

- 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, EMS (Environmental Mutagen Society) 43rd Annual Meeting, Bellevue, Washington, 2012.09.
- 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, EMS (Environmental Mutagen Society) 43rd Annual Meeting, Bellevue, Washington, 2012.09.
- 5) 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., 3rd ACEM (Asian Conference on Environmental Mutagens), Hangzhou, China, 2012.10.
- 6) Uno, F., Tanaka, J., Takai, M., Masumori, S., Takami, S., Wako, Y., Kawasako K., Kougo, Y., Hayashi, M.: Evaluation of the repeated dose liver micronucleus assay using Quinoline, 3rd ACEM (Asian Conference on Environmental Mutagens), Hangzhou, China, 2012.10.
- 7) 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、第41回日本環境変異原学会、静岡、2012.11
- 8) 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、第41回日本環境変異原学会、静岡、2012.11.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 林 真 : レギュラトリーサイエンスの課題、平成 26 年度日本環境変異原学会公開シンポジウム、2014 年 5 月 24 日、東京
- 12) Y. Sakuratani, T. Yamada, Y. Ikenaga, J. Yamada, S. Ohta and M. Hayashi: Utilization status and future development of HESS repeated dose toxicity prediction system, 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Science, 24-28 August 2014, Prague, Czech Republic
- 13) Hamada S, Ohyama W, Takashima R, Shimada S, 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.
- 14) Makoto Hayashi: Safety perspective on preservatives and/or impurities in consumer products in local country, The 3rd Asia Safety Experts Workshop, November 13, 2014, Singapore Innovation Center, Singapore
- 15) 林 真 : レギュラトリーサイエンスにおける遺伝毒性の国際的協調に対する貢献、日本環境変異原学会第 43 回大会、2014 年 12 月 4-5 日、東京
- 16) 鈴木健一郎、益森勝志、林 真 : 塩基性アミノ酸による Ames 試験への影響、日本環境変異原学会第 43 回大会、2014 年 12 月 4-5 日、東京
- 17) 田中仁、三輪愛、福室真仁、永井美穂、宇野冬美、夏目匡克、笠本佐和子、鈴木健一郎、大羽みちよ、飯尾美沙子、

益森勝志、林 真：細胞液の保存時間の結果への影響、日本環境変異原学会第 43 回大会、2014 年 12 月 4-5 日、東京

- 18) 笠本佐和子、福室真仁、三輪愛、田中仁、飯尾美沙子、夏目匡克、鈴木健一郎、宇野冬美、益森勝志、林 真：RccHAn:Wistar ラットと CD(SD)ラットの DNA 損傷製の比較 -陰性対照および陽性対照について-、日本環境変異原学会第 43 回大会、2014 年 12 月 4-5 日、東京
- 19) 伊藤圭一、益森勝志、向井大輔、林 真、榊原啓之、保田倫子、下位香代子：エチルニトロソウレアによる小核誘発とエリスポエチン分泌の日内リズムとの関連性、日本環境変異原学会第 43 回大会、2014 年 12 月 4-5 日、東京

G. 知的所有権の取得状況

なし。

Table 1 Standard genotoxicity profiles and rat carcinogenicity data for the test chemicals

Table 3. Standard genotoxicity profiles and rat carcinogenicity data for the test chemicals

Chemical	In vitro genotoxicity		In vivo MN assay (BMPB)		Rat carcinogenicity						
	Ames	Ref.	CA	Ref.	Single	Ref.	4 weeks	Ref.	Liver	Other sites	Ref.
Group A-1 (9 chemicals)											
DMN	+	[20]	+	[20]	-	[29]	ND		+	kid, lun, vsc, tes	[24]
NPYR	+	[20]	ND		-	[30]	ND		+	kid, vsc, tes	[24, 36]
MDA	+	[21]	+	[21]	-	[4]	ND		+	thy	[37]
NDPA	+	[22]	+	[26]	-	[21]	ND		+	eso, nas	[24]
2,4-DNT	+	[20]	-	[20]	-	[30]	ND		+	ski, mgl	[24]
2,6-DNT	+	[20]	+	[6]	-	[6]	-	[35]	+	-	[24]
QUN	+	[23]	+	[23]	-	[23]	ND		+	-	[38]
DAB	+	[20]	+	[20]	-	[21]	ND		+	-	[24]
2-NP	+	[24]	+	[27]	-	[31]	ND		+	-	[39]
Group A-2 (5 chemicals)											
MCT	-	[20]	+	[20]	+	[32]	-	[32]	+	-	[24]
NMOR	+	[20]	+	[28]	+	[33]	ND		+	vsc	[24]
2-AAF	+	[20]	+	[20]	+	[32]	+	[32]	+	ski, mgl	[24]
Sudan I	+	[20]	-	[20]	+	[33]	ND		+	-	[24]
TAA	-	[20]	TC	[20]	+	[34]	ND		+	-	[24]
Group B (6 chemicals)											
MMC	+	[20]	+	[20]	+	[32]	-	[32]	-	per	[24]
CP	+	[20]	+	[20]	+	[32]	+	[32]	-	ub, lym, ner	[40]
KBrO ₃	+	[25]	+	[25]	+	[32]	+	[32]	-	kid, per, thy	[24]
MNNG	+	[20]	+	[20]	+	[33]	ND		-	eso, smi, sto	[24]
MMS	+	[20]	+	[20]	+	[32]	+	[32]	-	hmo, lun, ner	[24, 39]
KA	+	[23]	E	[23]	E	[23]	ND		-	thy (mouse)	[24]
Group C (2 chemicals)											
CFB	-	[20]	+	[20]	-	[35]	-	[35]	+	pan	[24]
MP	E	[20]	+	[20]	ND		ND		+	not identified	[24]

