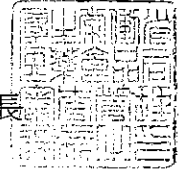


薬食審査発 0920 第 2 号
平成 24 年 9 月 20 日

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬食品局審査管理課長



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

医薬品の製造販売承認に際して添付すべき遺伝毒性に関する資料に関して、日米 E U 医薬品規制調和国際会議（以下「ICH」という。）における合意に基づき、新たに「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンス」（以下「新ガイダンス」という。）を別添のとおり定めたので、下記事項を御了知の上、貴管内関係者に対する周知方よろしく願いたい。

なお、本通知の適用に伴い、平成 8 年 7 月 2 日付け薬審第 444 号厚生省薬務局審査課長通知「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について」（以下、「S2A ガイダンス」という。）及び平成 10 年 7 月 9 日付け医薬審第 554 号厚生省医薬安全局審査管理課長通知「「遺伝毒性試験：医薬品の遺伝毒性試験の標準的組合せ」について」（以下、「S2B ガイダンス」という。）は廃止する。

記

1. 背景

優れた医薬品の国際的な研究開発の促進及び患者への迅速な提供を図るため、承認審査資料の国際的な調和を図る必要性が指摘されていることから、このような要請に応えるため、ICH における合意に基づき、近年の科学の進歩及び経験を踏まえて、新ガイダンスが定められたものであること。

2. 新ガイダンスの要点

- (1) S2A ガイダンス及び S2B ガイダンスを一つにまとめたこと。
- (2) 遺伝毒性試験の標準的組合せについて、2つのオプションを提示したこと（*in vitro* は乳類細胞試験を含むものと、含まないもの）。
- (3) *in vitro* は乳類細胞試験において、最高濃度の上限を 1 mM 又は 0.5 mg/mL の薬



いずれか低い濃度としたこと。

- (4) *in vitro* ほ乳類細胞試験として *in vitro* 小核試験の利用を認めたこと。
- (5) 条件によっては、*in vivo* 遺伝毒性試験を反復投与毒性試験に組み込んでもよいこととしたこと。
- (6) 第2の *in vivo* 試験として DNA 傷害性を評価できるコメット試験を推奨することとしたこと。
- (7) 条件によっては、細菌を用いる復帰突然変異試験を1試験だけでもよいこととしたこと。

3. 今後の取扱い

本通知日以降、医薬品の製造販売承認申請に際して添付すべき遺伝毒性に関する資料は、新ガイダンスに基づいて実施されたものであること。

ただし、平成25年3月31日までに平成11年11月1日付け医薬審第1604号厚生省医薬安全局審査管理課長通知「医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて」の別添「遺伝毒性ガイドライン」に基づいて開始又は実施された試験による資料は、当分の間、医薬品の製造販売承認申請に際し添付すべき遺伝毒性試験に関する資料として用いることができること。

医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンス

目次

| | | |
|-------|--------------------------------|----|
| 1. | 緒言 | 3 |
| 1.1 | ガイドラインの目的 | 3 |
| 1.2 | 背景 | 3 |
| 1.3 | ガイドラインの適用範囲 | 3 |
| 1.4 | 一般原則 | 3 |
| 2. | 遺伝毒性試験の標準的組合せ | 4 |
| 2.1 | 理論的根拠 | 4 |
| 2.2 | 標準的組合せの2つのオプションの詳細 | 5 |
| 2.3 | 試験組合せの変更 | 6 |
| 2.3.1 | 探索的臨床試験 | 6 |
| 2.3.2 | 細菌に毒性を示す化合物 | 6 |
| 2.3.3 | 構造的に遺伝毒性が予想される化合物 | 6 |
| 2.3.4 | <i>In vivo</i> 試験系の利用の限界 | 6 |
| 2.4 | 生殖細胞に対する変異原性物質の検出 | 7 |
| 3. | <i>In vitro</i> 試験に対する勧告 | 7 |
| 3.1 | 試験の繰り返し及び解釈 | 7 |
| 3.2 | 細菌を用いる遺伝子突然変異試験 | 7 |
| 3.2.1 | 最高用量の選択 | 7 |
| 3.2.2 | 試験のデザイン及びプロトコール | 8 |
| 3.3 | ほ乳類細胞を用いる試験 | 8 |
| 3.3.1 | 最高濃度の選択 | 8 |
| 3.3.2 | 試験デザイン及びプロトコール | 9 |
| 3.3.3 | 陽性対照 | 9 |
| 4. | <i>In vivo</i> 試験に対する勧告 | 10 |
| 4.1 | 染色体損傷の検出のための <i>in vivo</i> 試験 | 10 |
| 4.2 | その他の <i>in vivo</i> 遺伝毒性試験 | 10 |
| 4.3 | <i>In vivo</i> 遺伝毒性試験における用量設定 | 10 |
| 4.3.1 | 短期投与試験 | 10 |
| 4.3.2 | 反復投与試験 | 11 |
| 4.3.3 | 血液又は骨髄毒性のある化合物 | 11 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.4 | <i>In vivo</i> 試験結果が陰性の場合の標的組織での曝露証明 | 12 |
| 4.4.1 | <i>In vitro</i> 遺伝毒性試験が陽性の場合（又は実施されていない場合） | 12 |
| 4.4.2 | <i>In vitro</i> 遺伝毒性試験が陰性の場合 | 13 |
| 4.5 | <i>In vivo</i> 試験における採取時間 | 13 |
| 4.6 | 観察動物数 | 13 |
| 4.7 | <i>In vivo</i> 遺伝毒性試験におけるげっ歯類の性の選択 | 13 |
| 4.8 | 投与経路 | 13 |
| 4.9 | <i>In vivo</i> 試験の陽性対照の使用 | 13 |
| 5. | 試験結果の評価及び追加試験に関するガイダンス | 14 |
| 5.1 | 生物学的妥当性の評価 | 14 |
| 5.2 | <i>In vitro</i> 試験結果の評価 | 14 |
| 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 | 14 |
| 5.2.2 | ほ乳類細胞を用いる試験で得られた陽性結果の評価 | 15 |
| 5.2.3 | <i>In vitro</i> の陰性結果の評価 | 15 |
| 5.3 | <i>In vivo</i> 試験で得られた結果の評価 | 15 |
| 5.4 | 陽性結果に対する追加検討 | 16 |
| 5.4.1 | ほ乳類細胞を用いる <i>in vitro</i> 試験結果に対する追加検討 | 16 |
| 5.4.2 | <i>In vivo</i> 小核試験の陽性結果に対する追加検討 | 17 |
| 5.5 | がん原性試験で認められた腫瘍発生に関連する追加の遺伝毒性試験 | 17 |
| 6. | 注記 | 17 |
| 7. | 用語の解説 | 24 |
| 8. | 参考文献 | 26 |

医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンス

1. 緒言

1.1 ガイドラインの目的

このガイダンスはICH ガイダンス S2A 及び S2B に替わるもので、両者を1つにまとめたものである。改訂の目的は、ヒトに対するリスクを予測するための遺伝毒性試験の標準的組合せを最適化すること、及び結果の解釈のためのガイダンスを提供することであり、遺伝子の変化に基づく発がん性のリスク評価の精度向上を最終的な目的としている。本改訂ガイダンスは、国際的に合意された追加試験の基準並びに標準的組合せの *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験における陽性結果の解釈（妥当性のない[non-relevant]所見の評価を含む。）について述べ、医薬品として開発される製品についてのみ適用される。

1.2 背景

最新の経済開発協力機構（OECD）ガイドラインの勧告及び「遺伝毒性試験に関する国際ワークショップ（IWGT）」の報告書が適切に考慮されてきた。このガイダンスで述べるように、OECD 及び IWGT による勧告とは、いくつかの相違点がある。相違点は本ガイドラインを優先する。このガイダンスに続く注記は他の ICH ガイダンスと併せて適用すべきである。

1.3 ガイドラインの適用範囲

このガイダンスは新規の「低分子」医薬品の試験に関するものであり、生物学的製剤には適用されない。臨床開発段階における遺伝毒性試験実施のタイミングについては、ICH M3(R2)ガイダンスで推奨時期が示されている。

1.4 一般原則

遺伝毒性試験は、種々の機序で遺伝的な傷害を引き起こす物質を検出するために考案された *in vitro* 及び *in vivo* 試験と定義することができる。これらの試験は、DNA 損傷及びその損傷が固定された遺伝的傷害を検出する。DNA に対する遺伝的傷害とは、遺伝子突然変異、より広範な染色体の異常又は組換えのことであり、これらは後世代への遺伝的影響の本質であり、また、がん化における多段階過程の一部を担っていると一般的に考えられている。染色体の数的変化もまた腫瘍発生に関連しているとともに、生殖細胞における数的染色体異常誘発能を持つ可能性があることを示している。このような傷害を検出する試験で陽性となった物質は、ヒトに対する発がん物質や変異原物質である可能性がある。特定の化学物質の曝露とヒトでの発がん性の相関が証明されているが、遺伝性疾患について同様の関係を証明することは困難である。そのため、遺伝毒性試験は主としてがん原性を予測するために用いられてきた。しかしながら、生殖細胞系における突然変異はヒトの疾患と明確に関係していることから、ある物質が後世代への影響を引き起こすことが疑われた場合は、がん原性が疑われたのと同様に重大であると考えられる。また、遺伝毒性試験の結果はがん原性試験結果の解釈に有用である。

