, Nebert DW (2003) 4-Aminobiphenyl-induced liver and urinary bladder DNA adduct formation in Cyp1a2(1/1) and Cyp1a2(+/+) mice. *Journal of the National Cancer Institute*, **95**:1227–1237.
- Underwood PM, Zhou Q, Jaeger M, Reilman R, Pinney S, Warshawsky D, Talaska G (1997) Chronic, topical administration of 4-aminobiphenyl induces tissue-specific DNA adducts in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **144**:325–331.
- Verghis SBM, Essigmann JM, Kadlubar FF, Morningstar ML, Lasko DD (1997) Specificity of mutagenesis by 4-aminobiphenyl: Mutations at G residues in bacteriophage M13 DNA and G → C transversions at a unique dG^{8-ABP} lesion in single-stranded DNA. *Carcinogenesis*, **18**:2403–2414.
- Vineis P, Caporaso N, Tannenbaum SR, Skipper PL, Glogowski J, Bartsch H, Coda M, Talaska G, Kadlubar FF (1990) Acetylation phenotype, carcinogen–hemoglobin adducts, and cigarette smoking. *Cancer Research*, **50**:3002–3004.
- Von Tungeln LS, Bucci TJ, Hart RW, Kadlubar FF, Fu PP (1996) Inhibitory effect of caloric restriction on tumorigenicity induced by 4-aminobiphenyl and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridine (PhIP) in the CD1 newborn mouse bioassay. *Cancer Letters*, **104**:133–136.
- Vousden KH, Lu X (2002) Live or let die: The cell's response to p53. *Nature Reviews. Cancer*, **2**:594–604.
- Walpole AL, Williams MHC, Roberts DC (1952) The carcinogenic action of 4-aminodiphenyl and 3,2-dimethyl-4-aminodiphenyl. *British Journal of Industrial Medicine*, **9**:255–263.
- Walpole AL, Williams MHC, Roberts DC (1954) Tumours of the urinary bladder in dogs after ingestion of 4-aminodiphenyl. *British Journal of Industrial Medicine*, **11**:105–109.

Weston A, Caporaso NE, Taghizadeh K, Hoover RN, Tannenbaum SR, Skipper PL, Resau JH, Trump BF, Harris CC (1991) Measurement of 4-aminobiphenyl–hemoglobin adducts in lung cancer cases and controls. *Cancer Research*, **51**:5219–5223.

Wright C, Thomas D, Mellon K, Neal DE, Horne CH (1995) Expression of retinoblastoma gene product and p53 protein in bladder carcinoma: Correlation with Ki67 index. *British Journal of Urology*, **75**:173–179.

Wu XR, Lin JH, Walz T, Haner M, Yu J, Aebi U, Sun TT (1994) Mammalian uroplakins. A group of highly conserved urothelial differentiation-related membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **269**:13716–13724.

ホルムアルデヒド及びグルタルアルデヒドの鼻腔内細胞毒性： 発がん MOA のヒトへの関連性を解析するための IPCS フレームワークを用いた事例研究¹

Douglas McGregor, Hermann Bolt, Vincent Cogliano, & Hans-Bernhard Richter-Reichhelm

ホルムアルデヒド及びグルタルアルデヒドは、吸入によりラット及びマウスの鼻腔上皮に毒性を示す。また、一定濃度以上のホルムアルデヒドはラットとマウスの鼻腔腫瘍を用量依存的に増加させるが、グルタルアルデヒドにそのような作用はない。発がん MOA 解析のための 2006 年国際化学物質安全性計画（International Programme on Chemical Safety: IPCS）のヒトフレームワークを用いて、ホルムアルデヒドの MOA を策定し、非発がん性のグルタルアルデヒドの特性との関連性について検討した。これらの化合物は、病理組織学的検査及び遺伝毒性試験において同様の反応パターンを示した（ホルムアルデヒドの方が広範囲に研究されているものの）。MOA は、持続的な細胞毒性と再生細胞増殖の誘発に基づいており、長期ばく露によりホルムアルデヒドが鼻腔内腫瘍を誘発する濃度で生じるというものである。key events の用量依存性と時間的關係に関するデータは、この MOA と一致している。少なくとも *in vitro* 評価で遺伝毒性が明らかな化合物については、遺伝毒性 MOA を除外することはできない。しかし、提示されている MOA の基本となる非遺伝毒性は、鼻の腫瘍性病変を説明することができ、リスク評価において遺伝毒性よりも有益な情報を提供するかもしれない。グルタルアルデヒドを吸入しても発がん性を示さない理由はまだ完全には解明されていないが、固有の毒性が重要な要因である可能性がある。グルタルアルデヒドの二つのアルデヒド官能基は、ホルムアルデヒドに比べて、（特に分化制御に関与するタンパク質の場合）運動性の低下や、（核酸の）修復機能の低下へとつながる損傷を引き起こす可能性が高い。グルタルアルデヒドに関連した発がん性に関する研究はほとんどない。一方、ホルムアルデヒドがヒトの発がん物質であるというエビデンスは、副鼻腔がんでは少ないが、鼻咽頭がんについては多い。ホルムアルデヒドの吸入ばく露がはるかに少ない副鼻腔の腫瘍を鼻腔腫瘍と区別せず分類していることが一因となり、見かけの不一致を生み出していると考えられる。提示されているげっ歯類におけるホルムアルデヒドの MOA はヒトへの関連性評価については、key events は妥当ではあるが、ヒトのデータが限られているため限定的である。げっ歯類におけるホルムアルデヒドの MOA のヒトへの関連性は、動態的または薬力学的な理由から除外できないことは明らかである。

序文

ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドはそれぞれ脂肪族のモノアルデヒド、ジアルデヒドであり、アルデヒドに典型的な反応を経てアセタール、シアノヒドリン、オキシム、ヒドラゾン、重亜硫酸塩錯体を形成する。これらは反応性の高い化学物質であり、DNA やタンパク質と共有結合で架橋した錯体を生成する。これらの代謝には、アルデヒド脱水素酵素によって酸化されるという共通点がある。いくつかの研究では、ホルムアルデヒドの吸入ばく露はラットに鼻腔腫瘍を引き起こすことが示されているが、グルタルアルデヒドをラットに 2 年間吸入ばく露させた試験では鼻腔腫瘍は観察されなかった。

¹ WHO が著作権を有するこの論文は、*Critical Reviews in Toxicology*, Volume 36, pages 821-835 に 2006 年に掲載されたものである。この論文は、WHO の出版物のために編集されたものであり、コリジェンダが含まれている。

ホルムアルデヒド

ホルムアルデヒドの発がん性試験は、マウス、ラット、シリアンハムスターを対象とした吸入試験、ラットを対象とした経口投与（飲料水）試験、マウスを対象とした皮膚貼付試験、ラットを対象とした皮下投与試験が行われている。ラットではホルムアルデヒドが発がん物質であるという決定的なエビデンスは吸入試験の結果から得られている。

ホルムアルデヒドへの長期吸入ばく露は、ラットの前方及び後方の側鼻道腫瘍の発生率を、非線形性用量相関的に増加させるというエビデンスがある（Morgan ら、1986；Feron ら、1988 年；Woutersen ら、1989 年；Monticello ら、1996 年；Kamata ら、1997 年；CIIT、1999 年）。ホルムアルデヒド濃度が 7.2 mg/m³ 以上になると、腫瘍発生率が急激に増加する。2.4 mg/m³ 以下の濃度ではばく露しても、悪性の鼻腔腫瘍は誘発されなかった。表 1 は、同じ研究室で実施された 2 つのラットの試験データ（Kerns ら、1983 年 a；Monticello ら、1996 年）と、これらの研究のうちの 1 つで、公表時には調査されていなかった数匹のラットについての追加情報を組み合わせたものである（Schlosser ら、2003 年）。ホルムアルデヒド誘発性腫瘍の多くは扁平上皮がんであった。

表 1. ホルムアルデヒドにばく露されたラットにおける鼻腔扁平上皮がんの複合発生率

ホルムアルデヒド濃度 (mg/m ³)	リスクを抱えるラットの数 ^a	実際の腫瘍数 ^b
0	122	0
0.84	27	0
2.4	126	0
7.2	113	3
12	34	22
18	182	157

注：Schlosser ら（2003）からの引用

^a リスクを抱えるラットとは、2 年まで生存し、その時点で検査を受けたラットと、腫瘍が見つかった 2 年以内に死亡したラットのことである。

^b 2 年以内に腫瘍が認められたラット

対照的に、シリアンハムスターを対象とした吸入試験では、12.3 mg/m³ の単回投与で発がん性を示さなかった（Dalbey、1982 年）。マウスを用いた 2 つの吸入試験のうち 1 つは、17.6 mg/m³ の高用量濃度で雌には変化がなく、2 年の時点ですべて殺した雄 17 匹のうち 2 匹には扁平上皮がんが認められた（Kerns ら、1983 年 a、1983 年 b）。もう 1 つの試験は評価が不十分であった（Horton ら、1963 年）。

ラットを対象とした他のばく露経路を用いた試験では、4 つの飲水投与試験のうち 2 つの試験（Takahashi ら、1986 年；Tobe ら、1989 年）では有意な結果は得られなかった。もう 1 つの試験（Til ら、1989 年）では前胃乳頭腫、さらにもう一つの試験（Soffritti ら、1989 年）では白血病及び消化管腫瘍を認めた。しかし、最後に挙げた試験の解釈は疑問視されている（Feron ら、1990）。マウスの皮膚貼付試験及び皮下投与試験は評価に適さなかった。げっ歯類を対象とした研究では、ラットを対象とした 5 つの吸入ばく露試験以外に、鼻腔内腫瘍の有意な増加が認められた研究はなかった。

グルタルアルデヒド

グルタルアルデヒドの発がん性については、マウス及びラットでは吸入試験、ラットでは経口投与（飲水投与）試験が行われている。吸入試験では、B6C3F1 マウスに 400 µg/m³ の単濃度で 78 週間ばく露させた場合（Zissu ら、1998 年）、または 1000 µg/m³ までの複数濃度で 2 年間ばく露させた場合（NTP、1999 年）、または F344 ラットに 3000 µg/m³ までの濃度で 2 年間ばく露させた場合（NTP、1999 年）のいずれにおいても発がん性は認められなかった。雌雄の F344 ラットを最大 4000 mg/m³ のグルタルアルデヒド濃度で 2 年間ばく露した飲水試験では、すべてのばく露濃度で雌の脾臓に大顆粒リンパ球性白血病の発生率増加が認められた（Ballantyne、1995；Van Miller ら、1995 年）。

1. 動物における作用機序(MOA)を立証するのにエビデンスの重み付けは十分か

A. 推定される MOA

一定濃度以上のホルムアルデヒドを長時間ばく露させると、持続的な細胞毒性と細胞増殖が誘発される。この増殖細胞塊内における遺伝的変化の結果、腫瘍が発生する。このような遺伝的変化は、ホルムアルデヒドによって明らかに誘導される細胞毒性、化生、過形成の二次的なものであると推測されている。ホルムアルデヒドは *in vitro* では遺伝毒性物質であり、DNA-タンパク質架橋（DPX）を形成する。DPX はホルムアルデヒドばく露の指標として確立されているが、それらが腫瘍発生に必要な突然変異前病変（DNA 複製エラーを起こし、突然変異をもたらす）であるかは明らかではない。ラットで DPX が豊富であることを除けば、ホルムアルデヒドが生体内で哺乳類の細胞に変異原性を示すというエビデンスはほとんどない。

この MOA は、主に 3 つの key events（持続的な細胞増殖、DPX、腫瘍）すべてについて一貫した非線形の用量反応関係が観察されたこと及び鼻腔全体でこれらの影響の発生率が一致していることに基づいて推測される。

B Key events

ホルムアルデヒド

ホルムアルデヒドばく露後の障害が侵入口に限定されることは明らかに重要であり、その過程では代謝が重要な役割を果たしている。ホルムアルデヒド誘発性鼻腔腫瘍における侵入口の重要性は、ホルムアルデヒド溶液を経口ばく露させたラットにおいて、主要な非腫瘍性の影響が前胃及び腺胃の組織学的変化の進展であったことから裏付けられる（Til ら、1989 年；Tobe ら、1989 年）。

ホルムアルデヒドは、細胞内の *N*-、*O*-及び *S*-脱メチル化反応の内因性代謝産物であり（Hardman ら、2001 年）、ばく露を受けていない哺乳類の正常な血中濃度は約 2.0~2.6 µg/g である（Heck ら、1982 年、1985 年；Casanova ら、1988 年）。外因性ホルムアルデヒドは吸収されると急速に解毒される。ホルムアルデヒドを静脈内投与されたラットにおける血漿中の半減期は約 1 分で（Rietbrock、1965 年）、還元されたグルタチオンと容易かつ自然に結合する。そして、アルコール脱水素酵素 3（ADH3、グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素としても知られている）の基質である *S*-ヒドロキシメチルグルタチオンを形成し、*S*-ホルミルグルタチオンを産生する（Uotila & Koivusalo、1974 年；Koivusalo ら、1989 年）。

これは S-ホルミルグルタチオンヒドロラーゼ (Uotila & Koivusalo, 1997 年) によってさらにギ酸に代謝され、グルタチオンを減少させる。ADH3 とヒドロキシ-メチルグルタチオンの初期結合のための K_M 値は約 0.004 mmol/L であり、遊離ホルムアルデヒドの濃度はさらに低い可能性が高い (Uotila & Koivusalo, 1997 年 ; Hedberg ら, 1998 年)。また、ホルムアルデヒドがシステイン及びシステニルグリシンのようなチオール類と結合することは、毒性学的に重要であるかもしれない (Holmquist & Vallee, 1991 年)。この効率的な解毒代謝メカニズムに加えて、絨毛粘膜はガスや蒸気から下層の上皮を保護する。したがって、標的組織において細胞毒性が発生する遊離ホルムアルデヒドを高濃度で得るためには、これらの保護機構を克服することが必要であり、比較的高濃度のホルムアルデヒド蒸気を標的部位に到達させる必要がある。発がん性にとって明確で意義のある機序的な事象は、ラットにおけるホルムアルデヒドの解毒機構が飽和している用量で発現することである (Casanova & Heck, 1987 年)。

ホルムアルデヒド吸入ばく露後に測定された鼻のがん形成と関連している主な非腫瘍性及び前腫瘍性徴候には、細胞毒性、DPX 形成、鼻腔上皮細胞の再生性増殖、扁平上皮化生及び炎症が含まれる。これらは部位特異的で高度に非線形な反応過程であり、鼻腔がんの発生率と一致している。

相対的な細胞増殖の亢進の程度は、鼻腔内の特定領域内の標的細胞集団の大きさに依存し、ばく露期間または累積ばく露の総量と常に相関するわけではない (Swenberg ら, 1983 年、1986 年 ; Monticello ら, 1991 年、1996 年 ; Monticello & Morgan, 1994 年)。これらの因子は、ラット、サル及びヒト上皮細胞を対象とした多くの研究で明らかにされ、測定されている。3、6、12 及び 18 ヶ月の途中計画殺を伴う 24 ヶ月の発がん性試験では、7.2、12 及び 18 mg/m³ の濃度でばく露されたラットはすべての時点で細胞増殖活性が実証された (Monticello ら, 1991、1996 年)。

免疫組織化学的手法を用いて、同一腫瘍の病理組織切片中の細胞増殖マーカーである p53 タンパク質 (増殖細胞核抗原、または PCNA) 及び腫瘍成長因子 (TGF) を評価した。正常な鼻粘膜は陰性であったが、扁平上皮がんでは p53 陽性となり、特に前腫瘍性病変である角化亢進性プラーク内において角化した細胞での p53 陽性が観察された。PCNA の免疫染色の分布と p53 の免疫染色の分布との間に相関関係が認められた (Wolf ら, 1995 年)。

ラットにおける DPX の形成は、濃度の非線形関数であり (Casanova & Heck, 1987 年 ; Casanova ら, 1989 年、1994 年 ; Heck & Casanova, 1995 年)、腫瘍の部位特異性と一致している (Casanova ら, 1994 年)。架橋はラットの嗅粘膜または骨髄では検出されなかった (Casanova-Schmitz ら, 1984 年 ; Casanova & Heck, 1987 年)。DPX はホルムアルデヒド吸入ばく露後のアカゲザルで認められており、その濃度が最も高い部位は中鼻甲介で、次いで前側壁中隔及び鼻咽頭であった (Casanova ら, 1991 年)。

ラット、マウス、シリアンハムスター及びアカゲザルにホルムアルデヒドを 13 週間（マウス）または 26 週間ばく露した研究において、ラット及びアカゲザルでは鼻尖部の扁平上皮化生が 3.7 mg/m^3 で発現したが、シリアンハムスター及びマウスでは 4.9 mg/m^3 でも発現しなかった（Rusch ら、1983 年；Maronpot ら、1986 年）。細胞の複製は、ラット鼻腔上皮のうち腫瘍感受性がより高い領域の特徴でもある（Casanova ら、1994 年）。

グルタルアルデヒド

$400 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ の濃度でグルタルアルデヒドを 78 週間吸入ばく露させた結果、雌マウスの鼻前庭に非腫瘍性の病変が生じた。その病変は、背側壁を覆う扁平上皮の過形成及びアトリオタービネート（atrioturbinate）の側方面の過形成である（Zissu ら、1998 年）。

グルタルアルデヒドの米国国家毒性プログラム（NTP）の研究では、雌雄ラットにおいて以下のような鼻の変化が認められた。

1. 鼻腔の最も吻側にある扁平上皮、外鼻腔の後ろにある扁平上皮では、過形成と炎症の発生率が増加していた。過形成は、細胞層数の増加による上皮の不均一な肥厚と、より重篤な症例では、様々な程度のケラチンの蓄積を特徴とする変化であった。
2. 呼吸上皮では、過形成、軽微な杯細胞過形成（主に鼻中隔及び腹側中隔に沿って）、炎症及び扁平上皮化生が認められ、重度の症例では上皮表面にケラチンが蓄積していた。
3. 背側中膜の嗅覚上皮では、硝子変性がわずかに認められた。

扁平上皮及び呼吸上皮で観察されたグルタルアルデヒド関連の炎症は、好中球、リンパ球及び形質細胞の多巣性から広範な浸潤にわたる様々な程度の変化があった。時折、固有層内に数個のマクロファージが存在し、重度の場合には上皮にも存在していた。この研究では雌雄のマウスにおいて、病変の質はラットと類似していたが、雌の方が雄よりも重症度は高かった。

グルタルアルデヒドは、TK6 ヒトリンパ芽細胞株において DPX を誘発した（St. Clair ら、1991 年）。in vivo では、グルタルアルデヒドは、吸入（Gross ら、1994 年）及び鼻腔内投与（St. Clair ら、1990 年）によってばく露されたラット及びマウスの鼻腔内細胞において細胞増殖（S 期）を誘導した。同じ著者による並行して実施された鼻腔内投与試験において、ホルムアルデヒドでは、20 倍高いモル濃度で同様の細胞増殖を誘発した。

C. 用量反応関係

ホルムアルデヒド

ホルムアルデヒドをばく露したラットから得られたデータによると、key events の用量反応パターンは非線形であり、 2.4 mg/m^3 では反応を認めず、 7.2 mg/m^3 では最小の反応を認め、12 及び 18 mg/m^3 では急激に反応が増加している。

ホルムアルデヒドにばく露されたラットでは、 2.4 mg/m^3 以下の濃度に亜慢性または慢性的にばく露した後の鼻粘膜で、細胞の再生及び DNA 合成の増加は認められなかった (Rusch ら、1983 年; Zwart ら、1988 年; Monticello ら、1991 年; Casanova ら、1994 年)。Wistar ラットでは細胞の再生速度の部位特異的な軽度の増加が 3.7 mg/m^3 (6 時間/日、5 日/週、13 週間) で認められた (Zwart ら、1988 年)。同様の期間ばく露した Fischer 344 ラットでは DNA 合成速度の増加が 7.2 mg/m^3 で認められた (Casanova ら、1994 年)。しかしながら、これらの濃度では、6 週間後 (Monticello ら、1991 年) または 13 週間後 (Zwart ら、1988 年) の細胞再生率がばく露 1~4 日後よりも低いため、ラットの鼻腔上皮では適応反応が起こると思われる。単位長ラベリング指数 (ULLI) 法を用いて、0、0.84、2.4、7.2、12、または 18 mg/m^3 のホルムアルデヒド濃度に 6 時間/日、5 日/週、3、6、12、18、または 24 ヶ月間ばく露した雄の Fischer 344 ラットにおける増殖を測定した。ULLI の有意な上昇は 12 及び 18 mg/m^3 群でのみ認められ、前側側鼻道及び内側上顎鼻甲介での上昇が大きかった。前背側中隔における ULLI の上昇は、ばく露後しばらくしてから発現した。この遅発性の ULLI 上昇は、鼻腔腫瘍の影響を受けやすい部分における、病変の成長と空隙の歪みに関連する局所的なホルムアルデヒド濃度の変化でおこる気流変化による二次的なものと考えられた (Monticello ら、1996 年)。

ホルムアルデヒド誘発性 DPX 形成、上皮細胞増殖及びその後の鼻腔腫瘍の非線形関係を表 2 に示す。Casanova ら (1994 年) が提示した高腫瘍領域と低腫瘍領域の指定は最適なものではなく、真に腫瘍発生率の高い領域の DPX 反応は、中間的な腫瘍発生率 (後方側鼻道) 領域の DPX 反応によって希釈されている可能性がある。

他の研究では、 1.2 mg/m^3 (1 日 22 時間、7 日/週、26 週間) にばく露した Fischer 344 ラットでは、検出可能な鼻腔病変は認められなかったが、 3.6 mg/m^3 において組織学的変化は鼻甲介の扁平上皮化生のみであった (Rusch ら、1983 年)。同様に 2.4 mg/m^3 (6 時間/日、5 日/週、24 ヶ月間) にばく露した Fischer 344 ラットの鼻甲介においても、軽度な扁平上皮化生の発生が示された (Kerns ら、1983 年 b)。これらのラットでは上皮異形成及び鼻炎も観察された。扁平上皮化生の発生は、報告されている生体内反応の中で最も低濃度のホルムアルデヒドで発生する組織学的所見だと思われる。

ラットにおいて正確に計算された解剖学的流体力学モデルを用いて、ホルムアルデヒドによって誘発される扁平上皮化生の分布が、扁平上皮の後方にある高流量領域に関係しているかどうかを検証した。50%以上が扁平上皮に置き換わっている場合、扁平上皮化生が生じているとみなされた。 2.4 mg/m^3 以下でばく露されたラットの鼻には扁平上皮化生は認められなかった。 7.2 mg/m^3 以上のばく露では側鼻道に、12 または 18 mg/m^3 のばく露では気道の側壁及び内側壁に扁平上皮化生がみられた (Kimbrell ら、1997 年)。

4.8 mg/m^3 以上の吸入ばく露では、ラットで鼻組織内のホルムアルデヒドのグルタチオン介在性の解毒が飽和状態に達するというエビデンスがある。ホルムアルデヒド代謝の飽和は、この濃度以上のばく露における DPX、細胞増殖及び腫瘍発生率の用量反応関係の非線形性に寄与する可能性がある (Casanova & Heck、1987 年)。

表 2. ホルムアルデヒドばく露の影響の比較：細胞増殖、DNA-タンパク質架橋及び腫瘍発生率

ホルムアルデヒド 濃度 (mg/m ³)	細胞増殖 (³ H)チミジン標識細胞/mm 基底膜) ^a			DNA-タンパク質 架橋形成 (pmol [¹⁴ C]-ホルムアル デヒド結合/mg DNA) ^b		鼻腔がんの発生率 ^c			
	前側 鼻道	後側 鼻道	前中隔	高腫瘍 領域	低腫瘍 領域	全体	前側 鼻道	後側 鼻道	前中隔
0	10.11	7.69	6.58	0	0	0/90	0/90	0/90	0/90
0.84	10.53	7.82	8.04	5	5	0/90	0/90	0/90	0/90
2.4	9.83	11.24	12.74	8	8	0/96	0/96	0/96	0/96
7.2	15.68	9.96	4.15	30	10	1/90	1/90	0/90	0/90
12	76.79	15.29	30.01	—	—	20/90	12/90	2/90	0/90
18	93.22	59.52	75.71	150	60	69/147	17/147	9/147	8/147

a 指定された濃度のホルムアルデヒドに 6 時間/日、週 5 日/日、3 ヶ月間ばく露した雄の F344 ラットの鼻腔上皮の 3 箇所測定した細胞増殖 (Monticello ら、1996 年)。

b 指定された濃度のホルムアルデヒドに 6 時間/日、5 日/週、約 12 週間ばく露した雄の F344 ラットの鼻腔（呼吸器粘膜）の 2 つの領域で測定した DNA-タンパク質架橋形成の程度。腫瘍低発生領域は、鼻腔及び側鼻道の内側壁、後側壁、嗅覚領域を除く後背側鼻道及び鼻中隔からなる (Casanova ら、1994 年)。データは引用文献中のグラフに基づいている。

c 指定された濃度のホルムアルデヒドに 1 日 6 時間、1 日 5 日/週、24 ヶ月間ばく露した雄性 F344 ラットにおける鼻腔全体または鼻腔内の鼻腔腫瘍の発生率、または前側鼻道、後側鼻道、または前中隔の発生率 (Monticello ら、1996 年)。

グルタルアルデヒド

グルタルアルデヒドにばく露したラット及びマウスを用いた一連の反復投与試験が NICNAS (1994 年) にまとめられている。その中で、ラットの鼻腔に病変を生じる最も低い濃度は 1000 µg/m³ (6 時間/日、5 日/週、13 週間) であった (NTP、1993 年)。最も重篤な病変は鼻腔前部に発生し、呼吸上皮と嗅上皮の両方を障害した。過形成及び扁平上皮化生は、鼻腔の側壁及び鼻尖部に最もよく認められた。病変は 4000 µg/m³ にばく露されたラットで最も広範囲に認められたが、1000 及び 2000 µg/m³ 群でも認められ、500 µg/m³ 群の雄 1 匹でも認められた。ラットを用いた別の研究では、最大 776 µg/m³ の濃度で 14 週間投与しても鼻の病変は観察されなかった (Bushy Run、1983 年)。

マウスはグルタルアルデヒド吸入による感受性が高いようであり、13 週間の試験で雌マウスでは最低濃度の 250 µg/m³ で、雄マウスでは 1000 µg/m³ でも鼻腔の炎症が観察された。このような感受性の違いは、マウスのほうが気道が狭いためゴミなどで閉塞しやすいためと考えられる (NTP、1993 年)。呼吸器の病理組織学的病変は 4000 µg/m³ 群のマウスで最も重篤であり、喉頭上皮の扁平上皮の軽度から中程度の扁平上皮化生、鼻腔前部の膿瘍性炎症がみられた。

鼻尖部の扁平上皮化生は軽度であった。壊死と炎症は低濃度で、主に鼻腔前部で認められた。

グルタルアルデヒドを用いた NTP (1993 年) の 13 週間の試験では、鼻前庭の扁平上皮と、それよりも軽度ではあるが、背側鼻道のアトリオタービネートの呼吸器上皮において、ばく露に関連した ULLI の有意な増加が認められた。ばく露に関連した細胞増殖活性は、一般的にマウスよりもラットの方が高かった。個々のマウスを調べたところ、鼻前庭の扁平上皮では、粘膜に好中球浸潤が認められたマウスでのみ細胞増殖率の増加が認められた。ただし、細胞増殖の程度と浸潤の重症度は相関していなかった。これらの観察は、特に雌マウスでは 13 週目に最も明らかになった。ラットでは、前庭の扁平上皮の増殖増加に加えて、背側のアトリオタービネートの呼吸器上皮でも同様に顕著な増殖増加がみられたが、マウスではこの領域での反応は弱かった。

D. 時間的関連性

ホルムアルデヒド

ラットの呼吸器上皮内の細胞増殖に対するホルムアルデヒドばく露の影響について、短期、中期、長期の研究では、ばく露期間にかかわらず、 2.4 mg/m^3 以上の濃度にばく露した後、鼻腔上皮細胞の増殖が持続的に増加することが示されている。ホルムアルデヒドにばく露したラットでは、3 日間という短い期間から細胞増殖が観察された。すでに述べた ULLI 研究では、一般的に細胞増殖の増加率は時間の経過とともに減少したが、この影響は、特定の鼻腔部位では対照群の約 2～10 倍の増加を示し、最長で 18 ヶ月間の観察期間を含めて試験終了まで持続していた (Monticello ら、1996 年)。

ほとんどのホルムアルデヒド吸入による DPX 形成の研究は短期間 (すなわち、ばく露期間が 1 日まで) であるため、DPX の時間的関連性に関するデータは乏しい。ホルムアルデヒド誘発性 DPX は、ラットとアカゲザルの鼻腔上皮における研究で一貫して示された (Casanova ら、1991 年)。しかし、ホルムアルデヒドに約 12 週間ばく露したラットの急性及び累積 DPX 収量を調べる研究 (Casanova ら、1994 年) において、 7.2 mg/m^3 以上の濃度では、事前にばく露されたラットの側鼻道 (腫瘍発生率の高い部位) の急性 DPX 収量は、対照群の約半分であったが、内側及び後側の鼻道 (腫瘍発生率の低い部位) では差が見られなかった。事前にばく露されたラットでは、DPX の有意な蓄積は認められなかった。

ホルムアルデヒド誘発細胞毒性後の再生性細胞増殖は、DNA 複製数を増加させる。その結果、DPX が誘発する DNA 複製エラーを増加させ、突然変異を引き起こす。この仮説は、高濃度におけるラットの鼻での DNA 複製の阻害 (Heck & Casanova、1995 年) 及び前腫瘍病変における p53 発現の増加 (Wolf ら、1995 年) によって支持される。

18 mg/m³に最大2年間ばく露して誘発されたラットの扁平上皮がんの11例中5例では、p53 相補的 DNA (cDNA) 配列の GC 塩基対に点突然変異が認められた (Recio ら、1992 年)。

グルタルアルデヒド

ラット及びマウスの13週間のグルタルアルデヒド吸入試験 (NTP、1993 年) における細胞増殖の研究では、マウスで得られた結果とは対照的に、ラットの鼻前庭における細胞増殖の増加 (ULLI) は、早い時期 (数日以内) に発生し、試験期間中は上昇したままであるか、またはわずかに減少した。マウスの鼻前庭における ULLI の増加は時間の経過とともに増加する傾向があった。マウスを用いた吸入試験 (Zissu ら、1994 年) では、1.2 mg/m³に4日間ばく露した後、鼻中隔の呼吸上皮及び鼻及び顎甲介に最初の病変が観察された。4.0 mg/m³ばく露終了2週間後にも重篤な病理組織学的変化が認められた。気管及び肺ではばく露に関連した組織学的異常は認められなかった。

E. 腫瘍発生と key events との関連性の強さ、一貫性及び特異性

ホルムアルデヒド

ホルムアルデヒド誘発性腫瘍に関する広範な研究がある。入手可能なデータを見る限り、ラットやサル、ラットやヒトの様々な動物種や、ラットやヒトの様々な細胞の *in vitro* で明らかになっている。同程度のばく露量では、DPX の濃度はラットよりもアカゲザルの方が約一桁低いことが明らかになった。ホルムアルデヒドへの組織ばく露後のヒト上皮細胞増殖の亢進が、ヒトの気管支上皮細胞を移植したラット気管を胸腺欠損マウスに異種移植したモデル系で報告された。

key events と局所的な腫瘍発生率及び腫瘍発生部位との間には相関関係がある。腫瘍が観察されている鼻腔領域では、細胞増殖、化生及び DPX の増加が認められた。DPX、細胞毒性、細胞増殖、化生、腫瘍についての非線形用量反応関係は一貫しており、ある試験では 2.4 mg/m³ で化生の有意な増加が認められ、4.8 mg/m³ 以上の濃度では全てのエンドポイントが観察された。これはまた、粘膜クリアランスが抑制され、グルタチオンを介した代謝が飽和する濃度、すなわち 4.8 mg/m³ と密接な相関関係を示している。Morgan ら (1986 年) による雄ラットの鼻粘膜に対する吸入ホルムアルデヒドの影響を検討した研究では、2.4 mg/m³、7.2 mg/m³、18 mg/m³ の濃度で1日、9日及び14日間ばく露後、18時間の回復期間を設けた群が含まれていた。粘膜クリアランスの阻害は、ばく露時間が長くなるにつれて徐々に範囲が広がったが、ばく露停止18時間後の回復はほとんど、あるいは全く認められなかった。

ある濃度のホルムアルデヒドにばく露後発生する鼻腔腫瘍において、マウスはラットよりも感受性が低いようである。しかしながら、マウスでは有害化学物質の吸入に反応して換気量/分が減少することがよく知られている (Brown ら、1986 年 ; CIIT、1999 年)。

グルタルアルデヒド

ホルムアルデヒドと比較して、グルタルアルデヒドによって誘発された病変は、扁平上皮を含む鼻の前方に位置していた。また、それらの病変は異なる特徴を有しており、ホルムアルデヒドを 13 週間投与した動物にみられる細胞異型及び異形成を伴う局所的な角化亢進及び過形成は認められなかった (Monticello、1990 年 ; Morgan & Monticello、1990 年)。

F. 生物学的妥当性及び整合性

ホルムアルデヒド

長期間にわたる再生性細胞増殖が化学物質による発がんの原因であるという仮説を支持するエビデンスが蓄積され続けている (PCS、2002 年)。吸入ばく露された動物におけるホルムアルデヒド誘発性鼻腔腫瘍に対する MOA は、生物学的に妥当性があり、利用可能なデータと一致している。ラットを対象とした短期・中期毒性試験や他種の研究では、鼻腔内の持続的な細胞増殖活性が観察されている。鼻腔内の病理組織学的影響 (上皮細胞の異形成と化生) は、亜慢性及び慢性の動物実験で一貫していた。しかし、ラットの鼻腔腫瘍誘導における DPX、突然変異及び細胞増殖のそれぞれの役割は完全には解明されていないことに留意すべきである。

グルタルアルデヒド

吸入したグルタルアルデヒドの影響は、ホルムアルデヒドほど研究されていない。吸入試験では、グルタルアルデヒドはラットとマウスの鼻腔腫瘍を誘発しなかった。しかし、ホルムアルデヒドの鼻発がん性において key events とみなされる細胞毒性と細胞増殖が、グルタルアルデヒドにばく露されたラットとマウスでも実証されている。このことは、これらの過程がホルムアルデヒドにとって重要であることの妥当性を低下させるように見えるかもしれない。

G. 考えられる代替 MOA

ホルムアルデヒド

変異原性がホルムアルデヒド誘発性腫瘍の発生に関与している可能性がある。利用可能なデータを評価すると、ホルムアルデヒドは *in vitro* では遺伝毒性はあるが、標準的な *in vivo* アッセイでは概して遺伝毒性はないことが示されている。しかし、DPX を産生することを示す研究は数多くある。

ホルムアルデヒドは *in vitro* での遺伝毒性について広く研究されており、細菌や哺乳類細胞を用いた試験 (Ames 試験、遺伝子突然変異) で陽性結果が得られ、DNA の一本鎖切断や DPX の産生を認めた (IARC、2005 年レビュー)。生体内では、ホルムアルデヒドはショウジョウバエで再現性のある突然変異を誘発したが、げっ歯類の骨髓細胞試験では、その遺伝毒性について有力なエビデンスはない。しかし、ホルムアルデヒドのばく露が、ヒトの鼻や頬の細胞や末梢血リンパ球における染色体異常や小核発現頻度の増加と関連しているというわずかなエビデンスはある (IARC、2005 年 ; 付録参照)。

DPX がホルムアルデヒドの突然変異誘発性及び発がん性にどの程度寄与しているかは不明である (Recio, 1997 年 ; Merk & Speit, 1998 年 ; Speit ら, 2000 年 ; Liteplo & Meek, 2003 年)。DPX の存在は主にばく露の指標として考えられてきたが、これらの病変の特徴は前変異原性であり、それゆえに直接的な遺伝毒性メカニズムのエビデンスであるという見方もある。しかし、DPX は形成された細胞にダメージを与える可能性があり、高頻度で発生すると細胞死が起こる可能性が高い。また、本研究では細胞への影響はそれほど深刻ではないものの、タンパク質-タンパク質架橋 (PPX) が起こる可能性があることも示唆されている。もし主要なタンパク質が PPX の形成に関与していれば、分化の制御を含む細胞の制御機構に影響を及ぼす可能性がある。化生領域が出現しているため、このような変化は、ホルムアルデヒドにばく露されたラットの鼻腔上皮で生じている。遺伝毒性の MOA を示す有力なエビデンスがない限り、腫瘍は単に化生の一種と見なすことができる。

Gaylor ら (2004 年) は、J 型濃度曲線を特定するように設計された統計手法を用いて、ラットにおけるホルムアルデヒド誘発性細胞増殖の濃度-反応関係を解析し、異なるデータの解釈を提示した。解析の際、がん発生率に関する定量的なデータが不十分であったため、細胞増殖のデータを使用した。彼らの解析は、鼻腔腫瘍の発生に対する閾値を有する用量反応性が、低用量における軽度の遺伝毒性の結果であり、これにより細胞毒性を有する高用量において J 字型の細胞増殖曲線を呈するという仮説を支持するものである (Lutz, 1998 年)。低用量では、漸増する DNA 損傷は細胞増殖の減少によって打ち消される可能性があるため、明らかな閾値があるにもかかわらず、データは遺伝毒性メカニズムと一致している。

ホルムアルデヒドにばく露されたラットにおいて、*p53* 遺伝子の進化的に保存された領域 II-V の cDNA 配列の GC 塩基対における点突然変異が、原発性鼻腔扁平上皮がん 11 例のうち 5 例で認められた (Recio ら, 1992 年)。この結果は、発がん過程におけるホルムアルデヒドにより誘発された遺伝毒性過程を示すものと解釈される。しかし、出現した腫瘍における特定の突然変異の存在は、それらが腫瘍の初期段階に存在していたエビデンスでも、それらが化学物質によって直接誘導されたことを示すものではない。直接的な突然変異原性を示す可能性はあるが、これらの突然変異は、化学物質によって誘発されたクロマチンタンパク質の機能的変化により間接的に生じた可能性もある。これらの観察された突然変異が腫瘍の発生段階のどの段階で生じたかは推測の域を出ない。これらの突然変異は一般的な事象であることは明らかであるが、すべて同じタイプの腫瘍が発生するわけではないので、本質的な事象ではないこともまた明らかである。これらの突然変異の発生は、遺伝毒性のメカニズムが排除されていないことを示しているが、必ずしも支持するものでもない。

また、遺伝子発現の特異的な変化も生体内で観察されている。その結果、ホルムアルデヒドへのばく露は、異物代謝、細胞周期制御、DNA 合成と修復、がん遺伝子、アポトーシスを含むいくつかの機能に関与する遺伝子の発現レベルに変化をもたらすことが示された (Hester ら, 2003 年)。これらの変化がホルムアルデヒドにどの程度特異的であるか、あるいは発がん性においてどのような役割を果たしているのかは、現時点では明らかになっていない。

グルタルアルデヒド

グルタルアルデヒドは、ホルムアルデヒドに比べて *in vitro* 及び *in vivo* での遺伝毒性に関する試験があまり行われていない。グルタルアルデヒドは、*in vitro* 試験では軽微かつ不規則な陽性所見を示し、*in vivo* 試験の大部分では活性がない。最近、グルタルアルデヒドの遺伝毒性に関するレビューが発表された (Zeiger ら、2005 年)。

グルタルアルデヒドは細菌では DNA 修復系を誘導し、サルモネラ菌や大腸菌では弱い変異原性を示した。不定期 DNA 合成 (UDS)、DPX、二本鎖切断はヒト細胞株で認められたが、ラット初代細胞では認められなかった。哺乳類細胞を用いた染色体異常及び姉妹染色体交換 (SCE) 試験では、軽微かつ一貫性のない反応がみられ、培養シリアンハムスター胚 (SHE) 細胞においてグルタルアルデヒドは形質転換を誘導しなかった。

生体内では、ラット及びマウスの鼻腔内投与後、グルタルアルデヒドは鼻腔内細胞に S 期の DNA 合成を誘導した。グルタルアルデヒドはラット肝臓では DNA 損傷を生じず、ラット精巣 DNA や精子細胞では架橋を生じなかった。ラット及びマウスの骨髄細胞を用いた染色体異常試験では、概ね陰性であった。グルタルアルデヒドは、マウスの骨髄細胞に小核や優性致死性突然変異を誘発しなかった。このように、グルタルアルデヒドは遺伝毒性を有する可能性があり、データベースはホルムアルデヒドほど豊富ではないが、接触部位における遺伝毒性の発生が予想される。したがって、遺伝毒性がホルムアルデヒドの主要な発がん MOA であるとすれば、なぜグルタルアルデヒドが効果を発揮しないのかを説明する必要がある。

H. 不確実性、矛盾、データギャップ

ホルムアルデヒド

ホルムアルデヒドを用いたがんのバイオアッセイのほとんどは、細胞毒性の指標としての増殖反応や DPX などの中間エンドポイントに関するデータが限られている。そのため、中間病変と腫瘍の発生率を直接比較することには制限がある。加えて DPX と突然変異誘発との直接的な関係に関する情報及び DPX が突然変異につながる確率に関する情報が望まれる。一方で、腫瘍の発生に必要な突然変異の生成にはどの再生性細胞増殖が関与しているかを決定する必要がある。

ホルムアルデヒドばく露ヒト細胞における *hprt* 遺伝子突然変異スペクトルの研究により、突然変異の 50%は欠失であり、50%は A : T 塩基対での点突然変異によるものであることが明らかになった (Crosby ら、1988 年 ; Liber ら、1989 年)。ホルムアルデヒド誘発性扁平上皮がんにおいて、ホルムアルデヒド突然変異スペクトルの一部として欠失が認められたことで、*p53* 遺伝子で観察されるホモ塩基対変異の性質を説明できるかもしれない。しかし、変異している塩基対に関しては矛盾がある。ヒト及び哺乳類細胞株では *hprt* 遺伝子の A : T であり、ホルムアルデヒド誘発性扁平上皮がんでは *p53* の G : C であることが明らかになっている (Recio、1997 年)。*in vitro* ではホルムアルデヒドによってこのような突然変異が誘導されるが、このタイプの突然変異はホルムアルデヒドの発がん性の根本ではない可能性がある。

グルタルアルデヒド

グルタルアルデヒドは二官能性アルキル化剤であるためか、ホルムアルデヒドよりも明らかに細胞毒性が強い。経鼻投与試験では、水溶液を鼻粘膜に単回投与した場合、モル比でグルタルアルデヒドはホルムアルデヒドの 10～20 倍の毒性があることが実証されている (St. Clair ら、1990 年)。グルタルアルデヒドの 13 週間吸入試験 (NTP、1993 年) の結果とホルムアルデヒドの同様の吸入試験 (Heck ら、1990 年 ; Monticello ら、1990 年 ; Monticello ら、1991 年) との比較は、この経路でもグルタルアルデヒドはホルムアルデヒドより約 20 倍の毒性があることを示している。肺障害及び壊死は、かなり高い濃度のグルタルアルデヒドで発生する。細胞毒性は、グルタルアルデヒドを吸入した場合には外鼻に近いところで発現するため、主に影響を受ける組織はホルムアルデヒドを吸入した場合と同じではない。唯一の違いが毒性の強さであるならば、グルタルアルデヒドは、低用量でもホルムアルデヒドと同様の影響をもたらすと予想されるため、毒性作用部位における違いは特に重要かもしれない。

I. 推定される MOA の評価

ホルムアルデヒド

重要なエビデンスの観点より、ホルムアルデヒド誘発性鼻腔腫瘍の仮説 MOA は一貫して、key events すべてにおける用量反応関係の一致、データベースの生物学的妥当性と整合性など、いくつかの基準を満たしている。鼻腔内腫瘍誘発におけるホルムアルデヒドの推定される MOA は多くの実験データと一致しているため、この MOA は信頼性が高いと考えられる。

グルタルアルデヒド

細胞毒性、細胞増殖及び DPX 形成の key events (in vitro) は、グルタルアルデヒドへのばく露で実証されている。しかし、グルタルアルデヒドはラットやマウスでは鼻腔内腫瘍を発生させない。したがって、推定されているホルムアルデヒドの MOA を維持するためには、この矛盾を説明する必要がある。この矛盾の理由は特定されていないが、仮説を提示することは可能である。グルタルアルデヒドの二つのアルデヒド官能基は、細胞環境内で高分子のさらなる反応を阻害する重要な因子である。これらの高分子は、生存に関与するタンパク質であり、それらの不動態化は、おそらく分化状態の変化よりも細胞死につながる。このグルタルアルデヒドの高分子を不動態化させる特性が、ホルムアルデヒドよりも高分解能顕微鏡 (例えば電子顕微鏡) 用の優れた固定剤になる理由である。そのことはほぼ確実にジアルデヒドの非常に高い毒性につながっている。また、ホルムアルデヒドのアルデヒド官能基は細胞障害を引き起こすが、細胞の分化に関与するタンパク質は、腫瘍の初期変化となりうる分化方向の変化を伴うものの、その役割を維持することができるかもしれない。一方、これらのアルデヒドが核酸と反応する場合 (グルタルアルデヒドがこのように反応するというエビデンスは実質的なものではない)、ホルムアルデヒドが DNA と相互作用した後にアルキル化されたヌクレオチドの修復が起こるのに対し、グルタルアルデヒドの場合は、困難、あるいは不可能かもしれない。このように、発がん性におけるホルムアルデヒドの作用様式が推定されている通りなのか、それとも遺伝毒性が主な原因なのかにかかわらず、グルタルアルデヒドばく露に対する反応の違いを説明することができる。

2. 実験動物とヒトとの間の key events の根本的、質的な違いに基づいて、MOA のヒトとの関連性を合理的に排除することができるか

A. ホルムアルデヒド

7.2 mg/m³ のホルムアルデヒドに 1~6 週間ばく露したアカゲザルにおいて、ホルムアルデヒドに誘発された病変は、対照群の最大 18 倍を示す細胞増殖率の増加を伴っており、6 週間のばく露後も有意に高い値が続いた。組織学的な病変と細胞増殖の増加は鼻腔で最も広範囲に見られ、下気道では最小限であったが、上顎洞ではホルムアルデヒドばく露に対する反応のエビデンスは認められなかった。病変の程度及び細胞増殖のデータに基づいて、7.2 mg/m³ の用量でのホルムアルデヒドの急性及び亜急性影響に対する感受性はラットよりもアカゲザルの方が高いと考えられた (Monticello ら、1989 年)。アカゲザルの上顎洞における反応がないことは、疫学研究において (あるいは、腫瘍部位の報告において) 特別な注意を払うに値する所見である。副鼻腔がんのほとんどの疫学研究では、鼻に発生した腫瘍と副鼻腔に発生した腫瘍を区別していない。そのため、副鼻腔に発生するがんに対応するリスクがなければ、鼻腔がんのリスクは希釈される傾向にあり、統計的に検出されない可能性がある。

多くの疫学研究では、ホルムアルデヒドばく露と気道がんとの関連が調査されている。最も有力なエビデンスは、鼻咽頭がんを観察されている。工場労働者を対象とした最大規模のコホート研究 (Hauptmann ら、2004 年) では、鼻咽頭がんによる死亡者数の増加が観察されており、最大ばく露量と累積ばく露量についてばく露-反応関係を示している。死体防腐処理業者を対象とした米国最大のコホート研究では、上咽頭がんによる死亡者の増加が死亡率分析で観察されている (Hayes ら、1990 年)。ホルムアルデヒドを製造または使用している企業の労働者を対象としたデンマークの研究では、鼻咽頭がんの症例数の増加が観察された (Hansen & Olsen、1995 年)。他のコホート研究では、予想よりも鼻咽頭がんの症例数は少なかったと報告されている (Walrath & Fraumeni、1983 年 ; Coggon ら、2003 年 ; Pinkerton ら、2004 年)。鼻咽頭がんに関する 7 件の症例対照研究のうち、5 件ではホルムアルデヒドばく露によるリスク増加が認められた。

いくつかの症例対照研究では、ホルムアルデヒドへのばく露と副鼻腔がんとの関連が調査されている。12 件のプール解析では、木粉または革粉にばく露されたことがない男女における腺がんのリスク増加が示され、累積ばく露の指標に対し、ばく露用量反応性を示す傾向が示された (Luce ら、2002 年)。他の 1 件の症例対照研究 (Olsen & Asnaes、1986 年) と発生率研究 (Hansen & Olsen、1995 年) では、副鼻腔がん、特に扁平上皮がんのリスクの増加が示された。しかしながら、工場労働者を対象とした 3 件の最も有力なコホート研究では、副鼻腔がんの増加は認められなかった (Coggon ら、2003 年 ; Hauptmann ら、2004 年 ; Pinkerton ら、2004 年)。

この一連のエビデンスを評価するにあたり、国際がん研究機関 (IARC) は、ホルムアルデヒドがヒトで鼻咽頭がんを引き起こすという十分な疫学的エビデンスがあるが、ホルムアルデヒドがヒトで副鼻腔がんを引き起こすという疫学的エビデンスは限られている。

また、白血病とホルムアルデヒドの職業ばく露との間に因果関係があるという十分なエビデンスはない、と結論づけた (Cogliano ら、2005)。

ホルムアルデヒドにばく露されたヒトの鼻の細胞における DPX について記述している論文はない。ホルムアルデヒドにばく露された労働者の末梢リンパ球における DPX の評価では、全体的なばく露との関連性が示された (Shaham ら、2003 年)。単一の DPX 試験では、14 の病院の各病理部門で働く 399 人が参加し、ホルムアルデヒドばく露のカテゴリーは低レベル (平均 0.5 mg/m^3 、範囲 $0.05 \sim 0.8 \text{ mg/m}^3$) 及び高レベル (平均 2.7 mg/m^3 、範囲 $0.86 \sim 6.7 \text{ mg/m}^3$) であった。調整後の平均 DPX は被曝群で有意に高かった。この研究で用いられた物理的分離法の感度及び再現性には疑問があるようである (Heck & Casanova、2004 年)。

いくつかの研究では、ホルムアルデヒドに職業ばく露された労働者の鼻腔上皮内の組織学的変化を調査しているが、結果はまちまちであり、いくつかの研究では木粉への共ばく露があったため、鼻腔上皮細胞の再生性増殖がどの程度起こるのかは未解明である (Berke、1987 年; Edling ら、1988 年; Holmström ら、1989 年; Boysen ら、1990 年; Ballarin ら、1992 年)。

鼻腔前部の粘膜クリアランスは、ホルムアルデヒドの 0.30 mg/m^3 でのばく露後に減少した (Andersen & Mølhave、1983 年)。

ホルムアルデヒドに関する動物とヒトの key events の一致を表 3 にまとめた。

表 3. ホルムアルデヒドの用語索引表

key events	動物におけるエビデンス	ヒトにおけるエビデンス
細胞毒性	in vivo で陽性 (標的細胞)	妥当性あり
細胞増殖	in vivo で陽性 (標的細胞)	妥当性あり (エビデンスはあるが、共ばく露によって交絡されている)
遺伝毒性	DPX (in vivo 標的細胞)	DPX (非標的細胞、リンパ球など)
突然変異	in vitro では陽性、in vivo では説得力がない	陽性 (? 細胞)
鼻腔腫瘍	陽性 (主に前外側鼻腔)	陽性 (鼻咽頭) ? (副鼻腔)

B. グルタルアルデヒド

グルタルアルデヒドへのばく露とヒトのがんに関する疫学的研究はほとんどない。グルタルアルデヒド製造に携わる男性労働者 186 名のがん死亡者の増加は認められなかった。グルタルアルデヒドに初めてばく露されてからの平均期間は 20.6 年、ばく露期間は 3~7 年であった。モニタリングばく露期間中、大気中のグルタルアルデヒド濃度は $0.04 \sim 1.4 \text{ mg/m}^3$ の範囲であった (NICNAS、1994 年)。グルタルアルデヒドの潜在的な影響について、遺体整備師、病理医及び米国解剖学会のメンバーを対象とした研究では、すべての研究ががんリスクの増加を示している。しかしこのグループはホルムアルデヒドにもばく露されていた (Walrath & Fraumeni、1983 年、遺伝毒性変異; ホルムアルデヒドに関するコンセンサスワークショップ、1984 年; Stroup ら、1986 年)。

ヒトの鼻組織におけるグルタルアルデヒドばく露と DPX 形成、細胞毒性及び細胞増殖を検討した研究はない。

グルタルアルデヒドに関する動物とヒトの key events の一致を表 4 にまとめた。

表 4. グルタルアルデヒドの用語索引表

key events	動物におけるエビデンス	ヒトにおけるエビデンス
細胞毒性	陽性	妥当性あり
細胞増殖	in vivo で陽性	妥当性あり
遺伝毒性	DPX (in vitro)	不明
突然変異	in vitro で陽性	不明
鼻腔腫瘍	陰性（どの部位にもエビデンスがない）	不明

3. 実験動物とヒトとの間の動態的または薬力学的要因のいずれかの量的差異に基づいて、MOA のヒトへの関連性を合理的に排除することができるか

A. ホルムアルデヒド

推定される MOA に関する実験動物とヒトとの間の定量的差異は、標的組織におけるホルムアルデヒドの濃度がもたらす作用にある。細胞毒性を引き起こすのはホルムアルデヒドそのものであり、その代謝物ではない。吸入された外因性のホルムアルデヒドは、広く分布する多数の細胞酵素、特にホルムアルデヒド脱水素酵素によって急速に代謝されギ酸塩になる。この効率的な代謝解毒メカニズムに加えて、粘膜絨毛機構が、その下の上皮をガスや蒸気から保護する。したがって、標的組織において細胞毒性が発生するのに十分な遊離ホルムアルデヒドの濃度を達成するためには、これらの保護機構を克服することが必要であり、比較的高濃度のホルムアルデヒド蒸気を標的部位に到達させる必要がある。明らかに有意な発がん性をもたらす薬力学的事象は、ラットのホルムアルデヒド解毒機構が飽和した用量で発生する（Casanova & Heck、1987 年）。

呼吸器系におけるホルムアルデヒド誘発性毒性の定量的な種差を考慮する際には、投与量を考慮することが重要である。吸入されたホルムアルデヒドは、生体高分子との高い反応性のため、最初に接触する上気道の領域に多く沈着し、容易に吸収される（Heck ら、1983 年；Swenberg ら、1983 年）。鼻の生体機構、換気量、呼吸パターン（鼻または鼻腔）の間の複雑な関係が、種によって上気道のどこでホルムアルデヒドの吸収が起こるかを決定する。鼻呼吸であるげっ歯類では、沈着と吸収は主に鼻腔内で起こる。対照的に霊長類は口鼻呼吸であり、吸収と沈着は主に口腔粘膜と鼻腔で起こる可能性が高いが、気管と気管支でも起こる可能性がある（Monticello ら、1991 年）。

この仮説は、サルの上気道内のより遠位まで病理組織学的変化、上皮細胞の増殖及び DPX 形成が観察されることによって支持されている。

ヒトにおけるホルムアルデヒドの鼻腔発がんリスクを予測するために開発された 2 段階のクローン増殖モデルでは、用量評価における種差が考慮されている (Conolly ら、2004 年) このモデルには、ラットとヒトの正常成長曲線、細胞周期の時間及び気道の異なる領域におけるリスクのある細胞に関するデータも組み込まれている。

マウスは反復ばく露により呼吸速度と一回換気量の両方を低下させることができるため、マウスはラットよりもホルムアルデヒドの沈着が少なく、その結果、鼻腔上皮の組織損傷と細胞の再生率が低下する (Chang ら、1981 年、1983 年)。これらの特徴は、マウスの鼻で腫瘍発生がないことを説明するのに役立つかもしれない。

動物とヒトの間には、気道の用量評価の違いによる定量的な違いがあると思われるが、推定される MOA がヒトでは発生しないことを示すような根本的な違いはないようである。

B. グルタルアルデヒド

実験動物におけるグルタルアルデヒドの動態は、ホルムアルデヒドに比べてあまり知られていない。吸入試験は実施されていないようである。半減期は、静脈内投与 (ラット 10 時間、ウサギ 15~30 時間) と経皮投与 (ラット 40~110 時間、ウサギ 20~100 時間) の両方で長くなっているが、これはグルタルアルデヒドがタンパク質に結合し、代謝物の排泄が遅いためと考えられる。代謝物は同定されていないが、おそらくグルタルアルデヒドの代謝は、アルデヒド脱水素酵素による対応するカルボン酸への初期酸化を伴うと推定されている。酸化によって産生されたグルタル酸は、コエンザイム A (CoA) と反応してグルタリル CoA を産生する。そして、グルタリル CoA デヒドロゲナーゼによってグルタコニル CoA に酸化され、最終的にはアセテートを介して二酸化炭素に分解される (Beauchamp ら、1992 年 ; NTP、1993 年 ; NICNAS、1994 年 ; Ballantyne、1995 年)。

グルタルアルデヒドは、主にアミノ基間の架橋剤としてタンパク質と容易に反応する。この反応は迅速で pH に依存しており (pH>9 で反応速度が増加)、Schiff 塩基を生成する。さらに反応すると、多くの複雑な反応生成物が得られるが、架橋反応のメカニズムはまだ完全には解明されていない。

グルタルアルデヒドと DNA との相互作用についてはほとんど情報がないが、グルタルアルデヒドが DNA と反応するのは 60°C 以上の場合のみであることが報告されており (Hopwood、1975 年)、生理的条件下では反応しないことを示唆するデータもある (Sewell ら、1984 年 ; Douglas & Rogers、1998 年 ; Vock ら、1999 年)。

4. 信頼性、解析及び帰結の記述

A. ホルムアルデヒド

持続的な細胞毒性と細胞増殖は、いくつかの動物種における腫瘍誘発に対して提唱されている MOA にとっての key events である。ラットにおけるホルムアルデヒド誘発性鼻腔腫瘍の MOA を支持するデータは多数存在する。細胞毒性、DPX 形成、鼻腔上皮細胞の再生性増殖、扁平上皮化生、炎症はラットの研究で観察されており、部位特異的で非線形の濃度反応過程であり、鼻腔腫瘍の発生率と一致している。

エビデンスの重み付けに基づいて、動物 MOA は少なくとも定性的にはヒトに関連している可能性が高い。ホルムアルデヒド蒸気にはばく露されたサルでは、上気道上皮内の細胞増殖及び DPX 形成の増加が観察されている。また、ホルムアルデヒドへの組織ばく露後のヒト上皮細胞の増殖は、ヒト気管支上皮細胞を移植したラット気管を胸腺欠損マウスに異種移植したモデル系でも観察されている。主にホルムアルデヒドにはばく露されたヒトの鼻の病理学的病変に関する数少ないエビデンスは、定性的に類似している実験動物の上気道の病変と一致している。さらに、いくつかの疫学研究では、ホルムアルデヒドばく露に伴う鼻腔がんのリスク増加が示唆されている。

したがって、MOA はヒトに関連していると考えられ、ヒトのリスク評価のために、動物の鼻腔腫瘍やその他の裏付けとなるデータを活用すべきである。このプロセスには、ホルムアルデヒドが非線形で用量依存的に腫瘍を誘発することを示唆するデータを考慮することが含まれる。また、定量法の違いにより推定される MOA については種間の反応に量的な差異があるかもしれない。

B. グルタルアルデヒド

グルタルアルデヒドの疫学研究は非常に限られており、鼻腔腫瘍との関連性は示されていない。動物実験では、ラットとマウスの吸入試験において、グルタルアルデヒドは細胞毒性、細胞増殖、DPX 産生を引き起こすことが示されているが、鼻腔腫瘍は引き起こさないことが示されている。グルタルアルデヒドの方がホルムアルデヒドよりも明らかに毒性が強いという事実は、発がん性の違いの説明にはならない。グルタルアルデヒドはホルムアルデヒドよりも低用量での細胞死が多いため、発がん性があるとすれば、ホルムアルデヒドよりも低い用量でそのことが証明されなければならない。

ホルムアルデヒドで推定される MOA、すなわち持続的な細胞毒性と細胞増殖は、グルタルアルデヒドに関連しているように思われるが、腫瘍形成では実証されていない。これらのアルデヒドに対する病理学的反応の違いは、ホルムアルデヒドがモノアルデヒドであるのに対し、グルタルアルデヒドはジアルデヒドであるためであることが暫定的に示唆されている。この違いが、グルタルアルデヒドの架橋生成物が生物学的機能を保持する可能性も修復する可能性もないように、架橋の形態が異なるという結果になっているのかもしれない。この事例研究は、動物の腫瘍データが不十分な場合に HRF を適用することの難しさを浮き彫りにしている。

参考文献

- Andersen I, Møhlave L (1983) Controlled human studies with formaldehyde. In: Gibson JE, ed. *Formaldehyde toxicity*. Washington, DC, Hemisphere Publishing, pp. 155–165.
- Ballantyne B (1995) *Toxicology of glutaraldehyde: Review of studies and human health effects*. Bound Brook, NJ, Union Carbide Corporation.
- Ballarin C, Sarto F, Giacomelli L, Bartolucci GB, Clonfero E (1992) Micronucleated cells in nasal mucosa of formaldehyde-exposed workers. *Mutation Research*, **280**:1–7.
- Beauchamp ROJ, St Clair MB, Fennell TR, Clarke DO, Morgan KT, Kari FW (1992) A critical review of the toxicology of glutaraldehyde. *Critical Reviews in Toxicology*, **22**:143– 174.
- Berke JH (1987) Cytologic examination of the nasal mucosa in formaldehyde-exposed workers. *Journal of Occupational Medicine*, **29**:681–684.
- Boysen M, Zadig E, Digernes V, Abeler V, Reith A (1990) Nasal mucosa in workers exposed to formaldehyde: A pilot study. *British Journal of Industrial Medicine*, **47**:116–121.
- Burgaz S, Cakmak G, Erdem O, Yilmaz M, Karakaya AE (2001) Micronuclei frequencies in exfoliated nasal mucosa cells from pathology and anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde. *Neoplasma*, **48**:144–147.
- Burgaz S, Erdem O, Cakmak G, Erdem N, Karakaya A, Karakaya AE (2002) Cytogenetic analysis of buccal cells from shoe-workers and pathology and anatomy laboratory workers exposed to *n*-hexane, toluene, methyl ethyl ketone and formaldehyde. *Biomarkers*, **7**:151– 161.
- Bushy Run (1983) *Glutaraldehyde vapour subchronic inhalation study on rats*. Export, PA, Bushy Run Research Center (Project Report 46-101).
- Casanova M, Heck Hd'A (1987) Further studies of the metabolic incorporation and covalent binding of inhaled [³H]- and [¹⁴C]formaldehyde in Fischer-344 rats: Effects of glutathione depletion. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **89**:105–121.
- Casanova M, Heck Hd'A, Everitt JJ, Harrington WW Jr, Popp JA (1988) Formaldehyde concentrations in the blood of rhesus monkeys after inhalation exposure. *Food and Chemical Toxicology*, **26**:715–716.
- Casanova M, Deyo DF, Heck Hd'A (1989) Covalent binding of inhaled formaldehyde to DNA in the nasal mucosa of Fischer 344 rats: Analysis of formaldehyde and DNA by high- performance liquid chromatography and provisional pharmacokinetic interpretation. *Fundamental and Applied Toxicology*, **12**:397–417.

Casanova M, Morgan KT, Steinhagen WH, Everitt JI, Popp JA, Heck Hd'A (1991) Covalent binding of inhaled formaldehyde to DNA in the respiratory tract of rhesus monkeys: Pharmacokinetics, rat-to-monkey interspecies scaling, and extrapolation to man. *Fundamental and Applied Toxicology*, **17**:409–428.

Casanova M, Morgan KT, Gross EA, Moss OR, Heck Hd'A (1994) DNA–protein cross-links and cell replication at specific sites in the nose of F344 rats exposed subchronically to formaldehyde. *Fundamental and Applied Toxicology*, **23**:525–536.

Casanova-Schmitz M, Starr TB, Heck H (1984) Differentiation between metabolic incorporation and covalent binding in the labeling of macromolecules in the rat nasal mucosa and bone marrow by inhaled [¹⁴C]- and [³H]formaldehyde. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **76**:26–44.

Chang JCF, Steinhagen WH, Barrow CS (1981) Effects of single or repeated formaldehyde exposures on minute volume of B6C3F1 mice and F344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **61**:451–459.

Chang JCF, Gross EA, Swenberg JA, Barrow CS (1983) Nasal cavity deposition, histopathology and cell proliferation after single or repeated formaldehyde exposures in B6C3F1 mice and F-344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **68**:161–176.

CIIT (1999) *Formaldehyde: Hazard characterization and dose–response assessment for carcinogenicity by the route of inhalation*, rev. ed. Research Triangle Park, NC, Chemical Industry Institute of Toxicology.

Coggon D, Harris EC, Poole J, Palmer KT (2003) Extended follow-up of a cohort of British chemical workers exposed to formaldehyde. *Journal of the National Cancer Institute*, **21**:1608–1614.

Cogliano VJ, Grosse Y, Baan RA, Straif K, Secretan MB, El Ghissassi F (2005) Meeting report: Summary of IARC Monographs on formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-*tert*-butoxy- 2-propanol. *Environmental Health Perspectives*, **113**(9):1205–1208.

Conolly RB, Kimbell JS, Janszen D, Schlosser PM, Kalisak D, Preston J, Miller FJ (2004) Human respiratory tract cancer risks of inhaled formaldehyde: Dose–response predictions derived from biologically-motivated computational modeling of a combined rodent and human dataset. *Toxicological Sciences*, **82**:279–296.

Consensus Workshop on Formaldehyde (1984) Report on the consensus workshop on formaldehyde. *Environmental Health Perspectives*, **58**:323–381.

Crosby RM, Richardson KK, Craft TR, Benforado KB, Liber HL, Skopek TR (1988) Molecular analysis of formaldehyde-induced mutations in human lymphoblasts and *E. coli*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **12**:55–166.

- Dalbey WE (1982) Formaldehyde and tumors in hamster respiratory tract. *Toxicology*, **24**:9– 14.
- Douglas MP, Rogers SO (1998) DNA damage caused by common cytological fixatives. *Mutation Research*, **401**:77–88.
- Edling C, Hellquist H, Ödkvist L (1988) Occupational exposure to formaldehyde and histopathological changes in the nasal mucosa. *British Journal of Industrial Medicine*, **45**:761–765.
- Feron VJ, Bruyntes JP, Woutersen RA, Immel HR, Appelman LM (1988) Nasal tumours in rats after short-term exposure to a cytotoxic concentration of formaldehyde. *Cancer Letters*, **39**:101–111.
- Feron VJ, Til HP, Woutersen RA (1990) Letter to the editor. *Toxicology and Industrial Health*, **6**:637–639.
- Gaylor DW, Lutz WK, Connolly RB (2004) Statistical analysis of nonmonotonic dose– response relationships: Research design and analysis of nasal cell proliferation in rats exposed to formaldehyde. *Toxicological Sciences*, **77**:158–164.
- Gross EA, Mellick PW, Kari FW, Miller FJ, Morgan KT (1994) Histopathology and cell replication responses in the respiratory tract of rats and mice exposed by inhalation to glutaraldehyde for up to 13 weeks. *Fundamental and Applied Toxicology*, **23**:348–362.
- Hansen J, Olsen JH (1995) Formaldehyde and cancer morbidity among male employees in Denmark. *Cancer Causes and Control*, **6**:354–360.
- Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, eds (2001) *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*, 10th ed. The McGraw-Hill Companies, Inc., 2025 pp.
- Hauptmann A, Lubin JH, Stewart PA, Hayes RB, Blair A (2004). Mortality from solid cancers among workers in formaldehyde industries. *American Journal of Epidemiology*, **159**:1117–1130.
- Hayes RB, Blair A, Stewart PA, Herrick RF, Mahar H (1990) Mortality of U.S. embalmers and funeral directors. *American Journal of Industrial Medicine*, **18**:641–652.
- He J-L, Jin L-F, Jin H-Y (1998) Detection of cytogenetic effects in peripheral lymphocytes of students exposed to formaldehyde with cytokinesis-blocked micronucleus assay. *Biomedical and Environmental Sciences*, **11**:87–92.
- Heck H, Casanova M (1995). Nasal dosimetry of formaldehyde: Modelling site specificity and the effects of pre-exposure. In: Miller JF, ed. *Nasal toxicity and dosimetry of inhaled xenobiotics: Implications for human health*. Washington, DC, Taylor & Francis, pp. 159– 175.

- Heck H, Casanova M (2004) The implausibility of leukemia induction by formaldehyde: A critical review of the biological evidence on distant-site toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **40**:92–106.
- Heck Hd'A, White EL, Casanova-Schmitz M (1982) Determination of formaldehyde in biological tissues by gas chromatography/mass spectrometry. *Biomedical Mass Spectrometry*, **9**:347–353.
- Heck Hd'A, Chin TY, Schmitz MC (1983) Distribution of [¹⁴C]formaldehyde in rats after inhalation exposure. In: Gibson JE, ed. *Formaldehyde toxicity*. Washington, DC, Hemisphere Publishing, pp. 26–37.
- Heck Hd'A, Casanova-Schmitz M, Dodd PB, Schachter EN, Witek TJ, Tosun T (1985) Formaldehyde (CH₂O) concentrations in the blood of humans and Fischer-344 rats exposed to CH₂O under controlled conditions. *American Industrial Hygiene Association Journal*, **46**:1–3.
- Heck Hd'A, Casanova M, Starr TB (1990) Formaldehyde toxicity—new understanding. *Critical Reviews in Toxicology*, **20**:397–426.
- Hedberg JJ, Strömberg P, Höög JO (1998) An attempt to transform class characteristics within the alcohol dehydrogenase family. *FEBS Letters*, **436**:67–70.
- Hester SD, Benavides GB, Yoon L, Morgan KT, Zou F, Barry W, Wolf DC (2003) Formaldehyde-induced gene expression in F344 rat nasal respiratory epithelium. *Toxicology*, **187**:13–24.
- Holmquist B, Vallee BL (1991) Human liver class III alcohol and glutathione dependent formaldehyde dehydrogenase are the same enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **178**:1371–1377.
- Holmström M, Wilhelmsson B, Hellquist H, Rosén G (1989) Histological changes in the nasal mucosa in persons occupationally exposed to formaldehyde alone and in combination with wood dust. *Acta Otolaryngologica*, **107**:120–129.
- Hopwood D (1975) The reactions of glutaraldehyde with nucleic acids. *Journal of Histochemistry*, **7**:267–276.
- Horton AW, Tye R, Stemmer KL (1963) Experimental carcinogenesis of the lung. Inhalation of gaseous formaldehyde or an aerosol of coal tar by C3H mice. *Journal of the National Cancer Institute*, **30**:31–43.
- IARC (2005) *Formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tert-butoxypropan-2-ol*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 478 pp. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 88).

IPCS (2002) *Formaldehyde*. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Concise International Chemical Assessment Document No. 40).

Kamata E, Nakadate E, Uchida O, Ogawa Y, Suzuki S, Kaneko T, Saito M, Kurokawa Y (1997) Results of a 28-month chronic inhalation toxicity study of formaldehyde in male Fischer-344 rats. *Journal of Toxicological Sciences*, **22**:239–254.

Kerns WD, Pavkov KL, Donofrio DJ, Gralla EJ, Swenberg JA (1983a) Carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long-term inhalation exposure. *Cancer Research*, **43**:4382–4392.

Kerns WD, Donofrio DJ, Pavkov KL (1983b) The chronic effects of formaldehyde inhalation in rats and mice: A preliminary report. In: Gibson JE, ed. *Formaldehyde toxicity*. Washington, DC, Hemisphere Publishing, pp. 111–131.

Kimbell JS, Gross EA, Richardson RB, Conolly RB, Morgan KT (1997) Correlation of regional formaldehyde flux predictions with the distribution of formaldehyde-induced squamous metaplasia in F344 rat nasal passages. *Mutation Research*, **380**:143–154.

Koivusalo M, Baumann M, Uotila L (1989) Evidence for the identity of glutathione- dependent formaldehyde dehydrogenase and class III alcohol dehydrogenase. *FEBS Letters*, **257**:105–109.

Liber HL, Benforado K, Crosby RM, Simpson D, Skopek TR (1989) Formaldehyde-induced and spontaneous alterations in human *hprt* DNA sequence and mRNA expression. *Mutation Research*, **226**:31–37.

Liteplo RG, Meek ME (2003) Inhaled formaldehyde: Exposure estimation, hazard characterization, and exposure–response analysis. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **B6**:85–114.

Luce D, Leclerc A, Begin D, Demers PA, Gerin M, Orlowski E, Kogevinas M, Belli S, Bugel I, Bolm-Audorff U, Brinton LA, Comba P, Hardell L, Hayes RB, Magnani C, Merler E, Preston-Martin S, Vaughan TL, Zheng W, Boffetta P (2002) Sinonasal cancer and occupational exposures: A pooled analysis of 12 case–control studies. *Cancer Causes and Control*, **13**:147–157.

Lutz WK (1998) Dose–response relationships in chemical carcinogenesis: Superposition of different mechanisms of action, resulting in linear–nonlinear curves, practical thresholds, J- shapes. *Mutation Research*, **405**:117–124.

Maronpot RR, Miller RA, Clarke WJ, Westerberg RB, Decker JR, Moss OR (1986) Toxicity of formaldehyde vapor in B6C3F1 mice exposed for 13 weeks. *Toxicology*, **41**:253–266.

Merk O, Speit G (1998) Significance of formaldehyde-induced DNA–protein crosslinks for mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **32**:260–268.

Monticello TM (1990) *Formaldehyde induced pathology and cell proliferation: A thesis*. Durham, NC, Duke University.

Monticello TM, Morgan KT (1994) Cell proliferation and formaldehyde-induced respiratory carcinogenesis. *Risk Analysis*, **14**:313–319.

Monticello TM, Morgan KT, Everitt JI, Popp JA (1989) Effects of formaldehyde gas on the respiratory tract of rhesus monkeys. Pathology and cell proliferation. *American Journal of Pathology*, **134**:515–527.

Monticello TM, Miller FJ, Morgan KT (1991) Regional increases in rat nasal epithelial cell proliferation following acute and subacute inhalation of formaldehyde. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **111**:409–421.

Monticello TM, Swenberg JA, Gross EA, Leiniger JR, Kimbell JS, Seilkop S, Starr TB, Gibson JE, Morgan KT (1996) Correlation of regional and nonlinear formaldehyde-induced nasal cancer with proliferating populations of cells. *Cancer Research*, **56**:1012–1022.

Morgan KT, Monticello TM (1990) Formaldehyde toxicity: Respiratory epithelial injury and repair. In: Thomassen DG, Nettesheim P, eds. *Biology, toxicology, and carcinogenesis of the respiratory epithelium*. Washington, DC, Hemisphere Publishing, pp. 155–171.

Morgan KT, Jiang X-Z, Starr TB, Kerns WD (1986) More precise localization of nasal tumors associated with chronic exposure of F-344 rats to formaldehyde gas. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **82**:264–271.

NICNAS (1994) *Glutaraldehyde. Full public report*. Canberra, Australian Government Publishing Service, National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme, July (Priority Existing Chemical No. 3).

NTP (1993) *NTP technical report on toxicity studies on glutaraldehyde (CAS No. 111-30-8) administered by inhalation to F344/N rats and B6C3F1 mice*. Research Triangle Park, NC, National Institutes of Health, National Toxicology Program (NTP Toxicity Report No. 25; NIH Publication No. 93-3348).

NTP (1999) *Toxicology and carcinogenesis studies of glutaraldehyde (CAS No. 111-30-8) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies)*. Research Triangle Park, NC, National Institutes of Health, National Toxicology Program (NTP Technical Report Series No. 490; NIH Publication No. 99-3980).

Olsen JH, Asnaes S (1986) Formaldehyde and the risk of squamous cell carcinoma of the sinonasal cavities. *British Journal of Industrial Medicine*, **43**:769–774.

Pinkerton L, Hein M, Stayner L (2004). Mortality among a cohort of garment workers exposed to formaldehyde: An update. *Occupational and Environmental Medicine*, **61**:193–200.

- Recio L (1997) Oncogene and tumor suppressor gene alterations in nasal tumors. *Mutation Research*, **380**:27–31.
- Recio L, Sisk S, Pluta L, Bermudez E, Gross EA, Chen Z, Morgan K, Walker C (1992) *p53* mutations in formaldehyde-induced nasal squamous cell carcinomas in rats. *Cancer Research*, **52**:6113–6116.
- Rietbrock N (1965) [Formaldehyde oxidation in the rat.] *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, **251**:189–190 (in German).
- Rusch GM, Clary JJ, Rinehart WE, Bolte HF (1983) A 26-week inhalation toxicity study with formaldehyde in the monkey, rat, and hamster. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **68**:329–343.
- Schlosser PM, Lilly PD, Conolly RB, Janszen DB, Kimbell JS (2003) Benchmark dose risk assessment for formaldehyde using airflow modeling and a single-compartment, DNA–protein cross-link dosimetry model to estimate human equivalent doses. *Risk Analysis*, **23**:473–487.
- Sewell BT, Bouloukos C, von Holt C (1984) Formaldehyde and glutaraldehyde in the fixation of chromatin for electron microscopy. *Journal of Microscopy*, **136**:103–112.
- Shaham J, Bomstein Y, Gurvich R, Rashkovsky M, Kaufman Z (2003) DNA–protein crosslinks and *p53* protein expression in relation to occupational exposure to formaldehyde. *Occupational and Environmental Medicine*, **60**:403–409.
- Soffritti M, Maltoni C, Maffei F, Biagi R (1989) Formaldehyde: An experimental multipotential carcinogen. *Toxicology and Industrial Health*, **5**:699–730.
- Speit G, Schutz P, Merk O (2000) Induction and repair of formaldehyde-induced DNA–protein crosslinks in repair-deficient human cell lines. *Mutagenesis*, **15**:85–90.
- St Clair MB, Gross EA, Morgan KT (1990) Pathology and cell proliferation induced by intra- nasal instillation of aldehydes in the rat: Comparison of glutaraldehyde and formaldehyde. *Toxicologic Pathology*, **18**:353–361.
- St Clair MB, Bermudez E, Gross EA, Butterworth BE, Recio L (1991) Evaluation of the genotoxic potential of glutaraldehyde. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **18**:113–119.
- Stroup NE, Blair A, Erikson GE (1986) Brain cancer and other causes of deaths in anatomists. *Journal of the National Cancer Institute*, **77**:1217–1224.
- Swenberg JA, Gross EA, Martin J, Popp JA (1983) Mechanisms of formaldehyde toxicity. In: Gibson JE, ed. *Formaldehyde toxicity*. Washington, DC, Hemisphere Publishing, pp. 132–147.

Swenberg JA, Gross EA, Martin J, Randall HA (1986) Localization and quantitation of cell proliferation following exposure to nasal irritants. In: Barrow CS, ed. *Toxicology of the nasal passages*. Washington, DC, Hemisphere Publishing, pp. 291–300.

Takahashi M, Hasegawa R, Furukawa F, Toyoda K, Sato H, Hayashi Y (1986) Effects of ethanol, potassium metabisulfite, formaldehyde and hydrogen peroxide on gastric carcinogenesis in rats after initiation with *N*-methyl-*N*_o-nitro-*N*-nitrosoguanidine. *Japanese Journal of Cancer Research*, **77**:118–124.

Til HP, Woutersen RA, Feron VJ, Hollanders VHM, Falke HE (1989) Two-year drinking- water study of formaldehyde in rats. *Food and Chemical Toxicology*, **27**:77–87.

Titenko-Holland N, Levine AJ, Smith MT, Quintana PJ, Boeniger M, Hayes R, Suruda A, Schulte P (1996) Quantification of epithelial cell micronuclei by fluorescence in situ hybridization (FISH) in mortuary science students exposed to formaldehyde. *Mutation Research*, **371**:237–248.

Tobe M, Naito K, Kurokawa Y (1989) Chronic toxicity study on formaldehyde administered orally to rats. *Toxicology*, **56**:79–86.

Uotila L, Koivusalo M (1974) Formaldehyde dehydrogenase from human liver. Purification, properties, and evidence for the formation of glutathione thiol esters by the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, **249**:7653–7663.

Uotila L, Koivusalo M (1997) Expression of formaldehyde dehydrogenase and *S*-formylglutathione hydrolase activities in different rat tissues. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **414**:365–371.

Van Miller JP, Hermansky SJ, Neptun DA, Loscoa PE, Ballantyne B (1995) Combined chronic toxicity/oncogenicity study with glutaraldehyde (GA) in the drinking water of rats. *Toxicologist*, **15**:203 (abstract).

Vargová M, Janota S, Karelová J, Barancokova M, Šulcová M (1992) Analysis of the health risk of occupational exposure to formaldehyde using biological markers. *Analysis*, **20**:451–454.

Vock EH, Lutz WK, Ilinskaya O, Vamvakas S (1999) Discrimination between genotoxicity and cytotoxicity for the induction of DNA double-strand breaks in cells treated with aldehydes and diepoxides. *Mutation Research*, **441**:85–93.

Walrath J, Fraumeni JF Jr (1983) Mortality patterns among embalmers. *International Journal of Cancer*, **31**:407–411.

Wolf DC, Gross EA, Lycht O, Bermudez E, Recio L, Morgan KT (1995) Immunohistochemical localization of p53, PCNA, and TGF- β proteins in formaldehyde- induced rat nasal squamous cell carcinomas. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **132**:27–35.

Woutersen RA, van Garderen-Hoetmer A, Bruijntjes JP, Zwart A, Feron VJ (1989) Nasal tumours in rats after severe injury to the nasal mucosa and prolonged exposure to 10 ppm formaldehyde. *Journal of Applied Toxicology*, **9**:39–46.

Ying C-J, Yan W-S, Zhao M-Y, Ye X-L, Xie H, Yin S-Y, Zhu X-S (1997) Micronuclei in nasal mucosa, oral mucosa and lymphocytes in students exposed to formaldehyde vapor in anatomy class. *Biomedical and Environmental Science*, **10**:451–455.

Zeiger E, Gollapudi B, Spencer P (2005) Genetic toxicity and carcinogenicity studies of glutaraldehyde—A review. *Mutation Research*, **589**:136–151.

Zissu D, Gagnaire F, Bonnet P (1994) Nasal and pulmonary toxicity of glutaraldehyde in mice. *Toxicology Letters*, **71**:53–62.

Zissu D, Bonnet P, Binet S (1998) Histopathological study in B6C3F1 mice chronically exposed by inhalation to glutaraldehyde. *Toxicology Letters*, **95**:131–139.

Zwart A, Woutersen RA, Wilmer JWGM, Spit BJ, Feron VJ (1988) Cytotoxic and adaptive effects in rat nasal epithelium after 3-day and 13-week exposure to low concentrations of formaldehyde vapour. *Toxicology*, **51**:87–99.

付表:ホルムアルデヒドにばく露されたヒトにおける小核及び染色体異常に関する研究の概要 (IARC, 2005 年)

参考文献	標的組織	エンドポイント	反応 (対照群vsばく露群)	コメント及びばく露
Vargováら (1992)	PBL	MN	3.6% vs 3.08%	n = 20 ; 対照群では高頻度 ; 木材の破片製造ホルムアルデヒド 8-h TWA 0.55-10.36 mg/m ³ 5->16年
Ballarinら (1992)	鼻粘膜	MN	0.25 ± 0.22% vs 0.90 ± 0.47% (P < 0.01)	木粉の同時ばく露 ; 用量反応性なし
Burgazら (2001)	鼻粘膜	MN	0.61 ± 0.27% vs 1.01 ± 0.62% (P < 0.01)	ばく露、n = 23 ; 非ばく露、n = 27 ; 用量反応性なし
Burgazら (2002)	口腔粘膜	MN	0.33 ± 0.30% vs 0.71 ± 0.56% pathology laboratory (P < 0.05) 0.33 ± 0.30% vs 0.62 ± 0.45% shoe factory (P < 0.05)	ばく露、n = 22の可変ばく露 ; ホルムアルデヒドにばく露、n = 28 ; 非ばく露、n = 28 ; ばく露期間との相関性あり
Titenko-Hollandら (1996)	口腔粘膜	MN	0.6 ± 0.5% vs 2.0 ± 2.0% (P = 0.007)	ばく露、n = 28 ; ばく露前とばく露後の比較 ; 喫煙習慣の詳細は不明 ; ホルムアルデヒド濃度 口腔 : 1.2 mg/m ³ -h vs 18 mg/m ³ -h、90日間 鼻腔 : 2.4 mg/m ³ -h vs 20 mg/m ³ -h、90日間
	鼻粘膜	MN	2.0 ± 1.3% vs 2.5 ± 1.3% (NS)	
Yingら (1997)	鼻粘膜	MN	1.20 ± 0.67 vs 3.84 ± 1.48 (P < 0.001)	ばく露、n = 25 ; ばく露前とばく露後の比較 ; 年齢、性及び喫煙習慣のコントロールに関する質問 ; ホルムアルデヒド濃度 0.508 ± 0.299 mg/m ³ vs. 0.012 ± 0.0025 mg/m ³
	口腔粘膜	MN	0.57 ± 0.32 vs 0.86 ± 0.56 (P < 0.001)	
	PBL	MN	0.91 ± 0.39 vs 1.11 ± 0.54 (NS)	
Heら (1988)	PBL	CA	3.40 ± 1.57% vs 5.96 ± 2.40% (P < 0.01)	染色体異常には破壊や断片化が含まれており、解釈が難しくなっている
		MN	3.15 ± 1.46% vs 6.38 ± 2.50% (P < 0.01)	

CA、染色体異常 ; MN、小核 ; NS、有意差なし ; PBL、末梢血リンパ球 ; TWA、時間加重平均

第 2 部

非発がん MOA のヒトへの関連性を解析するための IPCS フレームワーク

序文

ヒトに対するがん MOA の妥当性を解析するための IPCS フレームワーク（第 1 部参照）の完成後、2006 年にジュネーブで専門家会議が開催され、化学物質リスク評価に IPCS フレームワークを一般的に適用できるか否か（すなわち、がん以外のフレームワークを開発すること）という問題が議論された。この専門家会議の参加者は、フレームワークはすべてのエンドポイントに適用可能であるべきであると結論付け、会期外に出版物の草案を作成した。この草案は、ハーモナイゼーションプロジェクト運営委員会のメンバーによって査読され、その後、受領した査読コメントを考慮して著者によって修正された。

貢献者リスト

Alan R. Boobis

インペリアル・カレッジ・ロンドン、ハーマスミス・キャンパス、医学部、実験医学・毒物学部門、ロンドン、イギリス

John E. Doe

化学物質の生態毒性学及び毒性学のための欧州センター (ECETOC)、ブリュッセル、ベルギー

Barbara Heinrich-Hirsch

物質と調剤の安全性、連邦リスクアセスメント研究所、ベルリン、ドイツ

M.E. (Bette) Meek

カナダ保健省、安全環境プログラム、既存物質部門、オンタリオ州オタワ市、カナダ

Sharon Munn

欧州化学品局、共同研究センター、健康・消費者保護研究所、毒物学・化学物質、イスプラ、イタリア

Mathuros Ruchirawat

チュラボーン研究所 (CRI)、ラックシー、バンコク、タイ

Josef Schlatter

スイス連邦公衆衛生局栄養学的・毒性学的リスクセクション、チューリッヒ、スイス

Jennifer Seed

環境保護庁リスクアセスメント課、ワシントン DC、米国

Carolyn Vickers

化学物質安全国際プログラム、世界保健機関、ジュネーブ、スイス

頭字語と略語のリスト

ACE	アンジオテンシン変換酵素
CSAF	化学物質特異的調整係数
EMS	好酸球増多筋痛症候群
HBOC	ヘモグロビン系酸素運搬体
HRF	ヒト関連性フレームワーク
ILO	国際労働機関
ILSI	国際生命科学研究機構
IPCS	国際化学物質安全性計画
MOA	Mode of Action（作用モード）
MPTP	1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン
RSI	リスクサイエンス研究所（ILSI）
SLE	全身性エリテマトーデス
UNEP	国際連合環境計画
WHO	世界保健機関

非発がん MOA のヒトへの関連性を解析するための IPCS フレームワーク¹

Alan R. Boobis, John E. Doe, Barbara Heinrich-Hirsch, M.E. (Bette) Meek, Sharon Munn,
Mathuros Ruchirawat, Josef Schlatter, Jennifer Seed, & Carolyn Vickers

体系化されたフレームワークは、化学物質のリスク評価の透明性と調和のとれたアプローチを促進する上で非常に有用である。これが成功している分野の一つに、発がん化学物質の MOA の実験動物とヒトの間の関連性の解析がある。最近、国際化学物質安全性計画 (International Programme on Chemical Safety: IPCS) はヒトとの関連性に対処するために、動物における MOA フレームワークの更新版を発表した (がんヒト関連フレームワーク、または HRF)。この作業は現在、発がん以外の影響にまで拡大されており、最終的には、発がんと非発がんの両方のエンドポイントに対するフレームワークの適用を調和させることを目的としている。発がん HRF と同様に、最初のステップは、実験的観察に基づくエビデンスの重み付けが、仮説 MOA を確立するのに十分であるか否かを判断することである。これは、毒性影響に因果関係のある一連の key events からなり、Bradford Hill 基準に基づくアプローチを用いて同定される。実験動物とヒトの間でこれらの事象を、まずは定性的に、それから定量的に比較する。解析により、結果の信頼性、解析及び帰結とともに、明確な結論が記述される。このフレームワークは、データの透明性のある評価、主要なデータギャップの特定、用量反応関係などの化合物のリスク評価に価値のある情報の特定、ライフステージの考慮などに基づく潜在的に感受性の高いサブグループを認識するための手段を提供している。

本論文に記載されているフレームワークは、非発がんヒト関連性フレームワーク (HRF) であり、国際化学物質安全性計画 (IPCS) (WHO/ILO/UNEP) の化学物質へのばく露によるリスク評価のアプローチの調和プロジェクトによって作成されたものである。この世界的な「調和プロジェクト」は、リスク評価手法の一貫性の向上と国際的なガイダンス文書の構築を通じて、化学物質のリスク評価に対する世界的適用を目的としている。このプロジェクトは、環境と開発に関する国際連合会議 (1992 年、国際連合)、化学物質の安全性に関する政府間フォーラム (1994 年)、持続可能な開発に関する世界首脳会議 (2002 年、UNEP)、国際的化学物質管理に関する戦略的アプローチ (2006 年、WHO) など合意された化学物質のリスク評価手法の調和に関する公約を達成できるようにするものである。このプロジェクトには、化学物質の評価が行われる様々な分野の専門家が参加しているため、作成された文書は、工業用化学物質、殺生物剤、殺虫剤、動物用化学物質、医薬品、化粧品、天然毒物、食品添加物ならびに、食品中、水中、大気中及び消費者製品中の環境汚染物質の評価に適用することができる。

調和プロジェクトの主な成果として、化学発がんに対する MOA 評価のための IPCS フレームワ

¹ 本論文は、WHO が著作権を有するもので、2008 年に Critical Reviews in Toxicology, Volume 38, pages 87-96 に掲載された。本論文は WHO の出版物のために編集された。

ーク (Sonich-Mullin ら、2001 年) と、それに続くがん MOA のヒトへの関連性を解析するための IPCS フレームワーク (IPCS cancer HRF) (Boobis ら、2006 年; 本文書の第 1 部も参照) がある。MOA 解析は、因果関係の Bradford Hill 基準 (Hill、1965 年) に基づくエビデンスの重み付け (weight of evidence) アプローチを利用している。これは、腫瘍の原因に沿った一連の key events の特定を必要とするエビデンスの重み付けアプローチを適用することで、動物実験で観察された発がん作用に対する MOA を確立できるか判断することを目的としている。実験動物で MOA が確立された場合、がん HRF は、MOA のヒトへの関連性を検討するために透明性のあるデータ評価を可能にする解析ツールを提供できる。

これを受けて、IPCS は、必要に応じて修正を加えながら、他のエンドポイントとそれに関連する MOA にもがんのフレームワークを適用できるか否かを検討することにした。国際生命科学研究機構 (ILSI) のリスクサイエンス研究所 (RSI) は、がん以外のリスク評価に適用するために、同様のフレームワークを開発した。また、IPCS は 2006 年 3 月にジュネーブで国際会議を開催した。そこで、ILSI のフレームワークが一般的に化学物質のリスク評価に適用できるかという問題を探るために、ILSI の出版物 (Seed ら、2005 年) と、ILSI のがん HRF (Boobis ら、2006 年; 本文書の第 1 部も参照) を評価、検討した。要約すると、この IPCS 会議では、フレームワークが発がんとは非発がんの両方のエンドポイントに適用されるべきであり、これを実践に移すための更なる作業を推奨している。そしてこれには、本稿にも記載しているが、フレームワークのより一般的適用のための根拠の文書化及びフレームワークの利用と利用を促進するための手順が含まれている。

IPCS 会議では、化学物質リスク評価において非発がん HRF は下記のような複数の有用性を持つことが認識された。

- 実験動物における MOA の確立とヒトとの関連性について、国際的に調和のとれたアプローチを提供する。
- MOA の基準が作成され、後続のケースを考慮することができるようになる。すなわち、ある化合物に確立された MOA を適合できるかを示すことができるようになる。
- MOA のヒトとの関連性に関する重要な情報が明らかになり、MOA を共有する他の化学物質の評価に情報を提供できるようになる。
- 一般的に、このフレームワークを適用することで、重要データの不足や必要な研究が明らかになり、定性的・定量的な評価に役立てることができるようになる。

非発がんヒト関連性フレームワークの必要性

非発がん HRF は、動物 MOA のヒトとの関連性を評価するための体系化されたアプローチを提供する手段であり、エビデンスの重み付けの文脈の中で、動物において推定される MOA のヒトへの関連性を評価する。その後、推定される MOA のヒトへの外挿性を明確に検討することが含まれており、多くの場合、種間の解剖学的、生理学的及び生化学的な差異などの一般的情報の検

討に基づいている。このようにして、フレームワークは、透明性のある解析方法で、化学物質に特異的な情報と一般的な情報の両方を最大限に利用することを奨励している。

フレームワークを用いてヒトへの関連性を決定する際の透明性を確保するために極めて重要なのは、key events の様々な種におけるエビデンスの性質を明確にし、検討することである。すなわち、推定される MOA における、測定可能で毒性学的反応の誘発に重要であると想定される key events に関するエビデンスの性質を明らかにし、考慮することである。実験動物とヒトの差異を明確に考慮した上での key events の一致性の評価は、ヒトとの関連性に関するエビデンスの重み付けを考慮する上での透明性を保つための基礎となる。

主にハザード評価において、非発がん HRF は、その後のヒトに関連すると考えられる MOA の用量反応解析に関わる適切な key events の明確な定義とデータの検討を通じて、リスク評価の透明性を高めることにも貢献している。実験動物における MOA がヒトと定性的に関連があると判断された場合には、ヒトとの関連性が否定されるか否かを判断するために、実験動物とヒトの双方からの動態学的及び薬力学的情報を考慮に入れた、より定量的な評価が必要である。

これらのデータは、その後の関連があると考えられる MOA の用量反応解析に極めて重要である (IPCS、2005 年)。例えば、化学物質特異的調整係数 (CSAFs) の定義づけにおいて、デフォルトの不確実係数を置き換えるための基礎として、利用可能な情報の妥当性を考慮する場合である。この情報は、標的組織における反応代謝物の形成速度の種差を考慮して、毒物動態の種間差に対するデフォルトのサブファクターを CSAF で置き換えるための適切な根拠となり得る (IPCS、2005 年)。

また、この非発がん HRF の使用はすべてのエンドポイントのリスク評価適用の調和を促進する。例えば、発がん影響と非発がん影響に関するこれまでの異なるアプローチの架け橋となる。ここでいう調和とは、関連情報を最大限に活用するために生物学的関連性を探ることが重要であり、すべてのエンドポイントのリスク評価における一貫したアプローチを意味する。例えば多くの場合、臓器毒性は同一部位に腫瘍を誘発すると推定される MOA において key events となる。非発がん HRF は、その後の用量反応解析における種間差及び個体間のばらつきの定量化に関連する、重要な前がん病変の key events を特定するための段階を設定する。他にも、推定される MOA が複数の臓器に毒性効果をもたらす可能性があれば同じ非発がん HRF 解析で検討されることになる。

さらに、透明性のあるフレームワークで検討することで、それ自体は毒性学的影響に必須ではない (すなわち key events ではない) が、key events を修飾し、種や個体間の差異に寄与する因子を特定できる可能性がある。そのような要因には、代謝経路の遺伝的差異、競合する代謝経路、及び同時進行する病理学的要因により誘発される細胞増殖が含まれる。

このような解析は、特定の用量範囲でのみ、作動する可能性のある推定される MOA の構成要

素に関する指標も提供するかもしれない。MOA に必須な事象を引き起こすのに、対象の化合物の高用量ばく露が必要とされる場合、ヒトのリスクとの関連性はばく露量に依存する問題となる。このように、リスク評価におけるばく露評価は、包括的な評価を行う上で非常に重要である。

重要なことは、非発がん HRF を適用することで、リスクが高い集団（例えば遺伝的素因を持つ人）を特定し、様々なライフステージにおける相対リスクに関連する情報を提供できるようになるということである。これは多くの場合、化学物質固有の情報に基づくのではなく、MOA の知識に基づき特定の年齢層でのリスクが増加しているか減少しているかを推論することに基づいている。このためには、ヒト及び動物モデルにおける発達及び老化過程を比較し、事象を明確に検討する必要がある。これらの検討事項は、後続のリスク評価過程において用量反応解析など、どこに重点を置くべきか決定する上で重要となる。

