

ANNEX 1

Definitions and abbreviations

Agonist: A substance that binds to a specific receptor and triggers a response in the cell. It mimics the action of an endogenous ligand binds to the same receptor.

AG ref: Agonist reference (500 pM of DHT) in the antagonist assay.

Androgenic activity: the capability of a chemical to mimic 5 α -Dihydrotestosterone in its ability to bind to and activate androgen receptors. AR mediated specific androgenic activity can be detected in this Test Guideline.

Antagonist: A type of receptor ligand or chemical that does not provoke a biological response itself upon binding to a receptor, but blocks or dampens agonist-mediated responses.

Anti-androgenic activity: the capability of a chemical to suppress the action of 5 α -Dihydrotestosterone mediated through androgen receptors. AR mediated specific anti-androgenic activity can be detected in this Test Guideline.

AR: Androgen receptor

ARTA: Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay.

BisA: Bisphenol A

CV: Coefficient of variation

Cytotoxicity: the harmful effects to cell structure or function ultimately causing cell death. It can be the result of a reduction in the number of cells present in the well at the end of the exposure period or a reduction of the capacity for a measure of cellular function when compared to the concurrent vehicle control.

DCC-FBS: Dextran-coated charcoal treated fetal bovine serum.

DEHP: Di(2-ethylhexyl)phthalate

DHT: 5 α -Dihydrotestosterone

DMSO: Dimethyl sulfoxide

EC50 value: the concentration of agonist that provokes a response halfway between the baseline (Bottom) and maximum response (Top).

ER: Estrogen receptor

FBS: Fetal bovine serum

HF: Hydroxyflutamide

IC50: the concentration of a test chemical at which the measured activity in an antagonist assay inhibits at level of 50% of the maximum activity induced by 500 nM DHT in each plate

IC30: the concentration of a test chemical at which the measured activity in an antagonist assay inhibits at level of 30% of the maximum activity induced by 500 nM DHT in each plate

PC: Positive control (DHT at 10 nM)

PC10: the concentration of a test chemical at which the response in an agonist assay is 10% of the response induced by positive control (DHT at 10 nM) in each plate

PC50: the concentration of a test chemical at which the response in an agonist assay is 50% of the response induced by positive control (DHT at 10 nM) in each plate

PCmax: the concentration of a test chemical inducing the RPCmax

RPCmax: maximum level of response induced by a test chemical, expressed as a percentage of the response induced by 1 nM E2 on the same plate

RT PCR: Real Time polymerase chain reaction

SD: Standard deviation

STTA: Stably Transfected Transcriptional Activation Assay.

TA: Transcriptional activation

Validation: The process by which the reliability and relevance of a particular approach, method, process or assessment is established for a defined purpose (12).

VC (Vehicle control): The vehicle that is used to dissolve test and control chemicals is tested solely as vehicle without dissolved chemical.

平成 26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」

分担研究課題名: 遺伝毒性試験法コメントアッセイ(*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

分担研究者: 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

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に出席し、ナノ材料の遺伝毒性評価に関するガイダンス文書の作成作業、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。改訂テストガイドラインでは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のうち 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)は、2014 年 4 月に WNT での承認を受け、9 月に改訂ガイドラインとして、正式に発行された。

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

A. 研究目的

経済協力開発機構(OECD)では、近年ヒト健康への懸念が問題となっている工業用ナノ物質の遺伝毒性評価法に関するガイダンス文書の作成を進めている。当該年度は、このガイダンス文書の SPSF が OECD に提出された。この、背景と内容について調査検討を行う。

OECD の化学物質の試験に関するガイドラインは、科学の進歩や規制上の必要性の変化および動物福祉への配慮などを踏まえて定期的に見直されてきている。遺伝毒性試験ガイドラインの多くは 1983 年から 1986 年にかけて採択され、その中の主要な試験ガイドラインは 1997 年に改訂された。2014

年には、それら改訂ガイドラインは、30 年近くにわたる試験の使用経験およびデータの解釈を反映して、さらに改訂版が発行された。それらの試験ガイドラインには、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)が含まれる。これらの試験ガイドラインは、化学物質を対象とした遺伝毒性試験として本邦で汎用されているものであり、その改訂に伴う変更点を把握しておくことは試験を適切に実施するうえで極めて重要である。本研究では、改訂 OECD 遺伝毒性試験ガイドラインの改訂点の妥当性について検討した。

B. 研究方法

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 月に改訂された 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、改訂内容に関する調査・研究を行った。

C. 研究結果・考察

1) 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

会議ではナノ物質の現行の遺伝毒性試験により試験するための適応に関するガイダンス文書を作成すべきことが合意された。ここでは、*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。

