

201035015A

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

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

平成 22 度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大野泰雄

平成 23 年（2011）年 4 月

目 次

I. 総括研究報告		
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-----		1
大野泰雄		
II. 分担研究報告		
1. 内分泌かく乱化学物質試験法のバリデーションおよび		
検証のための化合物測定の実施-----		17
小野 敦		
2. 遺伝毒性試験法コメットアッセイ (<i>in vivo</i>) のバリデーション-----		101
小島 肇		
3. コメットアッセイ (<i>in vitro</i>) のバリデーション研究-----		129
本間 正充		
4. コメットアッセイ (<i>in vitro</i>) の統計解析に関する研究-----		139
中嶋 圓		
5. 遺伝毒性試験 (トランスジェニックアッセイ) のバリデーションに		
関する基盤的研究-----		141
能美 健彦		
6. <i>in vitro</i> 皮膚感作性試験代替法のバリデーション研究-----		147
大野 泰雄		
7. バリデーション研究における被験物質の選択法に関する研究-----		155
森田 健		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----		167
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----		171

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

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

本研究では、我が国あるいは欧米で開発された新しい安全性試験法の内、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妥当性を確認し、国際的な受け入れが適切とされた方法のガイドライン化を通じて、新規試験法を国際的方法として公定化する手順を確立することを目的とした。

試験法としては、内分泌かく乱化学物質スクリーニング法として、エストロゲン受容体 α (ER α)に対するレポーターアッセイである①我が国発の HeLa9903 細胞を用いた ER α アнтаゴニスト測定法 (HeLa 法) 及び②米国で開発された Lumi-Cell 法、及び③ AR-EcoScreen 細胞を用いたアンドロゲン受容体転写活性化試験法 (AR-EcoScreen 法) を、遺伝毒性試験としては、DNA 損傷を評価する④ *in vivo* コメットアッセイ及び⑤ *in vitro* コメットアッセイ、*in vitro* 皮膚感作性試験としては、⑥ ヒト樹状細胞株を用いる方法 (h-CLAT 法) の国際バリデーションを実施した。また、⑦ 遺伝子組み換え動物を用いる *in vivo* 遺伝毒性試験法 (トランスジェニックアッセイ) のプロトコル確立のための研究を行った。

なお、①から⑦までの試験法を同時かつ同様のレベルで進める事は不可能であることから、平成 22 年度は、特に、HeLa 法、*in vivo* コメットアッセイ及び h-CLAT 法の研究を中心に、国際的なバリデーションを推進した。結果として、HeLa 法については、来年度早々の終了目途が立った。*in vivo* コメットアッセイについては、14 施設から予定通りの結果を集めることができた。h-CLAT 法は技術移転を終了した。以上が示すように、今年度中心的に進めた 3 方法の国際的なバリデーションをほぼ順調に遂行できた。

研究代表者

大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所 副所長

研究分担者

小野 敦 (国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室・主任研究員)

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)

本間正充 (国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部・室長)

能美健彦 (国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部・部長)

森田 健 (国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部・室長)

中嶋 圓 (財団法人 食品農医薬品安全性評価センター 試験部・次長)

A. 研究目的

安全性評価が十分になされていない多くの既存化学物質及び新規化学物質の安全性を評価するにあたり、動物実験の福祉または動物実験における 3 Rs (Reduction、Refinement 及び

Replacement) 原則を考慮に入れた新規の試験法の整備やその確立が、世界的に求められている。

本研究では、我が国あるいは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、欧米の動物実験代替法研究機関や他の研究機関と協力して国際的に受け入れられるか否かを検討し、妥当な方法のガイドライン化を通じて、新規代替試験法を国際的公定化する手順を確立することを目的としている。

試験法としては、以下の 7 種を取り上げて検討した。即ち、内分泌かく乱化学物質スクリーニング法として、① 我が国で開発された HeLa9903 細胞を用いたエストロゲン受容体 α (ER α) アнтаゴニスト測定法 (HeLa 法)、② 米国で開発された ER α に対するレポーターアッセイ Lumi-Cell 法、③ AR-EcoScreen 細胞を用いたアンドロゲン受容体転写活性化試験法 (AR-EcoScreen 法) を、遺伝毒性試験として、④ *in vivo* コメットアッセイ、⑤ *in vitro* コメットアッセイ、*in vitro* 皮膚感作性試験として、⑥ ヒト樹状細胞株を用いる方法 (h-CLAT 法) の

国際バリデーションを実施した。また、⑦遺伝子組み換え動物を用いる遺伝毒性試験法（トランスジェニックアッセイ）の調査研究を行った。なお、開発段階の異なる試験法のバリデーションを同時かつ同様のレベルで進める事は不可能である。そこで、上記①から⑦の検討を進めるとともに、国際的バリデーションについては特に内分泌かく乱化学物質に対する 2 つのレポーターアッセイ及び *in vivo* コメットアッセイに力を入れ、平成 21 年度は、Lumi-Cell 法のバリデーションを終了させた。また、平成 22 年度は、*in vivo* コメットアッセイ及び HeLa 法を中心に、国際的なバリデーションを推進した。

これらの結果を受け、上記試験法の OECD テストガイドラインの成立を目指している。その過程において、国際機関と十分な意見交換を行い、公的な試験法を確立に向けての経験を積み、今後の国際的な新規試験法バリデーションを円滑に行うための枠組みの構築と遂行、また、国際的受け入れのための手順の確立を目指している。

B. 研究方法

B-1. 内分泌かく乱化学物質スクリーニング

B-1-1. HeLa9903 細胞を用いた ER α アンタゴニスト測定法 (HeLa 法) : HeLa 法は、ヒト由来の細胞(HeLa 細胞)に、ヒトエストロゲン受容体 ER α 遺伝子及びエストロゲン応答配列と繋いだルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして組み込んだ安定形質株 (HeLa-9903) を用いたレポーター遺伝子アッセイ法である。本研究では、HeLa-9903 細胞を用いたアンタゴニスト活性評価法のガイドライン化に向けたバリデーションを進めた。バリデーションの実施にあたっては、国立医薬品食品衛生研究所 JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) を事務局として JaCVAM、ECVAM、EFSA 及び米国 EPA からの専門家、さらには生物統計専門家として寒水孝司博士 (京都大学) を含むメンバーからなるバリデーション実行委員会 (VMT) を組織して、実験の進行に関する情報の収集、解析及び状況に応じた測定施設における試験実施管理を行った。アンタゴニスト試験プロトコル及びバリデーション計画は、本試験を開発した化学物質評価研究機構 (CERI) において作成された案をもとに VMT の承認を得て最終化された。バリデーションは、本試験法を開発した CERI をリードラボとして、その他、海外 2 施設 (VITO (ベルギー)、KFDA (韓国)) 及び国内 2 施設 (大塚製薬、カネカ) の計 5 施設により 3 タスクからなるバリデーションを開始した。また、本年度から新たに株式会社 日吉がバリデーション施設として参加

した。本研究班では、バリデーション全体の管理を行うとともに得られた結果をもとに評価基準等の最適化を含む必要なプロトコルの調整を行い、バリデーション報告書及びガイドライン案を作成し OECD に提案することを目指した。

B-1-2. Lumi-Cell ER アッセイ (Lumi-Cell 法) : Lumi-Cell 法は、米国 Xenobiotic Detection Systems Inc.(XDS 社)により開発されたエストロゲン受容体を介した遺伝子転写活性化試験法である。ヒト卵巣がん細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、化学物質による内在性 ER への作用をルシフェラーゼ活性により検出する。本法についてはこれまでアゴニスト・アンタゴニスト法のいずれについても多施設バリデーション試験が実施されていなかったことから、米国 ICCVAM/NICEATM からの提案により、ICCVAM/NICEATM を事務局として、JaCVAM、米国 ICCVAM/NICEATM、欧州 ECVAM 及び韓国 KoCVAM (平成 22 年度より) の参加による VMT を組織し、米国、日本、欧州の 3 施設 (XDS、ECVAM、日吉) において、ICCVAM から提案されたプロトコルに従い 4 Phase からなる国際バリデーションを実施した。本研究班では、我が国の参加施設である株式会社 日吉において実施された測定結果の信頼性保証のためデータレビューを行うとともに、VMT において日米欧 3 施設からの結果をもとに施設内及び施設間再現性について評価を行った。得られた結果をもとにプロトコルの最適化について議論するとともに、ICCVAM ピアレビューのためのバリデーション報告書及びガイドライン案について検討した。

B-1-3. AR-EcoScreen 細胞を用いたアンドロゲン受容体転写活性化試験法 (AR-EcoScreen 法) : AR-EcoScreen 法は、アンドロゲン受容体を介した遺伝子転写活性化試験法である。AR-EcoScreen 細胞は、CHO-K1 細胞にヒトアンドロゲン受容体と蛍光ルシフェラーゼ遺伝子上流にアンドロゲンレスポンスエレメントを持つレポータープラスミド、及び細胞毒性評価の指標となるウミシイタケルシフェラーゼを安定発現する細胞株である。案どれ源受容体への作用と細胞毒性評価を同時に検討出来るという利点を有する。本試験系については、本研究班開始以前に CERI が中心となって国内 3 施設の参加によりバリデーション試験が実施されており、本研究班では既に実施済みのバリデーションの報告書及び OECD ガイドライン案を OECD に提出し、ピアレビューの実施を提案した。