推定される MOAs のエビデンスの重み付けと透明性のあるヒトとの関連性を示すこと（利用可能なデータベースの長所と短所を明確に検討し、種間の質的・量的な類似性と相違点及び関連する不確実性を強調することを必要とする）は、利用可能なデータの矛盾を特定し、重要なデータギャップと研究の必要性を明らかにすることにもなる。これは、各ステップにおいて、解析の基礎となるデータの質と量、フレームワーク内での解析の一貫性、データベースの一貫性（つまり研究が互いに矛盾していないこと）、そして一致解析の質的・量的な信頼性を明確に評価する必要があることに由来している。

すべてのデータが利用可能になる前であっても、推定される MOA 及びヒトとの関連性の解析に、非発がん HRF を繰り返して適用することは、追加情報の獲得とともに研究戦略を策定・改良するための基礎として有益である。すなわち、フレームワークは動物における推定される MOA のヒトへの関連性解析を支援するデータの性質について、リスク評価者と研究者が共に理解を深めること、データ取得に向け次の一手を決める手助けとなるに違いない。また、研究戦略を立案する際に MOA を繰り返し検討することで、重要な分野に資源を集中させ、より階層的で集中的なアプローチを行うことができ、効率性を高めることが期待される。

知識の進歩に伴い、MOA は化学物質に特化したものから、関連する主要な生物学的プロセスに基づいて、ある化合物から別の化合物へとヒトとの関連性をより一般化させることになるだろう。MOA を構成する **key events** が発生していることを厳密に立証することが常に必要であるものの、MOA を確立する際に化学物質固有のデータを必要とすることは少なくなるだろう。

非発がん HRF を適用した推定 MOA の透明性は、解析と推論を裏付ける明確で一貫性のある文書化を奨励している。そして、それを満たすことで結果の信頼性を高める重要なデータギャップを特定し、データの矛盾や不確実性を明らかにし、到達した結論に対する信頼性を向上させる。このような透明性は、リスク評価者と研究者との議論を促進させるだけでなく、異なる規制機関間の意見合意にも貢献すると期待される。

また非発がん HRF は、専門家の関与やピアレビューのために改善されたプロセスや内容の基礎を提供し、推定される MOA 及びそのヒトへの関連性についての助言や承認を得るための基礎として、解析の明確性や透明性の最低限の基準を明らかにする。これらの基準に従うことで、他者が key events や他の MOA の除外、対象 MOA のヒトへの関連性の結論の根拠を、明確に認識できるようにする。

非発がん HRF はどのような場合に適用されるのか

非発がん HRF は MOA を評価するための貴重なツールを提供するが、かなりの労力と実験的作業を必要とするため、すべての化学物質の評価に用いられるものではない。HRF の主な目的は、動物でみられるすべての影響がヒトに関連するというデフォルトの仮定を適用するか否かを決定することであろう。この疑問は、リスク評価の過程で上記の仮定を適用した場合に評価結果がヒトに有害な影響が発生する可能性が高いことを示す場合に重要性が増す。例えば、検討中の影響が発生する最低用量とヒトの推定ばく露量との差が小さい場合、特にヒトのばく露量の推定値が既に精緻化されている場合である。そしてその場合、リスク管理対策が必要かを知ることが重要になる。このことは、新たな影響を特定したデータ、化学物質の用量反応関係に関する追加データ、または使用パターンの変更やばく露推定値の変更など、既に使用されている化学物質のリスク評価を変更するような新たなデータが出てきた場合に最も懸念されることである。

非発がん HRF の使用は、動物での影響が神経毒性や催奇形性など、ヒトで発生した場合に重大な影響を及ぼす可能性がある場合にも有用である。これらの影響は非常に厳格なリスク評価プロセスの対象となるため、比較的頻繁にリスク管理措置の必要性が示唆される。

がん以外に HRF の使用を検討すべきもう一つの状況は、影響の種類または影響が発生する用量レベルのいずれかに種差がある場合である。このような場合には、どの種がヒトへの外挿において最も適切なものであるかを理解することが重要である。この指針は、同一種の性別又は系統間の違いにも適用される。

これらの状況は、さらなる検討が必要であることを示しており、非発がん HRF はこれを行う方法を提供している。このフレームワークは、影響を検討するプロセスのどの段階でも適用でき、科学者の道しるべとなるよう、影響を調査する過程で反復的に適用されるべきである。最初に影響が観察され、懸念が生じたとき、フレームワークは、調査者が対処すべき問いを示すことによって作業プログラムを構成できるようにする。研究の進展とともに、HRF はデータが作成されたときには、データを評価する研究者を導き、また他のデータが必要かどうか、どのようなデータが必要かを決定する際の指標となる。

大量のデータがある状況では、フレームワークにより、評価者はその重要性和量に応じてエビデンスの重み付けが可能となる。

非発がん HRF は、既にフレームワークを用いて確立されている MOA によって、化学物質が影響を起こすことが観察された場合や、化学物質が既に確立された MOA を持つ化学物質と構造的類似がある場合にも有用である。MOA を確立するために非発がん HRF を早期に使用することで、MOA を新しい化学物質に適用させるために調査する必要がある重要なステップを特定することができる。これは、新しい研究や試験を設計する際の前向きな方法としても、データを遡及的に評価する方法でも、価値あるものになるだろう。

非発がん HRF の検討

非発がん HRF は、推定される MOA とヒトとの関連性を評価するための全体的なエビデンスの重み付けのための手段を体系化する解析ツールである。このフレームワークは、状況に応じて異なるため、情報が十分であるか否かに対する絶対的な答えを提供するようには設計されていない。これは基準のチェックリストではなく、あくまでもデータの評価と提示の手段である。フレームワーク適用による成果は、化合物のリスク評価を継続するための基礎となる。

非発がん HRF は、臓器、組織、細胞の構造と機能の変化（生理学的影響や神経行動学的影響を含む）を含む幅広い毒性学的エンドポイントに適用されることが想定されている。このフレームワークを用いて対処できる毒性の種類には、以下のものが含まれるが、これらに限定されるものではない。

- 臓器毒性：例）ベンゼンによる血液毒性（再生不良性貧血）、パラコートによる肺毒性、クロロキンによる眼毒性など
- 生殖毒性：例）フタル酸による男性不妊、ダイオキシンによる女性の受胎能力障害など
- 発達毒性：例）メチル水銀による発達神経毒性、レチノイドによる催奇形性など
- 神経毒性：例）鉛による末梢神経障害、アクリルアミドによる軸索障害、1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン（MPTP）によるパーキンソン病など
- 免疫毒性：例）オルガノチンによる免疫抑制、イソニアジドによる全身性エリテマトーデス（SLE）様症候群、汚染された L-トリプトファンによる好酸球増多症候群（EMS）など

MOA の紹介

非発がん HRF 解析に着手する前に、実験動物における化学物質へのばく露による毒性学的反応のエビデンスの重みを慎重に評価する必要がある。非発がん HRF の特徴は一度に 1 つの MOA のみを解析する点である。したがって、例えば、化学物質の投与に関連した異なる毒性学的影響は、たとえ同じ動物で観察されたとしても、各影響の MOA を識別するために別のフレームワーク解析を必要とする。代謝的活性化と解毒における種や組織の違いと同様に、一部の毒性物質では毒性発現部位の一致性が低い場合がある。動物とヒトのデータを比較する際には、この点に留意する必要がある。

推定される MOA（事例における仮説）

ここで、被験物質の毒性学的影響の原因となっていると推定される MOA における一連の事象

の概要を簡単に説明している。この記述は次のセクションにつながり、MOA の中で「重要」と考えられる事象（すなわち、必要かつ測定可能な事象）を特定するものである。

Key events

MOA における「key events」を簡潔に説明する。key events とは、推定される MOA で仮定された毒性学的反応の誘発に重要な事象であり、測定可能な事象である。ある事象を key events として支持するためには、その事象を特徴づける、一貫した測定実験データが必要である。関連する可能性のある情報の種類には、例えば、類似の細胞における毒性学的反応と関連する key events、理論上関連する作用部位、特定の生化学的事象、酵素の発現または活性の変化、受容体とリガンドの相互作用、補因子レベルへの影響、組織学における特異的变化、細胞増殖の変化（増加または減少）、ホルモンのホメオスタシスまたは他のシグナル伝達経路（細胞内または細胞外）、セカンドメッセンジャー、またはイオン流束、高分子の分解性の増加、さらには膜透過性または膜統合性の変化などがある。

用量反応関係の一致

それぞれの key events と毒性学的反応の量的反応関係の特徴づけ、Bradford Hill 基準（Hill、1965 年）を参考にして相互関係を検討すべきである。理想としては、key events の大きさ（または頻度）の増加の用量依存性と、その後に発生する他の key events の重症度（例えば、病変の進行）の増加、最終的な毒性学的反応に関連づけられるべきである。key events と毒性学的反応の変化の大きさを比較することは、用量反応の一致を検討するのに役立つことが多い。

用量反応曲線の異なる部分において生物学的反応に根本的な違いがあるか否かを考慮することが重要である（Slikker ら、2004 年）。もしあれば、用量反応曲線の異なる部分に関連する key events を定義し、フレームワーク解析に用いる必要がある。

時間的関連性

各 key events と毒性反応の時間的関係の特徴付ける必要がある。key events は毒性が明らかになる前に観察可能であり、時間的に互いに一貫している必要がある。これは、データが推定される MOA を支持しているか否かを判断する上で不可欠なステップである。毒性反応と同時に（試験終了時など）key events を観察しても、時間的関連性についての結論は出ないが、次のセクションで説明する解析に貢献することができる。

key events と毒性学的反応との関連の強さ、一貫性及び特異性

key events、前駆病変及び毒性学的反応を結びつけるエビデンスの重みに注目すべきである（エビデンスの重みの意味についての考察は Weed [2005 年]を参照）。key events を遮断または減少させた場合に毒性が発現しない、または減少したことを示す中止/回復試験は関連性の試験として特に有用である。

様々な実験計画は未知のバイアスや交絡を減らすことができるため、実際デザインの異なる多

くの研究で一貫した結果が得られることは、MOA の支持を高める。一貫性 (Consistency) は、異なる研究において仮定された MOA の key events の再現性であるが、整合性 (coherence) とは異なるものであり、仮定された MOA と観察との関係をより広く扱うものである (次のポイントを参照)。ここで価値があると思われる観察には、類似の細胞における毒性学的反応や関連する key events、論理的に関連する作用部位、中止/回復試験の結果などが含まれる。

生物学的妥当性及び整合性

MOA が、ターゲットとなる順序／場所の生物学一般についての知見と一致しているかどうか (生物学的妥当性)、また物質の全体的な生物学的影响について具体的に知られていることとの関連性 (整合性) を考慮すべきである。推定される MOA とそれに関連する key events が生物学的に妥当であるためには、現在の生物学的知見と一致している必要がある。しかし、生物学的妥当性をエビデンスの重みを評価する基準として用いる場合には、我々の知識との間にギャップが生じる可能性を考慮することが重要である。推定される MOA と化学物質固有の観察結果との関係をより広く、例えば、毒性学的反応の MOA と他のエンドポイントの MOA との関連性などは、整合性 (前項で述べた) とは区別する必要がある。一貫性を評価する際には、構造類似体に関する情報に価値があるかもしれない (すなわち、構造活性解析)。また、推定される MOA を共有する他の化合物から得た性差、種差、系統の違いや key events との関係などに関する情報も有用であろう。さらに、このセクションでは、推定される MOA を支持するために、その物質に関するデータベースが内部的に一貫しているかどうかを検討すべきである。

その他の MOA

論理的に存在する代替 MOA を検討すべきである。代替 MOA が支持される場合、それらは別の非発がん HRF 解析を必要とする。これらは、検討中の MOA の一部として扱われるため、単一の MOA の追加的な構成要素とは区別されるべきである。

不確実性、矛盾及びデータギャップ

不確実性は完全かつ明示的に記載すべきである。不確実性には、毒性反応の生物学的性質に関連するものと、評価対象の化合物のデータベースに関するものが含まれるべきである。矛盾するものはすべて記載し、データギャップを特定すべきである。また特定されたデータギャップが、推定される MOA を支持する上で重要であるか否かも明記すべきである。

推定される MOA の評価

推定される MOA に対する高、中、低など信頼度を示す解析結果の明確な記述があるべきである。新規 MOA が推定されている場合は、これを明確に示すべきである。しかし、MOA が以前に説明されたものと同じである場合は、key events がこの MOA に適合する程度を明示的に記載する必要がある。主要な相違点はすべて記載し、MOA の適用が与える影響を議論すべきである。

ライフステージの考察

化学物質ばく露に対する生物の反応は、その一生を通じて変化する可能性があるため、すべての毒性エンドポイントの MOA 解析において、ライフステージを考慮することが重要である。器官の感受性は臨界期、主要な代謝酵素の発生時期、あるいは母体と胎児の相互作用に依存するかもしれないため、特に発生期のばく露で生じる影響において重要である (Zoetis & Walls, 2003 年を参照)。さらに、発生過程の障害はその下流に影響をもたらす可能性がある。

老化を考慮することも、いくつかの理由から重要である。第一に、発育期のばく露では、かなり後にならないと毒性が検出されないことがある。さらに、器官系ごとに種特異的な老化パターンが存在する可能性がある。例えば、生殖器はげっ歯類とヒトでは病因が異なり、げっ歯類の系統によっても異なることがある。

ヒトとの関連性

動物において毒性学的影響の MOA を確立することができれば、次の段階でヒトへの関連性を評価する必要がある。IPCS の非発がん HRF は、一連の 3 つの (または 4 つの) 問いに答えるアプローチとして提示されており、毒性学的影響の根底にある MOA のヒトへの外挿性に関する文書化された論理的な結論を導き出すことができる。このガイダンスを適用すると、4 つ (または 5 つ) のセクションで構成された説明文が作成され、リスクアセスメントのハザード評価に組み込むことができる。

1. 動物における MOA を確立するのにエビデンスの重み付けは十分か。この問いは、因果関係の Bradford Hill 基準 (Hill, 1965 年) に基づいた、上記のような MOA 解析を行うことで解決される。可能性のある代替 MOA におけるエビデンスの重みを考慮し、検討中の MOA を支持するエビデンス全体の強さに基づいて結論を出す必要がある。このようなアプローチは、重要なデータギャップを特定する。このデータギャップが埋められることにより、提示された MOA はより信頼性を高めるであろう。推定される MOA が他の化学物質について既に記述されている場合、そのヒトへの外挿性は評価されているだろう。推定される MOA が新規である場合、ヒトへの外挿性は新たに評価する必要がある。

2. 実験動物とヒトとの間の key events の根本的、質的な違いに基づいて、MOA のヒトとの関連性を合理的に排除することができるか。この問いでは、ヒトに対する MOA の関連性の質的評価を行う。動物の MOA で発生する重要な key events をリストアップし、各 key events がヒトで発生する可能性があるかどうかを直接評価することで、評価が容易になり、プロセスの透明性が高まる。一致表と呼ばれる表形式での提示は特に有用である。この表に従って証明するため、表の情報は比較的簡潔でなければならない。1 つの列には、key events のそれぞれについてのヒトへの影響が評価されている。毒性をもたらさない異なる系統、種、性、または異なる投与経路の結果に関する列は、比較するのに有用である。それ自体は重要ではないが、key events を修飾し、種差または個体差に寄与する因子が同定される場合がある。例としては、代謝経路における遺伝的差異、

競合する代謝経路及び同時並行的な病態によって誘発される影響などが挙げられる。特定されたそのような要因はすべて、一致表の脚注に記載する必要がある。

代謝経路における遺伝的差異、競合する代謝経路及び同時並行的な病態によって誘発される影響などが挙げられる。特定されたそのような要因はすべて、一致表の脚注に記載する必要がある。ある化学物質のヒトにおける MOA の key events の一致性の評価は、特定の化学物質の評価というよりは、ヒトにおける MOA の評価である。一般的に、初期の key events の詳細は、より化学物質に特化したものになる可能性が高い。その後の事象は、MOA により一般的に当てはまる事象となる。ヒトにおける key events を評価するための情報は、物質そのものに関する in vitro 及び in vivo 研究から得られるが、解剖学、生理学、内分泌学、遺伝的疾患、疫学、その他ヒトにおける key events に関して知られているあらゆる基本的な情報が重要となる。

この問いに答える際には、エビデンスの重みとヒトの情報における信頼度の評価を記述した説明文を作成する必要がある。有用な情報の具体例としては、以下のようなものがある。

- 必要に応じて、年齢、性別、人種差、化学物質やその他環境因子などの危険因子を含む、対象となる解剖学的部位や細胞種における発生率の背景値
- 生理的、細胞的、生化学的レベルの制御機構や発生、構造（肉眼、組織）を含む標的部位の性質と機能に関する知識
- 標的器官の制御と応答に関する考察をもたらすヒト及び動物の疾患状態
- 対象となる臓器や影響を含む、短期、中期、または長期ばく露後の、評価対象の化学物質または構造類似体に対するヒト及び動物の反応

MOA がヒトには関連性がないと明確に結論づけるためには、相当量の情報が必要である。そのような結論がデータによって強く支持されている場合、その MOA のみで毒性を生じる化学物質はヒトにリスクをもたらさず、このエンドポイントに関する追加のリスク評価は必要ない。

関連性の問題は、すべての集団とライフステージを考慮している。MOA が作動する条件が、主に感受性の高い集団やライフステージにいる人に発生する可能性がある。例えばすでにウイルスに感染しているか、ホルモンバランスの不均衡を有する人または疾患を持っている人である。感受性の質的または量的差異を示唆する情報は、リスクの特徴付けに使用するため強調される。

非発がん HRF 解析では、ライフステージに関連して考慮すべきいくつかの側面がある。第一に、解析ではヒトと動物モデルで起こる発生過程と事象を比較検討すべきである (Zoetis & Walls, 2003 年参照)。この比較は、ヒトと動物モデルにおいて発生過程がどの程度類似しているかを示すものである。一般的に、発生過程はそんなに変化しておらず、このような場合には、動物 MOA はヒト MOA にも当てはまるという結論が導き出される。しかし、いくつかの種には特有の発生過程があり、その場合種特異的な MOA となり、ヒトにも当てはまるとは限らない。

第二に、解析では、ヒトと動物モデルにおける発生過程や事象の相対的な時期や段階の特異性を考慮する必要がある。重要な発生過程における事象は、発生期の異なる時期に生じる可能性がある。いくつかの発生過程における事象は、動物では出生前の早い時期に発生し、ヒトでは出生前の遅い時期に発生する可能性がある。その他発生過程における事象は、ヒトでは出生前に発生し、動物では出生後に発生することもある、その逆もある。胎盤移行と乳汁移行に大きな差がある場合には、発生時期の違いが線量基準に影響を与える可能性がある。同様に、発生過程に関連する主要な代謝酵素の発生時期を比較すると、ヒトと動物モデルの間にはかなりの差があることが明らかになる可能性がある。このような考察から、ヒトでは動物モデルの MOA は妥当ではないという結論が導き出されるかもしれない。

3. 実験動物とヒトとの間の薬力学的または動態的要因のいずれかの量的差異に基づいて、MOA のヒトへの関連性を合理的に排除することができるか。実験動物における MOA がヒトと定性的に無関係であると判断できない場合（問い 2 に「No」）、実験動物とヒトから得られるあらゆる動態学的及び薬力学的情報を考慮して、より定量的な評価が行われる。このようなデータは、必然的に化学物質と MOA に固有のものであり、可能であれば、毒性を引き起こす薬力学的影響が発現する用量を含むべきである。動態学的考察には、吸収の速度及び程度、組織分布、代謝及び排泄が含まれる。胎生の違いは、胎盤移行及び乳汁移行において実質的な種差をもたらす可能性があり、これは定量的な影響を及ぼす。したがって、これによりヒトと実験動物との間で MOA の量的差異がもたらされる可能性がある。同様に、主要な代謝酵素の発現時期の違いにより、ヒトと実験動物の間ではかなりの差が生じる可能性がある。薬力学的な考慮事項には、化学物質と細胞、組織及び器官との相互作用が含まれる。量的差異に基づいてヒトへの外挿性を否定することができるのは、ごくまれである。定量的ばく露評価は HRF よりもむしろその後のリスクの判定の一部であるため、その差はヒトへのばく露がそのようなレベルに達するとは考えられないほどの大きさでなければならない。ほとんどの場合、後続のリスクの判定で正式なばく露評価を行わなければ、そのような結論に達することはできない。したがって、問いの答えは「No」であるが、その後のリスク評価では、リスクは無視できる程度であると結論づけられるかもしれない。メラミン誘発性膀胱がんは、この点を説明する有用な事例研究を提供している（Meek ら、2003 年）ここでも、実験動物とヒトからのデータを表形式で比較することが評価に役立つ。同様または類似の MOA によって作用する他の化合物の研究から得られた情報も価値がある。実験動物とヒトの間の反応の違いの基礎的な理解が深まれば、定性的であると考えられていた key events の違いが、定量的な違いによるものであることが示されるかもしれない。

量的差異に基づいて毒性 MOA がヒトと関連性がないと結論づけることはできないかもしれないが、評価の中で、これらの差異の程度はリスク評価に顕著な影響を与えるのに十分である。したがって、この問いへの回答の説明文は包括的であり、可能な限り定量的な情報を把握しておくことが重要である。

問い2と同様に、この質問への回答が「Yes」であれば、このMOAのみで毒性を示す化学物質へのばく露はヒトにリスクをもたらさず、追加のリスク特性評価は必要ない。

前述の3つの質問は、決定ツリーを構成している（図1参照）。

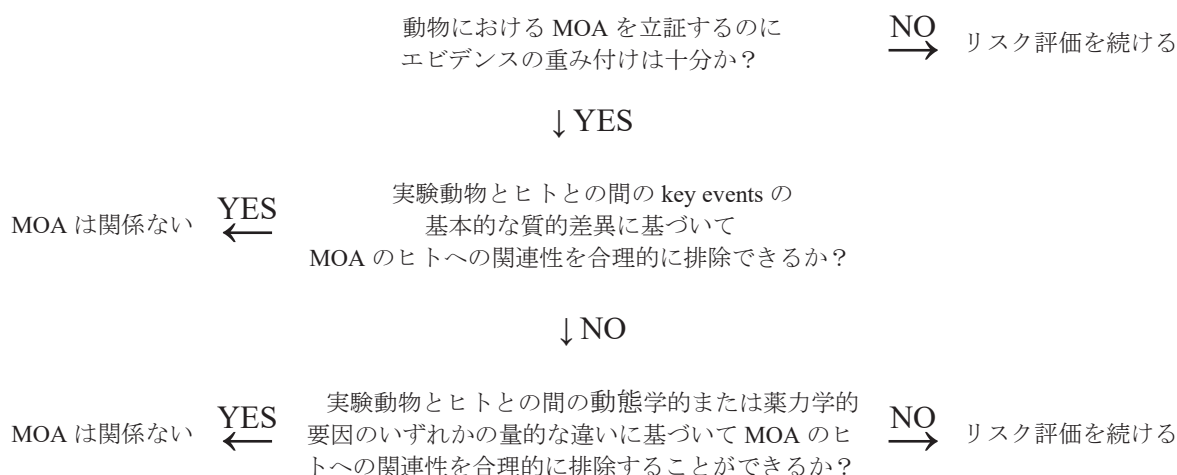


図1. 実験動物で観察された毒性に対するMOAのヒトへの関連性を判断するための決定ツリー

用量反応評価への影響

リスク評価を進める前に、毒性に対するMOAのヒトへの関連性を除外することはできないが、更なる問いに対処すべきである。それは以下の点である。これは、4. 種や個体差の不確実性因子のデフォルト値を変更できるような、key eventsに量的な違いがあるか。このような情報は、動態学又は薬力学のいずれかに関するものである。これはCSAFを計算するために使用することができ、その場合動態学又は薬力学における種又は個体差のデフォルト値の1つ以上が、化学物質固有の情報に基づく値に置き換えられる（IPCS、2005年）。調整係数の他の要素は変更しない。このような情報は、通常のデフォルト値と比較して調整係数の増加または減少をもたらす可能性がある。

発表された事例研究

がん以外のエンドポイントに対するMOAsのヒトへの関連性を評価するためのフレームワークを決定するにあたり、ILSI/RSIはまた、一連の例示的な事例研究を実施した。これらの事例研究は以下の通り。

モリネートによる精子形成阻害（Kavlock & Cummings、2005年a）、
エチレングリコールの腎及び発育への影響（Corleyら、2005年）、
ニコチンの発達神経毒性（Slikkerら、2005年）
フタル酸エステルの男性の生殖発達に対する影響（Foster、2005年）、
ビンクロゾリン誘発性奇形（Kavlock & Cummings、2005年b）、
バルプロ酸の発育への影響（Wiltse、2005年）、

ヘモグロビン系酸素運搬 (HBOC) 関連先天性奇形 (Holson ら、2005 年)、
アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害剤の発生影響 (Tabacova、2005 年)、
ポリハロゲン化芳香族炭化水素の発達聴器毒性 (Crofton & Zoeller、2005 年)、
プロピルチオウラシルが神経発達に及ぼす影響 (Zoeller & Crofton、2005 年) などがある。

これらの事例は、様々なエンドポイントを対象としているが、そのほとんどは発生段階の影響を対象としている。したがって、上記のような他のエンドポイントに関する追加の事例研究が必要である。このフレームワークの使用経験の積み重ねにより、公開された事例のいくつかは、フレームワーク適用のための例示的事例を提供できるように、さらに洗練されていく可能性がある。

一般的に、これらの事例は、この非発がん HRF の基礎となっているいくつかの重要な問題を強調する上で非常に有用である。例としては、一致解析の重要性、ヒトへの関連性を排除できない場合のフレームワーク適用中に特定された量的情報の価値、フレームワーク解析の結論を報告する際の透明性のある包括的な構成の必要性、重要なデータギャップの特定 (例: モリネートと HBOC の事例研究)、研究ニーズの特定 (例: ビンクロゾリンの事例研究)、特定の代謝物の形成を理解することの重要性、Bradford Hill 基準 (Hill、1965 年) を key events に適用して堅牢な MOA を確立することの重要性などが挙げられる。

信頼性、解析及び帰結の記述

非発がん HRF を適用し、3 つ (または 4 つ) の質問に回答した後、解析の基礎となるデータの質と量、フレームワーク内での解析の一貫性、データベースの一貫性及び一致性解析の性質と程度に対応した信頼性を示す文書を提供すべきである。必要に応じて代替的な MOAs は、同様に厳密に評価されるべきである。重要な成果は、解析の信頼性を高めるために実験的に対処できるデータギャップを特定することである。

非発がん HRF を行うことにより、実験動物における毒性 MOA がヒトに関連するかどうかを判断するだけでなく、それ以上に有用な情報が得られる。また、関連する影響のリスクの判定の次の段階で重要な情報を得ることができる。例えば、得られた情報に基づいて CSAFs を開発することができるかもしれない。フレームワークを適用することで、リスクに影響を与える可能性のある調節因子の情報も提供できる。さらに、推定される MOA の要素のうち、特定の用量範囲でのみ作用するものを特定することができる。MOA で必須の段階が、ある化合物の高用量投与後のみみ発生する場合、ヒトのリスクに対する MOA の関連性はばく露量によって決定される。したがって、効果的なばく露評価は、このような毒性によるヒトリスクの評価にとって特に重要である。

解析もまた、リスクが増加する可能性のある集団 (例えば、遺伝的素因を持つ人々) の特定に寄与し、多くの場合様々なライフステージにおける相対的なリスクを考慮するのに有用な情報を提供している。これは必ずしも化学物質固有の情報に基づくものではなく、むしろ MOA の知識に基づいて、年齢によってリスクが異なるかどうかについての推論に基づくものである。

非発がん HRF を用いたデータとその解析は、他の人が到達した結論の根拠を判別できるように明確かつ包括的な方法で報告されるべきである。

提示の具体的な形式は利用可能なデータの種類によって異なるが、可能であれば、フレームワークの主要な見出しを含む形式的な報告書を提供すべきである。発表は、到達した結論の透明性を確保するために、文脈と思考プロセスの詳細を含めるべきである。一致表を含めることが強く推奨される。これにより、透明性を高め専門家同士の協力が容易になる。

フレームワークとその成果の利用

IPCS の非発がん HRF は、主に推定される MOA の key events の堅牢な一致解析に基づいている。以下のようないくつかの分野で調和に貢献するための基礎として、リスク評価と研究コミュニティの双方に価値があると考えられている。

- 動物における推定 MOA の妥当性とエビデンスの重み付けの性質及びヒトへの関連性
- エンドポイント間の MOA の統合
- 専門家の参加とレビューを十分に確保するための透明性のある基準

非発がん HRF の強みは、その柔軟性、透明性及びエンドポイント間で適用できることである。これには、用量反応曲線の性質と形状の決定、個々の key events に対する生物学的閾値と位置の特定及びそれらの影響が含まれる。さらに、各 key events に関与する動態学的及び薬力学的要因を考慮することは、特定の集団、例えば、若年期、特定の疾患を有する人々、または特定の多型を有する人々への関連性の有無に関して有益である。あるいは、フレームワークを適用することで、そのようなグループ間の差異に関する定量的な情報を提供することもできる。また、ヒトへの関連性の有無についての解析において、ある種の生物が、用量制限のために潜在的に関連するエンドポイントの評価には不適切である場合もある。

次のステップ

非発がん HRF を効果的に適用するためには、その適用及びその利用の解釈において個人を訓練する必要がある。発がん性 HRF の利用においては経験が得られており、その得られた専門知識は、非発がん HRF 使用における訓練にも適用できる。訓練は、適切な事例研究がより多く利用可能となることによって促進されるであろう。これまでに発表された事例は、この目的のための適切な基盤となる (Seed ら、2005 年)。さらに、より広範囲のエンドポイントに関する事例を調査する必要がある。非発がん HRF 解析の経験を持つ組織が指針を作り、訓練を支援するために適切な専門家がその教材を利用できるようにすることは有用であろう。

一般的に受け入れられている MOA のデータベースを、有益な事例研究とともに編集し、持続させるべきである。このようなデータベースは、MOA の開発において事例は更新され続けられ、ある化合物の MOA が新規か、あるいは他の化合物について以前に記載されていたものかを判断

する上でも重要なものとなるだろう。

IPCS の発がん性 HRF から生まれた現在の非発がん HRF は、がん以外のエンドポイントに焦点を当てている。しかし、発がんと非発がんの効果を評価するための哲学や戦略には顕著な類似点がある。化学物質のリスク評価の調和における次のステップの一つとして、がんを含むすべての毒性学的エンドポイントに適用可能な統一的な HRF を作成することが強く推奨される。リスク評価過程へのフレームワーク適用は、さらに精緻化されるべきであり、その際には、例示が価値あるものとなるであろう。このようなフレームワーク文書には、リスク評価における HRF 解析の使用に関するガイダンスと同様に、HRF 解析に着手する前の問題の定式化に関するガイダンスが含まれるべきである。また、フレームワークを適用することで、用量反応関係の理解が深まることが多いが、これはハザード評価に反映されるべきである。上述のように、用量の変化に関する知識は、ばく露データを解釈する上で非常に重要である。MOA における key events を特定することで、種差及び個体差の原因や程度に関する知見を得ることができる。

参考文献

Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006) IPCS framework for analyzing the relevance of a cancer mode of action for humans. *Critical Reviews in Toxicology*, **36**:781–792.

Corley RA, Meek ME, Carney EW (2005) Mode of action: Oxalate crystal-induced renal tubule degeneration and glycolic acid-induced dysmorphogenesis—Renal and developmental effects of ethylene glycol. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:691–702.

Crofton KM, Zoeller RT (2005) Mode of action: Neurotoxicity induced by thyroid hormone disruption during development—Hearing loss resulting from exposure to PHAHs. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:757–769.

Foster PM (2005) Mode of action: Impaired fetal Leydig cell function—Effects on male reproductive development produced by certain phthalate esters. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:713–719.

Hill AB (1965) The environment and disease: Association or causation? *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, **58**:295–300.

Holson JF, Stump DG, Pearce LB, Watson RE, DeSesso JM (2005) Mode of action: Yolk sac poisoning and impeded histiotrophic nutrition—HBOC-related congenital malformations. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:739–745.

Intergovernmental Forum on Chemical Safety (1994) *The International Conference on Chemical Safety—Final report*. Geneva, World Health Organization (http://www.who.int/ifcs/documents/forums/forum1/en/FI-report_en.pdf).

IPCS (2005) *Chemical-specific adjustment factors for interspecies differences and human variability*:

Guidance document for use of data in dose/concentration–response assessment.

Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Harmonization Project Document No. 2; http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241546786_eng.pdf).

Kavlock R, Cummings A (2005a) Mode of action: Reduction of testosterone availability—Molinate-induced inhibition of spermatogenesis. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:685–690.

Kavlock R, Cummings A (2005b) Mode of action: Inhibition of androgen receptor function—Vinclozolin-induced malformations in reproductive development. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:721–726.

Meek ME, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKeeman LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003) A framework for human relevance analysis of information on carcinogenic modes of action. *Critical Reviews in Toxicology*, **33**:591–653.

Seed J, Carney E, Corley R, Crofton K, DeSesso J, Foster P, Kavlock R, Kimmel G, Klaunig J, Meek E, Preston J, Slikker W, Tabacova S, Williams G (2005) Overview: Using mode of action and life stage information to evaluate the human relevance of animal toxicity data. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:663–672.

Slikker W Jr, Andersen ME, Bogdanffy MS, Bus JS, Cohen SD, Conolly RB, David RM, Doerrner NG, Dorman DC, Gaylor DW, Hattis D, Rogers JM, Setzer RW, Swenberg JA, Wallace K (2004) Dose-dependent transitions in mechanisms of toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **201**:203–225.

Slikker W Jr, Xu ZA, Levin ED, Slotkin TA (2005) Mode of action: Disruption of brain cell replication, second messenger, and neurotransmitter systems during development leading to cognitive dysfunction—Developmental neurotoxicity of nicotine. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:703–711.

Sonich-Mullin C, Fielder R, Wiltse J, Baetcke K, Dempsey J, Fenner-Crisp P, Grant D, Hartley M, Knaap A, Kroese D, Mangelsdorf I, Meek E, Rice J, Younes M (2001) IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **34**:146–152.

Tabacova S (2005) Mode of action: Angiotensin-converting enzyme inhibition—Developmental effects associated with exposure to ACE inhibitors. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:747–755.

UNEP (2002) *Plan of implementation of the World Summit on Sustainable Development*. New York, NY, United Nations Environment Programme (http://www.un.org/esa/sustdev/documents/WSSD_POI_PD/English/WSSD_PlanImpl.pdf).

United Nations (1992) *Agenda 21: United Nations Conference on Environment and Development*. New York, NY, United Nations Division for Sustainable Development (<http://www.un.org/esa/sustdev/documents/agenda21/english/Agenda21.pdf>).

Weed DL (2005) Weight of evidence: A review of concept and methods. *Risk Analysis*, **25**:1545–1557.

WHO (2006) *Strategic Approach to International Chemicals Management (SAICM)*. Geneva, World Health Organization (http://www.who.int/ipcs/features/iccm_crp.pdf).

Wiltse J (2005) Mode of action: Inhibition of histone deacetylase, altering WNT-dependent gene expression, and regulation of beta-catenin—Developmental effects of valproic acid. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:727–738.

Zoeller RT, Crofton KM (2005) Mode of action: Developmental thyroid hormone insufficiency—Neurological abnormalities resulting from exposure to propylthiouracil. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:771–781.

Zoetis T, Walls I, eds (2003) *Principles and practices for direct dosing of preweaning mammals in toxicity testing and research. A report of the ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Direct Dosing of Preweaning Mammals in Toxicity Testing*. Washington, DC, ILSI Press.

ハーモナイゼーションプロジェクト文書シリーズ

IPCS risk assessment terminology (No. 1, 2004)

Chemical-specific adjustment factors for interspecies differences and human variability:
Guidance document for use of data in dose/concentration–response assessment (No. 2, 2005)

Principles of characterizing and applying human exposure models (No. 3, 2005)

Part 1. IPCS framework for analysing the relevance of a cancer mode of action for humans
and case-studies; Part 2. IPCS framework for analysing the relevance of a non-cancer mode
of action for humans (No. 4, 2007)

*To order further copies of monographs in this series, please contact WHO Press,
World Health Organization, 1211 Geneva 27,
Switzerland (Fax No.: +41 22 791 4857; E-mail:
bookorders@who.int).*

The Harmonization Project Documents are also available on the web at <http://www.who.int/ipcs/en/>.

This report contains the collective views of an international group of experts and does not necessarily represent the decisions or the stated policy of the World Health Organization, the International Labour Organization, or the United Nations Environment Programme.

Harmonization Project Document No. 4

PART 1: IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS AND CASE-STUDIES

PART 2: IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A NON-CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS

This project was conducted within the IPCS project on the Harmonization of Approaches to the Assessment of Risk from Exposure to Chemicals.

Published under the joint sponsorship of the World Health Organization, the International Labour Organization, and the United Nations Environment Programme, and produced within the framework of the Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals.

本報告書は、国際的な特別作業部会の見解をまとめたものであり、必ずしも世界保健機関（WHO）、国際労働機関（ILO）、国連環境計画（UNEP）の決定や表明された方針を代表するものではない。

ハーモナイゼーションプロジェクト文書第4号

第1部：

発がん MOA のヒトへの関連性を解析するための IPCS フレームワーク及び事例研究

第2部：

非発がん MOA のヒトへの関連性を解析するための IPCS フレームワーク

本プロジェクトは、化学物質へのばく露によるリスク評価のアプローチの調和に関する IPCS プロジェクトの一環として実施された。

本文書は世界保健機関（WHO）、国際労働機関（ILO）、国連環境計画（UNEP）の共同支援のもとに出版され、化学物質の適正な管理に関する国際機関間プログラムのフレームワークの中で作成された。

The **International Programme on Chemical Safety (IPCS)**, established in 1980, is a joint venture of the United Nations Environment Programme (UNEP), the International Labour Organization (ILO), and the World Health Organization (WHO). The overall objectives of the IPCS are to establish the scientific basis for assessment of the risk to human health and the environment from exposure to chemicals, through international peer review processes, as a prerequisite for the promotion of chemical safety, and to provide technical assistance in strengthening national capacities for the sound management of chemicals.

The **Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC)** was established in 1995 by UNEP, ILO, the Food and Agriculture Organization of the United Nations, WHO, the United Nations Industrial Development Organization, the United Nations Institute for Training and Research, and the Organisation for Economic Co-operation and Development (Participating Organizations), following recommendations made by the 1992 UN Conference on Environment and Development to strengthen cooperation and increase coordination in the field of chemical safety. The purpose of the IOMC is to promote coordination of the policies and activities pursued by the Participating Organizations, jointly or separately, to achieve the sound management of chemicals in relation to human health and the environment.

WHO Library Cataloguing-in-Publication Data

IPCS mode of action framework.

(IPCS harmonization project document ; no. 4)

1. Hazardous substances – toxicity. 2. Risk assessment – methods. 3. Risk management – methods. 4. Carcinogenicity tests. 5. Carcinogens. 6. Neoplasms – chemically induced. I. International Programme on Chemical Safety. II. Series.

ISBN 978 92 4 156349 9

(NLM classification: QV 602)

© World Health Organization 2007

All rights reserved. Publications of the World Health Organization can be obtained from WHO Press, World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland (tel.: +41 22 791 2476; fax: +41 22 791 4857; e-mail: bookorders@who.int). Requests for permission to reproduce or translate WHO publications—whether for sale or for non-commercial distribution—should be addressed to WHO Press, at the above address (fax: +41 22 791 4806; e-mail: permissions@who.int).

The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city, or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

The mention of specific companies or of certain manufacturers' products does not imply that they are endorsed or recommended by the World Health Organization in preference to others of a similar nature that are not mentioned. Errors and omissions excepted, the names of proprietary products are distinguished by initial capital letters.

All reasonable precautions have been taken by the World Health Organization to verify the information contained in this publication. However, the published material is being distributed without warranty of any kind, either express or implied. The responsibility for the interpretation and use of the material lies with the reader. In no event shall the World Health Organization be liable for damages arising from its use.

国際化学物質安全性計画 (International Programme on Chemical Safety: IPCS) は、1980 年に設立された国連環境計画 (UNEP)、国際労働機関 (ILO)、世界保健機関 (WHO) の共同事業である。IPCS の全体的な目的は、化学物質の安全性の向上のための必要条件として、国際的なピアレビューを通じて、化学物質へのばく露によるヒトの健康と環境へのリスクを評価するための科学的基盤を確立し、化学物質の健全な管理のために各国の管理能力を強化する技術支援を提供することである。

化学物質の適正な管理に関する国際機関間プログラム (IOMC) は、1992 年の国連環境開発会議 (UNCED) において表明された化学物質の安全性の分野での協力及び連携の強化を目的とした勧告に従い、UNEP、ILO、国連食糧農業機関 (FAO)、WHO、国際連合工業開発機関 (UNIDO)、国連訓練調査研究所 (UNITAR)、経済協力開発機構 (OECD) (以上参加機関) によって 1995 年に設立された。IOMC の目的は、ヒトの健康と環境に関連した化学物質の健全な管理を達成するために、参加機関が共同で、あるいは個別に遂行する政策と活動の連携を促進することである。

WHO ライブラリ出版物目録データ

IPCS MOA フレームワーク

(IPCS ハーモナイゼーションプロジェクト文書 ; no.4)

1. 有害物質-毒性
2. リスクアセスメント-方法
3. リスク管理-方法
4. 発がん性試験
5. 発がん物質
6. 腫瘍-化学的に誘発される腫瘍
- I. 国際化学物質安全計画 II. シリーズ

ISBN 978 92 4 156349 9 (NLM 分類: QV 602)

© World Health Organization 2007

本書は著作権により保護されています。世界保健機関の出版物は、世界保健機関 WHO 出版部 (住所: 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland (tel. +41 22 7912476, FAX: +41 22 791 4857; e-mail: bookorders@who.int) から入手可能です。WHO 出版物の複製または翻訳の許可を希望される場合は、販売目的であるか非商業的な配布であるかを問わず、WHO 出版部 (上記の住所, FAX: +41 22 791 4806; e-mail: permissions@who.int) までご連絡ください。

本書に掲載されている名称や資料は、国、地域、都市、地域の法的地位や主権、あるいは国境等の境界線に関する世界保健機関の見解を表明するものではありません。地図上の点線は、境界線について未だ完全な合意が得られていない地域についてのおおよその境界線を表しています。

特定の企業や特定のメーカーの製品についての記載は、世界保健機関がそれら製品を類似の性質を持つ他社の製品と比較し、推奨していることを意味するものではありません。誤字脱字を除き、製品の固有名称はそれとわかるよう頭文字を大文字で表記しています。

世界保健機関は、本書に含まれる情報の信頼性を保証するために、可能な限りの合理的な予防措置を講じています。しかし、本書に掲載されている資料は、明示または黙示を問わず、いかなる種類の保証もなく頒布されているものです。本資料の解釈及び使用に関する責任は読者にあります。いかなる場合においても、世界保健機関はその使用から生じる損害に対して責任を負いません。

TABLE OF CONTENTS

FOREWORD	1
 PART 1: IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS AND CASE-STUDIES	
PREFACE	4
LIST OF CONTRIBUTORS	7
LIST OF ACRONYMS AND ABBREVIATIONS	8
IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS	10
<i>A.R. Boobis, S.M. Cohen, V. Dellarco, D. McGregor, M.E. Meek, C. Vickers, D. Willcocks, & W. Farland</i>	
THIAZOPYR AND THYROID DISRUPTION: CASE-STUDY WITHIN THE CONTEXT OF THE IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS	30
<i>V.L. Dellarco, D. McGregor, C. Berry, S.M. Cohen, & A.R. Boobis</i>	
4-AMINOBIIPHENYL AND DNA REACTIVITY: CASE-STUDY WITHIN THE CONTEXT OF THE IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS	44
<i>S.M. Cohen, A.R. Boobis, M.E. Meek, R.J. Preston, & D.B. McGregor</i>	
FORMALDEHYDE AND GLUTARALDEHYDE AND NASAL CYTOTOXICITY: CASE-STUDY WITHIN THE CONTEXT OF THE IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS	75
<i>D. McGregor, H. Bolt, V. Coglian, & H.-B. Richter-Reichhelm</i>	
 PART 2: IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A NON-CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS	
PREFACE	104
LIST OF CONTRIBUTORS	105
LIST OF ACRONYMS AND ABBREVIATIONS	106

目次

序文	1
 第1部：発がんMOAのヒトへの関連性を解析するためのIPCSフレームワーク及び事例研究	
序文	4
貢献者リスト	7
頭字語と略語のリスト	8
発がんMOAのヒトへの関連性を解析するためのIPCSフレームワーク	10
<i>A.R. Boobis, S.M. Cohen, V. Dellarco, D. McGregor, M.E. Meek, C. Vickers, D. Willcocks, & W. Farland</i>	
チアゾピルと甲状腺障害：発がんMOAのヒトへの関連性を解析するためのIPCSフレームワークを用いた事例研究	30
<i>V.L. Dellarco, D. McGregor, C. Berry, S.M. Cohen, & A.R. Boobis</i>	
4-AminobiphenylとDNAの反応性：発がんMOAのヒトへの関連性を解析するためのIPCSフレームワークを用いた事例研究	44
<i>S.M. Cohen, A.R. Boobis, M.E. Meek, R.J. Preston, & D.B. McGregor</i>	
ホルムアルデヒド及びグルタルアルデヒドの鼻腔内細胞毒性：発がんMOAのヒトへの関連性を解析するためのIPCSフレームワークを用いた事例研究	75
<i>D. McGregor, H. Bolt, V. Coglian, & H.-B. Richter-Reichhelm</i>	
 第2部：非発がんMOAのヒトへの関連性を解析するためのIPCSフレームワーク	
序文	104
貢献者リスト	105
頭字語と略語のリスト	106

IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A NON-CANCER
MODE OF ACTION FOR HUMANS107
*A.R. Boobis, J.E. Doe, B. Heinrich-Hirsch, M.E. Meek, S. Munn, M. Ruchirawat,
J. Schlatter, J. Seed, & C. Vickers*

非発がん MOA のヒトへの関連性を解析するための IPCS フレームワーク 107
*A.R. Boobis, J.E. Doe, B. Heinrich k, S. Munn, M. Ruchirawat,
J. Schlatter, J. Seed, & C. Vickers*

FOREWORD

Harmonization Project Documents are a family of publications by the World Health Organization (WHO) under the umbrella of the International Programme on Chemical Safety (IPCS) (WHO/ILO/UNEP). Harmonization Project Documents complement the Environmental Health Criteria (EHC) methodology (yellow cover) series of documents as authoritative documents on methods for the risk assessment of chemicals.

The main impetus for the current coordinated international, regional, and national efforts on the assessment and management of hazardous chemicals arose from the 1992 United Nations Conference on Environment and Development (UNCED). UNCED Agenda 21, Chapter 19, provides the “blueprint” for the environmentally sound management of toxic chemicals. This commitment by governments was reconfirmed at the 2002 World Summit on Sustainable Development and in 2006 in the Strategic Approach to International Chemicals Management (SAICM). The IPCS project on the Harmonization of Approaches to the Assessment of Risk from Exposure to Chemicals (Harmonization Project) is conducted under Agenda 21, Chapter 19, and contributes to the implementation of SAICM. In particular, the project addresses the SAICM objective on Risk Reduction and the SAICM Global Plan of Action activity to “Develop and use new and harmonized methods for risk assessment”.

The IPCS Harmonization Project goal is *to improve chemical risk assessment globally, through the pursuit of common principles and approaches, and, hence, strengthen national and international management practices that deliver better protection of human health and the environment within the framework of sustainability*. The Harmonization Project aims to harmonize global approaches to chemical risk assessment, including by developing international guidance documents on specific issues. The guidance is intended for adoption and use in countries and by international bodies in the performance of chemical risk assessments. The guidance is developed by engaging experts worldwide. The project has been implemented using a stepwise approach, first sharing information and increasing understanding of methods and practices used by various countries, identifying areas where convergence of different approaches would be beneficial, and then developing guidance that enables implementation of harmonized approaches. The project uses a building block approach, focusing at any one time on the aspects of risk assessment that are particularly important for harmonization.

The project enables risk assessments (or components thereof) to be performed using internationally accepted methods, and these assessments can then be shared to avoid duplication and optimize use of valuable resources for risk management. It also promotes sound science as a basis for risk management decisions, promotes transparency in risk assessment, and reduces unnecessary testing of chemicals. Advances in scientific knowledge can be translated into new harmonized methods.

This ongoing project is overseen by a geographically representative Harmonization Project Steering Committee and a number of ad hoc Working Groups that manage the detailed work. Finalization of documents includes a rigorous process of international peer review and public comment.

序文

ハーモナイゼーションプロジェクト文書とは、国際化学物質安全性計画 (IPCS) (WHO/ILO/UNEP)のもと世界保健機関 (WHO) によって出版された出版物群である。ハーモナイゼーションプロジェクト文書は、化学物質のリスク評価方法に関する正式な文書として、環境保健クライテリア (EHC) の方法論シリーズ (黄表紙) を補完するものである。

有害化学物質の評価と管理に関する現在の国際的、地域的及び各国内の協調的な取り組みの主なきっかけは、1992年の国連環境開発会議 (UNCED) にあった。UNCED アジェンダ 21 の第 19 章において、有害化学物質の環境的に健全な管理のための「青写真」が示されている。各国政府によるこのコミットメントは、2002年の持続可能な開発に関する世界首脳会議で、さらに 2006年の国際的な化学物質管理のための戦略的アプローチ (SAICM) でも再確認された。化学物質へのばく露によるリスク評価のアプローチの調和に関する IPCS プロジェクト (ハーモナイゼーションプロジェクト) は、このアジェンダ 21 第 19 章の下で実施されており、SAICM の実施に貢献している。特に、本プロジェクトは、SAICM の目標である「リスク低減」と SAICM 世界行動計画の活動である「リスク評価のための新たな調和された手法の開発と利用」に対応している。

IPCS ハーモナイゼーションプロジェクトの目的は、共通の原則とアプローチを追求することによって化学物質のリスク評価を世界的に改善し、持続可能性というフレームワークの中でヒトの健康と環境をより良く保護するための国内及び国際的な管理手法を強化することである。ハーモナイゼーションプロジェクトは、特定の問題に関する国際的なガイダンス文書を作成することを含め、化学物質リスク評価に対する世界各国のアプローチを調和させることを目的としている。このガイダンスは、化学物質のリスク評価を実施する際に各国や国際機関で採用され、使用することを目的としている。このガイダンスは、世界中の専門家の協力を得て作成されている。本プロジェクトは、まず各国の手法や慣行について情報を共有し、理解を深め、異なるアプローチの統一化が有益となる分野を特定した上で、調和のとれたアプローチの実施を可能にするガイダンスを作成するという段階的アプローチを用いて採用している。本プロジェクトでは、アプローチの調和を図る上で、特に重要なリスク評価の側面に焦点を当てたビルディングブロック法を採用している。

このプロジェクトにより、国際的に認められた手法を用いてリスク評価 (またはその構成要素) を実施することを可能にし、これらの評価を共有することで重複を避け、リスク管理のための貴重な資源を最適に利用することが可能となる。また、リスク管理の意思決定の基礎となる健全な科学を促進し、リスク評価の透明性を高め、不必要な化学物質の試験を減らすことができる。また、科学的知識の発展が新たな調和のとれた手法の開発へとつながりうる。

この進行中のプロジェクトは、各地域の代表的なハーモナイゼーションプロジェクト運営委員会と、詳細な作業を管理するいくつかの特別作業部会によって監督されている。最終的には、国際的なピアレビュー及びパブリックコメントといった厳格なプロセスが含まれている。

PART 1

IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS AND CASE-STUDIES

第1部

発がん MOA のヒトへの関連性を解析するための
IPCS フレームワーク及び事例研究

PREFACE

Following publication of the International Programme on Chemical Safety (IPCS) Conceptual Framework for Evaluating a Mode of Action for Chemical Carcinogenesis (in animals),¹ an IPCS Cancer Working Group convened on 3–5 March 2004 in Arlington, Virginia, USA. The working group agreed that the issue of human relevance of animal tumours should be further explored with the goal of developing a unified IPCS Human Relevance Framework for use of mode of action information in risk assessment for regulatory and other purposes, and it provided initial guidance for this task. The members of this working group, including secretariat support and a representative of the Organisation for Economic Co-operation and Development, were as follows:

Professor Hermann Bolt, Institut für Arbeitsphysiologie, Germany
 Professor Alan R. Boobis, Department of Health Toxicology Unit, Imperial College London, United Kingdom
 Dr John Bucher, National Institute of Environmental Health Sciences, USA
 Dr Vincent Coglian, Unit of Carcinogen Identification and Evaluation, International Agency for Research on Cancer, France
 Dr Samuel M. Cohen, Pathology and Microbiology, Havlik-Wall Professor of Oncology, University of Nebraska Medical Center, USA
 Dr William Farland, Office of Research and Development, Environmental Protection Agency, USA
 Dr Jun Kanno, Division of Cellular & Molecular Toxicology, National Institute of Health Sciences, Japan
 Dr Lois D. Lehman-McKeeman, Bristol-Myers Squibb, USA
 Ms Bette Meek, Environmental Health Centre, Health Canada, Canada
 Ms Laurence Musset, Environment, Health and Safety Division, Organisation for Economic Co-operation and Development, France
 Dr Jerry Rice, Consultant, USA
 Ms Cindy Sonich-Mullin, International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, USA
 Ms Carolyn Vickers, International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Switzerland
 Ms Deborah Willcocks, Existing Chemicals, National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme (NICNAS), Australia

Extending the Mode of Action Framework to include consideration of human relevance, taking into account guidance from the Arlington meeting, was the subject of an IPCS international workshop convened in Bradford, United Kingdom, from 21 to 23 April 2005. This workshop prepared draft text for an IPCS Human Relevance Framework, including updating the 2001 Mode of Action Framework. The workshop participants, including

¹ Sonich-Mullin C, Fielder R, Wiltse J, Baetcke K, Dempsey J, Fenner-Crisp P, Grant D, Hartley M, Knaap A, Kroese D, Mangelsdorf I, Meek E, Rice J, Younes M (2001) IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **34**:146–152.

序文

国際化学物質安全性計画 (IPCS) の (動物における) ¹「化学物質の発がん作用機序の評価に関する概念的フレームワーク」の公表を受けて、2004 年 3 月 3 日から 5 日に米国バージニア州アーリントンで IPCS がんワーキンググループが開催された。このワーキンググループは、規制やその他の目的でリスク評価において作用機序に関する情報を利用するための統一された IPCS ヒト関連性フレームワークを開発することを目標に、動物における腫瘍のヒトへの関連性の問題をさらに検討する必要があることに合意し、この作業のための初期のガイダンスを提供した。このワーキンググループのメンバーは、事務局サポートと経済協力開発機構 (OECD) の代表者を含めて以下の通りである。

Hermann Bolt 教授 (ドイツ・生理学研究所)
 Alan R. Boobis 教授 (インペリアル・カレッジ・ロンドン、健康毒性学部門、英国)
 John Bucher 博士 (国立環境衛生科学研究所、米国)
 Vincent Coglian 博士 (国際がん研究機関 発がん物質同定・評価ユニット、フランス)
 Samuel M. Cohen 博士 (病理学・微生物学、ハヴリック・ウォール腫瘍学教授、ネブラスカメディカルセンター大学、米国)
 William Farland 博士 (環境保護庁研究開発局、米国)
 Jun Kanno 博士 (独立行政法人国立医薬品食品衛生研究所 細胞分子毒性学研究部門、日本)
 Lois D. Lehman-McKeeman 博士 (プリストル・マイヤーズ スクイブ、米国)
 Bette Meek 氏 (カナダ保健省環境衛生センター、カナダ)
 Laurence Musset 氏 (経済協力開発機構 環境安全衛生部門、フランス)
 Jerry Rice 博士 (コンサルタント、米国)
 Cindy Sonich-Mullin 氏 (世界保健機関 国際化学物質安全性計画、米国)
 Carolyn Vickers 氏 (世界保健機関 国際化学物質安全性計画、スイス)
 Deborah Willcocks 氏 (国家工業化学品届出・評価スキーム (NICNAS)、既存化学品担当、オーストラリア)

2005 年 4 月 21 日から 23 日に英国のブラッドフォードで開催された IPCS 国際ワークショップにおいてアーリントン会議のガイダンスを考慮し、MOA フレームワークに人間への関連性を考慮した内容に拡張することが検討された。このワークショップでは、2001 年の MOA フレームワークの更新を含む IPCS ヒト関連性フレームワークの草案が作成された。

¹ Sonich-Mullin C, Fielder R, Wiltse J, Baetcke K, Dempsey J, Fenner-Crisp P, Grant D, Hartley M, Knaap A, Kroese D, Mangelsdorf I, Meek E, Rice J, Younes M (2001) IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **34**:146–152.

secretariat support and representatives of the European Food Safety Authority and European Chemicals Bureau, were as follows:

Dr Peter Abbott, Scientific Risk Assessment and Evaluation Branch, Food Standards Australia New Zealand, Australia
Dr Antero Aitio, International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Switzerland
Dr Diana Anderson, Department of Biomedical Sciences, University of Bradford, United Kingdom
Professor Sir Colin Berry, United Kingdom
Professor Hermann Bolt, Institut für Arbeitsphysiologie, Germany
Professor Alan R. Boobis, Department of Health Toxicology Unit, Imperial College London, United Kingdom
Dr Susy Brescia, Health and Safety Executive, United Kingdom
Dr John Bucher, National Institute of Environmental Health Sciences, USA
Dr Vincent Coglian, Unit of Carcinogen Identification and Evaluation, International Agency for Research on Cancer, France
Dr Samuel M. Cohen, Pathology and Microbiology, Havlik-Wall Professor of Oncology, University of Nebraska Medical Center, USA
Dr Vicki Dellarco, Office of Pesticide Programs, Environmental Protection Agency, USA
Ms Christine Dove, School of Life Sciences, University of Bradford, United Kingdom
Dr Jun Kanno, Division of Cellular and Molecular Toxicology, National Institute of Health Sciences, Japan
Dr Janet Kielhorn, Department of Chemical Risk Assessment, Fraunhofer Institute for Toxicology and Experimental Medicine, Germany
Mrs Sandra Kunz, International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Switzerland
Dr Christian Laurent, Scientific Expert Services, European Food Safety Authority, Italy
Dr Douglas McGregor, Toxicity Evaluation Consultants, United Kingdom
Ms Bette Meek, Environmental Health Centre, Health Canada, Canada
Ms Sharon Munn, Toxicology and Chemical Substances, European Chemicals Bureau, Italy
Dr R. Julian Preston, National Health and Environmental Effects Research Laboratory, Environmental Carcinogenesis Division, Environmental Protection Agency, USA
Dr Jerry Rice, Consultant, USA
Dr Hans-Bernhard Richter-Reichhelm, Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Germany
Ms Carolyn Vickers, International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Switzerland
Ms Deborah Willcocks, Existing Chemicals, National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme (NICNAS), Australia
Dr William P. Wood, Risk Assessment Forum, Environmental Protection Agency, USA
Dr Zheng Yuxin, Institute for Occupational Health and Poison Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, and WHO Collaborating Centre of Occupational Health, People's Republic of China

ワークショップの参加者は、事務局サポート、欧州食品安全局と欧州化学品局の代表者を含め、以下の通りである。

Peter Abbott 博士（オーストラリア・ニュージーランド食品基準、科学的リスク評価局、オーストラリア）
Antero Aitio 博士（世界保健機関、国際化学物質安全性計画、スイス）
Diana Anderson 博士（ブラッドフォード大学、生物医学科、イギリス）
Colin Berry 教授（イギリス）
Hermann Bolt 教授（生理学研究所、ドイツ）
Alan R. Boobis 教授（インペリアル・カレッジ・ロンドン、健康毒性学部門、英国）
Susy Brescia 博士（イギリス健康安全局、英国）
John Bucher 博士（国立環境衛生科学研究所、米国）
Vincent Coglian, 博士（国際がん研究機関 発がん物質同定・評価部門、フランス）
Samuel M. Cohen 博士（病理学・微生物学、ハヴリック・ウォール腫瘍学教授、ネブラスカメディカルセンター大学、米国）
Vicki Dellarco 博士（環境保護庁、農薬プログラム部、米国）
Christine Dove 氏（ブラッドフォード大学 生命科学部、英国）
Jun Kanno 博士（独立行政法人国立医薬品食品衛生研究所 細胞分子毒性学研究部門、日本）
Janet Kielhorn 博士（フラウンホーファー毒物実験医学研究所 化学リスク評価部、ドイツ）
Sandra Kunz 氏（世界保健機関、国際化学物質安全性計画、スイス）
Christian Laurent 博士（欧州食品安全機関、科学的専門家サービス、イタリア）
Douglas McGregor 博士（毒性評価コンサルタント、英国）
Bette Meek 氏（カナダ保健省、環境衛生センター、カナダ）
Sharon Munn 氏（欧州化学機関、毒物・化学物質担当、イタリア）
Julian Preston 博士（環境保護庁、環境発がん部門 国立健康・環境影響研究所、米国）
Jerry Rice 博士（コンサルタント、米国）
Hans-Bernhard Richter-Reichhelm 博士（連邦リスク評価研究所（BfR）、ドイツ）
Carolyn Vickers 氏（世界保健機関、国際化学物質安全性計画、スイス）
Deborah Willcocks 氏（国家工業化学品届出・評価スキーム（NICNAS）既存化学品担当、オーストラリア）
William P. Wood 博士（環境保護庁、リスクアセスメントフォーラム、米国）
Zheng Yuxin 博士（労働衛生・毒物管理機関、中華人民共和国疾病管理予防局、WHO 労働衛生協力センター、中国）

The draft was published on the Internet for public comment and sent to a number of WHO Collaborating Centres and IPCS Participating Institutions for peer review. An expert meeting that convened in London in December 2005 considered the comments received and finalized the framework. The expert meeting participants were as follows:

Professor Alan R. Boobis, Department of Health Toxicology Unit, Imperial College
London, United Kingdom (*Rapporteur*)
Dr Samuel M. Cohen, Pathology and Microbiology, Havlik-Wall Professor of Oncology,
University of Nebraska Medical Center, USA
Dr Vicki Dellarco, Office of Pesticide Programs, Environmental Protection Agency,
USA
Dr William Farland, Office of Research and Development, Environmental Protection
Agency, USA (*Chair*)
Dr Douglas McGregor, Toxicity Evaluation Consultants, United Kingdom
Ms Carolyn Vickers, International Programme on Chemical Safety, World Health
Organization, Switzerland
Ms Deborah Willcocks, Existing Chemicals, National Industrial Chemicals Notification
and Assessment Scheme (NICNAS), Australia

草案はパブリックコメントのためにインターネット上で公開され、ピアレビューのために多くの WHO 協力機関と IPCS 参加機関に送付された。2005 年 12 月にロンドンで開催された専門家会議では、寄せられたコメントを検討し、最終的にフレームワークが決定された。専門家会議の参加者は以下の通りである。

Alan R. Boobis 教授（インペリアル・カレッジ・ロンドン、英国）（報告者）
Samuel M. Cohen 博士（病理学・微生物学、ハヴリック・ウォール腫瘍学教授、ネブラスカメディカルセンター大学、米国）
Vicki Dellarco 博士（環境保護庁、農薬プログラム部、米国）
William Farland 氏（環境保護庁、研究開発局、米国）（座長）
Douglas McGregor 博士（毒性評価コンサルタント、英国）
Carolyn Vickers 氏（世界保健機関、国際化学物質安全性計画、スイス）
Deborah Willcocks 氏（国家工業化学品届出・評価スキーム (NICNAS)、既存化学品担当、オーストラリア）

LIST OF CONTRIBUTORS

Sir Colin Berry

Emeritus Professor of Biology, Queen Mary, London, United Kingdom

Hermann Bolt

Institut für Arbeitsphysiologie, Dortmund, Germany

Alan R. Boobis

Experimental Medicine and Toxicology, Division of Medicine, Imperial College London, London, United Kingdom

Vincent Cogliano

Carcinogen Identification and Evaluation Unit, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France

Samuel M. Cohen

Department of Pathology and Microbiology and Eppley Institute for Cancer Research, University of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska, USA

Vicki Dellarco

Office of Pesticide Programs, Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA

William Farland

Office of Research and Development, Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA

Douglas McGregor

Toxicity Evaluation Consultants, Aberdour, United Kingdom

M.E. (Bette) Meek

Existing Substances Division, Safe Environments Programme, Health Canada, Ottawa, Ontario, Canada

R. Julian Preston

Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, North Carolina, USA

Hans-Bernhard Richter-Reichhelm

Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Berlin, Germany

Carolyn Vickers

International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, Switzerland

Deborah Willcocks

National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme, Sydney, Australia

貢献者リスト

Colin Berry 名誉教授（クイーン・メアリー、ロンドン、英国）

Hermann Bolt（産業生理研究所、ドイツ）

Alan R. Boobis（実験薬理学・毒性学、医学部、インペリアル・カレッジ・ロンドン、英国）

Vincent Cogliano（国際がん研究機関 発がん物質同定・評価部門、フランス）

Samuel M. Cohen（病理学・微生物学、エプリーがん研究所、ネブラスカメディカルセンター大学、米国）

Vicki Dellarco（環境保護庁、農薬プログラム部、米国）

William Farland（環境保護庁、研究開発局、米国）

Douglas McGregor（毒性評価コンサルタント、英国）

M.E. (Bette) Meek（カナダ保健省、安全環境計画、既存物質部門、カナダ）

R. Julian Preston（環境保護庁、米国）

Hans-Bernhard Richter-Reichhelm（連邦リスク評価研究所（BfR）、ドイツ）

Carolyn Vickers（世界保健機関、国際化学物質安全性計画、スイス）

Deborah Willcocks（国家工業化学品届出・評価スキーム（NICNAS）、既存化学品担当、オーストラリア）

LIST OF ACRONYMS AND ABBREVIATIONS

ADH	alcohol dehydrogenase
ANOVA	analysis of variance
bw	body weight
CAR	constitutively active receptor
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CoA	coenzyme A
CpG	cytosine and guanine separated by a phosphate
CYP	cytochrome P-450
dA	deoxyadenosine
dG	deoxyguanosine
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DPX	DNA–protein cross-links
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
HRF	Human Relevance Framework
IARC	International Agency for Research on Cancer
ILO	International Labour Organization
ILSI	International Life Sciences Institute
IPCS	International Programme on Chemical Safety
IU	International Units
JMPR	Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues
K_M	Michaelis-Menten constant
LOAEL	lowest-observed-adverse-effect level
MOA	mode of action
NAT	<i>N</i> -acetyltransferase
NOAEL	no-observed-adverse-effect level
NTP	National Toxicology Program (USA)
OAT	<i>O</i> -acetyltransferase
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PPX	protein–protein cross-linkage
RNA	ribonucleic acid
RSI	Risk Science Institute (ILSI)
rT3	reverse triiodothyronine
S9	9000 × <i>g</i> supernatant from rat liver
SCE	sister chromatid exchange
SHE	Syrian hamster embryo
T3	triiodothyronine
T4	thyroxine
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TGF	tumour growth factor
TSH	thyroid stimulating hormone
UDP	uridine diphosphate
UDS	unscheduled DNA synthesis
UGT	uridine diphosphate glucuronosyltransferase

頭字語と略語のリスト

ADH	アルコール脱水素酵素
ANOVA	分散分析
bw	体重
CAR	恒常的活性化受容体
cDNA	相補的デオキシリボ核酸
CoA	補酵素 A
CpG	シトシンとグアニンの 2 塩基配列
CYP	シトクロム P-450
dA	デオキシアデノシン
dG	デオキシングアノシン
DMSO	ジメチルスルホキシド
DNA	デオキシリボ核酸
DPX	DNA-タンパク質架橋
FAO	国連食糧農業機関
HRF	ヒト関連性フレームワーク
IARC	国際がん研究機関
ILO	国際労働機関
ILSI	国際生命科学研究機構
IPCS	国際化学物質安全性計画
IU	国際単位
JMPR	残留農薬に関する FAO/WHO 合同会議
KM	ミカエリス・メンテン定数
LOAEL	最小毒性量
MOA	Mode of Action (作用モード)
NAT	N-アセチルトランスフェラーゼ
NOAEL	無毒性量
NTP	米国国家毒性プログラム
OAT	O-アセチルトランスフェラーゼ
PCNA	増殖性細胞核抗原
PPX	蛋白質間架橋
RNA	リボ核酸
RSI	リスク科学研究所 (ILSI)
rT3	リバーストリヨードサイロニン
S9	9000g で遠心分離したラット肝臓上清 (肝ミクロソーム)
SCE	姉妹染色分体交換
SHE	シリアンハムスター胚
T3	トリヨードサイロニン
T4	チロキシン
TCDD	2,3,7,8-ジベンゾ-p-ダイオキシン
TGF	腫瘍成長因子
TSH	甲状腺刺激ホルモン
UDP	ウリジン二リン酸
UDS	不定期 DNA 合成
UGT	ウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素

ULLI	unit length labelling index
UNEP	United Nations Environment Programme
USA	United States of America
USEPA	United States Environmental Protection Agency
WHO	World Health Organization

ULLI	単位長及び標識指数
UNEP	国際連合環境計画
USA	アメリカ合衆国
USEPA	米国環境保護庁
WHO	世界保健機関

IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS¹

Alan R. Boobis, Samuel M. Cohen, Vicki Dellarco, Douglas McGregor,
M.E. (Bette) Meek, Carolyn Vickers, Deborah Willcocks, & William Farland

The use of structured frameworks can be invaluable in promoting harmonization in the assessment of chemical risk. The International Programme on Chemical Safety (IPCS) has therefore updated and extended its Mode of Action (MOA) Framework for cancer to address the issue of human relevance of a carcinogenic response observed in an experimental study. The first stage is to determine whether it is possible to establish an MOA. This comprises a series of key events along the causal pathway to cancer, identified using a weight-of-evidence approach based on the Bradford Hill criteria. The key events are then compared first qualitatively and then quantitatively between the experimental animals and humans. Finally, a clear statement of confidence, analysis, and implications is produced. The IPCS Human Relevance Framework for cancer provides an analytical tool to enable the transparent evaluation of the data, identification of key data gaps, and structured presentation of information that would be of value in the further risk assessment of the compound, even if relevancy cannot be excluded. This might include data on the shape of the dose-response curve, identification of any thresholds, and recognition of potentially susceptible subgroups, for example, the basis of genetic or life stage differences.

Fundamental to the evolution of cancer risk assessment over the last three decades has been our increasing understanding of the biology of cancer and the identification of key events in carcinogenesis. Through the mid-1980s, national and international assessments of human cancer hazard and risk depended primarily on lifetime assays in rodents of potentially carcinogenic agents. For few agents was there sufficient human evidence on which to base retrospective cancer assessments, and fewer still would be expected to be detected prospectively, given modern controls on general exposures in the workplace and in the environment generally. Inherent in rodent-based assessments was the assumption that the observation of tumours in laboratory animals could be meaningfully extrapolated to identify potential human carcinogens and, by the use of mathematical models, to provide upper-bound estimates of risk at human doses of regulatory significance. During the same period, the potential significance of mutagenesis in carcinogenesis was becoming accepted by the scientific community. Subsequently, it has become increasingly apparent that an appreciable number of chemicals cause cancer in laboratory animals by processes that do not involve direct interaction with DNA. These developments in our understanding of the biological basis of carcinogenesis in both laboratory animals and humans have benefited risk assessment processes by providing more data on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of suspect carcinogenic agents. Consideration of the biological processes involved in the carcinogenesis of specific compounds has led to the concept of mode of action (MOA).

¹ This article, to which WHO owns copyright, was originally published in 2006 in *Critical Reviews in Toxicology*, Volume 36, pages 781–792. It has been edited for this WHO publication and includes corrigenda.

発がん MOA のヒトへの関連性を解析するための

IPCS フレームワーク¹

Alan R. Boobis, Samuel M. Cohen, Vicki Dellarco, Douglas McGregor,
M.E. (Bette) Meek, Carolyn Vickers, Deborah Willcocks, & William Farland

体系化されたフレームワークの利用は、化学物質のリスク評価における調和を促進する上で非常に重要である。したがって、国際化学物質安全性計画 (International Programme on Chemical Safety: IPCS) は、実験的研究で観察された発がん性反応のヒトへの関連性の問題に対処するために、発がん Mode of Action (MOA) フレームワークを更新し、拡張した。第一段階は、MOA を確立することが可能かどうかを判断することである。MOA は、Bradford Hill 基準に基づいたエビデンスの重み付けアプローチを用いて特定された発がんの原因経路に沿った一連の key events で構成されている。次に、実験動物とヒトの間で key events を定性的に、次に定量的に比較する。最後に、信頼性、解析的検討及び意義についての明確な報告書が作成される。IPCS 発がん性ヒト関連性フレームワークは、データの透明性のある評価、重要なデータギャップの特定及び関連性が排除できない場合であっても、化合物のさらなるリスク評価において価値のある情報の体系的な提示を可能にする解析ツールを提供するものである。この価値ある情報には、用量反応曲線の形状に関するデータ、閾値の特定及び遺伝的またはライフステージの違いなどに基づいた潜在的に感受性の高い集団を認知することが含まれる。

過去 30 年間のがんリスク評価の発展の基礎となったのは、がんの生物学的理解の深まりと発がんにおける key events の特定である。1980 年代半ばまでは、ヒトにおけるがんのハザードとリスクに関する国内及び国際的な評価は、主に発がん性のある物質のげっ歯類を用いた生涯試験に依存していた。後ろ向きがん研究の基礎となるに十分なヒトにおけるエビデンスが存在する薬剤はほとんどなく、職場や環境における一般的なばく露に対する現代の規制を考えれば、将来的に発がん性が検出される薬剤はさらに少ないと予想される。げっ歯類を用いた評価において、実験動物で観察された腫瘍は、潜在的にヒトに対して発がん性を有する物質を特定するために意味のある外挿が可能であり、数学的モデルを用いて規制上重要となるヒトにおけるリスクの上限推定値を提供することができるという前提があった。同時期に、発がんにおいて変異原性が重要な意義を有する可能性があるということが科学界に受け入れられつつあった。その後、かなりの数の化学物質が、DNA との直接的な相互作用を伴わないプロセスによって実験動物にがんを引き起こすことが次第に明らかになってきた。実験動物とヒトの両方における発がんの生物学的基盤に関する我々の理解を深めることは、発がん性が疑われる薬剤の薬物動態及び薬理作用に関するより多くのデータを提供することにより、リスク評価の過程を有益なものとした。特定の化合物の発がんに関与する生物学的プロセスを考察することは、Mode of action (以下、MOA) の概念につながっている。

¹ この論文は、WHO が著作権を有するものであり、元々は 2006 年に *Critical Reviews in Toxicology*, Volume 36, pages 781–792 に掲載されたものです。この論文は WHO の出版物のために編集されたもので、正誤表が含まれています。

A postulated MOA for carcinogenesis is a biologically plausible sequence of key events leading to an observed effect supported by robust experimental observations and mechanistic data. It describes key cytological and biochemical events—that is, those that are both measurable and necessary to the observed carcinogenicity—in a logical framework. MOA contrasts with mechanism of action, which generally involves a sufficient understanding of the molecular basis for an effect and its detailed description so that causation can be established in molecular terms.

In 2001, as part of its efforts to harmonize risk assessment practices, the International Programme on Chemical Safety (IPCS) (WHO/ILO/UNEP) published a framework for assessment of MOA for carcinogenesis in laboratory animals (animal MOA), based on Bradford Hill criteria for causality. The IPCS Human Relevance Framework (HRF) presented in this document updates this MOA Framework and extends it to consider human relevance. It is an analytical tool to provide a means of evaluating systematically the data available on a specific carcinogenic response to a chemical in a transparent manner. While it is envisaged that the framework will be of value to risk assessors both within and outside of regulatory agencies, it will also be a valuable tool to the research community. Among reasons for using the framework are:

- to provide a generic approach to the analysis of data to contribute to harmonization;
- to encourage transparency of the consideration and use of available data and reasons for the conclusions drawn;
- to provide guidance in the presentation of data;
- to identify critical data deficiencies and needs;
- to inform the quantitative assessment of carcinogenic risk to humans.

These and other topics will be discussed in more detail below.

THE ROLE OF IPCS IN DEVELOPING THE FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A CANCER MOA FOR HUMANS

IPCS has been leading an effort to harmonize approaches to cancer risk assessment as part of its larger project on the Harmonization of Approaches to the Assessment of Risk from Exposure to Chemicals. The first phase of this work resulted in the publication of the IPCS Conceptual Framework for Evaluating a Mode of Action for Chemical Carcinogenesis in experimental animals (Sonich-Mullin et al., 2001). As described in that publication, a major impediment to harmonization identified in the consideration of weight of evidence was the evaluation of MOA in animals. Sonich-Mullin et al. (2001) provided a framework for evaluating MOA of chemical carcinogenesis in animals and recognized the importance of moving on to the next step in the overall characterization of cancer hazard and risk in humans: the assessment of relevance of the MOA of animal carcinogenesis to humans. Adoption of the MOA Framework concept is proceeding through its incorporation in the revised United States Environmental Protection Agency (USEPA) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment (USEPA, 1999, 2005), and the framework is now commonly used by other regulatory agencies and international organizations. In the United Kingdom, the framework is being used for the assessment of pesticides and industrial chemicals. The United Kingdom

推定される発がん MOA とは、試験で観察された影響につながる生物学的に妥当な key events の一連の流れであり、堅牢な実験観察とメカニズムデータに裏付けられ、重要な細胞学的及び生化学的事象、すなわち、観察された発がん性に必要かつ測定可能な事象を論理的なフレームワークで記述している。MOA は作用機序 (mechanism of action) とは対照的であり、作用騎乗では一般的に、効果の分子の基盤を十分に理解し、その詳細を記述することで、分子の観点から因果関係を確立することができる。

2001 年に、リスク評価手法の調和の一環として、国際化学物質安全性計画 (International Programme on Chemical Safety: IPCS) (WHO/ILO/UNEP) は、因果関係に関する Bradford Hill 基準に基づいた実験動物の発がん MOA (動物 MOA) 評価のためのフレームワークを発表した。本文書で紹介している IPCS ヒト関連性フレームワーク (HRF) は、この MOA フレームワークを更新し、ヒトとの関連性を考慮するために拡張したものである。これは、化学物質の特定の発がん性について利用可能なデータを透明性のある方法で体系的に評価する手段を提供する解析ツールである。フレームワークは、規制当局の内外のリスク評価者にとって価値のあるものであると同時に、研究者にとっても貴重なツールとなることを想定している。フレームワークを利用する理由には、以下のようなものがある。

- データ解析の一般的なアプローチを提供し、調和の推進に貢献する。
- 利用可能なデータの検討と使用及び導き出された結論の論拠の透明性を促進する。
- データの提示におけるガイダンスを提供する。
- 重要なデータの不足と必要な追加データを特定する。
- ヒトに対する発がん性リスクの定量的評価において情報を提供する。

これら及びその他のトピックについて、以下でより詳細に議論する。

発がん MOA のヒトへの関連性を解析するためのフレームワークを開発する上での IPCS の役割

IPCS は、化学物質へのばく露によるリスク評価のアプローチの調和に関するより大きなプロジェクトの一環として、発がんリスク評価への手法を調和させる取り組みを主導してきた。この作業の第一段階では、実験動物における化学物質の発がん MOA を評価するための「IPCS の概念的なフレームワーク」の公表につながった (Sonich-Mullin ら, 2001 年)。この出版物に記載されているように、エビデンスの重み付けを検討する際にみられる調和への障害は、主に動物 MOA の評価であった。Sonich-Mullin ら (2001 年) は、動物における化学物質の発がん MOA を評価するためのフレームワークを提供し、ヒトにおけるがんのハザードとリスクの総合的な判定の次のステップ、すなわち、動物における発がん MOA のヒトへの関連性の評価に進むことの重要性を認識した。MOA フレームワークの概念は、米国環境保護庁 (USEPA) 発がん物質リスク評価ガイドライン改訂版 (USEPA, 1999 年, 2005 年) に盛り込まれており、MOA フレームワークは現在、他の規制当局や国際機関でも一般的に用いられている。英国では、このフレームワークが農薬や工業用化学物質の評価に利用されている。

Committee on Carcinogenicity (2004) has noted the framework's value with regard to both harmonization between agencies and internal consistency in its latest guidelines. The framework has also been adopted and is being used by agencies in Australia and in Canada, in the evaluation of Existing Chemicals under the Canadian Environmental Protection Act. The European Union has incorporated the framework into its technical guidance documents on evaluating new and existing industrial chemicals and biocides, including carcinogenicity. With regard to international organizations, of particular note is the use of the framework by the Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR), for example, in its evaluation of pyrethrin extract and its incorporation into the resulting monograph.

The step to extend the MOA Framework to include consideration of human relevance has been undertaken by IPCS in cooperation with international partners. It was the subject of an IPCS international workshop convened in Bradford, United Kingdom, from 21 to 23 April 2005. This workshop prepared draft text for an IPCS HRF, including updating the 2001 MOA Framework. The draft was published on the Internet for public comment and sent to a number of WHO Collaborating Centres and IPCS Participating Institutions for peer review. An expert meeting convened in London in December 2005 considered the comments received and finalized the framework. The framework text and the steps leading to its development are discussed in detail in the following sections.

THE 2001 IPCS CONCEPTUAL MOA FRAMEWORK FOR EVALUATING ANIMAL CARCINOGENESIS

Purpose of the framework

The IPCS MOA Framework for evaluating carcinogenesis in animals (Sonich-Mullin et al., 2001) remains a fundamental basis for the IPCS Framework for Analysing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. The animal MOA Framework provides a generic approach to the principles commonly used when evaluating a postulated MOA for tumour induction in animals by a chemical carcinogen. Thus, the framework is a tool that provides a structured approach to the assessment of the overall weight of the evidence for the postulated MOA. In this context, a supported MOA would have evidence provided by robust experimental observations and mechanistic data to establish a biologically plausible explanation.

The framework is designed to bring transparency to the analysis of a postulated MOA and thereby promote confidence in the conclusions reached through the use of a defined procedure that encourages clear and consistent documentation supporting the analysis and reasoning and that highlights inconsistencies and uncertainties in the available data. The purpose of the framework is to provide a systematic means of considering the weight of the evidence for an MOA in a given situation; it is not designed to give an absolute answer on sufficiency of the information, as this will vary depending on the circumstance. It is not a checklist of criteria, but rather an analytical approach. However, the process can be greatly aided by the presentation of tabular summaries of comparative data on incidence of key events and tumours.

The animal MOA Framework analysis is an important step in the hazard characterization. It is envisaged that the animal MOA Framework will contribute to risk assessments of chemical

英国発がん性委員会（2004年）は、機関間の調和と最新のガイドラインにおける内部の整合性の両方の点でフレームワークの価値を指摘している。このフレームワークは、オーストラリアの機関でも採用され、カナダではカナダ環境保護法の下での既存化学物質の評価に用いられている。欧州連合（EU）は、新規及び既存の工業用化学物質及び殺生物剤の評価について、発がん性を含む技術ガイダンス文書に本フレームワークを組み込んでいる。国際機関では、FAO/WHO 合同残留農薬専門家会議（JMPR）が、例えばピレスリン抽出物の評価やその結果として得られた研究論文に、このフレームワークを組み込んでいることが、特筆される。

MOA フレームワークを拡張し、ヒトへの関連性の考慮を含めるためのステップは、IPCS が国際的なパートナーと協力して実施されてきた。これは 2005 年 4 月 21 日から 23 日まで英国ブラッドフォードで開催された IPCS の国際ワークショップの議題であった。このワークショップでは、2001 年の MOA フレームワークの更新を含む IPCS HRF の草案が作成された。この草案はパブリックコメントのためにインターネット上で公開され、また、ピアレビューのために多くの WHO 協力機関と PCS 参加機関に送付された。2005 年 12 月にロンドンで開催された専門家会議では、受け取ったコメントが検討され、フレームワークが最終決定された。フレームワークの内容とその発展へとつながるステップについては、以下のセクションで詳述する。

2001 年の動物における発がん性評価のための IPCS 概念的 MOA フレームワーク

フレームワークの目的

動物における発がん性評価のための IPCS MOA フレームワーク（Sonich-Mullin ら、2001 年）は今なお発がん MOA のヒトとの関連性を解析するための IPCS フレームワークの基本原則となっている。動物 MOA フレームワークは、発がん性化学物質による動物の腫瘍誘発に対して、想定される MOA を評価する際に一般的に適用される原則への汎用的アプローチを提供するものである。したがって、このフレームワークは想定される MOA に対する総合的なエビデンスの重み付けの評価に際して体系的なアプローチを提供するツールである。すなわち、この文脈では支持された MOA は、生物学的に妥当な説明を確立するためにしっかりとした実験的観察とメカニズムデータのエビデンスを持つことになる。

このフレームワークは、推定される MOA の解析に透明性をもたらし、その結果、明確にされた手法（解析と推論を裏付ける明確で一貫性のある文書化を促し、利用可能なデータの矛盾と不確実性を明らかにする手法）を用いることにより到達した結論の信頼性が増すように設計されている。フレームワークの目的は、特定の状況における MOA のエビデンスの重み付けを検討する体系的な手段を提供することであり、情報が十分か否かに関して絶対的な回答を与えるようには設計されていない。なぜなら情報は状況によって異なるためである。このフレームワークは基準のチェックリストではなく、むしろ解析的なアプローチである。しかし、key events 及び腫瘍の発生に関する比較データの表形式の要約はこのプロセスの大きな助けとなる。

動物 MOA フレームワーク解析は、ハザードの特性評価の重要なステップである。動物 MOA フレームワークは、すべての分野（医薬品、工業用化学物質、農薬、食品添加物など）にわたる発がん化学物質のリスク評価に貢献することが想定されている。

carcinogens across all sectors (drugs, industrial chemicals, pesticides, food additives, etc.). In the resulting risk assessment documentation, the framework analysis would be appropriately positioned within the hazard characterization section. In the absence of adequate epidemiological data, it may be regarded as an essential component in any discussion of human relevance, dose–response relationships, and risk characterization. It is also envisaged that the framework will be useful to both regulators and researchers in identifying research needs based on clear delineation of data gaps and inconsistencies.

MOA analysis can be used to establish either that a compound has an MOA that has been described previously or that it has a novel MOA. Thus, the output of an MOA analysis may serve to support the evaluation of a specific compound or contribute to the generation of a novel MOA. In the former, chemical-specific data play a vital role in the concordance analysis for human relevance. In the latter, it will be important to identify which events are key to the biological processes that represent the MOA.

Thus, an MOA comprising the same set of key events may apply to many different compounds. The evidence necessary to establish that a specific MOA is responsible for a given carcinogenic response will be substantial the first time such an MOA is proposed. As subsequent compounds are found to share this MOA, the “barrier” to acceptance will be lower, although it will always be necessary to establish rigorously that the key events comprising the MOA occur and that they fulfil the criteria described below. It will also be important to exclude other possible MOAs.

Scientific peer participation is a prerequisite for the development and acceptance of a novel postulated MOA. Peer participation includes both peer involvement in the development of an MOA and peer review by scientists who are independent of the process of development of the MOA. Publication in the scientific literature and presentation and discussion at scientific meetings and workshops constitute peer involvement that contributes to acceptance of an MOA by the scientific community.

While acceptance does not necessarily mean unanimity, most of the scientists reviewing an MOA analysis should agree that the relevant scientific information has been identified and appropriately analysed, that “key events” have been identified and are supported by the information presented, that their relationship to carcinogenesis has been clearly established in the hypothesized MOA, and that alternative MOAs have been considered and rejected.

As knowledge advances, the characterization of an MOA will change. Additional key events may be identified, and others may be refined or even dropped. Nevertheless, significant changes to the key events also need some general acceptance, through peer review, such as described above.

Update of framework guidelines

In development of the IPCS HRF, the 2001 animal MOA Framework text has been updated, and this revised version is presented here.

結果として得られるリスク評価文書では、フレームワーク解析はハザードの特性評価のセクション内に適切に配置されるであろう。適切な疫学データがない場合には、ヒトとの関連性、用量反応関係、リスクの特性を議論する上で、フレームワーク解析は不可欠な要素とみなされるかもしれない。また、このフレームワークは、データギャップや矛盾の明確な定義に基づいて研究の必要性を特定する上で規制当局と研究者の双方にとって有用であると考えられる。

MOA 解析は、化合物が以前に記述されている MOA を有すること、または新規の MOA を有することを確認するために用いることができる。したがって、MOA 解析の結果は、特定の化合物の評価に役立つこともあれば、新規の MOA の確立に貢献することもある。前者において、化学物質に特有のデータが、ヒトへの関連性を考慮した一致解析において重要な役割を果たす。後者においては、どのような事象が MOA を表す生物学的プロセスの鍵となるのかを特定することが重要になる。

このように、同様の一連の key events で構成された MOA は、多くの異なる化合物にも適用できる可能性がある。ある MOA が特定の発がん作用の原因であることを立証するために必要なエビデンスは、そのような MOA が初めて提示される場合には重要である。後発の化合物がこの MOA を共有することが発見される場合に、受け入れに対する「障壁」は低くなるが、MOA を構成する key events が発生すること、また、以下に説明する基準を満たしていることを厳密に立証する必要がある。また、他の可能性のある MOA を除外することも重要である。

科学的な専門家の関与は、新規に想定される MOA の確立と承認のための必要条件である。「専門家の関与」には、MOA の確立への専門家の関与と、MOA の研究プロセスから独立した科学者によるピアレビューの両方が含まれる。科学雑誌への発表、学会会議やワークショップでの発表や議論も、科学界が MOA を受け入れるための「専門家の関与」を意味する。

容認は必ずしも科学者全員が合意したことを意味するわけではないが、容認されたということは、MOA をレビューした科学者の大部分が、提示された MOA に関して関連する科学的情報が特定され適切に解析されていること、「key events」が特定され提示された情報によって支持されていること、発がんとの関係が仮説の MOA において明確に説明されていること及びその代替 MOA が検討され、それらが除外されていることに合意したということである。

知識の向上につれて MOA は変化するだろう。追加の key events が特定され、他の事象は見直されるか、あるいは取り除かれるかもしれない。しかしながら、key events に関する大きな変更は、上記のようなピアレビューを通してある程度一般に認められることも必要である。

フレームワークガイドラインの更新

IPCS HRF の発展において、2001 年の動物 MOA フレームワークの内容が更新されたので、その改訂版を以下に提示する。

Introduction to framework analysis

This section describes the cancer end-point or end-points that have been observed and identifies which of these are addressed in the analysis. Prior to embarking on a framework analysis, there needs to be careful evaluation of the weight of evidence for a carcinogenic response in experimental animals. The nature of the framework is such that only one MOA is analysed at a time; hence, for example, different tumour types associated with chemical treatment, even if recorded in the same animals, will require separate framework analyses to discern each tumour's MOA. However, in considering the pathogenesis of a single type of tumour, it should be recognized that it is possible that a chemical could induce that tumour type by more than one MOA. Hence, it might be necessary to undertake an analysis of more than one MOA for the same tumour type for a single chemical. Consistent with species- and tissue-specific variation in metabolic activation and detoxication, there is often only poor site concordance for genotoxic carcinogens. This will need to be kept in mind when comparing animal and human data. In contrast, consistent with the observation that most carcinogens acting by a non-genotoxic MOA perturb physiological processes that tend to be site specific, site concordance is reasonably assumed, at least as an initial premise in the HRF.

1. Postulated mode of action (theory of the case)

This section comprises a brief description of the sequence of events on the path to cancer for the postulated MOA of the test substance. This explanation of the sequence of events leads into the next section, which identifies the events considered “key” (i.e. necessary and measurable), given the database available for the analysis.

2. Key events

This section briefly identifies and describes the “key events”—measurable events that are critical to the induction of tumours as hypothesized in the postulated MOA. To support an association, a body of experiments needs to define and measure an event consistently. Pertinent observations include, for example, tumour response and key events in the same cell type, sites of action logically related to event(s), increased cell growth, specific biochemical events, changes in organ weight and/or histology, proliferation, perturbations in hormones or other signalling systems, receptor–ligand interactions, effects on DNA or chromosomes, and impact on cell cycle. For example, key events for tumours hypothesized to be associated with prolonged regenerative proliferation might be cytotoxicity as measured histopathologically and an increase in labelling index. As another example, key events for induction of urinary bladder tumours hypothesized to be due to formation of urinary solids composed primarily of calcium phosphate might include elevated urinary free calcium, phosphate, and pH and formation of urinary solids, followed by irritation and regenerative hyperplasia of the urothelium.

3. Concordance of dose–response relationships

This section should characterize the dose–effect/response relationships for each of the key events and for the tumour response and discuss their interrelationships, in the context of the Bradford Hill criteria. Ideally, one should be able to correlate the dose dependency of the increases in incidence of a key event with increases in incidence or severity (e.g. lesion progression) of other key events occurring later in the process, and with the ultimate tumour incidence. Comparative tabular presentation of incidence of key events and tumours is often helpful in examining dose–response. In the case of complex data sets, this is almost essential.

序文

このセクションでは、観察された発がんエンドポイントまたはその他エンドポイントについて記述し、これらのうちのどれが解析で扱われているかを特定する。フレームワーク解析に着手する前に、実験動物における発がん性反応のエビデンスの重み付けを慎重に評価する必要がある。フレームワークの性質上、一度に1つのMOAのみが解析される。したがって、例えば、化学物質の投与に関連した異なる種類の腫瘍は、かりに同じ動物で記録されていても、各種腫瘍のMOAを識別するために別々のフレームワーク解析が必要となる。しかしながら、あるひとつの腫瘍の病態を検討する際には、化学物質が複数のMOAによってそのタイプの腫瘍を誘発する可能性があることを認識しておくべきである。したがって、ある化学物質におけるひとつの腫瘍について複数のMOAの解析を行う必要があるかもしれない。遺伝毒性発がん物質の場合、代謝活性化と解毒における種や組織特異的な違いと同様に、発がん部位が異なることも多い。動物とヒトのデータを比較する際にはこのことについて留意する必要がある。対照的に、非遺伝毒性MOAに則って作用するほとんどの発がん物質は、特異的な傾向のある生理学的プロセスに影響を及ぼすという観察結果から、少なくともHRFの初期の前提として、部位の一致が合理的に想定されている。

1. 推定されるMOA (事例における仮説)

このセクションでは、被験物質において推定されるMOAについて、腫瘍になるまでの一連の事象を簡単に説明している。この一連の事象の説明は、次のセクションにつながり、解析に利用可能なデータベースから、「鍵」と考えられる事象（すなわち、必要かつ測定可能な事象）を特定する。

2. Key events

このセクションでは、「key events」—推定されるMOAにおいて仮定された腫瘍の誘発に極めて重要な測定可能な事象について簡潔に特定し、説明する。関連性を裏付けるためには、一連の実験で事象を定義し、それを一貫して測定する必要がある。関連する観察項目には、例えば、同じ種類の細胞における発がん性とkey events、事象に論理的に関連する作用部位、細胞増殖の増加、特定の生化学的事象、臓器重量や組織学的変化、増殖、ホルモンや他のシグナル伝達系の変動、受容体-リガンド相互作用、DNAや染色体への影響、細胞周期への影響などが含まれる。例えば、再生性増殖の延長と関連していると推定される腫瘍の発生におけるkey eventsは、病理組織学的検索における細胞毒性の検出と標識指標の上昇であるかもしれない。別の例として、リン酸カルシウムを主成分とする尿固形物の形成が原因であると推定される膀胱腫瘍の誘発のkey eventsには、尿中の遊離カルシウム、リン酸塩、pHの上昇と尿固形物の形成、それに続く尿路上皮への刺激及び再生性過形成が含まれる。

3. 用量反応関係の一致性

このセクションではBradford Hill基準の観点から、それぞれのkey eventsと発がんの用量-効果/反応関係を特徴づけ、それらの相互関係について議論するべきだろう。理想的には、key eventsの発生率の増加の用量依存性と、その後に発生する他のkey eventsの発生率または重症度（病変の進行など）の増加及び最終的な腫瘍の発生率とを相関させることができるようにすべきである。Key eventsと腫瘍の発生率を表形式で比較表示することは、しばしば用量反応性を検討する上でしばしば有用である。複雑なデータセットの場合、これはほぼ必須である。

It is important to consider whether there are fundamental differences in the biological response (i.e. dose transitions) at different parts of the dose–response curve for tumour formation (Slikker et al., 2004). If so, key events relevant to the different parts of the dose–response curve will need to be defined and used in the framework analysis.

4. Temporal association

This section should characterize the temporal relationships for each of the key events and for the tumour response. The temporal sequence of key events leading to the tumour response should be determined. Key events should be apparent before tumour appearance and should be consistent temporally with each other; this is essential in deciding whether the data support the postulated MOA. Observations of key events at the same time as the tumours (e.g. at the end of a bioassay) do not contribute to considerations of temporal association, but can contribute to analysis in the next section. Most often, complete data sets to address the criterion of temporality are not available.

5. Strength, consistency, and specificity of association of tumour response with key events

This section should discuss the weight of evidence linking the key events, precursor lesions, and the tumour response. Stop/recovery studies showing absence or reduction of subsequent events or tumour when a key event is blocked or diminished are particularly important tests of the association. Consistent observations in a number of such studies with differing experimental designs increase that support, since different designs may reduce unknown biases or confounding. Consistency, which addresses repeatability of key events in the postulated MOA for cancer in different studies, is distinguished from coherence, however, which addresses the relationship of the postulated MOA with observations in the broader database (see point 6). Pertinent observations include tumour response and key events in the same cell type, sites of action logically related to event(s), and results from multistage studies and from stop/recovery studies.