会議ではまた、*in vitro* 小核試験のプロトコー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た。たとえば、ナノ物質の細胞内への取り込み、用量、処理時間、サイトカラシン B の添加のタイミング等などの情報に関してはコンセンサスが得られておらず、論文によってもバラバラである。このため、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 つの細胞の種類 (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。試験条件として重要である培地中のナノ物質の物理化学的な特性に関しては JRC が検討する。また、次の段階として JRC は 5 つの細胞におけるナノ物質の取り込み効率や、そのキネティクスについても調査する。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。イタリア、フランス、ポーランド、ベルギー、ノルウェー、英国、BIAC、日本がこの共同研究に参加することを合意した。さらに参加機関を募る予定である。試験結果はガイダンス文書の開発のために重要な情報を提供してくれることが期待される。

会議では、技術的な問題についても議論され、合意された。主な問題点は以下の通りである。

- i. 処理時間
- ii. 細胞システムの選択
- iii. 用量 (適切な範囲、最高用量)
- iv. 処理時における血清の有無
- v. サイトカラシン B の利用
- vi. *In vitro* 試験条件下でのナノ物質の物理化学的性状の確認
- vii. *In vitro* 試験条件下でのナノ物質の定量評価
- viii. S9mix の利用

2) 改訂 OECD 遺伝毒性試験ガイドラインの妥当性に関する考察 (共通項目)

- i. 試験施設の習熟度
試験施設は、試験を日常的に実施する前に当該試験について十分な経験を積む必要のあることが記載された。そのためには、試験系の感度および検出範囲を明らかにし、対照の背景

データベースが利用可能となっている必要があるとされた。

ii. 対照の背景データベース

試験施設は、陽性対照および陰性（無処理、溶媒）対照について、その背景データの範囲および分布を確立しておく必要があるとされた。最初に背景陰性対照の分布データを得る場合は、公表されている陰性対照データと同時に陰性対照のデータが一致している必要があり、対照の分布に追加する同時陰性対照は、理想的には、ポアソン分布に基づく95%管理限界内にあることが望ましい。陰性対照の背景データベースは、最低10回の実験によって、できれば少なくとも20回の実験によって構築する。試験施設は、管理図などの品質管理の方法を用いて、陽性・陰性の両対照データが「管理下にある」ことを示す必要があり、また、実験プロトコルに変更による既存の対照背景データベースのデータとの重大な不一致があった場合には、新たに対照の背景データベースを構築する。

iii. 試験の許容基準

試験が許容できるかどうか、すなわち試験が成立し、データを評価することができるためには、以下の基準を満たす必要があるとした。

- ・ 同時陰性対照は、施設の陰性対照の背景データベースに追加可能である。
- ・ 同時陽性対照は、試験施設の陽性対照の背景データベースで得られる反応に一致し、同時陰性対照と比較して統計学的に有意に増加している。
- ・ 最高濃度/用量の選択基準が、記載基準と合致している。
- ・ 溶媒対照の細胞増殖基準が合致している (in vitro 試験の場合; TG 473, TG 487)

- ・ いずれかの実験条件によって陽性結果が得られていない限り、全ての条件で試験を実施している (in vitro 試験の場合; TG 473, TG 487)。
- ・ 適切な細胞数および濃度数で分析可能である (in vitro 試験の場合; TG 473, TG 487)。

iv. 結果の評価および解釈

試験許容基準がすべて満たされ、以下に該当する (in vitro 試験では、検討した実験条件のいずれかで以下の結果を示す) 場合、被験物質は明確に陽性であると結論できる。

- ・ 少なくとも1つの投与群（試験濃度）で、同時陰性対照と比較して統計学的に有意な増加が認められる。
- ・ 適切な傾向検定で、用量依存性の増加が認められる。
- ・ 当該結果は陰性対照の背景データの分布範囲外である。

また、試験許容基準がすべて満たされ、以下に該当する (in vitro 試験では、検討したすべての実験条件で以下の結果を示す) 場合、被験物質は明確に陰性であると結論できる。

- ・ いずれの投与群（試験濃度）においても、同時陰性対照と比較して統計学的に有意な増加が認められない。
- ・ 適切な傾向検定で、濃度依存性の増加が認められない。
- ・ すべての結果が陰性対照の背景データの分布範囲内である。
- ・ 骨髄が被験物質に曝露されている (in vivo 試験の場合; TG 474, TG 475)

すなわち、結果の評価における優先考慮事項は、これまでの生物学的妥当性から統計学的評価に変更され、陰性対照の背景データとの比較も必須となった。

v. 分析(計数細胞数)

異常細胞の出現頻度の算出にあたり、in vitro 染色体異常試験(TG 473)の1濃度あたりの観察細胞数は200個から300個に、in vivo 小核試験(TG 474)の1用量あたりの観察細胞数は2000個から4000個に、in vivo 骨髄染色体異常試験(TG 475)の1用量あたりの観察細胞数は100個から200個に、1.5倍から2倍に増やされた。In vitro 小核試験(TG 487)の1濃度あたりの観察細胞数は2000個で、変更なかった。

