

601 considered negative in this validation study. As well as this validation study
602 result, it is reported that 2-AAF failed to increase DNA migration in the rat liver
603 when administered orally (10). Interestingly, in the same report, it is mentioned
604 that clearly increased DNA migration was noted in the liver when 2-AAF was
605 administered by i.p. injection, indicating that the route of administration affects
606 the genotoxic potential in the liver (10). However, considering the overall
607 genotoxic MoA of 2-AAF, it is unclear why 2-AAF failed to increase DNA
608 migration in the liver under the conditions of this validation study and also in the
609 previous report. When considering that the dose level usually used in UDS assay
610 is 50 mg/kg or below based on the reference article in OECD-TG486 (11), the
611 lower dose levels could be considered to understand the negative results in this
612 validation study.

613

614 2) *o*-Anisidine (CASRN: 90-04-0)

615 This chemical is known to be oxidatively activated by peroxidase and
616 cytochrome P-450 (CYP), and DNA adducts are identified as deoxyguanosine
617 adducts formed from a metabolite, *N*-(2-methoxyphenyl)hydroxylamine. Rats
618 were treated i.p. with *o*-anisidine (0.15 mg/kg daily for 5 days) and DNA from
619 several organs was analyzed by ³²P-postlabeling. Two *o*-anisidine-DNA adducts
620 were detected in urinary bladder (4.1 adducts per 10⁷ nucleotides), the target
621 organ of carcinogenicity, and, to a lesser extent, in the liver, kidney and spleen
622 (12). In *in vivo* genotoxicity assays, this chemical is reported to be positive in
623 the kidney, bladder, lung, stomach and colon in rat Comet assay, and in the
624 bladder in gene mutation assay with BigBlue mice (see Appendix 3). In contrast,
625 negative results are reported in the liver in the BigBlue mouse gene mutation test
626 and the rat liver UDS test, and also in the mouse bone marrow MN test (see
627 Appendix 3). The carcinogenicity was evaluated with *o*-anisidine hydrochloride
628 by administering in feed to Fischer 344 rats at 5000 or 10000 ppm and B6C3F1
629 mice at 2500 or 5000 ppm, for 103 weeks then observed for 1 or 2 additional
630 weeks. It is concluded that *o*-anisidine hydrochloride was carcinogenic for rats
631 and mice, inducing transitional-cell carcinomas or papillomas of the bladder in
632 both rats and mice and in both sexes of each species, transitional-cell carcinomas
633 of the pelvis of the kidney in male rats, and follicular-cell tumors of the thyroid
634 in male rats (13).

635 Based on the above reports, the primary target organ in carcinogenicity studies
636 using *o*-anisidine hydrochloride is considered to be the urinary bladder. The

637 target-organ specific effects of genotoxicity would be supported by a series of
638 data that the DNA adducts are formed mainly in the bladder and lesser in the
639 liver, kidney, and spleen, and the positive results are obtained in the urinary
640 bladder in the gene mutation assay using TG mice and in the rat Comet assay
641 (also positive in the kidney), and, in contrast, the negative results in the rat liver
642 UDS assay, the mouse bone marrow MN assay, and the liver gene mutation
643 assay using TG mice. Positive results in the lung, colon and stomach, non-target
644 organ in carcinogenicity studies, are also reported in the rat Comet assay, but the
645 increases in tail migration were noted in a limited testing condition, i.e.,
646 increased only at 8 hr after the single oral administration of 1000 mg/kg but not
647 at 3 and 24 hrs, and not examined the dose-dependency, indicating that the
648 positive findings in non-target organs might be considered questionable.
649 Therefore, when considering the higher target organ specificity of this chemical,
650 the negative judgment in this validation study may be considered rational.
651 Reversely, the negative result might indicate a limitation of our standard
652 protocol using the liver and the stomach that, when carcinogenicity is noted in
653 organs other than the liver or the gastrointestinal, at least in the urinary bladder,
654 the target organ(s) should be examined with Comet assay if necessary to
655 investigate genotoxic MoA in the carcinogenic target organ(s).

656

657 3) Benzene (CASRN: 71-43-2)

658 Two-year carcinogenesis studies of benzene were conducted in F344/N rats and
659 B6C3F1 mice. Doses of 0, 50, 100, or 200 mg/kg body weight benzene in corn
660 oil (5 ml/kg) were administered by gavage to male rats, 5 days per week, for 103
661 weeks. Doses of 0, 25, 50, or 100 mg/kg benzene in corn oil were administered
662 by gavage to female rats and to male and female mice for 103 weeks. There was
663 clear evidence of carcinogenicity of benzene for both sexes in rats and mice. For
664 male and female rats, benzene caused increased incidences of Zymbal gland
665 carcinomas and squamous cell papillomas and squamous cell carcinomas of the
666 oral cavity. In male rats, benzene also caused increased incidences of squamous
667 cell papillomas and squamous cell carcinomas of the skin. For male and female
668 mice, benzene caused increased incidences of malignant lymphomas, Zymbal
669 gland squamous cell carcinomas, alveolar/bronchiolar carcinomas and
670 alveolar/bronchiolar adenomas or carcinomas (combined). In male mice,
671 harderian gland adenomas, and squamous cell carcinomas of the preputial gland
672 were also increased. For female mice, benzene also caused increased incidences

673 of ovarian granulosa cell tumors, ovarian benign mixed tumors, and carcinomas
674 and carcinosarcomas of the mammary gland. Dose-related lymphocytopenia was
675 observed for male and female F344/N rats and male and female B6C3F1 mice
676 (14).

