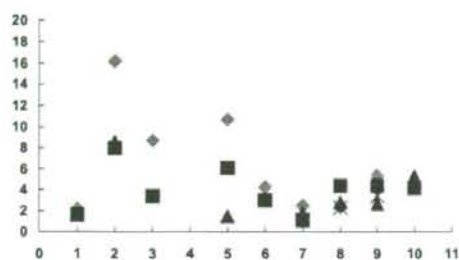


設3、施設5および施設9は一部のデータが外れていたが、はずれの程度が僅かなので概ね満たしていると考えて良いだろうとされた。表7に示した施設が最終的なPhaseIVバリデーション研究の参加施設となった。

なお、参加施設から提出されたAcrylamideおよび2,6-DATの結果は現在解析中である。

肝臓



胃

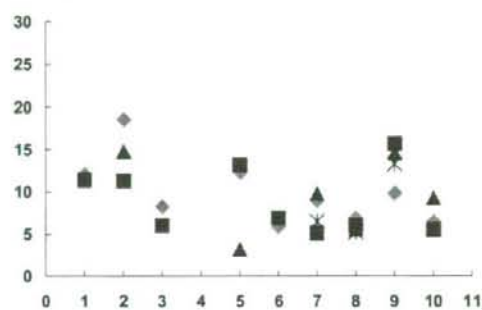
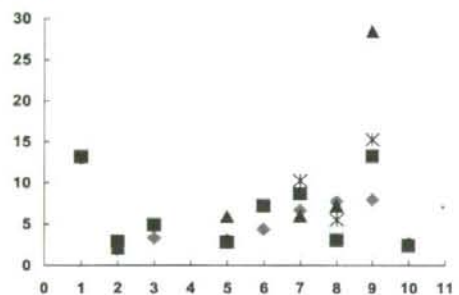


図7. Phase IVバリデーション研究参加予定施設の陰性対照分布

肝臓



胃

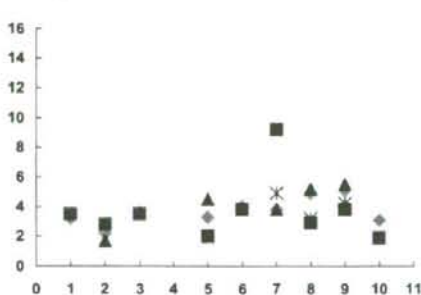


図8. Phase IVバリデーション研究参加予定施設のEffect (比)の分布

表7. 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-4-6 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)の使用が想定されている。

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:添付資料)。



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

## C-5 In vitro 試験

### C-5-1 Phase I

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 8 および 9 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。

### C-5-2 プロトコル作成のための問題点の抽出と対応

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

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

#### 1) S9 問題

- ・今回用いた Biopredic 社製の S9 と日本で汎用されているキッコーマン社製の比較では同等であった。
  - ・S9 が効かなかった施設もあった。
  - ・MolTox 社の S9 を用いて、dimethylnitrosoamine や cyclophosphamide の追加試験を行うべきである(日本で購入できるか調査が必要である)。
- #### 2) 細胞毒性
- ・トリパンブルーが一般的で使いやすい。
  - ・RCG と TB、ATP 測定が同様の結果を示した。オ

プションとして利用できるが限界もある。

- ・Neutral diffusion 法はよくない。細胞毒性について情報不足。
- ・TB の 0 時間では細胞毒性がでない。3-4 時間後に測定が有用。
- ・RCG24 時間後はよい指標である。
- ・Hedgehog が問題か? in vitro 特異的な問題である。スライドの質を示すよい指標である。100 細胞中、いくつ hedgehog があつたかの指標は必要である。
- ・2-AA ではほとんどが Hedgehog であつた。重要な細胞毒性の指標である。
- ・EMS が陽性反応、最高濃度で Hedgehog が多い。

#### 3) 処理枚数について

BioReliance において溶媒として用いたエタノール処理で 23.67 と 4.17 という値を得た。同様の現象は Merck でも起こった。

- ・観察したエリアの問題か?
- ・アガー中の細胞密度が一定のデータを得るために有用か?
- ・スライドの質が重要。人為的な視野の選択ではなく、自動的な測定が必要。
- ・%DNA in tail は大きな差を生じる。
- ・最低2枚は必要である。

