

どが取り入れられる。これら改訂は、ヒトへの遺伝毒性リスクを科学的に考慮した上で、医薬品の迅速な開発と、動物愛護に貢献できる内容となっている。

(3) 光毒性試験に関する国内外の現状とガイドライン策定についての調査研究：

光毒性の非臨床安全性試験の実施手法等に関し、既にガイドラインを策定している諸外国の例を参考にし、日本における当該ガイドライン案の策定する準備を開始した。

(4) 抗悪性腫瘍薬の非臨床安全性試験方法等の国際的標準化に関する研究：

本研究グループは、抗悪性腫瘍薬の非臨床安全性試

験方法の国際的標準化について、日本として規制当局と製薬業界の意志を統一し、ICH S9 EWGにおける議論に参加し、その中で発生する諸問題について検討を行い、一定の成果を得た。S9ガイドラインは、なお骨子の策定途上であり、来年度以降も粛々と研究を進めていく予定である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

各分担研究者の報告書を参照。

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
平成19年度分担研究報告書

— 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：臼居 敏仁（（財）実験動物中央研究所 センター長）
大西 保行（（財）実験動物中央研究所バイオメディカル部 室長）
西川 秋佳（国立医薬品食品衛生研究所 病理部 部長）
平林 容子（国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長）
梅村 隆志（国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長）
林 真（国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長）
務台 衛（田辺三菱製薬(株)研究本部 安全性研究所 所長）
久田 茂（あすか製薬(株)開発研究センター 安全性研究部 部長）
青木 豊彦（エーザイ(株)安全性研究所 所長）

研究要旨

rasH2、p53^{+/+}、Tg.AC及びXpaマウスの発がん性に関する文献調査を実施した。rasH2マウスについては、皮膚発がん機序の解析が進むと共に、経皮投与発がん性試験におけるTg.ACマウスの代替動物としての可能性が示唆された。さらに、PPAR α アゴニストに対して肝発がん感受性を有することが確認された。p53^{+/+}マウスに関しては、本モデルの発がん感受性に関与する遺伝子の役割の一端が解明され、発がん性評価における結果の解釈に有用な情報が示された。Tg.ACマウスに関しては、皮膚発がん過程に影響を与える遺伝子の役割や発がん修飾過程におけるがん抑制遺伝子の不活性化の関与が示唆され、皮膚発がん機序解明において成果が認められた。Xpaマウスについては、吸入暴露試験における毒性・発がん性評価やUV照射後の皮膚ではNER欠損の影響としてbulkyな変異が増加すること等が示された。また疫学調査から、ヒトXPA遺伝子に認められる一塩基多型と発がんリスクとの関連が示唆された。

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

医薬品のがん原性評価には、遺伝子改変動物の使用が認められており、ヒト型c-Ha-ras遺伝子導入トランスジェニックマウス（rasH2マウス）モデル、がん抑制遺伝子p53の片側アレル（exon5）を欠損させたC57BLp53ノックアウトマウス（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トランスジェニックマウス

（Tg.ACマウス）モデル並びに色素性乾皮症修復遺伝子を欠損させたXpaノックアウトマウス（XPA^{-/-}マウス、以下Xpaマウス）モデルが推奨されている。しかし、これらの遺伝子改変マウスの発がん機序については不明な点も多く残されている。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がん感受性や発がんメカニズムに関する文献収集並びに発がん感受性に関する検討を実施し、その有用性や問題点について

考察した。

B. 研究方法

rasH2マウス：昨年度に引き続き、rasH2マウスに関する研究状況を調査し、本マウスの発がん特性や有用性についてまとめた。さらに、本マウスの発がん感受性に関して、東京農工大学で実施した基礎的検討結果についてまとめた。

p53^{+/+}マウス：p53^{+/+}マウスの発がん感受性に関するメカニズム研究の文献報告を調査し、医薬品の発がん性評価におけるp53^{+/+}マウスの有用性や留意点についてまとめた。

Tg.ACマウス：昨年度に引き続き、Tg.ACマウスに関する研究状況を調査し、医薬品のがん原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。

Xpaマウス：昨年度に引き続き、Xpaマウス及びXPA^{+/+}/p53^{+/+}マウス（以下XPA/p53^{+/+}マウス）に関する研究状況を文献により調査し、これらのマウスモデルの発がん物質に対する高感受性に関する文献調査を実施した。

C. 研究結果

(1) rasH2マウス

化学発がん物質による皮膚腫瘍はヒトc-Ha-ras遺伝子導入マウスにおいて早期に誘発されるが、マウスc-Ha-ras遺伝子導入マウスでは誘発されない[1]：

rasH2マウス開発者の一人である勝木らは、ヒトとマウスのc-Ha-ras遺伝子中の1塩基変異の違いがDMBAに対する組織特異的な発がん感受性に関与しているか否かを検討するため、マウスのc-Ha-ras遺伝子（自身のプロモーターも含む）を導入したマウス（mrasマウス）を作成した。Western blottingでは、皮膚におけるH-RAS遺伝子の発現は、rasH2マウス及びmrasマウスの双方で認められ、non-Tgマウスよりも増加していた。さらに、DMBA及びTPAにより誘発される皮膚発がんにおいて、rasH2マウスでは同腹のnon-Tgマウスと比較して腫瘍形成時期の早期化並びに皮膚腫瘍数及び腫瘍サイズの増加が認められた。一方で、mrasマウスでは腫瘍形成増強作用は認められず、平均腫瘍数もmrasマウスとnon-Tgマウス間で差はなかった。rasH2マウスの腫瘍で

は、コドン61におけるA→Tへの1塩基変異は導入ヒトc-Ha-ras遺伝子にのみ観察され、内在性c-Ha-ras遺伝子には認められなかった。また、野生型及びmrasマウスにおける腫瘍では、マウスc-Ha-ras遺伝子のコドン61におけるA→Tへの1塩基変異が認められた。以上の結果より、マウスとヒトのc-Ha-ras遺伝子における塩基の違いが、DMBAに対する組織特異的的感受性に関与していることが推察された。

c-kitの機能低下によるrasH2マウスの皮膚発がん増強作用の抑制[2]：

rasH2マウスの皮膚では肥満細胞が動員されやすく、野生型マウスと比較するとDMBA及びTPA投与においてより多くの肥満細胞が出現する。勝木らは、rasH2マウスにおける皮膚発がん増強作用が肥満細胞の動員によるものか否かを検討するため、rasH2マウス及びWあるいはWv KITミュータントマウスとの交配によりrasH2 KIT^{Wv}マウス（肥満細胞欠損症rasH2マウス）を作成し、化学物質により誘発される皮膚発がんの感受性について検討した。rasH2 KIT^{Wv}マウスでは、DMBA及びTPAの投与前あるいは投与後共に、皮膚において肥満細胞は観察されなかった。rasH2 KIT^{+/+}マウスにおける乳頭腫発生数は同腹のrasH2 KIT^{Wv}マウスよりも4.6倍多く、また、投与12週間後における腫瘍体積は、rasH2 KIT^{+/+}マウスよりもrasH2 KIT^{Wv}マウスの方が小さかった。乳頭腫の発生時期及び発生数に関して、non-TgマウスとrasH2 KIT^{Wv}マウスの間に差は認められなかった。Western blottingの結果では、皮膚におけるH-RASタンパクの発現はrasH2 KIT^{Wv}、rasH2 KIT^{+/+}マウスに共に同等であった。以上の結果から、c-kitの機能抑制がHa-rasにより誘発される皮膚発がんの低下に寄与することが示唆された。また、c-kitの抑制は、H-rasの活性化が重要な役割を果たしているがんの治療モデルにおいて有用な標的となる可能性を秘めており、肥満細胞そのものが治療標的となりうることを示唆された。

rasH2マウスの経皮投与26週間発がん性試験への適応検討[3]：

浦野らは、rasH2マウス雌雄各75匹及び同腹の遺伝子非導入（non-Tg）マウス雌雄各75匹の総計300匹を非投与群、エタノール群、白色ワセリン群、アセトン群、

TPA群に分け、経皮投与による26週間短期発がん性試験を実施した。非投与群は背部毛刈り処置のみとし、TPAは陽性対照物質として用い、ILSI/HESI国際検証試験のTg.ACマウスにおける同用量（2.5 μ g/kgを3回/週）にて投与を行なった。その結果、経皮投与薬物の基材として用いられるエタノール、白色ワセリン及びアセトンの各投与群では、rasH2マウス及びnon-Tgマウスともに投与部位における腫瘍発生は認められなかった。TPA群では、rasH2マウスにおいて投与7週後から投与部位に結節が形成され、投与後26週までの結節形成率は雄で50.0%（7/14例）、雌で53.3%（8/15例）であった。その内、病理組織学的検査で皮膚乳頭腫あるいは角化棘細胞腫と診断されたものは雄で21.4%（3/14例）、雌で46.7%（7/15例）であり、その他は扁平上皮化生であった。一方non-Tgマウスの投与部位には結節形成並びに腫瘍発生は認められなかった。以上の結果から、rasH2マウスの26週間発がん性試験における経皮投与への適応拡大の可能性が示唆された。

FenofibrateのrasH2マウスにおける発がん感受性の検討：

三森（東京農工大学）は、peroxisome proliferator-activated receptor alpha（PPAR α ）アゴニストに対するrasH2マウスの発がん感受性を検討するため、長期発がん性試験で肝発がん性が示されているPPAR α アゴニストであるfenofibrate（FFB）を用いて解析を行った。7週齢の雄性rasH2マウスに対して肝二段階発がんモデルを用い、2/3部分肝切除24時間後にdiethylnitrosamine（DEN）を単回腹腔内投与し、さらにその1週間後からFFBを0、1200ないし2400ppmの濃度で7週間混餌投与した。その結果、FFB投与群では肝絶対・相対重量の増加とともに肝細胞肥大がみられ、最高用量の2400ppm投与群では変異増殖巣が認められた。免疫組織学的解析では、FFBの2400ppm投与群において細胞増殖核抗原（PCNA）陽性率並びに前がん病変マーカーとしての可能性が示唆されるCytokeratin 8/18陽性変異細胞数の有意な増加が認められた。これらの結果から、rasH2マウスはPPAR α アゴニストであるfenofibrateに対して肝発がん感受性を示すことが示唆された。

