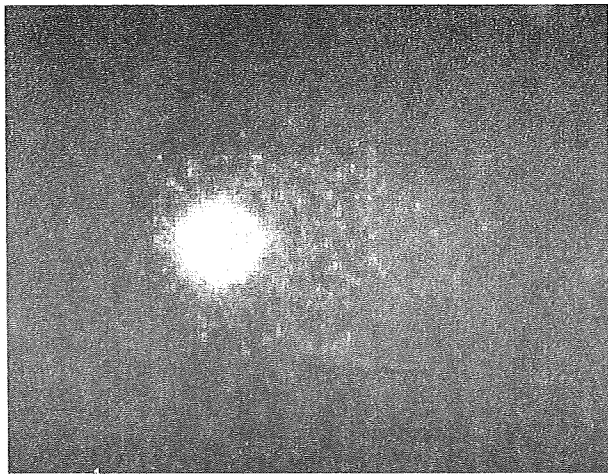
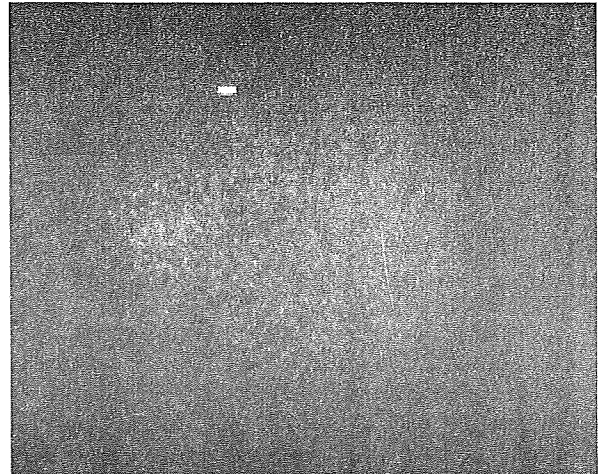


