

製薬協 医薬品評価委員会  
基礎研 資料 No.178

## 遺伝毒性試験 Q&A 2014

(2012-2013年度 活動報告)

改訂版

平成 27 年 10 月

日本製薬工業会 医薬品評価委員会 基礎研究部会  
2012 年度 特殊毒性課題対応チーム (T2)  
2013 年度 特殊毒性課題対応チーム (T2)

遺伝毒性 Q&A 2014  
(2012-2013 年度 活動報告)  
改訂版

1. 改訂版作成

2015 年 10 月

2. 改訂版作成メンバー

- 橋爪 恒夫 武田薬品工業株式会社  
2014・2015 年度 変異原性不純物の安全性評価タスクフォース TF3 リーダー
- 三島 雅之 中外製薬株式会社  
2014・2015 年度 変異原性不純物の安全性評価タスクフォース TF3 サブリーダー
- 若田 明裕 アステラス製薬株式会社  
2013・2014 年度 特殊毒性課題対応チーム T2 サブリーダー、遺伝毒性 Q&A 2014 編集責任者
  
- 基礎研究部会 副部長 池田 孝則 MSD 株式会社
- 基礎研究部会 副部長 岩瀬 裕美子 田辺三菱製薬株式会社
- 基礎研究部会 副部長 久田 茂 あすか製薬株式会社
- 基礎研究部会 副部長 藤原 道夫 アステラス製薬株式会社
- 基礎研究部会 副部長 三浦 慎一 第一三共株式会社
- 基礎研究部会長 渡部 一人 中外製薬株式会社

### 3. 改訂内容

#### 遺伝毒性 Q&A2014 17 頁

2.6.2 細菌に強い毒性を示す化合物（例えばある種の抗生物質）の場合には、*in vitro* のほ乳類培養細胞を用いる試験のいずれか 1 つを合わせて実施すべきとある。この場合、*in vitro* 染色体異常試験または *in vitro* 小核試験を選択しても良いか。

改訂前（削除）

[答]特別な理由がない限りは、細菌を用いる遺伝子突然変異試験の代わりとなる、培養細胞で突然変異誘発性を検出できるマウスリンフォーマ試験を選択するか、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験または小核試験に加えて、ほ乳類培養を用いる遺伝子突然変異試験を実施することが妥当である。

改訂後

[答]選択してよい。ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、小核試験及びマウスリンフォーマ試験は、ICH S2(R1)ガイドラインで同程度の検出力があると考えられているので、細菌に強い毒性を示す化合物の場合もこれらいずれの試験を選択してもよい。

解説) 旧 ICH S2B ガイドラインでは、抗生物質については染色体損傷を検出する試験に加え遺伝子突然変異を検出する試験の実施が要求されていたが、改訂された ICH S2(R1)では、*in vitro* 染色体異常試験、*in vitro* 小核試験及びマウスリンフォーマ試験のいずれか一つの試験でよいとされた。

旧 ICH S2B 抜粋（廃止）

#### 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）。

ICH S2(R1)抜粋（現行）

#### 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、細胞毒性を示す化合物がほ乳類細胞で試験されるのと同様に、細菌を用いる復帰突然変異（エームス）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 1 つを合わせて実施すべきである。すなわちオプション 1 を選択する。

製薬協 医薬品評価委員会  
基礎研 資料 No.155

遺伝毒性試験 Q&A 2014  
(2012-2013 年度 活動報告)

平成 26 年 4 月

日本製薬工業協会 医薬品評価委員会 基礎研究部

2012 年度 特殊毒性課題対応チーム (T2)  
2013 年度 特殊毒性課題対応チーム (T2)

## 目 次

1. 緒 言 .....	11
2. 細菌を用いる復帰突然変異試験 .....	13
2.1 試験菌株 .....	13
2.1.1 復帰突然変異試験に使用する試験菌株の供給施設を知りたい。 .....	13
2.1.2 試験菌株の bio safety level と、試験菌株のうち遺伝子組換え生物に該当する株があるか知りたい。 .....	14
2.2 用量段階 .....	14
2.2.1 「細菌に強い毒性を示す化合物」と判断するための目安（用量）はあるか。 .....	14
2.3 試験方法 .....	14
2.3.1 ヒスチジン、ピオチン、トリプトファン混合アガーを 5 菌株共通で使用が可能か。また、可能なとき、それぞれの濃度はどうすればいいか。 .....	14
2.3.2 試験を 1 回のみとする場合には、replicate culture は 3 以上でなければいけないか。 ..	14
2.4 観察方法 .....	15
2.4.1 微小コロニーが出現したとき、どのように評価するべきか。 .....	15
2.4.2 生育阻害の評価に復帰変異コロニー数の減少とあるが目安はどの程度か。 .....	15
2.5 結果の判定 .....	15
2.5.1 結果の表示方法は、復帰変異コロニー数の実測値及びその平均だけでよいか。 .....	15
2.5.2 試験結果表の形式及び記載内容について知りたい。 .....	15
2.5.3 試験結果の判定は 1 回の本試験だけで良いか。 .....	15
2.5.4 同じメカニズムの突然変異を検出する菌株（塩基対置換型：TA100、TA102、TA1535 及び WP2 <i>avrA</i> 、フレームシフト型：TA97、TA98 及び TA1537 など）において異なる試験結果を得た場合、どのように解釈すればよいか。 .....	16
2.6 その他 .....	16
2.6.1 医薬品のガイドラインでは、細菌を用いる復帰突然変異試験が明確な陰性、もしくは陽性結果を示した場合、繰り返し試験を実施して結果の再現性を確認する必要は無くなった。しかし、労安法や化審法といった国内の各種ガイドラインでは、試験の繰り返しが必要である。医薬品 GLP 下で実施した試験（実験 1 回のみ）では、安衛法や化審法の申請に耐えないと考えるのか。 .....	16
2.6.2 細菌に強い毒性を示す化合物（例えばある種の抗生物質）の場合には、 <i>in vitro</i> のほ乳類培養細胞を用いる試験のいずれか 1 つを合わせて実施すべきとある。この場合、 <i>in vitro</i> 染色体異常試験または <i>in vitro</i> 小核試験を選択しても良いか。 .....	17
2.7 参考文献 .....	17
3. ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験 .....	18
3.1 使用細胞 .....	18
3.1.1 染色体異常試験に適した株化細胞の供給施設をしりたい。 .....	18
3.2 用量段階 .....	18
3.2.1 最高用量設定時の細胞毒性の指標としては、細胞数、細胞集団倍加（PD）、分裂指数（M などのうち、どれを用いるのか。 .....	18
3.2.2 ヒト末梢血リンパ球を用いた場合の細胞毒性はどのようにして求めたらよいか。 ....	19
3.2.3 「細胞増殖抑制が約 50%を超えないようにする」とあるが、最高用量として 50%以上の増殖抑制率を示す濃度を選択してもよいのか。 .....	19

3.2.4 「細胞増殖抑制が約 50%を超えない用量を最高用量とする」とあるが、最高用量として例えば 30%の増殖抑制率を示す濃度を選択してもよいか。 .....	19
3.2.5 「難溶又は不溶の場合において細胞毒性が問題とならなければ、最高濃度は培養中で沈殿がみられ、観察を妨げない最も低い濃度とする。」において「細胞毒性が問題とならない場合」は「細胞毒性の有無に関わらず」と解釈してよいか。 .....	20
3.2.6 本試験において、染色体標本作製と同時に細胞増殖抑制率を調べるには、具体的にどのようにすればよいか。 .....	20
3.2.7 株化細胞を用いた場合、細胞毒性の指標について、ICH S2(R1)では細胞増殖を確認できる指標とされているが、どのような方法か。具体的な方法（実験、計算法）が知りたい。 .....	20
3.2.8 最高用量の設定基準を知りたい。 .....	21
3.3 陽性対照物質 .....	21
3.3.1 陽性対照物質の選定において、異数性を検出するための陽性対照物質は必要ないか。 .....	21
3.4 試験操作 .....	21
3.4.1 細胞増殖の計測にモノセレータを用いてよいか。 .....	21
3.5 観察方法 .....	21
3.5.1 細胞毒性で分裂像が少ない場合、被験物質の各濃度あたり、いくつの細胞を観察すればデータとして採用できるか。 .....	21
3.5.2 染色体異常の観察は染色体数がモード数±2 の細胞で行うこととされているが、 <b>fragmentation</b> や <b>multiple aberration</b> の場合、染色体数を正確に数えることが困難である。この様に明らかに構造異常を有する胞であるが染色体数を正確に数えられない場合は観察対象外としていいか。 .....	22
3.6 結果の評価 .....	22
3.6.1 ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験では、染色体異常を有する細胞の出現頻度がゼロとなる場合がある。ゼロケースの頻発は試験の妥当性に懸念が持たれることがあるが、陽性対照群で有意な変化が認められていれば、試験の実施妥当性は問題ないと言えるか。 .....	22
3.6.2 陽性結果の妥当性を疑わせるような条件として、 <i>in vivo</i> では起こりえない条件（pH、浸透圧、析出物）が挙げられているが、具体例をあげてほしい。 .....	22
3.7 参考文献 .....	23
4. マウスリンフォーマ TK 試験 (MLA).....	23
4.1 使用細胞 .....	23
4.1.1 MLA に使用する株化細胞の供給施設を知りたい。 .....	23
4.2 試験方法 .....	24
4.2.1 Microwell 法と agar plate 法のどちらを用いるのがよいか。 .....	24
4.2.2 被験物質の処理により細胞数が激減しても、最終的に mutation frequency (MF)用に必要な細胞が得られればよいか。それとも、はじめから細胞数を増やして処理した方がよいか。 .....	24
4.3 その他 .....	24
4.3.1 MLA の agar plate 法は申請資料として使えるか。 .....	24
4.3.2 陽性反応が得られた場合の追加試験としてはどのようなものが考えられるか。 .....	24
4.4 参考文献 .....	25
5. ほ乳類培養細胞を用いる小核試験 .....	25

5.1 使用細胞	25
5.1.1 <i>In vitro</i> 小核試験に適した株化細胞の供給施設をしりたい。	25
5.1.2 ヒトリンパ芽球 TK6 細胞は申請資料に使う細胞株として使用できるか。	26
5.1.3 <i>In vitro</i> 小核試験に使用できる細胞種は何か。また、利用される細胞の Recovery Time はどれだけとればよいか。	26
5.1.4 試験に用いる株化細胞の管理はどのようにすればよいか。	26
5.1.5 <i>In vitro</i> 小核試験に使用される以下の細胞の標準的な倍加時間が知りたい。(CHL/IU 細胞、CHO、V79、L5178Y、TK6、他)	27
5.1.6 <i>In vitro</i> 小核試験に使用される以下の細胞について、陰性対照及び陽性対照での小核の出現頻度及び許容範囲はどの程度か。(CHL/IU 細胞、CHO、V79、L5178Y、TK6、他)	27
5.2 用量段階	27
5.2.1 最高用量の設定基準を知りたい。また、被験物質の処理時間や S9 の有無により最高用量を変える必要があるか。	27
5.2.2 細胞毒性の指標としては何をいれればよいか。複数の指標算出をして、いずれか 1 つが適当な細胞毒性を示していれば良いのか。	27
5.2.3 ヒト末梢血リンパ球を用いた場合、細胞毒性はどのようにして求めたらよいか。	28
5.3 被験物質の析出	28
5.3.1 被験物質の析出がどの程度であれば小核の観察を妨げると判断するのか。	28
5.4 陽性対照物質	29
5.4.1 陽性対照物質の名称と使用濃度について具体的に知りたい。	29
5.4.2 代謝活性化系非存在下の短時間処理法の陽性対照物質は、代謝活性化を必要としない物質 (例えば mitomycin C) 及び代謝活性化を必要とする物質 (例えば dimethylnitrosamine) の両方を設定する必要があるか。	29
5.4.3 数的異常を検出するための陽性対照物質は必要ないか。必要ならば何が適切か。	29
5.4.4 陽性対照群の異常細胞出現率はどの程度が望ましいか。陽性対照群での出現率が高すぎると盲検の意味がなくなるが、確実に陽性にならないと試験の成立に関わるので用量設定が難しい。	30
5.5 試験操作	30
5.5.1 <i>In vitro</i> 小核試験の標準的な試験プロトコールを示して欲しい。(OECD ガイドラインに従えばよいか)	30
5.5.2 サイトカラシンの使用は必須か。	30
5.5.3 サイトカラシン処理を行う場合と行わない場合それぞれについて、標準的な試験法 (処理時間や標本作成時期) を教えてほしい。	30
5.5.4 どのようにして処置時間の延長や、回復期間などの必要性を判断するのか。 またその場合の処置時間や回復期間はどれくらいが適当か。	32
5.5.5 播種細胞数はどれくらいが適当か。(CHL/IU 細胞、CHO、V79、L5178Y、TK6、他)	33
5.5.6 細胞播種後、処理までの培養時間はどれくらいが適当か。 播種細胞数を多くし、翌日に被験物質処理をしてもよいか。	33
5.5.7 標本作製の具体的手法を知りたい。	33
5.5.8 標本の染色法の具体的手法を知りたい。	33
5.5.9 細胞増殖抑制試験において単層培養密度で評価する場合、 <i>in vitro</i> 小核試験とは培養	

条件（播種細胞数、細胞培養プレートなど）が異なる方法で行われることがあるが、条件を同一にする必要はないか。 .....	34
5.5.10 ヒト末梢血リンパ球を用いた具体的な手法を知りたい。 .....	34
5.6 代謝活性化系 .....	34
5.6.1 <i>In vitro</i> 小核試験で用いる S9mix の組成はどのようなものがよいか。また、復帰突然変異試験と同じでもよいか。 .....	34
5.6.2 S9 の至適濃度及び至適処理時間を知りたい。 .....	35
5.7 観察方法 .....	35
5.7.1 自動機器による観察でもよいか。 .....	35
5.7.2 被験物質の各濃度あたり、いくつの細胞を観察すればよいか。 .....	35
5.7.3 1つの細胞に複数の小核が存在する場合、どのような記録を残し、どのようにデータ集計すべきか。 .....	35
5.7.4 観察対象となる細胞と、その中で観察に適した細胞の選出基準（観察不適細胞を排除する基準）を知りたい。 .....	35
5.8 小核の定義 .....	36
5.8.1 <i>In vitro</i> 小核試験における小核のクライテリアを知りたい。 .....	36
5.9 結果の評価 .....	36
5.9.1 <i>In vitro</i> 小核試験の評価で用いられる一般的な統計手法があれば、例示して欲しい。 .....	36
5.9.2 陰性及び陽性反応の定義を示して欲しい。 .....	36
5.10 その他 .....	37
5.10.1 <i>In vitro</i> 小核試験で染色体異常試験を代行できるか。 .....	37
5.10.2 <i>In vitro</i> 小核試験における背景データの具体的な管理方法を知りたい。 .....	37
5.11 参考文献 .....	37
6. げっ歯類を用いる小核試験 .....	38
6.1 使用動物 .....	38
6.1.1 雌雄に曝露量の生物学的に明確な差が無かった場合、遺伝毒性エンドポイントを各群雌雄各3匹で実施してもよいか。 .....	38
6.1.2 使用動物の週齢の許容範囲はどの程度か。 .....	39
6.2 用量段階 .....	39
6.2.1 オプション1で、 <i>in vivo</i> 小核試験を反復投与毒性試験に組み込んで実施しようと考えているが、最高用量は臨床曝露量の50倍を超えていれば、最大耐量（MTD）でなくてもよいか。 .....	39
6.2.2 最低用量には推定臨床用量を設定する必要はないか。この場合、公比が $\sqrt{10}$ より大きくなる可能性があるがそれでもよいか。 .....	39
6.2.3 <i>In vivo</i> 試験を4週反復投与毒性試験に組み込むことについて、単回投与試験に比べてどの程度まで用量（曝露量）が下がった場合、評価できない(成立しない)と考えてよいか。 .....	39
6.2.4 最大耐量は、より高用量を投与すると死亡が予測されるような用量と定義されているが、致死用量の1/2用量で一般状態の悪化及び骨髄赤血球の増殖抑制が認められない場合でも最高用量とできるか。 .....	40
6.2.5 前Qの考え方は、第二の <i>in vivo</i> 試験でも同様か。 .....	40
6.2.6 小核試験を反復投与毒性試験に組み込む場合、どのような点に注意し、用量設定を行えばよいか。 .....	40

6.3 被験物質	41
6.3.1 生体内で速やかに活性本体へと変換される場合は、活性本体の小核試験を行えばよいか。	41
6.3.2 反復投与が必要な被験物質とは、具体的にどのような種類の化学物質か。	41
6.4 投与経路	41
6.4.1 臨床適用経路、強制経口投与及び腹腔内投与のうち投与経路として何を選べばよいか。	41
6.5 標本作製時期	41
6.5.1 最終投与からサンプルを採取するまでの許容時間範囲はどの程度か。	41
6.5.2 予備試験により、用量間で最大小核出現率の時間に違いが認められた場合、標本作製時期をどのように設定すればよいか。	42
6.6 標本作製・染色	42
6.6.1 観察に適した標本作製の具体的方法を知りたい。	42
6.6.2 反復投与毒性試験へ組み込んだ場合、投与期間の増加に関連して骨髓毒性が顕著になる場合は投与期間初期の血液採取が推奨されているが、反復投与毒性試験の評価への影響を考えた場合、採取量はどの程度か適当か。	45
6.6.3 <i>In vivo</i> 小核試験では、試験毎に陽性対照群を設ける必要がないが、試験毎の陽性対照スライドの観察は必要で、そのために定期的に陽性対照を設けた試験を実施しその試験で作製した陽性対照のスライドを保存しておき試験毎に観察すればよいことされている。そのためにはそのようなスライドはどのように作製し、保管しておけばよいか。	45
6.6.4 動原体を染色する方法として、DNA 塩基配列プローブを用いる <i>in situ</i> 蛍光ハイブリダイゼーション (FISH) 及びキネトコア蛋白への標識抗体が例示されていますが、その具体的な方法について示してほしい。	45
6.7 観察方法	46
6.7.1 ラットの新生網赤血球を用いる小核試験について自動解析装置を用いる場合の観察細胞数の目安はあるか。	46
6.7.2 スライドのコード化に携わった人が、標本観察しても問題ないか。	46
6.7.3 適切に評価されたものであれば自動解析装置 (画像解析及びフローサイトメトリー) を使用することができるが、自動解析の具体的な方法を知りたい。	47
6.8 結果の判定	47
6.8.1 ラットの新生網赤血球を用いる小核試験の統計処理法について知りたい。	47
6.8.2 被験物質処置により用量依存的な小核の出現頻度の増加がみられるが、その出現頻度が陰性対照値の背景データの範囲内であった場合、どのように評価すべきか。	47
6.9 予備試験	47
6.9.1 最高用量及び標本作製時期を設定するための予備試験は必須か。	47
6.9.2 最高用量及び標本作製時期設定のための予備試験の具体的方法は何か。	48
6.10 その他	49
6.10.1 <i>In vitro</i> 小核で数的異常を誘発する化合物は <i>in vivo</i> で陰性である場合、総合的にはヒトへの外挿性は低いと判断される。しかし、 <i>in vivo</i> 小核でも陽性が認められた場合、無毒性量と薬効量とのマージン関係でヒトへの外挿性は可能か。	49
6.11 参考文献	49
7. コメント試験	51
7.1 試験方法	51

