

平成26年度 日本環境変異原学会公開シンポジウム  
レギュラトリーサイエンス(平成26年5月24日)

# 環境変異原学会レギュラトリー サイエンスWGと最近の動き

本間正充

(国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部)

# 日本環境変異原学会

## The Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS)

### 【目的】

人間・生物・地球環境における突然変異原、とくに公衆の健康に重大な関係を有する変異原と、これに関連する基礎研究の推進ならびに関連情報技術の伝達を目的とする。

### 【設立】

昭和47年8月21日

### 【当時の環境・化学物質の問題点】

- ・ 四日市公害事件、水俣病、イタイイタイ病
- ・ スモン病
- ・ PCB事件
- ・ AF-2事件

# 日本環境変異原学会におけるレギュラトリーサイエンスの実践

環境変異原研究に携わる研究者は、医薬品、農薬、食品添加物等の安全性が十分な科学的根拠に基づいた予測、評価、判断によって保証されるように、自分の研究成果をこれらガイドラインに反映させ、社会にとって望ましい内容と方向に生かすことに努力すべきである。このような学問を「レギュラトリーサイエンス」と言う。環境変異原研究分野で、レギュラトリーサイエンスの実践のためには、国内外の各種遺伝毒性試験ガイドラインの策定に関与することが重要である。

2012年5月の理事会・評議員会で承認を得て、レギュラトリーサイエンスワーキンググループとして発足

# 日本環境変異原学会/レギュラトリーサイエンスWG

40名(2012年12月)

大学:	5
公的研究機関:	11
受託機関:	9
製薬・化学メーカー:	15

## 【当面の活動内容】

- OECD遺伝毒性試験改訂への助言
- ICHガイドラインへの助言
- JaCVAMへの協力
- その他

# これまでの活動(1)

2012年12月: OECD-TG473、TG478へのコメント募集

2012年12月: OECD-in vitro 遺伝毒性試験のヒストリカルデータの募集  
協力機関:

- 富士フイルム(笠原)
- 花王(笠松)
- 中外製薬(三島)
- 田辺三菱製薬(山村)
- 大日本住友製薬(足立)
- 安評センター(田中)
- 食薬センター(山影)
- 富山化学(鬼頭)
- 武田薬品工業(橋爪)
- 日本バイオアッセイ(浅倉)
- キヤノン(尾崎)
- 国立衛研(本間)

2013年3月: レギュトリーサイエンス関連文献集チームの発足の案内



## これまでの活動 (2)

2013年3月 : ICH-M7 (Step2)に対するコメント募集

2013年6月 : EURL ECVAM strategy to reduce animal use in genotoxicity testingへのコメント募集。OECD-TG476bisドラフト(ほ乳類細胞TK遺伝子突然変異試験)コメント募集

2013年6月 : OECD in vivo コメットアッセイガイドライン草案第1回コメント募集

2013年10月 : 改訂TG473、TG474、TG475、TG478、TG483、TG487へのコメント募集

2013年12月 : 改訂TG473、TG487 への最終コメント募集。OECDナノ遺伝毒性試験ドラフトガイダンスに関するコメント募集

2014年1月 : OECD in vivoコメットアッセイガイドライン草案最終コメント募集

# OECD遺伝毒性試験の改訂の主なポイント

## In vitro /in vivo共通

- データの解釈
- 陰性背景データの利用
- 観察細胞数
- 試験実施機関の技能
- 判定基準

## In vitro

- 最高用量
- 細胞毒性の指標と、用量設定



# 主な遺伝毒性試験OECDガイドライン

●No.471	細菌を用いる復帰突然変異試験	1997
●No.473	培養細胞を用いる染色体異常試験	1997
●No.474	骨髓あるいは末梢血の赤血球を用いる小核試験	1997
●No.475	骨髓細胞を用いる染色体異常試験	1997
●No.476	培養細胞を用いる体細胞突然変異試験（MLAを含む）	1997
●No.477	ショウジョウバエを用いる伴性劣性致死試験	1984
●No.478	げっ歯類を用いる優性致死試験	1984
●No.479	哺乳類細胞を用いる姉妹染色分体交換試験(SCE)	1986
●No.480	酵母菌を用いる突然変異試験	1986
●No.481	酵母を用いる有糸分裂組換え試験	1986
●No.482	培養細胞を用いるDNA損傷、修復および不定期DNA合成(UDS)試験	1986
●No.483	哺乳類の精原細胞を用いる染色体異常試験	1997
●No.484	マウスを用いる毛色スポットテスト	1986
●No.485	マウスを用いる遺伝性（相互）転座試験	1986
●No.486	哺乳類肝臓細胞を用いるin vivo不定期DNA合成（UDS）試験	1997
●No.487	哺乳類細胞を用いるin vitro 小核試験	2010
●No.488	トランスジェニック動物突然変異試験	2011
●No.	In vivoコメット試験	2014



