

Ames試験のフォローアップと*in vivo*試験

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 増村健一

日本環境変異原学会 BMS研究会 第59回定例会 (2018.07.07)

1

代表的な遺伝毒性試験法

	In vitro試験	In vivo試験
突然変異誘発性	細菌を用いる復帰突然変異試験 培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験：マウスリンフォーマTK試験 (MLA), TK6試験	トランスジェニック動物遺伝子突然変異試験 <i>Pig-a</i> 遺伝子突然変異試験
染色体異常誘発性	ほ乳類細胞を用いる染色体異常試験 ほ乳類細胞を用いる小核試験	小核試験 染色体異常試験
DNA損傷性	コメット試験 姉妹染色分体交換試験 不定期DNA合成試験 umu試験	コメット試験 姉妹染色分体交換試験 不定期DNA合成試験
生殖細胞遺伝毒性		トランスジェニック動物遺伝子突然変異試験 (TGR試験) 精原細胞を用いる染色体異常試験 げっ歯類を用いる優性致死試験 マウスを用いる遺伝性転座試験

2

2

遺伝毒性試験バッテリー(試験法の組み合わせ)

3

ICH S2(R1): 医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンス
標準的組合せに関する2つのオプション

オプション1

Ames試験
In vitro染色体異常試験 or in vitro小核試験 or MLA

In vivo骨髄小核試験

オプション2

Ames試験

In vivo骨髄小核試験
In vivo肝臓コメット試験

4

遺伝毒性試験バッテリー(試験法の組み合わせ)

オプション1

	遺伝子突然変異 gene mutation	染色体異常 clastogenicity	DNA損傷性
<i>In vitro</i>	Ames試験 培養細胞を用いた突然変異試験(MLA)	培養細胞を用いた 染色体異常試験 小核試験	コメット試験 UDS試験 umu試験
<i>In vivo</i>	TGR突然変異試験* 内在性遺伝子 (<i>Hprt, Aprt, Dlb-1, Pig-a</i>)	小核試験(骨髄)	コメット試験 UDS試験

*トランスジェニック動物遺伝子突然変異試験

5

遺伝毒性試験バッテリー(試験法の組み合わせ)

オプション2

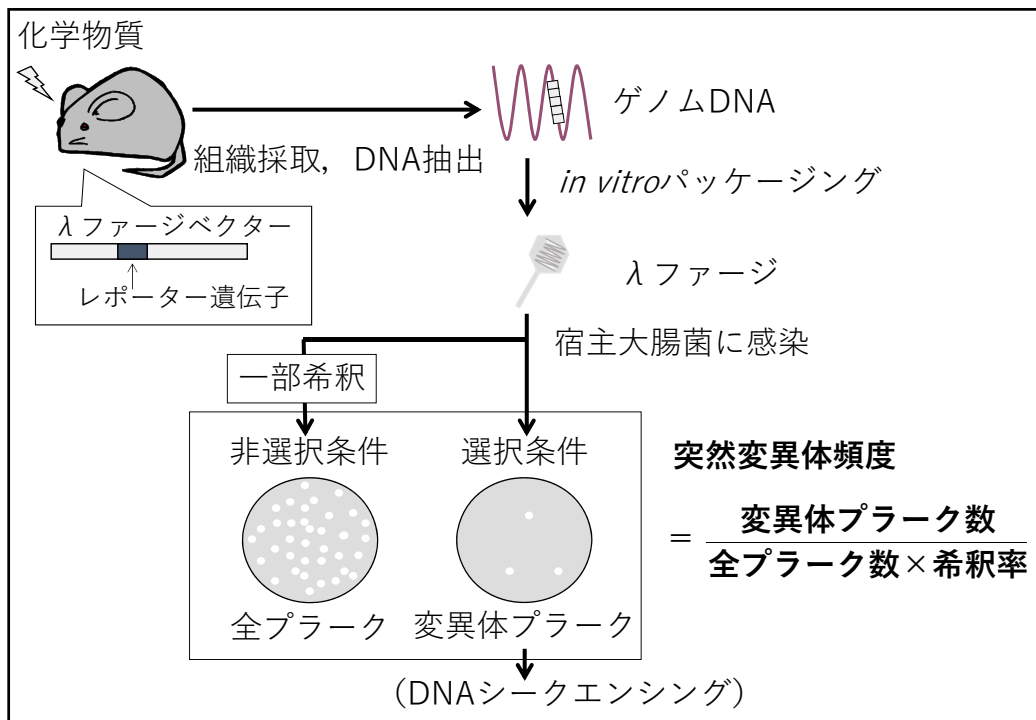
	遺伝子突然変異 gene mutation	染色体異常 clastogenicity	DNA損傷性
<i>In vitro</i>	Ames試験 培養細胞を用いた突然変異試験(MLA)	培養細胞を用いた 染色体異常試験 小核試験	コメット試験 UDS試験 umu試験
<i>In vivo</i>	TGR突然変異試験 内在性遺伝子 (<i>Hprt, Aprt, Dlb-1, Pig-a</i>)	小核試験(骨髄)	コメット試験 肝臓 UDS試験

