

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
分担研究報告書

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

研究分担者 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

研究要旨

本研究班ではコメットアッセイの国際的なバリデーション実行委員会を組織し、本試験の専門家とコンセンサスを取りながら、コメットアッセイの標準プロトコルの合意を目指してバリデーションを実施してきた。

バリデーションPhaseIV-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、作用機構に立脚した高い予測性を確認できた。

キーワード：遺伝毒性、コメットアッセイ、*in vivo*、バリデーション

協力研究者

宇野 芳文 田辺三菱製薬株式会社 研究本部
安全性研究所 第一部長
大森 崇 同志社大学文化情報学部 疫学・生
物統計学研究室 准教授
林 真 食品医農薬安全評価センター
センター長（副理事長）

A. 研究目的

遺伝毒性試験の中で、コメットアッセイとは単細胞ゲル電気泳動法とも呼ばれ、単離した細胞または核をアガロースに閉じ込めて融解した後、アルカリ処理で二本鎖DNAを単鎖にし、電気泳動による泳動パターンの変化によりDNA鎖切断などを検出する方法である。正常な細胞のDNAは非常に大きな分子であり、電気泳動してもほとんど移動せず、球形の核として観察される。一方、DNAで切断などが起こっている場合にはDNA断片の大きさに応じて移動し、球形の核を頭に尾を引いた彗星のような泳動パターンとなる¹⁾。

本方法は、*in vivo*でも*in vitro*でも試験可能であること、細胞が得られるならばどのような臓器、器官でも試験可能であること、短期間で結果が得られること、初期のDNA損傷を検出できることから広く利用されている。しかし、研究室間の再現性を検証するバリデーションが実施されておらず、プロトコルの国際的な合意がなされてこなかった。このような課題を解決すべく、平成20年度(2008

年度)までに実施された「厚生労働科学研究 リスク研究事業」において、日本環境変異原学会/哺乳類変異原性(MMS)研究会、欧米の研究機関と協力して国際的なプレバリデーション(phaseⅢ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。これまでの経緯を図1に示した。平成21年度以降、さらにバリデーションを実施し、将来的にはOECDガイドラインへの掲載を目指すものである。

平成21年度には、Phase IV-1バリデーションとして、確定できたプロトコル(ver.14.1)を用いて、4被験物質（エチルメタンサルフォネート：EMS、2-アセチルアミノフルオレン：2-AAF、ニトロソジメチルウレア：NDU、マンニトール）をコード化し、参加13施設に1もしくは2物質を配布し、施設間再現性を検討した。平成22年度から23年度に掛けて、バリデーションPhaseIV-2として参加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。また、その過程で明らかになったコメットとヘッジホッグの判別方法の不統一を解消し、国際的な基準の統一を図るため、図解集（カラーアトラス）を作成した。

B. 研究方法

B-1) 組織

本バリデーション組織は平成18年度に設立した。本年度は第9回国際バリデーション実行委員

会会議（以後、京都会議と記す）を9月に京都（同志社大）で開催した。

1) 国際実行委員会

委員長 林 真(食品医薬品安全センター:以下、安評センターと記す)

In vivo 担当委員長

宇野芳文(田辺三菱製薬株式会社)

委員 L. Schectmann (前 Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods : ICCVAM)

R. Tice (The NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods: NICEATM)

R. Corvi (European Centre for the Validation of Alternative Methods : ECVAM)

事務局 小島 肇(国立衛研 安全性生物試験研究センター 薬理部 : Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods : JaCVAM)

2) 国内実行委員会

委員長 林 真

委員 宇野芳文

浅野哲秀(元・日東電工株式会社)

中嶋 圓(安評センター)

森田 健(国立衛研 医薬安全科学部)

本間正充(国立衛研 変異遺伝部)

小島 肇

3) コンサルタント

P. Escobar (Boehringer-Ingelheim)

D. Lovell (Univ. of Surrey)

大森 崇(同志社大学文化情報学部)

大野泰雄(国立衛研)

4) バリデーション参加施設

表1に示す14施設が参加した。参加施設は、phaseIV-1で再現性の高い実験を行えることを確認できている。

B-2) 本年度の進捗

本バリデーションの目的は、コメットアッセイによる化学物質の発癌性予測能の検討である。バージョン14.2のプロトコルを用いて、参加14施設がphaseIV-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物質を各施設に配布し、施設毎に1~6物質を評価するバリデーションを実施した。

B-3) 試験方法

プロトコルの概要を以下に示す。

- ①動物: Crl: CD (SD)ラット雄 7-9週令を5匹/群使用
- ②投与方法: 3回の強制経口投与(初回投与21時間後に2回目、45時間後に3回目を投与し、その3時間後に安楽死させ、臓器をサンプリング)
- ③適用臓器: 胃及び肝臓
- ④サンプル: 単一細胞を使用
- ⑤電気泳動: 低温、20分の泳動で実施
- ⑥指標: テールに含まれるDNA量の細胞全体量に対する割合(%)の平均値、%DNA in tail
- 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(エチルメタン酸スルフォネート) 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-4) 被験物質の配布

