

の精神に基づき、「世界の患者さんに革新的医薬品をより早く、より安全に届ける」というICHに課せられた使命に取り組んでいくためにも、本研究班の医薬品評価法に関する研究が持つ意義は極めて大きいと言えよう。

ICH Topic and Guideline 進行状況

(2003年11月11日現在)

	Quality	Safety	Efficacy	Multidisciplinary
Step 3*	<p>Q1A : 安定性試験法ガイドライン (新有効成分含有医薬品)</p> <p>Q1AR : 安定性試験の見直し (一部のみ)</p> <p>Q1AR2 : 安定性試験の見直し (一部のみ)</p> <p>Q1B : 安定性試験法ガイドライン (光安定性)</p> <p>Q1C : 安定性試験法ガイドライン (新剤型及び一部変更)</p> <p>Q1D : 安定性試験法ガイドライン (Bracketing & Matrixing)</p> <p>Q1E : 安定性試験法ガイドライン (安定性データの評価)</p> <p>Q1F : 安定性試験法ガイドライン (気候帯Ⅲ及びⅣでの提出資料)</p> <p>Q2A : 分析法バリデーションに関する用語とその定義</p> <p>Q2B : 分析法バリデーションに関するテキスト</p> <p>Q2C : 実施方法</p> <p>Q3A : 不純物に関するガイドライン (原薬)</p> <p>Q3AR : 原薬の不純物に関するガイドラインの見直し</p> <p>Q3B : 不純物に関するガイドライン (製剤)</p> <p>Q3BR : 製剤の不純物に関するガイドラインの見直し</p> <p>Q3C : 不純物に関するガイドライン (残留溶媒)</p> <p>Q3CM : 不純物に関するガイドライン (メソ)</p> <p>Q5A : パイオテック/ロジ-医薬品の品質: ウィルスバリデーション</p> <p>Q5B : パイオテック/ロジ-医薬品の品質: 遺伝的安定性</p> <p>Q5C : パイオテック/ロジ-医薬品の品質: 製品の安定性</p> <p>Q5D : パイオテック/ロジ-医薬品の品質: 細胞株管理 (セルサブストレート)</p> <p>Q6A : 医薬品の規格及び試験方法に関するガイドライン (化学物質/3局方との調和を継続)</p> <p>Q6B : 医薬品の規格及び試験方法に関するガイドライン (バイオ)</p> <p>Q7A : 原薬GMP</p>	<p>S1A : がん原性試験を必要とする条件</p> <p>S1B : 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</p> <p>S1C : 医薬品のがん原性試験のための用量</p> <p>S1C(R) : 選択的ガイダンス</p> <p>S2A : 医薬品のがん原性試験のための用量補遺</p> <p>S2B : 医薬品のための遺伝毒性試験の特定項目に関するガイダンス</p> <p>S2C : 遺伝毒性試験: 医薬品の遺伝毒性試験の標準的組合せ</p> <p>S3A : トキソキネティクス: 毒性試験における全身暴露の評価に関するガイダンス</p> <p>S3B : 薬物動態試験: 反復投与組織分布試験のガイダンス</p> <p>S4 : 単回及び反復投与毒性試験ガイドライン</p> <p>S4A : 単回及び反復投与毒性試験ガイドライン: インスにおける長期投与</p> <p>S5A : 医薬品の生殖毒性試験法ガイドライン</p> <p>S5BM : 医薬品の生殖毒性試験法ガイドライン: 雄投精能評価法の確立</p> <p>S6 : パイオテック/ロジ-医薬品の安全性試験</p> <p>S7A : 安全性薬理試験ガイドライン</p>	<p>E1 : 慢性疾患に対し長期間の投与が想定される新医薬品の臨床試験段階において必要と症例数と投与期間について</p> <p>E2A : 臨床試験段階における安全性データの取扱いについて: 定義と緊急報告の基準</p> <p>E2BM : 臨床安全性データの取扱いについて: 報告様式</p> <p>E2C : 臨床安全性データの取扱いについて: 定期報告</p> <p>E2CA : E2Cの補遺</p> <p>E3 : 臨床試験データの取りまとめ方法と様式</p> <p>E4 : 新医薬品の承認に必要な用量反応の検出に際しての考え方</p> <p>E5 : 外国臨床データ受入れの際に考慮すべき人種・民族的要因についての指針</p> <p>E6 : GCP</p> <p>E7 : 高齢者に使用する医薬品の臨床評価ガイドライン</p> <p>E8 : 臨床試験の一般指針</p> <p>E9 : 臨床試験の統計ガイドライン</p> <p>E10 : 臨床試験における対照群選定のガイドライン</p> <p>E11 : 小児の臨床試験ガイドライン</p>	<p>M1 : 薬事関連用語集 (メディアカルターミナロジー)</p> <p>M2 : 緊急安全性情報等の電子媒体による伝達</p> <p>M2(e-CTD) : 電子化申請様式について</p> <p>M3 : 非臨床試験と臨床試験の実施タイミング</p> <p>M4 : Common Technical Document</p>
Step 4*			E2D : 承認後に得られる安全性データの取扱い	
Step 3*		S7B : 重大な不整脈発現を予測するための安全性薬理試験ガイドライン	E12A : 降圧薬の臨床評価に関する原則	
Step 2*	Q5E : パイオテック/ロジ-医薬品の同等性比較 (品質)		E2E : フアルマコビジュランス (PvP)	
Step 1*	Q8 : 製剤開発に関するガイドライン	S8 : 免疫毒性試験に関するガイドライン	E14 : QT延長及び重篤な不整脈の臨床評価ガイドライン	M5 : 医薬品辞書のためのデータ項目及び基準
	Q9 : リスク・マネジメントに関するガイドライン		E2BM : 臨床安全性データの取扱いについて: 報告様式 (見直し)	

* Step 1 : トピックスの選定・問題点の分析、EWGの設置、ICH調和ガイドライン案の起草 Step 2 : ICH調和ガイドライン案の決定・承認、各種におけるガイドライン案に対する意見聴取
 Step 3 : 寄せられた意見に基づくガイドライン案の修正 Step 4 : ICH調和ガイドライン最終合意 Step 5 : 各種における国内規制への取入れ

II. 分担研究報告 (非臨床安全性部門)

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）
平成15年度分担総括研究報告書

一非臨床安全性毒性問題一般に関する研究一

分担研究者：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長）
三森 国敏（東京農工大学 農学部 教授）
林 真（国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長）
澤田 純一（国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 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 治験指導部 顧問）
中澤 憲一（国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長）

研究要旨

本研究は、主として共同研究により、動物及び細胞を用いる試験研究およびそれらに関する調査を行い、前臨床毒性試験、安全性薬理試験に係る各方法論の国際的な確立並びにハーモナイゼーションを図ることを目的とする。本年度は3年計画の最終年度にあたるが、下記の課題の研究を遂行するため、共同研究を実施し、国内において班会議を開催すると共に、海外における専門家会議等に参加した。

- ・ 遺伝子改変マウスを用いた短期がん原性試験についての情報収集
- ・ In vitro小核試験の確立と、結果の評価に関する研究
- ・ 免疫毒性試験法の標準化に関する調査研究
- ・ 安全性薬理試験（ICH-S7B）の国際的ハーモナイゼーションに関する研究 -1
In vivo電気生理学的測定法による心臓不整脈の評価法に関する研究
- ・ 安全性薬理試験（ICH-S7B）の国際的ハーモナイゼーションに関する研究 -2
In vitro電気生理学的測定法による心室性不整脈評価法に関する研究

キーワード：国際動向、有効性評価、安全性評価、ハーモナイゼーション、ICH

A. 研究目的

新医薬品承認審査資料の国際的ハーモナイゼーションならびにガイダンス等のメンテナンス推進のための検討が進められてきている。本研究は、日・米・欧三極間の医薬品規制にかかる障壁を、科学的な裏付けの基に取り除くため、国内外の共同研究を実施し、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を目的とする。また、毒性発現のメカニズムの解明と解釈の統一を図り、それらの成果を行政に反映させるための基準値や、ガイドラインの設定を目指す。