6

TGR試験の特徴

- 😊 原理的には個体のあらゆる組織で測定できる。(一定の量・品質のゲノムDNAが必要。) 個体における曝露経路、発がん標的臓器、代謝や薬物動態等を考慮した評価が可能。
- 🟢 コストが高い。解析する臓器・組織の選択の妥当性が求められる(通常、肝臓と被験物質曝露組織を選択する)。発がん標的組織と異なる部位での結果の解釈が難しい。

7



8

化学物質等の発がん性とTGR試験結果の相関

(OECDのDRP (2009) に収録された2007年までのTGR試験関連学術文献データ、および2008年以降の厚生労働省委託試験等で行ったTGR試験データに基づく。)

Carcinogenicity v.s. TGR

		Tg positive	Tg negative
	146	99	47
carcinogen	123	91	34
non-carcinogen	23	8	15

Sensitivity 74.0%

Specificity 65.2%

Concordance 72.6%

(溶媒13物質を追加した場合は

specificity=77.8%、

concordance=74.8%)

Ames v.s. TGR (in carcinogen)

		Tg positive	Tg negative
	123	91	32
Ames positive	87	76	13
Ames negative	32	15	17
Ames n.d.	4	2	2

Concordance 76.4%

- ・ TGR試験と発がん性の一致率は72.6%。
- ・ 被験物質の選択バイアスが大きいと、傾向の一般性を評価するのは難しい。
- ・ 発がん標的とTGR解析臓器が異なる場合はsensitivityが低下する可能性がある。
- ・ 発がん標的でのTGR陰性結果はいわゆる非遺伝毒性メカニズムを示唆しうる。

9

In carcinogen, "Ames positive" and "TGR negative"

Chemical	Carcinogenicity targets	TGR	Targets performed in TGR
Hydrazine sulphate	liver, lung	-	Tg negative in bone marrow, liver, lung
Phenobarbital	liver	-	Tg negative in liver
3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX)	liver, lung	-	Tg negative in liver, lung
Methyl bromide	stomach	-	Tg negative in glandular stomach, liver
3-Amino-1-methyl-5Hpyrido(4,3-b)indole (Trp-P-2)	small intestine	-	Tg negative in caecum, colon, small intestine
Sodium nitrite	liver	-	Tg negative in liver, stomach
Malachite green	liver	-	Tg negative in liver
1,2:3,4-Diepoxybutane	nasal mucosa, lung, skin, Harderian gland	na (-)	Tg negative in bone marrow, ovarian granulosa
1,2-Dichloroethane	stomach, subcutaneous tissue, vascular system, mammary gland, lung, uterus	na (-)	Tg negative in liver, testes Tg negative in bone marrow, brain, lung, splenic lymphocytes, testicular germ cells
Acrylonitrile	ear/Zymbal's gland, nervous system, oral cavity, small intestine, mammary gland, nasal cavity	na (-)	Tg negative in heart, mammary gland
Genistein	uterus	na (-)	Tg negative in heart, mammary gland
Kojic acid	thyroid	na (-)	Tg negative in liver
Metronidazole	pituitary gland, testes, liver, mammary gland, lung, haematopoietic system	na (-)	Tg negative in stomach

