

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生省医薬安全局審査管理課長

「遺伝毒性試験：医薬品の遺伝毒性試験の標準的組合せ」について

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、変異原性試験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8年7月2日薬審第444号通知別添「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」により取り扱っているところであるが、今般、別添のとおり「遺伝毒性試験：医薬品の遺伝毒性試験の標準的組合せ」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、その合意に基づき、「遺伝毒性試験：医薬品の遺伝毒性試験の標準的組合せ」（以下「ICHガイダンス」という。）が制定された。

2.ICHガイダンスの要点

（1）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当該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。

(2) ICHガイダンスの基本的な考え方は、以下のとおりである。

- (a) これまでは、細菌を用いる復帰変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験及びマウスを用いる小核試験の組合せだった。ICHガイダンスも基本的にはこの組合せであるが、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験の代わりに、マウスリンフォーマ試験で代替できることになった。
- (b) 現行ガイドラインでは、必要があれば他の試験を追加すること（選ぶべき試験の例を示したリストを提示）といった程度であったが、標準的な組合せが不適切な場合の例が示された。
- (c) 標準的組合せにおける *In vitro* 試験の標準的方法が記載された。*In vitro* 試験としては、細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験及び染色体異常試験、マウスリンフォーマ試験が取り上げられた。海外ではこれまで *In vitro* 試験は2度繰り返して結果の再現性を確認することが要求されていたが、ここに示された手法を組み込むことにより、試験の繰り返し避けることができる。

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、当該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。

遺伝毒性試験：医薬品の遺伝毒性試験の標準的組合せ

1．緒言

本ガイドラインの適用範囲は、医薬品の遺伝毒性試験において調和が必要と考えられる次の二つの基本領域についてのものである：（１）申請に必要な試験の標準的組合せ、（２）標準的組合せにおける *In vitro* 遺伝毒性試験の確認試験。これ以外に調和が必要と考えられる項目については、ICH ガイドライン「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」に示されている。遺伝毒性に関するこれら二つの ICH ガイドラインは相補的であり、それ故、医薬品の遺伝毒性試験のための ICH ガイダンスの基本原則として、両方一緒に用いるべきものである。

2．遺伝毒性試験の一般的な目的

遺伝毒性試験は、種々の機構で直接あるいは間接的に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* の試験と定義することができる。これらの試験は、DNA の損傷とその固定に基づく傷害を検出することができる。遺伝子突然変異、染色体の広範囲な損傷、組換えおよび染色体の数的変化といった DNA 損傷の固定は、遺伝性の影響の発現にとって不可欠なものであると一般的に考えられており、また、癌化の多段階過程では、遺伝的变化がその複雑な過程のほんの一部を担っている可能性がある。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性物質である可能性がある。すなわち癌や遺伝性疾患を引き起こす可能性がある。特定の化合物がヒトで発がん性を示すこと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ため、遺伝毒性試験は主に発がん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瞭に関係していることから、ある物質が遺伝性の影響を引き起こすことが疑われた場合は、ある物質ががんを引き起こすことが疑われたのと同様に重大であると考えられる。また、それらの試験結果は発がん性試験結果の解釈に有用である。

3．遺伝毒性試験の標準的組合せ

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。ただ一つの試験だけで全ての種類の遺伝毒性物質を検出できないことは明らかである。そのため、*In vitro* および *In vivo* の遺伝毒性試験を組合せて実施するというのが通常の方法であろう。これらは異なるレベルの階層的な組合せではなく、相補的な試験の組合せである。

試験の標準的組合せの一般的な特徴を以下の様に要約することができる：

i) 細菌を用いる復帰突然変異試験は、遺伝毒性を評価するのに適切である。この試験は意味のある遺伝的变化を検出し、遺伝毒性を示すげっ歯類発がん物質の大部分を検出できることが示されている。

