

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)および非発がん物質(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(後述)。

2) 試験物質の投与

2-1) 2,4-DAT および 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 はげっ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 および 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、遺伝毒性およ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 および 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およ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(Ni₃S₂)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。

(倫理面への配慮)

本研究は、実験動物を用いたものであり、ヒトに関する倫理上の問題はない。また、全ての実験は、各参加施設における遺伝子組換え実験および動物実験に関する規定に準拠して行った。

C. 研究結果

1) F344 *gpt delta* ラットを用いた共同研究

1-1) 2,4-DAT および 2,6-DAT

雄 7 週齢の F344 *gpt delta* ラットに 2,4-DAT (10 および 30 mg/kg/day)、および 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。

1-2) 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 および 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。

2-3) 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。

2) 平成 23 年 3 月にパリで開催された OECD 会議に参加し、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。Tg 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、F344 *gpt delta* ラットの開発状況を報告した。

D. 考 察

遺伝毒性試験は、(1) Ames 試験、(2) *in vitro* 染色体異常試験あるいはマウスリンフォーマ遺伝子突然変異試験、(3) マウス小核試験の 3 試験が、多くのガイドラインで推奨されてきた。だが (2) で陽性となった物質の中に実験動物に発がん性を示さない物質 (偽陽性) が多数含まれることが明らかとなり、ICH (日米 EU 医薬品規制調和国際会議) では、従来の試験バッテリー以外に、(1) Ames 試験 (2) マウス小核試験 (3) 第二の *in vivo* 試験 からなる別な選択肢が提唱され、議論されている。Tg 動物を用いる遺伝毒性試験は、第二の *in vivo* 遺伝毒性試験の候補の一つと考えられている。Tg 遺伝毒性試験は、多臓器において遺伝子変異を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 *in vivo* 試験として有望である。OECD の Detailed Review Paper on Transgenic Rodent

Mutation Assays (2009)には、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が提案されているが、実際に同プロトコルで行われた試験データは充分でなく、特にラットの試験データは不足している。

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に F344 *gpt delta* ラットを用いた共同研究を進めた。参加施設を3グループに分け、2,4-DAT、2,6-DAT、アリストロキア酸、亜硫化ニッケルをそれぞれ投与し、変異解析を進めた。

2,4-DAT 投与群の肝臓における点突然変異体頻度は用量依存的に増加に増加した。一方、2,6-DAT においては媒体対照群と比較して明らかな増加は認められなかった。両化合物は Ames 試験の S9mix 存在下でも陽性を示すが、2,4-DAT はげっ歯類に肝癌を誘発し、2,6-DAT は肝癌を誘発しない。これは *in vivo* における解毒作用の影響と考えられる。*gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 遺伝毒性試験結果は、2,4-DAT 及び 2,6-DAT の肝発がん性の有無と対応していることが示唆された。

アリストロキア酸投与群では、発がん標的臓器の腎臓において用量依存的に突然変異体頻度の上昇がみられ、遺伝毒性結果とがん原性結果が一致した。一方、非標的臓器である肝臓においても突然変異体頻度の上昇がみられた。アリストロキア酸による発がんの過程には、遺伝毒性以外の要因も重要である可能性が示唆された。以上の結果から、*gpt delta* ラットを用いた4週間反復投与による遺伝毒性評価法は有用であることが示唆された。

亜硫化ニッケルについては週1回の気管内投与を4回行い、初回投与後28日目及び90日目に肺を採取して変異解析を進めた。

今後は、F344 *gpt delta* ラットを用いた共同研究結果をまとめて論文化を進める。トランスジェニック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

まとめ、OECD のトランスジェニック遺伝毒性試験ガイドライン案作成に貢献する。

E. 結 論

Tg 動物を用いる *in vivo* 遺伝毒性試験の技術普及および評価のため、F344 *gpt delta* ラットを用いた共同研究を進めた。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。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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 (2010)
- 7) 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)
- 8) 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)
2. 学会発表
- 1) 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 δ , 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)
- 2) 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
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
 - 6) 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)
 - 7) 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)
 - 8) 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)
 - 9) 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)
 - 10) 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)
 - 11) 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)

H. 知的所有権の取得状況

特になし

*in vitro*皮膚感作性試験代替法のバリデーション研究

研究分担者 大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所 副所長

研究要旨

ECVAM（欧州動物実験代替法バリデーションセンター）と共同でh-CLATバリデーションを進めている。

本年度、技術移転の段階で2施設に不具合が生じたが、解決できた。これらの事項をSOPに盛り込み、次の段階に進むことになった。

研究分担者

大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所
副所長

研究協力者

小島 肇 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
薬理部 新規試験法評価室
室長

相場節也 東北大学大学院医学研究科神経・感覚器病態学皮膚講座
教授

足利太可雄 (株)資生堂 品質評価センター
安全性評価研究グループ
副主任研究員

坂口 斉 花王株式会社 安全性評価研究所
上席主任研究員

に関する検討^{5, 6, 7)}や、予測モデル、陽性対照物質 (2, 4-Dinitrochlorobenzene: DNCB) の推奨適用濃度、及び測定指標であるCD86/CD54 発現亢進最小濃度の算出方法を見直した。また、化粧品原料に関するh-CLATの有用性評価を目的として防腐剤、染毛剤及び香料30品を評価し、その有用性を示した^{8, 9, 10)}。