# In vitro試験での最高用量

## TG 473(染色体異常試験)

### <現行>

16. At least three analysable concentrations should be used. Where cytotoxicity occurs, these concentrations should cover a range from the maximum to little or no toxicity; this will usually mean that the concentrations should be separated by no more than a factor between 2 and  $\sqrt{10}$ . At the time of harvesting, the highest concentration should show a significant reduction in degree of confluency, cell count or mitotic index, (all greater than 50%). The mitotic index is only an indirect measure of cytotoxic/cytostatic effects and depends on the time after treatment. However, the mitotic index is acceptable for suspension cultures in which other toxicity measurements may be cumbersome and impractical. Information on cell cycle kinetics, such as average generation time (AGT), could be used as supplementary information. AGT, however, is an overall average that does not always reveal the existence of delayed subpopulations, and even slight increases in average generation time can be associated with very substantial delay in the time of optimal yield of aberrations. For relatively non-cytotoxic compounds the maximum concentration should be 5  $\mu$ l/ml, 5 mg/ml, or 0.01M, whichever is the lowest.

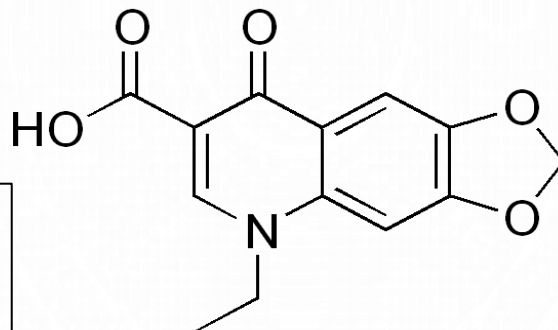
### <改訂>

23. If no precipitate or limiting cytotoxicity ~~\_or precipitate\_~~ is observed, the highest test concentration should correspond to 10 mM, 2 mg/mL or 2  $\mu$ l/mL, whichever is the lowest (37) (43) (44). Where the test chemical is not of defined composition e.g. substance of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials (i.e. UVCBs) (38), environmental extracts etc., the top concentration of the mixture should be higher (e.g. at least 5 mg/ml) to increase the concentration of each of the components. It should be noted however that these requirements may differ for human pharmaceuticals (36).

# In vitro試験での最高用量

Options	Name	Suggested values	Rationale
Option 1	called "OECD"	10 mM or 5000 µg/mL, whichever is lower	current criteria
Option 2	called "ICH"	1 mM or 500 µg/mL, whichever is lower,	currently suggested in ICH S2(R1) for pharmaceuticals
Option 3	called "DK"	1 mM or 500 µg/mL, whichever is higher,	mostly based on re-analysis of NTP database and recent experiments (Fowler and Kirkland). This proposal was with drawn by David Kirkland in favour of Option 6)
Option 4	called "BG"	10 mM or 1000 µg/mL, whichever is lower,	based on extrapolation made from the use of 1000 mg/kg <i>in vivo</i> , and the need to test higher concentrations for low molecular weight compounds
Option 5	called "BG-GD"	10 mM or 2000 µg/mL, whichever is lower,	based on extrapolation made from the use of 2000 mg/kg <i>in vivo</i> for short term treatment, and the need to test higher concentrations for low molecular weight compounds
Option 6	called "VTEL"	4 mM alone when molecular weight is known, and 2000 µg/mL, when molecular weight is unknown	Compromise that takes all other options into account, relies on molarity only except when no information is available on molecular weight, applies a 2.5 fold reduction to the current top concentration, and a 4-fold safety factor to "DK" proposal (based on the analysis of existing data)
Option 7	called "Alternative VTEL" (AVTEL)	4 mM or 2000 µg/mL, whichever is lower	VTEL proposal with a "cap" at 2000 µg/mL to avoid very high concentration in µg/mL for high molecular weight molecules.

