

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

医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて

医薬品の製造（輸入）承認申請に際し添付すべき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「医薬品の製造（輸入）承認申請に必要な毒性試験のガイドラインについて」別添「医薬品毒性試験法ガイドライン」により取り扱ってきたところであり、これに加え、遺伝毒性試験（変異原性試験）については、ICH（日米EU医薬品規制調和国際会議）における合意に基づいたガイダンスを公表してきたところである。

今般、これらICHガイダンスを踏まえて「医薬品毒性試験法ガイドライン」の遺伝毒性試験に関する内容を見直し、平成11年4月8日医薬発第481号医薬安全局長通知「医薬品の承認申請について」記の第2の3に規定する試験の指針として、新たに「遺伝毒性試験ガイドライン」を別添のとおり定めたので、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. ガイドラインの要点

- (1) 基本的には、2つのICHガイダンス（平成8年7月2日薬審第444号「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」及び平成10年7月9日医薬審第554号「遺伝毒性試験：医薬品の遺伝毒性試験の標準的組合せ」）に沿って「医薬品毒性試験法ガイドライン」の遺伝毒性試験に関する内容（以下「旧ガイドライン」という。）を見直したものであり、旧ガイドラインにはなかった基本的な考え方、試験実施上の留意点や結果の評価等が含められている。
- (2) ICHガイダンスは旧ガイドラインの全ての項目を網羅しているものではないので、ICHガイダンスに示されていない項目については、改訂OECDガイドラインを基に改訂が行われた平成9年10月31日付「新規化学物質に係る試験の方法について」（化審法ガイドライン）を基本的に取り込んでいる。
- (3) 旧ガイドラインからの主な変更内容は次のとおりである。
 - (a) 実施すべき試験の1つである哺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TK試験を用いることができることとなったため、マウスリンフォーマTK試験のガイドラインが新たに加えられている。
 - (b) 細菌を用いる復帰突然変異試験においては、用いる試験菌株の選択の幅が広められている。
 - (c) ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験においては、最初に代謝活性化存在下及び非存在下での短時間処理法による試験を行うこととし、陰性結果が得られた場合には確認試験を行うこととされている。また、これらの試験において細胞増殖

抑制を計測することとされている。

- (d) 上記の*in vitro* 試験については標準的方法が述べられており、この方法を用いた場合には同一条件での試験の繰り返しは必要ないとされている。
- (e) げっ歯類を用いる小核試験においては、末梢血を用いる試験が骨髄を用いる試験と同様に受け入れられるとされている。また、結果が陰性となった場合に、被験物質が標的臓器に到達していることを確認することとされている。
- (f) 従来と呼称である「変異原性試験」を「遺伝毒性試験」に改めている。

2．今後の取扱い

平成12年4月1日以降に申請される医薬品に添付される変異原性（遺伝毒性）に関する資料は、本ガイドラインに基づいたものであること。ただし、それ以前に開始されている試験は、旧ガイドラインに基づくものであっても差し支えない。

3．通知の改正

平成元年9月11日薬審1第24号「医薬品の製造（輸入）承認申請に必要な毒性試験のガイドラインについて」別添「医薬品毒性試験法ガイドライン」の〔4〕変異原性試験を削る。

遺伝毒性試験ガイドライン

目 次

遺伝毒性試験法概論

- 1 . はじめに
- 2 . 遺伝毒性試験の基本的考え方
- 3 . 遺伝毒性試験の標準的組合せ
- 4 . 標準的試験組合せの変更
 - 4.1 細菌を用いる試験系の限界
 - 4.2 化学構造的に遺伝毒性が予想される化合物
 - 4.3 標準的 in vivo 試験系の限界
 - 4.4 がん原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
 - 4.4.2 化学構造がユニークな化合物グループ
- 5 . 遺伝毒性試験実施上の留意点
 - 5.1 In vitro 試験に関するガイダンス
 - 5.1.1 毒性を示さない化合物の最高用量
 - 5.1.2 必要な細胞毒性のレベル
 - 5.1.3 難溶性化合物に対する用量設定
 - 5.1.4 In vitro 試験の標準的方法
 - 5.2 In vivo 試験に関するガイダンス
 - 5.2.1 In vivo で染色体損傷を検出するための骨髄を用いる試験系
 - 5.2.2 骨髄小核試験における雌雄げっ歯類の使用
- 6 . 試験結果の評価のためのガイダンス
 - 6.1 In vitro 試験結果の評価
 - 6.1.1 In vitro 試験での陽性結果
 - 6.1.2 In vitro 試験での陰性結果
 - 6.2 In vivo 試験結果の評価
 - 6.2.1 In vitro 試験結果が陰性の場合
 - 6.2.2 In vitro 試験結果が陽性の場合
 - 6.2.3 標的臓器での暴露証明の原則
 - 6.2.4 生殖細胞に対する遺伝毒性物質の検出
- 7 . 補足説明
 - 7.1 標準的組合せ試験の一般的特徴
 - 7.2 標準的組合せ以外の試験について

8 . 注

. 遺伝毒性試験法

- 1 . 細菌を用いる復帰突然変異試験
- 2 . ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験
- 3 . マウスリンフォーマTK 試験
- 4 . げっ歯類を用いる小核試験

. 文 献

． 遺伝毒性試験法概論

1． はじめに

医薬品規制ハーモナイゼーション国際会議(International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: ICH)での最終合意に基づき、遺伝毒性試験ガイドラインの改正を行う。ICH の遺伝毒性専門家会議では、今後もその時点での科学技術の進歩に応じたガイダンスの修正、追加を計画しており、本ガイドラインも必要に応じて改正する。

2． 遺伝毒性試験の基本的考え方

遺伝毒性試験とは、直接あるいは間接的に遺伝的な障害を引き起こす物質を検出するために考案された試験で、種々の機構により引き起こされる変化を *in vitro* 及び *in vivo* で検出することができるように工夫された試験と定義することができる。これらの試験は、DNA の損傷とその傷が固定されることによる障害を検出することができる。DNA に生じた傷が固定されることによりもたらされる遺伝子突然変異、染色体の広範囲な損傷、組換え及び数的変化は、遺伝的障害の発現に不可欠なものであると同時に、がん化の過程においても発現機構の一部を担っている可能性がある。

遺伝毒性試験で陽性となった物質は、ヒトに対する発がん物質の可能性もある。更に、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ことから、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。また、それらの試験結果は発がん性試験結果の解釈にも重要な役割を果たす。

一方、遺伝毒性試験で陽性となった物質は遺伝的障害物質である可能性もある。すなわち遺伝性疾患を引き起こす可能性がある。遺伝毒性試験結果とヒトでの遺伝性疾患との関係について証明するのは困難ではあるが、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、ある物質に遺伝毒性が疑われた場合は、ある物質に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。

