

- Usefulness of combined in vivo skin comet assay and in vivo skin micronucleus test. *Mutat Res.*, 743(1-2):42-52(2012)
48. Madoka Nakajima, Maya Ueda, Kohji Yamakage, Yuzuki Nakagawa, Munehiro Nakagawa, Wakako Ohyama, Takashi Omori, Norihide Asano, Makoto Hayashi, Yoshifumi Uno.: Tissue Sample Preparation for In Vivo Rodent Alkaline Comet Assay. *Genes & Environment*, 34(1): 50-54(2012)
49. Yu DY, Zhao QL, Furuta M, Todoriki S, Izumi K, Yamakage K, Matsumoto K, Nomura T, Kondo T.: Molecular mechanisms of apoptosis induction by 2-dodecylcyclobutanone, a radiolytic product of palmitic acid, in human lymphoma U937 cells. *Apoptosis*, 17(6):636-45(2012)
50. Honma M, Takahashi T, Asada S, Nakagawa Y, Ikeda A, Yamakage K.: In vitro clastogenicity and phototoxicity of fullerene (C60) nanomaterials in mammalian cells, *Mutation Res.*,749, 97-100 (2012)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 1 特許所得
- 特許出願（出願番号：2009-206686）、公開中（公開番号：2010-088426）

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

新規の安全性評価試験法を国際的なガイドラインするための手法に関する研究
分担研究報告書

バリデーションが終了した試験法の国際的な第三者評価

分担研究者 小島 肇 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長

研究要旨

日本で開発あるいはバリデーションが終了した試験法の内、1) 遺伝毒性試験 *in vivo* コメットアッセイ、2) 形質転換試験 Bhas42 アッセイ (Bhas 法)、3) 皮膚感作性試験 human Cell Line Activation Test (h-CLAT) および4) 眼刺激性試験 短時間曝露法 (STE 法) について、国際機関の協力を得て、専門家による第三者評価 (peer review) を実施し、h-CLAT を除く試験法で評価を終了した。これら試験法に関するテストガイドライン (TG) 案を OECD に提出し、各試験法の専門家会議で議論を行った。

キーワード：遺伝毒性試験、コメットアッセイ、形質転換試験、皮膚感作性試験、眼刺激性試験、代替法、バリデーション、第三者評価

分担研究者及び協力研究者の氏名・所属機関名及び所属機関における職名	足利 太可雄	資生堂株式会社 品質保証センター
宇野 芳文 田辺三菱製薬株式会社 研究本部 安全性研究所 第一部長	坂口 斉	株式会社 花王 安全性評価研究所 室長
林 真 食品医農薬安全評価センター センター長 (副理事長)	額田祐子	株式会社 花王 安全性評価研究所
森田 健 国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部 室長	吉村 功 大森 崇	東京理科大学 名誉教授 同志社大学文化情報学部 准教授
山影 康次 食品薬品安全センター 秦野研究所 部長		
佐々木澄志 食品薬品安全センター 秦野研究所	A. 研究目的	
田中 憲穂 食品薬品安全センター 秦野研究所 および鳥取県産業振興財団	OECD ガイダンス文書 (GD) No.34によれば、 新規試験法が行政的に受け入れられるためには、	

バリデーションを行い、施設間・施設内再現性を確認するとともに、予測性を明確にする必要がある。その後、バリデーションに関与しなかった専門家による第三者評価が必要となる。

本研究班ではバリデーションが終了した試験法がテストガイドラインとして行政的に受け入れられるよう、国際的な専門家による第三者評価 (peer review) を円滑に実施し、OECD テストガイドラインとすることを目指している。この理由として、2012年まで、日本が作成した健康影響に関するテストガイドライン (TG) はなかったことから、継続して日本の TG を構築するためである。

該当する試験法としては、1) 遺伝毒性試験 *in vivo* コメットアッセイ、2) 形質転換試験 Bhas42 アッセイ (Bhas 法)、3) 皮膚感作性試験 human Cell Line Activation Test (h-CLAT) および 4) 眼刺激性試験 短時間曝露法 (STE 法) が挙げられる。本研究では、これらの過程を通して、国際的な peer review システムを解析し、それを参考に日本における継続的な peer review システムを確立することを目指している。

B.研究方法

B-1) コメットアッセイ

本バリデーションは、厚生労働科学研究補助金事業(化学物質リスク研究事業:代表者 大野泰雄)の支援を受け、以下に示す組織による検討が平成 18 年 8 月に開始され、実験は平成 24 年 4 月に終了した。

Phase I から IV-2 に至るバリデーションが実施された。Phase III までで、プロトコルが固められ、phase IV-1 では施設内・施設間再現性が確認され、最終的な phase IV-2 では、合計 40 の被験物質を 14 施設に配布し、予測性が検討された。

B-1-1)OECD による peer review 報告書

OECD コメットアッセイ専門家会議の委員からの有志により peer review が実施された。日本からの参加はなかった。

B-1-2)OECD 専門家とともに、TG 案の協議

日本のバリデーション結果をもとに作成された TG 案 (昨年度 OECD に提出) をもとに、専門家間で議論が進んだ。直面会議は開催されなかったが、何回もの電話会議およびメールにより、意見調整がなされた。

B-2)形質転換試験 Bhas42 アッセイ (Bhas 法)

本試験は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の支援を受け、以下に示す組織による検討が平成 21 年 1 月にバリデーションが開始され、実験は平成 23 年 9 月に終了した²⁾。

B-2-1)ECVAM による peer review 報告書

EURL ECVAM (欧州動物実験代替法評価センター) 科学諮問会議 (ESAC) にて選ばれたワーキンググループにより peer review が実施された。日本から筒井健機氏 (日本歯科大) が協力した。

B-2-2)OECD 専門家とともに、TG 案の協議

TG 案は平成 25 年 9 月に OECD に提出した。OECD による第一次コメンティングラウンドに対応して、TG 案を平成 26 年 1 月に改訂した。

Bhas アッセイおよび形質転換試験 SHE アッセイに関する直面会議が平成 26 年 1 月に OECD 本部 (パリ) で開催され、改訂 TG 案に関する議論がなされた。

B-3) 皮膚感作性試験 h-CLAT

本試験法は、EURL ECVAM でバリデーションが実施された。厚生労働科学研究補助金事業(化学物質医薬品・医療機器総合研究事業:代表者 大野泰雄)³⁾でも日本の参加施設 (資生堂および花王) への支援を行ってきた。本バリデーションの終了を受け、日本の統計学者がデータ解析報告書を作成した。

EURL ECVAM による peer review は平成 25 年夏より実施されている。日本からの協力者はいない。

評価の過程で、以下の課題が未決のままであることから EURL ECVAM から調査依頼を受けた。h-CLAT の文献 (100 物質 : 表 1) とバリデーション試験 (24 物質 : 表 2) の正確性が 72% と 59% で異なったことである。この理由に対して、試験法開発者および日本の統計学者とともに検討した。

表 1. 文献による 100 物質の 3X3 表

		h-CLAT Category			Total
		1A	1B	NS	
GHS	1A	19	8	3	30
	1B	4	32	6	42
	NS	0	7	21	28
Total		23	47	30	100
Concordance rate =					72

