

表 10 反復投与胃腸管小核試験結果一覽 (4 日間投与)⁷⁾

| Chemical (dose range, mg/kg/day) | Results in the tested tissues | | | Battery | | Rat carcinogenicity (main target tissue) |
|-------------------------------------|-------------------------------|-------|----------------|--------------------|------------|---|
| | Glandular stomach | Colon | Bone marrow | in vitro | | |
| | 4 day | 4 day | 4 day | Ames | CA | |
| MNNG (6.25-50) | + | - | - | + (-S9) | + (-S9) | Stomach |
| NMUT (5-20) | + | - | - | + (-S9) | + (-S9) | Stomach |
| 4NQO (5-20) | + | - | + | + (-S9) | + (±S9) | Stomach |
| MNU (5.84-35.1) | + | + | + | + (-S9) | + (-S9) | Stomach, colon, etc. |
| DMH 2HCl (10-80) | - | + | + | Inc. ^{a)} | + (-S9) | Colon |
| PhIP HCl (50-250) | - | + | + | + (+S9) | + (+S9) | Colon |
| KBrO ₃ (80-120) | + | - | + | + (±S9) | + (-S9) | Kidney |
| Quercetin (1000) | - | - | - | + (±S9) | + (±S9) | Non-carcinogen (mostly reported) |
| Amaranth (1000) | - | - | - | - | + (-S9) | |

