

厚生労働科学研究研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質リスク評価法の国際的バリデーション
に関する研究

平成18年度 総括・分担報告書

主任研究者 大野泰雄

平成19（2006）年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
化学物質リスク評価法の国際的バリデーションに関する研究-----	1
大野泰雄	
II. 分担研究者報告	
1, コメットアッセイバリデーション -----	14
小島 肇	
2, OECD/EDTA validation management 活動戸の調整、 及び内分泌かく乱化学物質試験法のバリデーション -----	279
小野 敦	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	691
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	692

厚生労働科学研究費補助金
(化学物質リスク研究事業)

総括研究報告書

化学物質リスク評価法の国際的バリデーションに関する研究
(H18-化学一般-003)

主任研究者 大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

化学物質の安全性評価に用いられる動物実験の代替法を開発する目的で、DNA 損傷を捉える試験であるコメットアッセイと内分泌かく乱作用を調べるエストロゲン受容体 α (ER α) に対するレポーターアッセイ (HeLa-ER α 法) と Lumi-cell^R 法について欧米の研究機関と協力し、国際的なバリデーションを実施し、その妥当性の検討を行っている。

コメットアッセイは *in vivo* 及び *in vitro* で試験可能であること、いずれの臓器、器官に由来する細胞でも応用可能であること、短期間で結果が得られることから広く利用されているが、研究室間の再現性を検証するバリデーションが実施されておらず、プロトコールの国際的な合意がなされていない。本年度は国際的なバリデーション実行委員会を組織し、コメットアッセイの標準プロトコールの合意を目指した。その結果、国内外の実行委員会での議論および参加施設の予備試験をへて、プロトコールの問題点を解決でき、プレバリデーションを実施できる環境が整った。主なプロトコール作成上の決定事項としては、①Cr1:CD (SD) ラット雄 7-9 週令を 5 匹/群使用、②投与回数 2 回 (1 回目投与の 21 時間後に 2 回目を投与し、その 3 時間後にサンプリング)、③適用臓器は胃および肝臓、④単一細胞を使用、⑤電気泳動は冷蔵で実施、⑥指標はテールに含まれる %DNA 量の平均値である。これらを盛り込んだプロトコールを用いて、2007 年 4 月から半年間かけて、予備試験に参加した 5 施設でプレバリデーションを実施することになった。

HeLa-ER α 法については、これまでにアゴニストアッセイの国内バリデーションが終了し、OECD、EDTA の下部組織である OECD-VMG non-animal に於いて、その成果を報告書した。現在、OECD においてバリデーションの専門家による第三者評価が実施されている。さらに、OECD における評価結果を待って、今後、アンタゴニストアッセイのバリデーションを追加すべく、数種のアンタゴニストについて検討し、系の安定性や信頼性に関する基礎データの取得を行った。Lumi-cell 法については、米国の ICCVAM と EU の ECVAM との共同のもとバリデーション実施のために、国際的な運営委員会を組織し、プロトコールの確定、被験物質の選択を終了した。また、バリデーションに先立って国内参加施設の技術水準や使用する試薬類の検討のため、対照物質による基礎データをとった。その結果、十分な信頼性を示すデータ測定が可能であると判断されたことから、国内参加施設の決定を行い、バリデーションの準備を終了した。

分担研究者

小島 肇 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部
小野 敦 医薬基盤研究所・トキシコゲノミクスプロジェクト

A. 研究目的

既存及び新規化学物質は極めて多くあり、それらの安全性評価を速やかに行う必要がある。しかし、それらを従来動物を用いる安全性試験法で評価するのは時間がかかるだけでなく、経済性や研究資源の配分、動物福祉の面からの問題があり、効率的かつ倫理的な新規試験法が求められ、多くの代替法が開発されてきた。一方、OECDは新規試験法が真に行政目的に合致し、国民の安全を確保するのに有用であるかを客観的に評価するために、バリデーションと行政的受け入れに関する基準を作成した。しかし、多くの試験法を我が国のみで開発するのは不可能であるし、新規試験法について、OECD基準を満足させたバリデーションを行うことも容易ではない。また、本来、安全性評価は国際的に認められた方法で行うべきものである。これらのことから、新規試験法の評価はEUや米国の関連機関と連絡をとり、協力しながら進める必要がある。

本研究では我が国及び欧米で開発された安全性試験法の内、化学物質の安全性評価のための行政試験法として見込みのある方法について、欧米の研究機関と協力して検討し、国際的に受け入れられる方法を確立することを目的とする。即ち、1) 遺伝毒性についてはコメットアッセイの国際的バリデーションを、2) 内分泌かく乱性についてはLumi-cell[®]法及びHeLa細胞をベースとしたエストロゲン受容体 α に対するレポーターアッセイ試験法を評価する。

1) コメットアッセイについて

A. 研究目的

コメットアッセイとは単細胞ゲル電気泳動法とも呼ばれ、単離した細胞または核をアガロースに閉じ込めて融解した後、アルカリ処理で二本鎖 DNA を単鎖にし、電気泳動による泳動パターンの変化により DNA 鎖切断などを検出する方法である。正常な細胞の DNA は非常に大きな分子であり、電気泳動してもほとんど移動せず、球形の核として観察される。一方、DNA 切断が起こっている場合には DNA 断片の大きさに応じて移動し、球形の核を頭に尾を引いた彗星のような泳動パターンとなる¹⁾。

本方法は、in vivo でも in vitro でも試験可能であること、細胞が得られるならばどのような臓器、器官でも試験可能であること、短期間で結果が得られること、初期の DNA 損傷を検出できることから広く利用されている。行政的にも、欧州の規制当局では実施を要求することがあり、FDA Guidance (2006)²⁾にも記載がある。FDA や EPA でも申請データとして受け付けている。

しかし、本方法の正式なガイドラインは策定されていない。UDS の代替法として、試験法の標準化のため 3rd IWGTP at Washington (1999)、4th International Comet Assay Workshop at Ulm (2001)、4th IWGT at San Francisco (2005)においても公定化のため以下のような項目について議論が進められてきた³⁾。しかし、データ不足のためプロトコール一本化はできていない。

- ①適用濃度（複数濃度の適用か、単一濃度の適用か）
- ②電気泳動をする際には細胞か核のどちらを用いるべきか
- ③細胞毒性の測定項目を入れる必要があるか
- ④スコアリング方法
- ⑤陰性、陽性対照のデータ蓄積の必要性

そのため、研究室間の再現性を検証するバリデーションが実施できず、プロトコールの国際的な合意もなされてこなかった。一部で日本環境変異原学会 哺乳類変異原性研究会 (MMS) が 2005 年、②核/細胞の使用に関する問題に決着をつけるため、プレバリデーションを実施し、これらの間には差がないことを証明したのみであり、①、③、④の主な問題が残っていた（⑤のデータの蓄積のためには統一プロトコールが必要）。