2. 遺伝毒性試験の標準的組合せ

2.1 理論的根拠

医薬品の申請のためには遺伝毒性の総合的な評価が要求される。広範なレビューにより、細菌を用いる復帰突然変異（エームス）試験で陽性の化学物質の多くが、げっ歯類での発がん物質であることが示されている。ほ乳類培養細胞を用いる *in vitro* 試験を加えることによって、げっ歯類に対する発がん物質の検出感度が増し、検出される遺伝的傷害の範囲が広がるが、これにより逆に予測の特異性が減少する；すなわち、げっ歯類での発がん性と関連しない陽性結果が増加する。しかしながら、1つの試験でがん原性に関連するすべての遺伝毒性機序を検出できないことから、組合せによる試験の実施は依然として妥当なものと考えられる。

試験の標準的組合せは次のとおりである。

- i. 細菌を用いる復帰突然変異試験での変異原性の評価。この試験は妥当性のある遺伝的変化を検出し、げっ歯類及びヒト遺伝毒性発がん物質の大部分を検出することができると思われる。
- ii. ほ乳類細胞での *in vitro* 及び/又は *in vivo* 遺伝毒性の評価。ここでの遺伝毒性は以下のように評価されるべきである。

In vitro 分裂中期染色体異常試験、*in vitro* 小核試験（注1参照）及びL5178Y細胞を用いるマウスリンフォーマ Tk（チミジンキナーゼ）試験（MLA）の3種類の *in vitro* ほ乳類細胞試験系が広く使用されており、それらの信頼性は十分に保証されていると考えられる。これら3つの試験は同程度の検出力を持つと考えられており、このガイドラインで推奨されているプロトコルを用い、標準的組合せ試験として他の遺伝毒性試験と一緒にを行う場合は、染色体傷害の検出に関しては互換性がある。

In vivo で変異原性を示し、*in vitro* で変異原性陰性の化合物が存在すること（注2参照）、及び遺伝毒性の評価に、吸収、分布、代謝及び排泄などの要素を加味した試験法を加えることが望ましいことから、*in vivo* 遺伝毒性試験が標準的組合せに加えられている。この理由により、現時点では、末梢血若しくは骨髄中の赤血球の小核又は骨髄における分裂中期細胞の染色体異常のいずれかが評価の対象として選択される（注3参照）。被験物質で処理した動物の培養リンパ球もまた細胞遺伝学的解析に用いることができるが、その方法はまだ一般的ではない。

分裂中期細胞を用いる *in vitro* 及び *in vivo* の染色体異常試験は、染色体の安定性を変化させる様々な異常を検出することができる。染色分体又は染色体が切断されることで、無動原体染色体断片が生じ、これにより小核が形成される。したがって、染色体異常や小核を検出する試験のいずれも染色体の構造異常の検出に適切であると考えられている。小核はまた、分裂後期における1本以上の染色体の極への移動異常によっても形成されるため、小核試験は染色体の数的異常誘発物質を検出できる可能性がある。MLAはチミジンキナーゼ遺伝子の変異を検出する系であるが、この変異は遺伝子突然変異と染色体異常のいずれの機序によっても発生する。MLAはまた染色体の損失も検出可能であることが知られている。

いくつかの追加の *in vivo* 試験は組合せ試験にも用いることができる。また、*in vitro* 及び *in vivo* 試験結果を評価する際の証拠の重み付け（weight of evidence; WOE）を得るための追加試験と

しても有用である（下記参照）。評価対象となる試験が十分理にかなない、適正な方法により実施され、かつ、標的組織での曝露が証明されていれば（4.4 項参照）、その *in vivo* 試験（通常 2 試験）の陰性結果は、懸念すべき遺伝毒性リスクがないことを示す十分な証明となる。

2.2 標準的組合せの 2 つのオプションの詳細

標準的組合せに関する以下の 2 つのオプションは同等に適切と判断される（注 4 参照）。

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（下記及び 4.2 項、注 12 参照）

オプション 1 は、ICH ガイダンス S2A 及び B に準拠していることもあり、主に歴史的な経験で構成されている。しかしながら、オプション 1 と 2 が同等に受け入れられると考える理由は次のとおりである。*In vitro* は乳類培養細胞試験で陽性で、適切な組織で十分な曝露量が得られている適正に実施された 2 種の *in vivo* 試験で明らかな陰性の場合、*in vivo* では遺伝毒性を示さないことの十分な証拠と考えられる（5.4.1.1 項以降参照）。したがって、初めから 2 種の *in vivo* 試験を実施するオプションは、*in vitro* の陽性結果の追加検討と同等である（注 4 参照）。

標準的組合せの両オプションは、*in vivo* の短期又は反復投与どちらの試験方法にも組み入れて使うことができる。反復投与する場合、科学的に正しければ一般毒性試験に遺伝毒性の指標を組み込むことを考慮すべきである。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。多くの場合、試験開始前に反復投与毒性試験の投与量が適切かどうかの十分な情報が得られていると考えられるので、短期投与が適切かあるいは反復投与に組み入れるのがよいかの判断に使える。

このガイダンスに従い実施され、評価されたいずれかのオプションの標準的試験の組合せにおいて陰性の結果を示す化合物は、通常、遺伝毒性活性を持たないと考えられ、追加試験は必要ない。標準的組合せ試験で陽性の化合物は、その臨床での使用形態にもよるが、より広範な検討をする必要があるものと考えられる（5 項参照）。

オプション 2 において *in vivo* 評価の第 2 の試験として使用できるものは 4.2 項に示すような試験があり、これらのいくつかは反復投与毒性試験に組み入れることができる。肝臓は曝露及び代謝能の観点から特に最適な組織であると考えられるが、第 2 の組織及び試験法は想定可能な機序、代謝又は曝露情報などの要因を考慮して選択すべきである。

染色体の数的異常に関する情報は *in vitro* でのほ乳類細胞試験及び *in vitro* 又は *in vivo* の小核試験より得ることができる。異数性誘発能を示す指標としては、分裂指数の増加、倍数性及び小核の誘発がある。MLA でも紡錘体阻害剤の検出は可能であるとされている。オプション2において推奨される *in vivo* の細胞遺伝学的試験は、染色体の損失（異数体の可能性）を直接検出することができる小核試験が推奨されるが、染色体異常試験は推奨されない。

ここでは、試験の標準的組合せを提示したが、これは他の遺伝毒性試験が不十分又は不適當であることを意味している訳ではない。追加実施した試験結果は、標準的組合せで得られた試験結果をより詳細に調査するために使用することができる（4.2 及び5項参照）。必要性が示され、かつ十分に評価されている試験であれば、非げっ歯類を含む代替の試験系も利用可能である。

標準的組合せを構成する試験において、技術的な理由で試験が実施できない場合には、有用性が確認された代替試験を十分な科学的正当性を持つものとして利用することができる。

2.3 試験組合せの変更

下記のような状況下にあつては、標準的組合せを変更することが推奨される場合もある。

2.3.1 探索的臨床試験

特定の探索的臨床試験に関しては、*in vivo* での最高投与量設定に相応の理由があれば、限られた遺伝毒性試験又は異なる判断基準を適用してもよい（ICH M3(R2)ガイダンス参照）。

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。

2.3.3 構造的に遺伝毒性が予想される化合物

多くの「警告部分構造」は細菌の変異原性に関して定義されているため、構造的に遺伝毒性が予想される化合物（注5参照）は、通常、標準的組合せ試験により検出可能である。少数の化合物クラスは、細菌を用いる遺伝子突然変異試験よりもほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験で容易に検出できることが知られている。したがって、警告部分構造を有する化合物における標準的組合せにおける陰性結果は、遺伝毒性を有していない十分な保証となると考えられる。しかしながら、ある種の特異的な警告部分構造を有する化合物群に対しては、標準プロトコールを適切に変更することが望ましい（注5参照）。追加試験とするかプロトコールの変更とするかの選択は、問題となっている警告部分構造を有する化学物質に関する化学的性質、既知の反応性及び代謝データに基づいて選択する。

2.3.4 *In vivo* 試験系の利用の限界

骨髄、血液又は肝臓を用いる *in vivo* 試験を実施しても有用な情報が得られない化合物がある。トキシコキネティクスやファーマコキネティクスのデータから、全身での体内吸収がなく、標的

臓器に到達できないような化合物がそれに相当する。例として、ある種の造影剤、アルミニウムを主成分とする制酸剤、いくつかの吸入投与剤及び皮膚又は他の局所適用の医薬品があげられる。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、*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。汎用されている試験系ではないものの、これらの試験により、曝露部位に対する遺伝毒性評価を適切に実施することは可能である（注6参照）。

2.4. 生殖細胞に対する変異原性物質の検出

比較検討から、ほとんどの生殖細胞変異原物質は、体細胞を用いる試験で遺伝毒性が検出されることが定性的に示されている。したがって、体細胞を用いる *in vivo* 遺伝毒性試験の陰性結果は生殖細胞に影響がないことを示していると考えられることができる。

3. In vitro 試験に対する勧告

3.1 試験の繰り返し及び解釈

実験結果の再現性は、新しい手法による研究や、予期しない結果が得られた場合に必須の要素である。しかしながら、医薬品のために標準化され汎用されている定型的な遺伝毒性試験では、繰り返しを必要としない場合がある。これらの試験は特性が明確であり、また十分な内部コントロールを有しているため、明らかな陽性又は陰性の場合、試験の繰り返しは通常必要とされない。理想的には、試験結果は明らかな陽性又は明らかな陰性と確定すべきである。しかしながら、時には試験結果が陽性や陰性の判定基準を満たさないことがあり、その場合には「不確か(equivocal)」とせざるを得ない。このような場合には、統計学的手法の適用が解釈に役立つが、適切な生物学的解釈が極めて重要である。「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」となる可能性がある。

3.2 細菌を用いる遺伝子突然変異試験

OECD ガイドライン (1997) 及び IWGT 報告書 (Gatehouse ら、1994) にプロトコールに関する助言が記述されている。

3.2.1 最高用量の選択

最高用量

溶解性又は菌の生育阻害が問題とならない場合、最高用量は 5000 µg/plate (被験物質が液体の場合、5 µL/plate) とする。

溶解性の限界

菌の生育阻害がなく、また、最高用量が 5000 µg/plate (被験物質が液体の場合、5 µL/plate) 以下という条件下では、析出物が変異コロニーの検出を妨げない限り、析出する用量においても測定する。菌の生育阻害が観察されない場合は、析出する最低用量を最高用量とすべきである。も

