

200839003B

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
(H18-化学-一般-003)

平成18年度～平成20年度

総合研究報告書

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. 総合研究報告		
1. 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	
研究代表者 大野 泰雄		
2. 遺伝毒性試験法のバリデーション研究 -----	9	
研究分担者 小島 肇		
3. 内分泌かく乱化学物質試験法のバリデーション-----	117	
研究分担者 小野 敦		
4. OECD活動と国際協調 -----	261	
研究分担者 小島 肇		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	385
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	389

総合研究報告書

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

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ジェン受容体 α (ER α)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た 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 法によ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 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、本研究班の成果に基づき、Lumi-cell 法については米国より、HeLa 法については経済産業省より、遺伝毒性試験であるコメットアッセイ、皮膚感受性試験 Local Lymph Node Assay (LLNA) の変法である非放射線物質による LLNA 法および培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験については厚生労働省より試験法申請書にあたる Standard Project Submission Form (SPSF) を OECD に提出した。その中で、HeLa 法のアゴニストアッセイについては 2009 年 4 月、OECD ガイドライン 455 としての認証を受けた。

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
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、こ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、HeLa細胞をベースとしたエストロゲン受容体 α に対するレポーターアッセイ試験法(HeLa法)および同様の機序によるLumi-cell法のバリデーション研究を実施した。

B. 研究方法および結果

コメットアッセイについてはDNA損傷を捉える試験として、最近、コメットアッセイが汎用されている。本方法は、*in vivo*および*in vitro*で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および暴露、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り、FDA Guidanceにも記載がある。

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研究がなされておらず、プロトコルの国際的な合意がなされてこなかった。

このような混沌に終止符を打つべく、本研究班では国際的なバリデーション実行委員会を組織し、本試験の専門家とコンセンサスを取りながら、コ

メットアッセイの標準プロトコルの合意を目指すこととし、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。

平成18年度は、国内外の実行委員会での議論および参加5施設のEMS(Ethyl methanesulfonate)を用いたPhase Iバリデーション研究をへて、プロトコルの問題点を解決し、Phase IIバリデーション研究を実施できる環境を整えた。

主なプロトコル作成上の決定事項としては、①CrI:CD(SD)ラット雄 7-9週齢を5匹/群使用、②投与回数2回(1回目投与の21時間後に2回目を投与し、その3時間後にサンプリング)、③適用臓器は胃および肝臓、④単一細胞を使用、⑤電気泳動は冷蔵で実施、⑥指標はテールに含まれる%DNA量の平均値である。平成19年度には、これらを盛り込んだプロトコルを用いて、半年間かけて参加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、プロトコル改良の必要性が生じた。

平成20年度に実施された改良プロトコルを用いたPhase IIIバリデーション研究においては、参加4施設から仮に定めたデータ採用基準を満たさなかったデータがあったものの、すべての結果が統計学的に有意な差を認めた。以上の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。また、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。一方、追加施設の選抜も同時に行い、Phase IVバリデーション研究には13施設が参加することになった。

*In vitro*試験においては、平成19年度から*in vitro*バリデーションの組織を明確化し、Phase Iバリデーション研究を開始した。まず*in vivo*プロトコルを参考に*in vitro*版を確定し、参加5施設から5物質のデータを求めた。その結果、2-Aminoanthraceneを除き、4物質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た。

平成20年度においては、Phase IIバリデーション研究を行い、3月末にすべてのデータが集まった。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ためのプロトコルを確定する予定である。

化学物質の内分泌かく乱性を調べるための*in vitro*試験法のうち、行政的に有用であると判断された2種の試験法(HeLa法およびLumi-cell法)について、その信頼性や妥当性の検証を行うことを目的として、欧米の研究機関と共同で国際バリデーション研究を実施した。HeLa法は、我が国で開発

