

85 純物の許容限度について原薬を評価する際に TTC を適用する場合には、一生涯におけ
86 るがんリスク 10^5 に対応する値を $1.5 \mu\text{g}/\text{日}$ とすることが妥当である。TTC が基づいて
87 ている方法は複数の最悪のケースを想定した単純な線形外挿のため、一般に非常に保守
88 的と見なされている。この外挿では、腫瘍発生率が 50%となる用量 (TD_{50}) から発生
89 率が 10^6 分の 1になる用量を線形外挿するが、 TD_{50} のデータとしては、最も感受性の高
90 い種と最も感受性の高い腫瘍誘発部位に関するデータが使用される (Munro *et al.*
91 1999)。一方、TTC を下回る摂取量であっても著明な発がんリスクを示しうる変異原
92 性の高い物質として、構造的に異なるいくつかのグループが同定されている
93 (Cheeseman *et al.* 1999, Kroes *et al.* 2004)。この高発がん性物質のグループ (「発がん
94 性が懸念される化合物群」) は、アフラトキシン様化合物、N-ニトロソ化合物、アゾ
95 キシ化合物からなる。

96
97 臨床開発において、少数の患者でしか試験が実施されておらず、開発経験が全体として
98 限られている初期開発相では、不純物管理のための戦略と方法は十分構築されていない
99 と予想される。本ガイダンスでは、変異原性不純物の許容限度設定にあたり、その基礎
100 に確立されたリスク評価戦略を据える。許容可能リスクは、開発相については 100 万例
101 あたり約 1 例のがん増加に相当するリスクを設定する。有効性が示された後の開発後期
102 の製剤および市販製剤については、10 万例あたり約 1 例の増加を設定する。これらの
103 リスク水準は、ヒトが一生涯にいずれかのタイプのがんを発症する割合とされる 4 例あ
104 たり 1 例 (要文献) と比較したときの理論上のリスク上昇を表すものである。確立され
105 たがんリスク評価は一生涯の曝露に基づくものである。開発中と市販中のそれより短い
106 曝露期間では、不純物の許容限度を高くしても同等のリスク水準を維持できる。

107
108 1つの不純物に危険性が確認された場合、製造工程の理解および/または分析管理を活
109 用した適切な管理戦略を構築し、変異原性不純物由来がんリスクが許容限度以下となる
110 よう保証しなければならない。

111
112 変異原性を有する不純物が原薬の代謝物である場合も考えられる。その場合は、代謝物
113 としての総曝露量はその不純物の予想される曝露量よりも高い場合は特定の条件を充た
114 していると考え (ICH Q3A/Q3B)。

115 116 117 4. 評価実施を検討する場合

118 119 4.1 新規原薬とその関連製剤の承認申請

120
121 本文書は、新規原薬およびその関連製剤の承認申請についての指針を提供することを目
122 的としている。また、臨床開発中の製剤にも適用される。

123 124 4.2 M7 発行前後に承認された市販薬に関する承認後の変更

承認済みの市販薬に変更を加えた場合、変異原性不純物のリスクの評価が重要となる。このような変更としては、合成工程、処方、臨床適応、患者集団の修正・変更が挙げられる。

・ CMC 上の変更

- 原薬製造工程の変更（工程に関する規制上の記述範囲外への変更など）
 - 製造工程の変更による新たな変異原性不純物の残留があるか否か、既存の変異原性不純物の増加があるか否かについて評価する。これらの変更に関連する申請では、評価の要約と、適切な場合には新たな管理戦略を提出すること。
- 製剤の変更（添加物、組成、製造工程、剤形、配合製剤〔錠剤から注射液またはカプセルへなど〕の変更など）
 - 製剤の変更による新たな変異原性分解物があるか否か、既存の変異原性分解物の増加があるか否かについて評価する。これらの変更に関連する申請では、評価の要約と、適切な場合には新たな管理戦略を提出すること。
 - このような製剤に関連する原薬については、その製造工程に変更がない場合、再評価は不要である。

・ 臨床上的の変更

- 既承認薬に関する臨床投与方法の変更としては、用量、投与頻度、投与期間、投与経路などの変更が考えられる。用量または投与期間が著明に増大・延長し、低濃度の不純物の存在に伴う発がんリスクの上昇が示唆される場合には、再評価を検討する。逆に、治療期間が短縮される場合には再評価の必要はない。投与経路の変更でも再評価は不要である。これは、一生涯におけるがんリスク上昇の評価が非常に保守的な性質のものであり、投与経路にかかわらず低濃度の変異原性不純物に対して一律に適用されることに基づくものである。
- 既承認薬を新規の適応で、または新規の患者集団に対して臨床適用する場合は、その変更の性質によっては再評価が必要である。ヒトへの曝露量の変化がないと仮定すると、生命を脅かす（または衰弱性の）重度の疾患を新たな適応として追加する場合、また当該薬による考えられる便益が低濃度の不純物による発がんリスクを上回ると期待される場合には、再評価は不要である。重篤度の低い長期的な重症疾患を新たな適応として追加する場合など、適応に重大な変更がある場合には、再評価を検討する。新しい適応に伴って投与方法に変更がある場合（高用量での投与、投与期間の延長など）、新たな投与方法についても評価が必要であり、新たな適応についての評価はそれによっても影響を受ける。一生涯におけるがんリスクの上昇

167 が非常に保守的な性質であることから、製剤を使用する患者集団が（小児
168 などに）拡大される場合については、再評価は不要である。

170 4.3 M7 発行以前に承認された製剤の CMC 変更に関する特別な検討

171
172 製造工程の一部を変更した場合、変更のあった工程で生成される不純物についてのみ
173 変異原性不純物由来のリスクを評価する。当該工程で生成される変異原性不純物
174 が変更前より増加するか否か、および当該工程で新たな変異原性不純物が生じるか
175 否かについて評価すればよい。

176
177 新しい原薬供給業者を申請する場合、その供給業者が（既存業者と同じ合成経路
178 で）製造する原薬が、評価者の地域で販売されている既存薬の原薬として既に承認
179 されている場合、それを示すエビデンスがあれば、変異原性不純物のリスク／ベネ
180 フィットの十分なエビデンスと見なされ、M7 に従った評価は不要である。そうで
181 ない場合には、M7 に従った評価が期待される（要注釈？）。

182 183 4.4 変更がない既存の製剤に関する代替検討事項

184
185 本ガイドラインの既存の市販薬への後ろ向き適用は、原則として意図されていない。
186 例外は、規格設定時に検討されなかった不純物の遺伝毒性が試験データから明らか
187 にされた場合である。不純物が「発がん性が懸念される化合物群（cohort of
188 concern）」の構造的種類に属する場合を除き、構造的有害性があるだけでは追及対
189 策を講じるきっかけとして不十分と考えられる。