このような経緯を経て、試験法のプロトコールが確立できたことから、本研究班ではOECDガイドライン化のための最短経路として、ECVAM（欧州動物実験代替法バリデーションセンター）と共同でh-CLATバリデーションを行うこととし、ECVAMで行う3つの皮膚感作性試験代替法のバリデーションに組み込んだ。

B. 研究方法

B-1) バリデーション実行委員会

添付資料1に示す組織が*in vitro*皮膚感作性試験バリデーション実行委員会（以下、バリデーション実行委員会と記す）である。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。相場は、日本の代表としてバリデーション実行委員会に参画した。

A. 研究目的

足利、坂口らは、皮膚感作性試験代替法として、ヒト単球細胞株であるTHP-1細胞を用い、CD86及びCD54の発現亢進を指標とした試験法(human Cell Line Activation Test: h-CLAT)を開発した^{1, 2, 3)}。

本試験法を国際的標準法として磨きあげるため、厚生労働科学研究（医薬安全総合研究事業）において、国内7施設による共同研究を実施し、本試験法は技術移転が容易であり、基本的に施設間再現性が良好であることを明らかにした⁴⁾。さらに、本試験法の汎用性を向上させることを目的として、細胞と血清のロット差及び前培養条件

B-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 プレバリデーション（技術移転性の確認実験）開始

2011年：

- 1月 第6回運営委員会

B-3) プレバリデーションの概要

技術移転性を確認する目的で、表1に示す被験物質がコード化しないで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）

B-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）

倫理的な問題が生じる実験を実施しておらず、特に配慮すべき問題はない。

表1 技術移転に用いられた被験物質

Chemical name	Abbreviation	CAS N. #	Potency category
2,4-Dinitrochlorobenzene	DNCB	97-00-7	Extreme
Nickel sulfate	NiSO ₄	101-01-97-0	Moderate
Phenylacetaldehyde	PAA	122-78-1	Moderate
Sodium lauryl sulfate	SLS	151-21-3	Non-sensitizer
Lactic acid	LA	50-21-5	Non-sensitizer

C. 研究結果

C-1) プレバリデーションの結果

表2に示すように、IVMにおいて、乳酸が3回のうち2回で陽性となった。また、表3に示すように、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。

C-2) 原因追究

C-2-1) 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。図1に示すように、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、図2に示すように、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。

C-2-2) 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、図4に示すように、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。

C-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、バリデーション運営委員会に提出した。

D. 考察

2011年1月27日、バリデーション運営委員会より、h-CLATは4施設とも評価試験に進むことを認めるという通知を受けた。

一方、さらにIVMはこれまで使用していたAriaではなく、新たに購入したCanto IIを用いて評価を行うことを希望してきたため、トレーニングを新たに行った。

4施設は2011年3月より、バリデーション phase Bに入り、全ての施設が無事に次

のステップに進行できることとなった。

今後、3月24、25日に第6回バリデーション運営会議が開催され、現状が確認されるとともに、2011年11月までに9品(stage I) +45品(stage II)の評価終了を目指すことになると考えている。

