

第13回医薬品評価フォーラム
2016年4月22日

遺伝毒性の評価法と結果の解釈

林 真

makoto international consulting

名誉理事長 (公財)安全センター

Terminology

Mutagenicity vs Genotoxicity
変異原性 遺伝毒性

- **Mutagenicity**

 - Gene mutation**

 - Chromosomal aberrations**

 - Structural*

 - Numerical*

- **Genotoxicity**

 - Mutagenicity**

 - DNA adduct formation**

 - DNA damage (UDS, Comet)**

 - Sister chromatid exchange (SCE)**

 - Etc.**

- DNAに付いた傷はほとんどが修復される
- 修復に誤りがあった場合に変異が起きる
- 変異した細胞が生き残り, 増殖
- 次世代への影響: 生殖細胞; 流産

代表的な遺伝毒性試験

- **遺伝子に傷を付ける (DNA鎖切断)**
単細胞ゲル電気泳動法 (コメットアッセイ),
アルカリ流出法
- **修復 (除去修復)**
不定期DNA合成試験 (UDS)
- **遺伝子突然変異 (塩基対置換, フレームシフト)**
Ames試験, MLA, TG, Pig-A
- **染色体異常 (構造異常, 数的異常)**
ほ乳類培養細胞, MLA, 小核試験, DL

遺伝毒性試験

	DNA 傷害性	遺伝子突然変異	染色体異常 誘発性
<i>in vitro</i>	recアッセイ, コメット試験, UDS試験	Ames試験 MLA HPRT	CHL, ヒト末梢血 MLA 小核試験
<i>in vivo</i>	コメット試験, UDS試験	トランスジェニック 動物試験 Pig-A	げっ歯類を用いる 小核試験 多臓器小核試験

遺伝毒性試験

	DNA 傷害性	遺伝子突然変異	染色体異常 誘発性
<i>in vitro</i>	recアッセイ, コメット試験, UDS試験	Ames試験 MLA HGPRT	CHL, ヒト末梢血 MLA 小核試験
<i>in vivo</i>	コメット試験, UDS試験	トランスジェニック 動物試験 Pig-A	げっ歯類を用いる 小核試験 多臓器小核試験

遺伝毒性物質の検出

- 遺伝子に傷を付ける(DNA鎖切断)
- 修復(除去修復)
- 遺伝子突然変異(塩基対置換, フレームシフト)
- 染色体異常(構造異常, 数的異常)

Bacterial gene mutation assay (Ames assay)

Salmonella/microsome assay

His⁻ → His⁺ Trp⁻ → Trp⁺

Salmonella typhimurium

Base-change type: TA100, TA1535, TA102, TA92

Frame-shift type: TA98, TA1537, TA97(a), TA1538, TA94

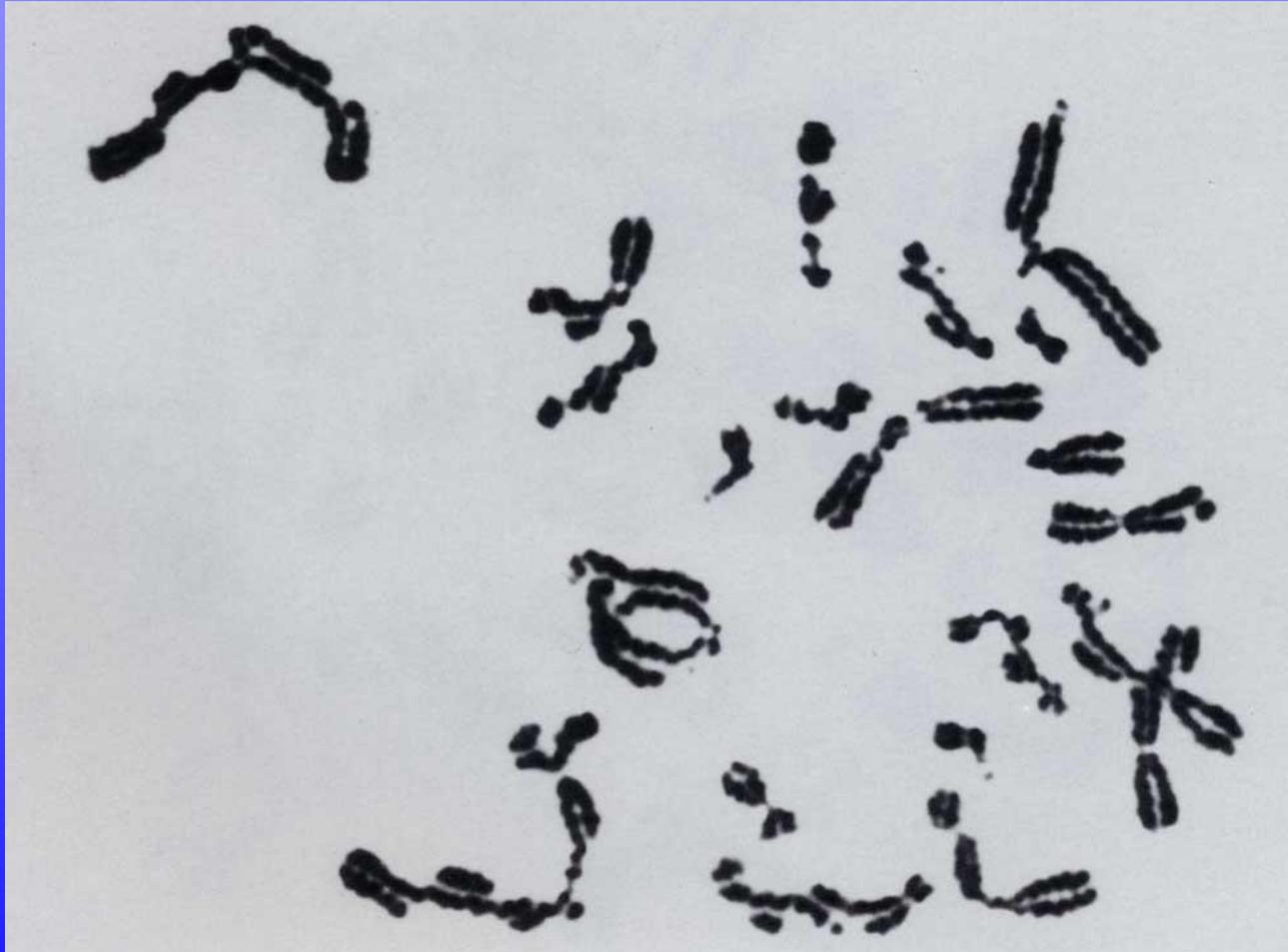
Cross-link: TA102, TA92, TA94

Escherichia coli: WP2uvrA(/pKM101), WP2(/pKM101)

チャイニーズ・ハムスター 正常



チャイニーズ・ハムスター 染色体異常



MMC



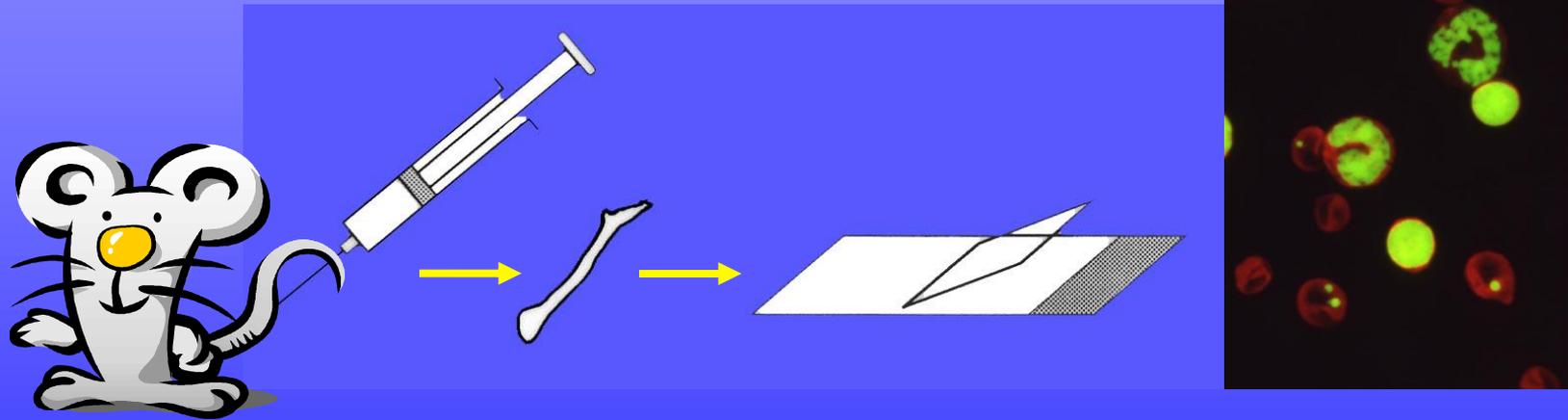
6-MP



Ara-C



げっ歯類を用いる小核試験



験体投与

骨髓細胞

塗抹
固定
染色

観察

In vivo micronucleus assay

Clastogen

Peripheral blood

Erythroblasts

Bone marrow

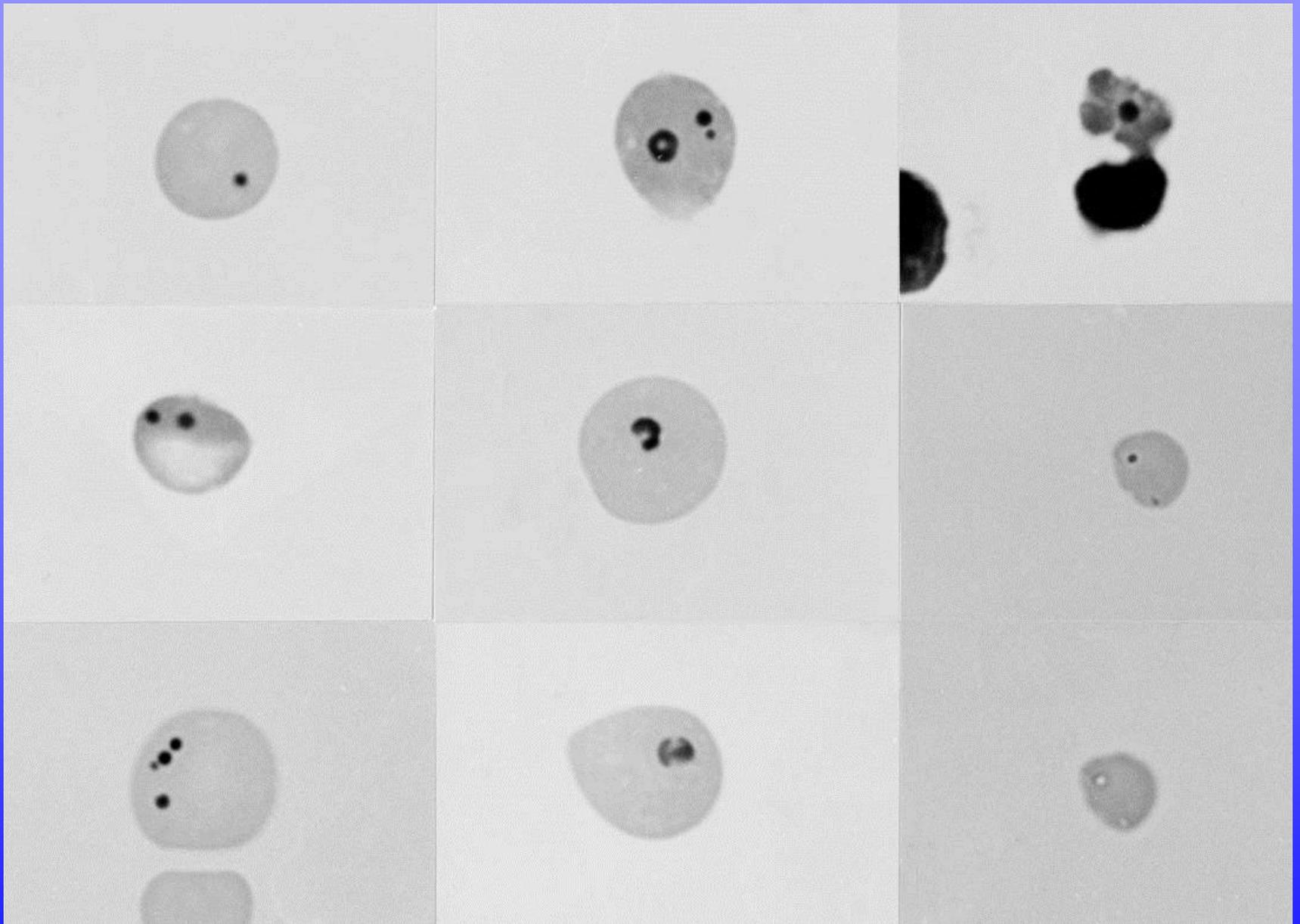
0.35-0.9

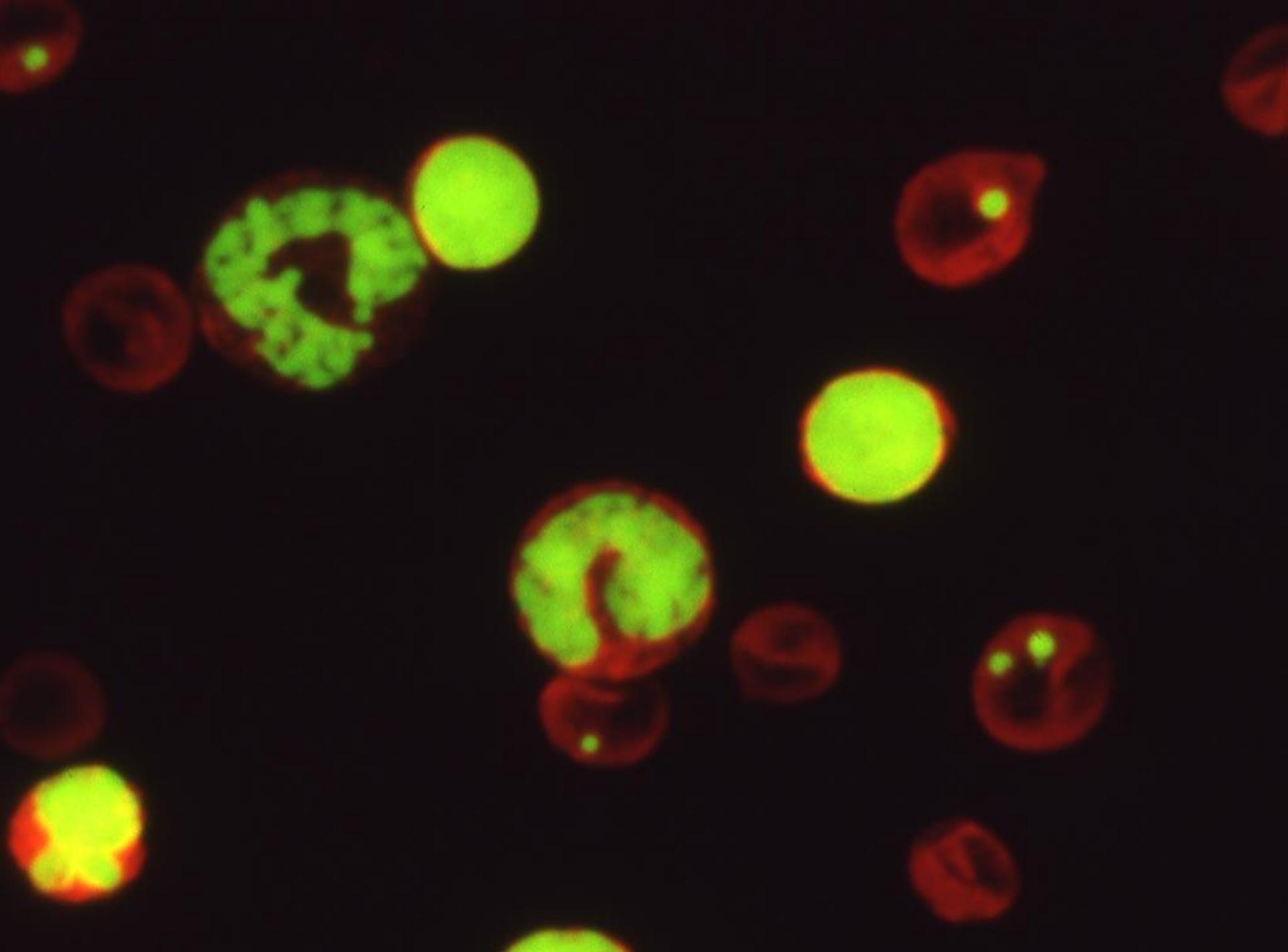
Immature erythrocytes

Mature erythrocytes

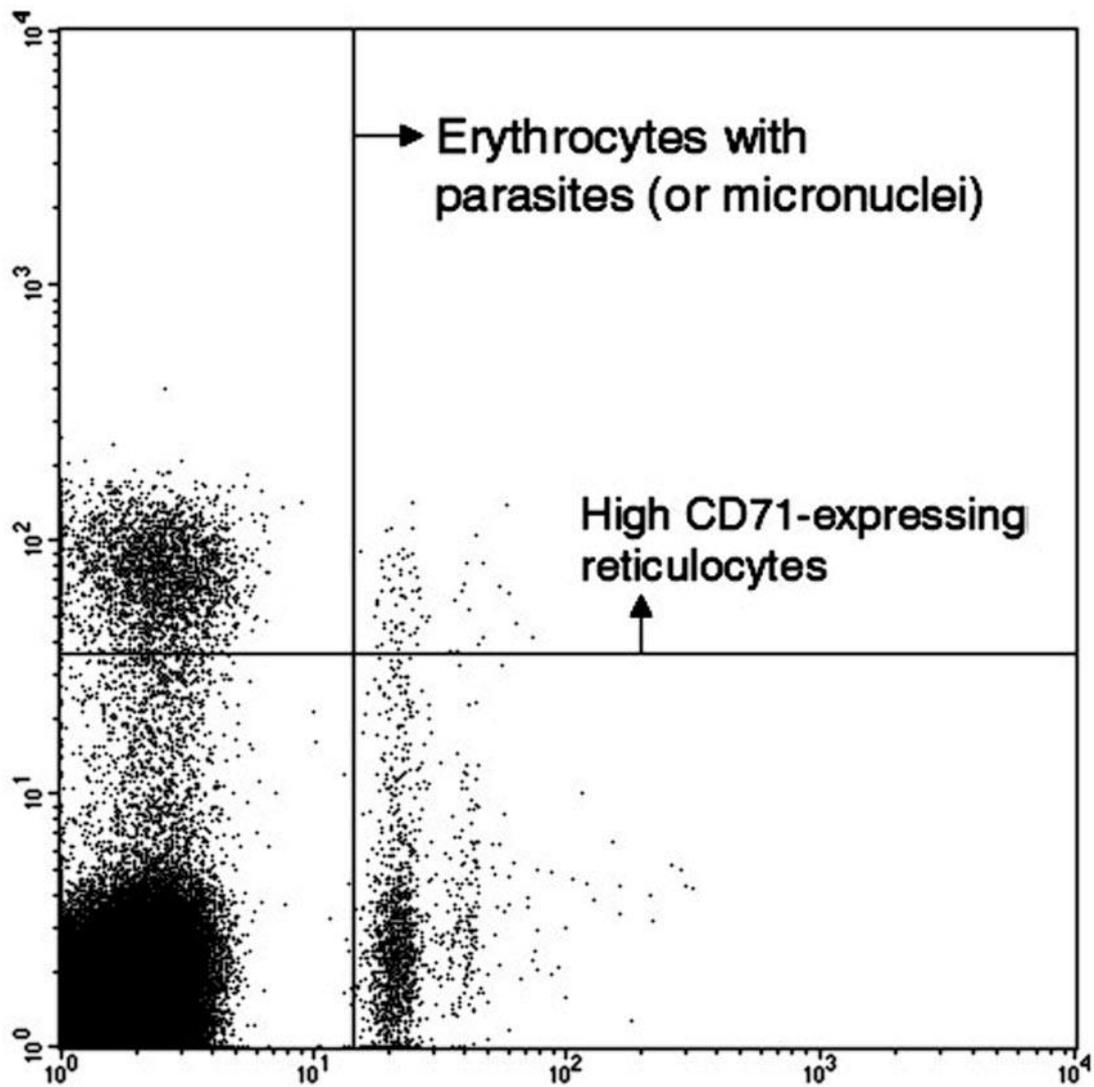
6-8 h

18-22 h



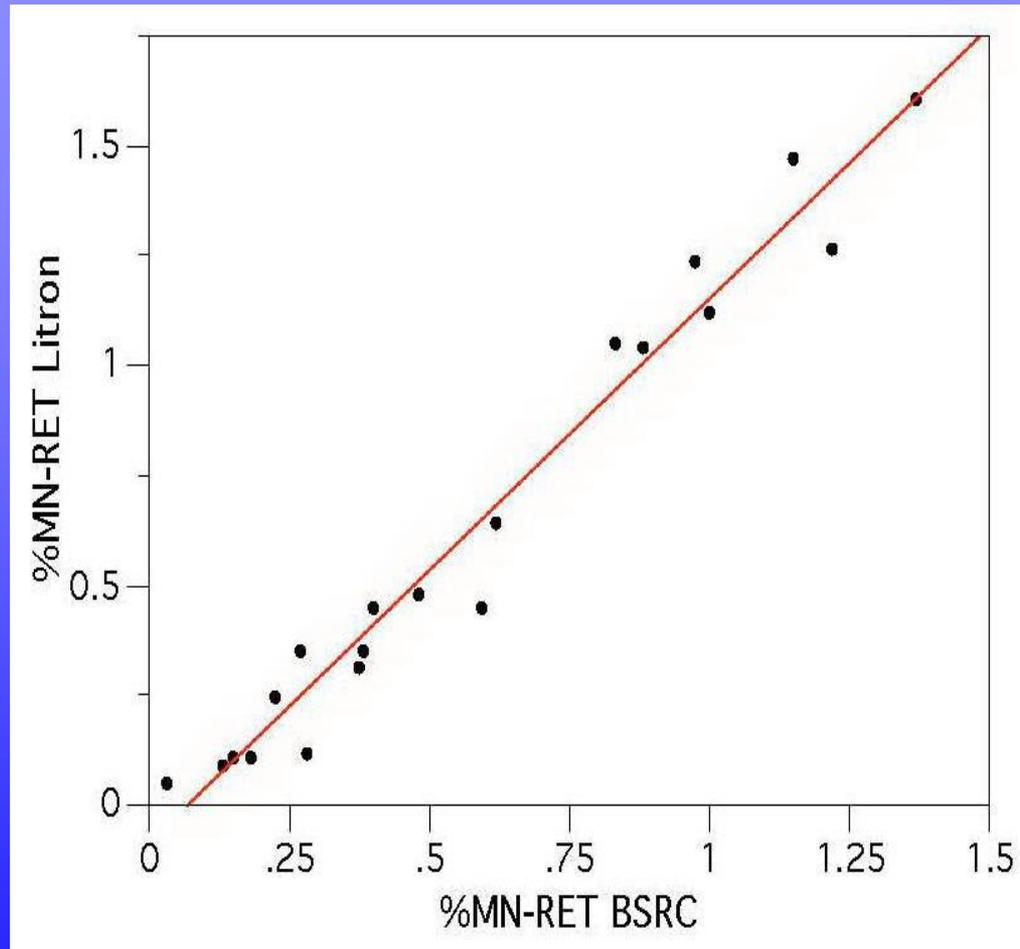


anti-CD71-FITC



Propidium Iodide

MN by flow cytometry



CP: SD rat
po single
5, 10, 15 mg/kg

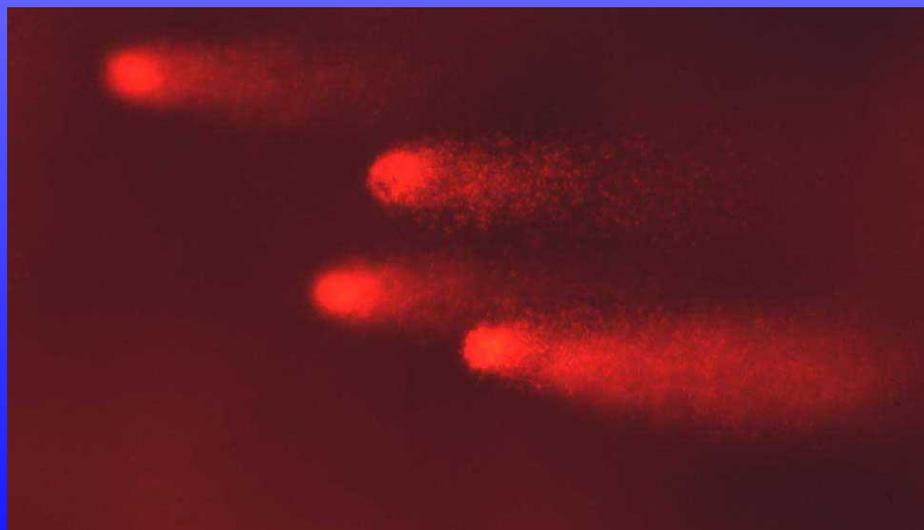
その他の試験法

- 単細胞ゲル電気泳動法(コメットアッセイ)
- *In vitro* 小核試験
- FISH, 染色体ペインティング
- トランスジェニック動物を用いる試験
- Pig-A assay

コメット法

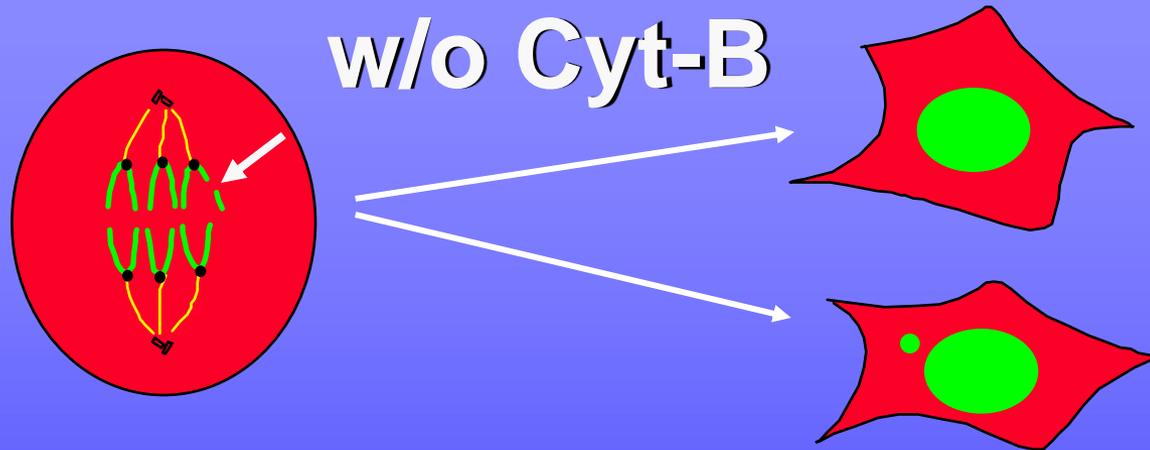


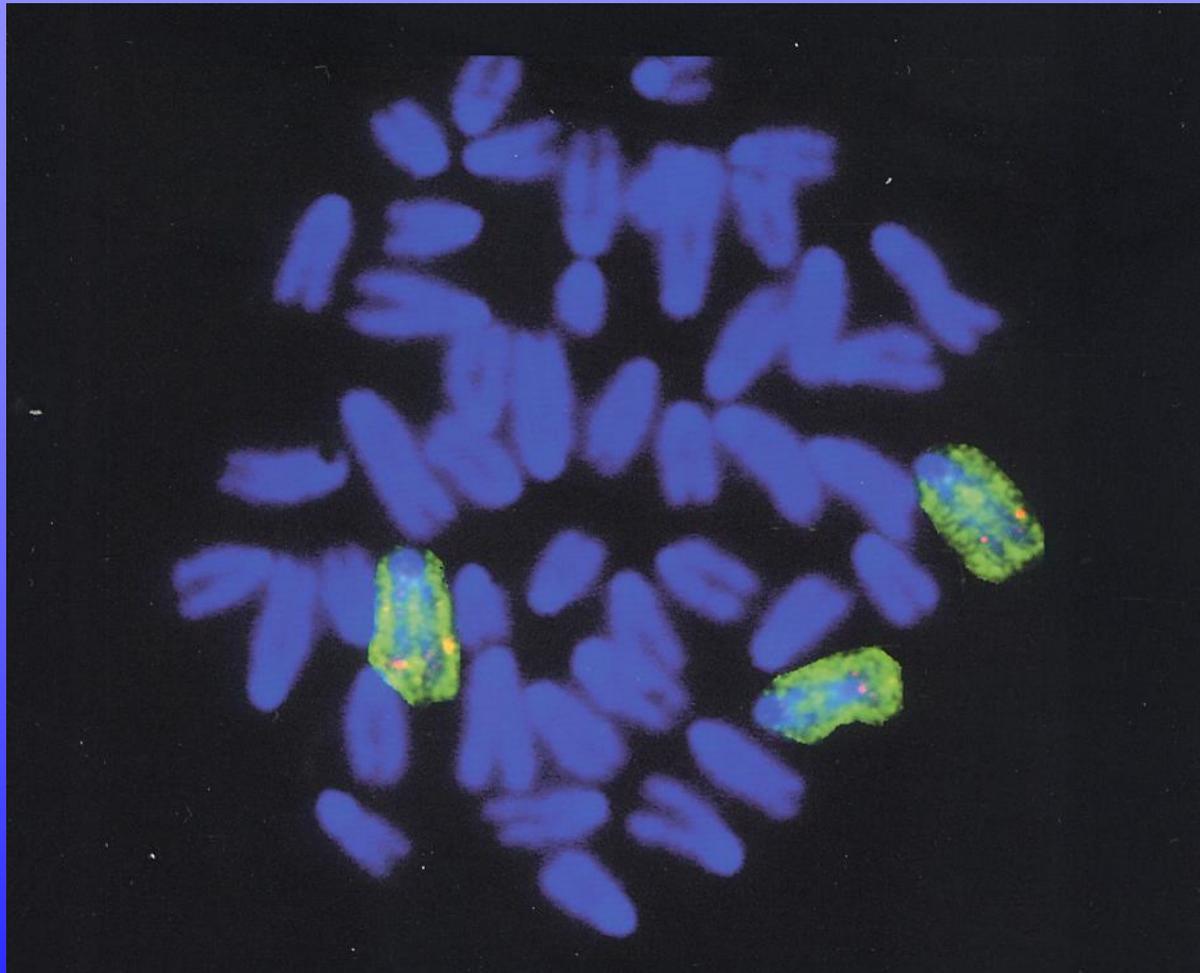
陰性



陽性

Absence vs presence of Cyt-B



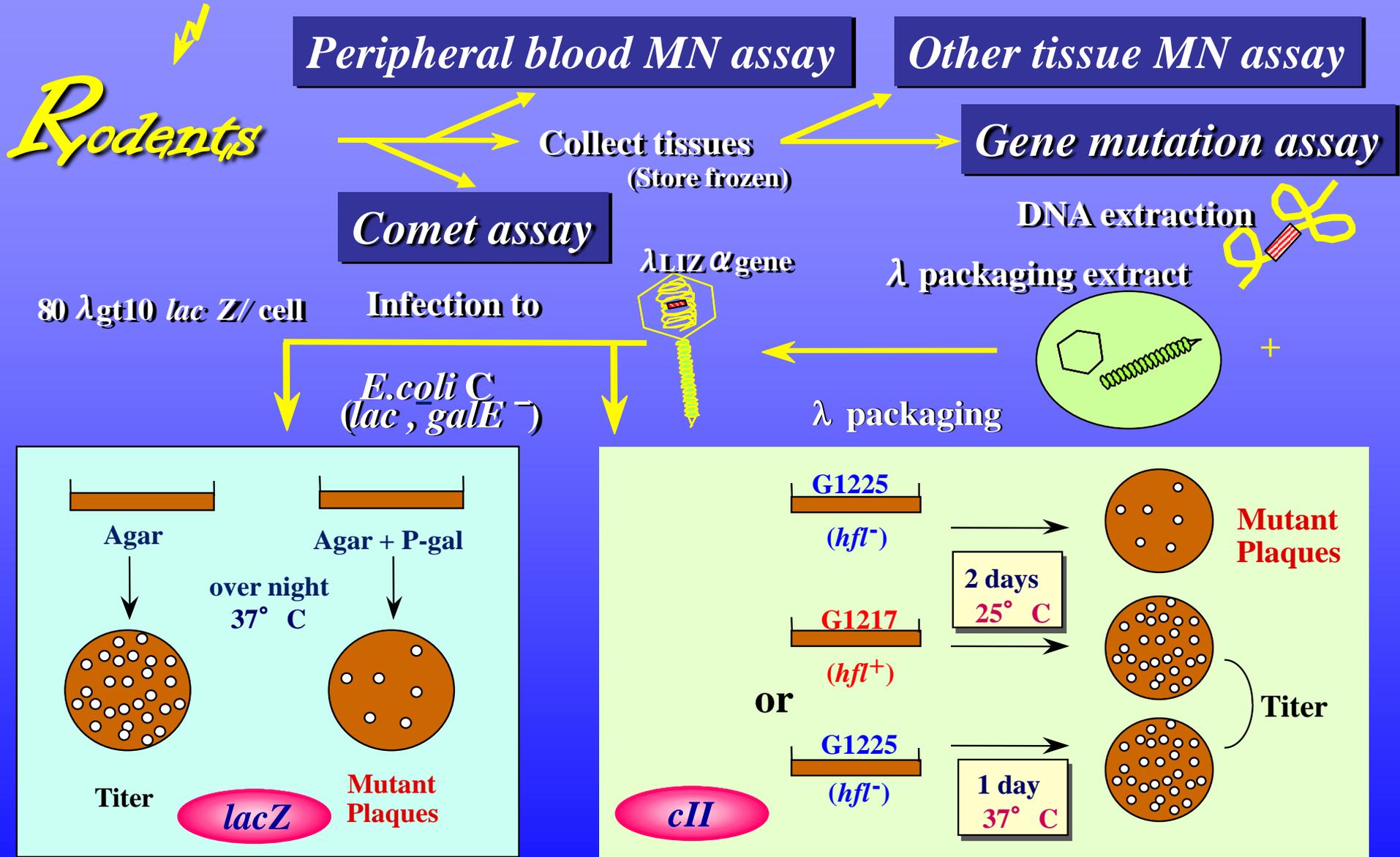


Transgenic animal model

- 外来遺伝子を標的として遺伝子突然変異を検出する
- 全ての臓器, 組織を評価対象とすることが出来る
- OECD TG-488として, 標準手法がある
- Ames試験で陽性の2nd *in vivo*試験として注目
- Multiple endpoint assayの構築が可能

Mutagens

Multiple-endpoint genotoxicity assay



Pig-A assay

Phosphatidylinositol Glycan
Complementation Group A (*Pig-A*)
遺伝子を内因性レポーター遺伝子として
用いる *in vivo* 試験

Environmental and Molecular Mutagenesis
Volume 49, Issue 4, 2008

遺伝毒性の特徴と限界

- DNAは皆同じ

ヒトへの影響をバクテリアで評価？

- 原核生物と真核生物

裸のDNAと染色体

- *In vitro* と *in vivo*

単細胞と多細胞
ハザードとリスク

- 閾値を設定できない

遺伝毒性の特徴と限界

- DNAは皆同じ

ヒトへの影響をバクテリアで評価？

- 原核生物と真核生物
裸のDNAと染色体

- *In vitro* と *in vivo*
単細胞と多細胞
ハザードとリスク

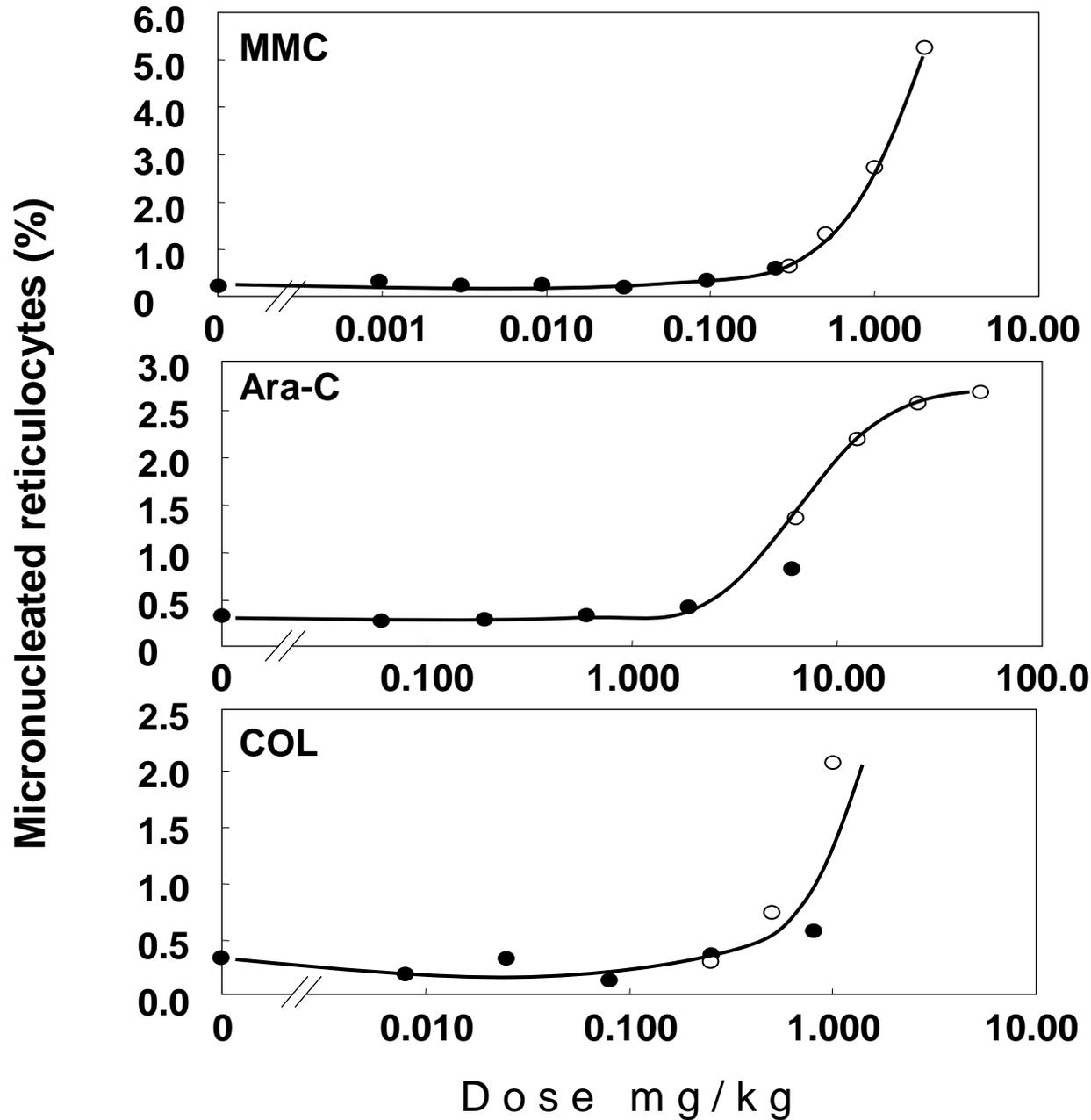
- 閾値を設定できない

■ 閾値がない

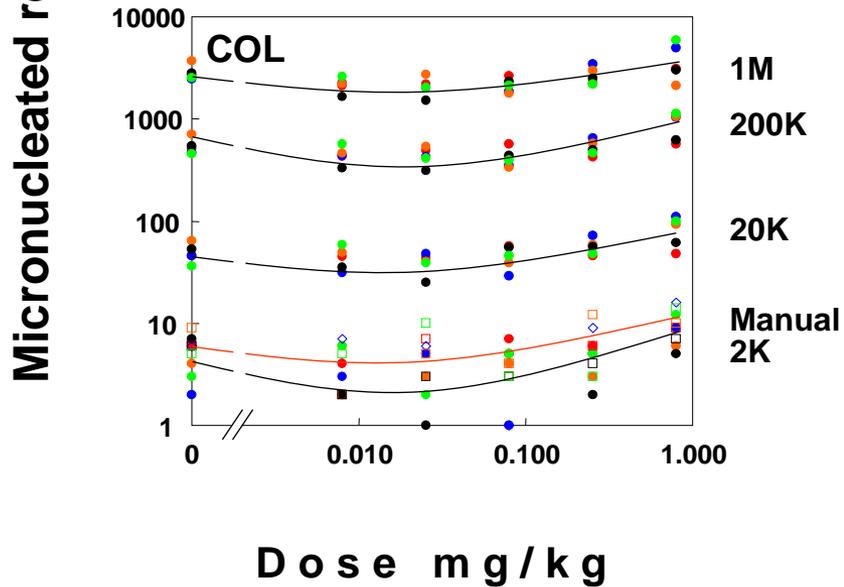
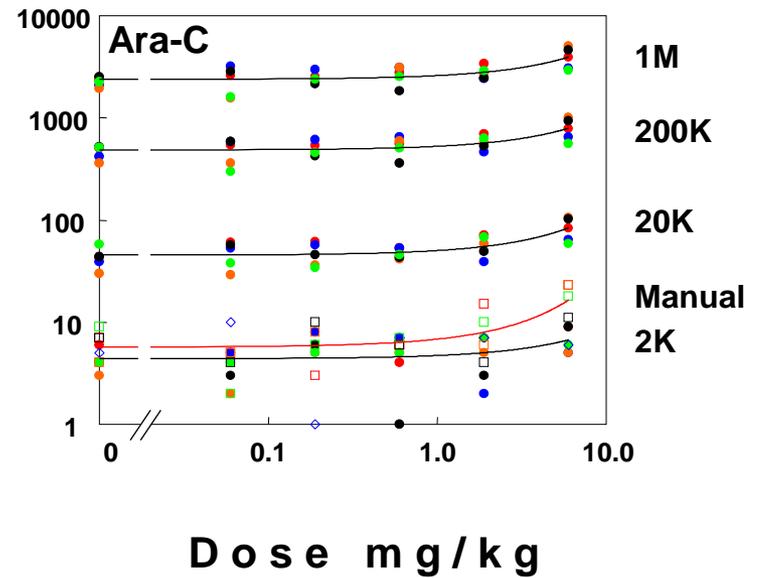
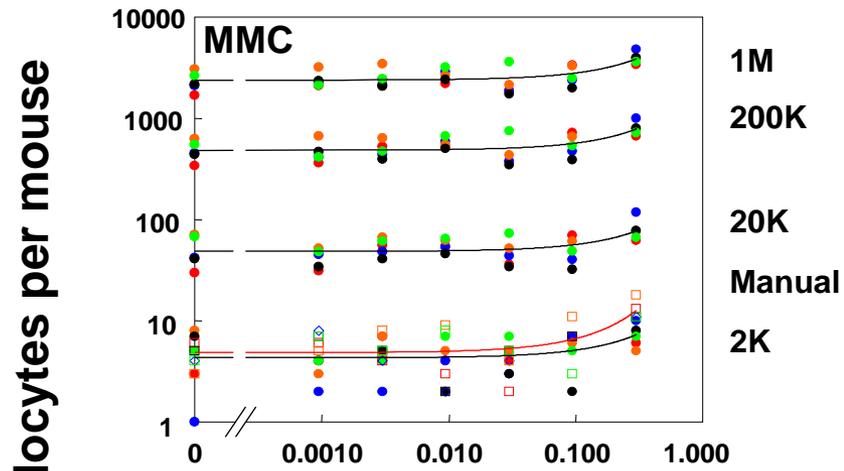
ある一定の線量以下では、注目している生物反応が起こらないとき、その値を”しきい値”という。個体の致死では明らかにそのような値が存在する。．．．．．しかし、突然変異のように、生きている個体に確率的に発生する障害では、線量を下げてもその頻度が下がるだけで、同種の傷害が依然として起こる。．．．

近藤宗平著「分子放射線生物学」

**Mouse
MN
assay**

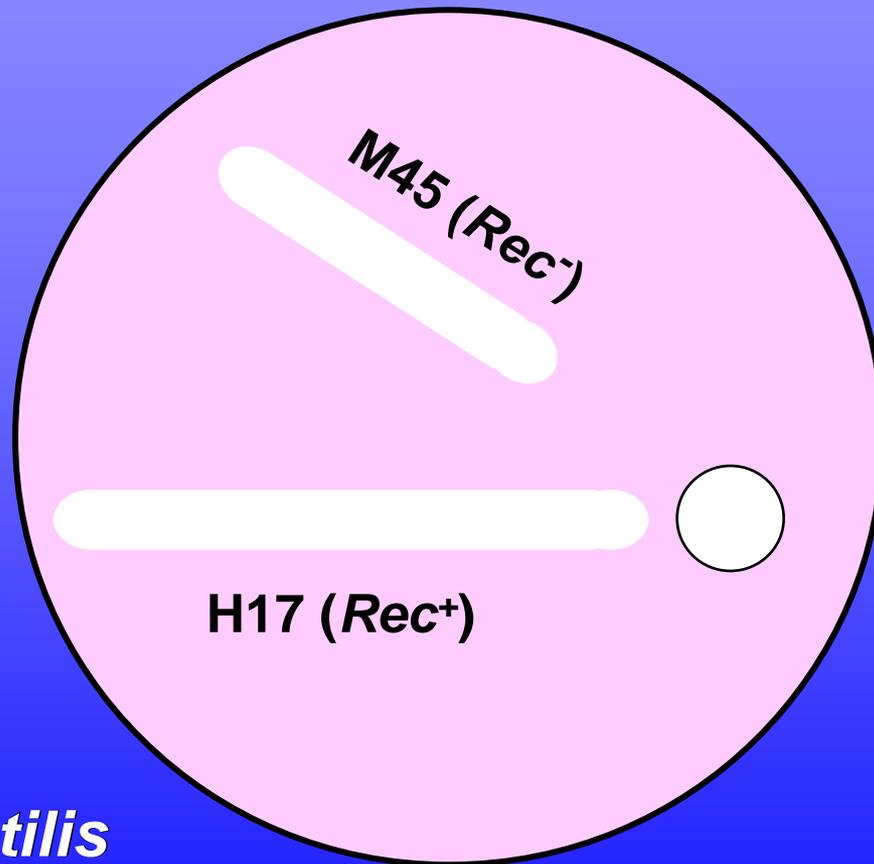


Mouse MN assay



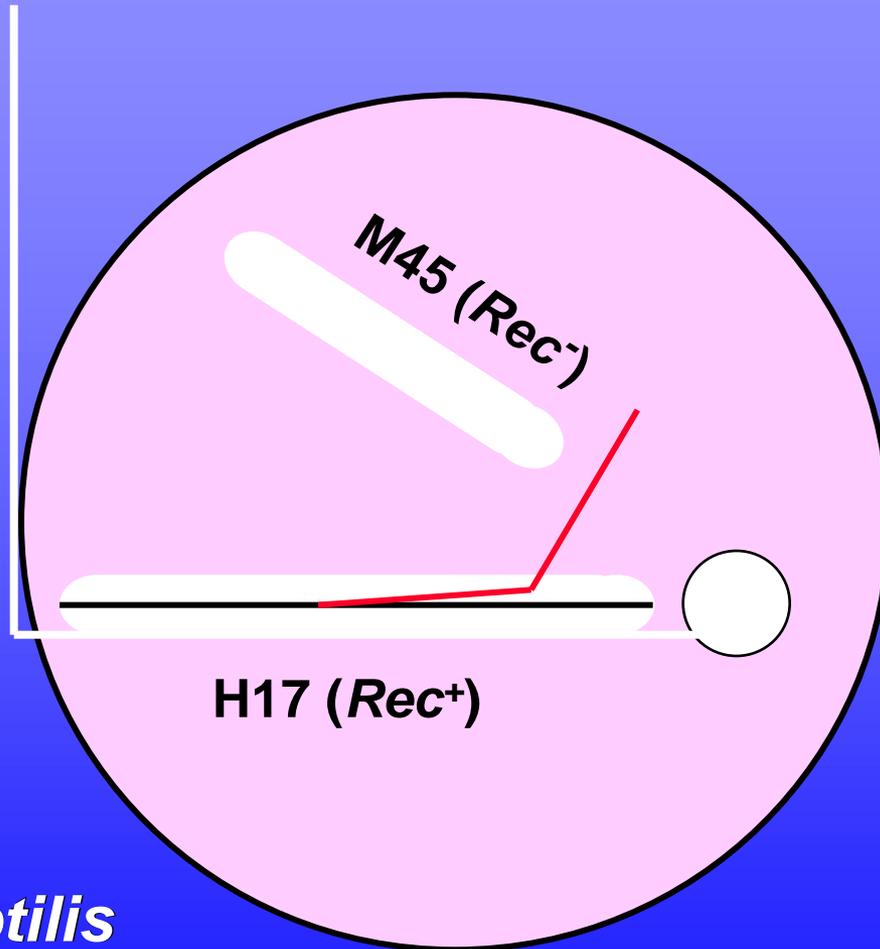
Asano et al., Mutagenesis (2006)

Rec assay



Bacillus subtilis

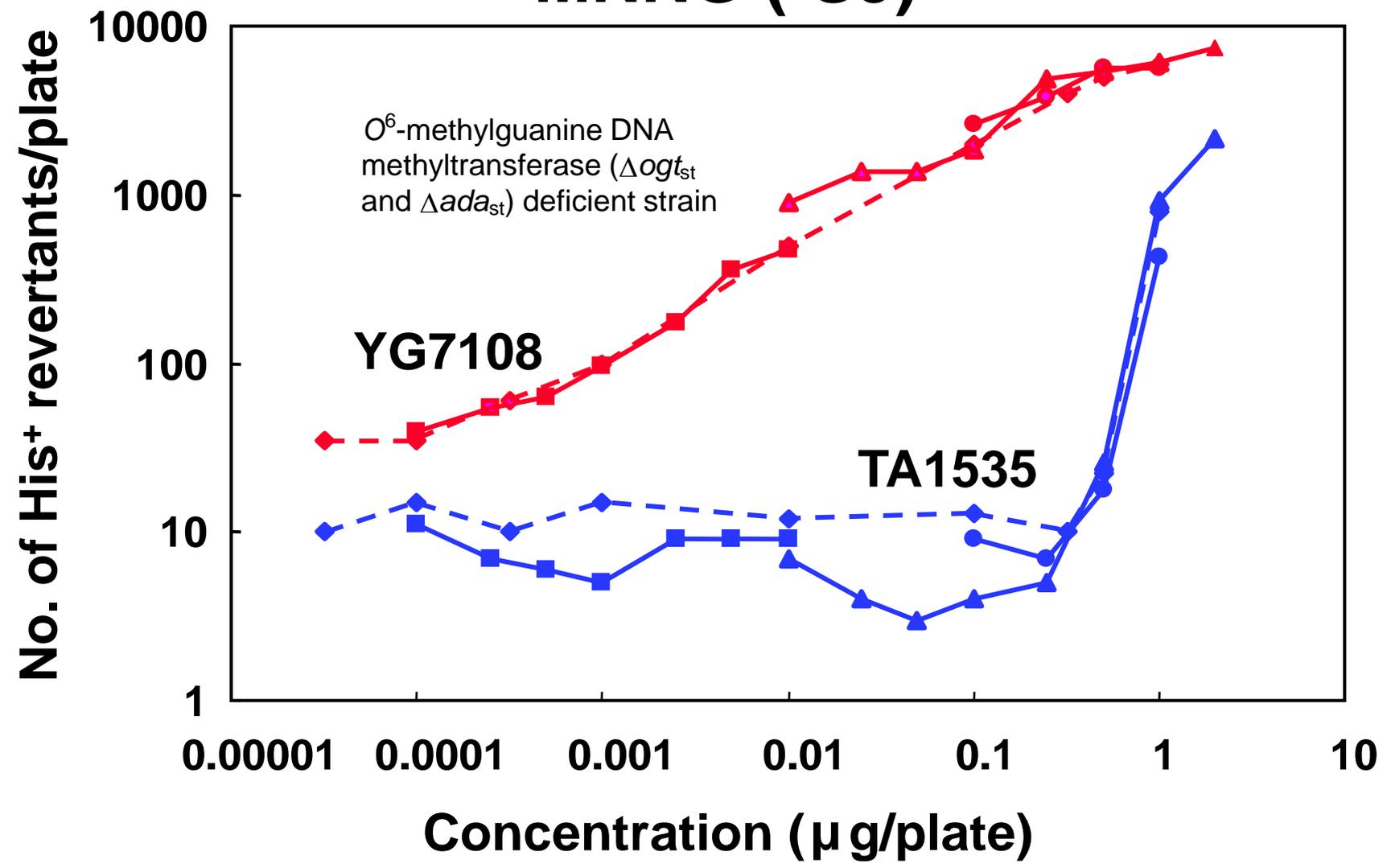
Rec assay



Bacillus subtilis

Ames assay

MNNG (-S9)

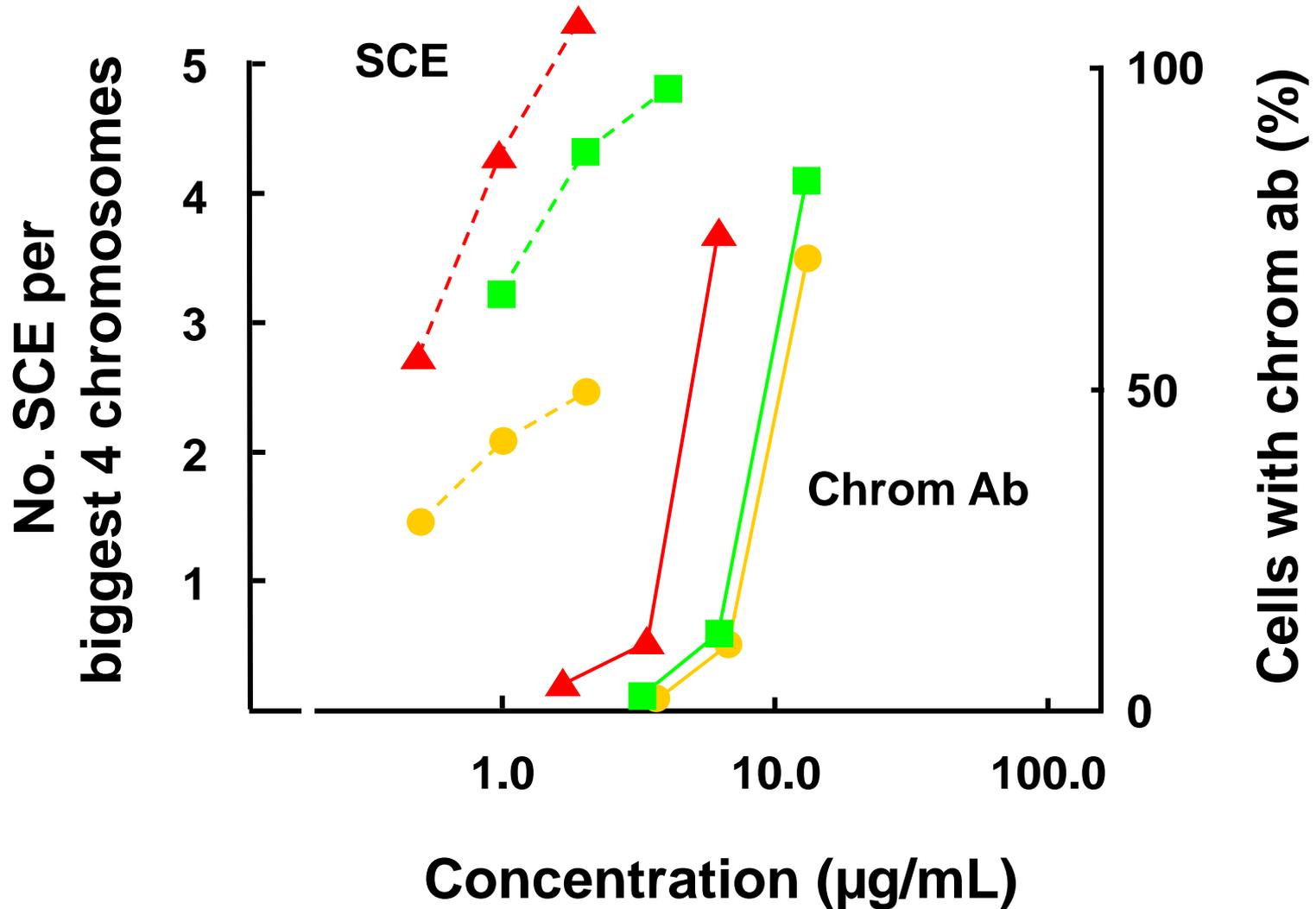


SCE & CA assay

NO-MTMC: Nitro-m-tolyl-methylcarbamate

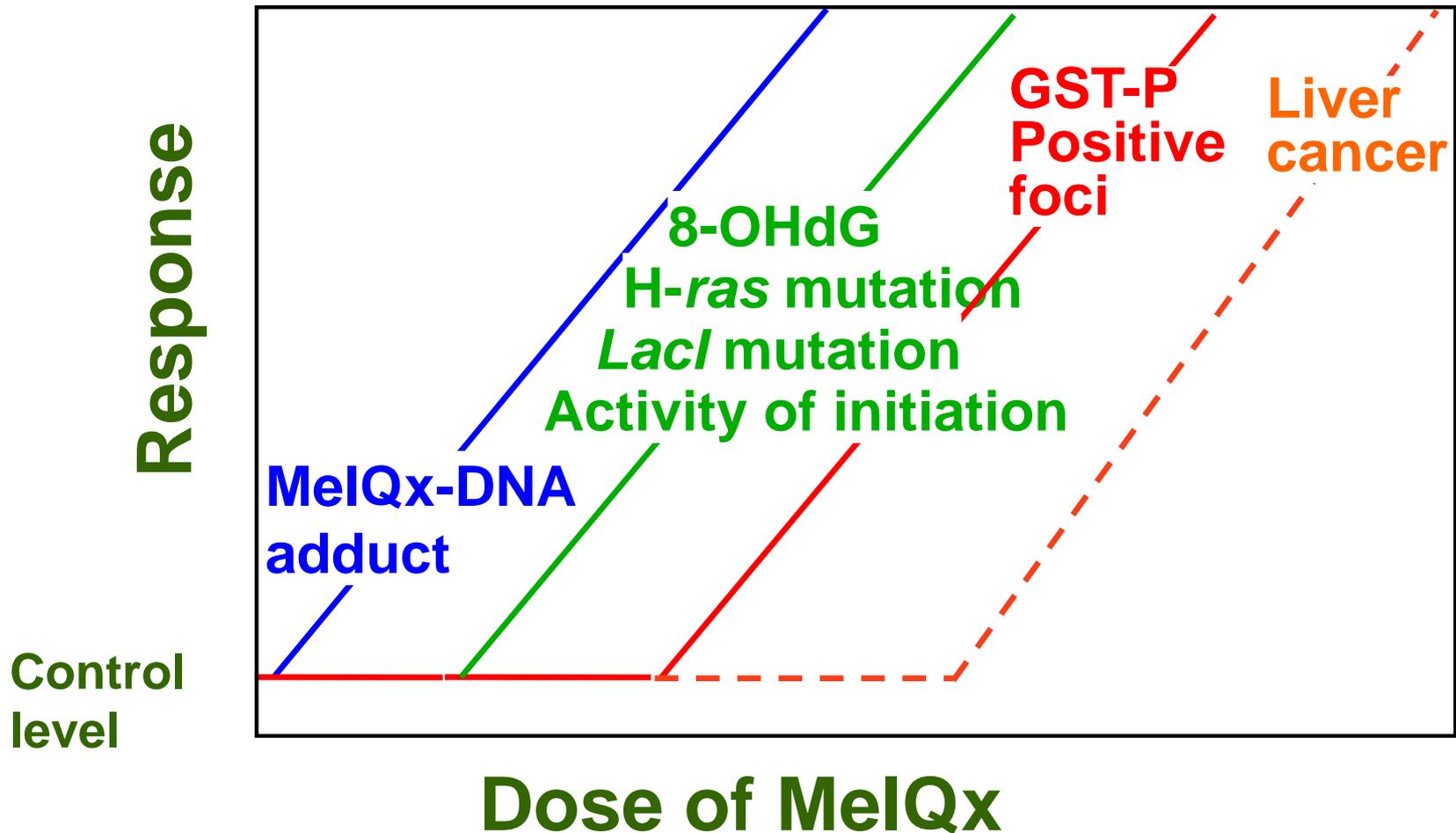
NO-MPMC: Nitro-3,4-xylyl-methylcarbamate

NO-Carbaryl: Nitro-1-naphtyl-N-methylcarbamate



Risk of liver cancer

Response of each carcinogenic marker at low dose level of MeIQx



By Dr. Fukushima

ICH S2(R1)

Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use

**Bacterial mutation assay
negative**

Option 1

Option 2

***In vitro* mammalian cell test**

No *in vitro* mammalian cell test

**Negative
(or Positive
but not
relevant based
on WoE)**

Positive and relevant

either

MNT
integrated in toxicology study
Acceptable only if top dose
is appropriate

2nd tissue
+ integrated if possible

MNT
integrated into
toxicology
study

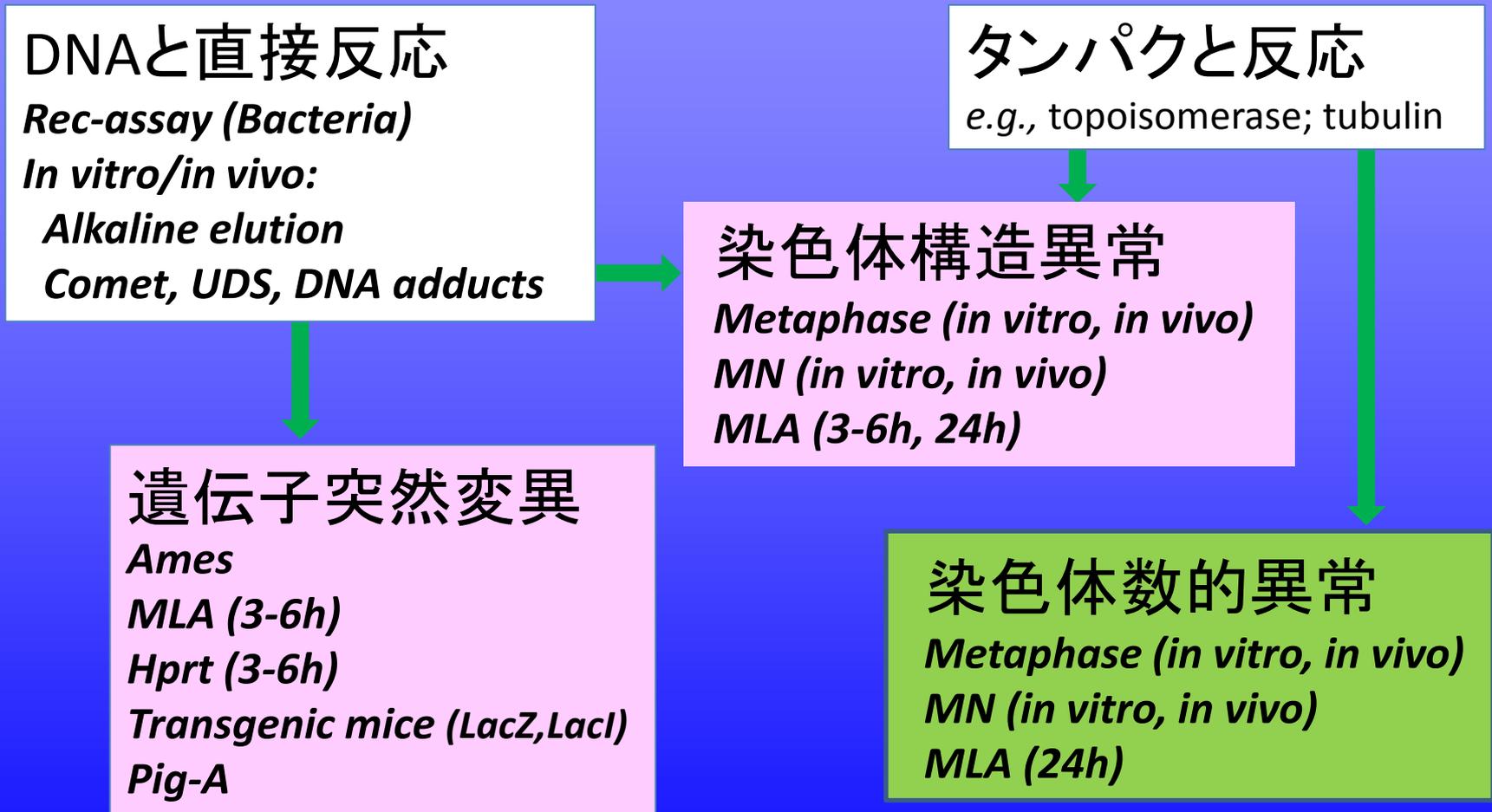
No 2nd *in vivo*

**If top dose is not acceptable
for genotoxicity evaluation**

or

**Acute genotoxicity
Assay (2 tissues if possible)**

遺伝毒性: 相互関係



遺伝毒性: 相互関係

閾値: ?

DNAと直接反応

Rec-assay (Bacteria)

In vitro/in vivo:

Alkaline elution

Comet, UDS, DNA adducts

遺伝子突然変異

Ames

MLA (3-6h)

Hprt (3-6h)

Transgenic mice (LacZ, LacI)

Pig-A

閾値: 有り

タンパクと反応

e.g., topoisomerase; tubulin

染色体構造異常

Metaphase (in vitro, in vivo)

MN (in vitro, in vivo)

MLA (3-6h, 24h)

染色体数的異常

Metaphase (in vitro, in vivo)

MN (in vitro, in vivo)

MLA (24h)

リスク

ハザード

暴露量 (Exposure)

バックグラウンド量

複合曝露の影響

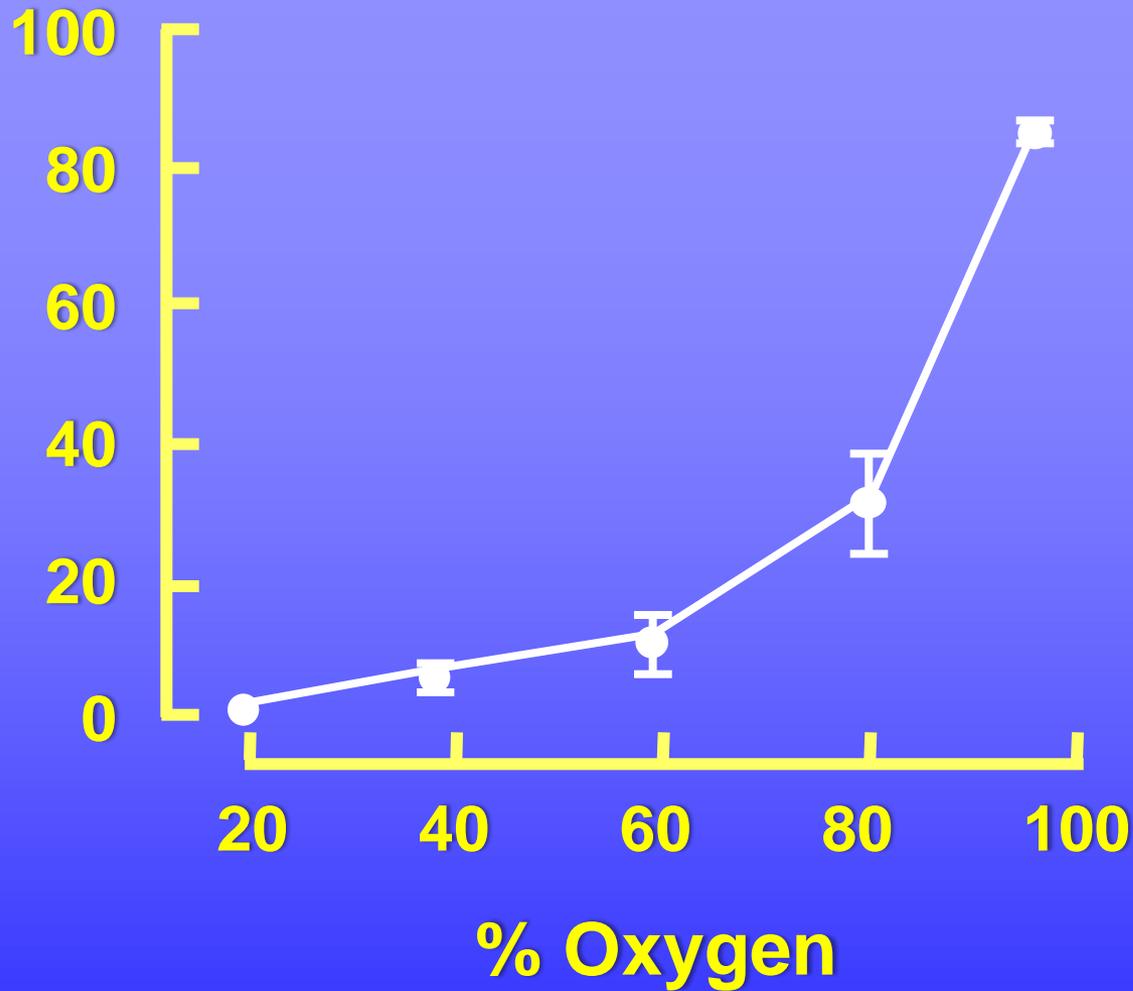
暴露の対象

物理化学性状

その他

これらが組み合わさった関数

染色体異常を有する細胞 (%)



J.E. Sturrock and J.F. Nunn (1978): Chromosomal damage and mutations after exposure of Chinese hamster cells to high concentrations of oxygen, *Mutat. Res.*, 57, 27-33.

リスク・ベネフィット

リスクの計算 → 定量的リスク
許容値を設定できるか
ベネフィットを上回るか

ベネフィット

ベネフィットの大きさを計算できるか
定量的ベネフィット

評価解釈に必要なもの

■ ガイドライン

評価に必要な試験の基本的な道筋
評価に必要な一定の基準を満たす質
再現性のあるデータ

■ GLP

試験条件の記録(結果の再構築)
再現性の高いデータ

■ 統計

客観性の高い評価

評価での問題点

■ ガイドライン

何が必要なデータかを考えなくなる
その被験物質に取っての最適データは保証されない
目的になっていないか

■ GLP

再現性の高いデータにするためのプロセス管理
目的になっていないか

■ 統計

内容と仮説を理解しているか(正しい手法?)

解釈での問題点

■ ガイドライン

必要最低限の基本的なデータ
その被験物質に取っての最良のデータか
目的になっていないか

■ GLP

解釈者に安心感を与える道具
目的になっていないか

■ 統計

統計の結果(*印)が一人歩きする
生物学的有意性に裏付けされているか

評価解釈での問題点

■ 安全サイドに立って考える

リスクベースで考えているか
ハザードで考えていないか
ベネフィットは考えているか
末端の使用者を考えているか
リスクトレードオフを考えているか
考えることの放棄／サイエンスの放棄

ものを怖がらなさ過ぎたり、
怖がりすぎるのはやさしいが、
正当に怖がることはなかなかむづかしい

寺田寅彦(近藤宗平)

**It is very easy to over- or under-
estimate of risk
but
very hard to make a rational
assessment of risk.**

*by Torahiko Terada
translated by Sohei Kondo*