

(+/-) TSG マウスは、上述のように、遺伝毒性がん原性物質に対し強い感受性を示すことが知られている。しかし、このマウスに N-nitrosodimethylamine (DMN) をイニシエーション処置した後 phenobarbital (PB) を6ヶ月投与した実験では、肝になんら増殖性病変が誘発されなかった事が報告されている¹³⁾。国立医薬品食品衛生研究所病理部では、オリエンタル酵母が維持繁殖している p53ノックアウト (ヘテロ欠損) CBA 雌マウス [p53 (+/-) マウス] および同腹仔の野生型雌マウス [p53 (+/+) マウス] (オリエンタル酵母) それぞれ30匹に DMN を 5 mg/kg 腹腔内投与した。1週間の休薬後、それぞれ15匹に0.05%PB を飲水投与し、残り15匹には蒸留水を26週与えた。最終屠殺時の肝増殖性病変の発生頻度では、p53 (+/-) および p53 (+/+) マウス共に、DMN+PB 群の好酸性肝細胞増殖巣、明細胞増殖巣、肝細胞腺腫の発生頻度は DMN 単独群に比し有意に増加した。さらに、DMN+PB 投与の p53 (+/-) マウスの肝細胞腺腫の発生頻度は DMN+PB 投与 p53 (+/+) マウスに比し有意に増加した。DMN+PB 群にみられた肝増殖性病変における PCNA 陽性率では、p53 (+/-) マウスの肝細胞腺腫の PCNA 陽性率が p53 (+/+) マウスに比し有意に増加した。以上のことから、CBA マウスは p53 (+/-) TSG マウスのバックグラウンドである C57BL マウスに比し、肝発癌感受性が高いことが明らかとなった。さらに、DMN と PB を投与した p53 (+/-) CBA マウスの肝細胞腺

腫の発生率および PCNA 陽性率は、同処置した p53 (+/+) マウスに比較して有意に上昇した事から、p53 (+/+) マウスよりも p53 (+/-) マウスの方が肝に対する発癌感受性がさらに高いことが示唆された。以上の成績より、p53ノックアウトマウスの肝に対する発癌感受性は遺伝子操作を受けたマウスの系統における本来の発癌感受性に左右されるものと推察された。今後、p53ノックアウトマウスを短期発癌試験に用いる場合には、ノックアウト処置をされたそのマウスの系統を十分考慮すべきであることが強く示唆された。

Tg.AC マウスモデル

米国 Taconic Farms 社で系統維持および生産されている Tg.AC マウスは、活性型 v-Ha-ras 遺伝子を胎児型 ζ-globin プロモーターと SV40の polyadenylation シークエンスと共に導入した発がんモデル動物である¹⁴⁾。従来から、遺伝的に皮膚細胞がイニシエートされた状態になっている皮膚発がんモデルとして有用性が期待されていたが、ILSI-HESI ACT プロジェクトにおいて、陽性対照物質として用いる皮膚発がんプロモーターである12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate (TPA) の皮膚塗布に対して発がん感受性が悪い動物 (nonresponder) が存在することが明らかになった¹⁵⁾。FDA の研究グループが TPA 投与に対し皮膚発がんを示す個体 (responder) と nonresponder について ζ-globin プロモーター遺伝子の発現状況を検討したところ、non-responder には ζ-glo-

表3 Tg.AC マウスにおける Genotype と Phenotype : Responder と Non-responder の比較

TPA treatment	Sex	Phenotype		Animals displaying 2-kb ζ-glob. fragment	
		Responder	Non-responder	Responder	Non-responder
6.25μg in EtOH, 2/wk	M	3	7	1/1	0/7
	F	5	7	4/4	0/2
6.25μg in Acetone, 2/wk	M	3	7	1/1	0/5
	F	3	7	3/3	0/4
1.25μg, 3/wk	M	6	7	6/6	0/2
	F	1	7	1/1	0/9
2.5μg, 3/wk	M	11	7	11/11	0/2
	F	5	7	5/5	0/3

bin 遺伝子の BamH I が欠落していることが判明した (表3)¹⁶⁾。この遺伝型の相違と表現型(発がん感受性)との一致率は100%であったことから、育成生産の過程で ζ -globin 遺伝子の欠損が生じたことが non-responder 問題の原因であることが明らかとなった。従来より、Taconic Farms 社では、Tg.AC マウスの遺伝的なチェックは、総産児のうち10%のマウスについて430bp の SV 40遺伝子を用いたサザンブロットアッセイのみで、v-Ha-ras 自体および ζ -globin 遺伝子については検査していなかった。現在、同社では系統維持および繁殖・生産コロニーを建て直し、遺伝的管理体制の整備が図られつつある。

一方、Tg.AC マウスのホモおよびヘテロ接合体マウスにおける responder 形質の発現率は、それぞれ40-100% および10-100%と報告されている。その導入遺伝子の解析から、 ζ -globin プロモーターの遺伝子が常に不安定であり、産児の数パーセントには必ずプロモーターゲノムの欠損が起こることが解ってきたため、本モデルでは実験に先立ち全動物の遺伝的チェックが不可欠である。しかし、これまでに実施された NIEHS グループ (ホモ接合体マウスを使用) および ILSI-HESI ACT の実験 (ヘテロ接合体マウスを使用) の両方の実験成績のうち、特に陰性成績の実験については、その信憑性が問題となっている。Taconic Farm 社では、FDA の研究者と協力して、実験中あるいは実験の終了した全動物の血液あるいは組織 (尾など) 凍結材料について、レトロスペクティブな遺伝子検査の実施を呼びかけてい

る。

ILSI-HESI 主宰の国際共同研究プログラム

医薬品のがん原性試験に関する ICH S1B ガイドライン [医薬品のがん原性を検出するための試験に関するガイダンス]¹⁷⁾において、1種の長期げっ歯類がん原性試験に加えて、in vivo 短期あるいは中期がん原性試験系から1試験系を選択実施するがん原性評価の枠組みが提唱された。しかし、in vivo 短期あるいは中期がん原性試験系の有用性に関しては検討が充分ではないことから、国際生命科学協会 (International Life Science Institute; ILSI) の1部門である保健環境科学研究所 (Health and Environmental Science Institute; HESI) が日米欧の製薬企業や安全性試験受託研究機関からの参画を募り、代替試験評価プロジェクト (Alternatives to Carcinogenicity Testing Subcommittee; ACT) を発足させた¹⁸⁾。ILSI-HESI ACT への参画企業・研究機関は、日米欧で約40にのぼり、日本からは製薬企業14社と実験動物中央研究所が加わっている。ILSI-HESI ACT では、基本的な実験デザインを統一しつつ、5種の in vivo 短・中期試験系 (rasH2 モデル、p53ノックアウトモデル、Tg.AC モデル、XPA ノックアウトモデル、新生児動物) について様々なカテゴリーの20化合物 (表4) のがん原性を評価することによって、それらの有用性評価に資する実験成績を収集することになっている。トランスジェニックあるいはノックアウトマウスを用いた試験系については、各分担研究機関において1997

表4 ILSI-HESI ACT で用いる化合物

Class	Compound
Genotoxic Human Carcinogens	Cyclophosphamide, Melphalan, Phenacetin
Immunosuppressant Human Carcinogens	Cyclosporin A
Hormones	Diethylstilbestrol, Estradiol
Rodent Carcinogens/ Putative Human Non-carcinogens (Epidemiology)	Clofibrate, Dieldrin, Phenobarbital, Reserpine,
Rodent Carcinogens/ Putative Human Carcinogens (Mechanism)	Chloroform, Chlorpromazine, Haloperidol, Metaproterenol, Methapyrilene, Sulfamethoxazole, WY-14, 643
Non-Carcinogens	Ampiciline, D-Mannitol, Sulfisoxazole

年から1998年にかけて相次いで実験が開始されている。当初は、動物の供給が進まず予定の遅延も見られたが、1998年11月の中間報告会では後述の Tg.AC モデルを除けば各モデルとも実験は軌道に乗ったものと思われる。Tg.AC モデルについては前述のトラブルの影響を受け、再実験も含め今後の対応が考慮されている。現在の見通しでは、全てのモデルにおいて2000年前半には実験成績が揃う予定であり、ILSI-HESI ACT 成果に関する国際ワークショップを2000年度中に開催する予定とのことである。

今後検討すべき点

rasH2 および p53 (+/-) マウスについては、遺伝毒性がん原性物質の検出に非常に感受性が高いことから、今後、変異原性試験の一部の試験において陽性結果が得られた場合には、上記の rasH2 ないし p53 (+/-) マウスを用いた短期がん原性試験を実施し、発がんのリスクの有無についてのスクリーニングを行う製薬企業体が増加するものと思われる。しかし、現時点では、rasH2 および p53 (+/-) マウスにおいても、必ずしもすべてのがん原性物質を検出することはできないことから、ICH のがん原性試験ガイドラインに明記されている一種類の短期がん原性試験の実施では、がん原性物質の検出を見逃す可能性があり、入手できる各遺伝子改変マウスのがん原性検出における短所を考慮して2種以上の短期がん原性試験の実施も被験物質により考慮すべきであろう。