このような混沌に終止符を打つべく、本研究班では国際的なバリデーション実行委員会を組織し、本試験の専門家とコンセンサスを取りながら、コメットアッセイの標準プロトコールの合意を目指すことになった。さらにバリデーション研究を実施し、将来的には OECD ガイドラインへの掲載を目指すものである。

B. 研究方法

方法の詳細は小島の分担報告を参照されたい。

要約すると、コメットアッセイの MMS と協力して本試験法の専門家を集め、8月に札幌でセミナーを開催し、このセミナー参加者を含めたコメットアッセイバリデーションのための国際および国内実行委員会を組織した。その組織のメンバーを以下に示す。

1) 国際実行委員会

委員長 林 真 (国立医薬品食品衛生研究所：以下、国立衛研と記す 安全性生物試験研究センター 変異遺伝部)

委員 L. Schectmann (FDA)

R. Tice (NICEATM)

T. Hurtung (ECVAM)

宇野芳文 (三菱ファーマ株式会社)

小島 肇 (国立衛研 安全性生物試験研究センター 薬理部)

2) 国内実行委員会

委員長 林 真

委員 宇野芳文

浅野哲秀 (日東電工株式会社)

中嶋 圓 (食品医農薬安全評価センター)

森田 健 (国立衛研 医薬安全科学部)

本間正充 (国立衛研 安全性生物試験研究センター 変異遺伝部)

山影康次 (食品薬品安全センター 秦野研究所)

小島 肇

3) コンサルタント

B. Burlinson (Huntingdon Life Sciences)

Nobumasa Nakashima (OECD)

D. Lovel (Univ. of Surrey)

B. Young (BioReliance)

大森 崇 (京都大学医学部医学研究系)

佐々木 有 (八戸高専)

大野泰雄 (国立衛研)

田中憲穂 (食品薬品安全センター 秦野研究所)

4) プレバリデーション参加施設

Huntingdon Life Sciences

BioReliance

Syngenta CTL (研究所閉鎖に伴い、実験は実施せず)

Merck Research Laboratories

食品医農薬安全評価センター

食品薬品安全センター 秦野研究所

国際および国内実行委員会、コンサルタントのメンバーのほとんどが札幌に集い開催された第 1 回国際バリデーション実行委員会では、試験法の問題点を明確にした。次にこれらの問題点を加味したプロトコールを作成し、予備試験を行う合意

が得られた。9月以降、プレバリデーション参加5施設の協力を得て予備試験を行った。

その結果を12月に東京で開催した第2回国際バリデーション実行委員会で確認した。得られたデータは生物統計学者の大森 崇准教授が解析し、これをもとにプレバリデーション実施のための最終プロトコール (Ver. 11) を完成させた。この合間に国内実行委員会を3度、MMS および日本環境変異原学会第31回大会中にも会合を持った。

また、プロトコールの討議事項の一つであるスコアリングで大きな比重を占める画像解析ソフトによるばらつきの検討については MMS に研究委託した。MMS では7施設の協力を得て、以下のイメージアナライザーについて検討した。

- ①Komet Ver. 4.0.4&5.5 (Kinetic imaging Ltd)
- ②CometAnalyzer Ver. 1.1.1&1.5 (Youworks)
- ③Cometscore Ver.1.5 (Tri Tek)
- ④Comet Imager Ver.1.20 (Carl Zeiss)
- ⑤Comet Ver. 4.1.1 (Perceptive Instruments)

C. 研究結果

C-1) 画像解析ソフトによるばらつきの検討

7施設のイメージアナライザーのうち、3施設では明らかな陽性イメージを測定できなかった。いずれも古いバージョンの画像解析ソフトであった。

イメージアナライザー間の陰性対照の差 (平均値) は Tail の長さで 1.06~92.6、テールに含まれる %DNA 量で 0.75~9.75、Tail モーメントで 0.02~5.68 であった。

陰性対照および弱い陽性対照物質の間のパラメーターの部分的一致は Tail の長さや Tail モーメントよりも Tail 中の %DNA で小さかった。パラメーターとして、Tail 中の %DNA を利用した場合、もっとも信頼性が高いと考えられる。

C-2) プロトコール作成のための問題点の抽出と対応

国際実行委員会では、それぞれの分野の専門家がセミナーで用いた資料を用いてプロトコール作成のため以下の問題点を抽出し検討した。以下に検討事項を示す。

- ① 単離核か、細胞か
- ② 陽性対照物質および被験物質の選択
- ③ 動物種、試験サイズ、投与方法、サンプリング時間
- ④ スライド調製方法、電気泳動方法、染色方法
- ⑤ 指標および解析方法 (解析ソフト、カテゴリー分類)
- ⑥ 細胞毒性検出のための病理観察の導入
- ⑦ 統計学的解析
- ⑧ 適合基準

この中で、①の問題については、MMS での検討結果が受け入れられ⁴⁾、どちらを用いても結果に影響しないとの合意を得た。議論の末、予備試験のためのプロトコールとして、②~④に関する決定ま

たは検討事項を表1に示した。⑤のソフトによるばらつきについては、C-1)の結論が採用された。⑤のカテゴリー分類は解析に用いないことになった。⑥、⑦は予備試験結果を経てから決めることになった。⑧はプレバリデーション終了後に検討される。これらの検討を経て、プロトコール (ver. 10) を決定した。

C-3) 予備試験結果

12月の東京の会議においては、予備試験結果から以下の点について疑問点または問題点が指摘された。

- ①アガロースに EDTA を加える必要性
- ②室温電気泳動でのアガロースが溶ける可能性
- ③GLP 適合施設にて試験を実施
- ④クロスリンク型の直接変異原の追加の必要性
- ⑤一群当たりの動物数
- ⑥陰性対照におけるテールに含まれる %DNA 量平均値の範囲 (1-15%)
- ⑦脱水処理
- ⑧テールに含まれる %DNA 量において >90% が hedgehog の認識
- ⑨病理標本観察の必要性
- ⑩適切な統計解析方法

これらの問題を検討して、次のプロトコールに反映させることになった。

データ解析結果はテールに含まれる %DNA 量、Tail の長さ、tail モーメントなどの endpoint 毎に、個々の動物の値を用いるのではなく平均や中央値を用い、溶媒との差や比を用いて施設間差を評価することに加え、別に統計学的検定を行うとの見解が示された。これに基づいて解析した結果、平均でも中央値でも差がないこと、対数変換では用量依存性が不明確になること、陽性対照物質の結果であるためか施設間のバラツキが大きいことなどが明らかになった。

統計学的検定結果としては、安評センター推薦の Dennett' s 検定について報告された。陽性対照物質の低用量において施設2の胃に有意差を認めなかった以外、ほとんどの結果が Dennett' s 検定で有意な差が対照群との間で認められた。この解析方法や分散、変動係数などをもとに、プレバリデーションを経てバリデーションの成功基準を決めることとなった。

さらに、スライド間のバラツキについても検討した結果、スライド間の差は少ない傾向が示されたことから以後スライド間差は考慮しないことになった。また、動物数を5匹から4匹に減らす Reductionが可能かという検討を行うため、スライド3枚/匹、5匹でプレバリデーション行うことになった。

