

「ICH S2(R1)：医薬品の遺伝毒性試験および解釈に関するガイダンス（案）」に関するご意見・情報の募集について

平成20年 4月 1日
厚生労働省医薬食品局審査管理課

日米EU医薬品規制調和国際会議（ICH）において、「ICH S2(R1)：医薬品の遺伝毒性試験および解釈に関するガイダンス（案）」が別添のとおりまとまりましたので、広くご意見・情報を募集いたします。

つきましては、本案に関してご意見・情報のある場合には、下記により提出してください。皆様から頂いたご意見・情報については、今後の活動における参考とさせていただきます。

なお、提出していただいたご意見・情報に対する個別の回答はいたしかねますので、その旨ご了承ください。

記

1. 募集期限

平成20年4月30日（水）必着

2. 提出方法

提出していただく御意見等には必ず「ICH S2(R1)：医薬品の遺伝毒性試験および解釈に関するガイダンス（案）」と明記の上、以下に掲げるいずれかの方法で提出してください。お電話による御意見・情報の提出はお受けできませんのでご了承ください。

○電子メールの場合

電子メールアドレス：ichs2r1@mhlw.go.jp

（ファイル形式はテキスト形式でお願いします。）

○ファクシミリの場合

ファクシミリ番号：03-3597-9535

厚生労働省医薬食品局審査管理課あて

○郵送の場合

〒100-8916 東京都千代田区霞が関1-2-2

厚生労働省医薬食品局審査管理課あて

3. ご意見等の提出上の注意

ご意見等は日本語に限ります。また、個人の場合は住所・氏名・年齢・職業を、法人の方は法人名・所在地を記載してください。なお、個人又は法人の属性に関する情報以外は公開することがありますので、あらかじめご了承ください。

医薬品の遺伝毒性試験および解釈に関するガイダンス

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 ガイド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と小核が形成される。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る(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、倍数性の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不相当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性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がある（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、最も暴露される組織において適切な遺伝性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、暴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、総合として陰性、(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*) WP2uvrA または大腸菌 WP2uvrA/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ない(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 (陽性の場合) 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分類が必要である。

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の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ー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を行うときに限る）。

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ールを考慮すると

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に使わ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（コメット法[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にみられる場合、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（骨髓あるいは血液）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。骨髓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髓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ー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、通常の *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 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ム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際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うる。

- 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* のほ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 (Corvi 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 (コメン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性である。

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す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* 遺伝毒性試験で陽性を示すものであった。これらには短鎖の脂肪族ニトロソアミン；二価金属；アルデヒド (例えばホルムアルデヒド、クロトンアルデヒド)；アゾ色素 (例えばバターイエロー)；ピロリジジンアルカロイド；アリル化合物 (イソチオシアン酸アリル、塩化アリル)、およびニトロ (例えば芳香族、脂肪族) 化合物が相当する。
8. *In vitro* のほ乳類培養細胞試験における最大濃度を 1 mM とする理論的根拠は以下とおりである。試験の標準組合せは Ames 試験と *in vivo* 試験が含まれている。組合せ全体で考えると、ほ乳類培養細胞試験において遺伝毒性発がん物質と考えられるすべての化学物質を検出する必要はない。Ames 試験あるいは *in vivo* 遺伝毒性試験では検出されないが、*in vitro* のほ乳類試験の 1 mM 以上でのみ検出されるような化学物質 (DNA を損傷する発がん物質) が存在する可能性は低い。更に、上限の 1 mM は、既知医薬品の組織中の濃度を含めた臨床曝露より高く (Goodman& Gilman, 2001)、また、*in vivo* の非臨床試験で一般的に達する量より高い (PhRMA/EFPIA/JPMA の調査) ことから、ハザード同定の色合いが強い。ヌクレオシド類縁体およびいくつかの抗生物質のように、ある種の薬物は極めて高い臨床曝露を必要とすることが知られている。既存薬物との強さの比較はスポンサーの興味のあるところであり、1 mM の上限以上での評価が必要であったとしても、ヒトの安全性を最終的に決定するのは *in vivo* 試験である。