- (1) ICHで策定された遺伝子改変動物を用いた短期発がん試験により、医薬品のがん原性が評価されてきたが、これらに遺伝子改変動物における発癌メカニズムについては十分に理解されていない。これら遺伝子改変マウスにおける発癌増強メカニズムがどこまで解明されたかについての文献収集を行い、それらの問題点を明らかにした。
- (2) 発がんメカニズムや、次世代に対する遺伝的影響を解明するためには、染色体の構造的変異だけでなく、染色体の数的変異（特に異数性）の検出が重要である。近年、異数性誘発物質の検出系として、小

核をキネトコア（染色体の動原体）抗体、あるいは動原体特異的プローブで標識するFISH法のガイドライン化について、IWGTでも検討議題となりつつあることを受け、染色体の異数性を検出するための細胞遺伝学的技術のプレバリデーションを目的とした共同研究を行った。

- (3) 免疫毒性試験に関する文献調査及び国内外の動向調査を行い、得られた情報を基に、免疫毒性試験ガイドランス（案）を作成した。さらに、ICHにおける調和ガイドライン作成を目的とした免疫毒性試験データの収集を行った。
- (4) 医薬品の重篤な副作用として近年注目されている心臓の致命的不整脈であるTorsade de Pointes（TdP）誘発を予測的に評価するための非臨床試験法について、国際的ハーモナイズした安全性薬理試験のガイドラインを開発するために調査、検討を行った。
- (5) 医薬品の副作用の一つであるQT延長を伴う致死性の心室性不整脈を評価するin vitro試験方法を検討し、評価法の国際的なハーモナイゼーションを行った。

B. 研究方法

がん原性、遺伝毒性、免疫毒性、安全性薬理試験に関する各々のガイドラインについてさらなる科学的根拠を得るため、これまで通り産官学の研究者の密接なる協力を得て研究は実施された。研究成果を厚生労働行政に反映させるため、班員による定期的な会合の他に、海外での会議にも参加し、日米欧の専門家との討議を行った。

各研究課題の具体的研究計画は以下の通りである。

- (1) CB6F1rasH2マウス、p53 (+/-) マウス、Tg.ACマウス、Xpaノックアウトマウス（以下Xpaマウス）及びXpa/p53^{+/-}ノックアウトマウス（以下Xpa/p53^{+/-}マウス）に関する研究状況を、2002年及び2003年度の発表文献を中心に調査した。また、医薬品をはじめ、ヒトに暴露の可能性のある化合物の発癌性評価における上記のモデル動物の利用可能性に関する成績をまとめた。
- (2) 染色体の数的異常を検出するための細胞遺伝学的技術のバリデーションに関する共同研究を行った。

染色体異数性を誘発するモデル化合物としてTrichlorfon、Carbendazimを選択し、ヒトリンパ芽球細胞株WTK-1を用いてTK遺伝子突然変異試験、および小核試験を行った。小核用スライドの一部を5種類の染色体特異的プローブ、もしくは動原体近傍にのみ局在する染色体特異的配列であるalpha satellite DNAをプローブとしてFISHを行い、染色体異数化による小核の頻度を求めた。

- (3) ICHにおける三極のガイドランスの調和を図るために必要な免疫毒性試験データの収集を行った。調査項目としては、用量、体重、器官重量、血液学的指標、病理組織学的指標、リンパ球サブセット、血中Igレベル、特異的抗体産生、NK細胞活性、遅延型過敏症、宿主抵抗性等を挙げた。
- (4) 現在ICHにおいてステップ3にある安全性薬理試験のS7Bガイドライン作成の基となるデータ収集、解析、討議を行った。データ収集は日本製薬協会のQTPRODUCTプロジェクト（山本恵司代表、44製薬企業＋6委託試験機関が参加）、ILSI/HESIプロジェクト（Pete Siegl代表、総計55社参加）およびFDA/George town大が主に行った。
- (5) 非臨床安全性薬理試験に有効なin vitro試験方法の評価を行うために、日米欧の行政および民間からの専門家で形成されるワーキンググループを組織し、必要に応じて実際に試験を行なって各試験法の適否を判定した。

（倫理面への配慮）

本研究班においては培養細胞を用いる試験研究、文献調査等が主として行われ、倫理面で問題となるようなものではない。一部動物を用いた研究がなされたが、それぞれ実験動物倫理規範の精神をくみ取り、十分問題の無いよう慎重に行った。また、本研究班においては「提供されたヒト試料を用いる」および「人を対象とする」研究は行われていないので、ヒトへの倫理面で問題となることはなかった。

C. 研究結果

- (1) rasH2、p53^{+/-}、Tg.AC、Xpa及びXpa/p53^{+/-}マウスの発がん感受性に関する研究についての文献調査

を行った結果、新たに以下の知見が得られた。

rasH2マウスでは遺伝子障害性の化合物では導入遺伝子の点突然変異があり、発癌のプロセスに入っているのが主体であろうと思われた。p53^{+/-}マウスでは、ニトロソアミン類のDBNの成績により、本モデルが遺伝子障害物質の検索に有用であることを補強する知見が得られた。Tg.ACマウスでは、glucocorticoid receptorや青色光照射は、皮膚腫瘍発生に対して抑制的に働くこと、v-Ha-rasを介した皮膚腫瘍発生にKSRIが必須であるが、cytokineであるIL-1 α は抑制的に働くことが示唆された。Xpaマウス及びXpa/p53^{+/-}マウスでは、NERはbulkyなDNA障害を修復する重要な機序であるが、NER欠損マウスは、GGR或いはTCRのいずれの過程が欠損するかにより発癌感受性や毒性発現に差を生じることがわかった。

(2) モデル化合物として、マウス精子における異数性誘発物質 (Trichlorfon) と、倍数性誘発物質 (Carbendazim) を用い、ヒトリンパ芽球WTK-1細胞における小核誘発率、分裂細胞の数、染色体数の分布、ヒト染色体プローブを用いたFISH法による間期核および小核のシグナル数および突然変異誘発率の分析結果を比較検討した。両物質とも小核も誘発するとともに、分裂細胞の数も増加させたが、それらの結果から異数性と倍数性を区別することはできなかった。FISH法でシグナル陽性となった小核の頻度は、小核含有細胞を指標にすると濃度依存的に増加したが、小核自身を指標にした場合には明確な濃度依存性は認められず、どちらの指標でも異数性と倍数性を区別できなかった。また、直接染色体数を計数した結果は、労力を要するうえにバラツキが大きいためから数的異常の検出系としては推奨できないことが示唆された。一方、FISH法で間期核の特定染色体の数を計数する方法は、染色体数の分析が比較的簡便であり、しかも染色体の消失と付加を区別して解析することにより、異数性誘発物質と倍数性誘発物質を区別できる可能性も示唆されたことから、染色体の数的異常の検出系としては最も有力であることが明らかとなった。

(3) 免疫毒性試験データを収集するための調査票を作成し、日米欧の製薬企業に頒布してデータを収集し

た。データは、化合物数にして45品目あり、反復投与毒性試験及び機能試験の両者のデータがあるため、データとして採用しうるものは28品目であった。非公式ワーキンググループ会合において解析及び議論を行い、引き続きデータ収集を継続し、ICHにおける調和ガイドラインの作成に着手することが望ましいとされ、ICH運営委員会に提案された。調和すべき免疫毒性試験ガイダンスの内容としては、「意図せざる免疫抑制」を対象とすることで合意された。