#### 4) その他

- ・細胞種

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

- ・陽性対照

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

- ・血清  
FBS が推奨される。
- ・陽性の定義、電気泳動条件、スコアの方法は vivo と同じ条件とする。

C-5-3 統計解析

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で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 8. 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) *dose+ 7.51 [0.6040]	TD= (0.01044) *dose+ 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) *dose+ 6.39 [0.1172]	TD= (-0.001) *dose+ 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) *dose+ 13.3 [0.7713]	TD= (0.03219) *dose+ 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) *dose+ 5.91 [0.7137]	TD= (0.0008) *dose+ 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]	Failed	TD= (0.0001) *dose+ 3.24 [0.7713]	TD= (0.05) *dose+ 2.36 [0.4273]

表 9. S9 を用いた場合の in vitro 試験結果

		EMS	MMC	2AA	CHX	TRX
Lab. A	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]
Lab. B	W (SE, Tube)	TD= (0.02) *dose+ 58.2 [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]
Lab. C	W (SE, Tube)	TD= (0.12) *dose+ 1.93 [<.0001]	TD= (7.90) *dose+ 24.82 [0.0178]	Failed	TD= (-0.001) *dose+ 16.3 [0.3523]	TD= (0.10) *dose+ 7.18 [0.1240]
Lab. D	W (SE, Tube)	TD= (0.04) *dose+ 2.09 [0.0002]	TD= (1.42) *dose+ 3.49 [0.0570]	TD= (0.30) *dose+ 5.24 [0.8748]	Failed	TD= (-0.01) *dose+ 5.09 [0.7663]
Lab. E	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]

ピンク：有意差あり



#### D. 考察

in vivo バリデーション研究において、Phase IIIまで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、世界的に参加施設を募集し、13施設(海外9施設および国内4施設)の参加が決まった。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2009年内にデータ採用基準を確定したプロトコルを確定し、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 IIIまで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: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)
- 2) 小島肇夫:JaCVAMの設立と使命、日皮協ジャーナル、57、129 (2007)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)

- 8) 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)
- 9) 小島肇夫:EUにおける動物実験代替法の現状とREACH対策、日皮協ジャーナル、30(2) 156-162 (2008)
- 10) Kojima, H.: Perspectives on validation and regulatory acceptance of animal alternative testings in Japan, P&G Actives Risk Communication, 2(1), 1-4 (2008)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) 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)
- 16) 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)
- 17) 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)
- 18) 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)
- 19) 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)
- 20) 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)
- 21) 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.: Current activities on alternative research in Japan. KSOT/KEMS Spring Annual Meeting, Alternative Toxicology and Marine Ecotoxicology, Korea (2006)
- 2) 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)
- 3) Kojima, H.: JaCVAM Update, Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods, North Carolina (2006)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) Kojima, H.: JaCVAM Update, Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods, Bethesda, (June, 2007)
- 8) Kojima, H.: JaCVAM Update, 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, p. 119, Tokyo (2007)
- 9) Kojima, H.: JaCVAM Process to Validate and Peer Review of New Alternative Methods, 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, p. 82, Tokyo (2007)
- 10) Kojima, H.: Validation study using Japanese models, 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, p. 64, Tokyo (2007)
- 11) Kojima, H.: JaCVAM Update, ECVAM Scientific Advisory Committee, Ispra (November, 2007)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) 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, 36<sup>th</sup> Annual Meetings of the Japanese Environmental Mutagen Society, Kitakyusu (2007)
- 16) 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)
- 17) 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)
- 18) Kojima, H., et al.: Panel Discussion, ICCVAM Ten-Year Anniversary Symposium, Washington DC (2008)
- 19) 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)
- 20) Kojima, H.: Report JaCVAM, ECVAM Scientific Advisory Committee, Ispra (May, 2008)
- 21) 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)
- 22) Kojima, H.: Japanese Collaboration on Alternative to Animal Toxicology Testing, World Congress on in Vitro Biology, Tucson (2008)
- 23) Kojima, H.: JaCVAM Update, Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods, Bethesda, (June, 2008)
- 24) 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、牧業二、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)
- 25) 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)
- 26) 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)
- 27) Kojima, H.: Report JaCVAM, ECVAM Scientific Advisory Committee, Brussels (November, 2008)
- 28) Kojima, H.: International Current of 3Rs International Symposium on the 3Rs Promotion in Asia, Saitama (2008)
- 29) 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)

- 30) 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)
- 31) 金澤由基子、横関博雄、中田土起丈、坂口斉、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 感受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)
- 32) 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)
- 33) 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)
- 34) 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)
- 35) 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)
- 36) 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)
- 37) 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)
- 38) 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)
- 39) 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)
- 40) 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)