7.1.1 標準的な試験プロトコールを示して欲しい。	51
7.2 標本作製時期	55
7.2.1 最終投与からサンプル（血液、肝臓、骨髄等）を採取するまでの許容時間範囲ほどの程度か。	55
7.3 観察方法	55
7.3.1 DNA 損傷と合わせて病理評価が必要となっているが、なぜ病理評価が必要か。また、病理評価がなければ、DNA 損傷試験として成立しないか。	55
7.4 参考文献	56
8. 共通項目 ( <i>IN VITRO</i> )	56
8.1 全般	56
8.1.1 試験の都合上、短時間処理法と連続処理法、あるいは短時間処理方において代謝活性化系存在下と非存在下で時期を変えて別々に実施してよいか。	56
8.1.2 標本作製時の細胞増殖抑制率を測定した際、細胞増殖抑制試験の抑制率と異なった場合はどのように対応すればよいか。	56
8.1.3 浮遊細胞を使用する場合、細胞播種と同時に被験物質処置を行ってもよいか。	57
8.1.4 「陰性又は溶媒対照の値と比較して統計学的に有意であるが、試験施設での適切な背景データの統計信頼区間の範囲内にある程度の増加」とあるが「統計信頼区間」とは95%と99%のどちらを指すのか。	57
8.2 用量段階	57
8.2.1 最高濃度の上限については1 mM 又は0.5 mg/mL のいずれか低い濃度が推奨されるとあるが、極めて低い分子量(200 以下のような)のときはより高い試験濃度を考慮すべきと記載がある。このような化合物については具体的にどの程度の濃度まで試験すればよいか。	57
8.2.2 最高用量は0.5 mg/mL と1 mM のどちらを優先したらよいか。その場合に表の表示を合わせる必要は無いのか。	57
8.2.3 被験物質が培養液中で析出するような場合の用量設定の方法について知りたい。	58
8.2.4 本試験において50%を超えない適切な細胞増殖抑制が認められなかった場合、どの程度まで許容されるか。あるいは、再試験が必要か。	58
8.2.5 用量段階の間隔はどのように決定するか。	58
8.3 陽性対照	58
8.3.1 陽性対照は全ての処理条件で必要か。	58
8.3.2 陽性対照物質の処置濃度についても、細胞増殖抑制が約50%を超えないように設定すべきか。	58
8.4 代謝活性化系	59
8.4.1 ヒトS9を用いる場合の調製方法について知りたい。	59
8.5 参考文献	59
9. 共通項目 ( <i>IN VIVO</i> )	59
9.1 全般	59
9.1.1 4.4.1 項の <i>in vivo</i> における曝露証明として血液生化学的毒性指標を挙げているが、どのような指標が想定されるか。	59
9.1.2 「投与経路を変更しても標的臓器が十分に曝露されず、最も曝露される組織において適切な遺伝毒性試験が実施できない場合には、 <i>in vitro</i> 試験系のみでの評価が基本的に適切であるかもしれない。」とあるが、追加の <i>in vitro</i> 試験が必要か。必要な場合、適切	

な試験は何か。.....	59
9.1.3 肝臓で短寿命の活性代謝物が生成されると予想される場合は、オプション 2 が推奨されるとあるが、短寿命とはどれくらいか。.....	59
9.1.4 「1つの <i>in vivo</i> 試験を独立して短期投与で行う場合には2つ以上の指標を組み込むことが望まれる」とあるが、 <i>in vivo</i> 小核試験と組み合わせ可能な試験方法とは、何か。...	60
9.2 用量段階.....	60
9.2.1 反復投与試験に <i>In vivo</i> 試験を組み込む場合の最高用量の設定において、「短期投与のデータがある場合は、その最高用量（最少致死量付近）の 50%以上の用量」とあるが、その用量では毒性が強すぎる場合、50%を下回る用量を設定しても、試験が成立すると考えてよいか。.....	60
9.2.2 <i>In vivo</i> 試験を4週反復投与試験に組み込むことについて、単回試験に比べてどの程度まで用量（曝露量）が下がった場合、評価できない(成立しない)と考えてよいか。.....	60
9.2.3 反復投与試験に <i>In vivo</i> 試験を組み込む場合の最高用量の設定において、「毒性を伴わない曝露マージン（臨床曝露の複数倍）のみに基づく用量設定は、十分な正当性があるとは考えられない」とあるが、「毒性を伴う曝露マージンに基づく用量設定」であれば、試験が成立すると考えてよいか。.....	60
10. その他.....	61
10.1 ラットの一般毒性試験（2週間から3ヵ月の投与期間の試験の内のいずれか1つ）の中に、2つのエンドポイント（骨髄小核と肝臓のDNA鎖切断）を組み込むことでよいか。.....	61
10.2 曝露部位における遺伝毒性試験が必要な場合とは、どのような場合か。.....	61
10.3 探索的臨床試験の Type 4 又は Type 5 におけるげっ歯類の毒性試験に <i>in vivo</i> 遺伝毒性試験を組み込む場合の最高用量はどのようにすればよいか。.....	61
10.4 <i>In vitro</i> のほ乳類細胞を用いた試験において陽性となったために、1ヵ月のラットの反復投与毒性試験において各投与群を2つに分けて、一方は最終投与3時間後に最終解剖を行い肝臓のコメット試験を、他方は最終投与24時間後に最終解剖を行い骨髄小核試験を行う計画であるが、このような計画での注意点はなにか。.....	61
10.5 遺伝毒性試験での Maximum Feasible Dose (MFD)は、短期投与試験での投与可能最大量と理解したが、投与に用いる媒体の毒性から、反復投与試験ではこの MFD は投与不可能であった場合には、独立した <i>in vivo</i> 遺伝毒性試験を実施すべきか。.....	62
10.6 オプション 2 に関して、2つの異なる組織における <i>in vivo</i> 試験とあるが、同じエンドポイントで2つの異なる組織について検討を行うことでも構わないか。.....	62
10.7 M3(R2)ガイドラインにおいて反復投与の臨床試験を行う場合、「ほ乳類の試験系を用いた染色体損傷検出のための追加評価が実施されるべき」とあるが、S2(R1)ガイドラインでオプション 2 を選択した場合、反復投与の臨床試験を行う前に実施すべき遺伝毒性試験はどれになるか。.....	62
10.8 点眼剤等では、ガイドライン記載の最高用量を上回る濃度で臨床使用する場合があるが、このような薬剤の最高用量も S2(R1)ガイドラインに記載のとおりで構わないか。.....	62
10.9 遺伝毒性に関連した記載のある ICH ガイダンスにはどのようなものがあるか。.....	62
10.10 オプション 2 において、 <i>in vivo</i> で2つのエンドポイントを調べる場合には、1つの <i>in vivo</i> 試験でおこなうことが望ましいか。.....	64
10.11 注 16 には、コメット試験のみに同時対照が望ましいとされているが、アルカリ溶出試験では同時対照は必要ないと判断してよいか。.....	64
10.12 試験実施の際、黄色灯下で実施するべきか。.....	64

10.13 実施すべき遺伝毒性試験の組合わせについて解説してほしい。 .....64

## 遺伝毒性 Q&A 2014

製薬協医薬品評価委員会基礎研究部会  
特殊毒性課題対応チーム (T2)

### メンバー

あすか製薬株式会社	久田 茂	(前リーダー, 2013年8月まで)
アステラス製薬株式会社	若田 明裕	(サブリーダー, 編集責任者)
エーザイ株式会社	青木 豊彦	(リーダー, 2013年9月より)
MSD 株式会社	池田 孝則	
杏林製薬株式会社	槌谷 雄一	
興和株式会社	西村 次平	
第一三共株式会社	三分一所 厚司	
武田薬品工業株式会社	福田 良	
田辺三菱製薬株式会社	田中 雅治	
中外製薬株式会社	三島 雅之	
マルホ株式会社	井上 健司	

敬称略、順不同

## 1. 緒言

医薬品の製造販売承認に必要な遺伝毒性試験の実施については、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）で合意されたガイドラインに基づき制定されている。今回、2011 年 11 月に ICH 遺伝毒性試験ガイドライン（ICH S2(R1): Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use）の改訂を受けて、本邦においても 2012 年 9 月に厚生労働省の医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインが改訂された（「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンスについて」、薬食審査発 0920 第 2 号、平成 24 年 9 月 20 日）。従前の厚生労働省の医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドライン（「医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて」、医薬新第 1604 号、平成 11 年 11 月 1 日）は、ICH で 1995 年に合意された「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」（ICH S2A: Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals）及び 1997 年に合意された「医薬品の遺伝毒性試験の標準的組み合わせ」（ICH S2B: Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals）の 2 つのガイダンスに従い、1999 年 11 月に発出されたものである。したがって、今回の改訂は、ICH ガイダンスにとっては S2A 合意から 16 年ぶり、厚生労働省のガイドラインとしては 13 年ぶりとなる。この間、遺伝毒性試験に関する考え方の変化や、新しい試験方法の開発等も行われ、それらを取り入れるべく今回は大幅な改訂が行われた。

ICH S2(R1)における大きな変更点は、まず、要求される試験の組合せについて、従来の細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞で染色体異常を検出する試験及び *in vivo* で染色体異常誘発性を検出する試験の組合せに加え、*in vitro* のほ乳類培養細胞を用いる試験を実施せずに、*in vivo* の試験を 2 種類実施する組合せのオプションが設定された。また、*in vitro* のほ乳類培養細胞を用いる試験での最高処理濃度を以前の 5 mg/mL あるいは 10 mM から 0.5 mg/mL あるいは 1 mM に下げられ、評価する濃度での細胞毒性の基準を 50%以上の細胞毒性が見られる濃度から、50%を超えない細胞増殖抑制濃度に下げられた。これらの変更は、*in vitro* のほ乳類培養細胞を用いる試験で、偽陽性の結果が多いことに対する対応である。また、*in vivo* 試験を 2 種類実施する試験の組合せに関しては 2 つ目の *in vivo* 試験は肝臓を用いる試験とされ、新たに comet 試験が推奨される試験として加えられた。さらに、動物福祉（3Rs）の観点から、使用動物数を減らすため、*in vivo* の遺伝毒性試験を反復投与毒性試験に組込むことが可能となった。*In vitro* ほ乳類培養細胞を用いる試験にも、新しい試験系として *in vitro* 小核試験が加えられた。また、細菌を用いる復帰突然変異試験は、試験結果が明らかな時は繰り返しの実施は必要なく、1 回のみでよいこととなった。

日本製薬工業協会（製薬協）医薬品評価委員会 基礎研究部会では、これまでに、新しく発行された医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて、1992 年及び 2000 年に試験を

実施する際の種々の問題点を取り上げて解説した『変異原性試験 Q&A』を作成してきた。今回、ICH ガイドラインが改訂され、それを受けて厚生労働省の医薬品の遺伝毒性試験ガイドラインが改訂されたのに伴い、これまでと同様に、製薬協特殊毒性課題対応チームで新ガイドラインに対応した Q&A を作成した。ただし、今回取り上げた Q&A は今回のガイドラインで変更・追加された項目に関連したもの及び情報を更新する必要があるものに限られているため、日常の試験を実施するに当たり直面する問題点を網羅しているものではない。そのような問題点については、既刊の「遺伝毒性試験 Q&A」(サイエンティスト社、東京、2000 年)を参照願いたい。

これまでのものと同様に、本 Q&A も試験施設における実務経験担当者の立場で、試験を実施する場合に直面する問題点を提起し、ガイドラインを補完する情報としてまとめた。ただし、本 Q&A はあくまで企業サイドの研究者によりまとめられたものであるため、ガイドラインを補完するとはいえ、本書に記載された内容は何ら拘束力を持つものではなく、問題点の解決の方向性を示すものであり、試験の実施にあたり参考となる情報を提供することを目的としている。この Q&A が、新ガイドラインに従って試験を実施する場合の問題点の解決に寄与し、より良い試験の実施に役立てば幸いである。

2014 年 4 月

## 2. 細菌を用いる復帰突然変異試験

### 2.1 試験菌株

#### 2.1.1 復帰突然変異試験に使用する試験菌株の供給施設を知りたい。

[答]復帰突然変異試験で使用しなければならない試験菌株は通知<sup>1)</sup>で定められている。ネズミチフス菌株 (*Salmonella typhimurium*) と大腸菌株 (*Escherichia coli*) は独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンターから入手できる。

独立行政法人製品評価技術基盤機構

バイオテクノロジーセンター

生物資源課

〒292-0818

千葉県木更津市かずさ鎌足 2-5-8

TEL : 0438-20-5763

FAX : 0438-52-2329

国立医薬品食品衛生研究所からも入手可能である。

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝第二室

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

TEL(代表) : 03-3700-1141

– 大腸菌は、国立遺伝研のナショナルバイオリサーチプロジェクトでも入手可能

• <http://www.nbrp.jp/index.jsp>

– WP2 *uvrA* 株は NBRC より入手可能

• <http://www.nbrc.nite.go.jp/index.html>

ネズミチフス菌の開発者である元カリフォルニア大学の Ames 教授からの配布は現在では行われていない。

上記の供給先から提供される菌株は、十分な特性検査や精度管理は行われていないことに注意が必要である。

BMS 研究会に属する研究機関は菌株の精度管理がしっかり行われているので、これらの研究機関から入手するのもよい。

いずれの場合も、菌株は受領後必ずコロニーの分離を行い、単一コロニーをいくつか拾って培養し、その中から正しい表現型を示す菌株を選別する。受け取った菌株から直接培養し、保存することは好ましくない。

**2.1.2 試験菌株のbio safety levelと、試験菌株のうち遺伝子組換え生物に該当する株があるか知りたい。**

[答]ガイドラインで推奨されている復帰突然変異試験で使用する全ての菌株は、BSL1 で扱っても病原性に関する危険性は科学的見地と経験から特に問題はなく、「遺伝子組換え生物」にも科学的見地から該当しないと考えられる。

## 2.2 用量段階

**2.2.1 「細菌に強い毒性を示す化合物」と判断するための目安（用量）はあるか。**

[答]1 µg/plate 以下で生育阻害が見られる場合、強い毒性と考えてもよい。ただし、このような化合物でも、陽性となる化合物があることが知られているので、細菌を用いる復帰突然変異試験は実施する必要がある。併せて、ほ乳類培養細胞を用いる試験を実施する（2.6.2 項参照）。したがって、オプション1を選択することになる。

## 2.3 試験方法

**2.3.1 ヒスチジン、ビオチン、トリプトファン混合アガーを 5 菌株共通で使用が可能か。また、可能なとき、それぞれの濃度はどうすればいいか。**

[答]混合して使用できる。濃度は、個々のトップアガーでの濃度と同じでよい。ネズミチフス菌株と大腸菌株ではアミノ酸要求性が異なり、この程度のアミノ酸の混在により生育が亢進されることはなく、非復帰変異体がコロニーを形成する心配もない。

**2.3.2 試験を 1 回のみとする場合には、replicate cultureは 3 以上でなければいけないか。**

[答]OECD ガイドライン<sup>2)</sup>では、従来より基本的に各用量 3 枚のプレートが要求されており、理由があれば 2 枚でもよいとなっている。これまで各用量 2 枚の試験でも受け入れられていたのは、必ず確認試験を実施していたためであると考えられる。したがって、1 回の試験で判断するためには、3 枚のプレートを用いるのがよい。

## 2.4 観察方法

### 2.4.1 微小コロニーが出現したとき、どのように評価すべきか。

[答]Background lawn が見られない場合は、微小コロニーは僅かに生き残った非変異体の細菌のコロニーと考えられるため、復帰変異コロニーとして計数せず、全く細菌が死滅してしまった用量と同じ様に評価してよい。

### 2.4.2 生育阻害の評価に復帰変異コロニー数の減少とあるが目安はどの程度か。

[答]一般的には、溶媒対照の復帰変異コロニー数の平均値より、TA100 などの自然復帰変異コロニー数が多い株では半分程度、TA1535 のような自然復帰変異コロニー数が少ない株では1/4 程度であろう。自然復帰変異コロニー数の各試験実施施設での背景データの範囲が参考となる。

## 2.5 結果の判定

### 2.5.1 結果の表示方法は、復帰変異コロニー数の実測値及びその平均だけでよいか。

[答]すべての試験群について、個々のプレートにおける復帰変異コロニー数の実測値及び平均値を表示する。ただし、実測値の表とは別に平均値だけの表を作成し、結果表としても問題ない。生育阻害や被験物質の析出が観察された場合はその用量も表示する。

### 2.5.2 試験結果表の形式及び記載内容について知りたい。

[答]結果表の形式は自由に工夫して作成すればよい。ただし、次の項目が表中に明記されている必要がある。

- ① 個々のプレートの復帰変異コロニー数の実測値と平均値
- ② 使用した試験菌株の名称
- ③ 被験物質の名称あるいは略称、及び用量
- ④ 陽性対照物質の名称あるいは略称、及び用量
- ⑤ 陰性対照物質（溶媒対照）の名称あるいは略称
- ⑥ 代謝活性化系の存在下か、非存在下か（S9mix 添加の有無）の区別
- ⑦ 菌株に対する生育阻害があれば、その用量の表示
- ⑧ 被験物質の析出があれば、その用量の表示

### 2.5.3 試験結果の判定は1回の本試験だけで良いか。

[答]細菌を用いる復帰突然変異試験はよく確立された試験であり、試験菌株の性状も適切に管理されていれば、医薬品の評価においては、結果が明らかに陰性又は陽性で、代謝活性化系の

存在下及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並びに適切な陽性及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。不確か又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方がよい。

**2.5.4 同じメカニズムの突然変異を検出する菌株（塩基対置換型：TA100、TA102、TA1535 及びWP2uvrA、フレームシフト型：TA97、TA98 及びTA1537 など）において異なる試験結果を得た場合、どのように解釈すればよいか。**

[答]化合物による遺伝毒性の誘発は様々なメカニズムによって引き起こされるので、ガイドラインで5菌株の使用が義務付けられている。したがって、1菌株でも陽性になれば、その物質は遺伝毒性陽性と判断され、DNA に対する反応性があると判断される。これら5菌株はそれぞれ固有の特性があるので、同じ塩基対置換型あるいはフレームシフト型の変異を検出する菌株でも結果が違う場合がある。5菌株の結果の違いを比較することにより、変異誘発のメカニズム（塩基対置換変異によるものかフレームシフト変異によるものか、GC 塩基対あるいはAT 塩基対にDNA 損傷が誘発されたか、誘発された変異は誤りがちDNA 修復酵素の関与があったか否かなど）がある程度理解できる。