B-2. 遺伝毒性試験

B-2-1. *in vivo* コメットアッセイ

平成 20 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 (phase III まで) を実施し、コメットアッセイの標準プロトコルを確定した。

平成 21 年度には、Phase IV-1 バリデーション研究にて、確定できたプロトコル (ver. 14. 1) を用いて、4 被験物質 (エチルメタンサルフォネート: 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。

本年度は第 8 回 VMT 会議を 2 月にハンチントン (英国) で開催した。バリデーションには、14 施設が参加した。参加している施設は、phase IV-1 で再現性の高い実験を行えることを確認できている。

本バリデーションの目的は、化学物質の発癌性の予測性能を検討することである。バージョン 14. 2 のプロトコルを用いて、参加 14 施設が phase IV-2 バリデーションを実施した。

プロトコル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: 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: 胃及び肝臓
- 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
なお、%DNA in tail におけるデータ採用基準を以下に示す。

陰性対照 肝臓の平均値 1-8%

胃の平均値 1-20%

陽性対照: EMS (エチルメタン酸サルフォネート)

200mg/kg、経口 2 回投与、臓器を問わず、

溶媒との差 5%以上

溶媒との比 2倍以上

Phase IV-2 では、遺伝毒性発癌物質、非遺伝毒性発癌物質、遺伝毒性非発癌物質、非遺伝毒性非発癌物質で分類した 40 物質を各施設に配布し、1 物質/施設、施設毎に 1~3 物質を評価するバリデーションを約 1 年掛けて実施した。

被験物質の配布は、基本的に薬理部 新規試験法評価室で実施した。米国の参加施設につい

ては、NICEATM の支援を受けて配布した。被験物質コード番号は、A4201~A4240 とした。

また、コメット像分類の最終確認が実施され、アトラスをテキストとして発行する準備を進めた。

B-2-2. *in vitro* コメットアッセイ

1) 試験計画 (これまでの経緯を含む)

国際バリデーションは試験評価のための 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。Phase I 試験は 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。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。今回の Phase III 試験はプロトコルの確立を目指し、2010 年 6 月から開始され、2011 年 1 月に終了した。5 つの研究機関 (日本 1、米国 2、英国 1、韓国 1) により 2 化合物が試験された。化合物名は開示せず、溶媒の選択は試験担当機関が行った。用量設定は行わず、指定された広範囲の用量で試験を行った。

2) Phase III 試験

以下の 5 つに試験機関により試験が実施された。

- i) 食品薬品安全センター (日本)
- ii) バイオリライアンス (米国)
- iii) ベーリンガーインゲルハイム (米国)
- iv) ハンチントンライフサイエンス (英国)
- v) 韓国毒性研究所 (韓国)

アルキル化剤である MMS、及び代謝活性化を必要とする 2-Aminoanthracene (2AA) の 2 化合物を試験した。VMT がシグマ社から同一ロットのものを購入し、各試験機関のケミカルマスターに郵送した。ケミカルマスターは試験担当者に、試験化合物名を開示せず、提供し、試験担当者はプロトコルに従い、S9 存在下、もしくは非存在下で 0.15~5000ug/mL までの指定した用量で試験を行った。溶媒の選択は試験担当機関が行った。

S9 は MolTox 社が販売するフェノバルビタール、5、6 ベンゾフラボン誘導のラット肝 S9 を用いた。各研究機関は指定された製品 (#11-05) を MolTox 社から購入し、試験に用いた。S9mix の調整法は VMT

が作成したプロトコルに従った。

ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 を用いた。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。

細胞毒性試験は 2 種類の方法を標準的に用いた。i) 細胞増殖試験(RCG)と、ii) ヘッジホッグ(NDCN)の観察による視細胞評価試験である。

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;RCG (Relative Cell 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) ヘッジホッグ(NDCN)の観察: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。

100%細胞増殖抑制、20%NDCN を目安としてレトルスペクティブに最高用量を設定した。

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。

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。

3) 統計解析

・主要評価変数

コメットアッセイ (*in vitro*) の Phase III バリデーション研究で集められたパラメータの内、% Tail DNA 値を主要評価変数とした。

・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、外れ値の除去及び欠測値の補完作業は行わなかった。

・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。

B-2-3. トランスジェニックアッセイ

1) 共同研究の概要

プロトコルの確立を目指した *gpt delta* ラットを用いた共同研究には国内約 10 施設が参加した。参加施設を 3 グループに分け、各化合物の試験を行った。各グループの 1 施設が動物実験を担当し、また、Tg アッセイの経験がある施設が各グループに少なくとも 1 施設含まれるようにグループに分けた。共通の陽性対照群として、7 週齢雄の F344 *gpt delta* ラットにエチルニトロソ尿素(ENU) 50 mg/kg を 5 日間腹腔内投与し、試験 31 日目(最終投与後 26 日目)に採取した肝臓組織(n=5)を全参加施設に配布して用いた。本試験では、発がん物質(2、4-DAT、アリストロキア酸、亜硫化ニッケル)及び非発がん物質(2、6-DAT)の *in vivo* 遺伝毒性を検索した。IWGT (International Workshop on Genotoxicity Testing)が推奨する、28 日間の連続投与、最終投与後 3 日目に組織を採取するという試験プロトコルを基本に動物実験をデザインした。ただし、亜硫化ニッケルについては週 1 回の気管内投与を 4 回行った。

2) 試験物質の投与

2-1) 2、4-DAT 及び 2、6-DAT

両化合物は Ames 試験の S9mix 存在下でともに陽性を示す変異原物質だが、2、4-DAT はげつ歯類に肝癌を誘発し、異性体の 2、6-DAT は肝癌を誘発しない。今回、両化合物の Tg 遺伝毒性による評価を行った。2、4-DAT の投与量は 10 及び 30 mg/kg/day、2、6-DAT の投与量は 60 mg/kg/day とした。雄の *gpt delta* ラットに 1 日 1 回、28 日間反復経口投与し、最終投与の 3 日後に臓器を採取した。発がん標的臓器の肝臓について *gpt* アッセイを実施した。実験には各群 5 匹の雄ラットを用いた。

2-2) アリストロキア酸

アリストロキア酸はハーブや生薬に含まれ、腎障害、遺伝毒性及び発がん性が報告されている。アリストロキア酸の投与量は 0.3 mg/kg 及び 1 mg/kg とした。雄 *gpt delta* ラットに 28 日間反復経口投与し、最終投与日から 3 日後に剖検し、発がん標的臓器の腎臓及び非発がん標的の肝臓を用いて *gpt* アッセイを行った。実験には各群 5 匹の雄ラットを用いた。

2-3) 亜硫化ニッケル

亜硫化ニッケル(Ni_3S_2)は不溶性の金属化合物であり、ラットに吸入又は気管内投与すると肺がんを誘発することが報告されている。亜硫化ニッケルをパラフルオロカーボンに懸濁し、0、0.5、1.0 mg/匹の用量で、週 1 回の気管内投与を 4 回行った。標的臓器が肺であることから、気管内投与による負担を軽減するため、投与は週 1 回×4 週で行った。

初回投与後 28 日目及び 90 日目に肺を採取し、*gpt* アッセイを行った。実験には各群 5 匹の雄ラットを用いた。

3) 突然変異体頻度の測定 (*gpt* アッセイ)

F344 *gpt* delta ラットの臓器(肝臓、腎臓、肺)から RecoverEase DNA isolation kit (Stratagene)またはフェノール/クロロホルム抽出法を用いてゲノム DNA を採取した。Transpack packaging extract (Stratagene)を用いて *in vitro* パッケージング反応を行い、ゲノム DNA から λ EG10 ファージを回収した。回収したファージを大腸菌 YG6020 に感染させ、6-チオグアニンとクロラムフェニコールを含む培地上に播種し耐性となったコロニー(*gpt* 変異体候補コロニー)を検出した。候補コロニーを再度 6-チオグアニンとクロラムフェニコールを含む培地上にストリークして、*gpt* 変異体を確認した。回収したファージの一部は適宜希釈した後 YG6020 に感染させ、クロラムフェニコールのみを含む培地上に播種し、耐性コロニー数を計測して回収したレポーター遺伝子の総数を求めた。*gpt* 変異体数を回収したレポーター遺伝子数で除して *gpt* 突然変異体頻度を算出した。

B-2-4 バリデーシヨンの手順に関する研究

バリデーシヨンにおける被験物質の選択手順の確立を目的に、*In vitro* 細胞形質転換試験を一例として以下の検討を行った。

In vitro 細胞形質転換試験 (Cell transformation assay, CTA) には、SHE CTA や Balb/c 3T3 CAT など、OECD ガイドライン化に向けバリデーシヨン試験が先行している試験系がある。また、本 Bhas 42 CTA においては、96 ウェルプレート法に先立ち、食品薬品安全センター秦野研究所による 6 ウェルプレート法を用いた広範な検討ならびにバリデーシヨン試験が実施されている。被験物質の選択に関しては、これらの状況を鑑み、これまでの検討における使用状況や試験目的を含めた背景、発がん性、遺伝毒性、化学物質特性や化学物質クラス、及び予算を含めた入手可能性を考慮する必要がある。

1) 背景

SHE 及び Balb/c 3T3 CTA との比較/差別化の観点から、ECVAM における両 CTA のバリデーシヨン試験での使用物質を被験物質に含める。また、バリデーシヨン試験の各 phase における目的を考慮し、知見の得られている 6 ウェルプレート法での検討物質を優先的に選択する必要がある。