190 191 4.5 評価が不要の場合

192
193 原薬それ自体が遺伝毒性を有し、臨床での使用でがんリスク上昇が予想される場合、
194 変異原性不純物の存在について詳細な評価は必要ない。これらの条件の下で原薬／
195 製剤中に変異原性不純物の存在が知られている場合、ICH Q3A/B が適用される。

196 197 198 5. 製造工程および製剤中の不純物に関する評価

199
200 製造工程および製剤の変異原性不純物リスク評価で重要な要因の1つは、存在が判明し
201 ている「実際の不純物」と、存在が考えられる「潜在的な不純物」について理解すること
202 である。

203
204 ICH Q3A/Bガイダンスに記載されているように、新規原薬の合成、精製、貯蔵の工程お
205 よび新規製剤の製造、貯蔵の工程中に生じる可能性が高い実際の不純物と、潜在的な不
206 純物について要約すること。

207

208 実際の不純物には、原薬および製剤中に認められるICH Q3A/Q3Bで述べる閾値を超え
209 る不純物を含めることとし、また分解産物を含める。実際の分解産物とは、計画された
210 市販の包装内で、推奨される保存条件で保管した場合に、製品（原薬および製剤）の品
211 質維持期間中にICH Q3A/Q3Bに述べる閾値を超えて認められるものを指す。

212
213 ただし、以下に述べるように、これらの閾値を下回る変異原性不純物や分解物が考えら
214 れるか否かを明らかにすることが重要である。

215
216 潜在的な不純物としては、出発原料、試薬、中間体、出発原料／中間体中で同定された不
217 純物、合理的に予想される反応副生成物が挙げられる。出発原料合成に関する知識、特
218 に、変異原性を有する試薬についての知識は、出発原料中の潜在的な不純物を知る上で重
219 要な要因である。

220
221 原薬および製剤中の潜在的な分解物とは、品質維持期間中に生成すると合理的に予想され
222 る分解物であるが、最終包装原薬または製剤で確認すべき分解物も含まれる。潜在的な
223 分解物には、ICH Q1B に記載された加速安定性試験（例えば、40°C/75%相対湿度で6ヵ
224 月間）や光安定性試験において確認閾値を超える分解物が含まれる。関連する既知の分
225 解経路の知識に基づいて潜在的な分解物を検討する。

226
227 その構造が知られている場合、変異原性の可能性について、実際の不純物および潜在的
228 な不純物すべてを、下記セクション6に従って評価する。

229
230

231 6. ハザード評価

232
233 ハザード評価ではまず、実際の不純物と潜在的な不純物について、構造活性相関（SAR）
234 を用いた包括的な構造ベースの評価を実施する（Dobo *et al.*, 2006; Mueller *et al.*, 2006; 白
235 書文献追加予定。注1）。この構造活性相関評価の焦点は、既存のAmes変異原性のSAR
236 の知識ベースに基づいてAmes変異原性を予測することである。Ames試験による変異原
237 性評価は、構造ベースの懸念の追求のため、発がん性が考えられるDNA反応性物質を
238 不純物として特定する目的で適用できる。

239
240 サルモネラ菌を用いた変異原性試験の結果を予測する*in silico*モデルを用いて、毒性の
241 計算科学的評価を実施する。変異原性の可能性と関連がある構造的な特徴の有無について
242 の化学構造の評価を、広く是認されている利用可能な*in silico*システムを用いて最初に
243 実施することを推奨する。問題の化学構造に構造的有害性が含まれている場合、
244 Muellerらにより発表された分類システム(2006)にしたがってこれを分類すること。

245
246 構造的有害性を含まない化合物については、第2段階のレビューを実施することを推
247 奨する。二次的なレビューは以下の2つのうちのいずれか1つを含むこと。

248

- 249 1) 代替法を用いて有害性が認められないことを保証するため、変異原性予測に関
250 して2回目の*in silico*システムを使用する。このシステムでは、不純物の検討に
251 使用した最初のシステムとは異なるアルゴリズムまたは方法論を使用することを
252 推奨する。

253
254 あるいは

- 255
256 2) Ames試験の変異原性データからその不純物に変異原性がある、あるいはないこ
257 とが暗示される類似化合物について、データベース検索と文献検索を実施する。

258
259 構造ベースの懸念がないことを示すことができれば、不純物に懸念がないと結論できる。
260 変異原性試験に関する措置はそれ以上は不要である。

261
262 構造的有害性が予想される不純物についてさらに追究し、またその過去の使用経験およ
263 び DNA 反応性発がん物質を高い確率で予測できる性質に基づいて変異原性ハザードを
264 特定するのに、Ames 変異原性試験は十分と考えられる。適切に実施された Ames 試験
265 で陰性結果が得られた場合(注 2)、いかなる構造ベースの懸念も否定され、遺伝毒性
266 に関するさらなる評価は必要ない。これらの不純物は ICH Q3A/Q3B に従って、通常の
267 不純物として管理する。Ames 試験で陽性結果が得られた場合、さらにリスクに関する
268 特性解析および/または管理対策を実施する必要がある。構造から有害性が予想された
269 場合の別の選択肢として、Ames 試験を実施する代わりに適切な管理対策を実施するこ
270 ともできる。

271
272 時によって Ames 試験で1つの不純物が陽性と判定される、その濃度を適切な TTC ま
273 で低下させることができない場合がある可能性がある。しかし試験委託者は、遺伝毒性
274 に関して不純物を適格とするため追加試験の実施を望むことができる。ブリッジング試
275 験として役立つ可能性があるので、*in vitro* 小核試験を推奨する。*in vitro* 小核試験で陽
276 性の結果が得られた場合、*in vivo* 骨髄小核試験と肝臓と末梢血リンパ球などの適切な組
277 織を用いたコメント法とを併用した評価を行う。*in vitro* 小核試験で陰性の結果が得ら
278 れた場合、*pig-a* 遺伝子突然変異試験や遺伝子組み換えマウスを用いた突然変異試験な
279 どの *in vivo* 遺伝子突然変異試験を実施する。適切な *in vivo* 試験で陰性の結果が得られ
280 た場合、細菌を用いた突然変異試験で陽性であった不純物を適格とみなすことができ
281 とと思われる。

282 283 7. リスクの特性解析

284 285 化合物ごとのリスク評価

286
287
288 用量反応関係が非線形になるような、あるいは閾値を持つようなメカニズムの存在が認
289 識されてきている。こうしたメカニズムは、非 DNA 標的と相互作用する化合物だけで
290 なく、DNA と反応する化合物でもみられ、それらの DNA 反応性化合物の作用は、

291 DNA との接触前の急速な解毒作用や、損傷の効果的な修復などにより調節されている。
 292 これらの化合物に対しては、最大無作用量 (NOEL) の同定、およびデータがある場合
 293 には、不確実係数の使用に基づいて、規制上の対応を行うことがある。

294
 295 許容限度の導出を目的とした化合物ごとのリスク評価は、十分な発がん性データが存在
 296 する場合に TTC ベースの摂取量の代わりに適用するか、用量反応関係に閾値の存在を
 297 示す十分なエビデンスが認められる化合物について適用する。既知の変異原性発がん物
 298 質については、発がん作用に基づいて線形外挿を行うことにより、化合物ごとの許容限
 299 度を算出できる。閾値に関する十分なエビデンスがある化合物については、ICH Q3C
 300 に従って 1 日許容曝露 (PDE) 限度を算出できる。既知の発がん性化合物に化学的に類
 301 似した不純物については、化学的類似性の根拠と裏付けとなるデータを示すことができ
 302 る場合は、許容限度を化合物ごとにケースバイケースで算出できる (要注釈?)。

303
 304 化合物ごとに算出した許容限度は、短期の使用については、段階的 TTC と同じ比率で
 305 調整することができる。

306 一生涯よりも短い (LTL) 曝露期間

307
 308
 309 TTC ベースの限度を 1.5 $\mu\text{g}/\text{日}$ とすることによって、一生涯にわたって毎日曝露されて
 310 も防護されると考えられる。医薬品中の変異原性不純物に対する曝露期間を LTL 曝露
 311 期間とするため、一生涯の累積許容量 (1.5 $\mu\text{g} \times 25,500$ 日) を LTL 曝露期間における総
 312 曝露日数に均等に分配する (Felter *et al.*, 2011)。これによって変異原性不純物の 1 日
 313 摂取量が曝露が一生涯にわたる場合よりも高くなるが、毎日投与の場合と毎日投与では
 314 ない場合のリスクレベルをほぼ同等に維持できる。

315
 316 この概念を曝露期間が約 6 ヶ月以内の開発初期の医薬品に当てはめる場合、これらの初
 317 期試験には健康に関する利益が得られない健康被験者が含まれることが多いため、がん
 318 のリスクレベルを 10^{-6} とする。また、投与期間を 1 ヶ月未満に短縮する場合、1 日許容
 319 量を保守的に引き下げる用量率補正係数を用いる。開発後期の製剤や市販製剤の場合、
 320 長期間投与 (>10 年) 時のデフォルトの制限を 1.5 $\mu\text{g}/\text{日}$ とする場合と同様、がんのリ
 321 スクレベルを 10^{-5} とすることにより 6 ヶ月を超える曝露期間について TTC 限度を調整
 322 する。次表に市販前および市販後の製剤についての 1 日許容摂取値を示す。開発中の製
 323 剤と市販製剤の 1 日許容摂取値は類似している。結果として利益が生じるので市販製剤
 324 の許容できるリスクはさらに高い可能性があるが、臨床試験の対象集団と比較して市販
 325 製剤の場合は曝露される大規模な、また/あるいは不均質な集団に対して公衆衛生上の
 326 影響が生じるため、より保守的な 1 日許容摂取値を指定する。

327
 328 表 1: 臨床開発

329

投与期 間	≤ 14 日*	≤ 1 ヶ月	> 1 ~ 12 ヶ月	> 1 年**
----------	--------------	-------------	----------------	---------

1日摂取量 [μg/日]	120	120	20	10
-----------------	-----	-----	----	----

330

331 * 遺伝毒性試験バッテリーの Ames 試験で陰性の原薬の場合、14 日間以内の第 I 相
332 臨床試験にはこの限度値を適用しない。

333 ** 第 III 相臨床試験の期間は寿命よりも著しく短いので、上記の表の 1 日摂取量が
334 すべての期間に当てはまる。

335

336 表 2：市販製剤

337

投与期間	≦1カ月	1～12カ月	1～10年	>10年
1日摂取量 [μg/日]	120	20	10	1.5

338

339 例外および自由度

340

- 341 ・ 単官能基ハロゲン化アルキルのような様々な構造的有害性のカテゴリーに関連した
342 発がん作用の差が認められることに基づき、デフォルトの TTC よりも高い化合物の
343 種類ごとに許容限度値を当てはめる（参考文献）。
- 344 ・ その不純物のヒトに対する曝露量が食品などの他のものに由来する曝露量よりもか
345 かなり高い場合、より高い限度値を設けることは当然と考えられる。
- 346 ・ 重症疾患、短余命の場合、または代替治療薬が限られている場合など、ケースバイ
347 ケースで適切な TTC を使用する例外を設けることは妥当である。

348

349 TTC 値を個別の不純物に適用することとし、TTC 値を満たすよう複数の不純物を加算
350 しない。化学的種類が類似の、あるいは異なる複数の不純物を併合した場合の影響の詳
351 細な解析によって、また TTC に保守的な仮定を取り入れること、および変異原性が極
352 めて低い不純物濃度で相乗的な発がん作用が認められる尤度が低いことから、これが裏
353 付けられる（Bercu *et al.*, 2008）。これはレベルが 1.5 μg/日の 3 個以下の不純物だけに
354 当てはまる。寿命よりも短い TTC カテゴリーについては、すべての不純物の合計を指
355 定された限度に対して調整する（表 1、2）。

356

357 上記の指針はすべての投与経路に適用可能であり、一般に、上述の許容限度を投与経路
358 の違いによって修正することは必要ない。ただし、データから特定の投与経路で懸念が
359 生じることが正当化される場合には、それらの懸念についてケースバイケースで評価す
360 る必要がある。上記の指針は、その方法の保守的な性質から、すべての患者集団に適用
361 可能である。

362

363

364 **8. 管理**

365

366 管理戦略とは、最新の製品や製造工程の理解から導かれる製造工程の稼働性能および製
367 品の品質を保証する計画された管理の一式である（ICH Q10）。管理戦略には以下のよ
368 うな事項が含まれるが、これに限らない。

369

370 ・ 材料特性の管理（原料、出発原料、中間体、試薬、一次包装材料など）

371 ・ 製造工程の設計に内在する管理

372 ・ 工程管理（工程検査および工程のパラメータを含む）

373 ・ 原薬および製剤に関する管理（出荷試験など）

374

375 ある不純物が変異原性を有することが判明した場合、原薬および／または製剤中のその
376 不純物の濃度が許容限度を下回ることを保証するための管理戦略の構築が重要となる。
377 適切な管理戦略の構築において基本的に重要なことは、原薬の製造工程および製剤の製
378 造工程で起きる化学について十分な知識を有すること、および原薬と製剤の総合的安定
379 性について理解していることである。

380

381 原薬の管理戦略を構築する方法として、次の4つが考えられる。

382

383 **選択肢1**

384

385 ・ 適切な分析手順を用いて得られた許容限度値あるいはそれよりも低い値を許容基準
386 とする原薬規格における不純物検査を含める。

387

388 **選択肢2**

389

390 ・ 適切な分析手順を用いて、許容限度値あるいはそれよりも低い値を許容基準とする
391 原料、出発原料または中間体の規格、あるいは工程管理としての規格に不純物検査
392 を含める。

