200736017A

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19年度　総括・分担研究報告書

研究代表者　大野泰雄

平成20年（２００８）年　4月

研究代表者

大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所）

研究分担者

小島　肇　（国立医薬品食品衛生研究所　薬理部）

小野　敦　（国立医薬品食品衛生研究所　毒性部）

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. 分担研究報告
1．遺伝毒性試験方のバリデーションとバリデーションの管理と実施------ 13
小島　肇

2．内分泌かく乱化学物質試験法のバリデーション---------------------- 209
小野　敦

3．OECD/EDTA validation management活動との調整--------------------- 293
小島　肇

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ------------------------------ 331

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ------------------------------ 333

平成18年度厚生労働科学研究費補助金(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（H18-化学--一般-003）」

総括研究報告書

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ジェン受容体α(ＥＲα)に対するレポーターアッセイ（HeLa 法)および 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研究を実施し、その妥当性の検討を行っている。

コメットアッセイについては in vivo および 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研究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。昨年度は国内外の実行委員会での議論および参加施設の in vivo Phase I バリデーション研究をへて、プロトコールを決定した。本年度はこのプロトコール用いて、3 物質をブラインドで配布し、2007 年 5 月から半年間かけて、Phase I バリデーション研究と同様の 5 施設で Phase II バリデーション研究を実施した。その結果、陽性対照として用いた EMS(Ethylmethnasulfonate)においても統計学的に有意な陽性結果が得られない場合が生じ、プロトコールの遵守がなされていない可能性が示唆された。また、施設間内のバラツキが大きく、プロトコールの改良の必要性が示された。今後、改良プロトコールを確立し、かつその遵守を徹底し、PhaseⅢバリデーション研究としてほぼ同様の実験を来年度早々開始の予定である。

一方、本年度から in vitro バリデーション研究の組織を明確化し、Phase I バリデーション研究を開始した。まず in vivo プロトコールを参考に in vitro 版を確定し、リードラボである国立衛研において 5 物質のデータを得た。現在、in vivo と同じ 5 施設で確認実験を遂行中である。

内分泌かく乱作用の検討については、本年度は、HeLa 細胞をベースとしたＥＲαに対するレポーターアッセイ試験(HeLa 法)において、アゴニストアッセイ法としての OECD ガイドライン案に対するコメントに対応した。また、来年度に計画しているアンタゴニストアッセイ法としてのバリデーション研究に向けて品質管理基準（Quality Control）および性能基準（Performance criteria）を定めるための検討および抗エストロゲン活性の評価法について検討するとともに、次年度計画を立案した。一方、Lumi-cell 法については、米国の ICCVAM（Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods）と EU の ECVAM（European Centre for the Validation of Alternative Methods）との共同で、共通のプロトコールによる標準物質およびコントロール物質を用いた国際バリデーション研究の Phase I を実施し、本アッセイ系の検出能力や再現性について検討し、施設内のデータベースを構築した。また、細胞毒性評価法として提案されている目視評価法について細胞毒性濃度のビスフェノールＡを用いた検証を実施した。

これらの試験法の OECD ガイドライン化を目指し、Standard Project Submission Form（SPSF）を 2008 年 1 月までにそれぞれの担当省庁を通して OECD に提出した。

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

既存およ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、従来の動物を用いる安全性試験法で評価するに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、バリデーション研究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研究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。

本研究では我が国およ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研究を、2）内分泌かく乱性についてはLumi-cell法およびHeLa細胞をベースとしたエストロジェン受容体αに対するレポーターアッセイ試験法(HeLa法)のバリデーション研究を実施する。

B. 方法

コメットアッセイについては、昨年度は決定したプロトコール用いて、3物質をブラインドで配布し、2007年5月から半年間かけて、PhaseⅠバリデーション研究と同様の5施設でPhaseⅡバリデーション研究を実施した。一方、本年度からin vitroバリデーション研究の組織を明確化し、PhaseⅠバリデーション研究を開始した。内分泌かく乱性のスクリーニングについてはLumi-cell法については、共通のプロトコールによる標準物質およびコントロール物質を用いた国際バリデーション研究のPhaseⅠを実施し、本アッセイ系の検出能力や再現性について検討した。HeLa法については、来年度に計画しているアンタゴニストアッセイ法ではバリデーション研究に向けて品質管理基準 および性能基準 を定めるための検討を行った。

B.　結果および考察

個々の試験法の結果については、後に詳細を報告する。ここでは、要約のみ記載する。

コメットアッセイの中で、in vivo試験においては、PhaseⅡバリデーション研究において施設間でバラツキが生じ、陽性対照で適合結果が得られない施設がでた。今後、プロトコールを改良し、このプロトコールを用いてPhaseⅢの追加バリデーション研究を実施する予定である。一方、in vitro試験においては、PhaseⅠバリデーション研究が進行中である。

内分泌かく乱作用スクリーニング試験法として、今回検討した試験法の中で、Lumi-cell法については本アッセイ系の検出能力や再現性について検討を行い、施設内のデータベースを構築した。HeLa法については、品質管理基準 および性能基準を定め、プロトコールを改良するとともに、次年度の計画を立案した。

D. 結論

試験法の特性と限界が明らかにし、行政的試験法としての使用可否が明らかにするとともに、国際的にハーモナイズされたガイドライン作成につながることが期待して、いずれの試験においても欧米の機関と協力して国際バリデーション研究を実施している。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

F-1）論文発表

1) 大野泰雄：動物福祉と動物実験代替法への考慮の必要性について。Biophilia 3, 4-5 (2007)
2) 大野泰雄：動物実験代替法の国際動向。Fragrance Journal 10, 20-28 (2007)
3) 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. 日本薬理学雑誌 印刷中
4) 大野泰雄：WC6（第6回国際動物実験代替法会議）を終えて. 日本動物実験代替法学会News Letter. 34, 2-4. 2007.
5) Takao Ashikaga, Hitoshi Sakaguchi, Kenji Okamoto, Makoto Mizuno, Jun Sato, Takaaki Yamada, Mayumi Yoshida, Naoko Ota, Seiji Hasegawa, Tatsuji Kodama, Yuko Okomoto, Hirofumi Kuwahara, Nanae Kosaka, Sakiko Sono, Yasuo Ohno: Assessement of the human cell line activation test (h-CLAT) for skin sensitization; Results of the first Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 27-35, 2008
6) Hajime Kojima, Tomoko Ando, Katsuhiro Inagaki, Mahito Ohhira, Tadashi Kosaka, Yosuke Nakamura, Hisashi Torishima, Noriyuki Morikawa, Jun Kanno, Mami Kuboki, Michiru Genno, Masaru Nokata, Takanori Harada,

Takashi Morimoto, Isao Yoshimura, Yasuo Ohno: Validation of human skin models for skin corrosibvity tests in Japan. AATEX 13, 36-44, 2008

7) 小島肇夫、バリデーションについて、最新動物実験代替法、技術情報協会pp. 267-273 (2007)

