20113300４A

厚生労働科学研究費補助金

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

（Ｈ２１－化学－一般－００４）

平成 23 年度　総括・分担研究報告書

研究代表者　大野泰雄

平成 24 年（２０１２）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（*in vivo*）のバリデーション------ 139
小島　肇

3．遺伝毒性試験法コメットアッセイ（*in vitro*）のバリデーション研究-- 203
本間　正充

4．遺伝毒性試験法の統計解析 ---------- 211
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 ---------- 213
能美　健彦

6．*in vitro*皮膚感作性試験代替法のバリデーション ---------- 219
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 -------- 223
森田　健

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ---------- 251

IV. 研究成果の刊行物･別刷 ---------- 257

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
平成23年度総括研究報告書

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
（H21-化学-一般-004）

研究代表者　大野 泰雄　国立医薬品食品衛生研究所　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　(ERα)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 ERα アンタゴニスト測定法（HeLa 法）及び②米国で開発された Lumi-Cell 法、及び③AR-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。

本年度までの主な成果として、①Lumi-Cell 法のバリデーションを終了し、OECD テストガイドライン案を作成した、②*in vivo* コメットアッセイのバリデーションを成功裏に終了できた、③被験物質の選択を中心とするバリデーションの手順をまとめることができた。

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・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、動物実験における 3Rs（Reduction、Refinement 及び Replacement)の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、欧米及び韓国の動物実験代替法研究機関や我が国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して、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(ERα)アンタゴニスト測定法（HeLa 法)、②米国で開発された ERα に対するレポーターアッセイ Lumi-Cell 法、③AR-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 *in vivo* 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。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及び23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た。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た。

B.研究方法

B-1) 内分泌かく乱物質スクリーニング法

B-1-1) 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（HeLa 法）

HeLa 法は、ヒト由来の細胞(HeLa cell)に、ヒトエストロゲン受容体 ERα 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。本法は、厚生労働省及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、TG455 ガイドライン化にあたり OECD より要求された HeLa 法のガイドライン化に向けたバリデーションを実施した。バリデーション実施にあたり国立医薬品食品衛生研究所 JaCVAM（Japanese Center for the Validation of Alternative Methods）が中心となり JaCVAM、欧州 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を組織し、バリデーション全体の進捗管理、各施設からの試験結果の収集と解析及びを行うとともに、得られた結果をもとに評価成立基準の最適化を含む必要なプロトコルの調整を行った。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バリデーション実行委員会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、平成22年度から新たに(株) 日吉がバリデーション施設として参加し、バリデーションを開始した。本年度は、昨年度、(株) 日吉において実施した Task 2 データを反映して更新した成立基準をもとに、Task 3 試験を開始したものの成立基準値をクリアできず、原因解明のため HeLa9903 細胞を構築した住友化学(株)より別ロットの細胞を入手して検討した。その結果、試験系（細胞）自体の問題が疑われたため、解決のためリードラボである CERI において、細胞や培地を含む試験条件の再検討を実施した。

B-1-2) Lumi-cell ER（BG1 細胞）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。ヒト卵胞がん細胞（BG1 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、米国 ICCVAM/NICEATM が中心となって、米国 ICCVAM から提案されたプロトコルに従いアゴニスト・アンタゴニスト両法について 4 Phase からなる国際バリデーションを実施した。バリデーション実行委員会には、JaCVAM、ICCVAM/NICEATM、ECVAM 及び韓国 KoCVAM（平成22年度より）が参加し、試験実施施設として米国、日本、欧州の3施設（XDS、ECVAM、(株) 日吉）が参加した。本研究班では、我が国の参加施設である（株）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、バリデーション実行委員会において日米欧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、バリデーション報告書及び ICCVAM ガイドライン案の第三者評価に協力した。本年度は ICCVAM ガイドラインをもとに、OECD に対して本試験法のガイドライン案（アゴニスト・アンタゴニスト）及び STTA 法を含むアゴニスト評価系の PBTG 案の ICCVAM からの提案に協力するとともに、OECD VMG-NA 会議において最終化に向けた議論を行った。

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検討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 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報告書及び OECD ガイドライン案を昨年度 OECD に提出した。今年度は OECD 第三者評価コメントへの対応及び第三者評価で要求された追加バリデーションについて、その実施計画を検討した。

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　化学物質リスク研究事業」において、日本環境変異原学会/哺乳類変異原性(MMS)研究会及び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（エチルメタンスルフォネート：EMS、2－アセチルアミノフルオレン：2-AAF、ニトロソジメチルウレア：NDU、マンニトール）をコード化し、参加 13 施設に 1 もしくは 2 物質を配布し、施設間再現性を検討した。

本年度は、化学物質の発癌性の予測性能の評価を目的に、バージョン14.2のプロトコルを用いて、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参加14施設がphase Ⅳ-2バリデーションを実施した。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物質をコード化した。1～6物質/施設に配布し、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。

② 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
⑦標本観察：サイバーゴールドで染色して観察

なお、%DNA　in tailにおけるデータ採用基準は以下に示す通りである。

陰性対照　　肝臓の平均値　1-8%
　　胃の平均値　　1-20%
陽性対照：EMS (エチルメタンスルフォネート)
　　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

B-2-2）*in vitro* コメットアッセイ

in vitro コメットアッセイの標準化と、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を実施中である。これまでの国際共同研究結果から指摘された問題点として、

i) 細胞毒性の問題（*in vitro* コメットアッセイには適切な細胞毒性の指標がないこと）
ii) S9 の問題（コメットアッセイに S9 の効果が現れないこと）

が指摘された。特に i)の問題ではコメット陽性反応は極めて強い細胞毒性でのみしか観察されないことから、コメットアッセイの有用性及びその結果の解釈が問題となった。

本年度はコメットアッセイ結果の評価、解釈を考察すると共に、その有用性を確認するために、TK6 細胞を用いて、以下に示す 6 種類の遺伝毒性もしくは非遺伝毒性物質についてコメット試験及び小核試験を実施し、両者の結果を比較検討した。

・ EMS
・ メチルメタンスルホネート (MMS)
・ 過酸化水素
・ γ線
・ マイトマイシン C (MMC)
・ トライトン X（Tri-X）

B-2-3)　コメットアッセイの統計解析

1）陽性判定基準

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直線回帰の検討結果で，r>0 が有意である＝陽性化合物. という判定では問題があると考えられる。各施設の結果が僅か 1 化合物で一致していることが試験系の妥当性を示すものとなり得るかは検討の余地がある。そこで、陽性結果が予想される構造異形の数化合物で用量を統一し，決定係数と傾き幅などを比較した。

2）重み付け

重み付け分析を採用するのであれば，重みの選択理由が非常に重要な課題となる。しかし，今回は重みを 1/SE とするべき理由を明確に誘導せずに結果の評価に利用した。精度を上げるため，1

本の試験管の50個データのSD/√50にして，平均値の分散として利用した（一般的にデータ変動を重みつき分析で考慮するのであれば，重みは分散Ve（SD*SD）を採用するのが普通である）。

B-2-4）トランスジェニックアッセイ

In vivo 遺伝毒性試験であるトランスジェニックアッセイ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行った。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、亜硫化ニッケル及び非発がん物質 2,6-ジアミノトルエン（2,6-DAT）の *in vivo* 遺伝毒性を検討した。施設間の結果を比較するとともにOECDガイドライン策定のためのデータ提供を行った。

gpt deltaラットを用いた共同研究には国内約10の参加施設を3グループに分け、各グループの1施設が動物実験を担当した。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* 遺伝毒性を検討した。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試験プロトコルを採用した。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。

B-3.皮膚感作性試験（h-CLAT法）

*in vitro*皮膚感作性試験バリデーション実行委員会には、日本からはh-CLATのリード施設として、花王（株）及び（株）資生堂が参加した。他の2つの参加施設は、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。

プレバリデーションの概要を以下に示す。

1）phase A stage Ⅱ

2010年4月より、2つの参加施設（Bioassay及びIVM）がそれぞれの施設で既知化合物を正しく評価できるかどうかを確認した。

2）phase B stage I

2011年4月より、施設間再現性検証のためにリード施設を含む4施設が、24物質のうち9物質をブラインドで1回、評価した（計9試験）。

3）phase B stage Ⅱ

2011年11月より、施設内再現性検証のために4施設が24物質のうち15物質をブラインドでさらに3回評価した（計45試験）。

B-4.バリデーションの手順に関する研究

B-4-1)被験物質の選択

コメットアッセイには、遺伝毒性試験において肝UDS試験に代わる第2の *in vivo* 試験としての役割が求められていることから、被験物質の選択に関しては、発がん性、GHS分類、遺伝毒性、化学物質特性、急性毒性及び入手可能性を考慮する必要がある。以下、各項目について述べる。