## 2.6 その他

**2.6.1 医薬品のガイドラインでは、細菌を用いる復帰突然変異試験が明確な陰性、もしくは陽性結果を示した場合、繰り返し試験を実施して結果の再現性を確認する必要は無くなった。しかし、労安法や化審法といった国内の各種ガイドラインでは、試験の繰り返しが必要である。医薬品GLP下で実施した試験（実験1回のみ）では、安衛法や化審法の申請に耐えないと考えるのか。**

[答]医薬品のガイドライン医薬品に限られたガイドラインであるため、原則として他の用途の化合物には適用できない。特に、医薬品ガイドラインの基となっているICH S2(R1)については、最終化の際に、「医薬品として開発される製品についてのみ適用される。」との文章が追加された。したがって、安衛法や化審法での申請については、それぞれのガイドライン<sup>3)</sup>に従うこととなる。

2.6.2 細菌に強い毒性を示す化合物（例えばある種の抗生物質）の場合には、*in vitro*のほ乳類培養細胞を用いる試験のいずれか1つを合わせて実施すべきとある。この場合、*in vitro*染色体異常試験または*in vitro*小核試験を選択しても良いか。

[答]特別な理由がない限りは、細菌を用いる遺伝子突然変異試験の代わりとなる、培養細胞で突然変異誘発性を検出できるマウスリンフォーマ試験を選択するか、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験または小核試験に加えて、ほ乳類培養を用いる遺伝子突然変異試験を実施することが妥当である。 \*改訂版3頁参照

## 2.7 参考文献

- 1) 厚生労働省医薬安全局審査管理課長通知：平成24年9月20日 薬食審査発0920第2号、医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイドラインについて(2012).
- 2) OECD: OECD Guidelines for testing of chemicals, Genetic Toxicology, Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test (1997).
- 3) 厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長：平成23年3月31日 薬食発0331第7号、平成23・03・29製局第5号、環保企発第110331009号 新規化学物質等に係る試験の方法について 別添2<ほ乳類を用いる28日間の反復投与毒性試験、ほ乳類を用いる90日間の反復投与毒性試験及びほ乳類を用いる反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験並びに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染色体異常試験及びマウスリンフォーマTK試験による変異原性試験>

### 3. ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

#### 3.1 使用細胞

##### 3.1.1 染色体異常試験に適した株化細胞の供給施設をしりたい。

[答]下記の施設より入手可能である。

独立行政法人 医薬基盤研究所

JCRB 生物資源バンク

〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7丁目6番8号

TEL : 072-641-9811 FAX : 072-641-9812

<http://bioresource.nibio.go.jp/>

DS ファーマバイオメディカル株式会社

〒564-0053 大阪府吹田市江の木町33番94号

(大日本住友製薬総合研究所内)

TEL : 06-6337-5940 / FAX : 06-6337-5997

<http://www.dspbio.co.jp/index.html>

理化学研究所 バイオリソースセンター

〒305-0074 茨城県つくば市高野台3-1-1

TEL: 029-836-9111 FAX: 029-836-9109

<http://brc.riken.jp/>

American Type Culture Collection (ATCC)

10801 University Boulevard

Manassas, VA 20110 USA

<http://www.atcc.org/>

#### 3.2 用量段階

##### 3.2.1 最高用量設定時の細胞毒性の指標としては、細胞数、細胞集団倍加 (PD)、分裂指数 (M) などのうち、どれを用いるのか。

[答]ガイドラインでは、増殖した細胞を評価出来る細胞集団倍加 (PD) を推奨している。これは、細胞数の比較では、陰性対照の細胞が2倍に増える条件で、化合物処理群では細胞は死なないが全く増えなかった場合、細胞数としては処理開始と変わらないので、標本作製時の細胞数は陰性対照の50%となり50%の毒性と評価される。一方、PDでは細胞数が増加していない

ため、100%の毒性となる。染色体異常試験では、細胞分裂をしない細胞は評価出来ないので、全く分裂しない場合は細胞毒性は 100%とすることが理論的である。このように、細胞を計数するだけでは毒性を過小評価するおそれがあり、結果的に細胞増殖抑制が 50%を超える濃度で評価することとなるため、細胞集団倍加が有用である<sup>1)</sup>。また、相対細胞数増加 (Relative Increase in Cell Count) も同様に有用である。CHL/IU 細胞など単層増殖する細胞の場合には、分裂指数は細胞増殖の指標であるため、処理後の時間に依存的であり、分裂抑制が処理直後に認められても標本作製時には認められなかったり、回復時間後にはリバウンドによりコントロール以上の分裂指数を示すこともある。一方、ヒトリンパ球では、生細胞数をベースとした評価は、赤血球除去操作が必要なため実用的でない。そこで、ヒトリンパ球においては、細胞毒性の指標として分裂指数を用いることが妥当な手段として容認されている<sup>2)</sup>。

### 3.2.2 ヒト末梢血リンパ球を用いた場合の細胞毒性はどのようにして求めたらよいか。

[答]ヒト末梢血リンパ球を用いた場合は、生細胞数を求めるよりも分裂指数 (Mitotic Index、MI) を求めるのが一般的である。ヒト末梢血リンパ球を被験物質で処理し、染色体標本を作製する。1 濃度当り 1000 個以上の細胞を観察し、分裂中期細胞を計数してその頻度を求め、陰性対照処理群と比較する。生細胞数を求める場合は、トリパンプルーなどを用いた色素排除法を用いる。全血培養では、0.83%塩化アンモニウム溶液などの溶血剤による前処理を行い、赤血球を溶解させてから計数する。

### 3.2.3 「細胞増殖抑制が約 50%を超えないようにする」とあるが、最高用量として 50%以上の増殖抑制率を示す濃度を選択してもよいのか。

[答]50%を超える増殖抑制を示す濃度を選択してもよい。しかし、その濃度で陽性となった場合は、判断が難しくなる。50%を超える増殖抑制を示す濃度での染色体異常の誘発は毒性によるものと評価してよいが、50%を超える毒性の濃度でのみ染色体異常を誘発していた場合でも、その下の濃度では評価に十分な毒性が得られていない場合は、適切な毒性での染色体異常誘発性が評価されていないことになり、50%を超える毒性の濃度でのみの誘発を否定するためには確認試験が必要となる。50%を超える毒性の濃度で陰性であれば、陰性と判断できる。

### 3.2.4 「細胞増殖抑制が約 50%を超えない用量を最高用量とする」とあるが、最高用量として例えば 30%の増殖抑制率を示す濃度を選択してもよいか。

[答]できる限り、より適切な 50%以下の増殖抑制率 (例えば、40~50%) を示す濃度を設定する必要がある。ただし、濃度変化に伴い急激な細胞毒性の変化を示す化合物で、濃度を公比

2より狭い間隔で試験を実施した場合でも、30%の増殖抑制率を示す上の濃度で50%以上の増殖抑制率を示した場合は、30%の増殖抑制率を示す濃度とすることは許容される。

3.2.5 「難溶又は不溶の場合において細胞毒性が問題とならなければ、最高濃度は培養中で沈殿がみられ、観察を妨げない最も低い濃度とする。」において「細胞毒性が問題とならない場合」は「細胞毒性の有無に関わらず」と解釈してよいか。

[答]細胞毒性の有無に関わらずと理解してよい。したがって、沈殿する高濃度で細胞毒性が見られる場合でも沈殿が見られる最低濃度を観察する最高濃度としてよい。

3.2.6 本試験において、染色体標本作製と同時に細胞増殖抑制率を調べるには、具体的にどのようなようにすればよいか。

[答]別途用意したディッシュの細胞数を被験物質処理開始時に測定し、標本作成の細胞回収時に細胞懸濁液を一部取り細胞数を測定する。それらの値を用いて細胞増殖率を算出する。また、分裂指数を指標にするなら、染色体標本を用いて測定する。

3.2.7 株化細胞を用いた場合、細胞毒性の指標について、ICH S2(R1)では細胞増殖を確認できる指標とされているが、どのような方法か。具体的な方法（実験、計算法）が知りたい。

[答]細胞増殖率を算出する方法は次のものがある。いずれも処理開始時の細胞数と処理終了時の細胞数を測定する。そのためには、処理開始時の細胞数測定のための処理するものとは別ディッシュを用意しておく必要がある。

#### 1. 相対細胞数増加 (relative increase in cell counts, RICC)

$$\text{RICC} = (\text{細胞増加数 T} / \text{細胞増加数 C}) \times 100$$

細胞増加数 = 培養終了時細胞数 - 培養開始時細胞数

細胞増加数 T = 被験物質添加群の細胞増加数

細胞増加数 C = 溶媒対照群の細胞増加数

#### 2. 相対細胞集団倍加指数 (relative population doubling, RPD)

$$\text{RPD} = (\text{細胞集団倍加数 T} / \text{細胞集団倍加数 C}) \times 100$$

細胞集団倍加数 T = 被験物質添加群の細胞集団倍加数

細胞集団倍加数 C = 溶媒対照群の細胞集団倍加数

細胞集団倍加数 =  $[\log (\text{処理終了後細胞数} / \text{処理開始時細胞数})] / \log 2$

### 3.2.8 最高用量の設定基準を知りたい。

[答]最高用量には、細胞毒性が見られる場合は、細胞増殖抑制が 50%を超えないようにする。目標としては、50%より 10%の範囲であろう。溶解性がよく、かつ細胞毒性が認められない場合は、1 mM 又は 0.5 mg/mL のいずれか低い濃度を最高とする。細胞毒性の指標は、CHL/IU 細胞など単層増殖する細胞の場合には細胞集団倍加または相対細胞数増加が、ヒトリンパ球など懸濁増殖する細胞の場合には分裂指数が有用である。沈殿が見られる化合物の場合は沈殿が見られる最低濃度とできる。沈殿の有無は処理終了時で評価し、光学顕微鏡を用いて観察してもよい。被験物質の処理時間あるいは S9 の有無により細胞毒性発現あるいは沈殿の見られる濃度が異なるので、用量段階は処理系列ごとに設定する。

## 3.3 陽性対照物質

### 3.3.1 陽性対照物質の選定において、異数性を検出するための陽性対照物質は必要ないか。

[答]必要ない。本来、*in vitro* 染色体異常試験は、染色体構造異常を検出するための試験法であり、数的異常を検出するためにデザインされたものではない<sup>2, 3)</sup>。したがって、陽性対照を設定する目的は、試験系が正しく反応しているかの保証のためなので、構造異常を誘発する陽性対照で十分である。

## 3.4 試験操作

### 3.4.1 細胞増殖の計測にモノセレータを用いてよいか。

[答]モノセレータは単層細胞培養密度を染色された色の濃さで測定するものであるため、同じ細胞数でも細胞の重なりや偏りがあれば、染色のされ方が違うため、正確な細胞数を求めることは困難である。特に、ガイドラインでは相対的な細胞増殖を細胞毒性の指標として推奨していることから、初期細胞数と処置後の細胞数を求める必要があり、また染色体異常は通常軽度の細胞増殖抑制がみられる用量範囲でみられることから、使用は推奨できない。

## 3.5 観察方法

### 3.5.1 細胞毒性で分裂像が少ない場合、被験物質の各濃度あたり、いくつかの細胞を観察すればデータとして採用できるか。

[答]陰性の結果を得るためには、各濃度あたり 200 細胞（ディッシュ当たり 100 細胞）の観察が必要である。したがって、分裂像が少なく規定細胞数の分析が出来なかった場合で、3 段階

以上の用量を評価できなかった場合は、再度、用量を変更した試験が必要となる。ただし、観察は細胞増殖抑制が50%を超える濃度で行う必要がないので、分裂細胞が少ない場合PD等細胞増殖率で細胞毒性を評価すれば観察対象とならない場合が多い。陽性とするなら統計学的に有意差がつく細胞数の観察でも採用できる。

**3.5.2 染色体異常の観察は染色体数がモード数 $\pm 2$ の細胞で行うこととされているが、fragmentationやmultiple aberrationの場合、染色体数を正確に数えることが困難である。この様に明らかに構造異常を有する胞であるが染色体数を正確に数えられない場合は観察対象外としていいか。**

[答]どちらでもよい。多数の異常を持っているため染色体数が正しく計数できない場合は、異常を有する細胞数が増えているため、染色体数が計数できる細胞だけ観察したとしても、陽性判定を見誤ることはない。また、異常を数多く持っている細胞は明らかに染色体異常を持つ細胞なので、それを染色体異常を有する細胞として計数することに問題はない。ただし、観察対象とするかどうか決めておく必要がある。

### 3.6 結果の評価

**3.6.1 ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験では、染色体異常を有する細胞の出現頻度がゼロとなる場合がある。ゼロケースの頻発は試験の妥当性に懸念が持たれることがあるが、陽性対照群で有意な変化が認められていれば、試験の実施妥当性は問題ないと言えるか。**

[答]ヒトリンパ球を用いる染色体異常試験では、陰性対照群だけでなく被験物質処理でも、染色体異常を有する細胞の出現頻度がゼロとなる場合がある。ドナーの性別や年齢などが影響すると思われるが、まずは試験施設での背景データを考慮すべきである。背景データから、ゼロケースが頻発することが非常に稀である場合、出現頻度がゼロの試験が頻発することは、何らかの原因があったと考えるべきである。よって、試験の実施妥当性を考察しなければならず、必要によっては再実験を考慮すべきであろう。一方、背景データからゼロケースが多い場合は、当該試験において細胞が増殖していることが確かめられていて、陽性対照が背景データの許容範囲内であれば問題ない。

**3.6.2 陽性結果の妥当性を疑わせるような条件として、*in vivo*では起こりえない条件（pH、浸透圧、析出物）が挙げられているが、具体例をあげてほしい。**

[答]非生理的な条件をもたらす要因には培養液のpH、浸透圧及び著しい細胞毒性状況などがあげられる。低pHあるいは低/高浸透圧環境の培養液は染色体異常を誘発し得ることが報告されている<sup>4)</sup>。これらの染色体異常誘発のメカニズムは、低浸透圧や高細胞毒性はリソゾームか

らのヌクレアーゼ放出、高浸透圧はイオン不均衡、S9mix は活性酸素の産生、低 pH は DNA 合成/修復酵素阻害を引き起こすことによるものと推察されている。細胞にとって非生理的な環境は、被験物質本来の性質とは無関係に、陽性の反応を与える恐れがあるので、このような条件下での陽性結果の解釈は慎重にすべきである。また、析出物に関しては、その物理的な作用により細胞毒性を示すことがあり注意が必要であるが、加えて析出濃度でのみ陽性となる場合は不純物による可能性も考慮する必要がある。

### 3.7 参考文献

- 1) Fellows M.D. and M.R. O'Donovan: Cytotoxicity in cultured mammalian cells is a function of the method used to estimate it, *Mutagenesis*, 22, 275–280 (2007)
- 2) Armstrong, M.J., C.L. Bean and S.M. Galloway: A quantitative assessment of the cytotoxicity associated with chromosomal aberration detection in Chinese hamster ovary cells, *Mutat. Res*, 265, 45-60 (1992).
- 3) OECD : OECD guideline for the testing of chemicals, Test No. 473, *In vitro* mammalian chromosome aberration test (1997).
- 4) 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”, *Mutat. Res*, 257, 147-204 (1991).

## 4. マウスリンフォーマ TK 試験 (MLA)

### 4.1 使用細胞

4.1.1 MLAに使用する株化細胞の供給施設を知りたい。

[答]下記の施設から入手可能である。

独立行政法人 医薬基盤研究所

JCRB 生物資源バンク

〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7 丁目 6 番 8 号

TEL : 072-641-9811 FAX : 072-641-9812

<http://bioresource.nibio.go.jp/>

(財)食品薬品安全センター秦野研究所

〒257-8523 神奈川県秦野市落合 729-5

TEL : 0463-82-4751 FAX : 0463-82-9627

E-mail: tanac.noriho@nifty.ne.jp

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部  
〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1  
TEL : 03-3700-1141 FAX : 03-3707-6950  
E-mail: honma@nihs.go.jp

American Type Culture Collection (ATCC)  
10801 University Boulevard  
Manassas, VA20110-2209  
URL: <http://www.atcc.org/home.cfm>

## 4.2 試験方法

### 4.2.1 Microwell法とagar plate法のどちらを用いるのがよいか。

[答] Microwell 法を用いることが推奨されている。MLA は Clive らによって agar plate 法として開発され<sup>1)</sup>、その後 Cole ら<sup>2)</sup>により microwell plate を用いる改良法が開発された。Microwell 法は、agar plate 法の欠点である寒天のロットによるバラツキが改善されており、コロニーサイズの判定も容易になっている。

### 4.2.2 被験物質の処理により細胞数が激減しても、最終的にmutation frequency (MF)用に必要な細胞が得られればよいか。それとも、はじめから細胞数を増やして処理した方がよいか。

[答]一般的には、特に細胞数を増やす必要はない。本試験での最高用量として relative survival (RS)が 20%以下を示す用量が要求されている。この用量では細胞数が明らかに減少しているが、突然変異発現時間の間に障害を受けた細胞が回復し増加することが多いので、通常は MF 用に必要な細胞数は十分に得られる。

## 4.3 その他

### 4.3.1 MLAのagar plate法は申請資料として使えるか。

[答]申請資料として差し支えない。

### 4.3.2 陽性反応が得られた場合の追加試験としてはどのようなものが考えられるか。

[答]ガイドラインでは、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験と同等の試験であるため、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験が陽性の場合と同じ対応となる。したがって、追加の

*in vivo* 試験が必要となり、それには、肝臓のコメット試験あるいは不定期 DNA 合成試験やトランスジェニック動物を用いた遺伝子突然変異試験がある

#### 4.4 参考文献

- 1) Clive, D., O. Johnson, J. Spector, A. Batson and M. Brown: Validation and characterization of the L5178Y/TK+/- mouse lymphoma mutagen assay system, *Mutat. Res.*, 59, 61-108 (1979).
- 2) Cole, J., C. F. Arlett, M.H. Green, J. Lowe and W. Muriel: A comparison of the agar cloning and microtitration techniques for assaying cell survival and mutation frequency in L5178Y mouse lymphoma cells, *Mutat. Res.*, 111, 371-386 (1983).