677 It is generally agreed that the toxicity of inhaled benzene results from its
678 biotransformation to reactive species. Benzene is metabolized in the liver by
679 cytochrome P-4502E1 (CYP2E1) to its major metabolites: phenol, hydroquinone,
680 and catechol. The intermediate benzene oxide can also undergo ring opening to
681 trans-trans muconic acid. Although there is a scientific consensus that
682 metabolism of benzene is required for resultant toxicity and carcinogenic
683 response, the role of a metabolite or metabolites of benzene in producing these
684 adverse effects is controversial and more research data are needed to better
685 define sequelae of pathogenesis following exposure to benzene and its
686 metabolites. Current evidence indicates that benzene-induced myelotoxicity and
687 genotoxicity result from a synergistic combination of phenol with hydroquinone,
688 muconaldehyde, or catechol (15).

689 The bone marrow, Zymbal gland, and Harderian gland all contain peroxidases,
690 which can activate phenols to toxic quinones and free radicals. Sulfatases, which
691 remove conjugated sulfate and thus reform free phenols, are also present at high
692 levels in these target organs. The selective distribution of these two types of
693 enzymes in the body may explain the accumulation of free phenol,
694 hydroquinone, and catechol in the bone marrow and the resulting differences in
695 target organ toxicity of benzene metabolites in humans and animals (15).

696 Molecular targets are considered mainly tubulin, topoisomerase II and histones,
697 and less DNA (oxidation and adduct formation). In genotoxicity studies,
698 benzene exposure has been shown to induce aneuploidy in dividing cells,
699 presumably through inhibition of tubulin assembly during mitosis. However,
700 benzene exposure has failed consistently to induce point mutation in
701 genotoxicity studies (15).

702 In *in vivo* genotoxicity assays, oral administration of benzene showed positive
703 results in the rat bone marrow MN test, and the rat and mouse Comet assay in
704 many organs including the liver and stomach. In contrast, inhalation of benzene
705 failed to increase mutation frequency in the liver using BigBlue mouse gene
706 mutation assay (see Appendix 3).

707 In this validation study, benzene is judged to be negative in the liver and
708 stomach, and it is inconsistent with the previous report of Comet assay (5).

709 However, considering the known genotoxic and carcinogenic MoA, the negative
710 result might be more likely and rational.

711

712 4) Busulfan (CASRN: 55-98-1)

713 It is reported that this chemical is a direct-acting bi-functional alkylating agent
714 that binds to cellular macromolecules including DNA, RNA, and proteins.
715 Mono-adduct formation, intrastrand cross-links, and DNA-protein cross-links
716 are reported. In rats, i.v. administration of busulfan for one year was reported to
717 induce a variety of tumors in male rats, although the experiments could not be
718 evaluated in IARC due to incomplete reporting. In mice, the i.p. administration
719 induced lymphomas in two studies, but did not increase the incidence of tumors
720 in two other studies. The i.v. administration to mice increased the incidences of
721 thymic and ovarian tumors (16).

722 The above report indicates that the major genotoxic MoA of busulfan is
723 cross-link formation (16). When considering that simple mono-functional
724 alkylating agents such as EMS or MMS clearly increased % tail DNA in this
725 validation study, the “Negative” result of busulfan indicates that this chemical
726 would give DNA damage through cross-linking formation rather than
727 mono-adduct formation *in vivo*. It is reported that cross-linking agents
728 mitomycin C and cisplatin decreased % tail DNA compared with the negative
729 control (17, 18), and thus we expected that cross-linking agents might
730 decrease % tail DNA in this validation study. However, cross-linking agents,
731 busulfan and cisplatin used in this validation study failed to decrease % tail
732 DNA, indicating that cross-linking agents could not be detected in *in vivo* Comet
733 assay, at least under the conditions of this validation study. Longer
734 electrophoresis duration might be needed to detect the decreased % tail DNA,
735 because the decrease was reported in the longer duration with kidney cells (18).

736 Anyway, this chemical was optionally examined with the micronucleus assay
737 using peripheral blood in Lab C, and they reported that increased micronuclei
738 were observed in all dose groups (Appendix 4). This finding would be rational
739 when considering the genotoxic MoA of busulfan.