(4) S7B統合的リスク評価において主たる非臨床QT評価アッセイ系として採用されたインビボQTアッセイ、イオンチャネルアッセイおよびAPDに代表される再分極アッセイ系の感度、予測性および一貫性について信頼性を検証するために必要とされたデータ解析および検討を行った。Prospectiveなデータとして、FDA、PhRMAおよびEFPIAにより構成され非臨床Cardiovascular Safety Subcommitteeにより収集されたILSI/HESIデータ、44製薬企業と6受託試験機関が参加し、全ての試験系に関して、同一標準プロトコールの下で試験を行った日本製薬協によるQTPRODUCTプロジェクトデータを調査した。また、retrospectiveなデータとしてICH-S7Bワーキンググループに提出された、In vitro hERGについての149文献、および企業 (JPMA、US-PhARMA、EFPIA) による55情報、In vitro APDに関する143報、および34情報、In vivo麻酔に関する28報および36情報、In vivo Telemetryに関する5報、および24情報の、54薬物に関する総計325報および149情報をデータベースとして解析した。解析はブリュッセル会議と大阪会議で行った。

(5) in vitro安全性薬理試験における電気生理学的測定法として、活動電位再分極相で流れるカリウム電流 (I_{Kr})、および活動電位幅 (ADP) の測定が挙げられた。この2つの測定についてポジティブコントロールを用いて各研究施設間での結果がばらつかないように配慮した上で試験を実際に行なった。また、QT延長を起こすことが知られている医薬品を用いて実際に測定を行なった結果、 I_{Kr} 測定では確実に判定が可能であるが、APD測定では判定できないことがあることが判明した。

D. 考 察

(1) rasH2マウスの高い発癌感受性には導入遺伝子の突然変異や、発現過剰が一次的な要因になっていることが確認された。非遺伝子障害性の化合物の発癌メカニズムに関してはreceptorの介在など解明しなければならない多くの問題、特に免疫抑制剤による発癌メカニズムの外挿、内分泌活性物質の発癌性の外挿の問題があると思われる。p53^{+/-}マウスの発癌感受性は、遺伝的背景に影響を受けることを認識し、試験開始前に遺伝子レベルのチェックも考慮する必要があると考えられた。Tg.ACマウスでは偽陽性の試験結果が生じない可能性があるが、光発癌物質検出には今後更なる検討が必要である。Xpaマウスは免疫系を含めた毒性発現が野生型に比して増悪されることから短期癌原性試験モデルとして適当ではないと考えられた。Xpa/p53^{+/-}マウスはp53遺伝子に変異が生じる確率が高くなり、p53が機能しなければDNA障害によるアポトーシスが抑制され、発癌感受性が高まるものと思われた。

医薬品の発がん性評価に対して遺伝子改変動物の利用を推進していくためには、本モデルの生物学的特性や発がん感受性を左右する遺伝的背景や環境要因に関する情報の整備を更に進める必要があると考えられる。

- (2) 染色体異数性検出のための細胞遺伝学的手法として、FISH法を用いる間期核の染色体数計数が有力であった。しかしながら、FISH法は高価なプローブや専用の装置が必要であり、その技術導入はやや困難を伴う。一方、FISH法以外の検出系は技術導入が容易であるが、異数性検出系としてはいずれも不十分であった。これら方法を組み合わせることにより、異数性誘発物質を効率よく検出できる可能性のあることが示唆された。ヒト細胞を用いる異数性誘発物質検出系確立のための基礎データを得ることが出来たことから今後これらの基礎データを基に、試験条件の妥当性を検証することや、化合物の種類を増やし今回のデータの信頼性を高めるとともに、数的異常誘発物質検出のための試験の最適な組み合わせについてさらに検討を加える必要があると考えられる。
- (3) 免疫毒性に関しては、今後ともワーキンググループ

内でデータの収集を継続して行い、再度データの解析を行う。また、ICH調和ガイドラインの作成に着手し、試験データ解析結果に基づいたICHガイドライン案を平成16年11月に提案する予定となっている(Step 2)。今回、免疫毒性試験ガイダンス(案)の対象から除外した薬物アレルギー関連の試験法に関しても、次年度以降、さらに検討を行う必要がある。

- (4) S7BのワーキンググループにおいてIn vivo QTアッセイおよびIn vitro ion channelアッセイ(hERG/IkrまたはAPD30-90)の組み合わせにより陽性物質に関しては、ほぼ100%近くQT/TdPリスクを予測しうることが明らかとなった。ワーキンググループでは非臨床QTリスク評価法を用いれば、必ずしも全ての被験物質に対して臨床Thorough QT/QTc試験が必要でない薬物候補があることを主張したが、FDAは必ずしもE14の試験戦略を左右するに十分な予測性が得られたとの確証が示されていないと主張し、大阪会議における臨床QT評価E14ガイドライン案でも、非臨床評価結果が臨床QT評価戦略に及ぼす役割は除外基準以外にはほとんどないとの見解は変わらなかった。
- (5) 2つのin vitro試験法のうちI_{Kr}電流測定法では確実な判定が可能であり、これとin vivoの心電図測定を組み合わせることにより非臨床試験でQT延長作用が確実に予見できる可能性が示された。APDについては単純な電位幅の測定ではなく、より詳細なパラメータ測定で判定の確度が高まる可能性が残されている。

E. 結 論

- (1) rasH2、p53^{+/-}、Tg.AC、Xpa及びXpa/p53^{+/-}マウスの発がん物質に対する高感受性について文献調査を実施した。rasH2マウスの高い発癌感受性には、導入遺伝子の突然変異や発現過剰が重要な要因になっていることが確認された。p53^{+/-}マウスの発癌感受性は、遺伝的背景の影響を受け、試験開始前に遺伝子レベルのチェックも考慮する必要がある。Tg.ACマウスでは、偽陽性を生じる可能性が無いことが示唆されたが、光発癌物質の検出には使用可能かどうか更なる検討が必要である。Xpaマウス及びXpa/p53^{+/-}

マウスでは、一般毒性発現の増悪が見られるXpaマウスに比して、GGR欠損のみのXpcマウスがより有用である可能性が示された。

(2) 染色体の数的異常を検出するための細胞遺伝学的技術に関する共同研究を行った。染色体異数性検出のための細胞遺伝学的手法としては、FISH法を用いる間期核における染色体数計数が有力であった。FISH法以外の検出系は異数性検出系としては不十分であったが、それらを組み合わせることにより、異数性誘発物質を効率よく検出できることが示唆された。

(3) 日米欧の免疫毒性試験ガイダンスの国際調和を目的として、免疫毒性試験データの収集を行った。ICHにおいて免疫毒性試験ガイダンスの調和がトピックS8として承認された。今後は、専門家ワーキンググループとして、データ収集を継続すると同時に、ICH調和ガイドラインの作成に着手することとなった。

(4) 非臨床QT評価アッセイ系として採用されたIn vivo QTアッセイ、およびIn vitro ion channelアッセイ

(hERG/I_{kr}またはAPD30-90)の感度、予測性および信頼性を検証するため、これまでに報告されたデータの解析を行ったところ、これらアッセイの組み合わせにより陽性物質に関しては、ほぼ100%近くQT/TdPリスクを予測しうることがわかった。このことから、非臨床QTリスク評価法を用いれば、必ずしも全ての被験物質に対して臨床Thorough QT/QTc試験が必要でない薬物候補があることが主張できると考えられる。

(5) I_{kr}電流測定法では確実な判定が可能であり、これとin vivoの心電図測定を組合せることにより、非臨床試験でQT延長作用が確実に予見できる可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