8) 小島肇夫、日本における動物実験代替法の開発動向、Fragrance Journal 10, 29-34(2007)

9) 小島肇夫、動物実験代替法のバリデーション、COSMETIC STAGE, 8, 54-56(2007)

10) 小島肇夫、代替法国際動向から見た新技術導入の可能性、動物実験代替法のためのバイオマテリアル・デバイス、シーエムシー出版pp. 1-5 (2007)

11) 小島肇夫、動物実験代替法の現状と展望、日本薬理学会会誌、130、505-509 (2008)

12) Kojima, H., JaCVAM: An organization supporting the validation and peer review of new alternatives to animal testing, WC6 proceedings, accepted (2008)

13) 小島肇夫、EUにおける動物実験代替法の現況とREACH対策、日皮協ジャーナル、30(2) 156-162 (2008)

14) Kojima, H., Perspectives on validation and regulatory acceptance of animal alternative testings in Japan, P&G Actives Risk Communication, 2(1), 1-4 (2008)

F-2) 学会発表

1) 大野泰雄:第6回国際動物実験代替法会議開催報告. 日本動物実験代替法学会総会 (2007.11.20) 東京

2) 金子晃久、加藤基浩、橋本博幸、山田泰弘、長谷川真絹、中村明生、神山佳輝、森田繁道、大野泰雄:中空糸3次元培養ヒト凍結肝細胞を用いたCYP3A酵素誘導評価と施設間バリデーション. 日本薬学会第128年会(2008.3.28)

3) Kojima, H., JaCVAM Update, Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods, Bethesda, (June, 2007)

4) Kojima, H. JaCVAM Update, 6th World Congress on Alternatives 6 Animal Use in the Life Sciences, p.119, Tokyo (2007)

5) Kojima, H. JaCVAM Process to Validate and Peer Review of New Alternative Methods, 6th World Congress on Alternatives 6 Animal Use in the Life Sciences, p.82, Tokyo (2007)

6) Kojima, H. Validation study using Japanese models, 6th World Congress on Alternatives 6 Animal Use in the Life Sciences, p.64, Tokyo (2007)

7) Kojima, H., JaCVAM Update, ECVAM Scientific Advisory Committee, Ispra (November, 2007)

8) 小島　肇、代替法を取り巻く内外の動きと今後の方向性、皮膚基礎研究クラスターフォーラム第2回教育セミナー、東京 (2007)

9) 小島　肇、動物実験と代替法の現状、城西大学生命科学研究センター講演会、城西大学(2007)

10) 小島　肇、EUにおける動物実験代替法の現況とREACH対策、日皮協・会員研究会、京都(2007)

11) Arai, S., Saitou, M., Takashima, Y. Honma, M. and Kojima, H., A new trial for in vitro Comet assay using a 3-dimensional human epidermal model, 36th Annual Meetings of the Japanese Environmental Mutagen Society, Kitakyusu (2007)

12) Kojima, H., et al. Validation and implementation, Round table on International aspects of validation & accept, Regulatory Acceptance and Implementation of 3R approach, Annual Conference 2007 EPAA, Brussels (2007)

13) Kojima, H., The Importance of the in vivo comet assay in genotoxicity testing, Predictive Human Toxicity and ADME/TOX studies, 3rd Annual conference of Mondial Research Presentation, Brussels (2008)

14) Kojima, H., et al., Panel Discussion, ICCVAM Tan-Year Anniversary Symposium, Washington DC (2008)

15) 小島　肇、日本の動向とJaCVAMの活動、JaCVAM第1回ワークショップ「昨今の試験法ガイドラインを巡る国際動向」、東京 (2008)

16) 中村昌文、半田洋士、J.D.Gordon、G.C.Clark、小野 敦、小島 肇 "LUMI-cell ER アッセイ法の基礎性能および国際的バリデーション計画について" 第10回環境ホルモン学会研究発表会・国際シンポジウム 、埼玉 (2007)

G. 知的財産権の出願、登録状況

なし

以下にそれぞれの試験の概要を示す。

（1）コメットアッセイ

A. 研究目的

遺伝毒性試験法として、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、及び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。一方、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。これ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、スポットした時のままの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、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本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研究ができず、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研究を実施し、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、バリデーション研究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

B-1 組織

本バリデーション研究の組織は昨年度設立したが、本年度より in vitro バリデーション研究も開始すること、および T. Hartung 氏（ECVAM）の希望により ECVAM の代表が R. Corvi 氏に交代となった。よって、8 月の第 3 回国際バリデーション実行委員会会議において本国際バリデーション研究の組織を見直した。

新しいコメットアッセイバリデーション研究のための国際および国内実行委員会のメンバーを以下に示す。このメンバーで 8 月に第 3 回、3 月に第 4 回国際バリデーション実行委員会（以後、実行委員会と記す）を日本で開催した。なお、第 4 回実行委員会開催にあたり、情報の公開およびパブリックコメントを集めるため、JaCVAM ワークショップを東京にて開催した。

B-1-1 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）

In vivo 担当委員長（In vivo 委員長と記す）
宇野芳文（三菱田辺製薬株式会社）

In vitro 担当委員長（In vitro 委員長と記す）
本間正充（国立衛研　変異遺伝部）

委　員　L. Schectmann（元 ICCVAM : Interagency Coordinating Committee on the Validation of

Alternative Methods)

R. Tice (The NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods :NICEATM)

R. Corvi (European Centre for the Validation of Alternative Methods : ECVAM)

事務局　小島　肇（国立衛研　安全性生物試験研究センター　薬理部；Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM)）

B-1-2 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

B-1-3 コンサルタント

B. Burlinson (Huntingdon Life Sciences)

D. Lovel (Univ. of Surrey)

B. Young (BioReliance)

S. Hoffman (ECVAM)

Sue Nee Perk (KITR)

大森　崇（京都大学医学部医学研究系）

鈴木雅也（食品医農薬安全評価センター）

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）

B-1-4　バリデーション研究参加施設

Huntingdon Life Sciences

BioReliance

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

B-2. 試験方法

B-2-1) in vivo 試験

昨年行われた Phase I バリデーション研究ではプロトコールの最適化のために EMS (Ethylmethnasulfonate) を用いた検討が 5 施設で行われた。その結果を受けて改良されたプロトコールを用いて、本年 5 月から開催された Phase II バリデーション研究では、EMS 200mg/kg 濃度を陽性対照として、ブラインド化された以下に示す 3 物質を濃度と溶媒を指定して Phase I バリデーション研究と同じ 5 施設に配布し、実験を開始した。