被験物質の配布は、基本的に国立衛研 薬理部 新規試験法評価室にて実施した。米国の参加施設については、NICEATMの支援を受けて配布した。被験物質コード番号は、A4201~A4240とした(表2参照)。

B-5) コメットアトラスの作成

コメット像分類の最終確認が実施され、テキストとして発行するため、出版社と打ち合わせた。

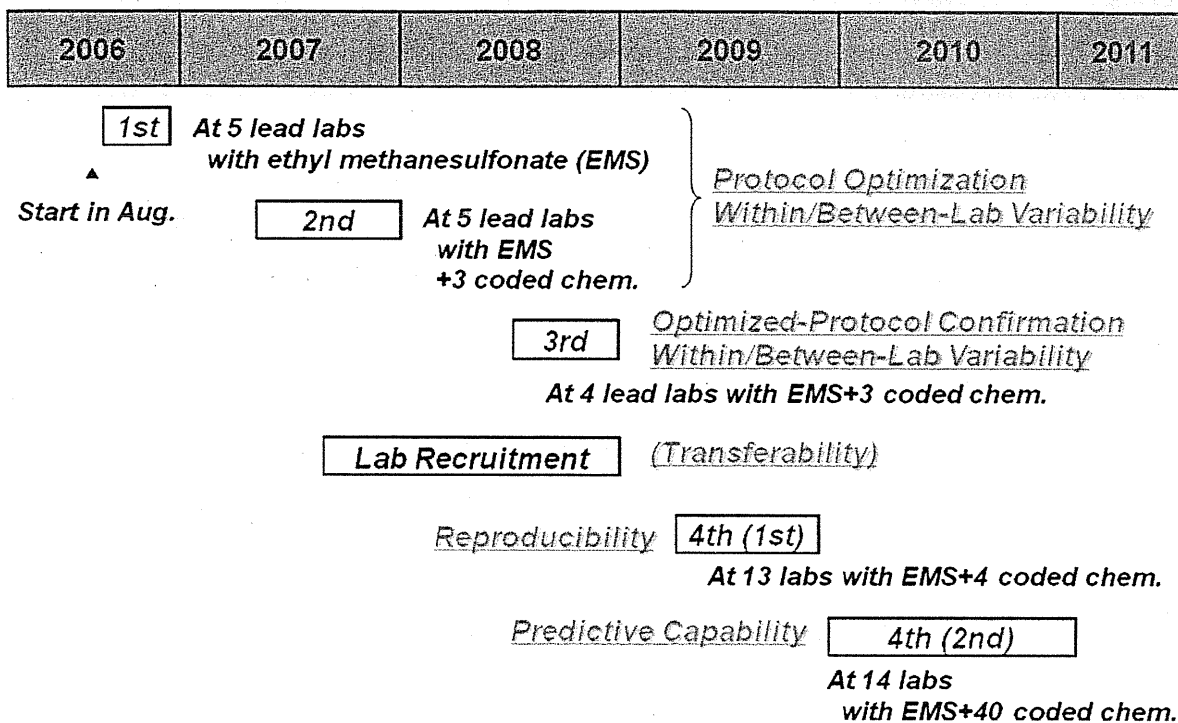


図1. これまでのバリデーションの経緯

表1. Phase IV-2 バリデーションの協力施設

施設名	国名	代表者
AstraZeneca	UK	Catherine Smith
Bayer HelthCare	Germany	Uta Wirnitzer
BioReliance*	USA	Buba Krsmanovic
Covance	UK	Lucinda Williams
Food and Drug Safety Center*	JPN	Kohji Yamakage
Health Canada	Canada	James P. McNamee
Huntingdon Life Sciences*	UK	Brian Burlinson
Johnson & Johnson	Belgium	Marlies De Boeck
Merck*	USA	Richard D. Storer
Mitsubishi Chemical Safety Institute	JPN	Hironao Takasawa
Novartis Pharma	Switzerland	Ulla Plappert-Helbig
mo Chemical	JPN	Sachiko Kitamoto
The Institute of Environmental Toxicology	JPN	Kunio Wada
ILS	USA	Cheryl A. Hobbs