CA: chromosomal aberration test; MN assay: micronucleus assay; BM: bone marrow; PB: peripheral blood
 +: positive; -: negative; E: equivocal; ND: no data
 TC: technical compromised, indicating a test result that was questionable due to failure to meet essential standard criteria for an adequate study.
 kid: kidney; lun: lung; vsc: vascular system; tes: testes; thy: thyroid gland; eso: esophagus; nas: nasal cavity; ski: skin; mgl: mammary gland; per: peritoneal cavity;
 ub: urinary bladder; lym: lymphocyte; ner: nervous system; smi: small intestine; sto: stomach; hmo: hematopoietic system; pan: pancreas
 Group A-1, Genotoxic hepatocarcinogens that are negative in the BMPB MN assay; Group A-2, Genotoxic hepatocarcinogens that are positive in the BMPB MN assay;
 Group B, Genotoxic carcinogens but non-liver-targeted; Group C, Non-genotoxic hepatocarcinogens

Table 2 Summary of the results from repeated-dose micronucleus assay with several organs

Table 5. Summary of the results from repeated-dose liver micronucleus (RDLMN) assay with other target organs

Chemical	Target organs in in vivo repeated-dose micronucleus assay							
	Liver		Bone marrow		Stomach		Colon	
	14 days	28 days	14 days	28 days	14 days	28 days	14 days	28 days
Group A-1 (9 chemicals)								
DMN	+	+	+	+	+	+	+	+
NPYR	+	+	+	+	+	+	+	+
MDA	+	+	+	+	+	+	+	+
NDPA	+	+	+	+	+	+	+	+
2,4-DNT	+	+	+	+	+	+	+	+
2,6-DNT	+	+	+	+	+	+	+	+
QUN	+	+	+	+	+	+	+	+
DAB	+	+	+	+	+	+	+	+
2-NP	+	+	+	+	+	+	+	+
Group A-2 (5 chemicals)								
MCT	+	+	+	+	+	+	+	+
NMOR	+	+	+	+	+	+	+	+
2-AAF	+	+	+	+	+	+	+	+
Sudan I	+	+	+	+	+	+	+	+
TAA	+	+	+	+	+	+	+	+
Group B (6 chemicals)								
MMC	+	+	+	+	+	+	+	+
CP	+	+	+	+	+	+	+	+
KBrO ₃	+	+	+	+	+	+	+	+
MNNG	+	+	+	+	+	+	+	+
MMS	+	+	+	+	+	+	+	+
KA*	+	+	+	+	+	+	+	+
Group C (2 chemicals)								
CFB	+	+	+	+	+	+	+	+
MP	+	+	+	+	+	+	+	+

+: positive; -: negative; ND: not done;
 Group A-1, Genotoxic hepatocarcinogens that are negative in the BMPB MN assay;
 Group A-2, Genotoxic hepatocarcinogens that are positive in the BMPB MN assay;
 Group B, Genotoxic carcinogens but non-liver-targeted;
 Group C, Non-genotoxic hepatocarcinogens
 *: An extra administration was performed 21 hours after the last administration (3 hours before necropsy) prior to the comet assay in the 14-day treatment.

Fig. 1 Results of the inter-laboratory reproducibility trial on the RDLMN assay using DEN (3.13, 6.25, 12.5 mg/kg/day).

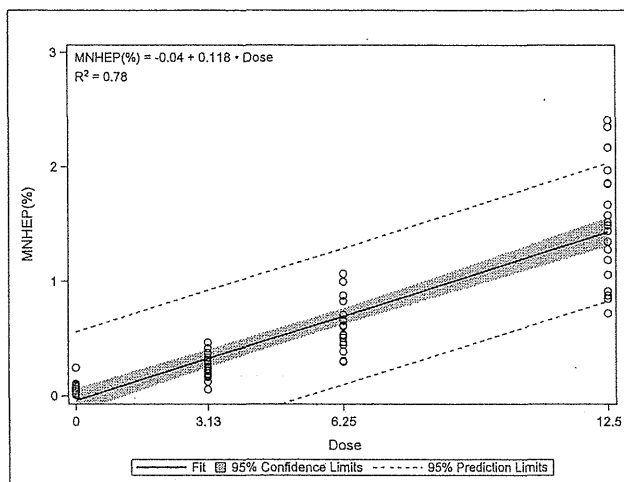


Fig. 2 Results of the main study on the RDLMN assays.