2) 発がん性

発がん性については、IARC 評価ならびに動物

における発がん性関連試験結果報告に基づいた。Bhas 42 CTA は、いわゆる遺伝毒性発がん物質を検出するイニシエーションアッセイと、発がんプロモーターとされる非遺伝毒性発がん関連物質を検出するプロモーターアッセイから成るため、被験物質を発がん物質 (C)、発がんプロモーター (TP) 及び非発がん物質 (NC) の 3 種に大別した。

3) 遺伝毒性

遺伝毒性は、原則的には *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験を組み合わせたバッテリー試験で評価する。そこで、標準的バッテリーの構成試験である Ames 試験、マウスリンフォーマ試験 (MLA)、*in vitro* 染色体異常試験及び *in vivo* 小核試験 (血液系細胞、骨髄染色体異常試験を含む) の結果を調査した。

4) 化学物質特性

In vitro 試験は、被験物質の物性によって結果が影響される場合がある。また、適切な溶媒選択も重要要素の 1 つである。また、遺伝毒性発がん物質は特にその化学物質クラスが重要である。そこで、化学物質の溶解性や揮発性ならびにクラスを HSDB 等を利用して調査した。

5) 入手可能性

科学的に妥当で被験物質として必要と考えられても、必要量の市販品の有無、予算的制約などから、被験物質として採用できないものがある。そこで、これらの観点から入手可能性を検討した。

B-3. 皮膚感作性試験 (h-CLAT 法)

1) VMT

VMTには日本からはh-CLATのlead labとして、花王と資生堂が参加した。他の2つの実験施設は、欧州共同研究機構 (JRCと略す) の *in vitro* methods部 (IVMと略す) 及びCROのBioassay社である。相場節也博士 (東北大) は、日本の代表としてVMTに参画した。

2) 本年度の進捗

2010年:

- 3月 IVM及びBioassay社に技術指導
- 4月 2施設による技術移転性確認開始
- 6月 JRCにおいて第5回運営会議開催
- 7月 SOPを修正し、確定版として提出
- 8月 プレバリデーシヨン (技術移転性の確認実験) 開始

2011年:

- 1月 第6回運営委員会

3) プレバリデーションの概要

本試験法の技術移転性を確認する目的で、コードされていない被験物質が2施設に配布された。SOPに従い実験が実施され、以下の条件が満たされた場合に、実験終了とされた。

感作性物質は全て、CD86、CD54とも陽性の判定（2/3以上陽性）

非感作性物質は全て、CD86、CD54とも陰性の判定（2/3以上陰性）

4) 原因追究

花王及び資生堂から専門家をIVM（10月18、19日）、Bioassay社（10月21、22日）に派遣して共に実験を行い、操作と過去の生データをチェックした。

（倫理面への配慮）

本研究は動物実験に替わる新しい *in vitro* 安全性試験法の開発を主とするものである。動物を用いる際は動物使用数や動物に与える苦痛は最小限に留める。臨床試験やヒト由来資料利用試験は行わない。

C. 研究結果

C-1. 内分泌かく乱化学物質スクリーニング法

C-1-1. HeLa 法

1) 進捗状況

昨年度までの研究により、バリデーション開始当初の参加5施設全ては、タスク1（アゴニスト試験）においてクラテリアを満たすデータの取得に成功したことから本試験系実施にあたって施設設備及び測定技術に問題がないと判断された。しかし、海外施設のうち ECVAM から委託により参加していた VITO は、バリデーション試験が当初予定より遅れたため契約期間の終了に伴い測定の継続が困難となり昨年度バリデーション試験から撤退した。また、KFDA は予備検討の結果から技術的な問題が示唆されたためリードラボである CERi とともに技術指導を実施し、タスク2実施可能な状況となったものの研究所移転に伴い測定の継続が困難である等の理由から試験実施が困難となりタスク2終了前にバリデーション試験から撤退した。一方、リードラボ及び国内参加施設のうち大塚製薬は、タスク3までの全ての測定において基準を満たすデータを取得して試験を終了した。残る国内参加施設の一つであるカネカは、予定していた全ての測定を一度終了したが、詳細解析の結果、タスク3の一部の結果においてリファレンスプレートが基準を満たしていないことから、再測定が必要であることが判明した。しかし、カネカが *in vitro* 事業から撤退したため追

加の測定は不可能となった。OECD GD34 に定めるバリデーション要件を満たすためには、さらに最低1施設における測定結果が必要であることから、LumiCell 法バリデーション参加施設であった株式会社日吉にバリデーションへの参加を打診したところ可能との回答を得た。そこで、CERi 技術者とともに現場施設の設備状況の査察及び現地トレーニングを実施後、バリデーションプロトコルに従い測定を開始した。

2) 日吉におけるタスク1測定結果

タスク1のうち、エッジ効果の検討試験結果からエッジ効果は認められなかったことから、96穴全てを用いるフォーマットで以降は測定した。1回目測定では基準を満たす結果が得られたものの、2、3回目測定では多くの指標で基準を逸脱する結果となった。2、3回目測定で用いた細胞は1回目で用いた同一ロットの継代であるが、E2存在下でのルシフェラーゼの発光値（PC_average）が非常に低いことから、新たなロットの細胞を用いて4、5回目測定を実施した。最終的に5回測定中3回で全基準を満たす結果を得たことから、本試験系実施に十分な測定技術を有すると判断された。

3) 日吉におけるタスク2測定結果

タスク2では、プロトコルに従い4つの参照化合物についてアンタゴニストアッセイを実施した。5回目の測定までは良い結果が出なかったが、6回目測定においては、再び新しいロットの細胞を用い、培地交換頻度を増やして継代し7回目測定を行った結果、1nM E2による発光値は10000以上で維持された。両測定結果は依然多くの基準を逸脱しているが、これは6回目測定に用いるまでに既に以前の継代法で数代培養した細胞であるためと考え、継代開始時から培地交換頻度を増やして継代した細胞を用いて8回目測定を実施した結果、8回目測定では Tamoxifen IC30 の1項目以外の基準を満たす結果を得た。新たな条件で9、10回目の測定を継続した結果、Tamoxifen に関しては基準を逸脱するものの、その程度は非常に小さく、また他の項目については基準を満たす再現性の高い結果を得ることに成功した。11、12回目測定では再び多くの項目で基準を逸脱したが、これは11回目測定前のトリプシン処理時間が規定より長かったことから、細胞がダメージを受けた為であると考えられた。再度、新しいロットの細胞を用いて13、14測定を行った結果、8~10回目測定と同様の結果が得られたことから、Tamoxifen 基準の逸脱は、むしろ試験施設間差によるものであると考えられた。よって、一部

の基準を逸脱するものの施設内再現性が高いとして、タスク 2 を終了した。

4) 日吉におけるタスク 2 の結果を反映したプロトコル及び基準値のアップデート

日吉におけるタスク 2 で採用した、8~10 及び 13、14 回目の 5 回の測定結果と、以前、国内 3 施設のデータと併せた基準値の再計算を実施した。再計算の結果から、合計 4 施設データをもとにした $\text{mean} \pm 2\text{SD}$ を新たな基準値として VMT に提案した。また、日吉での検討結果により明らかになった継代における培地交換頻度やトリプシン処理時間に関する注意点についてプロトコルへの追加記載によるアップデートについても VMT への提案を行った。

アップデートされたプロトコル及び基準値に関して VMT からの反対意見は出されなかったことから、これらに従い日吉におけるタスク 3 を実施することとなった。

C-1-2.Lumi-Cell 法

Lumi-Cell 法バリデーションに関しては、昨年度までに予定していた全てのフェーズの測定が全参加施設で終了した。データ解析の結果、アンタゴニストアッセイにおいて多くの化合物で高濃度域における非特異的なルシフェラーゼ活性低下が観察されたことに伴う最高濃度の低減化、アゴニスト・アンタゴニストアッセイにおける活性判定基準について、基準値をコントロール背景値の $\pm 3\text{SD}$ から $\pm 2000\text{RLU}$ に変更した。さらに従来は 1 点でも基準を超えれば陽性判定するとしていたのに対して、少なくとも 3 点以上からなる用量-反応曲線により判定するとの変更案が VMT より提案された。プロトコルの変更案について VMT 電話会議の結果、メンバーの合意が得られたことを受けて、現在、ICCVAM での peer review に向けて、事務局である NICEATM において背景評価文書の作成を進めている。

C-1-3.AR-EcoScreen 法

AR 転写活性化測定法については、本研究班開始以前に実施されたアゴニスト、アンタゴニスト測定の国内バリデーション結果をもとにしたバリデーション報告書及びガイドライン案を作成して peer review のため OECD に提案した。提出されたバリデーション報告書に関して、第 8 回 VMG-NA 会議における議論では、多施設測定における化合物数が、アゴニスト、アンタゴニスト各 5 化合物しか実施されていないため、peer review 段階で測定化合物の追加が要求される可能性が指摘された。

C-2. 遺伝毒性試験

C-2-1 *in vivo* コメットアッセイ

1) アトラス

昨年度までのプレバリデーションの過程でコメットアッセイの結果が安定しない原因が種々明らかになり、その一つがコメッ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)を作成した。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、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を完成した。画像の準備もでき、テキストとして発行する手筈を出版社と進めた。