し、用量相関的に菌の生育阻害又は復帰変異コロニーの増加が認められた場合には、溶解性に関係なく最高用量は以下の基準に基づくべきである。

生育阻害による制限

エームス試験では、生育阻害の現れる用量を最高用量とし、最高濃度 5000 µg/plate を超えない用量とする。生育阻害は復帰変異コロニー数の減少や背景の細菌の生育 (background lawn) の透明化 (clearing) 又は減少によって検出されることがある。

3.2.2 試験のデザイン及びプロトコール

塩基対置換及びフレームシフト突然変異の検出に OECD が推奨する試験菌株のセットは以下のとおりである。

- ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98
- ネズミチフス菌 TA100
- ネズミチフス菌 TA1535
- ネズミチフス菌 TA1537、TA97 又は TA97a
- ネズミチフス菌 TA102、大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA 又は大腸菌 WP2uvrA/pKM101

OECD ガイドライン及び IWGT 報告書との相違は、細菌を用いる復帰突然変異 (エームス) 試験については、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、医薬品の遺伝毒性試験の経験に基づき、1 試験で十分であると考えられるという点である。また、医薬品の試験ではプレート法及びプレインキュベーション法はともに受け入れ可能である (注 7 参照)。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ことが望ましい。

3.3 ほ乳類細胞を用いる試験

OECD ガイドライン (1997) 及び IWGT の公表文献 (例; Kirsch-Volders ら、2003; Moore ら、2006) にプロトコールに関する助言が記載されている。MLA の結果の解釈についての助言も、総合的評価ファクター (global evaluation factor) の使用も含め記載されている (Moore ら、2006)。ここでは医薬品の試験について推奨されるものと他とのいくつかの違い、特に最高用量の選択について述べる (詳細は下記参照)。

3.3.1 最高濃度の選択

最高濃度

溶媒若しくは培養液中の溶解性又は細胞毒性が問題とならない場合は、最高濃度の上限は 1 mM 又は 0.5 mg/mL のいずれか低い濃度が推奨される (注 8 参照)。

溶解性の限界

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。沈殿の評価は、肉眼観察又は光学顕微鏡による観察

などで行う。沈殿が最初から継続してみられるのか、又は培養中に新たに生じるのか処理の終了まで観察し、記載する。

細胞毒性

分裂中期の染色体異常又は小核を調べる *in vitro* の細胞遺伝学的試験では、細胞毒性は、細胞増殖抑制が約 50%を超えないようにする（注 9、10 参照）。MLA では、最高用量において細胞毒性が 80~90%（10~20%RTG）になるようにする（注 9 参照）。

3.3.2 試験デザイン及びプロトコール

In vitro の分裂中期細胞における染色体損傷の細胞遺伝学的評価には、陽性及び陰性対照を設けるとともに、代謝活性化系の存在下及び非存在下での試験の実施が必要である。被験物質の処理は 3~6 時間とし、処理開始から約 1.5 正常細胞周期後に標本を作製する。代謝活性化系の存在下及び非存在下の短時間処理の両方で陰性結果又は不確かな結果の場合には、代謝活性化系の非存在下で約 1.5 正常細胞周期の連続処理が必要である。*In vitro* の小核試験にも同じ原則が適用される。ただし、細胞の分裂期を終了させ、次の間期に入らせるため、一般に被験物質の処理開始から 1.5~2 正常細胞周期後に標本を作製する。これらの *in vitro* 細胞遺伝学的試験では、ヌグレオシドアナログ及びニトロソアミンのようなある種の化学物質に対しては、処理時間を長くするか、あるいは採取時間を遅らせるか、又は回復期間を設けるなどのプロトコールの変更によって容易に検出できる場合もある。染色体異常試験では、分裂中期細胞の出現率とともに倍数体（核内倍加を含む）細胞の出現率を記録することによって倍数性の情報を得ておくべきである。MLA では、適切な陽性及び陰性対照を設け、代謝活性化系の存在下及び非存在下で試験を実施する。被験物質の処理は 3~4 時間とする。代謝活性化系の存在下及び非存在下の短時間処理の両方において陰性結果あるいは不確かな結果の場合には、代謝活性化系の非存在下で約 24 時間の連続処理を実施すべきである。標準的な MLA では、(i) 主として小さなコロニーを誘発する陽性対照を用い、(ii) 被験物質が陽性を示した場合、陽性対照、溶媒対照及び被験物質で最大突然変異頻度を示した用量を含む少なくとも 1 陽性用量においてコロニーサイズのカテゴリ分けが必要である。

In vitro のほ乳類細胞試験では、上記に概説（例えば異なる処理時間、代謝活性化系の存在下及び非存在下による試験）したように、試験内に再現性をみる要素が組み込まれている。このような試験で明らかに陰性又は陽性の場合には、追加の確認試験は求められない。不確か、又は弱い陽性結果が得られた場合には、処理濃度の間隔を変更するなどプロトコールを最適化した試験の繰り返しが必要となるかもしれない。

3.3.3 陽性対照

同時陽性対照群は重要であるが、遺伝毒性検出のための *in vitro* ほ乳類細胞試験は十分に標準化されているため、（非代謝活性化系の試験と同時に行うのであれば）代謝活性化系の活性確認と試験系の反応性を証明するための代謝活性化系の存在下での陽性対照のみでよい。

4. In vivo 試験に対する勧告

4.1 染色体損傷の検出のための *in vivo* 試験

In vivo での骨髄細胞における染色体異常の分析、又は小核を有する多染性赤血球の解析は、いずれも染色体異常誘発物質の検出に関して適切と見なされる。骨髄細胞の小核試験に使用する動物種としてラット及びマウスはともに適切であると考えられる。小核はまた、マウス末梢血の幼若赤血球（多染性赤血球）又はラット末梢血の新生網赤血球を用いてもよい（注3参照）。同様に、他の動物種の幼若赤血球でも、骨髄又は末梢血における染色体異常誘発物質/数的異常誘発物質を検出する試験として適切な感度が示されており使用できる（注3参照）。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（OECD、1997；Hayashiら、2000、2007）。染色体異常は、被験物質を投与されたげっ歯類から採取培養された末梢リンパ球においても分析が可能である（注11参照）。

4.2 その他の *in vivo* 遺伝毒性試験

標準的組合せ2（オプション2）において第2の試験として示した *in vivo* 試験は、*in vitro* 及び *in vivo* 試験結果の評価における WOE を高めるための追加試験としても使用できる（注11及び12参照）。*In vitro* で観察された特定の反応や、作用機序に関する情報は *in vivo* 試験を選択する指針となり得るが、染色体異常又は内在性遺伝子における遺伝子突然変異の試験は、大部分の組織においては標準的な方法としては妥当ではない。突然変異はげっ歯類における導入遺伝子によっても検出できるが、特に細胞分裂の頻度が低い組織（注12参照）においては突然変異の発現、固定及び蓄積を必要とするため、長期（例えば28日間）の投与が必要となる。したがって、第2の *in vivo* 試験では多くの場合、代替指標としてDNA傷害性を評価することになる。これまでに発表された多くの文献や、推奨されるプロトコールを考慮すると、DNA鎖切断を検出する試験である単細胞ゲル電気泳動（「コメット」）試験及びアルカリ溶出試験が推奨され、これに *in vivo* トランスジェニックマウス突然変異試験及びDNA共有結合試験（これらの試験は多くの組織に適用できる、注12参照）が加わる。さらには肝細胞を用いる不定期DNA合成（UDS）試験も利用可能である。

4.3 *In vivo* 遺伝毒性試験における用量設定

通常3用量を解析する（Hayashiら、2005）。

4.3.1 短期投与試験

短期投与試験（一般に1~3回投与）では、遺伝毒性試験で推奨される最高用量は限界用量の2000 mg/kg又は最大耐量とする。最大耐量とは（例えば小核試験[OECD]）、同様の投与方法で、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して定義される。コメット試験（Hartmannら、2003）及びトランスジェニック突然変異試験（Heddleら、2000）についても同様な限界用量設定が推奨される。

用量設定には骨髄赤血球の増殖抑制も考慮に入れるべきである。低用量側の用量は、最高用量から通常公比約2~3の間隔で設定する。

4.3.2 反復投与試験

オプション1の組合せ

In vivo 遺伝毒性試験を反復投与毒性試験に組み込む場合、反復投与毒性試験の用量が臨床試験の実施を担保するための基準を満たしていれば、通常その用量は適切と判断される。その場合、その用量設定が *in vivo* 小核試験の OECD ガイドラインの基準と異なってもよい。以上の基準は、*in vitro* のほ乳類細胞試験が陰性（あるいは“妥当性のない陽性”、5項参照）である場合に適用される。

追加試験又はオプション2の組合せ

遺伝毒性兆候への追加試験を実施する場合又は *in vitro* のほ乳類細胞試験を行わないオプション2を使用する場合には、その試験における最高用量が遺伝毒性の評価に適切か否かを判断するために評価すべき条件がある。下記に示した基準のうち、いずれか1つでも満たすのであれば、小核の評価及びその他の遺伝毒性評価を行う試験（通常はラット）の最高用量として適切であると考えられる。

- i. 溶媒中の医薬品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）（注13参照）。
- 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料を除く）。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。[例えば Hartmann ら、2003]）。