されたHeLa細胞をベースとしたER α に対するレポーターアッセイ試験法であり、そのアゴニスト検出法については既にバリデーションが終了しており、本研究班ではバリデーション結果をもとにOECDに提案されたガイドライン案に対するピアレビューでのコメントへの対応を行うとともに、ピアレビューにおいて要望が出されていたアンタゴニスト検出法のバリデーションを実施した。まず代表的化合物についてアンタゴニストアッセイを実施してバリデーションプロトコルを作成し、さらに標準物質の繰り返し測定により品質管理基準 (Quality Control) 及び性能基準 (Performance Criteria) を設定した。作成されたバリデーションプロトコルに従い、JaCVAMの主導によりJaCVAM、ECVAMおよび米国EPAのメンバーによるスタディーマネージメントチームのもと日本、欧州、韓国の施設における3段階のTaskからなる国際バリデーション試験を実施した。Task1ではアゴニストアッセイにおいて標準物質の測定を実施し、全てのラボで評価基準を満たす結果を得たが、アンタゴニストアッセイの準備段階であるTask2において、海外ラボでは標準物質の評価基準をクリア出来ず、原因究明のための追加検証が必要となった。一方、Lumi-cell法は、米国で開発された同様にER α に対するレポーターアッセイ試験法であり、米国ICCVAMで作成されたプロトコルをもとに欧州ECVAMとJaCVAMの共同のもと日米欧の3施設に参加により、4段階のPhaseからなる国際バリデーションを実施した。Phase Iでは、標準物質の10回繰り返し測定により、施設間での測定値の差はあるものの施設内変動は許容範囲内であることが示され、各施設における以降の測定のためのヒストリカルデータベースおよび品質評価基準の構築に成功した。

Phase IIでは、Phase Iで設定された品質評価基準に従い、アゴニスト・アンタゴニスト試験を各4物質について実施したが、多くの不採用データが出たことに伴い、品質評価基準項目の見直しを行った。引き続きアゴニスト、アンタゴニスト試験各8物質からなるPhase IIbを実施した。その結果、特にアンタゴニスト試験では、3施設における化合物評価結果が多くの化合物で評価結果が一致せず、追加試験の必要性が示された。

一方、2007年および2008年にOECD/Endocrine Disruption Testing and Assessment Task Force (EDTA) Validation Management Team-Non Animal (VMT-NA) 会議に参加し、現在進めている国際バリデーション研究の進捗について意見交換した。2008年10月にベルリンで開催された皮膚刺激性専門家会議に参加し、新たなテストガイドライン案について意見交換するとともに、日本のバリデーション結果を報告した。

OECDガイドライン化を目指し、本研究班の成果に基づき、内分泌かく乱性スクリーニング法であるLumi-cell法については米国より、HeLa細胞をベースにしたエストロゲン受容体 α に対するレ

ポーターアッセイ試験法については経済産業省より、遺伝毒性試験であるコメットアッセイ、皮膚感作性試験Local Lymph Node Assay (LLNA)の变法である非放射線物質によるLLNA法および培養表皮モデルLabCyte EPI-MODEL24を用いた皮膚刺激性試験については、Standard Project Submission Form (SPSF)が厚生労働省よりOECDに提出された。

その中で、HeLa法のアゴニストアッセイについては2009年4月、OECDガイドライン455としての認証を受けた。

C. 考察

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と可能な限りの統一を進めてきた。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が達成された。

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、参加者全員の合意に基づきステップバイステップで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。

D. 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。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 大野泰雄：日本薬理学会の奨める動物実験-苦痛の評価と軽減-「はじめに」および日本薬理