6. Biological plausibility and coherence

One should consider whether the MOA is consistent with what is known about carcinogenesis in general (biological plausibility) and also in relation to what is known for the substance specifically (coherence). For the postulated MOA and the events that are part of it to be biologically plausible, they need to be consistent with current understanding of the biology of cancer. However, the extent to which biological plausibility can be used as a criterion against which weight of evidence is assessed may be limited due to gaps in our knowledge. Coherence, which addresses the relationship of the postulated MOA with observations in the broader database—for example, association of MOA for tumours with that for other end-points—needs to be distinguished from consistency (addressed in point 5), which addresses repeatability of key events in the postulated MOA for cancer in different studies. For coherence, likeness of the case to that for structural analogues may be informative (i.e. structure–activity analysis). Information from other compounds that share the postulated MOA may be of value, such as sex, species, and strain differences in sensitivity and their relationship to key events. Additionally, this section should consider whether the database on the agent is internally consistent in supporting the purported MOA, including that for relevant non-cancer toxicities. Some MOAs can be anticipated to evoke effects other than cancer, such as reproductive effects of certain hormonal disturbances that are carcinogenic.

腫瘍形成に対する用量反応曲線の異なる部分において、生物学的反応（すなわち線量推移）に基本的な相違があるか否かを検討することが重要である（Slikker ら, 2004 年）。もしそうであれば、用量反応曲線の異なる部分に関連する key events を明らかにし、フレームワーク解析に用いる必要がある。

4. 時間的関連性

このセクションでは、それぞれの key events と腫瘍反応の時間的關係の特徴について述べなければならない。腫瘍反応に至る key events を時系列的に明らかにすべきである。key events は腫瘍の発現前に明らかにしなければならず、互いに時間的な整合性が取れていなければならない。すなわち、時間的関連性についてはデータが想定される MOA を支持しているかどうかを判断する上で不可欠である。腫瘍と同時に key events が観察された場合（例えば、バイオアッセイの終了時など）は、時間的関連性の検討には役立たないが、次のセクションに述べる解析に役立てることができる。多くの場合、時間的関連性についての基準を満たす完全なデータセットは入手できない。

5. 腫瘍反応とkey events との関連性の強さ、一貫性、特異性

このセクションでは、key events、前がん病変及び腫瘍反応を結び付けるエビデンスの重み付けについて議論しなければならない。Key events を遮断または低減した場合に、その後の事象または腫瘍が発生しない、または減少することを示す中止/回復試験は、関連性を検証する上で特に重要である。デザインが異なることによって未知のバイアスや交絡因子を減少させると考えられるため、異なる実験デザインの研究において一貫した結果が観察されることは、key events と腫瘍の関連性をより強く裏付けることになる。しかし、さまざまな研究で推定される MOA の key events の再現性で示される一貫性（consistency）は、より広範なデータベースでの結果と推定 MOA の相関性で示される整合性（coherence）とは区別される（6 参照）。関連する観察項目には、同じ種類の細胞における腫瘍反応と key events、事象に論理的に関連する作用部位並びに多段階試験及び中止/回復試験の結果が含まれる。

6. 生物学的妥当性及び整合性

その MOA が、一般的にがんの発生について一般的に知られていることと一致している（生物学的に妥当である）かどうか、また、その物質について知られていることと関連している（理論的な整合性がある）かどうかを検討しなければならない。推定される MOA とその一部である事象が生物学的に妥当であるとするためには、それらが現在のがんについての生物学的理解と一致している必要がある。しかしながら、我々の知識には限りがあるために生物学的妥当性についてエビデンスの重み付けを評価する際の基準として用いることができる範囲は限られているであろう。推定される MOA とより広範なデータベースの観測値との関係—例えば、発がん MOA と他のエンドポイントの MOA との関連性—を扱う「整合性」は、異なる研究における推定される発がん MOA における key events の再現性を扱う「一貫性」（ポイント 5 参照）とは区別される必要がある。理論的な整合性については、構造的アナログにおける事例との類似性が参考になるかもしれない（すなわち、構造-活性解析）。推定される MOA を共有する他の化合物からの情報、たとえば、感度における性差、種差及び系統差や key events との関係に関するような情報は重要となるだろう。さらに、このセクションでは、その薬剤に関するデータベースが内部で一貫して関連している発がん以外の毒性を含めた MOA を支持しているかどうかを検討しなければならない。MOA の中には、発がんにつながるホルモン障害による生殖への影響のような、発がん以外の影響を引き起こすことが予想されるものがある。

7. Other modes of action

This section discusses alternative MOAs that logically present themselves in the case. If alternative MOAs are supported, they need their own framework analysis. These should be distinguished from additional components of a single MOA that likely contribute to the observed effect, since these would be addressed in the analysis of the principal MOA.

8. Uncertainties, inconsistencies, and data gaps

Uncertainties should include those related to both the biology of tumour development and those for the database on the compound of interest. Inconsistencies should be flagged and data gaps identified. For the identified data gaps, there should be some indication of whether they are critical as support for the postulated MOA.

9. Assessment of postulated mode of action

This section should include a clear statement of the outcome with an indication of the level of confidence in the postulated MOA—for example, high, moderate, or low. If a novel MOA is being proposed, this should be clearly indicated. However, if the MOA is the same as that proposed for other compounds, the extent to which the key events fit this MOA needs to be stated explicitly. Any major differences should be noted, and their implications for the MOA should be discussed.

ADDRESSING THE ISSUE OF HUMAN RELEVANCE

In 2000, an IPCS Harmonization Project Cancer Planning Work Group convened in Carshalton, United Kingdom (IPCS, 2000). (This initial IPCS working group differed in membership from the subsequent IPCS working group convened to work on the human relevance project.) Among the recommendations of that meeting was the suggestion that IPCS and the International Life Sciences Institute (ILSI) move forward together and in parallel on the development of the extension of the IPCS MOA Framework towards addressing human relevance. It was recognized that ILSI could provide much help in technical workshops. In June 2001, the ILSI Risk Science Institute (RSI) with support from the USEPA and Health Canada formed a working group to examine key issues in the use of MOA information to determine the relevance of animal tumours. These efforts have resulted in several published reports that are described below. An IPCS Cancer Working Group, convened on 3–5 March 2004 in Arlington, Virginia, USA, agreed that these reports should form the starting point for further exploration of the issue of human relevance of animal tumours by IPCS with the goal of developing a unified IPCS HRF for use of MOA information in risk assessment for regulatory and other purposes (IPCS, 2004).

To address the issue of the human relevance of the MOAs determined in animals, ILSI/RSI charged its working group with expanding the IPCS MOA Framework to include evaluation of the human relevance of a cancer MOA determined in animals. The details of the process, the case-studies, and the framework were published as a series of papers in the November 2003 issue of *Critical Reviews in Toxicology* (Cohen et al., 2003; Meek et al., 2003). These articles describe the ILSI/RSI HRF and provide guidance for its application. In addition, references to specific examples on which the framework is based are included. Several iterations of case-studies of chemicals with generally well known MOAs were used to

7. その他のMOA

このセクションでは、事例の中で論理的に提示された代替 MOA について議論する。代替 MOA が支持されている場合は、それ自体のフレームワーク解析が必要である。これら代替 MOA は観察された影響に寄与していると考えられる推定される MOA の追加的な構成要素とは区別し、異なる独立した MOA として解析しなければならない。さもなくば、代替 MOA ではなく、元々の解析の対象であった MOA に関する解析になってしまう。

8. 不確実性、矛盾、データギャップ

不確実性には、腫瘍発生の生物学的知見に関連するものと、対象の化合物のデータベースに関連するものの両方を含まなければならない。矛盾点にはフラグを立て、データギャップについて特定しなければならない。特定されたデータギャップについては、推定される MOA の裏付けとして重要か否かを示すべきである。

9. 推定されるMOAの評価

このセクションには、推定される MOA の信頼度を示す指標と共に（例えば、高、中、低など）結果に関する明確な記述を含まなければならない。新規の MOA が推定されている場合は、新規であることを明確に示すべきである。しかし、MOA が他の化合物について提示されているものと同じである場合には、key events がこの MOA にどの程度合致しているかを明示する必要がある。大きな違いがあれば、それを明記し、MOA に対するその違いの意味合いについて議論すべきである。

ヒトへの関連性の問題

2000 年に、英国のカーシャルトンで IPCS ハーモナイゼーションプロジェクトがん計画ワーキンググループが招集された（IPCS, 2000 年）（この最初の IPCS ワーキンググループは、ヒト関連性プロジェクトの作業のために招集されたその後の IPCS ワーキンググループとはメンバーが異なっていた）。この会議において、ヒトへの関連性への対応に向けて IPCS MOA フレームワークの拡張を IPCS と国際生命科学研究機構（ILSI）が協力して並行して進めていくことが提案された。ILSI は技術ワークショップにおいて多くの支援を提供できることが認識された。2001 年 6 月、ILSI リスクサイエンス研究所（RSI）は、USEPA とカナダ保健省の支援を受けて、動物における腫瘍とヒトとの関連性を判断するための MOA 情報の使用における重要な問題を検討するためのワーキンググループを結成した。これらの努力の結果、以下に記載されているいくつかの報告書が公表された。2004 年 3 月 3 日から 5 日に米国バージニア州アーリントンで開催された IPCS がんワーキンググループは、これらの報告書を出発点として、規制目的やその他の目的で MOA 情報をリスク評価に使用するための統一した IPCS HRF を作成することを目指し、動物における腫瘍のヒトへの関連性の問題を IPCS がさらに調査することに合意した（IPCS, 2004 年）。

動物で決定された MOA のヒトへの関連性の問題に対処するために、ILSI/RSI は同ワーキンググループに、動物で決定された発がん MOA のヒトへの関連性の評価を含めるために IPCS MOA フレームワークを拡張することを求めた。このプロセス、事例研究及びフレームワークの詳細は、*Critical Reviews in Toxicology* 誌の 2003 年 11 月号に一連の論文として発表された（Cohen ら, 2003 年）。これらの論文では ILSI/RSI HRF を説明し、その適用のための指針を提供している。さらに、フレームワークが基づいた具体的な例への参照も含まれている。統合フレームワークを開発するために、一般的によく知られている MOA を有する化学物質を複数回にわたって繰り返し検討した事例研究が使用された。その意図は、動物での MOA と各 key event についてヒトへの関連性を

develop the integrated framework. The intent was to provide guidance for a disciplined, transparent process evaluating the MOA in animals and each key event with respect to human relevance.

The ILSI/RSI HRF is based on three fundamental questions:

1. Is the weight of evidence sufficient to establish the mode of action (MOA) in animals?
2. Are key events in the animal MOA plausible in humans?
3. Taking into account kinetic and dynamic factors, are key events in the animal MOA plausible in humans?

Questions 2 and 3 involve qualitative and quantitative considerations, respectively, in a concordance analysis of human information in relation to the animal MOA and its key events.

These are followed by an explicit description of confidence in the evaluation, identification of specific data gaps, and the implications for risk assessment. It was emphasized by ILSI/RSI that use of this framework would form part of the hazard characterization step of the overall risk assessment process.

DEVELOPMENT OF AN IPCS HRF GUIDANCE DOCUMENT BASED ON THE IPCS MOA FRAMEWORK AND THE ILSI/RSI HRF

The 2004 IPCS Cancer Working Group discussed the type of document that would be produced as a result of its task to extend the IPCS MOA Framework to address human relevance. It was recognized that one integrated guidance document that worked as a whole would be needed to facilitate uptake and use by regulatory and other risk assessment bodies. The guidance could be supplemented by publication of the other materials generated through the process (e.g. issue papers and case-studies).

There was general agreement among working group members that the questions identified as the critical components of the ILSI/RSI HRF were important and in general appropriate for addressing the human relevance of an MOA determined in animals. However, several issues were identified that could benefit from additional clarification, development, or expansion.

These refinements of the ILSI/RSI HRF were developed through discussions of the IPCS Cancer Working Group and at a workshop convened for this purpose in Bradford, United Kingdom, on 21–23 April 2005 (IPCS, 2005). The resulting IPCS HRF is presented as an approach to answering a series of three questions, leading to a documented, logical conclusion regarding the human relevance of the MOA underlying animal tumours. The application of the guidance results in a narrative with four sections that may be incorporated into the hazard characterization of a risk assessment. The sections are as follows (see Figure 1):

1. Is the weight of evidence sufficient to establish a mode of action (MOA) in animals?
2. Can human relevance of the MOA be reasonably excluded on the basis of fundamental, qualitative differences in key events between experimental animals and humans?

評価する規律ある透明なプロセスの指針を提供することであった。

ILSI/RSI HRF は 3 つの基本的な問いかけに基づいている：

1. 動物における Mode of action (動物 MOA) を確立するのにエビデンスの重み付けは十分か？
2. 動物の MOA に含まれる key events はヒトにおいて妥当であるか？
3. 動態的、薬力学的要因を考慮した上でも、動物の MOA における key events はヒトにおいて妥当か？

問 2 と 3 に関して、動物の MOA とその key events に関連したヒトでの情報の一致解析において、それぞれ定性的な検討と定量的な検討が必要となる。

これらに続いて、ILSI/RSI HRF は評価の信頼性、特異的なデータギャップの特定、それらのリスク評価の意味合いを明確に記述している。ILSI/RSI では、このフレームワークの利用が全体的なリスク評価プロセスのハザードの特性評価ステップの一部を形成することを強調した。

IPCS MOA フレームワークと ILSI/RSI HRF に基づく IPCS HRF ガイダンス文書の開発

2004 年の IPCS がんワーキンググループでは、ヒトへの関連性に対処するために IPCS MOA フレームワークを拡張する作業の報告書として作成される文書のタイプについて議論された。規制当局や他のリスク評価機関による採用と利用を促進するためには、全体を一つに統合されたガイダンス文書が必要であると認識された。ガイダンスは、発行論文や事例研究といったプロセスを経て作成された他の公表資料を追加することができる。

ワーキンググループのメンバー間では、ILSI/RSI HRF の重要な構成要素として特定された問いかけは重要であり、動物で決定された MOA のヒトへの関連性に対処するのに適切であるという点で概ね合意されていた。しかし、フレームワークの補足説明、進展、または拡大が有効と思われるいくつかの課題が明らかとなった。

ILSI/RSI HRF のこれらの改良は IPCS がんワーキンググループの議論と、2005 年 4 月 21 日から 23 日に英国ブラッドフォードで開催されたワークショップでの議論を経て進められた (IPCS, 2005 年)。結果として得られた IPCS HRF は、動物の腫瘍における MOA のヒトへの関連性に関する文書化された論理的な結論へとつながる一連の 3 つの問いかけに答えるためのアプローチとして提示されている。このガイダンスを適用すると、リスク評価のハザードの特性評価に組み入れることができる 4 つのセクションからなるストーリーができあがる。これらのセクションは以下の通りである (図 1 を参照)。

1. 動物における Mode of action (動物 MOA) を立証するためにエビデンスの重み付けは十分か？
2. 実験動物とヒトとの間の key events の根本的、質的な違いに基づいて、MOA のヒトへの関連性を合理的に排除できるか？
3. 実験動物とヒトとの間の動態的または薬力学的要因のいずれかの量的な違いに基づいて、MOA のヒトへの関連性を合理的に排除できるか？
4. 結論：信頼性、解析的検討及び帰結の記述。

- Can human relevance of the MOA be reasonably excluded on the basis of quantitative differences in either kinetic or dynamic factors between experimental animals and humans?
- Conclusion: Statement of confidence, analysis, and implications.

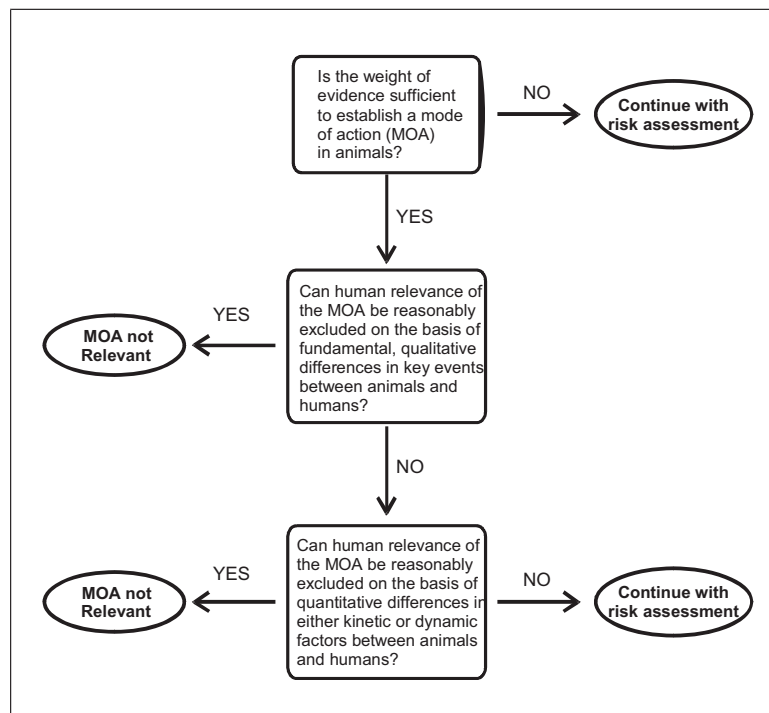


Figure 1. IPCS general scheme illustrating the main steps in evaluating the human relevance of an animal MOA for tumour formation. The questions have been designed to enable an unequivocal answer yes or no, but recognizing the need for judgement regarding sufficiency of weight of evidence. Answers leading to the left side of the diagram indicate that the weight of evidence is such that the MOA is not considered relevant to humans. Answers leading to the right side of the diagram indicate either that the weight of evidence is such that the MOA is likely to be relevant to humans or that it is not possible to reach a conclusion regarding likely relevance to humans, owing to uncertainties in the available information. In these cases, the assessment would proceed to risk characterization. It should be noted that only at this stage would human exposure be included in the evaluation.

In applying this framework for a given chemical, tumours of each animal target organ observed are evaluated independently, with the assumption that different MOAs are possible in different organs, although based on this analysis, MOAs in different tissues may be similar. Similarly, an evaluation of the likelihood of congruence between target organ(s) in different species and in humans needs to be made, based on the MOA analysis.

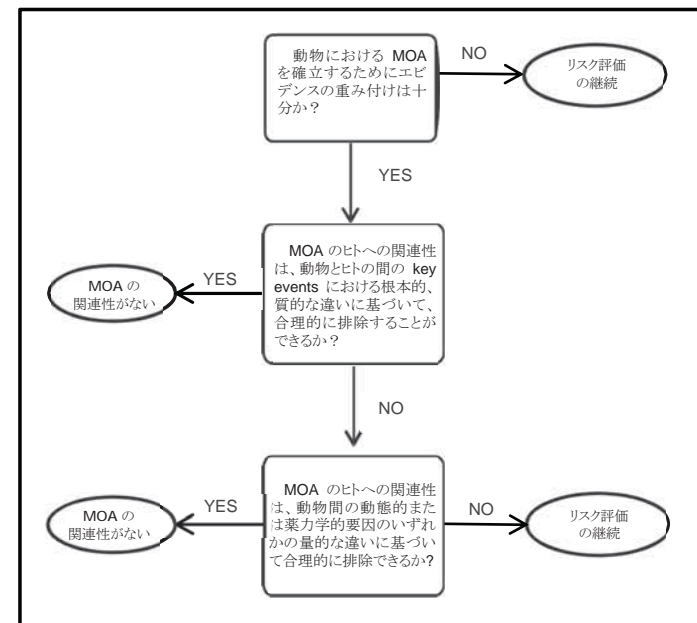


図 1. IPCS の一般的なスキーム:腫瘍形成に対する動物 MOA のヒトへの関連性を評価する際の主なステップを示す

質問は、Yes か No かを明確に答えられるように設計されているが、エビデンスの重み付けが十分であるかどうかを判断する必要がある。図の左側に示された回答は、エビデンスに十分な重みがあり MOA がヒトに関連するとは考えられないことを示している。図の右側の回答は、MOA がヒトに関連する可能性が高いと考えられるという十分に重みのあるエビデンスの存在を示しているか、利用可能な情報に不確実性があるため、ヒトへの関連性の可能性についての結論を出すことができないことを示している。このような場合、評価はリスクの判定に進むことになる。この段階でのみ、ヒトへのばく露評価が含まれることに留意すべきである。

このフレームワークをある化学物質に適用する場合、観察された各動物の標的臓器の腫瘍は、異なる臓器では異なる MOA が存在するという仮定の下、独立して評価される。しかし、この解析手法に基づいたとしても、異なる組織での MOA が類似している可能性はある。同様に、異なる種とヒトにおいて、標的臓器における MOA が一致する可能性についての評価も MOA 解析に基づいて行う必要がある。

Is the weight of evidence sufficient to establish a mode of action (MOA) in animals?

Answering this first question in the IPCS HRF requires application of the (updated) IPCS MOA Framework described previously in this document. The steps in the MOA Framework, which are based on the Bradford Hill criteria for causality, are:

1. postulated MOA;
2. key events; associated critical parameters;
3. dose–response relationships;
4. temporal association;
5. strength, consistency, and specificity of association of key events and tumour response;
6. biological plausibility and coherence;
7. possible alternative MOAs;
8. uncertainties, inconsistencies, and data gaps;
9. conclusion about the MOA.

This process incorporates an evaluation of the weight of evidence for possible alternative MOAs at a given site and an evaluation of the overall strength of evidence supporting the MOA under consideration. Ultimately, a decision concerning the weight of evidence supporting the MOA and the level of confidence in that decision must be made. The process also identifies critically important data gaps that, when filled, would increase confidence in the proposed MOA. It is also necessary to establish whether the postulated MOA has already been described for other chemicals, in which case human relevance will already have been evaluated, or whether the proposed MOA is novel, in which case human relevance needs to be assessed de novo.

For a given chemical, the primary sources of information for evaluating an MOA are likely to be data generated for that specific chemical in the animal model in which tumours were produced. Obviously, data from other sources can and should also be used, as appropriate, along with data on chemicals with similar chemical structures, the same or similar MOAs, or both. If the MOA for a chemical is novel, considerably more data will be required to support the conclusion that it is related to the carcinogenic process of the tumours induced by that chemical than for subsequent examples of chemicals acting by the same MOA. The ILSI/RSI working group and the IPCS Bradford workshop did not address the issue of how many data are sufficient to support a specific MOA for a given chemical per se, except by way of example within the case-studies and recognition that acceptance of a novel MOA requires scientific consensus (described above). Consideration at this stage of the MOA analysis of potential variations between animals and humans also facilitates addressing subsequent steps in the framework.

Can human relevance of the MOA be reasonably excluded on the basis of fundamental, qualitative differences in key events between experimental animals and humans?

The wording of this question was changed from that in the ILSI/RSI HRF, following discussion at the IPCS workshop on the implications of a *yes* or a *no* answer to the original question. In answering the original question, only an unequivocal *no* would be sufficient to

動物における Mode of action (動物 MOA) を確立するのにエビデンスの重み付けは十分か

IPCS HRF のこの最初の問いかけに答えるためには、上述の（更新された）IPCS MOA フレームワークを適用する必要がある。因果関係を説明するための Bradford Hill 基準に基づいた MOA フレームワークのステップは、次のとおりである：

1. 推定される MOA
2. Key events；関連する重要なパラメータ
3. 用量反応関係
4. 時間的関連性
5. Key events と腫瘍反応との関連の強さ、一貫性、特異性
6. 生物学的妥当性と整合性
7. 可能性のある代替 MOA
8. 不確実なこと、矛盾すること及びデータギャップ
9. MOA に関する結論

このプロセスには、状況に応じた考え得る代替 MOA のエビデンスの重み付けの評価と、検討中の MOA を支持するエビデンスの全体的な強度の評価が組み込まれている。最終的には、MOA を支持するエビデンスの重み付けと、それに対する信頼度について決定しなければならない。また、このプロセスは、ギャップを満たすことで推定される MOA の信頼性を高めるであろう決定的に重要なデータギャップを特定する。また、推定される MOA が他の化学物質において既に記述された MOA であり、ヒトへの関連性について既に評価されているかどうか、または、新規の MOA であり、ヒトへの関連性について新たに評価する必要があるかどうかを確認することも必要である。

ある化学物質について、MOA を評価するための主な情報源は、腫瘍が発生した動物モデルにおけるデータである可能性が高い。当然、類似の化学構造を持つ化学物質に関するデータや、同じまたは類似の MOA に関するデータ、もしくはその両方のデータといった他の情報源からのデータも必要に応じて利用することができるし、利用すべきである。ある化学物質の MOA が新規である場合、その化学物質が誘発された腫瘍の発がんプロセスに関連しているという結論を裏付けるためには、同じ MOA で作用する後続の化学物質よりもかなり多くのデータが必要である。ILSI/RSI ワーキンググループと IPCS ブラッドフォードワークショップでは、対象の化学物質の MOA を支持するのに十分なデータの数はどのくらいかという問題に関して、事例研究の中で例を示し、新しい MOA を受け入れるには科学的コンセンサスが必要であるとの認識（上述）を示してはいるが、それら以外についての方針等は何ら表明していない。この段階における動物とヒトとの間の潜在的な違いについての MOA 解析の検討は、フレームワークにおける次のステップの対応を容易にする。

実験動物とヒトの間の key events の根本的、質的な違いに基づいて、MOA のヒトとの関連性を合理的に排除することができるか

この質問の文言は、IPCS ワークショップにおける質問に対する回答の意味合いについての議論を受けて、ILSI/RSI HRF に記載されていた文言から変更された。元の質問への回答では、動物 MOA がヒトへの関連性を持たないという結論を出すには、はっきりとした「No」しか許容されていなかった。また、「plausible」という単語が他の言語に翻訳する際に問題になる可能性があることも

permit the conclusion that the animal MOA was not relevant to humans. Also, it was recognized that translation of the word “plausible” into other languages could be problematic. The question was therefore reworded to enable a *yes/no* answer, but qualified by the descriptor “reasonably”, based on recognition that decisions about the adequacy of weight of evidence are not absolute but involve scientific judgement based on transparent analysis of the available data.

This step represents a qualitative assessment of the relevance of the MOA to human cancer potential. Listing the critical specific key events that occur in the animal MOA and directly evaluating whether each of the key events might or might not occur in humans facilitate consideration and transparent presentation of the relevant information. Presentation in tabular form, referred to as a concordance table, can be helpful in delineating the relevant information (for an example, see Meek et al., 2003, case-study 6: kidney and liver tumours associated with chloroform exposure, Table 7; McGregor et al., current document, case-study on formaldehyde, Table 3). The key events (and possibly some of the critical associated processes) are listed with the information regarding these events for the animals in which the tumour was observed. It is intended that the information in these tables be brief, since a narrative explanation is expected to accompany the table. In the right-hand column, the effect on humans for each of the key events is evaluated. An additional column for the results in a different strain, species, sex, or route of administration that does not result in tumours can be useful if information is available for comparison with the model that leads to tumours. In addition, factors may be identified that, while not key themselves, can modulate key events and so contribute to differences between species or individuals. Such factors include genetic differences in pathways of metabolism, competing pathways of metabolism, and cell proliferation induced by concurrent pathology. Any such factors identified should be noted in a footnote to the concordance table.

The evaluation of the concordance of the key events for the MOA for a given chemical in humans is an evaluation of the MOA in humans, rather than an evaluation of the specific chemical. In general, details of the initial key events are likely to be more chemical specific—for example, the enzyme induction response by phenobarbital in rodent liver, or the formation of a cytotoxic metabolite from chloroform by specific cytochrome P-450 enzymes. Later events are more generic to the MOA—for example, pleiotropic stimulation of hepatic proliferation or regenerative hyperplasia. Information that can be utilized to evaluate the key events in humans can come from *in vitro* and *in vivo* studies on the substance itself, but also can involve basic information regarding anatomy, physiology, endocrinology, genetic disorders, epidemiology, and any other information that is known regarding the key events in humans. Information concerning an evaluation of the key event in humans exposed directly to the specific chemical is frequently unavailable.

As knowledge concerning the development of cancer evolves, it may become possible to combine some MOAs on the basis of the basic biology of the processes involved, thus relying less on chemical-specific information to reach a conclusion on the human relevance of a given MOA.

認識された。そのため、質問は Yes/No の回答を可能にするように書き換えられたが、エビデンスの重み付けの妥当性に関する決定は絶対的なものではなく、利用可能なデータの透明性のある解析に基づいた科学的判断が必要であるという認識に基づき、「合理的に」という語句が付け加えられた。

このステップでは、ヒトにおける発がんの可能性と MOA の関連性を定性的に評価することである。動物 MOA で発生する重要な特定の **key events** をリストアップし、それぞれの **key events** がヒトで発生するか否かを直接評価することで、関連する情報の検討と透明性のある提示が容易になる。一致表 (concordance table) と呼ばれる表形式での提示は、関連情報を明確にするのに役立つ (例として、事例研究 6:クロロホルムばく露に伴う腎臓及び肝臓の腫瘍、Meek ら、2003 年、表 7; 本書、ホルムアルデヒドに関する事例研究、McGregor ら、表 3 を参照)。腫瘍が観察された動物におけるこれらの事象に関する情報とともに、**key events** (及び重要と思われるいくつかの関連プロセス) がリストアップされる。これらの表の情報は簡潔にすることが意図されており、表には説明文が添付されることが予想される。右側の列では、各 **key events** についてヒトへの影響を評価している。追加の列として、腫瘍が発生しない別の系統、種、性、または投与経路での結果についての情報は、腫瘍が発生するモデルとの比較情報が得られる場合に有用である。さらに、それ自体は **key events** ではないが、**key events** を変化させ、種差または個体差に寄与する因子が同定されることがある。そのような因子には、代謝経路の遺伝的差異、競合する代謝経路及び同時進行する病態によって誘導される細胞増殖が含まれる。特定されたそのような要因はすべて、一致表の脚注に記載されるべきである。

ヒトにおけるある化合物の MOA の **key events** の一致性の評価は、その特定の化学物質の評価というよりは、ヒトにおける MOA の評価である。一般的に、初期の **key events** の詳細は化学物質に特異的である可能性が高い。例えば、げっ歯類の肝臓におけるフェノバルビタールによる酵素誘導反応や、特定のチトクローム P-450 酵素によるクロロホルムからの細胞毒性代謝物の生成などである。その後の事象は MOA においてより一般的なものであり、例えば、多面的な肝増殖刺激や再生性過形成などである。ヒトにおける **key events** の評価に利用できる情報は、化学物質の *in vitro* 及び *in vivo* 試験に由来するもののほか、解剖学、生理学、内分泌学、遺伝学、疫学、その他ヒトの **key events** に関する既知の情報などの基本的な情報が含まれる。特定の化学物質に直接ばく露されたヒトにおける **key events** の評価に関する情報は、入手できないことが多い。

がんの発生・進行に関する知見が蓄積されるにつれて、関与するプロセスの基本的な生物学的知見に基づいていくつかの MOA を組み合わせることが可能になるかもしれない。それにより、MOA のヒトへの関連性について結論付ける際に、その化学物質の特異的な情報への依存度が低くなるかもしれない。

In evaluating the concordance of the information in humans to that in animals, a narrative describing the weight of evidence and an evaluation of the level of confidence for the human information need to be provided. Some specific types of information that are useful include the following:

1. cancer incidences at the anatomical site and cell type of interest, including age, sex, ethnic differences, and risk factors, including chemicals and other environmental agents;
2. knowledge of the nature and function of the target site, including development, structure (gross and microscopic), and control mechanisms at the physiological, cellular, and biochemical levels;
3. human and animal disease states that provide insight concerning target organ regulation and responsiveness;
4. human and animal responses to the chemical under review or analogues following short-, intermediate-, or long-term exposure, including target organs and effects.

Obviously, a substantial amount of information is required to conclude that the given MOA is not relevant to humans. If such a conclusion is strongly supported by the data, then chemicals producing animal tumours only by that MOA would not pose a cancer hazard to humans, and no additional risk characterization for this end-point is required. Since there is no cancer hazard, there is no cancer risk for the tumour under consideration.

The question of relevance considers all groups and life stages. It is possible that the conditions under which an MOA operates occur primarily in a susceptible subpopulation or life stage—for example, in those with a pre-existing viral infection, hormonal imbalance, or disease state. Special attention is paid to whether tumours could arise from early-life exposure, considering various kinetic and dynamic aspects of development during these life stages. Any information suggesting quantitative differences in susceptibility is identified for use in risk characterization.

Can human relevance of the MOA be reasonably excluded on the basis of quantitative differences in either kinetic or dynamic factors between experimental animals and humans?

The wording of this question was changed from that in the ILSI/RSI HRF, following discussion at the IPCS workshop on the implications of a *yes* or a *no* answer to the original question. In answering the original question, only an unequivocal *no* would be sufficient to permit the conclusion that the animal MOA was not relevant to humans. The question was therefore reworded to enable a *yes/no* answer, but qualified by the descriptor “reasonably”, based on recognition that decisions about the adequacy of weight of evidence are not absolute but involve judgement based on transparent analysis of the available data.

For purposes of human relevance analysis, if the experimental animal MOA is judged to be qualitatively relevant to humans, a more quantitative assessment is required that takes into account any kinetic and dynamic information that is available from both the experimental animals and humans. Such data will of necessity be both chemical and MOA specific and will include the biologically effective doses required to produce the relevant dynamic responses from which neoplasia can arise. Kinetic considerations include the nature and time course of

ヒトの情報と動物の情報との一致性を評価する際には、エビデンスの重み付けを説明し、ヒトの情報の信頼度の評価をする必要がある。有用な情報の具体的な種類としては、以下のようなものがある。

1. 対象の解剖学的部位及び細胞の種類におけるがんの発生率：年齢、性別、人種及び化学物質やその他の環境因子などのリスク因子を含む。
2. 標的部位の性質と機能に関する知見：生理的、細胞的、生化学的レベルでの発生、構造（肉眼的、顕微鏡的）、制御機構を含む。
3. ヒト及び動物の疾患状態：標的臓器の調節及び応答性に関する洞察を提供する。
4. 短期、中期、または長期ばく露後の、対象となる化学物質または類似物質に対するヒト及び動物の反応：標的臓器及び影響を含む。

当然、対象の MOA がヒトに関連していないと結論づけるには、相当量の情報が必要である。そのような結論がデータによって強く支持されているならば、その MOA によってのみ動物の腫瘍を誘発される化学物質は、ヒトに対するがんに関するハザードを有さず、このエンドポイントに対するリスク判定を追加で行う必要はない。がんに関するハザードがないため、検討中の腫瘍に対する発がんリスクはない。

関連性の質問は、すべての集団とライフステージを考慮している。MOA が作用する状況は、例えばすでにウイルスに感染しているヒト、ホルモンバランスの不均衡のあるヒト、または病を患っているヒトなど、主に感受性の高い集団またはライフステージで起こる可能性がある。ライフステージの早期における発達に関する様々な動態的及び薬力学的側面を考慮して、腫瘍がライフステージの早期におけるばく露から発生するかどうか特別な注意が払われている。感受性の量的な違いを示唆するいかなる情報も、リスク判定に用いるために特定される。

実験動物とヒトの間の動態的または薬力学的要因のいずれかの量的差異に基づいて、MOA のヒトへの関連性を合理的に排除することができるか

この質問の文言は、IPCS ワークショップにおける質問に対する回答の意味合いについての議論を受けて、ILSI/RSI HRF に記載されていた文言から変更された。元の質問への回答では、動物 MOA がヒトへの関連性を持たないという結論を出すには、はっきりとした「No」しか許容されていなかった。そのため、質問は Yes/No の回答を可能にするように書き換えられたが、エビデンスの重み付けの妥当性に関する決定は絶対的なものではなく、利用可能なデータの透明性のある解析に基づいた科学的判断が必要であるという認識に基づき、「合理的に」という語句が付け加えられた。

ヒトへの関連性解析の目的では、実験動物の MOA がヒトに定性的に関連性があると判断される場合には、実験動物とヒトの両方から得られるあらゆる動態的及び薬力学的情報を考慮して、より定量的な評価が必要である。このようなデータは、必然的に化学物質及び MOA に特有のものであり、腫瘍形成を起こしうる薬力学的反応を引き起こすために必要な生物学的影響を及ぼす用量を含むものである。動態的考察には、化学物質の取り込み、分布、代謝及び排泄の性質及び経時的变化が含まれ、一方、薬力学的考察には、化学物質と細胞、組織及び器官との相互作用の結果が含まれる。

chemical uptake, distribution, metabolism, and excretion, while dynamic considerations include the consequences of the interaction of the chemical with cells, tissues, and organs. On occasion, the biologically effective dose that would be required to create these conditions would not be possible in humans. It may also be that quantitative differences in a biological process involved in a key event—for example, the clearance of a hormone—are so great that the animal MOA is not relevant to humans. However, the IPCS workshop recognized that only infrequently is it likely that it will be possible to dismiss human relevance on the basis of quantitative differences. As with the qualitative assessment, a tabular comparison of quantitative data from the experimental animals and humans can facilitate the evaluation (for example, see Meek et al., 2003, case-study 5, thyroid tumours associated with exposure to phenobarbital, Table 6; Dellarco et al., current document, case-study on thiazopyr, Table 4). Useful comparisons can also be made with key events identified from studies of other compounds believed to induce effects by a similar MOA. For example, in the case of thiazopyr, information on the effects of phenobarbital in humans was particularly informative in evaluating the relevance of the MOA. As molecular and kinetic approaches continue to evolve, understanding of the similarities and differences of responses in animals and humans will be improved. It may become apparent that qualitative differences in a key event between an animal model and humans will be identified as being due to a specific quantitative difference, thus changing the answer to the second question (described above) to *no*.

As with question 2, if the conclusion to this question is *yes*, then chemicals producing animal tumours only by that MOA would not pose a cancer hazard to humans, and no additional risk characterization for this end-point is required.

Statement of confidence, analysis, and implications

Following the overall assessment of each of the three questions, a statement of confidence is necessary that addresses the quality and quantity of data underlying the analysis, consistency of the analysis within the framework, consistency of the database, and the nature and extent of the concordance analysis. An evaluation of alternative MOAs, using comparable analyses and rigour, is also essential. A critically important outcome of adequate consideration of the weight of the evidence for an overall MOA and the qualitative and quantitative concordance is the identification of specific data gaps that can be addressed experimentally in future investigations to increase confidence.

Infrequently, there may be conclusive epidemiological data on the cancer risk from a chemical that shares the MOA of the compound under consideration—that is, the compound does or does not cause cancer in humans. Obviously, such data would lend considerable weight to the conclusion of the human relevance evaluation. However, there may be occasions when, despite it being possible to establish an MOA in animals, there is insufficient information on the key events in humans to reach a clear conclusion on human relevance. In such circumstances, it might be possible to bridge this data gap by using epidemiological data. For example, the database on key events in humans for compounds that act like phenobarbital via activation of the constitutively active receptor (CAR) to induce hepatic tumours is incomplete. However, there are robust epidemiological data showing that exposure to phenobarbital for prolonged periods at relatively high doses does not cause cancer in humans. One possibility, therefore, is to “read across” from these findings with phenobarbital to any other

時折、これらの条件を作り出すために必要とされる生物学的に影響を及ぼす用量が、ヒトにおいて不可能であることがある。また、ホルモンのクリアランスなど **key events** に関する生物学的プロセスにおける定量的な違いが大きすぎるため、動物の MOA がヒトには関連しないということもあり得る。しかし、量的な差異に基づいて MOA のヒトへの関連性を否定することが可能になるのは、ごくまれであると IPCS ワークショップでは認識されている。定性評価と同様に、実験動物とヒトの定量データを表形式で比較することで、評価を容易にすることができる（例えば、事例研究 5、フェノバルビタールばく露に伴う甲状腺腫瘍、Meek ら、2003 年、表 6；チアゾピルに関する事例研究、Dellarco ら、本書、表 4 参照）。同様の MOA によって効果を誘導すると考えられている他の化合物の研究から同定された **key events** との比較も有用である。例えば、チアゾピルの場合、ヒトにおけるフェノバルビタールの効果に関する情報は、MOA の関連性を評価する上で特に有用であった。分子学的及び動態学的アプローチが進化し続けるにつれ、動物及びヒトにおける反応の類似性及び相違点の理解が向上するであろう。動物モデルとヒトとの間の **key events** における定性的な違いが、特定の定量的な違いによるものであることが明らかになるかもしれない。その場合、第 2 の問いかけ（上述）への回答を「No」に変更する。

問 2 と同様に、この問いかけへの結論が「Yes」であれば、その MOA によってのみ動物に腫瘍を誘発させる化学物質はヒトにがんに関するハザードをもたらさず、このエンドポイントにおける追加のリスク判定は必要ない。

信頼性、解析及び帰結の記述

3 つの問いかけのそれぞれの総合評価に続いて、解析の基礎となるデータの質と量、フレームワーク内での解析の一貫性、データベースの一貫性、一致解析の性質と程度についての信頼性についての記述が必要である。また、同等の解析法や厳密な評価を用いた代替的な MOAs の評価も不可欠である。全体的な MOA と質的・量的一致のエビデンスの重み付けを十分に考慮し、その結果として、MOA の信頼性を高めることができる将来の研究で実験的に特異的なデータギャップを特定することが極めて重要である。

まれに、検討中の化合物と共通する MOA を有する化学物質の発がんリスクに関する決定的な疫学的データ、すなわち、その化合物がヒトに発がん性を有するか否かのデータが存在することがある。当然、そのようなデータは、ヒトへの関連性評価の結論にかなりの重みを与えるであろう。しかし、動物では MOA を確立することが可能であるにもかかわらず、ヒトでの **key events** に関する情報が不十分であり、ヒトへの関連性について明確な結論を出すことができない場合がある。そのような場合には、疫学データを利用することで、このデータギャップを埋めることができるかもしれない。例えば、構成的活性化受容体（CAR）の活性化を介してフェノバルビタールと同様の作用をして肝腫瘍を誘発する化合物のヒトでの **key events** に関するデータベースは不完全である。しかし、比較的高用量のフェノバルビタールに長期間ばく露しても、ヒトでは発がんしないことを示す確固たる疫学的データがある。したがって、1 つの可能性としては、これらのフェノバルビタールに関する知見から、げっ歯類に肝腫瘍を誘導する動物 MOA を共有する他の化合物について「類推」し、そのような化合物によって引き起こされる腫瘍は、ヒトにおける化合物のリスク評価には関係ないと結論づけることである（Holsapple ら、2006 年）。

compound that shares its MOA in animals in inducing rodent liver tumours and to conclude that the tumours caused by such a compound are not relevant to the risk assessment of the compound in humans (Holsapple et al., 2006). Such a conclusion would be critically dependent on the reliability of the epidemiological data and the similarity between the MOA for the chemical under test to that of the compound for which there are epidemiological data available.

In applying the framework to case-studies, it is apparent that much current research does not address key questions that would facilitate an analysis of an animal MOA or its relevance to humans. Often this has been because of lack of transparent delineation of key data gaps based on consideration of the data in analytical frameworks such as that presented here. Thus, use of the HRF can be very informative to researchers from the outset in the design of their studies.

The output of formal human relevance analysis provides information that is useful for more than just determining whether or not an end-point in animals is relevant to humans. Rather, consideration of the relevant information in a transparent, analytical framework provides much additional information that is critically important in subsequent steps in the risk characterization for relevant effects. Based on a human relevance analysis for a proposed MOA for relevant effects, it may be possible to predict, for example, site concordance or not of observed tumours in animals to humans. Application of the HRF also often provides information on relevant modulating factors that are likely to affect risk, such as hepatitis B and aflatoxin B₁ (see Cohen et al., current document, case-study on 4-aminobiphenyl). Analysis often also provides an indication of those components of a proposed MOA that may operate only over a certain dose range. If a high experimental dose of a given compound is needed to result in an obligatory step in an MOA, then the relevance to human risk becomes a matter of exposure. Thus, the exposure assessment step of the subsequent risk characterization is critical to the proper evaluation of human cancer potential. In addition, information identified during the framework analysis can prove invaluable in hazard quantification based on the key events for the MOA.

Importantly, the human relevance analysis also contributes to identification of any special subpopulations (e.g. those with genetic predisposition) who are at increased risk and often provides information relevant to consideration of relative risk at various life stages. In some cases, this may be based not on chemical-specific information but rather on inference, based on knowledge of the MOA, as to whether or not specific age groups may be at increased or decreased risk.

The data and their analysis using the framework should be reported in a transparent manner, enabling others to determine the basis of the conclusions reached with respect to the key events, the exclusion of other MOAs, and the analysis of human relevance. As the specific form of presentation will vary with the type of data available, it is not helpful to be prescriptive on how the information should be reported. However, presentation should include sufficient details on the context and thought processes to ensure transparency of the conclusions reached. The use of appropriate tables can be helpful in presenting certain data, such as comparative analysis of key events in experimental animals and humans.

このような結論は、疫学的データの信頼性及び試験対象の化学物質の MOA と疫学的データが利用可能な化合物の MOA との類似性に極めて依存している。

このフレームワークを事例研究に適用すると、現在の研究の多くは、動物 MOA の解析及びヒトとの関連性の解析を容易にするような重要な問いに対処していないことは明らかである。多くの場合、このことは、ここで紹介したような解析フレームワークでのデータの検討に基づいて、主要なデータギャップを透明性をもって記述していないことが原因である。このように、HRF を用いることは試験設計の初期段階から研究者にとって非常に有益である。

統一された形式のヒト関連性解析の結果は、動物のエンドポイントがヒトに関連するかどうかを判断するだけでなく、それ以上に有用な情報を提供してくれる。むしろ、透明性のある解析的フレームワークの中で関連情報を検討することで、関連する影響のリスク判定における次の段階で多くの極めて重要な追加情報が提供される。推定される関連影響に関する MOA のヒト関連性解析に基づくことで、例えば、動物で観察された腫瘍がヒトにおいて発生部位が一致するかどうかを予測することが可能である。また、HRF を適用することで、B 型肝炎やアフラトキシン B₁ などのように、リスクに影響を与える可能性のある関連する調節因子に関する情報が得られることが多い (4-Aminobiphenyl に関する事例研究、Cohen ら、本書を参照)。解析はまた、推定される MOA の構成要素のうち、一定の用量以上でのみ作用する可能性のあるものについての指標を提供することが多い。MOA に必須なステップを引き起こすために対象の化合物の実験的高用量のばく露が必要とされる場合、ヒトのリスクとの関連性はばく露の問題となる。このように、その後のリスク判定におけるばく露評価ステップは、ヒトでの発がん性を適切に評価するために重要である。さらに、フレームワーク解析で特定された情報は、MOA の key events に基づくハザードの定量化において非常に貴重なものとなりうる。

重要なことだが、ヒト関連性解析は、リスクが増大している特別な集団（遺伝的素因を持つ集団など）を特定することにも寄与し、しばしば、様々なライフステージにおける相対リスクの検討に関連する情報を提供してくれる。場合によっては、これは化学物質固有の情報に基づくのではなく、特定の年齢層のリスクが増加しているか減少しているかについて、MOA の知識に基づいている場合もある。

フレームワークを用いたデータ及びその解析は、透明性のある方法で報告され、他の者が key events、他の MOA の除外及びヒトとの関連性の解析に関して到達した結論の根拠を判断できるようにすべきである。具体的な提示形式は利用可能なデータの種類によって異なるため、情報がどのように報告されるべきかを規定することに意味はない。しかし、到達した結論の透明性を確保するために、文脈や考察のプロセスに関して十分な詳細情報が含まれていなければならない。実験動物とヒトにおける key events の比較解析など、特定のデータを提示する際には、適切な表を使用することが有用である。

Dissemination of the framework

To assist in the dissemination and application of the IPCS HRF, a database of generally accepted MOAs and informative cases should be constructed and maintained. This would comprise a series of MOAs and their associated key events, for reference by those developing framework analyses for compounds that may act by similar MOAs. The case-studies would comprise worked examples that have been analysed using the framework, to provide an indication of the relevant level of detail of the analyses and nature of the weight of evidence required to support acceptance of a proposed MOA in causing the carcinogenic response. Such cases would be particularly valuable early in the development of a new MOA.

Application of the IPCS HRF to DNA-reactive carcinogens

Because of similarities in the carcinogenic process between rodents and humans and the comparable initial interactions with DNA by DNA-reactive carcinogens, it would be expected that, in general, DNA-reactive carcinogens would be assessed as progressing to the step of “yes, the key events in the animal MOA could occur in humans” in the ILSI/RSI HRF, as was the case for ethylene oxide (Meek et al., 2003), and “no” to the equivalent step in the IPCS HRF that asks the question, “Can human relevance of the MOA be reasonably excluded on the basis of fundamental, qualitative differences in key events between experimental animals and humans?”, as was the case for 4-aminobiphenyl (Cohen et al., current document). In a recent paper, Preston & Williams (2005) presented a set of key events for tumour development that provided a guide for the use of the ILSI/RSI HRF with DNA-reactive carcinogens. This guide supported the view that for most DNA-reactive chemicals, the animal MOA would be predicted to be relevant to humans. However, it was also argued that there could be exceptions and that the ILSI/RSI HRF would be a valuable tool for identifying these. Use of the ILSI/RSI HRF and the IPCS HRF can also assist in quantifying differences in key events between rodents and humans that may be of value in extrapolating risk to humans. Not all rodent DNA-reactive carcinogens have been established to be human carcinogens, as judged by the International Agency for Research on Cancer (IARC) review process. For some of these exceptions, this human-rodent difference in tumour response is attributable to lower exposure of humans to the agent or to the relative insensitivity of epidemiological studies to detect tumour responses at low exposure levels. However, there are other reasons for such differences that are based on biological considerations. For example, if a DNA-reactive carcinogen induces tumours *only* in a species-specific organ, it is possible that the animal MOA based on key events might not be relevant to humans, although available data on MOA would need to be considered to permit such a conclusion. Similarly, the generally more proficient DNA repair processes that occur in humans compared with rodents (Cortopassi & Wang, 1996; Hanawalt, 2001) or a unique pathway of bioactivation in rodents could result in there being yes answers to the steps in the IPCS HRF that address the queries “Can human relevance of the MOA be reasonably excluded on the basis of fundamental, qualitative differences in key events between experimental animals and humans?” and/or “Can human relevance of the MOA be reasonably excluded on the basis of quantitative differences in either kinetic or dynamic factors between experimental animals and humans?” Alternatively, the IPCS HRF could provide quantitative information on these processes for use later in the risk characterization step.

フレームワークの普及

IPCS HRF の普及と適用を支援するために、一般的に受け入れられている MOA と有益な事例のデータベースを構築し、維持する必要がある。これは、類似の MOAs で作用する可能性のある化合物のフレームワーク解析を進めている人が参照できるよう一連の MOAs とそれに関連した key events で構成されている。事例研究は、実際の事例で構成されており、それらは発がん性反応を引き起こす推定 MOA の受入れを支持するために必要な解析の詳細の関連度とエビデンスの重み付けの性質を示すために、フレームワークを用いて解析されている。そのような事例研究は、新しい MOA を開発する初期段階では特に貴重であろう。

DNA 反応性発がん物質への IPCS HRF の適用

げっ歯類とヒトの発がんプロセスに類似性があり、DNA 反応性発がん物質による DNA との初期相互作用が類似しているため、一般的に DNA 反応性発がん物質は、エチレンオキシドの場合 (Meek ら, 2003 年) のように ILSI/RSI HRF の「動物の MOA の key events はヒトで起こりうる」という質問に対し「Yes」のステップに進むと評価され、IPCS HRF における上記質問に相当する「実験動物とヒトの間の key events の根本的、質的な違いに基づいて、MOA のヒトとの関連性を合理的に排除することができるか」の質問に対し 4-Aminobiphenyl の場合 (Cohen ら, 本書) 「No」のステップへと進むと評価されると予想される。最近の論文では、Preston & Williams (2005 年) は、DNA 反応性発がん物質に対する ILSI/RSI HRF の使用の指針となる腫瘍発生の key events のセットを提示した。この指針は、ほとんどの DNA 反応性化学物質について、動物 MOA はヒトに関連すると予測されるという見解を支持した。しかし、例外がある可能性があり、ILSI/RSI HRF はこれらを特定するための貴重なツールになると指摘された。ILSI/RSI HRF と IPCS HRF を使用することは、ヒトへのリスクを外挿する際に価値があるであろうげっ歯類とヒトの間の key events の違いを定量化するのにも役立つ。国際がん研究機関 (IARC) のレビュープロセスで判断されたように、すべてのげっ歯類における DNA 反応性発がん物質がヒトの発がん物質であると確立されているわけではない。これらの例外のいくつかについては、発がん性におけるこのヒト-げっ歯類間の違いは、ヒトがその化合物へのばく露量が少ないこと、または低ばく露レベルでの発がん性を検出する疫学研究の相対的な感度の低さに起因している。しかしながら、このような違いの理由は他にも生物学的考察に基づくものがある。例えば、DNA 反応性発がん物質が種特異的な器官でのみ腫瘍を誘発する場合、MOA に関する利用可能なデータを考慮する必要があるが、この key events に基づく動物 MOA はヒトには関連がない可能性もある。同様に、ヒトではげっ歯類と比較して一般的に DNA 修復プロセスが発達している (Cortopassi & Wang, 1996 年; Hanawalt, 2001 年)、あるいはげっ歯類に特有の生体内活性化の経路があることから、IPCS HRF における「実験動物とヒトの間の key events の根本的、質的な違いに基づいて、MOA のヒトとの関連性は合理的に排除できるか」及び/または「実験動物とヒトの間の動態的または薬力学的な要因のいずれかの量的な違いに基づいて、MOA のヒトとの関連性は合理的に排除できるか」という問いに対し「Yes」のステップへと進む可能性がある。あるいは、IPCS HRF はこれらのプロセスに関するその後のリスク判定の段階で利用可能な定量的な情報を提供しうる。

The need in applying the IPCS HRF for DNA-reactive carcinogens is to develop a set of key events that would clearly describe the cancer process and use these as the guide for establishing the human relevance of a rodent tumour MOA for any particular DNA-reactive carcinogen under consideration.

The IPCS HRF and risk assessment

Among the strengths of the framework are its flexibility, general applicability to carcinogens acting by any MOA, and the ability to explore the impact of each key event on the carcinogenic response. This includes determination of the nature of the dose-response curve, the identification and location of thresholds for individual key events, and their consequences for the overall tumour response curve. In addition, by considering the kinetic and dynamic factors involved in each key event, it may be possible to reach conclusions regarding the relevance or not of the carcinogenic response to specific subpopulations—for example, in early life, in those with particular diseases, or in those with specific polymorphisms. Alternatively, application of the framework can provide quantitative information on the differences between such groups. Application of the framework can also more generally inform the risk characterization of the chemical, even when it is concluded that the carcinogenic response per se is not relevant to humans.

As stated at the outset, MOA analysis and its human relevance counterpart are aspects of the hazard identification and characterization phases of risk assessment (National Research Council, 1983; Meek et al., 2003). Consistent with this paradigm, the human relevance case-studies referred to in the present report contribute to, but do not complete, a risk assessment for the chemicals under study. This is because a complete risk characterization requires not only evaluation of doses in the range of observations from experimental or occupational hygiene studies but also extrapolation to human exposure levels of interest in daily and lifetime activities.

Hazard characterization—and related MOA analysis—deals with the potential for harm in general terms, while the complete risk assessment puts this potential hazard into context with respect to exposure for decision-makers. Risk characterization seeks to describe the relationship between these effects and the doses to which humans are exposed in order to understand and estimate the nature and likelihood of effects in humans who are generally exposed at lower dose levels.

Understanding dose-response can have a profound effect on hazard characterization and therefore is an important component of the MOA analysis, particularly when non-linear processes or dose transitions are inherent in the relevant biology. Similarly, quantifying hazard in the context of dose informs the process of risk assessment by suggesting extrapolation models that are consistent with our understanding of the biology.

Estimating these generally lower human exposure levels is the task of the exposure analysis component of the risk assessment process. This usually involves extensive analysis of data collected from environmental media and plant and animal tissues, as well as those derived from pharmacokinetic models. This process also depends on analyses of human activity patterns and life stage and lifestyle factors that may bring about exposure. Ideally, based on

DNA 反応性発がん物質に IPCS HRF を適用する際に必要なことは、発がん過程を明確に説明する一連の key events を開発し、検討中の DNA 反応性発がん物質に対するげっ歯類における発がん MOA のヒトへの関連性を確立するための指針としてこれらを使用することである。

IPCS HRF 及びリスク評価

このフレームワークの強みは、柔軟性、あらゆる MOA によって作用する発がん物質への広範な適用性及び発がん性反応における各 key event の影響を探索する能力といった点である。これには、用量反応曲線の性質の決定、個々の key event の閾値の存在の特定やその値の特定及びそれらの腫瘍の反応曲線全体への影響の特定が含まれる。さらに、各 key event に関与する動態的及び薬力学的な因子を考慮することで、特定の集団、例えば、幼若な人々、特定の疾患を持つ人々、または特定の遺伝子多型を持つ人々に対する発がん性反応の関連性の有無に関する結論に到達することが可能になるかもしれない。あるいは、フレームワークを適用することで、そのようなグループ間の違いに関する定量的な情報を得ることができる。フレームワークの適用はまた、発がん性反応自体がヒトには関連性がないと結論づけられた場合でも、化学物質のリスク評価に概ね有益なものになりうる。

冒頭で述べたように、MOA 解析とヒトへの関連性の解析は、リスク評価におけるハザードの特定と特性評価の段階の側面である (National Research Council, 1983 年; Meek ら, 2003 年)。このフレームワークに沿って、本文書で言及しているヒトへの関連性に関する事例研究は、完全なものではないが、研究対象の化学物質のリスク評価に貢献する。これは、完全なリスク評価を行うためには、実験的研究や職業衛生研究で設定された範囲の用量を評価するだけでなく、日常生活や生涯の活動における対象化学物質のヒトへのばく露レベルへの外挿を必要とするからである。

ハザードの特性評価及び関連する MOA 解析は、一般的な用語で危害の可能性を扱うのに対し、完全なリスク評価は、意思決定者に対してこの潜在的なハザードをばく露に関する文脈で説明するものである。リスク評価は、一般的に低用量レベルで被ばくしているヒトにおける影響の性質と発生する可能性を理解し、推定するために、これらの影響とヒトへのばく露量との関係を記述しようとするものである。

用量反応関係を理解することは、ハザードの特性評価に大きな影響を及ぼす可能性があるため、MOA 解析の重要な要素であり、生物学的に非線形的なプロセスや種間における閾値の差が内在している場合には特に重要な要素である。同様に、用量に関連したハザードを定量化することは、生物学的理解と整合性のある外部モデルを提示することで、リスク評価のプロセスに役立つ。

これらの一般的に低いヒトばく露レベルを推定することは、リスク評価におけるばく露解析の課題である。これには通常、環境媒体、動植物組織、薬物動態モデルから得られたデータの広範な解析が含まれる。このプロセスはまた、ヒトの活動パターン、ライフステージや生活様式といったばく露をもたらす可能性のある要因の解析にも依存する。

this information, a range of exposure scenarios is developed for different groups (men, women, children, infants, special groups, based, for example, on ethnicity or occupation) for use in identifying populations of concern. While hazard characterization, which is largely included in the framework analysis, involves quantification (dose–response analysis), estimating external exposures and contextualizing the hazard with respect to these estimates comprise subsequent steps in the risk assessment process. For example, in the case of melamine (Meek et al., 2003, case-study 7), it was concluded that the animal MOA was potentially relevant to humans. However, recognition that bladder carcinoma formation occurred only at very high doses carried forward to the subsequent stages of the risk assessment, exposure assessment, and risk characterization. The full risk assessment established that human exposures would not achieve levels necessary to produce bladder carcinomas, by a substantial margin.

CONCLUSIONS

This IPCS HRF has been developed based on experience gained from the original 2001 IPCS MOA Framework and consideration of the 2003 ILSI/RSI human cancer relevance framework. Many aspects of these frameworks have been adopted, but a number of changes have been made to improve clarity and to introduce some elements not previously considered (e.g. sensitive subpopulations). The utility and role of the framework as an analytical tool within hazard characterization and within the overall risk assessment/characterization paradigm—that is, informing human relevance and dose–response extrapolation—have been emphasized. A number of general points and conclusions follow from the development of this framework:

1. Prior to embarking on a framework analysis, there needs to be careful evaluation of the weight of evidence for a carcinogenic response in experimental animals.
2. Peer involvement and independent review are essential prerequisites for the general acceptance and scientific defensibility of a new MOA.
3. The framework is applicable to all MOAs for carcinogens, including DNA reactivity.
4. Although human relevance is likely to be assumed for most DNA-reactive carcinogens, the human relevance analysis is a valuable approach to enhance understanding, improve characterization of the hazard and risk, and identify exceptions.
5. When dealing with a chemical that may operate through a novel MOA, the analysis is focused on the chemical and entails a detailed evaluation via the HRF. However, when a specific chemical produces a tumour response consistent with an already established and peer-reviewed MOA through which other chemicals have been shown to operate, the analysis is then focused on the established MOA and a determination of whether the chemical produces its carcinogenic effect via the same key events established for the pathway.
6. When evaluating the human relevance of a tumour response found in experimental animals, the concordance analysis of key events is for the MOA and is not necessarily a chemical-specific evaluation. Chemical-specific and generic information relevant to the carcinogenic process can be valuable in the analysis. As knowledge advances, MOAs will become less chemical specific and will be based even more on the key biological

理想は、この情報に基づいて懸念される集団を特定するために、異なる集団（男性、女性、子供、乳幼児、民族性や職業などに基づく特別な集団）を対象としたそれぞれのばく露量の範囲に関するシナリオが作成されることである。その大部分がフレームワーク解析に含まれているハザードの特性評価には定量化（用量反応解析）が含まれているが、外部ばく露量の推定及びこれらの推定ばく露量におけるハザードの説明は、リスク評価に含まれるその次のステップにおいて行われる。例えば、メラミンの場合（事例研究 7、Meek ら、2003 年）では、動物の MOA はヒトとの関連性が高いと結論づけられた。しかし、膀胱がんの形成は非常に高用量でしか起こらないという認識により、リスク評価、ばく露評価、リスク判定の次の段階へと解析が進められた。リスク評価全体として、メラミンのヒトへのばく露は膀胱がんの発生に必要なレベルを大きく下回るという評価が下された。

結論

この IPCS HRF は、2001 年の IPCS MOA フレームワークから得られた経験と 2003 年の ILSI/RSI ヒト発がん性関連フレームワークの検討に基づいて作成された。これらのフレームワークにおける概念の多くが採用されているが、明確性を向上させ、これまで考慮されていなかった要素（例えば、感受性の高い集団）を導入するために、多くの変更が加えられている。ハザードの特性評価及び全体的なリスク評価/判定のフレームワークにおける解析ツールとしてのフレームワークの有用性と役割、すなわちヒトへの関連性と用量反応性の外挿に役立つことが強調されている。このフレームワークの開発から得られた、多くの要点と結論は以下のとおりである。

1. フレームワーク解析に着手する前に、実験動物における発がん性反応のエビデンスの重み付けを慎重に評価する必要がある。
2. 専門家の関与及び第三者によるレビューは、新しい MOA が一般に受け入れられるため、また、科学的な正当性を得るための必須条件である。
3. フレームワークは、DNA 反応性を含むすべての発がん MOA に適用できる。
4. ほとんどの DNA 反応性発がん物質についてはヒトへの関連性が想定されると思われるが、ヒト関連性解析は、理解を深め、ハザードとリスクの特性評価/判定を改善し、例外を特定するための重要なアプローチである。
5. 新規の MOA を介して作用する可能性のある化学物質を扱う場合、解析はその化学物質に焦点を当て、HRF を介して詳細な評価を行うことが必要となる。しかし、ある化学物質が他の化学物質において既に確立され、専門家のピアレビューを経た MOA と一致した腫瘍反応をもたらす場合、解析は確立されている MOA と、その化学物質がその MOA の一連の流れにおいて確立されている key events と同じ key events を介して発がん作用を生み出すか否かに焦点を当てて行われる。
6. 実験動物で発見された腫瘍反応のヒトへの関連性を評価する場合、key events の一致解析は MOA に対するものであり、必ずしも化学物質に焦点を当てた評価ではない。発がんプロセスに関連する化学物質特有の情報や化学物質一般の情報は、解析において貴重なものとなり得る。知識の進歩に伴い、MOA は化学物質特有のものではなく、関連する重要な生物学的プロセスにより一層依拠することとなり、それにより、ある化合物におけるヒトとの関連性を別の化合物へと一般化することが可能になるであろう。

processes involved, allowing greater generalization of human relevance from one compound to another.

7. The biological understanding and significance of the key events can inform the approach to dose–response extrapolation for cancer risk, and thus understanding of the MOA can have a profound effect on the hazard and risk characterization, particularly when non-linear processes or dose transitions are inherent in the relevant biology.
8. It is recommended that a database of generally accepted MOAs and informative case-studies be established and maintained. It should provide examples that add to the existing case-studies developed by ILSI/RSI and IPCS and that are instructive in the application of the framework analysis. This database is particularly important as experience continues to evolve in the development of MOAs of carcinogens.
9. It is important to consider potentially susceptible subgroups and different life stages in the analysis.

In conclusion, the IPCS HRF provides a rigorous and transparent approach for judging whether data support a postulated mode of carcinogenic action for a chemical and for evaluating its relevance for humans. The scientific community is encouraged to use this approach as a means to increase the use of mechanistic information in cancer risk assessment and is encouraged to provide feedback, which may lead to additional refinements in the future. The framework is of value to both the risk assessment and research communities in furthering our understanding of carcinogenic processes, in identifying critical data gaps, and in informing the design of studies related to MOAs. When a carcinogenic response is considered potentially relevant to humans, information obtained on the key events during the analysis can prove invaluable in subsequent hazard quantification of the compound. It should be possible to extend the framework to non-cancer end-points, and further work on this is recommended. Thus, application of the IPCS HRF would be an invaluable tool for harmonization across end-points.

ACKNOWLEDGEMENTS

IPCS and the authors of this paper acknowledge the numerous experts involved in the scientific meetings and workshops leading to the development of this IPCS Human Relevance Framework for Analysing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. These were expert meetings and workshops convened and conducted in accordance with procedures of the IPCS/WHO. The outcomes, including this paper, contain the collective views of an international group of experts and do not necessarily represent the decisions or the stated policy of WHO. The work was funded by donations to IPCS from a number of Member States of the World Health Assembly.

REFERENCES

Cohen M, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003) The human relevance of information on carcinogenic modes of action: An overview. *Critical Reviews in Toxicology*, **33**:581–589.

7. Key events の生物学的理解と生体における重要性は、発がんリスクの用量反応性の外挿性に關する解析に情報を提供することができる。そのため MOA の理解はハザードとリスクの判定に大きな影響を与える。特に非線形性のプロセスや種間の閾値の差が、関連する生物学的性質に内在する場合に顕著である。
8. 一般的に受け入れられている MOA と有益な事例研究のデータベースを構築し、維持することが推奨される。このデータベースは、ILSI/RSI 及び IPCS によって行われた既存の事例研究に加え、フレームワーク解析の適用において有益な事例を提供するものでなければならない。このデータベースは、発がん物質の MOA の研究において知見が蓄積し続ける中で特に重要である。
9. 解析において、潜在的に感受性の高い集団やさまざまなライフステージを考慮することが重要である。

結論として、IPCS HRF は、推定される化学物質の発がん MOA をデータが裏付けるかどうかを判断し、ヒトへの関連性を評価するための厳格で透明性のあるアプローチを提供している。科学界において発がんリスク評価における作用機序に関する情報の利用を増やす手段として、このアプローチを利用し、フィードバックを行うことが奨励されており、このことが将来的な更なる改良につながるだろう。このフレームワークは、発がんプロセスの理解を深め、重要なデータギャップを特定し、MOA に関連した研究の設計に有益な情報をもたらすという点で、リスク評価と研究の両方のコミュニティにとって価値がある。発がん反応がヒトに関連する可能性があると考えられる場合、解析中に key events について得られた情報は、その後の化合物のハザードの定量化において極めて貴重なものとなりうる。このフレームワークは発がん以外のエンドポイントにまで拡張できるようにするべきであり、このことに関する更なる研究が推奨される。したがって、IPCS HRF の適用は、エンドポイント間の調和のための貴重なツールとなるであろう。

謝辞

IPCS と本論文の著者らは、この発がん MOA のヒトとの関連性を解析するための IPCS フレームワークの開発につながった科学的な会議やワークショップに關与した多くの専門家に謝意を表します。これらは IPCS/WHO の手順に従って招集され、実施された専門家会議及びワークショップです。本文書を含む成果物は、国際的な特別作業部会の意見を集約したものであり、必ずしも WHO の決定や表明された方針を代表するものではありません。本事業は、世界保健総会の多くの加盟国からの IPCS への寄付金により資金提供された。

参考文献

Cohen M, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003) The human relevance of information on carcinogenic modes of action: An overview. *Critical Reviews in Toxicology*, **33**:581–589.

Committee on Carcinogenicity (2004) *Guidance on a strategy for the risk assessment of chemical carcinogens*. London, Department of Health.

Cortopassi GA, Wang E (1996) There is substantial agreement among interspecies estimates of DNA repair activity. *Mechanisms of Ageing and Development*, **91**:211–218.

Hanawalt PC (2001) Revisiting the rodent repairadox. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **38**:89–96.

Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SM, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006) Mode of action in relevance of rodent livers to human cancer risk. *Toxicological Sciences*, **89**:51–56.

IPCS (2000) *Scoping meeting to address the human relevance of animal modes of action in assessing cancer risk, Carshalton, United Kingdom, 8–10 November 2000*. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (<http://www.who.int/ipcs/methods/harmonization/areas/cancer/en/index.html>).

IPCS (2004) *Report of the first meeting of the Cancer Working Group, Arlington, Virginia, USA, 3–5 March 2004*. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (<http://www.who.int/ipcs/methods/harmonization/areas/cancer/en/index.html>).

IPCS (2005) *Record of the Cancer Framework Workshop, Bradford, United Kingdom, 21–23 April 2005*. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (<http://www.who.int/ipcs/methods/harmonization/areas/cancer/en/index.html>).

Meek ME, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKeeman LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003) A framework for human relevance analysis of information on carcinogenic modes of action. *Critical Reviews in Toxicology*, **33**:591–653.

National Research Council (1983) *Risk assessment in the federal government. Managing the process*. Washington, DC, National Academy Press.

Preston JR, Williams GM (2005) DNA-reactive carcinogens: Mode of action and human cancer hazard. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:673–683.

Slikker W Jr, Andersen ME, Bogdanffy MS, Bus JS, Cohen SD, Conolly RB, David RM, Doerrner NG, Dorman DC, Gaylor DW, Hattis D, Rogers JM, Setzer RW, Swenberg JA, Wallace K (2004) Dose-dependent transitions in mechanisms of toxicity: Case studies. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **20**:226–294.

Sonich-Mullin C, Fielder R, Wiltse J, Baetcke K, Dempsey J, Fenner-Crisp P, Grant D, Hartley M, Knaap A, Kroese D, Mangelsdorf I, Meek E, Rice J, Younes M (2001) IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **34**:146–152.

Committee on Carcinogenicity (2004) *Guidance on a strategy for the risk assessment of chemical carcinogens*. London, Department of Health.

Cortopassi GA, Wang E (1996) There is substantial agreement among interspecies estimates of DNA repair activity. *Mechanisms of Ageing and Development*, **91**:211–218.

Hanawalt PC (2001) Revisiting the rodent repairadox. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **38**:89–96.

Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SM, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006) Mode of action in relevance of rodent livers to human cancer risk. *Toxicological Sciences*, **89**:51–56.

IPCS (2000) *Scoping meeting to address the human relevance of animal modes of action in assessing cancer risk, Carshalton, United Kingdom, 8–10 November 2000*. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (<http://www.who.int/ipcs/methods/harmonization/areas/cancer/en/index.html>).

IPCS (2004) *Report of the first meeting of the Cancer Working Group, Arlington, Virginia, USA, 3–5 March 2004*. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (<http://www.who.int/ipcs/methods/harmonization/areas/cancer/en/index.html>).

IPCS (2005) *Record of the Cancer Framework Workshop, Bradford, United Kingdom, 21–23 April 2005*. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (<http://www.who.int/ipcs/methods/harmonization/areas/cancer/en/index.html>).

Meek ME, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKeeman LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003) A framework for human relevance analysis of information on carcinogenic modes of action. *Critical Reviews in Toxicology*, **33**:591–653.

National Research Council (1983) *Risk assessment in the federal government. Managing the process*. Washington, DC, National Academy Press.

Preston JR, Williams GM (2005) DNA-reactive carcinogens: Mode of action and human cancer hazard. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:673–683.

Slikker W Jr, Andersen ME, Bogdanffy MS, Bus JS, Cohen SD, Conolly RB, David RM, Doerrner NG, Dorman DC, Gaylor DW, Hattis D, Rogers JM, Setzer RW, Swenberg JA, Wallace K (2004) Dose-dependent transitions in mechanisms of toxicity: Case studies. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **20**:226–294.

Sonich-Mullin C, Fielder R, Wiltse J, Baetcke K, Dempsey J, Fenner-Crisp P, Grant D, Hartley M, Knaap A, Kroese D, Mangelsdorf I, Meek E, Rice J, Younes M (2001) IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **34**:146–152.

USEPA (1999) *Guidelines for carcinogen risk assessment (review draft)*. Washington, DC, United States Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum (NCEA-F-0644).

USEPA (2005) *Guidelines for carcinogen risk assessment*. Washington, DC, United States Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum (EPA/639/P-03/001F).

USEPA (1999) Guidelines for carcinogen risk assessment (review draft). Washington, DC, United States Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum (NCEA-F-0644).

USEPA (2005) Guidelines for carcinogen risk assessment. Washington, DC, United States Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum (EPA/639/P-03/001F).

THIAZOPYR AND THYROID DISRUPTION: CASE-STUDY WITHIN THE CONTEXT OF THE IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS¹

Vicki L. Dellarco, Douglas McGregor, Sir Colin Berry, Samuel M. Cohen, & Alan R. Boobis

Thiazopyr increases the incidence of male rat thyroid follicular cell tumours; however, it is not carcinogenic in mice. Thiazopyr is not genotoxic. Thiazopyr exerts its carcinogenic effect on the rat thyroid gland secondary to enhanced metabolism of thyroxine leading to hormone imbalance. The relevance of these rat tumours to human health was assessed by using the 2006 International Programme on Chemical Safety Human Relevance Framework. The postulated rodent tumour mode of action (MOA) was tested against the Bradford Hill criteria and was found to satisfy the conditions of dose and temporal concordance, biological plausibility, coherence, strength, consistency, and specificity that fits with a well established MOA for thyroid follicular cell tumours. Although the postulated MOA could theoretically operate in humans, marked quantitative differences in the inherent susceptibility for neoplasia to thyroid hormone imbalance in rats allows for the conclusion that thiazopyr does not pose a carcinogenic hazard to humans.

A number of chemical substances have been shown to induce thyroid follicular cell tumours in rats through a mode of action (MOA) that involves perturbation of thyroid hormone homeostasis via reduction of circulating thyroid hormones (Hurley et al., 1998; Capen et al., 1999; IARC, 2001). Homeostatic responses to low thyroid hormone concentrations result in a compensatory increase in the release of thyroid stimulating hormone (TSH) from the pituitary gland, which in turn stimulates the thyroid gland to increase thyroid hormone synthesis and release. Persistent elevation of TSH levels leads to thyroid follicular cell hypertrophy and hyperplasia, which, if maintained (as a result of continuous exposure to the compound), can eventually lead to neoplasia. This neoplastic MOA in rats is well accepted by the scientific community, and both the International Agency for Research on Cancer (Capen et al., 1999; IARC, 2001) and the United States Environmental Protection Agency (USEPA, 1998) have established specific guidance or policies for evaluating the human relevance of rodent thyroid follicular cell tumours.

Thiazopyr, a herbicide that induces rat thyroid follicular cell tumours by its effect on thyroid homeostasis, was the case-study used to illustrate the original 2001 International Programme on Chemical Safety (IPCS) framework for mode of carcinogenic action analysis (Sonich-Mullin et al., 2001). Thiazopyr's MOA is revisited as a case-study here to illustrate the additional guidance provided in the 2006 IPCS Human Relevance Framework (HRF) for evaluation of a neoplastic MOA for humans. This updated case-study highlights how accumulating experience with a particular MOA can make subsequent analyses less difficult. Because this case-study is based on an established MOA in which the key events have been well defined, this analysis will focus on whether thiazopyr produces the biological effects

¹ This article, to which WHO owns copyright, was originally published in 2006 in *Critical Reviews in Toxicology*, Volume 36, pages 793–801. It has been edited for this WHO publication and includes corrigenda.

チアゾピルと甲状腺障害:

発がん MOA のヒトへの関連性を解析するための

IPCS フレームワークを用いた事例研究²

Vicki L. Dellarco, Douglas McGregor, Sir Colin Berry, Samuel M. Cohen, & Alan R. Boobis

チアゾピルは雄ラットの甲状腺濾胞細胞腫瘍の発生率を増加させるが、マウスに対して発がん性はないとされている。チアゾピルに遺伝毒性はない。チアゾピルは、チロキシンの代謝亢進によりホルモンバランスが崩れることにより二次的にラット甲状腺に発がん作用を及ぼす。これらのラットにおける腫瘍とヒトの健康への関連性は、2006 年の国際化学物質安全性計画ヒト関連性フレームワーク (IPCS HRF) を用いて評価された。推定されたげっ歯類における発がん MOA を Bradford Hill 基準に照らして検証したところ、用量と時間の一致、生物学的妥当性、整合性、強度、一貫性、特異性の条件を満たしており、甲状腺濾胞細胞腫瘍について確立されている MOA に適合していることがわかった。推定された MOA はヒトでも理論的には作用する可能性はあるが、甲状腺ホルモンの不均衡に対するラットの発がん性の感受性がヒトとは量的に顕著に異なることから、チアゾピルはヒトに対する発がんに関するハザードを有さないという結論が導き出された。

多くの化学物質が、循環甲状腺ホルモンの減少を介した甲状腺ホルモンのホメオスタシスのかく乱を伴う作用機序 (MOA) を介してラットの甲状腺濾胞細胞腫瘍を誘発することが示されている (Hurley ら、1998 年; Capen ら、1999 年; IARC, 2001 年)。甲状腺ホルモンの低下に対しホメオスタシスを保とうとする反応は、下垂体からの甲状腺刺激ホルモン (TSH) の放出の代償的な増加をもたらす、その結果、甲状腺を刺激して甲状腺ホルモンの合成及び放出を増加させる。TSH レベルの持続的な上昇は、甲状腺濾胞細胞の肥大及び過形成へとつながり、(化合物への持続的なばく露の結果) 高い TSH レベルが維持された場合、最終的には腫瘍形成へとつながる。ラットにおけるこの腫瘍形成 MOA は、科学界では十分に受け入れられており、国際がん研究機関 (Capen ら、1999 年; IARC, 2001 年) 及び米国環境保護庁 (USEPA, 1998 年) は、げっ歯類における甲状腺濾胞細胞腫瘍のヒトへの関連性を評価するための独自のガイダンスまたは方針を確立している。

除草剤であるチアゾピルは、甲状腺ホルモンのホメオスタシスへ影響することによりラット甲状腺濾胞細胞腫瘍を誘発するが、これは発がん MOA 解析のための 2001 年の国際化学物質安全性計画 (International Programme on Chemical Safety: IPCS) のオリジナルフレームワークを示すために用いられた事例である (Sonich-Mullin ら、2001 年)。ここではチアゾピルの MOA を、事例研究としてここで再検討し、2006 年の IPCS ヒト関連性フレームワーク (HRF) で提供されたヒトの腫瘍形成 MOA 評価のための追加ガイダンスを説明した。この更新された事例研究では、ある特定の MOA での経験の蓄積が、その後の解析の難易度をどの程度下げられるのかについて強調している。この事例研究は、key events が十分に定義されている確立された MOA に基づいているため、この解析では、チアゾピルがこの経路で期待されている生物学的効果をもたらすか否かに焦

² この論文は、WHO が著作権を有するものであり、元々は 2006 年に *Critical Reviews in Toxicology*, Volume 36, pages 793-801 に掲載されたものです。この論文は、WHO の出版物のために編集されており、正誤表が含まれています。

expected of this pathway. This case-study also emphasizes the importance of understanding the basic physiological processes underlying a toxicity pathway in animals and humans. For some compounds, chemical-specific data might be critical in evaluating the key events in humans. For others, the underlying biology is sufficient to allow interpretation of the human relevance of the carcinogenic MOA, both qualitatively and quantitatively. Thiazopyr is an example of the latter. Another MOA case-study of thyroid hormone disruption and the human relevance of rat thyroid follicular cell tumours is available for phenobarbital (Lehman-McKeeman & Hill, in Meek et al., 2003).

The present MOA analysis begins with a brief summary of the available information on the carcinogenicity of thiazopyr, followed by a discussion of the experimental biochemical and histopathological data considered for this thyroid disruption MOA. It is not intended to be a comprehensive assessment of the chemical per se.

CARCINOGENICITY DATA

Human epidemiological data on the carcinogenicity of thiazopyr are not available. Thiazopyr produces effects on liver and thyroid in various laboratory species, including mice, rats, and dogs. Thiazopyr was found to induce thyroid tumours in male rats only and appears to do so by increasing the hepatic metabolism and excretion of thyroid hormones.

Chronic dietary administration of thiazopyr to mice and rats resulted primarily in thyroid follicular cell tumours in male rats but not in female rats (Naylor & McDonald, 1992; Naylor & Raju, 1992). There were no significant increases in the incidences of any tumours in either sex in the chronic study of mice treated with thiazopyr at up to 800 mg/kg in the diet (128.4 mg/kg body weight [bw] per day in males and 215.9 mg/kg bw per day in females) (Naylor & Raju, 1992). In the rat carcinogenicity study, thiazopyr (technical, 94.8% pure) was administered to male and female Sprague-Dawley (SD) rats (60 per sex per group) at dietary concentrations of 0, 1, 10, 100, 1000, or 3000 mg/kg, providing dose levels of 0, 0.04, 0.4, 4.4, 44.2, or 136.4 mg/kg bw per day for males and 0, 0.06, 0.6, 5.6, 56.3, or 177.1 mg/kg bw per day for females (Naylor & McDonald, 1992). The incidences of thyroid follicular cell adenomas and carcinomas were increased in male rats of the 1000 mg/kg (44.2 mg/kg bw per day) and 3000 mg/kg (136.4 mg/kg bw per day) groups (Table 1). It should be noted that the increase in tumour incidence in male rats is primarily accounted for by benign tumours.

POSTULATED MOA FOR THE INDUCTION OF THYROID FOLLICULAR CELL TUMOURS IN RATS

The postulated MOA for thiazopyr-induced thyroid follicular cell tumours involves the perturbation of homeostasis of the pituitary–thyroid axis by an extrathyroidal mechanism. Specifically, thiazopyr induces hepatic thyroxine (T4)-uridine diphosphate (UDP) glucuronosyltransferase (UGT) activity, leading to enhanced metabolism of T4 by conjugation and increased biliary excretion of the conjugated hormone. The result of this enhanced liver metabolism is a decrease in serum T4 (and sometimes triiodothyronine, or T3) half-life. The pituitary gland responds to a decrease in circulating serum levels of T4 by enhancing the output and serum level of TSH. Prolonged elevation of circulating TSH levels stimulates the

点を当てている。この事例研究はまた、動物及びヒトにおける毒性発現の経路の基礎となる生理学的プロセスを理解することの重要性を強調している。いくつかの化合物では、化学物質特有のデータがヒトでの key events を評価する上で重要な場合があるかもしれないが、その他の化合物については、基礎となる生物学的知見があれば、発がん MOA のヒトへの関連性を定性的にも定量的にも解釈できる場合がある。チアゾピルは後者の例である。甲状腺ホルモンのかく乱とラット甲状腺濾胞細胞腫瘍のヒトへの関連性に関する他の MOA 事例研究としてフェノバルビタールについての事例研究がある (Lehman-McKeeman & Hill, in Meek ら, 2003 年)。

本 MOA 解析は、チアゾピルの発がん性に関する利用可能な情報の簡単な要約から始まり、続いて、この甲状腺ホルモンかく乱 MOA で考察された生化学的及び病理組織学的な実験データの議論が行われる。本解析は化学物質そのものの包括的な評価を意図したものではない。

発がん性データ

チアゾピルの発がん性に関するヒトの疫学的データは得られていない。チアゾピルは、マウス、ラット及びブイヌを含む様々な実験動物種において、肝臓及び甲状腺に影響を及ぼす。チアゾピルは雄ラットにおいてのみ甲状腺腫瘍を誘発することが確認されており、甲状腺ホルモンの肝代謝及び排泄を増加させることによってこれを引き起こすようである。

チアゾピルはマウス及びラットへの慢性的な混餌投与により、主に雄ラットに甲状腺濾胞細胞腫瘍を誘発したが、雌ラットでは誘発しなかった (Naylor & McDonald, 1992 年; Naylor & Raju, 1992 年)。チアゾピルを最大 800 mg/kg まで混餌投与したマウスの慢性試験 (雄では 1 日あたり 128.4 mg/kg 体重[bw]、雌では 1 日あたり 215.9 mg/kg bw) では、いずれの性においても腫瘍の発生率に有意な増加は認められなかった (Naylor & Raju, 1992 年)。ラット発がん性試験では、チアゾピル (原体、純度 94.8%) を雄及び雌の Sprague-Dawley ラット (SD ラット) (各群雌雄 60 匹ずつ) に 0, 1, 10, 100, 1000 または 3000 mg/kg の濃度で混餌投与し、雄では 1 日あたり 0, 0.04, 0.4, 4.4, 44.2, 136.4 mg/kg bw、雌では 1 日あたり 0, 0.06, 0.6, 5.6, 56.3 または 177.1 mg/kg bw の用量を与えた (Naylor & McDonald, 1992)。甲状腺濾胞細胞腺腫及びがんの発生率は、1000 mg/kg (1 日あたり 44.2 mg/kg bw) 及び 3000 mg/kg (1 日あたり 136.4 mg/kg bw) 投与群の雄ラットで増加した (表 1)。なお、雄ラットにおける腫瘍発生率の増加は主に良性腫瘍によるものであったことに留意すべきである。

ラットにおける甲状腺濾胞細胞腫瘍の誘発において推定される MOA

チアゾピル誘発性甲状腺濾胞細胞腫瘍において推定される MOA は、甲状腺外における機序による下垂体-甲状腺軸のホメオスタシスの乱れを含むものであった。具体的な流れを以下に述べる。チアゾピルは肝臓におけるチロキシン (T4)-ウリジン二リン酸 (UDP) グルクロン酸転移酵素 (UGT) 活性を誘導し、抱合による T4 の代謝を促進し、ホルモンの抱合体の胆汁排泄を増加させる。この肝臓代謝の促進の結果として、血清 T4 及び時にはトリヨードサイロニン (T3) の半減期が減少する。下垂体は、TSH の放出及び血清レベルを高めることにより、T4 の循環血清レベルの低下に対応する。循環 TSH レベルの長期的な上昇は、甲状腺を刺激して甲状腺ホルモンの貯蔵を枯渇させ、ホルモン産生を誘導し続ける。

thyroid gland to deplete its stores of thyroid hormone and continues to induce hormone production. Thus, the thyroid follicular cells enlarge (hypertrophy) and are induced to proliferate at an increased rate and to increase in number (hyperplasia). With chronic exposure, thyroid hyperplasia eventually progresses to neoplasia.

Table 1. Thyroid follicular cell tumour incidence in Sprague-Dawley male rats (2-year chronic study).

	Dose (mg/kg bw per day) ^a					
	0	0.04	0.4	4.4	44.2	136.4 ^b
Adenomas	1/50	2/47	0/49	2/47	8/49	12/48
Carcinomas	1/50	1/47	0/49	0/47	1/49	4/48
Combined	2/50	3/47	0/49	2/47	9/49	14/48
%	(2)	(6)	(0)	(4)	(18)	(29)
<i>P</i>	0.000 ^c	0.470	0.253	0.668	0.024*	0.001**

Note: Tumour incidences were extracted from data submitted to the USEPA Office of Pesticide Programs (Naylor & McDonald, 1992). Significance: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (statistical analyses based on Fisher's exact test).

^a Doses in mg/kg bw per day were estimated.

^b Two animals in the 136.4 mg/kg bw per day or 3000 mg/kg diet dose group had both benign and malignant tumours.

^c For trend with dose.

KEY EVENTS IN EXPERIMENTAL ANIMALS

The sequence of key events in thiazopyr's mode of carcinogenic action includes:

- induction of hepatic UGT activity;
- increase in hepatic metabolism and biliary excretion of T4;
- decrease in serum T4 half-life and concentration;
- increase in circulating TSH concentration;
- cellular thyroid hypertrophy and follicular cell hyperplasia.

An evaluation follows to determine whether thiazopyr works via disruption of thyroid–pituitary status by increasing hepatic clearance of circulating thyroid hormone. Thus, based on the key events listed above, biological indicators of thiazopyr's MOA should include changes in liver metabolism, alterations in hormone levels, increases in thyroid growth, and lesion progression in the thyroid. These effects have been observed and measured in male rats in short-term and subchronic studies, and at interim and terminal sacrifices in a chronic study (Hotz et al., 1997). The dose–response and temporal analyses of the key events and tumour response are presented below.

DOSE-RESPONSE RELATIONSHIP AND CONCORDANCE

A summary of the no-observed-adverse-effect levels (NOAELs) and lowest-observed-adverse-effect levels (LOAELs) for the key effects in thiazopyr's MOA are provided in Table 2. In the 56-day study by Hotz et al. (1997), male SD rats (20 per dose) were fed diets containing thiazopyr at 0, 10, 30, 100, 300, 1000, or 3000 mg/kg (doses not measured, but

その結果、甲状腺濾胞細胞は大きくなり（肥大）、高い増殖率で細胞数を増やす（過形成）ように誘導される。慢性的なチアゾピルのばく露により、甲状腺過形成は最終的には腫瘍へと進行する。

表 1. Sprague-Dawley 雄ラットにおける甲状腺濾胞細胞腫瘍の発生率 (2 年間の慢性試験)

	Dose (mg/kg bw per day) ^a					
	0	0.04	0.4	4.4	44.2	136.4 ^b
腺腫	1/50	2/47	0/49	2/47	8/49	12/48
がん腫	1/50	1/47	0/49	0/47	1/49	4/48
合計	2/50	3/47	0/49	2/47	9/49	14/48
%	(2)	(6)	(0)	(4)	(18)	(29)
<i>P</i>	0.000 ^c	0.470	0.253	0.668	0.024*	0.001**

注：腫瘍の発生率は、USEPA Office of Pesticide Programs (Naylor & McDonald, 1992 年) に提出されたデータから抽出した：有意差 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (フィッシャーの正確確率検定に基づく統計解析)

^a 1 日あたりの投与量を mg/kg bw で推定した。

^b 136.4mg/kg bw/日 (3000mg/kg) 混餌投与群の 2 匹の動物には、良性腫瘍と悪性腫瘍の両方が認められた。

^c 投与量に従って P 値が低下した。

実験動物における key events

チアゾピルの発がん MOA における一連の key events には、以下のものが含まれる。

- 肝 UGT 活性の誘導
- T4 の肝臓での代謝及び胆汁排泄の増加
- 血清 T4 の半減期及び濃度の低下
- 循環 TSH 濃度の上昇
- 甲状腺濾胞細胞肥大及び濾胞細胞過形成

次に、チアゾピルが、循環甲状腺ホルモンの肝クリアランスを増加させて甲状腺-下垂体軸を乱すことによって作用するかどうかを評価する。上記の key events に基づき、チアゾピルの MOA の生物学的指標は、肝臓代謝の変化、ホルモンレベルの変化、甲状腺の成長の増加及び甲状腺の病変の進行が挙げられることになる。これらの影響は、短期及び亜慢性試験さらに慢性試験における中間及び計画殺において、雄ラットで観察され、測定されている (Hotz ら, 1997 年)。Key events 及び腫瘍反応の用量反応性を以下に示す。

用量反応関係及び一貫性

チアゾピルの MOA における主要な影響について、無毒性量 (NOAEL) 及び最小毒性量 (LOAEL) の概要を表 2 に示す。Hotz ら (1997) による 56 日間の試験では、雄 SD ラット (各群 20 匹) に、チアゾピルを 0、10、30、100、300、1000、または 3000 mg/kg の濃度で (測定されていないが、チアゾピルの摂取量は 1 日あたり 0、0.5、1.5、5、15、50 及び 150 mg/kg bw と推定される) を 56 日間混餌投与し、肝臓 (重量、肝 T4-UGT 活性、T4 胆汁排泄)、甲状腺 (重量、肥大/過形成) 及びホルモン (T4、T3、リパース T3 (rT3) 及び TSH の血清レベル) に対する影響を評価した。この試験では、チアゾピルの主要作用部位である肝臓への影響が、下垂体-甲状腺のホメオスタシスのかく乱の最も敏感な指標であると考えられる。50 mg/kg bw/day 投与群及び 150 mg/kg bw/day 投

estimated to be 0, 0.5, 1.5, 5, 15, 50, and 150 mg/kg bw per day) for 56 days and evaluated for the effects on liver (weights, T4-hepatic UGT activity, T4 biliary elimination), thyroid (weights, hypertrophy/hyperplasia), and hormones (serum levels of T4, T3, reverse T3, or rT3, and TSH). In this study, the effects on liver, thiazopyr's primary site of action, appear to be the most sensitive indicator of pituitary–thyroid homeostasis perturbation. Statistically significant increases in hepatic T4-UGT activity in the 50 and 150 mg/kg bw per day groups (approximately 3- and 6-fold increases in activity over controls when adjusted for liver weight, respectively) were found at the end of the 56-day treatment period. Consistent with the increase in T4-UGT activity, clearance of T4 from the blood and elimination in bile (40% increase in excretion of ¹²⁵I-labelled T4) were increased after 150 mg/kg bw per day of thiazopyr (only dose evaluated). Statistically significant increases in liver weight were found at 15, 50, and 150 mg/kg bw per day of thiazopyr in the 56-day study in male rats by Hotz et al. (1997). In the 2-year rat study (Naylor & McDonald, 1992), absolute liver weights were increased by 122% at 44.2 mg/kg bw per day and by 178% at 136.4 mg/kg bw per day relative to controls. There were also statistically significant increases in the incidence of liver hypertrophy at 44.2 and 136.4 mg/kg bw per day (47/61 and 52/60 versus 0/60 in controls, respectively) in the 2-year rat study.

Table 2. Summary of effects on liver, hormones, and thyroid from a 56-day study (Hotz et al., 1997) and the 2-year chronic study (Naylor & McDonald, 1992) in male rats.

Effect	NOAEL/LOAEL
Liver	
Induction of UGT	15/50 mg/kg bw per day (56-day study)
Increase in T4 biliary elimination	<150/150 mg/kg bw per day (only dose tested in 56-day study)
Increase in liver weight	5/15 mg/kg bw per day (56-day study) 44.2/136.4 mg/kg bw per day (2-year study)
Hepatocellular hypertrophy	4.4/44.2 mg/kg bw per day (2-year study)
Hormones	
Decrease in serum T4	50/150 mg/kg bw per day (56-day study)
Increase in serum TSH	50/150 mg/kg bw per day (56-day study)
Thyroid	
Increase in thyroid weight	15/50 mg/kg bw per day (56-day study) 44.2/136.4 mg/kg bw per day (2-year study)
Increase in thyroid hyperplasia	44.2/136.4 mg/kg bw per day (2-year study)
Increase in thyroid tumours	4.4/44.2 mg/kg bw per day (2-year study)

Consistent with the enhanced hepatic clearance of T4 described above, when Hotz et al. (1997) treated male SD rats with doses of thiazopyr, statistically significant ($P \leq 0.05$) decreases in serum T4 levels (by 30%) and increases in TSH (by 60%) were found after 56 days of treatment at the highest dose tested (Table 3). T3 serum levels were non-significantly lower at 1.5 mg/kg bw per day and statistically significantly higher at 150 mg/kg bw per day after 56 days of treatment. In general, hepatic microsomal enzyme inducers appear to affect T3 less than T4; thus, T4 and TSH tend to be more reliable indicators of altered pituitary–

与群では、肝 T4-UGT 活性が 56 日間の投与期間終了時に統計学的に有意に増加した（肝重量で標準化したところ、対照群と比較してそれぞれ約 3 倍と 6 倍に活性が増加した）。T4-UGT 活性の増加と一致して、血中からの T4 のクリアランス及び胆汁中への排泄（125I 標識 T4 の排泄量）は、チアゾピルを 150 mg/kg bw/day 投与後に 40%増加した（150 mg/kg bw/day が評価された唯一の投与量）。Hotz ら（1997 年）による雄ラットを対象とした 56 日間の試験では、チアゾピルを 1 日あたり 15、50 及び 150 mg/kg bw 投与した場合に、肝重量の統計学的に有意な増加が認められた。ラット 2 年間の試験（Naylor & McDonald, 1992 年）では、絶対肝重量は対照群と比較して、44.2 mg/kg bw/day 投与群で 122%、136.4 mg/kg bw/day 投与群で 178%増加した。また、このラットの 2 年間試験では、44.2 及び 136.4 mg/kg bw/day 投与群で肝肥大の発生率が統計的に有意に増加した（対照群の 0/60 に対してそれぞれ 47/61 及び 52/60）。

表 2. 雄ラットを対象とした 56 日間の試験 (Hotz ら, 1997) 及び 2 年間の慢性試験 (Naylor & McDonald, 1992) から得られた肝臓、ホルモン及び甲状腺に対する影響の概要

影響	NOAEL/LOAEL
肝臓	
UGT の誘導	15/50 mg/kg bw/day (56 日間試験)
T4 の胆汁排泄量の増加	<150/150 mg/kg bw/day (56 日間試験において 150 mg/kg bw/day のみ実施された)
肝臓重量の増加	5/15 mg/kg bw/day (56 日間試験) 44.2/136.4 mg/kg bw/day (2 年間試験)
肝細胞肥大	4.4/44.2 mg/kg bw/day (2 年間試験)
ホルモン	
血清 T4 の減少	50/150 mg/kg bw/day (56 日間試験)
血清 TSH の上昇	50/150 mg/kg bw/day (56 日間試験)
甲状腺	
甲状腺重量の増加	15/50 mg/kg bw/day (56 日間試験) 44.2/136.4 mg/kg bw/day (2 年間試験)
甲状腺過形成の増加	44.2/136.4 mg/kg bw/day (2 年間試験)
甲状腺腫瘍の増加	4.4/44.2 mg/kg bw/day (2 年間試験)

Hotz ら（1997）が雄 SD ラットにチアゾピルを投与したとき、上述した T4 の肝クリアランスの充進と同様に、最高用量の投与 56 日後に血清 T4 濃度の統計学的に有意な ($P \leq 0.05$) 減少（30%減少）と TSH の増加（60%増加）が認められた（表 3）。T3 の血清レベルは、1.5 mg/kg bw/day では 56 日投与後に統計学的に有意ではないものの低下し、150 mg/kg bw/day では有意に上昇した。一般に、肝ミクロソーム酵素誘導剤による影響は T4 よりも T3 に影響を与えにくいようである。したがって、T4 及び TSH は、下垂体-甲状腺のホメオスタシスの変化の指標としてはより信頼性の高い傾向がある（Liu ら、1995 年、Hurley ら、1998 年、Hood ら、1999 年）。

thyroid homeostasis (Liu et al., 1995; Hurley et al., 1998; Hood et al., 1999). In the case of thiazopyr, there appears to be a poor correlation between the doses causing the T4 and TSH effects and those causing an increased incidence of thyroid follicular cell tumours. The lowest dose of thiazopyr producing a statistically significant ($P < 0.05$) increase in thyroid follicular cell tumours in male SD rats was 44.2 mg/kg bw per day in the 2-year study, whereas the NOAEL for effects on T4 and TSH was 50 mg/kg bw per day in the 56-day study (Table 2). Generally, effects on liver enzymes/weight and pituitary–thyroid hormone concentrations would be anticipated to occur at doses at least as low as those that produce thyroid weight changes and increases in thyroid tumour incidence, given that this thyroid disruption MOA is a threshold phenomenon. This apparent discrepancy is probably not real, because neither of the doses quoted is accurate. In the 2-year study, the milligrams per kilogram body weight doses were averaged estimates for the entire study, whereas the relevant doses for comparison with the 56-day mechanistic study are those for rats of 12–20 weeks of age. These doses would have been at least 2-fold higher than those that were readily available (so the real LOAEL for neoplasia would have been about 90 mg/kg bw per day). They would also have been more relevant for neoplasia, because the critical period for hormonal perturbations (e.g. prolonged elevation of TSH) to initiate pathological changes would be early, not late, in the 2-year study. The doses calculated for the 56-day study are also likely to be inaccurate, because food intake information was not available in the publication; the doses are estimates based on assumed intakes. Having acknowledged this uncertainty, it is observed that thyroid weights were increased significantly at 50 mg/kg bw per day and liver weights were increased at 15 mg/kg bw per day, which is consistent with the liver being the initial target in thiazopyr's MOA.