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、十分な正当性があるとは考えられない。

4.3.3 血液又は骨髄毒性のある化合物

紡錘体阻害剤のような異数性を誘発する多くの化合物は、骨髄あるいは血液を用いる小核試験において、その作用は、毒性用量に近い狭い用量範囲のみで検出される。この現象は、他の染色体異常誘発物質についても同様である。赤血球系の細胞に強い毒性（例えば、顕著な多染性赤血球（PCE）又は網赤血球の低下）を示す場合には、用量段階は、細胞毒性を示す最高用量以下、約2倍を超えない間隔で設定すべきである。適切な用量が反復投与試験に含まれていなければ、異数性誘発物質及び細胞毒性が強い染色体異常誘発物質を検出するための追加試験として下記のものが考えられる。

- i. 投与期間の増加に関連した毒性が顕著に増加した場合は、投与期間初期（投与3～4日）

の血液採取が推奨される。例えば、反復投与試験（例えば 28 日間）で血液若しくは骨髄が小核の評価に使用される場合又は網赤血球を評価する場合は、重篤な血液毒性が小核の検出力に影響を及ぼす可能性がある。すなわち、短期投与で十分に小核を誘発する投与量は、反復投与においては毒性が強く発現しすぎる可能性がある（Hamada ら、2001）。このような場合、投与初期のサンプルは、染色体異常誘発物質又は潜在的異数性誘発物質の検出について確証データを提供することができる（注 14、15 参照）。

- ii. *In vitro* のほ乳類細胞を用いる小核試験
- iii. 短期投与による骨髄を用いる小核試験

4.4 *In vivo* 試験結果が陰性の場合の標的組織での曝露証明

In vivo 試験は遺伝毒性を評価する上で重要な役割を担っている。*In vivo* 試験において、標的組織への被験物質の適切な曝露証明が試験結果の意義を左右する。特に、*in vitro* 試験で明白な遺伝毒性が認められたが *in vivo* 試験で陰性の場合又は *in vitro* ほ乳類細胞を用いる試験を実施されていない場合は標的組織の曝露証明が重要である。以下の項で示すように、曝露証明の方法として、標的組織における毒性又はトキシコキネティクスデータがある。

4.4.1 *In vitro* 遺伝毒性試験が陽性の場合（又は実施されていない場合）

In vivo の曝露評価は、遺伝毒性試験と同じ動物種、系統及び投与経路を用いて、最高用量又は適切な用量で行われるべきである。遺伝毒性が一般毒性試験に組み込まれて評価される場合には、曝露の情報は毒性学的評価と共有できる。

In vivo の曝露証明は次のいずれかによって行われる。

- i. 細胞毒性
 - a. 細胞遺伝学的試験：小核試験では、試験で使用した用量及び採取時間で評価した組織（骨髄あるいは血液）における全赤血球に対する幼若赤血球の割合の有意な変化。染色体異常試験では、分裂指数の有意な減少
 - b. 他の *in vivo* 遺伝毒性試験：肝臓あるいは評価した組織における毒性。例えば、病理組織学的評価又は血液生化学的毒性指標など
- ii. 曝露
 - a. 被験物質又はその関連物質の血中又は血漿中濃度の測定。骨髄は血液がよく灌流する組織であり、被験物質又はその関連物質の血中又は血漿中濃度は、骨髄濃度と通常同等である。また肝臓は、投与経路に関係なく全身曝露によって曝露されると予想される。
 - b. 標的組織における被験物質若しくはその関連物質濃度の直接測定又はオートラジオグラフィによる組織曝露評価

全身曝露が、予測される臨床曝露と同等あるいは低い場合には以下の方法が求められる。

- i. 異なる投与経路の利用
- ii. より高い曝露が得られる異なる動物種の利用
- iii. 異なる組織又は試験法の利用（2.3.4 項「*In vivo* 試験系の利用の限界」参照）

被験物質に適切に曝露されていない場合（例えば標的組織への取り込みが非常に低い場合）には、通常の *in vivo* 遺伝毒性試験はほとんど意味をなさないものと考えられる。

4.4.2 *In vitro* 遺伝毒性試験が陰性の場合

In vitro 試験で遺伝毒性が認められなかった場合、上記の方法を用いて *in vivo*（全身）の曝露を評価する。また、他の目的で実施されたげっ歯類における標準的な吸収、分布、代謝、排泄（ADME）試験の結果から評価してもよい。

4.5 *In vivo* 試験における採取時間

In vivo 小核試験、染色体異常試験及び UDS 試験における採取時間は、OECD ガイドライン（1997）に従うべきである。

小核試験が反復投与試験に組み込まれる場合には、血液あるいは骨髄の採取は最終投与の翌日に行う（上述の追加血液採取の推奨を参照）。

その他の遺伝毒性試験では、採取時間は試験に合わせて選択する；例えばDNA損傷/DNA鎖切断の判定は、通常最終投与後数時間（例えば2～6時間）に行われる。単回投与する場合は、投与後数時間と投与後24時間の2ポイントで採取する。

原則として、最高用量又は曝露が適切であれば、どのような投与期間の試験でも受け入れられる。

4.6 観察動物数

観察動物数は、小核試験（OECD）又は他の遺伝毒性試験で現在推奨されている動物数を設定する。一般的にはすべての投与動物を観察する必要はない。遺伝毒性評価用の動物は毒性試験に用いた動物から無作為に抽出されるべきである。

4.7 *In vivo* 遺伝毒性試験におけるげっ歯類の性の選択

男性又は女性にのみに用いられる医薬品の試験を行う場合には、適切な性を用いて試験を実施する。短期投与の *in vivo* 試験では、一般的には片側の性のみで実施する。短期投与試験で両性の使用が考慮されるのは、使用する動物種で、毒性、代謝又は曝露（ C_{max} 又は AUC）において毒性学的に意味のある性差が示されている場合のみである。その他の場合は、雄のみの使用が適切である。遺伝毒性試験を雌雄動物の反復投与毒性試験に組み入れる場合には、標本は両性から採取するが、毒性又は代謝において性差を示す十分な根拠がなければ、片側の性の観察のみでよい。投与量は「適切な投与量の基準（4.3.2 及び 4.3.3 項）」に従う。

その他の *in vivo* 遺伝毒性試験についても同じ原則が適用される。

4.8 投与経路

投与経路は通常、経口、静脈内又は皮下などの予定臨床投与経路とするが、局所用剤のような場合には全身曝露を得るために、投与経路を変更してもよい（2.3.4 項参照）。

4.9 *In vivo* 試験の陽性対照の使用

In vivo 試験では、試験施設が試験を行うのに十分な能力がある場合には、定期的に陽性対照

物質の動物に対する反応が確認されていれば、試験ごとに同時陽性対照群を置く必要はないと考えられる（注16参照）。

5. 試験結果の評価及び追加試験に関するガイダンス

In vitro 試験系では、げっ歯類のがん原性予測に対して偽陰性及び偽陽性の結果を与えることが試験結果の比較から明らかにされている。遺伝毒性試験の組合せ (*in vitro* 及び *in vivo* 試験) は、大部分の既知ヒト発がん物質でみられるように、直接的に遺伝的傷害を引き起こし作用すると考えられている発がん物質を検出する。したがって、これらの試験の組合せでは非遺伝毒性発がん物質は検出できない。*In vitro* の代謝活性化系に限界があるように、試験条件によっては *in vitro* 試験は偽陰性の結果をもたらすことがある。組合せ試験は、遺伝毒性を示す化合物が偽陰性となる危険性を減少させるようにデザインされているが、ある試験で陽性となった化合物が必ずしもヒトに対して遺伝毒性/発がん性を持つことを意味するものではない。

陽性の *in vitro* データは、医薬品が化学物質の特性として遺伝毒性を持つことを示しているが、多くの場合、これら *in vitro* の陽性結果の生物学的意義は適切な *in vivo* 試験で検証される必要がある。さらに、ある濃度以上でのみ作用を現す間接的遺伝毒性の機序が知られており、このような作用機序を持つ医薬品については、安全レベル（閾値）を設定することが可能であるとされている（5.2項、MüllerとKasper, 2000；Scottら, 1991；Thybaudら, 2007）。

5.1 生物学的妥当性の評価

試験が適切な用量間隔、適切な毒性レベルで実施された場合、以下のように考えることができる。

In vitro あるいは *in vivo* で、遺伝毒性の明らかな増加が認められるが、その程度が弱い場合はまずその再現性及び生物学的な意義について評価すべきである。生物学的に意味が乏しいと判断される例を以下に示す。

- i. 陰性又は溶媒対照の値と比較して統計的に有意であるが、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軽度の増加
- ii. 再現性のない弱い反応/不確かな反応

上記のいずれかの条件があてはまり、WOEから遺伝毒性がないと考えられれば、陰性又は生物学的に妥当性がない所見と判断され、追加試験の必要はない。

5.2 *In vitro* 試験結果の評価

特に細菌を用いる変異原性試験では、陽性結果が不純物に起因していないかを判断するため、被験物質の純度を考慮すべきである。

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。

5.2.2 ほ乳類細胞を用いる試験で得られた陽性結果の評価

陽性結果が得られた場合の WOE による評価及び追加試験の推奨に関しては IWGT の報告書の中で議論されている (例えば Thybaud ら, 2007)。さらに、論文などで *m vitro* 試験での陽性結果の妥当性を疑わせるようないくつかの条件についても報告されている。したがって、いかなる *m vitro* 試験での陽性結果についても、以下に示すような WOE を考慮して評価されるべきである。以下の項目はすべてを網羅したものではないが、判定を下すための一助となろう。

- i. *In vivo* では起こりえない条件 (pH ; 浸透圧 ; 析出物)
1 mM までは浸透圧の増加を考慮する必要はない。また、被験物質が pH を変化させる場合は、被験物質処理時の pH を無処理群の正常 pH に調整することが推奨される。
- ii. 強い毒性が発現する濃度のみでの作用
MLA において RTG が 80% 以上低下した場合
In vitro 細胞遺伝学的試験において細胞増殖が 50% 以上抑制された場合

