

temperature, electrophoresis conditions (pH, V/cm, mA, and temperature at the start of unwinding and the start and the end of electrophoresis) and staining procedure; criteria for scoring comets and number of comets analyzed per slide, per tissue and per animal; evaluation criteria; criteria for considering studies as positive, negative or equivocal.

3.1.3.5. Results

Signs of toxicity, including histopathology in the appropriate tissue(s) if applicable; individual and mean values for DNA migration (and ranges) and % hedgehogs in individual tissue, animal, and group; concurrent positive and negative control data; and statistical evaluation.

3.1.3.6. Discussion of the results and/or conclusion, as appropriate.

4. ARCHIVES AND REVIEW

The study report and all raw data (including slide samples and image data) from this study will be retained according to the SOP in each testing facility. All raw data will be submitted to the management team for review if required.

5. NOTES

- 1) We evaluated the data of the 3rd phase validation studies as to whether or not fewer (two, three or four) animals were sufficient in the positive control group to show a statistically significant increase in the Effect (difference) with a one-tailed student's t-test ($P < 0.025$). The analysis results were presented and discussed at the Florence meeting held on August 25-26, 2009, and the participants felt that the reduction of animal number would be possible but the slight decrease in the statistic power might require additional experiments and result in the increase in animal usage. Thus the VMT decided to continue using five animals as the positive control in this validation effort. We may need to further investigate the appropriate number of animals/group afterwards based upon power calculation.
- 2) We will likely need to specify shelf life for some solutions as we reconcile lab-specific protocols.
- 3) The VMT extensively discussed at the Osaka meeting held on Feb. 4-6, 2009 how a preliminary dose-finding study should be done to choose an appropriate high dose level, because selection of a suitable high dose would be closely related to the sensitivity/specificity of genotoxicity assays in general. The VMT decided to request each facility to submit its own protocol for dose-selection, and the VMT will review them and then direct each facility to use its own protocol as it is or to follow a

dose-finding study protocol recommended by the VMT.

- 4) When following the regimen for EMS as a positive control, micronucleus (MN) induction will be detected in bone marrow but not in peripheral blood. To also detect MN induction in peripheral blood, it would be necessary to administer EMS as well as the other test chemicals three times. It was also pointed out at the Florence meeting (August, 2009) that four times administration of test chemicals excluding the positive control, EMS, would be needed if we expect to detect micronuclei in the peripheral blood.
- 5) In this validation study, Comet analysis for the liver and the stomach will be conducted. Comet analysis along with MN for the bone marrow and/or the peripheral blood are optional in this validation study.
- 6) At the Florence meeting, it was pointed out that the duration of tissue sampling should be kept to a set time (e.g. within 10 min) and the duration for lysis should be controlled, in order to obtain more stable negative control values. The VMT considers that such action would be preferred and recommended but not required of participant laboratories because the feasibility would depend on the performance of each laboratory. To further address this issue, the duration of tissue sampling and the duration for lysis should be recorded in the study report of each facility.
- 7) The size of the liver portions will be at the discretion of the laboratory, because there is no recommendation for standardizing this step.
- 8) In each electrophoresis run, there should be the same number of slides from each animal in the study; see Attachment 1, an example of how to keep track of each slide during each electrophoresis run. Each laboratory will need to provide its own electrophoresis box chart, as different boxes can accommodate different numbers of slides.
- 9) Under those electrophoresis conditions, it is expected that an average DNA migration obtained in the negative control group will be 1-8% tail DNA for the liver, and 1-20% tail DNA for the stomach. These ranges were set based on the analysis with negative control data from the 2nd and 3rd phase validation studies, i.e. the average \pm 3XS.D. values were as follows in the 2nd and 3rd phase validation studies, respectively: 3.8 \pm 4.8 (n=15 from 5 labs) and 3.1 \pm 3.9 (n=12 from 4 labs) in the liver, and 12.5 \pm 6.9 (n=12 from 4 labs) and 8.8 \pm 9 (n=10 from 4 labs) in the stomach. The reason why the lowest value is set at 1 is to be able to detect a significant decrease in % DNA in the tail. The decrease in DNA migration is expected for cross-linkers, and if such agents are intended to be detected using the Comet assay then a decrease

in migration would be easier to detect when the negative control value is at the higher end of the acceptable range. If the negative control average deviates from the range, the duration of electrophoresis will be adjusted to achieve this range.