この観察細胞の増加は、陰性背景データに基づき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で妥当な計測細胞数であり、ゼロと計数される確率を下げるためとされた。

3) 改訂 OECD 遺伝毒性試験ガイドラインの妥当性に関する考察 (*In vitro* 試験)

i. 使用細胞

従来からのチャイニーズハムスター由来細胞を含め種々の細胞株が使用可能であるが、選択基準として、p53 遺伝子の状態、遺伝的(核型)安定性、DNA 修復能および由来(げっ歯類、ヒト)を考慮する必要性が指摘された。これに伴い、ヒトリンパ球細胞株 TK6 が新たに標準細胞として推奨された。

ii. 沈殿を生ずる場合の最高用量

沈殿が生じる場合は、それによる人為的影響を避けるため、目視による沈殿が生じる最低用量(1用量)を最高用量とする。従来は、細胞毒性がみられればそちらを優先させ、また、沈殿用量は1用量以上とされていた。

iii. 最高試験濃度

沈殿も細胞毒性も認められない場合、最高試験濃度は10 mM、2 mg/mL または 2 μ L/mL の

うち最も低い濃度とされ、従来の「10 mM、5 mg/mL または 5 μ L/mL」に比べ重量濃度が4割低減された。組成が不明な被験物質や複雑な反応生成物などは、各成分の濃度を高めるために5 mg/mLにする必要がある。ただし、これらの要件は、ヒト用医薬品(すなわち、1 mM または 0.5 mg/mL のいずれか低い方 [ただし、低い分子量(200 以下)の場合は、より高濃度を考慮])では異なるので注意することとされた。

iv. 細胞毒性の評価

細胞毒性の指標として、従来の生細胞数や単層細胞密度に代わり、細胞株については相対的細胞数増加(RICC)または相対的細胞集団倍加(RPD)が、初代培養リンパ球については分裂指数(MI)が推奨された。また、細胞毒性に基づく場合の最高濃度は、55 \pm 5%の細胞毒性をもたらすように(すなわち、細胞株については RICC および RPD が、初代培養リンパ球については MI が、同時陰性対照の 45 \pm 5%にまで低下するように)設定することが求められ、従来の「50%以上の有意な減少」よりも細かく規定された。

4) 改訂 OECD 遺伝毒性試験ガイドラインの妥当性に関する考察 (*In vivo* 試験)

i. 動物の週齢

従来は、「若齢成熟動物」としていたが、「投与開始時に6~10週齢が望ましい」ことが追記された。

ii. 投与経路

従来は、腹腔内投与も推奨される投与経路の1つであったが、改訂版では、腹腔内投与はヒトで意図される曝露経路ではないため、通常は推奨されず、特別な科学的妥当性がある場合のみ用いることとされた。

iii. 最大耐量(MTD)

最大耐量の定義が、従来の「最高用量は毒性の徴候を呈す用量で、同じ投与計画で更に高用量の投与を続ければ致死を引き起こすと予想される用量」から、「試験の実施を制限する毒性を示すことなく忍容性が認められる(例:体重減少や造血系の細胞毒性は認められるが、死亡や安楽死を必要とする疼痛、苦痛、疲弊は認められない)最高用量」に変更され、より動物福祉に配慮したものとなった。

iv. 用量段階

通常公比 2 (ただし 4 を超えない) による最低 3 用量段階を用い、それにより最大量(あるいは MTD)から毒性をほとんどあるいは全く生じない用量までの範囲を含めるのが望ましいとされた。以前の試験ガイドラインには公比の記載はなかった。

v. 限度試験

1) 明確な毒性作用認められず(骨髄毒性や標的組織の細胞毒性を含む)、2) 他の知見に基づき遺伝毒性が予測されず、3) 被験物質の標的組織(骨髄)への到達が証明されていれば、3 用量段階を用いた完全な試験は必要なく、限界用量のみの単一用量で十分であるとした。なお、限界用量は、14 日間以上の投与の場合 1000 mg/kg 体重/日、14 日間未満の場合 2000 mg/kg 体重/日である。従来の試験ガイドラインに 3) 項の条件が追記された。

vi. 性差の確認

動物数および性についての変更はなく、「1 群当たり雌雄いずれかの分析可能な動物を 5 匹以上、あるいは雌雄両性を用いる場合は、雌雄それぞれが 5 匹以上」とされているが、雌雄をともに用いる場合には、要因設計を用いたデータ分析が推奨され、その方法が補

遺に示された。

5) 改訂 OECD 遺伝毒性試験ガイドラインの妥当性に関する考察(個別試験)

i. 哺乳類細胞を用いた in vitro 染色体異常試験(TG 473)