- 学会の新動物実験指針：日本薬理学雑誌 129, 5-9. 2007.
- 2) Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Okamoto, K., Mizuno, M., Sato, J., Yamada, T., Yoshida, M., Ota, N., Hasegawa, S., Kodama, T., Okamoto, Y., Kuwahara, H., Kosaka, N., Sono, S., Ohno, Y.: Assesment 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.
 - 3) Kojima, H., Ando, A., Inagaki, K., Ohhira, M., Kosaka, T., Nakamura, Y., Torishima, H., Morikawa, N., Kanno, J., Kuboki, M., Genno, G., Nokata, M., Harada, T., Morimoto, T., Yoshimura, I. and Ohno, Y.: Validation of human skin models for skin corrosivity tests in Japan. AATEX 13, 36-44. 2008
 - 4) 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.
 - 5) 小島肇夫：動物実験代替に関する最近の動向、化粧品技術者会誌、40 (4) 263-268 (2006)
 - 6) 小島肇夫：JaCVAM の設立と使命、日皮協ジャーナル、57, 129 (2007)
 - 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, AATEX, special issue, 483-485 (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)
 - 15) 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)
 - 16) 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)
 - 17) 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)
 - 18) 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)
 - 19) 小島肇夫：REACH 対応に必要な動物実験代替法の現状、コスメティックステージ、2 (5)、1-4 (2008)
 - 20) 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)
 - 21) 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)
 - 22) T 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)
 - 23) 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)
 - 24) 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) Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Okamoto, K., Mizuno, M., Sato, J., Yamada, T., Yoshida, M. and Ohno, Y.: Results of a Japanese ring study of a human cell line activation test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential. SOT (2006. 3).
 - 3) 足利太可雄、坂口齊、岡本賢二、水野誠、山田貴亮、吉田真由美、佐藤淳、児玉達治、太田尚子、長谷川靖司、岡本裕子、桑原裕史、小坂七重、蘭さき子、大野泰雄：日本における *in vitro* 皮膚感作性試験：h-CLAT (human Cell Line Activation Test) の共同研究。第 30 回日本化粧品学会 (2006. 6. 2-3) 東京ヤクルトホール
 - 4) 大野泰雄：動愛法に定められた 3Rs 原則の実現のために～動物実験代替法の最近の進歩。第 33 回日本トキシコロジー学会 (2006. 7. 4) 名古屋
 - 5) 大野泰雄：第六回国際代替法学会 6th World Congress on Alternatives to Animal Experiments (WC6)、第 20 回日本動物実験代替

- 法学会 (2006. 12. 8-9) 東京
- 6) 大野泰雄: 動物実験と代替法. 東邦大学薬学部オープンリサーチセンター (ORC) 第2回講演会 (2007. 3. 22) 千葉
 - 7) 大野泰雄: 薬学研究における動物実験代替法研究の重要性とその問題点, 日本薬学会シンポジウム (2007. 3. 30) 富山
 - 8) Kojima, H.: Current activities on alternative research in Japan, KSOT/KEMS spring annual meeting, Alternative Toxicology and Marine Ecotoxicology, Korea (2006)
 - 9) 小島 肇: JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) 新規試験法評価室の紹介, 日本環境変異原学会 MMS 研究会第49回定例会, 熱川 (2006)
 - 10) Kojima, H.: JaCVAM update, Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods, North Carolina (2006)
 - 11) 小島 肇: JaCVAM の設立と使命, 日本産業皮膚衛生協会第39回研修会, 京都 (2006)
 - 12) 小島 肇: 特別企画1: 動物実験代替法に関する最近の国内外の動向, 国内において現在進行中の評価試験プロジェクト紹介, 日本動物実験代替法学会第20回大会, 東京 (2006)
 - 13) 小島 肇: 動物実験代替法開発の推進とその評価: JaCVAM の設立と役割, 日本薬学会第127年会, 富山 (2007)
 - 14) Kojima, H.: JaCVAM update, Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods, Bethesda, (June, 2007)
 - 15) Kojima, H.: JaCVAM update, 6th World Congress on Alternatives to Animal Use in the Life Sciences, p. 119, Tokyo (2007)
 - 16) Kojima, H.: JaCVAM Process to Validate and Peer Review of New Alternative Methods, 6th World Congress on Alternatives to Animal Use in the Life Sciences, p. 82, Tokyo (2007)
 - 17) Kojima, H.: Validation study using Japanese models, 6th World Congress on Alternatives to Animal Use in the Life Sciences, p. 64, Tokyo (2007)
 - 18) Kojima, H.: JaCVAM update, ECVAM Scientific Advisory Committee, Ispra (November, 2007)
 - 19) 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)
 - 20) 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)
 - 21) 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)
 - 22) 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, Kitakyusyu (2007)
 - 23) 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)
 - 24) 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)
 - 25) Kojima, H., et al.: Panel discussion, ICCVAM ten-Year anniversary symposium, Washington DC (2008)
 - 26) 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)
 - 27) Kojima, H.: Report JaCVAM, ECVAM Scientific Advisory Committee, Ispra (May, 2008)
 - 28) 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)
 - 29) Kojima, H.: Japanese Collaboration on Alternative to Animal Toxicology Testing, World Congress on in Vitro Biology, Tucson (2008)
 - 30) Kojima, H.: JaCVAM update, Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods, Bethesda, (June, 2008)
 - 31) 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)
 - 32) 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回日本免疫毒理学学会学術大会, 東京 (2008)
 - 33) 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)
 - 34) Kojima, H.: Report JaCVAM, ECVAM Scientific Advisory Committee, Brussels (November, 2008)
 - 35) Kojima, H.: International current of 3Rs, International Symposium on the 3Rs Promotion in Asia, Saitama (2008)
 - 36) 小島 肇: 医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会報告,