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すべ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* 及び *in vivo* の遺伝毒性試験を組合せて実施するのが通常の方法である。これ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。

次のような標準的試験の組合せが推奨される（補足説明 7.1）。

i) 細菌を用いる遺伝子突然変異試験

- ii) ほ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検出のための *in vivo* 試験

本ガイドラインに従って実施したこれら 3 試験の組合せにおいてすべて陰性の結果を示す化合物は，遺伝毒性活性を持たないという点で十分信頼できるレベルにあると考えられる（注 1）．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（補足説明 7.2）．

4．標準的試験組合せの変更

以下に示すような場合には標準的な 3 試験の組合せを変更し，より適切な手法で評価することができる．

4.1 細菌を用いる試験系の限界

細菌を用いる復帰突然変異試験を実施しても，適切あるいは十分な情報が得られない場合がある．これらには細菌に対し強い毒性を示す化合物（例えば，ある種の抗生物質）や，ほ乳類細胞複製系への阻害作用が知られている化合物（例えば，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．このような場合には，通常二つの異なったほ乳類細胞を用い，二つの異なった指標 [遺伝子突然変異（注 2）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用量設定試験のように限定された試験であれ，実施することが依然重要である（注 3）．

4.2 化学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 4）については，通常は標準的組合せで検出できる．しかし，標準的組合せにおいてすべて陰性結果を示すが，構造的に遺伝毒性が予想される物質については，追加試験が必要な場合がある．新しい試験を追加するか試験のプロトコールを変更するかは，化学的性質，既知の反応性及び代謝データに基づいて判断する（注 5）．

4.3 標準的 *in vivo* 試験系の限界

一般に行われている *in vivo* 試験を実施しても適切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体内への吸収が示されず，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．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及びある種の皮膚用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 がん原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

標準的組合せではすべて陰性でかつがん原性試験において影響が認められるものについて、非遺伝毒性的機構によるという明確な証拠がない化合物に対しては、適切なモデルに基づく遺伝毒性試験の追加が有効かもしれない。作用機構の理解を助けるための追加試験としては、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毒性を検出する in vivo 試験（例えば、肝 UDS 試験、³²P ポストラベル法、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がん原性試験が実施されていない場合には、遺伝毒性試験の追加検討が必要となるかもしれない。

5. 遺伝毒性試験実施上の留意点

5.1 In vitro 試験に関するガイダンス

5.1.1 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、細菌を用いる試験では 5 mg/plate、ほ乳類細胞を用いる試験では 5 mg/mL 又は 10 mM（いずれか低い方）とする。

5.1.2 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あるものは、in vitro 試験系においてはある程度細胞毒性を示すような濃度で試験しない限り検出できない。一方、過剰な毒性により、当該指標が適切に評価できなくなることもある。ほ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機構により、細胞毒性に関連した陽性結果が得られる場合がある（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）。この現象は、被験物質がある特定濃度（閾値）に達したときに初めて現れる傾向にある。

5.1.3 難溶性化合物に対する用量設定

細菌及びほ乳類細胞を用いる遺伝毒性試験において、用量相関性のある遺伝毒性が溶解限界を超えた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6）。培養液中の血清もしくは S9 mix の成分により析出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。更に、ある種のほ乳類細胞（例えばチャイニーズハムスタ

一の V79, CHO 並びに CHL 細胞) は貪食作用による細胞外物質の取り込み機能を有し、固形粒子を取り込み、その後細胞質中に分散させることがある。不溶性の化合物のあるものは、遺伝毒性を示す不純物を含んでいる可能性がある。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点にも注意する必要がある。

一方、析出物が沈殿する場合には、当該指標の測定が妨げられたり、被験物質処理が物理的に困難になる(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7)ことがある。また、そのような場合には、被験物質が細胞内に入って DNA に作用することを妨げたりする可能性がある。

下記の留意点は、培地中の被験物質を対象として、比較的難溶性化合物を試験するために提示されたものである。

細胞毒性が全く観察されない場合には、最高用量は被験物質が析出する最低濃度とする。用量相関性のある細胞毒性あるいは遺伝毒性が認められる場合には、溶解性に関係なく、最高用量はこれらを基準として決定する。この場合通常、析出の見られる用量が 2 以上(5.1.1.項の上限用量を超えない)あることが望ましい。析出物が試験の測定を妨げる場合には、上記の条件が得られなくてもよい。すべての場合において、析出物は処理の開始と終了時に、肉眼で観察する。

5.1.4 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、医薬品の評価のために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、完全な繰り返しは必要としない。細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験及びマウスリンフォーマ TK 試験では、その特性が十分に明らかにされており、本ガイドラインに示された標準的方法に基づいて実施されれば、プロトコール中に十分な内部コントロールを持ち、確認要素が組み込まれているので、試験の繰り返しは通常行う必要はない。

また、マウスリンフォーマ TK 試験以外のほ乳類細胞を用いる遺伝子突然変異試験においても、用量設定試験において、代謝活性化系の存在下と非存在下で、適切な陽性及び陰性対照を用い、かつ変異体の計数を行っていれば、その用量設定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8)。

本ガイドラインに示した標準的方法で試験を実施し、明らかな陰性や陽性の結果が得られた場合には、それ以上の確認試験は不要である。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もある。その場合の判定には「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。しかしながら、「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必要となる。

5.2 In vivo 試験に関するガイダンス

5.2.1 In vivo で染色体損傷を検出するための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、様々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すべては、まず最初の事象として生じた1～数カ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じると、小核が形成される。したがって、小核を指標とする試験は、in vivo で骨髄細胞を用いる染色体異常試験と共に染色体異常誘発物質の検出系として受け入れられる（注9）。小核は、また、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も検出できる可能性がある（注10）。

結論として、in vivo での骨髄細胞における染色体異常及び小核を有する未成熟赤血球（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、又は染色体異常/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赤血球（網赤血球）での測定が、骨髄でのそれと同等に受け入れられる（注11）。

5.2.2 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の高いことが示されている（注12）。小核誘発作用においては、性により反応の定量性に相違の生じる場合もあるものもあるが、陽性、陰性の判定には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相違が明確にある場合には雌雄両性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13）。骨髄小核試験には、ラットとマウスが共に使用できる（注14）。

すなわち、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。特定の性に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。