上記の条件があてはまり、WOE から遺伝毒性の可能性がないと判断できれば、標準的組合せ (オプション 1) に従う。このような場合には、1 つの *m vivo* 試験の実施で十分であると考えられる。

5.2.3 *In vitro* の陰性結果の評価

In vitro 試験で陰性でも、次のような場合には追加試験を考慮すべきである (ここにあげた例はすべてを網羅したものではないが、判断を下すための一助となろう。) : 化合物の構造やその既知の代謝経路から考えて、標準的な *m vitro* 代謝活性化法 (例えば、げっ歯類肝 S9) が不適切と考えられる場合。化合物の構造や既知の活性から考えて、他の方法 / 試験系が適切と考えられる場合。

5.3 *In vivo* 試験で得られた結果の評価

In vivo 試験には、吸収、分布及び排泄という *m vitro* 試験にはない要素が勘案されているという特徴があり、したがって、ヒトへの適用に重要な意味を持つ。さらに、薬物代謝は *m vitro* で通常使用されている系と比べると、*m vivo* の系の方がより生物学的に妥当性がある。*In vivo* と *m vitro* の結果が一致しない場合には両者の相違についてケース・バイ・ケースで判断され、説明がなされるべきである (例えば、代謝の差、*m vivo* での効率的な排泄など)。

- In vivo* 試験においても偽陽性 (misleading positive) 結果を引き起こす可能性がある。例えば、
- i. 遺伝毒性物質の投与がない場合でも小核の増加がみられることがあり、これは造血障害によることが知られている (Tweats ら, 2007, I)。
 - ii. DNA 付加体のデータは、既知の内因性付加体の背景レベルを考慮に入れて解釈すべきである。

- iii. 毒性に関連した間接的な作用が、DNA 鎖切断の結果に影響を及ぼすことがある（例えば、アルカリ溶出試験及びコメット試験において）。

このように、遺伝毒性データを評価する際にはすべての毒性学的及び血液学的所見を考慮することが重要である（注15参照）。毒性学的変化に関連する間接的な作用には安全域があり、これらが臨床で発現するとは考えにくい。

5.4 陽性結果に対する追加検討

5.4.1 ほ乳類細胞を用いる *in vitro* 試験結果に対する追加検討

以下の論議は細菌を用いる復帰突然変異試験は陰性であることを前提としてなされている。

5.4.1.1 作用機序/*in vivo* の追加検討

ほ乳類細胞を用いる *in vitro* 試験での陽性結果に妥当性がないことを示す WOE が不十分である場合、追加の *in vitro* 試験（下記 i）又は2種類の適切な *in vivo* 試験を実施することを推奨する（下記 ii）。これらは、ほ乳類細胞試験陽性に対して推奨される追加検討として実験的根拠を与えるものとなるであろう。

- i. 陽性結果が妥当性を欠くものであることを示す作用機序に関する情報は、しばしば *in vitro* から得られる。例えば、染色体異常を誘発したり、また MLA で陽性を示したりしても DNA 損傷性がない化合物であるとする証拠もある（例：エームス試験に加え、他の突然変異/DNA 傷害試験で陰性；化学構造に関する考察）。また、*in vivo* では妥当とされない又は閾値が想定される間接的な作用機序の証拠（例：DNA 合成阻害、高濃度のみで産生される活性酸素種）があげられる（Galloway ら、1998；Scott ら、1991；Muller と Kasper、2000）。同様のケースは、*in vitro* 小核試験における陽性結果の追加検討についても言える。染色体の損失又は異数性の機序が考えられ、染色体の損失を示す動原体染色実験（注17参照）が証拠としてあげられる。倍数性は *in vitro* の染色体異常試験ではよくみられる所見である。異数性誘発物質は倍数性を誘発するが、倍数性だけでは異数性誘発の証拠としては不十分である。単に細胞周期の遅延によるのかもしれない。それは、通常、細胞毒性の増加も伴う。*In vitro* 試験において構造的な染色体異常はないが倍数性がみられる場合には、適切に曝露されたことが確認された *in vivo* 小核試験の陰性結果により、異数性誘発能を有さないことが十分に担保される。

上記の機序に関する情報及び WOE が、陽性結果が妥当性を欠くことの裏づけとなるのであれば、適切な曝露情報を有する1つの *in vivo* 試験の陰性により、遺伝毒性がないことを示すことができる。これに用いられるのは、一般に細胞遺伝学的試験であり、染色体の損失を追加検討する場合は *in vivo* 小核試験が推奨される。

妥当性がないと判断しうる十分な WOE がない場合、又は作用機序に関する情報がない場合には、2種類の *in vivo* 試験が要求される。この場合、適切な遺伝毒性の指標及び組織（通常2つの異なる組織）で行う。さらに、*in vivo* モデルで十分な曝露が得られることが重要である。

又は

ii. 曝露証明を伴い異なる組織を用いての適切な *in vivo* 試験を 2 種類実施する。

以上を要約すると、試験が的確になされ、曝露が確認された適切な *in vivo* 試験の陰性結果は (4.4.1 項参照)、遺伝毒性を示さない十分な証拠となる。

5.4.1.2 S9 活性化系存在下での *in vitro* 試験の陽性結果に対する追加検討

S9 活性化系の存在下のみで陽性結果がみられた場合には、代謝活性化がその要因であり、代謝活性化以外の条件 (例えば、非代謝活性化系のインキュベーションにおける 10%以上の血清と比較した、S9 mix 存在下での低濃度の血清又は無血清) が関与していないことを確認する。ここでの追加試験の目的は *in vitro* での結果の *in vivo* 条件に対する妥当性を確認することであり、通常、肝臓を用いる *in vivo* 試験が対象となる (注 18 参照)。

5.4.2 *In vivo* 小核試験の陽性結果に対する追加検討

In vivo で小核の増加がみられる場合には、非遺伝毒性作用が原因あるいは関与している可能性を判断するため、すべての毒性試験データを考察する (注 15 参照)。造血障害あるいは生理的攪乱 (低体温、高体温) のような非特異的作用が疑われる場合には、*in vitro* 染色体異常試験がより適切かもしれない。小核の「真の」増加が懸念される場合には、その増加が染色体の損失によるものか、又は染色体の切断に起因するかを立証する必要がある (注 17 参照)。例えば紡錘体阻害剤による異数性の誘発は、非線形の用量相関反応性を示すという証拠がある。したがって、染色体の損失には閾値があり、それより低い曝露では染色体損失は生じず、臨床での曝露と比較して適切な安全域があると判断することは可能であろう。

結論として、化合物の遺伝毒性誘発能の評価は、得られた所見全体を考慮に入れ、*in vitro* 及び *in vivo* 両試験の本質的な意義及び限界を認識すべきである。

5.5 がん原性試験で認められた腫瘍発生に関連する追加の遺伝毒性試験

標準的組合せ試験では陰性であるが、がん原性試験で腫瘍の発生頻度の増加を示し、不十分な証拠ではあるが非遺伝毒性の機序が示された化合物に関しては、適切な試験系を用いた追加試験の実施が望まれる。作用機序の理解を助けるための補助的な試験として、*in vitro* 試験における代謝活性化の条件の変更や、腫瘍が誘発された標的臓器における遺伝子損傷を指標とする *in vivo* 試験、例えばコメット試験あるいはアルカリ溶出試験のような DNA 鎖切断試験、肝 UDS 試験、DNA 共有結合性 (例えば、³²P ポストラベル法)、導入遺伝子における突然変異誘発又は腫瘍関連遺伝子の遺伝的変異の分子レベルでの解析が含まれる (Kasper ら、2007)。

6. 注記

1. *In vitro* の小核試験は国際共同研究 (Kirsch-Volders ら、2003) において幅広く評価され、ECVAM (Corvi ら、2008) によって有効性が検証され、OECD ガイドライン 487 (2010) として策定された。
2. 標準的組合せの *in vitro* 試験では陰性若しくは弱陽性又は相反する結果しか得られないが、骨髄の染色体損傷試験で明らかに陽性となる遺伝毒性発がん物質が少数ながら存在する。

プロカルバジン、ヒドロキノン、ウレタン、ベンゼンなどがこの分類に入る。企業の調査から、その他のいくつかの例が Tweats ら (2007,II) によって紹介されている。

3. 原則として、造血細胞の小核は、骨髄ではいかなる動物種においても評価可能であり、また、血液では全身を循環している小核含有赤血球が脾臓で取り除かれない動物種において評価可能と考えられる。マウスの場合、血液では多染性赤血球を用いて小核の計測が可能であり、約4週間以上の継続投与をした場合には成熟(正染性)赤血球も使用可能である。ラットの場合、小核を有する赤血球は速やかに血液中から取り除かれるが、一連の染色体異常誘発物質及び異数性誘発物質による小核の誘発がラットの網赤血球を用いて検出可能なことが確認されている(Wakataら、1998; Hamadaら、2001)。ラットの血液は新しく生成された網赤血球を確実に観察でき(Hayashiら、2007; MacGregorら、2006)、骨髄よりも低い血液での小核頻度を検出できる適当な統計学的な感度を与えられるだけの十分な観察細胞数があれば、小核試験に利用できる(Kisslingら、2007)。骨髄又は血液で、自動計測又はマニュアル計測のいずれの方法を選択しても、各試験施設は動物間のばらつきを下回るレベルに測定誤差を維持できるだけの最小限の観察細胞数を決定する必要がある。

イヌ又はアカゲザルを用いた小核誘発の検討が行われており、現在利用可能となっている(Harperら、2007; Hotchkissら、2008)。このような代替動物種が有用とされる一例として、げっ歯類では十分に認められないがイヌやサルでは生成されるようなヒト代謝物の評価があげられる。