- 10) An investigation was conducted to compare with two slides/animal and three slides/animal about some data of the 3rd phase validation study, and the result was presented and discussed at the Florence meeting. As there was no difference between them as far as the present analysis method was used, the VMT decided to use two slides/animal.
- 11) In order to obtain suitable areas for observation, dilution of cell suspension may be required during the single cell preparation process.
- 12) This instruction indicates that if a comet is analyzable by the software program then it should be analyzed. However the following cases will be excluded from the analysis: a) analyzable but the recognition by software is considered incorrect (e.g. the automatic recognition of nucleus center is shifted); and b) the staining of nucleus and/or migration is considered poor. At the Florence meeting, more detailed analysis methods were discussed and agreed to, i.e. cells should be classified into three categories, scorable, non-scorable and hedgehog, and also scorable cells with a 90% or more DNA in the tail should not be adopted as part of the data for analysis. The VMT will prepare a color atlas to instruct how to distinguish comet and hedgehog.
- 13) 'Tail length' is defined as 'Tail migration' in some image analyzers such as Comet IV.
- 14) At the Atagawa meeting held on March 13-14, 2008, there was discussion about the need to collect data on tail length and Olive tail moment in this validation study. Again, there was brief discussion about this point at the Osaka meeting. The consensus was that % DNA in tail seems to be a sufficient endpoint for validation and therefore these parameters would no longer be analyzed statistically. However, data on tail length and tail moment will continue to be collected in this validation study in case there is a reason to analyze these data in the future.
- 15) Effect (difference) seems to be more suitable for revealing variation between labs than Effect (ratio), which was pointed out at Osaka meeting in the discussion of the data of 3rd phase validation study.
- 16) At the present moment, there is no evident data on the consistency between the percentage of "hedgehogs" and histopathology. In this validation study, histopathology will be used as a primary endpoint to evaluate cytotoxicity, although both of the data will be collected for further analysis on the consistency between the percentage of "hedgehogs" and histopathology.

6. REFERENCES

Burlinson B, et al., Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* comet assay workgroup. *Mutation Res.*, 627, 31-35, 2007.

Collins AR, et al., Direct enzymatic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*, 14, 1733-1735, 1993.

Hartmann A, et al., Recommendation for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 18(1), 45-51, 2003.

Lovell DP, G Thomas G, R Dubow., Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* comet studies. *Teratog Carcinog Mutagen.* 19(2), 109-119, 1999.

Olive PL, et al., Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cell using the "comet" assay. *Radiat. Res.*, 122, 86-94, 1990.

Tice RR et al., Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, 35, 206-221, 2000.

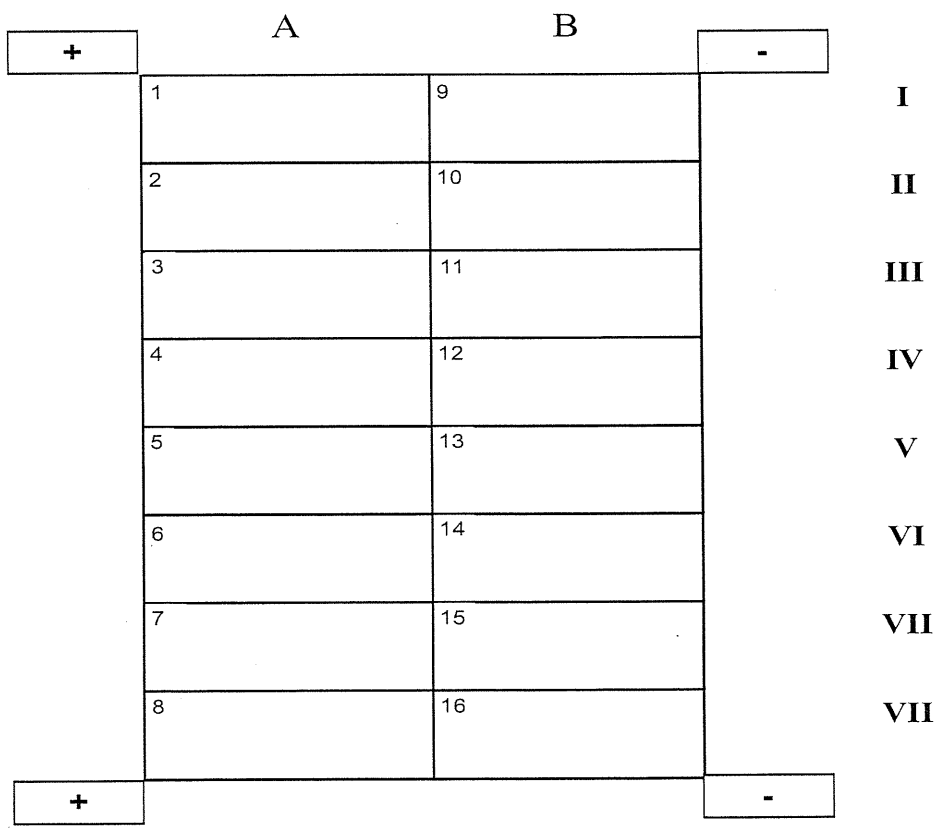
Wiklund SJ, E Agurell., Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay. *Mutagenesis* 18(2):167-175, 2003.