*:Leading laboratory

表2. 被験物質コード、物質名、カテゴリ、実施施設、溶媒、実験濃度

Test chemical code	Test chemical name (CASRN)	Category of genotoxicity and carcinogenicity	Lab tested (coded lab name)	Vehicle	Dose level (mg/kg/day)
A4114	2-Acetylaminofluorene (53-96-3)	Genotoxic carcinogen	Lab O	Corn oil	250, 500, 1000
A4201	1,3-Dichloropropene (542-75-6)	Genotoxic carcinogen	Lab C	Corn oil	50, 100, 200
A4202	Ethionamide (536-33-4)	Non-genotoxic non-carcinogen	Lab C	Corn oil	125, 250, 500
A4203	Buslfan (55-98-1)	Genotoxic carcinogen	Lab C	Corn oil	10, 20, 40
A4204	N-Nitrosodimethylamine (62-75-9)	Genotoxic carcinogen	Lab L	Saline	2.5, 5, 10
			Lab O *	Saline *	0.63, 1.25, 2.5 *
A4205	Ampicillin trihydrate (7177-48-2)	Non-genotoxic non-carcinogen	Lab L	Saline	25, 50, 100
				Corn oil	500, 1000, 2000
A4206	1,2-Dimethylhydrazine dihydrochloride (306-37-6)	Genotoxic carcinogen	Lab L	Saline	6.25, 12.5, 25
			Lab O *	Saline *	1.56, 3.13, 6.25 *
A4207	Isobutyraldehyde (78-84-2)	Non-genotoxic non-carcinogen	Lab B	Corn oil	500, 1000, 2000
A4208	Cisplatin (15663-27-1)	Genotoxic carcinogen	Lab B	0.5% CMC	6, 12.5, 25
A4209	Azidothymidine (30516-87-1)	Genotoxic carcinogen	Lab B	0.5% CMC	500, 1000, 2000
A4210	p-Dichloroaniline (106-47-8)	Genotoxic carcinogen	Lab D	Corn oil	37.5, 75, 150
A4211	t-Butylhydroquinone (1948-33-0)	Non-genotoxic non-carcinogen	Lab D	Corn oil	131.3, 262.5, 525
A4212	Methyl carbamate (598-55-0)	Non-genotoxic carcinogen	Lab D	Saline	500, 1000, 2000
A4213	Methyl methanesulfonate (66-27-3)	Genotoxic carcinogen	Lab G	Saline	20, 40, 80
A4214	2,6-Diaminotoluene (823-40-5)	Genotoxic non-carcinogen	Lab G	Corn oil	150, 300, 600
A4215	5-Fluorouracil (51-21-8)	Genotoxic non-carcinogen	Lab G	Saline	25, 50, 100
A4216	8-Hydroxyquinoline (148-24-3)	Genotoxic non-carcinogen	Lab N	Corn oil	125, 250, 500
A4217	Hydroquinone (123-31-9)	Genotoxic carcinogen	Lab N	Saline	125, 250, 500 ¹⁾
A4218	Saccharin (81-07-2)	Non-genotoxic carcinogen	Lab N	Corn oil	500, 1000, 2000
A4219	Sodium arsenite (7784-46-5)	Genotoxic carcinogen	Lab M	Saline	7.5, 15, 30
			Lab O *	Saline *	7.5, 15, 30 *

A4220	Thioacetamide (62-55-5)	Non-genotoxic carcinogen	Lab M	Saline	19, 38, 75
A4221	Diethanolamine (111-42-2)	Non-genotoxic carcinogen	Lab M	Saline	175, 350, 700
A4222	<i>p</i> -Phenylenediamine dihydrochloride (624-18-0)	Genotoxic non-carcinogen	Lab K	Saline	25, 50, 100
A4223	<i>o</i> -Phenylphenol sodium salt (132-27-4)	Non-genotoxic carcinogen	Lab K	Corn oil	250, 500, 1000
A4224	2,4-Diaminotoluene (95-80-7)	Genotoxic carcinogen	Lab K	Saline	100, 150, 200 37.5, 75, 150
A4225	4,4'-Oxydianiline (101-80-4)	Genotoxic carcinogen	Lab H	0.5% CMC	50, 100, 200
A4226	<i>o</i> -Anisidine (90-04-0)	Genotoxic carcinogen	Lab O	Corn oil	150, 300, 600
A4227	Sodium chloride (7647-14-5)	Non-genotoxic non-carcinogen	Lab O	Water	500, 1000, 2000
A4228	Acrylonitrile (107-13-1)	Genotoxic carcinogen	Lab E	Corn oil	15.7, 31.3, 62.5
A4229	9-Aminoacridine hydrochloride monohydrate (52417-22-8)	Genotoxic non-carcinogen	Lab E	Corn oil	15.7, 31.3, 62.5
A4230	Ethanol (64-17-5)	Non-genotoxic carcinogen	Lab E	Saline	500, 1000, 2000
A4231	1,2-Dibromomethane (106-93-4)	Genotoxic carcinogen	Lab J	Corn oil	25, 50, 100
A4232	<i>p</i> -Anisidine (104-94-9)	Genotoxic non-carcinogen	Lab J	0.5% CMC	125, 250, 500
A4233	<i>o</i> -Anthranilic acid (118-92-3)	Non-genotoxic non-carcinogen	Lab J	0.5% CMC	500, 1000, 2000
A4234	Benzene (71-43-2)	Genotoxic carcinogen	Lab I	Corn oil	500, 1000, 2000
A4235	Di(2-ethylhexyl)phthalate (117-81-7)	Non-genotoxic carcinogen	Lab I	Corn oil	500, 1000, 2000
A4236	Trisodium EDTA monohydrate (10378-22-0)	Non-genotoxic non-carcinogen	Lab I	Saline	500, 1000, 2000
A4237	Cadmium chloride (10108-64-2)	Genotoxic carcinogen	Lab F	Saline	20, 40, 80
A4238	Chloroform (67-66-3)	Non-genotoxic carcinogen	Lab F	Corn oil	125, 250, 500
A4239	D,L-Menthol (15356-70-4)	Non-genotoxic non-carcinogen	Lab F	Corn oil	125, 250, 500

* 溶媒と実験濃度は国際実行委員会によって指示された。

C. 研究結果

C-1) 被験物質の配布

被験物質は、平成 22 年初頭に配布された。一部物質の決定が遅れたこと及び連絡の不手際もあり、メルクとバイオリアンスに各 1 物質が届いていないことが平成 22 年末に判明した。これらは平成 23 年 2 月末までに送付した。

京都会議で追加試験が必要となった 3 物質は 10 月末までに Lab O に送付された。

C-2) データの収集

平成 23 年 5 月までに追加実験結果も含むすべての結果が収集され、京都会議でまずコード化した状態で議論された。これらの中で、再試験が必要と判断された A4219、A4204、A4206 の 3 物質に関しては、実施施設に再試験を打診したが、実験不可能との返事を受けたことから、C-1) で上述したように、Lab O によって実施された。Lab O は 2012 年 2 月までにすべての実験を終了し、結果を事務局に送付してきた。

C-3) データの採用

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（肝臓、胃）の結果を、図 2 及び 3 に示した。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。図 2 に示すように、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（図 2 の赤丸データ）、%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、国際実行委員会は溶媒間に差がないと判断した（データは示していない）。

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（データは示していない）。

陽性対照（肝臓、胃）の結果を、図 4 及び 5 に示した。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、エチジウムプロマイド (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とから、この結果も採用となった。

C-4) 被験物質結果の扱い

すべての被験物質コード、物質名、カテゴリ、実施施設、溶媒、実験濃度を表 2 に示した。なお、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、参加施設も含めた京都会議における議論にて、最終判定を決めた。

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。

京都会議では、C-2) にも記載したように、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-2) 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。

C-5) 最終判定

表 3 に示す一覧は、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（添付資料 3 に示す報告書案）。

これまでの結果及び判定を以下に示す。

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:Acrylonitrile の結果は、施設と最終結果が

食い違っているが、いずれも陽性と国際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-6) コメットアトラス

出版社とともに、コメット像分類の最終確認を進めた。画像の準備もでき、テキストとして発行する手筈を出版社が終わった。

D. 考察

ほとんどの施設の結果が、陰性及び陽性対照の適合基準を満たしており、バリデーションを無事終了できた。被験物質の判定結果も、遺伝毒性発癌物質において、偽陽性物質が多く検出されたものの、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り、作用機構が異なる小核試験と組み合わせることで予測性が確保できると現時点

では国際実行委員会が判断している。

なお、以上の施設の判定結果と最終判定が食い違った物質、病理学的な指標を考慮して判定が変わった物質、ヘッジホッグの扱い等については、今後の国際実行委員会の議論により判定結果が変わりうることから明記を避けた。

E. 結論

バリデーションPhaseIV-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、平成24年初頭にすべての実験を終了した。

40物質の結果を解析中であるが、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国際実行委員会が判断している。

F. 健康危険情報

特になし

G. 参考文献

- 1) 日本トキシコロジー学会教育委員会編集、トキシコロジー、p142、朝倉書店(2002)
- 2) FDA Guidance、
<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
- 3) Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, Escobar P, Honma M, Kumaravel TS, Nakajima M, Sasaki YF, Thybaud V, Uno Y, Vasquez M, Hartmann A; In Vivo Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutat Res.* 627(1):31-5(2007)
- 4) Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR; 4th International Comet Assay Workshop. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop, *Mutagenesis.* 18(1), 45-51(2003)

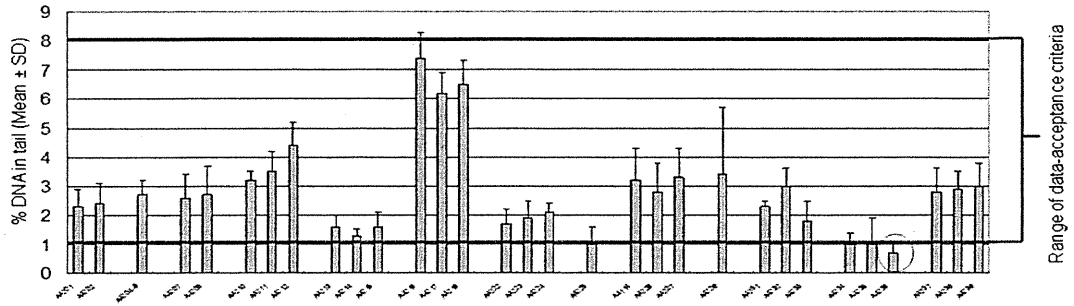


图 2. 陰性对照值 (肝臟)

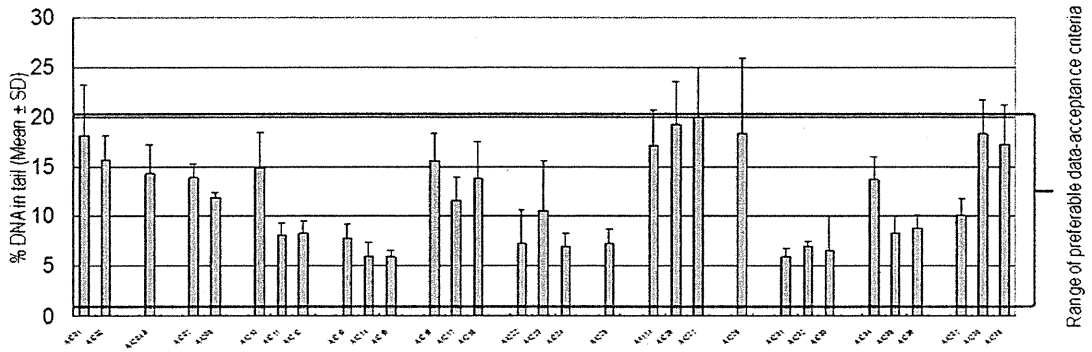


图 3. 陰性对照值 (胃)

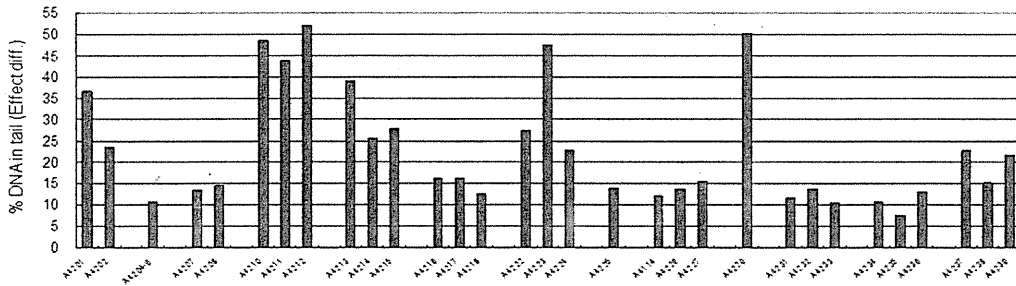


图 4. 陽性对照值 (肝臟)

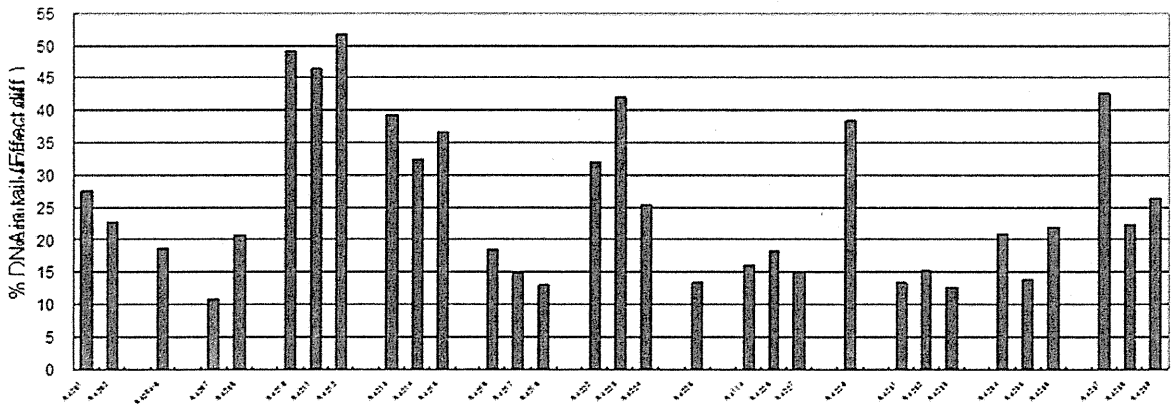


表3. コメットアッセイphaseIV-2バリデーション結果
遺伝毒性発癌物質

Chemical (CASRN)	Vehicle	Lab judge	VMT judge	Final judge	Note	
					<i>In vivo</i> genotoxicity	Other information
2-Acetylaminofluorene (53-96-3)	Corn oil	Negative	No change	Negative	UDS, MN, Comet, TG (L): +	Ames, CA: + Rat Carc.: L, Mgl, Ski
Acrylonitrile (107-13-1)	Corn oil	Negative (within historical control range)	Equivocal (Trend: L), Decrease (S)	Positive (L)	UDS, MN, TG: - Comet: +	Ames, CA: + Rat Carc.: Zy, Nrv, Orc. Smi, S, Mgl, Nas
		Negative (within historical control range)	Increase (L)			
<i>o</i> -Anisidine (90-04-0)	Corn oil	Negative	No change	Negative	UDS, MN: - Comet, TG (Ubl): +	Ames, CA: + Rat Carc.: Kid, Thy, Ubl
Azidothymidine (30516-87-1)	0.5% CMC	Positive	Increase (L), Equivocal (Trend:S)	Positive (L)	MN: +	Ames: -, CA: + Rat Carc.: Vag
Benzene (71-43-2)	Corn oil	Negative	No change	Negative	MN, Comet: + TG (L): -	Ames: -, CA: + Rat Carc.: Zy, Nas, Orc, Ski, S, Vsc
Buslfan (55-98-1)	Corn oil	Negative	No change	Negative	MN, Comet: +	Ames, CA: + Mouse Carc.: Hmo, Ova
Cadmium chloride (10108-64-2)	Saline	Positive	Increase (L), Equivocal (Du: S)	Positive (L)	MN: + or - Comet: -	Ames: -, CA: + Rat Carc.: Hmo, Kid, Lun, Pro, Tes
<i>p</i> -Chloroaniline (106-47-8)	Corn oil	Positive	Increase (L, S)	Positive (L, S)	MN: equivocal Comet: +	Ames: +, CA: + or - Rat Carc.: Spl
Cisplatin (15663-27-1)	0.5% CMC	Positive	Increase (L)	Positive (L)	MN, Comet, TG (L): +	Ames, CA: +
2,4-Diaminotoluene (95-80-7)	Saline	Equivocal	Increase (L)	Positive (L)	UDS, TG (L): + MN, Comet: + or -	Ames, CA: + Rat Carc.: L, Mgl
		Positive	Increase (L)			
1,2-Dibromoethane (106-93-4)	Corn oil	Positive	Increase (L, S)	Positive (L, S)	UDS, Comet: + MN, TG (L): -	Ames, CA: + Rat Carc.: Nas, Per, Pit, S, Vsc, L, Lun, Mgl
1,3-Dichloropropane (542-75-6)	Corn oil	Positive	Increase (L)	Positive (L)	UDS, MN: - Comet: +	Ames, CA: + Rat Carc.: L
Chemical	Vehicle	Lab judge	VMT judge	Final	Note	

(CASRN)				judge	<i>In vivo</i> genotoxicity	Other information
1,2-Dimethylhydrazine 2HCl (306-37-6)	Saline	Positive	Increase (L)	Positive (L)	UDS, MN, Comet: +	Ames, CA: + Rat Carc.: not available Mouse Carc.: Lung, Vsc
		Positive	Increase (L)			
Hydroquinone (123-31-9)	Saline	Negative	No change	Negative	MN: + (aneugen)	Ames: -, CA: + Rat Carc.: Kid, Hmo
Methylmethanesulfonate (66-27-3)	Saline	Positive	Increase (L, S)	Positive (L, S)	UDS, MN, Comet: + TG: + or -	Ames, CA: + Mouse Carc.: Hmo, Lun
N-Nitrosodimethylamine (62-75-9)	Saline	Positive	Increase (L)	Positive (L)	UDS, MN, Comet: +	Ames, CA: + Rat Carc.: L, Kid, Lun, Tes, Vsc
		Positive	Increase (L)			
4,4'-Oxydianiline (101-80-4)	0.5% CMC	Negative	Decrease (S)	Negative	UDS: - MN, Comet: +	Ames, CA: + Rat Carc.: L, Thy
Sodium arsenite (7784-46-5)	Saline	Positive	Equivocal (Trend: L)	Equivocal	MN: +	Ames: -, CA: + Rat Carc.: not available Mouse Carc.: L
		Negative	Equivocal (Dunnett: L)			
Thioacetamide (62-55-5)	Saline	Negative (due to toxicity)	Increase (L, S)	Positive (S)	MN, Comet: +	Ames, CA: - Rat Carc.: L Hepatotoxicant

遺伝毒性非発癌物質

Chemical (CASRN)	Vehicle	Lab judge	VMT judge	Final judge	Note	
					<i>In vivo</i> genotoxicity	Other information
9-Aminoacridine hydrochloride monohydrate (52417-22-8)	Corn oil	Negative	No change	Negative	No data	Ames: +
<i>p</i> -Anisidine (104-94-9)	0.5% CMC	Negative	No change	Negative	No data	Ames, CA: +
2,6-Diaminotoluene (823-40-5)	Corn oil	Positive	Increase (L)	Positive (L)	UDS, MN, Comet: + or -	Ames, CA: +
5-Fluorouracil (51-21-8)	Saline	Negative	No change	Negative	MN: + Comet: -	Ames, CA: -
8-Hydroxyquinoline (148-24-3)	Corn oil	Negative	Decrease (S)	Negative	UDS, MN, Comet: -	Ames, CA: +
<i>p</i> -Phenylenediamine dihydrochloride (624-18-0)	Saline	Negative	No change	Negative	MN, Comet: -	Ames, CA: +

非遺伝毒性発癌物質

Chemical (CASRN)	Vehicle	Lab judge	VMT judge	Final judge	Note	
					<i>In vivo</i> genotoxicity	Other information
Chloroform (67-66-3)	Corn oil	Negative (due to toxicity)	Increase (L)	Negative	UDS, Comet, TG (L): - MN: + or -	Ames, CA: - Rat Carc.: Kid, L Hepatotoxicant
Diethanolamine (111-42-2)	Saline	Negative	No change	Negative	MN: -	Ames, CA: - Rat Carc.: - Mouse Carc. (dermal): L
Di(2-ethylhexyl)phthalate (117-81-7)	Corn oil	Negative	No change	Negative	UDS, MN, Comet, TG: -	Ames, CA: - Rat Carc.: L Peroxisome proliferator
Ethanol (64-17-5)	Saline	Negative	No change	Negative	MN: -	Ames, CA: - Rat Carc.: Adr, L, Pan, Pit Hepatotoxicant
Methyl carbamate (598-55-0)	Saline	Negative	No change	Negative	MN: -	Ames, CA: - Rat Carc.: L Hepatotoxicant
Saccharin (81-07-2)	Corn oil	Negative	No change	Negative	MN, TG (L): - Comet: +	Ames, CA: - Rat Carc.: Ubl
<i>o</i> -Phenylphenol sodium salt (132-27-4)	Corn oil	Negative	No change	Negative	MN, CA: - Comet: + or -	Ames: - CA: + or - Rat Carc.: Kid, Ubl

非遺伝毒性非発癌物質

Chemical (CASRN)	Vehicle	Lab judge	VMT judge	Final judge	Note	
					<i>In vivo</i> genotoxicity	Other information
Ampicillin trihydrate (7177-48-2)	Saline	Negative	Equivocal (Trend:L)	Negative	MN: -	Ames: -, CA: +
	Corn oil	Negative	No change			
<i>o</i> -Anthranilic acid (118-92-3)	0.5% CMC	Negative	No change	Negative	MN: -	Ames: - CA: +
<i>t</i> -Butylhydroquin one (1948-33-0)	Corn oil	Negative (within historical control range)	Increase (L), Equivocal (Du: S)	Positive (L)	MN: -	Ames: - CA: +
Ethionamide (536-33-4)	Corn oil	Negative	Decrease (S)	Negative	No data	Ames: - CA: +
Isobutyraldehyde (78-84-2)	Corn oil	Negative	No change	Negative	MN: -	Ames: - CA: +
D,L-Menthol (15356-70-4)	Corn oil	Negative	No change	Negative	MN, Comet: -	Ames: - CA: +
Sodium chloride (7647-14-5)	Water	Negative	Decrease (S)	Negative	CA: - UDS (S): -	Ames, CA: - Gastrotoxicant
Trisodium EDTA monohydrate (10378-22-0)	Saline	Negative	No change	Negative	Comet: -	Ames, CA: -

H 研究発表

1. 論文発表

- 1) 小島肇夫：動物実験代替法における国際協調、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)

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 (2011.7)
- 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) 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)
 - 20) 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)
 - 21) 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)
 - 22) Kojima, H.: JaCVAM update、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台 (2011.11)
 - 23) 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)
 - 24) 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)
 - 25) 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)
 - 26) 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)
 - 27) 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)
 - 28) 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、萩原庸介、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)
 - 29) 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)
 - 30) 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)

- 31) 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）
- 32) 小島 肇：毒性発現機序からみたりスク評価
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）
- 33) 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）

I. 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

J. 添付資料

添付資料 1： Minutes, 9th International Validation
Management Team meeting in UK

添付資料 2： Protocol International Validation of the in
vivo Rodent Alkaline Comet Assay for the
Detection of Genotoxic Carcinogens (Version
14.2)

添付資料 3： phaseIV-II report(draft)

Minutes

The 9th Meeting for the International Comet Assay Validation Study
Validation Management Team Meeting

Date: September 12, 2011, 13:00 - 18:00

Venue: Keisuikan, Imadegawa Campus, Doshisya Univ., Kyoto

Karasuma-Higashi-hairu, Imadeawadori, Kamigyoku, Kyotoshi

Attendees: Drs. Makoto Hayashi, Yoshifumi Uno, Raymond Tice, Raffaella Corvi, Takeshi Morita, Takashi Omori, Hajime Kojima, and Taku Otoizumi

Chair: Yoshifumi Uno

1. VMT decided that judgment of each data will be described as two separate method: 1) judgment based on statistical analysis only, and 2) judgment in consideration with histopathology results.
2. VMT decided to conduct independent evaluation of histopathology in BSRC. VMT asks all labs to send histopathology slides if available, or paraffin blocks.
3. VMT NEEDS the study reports of 4th phase-1st step and -2nd step validation study by the end of September. If you cannot make this date, contact Dr. Kojima with reasonable alternative date.
4. VMT will ask labs to prepare published papers (for Mutation Res.). Formatting uniformity and schedule will be informed later.

INTERNATIONAL VALIDATION OF THE *IN VIVO* RODENT ALKALINE COMET ASSAY FOR THE DETECTION OF GENOTOXIC CARCINOGENS (VERSION 14.2)

Issued by: the Validation Management Team (VMT)

Date: November 30, 2009 revised

A. PURPOSE OF THIS DOCUMENT

This document is provided to clarify the conduct of an international validation study to evaluate the ability of the *in vivo* rodent alkaline Comet assay to identify genotoxic carcinogens, as a potential replacement for the *in vivo* rodent hepatocyte unscheduled DNA synthesis (UDS) assay. This document represents the final study protocol developed as a result of the collaboration efforts of the participating testing facilities and the VMT. Each testing facility will develop a study protocol based on the information provided in this document.

B. ASSURANCE OF DATA QUALITY

The study will be conducted in facilities that are Good Laboratory Practice compliant. Consistency between raw data and a final report is the responsibility of each testing facility. The VMT may review the data for accuracy, if deemed necessary.

C. ANIMAL WELFARE AND 3Rs

Appropriate national and/or international regulations on animal welfare should be followed. The 3Rs-principle for experimental animal use should be considered for determining the experimental design.

D. TESTING PROCEDURE

1. MATERIALS AND METHODS

1.1. Test substances and positive/negative controls

1.1.1. Test substance

With the exception of ethyl methanesulfonate (EMS), test substances will be supplied to each testing facility by the VMT. When coded substances are supplied, appropriate safety information will be provided in a sealed envelope to be opened only by an appropriate individual within the organization who is not involved in the study and/or in the case of

an emergency. If opened, appropriate documentation and justification will need to be provided to the VMT.