6. 試験結果の評価のためのガイダンス

げっ歯類の発がん性予測に対して偽陰性及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。ここに示した試験の組合せは、多くの既知ヒト発がん物質がそうであるように、主に直接的に遺伝毒性を誘発する物質を検出するが、非遺伝毒性発がん物質を検出できない。In vitro での代謝活性化系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得られることがあり、遺伝毒性物質が偽陰性となる確率を低くするように試験の組み合わせが考えられている。しかしながら、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的障害性/発

がん性を示すことを意味するものではない。

6.1 In vitro 試験結果の評価

6.1.1 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場合のあることが報告されている。したがって、すべての 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。これらの項目はすべ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る。

- i) 陰性あるいは溶媒対照の背景データと比較して有意に増加し、意義のある遺伝毒性的な影響と考えられるか？
- ii) 用量依存性はあるか？
- 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 15）
- 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析出物の沈殿）（注 7）
- vi) ほ乳類細胞を用いる試験系において、その作用は生存率が極めて低い場合にのみ見られるか？
- 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、遺伝毒性が弱い、あるいは非常に高用量でのみ遺伝毒性を示す場合には、このようなケースの可能性がある）
- 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？

6.1.2 In vitro 試験での陰性結果

In vitro 試験で陰性の場合には、次のような点を考慮すべきであろう。ここに掲げた例はすべ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る。

- i) 被験物質の構造やその代謝経路から考えて、標準的な in vitro 代謝活性化系（例えばげっ歯類肝 S9）が適切であったかどうか？
- ii) 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？

6.2 In vivo 試験結果の評価

6.2.1 In vitro 試験結果が陰性の場合

In vivo 試験の利点は、その性質上、ヒトに使用した場合に関連する吸収、分布並びに排泄という in vitro 試験にはない特性にある。更に、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。しかし、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 試験系は限られており、骨髄あるいは末梢血を

用いる細胞遺伝学的試験が主として用いられている。In vitro 試験の結果がすべて陰性の場合には、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には通常十分であると考えられる。

6.2.2 In vitro 試験結果が陽性の場合

一つ以上の in vitro 試験で生物学的に意義のある陽性結果を示す物質（6.1.1. 参照）については、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 試験を追加することにより更に有用な情報の得られることがある。In vivo で暴露される標的細胞や、in vitro で検出される遺伝毒性的指標を基に、追加する in vivo 試験系を選択する。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現在はまだない。ラットやマウスの各組織の内在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。このような遺伝子突然変異を検出する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、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 試験はより科学的に妥当なものを選択すべきである（注 16）。

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（注 15）。

被験物質の遺伝毒性の評価には、in vitro 及び in vivo 両試験の本質と限界を考慮し、得られた結果を総合的に判断しなければならない。

6.2.3 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結果を解釈する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依存する。In vitro 試験で明確に遺伝毒性が検出されているのに、in vivo 試験で陰性となる場合がある。標的組織以外の組織で毒性が現れて用量限界に達するため、標的組織で遺伝毒性を発現するのにじゅうぶん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できる。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、標的組織が被験物質によって適切に暴露されていない場合には、その遺伝毒性試験における陰性結果はほとんど意味をなさないものと考えられる。

6.2.3.1 In vitro 試験結果が陽性の場合

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) 当該 in vivo 試験と同一用量及び同一標本作製時期における、標的組織での毒性の発現、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又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 17）。

- iii) 標的組織での被験物質又はその関連物質の直接的測定。
- iv) オ - トラジオグラフィーによる組織暴露の評価。

ii) ~ iv)の方法においては、可能な限り in vivo 試験と同じ動物種、系統、及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。

6.2.3.2 In vitro 試験結果が陰性の場合

この場合においても、in vivo 暴露の証拠が必要であり、6.2.3.1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。

6.2.4 生殖細胞に対する遺伝毒性物質の検出

生殖細胞に対する遺伝毒性物質の検出に関する比較研究の結果から、これらの物質のほとんどは体細胞を用いた試験で定性的に検出できることが示されている。したがって、体細胞を用いた in vivo 遺伝毒性試験で陰性の場合、生殖細胞に対する作用もないことを示していると考えられる（注18）。

7. 補足説明

7.1 標準的組合せ試験の一般的特徴

- 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な試験系である。この試験は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) ほ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、ほ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ほ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2）、並びに遺伝子突然変異及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19）。注20及び21に述べている科学的な情報は、適切な試験プロトコールに従えば、種々の in vitro 染色体損傷検出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、本ガイドラインに示された標準的方法に基づいて試験が実施されていれば、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 22）。げっ歯類の造血細胞を用いる染色体損傷を検出する 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 染色体損傷検出試験としては，骨髓細胞での染色体異常の解析でも，骨髓又は末梢血赤血球での小核の解析でもよい。

7.2 標準的組合せ以外の試験について

本ガイドラインでは，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（例えば，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相当であると考えられていることを意味しているのではない。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。更に，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の試験は含まれていない。しかしながら，染色体の数的異常に関する情報は，in vitro 及び 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，倍数体及び小核の誘発がある。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実験的証拠もある（注 20, 21）。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。

8. 注

- (1) 短期試験及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，医薬品のための標準的な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。
- (2) 現在ほ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，マウスリンパ腫 L5178Y 細胞及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* 遺伝子座及び AS52 細胞の *gpt* 遺伝子座を用いる試験がある。

- (3) 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）。
- (4) ある種の構造活性相関を有する化合物は、発がん性や遺伝的障害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ような構造を有するものがある：アルキル化剤、活性エポキシド、芳香族アミン、アゾ化合物、ニトロソ化合物、芳香族ニトロ化合物。
- (5) 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、アゾ基を含むもの、グリコシド、活性化にニトロ還元が必要なニトロイミダゾールのような化合物、代謝活性化に他のほ乳類のS9が必要なフェナセチンなど）。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。
- (6) 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、多環芳香族炭化水素類、フェニレンジアミン類、ヘプタクロルなどが含まれる。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、メルボルン国際会議の'in vitro'サブグループの報告書(Kirkland, 1994)に記載されている。
- (7) 沈澱状態で被験物質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：ヒト末梢血リンパ球やマウスリンパ腫細胞）を用いる場合は、最高用量として析出が認められる最低濃度を使用するのが妥当である。
- (8) 用量設定試験で、(i) 当該被験物質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。当該被験物質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。