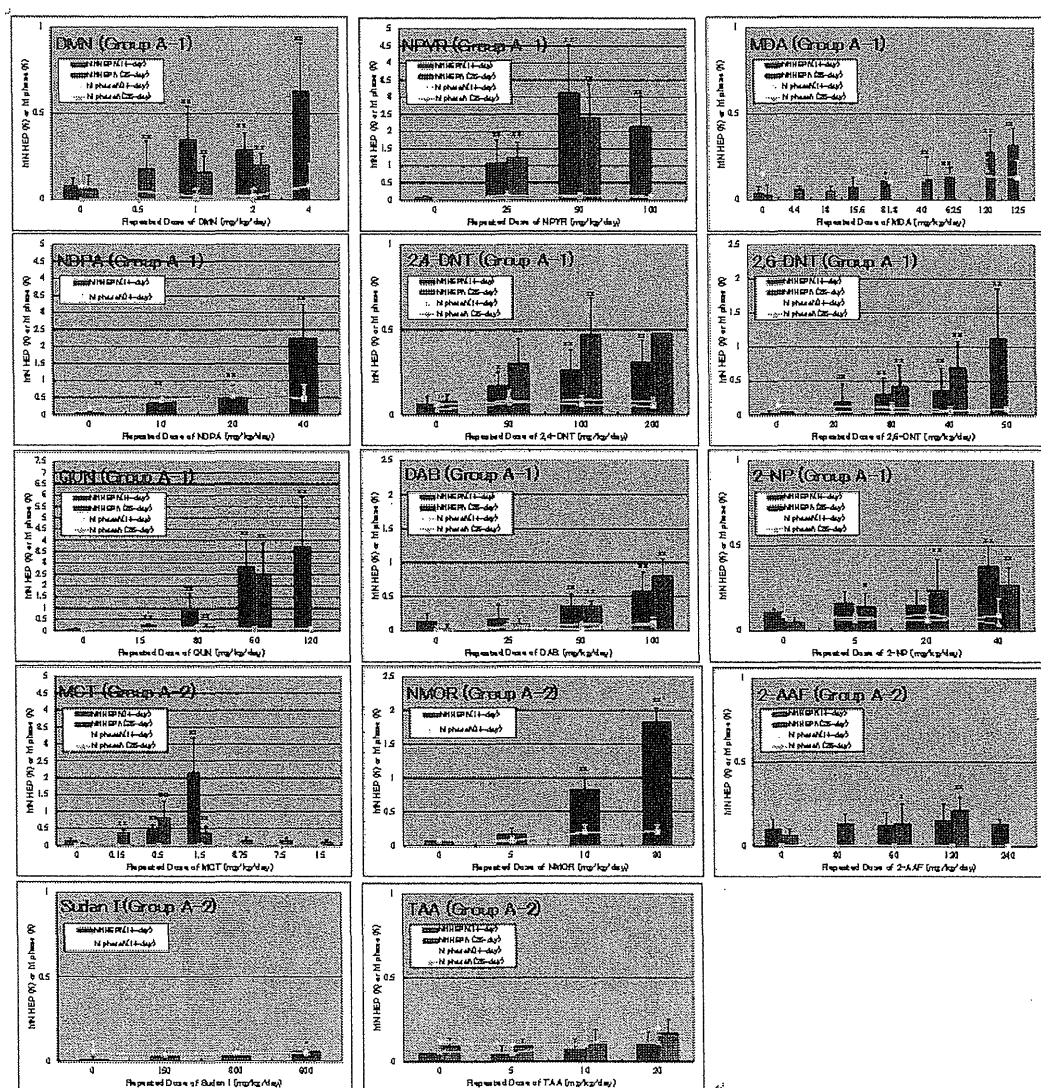


Fig. 2 Results of the main study on the RDLMN assays. (cont.)