A: 2, 4-Diaminotoluene

B: Acrylamide

C: 2, 6-Diaminotoluene

昨年度に決まったプロトコール概要の決定事項を以下に示す。

①動物：Crl:CD (SD) ラット雄　7-9 週令を 5 匹／群使用

②投与方法：強制経口投与（初回投与 21 時間後に 2 回目投与し、その 3 時間後に安楽死させ、臓器をサンプリング）

③適用臓器：胃および肝臓

④サンプル：単一細胞を使用

⑤電気泳動：低温で実施

⑥指標：テールに含まれる DNA 量の細胞全体量に対する割合（%）の平均値

本結果は、2007 年末を期限にコンサルタントである生物統計学者の大森　崇准教授（京都大学医学部医学研究系）に提出し、Dunnet の両側あるいは片側検定で統計学的検定を行い、危険率 5 % を有意基準として解析することとされた。

なお、各施設の実験は 2007 年内に終了し、報告書およびデータは 2008 年 1 月中旬までに集まった。集まったデータシートからデータを並べ換え、スクーリングするとともに、統計学的な解析が実施された。

この解析結果が第 4 回実行委員会で発表され、そのデータをもとに意見交換した。なお、この会議の 1 週間前（全データ収集後）に被験物質のコードが開示され、この会議において初めて施設番号が in vivo 実行委員長から開示された。

B-2-2) in vitro 試験

In vitroのプロトコールは8月の第3回実行委員会にて本間in vitro委員長より初案が提出された。以後、種々の寄せられた意見をもとに修正が行われ、2007年10月に確定された。このプロトコールを用い、in vivoと同じ施設による参加協力を得て、細胞、S9、被験物質を配布して年末から実験が開始された。

以上のような経過もあり、3月上旬の時点では各施設の実験はまだすべて終了していないこともあり、第4回実行委員会では、プロトコール提案者の本間in vitro委員長の作成した報告書および各施設の途中経過を確認しながら、意見交換を行った。

プロトコールの概要を以下に示す。

細胞株：ヒトリンパ球由来細胞株　TK6細胞
培養液：10%FBSを含むDMEM
処理条件：4時間処理
代謝活性化：あり
電気泳動および標本観察：in vivo試験と同様
試薬等：バリデーション研究のため、細胞株、血清、S9は共通の会社およびロットのものが配布された。
被験物質：同一メーカーの同一ロットが非ブラインドにおいて配布され、かつ試験濃度を指定して実施した。

A:　Ethylmethanesulfonate (EMS)
B:　Mitomycin C (MMC)
C:　Cycloheximide
D:　2－Aminoanthracene(2-AA)
E:　Triton X-100　(TX100)

C.研究結果

C-1　JaCVAMワークショップ

コメットアッセイの国際バリデーション研究を進めるにあたり、関係者の情報を共有化し、かつ国内外の動向を把握するため、協力研究者として環境省から戸田英作氏を招聘し、試験法ガイドラインを巡る国際動向およびコメットアッセイに関するバリデーション研究のセミナーを開催し、それをもとに意見交換を行った。

1．「昨今の試験法ガイドラインを巡る国際動向」について

以下の3名が講演した。欧州や日本の動物実験代替法を巡る動向について確認するとともに、OECDテストラインの概要について理解を深めることができた。

1）欧州の動向とECVAMの活動について
　Raffaella　Corvi (ECVAM)
2）日本の動向とJaCVAMの活動
　小島　肇（国立衛研）
3)OECDテストガイドラインの概要、手続き、規制における活用、最近の動向
　戸田英作（環境省環境保健部化学物質審査室）

2．「Evaluation of Comet Assay -Present State and Future」について

以下の4名が講演した。コメットアッセイのバリデーション研究の進捗とその問題点について理解を深めることができた。

1）Overview
　Brian Burlinson (Huntingdon)
2) *In vivo* validation study
　宇野芳文(三菱田辺製薬)
3)　Practical issues to be discussed at protocol in this validation study
　Andy Kraynak (Merck)
4）*In vitro*　validation study
　本間正充（国立衛研）

C-2　In vivo試験

3物質毎に同時に行われたEMSの結果から、得られた5施設、3回の結果はいずれも統計学的に有意であった。表2に示すように、肝臓においては施設内のCV値は16.97～54.5%、平均で56.15%であり、施設内間のバラツキは大きかった。

一方、胃でも、施設内間のバラツキが大きく、施設内のCV値は3.1-47.95%、平均で44.82%であった。得られた5施設、3回の結果のうち、3回目の結果で2施設が陽性と判断されなかった。

各被験物質における結果においては、施設毎に異なった傾向が認められた。特に、陽性を示すと予想されたアクリルアミドが全施設で陽性とならなかったとともに、各施設の反応性は全般的に低かった。

これを受け、実行委員会では以下の将来への方針およびプロトコール改定提案がなされた。

1）　指標としては%DNA in tailを用いる。Tailの長さやオリーブtailモメントは追加情報とする。
2）　溶媒対照と比較して、陽性対照の%DNA in tailが2～5倍になった場合に

適切な試験が行われたとして、データを採用する。

3） 今回のEMSの投与量が低すぎたかもしれない。今後は300mg/kgに改定を考えている。

4） 実験に用いる低温アガロースのメーカー確認

5） 被験物質の2回投与（1回投与の3時間後）

6） スライドの脱水工程を不要とする

7） EDTAはアガロースに加えない

8） 電気泳動温度を10℃未満とする（暫定案）

9） Histopathologyは必要である。

10） 一視野5〜10細胞を観察する（in vitro試験では重要である）。

C-3 In vitro試験

本間in vitro委員長の実験結果では、EMSおよび2-AAにおいて陽性反応が認められた。MMC、シクロヘキシミドは無反応であった。TX100の最高濃度の反応は細胞毒性によるものである。

プロトコールについて意見交換がなされ、主な問題点として以下のものが提起された。一部追加実験に関する提案があり、以下の項目を含め今後プロトコールや計画が改良され、追加実験が実施されることになった。

1） S9の供給と活性について

明確な陽性反応を確認できる被験物質を用いた追加実験の提案があった。

2） 細胞毒性について

トリパンブルーを処理3-4時間後に測定する。Hedgehog（核が小さいか、なくなっている泳動像）が良い指標となるなどの意見が得られた。

3） 処理枚数について

2枚が推奨された。

4） その他

細胞種、血清、陽性対照物質などについて意見が得られた。

D. 考察

In vivo試験においては、施設間でバラツキが生じ、胃での結果では陽性対照で適合結果が得られない施設がでた。被験物質においても陽性が予測されたアクリルアミドをすべての施設が陰性と判定したとともに、各施設の反応性が低かった。

原因は定かではないが、陽性対照の投与回数が守られず、また、電気泳動条件も見直さなければならない状況である。もう一度、各ラボの背景データの検証を行い、細部の詰めを行った後にプロトコールの改良が行われる予定である。

しかし、5施設はそれぞれがコメットアッセイの専門施設であり、これまでの施設毎のノウハウが蓄積され、試験法の詳細が微妙に異なっている。これが陽性対照のバラツキおよび被験物質の判定結果の違いに結びついていると考える。