- (9) 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; 1994; Hayashi, 1994），小核試験及び染色体異常試験はいずれも被験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．同じ被験物質について行われた，マウス小核試験とラット骨髓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）及び量的（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．
- (10) 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の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．FISH (Fluorescence in situ hybridization)法のように，間期の核の個々の（ほ乳類）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．
- (11) 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により，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 (The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test, 1992)．同一個体から投与 0, 24, 48, 72 時間後（又はそれ以上）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 施設で試験を実施した（46 機関が参加）．その結果，すべ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 48 時間後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，メルボルンでの国際ワークショップで，この試験法は骨髓小核試験と同等であると結論された (Hayashi et al., 1994)．また，ラットを用いる末梢血小核試験についても，日本の小核試験共同研究グループにより有効性が確認されつつある．
- (12) 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（及び 48 の非染色体異常誘発物質）についてデータが解析され，同じ結論に達した (Hayashi et al., 1994)．
- (13) 小核と染色体異常の誘発には関連性があるので，骨髓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) ．

- (14) ラット，マウスは共に骨髓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(Albanese et al., 1988) ．更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 ．
- (15) *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* 系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* 系では解毒されない可能性，(iii) *in vivo* 系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(Ashby, 1983) ．
- (16) *In vivo* 試験のデータベースとしては，骨髓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 試験と骨髓小核試験を組み合わせると偽陽性がほとんどなくなり，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及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 ポストラベル法，DNA 鎖切断試験など）の方がより適切な場合があるので，二次選択試験として 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 ．
- (17) 例えば，小核試験において以下のように考えられる ．すなわち，骨髓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，骨髓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，これら二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，骨髓が暴露されていることを実証するのにじゅうぶんな相関関係がある ．
- (18) 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遺伝毒性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 ．

- (19) *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、組換えなど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、あるいは組換えなどの遺伝的変異により標的となる *tk* 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。
- (20) 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、すなわちほ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、各種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* 染色体異常試験の結果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、染色体の構造異常及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。
- (21) マウスリンフォーマ TK 試験のマイクロウェル法(96穴マイクロウェルプレートを用いる方法)とソフトアガー法において、代謝活性化系非存在下の24時間処理法を用いると種々の核酸アナログ及び塩基アナログの遺伝毒性物質に対する検出力が増大する。同様に、マイクロウェル法の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。マイクロウェル法で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ウェル法を用いることが推奨される。

- (22) 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を細胞遺伝学的に評価する試験，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 試験では陰性又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．プロカルバジン，ヒドロキノン，ウレタン並びにベンゼンなどの発がん物質がこの分類に入る．

．遺伝毒性試験法

1．細菌を用いる復帰突然変異試験

本試験はネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) 及び大腸菌 (*Escherichia coli*) を用いる遺伝子突然変異試験である．前者では，ヒスチジン要求性の変異 (his^- His^+)，後者では，トリプトファン要求性の変異 (trp^- Trp^+) を指標としている．これらの菌株の多くは DNA 損傷の除去修復能を欠損しており，紫外線あるいは種々の遺伝毒性物質に対して高い感受性を示す．本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．

1) 目的

細菌を用いて，被験物質の遺伝子突然変異誘発性の有無を検索する．

2) 使用菌株

以下の5菌株を用いて試験を行う．

- (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

DNAにクロスリンクする化合物を検出する時には，ネズミチフス菌ではTA102を含めるか，大腸菌では除去修復能が野生型のWP2株またはWP2/pKM101株を追加する．ただし，そのような化合物は染色体損傷を検索する試験でも検出可能である(注1)．

3) 試験法

ブレインキュベーション法またはプレート法のいずれかで実施する．科学的に正当な理由があれば，他の方法を用いてもよい．いずれの方法においても，代謝活性化系の存在下及び非存在下について試験を行う．代謝活性化系の存在下で行う試験には，適切な薬物代謝酵素誘導剤(例えばフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンとの併用など)で処理したげっ歯類(通常ラット)肝ホモジネート9000×g上清

画分 (S9) に補酵素などを加えたS9 mixを用いる。S9のS9 mix中での濃度は5～30%の範囲内 (通常10%) とする (注2)。

4) 被験物質の調製

被験物質が水溶性の場合は滅菌蒸留水あるいは生理食塩液などに溶解し、水に不溶の場合はジメチルスルホキシド (DMSO) などに溶解する。いずれにも溶解しない場合には懸濁液を用いるか、試験菌及びS9 mixの活性に影響を及ぼさない適切な溶媒を用いる。

5) 用量段階

適切な用量間隔 (原則として公比 10以下) で5段階以上の解析できる用量を用いる。最高用量は、あらかじめ用量設定試験を行い、生育阻害及び溶解性を考慮に入れて設定する。原則として、生育阻害の現れる用量を最高用量とし、生育阻害の現れない場合は5 mg/plateを最高用量とする。難溶性物質で試験に用いた菌株において生育阻害がみられない場合には、析出する用量を最高用量とすることができる (注3)。

6) 対照

陰性対照として溶媒処理群を、陽性対照として適切な既知の変異原物質による処理群を設ける (注4)。

7) プレート数

被験物質の各用量、並びに陰性及び陽性対照について、原則としてそれぞれ2枚以上のプレートを用いる。

8) 復帰変異コロニーの観察

全てのプレートを原則として37℃で48～72時間培養した後に、プレート毎に復帰変異コロニー数を計測し、記録する。同時に生育阻害を観察し、それが認められた場合には、その用量を記録する。また、被験物質の析出が認められた場合にも記録する (注5)。

9) 再現性

原則として、試験結果には再現性がなければならない。ただし、全菌株を用いて、代謝活性化系の存在下及び非存在下で、陰性対照及び陽性対照も含めた用量設定試験が各用量2枚以上のプレートを用いて行われている場合には、本試験と合わせて再現性の確認に用いることができる。用量設定試験及び本試験の結果に再現性が認められない場合には、再現性を確認する試験を実施する。

10) 結果の判定

復帰変異コロニー数が陰性対照に比較して明らかに増加し、かつ、その増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に陽性と判定する (注6)。明確に陽性あるいは陰性と結論づけられない場合には、適切な実験条件で確認試験を実施する。

11) 結果の表示

各プレート毎の復帰変異コロニー数を示すと共に、各用量毎にその平均値を表示

する。また、処理終了時（または変異コロニー計測時）の被験物質の析出並びに生育阻害も表示する。

1.2) 注

- (1) ネズミチフス菌株（TA1535，TA1537，TA97，TA97a，TA98，TA100）では標的となっているヒスチジン遺伝子のG-C（guanine-cytosine）塩基対の変化が検出できる。しかし、ある種の変異原はA-T（adenine-thymine）塩基対に突然変異を生じることが明らかにされている。そのため、本ガイドラインではG-C部位での突然変異を検出できる菌株と、A-T部位での突然変異を検出できる菌株を組み合わせ使用する。A-T塩基対の変異を検出できる菌株として、*hisG*遺伝子のA-T部位の変異を検出できるネズミチフス菌のTA102株や、*trpE*遺伝子のA-T部位の変異を検出できる大腸菌のWP2*uvrA*株と、この大腸菌に誤りがち修復を増大させる*mucAB*遺伝子をもつpKM101プラスミドを導入したWP2*uvrA*/pKM101株がそれに該当する。