393

394 **選択肢3**

395

396 ・ 不純物の最終結果と除去についての理解の裏付けと、追加検査を必要とせずに原薬
397 中濃度が許容限度未満であることを保証する関連した工程管理とを併用した適切な
398 分析法を用いて、許容限度値よりも高い許容基準に基づく原料、出発原料または中
399 間体の規格、あるいは工程管理規格に不純物の検査を含める。

400

401 **選択肢4**

402

403 ・ 工程のパラメータとその残留不純物濃度への影響について理解しており（不純物の
404 最終結果と除去についての知識含む）、原薬中の不純物濃度が許容限度を下回り、
405 不純物についての規格設定を行う必要がないという十分な確信があること。

406
407 分析試験の代わりに工程管理に依存する管理戦略（選択肢4）は、変異原性不純物の濃
408 度に影響を与える化学的現象と工程パラメータについて科学的な理解があり、最終的な
409 原薬または製剤中に不純物が許容限度を超えて残留する危険性が無視できるほど小さい
410 と判断できる場合に適當である。このための科学的なリスク評価／化学的根拠としては、
411 不純物の最終結果や除去に影響を与える様々な要因（化学反応性、溶解性、揮発性、電
412 離性、不純物除去のための物理過程など）の評価が挙げられる。科学的原則に基づいて
413 正当化するだけで十分とは考えられない場合、申請者は分析データを用いてこの方法の
414 裏付けとする（要注釈？）。本製品のライフサイクル全体を通じて、製造工程に関する
415 規制上の記述範囲外の意図された変化あるいは意図されない変化が工程内で発生した場
416 合、検査が必要かどうかについて再評価することが重要である。工程のモニタリングに
417 よって工程の適切性と可能性の継続の保証が向上し、不純物を適切に管理できるよう
418 なる。

419
420 不純物除去に関する化学的議論のみで原薬中に不純物の残留がないことを結論できない
421 場合、この化学的除去に関する議論に加え、中間体／出発原料の規格を併用することも
422 できる（選択肢3）。このように合成過程の早期の段階でモニタリングする場合、不純
423 物の最終結果／除去に関する議論に頑健性があることが示され、製造される製剤の不純
424 物濃度が一貫して許容限度未満に抑えられる限りにおいては、最終的な原薬に求められ
425 る限度より高い限度を設定することができると予想される。除去係数が開発データに基
426 づく場合、スケール依存性またはスケール非依存性が予想されるかどうかを検討するこ
427 とが重要である。この状況下では、原薬の規格におけるこの不純物に関する試験は不要
428 である。

429
430 選択肢3、4が妥当でない場合、中間体／出発原料／原料中（選択肢2）または原薬中
431 （選択肢1）の許容限度の規格に関して不純物の試験を行うことを推奨する。

432
433 変異原性不純物濃度が許容限度より低い場合、「合理的に実行可能な限りできるだけ低
434 い（as low as reasonably practicable; ALARP）」濃度を適用する必要はない。同様に、変
435 異原性不純物濃度が許容限度を超えないための管理が実施されている限り、変異原性不
436 純物の生成を回避する別の合成経路を探求したことを示す必要もない。

437
438 変異原性を有すると判明した潜在的分解物について、分解経路が原薬や製剤の製造工程
439 および／または計画された包装条件や保存条件と関連があるかどうかを明らかにするこ
440 とが重要である。潜在的分解産物の関連性を検討するため、提案された包装内の適切に
441 計画された加速安定性試験（例えば 40°C、75%相対湿度、6 ヶ月以内で熱力学的に等
442 価）と光安定性試験を適切な分析法を用いて実施することが推奨される。

443
444 これらの加速試験の結果に基づき、提案された包装条件下と保存条件下で許容限度に近
445 い濃度の分解物が生じると予想される場合は、分解物の生成を抑制するよう努力すべき
446 である。処方開発および／または水分、光、酸素から保護するよう包装を設計すること
447 によって分解の程度が低下することがしばしばある。このような場合は一般的に、（提

448 案された市販の包装中における) 提案された保存条件下の長期主要安定性試験において
449 原薬または製剤中の分解物のモニタリングが行われる。変異原性分解物の規格を設定す
450 る必要があるかどうかは、一般にこれらの安定性試験の結果によって決まる。

451
452 処方開発や包装のデザインなどを選択しても変異原性分解物の濃度を許容限度未満に抑
453 えることができないと予想される場合、適切な管理戦略の最終的決定のためリスク-ベ
454 ネフィット評価が必要となる。

455
456

457 9. 文書化

458

459 以下の各段階について、本ガイダンスの適用対象に関する情報を記載する。

460

461 CTA (臨床試験)

- 462 ・ 開発早期の段階で適切と考えられる場合、懸念される構造などの (Q) SAR によっ
463 て現在までに検討された構造の種類 (後期中間体など) に関する短い説明を含め、
464 変異原性不純物のリスクを低下させる努力についての高度な要約を示すこと。
- 465 ・ 開発後期の段階では、CTD を遵守した提出に向けた経過を示すことが適切と思われ
466 る。

467

468 CTD (販売承認申請)

- 469 ・ (Q)SAR のため評価した不純物の構造の表、使用した方法および結果と解釈 (分類
470 など) の要約。白書に引用された (Q)SAR の方法論に関する報告。さらに幾分詳細
471 な (Q)SAR の結果を含めることが適切である場合もある。その構造を考慮すると陰
472 性と予測することができない化合物、専門家の知識により予測が変更された場合、
473 また不確かな状況などがこれに含まれる。有害な構造を原薬と共有する Ames 試験
474 陽性と考えられる化合物については、不純物または原薬のいずれかの遺伝毒性を調
475 節できる可能性がある構造的特徴について考察することが有益である。
- 476 ・ 不純物の Ames 試験の結果：実験結果にかかわらず、Ames 試験を実施した場合は正
477 規の試験報告書を提出する。
- 478 ・ 許容限度の正当化の理由と管理戦略

479

480

481 10. 注記

482

483 注 1

484 常に同じ予測が得られる 2 つのモデルを選択することで、いずれか 1 つのモデルだけを
485 使用する場合を上回る価値は得られない。したがって、補足的モデルを選択することが
486 重要である。この場合、1 回のプログラムで陽性の結果を確認できないとしても (偽陰
487 性を生じる)、2 回目のプログラムが真の陽性を予測してそれを補完すると仮定する。
488 エキスパートルールベース・モデルと統計ベース・システムの使用、使用される方法論
489 は定義上異なり、相補性の尤度がより大きい。2 つのエキスパート・システムから予測を