9. ある種の遺伝毒性発がん物質は、ある程度の細胞毒性を引き起こす濃度で試験しない限り、*in vitro* 遺伝毒性試験で検出されないが、DNA 損傷物質は一般に中等度の毒性レベルで検出可能である（例えば染色体異常試験のサンプリング時で30%増殖抑制、Greenwoodら、2004）。細胞毒性が強くなるにしたがって、化学物質あるいはその代謝物による直接的な DNA 損傷以外の作用により、遺伝毒性ではなく細胞毒性に関連した「陽性」結果をもたらすことがある。このような非 DNA 部位を損傷することによって、二次的におこる間接的 DNA 損傷の誘発は、ある閾値濃度以上で引き起こされることが多い。このような現象が薬理的に意味のあるような低濃度で引き起こされるとは考えられない。染色体異常誘発作用の弱い既知発がん物質であっても、細胞遺伝学的試験においては、50%より低い細胞増殖抑制濃度で陽性結果を示す（Armstrongら、1992）。一方、DNA 損傷、変異原性あるいはがん原性を有しない化学物質でも、細胞毒性が認められるような濃度で染色体切断を誘発することがある（Hilliardら、1998）。*In vitro* 細胞遺伝学的試験（染色体異常試験および小核試験）において、約50%の増殖抑制を上限とすることは適切である。

株細胞を用いた細胞遺伝学的試験では、時間経過における細胞集団増殖の測定値が（培養中の細胞数の変化を対照と比較して測定する、例えば細胞集団倍加（PD；注10）と呼ばれる方法）細胞毒性の尺度として有用であることが示されている。また、単純な細胞数は毒性を過小評価するおそれのあることが知られている。リンパ球の培養では、約50%を超えない分裂抑制で十分と考えられる。このためには、中期分裂像の異常を見る試験の場合は分裂指数（MI）を、*in vitro* 小核試験では細胞分裂阻止に基づく指標を用いることができる。さらに *in vitro* 小核試験については、小核は細胞分裂に続く間期で計数されることから、細胞周期全体が回っているのを確認することが重要である。このためには、細胞の分裂を抑制が核の分裂には影響を与えないサイトカラシン B の使用が考えられ、二核細胞における小核を計数すればよいことになる（リンパ球を用いる場合に推奨される）。株化細胞では、上に記した時間経過による細胞集団倍化（PD）など、細胞増殖を他の方法で証明することもできる（Kirsch-Voldersら、2003）。

マウスリンフォーマ試験（MLA）にはソフトアガー法およびマイクロウェル法があるが、ともに最高濃度を相対増殖率（RTG）20%に近い濃度に制限することで適切な感受性が得られる（IWGT）。Mooreら（2006）の基準を用いた公表データを再調査すると、RTGが20%未満の濃度でのみ MLA 結果が陽性であったげっ歯類発がん物質は極めて少数であり、この範疇の化学物質については遺伝毒性発がん物質である信頼に足る証拠がない。20%以下の RTG でのみ突然変異の増加がみられる場合には結果の解釈を慎重に行う必要があり、特に RTG が 10%以下の濃度のみで突然変異の誘発が認められる場合、その結果のみをもって陽性とは判断できないことが合意された（Mooreら、2006）。

結論として、増殖／生存の減少が、細胞遺伝学的試験では50%、MLAでは80%に達するかそれ以上で得られた陽性結果の解釈には注意が必要である。このような細胞毒性／コロニー形成率レベルで処理された細胞での評価は、感受性を高めると共に、不適切

な陽性結果をもたらすリスクを増加させることが知られている。遺伝毒性試験の組合せは、強い細胞毒性発現用量を用いた単一の *in vitro* ほ乳類細胞試験に頼らなくても、適切な感受性を保証できるように考えられている。

適切な毒性の範囲を得るため、広い範囲の濃度を用いた用量設定のための予備試験は有用であるが、遺伝毒性試験ではしばしば極めて狭い間隔（公比 2 以下）で数段階の濃度を用いることが必須になる。追加の濃度での試験が有用となる場合があるが、すべての処置濃度群を観察する必要はない。正確な 50%の増殖抑制あるいは 80%の RTG 抑制を示す濃度で試験するために、何度も試験を繰り返すことを意図するものではない。