(2) p53^{+/-}マウス

2006年10月以降に公表された論文では、p53ノックアウトマウスを用いた化学物質の発がん性評価研究に関する文献情報は見当たらなかった。一方、p53ノックアウトマウスを用いた短期発がん性試験の成績解釈に有用と思われる報告がみられた。

p53ノックアウトマウスにおける胸腺リンパ腫の発生にはHeat Shock Protein Transcription factor（hsf1）が関係する[4]：

Minらは、p53^{+/-}マウスとhsf1^{+/-}p53^{+/-}ダブルノックアウトマウス、あるいはp53^{+/-}マウスとhsf1^{+/-}p53^{+/-}ダブルノックアウトマウスを比較し、以下の結果を得た。すなわち、p53とhsf1遺伝子とのダブルノックアウトマウスでは、p53ノックアウトマウスで高発するリンパ腫の発生率が低下し、肉腫や精巣腫瘍の発生が増加した。両マウスのリンパ腫における構成細胞には有意な差はみられなかった。次に、このhsf1欠損がリンパ腫の発生頻度に影響を与えるメカニズムについて検討が行われた。hsf1^{+/-}p53^{+/-}ダブルノックアウトマウスは、p53^{+/-}マウスに比べて生存期間の延長がみられた。さらに、p53^{+/-}マウスとhsf1^{+/-}p53^{+/-}ダブルノックアウトマウスの骨髄細胞を、放射線処理したマウスに移植して作出したキメラマウスによる検討から、hsf1遺伝子の欠損はリンパ腫発生に抑制的に働いていることが判明した。

T細胞のIL-2増殖刺激に対する応答性及びT細胞のIL-2、11、13、16及び17、TNF- α 及び β の各産生量は、p53^{+/-}マウスと比較してhsf1^{+/-}p53^{+/-}ダブルノックアウトマウスにおいて低下していた。またアポトーシスへの抵抗性は、dexamethazone等のp53に依存しないアポトーシスの場合、hsf1^{+/-}p53^{+/-}ダブルノックアウトマウスで低下し、野生型と同程度であったが、放射線のようにp53依存性のアポトーシスでは、p53^{+/-}マウスとhsf1^{+/-}p53^{+/-}ダブルノックアウトマウスに差は認められなかった。

これらの成績は、hsf1遺伝子の不活性化がp53^{+/-}マウスにおけるリンパ腫低下のメカニズムの一端を担っていることを示すものであり、p53ノックアウトマウスを用いた化学物質の発がん性評価研究において発生腫瘍の頻度やスペクトラムの変化がみられた場合の解釈に役立つ情報と考えられた。

p53ノックアウトマウスの放射線誘発発がんにみら

れたLOHのパターンとCadherin 1及び5の不活性化について[5] :

梅迫らは、p53^{+/+}マウスに誘発した乳がんのアレル欠損について42のlociを検索し、30%以上の頻度でLOHが認められる染色体として、第5、8、11、12、14及び18番染色体を見出した。特に、第8、11及び12番染色体については、他のマウス腫瘍と比較すると放射線誘発乳がんの特徴的であった。検索した60%以上の乳がんにおいて、第8染色体のD8Mit85-D8Mit113の領域にLOHが認められたが、この領域はヒト乳がんではLOHがみられる16q22.1と相同であった。26個の乳がんを検索した結果、第8番染色体のLOHはCadherin1及び5遺伝子(Cdh1、Cdh5)のmRNA発現レベルの減少・消失と関連していた(Cdh1とCdh5のmRNA低下・消失は、それぞれ58%、31%で認められた)。すなわちCdh1及び5はp53欠損による乳がんの発生抑制に関与している可能性が示唆された。

これらの成績は、p53ノックアウトマウスにおける乳腺発がんに関連するメカニズムの一端を示すものであり、p53ノックアウトマウスを用いた化学物質の発がん性評価研究において乳がんが発生した場合の解釈に役立つ情報と思われた。

(3) Tg.ACマウス

Tg.ACマウスを用いた新規研究に関する文献情報は発がん増強メカニズム解明に関するものも含め、昨年同様極めて少なかったが、Tg.ACマウスにおける発がんの分子機序に関していくつか報告があった。

Russellらは、Tg.ACマウスを用いた皮膚二段階発がん試験において、転写因子E2F1の過剰発現が皮膚発がんを抑制すること及びその分子機序について報告した[6, 7, 8]。転写因子E2Fファミリーは、細胞周期調節やDNA合成に関与しており、p16^{INK4a}-cyclin D-retinoblastoma (Rb) tumor suppressor pathwayを經由したE2F転写因子の活性化は、発がんにおける重要なイベントである。E2F1を過剰発現するトランスジェニックマウス(K5 E2F1マウス)は、表皮の過形成とアポトーシスが亢進するが、一方でDMBA及びTPAによる皮膚二段階発がん試験において皮膚腫瘍発生を抑制することが分かっている。この試験系における発がん抑制作用は、他のE2FファミリーであるE2F3、E2F4、DP1

やMyc遺伝子の過剰発現が腫瘍発生を促進することから、E2F1にユニークな現象であると考えられる。K5 E2F1マウスの皮膚二段階発がんモデルにおいて認められた腫瘍抑制メカニズムを調べるため、Tg.ACマウスとTg.AC/K5 E2F1 bigenicマウスにTPA (1.0 µg/head)を週2回、15週間背部皮膚に投与した。その結果、Tg.ACマウスでは15週間後に皮膚乳頭腫の発生個数が一個体当たり約8個であったのに対して、Tg.AC/K5 E2F1 bigenicマウスでは2個以下であり、E2F1過剰発現による皮膚発がんの抑制はプロモーション段階で起こることが明らかとなった。またK5 E2F1マウスと野生型マウスにDMBA (10 nmol)及びオカダ酸 (2 µg/head、週2回、25週間)を投与する皮膚二段階試験を実施した結果、野生型マウスでは一個体当たり8個の乳頭腫の発生が認められたが、K5 E2F1マウスにおける発生は1個未満であったことから、E2F1の皮膚腫瘍抑制効果は発がんプロモーターの種類に特異的なものではないことが示された。一方、SKH1ヘアレス系背景を持つ野生型マウスとK5 E2F1マウスにUVBを20週間(100 mJ/cm²、週3回、15週間→50 mJ/cm²、週3回、5週間)照射した結果、野生型マウスに比べK5 E2F1マウスでは短い潜伏期間で皮膚腫瘍の発生が認められたことから、K5 E2F1マウスは紫外線照射による皮膚発がん感受性が高いことが示された。DMBAと紫外線に対する感受性の違いに関しては、DMBAがc-Ha-ras遺伝子のcodon 61におけるmissense変異を引き起こすのに対して、紫外線はp53遺伝子の早期の変異を引き起こすことから、E2F1が腫瘍発生を抑制するか促進するかは誘発する変異の違いによるものであることが考えられた。また、野生型マウス(p53^{+/+})、K5 E2F1マウス、p53^{-/-}マウスとp53^{-/-}/K5 E2F1 bigenicマウスを用いたDMBA及びTPAの皮膚二段階発がんモデルでは、野生型マウスでは個体当たりの皮膚乳頭腫発生数は多いのに対して、K5 E2F1マウスでは皮膚腫瘍の発生は一個体当たり1個未満であった。一方、p53^{-/-}マウスにおける発生数は野生型マウスを上回り、またp53^{-/-}/K5 E2F1 bigenicマウスは野生型マウスの発生数とほぼ同等であった。このことから、E2F1による腫瘍発生抑制にはp53が必要であることが示唆された。さらに、E2F1の腫瘍発生抑制にARFがどのような役割を担っているかを確

認するため、皮膚二段階発がんモデルを用いて、ARF遺伝子をもつ野生型マウス (Arf^{+/+}) と K5 E2F1 マウス、ARF-null マウス (Arf^{-/-}) と Arf^{-/-}/K5 E2F1 bigenic マウスにおける皮膚腫瘍発生を調べた。その結果、野生型マウスと K5 E2F1 マウスは同様の反応で、ARF-null マウス (Arf^{-/-}) における皮膚乳頭腫の発生は野生型よりも多かった。また、表皮における caspase 3 陽性細胞数は、野生型と比較し K5 E2F1 マウスにおいては Arf 遺伝子の有無とは関係なく高かったことから、ARF は皮膚発がんの抑制には重要であるが、アポトーシスには重要ではないと考えられた [8]。