### 5. ほ乳類培養細胞を用いる小核試験

#### 5.1 使用細胞

##### 5.1.1 *In vitro*小核試験に適した株化細胞の供給施設をしりたい。

[答]*In vitro* 小核試験には、様々な株化細胞が使用できるが、染色体異常試験に用いる細胞が汎用されている、そのような細胞の供給可能施設として、以下のところがある。

- 1) ヒューマンサイエンス研究資源バンク  
〒540-0006 大阪府大阪市中央区法円坂 1-1-43  
TEL: 06-6945-2869、FAX: 06-6945-2872  
URL: [http://www.jhsf.or.jp/index\\_b.html](http://www.jhsf.or.jp/index_b.html)
- 2) 大日本製薬株式会社ラボラトリープロダクツ部  
〒564-0053 大阪府吹田市江の木町 33-94  
TEL: 06-6386-2164、FAX: 06-6337-1606  
URL: <http://www.dainippon-pharm.co.jp/labopro/index.html>
- 3) 理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター  
〒305-0074 茨城県つくば市高野台 3-1-1  
TEL: 0298-36-9111、FAX: 0298-36-9109  
URL: <http://rtcweb.rtc.riken.go.jp/index.html>
- 4) American Type Culture Collection (ATCC)

10801 University Boulevard  
Manassas, VA 20110-2209 USA  
URL: <http://www.atcc.org/home.cfm>

**5.1.2 ヒトリンパ芽球TK6 細胞は申請資料に使う細胞株として使用できるか。**

[答]使用できる。使用する細胞の陰性対照物質及び陽性対照物質での小核誘発性を調べ、安定した結果が得られることが確かめられればいずれの細胞も使用可能である<sup>1)</sup>。一般的には、染色体異常試験に使用する細胞が多く利用されている。

**5.1.3 *In vitro*小核試験に使用できる細胞種は何か。また、利用される細胞のRecovery Timeはどれだけとればよいか。**

[答]ヒト初代培養末梢血リンパ球、ヒトリンパ芽球 TK6 細胞、CHO、V79、CHL/IU 及び L5178Y 細胞等が使用できる<sup>1)</sup>。他に、使用する細胞の陰性対照物質及び陽性対照物質での小核誘発性を調べ、安定した結果が得られることが確かめられればいずれの細胞も使用可能である。一般的には、染色体異常試験に使用する細胞が多く利用されている。特にバックグラウンドの小核誘発率は検出感度に影響するため、バックグラウンドの値が低く安定しているものが良い。

ヒトリンパ球を使用する場合は、若年（約 18～35 歳）の健康な非喫煙者で最近放射線に曝露されていない者から採取する。

処理開始から小核を観察するための標本作製の培養時間は使用する細胞の 1.5～2.0 正常細胞周期とする。

**5.1.4 試験に用いる株化細胞の管理はどのようにすればよいか。**

[答]一般に株化細胞は継代を続けると核型が変化する。また、世代倍加時間や陽性対照物質に対する反応性も異なってくる。このため、試験には入手後、継代数の少ない細胞を大量に凍結保存し、必要に応じてこれを解凍して用いるのがよい。使用細胞については、その染色体数（モード数）、細胞周期（世代倍加時間）及びマイコプラズマ感染の有無を調べる。さらに、陰性対照物質及び陽性対照物質における小核出現頻度を確認する。これらの検討は、凍結ロット毎に実施する。また、使用する血清のロットによって、世代倍加時間あるいは小核出現頻度の変動することがあるので、血清のロットを変更した際は、確認した方がよい。

**5.1.5 *In vitro*小核試験に使用される以下の細胞の標準的な倍加時間が知りたい。(CHL/IU細胞、CHO、V79、L5178Y、TK6、他)**

[答]細胞の倍加時間は培養条件によって異なるが、CHL/IU 細胞の標準的な倍加時間は、子牛血清を用いた場合で約 15 時間、牛胎児血清ではそれより若干短くなる傾向にある。代表的な細胞の標準的な倍加時間は次のとおりである。

CHL: 12~15 時間、CHO: 14~17 時間、V79: 約 14 時間、L5178Y: 8~10 時間、TK6: 12~15 時間

**5.1.6 *In vitro*小核試験に使用される以下の細胞について、陰性対照及び陽性対照での小核の出現頻度及び許容範囲はどの程度か。(CHL/IU細胞、CHO、V79、L5178Y、TK6、他)**

[答]論文<sup>2-6)</sup>を参照し、各施設での背景データより許容範囲を設定すればよい。おおむね、いずれの細胞も陰性対照での小核出現頻度は、1%前後である。また、サイトカラシン B を使用する方法では、使用しない方法に比べて少し高くなる傾向にある。しかし、いずれの場合も2%を超えないことが望ましい。陽性対照での頻度は、陰性対照に比べ有意に増加すればよいが、陰性対照の頻度に比べ少なくとも3倍程度以上増加するのが適当であろう。

## 5.2 用量段階

**5.2.1 最高用量の設定基準を知りたい。また、被験物質の処理時間やS9の有無により最高用量を変える必要があるか。**

[答]最高用量には、細胞毒性が見られる場合は、細胞増殖抑制が50%を超えないようにする。目標としては、40~50%の範囲であろう。溶解性がよく、かつ細胞毒性が認められない場合は、1 mM 又は 0.5 mg/mL のいずれか低い濃度を最高とする。沈殿が見られる化合物の場合は沈殿が見られる最低濃度とできる。

被験物質の処理時間あるいは S9 の有無により細胞毒性発現あるいは沈殿の見られる濃度が異なるので、用量段階は処理系列ごとに設定する。

**5.2.2 細胞毒性の指標としては何をいれればよいか。複数の指標算出をして、いずれか1つが適当な細胞毒性を示していれば良いのか。**

[答]細胞毒性は、推奨されている一つの指標を用いて評価し、その指標で適切な細胞毒性が得られるように試験濃度を設定する。その様にして、公比2より狭い濃度設定をして試験をしたのにもかかわらずその指標では適切な細胞毒性濃度が得られなかった場合には、評価濃度の正当性を示すために他の指標での細胞毒性の結果を示すことは有用である。

サイトカラシンを用いない場合は、染色体異常試験と同じ細胞増殖の指標を用いる。

サイトカラシンを用いる場合は、下記の細胞増殖指標を用いることができる。

細胞分裂阻止増殖率 (cytokinesis-block proliferation index、 CBPI)

細胞増殖抑制% =  $100 - 100 \left[ \frac{(\text{CBPIT} - 1)}{(\text{CBPIC} - 1)} \right]$

CBPIT = 被験物質添加群の CBPI

CBPIC = 溶媒対照群の CBPI

CBPI =  $\left[ (\text{単核細胞数}) + (2 \times \text{二核細胞数}) + (3 \times \text{多核細胞数}) \right] / (\text{総細胞数})$

増殖指数 (replication index、 RI)

細胞増殖抑制% =  $100 - \text{RI}$

RI =  $\left[ \frac{\{ \text{二核細胞数} + (2 \times \text{多核細胞数}) \}}{\text{総細胞数 T}} \right] / \left[ \frac{\{ \text{二核細胞数} + (2 \times \text{多核細胞数}) \}}{\text{総細胞数 C}} \right]$

総細胞数 T = 被験物質添加群の総細胞数

総細胞数 C = 溶媒対照群の総細胞数

細胞毒性の評価方法は、あらかじめ決めておかなければ化合物によって評価する濃度が違ってくることになる。ただし、急激な細胞毒性の変化がみられる場合など、通常の評価方法では適切な毒性の濃度でなかった場合は、他の方法での評価で試験の正当性を示す一助とできる。

### 5.2.3 ヒト末梢血リンパ球を用いた場合、細胞毒性はどのようにして求めたらよいか。

[答] ヒト末梢血リンパ球を用いる場合は細胞分裂頻度が低いので、サイトカラシン B の使用するため、細胞増殖の指標として、細胞分裂阻止増殖率 (cytokinesis-block proliferation index、CBPI) あるいは増殖指数 (replication index、 RI) を使用することができる。

## 5.3 被験物質の析出

### 5.3.1 被験物質の析出がどの程度であれば小核の観察を妨げると判断するのか。

[答] 小核が観察できれば、析出の程度は問われない。

## 5.4 陽性対照物質

### 5.4.1 陽性対照物質の名称と使用濃度について具体的に知りたい。

[答]チャイニーズハムスター由来の株化細胞を用いる場合の例を以下に示す。なお、処理濃度は参考であり、試験施設毎に使用細胞、処理時間など試験条件にあわせて至適用量を設定すべきである。

標準的な染色体異常試験に用いる主な陽性対照物質とその使用濃度を示す。

代謝活性化系 非存在下

Mitomycin C: 0.04～0.2 µg/mL

MNNG: 5～10 µg/mL

ENNG: 5～10 µg/mL

Methyl methanesulfonate: 10～20 µg/mL

代謝活性化系 存在下

Dimethylnitrosamine: 800～1000 µg/mL

Cyclophosphamide: 10～20 µg/mL

Benzo[a]pyrene: 20～40 µg/mL

DMBA: 30～60 µg/mL

### 5.4.2 代謝活性化系非存在下の短時間処理法の陽性対照物質は、代謝活性化を必要としない物質（例えば mitomycin C）及び代謝活性化を必要とする物質（例えば dimethylnitrosamine）の両方を設定する必要があるか。

[答]代謝活性化を必要としない物質のみの設定でよい。陽性対照とはその試験系が正常に機能しており、技術的に問題がないかを保証するために設けられているためのものなので、非代謝活性化で陽性反応を示す物質だけでよい。非代謝活性化で代謝活性化を必要とする物質を試験すれば、陰性の結果が期待できるが、陰性は操作等が正しく行われていなかったことによる場合もあるので、陰性の結果から試験系を保証することはできない。

### 5.4.3 数的異常を検出するための陽性対照物質は必要ないか。必要ならば何が適切か。

[答]必要ない。陽性対照の目的はその試験系が正しく機能しているかを確かめるためのものなので、構造異常を誘発する陽性対照のみでよい。

5.4.4 陽性対照群の異常細胞出現率はどの程度が望ましいか。陽性対照群での出現率が高すぎると盲検の意味がなくなるが、確実に陽性にならないと試験の成立に関わるので用量設定が難しい。

[答]陽性対照の目的は、その試験系が適切に反応していること、すなわち感受性を保証することにある。そして、陽性対照は再現性のある検出可能な小核の増加が得られる濃度を用いることが推奨されている。その小核の出現頻度に規定はないが、目安として、陰性対照の3倍程小核を有する細胞が出現する濃度を選択すればよいであろう。一般的には、処理濃度は、染色体異常試験と同じでよい。

## 5.5 試験操作

5.5.1 *In vitro*小核試験の標準的な試験プロトコールを示して欲しい。(OECDガイドラインに従えばよいか)

[答]OECD ガイドライン<sup>1)</sup>に従えば問題ない。ただし、処理濃度あるいは細胞毒性の基準等医薬品ガイドラインに記載のあるものは、それに従う。また、医薬品非臨床試験ガイドライン解説 2013<sup>7)</sup>に試験方法が記載されているので、参考にすることができる。

5.5.2 サイトカラシンの使用は必須か。

[答]分裂頻度の低い細胞では、全細胞中の観察対象とする分裂した細胞の割合が低いため、例えばヒト末梢血リンパ球を用いる場合は、必須である。株化細胞のように分裂頻度が高い細胞については、ほとんどの細胞が分裂するため、処理中の細胞増殖を確認すれば、サイトカラシン B の使用は必須ではない。

5.5.3 サイトカラシン処理を行う場合と行わない場合それぞれについて、標準的な試験法(処理時間や標本作成時期)を教えてほしい。

[答]以下に、CHL 細胞を用いた試験方法の例を記載する。

<サイトカラシン B (CytoB) を用いない方法>

① 代謝活性化を行わない場合(短時間処理法) :直径 60 mm シャーレ(培地 5 mL)に  $1 \times 10^5$  個の細胞を播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1 日培養する。1 日後、各濃度の被験物質溶液の、陽性対照物質溶液あるいは溶媒(滅菌水、生理食塩液又は DMSO)をそれぞれ加えて、6 時間 CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養する。処理開始時にシャーレ 2 枚について、細胞浮遊液の調製の操作に従い単細胞の浮遊液を調製し、細胞数を計測する。培養終了後、培地を除いて、PBS(-) 2 mL で軽く 1 回洗い、これに新しい培地 5 mL を加え培養を続け、処理開始から 1.5~2 正常細胞周期培養する。その後、以下の、標本作製の操作を行う。シャーレを取り出して培

地を遠心管に集める。次いで、シャーレに37℃に加温したトリプシン溶液2 mLを加え数分放置する。細胞がはく離したらピペッティングして細胞浮遊液とし、一部(少量)を取り細胞数を測定する。残りの浮遊液を先の遠心管に集め、200×gで5分間遠心して上清を捨てる。細胞沈さをほぐし、均一な細胞浮遊液とした後、加温したKCl低張液を約5 mL加え、軽くかくはんして37℃で約5分間静置する。次いで、固定液0.5 mLを徐々に加え、かくはんして半固定する。200×gで5分間遠心し上清を捨てる。新しい固定液5 mLを加え、細胞を再度浮遊させて遠心する。この操作を2度繰り返して十分な固定、脱水を行う。

最後に、少量(0.5~1 mL程度)の固定液に細胞を浮遊させ、ピペットでその1-2滴を清浄なスライドガラス上に滴下し、風乾して表面に付着させる。各シャーレ当たり数枚のスライド標本を作成する。スライドガラスにAO溶液を1~2滴滴下し、カバーガラスをかぶせる。余分なAO溶液は、紙等で吸い取り、封入する。観察は、AO溶液が乾燥しないうちに行う。

② 代謝活性化を行わない場合(連続処理法) :直径60 mmシャーレ(培地5 mL)に $1 \times 10^5$ 個の細胞を播種し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で1日培養する。1日後、各濃度の被験物質溶液、陽性対照物質溶液あるいは溶媒をそれぞれ加えて、1.5~2正常細胞周期培養する。処理開始時にシャーレ2枚について、細胞浮遊液の調製の操作に従い単細胞の浮遊液を調製し、細胞数を計測する。培養終了後、標本作製する。この時短時間処理法と同様に標本作製時の細胞数を測定する。標本作製の操作は、すべて短時間処理法と同様に行う。

③ 代謝活性化を行う場合 :直径60 mmシャーレ(培地5 mL)に $1 \times 10^5$ 個の細胞を播種し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で1日培養する。1日後、培地を0.83 mL除いた後、S9mix 0.83 mLを加え、これに各濃度の被験物質溶液、陽性対照物質溶液及び溶媒をそれぞれ加え、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で6時間培養する。処理開始時にシャーレ2枚について、細胞浮遊液の調製の操作に従い単細胞の浮遊液を調製し、細胞数を計測する。培養終了後、培地を除いて、PBS(-) 2 mLで軽く1回洗い、これに新しい培地5 mLを加え培養を続け、処理開始から1.5~2正常細胞周期培養後に標本作製する。この時、代謝活性化を行わない場合(短時間処理法)と同様に標本作製時の細胞数を測定する。標本作製の操作は、すべて代謝活性化を行わない場合(短時間処理法)と同様に行う。

#### <CytoBを用いる方法>

① 代謝活性化を行わない場合(短時間処理法) :直径60 mmシャーレ(培地5 mL)に $4 \times 10^5$ 個の細胞を播種し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で1日培養する。1日後、各濃度の被験物質溶液、陽性対照物質溶液あるいは溶媒をそれぞれ加えて、6時間CO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養する。その後、培地を除いて、PBS(-) 2 mLで軽く1回洗い、これにcytoBを3 µg/mL含む新しい培地5 mLを加え培養を続け、処理開始から1.5~2正常細胞周期培養する。その後、以下の標本

作製の操作を行う。シャーレを取り出して培地を遠心管に集める。次いで、シャーレに 37°C に加温したトリプシン溶液 2 mL を加え数分放置する。細胞がはく離したらピペッティングして細胞浮遊液とし、この浮遊液を先の遠心管に集め、200×g で 5 分間遠心して上清を捨てる。細胞沈さをほぐし、均一な細胞浮遊液とした後、加温した KCl 低張液を約 5 mL 加え、軽くかくはんして 37°C で約 5 分間静置する。次いで、固定液 0.5 mL を徐々に加え、かくはんして半固定する。200×g で 5 分間遠心し上清を捨てる。新しい固定液 5 mL を加え、細胞を再度浮遊させて遠心する。この操作を 2 度繰り返して十分な固定、脱水を行う。

最後に、少量(0.5~1 mL 程度)の固定液に細胞を浮遊させ、ピペットでその 1-2 滴を清浄なスライドガラス上に滴下し、風乾して表面に付着させる。各シャーレ当たり数枚のスライド標本を作成する。スライドガラスに AO 溶液を 1~2 滴滴下し、カバーガラスをかぶせる。余分な AO 溶液は、紙等で吸い取り、封入する。観察は、AO 溶液が乾燥しないうちに行う。

② 代謝活性化を行わない場合(連続処理法) :直径 60 mm シャーレ(培地 5 mL)に  $2 \times 10^5$  個の細胞を播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1 日培養する。1 日後、各濃度の被験物質溶液、陽性対照物質溶液あるいは溶媒をそれぞれ加えて、1.5~2 正常細胞周期培養する。その後、培地を除いて、PBS(-) 2 mg で軽く 1 回洗い、これに cytoB を 3 µg/mL 含む新しい培地 5 mL を加え、引き続き 18 時間 CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養する。その後、標本を作成する。標本作製の操作は、すべて短時間処理法と同様に行う。

③ 代謝活性化を行う場合:直径 60 mm シャーレ(培地 5 mL)に  $4 \times 10^5$  個の細胞を播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1 日培養する。1 日後、培地を 0.83 mL 除いた後、S9mix 0.83 mL を加え、これに各濃度の被験物質溶液、陽性対照物質溶液及び溶媒をそれぞれ加え、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 6 時間培養する。その後、培地を除いて、PBS(-) 2 mL で軽く 1 回洗い、これに cytoB を 3 µg/mL 含む新しい培地 5 mL を加え、引き続き処理開始から 1.5~2 正常細胞周期培養後に標本を作製する。標本作製の操作は、すべて代謝活性化を行わない場合(短時間処理法)と同様に行う。

#### 5.5.4 どのようにして処置時間の延長や、回復期間などの必要性を判断するのか。

またその場合の処置時間や回復期間はどれくらいが適当か。

[答]基本的には、処理時間や回復期間の延長は必要ない。しかし、サイトカラシン B を使用しない場合に、有意ではないが小核頻度の増加、強い細胞周期停止作用などが見られる場合、また染色体の異数性誘発物質の場合には、処置時間や回復期間の延長が感度を高めることが、経験的に知られているので、その場合細胞、回復期間あるいは処理時間をさらに 1.5~2.0 細胞周期延長することは有用である。

#### 5.5.5 播種細胞数はどれくらいが適当か。(CHL/IU細胞、CHO、V79、L5178Y、TK6、他)

[答]播種細胞数は、使用する細胞の倍加時間、播種後標本作製までの培養時間等を考慮して、標本作製時に陰性対照群の細胞が完全にコンフルエントにならないよう設定する。例えば、CHL/IU 細胞を用いて細胞播種後 3 日目に被験物質処理を行い、処理開始後 24 時間目に標本作製する場合の適正播種細胞数は、直径 6 cm のプレート当たり約  $2 \times 10^4$  cells である。