# ICH vs. OECD



**Pharmaceutical for urinary tract infection**

Daily dosages : 12-20mg/kg

Negative in CA as a pharmaceutical (ICH)



No concern for Clastogenicity

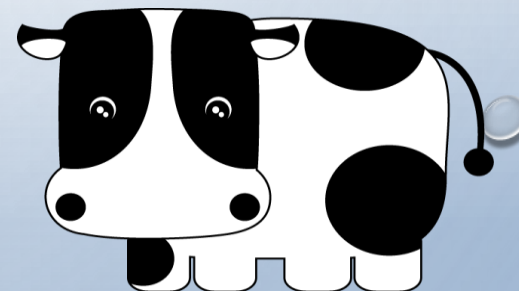
**Oxolinic acid (MW 261)  
(Antimicrobial drug)**

CA positive in equal or more than 2.5 mM in CHL cells without S9

**Agricultural chemical and animal drug**

ADI : 0.021mg/kg

Positive in CA as a chemical (OECD)



Concern for Clastogenicity?

# データの解釈と評価

## TG 473(染色体異常試験)

### <現行>

33. There are several criteria for determining a positive result, such as a concentration-related increase or a reproducible increase in the number of cells with chromosome aberrations. Biological relevance of the results should be considered first. Statistical methods may be used as an aid in evaluating the test results (3)(13). Statistical significance should not be the only determining factor for a positive response.

### <改訂>

43. Providing that all acceptability criteria are fulfilled, a test chemical is considered to be clearly positive if, in any of the experimental conditions examined (see paragraph 27):

- a) at least one of the test concentrations exhibits a statistically significant increase compared with the concurrent negative control,
- b) the increase is dose-related when evaluated with an appropriate trend test,
- c) any of the results are outside the distribution of the historical negative control data (e.g. Poisson-based 95% control limit; see paragraph 39).

When all of these criteria are met, the test chemical is then considered able to induce chromosomal aberrations in cultured mammalian cells in this test system. Recommendations for the most appropriate statistical methods can be found in the literature (46) (47) (48).



# 観察細胞数

## TG 473(染色体異常試験)

### <現行>

27. All slides, including those of positive and negative controls, should be independently coded before microscopic analysis. Since fixation procedures often result in the breakage of a proportion of metaphase cells with loss of chromosomes, the cells scored should therefore contain a number of centromeres equal to the modal number  $\pm 2$  for all cell types. At least 200 well-spread metaphases should be scored per concentration and control equally divided amongst the duplicates, if applicable. This number can be reduced when high numbers of aberrations are observed.

### <改訂>

30. At least 300 well-spread metaphases should be scored per concentration and control to conclude a test chemical as clearly negative (see paragraph 40). The 300 cells should be equally divided among the replicates, if applicable when replicate cultures are used. ~~In case of~~ When single cultures are used per concentration (see paragraph 20), at least 300 well spread metaphases should be scored in this single culture. Scoring 300 cells has the advantage of increasing the statistical power of the test and in addition, zero values will be rarely observed (expected to be only 5%). The ~~is~~ number of metaphases scored can be reduced when high numbers of cells with chromosome aberrations are observed and the test chemical considered as clearly positive.

# 觀察細胞数

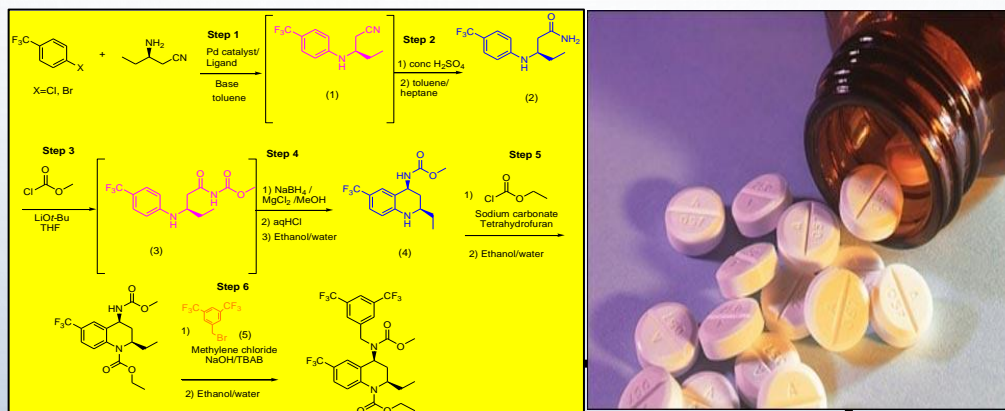
## TG 474 (in vivo小核試験)

