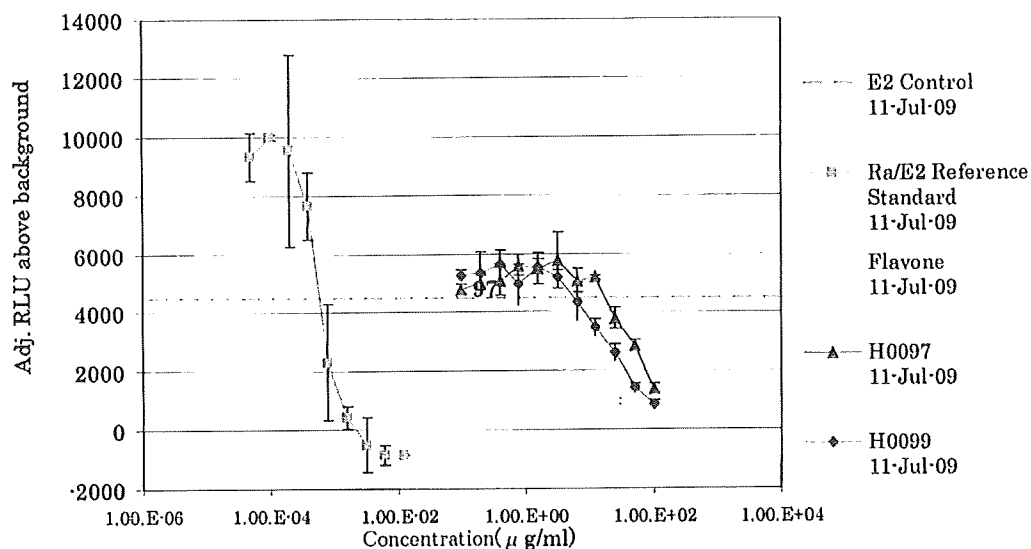


25 Jan 2009

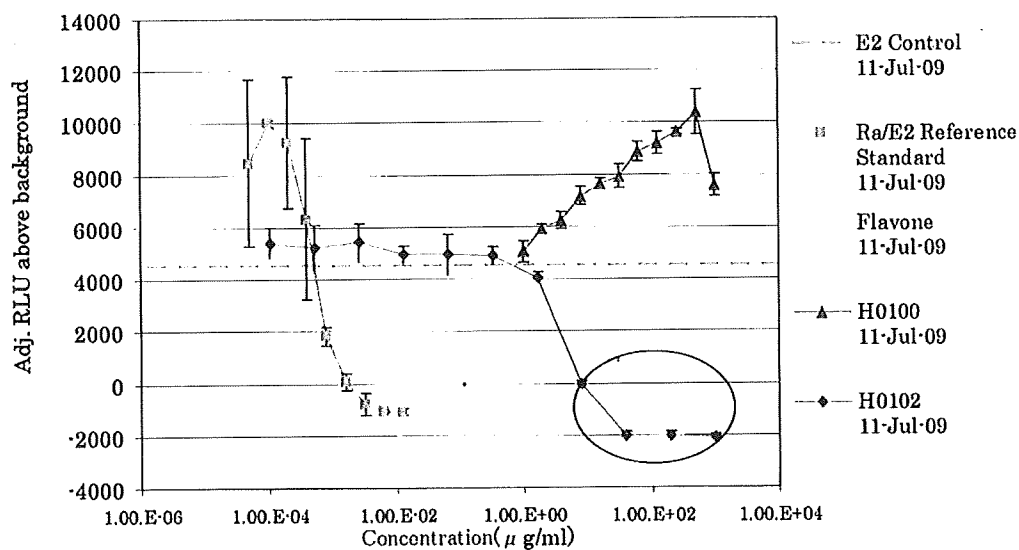
Figure 3.46 Antagonist Comprehensive Testing for AntCT5-1[H0097-1, H0099-1]



H0097-1 : Fail → p117,

H0099-1 : Fail → p117

Figure 3.47 Antagonist Comprehensive Testing for Antct5-2[H0100-1, H0102-1]



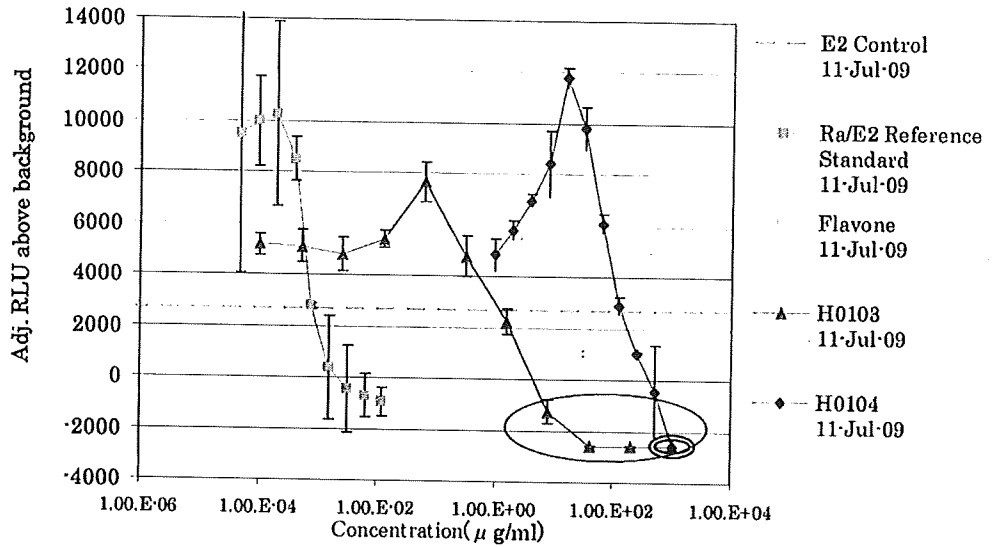
H0100-1 : Fail → p117,

H0102-1 : Fail → p117

○ : Score2-5, Deleted 1 high concentration points to calculate IC₅₀ of H0102-1

25 Jan 2009

Figure 3.48 Antagonist Comprehensive Testing for AntCT 5-3[H0103-1, H0104-1]