- 日本動物実験代替法学会第21回大会、埼玉(2008)
- 37) 杉山真理子、河合敬一、小島 肇、寒水孝司、辰見寿、夏秋優、森福義：医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関わるあり方検討委員会報告 皮膚刺激性分科会からの報告、日本動物実験代替法学会第21回大会、埼玉(2008)
- 38) 金澤由基子、横関博雄、中田土起丈、坂口育、大野泰雄、小島 肇：医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関わるあり方検討委員会報告 感作性試験分科会からの報告、日本動物実験代替法学会第21回大会、埼玉(2008)
- 39) 瀬戸 洋一、萩野 滋延、畠 賢一郎、森田正道、平野 耕治、金子 豊蔵、小島 肇：医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関わるあり方検討委員会報告 眼刺激性分科会からの報告、日本動物実験代替法学会第21回大会、埼玉(2008)
- 40) 藤井まき子、小島 肇、杉林堅次、上月裕一、桑原裕史：医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関わるあり方検討委員会報告 皮膚透過・経皮吸収試験分科会からの報告、日本動物実験代替法学会第21回大会、埼玉(2008)
- 41) 笠松俊夫、江幡真也、林 真、能美建彦、本間正充、小島 肇：医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関わるあり方検討委員会報告 遺伝毒性分科会からの報告、日本動物実験代替法学会第21回大会、埼玉(2008)
- 42) 武吉正博、小島 肇、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、日本動物実験代替法学会第21回大会、埼玉(2008)
- 43) 小島 肇、安藤洋子、山口能宏、小坂忠司、鈴木民恵、湯浅敦子、渡邊幸彦、篠田伸介、出原賢治、吉村 功、宮岡悦良、石山賢也、加藤雅一、大森 崇：培養皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション研究 予備試験結果、日本動物実験代替法学会第21回大会、埼玉(2008)
- 44) 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、沖繩(2008)
- 45) 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)
- 46) 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)
- 47) 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)
- 48) Kojima, H. : Report JaCVAM, ECVAM Scientific Advisory Committee, Ispra (March, 2009)
- 49) Strickland, J., Paris, M., Allen, D., Tice, R., Kojima, H., Prieto, P., Wind, W., 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)
- 50) Stokes, W. S., Bremer, S., Jacobs, M., Kojima, H., Kanno, J., Ceger, R., Deal, F.H., Tice, R.R. : NICEATM/ECVAM/JaCVAM Multi-phased International Validation Study of a Stably-Transfected Estrogen Receptor (ER) Transcriptional Activation (TA) Test Method, 46th SOT, North Carolina (2007)
- 51) Stokes, W. S., Bremer, S., Jacobs, M., Ono, A., Kojima, H., Ceger, P., Deal, F. and Tice, R. : NICVEATM/ECVAM/JaCVAM Multi-phase International validation study of an in vitro estrogen receptor transcriptional activation assay to detect agonist and antagonist activity, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, p.265, Tokyo (2007)
- 52) 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及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. 12. 10-11
- 53) Tice, R., Deal, F., Ceger, P., Allen, D., Gordon, J., DeLange, J., Bremer, S., Nakamura, M., Kojima, H., Ono, A., Stokes, W.S. : 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. その他成果発表

