

OECD 遺伝毒性試験ガイドラインの改訂

本間正充[#], 森田健

Revision of OECD genotoxicity test guidelines

Masamitsu Honma[#], Takeshi Morita

Four OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) genotoxicity testing guidelines (TGs) were first published in 1983. Thereafter, totally twenty genotoxicity TGs have been developed, which are major OECD guidelines concerning human health effects. During recent two decades, the role of the genotoxicity tests and their TGs have changed. Simultaneously, the knowledge of the mechanisms of genotoxicity as well as the experiences with the use of the tests have been accumulated. The interpretation of test results has evolved, as has the identification of the critical steps in the different tests. According to the significant economic changes, the number of newly developed chemicals to be tested has increased. The genotoxicity tests must be more efficient, faster and cheaper, whereas the performance (i.e. sensitivity and specificity) should be maintained at the same time. In addition, most regulatory authorities have increased their commitment to a reduction in the use of animals in toxicology testing. To globally update the genotoxicity TGs in this circumstance, the Genotoxicity Expert Workgroup undertook an extensive revision of the OECD genotoxicity TGs including a comprehensive harmonization of recommendations across the TGs. This review provides important issues should be considered for test conduct and data interpretation, and also an overview of the new recommendations in the revised guidelines.

Keywords: OECD guideline for the testing of chemicals, human health effect, genetic toxicology, animal welfare

1. はじめに

OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) 試験ガイドラインは、化学物質や、その混合物の物理化学的性質、生態系への影響、生物分解及び生物濃縮、ならびにヒト健康影響などに関する知見を得るための国際的に合意された試験方法であり、国を超えた試験機関でも同じように試験が実施できるようにデザインされている。その試験結果はMAD (Mutual Acceptance of Data: データの相互受理) が原則であり、これにより、他国にて規制目的で作成された試験データ

であれば、OECD加盟国にデータの受け入れを求めることができる。MADにより、不要な試験の重複が避けられ、貿易の円滑化を促進することができる。世界経済の発展に伴い、新規開発化学物質の数が大幅に増加している今日、OECD試験ガイドラインの役割はますます重要となっている。

欧州の「化学物質の登録・評価・認可・制限に関する規則 (REACH)」においては、既に商業化されているが、ヒトへの安全性が確認されていない数多くの化学物質について試験を実施するよう求められている。その結果、試験結果の信頼性を損なわない上で、迅速、且つ効率的な試験法が求められている。また、規制当局の多くは、毒性試験における動物利用を削減することを要求している。人道的な動物実験の基本原則 (Reduce [使用動物数の削減], Refine [苦痛の軽減], Replace [代替法の活用] の3R) に則り、実験動物個体を用いる *in vivo* 試験は、可能な限り少なくすることが推奨されている。動物利用の大幅な削減を推進するためには、新たな

[#] To whom correspondence should be addressed:
Masamitsu Honma; Division of Genetics and Mutagenesis, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-9872; Fax: +81-3-3700-2348; E-mail: honma@nihs.go.jp

in vitro, *in silico* 試験法の開発や改良, 3Rを目指した*in vivo* 試験の改良, 効率的な試験デザインの開発, 新たな試験結果の評価法の開発などが重要である。OECDにおいても, これら現状の問題に対応した新たな試験法の開発のためのプログラムや, 評価スキームを構築している。AOP (Adverse Outcome Pathway) をベースとした毒性に関する情報の構築と, この情報を基にした試験法の組み合わせ (IATA: Integrated Approaches to Testing and Assessment) は, その一つである¹⁾。

遺伝毒性に関与するOECD試験ガイドラインに関しては, 1983年に「細菌復帰突然変異試験 (TG471/472)」, 「哺乳類の*in vitro* 染色体異常試験 (TG473)」, 「哺乳類赤血球小核試験 (TG474)」が初めてガイドライン化されて以降, 今日までに20の試験ガイドラインが開発されてきた。ヒト健康影響に関するOECD試験ガイドラインは約80存在することから, 他の毒性エンドポイントと比較してその数は多い。遺伝毒性試験が多く存在する理由は, 試験に用いる生物種が, 細菌, 酵母, 昆虫, 哺乳類細胞, 動物個体と多岐にわたること, ゲノム研究や, 遺伝毒性に関与するDNA損傷や修復機構の研究の進歩により, それら研究成果に基づく新たな試験系の開発が常に報告されていることにある。最近では2011年に, 「トランスジェニックげっ歯類の体細胞および生殖細胞を用いた遺伝子突然変異試験 (TG488)」, 2014年に「*In vivo* 哺乳類アルカリコメットアッセイ (TG489)」が開発された。一方, 開発された試験法が汎用され, 経験が蓄積するとともに, その試験法の特徴, 長所, 短所も明らかになり, 問題点が露呈してきている。たとえば, 「哺乳類の*in vitro* 染色体異常試験 (TG473)」は発がん物質を陽性と判定する能力 (感度) は高いが, 非発がん物質を陰性と判定する能力 (特異性) は低く, 偽陽性を引き起こしやすい²⁾。そのため, この*in vitro* 試験陽性のフォローアップとして*in vivo* 試験がしばしば要求される。このことは先のOECDが目指す試験法のあり方と相反するものである。偽陽性の問題は, 他の*in vitro* 試験でも多く見られる。非生理的な条件下 (高濃度, 強い細胞毒性, 低pH等) は偽陽性を引き起こし易く, 試験条件の変更が必要である³⁾。また, 2000年代後半から遺伝毒性試験の役割も変化し, これまでのハザードの同定から, リスク評価への利用が求められてきた。このため, 試験結果の解釈も複雑化, 高度化している。

