

医薬品のための遺伝毒性試験の特定項目に関するガイダンスについて

(平成8年7月2日 薬審第444号
各都道府県衛生主管部(局)長あて 厚生省薬務局審査課長通知)

医薬品の製造(輸入)承認申請に際し添付すべき資料のうち、毒性に関する資料については、平成元年9月11日薬審1第24号厚生省薬務局審査第一課長・審査第二課長・生物製剤課長通知別添「医薬品毒性試験法ガイドライン」及び平成6年7月7日薬審第470号通知別添「生殖毒性検索のための試験法ガイドライン」により取り扱っているところであるが、このうち、変異原性試験に関して、別添のとおり「医薬品のための遺伝毒性試験の特定項目に関するガイダンス」を定めたので、下記事項を御了知の上、貴管下医薬品製造(輸入販売)業者に対する周知方よろしく願いたい。

記

1. 背景

近年、優れた医薬品の国際的な研究開発の促進及び患者への迅速な提供を図るため、承認審査資料の国際的なハーモナイゼーション推進の必要性が指摘されている。このような要請に応えるため、日・米・EU三極医薬品規制ハーモナイゼーション国際会議(ICH)が組織され、品質、安全性、有効性及び規制情報の4分野でハーモナイゼーションの促進を図るための活動が行われている。今回の「医薬品のための遺伝毒性試験の特定項目に関するガイダンス」(以下「ICHガイダンス」という。)の制定は、三極の合意に基づき行われるものである。

2. ICHガイダンスの要点

標記ガイダンスは、日・米・EUのそれぞれの遺伝毒性試験に関するガイドラインの主要な相違点を取り上げ、現在の科学技術水準を考慮して相互に受け入れ可能な基準として作成されたものである。従って、平成元年9月11日薬審1第24号厚生省薬務局審査第一課長・審査第二課長・生物製剤課長通知別添「医薬品毒性試験法ガイドライン」のうち「変異原性試験」(以下「現行ガイドライン」という。)については、ICHガイダンスに該当項目がある場合にはその指摘に基づいて試験を実施し、それ以外の項目については現行ガイドラインに従って実施すればよい。

ICHガイダンスと現行ガイドラインとの主な相違点は次のとおりである。

- (1) 細菌を用いる復帰突然変異試験においては、用いる試験菌株をサルモネラ菌 TA98, TA100, TA1535の3菌株に加えて、TA1537またはTA97またはTA97aのうちの1菌株、およびTA102または大腸菌 WP 2 uvrA (pKM101)のうちの1菌株、の合計5菌株とした。
- (2) *In vitro* 試験における最高用量は、現行ガイドライン及びその解説に示されている内容に従って設定された場合は、基本的にICHガイダンスに適合するものであるが、難溶性物質の場合で細胞毒性が全く観察されない場合には、最高用量は沈澱が析出する最低濃度としてよい。
- (3) *In vivo* で染色体異常を検出するためには、現行ガイドラインに示されたげっ菌類による小核試験を実施することで問題はないが、マウスを用いる場合には末梢血を用いた試験も骨髄小核試験と同様に受け入れることができる。また、用いる動物の性は現行ガイドラインに示されているように特段性差に問題がない場合には雄のみでよい。
- (4) げっ菌類を用いる小核試験の結果が陰性となった場合には、幼若赤血球の割合の減少、血中もしくは血漿中の被検物質の測定などによって、被検物質が標的臓器に到達していることを確認する。

3. ガイダンスの取扱い

- (1) この通知の施行の日より、ICHガイダンスに該当項目がある場合にはその指摘に基づいて実施された試験による資料を医薬品の製造(輸入)承認申請に際し添付すべき毒性試験に関する資料とすることができる。
- (2) 現行ガイドラインに基づいて実施された試験による資料は、当分の間、引き続き、医薬品の製造(輸入)承認申請に際し添付すべき毒性試験に関する資料とすることができる。

4. その他

今後、現行ガイドラインを改正し、ICHガイダンスとの整合を図る予定である。

医薬品のための遺伝毒性試験の特定項目に関するガイダンス

1. 緒言

医薬品のための遺伝毒性試験ガイドラインは、EC (EEC, 1987) および日本 (厚生省, 1989) では既に制定されている。FDA の Centers for Drug and Biologics Evaluation and Research (CDER and CBER) では、FDA Center for Food Safety and Applied Nutrition が発表した遺伝毒性試験のガイダンス (Federal Register notice, 1993年 3月 29日付け) を医薬品に適用することを検討中である。