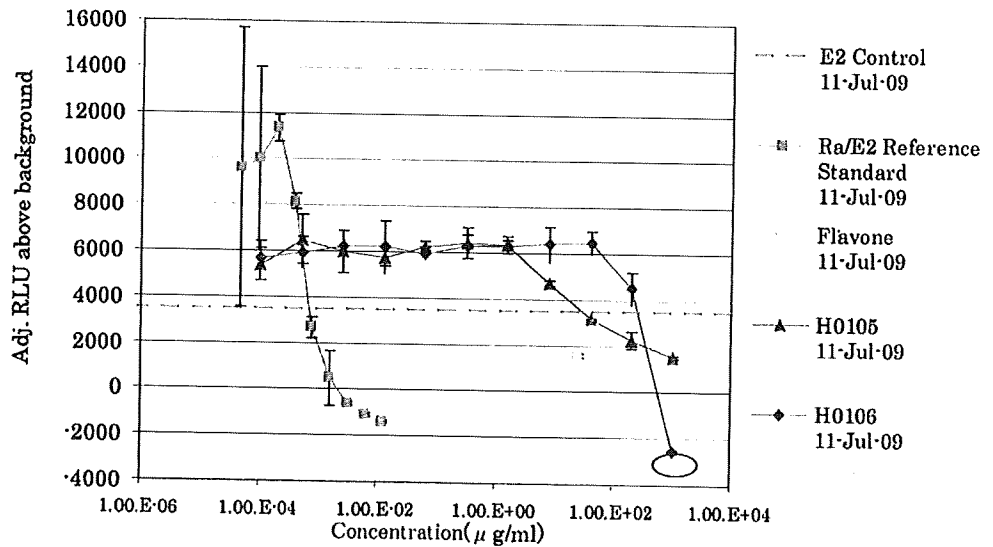
H0103-1 : Fail → p117,

H0104-1 : Fail → p117

○ : Score2-5, Deleted 1 high concentration points to calculate IC₅₀ of H0103-1

⊖ : Score2-5, Deleted 1 high concentration points to calculate IC₅₀ of H0104-1

Figure 3.48 Antagonist Comprehensive Testing for AntCT5-4[H0105-1, H0106-1]



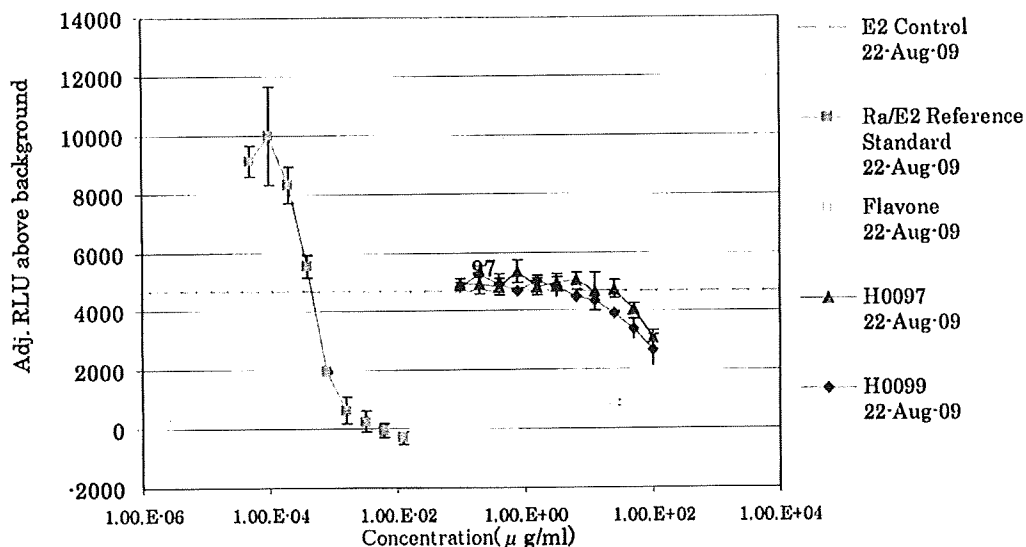
H0105-1 : Fail → p117,

H0106-1 : Fail → p117

○ : Score2-5, Deleted 1 high concentration points to calculate IC₅₀ of H0106-1

25 Jan 2009

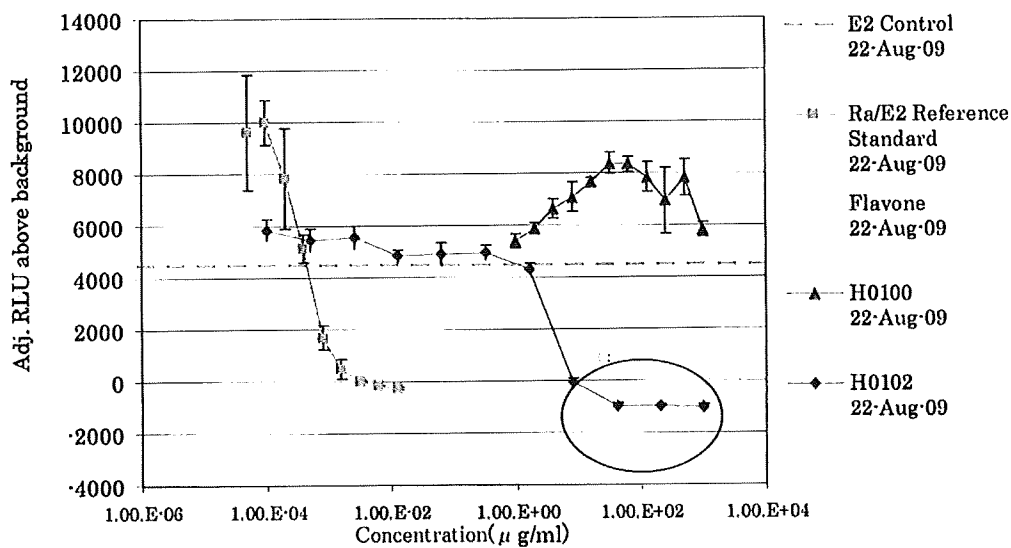
Figure 3.49 Antagonist Comprehensive Testing for AntCT 5-5[H0097-2, H0099-2]



H0097-2 : Acceptable ,

H0099-2 : Acceptable

Figure 3.50 Antagonist Comprehensive Testing for AntCT5-2[H0100-2, H0102-2]



