

201133004B

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21年度～平成23年度 総合研究報告書

研究代表者 大野泰雄

平成24年(2012)年 4月

目 次

I. 総合研究報告

- 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. 資料： 研究分担者総合研究報告

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 ----- 27
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----- 171
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-- 253
本間 正充
4. 遺伝毒性試験法コメットアッセイ (*in vitro*) の統計解析に
関する研究 ----- 263
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 ----- 267
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 ----- 275
大野 泰雄
7. 国際協調を重視したバリデーションの手順に関する研究 ----- 281
小島 肇
8. 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 ----- 293
森田 健

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 297

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 (ER α) 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 ER α 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。

本研究班の主な成果として、①Lumi-Cell 法のバリデーションが終了し、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ことが挙げられる。

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 3 Rs (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 (ER α) アンタゴニスト測定法 (HeLa 法)、②米国で開発された ER α 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。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 ER α 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たもので、アゴニスト活性評価法としては、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 ER α アンタゴニストを用いた HeLa 法の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を行うとともに、得られた結果をもとに成立基準の最適化のために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 をリード施設として、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 (株)、(株) 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。(株) 日吉において実施した Task 2 データをもとに成立基準を見直した。平成 23 年度、(株) 日吉で Task 3 試験を開始したものの成立基準を達成できず、原因解明のため HeLa9903 細胞を構築した住友化学 (株) (株) より別ロットの細胞を入手して、更に検討した。その結果、試験系 (細胞) 自体に問題があることが疑われたため、解決のためリード施設である 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 フェーズ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、米国 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った。また、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。平成 23 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 Performance Based Test Guideline (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の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を導入し、更に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導入し、それらを安定発現するようにした細胞株である。アンドロゲン受容体への作用と細胞毒性の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

B-2-1-1) 組織

本バリデーション組織は 2006 年度（平成 18 年度）に設立した。国際的な組織の下に、コンサルタントチーム及び国内組織を置き、日本人や専門家の意向をバリデーションに反映させた。バリデーションには、表 1 に示す 14 施設が参加した。

表 1. コメットアッセイバリデーション参加施設

No	施設名
1	AstraZeneca
2	Bayer HealthCare
3	BioReliance*
4	Covance
5	Food and Drug Safety Center*
6	Health Canada
7	Huntingdon Life Sciences*
8	Johnson & Johnson
9	Merck*
10	Mitsubishi Chemical Safety Institute
11	Novartis Pharma
12	Sumitomo Chemical
13	The Institute of Environmental Toxicology
14	ILS

*: Lead laboratory

B-2-1-2) 計画及び試験方法

1) バリデーション Phase IV-1

Phase IV-1 バリデーションでは、平成 20 年度までに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。

EMS 200mg/kg 濃度を陽性対照とし、被験物質の適用濃度及び溶媒は各施設に選択させた。

2) バリデーション Phase IV-2

Phase IV-1 を経て微修正されたプロトコル(ver.14.2)を用い、合計 40 の被験物質を 14 施設に配布し（3 物質／施設）、*in vivo*における遺伝毒性をどの程度評価できるかを目的に、バリデーションを開始した。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、配布した。被験物質は、基本的に国立衛研 薬理部 新規試験法評価室が配布した。米国の参加施設については、NICEATM の支援を受けて配布した。表 2 に示すように、被験物質コード番号は、A4201～A4240 とした。

Ver.14.1 から 14.2 におけるプロトコルの変更点は小さいと考えている。

プロトコルの概要を以下に示す。

- ①動物：CrI: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(エチルメタン酸サルフォネート)
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-2-3) コメットアトラスの作成

今までのバリデーシヨンの過程で結果が安定しない原因が種々明らかになり、その一つがコメント結果の判定方法の不統一によると判断とされた。そこで本問題を解消し、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。

表 2. 被験物質コード、物質名、カテゴリー、実施施設、溶媒、実験濃度

Test chemical code	Test chemical name (CAS-RN)	Category of genotoxicity and carcinogenicity
A4114	2-Acetylaminofluorene (53-96-3)	Genotoxic carcinogen
A4201	1,3-Dichloropropene (542-75-6)	Genotoxic carcinogen
A4202	Ethionamide (536-33-4)	Non-genotoxic non-carcinogen
A4203	Buslfan (55-98-1)	Genotoxic carcinogen
A4204	N-Nitrosodimethylamine (62-75-9)	Genotoxic carcinogen
A4205	Ampicillin trihydrate (7177-48-2)	Non-genotoxic non-carcinogen
A4206	1,2-Dimethylhydrazine dihydrochloride (306-37-6)	Genotoxic carcinogen
A4207	Isobutyraldehyde (78-84-2)	Non-genotoxic non-carcinogen
A4208	Cisplatin (15663-27-1)	Genotoxic carcinogen
A4209	Azidothymidine (30516-87-1)	Genotoxic carcinogen
A4210	p-Dichloroaniline (106-47-8)	Genotoxic carcinogen
A4211	t-Butylhydroquinone (1948-33-0)	Non-genotoxic non-carcinogen
A4212	Methyl carbamate (598-55-0)	Non-genotoxic carcinogen
A4213	Methyl methanesulfonate (66-27-3)	Genotoxic carcinogen
A4214	2,6-Diaminotoluene (823-40-5)	Genotoxic non-carcinogen
A4215	5-Fluorouracil (51-21-8)	Genotoxic non-carcinogen
A4216	8-Hydroxyquinoline (148-24-3)	Genotoxic non-carcinogen
A4217	Hydroquinone (123-31-9)	Genotoxic carcinogen
A4218	Saccharin (81-07-2)	Non-genotoxic carcinogen
A4219	Sodium arsenite (7784-46-5)	Genotoxic carcinogen

A4220	Thioacetamide (62-55-5)	Non-genotoxic carcinogen
A4221	Diethanolamine (111-42-2)	Non-genotoxic carcinogen
A4222	p-Phenylenediamine dihydrochloride (624-18-0)	Genotoxic non-carcinogen
A4223	o-Phenylphenol sodium salt (132-27-4)	Non-genotoxic carcinogen
A4224	2,4-Diaminotoluene (95-80-7)	Genotoxic carcinogen
A4225	4,4'-Oxydianiline (101-80-4)	Genotoxic carcinogen
A4226	o-Anisidine (90-04-0)	Genotoxic carcinogen
A4227	Sodium chloride (7647-14-5)	Non-genotoxic non-carcinogen
A4228	Acrylonitrile (107-13-1)	Genotoxic carcinogen
A4229	9-Aminoacridine hydrochloride monohydrate (52417-22-8)	Genotoxic non-carcinogen
A4230	Ethanol (64-17-5)	Non-genotoxic carcinogen
A4231	1,2-Dibromomethane (106-93-4)	Genotoxic carcinogen
A4232	p-Anisidine (104-94-9)	Genotoxic non-carcinogen
A4233	o-Anthranilic acid (118-92-3)	Non-genotoxic non-carcinogen
A4234	Benzene (71-43-2)	Genotoxic carcinogen
A4235	Di(2-ethylhexyl)phthalate (117-81-7)	Non-genotoxic carcinogen
A4236	Trisodium EDTA monohydrate (10378-22-0)	Non-genotoxic non-carcinogen
A4237	Cadmium chloride (10108-64-2)	Genotoxic carcinogen
A4238	Chloroform (67-66-3)	Non-genotoxic carcinogen
A4239	D,L-Menthol (15356-70-4)	Non-genotoxic non-carcinogen