菌株はいずれも適切な研究機関より、品質が保証されたものを入手する。また、試験菌株の特性（アミノ酸要求性、薬剤耐性因子の有無、紫外線に対する感受性、膜変異など）を確認し、特性が適切なものを保存して、試験に使用する。

- (2) 被験物質の化学構造によっては、通常使用のS9量（10%）よりも少ない場合（例えば芳香族アミン類など）や多い場合（例えばニトロサミン類など）に最適S9濃度となるものがある。またハムスターやマウスの肝S9の方がラットよりも代謝活性化が適切な場合（例えばフェナセチンやハロゲン化合物類など）がある。被験物質の化学構造によっては、適切なS9濃度やS9調製用の動物種を選択し実施することが望ましい。
- (3) 難溶性化合物を懸濁状態で試験した場合に、懸濁の用量範囲で用量相関性のある陽性反応が得られることがある。特に、S9 mixを添加する場合には、S9 mix中で析出物の溶解性が高まることが考えられる。そのため、析出用量範囲で生育阻害（抗菌性）が認められる場合には、溶解性に関係なく、最高用量には明らかな生育阻害を示す濃度を5 mg/plateを超えない範囲で選択しなければならない。析出物によって変異コロニー計測が不能な場合には、必ずしも最高用量が明らかな生育阻害を示す濃度でなくてもよい。なお、難溶性で、かつ全く生育阻害を示さない化合物の場合には析出の有無に関わらず5 mg/plateを最高用量とすることができる。この場合、全ての用量で析出が認められてもよい。あるいは被験物質が析出する最低用量を最高用量とすることができる。
- (4) 実験ごとに陰性及び陽性対照をおく。陰性対照には原則として溶媒のみを加える。陽性対照には、試験菌株の種類に応じ、また、代謝活性化系の有無に応じた適切な既知変異原物質を適切な用量で用いる。参考までに、一般的に広く使用されている既知変異原物質の例を次の表に示す。

試験菌株の種類	代謝活性化の有無
---------	----------

		無	有
ネズミチフス菌	TA1535	2-AA	ENNG NaN ₃
	TA1537	2-AA B[a]P	ICR-191 9-AA
	TA97 TA97a	2-AA B[a]P	ICR-191 9-AA
	TA98	2-AA B[a]P	AF-2 2-NF 4NQO
	TA100	2-AA B[a]P	AF-2 ENNG 4NQO NaN ₃ MMS
	TA102	2-AA B[a]P	BM MMC CHP
大腸菌	WP2 <i>uvrA</i>	2-AA	AF-2 ENNG
	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	2-AA	AF-2 ENNG
	WP2/pKM101	2-AA	MMC

ENNG : *N*-エチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン

4NQO : 4-ニトロキノリン-*N*-オキシド

NaN₃ : アジ化ナトリウム

9-AA : 9-アミノアクリジン

2-NF : 2-ニトロフルオレン

BM : プレオマイシン

MMC : マイトマイシンC

MMS : メタンスルホン酸メチル

CHP: クメンヒドロペルオキシド

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

2-AA : 2-アミノアントラセン

B[a]P : ベンツ[a]ピレン

- (5) 試験菌株の生育阻害は復帰変異コロニー数の減少や背景の菌の生育 (background lawn) の減少や透明化によって判断する。背景の菌の生育の観察は実体顕微鏡を用いて実施する。被験物質の析出の有無については、処理の開始と終了時 (または変異コロニー計測時) に肉眼で観察する。
- (6) 例えば判断基準として、プレート当たりの復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加し、かつ、用量依存性が認められた場合に陽性と判定する2倍法などが統計学的手法と並用されている。結果の判定に際しては、必要に応じ

背景データを考慮すると共に、統計学的手法を用いる場合においても、最終的な判定は試験条件下での生物学的妥当性を考慮して行うことが望ましい。

2. ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

本試験はほ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* 試験である。染色体異常は、形態の変化（構造異常）と染色体数の変化（異数性、倍数性）に分けられる。構造異常は通常 DNA 鎖切断に起因すると考えられる。一方、数的異常は主として分裂装置への作用の結果生じる染色体の不分離や分裂の停止に起因する。構造異常や数的異常が誘発された細胞の多くは増殖できずに死滅すると考えられているが、生存した場合には正常と異なる染色体構成（染色体変異）を持つ細胞集団に移行する可能性がある（注1）。

1) 目的

ほ乳類培養細胞を用いて、被験物質の染色体構造異常誘発性の有無を検索する。更に、倍数体等の出現頻度に関する情報をとる（注2）。

2) 使用細胞

チャイニーズハムスター細胞株（例えば CHL/IU, CHO）、ヒト末梢血リンパ球、もしくはその他の初代、継代又は株細胞を用いる。試験に用いる細胞については、染色体数（モード数）、細胞周期、マイコプラズマの汚染の有無などを調べておく（注3）。

3) 試験法

増殖期にある細胞を用い、最初に短時間処理法として代謝活性化系の存在下及び非存在下について、3~6時間被験物質で処理し、処理開始より約 1.5 正常細胞周期後に染色体標本を作製する。代謝活性化系の非存在下の短時間処理法の結果が陰性の場合には、代謝活性化系非存在下で約 1.5 正常細胞周期の連続処理法による試験を実施する。代謝活性化系の存在下の短時間処理法の結果が陰性の場合には、必要に応じて代謝活性化系存在下での確認試験を行う（注4）。

代謝活性化には、適切な薬物代謝酵素誘導剤（例えばフェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンとの併用など）で処理したげっ歯類（通常ラット）肝ホモジネートの 9000 × g 上清画分（S9）に補酵素などを加えた S9 mix を用いる。S9 の最終濃度は 1~10% の範囲内（通常 5%）とする。

4) 被験物質の調製

被験物質を適切な溶媒に溶解又は適切な媒体に懸濁させる。被験物質が液体の場合は直接試験系に加えてもよい。被験物質が水溶性の場合は生理食塩液などを用いて溶解さ

せ、水に不溶の場合はジメチルスルホキシド（DMSO）などを用いて溶解させる。必要に応じてカルボキシメチルセルロース（CMC）ナトリウムなどを用いて均一な懸濁液を調製する。

