

## 2. 細胞

ヒトリンパ芽球由来のWTK-1細胞を用いた。培養には、 $\text{NaHCO}_3$  (2 mg/mL)、抗生物質 (ペニシリン: 100 units/mL、ストレプトマイシン: 100  $\mu\text{g/mL}$ )、ピルビン酸ナトリウム (200  $\mu\text{g/mL}$ ) および56°Cで30分間非動化した馬血清 (ロット番号: 002002A, JRH Biosciences) を10%添加したRPMI1640培地を用いて $\text{CO}_2$ インキュベーター (5%  $\text{CO}_2$ , 37°C) 内で培養した。

## 3. 処理方法

増殖期のWTK-1細胞を振とうにより単一細胞にして細胞数を計数し、細胞濃度を調整 (突然変異試験では $2 \times 10^5$ 個/mL、それ以外は $1 \times 10^5$ 個/mL) してプラスチックディッシュ又はフラスコに播種し、用時調製した化合物溶液を1%添加し、24時間連続処理した。

TK遺伝子を指標とした突然変異試験以外の試験については、処理終了後、細胞懸濁液の一部を用いて、コールターカウンタで細胞数を測定し、細胞毒性作用の指標とした。残りの細胞懸濁液については、後述の各実験に用いた。各群1つの細胞懸濁液を用いて処理を行い、必要に応じてその細胞懸濁液の一部を採取して、それぞれの実験に用いた。なお、細胞の処理は1機関で行い、同じ実験を2回行った。

## 4. 小核および分裂細胞数の分析

24時間処理後、遠心して上澄を捨て、0.075 M KCl水溶液を加えて室温で低張処理を行い、固定液 (メタノール: 氷酢酸=3:1, v/v) を静かに加えた。遠心 (1000~1500 rpm, 約5分) による固定液の更新を2回繰り返したのち、細胞を少量の固定液に浮遊させ、その懸濁液を伸展器上であらかじめ約30°Cに暖めてあるスライドグラスに滴下し、小核標本作製した。標本をコード化し、観察直前に20  $\mu\text{g/mL}$ のアクリジンオレンジ溶液をスライドグラス上に滴下して染色し、B励起による蛍光顕微鏡下で2000細胞あたりの小核を有する細胞の数、および分裂細胞数を計数した。なお、小核および分裂細胞の分析は2回行った実験の両方について、2機関で行った (1000細胞/群/機関)。

## 5. 染色体数の分析

24時間処理終了の2時間前に、染色体分析用に細胞懸濁液の一部を採取し、コルセミドを最終濃度が0.1  $\mu\text{g/mL}$ となるように添加した。培養終了後、培養液を捨て、遠沈 (1000~1500 rpm, 約5分) 後、0.075 M KCl水溶液を加え、約30分間低張処理を行った。低張処理後、固定液 (メタノール: 氷酢酸=3:1, v/v) を加えて細胞を固定した。数回固定液を交換して十分に固定したのち、少量の固定液に懸濁させた細胞浮遊液をスライドグラス上に滴下し、自然乾燥させた。作製したスライド標本を3 vol%ギムザ液 (pH 6.8 の1/15 mol/Lリン酸緩衝液で希釈調製) で染色し、200個の分裂中期細胞について、染色体数を顕微鏡下または写真を用いて計数した。なお、染色体数の分析は2回行った実験の1回目の標本について実施し、1化合物につき4機関で分析した (25細胞/群/機関)。

## 6. FISH法による染色体の数的異常分析

24時間処理後、染色体数計数用の標本とほぼ同様の方法でスライド標本作製した (ただし、コルセミド処理なし)。作製した標本を以下の手順で前処理し、5種類の染色体 [2番 (a群)、4番 (b群)、18番 (e群)、20番 (f群) およびX (c群)] の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プローブ (CEPプローブ) とハイブリダイゼーションを行った。なお、FISH法による数的異常の分析は2回行った実験の2回目のサンプルについて、1機関で実施した。以下に今回実施したFISHの方法を記載した。

### <前処理>

作製したスライドグラスをエージング溶液 (2×SSC/0.1%NP-40) に浸漬 (37°C, 30分) したのち、70、85、100%エタノールで脱水洗浄 (各1分) し、冷風風乾した。変性溶液 (70% formamide/2×SSC) に浸漬 (73°C, 5分) し、70、85、100%エタノールで脱水洗浄 (各1分) し、冷風風乾した。

### <ハイブリダイゼーション>

スライドグラスを45°Cのスライドウォーマーの上に置き、標本の標的範囲にあらかじめ変成 (73°C, 5分) させたCEPプローブ (10  $\mu\text{L}$ ) を載せ、直ちにカバーグラスをかぶせ、ペーパーボンドでシールした。これ

をあらかじめ加温した湿潤箱に入れ、37℃のインキュベーターで16時間ハイブリダイゼーションを行った。ボンドを取り除き、2×SSCで5分間処理し、カバーガラスを剥がしたのち、スライドガラスを0.4×SSC/0.3%NP-40 (73℃、2分)、2×SSC/0.1%NP-40 (室温、1分) および2×SSC (室温、1分) でそれぞれ洗浄し、DAPI IIもしくはAntifade II solution (10 μL) を滴下し、カバーガラスをかけた。観察は、蛍光顕微鏡下で適切なフィルターを用いて間期細胞核 (平均的な核直径の1/2以上の細胞) を1000個観察し、各プローブ由来のシグナル数を計数した。なお、用いたCEPプローブ (Vysis社製) とその蛍光色および使用したフィルター (Vysis社製) は以下の通りである。

#### <染色体特異的プローブ>

(alpha satellite DNA) :

2番 (Orange)、4番 (Green)、18番 (Green)、20番 (Orange)、X (Aqua)

#### <FISH フィルター>

Quad Bandpass Filter Sets :

(DAPI/Aqua/Green/Orange)

Triple Bandpass Filter Sets :

(Aqua/Green/Orange)

#### 7. FISH法による動原体陽性小核の分析

小核標本については、ヒト動原体特異的プローブであるSTARFISHプローブ (Human Pan-Centromeric Chromosome Paint-Cy3 label, Cambio社) を用い、前述のFISH法とほぼ同様の手順で前処理およびハイブリダイゼーションを行い、DAPIでカウンター染色したのち、蛍光顕微鏡下で分析を行った。コード化した状態で各群50個の小核について、動原体シグナル陽性的小核の数をカウントした。

なお、FISH法による動原体陽性小核の分析は、2回行った実験のうち1回目のサンプルについて、1機関で実施した。

#### 8. TK遺伝子を指標とした突然変異試験

24時間処理終了直後と発現時間 (3日間) 終了時に細胞懸濁液の一部を用いて、1.6 cells/wellになるように細胞を再播種し、コロニー形成率 (それぞれPE0および

PE3) を算出した。また、処理終了直後から発現時間終了までの間毎日細胞数を計測し、各濃度における相対増殖率 (RSG) を算出した。処理終了3日 (発現時間終了) 後に、2000 cells/wellとなるように細胞を播種し、3 μg/mLトリフルオロチミジン (TFT) 中で選択培養し、12日目に突然変異コロニー (TFT耐性コロニー) の数を計数し、突然変異率を算出した。溶媒対照群については2フラスコを用い、各フラスコにつき96ウェルプレートを4枚 (計8枚)、その他の処理群では各群1フラスコにつき2枚のプレートをを用いた。なお、突然変異試験については、小核試験の結果に基づき濃度設定を行い、1機関で1回のみ実験を行った。

#### C. 研究結果

##### 1. 小核および分裂細胞数の分析

TFで24時間処理した場合、濃度依存的に細胞数が減少し、25 μg/mLでは約40%の細胞数となった。小核を有する細胞は15 μg/mLで急激に増加し、25 μg/mLでもその出現率は変わらず、明確な濃度依存性は認められなかった (Table 1)。分裂細胞の数については、明らかな小核誘発が認められた15 μg/mLからその数が濃度依存的に増加した (Table 1)。MBCの場合には、細胞毒性のほとんど認められない0.2 μg/mLの濃度から小核を有する細胞の出現率が濃度依存的に増加しはじめ、細胞毒性の弱い (約70%の細胞数) 0.5 μg/mLの濃度でも小核を有する細胞が明らかに増加した (Table 1)。分裂細胞数についても小核とほぼ同様の反応性を示し、0.2 μg/mLの濃度からその数が濃度依存的に増加した (Table 1)。

以上のように、TFとMBCにおける小核誘発の濃度依存性に関してはやや異なる反応性を示したものの、両物質ともに小核誘発作用と同時に細胞分裂を中期で止める作用を有しており、マウス精子で認められた数的異常誘発作用の差異を検出することは出来なかった。

##### 2. FISH法による小核分析

TFおよびMBCによって誘発された小核が染色体断片 (構造異常) と染色体自身 (数的異常) のどちらに由来するかを推定するために、ヒト動原体特異的プローブを用いたFISH法により小核内の動原体の有無を

Table 1 Induction of micronucleated and mitotic cells in WTK-1 cells after 24 h treatment

Compound	Concentration ( $\mu$ g/mL)	Concurrent cell growth <sup>a</sup> (% of control)			No. of cells analyzed	Micronucleated cells			No. of cells analyzed	Mitotic cells		
		Exp. 1 <sup>b</sup>	Exp. 2	Average		Exp. 1	Exp. 2	Average		Exp. 1	Exp. 2	Average
	5	92	86	89	2000	17	8	12.5	2000	51	56	54
	10	76	66	71	2000	18	15	16.5	2000	62	51	57
	15	62	57	59	2000	56	95	75.5	2000	64	92	78
	20	49	47	48	2000	69	47	58.0	2000	137	144	141
	25	43	39	41	2000	72	70	71.0	2000	240	177	209
Carbendazim	0 (DMSO, 1%)	100	100	100	2000	10	12	11.0	2000	55	37	46
	0.1	103	99	101	2000	18	8	13.0	2000	38	29	34
	0.2	97	92	95	2000	27	19	23.0	2000	51	66	59
	0.3	80	87	83	2000	58	36	47.0	2000	115	108	112
	0.4	84	70	77	2000	79	70	74.5	2000	222	239	231
	0.5	72	72	72	2000	109	81	95.0	2000	362	273	318

a: Cell numbers were counted with a Coulter Counter.

b: Experiments were conducted twice (Exp. 1 and Exp. 2).