参考文献

- (1) Yamamoto S, Mitsumori K, Kodama Y, Matsunuma N, Manabe S, Okamiya H, Suzuki H, Fukuda T, Sakamaki Y, Sunaga M, Nomura G, Hioki K, Wakana S, Nomura T, and Hayashi Y (1996). Rapid induction of more malignant tumors by various carcinogens in transgenic mice harboring a human prototype c-Ha-ras gene than in control non-transgenic mice. *Carcinogenesis* 17 : 2455-2461
- (2) Mitsumori K, Wakana S, Yamamoto S, Kodama Y, Yasuhara K, Nomura T, Hayashi Y, and Maronpot RR (1997). Susceptibility of transgenic mice carrying human prototype c-Ha-ras gene in a short-term carcinogenicity study of vinyl carbamate and ras gene analysis of the induced tumors. *Mol Carcinogenesis* 20 : 298-307
- (3) Yamamoto S, Urano K, Koizumi H, Wakana S, Hioki K, Mitsumori K, Kurokawa Y, Hayashi Y, and Nomura T (1998). Validation of transgenic mice carrying the human prototype c-Ha-ras gene as a bioassay model for rapid carcinogenicity testing. *Environ Health Perspect* 106 Suppl 1 : 57-69
- (4) Yamamoto S, Hayashi Y, Mitsumori K, and Nomura T (1997). Rapid carcinogenicity testing system with transgenic mice harboring human prototype c-HRAS gene. *Lab Animal Sci* 47 : 121-126
- (5) National Toxicology Program (NTP) (1996). Toxicology and Carcinogenesis Studies of Phenolphthalein in F344/N Rats and B6C3F1 Mice. Technical Report No. 465
- (6) Dunnick JK, Hailey JR. Phenolphthalein Exposure Causes Multiple Carcinogenic Effects in Experimental Model Systems. *Cancer Res.* 56 : 4922-4926 (1996)
- (7) Dunnick JK, Hardisty JF, Herbert RA, Seely JC, Furedi-Machacek EM, Foley JF, Lacks GD, Stasiewicz S, and French JE (1997). Phenolphthalein induces thymic lymphomas accompanied by loss of the p53 wild type allele in heterozygous p53-deficient (+/-) mice. *Toxicol Pathol* 25 : 533-540
- (8) Saitoh A, Kimura M, Takahashi R, Yokoyama M, Nomura T, Izawa M, Sekiya T, Nishimura S, Katsuki M. (1990). Most Tumors in Transgenic Mice with Human c-Ha-ras Gene Contained Somatically Activated Transgenes. *Oncogene* 5 : 1195-1200
- (9) Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery Jr CA, Butel JS, and Bradley A (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. *Nature* 356 : 215-221
- (10) Harvey M, McArthur MJ, Montgomery Jr CA, Butel JS, Bradley A, and Donehower LA (1993). Spontaneous and carcinogen induced tumorigenesis in p53-deficient mice. *Nature Genetics* 5 : 225-229
- (11) Tennant RW, French JE, and Spalding JW (1995). Identifying chemical carcinogens and assessing potential

- risk in short-term bioassays using transgenic mouse models. *Environ Health Perspect* 103 : 942-950
- (12) Eastin WC, Haseman JK, Mahler JF, and Bucher JR (1998). The national toxicology program evaluation of genetically altered mice as predictive models for identifying carcinogens. *Toxicol Pathol* 25 : 461-473
- (13) 須方督夫ら (1996)。肝発癌に対する p53ノックアウトマウスの感受性。第57回日本癌学会総会要旨 265
- (14) Leder A., Kuo A., Cardiff RD, Sinn E, and Leder P (1990). V-Ha-ras transgene abrogates the initiation step in mouse skin tumorigenesis : Effects of phorbol esters and retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 9178-9182
- (15) Weaver JL, Contrera JF, Rosenzweig BA, Thompson KL, Faustino PJ, Strong JM, Ellison CD, Anderson LW, Prasanna HR, Long-Bradley PE, Lin KK, Zhang J, and Sistar FD (1998). An evaluation of the hemizygous transgenic Tg.AC mouse for carcinogenicity testing of pharmaceuticals. I. Evidence for a confounding nonresponder phenotype. *Toxicol Pathol* 26 : 532-540
- (16) Thompson KL, Rosenzweig BA, and Sistar FD (1998). An evaluation of the hemizygous transgenic Tg.AC mouse for carcinogenicity testing of pharmaceuticals. II. A Genotypic marker that predicts tumorigenic responsiveness. *Toxicol Pathol* 26 : 548-555
- (17) ICH Guidance S1B : Testing for carcinogenicity of pharmaceuticals
- (18) Robinson D. (1998). The international life science institute's role in the evaluation of alternative methodologies for the assessment of carcinogenic risk. *Toxicol Pathol* 25 : 474-475

In vitro 小核試験国際共同研究について

研究協力者：祖父尼俊雄（国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部部長）

協力研究者：林 真（国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部室長）

松岡 厚子（国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部）

田中 憲穂（食品薬品安全センター秦野研究所）

島田 弘康（第一製薬㈱）

若田 明裕（山之内製薬㈱東京研究所）

森田 健（日本グラクソ㈱）

浜田 修一（エスエス製薬㈱）

宮島 博文（塩野義製薬㈱）

要旨

染色体異常試験の代替法として、小核試験への関心が高まっているが、今回、ICH/OECD ガイドライン作成のための基礎データを提供するという目的で、9種の被験物質をもちいて、cytochalasin B 添加の必要性および6種の小核試験のプロトコールの検討を行った。すでに試験が終了し陽性結果が得られた、#9（コード化されているため化学物質名は不明）のデータからは以下のことが判明した。Cytochalasin B 添加および非添加に拘わらず、同じ被験物質処理用量での、誘発小核頻度は同程度であり、また陽性対照物質 mitomycin C に対しても、差は認められなかったことから、cytochalasin B 添加の必要性は認められなかった。処理時間および標本作製時間の比較では、3時間処理よりも24時間処理のほうがより低用量で、高頻度の小核を誘発した。標本作製時間の違いは、誘発小核頻度に大きな影響を及ぼさなかった。結果として、cytochalasin B を添加せずに、被験物質で24時間処理を行う方法がもっとも感度よく小核を検出できると考えられる。

キーワード：遺伝毒性試験、小核試験、CHL/IU 細胞、SFTG 小核試験国際共同研究

A. 研究目的

本共同研究は、下記の目的の下に行う。

1. 試験実施機関間のデータの再現性の評価

表1に示す9種の化学物質が今回の被験物質であるが、すべてコード番号のみを記載した形で配布され、1被験物質は少なくとも2機関に配布されている。また、各細胞グループ毎に、同じロットの細胞を使い、使用する培養液等についても、同じロットの製品を使うなど、実験条件を極力揃えて、共同研究を行う。

2. 小核試験の検出特異性の検討

表1に示すように、作用機作の異なる被験物質を選んで、小核誘発性の特異性を比較検討する。

3. 種々の細胞間の比較

この目的のために、4種類の細胞を使用している。チャイニーズ・ハムスター由来の細胞株 CHL、CHO、マウスリンパ腫由来細胞株 L5178Y、およびヒト末梢血リンパ球である。

4. 培養細胞を用いる他の試験、遺伝子突然変異試験および染色体異常試験のデータとの比較を行う。

5. 実験プロトコールの検討

今回、6種のプロトコールについて小核試験を行うことになっているが、主な検討項目としては、cytochalasin B 添加の必要性、至適処理時間、至適標本作製時間およびヒト末梢血リンパ球では、全血培養を行うか、

表1 PRELIMINARY LIST OF 18 COMPOUNDS

COMPOUND	CAS.No.	Selection of the 9 first	GUM list	MLA lists	Type of action
Negative compounds					
Acetylsalicylic acid	50-78-2		No	Yes	Negative
Clofibrate	637-07-0		No	Yes	Non genotoxic carcinogen
D-Mannitol	69-65-8		No	Yes	Negative
Nicotinic acid	59-67-6		No	Yes	Negative
Clastogens					
Bleomycin	9041-93-4		Yes	No	Radiomimetic clastogen
4-Nitroquinoline oxide	56-57-5		No	No	Clastogen
Urethane	51-79-6		Yes	Yes	Clastogen
Phenacetin	82-44-2		No	Yes	Clastogen
2-Acetyl aminofluorene *	53-96-3		Yes	No	Clastogen
5-Fluorouracil	51-21-8		Yes	Yes	Antimetabolite, RNA target, early S
Cytosine arabinoside	147-94-4		Yes	Yes	Antimetabolite, analog, late S or G 2
Dideoxycytidine	7481-89-2		No	Yes	Antimetabolite deoxyribose analog
Aneugens					
Cadmium sulfate	10124-36-4		Yes	Yes	Aneugen
Colchicine	64-86-8		No	Yes	Aneugen, tubulin polymerization
Diethylstilboestrol	56-53-1		Yes	Yes	Aneugen
Econazole	24169-02-6		No	No	False aneugen, membrane modifier
Griseofulvin	126-07-8		Yes	Yes	Aneugen, microtubules
Thiabendazole	148-79-8		Yes	Yes	Aneugen, tubulin assembly
Mitomycin C	50-07-7	Positive control	Yes	Yes	Clastogen, cross-linking agent
Cyclophosphamide	50-18-0	Positive control	Yes	No	Alkylating clastogen