4. 試験の組合せに示す2つのオプションは同様に適切であるが、それぞれの被験物質特有の性質により、一方がより適切となる場合がある。例えば、実験動物における全身曝露が、臨床で予想される曝露と同等かそれ以下の場合には、*in vitro* 試験を選択すべきである：オプション1(2.3.4及び4.4.1参照)。一方、オプション2は肝臓での試験も含んでおり、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に推奨される。
5. ある種の警告部分構造を有する化学物質は、発がん性や変異原性とある程度関連があると考えられている。警告部分構造の例として、アルキル化求電子中心、不安定型エポキシド、芳香族アミン類、アゾ構造、N-ニトロソ基及び芳香族ニトロ基があげられる(AshbyとPaton、1994)。特別な警告部分構造を有するある種の化学物質では、プロトコールの特別な変更/追加による試験が遺伝毒性の検出に重要であることが明らかにされている(例えばアゾ基含有化学物質、配糖体、活性化にニトロ還元を必要とするニトロイミダゾールのような化学物質、代謝活性化に別種のげっ歯類のS9を必要とするフェナセチンのような化学物質)。
6. 皮膚及び結腸における*in vivo* 小核試験が開発されている(Hayashiら、2007)。また、これらの組織ではDNA損傷試験も用いることが可能である。
7. プレート法又はプレインキュベーション法で検出感度に差のある場合があるが、量的な

違いのみで、結果が逆転することはない (Gatehouse ら、1994)。両プロトコールで試験した製薬企業の経験では、2つの試験法で異なる結果は得られておらず、また、IWGTの報告書 (Gatehouse ら、1994) ではプレインキュベーション法でより容易に検出できるとされる化学物質は一般に医薬品ではなく、また、肝臓を用いる *in vivo* 遺伝毒性試験で陽性を示すものであった。これらには短鎖の脂肪族ニトロソアミン；二価金属；アルデヒド (例えばホルムアルデヒド、クロトンアルデヒド)；アゾ色素 (例えばバターイエロー)；ピロリジジナルカロイド；アリル化合物 (イソチオシアン酸アリル、塩化アリル) 及びニトロ (例えば芳香族、脂肪族) 化合物が含まれる。

8. *In vitro* のほ乳類培養細胞試験における最大濃度を 1 mM とする理論的根拠は以下のとおりである。試験の標準的組合せはエームス試験と *in vivo* 試験が含まれている。この標準的組合せは、個別の試験結果のみに頼らずに遺伝毒性発がん物質を検出することに最適化されている。エームス試験又は *in vivo* 遺伝毒性試験では検出されないが、*in vitro* のほ乳類細胞試験の 1 mM 以上でのみ検出されるような化学物質 (DNA を損傷する発がん物質) が存在する可能性は低い。さらに、上限の 1 mM は、既知医薬品の組織中の濃度を含めた臨床曝露より高く (Goodman と Gilman、2001)、また、*in vivo* の非臨床試験で一般的に達する量より高いことからハザード同定の色合いが強い。ヌクレオシドアナログ及びいくつかの抗生物質のように、ある種の薬物は極めて高い臨床曝露を必要とすることが知られている。既存薬物との強さの比較は興味のあるところであり、1 mM の上限以上での評価が必要であったとしても、ヒトの安全性を最終的に決定するのは *in vivo* 試験である。極めて低い分子量 (200 以下のような) の医薬品の場合には、より高い試験濃度を考慮すべきである。

9. ある種の遺伝毒性発がん物質は、ある程度の細胞毒性を引き起こす濃度で試験しない限り、*in vitro* 遺伝毒性試験では検出されないが、DNA に直接損傷を与えるような物質は一般に中等度の毒性レベルで検出可能である (Greenwood ら、2004)。細胞毒性が強くなるに従って、試験化合物又はその代謝物による直接的な DNA 損傷以外の作用により、遺伝毒性ではなく細胞毒性に関連した「陽性」結果をもたらすことがある。このような非 DNA 損傷性によって、二次的におこる間接的 DNA 損傷の誘発は、ある閾値濃度以上で引き起こされることが多い。このような細胞機能障害が薬理的に妥当性のあるような低濃度で引き起こされるとは考えられない。

染色体異常誘発能の弱い既知発がん物質であっても、細胞遺伝学的試験においては、50%より低い細胞増殖抑制濃度で陽性結果を示す。一方、DNA 損傷、変異原性又はがん原性を有しない化学物質でも、細胞毒性が認められるような濃度で染色体切断を誘発することがある。*In vitro* 細胞遺伝学的試験 (染色体異常試験及び *in vitro* 小核試験) において、約 50%の増殖抑制を上限とすることは適切と考えられる。

株化細胞を用いた細胞遺伝学的試験では、細胞を計数するだけでは毒性を過小評価するおそれのあることが知られているため、時間経過における細胞集団増殖の測定値 (培

養中の細胞数の変化を対照と比較して測定する。例えば細胞集団倍加[PD；注 10 参照]と呼ばれる方法)が、細胞毒性の指標として有用であることが示されている。リンパ球の培養では、約 50%を超えない分裂抑制が十分と考えられる。このためには、分裂中期像の異常をみる試験の場合は分裂指数 (MI) を、*in vitro* 小核試験では細胞分裂阻止に基づく指標を用いることができる。さらに *in vitro* 小核試験については、小核は細胞分裂に続く間期で計数されることから、細胞周期全体が回っているのを確認することが重要である。このためには、細胞分裂はさせないが核分裂には影響しないサイトカラシン B の使用が考えられ、二核細胞における小核を計数すればよいことになる (リンパ球を用いる場合に推奨される)。株化細胞では、上に記した時間経過による細胞集団倍加 (PD) など、細胞増殖を他の方法で証明することもできる (Kirsch-Volders ら、2003)。

MLA にはソフトアガー法及びマイクロウェル法があるが、ともに最高濃度を相対総増殖率 (RTG) が 20%に近い (10~20%) 濃度に設定することで適切な感受性が得られる (Moore ら、2002)。公表データを現在の基準で再調査すると、RTG が 20%未満の濃度でのみ MLA 結果が陽性であったげっ歯類発がん物質は極めて少数であり、この範疇の化学物質については遺伝毒性発がん物質である信頼に足る証拠がない。20%以下の RTG でのみ突然変異の増加がみられる場合には結果の解釈を慎重に行う必要があり、RTG が 10%以下の濃度のみで突然変異の誘発が認められる場合、陽性とは判断できない。

結論として、細胞増殖/生存細胞率の減少が、細胞遺伝学的試験では 50%、MLA では 80%に達するかそれ以上で得られた陽性結果の解釈には注意が必要である。このような細胞毒性/コロニー形成率 (clonal survival) レベルで処理された細胞を評価することは、感度を高め、不適切な陽性結果をもたらす危険性を増加させる。遺伝毒性試験の組合せは、強い細胞毒性発現用量を用いた単一の *in vitro* ほ乳類細胞試験に頼らなくても、適切な感度を保証できるようデザインされている。

適切な毒性の範囲を得るため、広い範囲の濃度を用いた用量設定のための予備試験は有用であるが、遺伝毒性試験ではしばしば極めて狭い間隔 (公比 2 以下) で数段階の濃度を用いることが重要である。標準的な設定数以上の用量で試験が実施されることもありうるが、すべての処理濃度群について評価する必要はない。正確な 50%の増殖抑制あるいは 80%の RTG 抑制を示す濃度で試験するために、何度も試験を繰り返すことを意図するものではない。

10. *In vitro* の細胞遺伝学的試験において、細胞毒性を評価するためには、細胞の計数では細胞毒性を過小に見積もることがあるため細胞毒性評価には相対細胞増殖率が適している (Greenwood ら、2004)。50%増殖抑制レベルを算定するために細胞集団倍加 (用語の解説を参照) を用いると、DNA に直接損傷を与える物質は確実に陽性となる一方で、変異原性あるいは発がん性を有さない物質の陽性頻度が減少することが示されている。
11. 骨髄の分裂中期細胞が使用されるのと同様に、被験物質を 1 回以上投与された試験動物から採取して培養したリンパ球の分裂中期における染色体異常を調べるのが有用な場

合がある。循環しているリンパ球は複製しないため、遺伝毒性作用に複製が必要な薬剤（例えばいくつかのヌクレオシドアナログ）では、通常のリンパ球細胞を用いた場合には検出されないと考えられる。ある種のリンパ球の寿命は長いため、原理的に修復されないDNA損傷の蓄積が起こる可能性があり、これらの細胞が *in vitro* で分裂を誘導された時に染色体異常が増加する可能性がある。*In vivo* のリンパ球試験は染色体異常誘発能を調べるための追加試験として有用となりうるが、一般には、造血細胞の小核試験に加え、肝臓のような他の組織を用いた方が、より多くの情報が得られる。すなわち薬物及び代謝物の曝露がしばしば肝臓でより高いためである。

12. 試験の組合せに第2の *in vivo* 試験を含めるのは、薬物やその代謝物に十分に曝露される組織を使用することにより遺伝毒性がないことを保証するためである；遺伝毒性を有すると判断される発がん物質のいくつかは肝臓を用いる試験では陽性結果を示すが、骨髄を用いる *in vivo* 細胞遺伝学的試験では陰性を示すことがある。これらの例は、適切な代謝活性化能の欠如又は活性中間体が骨髄の血液系細胞には到達していないことを反映したものであろう。