データ解析の結論として、Dennett' s 検定による解析に加え、テールに含まれる %DNA 量の平均値を用いて施設間差の結果を比較することになった。

C-4) バリデーションに用いるプロトコールの作成

以上の問題点を考慮の上、最終的なプレバリデーションのためのプロトコールが確定した（表2参照）。

D. 考察

東京における会議において、来年以降の本格的なバリデーションに向けて以下の問題が提起された。

- ①化学物質の分類を考慮した被験物質の選択
 - ②適切な被験物質数
 - ③新規参加施設への技術導入と参加施設の公募と選択
 - ④バリデーションの計画
 - ⑤陽性・陰性対照における動物数の削減
- これを受けて、1月の国内実行委員会で確認したところ、以下の予定が決まった。
- ①2007年4月から半年間かけて、現在の5施設でプレバリデーションを実施する（4物質/施設）
 - ②その間に本試験の参加施設を募集し、決められたプロトコールによる試験データの提出を求め、その結果に基づいて、参加施設を決める
 - ③2008年より2年間かけて15施設で40物質の試験を実施する。
 - ④Phaseで区切り、データまとめやプロトコールの検討を行う
 - ⑤プレバリデーション終了後には半年程度のデータ解析期間をおき、会議を開いて次のPhaseへの進行に関して議論する
 - ⑥厚生科学研究の延長を考慮しても後5年で完結したい
 - ⑦OECDガイドラインへの提案は来年度を目処にしたい（プレバリデーション終了後？）
 - ⑧被験物質の選択が重要（実行委員会で陽性強度、陰性数のバランスを考慮して対応する：林実行委員長）

E. 結論

画像解析ソフトによるばらつきの検討および国際共同研究による予備試験結果から、統一した試験手順書を確立でき、プレバリデーションを実施する準備が整った。主なプロトコール作成上の決定事項を以下に示す。

- ① Cr1:CD (SD)ラット雄 7-9週令を5匹/群使用
- ②投与回数2回（投与21時間後に2回目投与し、その3時間後にサンプリング）
- ③適用臓器は胃および肝臓
- ④単一細胞を使用
- ⑤電気泳動は冷蔵で実施
- ⑥指標はテールに含まれる%DNA量の平均値

F. 健康危険情報

なし

G. 参考文献

- 1) 日本トキシコロジー学会教育委員会編集、トキシコロジー、p142、朝倉書店(2002)
- 2) FDA Guidance、
<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
- 3) Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, Escobar P, Honma M, Kumaravel TS, Nakajima M, Sasaki YF, Thybaud V, Uno Y, Vasquez M, Hartmann A; In Vivo Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutat Res.* 627(1):31-5(2007)
- 4) Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR; 4th International Comet Assay Workshop. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *4th International Comet Assay Workshop, Mutagenesis.* 18(1), 45-51(2003)

表1. 予備試験プロトコルのポイント

問題点	決定事項	検討事項	実施状況
GLP	GLP精神を遵守	動物福祉への配慮も含む	遵守確認
陽性対照物質	Ethylmethane sulfonate	同一メーカーのロット使用	確認
濃度	2段階		確認
溶媒	適当な溶媒	生理食塩水または0.5%カルボキシメチルセルロース水溶液	生理食塩水を全機関使用
動物種	ラットCr1:CD(SD)雄 7-9週令		6-8週令のCD(SD)雄
匹数	5匹		確認
投与方法	経口、2回(投与21時間後に2回目投与)	1回投与の結果も一部であり	2回投与を確認
サンプリング時間	2回目の投与3時間後		確認
試薬の調製	アガロースゲル、用時調製	同一メーカー、ロット使用	アガロースゲルに10mMのEDTAを添加した施設あり
DNA染色	Cyber-Gold		確認
臓器種	胃、肝臓		確認
核か細胞か	単一細胞	MMSの検討結果では差はない	未確認
スライド調製	20分放置		1-5および20℃前後
電気泳動条件	0.7-1.0V-cm, 0.25-0.3A 2-10℃	室温での電気泳動	0.7-1.0V-cm, 0.29-0.3A 2-8および20度
計測数	50		確認
指標	テールに含まれる%DNA量、Tailモーメント、Tailの長さ	カテゴリー分類はしない	確認
イメージアナライザー	不問		CometIVまたはKometIV
細胞毒性	病理観察の必要性は結論がでなかった		進行中またはいいえ
統計	不問		Dunnetまたは使用せず
被験物質の選択		実行委員会検討事項 Benzo[a]pyrene, 2,6-diaminolueneが推奨された。	

表 2. プレバリデーションのためのプロトコール確定事項

問題点	決定事項
GLP	GLP 精神を遵守
陽性対照物質	Ethylmethane sulfonate
陽性対照濃度	1 段階
溶媒	生理食塩水または CMC 数溶液
動物種	ラット Cr1:CD(SD)雄 7-9 週令
匹数	5 匹
投与方法	経口、2 回 (投与 21 時間後に 2 回目投与)
サンプリング時間	2 回目の投与 3 時間後
試薬の調製	アガロースゲル、用時調製
DNA 染色	Cyber-Gold
臓器種	胃、肝臓
核か細胞か	単一細胞
スライド調製	20 分放置
電気泳動条件	0.7-1V-cm, 0.25-0.3A 2-10°C
計測数	50
指標	テールに含まれる %DNA 量の平均値
イメージアナライザー	機種については不問
細胞毒性評価の実施	未決定
統計	Dunnet 検定

2) 内分泌かく乱化学物質試験法のバリデーション

A. 研究目的

本研究では、化学物質の内分泌かく乱性 *in vitro* 試験法のうち、行政的有用性が推定される試験法として、我が国で開発された HeLa 細胞をベースにしたエストロゲン受容体 α (ER α) に対するレポーターアッセイ試験法 (HeLa 法) および欧米で開発された Lumi-cell[®] 法について欧米の研究機関と協力し、国際的なバリデーションを実施し、その妥当性を検討することを目的としている。

HeLa 法は、ヒト由来の細胞 (HeLa cell) に、ヒトエストロゲン受容体 ER α 遺伝子およびエストロゲン応答配列とルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして組み込み開発した安定形質株 (HeLa-9903) を用いたレポーター遺伝子アッセイ法である。

本法は、厚生労働省および経済産業省の研究費により我が国の化学物質評価研究機構 (化評研) において開発が進められてきたものであり、これまでに国内におけるアゴニストアッセイバリデーションが終了している。本年度は、すでに終了しているバリデーション結果について OECD、EDTA の下部組織である OECD-VMG non-animal に於ける検討を実施し、その成果をまとめた報告書の作成を、6~7 月に OECD-VMG non-animal の secretary である Dr. Miriam Jacob を日本に招いて行った。この報告書を受け、現在 OECD において本分野の専門家およびバリデーションの専門家による第三者評価が実施されている。一方、報告書作成の過程で、これまでアゴニストの評価しかバリデーションが実施されていないことが指摘された。そこで、今後、OECD におけるアゴニストアッセイに関する評価結果を待って、アンタゴニストアッセイについて必要なバリデーション試験を追加すべく、内因性の女性ホルモンである 17 β -estradiol によるレポーター遺伝子転写活性化の阻害を指標とした抗エストロゲン作用 (アンタゴニスト活性) 検出系について、①阻害対象となる 17 β -estradiol の最適濃度について、②既に ER アンタゴニスト作用の判明している 4 種の化学物質を用いた測定の実験の再現性について、更に③既に ER アンタゴニストではないことが判明している 2 種の化学物質も含めて文献での結果と比較を行い、測定系の妥当性について検討を行った。