また、紫外線照射による皮膚発がん過程における Epidermal growth factor receptor (EGFR) 活性化の寄与に関する報告があった [10]。Epidermal growth factor receptor (EGFR) は、チロシンキナーゼ型受容体の中でも構造上の類似性から ErbB ファミリーに属している。紫外線への長期曝露における EGFR の持続的な活性化が紫外線照射による皮膚発がんに寄与するとの仮説を検証するため、El-Abaseri らは、皮膚発がんに感受性があり、遺伝的にイニシエートされていると見做される Tg.AC マウスモデルを用いて過去に検討を行っている [9]。Tg.AC マウスに対して、紫外線照射 2 時間前に EGFR 阻害剤である AG1478 (プロテインチロシンキナーゼを阻害する tyrophostin の一種) を投与すると、紫外線照射による EGFR の活性化が阻害され、皮膚乳頭腫の発生数及びサイズが媒体対照群に比べ約半分に抑制された。紫外線照射により引き起こされる EGFR の活性化は、皮膚角化細胞の増殖を増大させ、アポトーシスを抑制することで皮膚の過形成を誘導する。さらに EGFR は、G1 cyclin の発現を増大し、Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitor の発現を抑制する。紫外線照射による酸化ストレスの増大により EGFR は活性化し、さらに受容体ヘリガンドが結合することにより EGFR のチロシンキナーゼ部位のリン酸化が起こり、細胞内のシグナル伝達が引き起こされる。EGFR のシグナル伝達経路には、Ras/Raf/MAPK (Mitogen-activated protein kinase) 経路、PI3K (Phosphatidylinositol-3-kinase)/AKT 経路、Jak/STAT 経路の 3 つの経路があり、Ras/Raf/MAPK 経路は主に細胞増殖に関与し、表皮の増

殖を増大する。一方で PI3K/AKT 経路は細胞成長や抗アポトーシスに関与し、結果として皮膚の過形成から皮膚発がんへと進展するものと考えられる [10]。

Leder らは、Tg.AC モデルから得られた腫瘍及び腫瘍細胞に Genome-wide SNP (single nucleotide polymorphism) screen 解析 (ゲノム全域にわたる一塩基多型解析) を適用し、発がん修飾過程において ras 遺伝子と共同で働く他の癌遺伝子の発現あるいはがん抑制遺伝子の不活性化の必要性について報告した [11]。Tg.AC マウス (FVB 系の遺伝背景) とは異なる遺伝形質を有する系統のマウス (Balb/cJ, Spretus/Ei, C57BL/6J, C3H/HeJ 系) と交配して得られた F1 マウスに自然発生した腫瘍から、21 の腫瘍細胞株 (皮膚腫瘍: 10、脾臓組織球腫: 7、顎部腫瘍: 2、頸部腫瘍: 1、リンパ節由来: 1) を分離し、活性化した ras の存在下で形質変換したマウス細胞株のゲノム解析を行った。その結果、正常な細胞は一律に heterozygous であり、9 つの細胞株には LOH (loss of heterozygosity) はみられなかったが、残りの 12 の細胞株においては第 4 番染色体上に LOH が認められた。LOH の領域は各細胞株で異なっていたが、全ての LOH は染色体遠位部の一箇所に起こっていた。7 つの細胞株では FVB allele が失われ、5 つの細胞株では交配相手の系統の allele が失われていたが、それらは 6 つの FVB/Balb/cJ 由来の細胞株のうちの 5 つにおいて認められた。また、原発腫瘍 (脾臓の組織球腫) 組織についてもゲノム解析を行った結果、同様に第 4 番染色体上に LOH が認められた。FISH 解析の結果、観察される LOH の機序は欠損によるものではなく、細胞分裂における組み換えあるいは遺伝子変換によるものであることが示唆された。複数の腫瘍細胞株で一箇所の LOH が認められることから、v-Ha-ras 導入遺伝子と第 4 番染色体に位置する腫瘍抑制子の不活性化の関連が強く示唆され、その位置から Ink4a と Ink4b がその候補として考えられた。PCR 解析を実施したところ、LOH のある全ての腫瘍細胞株で Ink4a 遺伝子座における homozygous な欠損が認められ、また多くの細胞株で近接した Ink4b 遺伝子座に付加的な欠損が認められた。32 の腫瘍細胞株の内、25 (78%) で Ink4a^{p16} と Ink4a^{p19} の両方が不活性化されており、その内の 20 は欠損であった。これは両者の協力が腫瘍抑制に必要であること

を示している。さらに、 $Ink4a^{p15}$ と $Ink4a^{p19}$ が共に不活性化している細胞株はなかったことから、 $Ink4b^{p15}$ は $Ink4a^{p16}$ に代替できないものと考えられた。また、 $Tg.AC/p53^{+/+}$ bigenicマウスに自然発生した腫瘍から分離した7つの腫瘍細胞株のgenomic DNAについて、 $Ink4$ 遺伝子座の状態と野生型 $p53$ alleleをPCRを用いて調べた。その結果、 $Tg.AC$ と異なり、 $Tg.AC/p53^{+/+}$ 線維肉腫細胞株の一つで $Ink4a^{p15/p19}$ の欠損を示したが、その他残りのエナメル芽細胞腫、線維肉腫、胸腺腫、唾液腺、乳腺腫瘍由来の腫瘍細胞株では全て $Ink4$ 遺伝子はそのままであった。また5/6の細胞株では $p53$ 野生型 alleleを欠損していた。 $Tg.AC$ マウスの腫瘍細胞株の大半は $Ink4a^{p15/p19}$ の欠損あるいは不活性化を示したが、欠損が認められたのは7つの $Tg.AC/p53^{+/+}$ 腫瘍細胞株の内1つのみであった。さらに $Ink4$ 遺伝子座を保持し、発現している腫瘍細胞株は野生型の $p53$ alleleを欠損しており、一方 $Ink4a^{p15/p19}$ の欠損した唯一の $Tg.AC/p53$ 細胞株が野生型の $p53$ alleleを保持していることが明らかとなった。以上の結果から、これらの細胞では $p53$ の欠損が $Ink4a^{p15/p19}$ の不活性化による影響を無効にすることが示唆された[11]。

(4) XPAマウス

今年度は、 $Xpa/p53^{+/+}$ マウスを用いた毒性・発がん性の評価試験として、アルデヒドガスの吸入暴露における上部気道の毒性・発がん性を評価した成績が報告された[12]。 Xpa マウスの発がん高感受性に関する報告としては、UV照射により発生する遺伝子変異へのXPA遺伝子欠損の影響を調べた結果が報告された[13]。これらの報告以外に Xpa マウスを用いた発がん性に関連した報告はみられなかった。また、色素性乾皮症患者ではNERを欠損していることから、紫外線による皮膚発がんが顕著に増加することが知られているが、このNER遺伝子と一塩基変異 (SNPs) 並びに発がんの関係に関する疫学的調査の結果がいくつか報告された[14-18]。

Xpa/p53^{+/+}マウスを用いた毒性・発がん性評価[12] :

Casseeらは、 $Xpa/p53^{+/+}$ マウスにおける喫煙の影響を評価する為に、喫煙を模してacetaldehyde、foraldehyde及びacroleinの混合ガス (以下、アルデヒドガス) を間欠的に (45分毎に7分間、1回用量はタバコ1本に相

当する量、12回/日、5日/週)、あるいは1/2の濃度で持続的に (8時間/日、5日/週) 吸入暴露させた。13週間の暴露終了後並びに暴露終了後52週間清浄空気で飼育した後に剖検を行い、病理組織学的検査を実施した。その結果、13週間暴露後には、嗅上皮の萎縮が認められ、1年後には嗅上皮の呼吸上皮化生が認められた。持続暴露群と対照群では、 $Xpa/p53^{+/+}$ マウスにおける腫瘍発生は増加したが、間欠暴露群と低濃度持続暴露群との間に差はみられなかった。

XPA欠損によるUV誘発遺伝子変異への影響[13] :

池畑らは、 Xpa あるいは野生型マウスにレポーター遺伝子としてLacZ遺伝子を導入したF1 hybridマウスを用い、UVB照射後の皮膚を解析した。UVB照射後の皮膚には、photoproductとしてcyclobutan pyrimidine dimers (CPDs) やpyrimidine (6-4) pirimidone photoproduct (64PPs) が検出されたが、 Xpa マウスと野生型マウスでその量に差は見られなかった。12時間後においても Xpa マウスではこれらの傷害が除去されなかったが、野生型では64PPsが減少した。また、UVB照射後にLacZ変異の増加がみられたが、 Xpa マウスと野生型マウスでその頻度に明らかな差は認められなかった。変異のタイプとしては、UV照射に特徴的なdipyrimidine部位でのC→T変異が Xpa 及び野生型マウスに共通して認められた。一方、 Xpa マウスに特異的な変異として、CC→TT置換を含む2塩基置換、3塩基置換や1塩基を挟んでの2塩基置換等が多数発生した。すなわち Xpa マウスでは、NERの完全な欠損により多塩基の置換による遺伝子変異が高頻度に発生することが示された。

疫学調査によるXP遺伝子変異の分布[14-18] :

NER遺伝子の変異により、傷害されたDNAの修復能が変化し、自然発生腫瘍や発がん性化合物による発がん感受性が変化する可能性がある。発がん感受性を左右する遺伝子として、薬物代謝酵素遺伝子と共に、除去修復を含むDNA修復遺伝子が挙げられるが、その多型と腫瘍発生リスクとの関連が疫学調査によって数多く調査されている。ヒトXPA遺伝子では、5'側上流 (開始コドンの4塩基手前) の非転写領域におけるG23A (あるいはA23G) 多型が知られている。肺がん発生のリスクあるいは喫煙による肺がん発生のリスクとNER遺伝子の一塩基変異との関連については、いくつかの

報告があり[14-16]、XPA G23A多型との関連を示唆する報告があった。また口腔前悪性病変 (oral premalignant lesion) [17]あるいは食道扁平上皮がん[18]に関しては、発生率が高い中国北部で、その発生リスクとXPA G23A多型との関連が報告された。

