

961 DNA. Researchers using Comet assay may think that lower values of negative
962 control (zero if possible) would be effective to detect very slight increases in % tail
963 DNA. However, this would be the most likely cause to produce false-positive
964 (toxicologically insignificant) results. In this validation study, there were no clearly
965 false-positive results, and this would strongly indicate the usefulness of the
966 standardized study protocol and the data-acceptance criteria. Especially, VMT
967 would like to stress that the data-acceptance criteria used in this validation study
968 should be strictly followed to obtain a toxicologically significant output with *in vivo*
969 Comet assay. To follow the criteria, technical maturation would be required,
970 although it is generally required in all genotoxicity assays.
971

972 **9. References**

- 973 1. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H,
974 Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/Comet assay:
975 guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol.*
976 *Mutagen.* 2000; 35:206-21.
- 977 2. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P,
978 Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR. Recommendation for
979 conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 2003; 18:45-51.
- 980 3. Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR,
981 Escobar P, Honma M, Kumaravel TS, Nakajima M, Sasaki YF, Thybaud V, Uno
982 Y, Vasquez M, Hartmann A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity
983 Testing: result of the in vivo comet assay workgroup. *Mutat. Res.* 2007;
984 627:31-5.
- 985 4. Sasaki YF, Sekihashi K, Izumiyama F, Nishidate E, Saga A, Ishida K, Tsuda S.
986 The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay
987 results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC
988 monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database. *Crit. Rev. Toxicol.* 2000;
989 30:629-799.
- 990 5. Sekihashi K, Yamamoto A, Matsumura Y, Ueno S, Watanabe-Akanuma M,
991 Kassie F, Knasmüller S, Tsuda S, Sasaki YF. Comparative investigations of
992 multiple organs of mice and rats in the comet assay. *Mutat. Res.* 2002;
993 517:53-74.
- 994 6. Kirkland D, Speit G. Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro*
995 genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III.
996 Appropriate follow-up testing *in vivo*. *Mutat. Res.* 2008; 654:114-132.
- 997 7. Nakajima M, Ueda M, Yamakage K, Nakagawa Y, Nakagawa M, Ohyama W,
998 Omori T, Asano N, Hayashi M, Uno Y. Tissue sample preparation for *in vivo*
999 rodent alkaline comet assay. *Genes Environ.* 2012; 34:50-4.
- 1000 8. Gold LS. The Carcinogenic Potency Database (CPDP). Available at
1001 <http://potency.berkeley.edu/cpdb.html> (accessed 21 March, 2012).
- 1002 9. Reproductive and Cancer Hazard Assessment Section, Office of Environmental
1003 Health Hazard Assessment, California Environmental Protection Agency.
1004 Evidence on the carcinogenicity of 2-aminofluorene, draft. 1998.
- 1005 10. Rothfuss A, Honma M, Czich A, Aardema MJ, Burlinson B, Galloway S,
1006 Hamada S, Kirkland D, Heflich RH, Howe J, Nakajima M, O'Donovan M,
1007 Plappert-Helbig U, Priestley C, Recio L, Schuler M, Uno Y, Martus HJ.

- 1008 Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests
1009 and integration into standard toxicity testing. *Mutat Res.* 2011; 723(2):108-20.
- 1010 11. Madle S, Dean SW, Andrae U, Brambilla G, Burlinson B, Doolittle DJ,
1011 Furihata C, Hertner T, McQueen CA, Mori H. Recommendations for the
1012 performance of UDS tests *in vitro* and *in vivo*. 1994; 312(3):263-85.
- 1013 12. Stiborová M, Miksanová M, Sulc M, Rýdlová H, Schmeiser HH, Frei E.
1014 Identification of a genotoxic mechanism for the carcinogenicity of the
1015 environmental pollutant and suspected human carcinogen *o*-anisidine. *Int. J.*
1016 *Cancer.* 2005; 116(5):667-78.
- 1017 13. *Natl. Toxicol. Program Tech Rep. Ser.* 1978; 89.
- 1018 14. *Natl. Toxicol. Program Tech Rep. Ser.* 1986; 289:1-277.
- 1019 15. US EPA-IRIS. Available at <http://www.epa.gov/iris/subst/0276.htm> (accessed
1020 21 March, 2012).
- 1021 16. IARC monograph 100A, pp 37-44.
- 1022 17. McKenna DJ, Gallus M, McKeown SR, Downes CS, McKelvey-Martin VJ.
1023 Modification of the alkaline Comet assay to allow simultaneous evaluation of
1024 mitomycin C-induced DNA cross-link damage and repair of specific DNA
1025 sequences in RT4 cells. *DNA Repair (Amst).* 2003; 2(8):879-90.
- 1026 18. Nesslany F, Zennouche N, Simar-Meintières S, Talahari I, NKili-Mbouï EN,
1027 Marzin D. *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic
1028 carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds. *Mutat. Res.*
1029 2007; 630:28-41.
- 1030 19. *Natl. Toxicol. Program Tech Rep Ser.* 1989; 366:1-248.
- 1031 20. McGregor D. Hydroquinone: an evaluation of the human risks from its
1032 carcinogenicity and mutagenic properties. *Crit Rev Toxicol.* 2007;
1033 37(10):887-914.
- 1034 21. *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser.* 1980; 205:1-131.
- 1035 22. Maronpot RR, Pitot HC, Peraino C. Use of rat liver altered focus models for
1036 testing chemicals that have completed two-year carcinogenicity studies.
1037 *Toxicol Pathol.* 1989; 17(4 Pt 1):651-62.
- 1038 23. Butterworth BE, Templin MV, Borghoff SJ, Conolly RB, Kedderis GL, Wolf
1039 DC. The role of regenerative cell proliferation in chloroform-induced cancer.
1040 *Toxicol Lett.* 1995; 82/83:23-26.
- 1041 24. Hayashi M, Dearfield K, Kasper P, Lovell D, Martus HJ, Thybaud V.
1042 Compilation and use of genetic toxicity historical control data. *Mutat. Res.*
1043 2011; 723(2):87-90.

