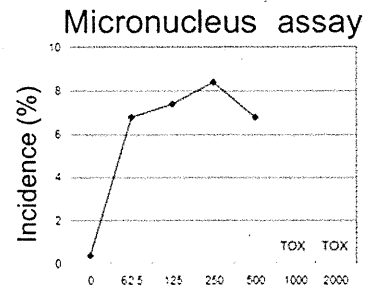
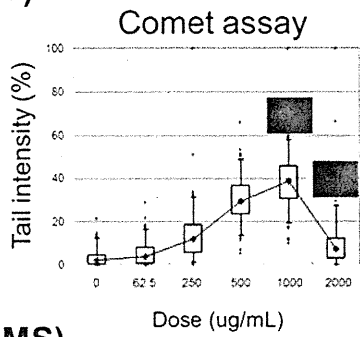
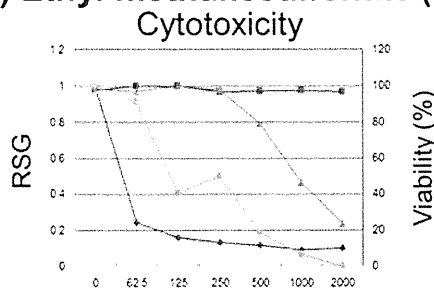
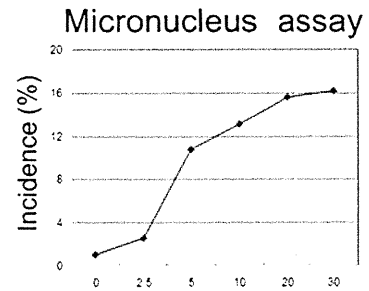
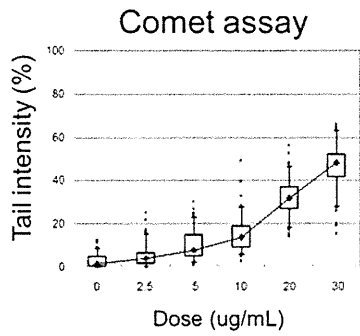
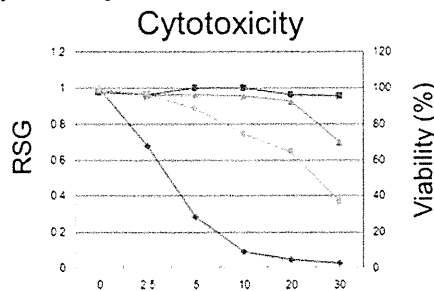


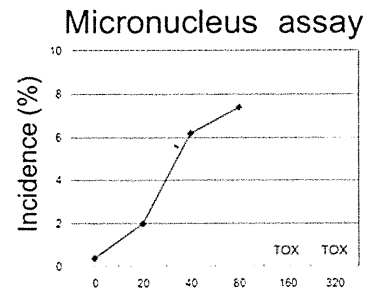
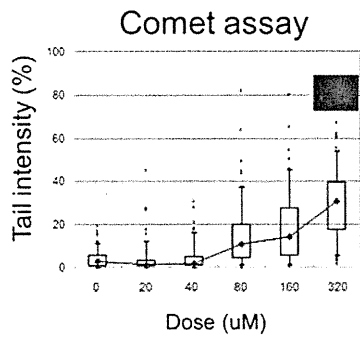
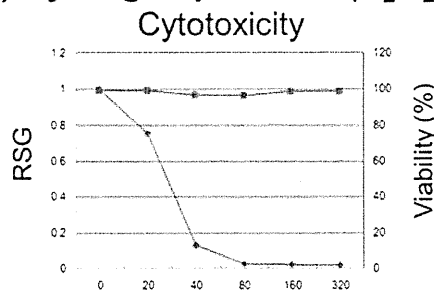
1) Ethyl methanesulfonate (EMS)



2) Methylmethane sulfonate (MMS)

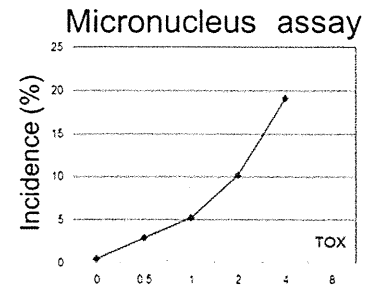
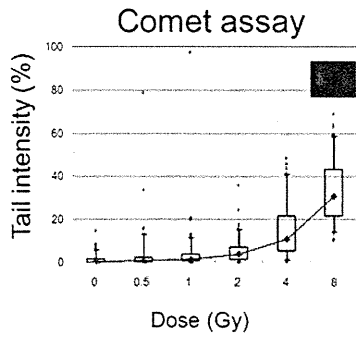
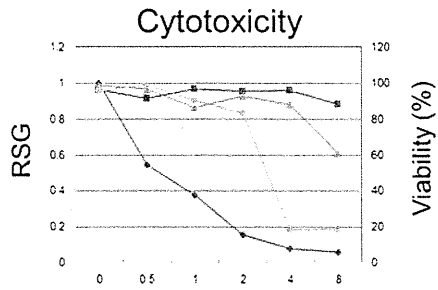


3) Hydrogen peroxide (H₂O₂)

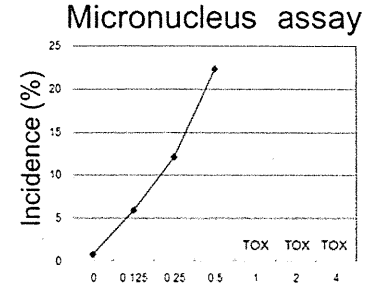
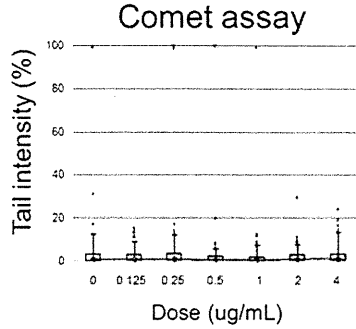
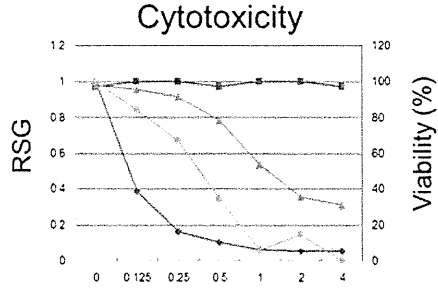


☒ 1

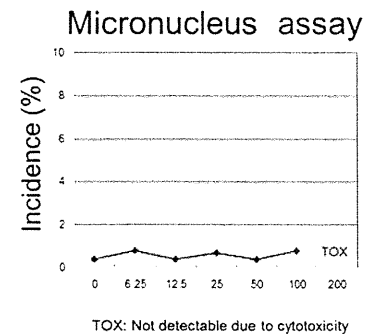
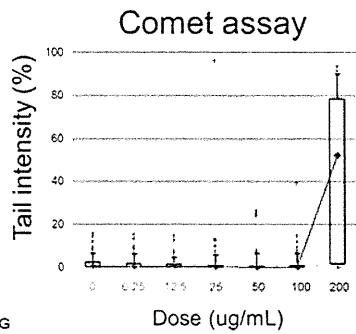
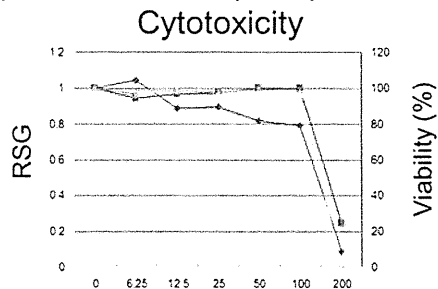
4) Gamma-ray



5) Mitomycin C (MMC)



6) Triton X-100 (TRX)