- 41) Kojima, H. : Report JaCVAM, ECVAM Scientific Advisory Committee, Ispra (March, 2009)
  - 42) 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, 48<sup>th</sup> Annual SOT meeting, Baltimore (2008)
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, 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)

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)

#### J. 添付資料

- 添付資料 1: 第1回コメットアッセイ国内委員会会議議事録  
 添付資料 2: 第2回コメットアッセイ国内委員会会議議事録  
 添付資料 3: 第3回コメットアッセイ国内委員会会議議事録  
 添付資料 4: 第4回コメットアッセイ国内委員会会議メモ  
 添付資料 5: 第5回コメットアッセイ国内委員会会議議事録  
 添付資料 6: 第6回コメットアッセイ国内委員会会議議事録  
 添付資料 7: 第7回コメットアッセイ国内委員会会議議事録  
 添付資料 8: 第8回コメットアッセイ国内委員会会議メモ  
 添付資料 9: 第1回コメットアッセイ国際実行委員会会議議事録  
 添付資料 10: 第2回コメットアッセイ国際実行委員会会議議事録  
 添付資料 11: 第3回コメットアッセイ国際実行委員会会議議事録  
 添付資料 12: 第1回 in vitro コメットアッセイ国際実行委員会会議議事録  
 添付資料 13: 第4回コメットアッセイ国際実行委員会会議議事録  
 添付資料 14: 第5回コメットアッセイ国際実行委員会会議議事録  
 添付資料 15: 札幌セミナーレジュメ  
 添付資料 16: 東京セミナー(第一回 JaCVAM ワークショップ)レジュメ  
 添付資料 17: Protocol International Validation of the in vivo Rodent Alkaline Comet Assay for the Detection of Genotoxic Carcinogens (Version 14)  
 添付資料 18: PHASE II VALIDATION STUDY OF THE IN VITRO ALKALINE COMET ASSAY  
 添付資料 19: In vivo comet assay: 4<sup>th</sup> phase



## コメットアッセイバリデーション第1回国内マネージメントチーム (MT)

### 会議議事録

日時：平成18年4月13日(木) 14:00~17:20

場所：国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター会議室

出席者：林 真 (国立衛研)、本間正充 (国立衛研)、森田 健 (国立衛研)、浅野哲秀 (日東電工)、宇野芳文 (三菱化学安全研)、中嶋 圓 (安評センター)、大森 崇 (京都大学)、小島 肇 (国立衛研) 以上8名、敬称略

#### 配布資料

1. 第1回コメットアッセイバリデーション準備会議次第
2. Protocol
3. 平成18年度厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)研究計画書
4. (別紙)平成18年度新規採択研究課題に関する3年間の研究成果予定記入様式
5. International validation study of in vitro/in vivo Comet assay
6. ATTACHMENT 1 (ICCVAMの別のバリデーションの組織案)
7. 統計家としてのComet Assayバリデーション会合へのコメント
8. Comparison (未配布)
9. OPP-Comet (未配布)
10. IWGT-comet-final (未配布)

#### 議事

資料1に示す議事次第に基づき、小島が司会を務めた。

##### 1. 厚生労働科学研究の申請計画内容について

平成18年度厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)研究計画書(資料3)をもとに、「コメットアッセイの国際的バリデーションに関する研究」の研究課題が、採択されたことを小島より紹介した。資料4に示すような成果を達成するため、コメットアッセイの有識者である本会の出席者に協力を要請した。資金として、海外からの招聘費用、会議費用の他に、MMS研究会にバリデーションを円滑に進めるための消耗品代として、200万円を委託研究費として拠出を提案した。

##### 2. これまでの経緯の確認

コメットアッセイの研究経緯について、資料8~10をもとに宇野より説明がなされた。従来から、試験法により結果が異なると経験者から指摘されており、試験法を固定するため、1999年にワシントンで開催された国際ワーキンググループ会議(IWGT)にて、詳細な検討が初めてなされ、2001年の国際コメットワークショップにて微修正がなされた現状が報告された。

動物数(3-5匹)、投与経路(腹腔または経口)、適用濃度の段階(1~複数濃度)、処

理細胞（細胞または核）、イメージアナライザーの解析の有無、電気泳動のポイント（温度、電流）、細胞毒性の評価（トリパンプルーの使用またはHisopathologyによる評価）、統計解析手法など、試験法確立のため残された課題は多いとの指摘があった。