Table 3. Fifty-six-day study in male rats: Hormonal effects (Hotz et al., 1997).

	Dose (mg/kg bw per day) ^a						
	0	0.5	1.5	5	15	50	150
T4 (µg/dl)	4.1 ± 0.2	4.3 ± 0.3	3.9 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.0 ± 0.2	4.0 ± 0.2	2.9 ± 0.1 ^a
T3 (ng/dl)	84 ± 3	82 ± 4	68 ± 2	84 ± 3	82 ± 3	91 ± 4	110 ± 6 ^a
TSH (ng/ml)	2.7 ± 0.2	3.5 ± 0.4	2.7 ± 0.1	3.1 ± 0.4	2.9 ± 0.3	3.1 ± 0.2	4.3 ± 0.4 ^a

Note: The mg/kg bw per day doses were estimated. Values are mean ± standard error of the mean; 19 or 20 animals per group.

^a Significantly different from control with Dunnett's test after analysis of variance (ANOVA) ($P \leq 0.05$).

As stated above, prolonged TSH stimulation leads to both hypertrophy and hyperplasia of the thyroid. In the 2-year rat study, there was a poor dose correlation between thyroid hyperplasia alone and tumour incidence. While tumour incidence was increased at 44.2 mg/kg bw per day, a statistically significant increase in the incidence of hyperplasia (8/58 versus 1/60 in controls) was found only at 136.4 mg/kg bw per day. Furthermore, in the 56-day rat study, where thyroid histology was reported as follicular cell hypertrophy and hyperplasia combined, there was a significant increase in the incidence of this diagnosis at 150 mg/kg bw per day but not at lower doses (Hotz et al., 1997). There was, however, a good dose correlation between increases in thyroid weights in the 56-day study and tumour incidence in the 2-year study. Statistically significant increases in thyroid weights of 46% were found at 150 mg/kg bw per day and 25% at 50 mg/kg bw per day (Hotz et al., 1997).

チアゾピルの場合、T4 及び TSH に影響を及ぼす用量と、甲状腺濾胞細胞腫瘍の発生率の増加を引き起こす用量との間には、相関関係が乏しいようである。雄 SD ラットにおいて甲状腺濾胞細胞腫瘍の統計学的に有意 ($P < 0.05$) な増加をもたらしたチアゾピルの最低用量は、2 年間の試験では 1 日当たり 44.2 mg/kg bw であったが、T4 及び TSH に対する影響の NOAEL は 56 日間の試験では 1 日当たり 50 mg/kg bw であった (表 2)。一般的に、肝酵素/肝重量及び下垂体-甲状腺ホルモン濃度への影響は、この甲状腺ホルモンかく乱 MOA が閾値を有する現象であることを考えると、少なくとも甲状腺の重量変化及び甲状腺腫瘍発生率の増加をもたらす用量と同程度の低用量で起こると予想される。引用された投与量のどちらも正確ではないので、この見かけの不一致はおそらく真ではない。2 年間の試験における体重 1 kg 当たりの投与量は、試験期間全体の平均的な推定値であったのに対し、比較に用いられた 56 日間のメカニズム試験での投与量は、12~20 週齢のラットにおけるものである。これらの投与量は、容易に算出可能な投与量よりも少なくとも 2 倍高かったと考えられる (したがって、腫瘍に対する実際の LOAEL は 1 日あたり約 90 mg/kg bw であったはずである)。また、ホルモンのかく乱 (例えば TSH の長期上昇) が病理学的変化をもたらす始める臨界期は、2 年間の試験において後期ではなく早期であったため、これらの投与量は腫瘍に対する関連性も高かったと考えられる。56 日間の試験で計算された投与量は公表された論文からは摂餌量の情報が入手できなかったため、摂餌量の推定値に基づいて計算された。そのためこれについても不正確である可能性が高い。この不確実性を認識した上で、1 日あたり 50 mg/kg bw で甲状腺重量が有意に増加し、1 日あたり 15 mg/kg bw で肝臓重量の増加が認められたが、これはチアゾピルの MOA では最初のターゲットが肝臓であることと一致している。

表 3. 雄ラットにおける 56 日間の試験:ホルモン作用 (Hotz ら, 1997 年)

	Dose (mg/kg bw per day) ^a						
	0	0.5	1.5	5	15	50	150
T4 (µg/dL)	4.1 ± 0.2	4.3 ± 0.3	3.9 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.0 ± 0.2	4.0 ± 0.2	2.9 ± 0.1 ^a
T3 (ng/dL)	84 ± 3	82 ± 4	68 ± 2	84 ± 3	82 ± 3	91 ± 4	110 ± 6 ^a
TSH (ng/mL)	2.7 ± 0.2	3.5 ± 0.4	2.7 ± 0.1	3.1 ± 0.4	2.9 ± 0.3	3.1 ± 0.2	4.3 ± 0.4 ^a

注: 投与量 mg/kg bw/day は推定値である。値は平均値±標準誤差で表している; 1 群あたり 19 または 20 匹。

^a 分散分析 (ANOVA) 後の Dunnett の検定で対照群と統計学的に有意に異なる ($P \leq 0.05$)。

上述のように、長期の TSH 刺激は甲状腺の肥大と過形成の両方を引き起こす。ラットの 2 年間の試験では、甲状腺肥大のみと腫瘍発生率との間には用量相関性は見られなかった。腫瘍発生率は 44.2 mg/kg bw/day 投与群で増加したが、過形成の発生率の統計学的に有意な増加 (対照群 1/60 に対し 8/58) は 136.4 mg/kg bw/day 投与群でのみ認められた。さらに、ラットの 56 日間の試験では、組織学的に甲状腺濾胞細胞肥大と過形成が併発しており、150 mg/kg bw/day 投与群での発生率は統計学的に有意に増加したが、それ以下の用量では増加しなかったと報告されている (Hotz ら, 1997 年)。しかし、56 日間の試験での甲状腺重量の増加と 2 年間の試験での腫瘍発生率との間には良好な用量相関性があった。150 mg/kg bw/day 投与群で 46%、50 mg/kg bw/day 投与群で 25% の統計学的に有意な甲状腺重量の増加が認められた (Hotz ら, 1997 年)。

TEMPORAL RELATIONSHIP

If an event (or events) is an essential element of tumorigenesis, it must precede tumour appearance. Multiple exposure time data at 7, 14, 28, 56, and 90 days are available in which male SD rats were offered diets containing thiazopyr at 3000 mg/kg (150 mg/kg bw per day) (Hotz et al., 1997). Liver weights and hepatic T4-UGT activity were increased at all observation times from the earliest time of assessment on day 7. Biliary excretion of conjugated T4 was not measured in this experiment; however, serum T4 was reduced at all observation times. Increases in circulating TSH were observed at all sampling times, although the increase was not significant at 14 days after treatment began. Increases in thyroid weight were also observed at all sampling times. Histologically, there was a time-related increase in hypertrophy/hyperplasia beginning at 14 days. In the 2-year rat study, the first thyroid adenoma was observed at week 69 at a dose of 136.4 mg/kg bw per day. Thus, there is a logical temporal response for the key events in thiazopyr-induced thyroid follicular cell tumour formation in which all key events precede tumour formation.

STRENGTH, CONSISTENCY, AND SPECIFICITY OF ASSOCIATION OF THE TUMOUR RESPONSE WITH KEY EVENTS

Strength, consistency, and specificity of the association can be established from the studies described above. The quantifiable precursor events, fundamental to the proposed MOA, are relatively consistent with the emergence of thyroid follicular cell tumours. Observation of liver weight increase and induction of hepatic T4-UGT in rats receiving the thiazopyr in the diet would be consistent with perturbation of homeostasis of the pituitary–thyroid axis by an extrathyroidal mechanism. An increase in hepatic T4-UGT activity is a step occurring before the other key biochemical changes and before thyroid follicular cell hypertrophy and hyperplasia. Thiazopyr treatment clearly results in a decrease in circulating T4 and an increase in TSH following enhanced liver metabolism of T4. Furthermore, in subchronic studies, the increases in thyroid weight and the development of hypertrophy/hyperplasia were shown to appear to a statistically significant degree under the same conditions of dose and time as the appearance and reversal of changes in thyroid hormone levels and thyroid hormone metabolism. Stop/recovery studies (Hotz et al., 1997) showed that cessation of thiazopyr dosing was followed by a return of hormone levels to control values, as well as a reduction in liver and thyroid weights and reversal of hyperplasia of thyroid follicular cells. Early dosing withdrawal would be expected to result in a reversal of hypothyroidism and of lesion progression for this non-genotoxic MOA. The only sign that was slow to reverse was the increase in thyroid weight after the longest dosing period.

BIOLOGICAL PLAUSIBILITY AND COHERENCE

There are considerable data from studies in laboratory rodents demonstrating the relationship between sustained perturbation of the hypothalamic–pituitary–thyroid axis, prolonged stimulation of the thyroid gland by TSH, and the progression of thyroid follicular cells to hypertrophy, hyperplasia, and eventually neoplasia (McClain, 1995; Hard, 1998; Hurley et al., 1998; Capen et al., 1999; IARC, 2001). Increased secretion of TSH may result via several mechanisms, including increased hepatic clearance of T4, as is the case with thiazopyr.

時間的関連性

ある事象が腫瘍形成の必須要素である場合、それは腫瘍の発生に先行して発現しなければならない。雄 SD ラットに 3000 mg/kg (1 日あたり 150 mg/kg bw) のチアゾピルを混餌投与した 7、14、28、56 及び 90 日後といった複数のタイミングにおけるデータが利用可能である (Hotz ら、1997 年)。肝重量増加及び肝 T4-UGT 活性上昇は、最も早く測定した 7 日目から全ての測定時期において認められた。この実験では抱合化 T4 の胆汁排泄は測定されなかったが、血清 T4 はすべての観察時期において減少した。循環 TSH の増加は、投与開始後 14 日目においては有意ではなかったが、すべてのサンプリング時期で観察された。甲状腺重量の増加もすべてのサンプリング時期で観察された。組織学的には、14 日目から肥大/過形成の経時的な増加が認められた。2 年間のラット試験では、1 日あたり 136.4 mg/kg bw を投与した 69 週目に最初の甲状腺腺腫が観察された。このように、チアゾピル誘発性甲状腺濾胞細胞腫瘍形成においては、すべての key events が腫瘍形成に先行するという論理的な経時的反応が認められた。

腫瘍反応と key events との関連性の強さ、一貫性及び特異性

この関連性の強さ、一貫性、特異性は、上述の試験から確立できる。推定される MOA の基礎となる定量可能な前駆事象は、甲状腺濾胞細胞腫瘍の発現と比較的一致している。チアゾピルを混餌投与されたラットにおいて、肝重量の増加及び肝 T4-UGT の誘導が観察されることから、甲状腺外の機序による下垂体-甲状腺軸のホメオスタシスのかく乱と一致しているようである。肝 T4-UGT 活性の上昇は、他の重要な生化学的変化や甲状腺濾胞細胞の肥大及び過形成の前に起こる段階である。チアゾピルの投与は肝臓における T4 の代謝が促進されるため、循環 T4 の減少及び TSH の増加が明らかである。さらに、亜慢性試験では、甲状腺重量の増加及び肥大・過形成の発生は、甲状腺ホルモン濃度及び甲状腺ホルモン代謝の変化の出現や回復と同じ用量及び時間の条件下で統計学的に有意な程度で現れることが示された。中止/回復試験 (Hotz ら、1997 年) では、チアゾピルの投与中止後、ホルモン値がコントロール値に戻り、肝臓と甲状腺の重量が減少し、甲状腺濾胞細胞の過形成が回復することが示された。早期に投与を中止することで、この非遺伝毒性 MOA における甲状腺ホルモンの低下と病変の進行が回復することが期待された。唯一回復が遅くなったのは、最も長い投与期間の後の甲状腺重量の増加であった。

生物学的妥当性及び整合性

実験用のげっ歯類を用いた研究から、視床下部-下垂体-甲状腺軸の持続的にかく乱、TSH による甲状腺への長期的な刺激及び甲状腺濾胞細胞の肥大、過形成、最終的な腫瘍への進行との関係を示すデータが数多く存在する (McClain, 1995 年; Hard, 1998 年; Hurley ら、1998 年; Capen ら、1999 年; IARC, 2001 年)。チアゾピルの場合と同様に、TSH の分泌増加は、T4 の肝クリアランスの増加を含むいくつかのメカニズムを介して生じる可能性がある。

Circulating levels of T4 are monitored by the thyrotropic cells of the pituitary gland that are responsible for the synthesis of TSH. In the pituitary gland, T4 is metabolized by 5'-deiodinase type II to T3, which then binds to specific receptors in the cell nucleus. A decrease in T3 receptor occupancy results in stimulation of TSH synthesis and secretion. Studies in vivo have shown that injection of rats with TSH leads to reductions in thyroid follicular cell nuclear stain, a non-proliferation-specific nuclear antigen, indicating that these cells were leaving the non-dividing state to resume the cell cycle (Bayer et al., 1992). This study showed that low, repeated doses of TSH (0.25 IU per rat twice daily) produced a cumulative response in nuclear stain levels over 10 days, which returned to normal resting levels within 5 days of cessation of TSH injections. Reduction in nuclear stain is also an early event that parallels the earliest known pinocytotic response to TSH. These data are consistent with increased TSH concentrations alone causing thyroid follicular cells of rats to enter a state of pre-proliferation. Therefore, the suggestion that thiazopyr causes thyroid follicular cell neoplasms in rats by initially inducing hepatic T4-UGT is coherent with the known physiology of the hypothalamus–pituitary–thyroid dynamic control system, at least to the stage of hypertrophy and hyperplasia.

Lastly, the tumour response elicited by thiazopyr is typical of a rodent thyroid carcinogen, in that thyroid follicular cell tumours are found in male rats but not in female rats or mice. Rats tend to be more sensitive to thyroid carcinogenesis than mice, and male rats are frequently found to be more sensitive than female rats with respect to the proportion of chemicals that induce thyroid tumours (Hurley et al., 1998). In keeping with this, TSH levels are typically higher in male rats than in females (Hill et al., 1989). In addition, male rats are sometimes more prone to hepatic enzyme induction than females of the same strain, but this depends on the enzyme in question, the dose of the inducing compound, and the age of the animals (Sundseth & Waxman, 1992; Agrawal & Shapiro, 1996; Oropeza-Hernandez et al., 2003).

OTHER MODES OF ACTION

Mutagenesis is always one possible MOA to consider, but no genetic toxicity has been demonstrated for thiazopyr in the following tests:

- mutation in four strains of *Salmonella typhimurium* (Bakke, 1989a);
- mutation at the *hprt* locus of Chinese hamster ovary cells (Li & Myers, 1989);
- micronucleus induction in bone marrow cells of mice treated in vivo (Flowers, 1990);
- unscheduled DNA synthesis induction in hepatocytes of rats treated in vivo (Bakke, 1989b).

Therefore, the available evidence indicates that mutagenesis is not an alternative MOA for thiazopyr.

Additional effects on the hypothalamic–pituitary–thyroid axis and disruption of other pathways of thyroid hormone metabolism are other possibilities for altering thyroid homeostasis. These variations would not differ in any fundamental way from the one that has been proposed for thiazopyr, in that all would lead to prolonged TSH stimulation with continuous exposure.

T4 の循環レベルは、TSH の合成を担う下垂体の甲状腺刺激細胞によってモニターされている。下垂体では、T4 は、5-deiodinase (ヨウ素ペルオキシダーゼ) II 型により T3 に代謝され、T3 は細胞核内の特定の受容体に結合する。T3 受容体の占有率が低下すると、TSH 合成と分泌が刺激される。ラットへの TSH の注射が、非増殖細胞特異的核抗原である甲状腺濾胞細胞核スタチンが減少し、これらの細胞が非分裂状態を脱して細胞周期を再開していることが生体内での研究で示されている (Bayer ら、1992 年)。この試験では、低用量の TSH を反復投与 (ラット 1 匹あたり 0.25 IU を 1 日 2 回) すると、核内スタチンレベルが 10 日間にわたって累積反応が生じ、TSH の注射を中止してから 5 日以内に正常な安静時のレベルに戻ることが示された。核内スタチンの減少もまた、TSH に対する最も早い反応として知られているピノサイトーシスと類似した初期の事象である。これらのデータは、TSH 濃度の増加だけでラットの甲状腺濾胞細胞を増殖前の状態になることと矛盾しない。したがって、チアゾビルが最初に肝 T4-UGT を誘導することでラットの甲状腺濾胞細胞腫瘍を引き起こすという指摘は、少なくとも肥大と過形成の段階までは視床下部-下垂体-甲状腺の動的な制御システムに関する既知の生理学的知見と一致している。

最後に、チアゾビルにより誘発される腫瘍反応はげっ歯類の甲状腺発がん物質の典型的なものであり、甲状腺濾胞細胞腫瘍は雄ラットにはみられるが、雌のラットやマウスには認められない。ラットはマウスよりも甲状腺発がん物質に対し感受性が高い傾向があり、さらに、雄ラットは雌ラットよりも甲状腺腫瘍を誘発する化学物質の割合が大きいことがよくみられている (Hurley ら、1998 年)。このことと一致して、TSH レベルは通常雄ラットの方が雌よりも高い (Hill ら、1989 年)。さらに、雄ラットは時に同系統の雌よりも肝酵素が誘導されやすいことがあるが、これは酵素の種類、酵素誘導を起こす化合物の用量や動物の年齢に依存する (Sundseth & Waxman, 1992 年; Agrawal & Shapiro, 1996 年; Oropeza-Hernandez ら、2003 年)。

その他の MOA

変異原性は常に考慮すべき可能性のある MOA の 1 つであるが、以下の試験においてチアゾビルの遺伝毒性は示されていない。

- ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) の 4 つの菌株を用いた突然変異試験 (Bakke, 1989 年 a)。
- チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いたの突然変異試験 (hprt 座位) (Li & Myers, 1989 年)。
- マウスの骨髄細胞を用いた In vivo 小核試験 (Flowers, 1990 年)。
- ラットの肝細胞を用いた In vivo 不定期 DNA 合成試験 (Bakke, 1989 年 b)。

したがって、利用可能なエビデンスは、突然変異誘発がチアゾビルの代替 MOA ではないことを示している。

その他の視床下部-下垂体-甲状腺軸への影響及び甲状腺ホルモン代謝における他の経路のかく乱は、甲状腺のホメオスタシスを変化させる可能性がある。しかし、これらの変化は、チアゾビルについて推定されているものと根本的には変わらず、すべて継続的なばく露による TSH 刺激の長期化につながっているであろう。

UNCERTAINTIES, INCONSISTENCIES, AND DATA GAPS

There appears to be a lack of dose concordance for thyroid tumours and hormone changes, but this is likely to be due to inaccuracies in the milligrams per kilogram body weight doses compared—which either were estimated (versus calculated on the basis of food consumption and body weight data) and cover an early period in the life of rats or were averages for the whole duration of the experiment—as well as experimental variability.

ASSESSMENT OF POSTULATED MODE OF ACTION

The data presented are judged, with a moderately high degree of confidence, to be adequate to explain the development of thyroid follicular cell tumours in male rats following chronic dietary exposure to thiazopyr. Thiazopyr clearly increased liver weights (i.e. the initial target organ) at doses lower than those causing tumours and enhanced thyroid growth (i.e. increased thyroid weights) at the lowest tumorigenic dose.

Human applicability of the proposed MOA

The IPCS HRF, which was developed from the Risk Science Institute/International Life Sciences Institute “Human Relevance Framework” (Meek et al., 2003) and modified based on discussions by the IPCS Cancer Working Group (Boobis et al., current document), presents a four-part approach to addressing a series of three questions and leading to a documented, logical conclusion regarding the human relevance of the MOA underlying animal tumours.

1. *Is the weight of evidence sufficient to establish a mode of action (MOA) in animals?* As described in detail above, there is clear evidence that thiazopyr alters thyroid homeostasis by UGT induction, by reducing serum T4 levels and consequently elevating serum TSH.

2. *Can human relevance of the MOA be reasonably excluded on the basis of fundamental, qualitative differences in key events between experimental animals and humans?* The current understanding of the regulation of thyroid hormone homeostasis in humans and of the role of increased TSH levels (as a result of altered thyroid homeostasis) as a risk factor for thyroid cancer was considered in order to assess the human relevance of the key events in thiazopyr’s animal mode of carcinogenic action. Although there are substantial quantitative dynamic differences (discussed below), the fundamental mechanisms involved in the function and regulation of the hypothalamic–pituitary–thyroid axis in rats are qualitatively similar to those in humans (Bianco et al., 2002). Therefore, an agent that decreases T4 levels in rats could likewise reduce T4 in humans; this, in turn, could potentially lead to an increase in TSH levels. There are data showing that rodents and humans respond in a similar fashion to perturbations of pituitary–thyroid function. For example, it is well known that iodine deficiency, which readily leads to decreased thyroid hormone levels, stimulates thyroid cell proliferation in humans, leading to goitre. If left untreated, iodine deficiency may lead to tumour formation, albeit rarely (Thomas & Williams, 1999). Although there is no evidence of increased susceptibility to thyroid cancer, a number of pharmaceuticals (e.g. propylthiouracil, lithium, amiodarone, iopanoic acid) that disrupt thyroid homeostasis by acting directly on the thyroid gland (e.g. by inhibiting hormone synthesis or release or by blocking the conversion

不確実性、矛盾、データギャップ

甲状腺腫瘍とホルモンの変化には用量の一致がみられないが、これは比較に用いられた体重 1 kg 当たりのミリグラム投与量（摂餌量と体重値から算出された）が不正確であること、比較した投与量が一方は若齢期のラットにおける平均値であり、もう一方が試験全体の平均値であったこと、また、試験間のばらつきなどに起因している可能性がある。

推定される MOA の評価

提示されたデータは、中程度に高い信頼度で、チアゾピルの混餌投与による慢性ばく露後の雄ラットにおける甲状腺濾胞細胞腫瘍の発生を説明するのに十分であると判断される。チアゾピルは、腫瘍を引き起こす用量よりも低い用量で明らかに肝臓重量を増加させ（すなわち、肝臓が最初の標的臓器である）、腫瘍を誘発させる中で最も低い用量で甲状腺の成長（すなわち、甲状腺重量の増加）を促進させた。

推定される MOA のヒトへの適用可能性

IPCS HRF はリスクサイエンス研究所/国際生命科学研究機構の「ヒト関連性フレームワーク」（Meek ら、2003 年）をもとに開発され、「IPCS がんワーキンググループ」の議論をもとに修正されたものであり（Boobis ら、本書）、一連の 3 つの問いかけに対処し、動物の腫瘍における MOA のヒトへの関連性に関する文書化された論理的な結論を導くための 4 つの部分からなるアプローチを提示している。

1. 動物 MOA を確立するのにエビデンスの重み付けは十分か？上で詳述したように、チアゾピルは UGT 誘導により血清 T4 レベルを低下させ、その結果として血清 TSH を上昇させることで、甲状腺ホルモンのホメオスタシスを変化させるという明確なエビデンスがある。

2. 実験動物とヒトとの間の key events の根本的、質的な違いに基づいて、MOA のヒトとの関連性を合理的に排除することができるか？ヒトにおける甲状腺ホルモンのホメオスタシスの調節に関する現在の理解と、（甲状腺ホルモンのホメオスタシスの変化の結果としての）TSH レベルの上昇が甲状腺がんのリスク因子として果たす役割について、チアゾピルの動物における発がん MOA の key events のヒトへの関連性を評価するために検討がなされた。ラットにおける視床下部-下垂体-甲状腺軸の機能と調節に関与する基本的なメカニズムは、量的な薬力学的差異（後述）はあるが、定性的にはヒトのそれと類似している（Bianco ら、2002 年）。したがって、ラットで T4 レベルを低下させる薬剤は、ヒトでも同様に T4 を低下させる可能性があり、その結果、TSH レベルの上昇につながる可能性がある。げっ歯類とヒトは、下垂体-甲状腺機能のかく乱に対して同様の反応を示すデータがある。例えば、甲状腺ホルモンのレベルを容易に低下させるヨウ素欠乏症は、ヒトでは甲状腺細胞の増殖を刺激して甲状腺腫を引き起こすことが知られている。ヨウ素欠乏症を放置すると、まれではあるが腫瘍形成につながることもある（Thomas & Williams, 1999 年）。甲状腺がんになりやすいというエビデンスはないが、甲状腺に直接作用して（例えば、ホルモン合成や放出を阻害する、T4 から T3 への変換を阻害する）甲状腺ホルモンのホメオスタシスを乱す多くの医薬品（プロピルチオウラシル、リチウム、アミオダロン、イオパノ酸など）は、ヒトでは甲状腺ホルモンの低下及び TSH の上昇につながることを知られている（Ron ら、1987 年）。

of T4 to T3) are known to lead to hypothyroidism and increases in TSH in humans (Ron et al., 1987).

In contrast to rats, no increases in TSH levels have been found in humans following exposure to agents that induce hepatic microsomal enzymes and reduce circulating T4 levels (discussed in Lehman-McKeeman & Hill, in Meek et al., 2003). For example, the pharmaceutical compounds phenytoin, rifampin, and carbamazepine induce hepatic microsomal enzymes, including UGT, and reduce circulating T4 levels, but TSH levels are unchanged (Curran & DeGroot, 1991); agents that produce thyroid tumours in rats by increasing glucuronidation and biliary excretion of T4 at high experimental doses (e.g. omeprazole, lansoprazole, and pantoprazole) produce no changes in thyroid hormones at clinical doses in humans (Masu-buchi et al., 1997). Thus, there appears to be a substantial difference in the dose-response relationship for altered homeostasis of the pituitary-thyroid axis in rats compared with humans. As discussed below, this observation is due to quantitative dynamic differences between rats and humans in the basic physiological processes underlying pituitary-thyroid function.

3. *Can human relevance of the MOA be reasonably excluded on the basis of quantitative differences in either kinetic or dynamic factors between experimental animals and humans?* Thiazopyr does not target the thyroid directly. Rather, its primary effect is on hepatic metabolizing enzymes, and the increase in metabolic activity indirectly increases the systemic clearance of T4, leading to the hypothyroid state and the compensatory increase in TSH found in rats. Although there are no chemical-specific data on the potential for thiazopyr to disrupt thyroid hormone homeostasis in humans, a number of other microsomal enzyme inducers have been extensively studied, such as phenobarbital (Lehman-McKeeman & Hill, in Meek et al., 2003). As discussed above, agents that produce hypothyroidism by altering hepatic clearance of T4 do not appear to result in elevated TSH levels in humans. Presumably, TSH is not increased because a critical reduction of T4 is not reached.

There are several important physiological and biochemical differences between rats and humans related to thyroid function. Rats have a smaller reserve capacity of thyroid hormones when compared with humans. The rat has a much shorter thyroid hormone half-life than humans. The half-life of T4 is about 12 h in rats compared with 5–9 days in humans (Dohler et al., 1979). The shorter half-life in rats is likely related to the absence of a high affinity binding globulin for T4 that is present in humans (Hill et al., 1989). In rats, the increased clearance contributes to the need for a higher rate of production of T4 (per unit of body weight) to maintain normal levels of T4. In contrast, in humans, the binding of thyroid hormone to this globulin accounts for a slower metabolic degradation and clearance, which in turn result in the thyroid gland being less active than in rats. The constitutive TSH levels are approximately 25 times higher in rats than in humans, reflecting the higher activity of the pituitary-thyroid axis in rats (Dohler et al., 1979; McClain, 1992). Therefore, humans are quantitatively less sensitive than rats to agents that reduce T4 and lead to elevated TSH. There is no increased risk of thyroid tumour development if TSH is not elevated.

Another difference of rats compared with humans is the histological appearance of the thyroid. This histological difference is related to the higher rate of production of T4 to

ラットとは対照的に、ヒトでは、肝ミクロソーム酵素が誘導され、循環 T4 レベルを低下させる薬剤にばく露されても TSH レベルの上昇は認められていない (Lehman-McKeeman & Hill, in Meek et al., 2003 年)。例えば、医薬品のフェニトイン、リファンピン、カルバマゼピンは、UGT を含む肝ミクロソーム酵素を誘導し、血中の T4 レベルを低下させるが、TSH レベルは変化しない (Curran & DeGroot, 1991 年)。同様に、実験的に高用量で T4 のグルクロン酸抱合及び胆汁排泄を増加させることによりラットに甲状腺腫瘍を発生させる薬剤 (例えば、オメプラゾール、ランソプラゾール、パントプラゾール) は、ヒトにおいて臨床用量では甲状腺ホルモンに変化をもたらさない (Masu-buchi et al., 1997 年)。このように、ラットにおける下垂体-甲状腺軸のホメオスタシスの変化の用量反応関係には、ヒトと比較してかなりの違いがあるように思われる。後述するように、この現象は、ラットとヒトでは下垂体-甲状腺機能の基礎となる生理学的プロセスの量的な薬力学的差異に起因している。

3. *実験動物とヒトとの間の薬力学的または動態的要因のいずれかの量的差異に基づいて、MOA のヒトへの関連性を合理的に排除することができるか?* チアゾピルは甲状腺を直接標的とするものではない。むしろ、その主な作用は肝代謝酵素に対するものであり、代謝活性の亢進は間接的に T4 の全身クリアランスを増加させ、ラットでみられるような甲状腺機能低下状態と TSH の代償性の増加をもたらす。チアゾピルがヒトにおける甲状腺ホルモンの恒常性を乱す可能性については、チアゾピル特有のデータはないが、フェノバルビタール (Lehman-McKeeman & Hill, in Meek et al., 2003 年) のような他の多くのミクロソーム酵素誘導剤で広く研究されている。上述したように、T4 の肝クリアランスを変化させることで甲状腺機能減退症下を引き起こす薬剤は、ヒトでは TSH レベルの上昇をもたらさないようである。おそらく、T4 の減少が閾値まで達していないので、TSH は上昇しないのではないかと考えられる。

甲状腺機能に関連して、ラットとヒトの間にはいくつかの重要な生理学的及び生化学的相違がある。ラットはヒトに比べて甲状腺ホルモンの予備容量が小さい。ラットはヒトに比べて甲状腺ホルモンの半減期が非常に短く、T4 の半減期は、ヒトの 5–9 日に対し、ラットでは約 12 時間である (Dohler et al., 1979 年)。ラットの半減期が短いのは、ヒトに存在する T4 の高親和性結合グロブリンが存在しないことに関係していると考えられる (Hill et al., 1989 年)。ラットでは、クリアランスの増加によって正常な T4 レベルを維持するために、より高い体重あたりの T4 産生率を必要とする。対照的に、ヒトではこのグロブリンへ甲状腺ホルモンが結合することによって、ラットと比較して代謝的分解及びクリアランスが遅く、その結果、甲状腺はラットよりも活性が低い。恒常的な TSH レベルは、ラットではヒトよりも約 25 倍高く、ラットでは下垂体-甲状腺軸の活性が高いことを反映している (Dohler et al., 1979 年; McClain, 1992 年)。したがって、ヒトは、T4 を減少させ TSH の上昇をもたらす薬剤に対して、ラットよりも定量的に感受性が低い。TSH が上昇していなければ、甲状腺腫瘍発生のリスクが高まることはない。

ヒトとの比較においてラットのもう一つの違いは、甲状腺の組織像にある。この組織学的な相違は、ラットでは安定した一定の血清 T4 濃度を維持するための T4 のより高い産生速度と関連しており、これによりラットの甲状腺は、人間を含む霊長類のそれよりも「機能的に活性化」した状態となっている (McClain, 1995 年)。

maintain a consistent serum concentration, thus making the rat thyroid more “functionally active” than that of primates, including humans (McClain, 1995). More of the follicular epithelium in the rat is stimulated to synthesize thyroglobulin, and therefore more of the follicular cells are tall cuboidal and appear to be active in synthesis. In contrast, more of the follicular cells in humans tend to be short cuboidal or almost squamous in appearance, suggesting they are quiescent. Because rat follicular cells are already generally active, under stimulation from TSH, they will respond with hyperplasia more readily than human follicular cells. Because of the greater storage capability of the human thyroid and the greater numbers of cells in a quiescent state, human thyroid follicular cells will be roused from their quiescent state to synthesize and secrete additional thyroid hormone without the need for a hyperplastic response to re-establish homeostasis. Therefore, the primary response in the human thyroid gland would be thyroglobulin reabsorption and cellular hypertrophy rather than hyperplasia. In short, there is much greater buffering capacity in the biochemistry of the human than the rat thyroid.

Even though certain agents can cause a reduction in thyroid hormone levels in humans, there is no clear evidence that these agents increase susceptibility to thyroid cancer (Ron et al., 1987). For example, epidemiological studies with phenobarbital do not show any increased risk of thyroid cancer (Olsen et al., 1993). Studies of individuals with conditions that would lead to elevated TSH (patients with Graves disease or goitre) indicate that the occurrence of thyroid cancer is rare in these circumstances (e.g. Mazzaferri, 2000; Gabriele et al., 2003). A study of environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals, using the nationwide Swedish Family-Cancer Database, found that the environment did not appear to play a principal causative role in thyroid cancer (Lichtenstein & Hemminki, 2002). The only known human thyroid carcinogen is radiation, a mutagenic exposure.

As summarized in Table 4, there is sufficient evidence in the general literature on the biochemical and physiological differences in thyroid function to indicate differences in tumour susceptibility between rats and humans. In contrast to humans, rats are very susceptible to thyroid neoplasia secondary to hypothyroidism. In particular, modest changes in thyroid hormone homeostasis will promote tumour formation in rats. Thus, thyroid tumours induced by thiazopyr involving increased hepatic clearance of hormone and altered homeostasis of the pituitary–thyroid axis in rodents are considered not relevant to humans, based on quantitative dynamic differences.

4. Conclusion: statement of confidence, analysis, and implications. There is sufficient experimental evidence to establish a thyroid disruption MOA for thiazopyr-induced thyroid follicular cell tumours in rats. Although thiazopyr may potentially result in hypothyroidism in humans, there is sufficient quantitative evidence on the basic physiological processes in the general literature to conclude that thyroid tumours induced by a process involving increased hepatic clearance of thyroid hormone and altered homeostasis of the pituitary–thyroid axis in rodents is not likely to lead to an increase in susceptibility to tumour development in humans. Although there are no human data on thiazopyr, clinical data on other hepatic microsomal enzyme inducers were critical to this human relevance analysis. The general literature provided sufficient evidence to show that unlike in the rat, decreased T4 levels typically show no evidence of compensatory increases in TSH levels in humans. There is also cellular and

ラットの濾胞上皮の多くは、刺激を受けてサイログロブリンを合成するため、濾胞細胞の多くは背の高い立方体状をしており、活潑にホルモン合成しているように見える。対照的に、ヒトの濾胞細胞の多くは、短い立方体状またはほぼ扁平な外観を呈し、静止状態のように見える傾向がある。ラットの濾胞細胞はすでに全体的に活性化しているので、TSH による刺激を受けると、ヒトの濾胞細胞よりも容易に反応し過形成を生じる。ヒトの甲状腺は貯蔵能力が高く、休止状態にある細胞の数が多いため、ヒトの甲状腺濾胞細胞は恒常性を回復するための過形成反応を必要とせずに、休止状態から覚醒して追加の甲状腺ホルモンを合成・分泌する。したがって、ヒト甲状腺における主要な反応は、過形成ではなくサイログロブリンの再吸収と細胞の肥大であろう。要するに、ラット甲状腺よりもヒト甲状腺の方が、生化学的な面においてははるかに大きな緩衝能力を持っているということである。

ある薬剤がヒトにおいて甲状腺ホルモンレベルの低下を引き起こす可能性があるとしても、これらの薬剤が甲状腺がんの感受性を高めるという明確なエビデンスはない (Ron ら, 1987 年)。例えば、フェノバルビタールを用いた疫学研究では、甲状腺がんのリスクの増加は示されていない (Olsen ら, 1993 年)。TSH が上昇するような状態にある人々 (バセドウ病または甲状腺腫の患者) を対象とする研究は、このような状況においても甲状腺がんの発生はまれであることを示している (例えば、Mazzaferri, 2000 年; Gabriele ら, 2003 年)。全国規模のスウェーデンの家族がんデータベースを用いた 960 万人のがんの環境的及び遺伝的原因を調査した結果、環境が甲状腺がんの主な原因となる役割を果たしているようには見えないことが明らかにされた (Lichtenstein & Hemminki, 2002 年)。唯一知られているヒト甲状腺の発がん物質は放射線であり、すなわち変異原性物質のばく露である。

表 4 に要約されているように、甲状腺機能の生化学的及び生理学的の差異に関する一般的な文献には、ラットとヒトの間で腫瘍に対する感受性に違いがあることを示す十分なエビデンスがある。ヒトとは対照的に、ラットは甲状腺ホルモンの低下症に続発する甲状腺腫瘍に対して非常に感受性が高い。特に、甲状腺ホルモンの恒常性にわずかも変化があるとラットでは腫瘍形成が促進される。したがって、げっ歯類におけるホルモンの肝クリアランスの増加と下垂体-甲状腺軸のホメオスタシスの変化を伴うチアゾピルによって誘発される甲状腺腫瘍は、量的な動態の違いからヒトへの関連性はないと考えられる。

4. 結論：信頼性、解析及び帰結の記述。 ラットにおけるチアゾピル誘発性甲状腺濾胞細胞腫瘍に関して、甲状腺ホルモンかく乱 MOA を確立するのに十分な実験的エビデンスが存在する。チアゾピルはヒトにおいて甲状腺機能減退症を引き起こす可能性があるが、一般的な文献には、げっ歯類における甲状腺ホルモンの肝クリアランスの増加と下垂体-甲状腺軸のホメオスタシスの変化を伴うプロセスによって誘発される甲状腺腫瘍は、ヒトの腫瘍発生に対する感受性の増加にはつながらないと結論づけるのに十分な基本的な生理学的プロセスに関する定量的エビデンスがある。チアゾピルに関するヒトでのデータはないが、他の肝ミクロソーム酵素誘導剤に関する臨床データは、チアゾピルのヒトへの関連性の解析には不可欠であった。一般的な文献からは、ラットとは異なりヒトでは T4 レベルの低下が代償的に TSH レベルを上昇させることを示すエビデンスはないことを示すのに十分なエビデンスが得られた。また、ラットの下垂体-甲状腺軸がこのようなホルモンのかく乱に対してヒトよりもはるかに感受性が高いという細胞学的及び生化学的エビデンスもある。

biochemical evidence that the rat pituitary–thyroid axis is much more sensitive than that in humans to such perturbations. This sensitivity is likely the result of the rapid turnover of T4 in rats coupled with the higher demand for TSH to maintain thyroid activity.

Table 4. A comparison of key events in rats and humans.

Key event	Evidence in rats	Evidence in humans
Increased hepatic clearance of T4	In short-term and chronic rat studies, the liver is found to be the most sensitive target, and evidence of increased T4 hepatic clearance is provided by studies on T4-hepatic UGT activity, T4 half-life, T4 biliary elimination, liver weights, and hypertrophy.	No data available for thiazopyr, but microsomal enzyme induction is plausible.
Decreased serum T4	Direct experimental evidence.	No data available for thiazopyr, but plausible given that other microsomal enzyme inducers have been shown to reduce T4 in humans.
Increased TSH levels	Direct experimental evidence.	No data available for thiazopyr, but other microsomal enzyme inducers have not been shown to increase TSH levels even when T4 is decreased.
Increased TSH increases thyroid cell proliferation and tumour formation	Direct experimental evidence.	Induction of thyroid follicular cell tumours secondary to hypothyroidism is remote in humans, given the quantitative differences in thyroid function/homeostasis. Occurrence of thyroid cancer is rare even in severely hypothyroid individuals.

IMPLICATIONS OF THE IPCS HRF

The thiazopyr example is an illustration of an induced tumour response consistent with an MOA that has been previously defined and established. Thus, addressing the first question in the framework analysis, “Is the weight of evidence sufficient to establish a mode of action (MOA) in animals?”, became a determination of whether the data set on the chemical conforms to the same key events defined for the pathway of interest. This example further demonstrates how data on the basic understanding of the biological processes involved in the MOA provide an important means to compare the rodent and human key events. Thus, this generic human information was essential to evaluating the qualitative and quantitative differences between experimental animals and humans in addressing the plausibility of the cancer MOA for humans (i.e. questions 2 and 3 in the HRF).

この感受性の高さは、甲状腺の活動を維持するための TSH の需要が高いことと相まって、ラットにおける T4 の急速なターンオーバーが早いことに起因すると思われる。

表 4. ラットとヒトにおける key events の比較

Key events	ラットにおけるエビデンス	ヒトにおけるエビデンス
T4 の肝クリアランスの増加	ラットの短期及び慢性試験で、肝臓が最も感受性の高い標的であることが判明しており、T4 肝 UGT 活性、T4 半減期、T4 胆汁排泄、肝重量及び肥大に関する研究により、T4 肝クリアランスの増加のエビデンスが得られている。	チアゾピルについてのデータはないが、ミクロソーム酵素の誘導が起こっていると思われる。
血清 T4 の減少	直接的な実験的エビデンス。	チアゾピルのデータはないが、他のミクロソーム酵素誘導剤がヒトで T4 を減少させることが示されていることを考えると、チアゾピルについてもそうであると思われる。
TSH レベルの上昇	直接的な実験的エビデンス。	チアゾピルのデータはないが、他のミクロソーム酵素誘導剤において T4 が減少しても TSH レベルが上昇することは示されていない。
TSH の増加は甲状腺細胞の増殖と腫瘍形成を促進させる。	直接的な実験的エビデンス。	甲状腺ホルモンの低下に続発する甲状腺濾胞細胞腫瘍の誘発は、甲状腺機能/ホメオスタシスの齟齬類との量的な違いを考えると、ヒトでは起こりそうにない。 甲状腺ホルモンレベルがかなり低いヒトにおいても甲状腺がんの発生はまれである。

IPCS HRF の結果

チアゾピルの例は、過去に明確にされ、確立された MOA と一致する誘発された腫瘍反応について示したものである。したがって、フレームワーク解析の最初の質問である「動物 MOA を確立するのにエビデンスの重み付けは十分か」に対応することは、その化学物質に関するデータセットが対象となる経路に対して定義にされた同じ key events に適合しているか否かを判断する必要があった。この例は、MOA に関与する生物学的プロセスの基本的な理解に関するデータが、どのようにげっ歯類とヒトの key events を比較するための重要な手段となるかを示している。このように、実験動物とヒトの間の質的及び量的な差異を評価し、ヒトに対する発がん MOA の妥当性（すなわち、HRF の問 2 と 3）評価するためには、このヒトに関する一般的な情報は、不可欠であった。

REFERENCES

- Agrawal AK, Shapiro BH (1996) Phenobarbital induction of hepatic CYP2B1 and CYP2B2: Pretranscriptional and post-transcriptional effects of gender, adult age, and phenobarbital dose. *Molecular Pharmacology*, **49**(3):523–531.
- Bakke JP (1989a) *Ames/Salmonella mutagenicity assay with MON 13200: Study No. ML-88-191/EHL No. 88124*. Testing facility: Monsanto's Environmental Health Laboratory, St. Louis, MO. Submitted by Monsanto, St. Louis, MO (MRID No. 42275535).
- Bakke JP (1989b) *Evaluation of MON 13200 to induce unscheduled DNA synthesis in the in vitro hepatocyte DNA repair assay in the male F-344 rat: Study No. SR-88-204/SRI No. LSC 6327*. Testing facility: SRI International, Menlo Park, CA. Submitted by Monsanto, St. Louis, MO (MRID No. 42275538).
- Bayer I, Mitmaker B, Gordon PH, Wang E (1992) Modulation of nuclear statin expression in rat thyroid follicle cell following administration of thyroid stimulating hormone. *Journal of Cellular Physiology*, **150**:276–282.
- Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR (2002) Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine Reviews*, **23**(1):38–89.
- Capen CC, Dybing E, Rice JM, Wilbourn JD, eds (1999) *Species differences in thyroid, kidney and urinary bladder carcinogenesis*. Lyon, International Agency for Research on Cancer (IARC Scientific Publications No. 147).
- Curran PG, DeGroot LJ (1991) The effect of hepatic enzyme-inducing drugs on thyroid hormones and the thyroid gland. *Endocrine Reviews*, **12**:135–150.
- Dohler KD, Wong CC, Von Zur Muhlen A (1979) The rat as a model for the study of drug effects on thyroid function: Consideration of methodological problems. *Pharmacology and Therapeutics*, **5**:305–318.
- Flowers LJ (1990) *Micronucleus assay with MON 13200: ML-88-390/EHL Study No. 88230*. Testing facility: Monsanto's Environmental Health Laboratory, St. Louis, MO. Submitted by Monsanto, St. Louis, MO (MRID No. 42275537).
- Gabriele R, Letizia C, Borghese M, De Toma G, Celia M, Izzo L, Cavalla A (2003) Thyroid cancer in patients with hyperthyroidism. *Hormone Research*, **60**(2):79–83.
- Hard GC (1998) Recent developments in the investigation of thyroid regulation and thyroid carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, **106**(8):1–21.
- Hill RN, Erdreich LS, Paynter OE, Roberts PA, Rosenthal SL, Wilkinson CF (1989) Thyroid follicular cell carcinogenesis. *Fundamental and Applied Toxicology*, **12**(4):629–697.

参考文献

- Agrawal AK, Shapiro BH (1996) Phenobarbital induction of hepatic CYP2B1 and CYP2B2: Pretranscriptional and post-transcriptional effects of gender, adult age, and phenobarbital dose. *Molecular Pharmacology*, **49**(3):523–531.
- Bakke JP (1989a) *Ames/Salmonella mutagenicity assay with MON 13200: Study No. ML-88-191/EHL No. 88124*. Testing facility: Monsanto's Environmental Health Laboratory, St. Louis, MO. Submitted by Monsanto, St. Louis, MO (MRID No. 42275535).
- Bakke JP (1989b) *Evaluation of MON 13200 to induce unscheduled DNA synthesis in the in vitro hepatocyte DNA repair assay in the male F-344 rat: Study No. SR-88-204/SRI No. LSC 6327*. Testing facility: SRI International, Menlo Park, CA. Submitted by Monsanto, St. Louis, MO (MRID No. 42275538).
- Bayer I, Mitmaker B, Gordon PH, Wang E (1992) Modulation of nuclear statin expression in rat thyroid follicle cell following administration of thyroid stimulating hormone. *Journal of Cellular Physiology*, **150**:276–282.
- Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR (2002) Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine Reviews*, **23**(1):38–89.
- Capen CC, Dybing E, Rice JM, Wilbourn JD, eds (1999) *Species differences in thyroid, kidney and urinary bladder carcinogenesis*. Lyon, International Agency for Research on Cancer (IARC Scientific Publications No. 147).
- Curran PG, DeGroot LJ (1991) The effect of hepatic enzyme-inducing drugs on thyroid hormones and the thyroid gland. *Endocrine Reviews*, **12**:135–150.
- Dohler KD, Wong CC, Von Zur Muhlen A (1979) The rat as a model for the study of drug effects on thyroid function: Consideration of methodological problems. *Pharmacology and Therapeutics*, **5**:305–318.
- Flowers LJ (1990) *Micronucleus assay with MON 13200: ML-88-390/EHL Study No. 88230*. Testing facility: Monsanto's Environmental Health Laboratory, St. Louis, MO. Submitted by Monsanto, St. Louis, MO (MRID No. 42275537).
- Gabriele R, Letizia C, Borghese M, De Toma G, Celia M, Izzo L, Cavalla A (2003) Thyroid cancer in patients with hyperthyroidism. *Hormone Research*, **60**(2):79–83.
- Hard GC (1998) Recent developments in the investigation of thyroid regulation and thyroid carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, **106**(8):1–21.
- Hill RN, Erdreich LS, Paynter OE, Roberts PA, Rosenthal SL, Wilkinson CF (1989) Thyroid follicular cell carcinogenesis. *Fundamental and Applied Toxicology*, **12**(4):629–697.

Hood A, Liu YP, Gattone VH 2nd, Klaassen CD (1999) Sensitivity of thyroid gland growth to thyroid stimulating hormone (TSH) in rats treated with antithyroid drugs. *Toxicological Sciences*, **49**:263–271.

Hotz KJ, Wilson AG, Thake DC, Roloff MV, Capen CC, Kronenberg JM, Brewster DW (1997) Mechanism of thiazopyr-induced effects on thyroid hormone homeostasis in male Sprague-Dawley rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **142**:133–142.

Hurley PM, Hill RN, Whiting RJ (1998) Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular-cell tumors in rodents. *Environmental Health Perspectives*, **106**(8):437–445.

IARC (2001) *Some thyrotropic agents*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 763 pp. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 79).

Li AP, Myers CA (1989) *CHO/HGPRST gene mutation assay with MON 13200: Study No. ML-88-382/EHL No. 88071*. Testing facility: Monsanto's Environmental Health Laboratory, St. Louis, MO. Submitted by Monsanto, St. Louis, MO (MRID No. 42275536).

Lichtenstein CK, Hemminki K (2002) Environmental and heritable cause of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database. *International Journal of Cancer*, **1099**(2):260–266.

Liu J, Liu Y, Barter RA, Klaassen CD (1995) Alteration of thyroid homeostasis by UDP-glucuronosyltransferase inducers in rats: A dose-response study. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **273**:977–985.

Masubuchi N, Hokusui H, Okazaki O (1997) Effects of proton pump inhibitors on thyroid hormone metabolism in rats: A comparison of UDP-glucuronosyltransferase induction. *Biochemical Pharmacology*, **54**(11):1225–1231.

Mazzaferri EL (2000) Thyroid cancer and Graves' disease: The controversy ten years later. *Endocrine Practice*, **6**:221–225.

McClain RM (1992) Thyroid gland neoplasia: Non-genotoxic mechanisms. *Toxicology Letters*, **64/65**:397–408.

McClain RM (1995) Mechanistic considerations for the relevance of animal data on thyroid neoplasia to human risk assessment. *Mutation Research*, **333**(1–2):131–142.

Meek ME, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKeeman LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003) A framework for human relevance analysis of information on carcinogenic modes of action. *Critical Reviews in Toxicology*, **33**(6):591–654.

Hood A, Liu YP, Gattone VH 2nd, Klaassen CD (1999) Sensitivity of thyroid gland growth to thyroid stimulating hormone (TSH) in rats treated with antithyroid drugs. *Toxicological Sciences*, **49**:263–271.

Hood A らの文献が欠落

Hotz KJ, Wilson AG, Thake DC, Roloff MV, Capen CC, Kronenberg JM, Brewster DW (1997) Mechanism of thiazopyr-induced effects on thyroid hormone homeostasis in male Sprague-Dawley rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **142**:133–142.

Hurley PM, Hill RN, Whiting RJ (1998) Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular-cell tumors in rodents. *Environmental Health Perspectives*, **106**(8):437–445.

IARC (2001) *Some thyrotropic agents*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 763 pp. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 79).

Li AP, Myers CA (1989) *CHO/HGPRST gene mutation assay with MON 13200: Study No. ML-88-382/EHL No. 88071*. Testing facility: Monsanto's Environmental Health Laboratory, St. Louis, MO. Submitted by Monsanto, St. Louis, MO (MRID No. 42275536).

Lichtenstein CK, Hemminki K (2002) Environmental and heritable cause of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database. *International Journal of Cancer*, **1099**(2):260–266.

Liu J, Liu Y, Barter RA, Klaassen CD (1995) Alteration of thyroid homeostasis by UDP-glucuronosyltransferase inducers in rats: A dose-response study. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **273**:977–985.

Masubuchi N, Hokusui H, Okazaki O (1997) Effects of proton pump inhibitors on thyroid hormone metabolism in rats: A comparison of UDP-glucuronosyltransferase induction. *Biochemical Pharmacology*, **54**(11):1225–1231.

Mazzaferri EL (2000) Thyroid cancer and Graves' disease: The controversy ten years later. *Endocrine Practice*, **6**:221–225.

McClain RM (1992) Thyroid gland neoplasia: Non-genotoxic mechanisms. *Toxicology Letters*, **64/65**:397–408.

McClain RM (1995) Mechanistic considerations for the relevance of animal data on thyroid neoplasia to human risk assessment. *Mutation Research*, **333**(1–2):131–142.

Meek ME, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKeeman LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003) A framework for human relevance analysis of information on carcinogenic modes of action. *Critical Reviews in Toxicology*, **33**(6):591–654.

Naylor MW, McDonald MM (1992) *Chronic study of MON 13200 administered in feed to albino rats. Project No. ML-88-247/EHL 88148*. Testing facility: Monsanto Company, The Agricultural Group, Environmental Health Laboratory, St. Louis, MO. Submitted by Monsanto Agricultural Company, St. Louis, MO (MRID No. 426197-24).

Naylor MW, Raju NR (1992) *Chronic study of MON 13200 administered in feed to albino mice. Project No. ML-88-248/EHL 88147*. Testing facility: Monsanto Company, The Agricultural Group, Environmental Health Laboratory, St. Louis, MO. Submitted by Monsanto Agricultural Company, St. Louis, MO (MRID No. 426197-23).

Olsen JH, Wallin H, Boice JD, Rask K, Schulgen G, Fraumaen FF Jr (1993) Phenobarbital, drug metabolism and human cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, **5**:449–452.

Oropeza-Hernandez LF, Lopez-Romero R, Albores A (2003) Hepatic CYP1A, 2B, 2C, 2E and 3A regulation by methoxychlor in male and female rats. *Toxicology Letters*, **144**(1):93–103.

Ron E, Kleinerman RA, Boice JD, LiVolsi VA, Flannery JT, Fraumeni JF Jr (1987) A population-based case–control study of thyroid cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **79**:1–12.

Sonich-Mullin C, Fielder R, Wiltse J, Baetcke K, Dempsey J, Fenner-Crisp P, Grant D, Hartley M, Knaap A, Kroese D, Mangelsdorf I, Meek E, Rice JM, Younes M (2001) IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **34**:146–152.

Sundseth SS, Waxman DJ (1992) Sex-dependent expression and clofibrate inducibility of cytochrome P450 4A fatty acid omega-hydroxylases. Male specificity of liver and kidney CYP4A2 mRNA and tissue-specific regulation by growth hormone and testosterone. *Journal of Biological Chemistry*, **267**(6):3915–3921.

Thomas GA, Williams ED (1999) Thyroid stimulating hormone (TSH)-associated follicular hypertrophy and hyperplasia as a mechanism of thyroid carcinogenesis in mice and rats. In: Capen CC, Dybing E, Rice JM, Wilbourn JD, eds. *Species differences in thyroid gland, kidney and urinary bladder carcinogenesis*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, pp. 45–59 (IARC Scientific Publications No. 147).

USEPA (1998) *Assessment of thyroid follicular cell tumors*. Washington, DC, United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Risk Assessment Forum (EPA/630/R-97/002; <http://cfpub.epa.gov/ncea/raf/recordisplay.cfm?deid=13102>; accessed 22 November 2004).

Naylor MW, McDonald MM (1992) *Chronic study of MON 13200 administered in feed to albino rats. Project No. ML-88-247/EHL 88148*.

Testing facility: Monsanto Company, The Agricultural Group, Environmental Health Laboratory, St. Louis, MO. Submitted by Monsanto Agricultural Company, St. Louis, MO (MRID No. 426197-24).

Naylor MW, Raju NR (1992) *Chronic study of MON 13200 administered in feed to albino mice. Project No. ML-88-248/EHL 88147*.

Testing facility: Monsanto Company, The Agricultural Group, Environmental Health Laboratory, St. Louis, MO. Submitted by Monsanto Agricultural Company, St. Louis, MO (MRID No. 426197-23).

Olsen JH, Wallin H, Boice JD, Rask K, Schulgen G, Fraumaen FF Jr (1993) Phenobarbital, drug metabolism and human cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, **5**:449–452.

Oropeza-Hernandez LF, Lopez-Romero R, Albores A (2003) Hepatic CYP1A, 2B, 2C, 2E and 3A regulation by methoxychlor in male and female rats. *Toxicology Letters*, **144**(1):93–103.

Ron E, Kleinerman RA, Boice JD, LiVolsi VA, Flannery JT, Fraumeni JF Jr (1987) A population-based case–control study of thyroid cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **79**:1–12.

Sonich-Mullin C, Fielder R, Wiltse J, Baetcke K, Dempsey J, Fenner-Crisp P, Grant D, Hartley M, Knaap A, Kroese D, Mangelsdorf I, Meek E, Rice JM, Younes M (2001) IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **34**:146–152.

Sundseth SS, Waxman DJ (1992) Sex-dependent expression and clofibrate inducibility of cytochrome P450 4A fatty acid omega-hydroxylases. Male specificity of liver and kidney CYP4A2 mRNA and tissue-specific regulation by growth hormone and testosterone. *Journal of Biological Chemistry*, **267**(6):3915–3921.

Thomas GA, Williams ED (1999) Thyroid stimulating hormone (TSH)-associated follicular hypertrophy and hyperplasia as a mechanism of thyroid carcinogenesis in mice and rats. In: Capen CC, Dybing E, Rice JM, Wilbourn JD, eds. *Species differences in thyroid gland, kidney and urinary bladder carcinogenesis*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, pp. 45–59 (IARC Scientific Publications No. 147).

USEPA (1998) *Assessment of thyroid follicular cell tumors*. Washington, DC, United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Risk Assessment Forum (EPA/630/R-97/002; <http://cfpub.epa.gov/ncea/raf/recordisplay.cfm?deid=13102>; accessed 22 November 2004).

4-AMINOBIIPHENYL AND DNA REACTIVITY: CASE-STUDY WITHIN THE CONTEXT OF THE IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS¹

Samuel M. Cohen, Alan R. Boobis, M.E. (Bette) Meek, R. Julian Preston, & Douglas B. McGregor

The International Programme on Chemical Safety (IPCS) Human Relevance Framework (HRF) was evaluated for a DNA-reactive (genotoxic) carcinogen, 4-aminobiphenyl, based on a wealth of data in animals and humans. The mode of action (MOA) involves metabolic activation by *N*-hydroxylation, followed by *N*-esterification leading to the formation of a reactive electrophile, which binds covalently to DNA, principally to deoxyguanosine, leading to an increased rate of DNA mutations and ultimately to the development of cancer. In humans and dogs, the urinary bladder urothelium is the target organ, whereas in mice, it is the bladder and liver; in other species, other tissues can be involved. Differences in organ specificity are thought to be due to differences in metabolic activation versus inactivation. Based on qualitative and quantitative considerations, the MOA is possible in humans. Other biological processes, such as toxicity and regenerative proliferation, can significantly influence the dose-response of 4-aminobiphenyl-induced tumours. Based on the IPCS HRF, 4-aminobiphenyl would be predicted to be a carcinogen in humans, and this is corroborated by extensive epidemiological evidence. The IPCS HRF is useful in evaluating DNA-reactive carcinogens.

4-Aminobiphenyl is carcinogenic when administered to several species by a variety of routes (IARC, 1972, 1986, 1987). It was selected as a chemical for a case-study for the International Programme on Chemical Safety (IPCS) Human Relevance Framework (HRF) as a representative DNA-reactive carcinogen because of its established mode of action (MOA) in animal models, based on substantial data available evaluating its metabolic activation, DNA reactivity, genotoxicity, and carcinogenicity. It is also similar to numerous known animal and human carcinogens belonging to the chemical class of aromatic amines (structure-activity relationships), and there are extensive epidemiological, metabolic, and biochemical data in humans. This case-study illustrates the nature of data that are helpful in delineating MOAs for DNA-reactive carcinogens. Distinction between modulating factors and key events in an MOA analysis is also presented.

Based on the strong animal evidence and extensive epidemiological data, the International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified 4-aminobiphenyl as a known human carcinogen (IARC, 1972, 1987). Although initially identified as a human urinary bladder carcinogen in individuals exposed to high levels occupationally, it has subsequently been demonstrated as a major component of cigarette smoke, leading to an increased risk of urinary bladder cancer in cigarette smokers (Del Santo et al., 1991; Curigliano et al., 1996). Additional research has shown that it is a ubiquitous environmental chemical occurring naturally when organic material containing nitrogen undergoes combustion.

¹ This article, to which WHO owns copyright, was originally published in 2006 in *Critical Reviews in Toxicology*, Volume 36, pages 803–819. It has been edited for this WHO publication and includes corrigenda.

4-Aminobiphenyl と DNA の反応性： 発がん MOA のヒトへの関連性を解析するための IPCS フレームワークを用いた事例研究¹

Samuel M. Cohen, Alan R. Boobis, M.E. (Bette) Meek, R. Julian Preston, & Douglas B. McGregor

DNA 反応性 (遺伝毒性) 発がん物質である 4-Aminobiphenyl を例に、動物とヒトにおける豊富なデータに基づいて国際化学物質安全性計画 (International Programme on Chemical Safety: IPCS) のヒト関連性フレームワーク (Human Relevance Framework: HRF) を評価した。この Mode of action (MOA) は、*N*-水酸化による代謝的活性化、*N*-エステル化による反応性親電子物質の生成を経て、この親電子物質が DNA (主にデオキシグアノシン) と共有結合し、DNA の突然変異を促進させ、最終的にはがんの発生につながると考えられている。ヒトとイヌでは、膀胱が標的臓器であるのに対し、マウスでは膀胱と肝臓が標的臓器であり、他の種では他の組織が関与することもある。臓器特異性の違いは、代謝的活性化と不活性化の違いによるものと考えられている。定性的及び定量的な考察から、ヒトの MOA が可能である。毒性や再生性増殖などの他の生物学的过程は、4-Aminobiphenyl 誘発性腫瘍の用量反応に大きく影響する可能性がある。IPCS HRF によれば、4-Aminobiphenyl はヒトにおいて発がん物質であると予測され、これは広範な疫学的エビデンスによって裏付けられている。IPCS HRF は DNA 反応性発がん物質の評価に有用である。

4-Aminobiphenyl は、様々な経路で複数の種において発がん性が確認されている (IARC、1972 年、1986 年、1987 年)。4-Aminobiphenyl は、代謝的活性化、DNA 反応性、遺伝毒性、発がん性を評価した多くのデータに基づき、動物モデルにおける MOA が確立されていることから、代表的な DNA 反応性発がん物質として、国際化学物質安全性計画 (International Programme on Chemical Safety: IPCS) のヒト関連性フレームワーク (Human Relevance Framework: HRF) の事例研究対象化学物質に選定された。また、芳香族アミンに属する既知の動物及びヒト発がん物質と類似しており (構造活性相関)、ヒトにおける疫学的、代謝学的、生化学的データが豊富に存在している。この事例研究は、DNA 反応性発がん物質の MOA を明確にするのに役立つデータの性質を示している。MOA 解析における調節因子と key events の区別についても示されている。

動物における有力なエビデンスと広範な疫学的データに基づいて、国際がん研究機関 (IARC) は 4-Aminobiphenyl を既知のヒト発がん物質として分類した (IARC、1972 年、1987 年)。4-Aminobiphenyl は最初、職業的に高レベルにばく露されたヒトの膀胱発がん物質として同定された。その後、タバコの煙の主成分として実証され、喫煙者の膀胱がんのリスク増加につながるといわれている (Del Santo ら、1991 年; Curigliano ら、1996 年)。追加研究では、窒素を含む有機物が燃焼する際に自然に発生し、至る所に存在する環境化学物質であることが示されている。

¹ この論文は、WHO が著作権を有するものであり、元々は 2006 年に *Critical Reviews in Toxicology*, Volume 36, pages 803-819 に掲載されたものである。この論文は WHO の出版物のために編集されたもので、正誤表が含まれている。

CARCINOGENICITY OF 4-AMINOBIIPHENYL IN ANIMALS

Experimental studies indicate that 4-aminobiphenyl is carcinogenic in mice, rats, rabbits, and dogs, although significant target tissue differences and susceptibility have been observed (IARC, 1972). By most routes of exposure, 4-aminobiphenyl is primarily a carcinogen of the liver and, to a lesser extent, the urinary bladder in mice, whereas in dogs (and humans), the urinary bladder appears to be the target organ. Many of the studies were conducted a number of years ago, and published accounts include only limited details. In addition, potential precursor lesions at interim periods were rarely documented, and none of the studies included protocols, such as stop/recovery, which might be informative in the context of MOA. Nonetheless, results indicate clear species and individual differences in response (e.g. Block et al., 1978), characteristic of MOAs entailing competing metabolic activation and deactivation processes (Table 1).

Table 1. Carcinogenicity studies of 4-aminobiphenyl in various species.

Species	Route/dose	Incidence	Comment	Reference
Mice	Gavage; 1 mg/week for 38 weeks	Bladder carcinomas in 2/12 mice surviving to 90 weeks		Clayson et al. (1965)
Mice	Gavage; 0 or 1.5 mg/week for 52 weeks	Bladder carcinomas in 1/21 exposed males vs 0/19 in controls; increased incidence of hepatomas in males and females		Clayson et al. (1967)
Mice	Subcutaneous injection of 200 µg for up to 52 weeks	Hepatomas in 19/20 males and 6/23 females after 48–52 weeks		Gorrod et al. (1968)
Mice (BALB/cStCrIfc3Hf/Nctr)	0–220 mg/l in drinking-water (males), 0–300 mg/l (females), for up to 96 weeks	Significant increases in urinary bladder carcinomas (males only), hepatocellular carcinomas (females only), and angiosarcomas (males and females)	Hyperplasia of the bladder in most mice of both sexes receiving 75 mg/l (females) and 55 mg/l (males) or greater, but none in controls	Schieferstein et al. (1985)
Mice (newborn B6C3F1)	Different regimens; injected prior to weaning	Liver tumours		Dooley et al. (1988, 1992); Von Tungeln et al. (1996); Parsons et al. (2005)
Rats	Subcutaneous injection in arachis oil of total dose of 3.6–5.8 g/kg bw	Mammary and intestinal tumours		Walpole et al. (1952)

動物における 4-Aminobiphenyl の発がん性

実験的研究では、標的組織と感受性には有意な差が認められているものの、4-Aminobiphenyl はマウス、ラット、ウサギ、イヌにおいて発がん性があることが示されている (IARC, 1972 年)。4-Aminobiphenyl は、ほとんどのばく露経路において、マウスでは主に肝臓と、低頻度で膀胱に対して発がん性が認められるが、イヌ（及びヒト）では膀胱が標的臓器であると考えられる。これらの研究の多くが数年前に行われたものであり、詳細な情報は限られたものしか公表されていない。さらに、試験途中における潜在的な前駆病変はほとんど記録されておらず、どの研究にも MOA で参考となる中止/回復などの研究計画書は含まれていなかった。それにもかかわらず、研究結果には競合する代謝的活性化及び不活性化プロセスが競合する MOA に特徴的な反応における影響の種及び個体差（例えば、ブロックら、1978 年）が示されている（表 1）。

表 1. 各種種における 4-Aminobiphenyl の発がん性試験

動物種	投与経路/用量	発生率	コメント	参考文献
マウス	経口投与；1 mg/週を 38 週間投与	90 週まで生存した 2/12 匹に膀胱がん		Clayson et al. (1965)
マウス	経口投与；0 または 1.5 mg/週を 52 週間投与	対照群 0/19 匹に対し、雄 1/21 匹に膀胱がん；雌雄とも肝臓がんの発生率が増加		Clayson et al. (1967)
マウス	200 µg を最大 52 週間皮下注射	48～52 週後の雄 19/20 匹、雌 6/23 匹に肝臓がん		Gorrod et al. (1968)
マウス (BALB/cStCrIfc3Hf/Nctr)	飲料水中 0-220 mg/L (雄)、0-300 mg/L (雌) を最大 96 週間投与	膀胱がん (雄のみ)、肝細胞がん (雌のみ)、血管肉腫 (雄雌) の有意な増加	75 mg/L (雌) 及び 55 mg/L (雄) 以上の投与では、雌雄ともほとんどのマウスで膀胱の過形成が認められたが、対照マウスでは認められなかった。	Schieferstein et al. (1985)
マウス (新生児 B6C3F1)	異なる投与用法；離乳前に注射された	肝臓腫瘍		Dooley et al. (1988, 1992); Von Tungeln et al. (1996); Parsons et al. (2005)
ラット	総量 3.6～5.8 g/kg bw のビーナッツオイルを皮下注射	乳腺腫瘍・腸管腫瘍		Walpole et al. (1952)

Table 1 (Contd)

Species	Route/dose	Incidence	Comment	Reference
Rabbits	Oral administration of unspecified dose	Bladder papillomas in 1 animal and carcinomas in 3 animals	Earliest carcinoma observed 4 years after start of treatment	Bonser (1962)
Dogs (2)	Gelatin capsules 6 times weekly for life for a total dose of 30 or 34 g	Carcinoma of the bladders appeared in 33 months		Walpole et al. (1954)
Dogs	Gelatin capsules 0.3 g 3 times weekly (total dose: 94.5–144 g per dog)	Bladder carcinomas after 21–34 months		Deichmann et al. (1958)
Dogs (6)	1.0 mg/kg bw 5 times weekly for 34 or 37 months (total dose 5.5–7.0 g per dog)	3 bladder papillomas and 3 bladder carcinomas (transitional cell type)		Deichmann et al. (1965)
Dogs	Single dose	Ineffective in inducing bladder tumours over a 5-year period		Deichmann & MacDonald (1968)
Dogs (24 beagles)	Oral administration 5 days/week for 3 years	Negative or minimal disease in 4 dogs, with no neoplasia in 2; neoplasia developed slowly in 11 dogs, while a rapidly progressive pattern was observed in the remaining 9 dogs		Block et al. (1978)

bw, body weight

Following its oral administration by gavage (1 mg per mouse per week for 38 weeks), 2/12 mice surviving to 90 weeks developed bladder carcinoma (Clayson et al., 1965). In a separate but similar experiment, dosing mice with 1.5 mg of 4-aminobiphenyl for 52 weeks resulted in bladder carcinoma in 1/21 male mice as compared with 0/19 in controls. In this experiment, the frequency of hepatomas in both male and female mice was significantly higher than that in the controls (Clayson et al., 1967). Three subcutaneous injections of mice with 200 µg of 4-aminobiphenyl produced hepatomas in 19/20 males and 6/23 females after 48–52 weeks (Gorrod et al., 1968). Oral administration of 4-aminobiphenyl in drinking-water at concentrations of up to 220 and 300 mg/l to male and female BALB/cStCrIFC3Hf/Nctr mice, respectively, for up to 96 weeks induced dose-related, significant increases in angiosarcomas (males and females), urinary bladder carcinomas (males only), and hepatocellular carcinomas (females only). Hyperplasia of the bladder was observed in most of the mice of both sexes in groups of about 118 receiving concentrations of 75 mg/l (females) and 55 mg/l (males) or greater, whereas none was reported in the control groups of similar size (Schieferstein et al., 1985). In a number of experiments, newborn B6C3F1 mice were primarily susceptible to

表 1. (続き)

動物種	投与経路/用量	発生率	コメント	参考文献
ウサギ	不定量の経口投与	1 匹に膀胱乳頭腫、3 匹に膀胱がん	投与開始から 4 年後に観察された最も早いがん	Bonser (1962)
イヌ(2)	ゼラチンカプセルを週 6 回終身投与、合計 30 または 34 g	膀胱がんが 33 ヶ月で出現		Walpole et al. (1954)
イヌ	ゼラチンカプセル 0.3 g を週 3 回 (総投与量: イヌ 1 匹あたり 94.5–144 g)	21–34 ヶ月後に膀胱がん		Deichmann et al. (1958)
イヌ(6)	1.0 mg/kg bw を週 5 回、34 ヶ月または 37 ヶ月間 (イヌ 1 頭あたりの総投与量 5.5–7.0 g)。	膀胱乳頭腫 3 匹、膀胱がん (移行上皮型) 3 匹		Deichmann et al. (1965)
イヌ	単回投与	5 年間にわたり膀胱腫瘍は誘発されなかった		Deichmann & MacDonald (1968)
イヌ (24、ビーグル)	経口投与週 5 回、3 年間	4 匹のイヌでは陰性または軽症 (2 匹で腫瘍なし) 11 匹では腫瘍はゆっくりと進行したが、残りの 9 匹では急速に進行		Block et al. (1978)

bw, 体重

経口投与 (マウス 1 週あたり 1 mg、38 週間) の後、90 週まで生存した 2/12 のマウスに膀胱がんが発生した (Clayson ら、1965 年)。別の実験では、マウスに 1.5 mg の 4-Aminobiphenyl を 52 週間投与したところ、対照群では 0/19 匹であったのに対し、1/21 匹の雄マウスで膀胱がんが発生した。この実験では、雄マウスと雌マウスの両方で肝臓がんの頻度が対照群よりも有意に高かった (Clayson ら、1967 年)。4-Aminobiphenyl 200 µg をマウスに 3 回皮下注射したところ、48–52 週後に 19/20 匹の雄及び 6/23 匹の雌で肝臓がんが生じた (Gorrod ら、1968 年)。4-Aminobiphenyl を、BALB/cStCrIFC3Hf/Nctr マウスの雄と雌に、それぞれ 220 mg/L と 300 mg/L までの濃度で飲水投与すると、投与量に相関して、血管肉腫 (雄と雌)、膀胱がん (雄のみ)、肝細胞がん (雌のみ) の有意な増加が認められた。膀胱の過形成は、75 mg/L (雌) 及び 55 mg/L (雄) 以上の濃度の投与を受けた約 118 匹の群では、両性のマウスのほとんどで観察されたが、対照群では報告されていない (Schieferstein ら、1985 年)。多くの実験において、新生児 B6C3F1 マウスは、4-Aminobiphenyl 投与後に、主に肝臓がんに感受性があつた (Dooley ら、1988 年、1992 年; Von Tungeln ら、1996 年; Parsons ら、2005 年)。

liver carcinogenesis following 4-aminobiphenyl administration (Dooley et al., 1988, 1992; Von Tungeln et al., 1996; Parsons et al., 2005).

Daily subcutaneous injection of rats with 4-aminobiphenyl in arachis oil to a total dose of 3.6–5.8 g/kg body weight (bw) resulted in significant increases in the incidence of mammary gland and intestinal tumours (Walpole et al., 1952).

Among seven rabbits given commercial 4-aminobiphenyl orally (dose unstated), bladder papillomas were found in one and carcinomas in three animals. The earliest carcinoma was observed 4 years after the start of treatment (Bonser, 1962).

Two dogs fed 4-aminobiphenyl in gelatin capsules 6 times weekly for life (total dose per dog: 30, 34 g) developed carcinoma of the bladder in 33 months (Walpole et al., 1954). This was confirmed by similarly feeding capsules containing 4-aminobiphenyl (0.3 g per dog) 3 times weekly. Bladder carcinomas were observed after 21–34 months (total dose: 94.5–144.0 g per dog) (Deichmann et al., 1958). When the dose of 4-aminobiphenyl was reduced to 1.0 mg/kg bw and given to six dogs 5 times weekly for 34 months or 37 months (total dose: 5.5–7.0 g per dog), three bladder papillomas and three bladder carcinomas (transitional cell type) were observed (Deichmann et al., 1965). A single dose was not effective in inducing bladder tumours over a period of 5 years (Deichmann & MacDonald, 1968). Among 24 beagles that received 4-aminobiphenyl orally 5 days per week for 3 years, three basic patterns of bladder carcinogen responses were seen. Negative or minimal disease was seen in four dogs, of which two remained completely free of neoplasia. Neoplasia developed slowly in 11 dogs, while a rapidly progressive pattern was observed in the remaining 9 dogs (Block et al., 1978).

IS THE WEIGHT OF EVIDENCE SUFFICIENT TO ESTABLISH A MODE OF ACTION (MOA) IN ANIMALS?

The first question of the IPCS HRF is an evaluation of the animal MOA itself. This is based on the process delineated by the MOA Framework developed by IPCS and published in 2001 (Sonich-Mullin et al., 2001), which evolved from the Bradford Hill criteria for causality in epidemiology studies (Hill, 1965).

A. Postulated mode of action

4-Aminobiphenyl is metabolized by hepatic enzymes to *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl, which can be *N*-esterified (*N*-acetylated, *N*-glucuronidated, or *N*-sulfated) in hepatic and other tissues (Miller et al., 1961; Kadlubar et al., 1977, 1991; Miller & Miller, 1977; Delclos et al., 1987; Chou et al., 1995) (Figure 1). *O*-Esterification and ring hydroxylation are competing enzymatic reactions leading to detoxification. Tissue and species differences in the activity of these reactions dictate, at least in part, variations in susceptibility to the carcinogenic effects of 4-aminobiphenyl and differences in organ specificity in the development of tumours. Ultimately, a reactive electrophilic nitrenium ion is formed in the target tissue following *N*-esterification, and this is capable of forming DNA adducts. The principal DNA adduct is *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl (Talaska et al., 1990; Kadlubar et al., 1991; Flammang et al., 1992; Hatcher & Swaminathan, 1995, 2002). As a consequence of the

ビーナツオイル中に 4-Aminobiphenyl を混入して合計 3.6–5.8 g/kg 体重 (bw) の用量をラットに毎日皮下注射すると、乳腺及び腸の腫瘍の発生率が有意に増加した (Walpole ら、1952 年)。

市販の 4-Aminobiphenyl を経口投与 (用量は記載なし) した 7 匹のウサギのうち、1 匹に膀胱乳頭腫が、3 匹に膀胱がんが認められた。最も早い発がんは投与開始から 4 年後に観察された (Bonser, 1962 年)。

4-Aminobiphenyl をゼラチンカプセルで週 6 回投与し続けた 2 匹のイヌ (1 匹あたりの総投与量: 30, 34 g) は、33 ヶ月で膀胱がんを発症した (Walpole ら、1954 年)。同様に 4-Aminobiphenyl を含むカプセル (イヌ 1 匹あたり 0.3 g) を週 3 回与えても、21–34 ヶ月後に膀胱がんが観察された (総投与量: イヌ 1 匹あたり 94.5–144.0 g) (Deichmann ら、1958 年)。4-Aminobiphenyl を 1.0 mg/kg bw に減量し、6 匹のイヌに週 5 回、34 ヶ月または 37 ヶ月間投与したところ (総投与量: 1 匹あたり 5.5–7.0 g)、それぞれ 3 例で膀胱乳頭腫及び膀胱がん (移行上皮型) が観察された (Deichmann ら、1965 年)。単回投与では、5 年間で膀胱腫瘍は誘発されなかった (Deichmann & MacDonald, 1968 年)。4-Aminobiphenyl を週 5 日、3 年間経口投与した 24 匹のビーグル犬では、膀胱発がん物質の反応の基本的な 3 つのパターンが認められた。陰性または最小限の病変は 4 匹にみられ、そのうちの 2 匹には腫瘍が発生しなかった。腫瘍は 11 匹のイヌでゆっくりと進行したが、残りの 9 匹では急速に進行するパターンが観察された (Block ら、1978 年)。

動物 MOA を立証するのにエビデンスの重み付けは十分な

IPCS HRF の最初の問いかけは、動物 MOA そのものの評価である。これは、疫学研究における因果関係を説明するための Bradford Hill 基準 (Hill, 1965 年) から発展し、IPCS が開発した、2001 年発表の MOA フレームワーク (Sonich-Mullin ら、2001 年) に示されている手順に基づいている。

A. 推定される MOA

4-Aminobiphenyl は、肝酵素によって *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl に代謝され、肝及び他の組織において *N*-エステル化 (*N*-アセチル化、*N*-グルクロン化、または *N*-硫酸化) される (Miller ら、1961; Kadlubar ら、1977 年、1991 年; Miller & Miller, 1977 年; Delclos ら、1987 年; Chou ら、1995 年) (図 1)。*O*-エステル化及び環状水酸化は、無毒化につながる競合する酵素反応である。これらの反応の活性における組織差や種差により、少なくとも部分的には、4-Aminobiphenyl の発がん作用に対する感受性の違いや、腫瘍の発生における臓器特異性に違いを生じさせる。最終的には、*N*-エステル化の後、反応性親電子ニトロニウムイオンが標的組織に形成され、これが DNA 付加体を形成しうる。主な DNA 付加体は、*N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl である (Talaska ら、1990 年; Kadlubar ら、1991 年; Flammang ら、1992 年; Hatcher & Swaminathan, 1995 年、2002 年)。

mutations that can result from these reactions at critical sites of critical genes, neoplastic cells eventually develop.

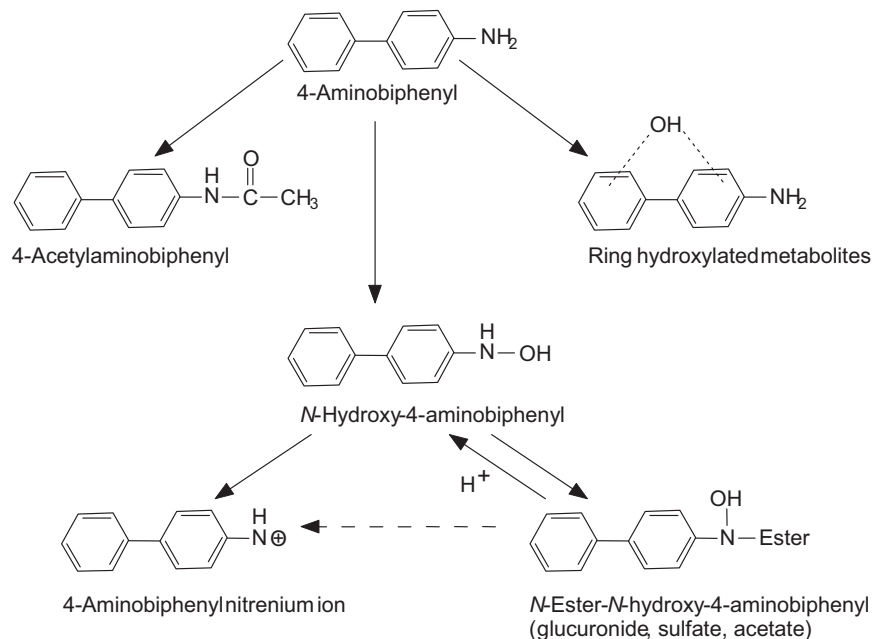


Figure 1. Metabolism of 4-aminobiphenyl

B. Key events

The major route of hepatic activation of 4-aminobiphenyl begins with its *N*-hydroxylation, catalysed, the balance of evidence indicates, by CYP1A2, at least in rats and humans (Butler et al., 1989b). In mice, there is evidence that CYP1A2 is not the only, or even the primary, form of cytochrome P-450 involved (Kimura et al., 1999). The *N*-hydroxylamine can also be produced by reaction with a variety of oxidases and peroxidases, such as by the prostaglandin synthase component of cyclo-oxygenase (Kadlubar et al., 1982). Whether any of these non-cytochrome P-450 reactions occur in vivo and are of toxicological significance remains unclear. The *N*-hydroxylamine undergoes *N*-acetylation by *N*-acetyltransferase-1 (NAT1) (Flammang & Kadlubar, 1986; Oda, 2004), resulting in an *N*-acetoxy ester that is unstable in acidic conditions, forming an aryl nitrenium ion that can react directly with DNA, forming a DNA adduct at the C-8 position of guanine (Hammons et al., 1985; Flammang & Kadlubar, 1986; Hatcher & Swaminathan, 2002). Additionally, the *N*-hydroxylamine generated in liver can serve as a substrate for uridine diphosphate (UDP) glucuronosyltransferase (UGT),

これらの反応が重要な遺伝子の重要な部位で起こることにより突然変異がおこり、その結果、最終的に腫瘍細胞が発生する。

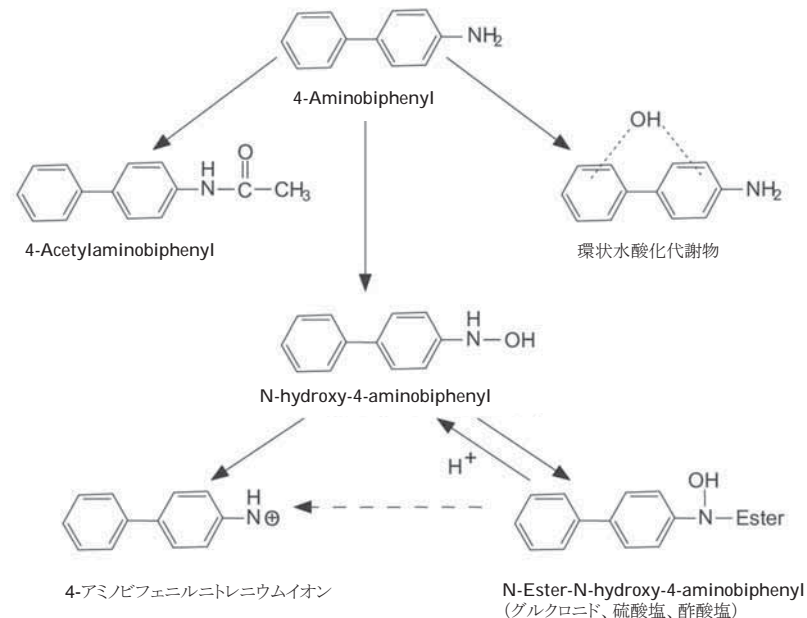


図 1. 4-Aminobiphenyl の代謝

B. Key events

4-Aminobiphenyl の肝活性化の主要経路は、少なくともラットとヒトでは CYP1A2 によって触媒される 4-Aminobiphenyl の *N*-水酸化から始まる (Butler ら, 1989 年 b)。マウスでは、CYP1A2 やチトクローム P-450 が唯一もしくは主要に関与しているわけではないという報告がある (Kimura ら, 1999 年)。また、*N*-hydroxylamine はシクロオキシゲナーゼのプロスタグランジン合成酵素 (Kadlubar ら, 1982 年) のような様々なオキシダーゼ及びペルオキシダーゼとの反応によって生成される。これらの非チトクローム P-450 反応のいずれかが生体内で起こるが、毒性的に意義があるかは不明なままである。*N*-hydroxylamine は、*N*-アセチルトランスフェラーゼ 1 (NAT1) (Flammang & Kadlubar, 1986 年; Oda, 2004 年) による *N*-アセチル化を受け、酸性条件下では不安定な *N*-アセトキシエステルを生じ、DNA と直接反応し得るアリルニトロニウムイオンを形成し、グアニンの C-8 位に DNA 付加体を形成する (Hammons ら, 1985 年; Flammang & Kadlubar, 1986 年; Hatcher & Swaminathan, 2002 年)。さらに、肝臓で生成された *N*-hydroxylamine は、ウリジン二リン酸 (UDP) グルクロン酸転移酵素 (UGT) の基質として機能し、*N*-グルクロニド抱合体を生じ、これが膀胱に運ばれる (Kadlubar ら, 1977 年)。グルクロニドは尿中に排泄されるか、酸性条件下において、加水分解後に膀胱内の *N*-hydroxylamine の追加供給源として機能する。*N*-アセチルトランスフェラーゼ-2 (NAT2) による 4-Aminobiphenyl の *N*-アセチル化など、この反応と

yielding an *N*-glucuronide conjugate that is transported to the urinary bladder (Kadlubar et al., 1977). The glucuronide can either be excreted in urine or, under acidic conditions, serve as an additional source of the *N*-hydroxylamine in the urinary bladder, following hydrolysis. There are a number of reactions that can compete with this reaction scheme, including *N*-acetylation of 4-aminobiphenyl by *N*-acetyltransferase-2 (NAT2), but the resulting arylacetamide is a poor substrate for CYP1A2, and it is considered to be primarily a detoxification reaction. As a consequence, *N*-acetylation of the parent amine is considered a deactivating process. Rates of acetylation can thus affect the balance between activation and deactivation. Humans phenotypically are either rapid or slow acetylators (Lower et al., 1979). Mouse strains exist that are analogous to human slow and rapid acetylators. Thus, C57BL/6 is a rapid acetylator strain, while A/J is a slow acetylator (Hein, 1988). Interest in these differences includes a possible explanation for interspecies, interstrain, and interindividual differences in response. As a consequence of the DNA adducts formed, mutations can be produced. The key events are summarized in Table 2.

Table 2. Key events in the carcinogenicity of 4-aminobiphenyl in animals.

1. Metabolic activation
a) <i>N</i> -Hydroxylation
b) <i>N</i> -Esterification (glucuronide, acetyl, sulfate)
c) Hydrolysis to nitrenium ion
2. DNA adduct formation (dG-C8, dA-C8, dG-N2) in pluripotential cell of target organ
3. DNA mutation in critical gene(s) leading to cancer
4. Cancer

dA, deoxyadenosine; dG, deoxyguanosine

C. Dose–response relationship

In view of the fact that many of the relevant studies were conducted a number of years ago, data on concordance of dose–response for precursor lesions for tumours are restricted to hyperplasia in the mouse urinary bladder. Dogs do not develop bladder tumours after a single dose of 4-aminobiphenyl (Deichmann & MacDonald, 1968), and there do not appear to have been studies of dose–response relationships in this species following multiple exposures. In the only study in which information on the incidence of precursor lesions was reported, male BALB/c mice were treated with drinking-water containing 4-aminobiphenyl at concentrations of 0, 7, 14, 28, 55, 110, or 220 mg/l for up to 96 weeks (Schieferstein et al., 1985). These treatments were associated with bladder carcinoma incidences of 0/116, 1/117, 1/118, 0/118, 6/115, 5/118, and 23/118, respectively. The incidences in the 55 mg/l group and higher were statistically significantly higher than in controls. Female mice were exposed to drinking-water concentrations of 4-aminobiphenyl of 0, 7, 19, 38, 75, 150, and 300 mg/l. The corresponding incidences of bladder carcinomas were 0/118, 0/118, 0/119, 1/118, 0/118, 5/117, and 1/117. Incidences of hyperplasia were much higher, although severity was not indicated. In males, the incidences of hyperplasia were 0/116, 4/117, 9/118, 71/118, 108/115, 107/118, and 102/118 for doses of 0, 7, 14, 28, 55, 110, and 220 mg/l, respectively, and for females, 0/118, 0/118, 3/119, 53/119, 106/118, 97/117, and 83/117 for doses of 0, 7, 19, 38, 75, 150, and 300 mg/l, respectively. Thus, the dose–response curves for tumours and

競合する反応が多数存在するが、得られるアリルアセトアミドは、CYP1A2 にとって貧弱な基質であり、主に解毒反応であると考えられている。その結果、親アミンの *N*-アセチル化は不活性化反応と考えられている。アセチル化の速度は、活性化と不活性化のバランスに影響を与える。ヒトの表現型には、rapid acetylators と slow acetylators が存在する (Lower ら, 1979 年)。ヒトのそれぞれのアセチレーターに類似したマウスの系統が存在し、C57BL/6 は rapid acetylators 系統であり、A/J は slow acetylators 系統である (Hein, 1988)。これらの違いに対する研究は、種間、系統間、個体間での反応の違いを説明しうる。形成された DNA 付加体により、突然変異が生じる可能性がある。key events を表 2 にまとめた。

表 2. 動物における 4-Aminobiphenyl の発がん性における key events

1. 代謝的活性化
a) <i>N</i> -ヒドロキシル化
b) <i>N</i> -エステル化 (グルクロニド、アセチル、硫酸塩)
c) 加水分解してニトレンウムイオンにする
2. 標的臓器の多能性細胞における DNA 付加体形成 (dG-C8, dA-C8, dG-N2)
3. がんにつながる重要な遺伝子の DNA 突然変異
4. 発がん

dA、デオキシアデノシン ; dG、デオキシグアノシン

C. 用量反応関係

関連する研究の多くが何年も前に実施されたという事実を考慮すると、腫瘍の前駆病変に対する用量反応の一致に関するデータは、マウスの膀胱過形成に限定されている。イヌでは、4-Aminobiphenyl の単回投与後に膀胱腫瘍が発生することはなく (Deichmann & MacDonald, 1968 年)、複数回投与後の用量反応関係の研究は行われていない。前駆病変の発生率に関する情報が報告されている唯一の研究では、雄の BALB/c マウスに 0、7、14、28、55、110、220 mg/L の濃度の 4-Aminobiphenyl を含む飲料水を介して 96 週間まで処置したものがある (Schieferstein ら, 1985 年)。これらの処置後の膀胱がん発生率は、それぞれ 0/116、1/117、1/118、0/118、6/115、5/118 及び 23/118 であった。55 mg/L 以上の群の発生率は、対照群に比べて統計的に有意に高かった。雌マウスに 4-Aminobiphenyl を濃度 0、7、19、38、75、150 及び 300 mg/L の飲料水を介してばく露させると、膀胱がんの発生率は、0/118、0/118、0/119、1/118、0/118、5/117 及び 1/117 であった。重症度は示されていないが、過形成の発生率ははるかに高かった。雄では、0、7、14、28、55、110 及び 220 mg/L の投与量で、過形成の発生率は 0/116、4/117、9/118、71/118、108/115、107/118 及び 102/118 であった。雌では、それぞれ 0、7、19、38、75、150 及び 300 mg/L の用量で 0/118、0/118、3/119、53/119、106/118、97/117 及び 83/117 であった。このように、腫瘍及び過形成の用量反応曲線は、シグモイド型またはホッケースティック型であった。対照的に、尿路上皮細胞の C-8 グアニン DNA 付加体の平衡レベルは直線的な用量反応関係を示した (Poirier ら, 1995 年)。

同研究 (Schieferstein ら, 1985 年) では、雄では肝腫瘍の発生率の増加は認められなかったが、雌では、それぞれ 0、7、19、38、75、150 及び 300 mg/L の投与量で、肝腫瘍 (肝腫及びがんを合わせたもの) の発生率は 0/117、0/120、2/120、4/119、11/119、17/118 及び 10/117 であった。様々な組織を合わせた血管肉腫の発生率は、雄と雌の高い 3 用量で増加したが、発生率は雄よりも雌の方がやや高かった。

hyperplasia were sigmoidal or hockey stick-shaped. In contrast, steady-state levels of urothelial C-8 guanine DNA adducts showed a linear dose–response (Poirier et al., 1995).

In this same study (Schieferstein et al., 1985), there was no increase in the incidence of liver tumours in the males, whereas in the females, the incidences of liver tumours (adenomas and carcinomas combined) were 0/117, 0/120, 2/120, 4/119, 11/119, 17/118, and 10/117 at doses of 0, 7, 19, 38, 75, 150, and 300 mg/l, respectively. The incidence of angiosarcomas of various tissues combined was also increased at the three highest doses in males and females, although the incidences were somewhat higher in females than in males.