各協力研究者の報告書を参照。

厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書概要版

研究費の名称＝厚生労働科学研究費補助金

研究事業名＝医薬品等医療技術リスク評価研究事業

研究課題名＝国際的動向を踏まえた医薬品等の新たな有効性及び安全性の評価に関する研究（非臨床安全性毒性問題一般に関する研究）

研究期間（西暦）＝2001－2003

研究年度（西暦）＝2003

主任研究者名（所属機関）＝上田 慶二（東京都多摩老人医療センター）

分担研究者名（所属機関）＝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）

三森 国敏（東京農工大学 農学部獣医学科）

林 真（国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝）

澤田 純一（国立医薬品食品衛生研究所 機能性化学）

藤森観之助（医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構、昭和大学薬学部）

中澤 憲一（国立医薬品食品衛生研究所 薬理部）

長谷川隆一（国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部）2001－2002の2年間

<研究目的>

- (1) 遺伝子改変したrasH2、p53^{+/-}、Tg.AC、Xpaマウスの発がん物質に対する発がん感受性について文献調査を実施し、医薬品の発癌性評価におけるこれらのモデル動物の利用可能性について考察する。
- (2) 発がんや、遺伝性疾患における、遺伝的異常の一つである染色体の異数性を検出する系を確立する目的で、染色体動原体特異的プローブを用いたFISH法を組み合わせた小核試験法のプレバリデーションを目的とした共同研究を行う。
- (3) 免疫毒性試験法ガイダンス案の作成および、ICH調和ガイドライン作成に向けた免疫毒性試験データ収集を行う。
- (4) 致死的不整脈Torsade de Pointsの前兆であるQT間隔延長リスクを予測的に評価するためのICH非臨床試験ガイドラインを開発する。
- (5) QT延長を伴う致死性の心室性不整脈の誘発する医薬品を的確に評価するためのin vitro試験方法を検討し、評価法の国際的なハーモナイゼーションを行なう。
- (6) 残留溶媒ガイドラインの維持管理文書の完成およびガイドライン値改訂の検討を行う。

<研究方法>

- (1) rasH2、p53^{+/-}、Tg.AC、Xpaマウスに関する研究状況を文献調査した。
- (2) モデル化合物として異数性誘発物質（trichlorfon）と、倍数性誘発物質（carbendazim）を用い、ヒトリンパ芽球WTK-1細胞における小核誘発率、分裂細胞の数、染色体数の分布、突然変異誘発率を検討した。また、FISH法により小核中の動原体シグナルを解析し、遺伝毒性との関連を比較検討した。
- (3) 免疫毒性試験に関する国内外の動向の調査、関連資料収集を行った。
- (4) QT評価試験法に関する調査、並びに収集データの解析を行った。
- (5) QT延長をin vitroで評価するための国際的ワーキンググループを組織し、試験法の検討を行なった。また、必要に応じて実際に試験を行なって、各試験法の適否を判定した。

(6) 残留溶媒専門家による文献等の解析を行い、それに基づいて専門家会議を行った。

<結果と考察>

- (1) rasH2マウスでは遺伝子障害性の化合物での結果には、導入遺伝子の点突然変異が見出され、発癌のプロセスへの直接的関与機構があるものと思われた。p53^{+/-}マウスでは、ニトロソアミン類のDBNの成績により、本モデルが遺伝子障害物質の検索に有用であることを補強する知見が得られた。Tg.ACマウスでは、glucocorticoid receptorや青色光照射は、皮膚腫瘍発生に対して抑制的に働くこと、v-Ha-rasを介した皮膚腫瘍発生にKSRIが必須であるが、cytokineであるIL-1 α は抑制的に働くことが示唆された。Xpaマウス及びXpa/p53^{+/-}マウスでは、NERはbulkyなDNA障害を修復する重要な機序であるが、NER欠損マウスは、GGR或いはTCRのいずれの過程が欠損するかにより発癌感受性や毒性発現に差を生じることがわかった。
- (2) モデル化合物として用いたtrichlorfonとcarbendazim両物質とも小核も誘発するとともに、分裂細胞の数も増加させたが、それらの結果から異数性と倍数性を区別することはできなかった。FISH法でシグナル陽性となった小核の頻度は、小核含有細胞を指標にすると濃度依存的に増加したが、小核自身を指標にした場合には明確な濃度依存性は認められず、どちらの指標でも異数性と倍数性を区別できなかった。一方、FISH法で間期核の特定染色体の数を計数する方法は、染色体数の分析が比較的簡便であり、しかも染色体の消失と付加を区別して解析することにより、異数性誘発物質と倍数性誘発物質を区別できる可能性も示唆されたことから、染色体の数的異常の検出系としては最も有力であることが明らかとなった。
- (3) 免疫毒性試験法ガイドランス（案）を作成し、免疫毒性試験データの収集を行った。今後のデータ収集及びガイドラインの作成は、ICHのトピックS8のワーキンググループとして継続することとなった。
- (4) S7BのワーキンググループにおいてIn vivo QTアッセイおよびIn vitro ion channelアッセイ（hERG/IkrまたはAPD30-90）の組み合わせにより陽性物質に関しては、ほぼ100%近くQT/TdPリスクを予測しうることが明らかとなった。ワーキンググループでは非臨床QTリスク評価法を用いれば、必ずしも全ての被験物質に対して臨床Thorough QT/QTc試験が必要でない薬物候補があることを主張したが、予測の信頼性に関してFDAから更に検討を要求された。
- (5) in vitroの電気生理学的測定法について検討を行なった結果、活動電位再分極相で流れるカリウム電流（I_{Kr}）の測定および活動電位幅（APD）の測定が候補となった。この2つの試験法についてポジティブ・コントロールを用いた試験を実際に行なった結果、I_{Kr}測定では確実に判定が可能であることが判明した。
- (6) 残留溶媒ガイドラインの維持管理文書の完成・合意が得られた。また、2溶媒のガイドライン値改訂が合意され、1溶媒の改訂案が却下された。

<結 論>

- (1) 遺伝子改変マウスにおける発癌増強機序の一部が解明されたが、医薬品の発がん性評価に対して利用を推進していくためには、ここで取りあげた各モデルの生物学的特性や、遺伝的背景、環境要因に関する情報の整備を更に進める必要があると考えられた。
- (2) 染色体の数的異常を検出するための細胞遺伝学的技術に関する共同研究を行った。染色体異数性検出のための細胞遺伝学的手法としては、FISH法を用いる間期核における染色体数計数が有力であった。
- (3) 免疫毒性試験法ガイドランス案の作成及びICHによる免疫毒性試験データ収集を行った。ICHにおいて免疫毒性試験ガイドランスの調和がトピックS8として承認された。
- (4) 非臨床QT評価アッセイ系として採用されたIn vivo QTアッセイ、およびIn vitro ion channelアッセイに関して、これまでに報告されたデータの解析を行ったところ、これらアッセイの組み合わせにより陽性物質に関しては、

ほぼ100%近くQT/TdPリスクを予測しうることがわかった。

- (5) I_{Kr} 電流測定法では確実な判定が可能であり、これとin vivoの心電図測定を組合せることにより非臨床試験でQT延長作用が確実に予見できる可能性が示された。
- (6) 残留溶媒ガイドラインの改訂手法の確立と、2つのガイドライン値の改訂が完了した。

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）
平成15年度分担研究報告書

－遺伝子改変マウスを用いた短期発癌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）
研究協力者：林 裕造（NPO食品保健科学情報交流協議会理事長）
玉置 憲一（(財)実験動物中央研究所副所長）
白居 敏仁（(財)実験動物中央研究所主席研究員）
広瀬 雅雄（国立医薬品食品衛生研究所病理部部长）
西川 秋佳（国立医薬品食品衛生研究所病理部室長）
菅野 純（国立医薬品食品衛生研究所毒性部部长）
梅村 隆志（国立医薬品食品衛生研究所病理部主任研究員）
林 真（国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部部長）
務台 衛（三菱ウェルファーマ(株)研究本部安全性研究所主任研究員）
青木 豊彦（エーザイ(株)薬理安全性研究所主幹研究員）
久田 茂（帝国臓器製薬(株)安全性研究部主席研究員）

研究要旨

rasH2、 $p53^{+/-}$ 、Tg.AC、*Xpa*及び*Xpa/p53^{+/-}*マウスの発がん物質に対する高感受性について文献調査を実施した。rasH2マウスの高い発癌感受性には、導入遺伝子の突然変異や発現過剰が重要な要因になっていることが確認された。 $p53^{+/-}$ マウスの発癌感受性は、遺伝的背景の影響を受け、試験開始前に遺伝子レベルのチェックも考慮する必要がある。Tg.ACマウスでは、偽陽性を生じる可能性が無いことが示唆されたが、光発癌物質の検出には使用可能かどうか更なる検討が必要である。*Xpa*マウス及び*Xpa/p53^{+/-}*マウスでは、一般毒性発現の増悪が見られる*Xpa*マウスに比して、GGR欠損のみの*Xpc*マウスがより有用である可能性が示された。