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

研究分担者 本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部室長

研究要旨

In vitro コメット試験法の標準化と、その結果の信頼性と妥当性を評価するため、国際共同バリデーション研究を実施中である。本年度はコメット試験結果の評価、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、6種類の遺伝毒性もしくは非遺伝毒性物質を試験した。試験はコメット試験および小核試験を実施し、両者の結果を比較検討した。また、細胞毒性については色素排除試験による細胞生存率、および増殖細胞数を指標とした細胞増殖抑制率によって評価した。コメット試験はマイトマイシンを除く全ての遺伝毒性物質を適切に陽性と判定でき、非遺伝毒性物質である Triton-X を陰性と判断できた。一般にコメット試験は感度の高い試験と考えられているが、小核試験結果と比較すると、むしろ感度は低かった。すなわち、コメット試験陽性は、高用量でのみ観察された。細胞毒性の指標として色素排除試験は細胞処理直後では全く反応せず、適切ではないと判断された。細胞増殖抑制率が利用可能であるが、コメット陽性反応は強い増殖抑制下でのみ観察された。総合的に考えると、*in vitro* コメット試験は遺伝毒性試験としての有用性は低いと考えられる。本研究で明らかとなった問題点は、コメット試験自体の問題ではなく、TK6 細胞特有の問題であるのかもしれない。今後、統一したガイドライン化を目指すためには、他の細胞を用いた *in vitro* コメット試験のバリデーションを検討する必要がある。

A. 研究目的

コメット試験は初期 DNA 損傷を個々の細胞レベルで検出できる遺伝毒性試験として広く利用されている。特に *in vitro* コメット試験は化学物質の遺伝毒性ハザードを簡便で、感度よく検出できるとされている。しかしながら、コメット試験は研究機関間での再現性に乏しく、しばしば報告によってその結果が異なる。標準的なプロトコルが存在せず、各機関が独自のプロトコルや、実験器具、実験条件、および評価法で行っていることが原因と考えられる。また、DNA 損傷による DNA の低分子フラグメント化は、細胞毒性によるアポトーシスから生じる DNA フラグメント化としばしば区別が付き難い。このような

細胞毒性の評価法の違い、DNA 損傷とアポトーシスの区別の基準等の違いもはコメット試験の低再現性の原因の一つと考えられる。

これら問題の解決のため、*in vitro* コメット試験法の標準化と、その結果の信頼性と妥当性を評価するため、国際共同バリデーション研究を実施中である。これまで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* コメット試験には適切な細胞毒性の指標がないこと)
- ii) S9 の問題 (コメット試験に 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、コメット試験の有用性およびその結果の解釈が問題となった。

本年度はコメット試験結果の評価、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、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および小核試験を実施し、両者の結果を比較検討した。

B. 研究方法

1. 被験物質

- ・メタンスルホン酸エチル(EMS)
- ・メタンスルホン酸メチル(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)

2. 試験系

細胞名称: TK6

特性: この細胞の平板効率(Plating Efficiency)は98.0%、自然突然変異頻度(Spontaneous Mutation Frequency)は 4.1×10^{-6} であることを確認している。

3. 細胞培養液

10.4 g の RPMI Medium 1640 (*In vitro*gen Corporation, Cat. No. 31800-022)を Milli-Q 水に溶解させ、2 g の炭酸水素ナトリウム(NaHCO_3 、和光純薬工業株式会社)及び 2 mL の 1 mol/L 塩酸(HCl、和光純薬工業株式会社)を加えた。その後、Milli-Q 水で 1000 mL にメスアップし、孔径 0.20 μm のフィルターでろ過滅菌後、冷蔵保存した。

使用する前に、10 vol%の馬血清(JRH Biosciences, Inc., 56°C、60 分間非動化済み)、1 vol%のペニシリン・スプレプトマイシン(*In vitro*gen Corporation, Cat. No. 15140-122、最終濃度:ペニシリン 100 units/mL、スプレプトマイシン 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及び 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のピルビン酸ナトリウム(和光純薬工業株式会社)を加え、細胞培養液とした。

4. 細胞培養条件

培養器は培養フラスコを用い、5% CO_2 存在下、温度 37°C、加湿条件の CO_2 インキュベータ内で培養した。

5. 細胞数計測法

細胞濃度の計測には、細胞計数分析装置(コールター・カウンターZ2 型、コールター株式会社)及び血球計算盤(Burker-Turk)を用いた。細胞計数分析装置では、希釈液(Isoton II Diluent)で 20 倍希釈した細胞懸濁を測定した(Cell growth)。血球計算盤では、等量のトリパンプルー染色液を加え、4 区画の生及び死細胞数を計測した(Dye exclusion assay)。

6. 実験操作

6.1 前培養

- 1) 37°C の温水中で、凍結保存しておいた 1 mL の TK6 細胞懸濁液をすばやく解凍した。
- 2) この細胞懸濁液を約 9 mL の細胞培養液に加えた後、1000 rpm、5 分間室温で遠心分離し、上清を除去した。
- 3) 残った上清で細胞沈渣をよく攪拌し、50 mL の細胞培養液を加え培養した。
- 4) 1.5×10^6 cells/mL 以上の細胞濃度にならないように細胞を希釈しながら数日間培養を続けた。

6.2 被験物質の処理及び除去

- 1) 培養終了後、細胞培養液で 2×10^5 cells/mL の細胞懸濁液を調製した。
- 2) 15 mL のアシストチューブに次表の通り加え、 CO_2 インキュベータ内にある MILD MIXER (PR-12、TAITEC)を用いて攪拌しながら 4 時間処理した。
- 3) 4 時間処理後、Dye exclusion assay 用に細胞懸濁液の一部を分取し、各処理における細胞濃度を計測した(Day 0)。
- 4) アルカリコメットアッセイ用に、1 mL の細胞懸濁液を別のアシストチューブに分取した。
- 5) 残りの細胞懸濁液を 1000 rpm、5 分間室温で遠心分離し、上清を除去した。
- 6) 残った上清で細胞沈渣をよく攪拌し、5 mL の細胞培養液を加え、再度遠心分離後、上清を除去した。

- 7) 残った上清で細胞沈渣をよく攪拌し、10 mL の細胞培養液を加えた。
- 8) Cell growth 測定用に細胞懸濁液の一部を分取し、各処理における細胞濃度を計測し (Day 0)、細胞懸濁液 A とした。

6.3 細胞毒性試験

細胞懸濁液 A は 48 時間培養を続けた。この期間中は毎日、細胞懸濁液の一部を分取し、各処理における細胞濃度を計測した (Cell growth 及び Dye exclusion assay、Day 1 及び 2)。この細胞懸濁液は 1.5×10^6 cells/mL 以上の細胞濃度にならないように細胞を希釈しながら培養を続けた。培養 48 時間後、in vitro 小核試験用に約 1×10^6 cells を含む細胞懸濁液を別の遠沈管に分取した (4.6.5 項 In vitro 小核試験に続く。)

6.3.2 データの計算法

・RSG (Relative Suspension Growth)

細胞毒性の指標となる RSG は次の式で算出した。

$$\text{RSG} = \frac{\text{Daily Cell Growth (DCG) at Day1} \times \text{DCG at Day2 (処理群)}}{\text{Daily Cell Growth (DCG) at Day1} \times \text{DCG at Day2 (陰性対照群)}}$$

ここで Daily Cell Growth とは、1 日あたりの細胞増加率であり、次の式で算出した。

DCG = $\frac{\text{翌日の細胞濃度}}{\text{前日の細胞濃度}}$

・生存率 (%Viable Ratio)

$$\text{生存率} = \frac{\text{生細胞数}}{\text{生及び死細胞数}}$$

・生存率 (%Viable Ratio)

$$\text{生存率} = \frac{\text{生細胞数}}{\text{生及び死細胞数}}$$

6.4 アルカリコメットアッセイ

6.4.1 試液の調整

- ・PBS: PBS Tablets 10 錠を蒸留水に溶解し、全量を 1000 mL とした。
- ・低融点アガロース: Low-melting agarose を 0.5 w/v% となるように PBS に加え、電子レンジで加熱し溶解させた後、40°C のウォーターバスで保温した。
- ・細胞溶解液: 細胞溶解液中の最終濃度が 2NA (EDTA・2Na) 100 mM、塩化ナトリウム 2.5 M、トリス(ヒ

ドロキシメチル) アミノメタン 10 mM となるように超純水に加え、水酸化ナトリウムで pH を 10.0 に調整した。この溶液は 10°C 以下で冷蔵保存した。使用する 30 分以上前に、Triton X-100 を 1 vol%、DMSO を 10 vol% となるように加え、10°C 以下で冷蔵保存し、細胞溶解液とした。

・200 mM 2NA (EDTA・2Na): 約 70 mL の超純水に 7.44 g の 2NA (EDTA・2Na) を加え、数粒の水酸化ナトリウムを加え完全に溶解させた後、2N 水酸化ナトリウム液で pH10.0 に調整し、超純水で 100 mL にメスアップした。

・鎖解離及び電気泳動用アルカリ緩衝液: 8.4 g の水酸化ナトリウム (粒状、最終濃度 300 mM)、3.5 mL の 200 mM 2NA (EDTA・2Na、最終濃度 1 mM) を 700 mL の超純水に加えた。この溶液は使用する 1 時間以上前に調製し、10°C 以下で冷蔵保存した。

・中和溶液: トリス(ヒドロキシメチル) アミノメタンを 0.4 M となるように超純水に加えた。この pH を 7.5 に調整した。この溶液は 10°C 以下で冷蔵保存した。

・ミンシング/ホモジナイズ用緩衝液: 2NA (EDTA・2Na) を 20 mM、DMSO を 10 vol% となるように HBSS に加えた (DMSO は使用直前に加えた。)。この pH を 7.5 に調整した。この溶液は 10°C 以下で冷蔵保存した。

・TE 緩衝液: トリス(ヒドロキシメチル) アミノメタンを 10 mM、2NA (EDTA・2Na) を 1 mM となるように超純水に加え、1 mol/L 塩酸で pH を 7.5~8.0 に調整した。

・DNA 染色液: SYBR Gold nucleic acid gel stain を TE 緩衝液 (pH7.5~8.0) で 10000 倍希釈した。希釈後は約 4°C で冷蔵遮光保存し、数週間以内に使用した。

6.4.2 標本の作製

- 1) 1 mL の細胞懸濁液を 1000 rpm、5 分間、4°C で遠心分離し、アスピレーターで上清を除去した。
- 2) 1 mL のミンシング/ホモジナイズ用緩衝液を加え懸濁させ、再度遠心分離後、上清を除去した。
- 3) 0.5 mL のミンシング/ホモジナイズ用緩衝液を加え懸濁させた。
- 4) この細胞懸濁液 10 uL に 90 uL の低融点アガロ

ースを加え、穏やかに混和し、高撥水印刷スライドガラス(MAS コートスライド、松浪硝子工業株式会社)に 80 μ L スポットした。

- 5) 混和液のゲル化を確認し、スライド標本を細胞溶解液に入れ、一晚遮光で冷蔵庫に置いた。その後、スライド標本を超純水で洗った。
- 6) スライド標本をサブマリン型電気泳動槽にランダムに置いた。電気泳動用アルカリ緩衝液を、スライド標本が完全に浸るまで入れ、そのまま 20 分間静置し、鎖解離させた。
- 7) 一定電流(0.30 A)で電気泳動を 15 分間行った。鎖解離から電気泳動までの電気泳動用アルカリ緩衝液の温度は 10 $^{\circ}$ C 以下の一定温度となるようにした。
- 8) 電気泳動後、スライド標本は 5 分間中和溶液に入れた。次に無水エタノール($^{\circ}$ 99.6%)に 5 分間入れ、その後空気乾燥させた。なお、電気泳動後にスライド標本から EMS 125 μ g/mL 処理群のゲルが剥がれ落ちた。
- 9) DNA 染色液 80 μ L をスライド標本に滴下し 10 分間静置した。次に超純水で 5 分間洗浄を 3 回繰り返し、空気乾燥させた。

6.4.3 標本の観察法

スライド標本の解析は、蛍光装置付き生物顕微鏡(BX50、倍率 200 倍、Olympus)を用いて、デジタルカメラ付き画像解析システムで行った。画像解析ソフト Comet assay IV を用いて、スライド標本あたり 100 個の細胞を解析した。測定パラメーターは Comet's total intensity に対する Tail intensity の割合(%Tail intensity)とした。

6.5 In vitro 小核試験

6.5.1 標本の作製

- 1) 約 1×10^6 cells を含む細胞懸濁液を 1000 rpm、5 分間室温で遠心分離し、上清を除去した。
- 2) 残った上清で細胞沈渣をよく攪拌し、温めておいた 4 mL の KCl(0.075 mol/L)を加えた。
- 3) 倒立懸濁後、10 分間室温に放置し低張処理した。

- 4) 固定液(メタノール:酢酸=3:1)を 10~15 滴加え 3~4 回倒立懸濁した(半固定)。
- 5) 再度遠心分離し、上清を除去した。
- 6) 4 mL の固定液を加え 5 分間静置後、遠心分離した。
- 7) 上清を除去し、4 mL の固定液を加え 10 分間静置後、遠心分離した。
- 8) 上清を除去し、4 mL の 1 vol%酢酸/メタノールを加え 15 分間静置後、遠心分離した。
- 9) 細胞沈渣をほぐし、少量の 1 vol%酢酸/メタノールを加えた。この細胞懸濁液をスライドガラスに 1 滴落とし、空気乾燥させた。

6.5.2 標本の観察法

スライド標本に 40 μ g/mL のアクリジンオレンジを 1 滴滴下し、カバーガラスを被せ、蛍光装置付き生物顕微鏡(BX50、倍率 400 倍、Olympus)下で観察した。1000 個の正常細胞を観察し、小核を持つ細胞数を計測した(EMS 1000 及び 2000 μ g/mL 処理群は細胞毒性により標本観察が不可能であり、TOX と分類した。なお、EMS 500 μ g/mL 処理群は観察可能な 720 個の細胞を観察した。)。小核は、主核の 1/3 未満の大きさ、1/3 以上 1/2 未満の大きさ、あるいは、複数の小核を持つ細胞に区別して計測した。なお、1000 個の正常細胞観察中に、分裂期細胞、多核細胞及び変形核細胞がみられた場合、別途に計測した。

C. 研究結果

メタンスルホン酸エチル(EMS)、メタンスルホン酸メチル(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)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、トリパンプ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。結果を図 1、2(章末)に示す。

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、コメット試験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プ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。

コメット試験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、コメット試験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。

D. 考察

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

本年度は特に細胞毒性の問題に注目し、細胞毒性とコメット試験結果の解釈との関係を考察すると共に、コメット試験の遺伝毒性試験としての有用性を確認を行った。

これまで同様に、TK6でのコメットの反応は遺伝毒性物質を確実に陽性と判定できる一方、その陽性反応は細胞毒性が用量でしか観察されなかった。現在、OECDやICHのin vitro遺伝毒性試験ガイドラインでは、最高用量での細胞毒性レベルの低減化が行われている。その理由は、高い細胞では真に遺伝毒性と関係が無い、非特異的な遺伝毒性反応が出現する

可能性があるためであり、その最高用量のレベルはRSGを約55%にコントロールすることが推奨されている。本研究でのコメット試験の陽性反応のほとんどはRSG30%以下で観察されており、これらガイドラインに基づくと陰性と判定される。

一方、小核試験は低用量から反応する。小核試験の反応用量は、染色体異常試験、遺伝子突然変異試験と同領域であることから、コメット試験の低反応性がむしろ、in vitro遺伝毒性試験では特別であると考えられる。

コメットの反応性はクロスリンカーを除く遺伝毒性物質でのみ観察され、細胞毒性は強いながらも用量依存性があることは明らかである。本研究でのコメット試験の低反応性は、コメット試験自体にあるのではなく、細胞毒性の指標や、評価方法の問題であるのかもしれない。

他の付着精細胞株(たとえば、CHL)を用いたコメット試験では多くの遺伝毒性物質が、低用量でコメット陽性を示すこと、また、サイクロフォスファミドや、DMNのような代謝活性化を必要とする物質に対しても高い反応性を示すことが報告されている。細胞毒性の問題は、TK6もしくは浮遊系細胞特有の問題なのかもしれない。今後、TK6や浮遊系細胞以外の他の細胞を用いた試験により、検証していく必要があると考える。

しかしながら、いずれにせよ、in vitroコメット試験の遺伝毒性としての有用性は低いと考えられる。コメット試験をガイドライン化するためには、他の試験にはない何らかの有用性が必要である。

E. 結論

In vitroコメット試験法の標準化と、その結果の信頼性と妥当性を評価するため、国際共同バリデーション研究を実施中である。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。

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし

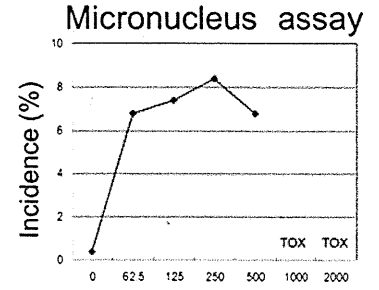
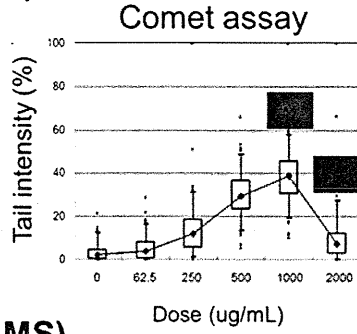
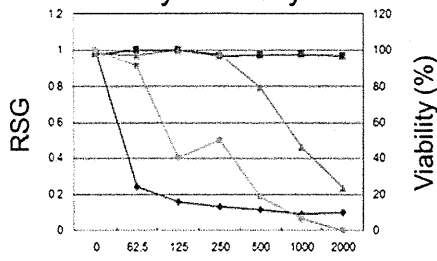
2. 学会発表

特になし

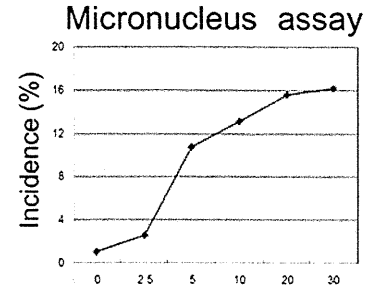
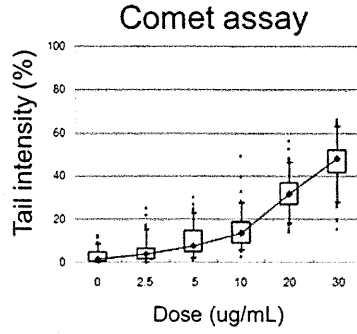
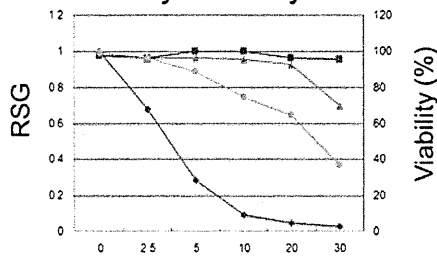
G. 知的所有権の取得状況

なし

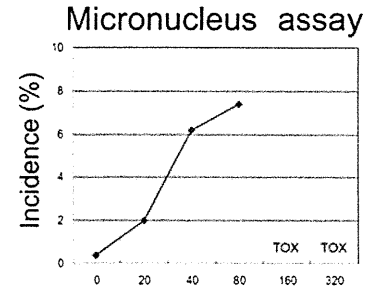
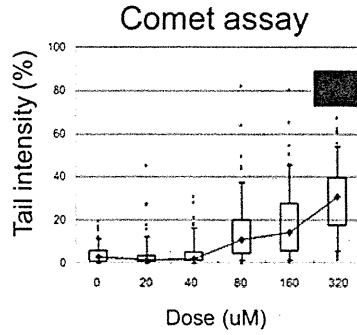
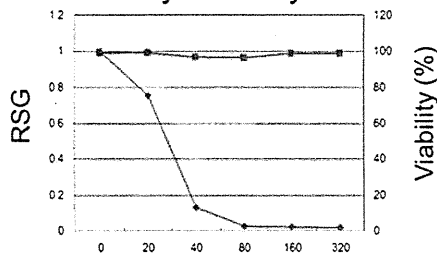
1) Ethyl methanesulfonate (EMS)
Cytotoxicity



2) Methylmethane sulfonate (MMS)
Cytotoxicity

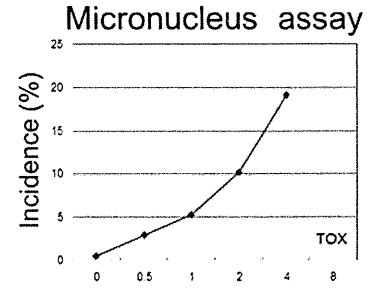
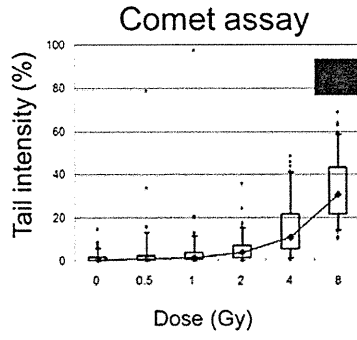
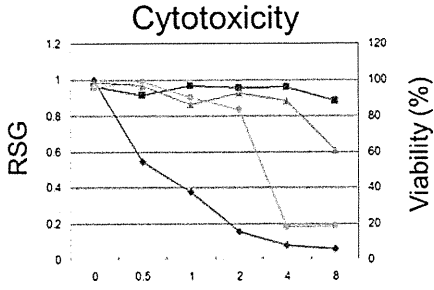


3) Hydrogen peroxide (H₂O₂)
Cytotoxicity

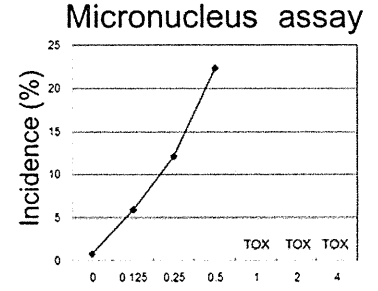
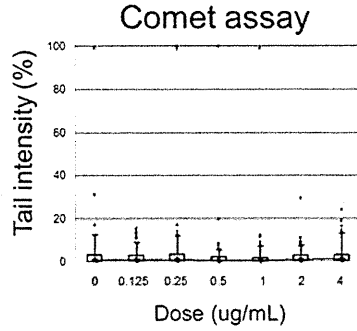
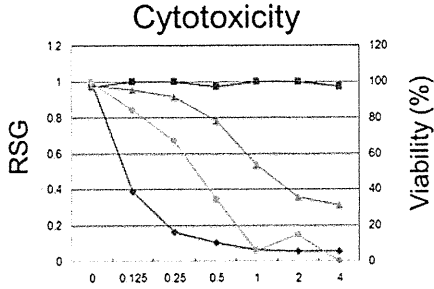


☒ 1

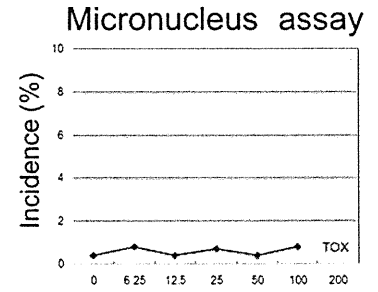
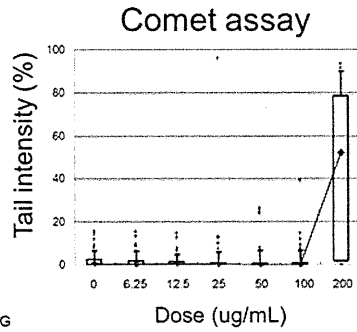
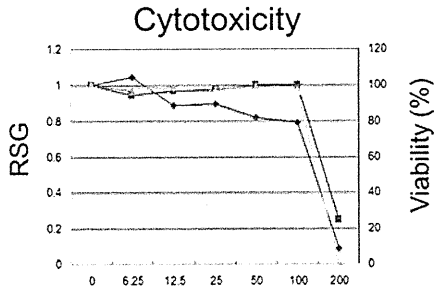
4) Gamma-ray



5) Mitomycin C (MMC)



6) Triton X-100 (TRX)



— Day0 (viability) — Day1 (viability) — Day2 (viability) — RSG

TOX: Not detectable due to cytotoxicity

☒ 2

遺伝毒性試験法の統計解析

研究分担者 中嶋 圓 （財）食品農医薬品安全性評価センター 試験部

研究要旨

本研究は、遺伝毒性試験法であるコメットアッセイ (*in vitro*) のバリデーション研究で化合物の陽性判定に使用する統計的手法について検討した研究である。バリデーション研究では得られたデータについて重み付き回帰分析を実施した結果、化合物によっては判定に不一致が認められた。本研究での不一致の原因を解明し、問題点を洗い出した上で、より精度の高い判定方法の提案をしたい。

A. 目的

遺伝毒性試験法であるコメットアッセイ (*in vitro*) 試験の評価に使用されている多くの統計解析手法が存在するが、世界的に統一された実験条件の下での検討がなされていない。

本研究はコメットアッセイ (*in vitro*) 試験法の国際バリデーション研究(分担研究者: 本間正充)において、各化合物の陽性・陰性の判定に用いられる統計手法の検討を行った。

B. 検討課題

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妥当性の検証となり得るかは少し検討の余地がある。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するでも比べる必要があると思われる。

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 $SD/\sqrt{50}$ にして、平均値の分散として利用したが、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。

C. コメットデータの特性

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、まだまだコメットアッセイの定量的方法自体に改良の余地があると判断される。

D. 統計手法の新たな提案

当面は記述的な validation のときに使った y_i の変動重みづけによる直線回帰で行い、データの分散傾向が安定したら、チューブ内では二項分布または負の二項分布するデータとしてチューブ間差と誤差をとまなう混合モデルによるロジスティック回帰などへの発展を考える。

このような計算技術は、従来は容易ではなかったが、SASのNLNMIXEDプロシジャーを利用することで最近では可能となっている。

当てはまりの良さをAICなどで評価し、適切な関数を選択することが可能であれば、傾きと高さに対応する非線形パラメータに基づいて陽性化合物の判定基準を決定して行くことの実現性は

高いものと考える。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

論文発表

- 1) 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 gavage in rats, of Toxicological Sciences, Vol.36(6), 421-428, (2011)
 - 2) 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.
 - 3) 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)
 - 4) 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)
 - 5) 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 C₆₀nanoparticles in comet assay using lung cells of ratsintratracheally instilled, Regulatory Toxi. And Pharmacology, Vol.62, 419-424 (2012)
- 4) 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)
 - 5) 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)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

学会発表

- 1) 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)
- 2) 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およびコメットアッセイ, 第40回 日本環境変異原学会 (2011. 11)
- 3) 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

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

分担研究者 能美健彦 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長

研究要旨

トランスジェニック遺伝毒性試験のバリデーションに関する基盤的研究として、F344 *gpt* delta rat を用いた国内共同研究を進め、発がん物質(2,4-ジアミノトルエン, アリストロキア酸、亜硫化ニッケル)および非発がん物質(2,6-ジアミノトルエン)の *in vivo* 遺伝毒性を検索した。28 日間連投モデルの検証結果をとりまとめるとともに、OECD ガイドライン策定のためデータ提供を行った。2011 年にトランスジェニックげっ歯類を用いた遺伝子突然変異試験の OECD ガイドライン(TG488)が公開された。

キーワード:*in vivo* 遺伝毒性試験、*gpt* delta トランスジェニックラット、突然変異体頻度

A. 研究目的

トランスジェニック(Tg)齧歯類を用いる遺伝毒性試験は、変異検出用のレポーター遺伝子を導入した Tg マウスあるいはラットを化学物質に曝露し、任意の臓器・組織からレポーター遺伝子を *in vitro* パッケージ法によりλファージ粒子として回収して大腸菌に感染させ、動物個体で起きた変異を、大腸菌を用いて検出する試験法である。原理的には個体のあらゆる組織で測定可能であるため、個体における曝露経路、発がん標的臓器、代謝や薬物動態等を考慮した評価に有用である。

我々は、個体に生じた点突然変異と欠失変異を効率良く検出するために新規なλファージλ EG10 を開発し、これを C57BL6/J マウスの受精卵に導入して *gpt* delta マウスを樹立した。またλ EG10DNA を Sprague Dawley (SD)ラットに導入して *gpt* delta ラットを作成した。さらに、発がん試験において汎用されている F344 系統にバッククロスを行い F344 *gpt* delta ラットを樹立した。ラットは、一般毒性試験、発がん試験に汎用されており、Tg ラットを用いて *in vivo* 遺伝毒性試験と一般毒性試験(あるいは短期発がん試験)を統合することは、3R の点から望ましい方向と考えられる。

Tg 遺伝毒性試験については International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT)において、長年にわたって試験法の評価とガイドライン化を視野に入れた検討が行われており、推奨試験プロトコルが提唱されている。しかしながら、IWGT の推奨プロトコル(反復投与 28 日間+3 日後に組織採取)に準じた試験データは不足している。特にラットについては

データが無い。

本研究では、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]および非発がん物質 2,6-ジアミノトルエン(2,6-DAT)の *in vivo* 遺伝毒性を検索した。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。

B. 研究方法

1) 概要

gpt delta ラットを用いた共同研究には国内約 10 施設が参加した。参加施設を 3 グループに分け、各グループの 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)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。

2) 3 試験の方法

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 のみ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。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。雄 *gpt delta* ラットにアリストロキア酸を 0.3 mg/kg および 1 mg/kg の用量で 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について *gpt* アッセイを行った。実験には各群 5 匹の雄ラットを用いた。

2-3) 亜硫化ニッケル

亜硫化ニッケル (Ni_3S_2) は不溶性の金属化合物であり、ラットに吸入又は気管内投与すると肺がんを誘発することが報告されている。亜硫化ニッケルをパラフルオロカーボンに懸濁し、0、0.5、1.0 mg/匹の用量で、週 1 回の気管内投与を 4 回行った。標的臓器が肺であることから、麻酔下の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*、*Sp1* 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

試験物質で処理した F344 *gpt delta* ラットの臓器(肝臓、腎臓、肺)を各グループ内の施設に送付した。各試験において 2~4 施設が全個体について突然変異体頻度の測定を行った。凍結組織からゲノム DNA を抽出し、*in vitro* パッケージングによって λ EG10 ファージを回収した。回収したファージを大腸菌に感染させ、*gpt* アッセイによって *gpt* 点突然変異体頻度を測定した。また、一部の施設では *Sp1* アッセイによって *Sp1* 欠失変異体頻度を測定した。試験結果は各グループにおいてグループ全体および施設別に集計された。統計学的解析は、等分散の検定 (Bartlett's test) を行い、等分散の場合はパラメトリック検定 (Dunnett's test)、不等分散の場合はノンパラメトリック検定 (Steel's test) を行った。いずれも $p < 0.05$ を有意差とした。

(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、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。

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、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。

1-3) 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 および 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 *Sp1* 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。

2) 本共同研究の結果は、OECD のトランスジェニック遺伝毒性試験ガイドラインの策定にあたり、ラットによる 28+3 プロトコルの施設間比較データとして提供された。2011 年に新規ガイドライン (OECD Test Guideline 488: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays) が公開された。

D. 考 察

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。IWGT の議論を受けて作成された 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行った。1) 発がん物質 2,4-DAT と非発がん物質 2,6-DAT を用いた標的組織における *in vivo* 変異原性の検討、2) アリストロキア酸を用いた発がん標的および非標的臓器における変異原性の検討、3) 亜硫化ニッケルを用いた肺の曝露と炎症を背景とした発がんにおける変異原性の検討、の 3 試験を行った。

2,4-DAT は陽性、2,6-DAT は陰性となり、*in vivo* 遺伝毒性試験結果が 2,4-DAT および 2,6-DAT の肝発がん性と対応していることが示唆された。施設間データの比較に関しては、1 施設において、2,4-DAT を有意に陽性判定できなかった。(30 mg/kg で MF 増加(P=0.06)) 理由として、同施設データの個体あたり回収コロニー数が低かったため、試験群 24 匹中 8 匹で変異体数=0 となるなど、低頻度域の検出力不足が考えられた。また、別の 1 施設において、他施設より突然変異体頻度が高い傾向がみられた。変異コロニー判定基準を確認、統一するよう必要があると考えられた。2,6-DAT の突然変異体頻度は媒体対照群と比較して有意差はないもののやや高値を示したが、値が高い個体 1 匹の影響によると考えられた。

アリストロキア酸は、発がん標的臓器の腎臓および非標的臓器の肝臓において用量依存的に突然変異体頻度の上昇が認められた。肝臓の変異体頻度増加は腎臓よりも高値であり、突然変異誘発能が発がん標的性と必ずしも一致しないことが示唆された。施設間比較に関しては 2 施設の結果は比較的一致していた。群内の個体差が大きいと低用量群で統計的有意差が付きにくい傾向がみられた。検定法の影響も考えられ、傾向検定等他の方法で補強することも検討の余地があると考えられた。

亜硫化ニッケルは、*gpt* 点突然変異体頻度および Spi 欠変異体頻度ともに有意な増加は認められず、陰性となった。中長期の酸化的損傷・炎症を背景とする発がん物質(金属系化合物等)に対する Tg 試験の感受性が低い可能性が示唆された。施設間比較では 4 施設全てで同等の結果が得られた。

以上の結果から F344 *gpt delta* ラットを用い

た *in vivo* 遺伝毒性試験の有効性が示唆された。本共同研究の結果は、OECD のトランスジェニック遺伝毒性試験ガイドラインの策定にあたり、データ提供された。2011 年に新規ガイドライン 488 (Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays) が公開された。今後の課題としては、まず 28 日間反復経口投与が適当でない場合の投与プロトコルの妥当性の問題が挙げられる。また、特に陰性結果の場合における用量設定の妥当性も課題である。文献値や系統の異なる動物のデータに基づいた用量設定で最高用量(=MTD)を充分担保できるかは不明であり、用量設定試験および本試験での一般毒性データの検討が重要である。さらに、現在の推奨プロトコルである、28 日間反復経口投与、最終投与 3 日後に組織採取という方法は、亜急性の毒性試験で用いられるプロトコル(28 日間反復経口投与の翌日に解剖)と差違があるため、*in vivo* 遺伝毒性試験と一般毒性試験の併用の際に障害となる。同種の動物で発がん性の標的組織における変異原性を検索可能な Tg 試験の長所を活かす意味でも、3R の観点においても、統合を視野に入れた試験法を整備していくことが課題である。

