

- F. 研究発表
- 1. 論文発表
なし
- 2. 学会発表
なし

平成20年度分担研究報告書

遺伝毒性試験法のバリデーション研究

分担研究者 小島 肇 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部

研究要旨

本研究班ではDNA損傷を捉える試験であるコメットアッセイの国際ガイドライン化を目指した。まず、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した。

本年度、in vivo試験においては、Phase IIIバリデーション研究を実施し、Phase IIと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。小核試験も同時に行うという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ためのプロトコルを確定する予定である。

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。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、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)²⁾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 IWGT 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。しかし、データが不足し、主に以下の問題があり、プロトコルが一歩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平成18年度に設立されたが、本年度は第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ルの検証 | 5 | 1 | 2006年10月～12月 |
| II | プロトコルの検証 | 5 | 4（陽性対照を含む） | 2007年5月～11月 |
| III | プロトコルの検証、データ採用基準の確定および施設間再現性の検証 | 4 | 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（予定） | 未定 | 2009年（予定） |

B-2-1-1 Phase II

前年度（平成19年度：2007年）に行われた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を表2に示すように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ルver.12の概要を以下に示す。

- ①動物：CrI: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

表2. In vivo Phase II バリデーション研究に用いた被験物質コード表

| Laboratory | Number | Name | Solvent | Maximum 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 |

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、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、ブライント化された 3 物質

(N-Methyl-N-nitrosourea , Ethyl Methanesulfonate, D(-)-Mannitol)を表3に示すように濃度と溶媒を指定して Phase II バリデーション研究の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。

表3. in vivo Phase IIIバリデーション研究に用いた被験物質コード表

| Laboratory | Allocated Number | Name | Solvent | Maximum dose (mg/kg) | Middle dose (mg/kg) | Minimum dose (mg/kg) |
|-------------|------------------|------------------------|---------|----------------------|---------------------|----------------------|
| Merck | 2-04 | N-Methyl-N-nitrosourea | water | 100 | 50 | 25 |
| | 2-05 | Ethyl Methanesulfonate | saline | 300 | 200 | 100 |
| | 2-06 | D(-)-Mannitol | water | 2000 | 1000 | 500 |
| BioReliance | 2-07 | N-Methyl-N-nitrosourea | water | 100 | 50 | 25 |
| | 2-08 | D(-)-Mannitol | water | 2000 | 1000 | 500 |
| | 2-09 | Ethyl Methanesulfonate | saline | 300 | 200 | 100 |
| HLS | 2-10 | D(-)-Mannitol | water | 2000 | 1000 | 500 |
| | 2-11 | Ethyl Methanesulfonate | saline | 300 | 200 | 100 |
| | 2-12 | N-Methyl-N-nitrosourea | water | 100 | 50 | 25 |
| FDSC | 2-01 | Ethyl Methanesulfonate | saline | 300 | 200 | 100 |
| | 2-02 | N-Methyl-N-nitrosourea | water | 100 | 50 | 25 |
| | 2-03 | D(-)-Mannitol | water | 2000 | 1000 | 500 |

B-2-1-3 Phase IVバリデーション研究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(平成19年度:2007年)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。これらの施設に実験経験の有無を打診し、経験ありと答えた11施設に、EMSによるヒストリカルデータの提出を促すとともに、Phase IIバリデーション研究で用いたプロトコル(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4にPhase毎の目的を示した。

表4. 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(予定) | 未定 | 2009年(予定) |

B-2-2-1 Phase I

In vitro のプロトコールは平成 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。このプロトコールに従い、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 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、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% のトリバンブルー (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 3σ にあたる $(3 \times \sqrt{10})^2 = 100$ 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 2 施設が陽性と判断されなかった。

プロトコールの検証に用いた 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 は図 1 に示すように、施設 4 を除き、肝臓で陽性と判定された。胃では図 2 に示すように、施設 1 および施設 4 を除き、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、図 3 に示すように、2,4-DAT は施設 2 および施設 3 で肝臓に陽性が認められた。2,6-DAT は施設 3 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。胃では図 4 に示すように、2,4- および 2,6-DAT は施設 2 および施設 3 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が検出された。