### <改訂>

41. All slides or samples for analysis, including those of positive and negative controls, should be independently coded before any type of analysis and should be randomized so the manual scorer is unaware of the treatment condition; such coding is not necessary when using automated scoring systems which do not rely on visual inspection and cannot be affected by operator bias platforms. The proportion of immature among total (immature + mature) erythrocytes is determined for each animal by counting a total of at least 500 erythrocytes for bone marrow and 2000 erythrocytes for peripheral blood (42). At least 4000 immature erythrocytes per animal should be scored for the incidence of micronucleated immature erythrocytes. If the historical negative control database indicates the mean background micronucleated immature erythrocyte frequency is  $<0.1\%$  in the testing laboratory, consideration should be given to scoring additional cells. When analysing samples, the proportion of immature erythrocytes to total erythrocytes in treated animals should not be less than 20% of the vehicle/solvent control proportion when scoring by microscopy and not less than approximately 5% of the vehicle/solvent control proportion when scoring CD71+ immature erythrocytes by cytometric methods (see paragraph 29) (29). For example for a bone marrow assay scored by microscopy, if the control proportion of immature erythrocytes in the bone marrow is 50%, the upper limit of toxicity would be 10% immature erythrocytes.



# ICH-M7ガイドライン(医薬品中に存在する遺伝毒性不純物の評価と管理) の主なポイント



合成過程の試薬、  
反応中間体、副産物

医薬品の分解物

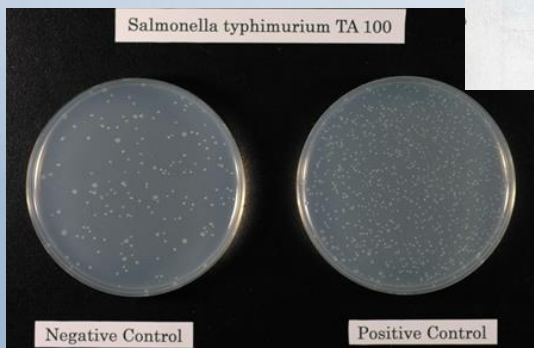
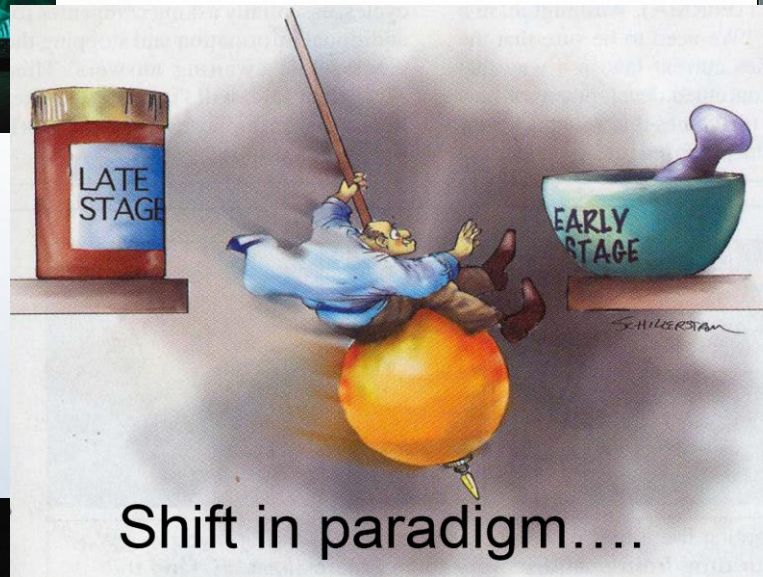
不純物