E. 結論

h-CLATバリデーションにおいて、技術移転の段階で生じた2施設の不具合を解決できた。これらの事項をSOPに盛り込み、次の段階に進むことになった。

F. 参考文献

- 1) Ashikaga T., Yoshida Y., Hirota M., Yoneyama K., Itagaki H., Sakaguchi H., Miyazawa Y., Ito Y., Suzuki H., Toyoda H., Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol, *Toxicology in Vitro*, 20, 767-773, 2006.
- 2) Sakaguchi H., Ashikaga T., Miyazawa Y., Yoshida Y., Ito Y., Yoneyama K., Hirota M., Itagaki H., Toyoda H., Suzuki H., Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT) II. An inter-laboratory study of the h-CLAT, *Toxicology in Vitro*, 20, 774-784, 2006.
- 3) 足利太可雄、坂口齊、ヒト細胞株(THP-1)を用いた皮膚感作性試験代替法の開発と2施設間バリデーション、フレグランスジャーナル、8、108-111、2004.
- 4) Ashikaga T., Sakaguchi H., Okamoto K., Mizuno M., Sato J., Yamada T., Yoshida M., Ota N., Hasegawa S., Kodama T., Okamoto Y., Kuwahara H., Kosaka N., Sono S and Ohno, Y., Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study, *AATEX*, 13 (1), 27-35, 2008
- 5) Kosaka N., Okamoto K., Mizuno M., Yamada T., Yoshida M., Kodama T., Sono S., Ashikaga T., Sato J., Ohta N., Hasegawa S., Okamoto Y., Kuwahara H., Sakaguchi H. and Ohno, Y., A study of the criteria for THP-1 cells selection in the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) : Results of 2nd Japanese Inter-laboratory Study, *AATEX*, 13 (2), 55-62, 2008.
- 6) Sono S., Yamada T., Kosaka N., Okamoto K., Mizuno M., Sato J., Yoshida M., Ota N., Kodama T., Okamoto Y., Kuwahara H., Sakaguchi H., Hasegawa S., Ashikaga T. and Ohno, Y., A study on serum difference on test results in the human Cell Line Activation Test (h-CLAT): Results of 3rd Japanese inter-laboratory study, *AATEX*, 13 (2), 63-69, 2008.
- 7) Mizuno M., Yoshida M., Kodama T., Kosaka N., Okamoto K., Sono S., Yamada T., Hasegawa S., Ashikaga T., Kuwahara H., Sakaguchi H., Sato J., Ota N., Okamoto Y. and Ohno, Y., Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results: Results of the 4th Japanese inter-laboratory Study, *AATEX*, 13 (2), 70-82, 2008
- 8) Kosaka N., Inaba H., Okamoto K., Mizuno M., Sono S., Kato Y., Kishi M., Ashikaga T., Okamoto Y., Kuwahara H., Nakamura T., Sakaguchi H., and Ohno, Y. 11. Results of the Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (5th Report): A study for evaluating preservative skin sensitization potential using h-CLAT, *AATEX*, 15 (2), 71-80, 2010
- 9) Okamoto K., Kato Y., Kosaka N., Mizuno M., Inaba H., Sono S., Ashikaga T., Nakamura T., Okamoto Y., Sakaguchi H., Kishi M., Kuwahara H., and Ohno, Y., Results of a Japanese ring study of

human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization (6th Report): A Study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT, *AATEX* 15 (2), 81-88, 2010

- 10) Sono S., Mizuno M., Kosaka N., Okamoto K., Kato Y., Inaba H., Nakamura T., Kishi M., Kuwahara H., Sakaguchi H., Okamoto Y., Ashikaga T. and Ohno, Y., Results of a Japanese ring study of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th Report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials, *AATEX* 15 (2), 89-96, 201

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 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)

- 2) 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)
- 3) 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

