

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：がん原性代替試験法の一つであるrasH2マウスの研究状況について文献調査を行なった。

p53^{+/-}マウス：Trp53 (+/-)マウスを用いた短期発がん性試験に関連する過去1年の文献報告を調査し、医薬品の発がん性評価に活用する際の留意点等についてまとめた。

Tg.ACマウス：昨年度に引き続き、がん原性短期代替試験法の試験モデルのひとつであるTg.ACマウスに関する研究状況を調査し、医薬品の発がん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、がん原性短期代替試験法のバリデーション研究に用いられている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における高発がん感受性に関わる要因について検討した。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮は特に必要としない。

C. 研究結果

1. rasH2マウス

rasH2マウスでの肝二段階発がんモデルにおける肝発がん感受性に関して、PPAR α 作動薬であるフェノフィブレート (FF) の肝発がん感受性が報告された。一方、PPAR γ アゴニストであるトログリタゾン (TRG) は肝発がん感受性を示さなかった。鼻腔上皮の増殖性病変に関して、N-Methyl-N-nitrosourea (MNU) の腹腔内投与が報告された。MNU投与に

より雄で7%、雌で20%増殖性病変が発生し、病変は結節状 (異形型)、茸腫状 (過形成型)、乳頭状 (乳頭腫) の3タイプであった。さらに医療用インプラントを用いた短期発がん性試験が報告された。陰性対照群に高密度ポリエチレン (HDPE) 及び陽性対照群にMNUを用いたところ、陰性対照群は腫瘍の発生はほとんど観察されず、陽性対照群は胸腺、心臓、肺、肝臓等における悪性リンパ腫の浸潤性病変、ならびに皮膚や胃における扁平上皮腫が高率に観察された。

2. p53^{+/-}マウス

Trp53 (+/-) マウスを用いた短期発がん性試験の陽性対照物質としてrasH2マウスで利用されているMNUの適切性を検討した報告があった (Mortonら)。MNUはTrp53 (+/-) マウスに対しても悪性リンパ腫を高頻度に惹起し、陽性対照物質として使用できると結論された。この論文のほかに、Trp53 (+/-) マウスを用いた発がんメカニズム研究論文を収集した。

3. Tg.ACマウス

過去三年間のTg.ACマウスの文献情報は極めて少なかった。皮膚発がん過程における転写因子E2F1やEGFRの活性化の関与と機序解明にTg.ACマウスが用いられた。また、米国NTPで実施した化合物の発がん性評価の報告では、Tg.ACマウスを含め遺伝子改変モデルの発がん性評価への利用に関しては注意が必要であることが示唆された。

4. Xpaマウス

過去3年間にXpaを用いたアルデヒドガスの13週間吸入暴露の結果が報告された。また、腫瘍以外の自然発生病変、UVB照射による遺伝子変異やアポトーシス誘発への影響、サイクロスポリンA (CsA) による腫瘍発生への免疫抑制の関与、及びXpa/53マウスへの化合物の短期間投与による網羅的遺伝子解析の有用性に関する検討等が報告された。

D. 考察

1. rasH2マウス

rasH2マウスに関して過去3年間 (平成19年度~21年度) に15報の論文発表がなされた。大別すると、PPARアゴニストの発がん性評価あるいは発がん機

序解明に関する研究が4件、皮膚を標的にした発がん性評価法あるいは発がん機序解明に関する研究が4件、背景データに関する報告が2件、遺伝毒性発がん物質の発がん感受性促進効果に関する研究が1件であった。また、rasH2マウスに予め発がん物質を投与して「担がんマウス」とし、その後に抗がん剤の薬効を評価する系の報告や、医療用材料の短期発がん性評価法を試みる報告もみられた。

Society of Toxicologic Pathology (STP) の Carcinogenicity Alternative Mouse Models (CAMM) Working Groupが実施したアンケート調査において、rasH2マウスおよびp53^{+/+}マウスの有用性が再確認された。また、試験実施上の問題点や改善案がユーザー側から提出された。なお、最近の進行中あるいは予定の試験においてrasH2マウスが利用されていることも明らかになった。

2. p53^{+/+}マウス

p53^{+/+}マウスを用いた研究からは、本年度の調査により、Trp53 (+/-) マウスを用いた短期発がん性試験の陽性対照物質としてrasH2マウスと同様に、MNU単回投与下の胸腺の病理組織検査のみで試験系の検証には十分であることが示された (Mortonら)。これは、各施設における試験系検証の負荷が軽減できる点で有用な情報であると思われる。一方、昨年度調査と同様、Trp53 (+/-) マウスやTrp53 (-/-) マウス (Sguraら、Kawasakiら)、あるいはp53と別の遺伝子の多重ノックアウトマウス (Ozturkら、Hussainら) は、発がんメカニズム研究のツールとしての利用が進んでいることが示された。これらの研究アプローチは、RNAi等の核酸医薬を含むバイオリジクスの発がん性評価に際して参考になるものと思われた。

本年度を含む過去3年の文献調査により、Trp53 (+/-) マウスは遺伝毒性作用に基づく発がん性の有無を確認する試験系として、また生体異物 (皮下埋植) による酸化ストレスやNOストレスに基づく発がん性を確認する試験系として有用であることが示された。また、発がん性の懸念がある医薬品の発がん性評価 (たとえば乳腺発がん) やメカニズム検討等のp53遺伝子の発がんプロセスにおける役割を考慮した仮説検証型の検討については、本モデル

を活用する場面があると思われる。

3. Tg.ACマウス

Tg.ACマウスの文献調査から、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して、また、ヒ素の胎児期における経胎盤的曝露による皮膚発がんリスクに関する機序と標的的解明に関してTg.ACマウスが用いられ、本モデルの皮膚発がん機序解明に対する一定の有用性が示された。

Michael Pら (2009) は、飲料水の消毒薬由来の不純物の一つで、マウス及びラットの2年間のがん原性試験で肝腫瘍が発生することが分かっている Dichloroacetic acid (DCA) について、Tg.ACマウスとp53 KOマウスを用いて試験を実施した結果、いずれのモデルにおいても肝発がん性は示されず、通常のげっ歯類を用いた2年間発がん性試験に比べ感受性が弱く、飲料水中に含まれる未知の化合物に対する発がん性評価への利用に関しては注意が必要であると結論している。DCAを含め、米国NTPは遺伝子改変モデルを用いた化合物の発がん性評価が行われ、2005年からこれまで10化合物の評価結果が公開されている (Natl Toxicol Program Genet Modif Model Rep.2005-2008)。その結果、Tg.ACマウスの経皮投与試験で陽性を示した5化合物 (Pentaerythritol triacrylate、Trimethylolpropane triacrylate、Dichloroacetic acid、Dicyclohexylcarbodiimide、Allyl bromide) で皮膚に対する刺激性や接触過敏性を有する化合物は3化合物あった。皮膚刺激性を有するSEPA 0009 (Fuhrman J, et al. 2005)、trimethylolpropane triacrylate (TMPTA)、pentaerythritol triacrylate (PETA) (Doi AM, et al. 2005) のTg.ACマウスを用いた短期発がん試験において、皮膚の慢性炎症を伴う過形成、アポトーシスや壊死性病変が投与量依存的に認められると共に、投与部位の乳頭腫の発生頻度の増加用量依存的に認められており、本モデルにおいて皮膚に対する強い刺激性を有する化合物が刺激による二次的な皮膚腫瘍の発生を引き起こす可能性があることが報告された。

これらのことから、Tg.ACモデルを用いた化合物の発がん性評価はより慎重な対応が臨まれるものと

考えられる。

4. Xpaマウス

XpaマウスはDNA除去修復 (NER) のsubpathwayであるglobal genome repair (GGR) とtranscription-coupled repair (TCR) を欠損し、短期投与による遺伝毒性発癌物質の検出に有用なモデルである。しかし、XpaマウスはTCRの欠損により、GGRのみが欠損したXpcマウスに比して、一般的にUVや化学物質によるDNA傷害によりアポトーシスが誘導されやすく、Xpcマウスに比して毒性発現により投与用量が制限され、発がん感受性がやや低いことが報告されている。事実、Xpa、Xpc、及びCsb (TCR欠損) マウス由来の線維芽細胞を用いて、UVB照射によるアポトーシス誘発を比較したところ、Xpa及びCsbマウスの紫外線感受性が高く、Xpcマウスは野生型と同程度であることが報告され、XpaマウスではDNA傷害により細胞死が発生しやすいことが示された。

Xpa/p53マウスでは、Xpaマウスにp53遺伝子のhaprorin sufficiencyが導入されたことにより、DNA傷害に起因するアポトーシス誘発が減弱されると考えられ、Xpaマウスに比して発がん感受性の改善が期待される。