#### 5.5.6 細胞播種後、処理までの培養時間はどれくらいが適当か。

播種細胞数を多くし、翌日に被験物質処理をしてもよいか。

[答]特に問題はなく、このような方法で実施している試験施設も多い。また、処理時間の違いにより播種細胞数や処理開始までの培養時間を調節してもよい。

#### 5.5.7 標本作製の具体的手法を知りたい。

[答]小核試験の標本は、染色体異常試験の標本と異なり、細胞質が見えるように残っている必要がある。したがって、染色体標本と同じ条件で小核標本をつくることは難しい。染色体標本のように細胞質を無くす場合は、ある一定の条件以上にすればなくなるので、標準的な条件を設定することが容易だが、細胞質を小核が観察できる程度に残すには、細胞質の消失を一定の範囲に収めなければならないので条件設定が難しい。標本作製の条件としては、低張処理時間、固定の時間及び回数、固定液の組成がある。基本的な考えとして、染色体標本作製より低張処理時間及び固定時間は短くする。また、固定液の酢酸濃度を下げることにより細胞質が残った細胞の標本が作りやすくなる<sup>8)</sup>。細胞懸濁液をスライドグラスに滴下後の乾燥させる速度の調整については、染色体標本の作成方法が参考になる。したがって、施設でよい標本作製できる条件をあらかじめ検討しておく。

#### 5.5.8 標本の染色法の具体的手法を知りたい。

[答]染色は、染色体標本と同じ方法でギムザ染色を行ってもよいが、ギムザ染色の場合は、小核と細胞質の色調は同じなので、細胞質が濃く残った場合アクリジンオレンジ染色よりも小核の観察が難しくなる。アクリジンオレンジ染色の場合は、細胞質はオレンジ、主核と小核は黄緑色となり違う色の蛍光を発する。ただし、アクリジンオレンジ染色の標本は乾燥すれば観察ができなくなるので、長期保存することはできないが、ギムザ染色標本は封入すれば長期保存できる。

5.5.9 細胞増殖抑制試験において単層培養密度で評価する場合、*in vitro*小核試験とは培養条件（播種細胞数、細胞培養プレートなど）が異なる方法で行われることがあるが、条件を同一にする必要はないか。

[答]単層細胞培養密度測定は細胞数を染色された色の濃さで測定するものであるため、同じ細胞数でも細胞の重なりや偏りがあれば、染色され方が違うため、正確な細胞数を求めることは困難である。特に、ガイドラインでは細胞集団倍加等、細胞分裂頻度を細胞毒性の指標として推奨していることから、初期細胞数と処置後に増加した細胞数を求める必要があり、また小核誘発は通常軽度の細胞増殖抑制がみられる非常に狭い用量範囲でみられることから、使用は推奨できない

5.5.10 ヒト末梢血リンパ球を用いた具体的な手法を知りたい。

[答]ヒト末梢血リンパ球の培養方法と、染色体標本作製手順の一例を示す<sup>9)</sup>。

- 1) 健康な成人から 10~20 mL の静脈血を、ヘパリンで内壁をぬらした注射筒で無菌的に採取する。
- 2) 全血を用いる場合は、約 0.5~1.0 mL の血液をウシ胎児血清 (10~20%) を含む培養液 (RPMI 1640、MEM、L15 など) 4.5~9.0 mL と混合し、0.1~0.2 mL の phytohaemagglutinin-M (PHA-M) を添加し、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養する。リンパ球を分離して行う場合は、リンパ球比重分離液を用いて採取した血液からリンパ球を回収する。Phosphate buffered saline (PBS) で 2~3 回洗浄後、1/50 量 (2% v/v) の PHA-M を含む培養液で細胞数を調整 (0.5~2.0×10<sup>6</sup> cells/mL) し、培養する。
- 3) 培養開始後 48 時間目に被験物質を加える。
- 4) 短時間処理法の場合は、代謝活性化系存在下及び非存在下で通常 3 時間処理した後、新鮮な培養液と交換し、さらに約 21 時間培養後 (処理開始より約 1.5 正常細胞周期後)、染色体標本作製する。連続処理法では、約 1.5 正常細胞周期時間 (約 24 時間) 処理した後、染色体標本作製する。
- 5) 以下、染色体標本の作製は、前記 5.5.7 に準じて行う。

## 5.6 代謝活性化系

5.6.1 *In vitro*小核試験で用いるS9mixの組成はどのようなものがよいか。また、復帰突然変異試験と同じでもよいか。

[答]染色体異常試験で用いる組成と同じでよい。しかし、染色体異常試験に用いる S9mix の組成も規定されておらず、その妥当性は陽性対照物質が代謝活性化を受け、適切に反応していることで示されるとされている<sup>10)</sup>。したがって、復帰突然変異試験と同じ組成を用いてもよい。

### 5.6.2 S9 の至適濃度及び至適処理時間を知りたい。

[答]基本的には、染色体異常試験と同じでよい。

化学物質によって S9 の至適濃度が異なるが、通常は培養液中に S9 として最終濃度 1~10% (通常 5%) となるよう添加し、3~6 時間の処理を行うのが適当である。S9 にはそれ自体細胞毒性があり、6 時間を越える処理では細胞毒性が強く発現し、さらに、小核出現頻度のベースラインも高くなるので適当ではない。また、S9 存在下であいまいな結果が得られ、確認試験を実施する場合などは、いくつかの S9 濃度を設定するとよい。

## 5.7 観察方法

### 5.7.1 自動機器による観察でもよいか。

[答]適切に検証されたものであれば、自動解析装置 (画像解析及びフローサイトメトリー) を用いて分析してもよい<sup>11, 12)</sup>。

### 5.7.2 被験物質の各濃度あたり、いくつかの細胞を観察すればよいか。

[答]各濃度あたり、少なくとも 2000 個の細胞を観察する。各濃度あたり 2 系列の培養を使用することになっているため、各培養あたり 1000 個以上観察する。

### 5.7.3 1 つの細胞に複数の小核が存在する場合、どのような記録を残し、どのようにデータ集計すべきか。

[答]結果は、*in vivo* 小核試験と同様、小核を持つ細胞の出現頻度で評価するため、各細胞の持つ小核の数を記録する必要はない。

### 5.7.4 観察対象となる細胞と、その中で観察に適した細胞の選出基準 (観察不適細胞を排除する基準) を知りたい。

[答]サイトカラシン B を使用しない場合は、単核細胞を観察対象とする。観察対象とする単核細胞は、細胞質が壊れず残っている、核が一つの細胞で、二核以上の細胞は観察しない。

サイトカラシン B を使用する場合は、二核細胞を観察対象とする。観察対象とする二核細胞は細胞質が壊れず残っている細胞で、1) 主核が分離しほぼ同じ大きさのもの、2) 主核が接触又は重なっていても境界が明瞭で識別できるものである。また、核が完全に分裂している場合でも染色体の異常により二つの核が架橋している場合があるが、その細胞は観察対象とする。三核以上の核を有する細胞は観察対象としない。

## 5.8 小核の定義

### 5.8.1 *In vitro*小核試験における小核のクライテリアを知りたい。

[答]小核の判定基準を以下に示す<sup>1,13)</sup>。

大きさ：通常、主核の直径の 1/3 以下

色調：主核と同質に見えるもの

輪郭：一般に小核は核膜を有しているため、輪郭がはっきりしている。輪郭が不明瞭なものや、周囲が白くなっているものは小核ではない可能性が高い。

主核との関連性：主核と繋がっていたり (nuclear buds)、重なっていないもの。主核と接している場合は主核との境界が明確に区別できること。

CytoB を用いる場合は、二核細胞を観察対象とする。二つの核の大きさが大きく異なるものは計数に用いない。CytoB を用いない場合は、観察対象とする細胞の主核数について、単核細胞のみを観察対象とするのが一般的である。他の細胞と接していて、明確な境界が見られないもの、主核の形状が不規則なもの、アポトーシス細胞及び壊死細胞は計数の対象にしない。

## 5.9 結果の評価

### 5.9.1 *In vitro*小核試験の評価で用いられる一般的な統計手法があれば、例示して欲しい。

[答]染色体異常試験と同じく、Fisher の正確確率検定、カイ二乗検定などが使用できる。また、用量依存性については Cochran-Armitage trend test などが用いられる。

### 5.9.2 陰性及び陽性反応の定義を示して欲しい。

[答]基本的には、被験物質処理群の小核を有する細胞の出現頻度が陰性対照群のそれと比較して用量依存的な増加を示すことが必要である。陽性反応の定義の 1 例として、以下の項目を満たす場合が挙げられる。

- ・ 1 つあるいはそれ以上の用量で統計学的に有意に増加し、その増加に用量依存性がある。
- ・ 背景データの陰性対照範囲を有意に越えている (特に弱い反応を評価する場合)。

上記定義に該当しない場合を陰性と定義する。しかしながら、実際にはこの陽性、陰性の定義に明確に該当しない場合がある。このような場合には、「不確か」として追加試験を実施する。

「不確か」な場合、再試験において、(i) 明らかな陽性結果を示せば総合して陽性、(ii) 陰性結果を示せば再現性がないため総合して陰性又は (iii) 再び「不確か」を示せば、最終結論も「不確か」となる。

## 5.10 その他

### 5.10.1 *In vitro*小核試験で染色体異常試験を代行できるか。

[答]代行できる。今回のガイドラインより *in vitro* 小核試験がほ乳類培養細胞を用いる染色体異常を検出する試験の一つとされたので、染色体異常試験と同等である。

### 5.10.2 *In vitro*小核試験における背景データの具体的な管理方法が知りたい。

[答]陰性対照の背景データとしては、代謝活性化系存在下、非存在下、短時間処理、長時間処理のそれぞれについて、蓄積した陰性対照群の小核を有する細胞の出現頻度の平均値ならびに標準偏差を算出することが通常行われる。各種溶媒対照あるいは無処理対照を分けて集計することもある。また、陽性対照のデータも同様に各処理系列毎に蓄積する。背景データとするために必要な細胞数あるいは試験数に決まりはなく、実験手技的に誤りが認められない限り、全てのデータを受け入れ背景データとして蓄積する。さらに、個々のデータの経時的変化やその分布様式を把握するために、管理図を用いる方法もある。小核試験データにおける管理図の使い方<sup>14)</sup>を参照されたい。

## 5.11 参考文献

- 1) OECD : OECD guideline for the testing of chemicals, Test No. 487: *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test (2010)
- 2) Lorge E., V. Thybaud, M.Jn Aardema, J. Oliver, A. Wakata, G. Lorenzon, D. Marzin. SFTG international collaborative study on *in vitro* micronucleus test I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutat Res.*, 607,13-36 ( 2006)
- 3) Kirchner S. and A. Zeller, Comparison of different cytotoxicity measures for the *in vitro* micronucleus test (MNVit) in L5178Y Tk+/- cells: Summary of 4 compounds (Mitomycin C, Cyclophosphamide, Colchicine and Diethylstilboestrol) with clastogenic and aneugenic mode of action. *Mutat Res.*, 702, 193-8 (2010)
- 4) Lorge E. Comparison of different cytotoxicity measurements for the *in vitro* micronucleus assay using L5178Y and TK6 cells in support of OECD draft Test Guideline 487. *Mutat Res.* 702, 199-207 (2010).
- 5) von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H.G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. and Madle, S., *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances, *Mutation Res.*, 468, 137-163 (2000)

- 6) Hashimoto K., Nakajima Y., Matsamura S., Chatani F., Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 59, 28-36 (2011)
- 7) 医薬品非臨床試験ガイドライン研究会、医薬品非臨床試験ガイドライン解説 2013、薬事日報、東京 (2013)
- 8) Matsuoka, A., N. Yamazaki, T. Suzuki, M. Hayashi and T. Sofuni: Evaluation of the micronucleus test using a Chinese hamster cell line as an alternative to the conventional *in vitro* chromosome aberration test, *Mutat. Res.*, 272, 223-236 (1993).
- 9) M.G. Clare et al, SFTG international collaborative study on *in vitro* micronucleus test II. Using human lymphocytes, *Mutat Res.*, 607, 37-60 (2006)
- 10) Armstrong, M.J., C.L. Bean and S.M. Galloway: A quantitative assessment of the cytotoxicity associated with chromosomal aberration detection in Chinese hamster ovary cells, *Mutat. Res.*, 265, 45-60 (1992).
- 11) Steven M. Bryce, Jeffrey C. Bemis, Svetlana L. Avlasevich, Stephen D. Dertinge, *In vitro* micronucleus assay scored by flow cytometry provides a comprehensive evaluation of cytogenetic damage and cytotoxicity, *Mutat. Res.*, 630, 78-91 (2007)
- 12) Dolores Diaz, Andrew Scott, Paul Carmichael, Wei Shi, Chester Costales, Evaluation of an automated *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells, *Mutat. Res.*, 630, 1-13 (2007)
- 13) Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res.*, 534, 65-75 (2003)
- 14) 林 真、小核試験、増補版、サイエンティスト社、pp.60、東京 (1999).

## 6. げっ歯類を用いる小核試験

### 6.1 使用動物

6.1.1 雌雄に曝露量の生物学的に明確な差が無かった場合、遺伝毒性エンドポイントを各群雌雄各 3 匹で実施してもよいか。

[答] 雌雄差がない場合は、基本的には雄のみを使用する。雌雄を用いるのは、雌雄差があるときのみとする。生物学的に明確な差はない場合でも、条件が違うものはそれぞれ独立して評価すべきである。小核試験に用いる動物数と観察細胞数は、ともに統計解析における重要な因子であり、標本数が多いほど統計学的な検出力が増加する。例えば、陰性対照と 3 用量の被験物質投与群の計 4 群の試験を行い、動物あたり 1000 個の細胞を観察したとする。このとき、

試験全体の有意水準を 1% として、最高用量群で陰性対照群の背景データの 2 倍又は 3 倍の小核を用量依存的に誘発する物質を試験した場合、1 群あたり 6 匹の動物を用いれば、検出力はそれぞれ 約 65 又は 95%となる<sup>1)</sup>。現在は、個体あたり 2000 個の細胞を観察することになっており、1 群 5 匹という動物数は、小核試験の観察データを統計処理する時の解析可能な匹数ということである。雌雄を使う目的は、雌雄での差（差がないということも含めて）を見ることなので、それぞれの性で評価できていることが必要である。したがって、いずれの性でも評価に必要な動物数が必要である。また、雌雄差を考える上では、曝露量の差だけではなく、毒性の質的差、代謝等の差を考慮する必要がある。

#### 6.1.2 使用動物の週齢の許容範囲はどの程度か。

[答]小核の自然出現率に関し、幼若動物あるいは老齢動物で顕著な差が認められたという報告はない<sup>2)</sup>。通常、骨髓造血機能が活発で形態的にも機能的にも十分に成熟した時期である若い成熟動物（8～12 週齢）を試験に用いれば問題はない。

### 6.2 用量段階

6.2.1 オプション 1 で、*in vivo*小核試験を反復投与毒性試験に組み込んで実施しようと考えているが、最高用量は臨床曝露量の 50 倍を超えていれば、最大耐量（MTD）でなくてもよいか。

[答]遺伝毒性を評価する場合は、臨床曝露量に基づく用量設定はできない。したがって、遺伝毒性を組込む反復投与試験の投与量が臨床曝露量に基づき設定されている場合は、ガイドラインに記載されている条件に合うように変更しなければならない場合がある。

6.2.2 最低用量には推定臨床用量を設定する必要はないか。この場合、公比が $\sqrt{10}$ より大きくなる可能性があるがそれでもよいか。

[答]遺伝毒性試験では、臨床用量を設定する必要はない。追加してもよいが、その場合でも公比は $\sqrt{10}$ 以下としなければならないので、それで目的の用量が設定できない場合は、処理群数を増やすことになる。

6.2.3 *In vivo*試験を 4 週反復投与毒性試験に組み込むことについて、単回投与試験に比べてどの程度まで用量（曝露量）が下がった場合、評価できない(成立しない)と考えてよいか。

[答] 曝露量についての基準はなく、オプション 2 を選択する場合あるいはほ乳類培養細胞を用いる試験で陽性の場合、投与量に関しては短期投与の最高用量の 50%以上の用量が必要である。また、反復投与に初期曝露量より 50%以上減少する場合は反復投与試験に組み込むこ

とはできない。ただし、ほ乳類培養細胞を用いる試験が陰性の場合、通常の反復投与試験の用量でよい。

6.2.4 最大耐量は、より高用量を投与すると死亡が予測されるような用量と定義されているが、致死用量の 1/2 用量で一般状態の悪化及び骨髄赤血球の増殖抑制が認められない場合でも最高用量とできるか。

[答]致死量の 1/2 を最高用量として問題はない。

6.2.5 前Qの考え方は、第二の *in vivo* 試験でも同様か。

[答]同様である。

6.2.6 小核試験を反復投与毒性試験に組み込む場合、どのような点に注意し、用量設定を行えばよいか。

[答]遺伝毒性評価を反復投与試験に組み込める条件は下記のようにになっている。したがって、これらの条件に合わない事態が起こらないか注意する必要がある。しかし、ほ乳類培養細胞を用いる試験を実施し陰性の場合、通常の一般毒性試験の用量設定でよい。

- i. 溶媒中の化合物の物理化学的特性に基づく投与可能最大量 (MFD) (短期投与試験と同じ溶媒を使用した場合)。
- ii. 14 日間以上の試験では、耐量の場合には 1000 mg/kg を限界用量とする。
- iii. 曝露がプラトー／飽和に達する場合、あるいは化合物の蓄積が認められる場合は最大可能曝露量。逆に、親化合物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) する場合は、通常試験は不適切と考えられる (投与開始数日後に採血された血液試験を除く)。このような現象が片方の性のみにもみられる場合、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試験終了時に評価対象とすべきでない。
- iv. 短期投与のデータがある場合、その最高用量 (最小致死量付近) の 50%以上の用量 (短期投与による小核試験の最高用量に関しては OECD ガイドライン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<sup>3)</sup>。

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、ガイドライン上は受け入れられていない。

### 6.3 被験物質

6.3.1 生体内で速やかに活性本体へと変換される場合は、活性本体の小核試験を行えばよいか。

[答]速やかに活性本体に変換されるのであれば、親化合物の試験でよい。逆に、小核試験を実施する動物で活性体の曝露量が臨床での曝露量を下回る場合は、活性体の試験が必要である。