Table 2 Analysis of micronuclei hybridized with human pan-centromeric chromosome probe in WTK-1 cells treated for 24 hr

Compound	Concentration ( $\mu$ g/mL)	Concurrent cell growth (% of control)	FISH method			No. of micronucleated cells/2000 cells	
			No. of MM analyzed	No. of positive MN	(%)	analyzed	FISH positive (Estimation)
Trichlorfon	0 (DW, 1%)	100	50	27	(54)	12	6.5
	5	92	50	21	(42)	17	7.1
	15	62	50	26	(52)	56	29.1
Carbendazim	0 (DMSO, 1%)	100	50	17	(34)	10	3.4
	0.2	97	50	14	(28)	27	7.6
	0.3	80	50	28	(56)	58	32.5

確認した (Table 2)。細胞数がやや減少ししかも小核の誘発が明確でない濃度 (TF: 5  $\mu$ g/mL、MBC: 0.2  $\mu$ g/mL) と、小核の誘発が明らかな濃度 (TF: 15  $\mu$ g/mL、MBC: 0.3  $\mu$ g/mL) を選択して分析した結果、TFは溶媒対照群を含まない濃度群においても50%前後の小核が動原体を有しており、TF処理による動原体保有小核頻度の増加は認められなかった。MBCについては、動原体保有小核頻度が濃度依存的に増加したが、動原体保有小核頻度の最も高かった0.3  $\mu$ g/mLにおいても、その頻度はTFの溶媒対照群とほぼ同じ56%であった。FISH法により得られた結果と小核の分析結果を基に算出すると、動原体保有小核を有する細胞数は、TFおよびMBCともに同様のパターンを示した。

### 3. 染色体数の分析

FISH法による小核分析と同じ処理濃度について、小核標本と同時に染色体標本も作製し、染色体数の分析も実施した。

TFで処理したWTK-1細胞の染色体数を調べた結果、約50%の細胞がヒト正常細胞と同じ46本の染色体数であった。TFで処理すると染色体数46本の細胞の頻度がやや減少する傾向は認められたものの、その分布は溶媒対照群とほぼ一致した。また、倍数性細胞 (染色体数69本以上の細胞) の頻度についても変化は認められなかった。MBCで処理した場合も同様に、染色体数の分布は溶媒対照群とほぼ一致し、小核が誘発される濃度においても染色体数の明らかな変化は認められなかった。TFとMBCの処理は同じ日に同じ細胞集団を用いて行ったが、MBC処理群の染色体数のモードは47本で、

TFのモードと異なる結果となった。また、同じ細胞集団から作製した標本を複数の機関で分析したが、分析機関によるバラツキが大きかった。

#### 4. FISH法による染色体の数的異常分析

今回試験に用いたプローブは、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プローブであることから、そのシグナルの数は動原体を有する染色体の数、すなわち細胞内の特定染色体の本数を示すと考えられる。すなわち、2組の常染色体（今回はNo. 2およびNo. 4染色体）を組み合わせた場合、正常2倍体細胞ではそれぞれ色の異なる2個のシグナル（全部で4個のシグナル）として検出される。また、常染色体と性染色体（今回はNo.18、No.20およびX染色体）を組み合わせた場合には、正常2倍体細胞では2組の常染色体由来シグナルと1個の性染色体由来シグナル（合計5個のシグナル）として検出される。しかしながら、異数性が生じた場合にはいずれかのシグナルが増減し、倍数性が生じた場合にはすべてのセッ

トが倍加することになる。従って、シグナルの数を分析することにより、染色体の数的異常を検出することが可能となる。WTK-1細胞をTFで処理し、No.18とNo.20およびX染色体のプローブを用いて分析した場合には、顕著な異数性細胞の誘発は認められなかったが、No. 2とNo. 4染色体のプローブを用いて分析した場合には小核誘発の認められた高濃度群で明らかに異数性細胞が増加した。このように、プローブの組み合わせにより若干異なる結果が得られ、異数性細胞誘発作用が明確ではなかったが、倍数性細胞については、どの組み合わせのプローブを用いても濃度依存的に増加した（Table 3）。MBCの場合には、プローブの組み合わせによる結果の差異は少なく、異数性細胞については濃度に依存してその頻度が増加したが、倍数性細胞については明確な誘発は認められなかった（Table 3）。誘発された異数性細胞のシグナルを、各染色体毎に解析した場合と、その結果をさらに消失した場合と増加した場合に分けて解析した。その結果、TFではNo. 2、No. 4およびNo.18染色体の異数性誘発率が溶媒対照群

Table 3 Analysis of chromosome numbers in WTK-1 interphase nuclei after 24 hr treatment using human chromosome-specific DNA-probes

Compound	Concentration ( $\mu$ g/mL)	No. of cells scored	Probe	No. of cells with combinations of signal numbers of chromosome No. 2 and No. 4												
				Normal	Polyploid	Aneuploid										
						Total	Loss				Gain					
			No. 2	2	4	1	0	1	2	2	3	3	4 $\leq$	2	2	
			No. 4	2	4	1	2	2	0	1	3	2	2	3	4 $\leq$	
Trichlorfon	0 (DW, 1%)	1000		940	4	56	1	0	17	0	17	1	7	1	8	4
	5	1000		925	12	63	1	0	13	0	8	0	5	1	33	2
	15	1000		840	42**	118**	3	0	51	0	17	5	8	0	30	4
Carbendazim	0 (DMSO, 1%)	1000		914	8	78	7	1	24	0	9	2	11	1	22	1
	0.2	1000		872	4	124**	5	0	49	0	17	1	12	2	34	4
	0.3	1000		817	10	173**	7	2	39	0	18	16	24	2	54	11
Compound	Concentration ( $\mu$ g/mL) scored	No. of cells	Probe	No. of cells with combinations of signal numbers of chromosome No. 18, No. 20 and X												
				Normal	Polyploid	Aneuploid										
						Total	Loss				Gain					
			No.18	2	4	1	2	2		3	4	2	2	2	2	
			No.20	2	4	2	1	2		2	2	3	4	2	2	
			X	1	2	1	1	0		1	1	1	1	2	3	
Trichlorfon	0 (DW, 1%)	1000		927	3	70	9	7	4		28	1	11	0	9	1
	5	1000		902	12*	86	27	7	1		27	3	7	0	14	0
	15	1000		877	34**	89	20	15	0		39	1	2	0	11	1
Carbendazim	0 (DMSO, 1%)	1000		946	5	49	18	6	3		19	1	1	0	1	0
	0.2	1000		919	12	69	12	2	8		32	1	7	0	7	0
	0.3	1000		858	10	132**	23	23	13		40	1	10	1	20	1

\* : Significantly different from solvent control ( $p < 0.05$ ,  $\chi^2$  test)

\*\* : Significantly different from solvent control ( $p < 0.01$ ,  $\chi^2$  test)

Table 4 Gene mutation assay at TK locus in WTK-1 cells treated for 24 hr

Concentration ( $\mu$ g/mL)	Expression time (Days)	Cell <sup>a</sup> growth (%)	Relative survival <sup>b</sup> (%)		RSG <sup>f</sup> (%)	RTG <sup>g</sup> (%)	Total no. of wells (WC)	Mutation frequency <sup>b</sup> ( $\times 10^{-6}$ )		
			PE0 <sup>c</sup> (WC <sup>d</sup> )	PE3 <sup>e</sup> (WC)				SC <sup>h</sup>	LC <sup>i</sup>	Total
Trichlorfon										
0 <sup>j</sup>	3	—	—(154)	—(145)	—	—	384( 59)	78.3	16.5	(94.8, 62.1)
0	3	100	100(146)	100(152)	100	100	384( 44)	45.9	16.2	77.6
5	3	100	126( 82)	83( 68)	84	70	192( 26)	59.7	3.5	94.5
15	3	65	88( 71)	102( 75)	55	56	192( 78)	260.5	1.4	274.4
25	3	46	8( 11)	78( 66)	5	4	192( 40)	1019.0	6.0	1078.9
35	3	28	1( 1)	NT	0	NT	192( 0)	NT	NT	NT
Carbendazim										
0 <sup>j</sup>	3	—	—(154)	—(144)	—	—	384( 57)	74.4	18.3	(92.7, 103.4)
0	2	100	100(135)	100(144)	100	100	384( 63)	94.3	9.1	98.0
0.2	3	92	93( 69)	69( 59)	92	63	192( 28)	90.9	3.1	122.1
0.3	3	76	136( 81)	79( 64)	86	68	192( 33)	94.4	4.3	137.3
0.5	3	62	66( 57)	46( 45)	72	33	192( 35)	151.7	10.3	254.5
0.9	3	63	15( 18)	27( 30)	21	6	192( 89)	624.6	70.5	1329.7

a: Relative cell number after treatment, b: Two plates for control and one plate for treatment groups were used, c: Plating efficiency at day 0 (after treatment), d: No. of wells with colony, e: Plating efficiency at day 3, f: Relative suspension growth, g: Relative total growth, h: Small colony, i: Large colony, j: Duplicate cultures were used.