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。

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

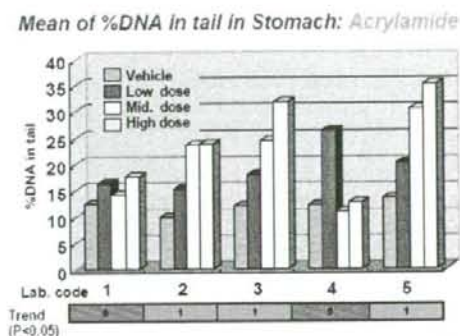
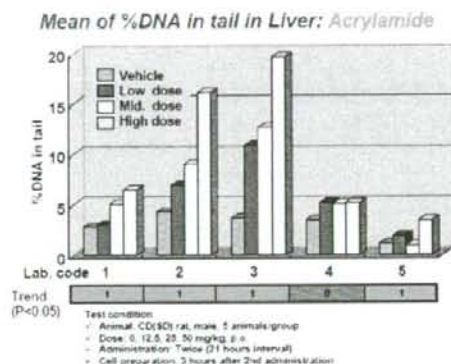


図1. Acrylamide の肝臓および胃における in vivo コメットアッセイ結果

Mean of %DNA in tail in Liver: 2,4- & 2,6-DAT

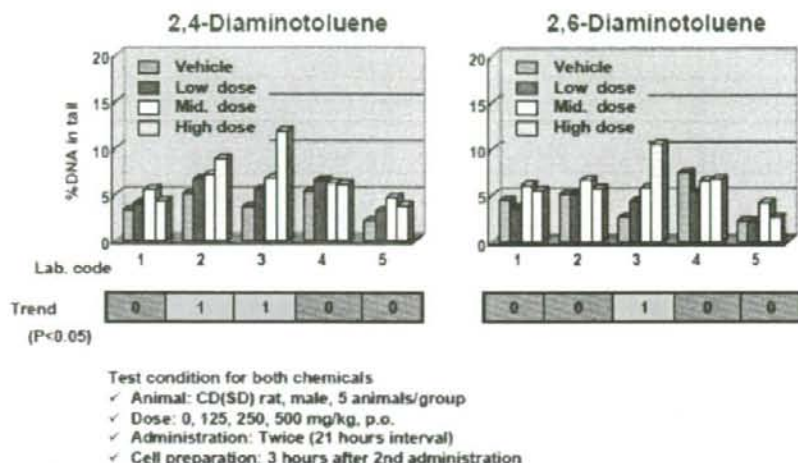


図2. 2,4-diaminotoluene および 2,6-diaminotoluene の肝臓における in vivo コメットアッセイ結果

Mean of %DNA in tail in Stomach: 2,4- & 2,6-DAT

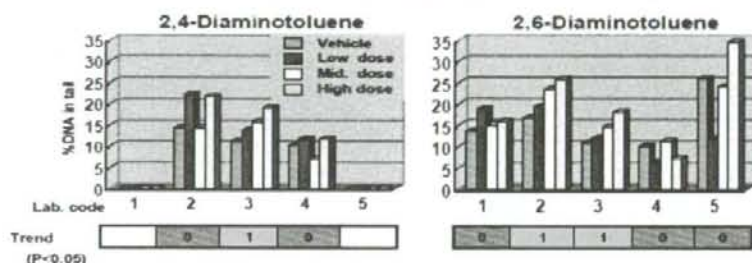


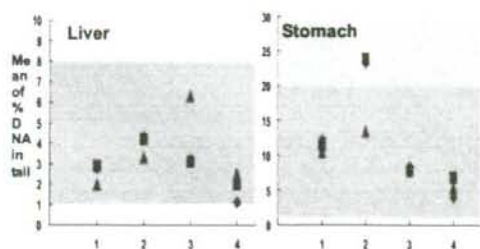
図3. 2,4-diaminotoluene および 2,6-diaminotoluene の胃における in vivo コメットアッセイ結果

C-1-2 Phase III

図4に示すように、陰性対照の採用基準はすべての施設でクリアできた。施設2の胃が20%を越えていたが、30%以内であった。図5に示すように、施設4の肝臓I試験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%)。また、図6に示すように、施設1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%)。これらの逸脱をどう考えるかを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、施設1および4の肝

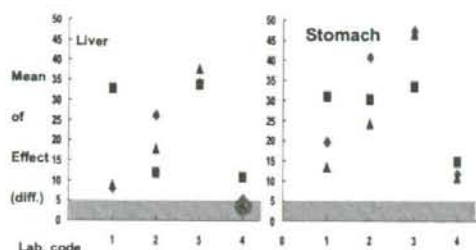
臓におけるEMSの結果を含め、全ての施設の全実験で陽性となった。すなわち、陽性対照は統計学的に有意であれば良い、データ数が少ないので変動係数を考えることにあまり意味はない、施設間での陽性レスポンスの強さの違いは泳動時間に起因するとの考察がなされた。