このガイダンスは、米国、EU および日本の現行ガイドラインに共通して適用されるべきものである。作成に当たっては、国際的製薬業界、日米欧の行政官庁ならびに科学論文などに蓄積された情報を考慮した。さらに、最新の OECD ガイドライン (OECD, 1994) や1993年に開催された「遺伝毒性試験法の標準化に関する国際ワークショップ」(Mutation Research, No. 312⁽³⁾, 1994) の勧告についても考慮している。

2. 特定項目に関するガイダンスおよび勧告

2.1 *In vitro* 試験の特定項目に関するガイダンス

2.1.1 細菌による突然変異試験に用いる菌株の基本セット

最近のガイドラインでは、塩基対置換およびフレームシフト点突然変異を検出するための細菌による変異原性試験には、複数の菌株を用いることが要求されている。ガイドラインに記載されている *Salmonella typhimurium* の菌株 (通常は TA1535, TA1537, TA98ならびに TA100) では、標的となっているヒスチジン遺伝子中の G-C (guanine-cytosine) 部位の変化が検出できる。ある種の変異原性を有する発がん物質は、A-T (adenine-thymine) 塩基対も修飾することが文献から明らかにされている。そのため、細菌を用いる変異原性試験に使用される菌株の標準的なセットには、A-T 部位で点突然変異を検出できる菌株を含むべきである。例えば、マルチコピープラスミドの *hisG* 遺伝子中の A-T 部位の変異が検出できる *Salmonella typhimurium* TA102 株や、*trpE* 遺伝子において A-T 部位の変異を検出できる *Escherichia coli* WP 2 *uvrA* 株あるいは誤りがち修復を増大させる *mucAB* 遺伝子を持つ pKM101 プラスミドを導入した *Escherichia coli* WP 2 *uvrA* (pKM101) 株がそれに該当する (注 1)。結論として、次の菌株の基本セットをルーチンの試験で使用すべきである：なお、他に明記しない限り下記の菌株は全て *Salmonella typhimurium* である。

1. TA98 :
2. TA100 :
3. TA1535 :
4. TA1537または TA97または TA97a (注 2) :
5. TA102 または *Escherichia coli* WP 2 *uvrA* または *Escherichia coli* WP 2 *uvrA* (pKM101)。

DNA とクロスリンクする化合物を検出するためには、*Salmonella typhimurium* TA102株を選択するか、あるいは DNA 修復能を有する *Escherichia coli* WP 2 (pKM101) 株を追加することが望ましい。ただし、そのような化合物は染色体損傷を測定する試験でも検出可能であることを付け加えておく。

2.1.2 *In vitro* 試験における最高用量の定義

2.1.2.1 毒性を示さない化合物の最高用量

溶解性が良くかつ毒性を示さない化合物の処理濃度の上限は、細菌では 5 mg/plate, 哺乳類細胞では 5 mg/ml または 10mM (いずれか低い方) とする。

2.1.2.2 必要な細胞毒性のレベル

遺伝毒性を有する発がん物質のいくつかは、ある程度細胞毒性を誘発するような濃度で試験しない限りは、*in vitro* 遺伝毒性試験では検出できない。一方、過剰な毒性により、該当する遺伝的指標の適切な評価がしばしばできなくなることも明らかである。確かに、哺乳類細胞では生存率が極めて低い場合、遺伝毒性作用以外のメカニズムにより、遺伝毒性ではなく細胞毒性に関連した '陽性' 結果が得られることがある (例えば、アポトーシスと関連した事象、ライソゾームからのエンドヌクレアーゼの放出など)。このような現象は、毒性物質のある特定濃度閾値に達したときに初めて現れる傾向にある。

このような矛盾を解決するため、最近では細菌および哺乳類細胞を用いる *in vitro* 試験には、細胞毒性のレベルに関し次のような考え方が受け入れられている (2.1.2.1 で規定した濃度を越えない)：