また、試験計画も予備的検討がやや不十分であったのかもしれない。陽性対照の濃度設定や被験物質の選定や濃度設定が妥当であったかの検証は、PhaseⅢ以降のバリデーション研究への教訓として生かされなければならないと考えている。

国際バリデーション研究の問題点は、1）技術講習会を避け、紙面のみで技術の共有化を図ること、2）熟練した施設が参加する場合、手技が確立されており、プロトコールによる新たな提案を素直に受け入れない点にある。今後、この点を重視したバリデーション研究を構築する必要があると感じている。

これらの改良を受け、PhaseⅢのバリデーション研究として、5施設に2〜3コード物質を配布して追加実験を行い、プロトコールの改善を確認することになった。このバリデーション研究は5月〜8月までの間に実施され、その結果を今秋に開催予定の第5回バリデーション実行委員会で確認することが内定した。さらに、年内に実行委員会を開催し、PhaseⅣの本格的なバリデーション研究を開始する予定である。

E. 健康危険情報

なし

（2）内分泌かく乱化学物質試験法のバリデーション研究

A. 研究目的

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研究を実施し、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 ERα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、これまで厚生労働省および経済産業省の研究費により我が国において開発が進められてきたものであり、アゴニストアッセイ法については、すでに国内におけるバリデーション研究が終了し、OECD においてガイドライン化に向けた提案を行い、現在、最終化に向けた検討が進められている。本年度は、HeLa 法に対してバリデーション専門家による第三者評価により示されたコメントへの対応を行った。また、第三者評価において指摘された「アゴニストについてしかバリデーションされていない」というコメントに対応し、来年度、アンタゴニストアッセイ法のバリデーション研究を JaCVAM-ECVAM の共同で実施する。そこで本年度は、アンタゴニストアッセイ法のバリデーション研究に向けて品質管理基準 (Quality Control) および性能基準 (Performance criteria) を定めるための検討を行うと共に、これまでの研究から抗エストロゲン活性の評価において logistic 式が適用できない物質があることが想定されることから、直線回帰により算出する lin.IC50 および lin.IC30 について検討を行った。

一方、Lumi-cell 法は、米国 Xenobiotic Detection Systems Inc.(XDS 社)により開発された方法で、ヒト卵胞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セプター(ER)との結合をルシフェラーゼ活性により検出する方法である。本法については、バリデーション研究は実施されていない。本研究では、JaCVAM、NICEATM および ECVAM と共同で国際バリデーション研究を進めている。本年度は、NICEATM、ECVAM、そして JaCVAM によって構成される運営委員会により計画されたアゴニストおよびアンタゴニスト検出のためのマルチフェーズ国際バリデーション研究の Phase I を行った。Phase I では共通のプロトコールによる標準物質およびコントロール物質を用いた独立した実験により LUMI-CELL 法の能力を実証し、またあわせてビスフェノールAの細胞毒性濃度検査により細胞活性の目視による評価能力を実証した。基準をクリアしたアゴニスト、アンタゴニストの標準物質およびコントロール物質の結果は本バリデーション研究の PhaseⅡの経歴データベース作成に使われる。各試験施設における試験結果は、Validation Study Project Coordinator が取りまとめ、サイト内およびサイト間の再現性、細胞活性目視法の信頼性等について評価した。

B. 研究方法および研究結果

B-1. hERα-HeLa-9903 細胞を用いた ERα アンタゴニスト検出系の再現性および妥当性に関する研究

B-1-1 研究方法

試験施設:本試験は、(財)化学物質評価研究機構・安全性評価技術研究所(試験責任者:武吉正博、赤堀有美、宮浦英樹)において実施した。

被験物質およびその略号は以下のとおり。

4-Hydroxytamoxifen (*trans*) : OHT
Tamoxifen (*trans*) : TAM
Raloxifen hydrochloride : RAL
ICI 182780 : ICI

B-1-2 試験法、結果および考察

B-1-2-1 抗エストロゲン活性評価試験の品質管理基準 (QC; Quality Control)の設定

1) 25 pM の E2 対照区と 1 nM の E2 対照区の応答性の比較

抗エストロゲン活性評価において基準活性となる 25 pM の E2 は、平均的な E2 の用量反応曲線の EC80 に相当する濃度であり、1 nM は E2 自身の応答が飽和している濃度であることから 1 nM の E2 の RTA は 100%より大きい必要がある。そこで、抗エストロゲン活性評価試験における基準活性となる 25 pM の E2 の濃度が最大活性未満であることを保証するため、これを抗エストロゲン活性評価における QC 項目の一つとした。

本検討で実施した 10 回繰返し測定において、8 回目(n-8)のデータでは 1 nM の E2 の RTA が 80.7%であり、抗エストロゲン活性評価において QC を満たさなかった試験と判断した。以降は n-8 のデータを除外して解析を行った。

2) 25 pM の E2 対照区の Fold-induction の許容値

転写活性化倍率 (fold-induction, FI) は抗エストロゲン活性を測定する上でそのダイナミックレンジに影響を与え、試験精度を左右する重要な要素であることから抗エストロゲン活性評価における QC 項目の

一つとした。本検討で実施した9回繰返し測定においては、25 pMのE2のFIは全て6より大きかったことから、25 pMのE2のFIの許容値は6以上とした。

3) 抗エストロゲン活性の陽性対照区の許容値

25 pMのE2が誘導する活性を完全に抑制する対照区として1 μMのOHTを設定し、9回の繰返し測定を実施したデータにおいては、相対転写活性化倍率（RTA; Relative Transcriptional activity (%)）は4.1±4.3%であり、最大でも8.0%であった。アゴニスト活性におけるQCを設定する際、背景データの平均±3SDの範囲を使用したことから、1 μMのOHTの抗エストロゲン活性の陽性対照区の許容値は-8.7%～16.9%とし、これを抗エストロゲン活性評価におけるQC項目の一つとした。

4) 細胞毒性評価用の陽性対照区の許容値

抗エストロゲン活性評価においては、化学物質による細胞毒性による影響と抗エストロゲン活性による影響を区別するために、細胞毒性試験を平行して実施することが望ましく、抗エストロゲン活性評価試験と細胞毒性試験に使用する被験物質の調製液が完全に同じであることにより、結果の解釈がより正確なものとなる。そこで、細胞毒性試験において必要となる明確な細胞毒性を示す陽性対照として100 μMのDigitoninを使用したところ、9回の繰返し測定におけるRTA値はいずれも0未満であった。これを抗エストロゲン活性評価におけるQC項目の一つとした。なお、RTA値が0未満になる理由としては、細胞毒性に伴う細胞剥離が原因の一つと考えられる。