Attachment 1:

SLIDES UNWINDING & ELECTROPHORESIS RECORDING SHEET

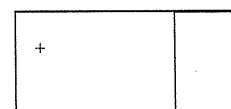
Electrophoresis Run #				Initials & Date	
Approximate alkaline electrophoresis buffer volume in chamber					
Unwinding					
Time		Total	Start	End	
Buffer Temperature					
Electrophoresis					
Running time		Total	Start	End	
Volts					
Milliamperes					
Buffer Temperature					
Thermometer No.					
Electrophoresis chamber No.					
Power supply No.					

Diagram Electrophoresis Chamber



RED(+)

BLACK(-)



Position of slide in

**INTERNATIONAL VALIDATION OF THE *IN VIVO* RODENT
ALKALINE COMET ASSAY FOR THE DETECTION OF
GENOTOXIC CARCINOGENS
- Study Plan for 2nd Step of 4th Phase Validation Study -**

Issued by: the Validation Management Team (VMT)

Date: November 30, 2009

A. PURPOSE OF THIS DOCUMENT

This document is provided as a supplement to the study protocol to clarify the purpose, schedule, and specific notes of each trial of an international validation study to evaluate the ability of the *in vivo* rodent alkaline Comet assay.

B. STUDY TITLE

2nd step of 4th phase validation study of international validation of the *in vivo* rodent alkaline Comet assay for the detection of genotoxic carcinogens (abbreviation: 2nd step of 4th phase validation study of *in vivo* Comet assay)

C. BACKGROUND AND PURPOSE OF THIS STUDY

In the 1st step of the 4th phase validation study, the purpose was to examine the extent of reproducibility and variability of assay results among laboratories using coded test chemicals and the positive control EMS, when experiments were conducted in accordance with the Comet assay protocol-version 14. In brief review of the data, the VMT qualitatively confirmed the reproducibility and variability of assay results among laboratories. Thus the VMT decided to move on the 2nd step of 4th phase validation study with an expanded set of test chemicals in accordance with the Comet assay protocol-version 14.2.

The purpose of the 2nd step is to investigate the predictive capability of the assay against carcinogenicity of test chemicals.

D. SCHEDULE

November 30, 2009: Agreement of the study plan by the VMT

~December 11, 2009: Delivery of the protocol-version 14.2 and the study plan to testing facilities

~December 31, 2009: Delivery of two or three test chemicals (if two test chemicals are delivered, another will be delivered later)

~January 31, 2010: Delivery of data-spread sheet (Excel file)

January ~ September, 2010: Experimental period (the experiment should be started after acceptance of the study protocol and preparation of appropriate SOPs in each testing facility; the data-spread sheet should be submitted to VMT soon after the data are available)

March 12, 2010: Meeting on Comet international validation study at Salt Lake City, Utah, USA

October 31, 2010: Deadline of data-spread sheet submission to VMT

~January 31, 2011: Data analysis

~March 31, 2011: Finalization of the 2nd step of 4th phase validation study

E. SPECIFIC NOTES

1. SUCCESS CRITERIA

1-1. To obtain the predictive capability (values of positive sensitivity and negative specificity) of the assay against carcinogenicity of test chemicals (to be discussed in the VMT meeting)

2. OTHERS

3-1. Dose selection of coded test chemical

The dose levels of each coded test chemical will be decided by each facility. If available, the VMT will provide toxicological information about each coded test chemical, such as the rat LD50, to assist in this process.

3-2. Solvent/vehicle

The selection of the solvent/vehicle to use in preparing the dosing formulation for each coded test chemical will be decided by each facility.

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。本年度は細胞毒性と、S9 の問題を明らかにした。ヒトリンパ芽球 TK6 細胞を用い、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)を S9 存在下、もしくは非存在下で、0.15~5000ug/ml までの広範囲の用量で 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。細胞毒性の指標として、処理後の 24 時間相対細胞増殖(RCG)及び、ヘッジホッグ(NDCN)を用いた。それぞれ 100%細胞増殖抑制、20%NDCN を目安として最高用量をレトロスペクティブ設定し、試験結果を評価した。また、陽性対照として EMS (500ug/ml) を用いた。実際の試験は国内外の 5 つの研究機関で GLP に準拠し、実行された。コメット試験の結果は試験機関間で極めて再現性の高かったが、細胞毒性の評価はばらつきが大きく、特に RCG を用いると、最高用量に 1000 倍もの違いが試験機関間で生じた。NDCN では比較的同程度の最高用量が設定できたが、反応が急激であり細胞毒性の指標として適切かどうか疑問が残った。2AA では S9 の効果が現れたが、同時に細胞毒性も顕著に表れ、結果として陰性と判断されるケースが生じた。これらの問題はコメット試験の問題ではなく、細胞毒性の問題と考えられ、他の細胞では生じにくいことが報告されていることから、TK6 細胞特有の問題であるのかもしれない。今後、統一したガイドライン化を目指すためには、他の細胞を用いた *in vitro* コメット試験のバリデーションを検討する必要がある。