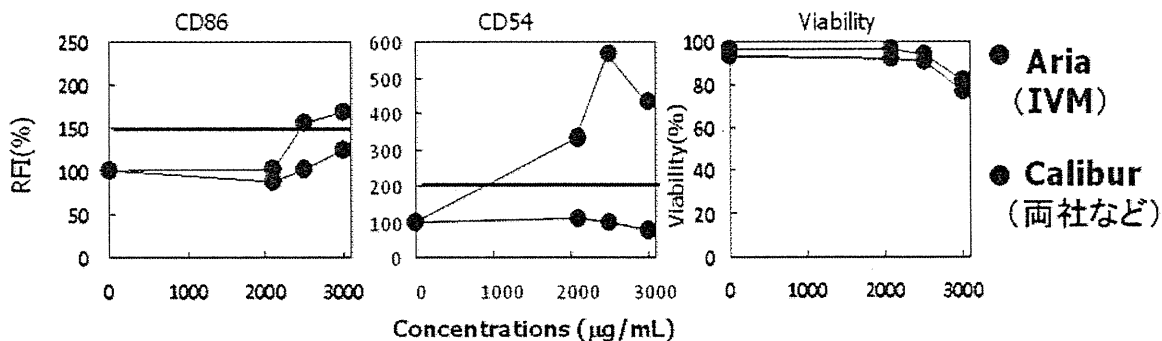


図 1. FACS 機種による乳酸処理細胞の挙動の相違

表 2. IVM の実験結果

Test chemical	Dose (mg/mL)	CD86 RFI			CD54 RFI			Cell viability			Judgement
		1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd	
DNCB	2.7	83	87	110	92	80	76	96	98	92	CD86 : 2/3 CD54 : 3/3 Positive
	3.2	82	93	302	113	68	349	96	97	84	
	3.9	82	75	357	74	50	414	95	99	82	
	4.6	59	54	391	121	63	743	97	98	80	
	5.6	78	67	339	207	66	958	94	97	84	
	6.7	233	97	250	1157	76	1223	78	98	75	
	8.0	295	113	217	1908	263	1199	73	83	75	
	9.6	99	97	123	347	88	419	64	98	88	
NiSO4	67	239	169	193	523	286	631	87	89	89	CD86 : 3/3 CD54 : 3/3 Positive
	80	274	222	252	627	408	775	87	84	86	
	96	273	279	253	1017	739	965	78	80	84	
	116	244	262	271	1400	1080	1437	78	80	76	
	139	233	234	235	2058	1654	2268	77	75	72	
	167	212	217	205	3136	2219	3653	75	69	61	
	200	231	143	230	4700	3108	6168	74	70	58	
	240	261	148	159	5208	3316	7959	71	65	52	
PAA	17	132	104	64	501	158	167	95	93	98	CD86 : 2/3 CD54 : 3/3 Positive
	20	120	103	84	805	212	422	97	94	97	
	24	131	101	81	1042	236	464	96	92	96	
	29	148	122	91	1283	341	843	97	92	95	
	35	214	161	66	2362	386	361	93	95	96	
	42	219	243	107	2167	492	1157	94	88	92	
	50	348	355	138	2766	609	1438	84	60	88	
	60	-	-	-	-	-	-	42	38	45	
SLS	18	124	109	77	92	178	108	97	99	98	CD86 : 0/3 CD54 : 1/3 Negative
	22	128	77	94	111	173	101	98	99	97	
	27	98	69	71	133	126	93	97	98	97	
	32	110	93	77	133	170	109	94	98	97	
	38	126	92	60	179	153	102	96	98	97	
	46	123	79	79	192	247	135	90	96	98	
	55	98	79	69	186	269	146	65	86	85	
	66	-	-	-	-	-	-	33	11	39	
LA	1005	97	86	114	98	120	72	96	95	97	CD86 : 2/3 CD54 : 0/3 Positive
	1206	83	80	88	69	121	88	97	93	98	
	1447	57	77	61	71	115	64	97	93	98	
	1736	81	69	66	129	150	98	97	95	98	
	2083	74	56	95	107	165	108	95	93	97	
	2500	165	63	95	112	141	64	93	93	94	
	3000	176	62	159	20	116	84	74	80	84	
	3600	-	-	-	-	-	-	10	22	6	

表 3. Bioassay 社の実験結果

Test chemical	Dose (mg/mL)	CD86 RFI			CD54 RFI			Cell viability			Judgement
		1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd	
DNCB	2.7	134	384	338	111	283	258	89	84	85	CD86 : 3/3 CD54 : 3/3 Positive
	3.2	147	510	409	102	383	276	89	80	85	
	3.9	181	597	505	156	506	370	85	76	80	
	4.6	235	752	658	200	634	364	79	71	74	
	5.6	224	690	799	200	719	744	79	69	68	
	6.7	241	542	672	354	906	1524	66	57	53	
	8.0	210	-	-	361	-	-	67	46	45	
	9.6	-	-	839	-	-	1380	43	28	53	
NiSO4	67	198	186	252	385	321	285	93	92	92	CD86 : 3/3 CD54 : 3/3 Positive
	80	208	186	291	550	308	431	92	91	90	
	96	269	236	298	839	524	841	91	90	86	
	116	195	242	348	1209	837	1406	87	87	82	
	139	99	255	320	1628	1306	1159	84	84	83	
	167	220	210	295	2909	1932	2035	80	82	76	
	200	198	209	267	3826	2656	3485	78	77	69	
	240	202	201	299	4978	3577	4711	72	73	60	
PAA	17	141	187	151	-180	525	782	92	92	92	CD86 : 3/3 CD54 : 3/3 Positive
	20	148	195	157	684	583	1321	90	92	91	
	24	177	218	190	727	708	1700	89	91	92	
	29	195	202	177	927	855	2213	86	90	84	
	35	244	260	140	913	923	1958	79	87	85	
	42	-	323	141	-	1193	2253	49	80	77	
	50	-	498	-	-	1547	-	18	55	21	
	60	-	-	-	-	-	-	11	47	17	
SLS	18	95	74	67	69	86	54	92	94	94	CD86 : 1/3 CD54 : 0/3 Negative
	22	92	81	89	70	65	57	91	94	95	
	27	90	85	44	85	91	64	90	94	94	
	32	246	92	101	43	94	86	90	93	92	
	38	88	97	124	59	97	113	91	88	82	
	46	79	-	-	93	-	-	89	36	37	
	55	66	-	-	31	-	-	90	13	4	
	66	102	-	-	69	-	-	84	7	6	
LA	1005	68	80	77	89	221	108	93	94	95	CD86 : 0/3 CD54 : 1/3 Negative
	1206	69	92	80	97	90	108	93	94	95	
	1447	64	72	65	108	89	103	93	94	95	
	1736	71	87	65	81	123	97	94	94	96	
	2083	88	72	43	110	132	79	93	94	96	
	2500	80	82	63	122	153	79	91	93	94	
	3000	79	118	74	86	239	61	81	88	92	
	3600	-	-	-	-	-	-	2	33	2	