- i) 細菌を用いる復帰突然変異試験では、試験物質の最高濃度は明かな毒性を示すことが望ましい。毒性は、復帰変異コロニー数の減少、background lawn の減少や透明化によって検出できる。
- ii) 株細胞を用いる *in vitro* 細胞遺伝学的試験のために必要な細胞毒性のレベルは、細胞数または単層培養密度の50%以上の抑制と定義される。培養リンパ球では50%以上の分裂指数の抑制があれば十分である。
- iii) 哺乳類細胞を用いる突然変異試験では、理想的に最高濃度は少なくとも80%の毒性 (20%以下の生存率) を示すべきである。毒性は、処理直後のコロニー形成率 (cloning efficiency) からでも、相対増殖率 (relative total growth) からでも算出できる。相対増殖率は、発現期間中の相対浮遊細胞増殖率 (relative suspension growth) と突然変異を選抜する際の相対プレート効率 (relative plating efficiency) から算出される。10% 以下の生存率で得られた陽性結果には注意を払う必要がある。

2.1.2.3 難溶性化合物に対する試験

細菌および哺乳類細胞を用いる遺伝毒性試験では、用量相関性のある遺伝毒性作用が、化合物が不溶の濃度範囲で検出されることがある。これには用量に相関した毒性を伴っていることが多い（注3参照）。培養液中の血清もしくはS9 mixの成分により沈殿物の溶解性が増す可能性がある。また、脂溶性物質は細胞膜の脂質により細胞内への透過性が促進されることも考えられる。さらに、ある種の哺乳類細胞（例えばチャイニーズ・ハムスターのV79、CHOならびに（CHL細胞）は細胞膜の陥入による細胞外物質の取り込み機能を有し、固形粒子を摂取し、その後細胞質中に分散させる。不溶性の化合物のうちあるものは、遺伝毒性を示す可溶性の不純物を含んでいるかも知れない。また、いくつかの不溶性の医薬品は、懸濁液もしくは微粒子成分としてヒトに投与されることにも注意する必要がある。

一方、重い沈殿物ができる場合には、必要なパラメーターの測定が妨げられたり、被験物質処理の調節が困難になったり（例えば、被験物質を添加した培養液より細胞を取り出すために遠心分離の操作が試験プロトコールに含まれている場合）（注4参照）、あるいは被験物質が細胞内に入りDNAに作用することが妨げられたりする。

下記の方法は、比較的難溶な化合物を試験するために提示されたものである。なお、下記の勧告は培養液中の被験物質を対象とする。

細胞毒性が全く観察されない場合には、最高用量は沈殿が析出する最低濃度とするが、細菌を用いる試験では5 mg/plate、哺乳類細胞を用いる試験では5 mg/mlもしくは10mMを上限として良い。用量相関性のある細胞毒性あるいは突然変異が認められる場合には、溶解性に関係なく、最高濃度は上記の細胞毒性を基準として決定する。この場合通常、沈殿の見られる濃度が2用量以上（上記の用量を越えない）あることが望ましい。沈殿物が試験の測定を妨げる場合には、要求されている細胞毒性のレベルが得られなくても良い。全ての場合において、沈殿物は処理の開始と終了時に、肉眼で観察すべきである。

2.2 *In vivo* 試験の特定項目に関するガイダンス

2.2.1 *In vivo* で染色体異常を検出するために受け入れられる骨髄を用いる試験系

げっ歯類骨髄の有核細胞で染色体異常を観察する試験では、さまざまな染色体の変化を検出することができる。これらの変化のほぼ全ては、まず最初の事象として生じた1～数ヶ所の染色分体の切断に起因する。染色分体あるいは染色体の切断により動原体を持たない染色体断片が生ずると、小核が生成される。従って、染色体異常または小核を選出する試験は、ともに染色体異常誘発物質の検出系として共に受け入れられる（注5）。小核は1本以上の染色体が分裂装置から離脱することによっても形成されるので、小核試験で異数性誘発物質を検出できる可能性がある（注6）。

結論として、*in vivo*での骨髄細胞における染色体異常または小核を有する多染性赤血球の解析は、染色体異常誘発物質の検出系として共に受け入れられる。マウスあるいは他の動物種でも、小核を持つ赤血球が脾臓で除去されないことが示されているか、または染色体異常/異数性誘発物質を検出できる十分な感度が認められる場合には、末梢血中の小核を持つ未成熟（例：多染性）赤血球での測定が、骨髄でのそれと同等に受け入れられる（注7）。

