

p53^{+/+}マウス

Oxidative and nitritive stress caused by subcutaneous implantation of a foreign body accelerates sarcoma development in Trp53^{+/+} mice

H. Tazawa, et al., Carcinogenesis 28: 191-198, 2007

p53^{+/+}マウスを用い、生体異物(プラスチック片)の皮下移植による酸化ストレスおよびNOストレスの発がんに関連する影響を検討

※ 方法: 10day1mmのプラスチック片を11週齢のp53^{+/+}マウスおよびp53^{-/-}マウスに移植した。

※ 結果: 平均45歳で79% (30/38) のp53^{+/+}マウスの移植片周囲にSarcomaが発生したが、p53^{-/-}マウスでは平均96歳で腫瘍発生率は10% (1/10) であった。過半数群ではSarcomaの発生はみられなかった。

※ また、20% (2/10) の非移植p53^{+/+}マウスでは7、81および84週時に計3ヶ所にSarcomaが発生した。

※ これらのSarcomaについて酸化およびNOストレスマーカーの免疫組織化学染色を実施したところ、異物発がんのSarcomaの方が自然発生Sarcomaに比べ、腫瘍細胞および周囲の炎症細胞の染色強度が高かった。さらに、異物発がんSarcomaではLQH1(R6N (26/29))の発現にみられた。

※ 結論: p53^{+/+}マウスの皮下異物による発がんを加速する。

※ それらに酸化およびNOストレスが関与する。

※ LQHによるp53機能の喪失も発がんの一部に関与している可能性が示唆された。

p53^{-/-}マウス

Resveratrolの発がん性評価にTrp53^{-/-}マウスを用いた短期発がん性試験が適用された事例から、米国において省資源タイプの発がん性評価手法として、大規模な臨床試験を実施する前に適用可能な試験法として選択可能と考えられていることが示唆された。

発がんモデルとして、酸化ストレスやNO等の発がん修飾因子、発がんプロモーション作用の指標の検討、発がん抑制や化学予防効果の検討などにp53ノックアウトマウスの活用が進んでいる。これは、一般的な動物実験系としての認知度が上昇してきたことを示唆するものと思われる。

p53ノックアウトマウスと別の遺伝子のダブルノックアウトマウスでの研究報告も例年どおりみられた。これらは化学合成の低分子医薬品の発がん性評価と関連は強いが、RNAi等の核酸医薬やバイオロジクス創薬においては、創薬標的遺伝子p53のダブルノックアウトマウスを発がんリスク評価のツールとして、将来的には選択肢の一つとして考慮する必要があるとされている可能性もあると思われる。

Tg.ACマウス

ヒ素の給餌期暴露による皮膚発がんの機序

Wang JF et al., 2008

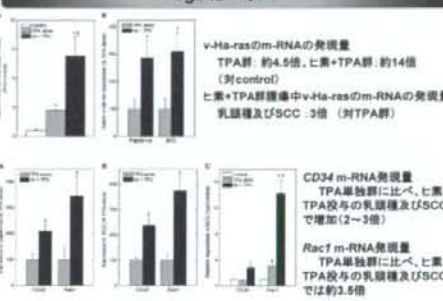
Table 1. Total arsenic products, reduced methylarsonic acid, and cancer susceptibility in Tg.AC mice

Treatment group	n	Epigenetic multiplicity (epigenetic)	SCC multiplicity (SCCs/mouse)	Mice with fixed to severe SCCs/mouse (%)
Control	30	3.00 ± 0.27*	0.00 ± 0.00	0/30 (0%)
Low arsenic	27	9.76 ± 0.28	0.00 ± 0.00	0/27 (0%)
High arsenic	27	2.44 ± 0.28	0.00 ± 0.00	0/27 (0%)
17β-estradiol	27	9.18 ± 0.27*	0.02 ± 0.02†	0/27 (0%)
Low arsenic plus 17β	26	6.17 ± 0.28*	1.35 ± 0.28**	0/26 (0%)
High arsenic plus 17β	26	6.12 ± 0.28*	1.49 ± 0.28**	0/26 (0%)

SCCs, skin cancer; epigenetic multiplicity, the number of epigenetic sites; SCC multiplicity, the number of SCCs per mouse; fixed to severe, mice with fixed to severe SCCs; 17β-estradiol, 17β-estradiol; low arsenic, 10 μg/kg body weight; high arsenic, 100 μg/kg body weight; 17β-estradiol plus low arsenic, 10 μg/kg body weight plus 17β-estradiol; 17β-estradiol plus high arsenic, 100 μg/kg body weight plus 17β-estradiol. *P < 0.05, significant difference from control. **P < 0.05, significant difference from high arsenic.

・ 雌と雄のみの発がんは皮膚腫瘍発生に影響なし。
・ 給餌期に雌+TPA投与+乳腫瘍の発生頻度及び数に違いはなかったが、SCCの頻度および数は雌に雄に比べて有意に増加した。

Tg.ACマウス



Tg.ACマウス

Summary of the 26- and 41-Week Carcinogenesis Study in Tg.AC Hemizygous Mice in the Drinking Water Studies of Dichloroacetic Acid

Carcinoma site	26 Week		41 Week	
	26 Week	41 Week	26 Week	41 Week
Overall incidence	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)
Overall incidence	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)
Overall incidence	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)
Overall incidence	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)
Overall incidence	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)

DCAIはp53 KOマウスでは腫瘍発生は認められず、Tg.ACマウスの試験でのみ発がん性が示唆された。DCAIはp53 KOマウスを用いた他の種類の長期試験で発がん性が認められており、これらの遺伝子変異マウスは発がんの長期的なリスクに比べては感受性が低い。

XPAマウス

Mouse models for xeroderma pigmentosum group A and group C show divergent cancer phenotypes. XPC/Melis JP et al. Cancer Res 68: 1347-1353 (2008)

Table 1. Tumor incidence and P values for differences between control and XPC mutant group

Tumor	XPC/Mel1		P	XPC/Mel2		P
	Incidence	n		Incidence	n	
Colon	10/175	20 (11%)		10/150	20 (13%)	
Stomach	0/150	0 (0%)	0.001	0/150	0 (0%)	
Prostate	0/150	0 (0%)	0.001	0/150	0 (0%)	
Bladder	0/150	0 (0%)	0.001	0/150	0 (0%)	
Other	0/150	0 (0%)	0.001	0/150	0 (0%)	

・ Xpa及びXpcマウスを生産飼育して腫瘍発生を比較した。
・ XpcマウスはXpaマウスに比べて腫瘍の発生率が高いことが示された。
・ Xpcマウスの給餌線維芽細胞は、Xpaマウスに比べて発がんに対する感受性が高かった。
・ 酸化損傷を除去するXPC蛋白の欠損により、Xpcマウスでは腫瘍に対する感受性が上昇することにより、腫瘍発生が増加する可能性が示唆された。

XPAマウス

Impaired spermatogenesis and elevated spontaneous tumorigenesis in xeroderma pigmentosum group A gene (Xpa)-deficient mice

Hironobu Nakane et al. *DNA Repair* 7: 1938-1950 (2008)

- XPA遺伝子のエクソン4をノックアウトして生殖飼育したところ、エクソン4及び5をノックアウトしたXpaマウスとは異なり、悪性の腫瘍が増加し、それは遺伝的背景の差によると考えられた。
- 精巣病変や大脳重量の低値が認められ、ヒトXPA患者の病態との類似性が示された。
- これらの事実は、XpaマウスがヒトXPの研究に有用なモデルとなる可能性を示しているが、短期発癌モデルとしては、望ましくない特性と考えられる。

結論

rasH2マウス

本年度の文献調査では、医薬品（候補物質）の発がん性評価を実施したものは把握できなかったが、本モデルが発がん性評価、化学発癌等の検討に広く用いられていることが把握できた。

p53^{+/+}マウス

医薬品についての7p53^{+/+}マウスを用いた短期発がん性試験の利用状況については把握することができなかったが、本モデルが発がん性評価、発がん機序研究、発がん抑制や化学発癌等の検討・評価に広く応用されていることが把握できた。

Tg.ACマウス

Tg.ACマウスやp63 KOマウスは、ある種の化合物に対しては、通常のげっ歯類を用いた2年間がん慢性試験に比べ感受性が強い場合があり、未知の化合物に対する発がん性を検出するために遺伝子改変マウスモデルを使用することには注意が必要であるとの報告があった。