10. *In vitro* の細胞遺伝学的試験において、細胞毒性を評価するため、細胞数を用いると細胞毒性を過小に見積もることがあるため細胞毒性評価には相対細胞増殖率が適している (Greenwood ら、2004)。50%増殖抑制レベルを算定するために細胞集団倍加を用いると、DNA 損傷物質は確実に陽性となる一方で、変異原性あるいは発がん性を有さない物質の陽性頻度が減少することが示されている。
11. 骨髄の分裂中期細胞が使用されるのと同様に、被験物質を 1 回以上投与された試験動物から採取して培養したリンパ球の分裂中期における染色体異常を調べることが有用である場合がある。ある種のリンパ球の寿命は長いため、原理的に修復されない DNA 損傷の蓄積が起こる可能性があり、これらの細胞が *in vitro* で分裂を誘導されたときに染色体異常を増加させる可能性がある。*In vivo* のリンパ球試験は染色体異常誘発性の追加試験として有用となるかも知れないが、一般には、造血細胞の小核試験に加え、肝臓のようなその他の組織を用いた小核試験からの方が、より多くの情報が得られる。すなわち薬物および代謝物の曝露が造血細胞よりもしばしば肝臓で高いためである。
12. 単回投与とマウス骨髄小核試験における既知染色体異常誘発物質の活性を詳細に検討すると、一般的に雌よりも雄が小核の誘発に対して鋭敏なことが示されている。雌雄で小核試験における量的な差が認められているが、質的な差は認められていない。明確に量的な差がある場合には雌雄間に毒性の差があるのが通常である。したがって、単回投与の *in vivo* 小核試験では雄のみを使用することで問題ないであろう。
13. 毒性試験において、曝露の測定などの目的で追加の血液サンプリングが計画されている場合には注意を要する。そうした放血が小核試験結果を混乱させることがある。すなわち、放血により刺激された赤血球新生が小核を有する赤血球を増加させることがある。
14. メチルセルロース水溶液に代表されるような水溶性溶媒では通常問題ないが、Tween 80 のような溶媒では投与可能な容量は単回投与の 30 分の 1 程度である。
15. 小核（およびその他の細胞遺伝学的）試験における陽性対照の目的は、標本観察者が小核の増加を間違いなく検出できることの証明である。これには、少数の陽性対照動物（片性で可）を用いる定期的な試験から採取したサンプルを使用すればよい。マニュアル計測では、このようなスライドを各試験で観察するコード化スライドに加えたり、あるいは標本観察者が陽性反応識別能力を有していることを定期的に証明するために用いることも可能である。陽性対照のスライドは、その染色特性や小核頻度によって標本観察者

に容易に識別されてはならない。自動計測では、各試験で適切な品質保証対照サンプルを使用する。

他の *in vivo* 遺伝毒性試験における陽性対照の目的は、選択した動物種、組織およびプロトコールによる試験が DNA 損傷/変異原性の増加を間違いなく検出できることの証明である。試験施設が、複数回の独立した試験において適切な陽性対照物質を常に検出可能なことを証明すれば、そのプロトコールを用いる試験では、試験ごとに陽性対照をおく必要はないが、定期的に陽性対照を試験するのが望ましい。

16. 標準的誘導 S-9 mix はヒト S-9 よりも高い活性化能を有し、特定の補因子が供給されない限り第 2 相の解毒能を欠いている。また、*in vitro* では高濃度の試験物質の場合、非特異的な活性化が生ずる可能性がある (Kirkland ら、2007)。ヒト S-9 あるいは他のヒトに関連した代謝活性化系を用いた遺伝毒性試験は有用である。前臨床試験の動物種、(非誘導のマイクロゾームまたは肝細胞、あるいは *in vivo*)、あるいはヒト試料における既知の代謝物プロファイルとの比較のために、遺伝毒性試験材料を用いた代謝物プロファイルの解析も結果の妥当性検証に役立つ (Ku ら、2007)。追加試験では通常、肝臓を用いた *in vivo* 試験に焦点を当てる。S-9 存在下の *in vitro* 試験で陽性結果を示す化学物質が *in vivo* では遺伝毒性を誘発しない可能性があり、それは、代謝物が生成されないか、生成されても極めて少量か、あるいは代謝的に解毒されるかまたは速やかに排泄されるためであり、この場合 *in vivo* ではリスクがないことを示唆している。
17. 小核の増加は、遺伝毒性物質を投与しなくても赤血球生成障害 (再生性貧血; 髄外造血など)、ストレス、低体温および高体温により生ずる (Tweats らによる総説、2007, IWGT)。血液中では、脾臓の機能変化が血液からの小核含有赤血球細胞の除去に影響を及ぼし、循環する小核含有赤血球の増加をきたすと考えられる。
18. 小核の誘発が主に染色体損失によるものかあるいは染色体切断によるものかを決定するには、動原体の存在を確認するために、*in vitro* あるいは *in vivo* での小核染色を実施する。例えば、動原体部位の DNA 塩基配列プローブを用いる *in situ* 蛍光ハイブリダイゼーション (FISH)、あるいはキネトコア蛋白への標識抗体を使用する。誘発された小核の大部分が動原体陽性であれば、染色体損失が示唆される (コルヒチンおよびビンブラスチンのような強力なチューブリン阻害物質でも 100%のキネトコア陽性小核を生ずることはなく、大体 70~80%程度であるが、リスク評価ではまず異数性誘発物質として認められている)。代替法として、分裂中期の構造異常を調べる *in vitro* あるいは *in vivo* 試験を実施する; 陰性であれば、小核の誘発は染色体損失に関連したものと推察する。