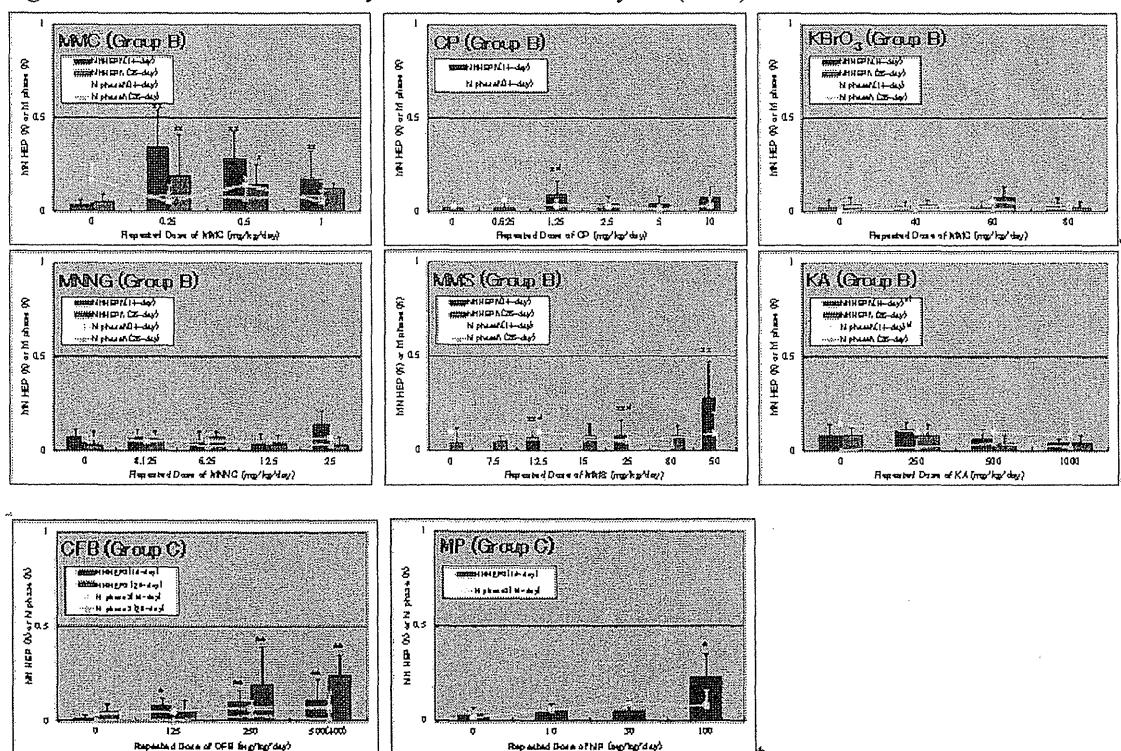
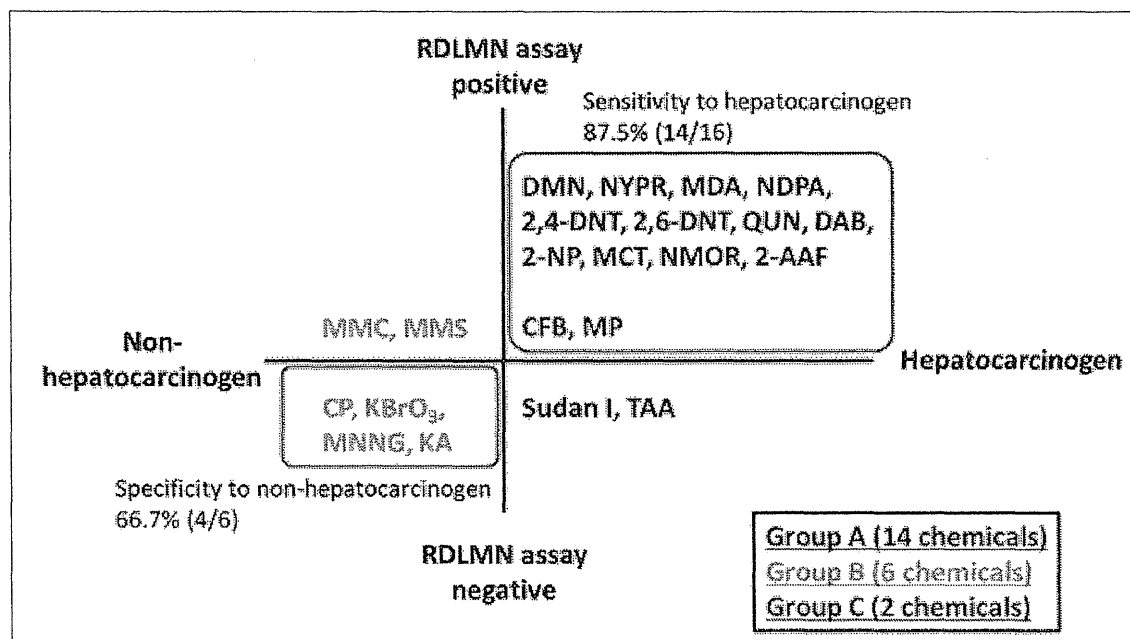


Fig. 3 The performance of the repeated-dose liver micronucleus (RDLMN) assay.

Group A: Genotoxic hepatocarcinogens

Group B: Genotoxic carcinogens but non-liver-targeted

Group C: Non-genotoxic hepatocarcinogens



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」

(H24-化学-指定-008)

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

研究要旨

形質転換した細胞からなるコロニー (形質転換巣) を客観的に判定する方法として、我々が開発した過酸化水素処理後の吸光度測定による判定法は、陽性と判定する吸光度の値 (カットオフ値) を 0.12 とすることで、発がん性試験結果との一致率が観察法よりも高くなることを示唆した。

今年度は、吸光度をさらに細分化した場合の陰性対照と陽性対照の判定結果を分析し、カットオフ値 0.12 の妥当性を検証した。その結果、0.08 以下では陰性対照の試験成立条件を満たさないケースが多く認められ、0.09~0.13 では結果がほぼ一定であった。この結果を踏まえ、カットオフ値を 0.06~0.13 に設定して 26 物質 (発がん物質：17 物質、非発がん物質：9 物質) の形質転換率を調べた結果、発がん物質の検出率 (感度：Sensitivity) は従来の観察法では 88%、過酸化水素処理による吸光度法では 82%と吸光度法で疑陽性と判定された 1 物質の差であった。しかしながら、非発がん物質の検出率 (特異度：Specificity) はそれぞれ 75%および 67%と吸光度法では疑陽性と判定される物質がやや多く、過酸化水素耐性細胞には前がん状態の細胞も含まれることが影響している可能性が考えられた。

客観的判定が可能な吸光度法は形質転換試験の普及には有用な手法であることから、さらなる条件検討が必要であると考えられる。

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。

前年度は、陽性とする吸光度の値 (カットオフ値) を 0.12 とした場合、観察法よりも良い結果が得られることを示したが、今年度はそのカットオフ値の妥当性を検証するため、従来の観察による判定と吸光度法による陰性対照および陽性対照の各ウェルの結果を比較するとともに、26 物質 (発がん物質：17 物質、非発がん物質：9 物質)

について、従来法とカットオフ値による判定結果を発がん性試験結果と比較し、過酸化水素処理による吸光度測定法の有効性を検討した。

B. 研究方法

96 ウェルプレートに 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 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し、ギムザ染色することにより、肉眼観察による形質転換巣の有無を判定した。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。

形質転換巣の判定は、酒井らの方法²⁾に従った。

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、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。

過酸化水素法における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、仮のカットオフ値を基準として陽性ウェルを判定し、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。