なお、被験物質の解析はまだ終了していない。



Data acceptance criteria (draft): Negative control

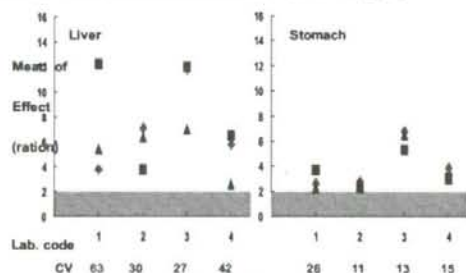
図4. 陰性対照のデータ範囲



Data acceptance criteria (draft): Positive control

- Effect (difference of means of %DNA in tail between EMS & vehicle) in liver and stomach: 5% or higher

図5. EMSにおけるEffect (差)の分布



Data acceptance criteria (draft): Positive control

- Effect (ratio of means of %DNA in tail between EMS & vehicle) in liver and stomach: 2-fold or higher
- CV of Effect (ratio) in two or more independent experiments with liver and stomach: 50% or less

図6. EMSにおけるEffect (比)の分布

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ールがver. 14に改定された。

プロトコール Ver. 14 の改定ポイント

1) 0.7V/cm、約300mAで電気泳動時間を20分に決める

プロトコール 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ひとつしかなく、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だろうとされた。表3に示した施設が最終的なPhase IVバリデーション研究の参加施設となった。