10

In carcinogen, “Ames negative” and “TGR positive”			
Chemical	Carcinogenicity targets	TGR	Targets performed in TGR
[4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio]acetic acid (AKA Wyeth 14,643)	liver	+	Tg positive in liver
Benzene	lung, haematopoietic (bone marrow, lymphocytes and T-cells) tissues	+	Tg positive in bone marrow, lung, spleen, negative in liver
Oxazepam	liver	+	Tg positive in liver
Procarbazine HCl (Natulan)	lung, haematopoietic (bone marrow, lymphocytes and T-cells) tissues	+	Tg positive in bone marrow, kidney, lung, spleen, testes, negative in brain, liver
Uracil	bladder	+	Tg positive in bladder
Comfrey	liver	+	Tg positive in liver
Cyproterone acetate	liver	+	Tg positive in liver
Dicyclanil	liver	+	Tg positive in liver
Tamoxifen	liver	+	Tg positive in liver
Amosite asbestos	lung	+	Tg positive in lung
Crocidolite asbestos	lung	+	Tg positive in lung, omentum
Ferric nitrilotriacetate	kidney	+	Tg positive in kidney
Hexachlorobutadiene	kidney	+	Tg positive in kidney, negative in bone marrow, liver
Acrylamide	Lung, skin, testes, nervous system, peritoneal cavity, thyroid, clitoral gland, mammary gland, oral cavity, brain	+	Tg positive in bone marrow, lung, brain
CC-1065	lung	na (+)	Tg positive in liver

11

まとめ 1

Ames試験と組み合わせるin vivo試験として、

- ・ 小核試験（染色体異常）
- ・ コメット試験（DNA損傷）
- ・ TGR突然変異試験（遺伝子突然変異）

などがあり、異なる組織とエンドポイントを組み合わせることが有効。

Ames試験とTGR試験の遺伝毒性発がん物質検出力はともに高い。

In vivo試験の課題（標的組織の選択、曝露証明）

12

Ames試験のフォローアップ

13

ICH S2(R1):

5.2.1 細菌を用いる復帰突然変異試験で得られた陽性結果の評価

エームス試験で得られた陽性結果は、DNA との反応性があることを示しているため、適切なリスクベネフィット解析により担保されない限り、**in vivo** での**変異原性**又は**発がん性**を評価するための**広範囲の追加試験**が、患者に投与する際の予測される潜在的リスクを評価するために必要である。変異体ではない疑似的なコロニー増加の例が知られている。これらはアミノ酸の混入によって引き起こされる（ネズミチフス菌の試験系ではヒスチジン、大腸菌の試験系ではトリプトファン）。そのため、細菌を用いる復帰突然変異試験は分解しやすいペプチドの試験には適さない。また、例えば細菌のニトロ還元酵素による活性化のように、細菌の特異的な代謝が関与する陽性反応も存在し、ヒトでの遺伝毒性とは無関係の場合もある。

14

遺伝毒性試験バッテリー(試験法の組み合わせ)

	遺伝子突然変異 gene mutation	染色体異常 clastogenicity	DNA損傷性
<i>In vitro</i>	Ames試験陽性 培養細胞を用いた突然変異試験 (MLA)	培養細胞を用いた 染色体異常試験 小核試験	コメット試験 UDS試験 umu試験
<i>In vivo</i>	TGR突然変異試験 内在性遺伝子 (<i>Hprt</i> , <i>Aprt</i> , <i>Dlb-1</i> , <i>Pig-a</i>)	小核試験(骨髄)	コメット試験 肝臓 UDS試験

15



International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT) (7th IWGT)

Steering committee:

Hans-Jörg Martus (Switzerland, Chair), Masamitsu Honma (Japan, Co-Chair), David Kirkland (UK, Co-Chair), Roland Frötschl (Germany), Bhaskar Gollapudi (USA), Rita Schoeny (USA), Yoshifumi Uno (Japan)

National Cancer Center Research Institute (NCCRI)

Tokyo, Japan; November 8-10, 2017

In vivo strategy workgroup

Can we give more precise advice on appropriate in vivo testing to follow up an in vitro positive?

- What can we learn from the historical database of overlapping TGR & comet results?
- Can the comet assay be an alternative to the TGR, even for gene mutagens and mutagenic carcinogens?