XPAマウス

Xpa^{-/-}はXpa/p53^{+/+}マウスを用いた化学物質の発がん性について検討された場合はなく、XpaマウスはむしろDNA障害の蓄積に関連した発癌の検討に有用と考えられた。また、Xpaマウスの特性に關連して、1) 酵素的DNA障害を除去するXPC蛋白の欠損によりXpcマウスはDNA損傷発生率がXpaマウスに比して高いと考えられること、2) Xpaマウスの自然発生腫瘍は遺伝的背景の影響を受けることが示された。

－遺伝毒性試験バッテリーの最適化に関する研究－

研究分担者：本間 正充（国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部室長）
研究協力者：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）
吉富 真理（(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ダンスに関して、11年ぶりの改訂作業が進行している。主な改訂部分として以下のことが挙げられる。

1. これまでの2つのガイダンスS2Aと、S2Bを一つにまとめるS2（R1）。
2. 哺乳類培養細胞を用いた*in vitro*試験での最高用量を10mMから1mMに低減化する。また、*in vitro*小核試験を代替としてもよい。
3. 2つのバッテリー試験をオプションで選択することができる。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。

一方、バッテリー試験での2つの*in vivo*試験の実施は、動物愛護の現在の潮流に逆行することのないように、一般毒性試験に組み入れ（integration）や、複数の試験の同時実施（combination）などが論議され、共同研究が進行中である。この共同研究の結果から、2つの*in vivo*試験が無理なく実行されることが示されれば改訂ガイダンスは2009年5月のEWG（横浜）でステップ4に上がる予定である。新しいガイダンスは、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、遺伝毒性試験ガイダ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ダ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、ポートランドの会議で、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ダンスの策定を行った。

B. 研究方法

本研究は規制側として(財)食品農医薬品安全性評価センターの林、国立衛研の本間、PMDAの吉富が、企業側からはJPMAの若田、および澤田がICHの遺伝毒性EWGに参画し、ガイダンスの改訂作業を行った。国立衛研の森田、(財)食品薬品安全センターの山影は研究協力者として主に文献調査等に関与した。

昨年度までに過去10年間の遺伝毒性試験に関する文献、および企業内部データを調査し、*in vitro*哺乳類細胞試験の検出能力評価、*in vitro*哺乳類細胞試験での最高用量の妥当性の検討、*in vivo*遺伝毒性試験のCmaxの検討を行った。これらの結果を基に、現行ガイダンスの問題点を明らかにし、改訂作業を行った。

6局によって合意された改訂ガイダンス(ステップ2)の日本語への翻訳作業を行い、Web上に公開し、パブリックコメントを求めた。

他の分野との整合性をとるためのM3との協議を行った。また、ガイダンスの最終化(ステップ4)のための必要事項を論議した。

C. 研究結果

(1) 改訂遺伝毒性試験ガイダンスの要点

改訂ガイダンスは2007年10月の横浜での論議を基に策定された。その場では全て合意には至らなかったが、メールでの論議を重ね2008年2月にステップ2として6局で合意のサインが交わされた。改訂ガイダンスの主な要点は以下の通りである。

1. これまでの2つのガイダンスS2Aと、S2Bを一つにまとめるS2 (R1)。
2. バクテリアを用いた復帰突然変異試験では、明らかな陰性の場合繰り返し試験の必要はない。

3. 哺乳類培養細胞を用いた*in vitro*試験での最高用量を1mMに低減化する。一方、最高用量における細胞毒性の程度についてはこれまで通りとする。また、沈殿が出現する用量での試験の必要はない。

4. 哺乳類培養細胞を用いた*in vitro*試験として小核試験を代替としてもよい。

5. 2つのバッテリー試験をオプションで選択することができる。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(オプション1)、もう一つは含まないバッテリーである(オプション2)。ただし、後者は、2つの*in vivo*試験が要求される。

6. *In vivo*試験では試験ごとの陽性対象を設定する必要はない。

一方、*in vivo*試験の実施に当たっては動物愛護精神を重要視し、一般毒性試験に組み入れ(integration)が論議された。すなわち、動物での十分な暴露量が証明されれば、一般毒性試験に組み入れることができる。この条件として、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。

(2) 改訂ガイダンスの翻訳、パブリックコメントの募集

2月にステップ2となった改訂ガイダンス(S2R1)は日本語への翻訳作業が行われた。翻訳したもの文末に別添した。翻訳された改訂ガイダンスは厚生労働省のホームページで公開され、パブリックコメントの募集が行われた。

(3) 改訂ガイダンスの最終化

2008年6月、オレゴン州ポートランドにおいてステップ4に至るために論議を重ねた。新しいガイダンスのバッテリー試験での2つの*in vivo*試験の実施が要求されているが、第2の*in vivo*試験としては、コメット試験(肝臓)が最も適切であることが合意された。他にトランスジェニック動物を用いた遺伝子突然変異試験等が候補として挙げられた。また、

動物愛護の現在の潮流に逆行することのないように、一般毒性試験に組み入れ (integration) や、複数の試験の同時実施 (combination) などが論議された。しかしながら、小核試験は、一般毒性試験に組み入れが容易であるのに対して、コメット試験はプロトコール上組み入れが困難であること、またその経験が少ないことから、共同研究の実施が提案された。

一方、ガイダンスの改訂に伴い、臨床試験実施のための遺伝毒性試験のタイミングについてはこれまでのM3のガイダンスと矛盾が生じる。これについてはM3のEWGメンバーと論議を行った。これまでは、遺伝毒性の*in vivo*試験 (小核試験) はPhaseIIまでに終了すればいいことになっていたが、新しいガイダンスは、オプション2を選択した場合には全ての遺伝毒性試験はPhaseIまでに終了することで合意がなされた。また、探索的臨床試験、単回投与試験に必要な遺伝毒性試験に関しては別に定めた。

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、2008年6月にポートランドでEWGが開催された。2008年2月にはステップ2の内容に合意する旨のサインが6局でなされ、ポートランドではパブリックコメントへの対応後、ステップ4へ上がる予定であったが、実現には至らなかった。その主な理由は、改訂ガイダンスが動物愛護にどれだけ貢献できるのかが疑問視されたためである。

ほ乳類細胞を用いた*in vitro*試験を含まないオプション2では2つ*in vivo*試験が実施される。小核試験はこれまで汎用されている試験であり、これを第一の試験とした場合、第2の試験としては異なるエンドポイントであること、造血系以外の臓器であることが重要である。現状を考えた場合、肝臓でのコメット試験が適切であると考えられた。ガイダンスではこれら試験をできるだけ一般毒性試験に組み入れ、さらなる動物の利用をできるだけ避けることを要求しているが、その実行可能性は曖昧である。小核試験やトランスジェニック動物遺伝子突然変異試験は

28日間一般毒性試験への組み入れは容易であるが、コメット試験にはこのような経験はほとんど無い。コメット試験はDNAの初期損傷を検出する試験であり、投与後3、4時間の短時間で動物を屠殺、解析するのが一般的であり、28日間試験への組み入れはプロトコール上困難と考えられた。この問題を解決するために米国、EUの製薬メーカーが中心となり共同研究が組織され、28日間最終投与3時間後のコメット試験 (integration) のバリデーションが進行中である。一方、日本では2つの*in vivo*試験である小核試験とコメット試験を同時に行う共同研究 (combination) が実施されている。Integrationもcombinationも動物愛護に貢献できると考えられる。

このようなバリデーション試験結果を評価し2つの*in vivo*試験 (小核試験、コメット試験) が動物愛護の精神に沿って無理なく実行されることが示されれば改訂ガイダンスは2009年5月のEWG (横浜) でステップ4に上がる予定である。

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、ガイダンスの改訂を行った。改訂ガイダンスのバッテリー試験は、オプションとして2つが選択できる。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。この*in vivo*試験としては小核試験 (造血組織)、コメット試験 (肝臓) が推奨される。また、これら*in vivo*試験はできるだけ一般毒性試験に組み入れるか、同時に行うことによりこれまで以上に動物を用いることのないようにする。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yatagai, F., Umabayashi, Y., Honma, M., Sugawara, K., Takayama, Y., and Hanaoka, F. Mutagenic

radioadaptation in a human lymphoblastoid cell line. *Mutat. Res.*, 638, 48-55 (2008)

Yasui, M., Suenaga, E., Koyama, N., Masutani, C., Hanaoka, F., Gruz, P., Shibutani, S., Nohmi T., Hayashi, M., and Honma, M. Miscoding properties of 2'-deoxyinosine, a nitric oxide-derived DNA Adduct, during translesion synthesis catalyzed by human DNA polymerases. *J Mol Biol*, 377, 1015-1023 (2008)

Yatagai, F., Suzuki, M., Ishioka, N., Ohmori, H., Honma, M. Repair of I-SceI Induced DSB at a specific site of chromosome in human cells: influence of low-dose, low-dose-rate gamma-rays. *Radiat Environ Biophys* 47, 439-44 (2008)