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

TOX: Not detectable due to cytotoxicity

☒ 2

遺伝毒性試験法コメットアッセイ (*in vitro*) の統計解析に関する研究

研究分担者 中嶋 圓 公益財団法人 食品農医薬品安全性評価センター 試験部次長

研究要旨

本研究は、コメットアッセイ (*in vitro*) のバリデーション研究において化合物の陽性判定に使用する統計的手法について検討した研究である。プレバリデーション研究ではまず 4 機関で 5 化合物について -S9 処理および +S9 処理それぞれ実施し、Phase I では同じく 4 機関で 6 化合物を用いて実験した。その結果、プレバリデーション試験では 6/10 [5 化合物×±S9]、Phase I では 7/12 [6 化合物×±S9] について全ての参加施設で一致した判定を得ることができた。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 Phase II では 5 機関で 2 化合物を実施した。片方の化合物では 10/10 [2 化合物×±S9] と完全一致を見たが、もう一方の化合物では 6/10 [2 化合物×±S9] という一致率となった。

以上のバリデーション研究では、得られたデータについて重み付き回帰分析を実施したが、結果としては化合物によっては判定に不一致が認められることとなった。本研究での不一致の原因を解明し、問題点を洗い出した上で、より精度の高い判定方法の提案を試みた。

A. 研究目的

コメットアッセイ (*in vitro*) 試験の評価に使用されている統計解析手法に関しては、様々な方法が存在するが、世界的に統一された実験条件の下での検討がなされていない。

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

B. 方法

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 および Phase II 研究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、外れ値の除去およ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、化合物を陽性と判定した。

C. 結果

プレバリデーション研究の判定結果を図 1 に示した。陽性と判定された物質には図上のセルの背景色を色づけして表示した。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。

-S9

	TSO	MOE	MA	CMC	TKX
BSRC	10/10 [5 化合物×±S9] [0.000]	10/10 [5 化合物×±S9] [0.000]	10/10 [5 化合物×±S9] [0.000]	10/10 [5 化合物×±S9] [0.000]	10/10 [5 化合物×±S9] [0.000]
Non-Reference	10/10 [5 化合物×±S9] [0.000]	10/10 [5 化合物×±S9] [0.000]	10/10 [5 化合物×±S9] [0.000]	10/10 [5 化合物×±S9] [0.000]	10/10 [5 化合物×±S9] [0.000]
HLS	10/10 [5 化合物×±S9] [0.000]	10/10 [5 化合物×±S9] [0.000]	10/10 [5 化合物×±S9] [0.000]	10/10 [5 化合物×±S9] [0.000]	10/10 [5 化合物×±S9] [0.000]
Met	10/10 [5 化合物×±S9] [0.000]	10/10 [5 化合物×±S9] [0.000]	10/10 [5 化合物×±S9] [0.000]	10/10 [5 化合物×±S9] [0.000]	10/10 [5 化合物×±S9] [0.000]
FSRC	10/10 [5 化合物×±S9] [0.000]	10/10 [5 化合物×±S9] [0.000]	10/10 [5 化合物×±S9] [0.000]	10/10 [5 化合物×±S9] [0.000]	10/10 [5 化合物×±S9] [0.000]

+S9

	9-AA	CAMP	CP	MAN	ETOP	DMN
BioReliance	TD=(1.2)*doses+4.4 [<0.001]	TD=(0.101)*doses+11.9 [0.134]	TD=(0.005)*doses+7.5 [<0.001]	TD=(0.001)*doses+7.62 [0.44]	TD=(1.3)*doses+15.72 [0.01]	TD=(0.001)*doses+8.07 [0.36]
BioReliance	TD=(0.05)*doses+4.69 [<0.001]	TD=(0.002)*doses+29.7 [0.72]	TD=(0.0000000001)*doses+1.37 [0.01]	TD=(0.0000000001)*doses+1.37 [0.01]	TD=(4.69)*doses+4.7 [<0.001]	TD=(0.0000000001)*doses+1.37 [0.01]
HLS	TD=(0.50)*doses+1.28 [<0.001]	TD=(0.0000000001)*doses+1.28 [<0.001]	TD=(0.0000000001)*doses+1.28 [<0.001]	TD=(0.0000000001)*doses+1.28 [<0.001]	TD=(0.0000000001)*doses+1.28 [<0.001]	TD=(0.0000000001)*doses+1.28 [<0.001]
Merck	TD=(0.50)*doses+1.28 [<0.001]	TD=(0.0000000001)*doses+1.28 [<0.001]	TD=(0.0000000001)*doses+1.28 [<0.001]	TD=(0.0000000001)*doses+1.28 [<0.001]	TD=(0.0000000001)*doses+1.28 [<0.001]	TD=(0.0000000001)*doses+1.28 [<0.001]
FDSC	TD=(0.50)*doses+1.28 [<0.001]	TD=(0.0000000001)*doses+1.28 [<0.001]	TD=(0.0000000001)*doses+1.28 [<0.001]	TD=(0.0000000001)*doses+1.28 [<0.001]	TD=(0.0000000001)*doses+1.28 [<0.001]	TD=(0.0000000001)*doses+1.28 [<0.001]

図 1

Phase I 研究の判定結果を図 2 に示した。Phase I 研究について、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。

-S9

	9-AA	CAMP	CP	MAN	ETOP	DMN
BioReliance	TD=(1.2)*doses+4.4 [<0.001]	TD=(0.101)*doses+11.9 [0.134]	TD=(0.005)*doses+7.5 [<0.001]	TD=(0.001)*doses+7.62 [0.44]	TD=(1.3)*doses+15.72 [0.01]	TD=(0.001)*doses+8.07 [0.36]
BioReliance	TD=(0.05)*doses+4.69 [<0.001]	TD=(0.002)*doses+29.7 [0.72]	TD=(0.0000000001)*doses+1.37 [0.01]	TD=(0.0000000001)*doses+1.37 [0.01]	TD=(4.69)*doses+4.7 [<0.001]	TD=(0.0000000001)*doses+1.37 [0.01]
FDSC	TD=(0.1)*doses+2.56 [0.001]	TD=(0.001)*doses+25.6 [0.01]	TD=(0.0000000001)*doses+2.56 [0.01]	TD=(0.0000000001)*doses+2.56 [0.01]	TD=(0.0000000001)*doses+2.56 [0.01]	TD=(0.0000000001)*doses+2.56 [0.01]
HLS	TD=(1.0)*doses+2.56 [<0.001]	TD=(0.001)*doses+25.6 [0.01]	TD=(0.0000000001)*doses+2.56 [0.01]	TD=(0.0000000001)*doses+2.56 [0.01]	TD=(0.0000000001)*doses+2.56 [0.01]	TD=(0.0000000001)*doses+2.56 [0.01]

+S9

	9-AA	CAMP	CP	MAN	ETOP	DMN
BioReliance	TD=(1.3)*doses+2.4 [<0.001]	TD=(0.01)*doses+24 [0.01]	TD=(0.001)*doses+240 [0.01]	TD=(0.001)*doses+240 [0.01]	TD=(0.01)*doses+24 [0.01]	TD=(0.001)*doses+24 [0.01]
BioReliance	TD=(0.05)*doses+4.69 [<0.001]	TD=(0.002)*doses+29.7 [0.72]	TD=(0.0000000001)*doses+1.37 [0.01]	TD=(0.0000000001)*doses+1.37 [0.01]	TD=(4.69)*doses+4.7 [<0.001]	TD=(0.0000000001)*doses+1.37 [0.01]
FDSC	TD=(0.87)*doses+14.59 [0.01]	TD=(0.001)*doses+145.9 [0.01]	TD=(0.0000000001)*doses+14.59 [0.01]	TD=(0.0000000001)*doses+14.59 [0.01]	TD=(0.001)*doses+14.59 [0.01]	TD=(0.0000000001)*doses+14.59 [0.01]
HLS	TD=(0.87)*doses+14.59 [0.01]	TD=(0.001)*doses+145.9 [0.01]	TD=(0.0000000001)*doses+14.59 [0.01]	TD=(0.0000000001)*doses+14.59 [0.01]	TD=(0.001)*doses+14.59 [0.01]	TD=(0.0000000001)*doses+14.59 [0.01]

図 2

Phase II 研究の判定結果を図 3 に示した。陽性と判定された物質には表中のセルを網掛けを施し表示した。Phase II 研究について、直接法 (-S9 処理)、化合物 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、化合物 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)、化合物 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、化合物 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。

-S9 処理の場合

	Chemical A	Chemical B
Lab. 1	0.004	0.0153
Lab. 2	0.0075	0.0928
Lab. 3	<0.0001	0.3635
Lab. 4	<0.0001	<0.0001
Lab. 5	<0.0001	0.018