740

741 5) Hydroquinone (123-31-9)

742 The 2-year carcinogenicity study was conducted by administering 0, 25 or 50
743 mg/kg in deionized water by gavage to F344/N rats, 5 days/wk. Nearly all male
744 rats and most female rats in all vehicle control and exposed groups had

745 nephropathy, which was judged to be more severe in high-dose male rats.
746 Hyperplasia of the renal pelvic transitional epithelium and renal cortical cysts
747 were increased in male rats. Tubular cell hyperplasia of the kidney was seen in
748 two high-dose male rats, and renal tubular adenomas were seen in low- and
749 high-dose male rats. Mononuclear cell leukaemia in female rats occurred with
750 increased incidences in the dosed groups. B6C3F1 mice were given 0, 50 or 100
751 mg/kg on the same schedule as rats. Compound-related lesions observed in the
752 liver of high-dose male mice included anisokaryosis, syncytial alteration and
753 basophilic foci. The incidences of hepatocellular neoplasms, primarily adenomas,
754 were increased in dosed female mice. Follicular cell hyperplasia of the thyroid
755 gland was increased in dosed mice (19).

756 All renal tubule adenomas and all cases of renal tubule atypical hyperplasia
757 occurred in areas of severe or end-stage chronic progressive nephropathy and the
758 neoplasms were not otherwise confined to any particular part of the kidney. It is
759 likely that the mode of carcinogenic action of hydroquinone is exacerbation of
760 this natural disease process.

761 Hydroquinone is a metabolite of benzene. It is mutagenic *in vitro* and *in vivo*,
762 having caused genotoxicity or chromosomal aberrations in rodent bone-marrow
763 cells, although the Ames test showed a negative result. At least a portion, if not
764 all, of the chromosomal effects are caused by interference by hydroquinone or
765 its metabolites with chromosomal segregation, probably due to interaction with
766 mitotic spindle proteins (20). Although the dose routes used to demonstrate these
767 effects in almost all of the studies *in vivo* were not p.o., but i.p. or s.c. injection,
768 the major genotoxic MoA is considered to be interaction with mitotic spindle
769 proteins (aneugenic effects). There were five genotoxicity studies by the oral
770 route. These included a mouse bone-marrow cell MN test in which a weak,
771 marginally positive response was obtained following a single oral dose of 80
772 mg/kg body weight. The remaining oral route studies showed no significant
773 effect. They included a mouse bone-marrow cell MN test in which there was no
774 genotoxic activity after exposure to a diet containing 0.8% hydroquinone for 6
775 days; two ³²P-post-labeling assays, one with targets of Zymbal gland, liver, and
776 spleen in SD rats, and the other with the kidney as target in F344 rats; and the
777 last oral assay was for 8-hydroxydeoxyguanosine adducts in F344 rat kidney
778 DNA. Thus, the evidence (and the database) for any genotoxic effect *in vivo* is
779 sparse and none has been observed in kidney (20).

780 While glutathione conjugates could be responsible for the tumor induction,

781 careful histology seems to show that the most actively toxic of several
782 glutathione compounds tested, 2,3,5-triglutathion-S-yl hydroquinone, targets a
783 very specific region of the kidney, the outer stripe of the outer medulla, whereas
784 hydroquinone-associated adenomas are more randomly distributed and occur in
785 the cortex as well as the medulla. A non-genotoxic MoA that involves
786 exacerbation of a spontaneously occurring rodent renal disease, chronic
787 progressive nephropathy (CPN), is proposed and evaluated. This disease is
788 particularly prominent in male rats and the evidence is consistent with an
789 absence of any human counterpart. Therefore, the increased incidence of renal
790 tubule adenomas in hydroquinone-dosed male rats is without human
791 consequence (20).

792 When considering the above genotoxic and carcinogenic MoA, the negative
793 result in this validation study would be rational.

794

795 6) 4,4'-Oxydianiline (CASRN: 101-80-4)

796 A bioassay of this chemical for possible carcinogenicity was conducted by
797 feeding diets containing 200, 400, or 500 ppm of the test chemical to F344 rats
798 and 150, 300, or 800 ppm to B6C3F1 mice for 104 weeks. 4,4'-Oxydianiline was
799 carcinogenic for male and female F344 rats, inducing hepatocellular carcinomas
800 or neoplastic nodules and follicular-cell adenomas or carcinomas of the thyroid.
801 4,4'-Oxydianiline was also carcinogenic for male and female B6C3F1 mice,
802 including adenomas in the harderian glands, hepatocellular adenomas or
803 carcinomas in both sexes, and follicular-cell adenomas in the thyroid of females
804 (21).

805 This chemical is considered a mutagen due to the positive results in Ames and *in*
806 *vitro* chromosome aberration tests. Positive results in mice are also reported in
807 the micronucleus test (i.p. injection) and the Comet assay (p.o.). However, a
808 negative result is reported in the rat liver UDS test (p.o.). On the other hand,
809 goitrogenic (anti-thyroid agent) effects of this chemical were also reported for
810 rats and mice in the 90-day toxicity studies (21). The authors indicate that rats or
811 mice receiving anti-thyroid compounds may develop tumors of thyroid gland.
812 They also point out that the goitrogenic and carcinogenic effects of this chemical
813 may be related to the structural similarity between the compound and thyroxin,
814 and nuclear binding sites for thyroxin have been demonstrated in the rat liver
815 and pituitary. In addition, 4,4'-oxydianiline was tested in a neonatal rat liver
816 focus model, and showed clear evidence of hepatocarcinogenicity (22). While

817 the chemical did not show initiating activity in neonatal models, promoting
818 activity, as indicated by increased number, size, or volume fraction of
819 histochemically detected hepatic foci of cellular alteration, was evident for the
820 chemical with previously demonstrated hepatocarcinogenicity.