キーワード： rasH2マウス、 $p53^{+/-}$ マウス、Tg.ACマウス、*Xpa^{-/-}*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）における新しいがん原性試験ガイドラインの策定により、現在、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により医薬品のがん原性が評価されている。現在使用可能な遺伝子改変動物モデルとしては、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 $p53^{+/-}$ マウス（ $p53^{+/-}$ マウス）モデル、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。しかし、これらのモデルにおいて何故発癌が増強するかについてのメカニズムについては全て明確になっているわけではない。本研究班では、今年度もこれらの遺伝子改変マウスにおける発癌増強メカニズムがどこまで解明された

かについての文献収集を行い、それらの問題点を明らかにした。

B. 研究方法

- (1) rasH2マウス：rasH2トランスジェニックマウスに関する研究状況を2002年及び2003年度の発表文献を中心に調査した。また、医薬品をはじめ、ヒトに暴露の可能性がある化合物の発癌性評価における本モデル動物の利用可能性に関する成績をまとめた。昨年度の調査時以降に論文発表されたために掲載できなかった2002年の報告及び2003年発表の論文をまとめた。
- (2) *p53*^{+/-}マウス：*p53* (+/-) 欠損マウスに関する研究状況を調査し、医薬品の発癌性評価における本モデル動物の利用可能性についての成績をまとめた。また、本年2月にバリデーション研究に用いられている Taconic Farm 社の B6.129-Tp53tm1N5 マウス (TSG-*p53*(r)Knockout mice) を用いた文献を中心に *p53*^{+/-}マウスに関する諸文献を収集し、本モデル動物の発がん高感受性にかかわる要因に関する実験成績をまとめた。
- (3) Tg.ACマウス：Tg.ACマウスに関する諸文献を収集し、本モデル動物の発がん高感受性にかかわる要因に関する実験成績をまとめた。
- (4) *Xpa*ノックアウトマウス：*XPA*^{-/-}マウス (*Xpa*マウス)、及び*Xpa*マウスに*p53*遺伝子欠損を導入した *Xpa/p53*^{+/-}ノックアウトマウス (*Xpa/p53*^{+/-}マウス) の発癌物質に対する高感受性に関するメカニズム研究の現状について文献調査を実施した。

C. 研究結果

- (1) rasH2マウス：短期発癌性の検証試験として、非変異原性非発癌性化合物である ampicillin を rasH2 マウス及び non-Tg マウスにそれぞれ26週間投与した結果、腫瘍性病変は全く認められなかった[1]。非変異原性非発癌性化合物を26週間投与した結果、発癌性陽性の結果を示したアッセイは無かった。ILSI HESI プロジェクトにおける rasH2 マウスの検証実験では、異なった12施設で *N*-methyl -*N*-nitrosourea (MNU) を陽性対照発癌物質として試験を実施したところ、MNU 群

には体重、死因、発生腫瘍の種類に施設間差はないことが確認された[2]。雌に *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) を単回腹腔内投与し、その後 phenolphthalein (PhP) 含有飼料を26週間投与した結果、ENU+PhP 群で肺胞上皮の過形成、腺腫、腺癌が認められ、ENU 単独群に比し、腺腫、腺癌の発生率、腫瘍数が多く、PhP は肺腫瘍促進作用を示すことが確認された[3]。強力な肺のプロモーターである butylhydroxytoluene (BHT) を用いて *in vivo* で9週間の肺発癌物質の二段階アッセイの有用性を検討したところ、BHT 400mg/kg 投与はII型肺胞上皮細胞の増殖活性が3日間で最大となり、7日目まで認められた[4]。また、ENU 120mg/kg を単回腹腔内投与後、22週間無処置で観察した結果、ENU 投与 rasH2 (ENU-rasH2) マウスの18%に子宮内膜腺癌、94%に異型過形成が発現し、子宮発癌に非常に感受性が高いことが示された[5]。他に肺胞、気管支の腫瘍、前胃の扁平上皮乳頭腫、気管支悪性腫瘍、脾臓血管腫など多くの腫瘍が認められた。また、ENU-rasH2 マウスに子宮腫瘍促進因子である ethinylestradiol (EE) の2.5ppm を26週間混餌投与した結果、子宮腫瘍発生が抑制された[6]。また、ENU-rasH2 マウスの前胃腫瘍発現機序解明の一環として遺伝子発現解析を mRNA レベルで解析したところ、これまで報告のある導入遺伝子の過剰発現に加えて内在性 ras 遺伝子の過剰発現も腫瘍形成の増強に関与していることが示唆された。その他の腫瘍発現機序に関する報告では、ILSI HESI の検証試験で clofibrate、DEHP、WY-14643 などの peroxisome proliferator の投与で rasH2 マウスに肝腫瘍が発現したが、他のトランスジェニックマウスでは有意な発生はみられなかった。rasH2 マウスに di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) で誘発した肝細胞腺腫と隣接の非腫瘍肝組織中の peroxisome proliferators activated receptor (PPAR) α とヒト *c-Ha-ras* gene の mRNA を半定量 RT-PCR で解析し、腫瘍中細胞増殖活性は上昇していたものの DEHP で誘発される肝腫瘍化には PPAR α または導入遺伝子の過剰発現は認められなかった[7]。前回の報告で vinyl carbamate (VC) と ethyl carbamate (urethane) で誘発した肺腫瘍のヒト *c-Ha-ras* 導入遺伝子の突然変異率に著しい差が認め

られ、VCはurethaneよりもrasH2マウスの肺腫瘍を強く誘発するが突然変異の頻度はurethaneよりも著しく低いこと、また、導入遺伝子の突然変異が発癌に関与することと矛盾する成績であったことを報告したが、これについてVCとurethaneで誘発したrasH2マウスの肺腫瘍の導入遺伝子の突然変異をRNAレベルで検討したところ、いずれの肺腫瘍にも導入遺伝子のcodon 12には変異はないものの、codon 61にはurethane及びVC誘発肺腫瘍でそれぞれ高頻度に変異が認められた[8]。

(2) $p53^{+/-}$ マウス: 本年2月のWashington DCで開催されたILSI HESI主催のワークショップで短期発癌性試験の現状に関する日米欧の規制当局の見解、試験系選択や試験デザインについて討議され、FDA医薬品評価センター (CDER) からTgマウスの短期発癌性試験に関する審査件数報告があった。FDA CDERではこれまでに短期発癌性試験に関して79件の試験計画書と23件の試験成績を審査した実績があり、それらの過半数は $p53$ (+/-) マウスを用いた試験であった。遺伝子障害性を有する化合物またはその疑いがある場合、FDA CDERは $p53$ (+/-) マウスを用いた試験を推奨している様子であったが、本マウスの問題点として、試験間における陽性対照物質に対する反応性のばらつきを指摘した。また、いずれの遺伝子改変動物モデルを用いた場合でも、単一の試験成績で発癌性評価を結論づけるのは誤りであり、発癌リスクの総合評価に関わる試験成績の1つであること、供試動物の週齢や試験期間などの条件について改善の余地があることを指摘した。

文献調査においては、米国NIEHSグループが短期発癌性試験の成績と従来の発癌性評価の一致性についてまとめたところ、 $p53$ (+/-) マウスによる26週間短期発癌性評価の予測率は、ヒト発癌物質に対して77%であり、遺伝毒性発癌物質に限ると83%になること、IARCのgroup 1, 2A, 2B化合物に対する陽性率はそれぞれ83%、52%、55%であった[9]。しかしながら、 $p53$ (+/-) マウスでは検出できないヒト発癌物質も存在し、これの解消には本マウスの短期発癌性試験とラット2年間発癌性試験との組み合わせが効果的 (検出率85%、偽陰性率0%) であった。