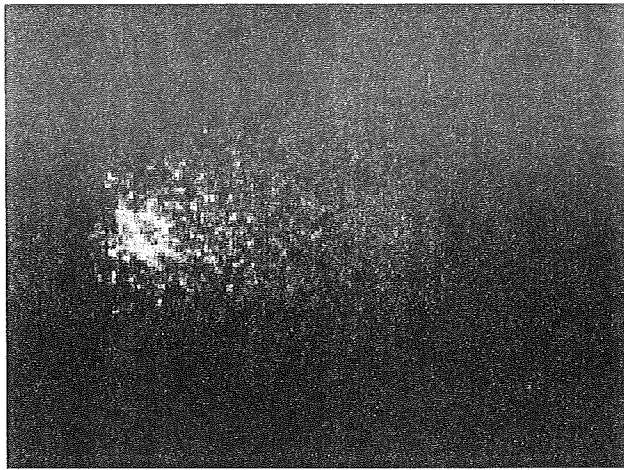
No.7



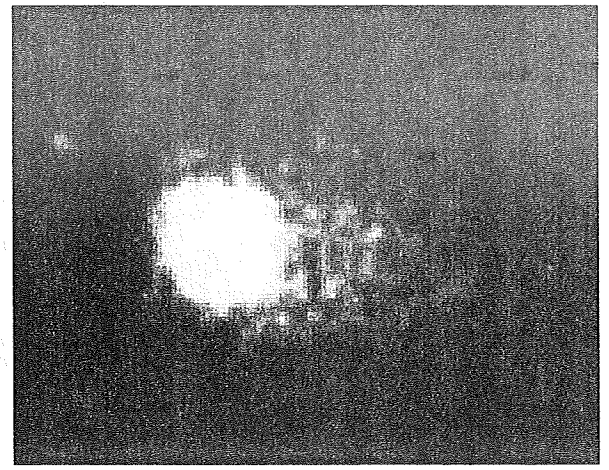
No.8



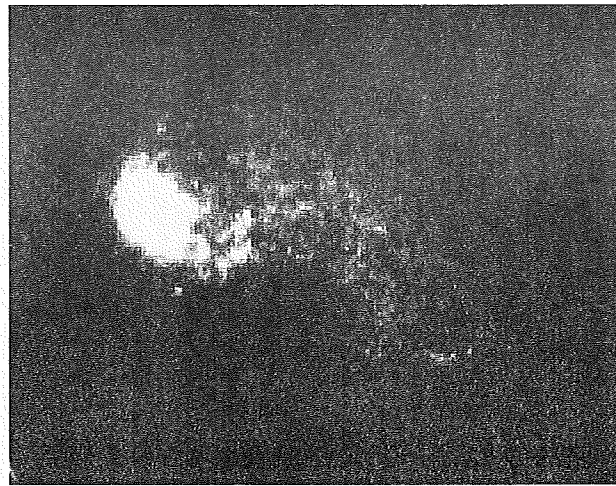
No.9



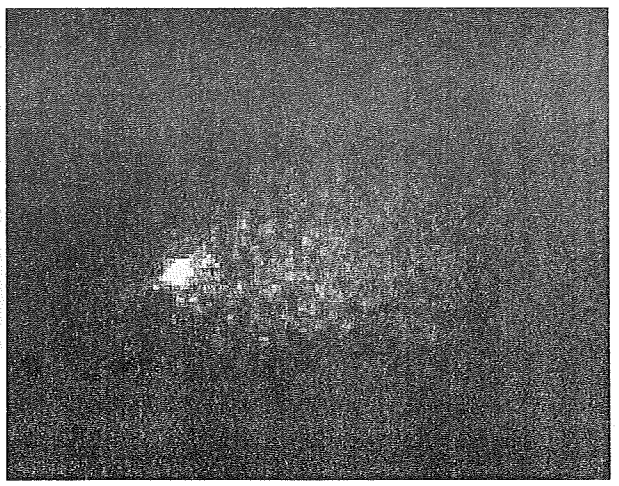
No.10



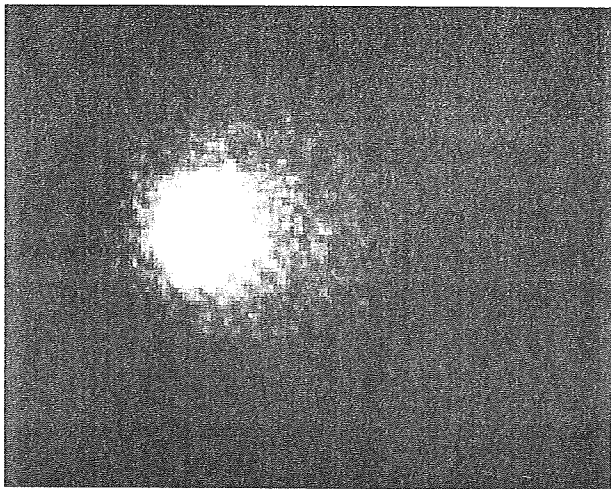
No.11



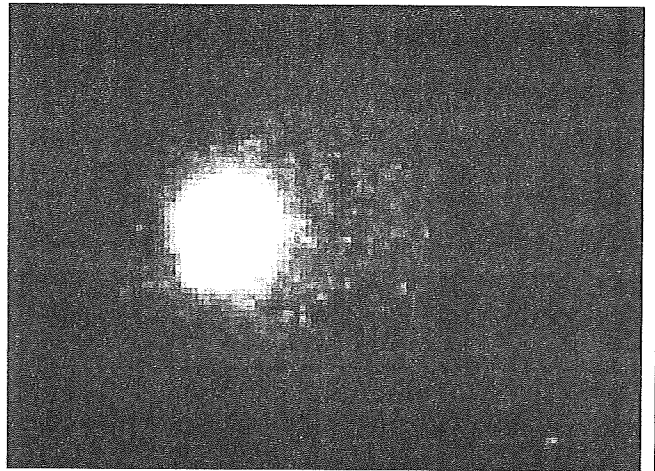
No.12



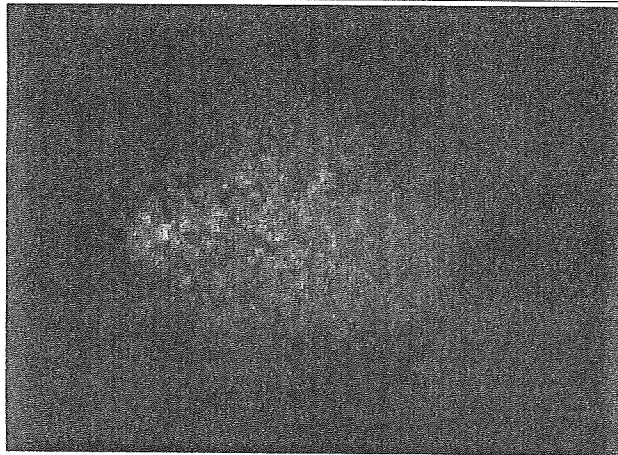
No.13



No.14



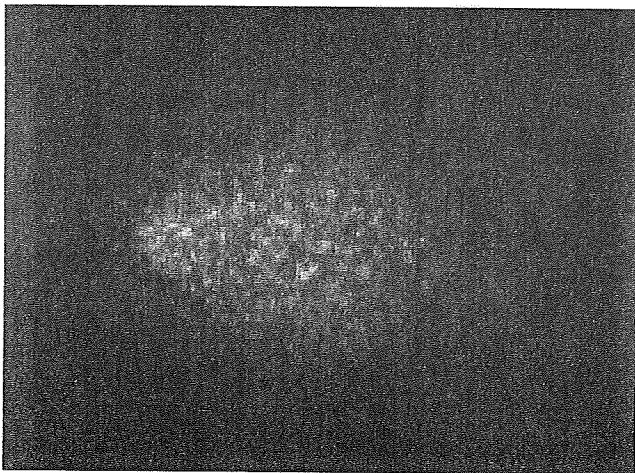
No.15



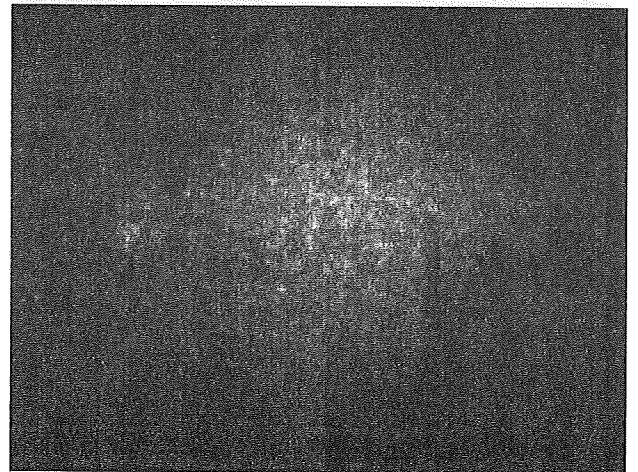
No.16



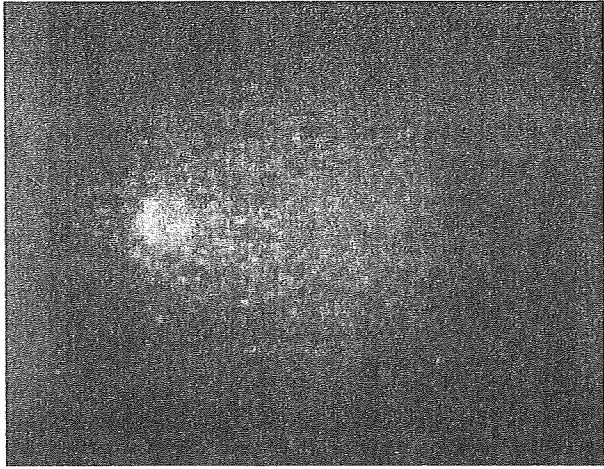
No.17



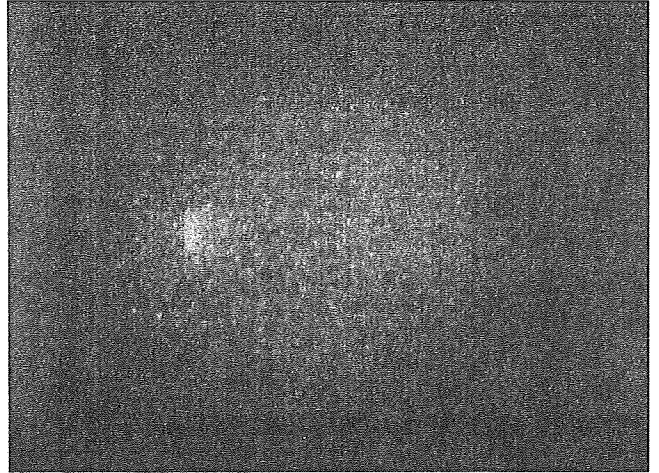
No.18



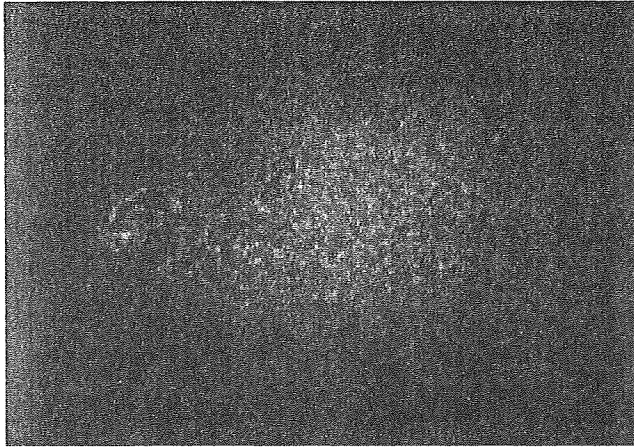
No.19



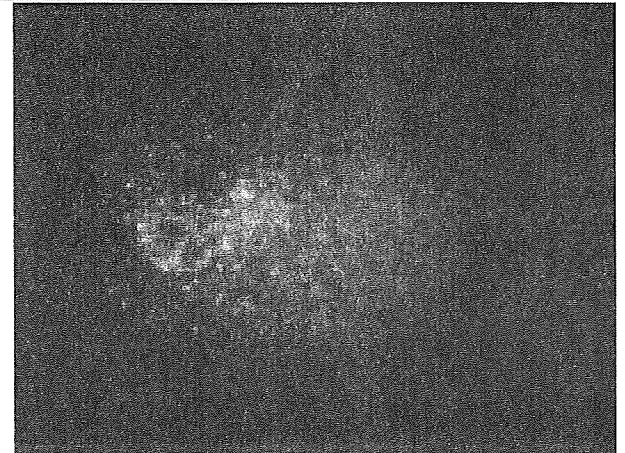
No.20



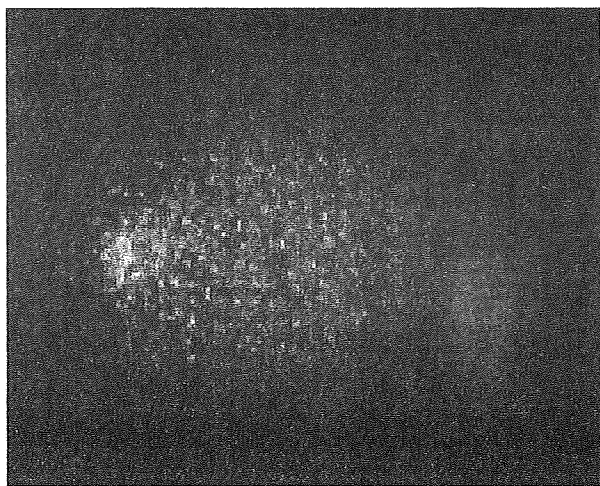
No.21



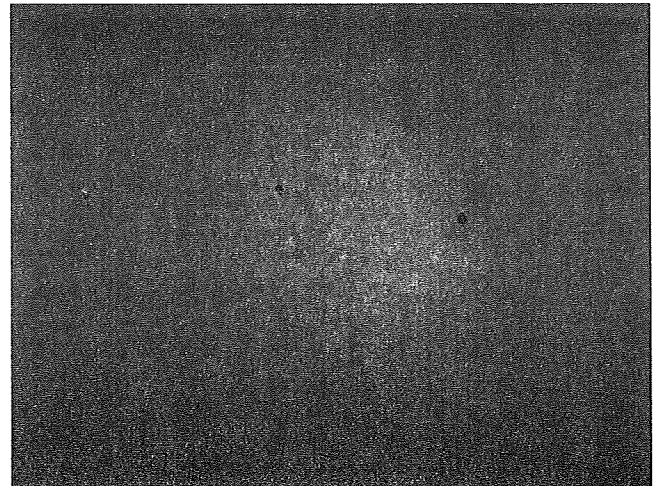