- ・ 気体/揮発性物質の処理: TG 487 と同様に、「密封容器内で処理するなど、標準的なプロトコールに適切な修正を加えて試験を実施する」ことが追記された。
- ・ 陽性対照: 推奨物質としてメタンスルホン酸エチルとエチルニトロソ尿素が削除され、一方、シトシンアラビノシドが新たに追加された。
- ・ 観察細胞数: 染色体異常の出現頻度算出には、1 用量あたり 200 個から 300 個へ変更された。ただし、明らかに陽性の場合にはこれより少ない数でもよい。

ii. 哺乳類赤血球小核試験(TG 474)

- ・ 小核の自動計数装置による評価: フローサイトメーター、画像解析装置およびレーザースキャニングサイトメーターなど自動計数装置による評価が推奨され、目視計数と比べて、試験施設間および試験施設内の再現性および感度が改善されることが示されているとしている。
- ・ 小核形成の由来: 通常、試験の一部として実施されることはないものの、小核形成の由来が染色体断片なのかあるいは染色体全体なのかを識別する方法についての記載が追加された。
- ・ 小核の自動解析: 考慮事項が記載された。
- ・ 使用動物種: 従来は、末梢血を用いる場合、マウスが推奨されていたが、改

訂版ではマウス、ラットともに推奨された。

- ・ 投与回数: 単回投与、2 回投与に加え、新たに 3 回以上の投与プロトコールが追加された。この場合、投与は約 24 時間間隔とし、骨髄の場合は最終投与後 24 時間以内、末梢血の場合は 40 時間以内にサンプリングする。このオプションは、コメット試験との組合せや反復毒性試験への組入れを考慮して追加された。
- ・ 観察細胞数: 幼若赤血球の比率算出のためには、個体あたり骨髄では 200 細胞から 500 細胞に、末梢血では 1000 細胞から 2000 細胞に増加された。また、小核出現頻度算出には、個体あたり 2000 個から 4000 個に増加された。また、試験施設の小核の背景出現頻度が 0.1% 以下の場合、計数細胞の増加を考慮することとされた。

iii. 哺乳類骨髄染色体異常試験 (TG 475)

- ・ 動物種: 通常使用される動物としてラットとマウスが推奨され、チャイニーズハムスターが削除された。
- ・ 陽性対照: 新たな陽性対照として、メタンスルホン酸メチルが追加された。
- ・ 観察細胞数: 染色体構造異常の出現頻度算出には、個体あたり 200 個以上の分裂中期細胞を分析することとして、従来の 100 細胞から増やされた。なお、細胞毒性の指標としての分裂指数は、一個体あたり 1000 個から求め、変更されていない。

iv. 哺乳類細胞を用いた *in vitro* 小核試験 (TG 487)

- ・ 陽性対照: 推奨される陽性対照物質の

表が追加され、代謝活性化不要の染色体異常誘発物質としてメタンスルホン酸メチル、マイトマイシン C、4-ニトロキノリン-N-オキシドおよびシトシンアラビノシドが、代謝活性化を必要とする染色体異常誘発物質としてベンゾ(a)ピレンおよびシクロフォスファミドが、異数性誘発物質としてコルヒチンおよびビンブラスチンが挙げられた。

- ・ 代謝活性化: 代謝活性化酵素を発現する遺伝子改変細胞の使用に関する記述が削除された。
- ・ 処理時間延長の必要性: 被験物質が細胞周期に影響を及ぼす場合(特に p53 正常細胞)、試料採取時間/回復時間を正常細胞周期の 1.5~2.0 倍の時間(すなわち、処理開始から正常細胞周期の 3.0~4.0 倍の時間)まで延長することを考慮する。

D. 結論

2014 年 10 月 13-14 日にパリの OECD 本部で開催され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では *in vitro* 小核試験のプロトコー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。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、試験プロトコールを確立させる。この推奨を基に専門家会議は SPSF の作成を決定した。SPSF は 2014 年 11 月 15 日までに OECD 事務局に提出される。

今回改訂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。

E. 研究発表

1. 論文発表

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.

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.

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.

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)

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 κ . *DNA Repair* 15, 21-28, 2014.

2. 学会発表

本間正充: 医薬品中に存在する遺伝毒性不純物の評価と管理, 第 350 回 CBI 学会研究講演会 2014 年 5 月 東京

本間正充: 日本環境変異原学会レギュラトリーサイエンス WG 活動, 日本環境変異原学会公開シンポジウム 2014 年 5 月 東京

M. Honma et al.,: Demonstration of non-threshold of 8-oxoG inducing genotoxicity by targeted mutagenesis, 43rd EEMS Annual Meeting 2014 年 7 月 ランカスター・英国

M. Honma: Use of QSAR Tools for Hazard Identification of Genotoxic Impurities in Pharmaceuticals, 9th World Congress on Alternative and Animal Use Sciences (WC9), 2014 年 8 月 プラハ・チェコ

本間正充: インシリコによる医薬品中不純物の安全性評価と、その向上に向けた国際共同研究, CBI 学会 2014 年大会プレミヤティングセッション 2014 年 10 月 東京