Xpa、Xpa/p53マウスの発癌高感受性の機序として、DNA除去修復の欠損による遺伝子変異の蓄積があげられるが、Ikehata Hらは、レポーター遺伝子としてLacZ遺伝子を導入したXpa及び野生型F1ハイブリッドマウスにUVBを照射した後の皮膚を解析した。その結果、UVB照射直後に生じる光分解生成物 (photoproducts) が野生型に比してXpaマウスではほとんど除去されないこと、及びLacZ遺伝子の1塩基置換の頻度は両マウスで差がないが、2及び3塩基置換がXpaマウスにおいて高頻度で発生することが示された。すなわち、NERが欠損したXpaマウスではバルキーなDNA傷害が除去・修復されないことに起因する遺伝子変異が蓄積することが示された。

XpaマウスやXpa/p53マウスは、ILSI/HESIによるがん原性代替試験法国際共同研究において示されたように、短期間の投与により遺伝毒性発癌物質を検出できるが、Xpa/p53マウスでは、非遺伝毒性発癌物質である17 β -estradiolやシクロスポリンA (CsA) の発

癌性も陽性を示す。CsAによる腫瘍発生に関しては、Van Kesteren PCEらが、Xpa/p53マウスへの39週間投与によりリンパ腫が増加すること、及びXpa/p53マウスへのCsAの12週間投与によりLacZ遺伝子変異が増加せず、CsAによる腫瘍発生の促進は非遺伝的機序によることを示した。さらに、T細胞受容体及び免疫グロブリン遺伝子の再構築が阻害され成熟T及びB細胞が発生せずに高度の免疫不全を示すDNA-PKcs/Xpa/p53マウスにはCsA投与Xpa/p53マウスと同様のリンパ腫が好発することから、CsAによるXpa/p53マウスのリンパ腫発生には免疫抑制が関与すると報告された。しかし、Xpa/p53マウスにおいて非遺伝毒性発癌物質により腫瘍が発生する機序については判明していない。

Xpaマウスの長期飼育による自然発生病変について報告された。C57BL6マウスを背景としたXpaマウスでは肺腺腫及び肝細胞腺腫が増加するが、CBA/C57BL6/CD-1マウスを背景としたXpaマウスでは12ヶ月齢以降に、肺腺癌、血管肉腫、悪性リンパ腫、扁平上皮癌、腎細胞癌等が増加したことから、Xpaマウスの自然発生腫瘍は背景系統に依存することが示された。また、後者では6ヶ月齢以降に、精子形成異常を伴う精細管萎縮が発生し、行動や組織変化を伴わずに大脳重量が低下した。NERが欠損するヒトの色素乾皮症 (XP) では、成長遅延、老化亢進、性成熟遅延、神経障害等が発生し、他のNER (TCR) 欠損マウスでも類似した所見がみられる。これらの事実から、NER欠損はDNA傷害の修復阻害に限らず広範な影響を及ぼすと思われる、Xpaマウスにおける毒性発現が影響される可能性も考えられる。

Xpa/p53及び野生型マウスを用いた遺伝毒性・非遺伝毒性発癌物質の短期間 (最大14日間) 投与後の発癌標的組織に対する網羅的遺伝子解析について報告された。発現が変化した遺伝子のパターンは、組織により、また遺伝毒性及び非遺伝毒性発癌物質により異なっていたが、遺伝子発現の変化は野生型マウスに多く見られ、短期投与によるtoxicogenomicsによる遺伝毒性・非遺伝毒性化合物の鑑別に、Xpa/p53マウスが有用ではないことが報告された。

E. 結 論

rasH2マウスは本来の使用目的である26週間短期発がん性試験において、その有用性が広く認知され利用されていることが確認された。また、特定薬物や特定標的臓器に対する発がん感受性評価や発がん機序解明用のツールとしての開発が進んでいることが窺われた。

Trp53(+/-)マウスを用いた短期発がん性試験の陽性対照物質の選択肢が広がった。また、発がんメカニズム研究や抗腫瘍薬の薬効研究にモデルが利用され成果を挙げていることから、遺伝毒性のある医薬品や乳腺発がんの懸念のある場合等の条件において、本モデルによる発がん性評価が有効であると考えられた。

Tg.ACマウスは皮膚発がんの機序解明のモデルとしての有用性はあるが、化合物の発がん性評価はより慎重な対応が臨まれるものと考えられる。

Xpaマウスの欠点を補うXpa/p53マウスは遺伝毒性発癌物質の検出に有効と考えられるが、NER欠損により毒性発現が修飾される可能性を考慮することが必要と考えられる。

以上の文献収集の結果、Tg.ACマウスは、皮膚発がんの感受性は高いが、全身暴露での感受性は低く、また、XPA(-/-)マウスは、発がん感受性が低く、かつ動物の供給が不十分であることから、この二つの動物モデルは、短期発がん性試験に使用することはできないと結論される。一方、p53(+/-)マウスモデルおよびrasH2マウスモデルは、各種の遺伝毒性発癌物質に対して高感受性を示すことから、医薬品の癌原性検出法として、今後も有用なモデルであると判断された。一方、rasH2マウスは、p53(+/-)マウスと異なり、PPARアゴニストのような非遺伝毒性発がん物質に対しても感受性を示すことが報告されている。しかし、一部の*in vitro*遺伝毒性試験で陽性であるが、遺伝子改変マウスを用いた短期がん原性試験で陰性である場合、長期がん原性試験結果が陽性となるか陰性となるかについては、今後検討する必要がある。以上のように、p53(+/-)マウスは遺伝毒性発がん物質のみに対して感受性を示すが、rasH2マウスは非遺伝毒性発がん物質に対しても感受性を示すものの、

その発がん性の検出能力は必ずしも高くないことから、全ての非遺伝毒性発がん物質を検出することはできないと結論される。今後、これらの生物学的特徴を十分理解した上で、適切な遺伝子改変マウスを選択して用いていくべきである。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

参考文献

1. Jin M., Saekusa Y., Dewa Y., Nishimura J., Matsumoto S., Shibutani M., Hasumi K., and Mitsumori K.: Hepatocarcinogenic susceptibility of rasH2 mice to troglitazone in a two-stage hepatocarcinogenesis model. Arch. Toxicol 83: 173-181 (2009).
2. Katoku K., Oshikata T., Kumabe S., Kuwasaki E., Mitsuishi M., Nakahara Y., and Hamamura M.: Epithelial proliferative lesions in the nasal cavities of c-Ha-ras transgenic mice., J. Toxicol. Pathol. 21: 193-197 (2008).
3. Kawai M., Jin M., Nishimura J., Dewa Y., Saegusa Y., Matsumoto S., Taniai E., Shibutani M., and Mitsumori K.: Hepatocarcinogenic susceptibility of fenofibrate and its possible mechanism of carcinogenicity in a two-stage hepatocarcinogenesis model of rasH2 mice. Toxicol. Pathol. 36: 950-957 (2008).
4. Long GG., Morton D., Peters T., Short B., and Skydsgaard M.: Alternative mouse models for carcinogenicity assessment: Industry use and issues with pathology interpretation. Toxicol. Pathol. Online First, as doi: 10.1177/0192623309354107 (2009).
5. Palazzi X. and Kergozien-Framery S.: Use of rasH2 transgenic mice for carcinogenesis testing of medical implants. Exp. Toxicol. Pathol. as doi:

- 10.1016/j.etp2008.10.008. (2008).
6. Hussain SP, et al.: Nitric oxide is a key component in inflammation-accelerated tumorigenesis. *Cancer Res* 68: 7130-7136 (2008).
 7. Morton D, et al.: N-methyl-N-nitrosourea (MNU) : A positive control chemical for p53+/- mouse carcinogenicity studies. *Toxicol Pathol.* 36: 926-931 (2008).
 8. Ozturk N, et al.: Loss of cryptochrome reduces cancer risk in p53 mutant mice. *PNAS* 106: 2841-2846 (2009).
 9. Kawasaki Y, et al.: Benzene-induced hematopoietic neoplasms including myeloid leukemia in Trp53-deficient C57BL/6 and C3H/He mice. *Toxicological Sciences* 110: 293-306 (2009).
 10. Sgura, A, et al.: Chromosome aberrations and telomere length modulation in bone marrow and spleen cells of melphalan-treated p53+/- mice. *Environ Molecular Mutagenesis* 49: 467-475 (2008).
 11. El-Abaseri TB and Hansen LA: EGFR activation and ultraviolet-induced skin carcinogenesis. *J Biomed Bioetch* 2007: 1-4 (2007).
 12. Leder A, McMenamin J, Zhou F, et al.: 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).
 13. Michael P. Waalkes, Jie Liu, Dori R. Germolec, et al.: Arsenic Exposure In utero Exacerbates Skin Cancer Response in Adulthood with Contemporaneous Distortion of Tumor Stem Cell Dynamics. *Cancer Res* 68: 8278-8285 (2008).
 14. Grace E. Kissling, David E. Malarkey, Molly K. et al.: Evaluation of Dichloroacetic Acid for Carcinogenicity in Genetically Modified Tg.AC Hemizygous and p53 Haploinsufficient Mice. *Toxicol Sci* 107: 19–26 (2009)
 15. NTP report on the Toxicology Studies of Aspartame (CAS No. 22839-47-0) in Genetically Modified (FVB Tg.AC Hemizygous) and B6.129-Cdkn2a^{tm1Rdp} (N2) deficient Mice and Carcinogenicity Studies of Aspartame in Genetically Modified [B6.129-Trp53^{tm1Brd} (N5) Haploinsufficient] Mice (Feed Studies), *Natl Toxicol Program Genet Modif Model Rep.* Oct;(1):1-222 (2005).
 16. NTP report on the Toxicology Studies of Acesulfame Potassium (CAS No. 55589-62-3) in FVB/N-TgN(v-Ha-ras)Led (Tg.AC) Hemizygous Mice and Carcinogenicity Studies of Acesulfame Potassium in B6.129-Trp53^{tm1Brd} (N5) Haploinsufficient Mice (Feed Studies), *Natl Toxicol Program Genet Modif Model Rep.* Oct;(2):1-113 (2005).
 17. NTP report on the Toxicology Studies of Trimethylolpropane Triacrylate (Technical Grade) (CAS No. 15625-89-5) in F344/N Rats, B6C3F₁ Mice, and Genetically Modified (FVB Tg.AC Hemizygous) Mice (Dermal Studies), *Natl Toxicol Program Genet Modif Model Rep.* Oct;(3):1-195 (2005).
 18. NTP report on the Toxicology Studies of Pentaerythritol Triacrylate (Technical Grade) (CAS No. 3524-68-3) in F344/N Rats, B6C3F₁ Mice, and Genetically Modified (FVB Tg.AC Hemizygous) Mice (Dermal Studies), *Natl Toxicol Program Genet Modif Model Rep.* Oct;(4):1-190 (2005).
 19. NTP report on the Toxicology Studies of Bromodichloromethane (CAS No. 75-27-4) in Genetically Modified (FVB Tg.AC Hemizygous) Mice (Dermal, Drinking Water, and Gavage Studies) and Carcinogenicity Studies of Bromodichloromethane in Genetically Modified [B6.129-Trp53^{tm1Brd} (N5) Haploinsufficient] Mice (Drinking Water and Gavage Studies), *Natl Toxicol Program Genet Modif Model Rep.* May;(5):1-227 (2007).
 20. NTP report on the Toxicology Study of Sodium

- Bromate (CAS No. 7789-38-0) in Genetically Modified (FVB Tg.AC Hemizygous) Mice (Dermal and Drinking Water Studies) and Carcinogenicity Studies of Sodium Bromate in Genetically Modified [B6.129-*Trp53*^{tm1Brd} (N5) Haploinsufficient] Mice (Drinking Water Studies), Natl Toxicol Program Genet Modif Model Rep. Mar;(6):1-169 (2007).
21. NTP report on the Toxicology Studies of Dicyclohexylcarbodiimide (CAS No. 538-75-0) in F344/N Rats, B6C3F₁ Mice, and Genetically Modified (FVB Tg.AC HEMIZYGOUS) Mice and Carcinogenicity Study of Dicyclohexylcarbodiimide in Genetically Modified [B6.129-*Trp53*^{tm1Brd} (N5) Haploinsufficient] Mice (Dermal Studies), Natl Toxicol Program Genet Modif Model Rep. Sep;(9):1-138 (2007).
 22. NTP report on the Toxicology Study of Diisopropylcarbodiimide (CAS No. 693-13-0) in Genetically Modified (FVB Tg.AC Hemizygous) Mice and Carcinogenicity Study of Diisopropylcarbodiimide in Genetically Modified [B6.129-*Trp53*^{tm1Brd} (N5) Haploinsufficient] Mice (Dermal Studies), Natl Toxicol Program Genet Modif Model Rep. Mar;(10):1-53 (2007).
 23. NTP report on the Toxicology Studies of Dichloroacetic Acid (CAS No. 79-43-6) in Genetically Modified (FVB Tg.AC Hemizygous) Mice (Dermal and Drinking Water Studies) and Carcinogenicity Studies of Dichloroacetic Acid in Genetically Modified [B6.129-*Trp53*^{tm1Brd} (N5) Haploinsufficient] Mice (Drinking Water Studies), Natl Toxicol Program Genet Modif Model Rep. Apr;(11):1-168 (2007).
 24. NTP report on the Toxicology Studies of Allyl Bromide (CAS No. 106-95-6) in Genetically Modified (FVB Tg.AC Hemizygous) Mice and Carcinogenicity Studies of Allyl Bromide in Genetically Modified [B6.129-*Trp53*^{tm1Brd} (N5) Haploinsufficient] Mice (Dermal and Gavage Studies), Natl Toxicol Program Genet Modif Model Rep. Apr;(7):1-122 (2007).
 25. Fuhrman J, Shafer L, Repertinger S, et al.: Mechanisms of SEPA 0009-induced tumorigenesis in v-ras (Ha) transgenic Tg.AC mice. *Toxicol Pathol.* 33: 623-630 (2005).
 26. Doi AM, Hailey JR, Hejtmancik M, Toft Ii JD, et al.: Topical application of representative multifunctional acrylates produced proliferative and inflammatory lesions in F344/N rats and B6C3F(1) mice, and squamous cell neoplasms in Tg.AC mice. *Toxicol Pathol.* 33: 631-640 (2005).
 27. 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* 46(2):527-36 (2008) .
 28. Wijnhoven SWP, Hoogervorst EM, de Waard H, van der Horst GT, van Steeh H: Tissue-specific mutagenic and carcinogenic responses in NER defective mouse models. *Mutation Res* 614:77-94 (2007).
 29. de Waard H , Sonneveld E , de Wit J , Lange RE , Hoeijmakers JH , Vrieling H , van der Horst GT: Cell-type-specific consequences of nucleotide excision repair deficiencies: Embryonic stem cells versus fibroblasts. *DNA Repair (Amst)* 7 :1659-1669 (2008).
 30. Ikehata H, Yanase F, Mori T, Nikaido O, Tanaka K, Ono T: Mutation spectrum in UVB-exposed skin epidermis of Xpa-knock out mice: frequency of triplet mutations. *Environ Mol Mutagen* 48: 1-13 (2007).
 31. Petra C.E.van Kesteren, Rudolf B.Beems, Mirjam Luijten, Joke Robinson, Annemieke de Vries and Harry van Steeg: DNA repair-deficient Xpa/p53 knockout mice are sensitive to the non-genotoxic

- carcinogen cyclosporine A: escape of initiated cells from immunosurveillance? *Carcinogenesis* 30: 538–543 (2009).
32. Nakane H , Hirota S , Brooks PJ , Nakabeppu Y , Nakatsu Y , Nishimune Y , Iino A , Tanaka K : Impaired spermatogenesis and elevated spontaneous tumorigenesis in xeroderma pigmentosum group A gene (Xpa)-deficient mice. *DNA Repair* 7: 1938-1950 (2008).
33. Martijs J.Jonker, Oskar Bruning, Maarten van Iterson, Mirjam M.Schaap¹, Tessa V.van der Hoeven, Harry Vrieling, Rudolf B.Beems, Annemieke de Vries, Harry van Steeg¹, Timo M.Breit and Mirjam Luijten: Finding transcriptomics biomarkers for *in vivo* identification of (non-)genotoxic carcinogens using wild-type and Xpa/p53 mutant mouse models. *Carcinogenesis* 30: 1805–1812 (2009).

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」(ICH井上班)
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

非臨床安全性(部会): 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
2009年度調査および総括

分担研究者 三森国敏 東京農工大学大学院共生科学技術研究院教授

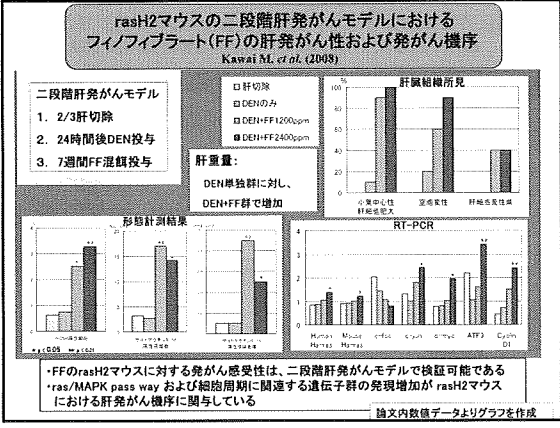
協力研究者
大西保行 (財)実験動物中央研究所バイオメディカル研究部室長
堤 秀樹 (財)実験動物中央研究所学術広報室室長
西川秋佳 国立医薬品食品衛生研究所病理部部長
平林容子 国立医薬品食品衛生研究所毒性部部長
梅村隆志 国立医薬品食品衛生研究所病理部部長
能美健彦 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部部長
務台 衛 田辺三菱製薬(株)研究本部安全性研究所所長
久田 茂 あすか製薬(株)開発研究センター安全性研究部部長
青木豊彦 エーザイ(株)安全性研究所所長

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



Benzene-induced hematopoietic neoplasms including myeloid leukemia in Trp53-deficient C57BL/6 and C3H/He mice.
Kawasaki Y, et al., Toxicol. Sciences. 110: 293-306 (2009).