6.3.2 反復投与が必要な被験物質とは、具体的にどのような種類の化学物質か。

[答]小核誘発能が反復投与でしか検出できない変異原物質は、実際にはほとんど知られていない。したがって、反復投与が必須な物質はないと考えられる。しかし、現在のところ 5-fluorouracil (5-FU)、methotrexate (MTX)、5-bromo-deoxyuridine (BrdU)、aminopterin などの核酸代謝拮抗剤では反復投与により、小核が感度よく誘発されることが知られている<sup>4)</sup>。すなわち、5-FU や MTX などは、1 回に大量投与しても小核の誘発作用は弱い、4 日間反復投与あるいは 2 日間反復投与後、48 あるいは 72 時間後に小核を観察すると、低用量域においても小核の出現頻度が用量依存的に上昇することが示されている<sup>4,5)</sup>。このように、核酸代謝拮抗剤などでは反復投与が効果的である。

### 6.4 投与経路

6.4.1 臨床適用経路、強制経口投与及び腹腔内投与のうち投与経路として何を選べばよいか。

[答]投与経路については、通常、経口、静脈内又は皮下などの予定臨床投与経路とする。全身曝露しない投与経路の場合は、評価する組織が曝露する投与経路とする。

### 6.5 標本作製時期

6.5.1 最終投与からサンプルを採取するまでの許容時間範囲はどの程度か。

[答]一般的なサンプリング時間は、骨髄を用いる場合、単回投与では投与 24~30 時間後とその 24 時間後の 2 回、2 回投与及び反復投与では最終投与の 24 時間後の 1 回、末梢血を用いる場合は、単回投与では投与 36~48 時間後とその 24 時間後の 2 回、2 回投与では最終投与 36~48 時間後の 1 回、反復投与で最終投与 24 時間後の 1 回である。生成した小核はすぐには消失しないので、目標時間のからの前後 1~2 時間のずれは大きな問題とはならない。しかし、各動物を同じ時間に合わせれば、質の高い結果を得ることができる。

**6.5.2 予備試験により、用量間で最大小核出現率の時間に違いが認められた場合、標本作製時期をどのように設定すればよいか。**

[答]予備試験結果から、すべての用量の中で小核誘発率が最大になると予想される時期を設定すればよい。なお、結果が陽性の場合には、最も高い小核出現頻度が得られた時間に設定すればよい。

**6.6 標本作製・染色**

**6.6.1 観察に適した標本作製の具体的方法を知りたい。**

[答]マウスを用いる一般的な手法を以下に示す<sup>6-8)</sup>。なお、ラットを用いる場合も基本的には同じである。

<骨髄細胞を用いる方法>

1. 骨髄細胞懸濁液の調製

- 1) 過剰な麻酔薬投与など、動物に苦痛を与えない方法でマウスを安楽死させ、大腿骨を摘出する。筋肉や血液をガーゼなどで取り除く。
- 2) 大腿骨の両端を切断する。
- 3) ウシ胎児血清で骨髄細胞を遠沈管へ洗い出す。1 mL 用のプラスチック注射器が使いやすい。マウスでは大腿骨 1 本について 0.5~1 mL の血清を用い、できるだけ多くの細胞を洗い出すようにする。
- 4) 1000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を捨てる。
- 5) 遠沈管に残ったごく少量の血清に骨髄細胞を再懸濁する。

2. 塗抹標本の作製

- 1) 清拭スライドガラスの一端へ、パストゥールピペットで骨髄細胞懸濁液を少量分取し、それにカバーガラス（血球計算盤用）を約 45° の角度で接触させる。液滴はカバーガラスに沿って一線に広がるので、そのまま前方へカバーガラスをすべらせ、細胞を薄く帯状に塗抹する。細胞のよく広がった観察しやすい標本を作るには、細胞懸濁液の濃度、スライドにとる液滴の量、塗抹の方法（カバーガラスの角度、すべらせる速度など）が適切でなければならぬ。
- 2) 扇風機かヘアードライアー（冷風）で塗抹を乾燥させる。又は、数時間以上自然乾燥する。
- 3) メタノールで 5 分間固定する。

小核検出の成否は、よい塗抹標本を用いているかどうかにかかっており、良好な標本作製するポイントは塗抹の手技にある。スライドガラスに滴下する細胞懸濁液の量は、3~5 cm

の長さにもスマアして使いきる程度にする。滴下量が多いと厚いスマアとなり、細胞の拡がりも悪く、染色性も良くない。

### 3. 染色：アクリジン・オレンジ (AO) 蛍光染色<sup>9)</sup>

- 1) 0.1% AO 水溶液 1 容を Sørensen リン酸緩衝液 (1/15 M、pH 6.8) 15 容で希釈した染色液で 3 分間染色する。
- 2) 緩衝液で 3 回 (各 1~3 分) 洗浄する。
- 3) 蛍光顕微鏡下で染色状態をチェックする。
- 4) 必要ならばさらに洗浄する。
- 5) 上記の緩衝液で封入する。
- 6) B 励起とオレンジ系の接眼フィルターを備えた蛍光顕微鏡で観察する。

AO 蛍光染色のためには、新鮮な塗抹標本をメタノール固定し、直ちに染色するのが最良であるが、固定後保存してある標本を染色することも可能である。染色状態のチェックは低倍率で行い、核が緑色、細胞質が橙赤色の強い蛍光を発しているかどうかを目安とする。核の蛍光が赤味を帯びている時は洗浄不足なので、緑色蛍光を発するまで洗浄を続ける。一方、核は緑色の蛍光を発しているが、細胞質の橙赤色蛍光が非常に弱い状態であれば、洗浄過剰なので再染色する。なお、AO 蛍光染色を施した標本は保存できないので、観察可能な枚数の標本をそのつど染色することが望ましい。

通常の観察には以下の簡便法を用いることができる。メタノール固定した塗抹標本に 40 µg/mL の AO 溶液 (Sørensen 緩衝液、pH 6.8) を 1 滴滴下する。直ちにカバーグラスをかけ、余分な溶液をティッシュペーパーで吸い取り、そのまま観察する。観察終了後、カバーグラスを外して室温保存すれば、再度観察が可能である。

AO 蛍光染色法によると、小核は DNA に特異的な黄緑色蛍光によって容易に同定でき、また、細胞質中に存在する RNA の橙赤色蛍光により RNA 含有赤血球の識別も容易である。AO による蛍光は非常に強く、他の蛍光色素で染色した場合のように暗室での観察は必ずしも必要なく、通常の研究室での観察が可能である。

#### <末梢血を用いる方法>

##### 1. 末梢血液の採取

末梢血液はどこから採血してもよい。一般的には尾静脈、後肢表在静脈、眼静脈、大腿静脈から採血される。また、心臓穿刺によっても採血できる。これらの方法については、動物実験法の成書を参考にしたい。ここでは、マウスやラットで少量の血液を連続して採取できる、尾の付け根の血管から採血する方法を示す<sup>9, 45)</sup>。

- 1) 動物を保定し尾の裏側がよく見えるようにする。

- 2) 尾の付け根の毛の生え際あたりを注射針（24G 程度のもので使いやすい）で刺す。この時、穿刺部位をアルコール綿などで拭くことはしない。濡れた状態では血液がにじんでうまく採血できない。
- 3) 針を抜くと血液が出てくるので、適当なピペットで吸う。この方法で 10  $\mu\text{L}$  くらいの血液は得られる。また、翌日には同じ場所から採血できる。

## 2. 標本スライドの作製及び染色

骨髓細胞の塗抹の場合と同様の手順で塗抹標本作製し、固定、染色を行う。末梢血では幼若赤血球の比率が骨髓に比べてはるかに低いいため通常のギムザ染色では観察が非常に困難であるので、蛍光色素（AO<sup>10)</sup>、Hoechst 33258 及び pyronin Y<sup>11)</sup>）による蛍光染色が有用である。染色法は骨髓細胞と同様に行えばよい。ここでは林らによって開発された AO をコートしたスライドグラスを用いる超生体染色法を示す<sup>12)</sup>。

- 1) 0.1% AO 水溶液を用意する。
- 2) 清拭スライドグラスを約 70°C に保温する。
- 3) スライドグラスを 1 枚取り、その上に AO 水溶液を 10  $\mu\text{L}$  のせる。
- 4) ガラス棒あるいはガラス管（パスツールピペットなど）をゆっくりと前後に動かしスライドグラスに塗布する（このスライドグラスは遮光下で長期保存可能）。
- 5) スライドグラスの AO 塗布面をティッシュペーパーなどで拭いごみを拭き取る。
- 6) 末梢血液を 5  $\mu\text{L}$  採り、AO コートしたスライドグラスの中央にのせる。この場合末梢血液は抗凝固剤を使用せずに採取したものを用いる。
- 7) 直ちに、カバーグラス（24×40 mm）をかぶせる。

標本は、作製直後から観察可能であるが、乾かないようにして 1 日冷蔵庫あるいは室温に置いた方が血液が固まって血球が動かなくなっており、染色性もよいので観察し易い。カバーグラスの縁を無蛍光のマニキュアなどでシールして冷蔵保存すると数日間は観察可能である。また、-80°C で凍結しておけば長期の保存も可能である。観察条件は骨髓細胞の AO 染色と同様であるが、対物レンズは 40 あるいは 60 倍の乾燥系のものを使用するのがよい（倍率 600～900 倍）。この方法で染色した標本では、幼若赤血球（網赤血球）はオレンジ色の蛍光を発する網状構造を持った細胞として観察できる。核及び小核は強い黄緑色の蛍光を発する。

注) AO をスライドグラスに塗布する操作は人体に対する安全を考慮し、ドラフトチャンバー内で行うことが望ましい。また、AO 塗布済みスライドグラス（東洋紡績株式会社）も市販されているので、それを利用するのもよい。

6.6.2 反復投与毒性試験へ組み込んだ場合、投与期間の増加に関連して骨髄毒性が顕著になる場合は投与期間初期の血液採取が推奨されているが、反復投与毒性試験の評価への影響を考えた場合、採取量はどの程度が適当か。

[答]小核の観察には、血液量は 5  $\mu$ L あれば十分なので、ラットの場合反復投与毒性試験の評価に影響の出る量ではない。

6.6.3 *In vivo*小核試験では、試験毎に陽性対照群を設ける必要がないが、試験毎の陽性対照スライドの観察は必要で、そのために定期的に陽性対照を設けた試験を実施しその試験で作製した陽性対照のスライドを保存しておき試験毎に観察すればよいことされている。そのためにはそのようなスライドはどのように作製し、保管しておけばよいか。

[答]固定しギムザ染色した標本は封入しておけば、半永久に保存可能である。蛍光染色する場合は、固定標本を作製しておき、観察時に染色する。この場合、固定標本は6ヵ月程度保存可能である。固定せずにアクリジンオレンジ等で染色した標本を作製する場合は、カバーガラスの周りをシールすれば、冷蔵で数日間は保存可能である。また、 $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結しておけば、数か月間は保存可能である。しかし、各施設で検討し、最適な条件を選択することが望ましい。また、標本は GLP に対応して作製するのが望ましい。陽性対照物質や動物の資料、投与や標本作製に関して生データに記録し、作製したスライドとともに GLP 資料保管庫に保存する。また、試験で使用した標本は、試験終了後に適切に廃棄又は、GLP 資料保管室に保存する。

6.6.4 動原体を染色する方法として、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) 及びキネトコア蛋白への標識抗体が例示されていますが、その具体的な方法について示してほしい。

[答]通常動原体染色には、市販のプローブあるいは抗体を使用するので、詳細な方法は各製品の説明書に従う。概略の手順は次のようなものである<sup>13,14)</sup>。

○FISH の場合

- ・ 標本の熱変性 (観察細胞の DNA の単鎖化)
- ・ 脱水
- ・ 乾燥
- ・ ハイブリダイゼーションバッファーと蛍光標識 DNA プローブの混合液 (プローブ混合液) の調製
- ・ 熱変性 (蛍光標識 DNA プローブの単鎖化)
- ・ 標本にプローブ混合液を滴下
- ・ カバーガラスをかぶせ、一晚  $37^{\circ}\text{C}$  でインキュベート

- ・洗浄
- ・核染色

#### ○CREST 染色

- ・界面活性剤処理（抗体の浸透をよくする）
- ・標本に抗体溶液滴下
- ・カバーガラスをかぶせ、37°Cでインキュベート
- ・洗浄
- ・蛍光色素標識二次抗体（抗ヒト IgG 抗体）溶液を標本に滴下
- ・カバーガラスをかぶせ、37°Cでインキュベート
- ・洗浄
- ・核染色

### 6.7 観察方法

#### 6.7.1 ラットの新生網赤血球を用いる小核試験について自動解析装置を用いる場合の観察細胞数の目安はあるか。

[答]基本的には、ガイドラインで求められている観察細胞数でよい。ただし、用いた方法で、その観察細胞数で、自動機器で観察した場合と、通常の方法で観察した場合の結果が一致性することが確認されている必要がある。また、自動解析装置では、多数の細胞を観察することが可能で、観察細胞数を増やすことにより精度は上がるので、通常の方法の2倍以上の細胞を観察することは有効である。

#### 6.7.2 スライドのコード化に携わった人が、標本観察しても問題ないか。

[答]コード化実施者以外の方が観察する方が望ましい。しかし、従事者が少ない場合、コード化実施者と標本観察者を分けることは現実的ではない場合がある。この様な場合、コード化実施者と観察者が同一であっても、すべてのスライドが判別できるとは考えられないため、コード化はできていると考えられる。しかし、観察中は観察する者がコードに関する資料を見られないようにする必要がある。

**6.7.3 適切に評価されたものであれば自動解析装置（画像解析及びフローサイトメトリー）を使用することができるが、自動解析の具体的な方法を知りたい。**

[答] 自動解析に関しては、数多くの、画像解析装置を用いる方法<sup>15-17)</sup>あるいは、フローサイトメーターを用いる方法<sup>18-24)</sup>が開発されているので、方法についてはそれぞれの文献を参照されたい。また、マウス及びラット小核試験用にキットが市販されている<sup>25)</sup>。

## 6.8 結果の判定

**6.8.1 ラットの新生網赤血球を用いる小核試験の統計処理法について知りたい。**

[答]マウスを用いる場合と同じでよい。

現在、一般的には、同一試験内の陰性対照群と被験物質投与群とを比較し、小核出現頻度の差の有意性を二項分布に基づく *Kastenbaum & Bowman* の表<sup>26)</sup> によって判定する方法が多用されている。しかし、検出力は必ずしも高くなく、多群の比較により多重性の問題も生じる。どのような検定法を採用するかは、背景データの分布型によって決定されるわけであるが、被験物質投与群のデータを同一試験内の陰性対照群と比較すると、陰性対照群の偶然変動により判定が左右される危険がある。このため、陰性対照群のデータを蓄積し、その統計学的性質を十分に把握した上で、処理群の値を評価することが大切であると考えられている<sup>6)</sup>。

**6.8.2 被験物質処置により用量依存的な小核の出現頻度の増加がみられるが、その出現頻度が陰性対照値の背景データの範囲内であった場合、どのように評価すべきか。**

[答]統計処理方法によって結果の判定は違ってくる可能性がある。同試験の陰性対照との統計処理をしている場合、背景データの範囲内であっても、その試験の陰性対照の値によっては処理群で有意差がつく可能性がある。また、背景データ<sup>27)</sup>と統計処理をする方法をとっている場合は、背景データの範囲内であれば有意差がつかない可能性がある。いずれにおいても小核出現頻度、作用機序及び毒性学的変化を考慮し、生物学的に意味のある変化かどうかを考慮し判断する必要がある。

## 6.9 予備試験

**6.9.1 最高用量及び標本作製時期を設定するための予備試験は必須か。**

[答]必須ではない。入手可能な情報から適切に用量設定ができると判断される場合は、実施する必要はない。

反復投与試験に組み込む場合は、ほ乳類培養細胞を用いる試験を実施し陰性であれば、一般毒性試験の最高用量の設定の根拠となる試験あるいはデータがあればよい。ほ乳類培養細胞を

用いる試験を実施しない場合あるいは陽性となった場合は、遺伝毒性の評価可能な用量まで投与できるかを見る予備試験が必要になる場合がある。

標本作製時期設定のための予備試験について、多くの化合物は骨髄の場合は1回投与後24時間目に、末梢血の場合は48時間目に小核誘発率のピークを示すが、中には48あるいは72時間後に最高となるものもある<sup>4)</sup>ため、陽性の化合物について、標本作成を1回だけとする場合は、標本作製時期設定の予備試験を行うことが望ましい。しかし、小核を誘発するかどうか不明な化合物の場合は、単回投与後24～48時間内（末梢血の場合は48～72時間）に最低2回のサンプリング、あるいは反復投与後18～24時間内でサンプリングを行う。2回投与した場合は、骨髄の場合は最終投与後24時間目に、末梢血の場合は、48時間後にサンプリングを行えば、陽性化合物の場合も標本作成時期のための予備試験は不要である。

#### 6.9.2 最高用量及び標本作製時期設定のための予備試験の具体的方法は何か。

[答]以下に、4種類の方法を示す。

##### 1) 最高用量設定のための予備試験<sup>28)</sup>

被験物質を各群3匹の動物に単回あるいは24時間間隔で2回投与し、投与後72時間以内の一般状態の観察及び体重の測定をする。

##### 2) 反復投与による最高用量設定のための予備試験

通常的一般毒性試験の用量よりも高い投与量が必要な場合は、各群2匹の動物に被験物質を反復投与し、投与後24時間以内の一般状態の観察及び体重の測定をする。

##### 3) 標本作製時期を設定するための予備試験

被験物質の最高用量を各群2匹の動物に単回投与し、投与後24、48及び72時間後に骨髄塗抹標本を作製し、小核を有する幼若赤血球及び幼若赤血球の比率を観察する。末梢血を用いる場合は、標本作成時期は投与後48、72及び96時間後とする。

##### 4) 単回投与による最高用量及び標本作製時期を設定するための予備試験<sup>29)</sup>

各群2匹の動物に被験物質を単回投与し、投与後24、48及び72時間後に骨髄塗抹標本を作製（末梢血の場合は48、72及び96時間）して小核を有する幼若赤血球及び幼若赤血球の比率を観察する。LD<sub>50</sub>値あるいは概略の致死量が既知の被験物質では、最高用量をLD<sub>50</sub>値の1/2あるいは概略の致死量とし、公比 $\sqrt{10}$ 以下で2～4段階の用量を設定する。LD<sub>50</sub>値あるいは概略の致死量が未知の場合は、2000 mg/kgを最高用量として、公比 $\sqrt{10}$ 以下で用量を設定する。もし、動物が投与後数分以内に死亡するような場合は、用量を1段階ずつ下げていく。得られた小核誘発率のデータより、本試験での最高用量と最適標本作製時期が同時に設定できる。

## 6.10 その他

6.10.1 *In vitro*小核で数的異常を誘発する化合物は*in vivo*で陰性である場合、総合的にはヒトへの外挿性は低いと判断される。しかし、*in vivo*小核でも陽性が認められた場合、無毒性量と薬効量とのマージン関係でヒトへの外挿性は可能か。

[答]DNA 反応性がなく、染色体異常試験で構造異常を誘発しない数的異常誘発物質は、その作用に閾値を設定することができる<sup>30)</sup>。したがって、そのような化合物の場合 *in vivo* 小核試験で陰性となる用量での曝露量とヒトの曝露量の間には十分な差がある場合人での安全性を保証できる。

## 6.11 参考文献

- 1) Hayashi, M., I. Yoshimura, T. Sofuni and M. Ishidate Jr.: A procedure for data analysis of the rodent micronucleus test involving a historical control, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 347-356 (1989).
- 2) Sato, S., M. Taketomi, M., Nakajima, M. Kitazawa, H. Shimada, S. Ito, M. Igarashi, N. Higashikuni, S. Sutou, Y. F. Sasaki, M. Hayashi, T. Sofuni, T. Higashiguchi, S. Nito, Y. Kondo, S. Honda, M. Hayashi, Y. Shinagawa, E. Nakajima, Y. Oka, K. Shimoi, Y. Hokabe, A. Morita, N. Kinai, M. Takeuchi, H. Hirono, E. Yamamura and K. Tamai: Effect of ageing on spontaneous micronucleus frequencies in peripheral blood of nine mouse strains: the results of 7th collaborative study organized by CSGMT/JEMS・MMS, *Mutat. Res.*, 338, 51-57 (1995).
- 3) 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)
- 4) The collaborative Study Group for the Micronucleus Test: Single vs multiple dosing in the micronucleus test, The summary of the fourth collaborative study by CSGMT/JEMS・MMS, *Mutat. Res.*, 234, 205-222 (1990).
- 5) Yamamoto, K.I. and Y. Kikuchi: Studies on micronuclei time response and on the effects of multiple treatments of mutagens on induction of micronuclei, *Mutat. Res.*, 90, 163-173 (1981).
- 6) 林 真：小核試験 - 実験法からデータの評価まで - (増補版)、サイエンティスト社、東京 (1999).
- 7) 菊池康基、山本好一：小核試験による変異原の検出、組織培養、11、 218-221 (1985).
- 8) 山本好一：小核試験の方法、放射線・化学物質と染色体異常、牧野佐二郎 他編、pp.289-296、医学書院、東京 (1982).
- 9) 林真、祖父尼俊雄、石館基：小核試験におけるアクリジンオレンジ蛍光染色法、トキシコロジーフォーラム、 6、 419-425 (1983).