16

Ames試験陽性のフォローアップと*in vivo*試験

Ames試験陽性

↓

DNA との反応性があることを示唆

↓

In vivoでの変異原性又は発がん性を評価するための広範囲の追加試験が必要

- ・ 発がん性の有無
- ・ 発がん標的組織における遺伝毒性（変異原性）の有無
- ・ 発がん機序の説明（遺伝毒性 or 非遺伝毒性メカニズム）

17

例 1

農薬評価書 キャプタン 食品安全委員会 2017.03

食品健康影響評価 より

“マウスでは十二指腸に腺腫及び腺癌が認められたが、トランスジェニックマウスを用いた遺伝子突然変異試験において陰性の結果が得られたことも含め、遺伝毒性試験の結果を総合的に勘案した結果、キャプタンは、*in vitro*では遺伝毒性を示すが、生体にとって問題となる遺伝毒性はないと考えられ、腫瘍の発生メカニズムは遺伝毒性によるものとは考え難く、評価に当たり閾値を設定することは可能であると考えられた。”

In vitro

復帰突然変異試験：陽性（±S9）

染色体異常試験：陽性

MLA：陽性

UDS 試験：陰性

In vivo

UDS 試験：陰性（肝臓）

染色体異常試験：陰性（骨髄）（1文献で陽性）

小核試験：陰性（骨髄）（1文献で陽性）

優性致死試験：陰性（1文献で陽性）

TGR突然変異試験：陰性（十二指腸、肝臓）

キャプタン又はチオホスゲンは、十二指腸陰窩細胞の基底部に存在する幹細胞に到達する前に、生体内のグルタチオン及びタンパク質のチオール基と反応して急速に代謝分解されると考えられている。血中における半減期も短く、これらが十二指腸の標的細胞においてDNA 傷害性を示すとは考え難い。キャプタンを高用量で投与した場合は、十二指腸に到達したキャプタン又は代謝物が、グルタチオン及び他のチオール基を枯渇させることにより小腸絨毛上皮細胞に損傷を与え、先端部分からの脱落及び絨毛の短縮を促進し、陰窩細胞の増殖及び幹細胞の過形成を増加させ、継続的な過形成がDNA 修復能を上回った結果、形質転換細胞の発現頻度が増大し、その中の自然発生性のDNA 損傷を有する細胞が、十二指腸の腺腫及び癌の発現頻度の増加を引き起こすと考えられている。食品安全委員会はこの考察を支持する。（農薬評価書より）

18

例 2

農薬評価書 ホルペット 食品安全委員会 2017.03
食品健康影響評価 より

“マウスを用いた発がん性試験において、十二指腸腺腫及び腺癌の発生頻度の増加が認められたが、遺伝毒性試験の結果を総合的に勘案した結果、ホルペットはin vitro では遺伝毒性を示すが、生体にとって問題となる遺伝毒性はないと考えられ、腫瘍発生メカニズムは遺伝毒性によるものとは考え難く、評価に当たり閾値を設定することは可能であると考えられた。”

In vitro

復帰突然変異試験：陽性（±S9）

染色体異常試験：陽性

In vivo

小核試験：陰性（骨髄、十二指腸）

染色体異常試験：陰性（骨髄）

優性致死試験：陰性

コメット試験：陰性（十二指腸陰窩細胞）

腫瘍の発生機序については、ホルペットを高用量で投与した場合は、十二指腸に到達したホルペット又は代謝物が、グルタチオン及び他のチオール基を枯渇させることにより小腸絨毛上皮細胞に損傷を与え、先端部分からの脱落及び絨毛の短縮を促進し、陰窩細胞の増殖及び幹細胞の過形成を増加させ、継続的な過形成がDNA修復能を上回った結果、形質転換細胞の発現頻度が増大し、その中の自然発生性のDNA損傷を有する細胞が、十二指腸の腺腫及び癌の発生頻度の増加を引き起こすと考えられている。食品安全委員会はこの考察を支持する。（農薬評価書より）