No.22



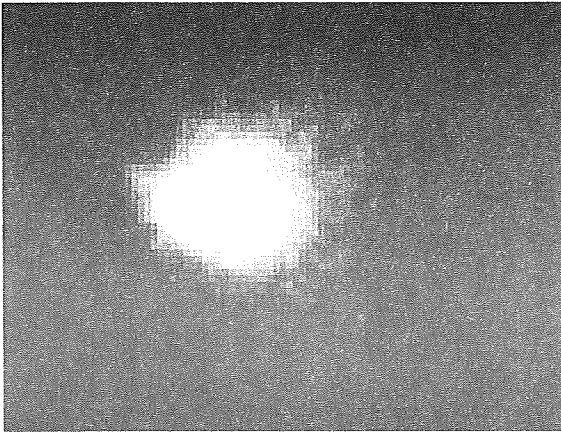
No.23



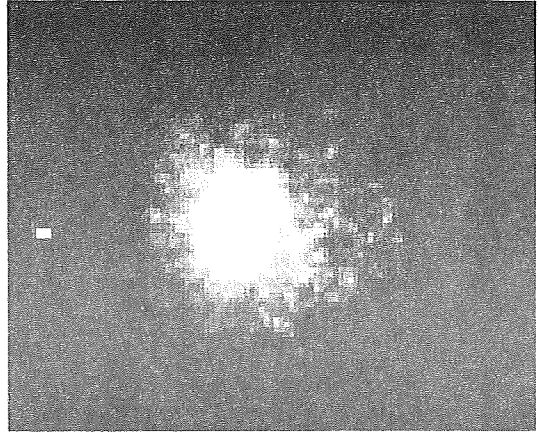
No.24



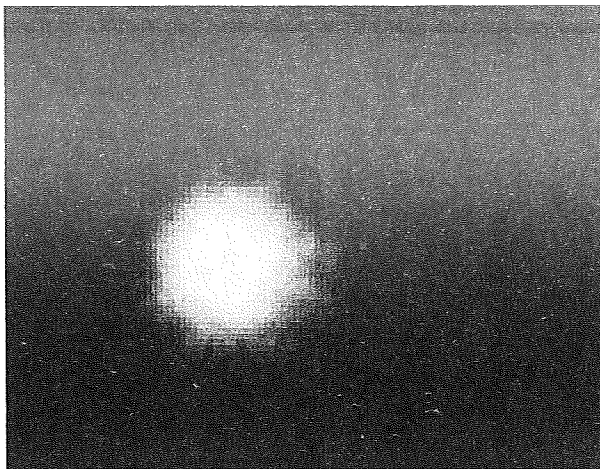
No.25



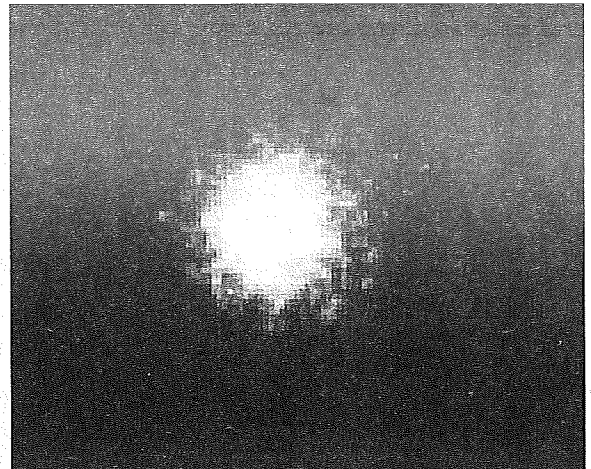
No.26



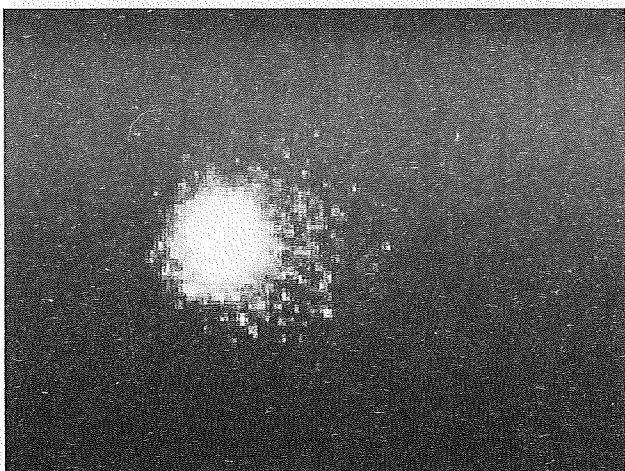
No.27



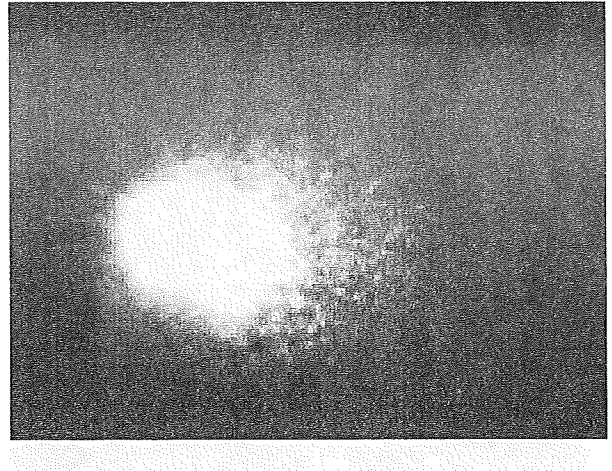
No.28



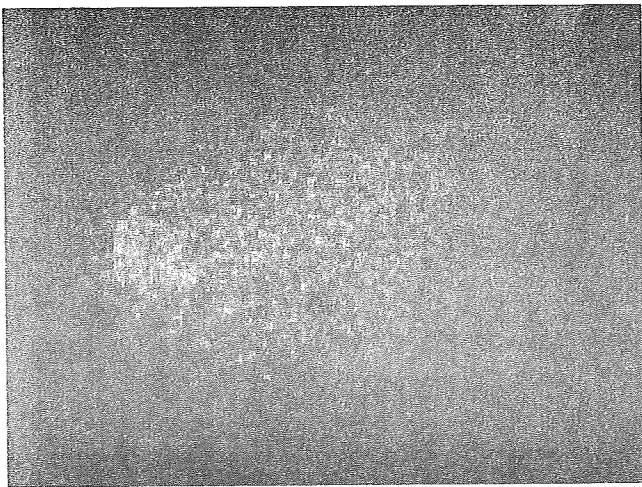
No.29



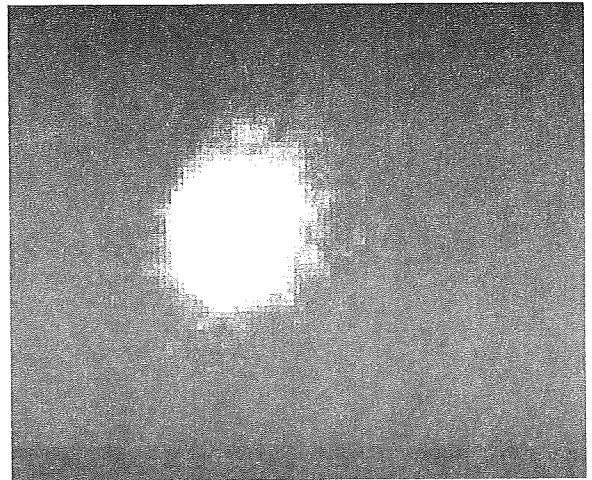
No.30



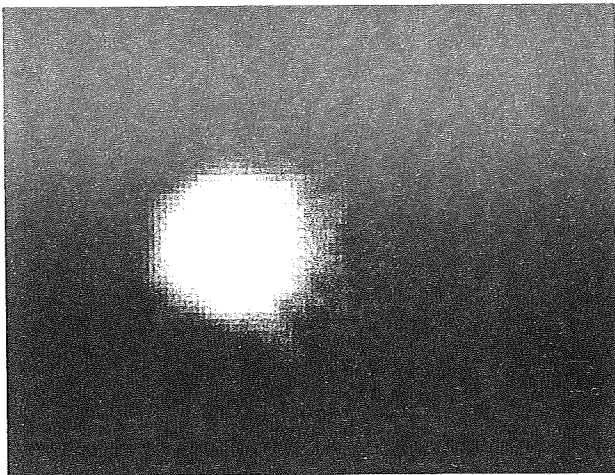
No.31



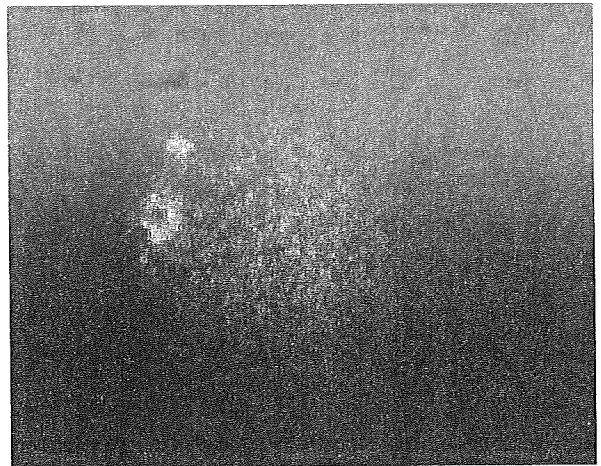
No.32



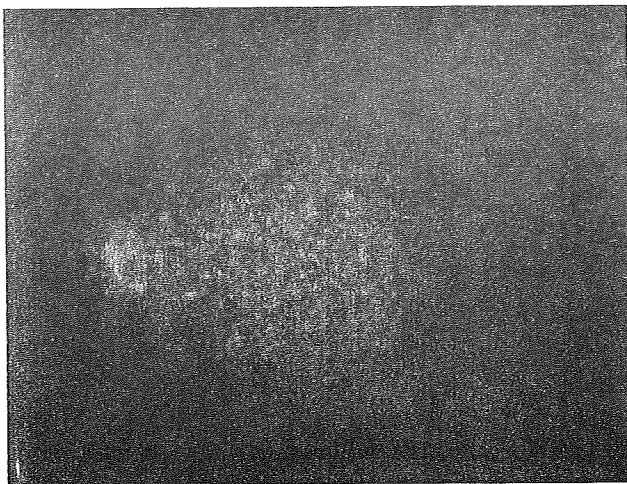
No.33



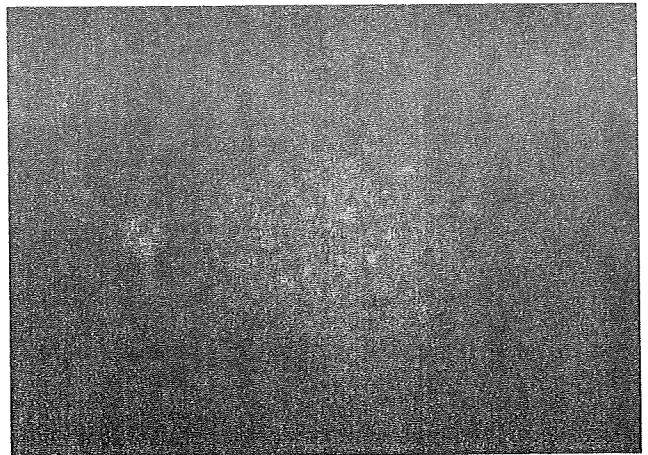
No.34



No.35



No.36



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：コメットアッセイ（in vitro）のバリデーション研究