+S9 処理の場合

	Chemical A	Chemical B
Lab. 1	0.0102	0.1845
Lab. 2	0.0002	0.0083
Lab. 3	0.0047	<0.0001
Lab. 4	<0.0001	0.226
Lab. 5	<0.0001	0.014

図 3 各試験における p 値一覧

D. 考察

プレバリデーションおよび Phase I での結果では、各用量の % Tail DNA の値がほぼ同じであっても有意差が認められた事例があり、今回使用した方法に加えて、陰性対象群に対しての一定の変化率などを条件に加えた判定方法の改良が必要だと考えた。各 Phase とも、およそ半数以上の化合物で全ての参加施設での判定が一致していた。判定が一致していなかった化合物の多くは、1 施設のみが異なる判定を示していたため、一致していた施設との実験条件の違いの確認が必要だと考えた。各施設で任意で用量設定したことが判定の不一致を引き起こした可能性があると考えられる。Phase II 研究では、各機関において定められた用量で実施され、施設間のバラツキを最少に抑えるよう工夫されたプロトコルで実施されている。しかしながら、化合物 B のように結果の一致度が低いものもあり、本モデルでの解析自体の適正を再検討する必要性を示唆しているかもしれない。コメントアッセイ特有のデータのバラツキ等を鑑み、解析すべき用量の選択基準を明確にした後、線形モデルでの解析を試みるのも一つの手であると考えられる。

さらに、各用量の % Tail DNA の値がほぼ同じであっても有意差が認められた事例があり、今回使用した方法に加えて、陰性対象群に対しての一定の変化率などを条件に加えた判定方法の改良が必要だと考えた。将来的には全施設に対して予め定められた用量でバリデーション試験を実施し、当該方法の一

致度の確認を行っていききたい。

・コメントデータの特徴

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

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

これがすべて本当だとすると、まだまだ comet 定量的方法自体に改良の余地があると判断される。

・検討課題

1. 陽性判定基準

コメントアッセイ (*in vitro*) 試験の評価に使用されている多くの統計解析手法が存在するが、世界的に統一された直線回帰の検討結果で、 $r > 0$ が有意である＝陽性化合物という判定では問題があると考えられる。各施設の結果が僅か1化合物で一致していることが妥当性の検証となり得るかは少し検討の余地がある。陽性結果が予想される構造異形の数化合物で用量を統一し、決定係数と傾き幅などを比較するでも比べる必要があると思われる。

2. 重み付け

重み付け分析を採用するのであれば、重みの選択理由が非常に重要な課題となる。しかし、今回は重みを $1/SE$ とするべき理由を明確に誘導せずに結果の評価に利用した。精度を上げるため、1本の試験管の50個データの $SD/\sqrt{50}$ にして、平均値の分散として利用したが、一般的にデータ変動を重みつき分析で考慮するのであれば、重みは分散 Ve (SD^2) を採用するのが普通である。

E. 統計手法の新たな提案

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

このような計算技術は、従来は容易ではなかったが、SASのNLNMIXEDプロシジャーを利用することで最近では可能となっている。当てはまりの良さをAICなどで評価し、適切な関数を選択することが可能であれば、傾きと高さに相当する非線形パラメータに基づいて陽性化合物の判定基準を決定して行くことの実現性は高いものとする。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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)
 - 2) 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)
 - 3) 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.
 - 4) 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)
 - 5) 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)
 - 6) Makoto Ema, Jin Tanaka, Norihiro Kobayashi, Masato Naya, Shigehisa Endoh, Junko Maru, Masayo Hosoi, Miho Nagai, Madoka Nakajima, Makoto Hayashi, Junko Nakanishi: Genotoxicity evaluation of fullerene C₆₀nanoparticles in comet assay using lung cells of rats intratracheally instilled, Regulatory Toxi. And Pharmacology, Vol.62, 419-424 (2012)
- ##### 2. 学会発表
- 1) 本間正充 山影康次 Burlingson, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., 林真, 中嶋圓, 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)

s

- 2) 田中仁, 益森勝志, 中嶋圓, 林真; Comet Assay Atlas, 第 39 回 日本環境変異原学会 (2010.11)
- 3) J. Tanaka, M. Ueda, S. Masumori, M. Nakajima, M. Hayashi: Comet assay atlas, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2011.8)
- 4) 福室 真仁, 田中 仁, 益森 勝志, 中嶋 圓, 林 真, 石田 雄二, 加国 雅和, 立野(向谷) 知世: ヒト肝細胞キメラマウス (PXB マウス®) を利用した小核試験およびコメットアッセイ, 第 40 回 日本環境変異原学会 (2011.11)
- 5) 濱田 修一, 高島 理恵, 嶋田 圭祐, 財前 和代, 川上 哲, 田中 仁, 松本 浩孝, 中井 智博, 鈴木 洋, 村村 奨士, 真田 尚和, 井上 健司, 武藤 重治, 萩尾 宗一郎, 林 亜耶, 高柳 智美, 萩原 庸介, 前田 晃央, 成見香 瑞範, 高沢 博修, 小川 いづみ, 大山 ワカ子, 中嶋 圓, 森田 健, 小島 肇, 林 真, 本間 正充: 反復投与肝臓小核試験法の有用性の検討 (MMS 共同研究), 第 40 回 日本環境変異原学会 (2011.11)
- 6) Chise Tateno, Yuji Ishida, Masakazu Kakuni, Shinji Fukumuro, Jin Tanaka, Shoji Masumori, Madoka Nakajima, Makoto Hayashi: Comet assay and micronucleus test using chimeric mice with humanized liver (PXB mice®), 51th Society of Toxicology (2012.3)
- 7) M. Naya, N. Kobayashi, M. Ema, S. Kasamoto, M. Fukumuro, S. Takami, M. Nakajima, M. Hayashi, and J. Nakanishi: *In Vivo* genotoxicity study of nanosized titanium dioxide particles using Comet assay following intratracheal instillation in rats, 51th Society of Toxicology (2012.3)

G. 健康危険情報

「なし」

H. 知的財産権の出願・登録状況

「なし」

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

研究分担者 能美健彦 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長

研究要旨

トランスジェニック遺伝毒性試験は、遺伝子変異を多臓器において定量的に解析することができるため、発がんの標的臓器で遺伝毒性を評価できる特徴を持つ。トランスジェニック遺伝毒性試験のバリデーションに関する基盤的研究として、F344 *gpt delta rat* を用いた国内共同研究を行い、発がん物質（2,4-ジアミノトルエン、アリストロキア酸、亜硫化ニッケル）および非発がん物質（2,6-ジアミノトルエン）の *in vivo* 遺伝毒性を検索した。IWGT (International Workshop on Genotoxicity Testing) および OECD 会議に出席し、トランスジェニック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。2011 年にトランスジェニックげっ歯類を用いた遺伝子突然変異試験の OECD ガイドライン (TG488) が公開された。

キーワード: *in vivo* 遺伝毒性試験、*gpt delta* トランスジェニックラット、発がん標的臓器

A. 研究目的

遺伝毒性試験は、(1) Ames 試験 (2) *in vitro* 染色体異常試験 (CA) あるいはマウスリンフォーマ遺伝子突然変異試験 (MLA) (3) マウス小核試験 (*in vivo* MN) の 3 試験が、多くのガイドラインで推奨されてきた。だが (2) *in vitro* CA, MLA で陽性となった物質の中には、実験動物に発がん性を示さない物質 (false positive) が多く含まれることが明らかとなり、ICH (日米 EU 医薬品規制調和国際会議) では、従来の試験バッテリー以外に、(1) Ames 試験 (2) *in vivo* MN (3) 第二の *in vivo* 試験 からなる別な選択肢が提唱されている。

第二の *in vivo* 遺伝毒性試験の候補の一つと考えられているのが、トランスジェニック (Tg) 動物を用いる遺伝毒性試験である。トランスジェニック (Tg) 動物を用いる遺伝毒性試験では、変異検出用のレポーター遺伝子を導入した Tg マウスあるいはラットを化学物質に曝露し、任意の臓器・組織からレポーター遺伝子を *in vitro* パッケージング法により入ファージ粒子として回収して大腸菌に感染させ、動物個体で起きた変異を大腸菌を用いて検出する。原理的には個体のあらゆる組織で測定可能であるため、曝露経路、発がん標的臓器、代謝や薬物動態等を考慮した評価に有用である。