2.2.2 骨髄小核試験における雌雄げっ歯類の使用

マウスの骨髄小核試験における既知染色体異常誘発物質の作用に関する広範な研究により、雄のほうが雌に比べて小核誘発作用の感受性が高いことが示されている（注8）。小核誘発作用においては、性により反応の量的相違はあるが、質的な相違のないことが確認されている。顕著な量的相違がある場合には、例外なく性による毒性の違いがある。雌雄間で代謝物の質的な相違が明確にある場合には、小核試験には雌雄両方を用いるべきである。同様の原則が、他の*in vivo*試験にも適用される（注9）。骨髄小核試験には、ラットとマウスの両者が使用できると考えられる（注10）。

要約すると、げっ歯類の雌雄間において、毒性あるいは代謝に明らかな相違がない場合には、骨髄小核試験に使用するのは雄だけで十分である。特定の性のみ用いる薬剤を試験する場合には、該当する性を使用すべきである。

2.3 試験結果の評価のためのガイダンス

*In vitro*試験系では、げっ歯類の発がん性予測に対して偽陰性および偽陽性の両方の結果が生じることが、試験結果の比較から明らかにされている。（*In vitro*および*in vivo*の）遺伝毒性試験の組合せは、多くの既知ヒト発がん物質のように主に直接的に遺伝的傷害を惹起するような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*での代謝活性化系には能力に限界があるように、試験条件によっても偽陰性の結果が導き出されることがある。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試験の組み合わせがデザインされているが、ある遺伝毒性試験で陽性となったとしても、必ずしもその化合物がヒトに対して遺伝毒性/発がん性の危険性をもつことを意味するものではない。

2.3.1 *In vitro* 試験結果の評価のためのガイダンス

2.3.1.1 *In vitro* 試験での陽性結果

*In vitro*試験での陽性結果の妥当性が疑われるような、いくつかの状況があることが文献により報告されている。そのため、全ての*in vitro*試験での陽性結果について、以下の事項を考慮してその生物学的な妥当性を評価しなければならない。（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) 陰性あるいは溶媒対照の背景データ以上に増加し、意義のある遺伝毒性的な影響と考えられるか？
- ii) 濃度依存性があるか？
- iii) 弱い/不確定な反応については、その反応に再現性があるか？
- iv) その陽性結果は、*in vitro* 特有の代謝経路/代謝物による結果ではないか？(注12)
- v) その作用は *in vivo* の状況では起こり得ない極端な培養条件に起因していないか？(例：極端な pH、浸透圧、特に細胞懸濁液での重い沈殿)(注4)
- vi) 哺乳類細胞において、その作用は生存率が極めて低い場合にのみ見られるか？(2.1.2.2 受け入れ可能な毒性レベルについてを参照)
- vii) その陽性結果は不純物に起因していないか(化学構造的に危険性が考えられない、変異原性が弱い、あるいは非常に高用量でのみ変異原性を示す場合には、このようなケースの可能性はある)？
- viii) その遺伝毒性の指標において得られた結果は、類縁化合物でも確認されているか？

2.3.1.2 *In vitro* 試験での陰性結果

In vitro 試験で陰性の場合には、次のような特別な考慮をすべきであろう(ここに掲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)：被験物質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)が不適切でないかどうか？あるいは、被験物質の構造や反応性から考えて、他の試験方法/他の試験系の方が適切であるかどうか？

2.3.2 *In vivo* 試験結果の評価のためのガイダンス

In vivo 試験には、その性質上、ヒトに使用した場合に関連する吸収、分布ならびに排泄という *in vitro* 試験にはない要素を持つ利点をがある。さらに、代謝系としては *in vitro* で通常使用されている系と比べると、*in vivo* の系の方がより適切である。妥当な遺伝毒性の評価系として受け入れられている *in vivo* 試験系は少ない。それらの中に、骨髄あるいは末梢血を用いる細胞遺伝学的試験がある。*In vitro* 試験の結果が陰性の場合には、1種類の *in vivo* 細胞遺伝学的試験を実施すれば(遺伝毒性の評価は)通常十分である。

1つ異常の *in vitro* 試験で生物学的に意義のある陽性結果を示す物質(2.3.1.1参照)においては、骨髄や末梢血を用いる細胞遺伝学的試験に加え、他の組織を用いた *in vivo* 試験により更に有効な情報が得られることがある。*In vivo* で暴露される標的細胞や、*in vitro* で検出される遺伝的指標により、追加する *in vivo* 試験の選択基準が判る。しかし、有効性が確認され、広く使われている *in vivo* 遺伝子突然変異試験系はない。ラットやマウスの各組織の内在性遺伝子や導入遺伝子を用いた *in vivo* 遺伝子突然変異試験は様々な開発段階にある。このような突然変異のための試験が受け入れ可能となるまでは、骨髄以外の組織を用いた *in vivo* 試験の結果を、重要な追加データとして提出してもよい。しかし、この場合の *in vivo* 試験は科学的に妥当なものを選択すべきである(注11)。