以上2.1.1～2.1.4に基づき各プレートの品質管理基準を設定した。

B-1-2-2. 試験の性能基準（Performance Criteria）の設定

本検討では新たに設定したQC用対照区を含めて、抗エストロゲン活性が既知の4物質（OHT、ICI、TAMおよびRAL）について抗エストロゲン活性を10回繰返し、測定した。前述のとおり、n-8ではQCを満たさなかったためにAVGおよびSDの算出から除外した。また、性能基準を設定するに当たり、測定により得られたlin. IC30、lin. IC50は、ばらつきを正規分布として評価するために対数値としてとして取り扱った。ここで、n-1のRALの測定結果において、lin. IC30が2ポイント算出されたことから、RAL測定における試験系の安定性が疑われたことから、n-1のデータをAVGおよびSDの算出から除外した。残りの8回の繰返し測定から得られた4物質のlin. IC30、lin. IC50の標準偏差（SD）はそれぞれ、0.14～0.30、0.07～0.25であり、変動係数（CV）の絶対値はそれぞれ1.47～3.01%、1.46～2.78%であった。前述したようにアゴニスト活性における性能基準を設定する際に背景データの平均±3SDの範囲を使用し、OHT、ICI、TAMおよびRALを用いた試験性能基準を設定した。

B-2. 内分泌かく乱物質スクリーニングLumi-cell ERアッセイのバリデーション研究

B-2-1 研究方法

試験施設：本試験は、株式会社 日吉 技術部分析研究課（試験責任者：中村　昌文）において実施した。

B-2-2. 検討項目

1）Lumi-cell ERの国際的バリデーション研究(Phase I)

アゴニストおよびアンタゴニストの標準およびコントロールの試験を用いて、Lumi-cell ERアッセイの熟練度合いを示し、ラボ内の繰り返し性およびラボ内・ラボ間の再現性を示し、個々の実験を行って（アゴニストおよびアンタゴニストのプロトコールそれぞれ10回）経歴データベース作成を目的とする。

アゴニスト試料
- 17β-estradiol (E2)
- p,p′-methoxychlor (methoxychlor)

アンタゴニスト試料
- 17β-estradiol (E2)
- Raloxifene Hydrochloride (RAL)
- Flavone

2）Lumi-cell ERの国際的バリデーション研究(Phase I)追加

アゴニスト標準およびコントロール、Bisphenol-Aの試験を用いて、Lumi-cell法に定められた試験と併行して肉眼的観察お

よびCell TiterGloRで測定する。個々の実験を行って、データベースを作成する。
3）Lumi-cell ERの国際的バリデーション研究(Phase I)追加2

Bisphenol-A は、10mg/ml の Stock solutionを作成し、最終濃度100、90、80、70、60、50μg/mlで6段階(100μg/ml～50μg/ml)を供試試料とする。これらの濃度で、各試料3ウェル、別のプレートで計3回測定する。

B-1-3 結果

・10回の試験の結果、アゴニストおよびアンタゴニストに係らず、再現性の高い試験結果が得られた。施設内のデータベースを構築できた。
・顕微鏡を使った目視判定および Cell TiterGloを使ったViability(%)の数値と合致していた。

C. 考察および今後の展望

HeLa系については、昨年度までに実施した試験条件に、試験の品質を保証するQCのための対照区を含め、抗エストロゲン活性が既知の4物質を用いて10回の繰返し試験を実施し、各試験プレートの品質管理基準および性能基準を設定した。性能基準については、抗エストロゲン活性の評価において logistic 式が適用できない物質があることが想定されることから、直線回帰により算出するlin.IC50およびlin.IC30についても検討を行い、抗エストロゲン活性が既知の4物質のlin.IC30、lin.IC50 および var.IC50 の標準偏差 (SD)および変動係数 (CV)をもとに、OHT、ICI、TAMおよびRAL を用いた試験性能基準を設定した。設定した基準は、来年度実施が予定されている複数の試験機関が参加するバリデーション研究における基準値として有用と思われる。しかしながら、本年度で設定した各基準は試験プロトコールを開発したリードラボのみの試験データに基づくものであり、次年度実施が予定されているバリデーション研究で得られるデータから、その妥当性を確認し、必要に応じて見直しを行うことも考慮するべきものと思われる。

Lumi-cell 法のプロトコールに関しては、データの採用[PASS or Fail]の基準があいまいであった。そこで本研究では、Phase I結果より独自にデータ許容基準を作成した。この基準は、Phase I アゴニストアッセイ Ag3 およびAg4のデータの不採用理由は、Induction not が 3 倍を超えないためであった。これは、一部の DMSO ウェルでの Background が高く出たことが原因であった。この理由については明らかには出来ていないが、作業中でのコンタミネーションの可能性も考えられたため、それ以降の暴露工程は、安全キャビネット内で行うこととした。BG-1細胞については、試験に使用してよい細胞の継代数の限界が示されておらず、Phase Iでは、10～60 代までを使用可能数と判断し分析を行ったが、今後、限界代数の基準を設定する必要があると考えられた。また、アッセイ効率に関して、転写活性測定用試薬として、Promega Luciferase Assay Kitを使用することになっているが、同種の試薬は様々な商品が販売されており、発光強度が長時間保持し、細胞を溶解させる成分も発光試薬に含まれているワンステップの試薬の使用を検討することでアッセイの簡素化が可能と考えられる。また、BG-1細胞は、エッジエフェクトが少ないことがわかっているので、Test Plate Layout の変更が可能と考えられる。さらに、細胞の播種や継代に関しても改良を検討する余地があると考察された。これらの点については、今後、運営委員会を通し、今後の検討課題として報告した。

D.健康危険情報

なし

3）OECD/EDTA validation management 活動との調整

A.研究目的

動物実験代替法に関しては、化粧品の安全性評価法を中心に、多くの検討が行われている。開発された皮膚腐食性試験や光毒性試験代替法などが、欧米および我が国において大規模なバリデーション研究と評価が行われ、一部がOECDのガイドラインに取り入れられ、化学物質の評価にも用いられている。しかし、感作性試験や生殖毒性試験など、まだ、開発やOECD基準に則ったバリデーション研究がなされていないものも多い。一方、内分泌かく乱化学物質の*in vitro*評価法については無細胞系受容体結合試験、酵母等各種導入受容体結合試験、各種受容体導入レポーター遺伝子転写活性化試験（Lumi-cell法など）、CERIが開発したHeLa法の他、アロマターゼ活性化試験など、いくつかの方法が開発され、OECD

ガイドライン化に向け検討が行われている。DNA損傷性を調べるコメットアッセイについても、*in vitro*および*in vivo*の試験法が開発されているが、データの評価、解釈のみならず方法論に関しても未熟であり、国際的なガイドラインは作成されていない。

本研究はこれら今まで評価が遅れていた化学物質の安全性評価のための試験法を OECD の基準に則ってバリデーション研究と評価を行い、ガイドライン化を目指すものである。

B. 研究方法

B-1 OECD/EDTA VMT-NA での会合

2007年11月13日～15日にイタリア イスプラで開催された OECD/EDTA VMT-NA に日本から小野 敦、小島 肇（以上、国立医薬品食品衛生研究所）、武吉正博、赤堀有美が出席した。