D. 考察

rasH2マウスを用いた研究では、皮膚腫瘍を標的とした新たな遺伝子改変マウスやハイブリッドマウスの作出による発がん機序解析が見られた。さらに、rasH2マウスはPPAR α アゴニストに対する肝発がん感受性を示すことが確認された。これらの研究から、rasH2マウスにおける発がん機序解明が今後さらに進むことが期待された。また、rasH2マウスを26週間経皮投与発がん性試験に適用した研究からは、rasH2マウスが、今後Tg.ACマウスを代替する皮膚発がん性評価ツールとして利用できる可能性が期待された。

p53^{+/+}マウスを用いた研究からは、hsf1遺伝子の不活性化がp53^{+/+}マウスにおける発がんスペクトラムに影響することやリンパ腫発生低下に関与することが示され、本モデルマウスを用いた化学物質の発がん性評価研究において腫瘍発生頻度やスペクトラムに変化がみられた場合の解釈に役立つ情報と考えられた。また、放射線誘発乳がんにおけるLOHのパターン及び遺伝子発現解析の結果からは、Cadherin1及びCadherin5がp53欠損による乳がんの発生抑制に関与している可能性が示され、本モデルマウスの乳腺発がんに関連したメカニズムの一端が解明された。これらの知見は、p53^{+/+}マウスを用いたがん原性試験の陽性結果の解釈に役立つものと考えられた。

Tg.ACマウスを用いた研究からは、転写因子E2F1はプロモーション段階で皮膚発がんを抑制し、その抑制作用は発がんプロモーターの種類に特異的ではないこと、紫外線によるイニシエーションに対しては逆に発がん感受性を増加させることが明らかとなった。さらにARFあるいはp53発現がない状態では、K5 E2F1マウスは皮膚二段階発がん感受性を示すことが示された。この結果は、intactなARF-p53 pathwayがE2F1の皮膚二段階発がんモデルにおける発がん抑制に必要であることを示唆するものである。また、紫外線による皮膚発

がんの研究からは、紫外線誘発皮膚がんにおけるEGFR活性化の機序並びに下流の細胞内シグナル伝達経路が明らかにされた。また、Genome-wide SNP screenの解析手法を利用し、発がん過程におけるTg.ACマウス中のv-Ha-ras遺伝子と協働する遺伝子を検索する研究が報告された。本研究においてTg.ACマウスが用いられた背景として、ヒトのがんの約30%にrasの変異があることや、皮膚に乳頭腫が発生すると、その約20%は悪性化し、全ての腫瘍にv-Ha-ras導入遺伝子の発現が認められるといった理由が挙げられた。この研究から、発がん過程ではがん遺伝子であるrasの他に、rasと共同で働くがん遺伝子の発現あるいはがん抑制遺伝子 (Ink4a, p53) の不活性化が必要であることが示された。

Xpaマウスについては、Xpa/p53^{+/+}マウス及び野生型マウスに、喫煙を模した投与デザインあるいは持続的な吸入によりアルデヒドガスを13週間吸入暴露させた研究が報告された。その結果、13週間の暴露直後には嗅上皮の萎縮が認められ、52週間後、嗅上皮の呼吸上皮化生が認められた。しかしながら、暴露終了52週間後における呼吸上皮化生を含めた前がん病変及び腫瘍の発生に差は認められず、暴露期間を含めた実験デザインの適切性に対して疑問がもたれた。

紫外線照射実験から、UVB照射Xpaマウス及び野生型マウスの皮膚では、照射直後に生じるDNA傷害や遺伝子変異頻度には差が認められないものの、2塩基・3塩基置換による変異がXpaマウスにおいて高頻度で発生することが明らかとなった。これらの結果から、XpaマウスではNERの欠損によりbulkyなDNA傷害が修復されず、その結果として遺伝子変異が生じていることが示唆された。また疫学調査の結果から、ヒトにおいて認められるXPA遺伝子の特定部位における一塩基多型と発がんリスクとの関連性を示唆する多くの報告がなされ、今後の研究が注目された。

E. 結論

rasH2マウスについては、皮膚腫瘍を標的とした新たな遺伝子改変マウスやハイブリッドマウスの作出により、さらに詳細な発がん機序解析や悪性度の評価が可能となることが示された。また、本モデルがPPAR α ア

ゴニストに対して肝発がん感受性を有することが確認された。さらに、当局申請用の26週間経皮投与発がん性試験においてTg.ACマウスを代替する皮膚発がん性評価モデルとしての可能性が示された。

p53^{+/+}マウスモデルに関しては、本モデルにおいて自然発生性にも高頻度で認められるリンパ腫の発生並びに肉腫や精巣腫瘍の発生に影響を与える因子としてのhsfl遺伝子産物の関与、さらには乳腺発がんにおいてCadherin1及び5が抑制的に作用する可能性を示す報告がみられた。これらの知見はp53ノックアウトマウスを用いた発がん性評価における結果の解釈に役立つものであると思われ、今後とも本モデルに関する調査を継続することが必要であると考えられた。

Tg.ACマウスについては、皮膚発がん過程における転写因子E2F1やEGFRの活性化の関与とそれらの機序解明に関する報告が認められた。さらに、Tg.ACモデルから得られた腫瘍及び腫瘍細胞を用いることにより、発がん過程・発がん修飾過程においてras遺伝子と共同で働く他の癌遺伝子の発現あるいはがん抑制遺伝子の不活性化の必要性が示唆され、成果がみられた。

Xpaマウスモデルについては、Xpa/p53^{+/+}マウスが吸入暴露試験に使用されたが、陽性対照群では腫瘍発生が増加したものの、暴露期間の設定には疑問が残った。一方、UV照射後の皮膚における遺伝子変異スペクトルを調べた研究では、Xpaマウスの皮膚ではNER欠損の影響としてbulkyな変異が増加することが明確に示された。また疫学調査では、ヒトXPA遺伝子に認められる一塩基多型が発がんリスクに影響するとして報告の増加が認められた。

参考文献

- 1) Muto S, Katsuki M, Horie S: Rapid induction of skin tumors in human but not mouse c-Ha-ras proto-oncogene transgenic mice by chemical carcinogenesis. *Cancer Sci.*, 97: 842-847 (2006).
- 2) Muto S, Katsuki M, Horie S: Decreased c-kit function inhibits enhanced skin carcinogenesis in c-Ha-ras protooncogene transgenic mice. *Cancer Sci.*, 98: 1549-1556 (2007).
- 3) Urano K, Suzuki S, Machida K, Eguchi N, Sawa N, Kikuchi K, Hattori Y, Usui T: Examination of percutaneous application in a 26-week carcinogenicity test in CB6F1-TG rasH2 mice. *J. Toxicol. Sci.*, 32: 367-375 (2007).
- 4) Min JN, Huang L, Zimonjic DB, Moskophidis D, Mivechi NF: Selective suppression of lymphomas by functional loss of Hsfl in a p53-deficient mouse model for spontaneous tumors. *Oncogene*, 26: 5086-5097 (2007).
- 5) Umesako S, Iiga S, Takahashi M, Imura K, Mori N, Hong DP, Song CW, Niwa O, Okumoto M: Distinct pattern of allelic loss and inactivation of cadherin 1 and 5 genes in mammary carcinomas arising in p53 (+/-) mice. *J. Radiat. Res.*, 48: 143-152 (2007).
- 6) Rounbehler RJ, Rogers PM, Conti CJ, Johnson DG: Inactivation of E2f1 enhances tumorigenesis in a Myc transgenic model. *Cancer Res.*, 62: 3276-3281 (2002).
- 7) Rogoff HA, Pickering MT, Debatis ME, Jones S, Kowalik TF: E2F1 induces phosphorylation of p53 that is coincident with p53 accumulation and apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, 22: 5308-5318 (2002).
- 8) Russell JL, Weaks RL, Berton TR, Johnson DG: E2F1 suppresses skin carcinogenesis via the ARF-p53 pathway. *Oncogene*, 25: 867-876 (2006).
- 9) El-Abaseri TB, Fuhrman J, Trempus C, Shendrik I, Tennant RW, Hansen LA: Chemoprevention of UV light-induced skin tumorigenesis by inhibition of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.*, 65: 3958-3965 (2005).
- 10) El-Abaseri TB and Hansen LA: EGFR Activation and Ultraviolet Light-Induced Skin Carcinogenesis. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2007: 97939 (2007).
- 11) Leder A, McMenamin J, Zhou F, Moran JL, Beier DR, Leder P: Genome-wide SNP analysis of Tg.AC transgenic mice reveals an oncogenic collaboration between v-Ha-ras and Ink4a, which is absent in p53 deficiency. *Oncogene*, advance online publication 22 October (2007).
- 12) Cassee FR, de Burbure CY, Rambali B, Vleeming W, van de Kuil A, van Steeg H, Fokkens PH, van

- Amsterdam JG, Dormans JA, Opperhuizen A: Subchronic inhalation of mixtures of cigarette smoke constituents in Xpa^{-/-}p53^{+/-} knock-out mice: A comparison of intermittent with semi-continuous exposure to acetaldehyde, formaldehyde, and acrolein. *Food Chem. Toxicol.*, advance online publication 7 September (2007).
- 13) Ikehata H, Yanase F, Mori T, Nikaido O, Tanaka K, Ono T: Mutation spectrum in UVB-exposed skin epidermis of Xpa-knockout mice: frequent recovery of triplet mutations. *Environ. Mol. Mutagen.*, 48: 1-13 (2007).
- 14) Kiyohara C, Yoshimasu K: Genetic polymorphisms in the nucleotide excision repair pathway and lung cancer risk: a meta-analysis. *Int. J. Med. Sci.*, 4: 59-71 (2007).
- 15) De Ruyck K, Szaumkessel M, De Rudder I, Dehoorne A, Vral A, Claes K, Velghe A, Van Meerbeeck J, Thierens H: Polymorphisms in base-excision repair and nucleotide-excision repair genes in relation to lung cancer risk. *Mutat. Res.*, 631: 101-110 (2007).
- 16) Raaschou-Nielsen O, Sørensen M, Overvad K, Tjønneland A, Vogel U: Polymorphisms in nucleotide excision repair genes, smoking and intake of fruit and vegetables in relation to lung cancer. *Lung Cancer*, advance online publication 1 October (2007).
- 17) Wang Y, Spitz MR, Lee JJ, Huang M, Lippman SM, Wu X: Nucleotide excision repair pathway genes and oral premalignant lesions. *Clin. Cancer Res.*, 13: 3753-3758 (2007).
- 18) Guo W, Zhou RM, Wan LL, Wang N, Li Y, Zhang XJ, Dong XJ: Polymorphisms of the DNA repair gene xeroderma pigmentosum groups A and C and risk of esophageal squamous cell carcinoma in a population of high incidence region of North China. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 134: 263-70 (2008).

