

201428018B

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 24～26 年度総合研究報告書

研究代表者 西川 秋佳

平成 27(2015)年 4 月

目 次

I. 総合研究報告

- 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. 総合分担研究報告

1. バリデーショング終了した試験法の国際的な第三者評価----- 17
小島 肇
OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS----- 37
IV VIVO MAMMALIAN ALKALINE COMET ASSAY
2. 内分泌かく乱化学物質試験法のバリデーショング ----- 62
小野 敦
3. 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- ----- 82
森田 健、林 真
4. 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 ----- 89
山影康次
5. 国際状況の調査 ----- 100
一鬼 勉

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 106

IV. 研究成果の刊行物・別刷り ----- 117

I. 総合研究報告

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 24 年度～26 年度総合研究報告書

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、プロトコールを開発し、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を開始した。TG の OECD を主とする国際状況についても調査した。日本発のガイドラインを国際的なものとするためには、OECD での活動状況を調査し、ガイドライン策定・改定に際し、日本の専門家も積極的に関わり、意見を反映させることが重要である。

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	長 森田 健	国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部室長
研究分担者 小島 肇	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長	食品薬品安全センター秦野研究所 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	日本化学工業会 化学品管理部長
本間正充	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部部長	研究協力者 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国内バリデーション実行委員会（林真委員長、宇野芳文、浅野哲秀、中嶋圓、森田健、本間正充、小島肇各委員）により実施された。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 Program）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（日本から筒井健機氏が協力）を経て、日本のバリデーション結果をもとに作成されたTG案をもとに、OECDにおいて議論がなされた。

皮膚感作性試験 h-CLAT が

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。本バリデーシヨンの終了を受け、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。並行して国内バリデーシヨン組織 (吉村功、大森崇、足利太可雄、坂口斉、小島肇各氏) が、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ヨンが平成 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ヨンが実施され、平成 22 年 11 月に終了した。バリデーシヨン報告書に加え、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 (日本から、山影康次氏が協力) を経て、OECD による TG 案の協議が進められた。

ER STTA 法

ER STTA 法は、ヒト由来の細胞 (HeLa 細胞) に、ヒトエストロゲン受容体 ER α 遺伝子およびエストロゲン応答配列と繋いだルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして組み込んだ安定形質株 (HeLa-9903) を用いたレポーター遺伝子アッセイ法である。本法は、厚生労働省および経済産業省における研究により開発された。本法によるアゴニスト活性評価法については、国内における多施設バリデーシヨン結果を基に、2009 年に OECD ガイドライン化 (OECD TG455) されており、本研究では、TG455 ガイドライン化にあたり OECD より要求されたアンタゴニスト活性評価法のガイドライン化に向けたバリデーシヨン試験を実施し

た。国立医薬品食品衛生研究所 JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) が中心となり JaCVAM、UK-PHE (UK-PHE の SMT メンバーは、開始当初は ECVAM に所属) 及び米国 EPA の専門家、及び生物統計専門家として寒水孝司博士 (京都大学) を含むメンバーからなる Study Management Team (SMT) を組織し、3 タスクからなるバリデーシヨン試験デザインに従ってバリデーシヨン測定を行った。得られた結果の詳細解析を行い、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後、バリデーシヨ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 法は、アンドロゲン受容体を介した遺伝子転写活性化試験法である。AR STTA 法に用いる AR-EcoScreen 細胞は、CHO-K1 細胞にヒトアンドロゲン受容体と蛍ルシフェラーゼ遺伝子上流にアンドロゲンレスポンスエレメントを持つレポータープラスミドおよび細胞毒性評価の指標となるウミシイタケルシフェラーゼを安定発現する細胞株であり、細胞毒性評価を単一のプレート上で実施出来る上、通常の細胞毒性検出法では評価が難しい被験物質によるルシフェラーゼ発光への影響をすることが可能であるという利点を有する。本試験系については、本研究開始以前に実施された国内 3 施設によるバリデーシヨン試験結果を基にしたバリデーシヨンレポート及び OECD ガイドライン案について OECD ピアレビューが実施され、試験化合物数が少ないため、ガイドライン化にあたっては追加バリデーシヨン試験の実施が要求された。そこで、本研究では、OECD VMG-NA メンバーの協力により追加測定化合物

の選定を行い、VMG-NA メンバーより構成される SMT を組織し、バリデーション試験計画を策定し、国内 3 施設、海外（韓国）1 施設の参加によるバリデーション測定を実施し、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 ガイドライン案を作成し、OECD へ提出した。

