

げられたため、調和対象は11試験法となっている。

生物薬品関連試験法は、上記の薬局方既収載項目の調和とは異なり、未収載項目の調和に該当するものである。各薬局方に収載された後の調和には既収載であるが故の種々の困難が経験されたことから、収載前に調和を図ることにより効率的な薬局方調和を期待するものである。調和項目として、バイオテクノロジー応用医薬品各条及び関連試験法が計画されたが、その後、医薬品各条は棚上げ状態となり、現在は生物薬品関連の6試験法について調和が進められている。

なお、3局の調和合意署名に至ったBacterial endotoxins及びPolyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)は、1999年度の成果として特筆すべきものである。

2000年3月現在の分野別調和状況は以下のとおりである。[]内はCoordinating Pharmacopoeiaを、行末は調和の現Stageを示す。なお、Stage 5A/2はStage 5A document第2版を意味する。

4. ICH Q6Aガイドライン関連試験法の調和状況

ICHとの協調の下に調和を検討している試験法の調和には急速な進展が見られているが、専らPDGが調和を進めている試験法では、エンドトキシン試験法は調和合意に至ったものの、未だ調和の初期段階を低迷しているものもある。

① Dissolution [USP], Stage 2

ICH EU/EP Task Force による調和提案に基づき2000年3月に3極の合意が形成されたことにより、溶出試験法の薬局方調和が急速に進むことが期待される。

② Disintegration [USP], Stage 2

溶出試験と同様に、ICH EU/EP Task Force による調和提案に基づき2000年3月に3極の合意が形成されたことにより、崩壊試験法の薬局方調和が急速に進むことが期待される。

③ Microbial contamination [EP], Stage 2

微生物限度試験法の薬局方調和はICHにおける合意形成の後に開始される。ICH US Task Forceによる調和提案が2000年3月に配布され、2000年中には3極の合意が見込まれているので、薬局方調和までにはある程度の期間が必要と考えられる。

④ Uniformity of content [USP], Stage 2

ICH Japan Task Force による調和提案に基づき、2000年3月に含量均一性試験法の判定基準の3極合意に至った。これを取り込んだ薬局方調和が急速に進むことが期待される。

⑤ Uniformity of mass [USP], Stage 2

ICH Japan Task Force による調和提案に基づき、2000年3月に重量偏差試験法の判定基準の3極合意に至った。これを取り込んだ薬局方調和が急速に進むことが期待される。

⑥ Bacterial endotoxins [JP], Stage 6

1999年11月に3局の合意署名を完了し、合意署名薬局方調和第1号となった。現在各薬局方は合意内容を取り込んだ改正に向けて作業中である。

⑦ Colour/clarity [EP], Stage 2

当初提案された調和試験法が標準品の品質に問題があることが判明したため、調和は振り出しに戻り、調和提案待ちの状態にある。

⑧ Extractable volume of parenterals [EP], Stage 4

⑨ Particulate matter [EP], Stage 4

⑩ Residue on ignition/Sulphated ash [JP], Stage 5A

調和試験法についての3局の内諾が得られた状態であり、2000年7～11月には合意署名に至ることが期待される。

⑪ Sterility [EP], Stage 4

1999年10月に開催された初回の薬局方調和3局専門家会合における調和協議の結果を反映した第2次調和案が各薬局方に配布され、目下検討中である。

5. 理化学試験法の調和状況

ICH Q6Aガイドライン関連試験法として調和が進められているColour/clarity [EP], Residue on ignition/Sulphated ash [JP]の他には、下記の試験法が調和項目として採択されている。

① Conductivity : 3局調和済みである。

② Heavy metals [USP], Stage 2

純度試験に重金属を規定する方針及び試験法（原子吸光度法のような特異性の高い測定法により各重金属の限度を個別に規定するか、硫化物法のような総重金属測定法により包括的に規定するか）に關

する調和が求められているが、調和案の提示には至っていない。

③ Organic volatile impurities

残留溶媒試験法は3局に規定されており、相互に若干の相違点はあるものの、調和の必要性の認識は低い。調和対象としての存在意義を再検討する必要があると考えられる。

6. 微生物関連試験法の調和状況

ICH Q6Aガイドライン関連試験法として調和が進められているMicrobial contamination [EP], Bacterial endotoxins [JP], Sterility [EP]以外の調和対象項目としてPreservative effectiveness (Efficacy of antimicrobial preservatives) [EP], Stage 5Aがある。保存効力試験の試験法については調和が進んではいるが、本試験法の適用対象について薬局方間の方針の違いがあり、調和の目途は立っていない。

7. 製剤試験法の調和状況

ICH Q6Aガイドライン関連試験法として調和が進められているDissolution [USP], Disintegration [USP], Uniformity of content [USP], Uniformity of mass [USP], Extractable volume of parenterals [EP], Particulate matter [EP] 以外の調和対象項目は、

- ① Friability of tablets [USP], Stage 3
- ② Inhalation [EP], Stage 2 (?)

である。

8. 物性試験法の調和状況

ICH Q6Aガイドライン関連試験法として調和が進められているものはない。

- ① Analytical sieving [USP], Stage 3
- ② Bulk density/Tapped density [EP], Stage 2
- ③ Density of solids : Bulk density/Tapped densityに統合された
- ④ Flowability [USP], Stage 3
- ⑤ Optical microscopy [USP], Stage 3
- ⑥ Powder fineness [USP], Stage 3
- ⑦ Specific surface area [EP], Stage 2

9. 生物薬品関連試験法の調和状況

ICH Q6Aガイドライン関連試験法として調和が進められているものはない。

- ① Amino acid determination [USP], Stage 4
- ② Capillary electrophoresis [EP], Stage 4
- ③ Isoelectric focusing [EP], Stage 3
- ④ Protein determination [USP], Stage 4
- ⑤ Peptide mapping [USP], Stage 4
- ⑥ Polyacrylamide gel electrophoresis [EP], Stage 6

10. 医薬品添加剤の調和状況

国際的に汎用されている医薬品添加剤約40品目について1990年以来調和作業を継続しているものであるが、合意目前のStage 5で停滞しているものが約半数を占めている。各条の全ての項目を3局共通にすることを前提に進められてきたが、各薬局方に固有の方針に拘束され歩み寄りに手間取っていることが大きな原因と思われる。これを克服するには、調和が困難な部分を当面除外し、各薬局方が合意しうる項目を抽出し、その試験方法と規格値を明示的に調和することが現実的な方策と考えられる。

Alcohol/Ethanol [EP], Stage 5A

Benzyl alcohol [EP], Stage 5A

Calcium disodium edetate [JP], Stage 5A/2

Calcium phosphate, dibasic [JP], Stage 5A/2

Calcium phosphate, dibasic, anhydrous [JP], Stage 5A/2

Carboxymethylcellulose calcium [USP], Stage 4

Carboxymethylcellulose sodium [USP], Stage 2

Carboxymethylcellulose sodium, cross-linked [USP],

Stage 5A

Cellulose, microcrystalline [USP], Stage 5A

Cellulose powdered [USP], Stage 5A

Cellulose acetate [USP], Stage 5A

Cellulose acetate phthalate [USP], Stage 5A

Citric acid, anhydrous [EP], Stage 5A

Citric acid monohydrate [EP], Stage 5A

Crospovidone [EP], Stage 4

Ethylcellulose [EP], Stage 5A/2

Hydroxyethylcellulose [EP], Stage 5A

Hydroxypropylcellulose [USP], Stage 3

Hydroxypropylcellulose, low-substituted [USP], Stage 3
Hydroxypropylmethylcellulose [JP], Stage 4
Hydroxypropylmethylcellulose phthalate [USP], Stage 5A
Lactose, anhydrous [USP], Stage 5A
Lactose monohydrate [USP], Stage 5A
Magnesium stearate [USP], Stage 5A/2
Methylcellulose [JP], Stage 4
Methyl parahydroxybenzoate [EP], Stage 5B
Petrolatum [USP], Stage 3
Polyethylene glycols [USP], Stage 3
Polysorbate 80 [EP], Stage 4
Povidone [JP], Stage 5A
Saccharin calcium [USP], Stage 5A
Saccharin, free [USP], Stage 5A
Saccharin sodium [USP], Stage 5A
Silicon dioxide [JP], Stage 4
Silicon dioxide, colloidal [JP], Stage 4
Sodium chloride [EP], Stage 5B
Sodium starch glycolate [USP], Stage 5A
Starch, maize [USP], Stage 5A
Starch, potato [EP], Stage 5A
Starch, rice [EP], Stage 5A
Starch, wheat [EP], Stage 5A
Stearic acid [EP], Stage 3
Sucrose [EP], Stage 5A
Talc [EP], Stage 5A
Titanium dioxide [JP], Stage 5A
Ethyl parahydroxybenzoate [EP], Stage 3
Propyl parahydroxybenzoate [EP], Stage 3
Butyl parahydroxybenzoate [EP], Stage 3
Glycerol [USP], Stage 2