* 溶媒と実験濃度は国際実行委員会によって指示された。

B-2-2) *in vitro* コメントアッセイ

B-2-2-1) 組織及び計画

国際バリデーション研究チームは試験評価のためのバリデーション実行委員会、実際の試験担当機関、試験計画、試験結果の評価のアドバイザーとしてのコンサルタントチームからなる。これまで1回のプレバリデーションが行われた。プレバ

リデーションは2007年10月から開始され、5つの研究機関（日本2、米国2、英国1）により4物質が試験された。物質名を開示し、バリデーション実行委員会が指定した用量でコメットアッセイを実施し、試験方法の妥当性と、各試験機関間の再現性を評価した。その後、Phase Iバリデーションが2008年8月から開始され、4つの研究機関（日本1、米国2、英国1）により6物質が試験された。被験物質名は開示せず、溶媒の選択、用量設定はすべて試験担当機関が行った。Phase IIバリデーションでは実際に規制評価試験としての妥当性と、各試験機関間の再現性の検討を目的とした。また、*in vitro*での代謝活性化の効果についても検討した。Phase IIバリデーションは2010年6月から開始され、2011年1月に終了した。5つの研究機関（日本1、米国2、英国1、韓国1）により2物質が試験された。2011年4月からはコメットアッセイ結果の評価、解釈と、その有用性を評価のためのConfirmation研究を国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部で行った。

1) 試験機関

1) Phase I

- i) 食品農医薬品安全性評価センター(日本)
- ii) 食品薬品安全センター(日本)
- iii) バイオリライアンス(米国)
- iv) ハンチントンライフサイエンス(英国)

2) Phase II

- i) 食品薬品安全センター(日本)
- ii) バイオリライアンス(米国)
- iii) ベーリンガーインゲルハイム(米国)
- iv) ハンチントンライフサイエンス(英国)
- v) 韓国毒性研究所(韓国)

3) Confirmation

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部

B-2-2-2) 試験方法

1)被験物質

・Phase I

表3. Phase I 使用物質

No.	物質名	特徴
1	9-Aminoacridine (9AA)	代謝活性化を不要とする遺伝毒性陽性物質
2	Camptothecin (CAM)	トポイソメラーゼ I の阻害剤。1本差DNA切断を誘導。代謝活性化不要。
3	Cyclophosphamide (CP)	強い遺伝毒性物質であり、代謝活性化が必要
4	D(-)-Mannitol (MAN)	非遺伝毒性物質
5	Etoposide (ETO)	トポイソメラーゼ II の阻害剤。2本差DNA切断誘導。代謝活性化は不要

6	N-Nitrosodimethylamine (DMN)	DNA をアルキル化する強力な遺伝毒性物質
---	------------------------------	-----------------------

・Phase II

- i) Methyl methanesulfonate (MMS)
アルキル化剤で典型的な遺伝毒性物質
- ii) 2-Aminoanthracene(2AA)
代謝活性化が必要な遺伝毒性物質

・ Confirmation

- i) Ethyl methanesulfonate (EMS)
- ii) Methyl methanesulfonate (MMS)
- iii) Hydrogen peroxide
- iv) γ -ray
- v) Mitomycin C (MMC)
- vi) Triton X (Tri-X)

2) プロトコル

ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 を用いた。本細胞は遺伝子突然変異試験、小核試験、コメット試験に適用可能な遺伝毒性試験のスタンダード細胞の一つである。

細胞毒性は、1) 処理後48時間の細胞増殖試験と2) トリパンブルー染色による色素除外能力(TBD)試験、3) 核のない細胞(NCDN、ヘッジホッグ)の割合を指標に、コメット観察時に平行して計測した。NCDNはアポトーシス像であり、細胞毒性の指標になりうる。80%TBD、20%NDCN、100%細胞増殖抑制を目安として最高用量を設定した。

4時間試験検体処理後の細胞をコメットアッセイ用サンプルとした。コメットアッセイの詳細については*in vivo*コメット国際バリデーションの方法に準じた。

Duplicateで行った試験の1つずつからそれぞれ50個の細胞を解析(合計100個)した。画像解析ソフト Comet assay IV を用いて次の解析パラメータを自動算出した。% tail DNA を統計解析の評価対象とした。

1000個の正常細胞を観察し、小核を持つ細胞数を計測した。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。

B-2-3) コメットアッセイの統計解析

1) 主要評価変数

本研究でのコメットアッセイ(*in vitro*)のプレバリデーション、Phase I及びPhase IIバリデーションで集められたパラメータの内、% Tail DNA値を主要評価変数とした。

2) 外れ値・欠測値の取り扱い

各参加施設から提出されたデータのすべてを解析対象とし、外れ値の除去及び欠測値の補完作業

は行わなかった。

3) 統計解析

各用量の各スライドの平均値を説明変数、標準偏差の逆数を重みとして重み付き回帰分析を行った。推定された回帰式の 1) 回帰係数 (傾き) が正でかつ、2) 回帰係数が 0 でないことを仮説とした F 検定で有意差が認められた場合に、物質を陽性と判定した。

B-2-4) トランスジェニックアッセイ

B-2-4-1) *gpt delta* ラット共同研究の概要

共同研究には国内約 10 施設が参加した。まず、参加施設に共通の陽性・陰性対照として F344 *gpt delta* ラット凍結組織を配布し、Tg 試験の技術的検討を行った。陽性対照としてはジエチルニトロサミン (DEN) 20 mg/kg を毎週 1 回、13 週間腹腔内投与したラット肝臓を用いた。陰性対照は溶媒対照群のラット肝臓を用いた。各施設で組織からのゲノム DNA 抽出、*in vitro* パッケージングによるレポーター遺伝子の回収効率、及び *gpt* アッセイによる突然変異頻度の測定を行った。

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 が推奨する 28 日間の経口投与、最終投与後 3 日目に組織を採取するという試験プロトコルを基本的に動物実験をデザインした (亜硫化ニッケルは除く、後述)。

参加施設を 3 グループに分け、各物質の試験を行った。各グループの 1 施設が動物実験を担当した。本試験では、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を全参加施設に配布して用いた。

被験物質を投与した F344 *gpt delta* ラットの臓器 (肝臓、腎臓、肺) をグループ内の各施設に送付した。グループ毎に 2~4 施設が全群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 Spi アッセイによって Spi 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及び施設別に集計された。群間の差の統計学的解析は、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 (Dunnnett'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。