821 In this validation study, the negative results in both liver and stomach were
822 obtained. Since this chemical clearly has genotoxic potential, the negative
823 results in UDS and Comet assays by using rats, and initiation assay of neonatal
824 rat model indicate that rats would be less sensitive for detecting genotoxicity of
825 this chemical compared with mice. On the other hand, the previous reports on
826 carcinogenicity indicate that the carcinogenic MoA of this chemical might be
827 related to the goitrogenic effect for the thyroid and the tumor promoting effect
828 for the liver. Therefore, it is also speculated that contribution of mutagenicity of
829 this chemical might be minimal to the carcinogenicity in rats. Further
830 investigation of genotoxicity using rats would be needed to clarify the rat
831 carcinogenic MoA, e.g., transgenic rat gene mutation assay or rat liver
832 micronucleus assay.

833

834 As a summary of above discussion, the five chemicals except for 2-AAF may be
835 justified in showing negative results because of the following reasons: *o*-anisidine
836 due to the higher target-organ specificity for urinary bladder; benzene and
837 hydroquinone due to the aneugenic effects; busulfan due to the cross-linking effects;
838 and 4,4'-oxydianiline due to the possibility of goitrogenic effects on rat
839 carcinogenicity. In other words, those negative results may indicate some limitations
840 of *in vivo* rat Comet assay using the liver and the stomach that the assay cannot
841 detect aneugens and cross-linkers, and target organs of carcinogenicity should be
842 analyzed to investigate whether or not genotoxic MoA is included in carcinogenic
843 MoA. In addition, a combination Comet and MN assay would be practically
844 recommended for screening purpose of the *in vivo* genotoxic potential of test
845 chemicals, because the five chemicals except for *o*-anisidine are reported to be
846 detected with the rodent MN assays.

847

848 The within- and/or between-laboratory variability of assay results was already
849 examined in the 1st to 3rd phase validation studies conducted in four or five
850 lead-laboratories, and variability found in the early phase disappeared by the
851 refinement of study protocol. By using the version 14 study protocol, no clear
852 between-laboratory variability was noted, which was robustly confirmed in the 1st

853 step of 4th phase validation study conducted in 13 laboratories. The
854 within/between-laboratory variability was also evaluated in this study with the data
855 of negative and positive control groups. No clear within-laboratory variability was
856 observed, indicating that the experiments would be well controlled in each testing
857 facility. Although slight between-laboratory variability was noted, the variation was
858 within the range of data-acceptance criteria except for one negative control value of
859 the liver in one laboratory. Those results indicate that consistent Comet assay results
860 could be obtained within and/or between laboratories as far as the experiments are
861 conducted with the version 14 (actually 14.2) study protocol.

862
863 Regarding cytotoxicity evaluation, histopathology was used in this validation study
864 based on the previous consensus of IWGT meeting (3). Histopathology criteria for
865 interpretation of positive findings in Comet assay were originally proposed by VMT
866 based on histopathological findings in the negative test chemicals of Comet assay
867 and independent interpretation of each test facility. Then the interpretation method
868 was discussed and concluded by all participants in Kyoto meeting under the
869 blind-condition of test chemicals (Appendix 6). As a result, increased % tail DNA in
870 the liver observed in thioacetamide and chloroform were interpreted to be related to
871 severe cytotoxicity. Both chemicals are well-known hepatotoxicants, and the liver
872 carcinogenic MoA of chloroform is reported to be cytotoxicity followed by
873 regenerative hepatocyte proliferation (23). Thus the interpretation of positive
874 findings in Comet assay using histopathology would be justified at least for
875 chloroform. In contrast, it is recommended that positive findings in Comet assay
876 should be interpreted to be relevant to *in vivo* genotoxicity even if weakly cytotoxic
877 changes such as single cell death/necrosis are observed in histopathology, because
878 many genotoxic carcinogens showing significant increases in % tail DNA in this
879 validation study induced such slight cytotoxicity in histopathology.

880
881 In contrast to histopathology, clear increases in % hedgehog were found in only
882 three genotoxic carcinogens, 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride, methyl
883 methanesulfonate, and *N*-nitrosodimethylamine. There were no relationships
884 between positive judgment in Comet assay or histopathological findings and
885 increased % hedgehog, indicating that % hedgehog would not be a good indicator
886 for cytotoxicity evaluation. Presumably, increased % hedgehog might be an
887 indicator to detect severe genotoxicity, because increased % hedgehog was only
888 observed in the treatment of three genotoxic carcinogens showing higher increases

889 in % tail DNA in this validation study, and also in the treatment of
890 *N*-methyl-*N*-nitrosourea which also showed very high increases in % tail DNA in the
891 4th phase-1st step validation study as well as this validation study. <Neutral
892 diffusion assay may be discussed if some data are available in the lab's study
893 reports.>

894

895 Another discussion point would be the significance of decreased % tail DNA in the
896 stomach, which were observed in the treatment with acrylonitrile (genotoxic
897 carcinogen), 4,4'-oxydianiline (genotoxic carcinogen), 8-hydroxyquinoline
898 (genotoxic non-carcinogen), ethionamide (non-genotoxic non-carcinogen), and
899 sodium chloride (non-genotoxic non-carcinogen). Since those chemicals are not
900 cross-linking agents as far as we know, and typical cross-linking agents, busulfan
901 and cisplatin failed to decrease % tail DNA in this validation study, decreased %
902 tail DNA found in this validation study would not indicate cross-linking genotoxic
903 MoA. A possible explanation to interpret the significance may be that cytotoxic
904 effects of above chemicals decreased % tail DNA in the stomach. For example,
905 acrylonitrile induced cytotoxicity for the stomach in histopathology, and sodium
906 chloride was selected for this validation study because of a well-known cytotoxic
907 agent for the stomach. Regarding a possible mechanism of decreased % tail DNA, it
908 was pointed out that, when cytotoxicity was observed in the stomach, the epithelial
909 cells would be eliminated and then cells mainly recovered from the stomach for
910 Comet analysis would be the basal cells which show lower values of % DNA in tail
911 (Sachiko Kitamoto, personal communication at Kyoto meeting). Since
912 histopathology was not always examined for the stomach in this validation study
913 because it was done in the case of increased % tail DNA, further investigation of
914 histopathology for the stomach would be needed to clarify the relationship between
915 decreased % tail DNA in the stomach and the histopathological changes.

916

917 Based on the discussion mentioned in the above three paragraphs, VMT has noticed
918 that there may be two different aspects about the relationship between changes of %
919 tail DNA and cytotoxicity, i.e., serious cytotoxicity would increase % tail DNA in
920 the liver but might decrease it in the stomach. Another consideration about those
921 phenomena may be that cytotoxicity might not affect at least increase in % tail
922 DNA, because cells damaged by serious cytotoxicity would be theoretically
923 non-scorable cells in the image analysis of alkaline-conditioned Comet assay.
924 Therefore, it may be suggested that more careful interpretation about increased or

925 decreased % tail DNA would be needed when severe cytotoxic changes are observed
926 in histopathology. To help the careful interpretation, it may be useful to examine test
927 chemicals having such toxicological properties by using other methods of
928 genotoxicity analysis, e.g., DNA-adduct formation, gene mutation assay with
929 transgenic animal models.

930

931 It should be also discussed how to use historical control data, especially for
932 considering the biological significance when increased % DNA in tail is noted in the
933 treatment with a test chemical. This topic has already discussed in IWGT meeting
934 (24), and it is suggested that the distribution of historical control data should be set
935 with negative control data from at least 10 (preferably 20) independent experiments
936 conducted with a same study protocol and testing conditions (after technical
937 maturation). Although the distribution of historical control data was not considered
938 to evaluate results of this validation study, it would be practically possible to use the
939 distribution in each testing facility that is established based on the IWGT consensus,
940 for the interpretation of biological significance of increased % DNA in tail.

941

942 We selected only the liver and the stomach in this validation study due to the use of
943 screening purpose, but it would be needed to discuss the possibility about
944 application of the methodology to other organs. A key-methodology, cell preparation
945 method used for the liver and the stomach would be basically applicable to other
946 organs as they are, because organs are largely classified as parenchymatous organs
947 represented by the liver and hollow organs represented by the stomach. Since the
948 methods other than cell preparation in the study protocol are, of course, applied to
949 other organs as they are, our Comet assay protocol would be applicable to all organs.
950 In case of the application to other organs, it is necessary to collect sufficient
951 historical control data in each testing facility with vehicle controls and a positive
952 control such as EMS (see the above paragraph about how to establish historical
953 control data).

954

955 Finally, VMT would like to suggest how the *in vivo* rodent alkaline Comet assay
956 should be conducted to obtain a toxicologically significant result, because many
957 researchers, at least in Japan, feel that Comet assay often gives false-positive results
958 for genotoxicity evaluation. VMT has noticed through the progress of this validation
959 effort that lower % tail DNA in the negative control group would sometimes
960 produce questionable (probably toxicologically insignificant) increases in % tail

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-Mboui 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した。ヒトリンパ芽球細胞 TK6 細胞を用い、代謝活性化の存在下、もしくは非存在下で披験物質を 4 時間処理によるコメット試験プロトコルを確立し、そのバリデーションを行った。国際共同バリデーションは 2 回に渡って実行された。Phase I では 4 つの研究機関で 6 種類の遺伝毒性、もしくは非遺伝毒性化学物質を評価した。遺伝毒性物質は MMC 以外、用量依存的な陽性反応が観察され、非遺伝毒性物質は明らかな陰性であったことからコメット試験は適切に遺伝毒性物質を検出しようと評価された。Phase II では細胞毒性と、S9 の問題を明らかにするため、代謝活性化の系を含む試験系で、MMS と 2AA について国内外の 5 つの研究機関で試験が実施された。コメット試験の結果は試験機関間で極めて再現性の高かったが、細胞毒性の評価はばらつきが大きく、最高用量に 1000 倍もの違いが試験機関間で生じた。S9 による代謝活性化の効果は認められたが、低く、また、それに伴うコメットの増加は顕著でなかった。*In vitro* コメット試験法の標準化には適切な細胞毒性評価と、効率的代謝活性化は必要であると判断された。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、6 種類の遺伝毒性もしくは非遺伝毒性物質の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。コメット試験は小核試験結果と比較すると、感度は低く、コメット試験陽性は、高用量でのみでしか観察されなかった。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。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。