11. 今後の動向

ICH 専門家会合と PDG との協調により Q6A ガイドライン関連試験法の調和が急速に進展したことにより、PDG と薬局方利用者である製薬業界及び規制当局との連携が薬局方調和の推進に極めて有効であることが実証された。ICH 専門家会合は、ICH と PDG の協調関係を今後も継続することを 2000 年 3 月の ICH 運営委員会に提案し、了承された。Q6A ガイドライン関連試験法

に止まることなく、製薬業界及び規制当局の薬局方調和への参画が期待される。

これまでの調和のための意見交換や調整は専ら文書交換により進められてきたが、微生物試験法及び生物薬品試験法の調和に関する専門家会合が 1999 年 10 月に試験的に開催され、多くの懸案事項の解決を見た。この実績を踏まえて専門家会合の開催を調和手順に取り入れることが予測される。

ICH との協調及び専門家会合の開催により、妥当な合意が時機を失することなく成立することが期待される。

C. 考察

PDG による薬局方調和については「名ばかりで実効が上がない」との評価がある。医薬品添加物各条の一部について、3 局が調和したとの認識が一時的にはあったが、互換性のある調和とは言い難いものであった。この 10 年間の明示的な成果は、調和 10 年目の 1999 年に合意署名されたエンドトキシン試験法及びアクリルアミド電気泳動法の 2 項目に過ぎず、頭記の評価を重く受け止めなければならない。しかし、この 10 年間 PDG は歴史や薬事規制上の位置づけが全くといってもよいほど異なる薬局方間の調和に向けて真摯な努力を重ね、貴重な経験を重ねてきたことも事実である。

10 年間の経験を ICH との協調や専門家会合の導入等の新たな局面に生かすことにより、薬局方利用者の要請に十分に応えうる「21 世紀の薬局方国際調和」が進展することが期待されるが、それには次のような点についても考慮することが必要であると考えられる。

1. 薬局方調和方針の見直し

薬局方調和は、1995 年に PDG 合意した「調和方針」に沿って進められているが、その基本である“The goal is harmony, not unison”の理解に、PDG と薬局方利用者の間にかかなりの乖離があり、これが実効が上からないとされる一因であると考えられる。薬局方調和は利用者の利便を図ることが目的であり、利用者の求めるものは、規制当局が認める互換性 (Regulatory interchangeability) であると理解される。薬局方の薬事規制上の役割には地域差があり、特に、日本薬局方には

国際的互換性の保証は馴染まないとされている。したがって、薬局方調和は科学的な同等性（Scientific equivalency）の保証を基本として進め、薬事規制上の互換性の保証には、各地域毎に薬局方と薬事規制との関係に応じた対応がとられるべきであろう。

したがって、PDGにおける薬局方調和の目的、並びに役割とその限界が薬局方利用者にも明確となるように、「調和方針」の見直しが必要と考えられる。

2. 薬局方調和手順の見直し

長期間にわたる協議の末に薬局方調和手順が合意されているが、さらにICHとの協調、専門家会合の開催、合意署名文書の公開等を盛り込んだものに改定することが必要と考えられる。

3. 事務手続き手順の明確化

これまでの薬局方調和は、手探り状態であったこともあり、3局間の十分な相互理解と共通認識なしに、調和作業を強引に押し進めてきたきらいもある。このため、功を急いだ「早とちり」や「独り合点」に起因すると思われる混乱や行き違いによる調和の停滞も少なからず経験された。

PDGは薬局方調和を総括する組織であるが、事務上の混乱を收拾すべき事務局に相当する機能に乏しいので、これを補完するため、各薬局方の十分な合意の下に、文書交換等の事務手続きの手順書（SOP）を策定し、3局がこれを遵守することが必要であると考えられる。

4. 調和項目の整理と優先項目の選定

Q6Aガイドライン関連試験法の調和が急速に進展したことの要因は、各薬局方が重点的にこれに取り組んだことにあると思われる。現在調和項目とされている80に上る項目の調和を同時並行的に進めることは、特に日本薬局方のように、薬局方事務局機能が限定された薬局方には大きな負担となり、調和の停滞につながりかねない。不急の調和項目の整理による各薬局方事務局の負担軽減及び重点項目の優先処理による調和の効率化が望まれる。

5. 日本薬局方の今後の対応

日本薬局方は、ICH Q6Aガイドライン関連試験法であるエンドトキシン試験法及び強熱残分試験法のCPとしての役割を十分に果たし、調和の実をあげている実績はあるものの、これまでの日本薬局方の薬局方調和への対応は、個人の奉仕精神への依存度の高いものであり、日本薬局方事務局の主体的な関与に乏しく、また継続的な責任を負うべき立場が不明確であったため場当たりの対応とならざるを得ない面があったことは否定できない。薬局方委員会においても、薬局方調和を日本薬局方の付加的な事項として受け止め、日本薬局方改正とは切り離れた対応がとられてきた傾向があり、薬局方調和の日本薬局方への反映が十分とはいえないとの理解もある。

このような現状の改善には、次のような基本的な事柄が確実に実行されることが必要不可欠と考えられる。

- ① 事務局が、常時、薬局方調和の進捗状況を的確に把握し、関係者に周知すること
- ② 薬局方委員会が、時機を失することなく国際調和案を審議すること
- ③ 日本薬局方の意見を、他薬局方に遅滞なく正確に伝達すること
- ④ 国際調和の成果を日本薬局方改正に迅速に反映すること

今後に予測される薬局方調和の急速な進展に的確に対応し、主体的に関与することにより薬局方調和における日本薬局方の存在を十分に内外に示して行くためには、日本薬局方事務局及び関連委員会が、薬局方調和は日本薬局方改正の一部にほかならないことを十分に認識し、薬局方調和に組織的に取り組むことが必要であると考えられる。

D. 研究発表

なし

E. 知的所有権の取得情報

なし

Ⅲ. 分担研究報告（安全性部門）

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業） 分担研究報告書 動物実験等による薬物代謝及び安全性評価等 のための国際共同研究(総括報告)

分担研究者：黒川 雄二（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長）
研究協力者：三森 国敏（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）
林 真（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変異遺伝部長）
藤森観之助（国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部長）
大野 泰雄（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薬理部長）

要旨

医薬品規制ハーモナイゼーション推進国際共同研究事業の一環として医薬品の安全性の観点から、新しい3年計画の第2年度として、本年度は下記の課題の研究を遂行するため、国内において班会議を開催し、かつ海外における専門家会議等に参加した。

- S1B 癌原性試験の適用とその評価法の確立（三森研究協力者）
- S2B In vitro染色体異常試験の代替としてのin vitro小核試験の評価（林真研究協力者）
- S7 一般薬理試験ガイドラインのハーモナイゼーション推進（藤森研究協力者）
- M3 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（大野研究協力者）

本総括報告書では、各課題の進捗状況と総括的な問題点を、今年度開催された各種会議における議論と関連づけて述べた。具体的な研究内容については、各々の報告書を参照されたい。