1) 発がん性

発がん性については、動物ならびにヒトについて考慮する必要がありIARC評価に基づいた。IARCで評価されていない物質については、動物における発がん性試験結果のデータベースであるCarcinogenicity Potency Database (CPDB)に基づいた。また、Kirklandら[4]は、*in vitro* 遺伝毒性試験の実効性を評価するための遺伝毒性物質ならびに非遺伝毒性物質のリストを報告しており、当リストに準じ、遺伝毒性発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性発がん物質及び非遺伝毒性非発がん物質の4種に分類することとした。

2) GHS分類

化学物質のGHS分類は、国連勧告に基づく新たなハザード分類である。EUでは、従来のAnnex IによるEU危険物分類から、REACH施行にあわせGHS分類に転換してきており、2008年12月にリストが発表された。当該リストに収載されている物質については、EUによるGHS分類（発がん性及び生殖細胞変異原性）を調査した。

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、*in vitro* 染色体異常試験及び *in vivo* 小核試験（血液系細胞）の結果を調査した。加えて、UDS試験の代替法としての位置づけから、肝UDS試験、既存のコメットアッセイならびに最近の *in vivo* 遺伝毒性試験の評価結果について調査した。

なお、発がん性分類も含めここでは、「遺伝毒性物質」を、Ames試験陽性あるいは標準的 *in vivo* 試験（主に赤血球小核試験）陽性の物質とした。

4) 化学物質特性

発がん物質は、遺伝毒性発がん物質と非遺伝毒性発がん物質に大別される。遺伝毒性試験の目的の1つは、遺伝毒性発がん物質の検出にあるが、遺伝毒性発がん物質は、その化学物質クラスあるいは作用様式（Mode of Action、MOA）が多種多様である。コメットアッセイが種々の遺伝毒性発がん物質に広く適用化可能か否かを検証するために、被験物質のクラスや発がんのMOAなど、関連する特性を、主にKirklandら、Moritaら、Sasakiら

の報告及びHSDBを利用して調査した。
5) 急性毒性
コメットアッセイのバリデーションにおける使用動物種はラットである。コメットアッセイの実施において、提供する被験物質量ならびにその投与量の設定は重要である。それらの一助とするために、経口投与によるラット急性毒性（LD_{50}）値を、原則としてRTECSデータベースを、また、必要に応じChemIDPlus等を利用して調査した。
6) 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、取り扱いや輸送の規制、高価格による経費的制限などの観点から、国際的バリデーションとしての使用には適当ではなく、結果として被験物質として採用できないものがある。そこで、一般的試薬メーカーにおける市販品や在庫の有無、包装量、ならびに価格を調査した。

（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)内分泌かく乱物質スクリーニング法
C-1-1)HeLa法
(株）日吉におけるTask 3測定では、リファレンスプレートにおいて、濃度決定試験を含む合計5測定が実施され、1回目（濃度決定試験）を除いて、2回目以降の結果では、いずれの測定結果でも共通する項目(OHTのIC30及びRU486のIC30, IC50）で成立基準を逸脱した。一方、コード化化合物の判定結果は、既にTask 3が終了している2施設と比較して(株）日吉の測定結果は、リファレンスプレートが成立基準を逸脱していることからプロトコル上、不採用ではあるが、コード化合物の陽性・陰性判定結果は他の2施設と良く一致した。
Task 3測定において、特に2測定目以降で成立基準を満たすことが出来なかった原因について1測定目とそれ以降の測定の違いを検討した結果、1測定目とそれ以降では、使用した細胞の系列が異なり、1測定目で用いた細胞は、Task 2後半で使用した細胞の継代であるのに対して、それ以外の測定においては、新たに眠起した細胞系列を用いていた。系列の違いが原因であると特定されたわけではないが、継代の系列による細胞特性（反応性）の違いが疑われた。しかも、これらの細胞は、オリジナルは1系列でありCERIで培養されて分割して凍結されたものであることから、凍結や眠起もしくはその後継代によって差が生じた可能性が示唆された。さらに、同系列の細胞では、CERIにおいても成立基準を逸脱する結果となることが多く、さらにCERIにおいては別系列の細胞が保存されていなかったことから、HeLa9903細胞を構築した住友化学より、別ロットの細胞供給を得てリファレンスプレートのみの測定を実施した。(株）日吉では2種類のロットの細胞を入手して測定を実施したところ、いずれのロットも一部の項目を除き成立基準を満たしたが、1ロット（ER2J2011.6.8）を継代して実施した2回目測定結果では、多くの項目で成立基準を逸脱し、やはり継代の問題が示唆された。これらの結果から、(株）日吉におけるTask 3データの成立基準逸脱の原因は、細胞もしくは継代によるものと考えられたため、本系を開発したCERIにて測定系の再構築（細胞や血清の再選択）を実施することとなった。
CERIでは、(株）日吉における検討結果を踏まえ新たに住友化学から別ロットの細胞を幾つか入手して最も適した細胞、血清の選択を実施した。その結果、成立基準の全項目を再現良く満たす結果を示すロットとしてLot.10732が選択された。今後、再構築により再現良く成立基準を満たすことが確認されたロットの細胞及び血清を(株）日吉に供給して、予備測定の後、改めてTask 3を再開する予定である。

C-1-2) Lumi-Cell法
Lumi-Cell法バリデーションに関しては、昨年度、全てのバリデーションが終了し、その結果を反映した最終プロトコルについてバリデーション実行委員会の合意が得られた。本年度は、バリデーション結果を基に、ICCVAMガイドラインの第三者評価が実施され、本研究班では、評価報告書の作成や第三者評価に協力した。第三者評価では大きな問題点の指摘はなく、ICCVAMガイドラインが成立したことをうけ、BG1アッセイのOECDガイドライン案（アゴニスト・アンタゴニスト）とアゴニスト評価系についてはOECDガイドラインとなっているSTTA法（OECD TG455）とBG1アッセイを統合したパフォーマンスベーステストガイドライン（PBTG）案をICCVAMと共同で作成し、それぞれのガイドライン案についてはICCVAMからOECDに正式に提案を行い、VMG-NA会議において最終化に向けた議論を行った。VMG-NA会議においては、BG1アッセイガイドラインについては、既に成立したICCVAMガイドラインを基にしていることからあまり議論は行われず、議論の焦点は主にPBTGにおけるProficiency Chemicalsリス

ト及び Performance Standards における Reference Chemicals リストについてであった。PBTG における Proficiency Chemicals は、新たにいずれかの系（STTA、BG1）で測定を実施する試験施設が、技術的習熟度を示すため予め測定を実施すべき化合物であり、Performance Standards は、同じ目的の新たな測定系の開発（バリデーション）にあたって、必要となる条件を定めるものであり、Reference Chemicals は新たな測定系のバリデーションにおいて測定されるべき化合物である。PBTG における Proficiency Chemicals は、Performance Standards における Reference Chemicals のサブセットとなっており、STTA 及び BG1 双方のバリデーションで測定が実施されている化合物リストをもとに、なるべく幅広い化合物構造や活性強度をカバーするとともに、入手や使用の容易さ等の観点から、最終的に Reference Chemicals として 22 化合物、Proficiency Chemicals として 14 化合物について合意を得た。また、Performance Standards 当初案では、施設内再現性及び施設間再現性の確認において、いずれも 22 化合物の測定実施を求める案となっていたが、必要以上に多すぎるとの意見が出され、その後の電話会議において施設内再現性確認においては、リスト内から 8 化合物、施設間再現性については、残り 14 物質の測定を行うことで VMG-NA メンバー合意を得ており、WNT 提出案において該当部分の修正が行われることとなった。

C-1-3)AR-EcoScreen 法

AR-EcoScreen 法については、昨年度、本研究班開始以前に国内 3 施設で実施されたアゴニスト、アンタゴニスト測定の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ピアレビューのため OECD に提案した。本年度は、OECD 第三者評価で指摘されたコメントへの対応を実施した。殆どのコメントは、レポートの記載の追加や修正で対応可能であった。しかし、バリデーションでの化合物数がアゴニスト・アンタゴニスト各 5 化合物と少なく、試験結果でカバー出来る活性レンジが十分でないとの指摘が出され、VMG-NA 会議においてもコメントは妥当でありガイドライン化のためには追加試験が必要であるとの結論が示された。