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

従来の組合せ	第二の選択肢
1) Ames test	1) Ames test
2) <i>in vitro</i> CA or MLA	2) <i>in vivo</i> MN
3) <i>in vivo</i> MN	3) Second <i>in vivo</i> assay

図1 遺伝毒性試験バッテリーの再構築

性試験（あるいは短期発がん試験）を統合することは、動物愛護の点からも望ましい方向と考えられる。

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

本研究では、Tg 遺伝毒性試験の技術普及とバリデーションに関する基盤的知見を得ることを目的に F344 *gpt delta* ラットを用いた共同研究を行った。国内約 10 機関が参加し、3 種類の発がん物質 [2,4-ジアミノトルエン (2,4-DAT), アリストロキア酸、亜硫化ニッケル] および非発がん物質 [2,6-ジアミノトルエン (2,6-DAT) の *in vivo* 遺伝毒性を検索した。施設間の結果を比較するとともに OECD ガイドライン策定のためのデータ提供を行った。

B. 研究方法

1) *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、および *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) および非発がん物質 (2,6-DAT) の *in vivo* 遺伝毒性を検索した。IWGT 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、各化合物の試験を行うこととした。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。

	Lab 1-3	Lab 4, 5	Lab 6-9
発がん物質	2,4-ジアミノトルエン (2,4-DAT)	アリストロキア酸	亜硫化ニッケル
非発がん物質	2,6-ジアミノトルエン (2,6-DAT)		
(標的臓器)	肝臓	腎臓	肺
(非標的臓器)		肝臓	
(投与方法)	28日間反復経口投与 最終投与3日後に採取	28日間反復経口投与 最終投与3日後に採取	週1回気管内投与4回 投与開始後28,90日後 に採取
	<i>gpt</i>	<i>gpt</i>	<i>gpt, Spi</i>

図2 F344 *gpt delta* rat を用いた共同研究

2) 被験物質の投与

2-1) 2,4-DAT および 2,6-DAT

両化合物は Ames 試験の S9mix 存在下でも陽性を示す変異原物質だが、2,4-DAT はげっ歯類に肝癌を誘発し、異性体の 2,6-DAT は肝癌を誘発しない。今回、両化合物の Tg 遺伝毒性による評価を行った。2,4-DAT の投与量は 10 および 30 mg/kg/day、2,6-DAT の投与量は 60 mg/kg/day とした。雄の *gpt delta* ラットに 1 日 1 回、28 日間反復経口投与し、最終投与の 3 日後に臓器を採取した。発がん標的臓器の肝臓について *gpt* アッセイを実施した。実験には各群 5 匹の雄ラットを用いた。

2-2) アリストロキア酸

アリストロキア酸はハーブや生薬に含まれ、腎障害、遺伝毒性および発がん性が報告されている。アリストロキア酸の投与量は 0.3 mg/kg および 1 mg/kg とした。雄 *gpt delta* ラットに 28 日間反復経口投与し、最終投与日から 3 日後に剖検し、発がん標的臓器の腎臓および非発がん標的の肝臓を用いて *gpt* アッセイを行った。実験には各群 5 匹の雄ラットを用いた。

2-3) 亜硫化ニッケル

亜硫化ニッケル (Ni_3S_2) は不溶性の金属化合物であり、ラットに吸入又は気管内投与すると肺がんを誘発することが報告されている。亜硫化ニッケルをパラフルオロカーボンに懸濁し、0、0.5、1.0 mg/匹の用量で、週 1 回の気管内投与を 4 回行った。標的臓器が肺であることから、気管内投与による負担を軽減するため、投与は週 1 回×4 週で行った。初回投与後 28 日目及び 90 日目に肺を採取し、*gpt, Spi* アッセイを行った。実験には各群 5 匹の雄ラットを用いた。

3) 突然変異体頻度の測定

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。各グループごとに 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およ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 (Dunnett's test)、不等分散の場合はノンパラメトリック検定 (Steel's test) を行った。いずれも $p < 0.05$ を有意差とした。

(倫理面への配慮)

本研究は、実験動物を用いたものであり、ヒトに関する倫理上の問題はない。また、全ての実験は、各参加施設における遺伝子組換え実験および動物実験に関する規定に準拠して行った。

C. 研究結果

1) F344 *gpt delta* ラットを用いた共同研究

1-1) 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 ファージ回収効率、陰性対照およ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の範囲内であり、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、亜硫酸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および *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。

1-2) 2, 4-DAT および 2, 6-DAT

雄 7 週齢の F344 *gpt delta* ラットに 2, 4-DAT (10 および 30 mg/kg/day)、および 2, 6-DAT (60 mg/kg/day) を 28 日間連続投与し、最終投与後 3 日目に組織を採取して肝臓の *gpt* アッセイを行った。溶媒対照群に対して 2, 4-DAT 投与群の *gpt* 突然変異体頻度は用量依存的に増加した。一方、60 mg/kg 2, 6-DAT 投与群の *gpt* 突然変異体頻度は溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加はみられなかった。2, 4-DAT の高用量群および 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。

Total *gpt* mutant frequencies (MFs) in the liver of 2,4-DAT or 2,6-DAT-treated rats. (3施設合計)

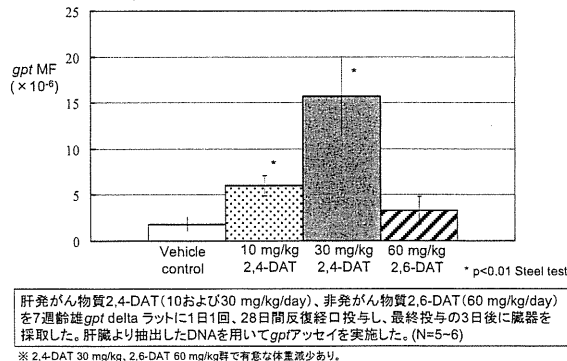


図3 2,4-DAT、2,6-DAT のラット肝臓における変異原性

1-3) 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 および 1.0 mg/kg/day) を 28 日間連続投与し、最終投与後 3 日目に組織を採取して腎臓と肝臓から DNA を抽出して *gpt* アッセイを行った。腎臓においては溶媒対照群に対してアリストロキア酸投与群の突然変異体頻度は用量依存的に増加した。肝臓においてもアリストロキア酸投与群の突然変異体頻度は用量依存的に増加し、腎臓と同等またはやや高値を示した。

Total *gpt* MFs in the liver and kidney of *gpt delta* rats treated with Aristolochic acid. (2施設合計)

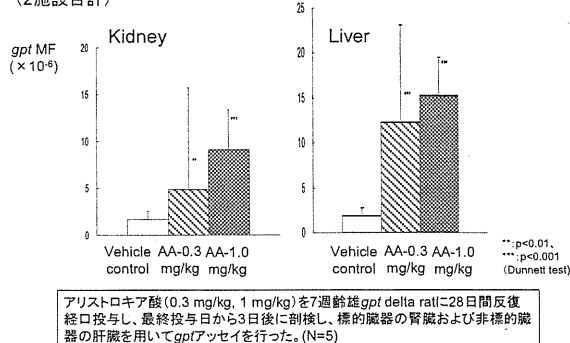


図4 アリストロキア酸のラット腎臓と肝臓における変異原性

1-4) 亜硫酸ニッケル

亜硫酸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および90日目の全投与群において、*gpt*点突然変異体頻度は溶媒対照群と比較して有意な増加は認められなかった。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Spi-欠失変異体頻度の測定を行った結果、全群において欠失変異体頻度の有意な増加は認められなかった。

The *gpt* MFs in the lung of *gpt* delta rats treated with nickel subsulfide.
(施設別+4施設合計)