M. Honma: Trend and Progress of OECD Genotoxicity Testing Guidelines, 2014 National

Workshop on Non-clinical Safety Evaluation and Quality Management 2014年11月 上海・中国

本間正充: 遺伝毒性インテリジェントテストシステム, 日本環境変異原学会第43回大会 2014年11月 東京

本間正充: QSAR を利用した医薬品中の遺伝毒性不純物の評価と管理, 日本動物実験代替法学会第27回大会 2014年12月 横浜

M. Honma et al., : Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome, 4th Asian Conference on Environmental Mutagens 2014年12月 コルカタ・インド

F. 知的所有権の取得状況
なし

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

—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—

研究分担者	森田 健	国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部第四室 室長
	林 真	(公財)食品農医薬品安全性評価センター 理事長
研究協力者	小宮佐知子	国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部
	濱田修一	三菱化学メディエンス株式会社 試験研究センター
	大山ワカ子	株式会社ヤクルト本社 中央研究所
	大橋信之	(公財)食品農医薬品安全性評価センター
	佐野正樹	(公財)食品農医薬品安全性評価センター

研究要旨

ラットを用いた反復投与肝臓小核試験の肝発がん物質検出の有効性と当該試験の一般毒性試験への組込み可能性を評価するために、日本環境変異原学会哺乳動物試験研究会（JEMS/MMS 研究会）に検討を委託し、24 機関が参加した共同研究を実施した。22 のモデル化合物を、14 日間あるいは 28 日間反復投与し、肝臓における小核誘発性を評価した。その結果、16 の肝発がん物質中 14 物質で陽性が示され、内 9 物質は単回投与による骨髓/末梢血小核試験で陰性と報告されている遺伝毒性発がん物質であった。また、施設間再現性も良好であった。これらの知見は、肝発がん物質に対する反復投与肝小核試験の感度の高さを示している。特異性については、肝臓を標的臓器としない遺伝毒性発がん物質 6 種のうち 4 つが陰性を示し、本試験系の高い臓器特異性が認められた。また、6 つの発がん物質については、反復投与肝小核試験と同時に胃腸管小核試験も実施した。腺胃を用いた小核試験では、胃を標的臓器とするものを含む 3 つの発がん物質を陽性と検出した。本共同研究で得られた知見は、*in vivo* におけるいくつかの組織で小核を検出するこの新しい手法が十分に使えることを示しており、多臓器小核試験（肝臓・胃腸管）の基本プロトコールが構築できた。

A. 研究目的

小核試験は、*in vivo*（主に血液系細胞）で

染色体異常を検出する試験系であり、重要かつ最も広く利用されている。染色体異常

誘発性とともに他の毒性学的指標を同時に評価すること、すなわち、小核試験を反復投与一般毒性試験に組込むことは、とりわけ重要な手法である。血液系細胞以外の組織は、ある種の遺伝毒性物質が標的としており、その標的組織を用いることも重要である。そこで、JEMS/MMS 研究会に委託し、肝臓と胃腸管における染色体異常を検出する新たな小核試験法を評価するための小核試験共同研究を組織した。

肝臓と胃腸管は一般毒性試験のみならず発がん性試験においても重要な組織である。本共同研究では、従来の手法と異なり動物になんら追加の処置を施さないで被験物質を反復投与した後に、肝臓と胃腸管を標的とした小核試験法を評価した。そのため、この遺伝毒性指標は、反復投与一般毒性試験に組み込み可能なものである。このような複数指標による試験は、実験動物の 3R（すなわち、実験動物数の削減、代替、精緻化）にも貢献可能である。さらに、同じ動物から同時に多くの情報を得ることができ、リスク評価を容易にかつより正確に行うことにつながる。

B. 研究方法

1. 共同研究

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 物質のグループ

分け、ならびに遺伝毒性/発がん性特性を Table 1 に示した。

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

グループ C : 非遺伝毒性の肝発がん物質

2. 小核試験

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。

3. 組織病理学的検査および肝重量測定

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。

4. 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。

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。

C. 研究結果

1. 施設間再現性

肝臓小核試験では、この検討に参加したすべての機関で、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 (Fig. 1)。回帰直線式は、以下の通りであった： $MNHEP(\%) = 0.118 \times \text{Dose} - 0.04$ ($R^2=0.78$)。本解析からも、施設間再現性が優れていることが示された。

2. 主試験

試験結果を Table 2 および Fig. 2 に示す。

2.1. 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 (Table 5, Fig. 3)。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、理由はふめい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 (Table 2, Fig. 2)。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 (Table 5, Fig. 3)。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。

2.2. 胃腸管小核試験

胃腸管小核試験は任意の検討としたため、一部の希望機関により行われた。用いた試験物質は DMN, QUN, 2-AAF, Sudan I, KBrO₃, および MNNG であった。これら 6 物質中 3 物質 (2-AAF, KBrO₃ 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。

2.3. 組織病理学的検査および肝重量測定

病理組織学的知見と肝重量の指標を総合評価にどのように利用するかを妥当性を結論付けることはできなかったが、グループ A に属する物質は肝傷害性および肝重量

増加を示す傾向がみられた。一方、グループ B および C の物質では、病理組織学的な知見はほとんどなかった。肝発がん性の有無にかかわらず、分裂期細胞頻度の増加は示されなかった。一般的に、肝重量は小核の誘発あるいは肝発がん性に関連していなかった。

D. 考察

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んだり、異なる複数の遺伝毒性指標を組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 Fig. 3 に要約した。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（Table 1）、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 KBrO₃ は腺胃で陽性を示した。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。

E. 結論

本共同研究により肝臓および胃腸管小核試験の基本的な手法（基本プロトコール）が確立できた。しかしながら、上述した問題点に加え、プロトコールを精緻化し、本試験の真の価値を評価するには、さらにいくつかの考慮すべき事項がある。例えば、観察細胞数、最適な投与期間、毒性や代謝に応じた動物の選択（雄あるいは雌）である。一方、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認められる。本共同研究の結果によれば、骨髄、肝臓、膵胃、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。これは、これらの試験の組合せが臓器特異性の評価を可能とすることを示唆している。最大の利点は、同じ動物における一般毒性と遺伝毒性指標の同時評価を行うことにより、より包括的な化学物質安全性の評価を可能にしていることである。

F. 研究発表

<森田 健>

1. 論文発表

1.1. 書籍

なし

1.2. 雑誌

- 1) ○Narumia K., Ashizawa k., Takashima K., Takasawa H., Katayama S., Tsuzuki Y.,

Tatemoto H., Morita T., Hayashi M., Hamada S.: Development of a repeated-dose liver micronucleus assay using adult rats: An investigation of diethylnitrosamine and 2,4-diaminotoluene, Mutation Research, 2012, 747, 234-239.

- 2) ○Takasawa H., Takashima R., Hattori A., Narumi K., Kawasako K., Morita T., Hayashi M., Hamada S.: Development of a repeated-dose liver micronucleus assay using adult rats (II): Further investigation of 1,2-dimethylhydrazine and 2,6-diaminotoluene, Mutation Res., 2013, 751, 12-18.
- 3) Takeshi Morita, Atsuko Miyajima, Akiko Hatano, Masamitsu Honma: 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 (2014) 34-49.
- 4) 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.
- 5) 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
- 6) 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
- 7) ○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
- 8) ○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.
- 9) ○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 Kawasako, 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.
2. 学会発表
- 1) ○Hamada S., Takashima R., Shimada K., Zaizen K., Kawakami S., Tanaka J., Matsumoto H., Nakai T., Suzuki H., Matsumura S., Sanada H., Inoue K., Muto S., Hagio S., Hayashi A., Takayanagi T., Ogiwara Y., Maeda A., Narumi K., Takasawa H., Ogawa I., Ohyama W.,

- Nakajima M., Morita T., Kojima H., Hayashi M., Honma M.: Evaluation of The Repeated Dose Liver Micronucleus Assay in Rats- Summary of The Collaborative Study by CSGMT/JEMS.MMS, 2011, 42nd EMS 2011 Annual Meeting.
- 2) ○濱田修一、高島理恵、嶋田圭祐、財前和代、川上哲、田中仁、松本浩孝、中井智博、鈴木洋、松村奨士、真田尚和、井上健司、武藤重治、萩尾宗一郎、林亜耶、高柳智美、萩原庸介、前田晃央、成見香瑞範、高沢博修、小川いづみ、大山ワカ子、中嶋圓、森田健、小島肇、林真、本間正充:反復投与肝臓小核試験法の有用性の検討 (MMS 共同研究)、2011年、第40回日本環境変異原学会
- 3) ○Hamada S, Takashima R, Shimada K, Matsumoto K, Kawakami S, Tanaka J, Matsumoto H, Nakai T, Imamura T, Matsumura S, Sanada H, Inoue K, Muto S, Hagio S, Hayashi A, Takayanagi T, Ogiwara Y, Maeda A, Narumi K, Takasawa H, Ogawa I, Ohyama W, Wako Y, Kawasako K, Morita T., Kojima H, Hayashi M, Honma M.: Evaluation of Repeated Dose Liver Micronucleus Assay in Rats (II): Summary of Collaborative Study by CSGMT/JEMS.MMS, 2012, EMS (Environmental Mutagen Society) 43rd Annual Meeting.
- 4) ○ Ohyama W, Narumi K, Okada E, Fujiishi Y, Takayanagi T, Hori H, Matsumura S, Ikeda N, Natsume M, Tanaka J, Takashima R, Hamada S, Asano N, Morita T., Kojima H, Honma M, Hayashi M: Evaluation of Repeated Dose Gastrointestinal tract Micronucleus Assay in Rats: Summary of Collaborative Study by CSGMT/JEMS.MMS, 2012, EMS (Environmental Mutagen Society) 43rd Annual Meeting.
- 5) ○Morita T.: Recent collaborative studies by JEMS.MMS – A repeated-dose micronucleus assay, 2012, 3rd ACEM (Asian Conference on Environmental Mutagens).
- 6) ○Hamada S, Takashima R, Shimada K, Matsumoto K, Kawakami S, Tanaka J, Matsumoto H, Nakai T, Imamura T, Matsumura S, Sanada H, Inoue K, Muto S, Hagio S, Hayashi A, Takayanagi T, Ogiwara Y, Maeda A, Narumi K, Takasawa H, Ogawa I, Ohyama W, Wako Y, Kawasako K, Sano M, Nobuyuki O, Morita T., Kojima H, Hayashi M, Honma M.: Development of repeated dose liver micronucleus assay using adult rats: Summary of collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS, 2012, 3rd ACEM (Asian Conference on Environmental Mutagens).
- 7) ○大山ワカ子、成見香瑞範、岡田恵美子、藤石洋平、高柳智美、堀妃佐子、松村奨士、池田直弘、夏目匡克、田中仁、高島理恵、松本浩孝、須井哉、浅野哲秀、森田健、小島肇、本間正充、濱田修一、林真:反復投与による消化管小核試験法の有用性の検討:MMS共同研究の報告、2012年、第41日本環境変異原学会
- 8) ○濱田修一、高島理恵、嶋田圭祐、松本和美、川上哲、田中仁、松本浩孝、中井智博、今村匡、松村奨士、真田尚和、井上健司、武藤重治、萩尾宗一郎、林亜耶、高柳智美、萩原庸介、前田晃央、成見香