キーワード：ICH、医薬品規制ハーモナイゼーション、安全性評価

A. 研究目的

新医薬品承認申請資料の国際的ハーモナイゼーション推進のための話し合いが1991年から進められている。その目的は、日・米・EU三極間の医薬品規制に係る障害を慎重かつ十分な科学的な裏付けのもとに取り除くための国際共同研究を実施するとともに、新医薬品の研究開発の促進と優れた新医薬品の患者への迅速な提供を図ることである。

本研究班は、医薬品の安全性の観点から各種毒性試験の方法及びガイドラインをハーモナイズするために

必要な研究を行うことを目的として平成4年度より開始されたものである。なお平成8年度より新たに、一般薬理及び薬物動態試験のハーモナイゼーション推進に関する研究班が組織された。これは日本には独自の当該ガイドラインが存在するが、米国、EUにはガイドラインが存在せず、三極間にギャップがあることが認識されたためである。

B. 研究方法

ICHおよび同運営委員会SCならびに専門家委員会

EWGにおいて提起された問題を中心に、国内外の関連行政機関・製薬企業・学会等と緊密な連絡を保ちつつ、医薬品を対象とする各種毒性試験法あるいはそのガイドラインの国際的ハーモナイゼーション実施をするに当たっての問題点を解決するために必要な調査・研究を行なった。研究成果のICH及び国内現行ガイドラインへの反映を積極的に推進するために、班員による定期的な会議の他に、EWGに参加・発表して三極の専門家と討議を行った。

C. 研究結果

本年度は新たな3年計画の第2年度にあたり、4つの研究課題を設定し（S4B 反復投与毒性試験の適用とその評価法の確立；広瀬雅雄研究協力者は、昨年度で終了した）、4名の研究協力者に加えて産官学からの36名の協力研究者の参画を得て活発な研究・調査・討議を行い、それらの研究結果は、後記のように各々の研究協力者の報告書として纏めたが、以下にその要約を列記する。

S1B 癌原性試験の適用とその評価法の確立（三森研究協力者）

ヒト型c-Ha-ras遺伝子導入マウス（rasH2マウス）、片側のp53遺伝子を欠損させたC57BL p53^{-/-}マウス、活性型v-Ha-ras遺伝子を胎児型 γ -globinプロモーターとSV40と共に導入したTg.ACマウスおよび色素性乾皮症修復遺伝子を欠損させたXPA^{-/-}マウスなどの遺伝子改変動物を用いた短期がん原性試験についての我が国および外国での最新情報をまとめると共に、国立医薬品食品衛生研究所病理部で実施されたrasH2とp53^{-/-}マウスを用いた研究成績をまとめ、これらの有用性について検討した。その結果、遺伝毒性発がん物質の検出に非常に感受性が高いとされるrasH2およびp53^{-/-}マウスにおいても、必ずしもすべての遺伝毒性発がん物質を検出できる訳ではないことが示された。また、これらのモデルの発がんメカニズムについては未だ不明な点があり、これらを明確にする研究が今後必要である。Tg.ACマウスやXPA^{-/-}マウスは未だ検証作業が十分ではなく、その有用性を評価するにはさらなるデータの

蓄積が必要である。また、遺伝子改変動物の発がん標的性および感受性はそれぞれ異なることが明らかになったことから、短期発がん試験モデルを用いて発がん性を評価する場合には、使用する系統や遺伝子操作などの違いを充分考慮すべきである。

S2B In vitro染色体異常試験の代替としてのin vitro小核試験の評価（林真研究協力者）

In vitro染色体異常試験の代替法として、in vitro小核試験への関心が高まっている。In vivoの試験系においては、げっ歯類の骨髄細胞を用いる染色体異常試験が、幼若赤血球の小核を観察し、数量化する小核試験が主流になっている。In vivoにおいては標的細胞を取り巻く微細環境は生体のホメオスタシスによりある程度恒常性が保証されている。しかし、in vitroにおいては、培養環境の制御は人為的に可能である反面、非常に多くの要素が細胞の状態を左右している。微小環境の制御の難しさ、細胞が生理的な状況で暴露されたか否か、生体で起こる代謝活性化・不活性化が適切になされているか、観察細胞集団が正確に規定されているか、等々不確定要素がいまだに未解決のまま残されている。一方で、OECDでのガイドライン化、ICHのS2における検討等、国際的なハーモナイゼーションの動きが活発化している。本研究は、国際的な共同研究（SFTG）の一環として、in vitro小核試験の評価を行うと共に、最適な試験条件の設定のための基礎データの収集を目的とする。本年度は9種類のモデル物質について検討し、染色体の構造・数的異常を誘発する物質はすべて陽性と評価することが出来た。また、陰性対照として用いた染色体異常を誘発しないことが知られている物質では明らかな小核誘発性は認められなかった。次に、観察対照細胞を限定するために、Cyt-B添加の有無について検討した結果、質的な差は認められなかった。検体の処理時間に関しては、短時間処理では陽性とはならず長時間の連続処理で初めて陽性となるものがあり、特に染色体の数的異常を誘発する物質にその傾向が強かった。同じ化合物を試験した2機関で定量的には差が見られたものの、定性的な差はなかった。

M3 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（大野研究協力者）

医薬品候補物質の雄性生殖臓器への毒性影響の有無を検討するための反復投与毒性試験の投与期間が2週間で十分か否か評価するためのバリデーションを実施した。参加企業は当初製薬協参加の医薬品企業28社で、核酸修飾剤、細胞分裂阻害剤、代謝阻害剤、抗感染症薬、ホルモン類及びその拮抗薬、その他の医薬品及び化学物質、合計24物質、30プロトコールについて2週間及び4週間試験の結果を比較した。その結果、予備試験あるいは本試験において4週間投与でも生殖臓器に明確な影響の見られなかったtheophyllineおよび予備試験で報文結果を再現出来ず、全ての動物が死亡してしまったBusulfanの場合を除き、いずれの薬物及びプロトコールにおいても4週間試験で認められた毒性と同様の結果が4週間試験と同じ用量或いはより高用量を用いた2週間試験においても認められた。この結果から、2週間試験においても精巣毒性物質の雄性生殖器官への影響の検出が可能であると結論された。

S7 一般薬理試験ガイドラインのハーモナイゼーション推進（藤森研究協力者）

平成11年度のICH推進における研究成果は「ICH-S7: 安全性薬理試験ガイドライン」をStep 0からStep 2にしたことである。平成8年度から医薬品等国際ハーモナイゼーション推進のための研究（ICH）として始まった研究は第1期に現行一般薬理試験ガイドラインの改正案として「安全性薬理試験ガイドライン案」を作成し、平成10年度から第2期に入り、平成10年度には「安全性薬理試験ガイドライン」のICHにおける正式議題化を実現し、平成11年3月のブラッセルでのICH-EWG会議よりS7としてガイドライン化への作業を開始した。以来、8月の東京での臨時S7-EWG会議でStep 1に、10月のワシントンEWG会議を経て、平成12年3月の東京EWG会議でステップ2安全性薬理試験ガイドラインをsign offに到達させた。ICHガイドラインを現行一般薬理試験ガイドラインと比較すると、その特徴は（1）安全性薬理に焦点を絞っている；（2）必須試験

としてCoreのBattery試験を行う；（3）GLPを適用することにある。短時日でICHハーモナイゼーションが順調に進行した理由として、第1期班研究において国際的に受け入れうるガイドライン改正案として作成し、ICHに日本案として提出した「安全性薬理試験ガイドライン案」の存在とそれまでに至る研究班の討議基盤が大きな促進要因と考えられる。本年度の研究班の活動は、一連のICH-EWG会議で作成された各ステップのICHガイドライン案について、国内での企業サイドと規制サイドの試験実行面あるいは評価課程に関する問題およびGLP適用面での実施の可能性の問題などに関して検討し、次案への対応を行いICH推進を支援したことである。本年度の最大の成果は本研究班の成果が先導となった「安全性薬理試験ガイドライン」のICHにおけるStep 2文書化である。平成12年度の計画はStep 2 ICH-S7ガイドライン文書を和訳し、国内コメントを集め、次回ICH-EWG会議で3極からのコメントの討議・調整を図り、Step 4にすることである。