研究分担者： 本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部第一室 室長

研究要旨

In vitro コメット試験法の標準化と、その結果の信頼性と妥当性を評価するため、国際共同バリデーション研究を実施した。ヒトリンパ芽球細胞 TK6 細胞を用い、代謝活性化の存在下、もしくは非存在下で披験物質を 4 時間処理し、コメット試験を実施した。コメット試験のプロトコールは in vivo コメット国際バリデーション試験に準じた。細胞毒性はトリパンプルー染色 (TBE)、ヘッジホッグ (NDCN)、および処理後の細胞増殖により評価し、それぞれ 80%TBD、20%NDCN、100%細胞増殖抑制を目安として最高用量を設定した。これまで 5 つの研究機関で 10 の遺伝毒性、もしくは非遺伝毒性化学物質を評価した。S9 非存在下では ethylmethanesulfonate、9-aminoacridine、camptothecin、etoposide の遺伝毒性物質で用量依存的な陽性反応が観察されたが、クロスリンク剤である mitomycin C では陰性であった。また、非遺伝毒性物質である cycloheximide、triton-X、mannitol は明らかな陰性であった。このことからコメット試験は適切に遺伝毒性物質（クロスリンク剤以外）を検出しうるかと評価された。一方、代謝活性化が必要である遺伝毒性物質（cyclophosphamide、diethylnitrosamine）に関しては、S9 存在下でその反応性は極めて低かった。細胞毒性、小核の発生は明らかであることから、これはコメット試験の特徴（限界）と考えられる。本研究結果から、in vitro コメット試験のガイドライン化に向けた、試験法の標準化、データの許容の基準、陽性・陰性の判定のための統計的解析方法等を提案していきたい。

キーワード；バリデーション研究、遺伝毒性、コメット試験、in vitro

A. 研究目的

コメット試験は初期 DNA 損傷を個々の細胞レベルで検出できる遺伝毒性試験として広く利用されている。特に In vitro コメット試験は化学物質の遺伝毒性ハザードを簡便で、感度よく検出できるとされている。しかしながら、コメット試験は研究機関間での再現性に乏しく、しばしば報告によってその結果が異なる。標準的なプロトコールが存在せず、

各機関が独自のプロトコールや、実験器具、実験条件、および評価法で行っていることが原因と考えられる。また、DNA 損傷による DNA の低分子フラグメント化は、細胞毒性によるアポトーシスから生じる DNA フラグメント化としばしば区別が付き難い。このような細胞毒性の評価法の違い、DNA 損傷とアポトーシスの区別の基準等の違いもはコメット試験の低再現性の原因の一つと考えられる。

これら問題の解決のため、in vitro コメット試験法の標準化と、その結果の信頼性と妥当性を評価するため、国際共同バリデーション研究を実施した。

B. 研究方法

1. 試験計画

国際バリデーション研究は試験評価のためのバリデーションマネジメントチーム(VMT)、実際の試験担当機関、試験計画、試験結果の評価のアドバイザーとしてのコンサルテーションチームからなる。これまで2回のバリデーション試験が行われた。1回目(Phase I)は2007年10月から開始され、5つの研究機関(日本2、米国2、英国1)により4化合物が試験された。化合物名を開示し、VMT が指定した用量でコメット試験を実施し、試験方法の妥当性と、各試験機関間の再現性を評価した。2回目(Phase II)は2008年8月から開始され、4つの研究機関(日本1、米国2、英国1)により6化合物が試験された。化合物名は開示せず、溶媒の選択、用量設定はすべて試験担当機関が行った。Phase II では実際に規制評価試験としての妥当性と、各試験機関間の再現性の検討を目的とした。また、in vitro での代謝活性化の効果についても検討を行った。

2. Phase I 試験

2.1 試験機関

以下の5つに試験機関により試験が実施された。

- i) 食品農医薬品安全性評価センター(日本)
- ii) 食品薬品安全センター(日本)
- iii) バイオリライアンス(米国)
- iv) メルク(米国)
- v) ハンチントンライフサイエンス(英国)

2.2 試験化合物

以下の4化合物を試験した。試験化合物名を開示して、S9 非存在下での指定した試験濃度と溶媒で試験を行った。試験は同時に2回重複して(duplicate)行い、それぞれの処理から調整したコメットスライドサンプルを観察対象とした。

i) Ethylmethanesulfonate (EMS): (DMSO)

0, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000 ug/ml

ii) Mitomycin C (MMC): (生理食塩水)

0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 ug/ml

iii) Cycloheximide (CHX): (エタノール)

0, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000 ug/ml

iv) Triton-X (TRX): (生理食塩水)

0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 ug/ml

2.3. 試験方法

2.3.1. 細胞

ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 を用いた。本細胞は近2倍体細胞であり、増殖能が高い。また、浮遊細胞であるため培養が容易である。TK6 細胞は遺伝子突然変異試験、小核試験、コメット試験に適用可能な、遺伝毒性試験のスタンダード細胞の一つである。

細胞のロットの統一を図るため TK6 細胞は各試験機関が指定されたロットのものを ATCC から直接購入した。

2.3.2. 細胞培養液

10.4 g の RPMI 1640 培地 (Invitrogen Corporation, Cat. #31800-022) を Milli-Q 水に溶解させ、2 g の炭酸水素ナトリウム (NaHCO₃, 和光純薬工業株式会社) 及び 2 mL の 1 mol/L 塩酸 (HCl, 和光純薬工業株式会社) を加えた。その後、Milli-Q 水で 1000 mL にメスアップし、孔径 0.20 μm のフィルターでろ過滅菌後、冷蔵保存した。使用する前に、10 vol% の馬血清 (JRH Biosciences, Inc., 56°C、60 分間非動化済

み)、1 vol%のペニシリン・スプレプトマイシン (Invitrogen Corporation, Cat.# 15140-122) 及び 200 ug/mL のピルビン酸ナトリウム (和光純薬工業株式会社) を加え、細胞培養液とした。

2.3.3. 細胞培養条件

培養器は培養フラスコを用い、5%CO₂ 存在下、温度 37C、加湿条件の CO₂ インキュベータ内で培養した。

2.3.4. 細胞数計測法

細胞濃度の計測には、細胞計数分析装置 (コールター・カウンター Z2 型、コールター株式会社) を用いた。細胞計数分析装置では、希釈液 (Isoton II Diluent) で 20 倍希釈した細胞懸濁液を測定した。

2.3.5. 代謝活性化系

実施しなかった。

2.3.6. 実験操作

2.3.6.1. 前培養

- i) 37C の温水中で、凍結保存しておいた 1 mL の TK6 細胞懸濁液をすばやく解凍した。
- ii) この細胞懸濁液を約 9 mL の細胞培養液に加えた後、1000 rpm、5 分間室温で遠心分離し、上清を除去した。
- iii) 残った上清で細胞沈渣をよく攪拌し、50 mL の細胞培養液を加え培養した。
- iv) 1.5×10⁶ cells/mL 以上の細胞濃度にならないように細胞を希釈しながら数日間培養を続けた。

2.3.6.2. 被験物質の処理及び除去

- i) 培養終了後、細胞培養液で 2×10⁵ cells/mL の細胞懸濁液を調製した。
- ii) 15 mL のアシストチューブに次表の通り加え、37C の恒温槽内にある Universal Shaker (SHK-U3, 35 rpm, IWAKI) を用いて攪拌しながら 4 時間処理した。処理

は細胞懸濁液 9.9 mL、に被験物質調製液あるいは媒体 1 mL を加えて開始した。

- iii) 4 時間処理後、細胞懸濁液の一部を分取し、各処理における細胞数を計測した。
- iv) コメットアッセイ用に、1 mL の細胞懸濁液を別のアシストチューブに分取した。
- v) 残りの細胞懸濁液を 1000 rpm、5 分間室温で遠心分離し、上清を除去した。
- vi) 残った上清で細胞沈渣をよく攪拌し、5 mL の細胞培養液を加え、再度遠心分離後、上清を除去した。
- vii) 残った上清で細胞沈渣をよく攪拌し、10 mL の細胞培養液を加えた。
- viii) 細胞懸濁液の一部を分取し、各処理における細胞数を計測し、細胞懸濁液 A とした。