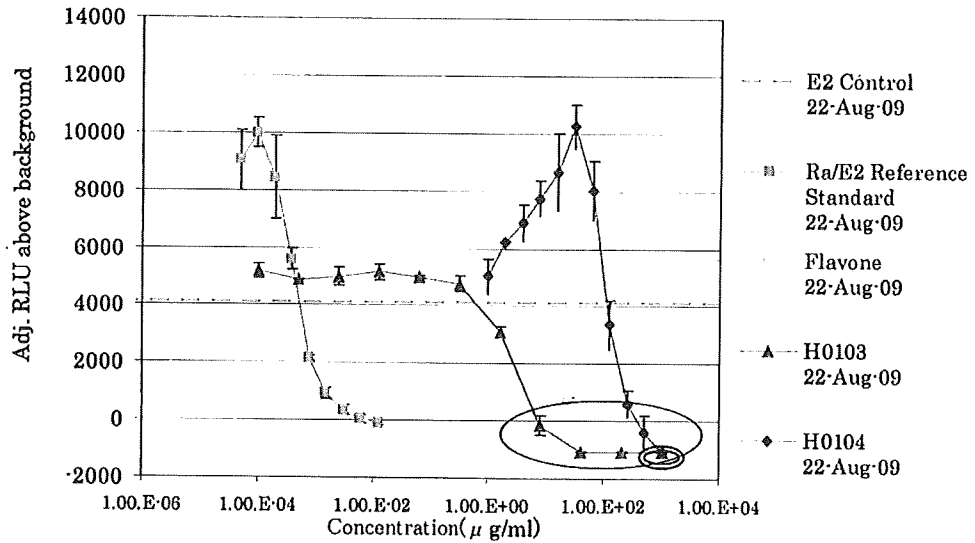
H0100-2 : Acceptable ,

H0102-2 : Acceptable

○ : Score2-5, Deleted 1 high concentration points to calculate IC₅₀ of H0102-2

25 Jan 2009

Figure 3.51 Antagonist Comprehensive Testing for H0103-2, H0104-2



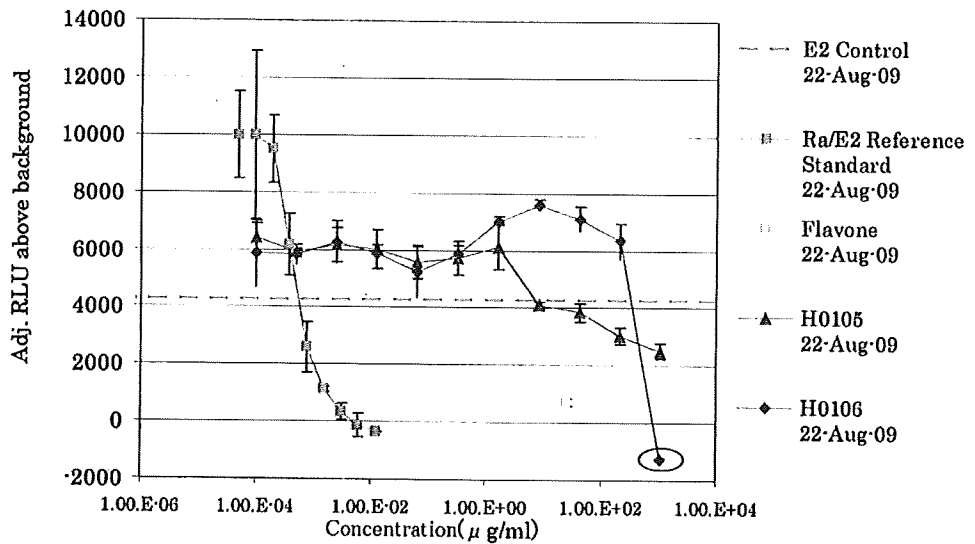
H0103-2 : Acceptable ,

H0104-2 : Acceptable

○ : Score2-5, Deleted 1 high concentration points to calculate IC₅₀ of H0103-2

⊖ : Score2-5, Deleted 1 high concentration points to calculate IC₅₀ of H0104-2

Figure 3.52 Antagonist Comprehensive Testing for H0105-2, H0106-2



H0105-2 : Acceptable ,

H0106-2 : Acceptable

○ : Score2-5, Deleted 1 high concentration points to calculate IC₅₀ of H0106-2

25 Jan 2009

3.0 PROBLEMS ENCOUNTERED

Sum-up and discussion on fail and repeat test in Phase 3

1. Fail occurred from operation error

- **Aagonist**

1-4/33; CT1-1~CT1-4

The reason for the failure is because Methoxchlor did not meet acceptance criteria.

For solution we have re-adjusted Methoxchlor. There is possibility of contamination while opening seal.

- **Antagonist**

1-4/24 ; CT-5-1~CT5-4

The reason for the failure is because DMSO did not meet acceptance criteria.

For solution we have changed to different DMSO lot stored separately. There is possibility of contamination while opening seal.

In 4 test plates out of 33 in Agonist test plates and 4 out of 24 in Antagonist were failed. All fail caused from exceeding of some criteria. If one test exceeded one or more criteria then all plates tested on the same day tend to become fail. Since those are only for some criteria, we took measure by changing some of reagent. There is possibility of effect of seeding condition, culturing condition, time, media, DMSO, other consumable and we have taken some solution in following order: 1) exchange and re-adjust DMSO and/or control solution 2) exchange media 3) exchange cells but we could not yet make the results completely without any fail.

2. Repeat test when range is not without the range.

- **Aagonist**

25 Jan 2009

1/65 H0031-3

Since the result of H0031-1(Fail) and H0031-2 done based on the active result in range finding test ($1.0 \times 10^{+1}$ - 1.0×10^{-5} ug/ml) was different, the test was repeated at same concentration ($1.00 \times 10^{+3}$ ug/ml) and same double serial dilution of H0031-2.

2/65 H0031-4

Although H0031-3 has showed activity as H0031-1 since we were not able to confirm the activity at low concentration range, the test was repeated by 10 times lower concentration ($1.00 \times 10^{+1}$ ug/ml) and half-log serial dilution.

3/65 H0033-2

Since we were not able to confirm the dose-responsibility at lower concentration range from the result of H0031-1 based on the active result in range finding test ($1.0 \times 10^{+2}$ - 1.0×10^{-4} ug/ml), the test was repeated at same concentration ($1.00 \times 10^{+2}$ ug/ml) and half-log serial Dilution.

4/65 H0034-2

Since we were not able to confirm the dose-responsibility at higher concentration range from the result of H0034-1 based on the active result in range finding test ($1.0 \times 10^{+1}$ - 1.0×10^{-5} ug/ml), the test was repeated by 10,000 times higher concentration ($1.00 \times 10^{+1}$ ug/ml) and half-log serial Dilution.

5/65 H0034-3

Since the pattern of range finding test result of H0034-2 done based on the active result in range finding test ($1.0 \times 10^{+1}$ - 1.0×10^{-5} ug/ml) were different, the test was repeated by 10 times higher concentration ($1.00 \times 10^{+2}$ ug/ml) and same double serial dilution.

6/65 H0037-2

Since we were not able to confirm the dose-responsibility at lower concentration range from the result of H0037-1 based on the active result in range finding test ($1.0 \times 10^{+2}$ - 1.0×10^{-4} ug/ml), the test was repeated at 10 times lower concentration ($1.00 \times 10^{+1}$ ug/ml) and half-log serial Dilution.

7/65 H0038-2

25 Jan 2009

Since we were not able to confirm the dose-responsibility at lower concentration range from the result of H0038-1 based on the active result in range finding test ($1.0 \times 10^{+2}$ - 1.0×10^{-4} ug/ml), the test was repeated at 10 times lower concentration ($1.00 \times 10^{+1}$ ug/ml) and half-log serial Dilution.

8/65 H0040-2

Since we were not able to confirm the dose-responsibility at higher concentration range from the result of H0040-1 based on the active result in range finding test ($1.0 \times 10^{+1}$ - 1.0×10^{-5} ug/ml), the test was repeated at 10 times higher concentration ($1.00 \times 10^{+2}$ ug/ml) and half-log serial Dilution.