- ベンゼンの血液発がん(HPNs)について、下記3点を明らかにすべく、2系統のマウス(野生型, null, hetero)を用いて検討した。
 - 従来の知見ではベンゼンの遺伝毒性の強さに比較し不適合に弱いHPNs発がんが低用量暴露でのみみられる理由
 - 発がん作用の用量相関性がみられない理由
 - ヒトでみられる急性骨髄性白血病(AMLs)がマウスではみられない理由
- 方法:
●ベンゼンをマウスに吸入暴露した
《用量: C57BL/6 (0, 33, 100, 300 ppm): C3H/He (0, 100, 300 ppm)》
- 結果:
●両系統のマウスでHPNsの発生は低用量から用量相関的に増加した。
●C3H/Heマウスでは高率にAMLsが惹起された(38% vs. 9%)。
- 結論:
●DNA修復能とアポトーシスの増加により、野生型マウスではベンゼン発がんが抑制されていることが示唆された。
●AMLsの発生には種差(マウスvsヒト)および系統差がある。

NTP genetically modified model: Report -2
(Tg.ACマウスモデル陽性化合物)

化合物名	Tg.AC	p53	遺伝毒性 (Ames)	がん原性試験
Dichloroacetic acid	陽性 (26/39週, 経皮, 用量依存的皮膚角化亢進, 腫瘍発生 (26/41週, 飲水))	陽性 (26/41週, 飲水)	陽性	陽性 (マウス: 肝腫瘍)
Dicyclohexylcarbodiimide	陽性 (20週, 経皮), 刺激性+	陰性 (27週, 経皮), 刺激性+	陰性	不明 (未実施)
Pentaerythritol triacrylate*	陽性 (26週, 経皮), 刺激性+	不明 (未実施)	陰性	不明 (未実施)
Trimethylolpropane triacrylate*	陽性 (26週, 経皮), 刺激性+	不明 (未実施)	不明	不明 (マウス80週系皮で陰性)
Allyl bromide	陽性 (marginal) (40週, 経皮), 陰性 (40週, 強制経口)	陰性 (40週, 強制経口)	陰性	?

*接触過敏性試験: +

Xpa(-/-)マウスの2009年の文献調査結果

- 毒性評価に関する文献
 - がん原性試験は無し。
 - アルデヒドガスの13週吸入暴露, 52週間無処置飼育 (1)
- Xpaマウスの特徴に関する報告
 - DNA障害によりアポトーシスが発生しやすく, 発がん感受性が低下
- 遺伝子変異の蓄積
- シクロスポリンA(CsA)の発がん機序への免疫抑制の影響
- Xpaマウスの加齢性病変の特徴 (精巣萎縮, 脳障害)
- 発がん物質鑑別にToxicogenomicsを適用する際のXpap53マウスの有用性

2007-2009年度文献調査のまとめ

rasH2マウス:

- rasH2マウスにおける遺伝毒性発がん物質の感受性の高さは、導入遺伝子の過剰発現による。
- rasH2マウスは、非遺伝毒性発がん物質全てに感受性を示すわけではない。

P53(+/-)マウス:

- P53(+/-)マウスは遺伝毒性作用に基づく発がんの有無を確認する試験系として、また生体異物(皮下移植)による酸化ストレスやNOストレスに基づく発がんを確認する試験系として有用。
- P53(+/-)マウスの発がん物質の検出スペクトラムが遺伝毒性作用に基づく物質に限られていることから、本モデルは医薬品の発がん性評価についての第一選択にはなり得ない。
- 医薬品の発がん性評価やメカニズム検討において、p53遺伝子の発がんプロセスにおける役割を考慮した仮説検証型の検討については、本モデルを活用する場面があると思われる。

Tg.ACマウス:

- 皮膚発がん過程における転写因子E2F1やEGFRの活性化の関与が明らかとなり、本モデルの皮膚発がん機序説明に対する一定の有用性は示された。
- 米国NTPが実施した遺伝子改変モデルを用いた化合物の発がん性評価では、Tg.ACマウスの経皮投与で陽性を示した化合物で皮膚刺激性を有する化合物は3化合物あり、皮膚刺激による二次的な皮膚腫瘍の誘発の可能性があることが確認された。
- ⇒以上から、Tg.ACモデルを用いた化合物の発がん性評価はより慎重な対応が望まれる。

Xpa(-/-)マウス:

- Xpaマウスに比して、Xpa/p53マウスでは、発がん感受性が改善され、遺伝毒性発がん物質の検出系としては妥当。
- Xpa/p53マウスは、ホルモン、免疫抑制剤の非遺伝的機序による発がんが検出できるが、その機序は不明。
- TCR欠損により細胞毒性が発現する可能性があること、及びNER欠損がDNA障害の修復のみならず広範な影響を及ぼす可能性があることに留意する必要がある。

2007-2009年度の遺伝子改変マウスについての文献収集: 総括

遺伝毒性発癌物質に対するp53(+/-)マウスおよびrasH2マウスの発がん感受性(短期発がん性試験)

Chemical	p53(+/-)	rasH2
Genotoxic carcinogen		
Phenacetin	Negative	Positive
cyclophosphamide	Positive	Positive
Melpharan	Positive	Equivocal/Positive
p-Cresidine	Positive	Positive
N-methyl-N-nitrosourea	Positive	Positive
Urethane	Positive	Positive
Phenolphthalein	Positive	Negative
Glycidol	Negative	Positive
Genotoxic noncarcinogen		
p-Anisidine	Negative	Negative
8-Hydroxyquinoline	Negative	Negative

遺伝毒性発癌物質に対するrasH2マウスの感受性及び発癌標的性

発癌標的	標的臓器										
	肝臓	腎臓	脾臓	肺臓	膵臓	胃腸	骨髄	骨髄	骨髄	リンパ	その他
遺伝毒性発がん物質	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
P-019506	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Cyclophosphamide	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
DEB	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1,2-Dimethylhydrazine	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
4-NQO	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
MNU	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Methylnitrosourea	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
MNU	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
MNU	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
MNU	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
4NQO	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Fluorenone	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Fluorenone	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
4,4'-Thiodianiline	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Thioles	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Vinyl carbamate	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
4-Vinylpyridine	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

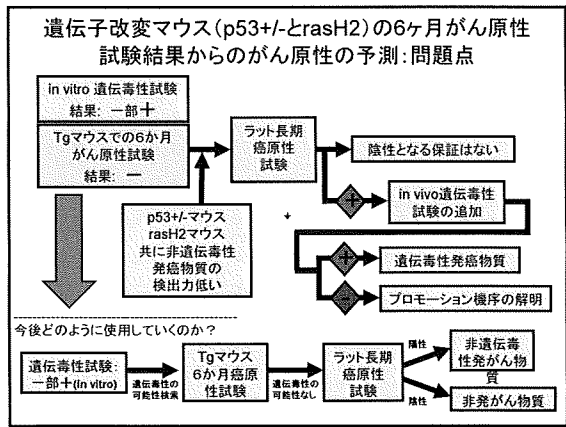
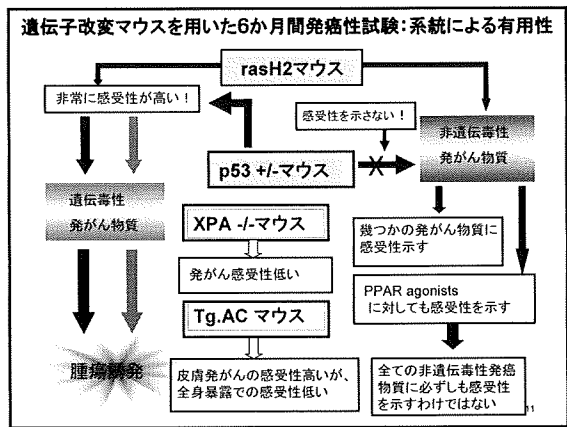
Data were obtained from the references of Yamamoto et al. (1996 and 1998) and Usui et al. (2001).