# 遺伝毒性試験のパラダイムシフト



ハザード同定から  
リスク評価へ



標準試験から  
インテリジェントシステムへ



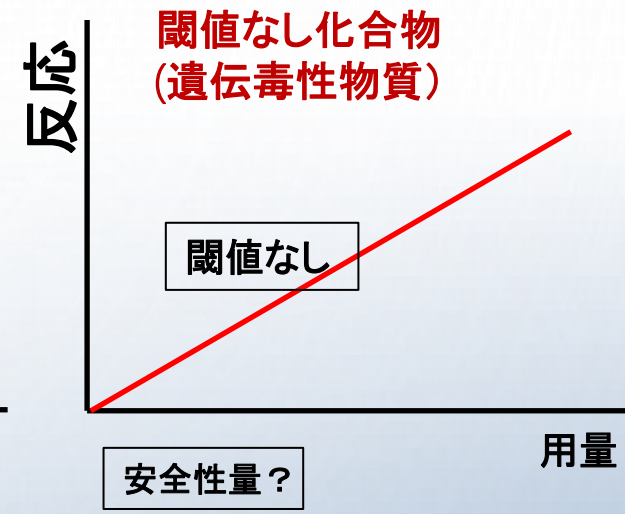
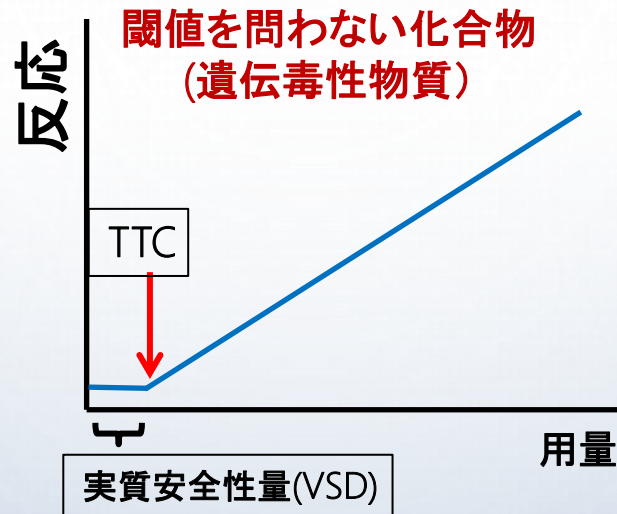
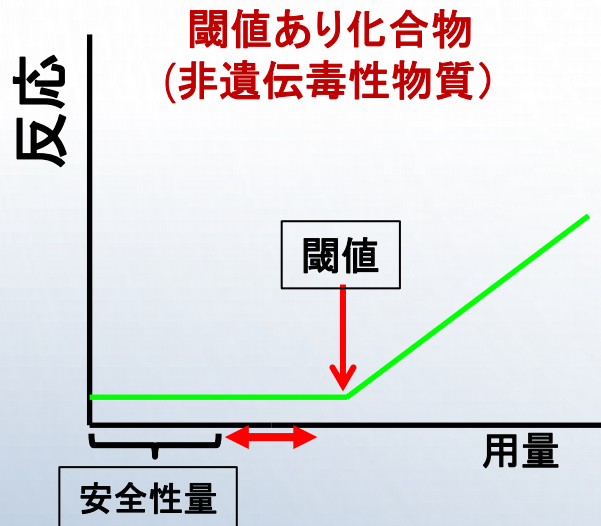


# ICH-M7 ガイドラインの主な新規ポイント (安全性)

---

- 毒性学的懸念の閾値(TTC)の適用
- 構造活性相関(SAR)によるin silico手法を用いて変異原性を評価する

# 遺伝毒性閾値とTTC



# 毒性学的懸念の閾値 (Thresholds of Toxicological Concern ; TTC)

---

すべての化学物質について、その値以下では明らかな健康被害がないとするヒトでの包括的な実質安全性閾値 (Virtual Safety Dose; VSD) の設定について述べた概念。

**$1.5 \mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$**

- 未知の化学物質の10%が発がん物質と仮定して、その99%が $10^{-5}$ の発がんリスクで担保される設定閾値

# リスクの緩和

---

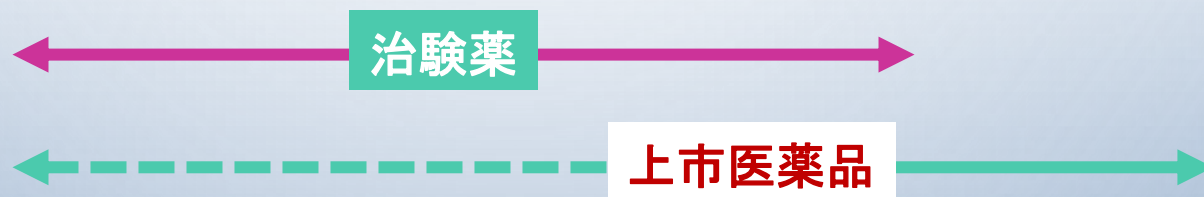
## 新しいTTC の導入 (Generic TTC to Adjusted TTC)

- 曝露期間に応じた許容レベル  
(Less than Lifetime TTC)
- 化合物の特徴に応じた許容レベル  
(Compound-specific TTC or VSD)



# 投与期間に応じた許容摂取レベル (LTC-TTC)

投与期間	≤1ヵ月	>1～12ヵ月	>1～10年	>10年、一生涯 にわたる
1日摂取量 ( $\mu$ g/day)	120	20	10	1.5



# 構造活性相関 (SAR) による in silico 手法による変異原性の評価

互いに相補的な2種類の(Q)SAR予測モデルを用いるべきである。1つは専門的な経験に基づくルールベースの方法、2つ目は統計ベースの手法である。



# まとめ

## レギュラトリーサイエンスとは？

(個人的な意見です)

- 医薬品、農薬、食品添加物等の安全性が十分な科学的根拠に基づいて評価されるようにするために、研究成果をそれらをガイドラインに反映させ、社会にとって望ましい方向に導くための学問。  
(本当に正しいかどうかはわからない？)

規制科学  
調整科学  
道徳科学？