C. 研究結果

カットオフ値を0.01毎に設定した場合の陽性ウェルの変化を陰性対照および陽性対照の11プレートを用いて検討した。その結果、陰性対照プレートでは、カットオフ値（吸光度）が高くなると陽性ウェルの数が急激に減少したが、陽性対照プレートではその変化は緩やかであった（図2）。

カットオフ値を0.04～0.13まで変化させた時の陽性ウェルの数を観察法による陽性ウェルの数と比較し、さらに同一ウェルにおける陽性ウェル判定の一致率、試験成立条件の達成状況を解析した（表1）。カットオフ値（吸光度）が低くなると陽性ウェルの数が増加することから、吸光度測定と観察法の両方の同一ウェルで陽性となる一致率は高くなるが、一方で試験成立条件を満たさない実験数（プレート数）が多くなった。カットオフ値を変えることによってウェルの陽性判定が観察法と完全に一致する結果は得られなかったが、陰性対照プレートの陽性ウェル数が観察法の数に近く、かつ、試験成立条件を満たす適切なカットオフ値は0.09ないし0.1と推定された。

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（表2）。代表例として、発がん物質である2-acetylamidofluoreneと非発がん物質であるcaffeineの結果をそれぞれ図3および図4に示した。

0.08以下のカットオフ値では試験不成立となるデータが認められたことから、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。1物質（Mezerein）は、カットオフ値が0.1以下の場合には観察法の結果と一致（疑陽性）したが、0.11以上では吸光度法では陰性となり、エームス試験結果と一致した。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。また、1物質（p-Phenylenediamin 2HCl）は、カットオフ値が0.12以上の場合には観察法の結果と一致（陰性）したが、0.11以下では吸光度法では疑陽性となった。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）が陽性または疑陽性と結果が異なった。非発がん物質の検出率（特異度：Specificity）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（Concordance）は観察法では81%（21/26）、吸光度法では69%（18/26）であった。

D. 考察

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、生細胞を吸光度で測定する方法により形質転換細胞の判定を可能にした。また、吸光度のカットオフ値0.12を用いて陽性ウェルの数を評価することによって、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ことから、カットオフ値を細かく設定してより適切なカットオフ値を検討した。しかしながら、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ず、観察法の結果と比較すると、イニシエーションアッセイの一致率がプロモーションアッセイ

より低かった。また、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、エームス試験陰性の発がん物質はすべて両方のプロモーションアッセイで陽性であったことに対して、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試験陽性物質であった。これらの結果は、前がん細胞が過酸化水素処理に対する耐性を獲得することで非発がん物質の検出力が低下したと考えられるが、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方法であることから、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。

E. 結論

過酸化水素処理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、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。

F. 引用文献

- 1) Asada, S., Sasaki, K., Tanaka, N., Takeda, K., Hayashi, M., Umeda, M.: 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, 2005.

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

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表(発表誌名、巻号、ページ、発行年も記入)

Yamakage, K., Muramatsu, D., Arai, S., Endo, N. and Sasaki, K.: Evaluation method in Bhas 42 cell transformation assay selecting transformed foci using hydrogen peroxide, H₂O₂, 9th World Congress in Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC9), ALTEX proceedings, 3, 2, 2014, (Prague, Czech Republic).

H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

名称: 哺乳動物形質転換細胞の選択方法

出願番号: 2009-206686

取得済み

2. 実用新案登録

なし

表 1 Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験におけるカットオフ値と従来法(観察法)との比較結果

	Initiation								Promotion							
	陰性プレート				陽性プレート				陰性プレート				陽性プレート			
	陽性ウェル平均	観察値差(絶対値)の合計	陽性ウェル一致率	不成立実験数	陽性ウェル平均	観察値差(絶対値)の合計	陽性ウェル一致率		陽性ウェル平均	観察値差(絶対値)の合計	陽性ウェル一致率	不成立実験数	陽性ウェル平均	観察値差(絶対値)の合計	陽性ウェル一致率	
観察値	6	0	1	0	55	0	1		12	0	1	0	43	0	1	
OD 0.04	9	76	0.89	3	70	232	0.98		24	175	0.98	8	50	86	0.93	
OD 0.05	8	56	0.87	2	67	199	0.97		20	124	0.96	6	46	53	0.88	
OD 0.06	7	44	0.84	1	65	176	0.96		17	86	0.93	6	43	33	0.84	
OD 0.07	6	35	0.80	1	63	151	0.94		15	58	0.91	4	40	36	0.81	
OD 0.08	5	33	0.79	0	61	140	0.93		13	33	0.90	2	38	54	0.79	
OD 0.09	5	31	0.72	0	60	132	0.92		12	31	0.88	1	37	68	0.75	
OD 0.10	5	32	0.70	0	58	127	0.91		11	39	0.85	1	36	80	0.74	
OD 0.11	4	31	0.67	0	57	120	0.90		11	39	0.85	1	35	92	0.72	
OD 0.12	4	31	0.66	0	56	121	0.89		10	45	0.81	1	34	100	0.70	
OD 0.13	4	33	0.65	0	54	123	0.87		10	46	0.80	1	33	112	0.68	

観察値差(絶対値)の合計: (吸光度による陽性ウェル数)と(観察法による陽性ウェル数)の差の絶対値

陽性ウェル一致率: 観察法による陽性ウェルを吸光度法で陽性と判定した率

不成立実験数: 陽性ウェル数が試験成立条件を満たさなかったプレート数

○: 検討した中で最適と考えられる結果

□: 最適と考えられるカットオフ値

表 2 Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験におけるカットオフ値と従来法(観察法)との比較結果

化合物	96ウェル法 ¹⁾														観察法		遺伝毒性 ^{2,3)}		発がん性 ^{2,3)}
	H ₂ O ₂ (OD)																		
	0.06		0.07		0.08		0.09		0.1		0.11		0.12		0.13		観察法		
	Ini	Pro	Ini	Pro	Ini	Pro	Ini	Pro	Ini	Pro	Ini	Pro	Ini	Pro	Ini	Pro	Ames	Others	
2-Acetylaminofluorene	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MNNG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phorbol 12,13-didecanoate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd	+
5-Azacytidine	+	NS	+	±	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+
Sterigmatocystin	+	NS	+	±	+	±	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	Vivo MN+	+
Benzo[a]pyrene	+	NS	+	NS	+	±	+	±	+	±	+	±	+	±	+	-	+	+	+
Dibenz[a,h]anthracene	+	±	+	±	+	±	+	±	+	±	+	±	+	±	+	±	+	+	+
Mitomycin C	+	±	+	±	+	±	+	±	+	±	+	±	+	±	+	±	+	+	+
Lithocholic acid	-	±	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	MLA ±	+
Methapyrilene HCl	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
Urethane	NS	NS	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
Zinc chloride	+	+	+	+	+	±	+	±	+	±	+	±	+	±	+	±	+	-	+
Mezerein	±	+	±	+	±	+	±	+	±	+	±	+	±	+	±	+	-	nd	+
Benz[a]anthracene	NS	-	NS	-	±	-	±	-	±	-	±	-	±	-	±	-	+	+	+
IQ	±	NS	-	NS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Styrene oxide	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+
o-Toluidine HCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	CA+	+
1-Naphthylamine	±	-	±	-	±	-	±	-	±	-	±	-	±	-	±	-	+	+	-
p-Phenylenediamin 2HCl	±	±	±	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	-	+	-
L(+)-Ascorbic acid	+	NS	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	w±	MN+	-
Phenol	NS	±	±	+	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	-	+	-
Eugenol	-	±	-	±	-	±	-	±	-	±	-	±	-	±	-	±	-	+	-
Caffein	-	NS	-	NS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CA+	-
m-Toluidine	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-
Ampicillin sodium salt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D(-)-Mannitol	-	NS	-	NS	-	NS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

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, NS: 試験不成立

CA: 染色体異常試験, MN: in vivo小核試験, nd: データ無し

1) 多重性を考慮した χ^2 検定, 2) Sakai et al. (2010), Mutation Res., 3) Validation Report

○: 観察法と一致しなかった結果

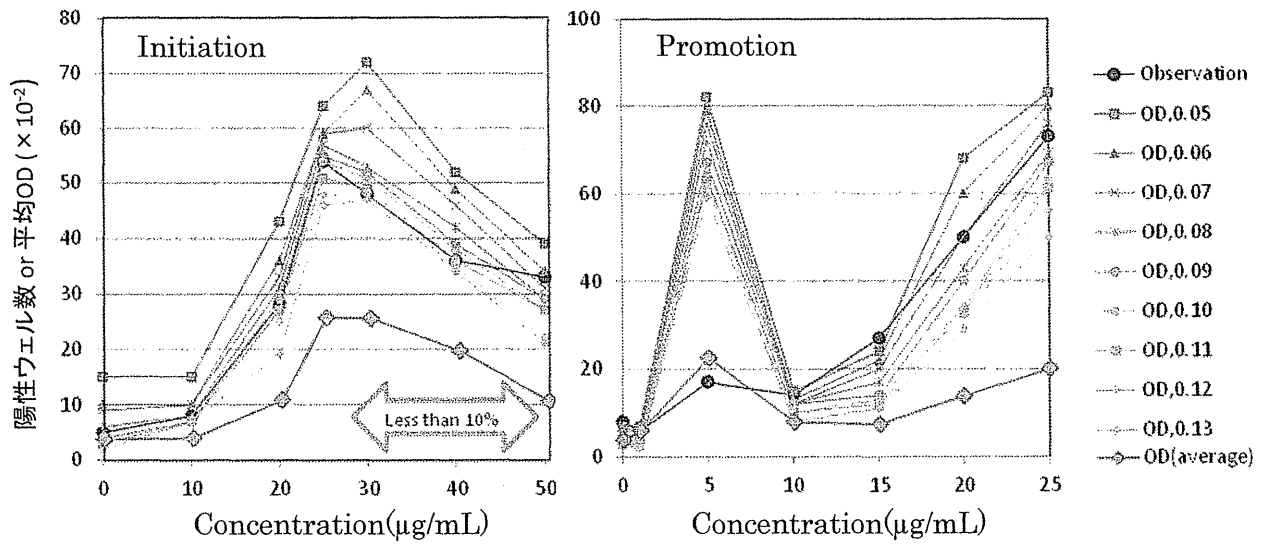


図3 発がん物質 (2-Acetylaminofluorene) の形質転換試験におけるカットオフ値と陽性ウェルの濃度依存性
Initiation assay では、30 µg/mL 以上の濃度では増殖率が10%未満であった。