非遺伝毒性発癌物質に対する遺伝子改変マウスの感受性と限界

p53(+/-)マウスおよびrasH2マウスを用いた短期発がん性試験

Chemical	P53(+/-)	rasH2
Non-genotoxic carcinogen		
Phenobarbital	Negative	Negative
Methoxyflurane	Negative	Negative
Reserpine	Negative	Negative
Clofibrate	Negative	Positive
Dieldrin	Negative	Negative
Chloroform	Equivocal	Negative
Chlorpromazine	Negative	Negative
Mefenorexol	Negative	Negative
Diethylstilbestrol	Equivocal	Positive
Haloquinolone	Negative	Negative
Sulfamethoxazole	Negative	Negative
Wy-14543	Negative	Positive
Cyclosporin A	Positive	Equivocal
Diethylstilbestrol	Positive	Positive
17β-Estradiol	Negative	Negative
Ethylene Thiourea	NA	Positive
Ethyl acrylate	NA	Positive
1,1,2-Trichloroethane	NA	Negative
Fluorenone	NA	Positive
Troglitazone	NA	Positive

NA: Not applicable



－ 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）
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)安全性研究部）
 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は現在、改訂作業が進行している。草稿ガイダンスは、2009年5月のEWG（横浜）でステップ4に挙がるまでに至ったが、ガイダンスの2つの大きな改訂点に関して米国行政当局内の一部の遺伝毒性の専門家に懸念が高まったため、FDA幹部は、これらの懸念を調査し、解決されるまでICHで提案されたガイダンスへのサインオフの決定を遅らせることを決定した。懸念される改訂点は

- 1) 遺伝毒性を評価する際の*in vitro*試験を含まない試験バッテリーの選択を与えること。
- 2) *In vitro*哺乳類細胞を用いた試験での最高用量を10mMから1mMまで低減化すること。

である。これら内容が、著しく臨床試験での治験者、実際の医薬品服用患者の健康を脅かす内容であると主張している。本研究ではこれら懸念に対応するため、改訂ガイドラインでのバッテリー試験の発がん可能性物質の検出能力（感受性）を調査、推定した。2)の最高用量の低減化により感受性は66%から58%に減少するが、これによって改訂バッテリー試験で発がん物質を見逃す可能性は1%程度の増加に留まることが推測された。また、1)の*in vitro*試験を含まない試験バッテリーを選択した場合には、むしろ現行のバッテリー以上に発がん可能性物質を検出できることが推測された。従って、行政当局内の一部の遺伝毒性の専門家の懸念の正当性は無いと判断される。同様の判断は最近開催されたFDA主催の改訂ICH S2 (R1) の科学的正当性に関するワークショップでもなされた。この見解を基にEWGは、FDA幹部に対して改訂ガイダンスの最終化決定を速やかに是認するように求める。

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、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開始した。草稿ガイダンスは、2008年3月に完成し (ステップ2)、パブリックコメントを求めるために公開された。数多くのコメントが内容に反映され (大部分は改訂内容を支持するものであった)、草稿は、さらに改訂を受け、2009年5月のEWG (横浜) でステップ4に挙がるまでに至った。しかしながらガイダンスにある2つの大きな改訂点に関して米国行政当局内の一部の遺伝毒性の専門家に懸念が高まった。これを受け、FDAの幹部は、これらの懸念を調査し、解決されるまでICHで提案されたガイダンスへのサインオフの決定を遅らせることを決定した。これにより現在、遺伝毒性試験改訂ガイドライン (S2 (R1)) は宙に浮いたままである。一部の遺伝毒性の専門家が懸念する改訂点は、1) 遺伝毒性を評価する際の試験バッテリーの選択を与えること、および2) *in vitro* 哺乳類細胞を用いた試験での最高用量を10mMから1mMまで低減化すること、である。これら内容が、著しく臨床試験での治験者、実際の医薬品服用患者の健康を脅かす内容であると主張している。

本研究では2)の問題に注目し、過去数年間に我が国で承認された医薬品の遺伝毒性データと、国立医薬品食品衛生研究所がもつ既存化学物質の遺伝毒性データの*in vitro*哺乳類細胞を用いた染色体異常試験に関する陽性反応に必要な最高用量を調査した。さらに、現行ガイダンスである最高用量を10mMから1mMまで低減化した場合に推定される、試験の感受性と特異性を推定した。

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と、医薬品データの調査を行った。国立衛研の森田は国立医薬品食品衛生研究所が所有する既存化学物質の遺伝毒性試験データを調査した。(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。

医薬品に関しては1999年から2009年までに我が国で承認された医薬品468品目のうち、哺乳類培養細胞試験データを持つ230品目を調査した。また、一般化学物質に関しては1994年から2006年までに我が国でOECDガイドラインに従い、GLP管理の下に染色体異常試験が行われた249化合物を調査した。

C. 研究結果

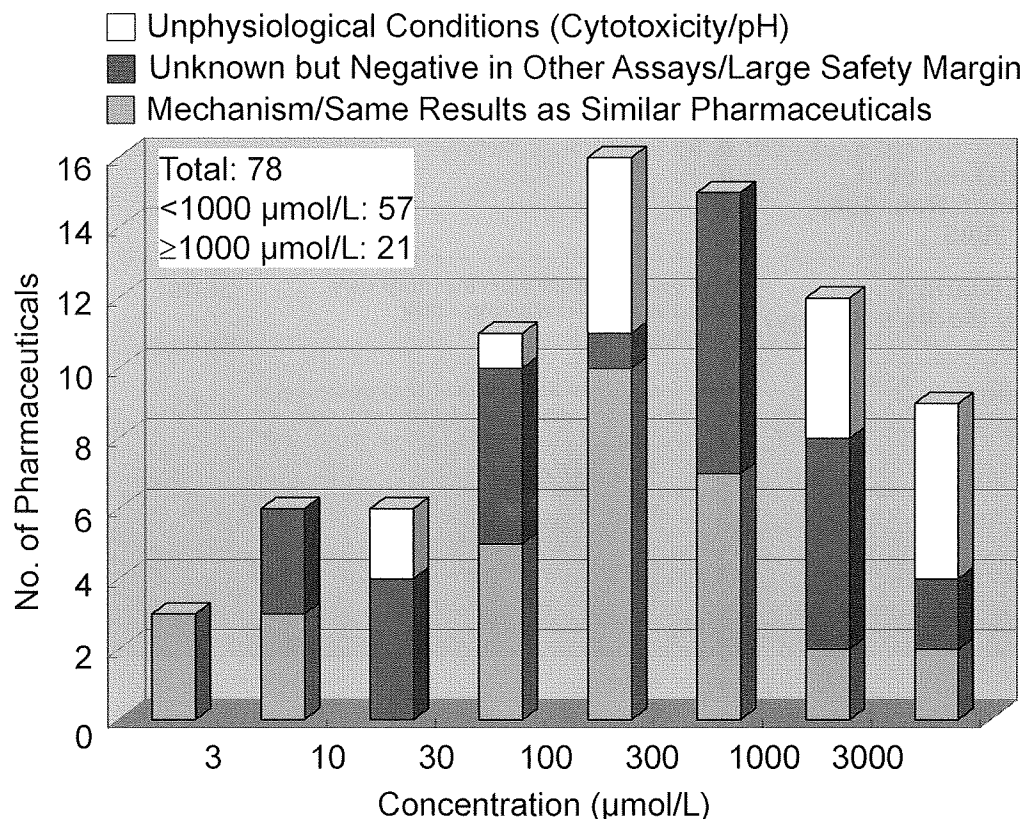
(1) 最高用量の低減化 (医薬品)

1999年から2009年までの11年間に我が国で承認された医薬品は468品目であり、このうち*in vitro*哺乳類細胞を用いた遺伝毒性試験データを持つものは230品目であった。この中で陽性結果を示した78品目の医薬品について陽性反応を示す最低用量について、その分布を検討した (図1)。

78品目中1mM以上の用量で陽性を示したものは21品目であった。この陽性結果が改訂ガイダンスでは陰性と判断される、その割合は27%である。陽性結果の中には(a)遺伝毒性メカニズムが明らかであるものと、(b)遺伝毒性メカニズムが不明だったり、他の遺伝毒性試験では明らかに陰性だったりするもの、もしくは高い細胞毒性や、細胞培養時のpHの変化により非特異的な陽性結果を示すものに分かれる。後者はヒトに対する遺伝毒性、発がんリスクとは無関係であり、偽陽性の原因に成りうる。(b)の割合は1mM未満の最高用量で陽性を示すもので51%、1mM以上では81%を占め、最高用量の低減化により(b)を優先的に陰性と判断できる。

(a)のカテゴリーに属するものは全部で32品目であり、うち4品目(13%)が1mM以上で陽性、(b)

Distribution in Positive Concentrations of Pharmaceuticals in Genotoxicity Assays with Cultured Cells



の категорияに属するものが46品目でうち、17品目 (37%) は 1 mM以上で陽性反応を示した。(a)の категорияに属するものが発がん性に関連し、(b)の categoriaに属するものが発がん性に関連しないと仮定し、最高用量を 1 mMに低減化した場合の現存の *in vitro*染色体異常試験結果のげっ歯類発がん性試験データとの感受性、特異性を推定した (表 1 ; シナリオ 2)。感受性は58%、特異性は65%と計算された。

(2) 最高用量の低減化 (一般化学物質)

1994年から2006年までに我が国でOECDガイドラインに従い、GLP管理の下に *in vitro*染色体異常試験が行われた249化合物を調査した。この中で陽性結果を示すものは113化合物 (45%) であり、この陽性化合物のうち 1 mM以上で陽性を示すものは54化合物 (48%) であった。1 mMに最高用量を低減化することによってこれら化合物は陰性と判定される。

