

200829003A

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 20 度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大野泰雄

平成 21 年（2009）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 総合評価研究室）

## 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-----		21
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-----		117
小野 敦		
3. OECD活動と国際協調	-----	273
小島 肇		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	341
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	343

平成 20 年度総括研究報告書

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

研究代表者 大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所 副所長

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 $\alpha$  (ER $\alpha$ )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、プロトコールの統一もなされていなかった。In vivo 試験においては、Phase II と Phase III のバリデーション研究を通じてプロトコールの統一とデータ採用基準を決定した。動物愛護に配慮したプロトコールの改定もなされ、最終的な段階である Phase IV バリデーション研究に入る準備が整った。In vitro 試験においても、Phase II バリデーション研究を遂行中である。早急にデータ採用基準を確定し、Phase III のバリデーション研究を実施する予定である。

我が国で開発され、行政的有用性が推定される HeLa 法によるアンタゴニスト測定法および欧米で開発された Lumi-cell 法を用いたアゴニスト・アンタゴニスト測定法について欧米の研究機関と協力し、国際バリデーションを実施した。HeLa 法ではアゴニスト測定においては、全ての参加施設が評価基準を満たすデータの取得に成功したものの、アンタゴニスト測定においては欧州、韓国のラボで評価基準を満たす測定結果を取得することが出来ず、その原因特定のため当初の計画より予定が遅れた。一方、Lumi-cell 法についても当初の評価基準では、特に欧州の施設で非常に多くのデータが不採用となったため、やはり計画に比べ予定は大幅に遅れた。評価基準の変更を行い、不採用データの割合は減ったものの、Phase II b バリデーション研究におけるアンタゴニスト測定においてはコード化された 8 化合物のほとんどについて評価判定結果が参加 3 施設で一致せず、プロトコール上の問題点が示唆された。

OECD の新たなガイドラインの成立に協力するとともに、日本からも皮膚感作性試験 LLNA の変法である非放射線物質による LLNA および培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験の OECD ガイドライン化を目指し、Standard Project Submission Form (SPSF) を提出して積極的な試験法の開発を進めている。

新規試験法の特性と限界を明らかにし、国際的な行政的試験法として確立し、国際的にハーモナイズされたガイドラインを作成するためには、試験法の統一化とバリデーション結果に基づく改良を一步一步進める必要がある。また、他のガイドライン成立に協力する過程でノウハウを蓄える必要がある。そのためには、十分な予算と 5~10 年単位の継続した検討が必要であることが判明した。

## 分担研究者

小島 肇	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 新規試験法評価室
小野 敦	国立医薬品食品衛生研究所 総合評 価研究室

## 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ゲン受容体 $\alpha$ 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. 研究方法

### 後記

## C. 結果および考察

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、プロトコルの国際的な統一がなされていない。そこで、In vivo試験においては、平成20年度においては、平成18および19年度の研究成果を踏まえ、Phase IIIのバリデーション研究を通じてプロトコルの統一化を計り、データ採用基準を決定した。動物愛護に配慮したプロトコルの改定もなされ、最終的な段階であるPhase IVバリデーション研究に入る準備が整った。In vitro試験においては、平成20年度にPhase I

の解析を行い、更にPhase IIバリデーション研究を遂行した。早急にデータ採用基準を確定し、Phase IIIのバリデーション研究を実施する予定である。全体的に遅れ勝ちではあるが、確実に国際合意を得ながら進めている。

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 $\alpha$ (ER $\alpha$ )に対するレポーターアッセイ(HeLa法)によるアンタゴニスト測定法および欧米で開発されたLumi-cell法を用いたアゴニスト・アンタゴニスト測定法について欧米の研究機関と協力し、国際バリデーションを実施した。HeLa法では、既にほぼガイドライン化されているアゴニスト測定においては、全ての参加施設が評価基準を満たすデータの取得に成功したものの、アンタゴニスト測定においては欧州、韓国のラボで評価基準を満たす測定結果を取得することが出来ず、その原因特定のため当初の計画より予定が遅れた。一方、Lumi-cell法についても当初の評価基準では、特に欧州の施設で非常に多くのデータが不採用となったため、やはり計画に比べ予定は大幅に遅れた。評価基準の変更を行い、不採用データの割合は減ったものの、Phase IIbバリデーション研究におけるアンタゴニスト測定においてはコード化された8化合物のほとんどについて判定結果が参加3施設で一致せず、プロトコル上の問題点が示唆された。

いずれの系においてもアンタゴニスト測定系は、アゴニスト測定系に比べ複雑であることから施設の技術的習熟度が要求される。本研究において明らかとなったそれぞれの評価系の問題点を明らかにすることは、これらのスクリーニング系を国際的に認められる評価法としてガイドライン化するにあたり、非常に重要な知見を提供するものであり、今後、プロトコルについても更なる検討を行い、いずれの施設においても再現性の高い結果を得られる手法を早期に確立しガイドライン化の提案を行うことが重要である。

一方、OECDの新たなガイドラインの成立に協力するとともに、日本からも皮膚感作性試験LLNAの変法である非放射線物質によるLLNAおよび培養表皮モデルLabCyte EPI-MODEL24を用いた皮膚刺激性試験のOECDガイドライン化を目指し、Standard Project Submission Form (SPSF)を提出して積極的な試験法の開発を進めた。

国際バリデーション研究の問題点は、1) 経費の問題から技術講習会を避け、紙面のみで技術の共有化を図らざるを得ないこと、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、この点に配慮したバリデーション研究をどう構築するかの提言が必要と感じている。本研究では、会議および実験結果に基づいて

プロトコルの適正化を進めてきた。その結果、コメットアッセイについては、in vivo および in vitro を問わず、プロトコルの統一化まで進んだ。HeLa 法および Lumi-cell 法についても最終的なプロトコルの確定段階にある。今後も国際的な合意を図りながら、OECD ガイドラインに向けて試験法の確立を行っていく予定である。

バリデーション研究とは一度の共同研究で終了するようなものはない。プロトコルを改良しながら会議や実験結果をもとに順を踏んで進めるものであり、お金と時間が掛かる。合意事項も多数決ではなく、参加者全員の合意で少しずつ進んでいくものである。しかし、本バリデーション研究の予算は、十分でなく、実験やデータ処理はボランティアの協力を得て実施してきた。関係者の協力には深く感謝する。

#### E. 結論

新規試験法の特性と限界を明らかにし、国際的な行政的試験法として確立し、国際的にハーモナイズされたガイドラインを作成するためには、試験法の統一化とバリデーション結果に基づく改良を一步一步進める必要がある。そのためには、十分な予算と 5~10 年単位の継続した検討が必要であることが判明した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Takao Ashikaga, Hitoshi Sakaguchi, Kenji Okamoto, Makoto Mizuno, Jun Sato, Takaaki Yamada, Mayumi Yoshida, Naoko Ota, Seiji Hasegawa, Tatsuji Kodama, Yuko Okamoto, Hirofumi Kuwahara, Nanae Kosaka, Sakiko Sono, Yasuo Ohno: Assessment 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.
- 2) 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 corrosivity tests in Japan. AATEX 13, 36-44, 2008
- 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、薬学雑誌 128 (5) 735-740, 2008.