- 1) Burlinson, B., Evaluation of comet assay—present state and future—, JaCVAM Workshop, Tokyo (2008)
- 2) 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)
- 3) 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)

- 4) 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)
- 5) 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)

G. 知的財産権の出願、登録状況
なし

総合研究報告書

遺伝毒性試験法のバリデーション研究

研究分担者 小島 肇 国立医薬品食品衛生研究所

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ールの合意を行った。

平成18年度は、国内外の実行委員会での議論および参加5施設のEMS(Ethylmethanesulfonate)を用いたPhaseIバリデーション研究をへて、プロトコールの問題点を解決でき、PhaseIIバリデーション研究を実施できる環境が整った。

主なプロトコール作成上の決定事項としては、①CrI:CD(SD)ラット雄 7-9週令を5匹/群使用、②投与回数2回(1回目投与の21時間後に2回目を投与し、その3時間後にサンプリング)、③適用臓器は胃および肝臓、④単一細胞を使用、⑤電気泳動は冷蔵で実施、⑥指標はテールに含まれる%DNA量の平均値である。これらを盛り込んだプロトコールを用いて、平成19年度に半年間かけて、参加5施設でPhaseII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生じた。

改良プロトコールを用いて、平成20年度に実施されたPhaseIIIバリデーション研究においては、参加4施設から仮に定めたデータ採用基準を満たさなかったデータがあったものの、すべての結果が統計学的に有意な差を認めた。以上のPhaseII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。また、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ールの改定もなされ、最終的な段階であるPhaseIVバリデーション研究に入る準備が整った。一方、追加施設の選抜も同時に行い、PhaseIVバリデーション研究には13施設が参加することになった。

In vitro試験においては、平成19年度からin vitroバリデーションの組織を明確化し、PhaseI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、参加5施設から5物質のデータを求めた。その結果、2Aminoanthraceneを除き、4物質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た。

現在、PhaseII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、PhaseIIIのバリデーション研究を実施するためのプロトコー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 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。しかし、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 研究会) 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、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、コミ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として、平成 18 年度 (2006 年) 国際バリデーション実行委員会 (以後、実行委員会と記す) を設立した。

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)

T. Hurtung (ECVAM: 平成 19 年度まで)

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: KINTR)

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)

田中憲穂 (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. 実行委員会

B-2-1 国内実行委員会

以下に示すように開催した。

- ・ 第一回 2006 年 4 月 東京
- ・ 第二回 2006 年 7 月 東京
- ・ 第三回 2007 年 1 月 東京
- ・ 第四回 2007 年 4 月 東京

- ・第五回 2007年11月 北九州
- ・第六回 2008年2月 東京
- ・第七回 2008年10月 東京
- ・第八回 2009年2月 大阪

B-2-2 国際実行委員会

以下に示すように開催した。

- ・第一回 in vivo 2006年8月 札幌
- ・第二回 in vivo 2006年12月 東京
- ・第三回 in vivo 2007年8月 東京
- ・第一回 in vitro 会議
- ・第四回 in vivo& in vitro 2008年3月 熱川
- ・第五回 in vivo& in vitro 2009年2月 大阪