In vitro コメットアッセイ

コメット法は初期 DNA 損傷を個々の細胞レベルで検出できる遺伝毒性試験として広く利用されているが、*in vitro* コメット試験には標準的なプロトコールが存在せず、また OECD においてもガイドライン化の議論も行われていない。*In vitro* コメット試験の標準的プロトコールの確立と、小核試験との組み合わせ試験の可能性を追求するためヒトリンパ芽球細胞株 TK6 を用いて、5 つの遺伝毒性物質と、1 つの非遺伝毒性物質に対してコメット試験と小核試験の同時試験を実施し、細胞毒性、コメット試験による DNA 損傷性、小核試験による染色体異常誘発性を比較検討した。

ナノ物質の *in vitro* 小核試験

工業ナノ材料の遺伝毒性に関するワークショップは 2013 年 11 月 19 日にカナダのオタワで開催された。その後、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。これら会議に参画し、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。

OECD 遺伝毒性試験の改定

改定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。

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 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。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 48 回会合(2012 年 2 月)から第 52 回会合(2014 年 11 月)の 5 回にわたる各会合の SCHEDULE OF ACTIVITIES FOR 2012/2013、2013/2014 および 2014/2015 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。OECD の試験法開発は、単に人健康に関わるものだけでなく、生態毒性など環境影響に関する試験法も含まれるが、本研究では、人健康に重きを置いて調査した。

(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。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

平成 24 年 8 月末までに、バリデーション実行委員会を中心にまとめたバリデーション報告書を OECD に提出した。バリデーション実行委員会は、明らかな偽陽性結果がなく、標準化されたプロトコールおよびデータ採用基準を用い、% tail DNA 値を測定することにより有益な結果を得ることができると結論した。平成 24 年 9 月に OECD にて開催されたコメントアッセイ専門家会議にて、このバリデーション報告書を中心に議論がなされ、種々の点で修正の指摘を受けた。これを受け、修正版を平成 25 年 1 月に OECD に提出した。日本のバリデーション結果をもとに作成された評価報告書が平成 26 年 1 月に公開された。OECD の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 案を用いて、議論がなされたが、第三者評価パネルからの提案を受け、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 WNT において TG489 として承認された。

形質転換試験 (Bhas 法)

田中らにより、バリデーション報告書が平成 24 年 7 月にまとめられ、EURL ECVAM に提出された。9~11 月に掛け、第三者評価が ESAC において実施された。日本のバリデーション結果をもとに作

成された評価報告書および EURL ECVAM の推薦書が平成 25 年 11 月に発行された。概要は以下のとおりである。2011 年に食品薬品安全センター 秦野研究所 (FDSC) は *in vitro* 発がん性試験である Bhas 形質転換試験 (Bhas 法) のバリデーション研究を終了した。Bhas 法のバリデーションは、2 つの類似の試験法プロトコル (6 ウェル法および 96 ウェル法) で実施された。バリデーションは NEDO の資金および、JaCVAM の支援により実施された。JaCVAM の要請により、EURL ECVAM が ESAC による review を 2012 年 12 月に終了した。日本で作成された TG 案は平成 25 年 9 月に OECD に提出された。OECD による第一次意見募集に対応して、TG 案を平成 26 年 1 月に改定した。形質転換試験に関する OECD 専門家による対面会議が平成 26 年 1 月に OECD 本部で開催され、改訂 TG 案に関する議論がなされた。本専門家会議では、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。平成 27 年度に Bhas 法を GD として成立させるため、GD 案を平成 27 年 2 月に OECD に提出した。

皮膚感作性試験 (h-CLAT)

EURL ECVAM より送付されてきたバリデーションデータを確認し、日本の統計学者が再検証し、報告書をまとめた。データ不備の指摘や、試験回数 の提言など有益な指摘がなされている。この報告書を受け、EURL ECVAM によりバリデーション報告書が作成された。次に、EURL ECVAM による第三者評価報告書が作成された。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いたこともあり、日欧の統計家で検討された。施設間再現性を統計解析により解決する手段を検討し、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)

眼刺激性を検出する *in vitro* 試験であり、被験物質の 5 分間曝露を通してウサギ角層細胞株 (SIRC 細胞) の細胞毒性試験を評価する。2011 年 3 月、背景評価報告書 (BRD) が米国毒性プログラム (NTP) 動物実験代替法評価センター (NICEATM) に提出された。NICEATM の評価は、眼刺激性の有害性を区分する Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS; UN 2011) および U.S. Environmental Protection Agency (EPA 2012) classification systems を基本としてトップダウンアプローチおよびボトムアップアプローチでなされた。トップダウンアプローチでは、STE 法はすべての有害性分類の中で、強い眼刺激性/腐食性を分類できた。すべての有害性分類の中から眼刺激性でない物質を分類するボトムアップアプローチで陽性の物質は、適切な有害性分類のためには追加試験が必要となる。ボトムアップアプローチでは GHS 分類なしおよび EPA 分類 IV における誤った眼有害性同定を避けるため、低い偽陰性率が求められる。日本で作成された TG 案は平成 25 年 5 月に OECD に提出された。OECD による第一次意見募集が 7 月に、第二次意見募集が 12 月に実施された。第三次意見募集が 8 月に実施され、それを受けた対面会議が 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、12 月に最後の意見募集に入った。この意見への対応を経て、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

バリデーション試験には、最終的に計 6 施設が

参加したが、海外から参加した 2 施設 (VITO (ベルギー)、KFDA (韓国)) は、各施設の理由によりタスク 2 終了前にバリデーション研究より離脱した。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 (パフォーマンスベ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 NiFDS) 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た。バリデーション試験では、フェーズ 1 で、リファレンス化合物の測定を行い、フェーズ 2 で、コード化被験物質の測定を行う計画とした。また、アゴニスト試験のリファレンス化合物として設定されていた R-1881 が入手不可であったことから Mestanolone を代替として選択し、国内 3 施設のフェーズ 1 測定結果をもとに Mestanolone のリファレンスクライテリアを設定し、NiFDS のフェーズ 1 試験結果で適用性の確認を行い、フェーズ 2 試験のクライテリアとして用いることとした。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。

In vitro コメットアッセイ

細胞毒性の指標として、相対細胞数 (RCC)、相対細胞倍加 (RPD)、相対細胞増加数 (RICC) と、トリパンブルー色素の排出 (TBDE) を指標とした相対生存率 (RV) を計算した。遺伝毒性物質に対する処理直後の RV は全く変化せず、TBDE 法は全く利用できないことがわかった。コメット試験と、小核試験の定性的結果 (陽性または陰性) はマイトマイシン C 以外に全て一致した。マイトマイシン C はクロスリンカーであり、コメット陰性が予想された。コメット試験が遺伝毒性物質で陽性を得るためには、小核試験の 2~4 倍の濃度を必要とした。また、コメット陽性を示す細胞濃度はすべて 50%RICC 以下の強い細胞毒性を引き起こす濃度であり、このような濃度での試験は OECD の小核試験ガイドラインでは許容されない。以上のことから、*in vitro* 小核試験とコメット試験の比較を行ったが、少なくとも TK6 細胞を用いる限り、コメット試験の優位性、有用性は得られなかった。

ナノ物質の in vitro 小核試験

工業ナノ材料の遺伝毒性に関するワークショップと、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、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、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とが合意された。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表明した。

OECD 遺伝毒性試験ガイドラインの改定

専門家会議には、カナダ、デンマーク、欧州委員会、イタリア、日本、オランダ、ノルウェー、スウェーデン、英国、米国、経済産業諮問委員会 (BIAC) および国際動物保護委員会 (ICAPO) からの代表者が出席した。統計値と生物学的重要性の両方に基づいてデータを解釈することが重視され、陰性の背景データの充実と、計測細胞数の変更を中心に改定案が議論された。これまで、4 つの既存試験ガイドライン (TG473: *in vitro* 染色体、TG474: *in vivo* 赤血球小核、TG475: *in vivo* 骨髄染色体、TG487: *in vitro* 小核) の改定作業が終了し、新たに TG489: *in vivo* コメットがガイドライン化された。これらガイドラインは、2014 年 4 月に WNT での承認を受け、9 月に改定ガイドラインとして、正式に発行された。

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, 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。

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: 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。

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* 試験法および Adverse Outcome Pathway に基づく IATA の開発である。この中には毒性発現に至る過程の中での Key Events を検出する試験法で、例えば *in chemico* 試験法も含まれる。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として国連環境計画 (UNEP) や OECD で取り上げられている。

D. 考察

日本で開発された試験法のうち、*in vivo* コメントアッセイの 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。

In vitro コメット試験は DNA クロスリンク剤以外の遺伝毒性物質を検出することができる。しかしながら、その陽性反応は極めて高い細胞毒性状態でのみ観察される。従って、コメット試験と、小核試験の組合せをデザインすることは困難と考えられる。細胞毒性の評価法、最高用量決定法、様々なタイプの遺伝毒性物質の評価を含む多くの研究が、コメット試験の標準化に必要と考える。*In vitro* コメット試験を標準化するためには使用細胞を再検討し、更なる調査、研究が必要と考える。