##### 2. 学会発表

#### H. 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。データは各分担研究者の報告書に示す。

#### (1) コメットアッセイ

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。この他に最近汎用されている DNA 損傷を捉える試験として、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ゲルに固定して融解した後、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<sup>1)</sup>。

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、化学物質等による暴露初期の 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る。FDA Guidance (2006)<sup>2)</sup>にも記載があり、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議論が進められてきた<sup>3)</sup>。主な討議事項として、以下の項目が議論されてきた。しかし、データが不足し、以下の問題がありプロトコールが一本化されてこなかった。

- ①投与用量 (複数用量の適用か、単一用量の適用か)
- 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が問題点として残っていた (⑤のデータの蓄積のためには、統一プロトコールに基

づくバリデーション研究が必要)。

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。

#### A. 研究方法

##### B-1 組織

本バリデーション研究の組織は平成 18 年度に設立されたが、本年度は国内委員会会議を 10 月に、第 5 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 2009 年 2 月に日本で開催した。

##### 1) 国際実行委員会

委員長 林 真 (食品医薬品安全センター; 以下、安評センターまたは An-pyo と記す)

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 (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)

##### 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 (食品医薬品安全評価センター)

森田 健 (国立衛研 医薬安全科学部)

本間正充

山影康次 (食品医薬品安全センター 秦野研究所; 以下、食薬センターまたは FDSC と記す)

小島 肇

##### 3) コンサルタント

B. Burlinson (Huntingdon Life Sciences; 以下、HLS と記す)

D. Lovel (Univ. of Surrey)

B. Young (BioReliance)

S. Hoffman (ECVAM)

Sue Nee Perk (Korean Institute of Toxicological Research:KITR)

大森 崇 (京都大学医学部医学研究系)

鈴木昌也 (食品医薬品安全評価センター)

佐々木 有 (八戸高専)

大野泰雄 (国立衛研)

田中憲徳 (食薬センター)

#### 4) バリデーション参加施設

①Huntingdon Life Sciences

②BioReliance

③Merck Research Laboratories (以下、Merckと記す)

④食薬センター

⑤安評センター (Phase IIまで)

#### B-2. 試験方法

##### B-2-1 in vivo 試験

In vivo 試験では4段階に分けて、バリデーション研究を計画した。表1にPhase毎の目的を示した。

表1. In vivo 試験の進捗

Phase	主な目的	参加施設	被験物質数	実施期間
I	陽性対照によるプロトコールの検証	5	1	2006年10月～12月
II	プロトコールの検証	5	4 (陽性対照を含む)	2007年5月～11月
III	プロトコールの検証、データ採用基準の確定および施設間再現性の検証	5	4 (陽性対照を含む)	2008年5月～11月
IV	施設間再現性および予測性の検証	13?	?	2009年?

##### B-2-1-1 Phase II

前年度(平成19年度、2007年)行われた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3物質(acrylamide、2,4-diaminotoluene:2,4-DAT)および2,6-diaminotoluene:2,6-DAT)を用量と溶媒を指定してPhase Iバリデーション研究に参加した5施設に配布し、試験を実施した。

Phase IIバリデーション研究で用いたプロトコールver.12の概要を以下に示す。

①動物:Cr1:CD(SD)ラット雄 7-9週齢を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:細胞を使用(核ではない)

⑤電気泳動:低温(4℃)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、昨年度報告書にも掲載したが、本年度にデータクリーニングをするとともに、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)により解析されたものである。統計学的検定法としては、Dunnett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された。

##### B-2-1-2 Phase III

Phase IIバリデーション研究の結果を受け、Phase IIIバリデーション研究のためのデータ採用基準を作成した(結果に記載してある)。このデータ採用基準をもとに、プロトコールを改訂し(ver.13)、EMS 200mg/kg濃度を陽性対照として、ブラインド化された3物質(N-Methyl-N-nitrosourea、Ethyl Methanesulfonate、D(-)-Mannitol)を用量と溶媒を指定してPhase IIバリデーション研究に参加した5施設のうち、安評センターを除く4施設に配布した。施設内再現性を確認するとともに、データ採用基準を検証するための実験を実施した。

その他の条件はPhase IIバリデーション研究と同様である。

##### B-2-1-3 Phase IVのための参加施設の選抜

Phase IVの多施設バリデーション研究の開始に向けて、昨年度より世界的に参加施設を募集し、15施設(海外10施設および国内5施設)から参加の申し出を受けた。これらの施設に経験の有無を打診し、11施設に対してEMSによるヒストリカルデータの提出を促すと同時に、Phase IIバリデーション研究で用いたプロトコール(Ver.12)を配布して、Acrylamideおよび2,6-DATを送付して実験を依頼した。

##### B-2-2 in vitro 試験

In vitro 試験では3段階に分けて、バリデーション研究を計画した。表2にPhase毎の目的を示した。

表2. In vitro 試験の進捗

Phase	主な目的	参加施設	被験物質数	実施期間
I	非コード化した被験物質によるプロトコルの検証	5	5	2007年11月～2008年3月
II	プロトコルの検証、データ採用基準の確定	4	6(陽性対照を含む)	2008年8月～2009年3月
III	施設間再現性および予測性の検証	4?	?	2009年?

#### B-2-2-1 Phase I

In vitro のプロトコルは平成19年度(2007年)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。このプロトコルに従い、in vivo と同じ施設における参加協力を得て、被験物質を配布して2007年末から実験が開始された。細胞株および牛血清(FBS)は購入先、ロットを指定した。

プロトコ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 Dulbecco's MEM  
 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  
 S9 Mix：製造会社およびロットは任意  
 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。

以下に名称(略語)：性質、溶媒、代謝活性化の必要性および使用濃度の順に記載した。

1. Ethyl methanesulfonate (EMS): alkylating agent, DMSO, S9 Mix +/-, 0, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$
2. Mitomycin C (MMC): cross-linker, physiological saline, S9 Mix +/-, 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$
3. 2-Aminoanthracene (2AA): aromatic hydrocarbon, DMSO, S9 Mix +/-, 0, 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , S9-mix +: 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$
4. Cycloheximide (CHX): inhibitor for protein synthesis, ethanol, S9 Mix +/-, 0, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$

5. Triton-X (TRX): detergent, physiological saline, S9-mix +/-, 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$

n数：1濃度当たり2枚のプレート

#### 統計解析

1) 各動物単位の% Tail DNAの平均値を用いた統計手法を用いており、In vivoと同一単位の平均値で解析することが好ましいと考え、In vitroでは細胞株単位の統計手法を用いた。  
 2) 群間比較を行う統計学検定は、各群2例以上を必要とするため、in vitroのデータについては適応しないことから、各群のデータ数が1の場合に判定できる重み付回帰分析を用いた。

#### B-2-2-2 Phase II

被験物質はブラインドで配布された。よって、細胞毒性は予備試験を実施して施設毎に処理濃度を定めることになった。最高濃度は5mg/mLとし、公比2で等比的に濃度設定を行った。細胞毒性は3つのパラメータを使って検討した。その結果から総合的に判断して最高用量を決める。最高濃度とは、80%のトリパンブルー(TBDE)の取り込み、20%のヘッジホッグ(アポトーシスによると考えられるコメット状の異型)の確認または24時間処理後の細胞増殖の有無の順番で判断する。80%未満のTBDEにおける用量が最高用量で、それに続く80%以上のTBDEの用量が5用量以上の濃度を設定できることが望ましいとした。

S9 Mixについては、MolTox社(Post-Mitochondrial Supernatant: Sprague-Dawley rat liver, Male, Phenobarbital/5,6 Benzoflavone induced)のS9 Mixを各施設が購入して、使用することになった。