B-2 SPSF の作成

内分泌かく乱性スクリーニング法である Lumi-cell 法については、提案機関である ICCVAM および HeLa 法については、開発者である化学物質評価研究機構および遺伝毒性試験であるコメットアッセイについては国立医薬品食品衛生研究所で Standard Project Submission Form（SPSF）の原案が作成された。

C. 結果

C-1 OECD/EDTA VMT-NA での会合

OECDVMT-NA で検討が進められている各種の内分泌かく乱物質スクリーニングの進捗について報告があり、各国の代表とその内容について意見交換した。特に、日本で開発された HeLa 法については、OECD ガイドライン成立を目指し、日本主導でバリデーション研究の準備を進めていると報告し、その内容に助言を頂いた。

C-2 SPSF の提出

内分泌かく乱性スクリーニング法である Lumi-cell 法については、FDA および HeLa 法については、経済産業省および遺伝毒性試験であるコメットアッセイについては厚生労働省の担当官から Standard Project Submission Form（SPSF）が OECD に提出された。

D. 考察

本研究班のテーマである「化学物質リスク評価法の国際的バリデーション」の目的は、安全性評価に有用な新規試験法を公定化することである。その代表が OECD ガイドラインであることから、このガイドライン化を目指して SPSF が提出され、今後本格的な国際議論が巻き起こることを期待するものである。

平成18年度厚生労働科学研究費補助金（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（H18-化学-一般-003）」

分担研究報告書

遺伝毒性試験法のバリデーションとバリデーションの管理と実施

分担研究者　小島　肇　国立医薬品食品衛生研究所

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、プロトコー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。

昨年度は国内外の実行委員会での議論および in vivo Phase I バリデーションをへて、プロトコールを決定した。本年度はこのプロトコール用いて、3 物質をブラインドで配布し、2007 年 5 月から半年間かけて、Phase I バリデーションに参加した 5 施設で Phase II バリデーションを実施した。その結果、陽性対照として用いた EMS(Ethylmethnasulfonate)においても統計学的に有意な結果が得られない場合が生じ、プロトコールの遵守がなされていない可能性が示唆された。また、施設間のばらつきが大きく、プロトコール改良の必要性が示唆された。今後のこの改良プロトコールを用い、かつその遵守を定めた PhaseIII バリデーションを来年度早々開始の予定である。

一方、本年度から in vitro バリデーションの組織を明確化し、Phase I バリデーションを開始した。まず in vivo プロトコールを参考に in vitro 版を確定し、リードラボである国立衛研において 5 物質のデータを求めた。現在の 5 施設で実験を遂行中である。ただし、現時点ですでにプロトコールの問題点が提起され、Phase II バリデーションの追加実施が決まっている。

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本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

B-1 組織

本バリデーション研究の組織は昨年度設立したが、本年度より、8 月の第 3 回国際バリデーション実行委員会会議において本国際バリデーションの組織を見直した。

これは、in vitro バリデーションも開始することおよび T. Hurtung 氏（European Centre for the Validation of Alternative Methods : ECVAM）の希望により ECVAM の代表が R. Corvi 氏に交代となった。

新しい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のメンバーを以下に示す。このメンバーで、8 月に第 3 回および 3 月に第 4 回国際バリデーション実行委員会（以後、実行委員会と記す）を日本で開催した。なお、第 4 回実行委員会開催にあたり、情報の公開およびパブリックコメントを集めるため、JaCVAM ワークショップが東京にて開催された。

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）

In vivo 担当委員長(In vivo 委員長と記す)
　宇野芳文（三菱田辺製薬株式会社）

In vitro 担当委員長(In vitro 委員長と記す)
　本間正充（国立衛研　変異遺伝部）

委　員　L.Schectmann（元 Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods : ICCVAM）
　R. Tice（The NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods :NICEATM）
　R. Corvi（European Centre for the Validation of Alternative Methods : ECVAM））

事務局　小島　肇（国立衛研　安全性生物試験研究センター　薬理部 : Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods : JaCVAM）

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
　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)
D. Lovel（Univ. of Surrey）
B. Young（BioReliiance）
S. Hoffman（ECVAM）
Sue Nee Perk（Korean Institute of Toxicological Reaearch:KITR）
大森　崇（京都大学医学部医学研究系）
鈴木　　（食品医農薬安全評価センター）
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）バリデーション参加施設

Huntingdon Life Sciences
BioReliance
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

B-2. 試験方法

B-2-1　in vivo 試験

昨年行われた PhaseI バリデーションではプロトコールの最適化のためにエチルメタンスルフォネート (EMS) を用いた検討が 5 施設で行われた。その結果を受けて改良されたプロトコールを用いて、本年5月から開催されたPhaseⅡバリデーションでは、EMS　200mg/kg 濃度を陽性対照として、ブラインド化された以下に示す 3 物質を表1に示すように濃度と溶媒を指定して phaseI バリデーションと同様の5施設に配布し、試験を実施した。

昨年度に決まったプロトコール概要の決定事項を以下に示す。

①動物：Crl:CD (SD) ラット雄　7-9 週令を 5 匹／群使用

②投与方法：強制経口投与（初回投与 21 時間後に 2 回目投与し、その 3 時間後に安楽死させ、臓器をサンプリング）

③適用臓器：胃および肝臓

④サンプル：単一細胞を使用

⑤電気泳動：低温で実施

⑥指標：テールに含まれる DNA 量の細胞全体量に対する割合（%）の平均値

本結果は、2007 年末を期限に集められ、集まったデータシートからデータを並べ換え、スクーリングするとともに、統計学的な解析が実施された。

データは、コンサルタントである生物統計学者の大森　崇准教授（京都大学医学部医学研究系）により解析された。統計学的検定法としては、Dunnet の両側あるいは片側検定で統計学的検定を行い、危険率５％を有意基準として解析することとされた。

この結果が第 4 回実行委員会で発表され、そのデータをもとに宇野in vivo委員長を中心に意見交換した。なお、この会議の 1 週間前に被験物質のコードが開示され、この会議において初めて施設番号が in vivo 実行委員長から開示された。

表 1．In vivo バリデーションに用いた被験物質コード表

Laboratory	Number	Name	Solvent	Maximal dose (mg/kg)	Middle dose (mg/kg)	Minimum dose (mg/kg)
Merck	1	2,6-Diaminotoluene	Corn oil	500	unknown	unknown
	2	Acrylamide	Physiological saline solution	50	25	12.5
	3	2,4-Diaminotoluene	Physiological saline solution or Tween 80 2% solution	500	unknown	unknown
BioReliance	4	Acrylamide	Physiological saline solution	50	25	12.5
	5	2,6-Diaminotoluene	Corn oil	500	unknown	unknown
	6	2,4-Diaminotoluene	Physiological saline solution or Tween 80 2% solution	500	unknown	unknown
HLS	7	Acrylamide	Physiological saline solution	50	25	12.5
	8	2,6-Diaminotoluene	Corn oil	500	unknown	unknown
	9	2,4-Diaminotoluene	Physiological saline solution or Tween 80 2% solution	500	unknown	unknown
FDSC	10	Acrylamide	Physiological saline solution	50	25	12.5
	11	2,6-Diaminotoluene	Corn oil	500	unknown	unknown
	12	2,4-Diaminotoluene	Physiological saline solution or Tween 80 2% solution	500	unknown	unknown
An-pyo	13	2,6-Diaminotoluene	Corn oil	500	unknown	unknown
	14	2,4-Diaminotoluene	Physiological saline solution or Tween 80 2% solution	500	unknown	unknown
	15	Acrylamide	Physiological saline solution	50	25	12.5