5) 用量段階

適切な間隔（原則として公比 10 以下）で 3 段階以上の染色体分析ができる用量を用いる。最高用量は、あらかじめ 5 mg/mL 又は 10 mM（いずれか低い方）を最高用量とした細胞増殖抑制試験を行って設定することが望ましい。細胞増殖抑制の指標は、株細胞の場合、細胞数または単層培養密度とし、ヒト末梢血リンパ球では分裂指数を用いてもよい。原則として、被験物質の培養液中での溶解性にかかわらず、細胞増殖が明らかに 50% 以上抑制される用量を最高用量とする。細胞増殖は短時間処理法による試験あるいは連続処理法による試験においても染色体標本作製時に計測する。50% 以上の細胞増殖抑制が認められない場合は、5 mg/mL 又は 10 mM（いずれか低い方）を最高用量とする。細胞増殖抑制が認められず、処理終了時に被験物質の析出が認められた場合には、析出が認められる最低濃度を試験の最高用量とすることができる。用量相関性のある細胞増殖抑制が被験物質の析出状況下で認められる場合には、析出の見られる濃度が 2 用量以上あることが望ましい。析出物が試験の測定を妨げる場合には、要求されている細胞増殖抑制が得られなくても良い（注 5）。

6) 対照

陰性対照として溶媒処理群を、陽性対照として適切な既知の染色体異常誘発物質による処理群を設ける（注 6）。必要に応じ、溶媒を加えない無処理対照群を置く。

7) プレート数

被験物質の各用量群、並びに陰性及び陽性対照群について、原則としてそれぞれ 2 枚のプレートを用いる。

8) 染色体異常の観察

スライド標本はコード化し、処理条件がわからない状況で観察する。染色体構造異常については、各用量当たり 200 個以上のよく広がった分裂中期細胞（染色体数がモード数 ± 2 ）を観察し、染色体構造異常をもつ細胞数を記録する。更に、構造異常の種類別に細胞数あるいは出現数を記録する。2 枚のプレートを用いた場合には、原則としてプレート当たり 100 個以上の分裂中期細胞を観察する。ギャップは染色分体幅よりも狭い非染色性部位と定義する。ギャップは他の異常と区別して記録するが、構造異常の判定には含めない。染色体の数的異常については、各用量当たり 200 個以上の分裂中期細胞について観察し、倍数体等の出現数を記録する。

9) 結果の判定

染色体異常をもつ細胞の出現頻度が陰性対照に比較して明らかに上昇し、かつ、その作用に用量依存性又は再現性が認められた場合に陽性と判定する（注 7）。明確に陽性あるいは陰性と結論づけられない場合には、適切な実験条件下で確認試験を実施する。

10) 結果の表示

プレート毎に、染色体構造異常をもつ細胞数及びその出現頻度(%)並びに構造異常の種類別に細胞数あるいは出現数を表示する。また、各群の平均値を表示する。倍数体等についてもその細胞数と出現頻度(%)を表示する。用量設定のための細胞増殖抑制試験並びに染色体分析のための短時間処理法による試験あるいは連続処理法による試験における各用量群と陰性対照群の細胞増殖に関するデータを表示する。被験物質の析出が見られた場合には、その用量を明記する。

11) 注

- (1) 染色体変異は多くのヒトの遺伝的疾患の原因であり、また、ヒトや実験動物のがんの誘発において、体細胞のがん遺伝子やがん抑制遺伝子の変化を引き起こす染色体変異が認められている。
- (2) 本試験は染色体の数的異常を検出するために計画された試験ではない。しかしながら、分裂中期細胞中の倍数性細胞（倍数体や核内倍加）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性細胞が増加した場合には、被験物質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。
- (3) 細胞周期は、増殖曲線から求めた世代倍加時間でよい。また、マイコプラズマの検出には、蛍光染色法やPCR法などがある。
- (4) 被験物質によっては顕著な細胞周期の遅延が生じる場合がある。また、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異常を検出し易くなる場合がある。これらの可能性が考慮される場合は、必要に応じて、代謝活性化系非存在下で約 1.5 正常細胞周期よりも長い連続処理を行うか、もしくは約 1.5 正常細胞周期の連続処理後、回復時間を設けたのちに標本作製をすることにより、確認試験を行う。
また、代謝活性化系の存在下の確認試験については、同じ種類及び濃度の S9 を用いた繰り返しの試験は、通常必要ない。特別な代謝が必要とされる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、当該化合物を代謝活性化するのに適切だと認められている代謝活性化系の使用が通常求められる。顕著な細胞周期の遅延が認められる場合には、約 1.5 正常細胞周期よりも遅い標本作製時期が

有効な場合がある。

(5) 被験物質の析出は処理の開始と終了時に、肉眼で観察する。

(6) 以下は、陽性対照物質の例である。

代謝活性化系の有無	化学物質名
有	ベンゾ[a]ピレン ジメチルベンゾアントラセン シクロフォスファミド ジメチルニトロサミン
無	マイトマイシンC N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン メタンスルホン酸メチル メタンスルホン酸エチル エチルニトロソウレア 4-ニトロキノリン-N-オキシド

(7) 統計学的手法を用いる場合においても、最終的な判定は試験条件下での生物学的妥当性も考慮して行うことが望ましい。

3. マウスリンフォーマTK試験

ほ乳類細胞を用いる遺伝子突然変異試験はほ乳類細胞に誘起された遺伝子突然変異を定量的に評価できる試験系である。マウスリンパ腫L5178Y細胞のチミジンキナーゼ(*tk*)遺伝子を標的とした試験系(以下マウスリンフォーマTK試験)は、現存する他の遺伝子突然変異検出系に比べ、高感度の遺伝子突然変異検出系であることが証明されており、被験物質のほ乳類細胞に対する遺伝子変異誘発能を評価するのに適した系であると考えられる(注1)。マウスリンフォーマTK試験では増殖速度が異なる2種類の変異体が出現するが、その出現頻度を比較することにより、変異の特徴を推定することも可能である(注2)。本試験にはマイクロウェルプレートを用いる方法(マイクロウェル法)と、ソフトアガーを用いる方法があるが、ここではマイクロウェル法について述べる(注3)。

1) 目的

マウスリンパ腫細胞のチミジンキナーゼ遺伝子座の変異を指標として、被験物質の遺伝毒性誘発性の有無を検索する。

2) 使用細胞

マウスリンパ腫細胞 L5178Y tk^{+/+}-3.7.2c 株を用いる。試験に用いる細胞については、マイコプラズマ汚染の有無、細胞周期、自然突然変異頻度などを調べておく（注4）。

3) 試験法

対数増殖期にある細胞を用い、最初に3～4時間の短時間処理法として代謝活性化系の非存在下及び、存在下について試験を実施する。代謝活性化系の非存在下の結果が陰性の場合には、代謝活性化系の非存在下の24時間連続処理による試験を実施する（注3）。代謝活性化系の存在下の短時間処理法の結果が陰性の場合には、必要に応じて確認試験を行う（注5）。