D. Temporal relationship

Establishing time sequences for events in a carcinogenic process is partially, but to an important extent, dependent upon the sensitivity of the available methods for their measurement. Thus, tumours must attain a size allowing their histological detection, while the measurement of mutations and DNA adducts requires not only time but sufficient tissue. Consequently, the latter are more usually studied in liver than in urinary bladder, where the paucity of tissue available in the urothelium, particularly in rodents, causes technical difficulties that have no connection with the frequency of the biochemical and biological events. The metabolism and formation of DNA adducts are early events, which can be observed within a few minutes or hours in vitro and within a day following in vivo treatment with 4-aminobiphenyl (e.g. Kadlubar et al., 1991; Swaminathan & Reznikoff, 1992; al-Atrash et al., 1995; Hatcher & Swaminathan, 1995; Doerge et al., 1999; Tsuneoka et al., 2003). Many in vivo experiments, however, continue exposure for 3–4 weeks to allow an accumulation of adducts, achieve steady-state levels, and facilitate their detection (e.g. Talaska et al., 1990; Flammang et al., 1992; Poirier & Beland, 1992; Poirier et al., 1995; Underwood et al., 1997). Mutations can also be detected within a short time in vitro, but have generally not been detected in vivo in target tissues until after several weeks or months of exposure (e.g. H-ras in mouse liver; Parsons et al., 2002), although this comparatively long period may not be a true reflection of when mutations first arise. In one study, mutations were detected in a Muta™Mouse urinary bladder assay 14 days after a single dose of 4-aminobiphenyl (Fletcher et al., 1998). Carcinomas and hyperplasia of the urinary bladder are apparently late-occurring lesions in mice and dogs; however, time course changes have not been systematically evaluated. Although mice were killed at intervals beginning at 13 weeks in one 2-year study, and hyperplastic lesions were induced in the urinary bladder, their incidences at different times were not presented (Schieferstein et al., 1985). Tumours in the urinary bladder are commonly not discovered until after about 2 years in mice (Schieferstein et al., 1985) and longer in dogs (Walpole et al., 1954; Deichmann et al., 1958, 1965). However, neoplastic transformation of human urothelial cells (infected with SV40) treated in vitro with 4-aminobiphenyl followed by in vitro culture for 6 weeks was demonstrated upon their inoculation into nude mice (Bookland et al., 1992b).

E. Strength, consistency, and specificity of association of the tumour response with key events

Evidence in support of the association of the tumour response with key events comes only in part from studies on bladder; considerable evidence is provided by studies on liver. DNA adduct formation has been demonstrated in both tissues.

D. 時間的関連性

発がん過程における事象の順序を確立することは、その測定方法の感度に部分的ではあるが大いに依存する。したがって、腫瘍は組織学的に検出できる大きさに達していなければならず、一方で突然変異や DNA 付加体の測定には時間だけでなく十分な量の組織が必要である。その結果、後者は膀胱よりも肝臓で研究されるのが一般的だが、特にげっ歯類では尿道の組織が少ないため、生化学的・生物学的事象の頻度とは関係のない技術的な困難が生じている。DNA 付加体の代謝及び形成は初期の事象であり、4-Aminobiphenyl による in vitro 処理後、数分または数時間以内及び 1 日以内に観察される (Kadlubar ら、1991 年; Swaminathan & Reznikoff, 1992 年; al-Atrash ら、1995 年; Hatcher & Swaminathan, 1995 年; Doerge ら、1999 年; Tsuneoka ら、2003 年)。しかしながら、多くの in vivo 実験では、付加体を蓄積させ、平衡レベルに達し、検出を容易にするために、3～4 週間ばく露を継続する (例えば、Talaska ら、1990 年; Flammang ら、1992 年; Poirier & Beland, 1992 年; Poirier ら、1995 年; Underwood ら、1997 年)。また、突然変異は in vitro では短時間で検出され得るが、生体内では数週間または数ヶ月のばく露後でないと検出されない (例えば、マウス肝臓における H-ras; Parsons ら、2002 年)。この期間は、突然変異が最初に生じた時期を正確に反映しているとは限らない。ある研究では、4-Aminobiphenyl の単回投与から 14 日後に Muta™Mouse 膀胱アッセイで突然変異が検出された (Fletcher ら、1998 年)。膀胱のがんや過形成は、マウスやイヌでは明らかに遅発性の病変であるが、時間経過の変化は体系的に評価されていない。ある 2 年間の研究では、マウスを 13 週から一定間隔で安楽殺し、膀胱に過形成病変を誘導したが、異なる時期の発生率は示されていない (Schieferstein ら、1985)。膀胱の腫瘍は、一般的に、マウスでは約 2 年後 (Schieferstein ら、1985 年)、イヌではそれより長い時間が経過するまで発見されない (Walpole ら、1954 年; Deichmann ら、1958 年、1965 年)。しかし、ヒトの (SV40 に感染した) 尿道粘膜細胞を 4-Aminobiphenyl で in vitro 処理し、6 週間 in vitro 培養した後、ヌードマウスに接種した場合、腫瘍性の形質転換が認められた (Bookland ら、1992 年 b)。

E. 腫瘍反応と key events との関連性の強さ、一貫性、特異性

腫瘍反応と key events との関連性を支持するエビデンスは、膀胱に関する研究から得られたものがあるが、肝臓に関する研究からも有力なエビデンスが得られている。DNA 付加体の形成は両組織で実証されている。

There is an abundance of studies that demonstrate that 4-aminobiphenyl is a mutagen, including positive mutagenicity with certain frameshift mutation and base pair substitution-sensitive strains (TA1538, TA98, and TA100) of *Salmonella typhimurium*, but only in the presence of rodent liver S9 metabolic activating preparations. The requirement for S9 metabolic activation clearly demonstrates the lack of DNA reactivity and mutagenicity of the parent amine. In addition, 4-aminobiphenyl induces unscheduled DNA synthesis in rat liver cells in vitro (United States Environmental Protection Agency Genetic Activity Profiles). These in vitro studies provide evidence that 4-aminobiphenyl can cause genetic damage following metabolic activation. Bacterial mutation studies have also been conducted comparing metabolic activation systems based on liver homogenates from Aroclor 1254-induced male Sprague-Dawley rats and C57BL/6 mice, using *S. typhimurium* TA100 tester strains that expressed different levels of *N*- and *O*-acetyltransferase (OAT) activity (Dang & McQueen, 1999). TA100 has a single copy of the NAT/OAT gene; YG1029 has multiple copies of the NAT/OAT gene, and TA100/1,8DNP₆ is NAT/OAT-deficient. Effects with mouse and rat S9 were similar (but the effects of Aroclor 1254 treatment were not examined). Using either 4-aminobiphenyl or 4-acetylaminobiphenyl as substrates, considerably more mutations were induced in YG1029 than in TA100 or TA100/1,8DNP₆, in which mutation induction was similar. This supports a role for high acetylation activity in mutation induction by the *N*-hydroxylamine in these bacteria.

The non-enzymatic step to an aryl nitrenium ion in the mechanism of mutagenesis in vivo is supported by the observation that *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl mutagenesis in the high OAT-expressing *S. typhimurium* TG1024 strain is dependent on the pH of the medium, with an inverse relationship between mutant numbers and pH over the range 4.0–8.0 (Sarkar et al., 2002).

Administration of 4-aminobiphenyl in the drinking-water of BALB/c mice for 28 days resulted in higher levels of DNA adducts in liver than in urinary bladder of females, while the reverse occurred in males. Thus, in each sex, the DNA adduct level correlated with the susceptibility of the tissue to tumour induction by 4-aminobiphenyl (Poirier et al., 1995). However, the shape of the dose–response curve was linear for DNA adducts in both tissues (although it appears to saturate and is relatively flat in female mice), whereas the tumour dose–response curve was sigmoidal (Poirier et al., 1995).

Adduct levels were also highest in the urinary bladder of female Hsd:ICR(Br) mice that were dosed topically (the more usual exposure route in occupational settings) with 50 nmol 4-aminobiphenyl for 21 weeks. The principal adduct in all tissues examined (bladder, liver, lung, and skin) co-chromatographed with *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl (Underwood et al., 1997).

One study of mutagenesis in male MutaTMMouse transgenic mice (i.e. transgenic CD2F, [BALB/c × DBA/2]) treated orally with 4-aminobiphenyl at 10 mg/kg bw per day for 10 days reported that the mutation frequencies in urinary bladder, liver, and bone marrow were increased by 13.7-, 4.8-, and 2.4-fold, respectively (Fletcher et al., 1998).

4-Aminobiphenyl が変異原性物質であることを示す研究は豊富にあり、*S. typhimurium* 菌の特定のフレームシフト型突然変異及び塩基対置換感受性株 (TA1538、TA98 及び TA100) に対する陽性反応が、げっ歯類肝 S9 代謝的活性化製剤の存在下でのみ認められている。S9 による代謝的活性化が必要であるということは、親アミンの DNA 反応性及び変異原性の欠如を示している。さらに、4-Aminobiphenyl は、in vitro でラット肝細胞において不定期 DNA 合成を誘導する（米国環境保護庁遺伝的活性プロファイル）。これらの in vitro 研究は、4-Aminobiphenyl が代謝的活性化後に遺伝的損傷を引き起こす可能性があるというエビデンスを示している。また、細菌を用いた突然変異試験でも代謝的活性化システムの解析が行われている（Dang & McQueen, 1999）。Aroclor 1254 誘発雄 Sprague-Dawley ラット及び C57BL/6 マウスの肝臓ホモジネート及び、異なるレベルの *N*-及び *O*-アセチルトランスフェラーゼ（OAT）活性を発現する *S. typhimurium* TA100 試験菌株が使用された。TA100 は NAT/OAT 遺伝子のシングルコピーを有し、YG1029 は NAT/OAT 遺伝子のマルチコピーを有し、TA100/1,8DNP₆ は NAT/OAT 欠損株である。マウス及びラット S9 を用いた効果は類似していた（ただし、Aroclor 1254 処理の効果は調べなかった）。4-Aminobiphenyl または 4-Acetylaminobiphenyl を基質とした場合、YG1029 では TA100 または TA100/1,8DNP₆ よりも多く突然変異が誘発された。このことは、これらの細菌における *N*-hydroxylamine による突然変異誘発には、高いアセチル化活性が関与していることを示唆している。

生体内での突然変異誘発機構におけるアリルニトロニウムイオンへの非酵素的ステップは、高 OAT-発現 *S. typhimurium* TG1024 株における *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl の突然変異誘発が培地の pH に依存し、4.0–8.0 の範囲で突然変異体数と pH との間に逆相関の関係が観察されたことによって支持される（Sarkar ら、2002 年）。

BALB/c マウスに 4-Aminobiphenyl を 28 日間飲水投与したところ、雌では膀胱よりも肝臓の方が DNA 付加体の量が多かったのに対し、雄では逆の結果が得られた。このように、各性において、DNA 付加体のレベルは、4-Aminobiphenyl による腫瘍誘導に対する組織の感受性と相関していた（Poirier ら、1995 年）。しかしながら、用量反応曲線の形状は、両組織の DNA 付加体では直線的であった（雌マウスでは飽和して比較的平坦）のに対し、腫瘍の用量反応曲線はシグモイド型であった（Poirier ら、1995 年）。

付加体の量は、50 nmol の 4-Aminobiphenyl を 21 週間にわたって局所投与した Hsd:ICR(Br)マウスの雌マウスの膀胱で最も高かった（一般的な職業的ばく露経路）。検査した全組織（膀胱、肝臓、肺、皮膚）の主な付加体は、*N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl とのコクロマトグラフィーを用いて検査した（Underwood ら、1997 年）。

雄の MutaTMMouse トランスジェニックマウス（すなわち、トランスジェニック CD2F、[BALB/c×DBA/2]）に 10 mg/kg bw/日の 4-Aminobiphenyl を 10 日間経口投与した突然変異誘発の研究では、膀胱、肝臓及び骨髄における突然変異頻度がそれぞれ 13.7 倍、4.8 倍及び 2.4 倍に増加したことが報告されている（Fletcher ら、1998 年）。

Newborn B6C3F1 (C57BL/6 × C3H) mice responded to treatment with 4-aminobiphenyl by developing a high frequency of liver tumours, many of which carried *H-ras* codon 61 CAA → AAA mutations (Parsons et al., 2005). In vivo, the level of one major DNA adduct [*N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl] was present at 5 adducts/10⁶ nucleotides in newborn mice treated with 0.3 μmol 4-aminobiphenyl 24 h earlier. After 8 months, the CAA → AAA mutation was detected in 67% of the treated mice and 50% of the vehicle (dimethyl sulfoxide, or DMSO) controls, but the average mutant fraction in treated mice was 45×10^{-5} compared with only 2×10^{-5} in controls. After 12 months, liver tumours had developed in 79% of the treated mice and in 8% of the controls. These tumours are not those of the human target organ, but the results of this study support the general MOA proposed for bladder carcinogenesis (i.e. DNA adduct formation, followed by mutation in a key gene and the subsequent emergence of tumours).

Dogs (sex not stated) killed 24 h after a single oral dose of 4-aminobiphenyl (5 mg/kg bw) had 5.4 fmol DNA adducts/μg liver DNA and 4.8 fmol DNA adducts/μg urinary bladder DNA, whereas no DNA adducts were detected in either the liver or bladder of a dog whose bladder had been instilled with 4-aminobiphenyl. In contrast, a dog bladder instilled with the reactive intermediate *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl had 3.9 fmol DNA adducts/μg bladder DNA and no detectable adducts in liver DNA. Quantification was by an immunochemical method (Roberts et al., 1988). Examination of bitches treated with tritium-labelled 4-aminobiphenyl (per os, intravenously, or intraurethraly), *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl (intravenously or intraurethraly), or *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl *N*-glucuronide (intravenously) demonstrated (1) the presence of 4-aminobiphenyl-haemoglobin adducts in blood erythrocytes; (2) that after per os dosing with 4-aminobiphenyl, the major portion of total *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl entering the bladder lumen was free *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl (0.7%), with lower concentrations of the acid-labile *N*-glucuronide (0.3%); (3) that urothelial DNA adducts following intraurethral instillation of *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl were 60 times higher than after intraurethral instillation of 4-aminobiphenyl; and (4) that exposure to *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl and subsequent 4-aminobiphenyl-DNA adduct formation are directly dependent on the frequency of urination and, to a lesser extent, on urinary pH (Kadlubar et al., 1991). The urinary pH of dogs may vary from about 4.5 to 7.5, depending upon the diet (Merck, 1998), time after eating, time of day, and amount of water consumed; these are factors that might influence the carcinogenic response (Cohen, 1995). Studies in vitro with microsomal preparations from dog liver and bladder have shown the presence of transacetylation activities in both organs, so that *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl binding to RNA and DNA occurs in the presence of 4-acetylaminobiphenyl, *N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl, or acetyl coenzyme A (CoA) as acetyl donors, although the levels of binding were less with bladder than with hepatic microsomes (Hatcher & Swaminathan, 1992).

Examination of urothelial cells exfoliated into urine of dogs treated with 4-aminobiphenyl showed that DNA adducts were identical to those from DNA modified in vitro with *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl and from dog bladder urothelial DNA isolated from 4-aminobiphenyl-dosed dogs at autopsy. A dose-related increase in 4-aminobiphenyl-DNA adduct formation was demonstrated (Talaska et al., 1990).

新生児 B6C3F1(C57BL/6×C3H)マウスは、4-Aminobiphenyl の投与に反応して高頻度の肝腫瘍を発症し、その多くは *H-ras* 遺伝子のコドン 61 における CAA→AAA 突然変異であった (Parsons ら, 2005 年)。in vivo では、0.3 μmol の 4-Aminobiphenyl を 24 時間前に投与した新生児マウスにおいて、主要な DNA 付加 *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl 量は、5 adducts /10⁶ スクレオチドであった。8 ヶ月後、CAA→AAA 突然変異は、投与マウスの 67%及び対照 (ジメチルスルホキシド、または DMSO) の 50%で検出されたが、投与マウスの平均突然変異率は 45×10^{-5} であったのに対し、対照ではわずか 2×10^{-5} であった。12 カ月後には、投与マウスの 79%、対照マウスの 8% に肝腫瘍が発生していた。これらの腫瘍はヒトの標的臓器の腫瘍ではないが、本研究の結果は、膀胱がんの発生において提示されている一般的な MOA (すなわち、DNA 付加体の形成、重要な遺伝子の突然変異、その後の腫瘍の出現) を支持するものである。

4-Aminobiphenyl (5 mg/kg bw) を単回経口投与してから 24 時間後に死亡したイヌ (性別は明記されていない) の DNA 付加体は、肝臓で 5.4 fmolDNA adducts/μg、膀胱で 4.8 fmolDNA adducts/μg であった。しかし、4-Aminobiphenyl を膀胱に投与したイヌの肝臓と膀胱では DNA 付加体は検出されなかった。一方、反応性中間体である *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl を膀胱に投与したイヌの膀胱では、3.9 fmol DNA adducts/μg の DNA 付加体が検出され、肝臓では付加体は検出されなかった。免疫化学的方法で定量を行った (Roberts ら, 1988 年)。トリチウム標識された 4-Aminobiphenyl (経口、静脈内、または尿道内)、*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl (静脈内、または尿道内)、*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl *N*-glucuronide (静脈内) を投与された雌イヌの試験では以下のことが実証された。

(1) 血中赤血球中の 4-aminobiphenyl-ヘモグロビン付加体の存在 (2) 4-aminobiphenyl 投与後、膀胱内腔に入る *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl の大部分は遊離 *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl (0.7%) であり、酸溶性 *N*-グルクロニドは低濃度 (0.3%) であること (3) *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl を尿道内に注入した後の DNA 付加体量は、4-Aminobiphenyl を尿道内に注入した後と比較して 60 倍多かったこと、(4) *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl へのばく露及びそれに続く 4-Aminobiphenyl-DNA 付加体の形成は、排尿の頻度及び尿の pH に依存すること (Kadlubar ら, 1991 年)。

イヌの尿中 pH は、食事内容 (Merck, 1998 年)、食後からの時間、時間帯及び消費水量に依存して、約 4.5 から 7.5 まで変化することがあり、これらは発がん性に影響を及ぼす可能性のある因子である (Cohen, 1995)。イヌの肝臓及び膀胱からのミクロソーム調製物を用いた in vitro の研究では、両臓器においてトランスアセチル化活性が存在することが示されており、そのため、4-Acetylaminobiphenyl、*N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl、またはアセチルコエンザイム A (CoA) がアセチル供与体として存在する場合には、*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl の RNA 及び DNA への結合が起こるが、結合量は肝臓ミクロソームよりも膀胱ミクロソームの方が少なかった (Hatcher & Swaminathan, 1992 年)。

4- Aminobiphenyl を投与したイヌの尿に含まれる尿膜細胞を調べたところ、*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl で in vitro で修飾した DNA や、4-aminobiphenyl を投与したイヌの剖検時に単離したイヌの膀胱尿路上皮細胞の DNA と同一の DNA 付加体が検出された。4- aminobiphenyl-DNA 付加体形成の用量依存的増加が示された (Talaska ら, 1990 年)。

F. Biological plausibility and coherence

The observations that 4-aminobiphenyl can form adducts with DNA and that it is mutagenic in organs in which tumours develop indicate, in general terms, that the proposed MOA is plausible (Fletcher et al., 1998). In addition, *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl is able to cause neoplastic transformation of non-tumorigenic SV40-immortalized human urothelial cells (Bookland et al., 1992b). The findings with 4-aminobiphenyl are also consistent with the vast literature regarding the metabolic activation, DNA adduct formation, mutagenesis, and urinary bladder carcinogenesis in several species (including humans) of several related aromatic amine chemicals (Kadlubar et al., 1977; Miller & Miller, 1977; Delclos et al., 1987). The lack of DNA adduct formation and mutagenicity of the parent amine in various in vitro systems without metabolic activation clearly demonstrates the requirement for metabolic activation. The same DNA adducts are identified in tissues after administration of the amine or following exposure to the *N*-hydroxyl metabolite, with the structure of the adducts having been chemically confirmed. The mutagenic potential of the specific C-8 guanine DNA adduct has also been demonstrated, although the specific biophysical aspects have been better demonstrated for structurally related aromatic amines such as 2-aminofluorene (Kriek, 1992).

G. Other modes of action

Alternatives of components of the already described MOA have been suggested. However, they do not detract from the overall described MOA but suggest either alternative specific aspects (such as other activating enzymes) or associative processes that could affect quantitative aspects. 4-Aminobiphenyl is oxidized by hepatic enzymes other than CYP1A2 (Kimura et al., 1999) to the *N*-hydroxylated metabolite that causes liver and urinary bladder toxicity and carcinogenesis, possibly including oxidases and peroxidases (Kadlubar et al., 1982, 1991). Although the specific enzymes involved in metabolic activation may vary, the ultimate sequence of generation of a reactive electrophile, DNA adduct formation, mutagenesis, and carcinogenesis is consistent. Furthermore, it is reasonable to believe that from this point in the MOA, the same sequence occurs as that involving CYP1A2-mediated activation, regardless of the activating enzyme.

In addition to bulky adducts, there is evidence to suggest that *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl causes oxidative damage in urothelial DNA, possibly involving endogenous peroxidases (Burger et al., 2001). The relevance of this for the carcinogenic activity of 4-aminobiphenyl is unknown.

N-Hydroxy-4-aminobiphenyl and its further activated forms are cytotoxic to urothelial and other cells in vitro (Reznikoff et al., 1986), but the role that this plays in its carcinogenic effects is unclear (see below for discussion of a potentiating role in urothelial carcinogenesis, rather than causative role). It is likely that this process alters the dose–response relationship, but does not alter the fundamental MOA described above.

H. Assessment of the postulated mode of action

The early steps in the proposed MOA are well supported by the available evidence, and it has been judged that there is good and sufficient evidence that 4-aminobiphenyl is a urinary bladder carcinogen in dogs and mice, and in other tissues (primarily the liver) in rodents. Thus, it is metabolized to products that can form DNA adducts in the liver and in other target

F. 生物学的妥当性及び整合性

4-Aminobiphenyl が DNA と付加体を形成し、腫瘍が発生する器官で変異原性を示すという結果は、一般的に提案されている MOA の妥当性を示している (Fletcher ら、1998 年)。さらに、*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl は、腫瘍化していない SV40 不死ヒト尿細管細胞の腫瘍化を引き起こすことができる (Bookland ら、1992 年 b)。また、4-Aminobiphenyl に関する知見はいくつかの関連芳香族アミンの代謝的活性化、DNA 付加体形成、突然変異誘発及びいくつかの種 (ヒトを含む) における膀胱発がんに関する膨大な文献と一致している (Kadlubar ら、1977 年; Miller & Miller, 1977 年; Delclos ら、1987 年)。代謝的活性化を伴わない様々な in vitro 系での親アミンの DNA 付加体形成及び変異原性の欠如は、代謝的活性化の必要性を明確に示している。アミンの投与後、または *N*-ヒドロキシル代謝物へのばく露後に組織内で同じ DNA 付加体が確認され、付加体の構造が化学的に確認されている。特定の生物物理学的側面は 2-aminofluorene のような構造的に関連する芳香族アミンの方がより明らかにされているが、C-8 グアニン DNA 付加体の変異原性についても明らかにされている、(Kriek, 1992 年)。

G. その他の MOA

既に記載されている MOA の構成要素の代替的なものが提案されている。しかし、それらは MOA の全体的な説明を損なうものではなく、限局的側面 (他の活性化酵素など)、または定量的側面に影響を与える可能性のある過程のいずれかを示唆している。4-Aminobiphenyl は、CYP1A2 以外の肝酵素 (Kimura ら、1999 年) によって *N*-水酸化代謝物に酸化され、肝臓及び膀胱の毒性及び発がんを引き起こすが、これには酸化酵素及びペルオキシダーゼが関与している可能性がある (Kadlubar ら、1982 年、1991 年)。代謝的活性化に関与する酵素は異なるかもしれないが、反応性親電子物質の生成、DNA 付加体の形成、変異原性、発がんという順序は一貫している。さらに、MOA のこの時点から、活性化酵素にかかわらず、CYP1A2 を介した活性化と同じ順序で起こると考えるのが妥当である。

巨大な付加体に加えて、*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl は、内因性ペルオキシダーゼが関与している可能性があり、尿道粘膜 DNA に酸化的損傷を引き起こすことを示唆するエビデンスがある (Burger ら、2001 年)。このことと 4-Aminobiphenyl の発がん活性との関連性は不明である。

N-hydroxy-4-aminobiphenyl 及びその活性型は、in vitro で尿道粘膜及び他の細胞に対して細胞毒性を示す (Reznikoff ら、1986 年) が、これが発がん作用に果たす役割は不明である (原因ではなく、尿道粘膜発がんにおける増強的な役割については以下を参照のこと)。この過程で用量反応関係は変化するが、上述の基本的な MOA は変化しないと考えられる。

H. 推定される MOA の評価

推定される MOA の初期段階は、利用可能なエビデンスによって十分に裏付けられており、4-Aminobiphenyl はイスラマウスでは膀胱発がん物質であり、げっ歯類では他の組織 (主に肝臓) での発がん物質である十分なエビデンスがあると判断されている。このように、肝臓や他の標的臓器では DNA 付加体を形成しうる生成物に代謝され、突然変異が生じることが実証されている。

organs, and mutations have been demonstrated to arise. Although other organs can also be targets for 4-aminobiphenyl-induced neoplasia, the urinary bladder is the main target in dogs and in some strains of mice. Evidence for the intervening steps between general genotoxicity and the emergence of neoplasia is lacking. There is a notable lack of study of the effects of 4-aminobiphenyl on cell proliferation in the urinary bladder, but information on related aromatic amines and amides is available, particularly the analysis of the interaction between DNA reactivity (and mutagenesis) and cell proliferation induced by 2-acetylaminofluorene in mouse urinary bladder utilizing data from a megamouse, ED-01 study (Cairns, 1979; Gaylor, 1979; Littlefield et al., 1979). The reliance for mutagenicity on cell proliferation can provide an explanation for the sigmoidal shape of the tumour dose-response despite a linear dose-response for DNA adducts (Cohen & Ellwein, 1990). This link has significant implications for assessing potency and dose-response for 4-aminobiphenyl-induced urinary bladder cancer (see discussion below).

I. Uncertainties, inconsistencies, and data gaps

Bacterial mutation studies of 4-aminobiphenyl with metabolic activation have shown that most mutations are frameshifts, whereas a single study of sequence analysis of 4-aminobiphenyl-induced mutations in the *lacZ* gene in single-stranded DNA from a bacteriophage M13 cloning vector revealed exclusively base pair substitutions, with over 80% occurring at G sites: G → T transversions predominated, followed by G → C transversions and G → A transitions. The major DNA adduct, *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl, was then inserted within the M13 genome, and the mutational frequency and specificity were measured after *in vivo* replication. The targeted mutational efficiency was approximately 0.01%, and the primary mutation was G → C transversion. Thus, the observations are consistent with *in vivo* observations, but the mutagenic activity was weak (Verghis et al., 1997).

Most *in vivo* investigations have been in mice. Dogs, for understandable reasons, have received less attention, although this is the species that is more sensitive to bladder carcinogenesis. Mouse strain differences in response are evident: B6C3F1 and female BALB/cStCrIFC3Hf/Nctr are more susceptible to liver carcinogenesis, whereas male BALB/cStCrIFC3Hf/Nctr mice develop bladder tumours after exposure to 4-aminobiphenyl (Schieferstein et al., 1985; Dooley et al., 1988, 1992). Nevertheless, mouse strain effects have received relatively little attention in the available studies.

The enzyme considered as fundamental for the metabolism of 4-aminobiphenyl to a product that forms adducts with DNA in liver and bladder is CYP1A2 (Butler et al., 1989a, 1989b). However, comparison of responses in CYP1A2(+/+) wild-type mice with CYP1A2(-/-) knockout mice showed that, contrary to expectations, CYP1A2 expression was not associated with 4-aminobiphenyl-induced oxidative stress or with 4-aminobiphenyl-DNA adduct formation. Furthermore, prior treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), which increased hepatic CYP1A2 protein expression 5-fold along with expression of other phase I and phase II enzymes, either did not change or actually decreased the level of adducts in liver. The specific quantitative effects of such induction will depend on the balance of the enzymes induced. These results suggest either that CYP1A2 is not the major metabolic activator of 4-aminobiphenyl or that other enzymes in mice activate the compound in the absence of CYP1A2 (Tsuneoka et al., 2003). Based on studies with other aromatic amines,

他の臓器も 4-Aminobiphenyl 誘発性腫瘍の標的となりうるが、イスやマウスの一部の系統では膀胱が主な標的となっている。一般的な遺伝毒性と腫瘍発生との間の段階についてのエビデンスは十分ではない。4-Aminobiphenyl の膀胱の細胞増殖への影響についての研究は著しく不足しているが、関連する芳香族アミンやアミドについての情報は入手可能であり、特にメガマウス ED-01 実験 (Cairns, 1979 年; Gaylor, 1979 年; Littlefield ら, 1979 年) のデータを用いたマウスの膀胱における 2-acetylaminofluorene によって誘導される DNA 反応性 (及び変異原性) と細胞増殖との間の相互作用の解析が行われている。変異原性が細胞増殖に依存していることは、DNA 付加体の用量反応が直線的であるにもかかわらず、腫瘍の用量反応がシグモイド型であることの説明を提供することができる (Cohen & Ellwein, 1990 年)。この関連性は、4-Aminobiphenyl 誘発性膀胱がんの発生と用量反応性を評価する上で重要な意味を持つ (以下の議論を参照)。

I. 不確実性、矛盾、データギャップ

4-Aminobiphenyl の代謝的活性化を伴う細菌を用いた突然変異試験では、ほとんどの変異がフレームシフトであることが示されているが、バクテリオファージ M13 クローニングベクターから得た一本鎖 DNA 中の *lacZ* 遺伝子の 4-Aminobiphenyl 誘発突然変異の配列解析を行ったところ、80% 以上が G 部位で生じる塩基対置換が明らかになった。G→T トランスバージョンが優勢で、次に G→C トランスバージョン、G→A トランジションが続いた。次に、主要な DNA 付加体である *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl を M13 ゲノム内に挿入し、生体内複製後に変異頻度と特異性を測定した。目標とする突然変異率は約 0.01% であり、一次突然変異は G→C トランスバージョンであった。このように、*in vitro* での観察結果は *in vivo* での観察結果と矛盾しないが、変異原性は弱いものであった (Verghis ら, 1997 年)。

in vivo での研究のほとんどはマウスで行われている。無理からぬ理由ではあるが、イスは膀胱発がんに対して感受性が高い種であるにもかかわらず、あまり注目されていない。反応におけるマウスの系統の違いは明らかである。B6C3F1 及び雌の BALB/cStCrIFC3Hf/Nctr マウスは、肝臓発がんに対してより感受性が高く、一方、雄の BALB/cStCrIFC3Hf/Nctr マウスは、4-Aminobiphenyl へのばく露後に膀胱腫瘍を発症する (Schieferstein ら, 1985 年; Dooley ら, 1988 年, 1992 年)。それにもかかわらず、利用可能な研究では、マウスの系統差による影響はあまり注目されていない。

4-Aminobiphenyl が代謝され、肝臓や膀胱で DNA と付加体を形成する基本的な酵素と考えられているのは CYP1A2 である (Butler ら, 1989 年 a, 1989 年 b)。しかし、CYP1A2(+/+)野生型マウスと CYP1A2(-/-)ノックアウトマウスの影響を比較すると、予想に反して、CYP1A2 の発現は、4-Aminobiphenyl 誘発性酸化ストレスまたは 4-Aminobiphenyl-DNA 付加体形成とは関連していないことが示された。さらに、他の第 1 相及び第 2 相反応の酵素の発現とともに肝 CYP1A2 タンパク質の発現を 5 倍に増加させた 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン (TCDD) は、肝臓における付加体量を変化させないか、または実際に減少させた。このような誘導の定量的効果は、誘導された酵素のバランスに依存するであろう。これらの結果は、CYP1A2 が 4-Aminobiphenyl の主要な代謝的活性化因子ではないか、CYP1A2 の非存在下でもマウスの他の酵素がこの化合物を活性化させていることを示唆している (Tsuneoka ら, 2003 年) 他の芳香族アミンを用いた研究に基づくと、活性化酵素は他にも、P-450 酵素、酸化酵素、またはベルオキシダーゼを含むかもしれない (Lakshmi ら, 1990 年; Smith ら, 1991 年; Hughes ら, 1992 年)。

additional activating enzymes might include other P-450 enzymes, oxidases, or peroxidases (Lakshmi et al., 1990; Smith et al., 1991; Hughes et al., 1992).

Another reaction considered to be important for carcinogenesis induced by 4-aminobiphenyl is acetylation. Acetylation plays several roles in 4-aminobiphenyl carcinogenesis. *O*-Acetylation and *N,O*-acetyltransfer of *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl are expected to increase risk in humans, whereas *N*-acetylation of 4-aminobiphenyl should reduce risk (Lower et al., 1979). Acetylation can be catalysed by NAT1 or NAT2, with the latter exhibiting a marked polymorphism within the population (Hein et al., 2000; Cascorbi et al., 2001). It is predicted that a slow acetylation phenotype will increase the risk of bladder cancer, since acetylation of the parent amine, 4-aminobiphenyl, is considered to be a detoxification process in humans, whereas a rapid acetylation phenotype should be associated with a decreased risk.

However, studies of acetylator phenotype in mice have produced conflicting results. In one study, male and female homozygous rapid acetylator or homozygous slow acetylator mice that were apparently identical in every other respect were administered 4-aminobiphenyl-HCl (55–300 mg/l) in drinking-water for 28 days. The levels of hepatic DNA adducts increased with dose in both sexes, with the levels being higher in females, but were independent of the mouse acetylator phenotype. In the urinary bladder, DNA adducts increased to a plateau at 100 mg/kg in male mice and were again independent of acetylator phenotype. In female mice, the DNA adduct levels were lower than in males and decreased at the highest dose; the DNA adduct levels were higher in the rapid acetylator phenotype, contrary to expectations (Flammang et al., 1992). These results were interpreted as suggesting that acetyltransferase activities are not rate determining for DNA adduct formation in mice. A similar conclusion that there was no correlation between murine *NAT2* alleles and 4-aminobiphenyl–DNA adduct levels was reached by McQueen et al. (2003), using C57BL/6, B6.A, and A/J mouse strains and the transgenic strains hNAT1:A/J and hNAT1:C57, which carry the human *NAT1* transgene. However, the differences in murine *NAT2* activity were modest and probably not sufficient to affect 4-aminobiphenyl genotoxicity. Recent studies suggest that in humans, NAT1, not NAT2, is responsible for the *O*-acetylation of *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl (Oda, 2004).

There are also mouse strain-specific mutations that require explanation. Thus, in B6C3F1, 4-aminobiphenyl induces predominantly C → A mutations (reflecting G → T transversions in the non-coding strand) in *H-ras* codon 61, whereas in CD-1 mice, the predominant mutation in *H-ras* codon 61 was A → T transversion (Manjanatha et al., 1996).

Cell proliferation is also required for neoplasia, but there have been few studies that have investigated cell proliferation at an early stage of the carcinogenic process of 4-aminobiphenyl. It is also notable that in the carcinogenicity experiment described previously (Schieferstein et al., 1985), although urinary bladder carcinomas developed only in males, a high prevalence of hyperplasia was reported in both males and females. Apparently this observation has not been investigated further (discussed below).

In summary, the evidence is strong for the sequence of key events including metabolic activation, DNA adduct formation, and gene mutation as the MOA for 4-aminobiphenyl-induced

4-Aminobiphenyl によって誘導される発がんにおいて重要であると考えられている別の反応は、アセチル化である。アセチル化は 4-Aminobiphenyl の発がんにくつかりの役割を果たしている。*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl の *O*-アセチル化及び *N,O*-アセチル化は、ヒトではリスクを増加させると予想されるが、4-Aminobiphenyl の *N*-アセチル化はリスクを減少させるはずである (Lower ら、1979 年)。アセチル化は、NAT1 または NAT2 によって触媒され、後者は集団内で顕著な多型が存在する (Hein ら、2000 年; Cascorbi ら、2001 年)。親アミンである 4-Aminobiphenyl のアセチル化はヒトでは解毒過程と考えられているため、アセチル化が遅い表現型は膀胱がんのリスクを増加させると予測されている。それゆえ、アセチル化が速い表現型はリスクの減少と関連しているはずである。

しかし、マウスの acetylator の表現型の研究では、相反する結果が得られている。ある研究では、他のすべての点で明らかに同一であると思われるホモ接合性の rapid acetylator マウスまたはホモ接合性の slow acetylator マウスの雄雌に、4-Aminobiphenyl 塩酸 (55-300 mg/L) を 28 日間飲水投与した。肝 DNA 付加体のレベルは雌雄ともに投与量の増加とともに増加したが、acetylator の表現型とは無関係であった。膀胱では、DNA 付加体は雄マウスでは 100 mg/kg でプラトーに到達し、acetylator の表現型とは無関係であった。雌マウスでは、DNA 付加体量は雄マウスよりも低く、最高用量で減少したが、予想に反して rapid acetylator 表現型では DNA 付加体量が高かった (Flammang ら、1992 年)。これらの結果は、アセチルトランスフェラーゼ活性がマウスの DNA 付加体形成の速度を決定するものではないことを示唆していると解釈された。McQueen ら (2003 年) の研究では、C57BL/6、B6.A 及び A/J マウス株と、ヒト NAT1 トランス遺伝子を持つトランスジェニックマウス hNAT1:A/J 及び hNAT1:C57 を用いて、マウス NAT2 対立遺伝子と 4-Aminobiphenyl-DNA 付加体量との間には相関関係がないという同様の結論に達した。しかし、マウスの NAT2 活性の違いは軽微であり、おそらく 4-Aminobiphenyl の遺伝毒性に影響を与えるには十分ではなかった。最近の研究では、ヒトでは *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl の *O*-アセチル化には NAT2 ではなく NAT1 が関与していることが示唆されている (Oda, 2004 年)。

また、説明が必要なマウスの系統特異的突然変異もある。例えば、B6C3F1 では、4-Aminobiphenyl は、*H-ras* 遺伝子のコドン 61 において主に C→A 突然変異 (非コード鎖の G→T トランスバージョンを反映) を誘発するのに対し、CD-1 マウスでは、*H-ras* 遺伝子コドン 61 における主な突然変異は A→T トランスバージョンであった (Manjanatha ら、1996 年)。

腫瘍の発生には細胞増殖も必要であるが、4-Aminobiphenyl の発がん過程の初期段階での細胞増殖を調べた研究は少ない。また、先に述べた発がん性試験 (Schieferstein ら、1985 年) では、膀胱がんの発生は雄のみであったが、過形成の発生率は雌雄ともに高いことが報告されている。しかしこのことについてはそれ以上調査されていない (後述)。

要約すると、4-Aminobiphenyl 誘発性膀胱がんの MOA は、代謝的活性化、DNA 付加体形成、遺伝子突然変異を含む一連の key events が関与していることが明らかになった。

urinary bladder carcinogenesis. It is further strengthened by data from studies with structurally related aromatic amines. However, data gaps remain concerning details of the specific enzymes involved, the basis for differing organ specificity between species and details regarding potency, and the shape of the dose–response curve in humans. This is, perhaps, not unexpected in view of the complexity of the relevant competing metabolic pathways. While available data are considered sufficient to support the hypothesized MOA, the impact of these uncertainties needs to be considered quantitatively in the overall assessment (Table 3).

Table 3. Modulating factors affecting 4-aminobiphenyl urinary bladder carcinogenesis.

1.	Competing activities of esterification enzymes
2.	Genetic polymorphisms affecting enzymatic activation or inactivation (e.g. slow and fast acetylators)
3.	Urinary pH (mainly affected by diet) and possibly other urinary constituents
4.	Urothelial cell proliferation (induced by high doses of 4-aminobiphenyl or by co-administration with some other agent affecting urothelial proliferation)

CAN HUMAN RELEVANCE OF THE MOA BE REASONABLY EXCLUDED ON THE BASIS OF FUNDAMENTAL, QUALITATIVE DIFFERENCES IN KEY EVENTS BETWEEN EXPERIMENTAL ANIMALS AND HUMANS?

There is considerable evidence in humans and human cell systems supporting each of the key events for 4-aminobiphenyl-induced urinary bladder cancer. Metabolic activation to the *N*-hydroxylamine has been demonstrated, with several different enzymes being suggested for activation and several others that might potentiate or reduce the effects of *N*-hydroxylation, such as *N*-acetylation. Genetic polymorphisms significantly affect activities of these enzymes, producing variations in the population that can affect susceptibility to the urinary bladder carcinogenesis response to 4-aminobiphenyl exposures. DNA adducts identical to those detected in DNA from mice and dogs have been identified in human urothelial cells, and consequently they have a similar mutagenic potential. Furthermore, extensive epidemiological evidence demonstrates the urinary bladder carcinogenicity of 4-aminobiphenyl in humans.

Bladder cancer is associated with smoking and occupational exposures to 4-aminobiphenyl. 4-Aminobiphenyl was manufactured in the United States of America from 1935 to 1955 (Melick et al., 1955) and was used as a highly efficient rubber antioxidant, but it is apparently no longer commercially produced. In epidemiological studies, which were confined to one series of workers occupationally exposed to commercial 4-aminobiphenyl, a high incidence of bladder carcinomas was reported (Melick et al., 1955, 1971; Melamed et al., 1960; Koss et al., 1965, 1969). Among 503 workers, 59 cases with positive cytology were identified, among which 35 cases of carcinoma of the urinary bladder were histologically verified; 7 remained cytologically positive at the time of publication, while 7 died from other causes and 10 were lost to follow-up (Koss et al., 1969). In addition to cigarette smoke, there also appear to be other, ill-defined environmental sources of exposure, possibly from other sources of combustion of substances containing carbon and nitrogen (Skipper et al., 2003). Cigarette

このことは、構造的に関連のある芳香族アミンを用いた研究によってさらに強化されている。しかし、関与する特定の酵素の詳細、種間での臓器特異性の違いの根拠や効力の詳細、ヒトにおける用量反応曲線の形状については、データギャップが残っている。これは、競合する代謝経路の複雑さを考えれば、想定内である。利用可能なデータは仮説 MOA を支持するのに十分であると考えられるが、これらの不確実性の影響については総合的な定量的評価を考慮する必要がある(表 3)。

表 3. 4-Aminobiphenyl 膀胱発がん性に影響を与える調節因子

1	エステル化酵素の競合的活性
2	酵素の活性化または不活性化に影響を与える遺伝的多型 (例: slow acetylator 及び rapid acetylator)
3	尿の pH (主に食事の影響を受ける) と他の尿成分
4	尿路粘膜細胞増殖 (4-アミノビフェニルの高用量投与、または尿路粘膜増殖に影響を与える他の薬剤との併用投与により誘導される)

実験動物とヒトとの間の key events の根本的、質的な違いに基づいて、MOA のヒトとの関連性を合理的に排除することができるか

4-Aminobiphenyl 誘発性膀胱がんの key events それぞれを支持するヒト及びヒトの細胞系における有力なエビデンスがある。*N*-hydroxylamine への代謝的活性化が実証されており、活性化のためにいくつかの酵素が示されているほか、*N*-アセチル化など *N*-ヒドロキシル化の効果を増強または減少させる可能性のある他の酵素も示唆されている。遺伝的多型はこれらの酵素活性に大きく影響し、4-Aminobiphenyl ばく露に対する膀胱がんの感受性に影響する変異を生じさせる。マウスやイヌの DNA から検出されたものと同一の DNA 付加体がヒトの尿路上皮細胞で確認されており、同様の変異原性を有することが明らかになった。さらに、広範な疫学的研究から、4-Aminobiphenyl のヒトにおける膀胱発がん性が証明されている。

膀胱がんは、喫煙や職業的ばく露といった 4-Aminobiphenyl の摂取と関連している。4-Aminobiphenyl は、1935 年から 1955 年まで米国で製造され (Melick ら、1955 年)、効率のいいゴム酸化防止剤として使用されていたが、現在では商業的には生産されていない。市販の 4-Aminobiphenyl に職業的にばく露された労働者の 1 系列に限定した疫学研究では、膀胱がんの発生率が高いことが報告されている (Melick ら、1955 年、1971 年; Melamed ら、1960 年; Koss ら、1965 年、1969 年)。503 人の労働者のうち、細胞診において 59 例が陽性、そのうち 35 例は組織学的に膀胱がんが確認された; 公表時、7 例は細胞診において陽性のまま、7 例は他の原因で死亡し、10 例は追跡調査できていない (Koss ら、1969 年)。たばこの煙に加えて、炭素及び窒素を含む物質の燃焼で生じるものへのばく露や不明確な環境中の物質もあるようである (Skipper ら、2003 年)。

smoking accounts for between 40% and 70% of the bladder cancer cases in the United States and Europe (IARC, 1986; Castelao et al., 2001). Black (air-cured) tobacco is a greater source of 4-aminobiphenyl than is blonde (flue-cured) tobacco (Bryant et al., 1988).

The key events demonstrated for 4-aminobiphenyl bladder carcinogenesis in mice and dogs have also been specifically evaluated for 4-aminobiphenyl in humans, primarily in individuals exposed to 4-aminobiphenyl in cigarette smoke, but also utilizing in vitro methods with human urothelial cells (see Table 4).

Table 4. Concordance evaluation of key events of 4-aminobiphenyl-induced urinary bladder carcinogenesis between species.

Key event	Mouse	Dog	Human
1. Metabolic activation to reactive electrophile	+	+	+
2. DNA adduct formation	+	+	+
3. Mutagenesis	+	+	+
4. Carcinoma	+	+	+

Absorbed 4-aminobiphenyl is *N*-oxidized in the liver by CYP1A2, which, in spite of its rather high homology with CYP1A1, has an essentially different substrate specificity and is found only in liver (Lang & Pelkonen, 1999). Other enzymes have been suggested to be capable of supporting metabolic activation to the *N*-hydroxylamine.

NAT1 and NAT2 each catalyse three types of acetylation: the *N*-acetylation of arylamines, the *O*-acetylation of *N*-hydroxylamines, and the *N,O*-acetyltransfer of arylhydroxamic acids (Flammang & Kadlubar, 1986; Mattano et al., 1989; Fretland et al., 1997; Hein et al., 2000). It is believed that *N*-acetylation by *N*-acetyltransferases has a protective effect regarding bladder carcinogenicity, primarily because the acetamide of 4-aminobiphenyl formed is significantly less potent as a substrate for *N*-hydroxylation compared with the amine. Two genes, *NAT1* and *NAT2*, code for the NAT isoforms, and allelic variation has been associated with susceptibility to urinary bladder cancer in humans (Hein et al., 2000). Most studies suggest that NAT2 slow acetylators are at increased risk of developing bladder cancer, whereas the contribution of the *NAT1* genotype to aromatic amine bladder carcinogenesis is less clear (Cartwright et al., 1982; Hein et al., 2000). Among smokers, there is a higher level of 4-aminobiphenyl-haemoglobin adducts associated with the slow acetylator phenotype (Vineis et al., 1990). Interactions of *NAT1* and *NAT2* have been suggested (Cascorbi et al., 2001). In a study of 425 German bladder cancer patients, Cascorbi et al. (2001) found that there is (1) a partial linkage of the *NAT1**10 genotype to the *NAT2**4 genotype, (2) a clear underrepresentation of *NAT1**10 genotypes among rapid *NAT2* genotypes in the cases studied, and (3) a gene-gene-environment interaction in that *NAT2**slow/*NAT1**4 genotype combinations with a history of occupational exposure were 5.96 (2.96–12.0) times more frequent in cancer cases than in controls without a risk from occupation ($P < 0.0001$). Hence, the data suggest that individuals with *NAT2**4 and *NAT1**10 are at a significantly lower risk for bladder cancer, particularly when exposed to environmental risk factors.

喫煙が原因とされているものは、米国とヨーロッパにおける膀胱がんの症例の 40%から 70%を占めている (IARC, 1986 年; Castelao ら, 2001 年)。黒タバコ (自然乾燥) は、ブロードタバコ (熱風乾燥) に比べて 4-Aminobiphenyl をより多く含んでいる (Bryant ら, 1988 年)。

4-Aminobiphenyl の膀胱発がんにおけるマウスやイスで示された key events は、主にタバコの煙中の 4-Aminobiphenyl にばく露されたヒトを対象に評価されているが、ヒトの尿路上皮細胞を用いた in vitro 評価法も利用されている (表 4 を参照)。

表 4. 4-Aminobiphenyl による尿路膀胱発がんの key events の種間一貫性評価

key events	マウス	イス	ヒト
1. 反応性親電子物質への代謝的活性化	+	+	+
2. DNA 付加体の形成	+	+	+
3. 変異原性	+	+	+
4. 発がん	+	+	+

吸収された 4-Aminobiphenyl は、CYP1A2 によって肝臓で *N*-酸化される。CYP1A2 は CYP1A1 との相同性が高いにもかかわらず、異なる基質特異性を有しており、肝臓でのみ見出される (Lang & Pelkonen, 1999)。他の酵素は、*N*-hydroxylamine への代謝的活性化をサポートする。

NAT1 及び *NAT2* はそれぞれ、3 種類のアセチル化を触媒する。すなわち、アリルアミンの *N*-アセチル化、*N*-hydroxylamine の *O*-アセチル化及びアリルヒドロキサム酸の *N, O*-アセチル化である (Flammang & Kadlubar, 1986 年; Mattano ら, 1989 年; Fretland ら, 1997 年; Hein ら, 2000 年)。*N*-アセチルトランスフェラーゼによる *N*-アセチル化は、主に、形成された 4-Aminobiphenyl のアセトアミドがアミンに比べて *N*-ヒドロキシル化の基質として小さいために、膀胱発がん性に対して保護効果を有すると考えられている。NAT アイソフォームをコードする 2 つの遺伝子には、*NAT1* と *NAT2* があり、対立遺伝子の変異はヒトにおける膀胱がんの感受性と関連している (Hein ら, 2000 年)。ほとんどの研究は、*NAT2* の slow acetylator が膀胱発がんのリスク増加を示唆しているが、芳香族アミン膀胱発がんに対する *NAT1* 遺伝子型の寄与は明らかではない (Cartwright ら, 1982 年; Hein ら, 2000 年)。喫煙者の間では、slow acetylator の発現に関連する 4-Aminobiphenyl-ヘモグロビン付加体がより多く存在する (Vineis ら, 1990 年)。また、*NAT1* と *NAT2* の相互作用が示唆されている (Cascorbi ら, 2001 年)。ドイツの膀胱がん患者 425 人を対象とした研究で、Cascorbi ら (2001 年) は、以下のことを明らかにした。(1) *NAT1**10 遺伝子型の *NAT2**4 遺伝子型への部分的な連鎖 (2) 調査した症例中の rapid *NAT2* 遺伝子型を有するヒトにおける、*NAT1**10 遺伝子型の発現量の低さ (3) 職業ばく露歴と *NAT2**slow/*NAT1**4 遺伝子型の組み合わせは、職業ばく露によるリスクのない対照群に比べて、がん症例は 5.96 倍 (2.96-12.0) の頻度であった ($P < 0.0001$)。

Polymorphisms in *CYP1A2* (Oscarson et al., n.d.) and *NAT2* (Hein et al., 2000) genes are associated with variations in the activities of these enzymes in human populations, although the extent to which variation in CYP1A2 activity is due to genetic factors has yet to be determined (Sachse et al., 2003). Moreover, expression of the *CYP1A2* gene is induced in cigarette smokers, leading to even higher CYP1A2 enzyme activities (Sesardic et al., 1988; Eaton et al., 1995). An individual exposed to 4-aminobiphenyl and expressing high levels of CYP1A2 and slow NAT2 activity would be expected to have increased levels of *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl and, therefore, higher levels of 4-aminobiphenyl-haemoglobin adducts and 4-aminobiphenyl-DNA adducts in liver and urinary bladder than an individual expressing low levels of CYP1A2 and rapid NAT2 activity.

The tumour suppressor genes *RB1* and *TP53* appear to be involved in bladder cancer, especially high-grade urothelial carcinomas rather than low-grade papillary tumours. Both genes are involved in the regulation of the cell cycle. In addition, *TP53* plays a role in response to DNA damage, cell death, and neovascularization (Hickman et al., 2002), and its gene product regulates the expression of multiple genes (Vousden & Lu, 2002). A strong association has been found between *RB1* inactivation and muscle invasion (Cairns et al., 1991; Ishikawa et al., 1991; Presti et al., 1991; Primdahl et al., 2000). In one study of 45 bladder cancers, seven of nine *TP53* mutations occurred in grade 3 tumours (i.e. invasion includes perivesicular tissue) (Martone et al., 1998). Inactivation of *RB1* occurs in 30–80% of muscle-invasive bladder cancers (Cairns et al., 1991; Logothetis et al., 1992; Wright et al., 1995; Ioachim et al., 2000), most frequently as a consequence of heterozygous 13q deletions in combination with mutation of the remaining allele (Cordon-Cardo & Reuter, 1997). In studies investigating at least 30 tumours, *TP53* mutations occurred in 40–60% of invasive bladder cancers (Tiguert et al., 2001; Lu et al., 2002). Although no specific mutational hot-spots were identified, more than 90% of the mutations occurred in exons 4–9. In a study of the binding spectrum of *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl in DNA fragments containing exons 5, 7, and 8 of *TP53*, preferential binding was identified at codon 285, a non-CpG site, and at codons 175 and 248, which are CpG sites, but only after C5 cytosine methylation had occurred (Feng et al., 2002). The authors concluded that the mutational spectrum in *TP53* in bladder cancer strongly suggests a role of 4-aminobiphenyl in the etiology of this neoplasm.

Exposure to tobacco smoke, an environmental source of 4-aminobiphenyl, is associated with increased levels of 4-aminobiphenyl-haemoglobin adducts, in both adults and fetuses. In a study of smoking ($n = 14$) and non-smoking ($n = 38$) women, 4-aminobiphenyl-haemoglobin levels were 183 ± 108 pg/g haemoglobin in smokers and 22 ± 8 pg/g haemoglobin in non-smokers, whereas the levels in their respective fetuses were 92 ± 54 pg/g haemoglobin and 17 ± 13 pg/g haemoglobin (Coghlin et al., 1991), a difference that has also been observed in adults in studies of tumour tissue DNA (Curigliano et al., 1996). Haemoglobin adduct levels (used as a surrogate for exposure levels and indicator for DNA adduct potential) have been associated with levels of exposure to tobacco as a source of 4-aminobiphenyl (black tobacco > blonde tobacco > non-smokers) in a male study population from Turin, Italy; the risk of bladder cancer followed the same pattern (Bryant et al., 1988). There is a substantial gap in information linking the presence of adducts, primarily an indication of exposure, and the emergence of cancer.

したがって、特に環境リスク因子にばく露される場合、*NAT2**4 及び *NAT1**10 を有する個体は、膀胱がんのリスクが有意に低いことが示唆される。

CYP1A2 (Oscarson ら, n.d.) 及び *NAT2* (Hein ら, 2000 年) 遺伝子の多型は、ヒト集団におけるこれらの酵素活性の変動と関連しているが、CYP1A2 活性の変動が遺伝的要因によるものであるかはまだ明らかになっていない (Sachse ら, 2003 年)。さらに、喫煙者に誘導される *CYP1A2* 遺伝子の発現は、CYP1A2 酵素活性を高める (Sesardic ら, 1988 ; Eaton ら, 1995 年)。4-Aminobiphenyl にばく露され、CYP1A2 と高い *slow NAT2* 活性を発現する個体は、CYP1A2 と低い *rapid NAT2* 活性を発現する個体よりも、*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl のレベルが高い。したがって、肝臓と膀胱における 4-Aminobiphenyl -ヘモグロビン付加体と 4-Aminobiphenyl-DNA 付加体の高いレベルを有することが予測される。

腫瘍抑制遺伝子 *RB1* 及び *TP53* は、膀胱がん、特に低悪性度の乳頭腫瘍よりも高悪性度の尿路上皮がんに関与しているようである。両遺伝子は細胞周期の調節に関与している。さらに、*TP53* は、DNA 損傷、細胞死及び血管新生の役割を果たし (Hickman ら, 2002 年)、その遺伝子産物は、複数の遺伝子の発現を調節する (Vousden & Lu, 2002 年)。*RB1* の不活性化と筋肉内への浸潤に強い関連が見出されている (Cairns ら, 1991 年 ; Ishikawa ら, 1991 年 ; Presti ら, 1991 年 ; Primdahl ら, 2000 年)。45 例の膀胱がんを対象とした研究では、*TP53* 変異を有する 9 人のうち 7 人がグレード 3 の腫瘍 (周囲組織への浸潤を含む) であった (Martone ら, 1998 年)。*RB1* の不活性化は、筋肉内浸潤性膀胱がんの 30–80% で発生し (Cairns ら, 1991 年 ; Logothetis ら, 1992 年 ; Wright ら, 1995 年 ; Ioachim ら, 2000 年)、多くの場合、ヘテロ接合性 13q 欠失と残りの対立遺伝子の突然変異の結果発生する (Cordon-Cardo & Reuter, 1997 年)。少なくとも 30 の腫瘍を調査した研究では、浸潤性膀胱がんの 40–60% で *TP53* 突然変異が認められた (Tiguert ら, 2001 年 ; Lu ら, 2002 年)。特定変異のホットスポットは確認されなかったが、変異の 90% 以上はエクソン 4-9 に発生していた。*TP53* のエクソン 5, 7 及び 8 を含む DNA 断片における *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl の結合スペクトルの研究では、非 CpG 部位である 285 コドン及び CpG 部位である 175 及び 248 コドンに優先的に結合することが確認されたが、C5 シトシンメチル化が起こった後のみ確認された (Feng ら, 2002 年)。著者らは、膀胱がんにおける *TP53* の変異スペクトルが、この腫瘍の原因である 4-Aminobiphenyl の役割を強く示唆していると結論づけた。

4-Aminobiphenyl の環境中ばく露の源であるタバコの煙へのばく露は、成人と胎児の両方で、4-Aminobiphenyl-ヘモグロビン付加体量の増加と関連している。喫煙者 ($n=14$) と非喫煙者 ($n=38$) の女性の研究では、4-Aminobiphenyl-ヘモグロビンレベルは、喫煙者では 183 ± 108 pg/g ヘモグロビン、非喫煙者では 22 ± 8 pg/g ヘモグロビンであったのに対し、それぞれの胎児のレベルは 92 ± 54 pg/g ヘモグロビンと 17 ± 13 pg/g ヘモグロビン (Coghlin ら, 1991 年) であった。この差は、腫瘍組織 DNA の研究において成人でも観察されている (Curigliano ら, 1996 年)。イタリア、トリノの男性における研究では、ヘモグロビン付加体量 (ばく露量の代用として、また DNA 付加体の可能性の指標として使用される) は、4-Aminobiphenyl の供給源であるタバコへのばく露量と関連しており (黒タバコ > 膀胱がんのリスクでも同様の傾向がみられた (Bryant ら, 1988 年)。主にばく露の指標である付加体の存在とがん発生とを結びつける情報には大きなギャップがある。

In humans, 4-aminobiphenyl has been associated only with urinary bladder cancer, whereas in mice, liver and urinary bladder tumours are induced. Although the specific reasons for these species differences in organ specificity are not known, they appear to be due to variations in competing *N*-esterification enzymatic activations. Sulfation appears to be primarily associated with liver carcinogenesis by aromatic amines, whereas *N*-glucuronidation appears to be more associated with bladder carcinogenesis. Acetylation has mixed effects, but in humans appears to be principally a detoxification process that can be influenced significantly by *N*-acetyltransferase polymorphisms that result in fast versus slow acetylation. Human tissues have been studied for their possible involvement in the metabolism of 4-aminobiphenyl and its metabolites. CYP1A2 is responsible for the metabolism of 4-aminobiphenyl to *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl by human hepatic microsomal fraction (Butler et al., 1989b). *N*-Hydroxy-4-aminobiphenyl can be metabolized to a product that binds covalently to calf thymus DNA by cytosolic sulfotransferases from human liver and, to a lesser extent, colon, but not from pancreas or urinary bladder. In view of this lack of sulfotransferase activity in bladder, it has been suggested that hepatic sulfotransferase may actually decrease the bioavailability of *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl in extrahepatic tissues and serve as a detoxification mechanism for the urinary bladder (Chou et al., 1995). On the other hand, *N*-acetyltransferases that are present in human urothelial cells (Frederickson et al., 1992; Swaminathan & Reznikoff, 1992) can metabolize *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl, as well as the acetylated compounds *N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl and *N*-acetoxy-4-acetylaminobiphenyl, to a DNA-reactive material. The major adduct co-chromatographs with *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl. ³²P-postlabelling analysis of the DNA from cytosol-mediated binding of *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl revealed four radioactive spots. Five adducts were found when intact human urothelial cells were used, two of which were the same as two found using cytosol. This suggests the possibility of an activation pathway or pathways in addition to acetylation.

Experiments similar to those performed with dog tissues have shown that human urothelial cell microsomes possess transacetylation activity, so that *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl binding to RNA and DNA occurs in the presence of 4-acetylaminobiphenyl, *N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl, or acetylCoA as acetyl donors (Hatcher et al., 1993). These authors also found that ³²P-postlabelling of DNA adducts formed after reaction with *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl, *N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl, and *N*-acetoxy-4-aminobiphenyl showed similar profiles, suggesting that the arylnitrenium ion, arising from *N*-acetoxy-4-aminobiphenyl, might be the common reactive species. The structures of the adducts have been identified as the 3',5'-bisphospho derivatives of *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl (dG-C8-aminobiphenyl), *N*-(deoxyadenosin-8-yl)-4-aminobiphenyl (dA-C8-aminobiphenyl) (Frederickson et al., 1992; Hatcher & Swaminathan, 1995), and *N*-(deoxyguanosin-*N*(2)-yl)-4-azobiphenyl (Hatcher & Swaminathan, 2002).

The results available comparing tobacco smokers with non-smokers support the relevance to humans of the hypothesized MOA. In a study of 46 T1 bladder cancer cases, mean relative staining intensity for 4-aminobiphenyl-DNA adducts was significantly higher in current smokers (275 ± 81 , $n = 24$) than in non-smokers (113 ± 71 , $n = 22$) (Curigliano et al., 1996). Similar results have been reported for laryngeal tissue (Flamini et al., 1998) and for mammary tissue (Faraglia et al., 2003). Using 4-aminobiphenyl-haemoglobin adducts as an

ヒトでは、4-Aminobiphenylは膀胱がんとのみ関連しているが、マウスでは肝臓と膀胱の腫瘍が誘発されている。臓器特異性におけるこれらの種差の具体的な理由は明らかにされていないが、競合する *N*-エステル化酵素の活性化の違いによるものと考えられる。硫酸化は芳香族アミンによる肝臓と密接に関連しているようだが、*N*-グルクロン酸化は膀胱がんに関連しているようである。アセチル化には様々な効果があるが、ヒトでは主に解毒プロセスであり、アセチル化が速いか遅いかを決定する *N*-アセチルトランスフェラーゼの型に大きく影響される。ヒトの組織が、4-Aminobiphenyl とその代謝物の代謝に関与しているかについて研究されてきた。CYP1A2 は、ヒト肝ミクロソーム分画による 4-aminobiphenyl から *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl への代謝に関与している (Butler ら、1989 年 b)。 *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl は、ヒト肝臓及びそれより程度は低い、結腸由来の細胞質性スルホトランスフェラーゼによって、牛胸腺 DNA と共有結合する生成物に代謝されるが、脾臓や膀胱由来のものによっては代謝されない。膀胱でのスルホトランスフェラーゼ活性の欠如を考慮すると、肝スルホトランスフェラーゼは肝外組織での *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl の生物学的利用能を低下させ、膀胱の解毒機構として機能する可能性が示唆されている (Chou ら、1995 年)。一方、ヒト尿路上皮細胞に存在する *N*-アセチルトランスフェラーゼ (Frederickson ら、1992 ; Swaminathan & Reznikoff, 1992 年) は、*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl 及びそのアセチル化合物 *N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl 及び *N*-アセトキシ-4-アセチルアミノビフェニルを DNA 反応性物質に代謝することができる。 *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl と主要な付加体はクロマトグラフされ、*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl のサイトゾル媒介結合で得た DNA を用いた ³²P-ポストラベリング法により、4 つの放射性スポットが明らかになった。健康なヒト尿路上皮細胞を用いた場合には 5 つの付加体が認められたが、そのうち 2 つはサイトゾルを用いた場合に認められた 2 つの付加体と同じであった。このことから、アセチル化以外の活性化経路の存在が示唆された。

イヌ組織を用いた実験と同様の実験により、ヒトの尿路上皮細胞ミクロソームがアセチル基転移活性を有していることが示されており、*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl の RNA や DNA への結合は、4-Acetylaminobiphenyl, *N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl, またはアセチル CoA をアセチル基供体とした場合に起こることが示されている (Hatcher ら、1993 年)。また、*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl, *N*-acetoxy-4-acetylaminobiphenyl, *N*-acetoxy-4-aminobiphenyl と反応させて生成した DNA 付加体の ³²P-ポストラベリングは、類似のプロファイルを示し、*N*-acetoxy-4-aminobiphenyl から生じるアリルニトリウムイオンが共通の反応種であることを発見した。この付加体の構造は、*N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl (dG-C8-aminobiphenyl) や *N*-(deoxyadenosin-8-yl)-4-aminobiphenyl (dA-C8-aminobiphenyl) の 3',5'-ビスホスホ誘導体 (Frederickson ら、1992 年 ; Hatcher & Swaminathan, 1995 年) 及び *N*-(deoxyguanosin-*N*(2)-yl)-4-azobiphenyl (Hatcher & Swaminathan, 2002 年) として同定されている。

喫煙者と非喫煙者を比較した結果は、仮説 MOA のヒトへの関連性を支持するものである。T1 膀胱がん 46 例の研究では、4-Aminobiphenyl-DNA 付加体の平均相対染色強度は、非喫煙者 (113 ± 71 , $n=22$) よりも現在の喫煙者 (275 ± 81 , $n=24$) の方が有意に高かった (Curigliano ら、1996 年)。同様の結果が喉頭組織 (Flamini ら、1998 年) 及び乳腺組織 (Faraglia ら、2003 年) についても報告されている。4-Aminobiphenyl-ヘモグロビン付加体をばく露の指標として使用すると、膀胱がん患者は対照者よりも高いレベルであったのに対し (Del Santo ら、1991 年)、肺がん患者はそうではなかった (Weston ら、1991 年)。この違いの根拠は不明である。

indicator of exposure, it was found that bladder carcinoma patients had higher levels than controls (Del Santo et al., 1991), whereas lung cancer patients did not (Weston et al., 1991). The basis for this difference is unknown.

In addition to the evidence of genotoxicity generated with non-human test systems, 4-aminobiphenyl can be metabolized by human urothelial cell microsomal preparations to a mutagen in *S. typhimurium* YG1024 (a derivative of TA98 with elevated *O*-acetyltransferase activity) but not in strain TA98 itself (Hatcher et al., 1993). No other species or other human tissues were examined in this study.

6-Thioguanine-resistant mutants can be induced in a non-tumorigenic, SV40-immortalized human urothelial cell line by exposure to 4-aminobiphenyl itself or exposure to *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl, *N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl, or *N*-acetoxy-4-acetylaminobiphenyl (Bookland et al., 1992a). No exogenous metabolic activation system was required for the observed activity. The lowest effective concentrations to produce a statistically significant increase in the mutant fraction were as follows: *N*-acetoxy-4-acetylaminobiphenyl, 2 µmol/l; *N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl, 5 µmol/l; *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl, 20 µmol/l; and 4-aminobiphenyl, 100 µmol/l. Three of these substances were also tested for tumorigenic transformation using the same human immortalized urothelial cells in an in vitro-in vivo assay in which the end-point was carcinoma development when treated cells were injected subcutaneously into nude mice (Bookland et al., 1992b). Transformation was demonstrated after all treatments, the lowest concentrations being as follows: *N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl, 0.5 µmol/l; *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl, 0.5 µmol/l; and 4-aminobiphenyl, 20 µmol/l. The lower concentrations required for transformation in comparison with those for mutation are noted, but how this should be interpreted is not clear. It is consistent with the transformation being independent of mutation and with the transformation assay having a higher sensitivity, or it could merely reflect a difference in sensitivity of the methods.

In summary, on a qualitative basis, the key events in the MOA are the same in mice, dogs, and humans: metabolic activation to the *N*-hydroxylamine with subsequent formation of a reactive electrophile (presumably the nitrenium ion), formation of guanine adducts, gene mutation, and the ultimate formation of cancer. The intervening events between gene mutation and cancer, such as which genes are mutated and how cancer is induced, are not known. The MOA, nevertheless, has been clearly demonstrated and is the same in the animal models and in humans.

CAN HUMAN RELEVANCE OF THE MOA BE REASONABLY EXCLUDED ON THE BASIS OF QUANTITATIVE DIFFERENCES IN EITHER KINETIC OR DYNAMIC FACTORS BETWEEN EXPERIMENTAL ANIMALS AND HUMANS?

As described in detail above, the metabolic activation, DNA adducts, and mutagenicity of 4-aminobiphenyl are qualitatively the same in mice, dogs, and humans, leading to the induction of urothelial tumours of the urinary bladder in these three species and other tumours in mice, rats, and rabbits. Although detailed aspects of absorption, distribution, and excretion have not been reported, similarity in the levels of DNA adduct formation in the urothelium occurring in mice, dogs, and humans suggests that kinetic differences are not significant between these

ヒト以外の試験系で得られた遺伝毒性のエビデンスに加えて、4-Aminobiphenyl は、ヒト尿路上皮細胞のミクロソーム調製物によって、*S. typhimurium* YG1024 (*O*-アセチルトランスフェラーゼ活性の高い TA98 の派生株) の変異原性物質に代謝されることがあるが、TA98 株自体では代謝されない (Hatcher ら、1993 年)。この研究では、他の種または他のヒト組織は調べられていない。

6-チオグアニン耐性変異体は、4-Aminobiphenyl 自体へのばく露、または *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl、*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl、*N*-acetoxy-4-acetylaminobiphenyl へのばく露によって、非腫瘍性 SV40 不死化ヒト尿路上皮細胞株で誘導することができる (Bookland ら、1992 年 a)。観察された活性には、外因性代謝の活性化経路は必要とされなかった。変異体分画の統計的に有意な増加をもたらすための最小濃度は以下の通りであった。*N*-acetoxy-4-acetylaminobiphenyl、2 µmol/L；*N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl、5 µmol/L；*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl、20 µmol/L；及び 4-Aminobiphenyl、100 µmol/L。また、これらの物質のうちの 3 つは処理した細胞をヌードマウスに皮下注射したときの発がんをエンドポイントとした in vitro-in vivo アッセイにおいて、同じヒト不死化尿路上皮細胞を使用した腫瘍性形質転換についても検討が実施された (Bookland ら、1992 年 b)。形質転換はすべての試験で示されたが、最小濃度は以下の通りであった。*N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl、0.5 µmol/L；*N*-hydroxy-4-aminobiphenyl、0.5 µmol/L；及び 4-Aminobiphenyl、20 µmol/L。突然変異と比較して形質転換に必要な濃度の方が低いことが指摘されているが、これをどのように解釈すべきかは明らかではない。それは、形質転換が突然変異に依存せず、形質転換アッセイがより高い感度を有しているか、または単に方法の感度の違いを反映している可能性がある。

要約すると、マウス、イヌ、ヒトにおいて、MOA の key events は定性的には同じである：*N*-hydroxylamine への代謝的活性化とそれに続く反応性親電子物質 (おそらくニトレンウムイオン) の形成、グアニン付加体の形成、遺伝子突然変異及びがんの形成である。どの遺伝子に変異し、どのようにしてがんが誘発されるのかなど、遺伝子変異とがんとの間に介在する事象は明らかにされていない。それにもかかわらず、MOA は明確に示されており、動物モデルでもヒトでも同じである。

実験動物とヒトとの間の動態的または薬力学的要因のいずれかの量的差異に基づいて、MOA のヒトへの関連性を合理的に排除することができるか

以上詳述したように、4-Aminobiphenyl の代謝的活性化、DNA 付加体、変異原性は、マウス、イヌ、ヒトでは定性的に同じであり、これら 3 種では膀胱腫瘍を誘発し、マウス、ラット、ウサギではその他の腫瘍を誘発する。吸収、分布、排泄に関する詳細は報告されていないが、マウス、イヌ、ヒトで発生する尿路上皮における DNA 付加体形成量が類似していることから、3 種の間では速度論的な差異は有意ではないことが示唆されている。

three species. Although similar enzymatic processes occur in the three species, quantitative differences are evident. These differences may explain some of the variations seen in target organ specificity among the species and might suggest possible quantitative differences in generation of the DNA adducts. Nevertheless, these differences do not negate the overall MOA for any of the species or the different target organs and are consistent with the complexity of the competing pathways for metabolic activation and deactivation.

Presumably there is a potential for repair of the different adducts, and quantitative differences might exist among species and even among tissues. However, the detection of relatively high numbers of adducts in all three species indicates that significant numbers of stable adducts are produced.

The target tissue common among mice, dogs, and humans, the urinary bladder urothelium, is similar morphologically (Pauli et al., 1983). The urothelium has a characteristic asymmetric unit membrane at the luminal surface that provides a major part of the barrier function to urine. It is composed of urothelium-specific proteins, the uroplakins, the sequence of which is highly conserved among species (Wu et al., 1994). In addition, the urothelium is metabolically active in all three species.

Modulating urinary factors have also been identified that can quantitatively affect the ultimate formation of urothelial DNA adducts, such as pH and frequency of urination (Cohen, 1995; Sarkar et al., 2002). Although the range of pH varies among species, the pH in mice, dogs, and humans readily reaches acidic and alkaline levels as well as neutral. Again, although quantitative differences occur, these do not preclude the existence of this MOA in humans.

There is no evidence implicating another MOA besides DNA reactivity. However, significant quantitative differences exist between species with regard to apparent potency of 4-aminobiphenyl with respect to urinary bladder carcinogenesis. It is clear, however, that metabolites of 4-aminobiphenyl interact with proteins (e.g. haemoglobin) as well as with DNA and that metabolites of 4-aminobiphenyl are cytotoxic (Schieferstein et al., 1985; Reznikoff et al., 1986; Kadlubar et al., 1991). Interaction with urothelial cellular proteins might be responsible for the cytotoxicity and regenerative proliferation seen in the mouse bladder at higher doses of 4-aminobiphenyl. The interaction of DNA reactivity and consequent mutagenicity and cell proliferation provide an explanation for the sigmoidal shape of the dose-response curve for tumours despite a linear dose-response for DNA adducts (Cohen & Ellwein, 1990). The high concentrations of 4-aminobiphenyl found in the urine of mice that can produce urothelial cytotoxicity are generally not attained in humans exposed to cigarette smoke. However, other (unknown) substances appear to produce urothelial hyperplasia in cigarette smokers (Auerbach & Garfinkel, 1989). This increased cell proliferation significantly potentiates the effects of 4-aminobiphenyl on the bladder, providing a significantly greater number of DNA-replicating cell targets on which to act in comparison with the small number present in the normal, slowly replicating urothelium. Thus, the apparent greater potency of 4-aminobiphenyl in humans compared with mice is unlikely, but represents the synergy of DNA reactivity and cell proliferation produced by a single substance, 4-aminobiphenyl, in mice, but by different substances in the complex mixture of cigarette smoke.

3種の酵素の過程は類似しているが、量的な違いは明らかである。これらの違いは、種間で見られる標的臓器の特異性の違いの一部を説明し、DNA付加体の生成における定量的な違いを示唆している可能性がある。それにもかかわらず、これらの違いは、どの種でも、あるいは異なる標的臓器でも、全体的なMOAを否定するものではなく、代謝的活性化と不活性化のための競合する経路の複雑さと一致している。

おそらく、異なる付加体の修復能や種間、組織間における量的な違いが存在するだろう。しかし、3種すべてで比較的多くの付加体が検出されたことから、かなり多くの安定的な付加体が産生されていることがわかる。

マウス、イヌ、ヒトに共通する標的組織である膀胱の尿路上皮は、形態学的に類似している (Pauli ら, 1983 年)。尿路上皮は、腔内表面の尿に対するバリア機能の大部分を担う特徴的な非対称性単位膜を有している。尿路上皮は、尿路上皮特異的タンパク質であるウロプラキンから構成されており、その配列は種間で高度に保存されている (Wu ら, 1994 年)。さらに、尿路上皮は、3種すべての種において代謝的に活性化している。

また、尿 pH や排尿頻度など、尿路上皮 DNA 付加体の最終的な産生量に影響を与える因子も同定されている (Cohen ら, 1995 年; Sarkar ら, 2002 年)。pH の範囲は種によって異なるが、マウス、イヌ及びヒトの尿 pH は、容易に酸性及びアルカリ性、また中性に変動する。繰り返しになるが、量的な違いは生じるものの、これらはヒトにおける MOA の存在を排除するものではない。

DNA 反応性以外の MOA を示唆するエビデンスはない。しかし、4-Aminobiphenyl の膀胱発がんに対する見かけの影響に関しては、種間で量的な差が存在する。4-Aminobiphenyl の代謝物は DNA と同様にタンパク質 (ヘモグロビンなど) と相互作用し、4-Aminobiphenyl の代謝物は細胞毒性を有することが明らかになっている (Schieferstein ら, 1985 年; Reznikoff ら, 1986 年; Kadlubar ら, 1991 年)。4-Aminobiphenyl の高用量投与によるマウス膀胱の細胞毒性と再生性増殖には、尿路上皮細胞タンパク質との相互作用が関与している可能性がある。DNA の反応性と、相反する変異原性と細胞増殖の相互作用は、DNA 付加体の用量反応が直線的であるにもかかわらず、腫瘍の用量反応曲線がシグモイド型であることを説明している (Cohen & Ellwein, 1990 年)。尿路上皮細胞毒性を生じる可能性があるマウスの尿中に見られる高濃度の 4-Aminobiphenyl は、一般的に受動喫煙者では達成されていない。しかし、他の (未知の) 物質は、喫煙者 (Auerbach & Garfinkel, 1989 年) で尿路上皮の過形成を生成するように見える。この細胞増殖の増加は、標的となる DNA 複製細胞の数を大幅に増やし、正常にゆっくりと複製する少数の尿路上皮と比較して、膀胱に対する 4-Aminobiphenyl の影響を大幅に増強する。このように、マウスと比較してヒトの方が 4-Aminobiphenyl の明らかに大きな効力は考えにくい。しかし、マウスでは 4-Aminobiphenyl 単一の物質による DNA 反応性と細胞増殖の相乗効果がタバコの煙の複雑な混合物中の様々な物質によって引き起こることが示されている。

Occupational exposure to 4-aminobiphenyl presumably resulted in greater doses of 4-aminobiphenyl than did exposure to cigarette smoke, since the incidence of bladder cancer in such populations was considerably higher than in smokers. However, quantitative measurements of metabolite concentrations or DNA adduct levels in urothelial cells could not be determined at the time these occupational exposures occurred, and cigarette smoking history in those individuals was not assessed (Koss et al., 1965, 1969).

In summary, although quantitative differences among species exist, they do not exclude the same MOA in mice and dogs occurring in humans.

CONCLUSION: STATEMENT OF CONFIDENCE, ANALYSIS, AND IMPLICATIONS

The early steps in the proposed MOA are well supported by the available evidence, indicating that the key events of metabolic activation, DNA adduct formation, and mutation are the same qualitatively in mice, dogs, and humans. There is strong and sufficient evidence that 4-aminobiphenyl is a human urinary bladder carcinogen. Evidence for the intervening steps between mutation and cancer development is lacking. The associations described for adduct levels and *TP53* mutations are not compelling because these particular genetic alterations appear late in tumour progression and are often the result of endogenous causes (e.g. spontaneous depurination at methylated CpG sites). This aspect of *TP53* mutations in bladder cancer has been studied in a case-control study (Schroeder et al., 2003). In addition, most urothelial tumours in humans are low-grade papillary lesions, which generally do not have *TP53* mutations.

The mutational spectrum of *N*-hydroxy-4-acetylamino-biphenyl has been studied in embryonic fibroblasts of the Big Blue mouse (Besaratina et al., 2002). Treatment of these cells for 24 h resulted in a dose-dependent increase in mutation frequency of the *cII* transgene of up to 12.8-fold over background. Single-base substitutions comprised 86% of the mutations in the treated cells and 74% of the mutations in the controls. Of these mutations, 63% and 36%, respectively, occurred at guanine residues along the *cII* gene. Whereas G → T transversions accounted for 47% of the mutations in the treated *cII* gene, the most common mutations in untreated cells were insertions, which accounted for 19% of the mutations. Mapping of the induced adducts established five preferred DNA adduction sites, of which four were major mutation sites for *N*-hydroxy-4-acetoxylaminobiphenyl, especially G → T transversions. In the *TP53* gene in human bladder cancer, however, G → A transitions predominate (53%) and are prevalent at all of its five mutational hotspots (codons 175, 248, 273, 280, and 285), three of which are at methylated CpG hotspots (175, 248, and 273). In *cII*, neither the preferred adduction sites nor the induced mutational hotspots are biased towards methylated CpG dinucleotides. It is concluded from this study that there is a serious discordance between the mutation pattern induced by *N*-hydroxy-4-acetoxylaminobiphenyl in the *cII* gene and the mutational pattern observed in *TP53* in human bladder cancer. However, the role of methylation status and transcriptional activity on the mutation spectrum induced by 4-aminobiphenyl has yet to be determined. It is also to be noted that the *TP53* mutation spectrum is a reflection of a selection process during tumour development.

4-Aminobiphenyl への職業的ばく露は、たばこの煙よりも 4-Aminobiphenyl の用量が多いと考えられる。なぜなら、膀胱がんの発生率が喫煙者に比べて職業的にばく露される集団の方がかなり高かったためである。しかし、これらの職業ばく露が発生した時点では代謝物濃度や尿路上皮細胞内の DNA 付加体レベルを定量的に測定することができず、また、個人の喫煙歴を評価することはなかった (Koss ら、1965 年、1969 年)。

要約すると、種間での量的な違いは存在するが、マウスやイヌと同じ MOA がヒトにも当てはまることを排除するものではない。

結論：信頼性、解析及び帰結の記述

推定される MOA の初期段階は、代謝的活性化、DNA 付加体形成及び突然変異の key events が、マウス、イヌ及びヒトにおいて定性的に同じであることを示す。これは利用可能なエビデンスによって十分に支持されている。4-Aminobiphenyl がヒトの膀胱発がん物質であるという強力かつ十分なエビデンスがある。しかし、突然変異とがんの発生との間に介在するステップについてのエビデンスは不足している。付加体量と *TP53* 突然変異との関連について説明したが、これらの特定の遺伝的変化は腫瘍の進行から遅れて現れ、しばしば内因性原因 (例えば、メチル化された CpG 部位での脱プリン) であるため、説得力のあるものではない。膀胱がんにおける *TP53* 突然変異については、症例対照研究で研究されている (Schroeder ら、2003 年)。さらに、ヒトの尿路上皮腫瘍のほとんどは低悪性度の乳頭病変であり、一般に *TP53* 変異を有していない。

N-hydroxy-4-acetylamino-biphenyl の変異スペクトルは、Big Blue mouse の胚性線維芽細胞において研究されている (Bessaratina ら、2002 年)。これらの細胞を 24 時間処理すると、*cII* 遺伝子の突然変異頻度がバックグラウンドと比較して最大 12.8 倍の用量依存的な増加をもたらした。一塩基置換は、処理細胞では突然変異の 86%、対照細胞では突然変異の 74% を占めていた。これらの変異のうち、63% と 36% はそれぞれ *cII* 遺伝子に沿ったグアニン残基で発生した。処置細胞では *cII* 遺伝子の変異の 47% が G → T のトランスバージョンであったのに対し、対照細胞では最も一般的な変異は挿入であり、これは変異の 19% を占めていた。誘導された付加体のマッピングにより、5 つの DNA 付加体部位が確立された。そのうちの 4 つは *N*-hydroxy-4-acetylamino-biphenyl による主な変異部位であり、特に G → T トランスバージョンを生じていた。しかしながら、ヒト膀胱がんの *TP53* 遺伝子では、G → A トランジションが優勢 (53%) であり、その 5 つの変異ホットスポット (コドン 175, 248, 273, 280, 285) のすべてで優勢で、そのうちの 3 つはメチル化 CpG ホットスポット (175, 248, 273) にあった。*cII* 遺伝子では、誘導される突然変異ホットスポットも、メチル化 CpG ジヌクレオチドに偏っていない。この研究から、*cII* 遺伝子における *N*-hydroxy-4-acetylamino-biphenyl によって誘導される突然変異パターンと、ヒト膀胱がんにおける *TP53* 遺伝子で観察される突然変異パターンとの間には大きなギャップがあると結論づけられる。しかし、4-Aminobiphenyl によって誘導される突然変異スペクトルにおけるメチル化状態や転写活性の役割はまだ明らかにされていない。また、*TP53* 遺伝子の変異スペクトルは、腫瘍発生過程の選択を反映したものであることにも留意しなければならない。

Based on the preceding analysis, it is clear that the MOA for 4-aminobiphenyl carcinogenesis is known in the animal model, and the MOA is relevant to humans both qualitatively and quantitatively. The conclusion based on this evaluation, even without epidemiological evidence, is that 4-aminobiphenyl poses a cancer hazard to humans.

To perform a full risk assessment requires additional information regarding the dose-response and human exposures. Based on the information described above, it is clear that the data predict a cancer hazard for humans at expected exposures, at least for occupational (historical) and cigarette smoking exposures. Further analysis is required regarding the potential risk at ambient exposures in those who are not cigarette smokers. The MOA analysis provides the basis and foundation for such an assessment. The epidemiological evidence on 4-aminobiphenyl supports the conclusions suggested by the MOA HRF.

4-AMINOBIIPHENYL AND THE HUMAN RELEVANCE FRAMEWORK

4-Aminobiphenyl was evaluated using the proposed IPCS HRF based on an MOA analysis. The defined key events for this DNA reactivity MOA—metabolic activation, DNA adduct formation, mutagenicity, and cancer induction—clearly are the same in humans as in the animal (mice, dogs) models, indicating that 4-aminobiphenyl presents a cancer hazard for humans. The information for this MOA analysis provides a substantive foundation on which to build a complete cancer risk assessment for humans. For this chemical, there is also substantial epidemiological evidence to verify the conclusions derived from the HRF analysis.

The additional key events for this MOA—which genes are mutated and how do these genetic alterations lead to cancer—are not known for 4-aminobiphenyl. However, this does not detract from the conclusions, given the strength of evidence for the proposed MOA, based on the framework analysis presented here.

What data are necessary to conclude that a chemical produces cancer by a DNA-reactive MOA? Our suggestion is that at the very least there be a demonstration that DNA adducts are produced, preferably in the target tissue, and that the chemical is mutagenic (either with or without metabolic activation). Mutagenicity is used here in a more specific, restricted sense than the broader term genotoxicity. Demonstration of DNA adducts and mutagenicity in the target tissue after in vivo exposure increases confidence in the proposed MOA. Identification of the specific metabolic pathway and specific DNA adducts induced provides a significantly better basis for extrapolating between the animal model and humans.

This case demonstrates the potential utility of data on surrogate compounds in MOA analysis. However, the relevance of data on related compounds, whether in vivo or in vitro, needs to be adequately justified. Weight-of-evidence analysis of structure-activity relationships, which have been well developed for DNA reactivity and mutagenicity, should also contribute to framework analysis.

以上の解析から、4-Aminobiphenyl 発がん MOA は動物モデルで知られており、その MOA は定量的にも定量的にもヒトに関連していることが明らかになった。この評価に基づく結論は、疫学的なエビデンスがなくても、4-Aminobiphenyl はヒトに対して発がんの危険性があるということである。

完全なリスク評価を行うためには、用量反応及びヒトへのばく露に関する追加情報が必要である。上記の情報に基づいて、職業的（過去の）ばく露と喫煙ばく露など予想されるばく露による発がんリスクを予測している。非喫煙者の環境ばく露における潜在的リスクについては、さらなる解析が必要である。MOA 解析は、そのような評価のための基礎と基盤を提供する。4-Aminobiphenyl に関する疫学的エビデンスは、MOA の HRF によって推定される結論を支持している。

4-Aminobiphenyl とヒト関連性フレームワーク

4-Aminobiphenyl は、提唱されている IPCS HRF を用いて MOA 解析に基づいて評価した。その結果、DNA 反応性 MOA の key events である代謝的活性化、DNA 付加体形成、変異原性、発がんは、ヒトにおいてもマウスやイスなどの動物モデルと同様であり、4-Aminobiphenyl はヒトに対して発がんの危険性を示すことが明らかになった。この MOA 解析の情報は、ヒトに対する完全な発がんリスク評価を構築するための実質的な基礎を提供するものである。この化学物質については、HRF 解析から導き出された結論を検証するための実質的な疫学的エビデンスも存在する。

この MOA では、どのような遺伝子が突然変異し、その遺伝子変化がどのようにして発がんにつながるのかという追加の key events は、4-Aminobiphenyl では知られていない。しかし、ここで提示されたフレームワーク解析に基づいて MOA のエビデンスの信頼性を考えると、このことは結論を損なうものではない。

ある化学物質が DNA 反応性 MOA によって発がんすると結論づけるには、どのようなデータが必要なのか？我々が提案するのは、少なくとも DNA 付加体が、標的組織で生成され、その化学物質に変異原性（代謝的活性化の有無にかかわらず）があることを実証することである。変異原性は、ここでは遺伝毒性という広い意味よりも、より具体的に限定的な意味で用いられている。in vivo ばく露後の標的組織における DNA 付加体及び変異原性が証明されれば、推定された MOA の信頼性が向上する。特定の代謝経路と誘導される特定の DNA 付加体を同定することにより、動物モデルをヒトに外挿するための優れた根拠が得られる。

この事例は、MOA 解析における代替化合物に関するデータの潜在的な有用性を示している。しかし、関連化合物に関するデータの妥当性は、in vivo であれ in vitro であれ、十分に正当化される必要がある。また、DNA 反応性や変異原性については、これまでに十分に開発されてきた構造活性相関に関するエビデンスの重み付け解析も、フレームワーク解析に貢献すべきである。

ACKNOWLEDGEMENTS

This paper has been reviewed in accordance with United States Environmental Protection Agency (USEPA) guidance but does not necessarily reflect USEPA policy. We thank Drs. Andrew Kligerman and Doug Wolf for their careful review of this paper.

REFERENCES

- al-Atrash J, Zhang YJ, Lin D, Kadlubar FF, Santella RM (1995) Quantitative immunohistochemical analysis of 4-aminobiphenyl-DNA cultured cells and mice: Comparison to gas chromatography/mass spectroscopy analysis. *Chemical Research in Toxicology*, **8**:747–752.
- Auerbach O, Garfinkel L (1989) Histologic changes in the urinary bladder in relation to cigarette smoking and use of artificial sweeteners. *Cancer*, **64**:983–987.
- Besaratinia A, Bates SE, Pfeifer GP (2002) Mutational signature of the proximate bladder carcinogen *N*-hydroxy-4-acetylamino-biphenyl: Inconsistency with the *p53* mutational spectrum in bladder cancer. *Cancer Research*, **62**:4331–4338.
- Block NL, Sigel MM, Lynne CM, Ng AB, Grosberg RA (1978) The initiation, progress, and diagnosis of dog bladder cancer induced by 4-aminobiphenyl. *Investigative Urology*, **16**:50–54.
- Bonser GM (1962) Precancerous changes in the urinary bladder. In: Severi L, ed. *The morphological precursor of cancer*. Perugia, University of Perugia, p. 435.
- Bookland EA, Reznikoff CA, Lindstrom M, Swaminathan S (1992a) Induction of thioguanine-resistant mutations in human uroepithelial cells by 4-aminobiphenyl and its *N*-hydroxy derivatives. *Cancer Research*, **52**:1615–1621.
- Bookland EA, Swaminathan S, Oyasu R, Gilchrist KW, Lindstrom M, Reznikoff CA (1992b) Tumorigenic transformation and neoplastic progression of human uroepithelial cells after exposure in vitro to 4-aminobiphenyl or its metabolites. *Cancer Research*, **52**:1606–1614.
- Bryant MS, Vineis P, Skipper PL, Tannenbaum SR (1988) Hemoglobin adducts of aromatic amines: Associations with smoking status and type of tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**:9788–9791.
- Burger MS, Torino JL, Swaminathan S (2001) DNA damage in human transitional cell carcinoma cells after exposure to the proximate metabolite of the bladder carcinogen 4-aminobiphenyl. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **38**:1–11.
- Butler MA, Guengerich FP, Kadlubar FF (1989a) Metabolic oxidation of the carcinogens 4-aminobiphenyl and 4,4'-methylene-bis(2-chloroaniline) by human hepatic microsomes and by purified rat hepatic cytochrome P-450 monooxygenases. *Cancer Research*, **49**:25–31.

謝辞

この論文は、米国環境保護庁（USEPA）のガイダンスに基づいてレビューされているが、必ずしも USEPA の方針を反映したものではない。Andrew Kligerman 博士と Doug Wolf 博士の慎重なレビューに感謝する。

参考文献

- al-Atrash J, Zhang YJ, Lin D, Kadlubar FF, Santella RM (1995) Quantitative immunohistochemical analysis of 4-aminobiphenyl-DNA cultured cells and mice: Comparison to gas chromatography/mass spectroscopy analysis. *Chemical Research in Toxicology*, **8**:747–752.
- Auerbach O, Garfinkel L (1989) Histologic changes in the urinary bladder in relation to cigarette smoking and use of artificial sweeteners. *Cancer*, **64**:983–987.
- Besaratinia A, Bates SE, Pfeifer GP (2002) Mutational signature of the proximate bladder carcinogen *N*-hydroxy-4-acetylamino-biphenyl: Inconsistency with the *p53* mutational spectrum in bladder cancer. *Cancer Research*, **62**:4331–4338.
- Block NL, Sigel MM, Lynne CM, Ng AB, Grosberg RA (1978) The initiation, progress, and diagnosis of dog bladder cancer induced by 4-aminobiphenyl. *Investigative Urology*, **16**:50–54.
- Bonser GM (1962) Precancerous changes in the urinary bladder. In: Severi L, ed. *The morphological precursor of cancer*. Perugia, University of Perugia, p. 435.
- Bookland EA, Reznikoff CA, Lindstrom M, Swaminathan S (1992a) Induction of thioguanine-resistant mutations in human uroepithelial cells by 4-aminobiphenyl and its *N*-hydroxy derivatives. *Cancer Research*, **52**:1615–1621.
- Bookland EA, Swaminathan S, Oyasu R, Gilchrist KW, Lindstrom M, Reznikoff CA (1992b) Tumorigenic transformation and neoplastic progression of human uroepithelial cells after exposure in vitro to 4-aminobiphenyl or its metabolites. *Cancer Research*, **52**:1606–1614.
- Bryant MS, Vineis P, Skipper PL, Tannenbaum SR (1988) Hemoglobin adducts of aromatic amines: Associations with smoking status and type of tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**:9788–9791.
- Burger MS, Torino JL, Swaminathan S (2001) DNA damage in human transitional cell carcinoma cells after exposure to the proximate metabolite of the bladder carcinogen 4-aminobiphenyl. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **38**:1–11.
- Butler MA, Guengerich FP, Kadlubar FF (1989a) Metabolic oxidation of the carcinogens 4-aminobiphenyl and 4,4'-methylene-bis(2-chloroaniline) by human hepatic microsomes and by purified rat hepatic cytochrome P-450 monooxygenases. *Cancer Research*, **49**:25–31.

Butler MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Kadlubar FF (1989b) Human cytochrome P-450PA (P-450IA2), the phenacetin *O*-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and *N*-oxidation of carcinogenic arylamines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**:7696–7700.

Cairns P, Proctor AJ, Knowles MA (1991) Loss of heterozygosity at the *RB* locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma. *Oncogene*, **6**:2305–2309.

Cairns T (1979) The ED₀₁ study: Introduction, objectives, and experimental design. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, **3**:1–7.

Cartwright RA, Rogers HJ, Barham-Hall D, Glashan RW, Ahmad RA, Higgins E, Kahn MA (1982) Role of *N*-acetyltransferase phenotypes in bladder carcinogenesis: A pharmacogenetic epidemiological approach to bladder cancer. *Lancet*, **16**:842–846.

Cascorbi I, Roots I, Brockmoller J (2001) Association of *NAT1* and *NAT2* polymorphisms to urinary bladder cancer: Significantly reduced risk in subjects with *NAT1**10. *Cancer Research*, **61**:5051–5056.

Castelao JE, Yuan JM, Skipper PL, Tannenbaum SR, Gago-Dominguez M, Crowder JS, Ross RK, Yu MC (2001) Gender- and smoking-related bladder cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, **93**:538–545.

Chou HC, Lang NP, Kadlubar FF (1995) Metabolic activation of the *N*-hydroxy derivative of the carcinogen 4-aminobiphenyl by human tissue sulfotransferases. *Carcinogenesis*, **16**:413–417.

Clayson DB, Lawson TA, Santana S, Bonser GM (1965) Correlation between the chemical induction of hyperplasia and of malignancy in the bladder epithelium. *British Journal of Cancer*, **19**:297–310.

Clayson DB, Lawson TA, Pringle JAS (1967) The carcinogenic action of 2-aminodiphenylene oxide and 4-aminodiphenyl on the bladder and liver of C57 × IF mouse. *British Journal of Cancer*, **1**:755–762.

Coghlin J, Gann PH, Hammond SK, Skipper PL, Taghizadeh K, Paul M, Tannenbaum SR (1991) 4-Aminobiphenyl hemoglobin adducts in fetuses exposed to the tobacco smoke carcinogen in utero. *Journal of the National Cancer Institute*, **83**:274–280.

Cohen SM (1995) The role of urinary physiology and chemistry in bladder carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*, **33**:715–730.

Cohen SM, Ellwein LB (1990) Proliferative and genotoxic cellular effects in 2-acetylaminofluorene bladder and liver carcinogenesis: Biological modeling of the ED₀₁ study. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **104**:79–93.

Butler MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Kadlubar FF (1989b) Human cytochrome P-450PA (P-450IA2), the phenacetin *O*-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and *N*-oxidation of carcinogenic arylamines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**:7696–7700.

Cairns P, Proctor AJ, Knowles MA (1991) Loss of heterozygosity at the *RB* locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma. *Oncogene*, **6**:2305–2309.

Cairns T (1979) The ED₀₁ study: Introduction, objectives, and experimental design. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, **3**:1–7.

Cartwright RA, Rogers HJ, Barham-Hall D, Glashan RW, Ahmad RA, Higgins E, Kahn MA (1982) Role of *N*-acetyltransferase phenotypes in bladder carcinogenesis: A pharmacogenetic epidemiological approach to bladder cancer. *Lancet*, **16**:842–846.