厚生労働科学研究
「国際的整合性を旨とする医薬品等の品質、有効性及び安全性に関する研究」における
遺伝子改変マウスを用いた発がん性評価に関する研究班

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
2007年度調査

- 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
白居敏仁 (財)実験動物中央研究所センター長
大西保行 (財)実験動物中央研究所バイオメディカル研究部室長
西川秋佳 国立医薬品食品衛生研究所病理部部長
平林容子 国立医薬品食品衛生研究所毒性部室長
梅村隆志 国立医薬品食品衛生研究所病理部部長
林 真 国立医薬品食品衛生研究所家畜遺伝部部長
務台 衛 田辺三養製薬(株)研究本部安全性研究所所長
久田 茂 あすか製薬(株)開発研究センター安全性研究部部長
青木豊彦 エーザイ(株)安全性研究所所長

研究目的・方法

医薬品のがん原性評価に用いられる以下の遺伝子改変動物について
文献調査を実施し、その発がん感受性や発がんメカニズムに関する
情報を得ることを目的とした。

対象とした遺伝子導入トランスジェニックマウスモデル

- rasH2マウス
ヒト型c-Ha-ras遺伝子導入マウス
- p53^{+/+}マウス
がん抑制遺伝子p53の片側アレル(exon5)欠損マウス
- Tg.ACマウス
活性型v-Ha-ras遺伝子導入マウス
- XPAマウス
色素性乾皮症修復遺伝子欠損マウス

rasH2マウス

■ マウスc-Ha-ras遺伝子導入マウス(mrasマウス)における皮膚発がん感受性

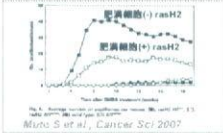
- DMBA+TPA 誘発皮膚発がん
rasH2マウス 腫瘍形成早期化
皮膚腫瘍数・大きさの増加
- mrasマウス 腫瘍形成増強作用はなし



→ DMBAの皮膚発がん感受性には
マウスとヒトのc-Ha-ras遺伝子における塩基の違いが関連していると推察された

■ rasH2マウスにおける皮膚発がん増強作用と肥満細胞の動員との関連性

- 肥満細胞欠損rasH2マウス (rasH2 KIT^{W/W})
におけるDMBA+TPA誘発皮膚発がん
- 誘発される乳頭腫数・腫瘍体積の低下
- * rasH2 KIT^{W/W}マウスでは肥満細胞の動員は認められず



→ rasH2マウスの皮膚発がん増強作用
におけるc-kitの機能低下の関与が推察された

rasH2マウス

■ 経皮投与による26週間短期発がん性試験におけるrasH2マウス有用性の検討

- rasH2及びnon-Tgマウス雌雄15匹
- ILSI/HESI 検証試験Tg.ACマウスにおける投与方法に準拠
アセトン・エタノール・白色ワセリン(試験基材), TPA (陽性対照物質)
- rasH2マウス TPAによる皮膚乳頭腫, 角化棘細胞腫発生
上記乳用基材に対する発がん性: なし
- non-TGマウス 腫瘍形成増強作用なし



Umano K et al., J Toxicol Sci 2007

→ rasH2マウスの経皮発がん性試験における有用性が示唆された

- rasH2マウスの皮膚発がん性評価/機序解明ツールとしての
mrasマウス, rasH2 KIT^{W/W}マウスの有用性が示唆された
- 26週間経皮発がん性試験のTg.ACマウス代替系統としての
rasH2の有用性が示唆された

rasH2マウス (東京農工大 獣医病理)

■ FenofibrateのrasH2マウスにおける発がん感受性の検討

- Fenofibrate (PPAR α アゴニスト: 抗脂血症薬)
長期発がん性試験において肝細胞腫瘍を誘発
- 肝二段階発がんモデルを用い、7週齢の雄性的rasH2マウスにFenofibrateを
0, 1200, 2400ppm濃度で7週間経口投与し、病理組織学的解析を実施

→ 肝絶対・相対重量増加

Group	Liver weight (g)	Relative liver weight (%)
PH + DEN	1.44 ± 0.24	5.17 ± 0.59
PH + DEN + FFB 1200 ppm	2.67 ± 0.30	9.35 ± 0.54
PH + DEN + FFB 2400 ppm	3.51 ± 0.45	11.73 ± 0.90

→ 肝細胞肥大, 肝細胞変異集の出現

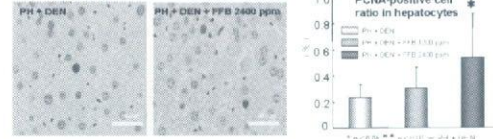


rasH2マウス (東京農工大 獣医病理)

Cytokeratin 8/18陽性変異増殖集



PCNA陽性細胞



→ rasH2マウスのPPAR α agonist Fenofibrateに対する
肝発がん感受性が示唆された

p53^{+/-}マウス

- p53ノックアウトマウスにおける胸腺リンパ腫の発生とHeat Shock Protein Transcription factor (hsf1)の関連
 Min JN et al., *Oncogene* 2007
 - p53⁺ vs hsf1⁺p53⁺ 及び p53⁺ vs hsf1⁺p53^{-/-}の比較解析
 → Hsf1欠損によるp53KO発がんスペクトラム変化 → T細胞のIL-2応答性増強減弱

- p53非依存性アポトーシスに対する抵抗性減弱

Hsf1遺伝子の不活性化がp53⁺マウスのリンパ腫低下に関与することが示唆された

p53^{+/-}マウス

- p53ノックアウトマウスの放射線誘発乳がんのみらされるLOHパターンとCadherin1と5の不活性化
 Umesako S et al., *J Radiat Res* 2007
 2系統のp53⁺マウスを用いて放射線により乳がんを誘発
 (BALB/cHeA × MSM/Ms) F1-p53⁺マウス; (BALB/cHeA × 129/SvEv) F1-p53⁺マウス
 検索した60%以上の乳がん第8染色体におけるLOHが確認
 Cadherin1, 5の不活性化

- 乳がんの発生におけるCadherin 1, 5のLOH/不活性化の関与が示唆された

マウス発がんにおけるp53遺伝子の重要性と関連する遺伝子の役割の一端が解明された
 → これらの知見はTrp53⁺マウスを用いたがん原性試験の陽性結果の解釈に役立つものと思われた

Tg.ACマウス

- 皮膚二段階発がん試験における転写因子E2F1の過剰発現による皮膚発がんの抑制機序
 Russall JR et al., *Oncogene* 2000
- E2F1過剰発現によるプロモーション段階での皮膚がん抑制
 - E2F1過剰発現Tg.ACマウス(Tg.AC/K5 E2F1 bigenicマウス)
 - プロモーターとしてTPAあるいはオキサゲ酸投与
 → 皮膚乳頭腫の発生: 野生型マウス > K5 E2F1マウス (プロモーターの種類とは無関係)
- E2F1過剰発現によるイニシエーション段階での皮膚発がん感受性の増加
 - UVB照射後における皮膚腫瘍発生のlatent期間
 → 皮膚乳頭腫の発生: 野生型マウス > K5 E2F1マウス
- E2F1過剰発現による皮膚発がん抑制におけるARF-p53経路の必要性
 - E2F1過剰発現-p53遺伝子欠損/ARF遺伝子欠損マウスにおける解析
 → p53/ARF KO形質の付与による皮膚乳頭腫発生数の抑制の解除
- 紫外線照射皮膚発がんにおけるEGFR活性化の重要性
 El-Agnaf F et al., *J Biomed Biotechnol* 2007
 - Tg.ACマウスへのAG1478投与によるEGFR活性化抑制
 → 皮膚乳頭腫発生抑制(腫瘍数・腫瘍サイズ)

Tg.ACマウス

- Genome-wide SNP screen analysisを利用した、発がん過程においてTg.ACマウスのras遺伝子と協働する遺伝子の検索
 Ledrer A et al., *Oncogene* 2007
- Tg.ACマウスと他系統マウスのF1マウスに自然発生した腫瘍から細胞株樹立
 → 活性化rasの存在下で形質転換した株細胞のゲノム解析
 → 第4番染色体遠位部におけるLOHの発生: 12/21例の細胞株
 Ink4aとInk4bが候補として示唆

Ink4a^{p16}とInk4a^{p19}の不活性化(78%), 欠損(58%)が観察

皮膚発がん過程における転写因子E2F1, EGFR活性化, さらにはがん抑制遺伝子の不活性化の関与が示唆された
 → Tg.ACマウスを用いた皮膚発がん機序解明において成果が認められた

XPAマウス

- Xpa/p53⁺マウスを用いた発がん性評価
- 喫煙を模したアルデヒドガス吸入暴露 (acetaldehyde, formaldehyde, acrolein混合ガス)
 Xpa/p53⁺ 持続暴露 → 腫瘍発生増加
 間欠暴露・低濃度持続暴露 → 腫瘍発生増加なし
 腫瘍形成増強作用なし
- WT 前がん病変及び腫瘍の発生率におけるKOマウスと野生型マウスの差はなかった
- XPA欠損によるUV誘発遺伝子変異への影響
- UVB照射後のXpa⁺マウス皮膚を解析
 照射12時間後の除去修復:
 Xpaマウスにおいて64PPs修復なし
 Xpa⁺特異的な変異:
 CC→TT置換を含む2塩基変異
 一塩基を挟む2塩基置換等多数発生

