

ったり、過去の測定結果から期待される作用が本系で示されない可能性も考慮して、本系での背景データがない物質についてリードラボである CERI において予備測定を行い決定した。バリデーション試験開始は予算上の都合から当初の予定より遅れたが、結果として被験物質の選定にあたり十分な検討が行えた。バリデーション測定は、ほぼ終了しており、これまでに得られている結果からほぼ全ての被験物質について全施設で期待された作用が検出された。しかし、アンタゴニストアッセイでは、陽性 1 物質で測定最高濃度の違いにより作用が検出されない施設があった。測定における被験物質の最高濃度は、各施設でプロトコルに従い媒体として用いた DMSO への溶解性試験及び培地へ添加した際の析出について確認して決定しており、今回のバリデーション試験において施設間で最高濃度の判断に違いが認められたことから、より分かりやすいプロトコルへの記載が必要と考察された。アゴニスト・アンタゴニスト両アッセイのリファレンス化合物の測定結果についても施設内・施設間とも非常に安定しており、本バリデーション試験結果から計算された平均±2SD は、非常に安定した測定結果が得られており以前に実施したバリデーション試験結果から設定されたリファレンスクライテリアに比べ狭い範囲であった。一方で、本バリデーション試験で新たにアゴニストアッセイのリファレンス物質とした Mestanolone について国内 3 施設のフェーズ 1 測定結果をもとに設定したリファレンスクライテリアは、アゴニストアッセイのもう 1 物質の陽性リファレンス物質である Dihydrotestosterone のクライテリアと比べて狭い範囲となった。本バリデーション試験フェーズ 2 では全施設でクライテリアを満たす測定結果が得られていることから問題は無いと

判断されるもののガイドライン化の際には、考慮が必要と考えられる。なお、OECD VMG-NA 会議において、本バリデーション試験は、前述のごとく既に OECD 提出済みのバリデーションレポートに対するコメント対応であることからバリデーションレポートは、先のレポートの addendum としてガイドライン案とともに提出すること及び、ガイドライン案にあわせて AR STTA 系のパフォーマンススタンダードの作成が求められており、SMT メンバーと共同で作成して来年度中に提出する予定である。

#### E. 結論

本研究では、生殖毒性を始めとした様々な毒性の原因となる分子イベントである化学物質による内分泌かく乱性を迅速評価するための *in vitro* スクリーニング法である HeLa9903 細胞を用いたエストロゲン受容体  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) 転写活性化試験法 (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、OECD ガイドライン化に向けた研究を進めている。OECD では、加盟国が行政的に利用可能な内分泌かく乱性の評価手法の開発整備を推進するため、スクリーニングレベルから確定試験に至るコンセプトualフレームワークに基づく試験法開発を進めている。本研究で対象とする *in vitro* スクリーニング系は、そのうちレベル 2 に相当するものであり、また、厚生労働省「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会」中間報告書で示された 2 段階からなる試験スキームにおいては、第 1 段階におけるスクリーニング手法のひとつでもある。我が国では、現在のところ内分泌かく乱性による化学物質の規制は行われていないものの、非常に初期の段階からこの問題に取り組んできた経緯から我が国が提案する両評価系について、早期の OECD ガ

イドライン化が国際的に期待されている。

HeLa 法についてのバリデーション試験は当初計画より遅れ、さらに複数の施設で最終的に定量性を担保する目的として設定したリファレンスクライテリアを満たすデータの取得が出来ない結果となったが、コード化化学物質の定性的評価についてのほぼ完全な再現性から、ガイドライン試験法としての有用性が示され、定性的評価法としてガイドライン提案することについて OECD VMG-NA の合意が得られた。一方、AR EcoScreen 法についてのバリデーション測定は、当初の予定より遅れたものの、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。新たな試験系についてバリデーションからガイドライン化までには、多くの専門家の協力が不可欠である。両評価系のバリデーション試験にあたっては、OECD VMG-NA メンバーの協力が得られたが、今後、新たな試験系をガイドライン化するにあたっては、如何にその体制を整備していくかも重要な課題である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 1) 書籍

小野 敦 他 26 名, . 動物実験代替安全性試験プロトコル集 (監修 ; 小島肇夫) 第 18 章 BG1Luc 細胞を用いるエストロゲン受容体転写活性化試験法. pp.228-242, シーエムシー出版 (東京) .2013.

小野 敦 他 34 名, . (2013). バイオテクノロジー

シリーズ: *In vitro* 毒性・動態評価の最前線 (監修 ; 小島肇夫) 第 3 章 化学物質の内分泌かく乱性の予測評価. pp.29-35, シーエムシー出版 (東京) .2013.

### 2) 雑誌

M. Matsumoto, M. Yamaguchi, Y. Yoshida, M. Senuma, H. Takashima, T. Kawamura, H. Kato, M. Takahashi, M. Hirata-Koizumi, A. Ono, K. Yokoyama and A. Hirose (2013) An antioxidant, N,N'-diphenyl-p-phenylenediamine (DPPD), affects labor and delivery in rats: a 28-day repeated dose test and reproduction/developmental toxicity test. *Food Chem Toxicol* **56**, 290-296.

M. Takahashi, K. Yabe, H. Kato, T. Kawamura, M. Matsumoto, M. Hirata-Koizumi, A. Ono and A. Hirose (2013) Reproductive and developmental toxicity screening test of 3-cyanopyridine in rats. *Reprod Toxicol* **35**, 7-16.

### 2. 学会発表

Atsushi Ono, Mutsuko Hirata-Koizumi, Ryota Ise, Hirohito Kato, Takashi Matsuyama, Makoto Ema and Akihiko Hirose :Gender-related difference in the toxic susceptibility of rats to an ultraviolet absorber, 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole: a role of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha. 2013, *49th Congress of the European Societies of Toxicology*

Atsushi Ono, Mika Takahashi, Kaoru Yabe, Hina Kato, Tomoko Kawamura, Mariko Matsumoto, Mutsuko Hirata-Koizumi and

Akihiko Hirose :The Japanese existing  
chemical safety survey program :  
Reproductive toxicity of 3-cyanopyridine in  
rats.. 2013,*XIII International Congress of  
Toxicology (ICT2013)*

花房 弘之, 森川 裕二, 上原 健城, 兼藤 雅子,  
小野 敦, 山田 弘, 大野 泰雄, 漆谷 徹  
郎 :マルチプレックスイムノアッセイに  
よるラット肝障害時のサイトカイン変動  
解析. 2013,*第40回日本毒性学会学術年会*

小野 敦, 平田 睦子, 加藤 寛人, 伊勢 良太,  
広瀬 明  
彦 :2-(2'-Hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)b  
enzotriazoleによる肝毒性メカニズムのト  
ランスクリプトーム解析. 2013,*第40回日  
本毒性学会学術年会*

大村 功, 森川 裕二, 上原 健城, 林 仁美, 三  
森 国敏, 南 圭一, 神吉 将之, 小野 敦,  
山田 弘, 大野 泰雄, 漆谷 徹郎 :肝発が  
んにおけるDNAメチレーションと遺伝子  
発現の関連. 2013,*第40回日本毒性学会学  
術年会*