B-3.皮膚感作性試験 (h-CLAT 法)

B-3-1)組織

本バリデーションの目的は、技術移転及び施設内、施設間再現性の確認である。EURL ECVAM 主導の *in vitro* 皮膚感作性試験バリデーション実行委員会に日本からは 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。

B-3-2)計画

1) 被験物質数 24 (陽性 16、陰性 8)

これ以上の情報はバリデーションが終了するまで公開されない。

2) バリデーションの段階

・技術移転

phase A stage I : リード施設による指導

II : 各施設での予備試験

(コード化なし)

・再現性

phase B stage I : コード化された 9 物質を用いて 1 回/施設

II : コード化された 15 物質を用いて 3 回/施設

B-3-3)プレバリデーションの概要

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物質を正しく評価できるかどうかを確認した。なお、花王 (株) 及び (株) 資生堂から専門家を IVM (2010年10月18、19日)、Bioassay 社 (2010年10月21、22日) に派遣して共に実験を行い、操作と過去の生データをチェックした。

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)バリデーションの手順

本研究班でバリデーションを実施した試験法はもちろんのこと、昨今実施された他のプロジェクト

トのバリデーションにおいても、実行委員会に参画したバリデーション試験法をすべて参照にした。

B-4-2) 被験物質の選択

コメントアッセイのバリデーションの目的は、発がん性予測能（感受性・特異性）及び付随的に肝 UDS 試験との代替性の検証であった。発がん性予測能の検証には、幅広く遺伝毒性発がん物質（ここでの“遺伝毒性”は、Ames 陽性あるいは標準的 *in vivo* 試験陽性とした）、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について計 40 物質を検討する必要があると判断された。そこで、発がん性、遺伝毒性、発がん及び遺伝毒性の作用機序・作用様式、化学物質クラスなどに基づき 88 候補物質を選出し、既存情報の充実性、化学物質特性、入手可能性、取扱容易性などに基づき、最終的に 40 物質を選択した。

一方、Bhas アッセイバリデーションの目的は、バリデーション済みの 6 ウェルプレート法と新規 96 ウェルプレート法とのブリッジングであり、施設間再現性、6 ウェルプレート法との同等性、ならびに非遺伝毒性発がん物質（ここでの“非遺伝毒性”は主に Ames 陰性の発がん物質あるいは Ames 陰性で発がんプロモーターとされるものとした）検出性、ならびに非発がん物質の陰性特異性の検証であった。そのためには、遺伝毒性発がん物質、非遺伝毒性発がん物質、及び非発がん物質を含む計 16 物質を検討する必要があると判断された。そこで、6 ウェルプレート法で評価済みの 98 物質の中から、これまでのバリデーションでの未検討物質、Ames 陰性の無機金属発がん物質、非高揮発性物質ならびに既存の遺伝毒性試験知見の充実性に基づき、最終的に 16 物質を選択した。

（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

1) Task 1 結果

Task 1 では、OECD ガイドライン TG455 に従い、アゴニストアッセイにおけるリファレンス物質の測定を実施した。追加で参加した（株）日吉を含む全 6 施設ともエッジ効果は認められなかったため、以降は 96 穴全てを用いるフォーマットで測定を行うこととした。また、全ての参加施設におい

て成立基準を満たすデータの取得に成功した。

2) 国内 3 施設における Task 2 結果からの成立基準の設定

Task 2 測定において、国内参加施設のうち大塚製薬（株）は予め CERI の施設内データをもとに設定した暫定成立基準を満たす 3 測定結果を得て Task 2 を終了した。また、CERI 及びカネカは、性能評価基準を一部の項目で若干逸脱したため 5 試行まで測定を実施したが、いずれの施設における結果も施設内での再現性が良いことを示しており、また基準を逸脱する項目も一部であると判断されるとのバリデーション実行委員会の承認を得て Task 2 測定を終了した。Task 2 をクリアした国内 3 施設の合計 13 回の測定結果の平均 \pm 2SD により設定した暫定成立基準の更新がバリデーション実行委員会にて承認された。また、CERI におけるプレバリデーション結果から陰性参照物質として設定されていたコルチコステロンについては、一部の測定結果で擬陽性が示されたため、Task 2 測定結果について評価対象外とし、陰性参照物質については再検討の結果、フルタミドに変更された。

3) 海外 2 施設での Task 2 における問題

海外の 2 施設（VITO、KFDA）では、予め設定した性能基準に近い再現性の良い測定結果を得ることが出来ず、得られた測定結果の信頼性に問題が示された。VITO においては、十分な Fold Induction が得られないこと及び細胞継代により反応性の急激な低下が観察されたため、測定に用いる細胞や FBS、試薬や器具の影響について追加検討を行った。その結果、培地調整に用いる超純水が測定に影響を与える可能性が示されたことから、調整済みの市販の培養用超純水の使用をプロトコルに追加した。追加検討に時間がかかったことなどから、VITO は、Task 2 終了前に ECVAM との契約期限が終了し、測定継続が困難となり Task 2 終了前にバリデーションから離脱した。一方、KFDA については、測定結果などから試薬等の問題だけでなく技術的な問題が示唆されたため、リード施設の試験担当者とともに NIFDS/KFDA 現地での施設・設備の調査と技術指導を実施し、技術的な問題はほぼクリアし、再現性の良い結果が得られるようになったものの、やはりバリデーション期間が当初予定より延長したことなどから参加の継続が困難となり Task 2 終了前にバリデーションから離脱した。

4) 国内 3 施設における Task 3 結果

Task 2 をクリアした国内 3 施設において、バリデーション計画に従う Observer グループの Task 3

測定を実施した。各参加施設には、コード化された 12 物質が測定用物質として JaCVAM より送付された。2 施設（大塚製薬（株）（株）、CERI）においては、リファレンス物質の IC 値が性能基準を満たす 3 測定結果の取得に成功したが、1 施設：カネカ（株）では 5 測定まで実施し、上記のとおりコード化物質の評価結果については、他の試験施設と良く一致したものの、同時に実施したリファレンス物質の測定結果が性能評価基準を満たす 3 測定が得られていないことから測定結果の採用は保留となった。また、カネカ（株）（株）はその後、*in vitro* 事業から撤退したため、追加測定は困難となった。

5) (株) 日吉における Task 2

(株) 日吉における Task 2 では、継代による細胞活性の低下 (fold change や発光強度の低下)、国内 3 施設の結果を基に設定された暫定成立基準からの多項目における逸脱等の問題が認められたため、問題の解決の検討も含め全 14 回の測定を実施し、一部の成立基準を逸脱するものの 8~10 及び 13, 14 回目の測定結果は再現性が高く信頼出来ると判断されこれらのデータを採用し Task 2 を終了した。成立基準は、(株) (株) 日吉の Task 2 採用データと国内 3 施設のデータの平均値 $\pm 2SD$ に再度アップデートされた。また、(株) 日吉での検討結果により明らかになった継代における培地交換頻度やトリプシン処理時間に関する注意点のプロトコルへの追加記載によるアップデートを行い、いずれもバリデーション実行委員会で承認された。

6) (株) 日吉における Task 3 測定と CERI における測定系の再構築

(株) 日吉における Task 3 測定では、リファレンスプレートの測定は、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、(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物質の陽性・陰性判定結果は、他の 2 施設と良く一致した。検討の結果、(株) 日吉における Task 3 データの成立基準逸脱の原因は、アッセイに使用した細胞そのもの、もしくは継代時のトリプシン処理時間や培地交換頻度による細胞の反応性変化によるものと考えられた。そのため、HeLa9903 細胞を構築した住友化学（株）より新たなロットの細胞の供給を受け、CERI にて測定系の再検討を実施し、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、再構築された条件（細胞、血清）を用いて（株）日吉における Task 3 を再開する予定である。

C-1-2) Lumi-Cell ER 法

1) バリデーション結果と ICCVAM ガイドライン
Lumi-Cell バリデーションに関しては、平成 22 年度までに予定していた全てのフェーズの測定が全参加施設で終了した。データ解析の結果、アンタゴニストアッセイにおいて多くの物質で高濃度域における非特異的なルシフェラーゼ活性低下が観察されたことに伴う最高濃度の低減化、アゴニスト・アンタゴニストアッセイにおける活性判定基準について、基準値をコントロール背景値の $\pm 3SD$ から $\pm 2000RLU$ に変更し、さらに従来は 1 点でも基準を超えれば陽性判定するとしていたのに対して、少なくとも 3 点以上からなる用量-反応曲線により判定するとの変更案が事務局より提案されバリデーション実行委員会電話会議においてメンバーの合意を得た。バリデーション結果を反映した最終プロトコルを基にした ICCVAM ガイドライン案について第三者評価が実施され、ICCVAM ガイドラインが成立した。

2) BG1 アッセイ OECD ガイドラインとエストロゲンアゴニスト PBTG の提案

平成 23 年度には、ICCVAM ガイドラインをもとにした、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 PBTG 案及び Performance Standards 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、主に PBTG における Proficiency Chemicals リスト及び Performance Standards における Reference Chemicals リストについて議論が行われ、最終的に Reference Chemicals として 22 物質、Proficiency Chemicals として 14 物質について合意を得た。

C-1-3) AR-EcoScreen 法

1) バリデーション報告書案及びガイドライン案に対する OECD 第三者評価

AR 転写活性化測定法については、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第三者評価のため OECD に提案した。バリデーション報告書に対する OECD 第三者評価報告

書では、バリデーション物質数がアゴニスト・アンタゴニスト各 5 物質と少なく、試験結果でカバー出来る活性範囲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。

2) 追加バリデーション実施の検討

OECD 第三者評価の指摘を受けて、追加バリデーション実施に向けて、以前のバリデーションにおけるリード施設である CERI とバリデーション実施の可否や実施体制、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、参加試験施設は、原則として以前のバリデーション参加施設とするが、1 施設は測定ラボを閉鎖してしまっていることから補充の 1 施設を探すことになった。また、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した上で参加を承認することとした。

C-2) 遺伝毒性試験

C-2-1) *in vivo* コメットアッセイ

C-2-1-1) バリデーション Phase IV-1

陽性対照物質 EMS は、すべての施設で肝臓、胃とも溶媒(陰性)対照と比較して統計学的に有意な変化を示した。この結果から、すべての被験物質の結果は採用できると判断した。陰性対照のコメット値は、ほとんどの施設がデータ採用基準である肝臓 1-8%、胃 1-30%の中にあった。2 施設が肝臓で 1%未満であった。

被験物質 EMS ではすべての施設において濃度依存的なコメットの増加を認めた。NDUでも同様の結果であった。すべての施設でマンニトール、2/3 施設で 2-AAF にはコメット数の増加を認めなかった。2-AAF における Lab K の結果は濃度依存性が明瞭ではないが、すべての濃度で有意な結果が得られた。媒体はコーン油を用いている。Lab B は 0.5% CMC 溶液を媒体として実施したが、高用量 (1000mg/kg) まで毒性が見られず、投与量が不十分であると考えられる。Lab H ではコードが開示されてしまい、2-AAF の毒性情報をもとに濃度を選択したため、毒性はでていないが、コメットも誘発されなかった。

C-2-1-2) バリデーション Phase IV-2

1) 被験物質の配布及びデータ収集

被験物質は、2010 年初めに 3 物質/施設に配布された。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イアンスに各 1 物質が届いていないことが 2010 年末に判明した。これらは 2011 年 2 月末までに送付した。結果的に、Lab H は 1 物質のみ実施したが、その他の施設は 3 物質を実施した。

2011 年 5 月までに、それまでに配布しや被験物質のデータはすべて収集され、その結果を 2011 年 9 月の京都での会議で議論した。結果として、A4219、A4204 及び A4206 の 3 物質について、再試験が必要と判断された。これらを施設に伝え、再試験を打診したが、実施不可能との返事を受けた。そこで、その実施を京都会議で受諾した Lab O により、3 物質の追加試験が実施されることになった。Lab O は 2012 年 2 月までに 3 物質の実験を終了し、結果を事務局に送付してきた。

2) 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。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いた。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。施設毎の溶媒対照としては、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。施設毎の溶媒対照としては、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。

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とから、この結果も採用となった。

3)被験物質結果の扱い

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。

バリデーション実行委員会では、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-2-1)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-2-2)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。

4)最終判定

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。

これまでの結果及び判定を以下に示す。

A) 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。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たことによる。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。

B) 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。

C) 非遺伝毒性発癌物質

7物質中、1物質A4238: Chloroformのみに肝臓で%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。

D) 非遺伝毒性非発癌物質

8物質中、1物質A4211: *t*-Butylhydroquinoneのみに肝臓で%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-2-1-3)コメットアトラス

実験者の判定基準を明確にするため、MMS研究会が数百枚の写真から選んだ150例の画像を用意し、参加施設に配布して判定させた。得られたコンセンサスをもとに、判定基準を明示した。カラーアトラスを作成した。テキストとして発行するため出版社と打ち合わせた。

C-2-2) *in vitro* コメットアッセイ

C-2-2-1) Phase I

Phase Iバリデーションは4つの試験機関で6つの物質を代謝活性化存在下(+S9)、及び非存在下(-S9)で実施された。全てブラインドで試験を行ったため、溶媒選択、用量設定は各試験機関で違いが認められた。

i) 9-Aminoacridine (9AA)

ほぼ全ての試験で陽性反応を示した。最高用量の根拠となったRSGでは細胞増殖が全く観察されないにもかかわらず、コメットの反応性は極めて低かった。コメット試験の細胞毒性指標にRSGを用いることには注意が必要である。

ii) Camptothecin (CAM)