2) バリデーション

2-1) 被験物質の配布

被験物質の配布については、本年度初めに配布した。一部物質の決定が遅れたこと及び連絡の不手際もあり、メルクとバイオリライアンスに各 1 物質が届いていないことが 2010 年末に判明した。これらは 2011 年 2 月中に送付した。

2-2) データの収集

データは 2010 年夏頃より順次回収され、VMT が開催された 2011 年 2 月初旬までに 40 物質中 36 物質の結果が集まった。被験物質の配送不手際で集まっていない 2 物質の他に、一施設の実験が遅れた 2 物質があったためであるが、後者は 3 月初旬に実験が終了した。よって、年度末までに 38 物質の結果が収集できたことになる。これらのデータを統計学者がスクリーニングし、データを確定した。いずれもほとんどの結果がデータ受入れ基準を満たした。結果は示していないが、溶媒との比もすべての結果が 2 倍以上であった。A4236 の陰性対照の %DNA in tail が基準の 1% より低かった。この理由は、電気泳動時間や泳動時の温度によらないと考察され、VMT は、同一施設でこの結果が繰り返されるようであれば、受入れ基準の変更も考慮すべきと考察した。その他のデータはすべて基準を満たしていた。

なお、データがすべて集まっていないこともあり、VMT は、被験物質名のコード開示は時期尚早と判断した。そこで、コード非公開の上、第 8 回 VMT で以下の議論がなされた。

陰性対照及び陽性対照が受入れ基準を満たしていたことから、コード化された被験物質の解析が、VMT にて詳細に実施された。一部で、参加施設と VMT の判定が割れた。その理由は、ヒストリカルコントロールの扱いによるものであ

た。VMT は統計処理を基本にしている。VMT でのヒストリカルデータに関する討論の結果、プロトコルに従った統計処理の実施が確認された。データを吟味した結果、A4205 及び A4217 は非適合と判断された。非適合の理由としては、最高投与量を溶解度限界で設定するなどしたため動物に毒性兆候がなく、陰性と判断できないとされたことによる。

一方、A4202、A4216、A4225 及び A4227 により胃の%DNA in tail は有意に減少していた。これは細胞毒性によるものかもしれないとの指摘があった。そこで、それぞれの施設に、すべての濃度で胃の病理学的な検査を依頼した。

さらに、より有用なデータベースを作成するため、VMT は、陰性結果のすべての被験物質の最高濃度における肝臓と胃の病理検査を要望した。

いくつかの施設で、胃においてヘッジホッグが陰性対照群も含めて高率で確認された。胃のヘッジホッグは、表面を注意深くスクラバーで除去すると減少するとの説明が実験者よりなされた。

パラメーターに関して、メディアンとテールモーメントを利用することにより、コメット試験の感度が高まるとの指摘があった。また、陰性対照値に対する fold-increase で判断する方が高感度との指摘もあったが、陰性対照値が低いときに誤った解釈を導く可能性があると考え、推奨されなかった。

2-3) 追試験

A4205 及び A4217 は動物に毒性兆候が現れる最高投与量までの再試験を依頼することになった。A4211 を実施した一施設と VMT の判定が食い違ったため、A4219 は肝臓において VMT が判定不能としたため追試験実施となった。以上 4 物質の追加実験が必要と判断された。これらの被験物質は、同一コードで 3 月末までに同施設に再送され、追加実験が実施される予定である。なお、VMT は、2011 年 5 月末までにはすべての実験が終了するよう要望した。

2-4) その他

VMT は、phase IV-1 及び IV-2 の報告書を各施設に 4 月末までに提出するよう依頼した。再試験の報告書も 8 月末までに提出が要望された。

VMT は、今秋までに全体のバリデーション報告書をまとめ、第三者評価の準備にかかると説明がなされた。また、これらの結果は、Mutation Research 特別号に投稿するとされ、小核試験の追加結果も含めた結果は各施設で投稿も可能と説明された。

C-2-2 *in vitro* コメットアッセイ

1) MMS

MMS 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。また、一部の機関で陰性対照が若干高かったが、定量的用量依存性に関しても試験機関間で極めて再現性が高かった。また、S9 の存在の有無はコメットの結果に影響を与えなかった。

RCG による細胞毒性の評価では、一部の機関の反応性が異なるため、100%細胞増殖抑制濃度を指標とした場合、試験機関間で最高濃度に 1000 倍もの大きな違いが生じた。一方、NDCN では、発現する濃度が機関間で安定しており、比較的同じ最高濃度が得られた。

2) 2AA

2AA は代謝活性化が必要な遺伝毒性物質で、S9 存在下でコメット陽性の報告がある。1 機関を除いて、S9 非存在下でのコメットの増加は顕著でなかった。S9 存在下では 4 機関でコメット陽性の結果が得られた。1 機関は細胞毒性のため、高用量での試験はできなかった。

MMS の時と同様に RCG による細胞毒性の評価では、一部の機関の反応性が異なるため、100%細胞増殖抑制濃度を指標とした場合、試験機関間で最高濃度に大きな違いが生じた。しかしながら、4 機関では S9 非存在下では 5000ug/mL の最高濃度まで細胞毒性は観察されなかった。一方、NDCN を用いた指標は、S9 存在下では 5 つの試験機関間で一致したが、S9 非存在下では本来細胞毒性はないはずなのに、NDCN の出現が不安定であるために、3 つの機関が低用量で 20%以上の NDCN を観察した。S9 存在下での 5 機関の設定最高用量はほぼ一致した。

最終的に陽性を示したのは 2 機関であり、内 1 機関は統計解析に必要な用量数が足りなかった。

3) 陰性対照、陽性対照

陰性対照のコメットは 1 機関で 10%程度の高い値を示したが、全てに機関で安定した値を示した。また、陽性対照では全ての 20%以上のコメットを観察した。一方、NDCN に関しては陰性対照では 5 機関で安定した値を示したが、陽性対照では 1 機関で全ての試験で 100%NDCN を示した。検体の調整ミスと考えられる。

4) 統計解析

陽性と判定された物質には表中のセルを網掛けを施し表示した。Phase III 研究について、直接法(-S9 処理)、化合物 A では実施 5 機関すべてで陽性と判定し、その陽性率は 100%であった。また、化合物 B では 2 機関のデータが陰性と判定され、陽性率は 60%となった。一方、代謝活性化法(+S9 処理)、化合物 A では 5 機関とも陽

性と判定され、その陽性率は 100%を示した。しかしながら、化合物 B については直接法同様、判定結果が分かれてしまい、陽性率は 60%にとどまった。

C-2-3 トランスジェニックアッセイ

1) 2、4-DAT 及び 2、6-DAT

雄 7 週齢の F344 *gpt delta* ラットに 2、4-DAT (10 mg/kg/day)、及び 2、6-DAT (60 mg/kg/day) を 28 日間連続投与した。溶媒は注射用水を用いた。最終投与後 3 日目に組織を採取し、肝臓から DNA を抽出して *gpt* アッセイを行った。溶媒対照群の *gpt* 点突然変異体頻度は $1.80 \pm 0.76 \times 10^{-6}$ であった。これに対して 2、4-DAT 投与群の突然変異体頻度は 10 mg/kg 投与群で $6.00 \pm 1.09 \times 10^{-6}$ 、30 mg/kg 投与群で $15.74 \pm 4.28 \times 10^{-6}$ であり、用量依存的に変異体頻度の増加が認められた。一方、60 mg/kg 2、6-DAT 投与群の突然変異体頻度は $3.30 \pm 1.52 \times 10^{-6}$ であり、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加は見られなかった。ENU 陽性対照肝臓サンプルの突然変異体頻度は $79.4 \pm 16.2 \times 10^{-6}$ であり、対照群と比較して顕著な増加が認められた。

2) アリストロキア酸

雄 7 週齢の F344 *gpt delta* ラットにアリストロキア酸 (0.3 及び 1.0 mg/kg/day) を 28 日間連続投与した。溶媒は生理食塩水を用いた。最終投与後 3 日目に組織を採取し、腎臓と肝臓から DNA を抽出して *gpt* アッセイを行った。溶媒対照群の腎臓における *gpt* 点突然変異体頻度は $1.69 \pm 1.07 \times 10^{-6}$ であった。これに対してアリストロキア酸投与群の突然変異体頻度は 0.3 mg/kg 投与群で $4.82 \pm 1.36 \times 10^{-6}$ 、1.0 mg/kg 投与群で $9.14 \pm 3.60 \times 10^{-6}$ であり、用量依存的に変異体頻度の増加が認められた。また、肝臓における *gpt* 点突然変異体頻度は溶媒対照群で $1.92 \pm 1.02 \times 10^{-6}$ であった。アリストロキア酸投与群の突然変異体頻度は 0.3 mg/kg 投与群で $12.28 \pm 8.05 \times 10^{-6}$ 、1.0 mg/kg 投与群で $15.29 \pm 6.25 \times 10^{-6}$ であり、変異体頻度の有意な増加が認められた。実験には各群 5 匹の雄ラットを用いた。ENU 陽性対照肝臓サンプルの突然変異体頻度は $110.1 \pm 26.0 \times 10^{-6}$ であり、対照群と比較して顕著な増加が認められた。

3) 亜硫化ニッケル

亜硫化ニッケルをパラフルオロカーボンに懸濁し、0、0.5、1.0 mg/匹の用量で週 1 回の気管内投与を 4 回行った。初回投与後 28 日目及び 90 日目に肺を採取した。初回投与後 28 日目の全投与群において、*gpt* 点突然変異体頻度は溶媒対照群と比較して有意な増加は認められなかった。引き続き、