9/65 H0041-2

Since we were not able to confirm the dose-responsibility at lower concentration range from the result of H0041-1 based on the active result in range finding test ($1.0 \times 10^{+1}$ - 1.0×10^{-5} ug/ml), the test was repeated at 100,000 times higher concentration ($1.00 \times 10^{+1}$ ug/ml) and half-log serial Dilution.

10/65 H0042-2

Since we were not able to confirm the dose-responsibility at lower concentration range from the result of H0042-1 based on the active result in range finding test ($1.0 \times 10^{+1}$ - 1.0×10^{-5} ug/ml), the test was repeated at 1,000 times lower concentration (1.00×10^{-3} ug/ml) and half-log serial Dilution.

11/65 H0044-2

Since we were not able to confirm the dose-responsibility at lower concentration range from the result of H0044-1 based on the active result in range finding test ($1.0 \times 10^{+1}$ - 1.0×10^{-5} ug/ml), the test was repeated at 10 times lower concentration (1.00×10^0 ug/ml) and half-log serial Dilution.

12/65 H0049-2

Since we were not able to confirm the dose-responsibility at lower concentration range from the result of H0049-1 based on the active result in range finding test ($1.0 \times 10^{+1}$ - 1.0×10^{-5} ug/ml), the test was repeated at same concentration ($1.00 \times 10^{+1}$ ug/ml) and half-log serial Dilution.

13/65 H0051-2

25 Jan 2009

Since we were not able to confirm the dose-responsibility at higher concentration range from the result of H0051-1 based on the active result in range finding test ($1.0 \times 10^{+2}$ - 1.0×10^{-4} ug/ml), the test was repeated at 1,000 times higher concentration (1.00×10^0 ug/ml) and same half-log serial Dilution.

14/65 H0051-3

Since the result of H0051-1 and H0051-2 were different, the test was repeated at same concentration (1.00×10^0 ug/ml) and same half-log serial dilution.

15/65 H0061-2

Since we were not able to confirm the dose-responsibility at lower concentration range from the result of H0061-1 based on the active result in range finding test ($1.0 \times 10^{+1}$ - 1.0×10^{-5} ug/ml), the test was repeated at 10 times lower concentration (1.00×10^0 ug/ml) and same double serial dilution.

16/65 H0062-2

Since we were not able to confirm the dose-responsibility at higher concentration range from the result of H0062-1 based on the active result in range finding test ($1.0 \times 10^{+2}$ - 1.0×10^{-4} ug/ml), the test was repeated at 10 times higher concentration ($1.00 \times 10^{+2}$ ug/ml) and same double serial dilution.

17/65 H0065-2

Since we were not able to confirm the dose-responsibility at lower concentration range from the result of H0065-1 based on the active result in range finding test ($1.0 \times 10^{+1}$ - 1.0×10^{-5} ug/ml), the test was repeated at same concentration (1.00×10^0 ug/ml) and half-log serial dilution.

In Agonist test, 17 out of 65 tests were repeated for insufficient dose-range. In most cases, there was no problem with starting range "highest dose" but the dose-range could not cover the dose-response curve adequately. Number of repeat test can be reduced by using half-log serial dilution when the active result was suggested at range finding test.

25 Jan 2009

In some tests (H0031 and H0051) since the result of first test and repeated test were different, we needed to re-test to confirm which result is correct. In order to avoid false negative, confirmation test maybe necessary for substances shows low or no activity.

In Antagonist test, 0 out of 65 tests were repeated for inappropriate range.

3. Type of retest

- Repeated tests done on our decision were as follow. The reasons are same as 1. & 2.

Agonist test: 24 tests

H0025-2, H0026-2, H0027-2, H0028-2, H0029-2, H0030-2, H0031-2, H0032-2

H0031-3, H0031-4, H0033-2, H0034-2, H0037-2, H0038-2, H0040-2, H0041-2

H0042-2, H0044-2, H0049-2, H0051-2, H0051-3, H0061-2, H0062-2, H0065-2

Antagonist test: 8 tests

H0097-2, H0099-2, H0100-2, H0102-2, H0103-2, H0104-2, H0105-2, H0106-2

-Repeated tests done by NICEATM direction were as follow. The reasons are same as 1. & 2.

Agonist test: 1 test

H0034-3

Table 7 List of Criteria in Phase III

Agonist	Phase III
Methoxychlor Control	6437-9801
E2 Reference Standard EC50	7.1E-7-4.7E-6
DMSO Control	784-9411
Induction	>3times

Antagonist	Phase III
Flavone/E2 Control	(-)1444-3094
E2 Control	3459-7757
Ral/E2 Reference Standard IC50	3.0E-4-9.6E-4
DMSO Control	1163-8780
Reduction	>3times

25 Jan 2009

4.0 MATERIALS AND EQUIPMENT USED

- For luminometer, we used Centro LB 960, BERTHOLD TECHNOLOGIES, Germany
- Used Lot:5-1 #43th.~ # 50th., Lot:6 #1st.~ # 43th. subculture cell
- List of chemicals used are shown in Table 1,2 as Phase III

Table 8 List of chemicals used in Phase III

Item	Chemical Name	Product Name	Manufacture	Code No.
RPMI Adjusted Media	RPMI Media	RPMI 1640 medium, with L-glutamine	NAKARAI	Code 30264-85
	FBS	Fetal Bovine Serum, UCDA Qualified	Mediatech, Inc	Cat. No. 35-010-CU
	P/S Solution	Penicillin/streptomycin solution, 5000 I.U. Penicillin, 5000 µg/ml	NAKARAI	Code 26252-94
DMEM Adjusted Media	DMEM Media	Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM), (1×Solution) without L-Glutamine,phenol red.	MP Biomedicals inc	CAT NO: 16427749
	Carbon Stripped FBS	Fetal Bovine Serum, Charcoal/Dextran Treated, triple 0.1 µm sterile filtered	HYCLONE	Cat No. SH30068.03
	P/S Solution	Penicillin/streptomycin solution, 5000 I.U. Penicillin, 5000 µg/ml	MP Biomedicals inc	Code 26252-94
	L-Glutamine	Glutamine for Sterilized freeze dry for tissue cultivation	Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.	Code 05908
Control	DMSO	Dimethyl sulfoxide 99.9%, HPLC grade	SIGMA ALDRICH	Cat#: D8418
Culture	PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered saline(-) without Calcium and Magnesium	NAKARAI	Code 14249-95
	G418	G418	INVIVOGEN	#ant-gn-1
	Trypsin	0.25%Trypsin Colorless liquid, Filtration sterilization completion	NAKARAI	Code 3555-54
Assay	Lysis Buf.	Cell Culture Lysis Reagent 5X	Promega	Cat. #E153A
	Substances	Luciferase Assay System	Promega	Cat. #E1501

25 Jan 2009

5.0 DEVIATIONS FROM PROTOCOL

NA

6.0 DISCUSSION

It will be same comment as **3.0 PROBLEMS ENCOUNTERED**

Although there is possibility of effect of seeding condition, culturing condition, time, media, DMSO, other consumable to avoid failure due to operational error we have taken some solution in following order: 1) exchange and re-adjust DMSO and/or control solution 2) exchange media 3) exchange cells but this cannot not yet make the results completely without any fail. We will wait to see results and discussion from other laboratory.