OECD 第三者評価コメントへの対応として、追加バリデーションに向けて、以前のバリデーションにおけるリード施設である CERI とバリデーションの可否や実施体制、試験計画等について検討した。検討の結果、追加バリデーションは、既に実施済みのバリデーションと同一のプロトコルにより実施することとし、実施被験物質については、VMG-NA メンバーに提案を求め、VMG-NA メンバーで組織された小グループにより被験物質が提案された。また、実施組織として、バリデーション実行委員会を JaCVAM が中心となって設置し、参加試験施設については、CERI をリード施設としてその他は原則として以前のバリデーション参加施設とすることとした。ただし、以前の参加施設のうち 1 施設は当該試験を実施したラボを閉鎖してしまっていることから別施設を選択する必要があり、同種の測定系である HeLa 法バリデーション参加施設を軸に補充の 1 施設を探すこととなった。VMG-NA 会議の後、韓国 KFDA から JaCVAM に対してバリデーションへの参加希望が示され、技術トレーニングの後、予備測定を実施して結果が成立基準を満たすことを確認出来た後、参加を承認することとした。ただし、バリデーションの実施時期については、実施のための予算が未確定であることから、SPSF を共同提出した経済産業省の担当部局と協議の上、必要な予算が確定出来た段階で試験をスタートする予定である。

C-2.遺伝毒性試験

C-2-1）*in vivo* コメットアッセイ

すべて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。陰性対照の肝臓においては、1 施設の 1 回の結果を除いて、いずれも 1-8％のデータ受入れ基準を満たしており、高い施設内再現性が確認できたが、施設間の値にはわずかに差が見られた。受入れ基準を満たさなかったデータは被験物質コード A4236 の陰性対照であり、%DNA in tail が基準の 1 %より低かった。その他のデータはすべて基準を満たしていた。この施設は全体的に陰性対照値が低めであることもあり、国際実行委員会は本データの採用を決めた。施設毎の溶媒としては、蒸留水、生理食塩水、0.5%CMC、コーン油が使われていたが、平均値は 2～3.5%の間にあり、国際実行委員会は差がないと判断した。

一方、胃においては、すべての結果が 1-20％のデータ受入れ基準を満たしており、高い施設内及び施設間再現性が確認できた。施設毎の溶媒としては、蒸留水、生理食塩水、0.5%CMC、コーン油が使われていたが、コーン油の平均値は 14.0 (n=16)と他の平均値 9 前後よりやや高いと考察された。

陽性対照の肝臓においても胃においても、すべての結果が統計学的に有意に増加していた。

以上の結果から、すべてのデータは以後の解析に使用できることを国際実行委員会が確認した。

その他の問題として、標本観察において Lab M がプロトコルに定められたサイバーゴールドではなく、エチジウムブロマイド（EB）を使用した。国際実行委員会では本逸脱について審議し、EB が

一般的にコメットアッセイの DNA 染色に使用されている実績を考慮するとともに、陰性対照値がデータ採用基準内であったころから、この結果も採用となった。

以下の議論はコード開示前になされた。判定結果はそれぞれの施設における判定と国際実行委員会の解釈が食い違う場合もあるが、参加施設も含めた会議で議論し、最終判定を決めている。

昨年度に報告したデータを吟味した結果、A4205 及び A4217 の結果が不採用と判断された問題については、最高投与量においても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。これらの物質では溶媒を変更して濃度を溶解度限界まで高める設定を行う等により再試験が実施され、A4205 は Lab L による溶媒変更して達成した最高適用濃度の再試験結果が採用された。一方、A4217 は Lab N により 750mg/kg で再試験がなされたが、結果として致死用量であったことが確認された。よって、第一回目の結果（500mg/kg）が最終結果として採用された。

国際バリデーション実行委員会会議では、A4219、A4204 及び A4206 に再試験が要求された。この理由として、A4219 は統計学的な評価が難しいにも関わらず、Lab M が陽性と判断したことによる。また、A4204、A4206 については、高用量において%DNA in tail の増加が認められるものの、病理学的検査で細胞毒性が認められ、より低用量での再試験が Lab L にて必要と判断されたことによる。しかし、両施設とも再試験を実施できないと回答してきたことから、C-1)にも記載したように、Lab O にて再実験が実施されることになった。

最終的には、C-2)に記述したように、Lab O は 2012 年 2 月までにすべての実験を終了し、それらの結果が事務局に送付されてきた。

以下はコード開示後に議論された結果であるが、すべての結果を含む最終判定は、まだ案の段階であり、国際実行委員会の最終確認がなされていない。

1）遺伝毒性発癌物質

19 物質中、12 物質で肝臓及び／または胃において、%DNA in tail の統計学的に有意な増加が認められた。

ただし、12 物質中、A4220:Thiacetamide 及び A4228:Acrylonitritle の結果は、施設の判定と最終判定が食い違っているが、いずれも陽性と国際バリデーション実行委員会は判断している。残りの 7 物質の内、5 物質（A4114:2-Acetylaminofluorene、A4226: *o*-Anisidine、A4234:Benzene、A4203:Buslfan、A4217: Hydroquinone）は偽陰性と判断された。さらに、A4225:4,4'-Oxydianiline は胃において%DNA in tail が有意に減少した（肝臓は変化なし）。A4219: Sodium arsenite は Lab M の報告において、肝臓で%DNA in tail が増加したとされ、再試験で Lab O においては陰性と判定していることもあり、国際バリデーション実行委員会は Equivocal と判断した。

2）遺伝毒性非発癌物質

6 物質中、1 物質 A4214: 2,6-Diaminotoluene のみに肝臓で%DNA in tail が増加した。

3）非遺伝毒性発癌物質

7 物質中、1 物質 A4238: Chloroform のみが肝臓で%DNA in tail が増加した。しかし、病理学的な解析も合わせ、最終的には陰性と判断されている。よって、本分類はすべての結果が一致したことになる。

4）非遺伝毒性非発癌物質

8 物質中、1 物質 A4211: *t*-Butylhydroquinone のみが肝臓で%DNA in tail が増加した。国際バリデーション実行委員会は陽性と判断したが、実施施設はヒストリカルコントロールの範囲内と判定し、陰性と判断している。

C-2-2） *in vitro* コメットアッセイ

EMS、MMS、過酸化水素、γ線、MMC、Tri-X に関して、コメット試験、小核試験を行った。また、細胞毒性評価として、トリパンブルー染色による色素排除試験を、細胞処理直後、1 日後、2 日後に行った。また、細胞増殖抑制は処理後 2 日間で評価した。

EMS、MMS、過酸化水素、γ線は用量依存的なコメット反応と、小核誘発性を示した。MMC は小核試験のみ陽性で、コメットアッセイではむしろその反応性は陰性対照より減少した。非遺伝毒性物質である Tri-X は両者で陰性であった。

細胞毒性としてトリパンブルー染色による色素排除試験は、細胞処理直後では全てにおいて全く反応がなかった。1 日後、2 日後では時間経過に依存して反応が観察された。2 日間の細胞増殖抑制による細胞毒性（RSG）は Tri-X を除き、用量依存的な反応を示した。

コメットアッセイと小核試験の反応性を比較すると、小核試験の方が低用量から小核の誘発が見られたのに対して、コメットアッセイでは高用量のみで反応性が見られた。また、細胞毒性を考慮すると、コメット反応は細胞増殖がほとんどない用量からでないと観察されなかった。

C-2-3）コメットアッセイの統計解析

2 年間にわたる *in vitro* コメットアッセイのデータを眺めた結果，試験データ毎に異なる特性を示していることが判明した。

1. 概ね等分散性を示している。
2. 用量ごとの標準偏差/平均がほぼ一定（対数変換するとよいデータとなり得る）となっている。
3. 反応が曲線状を示す。

これがすべて本当だとすると、まだコメットアッセイ自体に改良の余地があると判断された。

C-2-4)　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 及び 30 mg/kg/day）、及び 2,6-DAT（60 mg/kg/day）を 28 日間連続投与し、最終投与後 3 日目に組織を採取して肝臓の *gpt* アッセイを行った。溶媒対照群に対して 2,4-DAT 投与群の *gpt* 突然変異体頻度は用量依存的に増加した。一方、60 mg/kg 2,6-DAT 投与群の *gpt* 突然変異体頻度は溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加はみられなかった。施設間比較においては、3 施設中 1 施設で 2,4-DAT を統計学的に有意に陽性判定できなかった。また、1 施設で他施設よりも突然変異体頻度が高値を示す傾向が見られた。

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、最終投与後 3 日目に組織を採取して腎臓と肝臓から DNA を抽出して *gpt* アッセイを行った。腎臓においては溶媒対照群に対してアリストロキア酸投与群の突然変異体頻度は用量依存的に増加した。肝臓においてもアリストロキア酸投与群の突然変異体頻度は用量依存的に増加し、腎臓と同等またはやや高値を示した。施設間比較においては、試験を行った 2 施設とも用量依存的な変異体頻度の増加を認め、施設間差は少なかった。単独施設の集計では、低用量群の変異体頻度増加に統計学的有意差がつかない傾向が見られた。