2.3.6.3. 細胞毒性試験

細胞毒性試験は 2 種類の試験方法を標準的に用いた。1) 細胞増殖試験 (RSG) と 2) トリパンプルー染色 (TBDE) による色素除外能力試験である。

- i) 細胞増殖試験：細胞懸濁液 A を 24 時間培養した。培養後、細胞懸濁液の一部を分取し (B)、細胞数を計測した。相対細胞増殖率；RSG (Relative Suspension Growth) は B/A (陰性対照) を 100% としたときの B/A (検体処理群) の % で算出した。
- ii) トリパンプルー染色試験：4 時間試験検体で処理した細胞の一部を生理食塩水で作成した 0.4% トリパンプルー溶液と等量混合し、血球計算盤 (Burker-Turk) に充填した。光学顕微鏡下で 4 区画、約 100 個の細胞を数え、染色されなかった細胞の割合を生存率として算出した (TBDE ; Trypan Blue Dye Exclusion)。

2.3.6.4. コメット試験

4時間試験検体処理後の細胞をコメット試験用サンプルとした。コメット試験の詳細については in vivo コメット国際バリデーション研究の方法に準じた。試験条件を表1に記載する。

Agarose gel and sample Preparation	Bottom gel	1.0-1.5% low gelling temperature agarose in PBS (if used)
	Sample gel (A)	0.5% low gelling temperature agarose in PBS
	Solution of suspended cells (B)	Cells in HBSS with 20 mM EDTA and 10% DMSO*
	Mixture/ Final conc. of agarose	(A)/(B) = 9/1/0.45%
Lysis and electrophoresis	Lysis solution	2.5M NaCl, 100mM Na2EDTA, 10mM Tris-base, 10% DMSO, 1% Triton-X (pH 10*)
	Lysis condition	Overnight, 4C
	Rinse solution/ Condition	Distilled water/ Dipping
	Electrophoresis solution	0.3M NaOH, 1mM EDTA (pH > 13), < 10C
	Electrophoresis condition	Unwinding 20min + Electrophoresis 0.7-1 V/cm (300mA, < 10C)
Staining	Neutralization/ Dehydration	0.4M Tris- base (pH 7.5) at least 5 min/absolute ethanol at least 5 min
	Staining dye/ Time	SYBR Gold/ 10 min
Scoring	Comet analysis	Comet IV, Tail length, Tail moment, % tail DNA

* DMSO and/or Triton X should be added just before use.

表1

2.4. 標本の観察法

スライド標本の解析は、蛍光装置付き生物顕微鏡を用いて、最終倍率 200 倍、デジタルカメラ付き画像解析システムで行った。Duplicate で行った試験の 1 つからそれぞれ 50 個の細胞を解析 (合計 100 個) した。Small or non-existent head and large, diffuse tails はデータとしない。画像解析ソフト Comet assay IV を用いて次の解析パラメータを自動算出した。

- Tail %intensity [= % tail DNA]
- Tail length [= center of head to tail]
- Tail moment [= Olive tail moment]

このうち % tail DNA を統計解析の評価対象とした。

2.5. 統計学的手法

TBDE による細胞毒性試験で細胞生存率が 80%以上のデータを有効データと見なし、有効データが 3 つ以上の試験について統計解析を行った。1/標準偏差値を用い、重み付け回帰解析を行った。5%以下の信頼度で回帰解析を行い、試験結果を判定した。

3. Phase I 試験

3.1. 試験機関

以下の 4 つに試験機関により試験が実施された。

- 食品農医薬品安全性評価センター (日本)
- ベーリンガーマンハイム (米国)
- バイオリライアンス (米国)
- ハンチントンライフサイエンス (英国)

3.2. 試験化合物

以下の 6 化合物を試験した。試験化合物名は開示せず、ブラインド試験を行った。試験機関にして、S9 存在下、非存在下での指定した試験濃度で試験を行った。

- 9-Aminoacridine (9AA)
- Camptothecin (CAM)
- Cyclophosphamide (CYC)
- D(-)-Mannitol (MAN)
- Etoposide (ETO)
- N-Nitrosodimethylamine (DMN)

3.3 試験方法

3.3.1. 細胞、細胞培養液、細胞培養条件、細胞数計測法

Phase I 試験に準じた。

3.3.2 代謝活性化系

i. S9

代謝活性化のための S9 は MolTox

(<http://www.moltox.com/> Cat. #11-105

Phenobarbital/5,6 Benzoflavone induced)を共通して用いた。

ii. S9 mix

6.7g の NADP (disodium salt)と、12.5g のイソクエン酸(trisodium salt)を 500ml の蒸留水に溶解し、2.2um のフィルターで濾過し、コファクターとした。S9 mix は 1.5ml の S9 と 6ml のコファクターを混合して作成した。

3.3.3. 実験操作

Phase I 試験に準じた。尚、代謝活性化系の非存在下、存在下の条件は以下の通りである。

i) 代謝活性化系の非存在下

細胞懸濁液;9.9 mL、被験物質調製液あるいは媒体;0.1 mL

ii) 代謝活性化系の存在下

細胞懸濁液;9.15 mL、S9 mix;0.75 mL、被験物質調製液あるいは媒体;0.1 mL

3.3.4. 細胞毒性試験

細胞毒性試験は1)細胞増殖試験と2)トリパンプルー染色による色素除外能力試験加えて、3)核のない細胞(NCDN、ヘッジホッグ)の割合をコメットと観察時に計測した。NCDN はアポトーシス像であり、細胞毒性の指標になりうる。80%TBD、20%NDCN、100%細胞増殖抑制を目安として最高用量を設定した。Phase I 試験に準じた。

3.3.5. コメット試験

Phase I 試験に準じた。

3.4. 標本の観察法

Phase I 試験に準じた。

3.5. 統計学的手法

細胞毒性試験において最高用量 80%TBD、20%NDCN、100%細胞増殖抑制を目安として最高用量を設定し、有効データが 3 つ以上の試験について統計解析を行った。解析方法に関しては Phase I 試験に準じた。

(倫理面への配慮)

本研究ではいかなるヒト生物材料を使用しておらず、また実験動物も使用していないため倫理上問題はない。また、全ての試験は本研究所倫理規定に準拠して行った。

C. 研究結果

1) Phase I 試験

4 化合物を 5 つの研究機関で行った結果を図 1 に示す。

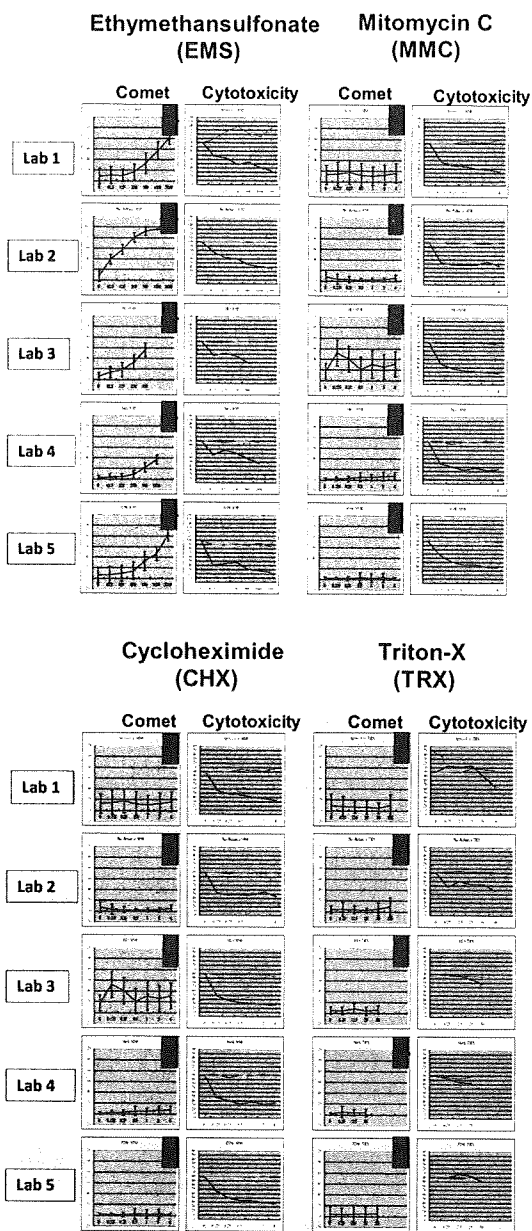


図 1

EMS はアルキル化剤で典型的な遺伝毒性物質であり、全ての試験機関で用量依存的な陽性反応を示した。一方、同様に典型的な遺伝物質である MMC に関しては全て陰性であった。また、MMC に

関しては逆に陰性対照に比べてコメットが減少する傾向が見られた。

CHXとTRXはタンパク合成阻害作用、界面活性化作用をもつ非遺伝毒性物質である。これら化合物に関してはほとんどコメットの誘発は観察されず、陰性と判断されたが、一部に関しては統計的に陽性と判定された。