キーワード;バリデーション研究、遺伝毒性、細胞毒性、コメット試験、小核試験

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難しい。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すると同時に、コメット試験結果の評価、解釈を考察し、その有用性を評価した。

B. 研究方法

B-1) 試験計画

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マネジメントチーム、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テーションチームからなる。これまで 1 回のプレバリデーション試験

が行われた。プレバリデーション試験は 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 化合物が試験された。化合物名を開示し、VMT が指定した用量でコメット試験を実施し、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 試験が 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 化合物が試験された。化合物名は開示せず、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 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を行った。Phase II 試験は 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 化合物が試験された。2011 年 4 月からはコメット試験結果の評価、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研究所・変異遺伝部で行った。

B-2) 試験機関

2.1) 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)

2.2) 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)

2.3) Confirmation

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部

B-3) 被験物質

3.1) Phase I

- i) 9-Aminoacridine (9AA)
- ii) Camptothecin (CAM)
- iii) Cyclophosphamide (CYC)
- iv) D(-)-Mannitol (MAN)
- v) Etoposide (ETO)
- vi) N-Nitrosodimethylamine (DMN)

3.2) Phase II

- i) Methylmethanesulfonate (MMS)
- ii) 2-Aminoanthracene (2AA)

3.3) Confirmation

- i) Ethylmethanesulfonate (EMS)
- ii) Methylmethanesulfonate (MMS)
- iii) Hydrogenperoxide
- iv) γ -ray

v) MitomycinC (MMC)

vi) TritonX (Tri-X)

B-4) 試験方法

4.1) 細胞

ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 を用いた。本細胞は近 2 倍体細胞であり、増殖能が高い。また、浮遊細胞であるため培養が容易である。TK6 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。細胞のロットの統一を図るため TK6 細胞は各試験機関が指定されたロットのものを ATCC から直接購入した。

4.2) 細胞培養液

10.4 g の RPMI 1640 培地(In vitrogen Corporation, Cat. #31800-022) を Milli-Q 水に溶解させ、2 g の炭酸水素ナトリウム (NaHCO₃, 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 μ m 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 vitrogen Corporation, Cat. # 15140-122) 及び 200 ug/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。

4.3) 細胞培養条件

培養器は培養フラスコを用い、5%CO₂ 存在下、温度 37C、加湿条件の CO₂ インキュベータ内で培養した。

4.4) 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) 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。

4.5) 代謝活性化系

S9mix の調整法は VMT が作成したプロトコールに従った。0.375mL の S9mix と、0.05mL の試験検体を培養液に加え、5mL として処理を行った。このときの s) 濃度は 1.5%である。代謝活性化を行わない場合は S9mix の代わりに 150mM 塩化カリウムを用いた。

4.6) 実験操作

4.6.1) 前培養

- i) 37C 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。
- ii) 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。
- iii) 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。
iv) 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。

4.6.2) 被験物質の処理及び除去

- i) 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。
- ii) 15 mL のチューブを用い、37°C の恒温槽内にある Universal Shaker (SHK-U3, 35 rpm, IWAKI) を用いて攪拌しながら 4 時間処理した。処理は細胞懸濁液 4.575 mL、に被験物質調製液あるいは媒体 0.05 mL と、150 mM 塩化カリウム(非代謝活性化) もしくは S9mix (代謝活性化) を 0.375 mL 加えて処理を開始した。
- iii) 4 時間処理後、細胞懸濁液の一部を分取し、各処理における細胞数を計測した。
- iv) コメットアッセイ用に、1 mL の細胞懸濁液を別のチューブに分取した。
- v) 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。
- vi) 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。
- vii) 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。
- viii) 細胞懸濁液の一部を分取し、各処理における細胞数を計測し、細胞懸濁液 A とした。
- ix) 残りの細胞は新鮮な培地に移し、48 時間培養し、小核試験用サンプルとした。

4.6.3) 細胞毒性試験

細胞毒性試験は 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試験、3) 核のない細胞 (NCDN、ヘッジホッグ) の割合をコメットと観察時に計測した。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。

4.7) コメット試験

4 時間試験検体処理後の細胞をコメット試験用サンプルとした。コメット試験の詳細については in vivo コメット国際バリデーション研究の方法に準じた。試験条件を表 1 に記載する。