B-2-2　in vitro 試験

In vitro のプロトコールは 8 月の第 3 回実行委員会にて本間 in vitro 委員長より初案が提出された。以後、参加施設より寄せられた意見をもとに修正が行われ、2007 年 10 月に確定された。このプロトコールに従い、in vivo と同じ施設における参加協力を得て、細胞株、S9、牛血清、被験物質を配布して年末から実験が開始された。

以上のような経過もあり、3 月上旬の時点では各施設の実験はまだすべて終了していないこともあり、第 4 回実行委員会では、プロトコール提案者の本間 in vitro 委員長の作成した報告書および各施設の途中経過を確認しながら、意見交換を行った。

プロトコールの概要を以下に示す。

細胞株：ヒトリンパ球由来細胞株　TK6 細胞

培養液：10%FBS を含む DMEM

処理条件：4 時間処理

代謝活性化：あり

電気泳動および標本観察：in vivo 試験と同様

バリデーション研究につき、細胞株、牛血清、S9 は共通の会社およびロットのものが配布された。

被験物質：同一メーカーの同一ロットが非ブラインドにおいて配布され、かつ試験濃度を指定して実施した。

A:　Ethylmethanesulfonate (EMS)

B:　MytomicinC (MMC)

C:　Cycloheximide

D:　2－Aminoanthracene (2-AA)

E:　Triton X-100　(TX100)

C.　研究結果

C-1　JaCVAM ワークショップ

コメットアッセイの国際バリデーション研究を進めるにあたり、関係者の情報を共有化し、かつ国内外の動向を把握する必要がある。協力研究者として環境省から戸田英作氏を招聘し、「試験法ガイドラインを巡る国際動向」および「コメットアッセイに関するバリデーション研究」のセミナーを開催し、それをもとに意見交換を行った。

1.「昨今の試験法ガイドラインを巡る国際動向」について

以下の 3 名が講演した。欧州や日本の動物実験代替法を巡る動向について確認するとともに、OECD テストラインの概要について理解を深めることができた。

1）欧州の動向と ECVAM の活動について
　Raffaella　Corvi (ECVAM)

2）日本の動向と JaCVAM の活動
　小島　肇（国立衛研）

3）OECD テストガイドラインの概要、手続き、規制における活用、最近の動向
　戸田英作（環境省環境保健部化学物質審査室）

2.「Evaluation of Comet Assay -Present State and Future」について

以下の 4 名が講演した。コメットアッセイのバリデーション研究の進捗とその問題点について理解を深めることができた。

1）Overview
　Brian Burlinson (Huntingdon)

2) *In vivo* validation study
　宇野芳文 (三菱田辺製薬)

3) Practical issues to be discussed at protocol in this validation study
　Andy Kraynak (Merk)

4）*In vitro*　validation study
　本間正充（国立衛研）

いずれも発表原稿を添付資料として示した。

C-2　In vivo 試験

各施設が 3 回に渡って実施した陽性対照物質である EMS の結果を表 2 および図 1 に示す。3 物質毎に同時に行われた EMS の結果から、得られた 5 施設、3 回の結果はいずれも統計学的に有意であった。表 2 に示すように、肝臓においては施設内の CV 値は 16.97～54.5%、平均で 56.15%であり、施設内間のバラツキは大きかった。

一方、胃でも、施設内間のバラツキが大きく、施設内の CV 値は 3.1-47.95%、平均で 44.82%であった。得られた 5 施設、3 回の結果のうち、3 回目の結果で 2 施設が陽性と判断されなかった。

各被験物質における結果においては、表 3 に示すように、施設毎に異なった傾向が認められた。特に、陽性を示すと予想されたアクリルアミドが全施設で陽性とならなかったとともに、各施設の反応性は全般的に低かった。他の 2 物質も陽性、陰性の評価が施設により分かれた。

これらの生データは添付資料 Fig. and Tables に示す。

また、各施設との意見交換の結果、以下の指摘や問題点が明らかになった。

1）　胃においては、処理のタイミングが重要である。

2）　投与回数がプロトコールでは 2 回であるが、陽性対照に限り 1 回にした施設があった。

3）　陰性対照の安定性を施設毎のヒストリカルデータを用いて検証すべきである。

4）　倍率と細胞密度を 200 倍で一視野 3～15 細胞とすべきである。

5）　電気泳動時の液温とコメット誘発の関係を調べきるべきである。

6）　電気泳動の電圧差が影響しているかもしれない。

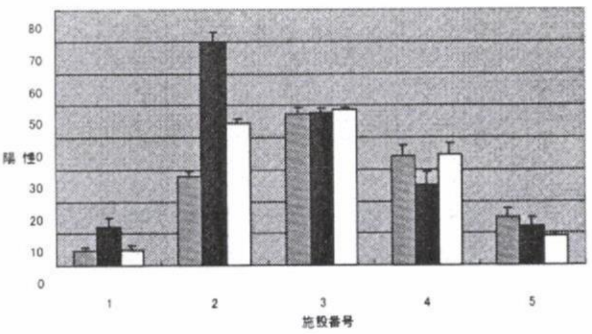
7）　電気泳動時間も関係があるかもしれない。

また、統計学者からは以下の指摘があった。

1）　陽性対照は明確に陽性を示さなければならない。その場合の陽性とは、溶媒対照の2～5倍、SDも10～20%が望ましい。
2）　陽性基準の作成は実行委員会の仕事である
3）　プロトコールの確定し、大規模なバリデーションに移管するにはさらなる追加試験が必要である。
4）　一化学物質当たり3施設からの結果が解析のためには必要である。