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 及び 90 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。施設間比較においては、試験を行った 4 施設が同様の結果となり、施設間差は見られなかった。さらに 1 施設において Spi⁻欠失変異体頻度の測定を行った結果、全群において欠失変異体頻度の有意な増加は認められなかった。

C-3.皮膚感作性試験　h-CLAT 法

1）phase A stage Ⅱ

当初 3 ヶ月で終了させる計画であったが、実際はトラブルの連続であり 1 年を要した。

2011 年 4 月に終了がバリデーション実行委員会に承認された。終了までの過程で、以下の課題を解決しながら進めた。

1. SOP の不備、解釈ミスなど試験法の不十分さとその把握の不正確さ、及び準備不足
2. 異常値の取り扱いと測定条件設定による偽陽性の発生

これらについては、直接それぞれの施設に行き実験を共に行うことで原因を究明し、測定機器メーカー及び統計学者と共に解決策を見いだした。

3. 陰性対象物質の変更など SOP の修正

SLS は偽陽性になることがあり、乳酸に変更した。また、試験実施に適した細胞を選択するため CD86 の発現量をもとに適切な細胞の選択基準を設定した。

2) phase B stage I

施設間で CD86 及び CD54 の発現パターンが異なる化合物が存在したが、被験物質名はまだコード開示されていないため、物質の特性に基づく考察はできない。プロトコルに従って全てのデータ取得が済された 8 物質に関する 4 施設の判定結果は完全に一致し施設間再現性は良かった。すべての施設において、実験終了が 2011 年 11 月のバリデーション実行委員会で確認された。

3) phase B stage Ⅱ

現在、進行中である。

C-4.バリデーションの手順に関する研究

B-4-1)被験物質の選択

候補被験物質の選択は第 1 次、第 2 次及び最終と 3 段階で行った。

1) 第 1 次選択物質

候補被験物質の発がん性、遺伝毒性、急性毒性、化学物質特性及び入手可能性を調査した。コメットアッセイの発がん予測性に関するバリデーションでは、最大 43 物質の使用が計画されているため、まず第 1 次選択として、約 2 倍の 88 物質を選択した。

遺伝毒性発がん物質として 40 物質を選択し、そのうち Ames 試験陽性が 31 物質、陰性（equivocal を含む）が 9 物質（いずれも *in vivo* 小核試験陽性）、UDS 試験では陽性が 14 物質、陰性が 12 物質、データなしが 14 物質であった。なお、Thioacetamide を、肝毒性を有する遺伝毒性発がん物質（Ames 試験及び *in vitro* 染色体異常試験で陰性だが、*in vivo* 小核試験で陽性）として選択した。遺伝毒性非発がん物質として 13 物質を選択し、そのうち Ames 試験陽性が 11 物質、陰性が 2 物質（いずれ

も *in vivo* 小核試験陽性)、UDS 試験では陽性が 2 物質、陰性が 2 物質、データなしが 9 物質であった。非遺伝毒性発がん物質として 19 物質（すべて Ames 試験陰性）を選択し、UDS 試験について陽性が 0 物質、陰性が 8 物質、データなしが 11 物質であった。本バリデーションでは、コメットアッセイの評価対象臓器を肝及び胃としている。肝臓における評価を検証するために、3 種の非遺伝毒性発がん性肝毒性物質（Chloroform, Ethanol, Methyl carbamate）を含めた。非遺伝毒性非発がん物質として 15 物質（すべて Ames 試験陰性）を選択し、そのうち UDS 試験陽性が 0 物質、陰性が 2 物質、データなしが 13 物質であった。前項の肝毒性物質の場合と同様、胃における評価を検証するために 1 種の非遺伝毒性非発がん性胃毒性物質（Sodium chloride）を含めた。また、コメットアッセイの陽性対照物質（遺伝毒性発がん物質）として、phase 1 から始まったこれまでの研究同様、Ethyl methanesulfonate を選択した。

2) 第 2 次選択物質

これらの暫定候補被験物質の中から、第 2 次選択として、化学物質類似性や入手可能性等による選別を行った。すなわち、phase 4 試験では、1 物質で 1 実施機関あたり、1 群 5 匹のラットを用い、用量設定試験で 1 回ならびに本試験で 3 回の計 4 回の経口投与が予定されている。被験物質必要量は、急性毒性値に基づく試験最高用量により異なってくるが、最高用量を 100 mg/kg とした場合の最低必要量は次のようになる：100 mg/kg は、ラット体重 200 g として 20 mg/匹に相当する。1 実施機関あたりの実消費量は、20 mg/匹 x 5 匹 x 2（2 倍希釈系列作成） x 4（投与回数）= 800 mg となる。これに加え、実際は、溶媒検討あるいはより高用量からの用量設定試験の開始が考えられ、1 g は最低必要と考えられる。試験最高用量の 2000 mg/kg の場合、実消費量は 16 g、最低必要量は 20 g となる。したがって、経費的観点から価格が ¥10000/g を超えるものは、原則として除くこととした。また、本邦の大手試薬メーカーによる取扱がないもの、在庫切れ（同一ロットによる必要量が確保できないもの）や重複した類似の化学物質クラスならびに適切な既存情報のあるものなどを除いた。また、必要に応じ代替品を検討した。

その結果、第 2 次選択では遺伝毒性発がん物質 24、遺伝毒性非発がん物質 6、非遺伝毒性発がん物質 7、非遺伝毒性非発がん物質 9 及び陽性対照物質 1 の計 47 物質を選択した。2 次選択されなかった 44 物質については、その理由は以下に集約される：

- ✓ 高価（16 物質、取扱が不便な 2 物質を含む）
- ✓ 類似性（16 物質）
- ✓ 発がん性あるいは遺伝毒性データの不備（7 物質）
- ✓ 取扱あるいは在庫なし（5 物質）

第 2 次選択 47 物質については、DNA 架橋剤の Mitomycin C 及び核酸アナログの Azidothymidine は、ともに遺伝毒性発がん性物質であり、その特徴的特性から候補物質としたが、購入経費が異常にかかることが判明した（施設間再現性をも考慮した 4 施設による検討では、Mitomycin C で計 228 万円、Azidothymidine で計 32 万円）。そのため、Mitomycin C の代替として Daunomycin あるいは Busulfan を、Azidothymidine の代替として Ganciclovir を検討した。

3) 最終選択物質

本バリデーションでは、最終的にコメットアッセイの発がん予測性を検証することとしている。そのための広範な検討が phase 4 - step 2 において実施されることとなり、最終選択物質として第 2 次選択 47 物質から 41 を選択した（陽性対照の 1 物質を含む）。選択から除かれたものは、以下の 6 物質である：

- 遺伝毒性発がん物質
  - ✓ Acrylamide（phase 2 で使用）
  - ✓ *N*-Methyl-*N*-nitrosourea (phase 3 及び phase 4 – step 1 で使用)
  - ✓ Mitomycin C（代替として Busulfan を使用）
  - ✓ Daunomycin HCl（MMC の代替）
  - ✓ Ganciclovir（AZT の代替）
- 非遺伝毒性非発がん物質
  - ✓ D-Mannitol（phase 3 及び phase 4 – step 1 で使用）

なお、既使用物質の中では、phase 2 で使用した遺伝毒性発がん物質の 2,4-Diaminotoluene 及び遺伝毒性非発がん物質の 2,6-Diaminotoluene は、phase 4 - step 2 においても使用することとなった。

最終選択の 41 物質は以下のとおりである。T

➢ <u>遺伝毒性発がん物質（19 物質）</u>

- ✓ 2-Acetylaminofluorene
- ✓ Acrylonitrile
- ✓ *o*-Anisidine
- ✓ Azidothymidine (AZT)
- ✓ Benzene
- ✓ Cadmium chloride
- ✓ *p*-Chloroaniline
- ✓ Cisplatin
- ✓ 2,4-Diaminotoluene
- ✓ 1,2-Dibromoethane
- ✓ 1,3-Dichloropropene
- ✓ 1,2-Dimethylhydrazine HCl
- ✓ Hydroquinone

- ✓ Methyl methanesulfonate
- ✓ *N*-Methyl-*N*-nitrosourea
- ✓ Busulfan
- ✓ *N*-Nitrosodimethylamine
- ✓ 4,4'-Oxydianiline
- ✓ Sodium arsenite
- ✓ Thioacetamide

➢ 遺伝毒性非発がん物質（6 物質）
- ✓ 9-Aminoacridine
- ✓ *p*-Anisidine
- ✓ 2,6-Diaminotoluene
- ✓ 5-Fluorouracil
- ✓ 8-Hydroxyquinoline
- ✓ *p*-Phenylenediamine 2HCl