7. 用語の解説

アルカリ溶出法 (*Alkaline elution assay*) : DNA 鎖切断試験を参照。

異数性(*Aneuploidy*) : 細胞あるい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。

動原体/キネトコア(*Centromere/kinetochore*) : 娘染色体の連合および娘染色体の極への移動と娘核の封入を確実にする紡錘糸の付着に重要な染色体の構造。

染色体異常誘発物質(*Clastogen*) : 染色体の構造的切断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。

コメット法(*Comet assay*) : DNA 鎖切断試験を参照。

培養飽和密度(*Culture confluency*) : 目視検査による培養における細胞密度の飽和状態。

細胞遺伝学的評価(*Cytogenetic evaluation*) : 有糸分裂および減数分裂における染色体構造の光学顕微鏡による解析、あるいは小核の解析。

DNA 付加体(*DNA adduct*) : 化学物質と DNA が共有結合した生成物。

DNA 修復(*DNA repair*) : DNA 損傷後の本来の DNA 配列への再構成。

DNA 鎖切断(*DNA strand breaks*) : DNA の単鎖あるいは二本鎖切断。

DNA 鎖切断試験(*DNA strand break assay*) : アルカリ処理は、特定の型の DNA 損傷をアルカリ溶出手技によって検出できる一本鎖切断に転換させる。これは、フィルターを通して、あるいは単細胞ゲル電気泳動法または顕微鏡スライド上で単層ゲルに包埋された細胞を電流に当てるコメット法で移動率を測定する。その結果、DNA の短い断片が核から「彗星の尾」に移動する。染色した細胞について広範囲の DNA 移入を顕微鏡下で肉眼的に計測する。

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 鎖切断、DNA 修復、DNA 付加体の生成など)

遺伝毒性(*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*) : 細胞質中の核 DNA の粒子 : 染色体全体あるいは染色体断片を含んでいる。

分裂指数(*Mitotic index*) : 染色体標本(スライド)において、細胞分裂していない(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、染色体外の微小遺伝子として存在する。

染色体の数的変化(*Numerical chromosome changes*) : 固有の一倍体あるいは二倍体の染色体数から染色体の数が増加していること ; 株細胞では、染色体数のモード値から外れていること。

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。

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

細胞集団倍化あるいは培養増殖(*Population doubling or culture growth*) : これはいくつかの方法で算出される ; 適切な計算式の 1 例を示す : 集団倍化 = 処理開始時の細胞数 (初期値) (X_0) に対する最終時の細胞数の割合 (N) の対数を 2 の対数で割った値。PD = $[\log(N \div X_0)] \div \log 2$

倍数性(*Polyploidy*) : 染色体のモード値の数的な異常、半数体数のおよその倍数。核内倍加は、分裂中期に染色体の対が「二重染色体」として結合している倍数性の形態学的な形である。

組換え(*Recombination*) : DNA 切断とそれに続く均衡あるいは不均衡な再結合

RTG (相対総増殖率) (*RTG (relative total growth)*) : この細胞毒性の測定は、相対浮遊細胞増殖率 (処理開始から処理後 2 日目までの細胞損失および細胞増殖に基づく) を求め、それに、変異体の定量のクローニング時の相対コロニー形成率を掛ける。

単細胞ゲル電気泳動法(*Single Cell Gel Electrophoresis assay*) : コメット法。DNA 切断試験を参照

生存 (率) (変異原性試験における) (*Survival (in the context of mutagenicity testing)*) : 死細胞を含む全細胞に占める生存細胞の割合で、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。

導入遺伝子(*Transgene*) : 体細胞や生殖株細胞の宿主遺伝子に組み込まれた外来の遺伝子。

不定期 DNA 合成試験 (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 除去修復と関連している。

8. REFERENCES

Ashby, J., D. Paton, "The influence of chemical structure on the extent and sites of carcinogenesis for 522 rodent carcinogens and 55 different human carcinogen exposures," *Mutation Research* 286:3-74, 1994.