Although most of starting concentration is within the range for comprehensive test based on range finding test, it sometimes could not cover range from low concentration to high concentration but the number of repeat test can be reduced by using half-log serial dilution when there is activity.

I am concerning that the criteria is based on actual data (raw data). In the future there is possibility of need of criteria to be established every time device has changed due to wasting or slight change by overhaul. Therefore there is need of establishment of criteria which ratio will not be affected by small changes.

We would like to consider establish lower cost and faster method such as automatic injection devices as a first step.

25 Jan 2009

PHASE III .REPORT APPROVAL

This report has been reviewed and approved by the following:

Sponsor Representative

Atsushi Ono _____ 小野 敦 _____ 23.2.2010
Co-chairficér _____ Signature _____ Date _____
JaCVAM

Study Director

The study will be conducted to the standards of,
Masafumi Nakamura _____ 中村 昌文 _____ 23.2.2010
Study Director _____ Signature _____ Date _____
Hiyoshi Corporation

Review

Hajime Kojima _____ 小島 肇 _____ 23.2.2010
Quality Assurance Officer _____ Signature _____ Date _____
JaCVAM

研究課題名：国際協調により公的な試験法を確立するための手順に関する研究

分担研究課題名：遺伝毒性試験法コメットアッセイ (*in vivo*) のバリデーション

研究分担者： 小島 肇 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 新規試験法評価室 室長

研究協力者： 宇野 芳文 田辺三菱製薬株式会社
大森 崇 京都大学大学院医学研究科
林 真 食品医農薬安全評価センター

研究要旨

DNA 損傷を捉える試験として、最近汎用されている試験としてコメットアッセイがある。本方法は、*in vivo* でも *in vitro* でも試験可能であること、細胞が得られるならばどのような臓器、器官でも試験可能であること、短期間で結果が得られること、初期の DNA 損傷を検出できることから広く利用されている。行政的にも、欧州の規制当局では実施を要求することがあり、FDA (米国食品薬品局) ガイダンスに記載がある。FDA や EPA (米国環境保護局) でも申請データとして受け付けている状況にある。

しかし、本方法の正式なガイドラインは策定されていない。不定期 DNA 合成試験 (UDS) の代替法として、試験法標準化のための議論が進められてきたが、研究室間の再現性を検証するバリデーション研究がされておらず、プロトコルの国際的な合意がなされてこなかった。

このような課題を解決すべく、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してバリデーション研究を実施している。将来的には OECD (経済協力開発機構) テストガイドラインへの掲載を目指すものである。

昨年度までに実施されたプレバリデーションの結果を解析し、参加機関で検討した結果、本バリデーションのためのプロトコルを確定できた。そこで、本年度は、参加 13 施設 (うち、国内 4 施設) の協力を得て、4 物質を用いて施設間再現性を評価するため、バリデーションを実施した。その結果から、良好な施設間再現性が得られることを確認できた。

A. 研究目的

遺伝毒性試験には、①DNA 損傷を捉える不定期 DNA 合成試験 (UDS)、Rec-Assay、②遺伝子突然変異を捉える Ames 試験、マウスリンフォーマ試験、③染色体異常を捉える染色体異常試験、小核試験が汎用されてきた。DNA 損傷を捉える試験としては、コメットアッセイが最近汎用されている。コメットアッセイとは単細胞ゲル電気泳動法とも呼ばれ、単離した細胞または核をアガロースに閉じ込めて融解した後、アルカリ処理で二本鎖 DNA を単鎖にし、電気泳動による泳動

パターンの変化により DNA 鎖切断などを検出する方法である。正常な細胞の DNA は非常に大きな分子であり、電気泳動してもほとんど移動せず、球形の核として観察される。一方、DNA で切断などが起こっている場合には DNA 断片の大きさに応じて移動し、球形の核を頭に尾を引いた彗星のような泳動パターンとなる¹⁾。

本方法は、*in vivo* でも *in vitro* でも試験可能であること、細胞が得られるならばどのような臓器、器官でも試験可能であること、短期間で結果が得られること、初期の DNA 損傷を検出

できることから広く利用されている。行政的にも、欧州の規制当局では実施を要求することがあり、FDA（米国食品薬品局）ガイダンス（2006）²⁾に記載がある。FDAやEPA（米国環境保護局）でも申請データとして受け付けている状況にある。

しかし、本方法の正式なガイドラインは策定されていない。UDSの代替法として、試験法の標準化のため3rd IWGT（International Workshop on Genotoxicity Testing）at Washington, 1999、4th International Comet Assay Workshop at Ulm, 2001、4th IWGT at San Francisco, 2005においても公定化のため議論が進められてきた³⁾。主な討議事項として、以下の項目が議論されてきたが、各施設においてノウハウを生かした独自のプロトコルで試験を実施しているのが現状である。

- ①適用濃度（複数濃度の適用か、単一濃度の適用か）
- ②電気泳動をする際には細胞と核のどちらを用いるべきか
- ③細胞毒性の測定項目を入れる必要があるか
- ④スコアリング方法
- ⑤陰性、陽性対照のデータ蓄積の必要性

そのため、研究室間の再現性を検証するバリデーション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、検討試験を実施し、これらの間には差がないことを証明したのみである。①、③、④の主な問題が残っていた（⑤のデータの蓄積のためには、バリデーションでできる統一プロトコルが必要）。

このような課題を解決すべく、昨年度までに実施された「厚生労働科学研究 リスク研究事業」において、日本環境変異原学会/哺乳類変異原性（MMS）研究会、欧米の研究機関と協力して国際的なプレバリデーション（phaseⅢまで）を実施し、コメントアッセイの標準プロトコルを確定した。本年度以降、さらにバリデーションを実施し、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。

本年度は、バリデーション PhaseⅣ-1として参加13施設（うち、国内4施設）の協力を得て、4物質を評価するためのバリデーションを実施した。このPhaseから施設が増えたためにPhaseⅢまでで確認された施設間再現性を確認することを目的とした。また、その過程で明らかになった判定方法の不統一を解消し、国際的な基準の統一を図るため、図解集（カラーアトラス）を作成をした。

B. 研究方法

B-1 組織

本バリデーション組織は2006年度設立したが、2009年度は第6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9月にフィレンツェ（イタリア）で、第7回実行委員会を3月にソルトレークシティ（米国）で開催した。

1) 国際実行委員会

委員長 林 真（食品医農薬安全センター：以下、安評センターと記す）

In vivo 担当委員長（In vivo 委員長と記す）

宇野芳文（田辺三菱製薬株式会社）

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（前 Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods：ICCVAM）