D. 考察・結論

研究の総括として、これまでの経緯及び現時点における安全性部門の活動内容について記す。

ICH-1（1991年11月、ブルッセル）では、急性毒性試験法に関して概略の致死量を求めること、及び用語の定義についての三極間の合意が得られた（S4）。さらに、長期反復投与試験法に関しては、げっ歯類の投与期間を6ヶ月にすることに関して三極間の合意が得られ、これに伴い日本のガイドラインが部分的に改訂された（S4）。1993年3月のワシントンEWGでは、生殖発生毒性試験法の統一化についての三極の合意が得られ、日本のガイドラインとしても有効なものとして1994年7月に公表された（S5A）。

ICH-2（1993年10月、オランダ）において三極間でほぼ合意に達し、その後1994年10月のEWGで調印されたガイドラインは、①癌原性試験法の中、用量設定に関する方法（S1B）、②遺伝毒性試験法の中のガイダンス（S2A）、③トキシコキネティクスのガイドライン（S3A）、④トキシコキネティクスの臓器分布に関するガイドライン（S3B）である。即ち、ICH-3までに7つのガイドラインがStep 5に達した（ただし、

未だガイドラインの一部が合意に至らないものも含む)。

ICH-3 (1995年12月、横浜)では、癌原性試験法の中、必要な条件に関するガイドライン (S1A)、雄授精能の評価法に関するガイドライン (S5B) が、Step 4 に達した。

ICH-4 (1997年7月、ブリュッセル)においては、懸案の、癌原性試験法の中、いわゆる2つの動物種の使用に関する問題 (S1B)、限界量の設定 (S1CR)、遺伝毒性試験法の標準バッテリー (S2B)、バイオ医薬品の安全性試験 (S6)、毒性試験と臨床試験のタイミング (M3) に関する5つのガイドラインが、Step 4 に達した。しかし、非げっ歯類の反復投与期間に関する問題 (S4B) は、Step 2の段階に留まった。

その後、S4BもStep 4の合意に達し、現時点までに、生殖発生毒性、トキシコキネティクス、遺伝毒性、がん原性、反復投与毒性、バイオ医薬品及び臨床試験とのタイミングについてのガイドラインが次々と公表・通知されている。残るは、Step 2段階にある安全性薬理試験ガイドラインを、ICH-5 (2000年11月) を目途にStep 4に進ませることである。

91年に開始されたICHも既にまる9年を経過し、すでに多くのガイドラインが三極で運用されている現状である。従って今後の課題は、公布されたICHガイドラインをいかに実践しより有効に運用するかにあると思われる。即ち、「ガイドライン解釈の国際的調和」であり、さらに安易にガイドラインそのままを運用しないような「脱チェックリスト的感觉」が重要であろう。これはあらゆるガイドラインについて言える、「より科学的に、効率的に、主体的に」運用する態度とも言える。このような認識から、安全性に関わる各種学会でもICHのガイドラインに関するシンポジウム等が

行われてきている。就中、日本トキシコロジー学会では、既に「毒性試験の国際化と今後の課題」、

「Biotechnology-derived Productsの毒性試験の現状と将来の展望」、及び「ヒトへのFirst trialについて。ヒト Screening studyの導入に関する毒性学的論点」の3つのワークショップを開催し、ICHにおける最新情報の伝達と理解に努めており、その集大成として「ICHガイドラインの果たした役割と問題点」及び「安全性薬理試験のあり方」が、2000年6月の同学会年会で開催される。その他にも、日本トキシコロジー学会はその機関誌The Journal of Toxicological Sciencesの学会情報に、Topics on Regulatory Toxicologyと題するセクションを設けているが、そこにもICH関連の最新情報を提供している。

当研究班は、平成4年度から11年度にかけて、延べ48の研究課題 (研究協力者48名) に対して、延べ371名の協力研究者の参画を得てきた。その内訳は、産131名、官96名、学144名である。48研究課題のうち、特に実験の実施を伴ったものは、4週間投与による雄性授精能評価 (S5B) を皮切りに、癌原性試験における2種動物 (S1B)、マウスリンフォーマ試験の有用性 (S2B) があり、現在、小核試験の評価 (S2A) 及び2週間投与による雄性授精能評価 (M3) が継続中である。このことはこれまでの三者による協同研究・調査が極めて円滑に行われて来たことの結果である。と同時に、産官学の安全性評価・トキシコロジー関係者のより緊密な関係を作り上げることになったのは、ICHのいわば素晴らしい副産物と言え、今後も様々な分野においてより一層の協力体制を維持できることと思われる。なお、今後これらの研究成果は、ICHメンテナンスコーディネーターを通じて、当該ガイドラインへの改訂となって反映されることになる。

遺伝子改変マウスを用いた 短期発がん性試験についての情報収集

研究協力者：三森 国敏（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）
協力研究者：林 裕造（北里大学薬学部客員教授）
野村 達次（財団法人実験動物中央研究所所長）
白居 敏仁（財団法人実験動物中央研究所専門研究員）
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部長）
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）
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部長）
梅村 隆志（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主任研究官）
林 真（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変異遺伝部部長）
岡宮 英明（山之内製薬株式会社安全性研究所室長）
西川 智（協和発酵工業株式会社安全性研究所室長）
務台 衛（三菱東京製薬株式会社安全性研究所主管研究員）

要旨

ヒト型c-Ha-ras遺伝子導入マウス（rasH2マウス）、片側のp53遺伝子を欠損させたC57BL p53^{+/+}マウス、活性型v-Ha-ras遺伝子を胎児型 κ -globinプロモーターとSV40と共に導入したTg.ACマウスおよび色素性乾皮症修復遺伝子を欠損させたXPA^{+/+}マウスなどの遺伝子改変動物を用いた短期がん原性試験についての我が国および外国での最新情報をまとめると共に、国立医薬品食品衛生研究所病理部で実施されたrasH2とp53^{+/+}マウスを用いた研究成果をまとめ、これらの有用性について検討した。その結果、遺伝毒性発がん物質の検出に非常に感受性が高いとされるrasH2およびp53^{+/+}マウスにおいても、必ずしもすべての遺伝毒性発がん物質を検出できる訳ではないことが示された。また、これらのモデルの発がんメカニズムについては未だ不明な点があり、これらを明確にする研究が今後必要である。Tg.ACマウスやXPA^{+/+}マウスは未だ検証作業が十分ではなく、その有用性を評価するにはさらなるデータの蓄積が必要である。また、遺伝子改変動物の発がん標的性および感受性はそれぞれ異なることが明らかになったことから、短期発がん試験モデルを用いて発がん性を評価する場合には、使用する系統や遺伝子操作などの違いを充分考慮すべきである。

キーワード：短期がん原性試験、遺伝子改変マウス、rasH2マウス、p53ノックアウトマウス、Tg.ACマウス

A. 研究目的

1997年のICH4での新しいがん原性試験ガイドラインの策定により、我が国においても1999年11月に医薬品についてのがん原性試験ガイドラインがこのICHガイドラインに準拠して大幅に改定された。このガイド

ラインによると、従来の2種のげっ歯類を用いた試験を実施する代わりに、一種のげっ歯類のがん原性試験の実施に加えて、トランスジェニック（Tg）やノックアウト（KO）マウスなどの遺伝子改変動物を用いた短期発がん試験モデル、イニシエーション・プロモ