2つのラボの-S9では陰性であったが、他は全て陽性であった。ただし、その反応性は弱く、ほとんどが陰性対照の2倍程度であった。2つにラボでの陰性の原因は不明であるが、細胞毒性の反応性が他標本と著しく異なるため、実験操作上の不手際が原因であるのかも知れない。

iii) Cyclophosphamide (CP)

-S9で、統計的には陽性を示したラボがあったが、

その反応性は僅かであり、アーチファクトと考えられる。+S9 では陽性傾向が見られたが、極めて高い細胞毒性での反応か、極めて弱いコメット反応であった。CP は他の遺伝毒性試験（小核試験、突然変異試験）では同様な条件で、強い遺伝毒性を示す。これらのことからコメット試験は他の試験に比べて感受性が極めて低いと考えられる。

iv) D(-)-Mannitol (MAN)

全ての試験機関で、代謝活性化の有無にかかわらず 5mg/ml まで試験されたが、陰性であった。

v) Etoposide (ETO)

全ての試験機関で、代謝活性化の有無にかかわらず用量依存的な陽性反応を示した。ただし、試験用量は試験機関でかなりの違いが見られた (0.5 ~ 1000ug/ml)。

vi) N-Nitrosodimethylamine (DMN)

+S9 ですべての機関で弱い陽性反応を示し、3つの機関で統計的に陽性と判定されたが、その反応性は極めて弱いものであった。その反応用量は 5000ug/ml である。他の *in vitro* 遺伝毒性試験で、DMN は 1ug/ml 以下で明らかな陽性反応を示すことが知られている。コメット試験はこのような強遺伝毒性物質に対しても、陽性反応を得るためには高濃度の処理が必要である。

vii) 陰性対照

コメット試験での陰性対照の %DNA in tail 値の範囲は、各試験機関で -S9 で 6.0~7.0、+S9 で 4.0~5.6 と比較的安定していた。このことは陰性対象のデータの許容値は比較的設計しやすいことを示している。

また、NCDN についても各試験機関の陰性対照を比較したが、-S9 で 0.2~3.3、+S9 で 0.5~4.6 と試験機関でばらつきが見られた。NCDN の評価基準が機関で異なるものと推察される。細胞毒性の指標として NCDN を用いるには評価基準の統一が必要である。

C-2-2-2) Phase II

Phase II バリデーションは 5つの試験機関で 2つの物質を +S9 及び -S9 下で実施された。物質名は開示せず、溶媒の選択は試験担当機関が行った。なお、指定された広範囲の用量で試験を行った。

i) MMS

全ての試験機関で用量依存的な陽性反応を示した。また、一部の機関で陰性対照が若干高かったが、用量依存性に関しても試験機関間で極めて再現性が高かった。また、S9 の有無はコメットアッセイの結果に影響を与えなかった。

RCG による細胞毒性の評価では、一部の機関の反応性が異なるため、100%細胞増殖抑制濃度を指標とした場合、試験機関間で最高濃度に 1000 倍もの大きな違いが生じた。一方、NDCN では、発現

する濃度が機関間で安定しており、比較的同じ最高濃度が得られた。

ii) 2AA

1 機関を除いて、-S9 でのコメットの増加は顕著でなかった。+S9 では 4 機関でコメット陽性の結果が得られた。1 機関は細胞毒性のため、高用量での試験はできなかった。

MMS の時と同様に RCG による細胞毒性の評価では、一部の機関の反応性が異なるため、100%細胞増殖抑制濃度を指標とした場合、試験機関間で最高濃度に大きな違いが生じた。しかしながら、4 機関では -S9 では 5000ug/mL の最高濃度まで細胞毒性は観察されなかった。一方、NDCN を用いた指標は、+S9 では 5つの試験機関間で一致したが、-S9 では本来細胞毒性はないはずなのに、NDCN の出現が不安定であるために、3つの機関が低用量で 20%以上の NDCN を観察した。+S9 での 5 機関の設定最高用量はほぼ一致した。

iii) 陰性対照、陽性対照

陰性対照(DMSO)の %DNA in tail 値はほとんどの機関で安定した値を示した。また、陽性対照 (MMS) では全ての施設で 20%以上の %DNA in tail 値を観察した。一方、NDCN に関しては 5 機関で陰性対照が安定した値を示したが、陽性対照では 1 機関の全ての試験で 100%NDCN を示した。検体の調整ミスと考えられる。

C-2-2-3) Confirmation

EMS、MMS、過酸化水素、 γ 線、MMC、Tri-X に関して、コメットアッセイ、小核試験を国立医薬品食品研究所・変異遺伝部で行った。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 は両方で陰性であった。

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、コメット反応は細胞毒性が引き起こされる用量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

プレバリデーション研究について直接法 (-S9 処理) では 5 物質中 4 物質 (一致率: 80%)、代謝活性化法 (+S9 処理) では 5 物質 2 物質 (一致率: 40%) が全参加施設で判定が一致した。両方法併せて一致率は 60%であった。

Phase I について、直接法 (-S9 処理) では 6 物質中 3 物質 (一致率: 50%)、代謝活性化法 (+S9 処理) では 6 物質 4 物質 (一致率: 66%) で全参加施設の判定が一致した。両方法併せた一致率は、58%であった。

Phase II について、直接法 (-S9 処理)、物質 A では実施 5 機関すべてで陽性と判定し、その陽性率は 100%であった。また、物質 B では 2 機関のデータが陰性と判定され、陽性率は 60%となった。一方、代謝活性化法(+S9 処理)、物質 A では 5 機関とも陽性と判定され、その陽性率は 100%を示した。しかしながら、物質 B については直接法同様、判定結果が分かれてしまい、陽性率は 60%にとどまった。

C-2-4) トランスジェニックアッセイ

1) 予備的検討

参加施設に共通の陽性・陰性対照として F344 *gpt delta* ラット凍結組織を配布し、肝臓 DNA からの λ EG10 フェージ回収効率、陰性対照及び陽性対照サンプルの *gpt* 突然変異体頻度を測定した。その結果、全施設で陰性対照値は通常範囲内であり、陽性対照サンプルは突然変異体頻度の明らかな増加が確認された。なお、亜硫化ニッケルについては他グループと異なり解析対象が肺となるため、ENU 投与 (50 mg/kg, 5 日間連続腹腔内投与) ラット肺サンプルをグループ施設に配布し、肺からの DNA 抽出、レポーター遺伝子の回収及び *gpt* アッセイの技術的検討を行い、問題がないことを確認した。

2) 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。

2,4-DAT の高用量群及び 2,6-DAT 群では投与により有意な体重減少が認められ、充分曝露されていることが示唆された。ENU 陽性対照肝臓サンプルは対照群と比較して突然変異体頻度の顕著な増加

が認められた。

3) 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。

4) 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。28 日後の肺には炎症性病変の所見が認められ、90 日後の肺では回復傾向がみられた。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。ENU 陽性対照サンプルは突然変異体頻度の顕著な増加が認められた。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。