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

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

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

2) 国内実行委員会

委員長 林 真

委員 宇野芳文

浅野哲秀（日東電工株式会社）

中嶋 圓（安評センター）

森田 健（国立衛研 医薬安全科学部）

本間正充

山影康次（食品薬品安全センター 秦野研究所：以下、食薬センターと記す）

小島 肇

3) コンサルタント

B. Burlinson（Huntingdon Life Sciences）

D. Lovel（Univ. of Surrey）

B. Young（BioReliance）

S. Hoffman（ECVAM）

Sue Nee Perk（Korean Institute of

Toxicological Research: KITR)
 W. Stokes (National Institute of
 Environmental Health Science:
 NIEHS)
 大森 崇 (京都大学大学院医学研科)
 鈴木昌也 (安評センター)
 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

表1に示す13施設が参加した。

表1. Phase IV-1バリデーションの協力施設

施設名	国名	代表者
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

B-2. 試験方法

B-2-1 バリデーション Phase IV-1

昨年度まで、プロトコルの確定にバリデーションを進めてきたが、標本を作製するための電気泳動条件は参加施設で設定した独自のものが採用されており統一されていなかった。Phase IIIの結果の検討から、施設間差の一因として電気泳動条件が考えられたため、このPhaseでは電気泳動条件の詳細をプロトコルに記載することにした。この結果を全参加施設で解析・協議し、プロトコルを確定できた。

このPhase IV-1バリデーション研究では、確定できたプロトコル(ver. 14.1)を用いて、4

被験物質(エチルメタンスルフォネート:EMS、2-アセチルアミノフルオレン:2-AAF、ニトロソジメチルウレア:NDU、マンニトール)をコード化し、参加13施設に1もしくは2物質を配布し、施設間再現性を検討した。

EMSを陽性対照とした。適用濃度および溶媒は各施設に選択させた。

プロトコル ver. 14.1の概要を以下に示す。

①動物:Cr1:CD(SD)ラット雄 7-9週令を5匹/群使用

②投与方法:3回の強制経口投与(初回投与21時間後に2回目、45時間後に3回目を投与し、その3時間後に安楽死させ、臓器をサンプリン

グ)

- ③適用臓器：胃および肝臓
- ④サンプル：単一細胞を使用
- ⑤電気泳動：低温、20分の泳動で実施
- 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、%DNA in tail

指定されたデータファイルに入力されたデータが各施設から集められ、スクリーニングが行われ、データ解析が行われた。スクリーニングとデータ解析はコンサルタントである生物統計学者の大森博士（京都大学大学院医学研究科）により行われ、国際実行委員会に報告された。この結果を国際実行委員会がまとめ直し、検討を行った。データ解析は、過去の Phase と同様に、各個体を平均値で要約した値を用いた。毒性の有無の基準として、統計学的検定法としては、Dunnnett の両側検定（有意水準 5%）を用いた。その他の基準として、以下の基準を採用した。

1) 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%（可能なら 1-20%：平均+/-標準偏差による)
- 2) 陽性対照：EMS, 200 mg/kg, 2 回経口投与
- ・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
 - ・有意水準 2.5% の片側 t 検定で有意であること

B-2-2 バリデーション Phase IV-2

Phase IV-1 を経て微修正されたプロトコール (ver. 14. 2) を用い、合計 39 の被験物質を 13 施設に配布し (3 物質/施設)、in vivo における遺伝毒性をどの程度評価できるかを見極める妥当性への検討を目的に、次段階のバリデーションを開始した。Ver. 14. 1 から 14. 2 におけるプロトコールの変更点を表 2 に示す。Ver. 14 と比較して大きな変更ではないと考えている。

表 2. Ver. 14. 1 から 14. 2 におけるプロトコールの変更点

No.	項目	変更点
1	末梢血による小核試験のオプション	検出を意図するなら 4 回投与が必要かもしれない
2	サンプリングと溶解時間	記録
3	電気泳動時間	20 分間以上
4	計測可能な細胞数	90%以上の%DNA in tail を示す細胞は除外
5	標本枚数	2 スライド/動物で変更なし
6	陽性対照群の匹数	削減可能だがバリデーションでは 5 匹で変更なし
7	結果の評価	リニアトレンドテストでの検定結果も考慮

B-2-3 アトラスの作成

今までのバリデーションの過程で結果が安定しない原因が種々明らかになり、その一つがコメント結果の判定方法の不統一によると判断とされた。そこで本問題を解消し、国際的な基準の統一を図るため、図解集（カラーアトラス）の作成を行った。

C. 研究結果

C-1 バリデーション Phase IV-1

陽性対照物質は、すべての施設で肝臓、胃とも溶媒（陰性）対照と比較して統計学的に有意であった。この結果から、すべての被験物質の結果は採用できると判断した。陰性対照のコメント値は、ほとんどの施設がデータ採用基準であ

る肝臓 1-8%、胃 1-30% の中にあった。2 施設が肝臓で 1% 未満であった。

それぞれの被験物質の肝臓および胃における結果を図 1~8 に示した。なお、施設はコード化しており、本報告書内では開示はされていない。

図 1 および 2 に示すように、EMS ではすべての施設において濃度依存的なコメントの増加を認めた。これは図 5 および 6 に示すように、NDU でも同様の結果であった。一方、図 3 および 4 に示すように、すべての施設でマンニトール、図 7 および 8 に示すように、2/3 施設で 2-AAF にはコメント数の増加を認めなかった。2-AAF における Lab K の結果から、濃度依存性は明瞭ではないが、リニアトレンドで有意差があり、すべての濃度で有意な結果が得られた。媒体はコーン油を用いている。Lab B は 0.5% CMC（カロボキシメチロー

ス) 溶液を媒体として実施したが、高用量(1000mg/kg)まで毒性が見られず、投与量が不十分であると考えられた。Lab Hでは施設内でコードが開示されてしまい、2-AAFの毒性情報をもとに濃度を選択したため、毒性はでていないが、コメントも誘発されなかった。

C-2 アトラスの作成

実験者の判定基準を明確にするため、現在、MMS 研究会が数百枚の写真から選んだ 150 例の画像を用意し、第 6 回実行委員会での趣旨を説明した後(添付資料 2)、参加施設に配布して判定させた。得られたコンセンサスをもとに、判定基準を明示した。カラーアトラス案を作成した。第 7 回実行委員会において(添付資料 3)、微細な判定の調整を行った。

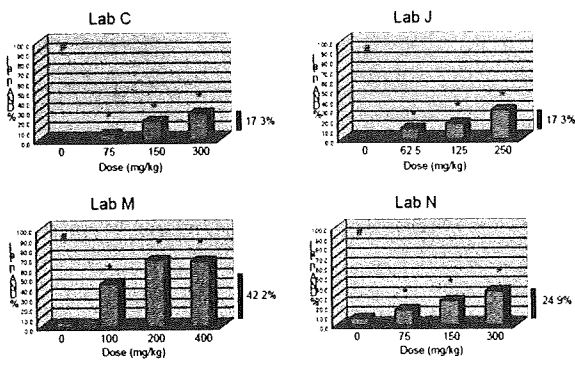


圖 1. EMS: 肝臟

* Dunnett test (P<0.05, two-sided) # Linear trend test (P<0.05, two-sided) - Positive control value