Nohmi, T., Toyoda-Hokaiwado, N., Yamada, M., Masumura, K., Honma, M., and Fukushima, S. International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds. *Genes and Environment*, 30, 101-107 (2008)

2. 学会発表

本間正充：医薬品に不純物として含まれる遺伝毒性物質の分類と許容量 第35回日本トキシコロジー学会学術年会 (2008.6)

本間正充：ICHにおける新しい遺伝毒性試験ガイドライン (S2R1) と試験実施タイミング 第35回日本トキシコロジー学会学術年会 (2008.6)

Honma, M. Ultimate Threshold and Genetic Consequence of A Single Double Strand Break in Human Cells. International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds (2008.7)

Honma, M. Genome Mapping of Damaged Chromosome Regions Induced by Ionizing Irradiation Using DNA Microarray Analysis. 38th European Environmental Mutagen Society (2008.9)

鈴木孝昌、小木美恵子、小原有弘、本間正充、田邊思帆里、山口照英：SNPおよびCGHマイクロアレイを用いたc-myc遺伝子増幅に関する詳細解析 第67回日本癌学会総会 (2008.10)

谷田貝文夫、菅澤薫、榎本秀一、本間正充：DSB修復効率からの適応応答の追求 日本放射線影響学会

第51回大会 (2008.11)

本間正充：DNA二本鎖切断修復と遺伝的不安定性 日本環境変異原学会第37回大会 (2008.12)

安井 学、本間正充：ヒトリンパ球細胞のゲノム内に導入させた8-オキソグアニン1分子の突然変異誘発能 日本環境変異原学会第37回大会 (2008.12)

小山直己、木村葵、安井学、高見成昭、高橋美和、今井俊夫、山本歩、汲田和歌子、増村健一、増田修一、木苗直秀、松田知成、能美健彦、本間正充：ライフステージを考慮したアクリルアミドの多臓器遺伝毒性評価 日本環境変異原学会第37回大会 (2008.12)

斉藤美香、松藤寛、千野誠、林真、本間正充、山形一雄：過酸化水素によって誘導されたヒトリンパ芽球細胞TK6の細胞増殖と遺伝毒性に対する天然抗酸化物質の保護効果 日本環境変異原学会第37回大会 (2008.12)

木村葵、坂本浩子、西郷和彦、洲加本孝幸、本間正充：In vitro コメットアッセイプロトコールの検証 日本環境変異原学会第37回大会 (2008.12)

Wang, J., Sawyer, J., Honma, M., Chen, T., and Moore, M. The Mouse Lymphoma Assay detects recombination, deletion, and aneuploidy. 日本環境変異原学会第37回大会 (2008.12)

谷田貝文夫、高橋昭久、本間正充、鈴木ひろみ、大森克徳、関真也、橋爪藤子、島津徹、榎本秀一、大西武雄、石岡憲昭：宇宙実験：放射線影響のLOH検出系による解析 日本環境変異原学会第37回大会 (2008.12)

鈴木孝昌、小泉朋子、本間正充、中嶋圓、濱田修一、渡辺貴志、降旗千恵：トキシコゲノミクスに関するJEMS/MMS共同研究II：遺伝子傷害性発癌物質の迅速スクリーニング系としてのTaqMan Low Density Arrayの評価 日本環境変異原学会第37回大会 (2008.12)

本間正充、櫻庭真弓、汲田和歌子、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 日本環境変異原学会第37回大会 (2008.12)

中嶋圓、鈴木雅也、田中仁、本間正充、林真：In vitro コメットアッセイ国際バリデーションデータ解析に

関する一考察 日本環境変異原学会第37回大会
(2008.12)

安井学、Suzuki, N.、本間正充、Shibutani, S.: 一酸化
窒素によって形成するDNA付加体の誤塩基対形成

メカニズム 第31回分子生物学会 (2008.12)

G. 知的所有権の取得状況
なし

1. 緒言

1.1. ガイドラインの目的

このガイダンスはICHガイドダンスS2AおよびS2Bに替わるもので、また、両者を併合したものである。改訂の目的は、ヒトに対する危険性予測のための遺伝毒性試験の標準組合せの最適化、結果の解釈のためのガイダンスの提供であり、遺伝的影響の変化を基礎とする発がん性の危険性評価精度の向上を最終的な目的としている。本改訂ガイダンスは、国際的に合意された追加試験の基準および不適切な (irrelevant) 結果の評価を含め、標準組合せの*in vitro*および*in vivo*遺伝毒性試験における陽性結果の解釈について述べる。

1.2. 背景

このガイダンスで特に言及されていない部分については、関連するOECDガイドラインでの推奨、および「遺伝毒性試験に関する国際ワークショップ (IWGT)」での報告書が適切であると考えられる。このガイダンスに続く注記 (ノート) は他のICHガイダンスと併せて適用すべきである。

1.3. ガイドラインの適用範囲

このガイダンスは基本的に「低分子」の薬剤のための試験に関するものであり、ICH S6ガイダンスで定義されているような生物製剤には適応外である。

1.4. 通則

遺伝毒性試験は、種々の機構で遺伝的な傷害を引き起こす物質を検出するために考案された*in vitro*および*in vivo*試験と定義することができる。これらの試験は、DNA損傷とその損傷が固定された傷害を検出する。固定された傷害とは、遺伝子突然変異、大きな規模の染色体の損傷あるいは組換えを指す。これらは後世代への遺伝性影響の本質であり、またがん化における多段階過程の一部を担っていると一般的に考えられている。染色体の数的変化もまた腫瘍発生に関連していると共に、生殖細胞における数的染色体異常誘発能を持つことを示している。このような傷害を検出する試験で陽性となった物質は、ヒトに対する発がん物質や変異原物質である可能性がある。特定の化学物質の暴露とヒトでの発がん性の相関が証明されているが、同様な関係を遺伝性疾患について証明するのは困難である。そのため、遺伝毒性試験は主としてがん原性を予測するために用いられてきた。しかしながら、生殖細胞系における突然変異はヒトの疾患と明確に関係していることから、ある物質が後世代への影響を引き起こすことが疑われた場合は、がん原性が疑われたのと同様に重大であると考えられる。また、遺伝毒性試験の結果は発がん性試験結果の解釈に有用である。

2. 遺伝毒性試験の標準組合せ

2.1. 理論的根拠

医薬品の申請のためには遺伝毒性の総合的な評価が要求される。広範なレビューにより、細菌を用いる復帰突然変異 (Ames) 試験で陽性の化学物質の多くがげっ歯類での発がん物質であることが示されている。ほ乳類培養細胞を用いる*in vitro*試験を加えることによってその検出感度が増し、検出される遺伝毒性指標の範囲が広がるが、これにより逆に予測の特異性が減少する；すなわち、げっ歯類での発がん性と関連しない陽性結果が増加する。しかしながら、一つの試験でがん原性発現機序に関連するすべての遺伝毒性を検出できないことから、組合せによる試験の実施は依然として妥当であるものと考えられる。

試験の標準的な組合せの一般的な特徴は次のとおりである。

- i. 細菌を用いる復帰突然変異試験での遺伝毒性 (変異原性) の評価。この試験は遺伝的变化を検出し、

げっ歯類およびヒト遺伝毒性発がん物質の大部分を検出することが出来るとされている。

ii. 遺伝毒性は、*in vitro*でのほ乳類細胞、および*in vivo*においても評価されなければならない。

いくつかの*in vitro*ほ乳類細胞系が広く使用されており、それらの信頼性は十分に保証されていると考えられる。*In vitro*分裂中期染色体異常試験、*in vitro*小核試験（注1）およびマウスリンフォーマTK試験（MLA）の3試験は同程度の検出能力を持ち、従って互換性があり、このガイドラインで推奨するプロトコールが使用される限り、医薬品安全性評価における遺伝毒性試験標準組合せの中で、他の試験法と共に利用される。

*In vivo*遺伝毒性試験は、生体にとって特有の要素（吸収、分布、代謝、排泄）を加味して遺伝毒性活性を評価することが出来るため、試験の標準組合せに加えなければならない（注2）。末梢血または骨髓細胞を用いる小核、および骨髓細胞の分裂中期像における染色体異常試験はげっ歯類を用いる*in vivo*染色体傷害試験として共に受け入れ可能である（注3）。被験物質で処理した動物の培養リンパ球もまた細胞遺伝学的解析に用いることができるが、その方法はまだ一般的ではない。