In vivo 及び *in vitro* 試験の結果が一致しない場合は、ケースバイケースで結果の違いに対する考察あるいは説明が必要である(2.3.1.1, 2.3.2.1及び注12参照)。

結論として、被験物質の遺伝毒性の評価には、得られた結果を総合的に判断し、*in vitro* 及び *in vivo* 試験両方の本質的な価値と限界を考慮しなければならない。

2.3.2.1 *In vivo* 試験で陰性の場合の標的臓器での暴露証明の原則

In vivo 試験は遺伝毒性試験の考え方の上で重要な役割を持つ、遺伝毒性試験における *in vivo* 試験結果の意義は、被験物質による標的組織の適切な暴露証拠に直接関係する。*In vitro* 試験で確実に遺伝毒性が検出されているのに、*in vivo* 試験では陰性となる場合がある。たとえ問題の組織内で生物学的応答(例：毒性)を引き出すに十分な用量が望ましいとしても、標的組織以外の組織で毒性が観られて用量限界に達するため、標的組織でそのような用量に到達しえないことがある。このような場合にはトキシコキネティクスのデータを生体への取り込みの証拠とすることが出来る。例えば標的組織への取り込みが非常に低い場合や蛋白結合が非常に強い場合などのように、被験物質が適切に暴露されていない場合には、通常の *in vivo* 遺伝毒性試験はほとんど意味をなさないものと考えられる。

以下の勧告は、一例として骨髄細胞を用いる細胞遺伝学的試験系に適用される。なお、他の標的組織を用いる場合にも、同様の考え方で対処する。

いずれかの *in vitro* 試験で陽性の結果を示した被験物質について、下記の方法のいずれかにより *in vivo* での暴露の証拠を示さねばならない。

- i) 小核試験においては、試験と同一用量及び同一標本作製時期における、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。
- ii) 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による生体への取り込みの確認(注13参照)。
- iii) 骨髄中での被験物質またはその関連物質の直接的測定。
- iv) オートラジオグラフィによる組織暴露の評価。
 - ii) ~ iv) の方法においては、できうれば骨髄を用いる試験と同じ動物種、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について行われるべきである。

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、やはり *in vivo* (全身)暴露の証拠が必要

であり、上記の方法を用いて証明することもできる。なお、げっ歯類における標準的な吸収、分布、代謝、排泄（ADME）試験の結果から推察してもよい。

2.3.2.2 生殖細胞に対する変異原物質の検出

生殖細胞に対する変異原物質の検出に関する比較研究の結果は、ほとんどの生殖細胞変異原物質は恐らく体細胞を用いた試験で定性的に検出できることを示している。したがって、*in vivo* 体細胞遺伝毒性試験で陰性の場合には、概して生殖細胞に対する作用もないことを示している（注14）。

〔注〕

注1：基本セットの菌株の中に A-T 部位を標的とする菌株を含めた場合に検出できる遺伝毒性発がん物質のあることが文献的に知られている（e.g., Levin et al. 1983；Wilcox et al. 1990）。日本の労働省の5526化合物についてのデータベース（および各種製薬企業の小規模なデータベースでも裏付けられている）の解析を行った結果、細菌で変異原性が認められている物質のうち、標準的なサルモネラ4菌株では検出できず、大腸菌 WP 2 *uvrA* 株でのみで検出されるものが約7.5%であった。これらの化合物の動物の発がん性データは不明だが、標準的なサルモネラ菌株で変異原性を示す物質と同様に発がん性の可能性があると思われる。

注2：TA1537, TA97およびTA97a はいずれも、標的のヒスチジン遺伝子座のシトシン連続部分が変異検出部位であり、このフレームシフトのホットスポットに塩基の欠失を誘発するようなフレームシフト変異原に対して同様に感受性を示す。この3菌株はいずれを使用してもよいことが1993年にメルボルンで開催された「遺伝毒性試験法の標準化に関する国際ワークショップ」（Gatehouse et al., 1994）で合意され、ここでもその決定に賛成する。