それ以外の条件は、Phase Iバリデーション研究と同様である。

#### C. 研究結果

##### C-1 In vivo 試験

##### C-1-1 Phase II

昨年度報告書に記載したように、各施設が3回に渡って実施した陽性対照物質であるEMSの結果から、肝臓においては施設内の標準偏差は10と小さいことがわかった。施設間では3 $\sigma$ にあたる(3 $\times\sqrt{10}$ )<sup>2</sup>=100以内であることを確認できた。得られた5施設、3回の結果はいずれも溶媒対照と比較して統計学的に有意であった。

一方、胃では、施設内のバラツキが大きく、施設間の標準偏差も大きくなった。得られた5施設、3回の結果のうち、3回目の結果で1施設が陽性と判断されなかった。

プロトコルの検証に用いた3物質において、acrylamideは肝臓、胃とも強くはないが明らかな陽性、2,4-DATは肝臓に弱い陽性、および2,6-DATは陰性を示すことを期待した。



acrylamideは1施設を除き、肝臓で陽性と判定された。胃では2施設で陽性と判定された。よって、acrylamideはほぼ期待された結果通りとなった。

一方、2,4-DATは2施設で肝臓に陽性が認められた。2,6-DATは1施設を除き、陰性であった。2,6-DATの結果は予想通りであったが、2,4-DATはわずかに予想を裏切った。胃では、2,4- および 2,6-DATは2施設で陽性であった。両物質は変異原性物質であり、コメットアッセイでは弱い遺伝毒性として検出された。

これらのバリデーション研究の結果として、陽性対照物質を検出できない施設があったこと、各施設のデータのバラツキが大き過ぎることが明らかになった。

その理由として、電気泳動条件の施設間の相違およびデータ採用基準を定めていなかったことによる。

そこで、これまでのPhase IおよびIIバリデーション研究の結果をもとに、仮のデータ採用基準を作成し、プロトコルをver. 13を改定した。これをPhase IIIバリデーション研究に反映させることになった。なお、プロトコルver. 12の概要を表3にまとめている。

#### プロトコル Ver. 13 の改定点

- 1) 0.7V/cm、約300mAで電気泳動を行う
- 2) 泳動時間は陰性対照値が所定の幅に収まるように調整する

プロトコルVer. 13から仮採用するデータの解析法およびデータ採用基準

- 1) データは平均値を用いる。
- 2) 陰性対照
  - ・ 肝臓の%DNA in tail 平均値: 1-8% (平均+/-標準偏差による)
  - ・ 胃の %DNA in tail 平均値: 1-30% または 1-20% ; 平均+/-標準偏差による)
- 3) 陽性対照: EMS, 200 mg/kg, 1~2 経口投与
  - ・ 肝臓と胃の Effect (溶媒と EMS の %DNA in tail 平均値の比): 2 倍以上
  - ・ 肝臓と胃の Effect (溶媒と EMS の %DNA in tail 平均値の差): 5% 以上
  - ・ 肝臓と胃の 2 回以上の実験における Effect (比) の変動係数: 50% 未満
  - ・ 統計学的に有意であること

#### C-1-2 Phase III

陰性対照の採用基準はすべての施設でクリアできた。1施設において胃の値が20%を越えていたが、基準の30%以内であった。また、ある施設において肝臓で陽性とする基準のうち溶媒と EMS の %DNA in tail 平均値の差 (以下、Effect (差) と記す) が基準を満たさなかった (5%以上が基準で4.1%)。さらに、ある施設の肝臓における溶媒と EMS の %DNA in tail 平均値の比 (以下、Effect (比) と記す) の変動係数が基準を満たさなかった (CV50%以下が基

準で63%)。これらの基準値外の値についてバリデーション実行委員会で議論し、基準を満たさなかったデータも統計学的に有意な差を認めたことから、採用することにした。結果として、全ての施設の全実験で陽性となった。すなわち、陽性対照は統計学的に有意であれば良い、データ数が少ないので変動係数を考えることにあまり意味はない、施設間での陽性レスポンスの強さの違いは泳動時間に起因するとの考察がなされた。

データの採用基準としては、①陰性対照の考え方はそのまま、②泳動時間を20分に決める、③陽性対照は統計学的に陽性になれば良い (検定には Effect (平均値の差) を使う: t 検定)、が、Phase IIとIIIのバリデーション研究を通じた結論となった。以上の結果から、Phase IVバリデーション研究に向けて以下のようにプロトコルがver. 14に改定された。

#### プロトコル Ver. 14 の改定点

- 1) 0.7V/cm、約300mAで電気泳動時間を20分に決める

プロトコルVer. 14から仮採用するデータ採用基準

- 1) データは平均値を用いる。
- 2) 陰性対照
  - ・ 肝臓の%DNA in tail 平均値: 1-8% (平均+/-標準偏差による)
  - ・ 胃の %DNA in tail 平均値: 1-20% (平均+/-標準偏差による)
- 3) 陽性対照: EMS, 200 mg/kg, 1~2 回経口投与
  - ・ 統計学的に有意であること

#### C-1-3 Phase IV 施設選択

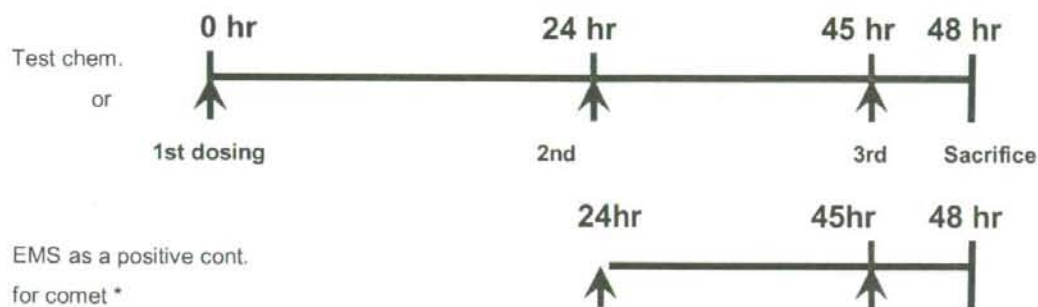
11施設のうち、施設4および施設11はデータの提出がなく脱落とした。施設2と施設10はともに1実験で2つのコード化合物を評価したので陰性対照と陽性対照のデータが一つしかなく、加えて施設2は肝の陰性対照データが高値であった。このため、バリデーション実行委員会は、陰性対照と EMS のデータを施設2には2回分、施設10には1回分追加要求した。結果として、基準を満たすデータを出してきたので合格とした。また、施設3、施設5および施設9は一部のデータが外れていたが、はずれの程度が僅かなので概ね満たしていると考えて良いとされた。

#### C-1-4 Phase IV計画

動物実験の3Rs原則に従い、ICHや欧州製薬工業会では反復投与毒性試験の中でのコメットアッセイの利用において、我々のプロトコル (Ver. 13) の使用が想定されている (まだ決定されているため)。

そこで、我々のバリデーション研究においても、小核試験およびコメットアッセイを両方求めるオ

ブションを追加した。以下の図1に示すように、被験物質の2回投与に代わり、0、24および45時間後の計3回の処理し、48時間後に臓器を採取するようプロトコールを改定した(ver. 14)。



\* A positive control for MN will be no longer required when considering current ICH-S2 discussion.