分離リンパ球を用いるかなどがあげられる。

6. ICH/OECD ガイドライン作成のための情報提供

上記5までの項目の検討後、推薦できる標準プロトコールの作成をめざす

7. 小核試験の国際的普及をはかる。

B. 研究方法

当研究室では、CHL細胞を用いるグループ（表2）に参加した、#9および#16の被験物質を担当した。

図1に示す6種のプロトコールについて、各々2回、実験を繰り返した。

実験条件は以下の通りである。

細胞：CHL/IU株（細胞バンクより購入）

播種細胞数：cytochalasin B 添加実験

3時間処理： 4×10^5 /plate

24時間処理： 2×10^5 /plate

cytochalasin B 非添加実験： 1×10^5 /plate

陽性対照 mitomycin C の濃度：3時間処理：0.1 μ g/ml

24時間処理：0.05 μ g/ml

cytochalasin B の最終濃度：3 μ g/ml

Acridine orange 染色を行い、1000個の細胞を観察して、その中の小核を有する細胞数を計数した。

表2 ACTIVE PARTICIPANTS USING CHL PROTOCOL (17)

Hideo	Daigo	TOKYO TABANE SEIYAKU Co., Ltd.	Japan	+81 3 3905 8013	+81 3 3907 3477		1 compound
Shuichi	Hamada	SS Co., Ltd.	Japan	+81 476 27 1511	+81 475 26 7948		1
Kinya	Kubo	KIRIN BREWERY Co., Ltd.	Japan	+81 272 54 8609	+81 272 54 5145	kubok@kirin.co.jp	1
Atsuko	Matsuoka	NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES	Japan	+81 3 3700 9872	+81 3 3700 2348	matsuoka@nihs.go.jp	2
Miki	Miura	DAIICHI PHARMACEUTICAL Co., Ltd	Japan	+81 3 5696 8594	+81 3 5696 8335		1
Hirofumi	Miyajima	SHIONOGI & Co., Ltd.	Japan	+81 6 331 8081	+81 6 332 6385	Hirofumi.miyajima@shionogi.co.jp	1
Shozo	Nakamura	TOYAMA CHEMICAL Co., Ltd.	Japan	+81 764 31 8275	+81 764 31 8208		1
Souji	Nishida	TORAY INDUSTRIES, Inc.	Japan	+81 775 33 8501	+81 775 33 8692		1
Shigenari	Ozawa	KISSEI PHARMACEUTICAL Co., Ltd.	Japan	+81 263 83 5053	+81 263 83 5112		1
Nami	Senju	MEIJI SEIKA KAISHA Ltd.	Japan	+81 45 545 3175	+81 45 545 3196		1
Keizo	Shibata	ZERIA PHARMACEUTICAL Co., Ltd.	Japan	+81 485 36 3456	+81 485 39 1072		1
Noriho	Tanaka	HATANO RESEARCH INSTITUTE	Japan	+81 463 82 0773	+81 463 82 0773	Tanac.noriho@nifty.ne.jp	1
Raymond Maria	Tice Donner	INTEGRATED LABORATORY SYSTEMS	USA	+ 1 919 544 4589 (ext.223)	+ 1 919 544 0380	Rtice@ils-inc.com Mdonner @ mindspring.com	1
Akihiro	Wakata	YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., Ltd. (JPMA)	Japan	+81 3 5916 2177	+81 3 3960 8788	Wakata@yamano-uchi.co.jp	2
Eiji	Yamamura	YOSHITOMI PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, Ltd.	Japan	+81 979 23 8967	+81 979 24 8524		1
Junichi	Yoshida	KAKEN PHARMACEUTICAL Co., Ltd.	Japan	+81 54 635 2939	+81 54 635 8940		1
Eryl	Jones	ZENECA CTL	UK	+44 1625 590249	+44 1625 590249	Eryl.Jones@CTL.Zeneca.com	

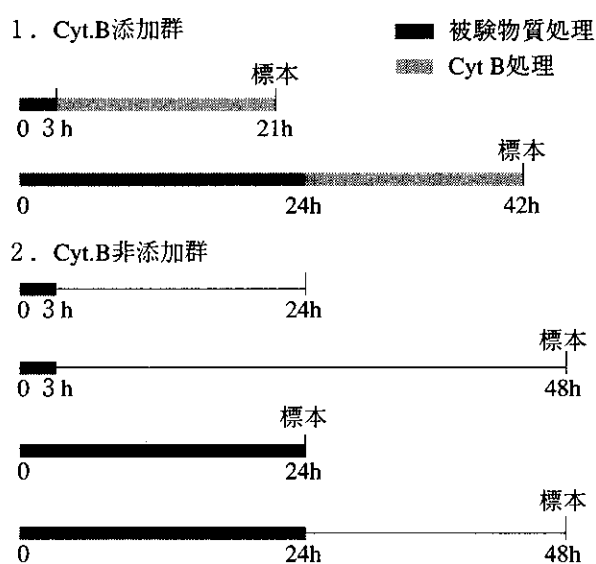


図1 処理時間および標本作製時間

C. 研究結果

今回の実験の結果、# 9は陽性、# 16は陰性であった。ここでは、陽性となった# 9の結果を紹介する。# 9は予備試験の結果50 μ g/mlでは、完全に細胞が死んでしまうことを確認している。

図2には、被験物質で3時間処理を行ったあとに cytochalasin B を添加した場合と、添加しない場合について比較した結果を示している。同時に行った2枚のプレートの各々のデータを2枚のグラフで示している。# 9は、急激に細胞毒性を示す物質であるが、強い毒性を示す40 μ g/mlでは、同時に行った2枚のプレートでも1枚はあまり強い毒性をしめさず、小核の頻度も低いが、他の1枚では、50%以上の毒性を示し、小核頻度も高くなった。これは、cytochalasin B 添加、非添加