細胞毒性の指標として用いたTBDEは全てにおいて変化が見られず。細胞毒性の指標としては役に立たないことがわかった。

2) Phase II 試験

Phase II の試験結果を図 2 に示した。

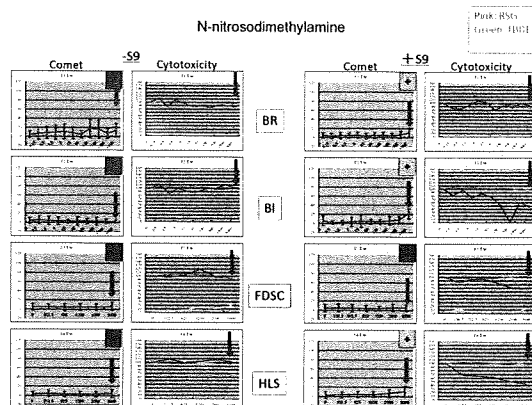
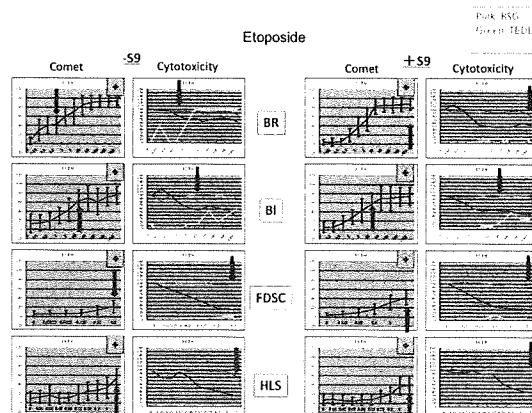
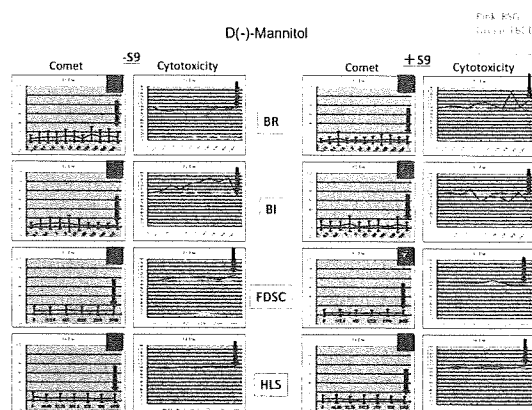
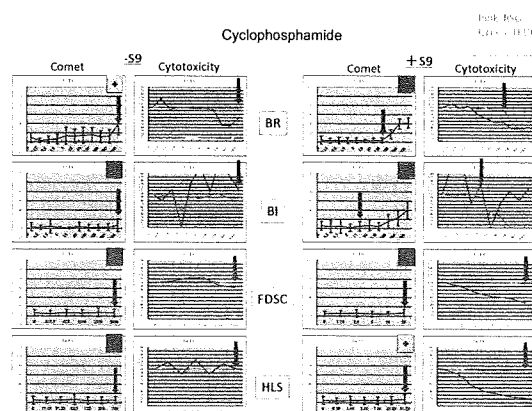
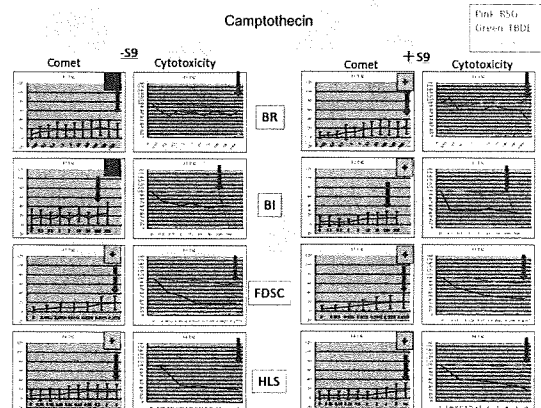
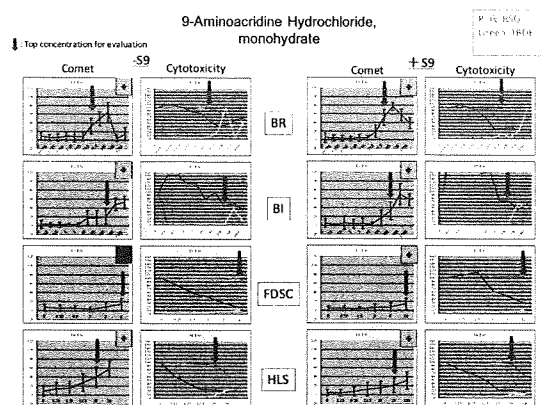


図 2

Phase II は 4 つの試験機関で 6 つの化合物を代謝活性化存在下、および非存在下で試験を行った。全てブラインドで試験を行ったため、溶媒選択、用量設定は各試験機関で違いが認められた。

i) 9-Aminoacridine (9AA)

代謝活性化を不要とする遺伝毒性陽性化合物である。核酸に強い親和性を持つ。

FDSC の-S9 以外の全ての試験で陽性反応を示した。この例外も統計的には有意差は認められなかったが、陽性傾向が見られた。FDSC は最高用量の設定根拠として RSG を選択したため、他の機関に比べて低用量で試験を実施し、十分に DNA 損傷が引き起こされず、陰性もしくは低反応性の結果となったと考えられた。最高用量の根拠となった RSG では細胞増殖が全く観察されないにもかかわらず、コメントの反応性は極めて低かった。コメント試験の細胞毒性指標に RSG を用いることには注意が必要である。

BR では細胞毒性の反応性が不連続でデータの質が問題と考えられた。反応用量が 1ml と標準の試験の 1/10 にスケールダウンしたため、操作時に細胞を消失した結果であると推察される。

ii) Camptothecin (CAM)

トポイソメラーゼ I の阻害剤であり、1 本差 DNA 切断を引き起こす。代謝活性化の必要は無い。

BR と BI の-S9 では陰性であったが、他は全て陽性であった。ただし、その反応性は弱く、ほとんどが陰性対照の 2 倍程度であった。BR と BI での陰性の原因は不明であるが、細胞毒性の反応性が他

と著しく異なるため、実験操作上の不手際が原因であるのかも知れない。

iii) Cyclophosphamide (CP)

強い遺伝毒性物質であり、代謝活性化を必要とする。代謝活性化非存在下ではほとんど遺伝毒性を示さない。

-S9 で、BR は統計的には陽性であったが、その反応性は僅かであり、アーチファクトと考えられる。+S9 では BR と BI は陽性傾向が見られたが、極めて高い細胞毒性での反応であり、評価の対象外であった。一方、HLS では統計的に陽性反応を示したが、極めて弱い反応であった。CP は他の遺伝毒性試験（小核試験、突然変異試験）では同様な条件で、強い遺伝毒性を示す。これらのことからコメント試験は他の試験に比べて感受性が極めて低いと考えられる。

iv) D(-)-Mannitol (MAN)

非遺伝毒性物質である。In vivo バリデーション試験で陰性対照として用いられている。

全ての試験機関で、代謝活性化の有無にかかわらず 5mg/ml まで試験されたが、陰性であった。

v) Etoposide (ETO)

トポイソメラーゼ II の阻害剤であり、2 本差 DNA 切断を引き起こす。代謝活性化の必要は無い。

全ての試験機関で、代謝活性化の有無にかかわらず用量依存的な陽性反応を示した。ただし、試験用量は試験機関でかなりの違いが見られた (0.5~1000ug/ml)。

vi) N-Nitrosodimethylamine (DMN)

代謝活性化によりメチルカルボカチオンを発生し、DNA をアルキル化する強力

な遺伝毒性物質である。

+S9 ですべての機関で弱い陽性反応を示し、3つの機関で統計的に陽性と判定されたが、その反応性は極めて弱いものであった。その反応用量は 5000ug/ml である。他の *in vitro* 遺伝毒性試験で、DMN は 1ug/ml 以下で明らかな陽性反応を示すことが知られている。コメント試験はこのような強遺伝毒性物質に対しても、陽性反応を得るためには高濃度の処理が必要である。

vi) 陰性対照

Phase II のコメント試験での陰性対照コメントの各試験機関での範囲は-S9 で 6.0~7.0、+S9 で 4.0~5.6 と比較的安定していた。このことは陰性対象のデータの許容値は比較的设置しやすいことを示している。また、+S9 での低下傾向が見られたことは S9 に DNA を修復する能力があることを示唆しているのかも知れない。

また、NCDN についても各試験機関の陰性対照を比較したが、-S9 で 0.2~3.3、+S9 で 0.5~4.6 と試験機関でばらつきが見られた。NCDN の評価基準が機関で異なるものと推察される。細胞毒性の指標として NCDN を用いるには評価基準の統一が必要である。

v) その他

溶媒の選択は各試験機関に行った。CP、MAN、DMN で試験機関によって違う溶媒（生理食塩水 vs DMSO）が選択されたが、結果には影響を与えなかった。

D. 考 察

Phase I 試験では主として *in vitro* コメッ

ト試験のプロトコールの確立と、ラボ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に行った。

試験検体のうちアルキル化剤である EMS は陽性を期待した化合物である。EMS は全てのラボで陽性反応を示した。MMC は変異原物質であるがクロスリンク剤であり、コメント試験では陰性を示すことが報告されている。すべての機関で陰性を示し、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 1 例見られたが他は陰性であった。以上の結果から 4 化合物では予想通りの結果が得られ、Phase I 試験により、*in vitro* コメント試験の基本プロトコールは確立されたものと考ええる。統計解析方法に関しては、鈴木等によって開発された今回のコメント試験の統計解析、判定のフローでは見た目の感覚とは異なる判定結果となったものが見られた。用量を log に変換するなどして再計算を行う必要があると考えられる。また、用量相関性のある極わずかな増加でも陽性と判定されることがあるため、陽性判定の前提条件等（例；少なくとも陰性対照の 2 倍）の設定も検討すべきである。