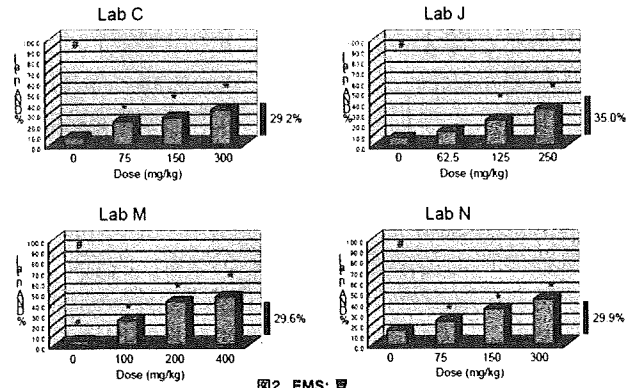


圖 2. EMS: 胃

* Dunnett test (P<0.05, two-sided) # Linear trend test (P<0.05, two-sided) - Positive control value

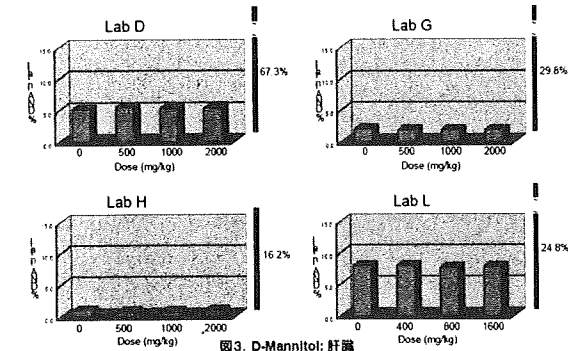


圖 3. D-Mannitol: 肝臟

No statistical significance with Dunnett test (P<0.05, two-sided) and linear trend test (p<0.05, two-sided) - Positive control value

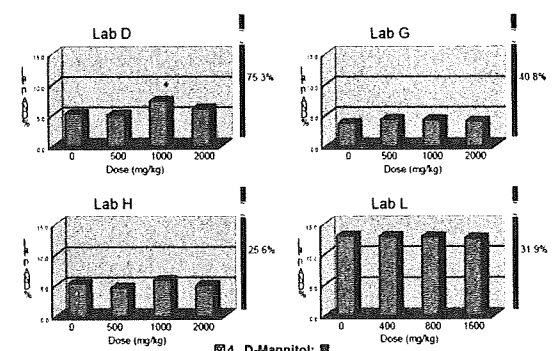


圖 4. D-Mannitol: 胃

* Dunnett test (P<0.05, two-sided) No statistical significance in linear trend test (p<0.05, two-sided) - Positive control value

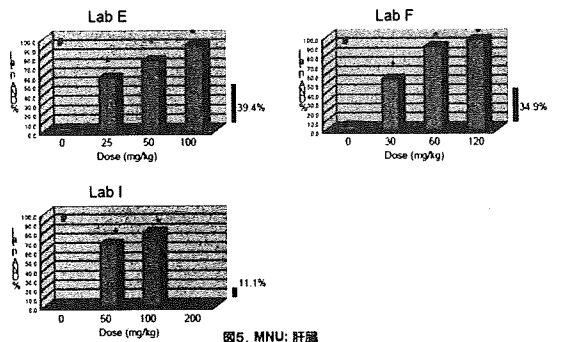


圖 5. MNU: 肝臟

* Dunnett test (P<0.05, two-sided) # Linear trend test (P<0.05, two-sided) - Positive control value

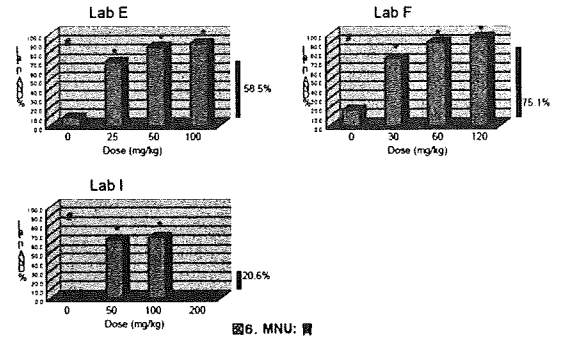


圖 6. MNU: 胃

* Dunnett test (P<0.05, two-sided) # Linear trend test (P<0.05, two-sided) - Positive control value

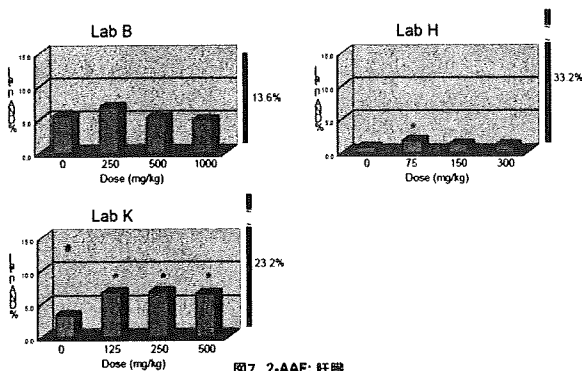


圖 7. 2-AAF: 肝臟

* Dunnett test (P<0.05, two-sided) # Linear trend test (P<0.05, two-sided) - Positive control value

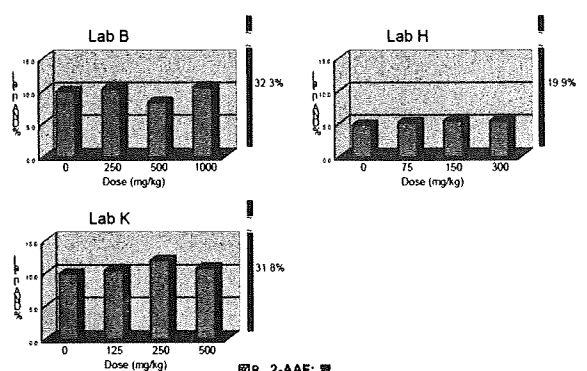


圖 8. 2-AAF: 胃

No statistical significance with Dunnett test (P<0.05, two-sided) and linear trend test (p<0.05, two-sided) - Positive control value

D. 考察

PhaseIV-1バリデーションにおける4被験物質の結果から、3-4施設/物質の施設間再現性は高いと判断された。また、陽性対照物質の結果から、PhaseIIIや施設選定試験結果と比較して、施設内再現性の高さも確認できた。以上の点から、PhaseIV-1バリデーションはその目的である施設間再現性の確認を達成できたと考えている。