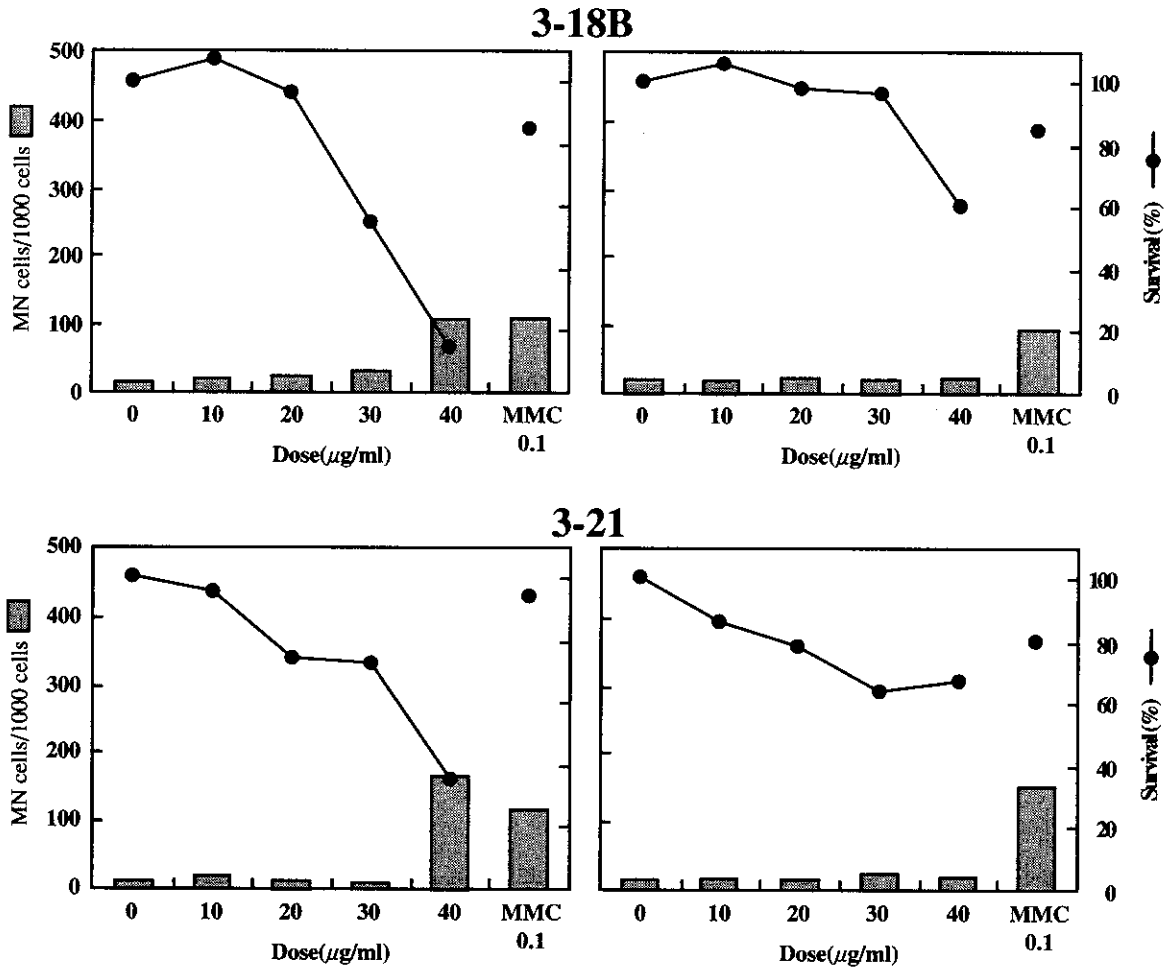


図 2

に拘わらず、同じ傾向が観察された。陽性対照物質 mitomycin C はいずれのプレートでも有意に高い小核頻度を示し、これも、cytochalasin B 添加、非添加に拘わらず同程度の値を示した。

図 3 には、被験物質で 24 時間処理を行ったあとに cytochalasin B を添加した場合と、添加しない場合について比較した結果を示している。同じプロトコルの 2 枚のプレート間の値は、細胞毒性、誘発小核頻度、陽性対照の小核頻度すべてについてよく一致していた。cytochalasin B を添加した場合と添加しない場合では、処理濃度が若干異なるが、約 10 あるいは 20 μg/m でいずれも陽性反応を示し、よく似た結果を示した。

図 4 は、cytochalasin B を添加しない実験群での、処理時間および標本作製時間の比較を行ったものである。同時に行った 2 枚のプレート間で結果がよく一致していたので、1 枚のプレートの結果を示している。3 時

間処理では、いずれの標本作製時期でも、最高濃度の 40 μg/ml でのみ陽性反応がみられた。24 時間処理群では 6.25 μg/ml から陽性反応がみられ、用量依存性も確認できた。

D. 考察

今回の # 9 に関する結果からは、特に cytochalasin B 添加による利点は認められなかった。また、処理時間については、24 時間処理の方が用量依存性も確認できるデータが得られた。24 時間処理での標本作製時期の影響を比較すると # 9 の小核頻度は処理直後のほうが高いが、陽性対照の値は処理後 24 時間において標本作製した方が高くなっている。# 9 は、この試験の他の指標の観察結果から、染色体の数的異常を誘発する物質であると推測され、染色体の構造異常を誘発する陽性対照物質とはその作用機作が異なることが、その

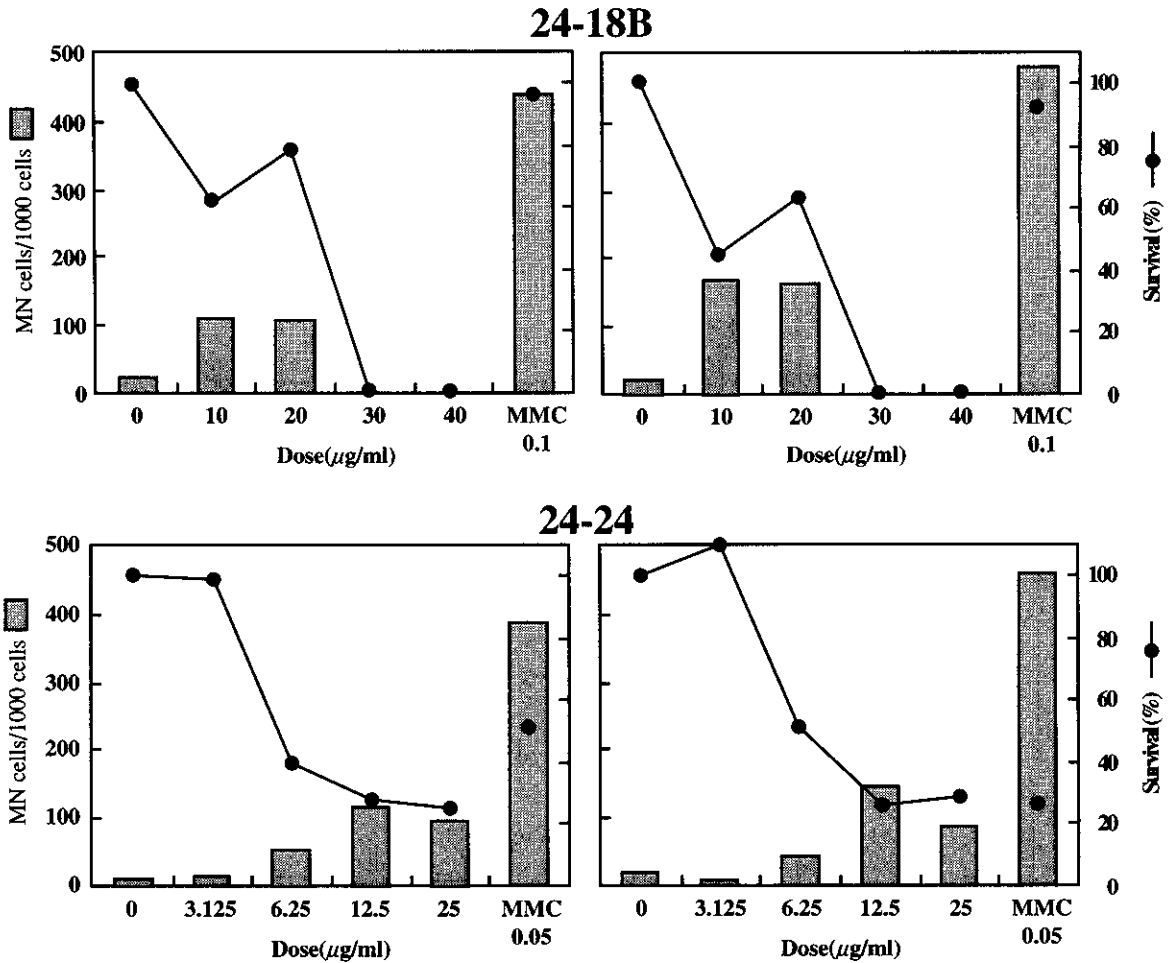


図 3

原因ではないかと考えられる。

国際共同研究の全体のまとめからは、化学物質の作用機作による至適プロトコルの違いなどが明らかになり、適切な標準プロトコルが提唱されるであろうことを期待している。

E. 結論

CHL/IU 細胞を用いる小核試験において、被験物質 # 9 は陽性、# 16 は陰性であった。陽性物質 # 9 のデータを用いた比較では、cytochalasin B 添加の必要性は認められず、また試験プロトコルとしては、24時間処理後、すぐに標本作製を行う方法がもっとも高い試験感度を示した。