ーションモデルや新生仔動物モデルの中から一つの試験を実施してがん原性を評価することが可能である。

遺伝子改変動物を用いた短期発がん性試験法として、ヒト型c-Ha-ras遺伝子導入Tgマウス (rasH2マウス) モデルの有用性についての研究がわが国で、がん抑制遺伝子p53の片側のアレル (exon5) を欠損させたC57BL p53^{+/+}マウス (p53^{+/+}マウス) や活性型v-Ha-ras遺伝子を胎児型 γ -globinプロモーターとSV40と共に導入したTg.ACマウスを用いた試験モデルの有用性についての研究が米国で実施されてきている。また、国際生命科学協会 (International Life Science Institute; ILSI) の1部門であるHealth and Environmental Science Institute (HESI) が日米欧の製薬企業や受託研究機関からの参画を募り、1997年にAlternatives to Carcinogenicity Testing Subcommittee (ILSI-HESI ACT) を発足させ、遺伝子改変動物ならびに新生児動物モデルのがん原性評価法の有用性について検討している。

本研究班では、rasH2、p53^{+/+}、Tg.ACおよび色素性乾皮症修復遺伝子を欠損させたXPA^{+/+}マウスを用いた短期がん原性試験についてのILSI-HESIを含めた外国での最新情報をまとめた。また、rasH2と p53^{+/+}マウスを用いた試験研究を国立医薬品食品衛生研究所病理部で継続していることから、それらの試験成績も含めて遺伝子改変動物を用いたがん原性評価法の有用性について評価を行った。

B. 研究方法

米国National Toxicology Program (NTP) では、p53^{+/+}モデルとTg.ACモデルの検証作業が先行しているため、それらのデータを収集し、これらのモデルの有用性について考察した。

ILSI-HESI ACTでは、およそ40の民間企業と米国NIEHSが加わり、医薬品を中心に18品目の化合物について、p53^{+/+}モデル、Tg.ACモデル、rasH2モデル、XPA^{+/+}モデルならびに新生児モデルのがん原性評価法としての有用性を検討している。このプロジェクトでは2000年11月にワークショップを開催し、検証成績をまとめることになっていることから、平成11年度までに得られたデータを収集し、当研究班でその現状を把握すると共に、有用性について考察した。

種々の遺伝子改変動物を用いた短期発がん試験モデルでは、その遺伝子改変動物の種類によって発がん標的性が異なるものと考えられる。しかし、その種のデータは著しく少ないことから、国立医薬品食品衛生研究所病理部で実施されたp53^{+/+}モデルおよびrasH2モデルにN-ethyl-N-nitrosourea (ENU) を投与した実験成績を基に、その発がん標的性の違いについて検討した。

C. 研究結果

(1) 検証成績

rasH2マウスモデル： ILSI-HESI ACTのrasH2モデルの試験は日米欧の製薬企業が中心になって実施しており、表1に示すように、全部で28試験が行われている。一部終了しているものもあるが、大部分は投与、剖検、鏡検が終了しているものの、レビューは未完了の試験が多い。以下に病理診断の確定したものについて報告する。Cyclophosphamide では、試験デザインを変えた4試験が行われ、1、3、10mg/kgを週5日26週間経口投与した試験において、10mg/kg群で肺腺腫の発現が有意差に増加した。一方、50、100、150 mg/kgを週一回26週間経口投与した試験では、雌の150mg/kg群で有意の肺腺腫の発現、雌の全投与群でハーダー氏腺の腺腫が有意に増加した。また、この試験の雌では50、100mg/kg群で膀胱の移行上皮の乳頭腫、癌が有意に増加した。Diethylstilbestrolでは、用量設定を変えた2試験が行われ、飼料中0.1、0.3、1.0 ppmで26週間投与した試験の最高用量群で精巢間細胞腫瘍が4/15例にみられた。なお、同腫瘍は、同時に実施した同腹仔NonTgマウスの1.0ppmでも発生した。Phenobarbitalでは、500、1000、1400 ppmの混餌投与を行ったが、有意な腫瘍発現は認めなかった。Clofibrateでは、125、250、500 mg/kgを週7日26週間強制経口投与した結果、雄の250、500mg/kg群に肝細胞腺腫が3例ずつ発現した。Chlorpromazineでは、0.05、0.1、0.2% の26週間混餌投与した結果、有意な腫瘍の増加はなかったが、雄の最高投与群で脾臓の血管肉腫の頻度が増加した。Di (2-ethylhexyl) phthalateでは、飼料中に1500、3000、6000 ppm の用量で26週間摂取させた結果、雄で肝細胞腺腫を発生した個体が、それぞれ1/15、2/15、4/15例認められた。

表1 ILSI-HESI ACTにおけるrasH2マウスモデルのバリデーシンの現状

Class	Compound	Status	Results
Genotoxic Human Carcinogens	Cyclophosphamide	Terminated	Positive
	Melphalan	Terminated	Equivocal
	Phenacetin	Terminated	Positive
Immunosuppressant Human Carcinogens	Cyclosporin A	Terminated	Negative
Hormones	Diethylstilbestrol	Terminated	Positive
	17Beta-Estradiol	Ongoing	
Rodent Carcinogens/ Putative Human Non-carcinogens (Epidemiology)	Clofibrate	Terminated	Positive
	Dieldrin	Not going	
	Phenobarbital	Terminated	Negative
	Reserpine	Ongoing	
Rodent Carcinogens/ Putative Human Carcinogens (Mechanism)	Chloroform	Ongoing	
	Chlorpromazine	Terminated	Equivocal
	Haloperidol	Terminated	Negative
	Metaproterenol	Ongoing	
	Methapyrilene	Ongoing	
	Sulfamethoxazole	Terminated	Negative
	WY-14,643	Not going	
Non-Carcinogens	Ampiciline	Terminated	Negative
	D-Mannitol	Not going	
	Sulfisoxazole	Terminated	Negative

P53 KOマウスモデル：p53^{+/+}マウスモデルのバリデーシオン研究は、NTPの発がん性評価研究の一環として実施されている。NTPの評価化合物（主に一般化学品）は、総計50品目（実施中、予定含む）以上に達し、NTPが従来実施してきた長期がん原性試験との比較検討が可能なデータベースが構築されつつある。表2にNTPにおけるバリデーシオン試験成績を、表3にILSI-HESI ACTにおける中間成績を示す。同プロジェクトでは、現在（2000年3月）約2/3の実験が完了しているとのことであるが、個々の実験成績については明らかにされていない。

Tg.ACマウスモデル：本モデルは、従来皮膚発がんモデルとして検証が進められてきた。投与経路を経口に変えることにより、全身を標的臓器としたモデルとしての可能性が期待されており、NTPにおいては一部の化合物で経口投与の試験が行われている。また、ILSI-HESI ACTではすべての試験化合物について、皮

膚適用および経口投与の2経路を用いて有用性検討がなされている。本モデルは、一時期、不十分な遺伝的統御により導入遺伝子が不活性な動物が試験に供され、検証試験の実施が危ぶまれた。その後、動物の生産・管理体制の整備や遺伝子検査の実施などの対応策が図られ、バリデーシオン研究の推進上の障害とはならなくなっている。

表2にNTPにおけるバリデーシオン試験成績を示す。Tg.ACモデル（皮膚適用）は遺伝毒性発がん物質に高感受性を示すのみならず、多くの非遺伝毒性物質に対しても陽性を示すことが明らかになっている。例外は、非遺伝毒性マウス肝発がん物質に対する反応であり、1化合物（Mirex）を除き、腫瘍の発生増加はみられていない。また、2つの非発がん性物質（Resorcinol, Rotenone）を皮膚適用した場合に腫瘍の発生増加がみられていることにも注目する必要がある。

表 2-1 NTPにおけるp53^{+/+}およびTg.ACマウスモデルのバリデーション成績 (Genotoxic compounds)