- 瑞範、高沢博修、小川いづみ、大山ワカ子、涌生ゆみ、川迫一史、佐野正樹、大橋信之、森田健、小島肇、林真、本間正充:反復投与による肝臓小核試験法の有用性の検討:MMS 共同研究の報告、2012年、第41日本環境変異原学会
- 9) ○Hamada S, Takashima R, Shimada K, Matsumoto K, Kawakami S, Tanaka J, Matsumoto H, Nakai T, Imamura T, Matsumura S, Sanada H, Terashima Y, Inoue K, Muto S, Hagio S, Hayashi A, Takayanagi T, Ogiwara Y, Maeda A, Narumi K, Takasawa H, Ogawa I, Ohyama W, Wako Y, Kawasaki K, Morita T, Kojima H, Hayashi M, Honma M.: Evaluation of Repeated Dose Liver Micronucleus Assay in Rats: Summary of Collaborative Study by CSGMT/JEMS.MMS, 2013, 52nd SOT.
- 10) ○Hamada S, Ohyama W, Takashima R, Shimada K, Matsumoto K, Kawakami S, Uno F, Matsumoto H, Nakai T, Imamura T, Matsumura S, Sanada H, Inoue K, Muto S, Ogawa I, Hayashi A, Takayanagi T, Ogiwara Y, Maeda A, Okada E, Terashima Y, Takasawa H, Narumi K, Wako Y, Kawasaki K, Morita T, Kojima H, Honma M, Hayashi M: Evaluation of Repeated Dose Liver and Gastrointestinal Tract Micronucleus Assay with 22 Chemicals Using Young Adult Rats (III): Summary of Collaborative Study by CSGMT/JEMS.MMS, 2013, Environmental Mutagenesis and Genomics Society, 44th Annual Meeting.
- 11) ○Takeshi Morita: Micronucleus test other than bone marrow/peripheral blood and liver, 2013, 6th International Workshop on Genotoxicity Testing.
- 12) ○Hamada S, Takashima R, Shimada K, Matsumoto K, Kawakami S, Uno F, Matsumoto H, Nakai T, Imamura T, Matsumura S, Sanada H, Inoue K, Muto S, Ogawa I, Hayashi A, Takayanagi T, Ogiwara Y, Maeda A, Okada E, Takasawa H, Narumi K, Ohyama W, Wako Y, Kawasaki K, Morita T, Kojima H, Hayashi M, Honma M.: Evaluation of Repeated-Dose Liver Micronucleus Assay with 22 Chemicals Using Young Adult Rats, 2013, 11th International Conference on Environmental Mutagens.
- 13) ○Takeshi Morita and Shuichi Hamada: The Rat Liver Micronucleus Test: Summary of the 2013 IWGT Working Group on the Liver Micronucleus Test, 2014 GTA (Genetic Toxicology Association), Newark, US, 7 May 2014.
- 14) ○Hamada S, Ohyama W, Takashima R, Shimada 3, Matsumoto K, Kawakami S, Uno F, Sui H, Shimada Y, Imamura T, Matsumura S, Sanada H, Inoue K, Muto S, Ogawa I, Hayashi A, Takayanagi T, Ogiwara Y, Maeda A, Okada E, Terashima Y, Takasawa H, Narumi K, Wako Y, Kawasaki K, Morita T, Kojima H, Honma M, Hayashi M: Evaluation of Repeated Dose Liver and Gastrointestinal Tract Micronucleus Assay Using Young Adult Rats (IV): Summary of Collaborative Study by CSGMT/JEMS.MMS., Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EMGS), 45th Annual Meeting 2014: Hilton Orlando Lake Buena Vista, Orlando,

Florida September 13–17, 2014.