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中である。これまで Phase I、Phase II 国際共同研究を実施した。本年度は、前年度までの研究で問題が浮き彫りとな

った以下の2つの問題を検討するため、Phase IIIの共同研究を企画、実行した。

- i) 細胞毒性の問題
 - ✓ 一般に用いられている色素排除法は役に立たない。
 - ✓ In vitro コメット試験には適切な細胞毒性の指標がない。
 - ✓ 最高用量を設定の基準がない。
 - ✓ 試験機関間で最高用量に大きな違いが生じる。
- ii) S9の問題
 - ✓ コメット試験にS9の効果が現れない。
 - ✓ 他の試験(小核試験)では効果があること。

Phase III試験のプロトコールの特徴は以下である。

- i) 細胞処理条件等の完全統一化。
- ii) 予備試験により最高用量の設定は行わず、全て0, 0.15, 0.5, 5.0, 15, 50, 150, 500, 1500, 5000ug/mLの広範囲にわたり試験を行い、最高用量は試験終了後、細胞毒性を考慮しレトロスペクティブに設定する。
- iii) 細胞毒性は処理後の24時間の相対細胞増殖(RCG)、ヘッジホッグ(NDCN)により評価し、それぞれ100%細胞増殖抑制、20%NDCNを目安として最高用量を設定する。
- iv) 陽性対象としてEMS(500ug/ml)を用いる。この結果から試験機関間差を検討した。

B. 研究方法

1. 試験計画(これまでの経緯を含む)

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。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

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)

2.2. 試験化合物及び、S9

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

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。

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 37°C、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

S9mix の調整法は VMT が作成したプロトコルに従った。0.375 mL の S9mix と、0.05 mL の試験検体を培養液に加え、5 mL として処理を行った。このときの s) 濃度は 1.5% である。代謝活性化を行わない場合は S9mix の代わりに 150 mM 塩化カリウムを用いた。

2.3.6. 実験操作

2.3.6.1. 前培養

- i) 37°C 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) 1.5×10^6 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 2×10^5 cells/mL の細胞懸濁液を調製した。

ii) 15 mL のチューブを用い、37°C 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 4.575mL、に被験物質調製液あるいは媒体 0.05mL と、150mM 塩化カリウム(非代謝活性化)もしくは S9mix(代謝活性化)を 0.375mL 加えて処理を開始した。

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。

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)= 9:1/0.46%
Lysis and electrophoration	Lysis solution	2.5M NaCl, 100mM Na2EDTA, 10mM Tris-base, 10% DMSO, 1% Triton-X (pH 10*)
	Lysis condition	Ovenight, 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

鈴木らが開発した方法に準じた。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。詳しくは中嶋の分担報

告書に記載する。

(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、全ての実験は本研究所倫理規定に準拠して行った。

C. 研究結果

1) MMS

5つの研究機関で行ったMMSのコメットの結果を図1に示す。

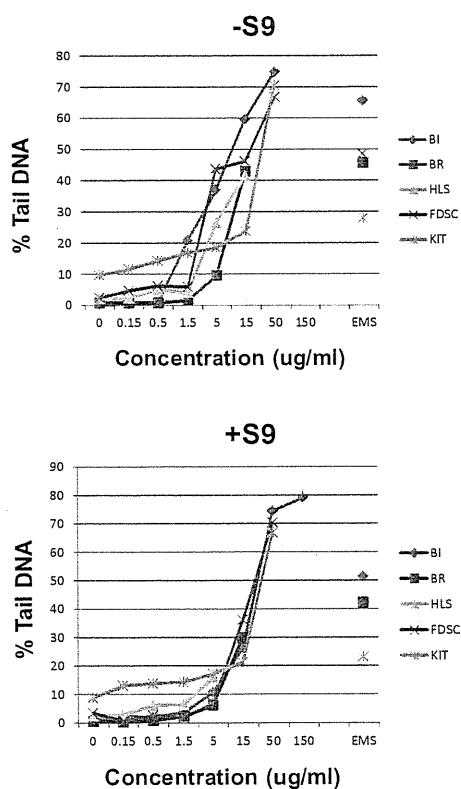


図1

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性の陽性反応を示した。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危険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ントの結果に影響を与えなかった。