Behata H et al., *Environ Mol Mutagen* 2007

→ Xpaマウスではヌクレオチド除去修復(NER)の完全な欠損により, UVによって誘発された多塩基置換による遺伝子変異が高頻度に蓄積することが示された

XPAマウス

- 疫学調査によるXPA遺伝子変異の分布
- NER遺伝子を含むDNA修復遺伝子の多型と腫瘍発生リスクとの関連性
 Kiyohara C et al., *Int J Med Sci* 2007
- 発がんリスクとNER遺伝子多型との関連
 - ヒトXPA遺伝子非転写領域におけるG23A多型と肺がん発生リスクとの関連
 Kiyohara C et al., *Int J Med Sci* 2007; De Ruycck K et al., *Mutat Res* 2007; Raaschou-Nielsen O et al., *Lung Cancer* 2007
 - G23A多型と口腔前癌性病変との関連 (発生率の高い中国北部)
 Wang Y et al., *Clin Cancer Res* 2007
 - G23A多型と食道扁平上皮がんとの関連 (発生率の高い中国北部)
 Gue W et al., *J Cancer Res Clin Oncol* 2007

→ UV照射による遺伝子変異解析から, XPAマウスの皮膚ではBulkyな変異の増加が認められ, NER欠損の影響が確認された
 → ヒト疫学調査の結果から, XPAの遺伝子多型と発がんリスクとの関連が示唆された

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
平成19年度分担研究報告書

－遺伝毒性試験バッテリーの最適化に関する研究－

分担研究者：本間 正充（国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部室長）

協力研究者：若田 明裕（アステラス製薬(株)安全性研究所）

澤田 繁樹（エーザイ(株)安全性研究所）

笛木 修（(独) 医薬品医療機器総合機構）

皆葉 清美（(独) 医薬品医療機器総合機構）

森田 健（国立医薬品食品衛生研究所安全情報部）

山影 康次（(財)食品薬品安全センター秦野研究所）

研究要旨

医薬品の安全性に係わる遺伝毒性試験ガイドランスに関して、10年ぶりの改訂作業が進行している。新しいガイドランスではオプションとして2つのバッテリーが提案されている。1つはこれまで通りの哺乳類培養細胞を用いた*in vitro*試験を含むバッテリーであり、もう一つは含まないバッテリーである。ただし、後者は、2つの*in vivo*試験が要求される。また、新しいガイドランスには、*in vivo*試験は条件によっては一般毒性試験に組み入れることが可能であること、*in vitro*試験では最高用量の低減化、小核試験の代替などが取り入れられる。これら改訂は、ヒトへの遺伝毒性リスクを科学的に考慮した上で、医薬品の迅速な開発と、動物愛護に貢献できる内容となっている。

キーワード：遺伝毒性試験、ICHガイドライン、バッテリー試験、動物愛護

A. 研究目的

2006年の横浜のICH会議において、遺伝毒性試験ガイドランスの改訂がトピックとしてICHの運営委員会に正式に認められた。これには、1) 遺伝毒性研究分野の過去10年間の発展、2) 動物愛護の精神に基づく試験系の必要性、3) *in vitro*哺乳類細胞試験における高い偽陽性反応、4) 閾値論を含む遺伝毒性結果の評価と解釈、などが背景にある。特に、3)の問題に関しては、*in vitro*染色体異常試験、マウスリンフォーマ試験（MLA）で、ヒトへの発がんリスクとは無関係と考えられる陽性反応が現行のガイドランスでは数多く観察されることが認識されている。この陽性反応が*in vitro*試験特異的反応であることを証明するためにはフォローアップ試験として新たな*in vivo*試験の追加が要求さ

れる。このことは、医薬品の迅速な開発を妨げるだけでなく、動物愛護の精神にも反するものであり、何らかの対応が求められている。

この問題に対処するための、遺伝毒性（S2）ワーキンググループ（EWG）では、シカゴ、ブラッセル、横浜の会議で、科学論文や、企業のデータを基にした調査研究を行い、議論を重ね、新しい遺伝毒性試験ガイドランスの策定に至った。

B. 研究方法

*In vitro*哺乳類細胞試験の検出能力評価：過去10年間の遺伝毒性試験に関する文献を調査し、それぞれの遺伝毒性試験結果と、げっ歯類動物での発がん性試験結果との相関性を明らかにした。

*In vitro*哺乳類細胞試験での最高用量の妥当性の検討：JPMA、EFPIA、PhRMAに属する企業の内部データを調査し、*in vitro*哺乳類細胞試験の陽性結果の用量依存性を調査した。また、それら陽性結果と*in vivo*遺伝毒性試験結果との相関性を調査した。

*In vivo*遺伝毒性試験のCmaxの検討：JPMA、EFPIA、PhRMAに属する企業の内部データを調査し、急性暴露で行われている*in vivo*遺伝毒性試験と、慢性暴露の一般毒性試験での血中Cmaxのデータを調査した。

C. 研究結果

(1) *In vitro*哺乳類細胞試験の発がん性検出能力評価

Kirklandら、Zeigerらの論文、National Toxicological Program (NTP)、International Agency for Research on Cancer (IARC)、Carcinogenicity Potency Database (CPDB)の報告を基に、*in vitro*遺伝毒性試験であるエームス試験、染色体異常試験、MLAと、げっ歯類発がん性試験との感受性 (sensitivity: 発がん性物質を陽性と判定しうる能力)、特異性 (specificity: 非発がん物質を陰性と判定しうる能力) を比較した。エームス試験は感受性が55~58%と低いが、特異性は70%以上であった。一方、染色体異常試験、MLAは逆の傾向を示した。特にMLAは特異性が40%以下であり、ほとんどの物質が陽性と判定されてしまうことがわかった。また、2種類以上の試験を組み合わせた場合の特異性は極端に低くなった。全てを組み合わせた場合75-95%の非がん原物質に対して陽性の結果(偽陽性)を示した。

哺乳類細胞を用いた*in vitro*試験の陽性率が高い原因としては、極端な試験条件下(例えば、細胞毒性が非常に強い、非常に高濃度、高浸透圧、異常pH、等)による反応、または間接的な機序により遺伝毒性影響(紡錘糸への傷害、タンパクやDNA合成への傷害、核酸の前駆体プールのバランスのかく乱、など)が考えられる。後者の物質は、DNAに直接作用するものとは異なり閾値を示す可能性が高いものと考えられる。

(2) *In vitro*哺乳類細胞試験での最高用量の妥当性の検討

JPMAに属する企業より、エームス試験陰性で、哺乳類細胞試験(染色体異常試験、MLA)陽性を示す292

データ、エームス試験、哺乳類細胞試験とも陽性を示す10データの提供を受け、陽性反応を示す最低用量、および最小細胞毒性反応を調査した。その結果、最低用量に関してはエームス試験結果とは無関係に1mM以下の濃度で90%以上の物質が陽性と判定できることがわかった。一方、細胞毒性と遺伝毒性発現は物質によって大きく異なり、明確な線引きは困難であった。

哺乳類細胞試験陽性物質の中で*in vivo*遺伝毒性陽性、もしくはげっ歯類発がん性試験陽性を示す物質(relevant positive)を対象とし、哺乳類細胞試験で陽性反応を示す最低用量を調査した。その結果、*in vivo*遺伝毒性陽性を示す物質のほとんどは、1mM以下の濃度で、哺乳類細胞試験陽性を示すことが明らかとなった。

EFPIA、PhRMAでの調査でも同様の結果が得られた。

(3) *In vivo*遺伝毒性試験のCmaxの検討

現在、急性毒性条件下で行っている*in vivo*遺伝毒性試験が(Acute)、慢性暴露(Sub-chronic)条件下での一般毒性試験に組み入れることができるかどうかを検討するため、両条件下におけるCmax(最高血中濃度)比較した。JPMA、EFPIA、PhRMAから全部で132データが提供され、調査を行った。Camxデータをいくつかのカテゴリーに分類し、1) Acute = Sub-chronicの場合、2) Acute \leq 2 X Sub-chronicの場合、3) Sub-chronicでCmaxの蓄積が観察される場合、を慢性暴露条件下でも*in vivo*遺伝毒性試験を評価できると定義した。その結果、132データの内91データ(69%)が条件をクリアできた。

D. 考察

2006年の横浜のICH会議で遺伝毒性試験がトピックとして取り上げて以来、2006年10月にシカゴ、2007年5月にブラッセル、2007年10月に横浜でEWGが開催された。シカゴの会議では主として、*in vitro*哺乳類細胞試験の高い陽性反応頻度について論議され、その解決のため以下の5つのオプションが提案された。

オプション 1: 変更なし。ただし、WOEに基づく評価法の開発と、フォローアップ試験の推奨が必要。

オプション 2: 意味のない陽性結果を避けるために、

最高濃度を下げる（現在は、5 mg/mlもしくは10mM）。
 オプション 3：意味のない陽性結果を避けるために、最高濃度に必要な細胞毒性基準を緩和する（現在の最高細胞毒性は、50%以上；染色体異常、20%以上；MLA）。
 オプション 4：哺乳類細胞試験をバッテリーから外す。この場合、発がん物質を、間違っして陰性と判定しうることはないことを保証が必要。

オプション 5：哺乳類細胞試験をバッテリーから外すが、*in vivo*の試験を2種類行うことにする。

この提案を受け、JPMA、EFPIA、PhRMAでは既存遺伝試験毒性データの調査を行い、ブラッセルのEWG会議に於いて、その評価とオプションの選択について論議を行った。ブラッセル会議での主な合意内容は以下の通りである。