この54化合物が陰性と判断される科学的妥当性、および健康リスクへの影響を検討した。54化合物の

うちエームス試験陽性化合物が14化合物、OECDガイドラインで要求する濃度 (10mM) 以上で試験され、陽性となったものを除くと37化合物であった。37化合物中、20化合物で観察された陽性反応は低pH (5化合物)、高い細胞毒性 (13化合物)、倍数体の誘発 (2化合物) と関連した非特異的陽性反応と判断された。残り17化合物に関しては陰性とすべき合理性は染色体異常試験結果、他の遺伝毒性試験データからは認められなかった。17化合物についてはDEREK、TIMESによって染色体異常誘発性に関するQSARアラートの検索を行った。DEREKでは3化合物、TIMESでは10化合物 (代謝中間体を含む) でアラートが検出された。ただし、これらQSARによる解析はまだ正確性に疑問があり、スクリーニングとしては有用であるが、遺伝毒性の決定的な証拠にはなり得ない。

解析の結果から10mMから 1 mMに低減化することにより113化合物中54化合物 (48%) が陰性と判定された。これら化合物の発がん性もしくは、発がん

Expected Capacity of Chromosome Aberration Test by Changing the Criteria of Top Concentration

		Chrom. Ab.	
Krikland et al., Mutat. Res. 584, 1, 2005	Sens.	65.6	
	Spec.	44.9	
Scenario 1 (by Morita's Survey)	If the positive results more than 1mM were judged as negative regardless their carcinogenicity.	Sens.	34
		Spec.	74
Scenario 2 (by JPMA's Survey)	If the positive results more than 1mM were judged as negative regarding that relevant or un-relevant positive is associated with carcinogenicity or non-carcinogenicity, respectively.	Sens.	58
		Spec.	65

性と関連する遺伝毒性の存在は不明であるため、発がん物質、非発がん物質の全てが同様の割合で陰性と判定された場合の感受性、特異性を推定した（表2；シナリオ1）。感受性は34%、特異性は74%と計算された。

(3) 試験バッテリーでの発がん物質検出能力

現行の遺伝毒性試験バッテリーで利用される試験は主にエームス試験、染色体異常試験、MLA試験、*in vivo*小核試験である。これに改訂ガイドランスでは新たに肝臓でのコメント試験が加わる。エームス試験の感受性は59%、染色体異常試験は現行の試験ガイドランスでは66%であるが、1 mMに最高濃度を変更することにより58%程度になると推測される（シナリオ2）。*in vivo*小核試験では52%、肝臓でのコメント試験は報告によって異なるが、77-89%程度と推測される。

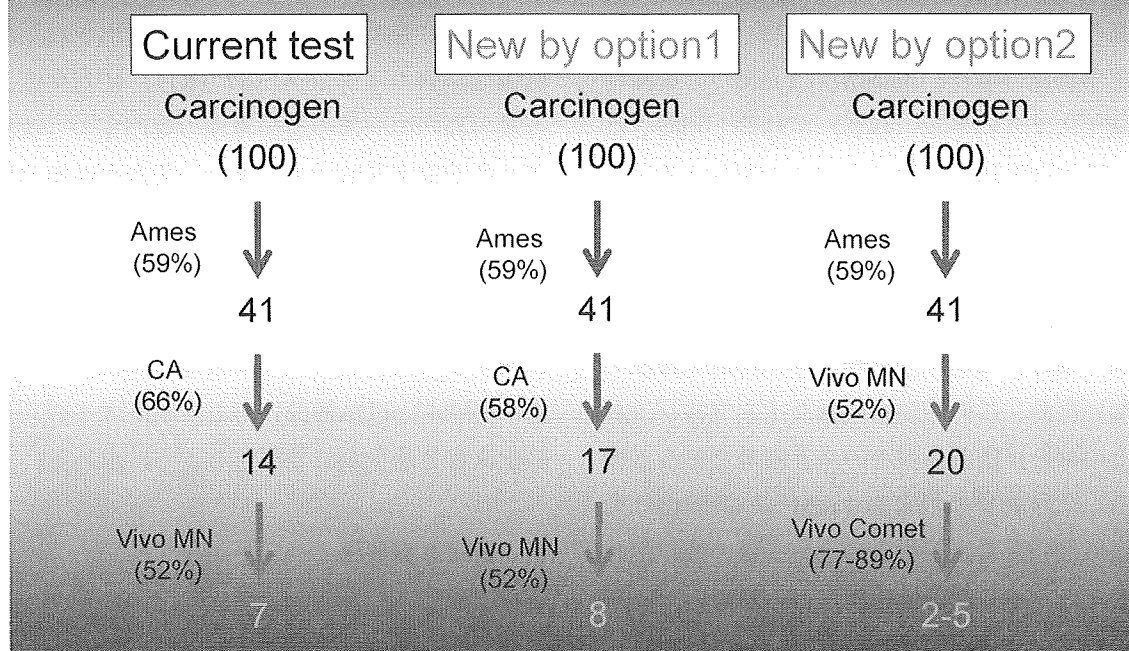
このような感受性を持つ試験で、現行の試験バッテリー、改訂ガイドランスでの試験バッテリーを利用したときの発がん性物質の検出の効率を比較した（図2）。尚、ここではバッテリーではなく、テアーの考えに基づき最終的な感受性を評価した。

現行のガイドランスでの3つの試験（エームス、染色体異常、*in vivo*小核）を行ったとすると、たとえば100化合物の発がん物質を試験した場合、7化合物（7%）が陰性と判断されることになり、発がん物質の検出能力は93%となる。改訂ガイドランスのオプション1（現行と同様のバッテリー）では染色体異常試験の感受性が58%に低下するため、陰性と判断される発がん物質は1%程度増加する（8%）。一方、オプション2を選択した場合それは逆に2~5%程度に減少する。報告ではコメント試験は高い感受性を有するため、発がん性を正しく予測できるのであれば、オプション2は最も感度の高いバッテリー試験になりうる。

D. 考 察

米国行政当局内の遺伝毒性の専門家の数人は、改訂遺伝毒性試験ガイドランスに関して、1) 遺伝毒性を評価する際の*in vitro*試験を含まない試験バッテリーの選択を与えること、2) *In vitro*哺乳類細胞を用いた試験での最高用量を10mMから1 mMまで低減化することが、臨床試験での治験者や、実際の医薬品服用患者の健康を著しく脅かす内容であると主張

The Number of Carcinogens Missed in the Battery Tests



している。本研究ではこれら懸念に対応するため、改訂ガイドラインでのバッテリー試験の発がん可能性物質の検出能力（感受性）を調査、推定した。

過去11年間に我が国で承認された医薬品のうち *in vitro* 哺乳類細胞を用いた遺伝毒性試験（主に染色体異常試験）で陽性を示すものは78品目であり、このうち21品目が1 mM以上でのみ陽性を示すものである。この21品目のうち11品目については発がん性試験が行われており、うち5品目については陽性であった。しかしながらこのうち4品目に関しては発がん性陽性と染色体異常陽性を関連づけるメカニズムは不明であり、結局1品目のみが発がん性と関連し、最高用量を1 mMに低減化した場合に見逃す可能性が考えられた。従ってそれに伴う健康リスクの増加は最小限であると予測される。

また、(a) 遺伝毒性メカニズムが明らかであり、発がん性との相関が考えられると仮定したものと、(b) 遺伝毒性メカニズムが不明で、非特異的な陽性結果を示し、非発がん性と推測されるものに分類し、現在の *in vitro* 染色体異常試験結果のげっ歯類発がん性試験データとの感受性、特異性が1 mMに低減化した場合の値を計算した結果、感受性は58%、特異性

は65%と推定された。この感受性データを基に改訂ガイドラインでの試験バッテリーを利用したときの発がん性物質の検出効率を現行ガイドラインの検出効率と比較した。現行のガイドラインでの3つの試験（エームス、染色体異常、*in vivo* 小核）による発がん物質の検出能力は93%であり、7%の発がん物質は陰性と判断される。改訂ガイドラインのオプション1（現行と同様のバッテリー）では染色体異常試験の感受性が58%に低下するため、陰性と判断される発がん物質は8%程度に増加する。一方、オプション2を選択した場合それは逆に2~5%程度に減少する。コメット試験は高い検出感度を有するための結果である。コメット試験が十分にバリデートされていないために試験バッテリーに組み込むことは早計であるとの指摘もCDERのメンバーからなされている。コメット試験の高い検出感度は *in vivo* での偽陽性を引き起こす原因に成り、新たな問題を引き起こす可能性は否定できない。現在進行中の国際バリデーション試験の推移を見守る必要があると考えられる。しかしながら、現時点ではコメット試験の導入は発がん物質の検出力の低下をもたらすものではないと断言できる。また、オプション2は *in vitro* 試験で陽