B-3. セミナー

B-3-1 札幌セミナー

コメットアッセイの問題点を共通認識するため、まず、MMS研究会と協力して本試験法の専門家を集め、平成18年度(2006年)8月に札幌でセミナーを開催した。

B-3-2 東京セミナー

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2008年3月に東京にて開催された。

B-4. 試験方法

B-4-1 画像解析検討

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

1) 参加施設

- ①食薬センター
- ②田辺製薬
- ③残留農薬研究所
- ④富士バイオ
- ⑤東レ
- ⑥キャノン
- ⑦インビトロジェン
- ⑧ヤクルト中央研究所

2) イメージアナライザー

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

3) 計測方法

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

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

- ・計測指標は、テールに含まれる%DNA量、Tail

モーメント、Tailの長さとする⁴⁾。

配布する画像について

- ・1枚の画像には、1細胞の画像のみが含まれるようにする。

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

4) 評価方法

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

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

B-3-2 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	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	13(予定)	未定	2009年より

B-3-1-1 Phase I

実行委員会での議論により、種々の問題点を加味したプロトコルを作成し、Phase Iバリデーション研究を行う合意が得られた。2006年9月以降、参加5施設において、EMS(Ethyl methanesulfonate)を用いたPhase Iバリデーション研究を実施した。

B-3-1-2 Phase II

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 : 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 : 細胞を使用 (核ではない)
- ⑤電気泳動 : 低温 (4℃) で実施
- ⑥指標 : %DNA in tail 量の細胞全体量に対する割合 (%) の平均値

得られたデータをクーリ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) が解析した。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された。

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

B-3-1-3 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-3-1-4 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、平成 19 年度（2007 年）より国内外の環境変異原学会において、コメントアッセイの経験を有することを条件としてバリデーション研究への参加施設を公募し、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。これらの施設に詳細な実験経験の内容を確認し、実行委員会が十分な経験ありと判断した 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-4-1 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ールの検証	5	5	2007年11月～2008年3月
II	プロトコールの検証、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	4 (予定)	未定	2009年より

B-4-2-1 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) In vivo では、各動物単位の % Tail DNA の平均値を用いた統計手法を用いている。
- 2) 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。
- 3) 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-4-2-2 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 実行委員会

各実行委員会の議事録を添付資料に示す。

C-2 セミナー

C-2-1 札幌セミナー

国際および国内実行委員会、コンサルタントのメンバーのほとんどが札幌に集い 2006 年 8 月に開催されたセミナーで、試験法の問題点を明確にした。レジュメを添付資料とした。

C-2-2 東京セミナー

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 (Merk)

4) *In vitro* validation study

本間正充 (国立衛研)

レジュメを添付資料として示した。

C-3 画像解析ソフトによるばらつきを検討

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

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

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

C-4 *in vivo*

C-4-1 プロトコール作成のための問題点の抽出と対応

2006年8月の国際実行委員会では、それぞれの分野の専門家が札幌セミナーで用いた資料を用いてプロトコール作成のため以下の問題点を抽出し検討した。以下に検討事項を示す。

① 単離核か、細胞か

② 陽性対照物質および被験物質の選択

③ 動物種、試験サイズ、投与方法、サンプリング時間

④ スライド調製方法、電気泳動方法、染色方法

⑤ 指標および解析方法(解析ソフト、カテゴリー分類)

⑥ 細胞毒性検出のための病理観察の導入

⑦ 統計学的解析

⑧ 適合基準

この中で、①の問題については、MMS研究会での検討結果が受入れられ⁴⁾、どちらを用いても結果に影響しないとの合意を得た。議論の末、②~④に関する決定または検討事項を表5に示す。⑤のソフトによるばらつきについては、C-3の結論が採用された。⑤のカテゴリー分類は解析に用いないことになった。⑥、⑦は phase I バリデーション結果を経てから決めることになった。⑧は Phase I バリデーション研究終了後に検討される。これらの検討を経て、プロトコール(ver. 10)を決定した。

C-4-2 Phase I

2006年12月の東京の国際実行委員会においては、予備試験の修了をチェックリストで確認するとともに、実験を行った結果から得られた以下の疑問点または問題点が浮き彫りにされた。