<林 真>

1. 論文発表

1.1. 書籍

なし

1.2. 雑誌

- 1) ○Narumi, K., Ashizawa, K., Takashima, R., Takasawa, H., Katayama, S., Tsuzuki, Y., Tatemoto, H., Morita, T., Hayashi, M., Hamada, S.: Development of a repeated-dose liver micronucleus assay using adult rats: An investigation of diethylnitrosamine and 2,4-diaminotoluene, *Mutation Research*, 747, 234-239 (2012)
- 2) ○Takasawa, H., Takashima, R., Hattori, A., Narumi, K., Kawasaki, K., Morita, T., Hayashi, M., Hamada, S. : Development of a repeated-dose liver micronucleus assay using adult rats (II): Further investigation of 1,2-dimethylhydrazien and 2,6-diaminotoluene, *Mutation Research* 751, 12-18 (2013)
- 3) Hiroshi Takehara, Maki Makita, Ryota Tanaka, Mai Tsuchiya, Masato Naya and Makoto Hayashi: Lung toxicity assessment using bronchoalveolar lavage fluid and pleural lavage fluid cytology by intratracheal treatment in rats, *The Journal of Toxicological Sciences* 39(1), 141-145, (2014)
- 4) Takashi Yamada, Yushiro Tanaka, Ryuichi Hasegawa, Yuki Sakuratani, Yasushi Yamazoe, Atshushi Ono, Akihiko Hirose, Makoto Hayashi: Hazard evaluation support system (HESS): Category approach to screen chemicals which are metabolized to methoxy or ethoxyacetic acid responsible for testicular toxicity, *Toxicology Letters*, 229, supplement, S165, (2014)
- 5) Sawako Kasamoto, Daisuke Mukai, Shoji Masumori, Kenichiro, Suzuki, Ryota Tanaka, Dorothea K. Torous, Jyoji Yamate, Makoto Hayashi: Flow cytometric analysis of micronuclei in rat peripheral blood: An interlaboratory reproducibility study, *Mutation Research* 762, 39-42, 2014.
- 6) 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
- 7) 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
- 8) ○Fuyumi Uno, jin Tanaka, Maya Ueda, Miho Nagai, Masahito Fukumuro, Masakatsu Natsume, Michiyo Oba, Ayaka Akahori, Shoji Masumori, Shigeaki Takami, Yumi Wako, Kazufumi Kawasaki, Yuriko Kougo, Wakako Ohyama, Kazunori Narumi, Yohei Fujiishi, Emiko Okada and Makoto Hayashi: Repeated-dose liver and gastrointestinal tract micronucleus assays for quinoline in rats, *Mutation Research* (2014)
- 9) Takashi Yamada, Yushiro Tanaka, Ryuichi Hasegawa, Yuki Sakuratani, Yasushi Yamazoe, Atsushi Ono, Akihiko Hirose and Makoto Hayashi: Development of a category approach to predict the testicular toxicity of chemical substances structurally related to ethylene glycol methyl ether, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* (2014) (in press)
- 10) ○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.
2. 学会発表
- 1) Hamada S., Takashima R., Shimada K., Zaizen K., Kawakami S., Tanaka J., Matsumoto H., Nakai T., Suzuki H., Matsumura S., Sanada H., Inoue K., Muto S., Hagio S., Hayashi A., Takayanagi T., Ogiwara Y., Maeda A., Narumi K., Takasawa H., Ogawa I., Ohyama W., Nakajima M., Morita T., Kojima H., Hayashi M., Honma M.: Evaluation of The Repeated Dose Liver Micronucleus Assay in Rats- Summary of The Collaborative Study by CSGMT/JEMS.MMS, 2011, 42nd EMS 2011 Annual Meeting
- 2) 濱田修一、高島理恵、嶋田圭祐、財前和代、川上哲、田中仁、松本浩孝、中井智博、鈴木洋、松村奨士、真田尚和、井上健司、武藤重治、萩尾宗一郎、林亜耶、高柳智美、萩原庸介、前田晃央、成見香瑞範、高沢博修、小川いづみ、大山ワカ子、中嶋圓、森田健、小島肇、林 真、本間正充：反復投与肝臓小核試験法の有用性の検討（MMS 共同研究）、2011年、第40回日本環境変異原学会