Chemical	Genotoxicity	2Y-Bioassay	p53 ^{+/+}	Tg.AC
p-Anisidine	+	-	-	-
Benzene	+	+	+	+
1-Chloro-2-methyl propene	+	+	UK	+
2-Chloroethanol	+	-	UK	-
p-Cresidine	+	+	+	+
2,4-Diaminotoluene	+	+	+	+
2,6-Diaminotoluene	+	-	-	-
Diisopropylcarbodiimide	+	NT	UK	UK
7,12-Dimethylbenzanthracene	+	+	UK	+
Ethyl acrylate	+	+	UK	-
Glycidol	+	+	-	UK
8-Hydroxyquinoline	+	-	-	-
Melphalan	+	+	+	+
Methyl ethyl ketone peroxide	+	+	UK	+
Urethane	+	+	UK	+
4-Vinyl-1-cyclohexene diepoxide	+	+	+	UK
2,4-dinitro-1-fluorobenzene	+	NT	UK	+

UK, unknown; NT, not tested; +, positive response; -, negative response

ILSI-HESI ACTでは、個々の試験成績が明らかにされていないが、皮膚の創傷刺激により乳頭腫が発生すること、皮膚適用に用いる溶媒（70%ethanol, acetone, DMSO）毎に腫瘍発生の対照値が大きく異なること、および乳頭腫の発生個数が経過週ごとに増減すること等の評価上の課題が指摘されている。

XPA KOマウスモデル： XPA^{-/-}マウスはオランダ National Institute of Public Health and Environment (RIVM) のde Vriesらによって、C57BL/6マウスをベースに作出された遺伝子改変動物である¹⁾。ヒトの常染色体劣性遺伝病である色素性乾皮症 (Xeroderma pigmentosum, XP) は、日光暴露によって皮膚病を発生し、若年で皮膚癌を好発するが、このXP患者の細胞は紫外線によるDNA損傷を修復する能力が欠如していることが知られており、A~Gの7つの相補群とvariantの8型の遺伝的に異なったXPグループが報告さ

れている。このうちXP group Aのモデルとして日本²⁾ およびオランダ²⁾でXPA KOマウスが作出された。オランダで開発されたXPA KOマウスは、XPAアレルのspanning exon 3および4の欠損マウスであり、このマウスの細胞はヌクレオチドの除去修復excision repair能を失っている^{1,3)}。紫外線障害に高感受性であると同時にdimethylbenz[a]anthracene (DMBA) 等の化学発がん物質にも高感受性を示すことが報告され¹⁾、短期発がん試験モデルとしての有用性が検証されている¹⁾。XPA^{-/-}マウスの自然発生腫瘍発現率は低く、12カ月齢以上においても15%程度以下であり、wild typeと差はみられない。先にも述べたように、XPA^{-/-}マウスは紫外線を含む数種の遺伝毒性発がん物質の暴露により腫瘍を発現するが、その腫瘍もwild typeのマウスでみられるものと同じタイプであり、XPA^{-/-}マウスではより早く高率に発現するとされている。

表 2-2 NTPにおけるp53^{+/+}Tg.ACマウスモデルのバリデーション成績 (Nongenotoxic compounds)

Chemical	Genotoxicity	2Y-Bioassay	p53 ^{+/+}	Tg.AC
Acetic acid	-	NT (Not tested)	UK	-
Acetone	-	NT	UK	-
Benzethonium chloride	-	-	UK	-
o-Benzyl-p-chlorophenol	-	+	UK	+
1-Chloro-2-propanol	-	UK	-	-
Chloroform	-	+	UK	UK
Chloroprene	-	+	UK	UK
Coconut oil diethanolamine	-	+	-	-
Cyclosporin A	-	+	-	+
Di-(2-ethylhexyl)phthalate	-	+	UK	UK
Diethanolamine	-	+	-	-
Diethylstilbestrol	-	+	-	+
Ethanol (95% or 75%)	-	NT	UK	-
Furfuryl alcohol	-	+	-	-
Lauric acid diethanolamine	-	+	-	+
N-Methylolacrylamide	-	+(mice liver)	-	-
Methylphenidate	-	+(mice liver)	UK	-
Mirex	-	+(mice liver)	-	+
Oleic acid diethanolamine	-	-	-	-
PeNTachlorophenol	-	+	-	+
Phenol	-	-	UK	UK
Pyridine	-	+	-	UK
Resorcinol	-	-	-	+
Rotenone	-	-	-	+
TPA	-	+	UK	+
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzodioxin	-	+	-	+
Triethanolamine	-	+(mice liver)	-	-
WY-14,643	-	+	UK	UK
Benzoyl peroxide	UK	+	UK	+
Dicyclohexylcarbodiimide	UK	NT	UK	+
Mezerein	UK	NT	UK	+
Oxymetholone	UK	+	UK	+
Sodium arsenite	UK	NT	UK	+
Flucinolone acetonide	NT	NT	UK	UK
Tripropylene glycol diacrylate	NT	NT	UK	+

UK, unknown; NT, not tested; +, positive response; -, negative response

表3 ILSI-HESI ACTにおけるp53⁺マウスモデルのバリデーシヨンの現状

Class	Compound	Status	Result (Comments)
Genotoxic Human Carcinogens	Cyclophosphamide	Terminated	Positive (Lymphosarcoma)
	Melphalan	Terminated	Positive (NTP study)
	Phenacetin	Terminated	Negative
Immunosuppressant Human Carcinogens	Cyclosporin A	Terminated	Negative (NTP study)
Hormones	Diethylstilbestrol	Terminated	Negative (NTP study)
	17Beta-Estradiol	Terminated	Negative (MTD)
Rodent Carcinogens/ Putative Human Non-carcinogens (Epidemiology)	Clofibrate	Terminated	Negative (MTD)
	Dieldrin	Ongoing	
	Phenobarbital	Terminated	Negative (nonMTD, pre-sedative dose)
	Reserpine	Ongoing	
Rodent Carcinogens/ Putative Human Carcinogens (Mechanism)	Chloroform	Terminated	Negative (nonMTD, mild toxic dose)
	Chlorpromazine	Ongoing	
	Haloperidol	Terminated	Negative
	Metaproterenol	Terminated	Negative (MTD)
	Methapyrilene	Ongoing	
	Sulfamethoxazole	Ongoing	
	WY-14,643	Ongoing	
Non-Carcinogens	Ampiciline	Terminated	Negative
	D-Mannitol		
	Sulfisoxazole	Terminated	Negative (2% in diet)

これまでに検討された暴露経路は皮膚照射 (UV-B)、皮膚塗布 (DMBA)、経口投与 (Benzo[a]Pyrene (B[a]P)、p-Cresidine、2-Acetylaminofluorene (2-AAF)など) である。ILSI-HESI ACT標準プロトコール (試験期間: 26週) における陽性対照物質を検討する目的でB[a]P (20mg/kg, 3times/week, 強制経口投与)、p-Cresidine (2500ppm, 混餌) および2-AAF (300ppm, 混餌) について試験が実施された。その結果、いずれの物質についても26週では前腫瘍性病変が認められたものの腫瘍は発現せず、発がん性に関する明確な陽性結果は得られなかった。XPA⁺とp53⁺のダブルノックアウトマウスでは26週で標的臓器に腫瘍の発現がみられている。このため、試験期間を39週間に延長して試験を実施した結果、明確に発がん性陽性の結果が得られている。しかし、B[a]Pおよびp-Cresidineでは投与物質の毒性も

強く発現し、毒性 (細胞毒性) 感受性が增強されたことが報告されている。これらの結果より、XPA⁺マウス試験系では、試験期間は39週間必要、陽性対照物質として2-AAF (300ppm 混餌投与、標的臓器: 膀胱および肝) を使用するという提案がなされ、現在はこの試験計画で検証作業が実施されている。

現在までに得られたILSI-HESIにおける検証試験の成績を表4に示した。終了した試験は少ないが、これまでに得られた結果から、XPA⁺マウスの発がん特性については、UV-B, DMBA, B[a]P, PhIP, p-Cresidine, 2-AAFが陽性であったことから遺伝毒性発がん物質に関する検出力を有すると予測されるが、Phenobarbital、Haloperidol、Sulfamethoxazoleは陰性、Cyclosporin Aは陽性であったことから、非遺伝毒性発がん物質については検出できない可能性が高いことが予測される。