Table 5 Genotoxic data on trichlorfon and carbendazim

Compound	Test system	Species	Parameter	Results	Reference
Trichlorfon	Gene mutation assay	Salmonella	Gene mutation	Positive	5
	Spindle disturbance	V79 cells	Mitotic index	Positive	6
			C-mitosis analysis	Positive	6
			FISH assay	Mouse	Sperm-FISH
	Chromosomal aberration test	Syrian hamster	Structural aberration (BM)	Negative	7
	Chromosome aberration test	Mouse	Structural aberration (BM)	Negative	8
	Dominant lethal	Mouse	Structural aberration	Negative	8
	Unscheduled DNA synthesis				
Carbendazim	Gene mutation	Salmonella	Gene mutation	Negative	10
	Comet assay	CHO-K1	Single cell gel electrophoresis	Negative	11
	Chromosome aberration test	CHO-K1	Structural aberration	Negative	11
	Chromosome aberration test	CHO-K1	Numerical aberration	Positive	11
	Micronucleus test (antikinetochores antibodies)	Mouse	Kinetochores positive (K+) micronuclei	Positive	12
	Micronucleus test (chromosome specific probe)	Human lymphocyte	Micronuclei with centromere	Positive	13

よりも高い傾向が認められた。また、誘発された異数性は、分析した染色体によって、増加による場合と消失による場合が異なっていたが、消失の関与がやや大きい傾向が認められた。一方、MBCの場合には、No.20およびX染色体の異数性誘発率の変化が著しく、誘発された異数性はいずれの染色体においても消失よりも増加の誘発率が高かった。

#### 5. TK遺伝子を指標とした突然変異試験

小核試験の結果を参考に処理濃度を設定し、十分に高い濃度まで試験を実施した。TFおよびMBCともに高濃度で突然変異コロニー誘発率が溶媒対照群の2倍以上となったことから、両化合物はともにWTK-1細胞に遺伝子突然変異を誘発すると考えられる (Table 4)。しかしながら、TFでは明らかに小核が誘発された濃度 (15  $\mu$ g/mL) で突然変異の誘発が認められたが、MBCでは同じく小核が誘発された濃度 (0.3  $\mu$ g/mL) でや

や高い突然変異誘発率を示すもののその反応性は明確ではなかった。

#### D. 考 察

TFおよびMBCともに殺虫剤として開発されたが、TFはダウン症候群高発生率の原因物質であることが示唆されており、MBCについては抗ガン剤としての開発が検討されている<sup>2), 3), 4)</sup>。これらの化合物については、Table 5に示したように生物学的安全性に関する様々な結果が報告されているが、両物質とも染色体の構造異常を誘発しないが、染色体の数的異常を誘発すると報告されている。また、これらの物質をマウスに投与し、得られた精子を染色体特異的プローブで染色すると、TFは異数性 (disomy) の精子のみを誘発し、MBCは倍数性 (diploidy) の精子のみを誘発することも報告されている<sup>1)</sup>。

WTK-1細胞を用いて行った今回の実験結果を比較するとFig.22のようになる。TFおよびMBCでWTK-1細胞を処理するといずれも小核を誘発し、誘発された小核の約半数が動原体を有していた。また、小核を誘発する濃度では分裂阻害作用も示した。このように、両物質ともに染色体の数的異常誘発物質の特徴である分裂阻害作用や小核誘発作用を有していることが確認できたが、これらの指標からマウス精子における両物質の異なる作用を区別することはできなかつた。また、動原体特異的プローブを用いて誘発された小核を分析したが、この方法によっても異数性と倍数性を区別することは出来なかつた。また、直接染色体数を計数し、異数性および倍数性を区別して検出することを試みたが、これらの物質で処理した細胞集団において、染色体数モードの減少傾向がわずかに認められたものの、コントロールとほぼ同じ分布を示し、数的異常誘発作用そのものを捕らえることが出来なかつた。今回の染色体数の分析は遺伝毒性試験の分野に関わっている熟練した研究者が担当したことから考えると、染色体数の多いヒト由来細胞を用いて染色体数カウントによって異数性を検出することは非常に困難であると考えられる。一方、染色体数カウントに代わる画期的な方法として、染色体特異的DNAプローブを用いるFISH法が開発されていることから、今回我々も異数性検出系とし

てのFISH法の有効性を確認するために、5種類のプローブを用いて解析を行った。その結果、間核内の各シグナルの数から、異数性細胞と倍数性細胞を区別することができるものの、両物質における異数性細胞の出現パターンは小核誘発パターンと類似しており、マウス精子における両物質の作用の違いを区別することは出来なかつた。また、倍数性細胞の出現パターンは、マウス精子における結果とは逆にTFが倍数性も誘発し、MBCが異数性のみを誘発するという結果となった。しかしながら、FISH法で得られた結果を、シグナルが失われた細胞とシグナルが付加された細胞に区別して解析したところ、TFで誘発された異数性は染色体消失によるケースがやや多い傾向が認められたが、MBCでは染色体付加の出現率の方が高く、両者の異数性誘発パターンは明らかに異なっていた。TK遺伝子を指標とした突然変異試験の結果は、両物質とも陽性の結果となったが、同程度の小核誘発率を示す濃度で比較した場合、TFは明らかな突然変異誘発作用を示したが、MBCの突然変異誘発作用は明確ではなかつた。

突然変異試験以外は、化合物によって誘発された異常を処理直後に検出するものであり、異常を生じた細胞のその後の運命については不明である。従って、処理直後に得られた結果と処理により生じた異常を細胞増殖 (コロニー形成) として検出する突然変異試験の結果を比較して考察することは非常に興味深いと考えられる。そこで、今回得られたすべての結果を比較すると以下のような説明が考えられる。

TFおよびMBCで処理すると、その分裂阻害作用により細胞分裂が分裂中期で抑制 (分裂細胞の増加) され、その結果として動原体を有する小核が誘発されると考えられる。TF処理によって誘発される小核は1本ないし数本の染色体に由来 (染色体の消失による異数性) し、たまたまTK遺伝子が座位する17番染色体が消失した細胞はTFT存在下で増殖し、耐性コロニーとして検出されると考えられる。一方、MBCの場合、TFと同様に小核を形成するが、TFとは異なり不等分裂のような異常分裂により小核も形成されるが、分裂後の細胞の多くはアンバランスな染色体構成 (染色体数の付加を伴う異数性または倍数性) となり、TFTを含む培地では増殖不可能な細胞であるため、耐性コロニーは形成

されないと考えられる。

このように、精子形成過程で異数性を誘発する物質は、体細胞において染色体の消失を伴うような異数性を誘発し、倍数性を誘発する物質は染色体の付加による異数性を誘発すると考えると、FISH法による異数性検出系を用いてその消失と付加の解析を行うことにより、小核試験では区別できない異数性誘発物質を識別できる可能性が考えられる。また、この考えに基づくと、生殖細胞における異数性誘発物質と倍数性誘発物質を区別するための試験として、小核および分裂細胞の分析とTK遺伝子を指標とする遺伝子突然変異試験の組み合わせが考えられる。すなわち、分裂中期での分裂阻害を伴う小核誘発物質は、数的異常（異数性および倍数性）誘発物質であると考えられるが、細胞毒性作用が強くない濃度域で突然変異誘発作用を示した場合には異数性誘発物質であり、突然変異誘発作用が明確でない場合には倍数性誘発物質であると考えられるかもしれない。

以上、染色体の数的異常を検出するために、モデル化合物を用いて様々な角度から検討を加え、興味ある基礎情報を得ることができたが、それと同時に検討を要すると思われる以下のような点も明らかとなった。

- 1) コントロールにおける動原体陽性小核の出現率は、実験毎あるいは細胞毎に異なる可能性が高く<sup>14)-16)</sup>、我々の結果においてもコントロールの値が大きく異なったことから、FISH法による動原体陽性小核の検出系の精度や信頼性を検討する必要がある。
- 2) 染色体数カウントにより数的異常を検出するためには、処理中に最低1回の分裂期を経て、標本作製時には2回目の分裂中期である必要がある。今回の試験条件では、化合物処理による細胞周期の遅延により、数的異常を検出出来なかった可能性がある。
- 3) 今回は、マウス精子における異数性誘発物質と倍数性誘発物質を区別して検出するための可能性について考察したが、マウス精子で異数性のみを誘発するcolchicineは、in vitro試験系では異数性および倍数性の両方を誘発する。また、今回異数性誘発のモデル化合物として用いたTFはWTK-1細胞の間期核内のシグナル分析では倍数性も誘発し、