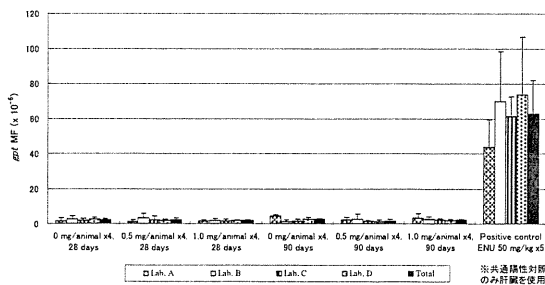


図5 亜硫化ニッケルのラット肺における変異原性

2) 国際会議参加およ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、Tg 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。

D. 考察

Tg 遺伝毒性試験は、多臓器において遺伝子変異を定量的に解析することができるため、発がんの標的臓器で遺伝毒性を評価できる *in vivo* 試験として有望である。IWGT の議論を受けて作成されたOECDのDetailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays (2009)には、28日間の連続投与、最終投与後3日目に組織を採取するという試験プロトコルが提案されているが、実際に同プロトコルで行われた試験データは充分でなく、特にラットの試験データは不足している。

F344 *gpt* delta ラットは、発がん試験に汎用されるF344 ラットを遺伝的背景にしており、発が

んと遺伝毒性の関連を調べる上で有用と考えられる。また、一般毒性試験（あるいは短期発がん試験）との統合によって使用動物数の削減が可能と考えられる。Tg 遺伝毒性試験の技術普及とバリデーションに関する基盤的知見を得ることを目的に、F344 *gpt* delta ラットを用いた共同研究を行った。参加施設にはTg試験の経験のない施設が含まれており、事前に共通の陽性・陰性対照サンプルを用いた技術的検討を行った。その結果、DNA抽出およびトランスジェン回収効率は各施設とも試験が可能な水準であった。*gpt* アッセイにおいても、多くの施設で適切な陰性対照値と有意に高い陽性対照値が得られた。予備検討を踏まえて、本試験では参加施設を3グループに分け、1) 発がん物質2,4-DATと非発がん物質2,6-DATを用いた標的組織（肝臓）における *in vivo* 変異原性の検討、2) アリストロキア酸を用いた発がん標的（腎臓）および非標的臓器（肝臓）における変異原性の検討、3) 亜硫化ニッケルを用いた発がん標的（肺）における変異原性の検討、の3試験を行った。

2,4-DAT投与群の肝臓における *gpt* 点突然変異体頻度は用量依存的に増加に増加した。一方、2,6-DATにおいては媒体対照群と比較して明らかな増加は認められなかった。両化合物はAmes試験のS9mix存在下でも陽性を示すが、2,4-DATはげっ歯類に肝癌を誘発し、2,6-DATは肝癌を誘発しない。これは *in vivo* における解毒作用の影響と考えられる。*gpt* delta ラットを用いた *in vivo* 遺伝毒性試験結果は、2,4-DAT及び2,6-DATの肝発がん性の有無と対応していることが示唆された。

アリストロキア酸投与群では、発がん標的臓器の腎臓において用量依存的に *gpt* 突然変異体頻度の上昇がみられ、遺伝毒性結果とがん原性結果が一致した。一方、非標的臓器である肝臓においても *gpt* 突然変異体頻度の上昇がみられた。肝臓の変異体頻度増加は腎臓よりも高値であり、突然変異誘発能が発がん標的性と必ずしも一致しないことが示唆された。アリストロキア酸による発がんの過程には、遺伝毒性以外の要因も重要である可能性が示唆された。

亜硫化ニッケルは、発がん標的臓器の肺において *gpt* 点突然変異体頻度および Spi-欠失変異体頻度ともに有意な増加は認められず、陰性となった。中長期の酸化損傷・炎症を背景とする発がん物質（金属系化合物等）に対するTg試験の感受性が低い可能性が示唆された。

本共同研究の結果は、OECDのトランスジェニック遺伝毒性試験ガイドラインの策定にあたり、データ提供された。2011年に新規ガイドライン488 (Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell

Gene Mutation Assays) が公開された。

今後の課題としては、28日間反復経口投与以外の投与プロトコルの妥当性、陰性結果の場合における用量設定の妥当性の問題が挙げられる。また、現在の推奨プロトコルである、28日間反復経口投与し最終投与3日後に組織を採取する方法は、亜急性の毒性試験で用いられるプロトコル(28日間反復経口投与の翌日に解剖)と差があるため、*in vivo* 遺伝毒性試験と一般毒性試験の併用の際に障害となる。同じ動物種で発がん標的組織における変異原性を検索可能なTg試験の長所を活かす意味でも、3Rの観点においても、統合を視野に入れた試験法を整備していくことが課題である。

E. 結論

Tg試験のバリデーションに関する基盤的研究として、F344 *gpt* delta ratを用いた国内共同研究を行い、発がん物質(2,4-DAT, アリストロキア酸、亜硫化ニッケル)および非発がん物質(2,6-DAT)の*in vivo*変異原性を検索した。28日間投与試験の結果をとりまとめるとともに、OECDガイドライン策定のためデータ提供を行った。

F. 健康危機情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) H. Sui, R. Ohta, T. Shiragiku, A. Akahori, K. Suzuki, M. Nakajima, H. Hayashi, K. Masumura, T. Nohmi, Evaluation of *in vivo* mutagenicity by 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene in liver of F344 *gpt* delta transgenic rat dosed for 28 days: a collaborative study of the *gpt* delta transgenic rat mutation assay, *Genes and Environ.*, 34, 25-33 (2012).
- 2) Y. Kawamura, H. Hayashi, O. Tajima, S. Yamada, T. Takayanagi, H. Hori, W. Fujii, K. Masumura, T. Nohmi, Evaluation of the genotoxicity of aristolochic acid in the kidney and liver of F344 *gpt* delta transgenic rat using a 28-day repeated-dose protocol: a collaborative study of the *gpt* delta transgenic rat mutation assay, *Genes and Environ.*, 34, 18-24 (2012).
- 3) T. Kamigaito, T. Noguchi, K. Narumi, R. Takashima, S. Hamada, H. Sanada, M. Hasuko, H. Hayashi, K. Masumura, T. Nohmi, Evaluation of the *in vivo* mutagenicity of nickel subsulfide in the lung of F344 *gpt* delta transgenic rats exposed by intratracheal instillation: a collaborative study for the *gpt* delta transgenic rat mutation assay, *Genes and Environ.*, 34, 34-44 (2012).
- 4) N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Takamune, M. Yamada, M. Muramatsu, K. Masumura, M., T. Ohta, T. Tanaka, T. Nohmi, Modulatory effects of capsaicin on *N*-diethylnitrosamine (DEN)-induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* YG7108 and DEN-induced hepatocarcinogenesis in *gpt* delta transgenic rats, *Genes and Environ.*, 33, 160-166 (2011)
- 5) N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Muramatsu, K. Masumura, M. Takamune, M. Yamada, T. Ohta, T. Tanaka T. Nohmi, Chemopreventive effects of silymarin against 1,2-dimethylhydrazine plus dextran sodium sulfate-induced inflammation-associated carcinogenicity and genotoxicity in the colon of *gpt* delta rats, *Carcinogenesis*, 32, 1512-1517 (2011)
- 6) 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)
- 7) N. Koyama, M. Yasui, A. Kimura, S. Takami, T. Suzuki, K. Masumura, T. Nohmi, S. Masuda, N. Kinase, T. Matsuda, T. Imai, M. Honma, Acrylamide genotoxicity in young versus adult *gpt* delta male rats, *Mutagenesis*, 26, 525-529 (2011)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
 - 12) 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)
 - 13) 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)
2. 学会発表
- 1) T. Nohmi, Possible mechanisms underlying practical threshold for genotoxic carcinogens, The 10th International Conference on Environmental Mutagens (10th ICEM), Firenze, Italy (2009. 8)
 - 2) N. Koyama, A. Kimura, M. Yasui, S. Takami, M. Takahashi, K. Inoue, M. Yoshida, T. Imal, M. Shibutani, T. Suzuki, A. Yamamoto, W. Kumita, K. Masumura, K. Horibata, S. Masuda, N. Kinase, T. Matsuda, T. Nohmi, M. Honma, Child-adult differences in evaluation of *in vivo* genotoxicity of acrylamide, The 10th International Conference on Environmental Mutagens (10th ICEM), Firenze, Italy (2009. 8)
 - 3) K. Masumura, N. Toyoda-Hokaiwado, T. Inoue, T. Umemura, A. Nishikawa, T. Nohmi, *In vivo* mutagenicity of structural isomers 2,4-DAT and 2,6-DAT in the target organ for carcinogenicity in F344 *gpt* delta transgenic rat, The 10th International Conference on Environmental Mutagens (10th ICEM), Firenze, Italy (2009. 8)
 - 4) T. Inoue, M. Tasaki, Y. Ishii, T. Okamura, Y. Suzuki, M. Jin, D. Hibi, T. Nohmi, T. Umemura, A. Nishikawa, Lack of *in vivo* mutagenicity and tumor-promotion activity in the livers of rats treated with tocotrienol, The 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009. 10)
 - 5) N. Toyoda, T. Inoue, K. Masumura, T. Umemura, A. Nishikawa, T. Nohmi, The aromatic amine 2,4-DAT induced point mutations in the target organ of carcinogenicity in F344 *gpt* delta rat, The 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009. 10)
 - 6) R. Ohta, H. Sui, T. Shiragiku, A. Akahori, M. Nakajima, H. Hayashi, K. Masumura, T. Nohmi, Collaborative study of the *gpt* delta transgenic rat mutation assays: 1) Distinguishable of hepatic carcinogens from a non-carcinogen, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS) (2009. 11)
 - 7) O. Tajima, S. Yamada, Y. Kawamura, H. Hayashi, T. Takayanagi, H. Hori, W. Fujii, K. Masumura, T. Nohmi, Collaborative study of the *gpt* delta transgenic rat mutation assays: 2) Evaluation of genotoxicity of aristolochic acid, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS) (2009. 11)
 - 8) T. Noguchi, T. Kamigaito, K. Narumi, R. Takashima, S. Hamada, H. Sanada, K. Masumura, M. Hasuko, T. Nohmi, Collaborative study of the *gpt* delta transgenic rat mutation assays: 3) Evaluation of genotoxicity of Nickel subsulfide by intratracheal instillation, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS) (2009. 11)
 - 9) K. Masumura, T. Nohmi, Inserted position of lambda EG10 transgene on *gpt* delta transgenic mouse genome, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS) (2009. 11)
 - 10) N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Muramatsu, K. Masumura, T. Tanaka, T. Nohmi, Chemopreventive effects of capsaicine and silymarin in F344 *gpt* delta transgenic rat, The 26th Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology (2010. 2)
 - 11) K. Masumura, N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Muramatsu, M. Takamune, M. Yamada, T. Tanaka, T. Nohmi, Chemopreventive effects

- of silymarin on 1,2-dimethylhydrazine-induced mutagenesis and carcinogenesis in the colon of *gpt* delta transgenic rats, The Society of Toxicology 50th Annual Meeting, USA (2011. 3)
- 12) T. Nohmi, N. Toyoda-Hokaiwado, T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa, Genotoxicity and pre-neoplastic lesions induced by 2,4-diaminotoluene in the liver of F344 *gpt* delta transgenic rats, The Society of Toxicology 50th Annual Meeting, USA (2011. 3)
- 13) K. Masumura, Y. Sakamoto, W. Kumita, M. Honma, T. Nohmi, Identification of genomic insertion sites of λ EG10 DNA in *gpt* delta transgenic mice and rats by high-throughput DNA sequencing, Society of Toxicology 51st Annual Meeting, USA (2012. 3)
- 14) K. Masumura, N. Osugi, N. Toyoda-Hokaiwado, T. Nohmi, Spontaneous point mutations and deletions accumulate in a different manner with aging of *gpt* delta transgenic mice, Society of Toxicology 51st Annual Meeting, USA (2012. 3)
- 15) H. Takagi, Y. Nozaki, A. Kawada, M. Yamada, K. Masumura, T. Nohmi, General toxicity study of F344 *gpt* delta transgenic rat for one-year feeding, Society of Toxicology 51st Annual Meeting, USA (2012. 3)

H. 知的所有権の取得状況
特になし

*in vitro*皮膚感作性試験代替法のバリデーショナル

研究分担者 大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所 所長

研究要旨

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

本年度までに、h-CLATの技術移転段階が終了し、施設間再現性が良いことがほぼ確認できた。

キーワード：感作性試験、h-CLAT、安全性評価、動物実験代替法

協力研究者

小島 肇 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部 新規試験法評価室 室長
足利太可雄 (株)資生堂 品質評価センター 安全性評価研究グループ 副主任研究員
坂口 斉 花王(株) 安全性評価研究所 上席主任研究員

A. 研究目的

足利、坂口らは、皮膚感作性試験代替法として、ヒト単球細胞株である THP-1 細胞を用い、CD86 及び CD54 の発現亢進を指標とした試験法(human Cell Line Activation Test: h-CLAT)を開発した^{1,2,3)}。

本試験法を国際的標準法として磨きあげるため、厚生労働科学研究（医薬安全総合研究事業）において、国内 7 施設による共同研究を実施し、本試験法は技術移転が容易であり、基本的に施設間再現性が良好であることを明らかにした⁴⁾。さらに、本試験法の汎用性を向上させることを目的として、細胞と血清のロット差及び前培養条件に関する検討^{5,6,7)}や、予測モデル、陽性対照物質(2,4-Dinitrochlorobenzene: DNCB)の推奨適用濃度、及び測定指標である CD86/CD54 発現亢進最小濃度の算出方法を見直した。また、化粧品原料に関する h-CLAT の有用性評価を目的として防腐剤、染毛剤及び香料 30 品を評価し、その有用性を示した^{8,9,10,11)}。

このような経緯を経て、試験法のプロトコールが確立できたことから、本研究班では OECD ガイ

ドライン化のため、EURL ECVAM (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing)と共同で h-CLAT バリデーショナルを行うこととし、ECVAM で行う 3 つの皮膚感作性試験代替法のプレバリデーショナルの中に組み込んだ（他は MUSST: Myeloid U937 Skin Sensitization Test 及び DPRA : Direct Peptide Reactivity Assay）。

B. 研究方法

B-1)バリデーショナル実行委員会

図1に示す組織がECVAMにおける*in vitro*皮膚感作性試験バリデーショナル実行委員会(以下、バリデーショナル実行委員会と記す)である。なお、バリデーショナルの目的は、技術移転及び施設内、施設間再現性の確認である。

B-1-1) h-CLAT協力施設

日本からはh-CLATのLead labとして、花王及び資生堂が参加した。他の2つの参加施設は、欧州共同研究機構(JRCと略す)の*in vitro* methods部(IVMと略す)及びCROのBioassay社である。

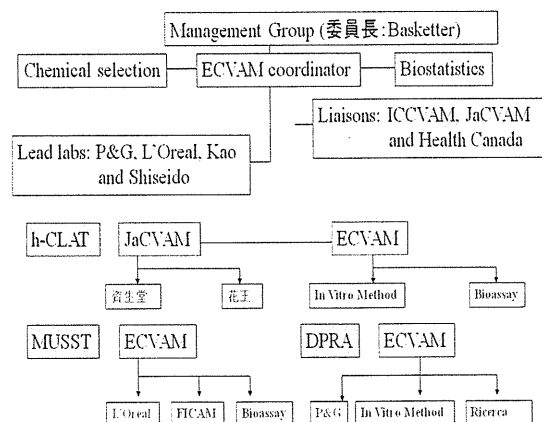


図1. バリデーショナル実行委員会組織

B-1-2) 被験物質数

被験物質数は陽性物質が 16、陰性物質が 8、合計 24 とされ、被験物質に関する名称や物理化学的性状などの具体的な情報はバリデーション研究が終了するまで公開されない。

B-1-3) バリデーションの進行計画

・技術移転の段階を Phase A とし、これを以下の 2 段階に分けて実施した。

Phase A stage I : リード施設による指導

stage II : 各施設での予備試験
(コード化なし)

・再現性の検討段階を Phase B とし、これを以下の 2 段階に分けて実施した。

Phase B stage I : コード化された 9 物質を用いて施設毎に 1 回実施

stage II : コード化された 15 物質を用いて施設ごとに 3 回実施。

B-2) プレバリデーションの概要

B-2-1) phase A stage II

2010年4月より、h-CLAT法を初めて経験する2つの施設(Bioassay社及びIVM)がそれぞれの施設で既知化合物を正しく評価できるかを確認した。

なお、花王及び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、操作状況と生データをチェックした。

B-2-2) phase B stage I

2011年4月より、施設間再現性検証の第1段階として、Lead labを含む4施設が、24物質のうち9物質をブラインドで1回ずつ評価した(計9試験)。

B-2-3) phase B stage II

2011年11月より、施設内再現性検証の第2段階として、4施設が24物質のうち15物質をブラインドでさらに3回ずつ評価した(計45試験)。

略号 : DNCB: 2,4-Dinitrochlorobenzene, NiSO₄: NiSO₄, PAA: Phenylacetaldehyde, SLS: Sodium Lauryl Sulfate, LA: Lactic acid

(倫理面への配慮)

倫理的な問題が生じる実験を実施しておらず、特に配慮すべき問題はない。

C. 研究結果

C-1)バリデーションの進行

バリデーションの進行のための実行委員会及び技術移転を以下のように実施した。

2009年 :

9月 JRCにおいて第1回実行委員会

12月 JRCにおいて第2回実行委員会

2010年 :

1月 JRCにおいて第3回実行委員会

3月 IVM及びBioassay社に技術指導(秦野)

JRCにおいて第4回実行委員会

4月 2施設による技術移転性確認開始

6月 JRCにおいて第5回実行委員会

7月 SOPを修正し、確定版として提出

8月 プレバリデーション(技術移転性の確認実験)開始

10月 IVM及びBioassay社に再指導

SOP改定

2011年 :

3月 第6回実行委員会

phase A stage II 承認

7月 第7回実行委員会

11月 第8回実行委員会

phase B stage I承認

2012年 :

4月 第9回実行委員会(予定)

C-2)プレバリデーション

C-2-1) phase A stage II

表1に示すように、IVMにおいて、陰性物質である乳酸(LA)が3回の繰り返し実験のうち2回でCD86発現量が陽性となった。また、表2に示すように、Bioassay社においても、乳酸において同様に3回の繰り返し実験の内1回で濃度依存性が無かったが、2濃度でCD54の発現量が陽性となった。

(3回の繰り返し実験で2回以上陽性となった場合に被験物質の皮膚刺激性を陽性と判定し、陽性が1回以下の場合、陰性と判定する。)

そこで、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。

以上の報告書を受け、2011年4月にバリデーシ

オン実行委員会において、技術移転の段階 Phase A が終了したことが承認された。なお、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。
 - ・ 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-2-2) phase B stage I

施設間で CD86 及び CD54 の発現パターンが異なる化合物が存在したが、被験物質名はまだコード開示されていないため、物質の特性に基づく考察はできない。プロトコールに従って全てのデータが取得された 8 物質に関する 4 施設の判定結果は完全に一致し、施設間再現性は良かった。すべ

ての施設において、実験終了が 2011 年 11 月のバリデーション実行委員会で確認された。

C-2-3) phase B stage II

現在、進行中である。

D. 考察

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

現在進行中のプレバリデーション phase B stage II においては、3 月までに花王における 20 物質の実験が終了し、2012 年 5 月までに全てが終了する予定である。資生堂においては、現在までに 8 物質の実験が終了した。2012 年 7 月までに全てが終了する予定である。他の 2 施設においては、1 施設は 2012 年 5 月までかかる可能性がある。いずれにしても、2012 年夏までにはすべての施設が終了する予定である。現在、すべての物質名コードが開示されておらず、物質毎の特性に応じた解析ができない状況である。すべての実験終了を待たずにデータ解析を待ちたい。

表 1. Phase A における IVM の結果

Test chemical	Dose (mg/mL)	CD86 RFI			CD54 RFI			Cell viability			Judgement
		1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd	
DNCB	2.7	83	87	110	92	80	76	96	98	92	CD86 : 2/3 CD54 : 3/3 Positive
	3.2	82	93	302	113	68	349	96	97	84	
	3.9	82	75	357	74	50	414	95	99	82	
	4.6	59	54	391	121	63	743	97	98	80	
	5.6	78	67	339	207	66	958	94	97	84	
	6.7	233	97	250	1157	76	1223	78	98	75	
	8.0	295	113	217	1908	263	1199	73	83	75	
	9.6	99	97	123	347	96	419	64	98	88	
	67	239	169	193	523	286	651	87	89	89	
	80	274	222	252	627	408	775	87	84	86	
NiSO4	96	273	279	253	1017	739	965	78	80	84	CD86 : 3/3 CD54 : 3/3 Positive
	116	244	262	271	1400	1080	1437	78	80	76	
	139	233	234	235	2058	1654	2268	77	75	72	
	167	212	217	205	3136	2219	3653	75	69	61	
	200	231	143	230	4700	3108	6168	74	70	58	
	240	261	148	159	5208	3316	7959	71	65	52	
	17	132	104	64	501	158	167	95	93	98	
	20	120	103	84	805	212	422	97	94	97	
PAA	24	131	101	81	1042	236	464	96	92	96	CD86 : 2/3 CD54 : 3/3 Positive
	29	148	122	91	1283	341	843	97	92	95	
	35	214	161	66	2362	386	361	93	95	96	
	42	219	243	107	2167	492	1157	94	88	92	
	50	348	355	138	2766	609	1438	84	60	88	
	60	-	-	-	-	-	-	42	38	45	
	18	124	106	77	92	178	108	97	99	98	
22	128	77	94	111	173	101	98	99	97		
27	98	69	71	133	126	93	97	98	97		
32	110	93	77	133	170	109	94	98	97		
38	126	92	60	179	153	102	96	98	97		
46	123	79	79	192	247	135	90	96	98		
55	98	79	69	186	269	146	65	86	85		
66	-	-	-	-	-	-	33	11	39		
LA	1005	97	86	114	98	120	72	96	95	97	CD86 : 2/3 CD54 : 0/3 Positive
	1206	83	80	88	69	121	88	97	93	98	
	1447	57	77	61	71	115	64	97	93	98	
	1736	81	69	66	129	150	98	97	95	98	
	2083	74	56	95	107	165	108	95	93	97	
	2500	165	63	95	112	141	64	93	93	94	
	3000	176	62	159	20	116	84	74	80	84	
	3600	-	-	-	-	-	-	10	22	6	

表2. Phase A における Bioassay 社の結果

Test chemical	Dose (mg/mL)	CD86 RFI			CD54 RFI			Cell viability			Judgement
		1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd	
DNCB	2.7	134	384	338	111	283	258	89	84	85	CD86 : 3/3 CD54 : 3/3 Positive
	3.2	147	510	409	102	383	276	89	80	85	
	3.9	181	597	505	156	506	370	85	76	80	
	4.6	235	752	658	200	634	364	79	71	74	
	5.6	224	690	799	200	719	744	79	69	68	
	6.7	241	542	672	354	906	1524	66	57	53	
	8.0	210	-	-	361	-	-	67	46	45	
	9.6	-	-	839	-	-	1380	43	28	53	
NiSO4	67	198	186	252	385	321	285	93	92	92	CD86 : 3/3 CD54 : 3/3 Positive
	80	208	186	291	550	308	431	92	91	90	
	96	269	236	298	839	524	841	91	90	86	
	116	195	242	348	1209	837	1406	87	87	82	
	139	99	255	320	1628	1306	1159	84	84	83	
	167	220	210	295	2909	1932	2035	80	82	76	
	200	198	209	267	3826	2656	3485	78	77	69	
	240	202	201	299	4978	3577	4711	72	73	60	
PAA	17	141	187	151	-180	525	782	92	92	92	CD86 : 3/3 CD54 : 3/3 Positive
	20	148	195	157	684	583	1321	90	92	91	
	24	177	218	190	727	708	1700	89	91	92	
	29	195	202	177	927	855	2213	86	90	84	
	35	244	260	140	913	923	1958	79	87	85	
	42	-	323	141	-	1193	2253	49	80	77	
	50	-	498	-	-	1547	-	18	55	21	
	60	-	-	-	-	-	-	11	47	17	
SLS	18	95	74	67	69	86	54	92	94	94	CD86 : 1/3 CD54 : 0/3 Negative
	22	92	81	89	70	65	57	91	94	95	
	27	90	85	44	85	91	64	90	94	94	
	32	246	92	101	43	94	86	90	93	92	
	38	88	97	124	59	97	113	91	88	82	
	46	79	-	-	93	-	-	69	36	37	
	55	66	-	-	31	-	-	90	13	4	
	66	102	-	-	69	-	-	84	7	6	
LA	1005	68	80	77	89	221	108	93	94	95	CD86 : 0/3 CD54 : 1/3 Negative
	1206	69	92	80	97	90	108	93	94	95	
	1447	64	72	65	108	89	103	93	94	95	
	1736	71	87	65	81	123	97	94	94	96	
	2083	68	72	43	110	132	79	93	94	96	
	2500	80	82	63	122	153	79	91	93	94	
	3000	79	118	74	86	239	61	81	88	92	
	3600	-	-	-	-	-	-	2	33	2	

E. 結論

h-CLATバリデーションにおいて、バリデーションphase B stage Iとして、9物質を用いた施設間再現性の検証が終了し、本年度までに、h-CLATの技術移転及び施設間再現性が良いことが確認できた。

F. 参考文献

1) Ashikaga T., Yoshida Y., Hirota M., Yoneyama K., Itagaki H., Sakaguchi H., Miyazawa Y., Ito Y., Suzuki H., Toyoda H., Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol, *Toxicology in Vitro*, **20**, 767-773, 2006.

2) Sakaguchi H., Ashikaga T., Miyazawa Y., Yoshida Y., Ito Y., Yoneyama K., Hirota M., Itagaki H., Toyoda H., Suzuki H., Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT) II. An inter-laboratory study of the h-CLAT, *Toxicology in Vitro*, **20**, 774-784, 2006.

3) 足利太可雄, 坂口齊, ヒト細胞株(THP-1)を用いた皮膚感作性試験代替法の開発と2施設間バリデーション, フレグランスジャーナル, 8, 108-111, 2004.

4) Ashikaga T., Sakaguchi H., Okamoto K., Mizuno M., Sato J., Yamada T., Yoshida M., Ota N., Hasegawa S., Kodama T., Okamoto Y., Kuwahara H., Kosaka N, Sono S and Ohno, Y., Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study, *AATEX*, **13** (1), 27-35, 2008

5) Kosaka N., Okamoto K., Mizuno M., Yamada T., Yoshida M., Kodama T., Sono S., Ashikaga T., Sato J., Ohta N., Hasegawa S., Okamoto Y., Kuwahara H., Sakaguchi H. and Ohno, Y., A study of the criteria for THP-1 cells selection in the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) : Results of 2nd Japanese Inter-laboratory Study, *AATEX*, **13** (2), 55-62, 2008.

6) Sono S., Yamada T., Kosaka N., Okamoto K., Mizuno M., Sato J., Yoshida M., Ota N., Kodama T., Okamoto Y., Kuwahara H., Sakaguchi H., Hasegawa S., Ashikaga T. and Ohno, Y., A study on serum difference on test results in the human Cell Line Activation Test (h-CLAT): Results of 3rd Japanese inter-laboratory study, *AATEX*, **13** (2), 63-69, 2008.

7) Mizuno M., Yoshida M., Kodama T., Kosaka N., Okamoto K., Sono S., Yamada T., Hasegawa S., Ashikaga T., Kuwahara H., Sakaguchi H., Sato J., Ota N., Okamoto Y.

- and Ohno, Y., Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results: Results of the 4th Japanese inter-laboratory Study, *AATEX*, **13** (2), 70-82, 2008
- 8) 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** (2), 71-80, 2010
 - 9) 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** (2), 81-88, 2010
 - 10) 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** (2), 89-96, 2010
 - 11) 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(6):343-53, 2011
- 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** (2), 81-88, 2010
- 3) 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** (2), 89-96, 2010
 - 4) 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(6):343-53, 2011
 - 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) 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.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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** (2), 71-80, 2010
- 2) Okamoto K., Kato Y., Kosaka N., Mizuno M., Inaba H., Sono S., Ashikaga T., Nakamura T.,

2. 学会発表

- 1) 大野泰雄：代謝物の安全性評価とFDA及びICHの指針について。第37回日本トキシコロジー学会シンポジウム(2010.6.17)
- 2) 大野泰雄：「動物の愛護及び管理に関する法律」(動愛法)の改定に向けて。日本動物実験代替法学会 第23回大会シンポジウムのオーガナイズ(2010.12.5)

- 3) 大野泰雄：薬理学における動物実験代替法研究の重要性。日本薬理学会(2010.3.23 誌上発表)
- 4) Ohno, Y., Japanese regulation for food safety and role of National Institute of Health Sciences. 1st Pan Asia Conference on Food & Drug Safety Assessment Policies and Regulations in Different Countries I (2011.4.15)
- 5) 大野泰雄、ICH M3(R2)ガイドラインへの経緯、日本毒性学会(2011,7.13)
- 6) 大野泰雄、MD試験および探索的INDをめぐる最近の国際的動向、APDD シンポジウム(2011.12.16)
- 7) 大野泰雄、安全性評価における動物実験と *in vitro* 代替法の利点および問題点、その現状について、東京都健康安全研究センター技術懇話会(2011.12.08)
- 8) Ohno, Y., Reliability of Data for New Drug Application in Japan –Non-GLP Tests–, Global Quality Assurance Conference (2011.11.15)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

国際協調を重視したバリデーシヨンの手順に関する研究

研究分担者 小島 肇 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部新規試験法評価室

研究要旨

本研究班では、研究期間内に国内で実施されたバリデーシヨン研究に参加した経験から、国際バリデーシヨンを進めるにあたっての手順やノウハウをまとめた。もっとも重要な点は、バリデーシヨン実行委員のモチベーション維持および数が十分で、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と考えられた。

キーワード：バリデーシヨン、動物実験代替法

A. 研究目的

動物実験の3Rs (Reduction: 実験動物の削減、Refinement: 実験動物の苦痛の軽減、Replacement: 実験動物の置き換え) を考慮した試験法を増やしていかなければならない欧米の状況を受け、化学物質等の安全性試験の公定化には厳密な国際ルールが作られている。昨今、代替法に関わらず、新規安全性試験法の行政的な受入れのためにはこのプロセスを踏まねばならない。ある試験法が公定化されるためには、研究・開発された試験法が論文に掲載されるだけでなく、まずバリデーシヨンが必要となる。この後にバリデーシヨンに関与していない専門家による第三者評価、行政的な受入れのための検討が必要となる。簡単なフローを図1に示すが、このような厳しい基準をクリアして新規試験法は行政的に認められるのである。

試験法の確立のためには、3つの試験法の主要素が存在する。

- 1) 作用機構および機能、既存の標的臓器
- 2) 最小限の対照物質
- 3) 適性かつ信頼性を確認できるデータの所在

この成立基準を満たした試験法が開発者または関係者からバリデーシヨンセンターに提案されてきた場合、一次評価がなされ、バリデーシヨンの必要性

が吟味される。承認された場合、予算が付いてバリデーシヨン実行委員会が組織され、バリデーシヨンが実施されるという手順を踏むことになる。

バリデーシヨンで明らかにすべきものを OECD ガイダンス文書 (GD) 34 から引用すると¹⁾、以下の3点が要素として挙げられる。

- 1) 施設内、施設間の再現性 (信頼性)
- 2) データの質
- 3) 適性 (感度、特異度、正確度、陽性の予測性、陰性の予測性、有用性、適用限界など)

上記の3要素を満たすために行うバリデーシヨンに必要な手順およびノウハウについて研究した。

B. 研究方法

本報告書をまとめる上で参考とした国際バリデーシヨンの一覧を表1に示す。本研究班でバリデーシヨ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のバリデーシヨンにおいても、実行委員会に参画したバリデーシヨン試験法をすべて参照にした。本研究班前に実施されているバリデーシヨンも参考になるが、日本人でのみによりバリデートされた試験法は表には挙げていない。