19

ICH M7(R1):潜在的発がんリスクを低減するための 医薬品中DNA反応性（変異原性）不純物の評価及び管理

“細菌を用いる変異原性試験の結果が陽性であれば、さらなるハザード評価や管理対策を必要とする（表1のクラス2）。例えば、不純物のレベルを適切な許容限度値で管理できない場合、細菌を用いる変異原性試験の結果のin vivo 条件下における関連性を理解するために、その不純物をin vivo 遺伝子突然変異試験で検証することが推奨される。他のin vivo 遺伝毒性試験を選択するにあたっては、その不純物の作用機序及び予想される標的組織への曝露に関する知見に基づき（注3）、その科学的な妥当性を示す必要がある。”

20

ICH M7(R1):

注3 *in vitro* 変異原性物質（細菌を用いる変異原性試験で陽性）の*in vivo* への関連性を検討するための試験

in vivo 試験	目的に適した試験法選択の妥当性を示す要素
トランスジェニック突然変異試験	細菌を用いる変異原性試験で陽性。試験に選択した組織や臓器が妥当であることを示す
<i>Pig-a</i> 試験（血液）	直接作用する変異原性物質（細菌を用いる変異原性試験がS9非存在下で陽性）*
小核試験（血液又は骨髄）	直接作用する変異原性物質（細菌を用いる変異原性試験がS9非存在下で陽性）でかつ染色体異常誘発作用が確認されている化合物*
ラット肝不定期DNA合成（UDS）試験	特に細菌を用いる変異原性試験がS9存在下でのみ陽性原因となる肝代謝物について以下が確認されている ・試験に用いた動物種で生成される ・パルキアダクトを誘発する
コメント試験	妥当性を示す必要あり（アルカリに不安定な部位や一本鎖切断などの形成といった、突然変異に至る可能性のある初期DNA損傷に特有な作用機序を有した化合物クラス） 試験に選択した組織や臓器が妥当であることを示す
その他	説得力のある根拠を示す

* 間接的に作用する（代謝活性化を必要とする）変異原性物質については、代謝物の曝露量が妥当であることを立証する必要がある。

21

ICH M7(R1):

表1：潜在的な変異原性及びがん原性に関する不純物の分類と管理措置

クラス	定義	提案される管理措置
1	既知の変異原性発がん物質	化合物特異的な許容限度値以下で管理する
2	発がん性が不明の既知の変異原性物質（細菌を用いる変異原性試験で陽性*であり、げっ歯類の発がん性データがない物質）	許容限度値（適切なTTC）以下で管理する
3	警告構造を有し、原薬の構造とは関連しない警告構造であり、変異原性試験のデータが存在しない	許容限度値（適切なTTC）以下で管理する、又は細菌を用いる変異原性試験を実施する 変異原性がない場合はクラス5 変異原性がある場合はクラス2
4	警告構造を有するが、試験によって変異原性がないことが示されている原薬又は原薬に関連する化合物（工程中間体など）と同じ警告構造である	非変異原性不純物として扱う
5	警告構造を有しないか、警告構造を有するが変異原性もしくは発がん性のないことを示す十分なデータが存在する	非変異原性不純物として扱う

* 又は遺伝子突然変異誘発と関連したDNA反応性を示唆する、その他の関連する陽性の変異原性データ（例えば、*in vivo* 遺伝子突然変異試験における陽性所見など）

22

ICH M7(R1):

毒性学的懸念の閾値 (TTC : Threshold of Toxicological Concern)

あらゆる化学物質についてそれ以下の暴露量では明らかな有害影響が現れないと考えられる閾値。

発がん性 (TD₅₀値) からの直線外挿により腫瘍発生率が100万分の1となる用量、または理論上の生涯過剰発がんリスク10⁻⁵に相当する1.5µg/human/dayが用いられる。

※一部の強い変異原性発がん物質のグループ (アフラトキシン様化合物、N-ニトロソ化合物及びアルキルアゾキシ化合物) は「cohort of concern」と呼ばれ、TTCを下回る用量でも高い発がんリスクの可能性がある。

23

まとめ2

Ames試験陽性のフォローアップ:

原理的に、in vitro/in vivo遺伝子突然変異試験が推奨される。

1) Ames試験の精査

純度、アミノ酸の影響、統計、QSARアラート構造有無

2) 培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験 (MLA, TK6)

細菌特異的代謝

3) In vivo遺伝子突然変異試験 (TGR試験)

In vivo条件下における関連性、外挿性 (曝露、代謝、標的組織)

X) リスクレベルでの管理 (TTC)

24