Corvi, R., S. Albertini, T. Hartung, S. Hoffmann, D. Maurici, S. Pfuhler, J. van Benthem, P. Vanparys, "ECVAM Retrospective Validation of the *in vitro* micronucleus test (MNT)", *Mutagenesis*, submitted 2007.

Gatehouse, D., S. Haworth, T. Cebula, E. Gocke, L. Kier, T. Matsushima, C. Melcion, T. Nohmi, T. Ohta, S. Venitt, E. Zeiger, "Report from the working group on bacterial mutation assays: International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures," *Mutation Research* 312: 217-233, 1994

Goodman & Gilman "The Pharmacological Basis of Therapeutics". J. G. Hardman, L E. Limbird, A. G. Gilman (Eds.), McGraw-Hill Professional, New York; 10th edition (August 13, 2001).

Greenwood, S.K., R.B. Hill, J.T. Sun, M.J. Armstrong, T.E. Johnson, J.P. Gara, S.M. Galloway, "Population Doubling: A simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 43:36-44, 2004.

Hamada S., S. Sutou, T. Morita, A. Wakata, S. Asanami, S. Hosoya, et al., "Evaluation of the rodent micronucleus assay by a 28-day treatment protocol: summary of the 13th collaborative study by the collaborative study group for the micronucleus test (CSGMT)/Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)–Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS)," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 37:93-110, 2001.

Hartmann A., E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, A. Smith, G. Speit, V. Thybaud, R.R. Tice, "Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay", *Mutagenesis* 18:45-51, 2003.

Hayashi, M., J.T. MacGregor, D.G. Gatehouse, I. Adler, D.H. Blakey, S.D. Dertinger, G. Krishna, T. Morita, A. Russo, S. Sutou, "*In vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. II. Some Aspects of Protocol Design Including Repeated Treatments, Integration With Toxicity

Testing, and Automated Scoring," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35:234-252, 2000.

Hayashi, M., J.T. MacGregor, D.G. Gatehouse, D.H. Blakey, S.D. Dertinger, L. Abramsson-Zetterberg, G. Krishna, T. Morita, A. Russo, N. Asano, H. Suzuki, W. Ohyama, D. Gibson, "In vivo erythrocyte micronucleus assay. III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test," *Mutation Research*, 627:10-30, 2007.

Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H-J Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R. Tindall, N. Yajima, "In vivo transgenic mutation assays", *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35:253-259, 2000.

Kasper, P., Y. Uno, R. Mauthe, N. Asano, G. Douglas, E. Matthews, M. Moore, L. Müller, M. Nakajima, T. Singer, G. Speit, "Follow-up testing of rodent carcinogens not positive in the standard genotoxicity testing battery: IWGT workgroup report," *Mutation Research*, 627:106-116, 2007.

Kenelly, J.C., R. Waters, J. Ashby, P.A. Lefevre, B. Burlinson, D.J. Benford, S.W. Dean, I deG. Mitchell, "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, 1993

Kirkland, D.J., S. Pfuhler, D. Tweats, M. Aardema, R. Corvi, F. Darroudi, A. Elhajouji, H. Glatt, P. Hastwell, M. Hayashi, P. Kasper, S. Kirchner, A. Lynch, D. Marzin, D. Maurici, J-R. Meunier, L. Müller, G. Nohynek, J. Parry, E. Parry, V. Thybaud, R. Tice, J. van Benthem, P. Vanparys, P. White, "How to reduce false positive results when undertaking *in vitro* genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of the ECVAM workshop," *Mutation Research*, 628:31-55, 2007.

Kirsch-Volders, M., T. Sofuni, M. Aardema, S. Albertini, D. Eastmond, M. Fenech, M. Ishidate, S. Kirchner, E. Lorge, T. Morita, H. Norppa, J. Surralles, A. Vanhauwaert, A. Wakata, "Report from the *in vitro* micronucleus assay working group", *Mutation Research*, 540:153-163, 2003.