① アガロースに EDTA を加える必要性について

② 室温での電気泳動ではアガロースが溶ける可能性

③ GLP 適合施設にて試験を実施

④ クロスリンク型の直接変異原を被験物質に追加

⑤ 一群当たりの動物数はプレバリデーション後で再検討する

⑥ 陰性対照におけるテールに含まれる %DNA 量 平均値の範囲 (1-15%)

⑦ 脱水処理

⑧ テールに含まれる %DNA 量において >90% が hedgehog の認識

⑨ 病理標本観察の必要性

⑩ 適切な統計解析方法

これらの問題を考慮して、次のプロトコールに反映させることになった。

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

表 5. Phase I バリデーション研究実施のために決定されたプロトコールのポイント

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

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

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

データ解析の結論として、Dunnett 検定による解析に加え、%DNA in tail 量の平均値を用いて施設間差の結果を比較することになった。

以上の問題点を考慮の上、Phase II バリデーション研究のためのプロトコールが確定した。

表 6. Phase II バリデーション研究のための
プロトコール確定事項

問題点	決定事項
GLP	GLP 精神を遵守
陽性対照物質	Ethyl methanesulfonate
陽性対照濃度	1 段階
溶媒	生理食塩水または CMC 数 溶液
動物種	ラット CrI:CD (SD) 雄 7-9 週令
匹数	5 匹
投与方法	経口、2 回 (投与 21 時間 後に 2 回目投与)
サンプリング 時間	2 回目の投与 3 時間後
試薬の調整	アガロースゲル、用事調整
DNA 染色	Cyber-Gold
臓器種	胃、肝臓
核か細胞か	単一細胞
スライド調整	20 分放置
電気泳動条件	0.7-1V-cm, 0.25-0.3A 2-10℃
計測数	50
指標	%DNA in tail 量の平均値
イメージアナ ライザー	不問
細胞毒性	未決定
統計	Dunnet 検定

C-4-3 Phase II

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、プロトコールを 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。