DNA鎖切断試験、DNA付加体試験及び導入遺伝子の突然変異試験は多くの組織に適用できるという利点がある。それらすべての *in vivo* 試験について、国際的に合意されたプロトコールはまだないが、UDS試験に加え、DNA鎖切断試験（コメット試験及びアルカリ溶出試験）、DNA付加体（共有結合）測定及びげっ歯類を用いたトランスジェニック遺伝子突然変異試験に関する多数の公表データや、推奨されるプロトコールがある。MLAで陽性を示し、主に大きなコロニーを誘発するが、*in vitro* 分裂中期細胞試験で染色体切断を示さない化合物に対しては、トランスジェニックマウス遺伝子突然変異試験のような *in vivo* 突然変異試験がDNA鎖切断試験よりも優先度が高いと考えられる。UDS試験は、大きなDNA付加体を誘発、あるいは細胞を用いる復帰突然変異（エームス）試験陽性の化合物に対して有用と考えられる。

細胞毒性はDNA鎖切断を誘発するため、DNA鎖切断試験の結果から混乱を招かぬよう注意深い細胞毒性評価が必要である。細胞毒性の問題は、*in vitro* アルカリ溶出試験では十分にその特性が評価されているが（Storerら、1996）、コメット試験では完全には評価されていない。原則として、DNA鎖切断試験を反復投与毒性試験で行う場合は適切な用量設定と採取時間が重要である。

成熟動物の肝臓は分裂が盛んな組織ではないことから、第2の試験としては非細胞遺伝学的指標が汎用される。しかし、部分肝切除や幼若ラット（Hayashiら、2007）などの利用により肝細胞の分裂が認められれば、肝臓を用いた小核試験は実施可能であり、既知の遺伝毒性物質を検出できる。

13. メチルセルロース水溶液に代表されるような水溶性溶媒では通常問題ないが、Tween 80のような溶媒では反復投与可能な容量は単回投与の30分の1程度である。
14. 毒性試験において、曝露の測定などの目的で追加の採血が計画されている場合には注意

を要する。そうした失血が小核試験結果に影響を与えることがある。すなわち、失血により刺激された赤血球の新生が小核を有する赤血球を増加させることがある。

15. 小核の増加は、遺伝毒性物質を投与しなくても赤血球生成障害（再生性貧血；髄外造血など）、ストレス、低体温及び高体温により生ずる（Tweatsらによる総説、2007J）。血液中には、脾臓の機能変化が血液からの小核含有赤血球細胞の除去に影響を及ぼし、循環する小核含有赤血球の増加をきたすと考えられる。

16. 短期試験あるいは反復投与毒性試験における陽性対照：

小核（及びその他の細胞遺伝学的）試験における陽性対照の目的は、標本観察者が小核の増加を間違いなく検出できることを証明することである。これには、陽性対照を短期投与した少数の動物（片性で可）を用いる定期的な試験（数ヶ月毎）から採取したサンプルを使用すればよい。マニュアル計測では、このようなスライドを各試験で観察するコード化したスライドに加えることが可能である。陽性対照のスライドは、その染色特性や小核頻度によって標本観察者に容易に識別されてはならない。自動計測では、各試験で適切な品質保証対照サンプルを使用する。

他の *in vivo* 遺伝毒性試験における陽性対照の目的は、選択した動物種、組織及びプロトコールによる試験が DNA 損傷/変異原性の増加を間違いなく検出できることを証明することである。試験施設が、複数回の独立した試験において適切な陽性対照物質を常に検出可能であることを証明すれば、一般的には陽性対照と被験物質の実験条件も変わらないことを十分に示している。しかしながら、現在のところ、コメット試験では同時の陽性対照をおくことが望ましいと考えられる。

17. 小核の誘発が主に染色体損失によるものか、又は染色体切断によるものかを証明するには、動原体の存在を確認するために、*in vitro* 又は *in vivo* での小核の染色が有効である。例えば、動原体部位の 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）又はキネトコア蛋白への標識抗体を使用する。誘発された小核の大部分が動原体陽性であれば、染色体損失が示唆される（コルヒチン及びビンブラスチンのような強力なチューブリン重合阻害物質でも 100%のキネトコア陽性小核を生ずることはなく、大体 70~80%程度であるが、リスク評価の際はまず異数性誘発物質として認められている。）。代替法として、分裂中期の構造異常を調べる *in vitro* 又は *in vivo* 試験がある；陰性であれば、小核の誘発は染色体損失に関連することを意味する。

18. 標準的な方法で誘導された S9 mix は、ヒト S9 よりも高い活性化能を有し、特定の補因子が供給されない限り第 2 相の代謝（解毒）能を欠いている。また、*in vitro* では高濃度の被験物質の場合、非特異的な活性化が生ずる可能性がある（Kirklandら、2007）。ヒト S9 又は他のヒトに関連した代謝活性化系を用いた遺伝毒性試験は有用である。前臨床試験で用いた動物種（非誘導のマイクロゾーム、肝細胞又は *in vivo* 組織を含む。）又はヒト試料における既知の代謝物プロファイルと、遺伝毒性試験の代謝物プロファイルを解析し、

比較する事も試験結果の関連性を判断するのに有用であり (Ku ら、2007)、その追加試験では通常、肝臓を用いた *in vivo* 試験に焦点を当てる。S9 存在下の *in vitro* 試験で陽性結果を示す化合物が *in vivo* では遺伝毒性を誘発しない可能性があり、それは、*in vitro* で生成される代謝物が *in vivo* では生成されないか、生成されても極めて少量の場合又は代謝的に解毒されるか若しくは速やかに排泄されるためであり、このような場合、*in vivo* ではリスクがないことを示唆している。

7. 用語の解説

アルカリ溶出試験 (*Alkaline elution assay*) : DNA 鎖切断試験を参照。

異数性 (*Aneuploidy*) : 細胞あるいは生物種に固有な染色体基本数からずれていること。

塩基対置換 (*Base substitution*) : 塩基配列において1つ以上の塩基が他の塩基と置き換わっていること。これにより元のものとは異なるたん白質が合成される可能性がある。

細胞増殖 (*Cell proliferation*) : 細胞分裂して娘細胞をつくる能力。

動原体/キネトコア (*Centromere/kinetochore*) : 姉妹染色分体の接着及び娘染色体の極への移動と娘核への封入を確実にする紡錘糸の付着に重要な染色体の構造。

染色体 (構造) 異常誘発物質 (*Clastogen*) : 染色体の構造的切断を引き起こす物質で、通常光学顕微鏡で検出可能。

コロニー形成率 (*Cloning efficiency*) : 1 個の細胞がクローンを形成する割合。通常少量の細胞を適切な培養条件下で播種した後に測定する。

コメット試験 (*Comet assay*) : DNA 鎖切断試験を参照。

培養飽和密度 (*Culture confluency*) : 目視検査による培養における細胞密度の飽和状態。

細胞遺伝学的評価 (*Cytogenetic evaluation*) : 有糸分裂及び減数分裂における染色体構造の光学顕微鏡による解析、あるいは小核の解析。

DNA 付加体 (*DNA adduct*) : 化学物質と DNA が共有結合した生成物。

DNA 修復 (*DNA repair*) : DNA 損傷後の本来の DNA 配列への再構成。

DNA 鎖切断 (*DNA strand breaks*) : DNA の単鎖あるいは二本鎖切断。

DNA 鎖切断試験 (*DNA strand break assay*) : アルカリ処理により、特定の型の DNA 損傷が一本鎖切断に転換される。これらはフィルターを通過する移動率を測定するアルカリ溶出試験、単細胞ゲル電気泳動試験又はコメット試験 (スライドガラス上に単層ゲルを重層し、そこに包埋された細胞に電流をあて、電気泳動する方法。DNA の短い断片が核の外側に移動し、「彗星の尾」の様な像を呈し、DNA の移動した程度は、細胞を染色することにより顕微鏡下で計測する。) で検出可能である。

フレームシフト突然変異 (*Frameshift mutation*) : 遺伝子の塩基配列に1個又は2個の塩基が付加 (挿入) 又は欠失した突然変異 (遺伝コードの変化)。これにより、元のものとは異なる、又は短い蛋白質が合成される可能性がある。

遺伝子突然変異 (*Gene mutation*) : 単一の遺伝子又はその調節遺伝子の配列内に生じた恒久的な変化。変化としては点突然変異、挿入、欠失などがある。

遺伝的指標 (*Genetic endpoint*) : 対象とする遺伝的変化の型又はそのクラス (例えば、遺伝子突然変異、染色体異常、DNA 鎖切断、DNA 修復、DNA 付加体の生成など)

遺伝毒性 (*Genotoxicity*) : 誘発の機序に関係なく、遺伝物質に生じた有害な変化の総称。

小核 (*Micronucleus*) : 細胞質中の核 DNA の粒子:染色体全体又は染色体断片を含んでいる。

分裂指数 (*Mitotic index*) : 染色体標本 (スライド) において、細胞分裂していない (間期) 細胞を含む全細胞中に占める各段階の分裂細胞の割合。

染色体の数的変化 (*Numerical chromosome changes*) : 固有の一倍体あるいは二倍体の染色

体数から染色体の数に変化していること；株細胞では、染色体数のモード値から外れていること。

プラスミド (*Plasmid*) : バクテリアの通常の遺伝子とは別の微小遺伝子。プラスミドは宿主の遺伝子に挿入されるか、染色体外の微小遺伝子として存在する。

点突然変異 (*Point mutations*) : 遺伝コードの変化のことで、通常は単一の DNA 塩基対に限定される。

多染色性赤血球 (*Polychromatic erythrocyte*) : 細胞分化の途中にあるリボゾームを持つ未成熟な赤血球で、成熟した正染色性赤血球 (リボゾームを欠く) とは RNA の特異染色により容易に判別ができる。

倍数性 (*Polyploidy*) : 染色体のモード値の数的な異常、半数体数のおよその倍数。核内倍加は、分裂中期に染色体の対が「二重染色体」として結合している状態を意味する。

細胞集団倍加あるいは培養増殖 (*Population doubling or culture growth*) : これはいくつかの方法で算出されうる；適切な計算式の一例を示す：集団倍加 = 処理開始時の細胞数 (初期値) (X_0) に対する最終時の細胞数 (N) の割合を対数化し、2 の対数で割った値。PD = $[\log(N \div X_0)] \div \log 2$