5) 国際会議参加及びガイドライン策定

平成 21 年 8 月にスイスのバーゼルで開催された IWGT の "Strategy for genotoxicity testing" のグループに参加し、F344 *gpt delta* ラットの開発状況を報告した。平成 23 年 3 月にパリで開催された OECD 会議に参加し、トランスジェニックアッセイ遺伝毒性試験ガイドライン案へのコメント提出と討論を行った。ガイドラインの策定にあたり、本共同研究の結果はラットによる試験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。

C-3) 皮膚感作性試験 h-CLAT 法

C-3-1) プレバリデーション

phase A stage II

IVM において、乳酸が 3 回のうち 2 回で陽性となった。また、Bioassay 社においても、乳酸において 1 回は濃度依存性がなく 2 濃度で陽性となった。

IVM 及び Bioassay 社を訪問し、共に実験を行い、操作を確認した。バリデーション実行委員会には、以下のようにトレーニング終了報告書及び修正 SOP を作成し、提出した。

IVM: 使用しているフローサイトメーターの機種の問題と考えられ、設定を変更したところ乳酸は陰性となり、技術移転は終了したと考えた。

Bioassay 社: 不自然な値が認められたが、フローサイトメーター流路の汚れを見逃していたためと考えられ、改善して再評価したところ、乳酸は陰性となり、技術移転は終了したと考えた。

以上の報告書は、2011年4月に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。

C-3-2) プレバリデーション phase B stage I

施設間でCD86及びCD54の発現パターンが異なる物質が存在したが、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。

C-4) バリデーションの手順に関する研究

C-4-1) バリデーションの手順

1) バリデーション実行委員会

試験法の専門家、生物統計家、バリデーションの専門家及び試験法の開発者（リード施設）により構成される第三者組織である。バリデーション開始にあたり、試験の成立基準を含むプロトコル、試験計画の作成、参加施設の決定や被験物質の選定、コード化、その他資材を含む配布を行う。バリデーション終了後には得られた結果が適正に実施された結果であることの検証、結果の解析、報告書の作成などを担当する。参加施設の代表は基本的にこの実行委員会のオブザーバーである。その他、被験物質の選定、コード化、配布などを行う被験物質管理やデータの処理や評価を行う統計解析などはコンサルタントグループに任せる。

2) 参加施設

試験法やGLP (Good Laboratory Practical) 基準を把握している研究者がおり、GLP 対応試験を実施できる複数施設の参加が必要である（最低3施設）。なお、GLP 適合施設での実施が望ましいが、試験をGLP 準拠で行えなくとも、GLP 基準や内容を把握している施設であれば参加できる。試験法の開発者や試験法に精通した施設をリード施設に認定して、参加施設の力量を客観的に評価するためには、技術講習会に試験関与者を必ず出席させ、その後トレーニングとして陽性対照物質等を用いた予備試験（プレバリデーション phase I とする場合もある）を行い、データを確認して参加施設の適合条件をクリアできなければ参加を認めない。

3) 計画

信頼性と適性を評価するためには基準が必要である。OECD のGD34 やICCVAM 基準の中では、以下のように記載されている。

行政的な規制を行うことを目的としたリスク評価のための新しい試験方法、あるいは変法をバリデーションする際は、以下のバリデーション基準を満たさねばならない。これらの基準は方法や目的によりある程度変わりうる。しかし、その目的にあったデータベースを構築しなければいけない。なぜなら、試験法の評価は目的、組織（規制当局）、物質分類によりケースバイケースで異なってくるからである。よって、この基準に関する情報は、試験法バリデーション結果を行政目的のための受入れ審議の際には欠くことができないものである。

- ① 科学的及び規制上の合理性
- ② 指標の生物学的な意義
- ③ 詳細な試験計画
- ④ 再現性（施設内、施設間再現性）に関する情報
- ⑤ 対照物質の存在
- ⑥ 関連性を見極められる情報とデータ
- ⑦ GLP に準拠したデータ
- ⑧ すべてのデータ及び詳細な試験計画が公開され、利用できること

4) 成立基準を含むプロトコル

プロトコルには試験法を実施するすべての必要事項が記載されねばならない。

もっとも実行委員会が注意しなければならないのは、開発者がプロトコルに自信を持ち過ぎ、中々説明し難い技を必要としたり、狭い成立基準を設定する場合である。参加施設の助言に耳を貸さないことである。開発者はすでにデータベースを構築していることから、プロトコルの改良はデータベースの再作製を意味することになり、難しい問題であるが、試験法は誰のためにあるのか、なぜ

バリデーションするののかという原点に帰らねばならない。

5)被験物質の選定

バリデーションに最も重要な問題点は、被験物質の数が十分で、種類がバラエティに富み、バランスが取れていることである。これが不完全であれば、試験法がどのように高い予測性を有していても評価に値しない。適用限界も明確にならないからである。

6)報告書と論文

報告書が先か、論文が先か、その作成順で実行委員長と実行委員会で議論が分かれる。どちらも必要であることは明確であるが、可能であれば、バリデーション報告書をまず作成すべきである。バリデーション報告書は実行委員会の責任で揉まなければならない。バリデーション報告書にはすべての解析結果が網羅されるが、論文では論点のみ掲載される場合が多い。

C-4-2)被験物質の選択

コメントアッセイ及び Bhas アッセイのバリデーションにおける被験物質の選択のための原則をまとめた。選択のフローとしては、最小被験物質数の検討、対象物質範囲の選択、候補物質の収集、科学的絞込み及び実務的絞込みのプロセスをとる。

まず、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適切な最小限の被験物質数を検討した。この数は、研究目的、試験の種類、内容により異なってくる。次に、選択する対象物質範囲を明確とし、その妥当性を確保するために、利用する化学物質データベース（例えば、IARCでの評価物質、GHS分類された物質、NTPでの評価物質、総説文書掲載物質など、複数選択も可能）を選定し、基本的にその中から被験物質を選択する。そして、バリデーション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、当該毒性分野で検討され、その毒性に関する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ならびに種類の候補物質をリストアップする。続いて、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、化学構造、毒性の作用機序・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的あるいは段階的に、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、毒性データ、入手可能性、取扱容易性、価格などが含まれ

る。これらの絞込み作業により、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。

この一連のプロセスにより、当該バリデーションに最適な被験物質の選択が可能と考えられる。

D. 考察

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である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を促進するため、5段階からなるコンセプト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ステップを勧めており、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に相当する段階にあった。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、国際的にコンセンサスの得られた試験法が存在しなかったことから、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った。

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。一方、アンドロゲン作用を評価する AR Ecoscreen 法については、過去に実施されたバリデーションについて実施物質数が少ないと評価され、今後、追加バリデーションが必要となった。これらの試験法はいずれも既存の試験法を代替する方法ではなく、OECD ガイドラインとしては、毒性そのものではなく毒性につながる可能性のある作用を評価するという新たな試験法である。エストロゲン受容体アンタゴニストやアンドロゲン受容体作用についてリファレンスとなる物質が限られており、バリデーションにおける対象物質の選定も課題であった。バリデーションにおいて使