本マウスのバックグランド系統や遺伝子不活化部位の違いによる発癌感受性についてphenolphthaleinを用いた検討がなされ、遺伝子改変動物の感受性にバックグランド系統や遺伝子不活化部位の違いが関連している可能性が示された[10]。カーバメイト系殺虫剤であるcarbarylでは遺伝毒性的な機序による発癌が疑われていたが、短期発癌性試験は陰性であった。同じく遺伝毒性的な機序による発癌が疑われているurethaneでは本マウスに血管腫瘍を誘発することから、carbarylは非遺伝子障害的な機序によるものである可能性が伺われた。遺伝毒性物質のN, N-dibutyl nitrosamine (DBN) の0.05%を8週間飲水投与した場合、本マウスに高率に食道及び膀胱腫瘍が発現した[11]。発癌感受性メカニズムとしては $p53$ 片側アレルの点突然変異と食道及び膀胱の上皮の増殖活性が考えられた。砒素は疫学的にヒトに発癌性があることが確認されているが、dimethylarsenic acid (DMA) の200ppmを本マウスに8週間投与した結果、DMAには本マウスに特異的な発癌標的性を示さず、自然発生腫瘍を早期発現させる作用がみられた[12]。

(3) Tg.ACマウスモデル: *in vitro* gadd153 promoter assayでスクリーニングし、活性が高かったamiloride, dipyrindamole, pyrimethamineの3つについて本マウスに26週間投与した結果、いずれの化合物も皮膚乳頭腫の発生増加はMTDの容量でも認められなかったことから、本モデルは的確な感受性を示し、偽陽性を生じることがないと示唆された[13]。光発癌物質であるlomefloxacin (LOME)、8-methoxypsoralen (8-MOP) を皮膚塗布した結果、UVA対照群及びLOME+UVA群或いは8-MOP+UVA群と差は認められなかった。表皮の増殖と皮膚発癌サプレッサーであるglucocorticoidは既知の転写因子であるglucocorticoid receptor (GR) を経由して細胞内で機能する。keratin 5 promoterの制御下でGRを過剰発現しているtransgenic mouse (K5-GRマウス) とTg.ACマウスを交配し、double transgenicマウス (K5-GR/ras+) を作製し、TPAによる皮膚発癌の発生状況を調べた結果、皮膚にGRを過剰発現したK5-GR/ras+double transgenicマウスでは皮膚腫瘍の

発生を劇的に抑制し、一頭あたりの皮膚乳頭腫発生数は、雄で15%、雌で40%であった。またGRの過剰発現した皮膚乳頭腫ではapoptosisと角化細胞への分化の増加がみられた。転写因子である核内因子kappa B (NF- κ B)とGRの相互作用はNF- κ Bの機能的阻害を引き起こすことが知られており、GRタンパクとNF- κ Bの干渉が結果としてK5-GR/ras⁺ double transgenicマウスの皮膚腫瘍におけるNF- κ B阻害を引き起こすことが示唆された[14]。TPAを背部皮膚に投与した本マウスでは毎日1時間470nmの波長の青色光を暴露したところ、青色光を暴露したTPA投与群で皮膚腫瘍発生頻度及び直径1mm以上の皮膚腫瘍数の抑制が認められた。また病理組織学的に青色光暴露で退行性変化として過剰な角化がみられるものの、皮膚乳頭腫の発生は抑制された[15]。TPA処理Tg.ACマウスの皮膚の角化細胞前駆細胞を単離し、TPA処理によりup-regulateした9つの遺伝子のうちの一つの遺伝子Dss1の特徴を調べたところ、TPA誘発皮膚過形成を発現したTg.ACマウスの皮膚におけるDss1の発現はTPA濃度と期間依存的に増強し、またTPA誘発皮膚腫瘍では正常皮膚に比し、2.5~6.2倍の高いRNA転写活性がみられた。さらにDss1の過剰発現は、前がん状態のマウス表皮細胞の腫瘍細胞への形質転換を増強した[16]。ras/Raf-mitogen-activated protein kinase (MAPK)のシグナルを調整しているrasのkinase suppressor (KSR)のうちKSR1の生体における機能を調べるため、KSR1のノックアウトマウス (*Ksr1*^{-/-})を作製したところ、EGFR欠損マウスと類似した特有の毛嚢形態変化を認めた。*Ksr1*^{-/-}マウスとTg.ACマウスを交配して得られたdouble transgenicマウスにTPAを15週間投与し、実験開始20週後の皮膚乳頭腫の発生頻度を調べたところ、KSR1野生型 (*Ksr1*^{+/+})が70%、KSR1 knockout Tg.ACマウスでは10%を示し、v-Ha-rasを介した皮膚腫瘍発生にはKSR1が必須であることが示された[17]。皮膚発癌過程におけるIL-1 α と炎症の役割を調べるため、皮膚でIL-1 α を過剰発現したK14/IL-1 α マウスを使用し、DMBA/TPA皮膚二段階発癌プロトコールによる皮膚腫瘍発生は完全に抑制され、また、K14/IL-1 α マウスとTg.ACマウスを交配させた

double transgenicマウスでも同DMBA/TPAプロトコールにおいて皮膚腫瘍発生を抑制した。しかしながら、K14/IL-1 α マウスにDMBAを連続投与すると、逆に乳頭腫を経由することなく皮膚の扁平上皮癌が*de novo*で高率に発生した。これは繰り返し遺伝子傷害刺激を受け変異した上皮細胞の増殖自体がIL-1の抑制に感受性はなく、このcytokineによって促進されることを示唆している[18]。

(4) *Xpa*マウス及び*Xpa/p53*^{+/-}マウス：2-AAF及びWy-14643による肝腫瘍を除き、概ねこれらマウスの発癌感受性は同等か、*Xpa/p53*^{+/-}の感受性が高いことが確認された。さらにphenacetinの発癌性がこれらマウスで証明できなかったが、*LacZ*遺伝子を導入した*Xpa/LacZ*及び*Xpa/p53*^{+/-}/*LacZ*マウスの腎臓で*LacZ*の変異が発生することが明らかになった[19]。その他NER欠損マウスについて、*Xpc*マウスは*Xpa*マウスと同等の発癌感受性を示すが、GGRが欠損しTCRが正常であるために、UVBによる急性の皮膚症状やDMBA及びPhIPによる急性毒性が発症しにくい[20]。Csb欠損マウスはTCRが阻害され、GGRが正常なマウスであり、UVB照射等による急性毒性は*Xpa*マウスと同様に発生する[20]。ヒトCsb患者ではUVBによる皮膚癌が発生しないが、Csb欠損マウスではUVBにより皮膚癌が発生する[20]。また、これらNER欠損マウスにレポーター遺伝子を組み込んだ遺伝子改変マウスは、組織毎の突然変異誘発性及び発癌性と良く相関した[20]。*Xpa/p53*^{+/-}マウスモデルはcyclopolin A、DES及びestradiolの結果が陽性である[20]。GGR及びTCR欠損の特徴と*p53*の関連性について、*p53*蛋白がNERに関与することは既に知られているが、DNA障害部位へのNER因子の集合と構築が*p53*蛋白に依存すること、すなわち、核のUV照射スポットへのXPC及びTFIIHの動因は細胞内*p53*の状態に依存し、*p53*はcyclobutane pyrimidine dimmers (CDP)の修復においてこれらのGGR因子の動員の引き金になるが、6-4 photoproducts (6-4PP)の修復には引き金にはならないことなどを示した[21]。GGRの欠損により発癌リスクが増加するが、細胞死や老化の促進はみられず、TCR欠損の場合 (GGRの欠損)により発癌リスクが増すが老化への影響はな

く、CSA、CSB或いはXPGの欠損（TCRの欠損）の場合には停止したRNAポリメラーゼを除去できないために全身に様々な障害を生じ、老化が促進されたが、発癌リスクへの影響はない[22]。正常ヒトXPA（GGR及びTCRの欠損）及びCockayne Syndrome（CS）B（GGR欠損）患者の線維芽細胞を用いて、これらに2-acetylaminofluoreneのDNA付加体を形成させ、p53発現細胞を計測した結果、XPA及びCSB患者の細胞で、p53の蓄積が顕著であり、p53の蓄積が始まる濃度（培地に添加したN-acetoxy-acetylaminofluorene（NAAAF）が低く、DNA障害による転写阻害がp53蛋白蓄積の引き金になることが示された[23]。

D. 考察

rasH2マウスでは遺伝子障害性の化合物では導入遺伝子の点突然変異があり、発癌のプロセスに入っていくのが主体であろうと思われ、これまでの検証試験からも明らかである。非遺伝子障害性の化合物の発癌メカニズムに関してはreceptorの介在など解明しなければならぬ多くの問題、特に免疫抑制剤による発癌メカニズムの外挿、内分泌活性物質の発癌性の外挿の問題があると思われる。

p53^{+/-}マウスでは、ニトロソアミン類のDBNの成績が本モデルが遺伝子障害物質の検索に有用であることを補強する知見である。砒素化合物のDMAの成績はヒト発癌物質の検索に本モデルが有用である可能性と、条件によっては26週以上の長期投与による解析も有用であることを示しているものと考えられた。carbarylの検討は従来の発癌性試験でみられた発癌が遺伝毒性的な機序によるものかを明らかにする手法として本モデルが有効であることを示すものであった。一方、本モデルの発癌感受性は遺伝的背景に影響を受けることを認識し、試験開始前に遺伝子レベルのチェックも考慮する必要があると考えられた。

Tg.ACマウスでは偽陽性の試験結果が生じない可能性があるが、光発癌物質検出には今後更なる検討が必要である。また、glucocorticoid receptorや青色光照射は、皮膚腫瘍発生に対して抑制的に働くこと、Tg.ACマウスのv-Ha-rasを介した皮膚腫瘍発生にKSRIが必須であ

るが、cytokineであるIL-1 α は抑制的に働くことが示唆された。

Xpaマウス及びXpa/p53^{+/-}マウスでは、NERはbulkyなDNA障害を修復する重要な機序であるが、NER欠損マウスは、GGR或いはTCRのいずれの過程が欠損するかにより発癌感受性や毒性発現に差を生じる。GGRが欠損したXpcマウスはTCRに影響される毒性発現が無く、発癌感受性が高いために短期発癌試験モデルとしてはXpaマウスよりも好ましいと考えられる。TCR欠損Csa、Csbマウスでは発癌感受性は変化しない。Xpaマウスは免疫系を含めた毒性発現が野生型に比して増悪されることから短期癌原性試験モデルとして適当ではないと考えられた。Xpa/p53^{+/-}マウスはp53遺伝子に変異が生じる確率が高くなり、p53が機能しなければDNA障害によるアポトーシスが抑制され、発癌感受性が高まるものと思われた。

E. 結論

rasH2マウスの高い発癌感受性には、導入遺伝子の突然変異に加えて導入遺伝子の発現過剰が重要な要因になっていることが示唆された。免疫抑制剤による発癌メカニズムの外挿、内分泌活性物質の発癌性の外挿の問題、レセプターの介在など解明しなければならない問題も残っており、更にメカニズムの解明をしていくことが不可欠である。

p53^{+/-}マウスは、医薬品の発癌性評価に適用可能なことは、これまでの調査で明らかである。しかしその適用にあたっては被験物質に関する様々な毒性的な情報と試験の目的、本モデルの特徴を踏まえた試験系の選択の科学的な説明が必要であり、試験系の有効性を確認するためには陽性対照物質の反応性や遺伝子改変部位のチェックが望ましいと考えられた。

Tg.ACマウスの発がん高感受性については、本モデルは的確な感受性を示し、偽陽性を生じる可能性が無いことが示唆された。一方、光発癌物質の検出にはTg.ACマウスが使用可能かどうか更なる検討が必要であると考えられた。TPA処置によりイニシエートされた細胞の急激な増生とに依存した腫瘍形成をIL-1 α の発現が抑制しうるが、IL-1の抗腫瘍性効果は繰り返し遺伝障害刺激を与えることにより打ち消されたが、こ

れは繰り返し遺伝子傷害刺激を受けた変異上皮細胞の増殖自体はIL-1の抑制に感受性がなく、このcytokineによって促進される可能性が示唆された。

*Xpa/p53^{+/-}*マウスは、*Xpa*マウスの欠点をp53遺伝子変異と組み合わせることにより補った有用なモデルと考えられる。NER欠損マウスではGGRとTCRの両者の欠損により、免疫毒性を含めた一般毒性発現の増悪が見られる*Xpa*マウスに比して、GGR欠損のみの*Xpc*マウスがより有用である可能性が示された。

REFERENCES

- 1) Adachi T, et al (2002) Twenty-six week carcinogenicity study of ampicillin in CB6F1-TgrasH2 mice. *J. Toxicol. Sci.* 27(3): 147-163.
- 2) Takaoka M, et al (2003) Interlaboratory comparison of short-term carcinogenicity studies using CB6F-1rasH2 transgenic mice. *Toxicol. Pathol.* 31(2): 191-199.
- 3) Imaoka M, et al (2002) Tumor promoting effect of phenolphthalein on development of lung tumors induced by N-ethyl-N-nitrosourea in transgenic mice carrying human prototype c-Ha-ras gene. *J. Vet. Med. Sci.* 64(6): 489-493.
- 4) Umemura T, et al (2002) The mouse rasH2/BHT model as an in vivo rapid assay for lung carcinogens. *Jpn. J. Cancer Res.* 98(8): 861-866.
- 5) Watanabe T, et al (2002) Rapid induction of uterine endometrial proliferative lesions in transgenic mice carrying human prototype c-Ha-ras gene (*rasH2* mice) given a single intraperitoneal injection of N-ethyl-N-nitrosourea. *Cancer Lett.* 188(1-2): 39-46.
- 6) Watanabe T, et al (2003) Inhibition by ethinylestradiol of N-ethyl-N-nitrosourea-initiated uterine carcinogenesis in transgenic mice carrying a human prototype c-Ha-ras gene (*rasH2* mice). *Toxicol. Pathol.* 31: 496-505.
- 7) Toyosawa K, et al (2003) Overexpression of the peroxisome proliferators activated receptor alpha or the human c-Ha-ras transgene not involved in tumorigenesis induced by di(2-ethylhexyl)phthalate in *rasH2* mice. *Cancer Lett.* 192(2): 199-203.
- 8) Toyosawa K, et al (2003) Mutation analysis of vinyl carbamate or urethane induced lung tumors in *rasH2* transgenic mice. *Toxicol. Lett.* 142(1-2): 111-117.
- 9) Pritchard JB, et al (2003) The role of transgenic mouse models in carcinogen identification. *Environ. Health Perspect.* 111: 444-454.
- 10) Okamura M, et al (2003) Lack of susceptibility of heterozygous p53-knockout CBA and CIEA mice to phenolphthalein in a 6-month carcinogenicity study. *Toxicology* 185: 17-22.
- 11) Nishikawa T, et al (2003) High susceptibility of p53 knockout mice to esophageal and urinary bladder carcinogenesis induced by N, N-dibutyl nitrosamine. *Cancer Lett.* 194: 45-54.
- 12) Salim EI, et al (2003) Carcinogenicity of demethylarsinic acid in p53 heterozygous knockout and wild-type C57BL/6J mice. *Carcinogenesis.* 24: 335-342.
- 13) Tompson KL, et al (2003) Selection of drug to test the specificity of the Tg.AC assay by screening for induction of the gadd153 promoter in vitro. *Toxicol. Sci.* 74: 260-270.
- 14) Budunova IV, et al (2003) Glucocorticoid receptor functions as a potent suppressor of mouse skin carcinogenesis. *Oncogene* 22: 3279-3287.
- 15) Ohara M, et al (2003) Blue light inhibits the growth of skin tumors in the v-Ha-ras transgenic mouse. *Cancer Sci.* 94: 205-209.
- 16) Wei S-J, et al (2003) Identification of Dss 1 as a 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate-responsive gene expressed in keratinocyte progenitor cells, with possible involvement in early skin tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* 278: 1758-1768.
- 17) Lozano J, et al (2003) Deficiency of kinase suppressor of ras 1 prevents oncogenic ras signaling in mice. *Cancer Res.* 63: 4232-4238.
- 18) Murphy J-E, et al (2003) IL-1 α , innate immunity, and skin carcinogenesis: The effect of constitutive expression of IL-1 α in epidermis on chemical carcinogenesis. *J. Immunol.* 170: 5697-5703.