*In vitro*および*in vivo*の染色体異常試験は染色体の安定性を変化させる様々な異常を検出することができる。染色体分体あるいは染色体の切断により、無動原体染色体断片ができる小核が形成される。したがって、染色体異常試験や、小核を検出する試験は染色体の構造異常の検出に適切である。小核はまた、分裂後期における1本以上の染色体の極への移動異常によっても形成されるため、小核試験は染色体の数的異常誘発物質を検出できる可能性がある。MLAは、TK遺伝子での突然変異を検出する系であるが、ここでは突然変異と染色体異常の両者が結果に反映される。MLAはまた染色体全体の欠損も検出可能であることが知られている。

その他いくつかの*in vivo*試験が組み合わせ試験の一つとして、もしくは*in vitro*および*in vivo*試験結果の評価における証拠の重み付け（weight of evidence）のための追加試験として用いることができる（下記参照）。評価対象となる試験が十分理にかなっており、また、標的組織での曝露が証明されておれば（4.8項参照）、その*in vivo*試験（通常2試験）の陰性結果は、遺伝毒性がないことの十分な証明となる。

2.2. 標準組合せの2つのオプションの詳細

標準組合せの以下の2つのオプションは同等に適切と判断される。

オプション1

- i. 細菌を用いる復帰突然変異試験
- ii. 染色体損傷のための細胞遺伝学的試験（*in vitro*分裂中期での染色体異常試験あるいは*in vitro*小核試験）、あるいはMLA
- iii. *In vivo*遺伝毒性試験、一般には、齧歯類造血細胞での染色体損傷の試験であり、小核あるいは分裂中期の染色体異常を検出する。

オプション2

- i. 細菌を用いる復帰突然変異試験
- ii. 2種類の組織における*in vivo*遺伝毒性試験。通常げっ歯類造血細胞を用いる小核試験および2つ目の*in vivo*試験。

標準組合せの両オプションにおいて、投与量が十分である場合には*in vivo*遺伝毒性試験を反復投与毒性試験に組み入れることができる（4.7項参照）。オプション2において、投与量あるいは曝露が適切でなければ、適切な投与量の設定を行った単回投与試験（可能な場合、1つの試験に2種類の遺伝毒性試験を組み込む）を実施する（4.7.2および4.7.3項参照）。あるいは、ほ乳類培養細胞を用いる*in vitro*試験を含むオプション1に従う。

本ガイダンスに従い実施され、評価されたいずれかの試験の組合せにおいて陰性の結果を示す化合物は、通常、遺伝毒性活性を持たないと考えられ、試験を追加して実施する必要はない。標準的試験組合せで陽性

の化合物は、その臨床での使用形態にもよるが、より広範な検討をする必要があろう（5項参照）。

標準組合せは、染色体の異数性を特異的に検出する試験を含んでいない。しかしながら、数的異常に関する情報は*in vitro*でのほ乳類細胞試験、および小核試験より得ることが出来る。異数性誘発の情報を提供する指標としては、分裂指数の増加、倍数性および小核の誘発がある。MLAでも細胞分裂毒の検出は可能であるとされている。オプション2において推奨される*in vivo*の細胞遺伝学的試験は、染色体の欠損（異数体の可能性）を直接検出することが出来る小核試験が推奨され、染色体異常試験は推奨されない。

オプション2において*in vivo*評価の第2の試験として（注4）4.3に示すような試験がある。肝臓は曝露および代謝能の観点から特に最適の組織であると考えられるが、第2の組織および試験法の選択は想定可能なメカニズム、代謝、および曝露情報等の要因を考慮して選択すべきである。投与量が正当な根拠に基づいており（4.7項参照）、また、プロトコールに矛盾がない場合には、*in vivo*の遺伝性試験は反復投与毒性試験に統合可能であると考えられる。

ここでは、試験の標準組合せを提示したが、これは他の遺伝毒性試験が不十分であるとか不適當であることを意味している訳ではない。追加実施した試験結果は、標準組合せで得られた試験結果を補強するために使用することができる（4.3および5項参照）。必要性が示され、かつ十分に評価可能であるならば、非げっ歯類を含む代替の試験系も利用可能である。

標準組合せを構成する試験において、技術的な理由で試験が実施できないような極端な条件下では、その試験が科学的に妥当でないことが十分に説明できるならば、有用性が確認された代替試験を利用することができる。

2.3. 試験組合せの変更

以下のような状況下にあつては、標準的組合せを変更することが推奨される。

2.3.1. 特性が明らかなクラスの化合物

例えば、ある種のキノロン抗生物質およびヌクレオシド類縁体のように遺伝毒性が予測される場合には、陽性反応が期待される試験／プロトコールに変更可能である（注8も参照）。

2.3.2. 細菌に毒性を示す化合物

細菌に強い毒性を示す化合物（例えばある種の抗生物質）に関しては、毒性が発現しない低濃度で変異原性が誘発されることもあるため、細菌を用いる復帰突然変異（Ames）試験は依然実施すべきである。さらに、このような場合には、*in vitro*のほ乳類培養細胞を用いる試験のいずれか一つを実施すべきである。すなわちオプション1を選択する。

2.3.3. 構造的に遺伝毒性が予想される化合物

多くの「有害性を示す化学構造」は細菌の変異原性に関して定義されているため、そのような化合物（注5）は、通常は標準組合せ試験で検出可能である。数種類のクラスの化合物は、細菌を用いる遺伝子突然変異試験よりもほ乳類の培養細胞を用いる染色体損傷試験で容易に検出できることが知られている。したがって、構造的に有害性が予想される化合物であっても、標準組合せにおける陰性結果は遺伝毒性を有していない十分な保証となる。しかしながら、ある種の特異的な構造に有害性が予想される化合物群に対しては標準プロトコールを適切に変更する必要である（注5）。追加試験とするか、プロトコールの変更とするかは構造的に有害性が問題となるような化学的性質、既知の反応性および代謝データに基づいて選択する。

2.3.4. *In vivo*試験系の利用の限界

骨髄、血液あるいは肝臓を用いる*in vivo*試験を実施しても有用な情報が得られない化合物がある。トキシコキネティクスやファーマコキネティクスのデータから、全身的な吸収がなく、標的臓器に到達できないような化合物がそれに相当する。例として、ある種の造影剤、アルミニウムを主成分とする制酸剤、いくつか

の吸入投与剤、および皮膚あるいは他の局所適用の医薬品があげられる。投与経路を変えても標的臓器が十分に曝露されず、最も曝露される組織において適切な遺伝毒性試験が実施できない場合には、*in vitro*試験系のみでの評価が基本的に適切であろう。汎用されている試験ではないが、曝露部位の遺伝毒性評価が正しく行われるものもある（注6）。

2.4. 生殖細胞に対する変異原性物質の検出

定性的ではあるが、ほとんどの生殖細胞変異原物質が体細胞を用いる試験で遺伝毒性として検出されることが示されている。従って、体細胞を用いる*in vivo*遺伝毒性試験の陰性結果は生殖細胞に影響がないことを示していると考えることが出来る。

3. *In vitro*試験に対する勧告

3.1. 試験の繰り返しおよび解釈

実験結果の再現性は、新しい手法による研究や、予期しない結果が得られた場合に必須の要素である。しかしながら、医薬品のための標準化され汎用されている定型的な遺伝毒性試験では、繰り返しを必要としない場合がある。これらの試験は特性が明確であり、また内部コントロール十分であるので、明らかな陽性あるいは陰性である場合、試験の繰り返しは通常必要とされない。理想的には、試験結果が明らかな陰性あるいは明らかな陽性と確定できることである。しかし、時には試験結果が陰性や陽性の判定基準を満足しないことがあり、その場合には「判定不能 (equivocal)」とせざるを得ない。このような場合には、統計学的手法の適用が解釈に役立つが、適切な生物学的解釈が極めて重要である。「判定不能」な場合、再試験において、(i) 明らかに陽性結果、したがって、総合して陽性結果、(ii) 陰性結果、再現性の無いため、総合して陰性、(iii) 再び「判定不能」となり、最終結論も「判定不能」になる可能性がある。

3.2. 細菌を用いる遺伝子突然変異試験

OECDガイドライン（1997）およびIWGT報告書（Gatehouseら、1994）に記述されている。

3.2.1. 最高用量の選択

最高用量

溶解性あるいは菌の生育阻害による制限がない場合、最高用量は5000 µg/plateである。

溶解性の限界

菌の生育阻害が無く、また、最高用量が5000 µg/plate以下であるという条件下では、析出物が変異コロニーの検出を妨げない限り析出する用量においても測定する。ある化合物の細菌を用いる復帰突然変異試験では、溶解しない用量範囲において用量相関的に遺伝毒性が検出されることがある。一方、大量の析出がコロニー数の計測を妨げたり、化合物の細胞内への取り込み、DNAとの相互作用を困難にさせたりすることがある。この場合、菌の生育阻害が観察されなければ、析出する最低用量を最高用量とすることが出来る。もし、用量相関的に菌の生育阻害あるいは復帰変異コロニーの増加が認められた場合には、溶解性に関係なく最高用量は以下の基準に基づく。