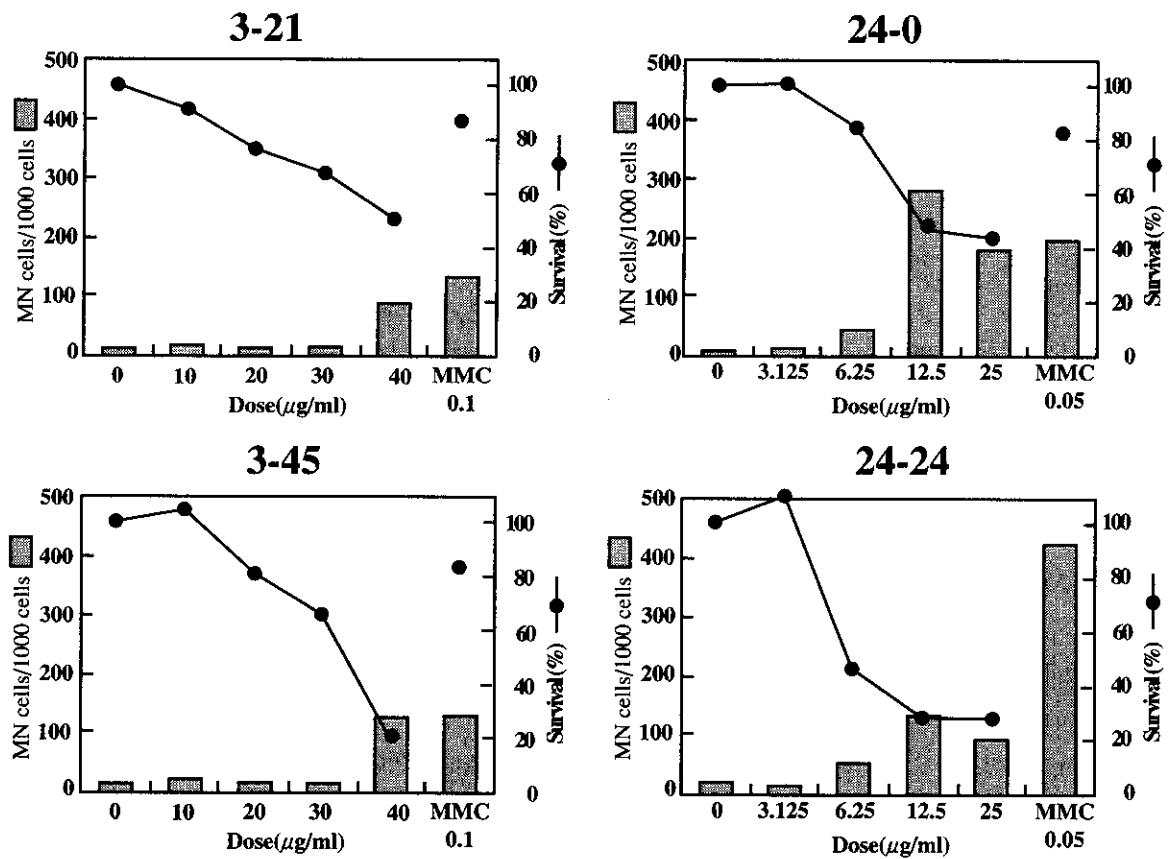


图 4

反復投与毒性試験の適用とその評価法の確立

研究協力者：広瀬 雅雄（国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター病理部長）
協力研究者：井上 達（国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター毒性部長）
長谷川隆一（国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター評価室長）
西川 秋佳（国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター病理部室長）
小野 宏（食品薬品安全センター秦野研究所所長）
松澤 利明（山之内製薬㈱開発研究本部 担当部長）
門田 利人（プリストルマイヤーズ・スクイブ毒性研究室 室長）
橋本 正晴（藤沢薬品工業㈱安全性研究所 副所長）

要旨

非げっ歯類（主としてイヌ）での反復投与毒性試験の期間については、ICH 1 では12カ月の投与期間が必要であるのか、6ヵ月で十分であるのか意見の一致をみなかった。1996年のロンドンの会議に引き続き、コペンハーゲンにて6ヵ月以内および12ヵ月間投与後の毒性発現の差を比較するための評価会議が行われた。評価可能であった16例について検討された結果、6ヵ月以降に新たな毒性発現を示した症例が確かにあることが認識されたが、少なくとも9ヵ月間の試験期間があれば、長期毒性所見を検出する根拠があることが確認された。そこで非げっ歯類の試験期間として9ヵ月間が提唱され、ステアリングコミッティでステップ2文書としてEU、日本、および米国の合意が得られ、広く意見の聴取が始められた。その後FDAより、場合によっては6ヵ月でもよい、あるいは12カ月の投与期間が適している場合もあるとする新しい案が提出された。1998年東京のICH・EWGではステップ2文書はそのまま合意し（ステップ4）、新提案を付記することが提唱された。現在MWHでICH合意に基づき、反復投与毒性試験ガイドラインの一部改正案を作成し、その内容の検討を行っている。

キーワード；反復投与毒性試験、慢性毒性試験、げっ歯類、非げっ歯類、投与期間

A. 研究目的

科学的に有効な国際調和ガイドラインを策定することは、医薬品の安全性評価の健全性を保ちつつ、試験を重複して実施する必要性を軽減し、非臨床試験の効率を高めることにより、有効な医薬品開発の促進につながるものと考えられる。医療用医薬品申請のための単回毒性試験に関しては、すでにICH 1で合意（Step 5）に達している。一方、ヒト投与期間が1ヵ月以上にわたる医薬品申請のための、げっ歯類の反復投与毒性試験の投与期間については、従来米国と日本では12ヵ月、EUでは6ヵ月であり、そのハーモナイゼーシヨ

ンが必要とされていた。その後、ハーモナイズのため3極によるデータベースの検索を行うことが提案され、検討された結果、げっ歯類については6ヵ月でよいとの合意に達した。これに伴い日本のガイドラインが部分的に改訂された（厚生省通知薬新薬第88号、平成5年8月10日）。一方、非げっ歯類（主としてイヌ）での反復投与毒性試験の投与期間については、12ヵ月間が必要であるとするFDAと6ヵ月で十分であるとするEUおよび日本との間で合意が得られなかった。また、日本とEUの間でも、日本は必要に応じて12ヵ月が必要であるとの立場であり、EUの6ヵ月と必ずしも足並

みが揃っていたわけでもなかった。FDA の提唱する IND および NDA 医薬品約100物質についてデータベース検索が行われた結果、6 ヶ月以降に毒性発現がみられたと思われる事例について、再評価を行うことになった。その結果、非げっ歯類の投与期間として、9 ヶ月間が提唱された。その後、ステアリングコミティーでステップ2文書として3極の合意が得られ、広く意見の聴取が開始された。本研究ではその後の経緯についての検討を行った。

B. 研究方法

前年度に引き続き官民合同の研究班で、Step 2 文書の検討、Step 4 に達した後に FDA から新たに提示された文書に対する対応、さらに ICH ガイドラインの原文、平成9年度本研究班業績報告書、「医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期についてのガイドライン」(平成10年医薬審第1019号通知) および現行の反復投与毒性試験ガイドライン(平成5年改正薬新薬第88号)を基本資料として、我が国の反復投与毒性試験ガイドラインの一部改正案を作成した。

C. 研究成果

1997年1月13日-14日にデンマーク・コペンハーゲン の Danish Medicines Agency で開催された第2回目の ICH -EWG (S 4 B) 行政側評価会議で16例を検討した結果、9 ヶ月間の試験期間があれば、長期毒性所見を検出するのに適当であるとする十分な情報があつたと考えられた。従って、非げっ歯類の試験期間を9 ヶ月として提唱することが決定された。その後、1998年7月 FDA から以下の内容を加えるよう提案がなされた。

(翻訳文)

9 ヶ月試験はほとんどの医薬品で適用される。

6 ヶ月試験は、短期間欠的に使用し、おそらく慢性試験が必要となる薬剤の場合(たとえば、ほとんどの細菌感染、偏頭痛、性的不能、ヘルペスなどに対する薬剤)、および生命を脅かす重篤な疾患に対する薬物で、長期の十分なヒト臨床試験結果が利用できる場合(進行がんに対する化学療法やアジュバント使用の場合)に特に適しているであろう。

12 ヶ月試験は、代替のマーカーを用いた短期臨床試験に基づいて承認される慢性使用の薬剤(たとえばエイズ治療)の場合に適しており、この場合、ヒト長期臨床試験が限られている。12 ヶ月試験は、また、新しい薬効を持つ薬剤で、同種のもので長期毒性データの乏しいもの(たとえば、新しい薬効を持つクラスの最初の薬剤)でも有用であろう。正常の寿命が望める小児など、かなり長期にわたって持続的に使用する薬剤(てんかん、鎌状赤血球症、気管支喘息など)で、十分な市販経験のないものも12 ヶ月試験でより適切に評価できるであろう。

(原文)

Nine month non-rodent toxicity studies are acceptable for most pharmaceuticals.

Six month studies may be especially studied for clinical indications with short term intermittent exposure, which might otherwise qualify for chronic testing (e. g. most bacterial infections, drugs for migraine, erectile dysfunction, herpes, etc.) and for indications of life-threatening diseases with substantial long-term human clinical trial safety data available (e. g. cancer chemotherapy in advanced diseases or in adjuvant use).

Twelve month studies may be appropriate for chronically used drugs to be approved on the bases of short term clinical trials employing surrogate markers (e. g. AIDS therapies) where long term clinical trial experience is limited. Twelve month studies may also be useful for new pharmacological classes with limited experiences for long term toxic potential for the class (e. g. the first agent in new pharmacological class). Drugs used chronically and continuously for a substantial portion of a lifetime where a significant fraction of the patient population includes pediatric patients with normal life expectancy (e. g. treatment of epilepsy, sickle cell anemia, asthma, etc.) also may be more appropriately evaluated in a twelve month study when there is not substantial prior market experiences.