Cascorbi I, Roots I, Brockmoller J (2001) Association of *NAT1* and *NAT2* polymorphisms to urinary bladder cancer: Significantly reduced risk in subjects with *NAT1**10. *Cancer Research*, **61**:5051–5056.

Castelao JE, Yuan JM, Skipper PL, Tannenbaum SR, Gago-Dominguez M, Crowder JS, Ross RK, Yu MC (2001) Gender- and smoking-related bladder cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, **93**:538–545.

Chou HC, Lang NP, Kadlubar FF (1995) Metabolic activation of the *N*-hydroxy derivative of the carcinogen 4-aminobiphenyl by human tissue sulfotransferases. *Carcinogenesis*, **16**:413–417.

Clayson DB, Lawson TA, Santana S, Bonser GM (1965) Correlation between the chemical induction of hyperplasia and of malignancy in the bladder epithelium. *British Journal of Cancer*, **19**:297–310.

Clayson DB, Lawson TA, Pringle JAS (1967) The carcinogenic action of 2-aminodiphenylene oxide and 4-aminodiphenyl on the bladder and liver of C57 × IF mouse. *British Journal of Cancer*, **1**:755–762.

Coghlin J, Gann PH, Hammond SK, Skipper PL, Taghizadeh K, Paul M, Tannenbaum SR (1991) 4-Aminobiphenyl hemoglobin adducts in fetuses exposed to the tobacco smoke carcinogen in utero. *Journal of the National Cancer Institute*, **83**:274–280.

Cohen SM (1995) The role of urinary physiology and chemistry in bladder carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*, **33**:715–730.

Cohen SM, Ellwein LB (1990) Proliferative and genotoxic cellular effects in 2-acetylaminofluorene bladder and liver carcinogenesis: Biological modeling of the ED₀₁ study. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **104**:79–93.

Cordon-Cardo C, Reuter VE (1997) Alterations of tumor suppressor genes in bladder cancer. *Seminars in Diagnostic Pathology*, **14**:123–132.

Curigliano G, Zhang YJ, Wang LY, Flamini G, Alcini A, Ratto C, Giustacchini M, Alcini E, Cittadini A, Santella RM (1996) Immunohistochemical quantitation of 4-aminobiphenyl–DNA adducts and p53 nuclear overexpression in T1 bladder cancer of smokers and nonsmokers. *Carcinogenesis*, **17**:911–916.

Dang LN, McQueen CA (1999) Mutagenicity of 4-aminobiphenyl and 4-acetylbiphenyl in *Salmonella typhimurium* strains expressing different levels of *N*-acetyltransferase. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **159**:77–82.

Deichmann WB, MacDonald WE (1968) The non-carcinogenicity of a single dose of 4-aminobiphenyl in the dog. *Food and Cosmetics Toxicology*, **6**:143–146.

Deichmann WB, Radomski JL, Anderson WAD, Coplan MM, Woods FM (1958) The carcinogenic action of *p*-aminobiphenyl in the dog; final report. *Industrial Medicine and Surgery*, **27**:25–26.

Deichmann WB, Radomski JL, Glass E, Anderson WAD, Coplan M, Woods FM (1965) Synergism among oral carcinogens. Simultaneous feeding of four bladder carcinogens to dogs. *Industrial Medicine and Surgery*, **34**:640–649.

Delclos KB, Miller DW, Lay JO Jr, Casciano DA, Walker RP, Fu PP, Kadlubar FF (1987) Identification of C8-modified deoxyinosine and N2- and C8-modified deoxyguanosine as major products of the in vitro reaction of *N*-hydroxy-6-aminochrysene with DNA and the formation of these adducts in isolated rat hepatocytes treated with 6-nitrochrysene and 6-aminochrysene. *Carcinogenesis*, **8**:1703–1709.

Del Santo P, Moneti G, Salvadori M, Saltutti C, Delle RA, Dolara P (1991) Levels of the adducts of 4-aminobiphenyl to hemoglobin in control subjects and bladder carcinoma patients. *Cancer Letters*, **60**:245–251.

Doerge DR, Churchwell MI, Marques MM, Beland FA (1999) Quantitative analyses of 4-aminobiphenyl–C8-deoxyguanosyl DNA adducts produced in vitro and in vivo using HPLC–ES–MS. *Carcinogenesis*, **6**:1055–1061.

Dooley KL, Stavenuiter JF, Westra JG, Kadlubar FF (1988) Comparative carcinogenicity of the food pyrolysis product, 2-amino-5-phenylpyridine, and the known human carcinogen, 4-aminobiphenyl, in the neonatal B6C3F1 mouse. *Cancer Letters*, **41**:99–103.

Dooley KL, Von Tungeln LS, Bucci T, Fu PP, Kadlubar FF (1992) Comparative carcinogenicity of 4-aminobiphenyl and the food pyrolysates, Glu-P-1, IQ, PhIP, and MeIQx in the neonatal B6C3F1 male mouse. *Cancer Letters*, **62**:205–209.

Cordon-Cardo C, Reuter VE (1997) Alterations of tumor suppressor genes in bladder cancer. *Seminars in Diagnostic Pathology*, **14**:123–132.

Curigliano G, Zhang YJ, Wang LY, Flamini G, Alcini A, Ratto C, Giustacchini M, Alcini E, Cittadini A, Santella RM (1996) Immunohistochemical quantitation of 4-aminobiphenyl–DNA adducts and p53 nuclear overexpression in T1 bladder cancer of smokers and nonsmokers. *Carcinogenesis*, **17**:911–916.

Dang LN, McQueen CA (1999) Mutagenicity of 4-aminobiphenyl and 4-acetylbiphenyl in *Salmonella typhimurium* strains expressing different levels of *N*-acetyltransferase. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **159**:77–82.

Deichmann WB, MacDonald WE (1968) The non-carcinogenicity of a single dose of 4-aminobiphenyl in the dog. *Food and Cosmetics Toxicology*, **6**:143–146.

Deichmann WB, Radomski JL, Anderson WAD, Coplan MM, Woods FM (1958) The carcinogenic action of *p*-aminobiphenyl in the dog; final report. *Industrial Medicine and Surgery*, **27**:25–26.

Deichmann WB, Radomski JL, Glass E, Anderson WAD, Coplan M, Woods FM (1965) Synergism among oral carcinogens. Simultaneous feeding of four bladder carcinogens to dogs. *Industrial Medicine and Surgery*, **34**:640–649.

Delclos KB, Miller DW, Lay JO Jr, Casciano DA, Walker RP, Fu PP, Kadlubar FF (1987) Identification of C8-modified deoxyinosine and N2- and C8-modified deoxyguanosine as major products of the in vitro reaction of *N*-hydroxy-6-aminochrysene with DNA and the formation of these adducts in isolated rat hepatocytes treated with 6-nitrochrysene and 6-aminochrysene. *Carcinogenesis*, **8**:1703–1709.

Del Santo P, Moneti G, Salvadori M, Saltutti C, Delle RA, Dolara P (1991) Levels of the adducts of 4-aminobiphenyl to hemoglobin in control subjects and bladder carcinoma patients. *Cancer Letters*, **60**:245–251.

Doerge DR, Churchwell MI, Marques MM, Beland FA (1999) Quantitative analyses of 4-aminobiphenyl–C8-deoxyguanosyl DNA adducts produced in vitro and in vivo using HPLC–ES–MS. *Carcinogenesis*, **6**:1055–1061.

Dooley KL, Stavenuiter JF, Westra JG, Kadlubar FF (1988) Comparative carcinogenicity of the food pyrolysis product, 2-amino-5-phenylpyridine, and the known human carcinogen, 4-aminobiphenyl, in the neonatal B6C3F1 mouse. *Cancer Letters*, **41**:99–103.

Dooley KL, Von Tungeln LS, Bucci T, Fu PP, Kadlubar FF (1992) Comparative carcinogenicity of 4-aminobiphenyl and the food pyrolysates, Glu-P-1, IQ, PhIP, and MeIQx in the neonatal B6C3F1 male mouse. *Cancer Letters*, **62**:205–209.

Eaton DL, Gallagher EP, Bammler TK, Kunze KL (1995) Role of cytochrome P4501A2 in chemical carcinogenesis: Implications for human variability in expression and enzyme activity. *Pharmacogenetics*, **5**:259–274.

Faraglia B, Chen SY, Gammon MD, Zhang Y, Teitelbaum SL, Neugut AI, Ahsan H, Garbowski GC, Hibshoosh H, Lin D, Kadlubar FF, Santella RM (2003) Evaluation of 4-aminobiphenyl–DNA adducts in human breast cancer: The influence of tobacco smoke. *Carcinogenesis*, **24**:719–725.

Feng Z, Hu W, Rom WN, Beland FA, Tang MS (2002) *N*-Hydroxy-4-aminobiphenyl–DNA binding in human *p53* gene: Sequence preference and the effect of C5 cytosine methylation. *Biochemistry*, **41**:6414–6421.

Flamini G, Romano G, Curigliano G, Chiominto A, Capelli G, Boninsegna A, Signorelli C, Ventura L, Santella RM, Sgambato A, Cittadini A (1998) 4-Aminobiphenyl–DNA adducts in laryngeal tissue and smoking habits: An immunohistochemical study. *Carcinogenesis*, **19**:353–357.

Flammang TJ, Kadlubar FF (1986) Acetyl coenzyme A-dependent metabolic activation of *N*-hydroxy-3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl and several carcinogenic *N*-hydroxy arylamines in relation to tissue and species differences, other acyl donors, and arylhydroxamic acid-dependent acyltransferases. *Carcinogenesis*, **7**:919–926.

Flammang TJ, Couch LH, Levy GN, Weber WW, Wise CK (1992) DNA adduct levels in congenic rapid and slow acetylator mouse strains following chronic administration of 4-aminobiphenyl. *Carcinogenesis*, **13**:1887–1891.

Fletcher K, Tinwell H, Ashby J (1998) Mutagenicity of the human bladder carcinogen 4-aminobiphenyl to the bladder of Muta™Mouse transgenic mice. *Mutation Research*, **400**:245–250.

Frederickson SM, Hatcher JF, Reznikoff CA, Swaminathan S (1992) Acetyl transferase-mediated metabolic activation of *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl by human uroepithelial cells. *Carcinogenesis*, **13**:955–961.

Fretland AJ, Doll MA, Gray K, Feng Y, Hein DW (1997) Cloning, sequencing, and recombinant expression of NAT1, NAT2, and NAT3 derived from the C3H/HeJ (rapid) and A/HeJ (slow) acetylator inbred mouse: Functional characterization of the activation and deactivation of aromatic amine carcinogens. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **142**:360–366.

Gaylor DW (1979) The ED₀₁ study: Summary and conclusions. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, **3**:179–183.

Eaton DL, Gallagher EP, Bammler TK, Kunze KL (1995) Role of cytochrome P4501A2 in chemical carcinogenesis: Implications for human variability in expression and enzyme activity. *Pharmacogenetics*, **5**:259–274.

Faraglia B, Chen SY, Gammon MD, Zhang Y, Teitelbaum SL, Neugut AI, Ahsan H, Garbowski GC, Hibshoosh H, Lin D, Kadlubar FF, Santella RM (2003) Evaluation of 4-aminobiphenyl–DNA adducts in human breast cancer: The influence of tobacco smoke. *Carcinogenesis*, **24**:719–725.

Feng Z, Hu W, Rom WN, Beland FA, Tang MS (2002) *N*-Hydroxy-4-aminobiphenyl–DNA binding in human *p53* gene: Sequence preference and the effect of C5 cytosine methylation. *Biochemistry*, **41**:6414–6421.

Flamini G, Romano G, Curigliano G, Chiominto A, Capelli G, Boninsegna A, Signorelli C, Ventura L, Santella RM, Sgambato A, Cittadini A (1998) 4-Aminobiphenyl–DNA adducts in laryngeal tissue and smoking habits: An immunohistochemical study. *Carcinogenesis*, **19**:353–357.

Flammang TJ, Kadlubar FF (1986) Acetyl coenzyme A-dependent metabolic activation of *N*-hydroxy-3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl and several carcinogenic *N*-hydroxy arylamines in relation to tissue and species differences, other acyl donors, and arylhydroxamic acid-dependent acyltransferases. *Carcinogenesis*, **7**:919–926.

Flammang TJ, Couch LH, Levy GN, Weber WW, Wise CK (1992) DNA adduct levels in congenic rapid and slow acetylator mouse strains following chronic administration of 4-aminobiphenyl. *Carcinogenesis*, **13**:1887–1891.

Fletcher K, Tinwell H, Ashby J (1998) Mutagenicity of the human bladder carcinogen 4-aminobiphenyl to the bladder of Muta™Mouse transgenic mice. *Mutation Research*, **400**:245–250.

Frederickson SM, Hatcher JF, Reznikoff CA, Swaminathan S (1992) Acetyl transferase-mediated metabolic activation of *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl by human uroepithelial cells. *Carcinogenesis*, **13**:955–961.

Fretland AJ, Doll MA, Gray K, Feng Y, Hein DW (1997) Cloning, sequencing, and recombinant expression of NAT1, NAT2, and NAT3 derived from the C3H/HeJ (rapid) and A/HeJ (slow) acetylator inbred mouse: Functional characterization of the activation and deactivation of aromatic amine carcinogens. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **142**:360–366.

Gaylor DW (1979) The ED₀₁ study: Summary and conclusions. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, **3**:179–183.

Gorrod JW, Carter RL, Roe FJ (1968) Induction of hepatomas by 4-aminobiphenyl and three of its hydroxylated derivatives administered to newborn mice. *Journal of the National Cancer Institute*, **41**:403–410.

Hammons GJ, Guengerich FP, Weis CC, Beland FA, Kadlubar FF (1985) Metabolic oxidation of carcinogenic arylamines by rat, dog, and human hepatic microsomes and by purified flavin-containing and cytochrome P-450 monooxygenases. *Cancer Research*, **45**:3578–3585.

Hatcher JF, Swaminathan S (1992) Microsome-mediated transacetylation and binding of *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl to nucleic acids by hepatic and bladder tissues from dog. *Carcinogenesis*, **13**:1705–1711.

Hatcher JF, Swaminathan S (1995) Detection of deoxyadenosine-4-aminobiphenyl adduct in DNA of human uroepithelial cells treated with *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl following nuclease P1 enrichment and ³²P-postlabeling analysis. *Carcinogenesis*, **16**:295–301.

Hatcher JF, Swaminathan S (2002) Identification of *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-azobiphenyl by ³²P-postlabeling analyses of DNA in human uroepithelial cells exposed to proximate metabolites of the environmental carcinogen 4-aminobiphenyl. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **39**:314–322.

Hatcher JF, Rao KP, Swaminathan S (1993) Mutagenic activation of 4-aminobiphenyl and its *N*-hydroxy derivatives by microsomes from cultured human uroepithelial cells. *Mutagenesis*, **8**:113–120.

Hein DW (1988) Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, **948**:37–66.

Hein DW, Grant DM, Sim E (2000) *Arylamine N-acetyltransferase (NAT) nomenclature* (<http://louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html>).

Hickman ES, Moroni MC, Helin K (2002) The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Current Opinion in Genetics and Development*, **12**:60–66.

Hill AB (1965) The environment and disease: Association or causation? *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, **58**:295–300.

Hughes MF, Smith BJ, Eling TE (1992) The oxidation of 4-aminobiphenyl by horseradish peroxidase. *Chemical Research in Toxicology*, **5**:340–345.

IARC (1972) 4-Aminobiphenyl. In: *Some inorganic substances, chlorinated hydrocarbons, aromatic amines, N-nitroso compounds, and natural products*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, pp. 74–79 (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 1).

Gorrod JW, Carter RL, Roe FJ (1968) Induction of hepatomas by 4-aminobiphenyl and three of its hydroxylated derivatives administered to newborn mice. *Journal of the National Cancer Institute*, **41**:403–410.

Hammons GJ, Guengerich FP, Weis CC, Beland FA, Kadlubar FF (1985) Metabolic oxidation of carcinogenic arylamines by rat, dog, and human hepatic microsomes and by purified flavin-containing and cytochrome P-450 monooxygenases. *Cancer Research*, **45**:3578–3585.

Hatcher JF, Swaminathan S (1992) Microsome-mediated transacetylation and binding of *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl to nucleic acids by hepatic and bladder tissues from dog. *Carcinogenesis*, **13**:1705–1711.

Hatcher JF, Swaminathan S (1995) Detection of deoxyadenosine-4-aminobiphenyl adduct in DNA of human uroepithelial cells treated with *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl following nuclease P1 enrichment and ³²P-postlabeling analysis. *Carcinogenesis*, **16**:295–301.

Hatcher JF, Swaminathan S (2002) Identification of *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-4-azobiphenyl by ³²P-postlabeling analyses of DNA in human uroepithelial cells exposed to proximate metabolites of the environmental carcinogen 4-aminobiphenyl. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **39**:314–322.

Hatcher JF, Rao KP, Swaminathan S (1993) Mutagenic activation of 4-aminobiphenyl and its *N*-hydroxy derivatives by microsomes from cultured human uroepithelial cells. *Mutagenesis*, **8**:113–120.

Hein DW (1988) Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, **948**:37–66.

Hein DW, Grant DM, Sim E (2000) *Arylamine N-acetyltransferase (NAT) nomenclature* (<http://louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html>).

Hickman ES, Moroni MC, Helin K (2002) The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Current Opinion in Genetics and Development*, **12**:60–66.

Hill AB (1965) The environment and disease: Association or causation? *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, **58**:295–300.

Hughes MF, Smith BJ, Eling TE (1992) The oxidation of 4-aminobiphenyl by horseradish peroxidase. *Chemical Research in Toxicology*, **5**:340–345.

IARC (1972) 4-Aminobiphenyl. In: *Some inorganic substances, chlorinated hydrocarbons, aromatic amines, N-nitroso compounds, and natural products*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, pp. 74–79 (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 1).

IARC (1986) *Tobacco smoking*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 421 pp. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 38).

IARC (1987) 4-Aminobiphenyl (Group 1). In: *Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, pp. 91–92 (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Supplement 7).

Ioachim E, Charchanti A, Stavropoulos NE, Skopelitou A, Athanassiou ED, Agnantis NJ (2000) Immunohistochemical expression of retinoblastoma gene product (Rb), p53 protein, MDM2, c-erbB-2, HLA-DR and proliferation indices in human urinary bladder carcinoma. *Histology and Histopathology*, **15**:721–727.

Ishikawa J, Xu HJ, Hu SX, Yandell DW, Maeda S, Kamidono S, Benedict WF, Takahashi R (1991) Inactivation of the retinoblastoma gene in human bladder and renal cell carcinomas. *Cancer Research*, **51**:5736–5743.

Kadlubar FF, Miller JA, Miller EC (1977) Hepatic microsomal *N*-glucuronidation and nucleic acid binding of *N*-hydroxy arylamines in relation to urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Research*, **37**:805–814.

Kadlubar FF, Frederick CB, Weis CD, Zenser TV (1982) Prostaglandin endoperoxide synthetase-mediated metabolism of carcinogenic aromatic amines and their binding to DNA and protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **108**:253–258.

Kadlubar FF, Dooley KL, Teitel CH, Roberts DW, Benson RW, Butler MA, Bailey JR, Young JF, Skipper PW, Tannenbaum SR (1991) Frequency of urination and its effects on metabolism, pharmacokinetics, blood hemoglobin adduct formation, and liver and urinary bladder DNA adduct levels in beagle dogs given the carcinogen 4-aminobiphenyl. *Cancer Research*, **51**:4371–4377.

Kimura S, Kawabe M, Ward JM, Morishima H, Kadlubar FF, Hammons GJ, Fernandez-Salguero P, Gonzalez FJ (1999) CYP1A2 is not the primary enzyme responsible for 4-aminobiphenyl-induced hepatocarcinogenesis in mice. *Carcinogenesis*, **20**:1825–1830.

Koss LG, Melamed MR, Ricci A, Melick WF, Kelly RE (1965) Carcinogenesis in the human urinary bladder. Observations after exposure to *para*-aminodiphenyl. *New England Journal of Medicine*, **272**:767–770.

Koss LG, Melamed MR, Kelly RE (1969) Further cytologic and histologic studies of bladder lesions in workers exposed to *para*-aminodiphenyl: Progress report. *Journal of the National Cancer Institute*, **43**:233–243.

Kriek E (1992) Fifty years of research on *N*-acetyl-2-aminofluorene, one of the most versatile compounds in experimental research. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **118**:481–489.

IARC (1986) *Tobacco smoking*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 421 pp. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 38).

IARC (1987) 4-Aminobiphenyl (Group 1). In: *Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, pp. 91–92 (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Supplement 7).

Ioachim E, Charchanti A, Stavropoulos NE, Skopelitou A, Athanassiou ED, Agnantis NJ (2000) Immunohistochemical expression of retinoblastoma gene product (Rb), p53 protein, MDM2, c-erbB-2, HLA-DR and proliferation indices in human urinary bladder carcinoma. *Histology and Histopathology*, **15**:721–727.

Ishikawa J, Xu HJ, Hu SX, Yandell DW, Maeda S, Kamidono S, Benedict WF, Takahashi R (1991) Inactivation of the retinoblastoma gene in human bladder and renal cell carcinomas. *Cancer Research*, **51**:5736–5743.

Kadlubar FF, Miller JA, Miller EC (1977) Hepatic microsomal *N*-glucuronidation and nucleic acid binding of *N*-hydroxy arylamines in relation to urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Research*, **37**:805–814.

Kadlubar FF, Frederick CB, Weis CD, Zenser TV (1982) Prostaglandin endoperoxide synthetase-mediated metabolism of carcinogenic aromatic amines and their binding to DNA and protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **108**:253–258.

Kadlubar FF, Dooley KL, Teitel CH, Roberts DW, Benson RW, Butler MA, Bailey JR, Young JF, Skipper PW, Tannenbaum SR (1991) Frequency of urination and its effects on metabolism, pharmacokinetics, blood hemoglobin adduct formation, and liver and urinary bladder DNA adduct levels in beagle dogs given the carcinogen 4-aminobiphenyl. *Cancer Research*, **51**:4371–4377.

Kimura S, Kawabe M, Ward JM, Morishima H, Kadlubar FF, Hammons GJ, Fernandez-Salguero P, Gonzalez FJ (1999) CYP1A2 is not the primary enzyme responsible for 4-aminobiphenyl-induced hepatocarcinogenesis in mice. *Carcinogenesis*, **20**:1825–1830.

Koss LG, Melamed MR, Ricci A, Melick WF, Kelly RE (1965) Carcinogenesis in the human urinary bladder. Observations after exposure to *para*-aminodiphenyl. *New England Journal of Medicine*, **272**:767–770.

Koss LG, Melamed MR, Kelly RE (1969) Further cytologic and histologic studies of bladder lesions in workers exposed to *para*-aminodiphenyl: Progress report. *Journal of the National Cancer Institute*, **43**:233–243.

Kriek E (1992) Fifty years of research on *N*-acetyl-2-aminofluorene, one of the most versatile compounds in experimental research. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **118**:481–489.

Lakshmi VM, Mattammal MB, Zenser TV, Davis BB (1990) Mechanism of peroxidative activation of the bladder carcinogen 2-amino-4-(5-nitro-2-furyl)-thiazole (ANFT): Comparison with benzidine. *Carcinogenesis*, **11**:1965–1970.

Lang M, Pelkonen O (1999) Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. *IARC Scientific Publications*, **148**:13–22.

Littlefield NA, Farmer JH, Gaylor DW, Sheldon WG (1979) Effects of dose and time in a long-term, low-dose carcinogenic study. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, **3**:17–34.

Logothetis CJ, Xu HJ, Ro JY, Hu SX, Sahin A, Ordonez N, Benedict WF (1992) Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **84**:1256–1261.

Lower GM Jr, Nilsson T, Nelson CE, Wolf H, Gamsky TE, Bryan GT (1979) *N*-Acetyltransferase phenotype and risk in urinary bladder cancer: Approaches in molecular epidemiology. Preliminary results in Sweden and Denmark. *Environmental Health Perspectives*, **29**:71–79.

Lu ML, Wikman F, Orntoft TF, Charytonowicz E, Rabbani F, Zhang Z, Dalbagni G, Pohar KS, Yu G, Cordon-Cardo C (2002) Impact of alterations affecting the p53 pathway in bladder cancer on clinical outcome, assessed by conventional and array-based methods. *Clinical Cancer Research*, **8**:171–179.

Manjanatha MG, Li EE, Fu PP, Heflich RH (1996) H- and K-*ras* mutational profiles in chemically induced liver tumours from B6C3F1 and CD-1 mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **47**:195–208.

Martone T, Airoidi L, Magagnotti C, Coda R, Randone D, Malaveille C, Avanzi G, Merletti F, Hautefeuille A, Vineis P (1998) 4-Aminobiphenyl–DNA adducts and *p53* mutations in bladder cancer. *International Journal of Cancer*, **75**:512–516.

Mattano SS, Land S, King CM, Weber WW (1989) Purification and biochemical characterization of hepatic arylamine *N*-acetyltransferase from rapid and slow acetylators mice: Identity with arylhydroxamic acid *N,O*-acetyltransferase and *N*-hydroxyarylamines *O*-acetyltransferase. *Molecular Pharmacology*, **68**:599–609.

McQueen CA, Chau B, Erickson RP, Tjalkens RB, Philbert MA (2003) The effects of genetic variation in *N*-acetyltransferases on 4-aminobiphenyl genotoxicity in mouse liver. *Chemico-Biological Interactions*, **146**:51–60.

Melamed MR, Koss LG, Ricci A, Whitmore WF Jr (1960) Cytohistological observations on developing carcinoma of urinary bladder in man. *Cancer (Philadelphia)*, **13**:67–74.

Lakshmi VM, Mattammal MB, Zenser TV, Davis BB (1990) Mechanism of peroxidative activation of the bladder carcinogen 2-amino-4-(5-nitro-2-furyl)-thiazole (ANFT): Comparison with benzidine. *Carcinogenesis*, **11**:1965–1970.

Lang M, Pelkonen O (1999) Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. *IARC Scientific Publications*, **148**:13–22.

Littlefield NA, Farmer JH, Gaylor DW, Sheldon WG (1979) Effects of dose and time in a long-term, low-dose carcinogenic study. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, **3**:17–34.

Logothetis CJ, Xu HJ, Ro JY, Hu SX, Sahin A, Ordonez N, Benedict WF (1992) Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **84**:1256–1261.

Lower GM Jr, Nilsson T, Nelson CE, Wolf H, Gamsky TE, Bryan GT (1979) *N*-Acetyltransferase phenotype and risk in urinary bladder cancer: Approaches in molecular epidemiology. Preliminary results in Sweden and Denmark. *Environmental Health Perspectives*, **29**:71–79.

Lu ML, Wikman F, Orntoft TF, Charytonowicz E, Rabbani F, Zhang Z, Dalbagni G, Pohar KS, Yu G, Cordon-Cardo C (2002) Impact of alterations affecting the p53 pathway in bladder cancer on clinical outcome, assessed by conventional and array-based methods. *Clinical Cancer Research*, **8**:171–179.

Manjanatha MG, Li EE, Fu PP, Heflich RH (1996) H- and K-*ras* mutational profiles in chemically induced liver tumours from B6C3F1 and CD-1 mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **47**:195–208.

Martone T, Airoidi L, Magagnotti C, Coda R, Randone D, Malaveille C, Avanzi G, Merletti F, Hautefeuille A, Vineis P (1998) 4-Aminobiphenyl–DNA adducts and *p53* mutations in bladder cancer. *International Journal of Cancer*, **75**:512–516.

Mattano SS, Land S, King CM, Weber WW (1989) Purification and biochemical characterization of hepatic arylamine *N*-acetyltransferase from rapid and slow acetylators mice: Identity with arylhydroxamic acid *N,O*-acetyltransferase and *N*-hydroxyarylamines *O*-acetyltransferase. *Molecular Pharmacology*, **68**:599–609.

McQueen CA, Chau B, Erickson RP, Tjalkens RB, Philbert MA (2003) The effects of genetic variation in *N*-acetyltransferases on 4-aminobiphenyl genotoxicity in mouse liver. *Chemico-Biological Interactions*, **146**:51–60.

Melamed MR, Koss LG, Ricci A, Whitmore WF Jr (1960) Cytohistological observations on developing carcinoma of urinary bladder in man. *Cancer (Philadelphia)*, **13**:67–74.

Melick WF, Escue HM, Naryka JJ, Mezera RA, Wheeler EP (1955) The first reported cases of human bladder tumors due to a new carcinogen—Xenylamine. *Journal of Urology (Baltimore)*, **74**:760–766.

Melick WF, Naryka JJ, Kelly RE (1971) Bladder cancer due to exposure to *para*-aminobiphenyl: A 17-year follow-up. *Journal of Urology (Baltimore)*, **106**:220–226.

Merck (1998) *Merck veterinary manual*. Whitehouse Station, NJ, Merck & Co., Inc.

Miller JA, Miller EC (1977) Ultimate chemical carcinogens as reactive mutagenic electrophiles. In: Hiatt HH, Watson JD, Winsten JA, eds. *Origins of human cancer*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 605–627.

Miller JA, Wyatt CS, Miller EC, Hartmann HA (1961) The *N*-hydroxylation of 4-acetylamino-biphenyl by the rat and dog and the strong carcinogenicity of *N*-hydroxy-4-acetylamino-biphenyl in the rat. *Cancer Research*, **21**:1465–1473.

Oda Y (2004) Analysis of the involvement of human *N*-acetyltransferase 1 in the genotoxic activation of bladder carcinogenic arylamines using a SOS/umu assay system. *Mutation Research*, **554**:399–406.

Oscarson M, Ingelman-Sundberg M, Daly AK, Nebert DW (n.d.) *Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee* (<http://www.cypalleles.ki.se/>).

Parsons BL, Culp SJ, Manjanatha MG, Heflich RH (2002) Occurrence of H-*ras* codon 61 CAA to AAA mutation during mouse liver tumor progression. *Carcinogenesis*, **23**:943–948.

Parsons BL, Beland FA, Von Tungeln LS, Delongchamp RR, Fu P, Heflich RH (2005) Levels of 4-aminobiphenyl-induced somatic H-*ras* mutation in mouse liver correlate with potential for liver tumor development. *Molecular Carcinogenesis*, **42**:193–201.

Pauli BU, Alroy J, Weinstein RS (1983) The ultrastructure and pathobiology of urinary bladder cancer. In: Bryan GT, Cohen SM, eds. *The pathology of bladder cancer, Vol. II*. Boca Raton, FL, CRC Press, pp. 41–140.

Poirier MC, Beland FA (1992) DNA adduct measurements and tumor incidence during chronic carcinogen exposure in animal models: Implications for DNA adduct-based human cancer risk assessment. *Chemical Research in Toxicology*, **5**:749–755.

Poirier MC, Fullerton NF, Smith BA, Beland FA (1995) DNA adduct formation and tumorigenesis in mice during the chronic administration of 4-aminobiphenyl at multiple dose levels. *Carcinogenesis*, **16**:2917–2921.

Presti JCJ, Reuter VE, Galan T, Fair WR, Cordon-Cardo C (1991) Molecular genetic alterations in superficial and locally advanced human bladder cancer. *Cancer Research*, **51**:5405–5409.

Melick WF, Escue HM, Naryka JJ, Mezera RA, Wheeler EP (1955) The first reported cases of human bladder tumors due to a new carcinogen—Xenylamine. *Journal of Urology (Baltimore)*, **74**:760–766.

Melick WF, Naryka JJ, Kelly RE (1971) Bladder cancer due to exposure to *para*-aminobiphenyl: A 17-year follow-up. *Journal of Urology (Baltimore)*, **106**:220–226.

Merck (1998) *Merck veterinary manual*. Whitehouse Station, NJ, Merck & Co., Inc.

Miller JA, Miller EC (1977) Ultimate chemical carcinogens as reactive mutagenic electrophiles. In: Hiatt HH, Watson JD, Winsten JA, eds. *Origins of human cancer*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 605–627.

Miller JA, Wyatt CS, Miller EC, Hartmann HA (1961) The *N*-hydroxylation of 4-acetylamino-biphenyl by the rat and dog and the strong carcinogenicity of *N*-hydroxy-4-acetylamino-biphenyl in the rat. *Cancer Research*, **21**:1465–1473.

Oda Y (2004) Analysis of the involvement of human *N*-acetyltransferase 1 in the genotoxic activation of bladder carcinogenic arylamines using a SOS/umu assay system. *Mutation Research*, **554**:399–406.

Oscarson M, Ingelman-Sundberg M, Daly AK, Nebert DW (n.d.) *Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee* (<http://www.cypalleles.ki.se/>).

Parsons BL, Culp SJ, Manjanatha MG, Heflich RH (2002) Occurrence of H-*ras* codon 61 CAA to AAA mutation during mouse liver tumor progression. *Carcinogenesis*, **23**:943–948.

Parsons BL, Beland FA, Von Tungeln LS, Delongchamp RR, Fu P, Heflich RH (2005) Levels of 4-aminobiphenyl-induced somatic H-*ras* mutation in mouse liver correlate with potential for liver tumor development. *Molecular Carcinogenesis*, **42**:193–201.

Pauli BU, Alroy J, Weinstein RS (1983) The ultrastructure and pathobiology of urinary bladder cancer. In: Bryan GT, Cohen SM, eds. *The pathology of bladder cancer, Vol. II*. Boca Raton, FL, CRC Press, pp. 41–140.

Poirier MC, Beland FA (1992) DNA adduct measurements and tumor incidence during chronic carcinogen exposure in animal models: Implications for DNA adduct-based human cancer risk assessment. *Chemical Research in Toxicology*, **5**:749–755.

Poirier MC, Fullerton NF, Smith BA, Beland FA (1995) DNA adduct formation and tumorigenesis in mice during the chronic administration of 4-aminobiphenyl at multiple dose levels. *Carcinogenesis*, **16**:2917–2921.

Presti JCJ, Reuter VE, Galan T, Fair WR, Cordon-Cardo C (1991) Molecular genetic alterations in superficial and locally advanced human bladder cancer. *Cancer Research*, **51**:5405–5409.

Primdahl H, von der Maase H, Christensen M, Wolf H, Orntoft TF (2000) Allelic deletions of cell growth regulators during progression of bladder cancer. *Cancer Research*, **60**:6623–6629.

Reznikoff CA, Loretz LJ, Johnson MD, Swaminathan S (1986) Quantitative assessments of the cytotoxicity of bladder carcinogens towards cultured normal human uroepithelial cells. *Carcinogenesis*, **7**:1625–1632.

Roberts DW, Benson RW, Groopman JD, Flammang TJ, Nagle WA, Moss AJ, Kadlubar FF (1988) Immunochemical quantitation of DNA adducts derived from the human bladder carcinogen 4-aminobiphenyl. *Cancer Research*, **48**:6336–6342.

Sachse C, Bhambra U, Smith G, Lightfoot TJ, Barrett JH, Scollay J, Garner RC, Boobis AR, Wolf CR, Gooderham NJ, Colorectal Cancer Study Group (2003) Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (*CYP1A2*) in colorectal cancer patients and controls: Allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **55**:68–76.

Sarkar MA, Nseyo UO, Zhong B-Z (2002) Mutagenic outcome of the urinary carcinogen 4-aminobiphenyl is increased in acidic pH. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **11**:23–26.

Schieferstein GJ, Littlefield NA, Gaylor DW, Sheldon WG, Burgers GT (1985) Carcinogenesis of 4-aminobiphenyl in BALB/cStCrIc3Hf/Nctr mice. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, **21**:865–873.

Schroeder JC, Conway K, Li Y, Mistry K, Bell DA, Taylor JA (2003) *p53* mutations in bladder cancer: Evidence for exogenous versus endogenous risk factors. *Cancer Research*, **63**:7530–7538.

Sesardic D, Boobis AR, Edwards RJ, Davies DS (1988) A form of cytochrome P450 in man, orthologous to form *d* in the rat, catalyses the *O*-deethylation of phenacetin and is inducible by cigarette smoking. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **26**:363–372.

Skipper PL, Tannenbaum SR, Ross RK, Yu MC (2003) Nonsmoking-related arylamine exposure and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, **12**:503–507.

Smith BJ, Curtis JF, Eling TE (1991) Bioactivation of xenobiotics by prostaglandin H synthase. *Chemico-Biological Interactions*, **79**:245–264.

Sonich-Mullin C, Fielder R, Wiltse J, Baetcke K, Dempsey J, Fenner-Crisp P, Grant D, Hartley M, Knaap A, Krose D, Mangelsdorf I, Meek E, Rice JM, Younes M (2001) IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **34**:146–152.

Primdahl H, von der Maase H, Christensen M, Wolf H, Orntoft TF (2000) Allelic deletions of cell growth regulators during progression of bladder cancer. *Cancer Research*, **60**:6623–6629.

Reznikoff CA, Loretz LJ, Johnson MD, Swaminathan S (1986) Quantitative assessments of the cytotoxicity of bladder carcinogens towards cultured normal human uroepithelial cells. *Carcinogenesis*, **7**:1625–1632.

Roberts DW, Benson RW, Groopman JD, Flammang TJ, Nagle WA, Moss AJ, Kadlubar FF (1988) Immunochemical quantitation of DNA adducts derived from the human bladder carcinogen 4-aminobiphenyl. *Cancer Research*, **48**:6336–6342.

Sachse C, Bhambra U, Smith G, Lightfoot TJ, Barrett JH, Scollay J, Garner RC, Boobis AR, Wolf CR, Gooderham NJ, Colorectal Cancer Study Group (2003) Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (*CYP1A2*) in colorectal cancer patients and controls: Allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **55**:68–76.

Sarkar MA, Nseyo UO, Zhong B-Z (2002) Mutagenic outcome of the urinary carcinogen 4-aminobiphenyl is increased in acidic pH. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **11**:23–26.

Schieferstein GJ, Littlefield NA, Gaylor DW, Sheldon WG, Burgers GT (1985) Carcinogenesis of 4-aminobiphenyl in BALB/cStCrIc3Hf/Nctr mice. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, **21**:865–873.

Schroeder JC, Conway K, Li Y, Mistry K, Bell DA, Taylor JA (2003) *p53* mutations in bladder cancer: Evidence for exogenous versus endogenous risk factors. *Cancer Research*, **63**:7530–7538.

Sesardic D, Boobis AR, Edwards RJ, Davies DS (1988) A form of cytochrome P450 in man, orthologous to form *d* in the rat, catalyses the *O*-deethylation of phenacetin and is inducible by cigarette smoking. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **26**:363–372.

Skipper PL, Tannenbaum SR, Ross RK, Yu MC (2003) Nonsmoking-related arylamine exposure and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, **12**:503–507.

Smith BJ, Curtis JF, Eling TE (1991) Bioactivation of xenobiotics by prostaglandin H synthase. *Chemico-Biological Interactions*, **79**:245–264.

Sonich-Mullin C, Fielder R, Wiltse J, Baetcke K, Dempsey J, Fenner-Crisp P, Grant D, Hartley M, Knaap A, Krose D, Mangelsdorf I, Meek E, Rice JM, Younes M (2001) IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **34**:146–152.

Swaminathan S, Reznikoff CA (1992) Metabolism and nucleic acid binding of *N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl and *N*-acetoxy-4-acetylaminobiphenyl by cultured human uroepithelial cells. *Cancer Research*, **52**:3286–3294.

Talaska G, Dooley KL, Kadlubar FF (1990) Detection and characterization of carcinogen–DNA adducts in exfoliated urothelial cells from 4-aminobiphenyl-treated dogs by ³²P-postlabelling and subsequent thin-layer and high-pressure liquid chromatography. *Carcinogenesis*, **11**:639–646.

Tiguert R, Bianco FJJ, Oskanian P, Li Y, Grignon DJ, Wood DPJ, Pontes JE, Sarkar FH (2001) Structural alteration of p53 protein in patients with muscle invasive bladder transitional cell carcinoma. *Journal of Urology*, **166**:2155–2160.

Tsuneoka Y, Dalton TP, Miller ML, Clay CD, Shertzer HG, Talaska G, Medvedovic M, Nebert DW (2003) 4-Aminobiphenyl-induced liver and urinary bladder DNA adduct formation in Cyp1a2(–/–) and Cyp1a2(+ / +) mice. *Journal of the National Cancer Institute*, **95**:1227–1237.

Underwood PM, Zhou Q, Jaeger M, Reilman R, Pinney S, Warshawsky D, Talaska G (1997) Chronic, topical administration of 4-aminobiphenyl induces tissue-specific DNA adducts in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **144**:325–331.

Verghis SBM, Essigmann JM, Kadlubar FF, Morningstar ML, Lasko DD (1997) Specificity of mutagenesis by 4-aminobiphenyl: Mutations at G residues in bacteriophage M13 DNA and G → C transversions at a unique dG^{8-ABP} lesion in single-stranded DNA. *Carcinogenesis*, **18**:2403–2414.

Vineis P, Caporaso N, Tannenbaum SR, Skipper PL, Glogowski J, Bartsch H, Coda M, Talaska G, Kadlubar FF (1990) Acetylation phenotype, carcinogen–hemoglobin adducts, and cigarette smoking. *Cancer Research*, **50**:3002–3004.

Von Tungeln LS, Bucci TJ, Hart RW, Kadlubar FF, Fu PP (1996) Inhibitory effect of caloric restriction on tumorigenicity induced by 4-aminobiphenyl and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridine (PhIP) in the CD1 newborn mouse bioassay. *Cancer Letters*, **104**:133–136.

Vousden KH, Lu X (2002) Live or let die: The cell's response to p53. *Nature Reviews. Cancer*, **2**:594–604.

Walpole AL, Williams MHC, Roberts DC (1952) The carcinogenic action of 4-aminodiphenyl and 3:2'-dimethyl-4-aminodiphenyl. *British Journal of Industrial Medicine*, **9**:255–263.

Walpole AL, Williams MHC, Roberts DC (1954) Tumours of the urinary bladder in dogs after ingestion of 4-aminodiphenyl. *British Journal of Industrial Medicine*, **11**:105–109.

Swaminathan S, Reznikoff CA (1992) Metabolism and nucleic acid binding of *N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl and *N*-acetoxy-4-acetylaminobiphenyl by cultured human uroepithelial cells. *Cancer Research*, **52**:3286–3294.

Talaska G, Dooley KL, Kadlubar FF (1990) Detection and characterization of carcinogen–DNA adducts in exfoliated urothelial cells from 4-aminobiphenyl-treated dogs by ³²P- postlabelling and subsequent thin-layer and high-pressure liquid chromatography. *Carcinogenesis*, **11**:639–646.

Tiguert R, Bianco FJJ, Oskanian P, Li Y, Grignon DJ, Wood DPJ, Pontes JE, Sarkar FH (2001) Structural alteration of p53 protein in patients with muscle invasive bladder transitional cell carcinoma. *Journal of Urology*, **166**:2155–2160.

Tsuneoka Y, Dalton TP, Miller ML, Clay CD, Shertzer HG, Talaska G, Medvedovic M, Nebert DW (2003) 4-Aminobiphenyl-induced liver and urinary bladderDNA adduct formation in Cyp1a2(1/1) and Cyp1a2(+ / +) mice. *Journal of the National Cancer Institute*, **95**:1227–1237.

Underwood PM, Zhou Q, Jaeger M, Reilman R, Pinney S, Warshawsky D, Talaska G (1997) Chronic, topical administration of 4-aminobiphenyl induces tissue-specificDNA adducts in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **144**:325–331.

Verghis SBM, Essigmann JM, Kadlubar FF, Morningstar ML, Lasko DD (1997) Specificity of mutagenesis by 4-aminobiphenyl: Mutations at G residues in bacteriophage M13DNA and G → C transversions at a unique dG^{8-ABP} lesion in single-stranded DNA. *Carcinogenesis*, **18**:2403–2414.

Vineis P, Caporaso N, Tannenbaum SR, Skipper PL, Glogowski J, Bartsch H, Coda M, Talaska G, Kadlubar FF (1990) Acetylation phenotype, carcinogen–hemoglobin adducts, and cigarette smoking. *Cancer Research*, **50**:3002–3004.

Von Tungeln LS, Bucci TJ, Hart RW, Kadlubar FF, Fu PP (1996) Inhibitory effect of caloric restriction on tumorigenicity induced by 4-aminobiphenyl and 2-amino-1-methyl-6- phenylimidazo-[4,5-b]pyridine (PhIP) in the CD1 newborn mouse bioassay. *Cancer Letters*, **104**:133–136.

Vousden KH, Lu X (2002) Live or let die: The cell's response to p53. *Nature Reviews. Cancer*, **2**:594–604.

Walpole AL, Williams MHC, Roberts DC (1952) The carcinogenic action of 4- aminodiphenyl and 3:2'-dimethyl-4-aminodiphenyl. *British Journal of Industrial Medicine*, **9**:255–263.

Walpole AL, Williams MHC, Roberts DC (1954) Tumours of the urinary bladder in dogs after ingestion of 4-aminodiphenyl. *British Journal of Industrial Medicine*, **11**:105–109.

Weston A, Caporaso NE, Taghizadeh K, Hoover RN, Tannenbaum SR, Skipper PL, Resau JH, Trump BF, Harris CC (1991) Measurement of 4-aminobiphenyl–hemoglobin adducts in lung cancer cases and controls. *Cancer Research*, **51**:5219–5223.

Wright C, Thomas D, Mellon K, Neal DE, Horne CH (1995) Expression of retinoblastoma gene product and p53 protein in bladder carcinoma: Correlation with Ki67 index. *British Journal of Urology*, **75**:173–179.

Wu XR, Lin JH, Walz T, Haner M, Yu J, Aebi U, Sun TT (1994) Mammalian uroplakins. A group of highly conserved urothelial differentiation-related membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **269**:13716–13724.

Weston A, Caporaso NE, Taghizadeh K, Hoover RN, Tannenbaum SR, Skipper PL, Resau JH, Trump BF, Harris CC (1991) Measurement of 4-aminobiphenyl–hemoglobin adducts in lung cancer cases and controls. *Cancer Research*, **51**:5219–5223.

Wright C, Thomas D, Mellon K, Neal DE, Horne CH (1995) Expression of retinoblastoma gene product and p53 protein in bladder carcinoma: Correlation with Ki67 index. *British Journal of Urology*, **75**:173–179.

Wu XR, Lin JH, Walz T, Haner M, Yu J, Aebi U, Sun TT (1994) Mammalian uroplakins. A group of highly conserved urothelial differentiation-related membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **269**:13716–13724.

FORMALDEHYDE AND GLUTARALDEHYDE AND NASAL CYTOTOXICITY: CASE-STUDY WITHIN THE CONTEXT OF THE IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS¹

Douglas McGregor, Hermann Bolt, Vincent Cogliano, & Hans-Bernhard Richter-Reichhelm

Formaldehyde and glutaraldehyde cause toxicity to the nasal epithelium of rats and mice upon inhalation. In addition, formaldehyde above certain concentrations induces dose-related increases in nasal tumours in rats and mice, but glutaraldehyde does not. Using the 2006 International Programme on Chemical Safety (IPCS) human framework for the analysis of cancer mode of action (MOA), an MOA for formaldehyde was formulated and its relevance tested against the properties of the non-carcinogenic glutaraldehyde. These compounds produce similar patterns of response in histopathology and in genotoxicity tests (although formaldehyde has been much more extensively studied). The MOA is based on the induction of sustained cytotoxicity and reparative cell proliferation induced by formaldehyde at concentrations that also induce nasal tumours upon long-term exposure. Data on dose dependency and temporal relationships of key events are consistent with this MOA. While a genotoxic MOA can never be ruled out for a compound that is clearly genotoxic, at least in vitro, the non-genotoxic properties fundamental to the proposed MOA can explain the neoplastic response in the nose and may be more informative than genotoxicity in risk assessment. It is not yet fully explained why glutaraldehyde remains non-carcinogenic upon inhalation, but its greater inherent toxicity may be a key factor. The dual aldehyde functions in glutaraldehyde are likely to produce damage resulting in fewer kinetic possibilities (particularly for proteins involved in differentiation control) and lower potential for repair (nucleic acids) than would be the case for formaldehyde. While there have been few studies of possible glutaraldehyde-associated cancer, the evidence that formaldehyde is a human carcinogen is strong for nasopharyngeal cancers, although less so for sinonasal cancers. This apparent discrepancy could be due in part to the classification of human nasal tumours with tumours of the sinuses, which would receive much less exposure to inhaled formaldehyde. Evaluation of the human relevance of the proposed MOA of formaldehyde in rodents is restricted by human data limitations, although the key events are plausible. It is clear that the human relevance of the formaldehyde MOA in rodents cannot be excluded on either kinetic or dynamic grounds.

INTRODUCTION

Formaldehyde and glutaraldehyde are aliphatic mono- and dialdehydes, respectively, that undergo reactions typical of aldehydes to form acetals, cyanohydrins, oximes, hydrazones, and bisulfite complexes. They are highly reactive chemicals and produce covalently cross-linked complexes with DNA and proteins. Their metabolism has some commonality in that they are both oxidized by aldehyde dehydrogenases. Several studies have demonstrated that inhalation exposure to formaldehyde causes nasal tumours in rats, whereas no nasal tumours were observed in the only 2-year inhalation study of rats exposed to glutaraldehyde.

¹ This article, to which WHO owns copyright, was originally published in 2006 in *Critical Reviews in Toxicology*, Volume 36, pages 821–835. It has been edited for this WHO publication and includes corrigenda.

ホルムアルデヒド及びグルタルアルデヒドの鼻腔内細胞毒性:

発がん MOA のヒトへの関連性を解析するための

IPCS フレームワークを用いた事例研究¹

Douglas McGregor, Hermann Bolt, Vincent Cogliano, & Hans-Bernhard Richter-Reichhelm

ホルムアルデヒド及びグルタルアルデヒドは、吸入によりラット及びマウスの鼻腔上皮に毒性を示す。また、一定濃度以上のホルムアルデヒドはラットとマウスの鼻腔腫瘍を用量依存的に増加させるが、グルタルアルデヒドにそのような作用はない。発がん MOA 解析のための 2006 年国際化学物質安全性計画 (International Programme on Chemical Safety: IPCS) のヒトフレームワークを用いて、ホルムアルデヒドの MOA を策定し、非発がん性のグルタルアルデヒドの特性との関連性について検討した。これらの化合物は、病理組織学的検査及び遺伝毒性試験において同様の反応パターンを示した (ホルムアルデヒドの方が広範囲に研究されているものの)。MOA は、持続的な細胞毒性と再生細胞増殖の誘発に基づいており、長期ばく露によりホルムアルデヒドが鼻腔内腫瘍を誘発する濃度で生じるというものである。key events の用量依存性と時間的關係に関するデータは、この MOA と一致している。少なくとも in vitro 評価で遺伝毒性が明らかな化合物については、遺伝毒性 MOA を除外することはできない。しかし、提示されている MOA の基本となる非遺伝毒性は、鼻の腫瘍性病変を説明することができ、リスク評価において遺伝毒性よりも有益な情報を提供するかもしれない。グルタルアルデヒドを吸入しても発がん性を示さない理由はまだ完全には解明されていないが、固有の毒性が重要な要因である可能性がある。グルタルアルデヒドの二つのアルデヒド官能基は、ホルムアルデヒドに比べて、(特に分化制御に関与するタンパク質の場合) 運動性の低下や、(核酸の) 修復機能の低下へとつながる損傷を引き起こす可能性が高い。グルタルアルデヒドに関連した発がん性に関する研究はほとんどない。一方、ホルムアルデヒドがヒトの発がん物質であるというエビデンスは、副鼻腔がんでは少ないが、鼻咽頭がんについては多い。ホルムアルデヒドの吸入ばく露がはるかに少ない副鼻腔の腫瘍を鼻腔腫瘍と区別せず分類していることが一因となり、見かけの不一致を生み出していると考えられる。提示されているげっ歯類におけるホルムアルデヒドの MOA はヒトへの関連性評価については、key events は妥当ではあるが、ヒトのデータが限られているため限定的である。げっ歯類におけるホルムアルデヒドの MOA のヒトへの関連性は、動態的または薬力学的な理由から除外できないことは明らかである。

序文

ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドはそれぞれ脂肪族のモノアルデヒド、ジアルデヒドであり、アルデヒドに典型的な反応を経てアセタール、シアノヒドリン、オキシム、ヒドラゾン、重亜硫酸塩錯体を形成する。これらは反応性の高い化学物質であり、DNA やタンパク質と共有結合で架橋した錯体を生成する。これらの代謝には、アルデヒド脱水素酵素によって酸化されるといふ共通点がある。いくつかの研究では、ホルムアルデヒドの吸入ばく露はラットに鼻腔腫瘍を引き起こすことが示されているが、グルタルアルデヒドをラットに 2 年間吸入ばく露させた試験では鼻腔腫瘍は観察されなかった。

¹ WHO が著作権を有するこの論文は、*Critical Reviews in Toxicology*, Volume 36, pages 821-835 に 2006 年に掲載されたものである。この論文は、WHO の出版物のために編集されたものであり、コリゲンダが含まれている。

Formaldehyde

Formaldehyde has been tested for carcinogenicity by the inhalation route in mice, rats, and Syrian hamsters, by oral administration (drinking-water) in rats, by skin application in mice, and by subcutaneous injection in rats. There is conclusive evidence from the inhalation studies that formaldehyde is a carcinogen in rats.

There is considerable evidence that prolonged inhalation exposure to formaldehyde induces highly non-linear dose-related increases in the incidence of tumours of the anterior and posterior lateral meatus of rats (Morgan et al., 1986; Feron et al., 1988; Woutersen et al., 1989; Monticello et al., 1996; Kamata et al., 1997; CIIT, 1999). There are sharp increases in tumour incidence at formaldehyde concentrations equal to and greater than 7.2 mg/m³. Exposure to concentrations of 2.4 mg/m³ and lower induced no malignant nasal tumours. Table 1 combines the data from two published rat studies (Kerns et al., 1983a; Monticello et al., 1996) conducted at the same laboratory and some additional information from one of these studies on a number of rats that had not been examined at the time of the publications (Schlosser et al., 2003). The majority of formaldehyde-induced neoplasms were squamous cell carcinomas.

Table 1. Combined incidence of nasal squamous cell carcinomas in rats exposed to formaldehyde.

Formaldehyde concentration (mg/m³)	Number of rats at risk^a	Actual number of tumours^b
0	122	0
0.84	27	0
2.4	126	0
7.2	113	3
12	34	22
18	182	157

Note: Adapted from Schlosser et al. (2003).

^a Rats at risk are those that survived to 2 years and were examined at that time plus those that died before 2 years in which tumours were found.

^b Rats in which tumours were found at or before 2 years.

In contrast, inhalation studies in Syrian hamsters showed no carcinogenic effect at a single dose of 12.3 mg/m³ (Dalbey, 1982), and one of two inhalation studies in mice showed no effect in females and squamous cell carcinomas in 2/17 males killed at 2 years at a high-dose concentration of 17.6 mg/m³ (Kerns et al., 1983a, 1983b), whereas the other was inadequate for evaluation (Horton et al., 1963).

Studies on rats using other routes of exposure produced no significant results in two of four drinking-water studies (Takahashi et al., 1986; Tobe et al., 1989), forestomach papillomas in one study (Til et al., 1989), and leukaemia and gastrointestinal tract tumours in another (Soffritti et al., 1989), but the interpretation of the last study has been questioned (Feron et al., 1990). Mouse skin application and subcutaneous injection studies were not suitable for evaluation. In no study in rodents was there a significant increase in nasal tumours other than in the five inhalation exposure studies in rats—that is, at the entry portal.

ホルムアルデヒド

ホルムアルデヒドの発がん性試験は、マウス、ラット、シリアンハムスターを対象とした吸入試験、ラットを対象とした経口投与（飲料水）試験、マウスを対象とした皮膚貼付試験、ラットを対象とした皮下投与試験が行われている。ラットではホルムアルデヒドが発がん物質であるという決定的なエビデンスは吸入試験の結果から得られている。

ホルムアルデヒドへの長期吸入ばく露は、ラットの前方及び後方の側鼻道腫瘍の発生率を、非線形性用量相関的に増加させるというエビデンスがある（Morgan ら、1986；Feron ら、1988 年；Woutersen ら、1989 年；Monticello ら、1996 年；Kamata ら、1997 年；CIIT、1999 年）。ホルムアルデヒド濃度が 7.2 mg/m³ 以上になると、腫瘍発生率が急激に増加する。2.4 mg/m³ 以下の濃度ではばく露しても、悪性の鼻腔腫瘍は誘発されなかった。表 1 は、同じ研究室で実施された 2 つのラットの試験データ（Kerns ら、1983 年 a；Monticello ら、1996 年）と、これらの研究のうちの 1 つで、公表時には調査されていなかった数匹のラットについての追加情報を組み合わせたものである（Schlosser ら、2003 年）。ホルムアルデヒド誘発性腫瘍の多くは扁平上皮がんであった。

表 1. ホルムアルデヒドにばく露されたラットにおける鼻腔扁平上皮がんの複合発生率

ホルムアルデヒド濃度 (mg/m ³)	リスクを抱えるラットの数 ^a	実際の腫瘍数 ^b
0	122	0
0.84	27	0
2.4	126	0
7.2	113	3
12	34	22
18	182	157

注：Schlosser ら（2003）からの引用

^a リスクを抱えるラットとは、2 年まで生存し、その時点で検査を受けたラットと、腫瘍が見つかった 2 年以内に死亡したラットのことである。

^b 2 年以内に腫瘍が認められたラット

対照的に、シリアンハムスターを対象とした吸入試験では、12.3 mg/m³ の単回投与で発がん性を示さなかった（Dalbey, 1982 年）。マウスを用いた 2 つの吸入試験のうち 1 つは、17.6 mg/m³ の高用量濃度で雌には変化がなく、2 年の時点ですべて殺した雄 17 匹のうち 2 匹には扁平上皮がんが認められた（Kerns ら、1983 年 a、1983 年 b）。もう 1 つの試験は評価が不十分であった（Horton ら、1963 年）。

ラットを対象とした他のばく露経路を用いた試験では、4 つの飲水投与試験のうち 2 つの試験（Takahashi ら、1986 年；Tobe ら、1989 年）では有意な結果は得られなかった。もう 1 つの試験（Til ら、1989 年）では前胃乳頭腫、さらにもう一つの試験（Soffritti ら、1989 年）では白血病及び消化管腫瘍を認めた。しかし、最後に挙げた試験の解釈は疑問視されている（Feron ら、1990）。マウスの皮膚貼付試験及び皮下投与試験は評価に適さなかった。げっ歯類を対象とした研究では、ラットを対象とした 5 つの吸入ばく露試験以外に、鼻腔内腫瘍の有意な増加が認められた研究はなかった。

Glutaraldehyde

Glutaraldehyde has been tested for carcinogenicity by the inhalation route in mice and rats and by oral administration (drinking-water) in rats. Inhalation studies showed no carcinogenic effect in either B6C3F1 mice exposed to a single concentration of 400 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ for 78 weeks (Zissu et al., 1998) or multiple concentrations up to 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ for 2 years (NTP, 1999) or F344 rats exposed to concentrations of up to 3000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ for 2 years (NTP, 1999). In a drinking-water study in which male and female F344 rats were exposed to glutaraldehyde concentrations of up to 4000 mg/m^3 for 2 years, increased incidences of large granular cell lymphatic leukaemia were found in the spleen of females at all exposure concentrations (Ballantyne, 1995; Van Miller et al., 1995).

1. IS THE WEIGHT OF EVIDENCE SUFFICIENT TO ESTABLISH A MODE OF ACTION (MOA) IN ANIMALS?

A. Postulated mode of action

Prolonged exposure to formaldehyde above a critical concentration induces sustained cytotoxicity and cell proliferation. As a result of genetic changes within this proliferating cell population, neoplasia emerges. The genetic changes are postulated to be secondary to the cytotoxicity, metaplasia, and hyperplasia that are clearly induced by formaldehyde. Formaldehyde is a genotoxic substance *in vitro* and forms DNA–protein cross-links (DPX). DPX are a well established indicator of formaldehyde exposure, but it is not clear whether they are premutational lesions required to produce neoplasia (by initiating DNA replication errors, resulting in mutation). Apart from the abundance of DPX observations in rats, there is little evidence that formaldehyde is mutagenic to mammalian cells *in vivo*.

This postulated MOA is mainly based on observations of consistent, non-linear dose–response relationships for all three key events (sustained cell proliferation, DPX, and tumours) and concordance of incidence of these effects across regions of the nasal passages.

B. Key events

Formaldehyde

Limitation of damage to the entry portal following exposure to formaldehyde is clearly important, with metabolism playing a significant role in the process. The importance of the entry portal for formaldehyde-induced nasal tumours is supported by the observation that the principal non-neoplastic effect in rats exposed orally to formaldehyde solutions is the development of histological changes within the forestomach and glandular stomach (Til et al., 1989; Tobe et al., 1989).

Formaldehyde is an endogenous metabolic product of *N*-, *O*-, and *S*-demethylation reactions within cells (Hardman et al., 2001), and circulating concentrations of about 2.0–2.6 $\mu\text{g}/\text{g}$ blood are normal in unexposed mammals (Heck et al., 1982, 1985; Casanova et al., 1988). Exogenous formaldehyde is rapidly detoxified upon absorption. It has a half-life in plasma of about 1 min in rats exposed intravenously (Rietbrock, 1965), and it readily and spontaneously combines with reduced glutathione to form *S*-hydroxymethylglutathione, the substrate for alcohol dehydrogenase 3 (ADH3, also known as glutathione-dependent formaldehyde

グルタルアルデヒド

グルタルアルデヒドの発がん性については、マウス及びラットでは吸入試験、ラットでは経口投与（飲水投与）試験が行われている。吸入試験では、B6C3F1 マウスに 400 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の単濃度で 78 週間ばく露させた場合（Zissu ら、1998 年）、または 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ までの複数濃度で 2 年間ばく露させた場合（NTP、1999 年）、または F344 ラットに 3000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ までの濃度で 2 年間ばく露させた場合（NTP、1999 年）のいずれにおいても発がん性は認められなかった。雌雄の F344 ラットを最大 4000 mg/m^3 のグルタルアルデヒド濃度で 2 年間ばく露した飲水試験では、すべてのばく露濃度で雌の脾臓に大顆粒リンパ球性白血病の発生率増加が認められた（Ballantyne、1995；Van Miller ら、1995 年）。

1. 動物における作用機序(MOA)を立証するのにエビデンスの重み付けは十分か

A. 推定される MOA

一定濃度以上のホルムアルデヒドを長時間ばく露させると、持続的な細胞毒性と細胞増殖が誘発される。この増殖細胞塊内における遺伝的変化の結果、腫瘍が発生する。このような遺伝的変化は、ホルムアルデヒドによって明らかに誘導される細胞毒性、化生、過形成の二次的なものであると推測されている。ホルムアルデヒドは *in vitro* では遺伝毒性物質であり、DNA-タンパク質架橋（DPX）を形成する。DPX はホルムアルデヒドばく露の指標として確立されているが、それらが腫瘍発生に必要な突然変異前病変（DNA 複製エラーを起こし、突然変異をもたらす）であるかは明らかではない。ラットで DPX が豊富であることを除けば、ホルムアルデヒドが生体内で哺乳類の細胞に変異原性を示すというエビデンスはほとんどない。

この MOA は、主に 3 つの key events（持続的な細胞増殖、DPX、腫瘍）すべてについて一貫した非線形の用量反応関係が観察されたこと及び鼻腔全体でこれらの影響の発生率が一致していることに基づいて推測される。

B Key events

ホルムアルデヒド

ホルムアルデヒドばく露後の障害が侵入口に限定されることは明らかに重要であり、その過程では代謝が重要な役割を果たしている。ホルムアルデヒド誘発性鼻腔腫瘍における侵入口の重要性は、ホルムアルデヒド溶液を経口ばく露させたラットにおいて、主要な非腫瘍性の影響が前胃及び腺胃の組織学的変化の進展であったことから裏付けられる（Til ら、1989 年；Tobe ら、1989 年）。

ホルムアルデヒドは、細胞内の *N*-, *O*-及び *S*-脱メチル化反応の内因性代謝産物であり（Hardman ら、2001 年）、ばく露を受けていない哺乳類の正常な血中濃度は約 2.0–2.6 $\mu\text{g}/\text{g}$ である（Heck ら、1982 年、1985 年；Casanova ら、1988 年）。外因性ホルムアルデヒドは吸収されると急速に解毒される。ホルムアルデヒドを静脈内投与されたラットにおける血漿中の半減期は約 1 分で（Rietbrock、1965 年）、還元されたグルタチオンと容易かつ自然に結合する。そして、アルコール脱水素酵素 3（ADH3、グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素としても知られている）の基質である *S*-ヒドロキソメチルグルタチオンを形成し、*S*-ホルミルグルタチオンを産生する（Uotila & Koivusalo、1974 年；Koivusalo ら、1989 年）。

dehydrogenase) (Uotila & Koivusalo, 1974; Koivusalo et al., 1989), to form *S*-formylglutathione, which is further metabolized to formic acid and reduced glutathione by *S*-formylglutathione hydrolase (Uotila & Koivusalo, 1997). The K_M for initial binding of hydroxymethylglutathione with ADH3 is about 0.004 mmol/l, and the concentration of free formaldehyde is likely to be even lower (Uotila & Koivusalo, 1997; Hedberg et al., 1998). It may be toxicologically significant that formaldehyde also combines with thiols such as cysteine and cysteinylglycine (Holmquist & Vallee, 1991). In addition to this efficient metabolic detoxification mechanism, the mucociliary apparatus provides protection of the underlying epithelium from gases and vapours. Thus, in order to attain free formaldehyde concentrations that may be cytotoxic to the target tissue, relatively high concentrations of formaldehyde vapour must be delivered to the target site to overcome these protective mechanisms. Mechanistic events of clear significance for carcinogenicity occur at dose levels where formaldehyde detoxification mechanisms are saturated in rats (Casanova & Heck, 1987).

The predominant non-neoplastic and preneoplastic events that have been measured and associated with nasal cancer formation following inhalation exposure of the nasal epithelium to formaldehyde include cytotoxicity, DPX formation, nasal epithelial cell regenerative proliferation, squamous metaplasia, and inflammation, which are site-specific, highly non-linear response processes in concordance with the incidence of nasal tumours.

The relative magnitude of an increase in cell proliferation is dependent upon the size of the target cell population within specific regions of the nasal cavity and not always directly related to the length of exposure, or total cumulative exposure (Swenberg et al., 1983, 1986; Monticello et al., 1991, 1996; Monticello & Morgan, 1994). These factors have been well defined and measured in a number of studies in rat, monkey, and human epithelial cells. In a 24-month carcinogenicity assay with interim sacrifices at 3, 6, 12, and 18 months, cell proliferation was demonstrated in rats exposed to 7.2, 12, and 18 mg/m³ at all times (Monticello et al., 1991, 1996).

An immunohistochemical technique was used to assess the presence of p53 protein, a marker of cell proliferation (proliferating cell nuclear antigen, or PCNA), and tumour growth factor (TGF)- α in the histopathological sections of the same tumours. In addition to the p53-positive immunostaining in squamous cell carcinomas, especially in cells with keratinization, p53-positive immunostaining was observed in preneoplastic hyperkeratotic plaques, while normal nasal mucosa did not stain. A correlation was found between the distribution of immunostaining of PCNA and that of p53 (Wolf et al., 1995).

The formation of DPX in rats is a non-linear function of concentration (Casanova & Heck, 1987; Casanova et al., 1989, 1994; Heck & Casanova, 1995) and correlates with the site specificity of tumours (Casanova et al., 1994). Cross-links were not detected in the olfactory mucosa or in the bone marrow of rats (Casanova-Schmitz et al., 1984; Casanova & Heck, 1987). DPX have been found in rhesus monkeys following inhalation exposure to formaldehyde, with the highest concentrations in the middle turbinates, followed by the anterior lateral wall septum and nasopharynx (Casanova et al., 1991).

これは *S*-ホルミルグルタチオンヒドロラーゼ (Uotila & Koivusalo, 1997 年) によってさらにギ酸に代謝され、グルタチオンを減少させる。ADH3 とヒドロキシ-メチルグルタチオンの初期結合のための K_M 値は約 0.004 mmol/L であり、遊離ホルムアルデヒドの濃度はさらに低い可能性が高い (Uotila & Koivusalo, 1997 年; Hedberg ら, 1998 年)。また、ホルムアルデヒドがシステイン及びシステイニルグリシンのようなチオール類と結合することは、毒性学的に重要であるかもしれない (Holmquist & Vallee, 1991 年)。この効率的な解毒代謝メカニズムに加えて、絨毛粘膜はガスや蒸気から下層の上皮を保護する。したがって、標的組織において細胞毒性が発生する遊離ホルムアルデヒドを高濃度で得るためには、これらの保護機構を克服することが必要であり、比較的高濃度のホルムアルデヒド蒸気を標的部位に到達させる必要がある。発がん性にとって明確で意義のある機序的な事象は、ラットにおけるホルムアルデヒドの解毒機構が飽和している用量で発現することである (Casanova & Heck, 1987 年)。

ホルムアルデヒド吸入ばく露後に測定された鼻のがん形成と関連している主な非腫瘍性及び前腫瘍性徴候には、細胞毒性、DPX 形成、鼻腔上皮細胞の再生性増殖、扁平上皮化生及び炎症が含まれる。これらは部位特異的で高度に非線形な反応過程であり、鼻腔がんの発生率と一致している。

相対的な細胞増殖の亢進の程度は、鼻腔内の特定領域内の標的細胞集団の大きさに依存し、ばく露期間または累積ばく露の総量と常に相関するわけではない (Swenberg ら, 1983 年, 1986 年; Monticello ら, 1991 年, 1996 年; Monticello & Morgan, 1994 年)。これらの因子は、ラット、サル及びヒト上皮細胞を対象とした多くの研究で明らかにされ、測定されている。3、6、12 及び 18 ヶ月の途中計画殺を伴う 24 ヶ月の発がん性試験では、7.2、12 及び 18 mg/m³ の濃度でばく露されたラットはすべての時点で細胞増殖活性が実証された (Monticello ら, 1991, 1996 年)。

免疫組織化学的手法を用いて、同一腫瘍の病理組織切片中の細胞増殖マーカーである p53 タンパク質 (増殖細胞核抗原、または PCNA) 及び腫瘍成長因子 (TGF) を評価した。正常な鼻粘膜は陰性であったが、扁平上皮がんでは p53 陽性となり、特に前腫瘍性病変である角化亢進性プラーク内において角化した細胞での p53 陽性が観察された。PCNA の免疫染色の分布と p53 の免疫染色の分布との間に相関関係が認められた (Wolf ら, 1995 年)。

ラットにおける DPX の形成は、濃度の非線形関数であり (Casanova & Heck, 1987 年; Casanova ら, 1989 年, 1994 年; Heck & Casanova, 1995 年)、腫瘍の部位特異性と一致している (Casanova ら, 1994 年)。架橋はラットの嗅粘膜または骨髄では検出されなかった (Casanova-Schmitz ら, 1984 年; Casanova & Heck, 1987 年)。DPX はホルムアルデヒド吸入ばく露後のアカゲザルで認められており、その濃度が最も高い部位は中鼻甲介で、次いで前側壁中隔及び鼻咽頭であった (Casanova ら, 1991 年)。

Studies of rats, mice, Syrian hamsters, and rhesus monkeys exposed to formaldehyde for 13 (mice) or 26 weeks found that squamous metaplasia in the nasal turbinates developed in rats and rhesus monkeys at 3.7 mg/m³, but not in Syrian hamsters or, at 4.9 mg/m³, in mice (Rusch et al., 1983; Maronpot et al., 1986). Cell replication is also a feature of the more tumour-susceptible areas of the nasal epithelium of rats (Casanova et al., 1994).

Glutaraldehyde

Inhalation exposure to glutaraldehyde at 400 µg/m³ for 78 weeks resulted in non-neoplastic lesions in the nasal vestibule of female mice, consisting of hyperplasia of the squamous epithelium lining the dorsal wall and the lateral aspect of the atrioturbinate (Zissu et al., 1998).

In the United States National Toxicology Program (NTP) studies of glutaraldehyde, the nasal changes observed in male and female rats included the following:

1. In the squamous epithelium in the most rostral part of the nasal passage, behind the external nares, there were increased incidences of hyperplasia and inflammation. The hyperplasia was a minimal to marked change characterized by variable thickening of the epithelium due to an increase in the number of cell layers and, in the more severe cases, varying degrees of keratin accumulation.
2. In the respiratory epithelium, there was hyperplasia, minimal goblet cell hyperplasia (primarily along the nasal septum and ventral meatus), inflammation, and squamous metaplasia, with accumulation of keratin on the epithelial surface in the more severe cases.
3. In the olfactory epithelium of the dorsal meatus, there were slightly increased incidences of hyaline degeneration.

The glutaraldehyde-associated inflammation that was observed in the squamous epithelial and respiratory epithelial regions was a minimal to marked change consisting of multifocal to locally extensive infiltrates of neutrophils, lymphocytes, and plasma cells. Occasionally, there were a few macrophages within the lamina propria and, in severe cases, within the epithelium itself. In male and female mice of this same study, the lesions were qualitatively similar to those found in rats. Females were more severely affected than male mice.

Glutaraldehyde induced DPX in a TK6 human lymphoblast cell line (St. Clair et al., 1991). In vivo, glutaraldehyde induced cell proliferation (S-phase nuclei) in nasal cells in rats and mice exposed by inhalation (Gross et al., 1994) and nasal instillation (St. Clair et al., 1990). In a parallel nasal instillation study by the same authors, formaldehyde induced the same level of cell proliferation at 20-fold higher molar concentrations.

C. Dose-response relationship

Formaldehyde

Available data from rats exposed to formaldehyde show a highly non-linear dose-response pattern for the key events, with no observed effects at 2.4 mg/m³, a minimal response at 7.2 mg/m³, and a sharp increase at 12 and 18 mg/m³.

ラット、マウス、シリアンハムスター及びアカゲザルにホルムアルデヒドを 13 週間（マウス）または 26 週間ばく露した研究において、ラット及びアカゲザルでは鼻尖部の扁平上皮化生が 3.7 mg/m³で発現したが、シリアンハムスター及びマウスでは 4.9 mg/m³でも発現しなかった (Rusch ら、1983 年；Maronpot ら、1986 年)。細胞の複製は、ラット鼻腔上皮のうち腫瘍感受性がより高い領域の特徴でもある (Casanova ら、1994 年)。

グルタルアルデヒド

400 µg/m³の濃度でグルタルアルデヒドを 78 週間吸入ばく露させた結果、雌マウスの鼻前庭に非腫瘍性の病変が生じた。その病変は、背側壁を覆う扁平上皮の過形成及びアトリオタービネート (atrioturbinate) の側方面の過形成である (Zissu ら、1998 年)。

グルタルアルデヒドの米国国家毒性プログラム (NTP) の研究では、雌雄ラットにおいて以下のような鼻の変化が認められた。

1. 鼻腔の最も吻側にある扁平上皮、外鼻腔の後ろにある扁平上皮では、過形成と炎症の発生率が増加していた。過形成は、細胞層数の増加による上皮の不均一な肥厚と、より重篤な症例では、様々な程度のセラチンの蓄積を特徴とする変化であった。
2. 呼吸上皮では、過形成、軽微な杯細胞過形成（主に鼻中隔及び腹側中隔に沿って）、炎症及び扁平上皮化生が認められ、重度の症例では上皮表面にセラチンが蓄積していた。
3. 背側中膜の嗅覚上皮では、硝子変性がわずかに認められた。

扁平上皮及び呼吸上皮で観察されたグルタルアルデヒド関連の炎症は、好中球、リンパ球及び形質細胞の多巢性から広範な浸潤にわたる様々な程度の変化があった。時折、固有層内に数個のマクロファージが存在し、重度の場合には上皮にも存在していた。この研究では雌雄のマウスにおいて、病変の質はラットと類似していたが、雌の方が雄よりも重症度は高かった。

グルタルアルデヒドは、TK6 ヒトリンパ芽細胞株において DPX を誘発した (St. Clair ら、1991 年)。in vivo では、グルタルアルデヒドは、吸入 (Gross ら、1994 年) 及び鼻腔内投与 (St. Clair ら、1990 年) によってばく露されたラット及びマウスの鼻腔内細胞において細胞増殖 (S 期) を誘導した。同じ著者による並行して実施された鼻腔内投与試験において、ホルムアルデヒドでは、20 倍高いモル濃度で同様の細胞増殖を誘発した。

C. 用量反応関係

ホルムアルデヒド

ホルムアルデヒドをばく露したラットから得られたデータによると、key events の用量反応パターンは非線形であり、2.4 mg/m³では反応を認めず、7.2 mg/m³では最小の反応を認め、12 及び 18 mg/m³では急激に反応が増加している。

In rats exposed to formaldehyde, no increases in cell turnover or DNA synthesis were found in the nasal mucosa after subchronic or chronic exposure to concentrations of $\leq 2.4 \text{ mg/m}^3$ (Rusch et al., 1983; Zwart et al., 1988; Monticello et al., 1991; Casanova et al., 1994). Small, site-specific increases in the rate of cell turnover were noted at 3.7 mg/m^3 (6 h/day, 5 days/week, for 13 weeks) in Wistar rats (Zwart et al., 1988) and in the rate of DNA synthesis at 7.2 mg/m^3 in Fischer 344 rats exposed for a similar period (Casanova et al., 1994). At these concentrations, however, an adaptive response would seem to occur in rat nasal epithelium, since cell turnover rates after 6 weeks (Monticello et al., 1991) or 13 weeks (Zwart et al., 1988) are lower than those after 1–4 days of exposure. The unit length labelling index (ULLI) method was used to establish the proliferation in male Fischer 344 rats exposed to formaldehyde concentrations of 0, 0.84, 2.4, 7.2, 12, or 18 mg/m^3 for 6 h/day, 5 days/week, for 3, 6, 12, 18, or 24 months. Significant increases in ULLI were present only in the 12 and 18 mg/m^3 groups, with the greater increases on the anterior lateral meatus and the medial maxilloturbinate. Elevated ULLI in the anterior dorsal septum developed later in the course of the exposure. This belated elevation of ULLI may have been secondary to changes in airflow patterns and thus local formaldehyde concentrations associated with growth of lesions and distortion of the airspace in those areas of the nose more susceptible to neoplasia (Monticello et al., 1996).

The non-linear relationships for formaldehyde-induced DPX formation, epithelial cell proliferation, and subsequently nasal tumours are demonstrated in Table 2. It is arguable that the designations of high- and low-tumour areas proposed by Casanova et al. (1994) are not the most appropriate, and consequently the truly high tumour incidence region DPX response may have been diluted by that of the intermediate tumour incidence (posterior lateral meatus) region.

Other studies showed that Fischer 344 rats exposed to 1.2 mg/m^3 (22 h/day, 7 days/week, for 26 weeks) developed no detectable nasal lesions, whereas at 3.6 mg/m^3 , the only histological change was squamous metaplasia in the nasal turbinates (Rusch et al., 1983). The development of mild squamous metaplasia was similarly demonstrated in the nasal turbinates of Fischer 344 rats exposed to 2.4 mg/m^3 (6 h/day, 5 days/week, for 24 months) (Kerns et al., 1983b). Epithelial dysplasia and rhinitis were also observed in these rats. The occurrence of squamous metaplasia appears to be the histological feature requiring the lowest formaldehyde concentration of any of the in vivo responses reported.

A rat, anatomically accurate computational fluid dynamics model was used to test whether the distribution of formaldehyde-induced squamous metaplasia was related to the location of high-flux regions posterior to the squamous epithelium. Squamous metaplasia was considered present when $\geq 50\%$ of a subsection was lined by squamous epithelium. No squamous metaplasia was present in sections of nose from rats exposed to 2.4 mg/m^3 or less. Squamous metaplasia was present on the lateral meatus after exposure to 7.2 mg/m^3 or more and on the lateral and medial walls of the airway after exposure to 12 or 18 mg/m^3 (Kimbell et al., 1997).

There is evidence that glutathione-mediated detoxification of formaldehyde within nasal tissues becomes saturated in rats at inhalation exposures above 4.8 mg/m^3 . This saturation of

ホルムアルデヒドにばく露されたラットでは、 2.4 mg/m^3 以下の濃度に亜慢性または慢性的にばく露した後の鼻粘膜で、細胞の再生及び DNA 合成の増加は認められなかった (Rusch ら, 1983 年; Zwart ら, 1988 年; Monticello ら, 1991 年; Casanova ら, 1994 年)。Wistar ラットでは細胞の再生速度の部位特異的な軽度の増加が 3.7 mg/m^3 (6 時間/日、5 日/週、13 週間) で認められた (Zwart ら, 1988 年)。同様の期間ばく露した Fischer 344 ラットでは DNA 合成速度の増加が 7.2 mg/m^3 で認められた (Casanova ら, 1994 年)。しかしながら、これらの濃度では、6 週間後 (Monticello ら, 1991 年) または 13 週間後 (Zwart ら, 1988 年) の細胞再生率がばく露 1~4 日後よりも低いため、ラットの鼻腔上皮では適応反応が起こると思われる。単位長ラベリング指数 (ULLI) 法を用いて、0、0.84、2.4、7.2、12、または 18 mg/m^3 のホルムアルデヒド濃度に 6 時間/日、5 日/週、3、6、12、18、または 24 ヶ月間ばく露した雄の Fischer 344 ラットにおける増殖を測定した。ULLI の有意な上昇は 12 及び 18 mg/m^3 群でのみ認められ、前側側鼻道及び内側上顎鼻甲介での上昇が大きかった。前背側中隔における ULLI の上昇は、ばく露後しばらくしてから発現した。この遅発性の ULLI 上昇は、鼻腔腫瘍の影響を受けやすい部分における、病変の成長と空隙の歪みに関連する局所的なホルムアルデヒド濃度の変化でおこる気流変化による二次的なものと考えられた (Monticello ら, 1996 年)。

ホルムアルデヒド誘発性 DPX 形成、上皮細胞増殖及びその後の鼻腔腫瘍の非線形関係を表 2 に示す。Casanova ら (1994 年) が提示した高腫瘍領域と低腫瘍領域の指定は最適なものではなく、真に腫瘍発生率の高い領域の DPX 反応は、中間的な腫瘍発生率 (後方側鼻道) 領域の DPX 反応によって希釈されている可能性がある。

他の研究では、 1.2 mg/m^3 (1 日 22 時間、7 日/週、26 週間) にばく露した Fischer 344 ラットでは、検出可能な鼻腔病変は認められなかったが、 3.6 mg/m^3 において組織学的変化は鼻甲介の扁平上皮化生のみであった (Rusch ら, 1983 年)。同様に 2.4 mg/m^3 (6 時間/日、5 日/週、24 ヶ月間) にばく露した Fischer 344 ラットの鼻甲介においても、軽度な扁平上皮化生の発生が示された (Kerns ら, 1983 年 b)。これらのラットでは上皮異形成及び鼻炎も観察された。扁平上皮化生の発生は、報告されている生体内反応の中で最も低濃度のホルムアルデヒドで発生する組織学的所見だと思われる。

ラットにおいて正確に計算された解剖学的流体力学モデルを用いて、ホルムアルデヒドによって誘発される扁平上皮化生の分布が、扁平上皮の後方にある高流量領域に関係しているかどうかを検証した。50%以上が扁平上皮に置き換わっている場合、扁平上皮化生が生じているとみなされた。 2.4 mg/m^3 以下でばく露されたラットの鼻には扁平上皮化生は認められなかった。 7.2 mg/m^3 以上のばく露では側鼻道に、12 または 18 mg/m^3 のばく露では気道の側壁及び内側壁に扁平上皮化生がみられた (Kimbell ら, 1997 年)。

4.8 mg/m^3 以上の吸入ばく露では、ラットで鼻組織内のホルムアルデヒドのグルタチオン介在性の解毒が飽和状態に達するというエビデンスがある。ホルムアルデヒド代謝の飽和は、この濃度以上のばく露における DPX、細胞増殖及び腫瘍発生率の用量反応関係の非線形性に寄与する可能性がある (Casanova & Heck, 1987 年)。

formaldehyde metabolism may contribute to the non-linearity of the dose-response relationships for DPX, cell proliferation, and tumour incidence at exposures above this level (Casanova & Heck, 1987).

Table 2. Comparative effects of formaldehyde exposure upon cell proliferation, DNA-protein cross-linking, and tumour incidence.

Formaldehyde concentration (mg/m ³)	Cell proliferation ([³ H]thymidine-labelled cells/mm basement membrane) ^a		DNA-protein cross-link formation (pmol [¹⁴ C]-formaldehyde bound/mg DNA) ^b		Incidence of nasal carcinoma ^c				
	Anterior lateral meatus	Posterior lateral meatus	Anterior mid-septum	"High-tumour region"	"Low-tumour region"	All sites	Anterior lateral meatus	Posterior lateral meatus	Anterior mid-septum
0	10.11	7.69	6.58	0	0	0/90	0/90	0/90	0/90
0.84	10.53	7.82	8.04	5	5	0/90	0/90	0/90	0/90
2.4	9.83	11.24	12.74	8	8	0/96	0/96	0/96	0/96
7.2	15.68	9.96	4.15	30	10	1/90	1/90	0/90	0/90
12	76.79	15.29	30.01	—	—	20/90	12/90	2/90	0/90
18	93.22	59.52	75.71	150	60	69/147	17/147	9/147	8/147

^a Cell proliferation measured in three locations of the nasal epithelium in male F344 rats exposed to the indicated concentrations of formaldehyde, 6 h/day, 5 days/week, for 3 months (Monticello et al., 1996).

^b Extent of DNA-protein cross-link formation measured in two regions of the nasal cavity (respiratory mucosa) in male F344 rats exposed to the indicated concentrations of formaldehyde, 6 h/day, 5 days/week, for about 12 weeks; the complete lateral meatus was designated the "high-tumour region"; the "low-tumour region" comprised the medial aspects of naso- and maxilloturbinates, posterior lateral wall, posterior dorsal septum excluding olfactory region, and nasopharyngeal meatuses (Casanova et al., 1994). Data were derived from graphical representations in the reference cited.

^c Incidence of nasal tumours within the entire nasal cavity or the anterior lateral meatus, posterior lateral meatus, or anterior mid-septum in male F344 rats exposed to the indicated concentrations of formaldehyde, 6 h/day, 5 days/week, for 24 months (Monticello et al., 1996).

Glutaraldehyde

A series of repeated-dose experiments with rats and mice exposed to glutaraldehyde has been summarized by NICNAS (1994). Among these, the lowest concentration producing lesions of the nasal cavity of rats was 1000 µg/m³ (6 h/day, 5 days/week, for 13 weeks) (NTP, 1993). The most severe lesions occurred in the anterior portions of the nasal passages and involved both the respiratory and olfactory epithelium. Hyperplasia and squamous metaplasia were most commonly noted on the lateral wall of the nasal cavity and on the tips of the nasoturbinate. Lesions were most extensive in rats exposed to 4000 µg/m³, but were also noted in the 1000 and 2000 µg/m³ groups and in one male exposed to 500 µg/m³. In another study in rats, no nasal lesions were observed at concentrations up to 776 µg/m³ delivered for 14 weeks (Bushy Run, 1983).

Mice appeared to be more sensitive to glutaraldehyde inhalation in a 13-week study, with inflammation of the nasal cavity being observed in female mice even at the lowest concentration of 250 µg/m³ and in male mice at 1000 µg/m³. The species difference in

表 2. ホルムアルデヒドばく露の影響の比較：細胞増殖、DNA-タンパク質架橋及び腫瘍発生率

ホルムアル デヒド濃度 (mg/m ³)	DNA-タンパク質 架橋形成 (pmol [¹⁴ C]-ホルムアル デヒド結合/mg DNA) ^b									鼻腔がんの発生率 ^c
	細胞増殖 ([³ H]チミジン標識細胞/mm 基底膜) ^a									
	前側 鼻道	後側 鼻道	前中隔	高腫瘍 領域	低腫瘍 領域	全体	前側 鼻道	後側 鼻道	前中隔	
0	10.11	7.69	6.58	0	0	0/90	0/90	0/90	0/90	
0.84	10.53	7.82	8.04	5	5	0/90	0/90	0/90	0/90	
2.4	9.83	11.24	12.74	8	8	0/96	0/96	0/96	0/96	
7.2	15.68	9.96	4.15	30	10	1/90	1/90	0/90	0/90	
12	76.79	15.29	30.01	—	—	20/90	12/90	2/90	0/90	
18	93.22	59.52	75.71	150	60	69/147	17/147	9/147	8/147	

^a 指定された濃度のホルムアルデヒドに 6 時間/日、週 5 日/週、3 ヶ月間ばく露した雄の F344 ラットの鼻腔上皮の 3 箇所測定した細胞増殖 (Monticello ら、1996 年)。

^b 指定された濃度のホルムアルデヒドに 6 時間/日、5 日/週、約 12 週間ばく露した雄の F344 ラットの鼻腔 (呼吸器粘膜) の 2 つの領域で測定した DNA-タンパク質架橋形成の程度。腫瘍低発生領域は、鼻腔及び側鼻道の内側壁、後側壁、嗅覚領域を除く後背側鼻道及び鼻中隔からなる (Casanova ら、1994 年)。データは引用文献中のグラフに基づいている。

^c 指定された濃度のホルムアルデヒドに 1 日 6 時間、1 日 5 日/週、24 ヶ月間ばく露した雄 F344 ラットにおける鼻腔全体または鼻腔内の鼻腔腫瘍の発生率、または前側鼻道、後側鼻道、または前中隔の発生率 (Monticello ら、1996 年)。

グルタルアルデヒド

グルタルアルデヒドにばく露したラット及びマウスを用いた一連の反復投与試験が NICNAS (1994 年) にまとめられている。その中で、ラットの鼻腔に病変を生じる最も低い濃度は 1000 µg/m³ (6 時間/日、5 日/週、13 週間) であった (NTP、1993 年)。最も重篤な病変は鼻腔前部に発生し、呼吸上皮と嗅上皮の両方を障害した。過形成及び扁平上皮化生は、鼻腔の側壁及び鼻尖部に最もよく認められた。病変は 4000 µg/m³ にばく露されたラットで最も広範囲に認められたが、1000 及び 2000 µg/m³ 群でも認められ、500 µg/m³ 群の雄 1 匹でも認められた。ラットを用いた別の研究では、最大 776 µg/m³ の濃度で 14 週間投与しても鼻の病変は観察されなかった (Bushy Run、1983 年)。

マウスはグルタルアルデヒド吸入による感受性が高いようであり、13 週間の試験で雌マウスでは最低濃度の 250 µg/m³ で、雄マウスでは 1000 µg/m³ でも鼻腔の炎症が観察された。このような感受性の違いは、マウスのほうが気道が狭いためゴミなどで閉塞しやすいためと考えられる (NTP、1993 年)。呼吸器の病理組織学的病変は 4000 µg/m³ 群のマウスで最も重篤であり、喉頭上皮の扁平上皮の軽度から中程度の扁平上皮化生、鼻腔前部の膿瘍性炎症がみられた。

sensitivity is probably due to the smaller airways of mice being more prone to blockage by debris (NTP, 1993). Histopathological lesions in the respiratory tract were most severe in mice in the 4000 µg/m³ group and consisted of minimal to mild squamous metaplasia of the laryngeal epithelium, suppurative inflammation in the anterior parts of the nasal cavity, and minimal squamous metaplasia on the tips of the nasoturbinate. Necrosis and inflammation were noted at lower concentrations, primarily in the anterior portion of the nasal passage.

In the NTP (1993) 13-week studies with glutaraldehyde, there were significant, exposure-related increases in ULLI in the squamous epithelium of the nasal vestibule and, to a lesser extent, the respiratory epithelium of the atrioturbinate of the dorsal meatus. The exposure-related increase in cell replication was generally greater in rats than in mice. Upon examining the results in individual mice, it was found that there was an increased rate of cell replication in the squamous epithelium of the nasal vestibule only of those mice in which there was also neutrophilic infiltration of the mucosa; however, the severity of the infiltrate did not correlate with the degree of cell proliferation. These observations were clearest at 13 weeks, particularly in female mice. In rats, in addition to increased replication in the squamous epithelium of the vestibule, there was an equally prominent increase in replication in the respiratory epithelium of the dorsal atrioturbinate, whereas in mice, the response in this area was weak.

D. Temporal association

Formaldehyde

A number of short-, medium-, and long-term studies of the effect of formaldehyde exposure on cell proliferation within the respiratory epithelium of rats have indicated a sustained increase in proliferation of nasal epithelial cells following exposure to concentrations greater than 2.4 mg/m³, irrespective of the exposure period. Cell proliferation was observed in rats exposed to formaldehyde for periods from as short as 3 days. In the ULLI study already described, the magnitude of increased cell proliferation generally decreased over time but remained significantly increased by approximately 2- to 10-fold over controls, for certain nasal locations, up to and including the 18-month observation period when this effect was last examined (Monticello et al., 1996).

Data relating to temporal associations for DPX are limited, as most formaldehyde inhalation studies of DPX formation are of short duration (i.e. exposure duration up to 1 day). Formaldehyde-induced DPX in the nasal epithelium of rats and rhesus monkeys was shown consistently in these studies (Casanova et al., 1991). However, a well conducted study investigating both acute and cumulative DPX yields in rats exposed to formaldehyde for about 12 weeks (Casanova et al., 1994) found that the acute DPX yield in the lateral meatus (a high tumour yield site) of previously exposed rats was about half that in naive rats at concentrations greater than 7.2 mg/m³, while there were no differences in the medial and posterior meatuses (low tumour yield sites). No significant accumulation of DPX occurred in previously exposed rats.

Regenerative cell proliferation following formaldehyde-induced cytotoxicity increases the number of DNA replications and thus increases the probability of DPX-initiated DNA

鼻尖部の扁平上皮化生は軽度であった。壊死と炎症は低濃度で、主に鼻腔前部で認められた。

グルタルアルデヒドを用いた NTP (1993 年) の 13 週間の試験では、鼻前庭の扁平上皮と、それよりも軽度ではあるが、背側鼻道のアトリオタービネートの呼吸器上皮において、ばく露に関連した ULLI の有意な増加が認められた。ばく露に関連した細胞増殖活性は、一般的にマウスよりもラットの方が高かった。個々のマウスを調べたところ、鼻前庭の扁平上皮では、粘膜に好中球浸潤が認められたマウスでのみ細胞増殖率の増加が認められた。ただし、細胞増殖の程度と浸潤の重症度は相関していなかった。これらの観察は、特に雌マウスでは 13 週目に最も明らかになった。ラットでは、前庭の扁平上皮の増殖増加に加えて、背側のアトリオタービネートの呼吸器上皮でも同様に顕著な増殖増加がみられたが、マウスではこの領域での反応は弱かった。

D. 時間的関連性

ホルムアルデヒド

ラットの呼吸器上皮内の細胞増殖に対するホルムアルデヒドばく露の影響について、短期、中期、長期の研究では、ばく露期間にかかわらず、2.4 mg/m³ 以上の濃度にばく露した後、鼻腔上皮細胞の増殖が持続的に増加することが示されている。ホルムアルデヒドにばく露したラットでは、3 日間という短い期間から細胞増殖が観察された。すでに述べた ULLI 研究では、一般的に細胞増殖の増加率は時間の経過とともに減少したが、この影響は、特定の鼻腔部位では対照群の約 2～10 倍の増加を示し、最長で 18 ヶ月間の観察期間を含めて試験終了まで持続していた (Monticello ら、1996 年)。

ほとんどのホルムアルデヒド吸入による DPX 形成の研究は短期間 (すなわち、ばく露期間が 1 日まで) であるため、DPX の時間的関連性に関するデータは乏しい。ホルムアルデヒド誘発性 DPX は、ラットとアカゲザルの鼻腔上皮における研究で一貫して示された (Casanova ら、1991 年)。しかし、ホルムアルデヒドに約 12 週間ばく露したラットの急性及び累積 DPX 収量を調べる研究 (Casanova ら、1994 年) において、7.2 mg/m³ 以上の濃度では、事前にばく露されたラットの側鼻道 (腫瘍発生率の高い部位) の急性 DPX 収量は、対照群の約半分であったが、内側及び後側の鼻道 (腫瘍発生率の低い部位) では差が見られなかった。事前にばく露されたラットでは、DPX の有意な蓄積は認められなかった。

ホルムアルデヒド誘発細胞毒性後の再生性細胞増殖は、DNA 複製数を増加させる。その結果、DPX が誘発する DNA 複製エラーを増加させ、突然変異を引き起こす。この仮説は、高濃度におけるラットの鼻での DNA 複製の阻害 (Heck & Casanova, 1995 年) 及び前腫瘍病変における p53 発現の増加 (Wolf ら、1995 年) によって支持される。

replication errors, resulting in mutations. This hypothesis is supported by the observed inhibition of DNA replication in the rat nose at elevated concentrations (Heck & Casanova, 1995) and increased p53 expression in preneoplastic lesions (Wolf et al., 1995). In 5 of 11 squamous cell carcinomas from rats exposed to 18 mg/m³ for up to 2 years, there were point mutations at the GC base pairs in the p53 complementary DNA (cDNA) sequence (Recio et al., 1992).

Glutaraldehyde

The study of cell replication in the 13-week rat and mouse inhalation studies with glutaraldehyde (NTP, 1993) showed that, in contrast to the results obtained for mice, the increased cell replication (ULLI) in the nasal vestibule of rats occurred early (within a few days) and either remained elevated or decreased slightly through the course of the study. Increases in ULLI in the nasal vestibule of mice tended to develop with time. In an inhalation study with mice (Zissu et al., 1994), the earliest lesions were observed in the respiratory epithelium of the septum and the naso- and maxilloturbinates after 4 days of exposure to 1.2 mg/m³. Severe histopathological changes were still observed 2 weeks after the end of the exposure to 4.0 mg/m³. No exposure-related histological abnormalities were detected in the trachea and lungs.