Phase II では確立したプロトコールで実際の試験を想定し、ブラインドで試験を行った。また、代謝活性化の系を組み入れた。Phase I と同様に陽性反応が得られると考えられた、9 AA、CAM、ETO ではほとんどの試験で陽性が得られ、また陰性対照である MAN では全てにおいて陰性であったことから Phase I 試験の結果を確認できた。一方、代謝活性化が必要な化合物（CP、

DMN) に関しては期待した反応性は得られなかった。これまで *in vitro* コメット試験で代謝活性化の系を用いた報告は少ない。代謝活性化を用いた報告でも、その反応性は極めて弱い。同一条件下で、他の遺伝毒性エンドポイント（小核、突然変異）では明らかな陽性反応を示すことから、S9 は十分に機能していると考えられる。コメット試験のみが感度が悪い原因は不明であるが、S9 には断片化した DNA を再結合させる能力があるのかもしれない。いずれにせよ、代謝活性化法には問題はないため、この性質は *in vitro* コメット試験の特徴（適用の限界）として解釈せざるを得ない。

細胞毒性はコメット評価の重要なパラメータである。今回、TBDE、NDCN、RSG の 3 つの指標を最高用量の設定に用いた。TBDE は実際にコメットが出現する強い細胞毒性条件下でもほとんど変化が認められなかった。TBDE の毒性は細胞処理直後のアポトーシスが起きる以前には認められず、その発言には時間がかかるものと推察される。逆に RSG では細胞増殖が全くない細胞毒性条件下でもコメット像が得られないことが陽性物質でも示された。これらのことは TBDE と RSG は最高用量の設定には不適切であることを示している。NDCN はコメットの観察と同時にできることを考えると、細胞毒性の指標としては最も簡便である。また、これは *in vivo* コメットでも毒性の指標として採用が検討されている。しかしながら、その評価は客観性に乏しく、試験機関間で大きな差が認められた。今後、評価基準の統一化が必要であると考えられる。

細胞毒性の評価から、*in vitro* コメット試

験で陽性を得るためには、極めて高い細胞毒性が必要であることがわかった。現在、ICH や IWGT の場では *in vitro* 遺伝毒性試験において最高用量の低減化、毒性条件の緩和等の改正が議論されているが、*in vitro* コメット試験はこれら改正により、遺伝毒性物質の多くを検出できなくなる可能性がある。特徴や限界を見極めた上で、その適用範囲を考慮する必要がある。

E. 結論

In vitro コメット試験法の標準化と、その結果の信頼性と妥当性を評価するため、国際共同バリデーション研究を実施した。Phase I、Phase II の 2 回の共同研究の結果、*in vitro* コメット試験の標準プロトコールの確立はできたと考える。しかしながら、大きな問題点として、細胞毒性評価法と、それに基づく最高用量の設定法に関してはさらなる検討が必要である。また、*in vitro* コメット法は通常の *in vitro* 遺伝毒性試験に比べて、陽性反応を得るためには高用量、強細胞毒性条件が必要であること、S9 による代謝活性化法はあまり有効では無いことが明らかとなった。今度はこれら限界を見極めた上で、バリデーション研究をさらに継続させる。最終的には本研究結果から、*in vitro* コメット試験のガイドライン化に向けた、試験法の標準化、データの許容の基準、陽性・陰性の判定のための統計的解析方法等を提案していきたく。

F. 研究発表

1. 論文発表

Takashima Y, Sakuraba M, Koizumi T, Sakamoto

H, Hayashi M, Honma M : Dependence of DNA double strand break repair pathways on cell cycle phase in human lymphoblastoid cells. *Environ Mol Mutagen.* 815-822 (2009)

Wang J, Sawyer JR, Chen L, Chen T, Honma M, Mei N, Moore MM : The mouse lymphoma assay detects recombination, deletion, and aneuploidy. *Toxicol Sci.* 109, 96-105 (2009)

Yatagai, F., Sugasawa, K., Enomoto, S., and Honma, M. : An approach to estimation from DSB Repair Efficiency. *J. Radiat. Res.*, 50, 407-413 (2009)

Koyama, N., Yasui, M., Oda, Y., Suzuki, S., Satoh, T., Suzuki, T., Matsuda, T., Masuda, S., Kinae, N., Honma, M. : Genotoxicity of acrylamide in vitro: Acrylamide is not metabolically activated in standard in vitro systems. *Environ Mol Mutagen.* (in press)

2. 学会発表

Honma, M., Kumita, W., and Sakuraba, M. : Demonstration of ionizing irradiation inducing genomic instability via breakage -fusion-bridge cycle in human cells by CGH-microarray. Keystone symposia "Genome Instability and DNA Repair (2009. 3)

Honma, M., Koyama, N., Kimura, A., Yasui, M., Takami, S., Takahashi, M., Imai, T., Yamamoto, Y., Kumita, W., Masumura, K., Masuda, S., Kinae, N., Matsuda, T., and Nohmi, T. : Child-adult differences in evaluation of in

vivo genotoxicity of acrylamide. 48th Annual Meeting for Society of Toxicology (2009. 3)

Kimura, A., Sakamoto, H., Saigo, K., Sukamoto, T., and Honma, M. : Establishment of simple in vitro Comet Assay Protocol. 48th Annual Meeting for Society of Toxicology (2009. 3)

Honma, M. : DNA double strand break repair and genomic stability. The 14th Academic Conference of Chinese Environmental Mutagen Society (2009. 7)

Honma, M. : The new ICH guidance on genotoxicity. The 5th National Congress of Chinese Society of Toxicology. (2009. 8)

Uno, Y., Kojima, H., Honma, M., Tice, R., Corvi, R., Schechtman, and Hayashi, M. : In vivo Comet assay: update on going international validation coordinated by JaCVAM.

10th International Conference on Environmental Mutagens (2009. 8)

Yamamoto, A., sakamoto, Y., Matsumura, K., Honma, M., and Nohmi, T. : Combined genotoxic effects of a methylating agent and radiation on human cells.

10th International Conference on Environmental Mutagens (2009. 8)

- Yasui, M., Koyama, N., Koizumi, T., Sakuraba, M., Takashima, Y., Hayashi, M., Sugimoto, K., and Honma, M.: Life cycle of micronucleus analyzed by confocal live cell imaging. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009. 8)
- Koyama, N., Kimura, A., Yasui, M., Takami, S., Takahashi, M., Inoue, K., Yoshida, M., Imai, T., Shibutani, M., Suzuki, T., Yamamoto, A., Kumita, W., Masumura, K., Horibata, K., Masuda, S., Kinae, N., Nohmi, T., and Honma, M.: Child-adult difference in evaluation of in vitro genotoxicity of acrylamide. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009. 8)
- Suzuki, T., Kohara, A., Ramadan, A., Kikuchi, Y., Honma, M., and Hayashi, M.: Comparative study of in vitro genotoxicity of ochratoxin A and aristolochic acid as a causative for Balkan endemic nephropathy. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009. 8)
- Honma, M., Yamakage, K., Burlingson, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., Hayashi, M., Nakajima, M., Suzuki, M., Corvi, R., Uno, Y., Schechtman, L., Tice, R., and Kojima, H.: International validation study of the in vitro alkaline Comet assay. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009. 8)
- Hirose, A., Kamata, T., Yamazaki, T., Sato, K., Yamada, M., Ono, A., Fukumoto, T., Okamura, H., Mirokuji, Y., and Honma, M.: Validation of the (Q)SAR combination approach for mutagenicity prediction of flavour chemicals. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009. 8)
- Honma, M.: The new ICH guidance on genotoxicity. International Conference on Environment, Occupational & Lifestyle Concern-Transdisciplinary Approach (2009. 9)
- 鈴木孝昌, 小原有弘, 小木美恵子, 田邊思帆里, 本間正充; 8 番染色体特異的 CGH アレイ解析による各種がん細胞株での c-myc 遺伝子増幅形式の解析
第 68 回日本癌学会学術総会 (200. 10)
- Honma M, Takashima Y, Sakuraba M, Koizumi T, Sakamoto H, and Hayashi M: DNA double strand break repair pathways and its dependence on cell cycle phases in human lymphoblastoid cells. Environmental Mutagen society 40th Annual Meeting (2009. 10)
- 本間正充; In vitro 遺伝毒性試験における最高用量と細胞毒性の評価
日本環境変異原学会第 38 回大会 (2009. 11)
- 真田尚和, 櫻田直美, 米澤豊, 入山昌美, 本間正充; コルヒチン及び ビンブラスチンのラット末梢血を用いた小核試験
日本環境変異原学会第 38 回大会 (2009. 11)

小山直己、木村葵、安井学、高見成昭、高橋美和、井上薫、吉田緑、今井俊夫、渋谷淳、鈴木拓也、増村健一、堀端克良、増田修一、木苗直秀、松田知成、能美健彦、本間正充；ライフステージ（週齢）を考慮したアクリルアミドの多臓器遺伝毒性評価