ii) 哺乳類細胞に対しては意味があるが、細菌で試験することが適切でないと考えられる DNA 損傷は、哺乳類細胞で評価しなければならない。これにはいくつかの哺乳類細胞を用いる試験系が利用できる：広範囲な染色体損傷を検出する系（染色体の構造及び数的異常検出のための *In vitro* 試験）、主として遺伝子突然変異を検出する系（注 1 参照）、ならびに遺伝子突然変異および染色体異常誘発作用を検出する系（マウスリンフォーマ tk 試験）（注 2 参照）。注 3 および 4 に述べている科学的な情報は、適切な試験プロトコール（第 5 章参照）に従えば、種々の *In vitro* 染色体損傷試験とマウスリンフォーマ tk 試験の結果は、細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性の遺伝毒性物質に対して高い一致性があることを示している。それゆえ、医薬品のための遺伝毒性試験の標準的組合せの中で他の遺伝毒性試験と共に用いる場合は、上記の試験プロトコールが用いられていれば、これらの試験系は互換できるものであると考えられている。

iii) *In vivo* 遺伝毒性試験は、通常、試験の組合せの一部であり、ある物質の遺伝毒性活性に影響を与える可能性がある付加的な要素（吸収、分布、代謝、排泄）が含まれている試験系でなければならない。その結果、*In vivo* 試験で更にいくつかの遺伝毒性物質を検出することが可能になる（注 5 参照）。げっ歯類の造血細胞を用いる染色体損傷のための *In vivo* 試験はこの要求を十分に満足している。このげっ歯類での *In vivo* 染色体損傷試験としては、骨髓細胞の染色体異常の解析でも、骨髓または末梢血赤血球での小核の解析でも良い。

上記の考察から、次のような標準的試験の組合せが推奨される。

- i) 細菌を用いる遺伝子突然変異試験
- ii) 哺乳類細胞を用いて染色体損傷を細胞遺伝学的に評価する *In vitro* 試験、
あるいは *In vitro* マウスリンフォーマ tk 試験
- iii) げっ歯類造血細胞を用いる染色体損傷のための *In vivo* 試験

最新の勧告に従い実施・評価したこの 3 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いう点では十分なレベルにあると考えられる（注 6 参照）。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（ICH “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” 参照）。

ここでは、試験の標準的組合せを提示したが、これは他の遺伝毒性試験（たとえば、DNA 付加体、DNA 鎖切断、DNA 修復あるいは組換えを検出する試験）が一般に不十分であるとか不適

当であると考えられていることを意味している訳ではない。これらの試験は、標準的組合せで得られた遺伝毒性試験結果をより詳細に検討するために、標準的組合せに加えてオプションとして利用することができる。さらに、標準的組合せの試験系における遺伝毒性作用のメカニズムを研究するための分子生物学的なアプローチはリスク評価のために有用である。標準的組合せを構成する一つあるいはそれ以上の試験において、技術的な理由から極端な条件下でしか試験が実施できないような場合には、有効性が確認された代替試験をその代わりとして利用できる。その場合には、標準的組合せの試験が妥当でないことを、十分に科学的な根拠により説明しなければならない。

標準的組合せは、染色体の異数性を検出するために特別に計画された試験を含んではいない。しかしながら、この種の損傷に関する情報は、*In vitro* および *In vivo* の染色体損傷を調べる試験から得ることができる。これらの情報を提供する標準プロトコールの項目としては、分裂指数の増加、倍数体誘発および小核の評価がある。異数性誘発物質は、マウスリンフォーマ tk 試験で検出可能であるとする限定された実験的証拠がある（注 4 参照）。そのような場合には、追加検討が必要になるかもしれない。

4.3 試験組合せの変更

以下のセクションは標準的な 3 試験の組合せに変更が必要となる可能性のある状況を示している。

4.1 細菌を用いる試験系の利用の限界

細菌を用いる復帰突然変異試験を実施しても、遺伝毒性の評価において適切あるいは十分な情報が得られない場合がある。これには細菌に対し強い毒性を示す化合物（たとえば、ある種の抗生物質）や、哺乳類細胞複製系への阻害作用が知られているあるいは考えられている化合物（たとえば、トポイソメラーゼ阻害剤、核酸アナログ、あるいは DNA 代謝阻害剤）が該当する可能性がある。このような場合には、通常二つの異なった哺乳類細胞を用い、二つの異なった指標 [遺伝子突然変異（注 1 参照）と染色体損傷] を検出する *In vitro* 試験の実施が必要である。一方、細菌を用いる復帰突然変異試験は、それが完全な試験であれ限定された試験（用量設定）であれ（第 5 章参照）、実施することが依然重要である（注 7 参照）。

4.2 構造的に遺伝毒性が予想される化合物

構造的に有害性が予想される化合物（注 8 参照）は、通常は標準的 3 試験組合せで検出できる。しかしながら、標準的 3 試験組合せにおいては陰性結果を示すが、構造的に遺伝毒性が予想される物質については、限定された追加試験が必要な場合がある。追加試験とするかプロトコールの変更とするかは、構造的に遺伝毒性が問題となる化合物の、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（注 9 および ICH “医薬品のための遺伝毒性試験の特定項目に関する”

るガイドンス”参照)。

4.3 標準的な *In vivo* 試験系の利用の限界

一般に行われている *In vivo* 試験を実施しても特別に有用な情報が得られない化合物がある。これには、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、したがって *In vivo* 遺伝毒性試験の標的臓器に到達できない化合物が含まれる。このような化合物の例として、ある種の造影剤、アルミニウムを主成分とする制酸剤およびいくつかの皮膚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暴露されない場合には、*In vitro* 試験系のみで構成される試験の組合せが適切であろう。

4.4 発がん性試験との関連で考慮される追加の遺伝毒性試験

4.4.1 発がん性のための証拠

標準的 3 試験組合せでは陰性だが、発がん性試験において影響が認められ、それが非遺伝毒性的機構によるという明確な証拠がないような化合物に対しては、適切なモデルによる追加の遺伝毒性試験が実施されるかもしれない。作用機構の理解を助けるための追加試験には、*In vitro* 試験における代謝活性化の条件を変更することや、腫瘍誘発の標的臓器における遺伝的傷害を検出する *In vivo* 試験 (例えば、肝 UDS 試験、³²P ポストラベル、導入遺伝子での突然変異誘発、腫瘍関連遺伝子の遺伝的変化の分子レベルでの解析など) が含まれる。

4.4.2 化学構造がユニークな化合物グループ

比較的まれではあるが、ユニークな化学構造を有する全く斬新な化合物が医薬品として開発されることがある。そのような化合物で長期の発がん性試験が実施されていない場合には、遺伝毒性の追加検討が必要となるかもしれない。

5 . 標準的組合せにおける *In vitro* 試験の標準的方法

実験結果の再現性は、斬新な方法による研究や予期しない知見が得られた研究にとって必須の要素である；しかしながら、化学物質のための標準化され広く用いられている定型的な遺伝毒性試験では、完全な繰り返しを常には必要としない。これらの試験はその特性が十分に明らかにされており、また十分な内部コントロールを持っているので、プロトコール中に以下に示すような確認要素が組み込まれているならば、繰り返しは通常避けることができる。

細菌および哺乳類細胞を用いる遺伝子突然変異試験においては、用量設定試験の結果を基に最終的な突然変異試験での用量を選択することになる。その意味で、用量設定試験の結果は、報告された結果が正しいことを確認するのに十分なデータを提供するのである。細菌を用いる変異原性試験においては、すべての菌株を用い、代謝活性化の存在下と非存在下で、適切な陽性および陰性対照を設け、かつ変異体コロニーの計数が行われている予備的な用量設定試験は、引き続い

て実施する本試験の十分な反復とみなすことができる。同様に、マウスリンフォーマ tk 試験（下記参照）以外の哺乳類細胞を用いる遺伝子突然変異試験では、用量設定試験において、代謝活性化の存在下と非存在下で、適切な陽性および陰性対照を用い、かつ変異体の計数を行っていれば、その予備試験は完全な繰り返し試験の代替とするに十分である（注 10 参照）。

染色体損傷を *In vitro* で細胞遺伝学的に評価する場合には、代謝活性化の存在下および非存在下で実施し、適切な陽性および陰性対照を用い、被験物質で 3～6 時間処理し、処理開始から 1.5 正常細胞周期後に標本作製することが試験プロトコールに含まれる。代謝活性化非存在下の短時間処理で陰性の場合には、代謝活性化非存在下で約 1.5 正常細胞周期の連続処理が必要である。ある種の化合物、例えばある種の核酸類似物質やニトロサミン類では、より長時間の処理もしくは標本作製時期の延長により検出し易くなることがある。代謝活性化存在下で陰性の場合には、ケースバイケースで確認試験を行う必要があるだろう（注 11 参照）。どのような場合にも、分裂中期細胞中の倍数性細胞の割合を記録して、倍数体誘発に関する情報をとるべきである。分裂指数の増加や倍数体を有する細胞が増加した場合には、当該化合物が異数性誘発作用を有することを示唆している可能性がある。そのような場合には、より詳細な検討が必要になることがある。

マウスリンフォーマ tk 試験においては、代謝活性化の存在下および非存在下で実施し、適切な陽性及び陰性対照を用い、3～4 時間被験物質で処理することが試験プロトコールに含まれる。代謝活性化非存在下の短時間処理で陰性の場合には、代謝活性化非存在下での 24 時間連続処理を行う必要がある（注 4 参照）。代謝活性化存在下で陰性の場合には、ケースバイケースで確認試験を行う（注 11 参照）。どのような場合にも、マウスリンフォーマ tk 試験では以下の点を含める必要がある：(i) 小さなコロニーを主として誘発する陽性対照物質の使用、(ii) 陽性および陰性対照ならびに陽性反応が得られた場合には最大突然変異頻度が得られた用量を含めた少なくとも一用量以上でのコロニーサイズの解析。

上記の条件での試験で、明らかに陰性や陽性の結果が得られた場合には、通常はそれ以上の確認試験は不要である。

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に合わないことがあり、その場合には「不確か (equivocal)」とせざるを得ない。このような状況下では、統計学的手法の適用が結果の解釈に役立つが、適切な生物学的解釈が極めて重要である。如何なる場合においても、「不確か」な結果が得られた場合には通常追加試験の実施が指摘される。

6 . 注

(1) 現在哺乳類細胞における遺伝子突然変異を評価するのに適切だと見なされている試験系には、

マウスリンフォーマ L5178Y 細胞およびヒトリンパ芽球様細胞 TK6 の tk 遺伝子座、CHO、V79 あるいは L5178Y 細胞の hprt 遺伝子座および AS52 細胞の gpt 遺伝子座を用いる試験がある。

(2) tk 遺伝子に生じた変異の遺伝子解析からは、点突然変異、欠失、転座、組換え等を含む広範囲な遺伝的变化が生じていることが示されている。小さなコロニーとなる変異体は、主として染色体の構造異常や数的異常、あるいは組換え等の遺伝的変異により tkb 対立遺伝子が欠失している場合が多いことが示されている。もちろん hprt や gpt のような他の遺伝子も広範囲な欠失に対して感受性を示すという証拠もある。しかしながら、hprt 遺伝子は X 染色体上にあり、恐らくその近傍には必須遺伝子が存在することから、広範囲な欠失や数的変化が起こっても変異コロニーが発現しないことがしばしばあり、広範囲な遺伝的变化の検出という点では、tk 遺伝子と比較すると hprt 遺伝子には感受性に限界がある。

(3) 染色体損傷の細胞遺伝学的評価に関しては、最近用いられている試験系、すなわち哺乳類の樹立培養細胞株や全血あるいは単離したヒトリンパ球を用いた試験系では、同じ化合物で異なる結果が得られることは珍しいことではない。しかしながら、結果の違いの幾つかは、プロトコールの違いによるものであることを示す証拠がある。この場合には、第 5 章に記載した方法により結果の差異を最小化することが可能である。

細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性の遺伝毒性物質の大部分は、*In vitro* 染色体損傷のデータとマウスリンフォーマ tk 試験の結果が一致している。マウスリンフォーマ tk 試験は、染色体の構造異常および数的異常を誘発する物質を検出できることが多くの実験により示されている。医薬品の安全性試験という観点からは、マウスリンフォーマ tk 試験は *In vitro* での染色体損傷の直接的な解析の代替として受け入れることができる。コロニーサイズの解析は、マウスリンフォーマ tk 試験のプロトコールに必須の要件であるが、これを行っても変異体コロニーの損傷のタイプに関しては限られた情報しか得られない。マウスリンフォーマ tk 試験において、染色体の構造異常誘発物質や数的異常誘発物質による染色体変化の性質を明らかにするためには、よりメカニズムに関する検討が有用となる。そのような情報は tk 遺伝子の欠失あるいは tk 遺伝子を担っている染色体の欠失を明らかにするような研究によって得られる。