- 10) Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate Jr.: An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutat. Res.*, 105, 253-256 (1983).
- 11) MacGregor, J. T., C. M. Wehr and R. G. Langlois: A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, *Mutat. Res.*, 120, 269-275 (1983).
- 12) Hayashi, M., T. Morita, Y. Kodama, T. Sofuni and M. Ishidate Jr.: The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using Acridine Orange coated slides, *Mutat. Res.*, 245, 245-249 (1990).
- 13) G. Schriever-Schwemmer, I.D. Adler, Differentiation of micronuclei in mouse bone marrow cells: a comparison between CREST staining and fluorescent in situ hybridization with centromeric and telomeric DNA probes, *Mutagenesis*, 9, 333-340 (1994)
- 14) Miller BM, Adler I-D. Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*. *Mutagenesis*, 5, 411- 415 (1990)
- 15) Asano N, Katsuma Y, Hironobu T, Higashikuni N, Hayashi M.. An automated new technique for scoring rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravivally stained peripheral blood cells. *Mutat Res*, 404, 149-154 (1998).
- 16) Parton JW, Hoffman WP, Garriott ML., Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system. *Mutat Res*, 370, 65-73 (1996).
- 17) Romagna F, Staniforth CD. 1989. The automated bone marrow micronucleus test. *Mutat Res*, 213, 91-104 (1989)
- 18) Criswell K, Krishna G, Zielinski D, Urda G, Theiss J, Juneau P, Bleavins M. (1998). Use of acridine orange in flow cytometric assessment of micronuclei induction. *Mutat Res*, 414, 63-75 (1998)
- 19) Dertinger SD, Torous DK, Tometsko KR., Simple and reliable enumeration of micronucleated reticulocytes with a single-laser flow cytometer. *Mutat Res*, 371, 283-292 (1996).
- 20) Dertinger SD, Torous DK, Tometsko KR., Flow cytometric analysis of micronucleated reticulocytes in mouse bone marrow. *Mutat Res*, 390, 257-262 (1997).
- 21) Hayashi M, Norppa H, Sofuni T, Ishidate M Jr., Flow cytometric micronucleus test with mouse peripheral erythrocytes. *Mutagenesis*, 7, 257-264 (1992).
- 22) Hutter K-J, Sto`hr M. , Rapid detection of mutagen induced micronucleated erythrocytes by flow cytometry. *Histochemistry*, 75, 353-362 (1982).
- 23) Krishna G, Brott D, Urda G, McKeel M, Zandee J, Theiss J. 1993. Comparative micronucleus quantitation in pre- and post-column fractionated mouse bone marrow by manual and flow methods. *Mutat Res*, 302, 119-127 (1993).
- 24) Tometsko AM, Torous DK, Dertinger SD., Analysis of micronucleated cells by flow cytometry. 3.

- Advanced technology for detecting clastogenic activity. *Mutat Res*, 292, 145-153 (1993).
- 25) Torous DK, Hall NE, Illi-Love AH, Diehl MS, Cederbrant K, Sandelin K, Pontén I, Bolesfoldi G, Ferguson LR, Pearson A, Majeska JB, Tarca JP, Hynes GM, Lynch AM, McNamee JP, Bellier PV, Parenteau M, Blakey D, Bayley J, van der Leede BJ, Vanparys P, Harbach PR, Zhao S, Filipunas AL, Johnson CW, Tometsko CR, Dertinger SD., Interlaboratory validation of a CD71-based flow cytometric method (MicroFlow1) for the scoring of micronucleated reticulocytes in mouse peripheral blood. *Environ Mol Mutagen* 45:44–55 (2005)
- 26) Kastenbaum, M.A. and K.O. Bowman: Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutat. Res.*, 9, 527-549 (1970).
- 27) Makoto Hayashi, Kerry Dearfield, Peter Kasper, David Lovell, Hans-Joerg Martus, Veronique Thybaud, Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutat. Res.*, 72, 387– 90 (2011)
- 28) 佐々木有：小核試験、新毒性試験法—方法と評価、白須泰彦、吐山豊秋 編、pp.279-287、リアライズ社、東京 (1985).
- 29) Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate Jr.: A pilot experiment for the micronucleus test, The multi-sampling at multi-dose levels method, *Mutat. Res.*, 141, 165-169 (1984).
- 30) Decordier, I., Dillen, L., Cundari, E. and Kirsch-Volders, M.: Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules, *Mutagenesis*, 17, 337-344 (2002).

## 7. コメット試験

### 7.1 試験方法

#### 7.1.1 標準的な試験プロトコールを示して欲しい。

[答]日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) がコメット試験の OECD ガイドライン化のために行ったバリデーション試験の方法の概略を記載する。詳細は、医薬品非臨床試験ガイドライン研究会、医薬品非臨床試験ガイドライン解説 2013、薬事日報、東京 (2013)<sup>1)</sup>を参照。なお、試薬等は例示であり、同等の性能を有する他社製品を用いることは差し支えない。

#### 1. 材料及び試薬

##### 1.1 使用動物

動物種：ラット又はマウスのいずれも使用できる。

性：雄のみでよい。雌雄を使用する場合は、他の *in vivo* 試験に準ずる。

週齢：7～9 週齢

動物数：5匹／群

## 1.2 陰性対照物質（溶媒／媒体）

他の、*in vivo* 遺伝毒性試験に準ずる。

## 1.3 陽性対照物質

EMS（CAS No. 62-50-0）

## 1.4 試薬等

### 1.4.1 ボトムレイヤー用 1.0～1.5%(w/v)標準アガロースゲル（使用するなら）

通常融点アガロースを 1.0～1.5%(w/v)となるようダルベッコリン酸緩衝液（カルシウム、マグネシウム及びフェノールフリー）に溶解。電子レンジで加熱して溶解する。

### 1.4.2 細胞封入レイヤー用、トップレイヤー用（使用するなら）0.5 % w/v 低融点アガロースゲル

低融点アガロースを 0.5%(w/v)となるようダルベッコリン酸緩衝液（カルシウム、マグネシウム及びフェノールフリー）に溶解。電子レンジで加熱して溶解する。使用時に 37～45℃に保温。

### 1.4.3 細胞溶解液（又は細胞核溶解液）

100 mM EDTA (disodium)、2.5 M sodium chloride 及び 10 mM tris hydroxymethyl aminomethane を含む水溶液を調製し、1 M sodium hydroxide 又は 1 M hydrochloric acid 溶液で pH 10.0 に調整する。使用時まで冷蔵保存。使用当日に、1%(v/v) triton-X100 及び 10%(v/v) DMSO となるよう添加。使用する前に少なくとも 30 分間 10℃未満で冷蔵。

### 1.4.4 アンワインディング及び電気泳動用アルカリ溶液

300 mM sodium hydroxide 及び 1 mM EDTA (disodium)を含む水溶液を調製し、pH 13 を超えていることを確認する。使用時まで冷蔵保存する。使用直前にも pH 13 を超えていることを確認する。

### 1.4.5 中和溶液

4 M tris hydroxymethyl aminomethane 水溶液を調製し、pH 7.5 に調整する。使用時まで冷蔵保存する。

### 1.4.6 組織細切用緩衝液

ハンクス平衡塩類溶液（HBSS、カルシウム及びマグネシウムフリー；入手可能ならフェノールレッドフリー）に 20 mM EDTA (disodium) 及び 10% DMSO となるよう添加し、pH 7.5 に調整する（DMSO は使用直前に添加する）。使用時まで冷蔵。

### 1.4.7 染色液

SYBR Gold を添付されている使用方法に従い調製する。

## 2. 試験方法

## 2.1 投与量

他の *in vivo* 遺伝毒性試験に準ずる。

## 2.2 投与

被験物質は、3 回投与する。初回の投与後 24 時間に 2 回目の投与を行い、2 回目の投与の 21 時間後に 3 回目の投与を行う。陽性対照の EMS は 2 回、組織採取する 24 時間前と 3 時間前に投与。

## 2.3 組織採取

被験物質の 3 回目の投与 3 時間後、及び陽性対照物質 EMS の 2 回目の投与 3 時間後に、肝臓を摘出する。組織は氷冷した組織細切用緩衝液の中に入れ、血液が残らないように組織細切用緩衝液で十分に洗浄し、組織細切用緩衝液中で氷冷しておく。病理組織学的検査用に、一部を（コメントアッセイに使用する葉と同一部位）を採取する。

## 2.4 単細胞の調製

単細胞は動物を屠殺後 1 時間以内に調製する。

外側左葉の一部を採取し、氷冷した組織細切用緩衝液で血液ができるだけ残らないように洗浄する。採取組織を細切し、細胞を遊離させる。氷上で、細胞懸濁液を 15~30 秒間静置し大きな組織塊が底に沈むのを待ってから上清を採取、又は細胞懸濁液をセルストレイナーでろ過して大きな組織塊を除去したろ液を採取して、スライド標本作製に使用する。

## 2.5 スライド標本の作製

スライド標本は単細胞を分離後 1 時間以内に作製する。スライド標本作製するために 0.50% 低融点アガロースゲルに添加する細胞懸濁液の量は、総量の 10% を超えないようにする。すなわち、低融点アガロースゲルの最終濃度が 0.45% を下回らないようにする。方法は、ボトムレイヤー用標準アガロースゲルをコートしたスライドグラスを作成しておきその上に細胞を懸濁した低融点アガロースゲルを重層する方法、細胞を懸濁した低融点アガロースゲルをテフロンプリントスライドグラスに乗せる方法等がある。

## 2.6 細胞溶解

スライド標本は、冷却した細胞溶解液に浸漬し、光の当たらない条件下で冷蔵庫の中で一晩保管する。その後、純水又は中和溶液ですすいで、細胞溶解液中に含まれる界面活性剤と塩類をアンワインディング実施前に除去する。

## 2.7 アンワインディング及び電気泳動

スライド標本をサブマリントタイプの電気泳動槽の中に無作為に置き、アルカリ溶液を加える。電気泳動が均質に行われるようスライド標本の配置などを工夫する必要がある。アルカリ溶液はスライド標本の表面が完全に覆われるまで添加する。その状態で 20 分間放置し、アンワインディングする。その後、0.7 V/cm、約 300 mA の一定条件下で少なくとも 20 分間電気泳動す

る。電気泳動の開始時と終了時の電流値を必ず記録する。アンワインディング及び電気泳動の実施中は、アルカリ溶液の温度を 10°C未満に維持する必要がある。アンワインディングの開始時、並びに電気泳動の開始時及び終了時のアルカリ溶液の温度を必ず記録する。

## 2.8 スライド標本の中和及び脱水

電気泳動の終了後、スライド標本を中和溶液に少なくとも 5 分間浸漬する。スライド標本を直ちに観察しない場合、スライド標本をエタノール（純度 99.6%以上）に少なくとも 5 分間浸漬して脱水し、風乾してから室温・湿度 60%以下で観察まで保存する。観察後のスライド標本も、再観察に備えて低湿度条件下で（例えば、デシケーターの中で）保存する。

## 2.9 DNA の染色、コメットの画像化及び解析

スライド標本をコード化し、ブラインド条件下で計測する。スライド標本は SYBR Gold を使用して製造元の指示する方法に従って染色する。デジタルカメラ付きの蛍光顕微鏡で撮影し、画像解析装置により計測する。各動物の 1 組織あたり 2 枚のスライド標本を準備し、スライド標本あたり 50 のコメットを解析する。撮影エリアの選択に作為が起らないよう注意し、また、細胞の重複計測やスライド標本の端のエリアの観察をしないようにする。頭部が小さい又は無く、尾部が大きく拡散した強いダメージを受けた細胞像（一般的にヘッジホッグと言われる）が見られることがあるが、もし画像解析装置で適切に計測できないのであれば、データ収集から除外する。ただし、観察した 100 細胞中にヘッジホッグがどの程度の頻度で見られたのかも動物ごとに記録する必要がある。コメットの評価指標として、% tail DNA を測定する。他のコメットの評価指標としては、尾部に近接した頭部の端と見なされる部分からミクロン単位で計測される tail length あるいは Olive tail moment [= a measure of tail length (a distance between a center of head mass and a center of tail mass; ミクロン)×a measure of DNA in tail (% tail DNA/100)<sup>2</sup>] がある。

## 2.10 病理組織学的検査

コメットアッセイで陽性反応が見られた組織について、アポトーシス及び／又は壊死の有無を評価するために、病理組織学的検査を実施する。

## 2.11 統計学的解析

コメットアッセイのデータ解析のために種々の手法が提案されている<sup>3-5</sup>。DNA の移動を表す主要な評価指標は% tail DNA である。加えて、動物ごとに解析した細胞の DNA の移動パターンの分布も考慮される。「ヘッジホッグ」の頻度も被験物質投与の影響を評価するために使用される。組織ごとの解析は動物を単位として行う。

陰性対照群と被験物質投与群の平均値について Dunnett 検定（両側、 $p<0.05$ ）と linear trend 検定（両側、 $p<0.05$ ）を行い、陽性又は陰性の判定をする。陽性対照群に対しては、Student の t 検定（片側、 $p<0.025$ ）を行う。

### 3. データ及び報告書作成

#### 3.1 結果の評価及び解釈

% tail DNA について、Dunnett 検定（両側、 $p < 0.05$ ）において陰性対照群と比較して少なくともひとつの被験物質投与群で統計学的有意差があり、かつリニアトレンド検定（両側、 $p < 0.05$ ）で統計学的有意差がある場合を陽性反応と定義する。両検定で統計学的有意差がない場合を陰性反応と定義し、いずれか一方の検定で統計学的有意差がある場合を曖昧な反応と定義する。陽性対照群は Student の t 検定（片側、 $p < 0.025$ ）で統計学的に有意な増加を示す必要性があり、そうでない場合は試験データを採用しない。被験物質投与群で統計学的に有意な陽性反応が得られた場合、試験実施者は陽性反応が遺伝毒性影響ではなく細胞傷害性によって生じた可能性がないかを「ヘッジホッグ」の出現頻度及び病理学的検査に基づいて評価する。最終的に陽性と判断された場合は、被験物質が検査された組織に DNA 損傷を誘発することを示唆している。陰性と判断された場合は、被験物質がその試験条件下で検査された組織に *in vivo* では DNA 損傷を誘発しないことを示唆している<sup>6)</sup>。

## 7.2 標本作製時期

7.2.1 最終投与からサンプル（血液、肝臓、骨髄等）を採取するまでの許容時間範囲はどの程度か。

[答] コメット試験では投与 3 時間後に標本を採取する。これは、コメット試験で検出する DNA 傷害は時間がたてば修復されるので、その前に標本を採取する必要があるためである。したがって、投与後から採取までの時間は一定にする必要がある。その差は、できれば 15 分以内が望ましい。また、細胞が死ねば DNA の断片化が起こるので、標本作製操作中に DNA なるべく切れないようにする必要がるため、標本は細胞を分離後 1 時間以内に作製する。

## 7.3 観察方法

7.3.1 DNA 損傷と合わせて病理評価が必要となっているが、なぜ病理評価が必要か。

また、病理評価がなければ、DNA 損傷試験として成立しないか。

[答] 細胞がアポトーシスあるいは壊死を起こすと DNA が断片化を起こすので、このような細胞はコメット陽性の細胞となり、遺伝毒性によらない細胞傷害の場合でも陽性の結果となってしまうと考えられている<sup>7)</sup>。これを避けるため、病理組織検査での細胞傷害性を考慮しコメット測定の結果を評価することができる。したがって、適切な用量で実施した試験で陰性の場合には病理組織検査がなくても問題ない。

## 7.4 参考文献

- 1) 医薬品非臨床試験ガイドライン研究会、医薬品非臨床試験ガイドライン解説 2013、薬事日報、東京 (2013)
- 2) Olive PL, et al., Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cell using the “comet” assay. *Radiat. Res.*, 122, 86-94, (1990).
- 3) A.Hartmann, E.Agurel, C.Beevers, S.Brendler-Schwaab, B.Burlinson, P.Clay, A.Collins, A.Smith, G.Speit, V.Thybaud and R.R.Tice, Recommendation for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 18(1), 45-51 (2003).
- 4) Lovell DP, G Thomas G, R Dubow., Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* comet studies. *Teratog Carcinog Mutagen.* 19(2), 109-119 (1999).
- 5) Wiklund SJ, E Agurell., Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay. *Mutagenesis* 18(2):167-175 (2003).
- 6) Tice RR et al., Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, 35, 206-221 (2000).
- 7) B. Burlinson RR. Tice, G. Speit, E. Agurell, SY. Brendler-Schwaab, AR. Collins, P. Escobar, M. Honma, TS. Kumarave, M. Nakajima, YF. Sasaki, V. Thybaud, Yo. Uno, M. Vasquez, A. Hartmann, Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research* 627, 31–35(2007).