1.1.2. Test substance preparation

Each test substance will be dissolved or suspended with an appropriate solvent/vehicle just before administration (see section 1.1.4.).

1.1.3. Positive control

EMS (CAS No. 62-50-0); the source and lot number to be used will be provided by the VMT. EMS will be dissolved in physiological saline just before administration (within 2 hours).

1.1.4. Negative control (solvent/vehicle)

Solvents/vehicles for test substance preparation will be used as negative controls. An appropriate solvent/vehicle for a test substance may be indicated by the VMT. In the absence of instruction from the VMT, an appropriate solvent/vehicle will be chosen for each test substance by the testing facility in the following order: physiological saline, 0.5% w/v sodium carboxymethylcellulose aqua solution, corn oil.

1.2. Test animals

1.2.1. Species

Although either rats or mice can be used in this assay, the validation study will use rats. The rat is the species most commonly used in toxicological studies and is the preferred species in the *in vivo* rodent hepatocyte UDS assay.

1.2.2. Sex

In order to allow for a direct comparison with the rat hepatocyte UDS assay, males will be used.

1.2.3. Strain

Rat: CrI:CD (SD)

1.2.4. Source

Charles River Laboratories, Inc.

1.2.5. Age

At the time of purchase: 6-8 weeks of age (body weight 150 g - 320 g)

At the time of dosing: 7-9 weeks of age

1.2.6. Body weight

The weight variation of animals should be +/- 20% of the mean weight at the time of

dosing.

1.2.7. Number of animals in each dose group at each sampling time

Five males (see note 1).

1.2.8. Animal maintenance

Animals will be reared under appropriate housing and feeding conditions according to the standard operating procedures (SOP) in each testing facility, consistent with Section C "Animal Welfare".

1.2.8.1. Diet

Animals will be fed *ad libitum* with a commercially available pellet diet.

1.2.8.2. Water

Animals will be given free access to tap water *ad libitum*.

1.2.9. Animal quarantine and acclimation

Animals will be quarantined and acclimated for at least 5 days prior to the start of the study, according to SOPs in each testing facility. Only healthy animals approved by the Study Director and/or the Animal Facility Veterinarian will be used.

1.2.10. Animal identification and group assignment

Animals will be identified uniquely and assigned to groups by randomization on the basis of body weight according to the SOP in each testing facility.

1.3. Preparation of Comet assay solutions

The following solutions will be prepared, consistent with laboratory SOPs, unless otherwise specified (see note 2).

1.3.1. 1.0-1.5% (w/v) standard agarose gel for the bottom layer (if used)

Regular melting agarose will be dissolved at 1.0-1.5% (w/v) in Dulbecco's phosphate buffer (Ca^{++} , Mg^{++} free and phenol free) by heating in a microwave.

1.3.2. 0.5 % (w/v) low-melting agarose (Lonza, NuSieve GTG Agarose) gel for the cell-containing layer and, if used, a top layer

Low-melting agarose will be dissolved at 0.5% (w/v) in Dulbecco's phosphate buffer (Ca^{++} , Mg^{++} free and phenol free) by heating in a microwave. During the study this solution will be kept at 37-45°C and discarded afterward.

1.3.3. Lysing solution

The lysing solution will consist of 100 mM EDTA (disodium), 2.5 M sodium chloride, and 10 mM tris hydroxymethyl aminomethane in purified water, with the pH adjusted to

10.0 with 1 M sodium hydroxide and/or hydrochloric acid. This solution may be refrigerated at <10°C until use. On the same day of use, 1 % (v/v) of triton-X100 and 10 % (v/v) DMSO will be added to this solution and the complete lysing solution will be refrigerated at <10°C for at least 30 minutes prior to use.

1.3.4. Alkaline solution for unwinding and electrophoresis

The alkaline solution consists of 300 mM sodium hydroxide and 1 mM EDTA (disodium) in purified water, pH >13. This solution will be refrigerated at <10°C until use. The pH of the solution will be measured just prior to use.

1.3.5. Neutralization solution

The neutralization solution consists of 0.4 M tris hydroxymethyl aminomethane in purified water, pH 7.5. This solution will be either refrigerated at <10°C or stored consistent with manufacturer's specifications until use.

1.3.6. Mincing buffer

The mincing buffer consists of 20 mM EDTA (disodium) and 10% DMSO in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free, and phenol red free if available), pH 7.5 (DMSO will be added immediately before use). This solution will be refrigerated at <10°C until use.

1.3.7. Staining solution

The fluorescent DNA stain is SYBR Gold (Invitrogen-Molecular Probes), prepared and used according to the manufacturer's specifications.

1.4. Comet assay procedure

1.4.1. Experimental design

Compound	Dose (mg/kg/day)	Number of animals (see note 1)
Vehicle (negative control)	0	5
EMS (positive control)	200	5
Test compound	Low (1/4 of high)	5
Test compound	Medium (1/2 of high)	5
Test compound	High*	5

*High dose selection (see note 3): in general, in the absence of VMT directions, the high dose level of a test compound will be selected as the dose producing signs of toxicity such that a higher dose level, based on the same dosing regimen, would be expected to