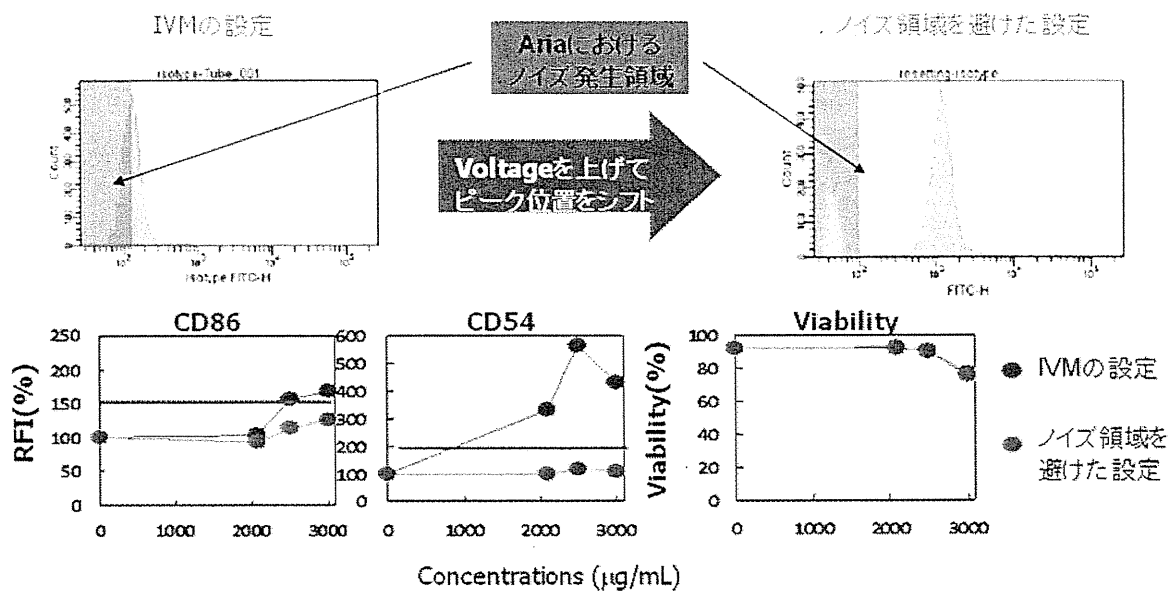


図2. 日本ベクトンディッキンソン社による乳酸処理細胞における FACS 条件の検討結果

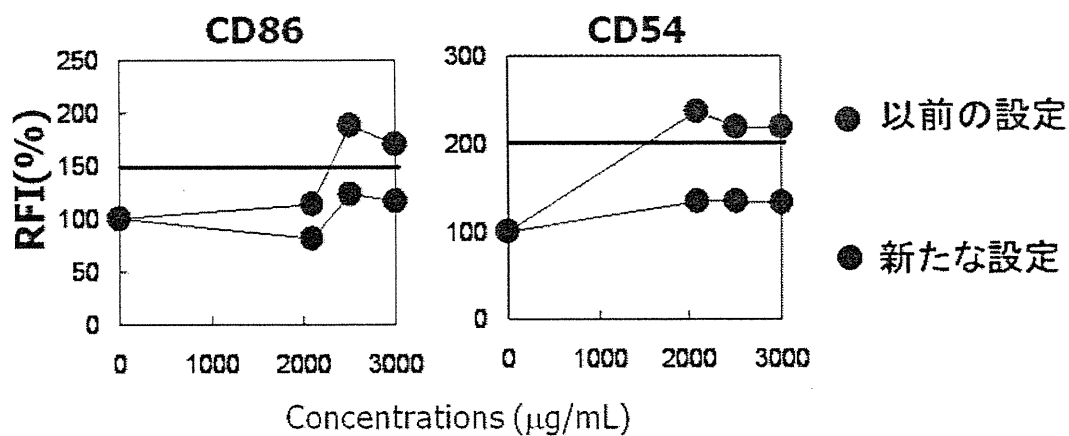


図3. IVM による乳酸処理細胞の改善結果

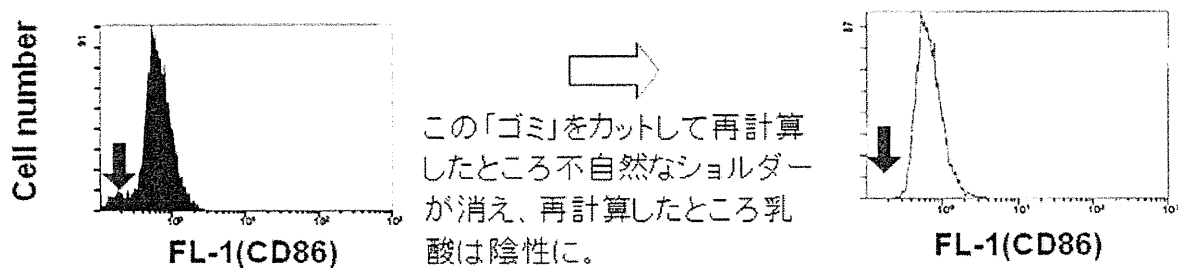


図4. Bioassay 社における乳酸処理細胞結果の改善

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
研究分担報告書

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

研究分担者 森田 健 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部第四室室長
研究協力者 福島久美子 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部第四室
森川 馨 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部部長