E. Strength, consistency, and specificity of association of tumour response with key events

Formaldehyde

There are extensive studies investigating formaldehyde-induced neoplasia. Available data revealed formaldehyde-induced DPX formation and increased epithelial cell proliferation within the upper respiratory tract in a range of species including rats and monkeys and a variety of rat and human cells in vitro. It was found that at similar levels of exposure, concentrations of DPX were approximately an order of magnitude lower in rhesus monkeys than in rats. Increased human epithelial cell proliferation following in situ exposure to formaldehyde was reported in a model system in which rat tracheae populated with human tracheobronchial epithelial cells were xenotransplanted into athymic mice.

There is good correlation between key events and regional tumour incidence and tumour sites. Cell proliferation, metaplasia, and increased DPX were seen in the regions of the nasal cavity where tumours have been observed. The highly non-linear dose–response relationships for DPX, cytotoxicity, cell proliferation, metaplasia, and tumours are consistent, with significant increases in metaplasia occurring at 2.4 mg/m³ in one study and all end-points being observed at concentrations of greater than 4.8 mg/m³. This is also in good correlation with the concentration at which mucociliary clearance is inhibited and glutathione-mediated metabolism is saturated—that is, 4.8 mg/m³. The study by Morgan et al. (1986) examining effects of inhaled formaldehyde on the nasal mucociliary apparatus in male rats also included 18-h recovery groups following days 1, 9, and 14 of exposure to concentrations of 2.4 mg/m³, 7.2 mg/m³, and 18 mg/m³. Inhibition of mucociliary clearance was progressively more extensive with increasing duration of exposure, but showed little or no evidence of recovery 18 h after cessation of exposure.

18 mg/m³に最大 2 年間ばく露して誘発されたラットの扁平上皮がんの 11 例中 5 例では、p53 相補的 DNA (cDNA) 配列の GC 塩基対に点突然変異が認められた (Recio ら、1992 年)。

グルタルアルデヒド

ラット及びマウスの 13 週間のグルタルアルデヒド吸入試験 (NTP, 1993 年) における細胞増殖の研究では、マウスで得られた結果とは対照的に、ラットの鼻前庭における細胞増殖の増加 (ULLI) は、早い時期 (数日以内) に発生し、試験期間中は上昇したままであるか、またはわずかに減少した。マウスの鼻前庭における ULLI の増加は時間の経過とともに増加する傾向があった。マウスを用いた吸入試験 (Zissu ら、1994 年) では、1.2 mg/m³ に 4 日間ばく露した後、鼻中隔の呼吸上皮及び鼻及び顎甲介に最初の病変が観察された。4.0 mg/m³ ばく露終了 2 週間後にも重篤な病理組織学的変化が認められた。気管及び肺ではばく露に関連した組織学的異常は認められなかった。

E. 腫瘍発生と key events との関連性の強さ、一貫性及び特異性

ホルムアルデヒド

ホルムアルデヒド誘発性腫瘍に関する広範な研究がある。入手可能なデータを見る限り、ラットやサル、ラットやヒトの様々な動物種や、ラットやヒトの様々な細胞の in vitro で明らかになっている。同程度のばく露量では、DPX の濃度はラットよりもアカゲザルの方が約一桁低いことが明らかになった。ホルムアルデヒドへの組織ばく露後のヒト上皮細胞増殖の亢進が、ヒトの気管支上皮細胞を移植したラット気管を胸腺欠損マウスに異種移植したモデル系で報告された。

key events と局所的な腫瘍発生率及び腫瘍発生部位との間には相関関係がある。腫瘍が観察されている鼻腔領域では、細胞増殖、化生及び DPX の増加が認められた。DPX、細胞毒性、細胞増殖、化生、腫瘍についての非線形用量反応関係は一貫しており、ある試験では 2.4 mg/m³ で化生の有意な増加が認められ、4.8 mg/m³ 以上の濃度では全てのエンドポイントが観察された。これはまた、粘膜クリアランスが抑制され、グルタチオンを介した代謝が飽和する濃度、すなわち 4.8 mg/m³ と密接な相関関係を示している。Morgan ら (1986 年) による雄ラットの鼻粘膜に対する吸入ホルムアルデヒドの影響を検討した研究では、2.4 mg/m³、7.2 mg/m³、18 mg/m³ の濃度で 1 日、9 日及び 14 日間ばく露後、18 時間の回復期間を設けた群が含まれていた。粘膜クリアランスの阻害は、ばく露時間が長くなるにつれて徐々に範囲が広がったが、ばく露停止 18 時間後の回復はほとんど、あるいは全く認められなかった。

Mice appear to be less susceptible than rats to the development of nasal tumours following exposure to a given concentration of formaldehyde. However, it is well known that mice decrease their minute volume in response to inhalation of noxious chemicals (Brown et al., 1986, in CIIT, 1999).

Glutaraldehyde

In comparison with formaldehyde, the glutaraldehyde-induced lesions were located in a more anterior part of the nose, involving the squamous epithelium. Also, they were of a different character, with none of the focal hyperkeratosis and hyperplasia with cellular atypia and dysplasia found in animals receiving formaldehyde for 13 weeks (Monticello, 1990; Morgan & Monticello, 1990).

F. Biological plausibility and coherence

Formaldehyde

Evidence supporting the hypothesis that prolonged regenerative cell proliferation can be a causal mechanism in chemical carcinogenesis continues to accumulate (IPCS, 2002). This proposed MOA for formaldehyde-induced nasal tumours in animals exposed by inhalation is consistent with biological plausibility and the available data. Sustained increased cell proliferation has been observed in the nasal cavity in extensive short- and medium-term toxicity studies in rats and a few studies in other species. Histopathological effects in the nasal cavity (epithelial cell dysplasia and metaplasia) were consistent in a range of sub-chronic and chronic animal studies. It should be noted, however, that the respective roles of DPX, mutation, and cellular proliferation in the induction of nasal tumours in the rat have not been fully elucidated.

Glutaraldehyde

Effects of inhaled glutaraldehyde have not been as extensively studied as those of formaldehyde. In inhalation studies, glutaraldehyde did not induce nasal tumours in rats and mice. However, the same key events that are considered key events in the nasal carcinogenicity of formaldehyde—cytotoxicity and cell proliferation—have been demonstrated in rats and mice exposed to glutaraldehyde. This might appear to reduce the plausibility of these processes being important for formaldehyde.

G. Possible alternative modes of action

Formaldehyde

There is the possibility that mutagenicity could play a role in the development of formaldehyde-induced tumours. Evaluation of the available data indicates that formaldehyde is genotoxic in vitro, but is generally not genotoxic in standard in vivo assays, although there are many studies demonstrating that it produces DPX.

Formaldehyde has been extensively studied for genotoxicity in vitro, with positive results in studies with bacterial and mammalian cells (Ames test, gene mutation), and produced DNA single-strand breaks and DPX (reviewed in IARC, 2005). In vivo, formaldehyde has reproducibly induced mutations in *Drosophila*, but there is no convincing evidence of its genotoxic activity in rodent bone marrow cell tests. There is limited evidence that formaldehyde expo-

ある濃度のホルムアルデヒドにばく露後発生する鼻腔腫瘍において、マウスはラットよりも感受性が低いようである。しかしながら、マウスでは有害化学物質の吸入に反応して換気量/分が減少することがよく知られている (Brown ら, 1986 年; CIIT, 1999 年)。

グルタルアルデヒド

ホルムアルデヒドと比較して、グルタルアルデヒドによって誘発された病変は、扁平上皮を含む鼻の前方に位置していた。また、それらの病変は異なる特徴を有しており、ホルムアルデヒドを 13 週間投与した動物にみられる細胞異型及び異形成を伴う局所的な角化亢進及び過形成は認められなかった (Monticello, 1990 年; Morgan & Monticello, 1990 年)。

F. 生物学的妥当性及び整合性

ホルムアルデヒド

長期間にわたる再生性細胞増殖が化学物質による発がんの原因であるという仮説を支持するエビデンスが蓄積され続けている (PCS, 2002 年)。吸入ばく露された動物におけるホルムアルデヒド誘発性鼻腔腫瘍に対する MOA は、生物学的に妥当性があり、利用可能なデータと一致している。ラットを対象とした短期・中期毒性試験や他種の研究では、鼻腔内の持続的な細胞増殖活性が観察されている。鼻腔内の病理組織学的影響 (上皮細胞の異形成と化生) は、亜慢性及び慢性の動物実験で一貫していた。しかし、ラットの鼻腔腫瘍誘導における DPX、突然変異及び細胞増殖のそれぞれの役割は完全には解明されていないことに留意すべきである。

グルタルアルデヒド

吸入したグルタルアルデヒドの影響は、ホルムアルデヒドほど研究されていない。吸入試験では、グルタルアルデヒドはラットとマウスの鼻腔腫瘍を誘発しなかった。しかし、ホルムアルデヒドの鼻発がん性において key events とみなされる細胞毒性と細胞増殖が、グルタルアルデヒドにばく露されたラットとマウスでも実証されている。このことは、これらの過程がホルムアルデヒドにとって重要であることの妥当性を低下させるように見えるかもしれない。

G. 考えられる代替 MOA

ホルムアルデヒド

変異原性がホルムアルデヒド誘発性腫瘍の発生に関与している可能性がある。利用可能なデータを評価すると、ホルムアルデヒドは in vitro では遺伝毒性はあるが、標準的な in vivo アッセイでは概して遺伝毒性はないことが示されている。しかし、DPX を産生することを示す研究は数多くある。

ホルムアルデヒドは in vitro での遺伝毒性について広く研究されており、細菌や哺乳類細胞を用いた試験 (Ames 試験、遺伝子突然変異) で陽性結果が得られ、DNA の一本鎖切断や DPX の産生を認めた (IARC, 2005 年レビュー)。生体内では、ホルムアルデヒドはショウジョウバエで再現性のある突然変異を誘発したが、げっ歯類の骨髄細胞試験では、その遺伝毒性について有力なエビデンスはない。しかし、ホルムアルデヒドのばく露が、ヒトの鼻や頬の細胞や末梢血リンパ球における染色体異常や小核発現頻度の増加と関連しているというわずかなエビデンスはある (IARC, 2005 年; 付録参照)。

sure is associated with increased chromosomal aberration and micronucleus frequencies in human nasal and buccal cells and peripheral blood lymphocytes (reviewed in IARC, 2005; see [Appendix](#)).

It is unclear to what extent DPX contributes to the mutagenesis and carcinogenicity of formaldehyde (Recio, 1997; Merk & Speit, 1998; Speit et al., 2000; Liteplo & Meek, 2003). The presence of DPX has been considered mainly as an indicator of exposure, although some have also seen these lesions as premutagenic in character and therefore evidence of a direct genotoxic mechanism. DPX are, however, potentially damaging to the afflicted cell, and cell death is a likely outcome should they occur at high frequency. They also indicate that protein-protein cross-linkage (PPX) may occur, with potentially less serious effects for the cell. Should key proteins be involved in the PPX formation, this could have consequences on the regulatory machinery of the cell, including the regulation of differentiation. Such a change clearly occurs in the nasal epithelium of rats exposed to formaldehyde, since areas of metaplasia emerge. Neoplasia could be viewed as simply a different kind of metaplasia, unless there is compelling evidence for a genotoxic mode of action.

A different interpretation of the data has been offered by Gaylor et al. (2004), who analysed the concentration-response relationship for formaldehyde-induced cell proliferation in rats using statistical methods designed to identify J-shaped concentration curves. Cell proliferation data were used because there were insufficient quantal data on cancer incidence to perform the analysis. Their analysis supports the hypothesis that the threshold-type dose-response for nasal tumour incidence is the result of a minor genotoxicity at low dose that is superimposed by a J-shaped dose-response for cell proliferation at high cytotoxic dose levels (Lutz, 1998). At low doses, the effect of incremental DNA damage may be cancelled out by a reduction in cell proliferation; therefore, in spite of the apparent threshold, the data remain consistent with a genotoxic mechanism.

In rats exposed to formaldehyde, point mutations at GC base pairs in the cDNA sequence of the evolutionarily conserved regions II-V of the *p53* gene were found in 5 of 11 primary nasal squamous cell carcinomas (Recio et al., 1992). This observation may be interpreted to indicate genotoxic processes induced by formaldehyde in the carcinogenic process; however, the presence of specific mutations in the emergent tumour is not evidence that they were present in the early stages of neoplasia or that they were directly induced by the chemical. While there is the possibility of a direct mutagenic event occurring, it is also possible that these mutations arose indirectly of exposure as a result of functional changes in chromatin proteins induced by the chemical. At what stage in the life history of the tumour these observed mutations occurred is also open to speculation: they are relatively common events, it is clear, but it is also clear that they are not essential events (since they do not occur in all tumours that are apparently of the same type). The occurrence of these mutations indicates that a genotoxic mechanism has not been excluded, but this evidence does not necessarily support one.

Specific changes in gene expression have also been observed in vivo. The results indicated that exposure to formaldehyde can cause alteration in the expression levels of genes involved in several functional categories, including xenobiotic metabolism, cell cycle regulation, DNA synthesis and repair, oncogenes, and apoptosis (Hester et al., 2003). It is not clear at present

DPX がホルムアルデヒドの突然変異誘発性及び発がん性にどの程度寄与しているかは不明である (Recio, 1997 年; Merk & Speit, 1998 年; Speit ら, 2000 年; Liteplo & Meek, 2003 年)。DPX の存在は主にばく露の指標として考えられてきたが、これらの病変の特徴は前変異原性であり、それゆえに直接的な遺伝毒性メカニズムのエビデンスであるという見方もある。しかし、DPX は形成された細胞にダメージを与える可能性があり、高頻度で発生すると細胞死が起こる可能性が高い。また、本研究では細胞への影響はそれほど深刻ではないものの、タンパク質-タンパク質架橋 (PPX) が起こる可能性があることも示唆されている。もし主要なタンパク質が PPX の形成に関与していれば、分化の制御を含む細胞の制御機構に影響を及ぼす可能性がある。化生領域が出現しているため、このような変化は、ホルムアルデヒドにばく露されたラットの鼻腔上皮で生じている。遺伝毒性の MOA を示す有力なエビデンスがない限り、腫瘍は単に化生の一種と見なすことができる。

Gaylor ら (2004 年) は、J 型濃度曲線を特定するように設計された統計手法を用いて、ラットにおけるホルムアルデヒド誘発性細胞増殖の濃度-反応関係を解析し、異なるデータの解釈を提示した。解析の際、がん発生率に関する定量的なデータが不十分であったため、細胞増殖のデータを使用した。彼らの解析は、鼻腔腫瘍の発生に対する閾値を有する用量反応性が、低用量における軽度な遺伝毒性の結果であり、これにより細胞毒性を有する高用量において J 字型の細胞増殖曲線を呈するという仮説を支持するものである (Lutz, 1998 年)。低用量では、漸増する DNA 損傷は細胞増殖の減少によって打ち消される可能性があるため、明らかな閾値があるにもかかわらず、データは遺伝毒性メカニズムと一致している。

ホルムアルデヒドにばく露されたラットにおいて、*p53* 遺伝子の進化的に保存された領域 II-V の cDNA 配列の GC 塩基対における点突然変異が、原発性鼻腔扁平上皮がん 11 例のうち 5 例で認められた (Recio ら, 1992 年)。この結果は、発がん過程におけるホルムアルデヒドにより誘発された遺伝毒性過程を示すものと解釈される。しかし、出現した腫瘍における特定の突然変異の存在は、それらが腫瘍の初期段階に存在していたエビデンスでも、それらが化学物質によって直接誘導されたことを示すものではない。直接的な突然変異原性を示す可能性はあるが、これらの突然変異は、化学物質によって誘発されたクロマチンタンパク質の機能的変化により間接的に生じた可能性もある。これらの観察された突然変異が腫瘍の発生段階のどの段階で生じたかは推測の域を出ない。これらの突然変異は一般的な事象であることは明らかであるが、すべて同じタイプの腫瘍が発生するわけではないので、本質的な事象ではないこともまた明らかである。これらの突然変異の発生は、遺伝毒性のメカニズムが排除されていないことを示しているが、必ずしも支持するものでもない。

また、遺伝子発現の特異的な変化も生体内で観察されている。その結果、ホルムアルデヒドへのばく露は、異物代謝、細胞周期制御、DNA 合成と修復、がん遺伝子、アポトーシスを含むいくつかの機能に関与する遺伝子の発現レベルに変化をもたらすことが示された (Hester ら, 2003 年) これらの変化がホルムアルデヒドにどの程度特異的であるか、あるいは発がん性においてどのような役割を果たしているのかは、現時点では明らかになっていない。

how specific these changes are to formaldehyde or what their role is, if any, in carcinogenicity.

Glutaraldehyde

Glutaraldehyde has been less extensively tested than formaldehyde for genotoxicity in vitro and in vivo. It produces weak and inconsistent positive findings in tests in vitro and is not active in the vast majority of in vivo studies. The genetic toxicity of glutaraldehyde has been recently reviewed (Zeiger et al., 2005).

Glutaraldehyde induced DNA repair systems in bacterial cells and was a weak mutagen in *Salmonella* and *Escherichia coli*. Unscheduled DNA synthesis (UDS), DPX, and double-strand breaks were seen in human cell lines, but not in primary rat cells. There were weak and inconsistent responses in chromosomal aberration and sister chromatid exchange (SCE) studies with mammalian cells, and glutaraldehyde did not induce transformation in cultured Syrian hamster embryo (SHE) cells.

In vivo, glutaraldehyde induced S-phase DNA synthesis in nasal cells in rats and mice following direct nasal administration. Glutaraldehyde did not produce DNA damage in rat liver or cross-links in rat testes DNA or sperm cells. Tests for induction of chromosomal aberration in bone marrow cells in rats and mice were generally negative. Glutaraldehyde did not induce micronuclei in bone marrow cells or dominant lethal mutations in mice. Thus, glutaraldehyde does possess genotoxic potential, and, although the database is not as extensive as it is for formaldehyde, it might be anticipated that site of contact genotoxicity would occur. Consequently, if genotoxicity is a major carcinogenic MOA for formaldehyde, it remains to be explained why glutaraldehyde is not active.

H. Uncertainties, inconsistencies, and data gaps

Formaldehyde

In most of the cancer bioassays for formaldehyde, data on intermediate end-points such as proliferative response as a measure of cytotoxicity and DPX are limited. Consequently, direct comparison of the incidence of intermediate lesions and tumours is restricted. Additionally, information on a direct relationship between DPX and mutation induction and the probability of converting a DPX into a mutation is desirable, while the mode by which regenerative cell proliferation is involved in the production of mutations required for tumour development needs to be determined.

Studies on the *hprt* mutation spectrum in formaldehyde-exposed human cells revealed that 50% of the mutations are deletions, whereas 50% are due to point mutation at the A:T base pair (Crosby et al., 1988; Liber et al., 1989). The finding of deletions as part of the formaldehyde mutation spectrum may explain the homozygous nature of base pair mutations observed in *p53* in formaldehyde-induced squamous cell carcinomas. However, there is an inconsistency with regard to the base pair that is mutated. It was found to be A:T in *hprt* in human and mammalian cell lines and G:C at *p53* in formaldehyde-induced squamous cell carcinomas (Recio, 1997). It is possible that, although mutations are induced by formaldehyde in vitro, these types of mutation may not be fundamental to its carcinogenicity.

グルタルアルデヒド

グルタルアルデヒドは、ホルムアルデヒドに比べて in vitro 及び in vivo での遺伝毒性に関する試験があまり行われていない。グルタルアルデヒドは、in vitro 試験では軽微かつ不規則な陽性所見を示し、in vivo 試験の大部分では活性がない。最近、グルタルアルデヒドの遺伝毒性に関するレビューが発表された (Zeiger ら、2005 年)。

グルタルアルデヒドは細菌では DNA 修復系を誘導し、サルモネラ菌や大腸菌では弱い変異原性を示した。不定期 DNA 合成 (UDS)、DPX、二本鎖切断はヒト細胞株で認められたが、ラット初代細胞では認められなかった。哺乳類細胞を用いた染色体異常及び姉妹染色体交換 (SCE) 試験では、軽微かつ一貫性のない反応がみられ、培養シリアンハムスター胚 (SHE) 細胞においてグルタルアルデヒドは形質転換を誘導しなかった。

生体内では、ラット及びマウスの鼻腔内投与後、グルタルアルデヒドは鼻腔内細胞に S 期の DNA 合成を誘導した。グルタルアルデヒドはラット肝臓では DNA 損傷を生じず、ラット精巣 DNA や精子細胞では架橋を生じなかった。ラット及びマウスの骨髄細胞を用いた染色体異常試験では、概ね陰性であった。グルタルアルデヒドは、マウスの骨髄細胞に小核や優性致死性突然変異を誘発しなかった。このように、グルタルアルデヒドは遺伝毒性を有する可能性があり、データベースはホルムアルデヒドほど豊富ではないが、接触部位における遺伝毒性の発生が予想される。したがって、遺伝毒性がホルムアルデヒドの主要な発がん MOA であるとすれば、なぜグルタルアルデヒドが効果を発揮しないのかを説明する必要がある。

H. 不確実性、矛盾、データギャップ

ホルムアルデヒド

ホルムアルデヒドを用いたがんのバイオアッセイのほとんどは、細胞毒性の指標としての増殖反応や DPX などの中間エンドポイントに関するデータが限られている。そのため、中間病変と腫瘍の発生率を直接比較することには制限がある。加えて DPX と突然変異誘発との直接的な関係に関する情報及び DPX が突然変異につながる確率に関する情報が望まれる。一方で、腫瘍の発生に必要な突然変異の生成にはどの再生性細胞増殖が関与しているかを決定する必要がある。

ホルムアルデヒドばく露ヒト細胞における *hprt* 遺伝子突然変異スペクトルの研究により、突然変異の 50%は欠失であり、50%は A : T 塩基対での点突然変異によるものであることが明らかになった (Crosby ら、1988 年; Liber ら、1989 年)。ホルムアルデヒド誘発性扁平上皮がんにおいて、ホルムアルデヒド突然変異スペクトルの一部として欠失が認められたことで、*p53* 遺伝子で観察されるホモ塩基対変異の性質を説明できるかもしれない。しかし、変異している塩基対に関しては矛盾がある。ヒト及び哺乳類細胞株では *hprt* 遺伝子の A : T であり、ホルムアルデヒド誘発性扁平上皮がんでは *p53* の G : C であることが明らかになっている (Recio, 1997 年)。in vitro ではホルムアルデヒドによってこのような突然変異が誘導されるが、このタイプの突然変異はホルムアルデヒドの発がん性の根本ではない可能性がある。

Glutaraldehyde

Glutaraldehyde is clearly much more cytotoxic than formaldehyde, perhaps because it is a bifunctional alkylating agent. Intranasal instillation studies have demonstrated that, on a molar basis, glutaraldehyde is 10- to 20-fold more toxic than formaldehyde when delivered to the nasal mucosa as a single treatment in aqueous solution (St. Clair et al., 1990). Comparison of results from a 13-week inhalation study of glutaraldehyde (NTP, 1993) with similar inhalation studies with formaldehyde (Heck et al., 1990; Monticello, 1990; Monticello et al., 1991) shows that glutaraldehyde is about 20-fold more toxic than formaldehyde by this route also. Pulmonary damage and mortality occur at much higher glutaraldehyde concentrations. Cytotoxicity is manifest closer to the external nares in the case of inhaled glutaraldehyde, so the tissue primarily affected is not the same as in the case of inhaled formaldehyde. This difference in the site of toxic action may be particularly important because, if the only difference was toxic potency, then glutaraldehyde would be expected to produce effects similar to those of formaldehyde, although only at lower doses.

I. Assessment of postulated mode of action

Formaldehyde

From a weight-of-evidence point of view, the hypothesized MOA for formaldehyde-induced nasal tumours satisfies several criteria, including consistency, concordance of dose-response relationships across all key events, and biological plausibility and coherence of the database. Given the extensive experimental data that address and are consistent with the proposed MOA of formaldehyde in the induction of tumours in the nasal cavity, a high degree of confidence may be ascribed to it.

Glutaraldehyde

The key events of cytotoxicity, cell proliferation, and DPX formation (in vitro) have been demonstrated with exposure to glutaraldehyde. However, glutaraldehyde has not produced nasal tumours in rats and mice. Therefore, if the proposed MOA for formaldehyde is to be maintained, an explanation for this discrepancy is necessary. A reason for the difference has not been identified, but a hypothesis can be proposed. The dialdehyde function of glutaraldehyde is an important factor that may inhibit the macromolecules with which it reacts from further reaction within the cellular environment. Should these macromolecules be proteins involved in the maintenance of survival, then their immobility perhaps more likely leads to cell death than to a change in differentiation state. This immobilization of macromolecules by glutaraldehyde is the property that makes it a better fixative for high-resolution microscopy (e.g. electron microscopy) than formaldehyde. It almost certainly contributes to the very much higher toxicity of the dialdehyde. The monoaldehyde function of formaldehyde also causes cellular damage, but a proportion of proteins involved in cellular differentiation may be able to continue in that role, although with an altered outcome that may be the beginning of a path to neoplasia. If, on the other hand, these aldehydes react with nucleic acids (the evidence for glutaraldehyde reacting in this way is not substantial), then the repair of the alkylated nucleotides may be more difficult or even impossible in the case of glutaraldehyde, whereas repair does occur following formaldehyde interaction with DNA. Thus, irrespective of whether the mode of formaldehyde action in carcinogenicity is as proposed or is primarily due to genetic toxicity, the different response to glutaraldehyde exposure can be explained.

グルタルアルデヒド

グルタルアルデヒドは二官能性アルキル化剤であるためか、ホルムアルデヒドよりも明らかに細胞毒性が強い。経鼻投与試験では、水溶液を鼻粘膜に単回投与した場合、モル比でグルタルアルデヒドはホルムアルデヒドの10～20倍の毒性があることが実証されている（St. Clair ら、1990年）。グルタルアルデヒドの13週間吸入試験（NTP、1993年）の結果とホルムアルデヒドの同様の吸入試験（Heck ら、1990年；Monticello ら、1990年；Monticello ら、1991年）との比較は、この経路でもグルタルアルデヒドはホルムアルデヒドより約20倍の毒性があることを示している。肺障害及び壊死は、かなり高い濃度のグルタルアルデヒドで発生する。細胞毒性は、グルタルアルデヒドを吸入した場合には外鼻に近いところで発現するため、主に影響を受ける組織はホルムアルデヒドを吸入した場合と同じではない。唯一の違いが毒性の強さであるならば、グルタルアルデヒドは、低用量でもホルムアルデヒドと同様の影響をもたらすと予想されるため、毒性作用部位における違いは特に重要かもしれない。

I. 推定される MOA の評価

ホルムアルデヒド

重要なエビデンスの観点より、ホルムアルデヒド誘発性鼻腔腫瘍の仮説 MOA は一貫して、key events すべてにおける用量反応関係の一致、データベースの生物学的妥当性と整合性など、いくつかの基準を満たしている。鼻腔内腫瘍誘発におけるホルムアルデヒドの推定される MOA は多くの実験データと一致しているため、この MOA は信頼性が高いと考えられる。

グルタルアルデヒド

細胞毒性、細胞増殖及びDPX形成のkey events (in vitro) は、グルタルアルデヒドへのばく露で実証されている。しかし、グルタルアルデヒドはラットやマウスでは鼻腔内腫瘍を発生させない。したがって、推定されているホルムアルデヒドのMOAを維持するためには、この矛盾を説明する必要がある。この矛盾の理由は特定されていないが、仮説を提示することは可能である。グルタルアルデヒドの二つのアルデヒド官能基は、細胞環境内で高分子のさらなる反応を阻害する重要な因子である。これらの高分子は、生存に関与するタンパク質であり、それらの不動態化は、おそらく分化状態の変化よりも細胞死につながる。このグルタルアルデヒドの高分子を不動態化させる特性が、ホルムアルデヒドよりも高分解能顕微鏡（例えば電子顕微鏡）用の優れた固定剤になる理由である。そのことはほぼ確実にジアルデヒドの非常に高い毒性につながっている。また、ホルムアルデヒドのアルデヒド官能基は細胞障害を引き起こすが、細胞の分化に関与するタンパク質は、腫瘍の初期変化となりうる分化方向の変化を伴うものの、その役割を維持することができるかもしれない。一方、これらのアルデヒドが核酸と反応する場合（グルタルアルデヒドがこのように反応するというエビデンスは実質的なものではない）、ホルムアルデヒドがDNAと相互作用した後にアルキル化されたヌクレオチドの修復が起こるのに対し、グルタルアルデヒドの場合は、困難、あるいは不可能かもしれない。このように、発がん性におけるホルムアルデヒドの作用様式が推定されている通りなのか、それとも遺伝毒性が主な原因なのかにかかわらず、グルタルアルデヒドばく露に対する反応の違いを説明することができる。

2. CAN HUMAN RELEVANCE OF THE MOA BE EXCLUDED ON THE BASIS OF FUNDAMENTAL, QUALITATIVE DIFFERENCES IN KEY EVENTS BETWEEN EXPERIMENTAL ANIMALS AND HUMANS?

A. Formaldehyde

In rhesus monkeys exposed to formaldehyde at 7.2 mg/m³ for between 1 and 6 weeks, formaldehyde-induced lesions were associated with increases in cell proliferation rates of up to 18-fold over controls and remained significantly elevated after 6 weeks of exposure. Histological lesions and increases in cell proliferation were most extensive in the nasal passages and were minimal in the lower airways, whereas the maxillary sinuses showed no evidence of a response to formaldehyde exposure. Based on the extent of lesions and cell proliferation data, it appeared that rhesus monkeys are more sensitive than rats to the acute and subacute effects of formaldehyde at 7.2 mg/m³ (Monticello et al., 1989). The absence of response in the maxillary sinuses in rhesus monkeys is an observation deserving special attention in the design of epidemiological studies (or, perhaps, in the reporting of tumour sites). Most epidemiological studies of sinonasal cancer have not distinguished tumours arising in the nose from those developing in the nasal sinuses. Thus, the risk for nasal cancer specifically would tend to be diluted if there was no corresponding risk for cancer in the sinuses and could go undetected through lack of statistical power.

Many epidemiological studies have investigated formaldehyde exposure and cancer of the respiratory tract. The strongest evidence of an association has been observed for nasopharyngeal cancers. A statistically significant excess of deaths from nasopharyngeal cancer has been observed in the largest cohort study of industrial workers (Hauptmann et al., 2004), with statistically significant exposure-response relationships for peak and cumulative exposure. An excess of deaths from nasopharyngeal cancer was observed in a proportionate mortality analysis of the largest cohort of embalmers in the United States (Hayes et al., 1990). An excess of cases of nasopharyngeal cancer was observed in a Danish study of proportionate cancer incidence among workers at companies that manufactured or used formaldehyde (Hansen & Olsen, 1995). Other cohort studies reported fewer cases of nasopharyngeal cancer than expected (Walrath & Fraumeni, 1983; Coggon et al., 2003; Pinkerton et al., 2004). Of seven case-control studies of nasopharyngeal cancer, five found elevations of risk for exposure to formaldehyde.

Several case-control studies have investigated the association between exposure to formaldehyde and sinonasal cancer. A pooled analysis of 12 studies showed an increased risk of adenocarcinoma in men and women thought never to have been exposed to wood dust or leather dust, with an exposure-response trend for an index of cumulative exposure (Luce et al., 2002). One other case-control study (Olsen & Asnaes, 1986) and a proportionate incidence study (Hansen & Olsen, 1995) showed an increased risk of sinonasal cancer, particularly squamous cell carcinoma. However, the three most informative cohort studies of industrial workers showed no excesses of sinonasal cancer (Coggon et al., 2003; Hauptmann et al., 2004; Pinkerton et al., 2004).

In evaluating this body of evidence, the International Agency for Research on Cancer (IARC) concluded that there was sufficient epidemiological evidence that formaldehyde causes

2. 実験動物とヒトとの間の key events の根本的、質的な違いに基づいて、MOA のヒトとの関連性を合理的に排除することができるか

A. ホルムアルデヒド

7.2 mg/m³ のホルムアルデヒドに 1～6 週間ばく露したアカゲザルにおいて、ホルムアルデヒドに誘発された病変は、対照群の最大 18 倍を示す細胞増殖率の増加を伴っており、6 週間のばく露後も有意に高い値が続いた。組織学的な病変と細胞増殖の増加は鼻腔で最も広範囲に見られ、下気道では最小限であったが、上顎洞ではホルムアルデヒドばく露に対する反応のエビデンスは認められなかった。病変の程度及び細胞増殖のデータに基づいて、7.2 mg/m³ の用量でのホルムアルデヒドの急性及び亜急性影響に対する感受性はラットよりもアカゲザルの方が高いと考えられた (Monticello ら、1989 年)。アカゲザルの上顎洞における反応がないことは、疫学研究において (あるいは、腫瘍部位の報告において) 特別な注意を払うに値する所見である。副鼻腔がんのほとんどの疫学研究では、鼻に発生した腫瘍と副鼻腔に発生した腫瘍を区別していない。そのため、副鼻腔に発生するがんに対応するリスクがなければ、鼻腔がんのリスクは希釈される傾向にあり、統計的に検出されない可能性がある。

多くの疫学研究では、ホルムアルデヒドばく露と気道がんとの関連が調査されている。最も有力なエビデンスは、鼻咽頭がんを観察されている。工場労働者を対象とした最大規模のコホート研究 (Hauptmann ら、2004 年) では、鼻咽頭がんによる死亡者数の増加が観察されており、最大ばく露量と累積ばく露量についてばく露-反応関係を示している。死体防腐処理業者を対象とした米国最大のコホート研究では、上咽頭がんによる死亡者の増加が死亡率分析で観察されている (Hayes ら、1990 年)。ホルムアルデヒドを製造または使用している企業の労働者を対象としたデンマークの研究では、鼻咽頭がんの症例数の増加が観察された (Hansen & Olsen, 1995 年)。他のコホート研究では、予想よりも鼻咽頭がんの症例数は少なかったと報告されている (Walrath & Fraumeni, 1983 年; Coggon ら、2003 年; Pinkerton ら、2004 年)。鼻咽頭がんに関する 7 件の症例対照研究のうち、5 件ではホルムアルデヒドばく露によるリスク増加が認められた。

いくつかの症例対照研究では、ホルムアルデヒドへのばく露と副鼻腔がんとの関連が調査されている。12 件のプール解析では、木粉または革粉にばく露されたことがない男女における腺がんのリスク増加が示され、累積ばく露の指標に対し、ばく露用量反応性を示す傾向が示された (Luce ら、2002 年)。他の 1 件の症例対照研究 (Olsen & Asnaes, 1986 年) と発生率研究 (Hansen & Olsen, 1995 年) では、副鼻腔がん、特に扁平上皮がんのリスクの増加が示された。しかしながら、工場労働者を対象とした 3 件の最も有力なコホート研究では、副鼻腔がんの増加は認められなかった (Coggon ら、2003 年; Hauptmann ら、2004 年; Pinkerton ら、2004 年)。

この一連のエビデンスを評価するにあたり、国際がん研究機関 (IARC) は、ホルムアルデヒドがヒトで鼻咽頭がんを引き起こすという十分な疫学的エビデンスがあるが、ホルムアルデヒドがヒトで副鼻腔がんを引き起こすという疫学的エビデンスは限られている。

nasopharyngeal cancer in humans; only limited epidemiological evidence that formaldehyde causes sinonasal cancer in humans; and strong but not sufficient evidence for a causal association between leukaemia and occupational exposure to formaldehyde (Cogliano et al., 2005).

There are no publications describing DPX in nasal cells from formaldehyde-exposed personnel. Assessment of DPX in peripheral lymphocytes from formaldehyde-exposed workers demonstrated an association with overall exposure (Shaham et al., 2003). The single DPX study involved 399 workers from 14 hospital pathology departments, and formaldehyde exposure categories were low-level (mean 0.5 mg/m³, range 0.05–0.8 mg/m³) and high-level (mean 2.7 mg/m³, range 0.86–6.7 mg/m³). Adjusted mean DPX were significantly higher in the exposed groups. There appear to be some doubts regarding the sensitivity and reproducibility of the physical separation method used in this study (Heck & Casanova, 2004).

Some studies have investigated the histological changes within the nasal epithelium of workers occupationally exposed to formaldehyde; however, the extent to which nasal epithelial cell regenerative proliferation occurs is unresolved because the results are mixed and there was co-exposure to wood dust in some studies (Berke, 1987; Edling et al., 1988; Holmström et al., 1989; Boysen et al., 1990; Ballarin et al., 1992).

Mucociliary clearance in the anterior portion of the nasal cavity was reduced following exposure of volunteers to formaldehyde at 0.30 mg/m³ (Andersen & Mølhave, 1983).

The concordance of animal and human key events for formaldehyde is summarized in Table 3.

Table 3. Formaldehyde concordance table.

Key event	Evidence in animals	Evidence in humans
Cytotoxicity	Positive in vivo (target cells)	Plausible
Proliferation	Positive in vivo (target cells)	Plausible (some evidence but confounded by co-exposure)
Genotoxicity	DPX (target cells in vivo)	DPX (non-target cells, i.e. lymphocytes)
Mutations	Positive in vitro; unconvincing in vivo	Positive (? cells)
Nasal tumours	Positive (mainly anterior lateral meatus)	Positive (nasopharyngeal) ? (sinonasal)

B. Glutaraldehyde

There are few epidemiological studies for exposure to glutaraldehyde and human cancer. No increase in the number of cancer deaths was observed among 186 male glutaraldehyde production workers. The average time since first exposure to glutaraldehyde was 20.6 years, and the period of exposure was 3–7 years. During periods of monitoring exposure, glutaraldehyde concentrations in air ranged from 0.04 to 1.4 mg/m³ (NICNAS, 1994). Studies of embalmers, pathologists, and members of the American Association of Anatomists for possible effects of glutaraldehyde have all shown increases in risk of cancer; however, all of

また、白血病とホルムアルデヒドの職業ばく露との間に因果関係があるという十分なエビデンスはない、と結論づけた (Cogliano ら, 2005)。

ホルムアルデヒドにばく露されたヒトの鼻の細胞における DPX について記述している論文はない。ホルムアルデヒドにばく露された労働者の末梢リンパ球における DPX の評価では、全体的なばく露との関連性が示された (Shaham ら, 2003 年)。単一の DPX 試験では、14 の病院の各病理部門で働く 399 人が参加し、ホルムアルデヒドばく露のカテゴリーは低レベル(平均 0.5 mg/m³、範囲 0.05–0.8 mg/m³) 及び高レベル (平均 2.7 mg/m³、範囲 0.86–6.7 mg/m³) であった。調整後の平均 DPX は被曝群で有意に高かった。この研究で用いられた物理的分離法の感度及び再現性には疑問があるようである (Heck & Casanova, 2004 年)。

いくつかの研究では、ホルムアルデヒドに職業ばく露された労働者の鼻腔上皮内の組織学的変化を調査しているが、結果はまちまちであり、いくつかの研究では木粉への共ばく露があったため、鼻腔上皮細胞の再生性増殖がどの程度起こるのかは未解明である (Berke, 1987 年; Edling ら, 1988 年; Holmström ら, 1989 年; Boysen ら, 1990 年; Ballarin ら, 1992 年)。

鼻腔前部の粘膜クリアランスは、ホルムアルデヒドの 0.30 mg/m³ でのばく露後に減少した (Andersen & Mølhave, 1983 年)。

ホルムアルデヒドに関する動物とヒトの key events の一致を表 3 にまとめた。

表 3. ホルムアルデヒドの用語索引表

key events	動物におけるエビデンス	ヒトにおけるエビデンス
細胞毒性	in vivo で陽性 (標的細胞)	妥当性あり
細胞増殖	in vivo で陽性 (標的細胞)	妥当性あり (エビデンスはあるが、共ばく露によって交絡されている)
遺伝毒性	DPX (in vivo 標的細胞)	DPX (非標的細胞、リンパ球など)
突然変異	in vitro では陽性、in vivo では説得力がない	陽性 (? 細胞)
鼻腔腫瘍	陽性 (主に前外側鼻腔)	陽性 (鼻咽頭) ? (副鼻腔)

B. グルタルアルデヒド

グルタルアルデヒドへのばく露とヒトのがんに関する疫学的研究はほとんどない。グルタルアルデヒド製造に携わる男性労働者 186 名のがん死亡者の増加は認められなかった。グルタルアルデヒドに初めてばく露されてからの平均期間は 20.6 年、ばく露期間は 3–7 年であった。モニタリングばく露期間中、大気中のグルタルアルデヒド濃度は 0.04–1.4 mg/m³ の範囲であった (NICNAS, 1994 年)。グルタルアルデヒドの潜在的な影響について、遺体整備師、病理医及び米国解剖学会のメンバーを対象とした研究では、すべての研究ががんリスクの増加を示している。しかしこのグループはホルムアルデヒドにもばく露されていた (Walrath & Fraumeni, 1983 年、遺伝毒性変異; ホルムアルデヒドに関するコンセンサスワークショップ、1984 年; Stroup ら, 1986 年)。

these groups were also exposed to formaldehyde (Walrath & Fraumeni, 1983; Consensus Workshop on Formaldehyde, 1984; Stroup et al., 1986).

There are no studies examining glutaraldehyde exposure and DPX formation, cytotoxicity, and cell proliferation in human nasal tissues.

The concordance of animal and human key events for glutaraldehyde is summarized in Table 4.

Table 4. Glutaraldehyde concordance table.

Key event	Evidence in animals	Evidence in humans
Cytotoxicity	Positive	Plausible
Proliferation	Positive in vivo	Plausible
Genotoxicity	DPX in vitro	Unknown
Mutations	Positive in vitro	Unknown
Nasal tumours	Negative (no evidence at any site)	Unknown

3. CAN HUMAN RELEVANCE OF THE MOA BE EXCLUDED ON THE BASIS OF QUANTITATIVE DIFFERENCES IN EITHER KINETIC OR DYNAMIC FACTORS BETWEEN EXPERIMENTAL ANIMALS AND HUMANS?

A. Formaldehyde

Quantitative differences between experimental animals and humans for the postulated MOA will be a function of the concentration of formaldehyde at the target tissue. It is formaldehyde per se, and not its metabolites, that causes cytotoxicity. Exogenous inhaled formaldehyde is rapidly metabolized upon absorption, to formate, by a number of widely distributed cellular enzymes, particularly formaldehyde dehydrogenase. In addition to this efficient metabolic detoxification mechanism, the mucociliary apparatus provides protection of the underlying epithelium from gases and vapours. Thus, in order to attain free formaldehyde concentrations that may be cytotoxic to the target tissue, relatively high concentrations of formaldehyde vapour must be delivered to the target site to overcome these protective mechanisms. Mechanistic events of clear significance for carcinogenicity occur at dose levels where formaldehyde detoxification mechanisms are saturated in rats (Casanova & Heck, 1987).

It is critical to take dosimetry into consideration when considering quantitative species differences for formaldehyde-induced toxicity in the respiratory tract. Inhaled formaldehyde is predominantly deposited and readily absorbed in the regions of the upper respiratory tract with which it comes into initial contact, owing to its high reactivity with biological macromolecules (Heck et al., 1983; Swenberg et al., 1983). A complex relationship between nasal anatomy, ventilation, and breathing patterns (nasal or oronasal) determines where in the upper respiratory tract formaldehyde absorption occurs in species. In rodents, which are obligate nasal breathers, deposition and absorption occur primarily in the nasal passage. In contrast, primates are oronasal breathers; although absorption and deposition are likely to occur primarily in the oral mucosa and nasal passages, they can also occur in the trachea and

ヒトの鼻組織におけるグルタルアルデヒドばく露と DPX 形成、細胞毒性及び細胞増殖を検討した研究はない。

グルタルアルデヒドに関する動物とヒトの key events の一致を表 4 にまとめた。

表 4. グルタルアルデヒドの用語索引表

key events	動物におけるエビデンス	ヒトにおけるエビデンス
細胞毒性	陽性	妥当性あり
細胞増殖	in vivo で陽性	妥当性あり
遺伝毒性	DPX (in vitro)	不明
突然変異	in vitro で陽性	不明
鼻腔腫瘍	陰性（どの部位にもエビデンスがない）	不明

3. 実験動物とヒトとの間の動態的または薬力学的要因のいずれかの量的差異に基づいて、MOA のヒトへの関連性を合理的に排除することができるか

A. ホルムアルデヒド

推定される MOA に関する実験動物とヒトとの間の定量的差異は、標的組織におけるホルムアルデヒドの濃度がもたらす作用にある。細胞毒性を引き起こすのはホルムアルデヒドそのものであり、その代謝物ではない。吸入された外因性のホルムアルデヒドは、広く分布する多数の細胞酵素、特にホルムアルデヒド脱水素酵素によって急速に代謝され酸塩になる。この効率的な代謝解毒メカニズムに加えて、粘膜絨毛機構が、その下の上皮をガスや蒸気から保護する。したがって、標的組織において細胞毒性が発生するのに十分な遊離ホルムアルデヒドの濃度を達成するためには、これらの保護機構を克服することが必要であり、比較的高濃度のホルムアルデヒド蒸気を標的部位に到達させる必要がある。明らかに有意な発がん性をもたらす薬力学的事象は、ラットのホルムアルデヒド解毒機構が飽和した用量で発生する（Casanova & Heck, 1987 年）。

呼吸器系におけるホルムアルデヒド誘発性毒性の定量的な種差を考慮する際には、投与量を考慮することが重要である。吸入されたホルムアルデヒドは、生体高分子との高い反応性のため、最初に接触する上気道の領域に多く沈着し、容易に吸収される（Heck ら、1983 年；Swenberg ら、1983 年）。鼻の生体機構、換気量、呼吸パターン（鼻または鼻腔）の間の複雑な関係が、種によって上気道のどこでホルムアルデヒドの吸収が起こるかを決定する。鼻呼吸であるげっ歯類では、沈着と吸収は主に鼻腔内で起こる。対照的に霊長類は口鼻呼吸であり、吸収と沈着は主に口腔粘膜と鼻腔で起こる可能性が高いが、気管と気管支でも起こる可能性がある（Monticello ら、1991 年）。

bronchus (Monticello et al., 1991). This hypothesis is supported by effects (histopathological changes, increased epithelial cell proliferation, and DPX formation) being observed farther along within the upper respiratory tract in monkeys.

Species differences in dosimetry have been taken into account in a two-stage clonal growth model that has been developed to predict the nasal carcinogenic risk of formaldehyde in humans (Conolly et al., 2004). The model also incorporates data on normal growth curves for rats and humans, cell cycle times, and cells at risk in the different regions of the respiratory tract.

Mice are better able to reduce both their respiratory rate and tidal volume upon repeated exposures; therefore, mice have less formaldehyde available for deposition than rats, resulting in less tissue damage and a lower rate of cell turnover in the nasal epithelium (Chang et al., 1981, 1983). These are characteristics that may help explain the lack of neoplastic response in the nose of mice.

Although there are likely to be quantitative differences between animal species and humans due to differences in dosimetry in the respiratory tract, there do not appear to be fundamental differences that would indicate that the proposed MOA does not occur in humans.

B. Glutaraldehyde

Much less is known of the kinetics of glutaraldehyde in experimental animals compared with formaldehyde. Inhalation studies do not appear to have been conducted. The terminal half-lives for elimination are long for both intravenous injection (rat 10 h, rabbit 15–30 h) and dermal application (rat 40–110 h, rabbit 20–100 h), probably due to the binding of glutaraldehyde to protein and the slow excretion of metabolites. The metabolites have not been identified, but it has been proposed that the metabolism of glutaraldehyde probably involves initial oxidation to the corresponding carboxylic acids by aldehyde dehydrogenase. The glutaric acid formed by oxidation is probably further metabolized by reaction with coenzyme A (CoA) to give glutaryl CoA, which is then oxidized by glutaryl CoA dehydrogenase to glutaconyl CoA, leading to its eventual degradation to carbon dioxide via acetate (Beauchamp et al., 1992; NTP, 1993; NICNAS, 1994; Ballantyne, 1995).

Glutaraldehyde reacts readily with proteins as a cross-linking agent, mainly between amino groups. The reaction is rapid and pH dependent (rate increases at pH >9), to give Schiff bases. Further reaction occurs to give a number of complex reaction products, with the mechanism of the cross-linking process not yet fully understood.

Little information is available on the interaction between glutaraldehyde and DNA, but it has been reported (Hopwood, 1975) that glutaraldehyde reacts with DNA only at >60 °C (summarized by NICNAS, 1994), and there are data implying that there is no reaction under physiological conditions (Sewell et al., 1984; Douglas & Rogers, 1998; Vock et al., 1999).

この仮説は、サルの上気道内のより遠位まで病理組織学的変化、上皮細胞の増殖及び DPX 形成が観察されることによって支持されている。

ヒトにおけるホルムアルデヒドの鼻腔発がんリスクを予測するために開発された 2 段階のクローン増殖モデルでは、用量評価における種差が考慮されている (Conolly ら, 2004 年) このモデルには、ラットとヒトの正常成長曲線、細胞周期の時間及び気道の異なる領域におけるリスクのある細胞に関するデータも組み込まれている。

マウスは反復ばく露により呼吸速度と一回換気量の両方を低下させることができるため、マウスはラットよりもホルムアルデヒドの沈着が少なく、その結果、鼻腔上皮の組織損傷と細胞の再生率が低下する (Chang ら, 1981 年, 1983 年)。これらの特徴は、マウスの鼻で腫瘍発生がないことを説明するのに役立つかもしれない。

動物とヒトの間には、気道の用量評価の違いによる定量的な違いがあると思われるが、推定される MOA がヒトでは発生しないことを示すような根本的な違いはないようである。

B. グルタルアルデヒド

実験動物におけるグルタルアルデヒドの動態は、ホルムアルデヒドに比べてあまり知られていない。吸入試験は実施されていないようである。半減期は、静脈内投与 (ラット 10 時間、ウサギ 15–30 時間) と経皮投与 (ラット 40–110 時間、ウサギ 20–100 時間) の両方で長くなっているが、これはグルタルアルデヒドがタンパク質に結合し、代謝物の排泄が遅いためと考えられる。代謝物は同定されていないが、おそらくグルタルアルデヒドの代謝は、アルデヒド脱水素酵素による対応するカルボン酸への初期酸化を伴うと推定されている。酸化によって産生されたグルタル酸は、コエンザイム A (CoA) と反応してグルタリル CoA を産生する。そして、グルタリル CoA デヒドロゲナーゼによってグルタコニル CoA に酸化され、最終的にはアセテートを介して二酸化炭素に分解される (Beauchamp ら, 1992 年; NTP, 1993 年; NICNAS, 1994 年; Ballantyne, 1995 年)。

グルタルアルデヒドは、主にアミノ基間の架橋剤としてタンパク質と容易に反応する。この反応は迅速で pH に依存しており (pH>9 で反応速度が増加)、Schiff 塩基を生成する。さらに反応すると、多くの複雑な反応生成物が得られるが、架橋反応のメカニズムはまだ完全には解明されていない。

グルタルアルデヒドと DNA との相互作用についてはほとんど情報がないが、グルタルアルデヒドが DNA と反応するのは 60°C 以上の場合のみであることが報告されており (Hopwood, 1975 年)、生理的条件下では反応しないことを示唆するデータもある (Sewell ら, 1984 年; Douglas & Rogers, 1998 年; Vock ら, 1999 年)。

4. STATEMENT OF CONFIDENCE, ANALYSIS, AND IMPLICATION

A. Formaldehyde

Sustained cytotoxicity and cell proliferation are key events in the proposed MOA for the induction of several types of animal tumours. There are substantial data to support this postulated MOA for formaldehyde-induced nasal tumours in rats. Cytotoxicity, DPX formation, nasal epithelial cell regenerative proliferation, squamous metaplasia, and inflammation have been measured in rat studies and are site-specific, highly non-linear concentration–response processes in concordance with the incidence of nasal tumours.

Based on the weight of evidence, it is likely that the MOA is relevant to humans, at least qualitatively. Increased cell proliferation and DPX formation within epithelia of the upper respiratory tract have been observed in monkeys exposed to formaldehyde vapour. Increased human epithelial cell proliferation following in situ exposure to formaldehyde has also been observed in a model system in which rat tracheae populated with human tracheobronchial epithelial cells were xenotransplanted into athymic mice. Limited evidence on histopathological lesions in the nose of humans exposed primarily to formaldehyde in the occupational environment is consistent with a qualitatively similar response of the upper respiratory tract in experimental animals. In addition, several epidemiological studies have indicated an increased risk of nasal cancers with formaldehyde exposure.

Therefore, the MOA is considered relevant to humans, and animal nasal tumour and other supporting data should be taken forward to evaluate human risk. This process would include consideration of the data suggesting that formaldehyde induces tumours in a non-linear, dose-dependent manner. There may also be quantitative differences in response between species for the proposed MOA due to differences in dosimetry.

B. Glutaraldehyde

The epidemiological studies for glutaraldehyde are very limited and do not show an association with nasal tumours. In animal studies, glutaraldehyde has been shown to cause cytotoxicity, cell proliferation, and DPX production, but not nasal tumours, in inhalation studies in rats and mice. The fact that glutaraldehyde is clearly more toxic than formaldehyde should not constitute a reason for the difference in carcinogenic potential. Although, dose for dose, glutaraldehyde exposure may tend to result in more cell death than formaldehyde exposure, if glutaraldehyde is a carcinogen, this should be demonstrable at doses lower than those used for formaldehyde.

The MOA postulated for formaldehyde—that is, sustained cytotoxicity and cell proliferation—would appear to be relevant to glutaraldehyde, but tumour formation has not been demonstrated. It has been tentatively suggested here that the difference in pathological responses to these aldehydes is due to formaldehyde being a monoaldehyde whereas glutaraldehyde is a dialdehyde. This difference may result in a different form of cross-linking so that glutaraldehyde cross-link products are neither likely to retain any biological function nor likely to be repairable. The case-study highlights the difficulties in applying the HRF when the animal tumour data are inadequate.

4. 信頼性、解析及び帰結の記述

A. ホルムアルデヒド

持続的な細胞毒性と細胞増殖は、いくつかの動物種における腫瘍誘発に対して提唱されている MOA についての key events である。ラットにおけるホルムアルデヒド誘発性鼻腔腫瘍の MOA を支持するデータは多数存在する。細胞毒性、DPX 形成、鼻腔上皮細胞の再生性増殖、扁平上皮化生、炎症はラットの研究で観察されており、部位特異的で非線形の濃度反応過程であり、鼻腔腫瘍の発生率と一致している。

エビデンスの重み付けに基づいて、動物 MOA は少なくとも定性的にはヒトに関連している可能性が高い。ホルムアルデヒド蒸気に基づく露されたサルでは、上気道上皮内の細胞増殖及び DPX 形成の増加が観察されている。また、ホルムアルデヒドへの組織ばく露後のヒト上皮細胞の増殖は、ヒト気管支上皮細胞を移植したラット気管を胸腺欠損マウスに異種移植したモデル系でも観察されている。主にホルムアルデヒドにばく露されたヒトの鼻の病理学的病変に関する数少ないエビデンスは、定性的に類似している実験動物の上気道の病変と一致している。さらに、いくつかの疫学研究では、ホルムアルデヒドばく露に伴う鼻腔がんのリスク増加が示唆されている。

したがって、MOA はヒトに関連していると考えられ、ヒトのリスク評価のために、動物の鼻腔腫瘍やその他の裏付けとなるデータを活用すべきである。このプロセスには、ホルムアルデヒドが非線形で用量依存的に腫瘍を誘発することを示唆するデータを考慮することが含まれる。また、定量法の違いにより推定される MOA については種間の反応に量的な差異があるかもしれない。

B. グルタルアルデヒド

グルタルアルデヒドの疫学研究は非常に限られており、鼻腔腫瘍との関連性は示されていない。動物実験では、ラットとマウスの吸入試験において、グルタルアルデヒドは細胞毒性、細胞増殖、DPX 産生を引き起こすことが示されているが、鼻腔腫瘍は引き起こさないことが示されている。グルタルアルデヒドの方がホルムアルデヒドよりも明らかに毒性が強いという事実は、発がん性の違いの説明にはならない。グルタルアルデヒドはホルムアルデヒドよりも低用量での細胞死が多いため、発がん性があるとすれば、ホルムアルデヒドよりも低い用量でそのことが証明されなければならない。

ホルムアルデヒドで推定される MOA、すなわち持続的な細胞毒性と細胞増殖は、グルタルアルデヒドに関連しているように思われるが、腫瘍形成では実証されていない。これらのアルデヒドに対する病理学的反応の違いは、ホルムアルデヒドがモノアルデヒドであるのに対し、グルタルアルデヒドはジアルデヒドであるためであることが暫定的に示唆されている。この違いが、グルタルアルデヒドの架橋生成物が生物学的機能を保持する可能性も修復する可能性もないように、架橋の形態が異なるという結果になっているのかもしれない。この事例研究は、動物の腫瘍データが不十分な場合に HRF を適用することの難しさを浮き彫りにしている。

REFERENCES

- Andersen I, Mølhav L (1983) Controlled human studies with formaldehyde. In: Gibson JE, ed. *Formaldehyde toxicity*. Washington, DC, Hemisphere Publishing, pp. 155–165.
- Ballantyne B (1995) *Toxicology of glutaraldehyde: Review of studies and human health effects*. Bound Brook, NJ, Union Carbide Corporation.
- Ballarin C, Sarto F, Giacomelli L, Bartolucci GB, Clonfero E (1992) Micronucleated cells in nasal mucosa of formaldehyde-exposed workers. *Mutation Research*, **280**:1–7.
- Beauchamp ROJ, St Clair MB, Fennell TR, Clarke DO, Morgan KT, Kari FW (1992) A critical review of the toxicology of glutaraldehyde. *Critical Reviews in Toxicology*, **22**:143–174.
- Berke JH (1987) Cytologic examination of the nasal mucosa in formaldehyde-exposed workers. *Journal of Occupational Medicine*, **29**:681–684.
- Boysen M, Zadig E, Digernes V, Abeler V, Reith A (1990) Nasal mucosa in workers exposed to formaldehyde: A pilot study. *British Journal of Industrial Medicine*, **47**:116–121.
- Burgaz S, Cakmak G, Erdem O, Yilmaz M, Karakaya AE (2001) Micronuclei frequencies in exfoliated nasal mucosa cells from pathology and anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde. *Neoplasma*, **48**:144–147.
- Burgaz S, Erdem O, Cakmak G, Erdem N, Karakaya A, Karakaya AE (2002) Cytogenetic analysis of buccal cells from shoe-workers and pathology and anatomy laboratory workers exposed to *n*-hexane, toluene, methyl ethyl ketone and formaldehyde. *Biomarkers*, **7**:151–161.
- Bushy Run (1983) *Glutaraldehyde vapour subchronic inhalation study on rats*. Export, PA, Bushy Run Research Center (Project Report 46-101).
- Casanova M, Heck Hd'A (1987) Further studies of the metabolic incorporation and covalent binding of inhaled [³H]- and [¹⁴C]formaldehyde in Fischer-344 rats: Effects of glutathione depletion. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **89**:105–121.
- Casanova M, Heck Hd'A, Everitt JI, Harrington WW Jr, Popp JA (1988) Formaldehyde concentrations in the blood of rhesus monkeys after inhalation exposure. *Food and Chemical Toxicology*, **26**:715–716.
- Casanova M, Deyo DF, Heck Hd'A (1989) Covalent binding of inhaled formaldehyde to DNA in the nasal mucosa of Fischer 344 rats: Analysis of formaldehyde and DNA by high-performance liquid chromatography and provisional pharmacokinetic interpretation. *Fundamental and Applied Toxicology*, **12**:397–417.

参考文献

- Andersen I, Mølhav L (1983) Controlled human studies with formaldehyde. In: Gibson JE, ed. *Formaldehyde toxicity*. Washington, DC, Hemisphere Publishing, pp. 155–165.
- Ballantyne B (1995) *Toxicology of glutaraldehyde: Review of studies and human health effects*. Bound Brook, NJ, Union Carbide Corporation.
- Ballarin C, Sarto F, Giacomelli L, Bartolucci GB, Clonfero E (1992) Micronucleated cells in nasal mucosa of formaldehyde-exposed workers. *Mutation Research*, **280**:1–7.
- Beauchamp ROJ, St Clair MB, Fennell TR, Clarke DO, Morgan KT, Kari FW (1992) A critical review of the toxicology of glutaraldehyde. *Critical Reviews in Toxicology*, **22**:143–174.
- Berke JH (1987) Cytologic examination of the nasal mucosa in formaldehyde-exposed workers. *Journal of Occupational Medicine*, **29**:681–684.
- Boysen M, Zadig E, Digernes V, Abeler V, Reith A (1990) Nasal mucosa in workers exposed to formaldehyde: A pilot study. *British Journal of Industrial Medicine*, **47**:116–121.
- Burgaz S, Cakmak G, Erdem O, Yilmaz M, Karakaya AE (2001) Micronuclei frequencies in exfoliated nasal mucosa cells from pathology and anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde. *Neoplasma*, **48**:144–147.
- Burgaz S, Erdem O, Cakmak G, Erdem N, Karakaya A, Karakaya AE (2002) Cytogenetic analysis of buccal cells from shoe-workers and pathology and anatomy laboratory workers exposed to *n*-hexane, toluene, methyl ethyl ketone and formaldehyde. *Biomarkers*, **7**:151–161.
- Bushy Run (1983) *Glutaraldehyde vapour subchronic inhalation study on rats*. Export, PA, Bushy Run Research Center (Project Report 46-101).
- Casanova M, Heck Hd'A (1987) Further studies of the metabolic incorporation and covalent binding of inhaled [³H]- and [¹⁴C]formaldehyde in Fischer-344 rats: Effects of glutathione depletion. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **89**:105–121.
- Casanova M, Heck Hd'A, Everitt JI, Harrington WW Jr, Popp JA (1988) Formaldehyde concentrations in the blood of rhesus monkeys after inhalation exposure. *Food and Chemical Toxicology*, **26**:715–716.
- Casanova M, Deyo DF, Heck Hd'A (1989) Covalent binding of inhaled formaldehyde to DNA in the nasal mucosa of Fischer 344 rats: Analysis of formaldehyde and DNA by high-performance liquid chromatography and provisional pharmacokinetic interpretation. *Fundamental and Applied Toxicology*, **12**:397–417.

Casanova M, Morgan KT, Steinhagen WH, Everitt JI, Popp JA, Heck Hd'A (1991) Covalent binding of inhaled formaldehyde to DNA in the respiratory tract of rhesus monkeys: Pharmacokinetics, rat-to-monkey interspecies scaling, and extrapolation to man. *Fundamental and Applied Toxicology*, **17**:409–428.

Casanova M, Morgan KT, Gross EA, Moss OR, Heck Hd'A (1994) DNA–protein cross-links and cell replication at specific sites in the nose of F344 rats exposed subchronically to formaldehyde. *Fundamental and Applied Toxicology*, **23**:525–536.

Casanova-Schmitz M, Starr TB, Heck H (1984) Differentiation between metabolic incorporation and covalent binding in the labeling of macromolecules in the rat nasal mucosa and bone marrow by inhaled [¹⁴C]- and [³H]formaldehyde. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **76**:26–44.

Chang JCF, Steinhagen WH, Barrow CS (1981) Effects of single or repeated formaldehyde exposures on minute volume of B6C3F1 mice and F344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **61**:451–459.

Chang JCF, Gross EA, Swenberg JA, Barrow CS (1983) Nasal cavity deposition, histopathology and cell proliferation after single or repeated formaldehyde exposures in B6C3F1 mice and F-344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **68**:161–176.

CIIT (1999) *Formaldehyde: Hazard characterization and dose–response assessment for carcinogenicity by the route of inhalation*, rev. ed. Research Triangle Park, NC, Chemical Industry Institute of Toxicology.

Coggon D, Harris EC, Poole J, Palmer KT (2003) Extended follow-up of a cohort of British chemical workers exposed to formaldehyde. *Journal of the National Cancer Institute*, **21**:1608–1614.

Cogliano VJ, Grosse Y, Baan RA, Straif K, Secretan MB, El Ghissassi F (2005) Meeting report: Summary of IARC Monographs on formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-*tert*-butoxy-2-propanol. *Environmental Health Perspectives*, **113**(9):1205–1208.

Conolly RB, Kimbell JS, Janszen D, Schlosser PM, Kalisak D, Preston J, Miller FJ (2004) Human respiratory tract cancer risks of inhaled formaldehyde: Dose–response predictions derived from biologically-motivated computational modeling of a combined rodent and human dataset. *Toxicological Sciences*, **82**:279–296.

Consensus Workshop on Formaldehyde (1984) Report on the consensus workshop on formaldehyde. *Environmental Health Perspectives*, **58**:323–381.

Crosby RM, Richardson KK, Craft TR, Benforado KB, Liber HL, Skopek TR (1988) Molecular analysis of formaldehyde-induced mutations in human lymphoblasts and *E. coli*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **12**:155–166.

Casanova M, Morgan KT, Steinhagen WH, Everitt JI, Popp JA, Heck Hd'A (1991) Covalent binding of inhaled formaldehyde to DNA in the respiratory tract of rhesus monkeys: Pharmacokinetics, rat-to-monkey interspecies scaling, and extrapolation to man. *Fundamental and Applied Toxicology*, **17**:409–428.

Casanova M, Morgan KT, Gross EA, Moss OR, Heck Hd'A (1994) DNA–protein cross-links and cell replication at specific sites in the nose of F344 rats exposed subchronically to formaldehyde. *Fundamental and Applied Toxicology*, **23**:525–536.

Casanova-Schmitz M, Starr TB, Heck H (1984) Differentiation between metabolic incorporation and covalent binding in the labeling of macromolecules in the rat nasal mucosa and bone marrow by inhaled [¹⁴C]- and [³H]formaldehyde. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **76**:26–44.

Chang JCF, Steinhagen WH, Barrow CS (1981) Effects of single or repeated formaldehyde exposures on minute volume of B6C3F1 mice and F344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **61**:451–459.

Chang JCF, Gross EA, Swenberg JA, Barrow CS (1983) Nasal cavity deposition, histopathology and cell proliferation after single or repeated formaldehyde exposures in B6C3F1 mice and F-344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **68**:161–176.

CIIT (1999) *Formaldehyde: Hazard characterization and dose–response assessment for carcinogenicity by the route of inhalation*, rev. ed. Research Triangle Park, NC, Chemical Industry Institute of Toxicology.

Coggon D, Harris EC, Poole J, Palmer KT (2003) Extended follow-up of a cohort of British chemical workers exposed to formaldehyde. *Journal of the National Cancer Institute*, **21**:1608–1614.

Cogliano VJ, Grosse Y, Baan RA, Straif K, Secretan MB, El Ghissassi F (2005) Meeting report: Summary of IARC Monographs on formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-*tert*-butoxy-2-propanol. *Environmental Health Perspectives*, **113**(9):1205–1208.

Conolly RB, Kimbell JS, Janszen D, Schlosser PM, Kalisak D, Preston J, Miller FJ (2004) Human respiratory tract cancer risks of inhaled formaldehyde: Dose–response predictions derived from biologically-motivated computational modeling of a combined rodent and human dataset. *Toxicological Sciences*, **82**:279–296.

Consensus Workshop on Formaldehyde (1984) Report on the consensus workshop on formaldehyde. *Environmental Health Perspectives*, **58**:323–381.

Crosby RM, Richardson KK, Craft TR, Benforado KB, Liber HL, Skopek TR (1988) Molecular analysis of formaldehyde-induced mutations in human lymphoblasts and *E. coli*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **12**:55–166.

Dalbey WE (1982) Formaldehyde and tumors in hamster respiratory tract. *Toxicology*, **24**:9–14.

Douglas MP, Rogers SO (1998) DNA damage caused by common cytological fixatives. *Mutation Research*, **401**:77–88.

Edling C, Hellquist H, Ödkvist L (1988) Occupational exposure to formaldehyde and histopathological changes in the nasal mucosa. *British Journal of Industrial Medicine*, **45**:761–765.

Feron VJ, Bruyntes JP, Woutersen RA, Immel HR, Appelman LM (1988) Nasal tumours in rats after short-term exposure to a cytotoxic concentration of formaldehyde. *Cancer Letters*, **39**:101–111.

Feron VJ, Til HP, Woutersen RA (1990) Letter to the editor. *Toxicology and Industrial Health*, **6**:637–639.

Gaylor DW, Lutz WK, Connolly RB (2004) Statistical analysis of nonmonotonic dose–response relationships: Research design and analysis of nasal cell proliferation in rats exposed to formaldehyde. *Toxicological Sciences*, **77**:158–164.

Gross EA, Mellick PW, Kari FW, Miller FJ, Morgan KT (1994) Histopathology and cell replication responses in the respiratory tract of rats and mice exposed by inhalation to glutaraldehyde for up to 13 weeks. *Fundamental and Applied Toxicology*, **23**:348–362.

Hansen J, Olsen JH (1995) Formaldehyde and cancer morbidity among male employees in Denmark. *Cancer Causes and Control*, **6**:354–360.

Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, eds (2001) *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*, 10th ed. The McGraw-Hill Companies, Inc., 2025 pp.

Hauptmann A, Lubin JH, Stewart PA, Hayes RB, Blair A (2004). Mortality from solid cancers among workers in formaldehyde industries. *American Journal of Epidemiology*, **159**:1117–1130.

Hayes RB, Blair A, Stewart PA, Herrick RF, Mahar H (1990) Mortality of U.S. embalmers and funeral directors. *American Journal of Industrial Medicine*, **18**:641–652.

He J-L, Jin L-F, Jin H-Y (1998) Detection of cytogenetic effects in peripheral lymphocytes of students exposed to formaldehyde with cytokinesis-blocked micronucleus assay. *Biomedical and Environmental Sciences*, **11**:87–92.

Heck H, Casanova M (1995). Nasal dosimetry of formaldehyde: Modelling site specificity and the effects of pre-exposure. In: Miller JF, ed. *Nasal toxicity and dosimetry of inhaled xenobiotics: Implications for human health*. Washington, DC, Taylor & Francis, pp. 159–175.

Dalbey WE (1982) Formaldehyde and tumors in hamster respiratory tract. *Toxicology*, **24**:9–14.

Douglas MP, Rogers SO (1998) DNA damage caused by common cytological fixatives. *Mutation Research*, **401**:77–88.

Edling C, Hellquist H, Ödkvist L (1988) Occupational exposure to formaldehyde and histopathological changes in the nasal mucosa. *British Journal of Industrial Medicine*, **45**:761–765.

Feron VJ, Bruyntes JP, Woutersen RA, Immel HR, Appelman LM (1988) Nasal tumours in rats after short-term exposure to a cytotoxic concentration of formaldehyde. *Cancer Letters*, **39**:101–111.

Feron VJ, Til HP, Woutersen RA (1990) Letter to the editor. *Toxicology and Industrial Health*, **6**:637–639.

Gaylor DW, Lutz WK, Connolly RB (2004) Statistical analysis of nonmonotonic dose–response relationships: Research design and analysis of nasal cell proliferation in rats exposed to formaldehyde. *Toxicological Sciences*, **77**:158–164.

Gross EA, Mellick PW, Kari FW, Miller FJ, Morgan KT (1994) Histopathology and cell replication responses in the respiratory tract of rats and mice exposed by inhalation to glutaraldehyde for up to 13 weeks. *Fundamental and Applied Toxicology*, **23**:348–362.

Hansen J, Olsen JH (1995) Formaldehyde and cancer morbidity among male employees in Denmark. *Cancer Causes and Control*, **6**:354–360.

Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, eds (2001) *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*, 10th ed. The McGraw-Hill Companies, Inc., 2025 pp.

Hauptmann A, Lubin JH, Stewart PA, Hayes RB, Blair A (2004). Mortality from solid cancers among workers in formaldehyde industries. *American Journal of Epidemiology*, **159**:1117–1130.

Hayes RB, Blair A, Stewart PA, Herrick RF, Mahar H (1990) Mortality of U.S. embalmers and funeral directors. *American Journal of Industrial Medicine*, **18**:641–652.

He J-L, Jin L-F, Jin H-Y (1998) Detection of cytogenetic effects in peripheral lymphocytes of students exposed to formaldehyde with cytokinesis-blocked micronucleus assay. *Biomedical and Environmental Sciences*, **11**:87–92.

Heck H, Casanova M (1995). Nasal dosimetry of formaldehyde: Modelling site specificity and the effects of pre-exposure. In: Miller JF, ed. *Nasal toxicity and dosimetry of inhaled xenobiotics: Implications for human health*. Washington, DC, Taylor & Francis, pp. 159–175.

Heck H, Casanova M (2004) The implausibility of leukemia induction by formaldehyde: A critical review of the biological evidence on distant-site toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **40**:92–106.

Heck Hd'A, White EL, Casanova-Schmitz M (1982) Determination of formaldehyde in biological tissues by gas chromatography/mass spectrometry. *Biomedical Mass Spectrometry*, **9**:347–353.

Heck Hd'A, Chin TY, Schmitz MC (1983) Distribution of [¹⁴C]formaldehyde in rats after inhalation exposure. In: Gibson JE, ed. *Formaldehyde toxicity*. Washington, DC, Hemisphere Publishing, pp. 26–37.

Heck Hd'A, Casanova-Schmitz M, Dodd PB, Schachter EN, Witek TJ, Tosun T (1985) Formaldehyde (CH₂O) concentrations in the blood of humans and Fischer-344 rats exposed to CH₂O under controlled conditions. *American Industrial Hygiene Association Journal*, **46**:1–3.

Heck Hd'A, Casanova M, Starr TB (1990) Formaldehyde toxicity—new understanding. *Critical Reviews in Toxicology*, **20**:397–426.

Hedberg JJ, Strömberg P, Höög JO (1998) An attempt to transform class characteristics within the alcohol dehydrogenase family. *FEBS Letters*, **436**:67–70.

Hester SD, Benavides GB, Yoon L, Morgan KT, Zou F, Barry W, Wolf DC (2003) Formaldehyde-induced gene expression in F344 rat nasal respiratory epithelium. *Toxicology*, **187**:13–24.

Holmquist B, Vallee BL (1991) Human liver class III alcohol and glutathione dependent formaldehyde dehydrogenase are the same enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **178**:1371–1377.

Holmström M, Wilhelmsson B, Hellquist H, Rosén G (1989) Histological changes in the nasal mucosa in persons occupationally exposed to formaldehyde alone and in combination with wood dust. *Acta Oto-laryngologica*, **107**:120–129.

Hopwood D (1975) The reactions of glutaraldehyde with nucleic acids. *Journal of Histochemistry*, **7**:267–276.

Horton AW, Tye R, Stemmer KL (1963) Experimental carcinogenesis of the lung. Inhalation of gaseous formaldehyde or an aerosol of coal tar by C3H mice. *Journal of the National Cancer Institute*, **30**:31–43.

IARC (2005) *Formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tert-butoxypropan-2-ol*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 478 pp. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 88).

Heck H, Casanova M (2004) The implausibility of leukemia induction by formaldehyde: A critical review of the biological evidence on distant-site toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **40**:92–106.

Heck Hd'A, White EL, Casanova-Schmitz M (1982) Determination of formaldehyde in biological tissues by gas chromatography/mass spectrometry. *Biomedical Mass Spectrometry*, **9**:347–353.

Heck Hd'A, Chin TY, Schmitz MC (1983) Distribution of [¹⁴C]formaldehyde in rats after inhalation exposure. In: Gibson JE, ed. *Formaldehyde toxicity*. Washington, DC, Hemisphere Publishing, pp. 26–37.

Heck Hd'A, Casanova-Schmitz M, Dodd PB, Schachter EN, Witek TJ, Tosun T (1985) Formaldehyde (CH₂O) concentrations in the blood of humans and Fischer-344 rats exposed to CH₂O under controlled conditions. *American Industrial Hygiene Association Journal*, **46**:1–3.

Heck Hd'A, Casanova M, Starr TB (1990) Formaldehyde toxicity—new understanding. *Critical Reviews in Toxicology*, **20**:397–426.

Hedberg JJ, Strömberg P, Höög JO (1998) An attempt to transform class characteristics within the alcohol dehydrogenase family. *FEBS Letters*, **436**:67–70.

Hester SD, Benavides GB, Yoon L, Morgan KT, Zou F, Barry W, Wolf DC (2003) Formaldehyde-induced gene expression in F344 rat nasal respiratory epithelium. *Toxicology*, **187**:13–24.

Holmquist B, Vallee BL (1991) Human liver class III alcohol and glutathione dependent formaldehyde dehydrogenase are the same enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **178**:1371–1377.

Holmström M, Wilhelmsson B, Hellquist H, Rosén G (1989) Histological changes in the nasal mucosa in persons occupationally exposed to formaldehyde alone and in combination with wood dust. *Acta Oto-laryngologica*, **107**:120–129.

Hopwood D (1975) The reactions of glutaraldehyde with nucleic acids. *Journal of Histochemistry*, **7**:267–276.

Horton AW, Tye R, Stemmer KL (1963) Experimental carcinogenesis of the lung. Inhalation of gaseous formaldehyde or an aerosol of coal tar by C3H mice. *Journal of the National Cancer Institute*, **30**:31–43.

IARC (2005) *Formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tert-butoxypropan-2-ol*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 478 pp. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 88).

IPCS (2002) *Formaldehyde*. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Concise International Chemical Assessment Document No. 40).

Kamata E, Nakadate E, Uchida O, Ogawa Y, Suzuki S, Kaneko T, Saito M, Kurokawa Y (1997) Results of a 28-month chronic inhalation toxicity study of formaldehyde in male Fischer-344 rats. *Journal of Toxicological Sciences*, **22**:239–254.

Kerns WD, Pavkov KL, Donofrio DJ, Gralla EJ, Swenberg JA (1983a) Carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long-term inhalation exposure. *Cancer Research*, **43**:4382–4392.

Kerns WD, Donofrio DJ, Pavkov KL (1983b) The chronic effects of formaldehyde inhalation in rats and mice: A preliminary report. In: Gibson JE, ed. *Formaldehyde toxicity*. Washington, DC, Hemisphere Publishing, pp. 111–131.

Kimbell JS, Gross EA, Richardson RB, Conolly RB, Morgan KT (1997) Correlation of regional formaldehyde flux predictions with the distribution of formaldehyde-induced squamous metaplasia in F344 rat nasal passages. *Mutation Research*, **380**:143–154.

Koivusalo M, Baumann M, Uotila L (1989) Evidence for the identity of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and class III alcohol dehydrogenase. *FEBS Letters*, **257**:105–109.

Liber HL, Benforado K, Crosby RM, Simpson D, Skopek TR (1989) Formaldehyde-induced and spontaneous alterations in human *hprt* DNA sequence and mRNA expression. *Mutation Research*, **226**:31–37.

Liteplo RG, Meek ME (2003) Inhaled formaldehyde: Exposure estimation, hazard characterization, and exposure–response analysis. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **B6**:85–114.

Luce D, Leclerc A, Begin D, Demers PA, Gerin M, Orlowski E, Kogevinas M, Belli S, Bugel I, Bolm-Audorff U, Brinton LA, Comba P, Hardell L, Hayes RB, Magnani C, Merler E, Preston-Martin S, Vaughan TL, Zheng W, Boffetta P (2002) Sinonasal cancer and occupational exposures: A pooled analysis of 12 case–control studies. *Cancer Causes and Control*, **13**:147–157.

Lutz WK (1998) Dose–response relationships in chemical carcinogenesis: Superposition of different mechanisms of action, resulting in linear–nonlinear curves, practical thresholds, J-shapes. *Mutation Research*, **405**:117–124.

Maronpot RR, Miller RA, Clarke WJ, Westerberg RB, Decker JR, Moss OR (1986) Toxicity of formaldehyde vapor in B6C3F1 mice exposed for 13 weeks. *Toxicology*, **41**:253–266.

Merk O, Speit G (1998) Significance of formaldehyde-induced DNA–protein crosslinks for mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **32**:260–268.

IPCS (2002) *Formaldehyde*. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Concise International Chemical Assessment Document No. 40).

Kamata E, Nakadate E, Uchida O, Ogawa Y, Suzuki S, Kaneko T, Saito M, Kurokawa Y (1997) Results of a 28-month chronic inhalation toxicity study of formaldehyde in male Fischer-344 rats. *Journal of Toxicological Sciences*, **22**:239–254.

Kerns WD, Pavkov KL, Donofrio DJ, Gralla EJ, Swenberg JA (1983a) Carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long-term inhalation exposure. *Cancer Research*, **43**:4382–4392.

Kerns WD, Donofrio DJ, Pavkov KL (1983b) The chronic effects of formaldehyde inhalation in rats and mice: A preliminary report. In: Gibson JE, ed. *Formaldehyde toxicity*. Washington, DC, Hemisphere Publishing, pp. 111–131.

Kimbell JS, Gross EA, Richardson RB, Conolly RB, Morgan KT (1997) Correlation of regional formaldehyde flux predictions with the distribution of formaldehyde-induced squamous metaplasia in F344 rat nasal passages. *Mutation Research*, **380**:143–154.

Koivusalo M, Baumann M, Uotila L (1989) Evidence for the identity of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and class III alcohol dehydrogenase. *FEBS Letters*, **257**:105–109.

Liber HL, Benforado K, Crosby RM, Simpson D, Skopek TR (1989) Formaldehyde-induced and spontaneous alterations in human *hprt* DNA sequence and mRNA expression. *Mutation Research*, **226**:31–37.

Liteplo RG, Meek ME (2003) Inhaled formaldehyde: Exposure estimation, hazard characterization, and exposure–response analysis. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **B6**:85–114.

Luce D, Leclerc A, Begin D, Demers PA, Gerin M, Orlowski E, Kogevinas M, Belli S, Bugel I, Bolm-Audorff U, Brinton LA, Comba P, Hardell L, Hayes RB, Magnani C, Merler E, Preston-Martin S, Vaughan TL, Zheng W, Boffetta P (2002) Sinonasal cancer and occupational exposures: A pooled analysis of 12 case–control studies. *Cancer Causes and Control*, **13**:147–157.

Lutz WK (1998) Dose–response relationships in chemical carcinogenesis: Superposition of different mechanisms of action, resulting in linear–nonlinear curves, practical thresholds, J-shapes. *Mutation Research*, **405**:117–124.

Maronpot RR, Miller RA, Clarke WJ, Westerberg RB, Decker JR, Moss OR (1986) Toxicity of formaldehyde vapor in B6C3F1 mice exposed for 13 weeks. *Toxicology*, **41**:253–266.

Merk O, Speit G (1998) Significance of formaldehyde-induced DNA–protein crosslinks for mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **32**:260–268.

Monticello TM (1990) *Formaldehyde induced pathology and cell proliferation: A thesis*. Durham, NC, Duke University.

Monticello TM, Morgan KT (1994) Cell proliferation and formaldehyde-induced respiratory carcinogenesis. *Risk Analysis*, **14**:313–319.

Monticello TM, Morgan KT, Everitt JJ, Popp JA (1989) Effects of formaldehyde gas on the respiratory tract of rhesus monkeys. Pathology and cell proliferation. *American Journal of Pathology*, **134**:515–527.

Monticello TM, Miller FJ, Morgan KT (1991) Regional increases in rat nasal epithelial cell proliferation following acute and subacute inhalation of formaldehyde. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **111**:409–421.

Monticello TM, Swenberg JA, Gross EA, Leiniger JR, Kimbell JS, Seilkop S, Starr TB, Gibson JE, Morgan KT (1996) Correlation of regional and nonlinear formaldehyde-induced nasal cancer with proliferating populations of cells. *Cancer Research*, **56**:1012–1022.

Morgan KT, Monticello TM (1990) Formaldehyde toxicity: Respiratory epithelial injury and repair. In: Thomassen DG, Nettesheim P, eds. *Biology, toxicology, and carcinogenesis of the respiratory epithelium*. Washington, DC, Hemisphere Publishing, pp. 155–171.

Morgan KT, Jiang X-Z, Starr TB, Kerns WD (1986) More precise localization of nasal tumors associated with chronic exposure of F-344 rats to formaldehyde gas. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **82**:264–271.

NICNAS (1994) *Glutaraldehyde. Full public report*. Canberra, Australian Government Publishing Service, National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme, July (Priority Existing Chemical No. 3).

NTP (1993) *NTP technical report on toxicity studies on glutaraldehyde (CAS No. 111-30-8) administered by inhalation to F344/N rats and B6C3F1 mice*. Research Triangle Park, NC, National Institutes of Health, National Toxicology Program (NTP Toxicity Report No. 25; NIH Publication No. 93-3348).

NTP (1999) *Toxicology and carcinogenesis studies of glutaraldehyde (CAS No. 111-30-8) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies)*. Research Triangle Park, NC, National Institutes of Health, National Toxicology Program (NTP Technical Report Series No. 490; NIH Publication No. 99-3980).

Olsen JH, Asnaes S (1986) Formaldehyde and the risk of squamous cell carcinoma of the sinonasal cavities. *British Journal of Industrial Medicine*, **43**:769–774.

Pinkerton L, Hein M, Stayner L (2004). Mortality among a cohort of garment workers exposed to formaldehyde: An update. *Occupational and Environmental Medicine*, **61**:193–200.

Monticello TM (1990) *Formaldehyde induced pathology and cell proliferation: A thesis*. Durham, NC, Duke University.

Monticello TM, Morgan KT (1994) Cell proliferation and formaldehyde-induced respiratory carcinogenesis. *Risk Analysis*, **14**:313–319.

Monticello TM, Morgan KT, Everitt JJ, Popp JA (1989) Effects of formaldehyde gas on the respiratory tract of rhesus monkeys. Pathology and cell proliferation. *American Journal of Pathology*, **134**:515–527.

Monticello TM, Miller FJ, Morgan KT (1991) Regional increases in rat nasal epithelial cell proliferation following acute and subacute inhalation of formaldehyde. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **111**:409–421.

Monticello TM, Swenberg JA, Gross EA, Leiniger JR, Kimbell JS, Seilkop S, Starr TB, Gibson JE, Morgan KT (1996) Correlation of regional and nonlinear formaldehyde-induced nasal cancer with proliferating populations of cells. *Cancer Research*, **56**:1012–1022.

Morgan KT, Monticello TM (1990) Formaldehyde toxicity: Respiratory epithelial injury and repair. In: Thomassen DG, Nettesheim P, eds. *Biology, toxicology, and carcinogenesis of the respiratory epithelium*. Washington, DC, Hemisphere Publishing, pp. 155–171.

Morgan KT, Jiang X-Z, Starr TB, Kerns WD (1986) More precise localization of nasal tumors associated with chronic exposure of F-344 rats to formaldehyde gas. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **82**:264–271.

NICNAS (1994) *Glutaraldehyde. Full public report*. Canberra, Australian Government Publishing Service, National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme, July (Priority Existing Chemical No. 3).

NTP (1993) *NTP technical report on toxicity studies on glutaraldehyde (CAS No. 111-30-8) administered by inhalation to F344/N rats and B6C3F1 mice*. Research Triangle Park, NC, National Institutes of Health, National Toxicology Program (NTP Toxicity Report No. 25; NIH Publication No. 93-3348).

NTP (1999) *Toxicology and carcinogenesis studies of glutaraldehyde (CAS No. 111-30-8) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies)*. Research Triangle Park, NC, National Institutes of Health, National Toxicology Program (NTP Technical Report Series No. 490; NIH Publication No. 99-3980).

Olsen JH, Asnaes S (1986) Formaldehyde and the risk of squamous cell carcinoma of the sinonasal cavities. *British Journal of Industrial Medicine*, **43**:769–774.

Pinkerton L, Hein M, Stayner L (2004). Mortality among a cohort of garment workers exposed to formaldehyde: An update. *Occupational and Environmental Medicine*, **61**:193–200.

Recio L (1997) Oncogene and tumor suppressor gene alterations in nasal tumors. *Mutation Research*, **380**:27–31.

Recio L, Sisk S, Pluta L, Bermudez E, Gross EA, Chen Z, Morgan K, Walker C (1992) *p53* mutations in formaldehyde-induced nasal squamous cell carcinomas in rats. *Cancer Research*, **52**:6113–6116.

Rietbrock N (1965) [Formaldehyde oxidation in the rat.] *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, **251**:189–190 (in German).

Rusch GM, Clary JJ, Rinehart WE, Bolte HF (1983) A 26-week inhalation toxicity study with formaldehyde in the monkey, rat, and hamster. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **68**:329–343.

Schlosser PM, Lilly PD, Conolly RB, Janszen DB, Kimbell JS (2003) Benchmark dose risk assessment for formaldehyde using airflow modeling and a single-compartment, DNA–protein cross-link dosimetry model to estimate human equivalent doses. *Risk Analysis*, **23**:473–487.

Sewell BT, Bouloukos C, von Holt C (1984) Formaldehyde and glutaraldehyde in the fixation of chromatin for electron microscopy. *Journal of Microscopy*, **136**:103–112.

Shaham J, Bomstein Y, Gurvich R, Rashkovsky M, Kaufman Z (2003) DNA–protein crosslinks and p53 protein expression in relation to occupational exposure to formaldehyde. *Occupational and Environmental Medicine*, **60**:403–409.

Soffritti M, Maltoni C, Maffei F, Biagi R (1989) Formaldehyde: An experimental multipotential carcinogen. *Toxicology and Industrial Health*, **5**:699–730.

Speit G, Schutz P, Merk O (2000) Induction and repair of formaldehyde-induced DNA–protein crosslinks in repair-deficient human cell lines. *Mutagenesis*, **15**:85–90.

St Clair MB, Gross EA, Morgan KT (1990) Pathology and cell proliferation induced by intra-nasal instillation of aldehydes in the rat: Comparison of glutaraldehyde and formaldehyde. *Toxicologic Pathology*, **18**:353–361.

St Clair MB, Bermudez E, Gross EA, Butterworth BE, Recio L (1991) Evaluation of the genotoxic potential of glutaraldehyde. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **18**:113–119.

Stroup NE, Blair A, Erikson GE (1986) Brain cancer and other causes of deaths in anatomists. *Journal of the National Cancer Institute*, **77**:1217–1224.

Swenberg JA, Gross EA, Martin J, Popp JA (1983) Mechanisms of formaldehyde toxicity. In: Gibson JE, ed. *Formaldehyde toxicity*. Washington, DC, Hemisphere Publishing, pp. 132–147.

Recio L (1997) Oncogene and tumor suppressor gene alterations in nasal tumors. *Mutation Research*, **380**:27–31.

Recio L, Sisk S, Pluta L, Bermudez E, Gross EA, Chen Z, Morgan K, Walker C (1992) *p53* mutations in formaldehyde-induced nasal squamous cell carcinomas in rats. *Cancer Research*, **52**:6113–6116.

Rietbrock N (1965) [Formaldehyde oxidation in the rat.] *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, **251**:189–190 (in German).

Rusch GM, Clary JJ, Rinehart WE, Bolte HF (1983) A 26-week inhalation toxicity study with formaldehyde in the monkey, rat, and hamster. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **68**:329–343.

Schlosser PM, Lilly PD, Conolly RB, Janszen DB, Kimbell JS (2003) Benchmark dose risk assessment for formaldehyde using airflow modeling and a single-compartment, DNA–protein cross-link dosimetry model to estimate human equivalent doses. *Risk Analysis*, **23**:473–487.

Sewell BT, Bouloukos C, von Holt C (1984) Formaldehyde and glutaraldehyde in the fixation of chromatin for electron microscopy. *Journal of Microscopy*, **136**:103–112.

Shaham J, Bomstein Y, Gurvich R, Rashkovsky M, Kaufman Z (2003) DNA–protein crosslinks and p53 protein expression in relation to occupational exposure to formaldehyde. *Occupational and Environmental Medicine*, **60**:403–409.

Soffritti M, Maltoni C, Maffei F, Biagi R (1989) Formaldehyde: An experimental multipotential carcinogen. *Toxicology and Industrial Health*, **5**:699–730.

Speit G, Schutz P, Merk O (2000) Induction and repair of formaldehyde-induced DNA–protein crosslinks in repair-deficient human cell lines. *Mutagenesis*, **15**:85–90.

St Clair MB, Gross EA, Morgan KT (1990) Pathology and cell proliferation induced by intra-nasal instillation of aldehydes in the rat: Comparison of glutaraldehyde and formaldehyde. *Toxicologic Pathology*, **18**:353–361.

St Clair MB, Bermudez E, Gross EA, Butterworth BE, Recio L (1991) Evaluation of the genotoxic potential of glutaraldehyde. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **18**:113–119.

Stroup NE, Blair A, Erikson GE (1986) Brain cancer and other causes of deaths in anatomists. *Journal of the National Cancer Institute*, **77**:1217–1224.

Swenberg JA, Gross EA, Martin J, Popp JA (1983) Mechanisms of formaldehyde toxicity. In: Gibson JE, ed. *Formaldehyde toxicity*. Washington, DC, Hemisphere Publishing, pp. 132–147.

Swenberg JA, Gross EA, Martin J, Randall HA (1986) Localization and quantitation of cell proliferation following exposure to nasal irritants. In: Barrow CS, ed. *Toxicology of the nasal passages*. Washington, DC, Hemisphere Publishing, pp. 291–300.

Takahashi M, Hasegawa R, Furukawa F, Toyoda K, Sato H, Hayashi Y (1986) Effects of ethanol, potassium metabisulfite, formaldehyde and hydrogen peroxide on gastric carcinogenesis in rats after initiation with *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine. *Japanese Journal of Cancer Research*, **77**:118–124.

Til HP, Woutersen RA, Feron VJ, Hollanders VHM, Falke HE (1989) Two-year drinking-water study of formaldehyde in rats. *Food and Chemical Toxicology*, **27**:77–87.

Titenko-Holland N, Levine AJ, Smith MT, Quintana PJ, Boeniger M, Hayes R, Suruda A, Schulte P (1996) Quantification of epithelial cell micronuclei by fluorescence in situ hybridization (FISH) in mortuary science students exposed to formaldehyde. *Mutation Research*, **371**:237–248.

Tobe M, Naito K, Kurokawa Y (1989) Chronic toxicity study on formaldehyde administered orally to rats. *Toxicology*, **56**:79–86.

Uotila L, Koivusalo M (1974) Formaldehyde dehydrogenase from human liver. Purification, properties, and evidence for the formation of glutathione thiol esters by the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, **249**:7653–7663.

Uotila L, Koivusalo M (1997) Expression of formaldehyde dehydrogenase and *S*-formylglutathione hydrolase activities in different rat tissues. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **414**:365–371.

Van Miller JP, Hermansky SJ, Neptun DA, Loscoa PE, Ballantyne B (1995) Combined chronic toxicity/oncogenicity study with glutaraldehyde (GA) in the drinking water of rats. *Toxicologist*, **15**:203 (abstract).

Vargová M, Janota S, Karelová J, Barancokova M, Šulcová M (1992) Analysis of the health risk of occupational exposure to formaldehyde using biological markers. *Analysis*, **20**:451–454.

Vock EH, Lutz WK, Ilinskaya O, Vamvakas S (1999) Discrimination between genotoxicity and cytotoxicity for the induction of DNA double-strand breaks in cells treated with aldehydes and diepoxides. *Mutation Research*, **441**:85–93.

Walrath J, Fraumeni JF Jr (1983) Mortality patterns among embalmers. *International Journal of Cancer*, **31**:407–411.

Wolf DC, Gross EA, Lycht O, Bermudez E, Recio L, Morgan KT (1995) Immunohistochemical localization of p53, PCNA, and TGF- α proteins in formaldehyde-induced rat nasal squamous cell carcinomas. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **132**:27–35.

Swenberg JA, Gross EA, Martin J, Randall HA (1986) Localization and quantitation of cell proliferation following exposure to nasal irritants. In: Barrow CS, ed. *Toxicology of the nasal passages*. Washington, DC, Hemisphere Publishing, pp. 291–300.

Takahashi M, Hasegawa R, Furukawa F, Toyoda K, Sato H, Hayashi Y (1986) Effects of ethanol, potassium metabisulfite, formaldehyde and hydrogen peroxide on gastric carcinogenesis in rats after initiation with *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine. *Japanese Journal of Cancer Research*, **77**:118–124.

Til HP, Woutersen RA, Feron VJ, Hollanders VHM, Falke HE (1989) Two-year drinking-water study of formaldehyde in rats. *Food and Chemical Toxicology*, **27**:77–87.

Titenko-Holland N, Levine AJ, Smith MT, Quintana PJ, Boeniger M, Hayes R, Suruda A, Schulte P (1996) Quantification of epithelial cell micronuclei by fluorescence in situ hybridization (FISH) in mortuary science students exposed to formaldehyde. *Mutation Research*, **371**:237–248.

Tobe M, Naito K, Kurokawa Y (1989) Chronic toxicity study on formaldehyde administered orally to rats. *Toxicology*, **56**:79–86.

Uotila L, Koivusalo M (1974) Formaldehyde dehydrogenase from human liver. Purification, properties, and evidence for the formation of glutathione thiol esters by the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, **249**:7653–7663.

Uotila L, Koivusalo M (1997) Expression of formaldehyde dehydrogenase and *S*-formylglutathione hydrolase activities in different rat tissues. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **414**:365–371.

Van Miller JP, Hermansky SJ, Neptun DA, Loscoa PE, Ballantyne B (1995) Combined chronic toxicity/oncogenicity study with glutaraldehyde (GA) in the drinking water of rats. *Toxicologist*, **15**:203 (abstract).

Vargová M, Janota S, Karelová J, Barancokova M, Šulcová M (1992) Analysis of the health risk of occupational exposure to formaldehyde using biological markers. *Analysis*, **20**:451–454.

Vock EH, Lutz WK, Ilinskaya O, Vamvakas S (1999) Discrimination between genotoxicity and cytotoxicity for the induction of DNA double-strand breaks in cells treated with aldehydes and diepoxides. *Mutation Research*, **441**:85–93.

Walrath J, Fraumeni JF Jr (1983) Mortality patterns among embalmers. *International Journal of Cancer*, **31**:407–411.