注3：遺伝毒性試験を実施している日本の施設は、沈澱状態での試験経験が豊富であり、沈澱する範囲の濃度でのみ明確な遺伝毒性を示す物質の例を確認している。これらの化合物には、ポリマーや混合物、polycyclic hydrocarbon 類、phenylene diamine 類、heptachlor などが含まれる。これらの化合物のいくつかを用いた共同研究から、これらの化合物は溶解濃度域で遺伝毒性を検出できる可能性もあるが、不溶濃度域においても遺伝毒性活性が明確に上昇することが明らかにされているようである。これらの事項の討議が、メルボルンでの会議の '*in vitro*' サブグループの報告書（Kirkland, 1994）に記載されている。

注4：沈澱状態で化合物を試験する場合には、浮遊して増殖する細胞を用いる試験では、暴露時間を明確にするという点で問題がある。所定の暴露時間の後、通常遠心分離により細胞をペレットとして集め、その後、被験物質を含まない新鮮な培地に再浮遊させる。もし沈澱物が存在すれば、その化合物は試験の後半まで持ち込まれ、暴露時間の調節が不可能となる。このような細胞（例：ヒト末梢リンパ球やマウスリンパ腫細胞）を用いる場合は、最高濃度として最低沈澱濃度を使用するのが妥当である。

注5：小核誘発機構は染色体異常誘発機構と関連しているため（例えば、Hayashi et al., 1984 and 1994；Hayashi, 1994）、小核及び染色体異常はいずれも化学物質の染色体異常誘発作用を検出する系として受け入れることができる。同じ化合物について行われた、マウス小核試験とラット骨髄細胞の分裂中期での染色体異常解析データを比較すると、質的（染色体異常誘発性の検出率）および量的（染色体異常を示す最低用量）により相関関係がみられる。同種動物のデータでは更により相関関係が期待できる。

注6：化合物が紡錘体に作用し染色体の移動に遅滞が生じたために小核が形成されることもあるが、小核試験ではすべて異数体誘発物質を検出できる訳ではない。異数性の特異的検出系が近い将来利用できるようになるであろう。Fluorescence *in situ* hybridisation（FISH）法のように、間期の核の個々の（哺乳類）染色体を迅速にしかも高感度に識別できる方法が開発されている。

注7：アクリジンオレンジ超生体染色法を用いたマウス末梢血小核試験が Hayashi ら（1990）により開発された。この試験は、日本の小核試験共同研究グループの最近の共同研究テーマであった（Mutation Research（1992）278 . Nos . 2/3）。種々の作用を持つ23化合物について、CD 1 マウスを用いて共同研究が実施された。同一個体から投与後0、24、48、72時間目（またはそれ以上）に末梢血を採取し観察した。原則として一つの化合物を異なる2施設で試験した（46機関が参加した）。その結果、全ての化合物が小核誘発物質として検出された。施設間で、結果に量的な差はあったが質的な差はなかった。ほとんどの化合物は投与後48時間目に最大の反応を示した。これらの結果より、アクリジンオレンジ超生体染色法による末梢血小核試験は、再現性があり化合物の染色体異常誘発作用を評価できる信頼性のあるデータが得られる試験法であることが示唆された。これらのデータに基づいて、メルボルンでのワークショップでこの試験法は骨髄小核試験と全く同等であると結論された（Hayashi et al., 1994）。ラットを用いる末梢血小核試験については、日本の小核試験共同研究グループにより有効性を確認中である。

注8：この問題については詳細な共同研究が実施されており（The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. 1986）、この研究から、一般に小核の誘発は雄マウスの方が雌マウスより感受性が高いことが示されたが、その相違は質的なものではなく量的なものであった。この解析は、メルボルンでの国際ワークショップで小核試験検討グループに引き継がれ、53の *in vivo* 染色体異常誘発物質（および48の非染色体異常誘発物質）についてデータが分析され、同じ結論に達した（Hayashi et al., 1994）。

注9：小核と染色体異常の誘発には関連性があるので、骨髄染色体異常試験における雄動物の使用について、同一条件を適用するのが適当といえる。末梢血小核試験は、*ex vivo* UDS 試験（Kennely et al., 1993；Madle et

al., 1994)と同様に、雄のげっ歯類でのみその有効性が確認されている(The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test, 1992)。