一方、RCGによる細胞毒性の結果を図2に示す。

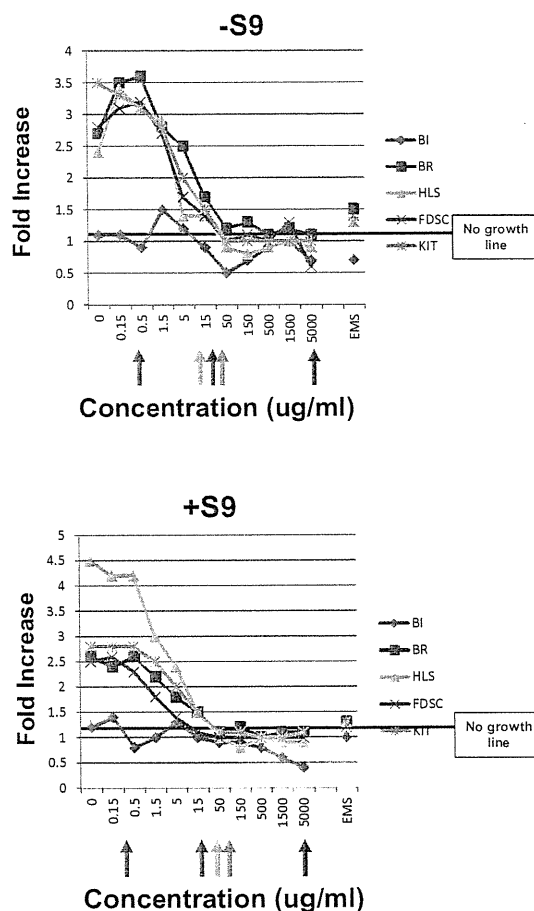


図2

また、NDCNによる細胞毒性の結果を図3に示す。

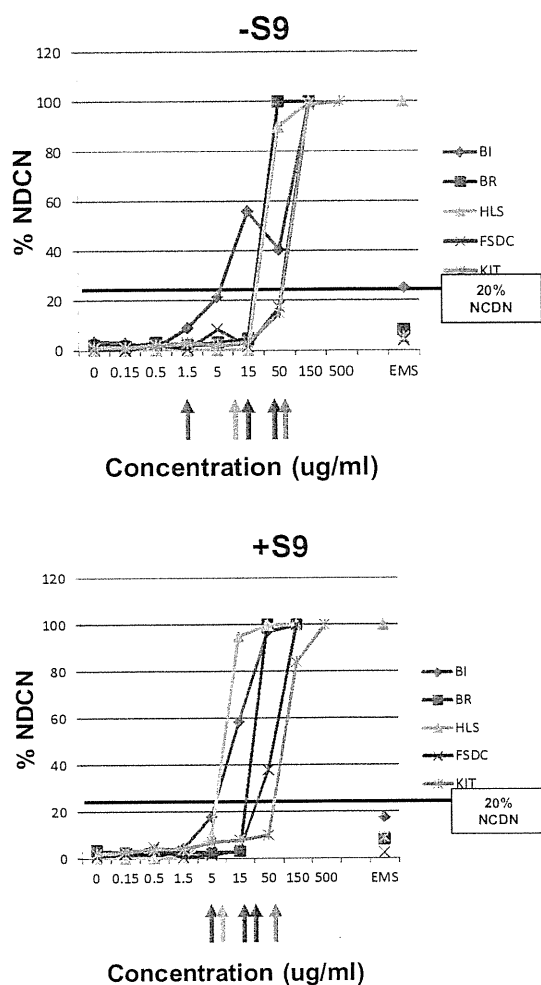


図 3

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(図2)。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(図3)。