1998年8～9月東京で開催された ICH-EWG では Step 2 文書をそのまま合意することで EC Dr. K. Oljniczak、MHW Dr. Y. Kurokawa、FDA Dr. J. DeGeorge と Dr. M. D. Green の間でサインが交わされ、Step 4 のガイドラインとして採用されることが合意された。また、Step 2 文書を Step 4 にステップアップする上で、従来実施されてきた 6 ヶ月および 12 ヶ月試験についての取り扱いが再検討された。その過程で、6 ヶ月および 12 ヶ月試験の取り扱いについての解説を補足するためのフットノートが提案されたが、国内規制への取り入れについては各国の方針にゆだねられることになった。提案されたフットノートは上記の内容を若干修正した以下の内容である。

(翻訳文)

6 ヶ月試験は、短期間歇的に使用し、おそらく慢性試験が必要となる薬剤の場合（現時点では細菌感染、偏頭痛、性的不能およびヘルペスに対する薬剤）、および生命を脅かす重篤な疾患に対する薬物で、長期の十分なヒト臨床試験結果が利用できる場合（進行がんに対する化学療法やアジュバント使用の場合）に特に適しているであろう。12 ヶ月試験は、代替のマーカーを用いた短期臨床試験に基づいて承認される慢性使用の薬剤であり、ヒトからの安全性データが短期暴露に限定されるような場合に適しているであろう。12 ヶ月試験は、また、新しい分子標的に作用し、同様の薬理機序を有する薬剤に関する市販経験がないような薬剤の場合にも有用と思われる。

(原文)

Six month studies may be especially suited for clinical indications with short term intermittent exposure, which might otherwise qualify for chronic testing (currently defined as bacterial infections, drugs for migraine, erectile dysfunction, and herpes) and for indications of life-threatening diseases with substantial long-term human clinical trial safety data available (e. g. cancer chemotherapy in advanced diseases or in adjuvant use).

Twelve month studies may be appropriate for chronically

used drugs to be approved on the bases of short term clinical trials employing surrogate markers where safety data from humans are also limited to short term exposure. Twelve month studies may also be useful for drugs acting at new molecular targets where postmarketing experience is not available for the pharmacological class.

FDA はこの文書を官報の前文として掲載する予定であり、実際に米国における承認のための申請では、12 ヶ月の投与期間を求めた事例もすでにある。一方、EU は付加的な記述を行うことに対して否定的である。日本ではガイドラインの注に、より短期またはより長期の投与期間として 6 ヶ月あるいは 12 ヶ月を例示することによる混乱を避けるため、諸外国の情報を参考に提示することが適切であると提案されている。現在 MHW では、ICH-S 4 合意に基づく反復投与毒性試験ガイドラインの改正案を作成し、意見の聴取を行っており来年度には Step 5 にステップアップする予定である。

3 極で合意された Step 4 文書は下記の通りである。

(翻訳文)

動物を用いた慢性毒性試験の投与期間について（げっ歯類および非げっ歯類の毒性試験）

ICH 合意に基づく 3 極のガイドライン

1998年9月2日 ICH ステアリングコミッティーで ICHS 4 に達し、このガイドラインが 3 極で適用されることが推奨される。

1. 目的

本ガイダンスの目的は、医療用医薬品の安全性評価の一環として、げっ歯類および非げっ歯類の慢性毒性試験に適用されるための考え方を提示することにある。ガイダンスは法的に規制されるものではなく、申請者が代替法の妥当性を述べることにより、その方法を採用することが出来る。

2. 適用範囲

本ガイダンスは医療用医薬品の開発のためであり、

「バイオテクノロジー-医薬品の安全性試験」ですでにカバーされている例えばモノクローナル抗体や組み換えDNA タンパクなどは除かれる。

3. 背景

1991年に開かれた第1回国際ハーモナイゼーション会議(ICH)において、3極(EU、日本、米国)での慢性毒性試験の方法について評価がなされ、げっ歯類については、6ヵ月というハーモナイズされた投与期間を支持するとの科学的合意が得られた。しかし、非げっ歯類を用いた慢性毒性試験の投与期間に関しては合意に達しなかった。

投与期間がハーモナイズされていないために、製薬会社は新しい医療用医薬品を開発する際に、一部で6ヵ月と12ヵ月の両方の試験の実施を余儀なくされている。ICHの目的としては、医薬品の開発において人々の健康を守るための保護的役割を維持する一方、試験の重複を避けるか、あるいは減らして、物的資源、および動物、ヒトを含めた生物資源のより経済的な使用を確保することにあるので、さらなる科学的評価がなされた。

EU、日本、米国の行政当局の各々が、非げっ歯類の慢性毒性試験について単一の投与期間を設定できるかどうかを決めるための再評価を行った。その分析結果から、16事例において6ヵ月と12ヵ月のデータをさらに詳細に評価すべきであることが判明した。

この評価は、3極のしかるべき当局側委員の合同審議・評価の形で実施された。

3極の会議において解析に供せられたいくつかの事例で、12ヵ月において追加すべき所見は得られなかった。他のいくつかの事例では投与期間の差のみにより6ヵ月と12ヵ月の所見に差が生じたと結論できるかどうか、試験のデザインと実施の比較に関して、行政担当者間で完全な一致が得られなかった。

いくつかの事例において、12ヵ月で観察されたが6ヵ月では観察されなかった所見があった。それらの所見は9ヵ月間の試験では検出できていたであろうと結論された。異なった投与期間の試験でのみみられた所見の違いについて、いろいろな見解があることが明らかとなった。これらの所見の臨床上の意義については

意見の一致をみるには至らなかった。

12ヵ月間の試験は、通常必要ではなく、9ヵ月間よりも短い期間の試験でも十分であろう。

EUにおいては、改訂された Council Directive 75/318/EEC に基づいて、非げっ歯類では、6ヵ月間の試験でもよい。重複をさけるため、それよりも長い期間の試験が実施されている場合には、6ヵ月間の試験を実施する必要はない。

4. 日米欧3極の慢性毒性試験の期間に関するガイダンス

新規の医薬品における慢性毒性試験の重複を避け、かつ単一の開発計画を可能にするため、上記に述べた非げっ歯類データの詳細な分析および評価の結果、ならびにげっ歯類についてはICH1の合意に基づき、次の試験が3極における申請時に受理される。

1) げっ歯類

6ヵ月間の試験

2) 非げっ歯類

9ヵ月間の試験

原文は以下の通り

Duration of Chronic Toxicity Testing in Animals (Rodent and Non-rodent Toxicity Testing)

ICH Harmonized Tripartite Guideline

Having reached Step 4 of the ICH Process at the ICH Steering Committee meeting on 2 September 1998, this guideline is recommended for adoption to the three regulatory parties to ICH

1. Objective

The objective of this guidance is to set out the considerations that apply to chronic toxicity testing in rodents and non-rodents as part of the safety evaluation of a medicinal product. Since guidance is not legally binding, an applicant may submit justification for an alternative approach.

2. Scope

This guidance has been prepared for the development of medicinal products with the exception of those already cov-

ered by *Safety for Biotechnological Products*, e. g. Monoclonal antibodies, recombinant DNA proteins.

3. Background

During the first International Conference on Harmonisation in 1991, the practices for the testing of chronic toxicity in the 3 regions (EU, Japan and US) had been reviewed. Arising from this it emerged that there was a scientific consensus on the approach for chronic testing in rodents, supporting the harmonised duration of testing of 6 months. However, for chronic toxicity testing in non-rodents, there were different approaches to the duration of testing.

The lack of harmonised duration led to the need for pharmaceutical companies to perform partially duplicative studies for both 6 and 12 months duration when developing new medicinal products. As the objective of ICH is to reduce or eliminate the need to duplicate testing during development of medical products and to ensure a more economical use of material, animal and human resources, while at the same time maintaining safeguards to protect public health, further scientific evaluation was undertaken.

Each of the regulatory authorities in EU, Japan and US undertook a review to determine whether a single duration for chronic toxicity testing in non-rodents could be identified. From this analysis it emerged that in 16 cases a more detailed evaluation of 6 versus 12 months data should be undertaken.

This evaluation was conducted as a joint exercise by the competent authorities in the 3 regions.

In some of the cases analysed at the tripartite meetings, there were no additional findings at 12 months. For some other cases, there was not complete agreement among the regulators with respect to the comparability in study design and conduct to allow assessment of whether there were differences in the findings at 6 and 12 months due to duration of treatment alone.

In a number of cases there were findings observed by 12 months, but not by 6 months. It was concluded that these would, or could have been detected in a study of nine months duration. Varying degrees of concern for the differ-

ences in findings detected between the studies of different durations were expressed. An agreement on the clinical relevance of these findings could not be reached.

Studies of 12 months duration are usually not necessary and studies of shorter than 9 months duration may be sufficient.

In the EU, studies of 6 months duration in non-rodents are acceptable according to Council Directive 75/318/EEC, as amended. To avoid duplication, where studies with a longer duration have been conducted, it would not be necessary to conduct a study of 6 months.

4. Guidance on duration of chronic toxicity testing for tripartite development plan

Arising from the extensive analysis and review of the above mentioned data in non-rodents and based upon the achievements of ICH 1 for testing in rodents, and so as to avoid duplication and follow a single development plan for chronic toxicity testing of new medicinal products, and the following studies are considered acceptable for submission in the 3 Regions :

- 1) Rodents :
a study of 6 months duration ;
- 2) Non-rodents :
a study of nine months duration.