Lumi-cell[®] 法は、米国 Xenobiotic Detection Systems Inc. (XDS 社) により開発された方法で、ヒト卵巣がん細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、エストロゲンとエストロゲンレポーター (ER) との結合をルシフェラーゼ活性により検出する。本法については、バリデーションは実施されていないため、本研究において米国 NICEATM および欧州 ECVAM と共同で国際バリデーションを実施する。本年度は、まず国際的な運営委員会を組織し、アゴニスト、アンタゴニストそれぞれ 4 フェーズからなるバリデーションプロトコルの確定、参加施設の選択、被験物質の選択等を行った。我が国におけるバリデーションの実施施設として、当初、レポーターアッセイの実験経験の豊富な化評研を提案したが、化評研では HeLa 法の開発を推進しており、利益相反の点で望ましくないとの指摘を受け、XDS 社と国内で唯一商業的ライセンスを締結している (株) 日吉を実施施設の候補として選定した。しかし、(株) 日吉では Lumi-cell[®] 法の実験経験が少ないため、本年度はバリデーションフェーズ 1 試験の実施に先立って、技術水準や使用する試薬類の検討のため、コントロール化合物の測定による基礎検討試験 (フェーズ 0) を行った。その結果、十分な信頼性を示すデータ測定が可能であると判断されたことから、国内参加施設として認定し、バリデーション試験開始の準備を終了した。

B. 研究方法および研究結果

B-1. hER α -HeLa-9903 細胞を用いた ER α antagonist 検出系の再現性及び妥当性に関する研究

B-1-1 研究方法

本試験は、(財)化学物質評価研究機構において実施した。方法の詳細は小野の報告を参照されたい。

供試化学物質としては、対照物質 17 β -estradiol (E2)、既に ER アンタゴニスト作用の判明している 4 種の化学物質、ER アンタゴニストではないことが判明している 2 種の化学物質を用いた。

細胞は (hER α) 安定形質転換細胞株を住友化学株式会社より入手し、実験に使用した。

3 検証内容

1) 細胞毒性の確認

細胞毒性による False positive 反応を回避するため、コントロール細胞、即ち ERE などのエンハンサーに依存せず常にルシフェラーゼを産生する細胞株 (Control 細胞) を用いて実験を行う化学物質濃度域でのルシフェラーゼ活性を観察した。化学物質を添加しない場合の酵素活性に対して 80%に相当する活性まで化学物質を添加した際の活性が低下した濃度域が認められた場合には、その濃度域におけるエストロゲン活性阻害作用は細胞毒性に伴う False positive 反応と判断した。

2) 対照物質 E2 濃度の最適化確認

阻害対象となる対照物質 E2 の共存濃度によって ER アンタゴニストの示すレポーター遺伝子転写活性化の阻害効率に違いが生じることが想定されたため、E2 の共存濃度の最適条件を確認するために、化学物質と同時に添加する E2 濃度を終濃度 10 nM、6 nM、1 nM、600 pM、100 pM、60 pM、10 pM、6 pM 及び 1 pM でそれぞれ添加し、最適条件の検討を行った。測定化学物質には、4-hydroxytamoxifen を用いた。

3) 再現性の確認

ER アンタゴニスト作用の判明している 4 物質を用いて、再現性の確認を実施した。測定は独立した実験を 9 回実施した。

4) 測定系の妥当性評価

ER アンタゴニスト作用の判明している 3 種の化学物質及び ER アンタゴニストではないことが判明している 2 種の化学物質を用いて測定を行い、文献での結果と比較して測定系の妥当性に関して評価した。

4. 結果の解析

各濃度区で得られた発光強度の平均値は陰性対照区の平均値で除し、転写活性化倍率 (Transcriptional activity) を求め、陽性対照区の転写活性化倍率の 1/2 の値まで転写活性化倍率が阻害される供試化学物質の濃度 (IC50) を Logistic 式より求めた。

B-1-2 研究結果及び考察

1) 細胞毒性の確認

今回実施した 4 物質について今回の試験濃度 10 pM~10 pM の範囲では、Control 細胞に対する細胞毒性がないことを確認した。

2) 対照物質 E2 濃度の最適化確認

E2 濃度を終濃度 10 nM~1 pM の範囲で検討した結果、E2 濃度が低くなるにつれて測定化学物質の IC50 値が低くなる傾向が見られた。E2 濃度 60 pM 以下の濃度域では、測定化学物質の IC50 値は安定し始めているが、1 pM になると測定化学物質の IC50 値及びその阻害曲線は悪くなっていた。これらは E2 自身の応答性を考慮すると 100 pM 以上の濃度域では、E2 自身の応答性が飽和しているためであり、1 pM になると E2 自身の応答性がほとんどなく、阻害のダイナミックレンジが狭くなってしまいうためであると考えられる。

以上のことから、E2 自身の応答性が飽和しておらず、阻害のダイナミックレンジも狭くないと考えられる 60 pM~6 pM の範囲に E2 濃度の最適化条件が含まれるものと推察された。これら 2 つの条件を考慮して、E2 自身の応答曲線から算出された EC80 相当の 25 pM を採用した。

3) 再現性の確認

測定値の評価に関しては、ばらつきを正規分布として評価するために $\text{Log}_{10}[\text{IC}_{50}(\text{M})]$ で評価した。算出された 9 回分の $\text{Log}_{10}[\text{IC}_{50}(\text{M})]$ 結果の標準偏差 (SD) は、実施 4 物質において、0.15~0.27 となり、変動計数 (CV) は、2.6~3.8% と良好な結果が得られた。各測定値は、1 点を除いて Mean $\pm 2 \times \text{SD}$ の範囲内に入っており、 $2 \times \text{SD}$ の最大値が 0.53 であることから、今回の結果から計算すると IC50 値は、 $\text{Log}_{10}[0.53] = 3.4$ 倍~ $1/3.4$ 倍の範囲に 95.4% の確立で入ってくるものと考えられる。4 物質について、それらの IC50 (M) は、 10^{-6} ~ 10^{-10} M 範囲に渡っており、この範囲において上記のことが適用できると考えられる。

4) 測定系の妥当性評価

事前スクリーニング以外で既に ER アンタゴニスト作用の判明している 3 種の化学物質、ER アンタゴニストではないことが判明している 2 種の化学物質を用いて測定を行い、文献での結果と比較した結果、既報文献での結果と本測定系での結果は一致しており、本測定系は、ER アンタゴニスト活性検出系として妥当であると考えられた。

B-2. Lumi-cell ER アッセイのバリデーション (Phase 0)

B-2-1 研究方法

本試験は、株式会社 日吉 技術部分析研究課において実施した。詳細は小野の分担報告を参照されたい。

化学物質リスク評価法の国際的バリデーションに関する研究を行うにあたり、初期検討として、下記の項目について検討を行った。

- (1) Lumi-cell[®]法のフロー及び試薬の整理
- (2) Lumi-cell ER 細胞のばらつきについて
- (3) Lumi-cell ER の増殖速度について
- (4) Lumi-cell ER の細胞数による比較
- (5) Lumi-cell ER の国際的バリデーションに関する研究(Phase 1)の事前確認試験

- (1) Lumi-cell[®]法のフロー及び試薬の整理
省略 (小野の分担報告参照)

- (2) Lumi-cell ER 細胞のばらつきについて

細胞系の測定方法の中には、エッジエフェクトといって、96 穴プレートの一番外側の well (全部で 36 穴) の外気に接触する状況 (温度や CO₂ 濃度) が他の内側の well と異なり、細胞の成育状態が悪くなり、内側の well の数値より低い数値を出すことがあり、ばらつきの要因となる。本研究で使用する Lumi-cell ER 細胞のエッジエフェクトを調査した。

その結果 Lumi-cell ER 細胞では、各プレートの発光量 (Rusifeyase Light Units ; RLU) の全 well の平均を「1」とした時の割合 1 回目 [0.85 - 1.05, (n=96), C.V.=9.17%]、2 回目 [0.80 - 1.37, (n=96), C.V.=5.76%] とばらつきは少ない。全体の well と外側、内側の well のばらつきを見ると 1 回目 C.V.=9.17%、8.51%、7.57%、2 回目 C.V.=5.76%、5.44%、5.77% と特にエッジエフェクトの影響は少ないと判断できる。エッジエフェクトがないので、96 穴全ての well を使用することが可能。プレートレイアウトの再検討も考えられる。

- (3) Lumi-cell ER の増殖速度について

Lumi-cell ER 細胞を増殖する際の試薬 (特に血清) については国内で調達するた

め XDS 社と異なった種類を使用している。したがって、増殖速度を確認する必要がある。Lumi-cell ER 細胞の場合、PRMI 調整培地で継代し、DMEM 調整培地でプレート播取するため、PRMI 調整培地による培養時及び DMEM 調整培地による培養時の 2 種類について増殖速度を調べた。

その結果、開始時の細胞数 (個) を「100%」とした時の 1 日毎の細胞数を示す。希釈率 1:8 で播種しているため、100%になった日が、8 倍に増殖した日となる。継代用の RPMI 調整培地は、増殖を目的とした培地であり、5~6 日で 1:8 希釈がコンフルエントに増殖することがわかった。しかし、DMEM 調整培地は、播種する際の培地で増殖を目的とせず、ブランクの低減を目的としているため、増殖は非常に低い。したがって、DMEM 調整培地で 24 時間以上培養は意味がないと思われる。

- (4) Lumi-cell ER の細胞数による比較

Lumi-cell ER アッセイ法では、細胞の適正細胞数 (2.0×10^5 cell/ml) が規定されている。その細胞数が異なることで活性 (RLU や Fold induction)、EC₅₀ の違いがあるか、細胞数を適正細胞数の 2 倍及び 1/2 倍での活性の比較を確認した。

その結果 Lumi-cell ER 細胞のアゴニスト活性及びアンタゴニスト活性両方とも細胞数が 1/2 倍~2 倍で変化することによって、EC₅₀ に大きな変化はないが、その細胞数毎の活性強度が絶対値で異なることから Fold Induciton に違いがあるため、同一プレート内での細胞数の均一性は精度確保には必須である。3 回繰り返して EC₅₀ を求めて、ばらつきを確認したが、細胞数の変化によるばらつきの大小はない。アゴニスト活性 ; 16.2%~24.2%、アンタゴニスト活性 ; 18.3~21.4% と C.V. は、30%以下であった。Phase 1 より通常量 (2.0×10^5 cell/ml) に一連のプロジェクト内で合わせる必要がある。

- (5) Lumi-cell ER の国際的バリデーションに関する研究(Phase 1)の事前確認試験

Lumi-cell ER の国際的バリデーションに関する研究に先駆けて、日本 (株式会社 日吉) のラボでの Lumi-cell ER の国際的バリデーションに関する研究に則った方法で事前確認を行った。

Lumi-cell ER 細胞のアゴニスト活性及びアンタゴニスト活性については、EC50 及び Dose response curve で確認した。

その結果、アゴニスト活性については、EC50 の平均(n=3) 1.17×10^{-11} M C.V.=30.9%、前回の「(4) Lumi-cell ER の細胞数による比較」の EC50 の平均(n=3) 1.13×10^{-11} M とほぼ同等であるが、C.V.=30%以上でばらつきが大きい傾向だった。DMSO の発光量 (RLU) の 3 σ も低く抑えられており、精度に問題はないと思われる。陽性対照物質 [Methoxychlor (323mg/ml)] の Fold Induction は、平均 6.9 (n=3)であった。

アンタゴニスト活性については、IC50 の平均(n=3) 9.43×10^{-10} M C.V.=30.9%、「(4) Lumi-cell ER の細胞数による比較」の IC50 の平均(n=3) 1.81×10^{-9} M とほぼ同等であるが、C.V.=7.1%でばらつきも少なかった(表 2-6)。陽性対照物質 1 [E2 (2.5mg/ml)] の Fold Induction は、13.7 [9.9-16.2(n=3)] 陽性対照物質 2 [Flavone (5mg/ml) /E2 (5ng/ml)] の Fold Induction は、5.4 [4.6-6.8(n=3)]であった。DMSO の発光量 (RLU) の 3 σ も低く抑えられており、精度に問題はないと思われる。

D. 考察及び今後の展望

HeLa 系については、アンタゴニスト検出系としての基礎検討結果から、17 β -estradiol の最適濃度を E2 自身の応答性が飽和しておらず、阻害のダイナミックレンジが広い EC80 相当の 25 pM とした。既に ER アンタゴニスト作用の判明している 4 種の化学物質を用いた測定における変動計数 (CV) は、2.6~3.8% と非常に安定した結果が得られ、また既に ER アンタゴニストではないことが判明している 2 種の化学物質も含めて文献での結果との比較既報文献での結果と本測定系での結果は一致した。今回の結果から HeLa 細胞アッセイ系アンタゴニスト活性検出系としての妥当性が確認できた。今後はこれまでに取得済みデータをもとにバリデーションに必要となる検討項目について整理し、プロトコールの作成を進める。

Lumi-cell ER 細胞及びアッセイ方法については、詳細な基礎データを取得しアッセイ系の特徴を把握することが出来た。Lumi-cell ER アッセイ法のフロー及び試薬の確認、事前検討の結果より、バリデー