➢ 非遺伝毒性発がん物質（7 物質）
- ✓ Chloroform
- ✓ Di(2-ethylhexyl)phthalate
- ✓ Ethanol
- ✓ Methyl carbamate
- ✓ Phenylphenol Sodium
- ✓ Saccharin
- ✓ Diethanolamine

➢ 非遺伝毒性非発がん物質（8 物質）
- ✓ Ampicillin trihydrate
- ✓ Anthranilic acid
- ✓ *t*-Butylhydroquinone
- ✓ Ethionamide
- ✓ Isobutyraldehyde
- ✓ D,L-Menthol
- ✓ Sodium chloride
- ✓ Trisodium EDTA monohydrate

➢ 陽性対照物質（1 物質、遺伝毒性発がん物質）
- ✓ Ethyl methanesulfonate

遺伝毒性非発がん物質として選択した 5-Fluorouracil は、IARC では発がんの陽性知見は認められないとしている一方、CPDB ではマウスにおいて発がん性陽性としている。しかしながら、一般的には、オランダ国立公衆衛生環境研究所（RIVM）による発がん性・変異原性・生殖毒性物質（CMR）分類にあるように、発がん性は陰性と考えられている [15]。非遺伝毒性非発がん物質として選択した Ethionamide は、CPDB ではマウスにおいて発がん性陽性としている。しかしながら、Kirkland らは、非発がん物質として分類しているとともに [4]、米国立がん研究所（NCI）の報告書では陰性と報告されていることから [16]、非発がん物質とした。

D.考察

内分泌かく乱物質は、生殖毒性を始めとした様々な毒性の原因となる分子イベントを引き起こす。本研究班では、化学物質による内分泌かく乱性を迅速評価するための *in vitro* スクリーニング法について多施設バリデーションによる再現性、信頼性についての検証を行い、OECD ガイドライン化を行うことを目的とした。OECD では、加盟国が行政的に利用可能な内分泌かく乱性の評価手法の開発整備を推進するため、5 段階からなるコンセプチュアルフレームワークに基づきスクリーニングレベルから確定試験に至る試験法開発を進めており、本研究で対象とする *in vitro* スクリーニング系は、そのうちレベル 2 に相当する。内分泌かく乱化学物質については、様々な問題が指摘されつつも、規制の根拠として国際的にコンセンサスの得られた試験法が無いため、内分泌かく乱性の観点からの化学物質によるヒトや環境へのリスクを的確に評価し、回避するために OECD フレームワークに示される各試験法のガイドライン化は重要である。本研究班で検討を進めてきた、各試験法については、バリデーションにより示された問題の解決等のため試験の進捗は当初計画より遅れているものの、これまでの成果として BG1 アッセイ（Lumi-Cell 法）については、本年度、ICCVAM ガイドラインが成立し、OECD にガイドライン提案をするに至った。また、アゴニスト測定系については、既に成立している TG455 の PBTG 化に向けたドラフトガイドライン案の提出に至った。また、HeLa 法については、バリデーション終了に至らなかったものの、国際的に受入れられる試験法とするためにはプロトコルの問題点を解決し、頑健な測定系とすることが重要であり、本研究で明らかとなった問題点の解決は、本研究班の研究目的に沿うものである。我が国では、現在のところ内分泌かく乱性による化学物質規制は検討されていないものの、非常に初期の段階からこの問題に取り組んできた経緯から、これまで OECD ガイドライン策定に多大な貢献をしてきている。本研究班における *in vitro* 評価法のガイドライン化においても非常に期待されており、早期のガイドライン化に向けた積極的な取り組みが今後も重要である。

遺伝毒性試験の中でも、*in vivo* コメットアッセイについては、バリデーション Phase Ⅳ-2 において、参加14施設（うち、国内4施設）の協力を得て、各施設が1～6物質を評価するバリデーションを実施した。結果として、2012年初頭にすべての実験を終了した。40物質の結果が国際バリデーション実行委員会で解析されているが、現時点では、判定結果もコメットアッセイの作用機構を考慮すると妥当なものであると判断されている。

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

デーションを実施中である。これまでの研究結果や、他の遺伝毒性試験結果との比較から、TK6 細胞を用いた現在のコメット試験の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。

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として、F344 *gpt* delta rat を用いた国内共同研究を行い、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* 変異原性を検索した。28 日間投与試験の結果をとりまとめた。

皮膚感作性試験については、h-CLATバリデーションにおいて、バリデーションphase B stage Iとして、9物質を用いた施設間再現性の検証が終了し、本年度までに、h-CLATの技術移転及び施設間再現性もほぼ確認できた。

バリデーションの手順の研究としての被験物質の選定については、施設内・施設間再現性の他に当該バリデーションの主目的を達成するために必要と考えられる最少限の被験物質数を検討した。この数は、試験の目的、種類、内容により異なってくる。次に、対象試験の毒性分野や種類に応じ、試験系の類似性（*in vitro/in vivo* 試験、使用動物種、毒性項目など）を考慮して、当該毒性分野や関連分野で検討され、その知見を有する物質を選出する。以降の種々の制約（絞込み）に対応できるよう十分な数の候補物質を収集する。候補物質の中から、科学的絞込みを行う。これには、化学物質クラス、化学物質構造、作用機序・作用様式、物性や既存情報の充実性が含まれる。この科学的絞込みと並行して、実際に候補物質を用いてバリデーションの実施が可能か否かを検証する実務的絞込みを行う。これには、毒性値、入手可能性、取扱い容易性、価格などが含まれる。これらの絞込み操作により、バリデーションに用いる最終被験物質を候補物質から選択する。この選択法は、試験の毒性分野や種類、*in vitro/in vivo* 試験を問わず、基本となる物質選定の一般原則として活用できるものと思われる。

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 *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。

本年度までの主な成果として、①Lumi-Cell 法バリデーションを終了し、OECD テストガイドライン案を作成した、②*in vivo* コメットアッセイのバリデーションを成功裏に終了できた、③被験物質の選択を中心とするバリデーションの手順をまとめることができた。

F. 研究発表

F-１．論文発表

1) 小島肇夫：動物実験代替法のおける国際協調、日薬理誌、138、103-107（2011）
2) 小島肇夫：経皮吸収と安全性、次世代経皮吸収型製剤の開発と応用、pp.157-164、シーエムシー出版、東京（2011）
3) 小島肇夫：監修及び序章、動物実験代替法と動物実験の住み分け、pp.3-9、第 1 章第 2 節　日本における各種承認申請に必要な安全性試験と代替法の受理の現状、pp.19-23、第 1 章第 3 節　REACH.GHS などの各種規制との違い、pp.24-29、第 2 章　皮膚腐食性試験の実験手法、pp.33-43、第 4 章　眼刺激性試験代替法の実験手法、pp.71-87、最新　動物実験代替法の技法ノウハウ、技術情報協会、東京（2011）
4) 小島肇夫：第 8 回国際動物実験代替法会議参加記、COSME　TECH　JAPAN,1(5):29-33(2011)
5) 小島肇夫：技術講座　安全性評価試験（1）、COSME　TECH　JAPAN,1（6）：10-13（2011）
6) Pfuhler S, Fellows M, van Benthem J, Corvi R, Curren R, Dearfield K, Fowler P, Frötschl R, Elhajouji A, Le Hégarat L, Kasamatsu T, Kojima H, Ouédraogo G, Scott A, Speit G: *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop, Mutat. Res., 723(2):101-7 (2011)
7) 小島肇夫：技術講座　安全性評価試験（2）、COSME　TECH　JAPAN,1（7）：18-22（2011）
8) Kano, S., Todo, H., Furui, K., Sugie, K., Tokudome, Y., Hashimoto, F., Kojima, H., Sugibayashi, K.: Comparison of Several Reconstructed Cultured Human Skin Models by Microscopic Observation: Their Usefulness as an Alternative Membrane for Skin in Drug Permeation Experiments, Altern. Animal Test. EXperiment, 16(2): 51-58（2011）
9) 小島肇夫：技術講座　安全性評価試験（3）、COSME　TECH　JAPAN、2(1)：73-77(2012)
10) 小島肇夫：技術講座　安全性評価試験（4）、COSME　TECH　JAPAN、2(2)：65-69(2012)
11) 小島肇夫：技術講座　安全性評価試験（5）、COSME　TECH　JAPAN、2(3)：44-49　(2012)

12) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. : Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, Altern Lab Anim., 40, 1-18 (2012)
13) Yoshihide Ueda, Masaru Tsuboi, Yasufumi Ota, Maki Makita, Takuya Aoshima, Madoka Nakajima and Isao Narama: Gastric mucosal changes induced by polyethylene glycol 400 administered by gavge in rats, of Toxicological Sciences, Vol.36(6), 421-428 , (2011)
14) Keiichi Itoh, Shoji Masumori, Madoka Nakajima, Makoto Hayashi, Hiroyuki Sakakibara, Kayoko Shimoi: Differences in micronucleus induction in peripheral blood reticulocytes of mice exposed to N-ethyl-N-nitrosourea at light and dark dosing times. Mutation Res., In press.
15) Madoka Nakajima, Maya Ueda, Kohji Yamakage, Yuzuki Nakagawa, Munehiro Nakagawa, Wakako Ohyama, Takashi Omori, Norihide Asano, Makoto Hayashi and Yoshifumi Uno: Tissue Sample Preparation for *In Vivo* Rodent Alkaline Comet Assay, Gene & Environment, Vol.34(1), 50-54 (2012)
16) Masato Naya, Norihiro Kobayashi, Makoto Ema, Sawako Kasamoto, Masahito Fukumuro, Shigeaki Takami, Madoka Nakajima, Makoto Hayashi and Junko Nakanishi: *In vivo* genotoxicity study of nanosized titanium dioxide particles using comet assay following intratracheal instillation in rats, Regulatory Toxi. And Pharmacology, Vol.62, 1-5 (2012)
17) Makoto Ema, Jin Tanaka, Norihiro Kobayashi, Masato Naya, Shigehisa Endoh, Junko Maru, Masayo Hosoi, Miho Nagai, Madoka Nakajima, Makoto Hayashi, Junko Nakanishi: Genotoxicityevaluation of fullerene C_{60}nanoparticles in comet assay using lung cells of ratsintratracheally instilled, Regulatory Toxi. And Pharmacology, Vol.62, 419-424 (2012)
18) H. Sui, R. Ohta, T. Shiragiku, A. Akahori, K. Suzuki, M.Nakajima, H. Hayashi, K. Masumura, T. Nohmi, Evaluation of *in vivo* mutagenicity by 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene in liver of F344 *gpt* delta transgenic rat dosed for 28 days: a collaborative study of the *gpt* delta transgenic rat mutation assay, *Genes and Environ.*, 34, 25-33 (2012).
19) Y. Kawamura, H. Hayashi, O. Tajima, S. Yamada, T. Takayanagi, H. Hori, W. Fujii, K. Masumura, T. Nohmi, Evaluation of the genotoxicity of aristolochic acid in the kidney and liver of F344 *gpt* delta transgenic rat using a 28-day repeated-dose protocol: a collaborative study of the *gpt* delta transgenic rat mutation assay, *Genes and Environ.*, 34, 18-24 (2012).
20) T. Kamigaito, T. Noguchi, K. Narumi, R. Takashima, S. Hamada, H. Sanada, M. Hasuko, H. Hayashi, K. Masumura, T. Nohmi, Evaluation of the *in vivo* mutagenicity of nickel subsulfide in the lung of F344 *gpt* delta transgenic rats exposed by intratracheal instillation: a collaborative study for the *gpt* delta transgenic rat mutation assay, *Genes and Environ.*, 34, 34-44 (2012).
21) G. Xing, X. Qia, M. Chen, Y. Wu, J. Yao, L. Gong, T. Nohmi, Y. Luan, J. Ren, Comparison of the mutagenicity of aristolochic acid I and aristolochic acid II in the *gpt* delta transgenic mouse kidney, *Mutat Res*, 743, 52–58 (2012)
22) N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Takamune, M. Yamada, M. Muramatsu, K. Masumura, M., T. Ohta, T. Tanaka, T. Nohmi, Modulatory effects of capsaicin on *N*-diethylnitrosamine (DEN)-induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* YG7108 and DEN-induced hepatocarcinogenesis in *gpt* delta transgenic rats, *Genes and Environ.*, 33, 160-166 (2011)
23) N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Muramatsu, K. Masumura, M. Takamune, M. Yamada, T. Ohta, T. Tanaka T. Nohmi, Chemopreventive effects of silymarin against 1,2-dimethylhydrazine plus dextran sodium sulfate-induced inflammation-associated carcinogenicity and genotoxicitiy in the colon of *gpt* delta rats, *Carcinogenesis*, 32, 1512-1517 (2011)
24) D. Hibi, Y. Suzuki, Y. Ishii, M. Jin, M. Watanabe, Y. Sugita-Konishi, T. Yanai, T. Nohmi, A. Nishikawa, T. Umemura, Site-specific *in vivo* mutagenicity in the kidney of *gpt* delta rats given a carcinogenic dose of ochratoxin A, *Toxicol. Sci.*, 122, 406-414 (2011)
25) A. Yamamoto, Y. Sakamoto, K. Masumura, M. Honma, T. Nohmi, Involvement of mismatch repair proteins in adaptive responses induced by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine against γ-induced genotoxicity in human cells, *Mutat. Res.*, 713, 56-63 (2011)
26) N. Koyama, M. Yasui, A. Kimura, S. Takami, T. Suzuki, K. Masumura, T. Nohmi, S. Masuda, N. Kinae, T. Matsuda, T. Imai, M. Honma, Acrylamide genotoxicity in young versus adult *gpt* delta male rats, *Mutagenesis,* 26, 525-529 (2011)
27) A. Sassa, T. Ohta, T. Nohmi, M. Honma, M. Yasui, Mutational specificities of brominated DNA adducts catalyzed by human DNA polymerases, *J. Mol. Boil.*, 406, 679-686 (2011)
28) K. Horibata, M. Saijo, M.N. Bay, L. Lan, I. Kuraoka, P.J. Brooks, M. Honma, T. Nohmi, A. Yasui, K. Tanaka, Mutant Cockayne syndrome group B protein inhibits repair of DNA topoisomerase I-DNA covalent complex, *Genes to Cells*, 16, 101-114 (2011)

29) A. Sassa, N. Niimi, H. Fujimoto, A. Katafuchi, P. Gruz, M. Yasui, R. C. Gupta, F. Johnson, T. Ohta, T. Nohmi, Phenylalanine 171 is a molecular brake for translesion synthesis across benzo[*a*]pyrene-guanine adducts by human DNA polymerase kappa, *Mutat. Res.*, 718, 10-17 (2011)
30) V. Thybaud, J.T. Macgregor, L. Muller, 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 and J. Van Benthem, Strategies in case of positive *in vivo* results in genotoxicity testing, *Mutat. Res.*, 723, 121-128 (2011)
31) Takeshi Morita, Masamitsu Honma, Kaoru Morikawa, Effect of reducing the top concentration used in the i*n vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, Mutation Research, 741, 32-56, 2012.
32) Takeshi Morita, James T. MacGregor and Makoto Hayashi, Micronucleus assays in rodent tissues other than bone marrow, Mutagenesis, 26, 223-230, 2011.
33) 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 Research, 723, 77-83, 2011.
34) Takeshi Morita and Kaoru Morikawa, Expert Review for GHS Classification of Chemicals on Health Effects, Industrial Health, 49, 559–565, 2011.
35) 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、追録版、化学工業日報社、東京、2011
36) 大野泰雄、薬理学における動物実験代替法研究の重要性、日本薬理学雑誌 138, 99-102, 2011.
37) Yudate HT, Kai T, Aoki M, Minowa Y, Yamada T, Kimura T, Ono A, Yamada H, Ohno Y, Urushidani T.　Identification of a novel set of biomarkers for evaluating phospholipidosis-inducing potential of compounds using rat liver microarray data measured 24-h after single dose administration. Toxicology. 295, 1-7, 2012.
38) Uehara T, Minowa Y, Morikawa Y, Kondo C, Maruyama T, Kato I, Nakatsu N, Igarashi Y, Ono A, Hayashi H, Mitsumori K, Yamada H, Ohno Y, Urushidani T. Prediction model of potential hepatocarcinogenicity of rat hepatocarcinogens using a large-scale toxicogenomics database. Toxicol Appl Pharmacol. 255, 297-306, 2011.