E. 結 論

Tg 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* 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)および非発がん物質(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るとともに、OECD ガイドライン策定のためデータ提供を行った。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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).
- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) 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)
- 4) 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)
- 5) 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 genotoxicity in the colon of *gpt* delta rats, *Carcinogenesis*, 32, 1512-1517 (2011)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) N. Koyama, M. Yasui, A. Kimura, S. Takami, T. Suzuki, K. Masumura, T. Nohmi, S. Masuda, N. Kinoue, T. Matsuda, T. Imai, M. Honma, Acrylamide genotoxicity in young versus adult *gpt* delta male rats, *Mutagenesis*, 26, 525-529 (2011)
- 9) A. Sassa, T. Ohta, T. Nohmi, M. Honma, M. Yasui, Mutational specificities of brominated DNA adducts catalyzed by human DNA polymerases, *J. Mol. Biol.*, 406, 679-686 (2011)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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)
2. 学会発表
- 1) 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)
- 2) 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および欠失変異の蓄積, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011.11)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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 κ 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)
- 6) 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)
 - 7) 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)
 - 8) K. Masumura, Y. Sakamoto, W. Kumita, M. Honma, T. Nohmi, Identification of genomic insertion sites of λ EG10 DNA in *gpt* delta transgenic mice and rats by high-throughput DNA sequencing, Society of Toxicology 51st Annual Meeting, USA (2012.3)
 - 9) 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)
 - 10) H. Takagi, Y. Nozaki, A. Kawada, M. Yamada, K. Masumura, T. Nohmi, General toxicity study of F344 *gpt* delta transgenic rat for one-year feeding, Society of Toxicology 51st Annual Meeting, USA (2012.3)
 - 11) 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)

H. 知的所有権の取得状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
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

*in vitro*皮膚感作性試験代替法のバリデーション

研究分担者 大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所 所長

研究要旨

EURL ECVAM (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing)と共同で皮膚感作性試験代替法 human Cell Line Activation Test (h-CLAT)プレバリデーションを進めている。

本年度までに、h-CLATの技術移転段階が終了し、施設間再現性をほぼ確認できた。

キーワード：感作性試験、h-CLAT、安全性評価、動物実験代替法

協力研究者

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
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)安全性評価研究所 上席
主任研究員

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^{10, 11, 12)}。

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、EURL ECVAM (European Union
Reference Laboratory for Alternatives to Animal
Testing) と共同で h-CLAT の国際バリデーション
を行うこととし、ECVAM で行う 3 つの皮膚感作
性試験代替法のプレバリデーションの中に組み込
んだ（他は MUSST: Myeloid U937 Skin
Sensitisation Test 及び DPRA: Direct Peptide
Reactivity Assay)。

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<sup>1, 2, 3, 4,
5)</sup>。

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⁶⁾。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に関する検
討^{7, 8, 9)}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

B. 研究方法

B-1) バリデーション実行委員会

図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、花王及び資生堂が参加した。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。

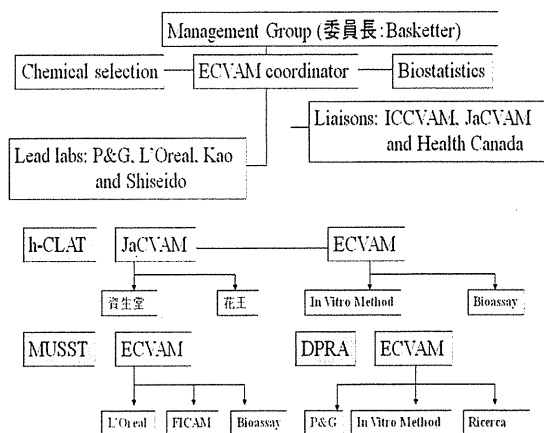


図1. バリデーション実行委員会組織

B-2) プレバリデーションの概要

B-2-1) 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。

B-2-2) phase B stage I

2011年4月より、施設間再現性検証のためにLead lab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）。

B-2-3) 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3回評価した（計45試験）。

（倫理面への配慮）

倫理的問題が生じる実験は実施していない。

C. 研究結果

C-1) バリデーション実行委員会

2010年3月に開催された第6回バリデーション実行委員会において、phase A stage IIの計画が承認された。

ついで、7月に第7回バリデーション実行委員会

D. 考察

本年度までに、h-CLATの技術移転段階が終了し、施設間再現性もほぼ確認できた。

現在進行中のプレバリデーション phase B stage IIでは、3月までに花王において20物質の実験が終了した。2012年5月までに終了の予定である。資生堂においては、8物質の実験が終了した。2012年7月までに終了の予定である。他の2施設においては、1施設は2012年5月までかかる可能性がある。いずれにしても、2012年夏までにはすべての施設が終了する予定である。現在、すべての物質名コードが開示されておらず、物質毎の特性に

が、11月に第8回バリデーション実行委員会が開催され、phase B stage Iの計画が承認された。

C-2) プレバリデーション

C-2-1) phase A stage II

本計画は、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、漸く、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。

それまでの過程で、解決された課題は以下のとおり。

- 1) SOPの不備、解釈ミスなど試験法の正確な把握と準備
- 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
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。
・CD86の発現量をもとに適切な細胞の選択基準を設定した。

C-2-2) phase B stage I

表1に示すように、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。プロトコールに従って全てのデータが取得された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。

C-2-3) phase B stage II

現在、進行中である。

応じた解析ができない状況である。すべての実験終了を待ってなされるデータ解析を待ちたい。

E. 結論

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が良いことが確認できた。

F. 健康危険情報

特になし