ションフェーズ 1 の実施は可能と判断された。ただし、今回の結果については XDS 社における試験結果と十分な比較検討を行っていないため、今後フェーズ 0 の結果についても、XDS 社と相互に情報を共有し、フェーズ 1 に備える。また、今回の検討結果より現状のプロトコール中で改善できる部分も考えられたため、これらについても国際的バリデーションに関する研究と併行に検討を行う。

E. 研究発表

E-1) 論文発表

- 1) 大野泰雄：日本薬理学会の奨める動物実験-苦痛の評価と軽減-「はじめに」および日本薬理学会の新動物実験指針：日本薬理学雑誌 129, 5-9, 2007.
- 2) 小島肇夫、動物実験代替に関する最近の動向、化粧品技術者会誌、40(4)263-268 (2006)
- 3) 小島肇夫、JaCVAM の設立と使命、日皮協ジャーナル、57、129 (2007)

E-2) 学会発表

- 1) T. Ashikaga, H. Sakaguchi, K. Okamoto, M. Mizuno, J. Sato, T. Yamada, M. Yoshida and Y. Ohno. Results of a Japanese ring study of a human cell line activation test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential. SOT (2006.3),
- 2) 足利太可雄、坂口齊、岡本賢二、水野誠、山田貴亮、吉田真由美、佐藤淳、児玉達治、太田尚子、長谷川靖司、岡本裕子、桑原裕史、小坂七重、藪さき子、大野泰雄、日本における in vitro 皮膚感作性試験：h-CLAT (human Cell Line Activation Test) の共同研究. 第30回日本化粧品学会(2006.6.2-3)東京ヤクルトホール
- 3) 大野泰雄、動愛法に定められた3Rs原則の実現のために-動物実験代替法の最近の進歩. 第33回日本トキシコロジー学会(2006.7.4)名古屋
- 4) 大野泰雄、第六回国際代替法学会 6th World Congress on Alternatives to Animal Experiments (WC6)、第20回日本動物実験代替法学会(2006.12.8-9) 東

京

- 5) 大野泰雄、動物実験と代替法. 東邦大学薬学部オープンリサーチセンター(ORC) 第2回講演会(2007.3.22) 千葉
- 6) 大野泰雄、薬学研究における動物実験代替法研究の重要性とその問題点、日本薬学会シンポジウム(2007.3.30) 富山
- 7) H. Kojima, Current activities on alternative research in Japan, KSOT/KEMS Spring Annual Meeting, Alternative Toxicology and Marine Ecotoxicology, Korea(2006)
- 8) 小島 肇、JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) 新規試験法評価室の紹介、日本環境変異原学会 MMS 研究会第49回定例会、熱川(2006)
- 9) H. Kojima, JaCVAM Update, Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods, North Carolina (2006)
- 10) 小島 肇、JaCVAM の設立と使命、日本産業皮膚衛生協会第39回研修会、京都(2006)
- 11) 小島 肇、特別企画1：動物実験代替法に関する最近の国内外の動向、国内において現在進行中の評価試験プロジェクト紹介、日本動物実験代替法学会第20回大会、東京(2006)
- 12) 小島 肇、動物実験代替法開発の推進とその評価：JaCVAM の設立と役割、日本薬学会第127年会、富山(2007)

F. 知的財産権の出願、登録状況
なし

分担研究報告書

コメットアッセイバリデーション

分担研究者：小島 肇

研究要旨

DNA 損傷を捉える試験として、最近汎用されている試験としてコメットアッセイがある。本方法は、in vivo でも in vitro でも試験可能であること、細胞が得られるならばどのような臓器、器官でも試験可能であること、短期間で結果が得られること、初期の DNA 損傷を検出できることから広く利用されている。行政的にも、欧州の規制当局では実施を要求することがあり、FDA Guidance に記載がある。FDA や EPA でも申請データとして受け付けている状況にある。

しかし、本方法の正式なガイドラインは策定されていない。不定期 DNA 合成試験 (UDS) の代替法として、試験法標準化のための議論が進められてきたが、研究室間の再現性を検証するバリデーションがされておらず、プロトコルの国際的な合意がなされてこなかった。

このような混沌に終止符を打つべく、本研究班では国際的なバリデーション実行委員会を組織し、本試験の専門家とコンセンサスを取りながら、コメットアッセイの標準プロトコルの合意を目指すことになった。さらにバリデーション研究を実施し、将来的には OECD ガイドラインへの掲載を目指すものである。

本年度は、国内外の実行委員会での議論および参加施設の予備試験をへて、プロトコルの問題点を解決でき、プレバリデーションを実施できる環境が整った。

主なプロトコル作成上の決定事項としては、①Cr1:CD (SD) ラット雄 7-9 週令を 5 匹/群使用、②投与回数 2 回 (1 回目投与の 21 時間後に 2 回目を投与し、その 3 時間後にサンプリング)、③適用臓器は胃および肝臓、④単一細胞を使用、⑤電気泳動は冷蔵で実施、⑥指標はテールに含まれる %DNA 量の平均値である。これらを盛り込んだプロトコルを用いて、2007 年 4 月から半年間かけて、予備試験に参加した 5 施設でプレバリデーションを実施することになった。

A. 研究目的

遺伝毒性試験には、①DNA 損傷を捉える不定期 DNA 合成試験 (UDS)、Rec-Assay、②遺伝子突然変異を捉える Ames 試験、マウスリンフォーマ試験、③染色体異常を捉える染色体異常試験、小核試験が汎用されてきた。DNA 損傷を捉える試験として、最近汎用されている試験としてコメットアッセイがある。コメットアッセイとは単細胞ゲル電気泳動法とも呼ばれ、単離した細胞または核

をアガロースに閉じ込めて融解した後、アルカリ処理で二本鎖 DNA を単鎖にし、電気泳動による泳動パターンの変化により DNA 鎖切断などを検出する方法である。正常な細胞の DNA は非常に大きな分子であり、電気泳動してもほとんど移動せず、球形の核として観察される。一方、DNA で切断などが起こっている場合には DNA 断片の大きさに応じて移動し、球形の核を頭に尾を引いた彗星のような泳動パターンとなる¹⁾。

本方法は、in vivo でも in vitro でも試験可能であること、細胞が得られるならばどのような臓器、器官でも試験可能であること、短期間で結果が得られること、初期の DNA 損傷を検出できることから広く利用されている。行政的にも、欧州の規制当局では実施を要求することがあり、FDA Guidance (2006) ²⁾ に記載がある。FDA や EPA でも申請データとして受け付けている状況にある。

しかし、本方法の正式なガイドラインは策定されていない。UDS の代替法として、試験法の標準化のため 3rd IWGTP at Washington, 1999、4th International Comet Assay Workshop at Ulm, 2001、4th IWGT at San Francisco, 2005 においても公定化のため議論が進められてきた ³⁾。主な討議事項として、以下の項目が議論されてきたが、データが不足しておりプロトコールが一歩化されてこなかった。