表-4 ILSI-HESI ACTにおけるXPA^{-/-}モデルのバリデーションの現状

Class	Compound	XPA ^{-/-} mice (9M study)	XPA ^{-/-} /p53 ^{+/-} mice (6M study)
Genotoxic Human Carcinogens	Cyclophosphamide	Ongoing	
	Melphalan	Ongoing	
	Phenacetin	Ongoing	
Immunosuppressant Human Carcinogens	Cyclosporin A	Positive	Positive (lymphoma)
Hormones	Diethylstilbestrol	Equivocal? (testis & pituitary tumors)	Positive (testis, bone & Pituitary tumors)
	17Beta-Estradiol	Ongoing	
Rodent Carcinogens/ Putative Human Non-carcinogens (Epidemiology)	Clofibrate	Negative at 6M study	
	Dieldrin	Ongoing	
	Phenobarbital	Negative	
	Reserpine,	Ongoing	
Rodent Carcinogens/ Putative Human Carcinogens (Mechanism)	Chloroform	Ongoing	
	Chlorpromazine	Ongoing	
	Haloperidol	Negative	
	Metaproterenol	Ongoing	
	Methapyrilene	Ongoing	
	Sulfamethoxazole	Negative	
	WY-14,643	Ongoing	
Non-Carcinogens	Ampiciline	Ongoing	
	D-Mannitol	Ongoing	
	Sulfisoxazole	Ongoing	

(2) 遺伝子改変動物の発がん標的性の違い

ENU 0ないし120mg/kgを雌雄のrasH2マウス (Tg(+)
マウス) および同腹仔の非遺伝子導入マウス (Tg(-)
マウス) 各20匹に1回腹腔内投与後、22週時に生存動物
全例を屠殺した。ENU投与により雌雄のTg(+)
およびTg(-)マウスで肺の腺腫/腺癌が80~95%、悪性リン
パ腫が5~20%の動物に認められた。雌雄のTg(+)
マウスでは前胃に乳頭腫/扁平上皮癌が35~70%、脾臓の
血管肉腫が25~40%、皮膚乳頭腫が15%の動物に認め
られた。更に、雌のTg(+)
マウスでは子宮内膜の異型
増殖症/癌が94%の動物に認められた。ENU 120mg/kg
を6週齢のB6C3F1マウスに1回腹腔内投与後終生飼育
すると肺、肝、ハーダー腺、胃、腎および造血器系に

腫瘍が誘発されることが報告されている。一方、p53
遺伝子の片側アレル (exon 2) を欠失させたp53^{-/-}CBA
マウスにENUを同様に投与し、22週間観察する実験
も行い、子宮内膜肉腫、肺腫瘍、皮下腫瘍およびリン
パ腫が誘発されることを見出している。今回のTg(+)
マウスの実験では、子宮内膜肉腫は誘発されなかつた
が、子宮に上皮性の腫瘍が高頻度に、また、前胃およ
び皮膚に扁平上皮腫瘍、脾臓に血管腫瘍が誘発されて
おり、マウスの系統あるいは遺伝子操作により発がん
標的性が異なることが明らかとなった。

D. 考察

rasH2マウスのCyclophosphamideを用いた試験では、

用量および投与頻度を慎重に選択しMTDに近い用量で発がん試験を行うと、ヒトで報告されている標的臓器（膀胱）に腫瘍の発現がみられ、このモデルがヒトへのリスク評価上の有用性が示唆された。Diethylstilbestrol（DES）ではやはりMTDに近い用量で内分泌器官に腫瘍性変化が発現したが、同腹仔のNon-Tgマウスでも同じ腫瘍が発生したことを考慮し、発がんメカニズムを含めた解釈が必要であろう。Phenobarbitalのような肝酵素誘導プロモーターにはこのrasH2モデルは全く反応しなかった。このマウスはBALB/c由来であることから、肝についての発がん感受性については更なる検討が必要である。Clofibrate、DEHPなどのperoxisome proliferatorでは、雄に肝の良性腫瘍が発現し、Peroxisome proliferator activated receptor α （PPAR α ）の関与が示唆された。試験実施予定のWY-14,643は、さらに強いPPAR α 活性を有することから、試験成績が期待される。Chlorpromazineはプロラクチン、SulfamethoxazoleはTSHが関与するげっ歯類特有の腫瘍を発生する化合物であり、それらに関連する腫瘍はrasH2マウスでは発生しなかったが、本モデルの2次発がん物質に対する感受性については、さらなる検討が必要であろう。

ILSI-HESI ACTのp53^{+/+}マウスを用いた各実験においては、陽性対照物質としてp-Cresidine（400mg/kg/day, p.o.）あるいはBenzene（100mg/kg/day, p.o.）が採用されているが、統計学的（Fisher exact test）に有意な腫瘍発生がみられない実験が散見されている。NTPにおける実験では、そのような問題は生じていないため、現状では実験間誤差、施設間誤差あるいはその他の本質的な問題点があるのかについては不明である。本モデルの実用化に向けて、陽性対照物質の反応性に実験再現性をもたせること、あるいは新たな良好な陽性対照物質を選択することが、ひとつの課題となると考えられる。

Tg.ACモデルの皮膚塗布適用では、非発がん物質でも腫瘍の発生増加がみられたこと、皮膚の創傷が刺激となり腫瘍が発生すること、腫瘍発生への溶媒の影響、皮膚腫瘍の経過ごととの増減問題、局所塗布における被験物質の全身（あるいは標的細胞）暴露証明方法等の問題点が存在する。これらは、試験成績の陽性・陰

性の判断や試験条件の妥当性判断に密接に関わる問題であり、今後発がんメカニズムの解明と共に、対応が必要と考えられる。

XPA^{+/+}マウスは、従来、遺伝毒性発がん物質に対しては高い感受性を示すとされ、lacZを導入したXPA^{+/+}lacZに発がん物質を投与したときの標的臓器（B[a]P：脾臓、2-AAF：肝臓）におけるlacZの突然変異の頻度はXPA^{+/+}lacZマウスと比較して増加していたとの報告がある⁹⁾。しかし、同じ処置を行ったwild typeマウスとの腫瘍発現の比較データが現時点では十分公表されていないため、XPA^{+/+}の発がん感受性がwild typeと比較してどの程度増強されているかについての評価はまだ十分にはなされていない。さらに、他の遺伝子改変動物の短期発がん試験モデルと比較して以下のような問題点が指摘される。すなわち、39週間の試験期間がこの試験系では必要であり、本試験系のみより長い試験期間が必要になる。p53^{+/+}とのダブルノックアウトでは26週間で評価可能とされているが、p53^{+/+} KOモデルが26週間で評価されていることを考えると、ダブルノックアウトの意義は明確ではない。また、試験物質の毒性影響の増強がこのマウスには起こりやすく、本試験系ではXPA^{+/+}マウスを使用した用量設定試験が必要になる。また、重度の細胞毒性作用は発がん性評価を阻害する可能性も考えられる。現在、同マウスの生産は、国立の研究機関であるRIVMで行われ、動物の生産・供給も実用化の障害になるものと推測される。また、XPA^{+/+}マウスはヘテロ（XPA^{+/+}）マウスの交配によって得られるが、XPA^{+/+}の胚の50%以上が胎生期に重篤な貧血（肝臓での造血障害？）により死亡することが報告されており¹⁰⁾、このことの影響も懸念される。いずれにしてもXPA^{+/+}モデルに関する検証作業は現時点ではまだ不十分であり、さらにデータを蓄積して本試験系の特性および有用性を検討する必要があると考えられる。

rasH2およびp53^{+/+}マウスを用いたENUの実験成績で明らかのように、遺伝子改変動物の発がん標的性および感受性はそれぞれ異なることから、今後、短期発がん試験モデルを用いて発がん性を評価する場合には、使用する系統や遺伝子操作などの違いを充分考慮すべきである。