このような状況から, 2010年3月に開催されたOECD試験ガイドラインに関するナショナルコーディネーター会合 (WNT) において, 存在するすべてのOECD遺伝毒性試験ガイドラインを検証し, 各試験ガイドラインの廃止または改訂, もしくは新規試験ガイドラインを作成することが決定された。これを受け2011年よりOECD

加盟国の遺伝毒性専門家による作業部会が組織され, 上記の問題に取り組んだ。最終的には2013-2015年にほとんどの遺伝毒性試験ガイドラインが改訂された。本稿ではこれらOECD遺伝毒性試験ガイドラインの改訂の中で化学物質の規制目的として本邦で汎用されている以下の5つの試験を中心に, その改訂点について詳細を述べる。

- 哺乳類細胞を用いた*in vitro* 染色体異常試験 (TG473)⁴⁾
- 哺乳類赤血球小核試験 (TG474)⁵⁾
- 哺乳類骨髄染色体異常試験 (TG475)⁶⁾
- 哺乳類細胞を用いた*in vitro* 小核試験 (TG487)⁷⁾
- チミジンキナーゼ遺伝子を用いる哺乳類細胞の*in vitro* 遺伝子突然変異試験 (TG490)⁸⁾

尚, 本総説は日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) で議論された「遺伝毒性試験評価書のあり方」の資料を基に, JaCVAM運営委員会の勧めにより作成した。

2. OECD 遺伝毒性試験ガイドラインの状況

各種試験ガイドラインの現在の状況を表1に要約した。1997年の試験ガイドラインの改訂以降, 新たな試験ガイドラインとして2010年に「哺乳類細胞を用いた*in vitro* 小核試験 (TG487)」, 2011年に「トランスジェニックげっ歯類の体細胞および生殖細胞を用いた遺伝子突然変異試験 (TG488)」, 2014年に「*in vivo* 哺乳類アルカリコメットアッセイ (TG489)」, そして2015年に「TK遺伝子を用いた*in vitro* 遺伝子突然変異試験 (TG490)」が承認された。TG490が承認されたことにより, TG476は改訂され, 「*Hprt* 遺伝子および*xprt* 遺伝子を用いた*in vitro* 遺伝子突然変異試験」のみがその対象となった。

OECD加盟国の化学物質の規制に関連する試験としては稀にしか用いられないこと, また同様のエンドポイントを持ち, 簡便で良好な試験成績を示す新規試験が代替可能であることから, 削除することが決まった試験ガイドラインもある。削除された試験ガイドラインは, 「ショウジョウバエを用いる伴性劣性致死試験 (TG477)」, 「出芽酵母を用いる遺伝子突然変異試験 (TG480)」, 「出芽酵母を用いる体細胞組み換え試験 (TG481)」, 「DNA傷害および修復/哺乳動物細胞を用いる*in vitro* 不定期DNA合成試験 (TG482)」, 「マウススポットテスト (TG484)」, および「哺乳動物細胞を用いる*in vitro* 姉妹染色分体交換試験 (TG479)」である。これら試験に関しては精通する専門家が少なくなっているため, 現実的にはガイドラインの改訂が困難であった。削除された試験ガイドラインの試験は, 通常新規に実施する試験に用いられるべきではない。ただし, これらの削除され

表1 OECD 遺伝毒性試験ガイドラインの現状

No.	表題	採択年	改訂年	削除年
最近改訂された試験ガイドライン				
473	哺乳類の <i>in vitro</i> 染色体異常試験	1983	1997/2014	
474	哺乳類赤血球小核試験	1983	1997/2014	
475	哺乳類骨髓染色体異常試験	1984	1997/2014	
476	<i>Hprt</i> 遺伝子と <i>xprt</i> 遺伝子を用いる哺乳類細胞の <i>in vitro</i> 遺伝子突然変異試験	1984	1997/2015	
478	げっ歯類を用いる優性致死試験	1984	2015	
483	哺乳類の精原細胞を用いる染色体異常試験	1986	1997/2015	
最近追加された試験ガイドライン				
487	哺乳類細胞を用いた <i>in vitro</i> 小核試験	2010	2014	
488	トランスジェニックげっ歯類の体細胞および生殖細胞を用いた遺伝子突然変異試験	2011	2013	
489	<i>In vivo</i> 哺乳類アルカリコメットアッセイ	2014		
490	<i>TK</i> 遺伝子を用いた哺乳類細胞の <i>in vitro</i> 遺伝子突然変異試験	2015		
保管 (Archived)・削除された試験ガイドライン				
472	大腸菌復帰変異試験	1983		1997
477	ショウジョウバエを用いる伴性劣性致死試験	1984		2014
479	哺乳動物細胞を用いる <i>in vitro</i> 姉妹染色分体交換試験	1986		2014
480	出芽酵母を用いる遺伝子突然変異試験	1986		2014
481	出芽酵母を用いる体細胞組み換え試験	1986		2014
482	DNA 傷害及び修復／哺乳動物細胞を用いる <i>in vitro</i> 不定期 DNA 合成試験	1986		2014
484	マウススポットテスト	1986		2014
削除・更新が見送られたガイドライン				
471	細菌復帰突然変異試験	1983	1997	
485	マウス転座試験	1986		
486	哺乳類肝細胞を用いる <i>in vitro</i> 不定期 DNA 合成試験	1997		

た試験ガイドラインによって行われたこれまでの試験成績は、今でも規制上の判断に用いることが可能である。

さらに、最近では利用範囲が限定されているため、一部の規制当局から好まれなくなった試験として「マウス転座試験 (TG485)」、「*in vivo* 不定期 DNA 合成試験 (TG486)」がある。これらの試験はいずれも削除基準のほとんどを満たすものの、規制上の有用性が引き続き認められると考えられることから、当該試験ガイドラインにおいては削除も更新もなされないことが決まった。さらにこの一連の改訂では、「細菌復帰突然変異試験 (TG471)」については更新しないことも決まった。

現在の OECD 遺伝毒性試験ガイドラインの日本語翻訳版は、他のヒト健康影響に関するガイドラインも含めて国立医薬品食品衛生研究所のホームページ (<http://www.nihs.go.jp/hse/chem-info/oecdindex.html>) で入手することができる。

3. 遺伝毒性試験ガイドライン共通の変更点 (TG473, TG474, TG475, TG487, TG490)

「試験施設の習熟度」、「陰性対照の背景データベース」および「試験の許容基準」に関する項目が新たに追加され、「結果の評価および解釈」および「分析 (計数細胞数)」の項目が大きく変更された。

3.1. 試験施設の習熟度

OECD 遺伝毒性試験ガイドラインの改訂版には、試験施設の習熟度の実証に関する要件が含まれている。動物の使用が制約されている 3R を考慮すると、試験施設の習熟度の証明に関する推奨事項は、*in vitro* 試験、体細胞を用いた *in vivo* 試験、および生殖細胞を用いた *in vivo* 試験で異なる。陽性対照および陰性対照の両方の背景データベースを構築することによって既に十分な習熟度をもつ経験の豊富な試験施設には、推奨されている方

法は適用する必要がない。また、新しい試験ガイドラインでは、最初および経時的な習熟度証明の一環として、背景データベースの評価に品質管理図を利用することが推奨されている。

3.2. 陰性対照の背景データベース

作業部会では、陰性対照背景データの範囲を統一的な数値で管理することは適切では無いとしたが、試験施設は、陽性対照および陰性（無処理、溶媒）対照について、その背景データの範囲および分布を確立しておく必要があるとされた。最初に陰性対照の背景分布データを得る場合は、公表されている陰性対照データと同一試験内陰性対照のデータが一致している必要があり、陰性対照の分布に追加する同一試験内陰性対照は、理想的には、ポアソン分布に基づく95%管理限界内にあることが望ましい。陰性対照の背景データベースは、最低10回の試験によって、可能であれば少なくとも20試験によって構築する。試験施設は、管理図などの品質管理の方法を用いて、陽性・陰性の両対照データが「管理下にある」ことを示す必要があり、また、実験プロトコルに変更による既存の対照背景データベースのデータとの重大な不一致があった場合には、新たに対照の背景データベースを構築する。

なお、95%管理限界については、不必要に試験が適応できなくなることや、背景データベースの範囲が狭くなることを避けるため、ある程度の柔軟性が認められている。陰性対照背景データベースを構築する際は、既報の文献と矛盾しない限り、試験の結果を却下すべきではない。背景データベースの構築に当たり、*in vivo* 試験ガイドライン、特に生殖細胞を用いる試験については、必ずしも20試験の実施を適用しないこととした。陰性対照背景データベースの再確立にあたって、何を試験条件の重大な変化とみなすかという判定は、試験実施機関の判断に任せることとした。

3.3. 試験の許容基準

試験が許容できるかどうか、すなわち試験が成立し、データを評価することができるためには、以下の基準を満たす必要があるとした。

- 同一試験内陰性対照が、試験施設の陰性対照の背景データベースに追加してもよいと考えられるか、文献上の最頻値（試験によって異なる）と一致している。
- 同一試験内陽性対照が、試験施設の陽性対照の背景データベースで得られる反応に一致し、同一試験内陰性対照と比較して統計学的に有意に増加している。

- In vitro* 試験の場合、いずれか1つの実験条件で明らかな陽性結果が得られていない限り、実験条件すべてで（推奨する処理時間で、代謝活性化の存在下および非存在下において）試験を実施している。
- 処理した個体数・細胞数が適切であり、実験期間中を通じて生存していた、または計数した（各試験に応じる）。
- 適切な用量・濃度域が含まれた適切な用量・濃度で分析可能である。
- 最高用量・濃度の設定基準が、各試験ガイドラインの記載と一致している。

上記の基準とは別に、マウスリンフォーマ試験（MLA; TG490）の許容基準については、MLA 専門家がいくつかの陰性対照データのパラメータについて評価を行い、その結果に基づいて個別に定義している^{9,10}。

3.4. 結果の評価および解釈

試験許容基準がすべて満たされ、以下に該当する要件を全て満たした（*in vitro* 試験では、検討した実験条件のいずれかで以下の結果を示す）場合、被験物質は明確に陽性であると結論できる。

- 少なくとも1つの投与群（試験濃度）で、同一試験内陰性対照と比較して統計学的に有意な増加が認められる。
- 適切な傾向検定で、用量依存性の増加が認められる。
- 当該結果は陰性対照の背景データの分布範囲外である。

また、試験許容基準がすべて満たされ、以下に該当する（*in vitro* 試験では、検討したすべての実験条件で以下の結果を示す）場合、被験物質は明確に陰性であると結論できる。

- いずれの投与群（試験濃度）においても、同一試験内陰性対照と比較して統計学的に有意な増加が認められない。
- 適切な傾向検定で、濃度依存性の増加が認められない。
- すべての結果が陰性対照の背景データの分布範囲内である。
- 標的組織（骨髄）が被験物質に曝露されている（*in vivo* 試験の場合）

結果の評価における優先考慮事項は、これまでの生物学的妥当性から統計学的評価に変更され、陰性対照の背景データとの比較も必須となった。

3.5. 分析（計数細胞数）

改訂の前に作業部会では適切な計測細胞数の設定のためには、*in vivo* と *in vitro* 試験では試験デザインが異なる

ることを考慮したアプローチが必要であることを確認した。すなわち*in vivo*での動物間のデータの変動（たとえば1群5匹）に係わる要因は、*in vitro*試験の変動要因（たとえば2回の反復測定）とは異なる。*in vivo*、*in vitro*試験で共通の判定評価を保証するため、以下の2つの主な選択肢について計数細胞数を検討した。

- i. 陰性対照背景データに基づいて、80%の検出力で陰性対照の2倍の発現頻度を観察するために必要な計測細胞数を決定する。
- ii. 試験ガイドラインにおいて必要な細胞計測数を決定する。計数細胞数はあらゆる場合において同一とする。

しかしながら、第1の条件を満足させるためには、計数細胞の数が試験実施機関ごとに異なることが予想された。また、第2の条件は、背景値となる陰性データが細胞系や試験実施機関によってさまざまであることを考えると、両条件を満足させることは容易ではないと考えられた。たとえば、TG473の場合、背景値が4～5%とすると、これまで推奨されている細胞数200個としても、明らかな陽性／陰性と結論づけることは比較的簡単であるが、背景値が1～2%である場合（たとえば、ヒトリンパ球ではしばしば1.5%を下回る）、判定精度の向上のためには細胞400個を計数する必要がある。最終的に作業部会では、第2の条件を満たし、計数細胞数を最小化するとともに、(1) ゼロの数を減らし、(2) 80%の検出力で2倍の発現頻度を観察する条件の達成を目指す、という2つの目標を達成するために協議を継続した。

TG473 (*in vitro* 染色体異常試験) 原案における細胞400個を計数するという提案について、WNTから提起された主な問題点は、計数は自動化することができないため、試験実施者の負担が増加するというものであった。計測細胞数の増加は陽性の結論を下す上で必要ないという点では合意した。作業部会での最終提案は、細胞300個を計数するが、異常が多数認められた場合にはこの数を減らすことができた。その場合、結果については明らかに陽性との結論が下される。しかしながら、被験物質が明らかに陰性であると結論づけるためには、細胞300個を計数しなければならない。細胞300個で平均染色体異常発生率1%の場合に、カウントがゼロになる確率は、約5%と推定できる。従って、1つの濃度につき細胞200個というこれまでの試験ガイドラインと、細胞400個という改訂原案の妥協点として、1つの濃度につき細胞300個という数に決定した。

その他の試験ガイドラインについても同様に議論され、以下のように決定された。

- i. TG487 (*in vitro* 小核試験)：変更無し。すなわち、1つの濃度につき細胞2000個を計測する。

- ii. TG475 (*in vivo* 染色体異常試験)：*In vitro* 染色体異常試験と比較し「ゼロ」の頻度が低いことが予想されるため（また、動物5～6匹を解析対象とするため、また、データを併合できるため）、細胞200個を計数する（これまでは100個）。
- iii. TG474 (*in vivo* 小核試験)：細胞2000個（これまでの試験ガイドライン）と細胞5000個（改訂原案）の妥協点として、細胞4000個を計数することが提案された。この数は、原案と比較すると減少にあたるが、依然として必要なだけの感度が確保される十分な数である。*In vivo* 小核の計測は自動化される可能性があることから、将来的に、試験機関の余分な負担が軽減されるものと考えられる。

4. *In vitro* 遺伝毒性試験ガイドラインの変更点(TG473, TG487, TG490)

「ナノ材料への適用」、「使用細胞」、「培養系列」、「実験条件（処理条件）」および「沈殿を生ずる場合の最高用量」「試験デザイン」の記述が変更／追記され、また、特に「最高試験濃度」および「細胞毒性の評価」の項目が大きく変更された。

4.1. ナノ材料への適用

本試験ガイドラインがナノ材料について適用される場合もあるかもしれないが、当該試験ガイドラインは、ナノ材料への適用については言及しないとした。

4.2. 使用細胞

従来からのチャイニーズハムスター由来細胞を含め種々の細胞株が使用可能であるが、選択基準として、p53遺伝子の状態、遺伝的（核型）安定性、DNA修復能および由来（げっ歯類、ヒト）を考慮する必要性が指摘された。これに伴い、ヒトリンパ球細胞株TK6が新たに標準細胞として推奨された。

4.3. 培養系列

従来は、2系列の培養間での変動が最小であれば1系列培養が認められたが、今回の改訂では、計数細胞の合計数が同じであるという条件で、1系列培養も複数系列培養もいずれも使用できる。

4.4. 実験条件（処理条件）

結果を厳密に陰性と判定するのに必要となる実験条件（処理条件）が明記された。例えば、*in vitro* 染色体異常試験では、代謝活性化の存在下および非存在下での短時間処理、ならびに代謝活性化の非存在下での長時間処理による3つの実験条件（細胞の処理・回収時期を含む）

表2 *In vitro* 遺伝毒性試験の最高濃度に関するオプション

OP	オプション名	最高濃度案	説明
1	OECD	10mM, 5mg/mL のいずれか低い方	現行
2	ICH	1mM 0.5mg/mL のいずれか低い方	ICH S2(R1) 遺伝毒性試験で医薬品に適用
3	DK	1mM, 0.5mg/mL のいずれか高い方	NTP データベースを再調査した結果、この濃度を最高用量としても偽陰性をもたらす可能性は低い
4	BG	10mM, 1mg/mL のいずれか低い方	<i>In vivo</i> 毒性試験の最高用量 1000mg/kg からの外挿、ただし、低分子化合物については更に高い用量が必要とする
5	BG-GD	10mM, 2mg/mL のいずれか低い方	<i>In vivo</i> 短期毒性試験の最高用量 2000mg/kg からの外挿、ただし、低分子化合物については更に高い用量が必要とする
6	VT-EL	4mM (分子量の未知の場合), 2mg/mL (分子量既知の場合)	既存データベースを再調査した結果、モルベースで 2.5 倍の低減下でも十分な安全マージンが保証できる
7	A-VT-EL	4mM, 2mg/mL のいずれか低い方	上記の案に高分子化合物での高濃度を避けるため 2mg/mL の上限を追加した

である。

4.5. 沈殿が生じる場合の最高用量

沈殿が生じる場合は、それによる人為的影響を避けるため、目視による沈殿が生じる最低用量（1用量）を最高用量とする。従来は、細胞毒性がみられればそちらを優先させ、また、沈殿用量は2用量以上必要であった。

4.6. 試験デザイン

改訂 *in vitro* 試験ガイドラインでは、許容基準（細胞毒性が適切であること、細胞数、背景頻度が妥当であることなど）に見合った対照群の設定と最小試験群数に関する推奨事項が更新された。また最小濃度群数を超えて実施することが望ましいと考えられる状況を明確化した指針も追加された。評価可能な試験濃度として、細胞遺伝学的試験で少なくとも3濃度、*in vitro* 遺伝子突然変異試験で4濃度が引き続き推奨されている。全試験で最低限必要な被験物質濃度に加え、溶媒対照および陽性対照培養を実施する。

推奨事項としては、2系列培養の利用が望ましいものの、試験する各濃度において複数系列または1系列の培養のいずれの使用でもよい。細胞遺伝学的試験については、各濃度において計測を行う総細胞数は、十分な統計的検出力がある数とすることが最も重要である。したがって、所定の濃度において複数系列で培養した細胞から得られた結果については、それぞれ分けて報告すべきであるが、データ解析の際にはプールデータとして扱わなければならない。細胞毒性をほとんどまたはまったく示さない被験物質については、通常、公比約2～3で設定した濃度段階の使用が適している。細胞毒性がある場合は、個別の試験において推奨されている、最大レベルの細胞毒性を示す、細胞毒性範囲をカバーする試験濃度

を選ぶ必要があり、その中には中等度の細胞毒性を示す濃度、および細胞毒性をほとんどまたは全く示さない濃度を含まれなければならない。被験物質によっては急勾配の濃度反応曲線を示すものがある。したがって、細胞毒性の全範囲をカバーし、濃度反応について詳細な検討を行うためには、より密な濃度間隔の設定や、3用量段階の濃度の設定が必要である。

4.7. 最高試験濃度

In vitro 遺伝毒性試験において、偽陽性が多く出現する理由として、従来の最高試験濃度（10mM, 5mg/mL または5μL/mL のいずれか低い方）が高いことが報告されている^{11,12}。同様の問題はICH（日米EU医薬品規制調和国際会議）でも議論されており、2011年に改訂された遺伝毒性試験ガイドライン（ICH-S2(R1)）では、最高濃度が従来の10分の1に低減化された（1mM, 0.5mg/mL または0.5μL/mL のいずれか低い方）¹³。従って、医薬品に関してはこの最高濃度が適用される。OECD作業部会においてもICHの決定にない、他の化学物質に関しても1/10に引き下げる案が検討されたが、1) 医薬品と異なり、一般化学物質は比較的分子量が低い化合物が多く、分子量を平均500と想定したICHのガイドラインは適用が困難であること、2) 最高濃度の低減により偽陰性が増えることが懸念されること、3) 医薬品では組み合わせ試験によりこの偽陰性を排除できるが、OECD試験ガイドラインは単独の試験での評価が基本であるため、偽陰性のフォローアップが困難であること、からICH案は否決された。その後、多くの案が示された（表2）。最終的にはオプション5の「BG-GD案」が採用された。これは、モルベースの最高濃度（10mM）は堅持するが、mg/mLベースでは、*in vivo* の短期毒性試験の最高用量が2000mg/kgを*in vitro*に外挿すると（動物の体が液体

のバッグであると仮定する), 2mg/mLと計算できることに基づく。この値は一般化学物質の平均分子量を200とした場合, 10mMは2mg/mLに相当することからも正当化される。

従って, OECD試験ガイドラインでは, 沈殿も細胞毒性も認められない場合, 最高試験濃度は10mM, 2mg/mLまたは2μL/mLのうち最も低い濃度とされ, 従来の「10mM, 5mg/mLまたは5μL/mL」に比べ重量濃度が4割に低減された。組成が不明な被験物質や複雑な反応生成物などは, 各成分の濃度を高めるために5mg/mLにする必要がある。これらの要件は, 医薬品では異なるので, 今後, 多くの問題が引き起こされることが予想される。

4.8. 細胞毒性の評価1 (TG473, TG487)

染色体異常試験, 小核試験の細胞毒性の指標として, 従来の生細胞数や単層細胞密度に代わり, 細胞株については相対的細胞数増加 (RICC; Relative Increase of Cell Counts) または相対的細胞集団倍加 (RPD; Relative Population Doubling) が, 初代培養リンパ球については分裂指数 (MI; Mitotic Index) を用いる¹⁴⁾。また, 細胞毒性に基づく場合の最高濃度は, $55 \pm 5\%$ の細胞毒性をもたらすように (すなわち, 細胞株についてはRICCおよびRPDが, 初代培養リンパ球についてはMIが, 同一試験内陰性対照の $45 \pm 5\%$ にまで低下するように) 設定することが求められ, 従来の「50%以上の有意な減少」よりも細かく規定された¹⁵⁾。

4.9. 細胞毒性の評価2 (TG490)

MLAの場合: 細胞毒性は, 従来どおり相対総増殖率 (RTG; Relative Total Growth) で評価する。この測定は, 細胞処理中の相対浮遊細胞増殖率 (RSG; Relative Suspension Growth), 発現期間, および変異体選択時の相対コロニー形成率 (RCE; Relative Cloning Efficiency)を含む。RSGには処理中の試験培養に生ずる, いかなる細胞消失も含むことに注意する^{9,10)}。

TK6試験の場合: 細胞毒性は, 相対生存率 (RS; Relative Survival) で評価する。すなわち, 細胞数に基づいて処理期間中の細胞消失を補正した処理直後のコロニー形成率を, 同様に補正した陰性対照のそれ (生存率を100%とする) と比較する。

細胞毒性に基づく場合の最高濃度は, MLAの場合はRTGが20 ~ 10%, TK6試験の場合はRSが20 ~ 10%になるように設定する¹⁶⁾。

5. *In vivo* 試験ガイドラインの変更点 (TG474, TG475)

「動物の週齢」, 「投与経路と投与量」, 「最大耐量 (MTD;

Maximum Tolerant Dose)」, 「用量段階」, 「限度試験」および「性差の確認」について変更が認められた。また, 「症状観察」, 「標的組織の曝露」, 「反復投与毒性試験への組み込み」が新たに追加された。

5.1. 動物の週齢

従来は, 「若齢成熟動物」としていたが, 「投与開始時に6 ~ 10週齢が望ましい」ことが追記された。

5.2. 投与経路と投与量

通常は, ヒトの予想曝露経路を用いることとするが, 妥当性が示されるならば, その他の曝露経路 (飲水, 皮下, 静脈内, 局所, 吸入, 気管内, 混餌, 埋植投与など) を選択することも可能である。腹腔内投与は, ヒトの曝露経路に生理的に関連しているとは言えないため, 改訂された試験ガイドラインでは推奨されない経路として具体的に提示されていることに留意しなければならない。強制経口投与, または注射により1回に投与できる最大液量は供試動物の大きさによって異なる。体重100gあたり2mLを超えてはならない。稀に, これより大きい用量の使用が可能な場合もあるが, 正当な理由が必要である。通常, 高濃度ほど影響が顕著になる刺激性または腐食性物質の場合を除き, 被験物質溶液の濃度を調節して量のばらつきを最小限にし, 全用量で投与容量が一定になるようにする。

5.3. 最大耐量 (MTD)

最大耐量の定義が, 従来の「最高用量は毒性の徴候を呈す用量で, 同じ投与計画で更に高用量の投与を続けられれば致死を引き起こすと予想される用量」から, 「試験の実施を制限する毒性を示すことなく忍容性が認められる (例: 体重減少や造血系の細胞毒性は認められるが, 死亡や安楽死を必要とする疼痛, 苦痛, 疲弊は認められない) 最高用量」に変更され, より動物福祉に配慮したものとなった。

5.4. 用量段階

通常公比2 (ただし4を超えない) による最低3用量段階を用い, それにより最大量 (あるいはMTD) から毒性をほとんどあるいは全く生じない用量までの範囲を含めるのが望ましいとされた。以前の試験ガイドラインには公比の記載はなかった。

5.5. 限度試験

1) 明確な毒性作用が認められず (骨髄毒性や標的組織の細胞毒性を含む), 2) 他の知見に基づき遺伝毒性が予測されず, 3) 被験物質の標的組織 (骨髄) への到達

が証明されていれば、3用量段階を用いた完全な試験は必要なく、限界用量のみの単一用量で十分であるとした。なお、限界用量は、14日間以上の投与の場合1000mg/kg体重/日、14日間未満の場合2000mg/kg体重/日である。従来の試験ガイドラインに3)項の条件が追記された。

5.6. 性差の確認

多くの化学物質において小核試験では、性差は認められないことが示されているが、米国国家毒性プログラム（NTP）試験による最近の報告では異なる結果が示された。これらの試験では、小核試験と28日間反復投与試験を併用しており、よって、雌雄両方についてデータが得られている。

作業部会では少なくとも一方の性別で結果が陽性であった47種の化学物質を解析し、以下の結果が示された。

- i. 化学物質の70%は雌雄いずれにおいても陽性であり、雄のみまたは雌のみにおいて陽性であった化学物質の数は同数であった。したがって、いずれか一方の性別で試験を行った場合、試験の感度は約15%低下する。
- ii. 雌雄の両性が陽性反応を示した場合の反応の強さは、雌に比べて雄の方が若干強かった。
- iii. 急性および亜慢性毒性データの検討は、小核の誘発における性差を予測するうえで有用ではなかった。したがって、ある化学物質についてより感受性の高い性別を選択するためにこれらのデータを使用することは不可能である。曝露データについては利用不可能であるとされた。

これらの結果を基に、一部の専門家から、*in vivo*小核試験については、標準的には雌雄の両性の試験を行うべきであり、また、一方の性別のみを用いて試験を実行しようとする場合には、一方の性別のみが妥当であることを証明する必要があると主張された。しかしながら、多くの専門家は本問題についてはすでに議論済みであり、性特異的な作用が認められない場合には、現行通り片性で1群5匹を用いて試験すること問題無いことが示された¹⁷⁾。従って、動物数および性についての変更はなく、「1群当たり雌雄いずれかの分析可能な動物を5匹以上、あるいは雌雄両性を用いる場合は、雌雄それぞれが5匹以上」とされた。雌雄をともに用いる場合には、要因設計を用いたデータ分析が推奨され、その方法が補遺に示された。

5.7. 症状観察

投与後の動物の症状観察の実施、さらに、長期投与の場合は、体重、摂餌量（飲水量）の記録が求められた。

5.8. 標的組織の曝露

In vivo 遺伝毒性試験において比較的複雑な問題のひとつは、特に限界用量で毒性を示さない物質で、陰性結果が得られた場合において、標的組織が十分な曝露を受けていたことについての判断である。これに関する情報は、組織に対する曝露量が十分であったか（すなわちバイオアベイラビリティ）を示すデータが重要である。曝露に関するデータがない場合には、骨髓が被験物質に曝露されていることを確認する目的で、被験物質の血漿中濃度を測定することが求められる。

5.9. 反復投与毒性試験への組み込み

項目立てでの記載ではないが、反復投与毒性試験に組み入れる場合の考慮点等が追記された。特に作業部会では、動物福祉の観点から小核試験と28日間反復投与毒性試験の併用の推奨に合意した。ただし、これはさらに多数の項目についての調査が必要である。

6. 各試験ガイドラインの変更点

各試験ガイドラインにおける特有の変更点を以下に示す。

6.1. 哺乳類細胞を用いた*In vitro* 染色体異常試験（TG473）

- 気体/揮発性物質の処理：TG487と同様に、「密封容器内で処理するなど、標準的なプロトコルに適切な修正を加えて試験を実施する」ことが追記された。
- 陽性対照：推奨物質としてメタンスルホン酸エチルとエチルニトロソ尿素が削除され、一方、シトシンアラビノシドが新たに追加された。
- 観察細胞数：染色体異常の出現頻度算出には、1用量あたり200個から300個へ変更された。ただし、明らかに陽性の場合はこれより少ない数でもよい。

6.2. 哺乳類赤血球小核試験（TG474）

- 小核の自動計数装置による評価：フローサイトメーター、画像解析装置およびレーザーキャニングサイトメーターなど自動計数装置による評価が推奨され、目視計数と比べて、試験施設間および試験施設内の再現性および感度が改善されることが示されているとしている。
- 小核形成の由来：通常、試験の一部として実施されることはないものの、小核形成の由来が染色体断片なのかあるいは染色体全体なのかを識別する方法についての記載が追加された。
- 使用動物種：従来は、末梢血を用いる場合、マウスが推奨されていたが、改訂版ではマウス、ラットと

もに推奨された。

- 投与回数：単回投与，2回投与に加え，新たに3回以上の投与プロトコールが追加された。この場合，投与は約24時間間隔とし，骨髓の場合は最終投与後24時間以内，末梢血の場合は40時間以内にサンプリングする。このオプションは，コメット試験との組合せや反復毒性試験への組入れを考慮して追加された。
- 観察細胞数：幼若赤血球の比率算出のためには，個体あたり骨髓では200細胞から500細胞に，末梢血では1000細胞から2000細胞に増加された。また，小核出現頻度算出には，個体あたり2000個から4000個に増加された。また，試験施設の小核の背景出現頻度が0.1%以下の場合には，計数細胞の増加を考慮することとされた。
- 症状観察：偽陽性を避けるため，必要に応じ，動物体温のモニターを考慮することが記載された。

6.3. 哺乳類骨髓染色体異常試験 (TG475)

- 動物種：通常使用される動物としてラットとマウスが推奨され，チャイニーズハムスターが削除された。
- 陽性対照：新たな陽性対照として，メタンスルホン酸メチルが追加された。
- 観察細胞数：染色体構造異常の出現頻度算出には，個体あたり200個以上の分裂中期細胞を分析することとして，従来の100細胞から増やされた。なお，細胞毒性の指標としての分裂指数は，一個体あたり1000個から求め，変更されていない。

6.4. 哺乳類細胞を用いた*In vitro*小核試験 (TG487)

- 陽性対照：推奨される陽性対照物質の表が追加され，代謝活性化不要の染色体異常誘発物質としてメタンスルホン酸メチル，マイトマイシンC，4-ニトロキノリン-N-オキシドおよびシトシンアラビノシドが，代謝活性化を必要とする染色体異常誘発物質としてベンゾ(a)ピレンおよびシクロフォスファミドが，異数性誘発物質としてコルヒチンおよびビンブラスチンが挙げられた。
- 代謝活性化：代謝活性化酵素を発現する遺伝子改変細胞の使用に関する記述が削除された。
- 処理時間延長の必要性：被験物質が細胞周期に影響を及ぼす場合（特にp53正常細胞），試料採取時間／回復時間を正常細胞周期の1.5～2.0倍の時間（すなわち，処理開始から正常細胞周期の3.0～4.0倍の時間）まで延長することを考慮する。

6.5. チミジンキナーゼ遺伝子を用いる哺乳類細胞の*In vitro* 遺伝子突然変異試験 (TG490)

新たに策定されたこのTG490には，チミジンキナーゼ (TK) レポーター遺伝子座に遺伝子変異を生ずる物質を特定するための特異的な試験法が2つ取り上げられている。L5178Y細胞を用いるマウスリンフォーマ試験 (MLA) と，TK6細胞を用いるTK試験である。両細胞ともTK遺伝子がヘテロ (+/-) の細胞株である^{18,19)}。この2種類の細胞株では，TK+/-からTK-/-への突然変異によってチミジンキナーゼ酵素を欠損した細胞の検出が可能となる。TK遺伝子座を用いて検出される遺伝的事象には，遺伝子変異（点突然変異，フレームシフト突然変異，小さな欠失）および染色体事象（大きな欠失，染色体の再構成および有糸分裂組み換え）の両方が含まれる。染色体事象はヘテロ接合性の消失 (LOH) として発現する。LOHはヒトの腫瘍形成において一般的に認められる腫瘍抑制遺伝子の重要な遺伝子変異である。

TK変異体には，正常な増殖を示す変異体と緩やかな増殖を示す変異体がある。これらの変異体は，MLAでは「大きなコロニー」および「小さなコロニー」の変異体として，またTK6試験では，「早期に現れるコロニー」および「後期に現れるコロニー」の変異体として検出される。正常な増殖を示す変異体および緩やかな増殖を示す変異体は，それぞれ変異頻度を分けて計数しなければならない。正常な増殖および緩やかな増殖を示す各変異体の計数は，TK変異体が点突然変異，もしくは染色体突然変異，またはその両方によって生ずるか否かの指標となる。正常な増殖を示すコロニーからは，点突然変異およびその他の小規模な突然変異を誘発する化学物質が示唆されると考えられ（ただし，予測にすぎない），緩やかな増殖を示すコロニーからは染色体損傷を誘発する化学物質が予測される。

本試験では，被験物質で細胞を処理した後，新しく誘発された変異体が機能しているTK酵素を失うのに十分な発現時間を設ける。その後，変異頻度を測定するため，選択薬剤トリフルオロチミジン存在下および非存在下で細胞集団にコロニーを形成させ，それぞれ突然変異細胞の計数およびコロニー形成率の測定を行う。この突然変異体の選択には，シャーレに入ったコロニー形成用の軟寒天培地，または培養用のマイクロウェルプレートに入った液体培地を用いることができる。

7. まとめ

今回の改訂における変更の要点は，これまでに得られた科学的知見をもとに各試験による遺伝毒性物質の検出感度を上げること，哺乳類細胞試験における偽陽性を削減すること，ならびに動物福祉を向上させることにある。

検出感度の向上は、試験施設の習熟度の検証、対照の背景データベースの構築、試験の許容基準（成立条件）および試験結果の陽性／陰性の基準の明確化、適切な細胞毒性指標の選択、統計学的検出力に基づく最適な観察細胞数ならびに標的組織の曝露証明に基づいている。偽陽性の削減は、*in vitro* 哺乳類細胞試験の試験最高濃度の低減に基づいている。一方、動物福祉の向上は、最大耐量の定義の明確化、限度用量の設定ならびに他の試験との組込みに基づいている。検出感度関連事項は、いずれも適切な参考文献が示されており、妥当な変更といえる。

OECD 試験ガイドラインは、すべての化学物質を対象としたものであり、医薬品や農薬と異なり特別な試験ガイドラインを有しない一般工業化学物質の安全性試験では、適用することが求められている。また、医薬品など独自の規制要件を有する化学物質についても、当該品目独特の基準を除き、OECD 試験ガイドラインに準じて実施することが適当とされている。さらに、OECD 試験ガイドラインはすでに本邦において受け入れられており、今回の改訂は、最新の科学的知見に基づき試験を適切に実施・評価するための、また、動物福祉に配慮するためのものであり、その適用は必然である。従って、これら改訂試験ガイドラインの社会的受け入れ性は高いものと考えている。

引用文献

- 1) OECD, GUIDANCE DOCUMENT ON DEVELOPING AND ASSESSING ADVERSE OUTCOME PATHWAYS, Series on Testing and Assessment No. 184, ENV/JM/MONO(2013)6, 17 April, 2013.
- 2) Kirkland D, Aardema M, Henderson L, Müller L, Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutat Res.* 2005;584:1-256.
- 3) Scott D, Roberts SA, Extrapolation from *in vitro* tests to human risk: experience with sodium fluoride clastogenicity. *Mutat Res.* 1987;189:47-58.
- 4) OECD, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, *in vitro* mammalian chromosomal aberration test, TG 473, Adopted: 26 September 2014.
- 5) OECD, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Mammalian erythrocyte micronucleus test, TG 474, Adopted: 26 September 2014.
- 6) OECD, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Mammalian bone marrow chromosomal aberration test, TG 475, Adopted: 26 September 2014.
- 7) OECD, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, *in vitro* mammalian cell micronucleus test, TG 487, Adopted: 26 September 2014.
- 8) OECD, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, *in vitro* mammalian cell gene mutation tests using the thymidine kinase gene, TG 490, Adopted: 28 July 2015.
- 9) Moore MM, Honma M, Clements J, Awogi T, Bolcsfoldi G, Cole J, Gollapudi B, Harrington-Brock K, Mitchell A, Muster W, Myhr B, O'Donovan M, Ouldelhkim MC, San R, Shimada H, Stankowski LF Jr. Mouse lymphoma thymidine kinase locus gene mutation assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report. *Environ Mol Mutagen.* 2000;35:185-90.
- 10) Moore MM, Honma M, Clements J, Awogi T, Douglas GR, van Goethem F, Gollapudi B, Kimura A, Muster W, O'Donovan M, Schoeny R, Wakuri S, Suitable top concentration for tests with mammalian cells: mouse lymphoma assay workgroup. *Mutat Res.* 2011;723:84-6.
- 11) Morita T, Honma M, Morikawa K, Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. *Mutat Res.* 2012;741:32-56.
- 12) Morita T, Miyajima A, Hatano A, Honma M. Effects of lowering the proposed top-concentration limit in an *in vitro* chromosomal aberration test on assay sensitivity and on the reduction of the number of false positives. *Mutat Res.* 2014;769:34-49.
- 13) ICH Harmonized Tripartite Guideline, GUIDANCE ON GENOTOXICITY TESTING AND DATA INTERPRETATION FOR PHARMACEUTICALS INTENDED FOR HUMAN USE S2 (R1), Step 4 version, 9 November 2011.
- 14) Greenwood SK, Hill RB, Sun JT, Armstrong MJ, Johnson TE, Gara JP, Galloway SM, Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results. *Environ Mol Mutagen.* 2004;43:36-44.
- 15) Honma M, Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutat Res.* 2011;724:86-7.

-
- 16) Honma M, Hayashi M, Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environ Mol Mutagen*. 2011;52:373-84.
 - 17) Pfuhler S, Kirkland D, Kasper P, Hayashi M, Vanparys P, Carmichael P, Dertinger S, Eastmond D, Elhajouji A, Krul C, Rothfuss A, Schoening G, Smith A, Speit G, Thomas C, van Benthem J, Corvi R, Reduction of use of animals in regulatory genotoxicity testing: Identification and implementation opportunities-Report from an ECVAM workshop. *Mutat Res*. 2009;680:31-42.
 - 18) Moore MM, Doerr CL, Comparison of chromosome aberration frequency and small-colony TK-deficient mutant frequency in L5178Y/TK(+/-)-3.7.2C mouse lymphoma cells. *Mutagenesis*. 1990;5:609-14.
 - 19) Honma M, Generation of loss of heterozygosity and its dependency on p53 status in human lymphoblastoid cells. *Environ Mol Mutagen*. 2005;45:162-76.