性結果が得られた場合に想定されるバッテリーであり、最悪のケースに対応したものである。従って、オプション2の選択は安全性を保証する観点から言えば最高の選択である。

一般化学物質の場合、10mMから1mMへの最高用量の低減化により約半数（48%）が陰性と判断されるため、この改訂は大きなインパクトを与える。しかしながら、1mM以上で陽性を示す化合物のうち、仮に陰性と判断された場合に、明らかにその陰性評価に問題がないケースは約70%と推測される。一般化学物質の場合、発がん性試験、*in vivo*遺伝毒性データがないため、この70%は最低ラインであり、おそらくその割合は医薬品のケースと同等であると推測される。化学物質の場合も1mMへの低減化は大きな問題はないと考えられるが、分子量の低い化合物に関しては、十分な毒性濃度が得られないケースも想定されており、特別な配慮が必要かもしれない。

以上の結果から一部の遺伝毒性の専門家の「改訂ガイダンスが臨床試験での治験者、実際の医薬品服用患者の健康を脅かす内容である」とのと主張の科学的正当性は無いものとする。同様の判断は最近開催されたFDA主催の改訂ICH S2 (R1) の科学的正当性に関するワークショップでもなされた。本ワークショップには、12名の遺伝毒性専門家が改訂ガイダンスにおける論争中の問題に関して彼らの意見を提示するように招待された。これらの専門家は学会、他の政府機関、コンサルタント、および化学産業に属する研究者である。ワークショップの議事録を添付する（添付1）。

ワークショップ後EWGメンバーは以下のことを確認した。1) パネラーのだれも、改訂ガイドラインが臨床試験における治験者、または実際に薬を服用する患者に、新たなリスクを引き起こすとは感じていないこと、2) ハザードの同定からリスク評価への転換は積極的な方向性であるという明確なコンセンサスが得られたこと、3) EWGは、パネラーのコメントに対応するためいくつかの指摘事項についてガイダンスに明記すること。

この見解を基にEWGは、FDA幹部に対して改訂ガイダンスの最終化決定を速やかに是認するように求

める。

E. 結論

2009年6月の横浜のICH会議で提出された改訂遺伝毒性試験ガイダンス (S2 (R1)) に対する、米行政当局内の一部の遺伝毒性の専門家の「改訂ガイダンスが臨床試験での治験者、実際の医薬品服用患者の健康を脅かす内容である」との主張は科学的正当性が無いものと判断する。同様の判断は最近開催されたFDA主催の改訂ICH S2 (R1) の科学的正当性に関するワークショップでもなされた。この見解を基にEWGは、FDA幹部に対して改訂ガイダンスの最終化決定を速やかに是認するように求める。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

本間正充；遺伝毒性物質に閾値はあるのか？ファルマシア 45, 143-148 (2009)

Takashima Y, Sakuraba M, Koizumi T, Sakamoto H, Hayashi M, Honma M.: Dependence of DNA double strand break repair pathways on cell cycle phase in human lymphoblastoid cells. *Environ Mol Mutagen.* 815-822 (2009)

Wang J, Sawyer JR, Chen L, Chen T, Honma M, Mei N, Moore MM.: The mouse lymphoma assay detects recombination, deletion, and aneuploidy. *Toxicol Sci.* 109, 96-105 (2009)

Yatagai, F., Sugawara, K., Enomoto, S., and Honma, M.: An approach to estimation from DSB Repair Efficiency. *J. Radiat. Res.*, 50, 407-413 (2009)

Koyama, N., Yasui, M., Oda, Y., Suzuki, S., Satoh, T., Suzuki, T., Matsuda, T., Masuda, S., Kinoshita, N., Honma, M.: Genotoxicity of acrylamide *in vitro*: Acrylamide is

not metabolically activated in standard *in vitro* systems.
Environ Mol Mutagen. (in press)

2. 学会発表

Honma, M., Kumita, W., and Sakuraba, M.:
Demonstration of ionizing irradiation inducing genomic
instability via breakage–fusion-bridge cycle in human
cells by CGH-microarray.

Keystone symposia “Genome Instability and DNA
Repair (2009.3)

Honma, M., Koyama, N., Kimura, A., Yasui, M., Takami,
S., Takahashi, M., Imai, T., Yamamoto, Y., Kumita, W.,
Masumura, K., Masuda, S., Kinae, N., Matsuda, T., and
Nohmi, T.: Child-adult differences in evaluation of *in
vivo* genotoxicity of acrylamide.

48th Annual Meeting for Society of Toxicology (2009.3)

Kimura, A., Sakamoto, H., Saigo, K., Sukamoto, T., and
Honma, M.: Establishment of simple *in vitro* Comet
Assay Protocol.

48th Annual Meeting for Society of Toxicology (2009.3)

Honma, M.: DNA double strand break repair and
genomic stability.

The 14th Academic Conference of Chinese
Environmental Mutagen Society (2009. 7)

Honma, M.: The new ICH guidance on genotoxicity
The 5th National Congress of Chinese Society of
Toxicology.(2009.8)

Uno, Y., Kojima, H., Honma, M., Tice, R., Corvi, R.,
Schechtman, and Hayashi, M.: *In vivo* Comet assay:
update on going international validation coordinated by
JaCVAM.

10th International Conference on Environmental
Mutagens (2009.8)

Yamamoto, A., sakamoto, Y., Matsumura, K., Honma, M.,

and Nohmi, T.: Combined genotoxic effects of a
methylating agent and radiation on human cells.

10th International Conference on Environmental
Mutagens (2009.8)

Yasui, M., Koyama, N., Koizumi, T., Sakuraba, M.,
Takahashi, Y., Hayashi, M., Sugimoto, K., and Honma,
M.: Life cycle of micronucleus analyzed by confocal live
cell imaging.

10th International Conference on Environmental
Mutagens (2009.8)

Koyama, N., Kimura, A., Yasui, M., Takami, S.,
Takahashi, M., Inoue, K., Yoshida, M., Imai, T.,
Shibutani, M., Suzuki, T., Yamamoto, A., Kumita, W.,
Masumura, K., Horibata, K., Masuda, S., Kinae, N.,
Nohmi, T., and Honma, M.: Child-adult difference in
evaluation of *in vitro* genotoxicity of acrylamide.

10th International Conference on Environmental
Mutagens (2009.8)

Suzuki, T., Kohara, A., Ramadan, A., Kikuchi, Y.,
Honma, M., and Hayashi, M.: Comparative study of *in
vivo* genotoxicity of ochratoxin A and aristolochic acid
as a causative for Balkan endemic nephropathy.

10th International Conference on Environmental
Mutagens (2009.8)

Honma, M., Yamakage, K., Burlingson, B., Escobar, P.,
Pant, K., Kraynak, A., Hayashi, M., Nakajima, M.,
Suzuki, M., Corvi, R., Uno, Y., Schechtman, L., Tice, R.,
and Kojima, H.: International validation study of the *in
vivo* alkaline Comet assay.

10th International Conference on Environmental
Mutagens (2009.8)

Hirose, A., Kamata, T., Yamazaki, T., Sato, K., Yamada,
M., Ono, A., Fukumoto, T., Okamura, H., Mirokuji, Y.,
and Honma, M.: Validation of the (Q)SAR combination
approach for mutagenicity prediction of flavour

chemicals.

10th International Conference on Environmental Mutagens (2009.8)

Honma, M.: The new ICH guidance on genotoxicity International Conference on Environment, Occupational & Lifestyle Concern- Transdisciplinary Approach (2009.9)

鈴木孝昌、小原有弘、小木美恵子、田邊思帆里、本間正充；8番染色体特異的CGHアレイ解析による各種がん細胞株でのc-myc遺伝子増幅形式の解析
第68回日本癌学会学術総会 (200.10)

Honma M, Takashima Y, Sakuraba M, Koizumi T, Sakamoto H, and Hayashi M: DNA double strand break repair pathways and its dependence on cell cycle phases in human lymphoblastoid cells.
Environmental Mutagen society 40th Annual Meeting (2009.10)

本間正充；*In vitro*遺伝毒性試験における最高用量と細胞毒性の評価
日本環境変異原学会第38回大会 (2009.11)

真田尚和、櫻田直美、米澤豊、入山昌美、本間正充；
コルヒチン及び、ビンブラスチンのラット末梢血を用いた小核試験
日本環境変異原学会第38回大会 (2009.11)

小山直己、木村葵、安井学、高見成昭、高橋美和、井上薫、吉田緑、今井俊夫、渋谷淳、鈴木拓也、増村健一、堀端克良、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(週齢)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38回大会 (2009.11)

安井学、小山直己、高島良生、林真、杉本憲治、本間正充；共焦点ライブセルイメージングによって明

らかとなった小核のライフサイクル

日本環境変異原学会第38回大会 (2009.11)

鈴木孝昌、小原有弘、ラマダンアリ、菊池裕、本間正充、林真；バルカン腎症の原因物質としてのアリストロキア酸およびオクラトキシンA
日本環境変異原学会第38回大会 (2009.11)