これを受け、議論した結果、一テーマ研究で課題を潰していくという案も出された。しかし、これまでの IWGT の検討から残された課題は整理されつつあり、資料2の共同研究プロトコルをもとに残された課題を併記しながら、in vivo プロトコルを宇野がまとめることで合意を得た。なお、許容量の関係から in vitro 試験については、一年後にスタートすることが了承された。

### 3. 組織について

小島より、資料5および6をもとに、構想中の組織について提案した。

国際的なMTとしては、林がリーダーを務め、L. Schectmann (FDA)、T. Hurtung (ECVAM)、R. Tice (NICEATM)、宇野、大森および小島（事務局）の7名で構成することを提案した。出席者からこのメンバーの合意が得られ、事務局が海外の専門家に打診することになった。

国内MTには、本会議の出席者に加え、山影（食品薬品安全センター・秦野研究所：以後、秦野研究所）を加えた9名を国内のMTとすることも了承された。

Consultationには、佐々木（八戸高専）、B. Bulinson (Huntingdon) に依頼するとともに、OECDまたはECVAMの専門家を探すことになった。

実験主導施設には、Huntingdon、Syngenta、Biolrreriance、安評研、秦野研究所が候補に上がった。ただし、秦野研究所にはイメージアナライザーがないことから、機器の購入の有無も合わせ、意向を事務局から打診することになった。

### 4. 第1回国際、国内合同MT会議の開催について

8月上旬に札幌にて開催すべく準備するとともに、国内MTへの連絡および海外専門家への参加打診を事務局で行う。また、電話会議またはIP電話による会議のシステムを構築し、7月に国内MTの電話会議をするべく事務局が調査することになった。

### 5. その他

- 1) 資料7をもとに、大森より統計家からの提案がなされた。コメントアッセイを把握するため、2001年講習会のテキストを浅野が手配するとともに、安評研を見学することになった。また、データ解析者について、大森が調査し、必要なら予算を事務局に提案することになった。
- 2) プロトコルの改訂版などをホームページ（HP）上で管理するため、International Comet assayのHPを利用できないか事務局よりR. Ticeに打診することになった。
- 3) 韓国やインドの参加の可能性を各自が探るとされた。
- 4) バリデーシヨンの参加希望施設には、背景データの提出を求めるなどの仕掛けが必要であるとされた。
- 5) 5月のMMSではこの内容を報告する。

以上

## 第2回コメットアッセイ国内委員会議事録

日時：平成18年7月27日（木）15:00-17:00

場所：国立衛研 新規試験法評価室

出席者：林 真、浅野哲秀、宇野芳文、中嶋 圓、森田 健、本間正充、小島 肇（以上国立衛研での参加）、山影康次、中川ゆづき、大森 崇、加藤麻矢子（以上 各施設での参加）

配布資料

1. コメットアッセイ国内委員会議事次第
2. MMS Seminar -The Pros & Cons of Comet Assay-
3. Draft Agenda
4. 名簿およびフライトスケジュール
5. International Validation study of in vitro/in vivo comet assay(pp.)
6. Plan for an international pre-validation study of in vivo alkaline comet assay(draft, ver.1)
7. Testing Procedure of in vivo alkaline comet assay for the international validation studies (Draft, Ver.2)
8. Study Protocol (Draft, Ver.1)へのコメント
9. Chemical selection
10. 画像解析まとめ
11. 統計解析の課題
12. Data sheet for preliminary study
13. データクリーニング計画書 Ver.1.0
14. データマネジメント計画書 Ver.1.0

議事：

電話による会議出席者もあり、全員自己紹介をした後、配布資料1に基づき、小島が司会を務め、議事を進めた。

1. 8月会議の参加者および予定確認（MMS セミナー、Management Team 会議の agenda および分担確認）
  - ・配布資料2に示すMMS セミナーに関しては、Dr. T. Hurtung の日本到着が遅れること、佐々木先生が欠席することもあり、組みなおしを検討中と林より連絡があった。
  - ・MMS セミナーをMMS/JaCVAM Joint Seminar とする提案が林よりなされ、了承された。
  - ・配布資料3に示すDraft Agendaについても、本日の議論を経て組みなおしを検討すると林より連絡された。
  - ・配布資料4に示す名簿を確認し、不備があれば、小島までの連絡を依頼した。また、フライトおよび宿泊スケジュールの確認を依頼した。