注10: ラット、マウスはともに骨髄小核試験の使用に適した動物種である。しかし、いくつかの種特異的な発がん物質が、その種特有の遺伝毒性物質であるというデータが蓄積されつつある(例: Albanese et al., 1988)。さらにデータが集まると、ラットとマウスの両方で小核試験を実施するケースが出てくる可能性がある。

注11: *in vivo* 試験のデータベースとしては、骨髄細胞を用いる細胞遺伝学的試験以外では、肝細胞を用いる不定期 DNA 合成 (UDS) 試験が最大である (Madle et al., 1994)。肝臓 UDS 試験と骨髄小核試験を組み合わせると偽陽性がほとんどなく、大部分の遺伝毒性発がん物質を検出できるという文献調査報告がある (Tweats, 1994)。この組合せによっても偽陰性となるような不安定な遺伝毒性物質およびある種の芳香族アミンは、既存の多くの *in vivo* 検出系にとって問題となる物質である (Tweats, 1994)。それ故、化合物によっては他の試験(例: 32P ポストラベリング法, DNA 鎖切断試験など)の方がより適切な場合があるので、2次選択試験として UDS 試験に限定すべきではない。これらの *in vivo* 試験の指標と突然変異との相関は明確にわかっている訳ではないことを認識することが大切である。

注12: *In vitro* 試験と *in vivo* 試験の結果の相違に関する考え方の例は文献に記載されている。それらは、(i) *in vitro* 系で生成した活性代謝物は *in vivo* では生成しない可能性、(ii) 活性代謝物が *in vivo* 系では速やかに解毒されてしまうが、*in vitro* では解毒されない可能性、(iii) *in vivo* では素早く排泄される可能性など。これらの具体例については既に記載されている (e. g. Ashby, 1983)。

注13: 骨髄は血液がよく灌流する組織であり、そのため血液もしくは血漿中の薬剤関連物質の濃度は、骨髄中濃度と類似するものと推察される。このことは、多くの異なった医薬品について、これら2つの組織における薬剤濃度を直接比較することにより実証されている (Probst, 1994)。両組織の薬剤濃度は常に同じであるというわけではないが、血液と血漿中の薬剤濃度には、骨髄が暴露されていることを実証するのに十分な相関関係がある。

注14: 減数分裂による配偶子形成過程に選択的に作用する異数体誘発剤のような特別な型の変異原物質がある可能性がある。しかし、そのような物質が存在するという明白な実験的証拠はない。

4. 用語の解説

異数性 aneuploidy: 細胞または生物種に固有な染色体基本数からずれていること。

塩基対置換 base substitution: 塩基配列において1つ以上の塩基が他の塩基と置き換わっていること。これにより元のとは異なる蛋白質が合成される可能性がある。

細胞増殖 cell proliferation: 細胞分裂して娘細胞をつくる能力。

染色体異常誘発物質 clastogen: 染色体の構造変化を引き起こす物質で、通常光学顕微鏡で検出可能。

コロニー形成率 cloning efficiency: 1個の細胞がクローンを形成する割合、通常少量の細胞を適切な培養条件下で播種した後に測定する。

培養飽和密度 culture confluency: 培養における細胞密度の飽和状態(一般的に細胞増殖は培養密度が最高になると抑制される)。

フレームシフト突然変異 frameshift mutation: 遺伝子の塩基配列に1個または2個の塩基が付加(挿入)または欠失した突然変異(遺伝コードの変化)。これにより、元のとは異なる、あるいは短い蛋白質が合成される可能性がある。

遺伝子突然変異 gene mutation: 単一の遺伝子またはその調節遺伝子の配列内に生じた恒久的な変化。変化としては点突然変異、挿入、欠失などがある。

遺伝的指標 genetic endpoint: 対象とする遺伝的变化の型またはそのクラス(例えば、遺伝子突然変異、染色体異常、DNA修復、DNA付加体の生成など)。

遺伝毒性 genetic toxicity genotoxicity: 誘発のメカニズムに関係なく、遺伝物質に生じた有害な変化の総称。

小核 micronucleus: 顕微鏡下で検出できる細胞質中の核 DNA の粒子: 染色体あるいは染色体断片を含んでいる。小核の大きさは通常主核の1/20以上、1/5以下と規定される。