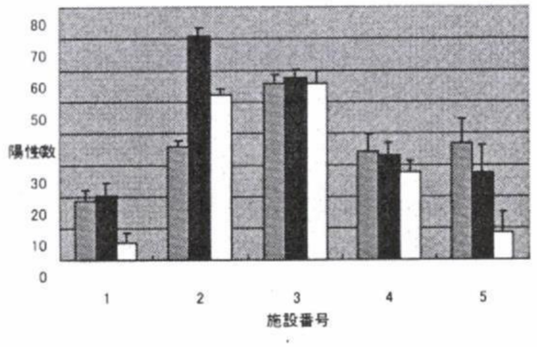
これを受け、実行委員会からは以下の将来への方針およびプロトコール改定の提案があった。
1）　指標としては%DNA in tail を用いる。Tailの長さやオリーブtailモメントは追加情報とする。
2）　溶媒対照と比較して、陽性対照の%DNA in tail が2～5倍になった場合に適切な試験が行われたとして、データを採用する。
3）　今回のEMSの投与量が低すぎたかもしれない。今後は300mg/kgに改定を考えている。
4）　実験に用いる低融点アガロースのメーカー変更への対応
5）　陽性対照物質を含む被験物質の2回投与（1回投与の3時間後）
6）　スライドの脱水工程を不要とする
7）　EDTAはアガロースゲルに加えない
8）　電気泳動温度が10度未満とする（暫定案）
9）　Histopathologyは必要である。
10）一視野5～10細胞を観察すべきである（in vitro試験では重要である）。

図1-1. 各施設における肝臓の陽性平均数



＊3回の試験結果

図1-2. 各施設における胃の陽性平均数



＊3回の試験結果

表２．陽性対照物質の溶媒比および変動係数（CV）値

CV of Effect (Effect is ratio of avarages of Estimate between EMS and cont. groups)

Analysis pattern A		Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 4	Lab 5
Liver						
EMS/Cont in	Vehicle	4.5	5.1	2.7	7.5	2.3
Chemical A	EMS	9.1	33	50	41.5	17.3
	Effect (ratio)	2.0	6.5	18.5	5.5	7.5
EMS/Cont in	Vehicle	2.8	4.3	3.7	3.5	1.2
Chemical B	EMS	15	74.4	51.2	28.5	13.4
	Effect (ratio)	5.4	17.3	13.8	8.1	11.2
EMS/Cont in	Vehicle	3.3	5.1	3.7	5.3	2.2
Chemical C	EMS	8.3	49.5	52.2	39.9	11.2
	Effect (ratio)	2.5	9.7	14.1	7.5	5.1
	Mean of Effect	3.30	11.16	15.49	7.07	7.93
	SD	1.80	5.56	2.63	1.36	3.06
	CV	54.58	49.82	16.97	19.30	38.58

Mean of Effect	8.99
SD	5.05
CV	56.18
(N=15)	

Stomach: calculated with 5 labs data						
EMS/Cont in	Vehicle	13.6	16.8	10.8	10.1	26
Chemical A	EMS	32.2	52.6	66.6	44.2	62.9
	Effect (ratio)	2.4	3.1	6.2	4.4	2.4
EMS/Cont in	Vehicle	12.6	10	12	12.2	13.5
Chemical B	EMS	32.8	80.8	69.6	45.1	41.1
	Effect (ratio)	2.6	8.1	5.8	3.7	3.0
EMS/Cont in	Vehicle	16.1	14.3	11.1	10.2	27.3
Chemical C	EMS	21.7	66.5	67	37.8	36.2
	Effect (ratio)	1.3	4.7	6.0	3.7	1.3
	Mean of Effect	2.49	5.29	6.00	3.93	2.73
	SD	0.17	2.54	0.19	0.39	0.44
	CV	6.70	47.95	3.10	9.93	16.18

Mean of Effect	4.31
SD	1.93
CV	44.82
(N=13)	

Data in yellow columns are excluded for calculation because of no significant increase in EMS

表３ In vivo 試験結果

Allocated Number	Name	Laboratory	Judge (liver)	Judge (stomach)	Pathology
1	2,6-Diaminotoluene	Merck	Negative	Negative	
5		BioReliance	Positive	Negative	
8		HLS	Positive	Positive	no change
11		FDSC	Negative	Negative	
13		An-pyo	Negative	Negative	no effect
2	Acrylamide	Merck	Positive	Negative	
4		BioReliance	Positive	Positive	no effect
7		HLS	Positive	Positive	effect in liver
10		FDSC	Negative	Negative	no response
15		An-pyo	Positive	Positive	no effect
3	2,4-Diaminotoluene	Merck	Negative	Negative	
6		BioReliance	Negative	Positive	some effect in liver
9		HLS	Positive	Positive	apoptosis and necrosis in liver
12		FDSC	Negative	Negative	
14		An-pyo	Negative	Negative	no effect

C-3　In vitro 試験

本間 in vitro 委員長の実験結果を図２に示す。EMS および 2-AA において陽性反応が認められた。MMC、シクロヘキシミドは無反応であった。TX100 の最高濃度の反応は細胞毒性によるものである。

これらについて、第 4 回実行委員会の意見交換内容を以下に記す。主な問題点として以下のものが提起された。

1）S9 の供給と活性について
2）細胞毒性について
3）処理枚数について
4）その他

1）S9 問題
・今回用いた Biopredic 社製の S9 と日本で汎用されているキッコーマン社製との比較では同等であった。
・　S９が効かなかった施設もあった。
・　MolTox 社の S9 を用いて、ジメチルニトロソアミンやシクロフォスファミドの追加試験を行うべきである(日本で購入できるか調査が必要である)。

2）細胞毒性
・トリパンブルーが一般的で使いやすい。
・　RCG と TB、ATP 測定が同様の結果を示した。オプションとして利用できるが限界もある。
・　Neutral　diffusion 法はよくない。細胞毒性について情報不足。
・　TB の 0 時間では細胞毒性がでない。3-4 時間後に測定が有用。
・　RCG24 時間後はよい指標である。
・Hedgehog が問題か？in vitro 特異的な問題である。スライドの質を示すよい指標である。100 細胞中、いくつ Hedgehog（核が小さいか、なくなっている泳動像）があったかの指標は必要である。
・２－AA ではほとんどが Hedgehog であった。重要な細胞毒性の指標である。
・EMS が陽性反応、最高濃度で Hedgehog が多い。

3）処理枚数について

BioReliance において溶媒として用いたエタノール処理で 23.67 と 4.17 という値を得た。同様の現象はメルクでも起こった（２～7 と 17)。
・　観察したエリアの問題か？
・　アガー中の細胞密度が一定のデータを得るために有用か？
・　スライドの質が重要。人為的な視野の選択ではなく、自動的な測定が必要。
・%DNA　in　tail は大きな差を生じる。
・最低 2 枚は必要である。

4）その他

・細胞種

ＴＫ６細胞は有用である。完全ではないが、このバリデーションでは使い続ける。L5178 細胞もまた有用である。ヒトリンパ球はバックグランドが低い。

・陽性対照

陽性、陰性が明確なので、陽性対照は必要なしとの意見もあったが、EMS の 250 μg/mL を用いる。溶媒の 2 倍以上が条件である。

・　血清

FBS が推奨される。

・陽性の定義、電気泳動条件、スコアの方法は vivo と同じ条件とする。

これらの意見をもとにプロトコールを見直し、追加実験として PhaseⅡバリデーション研究を実施することが決まった。この結果次第をもとに、2009 年から PhaseⅢバリデーション研究を開始する予定である。