代謝活性化には、適切な薬物代謝酵素誘導剤（例えばフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンとの併用など）で処理したげっ歯類（通常ラット）肝ホモジネートの9000×g上清画分（S9）に補酵素などを加えたS9 mixを用いる。S9の最終濃度は1～10%の範囲内（通常2%）とする。

4) 被験物質の調製

被験物質を適切な溶媒に溶解または懸濁させる。被験物質が液体の場合は直接試験系に加えてもよい。被験物質が水溶性の場合は生理食塩液などを用いて溶解させ、水に不溶の場合にはジメチルスルホキシド（DMSO）などを用いて溶解させる。

5) 用量段階

適切な間隔（原則として公比10以下）で4段階以上の突然変異コロニーが解析できる用量を用いる。最高用量は、用量設定試験の結果から80%以上の細胞毒性（20%以下の相対生存率または相対増殖率）が得られる用量とする（注6）。ただし、90%以上の細胞毒性が認められる用量で陽性結果が得られた場合には、結果の解釈には注意を要する。

80%以上の細胞毒性が認められない場合には5 mg/mlまたは10 mM（いずれか低い方）を最高用量とする。80%以上の細胞毒性が認められず、処理終了時に被験物質の析出が認められた場合には、析出が認められる最低濃度を試験の最高用量とすることができる。析出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が得られなくても良い（注7）。

6) 対照

陰性対照として溶媒処理群を、陽性対照として小さなコロニーを主として誘発する既知の遺伝毒性物質で処理した群を設ける（注8）。

7) 処理系列数

被験物質の各用量群並びに陽性対照群について、それぞれ1～2系列の処理を行う。

ただし陰性対照群については，2系列の処理を行う．

8) 細胞毒性及び突然変異の検出

被験物質処理直後の細胞を一部分取し，マイクロウェルプレートに播種して適切な期間培養し，生育コロニーを含むウェルを計数し，生存率を算出する（注9）．残りの細胞は2日間の突然変異発現期間に，毎日細胞濃度を測定して適宜継代した後，マイクロウェルプレートにトリフルオロチミジン（TFT）存在下及び非存在下で播種して適切な期間（通常12日間）培養し，それぞれTFT耐性変異体コロニー，及び生育コロニーを含むウェルを計数して，突然変異頻度を算出する．なおコロニーサイズの解析のためにTFT耐性変異体コロニーを含むウェルはコロニーの大小別に計数する．

9) 結果の判定

結果の判定は，適切な統計処理法を用いると共に，突然変異頻度の有意な上昇，及び用量依存性の有無を考慮して行う．最終的な判定は試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行うことが望ましい．明確に陽性あるいは陰性と結論づけられない場合には，適切な実験条件で確認試験を実施する．

10) 結果の表示

被験物質処理群，陰性及び陽性対照群について，薬物処理直後のコロニー形成率（PE0）と陰性対照に対する相対生存率（RS）2日間の突然変異発現期間中の細胞増殖率を考慮した細胞毒性指標（RSG，RTG），突然変異発現期間終了後のコロニー形成率（PE2），突然変異頻度（MF），統計処理結果を表示する．陰性及び陽性対照でのコロニーサイズの解析，ならびに被験物質処理群で突然変異頻度の上昇が認められた場合には，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結果を表示する（注10）．

11) 注

- (1) ほ乳類細胞を用いる遺伝子突然変異試験系には本方法以外に，チャイニーズハムスター細胞（CHO，V79），L5178Y細胞のヒポキサンチンフォスフォリボシルトランスフェラーゼ（*hprt*）遺伝子，チャイニーズハムスターAS52細胞のグアニンフォスフォリボシルトランスフェラーゼ（*gpt*）遺伝子，ヒトリンパ芽球TK6細胞のチミジンキナーゼ（*tk*）遺伝子を標的とした試験系などが確立されている．マウスリンフォーマTK試験の特徴は，標的遺伝子内に誘起された点突然変異等の小さな遺伝子変異のみならず，欠失，転座，組換え等を含む染色体レベルの変異を再現性よく検出できることである．
- (2) 変異体として，正常細胞と同等の増殖性を示す変異体（大コロニー）と，増殖性の

遅い変異体（小コロニー）の 2 種類が観察される。大コロニー変異体は主として標的となる *tk* 遺伝子に限局された変異と考えられ、小コロニー変異体は主として染色体レベルの大きな構造異常や数的異常により標的となる *tk* 遺伝子を含む染色体領域が消失した変異体と考えられる。

- (3) マウスリンフォーマ TK 試験のマイクロウェル法では代謝活性化系非存在下の 24 時間処理法を用いると、核酸及び塩基アナログや一部の異数性誘発物質の検出力が高くなる。それにも関わらず、特異性、すなわち非遺伝毒性物質に対する検出力には影響を与えないという結果が得られている。
- (4) 細胞周期は、増殖曲線から求めた世代倍加時間でよい。自然突然変異頻度が著しく高い場合 ($>200 \times 10^{-6}$) は適切な方法により、使用する細胞中より TK 変異体を除去する必要がある。
- (5) 同じ種類及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、当該種類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。
- (6) 細胞毒性の指標としては、処理直後の陰性対照に対する相対生存率(RS)、あるいは相対増殖率 (RTG) を用いる。RTG は突然変異発現期間中の相対浮遊細胞増殖率 (RSG) と突然変異を選抜する際のコロニー形成率から算出される。
- (7) 被験物質の析出は処理の開始と終了時に、肉眼で観察する。
- (8) 一般的に陽性対照物質としてメタンスルホン酸メチル（代謝活性化系の非存在下）、シクロフォスファミド、ベンツ[*a*]ピレン、3-メチルコラントレン（代謝活性化系の存在下）が用いられる。
- (9) 1 つのウェル中に発生するコロニーの数はポアソン分布に従い、 x 個のコロニーからなるウェルの割合を $P(x)$ とすると、 $P(x)=e^{-\lambda}\lambda^x/x!$ と表される (λ : 期待されるコロニーの発生数)。コロニーを含まないウェルの割合は $p(0)=e^{-\lambda}$ となり、 $P(0)=y/n$ (y : コロニーを含まないウェルの数、 n : 全体のウェルの数) であることから、 λ が計算できる。この式はコロニー形成率や、突然変異頻度を求める際に用いる。
- (10) 突然変異体コロニーを大（正常の増殖）と小（増殖が遅い:SC）の 2 種類に分類してウェルを計数して、全体に対する小コロニーの変異体の割合を %SC として算出する。