## 2. 経費について

本共同研究の実施に当たり、MMS と研究契約を交わし、厚生労働科学研究費補助金より委託金として300万円を拠出する旨を小島より説明した。



### 3. 目的、組織および今後のスケジュールについて

・配布資料5を示し、配布資料6の計画に記載する全体の予定、組織について確認した。本年度内の予備試験、来年度の本試験実施について林から説明がなされた。組織内の参加者名などのミスについて小島に修正依頼があった。

### 4. 改訂プロトコールについて（最終的には、8月の会議で確定する）

#### ①統計解析

コメントアッセイの統計解析に汎用されているスタンダードで適切な方法はない。プロトコールおよびコメント（配布資料7および配布資料8）作成者の宇野より、統計解析方法の追加記載に関する依頼が大森になされた。8月の会議中に統計解析のための電話会議の時間を作るとの提案が林よりなされ、本会議を欠席する大森への参加を打診し了承された。

配布資料11を基に、解析方法としては、さらに検討が必要と大森より説明があった。

#### ②GLP

配布資料6に基づき、本バリデーションのGLPでの実施有無について検討した。各施設のQAUの対応、書類のみの信頼性基準の確認などの案がだされたが、GLP精神に則って、実験を行うこと、およびmanagement teamが必要ならデータと資料の整合性を確認することで了解された。

#### ③被験物質

配布資料6に基づき、被験物質数について議論した。被験物質の増加は実験規模にも関与することから、陰性対照に加え、陽性対照(EMS)およびマウスで相反する結果が得られている $\alpha$ -phenylphenol Na (OPP)を2濃度ずつ実施することになった。

また、候補物質のプロファイリングが配布資料9を基に森田より説明され、本試験の被験物質についてコメント、希望があれば森田までと連絡があった（これは、Management team memberのみに開示する）。

#### ④処理時間

3および24時間で議論されたが、原則として3時間処理のみとして、提案することとなった。

#### ⑤試験臓器

肝臓と胃の他に、骨髄、肺などの案もだが、最小限の規模として肝臓と胃のみを用いることになった。

#### ⑥細胞か、分離核か？

細胞、核ともに試験を実施することが確認され、両者の比較を目的として第一相のプレバリデーションを行う。その結果に基づき、追加の第二相プレバリデーションの必要性を議論するとされた。

#### ⑦評価指標

中川の作成した配布資料10をもとに、各指標を検討した結果、%tail DNAを主なマーカーとすることが有用とされた。さらに、中島より統計学的な処理のし易い分類分けによる評価も提案するとされた。

#### ⑧データシート

配布資料12に示すデータシートが大森より説明され、ほぼフォーマットが了承された。

以上の提案を加味したプロトコールの改訂を宇野が8月4日までに行うことが確認された。

5. その他

今回配布した資料の修正は8月4日までに小島に必着とする。小島は再確認の上、8月7日に出席者全員に資料をメールで送付することになった。

以上

## 第3回コメントアッセイ国内委員会議事録

日時：平成19年1月30日（火）14:00-17:15

場所：国立衛研 第二会議室

出席者：林 真、浅野哲秀、宇野芳文、上田摩弥（中嶋代理）、森田 健、本間正充、中川ゆづき（山影代理）、小島 肇；以上国立衛研での参加、大森 崇（電話での参加）、以上順不同、敬称略

配布資料

1. Organization and Mission JaCVAM(Draft)
2. Draft Minutes, The 2<sup>nd</sup> International Validation Meeting on Comet Assay
3. Comet Pre-Validation study- Check sheet: Protocol/SOP
4. Before examinations –Endpoint, Estimate and Effect-
5. Data management Issue
6. Slide-to slide variation
7. Data on the protocol ver.10
8. One side Dennett's test
9. International Validation of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens (Version 11)
10. In vivo Comet Assay –International Validation- Plan in 2007-2010(Draft)
11. 検討事項 電気泳動条件の検討、ホールスライドを用いて多検体を泳動する方法の検討
12. 皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA 法)バリデーション研究

議事：

電話による会議出席者もあるため全員が自己紹介をした。本題に入る前に配布資料1をもとに、小島委員より最近まとまったJaCVAMの設立目的、役割および組織について説明があった。今後も引き続きJaCVAMの活動への支援依頼がなされた。

林委員長の指示にて、以後、宇野委員が司会を務め議事を進めた。

#### 1. 12月の実行委員会における議事確認

配布資料2をもとに、実行委員会の議事内容を確認した。Time schedule proposalに記載された宿題の中で、配布資料3に示すチェックリストが未完成と小島委員より報告された。各参加施設に連絡して、早急にリストを完成させるよう要望が出された。