研究要旨

96 ウェルプレート法を用いた Bhas 42 細胞形質転換試験 (CTA) のバリデーション研究、特に phase-II バリデーション試験における被験物質の選択にあたり、試験目的、背景（プレおよび phase-I バリデーション試験、ならびに 6 ウェルプレート法 Bhas 42 CTA を含む他の CTA バリデーション研究での使用歴）、発がん性 (IARC 分類等)、既存標準的遺伝毒性試験結果、特性（物性および化学物質クラス）、ならびに入手可能性を検討した。その結果、6 ウェルプレート法の試験結果のあるものの中から、発がん物質として 5 物質、発がんプロモーターとして 3 物質、非発がん物質として 8 物質の計 16 物質を選択した。今回選択した 16 の被験物質は、バリデーション済みの 6 ウェルプレート法と 96 ウェルプレート法をつなぐ本バリデーション研究の phase-II 試験の目的を十分に果たすものと考えられる。

A. 研究目的

国際的に認知された試験として行政的に受け入れられる安全性試験の新規開発あるいは改良には、OECD Guidance Document 34 (GD34)¹⁾により規定されたバリデーション研究および専門家による第三者評価を経る必要がある。ここでバリデーションとは、当該試験法について、その信頼性および妥当性を確立するためのプロセスのことであり、バリデーション研究はそのための科学的活動と理解される。

Bhas 42 細胞形質転換試験は、遺伝毒性発がん物質のみならず、発がんプロモーターを含めた非遺伝毒性発がん物質を検出可能な *in vitro* 試験法であり、行政使用可能な試験法として OECD ガイドライン化を図っている。試験には、Balb/c 3T3 細胞 (Balb/c

マウスの胎児から採取し繊維芽細胞株) に v-Ha-ras 遺伝子 (活性型がん遺伝子) を組み込んだ Bhas 42 細胞を用いる。本細胞は接触阻止を示すが、発がんイニシエーションを受けた段階にあると考えられており、発がん性物質であるイニシエーターまたはプロモーター処理により、一部の細胞は接触阻止能を失い形質転換巣を形成する。具体的には、細胞を 6 または 96 ウェルプレートに播種し、イニシエーター検出系では播種後 1~4 日目まで処理し、プロモーター検出系では播種後 4~14 日目まで処理し、21 日目に固定・ギムザ染色し、形質転換巣を判定するものである。

本試験は、2 段階 *in vitro* 発がん性試験としての有用性から、食品薬品安全センター 秦野研究所において、6 ウェルプレート法

によるバリデーションが実施され、すでに終了している^{2,3)}。今般、更なるハイスループト化のために 96 ウェルプレート法を構築し、そのバリデーションを実施するにあたり、被験物質の選定について検討した。

B. 研究方法

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ョン試験が先行している試験系がある^{4,5)}。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ョン試験が実施されている^{2,3)}。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、およ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 および Balb/c 3T3 CTA との比較/差別化の観点から、ECVAM における両 CTA のバリデーション試験での使用物質を被験物質に含める。また、バリデーション試験の各 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⁶⁾ならびに動物における発がん性関連試験結果報告基づいた²⁾。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) および非発がん物質 (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 試験および 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 染色体異常試験および 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^{3,7,8)}。

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 HSDB⁹⁾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。

C. 研究結果

96 ウェルプレート法による Bhas 42 CTA のバリデーション試験の目的は、

- 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およ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 バリデーション試験のためのプロトコール作成のためにプレバリデーション試験を実施した。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-Methylchroranthrene (3MC, as initiator)
- ✓ 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA, as promoter)

次に、試験施設間の再現性を検証するための Phase-I バリデーション試験を実施した。ここでは、SHE CTA および Balb/c 3T3 CTA のバリデーション試験において 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（バリデーション試験）で用いた被験物質（N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), B[a]P, Pyrene, Benz[a]anthracene, Anthracene, Mezeroin, 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：

- 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試験の目的には合致しにくいことから、MNNG, Lithocholic acid および 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試験の結果をふまえ、phase-II バリデーション試験を実施した。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

これらの被験物質の構造、発がん性、溶解性、蒸気圧、化学物質クラスを Table 1 に、6 ウェルプレート法による Bhas 42 CTA の結果ならびに各種の遺伝毒性試験の結果を Table 2 に示す。

なお、陽性対照物質として以下の 2 物質を用いた：

- 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。

D. 考察

バリデーション研究における被験物質の選択は、当該研究の成否に大きな影響を与える。バリデーション研究の目的に沿う特性を有する化学物質を適切な数で選択しなければならない。これらは、科学的観点から選択されるが、研究で用いる試験系や目的も考慮する必要がある。