## 8. 共通項目 (*In vitro*)

### 8.1 全般

8.1.1 試験の都合上、短時間処理法と連続処理法、あるいは短時間処理方において代謝活性化系存在下と非存在下で時期を変えて別々に実施してよいか。

[答]時期を変えて実施してよい。ただし、代謝活性化系の試験と非代謝活性化系の試験を同時に行わない場合は非代謝活性化系の試験の時にも陽性対照を設定する必要がある。

8.1.2 標本作製時の細胞増殖抑制率を測定した際、細胞増殖抑制試験の抑制率と異なった場合はどのように対応すればよいか。

[答]観察する濃度は、その試験で得られた細胞毒性に基づいて選択する。したがって、細胞増殖抑制試験と細胞毒性が異なり適切な濃度が取れなかった場合は、再試験を実施する必要がある。細胞毒性（細胞増殖抑制率）は、実験毎に常に同じように発現するとは限らない。特に細

胞毒性変化が急激な化合物では、その傾向が強い。したがって、再試験をなくすためにも、被験物質の毒性発現の状況に応じて、処理濃度間隔を公比2より狭くするなどの用量設定をする。加えて、実験誤差の可能性を考慮して目的とする細胞毒性を期待する濃度を挟んで上下に複数濃度を設定するとよい。

#### 8.1.3 浮遊細胞を使用する場合、細胞播種と同時に被験物質処置を行ってもよいか。

[答]付着細胞の場合、細胞播種後時間を置いて処理を開始するのは、細胞が付着するまでの時間を取っているのではなく、遺伝毒性を効率よく検出するためには細胞が増殖していることが必要のため、被験物質処理時に細胞が増殖期にあるようにするためである。したがって、浮遊細胞の場合でも処理時に増殖期に達するまでの時間を置く必要がある。

#### 8.1.4 「陰性又は溶媒対照の値と比較して統計学的に有意であるが、試験施設での適切な背景データの統計信頼区間の範囲内にある程度の増加」とあるが「統計信頼区間」とは95%と99%のどちらを指すのか。

[答]各施設で収集した背景データに応じて決める必要がある。即ち、95%信頼区間を出るデータでも非常にばらつきの少ない施設とばらつきの大きい施設で、その意味合いは異なる。また、Ames試験では菌株によって自然復帰変異コロニー数が大きく異なり、コロニー数が少ないTA1535やTA1537株では99%信頼区間の範囲内の変動は毒性学的意義は少ないと考えてよいだろう。

## 8.2 用量段階

#### 8.2.1 最高濃度の上限については1 mM又は0.5 mg/mLのいずれか低い濃度が推奨されるとあるが、極めて低い分子量(200 以下のような)のときはより高い試験濃度を考慮すべきと記載がある。このような化合物については具体的にどの程度の濃度まで試験すればよいか。

[答]平均的な低分子の医薬品の分子量は400程度であることから、それと同等な0.4 mg/mL程度まで試験すれば良い。

#### 8.2.2 最高用量は0.5 mg/mLと1 mMのどちらを優先したらよいか。その場合に表の表示を合わせる必要は無いのか。

[答]最高濃度の上限については1 mM又は0.5 mg/mLのいずれか低い濃度が推奨される。濃度の表示は、1 mMを基準とした場合でも、mg/mL表示で構わない。

### 8.2.3 被験物質が培養液中で析出するような場合の用量設定の方法について知りたい。

[答]析出する最低用量を試験最高用量とすることができる。また、析出を顕微鏡で観察することも可能になったため、例えば1 µg/mL の様な非常に低い濃度を試験最高用量とすることも起こりうる。ただし、全濃度で析出が認められても、観察に支障を来さない濃度を最高用量としてもよい。

### 8.2.4 本試験において 50%を超えない適切な細胞増殖抑制が認められなかった場合、どの程度まで許容されるか。あるいは、再試験が必要か。

[答]ガイドラインでは公比 2 以下の狭い間隔の濃度での試験が重要とされていることから、公比 2 以上の濃度間隔での試験で適切な細胞増殖抑制が認められなかった場合には、より狭い濃度間隔での再試験が必要となる。再試験で、非常に急劇な細胞毒性の変化が確認できた場合や前の試験より適切な細胞増殖抑制が認められれば更なる再試験は不要である。

### 8.2.5 用量段階の間隔はどのように決定するか。

[答]原則公比 $\sqrt{10}$  以下（一般的には公比 2）で用量を設定する。しかし、この用量間隔では、求められている最高用量の条件に合う用量が設定できない場合には条件に合うように、より小さい公比又は公差での用量設定を行う。ただし、条件に合うまで数回用量間隔を狭めて試験する必要はなく、その間隔で十分に評価できることを科学的に説明できれば問題ない。

## 8.3 陽性対照

### 8.3.1 陽性対照は全ての処理条件で必要か。

[答]陽性対照は使用した細胞及び代謝活性化系が適正に反応しているかを確認するためのものであり、*in vitro* ほ乳類培養細胞を用いる試験は十分に標準化されているため、代謝活性化系と非代謝活性化系の試験を同時に実施する場合は、その二つが同時に確認できる代謝活性化系の陽性対照のみでよい。また、短時間処理及び連続処理を同時に実施する場合は、いずれかの陽性対照のみでよい。

### 8.3.2 陽性対照物質の処置濃度についても、細胞増殖抑制が約 50%を超えないように設定すべきか。

[答]陽性対照として使用する化合物はその作用が遺伝毒性によるものだと確かめられているため、毒性による影響を考慮する必要はない。しかし、強い陽性反応を示す必要はないので、一般的な陽性対照では、50%を超える細胞毒性は必要ない。

## 8.4 代謝活性化系

### 8.4.1 ヒトS9 を用いる場合の調製方法について知りたい。

[答] S9 の濃度及び補酵素の濃度はラット S9 と同じでよい<sup>1)</sup>。

## 8.5 参考文献

- 1) A. Hakura, S. Suzuki, S. Sawada, S. Motooka, T. Satoh, An improvement of the Ames test using a modified human liver S9 preparation. J. Pharmacol. Toxicol. Methods, 46, 169-172 (2002)

## 9. 共通項目 (*In vivo*)

### 9.1 全般

#### 9.1.1 4.4.1 項の*in vivo*における曝露証明として血液生化学的毒性指標を挙げているが、どのような指標が想定されるか。

[答]評価する組織の細胞が傷害を受けた時に変化する血液生化学の項目である。肝臓ならば、ASTあるいはALT、骨髄であれば、血液学的パラメータの変動となる。

#### 9.1.2 「投与経路を変更しても標的臓器が十分に曝露されず、最も曝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るかもしれない。」とあるが、追加の*in vitro*試験が必要か。必要な場合、適切な試験は何か。

[答]基本的には、オプション1で実施する、2種類の*in vitro*試験で評価してよい。

#### 9.1.3 肝臓で短寿命の活性代謝物が生成されると予想される場合は、オプション2が推奨されるとあるが、短寿命とはどれくらいか。

[答]評価する組織が曝露されなければその組織では遺伝毒性は評価できないので、肝臓でのみ活性代謝物が生成される場合で肝臓以外でその代謝物の活性を見る場合は、その組織に代謝物が到達しなければならない。したがって、肝臓で生成される短寿命の代謝物の寿命とは、評価する組織に到達するまでより短い時間と考えられる。

9.1.4 「1 つの *in vivo* 試験を独立して短期投与で行う場合には 2 つ以上の指標を組み込むことが望まれる」とあるが、*in vivo*小核試験と組み合わせ可能な試験方法とは、何か。

[答]ガイドラインでは *in vivo* 試験として、コメット試験、アルカリ溶出試験、*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、肝細胞を用いる不定期 DNA 合成 (UDS) 試験及び部分肝切除や幼若ラットの肝臓小核試験が挙げられている。これらの試験はいずれも *in vivo* 小核試験と組み合わせることが可能である。ただし、それぞれの試験で適切な標本作製時期があるため、両試験ともに適切な標本作製時期になるように投与回数及び投与時期を決めなければならない。

## 9.2 用量段階

9.2.1 反復投与試験に *In vivo*試験を組み込む場合の最高用量の設定において、「短期投与のデータがある場合は、その最高用量（最少致死量付近）の 50%以上の用量」とあるが、その用量では毒性が強すぎる場合、50%を下回る用量を設定しても、試験が成立すると考えてよいか。

[答]オプション 1 で *in vitro* 試験が全て陰性の場合、最高用量は、一般毒性を評価する用量でよいが、オプション 1 で *in vitro* 試験で陽性の場合あるいはオプション 2 の場合はガイドラインで定められた最高用量の条件を満たさなければならないので、その最高用量がガイドラインに定められたその他の条件を満たしていなければ遺伝毒性評価としては成立しない。

9.2.2 *In vivo*試験を 4 週反復投与試験に組み込むことについて、単回試験に比べてどの程度まで用量（曝露量）が下がった場合、評価できない(成立しない)と考えてよいか。

[答]オプション 1 で *in vitro* 試験が全て陰性の場合、最高用量は一般毒性を評価する用量でよいので曝露量は問題とならない。しかし、オプション 1 で *in vitro* 試験で陽性の場合あるいはオプション 2 の場合は、ガイドラインで定められた最高用量の条件を満たさなければならない。しかし、その条件には曝露量での許容量は示されていない。したがって、単回投与に対する曝露量を反復投与試験の成立条件とすることは出来ない。

9.2.3 反復投与試験に *In vivo*試験を組み込む場合の最高用量の設定において、「毒性を伴わない曝露マージン（臨床曝露の複数倍）のみに基づく用量設定は、十分な正当性があるとは考えられない」とあるが、「毒性を伴う曝露マージンに基づく用量設定」であれば、試験が成立すると考えてよいか。

[答]反復投与試験に組み込む場合の最高用量設定の条件にあるように、反復投与により毒性が強くなり高用量を投与できなくなるのは許容されていない。したがって、毒性のために投与量

が下がっても十分なマージンがあると言うのは許容されない。しかし、遺伝毒性を評価する組織における毒性からその正当性を説明できれば成立すると考える。

## 10. その他

10.1 ラットの一般毒性試験（2 週間から 3 ヶ月の投与期間の試験の内のいずれか 1 つ）の中に、2つのエンドポイント（骨髄小核と肝臓の DNA 鎖切断）を組み込むことでよいか。

[答]最高用量が条件を満たせば、組み込んでよく 3R の観点からそちらの方が望ましい。しかし、肝臓の DNA 鎖切断を検出する試験（コメット試験）では投与後 2～6 時間（あるいは Tmax）での標本作製が必要なため、一般毒性の検査に影響を及ぼすと考えられるため、事前の検討が必要である。

10.2 曝露部位における遺伝毒性試験が必要な場合とは、どのような場合か。

[答]一般的に用いられている組織（例えば骨髄）が遺伝毒性を評価する十分な曝露量が得られない場合で、他に十分な曝露が得られる組織を用いて遺伝毒性の評価が可能な場合である。塗布による皮膚細胞を用いた試験等が該当する。

10.3 探索的臨床試験の Type 4 又は Type 5 におけるげっ歯類の毒性試験に *in vivo* 遺伝毒性試験を組み込む場合の最高用量はどのようにすればよいか。

[答]遺伝毒性試験は遺伝毒性の有無を調べる試験であるため、遺伝毒性を十分評価出来る用量が必要である。したがって、遺伝毒性を評価する場合は通常の遺伝毒性試験と同じ最高用量にする必要がある。

10.4 *In vitro* のほ乳類細胞を用いた試験において陽性となったために、1 ヶ月のラットの反復投与毒性試験において各投与群を 2 つに分けて、一方は最終投与 3 時間後に最終解剖を行い肝臓のコメット試験を、他方は最終投与 24 時間後に最終解剖を行い骨髄小核試験を行う計画であるが、このような計画での注意点はなにか。

[答]遺伝毒性評価として問題はないが、一般毒性の評価を 2 つに分けたグループ間でどのように行うかが問題であろう。また、2 つのグループに分けることによって使用動物数が増えるのであれば、遺伝毒性評価は組み込まず、単独試験を実施することも考えられる。

肝細胞のコメットと骨髄細胞の小核を同時に観察する方法としては、反復投与試験での投与後 24 時間での解剖の 3 時間前にもう一度投与を行う試験法が提案されている。

10.5 遺伝毒性試験での Maximum Feasible Dose (MFD)は、短期投与試験での投与可能最大量と理解したが、投与に用いる媒体の毒性から、反復投与試験ではこの MFD は投与不可能であった場合には、独立した *in vivo* 遺伝毒性試験を実施すべきか。

[答]反復投与で短期投与の MFD の 1/2 の投与が可能ならば反復投与で評価出来る。それよりも低くなる場合は独立した遺伝毒性試験を実施すべきである。ただし、オプション 1 で *in vitro* 試験が陰性の場合はこの限りではない。

10.6 オプション 2 に関して、2 つの異なる組織における *in vivo* 試験とあるが、同じエンドポイントで 2 つの異なる組織について検討を行うことでも構わないか。

[答]構わない。2 つの異なる組織で行う目的は組織による違い、特に代謝物への曝露の違いを考慮するたため、一般的には、1 つは肝臓を用いることが望ましい。

10.7 M3(R2)ガイドラインにおいて反復投与の臨床試験を行う場合、「ほ乳類の試験系を用いた染色体損傷検出のための追加評価が実施されるべき」とあるが、S2(R1)ガイドラインでオプション 2 を選択した場合、反復投与の臨床試験を行う前に実施すべき遺伝毒性試験はどれになるか。

[答]オプション 2 の場合、追加した *in vivo* 試験によって、ほ乳類培養細胞を用いる試験を補完する考えなので、バッテリー試験のすべてが必要になる。

10.8 点眼剤等では、ガイドライン記載の最高用量を上回る濃度で臨床使用する場合があるが、このような薬剤の最高用量も S2(R1)ガイドラインに記載のとおりで構わないか。

[答]今回のガイドラインではほ乳類培養細胞を用いる試験の最高濃度を下げたのは、生体内ではそれ以上の曝露はないということが理由の一つとなっているので、それ以上の曝露があるとする場合は、臨床での曝露量を上回る濃度での試験が必要である。

10.9 遺伝毒性に関連した記載のある ICH ガイダンスにはどのようなものがあるか。

[答]

遺伝毒性試験に関連する記載のある他の ICH ガイダンス

トピック	ガイダンス名	遺伝毒性関連記載場所
S1A	Guideline on the need for carcinogenicity studies of pharmaceuticals	4.3. Genotoxicity
S1B	Testing for carcinogenicity of pharmaceuticals	5.3. Considerations for additional genotoxicity testing, Note 2
S3A	Note for guidance on toxicokinetics: The assessment of systemic exposure in toxicity studies	4.4. Genotoxicity studies
S6(R1)	Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals	4.7. Genotoxicity studies, Note 3
S9	Nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals	2.6. Genotoxicity
S10	Photosafety evaluation of pharmaceuticals	Note 2
M3(R2)	Guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials for pharmaceuticals Impurities in new drug substances	7. Exploratory clinical trials 9. Genotoxicity studies 11.3 Women of childbearing potential 11.4 Pregnant women 12. Clinical trials in pediatric populations 17. Combination drug toxicity testing
M3(R2) Q&A	Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals Questions & Answers (R2)	4 June 2011, 10 March 2012
M4	The common technical document for the registration of pharmaceuticals for human use: Safety	Executive summary, Toxicology Written summary, Tabulated summary
Q3A(R2)	Impurities in new drug substances	Attachment 3
Q3B(R2)	Impurities in new drug products	Attachment 3
Q3C(R5)	Impurities: residual solvents	分類基準として全体にわたり記載

10.10 オプション 2 において、*in vivo* で 2 つのエンドポイントを調べる場合には、1 つの *in vivo* 試験でおこなうことが望ましいか。

[答]3R の観点から 2 つの評価を 1 試験で実施できるのであれば、そちらが望ましい。

10.11 注 16 には、コメット試験のみに同時対照が望ましいとされているが、アルカリ溶出試験では同時対照は必要ないと判断してよいか。

[答]同時の陽性対照が必要ない試験は、試験施設がその試験を行うのに十分な能力がある場合で、アルカリ溶出試験がそれに当たらなければ必要である。

10.12 試験実施の際、黄色灯下で実施するべきか。

[答]光に不安定な被験物質を用いる場合、遮光条件下、あるいは黄色灯のもとで試験を実施するなどの配慮が必要である。しかし、通常の化合物では黄色灯化で試験をする必要はない。ただし、コメット試験の細胞融解以降の操作は紫外線での DNA 鎖切断を防ぐため黄色灯化で実施する必要がある。

10.13 実施すべき遺伝毒性試験の組み合わせについて解説してほしい。

[答]今回のガイドラインでは、試験の組合せが、次の二つのオプションから選択できるようになった。

オプション 1

- i. 細菌を用いる復帰突然変異試験
- ii. 染色体傷害を検出する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又は *in vitro* 小核試験) 又はマウスリンフォーマ Tk 試験
- iii. *In vivo* 遺伝毒性試験。一般には、げっ歯類造血細胞での染色体傷害、すなわち小核又は分裂中期細胞の染色体異常を検出する試験

オプション 2

- i. 細菌を用いる復帰突然変異試験
- ii. 2 種類の異なる組織における *in vivo* 遺伝毒性試験。一般的には、げっ歯類造血細胞を用いる小核試験及び 2 つ目の *in vivo* 試験。他に適切な方法がない限り、一般的には肝臓の DNA 鎖切断を検出する試験が勧められる

この二つのオプションは同等であるので、基本的にはどちらを選んでも問題はない。例外として、細菌に対して強い毒性を示す化合物については、細菌を用いる試験で遺伝毒性を正し

く評価できない可能性があるため、*in vitro* のほ乳類培養細胞を用いる試験のいずれか 1 つを実施することが求められる（オプション 1）。また、全身曝露がない化合物については *in vivo* での遺伝毒性評価が困難であるため、*in vitro* のほ乳類培養細胞での評価が重要であり、オプション 1 の組合せが推奨される。

オプション 1 の利点としては、*in vitro* のほ乳類培養細胞を用いる試験で陰性の場合、*in vivo* 試験を一般毒性試験に組込む際に、最高投与量に規制はなくいずれの試験にも組込み可能である。この点、オプション 2 の場合は、最高投与量の規制があるため、それに合わない場合は、一般毒性試験に組込めない場合があり、遺伝毒性単独で実施する必要がある。

オプション 2 の利点としては、*in vitro* のほ乳類培養細胞を用いる試験の試験条件が変更され、偽陽性結果が減少したと言えゼロとはならないので、*in vitro* のほ乳類培養細胞実施しないことにより偽陽性の結果を避けられることがあげられる。

以上