#### 2. プロトコル Ver.10 に則ったデータ解析結果について

配布資料4～8および12を用いて、大森委員より解析結果が説明された。資料5にも示すような解析方法、データ数についてまず説明があり、今後の解析には人手が必要であることから、次年度はJaCVAMで新しい作業員（アルバイト）を手配するよう要望が示された。

解析にあたり、資料4に示すように、%tail DNA, Tail length, Olive tail moment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（Estimate）、溶媒との差や比を用いて施設間差を評価する（Effect）、および別に検定を行うとの見解が示された。Effectのま



とめ方としては、資料 12 に示す LLNA-DA バリデーション研究の資料がイメージされるとされた。これに基づいて解析された資料 7 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。

検定結果としては、安評センター推薦の Dennett's 検定について報告された（資料 7 の後半および資料 8）。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（この原因は溶媒対照値によると考えられる）、ほとんどの結果が Dennett's 検定で有意となった。この解析方法や分散、変動係数などをもとに、プレバリデーションを経てバリデーションの成功基準を決めることとなった。

さらに、資料 6 に示すように、スライド間のバラツキについても検討された。個体差に比べ、スライド間の差は少ない傾向が示された。これを受け、観察細胞数を変えないで、スライド数を 2 枚から 3 枚／匹に増やす代わりに動物数を 5 匹から 4 匹に減らす Reduction が可能かという検討を行うため、スライド 3 枚／匹、5 匹でプレバリデーション行うことになった。

以上のデータ解析の結論として、Dennett's 検定による解析に加え、Effect による施設間差でまとめたいとの大森委員の見解が合意を得た。

### 3. 今後の予定

データ解析結果の要約を宇野委員がまとめ、大森委員も endpoint を %DNA tail のみ、estimate も平均のみと今回の資料量を減らしてまとめることになった。これらを全メンバーにメールで送り、意見を求めるとされた。

さらに、宇野委員から、EDTA や温度の影響など、追加試験を行っている施設に連絡してデータおよび見解を集め、問題点を整理した後、それらを組み込んだプロトコルを作成し、2 月中～下旬までにすべてのメンバーにメールで送るとされた（現在 Ver.11:資料 9）。その後、メール会議、必要なら電話会議を経て、プレバリデーションを開始するためのプロトコルおよびデータシートを 3 月末までに固めることになった。

さらに以後の予定が配布資料 10 を用いて、宇野委員が説明した。①2007 年 4 月から 1 年間かけて、現在の 5 施設でプレバリデーションを実施すること（4 物質／施設）、②その間に本試験の参加施設を募集し、決められたプロトコルによる試験データの提出を求めるなどの厳しい条件を課して参加施設を決めること、③2008 年夏より 2 年間かけて 15 施設で 40 物質の試験を実施することなどの予定が示された。これを受け、①Phase で区切り、データまとめやプロトコルの検討を行う。②プレバリデーション終了後には半年程度のデータ解析期間をおき、会議を開いて次の Phase への進行に関して議論する。③厚生科学研究の延長を考えると後 5 年で完結したい、④OECD ガイドラインへの提案は来年度を目処にしたい（プレバリデーション終了後？）、⑤被験物質の選択が重要（実行委員会が陽性強度、陰性数のバランスを考慮して対応する：林委員長）などの意見が出された。

### 4. 中川委員による検討結果

中川委員より、配布資料 11 を用いて、in vitro の条件で行った電気泳動条件の検討およびホールスライドを用いて多検体を泳動する方法の検討結果が報告された。

画像解析装置を用いれば、20℃の泳動でも評価可能という結果から、in vivo においても泳動条件をオプション設定できることが明らかになった。また、ホールスライドの検討から今後のバリデーションにおいて本方法を提案できるとされた。

In vitro のバリデーションの実施については、ECVAM が主催しているワークショップにおける動向を見据えた後、日本が主導するのか、ECVAM に協力するか見極めることが確認された。

以上

## 第 4 回コメントアッセイ国内委員会議事録

日 時：平成 19 年 4 月 3 日（火）15:00～17:40

場 所：国立衛研 第二会議室

出席者：林 真、浅野哲秀、中嶋 圓、上田摩弥、山影康次、森田 健、本間正充、中川ゆずき、小島 肇、  
宇野芳文は電話会議で出席

配布資料：

1. 第 3 回コメントアッセイ国内委員会議事録
2. 大森プラン
3. Outline of next trial
4. Supplementary protocol for 2<sup>nd</sup> pre-validation study