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、鶴飼明子、島津徹、榎本秀一、堂前直、大西武雄、石岡憲昭；国際宇宙ステーション利用実験：ヒト培養細胞の突然変異解析から宇宙環境の生物影響を解明する試み
日本環境変異原学会第38回大会 (2009.11)

山本歩、本間正充；Unconnectable I-SceIサイトの挿入による放射線損傷様二本鎖DNA切断の修復機構の解析
日本放射線影響学会第52回大会 (2009.11)

安井学、本間正充；8-オキシグアニン1分子のゲノム内における突然変異誘発能の解析系の確立；低線量電離放射線の暴露モデルとして
日本放射線影響学会第52回大会 (2009.11)

本間正充、山影康次、Burlington, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., 林真、中嶋まどか、鈴木雅也、Corvi, R., 宇野芳文、Schechtman, L., Tice, R., 小島肇；*In vitro*アルカリコメットアッセイ国際バリデーション研究
第22回日本動物実験代替法学会総会 (2009.11)

The new paradigm of genotoxicity testing in regulatory science –ICH guideline and IWGT consensus-
The 1st International Symposium on the Drug Safety Evaluation (2009.12)

H. 知的所有権の取得状況
なし

FDA 遺伝毒性ワークショップ (2009年1月25日) と
EWG 非公式会議 (2009年1月26日)
議事録 (VER.1)

By David Jacobson-Kram
和訳 (本間正充)

FDA の CEDER (薬品評価・研究センター) は改訂作業が進んでいる ICH S2 (R1) のガイドラインに対して、ヨーロッパの EMEA と日本の MHLW 共に Step4 (最終的な) でサインオフするべきかを助言を外部に求めるためのワークショップを 1月25日に開催した。ICH 専門家作業部会 (EWG) は、2006年後半に現在のガイドラインの改訂作業を開始した (現行のガイドラインは 1990年代の半ばに公布されたものである)。改訂が進んでいる草稿ガイドラインは、2008年3月に完成して (ステップ2)、パブリックコメントを求めるために公開された。数多くのコメントが内容に反映され (大部分は改訂内容を指示するものであった)、草稿は、さらに改訂を受け、最終的な署名 (ステップ4) までに至った。

ガイダンスにある2つの大きな改正点に関して他の政府機関、他の FDA センター、CEDER 内の遺伝毒性の専門家に懸念が高まった。これを受け、OND 側は、これらの懸念を調査し、解決されるまでガイドラインの決定を遅らせることを決定した。

このために、公共のワークショップが計画され、12名の遺伝子毒性専門家が改訂されたガイダンスにおける論争中の問題に関して彼らの意見を提示するように本ワークショップに招待された。これらの専門家は学会、他の政府機関、コンサルタント、および化学産業に属する研究者である。本ワークショップの焦点は、1) 主として医薬品候補物質の遺伝毒性可能性を評価する際の試験バッテリーの選択をスポンサーに与えることに関する科学的妥当性、および2) *in vitro* 哺乳類細胞を用いた試験での最高用量を 10mM から 1mM まで低減化することを容認するか、である。

ICH EWG のメンバーの感想としては、概して、8人のパネルメンバーが改訂内容を支持しており、2人のメンバーが中立的、2人が改訂案に反対したように見えた。EWG は、翌日、ワークショップの結果について評価を行い、パネルメンバーから指摘された危惧に対処するため、ガイダンスに含むべき内容の明確化について議論を行った。

臨床試験における、患者の安全

ICH S2 ガイダンスの改訂案に反対したグループは、改定されるべきでない理由として、臨床試験での治験者の安全を引き合いに出して、国民の健康に多大な影響を与えることを懸念している。しかしながら、パネルメンバーのだれもこれを問題として取り上げなかった。

概して、改訂に反対するよう見えたパネルの 2 人のメンバーさえ、この点に問題があるとはしなかった。彼らの主な懸念は、安全性の問題ではなく、将来的に価値があるかもしれないデータの喪失にあると思われる。

FDA センターと他の政府機関の中のガイドラインの不調和

改訂に反対するグループは、改訂された ICH ガイドラインは、他の FDA センターや姉妹監督官庁によるガイダンスとの間に不調和を導入すると主張した。しかしながら、このことに関しては規制される製品の本質に基づき、既に明らかな違いが存在していることが指摘された。例えば、CDRH は異なった一連の試験を行うにあたって ISO ガイドラインに従う。また、EPA のテアー1 のバッテリーも ICH とは異なる。In vitro の哺乳類細胞を用いた染色体異常試験は ICH バッテリーに含まれているが、一方、EPA ではさらに培養哺乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験を要求する。

何故、薬は違うのか？

薬は、特定の薬理活性を持ち、特定のタイプの毒性を避けるように設計されている。これは工業用化学薬品と同じではない。生涯において健康を脅かさないように長期の服用のために設計されたすべての薬は、発がん性がないかどうか試験される。ほとんどの新規工業用化学薬品に関しては、発癌性は試験されないし、このような製品の長期にわたる影響は短期試験によって予測しなければならない。

ハザードの同定 VS リスクアセスメント

リスクアセスメントは多段階のプロセスである。最初に、化学物質に関連した健康被害が同定される。例えば、癌、出産障害、肝毒性が挙げられる。2 番目はその化学物質への暴露の定量化である。最後にリスク評価とは、この 2 つが結合し、予想される暴露による国民の健康影響を定量化する。遺伝毒性における初期の ICH ガイダンスはハザードの評価に焦点が置かれていた。しかしながら、この数年間、私たちの焦点はリスク評価に変化している。すなわち、暴露を考慮に入れて、臨床での薬の曝露が健康に何らかの影響を与えるかどうかを明らかにする必要がある。パネルではこの転換を高く支持していた。

最高試験用量

パネルメンバーの大部分が、10mM 試験最高用量の低減化は正当性があると感じていた。しかし、どこまで低減化すべきかに関しては明確なコンセンサスが得られなかった。1 人のパネルメンバーが、低分子量の薬は、最高用量を高く設定すべきと主張した。彼の論点を例証するために引用された例は、46 の分子量のエタノールである。エタノールの 1mM 溶液は 46ug/ml に相当し、これは毒性を検出するのに必要なレベル以下かもしれない。しかしながら、平均的な低分子量薬は約 400 の分子量を持つ。この場合、異常に低分子量の

薬に関しては *in vitro* の試験においてより高濃度の試験を考慮すべきであることをガイダンスの脚注に追加されるべきであろう。

オプション1と2

パネルメンバーの過半数はスポンサーが2つのテストバッテリーオプションを選ぶことを認めるというガイダンスは科学的に正当性があるという意見を述べた。オプション1、これはオリジナルのガイダンスの考え方であるが、非常に高い感度にもかかわらず、低い特異性を持つため、しばしば擬陽性を引き起こす。オプション2は新しい試験バッテリーである。これは「最悪の場合」を想定したアプローチであり、人間のリスクと関連する遺伝毒性物質をより効率的に検出するように思われる。しかしながら、動物モデルが適切ではないような薬の試験や、予想される臨床での暴露量と比較し、動物試験での暴露量がそれと同等もしくはそれ以下であるような場合は、*in vitro* 試験を行うべきであることをガイダンスに明記すべきであろう。

コメント試験

ICH S2の改訂に反対したグループは、オプション2における、試験バッテリーの項目であるコメント試験の導入が時期尚早であることを主張した。これは、コメント試験はまだその有効性が十分に評価されておらず、また、確立された国際的なプロトコルが作成されていないことが理由である。パネルメンバーは、確かにコメント試験の経験が、試験バッテリーの他の試験よりは少ないことを認めた。しかしながら、この試験に関しては膨大な論文が出版されており、多くの業務受託機関が現在、プロトコルを確立して、GLP条件のもとで試験を実施している。また、CDERは、*in vivo* 試験結果があいまいな場合には、コメント試験が結果の解釈の助けになることを認め、その試験を要求し、受け入れている。コメント試験は、薬物代謝を行う *in vitro* のマイクロゾーム S9 ミックスより効果的に肝細胞において試験がなされることが大きな利点である。もし、ある薬が *in vitro* マウスリンフォーマ試験で試験され、「大コロニー」変異体を誘発し、それが染色体異常誘発性を引き起こさないのであれば、コメント試験はフォローアップ試験として不適切であるかも知れないということをガイダンスの脚注に付け加えることが妥当かも知れない。そのような状況では、トランスジェニックマウスを用いた *in vivo* 試験がより適切であるかもしれない。

「3Rs」、reduction、refinement、and replacement

パネルメンバーの中には動物使用を削減するという目標のために改訂ガイダンスがどのように有効化について混乱があるように思えた。EWGメンバーでのフィードバックにおいて、以下の理由により改訂ガイダンスは3Rに貢献できることを明確にした。

1) 改訂ガイドラインでは、陽性対照をあらゆる *in vivo* 試験において通常必要ではないことを明確にする。その代わりに、陽性対照は、その試験機関で行われる試験量に応じて、