生育阻害による制限

細菌を用いる復帰突然変異試験では、生育阻害の現れる用量を最高用量とし、最高濃度5000 µg/plateを超えない用量とする。生育阻害は復帰変異コロニー数の減少や背景細菌叢 (background lawn) の透明化または減少によって検出する。

3.2.2. 試験のデザインおよびプロトコール

塩基対置換およびフレームシフト突然変異の検出にOECDが推奨する試験菌株のセットは以下の通りである。

- (1) ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98
- (2) ネズミチフス菌TA100
- (3) ネズミチフス菌TA1535
- (4) ネズミチフス菌TA1537、TA97またはTA97a
- (5) ネズミチフス菌TA102、大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2*uvrA*または大腸菌WP2*uvrA*/pKM101

OECDおよびIWGTとの相違は、医薬品の試験の経験に基づき、細菌を用いる復帰突然変異試験 (Ames試験) は、結果が明らかに陰性または陽性で、代謝活性系の存在下および非存在下ですべての試験菌株を含み、最高用量の選択基準を満たす用量範囲ならびに適切な陽性および陰性対照を設置して実施した場合には、1試験で十分であるという点である。また、医薬品の試験ではプレート法およびプレインキュベーション法は共に受け入れ可能である (注7)。判定不能あるいは弱い陽性結果が得られた場合には、用量レベルの間隔を変更するなどプロトコールを最適化した再試験を実施する必要がある。

3.3. ほ乳類細胞を用いる試験

OECDガイドライン (1997) およびIWGT報告書 (Kirsch-Voldersら、2003 ; Mooreら、2006) に記載されている。ここでは医薬品の試験について推奨される他の試験とのいくつかの違い、特に最高用量の選択とそれに関する最高濃度、細胞毒性および溶解性について述べる (詳細は下記参照)。

3.3.1. 最高濃度の選択

最高濃度

溶解性あるいは細胞毒性による制限がない場合には、最高濃度の上限は1 mMまたは0.5 mg/mLのいずれか低い用量とする (注8)。

溶解性

難溶または不溶の場合で細胞毒性がなければ、最高濃度は析出がみられ、観察を妨害しない最も低い濃度とする。析出の評価は、光学顕微鏡による観察等で行う。継続して析出するのか、あるいは培養中に新たに析出するのか処理の終了まで観察し、記載する。

細胞毒性

分裂中期の染色体異常あるいは小核を調べる*in vitro*の細胞遺伝学的試験では細胞増殖が約50%抑制される用量を最高用量とするが、約50%以上抑制される用量での試験は必要はい (注9、10)。MLAではRTG (相対増殖率) が約80%となる用量を最高用量とするが、RTGが約80%を超える細胞増殖抑制を示す用量での試験は不要である (注9)。

3.3.2. 試験のデザインおよびプロトコール

分裂中期における染色体損傷を*in vitro*評価する場合には、陽性および陰性対照を設けた代謝活性化系の存在下および非存在下での試験実施が必要である。被験物質の処理は3~6時間とし、処理開始から約1.5正常細胞周期後に標本を作製する。代謝活性化系の存在下および非存在下の両方で陰性結果あるいは判定不能な場合には、代謝活性化系の非存在下で約1.5正常細胞周期の連続処理試験が必要である。*In vitro*の小核試験にも同じ原則が適用される。ただし、被験物質の処理開始から1回の細胞周期を終了させ、次の分裂に入らせるため、一般に1.5~2正常細胞周期後に標本を作製する。これらの*in vitro*細胞遺伝学的試験では、ヌクレオシドアナログおよびニトロソアミンのような、ある種の化学物質では処理時間を長くするか、あるいはサンプリング時間を遅らせるか、または回復期間を設けることで容易に検出できる場合もある。染色体異常試験では、分裂中期細胞数に対する倍数体 (核内倍化を含む) 細胞の出現頻度を百分率で記録することによって倍数性の情報を得ておくべきである。高い分裂指数 (MI) あるいは倍数体細胞発現頻度の増加は、その化合物が異数性誘発能をもつ可能性を示唆している。MLAでは、適切な陽性および陰性対照を設け、代謝活性化系の存

在下および非存在下で試験を実施する。被験物質の処理は3~4時間とする。代謝活性化系の存在下および非存在下の両方において陰性結果あるいは判定不能な場合には、代謝活性化系の非存在下で約24時間の連続処理試験が必要である。MLAでは、(i) 主として小さなコロニーを誘発する陽性対照を用い、(ii) 陽性対照、溶媒対照および被験物質(陽性的場合)で陽性になった少なくとも1用量においてコロニーサイズのカテゴリが必要である。

*In vitro*のほ乳類細胞試験では、上記に概説(例えば異なる処理時間、代謝活性化系の存在下および非存在下による試験)したように、試験内に再現性をみる要素が組み込まれている。このような試験の実施後に、明らかに陰性あるいは陽性的場合には追加の確認試験は通常必要ない。判定不能あるいは弱い陽性結果が得られた場合には、処理濃度の間隔を変更するなどプロトコルを変更した試験の繰り返しが必要となる。

3.3.3. 陽性対照:

同時陽性対照群は重要であるが、遺伝毒性検出のための*in vitro*ほ乳類細胞試験は十分に標準化されているため、染色体異常試験およびMLA試験における陽性対照は、代謝活性化系の活性確認と試験系の反応性を同時に証明するための、代謝活性化系存在下での陽性対照のみで良い(非代謝活性化系の試験と同時に行うときに限る)。

4. *In vivo*試験に対する勧告

4.1. 染色体損傷の検出のための*in vivo*試験

*In vivo*での骨髄細胞における染色体異常の分析あるいは小核を有する幼若多染性赤血球の解析は、染色体異常誘発物質の検出に関しては同等と見なされる。骨髄細胞を用いる小核試験に使用する動物種としてラットおよびマウスは共に用いることが出来る。小核はまた、マウス末梢血の未成熟赤血球(網赤血球)あるいはラット末梢血の新生網赤血球を用いてもよい(注3)。同様に、未成熟赤血球は、骨髄または末梢血における染色体異常誘発物質/数的異常誘発物質を適切な検出感度で検出可能ならば、その他の動物種でも使用できる(注3)。染色体異常は、被験物質を投与されたげっ歯類から採取培養された末梢リンパ球においても分析が可能である(注11)。

*In vitro*のほ乳類細胞試験が実施されていない場合(オプション2)、*in vivo*試験は小核試験が推奨され、分裂中期の染色体異常試験は推奨されないことを特筆する。これは、染色体全体の欠失(chromosome loss)(異数性の誘発能)を検出するより直接的な能力を有するためである。

4.2. 小核の自動分析

適切に評価されたものであれば、自動解析装置(画像解析およびフローサイトメトリー)を使用することができる(OECD, 1997; IWGT, Hayashiら, 2000, 2007)。

4.3. その他の*in vivo*遺伝毒性試験

標準組合せ2(オプション2)において第2の試験として示した*in vivo*試験は、*in vitro*および*in vivo*試験結果の評価における証拠の重み付け(weight of evidence; WOE)を高めるための追加試験としても使用することが出来る(注4および11)。*In vitro*で観察された特定の反応や、作用機序に関する情報は*in vivo*試験を選択する基準となるが、染色体異常あるいは内在性遺伝子における遺伝子突然変異の測定は大部分の組織においては標準的な方法としては実行不可能である。突然変異はげっ歯類における導入遺伝子で検出できるが、特に細胞分裂の頻度が低い組織においては突然変異の発現/固定を可能にするため、長期の投与が必要となる(例えば28日間)。したがって、第2の*in vivo*試験は多くの場合、DNA傷害性を変異原性の代替指標として評価することになる。これまでに発表された多くの文献や、推奨されるプロトコルを考慮するとDNA傷害を検出できる試験として、単細胞ゲル電気泳動(「コメット」)法およびアルカリ溶出試験が推奨され、これに*in vivo*

トランスジェニックマウス突然変異試験、DNA共有結合試験（これらの試験は多くの組織に適用できる、注4）が加わる。さらには、肝不定期DNA合成（UDS）試験も利用可能である。