用すべき物質数は、系により一律には決められないと思われるが、今後の試験系開発を加速するためには、何らかの基準が必要であると考えられる。

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、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-1の13施設（海外9施設及び国内4施設）からなる多施設によるバリデーションにより、陽性対照物質を用いた結果から、施設内再現性が良いことを確認でき、4被験物質のみではあるが、施設間の再現性も良いことを確認できた。

バリデーションPhase IV-2において、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、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おり、今後OECDガイドライン化に向け、バリデーション報告書の作成、第三者評価という取り組みを行っていく。

In vitro コメット試験法についても、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した。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と思われた。大きな問題点は、1)適切な細胞毒性指標が無いこと、2)代謝活性化の効果が十分に現れないことである。また、細胞毒性が強い条件下でしか現れないこともコメット試験の問題点である。今後、TK6や浮遊系細胞以外の他の細胞を用いてプロトコルを見直す必要がある。培養細胞を用いた*In vitro* 遺伝毒性試験には小核試験、染色体異常試験、遺伝子突然変異試験があり、それぞれが検出しうる遺伝毒性物質には特徴がある。他の試験にはないコメットアッセイ特有の長所が無い限り、その有用性も無いであろうし、OECDガイドライン化も無駄である。

バリデーションの手順の研究として、国際バリデーションを進めるにあたっての手順やノウハウ

をまとめた。バリデーションを進めるにあたり、踏まえておくべき点が多いが、もっとも重要な点は、バリデーション実行委員のモチベーション維持及び数が十分で、種類がバラエティに富み、バランスが取れている被験物質の選択である。

バリデーションにおける被験物質の選択は、当該研究の成否に大きな影響を与える。バリデーションの目的に沿う特性を有する化学物質を適切な数で選択しなければならない。選択に際し最も重要な事項は、最小被験物質数の導出と候補物質の収集・検証であり、そのためには当該分野の幅広い情報・知識が必要となる。また、限られたリソースの中で必ずしも十分な被験物質選択ができるとは限らないという実務的制約もあり、バリデーション実施の際は、バリデーション実行委員会の大筋の了解を得ておくことはもちろんであるが、事前に国際的協議も行いコンセンサスをとっておくことが望ましい。ここで示した原則は、*in vivo* 遺伝毒性試験及び*in vitro* 発がん性試験のバリデーションのための被験物質選択から導かれたものではあるが、試験の毒性分野や種類、*in vitro/in vivo* 試験を問わず、被験物質選択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。

本研究班の主な成果として、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ことが挙げられる。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

- 1) 小島肇夫：動物実験代替法の現状と展望、*J. Environ Dermatol Cutan Allergol*, 3 (1)、1-6 (2009)
- 2) 小島肇夫：動物実験の3Rsにおける国内外の動向、城西大学生命科学研究センター報告第7号、p37-50 (2009)
- 3) 小島肇夫：動物実験データなしで新規医薬部

- 外品の申請はどこまで可能か?、BIO INDUSTRY,26 (8) 42-49 (2009)
- 4) 小島肇夫：皮膚・粘膜毒性、新版 トキシコロジー、日本トキシコロジー学会教育委員会編集、pp.246-254 (2009)
 - 5) 小島肇夫：医薬部外品と化粧品、GLP/非 GLP 試験の具体的実施ポイント、技術情報、東京、pp.425-433 (2009)
 - 6) 小島肇夫：REACH における環境影響試験、フレグランスジャーナル 2009-8、46-51 (2009)
 - 7) 小島肇夫、新井晶子、北條麻紀：再構築培養表皮モデルを用いた遺伝毒性の評価、コスメトロジー研究報告、17、57-62 (2009)
 - 8) 小島肇夫：現在の動物実験代替法の状況について、LABIO21、38、17-20 (2009)
 - 9) 小島肇夫：薬用化粧品の承認取得における安全性試験をめぐる問題点、医薬部外品有効成分承認取得のための対策と課題、フレグランスジャーナル社、48-58 (2010)
 - 10) 小島肇夫：医薬部外品の製造販売承認申請における安全性試験の資料に関するあり方検討会報告、日皮協ジャーナル、印刷中 (2010)
 - 11) Kojima, H.: Commentary to the Discussion on Topics 3, " *In Vitro* Test Approaches with Better Predictivity" at the 5th International Workshop on Genotoxicity Testing, Genes and Environment,32(2), 40-42 (2010)
 - 12) 小島肇夫：総合評価の方法、有用性化粧品の処方とその活用、鈴木正人監修、シーエムシー出版、東京、pp.147-151 (2010)
 - 13) Kojima, H, Takeyoshi, M, Sozu, T, Awogi, T, Arima, K, Idehara, K, Ikarashi, Y, Kanazawa, Y, Maki, E, Omori, T, Yuasa, A, Yoshimura, I.: Inter-laboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation. *J Appl Toxicol.* 31(1):63-74 (2010)
 - 14) Yamamoto, N, Hirano, K, Kojima, H, Sumitomo, M, Yamashita, H, Ayaki, M, Taniguchi, K, Tanikawa, A, Horiguchi, M.: Cultured human corneal epithelial stem/progenitor cells derived from the corneal limbus. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 46(9):774-80 (2010)
 - 15) Kojima, H.: 3Rs Activities in Japan, AVLR8 Alternative Testing strategies, Progress report 2010, 266 (2010)
 - 16) 小島肇夫：パイロジェン試験、大阪医薬品協会 会報第 745 号 31-63 (2011)
 - 17) 小島肇夫：動物実験代替法の現状と展望、創薬研究のストラテジー、pp.41-48、株式会社金芳堂、京都 (2011)
 - 18) 小島肇夫：動物実験の 3R における国内外の動向、ドージンニュース No.138、1-9 (2011)
 - 19) 柘植英哉、森充生、大庭澄明、大内正、寺田三郎、五島隆志、田邊豊重、山影康次、田中憲穂、渡辺美香、畔上二郎、大向英夫、小島肇：平成 21 年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告、輸液用ゴム栓試験法の見直し(第 3 報)ー細胞毒性試験法の検討ー、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 42 (3) 258-271 (2011)
 - 20) 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)
 - 21) 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)
 - 22) 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)
 - 23) 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)
 - 24) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (1)、COSME TECH JAPAN,1 (6) : 10-13 (2011)
 - 25) Pfuhrer 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)
 - 26) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (2)、COSME TECH JAPAN,1 (7) : 18-22 (2011)
 - 27) 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)
 - 28) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (3)、COSME TECH JAPAN, 2(1) : 73-77(2012)
 - 29) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (4)、COSME TECH JAPAN, 2(2) : 65-69(2012)
 - 30) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (5)、COSME TECH JAPAN, 2(3) : 44-49 (2012)
 - 31) 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, 33-50 (2012)
- 32) Kimura, A., Torigoe, N., Miyata, A., and Honma, M. : Validation of a simple *in vitro* comet assay method using CHL cells. *Genes and Environment*, 32, 63-65 (2010)
- 33) Saitoh Y, Harata Y, Mizuhashi F, Nakajima M, Miwa N.: Biological safety of neutral-pH hydrogen- enriched electrolyzed water upon mutagenicity, genotoxicity and subchronic oral toxicity *Toxicol and Industrial Health* Vol.26(4) . 203-216 (2010)
- 34) 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)
- 35) 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)
- 36) Makoto Ema, Jin Tanaka, Norihiro Kobayashi, Masato Naya, Shige-hisa Endoh, Junko Maru, Masayo Hosoi, Miho Nagai, Madoka Nakajima, Makoto Hayashi, Junko Nakanishi: Genotoxicity evaluation of fullerene C₆₀ nanoparticles in comet assay using lung cells of rats intratracheally instilled, *Regulatory Toxi. And Pharmacology*, Vol.62, 419-424 (2012)
- 37) T. Umemura, M. Tasaki, A. Kijima, T. Okamura, T. Inoue, Y. Ishii, Y. Suzuki, N. Masui, T. Nohmi and A. Nishikawa: Possible participation of oxidative stress in causation of cell proliferation and *in vivo* mutagenicity in kidneys of *gpt* delta rats treated with potassium bromate, *Toxicol.*, 257, 46-52 (2009)
- 38) K. Masumura and T. Nohmi: Spontaneous mutagenesis in rodents: spontaneous gene mutations identified by neutral reporter genes in *gpt* delta transgenic mice and rats, *J. Health Sci.*, 55, 40-49 (2009)
- 39) A. Sheh, C.W. Lee, K. Masumura, B.H. Rickman, T. Nohmi, G.N. Wogan, J.G. Fox, D.B. Schauer: Mutagenic potency of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa of mice is determined by sex and duration of infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 107, 15217-15222 (2010)
- 40) N. Toyoda-Hokaiwado, T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa, T. Nohmi: Integration of *in vivo* genotoxicity and short-term carcinogenicity assays using F344 *gpt* delta transgenic rats: *in vivo* mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene structural isomers, *Toxicol. Sci.*, 114, 71-78 (2010)
- 41) 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)
- 42) 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)
- 43) 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)
- 44) N. Koyama, M. Yasui, A. Kimura, S. Takami, T. Suzuki, K. Masumura, T. Nohmi, S. Masuda, N. Kinai, T. Matsuda, T. Imai, M. Honma: Acrylamide genotoxicity in young versus adult *gpt* delta male rats, *Mutagenesis*, 26, 525-529 (2011)
- 45) 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)
- 46) K. Masumura, Y. Sakamoto, M. Ikeda, Y. Asami, T. Tsukamoto, H. Ikehata, Y. Kuroiwa, T. Umemura, A. Nishikawa, M. Tatematsu, T. Ono, T. Nohmi: Antigenotoxic effects of p53 on spontaneous and UVB-induced deletions in the epidermis of *gpt* delta transgenic mice. *Environ. Mol. Mutagen.*, 52, 244-252 (2011)
- 47) 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)