図1. プロトコール Ver. 14 に組み込まれる案

### C-3 In vitro 試験

Phase I バリデーション研究では主として In vitro コメット試験のプロトコルの確立と、施設間での試験データの再現性の確認、適切な統計的手法の開発を目的とした。コメット試験のプロトコルは基本的に in vivo の方法に従った。細胞はヒトリンパ芽球細胞 TK6、処理時間は4時間を採用し、S9 の存在下、非存在下の条件で試験した。試験検体として EMS、MMC、2AA、CHX、TRX を用い、予備試験で細胞毒性を確認し、バリデーション実行委員会が指定した濃度で試験を行った。S9 を除き全ての試験材料は統一したものをを用いた。

試験検体のうちアルキル化剤である EMS と 2AA (+S9) は陽性を期待した化合物である。EMS は全ての施設で陽性反応を示したが、2AA は施設によって結果の判定にばらつきがあった。すなわち、2つの施設は細胞毒性のため試験不成立、2つが陰性、陽性を示した施設はわずか1つであった。原因として、S9 の活性が施設によって異なり、用量設定が適切では無かったことが考えられた。S9 を統一したバリデーション研究が望まれる。MMC は統計的に僅かに陽性であった1施設を除き、すべて陰性を示した。また、陰性対照としての CHX はすべての試験で陰性、同じく陰性対照の TRX に関しては統計的に僅かに陽性反応となったものが2例見られたが概ね陰性であった。以上の結果から2AAを除き、4化合物では予想通りの結果が得られ、試験は概ね適切に行われたものと判断される。

コメット試験の統計解析、判定のフローでは、解析結果から、一部のデータにおいて実測値と回帰直線の間乖離の可能性が見られた。そこで、用量を変数変換しない場合と常用対数変換した場合の回帰直線を比較した。

具体的には、陰性対照群を除く Dose (変数変換なし)、Log (Dose) (常用対数変換) を用いて重み付き回帰直線を作成した。

説明変数として、各用量の TD の平均値または各 Tube の TD の平均値を用い、それぞれの標準誤差の逆数を重みとして用いた。

予測値と実測値の差(残差)の平方和を比較し、残差平方和が低い回帰直線を実測値がよく当てはまった直線であると判定した。

その結果、残差和が低い回帰直線の頻度を集計した。各説明変数とも、変数変換しない回帰直線の数が多くなった。

結果の判定に関しては概ね一致したが、陰性コントロール値や、陽性化合物の反応性、標準誤差等には施設間で差が認められた。今後、Phase I バリデーション研究、およびまだ終了していないが Phase II バリデーション研究の試験結果をもとにデータの採用基準を設定する必要がある。

### D. 考察

in vivo バリデーション研究において、Phase II および III のバリデーション研究を通じてデータ採用基準を決定した。確実にプロトコルの改良が進んでいる。

Phase IV の多数施設のバリデーション開始に向けて、世界的に参加施設の募集を掛け、13施設(海外9施設および国内4施設)から参加が決まった。動物数の削減に関する点を考慮したプロトコルの改定もなされた。最終的なバリデーション研究の準備が整いつつある。

実行委員会に残る大きな仕事は Phase IV バリデーション研究に用いる被験物質の選択である。この課題に向け、早急に実行委員会のメンバーでコンセンサスを取る必要がある。

一方、in vitro バリデーション研究については、Phase II バリデーション研究を遂行中である。こちらも年内に早急にデータ採用基準を確定したプロトコルを改定し、2009 年末早々から Phase III バリデーションを開始する予定である。

### E. 結論

In vivo 試験においては、Phase II と Phase III のバリデーション研究を通じてデータ採用基準を決定した。動物愛護に配慮したプロトコルの改定もなされ、最終的な段階である Phase IV バリデーション研究に入る準備が整った。

In vitro 試験においても、Phase II バリデーション研究を遂行中である。早急にデータ採用基準を確定し、Phase III のバリデーション研究を実施する予定である。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

- 1) Kojima, H. The Importance of the in vivo comet assay in genotoxicity testing. Predictive Human Toxicity and ADME/TOX studies. 3<sup>rd</sup> Annual conference of Mondial Research Presentation, Brussels (2008)
- 2) Burlinson, B. "Evaluation of Comet Assay -Present State and Future-, JaCVAM Workshop, Tokyo (2008)
- 3) Escobar, P. : In vivo comet assay, ILSI/HESI Project Committee on the relevance and follow-up of positive results in in vitro genetic toxicity (IVGT) testing

- international workshop, Washington, DC (2008)
- 4) 宇野芳文：コメットアッセイ国際バリデーション研究進捗状況報告、MMS 第 53 回定例会、熱川 (2008)
- 5) Uno, Y.: In Vivo Comet Assay: Update on the On-Going Validation Coordinated by JaCVAM. International Symposium on Genotoxicity Assessment-New Concept, Strategy and Regulation -, Okinawa (2008)
- 6) 中嶋圓、鈴木雅也、田中仁、本間正充、林真：In vitroコメットアッセイ国際バリデーションデータ解析に関する一考察、日本環境変異原学会第38回大会、沖縄 (2008)

## (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

現在、内分泌かく乱性など新たな問題に対応すべく既存化学物質の安全性再評価が求められているが、対象となる化学物質の数は極めて多く、それらの安全性評価は予想以上に難しい。また、それらを従来の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、動物福祉の面から問題であり、効率的かつ倫理的な新規試験法が求められ、多くの方法が開発されている。新規試験法について OECD では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ているが、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、OECD 基準を満たすバリデーションを行うことも容易ではない。

本研究では、OECD 内分泌かく乱物質評価タスクフォース (EDTA : Task Force on Endocrine Disruptors Testing and Assessment) により示されたコンセプトフレームワークのレベル 2 に分類される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  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) 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同様のレポーターアッセイ法である 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とともに得られた結果から信頼性と再現性が確認された手法については、最終的に OECD においてガイドライン化の提案を行っていくことを目的としている。

### B. 研究方法

#### B-1. HeLa9903 細胞を用いたアンタゴニストアッセイバリデーション試験

##### B-1.1. バリデーション運営委員会 (Study Management Team (SMT)) の設置と参加施設

本年度は、昨年度までの検討により定められたバリデーションプロトコールおよび品質管理基準 (Quality Control) および性能基準 (Performance criteria) をもとに多施設国際バリデーション試験を開始した。本研究ではバリデーション研究の透明性および客観性を確保するため、Study Management Team (SMT) を組織し、実験の進行に関する情報の収集、解析および状況に応じた指示を行った。SMT は小島肇博士 (国立医薬品食品衛生研究所・新試験法評価室)、小野敦博士 (国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室)、Miriam Jacobs 博士 (ECVAM)、Susan C. Laws 博士 (US-EPA)、寒水孝司博士 (大阪大学) の 5 名で構成され、さらに菅野純博士 (国立医薬品食品衛生研究所) および OECD VMG non-animal メンバーをアドバイザーとし

た。実験の技術面の支援に関しては本法の開発施設である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) をリードラボとして、試験計画書の作成、参加施設に対する実験指導、結果の解析、実験進行に伴う技術的問題点の把握および問題解決のための技術支援を実施した。

本研究におけるバリデーション試験参加施設は、本測定系を開発した化学物質評価研究機構をリードラボとして、欧州 ECVAM の推薦によりベルギー VITO および韓国 KFDA の 3 施設とした。一方、本測定系は、これまで厚生労働省および経済産業省の共同により開発および検証が進められてきており、経済産業省において国内施設における多施設バリデーション試験が計画されていたことから、本研究班と共通のプロトコールにより実施することとし、全てのバリデーション試験の取りまとめを、日本主導で実施することとなった。これにより、国内外合計 5 施設の参加によりバリデーション試験を開始した。

参加施設の詳細は下記に示す。

施設 1 : 株式会社カネカテクノロジーサーチ環境分析部環境分析センター

施設 2 : 大塚製薬株式会社 大塚診断事業部特別プロジェクト Eco-Screen 開発室

施設 3 : 財団法人 化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所

施設 4 : Flemish Institute for Technological Research - VITO Expertise center Environmental Toxicology Research manager, Environment & Health Project leader, Test development in vitro alternatives