Agarose gel and sample Preparation	Bottom gel	1.0-1.5% low gelling temperature agarose in PBS (if used)
	Sample gel (A)	0.5% low gelling temperature agarose in PBS
	Solution of suspended cells (B)	Cells in HBSS with 20 mM EDTA and 10% DMSO*
	Mixture/Final conc. of agarose	(A):(B) = 9:1/0.45%
Lysis and electrophoration	Lysis solution	2.5M NaCl, 100mM Na2EDTA, 10mM Tris-base, 10% DMSO, 1% Triton-X (pH 10*)
	Lysis condition	Overnight, 4C
	Rinse solution/Condition	Distilled water/ Dipping
	Electrophoresis solution	0.3M NaOH, 1mM EDTA (pH >13), <10C
Staining	Electrophoresis condition	Unwinding 20min + Electrophoresis 0.7-1 V/cm (300mA, <10C
	Neutralization/Dehydration	0.4M Tris- base (pH 7.5) at least 5 min/absolute ethanol at least 5 min
Scoring	Staining dye/ Time	SYBR Gold/ 10 min
	Comet analysis	Comet IV, Tail length, Tail moment, % tail DNA

* DMSO and/or Triton X should be added just before use.

表 1

4.8) コメット標本の観察法

スライド標本の解析は、蛍光装置付き生物顕微鏡を用いて、最終倍率 200 倍、デジタルカメラ付き画像解析システムで行った。Duplicate で行った試験の 1 つからそれぞれ 50 個の細胞を解析 (合計 100 個) した。Small or non-existent head and large, diffuse tails はデータとしない。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 %intensity [= % tail DNA]
- Tail length [= center of head to tail]
- Tail moment [= Olive tail moment]

このうち % tail DNA を統計解析の評価対象とした。

4.9) コメット統計学的手法

鈴木らが開発した方法に準じた。有効データが 3 つ以上の試験について統計解析を行った。1/標準偏差値を用い、重み付け回帰解析を行った。5% 以下の信頼度で回帰解析を行い、試験結果を判定した。詳しくは中嶋の分担報告書に記載する。

4.10) In vitro 小核試験

4.10.1) 標本の作製

- i) 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。
- ii) 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。
- iii) 倒立懸濁後、10 分間室温に放置し低張処理した。
- iv) 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)。
- v) 再度遠心分離し、上清を除去した。
- vi) 4 mL の固定液を加え 5 分間静置後、遠心分離した。
- vii) 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。
- viii) 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。
- ix) 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グラスに 1 滴落とし、空気乾燥させた。

4. 10. 2) 標本の観察法

スライド標本に 40 ug/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 ug/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 ug/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。

(倫理面への配慮)

本研究ではいかなるヒト生物材料を使用しておらず、また実験動物も使用していないため倫理上問題は無い。また、全ての実験は本研究所倫理規定に準拠して行った。

C. 研究結果

C-1) Phase I

Phase I は 4 つの試験機関で 6 つの化合物を代謝活性化存在下、および非存在下で試験を行った。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)

代謝活性化を不要とする遺伝毒性陽性化合物である。核酸に強い親和性を持つ。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)

トポイソメラーゼ I の阻害剤であり、1 本差 DNA 切断を引き起こす。代謝活性化の必要は無い。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)

強い遺伝毒性物質であり、代謝活性化を必要とする。代謝活性化非存在下ではほとんど遺伝毒性を示さない。-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)

非遺伝毒性物質である。In vivo バリデーション試験で陰性対照として用いられている。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)

トポイソメラーゼ II の阻害剤であり、2 本差 DNA 切断を引き起こす。代謝活性化の必要は無い。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)

代謝活性化によりメチルカルボカチオンを発生し、DNA をアルキル化する強力な遺伝毒性物質である。+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コメットの各試験機関での範囲は -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设置しやすいことを示している。また、+S9 での低下傾向が見られたことは S9 に DNA を修復する能力があることを示唆しているのかも知れない。

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) Phase II

Phase II は 5 つの試験機関で 2 つの化合物を代謝活性化存在下、および非存在下で試験を行った。化合物名は開示せず、溶媒の選択は試験担当機関が行った。用量設定は行わず、指定された広範囲の用量で試験を行った。

i) MMS

MMS はアルキル化剤で典型的な遺伝毒性物質であり、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、定量的用量依存性に関しても危険機関間で極めて再現性が高かった。また、S9の存在の有無はコメット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

2AAは代謝活性化が必要な遺伝毒性物質で、S9存在下でコメット陽性の報告がある。1機関を除いて、S9非存在下でのコメットの増加は顕著でなかった。S9存在下では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非存在下では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存在下では5つの試験機関間で一致したが、S9非存在下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存在下での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)のコメット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20%以上のコメットを観察した。一方、NDCNに関しては陰性対照では5機関で安定した値を示したが、陽性対照では1機関で全ての試験で100%NDCNを示した。検体の調整ミスと考えられる。

C-3) Confirmation

EMS、MMS、過酸化水素、 γ 線、MMC)、Tri-Xに関して、コメット試験、小核試験を国立医薬品食品衛生研究所・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