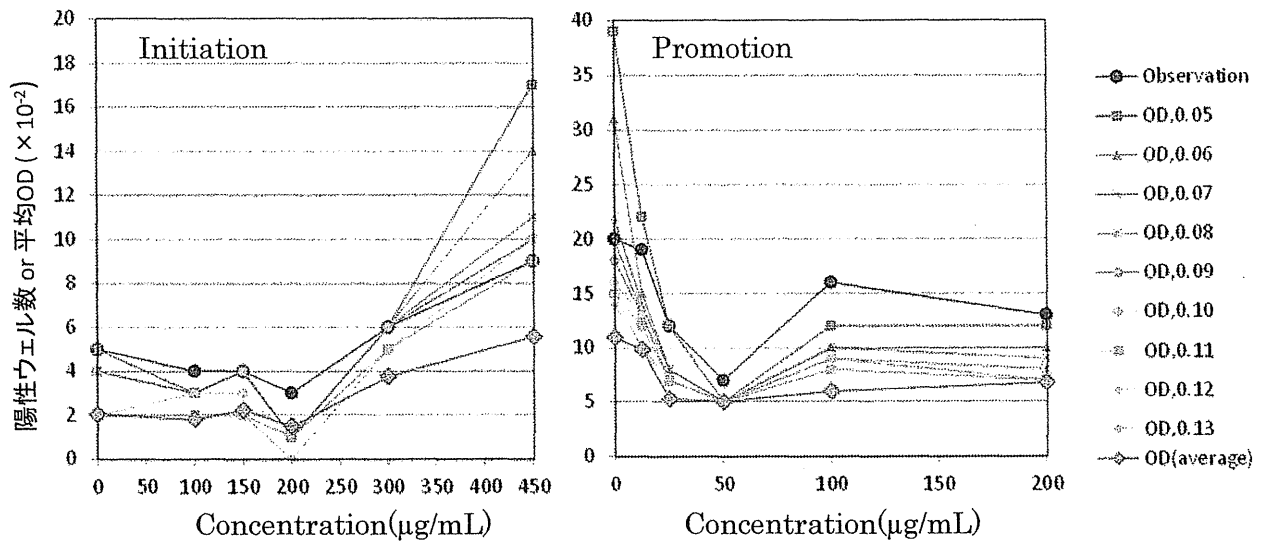


図4 非発がん物質 (Caffeine) の形質転換試験におけるカットオフ値と陽性ウェルの濃度依存性

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 年度分担研究報告書
分担研究課題名：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

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、経済協力開発機構(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。

A. 研究目的

OECD が開発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。たとえば、2015 年から施行される韓国や台湾の化学物質規制に関する法律や中国の化学物質規制に関する法律にも OECD 試験法が明記されている。しかし、試験法は絶えず改良され、また新たに持ち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とその傾向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 52 回会合(2014 年 11 月開催)の SCHEDULE OF ACTIVITIES FOR 2014/2015 (ENV/JM(2014)33¹⁾)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 workplan²⁾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。

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(TG401)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、EU では REGULATION (EC) No 1907/2006 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 18 December 2006 [Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH)]の完全施行が 2018 年に迫っており、一般化学品の分野においても上記のように動物実験を減らしていく方向にある。

また、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)として国

連環境計画[United Nations Environment Programme (UNEP)]や OECD で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) 前回会合から今回第 52 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。今回は、人健康に関する TG において、日本の規制にも大きく影響を与える変異原性試験に関するものが多かった。TG473 および 474 は日本においては、それぞれ染色体異常試験および小核試験として知られているが、統計学的有意差を確実に得るために観察細胞数の増加が図られている。これは逆に考えると、実験者の手技レベルが落ちていることを示しているかもしれない。日本では多くの研究所が手技レベルを維持するため、勉強会等を行っており、現実には日本では問題は起こっていない。

このような中で、下記の TG489(コメットアッセイ)は日本発の TG として成立しており、今後のブラッシュアップも考慮していかなければならない。

▶ 新規ガイドライン:

・生態毒性関連

TG 238: Sediment-free *Myriophyllum spicatum* Toxicity Test

TG 239: Water-sediment *Myriophyllum spicatum* Toxicity Test

・人健康関連

TG 489: In vivo Mammalian Alkaline Comet Assay

▶ アップデートガイドライン

・人健康関連

TG 431: In vitro skin corrosion (human skin model)

TG 473: In vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test

TG 474: In vivo Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test

TG 475: In vivo Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test

TG 487: In vitro Mammalian Cell Micronucleus Test

▶ 修正ガイドライン

・分解性及び蓄積性

TG 310: Ready Biodegradation – CO₂ in Sealed Vessels (Headspace test)

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。

▶ ガイダンスドキュメント:

No. 201 Copepod development and reproduction test

No. 202 Quantitative method for evaluation of antibacterial activity of porous and non-porous antibacterial treated materials

No. 203 Integrated Approach to Testing and Assessment for skin irritation and corrosion

No. 204 Single-laboratory validation of quantitative analytical methods

▶ 報告書:

No. 197 Peer-review report on the Comet assay

No. 205 Validation report on *Myriophyllum* test water phase

No. 206 Validation report on *Myriophyllum* test sediment-water

No. 208 Validation report on Bhas cell transformation assay

No. 207 Scoping document on in vitro and ex vivo assays for the identification of modulators of thyroid hormone signaling

GD 203 は初の IATA に関する GD であり、引き続き皮膚感作性に関する GD の作成が始まっている。

(3) ガイドラインに関する 2014-2015 年の活動

① 生態毒性関連(200 番台)