２．　学会発表

1) Kojima,H.: Update of skin equivalent and its regulatory use, BIT's 4th Annual World Congress of Industrial Biotechnology-2011, Dalin, China (2011.4)
2) 小島　肇：安全性評価のための in vitro 試験法を確立するために何をなすべきか、日本組織培養学会第 84 回大会、成育医療センター(2011.5)
3) 山本直樹、平野耕治、小島　肇、住友万里子、山下宏美、中村政志、原　和宏、谷川篤宏、谷口考喜、堀口正之：ヒト角膜組織より分離した角膜上皮細胞への不死化遺伝子の導入と評価、日本組織培養学会第 84 回大会、成育医療センター（2011.5）
4) 小島　肇：医薬品・医療機器の許認可に求められる安全性試験、第７回大阪大学医工連携シンポジウム 第２回　MEI 産学官連携部門勉強会講演会 大阪大学銀杏会館（2011.6）
5) Yamamoto, N., Hirano, K. , Sumitomo, M., Yamashita, H., Nakamura ,M., Hara , K., Tanikawa , A., Horiguchi, M., Taniguchi K. and Kojima, H. : Generation and Analysis of a New Immortalized Human Corneal Epithelium Cell Line, 2011 In Vitro Biology Meeting, Raleigh, North Carolina, USA(2011.6)
6) Kojima, H.: Current and future of correlation with japan and Korea on alternative to animal experiments, 8th　Congress of Korean Society for Alternative to Animal Experiments, Korea (2011.7)
7) 小島　肇：代替法から *in vitro* toxicology への発想転換、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会、パシフィコ横浜（2011.7）
8) 小島　肇：動物実験代替法の申請資料への活用、皮膚基礎研究クラスターフォーラム第６回教育セミナー、タワーホール船堀（20011.7）
9) 小島　肇：欧米、日本における代替法の現状と化粧品の安全性評価における代替法、千葉科学大学コスメティックサイエンスシンポジウム (第４回) 、化学会館・Ｆホール（2011.7）
10) Kojima, H. : Section II-11　The International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM), JaCVAM, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
11) Uno, Y., Kojima, H., Hayashi, M.: In vivo Comet assay: update on the ongoing international validation study coordinated by JaCVAM, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
12) Kojima ,H., Yamakage, K., Oba, S., Tsuge, H., Aoki, M.: Preliminary study of the revision of Japanese Pharmacopoeia test for rubber closure for aqueous infusions, 8th World Congress on

Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)

13) Ono, A., Takeyoshi , M., Bremer, S., Jacobs, M., Laws, S., Sozu, T. and Kojima, H.: Results of the validation study of the stably-transfected estrogen receptor alpha transcriptional activation antagonist assay using the HeLa9903 cell line, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)

14) Hayashi, K., Hayashi, T., Sakaguchi, M., Watanabe, S. and Kojima, H.: Inter-laboratory phase II validation study of *in vitro* eye irritation test; Short Time Exposure (STE) test, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)

15) Nakamura, M., Suzuki , T., Shinoda, S., Kato, M. and Kojima, H.: Additional validation of alternative skin irritation test method using LabCyte EPI-MODEL24 of cultured skin, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)

16) McFarland, R., Kulpa-Eddy, J., Isbrucker, R., Halder, M., Kojima, H., Johnson, N., Jones, B., Allen, D., Casey, W. and Stokes, W.: International workshop on alternative methods to reduce, refine, and replace the use of animals in human vaccine potency and safety testing, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)

17) Kulpa-Eddy , J., McFarland, R., Isbrucker, R., Halder, M., Kojima, H., Johnson, N., Jones, B., Allen, D., Casey, W. and Stokes, W.: International workshop on alternative methods to reduce, refine, and replace the use of animals in veterinary vaccine potency and safety testing, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)

18) Stephens, M., Kojima, H., Patlewicz-Tier, G., Spielmann H. and Telley, L.: AltTox.org: communication platform for 21st century toxicology, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)

19) Shuichi Hamada, Rie Takashima, Keisuke Shimada, Kazuyo Zaizen, Satoru Kawakami, Jin Tanaka, Hirotaka Matsumoto, Tomohiro Nakai, Hiroshi Suzuki, Shoji Matsumura, Hisakazu Sanada, Kenji Inoue, Shigeharu Muto, Soichiro Hagio, Aya Hayashi, Tomomi Takayanagi, Yousuke Ogiwara, Akihisa Maeda, Kazunori Narumi, Hironao Takasawa, Izumi Ogawa, Wakako Ohyama, Madoka Nakajima, Takeshi Morita, Hajime Kojima, Makoto Hayashi, and Masa Honma, Evaluation of Repeated Dose Liver Micronucleus Assay in Rats-Summary of The Collaborative Study by CSGMT/JEMS.MMS, 42nd EMS 2011 Annual Meeting, Montreal, Canada (2011.10)

20) Kojima, H.: Necessity of validation study of new or updated test methods for hazard assessment, Workshop on Validation of 3T3 Neutral Red Uptake Phototoxic Test, Guangzhou, China (2011.11)

21) Kojima, H.: JaCVAM update, シンポジウム動物実験代替法センターの国際協調、日本動物実験代替法学会　第 24 回大会、仙台（2011.11）

22) 小島肇：厚生労働省の新規対応、シンポジウム日本における代替法研究の新しい胎動、日本動物実験代替法学会　第 24 回大会、仙台（2011.11）

23) Kojima, H.: JaCVAM update、日本動物実験代替法学会　第 24 回大会、仙台（2011.11）

24) 丸山 裕子、湯浅 敦子、日置孝徳、笠原 利彦、小島肇：LLNA BrdU-ELISA におけるリンパ節細胞懸濁液調製方法の最適化に関する検討、日本動物実験代替法学会　第 24 回大会、仙台（2011.11）

25) 篠田伸介、萩原沙織、山口能宏、中村　牧、笠原利彦、芝井亜弥、加藤雅一、小島　肇：培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL24 皮膚刺激性試験法の追加共同研究、日本動物実験代替法学会　第 24 回大会、仙台（2011.11）

26) 内野　正、竹澤俊明、山下　邦彦、小島　肇、五十嵐良明、西村哲治：ビトリゲルチャンバーを用いた皮膚感作性試験代替法モデルの基礎的検討、日本動物実験代替法学会　第 24 回大会、仙台（2011.11）

27) 山口宏之、竹澤俊明、小島　肇：コラーゲンビトリゲル膜チャンバー内に構築したヒト角膜上皮モデルの有用性：化学物質暴露後の経上皮電気抵抗値の経時変化を指標として眼刺激性を外挿する新しいアプローチ、日本動物実験代替法学会　第 24 回大会、仙台（2011.11）

28) 加藤 義直、山本 直樹、山下 宏美、佐藤 淳、水谷 宏、中田 悟、小島 肇：新規不死化ヒト角膜上皮細胞株（iHCE-NY）を用いた眼刺激性試験代替法への取り組み 、日本動物実験代替法学会　第 24 回大会、仙台（2011.11）

29) 濱田修一、高島理恵、嶋田圭祐、財前和代、川上哲、田中仁、松本浩孝、中井智博、鈴木洋、松村奨士、真田尚和、井上健司、武藤重治、萩尾宗一郎、林亜耶、高柳智美、荻原庸介、前田晃央、成見香瑞範、高沢博修、小川いづみ、大山ワカ子、中嶋圓、森田健、小島肇、林真、本間正充：反復投与肝臓小核試験法の有用性の検討（MMS 共同研究）、日本環境変異原学会第 40 回大会、東京（2011.11）