議事：

1. プレバリデーションの実施について

1) 被験物質の送付

バリデーション実施にあたり、海外の参加施設へのブラインド化した発がん物質の送付は難しいとの指摘を受け、送付方法について意見交換した。結果として、ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) で実施しているような受領者と実験者を分け、各施設でブラインド化する対処する方法が提案され、了承された。

2) GLP 適合

バリデーション研究の GLP 適合について意見交換した。参加施設から GLP 適合にするための条件を満たすため、被験物質の安定性を把握できない、運営管理者や QAU の書類審査に時間がかかるなどの否定的な意見が出た。時間と経費的な問題から、GLP の精神を重視して、信頼性保証基準に則り書面審査のみで対応し、各施設の責任の範囲でプロトコル、データを確認することになった。今後、食薬センターおよび安評センターにおいて、GLP の精神をクリアすべき最低の基準案を作り、海外の実験施設に提示することになった。

3) 予算について

参加施設からプレバリデーションの実施にあたり資金面での支援が必要との声があった。支援するなら国内外を問わず一律がよいとの意見もあったが、厚生科学研究補助金という資金の性格からこれ以上、公には支援できないと小島委員より説明があり、公的な経済支援はないことが決定した。本バリデーションにおいても各参加施設への経費の支払いはないことを確認した。

4) スケジュールについて

3 物質を 3 濃度で実施すること、陽性対照として EMS (Ethylmethanesulfonate)、溶媒対照を 3 回の試験に入れる計画を確認した。プロトコルを 4 月中旬までに確定し、被験物質を JaCVAM から 4 月末までに送付し、5 月から試験を開始する、全試験の終了は 2007 年末までとするとされた。ただし、宇野委員が 10 月下旬の米国環境変異原学会で本バリデーション進捗について発表することから、データを揃えるため、9 月末までに少なくとも 2 物質の試験を終えることに日本の参加施設が了承した。データは得られ次第、大森委員に送るとされた。使用したプロトコルは林委員長が確認後、JaCVAM で保管するとされた。データ検討会（バリデーション実行委員会）はプレバリデーションが終了した 2 月に日本で開催す



ることとなった。

宇野委員より、これらの変更を盛り込んだ SOP ver. 11, Supplementary protocol (配布資料 4) を早急に関係者全員に送るとされた。

#### 5) 本バリデーション参加公募

宇野委員が公募要領を作成し、MMS 研究会の HP や英国のコメット HP を利用して、4 月から公募を開始する。6 月 15 および 16 日に熱川で開催される MMS 研究会定例会においても国内参加希望施設に説明する。参加の条件は、コメットデータの蓄積があること、計画書に合わせ EMS での結果を提出できること、GLP 試験対応可能機関となった。メリットとしてバリデーション参加施設には参加証を発行する、MMS 研究会の HP に掲載するなどの提案がなされた。

### 2. in vitro バリデーションについて

Kick-off 会議の前にワークショップを開くという計画について意見交換した。米国環境変異原学会の前後または会期中に行うとの案もあったが、8 月に東京で開催される 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC6) 会期中に開催することがほぼ決まった。ただし、Dr. Burlinson の意向を林委員長が確認し、了承が得られた場合という条件付きである（早速、林委員長が確認したところ、WC6 での開催への合意が得られた）。今後、林委員長と本間委員が演者を選定し、林委員長と小島委員で日程を調整する。WC6 終了後の 8 月 26 日（日）、バリデーション実行委員会会議を開催することも決まり、会場の準備と案内の作成を小島委員が行うとされた。

### 3. その他

#### 1) 統計処理について

資料 2 に示す大森委員からの提言を受け、今後の方向性について意見交換した。相互理解のため、より深い議論を交わす必要があるとの浅野委員の提案を受け、MMS 定例会に統計の専門家である Dr. Lovel (サリー大学) および大森委員を招き、講演を依頼するとともに実験者と意見交換を行うという案が決まった。大森委員より希望のあったデータ解析補助者については、JaCVAM において派遣社員を調達することで了承を得た。

#### 2) 実験での EDTA の使用について

胃などの消化管の場合、コメットの溶媒対照値が高くなる。この問題の対処法として、緩衝液に EDTA を加えると全体的に低くなるとの中川委員の提案が解決していないと上田委員から提言があった。EDTA を加えても出現傾向は不変であり、hedgehog 数も変わらない、作用機序が不明（浅野委員が EDTA 添加の根拠を佐々木有氏：八戸高専に確認する）などの理由から、溶媒対照の基準を上げれば、プロトコール通り無添加でも良いという意見が多かった。