2) 2AA

5 つの研究機関で行った2AA の comet の結果を図4に示す。

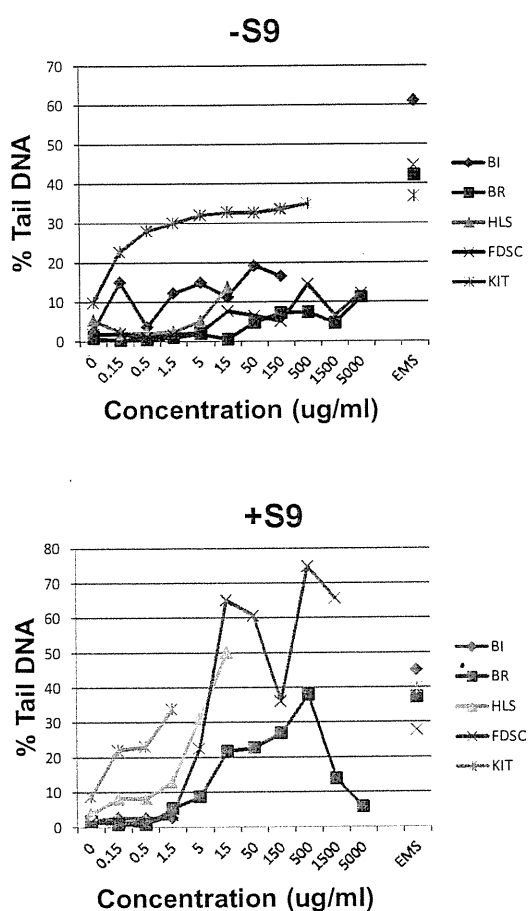


図 4

2AA は代謝活性化が必要な遺伝毒性物質で、S9 存在下で comet 陽性の報告がある。1 機関を除いて、S9 非存在下での comet の増加は顕著でなかった。S9 存在下では 4 機関で comet 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。

RCG による細胞毒性の結果を図5に、また、NDCN による細胞毒性の結果を図6に示す。

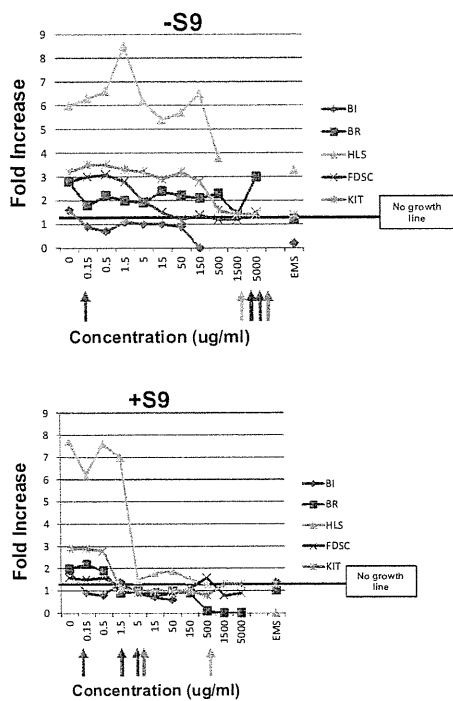


図 5

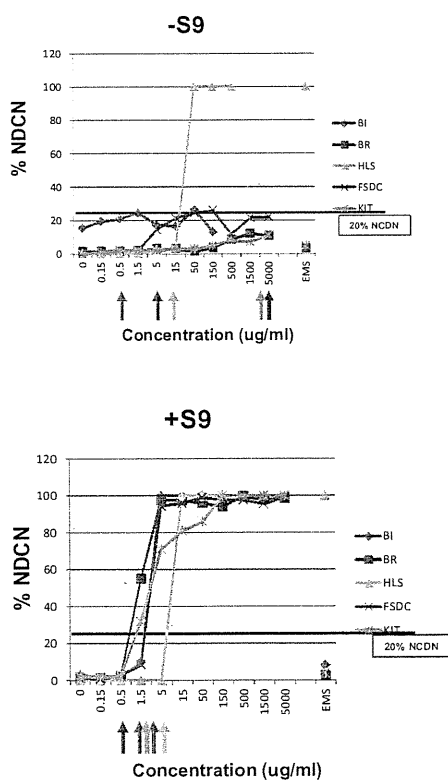


図 6

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(図5)。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(図6)。S9 存在下での 5 機関の設定最高用量はほぼ一致した(図6)。