- ①適用濃度 (複数濃度の適用か、単一濃度の適用か)
- ②電気泳動をする際には細胞か、核どちらも用いるべきか
- ③細胞毒性の測定項目を入れる必要があるか
- ④スコアリング方法
- ⑤陰性、陽性対照のデータ蓄積の必要性

そのため、研究室間の再現性を検証するバリデーションがされておらず、プロトコールの国際的な合意がなされてこなかった。一部で日本環境変異原学会 哺乳類変異原性研究会 (MMS) が 2005 年、②核/細胞の使用に関する問題に決着をつけるため、プレバリデーションを実施し、これらの間には差がないことを証明したのみであり、①、③、④の主な問題が残っていた (⑤のデータの蓄積のためには、バリデーションできる統一プロトコールが必要)。

このような混沌に終止符を打つべく、本研究班では国際的なバリデーション実行委員会を組織し、本試験の専門家とコンセンサスを取りながら、コメットアッセイの標準プロトコールの合意を目指すことになった。さらにバリデーション研究を実施し、将来的には OECD ガイドラインへの掲載を

目指すものである。

B. 研究方法

コメットアッセイの問題点を共通認識するため、まず、MMS と協力して本試験法の専門家を集め、8月に札幌でセミナーを開催した (レジュメ:添付資料1、参加者リスト:添付資料2)。このセミナー参加者を含めたコメットアッセイバリデーションのための国際および国内実行委員会を組織した。その組織のメンバーを以下に示す (組織図:添付資料3、参加者リスト:添付資料4)。

1) 国際実行委員会

委員長 林 真 (国立医薬品食品衛生研究所:以下、国立衛研と記す 安全性生物試験研究センター 変異遺伝部)

委員 L.Schectmann (FDA)

R. Tice (NICEATM)

T. Hurtung (ECVAM)

宇野芳文 (三菱ファーマ株式会社)

小島 肇 (国立衛研 安全性生物試験研究センター 薬理部)

2) 国内実行委員会

委員長 林 真

委員 宇野芳文

浅野哲秀 (日東電工株式会社)

中嶋 圓 (食品医農薬安全評価センター)

森田 健 (国立衛研 医薬安全科学部)

本間正充 (国立衛研 安全性生物試験研究センター 変異遺伝部)

山影康次 (食品薬品安全センター 秦野研究所)

小島 肇

3) コンサルタント

B. Burlinson (Huntingdon Life Sciences)

Nobumasa Nakashima (OECD)

D. Lovel (Univ. of Surrey)

B. Young (BioReliance)

大森 崇 (京都大学医学部医学研究系)
佐々木 有 (八戸高専)
大野泰雄 (国立衛研)
田中憲穂 (食品薬品安全センター 秦野
研究所)

4) プレバリデーション参加施設

Huntingdon Life Sciences
BioReliance
Syngenta CTL (研究所閉鎖に伴い、実
験は実施せず)
Merck Research Laboratories
食品医農薬安全評価センター
食品薬品安全センター 秦野研究所

国際および国内実行委員会、コンサルタントのメンバーのほとんどが札幌に集い開催された第1回国際バリデーション実行委員会では、試験法の問題点を明確にした。次にこれらの問題点を加味したプロトコールを作成し、予備試験を行う合意が得られた。9月以降、プレバリデーション参加5施設の協力を得て予備試験を行った。

その結果を12月に東京で開催した第2回国際バリデーション実行委員会で確認した(参加者リスト:添付資料5)。得られたデータはコンサルタントである生物統計学者の大森 崇助教授(京都大学医学部医学研究系)が解析し、これをもとにプレバリデーション実施のための最終プロトコール(Ver.11)を完成させた。この合間に国内実行委員会を3度、MMSおよび日本環境変異原学会第31回大会中にも会合を持った。

また、MMSにはプロトコールの討議事項の一つであるスコアリングで大きな比重を占める画像解析ソフトによるばらつきを検討を研究委託した。

1) 参加施設

- ①食品薬品安全センター秦野研究所
- ②田辺製薬
- ③残留農薬研究所
- ④富士バイオ
- ⑤東レ

- ⑥キャノン
- ⑦インビトロジェン
- ⑧ヤクルト中央研究所

2) イメージアナライザー

- ①Komet Ver.4.0.4&5.5 (Kinetic imaging Ltd)
- ②CometAnalyzer Ver.1.1.1&1.5(Youworks)
- ③Cometscore Ver.1.5 (Tri Tek)
- ④Comet Imager Ver.1.20 (Carl Zeiss)
- ⑤Comet Ver.4.1.1(Perceptive Instruments)

3) 計測方法

・陰性対照および陽性対照物質により作製したコメットの画像ファイルを配布し、各機関にて計測を行い、その結果を提出する。

・計測するコメットの数は、1個体の分析を想定して陰性対照および陽性対照物質それぞれ50個とする⁴⁾。

・計測指標は、テールに含まれる%DNA量、Tailモーメント、Tailの長さとする⁴⁾。

配布する画像について

・1枚の画像には、1細胞の画像のみが含まれるようにする。

・画像形式の変換や、減色によって生じる像の変化をなるべく抑えるため、カラーおよびモノクロ画像(8bit~24bit)の両方を、代表的な画像形式(BMP, TIFF, JPGなど)に変換したものを配布する。それぞれの画像解析ソフトに最適な形式を一つ選び、インポートして分析する。

4) 評価方法

- ①解析に使用したソフト名およびバージョン
- ②解析に使用した画像(ファイル形式)
- ③各画像のテールに含まれる%DNA量の測定値
- ④各画像のTailモーメントの測定値
- ⑤各画像のTailの長さの測定値

提出された各機関のデータについて、機関毎に平均値を求め、上下何%ぐらいの幅に収まるか調べる。

C. 研究結果

C-1) 画像解析ソフトによるばらつきの検討（添付資料 6）

7 施設のイメージアナライザーのうち、3 施設では明らかな陽性イメージを測定できなかった。いずれも古いバージョンの画像解析ソフトであった。

イメージアナライザー間の陰性対照の差（平均値）は Tail の長さで 1.06~92.6、テールに含まれる %DNA 量で 0.75~9.75、Tail モーメントで 0.02~5.68 であった。

陰性対照および弱い陽性対照物質の間のパラメーターの部分的一致は Tail の長さや Tail モーメントよりも Tail 中の %DNA で小さかった。パラメーターとして、Tail 中の %DNA を利用した場合、もっとも信頼性が高いと考えられる。

C-2) プロトコール作成のための問題点の抽出と対応

国際実行委員会では、それぞれの分野の専門家がセミナーで用いた添付資料 1 および 7~13 を用いてプロトコール作成のため以下の問題点を抽出し検討した。以下に検討事項を示す。

- ① 単離核か、細胞か
- ② 陽性対照物質および被験物質の選択
- ③ 動物種、試験サイズ、投与方法、サンプリング時間
- ④ スライド調製方法、電気泳動方法、染色方法
- ⑤ 指標および解析方法（解析ソフト、カテゴリー分類）
- ⑥ 細胞毒性検出のための病理観察の導入
- ⑦ 統計学的解析
- ⑧ 適合基準