E. 結論

今回の研究から、遺伝毒性発がん物質の検出に非常に感受性が高いとされるrasH2およびp53^{+/+}マウスにおいても、必ずしもすべての遺伝毒性発がん物質を検出することはできないものと推察される。また、その発がんメカニズムについて不明な点があり、これらを明確にする研究が必要である。Tg.ACマウスやXPA^{-/-}マウスは未だ検証作業が十分ではなく、今後のデータの集積が不可欠である。また、短期発がん試験モデルを用いて発がん性を評価する場合には、使用する系統や遺伝子操作などの違いを充分考慮すべきであろう。

参考文献

- (1) de Vries A et al (1995) Increased susceptibility to ultraviolet-B and carcinogens of mice lacking the DNA excision repair gene XPA. *Nature* 377: 169-173
- (2) Nakane H et al (1995) High incidence of ultraviolet-B or chemical-carcinogen induced skin tumors in mice lacking the xeroderma pigmentosum group A gene. *Nature* 377: 165-168
- (3) O'Neill TP (1996) A transgenic mouse model of skin cancer in XPA-deficient humans. *Toxicol. Pathol.* 24: 642-643
- (4) van Steeg H et al (1998) Use of DNA repair-deficient XPA transgenic mice in short-term carcinogenicity testing. *Toxicol. Pathol.* 26: 742-749
- (5) de Vries et al (1997) Induction of DNA adducts and mutations in spleen, liver and lung of XPA-deficient/lacZ transgenic mice after oral treatment with benzo[a]pyrene: correlation with tumour development. *Carcinogenesis* 18: 2327-2332

In vitro染色体異常試験の代替としてのin vitro小核試験の評価

研究協力者：林 真（国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部長）

協力研究者：祖父尼俊雄（オリンパス光学工業㈱）

田中 憲穂（(財)食品薬品安全センター秦野研究所）

若田 明裕（山之内製薬㈱）

島田 弘康（第一製薬㈱）

森田 健（グラクソ・ウエルカム㈱）

浜田 修一（エスエス製薬㈱）

宮島 博文（塩野義製薬㈱）

要旨

In vitro染色体異常試験の代替法として、in vitro小核試験への関心が高まっている。In vivoの試験系においては、げっ歯類の骨髄細胞を用いる染色体異常試験が、幼若赤血球の小核を観察し、数量化する小核試験が主流になっている。In vivoにおいては標的細胞を取り巻く微細環境は生体のホメオスタシスによりある程度恒常性が保証されている。しかし、in vitroにおいては、培養環境の制御は人為的に可能である反面、非常に多くの要素が細胞の状態を左右している。微小環境の制御の難しさ、細胞が生理的な状況で暴露されたか否か、生体で起こる代謝活性化・不活性化が適切になされているか、観察細胞集団が正確に規定されているか、等々不確定要素がいまだに未解決のまま残されている。一方で、OECDでのガイドライン化、ICHのS2における検討等、国際的なハーモナイゼーションの動きが活発化している。本研究は、国際的な共同研究（SFTG）の一環として、in vitro小核試験の評価を行うと共に、最適な試験条件の設定のための基礎データの収集を目的とする。本年度は9種類のモデル物質について検討し、染色体の構造・数的異常を誘発する物質はすべて陽性と評価することが出来た。また、陰性対照として用いた染色体異常を誘発しないことが知られている物質では明らかな小核誘発性は認められなかった。次に、観察対照細胞を限定するために、Cyt-B添加の有無について検討した結果、質的な差は認められなかった。検体の処理時間に関しては、短時間処理では陽性とはならず長時間の連続処理で初めて陽性となるものがあり、特に染色体の数的異常を誘発する物質にその傾向が強かった。同じ化合物を試験した2機関で定量的には差が見られたものの、定性的な差はなかった。

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

A. 研究目的

本共同研究の目的はin vitro小核試験法を確立することとあり、結果に影響を与える種々の実験条件について検討を加えるとともに、モデル化合物を用いてバリデーションを行うことにある。具体的には下記に示す各項目について共同研究を行う。

1. 小核試験の検出特異性の検討

表1に示す9種の作用機作の異なる被験物質（表1）を選んで、小核誘発性の特異性を比較検討する¹⁾。

2. 試験実施機関間のデータの再現性の評価

表1に示された被験物質は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。細胞および血清については同じロットのものを使用し、培養液等についても同一メーカーのものを用いるなど、実験条件を極力揃えて、共同研究を行う。

3. 培養細胞を用いる染色体異常試験のデータとの比較を行う。

4. 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、至適標本作製時間などがあげられる。

5. 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、ほ乳類培養細胞における推奨できる標準プロトコールの作成をめざす²⁾。

6. In vitro小核試験の国際的普及をはかる。

B. 研究方法

CHL細胞を用いる本共同研究には9機関が参加し(表2)、実験は下記のように行われた。

使用細胞：CHL/IU (各機関ヒューマンサイエンス研究資源バンクから同一ロットのものを購入)

培養液：MEM (Gibco BRL, Cat. No. 611000-061)、50U/ml- μ g/ml Penicillin-Streptomycin (Gibco BRL, Cat. No.15140-122)、10% Calf serum (CSは同一ロットのものを各自購入、非働化) 試験化合物：5-Fluorourasil, Bleomycin, Cytosine arabinoside, Urethane, Colchicine, Diethylstilbestrol, Griseofulvin, Clofibrate, Mannitol (国際共同研究事務局から同一ロットのものがコード化され1化合物当たり2機関に配布)

陽性対照：mitomycin C (MMC) (国際共同研究事務局から同一ロットのものが配布)

Cytochalasin B (cyt-B)：Sigmaのものを各自購入

処理：(図1)

- ・直径6cmのプラスチックディッシュに細胞を播種
- ・24時間後に各濃度2ディッシュを用い化合物処理を開始(陽性対照として、3時間処理ではMMC0.1 μ g/ml、時間処理ではMMC0.05 μ g/mlで処理した)
- ・処理終了後、化合物を除去し、新しい培養液で培養(Cyt-B添加群ではではこの時3 μ g/mlとなるように添加し18時間培養)

・培養終了後細胞を回収

・低張処理後固定し、スライド標本作製

観察：細胞毒性と小核誘発性について、各ディッシュ当たり以下のものを観察した。観察標本はアクリジンオレンジ染色を行った。

Cyt-B添加群

細胞毒性

- ・1000細胞当たりの2核以上の細胞の比率

小核誘発性

- ・1000個の2核細胞中の小核を持つ細胞数
- ・1000個の1核細胞中の小核を持つ細胞数(オプション)

Cyt-B非添加群

細胞毒性

- ・細胞回収時の細胞数

小核誘発性

- ・1000個の細胞中の小核を持つ細胞数

C. 研究結果および考察

陰性および陽性対照の結果を表3に示した。Cyt-Bを添加する系ではcyt-Bを添加しない系に比べ陰性対照での小核を持つ細胞の頻度は少し高めであった。これはcyt-Bによって、本来分裂して2個の細胞になるものが1個の細胞として存在することになるため、cyt-Bを加える場合は1細胞はcyt-Bを加えない場合の2細胞に相当することによるものと考えられた。Cyt-Bを添加する系でも添加しない系でも、処理時間による陰性対照での小核の出現頻度に差はみられなかった。

陽性対照でもcyt-Bを添加する系の方が小核を持つ細胞の出現頻度が高かった。この理由も陰性対照と同じであると考えられた。Cyt-Bを添加しない系において、3時間処理では回復時間の長さであり差はみられなかったが、24時間処理では短い回復時間では小核誘発性は低かった。これは陽性対照での長時間処理により細胞周期に遅延が生じたためと考えられた。

それぞれの化合物についての試験結果を図2に示した。なお、図中のシンボルの違いは試験を行なった施設の違いを示し、中抜きは1回目の試験、黒塗りは2回目の試験結果を示している。