S9 存在下で 20%以上 NDCN の用量を削除したときのコメントの結果を図7に示す。

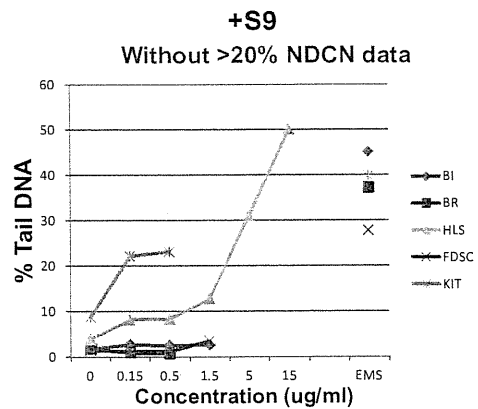


図 7

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。

2) 陰性対照、陽性対照

図8に MMS、2AA でそれぞれ S9 存在下、非存在下の 4 つの試験での溶媒(陰性対照)と、EMS(陽性対照)のコメントと、NDCN のデータを示す。

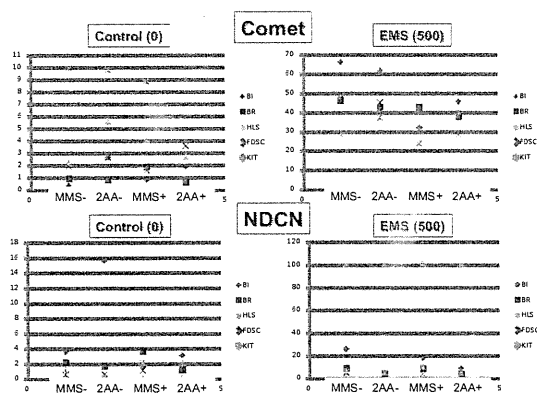


図 8

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。

D. 考 察

これまでの Phase I, II 試験結果から、TK6 細胞を用いたコメット試験の問題点として、1) 細胞毒性と、2) S9 の問題が示唆された。細胞毒性に関しては、従来利用されてきたトリパンブルーによる色素排除能を指標とした細胞毒性試験では、処理直後の細胞毒性を評価できないこと、コメットは極めて細胞毒性が高い用量でのみ反応が現れ、その領域での適切な細胞毒性指標がないこと、細胞毒性の結果が試験機関間で大きく異なるため、本試験での試験用量のレベルが、場合によっては 1000 倍以上も異なるケースが現れるため試験機関間の評価が困難であること、などが挙げられる。

また、S9 に関しては従来 S9 で代謝活性化されるシルロヘキシミドや、DMN が最高用量で

ある 5000ug/mL でもコメット陽性とならず、一方同時に行った小核試験では陽性となることから、S9 の効果が疑問視された。残念ながら、S9 存在下でコメット試験を行った研究は極めて少ない。

これら問題を解決するため、細胞毒性に関しては、細胞毒性を指標とした用量設定試験は行わず、0.15~5000ug/mL までの広範囲、多数用量設定により広範な濃度で試験を行い、細胞毒性の評価は、後でレトロスペクティブに行うこととした。細胞毒性は RCG、および NDCN の出現頻度で評価した。また、S9 の問題はこれまで S9 存在下でコメット陽性の報告がある 2AA を用いて、その効果を検証することとした。

MMS のコメットは試験機関間で極めて再現性がよく、また、反作用量に関してもほとんど一致した。陽性対照の EMS についても試験機関差はほとんど観察されなかった(試験検体の調整ミスをした 1 機関を除いて)ことから、MMS、EMS のようなアルキル化剤に関しては TK6 を用いたコメット法は再現性の高い信頼できる結果をもたらすことが示唆された。一方、代謝活性化を必要とする 2AA は S9 非存在下ではほとんど反応なく、S9 存在下では 4 機関でコメット陽性の反応が得られたことから、S9 はコメット試験においても有効であることが示唆された。しかしながら、試験機関間で反応性にばらつきが大きいことから、プロトコールの調整や、一定のスキルが必要と考えられる。

一方、細胞毒性の問題は複雑である。100%細胞毒性抑制濃度を指標とした場合、用量の設定に試験機関間で大きな差が観察された。これまでの報告でも、コメット陽性が観察される濃度は極めて細胞毒性が強い用量であり、ほぼ 100%の細胞が死滅してしまうため、細胞増

殖を指標とした細胞毒性の評価は困難であることが指摘されていた。一方、NDCN を指標とした場合は、試験機関間でほぼ安定した値が得られるが、その反応性は極めて急激であり、細胞毒性の指標として適当かどうかは疑問である。

また、2AA は S9 存在下でコメットを誘発したが、その陽性反応を示した用量は極めて細胞毒性が高く、20%NDCN を最高用量とした場合、陰性として判定されてしまうケースが多く見られた。この結果は、これまでの Phase I、II の結果と同様、コメットは極めて細胞毒性の高い用量でしか陽性反応を示さないとした結論と同様である。コメットの反応性の用量依存性は明らかであることから、この問題はコメット試験自体にあるのではなく、細胞毒性の指標や、評価方法の問題であるのかもしれない。

他の付着精細胞株（たとえば、CHL）を用いたコメット試験では多くの遺伝毒性物質が、低用量でコメット陽性を示すこと、また、サイクロフォスファミドや、DMN のような代謝活性化を必要とする物質に対しても高い反応性を示すことが報告されている。細胞毒性や S9 の問題は、TK6 もしくは浮遊系細胞特有の問題なのかもしれない。今後、TK6 や浮遊系細胞以外の他の細胞を用いた試験により、検証していく必要があると考える。また、これらの問題は、コメット試験がいったい何を示しているのかを改めて我々に投げかけている。コメット試験をガイドライン化するためには、このような根本的な問題を科学的に解決する必要がある。それがない限り、コメット試験のデータには mode of action が欠損していると言わざるを得ない。

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中である。TK6 細胞のみを用いた現在のコメット試験バリデーション研究では、ガイドライン化を目指すことは困難かもしれない。今後、TK6 や浮遊系細胞以外の他の細胞を用いてバリデーションする必要がある。また、コメットの反応には疑問な点が多く、これら問題も科学的に解決することが、信頼性の高い試験法の確立に重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

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)