倍数性誘発のモデル化合物として用いたMBCはWTK-1細胞の間期核内のシグナル分析では異数性のみを誘発した。このように、生殖細胞とin vitro細胞（体細胞）では異数性と倍数性の結果が逆転する化合物の存在が示唆されたことから、in vitro試験系において、異数性誘発のみをターゲットとして安全性評価を行うことの意義を検討する必要がある。

今後、これらの基礎データをもとに、今回明らかとなった検討項目を検証することや、複数の施設および複数の化合物によるバリデーション試験を実施して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更に検討を加える必要があると考えられる。

## E. 結論

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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kirkland, DJ, Hayashi, M, MacGregor, JT, Mueller, L, Schechtman, LM, Sofuni, T: Summary of major conclusion, *Mutat. Res.* 2003, 540, 123-125.
- 2) Kirsch-Volders, M, Sofuni, T, Aardema, M, Albertini,

- S, Eastmond, D, Fenech, M, Ishidate, MJr, Kirchner, S, Lorge, E, Morita, T, Norppa, H, Surralles, J, Vanhauwaert, A, Wakata, A: Report from the in vitro micronucleus assay working group, *Mutat Res.* 2003; 540, 153-163.
- 3) Mueller, L, Blakey, D, Dearfield, KL, Galloway, S, Guzzie, P, Hayashi, M, Kaspr, P, Kirkland, D, MacGregor, JT, Parry, JM, Schechtman, L, Smith, A, Tanaka, N, Twcats, D, Yamasaki, H: Strategy for genotoxicity testing and stratification of genotoxicity test results-report on initial activities of the IWGT Expert Group, *Mutat. Res.* 2003, 540, 177-181.
2. 学会発表
- 1) 阪本浩子、本間正充、羽倉昌志、ヒト細胞を基礎とした新しいin vitro遺伝毒性評価系の構築：ヒトS9の適応、日本環境変異原学会第32回大会、2003年11月
- 6) Sun FY, Schmid TE, Schmid E, Baumgartner A, Adler ID., Trichlorfon induces spindle disturbances in V79 cells and aneuploidy in male mouse germ cells. *Mutagenesis.* 2000 ;15 :17-24.
- 7) Dzwonkowska A, Hubner H., Induction of chromosomal aberrations in the Syrian hamster by insecticides tested in vivo. *Arch Toxicol.* 1986 ; 58 : 152-6.
- 8) Degraeve N, Chollet MC, Moutschen J., Mutagenic efficiency of organophosphorus insecticides used in combined treatments. *Environ Health Perspect.* 1985 ; 60 : 395-8.
- 9) Mitchell AD, Casciano DA, Meltz ML, Robinson DE, San RH, Williams GM, Von Halle ES., Unscheduled DNA synthesis tests. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res.* 1983 ;123 :363-410.
- 10) Sarrif AM, Arce GT, Krahn DF, O'Neil RM, Reynolds VL., Evaluation of carbendazim for gene mutations in the Salmonella/Ames plate-incorporation assay: the role of aminophenazine impurities. *Mutat Res.* 1994 ; 321 : 43-56.
- 11) Vigreux C, Poul JM, Deslandes E, Lebailly P, Godard T, Sichel F, Henry-Amar M, Gauduchon P., DNA damaging effects of pesticides measured by the single cell gel electrophoresis assay (comet assay) and the chromosomal aberration test, in CHOK1 cells. *Mutat Res.* 1998 ;419 : 79-90. Related Articles, Links
- 12) Sarrif AM, Bentley KS, Fu LJ, O'Neil RM, Reynolds VL, Stahl RG., Evaluation of benomyl and carbendazim in the in vivo aneuploidy/micronucleus assay in BDF1 mouse bone marrow. *Mutat Res.* 1994 ; 310 :143-9.
- 13) Marshall RR, Murphy M, Kirkland DJ, Bentley KS., Fluorescence in situ hybridisation with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutat Res.* 1996 ; 372 :233-45.
- 14) Parry JM, Parry EM, Bourmer R, Doherty A, Ellard S, O'Donovan J, Hoebee B, de Stoppelaar JM, Mohn GR, Onfelt A, Renglin A, Schultz N, Soderpalm-Berndes C,
- G. 参考文献
- 1) Adler ID, Schmid TE, Baumgartner A., Induction of aneuploidy in male mouse germ cells detected by the sperm-FISH assay: a review of the present data base. *Mutat Res.* 2002; 504 :173-82.
- 2) Czeizel AE, Elek C, Gundy S, Metneki J, Nemes E, Reis A, Sperling K, Timar L, Tusnady G, Viragh Z., Environmental trichlorfon and cluster of congenital abnormalities. *Lancet.*1993 ; 341 : 539-42.
- 3) Yin H, Cukurcam S, Betzendahl I, Adler ID, Eichenlaub-Ritter U., Trichlorfon exposure, spindle aberrations and nondisjunction in mammalian oocytes. *Chromosoma.* 1998 ;107 :514-22.
- 4) Hao D, Rizzo JD, Stringer S, Moore RV, Marty J, Dexter DL, Mangold GL, Camden JB, Von Hoff DD, Weitman SD., Preclinical antitumor activity and pharmacokinetics of methyl-2- benzimidazolecarbamate (FB642). *Invest New Drugs.* 2002 ;20 :261-70.
- 5) Barrueco C, Herrera A, de la Pena E., Mutagenic evaluation of trichlorfon using different assay methods with Salmonella typhimurium. *Mutagenesis.* 1991 ; 6 : 71-6.



- Jensen KG, Kirsch-Volders M, Elhajouji A, Van Hummelen P, Degraasi F, Antoccia A, Cimini D, Izzo M, Tanzarella C, Adler ID, Kliesch U, Hess P, et al., The detection and evaluation of aneugenic chemicals. *Mutat Res.* 1996 ; 353 : 11-46.
- 15) Doherty AT, Ellard S, Parry EM, Parry JM., A study of the aneugenic activity of trichlorfon detected by centromere-specific probes in human lymphoblastoid cell lines. *Mutat Res.* 1996 ; 372 : 221-31.
- 16) Jie YM, Jia C., Chromosomal composition of micronuclei in mouse NIH 3T3 cells treated with acrylamide, extract of *Tripterygium hypoglaucum* (level) hutch, mitomycin C and colchicine, detected by multicolor FISH with centromeric and telomeric DNA probes. *Mutagenesis.* 2001 ; 16 : 145-9.

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

－免疫毒性試験法の標準化に関する調査研究－

分担研究者：澤田 純一（国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 部長）  
研究協力者：大澤 基保（帝京大学薬学部 教授）  
今井 俊夫（国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長）  
手島 玲子（国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 室長）  
中村 和希（塩野義製薬株式会社 新薬研究所 主管研究員）  
筒井 尚久（三菱ウェルファーマ株式会社 安全性研究所 グループマネージャー）  
久田 茂（帝国臓器製薬株式会社 安全性・代謝研究部 主席研究員）  
牧 栄二（ヤンセンファーマ株式会社 研究開発本部データ管理部 部長）

研究要旨

免疫毒性試験法に関する国内外の動向調査を行うと同時に、ICHにおける日米欧の免疫毒性試験ガイドランスの調和を目的に、医薬品開発において得られた免疫毒性試験データ収集のための調査票の作成を行った。この調査票を日米欧の製薬企業に配布し、免疫毒性関連の試験データを収集し、解析を行った。解析結果より、この調査で得られたデータが三極におけるガイドランスの国際調和に非常に有用であることが示された。免疫毒性試験ガイドランスの調和がICHのトピックS8として正式に登録され、引き続きICHにおける専門家ワーキンググループ（EWG）として調査票の改訂を行い、追加調査を行うこととなった。

キーワード：免疫毒性試験法、データ収集、調査票、ICH、トピックS8

A. 研究目的

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）を作成する。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う。

B. 研究方法

平成15年度においては、ICHにおいて、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。データ収集のために調査票（エクセルのファイル）を作成した。調査票では、試験動物及び雌雄を別シートとした。調査項目としては、用量の

他に、反復投与毒性試験に関しては、体重、器官重量（胸腺、脾臓、リンパ節等）、血液学的指標、病理組織学的指標（胸腺、脾臓、リンパ節、骨髄、腸管（パイエル板を含む）、肝臓、腎臓、副腎、皮膚）を、追加の免疫機能関連の試験としては、リンパ球サブセット（フローサイトメトリーまたは免疫組織化学的染色）、血中Igレベル、特異的抗体産生（PFC、血清抗体価）、NK細胞活性、遅延型過敏症、宿主抵抗性等を挙げた（表1に詳細な項目を記した）。

今年度は、ヒトまたは動物の組織を研究材料として用いなかったため、倫理面への配慮に関する該当事項はない。

＜表1＞

免疫毒性試験データの調査項目

---

動物	ラット（雄、雌）、他
用量段階	
反復毒性試験における免疫関連指標	
体重	
器官重量	
胸腺、脾臓、リンパ節、副腎	
血液学的指標	
白血球数、リンパ球数	
病理組織学的指標	
脾臓、胸腺、リンパ節、骨髄、肝臓、腎臓、 副腎、パイエル板、皮膚	
免疫機能試験	
血中Igレベル（IgM、IgG、IgA、IgE）	
リンパ球サブセット	
CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、B細胞、NK細胞 （フローサイトメトリー、免疫組織化学染色）	
特異的抗体産生	
PFCアッセイ、IgM-ELISA、IgG-ELISA	
NK細胞活性	
遅延型過敏症	
宿主抵抗性	
臨床データ	
免疫関連指標の変化及び発生頻度	