90 日群の分析を行う。

C-2-4 バリデーシオンの手順に関する研究

96 ウェルプレート法による Bhas 42 CTA のバリデーシオンの目的は、

- 長期発がん性試験の代替法としての利用性の評価
- SHE CTA あるいは Balb/c 3T3 CTA と比較した有意性の評価
- 非遺伝毒性発がん物質の検出性の評価
- 6 ウェルプレート法と比較した利点及び同等以上の検出力の検証

にある。

そのために、まず参加機関に対する技術移転と phase-I バリデーシオンのためのプロトコル作成のためにプレバリデーションを実施した。ここでは、既知の陽性物質 (発がんイニシエーターあるいは発がんプロモーター) として以下の 2 物質を選択した：

- ✓ 3-Methylcholoranthrene (3MC)
- ✓ 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)

次に、試験施設間の再現性を検証するための Phase-I バリデーションを実施した。ここでは、SHE CTA 及び Balb/c 3T3 CTA のバリデーションにおいて ECVAM が選択した被験物質 (前者では Benz[a]pyrene (B[a]P)、3MC、o-Toluidine HCL、2、4-Diaminotoluene、Phthalic acid、Anthracene の 6 物質、後者では B[a]P、3MC、o-Toluidine HCL、2-Acetylaminofluorene (2AAF)、Anthracene、Phenanthrene の 6 物質)、6-well プレート法の国際共同研究 (バリデーション) で用いた被験物質 (N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)、B[a]P、Pyrene、Benz[a]anthracene、Anthracene、Mezerein、Lithocholic acid、Methapyrilene HCL、Phorbol の 9 物質)、プレバリデーションで用いた被験物質 (3MC、TPA の 2 物質)、ならびに非発がん物質として D-Mannitol の中から、以下の 10 物質を選択した (<> 中の物質は最終物質からは除外されたもの)：

- イニシエーター：3 物質 (最終 2 物質)
 - ✓ 3MC
 - ✓ B[a]P
 - ✓ <MNNG>
- プロモーター：4 物質 (最終 3 物質)
 - ✓ 2AAF
 - ✓ TPA
 - ✓ Toluidine HCL
 - ✓ <Lithocholic acid>
- 非発がん物質：3 物質 (最終 2 物質)
 - ✓ Anthracene
 - ✓ Phenanthrene
 - ✓ <D-Mannitol>

しかしながら、予算的制約から3物質の削減が必要となり、ECVAM 検討物質に含まれていないこと、加えて Lithocholic acid については検出濃度域が狭く本バリデーションの目的には合致しにくいことから、MNNG、Lithocholic acid 及び D-Mannitol を除いた（上記一覧の<>表示物質）。従って、最終的に Phase-I バリデーション試験では7物質を用いた。

前記2つのバリデーションの結果をふまえ、phase-II バリデーションを実施した。ここでは施設間再現性、6ウェルプレート法との同等性、ならびに非遺伝毒性発がん物質（ここでは主に Ames 陰性発がん物質あるいは発がんプロモーターの意）検出性、ならびに非発がん物質の陰性特異性を評価するために、背景、発がん性、遺伝毒性、化学物質特性や化学物質クラスを考慮した。すなわち、

- Bhas 42 CTA 6ウェルプレート法での評価済み物質から選択
- Phase-I バリデーション試験での未検討物質を主体に選択
- Ames 陰性無機金属発がん物質を含む
- 非高揮発性物質を選択
- 発がんプロモーターを含む
- 非発がん物質を追加
- 遺伝毒性試験の知見があるものを主体に選択

を条件とし、以下の16物質を選択した：

- 発がん物質：5物質
 - ✓ MNNG
 - ✓ B[a]P
 - ✓ Dibenz[a, h]anthracene
 - ✓ Sodium arsenite
 - ✓ Cadmium chloride
- 発がんプロモーター：3物質
 - ✓ Methapyrilene HCL
 - ✓ Mezerein
 - ✓ Lithocholic acid
- 非発がん物質：8物質
 - ✓ Pyrene
 - ✓ epsilon-Caprolactam
 - ✓ Ampicillin sodium salt
 - ✓ L-Ascorbic acid
 - ✓ D-Mannitol
 - ✓ Caffeine
 - ✓ Phorbol
 - ✓ Eugenol

陽性対照物質：

- イニシエーターの陽性対照物質
 - ✓ 3MC
- プロモーターの陽性対照物質
 - ✓ TPA

これらバリデーションで用いた物質は、いずれも同一ロットを必要量入手可能であった。

C-3. 皮膚感作性試験 h-CLAT 法

1) プレバリデーションの結果

実験の結果、IVMにおいて、乳酸が3回のうち2回で陽性となった。また、Bioassay社においても、乳酸において1回は濃度依存性がなく2濃度で陽性となった。

乳酸は、過去7施設での厚生労働科学研究の評価で陰性と評価されているばかりでなく、他のh-CLAT導入機関でも陰性になるという報告があるため、今回の問題は単に乳酸の1品の問題ではない本質的問題と思われた。

以上の結果から、プレバリデーション成功のために、時間をかけてでも徹底した検討が必要と判断した。

2) 原因追究

・ IVM

現地での調査の結果、操作上の問題はないことを確認した。しかし、派遣者が同施設で行った実験でも、乳酸の陽性反応を確認した。使用した細胞には問題ないことを、細胞を輸入して確認済みであったことから、FACSの機種（資生堂や花王などはベクトンディッキンソン社製 FACS Calibur (cell analyzer) を使用。IVMはベクトンディッキンソン社製 FACS Aria (cell sorter) を使用)の違いによるものでないかと考察した。すなわち、経験したことのない最新機種による感度やプログラムの違いではないかと考えた。

そこで、両機種を有している日本ベクトンディッキンソン社に、乳酸を処理した細胞を持ち込み、そこで抗体処理を行い、機種による違いを確認した。同じサンプルでも、Caliburでは陰性、Ariaでは陽性となった。このことから、Aria特有の問題ではないかと推察した。日本ベクトンディッキンソン社の専門家によると、Ariaは細胞を仕分けるために特化しているため、低voltageの領域の感度を高くしており、その領域の結果が不安定になっている可能性があるとのことであった。専門家のアドバイスにより、ノイズ領域を避けるような設定を変更すると、乳酸は陰性となった。

また、同時に測ったDNCB（陽性物質）は新たな設定でも陽性のままであった。

そこで、IVMでも新たな設定で乳酸を再評価してもらった。その結果、乳酸は陰性となった（n=3）。他の標準物質4品も再評価してもらったところ、陽性物質は陽性、陰性物質は陰性となり、問題は解決したと判断された。

SOPには、標準物質が正しく評価できるよう、FL-1のvoltageを確認・設定するような追加記

載を行った。

・Bioassay社

現地での調査の結果、操作には特に問題なく、共に行った試験では乳酸が陰性となった。乳酸が陽性となった当時の生データを現地で確認したところ、通常見られない粒子をそのまま含めて測定していた。機械の流路の汚れに気がつかず測定したため、コントロールの値が低くなり、乳酸が陽性になった可能性がある。本点に気をつけて再評価したところ、乳酸は3回とも陰性となった。

メンテナンスの徹底をSOPに明記した。

3) 報告書の提出

IVM: 使用している機種の問題と考えられ、設定を変更したところ乳酸は陰性となり、技術移転は終了したと考えた。

Bioassay社: 不自然な値が認められたが、流路の汚れを見逃していたためと考えられ、改善して再評価したところ、乳酸は陰性となり、技術移転は終了したと考えた。

トレーニング終了報告書及び修正SOPを作成し、VMTに提出した。

D. 考察

本年度に中心的に実施したHeLa法、*in vivo* コメットアッセイ及びh-CLAT法の国際的なバリデーションを順調に遂行できた。結果として、*in vivo*コメットアッセイについては、予定通りの結果を集めることができた。HeLa法については参加施設を変更し、来年度早々の国際的バリデーション終了の目途が立った。h-CLAT法について、技術移転性を目的としたバリデーションを実施し、技術移転を終了した。今年度の目標は、ほぼ遂行できたと考えている。

一方、*in vitro*コメットアッセイについては、これまでのバリデーションでプロトコル改良の余地が明らかになったことから、追加実験を実施した。しかし、プロトコルの確定にはつながらず、本方法については、本バリデーションに至るまでにはまだ時間が必要であるとVMTで結論された。

バリデーションの手順に関する研究では、昨年度に引き続き、被験物質の選択及びコード開示のタイミングについて議論した。本問題については、それぞれのVMTでも、コンセンサスを取ることに苦労した。

これらの試験法確立の諸問題については、全ての試験法に共通の問題点であることから、議論を重ねて国際的に解決していかねばならない。現状では、問題提起や対応などの点で、実際のバリデーション経験の多い日本の貢献度は高い

と考えている。これらの中で特に、本研究班で扱う試験法の開発については、日本がリーダーシップを取ってコンセンサスを得、試験法を公定化していきたい。

E. 結論

内分泌かく乱化学物質スクリーニング法として、①HeLa法、②Lumi-Cell法、③AR-EcoScreen法を、遺伝毒性試験として、④*in vivo* コメットアッセイ、⑤*in vitro* コメットアッセイ、*in vitro*皮膚感作性試験として、⑥h-CLAT法の国際バリデーションを実施した。また、⑦トランスジェニックアッセイのプロトコル確立のための調査研究を行った。これらの中で、今年度中心的に進めたHeLa法、*in vivo* コメットアッセイ及びh-CLAT法の国際的なバリデーションをほぼ順調に遂行できた。