4.4. *In vivo* 遺伝毒性試験における性差

男性または女性専用で用いられる医薬品の試験を行う場合には、適切な性を用いて試験を実施する。急性投与のプロトコールによる*in vivo*試験は、一般的に片性で実施してもよい（注12）。急性投与試験では、使用する動物種において毒性もしくは代謝において性差が十分に示されている場合にのみ両性の使用を考慮すべきである。その他の場合は、雄のみの使用が適切である。遺伝毒性試験を雌雄動物の反復投与毒性試験に組み入れる場合には、標本は両性から採取しうるが、毒性もしくは代謝において性差を示す十分な根拠がない場合は、片性の観察でよい。投与量は「適切な投与量の基準（4.7.2および4.7.3項）」に従う。

その他の*in vivo*遺伝毒性試験についても同じ原則が適用される。

4.5. *In vivo* 遺伝毒性試験における反復投与、および一般毒性試験への組み込み

4.5.1. サンプルング時間

小核試験が反復投与試験に組み込まれる場合には、血液あるいは骨髄の採取は最終投与の翌日に行う（下記参照）。

反復投与試験（例えば28日間）で血液あるいは骨髄が小核の評価に使用される場合、重篤な血液毒性が小核の検出力に影響を及ぼす可能性がある。すなわち、単回投与で十分に小核を誘発する投与量は、反復投与においては毒性が強く発現しすぎる可能性がある。このような場合には、投与2日から4日に（Hamadaら、2001）追加の末梢血サンプルを採取しておくに役に立つ。このような投与初期のサンプルは、必要であれば染色体異常誘発物質あるいは潜在的異数性誘発物質の検出について確証データを提供することができる（しかし、注13、17参照）。

その他の遺伝毒性試験では、サンプルング時間は試験に合わせて選択する；例えばDNA傷害もしくはDNA鎖切断試験では通常最終投与の数時間（例えば2-6時間）に行われる。

原則として、最高用量もしくは曝露が適切であれば、どのような投与期間の試験でも受け入れられる。

4.5.2. 観察動物数

小核試験や他の遺伝毒性試験における観察動物数は、現行のOECDガイドライン等によって決められており、一般的には投与動物のすべてを観察する必要はない（遺伝毒性評価用の動物は無作為に抽出すべきである）。

4.6. 投与経路

投与経路は通常、経口、静脈内あるいは皮下などの予想臨床経路とするが、局所用剤のような場合には全身曝露を得るために、投与経路を変更してもよい（2.3.4項）。

4.7. *In vivo* 試験における投与量

通常3用量を用いる（Hayashiら、2005）。

4.7.1. 短期試験

急性投与試験（一般に1~2回投与）のプロトコールでは、遺伝毒性試験で推奨される最高用量は限界用量の2000 mg/kg、もしくは、最大耐量とする。最大耐量は、例えば小核試験（OECD TG-474）では、同様の投与方法において、より高用量では動物の死亡が予測されるような用量として定義される（コメント法[Hartmannら、2005]およびトランスジェニック突然変異試験[Heddleら、2000]についても同様の推奨がなされている）。

用量設定には骨髄赤血球の増殖抑制も考慮に入れる必要がある。用量は、最高用量から通常公比約2~3の間隔で設定する。

4.7.2. 反復投与試験

オプション1の組合せにおいて、*in vitro*のほ乳類細胞試験が陰性あるいは「不適切な陽性」(5項参照)結果で、*in vivo*遺伝毒性試験を反復投与毒性試験に組み込む場合、その試験の用量が臨床試験としての基準を満たしていれば、用量は適切と判断される。しかし、オプション1においてほ乳類細胞試験が陽性で、遺伝毒性に焦点をあてた追加試験を実施する場合、あるいは*in vitro*のほ乳類細胞試験を行わないオプション2を使用する場合には、最高用量が遺伝毒性の評価に適切であることを保証する必要がある。

毒性試験(通常はラット)の最高用量が小核試験およびその他の遺伝毒性評価において適切であるとする条件を以下に示す(以下のいずれか1つに該当すればよい)。

- i. 溶媒中の医薬品の物理化学的特性に基づく最大投与可能用量(MFD)(その溶媒におけるMFDが急性投与で得られる用量と同様な場合)(注14)。
- ii. 14日間以上の試験の限界用量1000 mg/kg(動物が耐えられる場合)
- iii. 以下の曝露に関する情報がある場合:
 - a. 曝露がプラトー、もしくは飽和に達している場合
 - b. 蓄積が認められる場合

親物質の曝露が経時的に大幅に減少(例えば、初期曝露量から50%以上減少し代謝誘導の典型的な病理学的徴候を伴う)する場合、通常、試験は不適切と考えられる。このような現象が片性にのみみられる場合、代謝物の高曝露がみられない限り、曝露減少がみられる性を観察すべきでない。

- iv. 急性投与(最小致死量に近い)のデータがある場合、その最高用量の50%以上の用量(急性投与による小核試験の最高用量に関してはOECDガイダンスではその上の用量では死亡が予測される用量と記述されている;他の*in vivo*試験についても同様のガイダンスがある[例えばHartmannら、2003])

毒性を伴わない曝露マージン(臨床曝露の複数倍)のみに基づく用量選択は、十分な理由があるとは考えられない。

投与量もしくは曝露が適切でない場合には、曝露を最大にするため、あるいは適切な毒性用量を得るために急性投与の*in vivo*試験を実施(同じ動物で2種の遺伝毒性評価を行うことが望ましい)するか、あるいは、まだ完了していなければ*in vitro*のほ乳類細胞試験を実施すべきである。

4.7.3. 反復投与試験の用量設定に関する追加項目

紡錘体阻害剤のような異数性を誘発する化合物は、一般に骨髓あるいは血液を用いる小核試験において、毒性用量に近い狭い用量範囲で検出される。この現象は、他の染色体異常誘発物質についてもみられることがある。赤血球系の細胞に強い毒性(例えば、顕著なPCEあるいは網状赤血球の低下)を示す場合には、解析用量段階は細胞毒性を示す最高用量以下、約2倍を超えない間隔で設定すべきである。適切な用量が反復投与試験に含まれていなければ、異数性誘発物質および細胞毒性が強い染色体異常誘発物質を検出するため追加試験として下記のものが考えられる。

- a. 反復投与試験において投与2~4日の血液採取(重度の血液毒性が発現する前)
- b. *In vitro*のほ乳類細胞を用いる小核試験
- c. 急性投与による骨髓を用いる小核試験

4.8. *In vivo*試験結果が陰性の場合の標的臓器での曝露証明

*In vivo*試験は遺伝毒性を評価する上で重要な役割を担っている。*In vivo*試験において、標的組織への被験物質の適切な曝露証明が試験結果の意義を左右する。特に、*in vitro*試験において明白な陽性結果であって、*in vivo*試験が陰性の場合、または、*in vitro*ほ乳類細胞を用いる試験が実施されない場合、標的組織の曝露証明が鍵を握る。標的組織における毒性、またはトキシコキネティクスデータによって曝露証明はなされる。

4.8.1. *In vitro*遺伝毒性試験が陽性的の場合(または実施していない場合)

*In vivo*の曝露評価は、遺伝毒性試験と同じ動物種、系統、および投与経路を用いて、最高用量あるいは適切な用量で行われるべきである。遺伝毒性が一般毒性試験に組み込まれて評価される場合には、曝露の情報は毒性学的評価と共有できる。

*In vivo*の曝露証明は次のいずれかによって行われる。

i. 細胞毒性

- a. 細胞遺伝学的試験：小核試験においては、試験と同一用量および同一標本作製時期における、使用した組織（骨髄あるいは血液）での全赤血球に対する幼若赤血球の割合の有意な変化。染色体異常試験においては、分裂指数の有意な減少。
- b. 他の*in vivo*遺伝毒性試験：肝臓あるいは評価した組織における毒性、例えば、病理組織学的評価あるいは血液生化学的な毒性指標。

ii. 生物学的利用率

- a. 血中もしくは血漿中における被験物質またはその関連物質の測定。骨髄は血液がよく灌流する組織であり、血中あるいは血漿中の被験物質またはその関連物質濃度は骨髄中で観察される濃度と通常同等である。肝臓は、投与経路に関係なく全身曝露とともに被験物質曝露を予測することが出来る。
- b. 標的組織における被験物質またはその関連物質の直接的測定、あるいはオートラジオグラフィによる組織曝露の評価。

全身曝露が、予測される臨床曝露と同レベルあるいは低レベルの場合には、(i) 異なる投与経路；(ii) 高い曝露が得られる異なる動物種の利用；(iii) 異なる組織あるいは試験法の利用（2.3.4項「標準的な*in vivo*試験系の利用の限界」参照）を考慮する必要がある。