---

C. 研究結果

1. 免疫毒性試験データの収集

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。

得られたデータを、平成15年10月にロンドンにおいて開催された専門家会議で解析した。得られたデータは、化合物数にして45品目あり、解析の結果、反復投与毒性試験及び機能試験の両者のデータがあり、データとして採用しうるものは28品目であった（参考資料1参照）。解析には、さらに化合物数を増やす必要があることが認識されたものの、同時にこれらのデータが三極の異なるガイダンスの調和を行う上で非常に有用であることが示された。

2. 免疫毒性試験のトピック化

引き続き、平成15年11月に大阪で開催された非公式ワーキンググループ会合における解析及び議論の結果、正式なワーキンググループとして、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。ICH運営委員会への提案の結果、免疫毒性試験の検討がトピックS8として正式に承認され、専門家ワーキンググループ（EWG）が組織された。

3. 調査票の改訂及び再頒布

継続してデータ収集を行うために、EWGとして、調査票に改良を加えた。主な改良点は、統計学的有意性に関する項目を追加したこと、質問内容を分かりやすくし、回答方法を容易にしたことである。この改良調査票を、平成16年2月に再頒布した。回収期限としては、4月末を予定しており、次年度において、第2回目の調査で収集されたデータを解析する予定である。

D. 考察

今後は、ICHにおける免疫毒性試験データの収集を継続して行い、再度データの解析を行う。調査票収集後、平成16年6月以降に解析を開始する予定である。同時に、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）。また、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。

E. 結論

平成15年度は、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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1) 澤田純一：医薬品に関する免疫毒性試験ガイドランス(案)とICH。第10回日本免疫毒性学会学術大会、相模原、2003.9.
- 2) 久田茂：医薬品の免疫毒性試験国際調和ガイドライン作成のためのICH免疫毒性データ調査。第10回日本免疫毒性学会学術大会、相模原、2003.9.
- 3) 澤田純一：医薬品に関する免疫毒性試験ガイドランス(案)について。ImmunoTox Letter、8(1)、3-8、2003
- 4) 中村和希：医薬品の免疫毒性試験の国際調和ガイドライン作成のためのICH免疫毒性データ調査。ImmunoTox Letter、8(1)、8-9、2003
- 5) 澤田純一、安全性分野、ICH-6最前線～交際調和の新潮流～ 日刊薬事別冊、p.129、2003

<資料1>

Interim Summary Report of the Primary Survey

Analysis group meeting was held at the EMEA on 8-9 October, 2003 with following participants.

EMEA/CPMP: Jean-Marc Vidal, Jan Willem van der Laan, Henk van Loveren

EFPIA: Steven Spanhaak, Peter Ulrich

MHLW: Jun-ichi Sawada, Masafumi Kusunoki, Osamu Fueki

JPMA: Kazuichi Nakamura, Naohisa Tsutsui, Shigeru Hisada

FDA/CDER: Kenneth Hastings

PhRMA: Stephen Durham, Tom Kawabata (Teleconference)

Health Canada: Tibor Matula (Observer)

The methodology used to analyze the data was to compare to the results in the standard toxicology studies (organ weights and pathology) versus those in the specific immunotoxicity testing and classify the compounds accordingly. A table was generated classifying the

compounds into 5 different categories (please see the attached table). The group excluded cytotoxic anticancer agents and cytokines from the analysis due to their specific mode of action (7 compounds). As a number of compounds (10) fell also into the category E "inadequate data", the size of the exploitable data set was significantly reduced. A total of 28/45 compounds were found to be exploitable for the purpose of the survey. The group felt that the C category is very important in the discussion. This category contains at least 2 compounds for which the outcome of the immune function tests was considered questionable or suspect.

The conclusions may change because of final validation of analysis and/or results of the secondary survey.

<ICH Immunotoxicology Database>  
Comparison of Standard Toxicity Study  
and Immunotoxicity Assay Endpoints

Category	Finding		Compound	Total Number
	Std Tox	Imtx		
A	+	+	E2, E16 J4*, J13**, J18, J19, J23-24 U2-1&2, U3, U4, U5-1&2, U8-10	12
B	-	-	E3, E14 J3, J5, J8, J7, J11 U1-1&2, U7-9*	9
C	-	+	E6*, E15* J14	3
D	+	-	J1, J2, J12 U6	4
E	Inadequate Imtx data		E1, E4, E5, E7, E8, E9, E12-13 J10, J16, J25-26	10
-	Cytokines and Cytotoxic antineoplastic		E10***, E11*** J6, J9*, J15-22, J17, J20-21	7
Std Tox: Standard toxicology endpoints (organ weights, histopathology and hematology) Imtx: Immunotoxicology endpoints (T cell-dependent antibody response and immunophenotyping) *Incomplete evidence **Close call, slight changes in flow cytometry and hematology ***Cytokines				

厚生労働科学研究費補助金（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

安全性薬理試験（ICH-S7B：ヒト医薬品の再分極過程に関連した  
頻脈性心室不整脈評価に関する非臨床試験ガイドライン）の  
国際的ハーモナイゼーションに関する研究

合同研究項目：1、2

- (1) インビボ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。
- (2) インビトロ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。

分担研究者：

- 1班：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、昭和大学薬学部客員教授）
- 2班：中澤 憲一（国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・薬理部室長）

研究協力者：班員（50音順）

- 東 純一（大阪大学薬学部臨床薬効解析学教授）  
遠藤 仁（杏林大学医学部薬理学教室教授）  
尾崎 幸紘（国立医薬品食品衛生研究所生薬部・室長）  
佐神 文郎（エーザイ、製薬協）  
橋本 宗弘（ファルマシア毒性薬理研究グループ長、製薬協）  
橋本敬太郎（山梨医科大学薬理学教室教授）  
本坊 敏保（藤沢薬品工業株式会社 薬理研究所・主任研究員、製薬協）  
柳田 知司（イナリサーチ技術顧問、慈恵医大薬理客員教授、QA研究会会長）  
山本 恵司（武田薬品工業）  
渡辺 和夫（千葉大学薬学部）

協力機関

- 厚生労働省薬務局審査課、国際化専門官  
国立医薬品食品衛生研究所・審査センター  
医薬品機構調査指導部

要旨

本年度の目的は非臨床QT評価アッセイ系として採用されたインビボおよびインビトロアッセイ系に関して作成及び収集したデータの解析と検討を完了し、ICH臨床QT評価ガイドラインの評価に寄与しうるガイドラインとしてステップ3から大阪会議でステップ4に到達することであったが、臨床QT評価戦略における非臨床QT評価戦略の役割に関する整合が得られず、結果として、ステップ2のICH-S7B安全性薬理試験「ヒト医薬品の心室性再分極遅延ポテンシャルの評価に関する安全性薬理試験ガイドライン」案の構成とほとんど変わっていない。一方、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、イオンチャン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QTPRODUCTプロジェクト並びにILSI/HESIプロジェクトにより作成されたProspectiveなデータおよび収集されたRetrospectiveなデータについて本年度にブリュッセル会議と大阪会議で行った。その結果として、S7B-EWGは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とし、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。単純にE14案との整合だけを指向すると非臨床QT評価ガイドラインにおける主要アッセイ系の評価法としての要求性あるいは試験実施時期があいまいとなり、ガイドラインとしての意味がなくなると考えられた。S7Bの今後のあり方として、1. あくまでもE14と共にステップ4にする。2. S7B単独でステップ4にする。3. 十分な確証データが得られるまではガイドラインにしない。の3つの選択があると思うが、現時点では本ガイドラインをE14ガイドラインに整合させ、Revisedステップ2としてE14と共にPublic commentにかける予定であり、平成16年度の活動としては、臨床QT/QTc試験に匹敵すると認識している非臨床QTリスク評価試験系の予測性に関する信頼性を説明しうると十分なデータの再精査および蓄積に努めることを先決とし、E14と共に再度ステップ2（Revised Step 2）にすることを考えている。

キーワード：安全性薬理試験、ICHガイドライン、非臨床QTリスク評価、統合的リスク評価、アッセイ系データ解析、心臓QT延長

#### A. 研究目的

本研究の目的は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死的不整脈である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検討研究を行うことである。本トピックがS7A安全性薬理試験ガイドラインの補完的ガイドラインとしてICHで討議されるに至った背景として、抗アレルギー薬のテルフェナジン等によるTdP惹起による死亡事例があり、本薬が心電図上のQT延長とそれに続く重篤な頻脈性心室不整脈を起こしたという1980年代後半から90年代前半の欧米の報告（（USAで1985 - 1992年間で125例、1998年withdrawn、表1、2）が根底にある。TdPとQT間隔の延長との高い相関性については早くから知られていたが、その後、他にも消化管運動賦活調整剤シサプリド<sup>1)</sup>を始め、いわゆる“non-cardiovascular drugsもしくはは

non-antiarrhythmic drugs”でも同様のQT間隔延長（臨床および動物実験）と臨床においてTdP症例が見いだされ、あらゆる薬物がこの副作用の危険性を潜在的に有しているのではないかという懸念が高まっている<sup>2)</sup>。この懸念によりUSおよびUKでは1985以来QT延長およびTdPにより表1、2の医薬品が市場から撤退あるいは開発を中止している。さらに欧州ではCPMPから1997年にQTリスク評価のためのPoints of Considerが公表された<sup>3)</sup>。また1999年からUSおよびHealth Canadaによる非臨床および臨床QT評価ガイダンス案<sup>4)</sup>作成が始まった。これらの動きを受けて、ICH安全性薬理S7-EWGは平成12年11月にサンジェゴでStep 4に達した安全性薬理試験ガイドライン（S7A）<sup>5)</sup>中の心血管系に関する試験項目【コアバッテリー】における心電図測定、即ち医薬品の有する再分極と伝導における異常、特にTdPに大きく関連するQT延長作用の測定に関する討議を行った結果、QT延長を非臨床試験において