今回の 96 ウェルプレート法 Bhas 42 CTA の phase-II バリデーション試験における被験物質の選択法として、既存 Bhas 42 CTA 6 ウェルプレート法データの有無、Phase-I バリデーション試験の結果をふまえた同試験での未検討物質、化学物質の発がん性（IARC 分類、プロモーター評価）、既存の標準的遺伝毒性試験結果、特性（溶解性、揮発性）および化学物質クラスを考慮した。従って、今回選択した 16 の被験物質は、バリデーション済みの 6 ウェルプレート法と 96 ウェルプレート法をつなぐ本バリデーション研究の phase-II 試験の目的を十分に果たすものと考えられる。本 phase-II バリデーション試験の結果の検証が待たれる。

参考文献

- 1) OECD, Series on testing and assessment Number 34, Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment, ENJ/JM/MONO, 14 2005. <[http://applied.oecd.org/olis/2005doc.nsf/linkto/env-jm-mono\(2005\)14](http://applied.oecd.org/olis/2005doc.nsf/linkto/env-jm-mono(2005)14)> OR

<[http://www.olis.oecd.org/olis/2005doc.nsf/Lin
kTo/NT00002EAE/\\$FILE/JT00188291.PDF](http://www.olis.oecd.org/olis/2005doc.nsf/Lin
kTo/NT00002EAE/$FILE/JT00188291.PDF)>

- 2) Tanaka, N., K. Sasaki, K. Hayashi, S. Kuroda, F. Mizuhashi, M. Nagai, H. Suzuki, T. Imamura, M. Asakura, H. Satoh, A. Sakamoto, R. Nakao, H. Horose, N. Ishii and M. Umeda: An interlaboratory collaborative study on a cell transformation assay using Bhas 42 cells, AATEX, 14, 831-848, 2009.
- 3) Sakai, A., K. Sasaki, D. Muramatsu, S. Arai, N. Endou, S. Kuroda, K. Hayashi, Y. Lim, S. Yamazaki, M. Umeda and N. Tanaka: A Bhas 42 cell transformation assay on 98 chemicals: The characteristics and performance for the prediction of chemical carcinogenicity, Mutation Res., 702, 100-122, 2010.
- 4) ECVAM: Pre-validation SHE cell transformation assays, Draft final report, December 2008.
- 5) ECVAM: Validation of Balb/c 3T3 cell transformation assays, Draft report, September 2009.
- 6) International Agency for Research on Cancer, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. <<http://monographs.iarc.fr/>>
- 7) Morita, T., N. Asano, T. Awogi, Y.F. Sasaki, S. Sato, H. Shimada, S. Sutou, T. Suzuki, A. Wakata, T. Sofuni and M. Hayashi: Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (Groups 1, 2A, and 2B), The summary report of the 6th collaboration study by CSGMT/JEMS·MMS, Mutation Res., 389, 3-122, 1997 [Erratum, Mutation res., 391, 259-267, 1997].
- 8) Kirkland, D., Kasper, P., Muller, L., Corvi,

R., Speit, G., Recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests: A follow-up to an ECVAM workshop, Mutat. Res., 653, 99-108, 2008.

9) HSDB: Hazardous Substance Data Bank, Micromedex.

<<http://csi.micromedex.com/fraMain.asp?Mnu=&Restore=Y>> OR TOXNET, NLM <<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?CHEM>>

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takeshi Morita, James T. MacGregor and Makoto Hayashi: Micronucleus assays in rodent tissues other than bone marrow, Mutagenesis, 26, 223-230, 2011.
- 2) Sheila Galloway, Elisabeth Lorge², 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)
- 3) Takeshi Morita and Kaoru Morikawa: Expert Review for GHS Classification of Chemicals on Health Effects, Industrial Health (submitted)

2. 学会発表

- 1) 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）
- 2) 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）
- 3) 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）

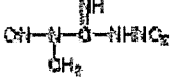
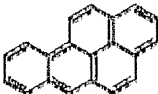
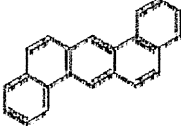
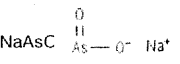
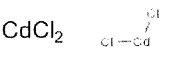
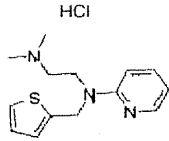
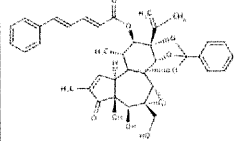
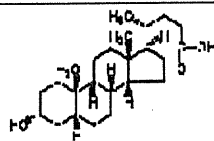
3. 公刊図書

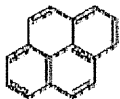

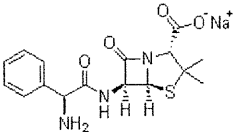
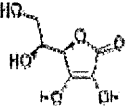
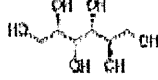
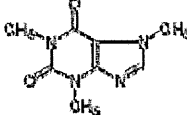
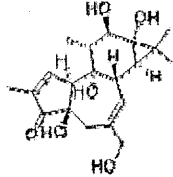
- 1) 城内 博、宮川宗之、森田 健：英和对訳最新 OECD 毒性試験ガイドライン、化学工業日報社、東京（2010）