以上

## 第5回コメットアッセイバリデーション国内委員会議事録

日時：平成19年11月28日（水）19:30～20:15

場所：北九州国際会議場 メインホール

参加者：林、本間、森田、小島（以上国立衛研）、宇野（田辺三菱製薬）、浅野（MMS 会長）、田中、山影、中川（食薬センター）、中嶋（安評センター）、バリデーション研究参加希望施設代表  
配布資料：SPSS 例

## 議題

## 1. 次回バリデーション実行委員会会議日程

次回会議の日程が小島委員より報告された。平成20年3月11日（火）に *in vitro* コメットアッセイワークショップを東京都内（案：国立衛研）で開催し、終了後、観光バスで熱川ハイツに移動する。12日（水）および13日（木）に熱川ハイツでバリデーション実行委員会（VMT）会議を開く提案がなされた。詳細なプログラムは未定であるが、12日は *vitro*、13日は *vivo*、14日解散を予定しているとされた。熱川ハイツの予約を浅野会長に依頼し、予算については浅野会長と相談すると説明された。*in vitro* ワークショップの演者人選を本間委員に依頼した。

2. *In vivo* コメットアッセイバリデーション

小島委員より Phase I の実験が終了次第、データをすべて大森委員に集めることおよびそのデータ整理を JaCVAM で行うと説明があった。データの整理は1月末までに行い、2月に大森委員がデータ解析後、渡英して Lovel 氏（Surry Univ.）と意見交換した結果が3月の VMT で報告される。

Phase II の参加施設については、平成19年末を締切として、応募のあった施設からエチルメタンスルフォネートを用いた2回の実験結果の提出を求めるとともに、JaCVAM からブランド化した2物質を送付して結果を求めて頂くと説明された。現在、海外5施設、国内5施設から応募があると宇野委員、中嶋委員より補足された。2物質の送付は年内に行い、データの提出期限は春の MMS 定例会までと説明した。3月の VMT では応募施設の合否基準が検討され、本試験の開始は8月とされた。応募施設は短期間で実験を行わなければならない、結果次第では参加できなくなる厳しい条件であることを承知の上で、参加をお願いしたいと *n vivo* 試験の実行委員長でもある宇野委員が説明した。また、宇野委員から今後、被験物質の選択を VMT で進めることから、国内委員会での意思疎通も不可能になるが了承頂きたいと説明された。

小島委員より、OECD ガイドラインに申請する SPSS の提出が来年1月末に迫っているので、本プロトコルを日本として提出する提案がなされた。時期尚早という意見もあったが、反対意見はなく、林実行委員長が OECD 国内コーディネーターに連絡して提出を働きかけることになった。JaCVAM で元 OECD の中嶋氏（医薬品総合調査機構）の助けを借りて SPSS の作成にかかることとされた。

また、小島委員より来年1月23日および24日、Brussels にて開催される Predictive Human Toxicity/ADME-ToxStudies2008 にて "The Importance of the *In Vivo* Comet Assay in Genotoxicity Testing" について講演を依頼されている。宇野委員がアトランタの米国 EMS で報告した内容を使わせて頂いて発表してきたと説明された。

### 3. In vitro コメットアッセイバリデーション

小島委員より、参加 5 施設に被験物質 5 点を送付したところであると説明された。in vitro 試験の本間実行委員長より、12 月初旬には細胞や血清が各施設に届けられ、プロトコール Ver.4.1 を用いて実験が開始されると説明された。3 月の VMT ではすべての結果が揃うとは限らないが、集まったデータを報告して検討する予定とされた。データ解析は安評センターの鈴木雅也先生にお願いすることを確認した。その検討結果を受けて、5 月の MMS 春の定例会で Phase I の参加施設募集の提案を行い、本試験の開始は 8 月とされた（後から考えると、国外の参加希望もあるでしょうし、参加希望施設をすべて受け入れる訳ではありませんので、vivo のようになんらかのデータ提出を義務つけることとなります。となると、Phase I の開始は沖縄での学会終了後、早くて年明けでしょうか）。

### 4. その他

中嶋委員より、コメット解析ソフトのリースをさらに増やせないかとの提案があり、再来年以降に検討したいと小島委員が説明した。

以上