施設 5 : National Institute of Toxicological Research, Korea Food and Drug Administration

#### B-1.2. バリデーションプロトコールと実施設計

バリデーション試験の実施は、昨年度までの本研究における検討により作成されたプロトコール案に基づき、最終的に運営委員会で合意されたバリデーションプロトコールに従い実施した。

バリデーション研究は Task-1 から Task-3 までの 3 段階に分割して実施し、バリデーション実験開始前に試験計画書の作成および VITO を除く 4 施設に対する試験計画書の沿った実験方法の説明を国立医薬品食品衛生研究所にて実施 (2008 年 4 月 14 日) し、KFDA (韓国) の実施担当者に対する技術指導を化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所にて実施した。標準物質を含む被験化合物および化合物を溶解する DMSO は同一ロットのものが配布された。

#### B-1.3. Task-1

Task-1 では各参加ラボが本法で用いる基本的な技術に対する習熟度を確認するため、Edge 効果の有無および代表的なアゴニスト作用物質および非

作用物質 (17β-Estradiol: E2, 17α-Estradiol, Corticosterone: CORT) を用いたアゴニスト実験を実施した。

#### Edge 効果の確認:

アッセイプレートに HeLa-9903 細胞を 10,000 個/ウェルの密度で播種した後、終濃度が 1 nM となるように E2 を添加し、約 20 時間後にルシフェラーゼ検出試薬を加え、全ウェルの発光強度を計測した。Edge 効果の有無はアッセイプレート全ウェルで平均値を算出し、バラツキを評価するため変動係数を算出した。変動係数が 10% 未満の場合、Edge 効果はないものと判断した。

#### アゴニスト検出手技の確認:

アゴニスト活性の確認は代表的なアゴニスト作用物質および非作用物質 (E2, 17α-Estradiol, CORT) を用いたアゴニスト実験を実施した。アゴニスト実験に関しては OECD ガイドライン化が進行し、既にガイドラインの中に性能基準 (Performance standard) が定められているため、その結果が性能基準を満たすことを条件とした。実験は最大 5 回までの実験を実施し、性能基準を満たす実験が 3 回となった時点で Task-1 終了とした。

#### B-1.4. Task-2

Task-2 は Task-1 通過施設がアンタゴニスト活性系実験において十分なスキルを有しているかを判断することを目的とした。

Task-2 では代表的なアンタゴニスト作用物質として (4-Hydroxytamoxifen (OHT), Tamoxifen (TAM), RU486, 非作用物質として CORT, 陽性対照およびスパイク用物質として E2, 細胞毒性用陽性対照物質として Digitonin (Dig) を用いて実験を行った。実験は最大 5 回までの実験を実施し、性能基準 (表 1-2) を満たす実験が 3 回となった時点で Task-2 終了とした。

#### アンタゴニスト検出手技の確認:

アンタゴニスト活性の確認は代表的なアンタゴニスト作用物質および非作用物質 (OHT, TAM, RU486, CORT) を用いたアンタゴニスト実験を実施した。アンタゴニスト実験の性能基準 (Performance standard) はリードラボである化学物質評価研究機構において実施された施設内試験結果のみに由来するため暫定基準とし、Task-2 実験の結果を基に見直しを行うこととした。

#### B-1.5. データ解析

各濃度区の発光強度の値から溶媒対照区 (VC) の平均値から差し引き、算出された 25 pM E2 の平均値でさらに各濃度区の値を除いて 25 pM E2 に対する相対転写活性化倍率 (RTA; Relative Transcriptional activity (%)) を求めた。これ

ら相対転写活性化倍率を用いて、以下の式より IC50 を算出した。IC50 値の算出には GraphPad Prism® Ver. 4 (GraphPad Software 社) を用いた。また、25 pM の E2 に対する RTA を 30 あるいは 50% 抑制する濃度 (lin. IC30 あるいは lin. IC50) を求めた。

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{-(\log \text{EC50} - X) * \text{Hill Slope}})$$

Hill Slope: 傾き

X: 対数濃度 (M)

Y: 相対転写活性化倍率の抑制率 (%)

#### B-2. 1 Lumi-cell ER アッセイバリデーション試験

本年度は、バリデーション計画における Phase II a および Phase II バリデーション研究を我が国の参加施設である株式会社・日吉において実施し、その信頼性保証のためデータレビューを行うとともに、ICCVAM, ECVAM, JaCVAM で構成されるバリデーション運営委員会において日米欧 3 施設からの結果をもとに施設内および施設間再現性について評価を行い、バリデーション試験の進め方について議論した。

##### B-2.1.1. 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-2.1.2. Lumi-cell ER アッセイ法のフロー

フローおよび試薬について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プロトコールに従って行った。試験に用いられる標準、コントロール物質および被検試料は LUMI-CELL ER Validation Study Substance Inventory and Distribution Management group により提供された。標準およびコントロールの前処理は Lumi-cell のプロトコールに具体的に記載されている。

##### B-2.1.3. Lumi-cell ER の国際的バリデーション Phase II a

コード化されたアゴニスト用およびアンタゴニスト用各 4 化合物についてプロトコールに従い、溶解性試験、Range finding testing に引き続き Comprehensive testing を行い、アゴニスト活性およびアンタゴニスト活性についての EC50 もしくは、IC50 および Dose response curve を得た。Phase II a バリデーション研究においては、日米欧 3 ラボの Phase I バリデーション試験結果の解析をもとに修正されたプロトコールおよび品質評価基準に従って実施した。Comprehensive testing における、質の評価基準として、Phase I バリデーション研究によって得られた経歴データベースからの値を用い、評価基準を満たさない測定に関しては再測定を実施し、各化合物について評価基準を満たす 3

測定以上のデータを取得した。

Phase I バリデーション研究におけるアゴニストおよびアンタゴニストのプロトコールからの、Phase II バリデーション研究に際しての変更点および追加点を下記に示す。

変更点-1 データ採用基準について

基準範囲内での Plate の Pass/Fail を判定する。

変更点-2 プレートレイアウトについて

Agonist および Antagonist 測定には、Phase I バリデーション研究における検討からエッジ効果は認められなかったことから 96 穴全てを用いるレイアウトに変更された。

変更点-3 細胞生存率について

初期のプロトコールでは Cell TiterGlo (Promega 製) を用いた、細胞毒性評価を行うこととなっていたが、Phase I バリデーション研究における Visual observation の検討結果から、細胞を顕微鏡で確認し、DRAFT LUMI-CELL ER ASSAY Visual Observation Cell Viability Manual に従って、カテゴリ-1、2、3、4 を判断する。さらに顕微鏡では、倍率×100 でウェル毎にデジタルカメラで撮影し、カテゴリの判断を評価する Visual observation 法のみを実施することとなった。

追加点-1 被験物質の溶解性について

被験試薬 (未知試薬) につき、下記の手順により溶解方法を決めておく。

1-1) 被験試薬の DMSO への可溶性確認試験

a) 15mL チューブに 100 mg 被験試薬および DMSO 溶液 1mL を加え準備する。(濃度; 100mg/mL)

b) 攪拌する。溶解しない場合は、10 分間超音波をかける。

c) 溶解しない場合は、100mg/mL 溶液 1mL に 9 mL DMSO を加える。(濃度; 10 mg/mL)