- 48) 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.
- 49) Takeshi Morita, Makoto Hayashi, Madoka Nakajima, Noriho Tanaka, David J. Tweats, Kaoru Morikawa and Toshio Sofuni: Practical Issues on the Application of the GHS Classification Criteria for Germ Cell Mutagens, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 55, 52-68, 2009.
- 50) Tetsuo Sato and Takeshi Morita: Chapter 95, Japan, In *Information Resources in Toxicology*, 4th Edition (Ed. Philip Wexler), pp.991-1011, Academic Press (Elsevier), ISBN 978-0-12-373593-5, pp. 991-1011, 2009.
- 51) 森田 健 : GHS 分類のための健康有害性評価基準、毒性情報の種類とデータの質の評価、*化学経済*、2009年5月号、62-67.
- 52) 森田 健 : GHS 分類のための健康有害性評価基準、毒性データ評価の要点、Part 1、*化学経済*、2009年6月号、69-75.
- 53) 森田 健 : GHS 分類のための健康有害性評価基準、毒性データ評価の要点、Part 2、*化学経済*、2009年7月号、88-93.
- 54) Takeshi Morita, James T. MacGregor and Makoto Hayashi, Micronucleus assays in rodent tissues other than bone marrow, *Mutagenesis*, 26, 223-230, 2011.
- 55) 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.
- 56) Takeshi Morita and Kaoru Morikawa: Expert Review for GHS Classification of Chemicals on Health Effects, *Industrial Health*, 49, 559-565, 2011.
- 57) Takeshi Morita, Masamitsu Honma, Kaoru Morikawa: Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, *Mutation Research*, 741, 32-56, 2012.
- 58) 城内 博、宮川宗之、森田 健 : 英和对訳 最新 OECD 毒性試験ガイドライン、化学工業日報社、東京 (2010)
- 59) 城内 博、宮川宗之、森田 健 : 英和对訳 最新 OECD 毒性試験ガイドライン、追録版、化学工業日報社、東京 (2011)
- 60) Hasegawa R, Hirata-Koizumi M, Dourson ML, Parker A, Sweeney LM, Nishikawa A, Yoshida M, Ono A, Hirose A.: Proposal of new uncertainty factor application to derive tolerable daily intake. *Regul Toxicol Pharmacol.* 58(2):237-42.(2010)
- 61) Kosaka N., Inaba H., Okamoto K., Mizuno M., Sono S., Kato Y., Kishi M., Ashikaga T., Okamoto Y., Kuwahara H., Nakamura T., Sakaguchi H., and Ohno, Y. 11. Results of the Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (5th Report): A study for evaluating preservative skin sensitization potential using h-CLAT, *AATEX*, 15, 71-80, 2010
- 62) Okamoto K., Kato Y., Kosaka N., Mizuno M., Inaba H., Sono S., Ashikaga T., Nakamura T., Okamoto Y., Sakaguchi H., Kishi M., Kuwahara H., and Ohno, Y., Results of a Japanese ring study of human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization (6th Report): A Study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT, *AATEX*, 15, 81-88, 2010
- 63) Sono S., Mizuno M., Kosaka N., Okamoto K., Kato Y., Inaba H., Nakamura T., Kishi M., Kuwahara H., Sakaguchi H., Okamoto Y., Ashikaga T. and Ohno, Y., Results of a Japanese ring study of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th Report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials, *AATEX*, 15, 89-96, 2010
- 64) Nukada Y, Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Mugita N, Hirota M, Miyazawa M, Ito Y, Sasa H, Nishiyama N., Predictive performance for human skin sensitizing potential of the human cell line activation test (h-CLAT) Contact Dermatitis. 65: 343-53, 2011
- 65) 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.
- 66) 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.
- 67) 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.

学会発表

- 1) 小島 肇 : バリデーション研究とは何か? & 国際動向、JaCVAM第2回ワークショップ、東京