4. げっ歯類を用いる小核試験

動物個体を用いて染色体損傷を検出する試験としては、通常げっ歯類の骨髓細胞を用いる染色体異常試験と造血系細胞を用いる小核試験が用いられる。染色体異常を観察する試験では、様々な染色体の変化が検出できる。また、染色体異常に起因して生成する小核を骨髓または末梢血を用いて検出する小核試験は、染色体異常誘発物質を検出する簡便な試験法として、前者と同等に受け入れられる。更に小核試験では異数性誘発物質を検出できる可能性がある。

げっ歯類以外の動物種でも染色体異常を検出できる十分な感度が認められる場合には、骨髓細胞での染色体異常または小核試験が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。また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、末梢血を用いた小核試験が骨髓でのそれと同等に受け入れられる。

1) 目的

げっ歯類を用いて、被験物質の生体内での染色体異常誘発性の有無を検索する。

2) 動物

通常若い成熟げっ歯類を用いる。原則として小核誘発作用の感受性が高い雄動物を用いるが、雌雄間に毒性または代謝の相違が明確に認められる場合には雌雄両性を用いるべきである。また、特定の性にのみ用いる薬剤を試験する場合は、該当する性を使用すべきである。なお、ラットについては、骨髓を用いた場合に肥満細胞の顆粒による疑似小核が出現する可能性があることから、適切な手法を用いて観察する。また、末梢血を用いた場合には小核を持つ赤血球が脾臓で除去される可能性があることなどを考慮する必要がある。

3) 動物数

1群、性あたり5匹以上とする。

4) 被験物質の調製

被験物質は適当な媒体に溶解または懸濁させて調製する(注1)(液体物質の場合は直接投与可能)。溶媒は、生理食塩液などの水系溶媒が推奨されるが、溶解しにくい場合には適切な媒体に懸濁するか、またはオリーブ油など他の溶媒(被験物質と反応性がなく、毒性を示さない投与量)を用いる。

5) 投与経路

臨床適用経路、強制経口投与または腹腔内投与とする。

6) 用量段階

何らかの毒性徴候が現れる用量を最高用量とし、原則として公比 10以下で少なくとも3段階以上の試験群を設定する(注2)。なお、毒性徴候が現れない場合の最高用量は、単回または14日以内の反復投与の場合2000 mg/kg/日、それを超える長期連続投与では1000 mg/kg/日とする。

7) 対照群

陰性対照は、原則として溶媒対照とする。陽性対照としては、既知小核誘発物質(注3)を用いる。

8) 投与回数

単回又は反復投与とする。

9) 標本作製時期

骨髄を用いる場合

単回投与では、投与後24～48時間の間に適当な間隔をおいて最低2回の標本作製時期を設定し、動物を屠殺、骨髄塗抹標本作製する(注4)。また、複数回の投与を行った場合には、最終投与後18～24時間の間に1回標本作製を行う。

末梢血を用いる場合

単回投与では、投与後36～72時間の間に適当な間隔をおいて最低2回の採血時期を設定し、標本作製する(注4)。また、複数回の投与を行った場合には、最終投与後24～36時間の間に1回標本作製を行う。

10) 観察細胞数

コード化した標本について、個体当たり2000個以上の幼若赤血球について小核の有無を検索する。同時に骨髄細胞の増殖抑制の指標として、全赤血球に対する幼若赤血球の出現頻度を、骨髄細胞を用いる場合には最低200個、末梢血を用いる場合には最低1000個の赤血球を観察することにより求める。

11) 結果の表示

個体ごとに小核を有する幼若赤血球の出現頻度及び全赤血球に対する幼若赤血球の比を表示する。陰性対照群の背景データの利用を含め、適切な統計処理を用いることにより結果の判定を行う。ただし、統計的な有意性のみが判断基準ではないので、判断の付きにくい結果が得られた場合には実験条件を検討した上で再試験を行い、最終的な判定を下すことが望ましい。なお、両性を用いた場合に、明確な性差が認められなければ、両性のデータをまとめて統計処理を行っても良い。

12) 陰性の場合の骨髄での暴露証明

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は、以下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。In vitro試験で遺伝毒性が認められなかった場合には、標的細胞が暴露されたことを以下の方法を用いて証明するか、標準的な吸収、分布、代謝、排泄(ADME)試験の結果から推察する。

小核試験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。
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。

骨髄中での被験物質またはその関連物質の直接的測定。

オートラジオグラフィによる組織暴露の評価。

～の方法においては、in vitro試験で陽性の場合には小核試験と同じ動物種、系統、及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ことが望ましい。

なお、代謝活性化により作用を現す物質においては、活性体が不安定で～の測定が適さない場合もある。骨髄でのじゅうぶんな暴露証明が得られないような場合には、肝臓など他の臓器を標的とする遺伝毒性試験系のうち適切なものを被験物質に応じて選び、追加することが望ましい。

13) 注

- (1) 投与直前に調製することが望ましいが、調製液が安定であればその限りではない。
- (2) 用量は、定められた公比の範囲内で、毒性徴候が現れない用量域を含む比較的広い用量範囲を設定し、用量相関関係を把握できるよう心がけることが望ましい。
- (3) 陽性対照物質の例

シクロフォスファミド
マイトマイシン C
メタンスルホン酸エチル

- (4) 単回投与においても、予備試験を行い標本作製時期を検討した場合は、適切な時期での1回のみでの標本作製とすることができる。この場合、標本作製時期はより明白な小核誘発頻度の上昇が認められる時期とする。ただし、いずれの時間においても明白な小核誘発頻度の上昇が認められない場合は、骨髄を用いる場合は投与後24～30時間、末梢血を用いる場合は36～48時間とする。

・ 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.* 312, 293-304.

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 (ICH2)*, Greystoke Books Ltd., Ireland, pp. 232-237.

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.

ICH Steering Committee (1995). S2A Genotoxicity: Guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity tests for pharmaceuticals.

ICH Steering Committee (1997). S2B Genotoxicity: A standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals.

Japanese Ministry of Health and Welfare (1989). Guidelines for toxicity studies of drugs.

Kenelly, J.C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, 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 (TA102) 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 (1997). OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Genetic Toxicology, Organization for Economic Co-operation and Development, Paris, 26 July 1997.
- 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 (ICH2)*, Greystoke 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 (ICH2)*, Greystoke books Ltd., N. Ireland, pp 240-244.
- Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D.J. and Gatehouse, D.G. (1990). Comparison of *Salmonella typhimurium* TA102 with *Escherichia coli* WP2 tester strains. *Mutagenesis.* 5, 285-291.