30) 宇野芳文、小島肇、林真：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 3 報）、日本環境変異原学会第 40 回大会、東京（2011.11）
31) 中村 昌文、武吉 正博、小野 敦、小島 肇：国際的バリデーションの行われた三種類のエストロゲン様活性測定法の比較検証、環境ホルモン学会、東京(2011.12)
32) 小島 肇：動物実験代替法の国際的動向と JaCVAM 活動について、日本輸入化粧品協会技術部会、東京（2011.12）
33) 小島 肇：毒性発現機序からみたリスク評価の現実 「毒性試験の代替に病理が果たす役割」、第 28 回日本毒性病理学会総会、東京（2012.2）
34) 小島 肇：生物学的製剤基準とワクチンの品質確保にどこまで動物実験は有用か、国際化時代の生物学的製剤基準とワクチンの品質確保のありかた、東京（2012.2）
35) J. Tanaka, M. Ueda, S. Masumori, M. Nakajima, M. Hayashi: Comet assay atlas, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2011.8)
36)福室 真仁, 田中 仁, 益森 勝志, 中嶋 圓, 林真, 石田 雄二, 加国 雅和, 立野(向谷) 知世：ヒト肝細胞キメラマウス (PXB マウス®) を利用した小核試験及びコメットアッセイ, 第 40 回 日本環境変異原学会（2011.11）
37) Chise Tateno, Yuji Ishida, Masakazu Kakuni, Shinji Fukumuro, Jin Tanaka, Shoji Masumori, Madoka Nakajima, Makoto Hayashi: Comet assay and micronucleus test using chimeric mice with humanized liver (PXB mice®), 51th Society of Toxicology (2012.3)
38) M. Naya, N. Kobayashi, M. Ema, S. Kasamoto, M. Fukumuro, S. Takami, M. Nakajima, M. Hayashi, and J. Nakanishi: *In Vivo* genotoxicity study of nanosized titanium dioxide particles using Comet assay following intratracheal instillation in rats, 51th Society of Toxicology (2012.3)
39) 高木久宜, 野崎祐次, 河田昭彦, 山田雅巳, 増村健一, 能美健彦, F344 系 *gpt* delta ラットの 6 ヶ月飼育試験による背景データの取得, 日本環境変異原学会第 40 回大会, 東京(2011.11)
40)増村健一, 大杉直弘, 豊田尚美, 能美健彦, *gpt* delta マウスの加齢に伴う点突然変異及び欠失変異の蓄積, 日本環境変異原学会第 40 回大会, 東京(2011.11)
41) 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, マウスをモデルとした、高頻度に発生する生殖系列突然変異が次世代以降の個体に与える影響の解析, 日本環境変異原学会第 40 回大会, 東京(2011.11)
42) 青木康展, 松本理, 能美健彦, 大気汚染物質による *gpt* delta マウス肺中の突然変異とヒト肺がん組織中 p53 遺伝子の突然変異の比較, 日本環境変異原学会第 40 回大会, 東京(2011.11)
43) 鈴木哲矢, Petr Grúz, 足立典隆, 本間正充, 能美健彦, 忠実度ないし活性を低下させた DNA ポリメラーゼ ζ を発現するヒト細胞株の樹立と遺伝毒性物質に対する感受性, 日本環境変異原学会第 40 回大会, 東京(2011.11)
44) 兼丸祐紀, 鈴木哲矢, 新見直子, Petr Grúz, 松元郷六, 足立典隆, 本間正充, 能美健彦, DNA ポリメラーゼκ遺伝子改変ヒト細胞を用いた遺伝毒性物質に対する感受性の検討, 日本環境変異原学会第 40 回大会, 東京(2011.11)
45)本山茂記, 竹入章, 和田直子, 寺社下浩一, 三島雅之, 新見直子, Petr Grúz, 増村健一, 山田雅巳, 能美健彦, MitomycinC による DNA 二本鎖切断の誘発に対する DNA polymerase κ の役割, 日本環境変異原学会第 40 回大会, 東京(2011.11)
46) K. Masumura, Y. Sakamoto, W. Kumita, M. Honma, T. Nohmi, Identification of genomic insertion sites of λEG10 DNA in *gpt* delta transgenic mice and rats by high-throughput DNA sequencing, Society of Toxicology 51st Annual Meeting, USA (2012.3)
47) K. Masumura, N. Osugi, N. Toyoda-Hokaiwado, T. Nohmi, Spontaneous point mutations and deletions accumulate in a different manner with aging of *gpt* delta transgenic mice, Society of Toxicology 51st Annual Meeting, USA (2012.3)
48) H. Takagi, Y. Nozaki, A. Kawada, M. Yamada, K. Masumura, T. Nohmi, General toxicity study of F344 *gpt* dalta transgenic rat for one-year feeding, Society of Toxicology 51st Annual Meeting, USA (2012.3)
49) K. Horibata, A. Ukai, T. Kimoto, T. Suzuki, N. Kamoshita, K. Masumura, T. Nohmi, M. Honma, Evaluation of in vivo genotoxicity induced by *N*-ethyl-*N*-nitrosourea, benzo[*a*]pyrene and 4-nitroquinoline-1-oxide by *Pig-a* and *gpt* assays, Society of Toxicology 51st Annual Meeting, USA (2012.3)
50) Takeshi Morita, Masamitsu Honma, Kaoru Morikawa, Analysis of *in vitro* chromosomal aberration test data with CHL cells for reducing top test concentration for industrial chemicals, 42nd EMS 2011 Annual Meeting, Montreal, Canada, October 2011.
51) 森田 健、生殖細胞変異原性に関する国際的規制動向、第 40 回日本環境変異原学会、シンポジウム、東京、2011.11
52) Ohno. Y., Japanese regulation for food safety and

role of National Institute of Health Sciences. 1st Pan Asia Conference on Food & Drug Safety Assessment Policies and Regulations in Different Countries I (2011.4.15)

53) 大野泰雄、ICH M3(R2)ガイドラインへの経緯、日本毒性学会(2011,7.13)

54) 大野泰雄、レギュラトリーサイエンスと国立衛研、名古屋市立大学大学院薬学研究科医薬品質保証学分野・医薬品安全性評価学分野発足公開シンポジウム (2011.7.16)

55) 大野泰雄、医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期とヒト初回投与について 、国立精神・神経センター (2011.7.22)

56) 大野泰雄、ＭＤ試験および探索的ＩＮＤをめぐる最近の国際的動向、 APDD シンポジウム (2011.12.16)

57) 大野泰雄、安全性評価における動物実験と *in vitro* 代替法の利点および問題点、その現状について、東京都健康安全研究センター技術懇話会 (111208)

58) Yasuo Ohno, Reliability of Data for New Drug Application in Japan －Non-GLP Tests－, Global Quality Assurance Conference（2011.11.15）

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

厚生科学研究費補助金(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
分担研究報告書

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ジェン受容体 α(ER α)転写活性化試験法（HeLa 法）のアンタゴニスト試験法バリデーションでは、海外 2 施設及び国内 1 施設において試験の継続が困難になったことから、追加で参加した国内 1 施設において Task2 で設定したクライテリア値を Task3 で再現できず、原因究明と解決のためリードラボにおいて、細胞や培地を含む試験系の検討を行い、再現良くクライテリアを満たす試験系の再構成に成功した。米国で開発された Lumi-Cell 法（BG1 細胞系）については、バリデーション結果を基にした ICCVAM ガイドラインの第三者評価に協力するとともに、OECD への本試験法のガイドライン案及び STTA 法を含むアゴニスト評価系の PBTG 案の ICCVAM からの提案に協力した。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に対する OECD ピアレビューの結果を受け、追加のバリデーション試験実施計画について検討を行った。

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 Disrupters Testing and Assessment）により示された 5 段階からなるコンセプ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ジェン受容体 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。本年度は、HeLa 法については、アンタゴニスト試験法のバリデーションにおいて、追加で参加した国内 1 施設においてクライテリア値を再現できず、原因として試験系の問題が疑われたため原因究明と解決のためリードラボにおいて、細胞や培地を含む試験系の検討を行い、再現良くクライテリアを満たす試験系の再構成に成功した。一方、Lumi-Cell 法（BG1 細胞系）については、バリデーション結果を基にした

ICCVAM ガイドラインの第三者評価に協力するとともに、OECD への本試験法のガイドライン案及び STTA 法を含むアゴニスト評価系の PBTG 案の ICCVAM からの提案に協力した。また、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に対する OECD ピアレビューの結果を受け、追加のバリデーション試験実施計画について検討を行った。

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（HeLa 法）：

HeLa 法は、ヒト由来の細胞(HeLa cell)に、ヒトエストロゲン受容体 ERα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、TG455 ガイドライン化にあたり OECD より要求された 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実施した。バリデーション試験実施にあたり国立医薬品食品衛生研究所 JaCVAM（Japanese Center for the Validation of Alternative Methods）が中心となり 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、本研究班では、バリデーション試験全体の進捗管理、各施設からの試験結果の収集と解析及び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の最適化を含む必要なプロトコルの調整を行った。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（CERI）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 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測定を開始した。また、平成 22 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、バリデーション測定を開始した。本年度は、昨年度、日吉において実施した Task2 データを反映して更新したクライテリアをもとに、Task3 試験を開始したもののクライテリア値を再現できず、原因解明のため HeLa9903 細胞を構築した住友化学より別ロットの細胞を入手して検討した結果、試験系（細胞）自体の問題が疑われたため、解決のためリードラボである CERI において、細胞や培地を含む試験条件の再検討を実施した。

2、Lumi-Cell ER（BG1 細胞）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。ヒト卵胞がん細胞（BG1 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、米国 ICCVAM/NICEATM が中心となって、米国 ICCVAM から提案されたプロトコルに従いアゴニスト・アンタゴニスト両法について 4Phase からなる国際バリデーションを実施した。SMT には、JaCVAM、米国 ICCVAM/NICEATM、欧州 ECVAM 及び韓国 KoCVAM（平成 22 年度より）が参加し、試験施設として米国、日本、欧州の 3 施設（XDS、ECVAM、日吉）が参加した。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、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、バリデーションリポート及び ICCVAM ガイドライン案の第三者レビューに協力した。さらに本年度、ICCVAM ガイドラインをもとに、OECD に対して本試験法のガイドライン案（アゴニスト・アンタゴニスト）及び STTA 法を含むアゴニスト評価系の PBTG 案の ICCVAM からの提案に協力するとともに、OECD VMG-NA 会議において最終化に向けた議論を行った。

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