490 得る可能性を排除すべきである。エキスパート・システムでは偽陽性が得られる率が低
491 く、文献ベースの陽性の予測が得られるが陰性の予測が得られず、またある程度適用可
492 能な範囲が得られないため、これは重要である。

493

494 注 2

495 不純物の変異原性の有無を評価するため、ICH S2R ガイドラインと OECD 471 ガイドラ
496 インに従って適切な試験実施計画書を用いて単一の Ames 試験を実施してもよい。この
497 試験は GLP を遵守して実施すべきである。しかし、被験物質の調製や分析では GLP 規
498 制を遵守しなくてもよいことに注意する。GLP を完全に遵守していないことは、必ず
499 しも、臨床試験や販売承認の裏付けにそのデータを使用できないことを意味するもので
500 はない。これらの逸脱を試験報告書に記載すること。Ames 試験の試験菌株の選定は有
501 害物質に対する感受性が証明されている試験菌株に限られる。単離または合成できる分
502 解物については、250 µg/プレートを最高濃度として Ames 試験を実施することができる
503 (参考文献)。

504

505

506

507

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23年度分担研究報告書

重金属不純物に関する毒性学的ならびに薬剤学的研究

研究分担者：四方田千佳子（国立医薬品食品衛生研究所 薬品部）
広瀬 明彦（国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究）

研究要旨

平成22年より、医薬品における金属不純物の規制に関するガイドラインの作成を目的としてQ3Dとして新たなトピックが開始された。平成22年の会議ではQ3Dガイドラインの適用範囲、取り上げるべき金属不純物に関してはほぼ方向性が決まり、平成23年はシンシナティ（6月）、セビア（11月）に於いて、コントロールストラテジーに関する議論と各種金属の毒性評価をほぼ終了し、ステップ2文書の原案として、プレステップ2文章を完成させた。今後、ICH関係者を中心とした内部レビューを行った後に、平成24年6月の福岡会合でステップ2の合意を目指す予定となっている。

キーワード：金属不純物、規制、医薬品

研究協力者

本橋 慧樹（独）医薬品医療機器総合機構
三島 雅之 中外製薬株式会社
植西 祐子 大日本住友製薬株式会社

本研究では、Q3DのEWG活動への積極的な参加を通して、ガイドライン文書を作成するための科学的な知見の収集とQ3D_EWG最新動向の把握を目的とする。

A. 研究目的

医薬品中の金属不純物の規制は、長らく重金属試験法に依存し、限度値としては、検出感度に依存して一律10ppm程度の総量としてきた。しかし、従来の重金属試験法で捉えられる金属は鉛が中心であり、より厳しい規制を必要とする金属の規制には不十分であった。

近年の機器分析法の発達により、承認申請時にはより厳しい個別の金属規格を設定する方向にあった。アメリカ薬局方（USP）の個別金属の規格設定と個別金属試法の設定の提案を受け、国際調和の観点から、個別金属の規制値の設定に関してはICHの場での議論が適当であろうという判断がなされ、2010年6月よりICHのトピックス（Q3D）としてEWGが開始された。

B. 研究方法

平成23年は、2回のICH会議（シンシナティ、セビア）に参加した。シンシナティ会議におけるQ3D_EWGの準備として、厚生労働省審査管理課、医薬品医療機器総合機構、製薬協関連者、国立医薬品食品衛生研究所からなる打ち合わせ会議を開催した。またセビア会議の前には、EWGはコントロールストラテジーと毒性評価に分かれて電話会議が開催され、会議に向けたドラフト案の作成等の作業が行われた。

C. 研究結果／考察

ICH会議における調和の進捗状況を2回の会議の内容を追って以下に記載する。

C-1. シンシナティにおける会議の議論について

1. Q3Dガイドラインのスキープの再検討

前回の福岡会議ではスキープとして、生薬、放射性医薬品、意図的に金属を添加する製剤、臨床試験用製剤は規制対象外としたが、バイテク品は結論に至らなかった。今回の議論では、産業側と規制当局側で意見が割れたが、結果として、バイテク医薬品をスキープから除外しないことを決定した。バイテク原薬に金属混入の可能性が極めて低いが、安全性の観点から除外する理由がなく、バイテク品に特化したコントロールストラテジ事例を追加する方向となった。しかし、従来型ワクチンはQ6Bと同様にスキープから外す。また、大規模臨床試験の場合は、完全に除外というわけにはいかないかもしれない。その他、IPECから添加剤に規制が及ぶことへの懸念が表明されたが、安全性の観点から除外する理由がなく、添加剤をはずすことにはならなかった。

本ガイドラインでは、規制すべき金属を選定し、各金属に対する安全性に基づいた限度値を設定する。なお、本ガイドラインで対象として取り上げる金属不純物とは、金属、半金属元素であり、これらを総じて金属と称する。また、実際の規格試験の実施方法や頻度等についてはQ8、Q9、Q10の概念を管理戦略（Control strategy）の項に盛り込むこととされた。

とりあえず、ICHのQ3Cの残留溶媒のガイドラインを基本フォーマットとしてガイドラインの作成が開始された。

2. 金属の安全性評価ドラフト文書の作成

前回の会議で、Q3Dで取り上げる金属として、①重篤な毒性を有する金属、②中等度の毒性を有する金属、③毒性が低い金属、④リスクアセスメントの結果、考慮する必要がない金属に仮に分類分けをおこない、その結果、前回の会議までに一次ドラフトが作成されたAs、Pb、Hg、Cdの汚染4化学物質に加えて、対象金属を全28種とし、汚染4化学物質の2次ドラフトの作成と残りの毒性アセスメント文書作成を開始した。我が国は、Rh、Ru、Mo、B、Se、を担当して、毒性評価文書をシンシナティ会議前に作成した。シンシナティ会議での評価では、基本的には、日米欧の環境規制など、既に存在する公的規

制値も考慮して、1日許容量（PDE）を決定することが確認された。しかし、PbのPDEについては10倍異なる意見が出ており、調整の難航が予想されたが、それ以外にレビューした15元素では、大きな意見の隔たりは無かった。今後の検討課題としては、データ不足の場合、安全係数が大きく掛かった厳しい数値となった場合のPDEの扱い、吸入に関するPDEの扱いについて、各局の専門家等からの意見を参考に次回までに電話会議等で解決することとなった。

3. コントロールストラテジー

前回の会議では、Q3Dに習ってリスクアセスメントに基づくコントロールストラテジーに関する文書を作成することとなり、シンシナティ会議までにワーキンググループでドラフト案が作成された。シンシナティ会議でそれに基づいた議論が行われ、その結果以下の方針が決定された。①汚染物質としての4金属（Hg、As、Cd、Pb）も含めて、原薬、添加物、原料、試薬、施設等からの混入の可能性について、まずアセスメントを行う。②その場合、一部試験を伴うこともあるし、必要に応じて規格を設定することもある。③以上をすることで、混入する可能性のある金属が、いずれも（試験実施の有無に関わらず）、PDE値に適合することを保証するものである。④これらの管理戦略を、実施例を用いて、よりわかりやすくすることを目標とする。