評価する試験ガイドラインが早急に必要であると合意され、平成13年よりS7Bとして討議が始まった。

表1 Withdrawn drugs in UK since 1986

Prenylamine	Lidoflazine	Terodiline
Grepafloxacin	Terfenadine	Astemizole
Cisapride	Sertindole	Flosequinan
Vesnarinone	Mibefradil	Droperidol

表2 Withdrawn drugs in US

Terfenazine : Feb. 1998	Sertindol:Dec. 1998
Astemizole:Jun. 1999	Grepafloxacin::Nov. 1999
Cisapride:July 2000	

Withdrawn due to risk of torsade de pointes

TdPというのはQT間隔延長に始まり、心室不整脈、次いで失神あるいは突然死をおこす症候群をいう。心電図は、心臓の多数の細胞で発生する活動電位の総和の記録と考えることが出来る。P波は心房筋の活動電位に対応し、QRS波とS-T波は心室筋の活動電位に対応する。従ってQT間隔は心室筋の平均活動電位持続時間 (APD; action potential duration) を表していると考えられる。心筋の活動電位の脱分極はNa<sup>+</sup>とCa<sup>2+</sup>のinward currentであり、最初にNa<sup>+</sup>チャンネルの急激な開口により (Na<sup>+</sup> inward current) 脱分極が始まるが急激に不活性化され、次いでCa<sup>2+</sup>チャンネルがゆっくりと活性化される (Ca<sup>2+</sup> inward current)。その後、Ca<sup>2+</sup>チャンネルがゆっくりと閉じるとともに、K<sup>+</sup>チャンネルが活性化され (K<sup>+</sup> outward current) 即ち再分極により、再び静止電位にもどる。ナトリウムチャンネルやカルシウムチャンネルが活性化されるとAPDは延長し、これらが抑制されるとAPDは短縮することになる。逆にカリウムチャンネルが活性化されるとAPDは短縮し、これが抑制されるとAPDが延長することになる。

これらのチャンネルの中で、カリウムチャンネルには多くの種類があり、主なものとして、主な静止電位の形成にかかわっている内向き整流カリウム電流 (IK1)、活動電位のピーク直後の再分極に関与している一過性外向きK電流 (Ito) および再分極の後半に関与している遅延整流K電流 (IK) の3つがある。これらはそれ

ぞれ特有のイオンチャンネルを介しており、いずれもがAPDに関係しているが、最も直接的に関係しているのは、IKである。IKは、さらに早い成分 (IKr; 急速活性化IK) と遅い成分 (IKs; 緩徐活性化IK) から構成されている。このどちらかが抑制されてもAPDの延長ひいてはQT延長が起こるが、QT間隔を延長しTdPを引起す薬物が選択的にIkrを阻害し、IkrチャンネルはhERG (Human-ether-ago-go-related gene)  $\alpha$  subunitとMiRP1  $\beta$  subunitからなる。

ガイドラインS7Bにおける致死的不整脈の非臨床的QT評価に用いられる測定法の選択に関しては、これらの心室再分極を構成する電気生理学レベルに基づいており、平成14年度に到達したステップ2ガイドラインではイオンチャンネル (hERG/Ikr) アッセイ系とin vivoQTアッセイ系並びに再分極アッセイ系 (APD) を主たる評価試験項目とし、さらに薬理的・化学的クラス情報及びその他毒性データ等の全ての情報を加えた統合的なリスクの評価を基本とした。しかしながら本分野の評価系としての背景データが少なく、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、イオンチャン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、予測性および結果の一貫性について (Prospective) 実験データを作成およびこれまで蓄積された (Retrospective) データの解析の必要があるとして、平成13年度からデータ収集を開始している。本年度の目的は本年度内に完了する収集データの総合解析の評価と検討と共に、その結果を用いて、臨床QT評価ガイドライン (Step 1 ICH-E14) に利するべくStep 3 ICH-S7Bガイドラインを整合あるいは修正し、大阪会議でステップ4に到達することであった。

## B. 研究方法

### 1. S7Bガイドライン

本研究班は突然死の原因の一つであるTorsade de Pointesの前兆である心筋のQT間隔延長即ち再分極過程の遅延を前臨床的に評価するための試験法がインビボおよびインビトロの多岐に涉っていることを考慮した。従って、専門的に詳細に検討を加えるために、インビボ試験法およびインビトロ試験法に関する2つの

研究班（藤森班および中澤班）を構成し、各々の段階で合同会議において、問題点を詳細に討議、検討し、ICH 作業会議での意見調整およびStep 4への達成のために、共同してICHの活動を推進した。

本年度の研究方法は、まず第一に現在ステップ3にあるS7Bガイドラインに関するICH-S7B EWG会議でのガイドライン作成の基となるデータ収集・解析・討議を行うこと並びにQT評価に関する非臨床および臨床試験方法における整合のための臨床ICH-E14 EWGとの合同会議による非臨床QTリスク評価の予測性とその利用範囲を確認する検討であった。一方、国内では、ICH-EWG会議の進行および討議を支える基本的理念と戦略を考えるための国内支援研究のための研究班会議をICH会議の前後に開催し、情報収集および解析検討を行った。ガイドライン作成の基となるデータ収集・解析・討議の対象は、ステップ2で選択した主たる3つの試験系であり、TdPリスクに繋がるQT延長リスクの予測性、感度、試験結果の合一性確認のために2000年より収集を開始した日本製薬協によるQTPRODUCTおよび欧米企業の参加したILSI/HESIプロジェクトにより収集されたProspectiveあるいはRetrospectiveデータ並びに専門家より提供された技術データあるいは各自収集した情報に関して討議した。なお上記の両プロジェクトによるデータ収集は本年度内にほとんど完了し、ブラッセルおよび大阪ICH-EWG会議までに解析し、その結果に基づき、11月に予定されているICH大阪において最終的に討議し、臨床QT評価EWGとの協議の下でステップ4非臨床QT評価ガイドラインを作成する方針であった。

## 2. データ収集

データ収集は日本製薬協の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Prospectiveデータ作成およびRetrospectiveデータの情報を収集した。Prospectiveなデータ収集にはTorsade de Pointes惹起の可能性から分類した薬物<sup>6)</sup>から陽性および陰性薬物としてFDAが選択した薬物を用いて複数の試験施設において試験を行い、データを収集した。非臨床QT評価試験系としてはIn vivo QTアッセイ系、In vitro hERGある

いはIkrアッセイ系および再分極APDアッセイ系である。ICH-EWGで検討したデータの内容は1. ILSI/HESIプロジェクト（Prospective study with 12 drugs、Retrospective参照論文数325）、2. JPMAによるQTPRODUCTプロジェクト（Prospective studies with 19 drugs）、3. FDAによるICH Call For Data（上記のPhRMA、IFPIA、JPMAによるデータを含む）および参考文献167（Retrospective call for data with 54 drugs）に基づくデータであった。

なお本報告中に引用したQTPRODUCTプロジェクト並びにILSI/HESIプロジェクトにより作成・収集されたデータはICH-EWGあるいは研究班会議用に作成した速報から引用した。これらのデータは現在再解析・追加解析中であり、両プロジェクトでは最終解析が終了次第、論文化する予定である。従って、本文中の作表および考察は藤森が本研究報告者としての考えからまとめたものであり、正確あるいは適正でない場合があることをお断りする。

## C. 研究結果

### 1. 収集データ解析

#### ① ILSI/HESIデータ（表3、4）

ProspectiveなデータがFDA、PhRMAおよびEFPIAにより構成された非臨床Cardiovascular Safety Subcommitteeの下、ILSI/HESI試験実施により収集された。陽性物質にはPhARMA/EFPIAグループが英国製薬協ABPIの下で公表データを用いて100薬物のhERG、APD、QT延長、およびヒトTdP報告を調査しリスクの強さで5カテゴリーに分類した物質を含む<sup>7)</sup>。カテゴリー2（Withdrawn or suspended from markets due to an unacceptable risk of TdP for the condition being treated）からCisapride、Terfenazineおよびカテゴリー3（measurable incidence of TdP in humans or for which numerous case reports exist）からBepridil、Haloperidol、Pimozide、Thioridazineの6物質を選択している。陰性物質はCaptopril、Verapamil（カテゴリー5）、Diphenhydramine（カテゴリー4）の他、amoxicillin、Aspirin、Propranololの6種である。選択したアッセイ系はhERG（2試験施設に委託）とIkr（whole cell voltage clamp, mammalian cell line,）、Action Potential Duration



(APD90、イヌ Purkinje fiber) および In vivo QTアッセイ (イヌ、Telemetry ECG) である。陽性 (positive) の基準として、hERG currentは50%抑制 (IC50)、イヌ Purkinje APD90は10%の延長、In vivo QTアッセイ TelemetryイヌQTは10%延長とした。