例えば標的組織への取り込みが非常に低い場合など、被験物質が適切に曝露されていない場合には、通常*in vivo*遺伝毒性試験は殆ど意味をなさないものと考えられる。

4.8.2. *In vitro*遺伝毒性試験が陰性の場合

*In vitro*試験で遺伝毒性が認められなかった場合においても、上記の方法を用いて*in vivo*（全身）の曝露を評価することが出来るが、他の目的で実施されたげっ歯類における標準的な吸収、分布、代謝、排泄（ADME）試験の結果から推量してもよい。

4.9. *In vivo*試験の陽性対照の使用

*In vivo*試験では、試験施設が試験を行うのに十分な能力がある場合には、試験ごとに同時陽性対照群を置く必要はない（注16参照）。

5. 試験結果の評価および追加試験に関するガイダンス

*In vitro*試験系では、げっ歯類のがん原性予測に対して偽陰性および偽陽性の結果を与えることが、試験結果の比較から明らかにされている。遺伝毒性試験の組合せ（*in vitro*および*in vivo*試験）は、大部分の既知ヒト発がん物質がそうであるように、直接的に遺伝的傷害を引き起こし作用すると考えられている発がん物質を検出する。従って、これらの試験の組合せでは非遺伝毒性発がん物質は検出できない。*In vitro*の代謝活性化系には限界があるように、試験条件によっては*in vitro*試験は偽陰性の結果をもたらすことがある。組み合わせ試験は、遺伝毒性を示す化合物が偽陰性となる危険性を減少させるようにデザインされているが、ある試験で陽性となった化合物が、必ずしもヒトに対して遺伝毒性/発がん性をもつことを意味するものではない。

陽性の*in vitro*データは、医薬品が化学物質の特性として遺伝毒性をもつ可能性を示しているが、多くの場合、これら*in vitro*の陽性結果の生物学的意義は適切な*in vivo*試験で検証される必要がある。さらに、ある濃

度以上でのみ作用を現す間接的遺伝毒性の機序が知られており、このような作用機序をもつ医薬品については、安全レベル（閾値）を設定することが可能であるとされている（5.2項、Müllerら、2000；Scottら、1991；Thybaudら、2007）。

5.1. 生物学的意義の評価

試験が適切な用量間隔、適切な毒性レベルで実施された場合、以下のように考えることが出来る。

*In vitro*あるいは*in vivo*で、遺伝毒性の明らかな増加が認められるが、その程度が弱い場合、まずその再現性および生物学的な意義について評価すべきである。生物学的に意味が乏しいと判断される例を以下に示す。

- i. 陰性あるいは溶媒対照の値と比較して統計学的に有意だが、試験施設での背景データの範囲内にある軽度の増加
- ii. 再現性のない弱い反応／判定不能

上記の条件があてはまり、WOEから遺伝毒性がないと考えられれば、陰性あるいは生物学的に不適切な所見と判断され、追加試験の必要はない。

5.2. *In vitro*試験結果の評価

特に細菌を用いる変異原性試験では、陽性結果が不純物に起因する可能性がないかを判断するため、被験物質の純度を考慮すべきである。

5.2.1. 細菌を用いる復帰突然変異試験で得られた陽性結果の評価

変異体ではない、人為的なコロニー増加の例が知られている。これらはアミノ酸の混入によって引き起こされる（ネズミチフス菌の試験系ではヒスチジンを、大腸菌の試験系ではトリプトファン）。そのため、細菌を用いる復帰突然変異試験は分解しやすいペプチドの試験には適さない。また、例えば細菌のニトロ還元酵素による活性化のように、細菌の特異的な代謝が関与する陽性反応も存在し、ヒトでの遺伝毒性とは無関係の場合もある。

5.2.2. ほ乳類細胞を用いる試験で得られた陽性結果の評価

陽性結果が得られた場合のWOEによる評価および追加試験の推奨に関してはIWGTの報告書の中で議論されている（例えばThybaudら、2007）。さらに、論文などで*in vitro*試験での陽性結果の妥当性を疑わせるようないくつかの条件についても報告されている。したがって、いかなる*in vitro*試験での陽性結果について、以下に示すようなWOEを考慮して評価されるべきである。以下の項目は全てを網羅したものではないが、判定を下すための一助となろう。

- i. *In vivo*では起こりえない非生理的試験条件（pH；浸透圧；析出物）
 - 1 mMまでは浸透圧の増加を考慮する必要はない。また、被験物質がpHを変化させる場合は被験物質の処理時間にpHを無処理群の正常pHに合わせるべきことを特記する。
- ii. 強い毒性が発現する濃度のみでの作用
 - MLAにおけるRTGが80%以上低下した場合
 - In vitro*細胞遺伝学的試験で細胞増殖が50%以上抑制された場合

上記の条件があてはまり、WOEから遺伝毒性の可能性がないと判断できれば、1つの陰性結果の*in vivo*試験を含む標準組合せ1（オプション1）以上の追加試験の必要はないと考えられる。

5.2.3. *In vitro*の陰性結果の評価

*In vitro*試験で陰性でも、次のような場合には追加試験を考慮すべきである（ここに挙げた例は全てを網羅したものではないが、判断を下すための一助となろう）：化合物の構造やその既知の代謝経路から考えて、標準的な*in vitro*代謝活性化法（例えば、げっ歯類肝S9）が不適切と考えられる場合。化合物の構造や既知の活性から考えて、他の方法／試験系が適切と考えられる場合。

5.3. *In vivo*試験で得られた結果の評価

*In vivo*試験には、吸収、分布ならびに排泄という*in vitro*試験にはない要素が勘案されているという特徴をもつ、したがって、ヒトへの適用に重要な意味を持つ。さらに、薬物代謝は*in vitro*で通常使用されている系と比べると、*in vivo*の系の方がより生物学的に意味がある。*In vivo*と*in vitro*の結果が一致しない場合には両者の相違についてケース・バイ・ケースで判断され、説明がなされるべきである（例えば、代謝の差、*in vivo*での効率的な排泄など）。

*In vivo*試験においても偽陽性結果を引き起こす可能性がある。例えば、遺伝毒性物質の投与がない場合でも小核の増加がみられることがあり、これは造血障害によることが知られている（Tweatsら、2007 I）。DNA付加体のデータは既知の内因性付加体の背景レベルを考慮に入れて解釈すべきである。また、毒性に関連した間接的な作用が、例えばアルカリ溶出試験およびコメットアッセイにおいてDNA鎖切断の結果に影響を及ぼすことがある。

このように、遺伝毒性データを評価するにはすべての毒性学および血液学的所見を考慮することが重要である（注17）。毒性学的変化に関連する間接的な作用には閾値があり、これらが臨床で発現するとは考えにくい。

5.4. 陽性結果に対する追加検討

5.4.1. ほ乳類細胞を用いる*in vitro*試験結果に対する追加検討

以下の論議は細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames）は陰性であることを前提としてなされている。

5.4.1.1. 作用機序/*in vivo*の追加検討

ほ乳類細胞を用いる*in vitro*試験でのWOE不十分である陽性結果の評価には、以下のような追加の*in vitro*試験、あるいは2種類の適切な*in vivo*試験を実施する。これにより、ほ乳類細胞試験に対するフォローアップは実験的根拠を与える。

- i. 陽性結果が不適切であることを示す作用機序に関する情報はしばしば*in vitro*から得られる。例えば、染色体異常を誘発したり、またMLAで陽性を示してもDNA傷害の無い化合物もある（例：Ames試験、その他の突然変異/DNA傷害試験で陰性；化学構造的な考察が根拠となる）。また、*in vivo*では考えられないような、間接的、または閾値が想定できる作用機序によってもたらされる場合がある（例：DNA合成阻害、高濃度のみで産生される活性酸素種；Gallowayら、1998；Scottら、1991；Muller and Kasper, 2000）。このようなケースは、*in vitro*の小核試験における陽性結果のフォローアップについても言える。染色体の損失または異数性の機序が考えられた場合、染色体の損失を示す動原体染色実験（注18）が証拠としてあげられる。

上記の機序に関する情報、および得られた証拠の重み付けが遺伝毒性陰性の裏づけとなるのであれば、適切な曝露情報とともに、遺伝毒性陰性であることを示すための*in vivo*の1試験を実施するだけでよい。これは、一般に細胞遺伝学的試験であり、*in vivo*の小核試験が推奨される。染色体の損失を評価するフォローアップになるためである。