Wolf DC, Gross EA, Lycht O, Bermudez E, Recio L, Morgan KT (1995) Immunohistochemical localization of p53, PCNA, and TGF- α proteins in formaldehyde-induced rat nasal squamous cell carcinomas. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **132**:27–35.

Woutersen RA, van Garderen-Hoetmer A, Bruijntjes JP, Zwart A, Feron VJ (1989) Nasal tumours in rats after severe injury to the nasal mucosa and prolonged exposure to 10 ppm formaldehyde. *Journal of Applied Toxicology*, **9**:39–46.

Ying C-J, Yan W-S, Zhao M-Y, Ye X-L, Xie H, Yin S-Y, Zhu X-S (1997) Micronuclei in nasal mucosa, oral mucosa and lymphocytes in students exposed to formaldehyde vapor in anatomy class. *Biomedical and Environmental Science*, **10**:451–455.

Zeiger E, Gollapudi B, Spencer P (2005) Genetic toxicity and carcinogenicity studies of glutaraldehyde—A review. *Mutation Research*, **589**:136–151.

Zissu D, Gagnaire F, Bonnet P (1994) Nasal and pulmonary toxicity of glutaraldehyde in mice. *Toxicology Letters*, **71**:53–62.

Zissu D, Bonnet P, Binet S (1998) Histopathological study in B6C3F1 mice chronically exposed by inhalation to glutaraldehyde. *Toxicology Letters*, **95**:131–139.

Zwart A, Woutersen RA, Wilmer JWGM, Spit BJ, Feron VJ (1988) Cytotoxic and adaptive effects in rat nasal epithelium after 3-day and 13-week exposure to low concentrations of formaldehyde vapour. *Toxicology*, **51**:87–99.

Woutersen RA, van Garderen-Hoetmer A, Bruijntjes JP, Zwart A, Feron VJ (1989) Nasal tumours in rats after severe injury to the nasal mucosa and prolonged exposure to 10 ppm formaldehyde. *Journal of Applied Toxicology*, **9**:39–46.

Ying C-J, Yan W-S, Zhao M-Y, Ye X-L, Xie H, Yin S-Y, Zhu X-S (1997) Micronuclei in nasal mucosa, oral mucosa and lymphocytes in students exposed to formaldehyde vapor in anatomy class. *Biomedical and Environmental Science*, **10**:451–455.

Zeiger E, Gollapudi B, Spencer P (2005) Genetic toxicity and carcinogenicity studies of glutaraldehyde—A review. *Mutation Research*, **589**:136–151.

Zissu D, Gagnaire F, Bonnet P (1994) Nasal and pulmonary toxicity of glutaraldehyde in mice. *Toxicology Letters*, **71**:53–62.

Zissu D, Bonnet P, Binet S (1998) Histopathological study in B6C3F1 mice chronically exposed by inhalation to glutaraldehyde. *Toxicology Letters*, **95**:131–139.

Zwart A, Woutersen RA, Wilmer JWGM, Spit BJ, Feron VJ (1988) Cytotoxic and adaptive effects in rat nasal epithelium after 3-day and 13-week exposure to low concentrations of formaldehyde vapour. *Toxicology*, **51**:87–99.

Appendix: Summary of studies on micronuclei and chromosomal aberrations in humans exposed to formaldehyde (IARC, 2005).

Reference	Target tissue	End-point	Response (control vs exposed)	Comments and exposures
Vargová et al. (1992)	PBL	CA	3.6% vs 3.08%	<i>n</i> = 20; high frequency in controls; wood splinter manufacture; formaldehyde 8-h TWA 0.55–10.36 mg/m ³ 5–>16 years
Ballarin et al. (1992)	Nasal mucosa	MN	0.25 ± 0.22% vs 0.90 ± 0.47% (<i>P</i> < 0.01)	Concurrent exposure to wood dust; no dose–response
Burgaz et al. (2001)	Nasal mucosa	MN	0.61 ± 0.27% vs 1.01 ± 0.62% (<i>P</i> < 0.01)	Exposed, <i>n</i> = 23; non-exposed, <i>n</i> = 27; no dose–response
Burgaz et al. (2002)	Oral mucosa	MN	0.33 ± 0.30% vs 0.71 ± 0.56% pathology laboratory (<i>P</i> < 0.05)	Exposed, <i>n</i> = 22 variable exposures; <i>n</i> = 28 exposed to formaldehyde; non-exposed, <i>n</i> = 28; correlation with duration of exposure
Titenko-Holland et al. (1996)	Oral mucosa	MN	0.33 ± 0.30% vs 0.62 ± 0.45% shoe factory (<i>P</i> < 0.05)	Exposed, <i>n</i> = 28; pre- versus post-exposure; no details on smoking habits; formaldehyde concentrations:
	Nasal mucosa	MN	0.6 ± 0.5% vs 2.0 ± 2.0% (<i>P</i> = 0.007)	Oral: 1.2 mg/m ³ -h vs 18 mg/m ³ -h, 90 days
			2.0 ± 1.3% vs 2.5 ± 1.3% (NS)	Nasal: 2.4 mg/m ³ -h vs 20 mg/m ³ -h, 90 days
Ying et al. (1997)	Nasal mucosa	MN	1.20 ± 0.67 vs 3.84 ± 1.48 (<i>P</i> < 0.001)	Exposed, <i>n</i> = 25; pre- versus post-exposure; questions about controlling for age, sex, and smoking habits; formaldehyde concentrations
	Oral mucosa	MN	0.57 ± 0.32 vs 0.86 ± 0.56 (<i>P</i> < 0.001)	0.508 ± 0.299 mg/m ³ vs 0.012 ± 0.0025 mg/m ³
	PBL	MN	0.91 ± 0.39 vs 1.11 ± 0.54 (NS)	
He et al. (1988)	PBL	CA	3.40 ± 1.57% vs 5.96 ± 2.40% (<i>P</i> < 0.01)	Chromosomal aberrations included breaks and gaps, which renders interpretation difficult
		MN	3.15 ± 1.46% vs 6.38 ± 2.50% (<i>P</i> < 0.01)	

CA, chromosomal aberrations; MN, micronuclei; NS, not significant; PBL, peripheral blood lymphocytes; TWA, time-weighted average.

付表:ホルムアルデヒドにばく露されたヒトにおける小核及び染色体異常に関する研究の概要 (IARC, 2005 年)

参考文献	標的組織	エンドポイント	反応 (対照群vsばく露群)	コメント及びばく露
Vargováら (1992)	PBL	MN	3.6% vs 3.08%	<i>n</i> = 20; 対照群では高頻度; 木材の破片製造ホルムアルデヒド 8-h TWA 0.55-10.36 mg/m ³ 5->16年
Ballarinら (1992)	鼻粘膜	MN	0.25 ± 0.22% vs 0.90 ± 0.47% (<i>P</i> < 0.01)	木粉の同時ばく露; 用量反応性なし
Burgazら (2001)	鼻粘膜	MN	0.61 ± 0.27% vs 1.01 ± 0.62% (<i>P</i> < 0.01)	ばく露, <i>n</i> = 23; 非ばく露, <i>n</i> = 27; 用量反応性なし
Burgazら (2002)	口腔粘膜	MN	0.33 ± 0.30% vs 0.71 ± 0.56% pathology laboratory (<i>P</i> < 0.05)	ばく露, <i>n</i> = 22の可変ばく露; ホルムアルデヒドにばく露, <i>n</i> = 28; 非ばく露, <i>n</i> = 28; ばく露期間との相関性あり
			0.33 ± 0.30% vs 0.62 ± 0.45% shoe factory (<i>P</i> < 0.05)	
Titenko-Hollandら (1996)	口腔粘膜	MN	0.6 ± 0.5% vs 2.0 ± 2.0% (<i>P</i> = 0.007)	ばく露, <i>n</i> = 28; ばく露前とばく露後の比較; 喫煙習慣の詳細は不明; ホルムアルデヒド濃度
	鼻粘膜	MN	2.0 ± 1.3% vs 2.5 ± 1.3% (NS)	口腔: 1.2 mg/m ³ -h vs 18 mg/m ³ -h, 90日間 鼻腔: 2.4 mg/m ³ -h vs 20 mg/m ³ -h, 90日間
Yingら (1997)	鼻粘膜	MN	1.20 ± 0.67 vs 3.84 ± 1.48 (<i>P</i> < 0.001)	ばく露, <i>n</i> = 25; ばく露前とばく露後の比較; 年齢、性及び喫煙習慣のコントロールに関する質問;
	口腔粘膜	MN	0.57 ± 0.32 vs 0.86 ± 0.56 (<i>P</i> < 0.001)	ホルムアルデヒド濃度
	PBL	MN	0.91 ± 0.39 vs 1.11 ± 0.54 (NS)	0.508 ± 0.299 mg/m ³ vs. 0.012 ± 0.0025 mg/m ³
Heら (1988)	PBL	CA	3.40 ± 1.57% vs 5.96 ± 2.40% (<i>P</i> < 0.01)	染色体異常には破壊や断片化が含まれており、解釈が難しくなっている
		MN	3.15 ± 1.46% vs 6.38 ± 2.50% (<i>P</i> < 0.01)	

CA、染色体異常; MN、小核; NS、有意差なし; PBL、末梢血リンパ球; TWA、時間加重平均

PART 2

IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A NON-CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS

第2部

非発がん MOA のヒトへの関連性を解析するための IPCS フレームワーク

PREFACE

Following completion of the IPCS Framework for Analysing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans (see [Part 1](#)), an expert meeting was convened in Geneva in 2006 to explore the question as to whether the IPCS framework could be applied in chemical risk assessment generally (i.e. to develop a non-cancer framework). The participants at this expert meeting concluded that the framework should be applicable to all end-points and proceeded to author a draft publication out of session. The draft was sent for peer review by the members of the Harmonization Project Steering Committee and subsequently revised by the authors, taking into account the peer review comments received.

序文

ヒトに対するがん MOA の妥当性を解析するための IPCS フレームワーク（第 1 部参照）の完成後、2006 年にジュネーブで専門家会議が開催され、化学物質リスク評価に IPCS フレームワークを一般的に適用できるか否か（すなわち、がん以外のフレームワークを開発すること）という問題が議論された。この専門家会議の参加者は、フレームワークはすべてのエンドポイントに適用可能であるべきであると結論付け、会期外に出版物の草案を作成した。この草案は、ハーモナイゼーションプロジェクト運営委員会のメンバーによって査読され、その後、受領した査読コメントを考慮して著者によって修正された。

LIST OF CONTRIBUTORS

Alan R. Boobis

Section of Experimental Medicine and Toxicology, Division of Medicine, Imperial College London, Hammersmith Campus, London, United Kingdom

John E. Doe

European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC), Brussels, Belgium

Barbara Heinrich-Hirsch

Safety of Substances and Preparations, Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, Germany

M.E. (Bette) Meek

Existing Substances Division, Safe Environments Programme, Health Canada, Ottawa, Ontario, Canada

Sharon Munn

Toxicology and Chemical Substances, Institute for Health and Consumer Protection, Joint Research Centre, European Chemicals Bureau, Ispra, Italy

Mathuros Ruchirawat

Chulabhorn Research Institute (CRI), Lak Si, Bangkok, Thailand

Josef Schlatter

Nutritional and Toxicological Risks Section, Swiss Federal Office of Public Health, Zurich, Switzerland

Jennifer Seed

Risk Assessment Division, Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA

Carolyn Vickers

International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, Switzerland

貢献者リスト

Alan R. Boobis

インペリアル・カレッジ・ロンドン、ハマースミス・キャンパス、医学部、実験医学・毒物学部門、ロンドン、イギリス

John E. Doe

化学物質の生態毒性学及び毒性学のための欧州センター（ECETOC）、ブリュッセル、ベルギー

Barbara Heinrich-Hirsch

物質と調剤の安全性、連邦リスクアセスメント研究所、ベルリン、ドイツ

M.E. (Bette) Meek

カナダ保健省、安全環境プログラム、既存物質部門、オンタリオ州オタワ市、カナダ

Sharon Munn

欧州化学品局、共同研究センター、健康・消費者保護研究所、毒物学・化学物質、イスブラ、イタリア

Mathuros Ruchirawat

チュラボーン研究所（CRI）、ラックシー、バンコク、タイ

Josef Schlatter

スイス連邦公衆衛生局栄養学的・毒性学的リスクセクション、チューリッヒ、スイス

Jennifer Seed

環境保護庁リスクアセスメント課、ワシントン DC、米国

Carolyn Vickers

化学物質安全国際プログラム、世界保健機関、ジュネーブ、スイス

LIST OF ACRONYMS AND ABBREVIATIONS

ACE	angiotensin-converting enzyme
CSAF	chemical-specific adjustment factor
EMS	eosinophilia-myalgia syndrome
HBOC	haemoglobin-based oxygen carriers
HRF	Human Relevance Framework
ILO	International Labour Organization
ILSI	International Life Sciences Institute
IPCS	International Programme on Chemical Safety
MOA	mode of action
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
RSI	Risk Science Institute (ILSI)
SLE	systemic lupus erythematosus
UNEP	United Nations Environment Programme
WHO	World Health Organization

頭字語と略語のリスト

ACE	アンジオテンシン変換酵素
CSAF	化学物質特異的調整係数
EMS	好酸球増多筋痛症候群
HBOC	ヘモグロビン系酸素運搬体
HRF	ヒト関連性フレームワーク
ILO	国際労働機関
ILSI	国際生命科学研究機構
IPCS	国際化学物質安全性計画
MOA	Mode of Action（作用モード）
MPTP	1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン
RSI	リスクサイエンス研究所（ILSI）
SLE	全身性エリテマトーデス
UNEP	国際連合環境計画
WHO	世界保健機関

IPCS FRAMEWORK FOR ANALYSING THE RELEVANCE OF A NON-CANCER MODE OF ACTION FOR HUMANS¹

Alan R. Boobis, John E. Doe, Barbara Heinrich-Hirsch, M.E. (Bette) Meek, Sharon Munn, Mathuros Ruchirawat, Josef Schlatter, Jennifer Seed, & Carolyn Vickers

Structured frameworks are extremely useful in promoting transparent, harmonized approaches to the risk assessment of chemicals. One area where this has been particularly successful is in the analysis of modes of action (MOAs) for chemical carcinogens in experimental animals and their relevance to humans. The International Programme on Chemical Safety (IPCS) recently published an updated version of its MOA Framework in animals to address human relevance (cancer Human Relevance Framework, or HRF). This work has now been extended to non-cancer effects, with the eventual objective of harmonizing framework approaches to both cancer and non-cancer end-points. As in the cancer HRF, the first step is to determine whether the weight of evidence based on experimental observations is sufficient to establish a hypothesized MOA. This comprises a series of key events causally related to the toxic effect, identified using an approach based on the Bradford Hill criteria. These events are then compared qualitatively and, next, quantitatively between experimental animals and humans. The output of the analysis is a clear statement of conclusions, together with the confidence, analysis, and implications of the findings. This framework provides a means of ensuring a transparent evaluation of the data, identification of key data gaps and of information that would be of value in the further risk assessment of the compound, such as on dose-response relationships, and recognition of potentially susceptible subgroups, for example, based on life stage considerations.

The framework described in this paper, a non-cancer Human Relevance Framework (HRF), was prepared by the International Programme on Chemical Safety (IPCS) (WHO/ILO/UNEP) project on the Harmonization of Approaches to the Assessment of Risk from Exposure to Chemicals. This global “Harmonization Project” aims to harmonize global approaches to chemical risk assessment through both increased consistency of risk assessment methodologies and development of international guidance documents. The project enables the achievement of commitments on harmonization of chemical risk assessment methodologies agreed by the United Nations Conference on Environment and Development (United Nations, 1992), the Intergovernmental Forum on Chemical Safety (1994), the World Summit on Sustainable Development (UNEP, 2002), and the Strategic Approach to International Chemicals Management (WHO, 2006). The project involves experts from the different sectors where chemicals are assessed, and hence the documents produced can be applied in the assessment of industrial chemicals, biocides, pesticides, veterinary chemicals, pharmaceuticals, cosmetics, natural toxicants, food additives, and environmental contaminants in food, water, air, and consumer products.

A main outcome of the Harmonization Project is the IPCS Conceptual Framework for Evaluating a Mode of Action for Chemical Carcinogenesis (Sonich-Mullin et al., 2001) and

¹ This article, to which WHO owns copyright, was published in 2008 in *Critical Reviews in Toxicology*, Volume 38, pages 87–96. It has been edited for this WHO publication.

非発がん MOA のヒトへの関連性を解析するための

IPCS フレームワーク¹

Alan R. Boobis, John E. Doe, Barbara Heinrich-Hirsch, M.E. (Bette) Meek, Sharon Munn, Mathuros Ruchirawat, Josef Schlatter, Jennifer Seed, & Carolyn Vickers

体系化されたフレームワークは、化学物質のリスク評価の透明性と調和のとれたアプローチを促進する上で非常に有用である。これが成功している分野の一つに、発がん化学物質の MOA の実験動物とヒトの間の関連性の解析がある。最近、国際化学物質安全性計画（International Programme on Chemical Safety: IPCS）はヒトとの関連性に対処するために、動物における MOA フレームワークの更新版を発表した（がんヒト関連フレームワーク、または HRF）。この作業は現在、発がん以外の影響にまで拡大されており、最終的には、発がんとは発がんの両方のエンドポイントに対するフレームワークの適用を調和させることを目的としている。発がん HRF と同様に、最初のステップは、実験的観察に基づくエビデンスの重み付けが、仮説 MOA を確立するのに十分であるか否かを判断することである。これは、毒性影響に因果関係のある一連の key events からなり、Bradford Hill 基準に基づくアプローチを用いて同定される。実験動物とヒトの間でこれらの事象を、まずは定性的に、それから定量的に比較する。解析により、結果の信頼性、解析及び帰結とともに、明確な結論が記述される。このフレームワークは、データの透明性のある評価、主要なデータギャップの特定、用量反応関係などの化合物のリスク評価に価値のある情報の特定、ライフステージの考慮などに基づく潜在的に感受性の高いサブグループを認識するための手段を提供している。

本論文に記載されているフレームワークは、非発がんヒト関連性フレームワーク（HRF）であり、国際化学物質安全性計画(IPCS) (WHO/ILO/UNEP) の化学物質へのばく露によるリスク評価のアプローチの調和プロジェクトによって作成されたものである。この世界的な「調和プロジェクト」は、リスク評価手法の一貫性の向上と国際的なガイダンス文書の構築を通じて、化学物質のリスク評価に対する世界的適用を目的としている。このプロジェクトは、環境と開発に関する国際連合会議（1992 年、国際連合）、化学物質の安全性に関する政府間フォーラム（1994 年）、持続可能な開発に関する世界首脳会議（2002 年、UNEP）、国際的化学品管理に関する戦略的アプローチ（2006 年、WHO）などで合意された化学物質のリスク評価手法の調和に関する公約を達成できるようにするものである。このプロジェクトには、化学物質の評価が行われる様々な分野の専門家が参加しているため、作成された文書は、工業用化学物質、殺生物剤、殺虫剤、動物用化学物質、医薬品、化粧品、天然毒物、食品添加物ならびに、食品中、水中、大気中及び消費者製品中の環境汚染物質の評価に適用することができる。

調和プロジェクトの主な成果として、化学発がんに対する MOA 評価のための IPCS フレームワ

¹ 本論文は、WHO が著作権を有するもので、2008 年に *Critical Reviews in Toxicology*, Volume 38, pages 87-96 に掲載された。本論文は WHO の出版物のために編集された。

its subsequent development into an IPCS Framework for Analysing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans (IPCS cancer HRF) (Boobis et al., 2006; see also Part 1 of this document). The mode-of-action (MOA) analysis utilizes a weight-of-evidence approach based on the Bradford Hill criteria for causality (Hill, 1965). It aims to determine whether it is possible to establish an MOA for a carcinogenic response observed in an experimental animal study, through application of a weight-of-evidence approach that requires identification of key events along the causal pathway to cancer. When an MOA has been established in experimental animals, the cancer HRF provides an analytical tool to enable the transparent evaluation of the data in order to consider the human relevance of the MOA.

Following on from this, IPCS decided to consider whether the framework for cancer could be applied, with modifications, if necessary, to other end-points and their associated MOAs. Recognizing the work that the Risk Science Institute (RSI) of the International Life Sciences Institute (ILSI) had conducted in parallel to develop a similar framework and apply it to non-cancer risk assessment, IPCS convened an international meeting in Geneva in March 2006 to review and consider the ILSI publication (Seed et al., 2005), along with the IPCS cancer HRF (Boobis et al., 2006; see also Part 1 of this document), in order to explore the question as to whether the IPCS framework could be applied in chemical risk assessment generally. In summary, this IPCS meeting recognized that the framework should be applicable to all end-points, both cancer and non-cancer, and recommended further work to put this into practice, including documenting the rationale for application of the framework more generally, which appears in the present paper, and steps to facilitate uptake and use of the framework.

The IPCS meeting recognized that the non-cancer HRF would have multiple uses in chemical risk assessment:

- It would provide an internationally harmonized approach to the establishment of an MOA in experimental animals and its relevance to humans.
- It would generate criteria for the MOA against which subsequent cases could be considered—that is, to show whether a compound shares an established MOA.
- It would enable clarification of key information relating to the human relevance of the MOA, and this would inform the assessment of other chemicals that share the MOA.
- In general, application of the framework would enable critical data deficiencies and research needs to be identified and inform qualitative and quantitative assessment.

THE NEED FOR A NON-CANCER HUMAN RELEVANCE FRAMEWORK

The non-cancer HRF is a tool that provides a structured approach to the assessment of human relevance of a postulated MOA in animals in a weight-of-evidence context. Subsequently, it includes explicit consideration of the relevance of the proposed MOA to humans, often based on consideration of more generic information, such as anatomical, physiological, and biochemical variations among species. In this manner, the framework encourages maximum use of both chemical-specific and more generic information in a transparent and analytical fashion.

ーク (Sonich-Mullin ら、2001 年) と、それに続くがん MOA のヒトへの関連性を解析するための IPCS フレームワーク (IPCS cancer HRF) (Boobis ら、2006 年; 本文書の第 1 部も参照) がある。MOA 解析は、因果関係の Bradford Hill 基準 (Hill, 1965 年) に基づくエビデンスの重み付け (weight of evidence) アプローチを利用している。これは、腫瘍の原因に沿った一連の key events の特定を必要とするエビデンスの重み付けアプローチを適用することで、動物実験で観察された発がん作用に対する MOA を確立できるか判断することを目的としている。実験動物で MOA が確立された場合、がん HRF は、MOA のヒトへの関連性を検討するために透明性のあるデータ評価を可能にする解析ツールを提供できる。

これを受けて、IPCS は、必要に応じて修正を加えながら、他のエンドポイントとそれに関連する MOA にもがんのフレームワークを適用できるか否かを検討することにした。国際生命科学研究機構 (ILSI) のリスクサイエンス研究所 (RSI) は、がん以外のリスク評価に適用するために、同様のフレームワークを開発した。また、IPCS は 2006 年 3 月にジュネーブで国際会議を開催した。そこで、ILSI のフレームワークが一般的に化学物質のリスク評価に適用できるかという問題を探るために、ILSI の出版物 (Seed ら、2005 年) と、ILSI のがん HRF (Boobis ら、2006 年; 本文書の第 1 部も参照) を評価、検討した。要約すると、この IPCS 会議では、フレームワークが発がんと非発がんの両方のエンドポイントに適用されるべきであり、これを実践に移すための更なる作業を推奨している。そしてこれには、本稿にも記載しているが、フレームワークのより一般的適用のための根拠の文書化及びフレームワークの利用と利用を促進するための手順が含まれている。

IPCS 会議では、化学物質リスク評価において非発がん HRF は下記のような複数の有用性を持つことが認識された。

- 実験動物における MOA の確立とヒトとの関連性について、国際的に調和のとれたアプローチを提供する。
- MOA の基準が作成され、後続のケースを考慮することができるようになる。すなわち、ある化合物に確立された MOA を適合できるかを示すことができるようになる。
- MOA のヒトとの関連性に関する重要な情報が明らかになり、MOA を共有する他の化学物質の評価に情報を提供できるようになる。
- 一般的に、このフレームワークを適用することで、重要データの不足や必要な研究が明らかになり、定性的・定量的な評価に役立てることができるようになる。

非発がんヒト関連性フレームワークの必要性

非発がん HRF は、動物 MOA のヒトとの関連性を評価するための体系化されたアプローチを提供する手段であり、エビデンスの重み付けの文脈の中で、動物において推定される MOA のヒトへの関連性を評価する。その後、推定される MOA のヒトへの外挿性を明確に検討することが含まれており、多くの場合、種間の解剖学的、生理学的及び生化学的な差異などの一般的情報の検

Pivotal to transparency in determining human relevance using the framework are the delineation and consideration of the nature of evidence in various species of key events—that is, those in a postulated MOA that are measurable and critical to the induction of the toxicological response. Evaluation of the concordance of key events based on explicit consideration of variations between experimental animals and humans constitutes the principal basis of transparency in consideration of weight of evidence for human relevance.

While principally relevant to hazard characterization, the non-cancer HRF additionally contributes more generally to transparency in risk assessment through explicit delineation and consideration of data on appropriate key events that are also relevant to subsequent dose–response analysis for MOAs deemed relevant to humans. If the MOA in experimental animals is judged to be qualitatively relevant to humans, a more quantitative assessment is required that takes into account any kinetic and dynamic information that is available from both the experimental animals and humans in order to determine whether human relevance might be precluded on this basis.

These same data are critical to subsequent dose–response analysis for MOAs considered relevant in considering the adequacy of, for example, available information as a basis for replacement of default uncertainty factors in the development of chemical-specific adjustment factors (CSAFs) (IPCS, 2005). This information could, for example, constitute an adequate basis to consider interspecies variation in rates of formation of reactive metabolites in the target tissue, for replacement of the default subfactor for interspecies differences in toxicokinetics with a CSAF (IPCS, 2005).

Use of this non-cancer HRF also promotes harmonization of approaches to risk assessment for all end-points, bridging previously distinct approaches on, for example, cancer and non-cancer effects. Harmonization in this context refers to a biologically consistent approach to risk assessment for all end-points, for which exploration of biological linkages is critical to ensuring maximal use of relevant information. Often, for example, organ toxicity is a critical key event in postulated MOAs for induction of tumours at the same site. The non-cancer HRF, then, sets the stage for identification of critical precursor non-cancer key events for which subsequent quantification of interspecies differences and interindividual variability in dose–response analysis is relevant. In other cases, a postulated MOA may lead to toxic effects in multiple organs, and these would be considered in the same non-cancer HRF analysis.

In addition, consideration in a transparent framework may identify factors that, while not themselves essential for the toxicological effect (and hence not key events), may modulate key events and, as a result, contribute to differences between species or individuals. Such factors include genetic differences in pathways of metabolism, competing pathways of metabolism, and cell proliferation induced by concurrent pathology.

Such an analysis may also provide an indication of those components of a proposed MOA that may operate only over a certain dose range. If a high experimental dose of a given compound is needed to result in an obligatory step in an MOA, then the relevance to human

討に基づいている。このようにして、フレームワークは、透明性のある解析方法で、化学物質に特異的な情報と一般的な情報の両方を最大限に利用することを奨励している。

フレームワークを用いてヒトへの関連性を決定する際の透明性を確保するために極めて重要なのは、key events の様々な種におけるエビデンスの性質を明確にし、検討することである。すなわち、推定される MOA における、測定可能で毒性学的反応の誘発に重要であると想定される key events に関するエビデンスの性質を明らかにし、考慮することである。実験動物とヒトの差異を明確に考慮した上での key events の一貫性の評価は、ヒトとの関連性に関するエビデンスの重み付けを考慮する上での透明性を保つための基礎となる。

主にハザード評価において、非発がん HRF は、その後のヒトに関連すると考えられる MOA の用量反応解析に関わる適切な key events の明確な定義とデータの検討を通じて、リスク評価の透明性を高めることにも貢献している。実験動物における MOA がヒトと定性的に関連があると判断された場合には、ヒトとの関連性が否定されるか否かを判断するために、実験動物とヒトの双方からの動態学的及び薬力学的情報を考慮に入れた、より定量的な評価が必要である。

これらのデータは、その後の関連があると考えられる MOA の用量反応解析に極めて重要である (IPCS, 2005 年)。例えば、化学物質特異的調整係数 (CSAFs) の定義づけにおいて、デフォルトの不確実係数を置き換えるための基礎として、利用可能な情報の妥当性を考慮する場合である。この情報は、標的組織における反応代謝物の形成速度の種差を考慮して、毒物動態の種間差に対するデフォルトのサブファクターを CSAF で置き換えるための適切な根拠となり得る (IPCS, 2005 年)。

また、この非発がん HRF の使用はすべてのエンドポイントのリスク評価適用の調和を促進する。例えば、発がん影響と非発がん影響に関するこれまでの異なるアプローチの架け橋となる。ここでいう調和とは、関連情報を最大限に活用するために生物学的関連性を探ることが重要であり、すべてのエンドポイントのリスク評価における一貫したアプローチを意味する。例えば多くの場合、臓器毒性は同一部位に腫瘍を誘発すると推定される MOA において key events となる。非発がん HRF は、その後の用量反応解析における種間差及び個体間のばらつきを定量化に関連する、重要な前がん病変の key events を特定するための段階を設定する。他にも、推定される MOA が複数の臓器に毒性効果をもたらす可能性があれば同じ非発がん HRF 解析で検討されることになる。

さらに、透明性のあるフレームワークで検討することで、それ自体は毒性学的影響に必須ではない (すなわち key events ではない) が、key events を修飾し、種や個体間の差異に寄与する因子を特定できる可能性がある。そのような要因には、代謝経路の遺伝的差異、競合する代謝経路、及び同時進行する病理学的要因により誘発される細胞増殖が含まれる。

このような解析は、特定の用量範囲でのみ、作動する可能性のある推定される MOA の構成要

risk becomes a matter of exposure. Thus, the exposure assessment step of the risk assessment is critical to a comprehensive evaluation.

Importantly, then, application of the non-cancer HRF contributes to identification of any specific subpopulations (e.g. those with genetic predisposition) who are at increased risk and provides information relevant to consideration of relative risks at various life stages. In many cases, this is based not on chemical-specific information but rather on inference, based on knowledge of the MOA, as to whether specific age groups may be at increased or decreased risk. This requires explicit consideration of comparative developmental and ageing processes and events in humans and animal models. These considerations are critical to determination of focus in the remaining stages of risk assessment, such as dose–response analysis.

The transparent delineation of the weight of evidence for postulated MOAs and their relevance to humans (requiring explicit consideration of the strengths and weaknesses of the available database, as well as highlighting qualitative and quantitative similarities and differences among species and related uncertainties) also identifies any inconsistencies in the available data and defines critical data gaps and research needs. This derives from the requirement in each step to explicitly assess confidence in the quality and quantity of data underlying the analysis, consistency of the analysis within the framework, consistency of the database—that is, that studies are not contradictory of each other—and the nature and extent of the concordance analysis.

Iterative application of the non-cancer HRF, even before all of the data are available, to the analysis of a postulated MOA and its relevance to humans are beneficial as a basis for developing and refining research strategies as additional information becomes available. In this context, the framework should prove helpful in facilitating discussion between risk assessors and research scientists in jointly understanding the nature of data that would support human relevance analysis of a postulated MOA in animals and defining next steps in data acquisition. Iterative consideration of MOA in designing research strategies is also expected to increase efficiency by focusing resources in critical areas in more tiered and targeted approaches.

As knowledge advances, MOAs will become less chemical specific and based even more on the key biological processes involved, allowing greater generalization of human relevance from one compound to another. The need for chemical-specific data for established MOAs will be less, although it will always be necessary to establish rigorously that the key events comprising the MOA occur.

The transparency in the human relevance of a postulated MOA that results from application of the non-cancer HRF should promote confidence in the conclusions reached, through the use of a defined procedure that encourages clear and consistent documentation supporting the analysis and reasoning, highlights inconsistencies and uncertainties in the available data, and identifies critically important data gaps that, when filled, would increase confidence in outcome. This transparency not only is anticipated to facilitate discussion between the risk assessment and research communities, but may also contribute to greater convergence among different regulatory agencies.

素に関する指標も提供するかもしれない。MOA に必須な事象を引き起こすのに、対象の化合物の高用量ばく露が必要とされる場合、ヒトのリスクとの関連性はばく露量に依存する問題となる。このように、リスク評価におけるばく露評価は、包括的な評価を行う上で非常に重要である。

重要なことは、非発がん HRF を適用することで、リスクが高い集団（例えば遺伝的素因を持つ人）を特定し、様々なライフステージにおける相対リスクに関連する情報を提供できるようになるということである。これは多くの場合、化学物質固有の情報に基づくのではなく、MOA の知識に基づき特定の年齢層でのリスクが増加しているか減少しているかを推論することに基づいている。このためには、ヒト及び動物モデルにおける発達及び老化過程を比較し、事象を明確に検討する必要がある。これらの検討事項は、後続のリスク評価過程において用量反応解析など、どこに重点を置くべきか決定する上で重要となる。

推定される MOAs のエビデンスの重み付けと透明性のあるヒトとの関連性を示すこと（利用可能なデータベースの長所と短所を明確に検討し、種間の質的・量的な類似性と相違点及び関連する不確実性を強調することを必要とする）は、利用可能なデータの矛盾を特定し、重要なデータギャップと研究の必要性を明らかにすることにもなる。これは、各ステップにおいて、解析の基礎となるデータの質と量、フレームワーク内での解析の一貫性、データベースの一貫性（つまり研究が互いに矛盾していないこと）、そして一致解析の質的・量的な信頼性を明確に評価する必要があることに由来している。

すべてのデータが利用可能になる前であっても、推定される MOA 及びヒトとの関連性の解析に、非発がん HRF を繰り返して適用することは、追加情報の獲得とともに研究戦略を策定・改良するための基礎として有益である。すなわち、フレームワークは動物における推定される MOA のヒトへの関連性解析を支援するデータの性質について、リスク評価者と研究者が共に理解を深めること、データ取得に向け次の一手を決める手助けとなるに違いない。また、研究戦略を立案する際に MOA を繰り返し検討することで、重要な分野に資源を集中させ、より階層的で集中的なアプローチを行うことができ、効率性を高めることが期待される。

知識の進歩に伴い、MOA は化学物質に特化したものから、関連する主要な生物学的プロセスに基づいて、ある化合物から別の化合物へとヒトとの関連性をより一般化させることになるだろう。MOA を構成する **key events** が発生していることを厳密に立証することが常に必要であるものの、MOA を確立する際に化学物質固有のデータを必要とすることは少なくなるだろう。

非発がん HRF を適用した推定 MOA の透明性は、解析と推論を裏付ける明確で一貫性のある文書化を奨励している。そして、それを満たすことで結果の信頼性を高める重要なデータギャップを特定し、データの矛盾や不確実性を明らかにし、到達した結論に対する信頼性を向上させる。このような透明性は、リスク評価者と研究者との議論を促進させるだけでなく、異なる規制機関間の意見合意にも貢献すると期待される。

The non-cancer HRF also provides the basis for improved process and content for scientific peer input and peer review, specifying minimum criteria of clarity and transparency as a basis to acquire input and acceptance of postulated MOAs and their relevance to humans. Adherence to these criteria enables others to determine the basis of the conclusions reached with respect to the key events, the exclusion of other MOAs, and the analysis of human relevance.

WHEN WOULD THE NON-CANCER HRF BE APPLIED?

The non-cancer HRF provides a valuable tool to assess an MOA, but it requires significant amounts of effort and experimental work, so it is not something that would be used during the course of the assessment of every chemical. Its main purpose would be to determine whether to apply the default assumption that all effects seen in animals are relevant to humans. This question increases in importance when the application of the default assumption during the course of a risk assessment indicates that adverse effects are likely to occur—for example, where there is a low margin of exposure between the point of departure for the effect under consideration and the estimated human exposure, especially if the human exposure estimate has already been refined. It then becomes important to know whether risk management measures will be required. This is of most concern when new data emerge, such as those identifying a new effect, additional data on the dose–response relationship of the chemical, or changes in use pattern or exposure estimation, which change the risk assessment of a chemical that is already in use.

Use of the non-cancer HRF may also be of value in the situation where the effects in animals would have potentially serious consequences if they occurred in humans, such as neurotoxicity or teratogenesis. These effects are subject to very rigorous risk assessment procedures, so they comparatively frequently suggest the need for risk management measures.

Another situation in which use of the non-cancer HRF should be considered is where there are interspecies differences in either the type of effect or the dose levels at which an effect occurs. In these cases, it will be important to understand which species is the most appropriate upon which to base extrapolation to humans. This indication would also apply to differences between sexes or strains in the same species.

These situations indicate that further consideration is required, and the non-cancer HRF provides a way of doing this. The framework can be applied at any stage in the process of considering an effect. It should be applied in an iterative way during the course of investigating an effect to help guide the scientist. When an effect has first been observed and gives rise to concern, the framework allows the investigator to structure the work programme by prompting the questions to be addressed. As the investigation develops, it guides the investigator in assessing the data as they are generated and provides pointers in deciding whether and what other data would be required.

In situations where there is a large body of data, the framework allows the evaluator to weight the evidence according to its significance as well as its volume.

また非発がん HRF は、専門家の関与やピアレビューのために改善されたプロセスや内容の基礎を提供し、推定される MOA 及びそのヒトへの関連性についての助言や承認を得るための基礎として、解析の明確性や透明性の最低限の基準を明らかにする。これらの基準に従うことで、他者が key events や他の MOA の除外、対象 MOA のヒトへの関連性の結論の根拠を、明確に認識できるようにになる。

非発がん HRF はどのような場合に適用されるのか

非発がん HRF は MOA を評価するための貴重なツールを提供するが、かなりの労力と実験的作業を必要とするため、すべての化学物質の評価に用いられるものではない。HRF の主な目的は、動物でみられるすべての影響がヒトに関連するというデフォルトの仮定を適用するかどうかを決定することであろう。この疑問は、リスク評価の過程で上記の仮定を適用した場合に評価結果がヒトに有害な影響が発生する可能性が高いことを示す場合に重要性が増す。例えば、検討中の影響が発生する最低用量とヒトの推定ばく露量との差が小さい場合、特にヒトのばく露量の推定値が既に精緻化されている場合である。そしてその場合、リスク管理対策が必要かを知ることが重要になる。このことは、新たな影響を特定したデータ、化学物質の用量反応関係に関する追加データ、または使用パターンの変更やばく露推定値の変更など、既に使用されている化学物質のリスク評価を変更するような新たなデータが出てきた場合に最も懸念されることである。

非発がん HRF の使用は、動物での影響が神経毒性や催奇形性など、ヒトで発生した場合に重大な影響を及ぼす可能性がある場合にも有用である。これらの影響は非常に厳格なリスク評価プロセスの対象となるため、比較的頻繁にリスク管理措置の必要性が示唆される。

がん以外に HRF の使用を検討すべきもう一つの状況は、影響の種類または影響が発生する用量レベルのいずれかに種差がある場合である。このような場合には、どの種がヒトへの外挿において最も適切なものであるかを理解することが重要である。この指針は、同一種の性別又は系統間の違いにも適用される。

これらの状況は、さらなる検討が必要であることを示しており、非発がん HRF はこれを行う方法を提供している。このフレームワークは、影響を検討するプロセスのどの段階でも適用でき、科学者の道しるべとなるよう、影響を調査する過程で反復的に適用されるべきである。最初に影響が観察され、懸念が生じたとき、フレームワークは、調査者が対処すべき問いを示すことによって作業プログラムを構成できるようにする。研究の進展とともに、HRF はデータが作成されたときには、データを評価する研究者を導き、また他のデータが必要かどうか、どのようなデータが必要かを決定する際の指標となる。

大量のデータがある状況では、フレームワークにより、評価者はその重要性と量に応じてエビデンスの重み付けが可能となる。

The non-cancer HRF can also be useful when a chemical is observed to cause an effect suspected of being caused by an MOA that has already been established using the framework or shares structural similarity to a chemical or class of chemicals with an established MOA. The earlier use of the non-cancer HRF to establish this MOA will have identified the key steps that need to be investigated in order to ascribe the MOA to the new chemical. This will prove valuable both in a prospective way in designing new research or testing programmes and retrospectively in evaluating a data set.

CONSIDERATION OF THE NON-CANCER HRF

The non-cancer HRF is an analytical tool that enables a structured approach to the assessment of the overall weight of the evidence for the postulated MOA and its relevance to humans. The framework is not designed to provide an absolute answer on sufficiency of the information, as this will vary, depending on the circumstance. It must be emphasized that it is not a checklist of criteria but an approach to data evaluation and presentation. The output from the application of the framework serves as the basis for the continuation of the risk assessment of the compound.

It is envisaged that the non-cancer HRF will be applicable to a wide range of toxicological end-points, encompassing changes in structure and function of organs, tissues, and cells, including physiological and neurobehavioural effects. The types of toxicity that could be addressed using the framework include, but are not limited to:

- *Organ toxicity*: Examples include benzene-induced haematotoxicity (aplastic anaemia), paraquat-induced lung toxicity, chloroquine-induced ocular toxicity.
- *Reproductive toxicity*: Examples include phthalate-induced male infertility, dioxin-induced dysregulation of female fertility.
- *Developmental toxicity*: Examples include methylmercury-induced developmental neurotoxicity, retinoid-induced teratogenesis.
- *Neurotoxicity*: Examples include lead-induced peripheral neuropathy, acrylamide-induced axonopathy, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced Parkinson disease.
- *Immunotoxicity*: Examples include organotin-induced immunosuppression, isoniazid-induced systemic lupus erythematosus (SLE)-like syndrome, contaminated L-tryptophan-induced eosinophilia-myalgia syndrome (EMS).

Introduction to MOA

Prior to embarking on a non-cancer HRF analysis, there needs to be careful evaluation of the weight of evidence for a toxicological response on exposure to a chemical in experimental animals. The nature of the non-cancer HRF is such that only one MOA is analysed at a time; hence, for example, different toxicological effects associated with chemical administration, even if observed in the same animals, will require separate framework analyses to discern the MOA for each effect. Consistent with species- and tissue-specific variation in metabolic activation and detoxication, there may be poor site concordance for some toxicants. This will need to be kept in mind when comparing animal and human data.

非発がん HRF は、既にフレームワークを用いて確立されている MOA によって、化学物質が影響を起すことが観察された場合や、化学物質が既に確立された MOA を持つ化学物質と構造的類似がある場合にも有用である。MOA を確立するために非発がん HRF を早期に使用することで、MOA を新しい化学物質に適用させるために調査する必要がある重要なステップを特定することができる。これは、新しい研究や試験を設計する際の前向きな方法としても、データを適応的に評価する方法でも、価値あるものになるだろう。

非発がん HRF の検討

非発がん HRF は、推定される MOA とヒトとの関連性を評価するための全体的なエビデンスの重み付けのための手段を体系化する解析ツールである。このフレームワークは、状況に応じて異なるため、情報が十分であるか否かに対する絶対的な答えを提供するようには設計されていない。これは基準のチェックリストではなく、あくまでもデータの評価と提示の手段である。フレームワーク適用による成果は、化合物のリスク評価を継続するための基礎となる。

非発がん HRF は、臓器、組織、細胞の構造と機能の変化（生理学的影響や神経行動学的影響を含む）を含む幅広い毒性学的エンドポイントに適用されることが想定されている。このフレームワークを用いて対処できる毒性の種類には、以下のものが含まれるが、これらに限定されるものではない。

- 臓器毒性：例）ベンゼンによる血液毒性（再生不良性貧血）、パラコートによる肺毒性、クロロキンによる眼毒性など
- 生殖毒性：例）フタル酸による男性不妊、ダイオキシンによる女性の受胎能力障害など
- 発達毒性：例）メチル水銀による発達神経毒性、レチノイドによる催奇形性など
- 神経毒性：例）鉛による末梢神経障害、アクリルアミドによる軸索障害、1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン（MPTP）によるパーキンソン病など
- 免疫毒性：例）オルガノチンによる免疫抑制、イソニアジドによる全身性エリテマトーデス（SLE）様症候群、汚染された L-トリプトファンによる好酸球増多症候群（EMS）など

MOA の紹介

非発がん HRF 解析に着手する前に、実験動物における化学物質へのばく露による毒性学的反応のエビデンスの重みを慎重に評価する必要がある。非発がん HRF の特徴は一度に 1 つの MOA のみを解析する点である。したがって、例えば、化学物質の投与に関連した異なる毒性学的影響は、たとえ同じ動物で観察されたとしても、各影響の MOA を識別するために別のフレームワーク解析を必要とする。代謝的活性化と解毒における種や組織の違いと同様に、一部の毒性物質では毒性発現部位の一致性が低い場合がある。動物とヒトのデータを比較する際には、この点に留意する必要がある。

推定される MOA（事例における仮説）

ここで、被験物質の毒性学的影響の原因となると推定される MOA における一連の事象

Postulated mode of action (theory of the case)

This comprises a brief outline of the sequence of events in the MOA postulated to be responsible for the toxicological effect of the test substance. This description leads into the next section, which identifies the events considered “key” (i.e. necessary and measurable) in the MOA.

Key events

The “key events” in the MOA are briefly identified and described. Key events are those events that are critical to the induction of the toxicological response as hypothesized in the postulated MOA and are also measurable. To support an event as key, there needs to be a body of experimental data in which the event is characterized and consistently measured. The types of information that might be relevant include, for example, toxicological response and relevant key events in the same cell type, sites of action logically related to the event(s), specific biochemical events, changes in the expression or activity of enzymes, receptor–ligand interactions, effects on cofactor levels, specific changes in histology, changes in cell proliferation (increased or decreased), perturbations in hormone homeostasis or other signalling pathways (either intracellular or extracellular), second messengers, or ion fluxes, increased degradation of macromolecules, and changes in membrane permeability or integrity.

Concordance of dose–response relationships

The dose–response relationships for each of the key events and for the toxicological response should be characterized and their interrelationships discussed with respect to the Bradford Hill criteria (Hill, 1965). Ideally, it should be possible to correlate the dose dependency of the increases in the magnitude (or frequency) of a key event with increases in the severity (e.g. lesion progression) of other key events occurring later in the process and with the ultimate toxicological response. Comparative tabular presentation of the magnitude of changes in key events and toxicological response is often helpful in examining dose–response concordance.

It is important to consider whether there are fundamental differences in the biological response (i.e. dose transitions) at different parts of the dose–response curve (Slikker et al., 2004). If so, key events relevant to the different parts of the dose–response curve will need to be defined and used in the framework analysis.

Temporal association

The temporal relationships for each of the key events and for the toxicological response should be characterized. Key events should be observable before toxicity is apparent and should be consistent temporally with each other; this is an essential step in deciding whether the data support the postulated MOA. Observations of key events at the same time as the toxicological response (e.g. at the end of a study) do not permit conclusions as to temporal association, but can contribute to the analysis described in the next section.

Strength, consistency, and specificity of association of toxicological response with key events

The weight of evidence linking the key events, any precursor lesions, and the toxicological response should be addressed (see Weed [2005] for a discussion of what is meant by weight of evidence). Stop/recovery studies showing absence or reduction of toxicity when a key

の概要を簡単に説明している。この記述は次のセクションにつながり、MOA の中で「重要」と考えられる事象（すなわち、必要かつ測定可能な事象）を特定するものである。

Key events

MOA における「key events」を簡潔に説明する。key events とは、推定される MOA で仮定された毒性学的反応の誘発に重要な事象であり、測定可能な事象である。ある事象を key events として支持するためには、その事象を特徴づける、一貫した測定実験データが必要である。関連する可能性のある情報の種類には、例えば、類似の細胞における毒性学的反応と関連する key events、理論上関連する作用部位、特定の生化学的事象、酵素の発現または活性の変化、受容体とリガンドの相互作用、補因子レベルへの影響、組織学における特異的变化、細胞増殖の変化（増加または減少）、ホルモンのホメオスタシスまたは他のシグナル伝達経路（細胞内または細胞外）、セカンドメッセンジャー、またはイオン流束、高分子の分解性の増加、さらには膜透過性または膜統合性の変化などがある。

用量反応関係の一致

それぞれの key events と毒性学的反応の量的反応関係の特徴づけ、Bradford Hill 基準 (Hill, 1965 年) を参考にして相互関係を検討すべきである。理想としては、key events の大きさ（または頻度）の増加の用量依存性と、その後に発生する他の key events の重症度（例えば、病変の進行）の増加、最終的な毒性学的反応に関連づけられるべきである。key events と毒性学的反応の変化の大きさを比較することは、用量反応の一致を検討するのに役立つことが多い。

用量反応曲線の異なる部分において生物学的反応に根本的な違いがあるか否かを考慮することが重要である (Slikker ら, 2004 年)。もしあれば、用量反応曲線の異なる部分に関連する key events を定義し、フレームワーク解析に用いる必要がある。

時間的関連性

各 key events と毒性反応の時間的関係の特徴付ける必要がある。key events は毒性が明らかになる前に観察可能であり、時間的に互いに一貫している必要がある。これは、データが推定される MOA を支持しているか否かを判断する上で不可欠なステップである。毒性反応と同時に（試験終了時など）key events を観察しても、時間的関連性についての結論は出ないが、次のセクションで説明する解析に貢献することができる。

key events と毒性学的反応との関連の強さ、一貫性及び特異性

key events、前駆病変及び毒性学的反応を結びつけるエビデンスの重みに注目すべきである（エビデンスの重みの意味についての考察は Weed [2005 年] を参照）。key events を遮断または減少させた場合に毒性が発現しない、または減少したことを示す中止/回復試験は関連性の試験として特に有用である。

様々な実験計画は未知のバイアスや交絡を減らすことができるため、実際デザインの異なる多

event is blocked or reduced are particularly useful tests of the association. Consistent observations in a number of studies, with different experimental designs, increase support for the MOA, since different designs can reduce any unknown bias or confounding. Consistency, which is the repeatability of the key events in the postulated MOA in different studies, is distinct from coherence, however, which addresses the relationship of the postulated MOA with observations more broadly (see next point). Observations that may be of value here include toxicological response and relevant key events in the same cell type, sites of action logically related to event(s), and results from stop/recovery studies.

Biological plausibility and coherence

One should consider whether the MOA is consistent with what is known about the biology of the target process/site in general (biological plausibility) and also in relation to what is known specifically about the overall biological effects of the substance (coherence). For the postulated MOA and its associated key events to be biologically plausible, they need to be consistent with current understanding of biology. However, when using biological plausibility as a criterion against which weight of evidence is assessed, it is important to consider the potential for gaps in our knowledge. Coherence, which addresses the relationship of the postulated MOA with chemical-specific observations more broadly—for example, association of the MOA for the toxicological response with that for other end-points—needs to be distinguished from consistency (addressed in the preceding point). In assessing coherence, information on structural analogues may be of value (i.e. structure–activity analysis). Information from other compounds that share the postulated MOA may also be helpful, such as sex, species, and strain differences in sensitivity and their relationship to key events. Additionally, this section should consider whether the database on the agent is internally consistent in supporting the proposed MOA.

Other modes of action

Alternative MOAs that logically present themselves should be considered. If alternative MOAs are supported, they will need a separate non-cancer HRF analysis. These should be distinguished from additional components of a single MOA, since these would be addressed as part of the MOA under consideration.

Uncertainties, inconsistencies, and data gaps

Uncertainties should be stated fully and explicitly. They should include those related to the biology of the toxicological response and those for the database on the compound being evaluated. Any inconsistencies should be noted and data gaps identified. It should be clearly stated whether the identified data gaps are critical in supporting the postulated MOA.

Assessment of postulated mode of action

There should be a clear statement of the outcome of the analysis, indicating the level of confidence in the postulated MOA—for example, high, moderate, or low. If a novel MOA is being proposed, this should be clearly indicated. However, if the MOA is the same as one previously described, the extent to which the key events fit this MOA needs to be stated explicitly. Any major differences should be noted and their implications for acceptance of the MOA discussed.

くの研究で一貫した結果が得られることは、MOA の支持を高める。一貫性 (Consistency) は、異なる研究において仮定された MOA の key events の再現性であるが、整合性 (coherence) とは異なるものであり、仮定された MOA と観察との関係をより広く扱うものである (次のポイントを参照)。ここで価値があると思われる観察には、類似の細胞における毒性学的反応や関連する key events、論理的に関連する作用部位、中止/回復試験の結果などが含まれる。

生物学的妥当性及び整合性

MOA が、ターゲットとなる順序/場所の生物学一般についての知見と一致しているかどうか (生物学的妥当性)、また物質の全体的な生物学的影響について具体的に知られていることとの関連性 (整合性) を考慮すべきである。推定される MOA とそれに関連する key events が生物学的に妥当であるためには、現在の生物学的知見と一致している必要がある。しかし、生物学的妥当性をエビデンスの重みを評価する基準として用いる場合には、我々の知識との間にギャップが生じる可能性を考慮することが重要である。推定される MOA と化学物質固有の観察結果との関係をより広く、例えば、毒性学的反応の MOA と他のエンドポイントの MOA との関連性などは、整合性 (前項で述べた) とは区別する必要がある。一貫性を評価する際には、構造類似体に関する情報に価値があるかもしれない (すなわち、構造活性解析)。また、推定される MOA を共有する他の化合物から得た性差、種差、系統の違いや key events との関係などに関する情報も有用であろう。さらに、このセクションでは、推定される MOA を支持するために、その物質に関するデータベースが内部的に一貫しているかどうかを検討すべきである。

その他の MOA

論理的に存在する代替 MOA を検討すべきである。代替 MOA が支持される場合、それらは別の非発がん HRF 解析を必要とする。これらは、検討中の MOA の一部として扱われるため、単一の MOA の追加的な構成要素とは区別されるべきである。

不確実性、矛盾及びデータギャップ

不確実性は完全かつ明示的に記載すべきである。不確実性には、毒性反応の生物学的性質に関連するものと、評価対象の化合物のデータベースに関するものが含まれるべきである。矛盾するものはすべて記載し、データギャップを特定すべきである。また特定されたデータギャップが、推定される MOA を支持する上で重要であるか否かも明記すべきである。

推定される MOA の評価

推定される MOA に対する高、中、低など信頼度を示す解析結果の明確な記述があるべきである。新規 MOA が推定されている場合は、これを明確に示すべきである。しかし、MOA が以前に説明されたものと同じである場合は、key events がこの MOA に適合する程度を明示的に記載する必要がある。主要な相違点はすべて記載し、MOA の適用が与える影響を議論すべきである。

Life stage considerations

Since the response of an organism to a chemical exposure may vary through its lifespan, consideration of life stage is important for the MOA analysis of all toxic end-points. This is particularly true for effects that result from developmental exposures, since organ susceptibility may be restricted to critical periods of development, may depend on the ontogeny of key metabolic enzymes, or may depend on the interaction of the developing organism with its mother (see [Zoetis & Walls, 2003](#)). In addition, disruption of developmental processes may have downstream consequences.

Consideration of the ageing process is also important, for several reasons. First, developmental exposures can result in toxicities that are not detected until much later in life. In addition, there can be species-specific patterns of ageing for different organ systems. For example, reproductive senescence has a different etiology in rodents and humans and can even differ among different strains of rodents.

Human relevance

If it is possible to establish an MOA in animals for a toxicological effect, the next stage is to evaluate its relevance to humans. The IPCS non-cancer HRF is presented as an approach to answering a series of three (or four) questions, leading to a documented, logical conclusion regarding the human relevance of the MOA underlying the toxicological effect. The application of the guidance results in a narrative with four (or five) sections, which may be incorporated into the hazard characterization of a risk assessment.

1. Is the weight of evidence sufficient to establish a mode of action (MOA) in animals? This question is addressed by performing an MOA analysis as described above, the steps of which are based on the Bradford Hill criteria for causality (Hill, 1965). The weight of evidence for possible alternative MOAs needs to be considered and a conclusion reached on the overall strength of evidence supporting the MOA under consideration. The approach also identifies any critically important data gaps that, when filled, would increase confidence in the proposed MOA. If the postulated MOA has already been described for other chemicals, its human relevance will already have been evaluated. If the proposed MOA is novel, human relevance will need to be assessed de novo.

2. Can human relevance of the MOA be reasonably excluded on the basis of fundamental, qualitative differences in key events between experimental animals and humans? This step involves a qualitative assessment of the relevance of the MOA to humans. Listing the critical key events that occur in the animal MOA and directly evaluating whether or not each of the key events might occur in humans facilitate the evaluation and increase the transparency of the process. Presentation in tabular form, referred to as a concordance table, can be particularly useful. The information in such tables should be relatively brief, as a narrative explanation should always accompany the table. In one column, the effect on humans for each of the key events is evaluated. Another column for the results in a different strain, species, or sex or for a different route of administration that does not result in toxicity can be useful for comparative purposes. Factors may be identified that, while not key themselves, can modulate key events and so contribute to differences between species or individuals. Examples include genetic differences in pathways of metabolism, competing pathways of

ライフステージの考察

化学物質ばく露に対する生物の反応は、その一生を通じて変化する可能性があるため、すべての毒性エンドポイントの MOA 解析において、ライフステージを考慮することが重要である。器官の感受性は臨界期、主要な代謝酵素の発生時期、あるいは母体と胎児の相互作用に依存するかもしれないため、特に発生期のばく露で生じる影響において重要である (Zoetis & Walls, 2003 年を参照)。さらに、発生過程の障害はその下流に影響をもたらす可能性がある。

老化を考慮することも、いくつかの理由から重要である。第一に、発育期のばく露では、かなり後にならないと毒性が検出されないことがある。さらに、器官系ごとに種特異的な老化パターンが存在する可能性がある。例えば、生殖器はげっ歯類とヒトでは病因が異なり、げっ歯類の系統によっても異なることがある。

ヒトとの関連性

動物において毒性学的影響の MOA を確立することができれば、次の段階でヒトへの関連性を評価する必要がある。IPCS の非発がん HRF は、一連の 3 つの (または 4 つの) 問いに答えるアプローチとして提示されており、毒性学的影響の根底にある MOA のヒトへの外挿性に関する文書化された論理的な結論を導き出すことができる。このガイダンスを適用すると、4 つ (または 5 つ) のセクションで構成された説明文が作成され、リスクアセスメントのハザード評価に組み込むことができる。

1. 動物における MOA を確立するのにエビデンスの重み付けは十分か。この問いは、因果関係の Bradford Hill 基準 (Hill, 1965 年) に基づいた、上記のような MOA 解析を行うことで解決される。可能性のある代替 MOA におけるエビデンスの重みを考慮し、検討中の MOA を支持するエビデンス全体の強さに基づいて結論を出す必要がある。このようなアプローチは、重要なデータギャップを特定する。このデータギャップが埋められることにより、提示された MOA はより信頼性を高めるであろう。推定される MOA が他の化学物質について既に記述されている場合、そのヒトへの外挿性は評価されているだろう。推定される MOA が新規である場合、ヒトへの外挿性は新たに評価する必要がある。

2. 実験動物とヒトとの間の key events の根本的、質的な違いに基づいて、MOA のヒトとの関連性を合理的に排除することができるか。この問いでは、ヒトに対する MOA の関連性の質的評価を行う。動物の MOA で発生する重要な key events をリストアップし、各 key events がヒトで発生する可能性があるかどうかを直接評価することで、評価が容易になり、プロセスの透明性が高まる。一致表と呼ばれる表形式での提示は特に有用である。この表に従って証明するため、表の情報は比較的簡潔でなければならない。1 つの列には、key events のそれぞれについてのヒトへの影響が評価されている。毒性をもたらさない異なる系統、種、性、または異なる投与経路の結果に関する列は、比較するのに有用である。それ自体は重要ではないが、key events を修飾し、種差または個体差に寄与する因子が同定される場合がある。例としては、代謝経路における遺伝的差異、

metabolism, and effects induced by concurrent pathology. Any such factors identified should be noted in a footnote to the concordance table.

The evaluation of the concordance of the key events for the MOA for a given chemical in humans is an evaluation of the MOA in humans, rather than an evaluation of the specific chemical. In general, details of the initial key events are likely to be more chemical specific. Later events will be more generic to the MOA. While information for evaluating the key events in humans can come from in vitro and in vivo studies on the substance itself, basic information on anatomy, physiology, endocrinology, genetic disorders, epidemiology, and any other information that is known regarding the key events in humans can be of value.

In answering this question, a narrative describing the weight of evidence and an evaluation of the level of confidence for the human information should be prepared. Examples of specific types of information that can be useful include:

- where appropriate, background incidences of the effect at the anatomical site and cell type of interest, including age, sex, ethnic differences, and risk factors, including chemicals and other environmental agents;
- knowledge of the nature and function of the target site, including development, structure (gross and microscopic), and control mechanisms at the physiological, cellular, and biochemical levels;
- human and animal disease states that provide insight concerning target organ regulation and responsiveness;
- human and animal responses to the chemical under review or structural analogues following short-, intermediate-, or long-term exposure, including target organs and effects.

Obviously, a substantial amount of information is required to conclude that a given MOA is not relevant to humans. If such a conclusion is strongly supported by the data, exposure to chemicals producing toxicity only by that MOA would not pose a risk to humans, and no additional risk characterization for this end-point is required.

The question of relevance considers all groups and life stages. It is possible that the conditions under which an MOA operates occur primarily in a susceptible subpopulation or life stage—for example, in those with a pre-existing viral infection, hormonal imbalance, or disease state. Any information suggesting qualitative or quantitative differences in susceptibility is highlighted for use in risk characterization.

There are several aspects relating to life stage that should be considered in the non-cancer HRF analysis. First, the analysis should consider the comparative developmental processes and events that occur in humans and the animal model(s) (see Zoetis & Walls, 2003). This comparison will demonstrate the extent to which developmental processes are similar in humans and the animal model(s). In general, development is highly conserved; where this is the case, it would lead to a conclusion that the MOA in animals is also plausible in humans. However, there are some developmental processes that are unique to some species, which may therefore lead to a species-specific MOA that will not be plausible in humans.

競合する代謝経路及び同時並行的な病態によって誘発される影響などが挙げられる。特定されたそのような要因はすべて、一致表の脚注に記載する必要がある。

代謝経路における遺伝的差異、競合する代謝経路及び同時並行的な病態によって誘発される影響などが挙げられる。特定されたそのような要因はすべて、一致表の脚注に記載する必要がある。ある化学物質のヒトにおける MOA の key events の一致性の評価は、特定の化学物質の評価というよりは、ヒトにおける MOA の評価である。一般的に、初期の key events の詳細は、より化学物質に特化したものになる可能性が高い。その後の事象は、MOA により一般的に当てはまる事象となる。ヒトにおける key events を評価するための情報は、物質そのものに関する in vitro 及び in vivo 研究から得られるが、解剖学、生理学、内分泌学、遺伝的疾患、疫学、その他ヒトにおける key events に関して知られているあらゆる基本的な情報が重要となる。

この問いに答える際には、エビデンスの重みとヒトの情報における信頼度の評価を記述した説明文を作成する必要がある。有用な情報の具体例としては、以下のようなものがある。

- 必要に応じて、年齢、性別、人種差、化学物質やその他環境因子などの危険因子を含む、対象となる解剖学的部位や細胞種における発生率の背景値
- 生理的、細胞的、生化学的レベルの制御機構や発生、構造（肉眼、組織）を含む標的部位の性質と機能に関する知識
- 標的器官の制御と応答に関する考察をもたらすヒト及び動物の疾患状態
- 対象となる臓器や影響を含む、短期、中期、または長期ばく露後の、評価対象の化学物質または構造類似体に対するヒト及び動物の反応

MOA がヒトには関連性がないと明確に結論づけるためには、相当量の情報が必要である。そのような結論がデータによって強く支持されている場合、その MOA のみで毒性を生じる化学物質はヒトにリスクをもたらさず、このエンドポイントに関する追加のリスク評価は必要ない。

関連性の問題は、すべての集団とライフステージを考慮している。MOA が作動する条件が、主に感受性の高い集団やライフステージにいる人に発生する可能性がある。例えばすでにウイルスに感染しているか、ホルモンバランスの不均衡を有する人または疾患を持っている人である。感受性の質的または量的差異を示唆する情報は、リスクの特徴付けに使用するため強調される。

非発がん HRF 解析では、ライフステージに関連して考慮すべきいくつかの側面がある。第一に、解析ではヒトと動物モデルで起こる発生過程と事象を比較検討すべきである (Zoetis & Walls, 2003 年参照)。この比較は、ヒトと動物モデルにおいて発生過程がどの程度類似しているかを示すものである。一般的に、発生過程はそんなに変化しておらず、このような場合には、動物 MOA はヒト MOA にも当てはまるという結論が導き出される。しかし、いくつかの種には特有の発生過程があり、その場合種特異的な MOA となり、ヒトにもあてはまるとは限らない。

Second, the analysis should consider the phase specificity or relative timing of the developmental processes or events in humans and the animal model(s). Critical developmental events may occur at different times during ontogeny. Some developmental events may occur early during the prenatal development of the animal and relatively late in human prenatal development. Other developmental events may occur prenatally in humans and postnatally in the animal, or vice versa. Differences in timing of the developmental events can have an impact on the dose metrics if there are substantial differences in placental versus lactational transfer. Similarly, a comparison of the ontogeny of key metabolic enzymes relative to the key developmental process may reveal substantial differences between humans and the animal model. Such considerations may lead to a conclusion that the animal MOA is not plausible in humans.

3. *Can human relevance of the MOA be reasonably excluded on the basis of quantitative differences in either kinetic or dynamic factors between experimental animals and humans?* If the MOA in experimental animals cannot be judged to be qualitatively irrelevant to humans (no to question 2), a more quantitative assessment is undertaken, taking into account any kinetic and dynamic information that is available from experimental animals and humans. Such data will of necessity be both chemical and MOA specific and where possible should include the biologically effective doses required to produce the dynamic effects giving rise to the toxicity. Kinetic considerations include the rate and extent of absorption, tissue distribution, metabolism, and excretion. Differences in ontogeny can result in substantial species differences in placental and lactational transfers, which will affect the dose metrics. This may therefore result in a quantitative difference in the MOA between humans and experimental animals. Similarly, the differential ontogeny of key metabolic enzymes can result in substantial quantitative differences between humans and experimental animals. Dynamic considerations include the consequences of the interaction of the chemical with cells, tissues, and organs. Only infrequently is it likely that it will be possible to dismiss human relevance on the basis of quantitative differences. Since quantitative exposure assessment is part of the subsequent risk characterization rather than the HRF, the difference would have to be of such a magnitude that human exposure could not possibly be envisaged to reach such levels. In most cases, it will not be possible to reach such a conclusion without undertaking formal exposure assessment in the subsequent risk characterization. Hence, the answer to the question will be *no*, but it may still be concluded that the risk is negligible in the subsequent risk characterization. Melamine-induced urinary bladder carcinogenesis provides a useful case-study illustrating this point (Meek et al., 2003). Again, tabular comparison of the data from experimental animals and humans can help in the evaluation. Information from studies of other compounds acting by the same or a similar MOA can be of value. As understanding of the basis for differences in responses between experimental animals and humans improves, differences in key events thought to be qualitative may be shown to be due to specific quantitative differences.

While it may not be possible to conclude that the MOA for toxicity is not relevant to humans on the basis of quantitative differences, during the evaluation it may become apparent that the magnitude of those differences is sufficient to impact markedly on the risk assessment. Hence, it is particularly important that the narrative for the answer to this question be comprehensive and capture as much quantitative information as possible.

第二に、解析では、ヒトと動物モデルにおける発生過程や事象の相対的な時期や段階の特異性を考慮する必要がある。重要な発生過程における事象は、発生の異なる時期に生じる可能性がある。いくつかの発生過程における事象は、動物では出生前の早い時期に発生し、ヒトでは出生前の遅い時期に発生する可能性がある。その他発生過程における事象は、ヒトでは出生前に発生し、動物では出生後に発生することもある、その逆もある。胎盤移行と乳汁移行に大きな差がある場合には、発生時期の違いが線量基準に影響を与える可能性がある。同様に、発生過程に関連する主要な代謝酵素の発生時期を比較すると、ヒトと動物モデルの間にかかなりの差があることが明らかになる可能性がある。このような考察から、ヒトでは動物モデルの MOA は妥当ではないという結論が導き出されるかもしれない。

3. 実験動物とヒトとの間の薬力学的または動態的要因のいずれかの量的差異に基づいて、MOA のヒトへの関連性を合理的に排除することができるか。実験動物における MOA がヒトと定性的に無関係であると判断できない場合（問い2に「No」）、実験動物とヒトから得られるあらゆる動態学的及び薬力学的情報を考慮して、より定量的な評価が行われる。このようなデータは、必然的に化学物質と MOA に固有のものであり、可能であれば、毒性を引き起こす薬力学的影響が発現する用量を含むべきである。動態学的考察には、吸収の速度及び程度、組織分布、代謝及び排泄が含まれる。胎生の違いは、胎盤移行及び乳汁移行において実質的な種差をもたらす可能性があり、これは定量的な影響を及ぼす。したがって、これによりヒトと実験動物との間で MOA の量的差異がもたらされる可能性がある。同様に、主要な代謝酵素の発現時期の違いにより、ヒトと実験動物の間ではかなりの差が生じる可能性がある。薬力学的な考慮事項には、化学物質と細胞、組織及び器官との相互作用が含まれる。量的差異に基づいてヒトへの外挿性を否定することができるのは、ごくまれである。定量的ばく露評価は HRF よりもむしろその後のリスクの判定の一部であるため、その差はヒトへのばく露がそのようなレベルに達するとは考えられないほどの大きさでなければならない。ほとんどの場合、後続のリスクの判定で正式なばく露評価を行わなければ、そのような結論に達することはできない。したがって、問いの答えは「No」であるが、その後のリスク評価では、リスクは無視できる程度であると結論づけられるかもしれない。メラミン誘発性膀胱発がんは、この点を説明する有用な事例研究を提供している（Meek ら、2003 年）ここでも、実験動物とヒトからのデータを表形式で比較することが評価に役立つ。同様または類似の MOA によって作用する他の化合物の研究から得られた情報も価値がある。実験動物とヒトの間の反応の違いの基礎的な理解が深まれば、定性的であると考えられていた key events の違いが、定量的な違いによるものであることが示されるかもしれない。

量的差異に基づいて毒性 MOA がヒトと関連性がないと結論づけることはできないかもしれないが、評価の中で、これらの差異の程度はリスク評価に顕著な影響を与えるのに十分である。したがって、この問いへの回答の説明文は包括的であり、可能な限り定量的な情報を把握しておくことが重要である。

As with question 2, if the response to this question is *yes*, then exposure to chemicals producing toxicity only by this MOA would not pose a risk to humans, and no additional risk characterization is required.

The preceding three questions comprise a decision tree (see Figure 1).

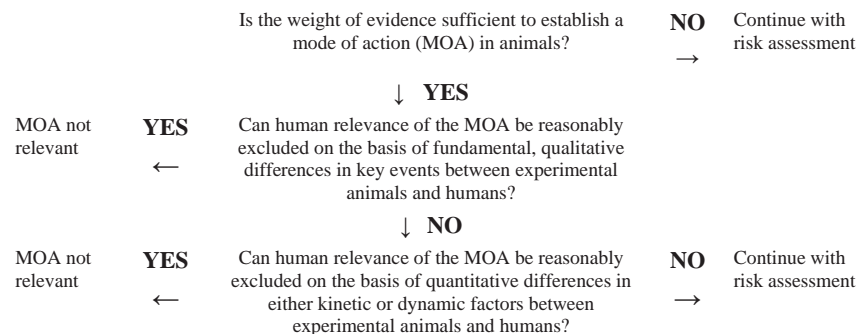


Figure 1. Decision tree for determining human relevance of an MOA for toxicity observed in experimental animals.

Potential implications for dose-response assessment

Should it not be possible to exclude human relevance of the MOA for toxicity prior to proceeding with the risk assessment, a further question should be addressed. This is: *4. Are there any quantitative differences in the key events such that default values for uncertainty factors for species or individual differences could be modified?* Such information, on either kinetics or dynamics, could be used to calculate a CSAF, in which one or more of the default values for species or interindividual differences in kinetics or dynamics are replaced by a value based on chemical-specific information (IPCS, 2005). The other components of the adjustment factor would retain their default values. Such information may lead to either an increase or a decrease in the adjustment factor relative to the normal default.

Published case-studies

In developing a framework for assessing the human relevance of MOAs for non-cancer endpoints, ILSI/RSI also developed a series of illustrative case-studies. These were on molinate-induced inhibition of spermatogenesis (Kavlock & Cummings, 2005a), renal and developmental effects of ethylene glycol (Corley et al., 2005), developmental neurotoxicity of nicotine (Slikker et al., 2005), phthalate ester effects on male reproductive development (Foster, 2005), vinclozolin-induced malformations (Kavlock & Cummings, 2005b), developmental effects of valproic acid (Wiltse, 2005), haemoglobin-based oxygen carriers (HBOC)-related congenital malformations (Holson et al., 2005), developmental effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors (Tabacova, 2005), developmental ototoxicity of polyhalogenated aromatic hydrocarbons (Crofton & Zoeller, 2005), and propylthiouracil-induced effects on neurological development (Zoeller & Crofton, 2005). While these cases

問い 2 と同様に、この質問への回答が「Yes」であれば、この MOA のみで毒性を示す化学物質へのばく露はヒトにリスクをもたらさず、追加のリスク特性評価は必要ない。

前述の 3 つの質問は、決定ツリーを構成している（図 1 参照）。

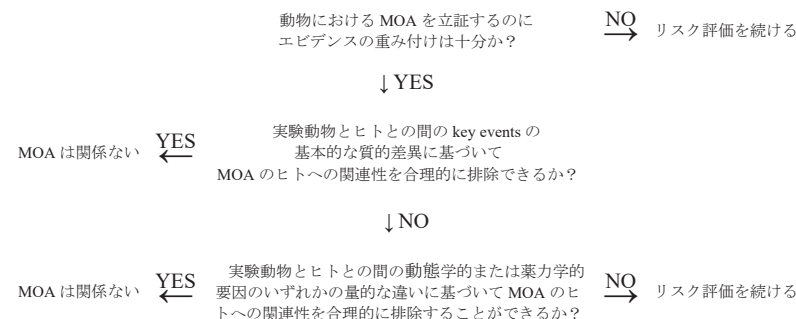


図 1. 実験動物で観察された毒性に対する MOA のヒトへの関連性を判断するための決定ツリー

用量反応評価への影響

リスク評価を進める前に、毒性に対する MOA のヒトへの関連性を除外することはできないが、更なる問いに対処すべきである。それは以下の点である。これは、*4. 種や個体差の不確実性因子のデフォルト値を変更できるような、key events に量的な違いがあるか。*このような情報は、動態学又は薬力学のいずれかに関するものである。これは CSAF を計算するために使用することができ、その場合動態学又は薬力学における種又は個体差のデフォルト値の 1 つ以上が、化学物質固有の情報に基づく値に置き換えられる（IPCS, 2005 年）。調整係数の他の要素は変更しない。このような情報は、通常のデフォルト値と比較して調整係数の増加または減少をもたらす可能性がある。

発表された事例研究

がん以外のエンドポイントに対する MOAs のヒトへの関連性を評価するためのフレームワークを決定するにあたり、ILSI/RSI はまた、一連の例示的な事例研究を実施した。これらの事例研究は以下の通り。

モリネートによる精子形成阻害（Kavlock & Cummings, 2005 年 a）、
エチレングリコールの腎及び発育への影響（Corley ら, 2005 年）、
ニコチンの発達神経毒性（Slikker ら, 2005 年）
フタル酸エステルの男性の生殖発達に対する影響（Foster, 2005 年）、
ピンクロズリン誘発性奇形（Kavlock & Cummings, 2005 年 b）、
バルプロ酸の発育への影響（Wiltse, 2005 年）、

covered a range of end-points, most involved effects during development. Hence, there is a need for additional case-studies on other end-points, such as those indicated above. As experience is obtained in using this framework, some of the published cases could be further refined to provide valuable illustrative examples for training in the application of the framework.

In general, the cases have been very useful in highlighting a number of the key issues on which this non-cancer HRF is based. Examples include the importance of the concordance analysis, the value of quantitative information identified during the application of the framework when it is not possible to exclude human relevance, the need for a transparent and comprehensive narrative when reporting the conclusions of a framework analysis, the importance in identifying key data gaps (e.g. case-study on molinate and HBOC), identification of research needs (e.g. case-study on vinclozolin), the importance of understanding the formation of a specific metabolite, and the importance of establishing a robust MOA through the application of the Bradford Hill criteria (Hill, 1965) to the key events.

Statement of confidence, analysis, and implications

Following application of the non-cancer HRF and answering the three (or four) questions, a statement of confidence should be provided that addresses the quality and quantity of data underlying the analysis, the consistency of the analysis within the framework, the consistency of the database, and the nature and extent of the concordance analysis. Alternative MOAs should have been evaluated, when appropriate, with the same rigor. A critical outcome is the identification of specific data gaps that could be addressed experimentally to increase confidence in the analysis.

The output of the non-cancer HRF provides information that is useful for more than just determining whether or not the MOA for toxicity in experimental animals is relevant to humans. It can also provide much information that is critically important in subsequent steps in the risk characterization for relevant effects. For example, it may be possible to develop CSAFs on the basis of the information provided. Application of the framework can also provide information on relevant modulating factors that are likely to affect risk. In addition, it can identify those elements of a proposed MOA that operate only over a certain dose range. Where an obligatory step in an MOA occurs only following a high experimental dose of a compound, the relevance of the MOA to human risk is determined by the exposure. Thus, effective exposure assessment is particularly important to the evaluation of human risk from such toxicity.

The analysis also contributes to the identification of any specific subpopulations (e.g. those with genetic predisposition) who may be at increased risk and often provides information useful in considering relative risk at various life stages. This may be based not always on chemical-specific information but rather on inference, on the basis of knowledge of the MOA, as to whether the risk in specific age groups might be expected to differ.

The data and their analysis using the non-cancer HRF should be reported in a clear and comprehensive manner, so that others can determine the basis of the conclusions reached.

ヘモグロビン系酸素運搬 (HBOC) 関連先天性奇形 (Holson ら、2005 年)、
アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害剤の発生影響 (Tabacova、2005 年)、
ポリハロゲン化芳香族炭化水素の発達聴器毒性 (Crofton & Zoeller、2005 年)、
プロピルチオウラシルが神経発達に及ぼす影響 (Zoeller & Crofton、2005 年) などがある。

これらの事例は、様々なエンドポイントを対象としているが、そのほとんどは発生段階の影響を対象としている。したがって、上記のような他のエンドポイントに関する追加の事例研究が必要である。このフレームワークの使用経験の積み重ねにより、公開された事例のいくつかは、フレームワーク適用のための例示の事例を提供できるように、さらに洗練されていく可能性がある。

一般的に、これらの事例は、この非発がん HRF の基礎となっているいくつかの重要な問題を強調する上で非常に有用である。例としては、一致解析の重要性、ヒトへの関連性を排除できない場合のフレームワーク適用中に特定された量的情報の価値、フレームワーク解析の結論を報告する際の透明性のある包括的な構成の必要性、重要なデータギャップの特定 (例: モリネートと HBOC の事例研究)、研究ニーズの特定 (例: ビンクロゾリンの事例研究)、特定の代謝物の形成を理解することの重要性、Bradford Hill 基準 (Hill、1965 年) を key events に適用して堅牢な MOA を確立することの重要性などが挙げられる。

信頼性、解析及び帰結の記述

非発がん HRF を適用し、3 つ (または 4 つ) の質問に回答した後、解析の基礎となるデータの質と量、フレームワーク内での解析の一貫性、データベースの一貫性及び一貫性解析の性質と程度に対応した信頼性を示す文書を提供すべきである。必要に応じて代替的な MOAs は、同様に厳密に評価されるべきである。重要な成果は、解析の信頼性を高めるために実験的に対処できるデータギャップを特定することである。

非発がん HRF を行うことにより、実験動物における毒性 MOA がヒトに関連するかどうかを判断するだけでなく、それ以上に有用な情報が得られる。また、関連する影響のリスクの判定の次の段階で重要な情報を得ることができる。例えば、得られた情報に基づいて CSAFs を開発することができるかもしれない。フレームワークを適用することで、リスクに影響を与える可能性のある調節因子の情報も提供できる。さらに、推定される MOA の要素のうち、特定の用量範囲でのみ作用するものを特定することができる。MOA で必須の段階が、ある化合物の高用量投与後にのみ発生する場合、ヒトのリスクに対する MOA の関連性はばく露量によって決定される。したがって、効果的なばく露評価は、このような毒性によるヒトリスクの評価にとって特に重要である。

解析もまた、リスクが増加する可能性のある集団 (例えば、遺伝的素因を持つ人々) の特定に寄与し、多くの場合様々なライフステージにおける相対的なリスクを考慮するのに有用な情報を提供している。これは必ずしも化学物質固有の情報に基づくものではなく、むしろ MOA の知識に基づいて、年齢によってリスクが異なるかどうかについての推論に基づくものである。

Although the specific form of presentation will vary with the type of data available, a structured report, including the key headings from the framework, should be provided where possible. Presentation should include sufficient details on the context and thought processes to ensure transparency of the conclusions reached. The inclusion of concordance tables is strongly encouraged. This increases transparency and facilitates peer engagement.

USE OF THE FRAMEWORK AND ITS OUTPUTS

The IPCS non-cancer HRF, which is based principally on robust concordance analysis of key events in postulated MOAs, is envisaged to be of value to both the risk assessment and research communities as a basis to contribute to harmonization in several areas, including:

- adequacy and nature of weight of evidence for postulated MOAs in animals and their relevance to humans;
- MOA integration across end-points;
- criteria for transparency to ensure sufficiency of peer input and review.

Among the strengths of the non-cancer HRF are its flexibility, transparency, and general applicability across end-points. This includes determination of the nature and shape of the dose–response curve, the identification and location of biological thresholds for individual key events, and their consequences. In addition, consideration of the kinetic and dynamic factors involved in each key event is informative regarding the relevance or not to specific subpopulations—for example, in early life, in those with particular diseases, or in those with specific polymorphisms. Alternatively, application of the framework can provide quantitative information on the differences between such groups. Human relevance analysis may also indicate that a species is inappropriate for evaluating a potentially relevant end-point because of dose limitations.

NEXT STEPS

To ensure effective adoption of the non-cancer HRF, there will be a need to train individuals in its application and in the interpretation of its outputs. Experience is being gained in the use of the cancer HRF, and the expertise gained would be applicable in the training of others in the use of the non-cancer HRF. Training would be facilitated by the availability of a number of suitable case-studies. Those published to date would be a sound basis for further development for this purpose (Seed et al., 2005). In addition, cases on a wider range of end-points need to be developed. It would be helpful if organizations with experience in non-cancer HRF analysis could develop courses and make the materials available to others with suitable expertise to help in training.

A database of generally accepted MOAs should be compiled and maintained, together with informative case-studies. Such a database would be of particular importance as experience continues to evolve in the development of MOAs and in determining whether the MOA for a compound is novel or has been described previously for other compounds.

非発がん HRF を用いたデータとその解析は、他の人が到達した結論の根拠を判別できるように明確かつ包括的な方法で報告されるべきである。

提示の具体的な形式は利用可能なデータの種類によって異なるが、可能であれば、フレームワークの主要な見出しを含む形式的な報告書を提供すべきである。発表は、到達した結論の透明性を確保するために、文脈と思考プロセスの詳細を含めるべきである。一致表を含めることが強く推奨される。これにより、透明性を高め専門家同士の協力が容易になる。

フレームワークとその成果の利用

IPCS の非発がん HRF は、主に推定される MOA の key events の堅牢な一致解析に基づいている。以下のようないくつかの分野で調和に貢献するための基礎として、リスク評価と研究コミュニティの双方に価値があると考えられている。

- 動物における推定 MOA の妥当性とエビデンスの重み付けの性質及びヒトへの関連性
- エンドポイント間の MOA の統合
- 専門家の参加とレビューを十分に確保するための透明性のある基準

非発がん HRF の強みは、その柔軟性、透明性及びエンドポイント間で適用できることである。これには、用量反応曲線の性質と形状の決定、個々の key events に対する生物学的閾値と位置の特定及びそれらの影響が含まれる。さらに、各 key events に関与する動態学的及び薬力学的要因を考慮することは、特定の集団、例えば、若年期、特定の疾患を有する人々、または特定の多型を有する人々への関連性の有無に関して有益である。あるいは、フレームワークを適用することで、そのようなグループ間の差異に関する定量的な情報を提供することもできる。また、ヒトへの関連性の有無についての解析において、ある種の生物が、用量制限のために潜在的に関連するエンドポイントの評価には不適切である場合もある。

次のステップ

非発がん HRF を効果的に適用するためには、その適用及びその利用の解釈において個人を訓練する必要がある。発がん性 HRF の利用においては経験が得られており、その得られた専門知識は、非発がん HRF 使用における訓練にも適用できる。訓練は、適切な事例研究がより多く利用可能となることによって促進されるであろう。これまでに発表された事例は、この目的のための適切な基盤となる (Seed ら、2005 年)。さらに、より広範囲のエンドポイントに関する事例を調査する必要がある。非発がん HRF 解析の経験を持つ組織が指針を作り、訓練を支援するために適切な専門家がその教材を利用できるようにすることは有用であろう。

一般的に受け入れられている MOA のデータベースを、有益な事例研究とともに編集し、持続させるべきである。このようなデータベースは、MOA の開発において事例は更新され続けられ、ある化合物の MOA が新規か、あるいは他の化合物について以前に記載されていたものかを判断

The current non-cancer HRF, which arose out of the IPCS cancer HRF, is focused on non-cancer end-points. However, there are marked similarities in the philosophy and strategy to evaluating cancer and non-cancer effects. It is strongly recommended that one of the next steps in harmonization of risk assessment of chemicals should be the preparation of a unified HRF that is applicable to all toxicological end-points, including cancer. The integration of framework approaches into the risk assessment process should be further elaborated, in which illustrative examples would be of value. Some guidance on problem formulation before embarking on an HRF analysis should be included in such a framework document, as should guidance on the use of the outputs of HRF analysis in risk assessment. For example, during application of the framework, a much deeper understanding of dose–response relationships is often developed, which should be taken forward into hazard characterization. As indicated above, knowledge of any dose transitions is invaluable in interpreting exposure data. Identification of key events in the MOA can provide insight into the sources and magnitude of interspecies and interindividual differences.

REFERENCES

- Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006) IPCS framework for analyzing the relevance of a cancer mode of action for humans. *Critical Reviews in Toxicology*, **36**:781–792.
- Corley RA, Meek ME, Carney EW (2005) Mode of action: Oxalate crystal-induced renal tubule degeneration and glycolic acid-induced dysmorphogenesis—Renal and developmental effects of ethylene glycol. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:691–702.
- Crofton KM, Zoeller RT (2005) Mode of action: Neurotoxicity induced by thyroid hormone disruption during development—Hearing loss resulting from exposure to PHAHs. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:757–769.
- Foster PM (2005) Mode of action: Impaired fetal Leydig cell function—Effects on male reproductive development produced by certain phthalate esters. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:713–719.
- Hill AB (1965) The environment and disease: Association or causation? *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, **58**:295–300.
- Holson JF, Stump DG, Pearce LB, Watson RE, DeSesso JM (2005) Mode of action: Yolk sac poisoning and impeded histiotrophic nutrition—HBOC-related congenital malformations. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:739–745.
- Intergovernmental Forum on Chemical Safety (1994) *The International Conference on Chemical Safety—Final report*. Geneva, World Health Organization (http://www.who.int/ifcs/documents/forums/forum1/en/FI-report_en.pdf).
- IPCS (2005) *Chemical-specific adjustment factors for interspecies differences and human variability: Guidance document for use of data in dose/concentration–response assessment*.

する上でも重要なものとなるだろう。

IPCS の発がん性 HRF から生まれた現在の非発がん HRF は、がん以外のエンドポイントに焦点を当てている。しかし、発がんと非発がんの効果を評価するための哲学や戦略には顕著な類似点がある。化学物質のリスク評価の調和における次のステップの一つとして、がんを含むすべての毒性学的エンドポイントに適用可能な統一的な HRF を作成することが強く推奨される。リスク評価過程へのフレームワーク適用は、さらに精緻化されるべきであり、その際には、例示が価値あるものとなるであろう。このようなフレームワーク文書には、リスク評価における HRF 解析の使用に関するガイダンスと同様に、HRF 解析に着手する前の問題の定式化に関するガイダンスが含まれるべきである。また、フレームワークを適用することで、用量反応関係の理解が深まることが多いが、これはハザード評価に反映されるべきである。上述のように、用量の変化に関する知識は、ばく露データを解釈する上で非常に重要である。MOA における key events を特定することで、種差及び個体差の原因や程度に関する知見を得ることができる。

参考文献

- Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006) IPCS framework for analyzing the relevance of a cancer mode of action for humans. *Critical Reviews in Toxicology*, **36**:781–792.
- Corley RA, Meek ME, Carney EW (2005) Mode of action: Oxalate crystal-induced renal tubule degeneration and glycolic acid-induced dysmorphogenesis—Renal and developmental effects of ethylene glycol. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:691–702.
- Crofton KM, Zoeller RT (2005) Mode of action: Neurotoxicity induced by thyroid hormone disruption during development—Hearing loss resulting from exposure to PHAHs. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:757–769.
- Foster PM (2005) Mode of action: Impaired fetal Leydig cell function—Effects on male reproductive development produced by certain phthalate esters. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:713–719.
- Hill AB (1965) The environment and disease: Association or causation? *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, **58**:295–300.
- Holson JF, Stump DG, Pearce LB, Watson RE, DeSesso JM (2005) Mode of action: Yolk sac poisoning and impeded histiotrophic nutrition—HBOC-related congenital malformations. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:739–745.
- Intergovernmental Forum on Chemical Safety (1994) *The International Conference on Chemical Safety—Final report*. Geneva, World Health Organization (http://www.who.int/ifcs/documents/forums/forum1/en/FI-report_en.pdf).
- IPCS (2005) *Chemical-specific adjustment factors for interspecies differences and human variability*.

Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Harmonization Project Document No. 2; http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241546786_eng.pdf).

Kavlock R, Cummings A (2005a) Mode of action: Reduction of testosterone availability—Molinate-induced inhibition of spermatogenesis. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:685–690.

Kavlock R, Cummings A (2005b) Mode of action: Inhibition of androgen receptor function—Vinclozolin-induced malformations in reproductive development. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:721–726.

Meek ME, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKeeman LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003) A framework for human relevance analysis of information on carcinogenic modes of action. *Critical Reviews in Toxicology*, **33**:591–653.

Seed J, Carney E, Corley R, Crofton K, DeSesso J, Foster P, Kavlock R, Kimmel G, Klaunig J, Meek E, Preston J, Slikker W, Tabacova S, Williams G (2005) Overview: Using mode of action and life stage information to evaluate the human relevance of animal toxicity data. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:663–672.

Slikker W Jr, Andersen ME, Bogdanffy MS, Bus JS, Cohen SD, Conolly RB, David RM, Doerr NG, Dorman DC, Gaylor DW, Hattis D, Rogers JM, Setzer RW, Swenberg JA, Wallace K (2004) Dose-dependent transitions in mechanisms of toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **201**:203–225.

Slikker W Jr, Xu ZA, Levin ED, Slotkin TA (2005) Mode of action: Disruption of brain cell replication, second messenger, and neurotransmitter systems during development leading to cognitive dysfunction—Developmental neurotoxicity of nicotine. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:703–711.

Sonich-Mullin C, Fielder R, Wiltse J, Baetcke K, Dempsey J, Fenner-Crisp P, Grant D, Hartley M, Knaap A, Kroese D, Mangelsdorf I, Meek E, Rice J, Younes M (2001) IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **34**:146–152.

Tabacova S (2005) Mode of action: Angiotensin-converting enzyme inhibition—Developmental effects associated with exposure to ACE inhibitors. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:747–755.

UNEP (2002) *Plan of implementation of the World Summit on Sustainable Development*. New York, NY, United Nations Environment Programme (http://www.un.org/esa/sustdev/documents/WSSD_POI_PD/English/WSSD_PlanImpl.pdf).

Guidance document for use of data in dose/concentration–response assessment.

Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Harmonization Project Document No. 2; http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241546786_eng.pdf).

Kavlock R, Cummings A (2005a) Mode of action: Reduction of testosterone availability—Molinate-induced inhibition of spermatogenesis. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:685–690.

Kavlock R, Cummings A (2005b) Mode of action: Inhibition of androgen receptor function—Vinclozolin-induced malformations in reproductive development. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:721–726.

Meek ME, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKeeman LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003) A framework for human relevance analysis of information on carcinogenic modes of action. *Critical Reviews in Toxicology*, **33**:591–653.

Seed J, Carney E, Corley R, Crofton K, DeSesso J, Foster P, Kavlock R, Kimmel G, Klaunig J, Meek E, Preston J, Slikker W, Tabacova S, Williams G (2005) Overview: Using mode of action and life stage information to evaluate the human relevance of animal toxicity data. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:663–672.

Slikker W Jr, Andersen ME, Bogdanffy MS, Bus JS, Cohen SD, Conolly RB, David RM, Doerr NG, Dorman DC, Gaylor DW, Hattis D, Rogers JM, Setzer RW, Swenberg JA, Wallace K (2004) Dose-dependent transitions in mechanisms of toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **201**:203–225.

Slikker W Jr, Xu ZA, Levin ED, Slotkin TA (2005) Mode of action: Disruption of brain cell replication, second messenger, and neurotransmitter systems during development leading to cognitive dysfunction—Developmental neurotoxicity of nicotine. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:703–711.

Sonich-Mullin C, Fielder R, Wiltse J, Baetcke K, Dempsey J, Fenner-Crisp P, Grant D, Hartley M, Knaap A, Kroese D, Mangelsdorf I, Meek E, Rice J, Younes M (2001) IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **34**:146–152.

Tabacova S (2005) Mode of action: Angiotensin-converting enzyme inhibition—Developmental effects associated with exposure to ACE inhibitors. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:747–755.

UNEP (2002) *Plan of implementation of the World Summit on Sustainable Development*. New York, NY, United Nations Environment Programme (http://www.un.org/esa/sustdev/documents/WSSD_POI_PD/English/WSSD_PlanImpl.pdf).

United Nations (1992) *Agenda 21: United Nations Conference on Environment and Development*. New York, NY, United Nations Division for Sustainable Development (<http://www.un.org/esa/sustdev/documents/agenda21/english/Agenda21.pdf>).

Weed DL (2005) Weight of evidence: A review of concept and methods. *Risk Analysis*, **25**:1545–1557.

WHO (2006) *Strategic Approach to International Chemicals Management (SAICM)*. Geneva, World Health Organization (http://www.who.int/ipcs/features/iccm_crp.pdf).

Wiltse J (2005) Mode of action: Inhibition of histone deacetylase, altering WNT-dependent gene expression, and regulation of beta-catenin—Developmental effects of valproic acid. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:727–738.

Zoeller RT, Crofton KM (2005) Mode of action: Developmental thyroid hormone insufficiency—Neurological abnormalities resulting from exposure to propylthiouracil. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:771–781.

Zoetis T, Walls I, eds (2003) *Principles and practices for direct dosing of preweaning mammals in toxicity testing and research. A report of the ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Direct Dosing of Preweaning Mammals in Toxicity Testing*. Washington, DC, ILSI Press.

United Nations (1992) *Agenda 21: United Nations Conference on Environment and Development*. New York, NY, United Nations Division for Sustainable Development (<http://www.un.org/esa/sustdev/documents/agenda21/english/Agenda21.pdf>).

Weed DL (2005) Weight of evidence: A review of concept and methods. *Risk Analysis*, **25**:1545–1557.

WHO (2006) *Strategic Approach to International Chemicals Management (SAICM)*. Geneva, World Health Organization (http://www.who.int/ipcs/features/iccm_crp.pdf).

Wiltse J (2005) Mode of action: Inhibition of histone deacetylase, altering WNT-dependent gene expression, and regulation of beta-catenin—Developmental effects of valproic acid. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:727–738.

Zoeller RT, Crofton KM (2005) Mode of action: Developmental thyroid hormone insufficiency—Neurological abnormalities resulting from exposure to propylthiouracil. *Critical Reviews in Toxicology*, **35**:771–781.

Zoetis T, Walls I, eds (2003) *Principles and practices for direct dosing of preweaning mammals in toxicity testing and research. A report of the ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Direct Dosing of Preweaning Mammals in Toxicity Testing*. Washington, DC, ILSI Press.

THE HARMONIZATION PROJECT DOCUMENT SERIES

IPCS risk assessment terminology (No. 1, 2004)

Chemical-specific adjustment factors for interspecies differences and human variability:
Guidance document for use of data in dose/concentration–response assessment (No. 2, 2005)

Principles of characterizing and applying human exposure models (No. 3, 2005)

Part 1. IPCS framework for analysing the relevance of a cancer mode of action for humans and case-studies; Part 2. IPCS framework for analysing the relevance of a non-cancer mode of action for humans (No. 4, 2007)

ハーモナイゼーションプロジェクト文書シリーズ

IPCS risk assessment terminology (No. 1, 2004)

Chemical-specific adjustment factors for interspecies differences and human variability:
Guidance document for use of data in dose/concentration–response assessment (No. 2, 2005)

Principles of characterizing and applying human exposure models (No. 3, 2005)

Part 1. IPCS framework for analysing the relevance of a cancer mode of action for humans and case-studies; Part 2. IPCS framework for analysing the relevance of a non-cancer mode of action for humans (No. 4, 2007)

*To order further copies of monographs in this series, please contact WHO Press,
World Health Organization, 1211 Geneva 27,
Switzerland (Fax No.: +41 22 791 4857; E-mail:
bookorders@who.int).*

The Harmonization Project Documents are also available on the web at <http://www.who.int/ipcs/en/>.

*To order further copies of monographs in this series, please contact WHO Press,
World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland
(Fax No.: +41 22 791 4857; E-mail: bookorders@who.int).*
The Harmonization Project Documents are also available on the web at <http://www.who.int/ipcs/en/>.