その後、攪拌。必要であれば 10 分間超音波をかける。

d) 溶解するまで、1/10 希釈を続ける。

1-2) 調整溶液の DMEM 培地への可溶性試験

a) 13mm チューブに一番濃度の高い調整 DMSO 溶液 (決定した液) 4μL を加える。

b) 400 μL エストロゲンフリー DMEM 培地を加え、攪拌する。

c) 濁りや沈殿が起こった場合、10 分間攪拌する。

d) 攪拌して、調整 DMSO が溶解しなければ、10 分間超音波をかける。

e) 再度濁りや沈殿がある場合、薄い濃度を順次作製する。

追加点-2 Range finding testing について

Range finding testing とは、Comprehensive testing における開始濃度の決定を行うための試験であり、Agonist および Antagonist それぞれ被験試薬溶解決定濃度から 10 倍希釈 (7 段階) で曝露

し、細胞毒性および細胞活性を考慮し、開始濃度および希釈段階 (1:2 か 1:5) を判断する。

B-2.1.4. Lumi-cell ER の国際的バリデーション Phase II b

コード化されたアゴニスト用およびアンタゴニスト用各 8 化合物についてプロトコールに従い、溶解性試験、Range finding testing に引き続き Comprehensive testing を行い、アゴニスト活性およびアンタゴニスト活性についての EC50 もしくは、IC50 および Dose response curve を得た。Phase II b バリデーション研究においては、日米欧 3 ラボの Phase II a バリデーション試験結果の解析をもとに修正されたプロトコールおよび品質評価基準に従って実施した。

Comprehensive testing における、評価基準値としては、Phase I および Phase II a バリデーション試験結果によって得られた経歴データベースからの値を用い、基準を満たさない測定に関しては再測定を実施し、各化合物について基準を満たす 3 測定以上のデータを取得した。Phase II b バリデーション研究における評価基準は、Phase I および Phase II a バリデーション研究の結果を踏まえて変更された。

変更点-1 基準について

変更点-2 Worksheet (Excel) の変更

特に Plate および Test Substance の Pass/Fail の細分判定が追加された。

B-2.2 Lumi-cell ER アッセイ日米欧 3 ラボにおける試験結果の評価

運営委員会で合意された Lumi-cell ER アッセイバリデーションプロトコールに従い、日米欧 3 施設において実施された Phase I、II a、II b バリデーション試験結果について各 Phase 終了時における解析結果をもとに施設内および施設間の測定結果のばらつきについて評価を行い、測定系の信頼性や再現性について検討を行った。解析結果をもとに必要と判断される場合には、運営委員会においてプロトコールの修正を検討し、合意の得られた修正プロトコールを次の Phase バリデーション試験プロトコールとして採用した。

C. 研究結果

C-1. HeLa9903 細胞を用いたアンタゴニストアッセイバリデーション試験

1.1 Edge 効果の確認

各試験施設結果を下表に示す。プレート内の変動係数は 10% 以下であることが確認され、全施設において明白な Edge 効果はないものと結論された。

C-1.2 Task-1

国内 3 施設の結果ではアゴニスト活性測定時の陽性対照物質に対する転写活性化倍率は平均 18.5 (29.0~9.5) であり、4 回までの実験で他の性能

標準も全て満足する結果となった。

一方、海外2施設の結果では、KFDAでは5回の実験で3回、性能標準も全て満足する結果が得られたものの、転写活性化倍率の平均が4.3(6.0~0.9)が国内ラボの結果に比較して低く、Task-2実施に備え、実験条件の確認および転写活性化倍率を上昇させるための施策が必要と判断された。

また、VITOのTask-1試験結果ではlogPC10やlogPC50に関しては性能基準を満足する結果が得られるものの、KFDAと同様に転写活性化倍率が低く、Fold Induction (FI)やI+2SDVC\_FI等の指標について満足な結果は得られなかった。

### C-1.3 Task-2

Task-2実験は現在、国内3施設について実験が終了したが、海外3施設では実験条件の確立等に時間を要し未だ完結していない。アンタゴニストアッセイにおける品質評価基準は、昨年度までの化学物質評価研究機構において実施された施設内試験結果をもとに暫定的に設定されたものであったため、実験の終了した国内3施設の結果をもとに施設間のばらつきを考慮した基準値の見直しを行った。

国内3施設の結果、国内施設的全試行回数(13回)の結果から、Fold Inductionは平均10.35(8.3~16.1)、RTA of 1nM E2は平均159.7%(112.2~193.2)、RTA of 1MOHTは19.94%(5.4~39.2)、RTA of 100 M Dig.は-10.05(-13~-5.5)となった。これらの結果から、アンタゴニストアッセイの性能基準について見直しを行った。基準見直しについて運営委員会において承認されたことをうけて、Task-3試験および海外施設のTask-2-3試験は新基準に従って実施することとした。

### C-2.1 Lumi-cell ER アッセイバリデーション試験

#### C-2.1.1 Lumi-cell ER の国際的バリデーションに関する研究(Phase II a)

アゴニスト・アンタゴニスト各8化合物のRange finder testingの結果をもとに、被験化合物のEC50(3回繰返し)の結果を求めた。

#### C-2.1.2 Lumi-cell ER の国際的バリデーションに関する研究(Phase II b)

Phase II bバリデーション研究におけるPlateのPass/Fail判定に用いた基準の基準範囲により、アゴニスト・アンタゴニスト各8化合物の溶解性の結果を求めた。

### C-2.2 Lumi-cell ER アッセイ日米欧3ラボにおける試験結果の評価

#### C-2.2.1 Phase Iバリデーション結果の評価とプロトコルの修正

Phase Iバリデーション研究の目的は、本測定系を開発したXDS社における施設内評価により準備

された標準プロトコルに従い、各バリデーション参加施設においてはアゴニスト系、アンタゴニスト系の標準物質およびコントロールの測定をそれぞれ10回ずつ行い、施設内、施設間でのばらつきを検討するとともに、次の試験Phaseを実施するための経歴データベースを構築することであった。米国(XDS社)、欧州(ECVAM)、日本(日吉)の3施設では、それぞれ別のプレートにより、10、18、10回のアゴニスト測定および15、18、12回のアンタゴニスト測定を実施した。いずれの施設においても、測定値の経時変化の傾きは大きくはないことから、アゴニスト、アンタゴニストいずれの系においても施設内での変動は大きくはないことが示された。一方、施設間比較においては、Phase IIバリデーション研究における品質評価基準となる複数の項目で統計的に有意な差が認められた。各施設の経歴データベースから施設ごとに評価基準値を設定することが妥当であると結論された。Phase II aバリデーション研究においては、プロトコルに従い、各施設はそれぞれの基準値により測定結果の採用、不採用の判定を行うこととなった。

Phase Iバリデーション研究では、あわせて実施したエッジ効果についての検討結果からedge効果は認められなかったことから、Phase IIバリデーション研究では96穴全てを用いるプレートフォーマットに変更になった。また、Bisphenol Aを用いて行った細胞毒性の目視判定の施設間比較結果から、細胞毒性の評価は、初期プロトコルに記載のCell TiterGlo(Promega製)を用いる方法ではなく、目視判定による方法に変更することが、運営委員会できちんと合意された。

#### C-2.2.2 Phase II aバリデーション結果の評価とプロトコルの修正

Phase II aバリデーション研究では、Phase Iバリデーション研究で構築した施設ごとの経歴データベースからの評価基準値および修正されたプロトコルに従い、コード化された化合物の測定を行い施設間での化合物評価の再現性を評価することを目的として、アゴニスト測定用としてBisphenol A (BPA)、Bisphenol B (BPB)、CORT、Diethylstilbestrol (DES)の4化合物が、アンタゴニスト測定用としてDibenzo[a,h]anthracene (DBA)、p-n-Nonylphenol (NON)、Progesterone (PRO)、TAMの4化合物がコード化されて各施設に送付された。それぞれ、ICCVAMのデータベースにおいて強い陽性、弱い陽性および陰性の化合物を含む。各施設では、プロトコルに従い、溶解度試験、濃度設定試験を実施し、本測定では、最終的に評価基準を満たす測定結果を、各化合物について3測定以上実施して化合物活性についての判定結果を比較した。アゴニスト測定においては、ICCVAMのデータベースで陰性のCORTについて、1施設で陽性判定となったのを除いて全ての施設で



同じ判定結果を得た。一方、アンタゴニスト測定では、DBA、TAM については全ての施設で ICCVAM データベースの評価と一致する陽性判定を得たが、NON では 1 施設のみ陰性判定となった。また、PROG については ICCVAM データベースでは陰性であるが、今回の試験では 3 施設全てで陽性判定となった。よって 3 施設の比較では、アゴニスト、アンタゴニストそれぞれ 1 化合物の評価結果において施設間差が示されたが、他の 3 化合物では 3 施設の評価は一致することから評価の再現性、安定性が示された。

一方、Phase II a バリデーション研究では、プロトコルに従い各施設は Phase I バリデーション結果から計算された基準を満たす測定結果が各化合物について 3 測定以上得られるまで測定を繰り返した。しかし、特に海外施設では基準をクリア出来ず不採用となる結果が多く、3 施設合計でアゴニスト、アンタゴニスト測定それぞれ 61% (33/54) および 38% (13/34) の測定が不採用となった。そのため、Phase II b バリデーション研究実施に先立って、測定採用のための評価基準の見直しが必要と判断された。不採用となった原因の解析結果から、アゴニスト測定においては、E2 EC50 値を基準からはずして、methoxychlor コントロール値の基準幅を広げ、アンタゴニスト測定においては、Ral/E2 IC50 値を基準からはずして、flavone/E2 コントロール値の基準幅を広げ、それぞれの系において標準化合物カーブがシグモイド曲線になっていることを評価基準として新たに加える変更が提案された。新たな基準を採用した場合の、Phase II a バリデーション研究において不採用となるデータの割合は、3 施設合計でアゴニスト測定 20% (54/11)、アンタゴニスト測定 5% (5/34) となる。結果作用基準変更の提案は、運営委員会で承認され (LUMI-CELL ER Assay Validation Study Design Work Plan Amendment #4 参照) Phase II b バリデーション研究における各施設の測定結果採用基準値が決まった。

#### C-2.2.3 Phase II b バリデーション結果の評価

Phase II b バリデーション研究では、新たにアゴニスト、アンタゴニスト測定用として各 8 化合物がコード化された各施設に配布され、Phase II a バリデーション研究と同様に各化合物について 3 測定以上の採用基準を満たす測定結果を得て化合物活性についての評価判定結果について検討した。Phase II a バリデーション研究で作用基準の見直しを行った結果、Phase II b バリデーション研究における不採用データの割合は 3 施設合計で、アゴニスト測定 16% (7/45) およびアンタゴニスト測定 14% (6/44) であった。アゴニスト測定においては、1 施設 (ECVAM) で 2 化合物について他の施設および ICCVAM データベースと一致しない判定結果となった。それ以外の化合物では判定結果は一致した。また、いずれのラボでも各化合物の 3 測定の判定

結果は、ほぼ一致した。一方、アンタゴニスト測定結果においては、各施設内における 3 測定の結果はほぼ一致するものの、ほとんど全ての化合物で 3 施設の判定結果が一致しなかった。

#### D. 考察

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  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) に対するレポーターアッセイ (HeLa 法) および欧米で開発された Lumi-cell 法を用いたアゴニスト・アンタゴニスト測定法について欧米の研究機関と協力し、国際バリデーションを実施した。

HeLa 法では、すでにテストガイドライン化が進行している HeLa-9903 細胞を用いる ER レポーター遺伝子アッセイのアゴニスト系試験に加え、アンタゴニストアッセイ系をガイドラインに加えるべく、施設間バリデーション研究を実施した。研究は Task-1 から Task-3 まで段階的に実施することとなった。Task-1 は既存のアゴニスト系ガイドラインの性能基準を満たすことを条件とし、すべての参加施設が基準を満たす結果の取得に成功したものの、国内施設に比較し、海外施設の Fold Induction が低値傾向であった。そこで、各施設の使用するルミノメーターの機種についてヒアリングを行った結果、VITO では Luminoskan Ascent (Labsystems)、KFDA では Victor3 (PerkinElmer) を使用しており、いずれも国内 3 施設の使用する機器 (TopCount NXT (PerkinElmer) 等) と比較すると感度の劣る機器であった。そこで、これらの施設に対して、感度の高い上位機種を試すこと等の指示を行った。

Task-2 は昨年度の施設内試験結果をもとに設定した暫定性能基準を基に実験を行い、本年度の国内 3 施設の結果から、新性能基準を設定することが出来た。しかし、海外施設においては、Task-1 と同様に①陽性対照物質 E2 に対する転写活性化倍率の低値、②細胞の活性低下という不具合が報告された。①の陽性対照物質 E2 に対する転写活性化倍率の低値に関しては、上述のとおり測定機器の感度の問題が疑われたが、KFDA および VITO 共に機種変更による劇的な改善はみられず、不具合の原因として他の要因が考えられた。各施設からのヒアリングにより、各施設で作製して使用する培地に起因する問題 (障害物質のコンタミ等)、使用する実験器具 (ピペット、ディッシュ類等)、細胞の継代方法 (フラスコによる継代 vs ディッシュによる継代) などが挙げられたため、リードラボにて培地 (血清不含) および実験器具類を各施設に供給し、実験を行った。その結果、両施設ともある程度の改善が認められたことから、培地或いは培地調製に用いる水に起因する障害要因が示唆された。培地に用いる水は限外濾過膜による精製処理を行ったものを使用するが、原料とな

る水はその施設の所在地によって条件が異なることが考えられる。そこで、培地調製に用いる水の要因を除外するため、海外施設でも入手可能な市販の実験用培養用水（SIGMA, Water sterile-filtered, cell culture tested Cat.No. W3500-1L）の使用をリードラボにおいて検討した結果、良好な成績が得られた。現在、海外施設においては、各施設で新たに入手した細胞を用いて、培養液を実験用培養用水にて調整し、再現性について検討を行っている。今後、Task-1、Task-2の結果明らかとなった海外施設における問題の原因を精査し、解決に取り組みと共に本研究の結果をガイドライン化のためのバリデーション報告書・およびガイドライン案の作成に活用していくことが望まれる。

Lumi-cell 法については、バリデーション計画のうち昨年度実施した phase I に引き続き Phase II a、Phase II b バリデーション研究を実施した。Phase II a バリデーション研究では、各施設は Phase I バリデーション結果から計算された基準を満たす測定結果が各化合物について 3 測定以上得られるまで測定を繰り返した。しかし、特に海外施設では基準をクリア出来ず不採用となる結果が多く、測定採用のための評価基準の見直しが必要となった。国内施設における測定でも、アゴニスト測定において 2 プレートの再測定を実施したが、うち 1 測定は、プロトコールの確認不足により被験物質の希釈率を間違えたためであり、品質基準を満たさないため不採用となった結果は、1 測定のみであった。化合物の活性評価結果については、アゴニスト、アンタゴニストともに 4 化合物中 1 化合物で施設によって異なる判定となるものがあつたが、その他の化合物についての判定は一致したことから、運営委員会において Phase II b バリデーション研究の実施が承認された。

Phase II b バリデーション研究に先立って、Phase II a バリデーション研究の結果をうけて不採用データを減らすため判定基準の見直し（一部項目の削除）を行った。これにより Phase II b バリデーション研究全体の不採用率は低下した。しかし、国内施設では、アゴニスト試験で 16 試験中 4 試験が、アンタゴニスト試験において、14 試験中 2 試験が基準内に入らなかったため、Fail 判定となった。主な原因は、Control および一部の well における過剰な活性を引き起こした為の基準判定以上の数値を示すことに原因があり、アゴニスト試験では、Control 過剰に伴い、E2 Reference Standard EC50 / Induction の Fail 判定や Methoxchlor Control 過剰の Fail 判定、アンタゴニスト試験では、Ral/E2 Reference Standard IC50 の Fail 判定であった。一方、参加 3 施設における化合物活性の評価結果は、アゴニスト測定を行った 8 化合物では施設間でほぼ一致したが、アンタゴニスト測定を行った 8 化合物については、ほとんどの化合物で 3 施設の判定が一致せず、Phase III バリデーション研究に

先立って不一致の原因を明らかにするとともに施設間再現性を確保するための検討が必要と考えられた。

その他、国内施設における測定において問題となった事項として、現在のプロトコールでは細胞の継代数 50 代程度までが使用期限となっているが、25 代程度までの継代数の少ない細胞使用を行うことで、突発的な活性などを極力軽減させてばらつきを無くすことが必要である。また、アッセイデータの基準が施設ごとの個別の指標であり、さらに測定を行うたびに再計算することとなっており変動してしまい煩雑であるとともに、一般に測定数が増えれば基準幅は狭くなるため測定を行うごとに基準が厳しくなる傾向にある。今後、出来れば全ての施設で共通の基準値の設定を検討することが必要であると考えられた。さらに、検量線および被検液の Comprehensive testing の際、一部 S. D. の高いものが見受けられたが、これに関しても採用基準の設定が必要と考えられた。

## E. 結論

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  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) に対するレポーターアッセイ (HeLa 法) によるアンタゴニスト測定法および欧米で開発された Lumi-cell 法を用いたアゴニスト・アンタゴニスト測定法について欧米の研究機関と協力し、国際バリデーションを実施した。HeLa 法では、既にほぼガイドライン化されているアゴニスト測定においては、全ての参加施設が評価基準を満たすデータの取得に成功したものの、アンタゴニスト測定においては欧州、韓国のラボで評価基準を満たす測定結果を取得することが出来ず、その原因特定のため当初の計画より予定が遅れた。一方、LumiCell 法についても当初の評価基準では、特に欧州の施設で非常に多くのデータが不採用となったため、やはり計画に比べ予定は大幅に遅れた。評価基準の変更を行い、不採用データの割合は減ったものの、Phase II b バリデーション研究におけるアンタゴニスト測定においてはコード化された 8 化合物のほとんどについて評価判定結果が参加 3 施設で一致せず、プロトコール上の問題点が示唆された。

いずれの系においてもアンタゴニスト測定系は、アゴニスト測定系に比べ複雑であることから施設の技術的習熟度が要求される。本研究において明らかとなったそれぞれの評価系の問題点を明らかにすることは、これらのスクリーニング系を国際的に認められる評価法としてガイドライン化するにあたり、非常に重要な知見を提供するものであり、今後、プロトコールについて更なる検討を行い、いずれの施設においても再現性の高い結果を得られる手法を早期に確立しガイドライン化の提案を行うことが重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Tice, RR., Deal, F., Ceger, P., Allen, D.,  
Gordon, J., DeLange, J., Bremer, S., Nakamura,  
M., Kojima, H., Ono, A., Stokes, W.,  
"Establishing a Historical Database for a  
Multi-phased International Validation Study of  
a Stably-Transfected Estrogen Receptor (ER)  
Transcriptional Activation (TA) Test Method."  
Society of Toxicology 48th Annual meeting  
(Baltimore, USA). 2009. 3.

### 3) OECD 活動と国際協調

#### 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。皮膚腐食性試験や光毒性試験代替法などにおいては、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専門家による第三者評価（以下、第三者評価と記す）が実施され、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、感受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 細胞をベースにしたエストロジェン受容体  $\alpha$  に対するレポーターアッセイ試験法の他、アロマトゼ活性化試験など、いくつかの方法が開発され、OECD 基準に則ったバリデーション研究が行われている。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。

本研究班は、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第三者評価を行うものである。また、極めて多大な労力を有し、大学や個々の研究機関、更には、一国では実施困難な多施設バリデーション研究と第三者評価を国際的な協力のもとで実施し、本研究で検討した試験方法の OECD ガイドライン化を目指すものである。そこで、我々の開発した方法を将来、OECD の試験法ガイドライン化するための活動を行うとともに、関連する OECD 活動に協力した。

本報告書では、日本で開発あるいは日本が中心となって開発している方法を中心に、OECD における活動、協力をまとめた。

#### B. 研究方法および結果

##### B-1 皮膚刺激性専門家会議

2008 年 10 月 21 日～22 日にベルリン BfR (Federal Institute for Risk Assessment) で開催された皮膚刺激性専門家会議に小島 肇 (国立医薬品食品衛生研究所) が参加した。

EU より提案のあった培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験テストガイドライン案について意見交換するとともに、培養表皮モデル LabCytE EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験に関する日本のバリデーション結果を報告し、その内容も今後考慮するように求めた。

##### B-2 OECD/EDTA VMT-NA での会合

2008 年 11 月 19 日～21 日にフランス パリ OECD

本部で開催された 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 (化学物質評価研究機構) が出席した。OECD VMT-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。

我々は進捗中のバリデーション研究内容について報告した。特に、日本で開発された HeLa 細胞をベースにしたエストロジェン受容体  $\alpha$  に対するレポーターアッセイについては、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の準備を進めていると報告し、その内容に助言を得た。

##### B-3 眼刺激性試験専門家会議

2008 年 12 月 4 日～5 日にワシントン D. C. で開催された眼刺激性専門家会議には日本から参加しなかった。

しかし、米国より提案のあった摘出牛角膜試験および摘出鶏眼球試験テストガイドライン案について事前に意見を送った。

##### B-4 SPSF の作成

皮膚感受性試験 LLNA の変法である非放射線物質による LLNA および培養表皮モデル LabCytE EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験の OECD ガイドライン化を目指し、試験法の予備登録である Standard Project Submission Form (SPSF) を 2009 年 1 月までに厚生労働省のナショナルコーディネーターを通して OECD に提出した。なお、我々の研究成果を踏まえ、コメットアッセイについては、厚生労働省から、Lumi-cell 法については米国から、HeLa 法については経済産業省から SPSF が OECD に提出された。

#### C. 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。その最終的な目標が OECD ガイドラインの確立であることから、このガイドライン化を目指して SPSF が提出し、本研究班のバリデーション結果から国際的検討に至るよう努力するものである。

なお、OECD ガイドラインとして完成させるまでには、短くても 3 年、通常 5 年以上掛かることを銘記しなければならない。この点でより迅速な国際合意を図るために共同研究は重要と考えている。

#### D. 結論

OECD の新たなガイドラインの成立に協力するとともに、日本からも SPSF を提出して積極的な試験法の開発を進めている。

#### E. 健康情報

なし