D. 考察および結論

非げっ歯類の慢性毒性試験の投与期間は、EU、日本、および米国でステップ4文書として国際的合意が得られ、9カ月の試験であれば、医薬品の申請に当たり3極いずれにおいても受理されうることになった。ただし、6カ月および12カ月試験に関するフットノートの取扱いについては各国の方針に委ねられることになり、我が国においては6カ月または12カ月の試験を例示することによる混乱を避けることを主目的として、諸外国の情報をガイドライン解説等を用いて、参考提示することが適切であるとの判断がなされた。その合意に基づいて反復投与毒性ガイドラインの一部改正案が作成され、現在意見聴取が行われている。しかし、我が国で行われた9カ月の試験が、米国での申請で必ず受

理されるのか、あるいは米国で行われた6ヵ月の試験が我が国で申請された場合の対応など細部において検討すべき点が残されており、case by case で対応せざるを得ない場合が増えることも予想される。

E. 参考文献

- 1) T. Igarashi : A review of the Japanese Pharmaceutical Manufacturers' Association database currently established to examine retrospectively the value of long-term animal toxicity studies. *Adverse Drug React. Toxicol. Rev.* (1993) 12(1) 35-52
- 2) J. F. Contrera, D. Aub, E. Barbehenn, E. Belair C. Chen, G. Evoniuk, K. Mainigi, F. Mielach and L. Sancilio : A retrospective comparison of the results of 6 and 12 month non-rodent toxicity studies. *Adverse Drug React. Toxicol. Rev.* (1993) 12(1) 63-76
- 3) 高橋道人、他：反復投与毒性試験の適用とその評

価法の確立、医薬品規制ハーモナイゼーション推進国際共同研究平成9年度研究業績報告集、(1998) pp.79-85

- 4) 厚生省薬務局監修：医薬品非臨床試験ガイドライン解説1997「反復投与毒性試験」(1997) 15-22
- 5) 厚生省医薬安全局：医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期についてのガイドライン、薬審第1019号通知 (1998)
- 6) 厚生省薬務局：医薬品毒性試験ガイドライン「反復投与毒性試験ガイドライン」薬新薬第88号改正通知、(1993)

F. 研究発表

- 1) 広瀬雅雄：反復投与毒性試験における問題点、医薬品国際ハーモナイゼーション促進研究班 平成10年度班会議総会、(1999)

2週間の反復投与毒性試験による雄性生殖器への影響評価の可否に関する研究

研究協力者：大野 泰雄、国立衛研、安全生物研、薬理部
協力研究者：川島 邦夫 国立衛研、大阪支所、生物試験部
堺 俊治 山之内製薬・開発研究本部、安全性研究所
高橋 道人 昭和大学薬学部
馬屋原 宏 製薬協基礎部会長（武田薬品工業）
三森 国敏 国立衛研、安全生物研、病理部

要約

ICHにおいて志願者に初めて医薬品候補物質を投与する前に必要な安全性試験の期間についての完全な合意は達成できず、日本では4週間、欧米では2週間の反復投与毒性試験が必要とされ差が残った。これは男性生殖能に対する評価に2週間投与で充分との証拠が無かったことによる。そこで三極におけるハーモナイゼーションを更に進めるために、4週間の反復投与で男性生殖器に影響を与えることの知られている物質を2週間投与した時に男性生殖器に及ぼす影響が検出できるか否かについてのバリデーションを開始した。本年度においては、本計画を製薬協傘下の企業に説明し、参加を求めた。その結果、28社の協力を得た。また、最小限の試験内容を示した統一プロトコールを作成した。また、被験物質を選考した。更に、予備試験を実施し、本試験の被験物質とその用量、投与スケジュールを確定した。

キーワード：精巣毒性、反復投与毒性試験、投与期間、バリデーション

A. 研究目的

臨床試験実施に関連した非臨床試験実施タイミングに関しては、ICH-M3ガイドラインにおいて多くの点で合意された。しかし、男性に始めて医薬品候補物質を投与する前に行うべき反復投与毒性試験の期間について、単回投与毒性試験結果に基づく単回投与臨床試験実施について、及び雌生殖毒性試験実施タイミングについて合意されずに残った。後2者については早急な解決は困難であるが、男性に始めて医薬品候補物質を投与する前に行うべき反復投与毒性試験の期間については以前のバリデーションの結果から2週間でも男性生殖器への影響評価が可能との結果が一部得られており、更にデータを追加し、このことが確認されるならば、欧米並に2週間の反復投与毒性試験結果に基づきヒトに投与することが可能となり、国際的ハーモナイゼーションの推進という事だけでなく、わが国医薬

品の開発もかなり促進される。そこで、男性に始めて医薬品を投与する前に行っておくべき、反復投与毒性試験の期間についての情報を得るために、ラット雄性生殖器に影響を与えることの知られている医薬品を中心とする化学物質を用いて2週間及び4週間の反復投与毒性試験を実施し、精巣への影響が2週間試験でどの程度評価可能か検討する。

B. 研究方法

多くの研究機関の参加によるバリデーションを実施するためには、参加機関の間で計画の意図を共有するとともに、共通の方法で試験を実施することが重要である。そこで、今年度はまず班員の間でバリデーションの背景の説明、研究の必要性および研究内容、今後の計画等についての検討を行った（第一回班会議（1998, 9, 11））。その後、作成した計画を製薬協傘下企

業にプロトコル案を提示し、参加企業を募集した。

第二回班会議および参加希望企業への説明会では参加希望企業へ研究の背景、研究の必要性および研究内容、標準試験計画書の説明、今後の計画等についての説明、被験物質の選択・調整、各社プロトコルの説明・調整、実験スケジュールの確認を行った(1998, 11, 2)。その後、参加企業の確認と被験物質の調整、各社プロトコルの確認を行った。また、予試験を実施し、必要に応じて被験物質およびプロトコルの修正が行われた。また、多くの企業で本試験が開始された。最終的な参加企業名を表1に示した。

第三回班会議(1999, 2, 16)では試験経過の中間報告が行われ、問題点を検討し、一部の社についてはプロトコルが修正された。その後、3月までに本試験を実施する予定である。

来年度においては、作成された病理組織学的標本について、個別に問題点を検討し、結果をまとめ、男性生殖臓器への影響評価系としての2週間の反復投与毒性試験の評価を行う予定である。

C. 研究結果：

1) 研究プロトコルの作製

2週間の反復投与毒性試験により男性生殖器への影響が評価できるか否かを判断するためのバリデーションのための基本プロトコルについて検討し、資料1に示した方法で行うとされた。なお、これらは用量や群数等についての最低限の要求であり、更に用量や試験群を追加しても構わないとされた。原則として、被験物質は4週間の反復投与試験で明らかに精巣毒性の現れる医薬品から主に選択するとされた。また、今回のバリデーションではコード化された被験物質を使用せず、必ずしもGLP下で行わなくとも良いとした

なお、必要に応じて、社内ピアレビューを行うこと、また、国立衛研病理部の三森室長もピアレビューを行うこととされた。

2) 個々の参加企業の被験物質の選択

被験物質の選択基準について検討し、①前回のバリデーションに参加した企業が同じ物質について更に検討を加える場合はその企業を優先させる。②ホルモン

類については短期の試験では作用が現れないことがあることから、なるべく被験物質には入れない。しかし、参加企業が多く、余裕がある場合はホルモンについて検討しても良い。③開発中の薬などで医薬品としての実体が明らかにできない場合もあるが、今回のバリデーションにおいてはなるべく明らかにできるものを選ぶ。但し、どうしてもだめな場合は薬効分類や作用機序くらいは示すものとする。④同じ被験物質であっても投与方法等が異なれば、重複しても構わない。⑤同じ被験物質について同じ実験を予定している場合はそれらの企業同士で調整する。

これらの基準に従って、各社の被験物質を検討した。その結果を表2に示す。なお、参加企業が多かったことから、ホルモン類についても被験物質として採用した。また、adriamycin、cyclophosphamide、theophylline、reserpine およびホウ素についてはそれぞれ2社で検討したが、それぞれ若干別のプロトコルを採用した。結果として、予備試験段階では24物質、29プロトコルについて試験が実施された。

3) 合格基準の検討

バリデーションを実施するに際し、2週間でも良いとする場合の合格基準について検討し、以下の場合に4週間試験に変わりうるとされた。①4週間試験と同様の用量で同じような精巣毒性が現れた。②4週間試験と同じ用量では精巣毒性は現れないが、用量を増加させることにより同じような精巣毒性が現れた。③4週間試験では精巣毒性は現れないが、2週間試験では現れた。④ホルモン類については短期の試験で精巣毒性が現れないこと予想されることから、2週間試験で4週間試験で認められる変化が認められない場合であっても合格とする。但し、その際はホルモン様の作用には適応できないことを明確にする。

4) バリデーションの中間報告

2月16日に中間報告会を開催し、バリデーション参加企業代表者から、選択した被験物質、プロトコル、予備試験結果、本試験結果について説明された。その報告及び議論を下に略記する。