- 19) Storer RD, et al (2003) Transgenic tumor models for carcinogen identification: the heterozygous Trp53-deficient and rasH2 mouse lines. Mutation Res. 540: 165-176.
- 20) Wijnhoven SWP, et al (2003) Transgenic and knockout mice for DNA repair functions in carcinogenesis and mutagenesis. Toxicology 193: 171-187.
- 21) Wang Qi-en, et al (2003) Tumor suppressor p53 dependent recruitment of nucleotide excision repair factors XPC and TFIIH to DNA damage. DNA Repair, 2: 483-499.
- 22) Mitchell JR, et al (2003) Devide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing. Current Opinion in Cell Biology 15: 232-240.
- 23) Ishibashi M, et al (2003) UV-induced skin damage. Toxicology 189: 21-39.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表： なし
2. 学会発表： なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得： なし
2. 実用新案登録： なし
3. 実用新案登録： なし

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）
平成15年度分担研究報告書

－In vitro小核試験の確立と結果の評価に関する研究－

分担研究者：林 真（国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部）
研究協力者：山影 康次（(財)食品薬品安全センター 秦野研究所）
若栗 忍（(財)食品薬品安全センター 秦野研究所）
山本 美佳（藤沢薬品工業株式会社 安全性研究所）
浅野 哲秀（日東電工株式会社 安全性試験センター）
荒木 春美（富山化学工業株式会社 総合研究所）
岡 宏昭（大鵬薬品工業株式会社 安全性研究所）
笠松 俊夫（花王株式会社 安全性評価研究センター）
小倉 良輔（花王株式会社 安全性評価研究センター）
小林 一男（キッセイ薬品工業 安全性研究所）
浜田 修一（エスエス製薬株式会社 中央研究所）
林崎 弥生（第一製薬株式会社 安全性研究所）
本間 正充（国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部）
益森 勝志（(財)食品農医薬品安全性評価センター）
宮島 博文（塩野義製薬株式会社 新薬研究所）
森田 健（国立医薬品食品衛生研究所）
若田 明裕（山之内製薬株式会社 安全性研究所）

研究要旨

ヒトリンパ芽球由来のWTK-1細胞を用い、染色体の数的異常を検出するための細胞遺伝学的技術のバリデーションに関する共同研究を行った。モデル化合物としてマウス精子における異数性誘発物質（trichlorfon）と倍数性誘発物質（carbendazim）の2化合物を用い、24時間処理後の小核誘発率、分裂細胞の数、染色体数の分布、ヒト染色体プローブを用いたFISH法による間期核および小核のシグナル数および突然変異誘発率の分析結果を比較検討した。その結果、両物質とも小核も誘発するとともに、分裂細胞の数も増加させたが、それらの結果から異数性と倍数性を区別することはできなかった。FISH法でシグナル陽性となった小核の頻度は、小核含有細胞を指標にすると濃度依存的に増加したが、小核自身を指標にした場合には明確な濃度依存性は認められず、どちらの指標でも異数性と倍数性を区別できなかった。また、直接染色体数を計数した結果は、労力を要するうえにバラツキが大きいことから、数的異常の検出系としては推奨できないことが示唆された。一方、FISH法で間期核の特定染色体の数を計数する方法は、染色体数の分析が比較的簡便であり、しかも染色体の消失と付加を区別して解析することにより、異数性誘発物質と倍数性誘発物質を区別できる可能性も示唆されたことから、染色体の数的異常の検出系としては最も有力であることが明らかとなった。

今回用いた様々な指標のなかで、染色体異数性検出のための細胞遺伝学的手法としては、FISH法を用いる間期核の染色体数計数が有力であったが、FISH法は高価なプローブや専用の装置が必要であり、その技術導入はやや困難を伴う。一方、FISH法以外の検出系は技術導入が容易であるが、異数性検出系としてはいずれも不十分であった。しかしながら、それらを組み合わせることにより、異数性誘発物質を検出できる可能性のあることが示唆された。すなわち、数的異常（異数性および倍数性）誘発物質は分裂阻害作用（分裂細胞の増加）と小核誘発作用の両方を有するが、細胞毒性作用が弱い濃度域におけるTK遺伝子を指標とした突然変異試験を実施した場合、異数性誘発物質は突然変異コロニーを明らかに誘発できるが、倍数性誘発物質は突然変異コロニーを誘発できない可能性が示唆された。

以上のように、ヒト細胞を用いる異数性誘発物質検出系確立のための基礎データを得ることが出来たことから、今後これらの基礎データをもとに、今回の試験条件の妥当性を検証することや化合物の種類を増やし今回のデータの信頼性を高めるとともに、数的異常誘発物質検出のための試験法ないしは試験の最適な組み合わせについてさらに検討を加える必要があると考えられる。

A. 研究目的

医薬品の遺伝毒性の評価に関しては、International Workshop on Genotoxicity Test Procedure (IWGT) での協議を経て、遺伝子レベルの変異を指標とする細菌を用いる復帰突然変異試験や染色体レベルの変異を指標とするほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験（あるいはマウスリンフォーマ試験）、および生体内での染色体異常を指標とする齧歯類動物を用いる小核試験が遺伝毒性試験の基本的な組み合わせとして推奨されている。しかしながら、発がんのメカニズムや次世代に対する遺伝的影響を考慮した場合、現在実施されている検出系に加えて、染色体の数的変異（特に異数性）の検出系が必要である。近年、異数性誘発物質の検出系として、化学物質処理により誘発された小核をキネトコア（染色体の動原体）抗体あるいは動原体特異的プローブで標識するFISH法のガイドライン化について、IWGTでも検討議題となりつつある。しかしながら、FISH法による小核試験以外にも異数性誘発物質検出のための試験系が多数報告されており、また、染色体の不分離によって生じた異数性は小核を形成しないと考えられることから、染色体の異数性を検出するための試験系の妥当性を検証する必要がある。

以上のような背景を踏まえ、今回我々は、染色体の異数性を検出するための細胞遺伝学的技術のプレバリ

テーションを目的として共同研究を行った。

モデル化合物として、マウス精子に異数性を誘発し、しかもヒトにおけるダウン症候群高発生率の原因物質と考えられているtrichlorfonとマウス精子に倍数性を誘発するcarbendazimの2化合物を用いて^{1), 2)}、ヒト培養細胞を処理した場合の小核誘発率や分裂細胞の数、染色体数の分布、FISH法による特定染色体の計数や動原体含有小核の分析、およびTK遺伝子を指標とした突然変異誘発率の分析を行った。これらの実験結果をマウスで認められた生殖細胞における結果と比較検討し、染色体の異数性誘発のための検出系について考察した。

B. 研究方法

1. モデル化合物

Trichlorfon (TF, 2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl-*O,O*-dimethyl phosphonate, CAS No.: 52-68-6, 分子量: 257.45, ロット番号: RWK9108, 和光純薬工業) は水に溶解したことから、日周注射用水に溶解して試験に用いた。Carbendazim (MBC, Methyl 2-benzimidazolecarbamate, CAS No.: 10605-21-7, 分子量: 191.18, ロット番号: MLH9040, 和光純薬工業) は水に不溶でジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解したことから、DMSOに溶解して試験に用いた。いずれも培養液に対して1%添加した。