1. これまでのS2AとS2BのガイドラインをS2R1に統一する。
2. *In vitro*哺乳類細胞試験として新たに小核試験の採用を認める。
3. バッテリー試験として、a) *in vitro*の試験を含むバッテリーと、b) *in vitro*の試験を含まないバッテリーの2つを設ける。
4. *In vitro*哺乳類細胞試験で偽陽性結果を避けるため、1) 最高用量を10mMから1 mMに下げる、2) 試験成立のための細胞毒性の条件を緩和する、3) 沈殿存在下での試験を免除する。
5. エームス試験で明らかな結果の場合、繰り返し試験は免除する。
6. 暴露量が十分に保証されている場合は*in vivo*の試験を一般毒性試験に組み入れることができる。
7. *In vivo*試験での陽性対照は免除する。

3の2つのバッテリー試験はオプションとして選択でき、*in vitro*の試験を含まないバッテリーの場合は2つの*in vivo*試験を行う。これまでどの変更点について表1にまとめる。

＜表1＞

Current	Revisions proposed in Brussels May 2007	
	Option 1	Option 2
Ames microbial mutagenesis & repeat	Ames (one complete assay)	Ames (one complete assay)
<i>In vitro</i> mammalian cell assay: C chromosome aberrations, OR tk mutations in mouse lymphoma cells	<i>In vitro</i> mammalian cell assay (1 mM top conc): C chromosome aberrations, OR: tk mutations in mouse lymphoma cells OR: <i>in vitro</i> micronucleus assay	
<i>In vivo</i> cytogenetic assay	<i>In vivo</i> cytogenetic assay integrated *	<i>In vivo</i> cytogenetic assay (integrated if top dose appropriate) 2 nd <i>in vivo</i> endpoint Integrated, if possible

* integrated provided tox study is adequate to support clinical trials and sampling within a day of last day of dosing

また、6の一般毒性試験へ組み込める条件として、1) 投与可能な最高量であること、2) 1000mg/kg、14日以上での投与であること、3) 慢性暴露で血中濃度の蓄積や飽和が観察されること、4) 急性毒性条件下での投与量の1/2以上であること、が定められた。これらの条件を満たさない場合は、従来の急性暴露条件下で試験を行う。

これら改訂は、医薬品の迅速な開発と、貴重な資源の有効活用に繋がる内容となっている。特に試験に必要な実験動物数を削減できることから動物愛護にも貢献できる。

2007年10月の横浜会議ではガイダンスのStep2に向けたドラフト作成作業を行った。最新のドラフト（バージョン5.2）を別添する。

E. 結論

これまでのICHでの遺伝毒性試験ガイダンスでの問題点を明らかにし、新しいガイダンスの策定を行った。特にバッテリー試験の最適化について重点を置いて論議した。新しいガイダンスのバッテリーは、オプションとして2つが選択できる。すなわち、1つはこれまで通り哺乳類培養細胞を用いた*in vitro*試験を含むバッテリーであり、もう一つは含まないバッテリーである。ただし、後者は、2つの*in vivo*試験が要求される。また、新しいガイダンスには、*in vivo*試験は条件によっては一般毒性試験に組み入れることが可能であること、*in vitro*試験では最高用量の低減化、小核試験の代替などが取り入れられる。これら改訂は、ヒトへの遺伝毒性リスクを科学的に考慮した上で、医薬品の迅速な開発と、動物愛護に貢献できる内容となっている。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Burlinson, B., Tice, RR., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, SY., Collins, AR., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, TS., Nakajima, M., Sasaki, YF., Thybaud, V., Uno, Y., Vasquez, M., and Hartmann, A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the *in vivo* Comet assay workgroup Mutat. Res., 627, 31-35 (2007)

Moore, MM., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, J., Burlinson, B., Cifone, M., Clark, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, J., Muster, W., Pant, K., Kidd, DA., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, Jr. LF., Thakur, AK., and Van Goethem, F. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, recommendations for 24-h treatment. Mutat. Res., 627, 36-40 (2007)

Ku, WW., Bigger, A., Brambilla, G., Glatt, H., Gocke, E., Guzzie, PJ., Hakura, A., Honma, M., Martus, H-J., Obach, RS., and Roberts, R. Strategy for genotoxicity testing—Metabolic considerations Mutat. Res., 627, 59-77 (2007)

Wang, J., Chen, T., Honma, M., Chen, L., Moore, M. 3'-Azido-3'-deoxythymidine induces deletions in L5178Y mouse lymphoma cells. Environ. Mol. Mutagen., 48, 248-257 (2007)

Honma, M., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Sakamoto, H., and Hayashi, M. Non-homologous end-joining for repairing I-SceI-induced DNA double strand breaks in human cells. DNA Repair, 6, 781-188 (2007)

Luan Y, Suzuki T, Palanisamy R, Takashima Y, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Saito M, Matsufuji H, Yamagata K, Yamaguchi T, Hayashi M, Honma M. Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions,

but not GC>TA transversion in human cells. Mutat. Res., 619, 113-123 (2007)

Newwirth, E., Honma, M., and Grosovsky, A., Interchromosomal crossover in human cell is associated with long gene conversion tracts. Mol. Cell. Biol., 27, 5261-5274 (2007)

Yatagai, F, Umebayashi, Y., Suzuki, M., Abe, T., Suzuki, H., Shimazu, T., Ishioka, N., Iwaki, M, and Honma, M. Influence of low-dose and low-dose-rate ionizing radiation on mutation induction in human cells. Advan. Space Res., 40, 470-473 (2007)

2. 学会発表

本間正充：代謝物の遺伝毒性評価 第34回日本トキシコロジー学会学術年会 (2007.6)

Honma M.: DNA double strand breaks inducing genomic instability in human cells. 13th International Congress of Radiation Research (2007.7)

Yatagai F., Suzuki M., Ishioka N., Ohmori H., and Honma M.: Repair of dsb at a specific site of chromosome: influence of low-dose/low-dose-rate gamma-rays. 13th International Congress of Radiation Research (2007.7)

Honma M.: Genotoxic assessment of drug metabolite and ICH guideline. Chinese National Conference on Drug Toxicology 2007 (2007.8)

Honma M.: A multi-endpoints *in vitro* genotoxicity test system consisting of Comet, micronuclei, and gene mutation assays. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences (2007.8)

Honma M., Takashima Y., Yasui M., Koyama N., Koizumi T., Sakuraba M., Sakamoto H., Sugimoto K., and Hayashi M.: Tracing Micronuclei by Fluorescent Live Cell Imaging Analysis. 37th European Environmental Mutagen Society (2007.9)

Honma M.: Genomic instability caused through breakage-fusion-bridge (BFB) cycle in human cells. The 8th International Symposium on Chromosomal Aberrations (2007.10)

Suzuki T., Luan Y., Praba D., Kogi M., Honma M., Koizumi T., Tanabe S., Sato Y., Suzuki K., and Yamaguchi

T.: CGH and SNP arrays; as new tools for detailed analysis of chromosome. The 8th International Symposium on Chromosomal Aberrations (2007.10)

Honma M.: The new ICH guideline on Genotoxicity. 2007 Korean National Institute of Toxicological Research International Symposium (2007.10)

Honma M.: Validation of a humanized *in vitro* genotoxicity test system. 2007 Korean NTP Workshop (2007.10)

安井学、小山直己、高島良生、小泉朋子、櫻庭真弓、坂本浩子、杉本憲治、林 真、本間正充：ライブセルイメーシングを用いた γ 線照射による小核形成と追跡 日本放射線影響学会第47回大会 (2007.11)

本間正充、櫻庭真弓、林 真：DNAマイクロアレイによる放射線損傷領域のゲノムマッピング 日本放射線影響学会第47回大会 (2007.11)

谷田貝文夫、鈴木雅雄、本間正充：低線量・低線量率 γ 線照射によるヒトリンパ芽球細胞での変異誘発 日本放射線影響学会第47回大会 (2007.11)

Koyama N., Yasui M., Sakamoto H., Sakuraba M., Masuda S., Kinoshita N., Matsuda T, Hayashi M., and Honma M.: Genotoxicity of acrylamide expressed via metabolic activation in CYP over-expressing human cells. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Yasui M., Suenaga E., Koyama N., Masutani C., Hanaoka F., Gruz P., Shibutani S., Nohmi T., Hayashi M., and Honma M.: Translesion synthesis past 2'-deoxyinosine, a major nitric oxide-induced DNA adduct, by human DNA polymerase η and κ . 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Yatagai F., Matsumoto H., Honma M.: A possible involvement of bystander effects in the repression of spontaneous mutation induction. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Saito M., Matsufuji H., Chino M., Hyashi M., Honma M., and Yamagata K. : Antioxidant activity and potential genotoxicity of flavonoid by using human lymphoblastoid

TK6 cells. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Arai S., Saito M., Takashima Y., Honma M., and Kojima H.: A new trial for *in vitro* Comet assay using 3-dimensional human epidermal model. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Kimura A., Sakamoto H., Hayashi M., Saigo K., Tokado H., and Honma M.: Establishment of a robust *in vitro* Comet protocol using human lymphoblastoid TL6 cells. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Honma M., Yasui M., Koyama N., Koizumi T., Sakuraba M., Sakamoto H., Takashima Y., Sugimoto K., and Honma M.: Visualization of micronuclei by fluorescent cell imaging analysis. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Suzuki T., Koizumi T., Prabha D., Luan Y., Honma M., Hamada S., Nakajima M., Watanabe T., and Furihata C.: Collaborative study on the toxicogenomics in JEMS/MMS II: High-throughput qPCR analysis by TaqMan low density array. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Honma M.: Background issues initiating a revision of the current ICH genotoxicity guidance. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

H. 知的所有権の取得状況

特になし

(別添)

**GUIDANCE ON GENOTOXICITY TESTING AND
DATA INTERPRETATION FOR
PHARMACEUTICALS INTENDED FOR HUMAN
USE (Daft ver 5.2)**

1. INTRODUCTION

1.1 Objectives of the Guideline

This guidance replaces and combines the ICH S2A and S2B guidelines. The purpose of the revision is to optimize the standard genetic toxicology battery for prediction of potential human risks, and to provide guidance on interpretation of results, with the ultimate goal of improving risk characterization for carcinogenic effects that have their basis in changes in the genetic material. The revised guidance describes internationally agreed upon standards for follow-up testing and interpretation of positive results *in vitro* and *in vivo* in the standard genetic toxicology battery, including assessment of non-relevant findings.