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

Table 1. Chemical properties on 16 coded test chemicals for Bhas 42 CTA with 96-well method in phase II validation study

#	Chemical Name	M.W.	Chemical structure	CAS	IARC [as May 2010]	Appearance	Water solubility	Solubility (Other solvents)	Vapor pressure (Volatile)	Chemical class
1	N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)	147		70-25-7	1 (C)	Solid	Slightly sol (< 0.5%) <poor>	Soluble in DMSO	(Maybe No)	Nitrosoguanidine; Alkylating agent
2	Benzo[a]pyrene	252		50-32-8	1 (C)	Solid	1.60X10-3 mg/L at 25C <very poor (almost insol)>	Sol in benzene, toluene, xylene, ether	5.49X10-9 mm Hg at 25C (extrapolated) (No)	Polycyclic aromatic hydrocarbon; Metabolic activation
3	Dibenz[a,h]anthracene	278		53-70-3	2A (C)	Solid	0.0005 mg/L at 27C <very poor (almost insol)>	Slightly sol in ethanol, soluble in acetone and benzene.	1.1X10-10 mm Hg (est) (Maybe No)	Polycyclic aromatic hydrocarbon; Metabolic activation
4	Sodium arsenite	130		7784-46-5	1 (as Arsenic cmpds) (C)	Solid	Freely sol <very good>	Slightly sol in alcohol	0% volatiles by volume at 21C (Maybe No)	Inorganic arsenite cmpd
5	Cadmium chloride	183		10108-64-2	1 (as Cadmium cmpds) (C)	Solid	140 g/100 mL at 20C <very good>	Soluble in acetone	10 mm Hg at 656C (No)	Inorganic cadmium cmpd
6	Methapyrilene hydrochloride	298		135-23-9	Not listed (TP)	Solid	1 gm dissolves in 0.5 mL water <very good>	1 gm dissolves in 5 mL alcohol, in 3 mL chloroform	(Unknown, Maybe No)	Heterocyclic amine; Anti-histamin drug
7	Mezerein	655		34807-41-5	Not listed (TP)	Solid	Not soluble <very poor (almost insol)>	Soluble in DMSO or ethanol	(Unknown, Maybe No)	Diterpene cmpd; Protein kinase activater (Non-phorbol type)
8	Lithocholic acid	377		434-13-9	Not listed (TP)	Solid	0.38 mg/L at 20 C <very poor (almost insol)>	Freely sol in hot alc	(Unknown, Maybe No)	Steroid derivative (bail acid)

#	Chemical Name	M.W.	Chemical structure	CAS	IARC [as May 2010]	Appearance	Water solubility	Solubility (Other solvents)	Vapor pressure (Volatile)	Chemical class
9	Pyrene	202		129-00-0	3 (NC)	Solid	0.135 mg/L at 25C <very poor (almost insol)>	Sol in alc, ether, benzene	8.92X10 ⁻⁵ mm Hg at 25C (No)	Polycyclic aromatic hydrocarbon
10	epsilon-Caprolactam	113		105-60-2	4 (NC)	Solid	5.25X10 ⁺⁶ mg/L at 25C <very good>	Freely sol in methanol, ethanol; Soluble in benzene, ethanol, chloroform	1.9X10 ⁻³ mm Hg at 25C <No>	Amid; Lactam
11	Ampicillin sodium salt	371		69-52-3	3 (as Ampicillin, 69- 53-4) (NC)	Solid	50 mg/mL <moderate>		(Unknown, Maybe No)	Beta-lactam antibiotics
12	L-Ascorbic acid	176		50-81-7	Not listed (NC)	Solid	0.33 g/mL <good>	0.02 mg/mL in ethanol; Insol in ether, chloroform, benzene	7.9179 Pa @ 465.15 deg K= 0.06 mm Hg at 192C (No)	Lacton structure; Antioxidant
13	D-Mannitol	182		69-65-8	Not listed (NC)	Solid	2.16X10 ⁺⁵ mg/L at 25C <good>	Insol in ether	(No)	Sugar alcohol
14	Caffeine	194		58-08-2	3 (NC)	Solid	2.16X10 ⁺⁴ mg/L at 25C <moderate>	1 gm dissolves in 66 mL alcohol, 50 mL acetone, 5.5 mL chloroform, 530 mL ether, 100 mL benzene	7.3X10 ⁻⁹ mm Hg at 25C (est) (No)	Purine alkaloid
15	Phorbol	364		17673-25-5	Not listed (NC)	Solid	Quite sol <good/very good>	Quite sol in polar solvents	(Maybe No)	Diterpene cmpd