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、試験プロトコールを確立させる。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る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 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。

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とともに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。

最近で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。

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。

In vitro コメット試験の標準化と OECD ガイドライン化を見据えて、国際共同研究を行ったが、十分な成果は得られなかった。また、*in vitro* 小核試験との比較

でも、コメット試験の優位性、有用性は得られなかった。*In vitro* コメット試験を標準化するためには更なる調査、研究が必要である。

遺伝毒性の OECD テストガイドライン(TG)のレビューに関する専門家グループ会議に出席し、ナノ材料の遺伝毒性評価に関するガイダンス、および現行の遺伝毒性試験テストガイドラインの改訂作業に参画した。*In vitro* 小核試験によるのナノ物質の評価には、共同研究の実施と、そのための予備検討が提案された。

遺伝毒性試験法の改定に関しては、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。化審法において重要な 4 つの改定ガイドラインは 2014 年 4 月に WNT での承認を受け、9 月に改定ガイドラインとして、正式に発行された。

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ールが確立できた。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。

日本発のガイドラインを国際的なものとするためには、化学物質の安全性評価手法の開発において重要な位置を占める OECD での活動状況を調査し、ガイドライン作成・改定に際し、日本の研究者ならび行政も積極的に関わり、意見を反映させ

ることが重要である。

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. Horimoto et 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 κ . *DNA Repair* 15, 21-28, 2014.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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
- 24) 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
- 25) 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
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) 柘植英哉、森充生、大庭澄明、大内正、寺田 三郎、五島隆志、田邊豊重、山影康次、田中 憲穂、渡辺美香、畔上二郎、大向英夫、小島 肇：平成 21 年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告、輸液用ゴム栓試験法の見直し（第 4 報）－細胞毒性試験法の検討－、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス、

- 43、473-482、2012.
- 30) Toyozumi T, Ohta R, Kawakami K, Nakagawa Y, Tazura Y, Kuwagata M, Noguchi S, Sui H, Yamakage K.: Usefulness of combined in vivo skin comet assay and *in vivo* skin micronucleus test. *Mutat Res.*, 743, 42-52, 2012.
- 31) Nakajima, M., Ueda, M., Yamakage, K., Nakagawa, Y., Nakagawa, M., Ohyama, W., Omori, T., Asano, N., Hayashi, M. and Uno, Y.: Tissue Sample Preparation for *In Vivo* Rodent Alkaline Comet Assay. *Genes & Environment*, 34, 50-54, 2012.
- 32) Yu DY, Zhao QL, Furuta M, Todoriki S, Izumi K, Yamakage K, Matsumoto K, Nomura T, Kondo T.: Molecular mechanisms of apoptosis induction by 2-dodecylcyclobutanone, a radiolytic product of palmitic acid, in human lymphoma U937 cells. *Apoptosis*, 17(6):636-45(2012)
- 33) Honma M, Takahashi T, Asada S, Nakagawa Y, Ikeda A, Yamakage K.: *In vitro* clastogenicity and phototoxicity of fullerene (C60) nanomaterials in mammalian cells, *Mutation Res.*,749, 97-100 (2012)
- 34) 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)
- 35) 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)
- 36) M. Ema, K. Endoh, R. Fukushima, S. Fujii, H. Hara, M. Hirata-Koizumi, A. Hirose, H. Hojo, M. Horimoto et al. ; Historical control data on developmental toxicity studies in rodents.; *Congenit Anom*,54,150-161 (2014)
- 37) 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)
- 38) M. Matsumoto, M. Yamaguchi, Y. Yoshida, M. Senuma, H. Takashima, T. Kawamura, H. Kato, M. Takahashi, M. Hirata-Koizumi, A. Ono, K. Yokoyama and A. Hirose An antioxidant, N,N'-diphenyl-p-phenylenediamine (DPPD), affects labor and delivery in rats: a 28-day repeated dose test and reproduction/developmental toxicity test. *Food Chem Toxicol* 56, 290-296(2013).
- 39) M. Takahashi, K. Yabe, H. Kato, T. Kawamura, M. Matsumoto, M. Hirata-Koizumi, A. Ono and A. Hirose (2013) Reproductive and developmental toxicity screening test of 3-cyanopyridine in rats. *Reprod Toxicol* 35, 7-16.
- 40) Ikeda A, Yamakage K.: *In vitro* clastogenicity and phototoxicity of fullerene (C60) nanomaterials in mammalian cells, *Mutation Res.*,749, 97-100 (2012)

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. 総合分担研究報告