分裂指数 mitotic index: 染色体標本(スライド)において、細胞分裂をしていない(間期)細胞を含む全細胞中に占める各段階の分裂細胞の割合。

プラスミド plasmid: バクテリアの通常の遺伝子とは別の微小遺伝子、プラスミドは宿主の遺伝子に挿入されるか染色体外の微小粒子として存在する。

点突然変異 point mutations: 遺伝コードの変化のことで、通常は単一の DNA 塩基対に限定される。

多染性赤血球 polychromatic erythrocyte: 細胞分化の途中にあるリボソームをもつ未成熟な赤血球で、成熟した正染性赤血球(リボソームを欠く)とはリボソームの特異染色により容易に判別ができる。

生存(率) survival (変異原性試験における): 死細胞を含む全細胞に占める生存細胞数の割合で、通常ある期間薬物処理した後に染色しコロニー数を測定することにより判定する。

不定期 DNA 合成 (UDS) unscheduled DNA synthesis (UDS): DNA 損傷によって誘発される S 期以外の DNA

合成，通常 DNA の除去修復と関連している。

参考文献

- Albanese, R., Mirkova, E., Gatehouse, D. and Ashby, J. (1988) Species-specific response to the rodent carcinogens, 1,2-dimethylhydrazine and 1,2-dibromochloropropane in rodent bone marrow micronucleus assays. *Mutagenesis*, 3, 35 - 38.
- Ashby, J. (1983). The unique role of rodents in the detection of possible human carcinogens and mutagens. *Mutat. Res.* 115, 177 - 213.
- EEC (1987) Notes for Guidance for the Testing of Medical Products for their Mutagenic Potential Official Journal Eur. Comm. L73.
- Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Ohta, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994). Report from the working group on bacterial mutation assay: International workshop on standardisation of genotoxicity test procedures. *Mutat. Res.* 312, 217 - 233.
- Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1984) Kinetics of micronucleus formation in relation to chromosomal aberration in mouse bone marrow. *Mutat. Res.* 127, 129 - 137.
- Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990). The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res.* 245, 245 - 249.
- Hayashi, M., Tice, R.R., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Kirsch-Volders, M., Oleson, F.B. Jr., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994) *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat. Res.* (in press).
- Hayashi, M. (1994) Acceptability of *in vivo* MN and CA tests. In: P.F.D'Arcy and D.W.G. Harron (eds.) Proceedings of the Second International Conference on Harmonisation (ICH 2) Greystone Books Ltd., Ireland, pp232 - 237.
- Japanese Ministry of Health and Welfare (1989) Guidelines for toxicity studies of drugs.
- Kenelly, J.C., Waters, R., Ashby, J., Lefever, P.A., Burlinson, B., Benford, D.J., Dean, S.W. and Mitchell I deG (1993) *In vivo* rat liver UDS assay. In: Supplementary Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. ed Kirkland D.J. and Fox, M., Cambridge University Press, pp. 52 - 77.
- Kirkland, D. (1994) Report of the *in vitro* sub-group. International Workshop on standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutat. Res.* 312, 211 - 215.
- Levin, D.E., Hollstein, M., Christman, M.F., Schwiers, E.A. and Ames, B.N. (1982) A new *Salmonella* tester strain (TA 102) with A-T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 79, 7445 - 7449.
- Madle, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C.A. and Mori, H. (1994) Recommendations for the performance of UDS tests *in vitro* and *in vivo*. *Mutat. Res.* 312, 263 - 285.
- OECD Guidelines for Genetic Toxicology (1983, 1984, 1986) Published by OECD, Paris; latest revisions discussed at ad hoc committee meeting, Rome, September 1994.
- Probst, G. (1994) Validation of target tissue exposure for *in vivo* tests. In: P.F.D'Arcy and D.W.G. Harron (eds.) Proceedings of the Second International Conference on Harmonisation (ICH 2) Greystone Books Ltd., Ireland, pp. 249 - 252.
- The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test, CSGMT (1986) Sex difference in the micronucleus test. *Mutat. Res.* 172, 151 - 163.
- The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992) Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS: MMS. *Mutat. Res.* 278, 83 - 98.
- Tweats, D.J. (1994) Follow-up of *in vitro* positive results. In: P.F.D'Arcy and D.W.G. Harron (eds.) Proceedings of the Second International Conference on Harmonisation (ICH 2) Greystone books Ltd., N. Ireland, pp240 - 244.
- Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D.J. and Gatehouse, D.G. (1990) Comparison of *Salmonella typhimurium* TA102 with *Escherichia coli* WP 2 tester strains. *Mutagenesis*. 5, 285 - 291.