陽性物質に関して結果を (表 3) に示す。Cisapride の場合hERG currentは21.0 - 30.8 nM (10-14.9 ng/ml) で抑制、APDは26.4 および360ng/mlでイヌPurkinje標本においてAPD90を延長、2615 ng/mlで短縮、In vivo QTはTelemetry系において4 mg/kgでQTcを延長した。

Terfenazineの場合、hERG currentはIC50として8.9、33.1 nM (4.2、15.6 ng/ml) で抑制、APDは5000 ng/mlでイヌPurkinje標本においてAPD90を延長、2615 ng/mlで短縮、In vivo QTはイヌTelemetry系において10 mg/kgでQTcを延長した。

Bepriidilの場合、hERG currentはIC50として24.1、84.1 nM (9.7、33.9 ng/ml) で抑制、APDは1250 - 25000 ng/mlでイヌPurkinje標本においてAPD90を短縮、In vivo QTはイヌTelemetry系において1、10、30 mg/kgで用量依存的にQT並びにQTcを延長した。

Haloperidolの場合、hERG currentはIC50として27.0、93.4 nM (10、35.1 ng/ml) で抑制、APDは39.7、350 ng/mlでイヌPurkinje標本においてAPD90を延長、In vivo QTはイヌTelemetry系において0.3、1.0 mg/kgでQTcを延長した。

Pimozideの場合、hERG currentはIC50として0.8、35.3 nM (0.37、16.3 ng/ml) で抑制、APDは231 - 1270 ng/mlでイヌPurkinje標本においてAPD90短縮、In vivo QTはイヌTelemetry系において1、5、10 mg/kgで用量依存的にQTcを延長した。

Thioridazineの場合、hERG currentはIC50として74、256 nM (30、104 ng/ml) で抑制、APDは1678 - 8600 ng/mlでイヌPurkinje標本においてAPD90短縮、In vivo QTはイヌTelemetry系において5、10、15 mg/kgでQTcを延長した。

陰性物質に関して (表 4) に示す。Captoprilの場合、hERG currentは1.15 mM (NE、250000 ng/ml) で抑制は50%以下であった。APDは検討濃度範囲ではイヌPurkinje標本においてAPD90影響なし、In vivo QTはイ

ヌTelemetry系において3、30、100 mg/kgでQT、QTcに影響なかった。

Verapamilの場合、hERG currentはIC50として180、252 nM (90、124 ng/ml) で抑制、APDは358.5 ng/mlでイヌPurkinje標本においてAPD90延長、3226 ng/mlで短縮、211000 mg/mlでAPD90不変、In vivo QTはイヌTelemetry系において1、5、15 mg/kgでQTcは不変であった。

Diphenhydramine (クラス4) の場合、hERG currentはIC50として74、256 nM (30、104 ng/ml) で抑制、APDは1678 - 8600 ng/mlでイヌPurkinje標本においてAPD90短縮、In vivo QTはイヌTelemetry系において5、10、15 mg/kgでQTcを延長した。

Amoxicillinの場合、hERG currentはIC50として1.9、5.7 nM (0.55、1.66 ng/ml) で抑制、APDは5.7 - 87850 ng/mlでイヌPurkinje標本においてAPD90不変、In vivo QTはイヌTelemetry系において1、3、10 mg/kgでQTcは不変だった。

Aspirinの場合、hERG currentは0.11、11.1 mM (0.02、2 mg/ml) で抑制は50%以下であった。APDは2.029 mg/mlでイヌPurkinje標本においてAPD90短縮、In vivo QTはイヌTelemetry系において10、30、100 mg/kgでQTcは不変だった。

Propranololの場合、hERG currentはIC50として2800、8200 nM (840、24200 ng/ml) で抑制、APD90は1091 ng/mlで短縮、209500 ng/mlでイヌPurkinje標本においてAPD90不変、In vivo QTはイヌTelemetry系において3、10、20 mg/kgでQT、QTcは不変だった。

表 3 陽性 6 物質 (ILSI/HESI data)

Positive drug	hERG	APD90	DogT	t.p-conc
	ng/ml	ng/ml	mg/kg	ng/ml
Bepriidil	9.7, 33.9	neg	>1	>233
Cisapride	10, 14.9	26.4-	4	105
Haloperidol	10, 35.1	39.7	>0.3	54
Pimozide	0.37, 16.	neg	>1	>89
Terfenazine	4.2, 15.6	neg	10	>36
Thioridazine	30, 104	neg	>5	>379

Neg: negative, DogT: Dog telemetry, t.p-conc.: Total plasma concentration in telemetry dog.

表 4 陰性 6 物質 (ILSI/HESI data)

negative drug	hERG IC50: ng/ml	APD90 ng/ml	DogT mg/kg	T.p.conc ng/ml
Amoxicillin	neg	neg	neg	<3843
Aspirin	neg	neg	neg	<115
Captopril	neg	neg	neg	<42516
Propranolol	2420, 837	neg	neg	<555
Diphenhydramine	550, 1660	neg	neg ≤10 Pos :10	<132 132
Verapamil	90,124	358.5	neg	

② QT PRODACTデータ (表 5、6、7、8)

日本製薬協によるQTPRODACTプロジェクトには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。検討した試験系はIn vitro試験系としてモルモット乳頭筋APDアッセイおよびIn vivo QT試験系としてイヌTelemetry、麻酔イヌ、サルTelemetryおよびミニブタTelemetryにおけるECGの解析である。陽性物質としてはABPIカテゴリー分類によるとカテゴリー1 (Repolarization-prolonging antiarrhythmics which have Ikr block as a primary pharmacodynamic mechanism, and QT prolongation as an intended desirable effect) であるd,l-sotalolを標準参照物質として用いた。カテゴリー2の陽性物質としてAstemizole、Cisapride、Terfenazine、カテゴリー3としてはBepriidil、Haloperidol、Pimozide、Thioridazine、その他にDisopyramide、E-4031、MK499、Quinidineの12物質を選択した。陰性物質としてはAspirin、Amoxicillin、Captopril、Ciprofloxacin、Diphenhydramine、Flecainide、Lidcaine、Nifedipine、Propranolol、Verapamilの10物質を選択した。各試験施設はdl-Sotalolを共通陽性物質として試験施設間あるいは結果間ばらつきを検討した。3、10、30 mg/kgで検討した結果、全ての施設は15 - 40%のQTcの用量依存性の延長を示した。10 mg/kgのdl-Sotalolをイヌに投与した場合の血中濃度Cmaxは5 μg/mlであり、ヒトMaximum Therapeutic Doseである160mg投与Cmaxである1.5 μg/mlの3倍であり、10mg/kgの値が設定用量として適切であり、この用量を用いて全ての試験施設は

positiveを示すものとしてpositive基準を設定すると、QTc (Fredericia補正) 延長10 %以上並びに統計的に有意なQT延長はpositiveと設定可能である。即ちこの基準は全ての試験施設はイヌTelemetryを用いたIn vivo QTアッセイ系において延長陽性を示した。APDに関しては、モルモット乳頭筋標本を用いて測定し、APD30、60、90値よりIKr成分に相当するAPD90およびIK成分に相当するAPD30-90を計算した。陽性基準は有意かつ10%以上の延長とするのが妥当であるとした。

陽性物質の結果に関して (表 5、7) に示す。Astemizoleの場合、2.5 μMでAPD30-90を延長positive、APD90は12.3 μMでnegative、In vivo QTはイヌTelemetry系において10、30 mg/kgでQTc延長positive、麻酔イヌにおいては0.1および0.3 mg/kgでpositiveであった。

Bepriidilの場合、3.8 μMでAPD30-90で延長positive、APD90は100 μM以上でnegative、In vivo QTはイヌTelemetry系において100 mg/kgでQTc延長positive、麻酔イヌにおいては3 mg/kgでpositiveであった。

Cisaprideの場合、0.09 μMでAPD30-90を延長positive、APD90は0.164 μMでpositive、In vivo QTはイヌTelemetry系において6 mg/kgでQTc延長positive、麻酔イヌにおいては1 mg/kgでpositive、サルTelemetryにおいては10mg/kgでpositiveであった。

Diisopyramideの場合、0.09 μMでAPD30-90を延長positive、APD90は0.164 μMでpositive、In vivo QTはイヌTelemetry系において3.9 mg/kgでQTc延長positive、麻酔イヌにおいては1.1 mg/kgでpositive、サルTelemetryにおいては1.8、7.2mg/kgでpositiveであった。

E-4031の場合、0.007 μMでAPD30-90を延長positive、APD90は0.0215 μMでnegative、In vivo QTはイヌTelemetry系において1、3 mg/kgでQTc延長positive、麻酔イヌにおいては0.005 mg/kgでpositive、サルTelemetryにおいては0.3、1、3 mg/kgでpositiveであった。

Haloperidolの場合、0.130 μMでAPD30-90を延長positive、APD90は0.404 μMで延長positive、In vivo QTはイヌTelemetry系において1、3 mg/kgでQTc延長したが有意でなくnegative、麻酔イヌにおいては1 mg/kgでQTc延長positive、サルTelemetryにおいては0.3 - 3 mg/kgでnegativeであった。

MK-499の場合、0.022 μMでAPD30-90を延長positive、

APD90は0.0439  $\mu$  Mでpositive、In vivo QTはイヌ Telemetry系において10、30 mg/kgでQTc延長positive、麻酔イヌにおいては0.1、0.3 mg/kgでpositive、0.03、0.1mg/kgで不整脈を惹起、サルTelemetryにおいては0.3 mg/kgでQTc延長positiveであった。