Kissling, G.E., S.D. Dertinger, M. Hayashi, J.T. MacGregor., “Sensitivity of the erythrocyte micronucleus assay: Dependence on number of cells scored and inter-animal variability”, *Mutation Research* 634:235–240, 2007.

Ku, W.W., A. Bigger, G. Brambilla, H. Glatt, E. Gocke, P.J. Guzzie, A. Hakura, M. Honma, H-J. Martus, R.S. Obach, S. Roberts, “Strategy for genotoxicity testing-Metabolic considerations,”*Mutation Research*, 627:59-77, 2007.

MacGregor J.T., M.E. Bishop, J.P. McNamee, M. Hayashi, N. Asano, A. Wakata, M. Makajima, J. Saito, A. Aidoo, M.M. Moore, S.D. Dertinger, “Flow Cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat”, *Toxicological Sciences*, 94:92-107, 2006.

Moore, M. M., M. Honma, J. Clements, G. Bolcsfoldi, B. Burlinson, M. Cifone, J. Clarke, R. Delongchamp, R. Durward, M. Fellows, B. Gollapudi, S. Hou, P. Jenkinson, M. Lloyd, J. Majeska, B. Myhr, M. O'Donovan, T. Omori, C. Riach, R. San, L. F. Stankowski, Jr., A. K. Thakur, F. Van Goethem, S. Wakuri, I. Yoshimura, "Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing—Aberdeen, Scotland, 2003—Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47:1-5, 2006.

Müller, L, P. Kasper, “Human biological relevance and the use of threshold arguments in regulatory genotoxicity assessment: Experience with pharmaceuticals.” *Mutation Research*, 464: 9-34, 2000.

OECD Guidelines for Genetic Toxicology (1997)

Scott, D., S.M. Galloway, R.R. Marshall, M. Ishidate Jr., D. Brusick, J. Ashby, B.C. Myhr, “Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9”, *Mutation Research*, 257:147-204, 1991.

Storer, R.D., T.W. McKelvey, A.R. Kraynak, M.C. Elia, J.E. Barnum, L.S. Harmon, W.W. Nichols, J.G. DeLuca, "Revalidation of the *in vitro* alkaline elution/rat hepatocyte assay for DNA damage: improved criteria for assessment of cytotoxicity and genotoxicity and results for 81 compounds," *Mutation Research*, 368:59-101, 1996.

Suzuki, H., N. Ikeda, K. Kobayashi, Y. Terashima, Y. Shimada, T. Suzuki, T. Hagiwara, S.Hatakeyama, K.Nagaoka, J. Yoshida, Y. Saito, J. Tanaka, M. Hayashi, "Evaluation of liver and peripheral blood micronucleus assays with 9 chemicals using young rats A study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) - Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS)," *Mutation Research*, 583: 133-145, 2005

Thybaud, V., M. Aardema, J. Clements, K. Dearfield, S. Galloway, M. Hayashi, D. Jacobson-Kram, D. Kirkland, J. T. MacGregor, D. Marzin, W. Ohyama, M. Schuler, H. Suzuki, E. Zeiger, "Strategy for genotoxicity testing: Hazard identification and risk assessment in relation to *in vitro* testing," *Mutation Research*, 627:41-58, 2007.

Tweats, D. J., D. Blakey, R. H. Heflich, A. Jacobs, S. D. Jacobsen, T. Morita, T. Nohmi, M. R. O'Donovan, Y. F. Sasaki, T. Sofuni, R. Tice, "Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory *in vivo* tests. I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards," *Mutation Research*, 627:78-91, 2007.

Tweats, D. J., D. Blakey, R. H. Heflich, A. Jacobs, S. D. Jacobsen, T. Morita, T. Nohmi, M. R. O'Donovan, Y. F. Sasaki, T. Sofuni, R. Tice, "Report of the IWGT working group on strategy/interpretation of regulatory *in vivo* tests. II. Identification of *in vivo*-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test," *Mutation Research*, 627:92-105, 2007.

Wakata, A., Y. Miyamae, S. Sato, T. Suzuki, T. Morita, N. Asano, T. Awogi, K. Kondo, M. Hayashi, "Evaluation of the Rat Micronucleus Test with Bone Marrow and Peripheral Blood: Summary of the 9th Collaborative Study by CSGMT/JEMS • MMS," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 32:84-100, 1998.