図1 反復投与肝臓小核試験における肝小核出現の推移

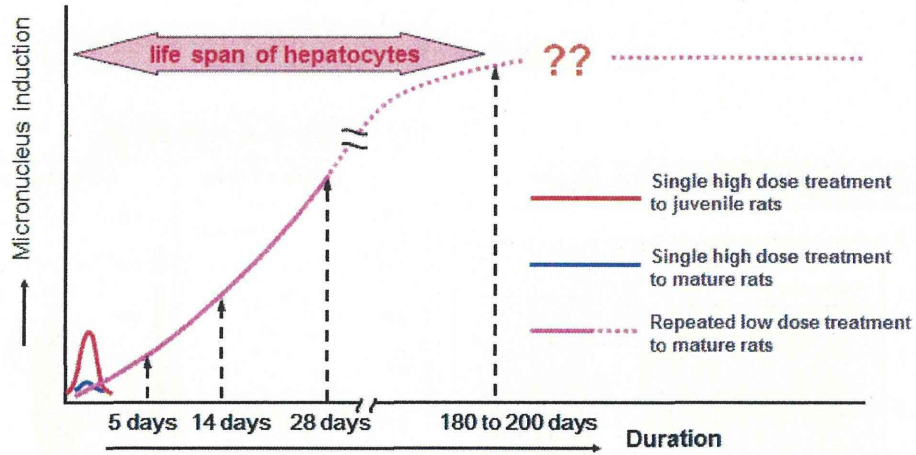


図2 DEHP と Carbendazim の反復投与肝臓小核試験結果³⁾

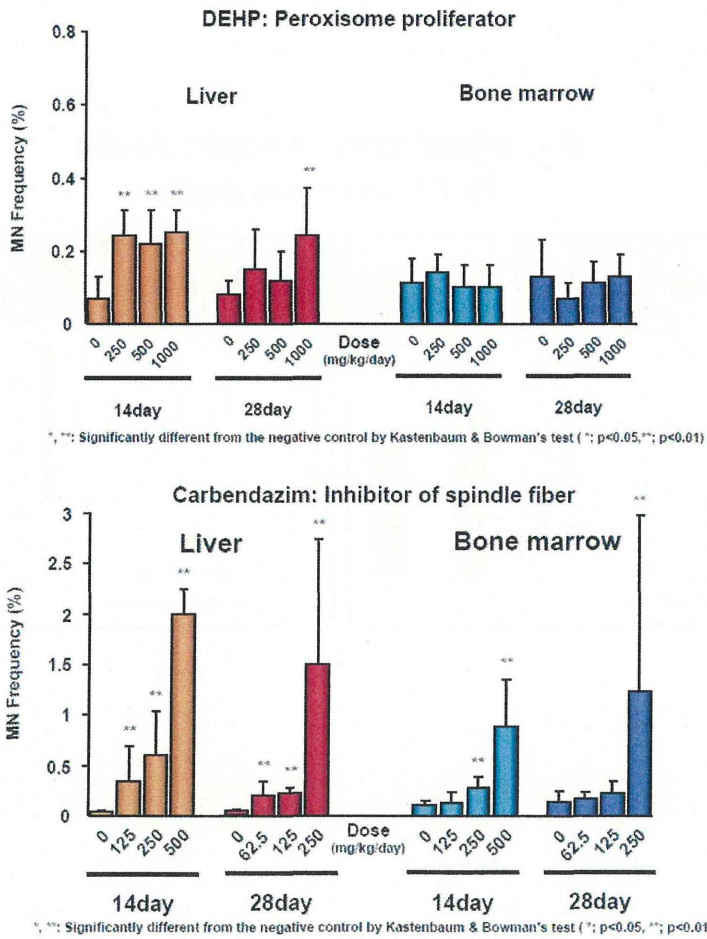


図3 固定肝細胞の保存期間による影響

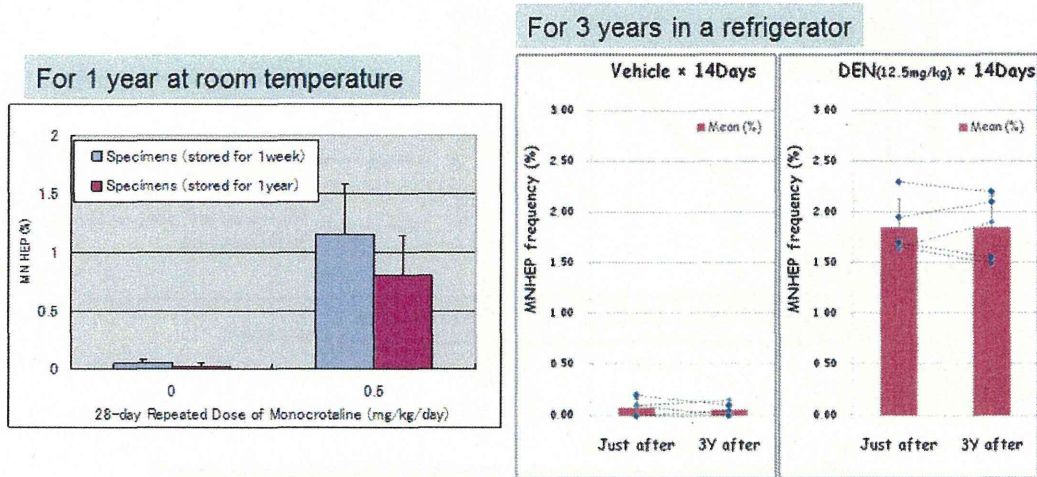


図4 固定胃腸管細胞の保存期間による影響

For 3.5 years in a refrigerator

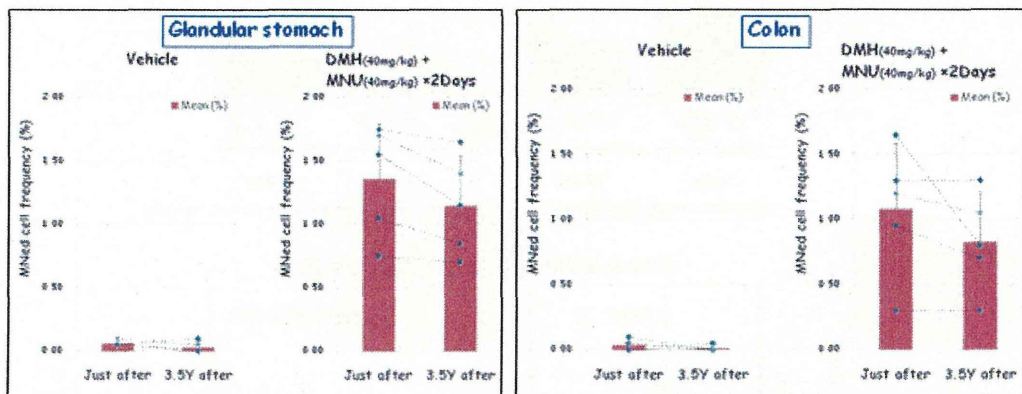


図5 IWGT で指摘された検討課題

6th IWGT
Iguassu, Brazil

Focus Further Research

General

- Need data on toxic, non-carcinogenic, substances
- Need data on other routes of administration:
dietary exposure, drinking water
- Need data to decide on number of hepatocytes to be counted

PH method

- Sampling time (in twice dosing): need for 1 or 2 timepoints?

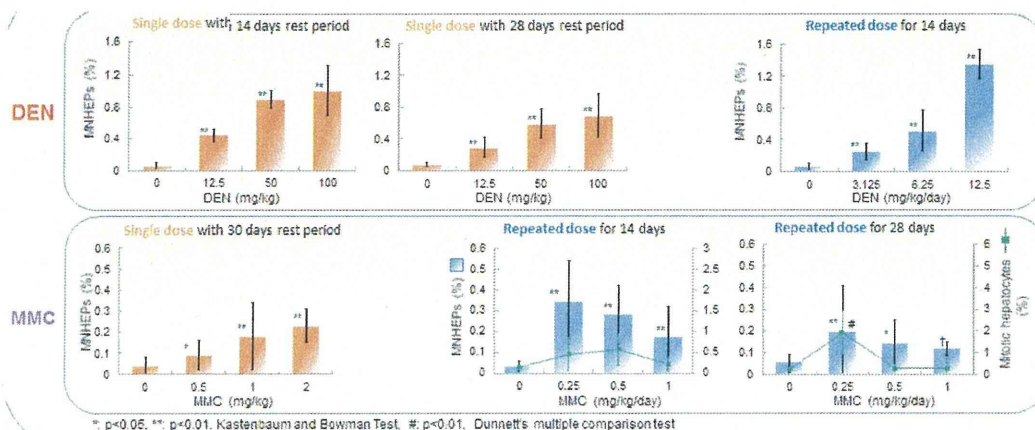
JR method

- Suitable age range animals
- Need data for sampling time after 7 days

RD method

- Positive control: need for concurrent control, duration of dosing positive control?
- Suitable age range animals

図6 変異原単回投与 14 日後あるいは 28 日後の肝小核誘発性⁵⁾



Standard Protocol

Repeated Dose Liver Micronucleus Assay in Young Adult Rats

1 Introduction

The liver micronucleus (MN) assay is a useful method to evaluate MN inducibility in rodent livers and has high sensitivity to detect genotoxic hepatocarcinogens which are undetectable in the bone marrow (BM) MN assay. As one of the most practical assays, the method of repeated dose liver (RDL) MN assay was established by previous reports [Narumi et al., 2012, Takasawa et al., 2013]. Collaborative investigations on the RDLMN assay are now being conducted by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) - Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS).

2 Assurance of Data Quality

The study should be conducted in a test facility that is Good Laboratory Practice (GLP) compliant.

3 Animal Use and Welfare

Appropriate national and/or international regulations and/or guidelines on animal use and welfare should be applied. The 3R-principles for experimental animals should be considered for making up the experimental design.

4 Materials and Methods

4.1 Test Compound and Controls

4.1.1 Test compound

The test compound is dissolved or suspended in an appropriate solvent/vehicle with an appropriate procedure to prepare the dosing formulations. The formulations are used within the period for which the stability of the test compound in the dosing formulations is certified. Concentrations (and homogeneity if necessary) of the test compound in the dosing formulations are analyzed with an appropriate method validated in the test facility. The concentration analysis is usually done in the test facility before the dosing procedures.

4.1.2 Negative control (vehicle/solvent)

Vehicle/solvent for the preparation of the test compound dosing formulations is used as the negative control. The vehicle/solvent should not produce toxic effects at the dose volumes used in this study, and should not be suspected of chemical reaction with the test compound. An appropriate vehicle/solvent should be chosen for the test compound: e.g. water, methylcellulose aqueous solution

and olive oil.

4.1.3 Positive control

A positive control group is not usually included with each test, because the RDLMN assay is currently under development for integration into a general toxicity study without a positive control group. Instead of setting a concurrent positive control group, the use of a hepatocyte-sample from periodic studies with a positive control group is expected as indicated by the ICH S2(R1) guidance.