中根 史行, 八舟 宏典, 盛田 怜子, 板橋 恵,  
赤根 弘敏, 小野 敦, 鈴木 和彦 and 渋谷  
淳 :Diheptyl phthalate (DHP) のラット90  
日間混餌投与によって誘発された肝前が  
ん病変における細胞周期とアポトーシス  
関連分子の発現解析. 2013,*第40回日本毒  
性学会学術年会*

南 圭一, 上原 健城, 近藤 千晶, 大村 功, 神  
吉 将之, 堀之内 彰, 小野 敦, 山田 弘,  
大野 泰雄, 漆谷 徹郎 :ラット腎における  
miRNA発現と腎障害モデルにおける変動  
の比較検討. 2013,*第40回日本毒性学会学  
術年会*

## G. 知的財産所有権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特になし

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし

## 添付資料

参考資料 1: Draft Validation Report for ERTA  
antagonist assay

参考資料 2 : ARTA Validation Plan

表 1 ER STTA アンタゴニストバリデーションTask3 におけるコード化被験物質のアンタゴニスト活性評価結果

Code	Chemical name	Candidate effect	GERI	OTSUKA	KANEKA	HIYOSHI	Total
ATG001	ICI 182,780	Strong	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive (4/4)
ATG002	Mifepristone(Mifeprex)=RU-486	mild	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive (4/4)
ATG003	4,4'-(Hexafluoroisopropylidene)diphenol	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative (4/4)
ATG004	Methylpiperdinylpyrazole dihydrochloride	mild	Positive	Positive		Positive	Positive (3/3)
ATG005	4-Hydroxytamoxifen	moderate	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive (4/4)
ATG006	Raloxifene HCl	moderate	Positive	Positive		Positive	Positive (3/3)
ATG007	Clomiphene citrate(cis and trans mixture)	moderate-mild	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive (4/4)
ATG008	Dibutyl phthalate	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative (4/4)
ATG009	Atrazine	Negative	Negative	Negative		Positive	Negative (2/3)
ATG010	Flutamide	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative (4/4)
ATG011	4,4'-Cyclohexylidenebisphenol	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative (4/4)
ATG012	4,4'-[1-[4-[1-(4-Hydroxyphenyl)-1-methylethyl]phenyl]ethylidene]bis[phenol]	mild	Positive	Positive		Positive	Positive (3/3)
ATG013	Apigenin	Negative	Negative	Negative		Negative	Negative (3/3)
ATG014	Genistein	to be negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative (4/4)
ATG015	Dibenzo[a,h]anthracene	positive	Negative	Positive		Positive	Positive (2/3)
ATG016	p-n-nonylphenol	not tested	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative (4/4)
ATG017	Flavone	to be negative	Negative	Negative		Negative	Negative (3/3)
ATG018	Resveratrol	to be negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative (4/4)
ATG019	Fenarimol	not tested	Negative			Negative	Negative (2/2)
ATG020	17 $\beta$ -estradiol	to be negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative (4/4)

2x2 table analysis compared with candidate effects Accuracy: 94% 100% 100% 94% 100% (97%)\*  
 Sensitivity: 88% 100% 100% 100% 100% (97%)\*  
 Specificity : 100% 100% 100% 88% 100% (97%)\*

\*: Values in parenthesis are calculated with all individual data derived in 4 laboratories (N=65).

表 2 ER STTA と BG1 細胞による化学物質のアンタゴニスト活性評価結果の比較

Code	Chemical name	Candidate effect	HeLa-9903	log(IC50)	BG1Luc	log(IC50)
ATG005	4-Hydroxytamoxifen	moderate	Positive	-8.459	Positive	-7.714
ATG006	Raloxifene HCl	moderate	Positive	-9.106	Positive	-7.206
ATG008	Dibutyl phthalate	Negative	Negative		Negative	
ATG009	Atrazine	Negative	Negative		Negative	
ATG014	Genistein	to be negative	Negative		Negative	
ATG015	Dibenzo[a,h]anthracene	positive	Positive	NC	Positive	NC
ATG016	p-n-nonylphenol	not tested	Negative		Negative	
ATG017	Flavone	to be negative	Negative		Negative	
ATG018	Resveratrol	to be negative	Negative		Negative	
ATG020	17 $\beta$ -estradiol	to be negative	Negative		Negative	

Accuracy: 100% (compared with BG1 results)  
 Sensitivity: 100%  
 Specificity : 100%

表3 ER STTA アンタゴニストバリデーションTask3におけるリファレンスクライテリア  
測定値 (赤字はクライテリアを逸脱した項目)

lab	Task	ID	4OH-Tamoxifen		Tamoxifen		RU-486		Flutamide		
			IC30	IC50	IC30	IC50	IC30	IC50	IC30	IC50	
			-9.58 ~ -8.63	-9.36 ~ -8.09	-7.68 ~ -6.37	-7.14 ~ -5.90	-6.10 ~ -5.41	-5.57 ~ -5.10			
CERI	Task3a	1	-9.542	-9.277	-7.573	-7.21	-6.115	-5.608	ND	ND	
	Task3a	2	-8.958	-8.494	-7.003	-6.445	-5.761	-5.359	ND	ND	
	Task3a	3	-9.038	-8.563	-6.982	-6.382	-5.721	-5.397	ND	ND	
	Task3a	4	-9.129	-8.683	-7.358	-6.764	-6.095	-5.583	ND	ND	
	Task3b	2	-9.058	-8.604	-6.655	-6.273	ND	ND	ND	ND	
	Task3b	3	-9.128	-8.678	-7.036	-6.466	-5.815	-5.271	ND	ND	
	Task3b	4	-9.16	-8.683	-7.055	-6.46	-5.907	-5.416	ND	ND	
	Task3b	5	-8.895	-8.355	-6.777	-6.175	-5.691	-5.28	ND	ND	
	Task3b	6	-9.05	-8.508	-7.149	-6.383	-5.843	-5.415	ND	ND	
	Task3b	7	-8.515	-8.085	-6.685	ND	-5.895	-5.405	ND	ND	
	Task3b	8	-9.178	-8.832	-7.318	-6.833	-5.862	-5.446	ND	ND	
	Task3b	9	-9.027	-8.6	-7.193	-6.68	-5.893	-5.347	ND	ND	
	Task3b	10	-8.917	-8.431	-6.893	-6.322	-5.903	-5.28	ND	ND	
		Mean		-9.046	-8.599	-7.052	-6.533	-5.875	-5.401		
	SD		0.227	0.275	0.269	0.290	0.129	0.108			
OTSUKA	Task3a	1	-8.743	-8.453	-6.922	-6.598	-5.726	-5.36	ND	ND	
	Task3a	2	-8.798	-8.535	-6.898	-6.627	-5.477	-5.202	ND	ND	
	Task3a	3	-8.818	-8.558	-6.942	-6.566	-5.467	-5.185	ND	ND	
	Task3b	1	-8.928	-8.352	-6.867	-6.376	-5.696	-5.276	ND	ND	
	Task3b	2	-8.736	-8.369	-6.849	-6.439	-5.811	-5.192	ND	ND	
	Task3b	3	-8.905	-8.402	-7.064	-6.454	-5.767	-5.324	ND	ND	
		Mean		-8.821	-8.445	-6.924	-6.510	-5.657	-5.257		
	SD		0.080	0.086	0.077	0.101	0.149	0.075			
KANEKA	Task3a	1	-9.465	-9.3	-7.501	-7.221	-5.395	-5.097	ND	ND	
	Task2a	2	-8.51	-8.277	-6.426	-6.047	-5.342	ND	ND	ND	
	Task3a	3	-8.32	-8.054	-6.188	ND	-5.264	ND	ND	ND	
	Task3a	4	-8.495	-8.105	-6.586	-6.075	-5.716	-5.378	ND	ND	
	Task3a	5	-8.361	-8.106	-6.13	ND	-5.441	ND	-4.7	ND	
		Mean		-8.630	-8.368	-6.566	-6.448	-5.432	-5.238		
		SD		0.474	0.528	0.554	0.670	0.172	0.199		
HIYOSHI	Task3a	1	-8.548	-8.307	-6.548	-6.256	-5.338	ND	ND	ND	
	Task3a	2	-8.415	-8.199	-6.422	-6.096	-5.359	ND	ND	ND	
	Task3a	3	-8.472	-8.225	-6.417	-6.146	-5.173	ND	ND	ND	
	Task3a	4	-8.6	-8.206	-6.361	-5.506	-5.504	ND	ND	ND	
	Task3b	1	-8.544	-8.292	-6.373	-6.009	-5.713	ND	ND	ND	
	Task3b	2	-8.483	-8.167	-6.126	-5.556	-5.341	ND	ND	ND	
	Task3b	3	-8.633	-8.239	-6.266	-5.788	-5.359	ND	ND	ND	
	Task3b	5	-8.343	-8.051	-6.059	ND	-5.197	ND	ND	ND	
		Mean		-8.505	-8.211	-6.322	-5.908	-5.373	NA		
		SD		0.096	0.080	0.163	0.295	0.172	NA		
	No. of values		32	32	32	28	31	20			
	Total mean		-8.803	-8.437	-6.769	-6.363	-5.632	-5.341			
	Total SD		0.324	0.305	0.414	0.401	0.263	0.126			
	Minimum		-9.542	-9.300	-7.573	-7.221	-6.115	-5.608			
	Maximum		-8.320	-8.051	-6.059	-5.506	-5.173	-5.097			
	Mean+2SD		-8.156	-7.828	-5.942	-5.561	-5.107	-5.088			
	Mean-2SD		-9.450	-9.046	-7.596	-7.165	-6.157	-5.594			

表4 AR EcoScreen バリデーション評価で用いた化学物質とその予想活性

アゴニストアッセイ用被験物質

No.	Chemical Name	CAS No.	Reference Result
1	Testosterone	58-22-0	+
2	17 $\beta$ -estradiol	50-28-2	+
3	Medroxyprogesterone acetate (MPA)	71-58-9	+
4	Benzyl butyl phthalate (BBP)	85-68-7	-
5	17 $\alpha$ -ethinyl estradiol	57-63-6	-

アンタゴニストアッセイ用被験物質

No.	Chemical Name	CAS No.	Reference Result
1	Flutamide	13311-84-7	+
2	Prochloraz	67747-09-5	+
3	Vinclozolin	50471-44-8	+
4	Propylthiouracil (PTU)	51-52-5	-
5	Atrazine	1912-24-9	-

表5 AR EcoScreen アゴニストアッセイのリファレンスプレート試験成績

		FI	PC10	DHT (PC10)	DHT (PC50)	Mestanolone (PC10)	Mestanolone (PC50)			
Criteria		>=6.4	>1	-9.87 ~ -12.08	-9.00 ~ -11.03					
TRIAL										
Phase 1	CERI	1	8.38	1.12	-10.76	-9.81	-10.65	-9.62		
		2	8.64	1.08	-10.66	-9.70	-10.56	-9.59		
		3	8.68	1.14	-10.71	-9.75	-10.64	-9.65		
	Sumitomo	1	7.67	1.10	-10.64	-9.59	-10.47	-9.43		
		2	7.35	1.08	-10.77	-9.82	-10.66	-9.60		
		3	8.14	1.12	-10.69	-9.67	-10.57	-9.53		
	Hokkaido	1	7.71	1.07	-10.83	-10.10	-10.79	-9.87		
		2	7.84	1.08	-10.83	-10.08	-10.81	-10.00		
		3	7.40	1.08	-10.83	-10.11	-10.84	-10.08		
		For 3 labs. MEAN			-10.75	-9.85	-10.67	-9.71		
		SD			0.07	0.20	0.13	0.22		
		MEAN+2SD			-10.60	-9.45	-10.41	-9.26	Criteria for Mestanolone	
		MEAN-2SD			-10.89	-10.25	-10.92	-10.15		
		NiFDS	1	7.44	1.07	-10.82	-9.75	-10.69	-9.56	
			2	6.91	1.05	-10.79	-9.80	-10.70	-9.60	
	3		6.94	1.04	-10.64	-9.50	-10.49	-9.35		
	For 4 labs. MEAN			-10.75	-9.81	-10.66	-9.66			
	SD			0.07	0.20	0.12	0.22			
	MEAN+2SD			-10.60	-9.41	-10.42	-9.22			
	MEAN-2SD			-10.90	-10.20	-10.90	-10.09			
Phase 2	CERI	1	8.19	1.05	-10.69	-9.70	-10.69	-9.65		
		2	8.18	1.13	-10.78	-9.84	-10.72	-9.72		
		3	8.14	1.04	-10.71	-9.71	-10.71	-9.66		
	Sumitomo	1	7.47	1.06	-10.74	-9.75	-10.62	-9.56		
		2	7.27	1.08	-10.73	-9.76	-10.59	-9.55		
		3	7.56	1.07	-10.76	-9.77	-10.66	-9.59		
	Hokkaido	1	7.41	1.11	-10.82	-10.04	-10.85	-10.02		
		2	7.49	1.09	-10.78	-9.87	-10.74	-9.77		
		3	7.35	1.09	-10.82	-9.97	-10.82	-9.99		
	NiFDS	1	7.42	1.04	-10.54	-9.56	-10.47	-9.49		
		2	7.51	1.06	-10.70	-9.71	-10.61	-9.57		
		3	7.02	1.09	-11.24	-9.78	-10.85	-10.27		
		For 4 labs. MEAN			-10.78	-9.79	-10.69	-9.74		
		SD			0.16	0.13	0.11	0.24		
		MEAN+2SD			-10.45	-9.53	-10.47	-9.26		
	MEAN-2SD			-11.10	-10.04	-10.92	-10.22			

表6 AR EcoScreen アンタゴニストアッセイのリファレンスプレート試験成績

TRIAL		FI	RTA	HF	HF	BPA	BPA			
			0.1 $\mu$ M HF	(IC30)	(IC50)	(IC30)	(IC50)			
Criteria		>=5.0	<= 46	-6.41	-6.17	-4.48	-4.29			
			~	~	~	~	~			
				-8.37	-7.80	-7.52	-7.05			
Phase 1	CERI	1	7.07	3.91	-7.36	-6.92	-5.76	-5.47		
		2	7.29	2.81	-7.44	-6.99	-5.88	-5.56		
		3	7.43	3.99	-7.41	-6.97	-5.78	-5.49		
	Sumitomo	1	5.44	4.02	-7.55	-7.10	-5.92	-5.58		
		2	5.54	6.97	-7.28	-6.82	-5.74	-5.40		
		3	6.00	2.09	-7.63	-7.19	-5.88	-5.56		
	Hokkaido	1	6.91	7.19	-6.93	-6.62	-5.53	-5.21		
		2	6.56	4.39	-7.10	-6.72	-5.71	-5.42		
		3	7.19	4.85	-7.17	-6.76	-5.61	-5.31		
	NiFDS	1	5.49	6.32	-7.59	-7.14	-6.00	-5.58		
		2	4.95	5.46	-7.78	-7.49	-6.13	-5.76		
		3	5.05	7.24	-7.83	-7.40	-6.29	-5.74		
			MEAN		-7.42	-7.01	-5.85	-5.51		
			SD		0.27	0.27	0.21	0.16		
			MEAN+2SD		-6.88	-6.48	-5.42	-5.18		
		MEAN-2SD		-7.97	-7.54	-6.28	-5.83			
Phase 2	CERI	1	6.46	3.25	-7.60	-7.18	-5.85	-5.55		
		2	6.18	2.87	-7.37	-6.92	-5.92	-5.59		
		3	6.28	2.84	-7.40	-6.98	-5.89	-5.58		
	Sumitomo	1	5.73	3.47	-7.65	-7.21	-5.85	-5.53		
		2	5.94	4.33	-7.37	-6.88	-5.81	-5.48		
		3	5.37	3.11	-7.62	-7.23	-5.97	-5.63		
	Hokkaido	1	6.40	2.24	-7.19	-6.78	-5.55	-5.28		
		2	7.66	4.46	-7.31	-6.84	-5.65	-5.38		
		3	7.33	5.26	-7.11	-6.73	-5.57	-5.29		
	NiFDS	1	5.69	1.26	-7.81	-7.40	-6.20	-5.75		
		2	5.43	1.73	-7.77	-7.36	-5.97	-5.64		
		3	5.44	2.30	-7.71	-7.32	-5.92	-5.60		
			CERI add	4	5.46	-0.12	-7.48	-7.06	-5.82	-5.52
			MEAN		-7.49	-7.07	-5.84	-5.52		
			SD		0.22	0.23	0.18	0.14		
			MEAN+2SD		-7.05	-6.61	-5.49	-5.25		
		MEAN-2SD		-7.93	-7.53	-6.20	-5.80			



表7 AR EcoScreen アゴニストアッセイでのコード化被験物質の試験結果

	Lab	ID	PC10	Mean SD intra-Lab.	Mean SD inter-Lab.	PC50	Mean SD intra-Lab.	Mean SD inter-Lab.
17 $\alpha$ -ethinyl estradiol	CERI	1	ND			ND		
CAS:57-63-6		2	ND			ND		
Candidate effect:		3	ND			ND		
NEG	Sumitomo	1	ND			ND		
		2	ND			ND		
		3	ND			ND		
	Hokkaido	1	ND			ND		
		2	ND			ND		
		3	ND			ND		
	NiFDS	1	ND			ND		
		2	ND			ND		
		3	ND			ND		
17 $\beta$ -estradiol	CERI	1	-7.63	-7.63	-7.41	ND		-5.10
CAS:50-28-2		2	-7.67	0.03	0.30	ND		0.20
Candidate effect:		3	-7.60		n=12	ND		n=6
POS	Sumitomo	1	-7.24	-7.23		ND		
		2	-7.19	0.04		ND		
		3	-7.27			ND		
	Hokkaido	1	-7.74	-7.72		-5.33	-5.27	
		2	-7.73	0.02		-5.34	0.12	
		3	-7.70			-5.13		
	NiFDS	1	-7.05	-7.03		-4.93	-4.93	
		2	-7.08	0.06		-4.88	0.05	
		3	-6.97			-4.97		
Butylbenzyl phthalate	CERI	1	ND			ND		
CAS:85-68-7		2	ND			ND		
Candidate effect:		3	ND			ND		
NEG	Sumitomo	1	ND			ND		
		2	ND			ND		
		3	ND			ND		
	Hokkaido	1	ND			ND		
		2	ND			ND		
		3	ND			ND		
	NiFDS	1	ND			ND		
		2	ND			ND		
		3	ND			ND		
Medroxyprogesterone 17-acetate	CERI	1	-8.94	-8.93	-9.06	-8.45	-8.46	-8.53
CAS:71-58-9		2	-8.93	0.02	0.25	-8.50	0.03	0.12
Candidate effect:		3	-8.90		n=12	-8.44		n=12
POS	Sumitomo	1	-8.92	-8.91		-8.44	-8.42	
		2	-8.91	0.02		-8.45	0.04	
		3	-8.89			-8.37		
	Hokkaido	1	-9.64	-9.38		-8.77	-8.71	
		2	-8.98	0.35		-8.62	0.08	
		3	-9.52			-8.72		
	NiFDS	1	-8.95	-9.05		-8.51	-8.55	
		2	-9.00	0.13		-8.58	0.03	
		3	-9.19			-8.56		
Testosterone	CERI	1	-9.83	-9.89	-9.96	-9.28	-9.30	-9.26
CAS:58-22-0		2	-9.98	0.08	0.23	-9.35	0.04	0.11
Candidate effect:		3	-9.85		n=12	-9.28		n=12
POS	Sumitomo	1	-9.85	-9.84		-9.24	-9.23	
		2	-9.84	0.00		-9.20	0.02	
		3	-9.84			-9.24		
	Hokkaido	1	-10.42	-10.32		-9.46	-9.41	
		2	-10.17	0.13		-9.37	0.05	
		3	-10.36			-9.39		
	NiFDS	1	-9.77	-9.81		-9.13	-9.12	
		2	-9.75	0.08		-9.10	0.02	
		3	-9.90			-9.12		

表 8 AR EcoScreen アンタゴニストアッセイでのコード化被験物質の試験結果

	Lab	ID	IC30	Mean	Mean	IC50	Mean	Mean	
				SD	SD		SD	SD	
				intra-Lab.	inter-Lab.				
						intra-Lab.	inter-Lab.		
6-Propyl-2-thiouracil	CERI	1	ND			ND			
CAS:51-52-5		2	ND			ND			
Candidate effect:		3	ND			ND			
NEG	Sumitomo	1	ND			ND			
		2	ND			ND			
		3	ND			ND			
	Hokkaido	1	ND			ND			
		2	ND			ND			
		3	ND			ND			
	NiFDS	1	ND			ND			
		2	ND			ND			
		3	ND			ND			
	CERI	4	ND			ND			
Atrazine	CERI	1	ND			ND			
CAS:1912-24-9		2	ND			ND			
Candidate effect:		3	ND			ND			
NEG	Sumitomo	1	ND			ND			
		2	ND			ND			
		3	ND			ND			
	Hokkaido	1	ND			ND			
		2	ND			ND			
		3	ND			ND			
	NiFDS	1	ND			ND			
		2	ND			ND			
		3	ND			ND			
	CERI	4	ND			ND			
Flutamide	CERI	1	-5.96	-6.08	-5.96	ND		-5.56	
CAS:13311-84-7		2	-6.13	0.11	0.16	ND		0.08	
Candidate effect:		3	-6.15		n=12	ND		n=9	
POS	Sumitomo	1	-5.96	-5.97		-5.57	-5.60		
		2	-5.88	0.09		-5.57	0.05		
		3	-6.07			-5.66			
	Hokkaido	1	-5.71	-5.74		-5.43	-5.47		
		2	-5.81	0.06		-5.53	0.05		
		3	-5.69			-5.44			
	NiFDS	1	-6.20	-6.04		-5.66	-5.61		
		2	-5.96	0.14		-5.58	0.05		
		3	-5.95			-5.58			
	CERI	4	-6.33			-5.82			
Prochloraz	CERI	1	ND		-5.55	ND		-5.22	
CAS:67747-09-5		2	ND		0.05	ND		0.07	
Candidate effect:		3	ND		n=9	ND		n=9	
POS	Sumitomo	1	-5.58	-5.60		-5.22	-5.25		
		2	-5.65	0.05		-5.33	0.06		
		3	-5.56			-5.21			
	Hokkaido	1	-5.54	-5.53		-5.27	-5.26		
		2	-5.59	0.06		-5.30	0.05		
		3	-5.47			-5.20			
	NiFDS	1	-5.53	-5.53		-5.15	-5.14		
		2	-5.52	0.01		-5.12	0.02		
		3	-5.54			-5.16			
	CERI	4	-5.77			-5.44			
Vinclozolin	CERI	1	-6.44	-6.45	-6.48	-6.07	-6.08	-6.10	
CAS:50471-44-8		2	-6.45	0.01	0.15	-6.04	0.05	0.16	
Candidate effect:		3	-6.46		n=12	-6.14		n=12	
POS	Sumitomo	1	-6.42	-6.38		-5.96	-5.92		
		2	-6.39	0.04		-5.95	0.06		
		3	-6.34			-5.85			
	Hokkaido	1	-6.46	-6.40		-6.10	-6.07		
		2	-6.42	0.07		-6.12	0.07		
		3	-6.32			-6.00			
	NiFDS	1	-6.83	-6.70		-6.47	-6.31		
		2	-6.65	0.11		-6.25	0.14		
		3	-6.62			-6.21			
	CERI	4	-6.51			-6.14			

平成 25 年度 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にするための手法に関する研究  
研究分担報告書

遺伝毒性試験法コメットアッセイ(*in vitro*)試験法開発と、OECD 遺伝毒性試験  
ガイドラインの動向に関する研究

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 部長

### 研究要旨

*In vitro* コメット試験の標準化と OECD ガイドライン化を見据えて、国際共同研究を行ったが、十分な成果は得られなかった。また、*in vitro* 小核試験との比較でも、コメット試験の優位性、有用性は得られなかった。後者の結果は本年度論文化した。*In vitro* コメット試験を標準化するためには更なる調査、研究が必要である。

遺伝毒性の経済協力開発機構(OECD)テストガイドライン(TG)のレビューに関する専門家グループ会議に出席し、ナノ材料の遺伝毒性評価に関するガイダンス、および現行の遺伝毒性試験テストガイドラインの改訂作業に参画した。統計値と生物学的重要性の両方に基づいてデータを解釈することが重視され、陰性の背景データの充実と、計測細胞数の変更を中心に議論され、ガイドラインが改定された。これら改訂ガイドラインは 2014 年 4 月に WNT での承認を受け、その後、正式に発行される予定である。

キーワード; 遺伝毒性、*in vitro* 試験、*in vivo* 試験、OECD ガイドライン

#### A. 研究目的

コメット法は初期 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、*in vitro* コメット試験には標準的なプロトコールが存在せず、また OECD においてもガイドライン化の議論も行われていない。本年度は、このような状況を踏まえて現在の OECD 遺伝毒性試験の状況の調査研究を行った。

#### B. 研究方法

遺伝毒性の経済協力開発機構(OECD)テストガイドラインのレビューに関する専門家グ

ループ会議が 2013 年 11 月 20~22 日にカナダのオタワで開催された。この会議の目的は、2013 年 9 月に提出された遺伝毒性テストガイドラインに対して各局から提起された多くのコメントを集約し、主要な問題を解決することである。これにより、2014 年 4 月の承認に向けて WNT への提出書類の準備を行う。会議は、工業ナノ材料の遺伝毒性に関する工業ナノ材料作業部会(WPMN)ワークショップに引き続いて開催された。したがって、同会議は、WPMN ワークショップの成果についても協議し、一部の勧告を短期的にテストガイドライン原案に適用できるか否かを検討する機会にもなった。

本年度は、本専門家グループ会議に参画し OECD 遺伝毒性試験ガイドラインの改訂に関

する調査・研究を行った。

### C. 研究結果・考察

会議は Tim Singer 氏 (カナダ) が議長を務めた。同氏が会議の開催を宣言し、参加者に歓迎の辞を述べた。カナダ、デンマーク、欧州委員会、イタリア、日本、オランダ、ノルウェー、スウェーデン、英国、米国、経済産業諮問委員会 (BIAC) および国際動物保護委員会 (ICAPO) からの参加者が会議に出席した。フランス、英国、米国の一部の代表者は、Webex により全会議に出席した。事務局が、2014 年 4 月の WNT による承認に向けたテストガイドライン原案の提出に関連した期限を明確にした。次回のレビューは 2013 年 12 月 20 日までに行われる予定であり、承認に向けたテストガイドライン原案の提出期限は 2014 年 2 月 14 日である。改訂中のテストガイドラインの数が多いことを考えると (in vitro のテストガイドラインが 4 件、in vivo のテストガイドラインが 4 件)、今回の会議中にそれらすべてのテストガイドラインの最終案をまとめることは実現不可能と考えられた。同グループはまず一般的な問題に注力し、その後で、次回 WNT 会議での承認に向けて提出される可能性が最も高い上記のテストガイドライン—すなわち、すでにくつかの論評会で協議されているテストガイドラインに注力することが提案された。

#### a) ナノ材料の遺伝毒性に関する WPMN ワークショップの成果

WPMN ワークショップの議長を務める Tim Singer 氏が、同ワークショップで策定された主な勧告を発表した。以下が勧告の要点である。

- i. Ames 試験 (TG 471) には、ある種のナノ材料、たとえば、大きさが 20 nm を超える

不溶性粒子などは適用すべきでない。テストガイドラインには、適用範囲をしかるべく修正することを検討すべきである。

- ii. *In vitro* 試験のテストガイドラインに記載された細胞増殖に基づく細胞毒性の評価基準は、ナノ材料においても最高濃度の決定にも適用できる。用量反応関係が明確に示されるようにするため、場合によっては標準的な  $\sqrt{10}$  よりも広い濃度間隔を検討したり、細胞毒性との関連性が認められていない濃度で検討したりするのが妥当である。
- iii. 処理開始時、また、場合によっては処理後にも、使用した細胞培地において物質の特性解析を実施する必要がある。ナノ材料を細胞培地に添加する際には、可能な限り、*in vivo* 系における生物学および生理学的条件に類似した条件を作ることである。
- iv. 細胞内取込みの程度は、試験結果を解釈する際に検討すべき重要な要因である。状況によっては、哺乳類細胞において取込みが行われないことは、直接的な遺伝毒性という観点からすれば固有のハザード (危険有害性) が低いことを示す場合もある。
- v. サイトカラシン B (cyto B) の非存在下でナノ材料に対する細胞培養系の曝露期間が確保されるように、*in vitro* 小核試験ではテストプロトコールの修正が必要かもしれない。また、cytB 使用の際はその使用のタイミング、また、遅延式同時投与手順を用いた場合はその追加添加について検討すべきである。
- vi. *In vivo* の遺伝毒性試験を実施する前に、ナノ材料が標的組織に到達するか否かを

判断するためにいくつかの毒物動態試験を実施する必要がある。この場合、標的組織は接触部位ではない。矛盾するデータがない場合、ナノ材料が標的組織に到達しなければ、この試験は一次遺伝毒性の検出に適用されないと考えるべきである。

- vii. *In vivo* 試験における投与経路の選択の基本として、ヒトへの曝露に最も適した経路を検討すべきである。

勧告の1つでは、ある種のナノ材料には適用できないとしてテストガイドライン(TG)471 (Ames 試験)の見直しを要求するものがあったが、この種のナノ材料としては、大きさが20 nmを超える不溶性粒子を対象とする。TG 471は、現在改訂中である現行の一連の遺伝毒性テストガイドラインには含まれておらず、その改訂をテストガイドライン作業プランに含めるには、事前にリード国によるOECD事務局へのプロジェクトの提出が必要である。

また、ワークショップでは、特にその他の *in vitro* テストガイドラインは、修正を加えれば有用なテストになりうるということが指摘された。ただし、現行のテストガイドライン 473 および 487 の原案では、不溶性の化学物質および粒子状物質が適用範囲から除外されている。だが、適用によってはこれらの試験が有効と予想される。

ワークショップは、いくつかの修正を現段階でテストガイドラインに直接盛り込むことは誤解を生じる可能性があることが示唆された。一部の勧告を裏付けるためにさらなる作業が必要であることから、テストガイドラインの修正は部分的にとどめられ、必要な修正をすべて網羅することはできなかった。ワークショップでは、遺伝毒性に関するOECDテストガイドラインの

イントロダクションの章または作成中のガイダンス文書に含める、という合意がされた。また、出席した専門家で構成されるサブグループが協力して、いくつかの確立された勧告を集約できる可能性のあるテストガイドラインの付属書の作成の可能性について検討することでも合意した。

#### b) GTTC の活動に関する発表

David Lovell 氏が HESI (健康環境科学研究所) GTTC (遺伝毒性技術委員会) のデータ解釈作業部会の調査について発表した。この作業部会の目的は、遺伝毒性試験の結果の解釈に関するガイダンスを提供すること、現在進行中の計画について、各種テストガイドライン間の結果の解釈を一致させること、また、OECD との考え方の擦り合わせである。GTTC は、特に *in vitro* の遺伝毒性試験について、許容可能な陰性対照の背景データの範囲を確立するために、経験豊富な検査室からのデータ収集を開始することを計画している。しかし、本作業部会は、同部会の最終 Web 会議において、OECD テストガイドラインは現在改訂対象として議論されていること、データ収集にはかなりの時間がかかること、よって、現在改訂中のテストガイドライン原案の承認を遅延させないため、2つの計画は別個のものとして考えるべきであることを確認した。

#### c) 一般的な問題 (*in vitro*, *in vivo* 共通)

一般的な問題の多くは改訂中のすべてのテストガイドラインに適用されるが、実用的な理由から、会議中に合意が形成された変更点は TG 473 (*in vitro* 染色体異常試験) を中心に議論され、改訂作業が行われた。その他のテストガイドラインは、これに基づいて会議後に適宜

改訂される予定である。

#### ①データの解釈

統計値と生物学的重要性の両方に基づいてデータを解釈すべきであるということ、すなわち、明らかな陽性反応または陰性反応を判定するための主要基準のリストにおいて、生物学的重要性の一要素として、陰性の背景データとの比較が有用であるという点で合意した。よって、明らかに陽性反応であると結論づけるには、以下の3つの基準(同等の重み)を満たさなければならない:

- i. 1つ以上の試験濃度で、同時の陰性対照と比較して統計的に有意な増加が示される。
- ii. 適切な傾向分析で評価を行った場合に、増加が用量依存的である。
- iii. いずれかの結果が陰性の背景データの分布の範囲外である(たとえば、ポアソンに基づく95%管理限界)。

#### ②陰性背景データベース

現時点では、陰性背景データの範囲を定義するための数値を提示することは不可能であることが認識された。試験結果を陰性背景データベースに含めるにあたっては、ある程度の柔軟性をもたせ、ポアソンに基づく95%管理限界を推奨することで合意がなされた。これと同じ推奨限界を試験に適用することでも合意された。しかし、試験が不必要に適応できなくなることを避けるため、また、背景データベースの範囲が狭くなること(データベースの95%管理限界の範囲外になると予想される結果を排除することによって生じる可能性がある)を避けるため、柔軟性を持たせることで合意した。

また、陰性背景データベースを構築する際は、既報の文献と矛盾しない限り、試験の結果を却下すべきではないという点で合意した。そ

の後、データベースが構築されたら、新たな試験のための除外基準を既存のデータベースに基づいて作成すべきである。

データベース構築中の開始数として、*in vitro*テストガイドラインについては10試験を最低限度とするが、その後はできれば20試験以上に増やすことで合意した。*In vivo*テストガイドライン、特に生殖細胞アッセイについては、必ずしも20試験への到達を適用しないこととした陰性背景データベースの再確立にあたって、何を試験条件の重大な変化とみなすかという判定は、試験実施機関の判断に任せた。

#### ③計数する細胞の数

作業部会では、*in vivo*と*in vitro*試験ではアプローチが異なる場合があることを理解した。動物間変動や、5動物間の異なる値を信頼できるデータとして用いることは、*in vitro*試験の解析要素(すなわち、2回の反復測定)には無い。以下の2つの主な選択肢について計数細胞数を検討した。

- i. 陰性背景データに基づいて、80%の検出力で陰性対照の2倍の発現頻度を観察するために必要な、妥当な計測細胞数を決定する。
- ii. 事前にテストガイドラインにおいて計数する細胞数に関する要件を示す。計数細胞の数はあらゆる場合において同一とする。

規制上の評価の見地から、最初の選択肢は不十分であると考えられた。というのも、計数細胞の数が試験実施機関ごとに異なることが予想されるためである。また、単一の計数細胞数を決定することは、バックグラウンド(背景値)となる陰性データが細胞系や試験実施機関によってさまざまであることを考えると、簡単ではないと考えられた。たとえば、TG 473の場合、バ

ックグラウンドを4~5%とすると、現在推奨されている細胞数200個としても、明らかな陽性/陰性と結論づけることは比較的簡単であるが、バックグラウンドがわずかに1~2%である場合(たとえば、ヒトリンパ球ではしばしば1.5%を下回る)、判定精度の向上のためには細胞400個を計数する必要がある。

しかし、作業部会では、第2の選択肢を選択することで合意し、計数細胞の合計数を最小化するとともに、(1)ゼロの数を減らし、(2)80%の検出力で2倍増加の達成を目指す、という2つの目標を確実に達成するため、この選択肢について考えられる導入方法について協議した。

TG 473 原案における細胞400個を計数するという提案について、WNTのコメントによって提起された主な問題点は、計数は自動化することができないため、試験実施者の負担が増加する、というものであった。ワークショップでは、サンプル・サイズ(標本数)の増加は陽性の結論を下すうえで必要ないという点で合意した。作業部会での最終提案は、細胞300個を計数するが、異常が多数認められた場合にはこの数を減らすことができ、その場合、結果については明らかに陽性との結論が下される、というものであった。被験化学物質が明らかに陰性であると結論づけるためには、細胞300個を計数しなければならない。細胞300個および平均発生率1%の場合にカウントがゼロになる確率は、約5%である。1つの濃度につき細胞200個というデザインと細胞400個というデザインの妥協点として、1つの濃度につき細胞300個(1つの培養物、または同型培養物の総和)という上記の数を選択した。

④その他のテストガイドラインにおける計数細胞数の決定

- i. TG 487 (*in vitro* 小核試験): 現行のテストガイドラインと比較して変更なし(すなわち、1つの濃度につき細胞2000個)。
- ii. TG 475 (*in vivo* 染色体異常試験): *In vitro* テストガイドラインを使用した場合と比べて「ゼロ」の頻度をはるかに低くなることが予想されるため(動物5~6匹を解析対象とするため、また、データを併合できるため)、細胞200個を計数することを推奨した。
- iii. TG 474 (*in vivo* 小核試験): 細胞2000個(現行のテストガイドライン)と細胞5000個(現行のテストガイドライン原案)の妥協点として、細胞4000個を計数することを提案した。この数は、先の原案と比較すると減少にあたるが、依然として必要なだけの感度が確保される十分な数である。これは、一部の検査室や一部の動物系統において、経時的に小核の自然発生頻度の低下が認められているという懸念に対処するものであり、手順が自動化される可能性があることから、検査室の余分な負担が軽減されると考えられる。

#### ⑤試験実施機関の技能

試験実施機関の技能に関する節は、試験系の感度および動的範囲を立証する必要性を盛り込むよう修正された。

#### ⑥判定基準

明確化するため文面が修正された。同時ポジティブ・コントロールの判定基準に陽性背景データベースとの適合性が追加された。

#### d) *In vitro* に特有の問題

##### ①細胞毒性

55 ± 5%の細胞毒性が、測定細胞数の相対的増加量(RICC)と相対的な細胞集団倍加

数(RPD)の減少に相当すること、また、同時の陰性対照の45±5%へのリンパ球初代培養細胞の分裂指数(MI)の減少に相当することを明確化するため、*in vitro* テストガイドラインの文面を修正した。さらに、TG473 で使用された、55+/-5%という範囲の上方を慎重に検討することを推奨するという文面も TG487 に盛り込まれ、60%を超える細胞毒性に言及した文章と置き換えられる予定である。

#### ②陽性対象

明確化のため、S9 を用いる際の陽性コントロールの必要性に関する文面が TG 473 の第 25 節で修正され、試験実施機関の技能を評価するため、また、陽性対照として、推奨される陽性化学物質の表がこの節の近くに移動された。

#### ③培養採取時期

TG 473 の第 27 節において、いつ条件を満たす必要があるか、また、いつ3つの条件が必要となるかが明確化された。この節は簡略化され、TG 487 の関連する節にも適用される。

#### ④同型培養と単一培養：

計数細胞の合計数が同じであるという条件で、シングルとデュプリケートカルチャーをいずれも使用できるという点が合意された。このことは、培養間の変動がわずかであることを示す証拠によって裏付けられている。

### e) *In vivo* に特有の問題

#### ①限界用量

文献で得られているデータに基づいて、(1) 当該化学物質が骨髄に達することが証明されており、かつ、(2) この曝露によって骨髄毒性は生じない、という条件で、限界試験の実施をテストガイドラインで認めることで合意した。

#### ②動物の数および性別

文献の一部のデータでは、小核試験において性差は認められないことが示されているが、米国国家毒性プログラム(NTP)試験による最近の解析で、異なる結果が示された。これらの試験では、小核試験と28日間反復投与試験を併用しており、よって、雌雄両方についてデータが得られた。少なくとも一方の性別で結果が陽性であった47種の化学物質を解析した結果、以下の結果が示された：

- i. 化学物質の70%は雌雄いずれにおいても陽性であり、雄のみまたは雌のみにおいて陽性であった化学物質の数は同数であった。したがって、いずれか一方の性別で試験を行った場合、試験の感度は約15%低下する。
- ii. 雌雄の両性が陽性反応を示した場合の反応の強さは、雌に比べて雄の方が若干強かった。
- iii. 急性および亜慢性毒性データの検討は、小核の誘導における性差を予測するうえで有用ではなかった。したがって、ある化学物質についてより感受性の高い性別を選択するためにこれらのデータを使用することは不可能である。曝露データについては利用不可能であるとされた。

標準的には雌雄の両性の試験を行うべきであり、また、一方の性別のみを用いて試験を実行しようとする場合には、一方の性別のみが妥当であることを証明する立証責任が試験実施機関に求められる。各性別の動物数についても検討した。性特異的な作用が認められない場合には、1群につき雄5匹、雌5匹を用いて試験する必要はない。この場合、合計6匹(雄3匹と雌3匹)を解析することにより、試験の妥当な検出力が確保される。性特異的な作用が認められる場合は、雄3匹および雌3匹から



得られたデータを併合することはできない。この場合には、最も反応が大きかった性別の5匹を対象とした追跡調査解析を実施する必要があると考えられる。性特異的な作用の有無についてデータの解析方法に関するガイダンスを提供するため、また、解析のためのデータの併合方法に関するガイダンスを提供するため、付属書の作成が必要かもしれない。一部の専門家は、雄と雌から得られたデータを併合することに疑問を感じており、合意を確認する前に当該付属書を参照する必要があることを指摘した。(その後の電話会議で本問題についてはすでに専門家で議論済みであり、性特異的な作用が認められない場合には、現行通り片性で1群5匹を用いて試験することで合意された。)

### ③併合試験

作業部会では、小核試験と28日間反復投与毒性試験の併用が有用であるという点でも合意した。ただし、これはさらに多数の項目について調査しなければならないことを意味している。

## D. 結論

会議中に検討されたテストガイドラインは、年末までに次のWNT論評会に向けた最終提出を視野に入れて最終承認される。2つのWeb会議(1つは*in vitro*テストガイドラインに関するもの、1つは*in vivo*テストガイドラインに関するもの)が12月半ばに実施され、上記の整理統合されたテストガイドラインについて協議が行われた。その結果、上記に示したように*in vivo*試験の動物の性と動物数に関しては現行のガイドラインのままで合意された。

*In vivo*の生殖細胞テストガイドラインに関

連した固有の問題は、時間が不足していたため検討できなかったが、検討された問題の大部分はこれらにも該当するため、これらのテストガイドラインは会議での協議に基づいて今後修正される予定である。このテストガイドラインを2014年4月のWNTの承認に向けて提出できるか否かは不明である。

TG 476(ほ乳細胞遺伝子突然変異試験)およびTK TGの原案については会議中に検討されなかったが、これらのテストガイドラインをさらに進展させるため、1月上旬にWeb会議を企画する。(2月末の時点ではまだ実施されていない)

オランダがリード国としてまとめているイントロダクションの部分に関してはテストガイドラインの最終的な内容に大きく依存するため、テストガイドラインの最終承認後に本文章を確定する。

尚、今回の会議で承認を受けたテストガイドライン(TG473)の変更箇所を付録として添付した。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- ① 本間正充 安全性に関するトピックの動向 M7:潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性(変異原性)不純物の評価及び管理 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 44, 1010-1015(2013)
- ② Hayashi M, Honma M, Takahashi M, Horibe A, Tanaka J, Tsuchiya M, Morita T, Identification and Evaluation of Potentially Genotoxic Agricultural and Food-related Chemicals. Food Safety 1, 32-42 (2013)
- ③ Horibata K, Ukai A, Kimoto T, Suzuki T, Kamoshita N, Masumura K, Nohmi T, Honma

- M. Evaluation of in vivo genotoxicity induced by N-ethyl-N-nitrosourea, benzo[a]pyrene, and 4-nitroquinoline-1-oxide in the Pig-a and gpt assays. *Environ Mol Mutagen.* 54, 747-754 (2013)
- ④ Kimura A, Miyata A, Honma M. A combination of in vitro comet assay and micronucleus test using human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutagenesis.* 28, 583-90 (2013)
- ⑤ Stefan Pfuhrer, Rosalie Elespuru, Marilyn Aardema, Shareen H. Doak, E. Maria Donner, Masamitsu Honma, Micheline Kirsch-Volders, Robert Landsiedel, Mugimane Manjanatha, Tim Singer, James H. Kim, Genotoxicity of Nanomaterials: Refining Strategies and Tests for Hazard Identification. *Environment Mol. Mutagen.* 54, 229-239 (2013)
- ⑥ Kimoto T, Horibata K, Chikura S, Hashimoto K, Itoh S, Sanada H, Muto S, Uno Y, Yamada M, Honma M. Interlaboratory trial of the rat Pig-a mutation assay using an erythroid marker HIS49 antibody. *Mutation Research,* 755, 126-34 (2013)
- ⑦ Sassa A, Kamoshita N, Matsuda T, Ishii Y, Kuraoka I, Nohmi T, Ohta T, Honma M, Yasui M, Miscoding properties of 8-chloro-2'-deoxyguanosine, a hypochlorous acid-induced DNA adduct, catalysed by human DNA polymerases, *Mutagenesis* 28, 81-88 (2013)
- ⑧ 本間正充:第II編 薬物評価における in silico 手法の活用、第4章 変異原性の予測—医薬品中に存在する不純物の評価—「In vitro 毒性・動態評価の最前線」シーエムシー出版 (小島肇夫監修)2013年
2. 学会発表
- ① 本間正充:ICH ガイドライン状況-遺伝毒性不純物(M7) 日本環境変異原学会 MMS 研究会第62回定例会 2013年5月長野県諏訪郡
- ② 本間正充:医薬品中に含まれる遺伝毒性不純物の安全性評価 日本環境変異原学会微生物変異原性試験研究会第49回定例会, 2013年6月 東京
- ③ 本間正充:医薬品開発における遺伝毒性予測とリスク評価 CBI 学術講演会 2013年 東京
- ④ 本間正充:Risk assessment and management of genotoxic impurities in pharmaceuticals(医薬品中の遺伝毒性不純物のリスク評価と管理) 第3回中国薬物毒理学会医薬品非臨床安全性評価研究フォーラム)2013年7月 中国蘇州
- ⑤ 本間正充:遺伝毒性の予測とリスク評価 平成25年度国立医薬品食品衛生研究所シンポジウム 2013年7月
- ⑥ M. Honma: A New Strategy for Hazard and Risk Assessment of Genotoxic Impurities. 第6回遺伝毒性試験国際ワークショップ 2013年10月 ブラジル・イグアス
- ⑦ M. Honma: Risk Assessment and Management of Genotoxic impurities in Pharmaceuticals. 第11回国際環境変異原学会 2013年11月 ブラジル・イグアス
- F. 知的所有権の取得状況  
なし

TG473

6. This test is used to detect chromosomal aberrations that may result from clastogenic events. The analysis of chromosomal aberration induction should be done on cells in metaphase initiated since the beginning of the treatment. It is thus essential that mitosis has occurred in both treated and untreated cultures. *For Manufactured Nanomaterials, specific adaptations of this Test Guideline are needed (refer to annex, MN GD, Introduction document or GD).*

9. Appropriate culture medium and incubation conditions (culture vessels, humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, incubation temperature of 37°C) should be used for maintaining cultures. Cell lines should be checked routinely for the stability of the modal chromosome number and the absence of *Mycoplasma* contamination (39) (40), and cells should not be used if contaminated or if the modal chromosome number has changed. The normal cell cycle time of cell lines or primary cultures used in the testing laboratory should be established and should be consistent with the published cell characteristics (41).

21. If the maximum concentration is based on cytotoxicity, the highest concentration should aim to achieve  $55 \pm 5\%$  cytotoxicity using the recommended cytotoxicity parameters (*i.e.* reduction in RICC and RPD for cell lines and reduction in MI for primary cultures of lymphocytes to  $45 \pm 5\%$  of the concurrent negative control). Care should be taken in interpreting positive results only to be found in the higher end of this range (24).

25. Positive controls are needed to demonstrate the ability of the cells used to identify clastogens under the conditions of the test protocol used and the proficiency of the exogenous metabolic activation system, when applicable (examples of positive controls are given in the table x below). Because *in vitro* mammalian cell tests for genetic toxicity are sufficiently standardized, the use of positive controls may be confined to a clastogen requiring metabolic activation. Provided it is done concurrently with the non-activated test using the same treatment duration, this single positive control response will demonstrate both the activity of the metabolic activation system and the responsiveness of the test system. Long term treatment (without S9) should however have its own positive control as the treatment duration will differ from the activated test. Each positive control should be used at one or more concentrations expected to give reproducible and detectable increases over background in order to demonstrate the sensitivity of the test system (*i.e.* the effects are clear but do not immediately reveal the identity of the coded slides to the reader), and the response should not be compromised by cytotoxicity exceeding the limits specified in the TG.

Category	Chemical	CASRN
<b>1. Clastogens active without metabolic activation</b>		
	Methyl methanesulphonate	66-27-3
	Mitomycin C	50-07-7
	4-Nitroquinoline-N-Oxide	56-57-5
	Cytosine arabinoside	147-94-4
<b>2. Clastogens requiring metabolic activation</b>		
	Benzo(a)pyrene	50-32-8
	Cyclophosphamide	50-18-0

**TABLE: REFERENCE CHEMICALS RECOMMENDED FOR ASSESSING LABORATORY PROFICIENCY AND FOR SELECTION OF POSITIVE CONTROLS**

27. For thorough evaluation, which would be needed to conclude a negative outcome, all three following experimental conditions should be conducted using a short term treatment with and without metabolic activation and long term treatment without metabolic activation (see paragraphs 39, 40 and 41):

- Cells should be exposed to the test chemical without metabolic activation for 3-6 hours, and sampled at a time equivalent to about 1.5 normal cell cycle length after the beginning of treatment (18),
- Cells should be exposed to the test chemical with metabolic activation for 3-6 hours, and sampled at a time equivalent to about 1.5 normal cell cycle length after the beginning of treatment (18),
- Cells should be continuously exposed without metabolic activation until sampling at a time equivalent to about 1.5 normal cell cycle length. Certain chemicals (e.g. nucleoside analogues) may be more readily detected by treatment/sampling times longer than 1.5 normal cell cycle length (24).

In the event that any of these conditions lead to a positive response, it is not necessary to complete the remaining conditions.

Paragraph 29 to be developed based on the following considerations

- Count 300 cells
- This number can be reduced when a high number of aberrations are observed and the result will be concluded as clearly positive.
- To conclude a test chemical is clearly negative, 300 cells should be counted.