次回会議までに、バイテク品も含めた実施例等につき、電話会議で議論を継続していくこととなった。

C-2. セビリアにおける会議の議論について

1. 品質チームによる議論

電話会議で作成を進めてきたドラフトを基に、本会議でコントロールストラテジーを完成させると共に、ガイドライン文書全体の見直しを行った。

コントロールストラテジーの概要としては、最新の製品及び製造工程の理解から導かれる、製造プロセスの稼働性能及び製品品質を保証する計画された管理の一式や金属不純物の管理は様々な方法で達成できるとされ、その例は以下のように記すことができることが示された。

- ・原料の管理（原材料、出発物質、中間体、添加剤、反応試薬、一次包装）

- ・製造プロセスのデザインに含まれる管理（精製工程、添加剤の添加順序、製剤処方）
- ・工程管理（工程内試験、工程パラメーター）
- ・原薬の管理
- ・最終製剤の管理

GMP品質システム関連である、ユーティリティ、装置、空気、水、施設由来因子などのリスクアセスメントは通常、規制当局への文書には記載されない。

リスクアセスメントの手法としては、ツール自体をここではガイドラインでは記載しないが、以下の因子は考慮すべきであるとされた。

- ・投与経路に基づく適切なPDEの決定と用量
 - ・金属不純物のソース
 - ・原薬合成に使われる原料（出発物質、触媒、反応試薬、中間体）
 - ・原薬
 - ・添加剤（タイプ、量、起源）
 - ・製造装置-原薬、製剤の製造で使用される容器、ユーティリティー
 - ・環境由来 空気、水
 - ・一次容器包装
 - ・製造段階における金属不純物の除去、減少の可能性
 - ・原薬が化学合成品であるかバイオ製品か
- リスクアセスメントの観点から金属不純物は以下の3種類に分類される。
- ・医薬品製剤に含まれる可能性の無い金属
 - ・医薬品製剤に含まれる可能性があるがGMPにより管理可能な金属
 - ・PDEと比較した評価が必要な金属

上記の分類過程に従って、必要な場合は、PDEを基に各種製剤（原料）における濃度限度値を設定するオプションは3種類用意された。

ライフサイクルマネージメントして、金属不純物含量に影響を与えるような変更が合成経路、添加剤の供給元、原料、工程、装置等に行われた場合には、金属不純物の再評価を行わなければならないとされた。

さらに、申請書には金属不純物のコントロールストラテジーの記載が推奨されることが付け加えられ

た。

2. 金属の安全性評価方針

基本的に、このガイドラインで取り上げられた金属は、科学雑誌に掲載されたデータ、政府機関による研究レポート、国際的な規制値やガイドライン、規制当局による研究や評価レポート等を基に評価されている。PDEの基本的な計算手法はQ3Cに倣うこととした。一部の金属オスミウム、ロジウム、ルテニウム、イリジウムはデータが不十分であったため、プラチナ類似物としてリストした。人に対するリスクが低い金属（Fe、Zn、K、Ca、Na、Mn、Mg）にはPDEを設定しなかったが、GMPや他の品質要求として管理されるべきであるとした。最も低いPDEはTTCである1.5 μ g/gを用いている。金属によっては、酸化の価数等が異なる金属種が存在するが、このガイドラインでは、製剤中に存在する可能性のあるものについてPDEを設定した。また、一つ以上の存在の可能性がある場合には、より毒性の高い種についてのPDEを設定した。PDEの評価は、毒性情報が投与経路と同じである場合を基本として算定するが、評価に十分なデータがない場合には、以下の様に算定した。

注射による暴露の場合、経口でのPDEに対して以下の計数を適用した。

- ・経口での生物学的利用能<50% 10で除する
- ・経口での生物学的利用能50%~90% 2で除する
- ・経口での生物学的利用能>90% 係数は1

また、吸入暴露に関する情報はTLV/TWAから換算してPDEを算定するが、情報が不十分な場合は、経口のPDEに係数100を適用して算出することとした。

さらに、特殊な場合にはより高いPDE値が許容可能であるとして、以下の様な例が示されることとなった

- ・一日用量が低い
- ・暴露期間が短い
- ・適応症（生命の危機に関わる場合）

しかし、PDE値を高くする妥当性は、ケースバイケースで示す必要があるとされた。

3. 今後の予定

セビリア会議で完成したQ3Dプレステップ2文書

は、ICHに関わる関係者に限定的に公開し、得られたコメントを活用する。得られたコメントを参考に、2012年5月までに、Q3Dプレステップ2文書の修正を行い、2012年6月のICH福岡会議でステップ2の合意を目指すこととされた。

D. 結論／まとめ

平成22年度に調和を開始した金属不純物のガイドラインは、品質チームと安全性評価チームによる効率的で集中した各局専門家の共同作業のおかげで、短期間でQ3Dプレステップ2文書を完成することができたと考えられる。今後、関係者による内部レビューとそれに対応した改訂を経て、次回福岡会議でステップ2文書が合意される予定となっている。

E. 添付資料

MHLW/JPMA担当物質評価文書案long version (Hg、B、Mo、Rh、Ru、Se)

F. 健康危険情報

該当する情報なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 知的所有権の取得状況
 2. 実用新案登録
- なし

MERCURY (Hg)

Introduction

Mercury is a representative element widely existing in the global environment. Organic forms of Hg are recognized as highly toxic to human, which would usually prevent production of therapeutics from using organic Hg. The 72nd meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) assumed that the predominant form of mercury in foods other than fish and shellfish is inorganic mercury. Although data on speciation of inorganic mercury in foods are limited, the Committee decided that the toxicological database for mercury(II) chloride was relevant for assessing the health risk of foodborne inorganic mercury. Similarly, the working group of Q3D assumed the predominant form of mercury in medical products present as a contaminant is inorganic. The assessment here covers inorganic mercury only that may be present in pharmaceuticals as contaminants.

Dietary intake

As for on the occurrence of mercury in different food commodities, the total mercury levels in foods other than fish products were generally low range (min-max 0.0001–0.050 mg Hg/kg), although the total mercury levels in fish samples ranged from 0.001 to 11.4 mg Hg/kg. The proportion of total mercury contributed by methylmercury generally ranged between 30% and 100%, depending on species of fish, size, age and diet. Furthermore, in about 80% of these data, methylmercury accounted for more than 80% of total mercury.