(エーザイ) 前回のバリデーションで4週間で精巣毒

性の現れた microtubule polymerization inhibitor である Compound E について2週間試験を実施中。2月中に投与、解剖が終了する。被験物質の名称についてはしばらくは公開できない。これについて、名称の公開は努力規定であることからと了解された。

(キッセイ) Methylmethanesulfonate の投与が終了し、2週間投与で精巣と精巣上体重量の低下が認められた。病理組織学的検索は3月中に終了の予定。PCNA ラベリング index を見ること、及び Leydig 細胞を注意深く観察するようコメントされた。

(ゼリア) Ethinylestradiol について、三菱化学の過去のバリデーションで毒性が現れていた用量を基準にプロトコルを作成した。2月中に投与が終了し、3月中に試験が終了する予定。

(ノバルティス ファーマ) aromatase 阻害剤の Fadrozole について予試験が終了。弱いながらも精巣の病理組織学的変化(精母細胞の壊死)の認められた30mg/kg を用いた本試験を行う(2月18日より投与開始)。本試験では、6週齢から2週間投与する群も設け、病理組織学的検査の他に精子検査(運動性、精子数、形態)を実施する予定。

(ヘキスト・マリオン・ルセル) Reserpin について、若干死亡の見られる用量を最高用量として投与中。2月18日に解剖予定。プロラクチンを介した作用が予想される。文献的に作用の認められた通常のSD系ラットを用いず、IGSのSDを用いたこと、および強い作用が期待できないのに4週間投与群の対照群の例数を4匹としたことが問題点と指摘された。

(旭化成) 2-Methoxyethanol について試験を行う。3月17日に解剖。5月中旬に病理組織の観察が終了予定。最終報告は6月中旬の予定。特殊な細胞が特異的に影響されることが知られており、アポトーシスの誘導の可能性があり、検索すると面白い結果が得られるかも知れないとコメントされた。

(杏林) ホウ酸について Crj:Wistar を用いて検討している。用量はマウスで精巣重量の低下、精子遊離抑制の認められた400mg/kg を基準に設定した。投与は既に終了し、精子検査、病理組織学的検索を実施中。なお、武田薬品もホウ酸を用いているが、使用した動物のブリーダー(Jcl:Wistar)が異なる。

(吉富) Haloperidol について過去のバリデーションで Leydig 細胞に変化の認められた用量を基準に用量を設定し、ラットに投与中。最終報告は5月末の予定。Prolactin 産生増加を介して作用するものと思われる。

(興和) Cyclophosphamide について、前回住友製薬が行った検討でゴニアの変化の認められた用量を基準に用量を設定した。作用は弱く、精子の staging が必要であろうとコメントされた。2月中に投与終了。

(三井) Carmofur について精巣の変化が認められた200mg/kg を基準に反復投与での本試験を行ったところ、2週間投与では全例死亡(15/15)。4週間投与群では死亡例は少ない(7/15)。若い時から投与した場合の方が毒性が弱い。また、300mg/kg について単回および週1回投与試験も行う。3月中に観察終了予定。

(三菱化学) Dibromoacetic acid 使用。2週間投与で精巣上体重量が低下。3月中に病理学的検査終了予定。

(参天) Flutamide(非ステロイド性抗アンドロゲン薬)については4日間投与の予備試験で精巣上体重量および精子への影響が認められたが、病理組織学的変化は認められなかったことから、試験の遂行を停止するとの意向が出された。しかし、更に投与を続けた場合作用が現れる可能性もあることから、継続をお願いした。

(山之内) 抗菌剤 Nitrofurazone について本試験の投与終了。精巣及び精巣上体重量の低下が著明であった。病理組織検査は3月末までに終了予定。

(大塚) Cyclophosphamide の単回投与試験。2月9日に解剖終了。臓器重量は余り変わっていない。精子の Staging 分析を含む病理検索は3月中に終了し、最終報告書は4月中に提出予定。

(大日本) Theobromine について Sertoli 細胞の空胞化の認められる250mg/kg を基準に用量設定。2週間投与群で臓器重量が低下。6週令からの投与群では精細管の変化が認められた。8週令からの投与群では明らかな変化は認められない。

(大鵬) Theophylline について予備試験の結果では精巣重量について作用が認められなかったため、別の化合物について検討中と報告されたが、Theophylline 投与群の病理組織学的検索を4週間及び2週間群について行うように依頼した。

(中外) 自社開発の Compound C について検討中。4

週間試験は前回のバリデーション時に実施し、10mg/kg/day 4週間投与で明らかに精巣毒性が認められた。2週間群では10mg/kg 群でも精巣等の変化が肉眼的に認められた。3月中に病理組織学的検査が終了予定。被験物質については要請があれば公開しても良い。

(帝人) Estradiol Benzoate 20µg/kg/day 2週間投与で精巣上体重量低下、50µg/kg/day で精巣、前立腺及び精嚢重量低下が認められた。2週間投与では若干高用量を要したが、本質的に4週間投与と同様の剖検所見、臓器重量の変化であった。

(田辺) アドリアマイシンについて試験実施中。3月9日に剖検予定。

(東レ) Ethynylestradiol について投与終了。2週投与で精巣重量が有意に低下。3月中に試験終了予定。

(東京田辺) Busulfan の作用を検討するとしてしたが、文献の結果が予試験で再現できず、全て死亡した。

(藤沢) Reserpine について試験実施中、剖検は3月2-3日、病理組織学的検査は3月中に終了予定。

(日研化学) Etoposide(DNA 鎖切断作用を有する抗がん剤) 5および10mg/kg iv 1回/週。2週間投与で有意差は無いが、精巣重量が5-10%低下。4週間投与群は2月15日解剖。病理組織学的検討を実施中。

(日本ベーリンガーインゲルハイム) Adriamycin を2、6 mg/kg 単回静注し2及び4週間後に剖検する。精巣等の臓器以外にテストステロンで活性がコントロールされている血清中ブチリルコリンエステラーゼ活性を測定する。2月3日に未成熟群に投与したが、体重抑制以外に特記すべき所見は見られていない。最終剖検は3月18日。

(日本ロッシュ) 5-FU 20、30mg/kg/day を2週間、20mg/kg/day を4週間投与した。いずれの群でも精巣の縮小、軟化、精巣上体、性嚢、前立腺の縮小が見られた。また、精細管の変性が認められた。20mg/kg/day 2週間投与群では精子形成の減少、Sertoli 細胞の空胞化等の変化が認められた。なお、30より20の方が、また、4週より2週の方が強い変化が認められた。これについて高用量では病巣部が既にはがれてしまっている可能性があると指摘された。

(日本ワイスレダリー) theophylline 及び pyrimethamine (葉酸代謝阻害剤、抗マラリア薬) について予備試験を

行ったが、theophylline 300、600mg/kg で死亡例が出たにもかかわらず精巣重量や精子数に影響が認められなかったため、本試験は行わない。精巣重量の軽度の変化が認められた(病理組織像は不変) pyrimethamine について本試験を行う。2月16日より投与開始。

(富山化学) Enoxacin 3000mg/kg/day 2週間経口投与で精巣上体重量が低下した。組織学的には精上皮の変性、多核巨細胞形成、精巣上体に変性/壊死した精上皮の出現が見られた。なお、試薬が高価であるため4週間の投与はできないと報告され、認められた。

(武田) ホウ酸300、500mg/kg/day を Jcl : Wistar に経口投与。500mg/kg/day 2 W 群で精巣重量の低下、精子遊離抑制が認められた。更に精査中。Sertoli 細胞の変化の反映かも知れないとコメントされた。

全体的なコメント：

- 1) 生殖臓器に通常の病理組織学的検索で明確な変化が認められていれば、精子の staging は行わなくとも良い。しかし、option として実施することは構わない。必要があれば、その観察について三森、高橋両氏が相談にのる。
- 2) 6週令からの4週間投与では変化が認められないが、8週令からの2週間投与では変化が認められることがある。

D. 考察：

多くの企業の積極的な参加を得、バリデーションが順調に進行している。但し、全体の集合する班会議では個々の参加機関の試験について検討できる時間が少なく、詳細な検討を行うことは不可能である。そこで、被験物質の特徴に応じて、いくつかのグループに分けて検討会を開催することが望ましい。例えば、ホルモン系薬物 (Ethynylestradiol、Estradiol benzoate、Fadrozole、Flutamide)、中枢性ホルモン作動性物質 (Reserpine、Haloperidol)、細胞障害性悪性腫瘍薬 (Methylmethane sulfonate、Cyclophosphamide、Adriamycin、Etoposide)、代謝阻害性悪性腫瘍薬 (Carmofur、Comp. E.、Comp. P.、5-FU)、一般化学物質 (2-Methoxyethanol、Boric acid、Dibromoacetic acid)、その他 (Nitrofurazone、Theobromine、Theophylline、Pyrimethamine、Enoxacin) に分け