Phase Iでは確立したプロトコールの検証を行った。遺伝毒性物質であるAA、CAM、ETOではほとんどの試験で陽性を得られ、また陰性対照であるMANでは全てにおいて陰性であったことからプロトコールの妥当性を確認できた。一方、代謝活性化が必要な化合物(CP、DMN)に関しては期待した反応性は得られなかった。これまで*in vitro*コメット試験で代謝活性化の系を用いた報告は少ない。代謝活性化を用いた報告でも、その反応性は極めて弱い。同一条件下で、他の遺伝毒性エンドポイント(小核、突然変異)では明らかな陽性反応を示すことから、S9は十分に機能していると考えられる。コメット試験のみが感度が悪い原因は不明であるが、S9には断片化したDNAを再結合させる能力があるのかもしれない。いずれにせよ、代謝活性化法には問題はないため、この性質は*in vitro*コメット試験の特徴(適用の限界)として解釈せざるを得ない。

細胞毒性はコメット評価の重要なパラメータである。TBDE、NDCN、RSGの3つの指標を最高用量の設定に用いたが、TBDEは実際にコメットが出現する強い細胞毒性条件下でもほとんど変化が認められなかった。TBDEの毒性は細胞処理直後のアポトーシスが起きる以前には認められず、その発言には時間がかかるものと推察される。逆にRSGでは細胞増殖が全くない細胞毒性条件下でもコメット像が得られないことが陽性物質でも示された。これらのことはTBDEとRSGは最高用量の設定には不適切であることを示している。NDCNはコメットの観察と同時にできることを考えると、細胞毒性の指標としては最も簡便である。

Phase I試験結果から、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。従って、Phase IIでは細胞毒性を指標とした用量設定試験は行わず、0.15~5000ug/mLまでの広範囲、多数用量設定により広範な濃度で試験を行い、細胞毒性の評価は、後でレトロスペクティブに行うこととした。

MMSのコメットは試験機関間で極めて再現性が高く、また、反応用量に関してもほとんど一致した。陽性対照のEMSに関しても試験機関差はほとんど

観察されなかった（試験検体の調整ミスをした 1 機関を除いて）ことから、MMS、EMS のようなアルキル化剤に関しては TK6 を用いたコメット法は再現性の高い信頼できる結果をもたらすことが示唆された。

細胞毒性の問題に関しては、100%細胞毒性抑制濃度を指標とした場合、用量の設定に試験機関間で大きな差が観察された。これまでの報告でも、コメット陽性が観察される濃度は極めて細胞毒性が強い用量であり、ほぼ 100%の細胞が死滅してしまうため、細胞増殖を指標とした細胞毒性の評価は困難であることが指摘されていた。コメットの反応性の用量依存性は明らかであることから、この問題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。

3 年目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の Confirmation 試験を行った。

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かもしれない。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バリデーションする必要があるかもしれない。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特徴を持っている。他の試験にはないコメット試験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。まずは、コメット試験結果の意味を科学的に解釈することが重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

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)

2. 学会発表

Kimura, A., Sakamoto, H., Saigo, K., Sukamoto, T., and Honma, M.: Establishment of simple *in vitro* Comet Assay Protocol.

48th Annual Meeting for Society of Toxicology (2009. 3)

Honma, M.: The new ICH guidance on genotoxicity The 5th National Congress of Chinese Society of Toxicology. (2009. 8)

Uno, Y., Kojima, H., Honma, M., Tice, R., Corvi, R., Schechtman, and Hayashi, M.: *In vivo* Comet assay: update on going international validation

coordinated by JaCVAM
10th International Conference on Environmental
Mutagens (2009. 8)

Honma, M., Yamakage, K., Burlingson, B., Escobar,
P., Pant, K., Kraynak, A., Hayashi, M., Nakajima,
M., Suzuki, M., Corvi, R., Uno, Y., Schechtman, L.,
Tice, R., and Kojima, H.: International validation
study of the in vitro alkaline Comet assay.
10th International Conference on Environmental
Mutagens (2009. 8)

本間正充; In vitro 遺伝毒性試験における最高用量
と細胞毒性の評価
日本環境変異原学会第 38 回大会 (2009. 11)

本間正充、山影康次、Burlingson, B., Escobar, P.,
Pant, K., Kraynak, A., 林真、中嶋まどか、鈴木雅
也、Corvi, R., 宇野芳文、Schechtman, L., Tice, R.,
小島肇; In vitro アルカリコメットアッセイ国際バリ
デーション研究
第 22 回日本動物実験代替法学会総会 (2009. 11)

本間正充; In vitro 遺伝毒性試験の問題点と将来 :
第 17 回 HAB 研究機構学術年会 (2010. 5)

本間 正充; 遺伝毒性試験とその科学的リレバンス :
第 11 回日本トキシコロジー学会生涯教育講演会
(2010. 6)

本間 正充; リスク評価における in vitro 遺伝毒性試
験の役割: 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会
(2010. 6)

Honma, M.; Novel approach for in vitro genotoxicity
assessment: Novel Approaches in preclinical safety
evaluation: Development and progress (2010. 9)

Honma, M.; JaCVAM in vitro Comet assay
international collaborative study (JaCVAM in
vitro. : International Symposium "Recent Advance in
Comet Assay", (2010. 11)

G. 知的所有権の取得状況
なし