(4) マウスリンフォーマ tk 試験のマイクロタイター法とソフトアガー法において、代謝活性化非存在下の 24 時間処理法を用いると種々の核酸アナログおよび塩基アナログの検出力が増大する。同様に、マイクロタイター法の 24 時間処理により異数性誘発物質の検出力が高まる。現時点においては、ソフトアガー法ではこの結論を支持する証拠は得られていない。マイクロタイター法で 24 時間処理を行っても、特異性、すなわち非遺伝毒性物質に対して正しい結果を与えることにはほとんど影響を与えなかった。ソフトアガー法では、同じ処理により特異性の減少が認められた。この情報に基づくと、標準的組合せの中ではマイクロタイター法を用いることが推奨される。

(5) 標準的組合せの *In vitro* 試験、例えば細菌を用いる遺伝子突然変異試験と染色体損傷の細胞遺伝学的な評価が可能な試験、あるいは細菌を用いる遺伝子突然変異試験とマウスリンフォーマ tk 試験では陰性または弱い反応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は明らかに陽性となる遺伝毒性を示す発がん物質が少数ながら存在する。Procarbazine, hydroquinone, urethane ならびに benzene などの発がん物質がこの分類に入る。

(6) 短期試験およびその手法の絶間ない改良によって、遺伝毒性物質を検出するための感受性、実用性、簡便性、経済性の点でより優れた技術が得られるだろう。そのうちのあるものは、規制を目的としている遺伝毒性試験と最終的に置き換わるかもしれない。将来有望な試験としては、*in vitro* 小核試験がスクリーニングの目的のためには可能性があると思われる。

(7) 細菌を用いる復帰突然変異試験において、試験菌株に対して強い毒性作用を示すにもかかわらず、ほとんど致死量に近い極めて低い用量において遺伝毒性作用が検出されるある種の抗菌性物質がある（例えばニトロフラン系抗菌物質）。

(8) ある種の構造活性相関を有する化合物は、発がん性や変異原性と関連があると考えられている。構造活性相関の例としては以下の様な構造を有するものがある：alkylating electrophilic centers, unstable epoxides, aromatic amines, azo-structures, N-nitroso-groups, aromatic nitro-groups。

(9) ある種の特別な構造を有する化合物は、遺伝毒性の検出には特別なプロトコールの変更や追加が必要であることが明らかにされている（例えば、azo-group を含むもの、glycosides、活性化に nitroreduction が必要な nitroimidazole のような化合物、代謝活性化に他の哺乳類の S9 が必要な phenacetin など）。活性構造を有する化合物が選択した 3 試験組合せで陰性となった場合には、このようなプロトコールの変更が必要となる。

(10) 用量設定試験では、(i) 当該化合物に細胞毒性がある場合は毒性作用の用量反応に関する情報を得ること、(ii) 十分に毒性が認められる高い用量を含めること、(iii) 毒性を示す用量範囲で変異体の計数を行うこと、が必要である。当該化合物に細胞毒性がない場合においても、変異体の計数は必要である。

(11) 同じ種類および濃度の代謝活性化系を用いた繰り返しの試験は通常必要ない。しかしながら、特別な代謝が必要なある種の化合物については代謝活性化系の変更が必要である。この場合には、当該クラスの物質を代謝活性化するのに適切だと認められている外来の代謝活性化系の使用が通常求められる。

7 . 用語の解説

細胞遺伝学的評価：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。

DNA 付加体：化学物質と DNA の（共有）結合。

DNA 修復：損傷した DNA 配列の再構築。

DNA 鎖切断：DNA の単鎖あるいは二本鎖切断。

染色体の数的変化：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変化していること；株細胞では、染色体数の中央値からはずれていること。

組み換え：DNA 切断とそれに続く均衡あるいは不均衡な再結合

導入遺伝子：体細胞や生殖細胞の宿主遺伝子に組み込まれた外来の遺伝子。