Pimozideの場合、16.3  $\mu$  MでAPD30-90を延長positive、APD90は10  $\mu$  Mまでnegative、In vivo QTはイヌ Telemetry系において1、10 mg/kgでQTc延長positive、麻酔イヌにおいては0.3 mg/kgでpositiveであった。

Quinidineの場合、4.5  $\mu$  MでAPD30-90を延長positive、APD90は6.8  $\mu$  Mでpositive、In vivo QTはイヌ Telemetry系において50 mg/kgでQTc延長positive、麻酔イヌにおいては3mg/kgでpositive、サルTelemetryにおいては10mg/kgでpositiveであった。

Terfenadineの場合、20  $\mu$  MまでAPD30-90およびAPD90はnegative、In vivo QTはイヌ Telemetry系において30、100 mg/kgでQTc延長positive、麻酔イヌにおいては3 mg/kgでpositive、サルTelemetryにおいては延長傾向を示したが10、30、100mg/kgでnegativeであった。

Thioridazineの場合、5、10、20  $\mu$  MでAPD30-90を延長positive、APD90は20  $\mu$  Mでnegative、In vivo QTはイヌ Telemetry系において5、10、20 mg/kgでQTc延長positive、麻酔イヌにおいては1、3 mg/kgでpositive、サルTelemetryにおいては20 mg/kgでpositiveであった。

陰性物質に関しては、Amoxicillinの場合、20  $\mu$  MまでAPD30-90はnegative、APD90はnegative、In vivo QTcはイヌ Telemetry系において70-500 mg/kgでnegative、麻酔イヌにおいては2-15 mg/kgでnegativeであった。

Aspirinの場合、In vivo QTcはイヌ Telemetry系 (in progress)、麻酔イヌにおいては1 - 10 mg/kgでnegative、サルTelemetryにおいては10、30、100mg/kgでnegative。

Captoprilの場合、100  $\mu$  MまでAPD30-90、APD90はnegative、In vivo QTcはイヌ Telemetry系において3 - 30 mg/kgでnegative、麻酔イヌにおいては0.3 - 3 mg/kgでnegativeであった。

Ciprofloxacinの場合、100  $\mu$  MでAPD30-90を延長positive、APD90は100  $\mu$  Mまでnegative、In vivo QTcはイヌ Telemetry系において5 - 200 mg/kgで、麻酔イヌにおいては1、10 mg/kgでnegative、サルTelemetryにおいては30、100、300mg/kgでnegativeであった。

Diphenhydramineの場合、3  $\mu$  MでAPD30-90を延長positive、APD90は30  $\mu$  Mまでnegative、In vivo QTcはイヌ Telemetry系において10、30 mg/kgでnegative、麻酔イヌにおいては1、10 mg/kgでnegativeであった。

Nifedipineの場合、30  $\mu$  MまでAPD30-90、APD90はnegative、In vivo QTcはイヌ Telemetry系において0.3、1 mg/kgでnegative、3mg/kgでpositive、麻酔イヌにおいては0.01 - 0.1 mg/kgでnegativeであった。

Propranololの場合、19.2  $\mu$  MでAPD30-90を延長positive、APD90は30  $\mu$  Mまでnegative、In vivo QTcはイヌ Telemetry系において3 - 30 mg/kgでnegative、麻酔イヌにおいては0.3 - 3 mg/kgでnegativeであった。

Verapamilの場合、0.46  $\mu$  MでAPD30-90を延長positive、APD90は100  $\mu$  Mまでnegative、In vivo QTcはイヌ Telemetry系において1 - 15 mg/kgでnegative、麻酔イヌにおいては30、100 mg/kgでnegative、300 mg/kgでpositive、サルTelemetryにおいては1、5、15 mg/kgでnegativeの結果であった。

Lidocaineは100  $\mu$  MまでAPD30-90、APD90はnegativeであったが、Flecainideは7  $\mu$  MでAPD30-90延長positive、9.8  $\mu$  MでAPD90を延長positiveであった。

表5 陽性物質QT延長QTPRODUCTデータ (Dose mg/kg)

Positive Drugs	イヌTele	麻酔イヌ	サルTele
Astemizole	3*,10,30	0.1, 0.3	
Bepidil	30*,100	1*,3	
Cisapride	0.6*,2*,6	1	3*,10
Disopyramide	3.9++	1.1++	1.8-7.2+
E-4031	1, 3	0.005	0.3, 1, 3
Haloperidol	1*,3*	0.3, 1*	3*
MK-499	0.1,0.3	0.01,0.03,0.1	0.3
Pimozide	1,10	0.3	1*,10
Quinidine	10*,50	3	50
Terfenazine	30,100	3	100*
Thioridazine	5,10,20	3*	5,*10*,20

neg: negative, \*:no significant >10%

表6 陰性物質QT延長QTPRODUCTデータ (Dose mg/kg)

Negative Drugs	イヌTele	麻酔イヌ	サルTele
Amoxicillin	neg<500	neg.<15	
Aspirin		Neg<10	Neg<100
Captopril	neg<30	Neg<3	
Ciprofloxacin	200*	Neg<10	Neg<300
Diphenhydramine	Neg<30	Neg<10	
Nifedipine	3	Neg<0.1	
Propranolol	Neg<30	Neg<3	
Verapamil	Neg<15	Neg<300	Neg<15

表7 APDおよびhERG QTPRODUCTデータ (μM)

Positive Drugs	APD90	APD30-90	hERG:IC50
Astemizole	neg :12.3	2.5 ++	0.9-2.6nM
Bepridil	neg ≤100	3.8 ++	0.6-1.3uM
Cisapride	0.164 ++	0.09++	2-45nM
E-4031	0.0215++	0.007++	5-20nM
Haloperidol	0.404++	0.130++	27nM
MK-499	0.0439++	0.022++	10nM
Pimozide	neg ≤10	16,3+	15-55nM
Quinidine	6.8++	4.5++	0.3-1μM
Terfenazine	neg ≤20	neg ≤20	20-200nM
Thioridazine	Neg<20	5,10,20	33-1250nM

Positive作用：APD++>+≥10 %，

表8 APDおよびhERG QTPRODUCTデータ (μM)

Negative Drugs	APD90	APD30-90	hERG
Amoxicillin	neg ≤2700	neg ≤2700	neg ≤1000
Captopril	neg ≤100	neg 100	neg ≤1150
Ciprofloxacin	neg ≤100	100+	96
Diphenhydramine	neg ≤30	3+	1-5
Flecainide	9.8+	7++	3.91
Lidocaine	neg ≤100	neg ≤100	1000
Nifedipine	neg ≤30	neg ≤30	275
Propranolol	neg ≤30	19.2+	2.8-8.2
Verapamil	neg ≤100	0.46++	140-830

neg: negative

ICH S7B retrospective data collected data (表9、10)  
In vitro hERGについて文献149および企業 (JPMA、US-PhARMA、EFPIA) 55情報、In vitro APDに関して143報および34情報、In vivo麻酔28報および36情報、In vivo Telemetry 5報および24情報、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。

表9に報告間における結果の合致度consistencyを示す。結果はIn vivoQTアッセイ、麻酔下では陽性物質19薬物中18薬物がpositiveであり、Amiodaroneだけがno signal、Erythromycin (1/3報でnegative)、Domperidone (1/2報がnegative)、Terfenazine (1/7報がnegative)であり、陰性5薬物中1薬物 (Ciprofloxacin) だけがPositiveを示した。Telemetry下では陽性9物質中8薬物がpositive、negativeはDomperidoneであり、陰性薬物2物質はnegativeを示した。hERGあるいはIKrアッセイでは陽性物質26中25薬物が抑制 (positive)、Arsenic Trioxideだけがnegative (hERG) を示した。陰性物質に関しては、14物質中12物質がhERGまたはIKrにpositive signalを示し (Nifedipineとnitrendipineのみがnegative)、高率のfalse positiveを示した。

APDアッセイ (Step 2での再分極系アッセイに相当) ではイヌPurkinje標本において、陽性物質でAPD90の10%延長を判定基準とすると標本の種類、濃度に拘わらずpositiveの報告があった薬物は24/26であり、イヌPF標本では9/14、PM標本では3/4、モルモットPM標本では9/10がpositiveを示している一方、陰性薬物では5/8にpositiveの報告が散見されている。陽性物質に関してはhERG/IKr、In vivo QT並びにAPD共にほぼ全例がpositiveを示したが、陰性物質に関してはhERG/IKr並びにAPDアッセイを用いるとかなりのFalse positiveが得られることが予想される。一方、陽性に分類されている薬物のpositiveを示した濃度幅を比較したのが表12である。hERGアッセイでIC50に最大の幅を示した物質はTerfenadineであり (21報告間でIC50は0.0017-350即ちオーダーとして10の4乗とかなり大きい。In vivoQTアッセイでは各々最大で40倍程度であるが、positiveとnegativeの結果を示す陽性物質も散見される。APD90に関しては報告によっては陽性物質でnegative (false negative) であるデータも認められた。

表9 収集情報および文献においてPositive例を示した薬物 (ICH-S7B data)

Drugs	hERG/IKr	In vivo QT	APD
Positive	25/26	18/19	24/26
Negative	12/14	1/5	5/8

Positive例を示した薬物/検討薬物数 (試験系考慮せず)