Most of the available dietary exposure assessments for mercury were from national and published Total Diet Studies (TDS) report. Estimated mean dietary exposure to total mercury ranged from 0.07 to 5.81 µg/kg bw per week, while the estimated mean dietary exposure to total mercury from fish and shellfish ranged from 0.07 to 1.75 µg/kg bw per week. The estimated mean dietary exposure to total mercury from foods other than fish and shellfish ranged from <0.01 to 4.06 µg/kg bw per week. The upper limit of that range corresponds to a subpopulation of children. When only total population or subpopulations of adults were considered, the estimated mean dietary exposure to total mercury from foods other than fish and shellfish ranged from <0.01 to 1.01 µg/kg bw per week.

Based on the above analysis, the 72nd JECFA meeting evaluated that the upper limits of estimates of average dietary exposure to total mercury from foods other than fish and shellfish were 1 µg/kg bw per week and 4 µg/kg bw per week for adults and children, respectively. Data for dietary intake of inorganic mercury are not available.

Toxicological data

Kinetics

Absorption via the lungs is low, probably due to deposition of particles in the upper respiratory system and subsequent clearance by the mucociliary escalator (Friberg & Nordberg, 1973).

Compared with elemental mercury, the amount of inorganic divalent mercury that crosses the blood–brain and placental barriers is much lower, because of poor lipid solubility (Clarkson, 1989; Inouye & Kajiwara, 1990). In contrast, the liver and kidneys accumulate inorganic mercury readily (Yeoh et al., 1986, 1989; Nielsen & Andersen, 1990). Sin et al. (1983) found the kidney to have the highest mercury levels following repeated oral exposure of mice to mercuric chloride (4–5 mg mercury/kg body weight) for 2–8 weeks (IPCS 2003).

The available evidence indicates that the metabolism of all forms of inorganic mercury is similar for humans and laboratory mammals. Once absorbed, elemental and inorganic mercury enter an oxidation–reduction cycle. Elemental mercury is oxidized to the divalent inorganic cation in the red blood cells and lungs. Evidence from animal studies suggests the liver as an additional site of oxidation. Absorbed divalent cation from exposure to mercuric mercury compounds can, in turn, be reduced to the metallic or monovalent form and released as exhaled elemental mercury vapour (ATSDR, 1999).

Elimination of mercury occurs primarily through the urine and faeces, with the expired air, sweat, and saliva contributing to a much lesser extent (IPCS 2003). Available information suggests that excretory routes for both metallic mercury and inorganic mercury compounds is similar in humans and experimental animals (ATSDR, 1999). Overall estimates of inorganic mercury half lives in both experimental animals and humans range from 1–2 months (IPCS 2003; Holmes et al., 2009).

Acute toxicity

Oral LD50s of inorganic mercury compounds ranged from 25 to 205 mg Hg/kg in rats and from 25 to 180 mg Hg/kg in mice (reviewed in Von Burg 1995). From HgCl₂, LD50s in rats were from 25.9 to 77.7 mg Hg/kg (Kostial 1978). Single oral dose of 7.4 or 9.2 mg Hg/kg of HgCl₂ caused various toxic effects including haematopoietic and renal effects in rats (IPCS 2003).

Sub-acute toxicity

HgCl₂ was administrated for 12 days at doses of 0, 1.25, 2.5, 5, 10, or 20 mg/kg/day to F344 rats (five animals/dose/sex) and 0, 5, 10, 20, 40, or 80 mg/kg/day to B6C3F1 mice (five animals/dose/sex) for 12 days (during the administration period of 16 days for rats and 14 days for mice). Two male rats in the 20 mg/kg group died in the first week, as did all male and four female mice from the 80 mg/kg group and one male mouse from the 40 mg/kg group. Kidney weights were increased at 2.5 mg/kg or greater doses in rats and all dose groups in mice. The mean mercury concentrations observed in the rat received 20 mg/kg were respectively 45.5 and 43.4 ppm in male and female kidney, 5.7 and 4.4 ppm in liver and less than 0.5 ppm in brain tissues. Chemical-related lesions

included renal tubule necrosis, inflammation and necrosis of the forestomach, and necrosis of the glandular stomach (NTP 1993).

Wistar rats (five animals/dose/sex) were exposed to the diet including mercuric chloride of 0, 75, 150, 300ppm for 4 weeks. The administration doses were corresponding to 0, 3.7, 7.4, 14.8 mg Hg/kg/day for male and 0, 4.1, 8.2, 16.4 mg Hg/kg/day for female. The increased relative weights, nephrosis and protein cast in kidney were observed at all dose groups in both sexes. The serum levels of AST and ALP were increased at dose of 300ppm in both sexes. Nephrose and urinary protein cast were observed in all the dose groups (Jonker 1993).

Sub-chronic toxicity

B6C3F1 mice (10 animals/sex/group) were administered with HgCl₂ by gavage at doses of 0.93, 1.9, 3.7, 7.4, 14.8 mg Hg/kg bw/day (adjusted by 5 days / week) for 6 months. In male mice, the body weights were decreased at dose of 14.8 mg/kg bw/day, and the absolute and relative kidney weights were increased at dose of more than 3.7 mg Hg/kg bw/day, and more than 7.4 mg Hg/kg bw/day, respectively. The kidney weight changes corresponded to an increased incidence of cytoplasmic vacuolation of renal tubule epithelium in male mice administered with at least 3.7 mg Hg/kg bw/day. In female mice, no histopathologic changes in the kidneys were observed. A NOAEL of this study was considered to be 1.9 mg Hg/kg bw/day (NTP 1993).

Fischer rats (10 animals/sex/group) were administered with HgCl₂ by gavage at doses of 0.23, 0.46, 0.92, 1.9 or 3.7 mg Hg/kg bw/day (adjusted by 5 days / week) for 6 months. The body weights were decreased at the dose of 3.7 mg Hg/kg bw/day in male rats, and at the doses of more than 0.46 mg Hg/kg bw/day in female rats. The absolute and relative kidney weights were significantly increased at dose of more than 0.46 mg Hg/kg bw/day in both sexes. The incidence of nephropathy (tubular regeneration, thickened tubular basement membrane, diluted tubules with hyaline casts) was 80% in the control male rats, and 100% in all treated male rats groups. The severities of the nephropathy were relatively greater at doses of more than 0.92 mg Hg/kg bw/day. In females, the incidence of nephropathy was increased at only the highest dose group. No treatment-related effects were observed in the other organs. A NOAEL of this study was considered to be 0.23 mg Hg/kg bw/day (0.20 mg Hg/kg bw/day) (NTP 1993).

Reproductive and developmental toxicity

Male mice received oral exposure to 0.25, 0.5 and 1 mg/kg/day of HgCl₂ for pre-mating 40 days, a spermatogenesis cycle, were mated with females gavaged with the same doses for pre-mating 16 days, a oogenesis cycle, and exposure was continued during the mating 21 days. The female mice were subsequently exposed to the compound to the end of lactation. The exposure caused decrease in fertility and live birth index in all the dose groups (Khan 2004).