これらの試験法からの情報に加え、バリデーションの手順に関する研究、進行中のOECDガイドラインやECVAMのバリデーションへの参画を通して、プロトコルの確立や被験物質の選定に関する国際的な議論を重ね、公的な試験法を国際的に確立するために貢献した。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

- 1) Hasegawa R, Hirata-Koizumi M, Dourson ML, Parker A, Sweeney LM, Nishikawa A, Yoshida M, Ono A, Hirose A.: Proposal of new uncertainty factor application to derive tolerable daily intake." Regul Toxicol Pharmacol. 58(2):237-42.(2010)
- 2) Kojima, H.: Commentary to the Discussion on Topics 3, "In Vitro Test Approaches with Better Predictivity" at the 5th International Workshop on Genotoxicity Testing, Genes and Environment, 32(2), 40-42 (2010)
- 3) 小島肇夫: 総合評価の方法、有用性化粧品の処方とその活用、鈴木正人監修、シーエムシー出版、東京、pp.147-151 (2010)
- 4) Kojima, H., Takeyoshi M, Sozu, T, Awogi, T, Arima, K, Idehara, K, Ikarashi, Y, Kanazawa, Y, Maki, E, Omori, T, Yuasa, A, Yoshimura, I.: Inter-laboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation. J Appl Toxicol. 31(1):63-74 (2010)
- 5) Yamamoto, N, Hirano, K, Kojima, H, Sumitomo, M, Yamashita, H, Ayaki, M, Taniguchi, K, Tanikawa, A, Horiguchi, M.: Cultured human corneal epithelial stem/progenitor cells derived from the corneal limbus. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 46(9):774-80 (2010)
- 6) Kojima, H.: 3Rs Activities in Japan, AVLR8 Alternative Testing strategies, Progress report 2010, 266 (2010)

- 7) 小島肇夫：バイロジェン試験、大阪医薬品協会 会報第 745 号 31-63 (2011)
- 8) 小島肇夫：動物実験代替法の現状と展望、創薬研究のストラテジー、pp.41-48、株式会社金芳堂、京都 (2011)
- 9) 小島肇夫：動物実験の 3R における国内外の動向、ドージンニュース No.138、1-9 (2011)
- 10) 柘植英哉、森充生、大庭澄明、大内正、寺田三郎、五島隆志、田邊豊重、山影康次、田中憲穂、渡辺美香、畔上二郎、大向英夫、小島肇：平成 21 年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告、輸液用ゴム栓試験法の見直し(第 3 報)－細胞毒性試験法の検討－、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 42 (3) 258-271 (2011)
- 11) Kimura, A., Torigoe, N., Miyata, A., and Honma, M.: Validation of a simple in vitro comet assay method using CHL cells. *Genes and Environment*, 32, 63-65 (2010)
- 12) V. Thybaud, J.T. Macgregor, L. Müller, R. Crebelli, K. Dearfield, G. Douglas, P.B. Farmer, E. Gocke, M. Hayashi, D.P. Lovell, W.K. Lutz, D. Marzin, M. Moore, T. Nohmi, D.H. Phillips, J. Van Benthem.: Strategies in case of positive in vivo results in genotoxicity testing. *Mutat. Res.*, In press.
- 13) K. Masumura, Y. Sakamoto, M. Ikeda, Y. Asami, T. Tsukamoto, H. Ikehata, Y. Kuroiwa, T. Umemura, A. Nishikawa, M. Tatematsu, T. Ono, T. Nohmi.: Antigenotoxic effects of p53 on spontaneous and UVB-induced deletions in the epidermis of gpt delta transgenic mice. *Environ. Mol. Mutagen.*, In press.
- 14) T. Okamura, Y. Ishii, Y. Suzuki, T. Inoue, M. Tasaki, Y. Kodama, T. Nohmi, K. Mitsumori, T. Umemura, A. Nishikawa: Effects of co-treatment of dextran sulfate sodium and MeIQx on genotoxicity and possible carcinogenicity in the colon of p53-deficient mice. *J. Toxicol. Sci.*, 35, 731-741 (2010)
- 15) T. Okamura, Y. Ishii, Y. Suzuki, T. Inoue, M. Tasaki, Y. Kodama, T. Nohmi, K. Mitsumori, T. Umemura, A. Nishikawa: Enhancing effects of carbon tetrachloride on in vivo mutagenicity in the liver of mice fed 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx). *J. Toxicol. Sci.*, 35, 709-720 (2010)
- 16) M. Tasaki, T. Umemura, Y. Suzuki, D. Hibi, T. Inoue, T. Okamura, Y. Ishii, S. Maruyama, T. Nohmi, A. Nishikawa: Oxidative DNA damage and reporter gene mutation in the livers of gpt delta rats given non-genotoxic hepatocarcinogens with cytochrome P450-inducible potency. *Cancer Sci.*, 101, 2525-2530 (2010)
- 17) A. Sheh, C.W. Lee, K. Masumura, B.H. Rickman, T. Nohmi, G.N. Wogan, J.G. Fox, D.B. Schauer: Mutagenic potency of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa of mice is determined by sex and duration of infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 107, 15217-15222 (2000)
- 18) N. Okudaira, Y. Uehara, K. Fujikawa, N. Kagawa, A. Ootsuyama, T. Norimura, K. Saeki, T. Nohmi, K. Masumura, T. Matsumoto, Y. Oghiso, K. Tanaka, K. Ichinohe, S. Nakamura, S. Tanaka, T. Ono: Radiation dose-rate effect on mutation induction in spleen and liver of gpt delta mice. *Radiat. Res.*, 173, 138-147 (2010)
- 19) N. Toyoda-Hokaiwado, T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa, T. Nohmi: Integration of in vivo genotoxicity and short-term carcinogenicity assays using F344 gpt delta transgenic rats: in vivo mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene structural isomers, *Toxicol. Sci.*, 114, 71-78 (2010)
- 20) Takeshi Morita, James T. MacGregor and Makoto Hayashi: Micronucleus assays in rodent tissues other than bone marrow, *Mutagenesis*, 26, 223-230, 2011.
- 21) Sheila Galloway, Elisabeth Lorge, Marilyn J. Aardema, David Eastmond, Mick Fellows, Bob Heflich, David Kirkland, Dan D. Levy, Anthony Lynch, Daniel Marzin, Takeshi Morita, Maik Schuler, Günter Speit: Workshop summary: Top concentration for in vitro mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for in vitro cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Res.* (in press)
- 22) Takeshi Morita and Kaoru Morikawa: Expert Review for GHS Classification of Chemicals on Health Effects, *Industrial Health* (submitted)
- 23) 城内 博、宮川宗之、森田 健:英和対訳 最新 OECD 毒性試験ガイドライン、化学工業日報社、東京 (2010)

F-2. 学会発表

- 1) 小野 敦: in vitro 内分泌かく乱試験法の OECD ガイドライン受け入れ (パネルディスカッション - In vitro トキシコロジー試験法の行政的な受け入れ) 第 37 回 日本トキシコロジー学会学術年会 (沖縄) 2010.6
- 2) A. Ono, A. Hirose, M. Hirata-Koizumi, K. Matsuno, M. Kawabata, K. Yajima, T. Matsuyama, E. Kamata, M. Ema: Gender-related differences of the hepatic enzyme activities in relation to the toxicity of benzotriazole ultraviolet absorber in rats, XII International congress of toxicology (Barcelona, Spain) 2010.7
- 3) F.Deal, W.Casey, P.Ceger, D.Allen, C.Yang, M.Nakamura, H.Kojima, A.Ono, H.Yoon, S.Han, W.Stokes: International Validation Study of an