プロトコール 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

プロトコール 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

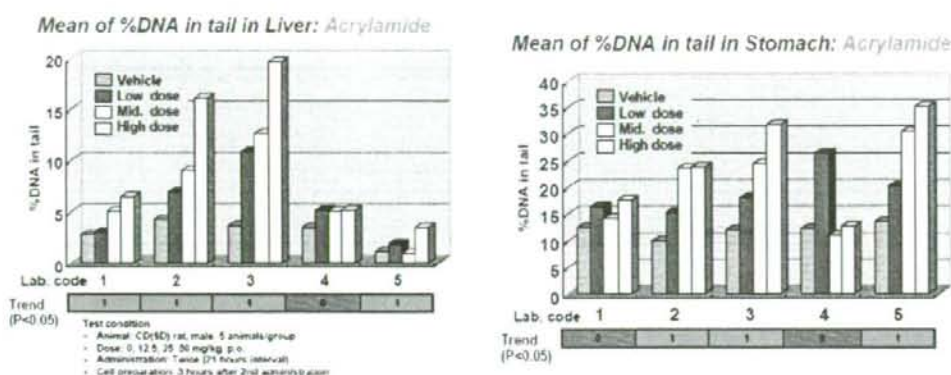


図1. Acrylamideの肝臓および胃における in vivo コメットアッセイ結果

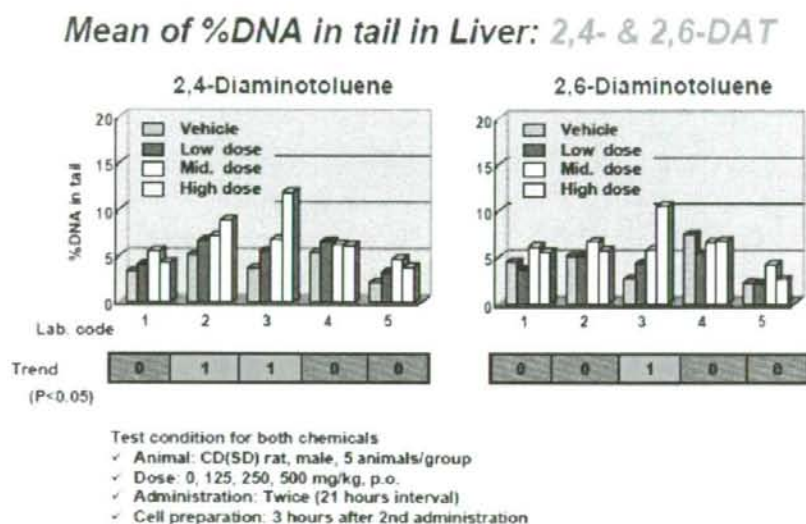


図2. 2,4-diaminotoluene および 2,6-diaminotoluene の肝臓における in vivo コメットアッセイ結果

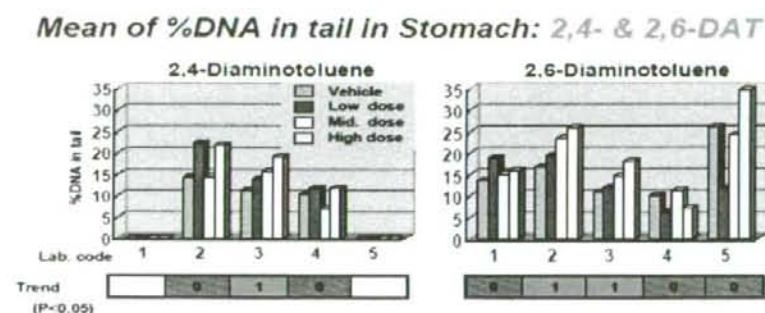


図3. 2,4-diaminotoluene および 2,6-diaminotoluene の胃における in vivo コメットアッセイ結果

C-4-4 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1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。

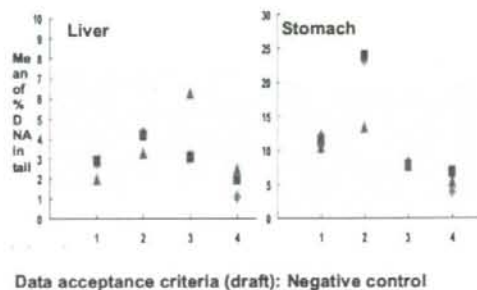


図4. 陰性対照のデータ範囲

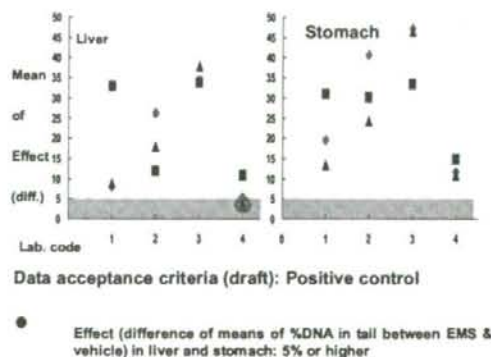


図5. EMSにおけるEffect(差)の分布

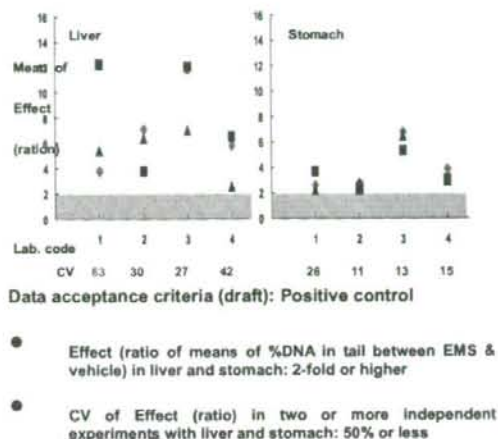


図6. EMSにおけるEffect(比)の分布

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

なお、被験物質の結果は現在解析中である。

C-4-5 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