この中で、①の問題については、MMS での検討結果が受入れられ⁴⁾、どちらを用いても結果に影響しないとの合意を得た。議論の末、②~④に関する決定または検討事項を表 1 に示す。⑤のソフトによるばらつきについては、C-1)の結論が採用された。⑤のカテゴリー分類は解析に用いないことになった。⑥、⑦は予備試験結果を経てから決

めることになった。⑧はプレバリデーション終了後に検討される。これらの検討を経て、プロトコール(ver.10)を決定した（添付資料 14）。会議の議事録を添付資料 15 に示す。

C-3) 予備試験結果

12 月の東京の会議においては、予備試験の修了をチェックリストで確認するとともに（添付資料 16）、予備試験を行った結果から得られた以下の疑問点または問題点が浮き彫りにされた。

- ① アガロースに EDTA を加える必要性について
- ② 室温での電気泳動ではアガロースが溶ける可能性
- ③ GLP 適合施設にて試験を実施
- ④ クロスリンク型の直接変異原を被験物質に追加
- ⑤ 一群当たりの動物数はプレバリデーション後で再検討する
- ⑥ 陰性対照におけるテールに含まれる %DNA 量平均値の範囲 (1-15%?)
- ⑦ 脱水処理
- ⑧ テールに含まれる %DNA 量において >90% が hedgehog の認識
- ⑨ 病理標本観察の必要性
- ⑩ 適切な統計解析方法

これらの問題を考慮して、次のプロトコールに反映させることになった。

データ解析結果は添付資料 17~18 に示すルールに従って後日まとめられた。添付資料 19 に示すように、テールに含まれる %DNA 量、Tail の長さ、tail モーメントなどの endpoint 毎に、個々の動物の値を用いるのではなく平均や中央値を用い、溶媒との差や比を用いて施設間差を評価することに加え、別に統計学的検定を行うとの見解が示された。これに基づいて解析された資料 20 から、平均でも中央値でも差がないこと、対数変換では用量依存性が不明確になること、陽性対照物質の結果であるためか施設間のバラツキが大きいことなどが明らかになった。

表 1. 予備試験実施のために決定されたプロトコールのポイント

問題点	決定事項	検討事項	実施状況
GLP	GLP 精神を遵守	動物福祉への配慮も含む	遵守確認
陽性対照物質	Ethylmethanesulfonate	同一メーカー、ロット使用	確認
濃度	2 段階		確認
溶媒	適当な溶媒	生理食塩水または 0.5%カルボキシメチルセルロース水溶液	生理食塩水を全機関使用
動物種	ラット Crl:CD(SD)雄 7-9 週令		6-8 週令の CD(SD)雄
匹数	5 匹		確認
投与方法	経口、2 回（投与 21 時間後に 2 回目投与）	1 回投与の結果も一部であり	2 回投与を確認
サンプリング時間	2 回目の投与 3 時間後		確認
試薬の調整	アガロースゲル、用事調整	同一メーカー、ロット使用	アガロースゲルに 10mM の EDTA を添加した施設あり
DNA 染色	Cyber-Gold		確認
臓器種	胃、肝臓		確認
核か細胞か	単一細胞	MMS の検討結果では差はない	未確認
スライド調整	20 分放置		1-5 および 20°C 前後
電気泳動条件	0.7-1V-cm,0.25-0.3A 2-10°C	室温での電気泳動	0.7-1V-cm,0.29-0.3A 2-8 および 20 度
計測数	50		確認
指標	テールに含まれる %DNA 量、Tail モーメント、Tail の長さ	カテゴリー分類はしない	確認
イメージアナライザー	不問		Comet IV または Komet IV
細胞毒性	病理観察？		進行中またはいいえ
統計	不問		Dunnet または使用せず
被験物質の選択		実行委員会検討事項、Benzo[a]pyrene,2,6-diaminotoluene が推奨された。	

統計学的検定結果としては、安評センター推薦の Dennett's 検定について報告された（資料 20 の後半および資料 21）。陽性対照物質の低用量において施設 2 の胃に有意差を認めない以外（この原因は陰性対照値によると考えられる）、ほとんどの結果が Dennett's 検定で有意となった。この解析方法や分散、変動係数などをもとに、プレバリデーションを経てバリデーションの成功基準を決めることとなった。

さらに、資料 22 に示すように、スライド間のバラツキについても検討された。個体差に比べ、スライド間の差は少ない傾向が示された。そこで、観察細胞数を変えないで、スライド数を 2 枚から 3 枚／匹に増やす代わりに動物数を 5 匹から 4 匹に減らす Reduction が可能かという検討を行うため、スライド 3 枚／匹、5 匹でプレバリデーション行うことになった。

データ解析の結論として、Dennett's 検定による解析に加え、テールに含まれる %DNA 量の平均値を用いて施設間差の結果を比較することになった。

C-4) バリデーションに用いるプロトコールの作成

以上の問題点を考慮の上、添付資料 23 に示すような最終的なプレバリデーションのためのプロトコールが確定した。

会議の議事録を添付資料 24 に示す。

表 2. プロトコール確定事項

問題点	決定事項
GLP	GLP 精神を遵守
陽性対照物質	Ethylmethanesulfonate
陽性対照濃度	1 段階
溶媒	生理食塩水または CMC 数溶液
動物種	ラット CrI:CD(SD)雄 7-9 週令
匹数	5 匹
投与方法	経口、2 回（投与 21 時間後に 2 回目投与）

サンプリング時間	2 回目の投与 3 時間後
試薬の調整	アガロースゲル、用事調整
DNA 染色	Cyber-Gold
臓器種	胃、肝臓
核か細胞か	単一細胞
スライド調整	20 分放置
電気泳動条件	0.7-1V·cm, 0.25-0.3A 2-10°C
計測数	50
指標	テールに含まれる %DNA 量の平均値
イメージアナライザー	不問
細胞毒性	未決定
統計	Dunnet 検定

D. 考察

東京における会議において、来年以降の本格的なバリデーションに向けて以下の問題が提起された。

- ① 化学物質の分類を考慮した被験物質の選択
- ② 適切な被験物質数
- ③ 新規参加施設への技術導入を参加施設の公募と選択
- ④ バリデーション研究の計画
- ⑤ 陽性・陰性対照における動物数の削減

これを受けて、1 月の国内実行委員会で確認したところ、以下の予定が決まった（添付資料 25）。

- ① 2007 年 4 月から半年間かけて、現在の 5 施設でプレバリデーションを実施すること（4 物質／施設）
 - ② その間に本試験の参加施設を募集し、決められたプロトコールによる試験データの提出を求めるなどの厳しい条件を課して参加施設を決める
 - ③ 2008 年より 2 年間かけて 15 施設で 40 物質の試験を実施することなどの予定が示された。
- これを受けさらに
- ④ Phase で区切り、データまとめやプロトコール