Concordance rate (72/100)	0.72
---------------------------	-------------

表 2. ECVAM バリデーション 24 物質による 3X3 表

		h-CLAT			Total
		1A	1B	NS	
GHS	1A	8	9	3	20
	1B	0	10	6	16
	NS	0	4	14	18
Total		8	23	23	54
Concordance rate = 32/54 = 0.593					

B-4) 眼刺激性試験 短時間曝露法 (STE 法)

本試験法は、日本動物実験代替法学会において、施設内・施設間再現性を確認するためのバリデーションが実施された。さらに、厚生労働科学研究補助金事業(医薬品医療機器総合研究事業 : 代表者小島 肇)⁴⁾の支援を受け、予測性を検討するバリデーションが実施された。バリデーション報告書に加え、背景評価報告書は厚生労働科学研究委託

事業において、JaCVAM と花王により作成された。B-4-1)ICCVAM (米国動物実験代替法に関する省庁間連絡会議) による peer review 報告書

日本のバリデーション結果のみならず、花王の背景データまで加えた事前資料を用い、peer review が実施された。日本から、山影康次氏 (食薬センター) が協力した。

B-4-2) OECD による TG 案の協議

TG 案は平成 25 年 5 月に OECD に提出した。OECD による第一次コメントングラウンドが 7 月に、第二次コメントングラウンドが 12 月に実施された。

B-5) 国際 peer review の比較検証

今年度実施された国際 peer review コメントアッセイ、Bhas 法および STE 法に関する実施システムを解析した。

(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) コメントアッセイ

C-1-1) OECD による peer review 報告書

日本のバリデーション結果をもとに作成された評価報告書が平成 26 年 1 月に公開された (添付資料 1)⁵⁾。以下に概要を示す。

Peer review パネルは、バリデーションのデータは十分であり、このバリデーションにより、*in vivo* コメントアッセイのプロトコルが改良され、TG の開発を促したと結論した。しかし、review に当たり、追加議論や追加データの収集が必要としている。

もっとも大きな懸念事項は、以下に示すバリデーションの質である。

- ・施設内および施設間再現性結果が不十分
- ・濃度選定基準、中央値または平均値の利用、データ解釈の評価または影響、統計解析を含むい

くつかの試験パラメーター確認の必要性；すべての基準が結果、解釈および／または結論に大きな影響をもつ；いくつかのパラメーターは史料の構築および利用に影響する

- ・ 使用された臓器数の限界
 - ・ 雄のみで実施されたバリデーションにおける性差の限界
 - ・ 不定期 DNA合成試験を越える試験であるかの確認
- パネルは以下のバリデーション作業に同意した。
- ・ TGの中に胃の利用は推奨されるべきではない。ばらつきが大きい。
 - ・ バリデーションの結果で、クロスリンク物質の検出はできないとされた。
- これらの限界はTGに記載する必要がある。

さらに、パネルは以下のように考察した。DNAに残る突然変異、発がん、他の病気につながる可能性が高い *in vivo* DNA損傷のすべての型を検出できない。すなわち、発がん性試験の単一予測試験として使用できない。しかし、バッテリーの一部としては有用である。パネルは行政的な利用の変更を推奨する。

バリデーションの範囲は、測定された臓器、種、性に限定される。バリデーション実験はTGの広範な範囲を適用できないので、パネルは文献データからラット以外の種や、雄以外の性の結果を調べ、TGに反映させることを検討した。

この試験法のバリデーション基準は一部を満たしているが、以下の追加情報が必要であることに全パネルが同意した。

- ・ 施設内/施設間再現性
- ・ 施設間で観察されたばらつきを減らすため、および施設内再現性を上げるため、平均か中央値どちらを用いるかの確認
- ・ バリデーションで用いられなかった、十分に評価されなかった物質の解析による適用限界の設定
- ・ 他の臓器やマウス、雌に関する範囲の拡大

- ・ 作用機構の記載

C-1-2)OECD 専門家とともに、TG 案の協議

当初は日本のバリデーション結果をもとに日本で作成された TG 案をもとに、議論が進んでいたが、peer review からの提案を受け、バリデーションの結果以外の、種々の条件（性差、匹数、観察細胞数など）が追加された。この TG 案について専門家間で合意が得られ、平成 26 年 4 月に開催される OECD WNT（ナショナルコーディネーター）会議において承認される可能性が高くなった。

C-2) 形質転換試験 Bhas 法

B-2-1)EURL ECVAM による peer review 報告書

日本のバリデーション結果をもとに作成された評価報告書および EURL ECVAM の推薦書が平成 25 年 11 月に発行された（添付資料 2）⁶⁾。概要を以下に示す。

2011 年に食品薬品安全センター秦野研究所（FDSC）は発がん性試験である Bhas 形質転換試験（Bhas 法）のバリデーション研究を終了した。Bhas法のバリデーションは、2つの類似の試験法プロトコル（6ウェル法および96ウェル法）で実施された。バリデーションはNEDOの資金および、JaCVAMの支援により実施された。JaCVAMの要請により、EURL ECVAMがESAC（ECVAM科学諮問委員会）によるreviewを2013年12月に終了した。ESAC 以下のような推奨を行った。

- 1) すでにバリデートされた *in vitro* 形質転換試験と同様に⁷⁾、Bhas法は、化学物質の発がん性の可能性を予測することを目的としている。バリデーションと他の公開物をもとに、両プロトコルとも標準化されており、技術移転性、施設間再現性、発がん予測性も十分と考察された。さらに、Bhas法は腫瘍イニシエーターかプロモーターかの情報も提供できる。
- 2) 発がん作用機構の複雑さおよび *in vitro* の本質的な限界（*in vitro* モデルおよび代謝能の限界な

ど)を考慮すると、Bhas法のみでは使用できず、他の情報と併せて有害性評価を行うべきである。形質転換試験法は、化学物質の分類や既存情報の利用など、証拠の重さ (Weight of Evidence : WoE) アプローチ や試験の組み合わせ戦略 (Integrated Testing Strategy : ITS)で評価されるべきである。

3) 行政的な状況および試験実施に関わらず他の情報に依存して、形質転換試験により集められた化学物質に関する情報は、政策決定にとっても充分であり、動物実験を避ける特異な例につながる可能性もある。しかし、形質転換試験データの利用および関連性は、今後も変わりうる可能性がある。それゆえ、他の形質転換試験と同様、他の情報が利用可能なら、Bhas法は発がん性の有害性同定およびリスク評価の動物実験を部分的な置き換え、または削減に寄与できると考えられる。

4) Bhas 法は、細胞株を用いているので、試験システムに必要とされる実験動物が不要であり、初代シリアンハムスター胎児細胞を用いる SHEアッセイのような他のバリデートされた形質転換試験 よりも 3Rsの観点から有益である。

5) Bhas法の96ウェルバージョンは、ハイスループットの開発につながる可能性がある。これをなすためには、自動的なイメージまたは転換細胞のスコア化が確立されねばならない。

6) Bhas法は、発がん可能性の評価に叶う信頼性と適性を持っており、WoE および ITSアプローチの中で有望である。EURL ECVAM はOECD TGとして、6ウェルおよび 96ウェルバージョンの両方が 開発されることを推奨する。

7) Directive 2010/63/EUの規定⁸⁾によれば、化学物質の発がん性評価のために動物実験に着手する前に、形質転換試験が動物実験を減らすか、避けるための補完情報が必要である。REACH規制のように、形質転換試験の行政的な利用と

は異なるが、Bhas 法や他の形質転換試験 (例えば、SHE アッセイ)のような試験法のデータも、WoE判断に必要とされる標準情報として適用されるべきである。

B-2-2)OECD 専門家とともに、TG 案の協議

直面会議は、Bhas アッセイの前に、類似法である SHE アッセイを TG とすることに重点がおかれた内容であった。Bhas アッセイの TG 案は先行している SHE アッセイ TG の影響を大きく受けると考えられる。

C-3)皮膚感作性試験 h-CLAT

文献結果とバリデーション結果の正確性の違いを検討した結果、GHS 分類に関する 2つのデータセットの予測性の違いは、強度分類数の相違と溶解性の割合が異なっていたためと結論できた。強度分類比 (GHS 分類 1:2 : 表示なし) は、文献では 30 : 42 : 28 (1.1 : 1.5 : 1) 、バリデーションでは 20 : 16 : 18 (1.1 : 0.8 : 1) と、文献では GHS 分類 2 の物質の比が大きい。溶解性の指標として、LogKow3.5 を基準として考えると、文献では 100 物質中、3.5 以上が 4 物質 (4%) しかなかったのに対し、バリデーションでは 24 物質中 4 物質 (17%) あった。バリデーションではこれら物質が繰り返して行われており、54 データ中、16 データ (30%、4 物質は 3 回実施)であった。h-CLAT では難水溶性物質の評価が難しいと言われており、正確性の違いはこれらに起因する可能性が高いと考察できる。

以上のような状況にあり、EURL ECVAM による peer review 報告書は審議中であり、まだ完成していない。

C-4) 眼刺激性試験 短時間曝露法 (STE 法)

C-4-1)ICCVAM による peer review 報告書

日本のバリデーション結果のみならず、花王の背景データまで加えた事前資料を用いた評価概要報告書となった(添付資料3)⁹⁾。

短時間曝露法 (STE) は眼刺激性を検出する *in vitro* 試験である。本方法は、高橋ら¹⁰⁾により開発され、被験物質の5分間暴露を通してウサギ角層細胞株 (SIRC 細胞) の細胞毒性試験を評価する。2011年3月、花王は背景評価報告書 (BRD) “Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Irritants: Short Time Exposure (STE) Test” を米国毒性プログラム (NTP) 動物実験代替法評価センターに提出した。NICEATM はBRDを初期評価し、追加情報を要求し、数回BRDを改訂した (最終版2012年5月)。BRDは第三者評価に利用できる文献、花王のin-houseデータおよび正確性と再現性を評価するバリデーション報告書に関するすべてのデータおよび情報を含む。この評価概要書はSTE法の *in vivo* データと比較した正確度、特異度、偽陽性率、偽陰性率を示している。この評価は、眼刺激性の有害性を区分する Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS; UN 2011) および U.S. Environmental Protection Agency (EPA 2012) classification systems を基本としてトップダウンアプローチおよびボトムアップアプローチでなされた。トップダウンアプローチでは、STE法はすべての有害性分類の中で、強い眼刺激性/腐食性を分類できた。他の追加試験を追加しないで、強い眼刺激性/腐食性を同定できると考えられた。ただし、トップダウンアプローチの偽陰性率は低かった。偽陰性率は分類に寄与しないが、その理由は、STE法の陰性物質は他の試験法で補完されるからである。

対照的に、ボトムアップアプローチではすべての有害性分類の中から眼刺激性でない物質を分類する。ボトムアップアプローチで陽性の物質は、適切な有害性分類のためには追加試験が必要であ

る。ボトムアップアプローチではGHS分類なしとEPA分類IVにおける誤った眼有害性同定を避けるため、低い偽陰性率が求められる。偽陽性率は分類に寄与しない。その理由は、陽性物質は他の試験法で補完されるからである。STE法のボトムアップアプローチにおける偽陰性率は、GHS分類12.3% (9/73)、EPA分類24.7% (24/97) であり、他の追加試験法が必要である。適用限界が、ボトムアップアプローチにおいてGHSおよびEPA分類の偽評価を減らすために検討された。

適用限界を見つめるため、化学物質の分類および物性で解析された。結果として、2つの適用限界が提案された。一つは、蒸気圧 ≥ 6 kilopascals (kPa) の液体および固体のアルコール、炭化水素、塩を除くことであり、その解析により、GHSおよびEPA分類それぞれで偽陰性率は2% (1/49) and 21% (14/68) となった。二つ目は、蒸気圧 ≥ 6 kilopascals (kPa) の液体および固体の界面活性剤である。GHSおよびEPA分類それぞれで偽陰性率は1.9% (1/54) および18% (13/73) に減少した。

C-4-2) OECDによるTG案の協議

OECDによる第一次コメンティングラウンドへの回答および改訂TG案を平成25年11月にOECDに送った。第二次コメンティングラウンドによるコメントを平成26年2月に受け取り、さらなる改訂作業を進めている。

C-5) 第三者評価の検証

国際機関の協力を得て、peer review を実施し、h-CLATを除く試験法に関するreview報告書が完成した。表3にこれら試験法の作業過程を示している。さらに、これら報告書完成に至る経緯概要および長短所を表4にまとめた。いずれも優れたpeer review報告書であるが、その進め方には一長一短がある。現状では、OECDの進め方が最も日本に導入しやすいと見ている。

表3. 本研究が取り扱う試験法とガイドライン化にいたる作業過程

試験法	分類	研究・開発	バリデーショ ン	Peer review	TG 案	成立予定
<i>in vivo</i> コメ ットアッセイ	遺伝毒性		日本環境変異 原学会 /JaCVAM	OECD 遺伝毒 性の専門家	日本	2014
Bhas 法	発がんスク リーニング	食薬センター	NEDO	ECVAM	日本	2015?
STE 法	眼刺激性	花王	日本動物実験 代替法学会 /JaCVAM	ICCVAM	日本	2015?
h-CLAT	皮膚感作性	花王・資生堂	ECVAM	ECVAM	??	2016?

赤枠：日本で実施

表4. 本研究と取り扱う国際第三者評価の比較

	OECD (コメットアッセ イ)	ICCVAM (STE 法)	ECVAM (Bhas 法)
事前準備	バリデーション報告書およ び ICH 共同研究報告書	バリデーション報告書おと び花王の背景データ	バリデーション報告書およ び関連論文
評価システム	事前資料をもとに、メール および電話会議後に報告書 作成	事前資料をもとに、メールお よび電話会議後に報告書作 成	Working Group での議論、 その後、ESAC が意見書を追 加
人選	専門家会議での公募	ICATM 推薦および NICEATM 選出	ICATM 推薦および ECVAM 選出
人数	7名	10名前後	4名
長所	設問が適切で長さも手ごろ である。期間も半年ほどで 適度。	適切な長さでまとめられて いる。設問もわかりやすい。	種々の国際的な委員が step を経て review している。
短所	第三者評価報告書を作成し ながら、TG 案が議論され た。	Review 開始までの資料準備 が長過ぎる (1年)。直面会議 が開催されず、委員間の意見 が揉まれていない。	全体が 1.5 年程かかり評価期 間が長すぎる。

D. 考察

本報告書に示した 4 試験法は、いずれも OECD, EURL ECVAM、ICCVAM などの国際機関により、peer review が実施された。これら試験法に関する TG 案をもとに、各試験法の専門家会議で議論を行い、結果として、*in vivo* コメットアッセイの TG 案について専門家間で合意が得られ、本年 4 月に開催される OECD WNT 会議において承認される可能性が高くなった。

まだ終了していない h-CLAT の peer review も含め、種々の国際的な peer review を通して、欧米の方法をまとめ、それをもとに日本における適切な peer review の方法を来年度までに提案したいと考えている。

E. 結論

日本で開発あるいはバリデーションが終了した試験法である 1) 遺伝毒性試験 *in vivo* コメットアッセイ、2) 形質転換試験 Bhas 法、3) 皮膚感作性試験 h-CLAT および 4) 眼刺激性試験 STE 法について、国際機関の協力を得て、peer review を実施した。h-CLAT を除く試験法に関する peer review を終え、これら試験法の TG 案を OECD に提出した。その中で、*in vivo* コメットアッセイの TG 成立の目途がたった。

F 参考文献

- 1) 国際協調により公的な試験法を確立するための手順に関する研究(2011 年度報告書) Available at: <http://research-er.jp/projects/mhlw/view/201133004/>
- 2) 平成 18 年度～平成 22 年度成果報告書 高機能簡易型有害性評価手法の開発 培養細胞を用いた有害性評価手法の開発 ハイスループット発がん性予測試験法の開発 (H18～H22) Available at:

http://www.nedo.go.jp/library/seika/shosai_201107/20110000000806.html

- 3) 動物実験代替法を用いた安全性評価体制の確立と国際協調に関する研究(2008 年度報告書) Available at: <http://research-er.jp/projects/mhlw/view/200838021/>
- 4) 国際協調を重視した化粧品・医薬部外品における安全性試験法の再評価に関する研究 (2012 年度)
- 5) DRAFT SUMMARY REPORT OF THE PEER REVIEW PANEL ASSESSING THE JACVAM INITIATIVE INTERNATIONAL VALIDATION STUDIES OF THE *IN VIVO* RODENT ALKALINE COMET ASSAY FOR THE DETECTION OF GENOTOXIC CARCINOGENS, Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/Comet%20assay%20draft%20peer%20review%20report.pdf#search=oeed+comet+review>
- 6) EURL ECVAM Recommendation on the Cell Transformation Assay based on the Bhas 42 cell line , Available at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-cell-transformation-assay-based-on-the-bhas-42-cell-line
- 7) EURL ECVAM Recommendation concerning the Cell Transformation Assays (CTA), Available at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/cta-recommendation
- 8) DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes, Available at: , <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=>

- 9) ICCVAM (2013)-Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Available at: http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf
- 10) Takahashi Y, Koike M, Honda H, Ito Y, Sakaguchi H, Suzuki H and Nishiyama N. (2008), Development of the short time exposure (STE) test: an in vitro eye irritation test using SIRC cells., *Toxicol. In Vitro* 22:760-770.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 小島 肇夫: 技術講座 安全性評価試験 (18) 遺伝毒性試験－組合せ、COSME TECH JAPAN, 3 (4) 74-77 (2013)
- 2) 小島 肇夫: 経皮吸収型製剤の安全性を考える、ファルマシア、49(5)、415-419 (2013)
- 3) 小島 肇夫: 技術講座 安全性評価試験 (19) 遺伝毒性試験－エイムス試験、COSME TECH JAPAN, 3 (5) 82-85 (2013)
- 4) 小島 肇夫: 動物実験代替安全性試験プロトコル集、シーエムシー出版、3- 10 (2013)
- 5) 小島 肇夫: 技術講座 安全性評価試験 (20) 遺伝毒性試験－哺乳類の培養細胞を用いる試験、COSME TECH JAPAN, 3 (6) 72-77 (2013)
- 6) 小島 肇夫: 機能性化粧品と薬剤デリバリー、シーエムシー出版、22- 27 (2013)
- 7) Kojima H, Hayashi K, Sakaguchi H, Omori T, Otoizumi T, Sozu T, Kuwahara H, Hayashi T, Sakaguchi M, Toyoda A, Goto H, Watanabe S, Ahiko K, Nakamura T, Morimoto T.: Second-phase validation study of short time exposure test for assessment of eye irritation potency of chemicals., *Toxicology In Vitro*, 27(6), 1855-69 (2013)
- 8) 小島 肇夫: 技術講座 安全性評価試験 (21)

- 遺伝毒性試験－げっ歯類を用いる小核試験、COSME TECH JAPAN, 3 (7) 116-120 (2013)
- 9) 小島 肇夫: 技術講座 安全性評価試験 (22) ウサギを用いる眼刺激性試験、COSME TECH JAPAN, 3 (8) 67-71 (2013)
- 10) 小島 肇夫: 化粧品・医薬部外品およびその原料の安全性評価と規格・試験法設定、サイエンス&テクノロジー、29-65 (2013)
- 11) Yamaguchi H, Kojima H, Takezawa T: Vitrigel-Eye Irritation Test Method using HCE-T cells, *Toxicological Sciences*, 135(2), 347-55 (2013)
- 12) 小島 肇夫、技術講座 安全性評価試験 (23) 実験動物を用いる皮膚刺激性試験、COSME TECH JAPAN, 3 (9) 81-84 (2013)
- 13) 小島 肇夫: In vitro 毒性・動態評価の最前線、シーエムシー出版、1-7 (2013)
- 14) Kojima H, Katoh M, Shinoda S, Hagiwara S, Suzuki T, Izumi R, Yamaguchi Y, Nakamura M, Kasahawa T and Shibai A : A catch-up validation study of an in vitro skin irritation test method using reconstructed human epidermis LabCyte EPI-MODEL24, *Journal of Applied Toxicology*, (2013)
- 15) 小島 肇夫: 技術講座 安全性評価試験 (24) 実験動物を用いる連続皮膚刺激性試験、COSME TECH JAPAN, 3 (10) 22-25 (2013)
- 16) 小島 肇夫: 技術講座 安全性評価試験 (25) 実験動物を用いる皮膚一次刺激性試験、COSME TECH JAPAN, 3 (11) 36-39 (2013)
- 17) 小島 肇夫: 日本動物実験代替法学会バリデーション委員会とJaCVAM、日本動物実験代替法学会 第25回大会記念誌、27-34 (2013)
- 18) 小島 肇夫: 経皮吸収性の試験法と評価法、株式会社 情報機構、1-54 (2013)
- 19) 小島 肇夫: 技術講座 安全性評価試験 (26) 実験動物を用いない眼刺激性試験、COSME TECH JAPAN, 3 (12) 44-48 (2013)

- 20) Stokes W, Srinivas G, McFarland R, Kulpa-Eddy J, Casey W, Walker A, Draayer H, Sebring R, Brown K, Balks E, Stirling C, Klaasen E, Hill R, Rippke B, Ruby K, Alt D, Mukhopadhyay S, Kojima H, Johnson N, Rinckel L, Doelling V, Jones B.: Report on the international workshop on alternative methods for *Leptospira* vaccine potency testing: state of the science and the way forward., *Biologicals*, 41 (5), 279-94 (2013)
- 21) Onoue S, Hosoi K, Toda T, Takagi H, Osaki N, Matsumoto Y, Kawakami S, Wakuri S, Iwase Y, Yamamoto T, Nakamura K, Ohno Y, Kojima H: Intra-/inter-laboratory validation study on reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation using two different solar simulators., *Toxicology In Vitro*, 28(4), 515-523 (2013)
- 22) Kojima H: Update from the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM)., *Alternatives to Laboratory Animals*, 41(6), 435-441(2013)
- 23) 小島 肇夫: 技術講座 安全性評価試験 (27) 生殖毒性試験、COSME TECH JAPAN, 4(1) 70-74 (2014)
- 24) 小島 肇夫: 技術講座 安全性評価試験 (28) 動物実験代替法を巡る動向 2013 年、COSME TECH JAPAN, 4 (2) 36-42 (2014)
- 25) 小島 肇夫: 動物実験代替法を用いた「これからの化粧品・医薬部外品の安全性評価とその根拠の示し方」、COSMETIC STAGE、8 (3) 1-8 (2014)
2. 口頭発表
- 1) 小島 肇: シンポジウム 8 : in vitro を用いた創薬安全性評価とその外挿性、in vitro によるスクリーニング (総論)、第 40 回日本毒性学会 学術年会、2013 年 6 月 17-19 日、幕張メッセ
- 2) 山口宏之、小島 肇、竹澤俊明: Vitrigel-EIT 法: ヒト角膜上皮組織シート型培養モデルをもちいた高感度な in vitro 眼刺激性試験、第 40 回日本毒性学会 学術年会、2013 年 6 月 17-19 日、幕張メッセ
- 3) 川上哲、尾上誠良、松本康浩、戸田嗣人、大崎尚人、若栗忍、岩瀬裕美子、山本敏誠、高木広憲、中村和市、細井一弘、小島 肇: 医薬品の光毒性ポテンシャル評価のための ROS アッセイバリデーション試験、第 40 回日本毒性学会学術年会、2013 年 6 月 17-19 日、幕張メッセ
- 4) 内野正、竹澤俊明、山下邦彦、小島 肇、清水久美子、秋山卓美、五十嵐良明: Vitrigel-EIT 法: ヒト角膜上皮組織シート型培養モデルをもちいた高感度な in vitro 眼刺激性試験、第 40 回日本毒性学会 学術年会、2013 年 6 月 17-19 日、幕張メッセ
- 5) 小島 肇: 日本での皮膚感作性代替法開発状況について、皮膚感作性試験ワークショップ、2013 年 7 月 12 日、日本化学工業協会
- 6) Kojima H: Workshop: Alternative Test Methods and International Regulatory perspectives, JaCVAM: Recent Progress and Future Plans for the Validation and Acceptance of Alternative Testing in Japan, The XIII International Congress of Toxicology, June 30-July 4, 2013, COEX, Seoul, Korea
- 7) Morita T, Kojima H, Hayashi M: General Principles of Chemical Selection for in vivo, Validation Studies, The International Symposium of the Center of Alternative Methods for Safety Evaluation of Cosmetics, July 2, 2013, COEX, Seoul, Korea
- 8) Kojima H: Our Practical Examples of International Validation Studies for Establishing OECD Test Guidelines , The International Symposium of the Center of Alternative Methods for Safety Evaluation of Cosmetics, July 2, 2013, COEX, Seoul, Korea
- 9) 小島 肇: 代替法の国内外の動向、皮膚基礎研究クラスターフォーラム、2013 年 8 月 1 日、亀戸文化センター

- 10) 小島 肇：動物実験代替法の国内外の動向と化粧品・医薬部外品の規制、日本化粧品技術者会 大阪支部 勉強会、2013年8月30日、薬業年金会館
- 11) 小島 肇：代替法の最新情報、動物実験についての知識を高めるための教育訓練 2013年9月11日、農研機構 中央農業総合研究センター
- 12) Kojima H, Oshimura M, Saito K, Saito F and Imatanaka N : Japanese Project “ARCH-Tox” for the Future Chemicals Management Policy: Research and Development of in vitro and in vivo Assays for Internationally Leading Hazard Assessment and Test Methods, 15th Annual Congress of European Society for Alternative to Animal Testing, 2013年9月17日、リンツ (オーストリア)
- 13) Kojima H, Stokes W, Horii I, Hwan K.B and Spielmann H, Peer Review Panel Evaluation of the ROS Photosafety Assay, 15th Annual Congress of European Society for Alternative to Animal Testing, 2013年9月15日、リンツ (オーストリア)
- 14) 小島 肇：in vitro 探索毒性試験の展望、日本薬物動態学会 第28回年会シンポジウム9、2013年10月10日、東京
- 15) 小島 肇：三次元培養モデルの現状と可能性、株式会社ニコゲームリサーチ 創立10周年記念特別講演会
- 16) 小島 肇：動物を用いないで医薬部外品の承認申請を取ることは可能か？、日皮協 会員研修会、2013年10月24日、京都
- 17) Kojima H, Oshimura M and Imatanaka N : Japanese Project “ARCH-Tox” for alternative to 28-day repeated dose oral toxicity study) , 10th annual Meeting of KSAAE (Korean Society of Alternative Animal Experiments) , 2013年11月6日、韓国中央大学
- 18) 小島 肇：昨今の皮膚毒性評価法の動向、安
- 全性評価研究会 安全性評価研究会 2013年冬のセミナー、平成25年12月7日、住友ベークライト、東京
- 19) 小島 肇：J a C V A M国際シンポジウム：日本動物実験代替法学会の活動、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
- 20) 小島 肇：シンポジウム4：動物実験代替法の化粧品規制に関する現状、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
- 21) 小島 肇：ランチョンセミナー：動物実験代替法開発における課題とカイコの可能性、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
- 22) 内野 正、清水 久美子、竹澤 俊明、山下邦彦、小島 肇、秋山 卓美、五十嵐 良明：ビトリゲルチャンバーを用いた皮膚感作性試験代替モデル (下面暴露法)、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
- 23) 木村 裕、藤村 千鶴、渡辺 美香、齋藤 るみ子、鈴木 紀之、岩城 知子、山影 康次、齋藤 幸一、中島 芳浩、近江谷 克裕、酒井 綾子、丸谷 あおい、大森 崇、山崎 晶次郎、小島 肇、田中 憲穂、相場 節也：IL-8 Luc assay の施設間差試験およびデータセットの作製、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
- 24) 丸谷 あおい、相場 節也、木村 裕、渡辺 美香、鈴木 紀之、岩城 知子、山影 康次、齋藤 幸一、中島 芳浩、近江谷 克裕、山崎 晶次郎、小島 肇、田中 憲穂、小林眞弓、森 梓、大森 崇：IL-8 Luc assay におけるばらつきを考慮した班手基準の提案、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
- 25) Kojima H, Stokes W, Horii I, Hwan K.B. and

- Spielmann H : Peer Review Panel of the Japanese validation study of the ROS in vitro phototoxicity for ICH、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
- 26) 加藤 義直、山本 直樹、佐藤 淳、中田 悟、小島 肇 : 不死化ヒト角膜上皮細胞株 (iHCE-NY) を用いた三次元角膜再構築モデルの作製、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
- 27) 古川 正敏、榊原 隆史、六川 潤美、伊藤浩太、佐々木 啓、平賀 武夫、小島 肇、松浦 正男 : 牛角膜を用いた混濁度および透過性試験法 (BCOP 法) における被験物質の濃度および曝露時間の影響、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
- 28) 大森 崇、簾内 桃子、池田 英史、中村 香織、鄭 美淑、山影 康次、萩野 滋延、小島 肇 : SIRC-CVS 試験を用いた眼刺激性評価代替法の国際バリデーション研究 (II)、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
- 29) 小島 肇、Nicole Kleinstreuer、Chae-Hyung Lim、寒水 孝司、渡辺 美香、新妻 健、山下 邦彦、福田 隆之、山口 典子、藤原 聖、山口 宏、竹澤 俊明 : Vitrigel-EIT (Eye Irritancy Test) 法のプレバリデーション研究、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
- 30) 成田和人、石原有人、小島 肇、板垣 宏 : 培養細胞を用いた試験における難水溶性物質の暴露方法の検討、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
- 31) 古川 正敏、榊原 隆史、六川 潤美、伊藤浩太、佐々木 啓、平賀 武夫、小島 肇、松浦 正男 : 牛角膜を用いた混濁度度および透過性試験法 (BCOP法) における病理組織学的検査、第30回日本毒性病理学会総会および学術集

会、平成26年1月30、31日、あわぎんホール (徳島)

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

添付資料1 : DRAFT SUMMARY REPORT OF THE PEER REVIEW PANEL ASSESSING THE JACVAM INITIATIVE INTERNATIONAL VALIDATION STUDIES OF THE IN VIVO RODENT ALKALINE COMET ASSAY FOR THE DETECTION OF GENOTOXIC CARCINOGENS

添付資料2 : EURL ECVAM RECOMMENDATION on the Cell Transformation Assay based on the Bhas 42 cell line

添付資料3 : Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document

厚生科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

分担研究報告書

内分泌かく乱化学物質試験法のバリデーション

研究分担者 小野 敦 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室

研究要旨

本研究では、OECD-EDTA で提案された化学物質の内分泌かく乱性評価のコンセプトフレームワークのレベル2に示されている *in vitro* スクリーニング試験法のうち、行政的有用性が期待される 2 試験法について、国内外の研究機関との協力により多施設国際バリデーションを実施し、得られた結果より信頼性・再現性の評価を行い OECD ガイドライン提案を行うことを目的とした研究を進めている。我が国で開発された HeLa9903 細胞を用いたエストロゲン受容体 α (ER α) 転写活性化試験法 (HeLa 法) のアンタゴニスト試験法バリデーションでは、幾つかの施設で定量的評価のためのリファレンスクライテリアの逸脱が解消出来なかったものの、得られた結果の解析により、コード化化学物質の定性的判定についての信頼性が示されたことから、定性的評価法としてガイドライン提案することが SMT 及び OECD VMG-NA 会議にて合意された。一方、アンドロゲン受容体転写活性化法として我が国で開発された AR EcoScreen 法については、VMG-NA メンバーの協力により選定された被験物質を用いて、SMT を組織して試験計画を策定し、国内外 4 施設におけるバリデーション測定を本年度内にほぼ終了し、非常に再現性の良い結果を得た。いずれの系についても、得られた結果をもとに、来年度、バリデーションレポート及び OECD ガイドライン案を取りまとめ OECD 事務局に提出する予定をしている。

A. 研究目的

本研究では、化学物質による内分泌かく乱性評価のための国際的な枠組みとして OECD 内分泌かく乱物質評価タスクフォース (EDTA : Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment) により示された 5 段階からなるコンセプトフレームワークのレベル2に分類される *in vitro* 試験法である転写活性化試験法のうち、行政的有用性が期待される試験法として、我が国で開発された HeLa 細胞

をベースにしたエストロゲン受容体 α (ER α) に対する試験法 (HeLa 法) 及びアンドロゲン受容体に対する転写活性化試験法である AR EcoScreen 法について、国内外の研究機関と協力してバリデーション試験を実施し、得られた結果から信頼性や再現性が確認された手法について、最終的に OECD ガイドラインとして提案することを目的としている。

B. 研究方法

1、HeLa9903 細胞を用いたエストロゲン受容体(ER)アンタゴニスト測定法バリデーション試験：

HeLa 法は、ヒト由来の細胞(HeLa 細胞)に、ヒトエストロゲン受容体 ER α 遺伝子およびエストロゲン応答配列と繋いだルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして組み込んだ安定形質株 (HeLa-9903) を用いたレポーター遺伝子アッセイ法である。本法は、厚生労働省および経済産業省における研究により開発された。本法によるアゴニスト活性評価法については、国内における多施設バリデーション結果を基に、2009 年に OECD ガイドライン化 (OECD TG455) されており、本研究では、TG455 ガイドライン化にあたり OECD より要求されたアンタゴニスト活性評価法のガイドライン化に向けたバリデーション試験を実施している。これまでに、国立医薬品食品衛生研究所 JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) が中心となり JaCVAM、UK-PHE (UK-PHE の SMT メンバーは、開始当初は ECVAM に所属) 及び米国 EPA の専門家、及び生物統計専門家として寒水孝司博士(京都大学) を含むメンバーからなる Study Management Team (SMT) を組織し、3 タスクからなるバリデーション試験デザインに従って検討を進めてきた。昨年度、予定したバリデーション測定を全て終了したものの、結果として複数の施設の結果においてリファレンスクライテリアの逸脱が認められた。そこで本年度は、これまでに得られた結果の詳細解析を行い、SMT においてクライテリアの変更や今後の方針について検討を行い、さらに SMT で合意した内容について OECD VMG-NA において報告を行い、ガイドライン化に向けた今後の対応について議論を行った。

2、AR-EcoScreen 細胞を用いたアンドロゲン受容体転写活性化試験法：

AR-EcoScreen 試験法は、アンドロゲン受容体を介した遺伝子転写活性化試験法である。AR-EcoScreen 細胞は、CHO-K1 細胞にヒトアンドロゲン受容体と蛍ルシフェラーゼ遺伝子上流にアンドロゲンレスポンスエレメントを持つレポータープラスミドおよび細胞毒性評価の指標となるウミシイタケルシフェラーゼを安定発現する細胞株であり、細胞毒性評価を単一のプレート上で実施出来る上、通常の細胞毒性検出法では評価が難しい被験物質によるルシフェラーゼ発光への影響をすることが可能であるという利点を有する (図 3)。本試験系については、本研究班開始以前に実施された国内 3 施設によるバリデーション試験結果を基にしたバリデーションレポート及び OECD ガイドライン案について OECD ピアレビューが実施され、試験化合物数が少ないため、ガイドライン化にあたっては追加バリデーション試験の実施が要求された。そこで、追加バリデーションの実施に向けて昨年度は、OECD VMG-NA メンバーの協力により追加測定化合物の選定を行った。本年度は、VMG-NA メンバーより構成される SMT を組織し、バリデーション試験計画を策定し、国内 3 施設、海外(韓国) 1 施設の参加によるバリデーション測定を実施した。

C. 研究結果

1、HeLa9903 細胞を用いたエストロゲン受容体(ER)アンタゴニスト測定法バリデーション試験：

1. 1 これまでの進捗状況

バリデーション試験には、最終的に計 6 施設が参加したが、海外から参加した 2 施設(VITO

(ベルギー)、KFDA (韓国)) は、各施設の理由により Task 2 終了前にバリデーション研究より離脱した。また、国内 2 施設 (CERI、大塚) は、クライテリアを満たす結果を得てバリデーション測定を終了したが、国内 1 施設 (カネカ) は、計画に従い 5 回測定を実施したものの、Task3 の多くの結果でリファレンスクライテリアの逸脱が認められた。その後、カネカは *in vitro* 事業から撤退したため追加測定が不可能となった。

結果として全てのクライテリアを満たすデータの取得に成功した施設は 2 施設のみであったことから、OECD GD34 に定めるバリデーション要件を満たすため、さらに最低 1 施設における測定結果が必要との判断から、LumiCell バリデーション参加施設であった株式会社日吉にバリデーションへの参加を要請し、追加で測定を実施した。日吉における Task2 では、当初、多くの項目でクライテリアを逸脱しており、細胞継代における問題などが示唆されたが、最終的に一部のクライテリアを逸脱するものの再現性の高い 5 回測定結果が得られたことから、許容される範囲の施設間誤差と判断し、これらのデータを採用して Task2 を終了した。しかし、引き続き Task3 では、1 測定を除きリファレンスクライテリアを満たすデータを得ることが出来なかった、リードラボによる再トレーニングと操作手順の再確認を行い、Task3 再測定を行った。Task3 再測定では最終的に 5 測定実施したが、全測定においていずれかのリファレンスクライテリアを逸脱する結果であった。さらに、化合物測定プレートにおいても、1 回目測定では、fold induction が 2 以下となり、また、4、5 回目測定の一部のプレートでは、OHT による阻害率がクオリティクライテリアを逸脱する結果であった。結果として、クライテリアを満たす

結果は得られなかったが、バリデーション計画で予定した 5 測定を終了したことから測定終了とした。

1. 2 コード化被験物質の活性評価結果の比較

Task3 におけるコード化被験物質の測定を実施した国内 4 施設の測定結果のうち、クオリティクライテリアを満たす採用プレートの結果からコード化被験物質のアンタゴニスト活性評価結果の比較を行った (表 1)。2 物質を除いて陽性/陰性判定結果は全施設で一致した。判定が一致しない結果となった物質のうち Atrazine では、日吉のみ 2 測定で IC30 が検出されたため陽性判定となったが、1 測定は陰性判定であった。一方、Dibenzo[a,h]anthracene では、CERI のみ陰性判定となったが、CERI 以外の測定結果でも IC30 のみが検出されてのみで、CERI の測定結果でも 1 測定では IC30 を検出した。全施設の測定結果からの判定は、これら 2 物質を含む全物質で期待された判定結果と一致した。すでに OECD ガイドライン化 (TG457) されている BG1 細胞のバリデーション測定で結果が示されている 10 物質についての判定結果は 100% 一致した (表 2)。

1. 3 リファレンスクライテリアの比較

国内 4 施設の Task3 測定結果のうちクオリティクライテリアを満たしたリファレンスプレートにおけるリファレンスクライテリアの判定結果を表 3 に示した。カネカ、日吉の測定結果では、全クライテリアを満たす測定結果は得られておらず、さらに RU-486 の IC50 値は多くの結果で不検出であった。IC30、IC50 値の比較から、測定値は各施設内では安定しており、測定値のばらつきよりもむしろ、施設間での差がリファレンスクライテリア逸脱の原

因として考えられた。また、各施設の測定結果の反応カーブは、クライテリアの逸脱の有無に関わらず大差はなく、コード化被験物質の判定結果から定性（陽性/陰性）判定に与える影響はほとんど無いと判断された。

1. 4 SMT 及び OECD VMG-NA での議論
得られた解析結果をもとに SMT で議論を行い、以下のように結論された。本系は定量的測定系として設計されており、リファレンスクライテリアは、定量値（IC30、IC50）の精度管理のため設けられている。バリデーション測定結果から、測定された IC30 や IC50 値に施設間差が認められたことから、本系の定量値の信頼性については十分な検証が出来たとはいえないものの、クオリティークライテリアを満たす測定結果からのコード化被験物質の定性判定結果は、施設間で完全に一致することから定性判定法としての信頼性は実証された。そのため、定性判定法として OECD ガイドライン提案を行うこととし、リファレンスクライテリアについては削除し、リファレンス化合物については、陽性（タモキシフェン）1 物質と陰性（フルタミド）1 物質を、化合物測定時に測定し、それぞれ陽性/陰性判定されることを測定結果の採用条件とすることで合意した。SMT で合意された内容について OECD VMG-NA 会議で報告を行い議論した結果、リファレンス化合物（タモキシフェン）の IC50 値については、新たに測定を行う施設の参考値を示したほうが良いとの意見が出された。また、定性判定法としてガイドライン提案を行うことについて合意が得られ、2014 年 6 月中をめどとしてバリデーションレポート及びガイドライン案を OECD に提案することになった。現在、VMG-NA での合意をもとにバリデーションレポートの作成を進めている。本報告書では、参

考資料 1 として、現時点におけるバリデーションレポート草案のレポート部分を添付した。

2、AR-EcoScreen 細胞を用いたアンドロゲン受容体転写活性化試験法：

2. 1 バリデーション試験計画

OECD VMG-NA よりアンドロゲン作用検出法もしくはレポーターアッセイ系に詳しいメンバーの協力により以下に示す 5 名からなる Study Management Team (SMT) を組織し、バリデーション試験計画の策定を行った。

The AR-STTA 2nd validation study management team

- Atsushi Ono (NIHS, Japan)
- Masahiro Takeyoshi (CERI-Japan)
- Anne Marie Vinggaard (Technical University of Denmark)
- Jenny Odum (Regulatory Science Associate)
- Susan Laws (US EPA)

本バリデーション試験は、以前に行われたバリデーション試験結果に対する OECD ピアレビューコメントへの対応として、被験物質の追加を行うことを目的としており、アゴニスト・アンタゴニスト各系で測定を行う各 5 被験物質は、昨年度、VMG-NA 内で組織された化合物選択小グループにより提案されたリストをもとに、国内での入手可能性や CERI での背景データから表 4 に示す物質を選択した。バリデーション測定には、国内 3 施設・国外 1 施設（韓国 NiFDS）が参加した。バリデーション試験は、新規に測定を行う施設があることからトレーニングフェーズに引き続き、フェーズ 1 で、リファレンス化合物の測定を行い、フェーズ 2 で、コード化被験物質の測定を行う計画とした。また、アゴニスト試験のリファレンス化

合物として設定されていた R-1881 が入手不可であったことから Mestanolone を代替としたことから、国内 3 施設のフェーズ 1 測定結果をもとに Mestanolone のリファレンスクライテリアを設定し、NiFDS のフェーズ 1 試験及び全施設のフェーズ 2 試験の評価に用いることとした。計画の詳細は、本報告書に添付の、参考資料 2: バリデーション試験計画に記載した。

2. 2 エッジ効果の検討

トレーニングフェーズにおける検証試験では、全施設でクライテリアを満たす結果の取得に成功した。検証試験にあわせて、各施設の測定機器固有のエッジ効果について確認を行った結果、いずれの施設においてもエッジ効果は認められなかった。

2. 3 フェーズ 1

フェーズ 1 では、アゴニスト・アンタゴニスト評価系のリファレンス化合物 (各 3 物質) の測定を行った。表 5 にアゴニストアッセイ、表 6 にアンタゴニストアッセイのリファレンスプレートの試験成績を示した。アゴニストアッセイにおいて、各施設ともクオリティークライテリア及びリファレンスクライテリア全てを満たす 3 測定結果を得た。Mestanolone のリファレンスクライテリアを国内 3 施設の 9 測定結果から平均 \pm 2SD で設定した。新たに設定した Mestanolone のリファレンスクライテリアの基準範囲は、以前のバリデーション試験結果をもとに設定済みの Dihydrotestosterone のクライテリアと比べて狭い範囲となったが、NiFDS の 3 測定結果は、Mestanolone のクライテリアも満たしており、本測定系の安定性・再現性の高さを示す結果となった。アンタゴニストアッセイにおいては、国内 3 施設ではクオ

リティークライテリア及びリファレンスクライテリア全てを満たす 3 測定結果を得た。NiFDS では、3 測定実施し、1 測定で fold induction の基準値が 5 以上であるのに対して 4.95 と若干低い結果であったがリファレンスクライテリアについては全て基準を満たしており、無視できるレベルの逸脱と判断された。他の 2 測定について全てのクライテリアを満たしていることから 3 測定でフェーズ 1 を終了した。

2. 4 フェーズ 2

フェーズ 2 では、アゴニスト・アンタゴニスト評価系のコード化被験物質の測定を行った。いずれの評価系においても、国内 3 施設では、3 測定を実施し全ての測定結果でクオリティークライテリア及びリファレンスクライテリア全てを満たす結果を得た。NiFDS では、アゴニスト測定において Mestanolone の PC50 値の低濃度側への逸脱が認められた以外は、実施した全ての測定結果がクライテリアを満たした。リファレンスプレートの試験成績は、フェーズ 1 試験成績とともに表 5, 6 に示した。コード化被験物質の試験結果を表 7 (アゴニストアッセイ)、表 8 (アンタゴニストアッセイ) に示す。アゴニストアッセイにおいて、17 β -estradiol で北海道、NiFDS の 2 施設では PC50 が検出されたのに対して残る 2 施設 (CERI、住友化学) では、PC10 は検出されたものの PC50 は検出されなかった。詳細な解析から、反応カーブそのものに施設間ではほとんど差は無いものの、住友化学では、最大濃度における反応が若干低いことが、また、CERI では最高濃度が他の施設と比較して低いことが原因と判明した。アンタゴニストアッセイの測定結果では、陽性物質の Prochloraz について CERI 以外の 3 施設では、IC50 が検出され

ているのに対して CERI では、陰性判定となった。また、同じく陽性物質である Flutamide については、CERI のみ IC30 までの検出にとどまった。詳細解析の結果、2 物質ともに CERI では測定最高濃度が、他施設に比べ低いことが原因と考えられた。両物質について CERI において最高濃度を 1 段階高く設定して実施した追加測定結果では、いずれの物質とも IC50 が検出され、その値は他施設とほぼ一致した。

D. 考察

HeLa9903 細胞を用いたエストロゲン受容体 α (ER α) 転写活性化試験法 (HeLa 法) のアンタゴニスト試験法バリデーションでは、昨年度までに全ての測定を終了した。結果として Task3 測定を実施した 4 施設のうち国内 2 施設 (カネカ、日吉) では、5 測定以上実施したが全てのリファレンスクライテリアを満たす測定結果を得ることは出来なかったが、コード化被験物質定性的 (陽性・陰性) 判定結果は、クライテリアを満たすデータの取得に成功した 2 施設 (CERI、大塚) の結果とほとんど一致した。本評価系の第一の目的は、評価対象の物質の ER アンタゴニスト作用の有無の評価であり、その点において、日吉及びカネカの結果は十分評価可能であることを示しており、プレートごとに設定されたクオリティークライテリアを満たすデータであれば定性的評価における信頼性は担保されると判断された。一方、コード化被験物質について測定された IC50 値や IC30 値に施設間で大きな差は認められなかったことから、当初、リファレンスクライテリア基準幅の拡大を検討したものの、4 施設の Task2 及び 3 で測定されたクライテリア値 (IC30、IC50) を解析した結果、各施設内ではクライテリア値は安定しており逸脱の原因は、測定値のばらつきによるものよりむしろ施

設間差によるものであり、単に基準幅を拡大することは妥当でないと考察された。結果として得られたバリデーション試験結果のみから、定量的信頼性を担保するためのリファレンスクライテリアを設定することは困難と判断されたため、本系は定量的評価可能な評価系として開発されたが、定性的評価系としてガイドライン提案することで SMT の合意を得た。また、バリデーションプロトコールにおいてはリファレンス化合物として陽性 3 物質、陰性 3 物質が設定されていたが、ガイドライン提案ではリファレンスクライテリアを廃止し、陽性・陰性各 1 物質について測定を行い、それぞれの定性的 (陽性・陰性) 判定が行えること信頼性評価基準として用いることで合意が得られた。SMT 合意内容について、OECD VMG-NA で議論を行った結果、既にガイドライン化されている BG1 細胞系も、定性的判定法として IC50 値に評価基準を設定しておらず、提案内容についてほぼ合意が得られた。また、陽性リファレンス化合物である Tamoxifen については参考値を示すべきとの意見が出された。合意した内容に従い次年度、バリデーションレポートとともにガイドライン案を作成することとなった。なお、ガイドライン案については、TG455 のアップデートとして提案することとなった。

AR EcoScreen アッセイに関しては、OECD ピアレビューにより要求された追加バリデーション試験のため SMT を組織し、SMT で合意された試験計画に従いバリデーション試験を実施した。OECD ピアレビューでは、以前のバリデーション試験における測定実施物質が少ないとの指摘を受けたが、アンドロゲン受容体への作用が明らかとなっている化学物質は限られている。追加バリデーション試験における被験物質選定においては、VMG-NA メンバーの協力により行ったが、国内入手不可であ