- in vitro Cell Proliferation Test Method for Screening Potential Estrogenic Agonists and Antagonists in MCF - 7 cell, 50th Annual Meeting of Society of Toxicology (Washington DC, USA) 2011.3
- 4) 山本直樹、谷川篤宏、内藤紘策、綾木雅彦、小島 肇、平野耕治、堀口正之：マウス水晶体上皮細胞の不死化細胞の作出、第114回日本眼科学会総会（2010.4）
 - 5) 小島 肇：ヒト iPS 細胞を用いた新規 *in vitro* 毒性評価系の構築、日本製薬工業協会セミナー（2010.5）
 - 6) 小島 肇：パネルディスカッション 新しい感作性及び局所刺激性（皮膚・眼）試験法の OECD テストガイドライン、日本トキシコロジー学会学術年会、沖縄（2010.6）
 - 7) 小島 肇：医薬部外品、化粧品の Regulatory Science の展望、第11回光老化研究会、東京慈恵会医科大学（2010.7）
 - 8) Kojima.H.： Global impact of 3Rs on regulatory process: sharing experiences and future trends. XII International Congress of Toxicology, Barcelona, Spain (2010.7)
 - 9) Kojima.H., Inoue, T. and Ohno.Y.： JaCVAM's role of new alternatives to animal testing and international harmonization. XII International Congress of Toxicology, Barcelona, Spain (2010.7)
 - 10) 小島 肇：昨今の国際バリデーション研究の進捗、皮膚基礎研究クラスターフォーラム 第5回教育セミナー（2010.8）
 - 11) 小島 肇：皮膚感作性試験のインビトロ代替法の現状、日本免疫毒性学会学術大会、独立行政法人国立環境研究所 大山記念ホール（2010.9）
 - 12) Kojima, H., Arai, S. and Hojyo M.： Importance of each human model and the optimal protocol for regulatory use of skin irritation assay. The 23rd Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, Hokkaido University, Sapporo, Japan (2010.9)
 - 13) 小島 肇：パイロジェン試験、大阪医薬品協会技術研究委員会、大阪（2010.10）
 - 14) 小島 肇、北條麻紀：3次元培養表皮モデルを用いるコメットアッセイの条件検討 第3報、日本環境変異原学会第39回大会、つくば(2010.11)
 - 15) 宇野芳文、小島 肇：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（第2報）、日本環境変異原学会第39回大会、つくば（2010.11）
 - 16) 小島 肇、中村 牧、山口能宏、泉 瑠名、鈴木民恵、萩原沙織、篠田伸介、加藤雅一：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、日本動物実験代替法学会第23回大会、東京（2010.12）
 - 17) 小島 肇、桑原裕史、林卓巳、坂口眞由美、豊田明美、後藤 悠、中村恒彰、渡辺真一、阿彦恭子、大森 崇、音泉 卓、寒水孝)、森本隆史、林 和彦、坂口 斉：眼刺激性試験代替法 (STE 試験) バリデーション研究 第3報、日本動物実験代替法学会第23回大会、東京（2010.12）
 - 18) 小島 肇、北條麻紀：3次元培養表皮モデルを用いるコメットアッセイの条件検討日本動物実験代替法学会第23回大会、東京（2010.12）
 - 19) 小島 肇：S5 化学物質の有害性評価に関する代替試験法開発—発癌性、発生毒性、免疫毒性—今後の展望、日本動物実験代替法学会第23回大会、東京（2010.12）
 - 20) 小島 肇：培養皮膚モデルを用いた皮膚刺激性評価の現状、第10回ヒューマンサイエンス研究資源バンクセミナー、大阪（2011.1）
 - 21) 小島 肇：動物実験代替法における国際動向、日本動物実験代替法学会・JaCVAM 合同ワークショップ 動物実験の3Rにおける国際動向、東京(2011.2)
 - 22) 小島 肇：皮膚細胞研究の応用とその可能性、日本化粧品技術者会大阪支部 第15回勉強会 ワークショップ、大阪（2011.2）
 - 23) Kojima, H.: The Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM): Recent ICATM contributions and Future Plans, Information Session: The International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM): Translating Science to Provide Improved Public Health Safety Assessment Tools, 50th Annual SOT meeting, Washington D.C.(2011.3)
 - 24) Kojima, H. and Hojyo, M.: Optimal conditions for performance of the comet assay using a three-dimensional human epidermal model, 50th Annual SOT meeting, Washington D.C.(2011.3)
 - 25) W Casey, P Ceger, F Deal, D Allen, G Clark, P Pazos, E Grignard, J de Lange, S Bremer, M Nakamura, H Kojima, A Ono, W Stokes.: Final Results of an International Validation Study of an *In Vitro* ER TA Test Method in BG-1 cells, 50th Annual SOT meeting, Washington D.C. (2011.3)
 - 26) J Kulpa-Eddy, R McFarland, R Isbrucker, M Halder, H Kojima, B Jones, NW Johnson, D Allen, E Lipscomb, S Morefield, W Casey, W Stokes: International Workshop on Alternative Methods to Reduce, Refine, and Replace the Use of Animals in Vaccine Potency and Safety

- Testing, 50th Annual SOT meeting, Washington D.C. (2011.3)
- 27) 小島 肇: 日本における動物実験代替法の現状、シンポジウム S2H27 アジアにおける動物実験代替法の展開、第 84 回日本薬理学会年会、パシフィコ横浜 (2011.3)
- 28) 小島 肇: 動物実験代替法の行政的受け入れと国際協調、シンポジウム S30 レギュラトリーサイエンスは社会にどう役立っているかー薬学系人材の役割と活躍の場を知るー、日本薬学会第 131 回年会、静岡 (2011.3)
- 29) 本間正充: *In vitro* 遺伝毒性試験の問題点と将来: 第 17 回 HAB 研究機構学術年会 (2010. 5)
- 30) 本間 正充: 遺伝毒性試験とその科学的リレバンス: 第 11 回日本トキシコロジー学会生涯教育講演会 (2010.6)
- 31) 本間 正充: リスク評価における *in vitro* 遺伝毒性試験の役割: 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2010.6)
- 32) Honma, M.: Novel approach for *in vitro* genotoxicity assessment: Novel Approaches in preclinical safety evaluation: Development and progress (2010.9)
- 33) Honma, M.: JaCVAM *in vitro* Comet assay international collaborative study (JaCVAM *in vitro*: International Symposium "Recent Advance in Comet Assay"), (2010.11)
- 34) Saitoh Y, Harata Y, Mizuhashi F, Nakajima M, Miwa N.: Biological safety of neutral-pH hydrogen-enriched electrolyzed water upon mutagenicity, genotoxicity and subchronic oral toxicity. *Toxicol and Industrial Health* Vol.26(4): 203-216 (2010)
- 35) 田中仁、益森勝志、中嶋圓、林真: Comet Assay Atlas 第 39 回 日本環境変異原学会 (2010.11)
- 36) A. Uchimura, Y. Hidaka, K. Masumura, T. Nohmi, I. Miura, S. Wakana, T. Yagi: Effects of a high spontaneous mutation rate in mammalian germline by using mutator mice modified replicative DNA polymerase α 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸 (2010.12)
- 37) A. Katafuchi, A. Sassa, N. Niimi, P. Gruz, M. Yamada, M. Shimizu, H. Fujimoto, C. Masutani, F. Hanaoka, T. Ohta, T. Nohmi: Y-family DNA polymerases and nucleotide pool damage, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸
- 38) 佐藤陽美, 阪下由香利, 増村健一, 古山昭子, 平野靖史郎, 能美健彦, 青木康展: ディーゼルナノ粒子長期曝露により gpt delta マウス肺・肝臓に誘導される突然変異, 日本環境変異原学会第 39 回大会, つくば (2010.11)
- 39) 蓮子雅之, 増村健一, 豊田尚美, 猪股智夫, 能美健彦: gpt delta マウスを用いたシクロフォスファミド曝露による肝臓と精巣の遺伝子突然変異の検討, 日本環境変異原学会第 39 回大会, つくば (2010.11)
- 40) 大杉直弘, 増村健一, 豊田尚美, 猪股智夫, 能美健彦: gpt delta トランスジェニックマウスを用いた加齢による自然突然変異の蓄積の検討, 日本環境変異原学会第 39 回大会, つくば (2010.11)
- 41) 本山茂記, 竹入章, 和田直子, 寺社下浩一, 三島雅之, 新見直子, ピーター・グルーズ, 増村健一, 山田雅巳, 能美健彦: DNA polymerase κ 遺伝子ノックイン gpt delta マウスにおいて mitomycin C によって骨髄に誘発された変異の解析, 日本環境変異原学会第 39 回大会, つくば (2010.11)
- 42) 増村健一, 豊田尚美, 蓮子雅之, 村松美那, 新見直子, ピーター・グルーズ, 竹入章, 寺社下浩一, 三島雅之, 能美健彦: DNA ポリメラーゼ κ ノックインマウスにおける自然突然変異の解析, 日本環境変異原学会第 39 回大会, つくば (2010.11)
- 43) 内村有邦, 日高裕子, 増村健一, 能美健彦, 三浦郁生, 若菜茂晴, 八木健: DNA ポリメラーゼ δ 変異マウスを利用した高い生殖系列突然変異率が後世代に及ぼす影響の解析, 日本環境変異原学会第 39 回大会, つくば (2010.11)
- 44) K. Masumura, N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Muramatsu, M. Takamune, M. Yamada, T. Tanaka, T. Nohmi: Chemopreventive effects of silymarin on 1,2-dimethylhydrazine-induced mutagenesis and carcinogenesis in the colon of gpt delta transgenic rats, The Society of Toxicology 50th Annual Meeting, USA (2011.3)
- 45) T. Nohmi, N. Toyoda-Hokaiwado, T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa: Genotoxicity and pre-neoplastic lesions induced by 2,4-diaminotoluene in the liver of F344 gpt delta transgenic rats, The Society of Toxicology 50th Annual Meeting, USA (2011.3)
- 46) N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Muramatsu, K. Masumura, M. Takamune, M. Yamada, T. Ohta, T. Tanaka, T. Nohmi: Chemopreventive effects of silymarin, a plant constituent, against the carcinogenicity of dimethylhydrazine plus dextran sodium sulfate in the colon of gpt delta transgenic rats, International Conference on Mechanisms of Antimutagens and Anticarcinogens, Brazil (2010.9)
- 47) 大野泰雄: 代謝物の安全性評価と FDA 及び ICH の指針について. 第 37 回日本トキシコロ

ジー学会シンポジウム(2010. 6. 17)