1.2 Background

Unless otherwise noted in this guidance, the recommendations from the latest OECD guidelines and the reports from the International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT) have been considered where relevant. The following notes for guidance should be applied in conjunction with other ICH guidances.

1.3 Scope of the Guideline

The primary focus of this guidance is testing of “small molecule” drug substances, and not biologics as defined in the ICH S6 guidance.

1.4 General Principles

Genotoxicity tests can be defined as *in vitro* and *in vivo* tests designed to detect compounds that induce genetic damage by various mechanisms. These tests enable hazard identification with respect to damage to DNA and its fixation. Fixation of damage to DNA in the form of gene mutations, larger scale chromosomal damage or recombination is generally considered to be essential for heritable effects and in the multi-step process of

malignancy, a complex process in which genetic changes may play only a part. Numerical chromosome changes have also been associated with tumorigenesis and can indicate a potential for aneuploidy in germ cells. Compounds that are positive in tests that detect such kinds of damage have the potential to be human carcinogens and/or mutagens. Because the relationship between exposure to particular chemicals and carcinogenesis is established for humans, whilst a similar relationship has been difficult to prove for heritable diseases, genotoxicity tests have been used mainly for the prediction of carcinogenicity. Nevertheless, because germ line mutations are clearly associated with human disease, the suspicion that a compound might induce heritable effects is considered to be just as serious as the suspicion that a compound might induce cancer. In addition, the outcome of genotoxicity tests can be valuable for the interpretation of carcinogenicity studies.

**2. THE STANDARD TEST BATTERY FOR
GENOTOXICITY**

2.1 Rationale

Registration of pharmaceuticals requires a comprehensive assessment of their genotoxic potential. Extensive reviews have shown that many compounds that are mutagenic in the bacterial reverse mutation (Ames) test are rodent carcinogens. Addition of *in vitro* mammalian tests increases sensitivity and broadens the spectrum of genetic events detected, but also decreases the specificity of prediction; i.e., increases the incidence of positive results that do not correlate with rodent carcinogenicity. Nevertheless, a battery approach is still reasonable because no single test is capable of detecting all genotoxic mechanisms relevant in tumorigenesis.

The general features of a standard test battery are as follows:

- i. Assessment of mutagenicity in a bacterial reverse mutation test. This test has been shown to detect relevant genetic changes and the majority of genotoxic rodent and human carcinogens.

- ii. Genotoxicity should also be evaluated in mammalian cells *in vitro* and/or *in vivo*.

Several *in vitro* mammalian cell systems are widely used and can be considered sufficiently validated: The *in vitro* metaphase chromosome aberration assay, the *in vitro* micronucleus assay (note 1) and the mouse lymphoma L5178Y *tk* assay. These three assays are currently considered equally appropriate and therefore interchangeable when used together with other genotoxicity tests in a standard battery for testing of pharmaceuticals, if the test protocols recommended in this guideline are used.

In vivo test(s) for genetic damage should usually be a part of the test battery to provide additional relevant factors (absorption, distribution metabolism, excretion) that can influence the genotoxic activity of a compound and permit the detection of some additional genotoxic agents (note 2). An *in vivo* test for chromosomal damage in rodent cells largely fulfills this need, either an analysis of micronuclei in erythrocytes in blood or bone marrow, or of chromosomal aberrations at metaphase in bone marrow cells (note 3). Lymphocytes cultured from treated animals can also be used for cytogenetic analysis, although experience with such analyses is less widespread.

In vitro and *in vivo* tests that measure chromosomal aberrations in metaphase cells can detect a wide spectrum of changes in chromosomal integrity. Breakage of chromatids or chromosomes can result in micronucleus formation if an acentric fragment is produced; therefore assays that detect either chromosomal aberrations or micronuclei are appropriate for detecting clastogens. Micronuclei can also result from lagging of one or more whole chromosome(s) at anaphase and thus micronucleus tests have the potential to detect some aneuploidy inducers. The mouse lymphoma cell mutation assay detects mutations in the *tk* gene that result from both gene mutations and changes in chromosome integrity. There is some evidence that the mouse lymphoma assay can also detect chromosome loss.

There are several additional *in vivo* assays that can be used in the battery or as follow-up tests to develop weight

of evidence in assessing results of *in vitro* or *in vivo* assays (see below). Negative results in appropriate *in vivo* assays, with adequate justification for the endpoints measured, and demonstration of exposure (see section 4.8) is sufficient to demonstrate absence of genotoxic activity.

2.2 Description of the two options for the standard battery

The following two options for the standard battery are considered equally suitable:

Option 1

- i. A test for gene mutation in bacteria.
- ii. A cytogenetic test for chromosomal damage (the *in vitro* metaphase chromosome aberration test or *in vitro* micronucleus test), or an *in vitro* mouse lymphoma *tk* mutation assay.
- iii. An *in vivo* test for genotoxicity, generally a test for chromosomal damage using rodent hematopoietic cells, either for micronuclei or for chromosomal aberrations in metaphase cells.

Option 2

- i. A test for gene mutation in bacteria.
- ii. An *in vivo* assessment of genotoxicity with two tissues, usually an assay for micronuclei using rodent hematopoietic cells and a second *in vivo* assay.

Under both standard battery options, the *in vivo* genotoxicity assays can often be integrated into existing (repeat dose) toxicity studies when the doses are sufficient (see section 4.7). Under Option 2, if exposure/toxicity is not appropriate, an acute *in vivo* study (incorporating two genotoxicity assays in one study where possible) should be performed to optimize dose selection based on exposure/toxicity (see sections 4.7.2 and 4.7.3), or Option 1, including an *in vitro* mammalian cell assay, should be followed.

For compounds that give negative results, the completion of either test battery, performed and evaluated in accordance with current recommendations, will usually provide sufficient assurance of the absence of genotoxic activity and no additional tests will be needed.

Compounds that give positive results in the standard test battery may, depending on their therapeutic use, need to be tested more extensively (see Section 5).

The standard battery does not include a required independent test designed specifically to test for aneuploidy. However, information on numerical changes can be derived from the mammalian cell assays *in vitro* and from the micronucleus assays. Elements of the standard protocols that provide such information are elevations in the mitotic index, polyploidy induction and micronucleus evaluation. There is also experimental evidence that spindle poisons can be detected in the mouse lymphoma tk assay. The preferred *in vivo* cytogenetic test under Option 2 is the micronucleus assay, not a chromosome aberration assay, to include more direct capability for detection of chromosome loss (potential for aneuploidy).

There are several *in vivo* assays (note 4) that may be used as the second part of the *in vivo* assessment under option 2 (see section 4.3). The liver is typically the preferred tissue because of exposure and metabolizing capacity, but choice of *in vivo* tissue and assay should be based on factors such as any knowledge of the potential mechanism, of the metabolism *in vivo*, and of the exposed tissues thought to be relevant. The *in vivo* genotoxicity assays may be integrated into existing (repeat dose) toxicity studies when the dose levels are justifiable (see section 4.7) and the protocols are compatible.

The suggested standard set of tests does not imply that other genotoxicity tests are generally considered inadequate or inappropriate. Additional tests can be used for further investigation of genotoxicity test results obtained in the standard battery (see sections 4.3 and 5). Alternative species, including non-rodents, can also be used if indicated, and if sufficiently validated.

Under extreme conditions in which one or more tests in the standard battery cannot be employed for technical reasons, alternative validated tests can serve as substitutes provided sufficient scientific justification is given to support the argument that a given standard battery test is not appropriate.

2.3 Modifications to the test battery

The following sections give situations where modification of the standard test battery may be advisable.

2.3.1 Compounds from well characterized classes

For compounds from well characterized classes where genotoxicity is expected, e.g., some quinolone antibiotics and some nucleoside analogues, the battery may be modified to characterize these appropriately in the tests/protocols known to respond to them (See also note 8).

2.3.2 Testing compounds that are toxic to bacteria

In cases where compounds are highly toxic to bacteria (e.g., some antibiotics), the bacterial reverse mutation (Ames) test should still be carried out, because mutagenicity can occur at lower, less toxic concentrations. In such cases, one of the *in vitro* mammalian cell assays should be done; i.e., Option 1 is followed.

2.3.3 Compounds bearing structural alerts for genotoxic activity

Structurally alerting compounds (Note 5) are usually detectable in the standard test battery since the majority of "structural alerts" are defined in relation to bacterial mutagenicity. A few chemical classes are known to be more easily detected in mammalian cell chromosome damage assays than bacterial mutation assays. Thus negative results in either test battery with a compound that has a structural alert is usually sufficient assurance of a lack of genotoxicity. However, for compounds bearing certain specific structural alerts modification to standard protocols can be appropriate (Note 5). The choice of additional test(s) or protocol modification(s) depends on the chemical nature, the known reactivity and any metabolism data on the structurally alerting compound in question.

2.3.4 Limitations to the use of *in vivo* tests

There are compounds for which many *in vivo* tests (typically in bone marrow, blood or liver) do not provide additional useful information. These include compounds for which data on toxicokinetics or pharmacokinetics indicate that they are not systemically absorbed and therefore are not available to the target tissues. Examples of such compounds are some radioimaging agents,