組換え (*Recombination*) : DNA 切断とそれに続く均衡あるいは不均衡な再結合。

RTG (相対総増殖率) (*RTG [relative total growth]*) : この細胞毒性の計算値は、被験物質処理後の細胞増加率 (処理開始から処理後 2 日目までの細胞損失及び細胞増殖に基づく計算値) と処理後 2 日の細胞生存率の積により求められる。

単細胞ゲル電気泳動試験 (*Single cell gel electrophoresis assay*) : コメット試験。DNA 切断試験を参照。

生存 (率) (変異原性試験における) (*Survival [in the context of mutagenicity testing]*) : 死細胞を含む全細胞に占める生存細胞の割合で、通常、ある期間の処理後、細胞染色法あるいはコロニー形成法により求める。

導入遺伝子 (*Transgene*) : 体細胞や生殖系列細胞の宿主遺伝子に組み込まれた外来の遺伝子。

不定期 DNA 合成試験 (UDS) (*Unscheduled DNA synthesis [UDS]*) : DNA 損傷によって誘発される S 期以外の DNA 合成。通常 DNA 除去修復と関連している。

8. 参考文献

Ashby, J., D. Paton, "The influence of chemical structure on the extent and sites of carcinogenesis for 522 rodent carcinogens and 55 different human carcinogen exposures," *Mutation Research* 286:3-74, 1994.

Corvi, R., S. Albertini, T. Hartung, S. Hoffmann, D. Maurici, S. Pfuhler, J. van Benthem, P. Vanparys, "ECVAM Retrospective Validation of the *in vitro* micronucleus test (MNT)", *Mutagenesis*, submitted 2007.

Gatehouse, D., S. Haworth, T. Cebula, E. Gocke, L. Kier, T. Matsushima, C. Melcion, T. Nohmi, T. Ohta, S. Venitt, E. Zeiger, "Report from the working group on bacterial mutation assays: International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures," *Mutation Research* 312: 217-233, 1994

Goodman & Gilman "The Pharmacological Basis of Therapeutics". J. G. Hardman, L. E. Limbird, A. G. Gilman (Eds.), McGraw-Hill Professional, New York; 10th edition (August 13, 2001).

Greenwood, S.K., R.B. Hill, J.T. Sun, M.J. Armstrong, T.E. Johnson, J.P. Gara, S.M. Galloway, "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," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 43:36-44, 2004.

Hamada S., S. Sutou, T. Morita, A. Wakata, S. Asanami, S. Hosoya, et al., "Evaluation of the rodent micronucleus assay by a 28-day treatment protocol: summary of the 13th collaborative study by the collaborative study group for the micronucleus test (CSGMT)/Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS)," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 37:93-110, 2001.

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.

Hayashi, M., J.T. MacGregor, D.G. Gatehouse, I. Adler, D.H. Blakey, S.D. Dertinger, G. Krishna, T. Morita, A. Russo, S. Sutou, "*In vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. II. Some Aspects of Protocol Design Including Repeated Treatments, Integration With Toxicity

Testing, and Automated Scoring," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35:234-252, 2000.

Hayashi, M., J.T. MacGregor, D.G. Gatehouse, D.H. Blakey, S.D. Dertinger, L. Abramsson-Zetterberg, G. Krishna, T. Morita, A. Russo, N. Asano, H. Suzuki, W. Ohyama, D. Gibson, "In vivo erythrocyte micronucleus assay. III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test," *Mutation Research*, 627:10-30, 2007.

Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H-J Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R. Tindall, N. Yajima, "In vivo transgenic mutation assays", *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35:253-259, 2000.

Hotchkiss CE, Bishop ME, Dertinger SD, Slikker W, Moore MM, MacGregor JT. Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes IV: an index of chromosomal damage in the rhesus monkey (*macaca mulatta*). *Toxicol Sci* 2008 ;102:352-8.

Kasper, P., Y. Uno, R. Mauthe, N. Asano, G. Douglas, E. Matthews, M. Moore, L. Müller, M. Nakajima, T. Singer, G. Speit, "Follow-up testing of rodent carcinogens not positive in the standard genotoxicity testing battery: IWGT workgroup report," *Mutation Research*, 627:106-116, 2007.

Kenelly, J.C., R. Waters, J. Ashby, P.A. Lefevre, B. Burlinson, D.J. Benford, S.W. Dean, I deG. Mitchell, "In vivo rat liver UDS assay. In: Supplementary Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures, ed Kirkland D.J. and Fox M., Cambridge University Press, pp 52-77, 1993

Kirkland, D.J., S. Pfuhler, D. Tweats, M. Aardema, R. Corvi, F. Darroudi, A. Elhajouji, H. Glatt, P. Hastwell, M. Hayashi, P. Kasper, S. Kirchner, A. Lynch, D. Marzin, D. Maurici, J-R. Meunier, L. Müller, G. Nohynek, J. Parry, E. Parry, V. Thybaud, R. Tice, J. van Benthem, P. Vanparys, P. White, "How to reduce false positive results when undertaking *in vitro* genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of the ECVAM workshop," *Mutation Research*, 628:31-55, 2007.

Kirsch-Volders, M., T. Sofuni, M. Aardema, S. Albertini, D. Eastmond, M. Fenech, M. Ishidate, S. Kirchner, E. Lorge, T. Morita, H. Norppa, J. Surralles, A. Vanhauwaert, A. Wakata, "Report from the *in vitro* micronucleus assay working group", *Mutation Research*, 540:153-163, 2003.

Kissling, GE., S.D. Dertinger, M. Hayashi, J.T. MacGregor., "Sensitivity of the erythrocyte micronucleus assay: Dependence on number of cells scored and inter-animal variability", *Mutation Research* 634:235-240, 2007.

Ku, W.W., A. Bigger, G. Brambilla, H. Glatt, E. Gocke, P.J. Guzzie, A. Hakura, M. Honma, H.-J. Martus, R.S. Obach, S. Roberts, "Strategy for genotoxicity testing-Metabolic considerations," *Mutation Research*, 627:59-77, 2007.

MacGregor J.T., M.E. Bishop, J.P. McNamee, M. Hayashi, N. Asano, A. Wakata, M. Makajima, J. Saito, A. Aidoo, M.M. Moore, S.D. Dertinger, "Flow Cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat", *Toxicological Sciences*, 94:92-107, 2006.

Moore MM, Honma M, Clements J, Harrington-Brock K, Awogi T, Bolcsfoldi G et al. Mouse lymphoma thymidine kinase locus gene mutation assay: follow-up international workshop on genotoxicity test procedures—New Orleans, Louisiana, April 2000. *Environ Mol Mutagen* 2002;40:292-9.

Moore MM, Honma M, Clements J, Bolcsfoldi G, Burlinson B, Cifone M et al. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: follow-up meeting of the international workshop on genotoxicity testing—Aberdeen, Scotland, 2003—Assay acceptance criteria, positive controls, and data evaluation. *Environ Mol Mutagen* 2006;47:1-5.

Müller, L, P. Kasper, "Human biological relevance and the use of threshold arguments in regulatory genotoxicity assessment: Experience with pharmaceuticals." *Mutation Research*, 464: 9-34, 2000.

OECD Guidelines for Genetic Toxicology (1997) , www.oecd.org/dataoecd.

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", *Mutation Research*, 257:147-204, 1991.

Storer, R.D., T.W. McKelvey, A.R. Kraynak, M.C. Elia, J.E. Barnum, L.S. Harmon, W.W. Nichols, J.G. DeLuca, "Revalidation of the *in vitro* alkaline elution/rat hepatocyte assay for DNA damage: improved criteria for assessment of cytotoxicity and genotoxicity and results for 81 compounds," *Mutation Research*, 368:59-101, 1996.

Suzuki, H., N. Ikeda, K. Kobayashi, Y. Terashima, Y. Shimada, T. Suzuki, T. Hagiwara, S. Hatakeyama, K. Nagaoka, J. Yoshida, Y. Saito, J. Tanaka, M. Hayashi, "Evaluation of liver and peripheral blood micronucleus assays with 9 chemicals using young rats A study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) - Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS)," *Mutation Research*, 583: 133-145, 2005

Thybaud, V., M. Aardema, J. Clements, K. Dearfield, S. Galloway, M. Hayashi, D. Jacobson-Kram, D. Kirkland, J. T. MacGregor, D. Marzin, W. Ohyama, M. Schuler, H. Suzuki, E. Zeiger, "Strategy for genotoxicity testing: Hazard identification and risk assessment in relation to *in vitro* testing," *Mutation Research*, 627:41-58, 2007.

Tweats, D. J., D. Blakey, R. H. Heflich, A. Jacobs, S. D. Jacobsen, T. Morita, T. Nohmi, M. R. O'Donovan, Y. F. Sasaki, T. Sofuni, R. Tice, "Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory *in vivo* tests. I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards," *Mutation Research*, 627:78-91, 2007, I.

Tweats, D. J., D. Blakey, R. H. Heflich, A. Jacobs, S. D. Jacobsen, T. Morita, T. Nohmi, M. R. O'Donovan, Y. F. Sasaki, T. Sofuni, R. Tice, "Report of the IWGT working group on strategy/interpretation of regulatory *in vivo* tests. II. Identification of *in vivo*-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test," *Mutation Research*, 627:92-105, 2007, II.

Wakata, A., Y. Miyamae, S. Sato, T. Suzuki, T. Morita, N. Asano, T. Awogi, K. Kondo, M. Hayashi, "Evaluation of the Rat Micronucleus Test with Bone Marrow and Peripheral Blood: Summary of the 9th Collaborative Study by CSGMT/JEMS • MMS," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 32:84-100, 1998.