4.2 Animals

4.2.1 Species, strain and sex

Male, CrI:CD(SD) rats

4.2.2 Age at initial administration

6 weeks old

According to the OECD test guideline for the Repeated Dose Toxicity Study in Rodent (TG407), healthy young adult animals should be used. Dosing should begin before the animals are nine weeks old, in any case.

4.2.3 Number of animals

At least five animals should be used at each dose level.

4.2.4 Quarantine and acclimation

Animals are weighed on their arrival and at the end of the quarantine, and they are checked for their general health conditions once a day during this period (i.e. quarantine period for at least 5 days) to confirm their body weight gains and normality in their conditions. The animals are acclimated until the day before the initial dosing as well as during the quarantine period, checking their clinical signs.

4.2.6 Animal allocation to treatment groups

Only healthy animals are assigned to groups by randomization on the basis of body weight according to the standard operating procedures (SOP) in each testing facility.

4.2.7 Body weight at initial dosing

At the initiation of the administration, the body weights of the animals should be within the range of the mean body weight \pm 20%.

4.3 Animal Husbandry

Animals are husbanded under appropriate housing and feeding conditions according to SOP in each

testing facility, according to Section 3.

4.3.1 Diet

Animals are fed *ad libitum* with a commercially available pellet diet. Lot of the diet is analyzed and is confirmed to meet the criteria of the SOPs in the test facility.

Animals are fasted from the evening on the day before the specimen preparation (approximately 18-h).

4.3.2 Drinking water

Tap water is given to the animals *ad libitum*. The drinking water is periodically analyzed and is confirmed to satisfy the criteria of the SOPs in the test facility. The tap water is exchanged at least once a week.

4.3 Preparation of Reagent Solutions

4.3.1 Collagenase solution

Collagenase Yakult S (approximately 1000 unit/mg, Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan) is recommend to use. Collagenase is dissolved in Hanks' Balanced Salt Solution (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free) at 100 unit/mL. The solution is adjusted to the pH at 7.5-8.0 (0.01 g/L of phenol red is added if necessary) and stored in a refrigerator until use. The collagenase solution should be used within a few days after the preparation.

4.3.2 Staining solution

Acridine orange (AO) is dissolved in purified water at 1 mg/mL. 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) is dissolved in purified water at 20 µg/mL. These solutions are mixed at the same volumes to prepare the staining solution with the final concentrations at 500 µg/mL of AO and 10 µg/mL of DAPI. The staining solution is stored in a refrigerator until use. The solution with the final concentration should be used within a month after the preparation.

4.4 Liver Micronucleus Assay Procedures

4.4.1 Administration to animals

The test compound is usually administered by gavage using a stomach tube. Other routes of exposure may be acceptable where they can be justified. However, intraperitoneal route is not recommended as it could expose the liver directly to the test compound rather than *via* the circulatory system. The dose volume is usually used at 1 ml/100 g body weight.

4.4.3 Treatment schedule

Once daily for 14 or 28 days

4.4.4 Group composition

| Test substance | Dosage volume (mL/kg/day) | Dose * (mg/kg/day) | Dosing period (days) |
|----------------|---------------------------|--------------------|----------------------|
| Vehicle | 10 | 0 | 14 or 28 |
| Test substance | 10 | Low | 14 or 28 |
| Test substance | 10 | Middle | 14 or 28 |
| Test substance | 10 | High | 14 or 28 |

*: At least, three dose levels should be provided to demonstrate dose related responses. The dose levels used in this study should preferably cover a range from toxic dose to no adverse effect level (NOAEL).

For a non-toxic compound, the maximum is 1000 mg/kg/day.

4.4.4 Clinical observation

General clinical observation are made at least once a day, preferably at the same time(s) each day and considering the peak period of anticipated effect after dosing.

At least twice a daily, all animals are observed for morbidity and mortality.

4.4.5 Body weight

All animals should be weighed at the initiation of administration and before the specimen preparation, and at least once a week.

4.4.5 Liver organ weight

The liver is weighed in all animals upon necropsy.

4.4.5 Preparation of hepatocyte specimens

4.4.5.1 Hepatocyte isolation

On the next day of the last administration for each time point (15 or 29 days), rats are euthanized under anesthesia.

Hepatocytes are isolated from the liver by the following Non-perfusion method [Narumi et al., 2012].

- (1) The liver is removed from each animal, and a part (approximately 1-2 g) of its left lateral lobe is sliced in approximately 0.5-1 mm thickness with a fine razor.
- (2) The liver slices are washed with HBBS or saline and transferred into a 50-mL centrifuge tube. The collagenase solution containing 100 unit/mL of Collagenase Yakult S (see section 4.3.1) is added to the tube at approximately 20 mL.
- (3) The tubes are incubated at 37°C in a water bath while being shaken at 50 rpm for an hour.

On the way at 30 min after starting of the incubation, the tubes are shaken vigorously at approximately 160-200 rpm for 1 min. At the end of the incubation, the vigorous shaking is performed again.

- (4) Then, the collagenase solution and liver tissues are mixed with a big pipette (25-30 mL) vigorously to release hepatocytes. The hepatocyte suspension is strained through a gauze sheet to remove massive tissues from the suspension, and then the hepatocyte suspension is filtered through a cell strainer (pore size: 100 μ m).
- (5) The mixture is centrifuged at 50 \times g for 1 minute to collect the fixed hepatocytes.
- (6) The hepatocytes are suspended again in about 10-mL volume of 10% formalin to wash them.
- (7) The mixture are centrifuged at 50 \times g for 1 minute.
- (8) The hepatocytes are suspended in an appropriate amount of 10% formalin to yield the stock hepatocyte suspension.

The stock suspensions are stored at room temperature until microscopic observation.

4.4.6 Microscopic observation

Just prior to the microscopic observation, the hepatocyte suspension is mixed and stained with the same volume of the AO-DAPI staining solution (see section 4.3.2). The mixture is spread onto a clean glass slide to prepare a specimen for microscopic observation. The prepared slide specimen is observed under a fluorescent microscope with U excitation (wave length: 330-385 nm) with the coding method to avoid bias for the microscopic observer. For each animal, at least 2000 parenchymal hepatocytes (HEPs) are examined to score the number of micronucleated HEPs (MNHEPs) [Narumi et al., 2012, Takasawa et al., 2013].

4.4.6 Statistics

Differences in the incidences of MNHEPs between the test compound groups and the vehicle (negative) control group are analyzed using the conditional binomial test [Kastenbaum and Bowman, 1970].

4.5 Histopathological evaluation in the liver

Where possible, histopathological examination is recommended to evaluate hepatotoxicity that may interfere with the micronucleus inducibility during the dosing period. The examination can bring useful information about the relationship between the micronucleus induction and hepatotoxicity.

Upon euthanasia, the residual liver tissue of the left lateral lobe are fixed with 10% formalin, embedded in paraffin, and then stained with hematoxylin and eosin (H.E.) according to the standard method. Histopathological examination is performed under a light microscope.

References

- Narumi K., *et al.*: Development of repeated-dose liver micronucleus assay using adult rats: investigation of diethylnitrosamine and 2,4-diaminotoluene. *Mutation Res.*, **747**, 234-239 (2012)
- Takasawa H., *et al.*: Development of a repeated-dose liver micronucleus assay using adult rats (II): Further investigation of 1,2-dimethylhydrazine and 2,6-diaminotoluene. *Mutation Res.*, **751**, 12-18 (2013)
- Kastenbaum M. A. and Bauman K. O.: Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutation Res.*, **9**, 527-549 (1970)

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

Bhas42 細胞を用いる形質転換試験の吸光度測定による
ハイスループット試験法の確立

分担研究者 山影 康次 (一財)食品薬品安全センター秦野研究所
佐々木澄志 (一財)食品薬品安全センター秦野研究所

研究要旨

我々が開発した過酸化水素処理による形質転換試験法は、形質転換した細胞からなるコロニー (形質転換巣) を形態学的に判別する従来法の欠点を解決することができると考えられた。

今回我々は、Bhas 42 細胞を用いて 96 ウェル法による形質転換試験を行い、同一プレートについて従来の観察法と過酸化水素法による判定を行い、それらの結果を比較した。過酸化水素法については、測定した各ウェルの吸光度の平均値で判定する方法とカットオフ値 (吸光度が 0.12 以上を陽性と判定) を設定して陽性ウェル数で判定する 2 つの方法を用いた。

12 物質 (8 発がん物質と 4 非発がん物質) について、イニシエーション試験およびプロモーション試験を実施した結果、イニシエーション試験の結果は、吸光度の平均値法では 2 物質、カットオフ値法では 1 物質が観察法の結果と一致しなかった。プロモーション試験の結果は、平均値法およびカットオフ値法による判定ともに 2 物質の結果が観察法と一致しなかった。しかしながら、カットオフ値法の結果は、イニシエーション試験ではエームス試験結果と一致し、イニシエーション試験とプロモーション試験の総合結果は発がん性試験結果と一致し、観察法よりも一致率が高かった。

過酸化水素耐性細胞は前がん状態にある細胞であると考えられるが、形態学的に形質転換した細胞のみではなく、増殖活性を獲得しカットオフ値以上の吸光度を示す細胞集団となった前がん細胞も評価に加えることにより、より精度良く発がん性を簡便かつ客観的に評価できることが示唆された。

A. 研究目的

In vitro 発がん性試験として行われている形質転換試験では、形質転換した細胞 (形質

転換巣) を形態学的に判別することから、観察者の主観に左右される。この欠点を解決するため、形質転換細胞を客観的かつ効率的に

判定する過酸化水素法を開発した。Bhas 42 細胞を過酸化水素で処理すると正常細胞が選択的に死滅することから、過酸化水素処理後の生存細胞すなわち前がん細胞を含む形質転換細胞を吸光度法で測定することにより、客観的評価が可能となった。

今回我々は、過酸化水素法の有効性を確認するために 12 物質の形質転換試験を実施し、従来の観察による評価と過酸化水素法による評価結果を比較検討した。

B. 研究方法

本研究では、発がん物質として 8 物質、非発がん物質として 4 物質を選択し、Bhas42 細胞を用いて形質転換試験を実施した。

96 ウェルプレートを用い Bhas 42 細胞をウェルあたり 200 細胞または 400 細胞播種し、浅田らの方法¹⁾および酒井らの方法²⁾の試験プロトコールとほぼ同様にイニシエーション試験およびプロモーション試験を実施した(図 1)。培養終了後、過酸化水素で 24 時間処理後、WST-8 を加え、マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定し生細胞率を求めた。その後、同じプレートをメタノール固定し、ギムザ染色することにより、肉眼観察による形質転換巢の有無を判定した。なお、1 群につき 96 ウェルプレート 1 枚 (96 ウェル/群) を用いた。

形質転換試験巢の判定は、酒井らの方法²⁾に従い、100 個以上の細胞からなる形質転換巢で、紡錘形をなして周囲の細胞とは異なる細胞形態 (spindle-shaped)、細胞質が塩基性(濃い紫色)に濃染 (basophilic)、ランダムな配列で互いに交差 (criss-cross)、積み重なりあった細胞の増殖 (piling-up)、増殖を停止し単層の細胞層に浸潤 (invasive

growth) の条件を満たした形質転換巢を陽性形質転換巢として計数した。陰性 (溶媒) 対照群と化合物処理群の形質転換巢を有する陽性ウェルの数について、多重性を考慮した χ^2 検定を行い、連続した 2 濃度で有意となった場合を陽性、1 濃度のみ有意となった場合を疑陽性と判定した。また、バリデーション試験と同様に、陰性 (溶媒) 対照群の陽性ウェルの数が、イニシエーション試験では 15 ウェル以下、プロモーション試験では 20 ウェル以下を試験成立条件とした。

吸光度測定法については、各ウェルの吸光度からブランクの吸光度を引いた値を各ウェルの吸光度とし、96 ウェルの吸光度の平均値を求め、陰性 (溶媒) 対照群と化合物処理群の平均値についてダネットの検定を行い、観察による判定と同様に、連続した 2 濃度で有意となった場合を陽性、1 濃度のみ有意となった場合を疑陽性と判定した。また、0.12 以上の吸光度を示したウェルを陽性ウェルとし、観察による方法と同様に判定した。

C. 研究結果

過酸化水素処理後に WST-8 を添加し 24 時間培養後の陰性対照プレート (52 プレート) について、陰性ウェルと陽性ウェルの吸光度の分布を調べた。その結果、陰性ウェルおよび陽性ウェルの平均吸光度はそれぞれ 0.011 および 0.36 であり、明らかに異なる値を示したが、両者の吸光度範囲が重なり、吸光度の値によって形質転換巢の有無を明確に区別することは困難であった(図 2)。プレートあたりの陽性ウェルの数と陽性ウェルの吸光度の値を検討し、陰性ウェルの 0.21% (10 ウェル/4668 ウェル) が陽性ウェルとなる 0.12 をカットオフ値とした。

発がん物質である 2-acetylaminofluorene の形質転換試験を実施し、従来の観察法により判定した結果、イニシエーション試験およびプロモーション試験ともに細胞毒性が認められる濃度範囲で形質転換巣を有する陽性ウェルの数が統計学的に有意に増加し、陽性の結果が得られた (図 3)。この結果を 96 ウェルの平均値と 0.12 以上の吸光度を示した陽性ウェルの数の結果と比較すると、イニシエーション試験では 3 つの判定法とも良く一致した結果が得られた (図 4)。また、プロモーション試験では 1 濃度で吸光度による判定法ではかなり高い値を示したが、それ以外では良く一致した結果が得られた (図 4)。非発がん物質である 1-naphthylamine の場合、イニシエーション試験では 1 濃度で陽性ウェルの有意な増加が認められ疑陽性と判定されたが、プロモーション試験では陽性ウェルの有意な増加は認められず陰性の結果が得られた (図 5)。吸光度の平均値およびカットオフ値の判定法においても観察法と一致した結果が得られ、イニシエーション試験で疑陽性の判定となった (図 6)。

同様にして、8 つの発がん物質と 4 つの非発がん物質の計 12 物質について 3 つの判定法の比較を行った (表 1)。なお、観察法およびカットオフ値法における陰性 (溶媒) 対照群の陽性ウェルの数は、プロモーション試験の方がやや多かったが、いずれも 15 ウェル以下または 20 ウェル以下となり試験成立条件を満たした。

イニシエーション試験では、styrene oxide が従来の観察法では陰性、カットオフ値法では陽性となり、結果が一致しなかったが、それ以外はすべて一致した。また、吸光度の平均値法では、styrene oxide に加え、観察法

で陽性であった 5-azacytidine と観察法で陰性であった caffeine がともに疑陽性と結果が一致しなかった。プロモーション試験では、観察法では疑陽性であった dibenz[a,h]anthracene が、平均値法およびカットオフ値法ではともに陽性となり、観察法で陰性であった mitomycin C がカットオフ値法では疑陽性、観察法で陽性であった lithocholic acid が平均値法では疑陽性となり、結果が一致しなかった。

従来の観察法と比較した場合、平均値法ではイニシエーション試験で 3 物質、プロモーション試験で 2 物質の計 5 物質が不一致の結果となり、カットオフ値法では、イニシエーション試験で 1 物質、プロモーション試験で 2 物質の計 3 物質が不一致の結果となった。しかしながら、カットオフ値法のイニシエーション試験の結果はエームス試験の結果と完全に一致し、イニシエーション試験とプロモーション試験を合わせた結果は、発がん性試験の結果と完全に一致し、従来の観察法および平均値法よりも良好な結果が得られた (表 1)。

D. 考察

In vitro 発がん性試験である形質転換試験に用いる BALB3T3 細胞または Bhas 42 細胞は、正常な状態ではコンフルエントになると接触阻害作用により単層の状態では細胞の増殖が停止するが、がん化した場合には、特異な細胞形態を有し増殖を続け多層となることから、形質転換巣として形態学的に判別することができる。しかしながら、肉眼観察によるこの判定法は、観察者の主観に左右されることや、培養容器内に形成されたすべてのコロニーについて肉眼的判定を実施する必要

があり、最終結果を得るまでにかかなりの時間が必要となる。

我々が開発した過酸化水素法は、接触阻害作用を有する正常細胞を選択的に死滅させ、前がん細胞やがん化した細胞は生細胞として増殖することができることから、吸光度によって生細胞を測定する方法による形質転換細胞の判定を可能にした。

今回我々は、過酸化水素法の有効性を確認するために、12 物質（発がん物質：8 物質、非発がん物質：4 物質）について、同一プレートの結果を3種類の方法で判定し、それらの判定結果を比較した。その結果、従来の観察法との比較では、吸光度測定による平均値法とカットオフ値法の判定結果はともに観察法の結果と完全には一致しなかった。しかしながら、カットオフ値法の結果は、エームス試験結果や発がん性試験結果と良く一致

していることから、カットオフ値に達するような増殖活性を獲得した前がん細胞を評価に加えることにより発がん性の予測性が向上すると考えられた。

以上のようにカットオフ値を設定することにより高精度で発がん性を予測できることが示唆されたが、今回使用したカットオフ値 (0.12) は陰性対照群の蓄積データをもとに仮に設定した値であることから、カットオフ値の設定を変えたシミュレーションを実施し、より精度の高いカットオフ値の設定を行う必要がある。

また、さらに多数の化合物の結果を蓄積し、我々が開発した新しい方法の有用性を検証する必要があると考えられた。

E. 参考文献

- 1) S. Asada, K. Sasaki, N. Tanaka, K. Takeda, M. Hayashi, M. Umeda, 2005. Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/c 3T3 cells (Bhas 42 cells), *Mutat. Res.* 588, 7-21.
- 2) A. Sakai, K. Sasaki, K. Hayashi, D. Muramatsu,

S. Arai, N. Endou, S. Kuroda, A. Poth, S. Bohnenberger, T. Kunkelmann, M. Asakura, H. Hirose, N. Ishii, F. Mizuhashi, S. Kasamoto, M. Nagai, K. Pant, S.W. Bruce, J.E. Sly, S. Yamazaki, M. Umeda, N. Tanaka, An international validation study of a Bhas 42 cell transformation assay for the prediction of chemical carcinogenicity, *Mutat. Res.*, 725 (2011) 57-77

表1 Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験における過酸化水素法と従来法(観察法)との比較結果

| Chemicals | 96-well method | | | | | | Genotoxicity ³⁾ | | Carcinogenicity ⁴⁾ |
|------------------------|--|-----|--|-----|----------------------------|-----|----------------------------|--------|-------------------------------|
| | H ₂ O ₂ (OD:0.12<) ¹⁾ | | H ₂ O ₂ (OD) ²⁾ | | Conventional ¹⁾ | | Ames | Others | |
| | Ini | Pro | Ini | Pro | Ini | Pro | | | |
| 2-Acetylaminofluorene | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| MNNG | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 5-Azacytidine | + | - | ± | - | + | - | + | + | + |
| Dibenz[a,h]anthracene | + | + | + | + | + | ± | + | + | + |
| Mitomycin C | + | ± | + | - | + | - | + | + | + |
| Styrene oxide | + | - | + | - | - | - | + | + | + |
| Lithocholic acid | - | + | - | ± | - | + | - | MLA+/- | + |
| Methapyrilene HCl | - | + | - | + | - | + | - | + | + |
| 1-Naphthylamine | ± | - | ± | - | ± | - | + | + | - |
| Caffein | - | - | ± | - | - | - | - | CA+ | - |
| Ampicillin sodium salt | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D(-)-Mannitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Ini: Initiation, Pro: Promotion, -: 有意差なし, ±: 1濃度のみ有意, +: 連続した2濃度で有意, MLA: マウスリンフォーマ試験, CA: 染色体異常試験

1) 多重性を考慮した χ^2 検定, 2) ダネットの検定

3) Sakai et al. (2010), Mutation Res. 4) Arai et al. (2013), AATEX,

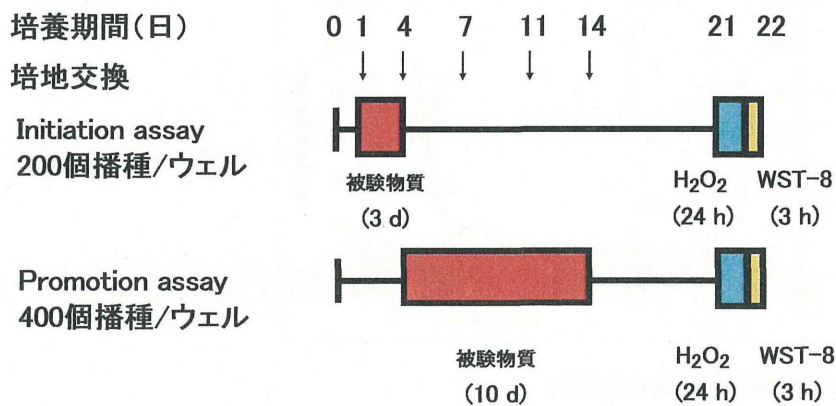


図1 過酸化水素法による形質転換試験の試験プロトコール

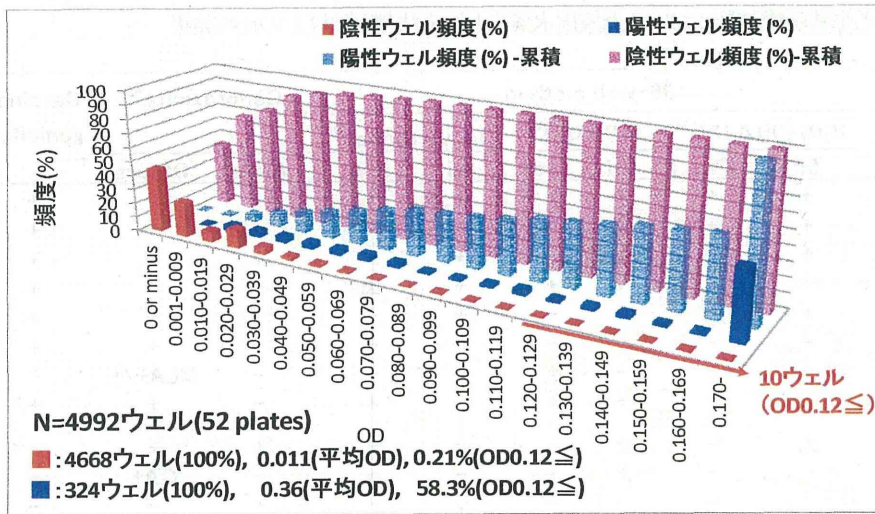


図2 過酸化水素法による形質転換試験の陰性および陽性ウェルの吸光度分布

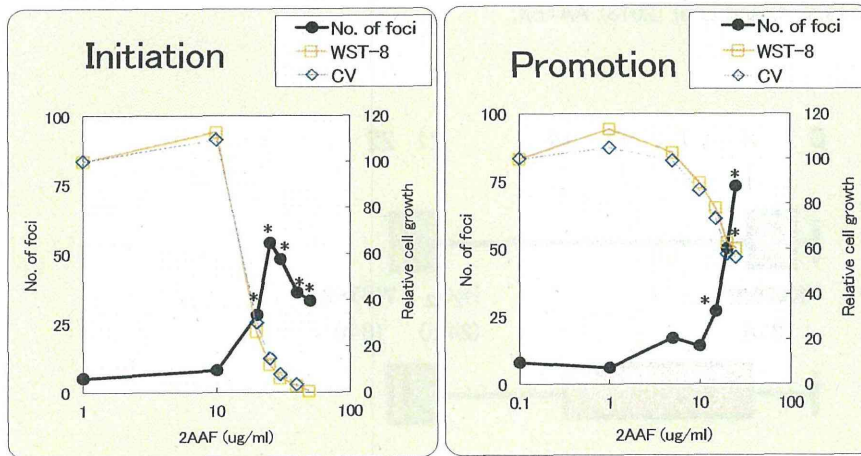


図3 2-Acetylaminofluorene の形質転換試験結果(通常法)

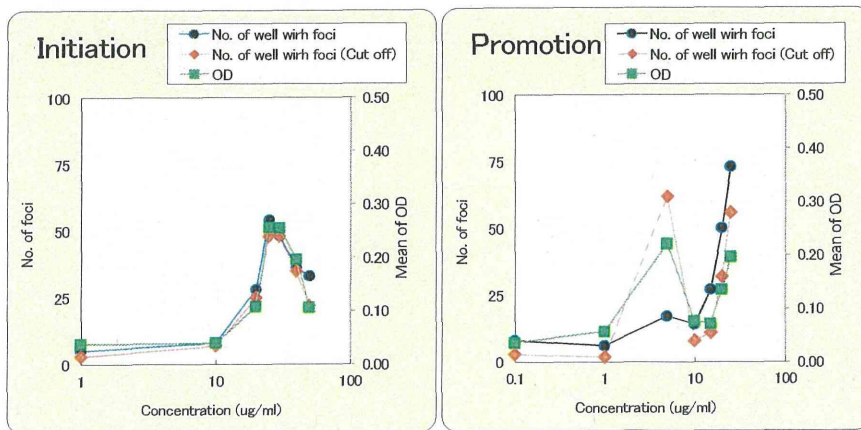


図4 2-Acetylaminofluorene の形質転換試験結果の判定法比較

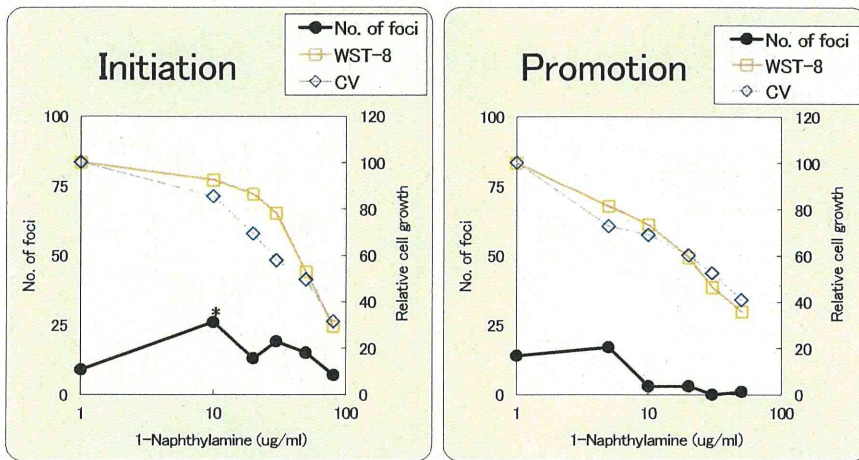


図5 1-Naphthylamine の形質転換試験結果(通常法)

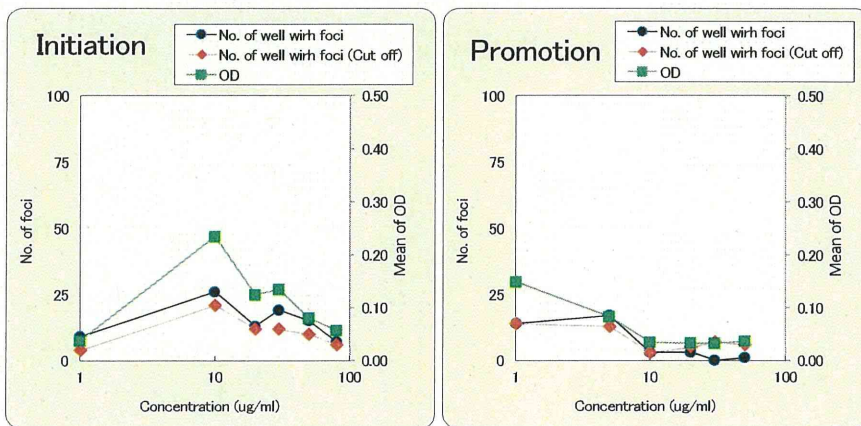


図6 2-Acetylaminofluorene の形質転換試験結果の判定法比較

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

国際状況の調査

研究分担者 一鬼 勉 一般社団法人日本化学工業協会 化学品管理部 部長

研究要旨

経済協力開発機構(OECD)は、長く化学物質の毒性試験法ガイドラインの開発を行っており、近年は動物実験の規制強化に伴って、生きた動物を使用しない試験法やより使用動物数の少ない試験法の開発や改良に資源を振り向けている。また、あらたに持ち上がってきている問題 (Emerging Policy Issues) にも対応するために、今までになかった試験法開発にも力を入れている。日本において、新たな試験法を国際的なガイドラインにするためにも、この OECD の試験法開発の状況を知っておくことは、効率的に進めるうえで非常に重要である。

A. 研究目的

OECD が作成する毒性試験法ガイドラインは、OECD 加盟国だけでなく、非加盟国においても当該国内の試験法に多大の影響を与えている。しかし、試験法は絶えず改良され、また新たに上がってくる問題に対処するために新しい試験法の開発も継続的に行われている。今回は、国際機関である OECD の試験法開発の動きについて調査したので報告する。

B. 研究方法

OECD で 8 か月ごとに開催されている化学品合同会合 (Joint Meeting of Chemicals Committee and Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology) の第 51 回会合 (2014 年 2 月開催) の SCHEDULE OF ACTIVITIES FOR 2014 (ENV/JM(2014)17) に記載されている試験法開発状況を調査し人健康にかかわる部分を抜粋した。

C. 研究結果および考察

(1) 健康影響に関する OECD 試験ガイドライン進捗状況

OECD の試験法は 3 桁の番号で作成管理されており、物化性状等に関わる試験法は

100 番台、生態毒性関連は 200 番台、環境中運命については 300 番台、人健康については 400 番台の番号となっている。中には不要となったあるいは現在は使用してはならない試験法は削除されているものもある。また、予定されていてまだガイドラインになっていないものなどがあり、必ずしも連番にはなっていない。この中で、400 番台の試験法では、使用動物が多すぎるという動物愛護の面から削除された試験法がある。以前は使用されていた急性経口投与毒性試験法である。現在はこれに代わる複数の試験法が開発整備されている。

現在、活発に開発されているのは、主に生きた動物を使用しない in vitro 試験法である。これは、EU の「化粧品に関する 2009 年 11 月 30 日付欧州議会・理事会規則 1223/2009 (2009 年 12 月 22 日付官報 L342 掲載)」により、2013 年 3 月より化粧品および化粧品の成分の安全性を確認する目的での動物実験が禁止されたことによる理由が大きい。