一方、妥当性の面から、2-AAFの結果を除き、予想通りの濃度依存性、予測性が確認できた。2-AAFは著名な遺伝毒性物質であるが、2/3施設で陰性となった原因は定かでない。代謝の問題であるのか、安定性の問題なのか、投与量が不十分だったのか、今後39物質を用いて実施されるPhaseIV-2のバリデーション結果をもとに検討していきたい。

アトラスの作成については、MMS研究会で作成した案に対して、2回の実行委員会でコンセンサスを計ることができ、ほぼ案が固まった。

E. 結論

PhaseIV-1の13施設（海外9施設および国内4施設）からなる多数施設のバリデーションにより、陽性対照物質の結果から、施設内再現性を確認できた。また、4被験物質のみではあるが、施設間の再現性を確認できた。

現在進行しているPhaseIV-2では、39物質が配布され、他の遺伝毒性試験結果との比較による妥当性の確認が行われる予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 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, Beever 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)

I. 研究発表

1. 関係者成果報告

- 1) 小島 肇:バリデーション試験の今後の予定について、コメットアッセイ国際バリデーション試験進捗報告、日本環境変異原学会MMS研究会 第54回定例会、熱川 (2009)
- 2) Kojima, H., Yamakage, K., Burlinson, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., Hayashi, M., Corvi, R., Uno, Y., Schechtman, L., Tice, R. and Honma, M.: International validation study of the in vitro alkaline comet assay, 8th International Comet Assay Workshop, Perugia (2009)
- 3) Uno, Y., The JaCVAM-sponsored International in vivo comet assay validation study, 8th International Comet Assay Workshop, Perugia (2009)
- 4) Nakajima, M., Masumori, S., Tanaka, J., Hayashi, M., Uno, Y., Kojima, H. and Tice, R.: An atlas of comet images: JaCVAM initiative International Validation trial for the in vivo comet assay, 8th International Comet Assay Workshop, Perugia (2009)
- 5) Honma, M., Kojima, H., Morita, T., Uno, Y., Asano, N., Nakajima, M., Corvi, R., Tice, R., Schectman, L. and Hayashi, M.: International validation study of the in vitro alkaline comet assay, 25th ICEM, Florence (2009)
- 6) Uno, Y., Kojima, H., Honma, M., Schectmann, L., Tice, R., Corvi, R., Morita, T., Asano, N. and Hayashi, M.: In vivo Comet Assay: Update on the on-Going international validation study, 25th ICEM, Florence (2009)
- 7) Hayashi, M., Uno, Y., Honma, M., Schectmann, L., Tice, R., Corvi, R., Morita, T., Asano, N. and Kojima, H.: In vivo Comet Assay: Update on the on-Going international validation study, 7th World

Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)

- 8) Honma, M., Kojima, H., Morita, T., Uno, Y., Asano, N., Nakajima, M., Corvi, R., Tice, R., Schectman, L. and Hayashi, M.: International validation study of the in vitro alkaline comet assay, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 9) 本間正充、山影康次、Burlinson, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., 林 真、中嶋圓、鈴木雅也、Corvi, R., 宇野芳文、Schechtman, L., Tice, R., 小島 肇: In vitro アルカリコメットアッセイ国際バリデーション研究、第22回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、大阪 (2009)
- 10) 中嶋圓、小島 肇、宇野芳文、本間正充、林 真: コメットアッセイの国際バリデーション、日本環境変異原学会第38回大会、清水・静岡 (2009)
- 11) JaCVAM: コメットアッセイ国際バリデーションプロジェクトチーム: インビボコメットアッセイ: JaCVAM 国際バリデーション試験の進捗状況報告、日本環境変異原学会第38回大会、清水・静岡 (2009)

2. 論文発表

- 1) 小島肇夫: 動物実験データなしで新規医薬部外品の申請はどこまで可能か?、BIO INDUSTRY, 26 (8) 42-49 (2009)
- 2) 小島肇夫: 皮膚・粘膜毒性、新版 トキシコロジー、日本トキシコロジー学会教育委員会編集、pp. 246-254 (2009)
- 3) 小島肇夫: 医薬部外品と化粧品、GLP/非GLP試験の具体的実施ポイント、技術情報、東京、pp. 425-433 (2009)
- 4) 小島肇夫: REACHにおける環境影響試験、フレグランスジャーナル 2009-8、46-51 (2009)
- 5) 小島肇夫、新井晶子、北條麻紀: 再構築培養表皮モデルを用いた遺伝毒性の評価、コスメトロジー研究報告、17、57-62 (2009)
- 6) 小島肇夫: 現在の動物実験代替法の状況について、LABIO21、38、17-20 (2009)
- 7) 小島肇夫: 薬用化粧品の承認取得における安全性試験をめぐる問題点、医薬部外品有効成分承認取得のための対策と課題、フレグランスジャーナル社、48-58 (2010)
- 8) 小島肇夫: 医薬部外品の製造販売承認申請における安全性試験の資料に関するあり方検討会報告、日皮協ジャーナル、32、82-91 (2010)

3. 学会発表

- 1) 小島 肇: バリデーション研究とは何か? & 国際動向、JaCVAM第2回ワークショップ、東京 (2009)
- 2) 小島 肇: 培養皮膚モデルバリデーション研究、JaCVAM第2回ワークショップ、東京 (2009)
- 3) 小島 肇: 動物実験代替法に関する国内外の動向、JALAMシンポジウム「安全性試験における動物実験代替法—国内外の動向と代替法開発の現状—」、大宮 (2009)
- 4) 小島 肇: 動物実験代替法における培養細胞の利用: 合同追悼シンポジウム「黒田行昭先生を偲んで」、日本組織培養学会第82回大会、栃木 (2009)
- 5) 小島 肇: バリデーション試験の今後の予定について、コメットアッセイ国際バリデーション試験進捗報告、日本環境変異原学会MMS研究会 第54回定例会、熱川 (2009)
- 6) 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、第36回日本トキシコロジー学会学術年会、盛岡 (2009)
- 7) 小島 肇: OECD Test Guideline 記載モデルとしてのLabCyte EPI-MODLの可能性、皮膚基礎研究クラスターフォーラム、東京 (2009)
- 8) Kojima, H.: 3D comet assay, JaCVAM experience, 5th International Workshop on Genotoxicity Testing, Basel (2009)
- 9) Kojima, H., Yamakage, K., Burlinson, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., Hayashi, M., Corvi, R., Uno, Y., Schechtman, L., Tice, R. and Honma, M.: International validation study of the in vitro alkaline comet assay, 8th International Comet Assay Workshop, Perugia (2009)
- 10) Nakajima, M., Masumori, S., Tanaka, J., Hayashi, M., Uno, Y., Kojima, H. and Tice, R.: An atlas of comet images: JaCVAM initiative International Validation trial for the in vivo comet assay, 8th International Comet Assay Workshop, Perugia (2009)
- 11) Kojima, H.: Validation of innovative methods for safety testing: drawbacks and advantages of Japanese validation studies, 7th World Congress on Alternatives &