Male mice received 4 ppm HgCl₂ in drinking water (estimated as 0.65 mg/kg/day) for 12 weeks showed decrease in relative testis weight and epididymal sperm numbers (Orisakwe 2001). When HgCl₂ was administrated to male mice at a dose of 1.25 mg/kg/day for 45 days, sperm motility, sperm count and viable sperm percentage were significantly decreased and mating ratio with non

treated females was 0 % in the treated mice whereas that of control mice was 92.5 % (Rao and Sharma 2001).

A single iv injection of 0.5 – 2.5 mg Hg/kg HgCl₂ was given to female mice on the first day of gestation. Dose of 1.5 mg Hg/kg caused significant increase in abnormal preimplantation embryos while those in 0.5 and 1.0 mg Hg/kg groups were similar to the control group (Kajiwara and Inouye 1986).

Genotoxicity

HgCl₂ was negative in Ames test with four Salmonella typhimurium tester strains, TA98, TA100, TA1535 and TA1537 both in the presence and absence of rat liver S9 (NTP database). HgCl₂ induced positive response in mouse lymphoma TK assay without metabolic activation. No statistically significant increase in mutation frequency was seen at 0.2 ug/mL or lower treatment concentrations in the TK assay (NTP database). HgCl₂ caused chromosomal aberrations in CHO cells at 6.03 ug/mL for 20.8 hours and 7.95 ug/mL for 10.7 hours treatments while the assay with metabolic activation resulted in negative (NTP database). When human lymphocytes were treated with 2, 5, 10, 20 uM of HgCl₂ in vitro, chromosomal aberrations and/or micronuclei were increased at 10 uM (2.7 ug/mL) and 20 uM (5.4 ug/mL) (Ogura 1996). HgCl₂ was also positive in mice bone marrow chromosomal aberration test with a single oral dose of 3, 6 or 12 mg/kg (Ghosh 1991).

Mercury compounds may involve both direct and indirect mode of genotoxic action such as free radicals, oxidative stress, microtubule dysfunction and inhibition of DNA repair systems (reviewed in Crespo-Lopez 2009). Although indirect mechanisms were suggested in biological assays, direct interaction with DNA was reported under a nonphysiologic condition using isolated DNA only.

Chronic study/Carcinogenicity

The 2-year NTP (1993) bioassays in rats and mice were considered to be relevant and appropriate for assessing carcinogenic and long-term effects of mercuric chloride at the WHO evaluation (CICAD, 2003). Mercuric chloride was classified as group 3 (not classifiable as carcinogenic to humans) by IARC, based on limited evidence in experimental animals.

B6C3F1 mice (60 animals/sex/group) were administered with HgCl₂ by gavage at doses of 0, 3.7 and 7.4 mg bw/day (adjusted by 5 days / week) for 104 weeks. The survival rate in the control, low- and high-dose groups was, respectively, 72, 72 and 62% for males, and 82, 70 and 62% for females. Although the incidences of nephropathy in male rats were commonly higher (80-90%) in all groups, the severity increased as the dosage increased. The incidence of nephropathy in female rats increased significantly in two treatment groups comparing to the control group. The incidences of renal tubular hyperplasia were 1/50, 0/50 and 2/49, and the combined incidences of renal tubular adenomas and adenocarcinomas were 0/50, 0/50 and 3/49 in control, low- and high-dose males, respectively. These observations were considered to be important and equivocal evidences of carcinogenic activity in male mice, because renal tubular hyperplasia and tumours in mice are rare.

Fischer 344 rats (60 animals/sex/group) were administered with HgCl₂ by gavage at doses of 0, 1.9 and 3.7 mg bw/day (adjusted by 5 days / week) for 104 weeks. Survival rate in control, low-, and

high-dose group was respectively, 43, 17, 8% in males, and 58, 47, 50% in females. The nephropathy was observed at the almost males in all groups including control, and the severities of the nephropathy in treatment groups were gradually greater in doses dependent manner. The incidence of renal tubular hyperplasia was significantly increased in male at the high dose group, but no significant increased incidence of the hyperplasia were observed in female. The incidence of papillary hyperplasia of the stratified squamous epithelium lining of the forestomach was significantly increased in all treatment males (3/49, 16/50 and 35/50 in control, low and high-dose males, respectively) and in high-dose females (5/50, 5/49 and 20/50 in control, low- and high-dose females, respectively). The incidence of forestomach squamous cell papillomas in the control, low- and high dose groups was respectively 0/50, 3/50 and 12/50 in males , and 0/50, 0/49 and 2/50 in females. A significant positive trend of the incidence of thyroid follicular cell carcinomas (1/50, 2/50 and 6/50 in control, low- and high-dose groups, respectively) in male was indicated , although the combined incidence of thyroid follicular cell neoplasms (adenoma and/or carcinoma) was not significantly increased. The assessment of carcinogenic potential from the results of this study was considered to be limited, because high mortality in both groups of treated males indicates that the Maximum Tolerated Dose (MTD) was exceeded in these groups. The forestomach tumours were considered to be of limited relevance to humans because of structural considerations, and the relevance of the thyroid carcinomas was also questioned because these neoplasms are usually seen in conjunction with increased incidences of hyperplasia and adenomas which were not observed in this study (IRIS, 1995).

Immunotoxicity

Low level exposure to HgCl₂ showed suppressive activities against both T-cell and B-cell activation in vitro (Shenker 1992, Daum 1993). BALB/c mice were exposed to HgCl₂ containing drinking water of 0.3, 1.5, 7.5 or 37.5 Hg ppm for 14 days. Decrease in T-cell populations in immune organs and altered inflammatory cytokine production or expression of MHC II were observed in 1.5 Hg ppm (0.31 mg Hg/kg) and higher doses NOEL was indicated as 0.3 Hg ppm (0.06 mg Hg/kg/day) (Kim 2003).

Neurotoxicity

Rats exposed to HgCl₂ at a dose of 0.74 mg Hg/kg/day for up to 11 weeks showed severe ataxia and sensory loss. Dietary exposure of rats to 2.2 mg mercury/kg body weight per day as mercuric chloride for 3 months resulted in inactivity and abnormal gait (CIACD 2003).

Epidemiology in humans

Many reports of acute poisonings in both adults and children after various exposure scenarios have been published (ATSDR, 1999). Only a limited number of reports that have information on the dose or exposure levels are available (IPCS 2003). Although the lethal dose is uncertain, the intentional ingestion cases suggest a range of 10 mg Hg/kg to more than 50 mg Hg/kg. As acute symptom, corrosive gastroenteritis, oropharyngeal burns, nausea, hematemesis, severe abdominal pain, anemia, liver enzyme elevations, gingivitis, hematochezia, acute tubular necrosis and