日本環境変異原学会第 38 回大会 (2009. 11)

安井学、小山直己、高島良生、林真、杉本憲治、本間正充；共焦点ライブセルイメージングによって明らかとなった小核のライフサイクル
日本環境変異原学会第 38 回大会 (2009. 11)

鈴木孝昌、小原有弘、ラマダンアリ、菊池裕、本間正充、林真；バルカン腎症の原因物質としてのアリストロキア酸およびオクラトキシン A

日本環境変異原学会第 38 回大会 (2009. 11)

谷田貝文夫、高橋昭久、本間正充、鈴木ひろみ、大森克徳、関真也、橋爪藤子、鵜飼明子、島津徹、榎本秀一、堂前直、大西武雄、石岡憲昭；国際宇宙ステーション利用実験：ヒト培養細胞の突然変異解析から宇宙環境の生物影響を解明する試み

日本環境変異原学会第 38 回大会 (2009. 11)

山本歩、本間正充；Unconectable I-SceI サイトの挿入による放射線損傷様二本鎖 DNA 切断の修復機構の解析

日本放射線影響学会第 52 回大会 (2009. 11)

安井学、本間正充；8-オキソグアニン 1 分子のゲノム内における突然変異誘発能の解析系の確立；低線量電離放射線の暴露モデルとして
日本放射線影響学会第 52 回大会 (2009. 11)

本間正充、山影康次、Burlingson, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., 林真、中嶋まどか、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 (2009. 11)

The new paradigm of genotoxicity testing in regulatory science -ICH guideline and IWGT consensus-

The 1st International Symposium on the Drug Safety Evaluation (2009. 12)

G. 知的所有権の取得状況

なし

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：コメットアッセイ (in vitro) の統計解析に関する研究

研究分担者： 鈴木 雅也 (財) 食品農医薬品安全性評価センター 試験部

研究要旨

本研究では、コメットアッセイ (in vitro) のバリデーション研究で化合物の陽性判定に使用する統計的手法について検討した。バリデーション研究では半数以上 (Phase I: 6/10、Phase II: 7/12) の化合物で参加全施設の一致した判定を得ることができた。本研究での不一致の原因を解明し、より精度の高い判定方法の提案をしていきたい。

A. 研究目的

コメットアッセイの評価に使用されている統計解析法として、多くの手法が存在するが、世界的に統一された実験条件の下での検討がなされていない。

本研究はコメットアッセイ (in vitro) の国際バリデーション研究 (分担研究者: 本間正充) において、各化合物の陽性・陰性の判定に用いられる統計手法を検討した。

B. 研究方法

B-1) 主要評価変数

コメットアッセイ (in vitro) のバリデーション研究で集められた Phase I および Phase II の % Tail DNA データを主要評価変数とした。

B-2) 外れ値・欠測値の取り扱い

各参加施設から提出されたデータのすべてを解析対象とし、外れ値の除去および欠

測値の補完作業は行わなかった。

B-3) 統計解析

各用量の各スライドの平均値を説明変数、標準偏差の逆数を重みとして重み付き回帰分析を行った。推定された回帰式の 1) 回帰係数 (傾き) が正でかつ、2) 回帰係数が 0 でないことを仮説とした F 検定で有意差が認められた場合に、化合物を陽性と判定した。

C. 研究結果

Phase I 研究の判定結果を図 1 に示した。陽性と判定された物質には図上のセルの背景色をピンクで表示した。Phase I 研究について直接法 (-S9) では 5 物質中 4 物質 (一致率: 80%)、代謝活性法 (+S9) では 5 物質 2 物質 (一致率: 40%) の判定が全参加施設で一致した。両方法併せて一致率は 60%であった。

Phase II 研究の判定結果を図 2 に示した。

Phase II 研究について、直接法(-S9)では6物質中3物質(一致率: 50%)、代謝活性化法(+S9)では6物質4物質(一致率: 66%)の判定が全参加施設で一致した。両方法併せて一致率は58%であった。

-S9

	EMS	MMC	2AA	CHX	TRX
BSRC	TD=(0.03)*dose+10.3 [<0.0001]	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]
Bio-Reliance	TD=(0.04)*dose+10.34 [<0.0001]	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]
HLS	TD=(0.05)*dose+39.56 [0.017]	TD=(1.68)*dose+32.42 [0.8178]	TD=(0.02)*dose+31.62 [0.4869]	TD=(0.0006)*dose+13.3 [0.7713]	TD=(0.03219)*dose+4.92 [0.1004]
Merk	TD=(0.04)*dose+1.66 [<0.0001]	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]
FDSC	TD=(0.04)*dose+7.18 [<0.0001]	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]

+S9

	EMS	MMC	2AA	CHX	TRX
BSRC	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]
Bio-Reliance	TD=(0.02)*dose+58.2 [0.0182]	TD=(0.35)*dose+4.02 [0.6745]	TD=(-0.41)*dose+2.22 [0.5420]	TD=(-0.0004)*dose+3.35 [0.7460]	TD=(0.006)*dose+2.31 [0.7132]
HLS	TD=(0.12)*dose+1.93 [<0.0001]	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]
Merk	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]
FDSC	TD=(0.04)*dose+0.56 [<0.0001]	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]

図1 Phase I 研究の判定結果

-S9

	9-AA	CAMP	CP	MAN	ETOP	DMN
BioReliance	TD=(1.2)*dose+6.5 [<0.0001]	TD=(0.0037)*dose+15.91 [0.34]	TD=(0.006)*dose+7.6 [<0.0001]	TD=(0.0005)*dose+7.62 [0.46]	TD=(115.3)*dose+13.73 [0.03]	TD=(0.001)*dose+8.07 [0.26]
Boehringer-Ingelheim	TD=(0.06)*dose+4.69 [<0.0001]	TD=(0.002)*dose+29.7 [0.72]	TD=(0.0006)*dose+1.32 [0.07]	TD=(-0.001)*dose+4.3 [0.18]	TD=(4.98)*dose+7.7 [<0.0001]	TD=(-0.0003)*dose+3.18 [0.07]
FDSC	TD=(2.13)*dose+4.26 [0.06]	TD=(51.74)*dose+7.7 [0.02]	TD=(0.0002)*dose+5.92 [0.338]	TD=(0.00003)*dose+7.98 [0.82]	TD=(33.74)*dose+4.91 [0.0002]	TD=(0.0003)*dose+4.37 [0.22]
HLS	TD=(1.02)*dose+9.70 [<0.0001]	TD=(4.05)*dose+10.36 [0.02]	TD=(0.0003)*dose+5.10 [0.83]	TD=(-0.0008)*dose+6.17 [0.20]	TD=(22.10)*dose+11.59 [<0.0001]	TD=(0.0002)*dose+3.17 [0.33]

+S9

	9-AA	CAMP	CP	MAN	ETOP	DMN
BioReliance	TD=(1.3)*dose+2.4 [<.0001]	TD=(0.016)*dose+10.12 [0.0101]	TD=(0.007)*dose+3.05 [0.10.73]	TD=(0.0002)*dose+3.78 [0.455]	TD=(0.08)*dose+28.26 [0.009]	TD=(0.001)*dose+4.04 [<.0001]
Boehringer-Ingelheim	TD=(0.06)*dose+5.53 [<.0001]	TD=(0.03)*dose+7.46 [0.045]	TD=(0.08)*dose+2.78 [0.61]	TD=(-0.00009)*dose+3.84 [0.94]	TD=(5.26)*dose+10.6 [0.0002]	TD=(0.004)*dose+2.56 [<.0001]
FDSC	TD=(0.87)*dose+3.459 [0.001]	TD=(40.39)*dose+8.19 [0.01]	TD=(0.06)*dose+4.75 [0.36]	TD=(0.00003)*dose+4.60 [0.78]	TD=(20.82)*dose+4.45 [0.0005]	TD=(0.0001)*dose+3.95 [0.52]
HLS	TD=(0.29)*dose+4.87 [<.0001]	TD=(0.73)*dose+6.44 [<.0001]	TD=(0.11)*dose+3.88 [0.001]	TD=(-0.0008)*dose+4.95 [0.14]	TD=(19.56)*dose+6.50 [<.0001]	TD=(0.002)*dose+2.92 [0.0006]

図2 Phase II研究の判定結果

D. 考察

各用量の% Tail DNA の値がほぼ同じであっても有意差が認められた事例があり、今回使用した方法に加えて、陰性対象群に対しての一定の変化率などを条件に加えた判定方法の改良が必要であると考えた。各Phaseとも、約半数以上の化合物で参加施設全部の判定が一致していた。判定が一致していなかった化合物の多くは1施設のみが異なる判定を示していたため、一致していた施設との実験条件の違いの確認が必要であると考えた。各施設で任意で用量設定したことが判定の不一致を引き起こした可能性があるため、将来的には全施設に対して予め定められた用量でバリデーション試験を実施し、当該方法の一致度の確認を行っていきたい。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

本間正充、山影康次、Burlingson, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., 林真、中嶋まどか、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 (2009. 11)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし