

201428018A(1/2)

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  
(H24-化学-指定-008)

平成 26 年度総括・分担研究報告書 (1)

研究代表者 西川 秋佳

平成 27(2015)年 4 月

# 目 次

## I. 総括研究報告

- 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 ----- 1  
西川 秋佳

## II. 分担研究報告

1. 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----- 14  
小島 肇
2. 内分泌かく乱化学物質試験法のバリデーション ----- 49  
小野 敦
3. 遺伝毒性試験法コメットアッセイ (*in vitro*) の試験法開発と  
OECD 遺伝毒性試験ガイドラインの動向に関する研究 ----- 119  
本間正充
4. 多臓器小核試験 (肝臓・胃腸管) プロトコールの基礎的検討  
-多臓器小核試験の統計学的解析- ----- 127  
森田 健、林 真
5. 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 ----- 143  
山影康次
6. 国際状況の調査 ----- 149  
一鬼 勉

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 153

## IV. 研究成果の刊行物・別刷り ----- 161

# I. 総括研究報告

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にするための手法に関する研究  
平成 26 年度総括研究報告書

研究代表者 西川 秋佳  
国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

我が国で開発された化学物質安全性評価試験法について、欧米の研究機関と協力して、試験法の開発、バリデーションおよび第三者評価を行い、経済協力開発機構（OECD）に提出し、国際的に受け入れられる試験法ガイドライン（TG）として成立させることを主たる目的とする。今年度は、エストロゲン受容体（ER）転写活性化法（ER-STTA 法）アンタゴニスト検出法、*in vivo* コメットアッセイ、ヒト樹状細胞株を用いた皮膚感作性検出法（h-CLAT 法）、Bhas 形質転換試験（Bhas 法）、眼刺激性試験短時間曝露法（STE 法）について、国際的な第三者評価を行った。その結果、*in vivo* コメットアッセイを OECD TG489 として成立させた。ER-STTA 法、h-CLAT 法、Bhas 法および STE 法については、TG 案の検討を進め、来年度の成立を目指している。また、日本で開発または研究の最も進んでいる肝小核試験、胃小核試験および Bhas 法のハイスループット化については、プロトコルを開発し、論文を作成した。アンドロゲン受容体転写活性化法（AR-STTA 法）については、OECD 第三者評価グループから要求された追加バリデーションを終了した。さらに、工業用ナノ物質の *in vitro* 遺伝毒性評価に関するガイダンス文書作成のため、*in vitro* 小核試験の国際共同研究に加わった。TG の OECD を主とする国際状況についても調査した。

キーワード： 遺伝毒性試験、形質転換試験、皮膚感作性試験、眼刺激性試験、内分泌かく乱、代替法、バリデーション、第三者評価

研究分担者及び研究協力者の氏名・所属機関名及び所属機関における職名	森田 健	長 国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部室長
研究分担者	山影康次	食品薬品安全センター秦野研究所 部長
小島 肇	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長	一鬼 勉 日本化学工業会 化学品管理部長
小野 敦	国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室主任研究官	研究協力者
本間正充	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部部長	小川久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長
林 真	食品医農薬安全評価センター 理事	

## A. 研究目的

本研究は、我が国で開発された安全性試験法の内、化学物質の安全性評価のための行政試験法として見込みのある方法について、国際状況調査を生かして欧米の研究機関と協力し、試験法の開発、バリデーションおよび第三者評価を経て、国際的に受け入れられる試験法ガイドライン案をOECD（経済協力開発機構）に提出することを目指している。その過程において、日本における継続的な試験法ガイドライン提案システムを構築することを目的とする。特に、バリデーションが終了し、その結果を科学的かつ客観的に評価する第三者評価方法について、国際的に認められる方法を確立することに主眼をおいている。なお、我が国で開発された安全性試験法とは、動物実験の3Rs（Replacement：動物を用いない方法に置き換える、Reduction：動物の使用数の削減、Refinement：動物使用に伴う苦痛の削減）に考慮しつつ、経済的かつ短期間に結果が求められる一方、ヒト安全性評価にこれまで以上に有用な“日本で開発されたまたは日本での研究が最も進んでいる安全性評価のための試験法”をいう。円滑に試験法を確立し、このシステムを幅広く国内に普及するため、多くの協力研究者に参画を求めていかねばならないことから、すべての研究者が自身のテーマだけでなく、密に連絡を取り、情報を共有化することにより、効果的・効率的に成果を求めるべく協力して進めた。

## B. 研究方法

動物実験の3Rsに考慮しつつ、日本で開発され、または日本での研究が最も進んでいる安全性評価のための試験法を公定化するために、以下の試験法について検討し、併せて国際状況を調査した。

### In vivo コメットアッセイ

本試験法は、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、平成18年8月にバリデーションが開始され、その実験は平成24年4月に終了した。具体的には、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、プロトコールが固められ、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。OECDに協力する専門家による第三者評価報告書および日本のバリデーション結果をもとに作成されたTG案（一昨年度OECDに提出）をもとに、専門家間で議論が進み、平成26年4月にナショナルコーディネーター作業グループ(WNT: Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme) 会議でTG案が議論された。

### 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、平成21年1月にバリデーションが開始され、その実験は平成23年9月に終了し、バリデーション報告書がまとめられた。欧州動物実験代替法センター(EURL ECVAM: European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing) 科学諮問会議(ESAC: EURL ECVAM Scientific Advisory Committee)における第三者評価を経て、OECDにおいてTGまたはGD案に関する議論がなされた。

### 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平成22年～平成25年に掛けて実施された。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 大野泰雄)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を行った。ESACによる第三者評価が平成25年より実施された。並行してEURL ECVAMの専門家とともに、TG案を作成した。

## 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平成 20 年から開始された。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)の支援を受け、予測性を検討する追加バリデーションが実施され、平成 22 年 11 月に終了した。バリデーション報告書に加え、背景評価報告書を厚生労働科学研究委託事業において、花王とともに作成した。米国動物実験代替法に関する省庁間連絡会議 (ICCVAM：Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) による第三者評価を経て、OECD による TG 案の協議が進められた。

## ER STTA 法

ER STTA 法によるアゴニスト試験法については、既に OECD ガイドライン (TG455) が成立しており、本研究ではアンタゴニスト試験法のバリデーション試験の取り纏め及びガイドライン案作成を行った。これまでに、試験プロトコルを開発した化学物質評価研究機構 (CERI) をリードラボとして、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バリデーション試験を実施し、予定したバリデーション測定を全て終了した。得られた結果の詳細解析を行い、試験管理グループ (SMT) においてクライテリアの変更等について検討を行った。平成 26 年度は、バリデーションレポート及びガイドライン案、パフォーマンススタンダード案を作成して OECD に提出し、WNT レビューコメントへの対応について OECD VMG-NA 会議において同意された内容を反映した修正稿を OECD に再提出した。

## AR STTA 法

AR STTA 法については、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のピアレビューにおいて測定化合物数が少ないことから追加バリデーション試験の実施が要求された。これまでに本研究では、OECD VMG-NA メンバーの協力を得て追加測定化合物の選定、バリデーション試験計画を策定するとともに、SMT を組織して追加バリデーション試験を実施してきた。平成 26 年度は、昨年度終了したバリデーション試験結果の解析を行い、得られた結果をもとにバリデーションレポート及び OECD ガイドライン案の作成を行い、OECD に提出した。

## ナノ物質の *in vitro* 小核試験

工業用ナノ物質の *in vitro* 小核試験での遺伝毒性評価に関する専門会議が 2014 年 10 月 13-14 日にパリの OECD 本部で開催された。本会議に参画し、ナノ物質の *in vitro* 遺伝毒性評価に関するガイダンス文書作成のための SPSF 提出作業に携わった。また、2014 年 9 月に改定された TG 473 (哺乳類細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験)、TG 474 (哺乳類赤血球小核試験)、TG 475 (哺乳類骨髄染色体異常試験)、TG 487 (哺乳類細胞を用いた *in vitro* 小核試験) の翻訳作業を行うと同時に、改定内容に関する調査・研究を行った。

## 多臓器小核試験

本共同研究には 24 機関が参加した。雄の CD (SD) ラットを、投与開始時 6 週齢で用いた。肝臓小核試験について 22 のモデル化合物を選択し、内 6 物質は胃腸管小核試験でも用いた。また、この 22 物質を遺伝毒性ならびに発がん性の特性に基づき、下記の 4 つのグループに分類した。ここで、「遺伝毒性物質」は、Ames 試験または *in vivo* 遺伝毒性試験 (例えば、赤血球小核試験) で陽性を示す物質とした。22 物質を、グループ A1：赤血球小核試験で陰性の遺伝毒性肝発がん物質、グループ A2：赤血球小核試験で陽性の遺伝毒性肝発がん物質、グループ B：肝臓を標的としない遺伝毒性発

がん物質及びグループ C：非遺伝毒性の肝発がん物質に分類した。すべての小核試験（肝臓、骨髄、胃腸管）は、GLP 基準に準拠して実施した。また、すべてのスライド標本はコード化して観察した。なお、肝臓小核では、2000 個の肝実質細胞（単核、二核および複数核を含む）を観察し、小核を有する肝細胞を計数した。同時に 2000 個の肝細胞中の分裂期にある細胞数も記録し、分裂指数（MI）を算出した。骨髄小核では、2000 個の幼若赤血球を観察し、小核を有する幼若赤血球を計数した。細胞毒性の指標として、各動物について 1000 個の赤血球に対する幼若赤血球の比率も記録した。胃腸管小核では、2000 個の損傷のない細胞を観察し、小核を有する細胞を計数した。剖検時に肝重量を測定し、小核試験用に一部を切除する前に、体重相対重量を記録した。肝細胞の単離後、左葉の残りの組織について組織病理学的検査を実施した。統計処理および結果の最終判定被験物質群と溶媒対照群との小核出現頻度（小核を有する肝細胞/幼若赤血球/胃腸管細胞）の相違は、Kastenbaum & Bowman による条件付き二項検定で行った。施設間再現性の検討では、ロジットデータを単純線形回帰モデルで解析した。

#### Bhas42 形質転換試験ハイスループット法

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、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。培養終了後、過酸化水素で 24 時間処理後、WST-8 試薬（同仁化学研究所）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後、ギムザ染色し、肉眼観察により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。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  $\chi^2$  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。過酸化水素処理後の吸光度測定については、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、2 つの判定方法について検討した。それらの検定結果については、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。

#### 国際状況の調査

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 52 回会合 (2014 年 11 月開催) の SCHEDULE OF ACTIVITIES FOR 2014/2015 (ENV/JM(2014)33 に記載されている試験法開発状況および Community site に記載されている Overview of all projects on the workplan を調査した。今回の報告は、人健康に重きを置いて行うが、他の特に生態毒性関連についても言及する。

#### (倫理面への配慮)

動物実験においては、各試験施設の倫理委員会にて適切性が諮問され、動物愛護に基づき、動物を取り扱った。その他に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かった。

#### C. 研究結果

##### In vivo コメントアッセイ

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 案用いて議論が進んだが、第三者評価からの提案を受け、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 月に開催された OECD WNT 会議において TG489 として承認された。

### 形質転換試験 (Bhas 法)

平成26年1月に開催されたOECDにおける専門家の対面会議は、Bhas法の類似法であるSHEアッセイをTGとすることに重点がおかれた。平成26年4月のWNT会議で認められたSHEアッセイはTGではなく、書面による手続きでGDとなることが決まった。このGDの承認が遅れ、Bhas 法のTGまたはGD案も影響を大きく受けた。来年度にBhas法をGDとして成立させるため、GD案を2015年2月にOECDに提出した。

### 皮膚感作性試験 (h-CLAT)

日本の専門家が作成した案に EURL ECVAM の担当者が加筆修正した TG 案は平成 26 年 6 月に OECD に送られた。この TG 案への意見募集は 8 月に始まり、10 月には各国の意見が送られてきた。この意見の中には、再現性が乏しいという厳しいクレームが含まれてきたこともあり、日欧の統計家で施設間再現性を統計解析により解決する手段を検討した。統計解析報告書および改訂 TG 案を平成 27 年 2 月に OECD に送った。

### 眼刺激性試験 短時間曝露法 (STE 法)

OECDによる第二次意見募集によるコメントを平成26年2月に受け取り、改訂版を6月に提出した。第三次意見募集が7月に実施され、それを受けたOECDにおける専門家の対面会議が11月にパリにて開催された。この会議にて、専門家の承認が得られ、平成27年4月のWNT会議でTG案の最終検討がなされることになった。

### ER STTA 法

ER STTA アンタゴニスト試験法のバリデーション結果の詳細解析から、リファレンスクライテリアを逸脱した結果であっても、プレート採用基準を満たしていれば定性的評価においては信頼性が示されたと判断された。このことからアンタゴニ

スト試験法については、当初設定したクライテリアの変更等を行ったうえで定性的評価を行う系としてガイドライン化する方針について SMT 及び OECD VMG-NA 会議で合意された。合意内容に従い、バリデーションレポート案及びガイドライン (TG) 案、パフォーマンススタンダード (PS) 案を作成した。また、現在の TG455 は、ER STTA 法と TG457 として成立している BG1luc 法のアゴニスト試験法のための PBTG (パフォーマンススペーステストガイドライン) であり、アンタゴニスト試験法を追加した TG455 アップデートの成立後、TG457 を廃止することが VMG-NA 会議で合意された。

### AR STTA 法

AR STTA 試験法については、本研究班が中心となって VMG-NA メンバーから構成される SMT を組織して試験計画を策定し、国内 3 施設、海外 1 施設 (韓国) の参加により 2 フェーズからなるバリデーション試験を実施し、ほぼ計画通り終了した。バリデーション試験結果の解析により、いずれの参加施設とも非常に再現性 (施設内、施設間とも) の良い結果が得られたことにより、本試験系の信頼性・再現性が確認された。バリデーション試験結果については、非常に良い結果を得ていることから、早急にガイドライン案を作成して OECD へ提出することが合意された。

### ナノ物質の *in vitro* 小核試験

ナノ物質を現行の遺伝毒性試験に適用するためのガイダンス文書の作成において、*in vitro* 小核試験 (TG487) 自体を変更するのではなく、ナノ物質に適用するために必要なプロトコールの変更をリスト化することになっているが、適用するための情報が不足していることが認識されたため、JRC が組織する共同研究 (ring trial) を行い、方法の標準化を目指す。ここでは、5 種類の細胞 (ヒトヒトリンパ球細胞, TK6 cells, Caco-2 cells, A549



cells, V79 cells)を用い、3つのナノ物質（ナノゴールド、ナノシルバー、ナノシリカ）を試験する。これらのデータを基に専門家チームは *in vitro* 小核試験のプロトコールを確立し、そのプロトコールの妥当性を、共同研究を通じて、ラボ間で検証する。主な問題点は、処理時間、細胞システムの選択、用量（適切な範囲、最高用量）、処理時における血清の有無、サイトカラシンBの利用、*In vitro* 試験条件下でのナノ物質の物理化学的性状の確認、*In vitro* 試験条件下でのナノ物質の定量評価および S9mix の利用であった。

### 多臓器小核試験

肝臓小核試験では、この検討に参加したすべての臓器で、DENによる小核を有する肝細胞の用量依存的な増加が認められた。陰性対照における小核肝細胞の平均出現頻度は、0.01%から0.25%の範囲にあった。処理群の平均頻度は3.13, 6.25 および 12.5 mg/kg/day 群でそれぞれ0.06~0.47%、0.30~1.07%および0.73~2.41%であった。主試験の結果は、以下のとおりである。肝臓小核試験グループA（遺伝毒性発がん物質）の14物質中12物質が陽性結果を示した。グループA-1（遺伝毒性発がん物質だが赤血球小核試験は陰性）の物質は9つすべてが含まれていた。グループA-2（遺伝毒性発がん物質で赤血球小核試験も陽性）の5物質中3物質は肝臓で陽性であったが、残りの2物質

（Sudan I と TAA）は、理由は不明であるが肝臓で陰性であった。グループB（肝臓を標的としない遺伝毒性発がん物質）の6物質中4物質は、肝臓で陰性であった。しかし、残りの2物質（MMC と MMS）は陽性であった。グループC（非遺伝毒性の肝発がん物質）の2物質は、肝臓で陽性であった。これら2物質（CFB と MP）は、Ames 試験ならびに *in vivo* の赤血球小核試験において陽性を示す明瞭な知見は得られていない。一方、*in vitro* の染色体異常試験では陽性である。陰性対照における小核肝臓細胞の平均出現頻度は、14日間投与

（8週齢ラット）と28日間投与（10週齢ラット）で、 $0.06 \pm 0.06\%$ であった。これらの値は、部分肝切除法や幼若動物法による肝臓小核試験の陰性対照値よりも低いものであった。

胃腸管小核試験は任意の検討としたため、一部の希望臓器により行われた。用いた試験物質は DMN, QUN, 2-AAF, Sudan I, KBrO<sub>3</sub>, および MNNG であった。これら6物質中3物質（2-AAF, KBrO<sub>3</sub> および MNNG）は、腺胃で陽性であった。結腸で小核を誘発した物質は認められなかった。腺胃における陰性対照の小核細胞の平均出現頻度は、14日間投与（8週齢ラット）で  $0.07 \pm 0.06\%$ 、28日間投与（10週齢ラット）で  $0.08 \pm 0.06\%$  であった。結腸では、陰性対照の小核細胞の平均出現頻度は、14日間投与（8週齢ラット）で  $0.08 \pm 0.08\%$ 、28日間投与（10週齢ラット）で  $0.18 \pm 0.13\%$  であった。反復投与胃腸管小核試験では、5物質について14日間および28日間投与の両方が実施された。5物質全てが両投与期間で同じ結果（陽性/陰性）を示した。

### Bhas42形質転換試験ハイスループット法

形質転換した多層化細胞を過酸化水素処理すると正常細胞は死滅し、形質転換巣は生存していることが明らかとなっている。この特性を利用することによって、過酸化水素処理後の生細胞を吸光度法で測定することにより形質転換細胞が増殖したウェルを効率的に区別することが可能となった。この結果をもとにカットオフ値を0.06~0.13とし、26物質（発がん物質：17物質、非発がん物質：9物質）について各カットオフ値に基づく判定と観察法、遺伝毒性試験結果および発がん性試験結果と比較した。0.09以上のカットオフ値での判定結果を観察法と比較すると、イニシエーションアッセイでは、26物質中7物質（発がん物質：4物質、非発がん物質：3物質）が観察法の結果と一致しなかったが、吸光度法としてはカットオフ値に関係なく一致した結果となった。0.09~0.13のカッ

トオフ値の結果がすべて一致した 25 物質の観察法との一致率は 72% (18/25) であった。プロモーションアッセイでは、26 物質中 4 物質 (発がん物質: 3 物質、非発がん物質: 1 物質) が観察法の結果と一致しなかったが、吸光度法としてはカットオフ値に関係なく一致した結果となり、しかも観察法より強い判定結果であった。0.09~0.13 のカットオフ値の結果がすべて一致した 25 物質の観察法との一致率は 84% (21/25) であった。

26 物質について、観察法および吸光度法の結果を発がん性試験結果と比較すると、発がん物質の検出率 (感度: Sensitivity) は観察法が 88% (15/17)、吸光度法が 82% (14/17) と物質数としては 1 物質の違いであったが、2 物質 (IQ、Styrene oxide) の陽性と陰性の判定が逆転し、1 物質

(Benz[*a*]anthracene) が陽性と疑陽性の違いであった。非発がん物質の検出率 (特異度) は観察法が 67% (6/9)、吸光度法が 44% (4/9) で、2 物質

(*p*-Phenylenediamin 2HC、Eugenol) の判定が陰性から疑陽性となった。このように、非発がん物質の検出率が低いことから、全体の一致率は観察法では 81% (21/26)、吸光度法では 69% (18/26) であった。

#### 国際状況の調査

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。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として国連環境計画 (UNEP) や OECD で取り上げられていることから、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。

#### D. 考察

日本で開発された試験法のうち、*in vivo* コメットアッセイの TG を欧米の専門家と協力して OECD TG489 として承認させることができた。その過程を通じて、試験法開発における国際的な発言力を高めることができた。また、試験法の特性と限界が明らかになり、行政的試験法としての適正利用が可能となった。さらに、動物実験代替法として適切に評価された安全性試験法が導入されることにより、動物福祉を考慮しながら、化学物質の安全性評価をより効率的かつ高レベルに実施することができた。以上のように、日本で開発された試験法を国際的に受け入れられる OECD の TG とする過程を経て、日本の安全性評価レベルを世界にアピールすると同時に、産業の発展に貢献できると考えた。

本研究では、OECD において化学物質による内分泌かく乱性評価のための試験法として必要とされている *in vitro* 試験法である転写活性化試験法として、いずれも我が国で開発された、エストロゲン受容体 (ER)、アンドロゲン受容体 (AR) の転写活性化試験法 (STTA 法) について、バリデーション試験の取り纏めを行い、得られた結果をもとに信頼性・再現性が示された手法について OECD ガイドライン化するための研究を進めてきた。ER-STTA アンタゴニスト法については、一部の参加施設でクライテリアを満たす結果を得ることが出来ず、バリデーション試験終了は当初の計画より遅れたが、結果としてバリデーション試験実施によりアンタゴニスト試験法の再現性の問題が明らかとなったことは、本研究の成果である。最終的に定性的評価法としてプロトコールの修正を行った上でのガイドライン提案に SMT 及び VMG-NA の同意が得られた。熟練した特定の施設でしかデータ取得出来ないクライテリアが設定された当初のプロトコールより、むしろ、試験実施の基本条件を満たす施設であれば実施可能な試験法である定性的評価のプロトコールは、OECD ガ

イドラインとしてより適切であると考察された。本試験法については、OECD にガイドライン (TG455) アップデート案及びアンタゴニスト試験法パフォーマンススタンダード案の提案を行い、平成 26 年度末にガイドラインが成立する見込みである。

一方、AR STTA 法については、OECD レビューにより要求された追加バリデーションを実施した。AR STTA 追加バリデーションにおいては、被験物質選定から SMT への参画など OECD VMG-NA メンバーからの多くの協力により実施された。参加施設の測定技術や試験法そのものの安定性から、非常に再現性の良い結果が得られバリデーション計画は、順調に進捗、終了することが出来た。参加施設の中には初めて本試験法を実施する施設も含まれており、結果は本系の安定性を示すものである。本系は培地交換無しにルシフェラーゼ活性測定が実施出来るようデザインされていることも本系の安定性に寄与しているものと思われる。本試験法についても、SMT メンバーの協力により、バリデーションレポート、OECD ガイドライン案を作成し、OECD へ提出した。バリデーションレポート案及びガイドライン案については、来年度、WNT コメント募集を行い、その結果をもとに、次回の VMG-NA 会議で最終化に向けた議論を行う予定をしている。

工業用ナノ物質の *in vitro* 小核試験での遺伝毒性評価に関する専門会議では、共同研究 (ring trial) を行い、方法の標準化を目指すことが合意されたが、その前に JRC で、*in vitro* 試験条件下でのナノ物質の物理化学的性状の検討、定量評価法を検討し、試験プロトコルを確立させる。この予備検討が重要で有り、その経過については十分に注視する必要があると考える。

今回改定された遺伝毒性テストガイドラインの要点はこれまでに得られた科学的知見をもとに各試験による遺伝毒性物質の検出感度を上げること、ならびに動物福祉を向上させることにある。検出

感度の向上は、試験施設の習熟度の検証、対照の背景データベースの構築、試験の許容基準 (成立条件) および試験結果の陽性/陰性の基準の明確化、適切な細胞毒性指標の選択、統計学的検出力に基づく最適な観察細胞数ならびに標的組織の曝露証明に基づいている。一方、動物福祉の向上は、最大耐量の定義の明確化、限度用量の設定ならびに他の試験との組み込みに基づいている。検出感度関連事項は、いずれも適切な参考文献が示されており、妥当な変更といえる。4 つの既存試験ガイドラインは 2014 年 9 月に OECD の Web 上にアップされた。現在、翻訳作業を実施中である。本改訂ガイドラインは速やかに国内通知を実施すべきと考える。

げっ歯類小核試験は *in vivo* における染色体異常誘発性を評価するために、規制目的で広く使われてきた。この試験系では、ほぼ例外なく骨髄や末梢血の血液系細胞が使われてきた。この試験の別の特徴は、試験物質の急性処理 (主に 1 日から 5 日間の処理) である。しかしながら、投与期間の改良法や他の組織への拡大を検討することは、ハザードの同定のみならずリスク評価においても望ましい。また、別の重要な要件は、動物福祉、例えば、実験動物数の削減である。遺伝毒性試験の指標を他の動物試験に組み込むか、異なる複数の遺伝毒性指標を組み合わせて実施することが推奨されている。これらの目的を達成するには、既存の方法の改良や異なる処理方法を研究することが必要である。

これらの試験系の習熟と実用性の評価のための共同研究を組織した。主な対象は肝臓とし、胃腸管は任意な検討とした。結果の項で述べたように、肝臓と胃腸管小核試験の技術移転は成功し、すべての参加機関が期待された陽性知見を得た。施設間の再現性は良好であった。新しい肝臓小核試験の結果は、14 の遺伝毒性肝発がん物質の内 12 物質が陽性であった。肝臓で陰性であった遺伝毒性肝発がん物質 (Sudan I と TAA) は、*in vitro* 染色体

異常試験ではそれぞれ陰性およびあいまいな反応を示しており、また TAA は実施した骨髄小核試験で陰性であった。2 つの非遺伝毒性の肝発がん物質 (CFB と MP) は、本試験で陽性であった。したがって、反復投与肝臓小核試験は種々の作用機序による肝発がん物質を検出することが可能なのかもしれないが、さらなる検討が必要であろう。6 つの発がん物質のうち 4 つは肝臓を標的としておらず、それらは陰性であった。他の例外物質 (MMC と MMS) は発がん物質ではあるが、肝臓を標的としていない。しかしながら、これらの物質は DNA 直接作用型遺伝毒性物質であり、遺伝毒性試験では陽性対照として用いられ、肝臓を含む多くの組織で小核を誘発する。化学物質の数は限られたものではあるが、肝発がん物質に対する感受性は 87.5% (14/16) で、非肝発がん物質に対する特異性は 66.7% (4/6) で、一致率は 81.8% (18/22) であった。

胃腸管は、化学物質を強制経口する場合、最初に接触する部位だからである。本試験法を用いると、胃における強力な発がん物質である MNNG を経口投与した場合、ラット骨髄小核試験では通常陰性反応を示す。一方、本試験法を用いることにより、明瞭な陽性反応を示した。加えて、2-AAF と KBrO<sub>3</sub> は胃で陽性を示した。これらの物質は、*in vitro* 染色体上試験では代謝活性化系なしで陽性結果を示す。結腸では小核の誘発は認められなかったが、結腸はここで用いた化学物質の経口投与による発がん標的臓器ではなかった。共同研究での主対象は肝臓であり、モデル化学物質も肝発がん物質に焦点をあてており、胃腸管発がん物質ではなかった。それゆえ、この新しい胃腸管小核試験の実用性を評価するためのモデル化合物の再選択が必要となり、そのための更なる検討が求められる。なお、本共同研究では、成果を 1 報の要約論文ならびに 22 報の個別論文として Mutation Research 誌の特別号として公表する。

*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、がん化した場合は、特異な細胞形態を有し増殖を続け多層となり、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なりの時間が必要となる。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るが、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。この方法の有効性を確認するために、同一プレートについて、従来の観察法、吸光度測定による平均値法、陽性ウェルを判定する吸光度のカットオフ値法の結果を比較した。その結果、同一プレートの結果にもかかわらず 3 つの方法はいずれも完全には一致しなかったが、カットオフ値を設定することにより発がん性試験結果との一致率が観察法より高くなることが示唆された。そこで、吸光度のカットオフ値を細かく設定して適切な値を検討したが、観察法の陽性ウェルとカットオフ値による陽性ウェルが完全に一致する値は得られなかったことから、結果が安定する 0.09~0.13 のカットオフ値の結果を比較することによりこの方法の有効性を検証した。その結果、発がん物質の検出率は観察法および吸光度法ともに 82%以上と高い値を示したが、観察法と吸光度法を比較すると、エームス試験陰性の発がん物質はすべてプロモーションアッセイでも陽性の結果が得られたのに対し、エームス試験陽性または疑陽性の発がん物質の一致率は低かった。また、非発がん物質については、吸光度法では陽性ウェル数が多くなる傾向にあるため、疑陽性あるいは陽性と判定される物質が多くなり、結果として吸光度法の非発がん物質の検出率は観

察法より低かったが、不一致の結果はすべて遺伝毒性物質であった。肉眼観察の場合、細胞の形態や形質転換巣の状態を観察して陽性ウェルの判定を行うが、吸光度法の場合は過酸化水素処理に対する耐性を獲得した前がん細胞と形質転換細胞を含むウェルが陽性ウェルとして判定される。また、観察法と吸光度法の一致率がイニシエーション試験で低いことと考え合わせると、過酸化水素耐性獲得に遺伝毒性作用が関与している可能性も考えられる。発がん物質の予測性が従来の観察法と同程度以上であれば、機械的測定を可能としたこの方法は特別な訓練を必要とせず、より迅速かつ簡便な形質転換試験法として非常に優れた試験法であることから、前がん細胞の影響を受けない試験条件を検討するなど、更なる条件検討が必要であると考えられた。

今期は、日本の各種ガイドラインにも大きく影響する TG の新規作成や改定が行われている。しかし、日本の意見や科学的妥当性が必ずしも反映されているとは言えないものも存在する。今後、新規作成される TG や改訂 TG については技術レベルや科学レベルに十分配慮しつつ適切なものとなっていくよう、各界の専門家の意見をより強く反映させていくことが肝要である。また、新たな試験法開発や、改訂を目指す場合には、ここに示したように試験法開発の状況を把握しておくことが重要である。開発中の試験法が現在どの位置にあると認識されているか再確認でき、個別試験法開発における今後の方向性をも確認できることにつながる。

## 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遺伝毒性試験 *in vivo* コメットアッセイ、形質転換試験 Bhas 法、皮膚感作性試験 h-CLAT および眼刺激性試験 STE 法について、国際機関の協力を得て、TG を進めた。結果とし

て、本年、*in vivo* コメットアッセイを OECD TG489 として承認させることができた。

ER STTA 法、AR STTA 法はいずれも我が国で開発された、OECD で初めてのレポーターアッセイ系をベースとした内分泌かく乱性評価法としての試験法である。内分泌かく乱性の *in vitro* 評価法のバリデーションについて議論するため設置された OECD 加盟各国の専門家会合から助言・提案や多くの協力を得ることが出来た。

工業用ナノ物質の *in vitro* 小核試験での遺伝毒性評価に関する専門会議において、*in vitro* 小核試験のプロトコルをナノ物質に適用するための情報が不足していることが認識され、共同研究 (ring trial) を行い、方法の標準化を目指すことが合意された。また、今回改定された遺伝毒性テストガイドラインの要点は、これまでに得られた科学的知見をもとに各試験による遺伝毒性物質の検出感度を上げること、ならびに動物福祉を向上させることにあり、いずれも適切な参考文献が示されており、妥当な変更といえる。

本共同研究により肝臓および胃腸管小核試験の基本プロトコルが確立できた。さらにいくつかの考慮すべき点がある一方で、遺伝毒性指標を一般毒性試験に組み込むことには多くの利点がある。骨髄、肝臓、腺胃および結腸における組織特異的な差異が各化学物質について認められたことは、これらの試験の組合せが臓器特異性の評価を可能とし、また同じ動物における一般毒性と遺伝毒性指標の同時評価によって、より包括的な化学物質安全性の評価を可能とすることを示唆する。

過酸化水素処理後の吸光度法による形質転換試験結果と発がん性試験結果との相関は、観察法結果との相関より低かったが、この方法は吸光度測定により客観的に評価できることから、更なる条件検討を行い、形質転換試験を一般化する必要があると考えられる。

化学物質の毒性試験法には、日本国内だけでも各種法律に基づいたさまざまな試験法ガイドラインが存在する。それらに大きく影響を及ぼすガイド

ラインが、OECD で開発される毒性試験法ガイドラインである。近年は動物実験そのものを削減する方向でガイドライン開発が進められており、ここ数年、動物を使用しない新規の試験法ガイドラインあるいは既存ガイドラインの改良が活発に行われている。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および傾向を知っておくことは、効率的に試験法開発を進めるうえで非常に重要である。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 小島肇夫：技術移転で整備すべき文章・報告書類，実験者／試験検査員の誤ったデータの取扱い・試験誤操作防止策. 技術情報協会，東京，pp.57-58(2014)
- 2) 小島肇夫：動物実験代替法を取り入れた安全性保証の考え方，美肌化学の最前線，(株)シーエムシー出版，東京，pp.157-163(2014)
- 3) 小島肇夫：代替法における工学的新技術の可能性，動物実験代替のためのバイオマテリアル・デバイス，(株)シーエムシー出版，東京，pp.1-5(2014)
- 4) 小島肇夫：化粧品の安全性評価，エマルションの特性評価と新製品開発，品質管理への活用，(株)技術情報協会，東京，pp.326-331(2014)
- 5) 小島肇夫：化粧品・医薬部外品 安全性評価試験法，(株)じほう，東京，pp.1-138(2014)
- 6) 小島肇夫：化粧品・医薬部外品の安全性評価のための動物実験代替法開発の現状と課題，フレグランスジャーナル，42(9)，pp.12-19(2014)
- 7) 小島肇夫，西川秋佳：日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) 平成 25 年度報告書. AATEX-JaCVAM, 3(2), pp.115-123(2014)
- 8) 中澤憲一，篠田和俊，小島肇，吉村 功，西岡吾朗，石井 健: *in vitro* 発熱性物質試験の評価報告書, AATEX-JaCVAM, 3(2), 71-96 (2014)
- 9) 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, *Toxicol In Vitro*. 28(4), 515-23 (2014)
- 10) Kojima H, Katoh M, Shinoda S, Hagiwara S, Suzuki T, Izumi R, Yamaguchi Y, Nakamura M, Kasahawa T, Shibai A: A catch-up validation study of an in vitro skin irritation test method using reconstructed human epidermis LabCyte EPI-MODEL24, *J Appl Toxicol*, 34(7), 766-74 (2014)
- 11) 小野 敦；効能の高い化粧品原料の安全性リスク評価に対する考え方; *Cosmetic stage*, 9,(1) 21-26 (2014)
- 12) H. Kato, S. Fujii, M. Takahashi, M. Matsumoto, M. Hirata-Koizumi, A. Ono and A. Hirose ; Repeated dose and reproductive/developmental toxicity of perfluorododecanoic acid in rats.; *Environ Toxicol*, (2014)
- 13) M. Ema, K. Endoh, R. Fukushima, S. Fujii, H. Hara, M. Hirata-Koizumi, A. Hirose, H. Hojo, M. Horimotoet.al. ; Historical control data on developmental toxicity studies in rodents.; *Congenit Anom*, 54, 150-161 (2014)
- 14) M. Takahashi, S. Ishida, M. Hirata-Koizumi, A. Ono and A. Hirose ; Repeated dose and reproductive/developmental toxicity of perfluoroundecanoic acid in rats.; *J Toxicol Sci*, 39,(1) 97-108 (2014)
- 15) Horibata K, Ukai A, Honma M., Evaluation of rats' *in vivo* genotoxicity induced by *N*-ethyl-*N*-nitrosourea in the RBC Pig-a, PIGRET, and gpt assays. *Genes and Environment*, 36:199-202, 2014.

- 16) Matsumoto, M., Masumori, S., Hirata-Koizumi, M., Ono, A., Honma, M., Yokoyama, K. and Hirose, A., Evaluation of in vivo mutagenicity of hydroquinone in Muta™ mice. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.*, 775-776, 94-98, 2014.
- 17) Morita, T., Miyajima, A., Hatano, A., Honma, M.: Effects of the proposed top concentration limit on an in vitro chromosomal aberration test to assay sensitivity or to reduce the number of false positives, *Mutation Research*, 769, 34–49, 2014.
- 18) Yasui M, Kanemaru Y, Kamoshita N, Suzuki T, Arakawa T, Honma M. Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome. *DNA Repair* 15, 11-20 (2014)
- 19) Sassa A, Suzuki T, Kanemaru Y, Niimi N, Fujimoto H, Katafuchi A, Grúz P, Yasui M, Gupta RC, Johnson F, Ohta T, Honma M., Adachi N, Nohmi T. *In vivo* evidence that phenylalanine 171 acts as a molecular brake for translesion DNA synthesis across benzo[a]pyrene DNA adducts by human DNA polymerase  $\kappa$ . *DNA Repair* 15, 21-28, 2014.
- 20) David Kirkland, Errol Zeiger, Federica Madia, Nigel Gooderham, Peter Kasper, Anthony Lynch, Takeshi Morita, Gladys Ouedraogo, Juan Manuel Parra Morte, Stefan Pfuhler, Vera Rogiers, Markus Schulz, Veronique Thybaud, Jan van Benthem, Philippe Vanparys, Andrew Worth, Raffaella Corvi: Can *in vitro* mammalian cell genotoxicity test results be used to complement positive results in the Ames test and help predict carcinogenic or in vivo genotoxic activity? I. Reports of individual databases presented at an EURL ECVAM Workshop, *Mutation Research* 769 (2014) 34–49.
- 21) James T. MacGregor, Roland Frötschl, Paul A. White, Kenny S. Crump, David A. Eastmond, Shoji Fukushima, Melanie Guérard, Makoto Hayashi, Lya Soeteman-Hernandez, Toshio Kasamatsu, Dan Levy, Takeshi Morita, Lutz Müller, Rita Schoeny, Maik J. Schuler, Véronique Thybaud, and George E. Johnson: IWGT Report on Quantitative Approaches to Genotoxicity Risk Assessment I. Methods and metrics for defining exposure-response relationships and points of departure (PoDs), *Mutation Research* (2014) doi:10.1016/j.mrgentox.2014.09.011
- 22) James T. MacGregor, Roland Frötschl, Paul A. White, Kenny S. Crump, David A. Eastmond, Shoji Fukushima, Melanie Guérard, Makoto Hayashi, Lya Soeteman-Hernandez, Toshio Kasamatsu, Dan Levy, Takeshi Morita, Lutz Müller, Rita Schoeny, Maik J. Schuler, Véronique Thybaud, and George E. Johnson: IWGT report on quantitative approaches to genotoxicity risk assessment II. Use of point-of-departure (PoD) metrics in defining acceptable exposure limits and assessing human risk, *Mutation Research* (2014) doi:10.1016/j.mrgentox.2014.10.008
- 23) Yoshifumi Uno, Takeshi Morita, Mirjam Luijten, Carol Beevers, Shuichi Hamada, Satoru Itoh, Wakako Ohyama, Hironao Takasawa: Recommended protocols for the liver micronucleus test: report of the IWGT working group, *Mutation Research* (2014) doi:10.1016/j.mrgentox.2014.10.010
- 24) Yoshifumi Uno, Takeshi Morita, Mirjam Luijten, Carol Beevers, Shuichi Hamada, Satoru Itoh, Wakako Ohyama, Hironao Takasawa: Micronucleus test in rodent tissues other than liver or erythrocytes: report of the IWGT working group, *Mutation Research* (2014) in press.
- 25) Shuichi Hamada, Wakako Ohyama, Rie Takashima, Keisuke Shimada, Kazumi Matsumoto, Satoru Kawakami, Fuyumi Uno, Hajime Sui, Yasushi Shimada, Takashi Imamura,

Shoji Matsumura, Hisakazu Sanada, Kenji Inoue, Shigeharu Muto, Izumi Ogawa, Aya Hayashi, Tomomi Takayanagi, Yosuke Ogiwara, Akihisa Maeda, Emiko Okada, Yukari Terashima, Hironao Takasawa, Kazunori Narumi, Yumi Wako, Kazufumi Kawasaki, Masaki Sano, Nobuyuki Ohashi, Takeshi Morita, Hajime Kojima, Masamitsu Honma, Makoto Hayashi: Evaluation of the repeated-dose liver and gastrointestinal tract micronucleus assays with 22 chemicals using young adult rats: Summary of the collaborative study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/The Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) – Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS), Mutation Research (2014) in press.

- 26) Yamakage, K., Sui, H., Ohta, R., Toyozumi, T., Kawakami, K., Matsumoto, H., Toshitaka Takahashi, T., Sasaki, S., Ikezumi, M., Negishi, S., Izumi, K., Todoriki, S., Takashi, K. and Furuta, M.: Genotoxic potential and *in vitro* tumor-promoting potential of 2-dodecylcyclobutanone and 2-tetradecylcyclobutanone, which are radiolytic products of fatty acids, Mutation Res., 770: 95–104, 2014.

#### 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



## 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に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

研究分担者 小島 肇  
国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

本研究は、我が国で開発された安全性試験法の内、化学物質の安全性評価のための行政試験法として見込みのある方法について、国際状況調査を生かして欧米の研究機関と協力し、試験法の開発、バリデーションおよび／または第三者評価を経て、国際的に受け入れられる試験法ガイドライン (TG) 案を経済協力開発機構 (OECD : Organisation for Economic Co-operation and Development) に提出し、承認させることを目指す。その過程を経て、日本における継続的な TG の公定化システムを構築することを目的としている。

以下に示すバリデーションが終了した試験法において、バリデーション報告書等の資料を用意し、国際的な第三者評価を行い、TG を目指す過程で手法を検討した。当該試験法としては、1)遺伝毒性試験 *in vivo* コメットアッセイ、2)*in vitro* 皮膚感作性試験 ヒト樹状細胞株を用いた検出法 (h-CLAT)、3) *in vitro* 発癌性スクリーニング Bhas 42 形質転換試験 (Bhas 法)、4)眼刺激性試験 短時間曝露法 (STE 法) である。

結果として、本年、*in vivo* コメットアッセイを OECD TG489 として承認させることができた。さらに、TG 案として h-CLAT、Bhas 法および STE 法について検討を進め、来年度の成立を目指すとともに、TG 公定化のための継続的なシステムを提案した。

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	情報部 室長
及び所属機関における職名	山影 康次 食品薬品安全センター 秦野研究所 部長
宇野 芳文 田辺三菱製薬株式会社 研究本部	佐々木澄志 食品薬品安全センター 秦野研究所
安全性研究所 第一部長	田中 憲穂 食品薬品安全センター 秦野研究所
林 真 食品医農薬安全評価センター	
センター長 (副理事長)	
森田 健 国立医薬品食品衛生研究所 安全	研究所および鳥取県産業振興財団

足利 太可雄 資生堂株式会社  
品質保証センター  
坂口 斉 株式会社 花王  
安全性評価研究所 室長  
宮澤正明 株式会社 花王 安全性評価研  
究所  
吉村 功 東京理科大学 名誉教授  
大森 崇 同志社大学文化情報学部 准教  
授

## A. 研究目的

経済協力開発機構（OECD：Organisation for Economic Co-operation and Development）ガイド  
ンス文書（GD）No.34によれば<sup>1)</sup>、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  
法が試験法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：第三者評価）を円滑に実施し、  
OECD 試験法ガイドライン（Test Guideline: TG）  
として成立させることを目指している。

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、国際的な第三者評価システムを解析し、  
それを参考に日本における継続的な TG の公定  
化システムを確立することを目指している。

## B. 研究方法

動物実験の 3Rs(Reduction, Refinement,  
Replacement) に考慮しつつ、日本で開発され、

または日本での研究が最も進んでいる安全性  
評価のための試験法を公定化するために、以下  
の試験法について検討した。

### B-1) コメットアッセイ

本試験法は、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、平成 18 年 8 月にバリデーショ  
ンが開始され、その実験は平成 24 年 4 月に終了した。

具体的には、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。OECD に協力する専門家による第  
三者評価報告書<sup>2)</sup>および日本のバリデーショ  
ン結果<sup>3,4)</sup>をもとに作成された TG 案（一昨年度  
OECD に提出）をもとに、専門家間で議論が進  
み、平成 26 年 4 月にナショナルコーディネーター  
作業グループ（WNT: Working Group of the  
National Coordinators of the Test Guidelines  
Programme）会議で TG 案が議論された。

### 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、平  
成 21 年 1 月にバリデーションが開始され、その  
実験は平成 23 年 9 月に終了し、バリデーショ  
ン報告書がまとめられた<sup>5)</sup>。

欧州動物実験代替法センター（EURL  
ECVAM: European Union Reference Laboratory for  
alternatives to animal testing）科学諮問会議  
（ESAC: EURL ECVAM Scientific Advisory  
Committee）における第三者評価を経て<sup>6)</sup>、OECD  
において TG または GD 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。平成 22 年～平成 25 年に掛けて実施された<sup>7)</sup>。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 大野泰雄)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を行った。

ESAC による第三者評価が平成 25 年より実施された<sup>8)</sup>。並行して EURL ECVAM の専門家とともに、TG 案を作成した。

#### 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平成 20 年から開始された。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)の支援を受け、予測性を検討する追加バリデーションが実施され、平成 22 年 11 月に終了した。バリデーション報告書に加え<sup>9,10)</sup>、背景評価報告書を厚生労働科学研究委託事業において、花王とともに作成した。

米国動物実験代替法に関する省庁間連絡会議 (ICCVAM : Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) による第三者評価を経て<sup>11)</sup>、OECD による TG 案の協議が進められた。

#### B-5) TG 公定化システムの構築

これまでの他のバリデーションセンターにおける第三者評価や TG 作成の経験をもとに、日本における最適な TG の公定化システムを検討した。

#### (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) コメットアッセイ

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 案を用いて議論が進んだが、第三者評価からの提案を受け、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 月に開催された OECD WNT 会議において TG489 として承認された(添付資料 1<sup>12)</sup>)。

#### C-2) 形質転換試験 Bhas 法

平成 26 年 1 月に開催された OECD における専門家の対面会議は、Bhas 法の類似法である SHE アッセイを TG とすることに重点がおかれた。平成 26 年 4 月の WNT 会議で認められた SHE アッセイは TG ではなく、書面による手続きで GD となることが決まった。この GD の承認が遅れ、Bhas 法の TG または GD 案も影響を大きく受けた。来年度に Bhas 法を GD として成立させるため、GD 案を 2015 年 2 月に OECD に提出した。

#### C-3) 皮膚感作性試験 h-CLAT

日本の専門家が作成した案に EURL ECVAM の担当者が加筆修正した TG 案は平成 26 年 6 月に OECD に送られた。この TG 案への意見募集は 8 月に始まり、10 月には各国の意見が送られてきた。この意見の中には、再現性が乏しいという厳しいクレームが含まれてきたこともあり、日欧の統計家で施設間再現性を統計解析により解決する手段を検討した。統計解析報告書および改訂 TG 案を平成 27 年 2 月に OECD に送った。

#### C-4) 眼刺激性試験 短時間曝露法 (STE 法)

OECD による第二次意見募集によるコメントを平成 26 年 2 月に受け取り、改訂版を 6 月に提出した。第三次意見募集が 7 月に実施され、それを