

IWGT報告と共同研究進捗状況

*Pig-a*アッセイ

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
堀端克良



Pig-a Workgroup Report

6th International Workshop on Genotoxicity Testing

11th International Conference on Environmental
Mutagens

Foz du Iguaccu, Brazil

7 November 2013

Workgroup

- **Chair:** Bhaskar Gollapudi, Exponent, Inc.
- **Co-chair:** Anthony Lynch, GlaxoSmithKline
- **Rapporteur:** Robert Heflich, US FDA
- **Members:** S. Dertinger, V. Dobrovolsky, R. Frotschl, K. Horibata, D. Jacobson-Kram, M. Kenyon, T. Kimoto, D. Lovell, L. Stankowski, P. White, K. Witt
- **Invited Participant:** J. Tanir, ILSI-HESI

Workgroup Charter

- 以下のコンセンサスを得る：
 - 試験法の成熟度
 - 試験デザイン
 - データの評価
 - 試験法の戦略的位置づけ
 - 将来の課題

Assay Maturity 試験法の成熟度

- **用語:** *Pig-a*変異体の名称 '*GPI-anchored-protein-deficient erythrocytes*' or '*Pig-a mutant phenotype*'.
- ***Pig-a*遺伝子上の変異の確証:** 良好な結果が得られている.
- **試験済みの化合物:** 代謝活性化を必要とする化合物を含めて、幅広いレンジにわたる26化合物. Ames陽性といくつかの non-mutagens.を含む
- **ラボ内、またはラボ間での再現性:** 良好
- **適用:** 安全性評価手法として推奨

Study Design 試験デザイン

- 種: ラット
- 数: 5-6匹のオス; 性特異的化合物の場合はメス
- Pre-screening: 有益だが、オプション
- 投与期間: 28日連投; 正当な根拠があれば、急性 (1-3 days)も可とする.
- 週齢、投与経路およびMTD: 関連する他のOECDガイドラインに類似.
- 陽性対照群の並行: 任意 (強制せず)
- 血液サンプリング: 投与開始後28日目を基軸に、それより早い時期、または遅い時期の採血をオプション

Study Design (contd.)

- **サンプルの保存と輸送:**適切な方法で5日間まで保存可能（データを論文特集号に掲載）。輸送は終夜。
- **染色と解析:** リトロンおよび**日本**での手法の**両方とも同等に受け入れられる**（現時点までの論文実績）。
- **細胞解析:** *Reticulocytes* および *RBCs*
- **細胞数:** 最小 $1 \text{ to } 5 \times 10^6$; 実現可能ならより多く。
- **対照群の変異体分画:** クオリティーコントロールされたラボ独自の方法。

Data Evaluation データの評価

- **統計学: 適切な手法** (例; \log_{10} transformation MPF followed by ANOVA and pair-wise)
 - RET および RBCs のMPFは個別に解析.
MPF; mutant phenotype frequency
- **データの解釈:**
 - 生物学的妥当性 + 適切な統計手法
 - 陽性反応: 用量相関性の増加、または単用量での明らかな増加
 - 生物学的妥当性:
 - ↑ RETsおよびRBCs両方のMPF, および複数のサンプリングポイント
 - 施設背景データ分布との比較
 - 陽性または陰性の基準を満たさない結果 = *Equivocal*.

Strategic Placement of the Assay 試験法の戦略的位置づけ

- 骨髄 (または血漿) 暴露に関する適切な証拠がある場合、本アッセイは以下のように考慮されるべきである
 - 代謝活性化の必要性に関わらず、Ames陽性およびほ乳類細胞を用いる *in vitro* 遺伝子変異試験陽性のフォローアップ
 - *in vivo* mutagenicity (またはその欠如) に関する weight of evidence の構築のためのエンドポイント
- *in vitro* clastogenicity または aneugenicity 所見のフォローアップとしては推奨されない。

Future Research Opportunities 将来の課題

- genotypeのさらなる検証.
- 本アッセイにおけるメチル化/脱メチル化の効果
- 追加化合物、特に*in vivo* mutagenic responseが予想されないもの
- 長期間投与の影響, e.g. ≥ 90 days.
- 他の種(e.g., ヒト, マウス, 犬, 豚) および他の造血細胞種におけるプロトコールの標準化
- 他の組織での有効性, e.g. Liver, germ cells.
- 類似性のある *in vitro* cell culture based assayの開発