また、これらとは別に国連の国際的な化学物質管理のための戦略的アプローチ (SAICM) が実施され、それを確認するため国際化学物質管理会議 (ICCM) が定期的に開催されている。その中で内分泌かく乱物質

やナノマテリアルなどが新規政策課題 (Emerging Policy Issues)として取り上げられている。したがって、各国およびOECDはこれらに対処するために各種毒性試験ガイドラインの開発に大きく動き出している。

(2) 前回会合から今回会合までに改訂された試験法

下記のガイドラインが改訂されている。ほとんどが刺激性試験に関するものとなっている。

430 *In vitro* skin corrosion (transcutaneous electric resistance)

431 *In vitro* skin corrosion (human skin model)

437 *Ex vivo* eye corrosion (bovine corneal opacity and permeability)

438 *Ex vivo* eye corrosion (isolated chicken eye)

439 *In vitro* skin irritation

488 Transgenic rodent somatic and germ cell mutation assay

また、ガイドラインでは決めきれなかったような特殊なケースなどに対応するために種々のガイダンスドキュメント類も出版されている。

No 151 Draft guidance document on the Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study

No 188 Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion

No 189 Streamlined Summary Document Supporting OECD Guideline 437 on the Bovine Corneal Opacity and Permeability for Eye Irritation/Corrosion

No190 Summary Document on the Statistical performance of test methods included in TG 431 for the sub-categorisation

(3) ガイドラインに関する2014年の活動

①Biotic systemsに関するガイドラインおよびガイダンス(200 番台)

16 個に及ぶガイドライン開発・修正が並んでいるが、そのうち約半分が endocrine disruptors に関するものとなっている。

②環境中運命に関するガイダンス(300 番台)

改訂濃縮度試験(TG305)に関わるガイダンス作成

③健康影響に関するガイドラインおよびガイダンス(400 番台)

日本がその開発に関わっている試験法については、その経緯と経過についても記載した。

1) New TG 433: Fixed Dose Procedure as Alternative to TG 403 (急性吸入代替)

2) New TG for *in vitro* SHE Cell Transformation Assay

3) Cell Transformation Assay using Balb/c 3T3 cell line (Japan)

• EC provided pre-validation and peer review reports in February 2011;

• WNT discussed the follow-up at its 2011 meeting;

• Expert meeting held on 14-15 December 2011;

• Submission of the expert group's recommendations to the WNT at its April 2012 meeting;

• WNT agreement that a few more chemicals should be tested with the BALB/c 3T3 to confirm the performance of the assay and the statistical approach used for data interpretation before a Test Guideline is developed.

4) EDTA Activity - New TG: Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha Binding Assays (hrERA, 2 protocols)

5) EDTA Activity - New TG: Stably Transfected Transcriptional Activation (STTA) Assay for the detection of androgenic and anti-androgenic activity of chemicals Cell Transformation Assay using Balb/c 3T3 cell line (Japan)

• Draft validation report and draft TG submitted to the Secretariat in 2010;

• Draft validation report submitted to the VMG-non animal in December 2010;

• Peer review report available in February 2011;

• Draft peer review report (with draft WNT Statement on the follow-up to the peer

- review) endorsed/agreed at the 2011 WNT meeting;
- Discussion of chemicals to be included in an additional validation at the VMG-NA meeting in 2012;
 - Additional validation completed in 2013; validation report to be prepared early 2014 and draft Test Guideline will follow and be ready for review at VMG-NA in December 2014.
- 6) EDTA Activity - New TG for a stably Transfected Transactivation (STTA) Assay for the detection of anti-estrogenic activity of chemicals (Japan)
- Collection of validation data expected in 2nd quarter 2012;
 - Validation completed in 2013 and report will be prepared in the course of 2014. A draft Test Guideline will follow and be ready for review at VMG-NA in December 2014.
- 7) New TG: Comet Assay in Genotoxicity Testing (Japan)
- Short presentation on Progress at WNT 21;
 - Expert group meeting to review all genotoxicity methods held on 1-2 March 2011 in Paris;
 - Submission of a draft validation report and draft Test Guideline early September 2012, to allow an initial review of these documents at the expert meeting on genotoxicity held on 25-27 September 2012 (Accelerate procedure requested by several EU countries);
 - Revised validation report submitted early January 2013
 - Peer review performed in January/February 2013
 - Expert meeting on 19-21 March 2013;
 - Request for WNT comments on the first draft Test Guideline expected in May 2013;
 - Submission for WNT approval of the validation report, peer review report, and WNT agreement on the follow-up to the peer review at the 2013 WNT meeting.
- Validation and peer-review reports were approved by the WNT in April 2013 and will be submitted to the Joint Meeting for declassification.
 - 1st WNT commenting round of the draft TG in June 2013; second WNT commenting round in December 2013, following the Expert Meeting in Ottawa in November 2013;
 - The draft TG is expected to be submitted to the WNT-26 for review in April 2014.
- 8) TG for the Cytosensor Microphysiometer Test Method: an In Vitro Method for Identifying Chemicals Not Classified as Irritant, as well as Ocular Corrosive and Severe Irritant Chemicals
- 9) GD on Skin Irritation/Corrosion and related TGs
- 10) Validation of a Cell Transformation Assay Using Bhas 42 Cell Line for Detection of Non-Genotoxic and Genotoxic Carcinogens (Japan)
- International validation studies were completed in 2010;
 - Discussion at an expert meeting held on 14-15 December 2011 at OECD;
 - Final validation report and draft TG expected in 2012;
 - Submission of peer review report expected in 2013; draft TG circulated for a WNT commenting round at the end of 2013;
 - A meeting of experts took place in January 2014 to address comments received.
- 11) Updated in vivo somatic cell genotoxicity TGs (TG 474 and 475)
- 12) Updated in vivo germ cell genotoxicity TGs (TG 478 and 483)
- 13) New TG to separate the Mouse Lymphoma Assay from the current TG 476
- 14) Updated TGs for in vitro genotoxicity assays (TG 473, 476, 487)
- 15) Revision of the introduction to the OECD TGs on genetic toxicity testing and guidance on the selection and application of the assays