- 48) 大野泰雄：「動物の愛護及び管理に関する法律」（動愛法）の改定に向けて。日本動物実験代替法学会 第23回大会シンポジウムのオーガナイズ(2010. 12. 5)
- 49) 大野泰雄：薬理学における動物実験代替法研究の重要性、日本薬理学会(2010. 3. 23 誌上発表)
- 50) 森田 健、森川 馨：GHS分類における専門家判断の適用、第37回日本トキシコロジー学会、沖縄(2010)
- 51) 森田 健、本間正充、福島久美子、森川馨：In vitro 染色体異常試験における1 mMの上限濃度は一般化学物質においても許容できるか？第39回日本環境変異原学会、つ

くば(2010)

- 52) 森田 健、本間正充、森川 馨：一般化学物質における哺乳類培養細胞を用いる遺伝毒性試験の最高濃度、日本薬学会第131年会、静岡(2011)

G. 知的所有権の取得状況

G-1. 特許取得
特になし

G-2. 実用新案登録
特になし

G-3. その他
特になし

内分泌かく乱化学物質試験法のバリデーションおよび 検証のための化合物測定の実施

研究分担者 小野 敦 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室

研究要旨

本研究では、OECD-EDTA で提案された化学物質の内分泌かく乱性評価のコンセプトチュアルフレームワークのレベル2に示されている *in vitro* スクリーニング試験法のうち、行政的有用性が期待される方法について、欧米の研究機関と協力し、多施設国際バリデーションを実施し、その信頼性・再現性の検証を行い得られた結果をもとに OECD にガイドライン化の提案を行うことを目的とした研究を実施した。我が国で開発された HeLa9903 細胞を用いたエストロゲン受容体 α (ER α) 転写活性化試験法 (HeLa 法) では、海外 2 施設及び国内 1 施設が、それぞれの施設の状況から試験の継続が困難になったことから、新たに国内 1 施設におけるバリデーション測定を開始し、これまでに Task2 を終了し、得られた結果を反映させたプロトコール及びクライテリア値のアップデートを実施した。米国で開発された Lumi-cell 法については、バリデーション測定が終了し、得られた結果をもとにプロトコールの変更等を実施し、バリデーション結果を基にした ICCVAM ガイドライン案の public peer review が実施された。さらに、我が国で開発されたアンドロゲン受容体転写活性化法 (AR EcoScreen 法) について、これまでに得られている国内バリデーション結果をもとにバリデーションレポート及びガイドライン案を作成し、OECD に peer review 提案を行った。

A. 研究目的

本研究では、化学物質による内分泌かく乱性評価のための国際的な枠組みとして OECD 内分泌かく乱物質評価タスクフォース (EDTA : Task Force on Endocrine Disruptors Testing and Assessment) により示された 5 段階からなるコンセプトチュアルフレームワークのレベル2に分類される *in vitro* 試験法である転写活性化試験法のうち、行政的有用性が期待される

試験法として、我が国で開発された HeLa 細胞をベースにしたエストロゲン受容体 α (ER α) に対する試験法 (HeLa 法) 及び米国で開発された Lumi-cell 法、さらに我が国で開発されたアンドロゲン受容体に対する転写活性化試験法について欧米の研究機関と協力して国際バリデーションを実施し、得られた結果から信頼性や再現性が確認された手法について、最終的に OECD ガイドラインとして提案するこ

とを目的としている。

B. 研究方法

1、HeLa9903 細胞を用いたエストロゲン受容体(ER)アンタゴニスト測定法バリデーション試験：HeLa 法は、ヒト由来の細胞(HeLa cell)に、ヒトエストロゲン受容体 ER α 遺伝子およびエストロゲン応答配列と繋いだルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして組み込んだ安定形質株 (HeLa-9903) を用いたレポーター遺伝子アッセイ法である。本法は、厚生労働省および経済産業省における研究により我が国において開発が進められてきており、アゴニスト活性評価法については、国内における多施設バリデーション結果を基に、2009 年に OECD ガイドライン化された (OECD TG455)。本研究では、HeLa-9903 細胞を用いたアンタゴニスト活性評価法のガイドライン化に向けたバリデーション試験を進めている。バリデーション試験の実施にあたっては、国立医薬品食品衛生研究所 JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) を事務局として JaCVAM、ECVAM、EFSA 及び米国 EPA からの専門家、さらには生物統計専門家として寒水孝司博士(京都大学)を含むメンバーからなる Study Management Team (SMT) を組織して、実験の進行に関する情報の収集、解析及び状況に応じた測定施設における試験実施管理を行った。アンタゴニスト試験プロトコル及びバリデーション試験デザインは、本試験を開発した化学物質評価研究機構において作成された案をもとに SMT の承認を得て最終化された。バリデーション試験は、本試験法を開発した化学物質評価研究機構をリードラボとして、その他、海外 2 施設 (VITO (ベルギー)、KFDA (韓国)) 及び国内 2 施設 (大塚製薬、カネカ) の計 5 施設により 3 タスクか

らなるバリデーション測定を開始した。また、本年度から新たに株式会社 日吉がバリデーション施設として参加した。本研究班では、バリデーション試験全体の管理を行うとともに得られた結果をもとに評価クライテリア等の最適化を含む必要なプロトコルの調整を行い、バリデーションレポート及びガイドライン案を作成し OECD に提案する。

2、Lumi-cell ER アッセイバリデーション試験：Lumi-cell ER アッセイ法は、米国 Xenobiotic Detection Systems Inc.(XDS 社)により開発されたエストロゲン受容体を介した遺伝子転写活性化試験法である。ヒト卵胞がん細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、化学物質による内在性エストロゲンレセプター(ER)への作用をルシフェラーゼ活性により検出する。本法についてはこれまでアゴニスト・アンタゴニスト法のいずれについても多施設バリデーション試験が実施されていなかったことから、米国 ICCVAM/NICEATM からの提案により、ICCVAM/NICEATM を事務局として、JaCVAM、米国 ICCVAM/NICEATM、欧州 ECVAM 及び韓国 KoCVAM (平成 22 年度より)の参加による SMT を組織し、米国、日本、欧州の 3 施設 (XDS、ECVAM、日吉)において、米国 ICCVAM から提案されたプロトコルに従い 4Phase からなる国際バリデーションを実施した。本研究班では、我が国の参加施設である株式会社・日吉において実施された測定結果の信頼性保証のためデータレビューを行うとともに、ICCVAM、ECVAM、JaCVAM で構成される SMT において日米欧 3 施設からの結果をもとに施設内および施設間再現性について評価を行い、得られた結果をもとにプロトコルの最適化について議論するとともに、ICCVAM ピアレビューのためのバリデーション

ンリポート及びICCVAMガイドライン案についての検討を行った。本試験法については、ICCVAMガイドライン成立の後、OECDに対してOECDガイドライン案の提案される予定である。

3、AR-EcoScreen細胞を用いたアンドロゲン受容体転写活性化試験法：AR-EcoScreen試験法は、アンドロゲン受容体を介した遺伝子転写活性化試験法である。AR-EcoScreen細胞は、CHO-K1細胞にヒトアンドロゲン受容体と蛍ルシフェラーゼ遺伝子上流にアンドロゲンレスポンスエレメントを持つレポータープラスミド、および細胞毒性評価の指標となるウミシイタケルシフェラーゼを安定発現する細胞株であり、細胞毒性評価を単一のプレート上で実施出来る上、通常の細胞毒性検出法では評価が難しい、被験物質によるルシフェラーゼ発光への影響をすることが可能であるという利点を有する。本試験系については、本研究班開始以前に化学物質評価研究機構（化評研）が中心となって国内3施設の参加によりバリデーション試験が実施されており、本研究班では既に実施済みのバリデーション結果を基にしたバリデーションリポート及びOECDガイドライン案をOECDに提出し、ピアレビュー実施の提案を行った。

C. 研究結果

1、HeLa9903細胞を用いたエストロゲン受容体(ER)アンタゴニスト測定法バリデーション試験：

1. 1 進捗状況

昨年度までの研究により、バリデーション開始当初の参加5施設全ては、タスク1（アゴニスト試験）においてクライテリアを満たすデータ

の取得に成功したことから本試験系実施にあたって施設設備及び測定技術に問題がないと判断された。しかし、海外施設のうちECVAMから委託により参加していたVITOは、バリデーション試験が当初予定より遅れたため契約期間の終了に伴い測定の継続が困難となり昨年度バリデーション試験から撤退した。また、KFDAは予備検討の結果から技術的な問題が示唆されたためリードラボである化評研とともに技術指導を実施し、Task2実施可能な状況となったものの研究所移転に伴い測定の継続が困難である等の理由から試験実施が困難となりタスク2終了前にバリデーション試験から撤退した。一方、リードラボ及び国内参加施設のうち大塚製薬は、タスク3までの全ての測定においてクライテリアを満たすデータを取得して試験を終了した。残る国内参加施設の一つであるカネカは、予定していた全ての測定を一度終了したが、詳細解析の結果、Task3の一部の結果においてリファレンスプレートがクライテリアを満たしていないことから、再測定が必要であることが判明した。しかし、カネカがin vitro事業から撤退したため追加の測定は不可能となった。OECD GD34に定めるバリデーション要件を満たすためには、さらに最低1施設における測定結果が必要であることから、LumiCellバリデーション参加施設であった株式会社日吉にバリデーションへの参加を打診したところ可能との回答を得た。そこで、化評研技術者とともに現場施設の設備状況の査察及び現地トレーニングを実施後、バリデーションプロトコルに従い測定を開始した。

1. 2 日吉におけるTask1測定結果

バリデーションプロトコルTask1のうち、エッジ効果の検討試験結果からエッジ効果は認められなかったことから、96穴全てを用い