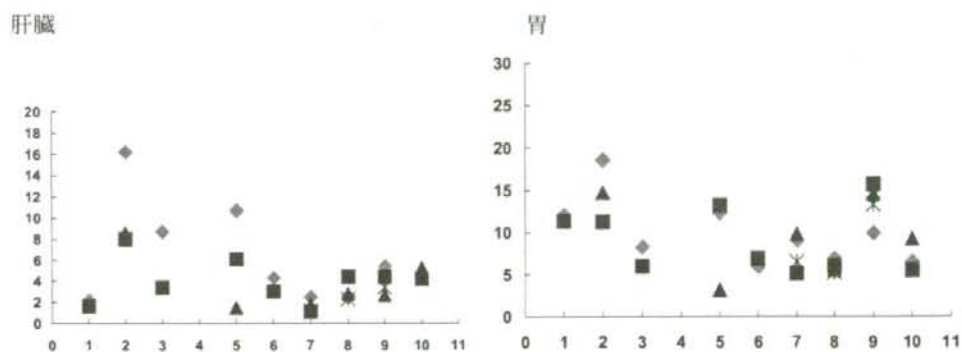


図7. Phase IVバリデーション研究参加予定施設の陰性対照分布

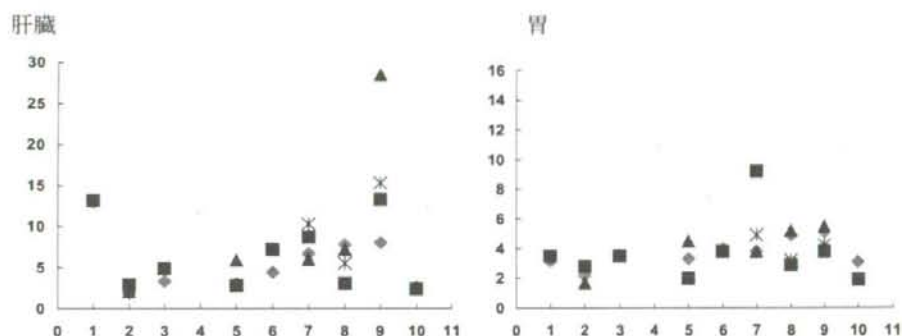


図8. Phase IVバリデーション研究参加予定施設のEffect (比)の分布

表3. Phase IVバリデーション研究の協力施設

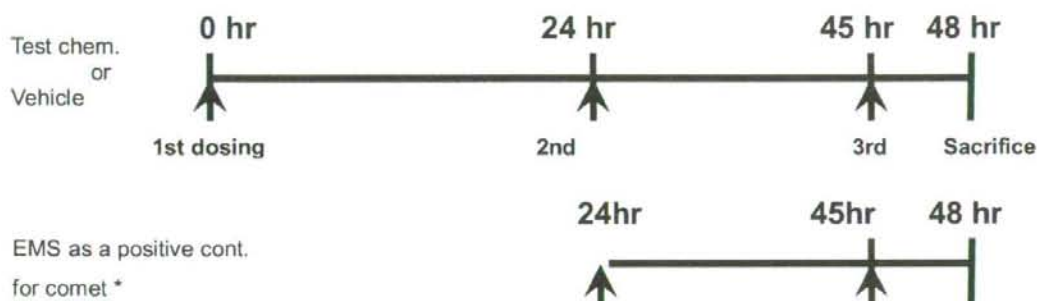
| Company | Country | Delegate |
|---|-------------|----------------------|
| AstraZeneca | UK | Catherine Smith |
| Bayer HealthCare | Germany | Uta Wirnitzer |
| BioReliance* | USA | Buba Krsmanovic |
| Covance | UK | Lucinda Williams |
| Food and Drug Safety Center* | JPN | Kohji Yamakage |
| Health Canada | Canada | James P. McNamee |
| Huntingdon Life Sciences* | UK | Brian Burlinson |
| Johnson & Johnson | Belgium | Marlies De Boeck |
| Merck* | USA | Richard D. Storer |
| Mitsubishi Chemical Safety Institute | JPN | Kazunori Narumi |
| Novartis Pharma | Switzerland | Ulla Plappert-Helbig |
| Sumitomo Chemical | JPN | Sachiko Kitamoto |
| The Institute of Environmental Toxicology | JPN | Kunio Wada |

*:Leading laboratory

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が、我々のプロトコール(Ver. 13)を使用して実施されている。

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プションを追加した。以下の図9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9. 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。表 4 および 5 に示すように、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 は変異原物質であるがクロスリンク剤であり、コメット試験では陰性を示すことが知られている。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、報告どおりの結

果となった。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には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) と、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、II バリデーション研究の試験結果を参考にしてデータの採用基準を設定する必要がある。

表 4. S9 を用いない場合の in vitro 試験結果

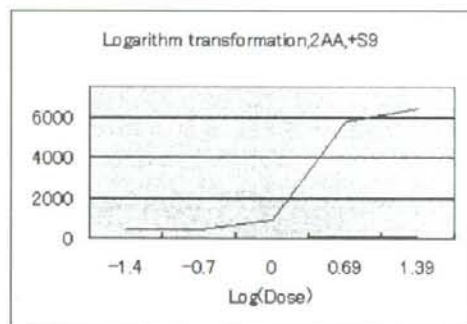
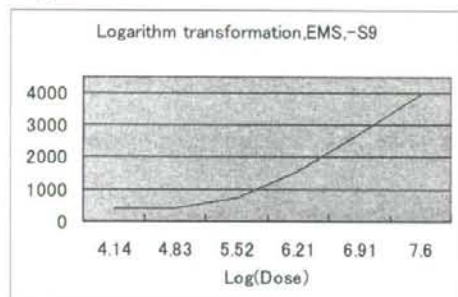
| | | EMS | MMC | 2AA | CHX | TRX |
|--------|--------------|--|--|---|--|--|
| Lab. A | W (SE, Tube) | TD= (0.03) *dose+ 10.3 [<.0001] | TD= (0.27) *dose+ 12.5 [0.7624] | TD= (0.005) *dose +17.74 [0.1532] | TD= (0.0006) *dos e+7.51 [0.6040] | TD= (0.01044) *d ose+4.21 [0.8776] |
| Lab. B | W (SE, Tube) | TD= (0.04) *dose+ 10.34 [<.0001] | TD= (0.35) *dose+ 3.19 [0.4177] | TD= (-0.00116) *d ose+6.39 [0.1172] | TD= (-0.001) *dos e+4.09 [0.4913] | TD= (0.03) *dose +2.99 [0.2311] |
| Lab. C | W (SE, Tube) | TD= (0.06) *dose+ 39.56 [0.017] | TD= (1.68) *dose+ 32.42 [0.8178] | TD= (0.02) *dose+ 31.62 [0.4869] | TD= (0.00006) *do se+13.3 [0.7713] | TD= (0.03219) *d ose+4.92 [0.1004] |
| Lab. D | W (SE, Tube) | TD= (0.04) *dose+ 1.66 [<.0001] | TD= (2.07) *dose+ 0.98 [0.0597] | TD= (-0.00204) *d ose+5.91 [0.7137] | TD= (0.0008) *dos e+6.36 [0.3639] | TD= (0.21) *dose +1.35 [0.0084] |
| Lab. E | W (SE, Tube) | TD= (0.04) *dose+ 7.18 [<.0001] | TD= (-0.02) *dose +1.92 [0.8605] | Fail | TD= (0.0001) *dos e+3.24 [0.7713] | TD= (0.05) *dose +2.36 [0.4273] |

表 5. S9 を用いた場合の in vitro 試験結果

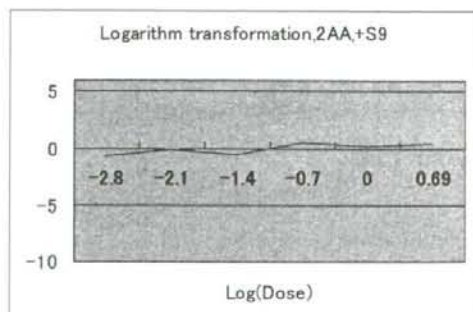
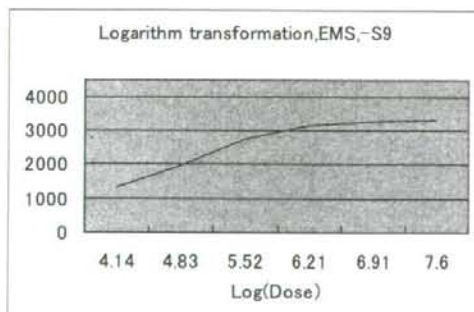
| | | EMS | MMC | 2AA | CHX | TRX |
|-------------|--------------|---|---|---|---|--|
| Anpyo Ctr. | W (SE, Tube) | TD= (0. 03) *dose+7. 27 [0. 0003] | TD= (0. 83) *dose+8. 11 [0. 2334] | TD= (22. 46) *dose+3. 51 [0. 0053] | TD= (0. 002) *dose+5. 13 [0. 1985] | TD= (-0. 002) *dose+3. 68 [0. 9039] |
| Bioreliance | W (SE, Tube) | TD= (0. 02) *dose+5. 8. 2 [0. 01182] | TD= (-0. 35) *dose+4. 02 [0. 6745] | TD= (-0. 41) *dose+2. 22 [0. 5420] | TD= (-0. 0004) *dose+3. 35 [0. 7460] | TD= (-0. 006) *dose+2. 31 [0. 7132] |
| HLS | W (SE, Tube) | TD= (0. 12) *dose+1. 93 [<. 0001] | TD= (7. 90) *dose+2. 4. 82 [0. 0178] | Failed | TD= (-0. 001) *dose+16. 3 [0. 3523] | TD= (0. 10) *dose+7. 18 [0. 1240] |
| Merck | W (SE, Tube) | TD= (0. 04) *dose+2. 09 [0. 0002] | TD= (1. 42) *dose+3. 4. 49 [0. 0570] | TD= (0. 30) *dose+5. 2. 24 [0. 8748] | Failed | TD= (-0. 01) *dose+5. 09 [0. 7663] |
| FDSC | W (SE, Tube) | TD= (0. 04) *dose+0. 56 [<. 0001] | TD= (0. 006) *dose+2. 16 [0. 9553] | Failed | TD= (-0. 000006) *dose+2. 45 [0. 9912] | TD= (0. 04) *dose+1. 86 [0. 0335] |

ブラインド：有意差あり

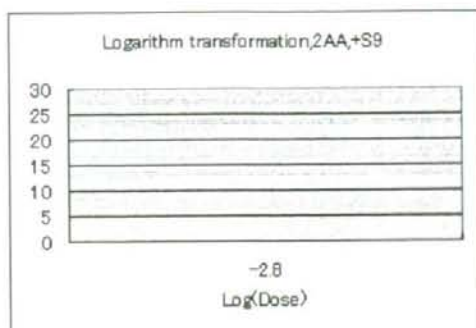
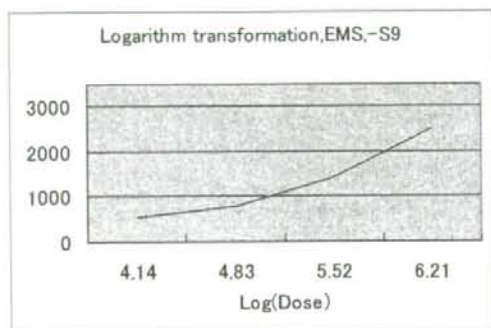
Anpyo Ctr.



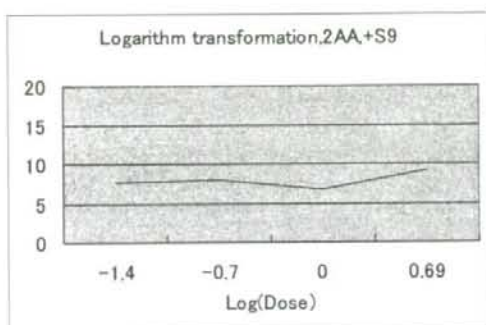
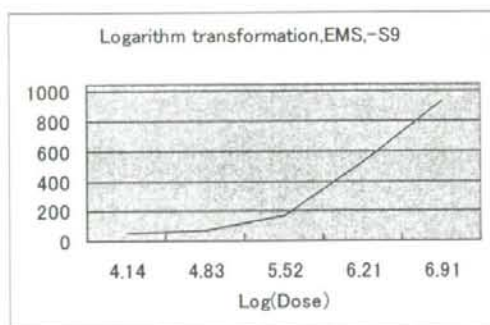
Bioreliance



HLS



Merck



FDSC

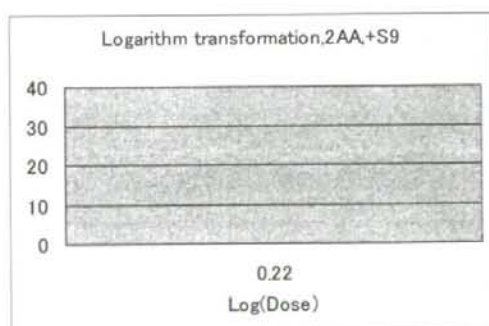
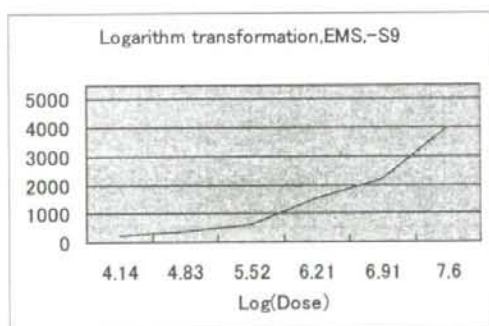


図10. In vitro Phase I バリデーション研究におけるEMSと2-AA (+S9)の結果

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 バリデーション研究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

- 1) 小島肇夫：in vivo 経皮吸収試験法、最新・経皮吸収剤～開発と基礎から申請のポイントまで～、株式会社情報機構、東京、pp. 95-103 (2008)
- 2) 小島肇夫：in vitro 経皮吸収試験法、最新・経皮吸収剤～開発と基礎から申請のポイントまで～、株式会社情報機構、東京、pp. 104-113 (2008)
- 3) 小島肇夫：安全性評価と動物実験代替法の現状、薬学雑誌、128 (5) 747-752. (2008)
- 4) 小島肇夫：動物実験の 3Rs における国内外の動向、ファルマシア、44 (9)、857-861 (2008)
- 5) 小島肇夫：REACH 対応に必要な動物実験代替法の現状、コスメティックスステージ、2 (5)、1-4 (2008)
- 6) 小島肇夫：動物実験代替法に関する 2008 年の国際動向、Fragrance Journal、2009-1、

65-69 (2009)

- 7) 小島肇夫：動物実験代替法の現状と展望、J. Environ Dermatol Cutan Allergol. 3 (1)、1-6 (2009)
 - 8) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I., Yuasa, A.: Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 58 11-26 (2008)
 - 9) Arai, S., Yamamoto, N., Kato M., and Kojima, H.: An in vitro evaluation methods to test ocular irritation using a human corneal epithelium model, Altern. Animal Test. Experiment, 13 (2), 83-90 (2008)
 - 10) 小島肇夫：動物実験の 3Rs における国内外の動向、城西大学生命科学研究センター報告第7号、p37-50 (2009)
- #### 2. 学会発表
- 1) Kojima, H.: Report JaCVAM, ECVAM Scientific Advisory Committee, Ispra (May, 2008)
 - 2) 小島肇夫：REACH 対応と動物実験代替法、第 128 回 FJ セミナー、東京 (2008)
 - 3) Kojima, H.: Japanese Collaboration on Alternative to Animal Toxicology Testing, World Congress on in Vitro Biology, Tucson (2008)
 - 4) Kojima, H.: JaCVAM Update, Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods, Bethesda. (June, 2008)
 - 5) 小島肇、武吉正博、大森崇、寒水孝司、有馬和範、出原賢治、金澤由基子、牧栄二、中桐直人、五十嵐良明、田中正志、吉村功、湯浅敦子：LLNA-BrdU 法の施設間バリデーション研究、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、東京 (2008)
 - 6) 小島肇、武吉正博、出原賢治：非 RI 法による皮膚感作性試験代替法 (LLNA 法) のバリデーション研究—試験法概要—、第 15 回日本免疫毒性学会学術大会、東京 (2008)
 - 7) 出原賢治、小島肇、武吉正博：非 RI 法による LLNA 法の比較、第 38 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会、大阪 (2008)
 - 8) Kojima, H.: Report JaCVAM, ECVAM Scientific Advisory Committee, Brussels (November, 2008)
 - 9) Kojima, H.: International Current of 3Rs

International Symposium on the 3Rs Promotion in Asia, Saitama (2008)

- 10) 小島 肇: *in vitro* 遺伝毒性試験—光と影—, 第37回日本環境変異原学会, 沖縄 (2008)
- 11) 小島 肇: 毒性試験における培養細胞の利用, 安全性評価研究会2008年冬のセミナー, 東京 (2008)
- 12) 小島 肇: 動物実験適正化のグローバルな動き—代替法の動きを中心に—, 日本制約工業協会医薬品評価委員会 第102回基礎研究部会総会, 京都 (2009)
- 13) Kojima, H.: Current aspects of LLNA-DA and LLNA-BrdU as alternatives for skin sensitizer classification in Japan, 2009 Winter Conference of Korean Society of Alternatives to Animal Experiments, Seoul (February, 2009)
- 14) Kojima, H.: Report JaCVAM, ECVAM Scientific Advisory Committee, Ispra (March, 2009)
- 15) 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, 48th Annual SOT meeting, Baltimore (2008)
- 16) Strickland, J., Paris, M., Allen, D., Tice, RR., Kojima, H., Prieto, P., Wind, M., Stokes, W.: ICCVAM/NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Acute Systemic Toxicity Evaluations, 48th Annual SOT meeting, Baltimore (2008)

H. 知的財産権の出願、登録状況
なし

I. 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)
3. 成果報告
- 1) 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)
- 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)

J. 添付資料

- 添付資料1: Protocol International Validation of the *in vivo* Rodent Alkaline Comet Assay for the Detection of Genotoxic Carcinogens (Version 14)
- 添付資料2: Participant list
- 添付資料3: Draft minutes, Osaka 200902
- 添付資料4: 第7回コメットアッセイ国内委員会会議事録
- 添付資料5: 第8回コメットアッセイ国内委員会会議メモ
- 添付資料6: *In Vivo* Comet Assay: Update on the On-Going Validation Coordinated by JaCVAM
- 添付資料7: *In Vivo* Comet Assay: 3rd Phase Validation Study

添付資料 8: *In Vivo* Comet Assay:4th Phase
Validation Study

添付資料 9: *In Vivo* Comet Assay:Examination
to Select Labs for 4th phase validation
study

添付資料10:Re2nd phase Figs and tables %tail
DNA

添付資料11: 3rd phase Figs and tables %tail DNA

添付資料 12: International Validation Study of
in Vitro Alkaline Comet Assay

添付資料 13: Data analysis and statistical
analysis of phase I study

添付資料 14: *in vitro* phase I Figs

添付資料 15: PHASE II VALIDATION STUDY OF THE IN
VITRO ALKALINE COMET ASSAY

List of participants at the meeting in Osaka, 2009

| No. | Name | Facility | Country |
|-----|-----------------------|--|---------|
| 1 | Leonard M. Schechtman | Innovative Toxicology Consulting, LLC | USA |
| 2 | Raymond R. Tice | NTP Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods | USA |
| 3 | Raffaella Corvi | European Center for the Validation of Alternative Methods | Italy |
| 4 | David Lovell | Postgraduate Medical School Univ. of Surrey | UK |
| 5 | Brian Burlinson | Huntingdon Life Sciences | UK |
| 6 | Kamala Pant | BioReliance Corporation | USA |
| 7 | Patricia Escobar | Boehringer-Ingelheim Pharmaceuticals, Inc. | USA |
| 8 | Andrew Kraynak | Merck & Co., Inc. | USA |
| 9 | Uta Wirtzler | Bayer Schering Pharma AG | Germany |
| 10 | Makoto Hayashi | Biosafety Research Center, Foods, Drugs and Pesticides (BSRC) | Japan |
| 11 | Madoka Nakajima | Biosafety Research Center, Foods, Drugs and Pesticides (BSRC) | Japan |
| 12 | Masaya Suzuki | Biosafety Research Center, Foods, Drugs and Pesticides (BSRC) | Japan |
| 13 | Jin Tanaka | Biosafety Research Center, Foods, Drugs and Pesticides (BSRC) | Japan |
| 14 | Koji Yamakage | Hatano Research Institute Food and Drug Safety Center | Japan |
| 15 | Yuzuki Nakagawa | Hatano Research Institute Food and Drug Safety Center | Japan |
| 16 | Ayako Sakai | Hatano Research Institute Food and Drug Safety Center | Japan |
| 17 | Yoshifumi Uno | Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation | Japan |
| 18 | Norihide Asano | Osaka Jogakuin College | Japan |
| 19 | Tkashi Omori | Department of Biostatistics Kyoto University School of Public Health | Japan |
| 20 | Hajime Kojima | National Institute of Health Sciences (NIHS) | Japan |
| 21 | Masamitsu Honma | National Institute of Health Sciences (NIHS) | Japan |
| 22 | Takeshi Morita | National Institute of Health Sciences (NIHS) | Japan |
| 23 | Maki Hojo | National Institute of Health Sciences (NIHS) | Japan |
| 24 | Yoko Suzuki | National Institute of Health Sciences (NIHS) | Japan |
| 25 | Toshiko Simoi | Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) | Japan |
| 26 | Yoshiko Nakamura | LSG Corporation | Japan |
| 27 | Kazunori Narumi | Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd. | Japan |
| 28 | Sachiko Kitamoto | Sumitomo Chemical Co., Ltd. | Japan |
| 29 | Kunio Wada | The Institute of Environmental Toxicology | Japan |
| 30 | Yasuaki Uematsu | Ds-pharma Co. Ltd | Japan |
| 31 | Nobuhiko Yamasaki | LMS Co. Ltd. | Japan |

**INTERNATIONAL VALIDATION OF THE *IN VIVO* RODENT
ALKALINE COMET ASSAY FOR THE DETECTION OF GENOTOXIC
CARCINOGENS
(VERSION 14)**

Issued by: the Validation Management Team (VMT)

Date: February 6, 2009 revised

A. PURPOSE OF THIS DOCUMENT

This document is provided to clarify the conduct of an international validation study to evaluate the ability of the *in vivo* rodent alkaline Comet assay to identify genotoxic carcinogens, as a potential replacement for the *in vivo* rodent hepatocyte unscheduled DNA synthesis (UDS) assay. A study protocol will be developed by the testing facilities based on the information provided in this document.

B. ASSURANCE OF DATA QUALITY

The study will be conducted in facilities that are Good Laboratory Practice compliant. Consistency between raw data and a final report is the responsibility of each testing facility. The VMT may review the data for consistency, if deemed necessary.

C. ANIMAL WELFARE AND 3Rs

Appropriate national and/or international regulations on animal welfare must be followed. The 3R-principle for experimental animal use must be considered for determining the experimental design.

D. TESTING PROCEDURE

1. MATERIALS AND METHODS

1.1. Test substances and positive/negative controls

1.1.1. Test substance

With the exception of ethyl methanesulfonate (EMS), test substances will be supplied to each testing facility by the VMT. When coded substances are supplied, appropriate safety information will be provided in a sealed envelope to be opened only by an appropriate individual within the organization who is not involved in the study and/or in the case of an emergency. If opened, appropriate documentation and justification will need to be provided to the VMT.

1.1.2. Test substance preparation

Each test substance will be dissolved or suspended with an appropriate solvent/vehicle just before administration (see section 1.1.4.).

1.1.3. Positive control

EMS (CAS No. 62-50-0); the source and lot number to be used will be provided by the VMT. EMS will be dissolved in physiological saline just before administration (within 2 hours).

1.1.4. Negative control (solvent/vehicle)

Solvents/vehicles for test substance preparation will be used as negative controls. An appropriate solvent/vehicle for a test substance may be indicated by the VMT. In the absence of instruction from the VMT, an appropriate solvent/vehicle will be chosen for each test substance by the testing facility in the following order: physiological saline, 0.5% w/v sodium carboxymethylcellulose aqua solution, corn oil. The source and lot of the corn oil will be specified by the VMT.

1.2. Test animals

1.2.1. Species

Although either rats or mice can be used in this assay, the validation study will use rats. The rat is the species most commonly used in toxicological studies and is the preferred species in the *in vivo* rodent hepatocyte UDS assay.

1.2.2. Sex

In order to allow for a direct comparison with the rat hepatocyte UDS assay, males will be used.

1.2.3. Strain

Rat: CrI:CD (SD)

1.2.4. Source

Charles River Laboratories, Inc.

1.2.5. Age

At the time of purchase: 6-8 weeks of age (body weight 150 g - 320 g)

At the time of dosing: 7-9 weeks of age

1.2.6. Body weight

The weight variation of animals should be +/- 20% of the mean weight at the time of dosing.