14 個に及ぶ TG および GD の開発・修正が並んでいるが、そのうち 4 個が endocrine disruptors に関するものとなっている。その中でも、特に TG on a Medaka Life Cycle (MLC)/Multi-generation Test (MMT) および TG on a Larval Amphibian Growth and Development Assay については、日本も EXTEND2010 で米国と共同で開発を行ってきたものである。

② 環境中運命に関するガイダンス(300 番台)

7 個の TG および GD の作成が行われるが、そのうち 5 個はナノ物質に関する TG および GD となっている。

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)

日本が中心となって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) EDTA Activity - New TG: Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha Binding Assays (hrERA, 2 protocols)

- 4) EDTA Activity - New TG: Stably Transfected Transcriptional Activation (STTA) Assay for the detection of androgenic and anti-androgenic activity of chemicals (日本)
 - 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; 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; addendum to validation report and draft TG expected to be available by the end of November 2014.
 - 5) EDTA Activity - New TG for a stably Transfected Transactivation (STTA) Assay for the detection of anti-estrogenic activity of chemicals (日本)
 - Collection of validation data expected in 2nd quarter 2012;
 - Validation completed in 2013 and report will be prepared in the course of 2014.
 - The assay has been added to TG 455 and the draft updated TG 455 sent for a 1st commenting round in July 2014;
 - The draft updated TG 455 is expected to be submitted to the WNT for approval in 2015.
 - 6) 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
 - 7) Validation of a Cell Transformation Assay Using Bhas 42 Cell Line for Detection of Non-Genotoxic and Genotoxic Carcinogens
 - International validation studies completed in 2010; discussion at an expert meeting held on 14-15 December 2011 at OECD;
 - Submission of peer review report in 2013; draft TG circulated for a WNT commenting round at the end of 2013;
 - Meeting of experts and regulators in January 2014 to address comments received;
 - WNT endorsed the validation and peer-review report in April 2014; the document has been published in July 2014 in the Series on Testing and Assessment, as No.208;
 - Pending decision of Joint Meeting in November 2014 on CTAs, the draft TG might be revised and a second commenting round may take place.
- 本プロジェクトは第 52 回 JM において、上記 2) の *in vitro* SHE CTA とともに議論され、ともに TG ではなく GD として作成されることとなった。
- 8) Updated *in vivo* germ cell genotoxicity TGs (TG 478 and 483)
 - 9) New TG to separate the Mouse Lymphoma Assay from the current TG 476
 - 10) Revision of the introduction to the OECD TGs on genetic toxicity testing and guidance on the selection and application of the assays
 - 11) Transcriptional Assay for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Compounds using the MELN Cells
 - 12) New TG: KeratinoSens: An *in vitro* Method for Identifying the Skin Sensitisation Potential of Chemicals
 - 13) New TG: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA): An *In Chemico* Method for Identifying the Skin Sensitisation Potential of Chemicals
 - 14) New TG: Short –Term Exposure Test (STE) for Identifying Ocular Irritants (日本)
 - Expert group met on 29-30 September 2011 and reviewed the SPSF;
 - Revised SPSF and validation report submitted to WNT 24; SPSF approved;
 - Comments on the validation report expected from the WNT by October 2012;
 - Peer review report and draft Test Guideline expected in 2013;
 - First draft TG circulated for a first commenting round in November 2013;
 - Second draft TG circulated in June 2014 to WNT; expert meeting schedule in Nov. 2014 at OECD to deal with remaining comments and revise the draft TG;
 - The draft TG is expected to be submitted for approval to the WNT in April 2015.
 - 15) Updated TG 421/TG 422 (Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test)/(Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test), Enhancement with ED-relevant endpoints
 - 16) New TG: Performance-Based Test Guideline on Androgen Receptor Transactivation Assays
 - 17) New TG on human Cell Line Activation Test (h-CLAT): an *in vitro* method for identifying the skin sensitisation potential of chemicals (日本および EU)
 - Validation study carried out, peer review completed in 2014 and EURL ECVAM Recommendation to follow;

- Draft TG sent for a first WNT commenting round and its expert group on in vitro skin sensitisation in August 2014;
 - Draft TG expected to be submitted to the WNT for approval in 2015.
- 18) Performance-Based Test Guideline for the establishment on human-derived hepatic system to investigate biotransformation and toxicity of compounds by evaluation of CYP450 induction competence
 - 19) Feasibility study for a Guidance Document on Study Designs, to be used in revisions to Guidelines
 - 20) Updated TG 488, Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays
 - 21) Revision or replacement of TG 402 on Acute Dermal Toxicity Test
 - 22) Revision of TG 431 and TG 439 to extend their applicability to coloured chemicals strongly interfering with the MTT reduction assay
 - 23) New TG on EpiOcular EIT for eye irritation testing
 - 24) Update of TG 455-TG 457 for inclusion of Transcriptional ERalpha CALUX assay for the detection of (anti)estrogenic chemicals
 - 25) New GD on Waiving of Bridging Mammalian Acute Toxicity Tests

26) Amendments to the Inhalation TGs and GD to accommodate nanomaterial safety testing

今期は、日本の各種ガイドラインにも大きく影響する TG の新規作成や改訂が行われている。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。

D. 参考資料

1. 第 52 回 OECD Joint Meeting 資料
<https://community.oecd.org/docs/DOC-72151> (登録されたもののみアクセス可能)
2. Overview of all projects on the workplan
<https://community.oecd.org/docs/DOC-57088> (登録されたもののみアクセス可能)

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 (2)

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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表