倍数性は*in vitro*の染色体異常試験ではよくみられる所見である。異数性誘発物質は倍数性を誘発するが、倍数性だけでは異数性誘発証拠としては不十分である。単に細胞周期の遅延によるのかもしれない。それは、通常、細胞毒性の増加も伴う。*In vitro*試験において構造的な染色体切断はないが倍数性がみられる場合には、概して適切に曝露されたことが確認された*in vivo*小核試験の陰性結果により、異数性誘発能を有さないことが十分に担保される。

あるいは

- ii. 曝露証明のある、異なる組織を用いての適切な*in vivo*試験を2種類実施する。

以上を要約すると、*in vitro*のは乳類細胞試験の陽性結果で、十分なWOEがない場合、もしくは意味がないと判断しうる作用機序に関する情報がある場合には、2種類の*in vivo*試験が要求される。この際、適切なエンドポイントおよび組織（通常2つの異なる組織）で行う。さらに、*in vivo*モデルで十分な曝露が得られることを強調する。

試験が的確になされ、曝露が確認された適切な2種類の*in vivo*試験の陰性結果は（4.8.1項参照）、遺伝毒性を示さない十分な証拠となる。

5.4.1.2. S9活性化系存在下での*in vitro*試験の陽性結果に対する追加検討

S-9活性化系の存在下のみで陽性結果がみられた場合には、代謝活性化以外の条件（例えば、非代謝活性化系のインキュベーションにおける10%以上の血清と比較して、S-9 mix存在下での低濃度の血清または無血清）が関与していないことを確認する。ここでの追加試験の目的は*in vitro*条件下で生成される代謝産物の反応を*in vivo*条件下で確認するためであり、*in vivo*試験をする場合は肝臓を標的として優先すること（注16）。

5.4.2. *In vivo*小核試験の陽性結果に対する追加検討

*In vivo*小核試験で陽性の場合には、非遺伝毒性機序によるものか否かを判断するため、幅広く毒性試験データについて評価すべきである（注17）。造血あるいは生理障害（低体温、高体温）のような非特異的作用が疑われる場合には、*in vitro*の染色体異常試験がより適切であるかもしれない。小核の「真の」誘発が懸念される場合には、小核の生成機序が染色体全体の欠失あるいは染色体の切断に起因するかを立証する必要がある（注18）。異数性の誘発、例えば紡錘体阻害剤での、非線形の用量相関反応をしめすという実験的証拠がある。したがって、染色体全体の欠失には閾値があること、すなわち、臨床での曝露と比較して適切な安全域があるか否かを決定することは可能であろう。

結論として、化合物の遺伝毒性誘発能の評価は、得られた所見の全体を考慮に入れ、*in vitro*および*in vivo*両試験の本質的な重要性および限界を認識すべきである。

5.5. がん原性試験で認められた腫瘍発生に関連する追加の遺伝毒性試験

標準的な組合せ試験では陰性であるが、がん原性試験で腫瘍の発生頻度の増加を示し、不十分な証拠ではあるが非遺伝毒性の機序を示された化合物に関しては適切な試験系があれば追加試験の実施が可能かもしれない。作用機序を理解するための補助的な追加試験として、*in vitro*試験における代謝活性化の条件を変更や、腫瘍が誘発された標的臓器における遺伝子損傷を指標とする*in vivo*試験、例えばコメットアッセイあるいはアルカリ溶出試験のようなDNA損傷試験、肝UDS試験、DNA共有結合性（例えば、³²Pポストラベル法）、導入遺伝子における突然変異誘発、あるいは腫瘍関連遺伝子の遺伝的変異の分子レベルでの解析が含まれる（Kasperら、2007）。

6. 注記

1. *In vitro*の小核試験は国際共同研究（Kirsch-Voldersら、2003）によって幅広く評価され、ECVAM（Corviraら、2008）によってバリデートされた。OECD TG-487としてガイドライン化中である。
2. 標準組合せの*in vitro*試験では陰性または弱陽性、あるいは相反する結果しか得られないが、骨髄の染色体損傷試験で明らかに陽性となる遺伝毒性発がん物質が少数ながら存在する。プロカルバジン、ヒドロキノン、ウレタン、ベンゼンなどがこの分類に入る。企業の調査から、その他のいくつかの例がTweatsら（2007、II）によって紹介されている。
3. 原則として、血液系細胞の小核は、骨髄ではいかなる動物種においても評価可能であり、また、血液では全身を循環している小核含有赤血球が脾臓で取り除かれない動物種において評価可能と考えられる。マウスの場合、血液では多染性赤血球を用いて小核の計測が可能であり、約4週間以上の継続投与をした

場合には成熟（正染性）赤血球も使用可能である。ラットの場合、小核を有する赤血球は速やかに血液の中から取り除かれるが、一連の染色体異常誘発物質および異数性誘発物質による小核の誘発がラットの網状赤血球を用いて検出可能なことが確認されている（Wakataら、1998；Hamadaら、2001）。従って、ラットの血液は条件付きの方法ではあるが、新しく生成された網状赤血球での小核試験に問題なく利用できる（Hayashi；MacGregorら、2006）。この場合、骨髄よりも低い血液での小核頻度を検出できる適当な統計学的な感度を与えられるだけの十分な大きな観察細胞数があることが必要である（Kisslingら、2007）。骨髄あるいは血液、自動計測あるいはマニュアル計測のいずれの方法を選択しても、各試験施設は動物間のばらつきを下回るレベルに測定誤差を維持できるだけの最小限の観察細胞数を決定する必要がある。

いくつかの経験から、イヌを用いた小核誘発の検討が現在利用可能である。このような代替動物種が有用とされる1例として、げっ歯類では十分に認められないがイヌでは生成されるようなヒト代謝物の評価がある。

4. 試験の組合せに第2の*in vivo*試験を含めるのは、薬物やその代謝物に十分に曝露される組織の使用により遺伝毒性がないことを保証するためである；遺伝毒性を有すると判断される発がん物質のいくつかは肝臓を用いる試験では陽性結果を示すが、骨髄を用いる*in vivo*細胞遺伝学的試験では陰性を示すことによる。これらの例は、適切な代謝活性化能の欠如あるいは活性中間体が骨髄の血液系細胞には到達していないことを反映したものであろう。DNA鎖切断試験、DNA付加体試験および導入遺伝子の突然変異試験には多くの組織に適用できるという利点がある。それらすべての*in vivo*試験について、国際的に合意されたプロトコールはまだないが、UDS試験に加え、DNA鎖切断試験（コメット試験およびアルカリ溶出試験）、DNA付加体（共有結合）測定およびげっ歯類を用いた導入遺伝子突然変異試験に関する多数の実験および公表データがある。細胞毒性はDNA鎖切断を誘発するため、DNA鎖切断試験の結果から混乱を招かぬよう注意深い細胞毒性評価が必要である。細胞毒性の問題は、アルカリ溶出試験では十分に特性評価されているが（Storerら、1996）、コメット試験では完全には評価されていない。原則として、DNA鎖切断試験は反復投与毒性試験において適切な用量段階およびサンプリング時間を用いた場合に使用可能である。

成熟動物の肝臓は分裂が盛んな組織ではないことから、第2の試験では非細胞遺伝学的指標が汎用される。しかし、特別なプロトコールや幼若ラット（Suzukiら、2005）を用いれば、肝臓を用いた小核試験は実施可能であり、既知の遺伝毒性物質を検出できる。

5. ある種の警告部分構造を有する化学物質は、発がん性や変異原性とある程度関連があると考えられている。警告部分構造の例として、アルキル化求電子中心、不安定型エポキシド、芳香族アミン類、アゾ構造、N-ニトロソ基、および芳香族ニトロ基があげられる（AshbyおよびPaton、1994）。特別な警告部分構造を有するある種の化学物質では、プロトコールの特別な変更/追加による試験が遺伝毒性の検出に重要であることが明らかにされている（例えばアゾ基含有化学物質、配糖体、活性化にニトロ還元を必要とするニトロイミダゾールのような化学物質、代謝活性化に別種のげっ歯類のS9を必要とするフェナセチンのような化学物質）。
6. 皮膚、肝臓および結腸における*in vivo*小核試験法が開発されている（Hayashiら、2007）。また、これらの組織におけるDNA損傷試験も用いることが可能となろう。
7. プレート法あるいはプレインキュベーション法で検出感度に差のある場合があるが、量的な違いのみで、結果が逆転することはない（Gatehouseら、IWGT、1994）。両プロトコールで試験した製薬企業の経験では、2つの試験法で異なる結果は得られておらず、また、IWGTの報告書ではプレインキュベーション法でより容易に検出できるとされる化学物質は医薬品ではなく、また、肝臓を用いる*in vivo*遺伝毒性試験