2. 学会発表

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)

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)

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)

Honma, M.; Novel approach for in vitro genotoxicity assessment : Novel Approaches in preclinical safety evaluation: Development and progress (2010.9)

Honma, M.; JaCVAM in vitro Comet assay international collaborative study (JaCVAM in

vitro.:International Symposium "Recent Advance
in Comet Assay", (2010.11)

G. 知的所有権の取得状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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 中嶋 圓 (財) 食品農医薬品安全性評価センター 試験部次長

研究要旨

本研究は、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研究である。バリデーション研究では5機関それぞれに2化合物を割り当て、その結果について重み付き回帰分析を実施した。1化合物については5機関とも陽性との判断が示されたが、もう一方の化合物については、判定結果に不一致が認められた。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. 目的

コメットアッセイ (*in vitro*) 試験の評価に使用されている多くの統計解析手法が存在するが、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*) 試験法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の検討を行った。

B. 方法

1. 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。

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。

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. 結果

Phase III 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。

-S9 処理の場合

	Chemical A	Chemical B
Lab. 1	0.004	0.0153
Lab. 2	0.0075	0.0928
Lab. 3	<0.0001	0.3635
Lab. 4	<0.0001	<0.0001
Lab. 5	<0.0001	0.018

+S9 処理の場合

	Chemical A	Chemical B
Lab. 1	0.0102	0.1845
Lab. 2	0.0002	0.0083
Lab. 3	0.0047	<0.0001
Lab. 4	<0.0001	0.226
Lab. 5	<0.0001	0.014

図 1 各試験における p 値一覧

D. 考 察

今回のバリデーション試験は、各機関において定められた用量で実施され、施設間のバラツキを最少に抑えるよう工夫されたプロトコールで実施されている。しかしながら、化合物 B のように結果の一致度が低いものもあり、本モデルでの解析自体の適正を再検討する必要があるかもしれない。コメントアッセイ特有のデータのバラツキ等を鑑み、解析すべき用量の選択基準を明確にした後、線形モデルでの解析を試みるのも一つの手であると考え

さらに、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だと考えた。

E. 健康危険情報

「なし」

F. 研究発表

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)

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)

G. 知的財産権の出願・登録状況

「なし」

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

研究分担者： 能美健彦 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長

研究要旨

トランスジェニック遺伝毒性試験のバリデーションに関する基盤的研究として、国内約 10 機関が参加した F344 *gpt delta* rat を用いた共同研究を進め、発がん物質(2,4-ジアミノトルエン, アリストロキア酸、亜硫化ニッケル)および非発がん物質(2,6-ジアミノトルエン)の *in vivo* 遺伝毒性を検索した。平成 23 年 3 月にパリで開催された OECD 会議に出席し、トランスジェニック遺伝毒性試験ガイドライン案へのコメント提出と討論を行った。

A. 研究目的

トランスジェニック(Tg)動物を用いる遺伝毒性試験は、変異検出用のレポーター遺伝子を導入した Tg マウスあるいはラットを化学物質に曝露し、任意の臓器・組織からレポーター遺伝子を *in vitro* パッケージング法により λファージ粒子として回収して大腸菌に感染させ、動物個体で起きた変異を、大腸菌を用いて検出する試験法である。検出された変異体は、DNA シークエンシングにより分子解析することができる。Tg 遺伝毒性試験では、遺伝子変異を多臓器において定量的に解析することができるため、発がんの標的臓器で遺伝毒性を評価できるという特徴がある。

我々は、個体に生じた点突然変異と欠失変異を効率良く検出することを目的に、新規な λファージ λ EG10 を開発し、これを C57BL6/J マウスの受精卵に導入して *gpt delta* マウスを樹立した。また λ EG10DNA を Sprague Dawley (SD)ラットに導入して *gpt delta* ラットを作成した。さらに、発がん試験において汎用されている F344 系統にバッククロスを行い F344 *gpt delta* ラットを樹立した。ラットは、一般毒性試験、発がん試験に汎用されており、Tg ラットを用いて

in vivo 遺伝毒性試験と一般毒性試験(あるいは短期発がん試験)を統合することは、3R の点から望ましい方向と考えられる。

本研究では、F344 *gpt delta* ラットを用いた共同研究を通じて、Tg 遺伝毒性試験の技術普及とバリデーションに関する基盤的知見を得ることを目的とした。共同研究には、国内約 10 機関が参加し、3 種類の発がん物質[2,4-ジアミノトルエン(2,4-DAT), アリストロキア酸、亜硫化ニッケル]および構造の類似した非発がん物質[2,6-ジアミノトルエン(2,6-DAT)]の *in vivo* 遺伝毒性を検索した。

B. 研究方法

1) 共同研究の概要

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うこととした。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分けを行った。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