

果を明示する方策として、従来の試験法や医薬品各条の「丸ごと調和」に拘泥することなく、調和が困難な部分（sticking point）を明示的に除外して調和する「部分調和」を選択肢として採択することとした。これにより、より多くの調和項目の合意が成立することが期待される。

薬局方国際調和は、3極の規制当局による3薬局方の規定の相互受入れを意図しているものであるが、PDGによる調和合意だけでは相互受入れに結びつく訳ではない。各薬局方が合意事項に沿って薬局方改正するとともに、各薬局方に取り込まれた合意事項が3極間で相互受け入れされるに必要な措置がとられることが必要である。

PDG発足以来の日本薬局方の薬局方国際調和への対応は、必ずしも十分なものではなかった。日本薬局方がPDGの構成員としての責任を果たすとともにその存在を示すには、次のような対応が可能となるように方策を講ずることが必要と考えられる。この提言への対処が「顧みて他を言う」に類するものに終わることのないよう切に期待する。

1. 日本薬局方の薬局方国際調和への対応についての提言

日本薬局方がPDGの構成員として、薬局方国際調和に主体的に参画するには、下記のような対応が可能となることが必要不可欠である。

① 日本薬局方事務局の整備と強化

これまでの日本薬局方のPDGへの対応は、個人の奉仕への依存度が高く、日本薬局方事務局の主体的な関与に乏しい。このため事務局は、調和の進捗状況の把握が不十分となり、委員会への調和案付議に時期を失したり、委員会の審議結果の欧米薬局方への伝達に著しい遅れを生じたりすることが少なくない。このような状況が今後も継続することは、欧米薬局方の日本薬局方に対する信頼の喪失につながることを憂慮される。

日本薬局方が対応すべき事項を把握し、時機を失することなく委員会に諮り、審議結果を遅滞なく欧米薬局方に伝達することが可能となるよう日本薬局方事務局の機能を整備、強化し、薬局方調和対応に関する運

営を大幅に改善することが必要不可欠である。なお、事務局には、欧米薬局方との情報交換に支障を来さない程度の英語能力を備えておくことも必須要件である。

② 調和案の迅速な審議と調和合意事項の日本薬局方改正案への確実な反映

国際調和案が欧米薬局方から提示された場合には、所定期間内に日本薬局方としての意見を提出する必要があるが、担当委員会の審議が提出期限に間に合わないことが少なくない。薬局方事務局が遅滞なく委員会に諮るよう調整に意を用いること、及び担当委員会が所定期間を念頭に置いて審議することが先ず何よりも必要である。

3局の調和合意は途中経過であり、合意内容を取り込んで薬局方改正により薬局方調和が完結することになる。したがって、薬局方委員会は、追補を含む薬局方改正時期を念頭に置いて、調和合意事項を正確に反映した薬局方改正案を審議する必要がある。これを怠ると、国内のみならず、国外からも薬局方国際調和への取り組み不足の誹りを受けることになる。

薬局方委員会は、調和案の科学的な審議、および合意事項を正確に反映した薬局方改正の審議を、時機を失することのないように進めることが必要である。なお、これには薬局方事務局による適切な調整が不可欠である。

③ 調和事項の相互受入れの保証

各薬局方が合意事項を反映した薬局方改正は、必ずしも3極の規制当局がそれらを相互に受け入れることを保証するものではない。我が国においては、薬局方改正時に調和合意事項を日本薬局方参考情報に明示し、調和明示された事項についての欧米薬局方の相互受入れを行政通知により保証するといわれている。相互受入れを保証するための適切な措置なしには「実効のある」薬局方調和は完結しない。

このような方式による相互受入れの保証には、日本薬局方改正時にその参考情報に調和事項が洩れなく正確に記載されること、及び相互受入れを保証する行政通知が時機を失することなく発出されることが、必要不可欠である。

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） 平成12年度分担総括研究報告書 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

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（医薬品副作用被害・救済研究振興調査機構 顧問）
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年計画の最終年度として、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 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（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/安全性薬理試験ガイドラインのハーモナイゼーション推進のための研究（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3年度にあたり、4つの研究課題を設定し、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 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（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 α -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のバリデーション研究に関する国際ワークショップがInternational Life Sciences Institute（ILSI）のHESI（Health and Environmental Sciences Institute）で昨年11月に米国で開催されたことから、そ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p53^{+/+}マウスを用いたphenolphthaleinについての研究成績をまとめ、これらの有用性について検討した。その結果、rasH2やp53^{+/+}マウスモデルは、遺伝毒性の機序に基づくがん原性を検出し得る試験系としての有用性の可能性が示唆されるが、問題点として、rasH2やp53^{+/+}マウスモデルでは全ての遺伝毒性発癌物質を必ずしも検出できず、さらにrasH2モデルではホルモンやPeroxisome proliferatorによる発癌メカニズムが不明であり、p53^{+/+}マウスモデルでも発癌メカニズムとしてp53の変異・欠損が発癌に必ずしも関与していないことが指摘された。また、Tg.ACマウスモデルでは、必ずしもすべての遺伝毒性・非遺伝毒性発癌物質を検出できず、その発癌メカニズムも明確ではなく、XPA^{+/+}マウスモデルにおいては、検証試験の数が少ないことから最終評価

が困難であり、被験物質を9ヵ月まで投与しない限り発癌評価ができないなどの問題点が本研究班で指摘された。その他、同じp53^{+/+}マウスでも遺伝子操作やマウスの系統によって発がん標的性および感受性が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ことが示唆された。

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）

2000年末に刊行された、英国Dept. of Healthの諮問機関であるCOM（Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment）のガイダンスにおいて、in vitro小核試験はin vitro染色体異常試験の代替法としてだけでなく、染色体の数的異常を検出するための試験法として推奨されている。これは、遺伝毒性の分野における新しい動きと考えることが出来る。In vivoの試験系においては、化学物質の染色体異常誘発性を評価するのに、げっ歯類の骨髓細胞を用い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試験系においては、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、それが結果に反映されてくる。微小環境の制御の難しさ、細胞が生理的な状態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。英国のCOMの動きと共に、OECDでのガイドライン化、ICHのS2における検討等、国際的にも新しい評価系として注目されている。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。本年度は日本側が受け持ったチャイニーズハムスター肺由来細胞株CHL/IUのみでなく、他の細胞株に関してもデータが出そろい、in vitro小核試験の全体的な評価をまとめる。

S7 一般/安全性薬理試験ガイドラインのハーモナイゼーション推進のための研究（藤森研究協力者）

平成12年度の研究成果は「ICH-S7:安全性薬理試験ガイドライン」をStep 2からStep 4として成立させたことである。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、平成11年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ガイドラインを作成し、平成12年度にはステップ2ガイドラインの和訳および国内コメント収集およびICH対応(Step 3)並びに9月のベルンでのEWG会議を経て11月のサンジエゴ会議において安全性薬理試験ガイドラインをStep 4に到達させた。本年度にStep 4に達したICHガイドライン(ICH S7A)の特徴は(1)焦点を安全性薬理に絞った；(2)安全性薬理試験を急性的生命維持機能における重みに関するランク付け(Hierarchy)からCoreのBattery試験を必須試験とし、それを補足するFollow up試験およびその他の器官機能に関するsupplemental試験に分類した；(3)安全性薬理試験にGLPを適用したことである。また極めて迅速かつ円滑にICHハーモナイゼーションが順調にStep 4まで進行した背景には、日本が当初からラポーター(Step 2まで：橋本宗弘、Step 2以後：藤森観之助)を務めて先導し、かつその裏には平成8年度からの日本の一般薬理試験ガイドラインに対する国際的反応に関する情報の蓄積を基にして第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(一般薬理試験ガイドライン改正案)を作成し、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ICHハーモナイゼーションに対する促進要因となったと考えられる。本年度の研究班の主たる活動は、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、特にGLP適用面での実施問題などに関し

て検討し、最終案への対応を行い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における完成(ICH S7A)であるが、その副産物として、臨床時の心血管系機能における大きな懸念であるTorsade de Pointesに関する非臨床試験による予測試験法(コアバッテリー注3)に関する討議から、完成した安全性薬理試験ガイドライン(S7A)を補足するガイドライン(ICH S7B)案としてICHで検討することになったことも成果といえる。平成13年度の研究班の活動として、まず第一に新ICH議題であるS7Bに関する支援研究およびICH-S7ガイドライン通知後のGLP適用における試験実施と信頼性確保に関する支援研究を計画している。

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週間で良いとのバリデーション結果を平成11年度に得た。そこで、今年度はこの結果を論文としてまとめるとともに、ICH-S5bおよびICH-M3ガイドラインの変更案を作成した。これらを三極のICH関係者に送付し、コメントを求めた。得られたコメントをもとに最終案を作成し、ICHのSteering Committeeに提出し、了承された。これらのガイドラインの変更を受け、わが国のガイドラインが改定された。

D. 考察・結論

平成12年度は、上記の如く、4研究課題について、研究協力者4名、協力研究者38名の構成で、研究・調査を行った。

三森班員による「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」においては、ILSIのHESIが、2000年11月に米国で開催したrasH2マウス、C57BL p53^{+/+}マウス、Tg.ACマウスおよび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のバリデーション研究に関する国際ワークショップについての情報をまとめた。さらに、国立医薬品食品衛生研究所病理部で実施されたp53^{+/+}マウスを用いたphenolphthaleinについての研究成績をまとめ、これら

の有用性について検討した。これらの調査結果から、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ことが示唆された。

林班員による「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」においては、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行い、日本側が受け持ったチャイニーズハムスター肺由来細胞株CHL/IUのみでなく、他の細胞株に関してもデータが出そろい、in vitro小核試験の全体的な評価をまとめた。

藤森班員による「一般/安全性薬理試験ガイドラインのハーモナイゼーション推進のための研究」における最大の活動結果は、安全性薬理試験ガイドラインをStep 2からStep 4として成立させたことである。即ち、今年度にはステップ2ガイドラインの和訳および国内コメント収集およびICH対応（Step 3）並びに9月のベルンでのEWG会議を経て、11月のサンジェゴ会議においてStep 4に到達させた。その特徴としては、(1)焦点を安全性薬理に絞った、(2)安全性薬理試験を急性的生命維持機能における重みに関するランク付けからCoreのBattery試験を必須試験とし、それを補足する

Follow up試験およびその他の器官機能に関するsupplemental試験に分類した、(3)安全性薬理試験にGLPを適用したことの3点が上げられる。

大野班員による「2週間の反復投与毒性試験による雄性生殖器官への影響評価の可否に関する研究」においては、昨年度の結論、即ち、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週間で良いとのバリデーション結果を、論文としてまとめるとともに、ICH-S5BおよびICH-M3ガイドラインの変更案を作成した。これらを三極のICH関係者に送付し、得られたコメントをもとに最終案を作成し、ICHのSteering Committeeに提出し、了承され、その変更を受け、わが国のガイドラインが改定された。

以上、4研究課題についての要約を列記した。大野班員による「2週間の反復投与毒性試験による雄性生殖器官への影響評価の可否に関する研究」は、今年度をもって終了としてよいとの結論になったが、他の3課題については、今後も研究・調査が必要とされ継続することとなった。なお次年度からは、新たに、免疫毒性及び残留溶媒毒性に関する研究班が開始され、5研究課題となる予定である。

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

分担研究者：三森 国敏（東京農工大学農学部 教授）

協力研究者：林 裕造（北里大学薬学部 客員教授）

玉置 憲一（財団法人実験動物中央研究所 副所長）

臼居 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）

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）

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 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のバリデーション研究に関する国際ワークショップがInternational Life Sciences Institute (ILSI) のHESI (Health and Environmental Sciences Institute) で昨年11月に米国で開催されたことから、そ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p53^{+/+}マウスを用いたphenolphthaleinについての研究成績をまとめ、これらの有用性について検討した。その結果、rasH2やp53^{+/+}マウスモデルは、遺伝毒性の機序に基づくがん原性を検出し得る試験系としての有用性の可能性が示唆されるが、問題点として、rasH2やp53^{+/+}マウスモデルでは全ての遺伝毒性発癌物質を必ずしも検出できず、さらにrasH2モデルではホルモンやペルオキシゾーム増生剤による発癌メカニズムが不明であり、p53^{+/+}マウスモデルでも発癌メカニズムとしてp53の変異・欠損が発癌に必ずしも関与していないことが指摘された。また、Tg.ACマウスモデルでは、必ずしもすべての遺伝毒性・非遺伝毒性発癌物質を検出できず、その発癌メカニズムも明確ではなく、XPA^{+/+}マウスモデルにおいては、検証試験の数が少ないことから最終評価が困難であり、被験物質を9ヵ月まで投与しない限り発癌評価ができないなどの問題点が本研究班で指摘された。その他、同じp53^{+/+}マウスでも遺伝子操作やマウスの系統によって発がん標的性および感受性が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ことが示唆された。

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、XPAノックアウトマウス

A. 研究目的

医薬品についての第4回国際ハーモナイゼーション会議（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は、ヒト型c-Ha-ras遺伝子導入Tgマウス（rasH2マウス）モデル、がん抑制遺伝子p53の片側のアレル（exon5）を欠損させたC57BLマウス（p53^{+/−}マウス）モデル、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マウスモデル、および色素性乾皮症修復遺伝子を欠損させたXPA^{+/−}マウスモデルがあげられる。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仔動物モデルのがん原性評価法の有用性について検討し、昨年（2000年）11月に国際ワークショップ（ILSI-HESI Workshop on the Evaluation of Alternative Methods for Carcinogenicity Testing）が開催された。

本研究班では、rasH2、p53^{+/−}、Tg.ACおよびXPA^{+/−}マウスモデルを用いた短期がん原性試験についてのILSI-HESIのワークショップでの研究成果をまとめた。また、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

ILSI-HESIのバリデーション共同研究では、これま

でおよそ40の民間企業と米国NIEHSが加わり、表1に示すように、医薬品を中心とした21品目の化合物（遺伝毒性、免疫抑制、ホルモン作用を含むヒト発がん物質、従来のげっ歯類を用いた長期発がん性試験では陽性であるが疫学的又は作用機序的にヒトには非発がん物質とされているもの、および非発がん物質）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が検討されてきた。本共同研究下で実施された試験の大部分が終了した2000年11月にワークショップが開催され、共同研究の成果に関する総括が行われた。本研究班では、これらの成績を元に各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。

さらに、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ものの、その種の検証作業は著しく少なく、今後データを蓄積していく必要がある。今回、国立医薬品食品衛生研究所病理部で実施されたp53(+/-)C57BL/6およびp53(+/-)CBAマウスにおけるphenolphthaleinについての短期発がん性試験の実験成績から、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) rasH2マウスモデル：rasH2マウスは、(財)実験動物中央研究所で開発され、微生物学的、遺伝的な厳重な管理の下に生産されたものであり、国際的な検証試験に提供され、26週間の短期試験モデルとしての有用性が検討された。被験物質として合計21化合物について、6ヶ月の試験期間を基本とする可能な限り共通なプロトコールに従って国際共同研究が実施された。陽性の判定は厳密に統計学的に有意差を示した腫瘍に基づいて行われた。その成績を表1に示した。

ヒト遺伝毒性がん原性化合物のうちCyclophosphamide、Phenacetinは陽性結果を示した。中でもCyclophosphamideは腫瘍の標的性についてもヒトと同様であり、膀胱の移行上皮の腫瘍が有意に認められた。Melphalanについては腫瘍の増加傾向は認められたが、統計的有意差はみとめられずequivocalな結

果であった。これは使用した用量がMTDに達していなかったこともあり、プロトコルを改めた検討が必要であると思われる。

非遺伝毒性ヒトがん原性化合物であるホルモンおよび免疫抑制剤については、rasH2モデルは、Diethylstilbestrolについては陽性結果が得られたが、17β-Estradiolのがん原性を検出する事は出来なかった。免疫抑制剤であるCyclosporin Aについてもがん原性は検出できなかったが、同様に再検討の余地を残している。

げっ歯類特異的がん原性化合物、即ち従来の発がん性試験陽性であるが、疫学的、機序的にヒトには発がん性は無いとされている化合物に関しては12の化合物について検討されたが、これら化合物が誘発したマウスにおける肝臓腫瘍、ラットにおける種特異的な内分泌環境の変化により誘発されたような腫瘍はrasH2モデルでは全く観察されなかった。ペロキシゾーム増生剤は今回試験した3種類のうちClofibrate、DEHPでは肝臓腫瘍陽性結果を示した。WY-14643については現在試験が進行中である。ペロキシゾーム増生剤の肝臓がんのメカニズムは肝臓に存在する受容体 (PPARα) を介することが解明されておりヒトではこの受容体の発現はないことからヒトに対する危険性は無いとされている。

非発がん化合物のAmpicillin、D-Mannitol、SulfisoxazoleにはrasH2モデルでの発がん性の検出は無かった。

2) p53^{+/+}マウスモデル：p53^{+/+}マウスは、共同研究ではTaconic Farm社が生産販売している系統 (N=5) が使用され、26週間モデルとしての有用性の検討がなされた。被験物質として21化合物が選択され、6ヶ月の試験期間を基本とする共通プロトコルに従ってこれらの化合物を投与する短期がん原性試験が実施された。その成績を表1に示した。

ヒト遺伝毒性がん原性物質に対してp53^{+/+}モデルは、MelfalanとCyclophosphamideのがん原性を検出できたものの、Phenacetinに対しては陰性であった。Cyclophosphamideにおいては週2回のMTD (最大耐量) 投与により陽性結果を得ていることから、Phenacetinについても実験条件を変えた検討が必要であると思われる。

非遺伝毒性ヒトがん原性物質およびホルモンについては、p53^{+/+}モデルは、Cyclosporin Aとdiethylstilbestrolについては陽性結果が得られたが、17β-Estradiolのがん原性を検出することはできなかった。

一方、げっ歯類特異的がん原性物質に関しては12化合物が検討されたが、p53^{+/+}モデルにおいて、マウスの肝臓、ラットの内分泌系腫瘍など非遺伝的な機序に基づく発がんは観察されなかった。しかし、3種のペロキシゾーム増生薬のうち、ClofibrateおよびDEHPに対しては、肝臓腫瘍のわずかな増加がみられた。

非がん原性物質については、いずれの化合物においても陰性であった。

3) Tg.ACマウスモデル：Tg.ACマウスモデルは、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発がんプロモーション作用を有する物質の検出において、その有用性が実証されてきたが、経口投与により全身を標的臓器としたモデルとして可能性が期待されており、今回のILSIプロジェクトでは両投与経路での検証結果が報告された。実験方法としては、8週齢雌雄動物に2-7回/週、総計26週間皮膚塗布と経口投与で実施した。結果の判断では皮膚塗布試験では皮膚のpapilloma、標的臓器の肉眼、組織検査を更に経口投与では前胃のpapillomaを指標にした。共通プロトコルに準拠して表1に示された21の被験物質が選択された。

ヒト遺伝毒性がん原性物質では、Melfalanに対しては経口投与でがん原性を検出できたがPhenacetinとCyclophosphamideでは陰性結果であった。

非遺伝毒性ヒトがん原性物質およびホルモンでは、Diethylstilbestrolおよび17β-estradiolでは陽性結果が得られた。しかしCyclosporin Aでは、最高用量群 (0.8mg) の雌でのみ皮膚のpapillomaの有意な発生増加を認めたが、雄ではcontrolと差異は認められなかった。

げっ歯類特異的がん原性物質では、7種の化合物のうちClofibrateでは経口投与で皮膚や肝臓に腫瘍の発生は認められなかったが肝細胞肥大が雄の500mg/kg群で認められた。また、Phenobarbitalの経口投与試験では試験開始前に動物が多数死亡し、必要数が不足して試験結果の判定は不能であった。その他の化合物、すなわちReserpine、Methapyrilene、WY-14643、DEHP

およびSulfamethoxazoleでは陰性であった。

非がん原性物質では何れの化合物においても陰性の結果が得られた。

なお、以前指摘された皮膚適用試験に用いる溶媒(アセトン、エタノール、メタノール、DMSO等)毎に腫瘍の発生に差異があるという問題は検討の結果、アセトンかエタノール(70-100%)を用いればその発生に差異は認められず、問題は解決したといえる。

4) XPA⁺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らによって開発されたものであり、DNA障害に対する除去修復能を欠損している。ヒトの遺伝性疾患である色素性乾皮症のモデルとして紫外線障害に高感受性であると同時に、DNA障害を誘発するDMBA、B[a]P、PhIP等の発がん物質にも高感受性を示すことが報告されている。さらに検討途中から、XPAとともにp53をノックアウトしたモデル(XPA⁺/p53⁻モデル)についての検証が追加された。これらXPA⁺およびXPA⁺/p53⁻モデルの検証試験で特記すべきは、他の遺伝子改変動物モデルとは異なり試験期間が39週間で実施されていることである。これは、XPA⁺モデルでは陽性対照物質であるB[a]P、p-Cresidine、2-AAFでも26週間の試験期間では腫瘍の発現が少なく、判定できないことが判明したためである。

ヒト遺伝毒性がん原性物質について、XPA⁺ではPhenacetinの試験が実施されており、結果は陰性であった。XPA⁺/p53⁻モデルも陰性の結果であった。CyclophosphamideおよびMelphalanについてはまだ結果が得られていない。

非遺伝毒性ヒトがん原性物質およびホルモンについては、XPA⁺およびXPA⁺/p53⁻モデルともCyclospolin AおよびDiethylstilbestrolで陽性、17-β-EstradiolはXPA⁺/p53⁻は陽性であったが、XPA⁺モデルでは陰性であった。

げっ歯類特異的がん原性物質に関してはXPA⁺モデルで7化合物、XPA⁺/p53⁻モデルで5化合物の試験結果が得られており、WY-14643がXPA⁺モデルで陽性であった以外は全て陰性であった。この結果より、本モデルは基本的には非遺伝毒性的な機序に基づくげっ歯類特有の発がん物質には反応しない可能性が示された。

例外のWY-14643はペルオキシゾーム増生薬であるが、同様の作用を有するClofibrate(26週間試験の結果)あるいはDEHPでは陰性であり、更に検討が必要と思われる。XPA⁺/p53⁻モデルではDEHPは陰性であり、WY-14643およびClofibrateの結果はまだ得られていない。

非がん原性物質のMannitol、Ampicillinでは陰性であった。

5) p53⁻ C57BL/6およびp53⁻ CBAマウスにおけるPhenolphthalein(ph)の発癌感受性: phは、Ames試験が陰性、染色体異常および小核試験が陽性であり、がん原性試験ではF344ラットの腎と副腎、B6C3F1マウスで造血器系と卵巣に腫瘍を誘発し、p53の片側アレルのexon5をノックアウト(KO)したC57BL/6マウス(p53⁻ TSGマウス)での6ヶ月の実験においてもリンパ腫を誘発することが知られている。しかし、rasH2マウスを用いた我々の実験でphはいずれの組織にも腫瘍は誘発されなかった。一方、我が国ではp53片側アレルのexon 2をKOしたCBAマウス(p53⁻ CBAマウス)とexon 2をKOしたC57BL/6マウス(p53⁻ CIEAマウス)が供給されているが、これらのマウスに対するphの発がん感受性は明確にされていないので、以下の実験を行った。雌雄のp53^{+/+} C57BL/6J CIEA(実中研)とp53^{+/+} CBA(オリエンタル酵母)およびそれらの同腹のwildマウスを用い、phを6000および12000ppmの濃度で基礎飼料に混じ26週間自由に与えた。実験期間中にphに起因すると思われる体重増加抑制や死亡動物は認められなかった。雌雄とも各投与群で造血器系を含めいずれの組織も投与に関連する腫瘍の増加は認められなかった。

D. 考察

rasH2マウスモデルにおけるヒト遺伝毒性がん原性化合物では、今回用量設定試験により決定した用量を用いて新たに実施したのはCyclophosphamideのみであり、適切なMTDを用いることにより、ヒトで報告されているものと同じ膀胱移行上皮腫瘍が高率に認められたことは、発がん性試験における用量設定の重要性を再認識させるものである。PhenacetinとMelphalanは、NTP試験の用量を採用した以前の試験であるため、

Phenacetinでは陽性結果が見られているが、MelphalanについてはMTDを採用した再試験を実施することにより明確な結果が得られると思われる。山本等により先回実施されたrasH2の検証結果と今回の結果を合わせて考察すると、rasH2モデルは遺伝毒性発がん物質には強い感受性を示すことが再確認された。非遺伝毒性発がん物質のうちホルモン剤についてはDiethylstilbestrolでは内分泌関連臓器に陽性結果を示したが、17β-Estradiolでは腫瘍性変化は発現されず、ホルモン受容体の亜系間の差異なども関連すると思われる。げっ歯類特有な発がん物質はペルオキシゾーム増生剤(pp)を除いて全て陰性であったが、ppのその発癌機序にppのリセプターを介した発癌メカニズムが関与しているか否か明らかでなく、今後の検討が必要である。

p53⁺モデルについては、米国NTPなどの発表成績から、p53⁺モデルは遺伝毒性がん原性物質に対する検出感度・精度の高いモデルであるとされてきた。本共同研究では、非遺伝毒性がん原性物質に対しては、ペルオキシゾーム増生剤を除いて陽性成績は得られなかった。したがって、p53⁺マウスを用いた短期がん原性試験は、ラットを用いたがん原性試験が陽性である時に、その発がんに遺伝的機序が関与するか否かについての情報を提供するものと考えられる。また、従来の知見と共同研究の成績から、本モデルが偽陽性結果をもたらす可能性は低いと思われる。しかし、本モデルは、ヒトがん原性物質であるPhenacetinなどのいくつかのがん原性物質を検出することができなかった。このため、本モデルでの陰性結果の評価は、投与条件や全身暴露などの周辺情報を考慮した上で慎重に行う必要があるものと思われる。今後、p53⁺マウスを用いた試験法のバリデーションにおいては、Phenacetinなどの偽陰性結果についての背景の解明や投与条件を変えた再試験の実施が必要であると考えられる。また、医薬品のがん原性評価に適用していく場合には、発がん感受性が増加する機序を明らかにすることが重要であろう。p53⁺マウスでは残った正常p53遺伝子が欠失するLOH (loss of heterogeneity) が多くの腫瘍で認められているが、それだけでは説明できない腫瘍もある。標的遺伝子のみでなく、他の癌遺伝子の動向も把握す

る必要があると思われる。

TG.ACマウスについてのヒト遺伝毒性がん原性物質では、PhenacetinとCyclophosphamideでがん原性を検出できなかった。これは従来指摘されている、局所塗布における被験物質の全身(あるいは標的細胞)暴露証明の問題等が関与しているのかも知れない。今後、全身暴露が証明された後、投与条件を変えるなどをして更なる追加実験が必要であろう。非遺伝毒性ヒトがん原性物質およびホルモンではCyclosporin Aで問題が見られた。すなわち雌の最高投与群の雌でのみ腫瘍の発生があり、性差が認められた。しかし残り2被験物質では陽性の結果であった。以上の結果から、本モデルは局所塗布における被験物質の全身暴露の証明という問題が指摘されているが、ある程度その有用性は認められると考えられる。米国の研究者はTg.ACとp53の両系を併せた評価系を推奨しているが、rasH2等他のモデルとの関連について三地域規制当局と各企業体との科学に基づいた調整が必要であろう。

XPA⁺マウスモデルは、遺伝毒性がん原性物質の検出に有用であると期待されたが、Phenacetinでは陰性であり、遺伝毒性がん原性物質を完全には検出できないことが判明した。さらに、他の遺伝毒性がん原性物質の試験結果を加えて評価する必要があると考えられる。Cyclosporin A、Diethylstilbestrolは陽性であったが17β-Estradiolは陰性であり、ホルモン剤に対しても偽陰性の結果が得られている。また、基本的には非遺伝毒性的な機序によるげっ歯類特有の発がん物質は検出しないと考えられるが、ペルオキシゾーム増生剤では陽性を示す可能性が示された。XPA⁺/p53⁺モデルにおいてもPhenacetinは検出できなかった。その他の試験結果もほぼXPA⁺モデルと類似した結果を示している。このモデルが開発され、検証試験が実施されている経緯は不明であるが、除去修復能を欠損しただけのXPA⁺モデルでは多様な遺伝毒性を示すがん原性物質の検出に限界があり、感受性を高める必要があると考えられたためではないかと想像される。本モデルを開発した研究者グループは、がん原性物質への反応は一般的にXPA⁺/p53⁺ > XPA⁺ > wild typeの順であり、ダブルノックアウトの効果を主張しているが、これまでに得られた結果でXPA⁺モデルあるいはp53⁺モデルと異なる

Table 1 Tentative Results from International Collaboration Study

	rasH2	p53 ^{+/+}	Tg.AC		XPA ^{-/-} (9mo)	XPA/p53
			Gavage	Skin		
Human carcinogen						
phenacetin	P	N	N	N	N	N
cyclophosphamide	P	P	N	N		
melphalan	Eq	P	P	N		
Immunosuppr. human carcinogen						
cyclosporin A	N	P	Eq	Eq	P	P
Human hormone carcinogen						
diethylstilbestrol	P	P	N	P	P	P
17-β-estradiol	N	N	N	P	N	P
Nongenotoxic rodent-only carcinogen						
based on Epidemiology	clofibrate	Eq / P	Eq	P	N (6mo)	
	phenobarbital	N	N	Inade	N	N
	reserpine	N	N	N	N	N
	dieldrin	N	N			
	methapyrilene	N	N	N		
based on mechanism	haloperidol	N	N		N	N
	chlorpromazine	N	N			
	metaproterenol	Eq	N			
	Wy-14643	(P)	N	N	N	P
	DEHP	P	Eq	N	N	N
Non-genotoxic non-carcinogen	sulfamethoxazole	N	N	N	N	
	mannitol	N	N	N	N	N
	ampicillin	N	N	N	N	N

P : 陽性 N : 陰性 Eq : 判定困難

のは17β-Estradiolで陽性を示したことのみにあり、ダブルノックアウトの意義は十分に検証されたとは言えない。XPA^{-/-}およびXPA^{-/-}/p53^{+/+}モデルのいずれも、他のモデルと比較してデータが少なく、十分な評価は困難であるが、試験期間が39週間必要である点だけでも、他の26週間で試験されているモデルと同列に扱うことはできないと考えられる。更に、両XPAモデルではwild typeと比較して毒性が強く発現し、投与量設定にはTg動物を使う必要があるとされている。以上のように、現時点では本モデルが他のモデルと比較して優位な点は示されていないと考えられる。

p53^{+/+} C57BL/6およびp53^{+/+} CBAマウスにおけるphenolphthaleinの発癌感受性についての実験成績のように、同じp53^{+/+}マウスでも遺伝子改変操作や系統の違いにより発がん感受性が異なることが示唆されたことから、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ろう。

E. 結論

今回の研究から、問題点として、rasH2マウスモデルについては、1) 全ての遺伝毒性発癌物質を必ずし

も検出できない；2）ホルモンに対して陽性結果が得られているが、そのメカニズムが不明；3）ペルオキシゾーム増生剤（pp）による肝腫瘍誘発にppのリセプターを介した発癌メカニズムが関与するか否か明らかでないことが、また、p53ノックアウトマウスモデルでは、1）遺伝毒性発癌物質全てを必ずしも検出できない；2）発癌メカニズムとしてp53の変異・欠損が発癌に必ずしも関与していないことが指摘された。さらに、Tg.ACマウスモデルでは、1）経口投与と経皮投与での試験結果が異なる；2）遺伝毒性・非遺伝毒性発癌物質のいずれに対しても発癌感受性が高いといわれているが、必ずしもすべてのそれらを検出できない；3）発癌メカニズムが明確ではないことが問題点としてあげられ、XPA⁺マウスモデルにおいては、1）検証試験の数が少なく、最終評価は困難；2）被験物質を9ヵ月まで投与しない限り発癌評価は困難などの問題点が本研究班で指摘された。しかし、各モデルに

解明すべき課題があるものの、rasH2やp53⁺マウスモデルは、遺伝毒性の機序に基づくがん原性を検出し得る試験系として、医薬品のがん原性評価のweight of evidence approachの一環として実用化の可能性が示唆される。しかし、長期がん原性試験を補足する目的で、本モデルを適用し得る条件に関しては、各国規制当局間や各医薬品開発企業において見解の相違が生じることが予想される。したがって、これらのモデルを含む各種の短期試験系の実用性が評価できるようになった段階で、ICHにおいて調和を図って行くことが実用化を推進する上で必要であろう。また、同じp53⁺マウスでも遺伝子操作やマウスの系統によって発がん標的性および感受性が異なることから、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ことも重要である。

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

分担研究者：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：本間 正充（国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部）
松岡 厚子（国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部）
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㈱安全性研究所）
島田 弘康（第一製薬㈱安全性管理部）
森田 健（グラクソ・スミスクライン㈱筑波研究所）
浜田 修一（エスエス製薬㈱中央研究所）
宮島 博文（塩野義製薬㈱新薬研究所）
小沢 重成（キッセイ薬品工業㈱安全性研究所特殊毒性研究室）
荒木 春美（富山化学工業㈱総合研究所 安全性研究所）
千手 奈美（明治製薬㈱薬品総合研究所安全性研究所）
内藤 寿英（ウェルファイド㈱研究本部開発研究所安全性研究部）

要旨

2000年末に刊行された、英国Dept. of Healthの諮問機関であるCOM（Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment）のガイダンスにおいて、in vitro小核試験はin vitro染色体異常試験の代替法としてだけでなく、染色体の数的異常を検出するための試験法として推奨されている。これは、遺伝毒性の分野における新しい動きと考えることが出来る。In vivoの試験系においては、化学物質の染色体異常誘発性を評価するのに、げっ歯類の骨髄細胞を用い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試験系においては、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、それが結果に反映されてくる。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。英国のCOMの動きと共に、OECDでのガイドライン化、ICHのS2における検討等、国際的にも新しい評価系として注目されている。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。本年度は日本側が受け持ったチャイニーズハムスター肺由来細胞株CHL/IUのみでなく、他の細胞株についてもデータが出そろい、in vitro小核試験の全体的な評価をまとめる。

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であり、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とともに、SFTGに協力し国際共同研究の総合的なまとめを行う。なお、本国際共同研究は9ヶ国、のべ42機関が参加し、以下の4項目を明確に結論づける目的をもって行われた。

1. Clastogenとaneugenを特異的に検出可能かの評価
2. 処理、標本作製時期の最適化と樹立細胞株を用いた場合のcytocharasin B (Cyt-B)の必要性
3. 細胞株間の反応性の比較
4. Cyt-Bを用いた場合の、単核細胞と二核細胞を共に検討する重要性に関する考察

1. 試験計画

共同研究の共通的な計画として、1) 原則として各被験物質は異なる2カ所以上の研究所で試験する、2) 事務局において被験物質は一括購入し、同一バッチの被験物質をコード化して各参加者に送付、3) 陽性対照物質に関しても共通のものを使用する (MMCを予備試験で決定した用量で使用)。以上を共通の確認事項として、参加者に通知し、共通認識の基に共同研究を行った。

本共同研究では、1) ヒトリンパ球、2) チャイニーズハムスター卵巣由来細胞株CHO、3) チャイニーズハムスター肺由来細胞株CHL/IUおよび、4) マウスリンパ腫細胞L5178Yを用いて行われた。各参加機関は1種類以上の使い慣れた細胞株を選択して試験を行った。なお、細胞に関しても出きる限り同一の細胞を用いて行った。例えば、我が国で対応したチャイニーズハムスター肺由来細胞株CHL/IUに関しては、同一ロットの細胞を各機関が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して用いた。

試験プロトコール関連の検討事項として、1) 処理時間、2) 処理時間およびCyt-B使用との関連における標本作製時期、3) 樹立細胞を用いる場合のCyt-B使用の必要性を検討するため、それぞれの使用細胞について固有の条件が設定された。

小核誘発性に関しては、1) Cyt-Bを用いない場合には1000細胞を観察してその内に観察された小核を有する細胞数、2) Cyt-Bを用いる場合には2核細胞1000細胞中の小核を有する細胞数および可能なら単核1000細胞中の小核を有する細胞数、3) さらに誘発倍数として溶媒対照に対する処理群における小核細胞の出現頻度の倍率を求めた。

細胞毒性の評価はin vitro試験系において重要な位置を占める。本共同研究においては、1) Cyt-Bを用いない場合には細胞数のカウント、2) Cyt-Bを用いる場合は1000細胞中の多核(2核以上)細胞のパーセント、3) 相対生存率として溶媒対照に対するパーセントを求めるとし、各試験においてこれらの情報を同時にとることとされた。

本共同研究における結果は、次の定義に従い集計を行った。

- 1) 溶媒対照に対して有意な小核を有する細胞の増加
 - 2) 再現性のある増加
 - 3) 用量反応関係のある増加
- 上記全てを満たす場合：陽性 (Positive)
上記全てを満たさない場合：陰性 (negative)
それ以外の場合：疑陽性 (equivocal)

B. 研究方法

本共同研究でモデル化学物質として用いたものを表1に細菌を用いる復帰突然変異試験 (BGM) とマウスリンフォーマTK試験 (MLA) の試験結果と共に示す。マウスリンフォーマTK試験でのみ陽性となった3種 (acetylsalicylic acid, clofibrate, D-mannitol)、染色体の構造異常を誘発することが知られている4物質 (Bleomycin, urethane, 5-fluorouracil, cytosinearaboside)、染色体の数的異常を誘発することが知られている3物質 (colchicine, diethylstilbestrol, griseofulvin)、および陽性対照物質としてmitomycin Cを用いた。なお、試薬として用いたCytochalasin BはSigma社製のものを各自購入して用いた。

表1 共同研究に用いたモデル化学物質とその分類

COMPOUND	CAS.negative.	BGM	MLA
<i>MLA unique positive</i>			
Acetylsalicylic acid	50-78-2	negative	positive
Clofibrate	637-07-0	negative	positive
D-Mannitol	69-65-8	negative	positive
<i>Clastogens</i>			
Bleomycin	9041-93-4	positive	negative
Urethane	51-79-6	positive	positive
5-Fluorouracil	51-21-8	positive	positive
Cytosine arabinoside	147-94-4	positive	positive
<i>Aneugens</i>			
Colchicine	64-86-8	negative	positive
Diethylstilboestrol	56-53-1	positive	positive
Griseofulvin	126-07-8	positive	positive
<i>Positive control</i>			
Mitomycin C	50-07-7	positive	positive

CHL/IU細胞を用いる本共同研究には国内9機関が参加し、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), 50 U/ml-mg/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-Fluorouracil, 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原則として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された)

化学物質処理に関しては、用いた細胞の増殖特性等を考慮し、細胞毎に微調整が行われた。それぞれの細胞に対する処理時間、発現時間を表2に示す。CHL/IUに関する具体的な処理方法を以下に示す。

- 1) 直径6 cmプラスチックディッシュに細胞を播種
- 2) 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MMC 0.1 μ g/mL、時間処理ではMMC 0.05 μ g/mLで処理した）
- 3) 処理終了後、化合物を除去し、新しい培養液で培養（Cyt-B添加群ではこの時3 μ g/mLとなるように添加し18時間培養）
- 4) 培養終了後細胞を回収
- 5) 低張処理後固定し、スライド標本作製

表2 各細胞に対する被験物質の処理時間および発現時間

Treatment	with cytochalasin B			without cytochalasin B			
	Short	Short	Long	Short	Short	Long	Long
Recovery	Long	Short	Long	Short	Long	Short	Long
Human lymphocytes	3+45	3+26	20+28	nt	nt	nt	nt
CHO cells	nt	3+20	24+20	3+21	3+45	24+0	24+24
CHL cells	nt	3+18	24+18	3+21	3+45	24+0	24+24
L5178Y cells	nt	3+20	24+20	3+21	3+45	24+0	24+24

nt: not tested

観察は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

今回の国際共同研究全体のまとめを表3に示し、さらに被験物質のグループ毎にまとめたものを表4に示す。

表3 結果のまとめ

Cell type	with cytochalasin B			without cytochalasin B				
	Treatment	Short	Short	Long	Short	Short	Long	Long
Recovery	Long	Short	Long	Short	Long	Short	Long	
<i>ALL COMPOUNDS</i>								
HL	5/10	6/10	5/10	nt	nt	nt	nt	
CHO cells	nt	5/6	5/6	5/6	5/6	5/6	5/6	
CHL cells	nt	7/10	9/10	9/10	7/10	9/10	9/10	
L5178Y cells	nt	4/6	4/6	4/6	6/6	4/6	6/6	
HL	50%	60%	50%	nt	nt	nt	nt	
CHO cells	nt	83%	83%	83%	83%	83%	83%	
CHL cells	nt	70%	90%	90%	70%	90%	90%	
L5178Y cells	nt	67%	67%	67%	100%	67%	100%	

nt: not tested

表4 化学物質グループ毎の結果（期待どおりの結果数/全体の結果数）

Cell type	with cytochalasin B			without cytochalasin B				
	Treatment	Short	Short	Long	Short	Short	Long	Long
Recovery	Long	Short	Long	Short	Long	Short	Long	
<i>MLA UNIQUE POSITIVE COMPOUNDS</i>								
HL	2/2	2/2	2/2	nt	nt	nt	nt	
CHO cells	nt	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	
CHL cells	nt	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	
L5178Y cells	nt	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	
<i>CLASTOGENS</i>								
HL	2/5	2/5	2/5	nt	nt	nt	nt	
CHO cells	nt	3/4	3/4	3/4	3/4	3/4	3/4	
CHL cells	nt	3/5	4/5	4/5	3/5	4/5	4/5	
L5178Y cells	nt	2/3	2/3	2/3	3/3	2/3	3/3	
<i>ANEUGENSAND POLYPLOIDY INDUCERS</i>								
HL	1/3	2/3	1/3	nt	nt	nt	nt	
CHO cells	nt	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	
CHL cells	nt	2/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	
L5178Y cells	nt	1/2	1/2	1/2	2/2	1/2	2/2	

nt: not tested

1. 細胞株間の比較

Cyt-B存在下での細胞間の比較を陰性対照と陽性対照について、それぞれ図1と図2に示す。陰性対照に関してはCHOとCHL/IUでほぼ同様の小核細胞出現頻度を示し、ヒトリンパ球が中間の値を示し、L5178Yが最も低い値を示した(図1)。一方陽性対照に関し

ては、L5178Yが最も高い小核誘発性を示し、CHO、CHL/IUがほぼ同等の高い値を示した。ヒトリンパ球を用いた場合にはCHO、CHL/IU、L5178Y各細胞株と比較して反応性が低かった。このように陽性対照物質であるMMCに関しては、強さに多少の差はあるものの、かなり安定した小核誘発性を示した。

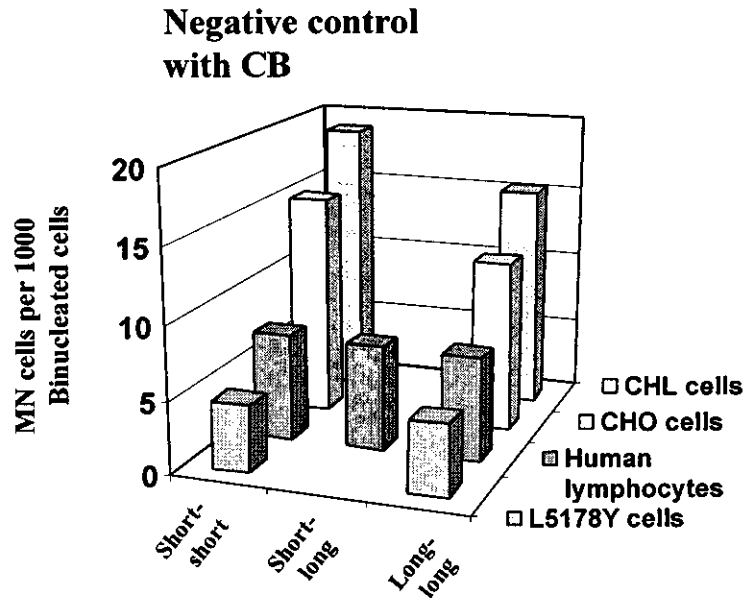


図1 細胞間の比較 (CB存在下での陰性対照)

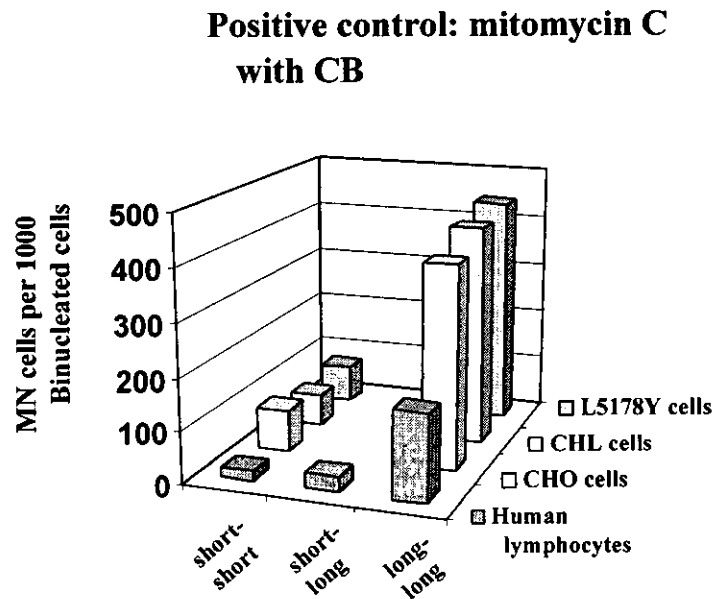


図2 細胞間の比較 (CB存在下での陽性対照)

2. Cyt-Bの効果

Cyt-Bの効果に関する検討結果、CHOとCHL/IUに関してはCyt-Bの効果は認められなかった。しかし、L5178Yを用いた場合にはCyt-Bが存在することにより

反応性が明らかに低下した。この原因は解明されていないが、今後も継続して検討する必要がある。陽性対照群についてのCyt-Bの効果の例を図3に示した。

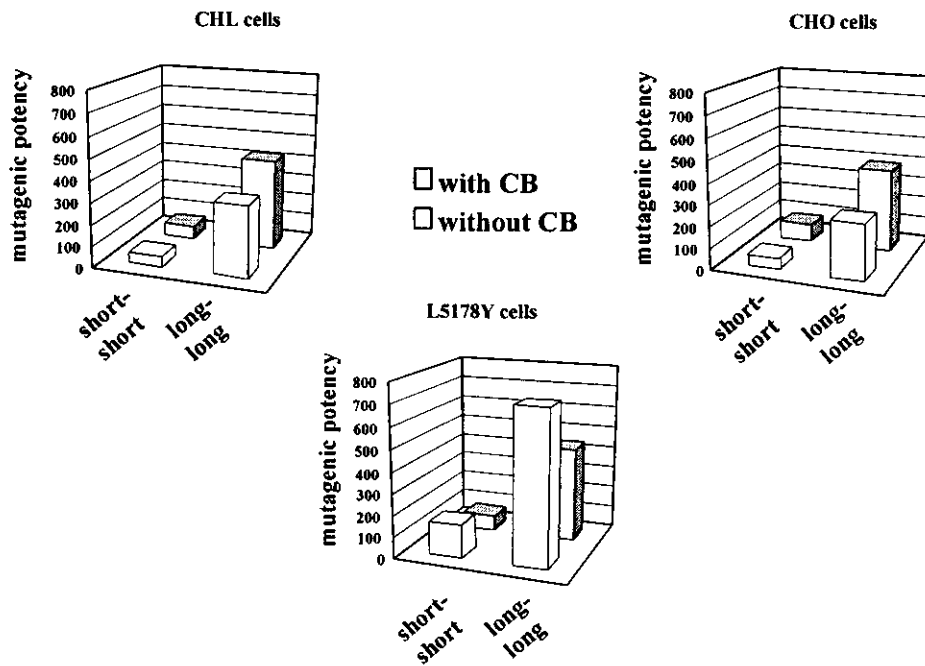


図3 各種細胞におけるCBの効果 (MMC)

D. 結論

今回の共同研究において得られた現時点での結論として、とりまとめを担当した事務局として以下のようにまとめている。

- 1) CHOとCHL/IU細胞では同様の反応性を示した
- 2) CHOとCHL/IU細胞に関してはCyt-Bの効果は認められなかった
- 3) ヒトリンパ球細胞が他の細胞株と比較して反応性が低い
- 4) L5178Yに関してはCyt-Bを用いることにより反応性が明らかに低下する
- 5) 短期処理と長期処理が必要
- 6) 短時間の回復時間をおく必要はない
- 7) Cyt-Bを用いる場合には単核細胞と2核細胞の両方について小核細胞の出現頻度を求める必要がある
- 8) Cyt-Bを用いない場合には処理前後の細胞数を計

数し、細胞の増殖を確認する必要がある

本研究班としては、上記1～4、6に関しては特に異論はない。ただし、現時点では例数が限られているため断定的なことは言えないが、これまでに蓄積してきた日本国内における共同研究等のデータベースも考慮に入れると、5)の長期処理に関しては今回行われた24時間処理よりさらに長時間の連続処理が有効であると考えている。また、7)のCyt-Bを用いる場合の単核細胞の計測に関しては、染色体の数的異常を起こす物質は単核細胞でも小核の誘発が見られることから、染色体数的異常誘発物質の識別に有効だとされ¹⁾、今回の試験でも染色体数的異常誘発物質で単核細胞に小核の誘発が観られたが、理論的な解釈が難しく、その必要性を強く示唆するデータは得られなかったと考える。さらに、8)に関しては、目下細胞毒性の評価法を探索している途中であり、今後、我が国からより適切な評価法を提案できるよう努力したい。

E. 今後の課題

今回の共同研究で新たに出てきた問題点として以下のものが挙げられる。

- 1) L5178Y細胞に於けるCyt-Bの効果についての考察
- 2) ヒトリンパ球を用いる場合の細胞周期に関する考察（2回目の分裂中期?）
- 3) 細胞毒性の評価法に関する選択及び考察（細胞計数vs2核細胞指数）
- 4) 小核誘発性に関して明確な結論が得られなかった場合の細胞毒性の評価
- 5) 数的異常を誘発しない物質に対する単核細胞中での小核細胞の増加の解釈

In vitro小核試験の需要は高まっているが、いまだに統一したプロトコール、ガイドラインが制定できないところに本試験法の難しさがある²⁾。In vivoの小核試験は現在生体内における染色体異常誘発性を評価する手法として問題なく幅広く用いられているが、in vitro小核試験に関しては未だ汎用されるに至っていない。一般化を妨げている問題は、in vitro小核試験はヒトの末梢リンパ球初代培養細胞を用いる方法が最初に検討されたため、被験物質での処理から標本作製までに細胞が分裂したか否かを見極める必要のあったことが考えられる。末梢リンパ球の初代培養においては、PHA（phytohemagglutinin）等細胞の分裂を開始する薬剤で全ての細胞が分裂するものではないのではなく、また反応性に個人差もあることから、分裂を保証するためにCyt-B処理が導入された³⁾。しかし、チャイニーズハムスター肺由来細胞株のように常に分裂を繰り返す、定常的に増殖している細胞集団においてCyt-Bの処理が必要か否かで専門家の間でも意見が分かれている。今回の国際共同研究の結果をみる限り、被験物質の選択にバイアスがある可能性は否定できないが、少なくともチャイニーズハムスター肺由来細胞株に関する限りCyt-Bを適用する効果は確認できなかった。さらに、データベースが十分でないために断定は出来ないが、マウスリンフォーマTK試験に用いられているL5178Y細胞においてはCyt-Bを適用することにより、明らかな感度の低下が観察された。ヒトリンパ球に関しては、今回の共同研究においてCyt-B非存在下での検討を行っていないので、その有効性の確認は出来て

いない。以上を総合的に判断するならば、Cyt-Bを適用することに疑問を持たざるを得ない。少なくとも、プロトコールのハーモナイゼーションを行う場合には、Cyt-Bの使用に関しては研究者の自主的判断が優先されるべきであろう。

今後に残された課題として、最も慎重に取り組むべきものとして、in vitro試験共通の懸案事項である細胞毒性を如何に評価し、どの程度の細胞毒性が認められる用量を被験物質の最高濃度として用いれば良いかの検討であろう。In vitro染色体異常試験においても、陽性が多すぎるとの指摘があり、その理由の一つとして細胞毒性の強い用量まで試験したため、本来の染色体異常誘発性ではなく細胞毒性による二次的なものの可能性が指摘されている。小核試験において、染色体異常試験以上に細胞毒性が認められても標本の観察が可能のため、前述のような二次的な小核誘発が結果の解釈を狂わせる基になりかねない。従って、最高用量の適切な設定法の確立はin vitro小核試験のみならず、染色体異常試験、マウスリンフォーマTK試験等ほ乳類培養細胞を用いる試験系に共通して緊急に解決されなければならない点である。

F. 参考文献

- 1) Elhajouji, A., M. Cunha and M. Kirich-Volders (1998), Spindle poison can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay, *Mutagenesis*, 13, 193-198.
- 2) Kirsch-Volders, M., T. Sofuni, M. Aardema, S. Albertini, D. Eastmond, M. Fenech, M. Ishidate, Jr., E. Lorge, H. Norppa, J. Surrallés, W. von der Hude and A. Wakata (2000), Report from the in vitro micronucleus assay working group, *Environ. Mol. Mutagen.*, in press.
- 3) Kirsch-Volders, M., A. Elhajouji, E. Cundari and P. V. Hummelen (1997). The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction, *Mutat. Res.*, 392, 19-30.