

表 4 AR EcoScreen バリデーション評価で用いた化学物質とその予想活性

アゴニストアッセイ用被験物質

No.	Chemical Name	CAS No.	Reference Result
1	Testosterone	58-22-0	+
2	17 β -estradiol	50-28-2	+
3	Medroxyprogesterone acetate (MPA)	71-58-9	+
4	Benzyl butyl phthalate (BBP)	85-68-7	-
5	17 α -ethinyl estradiol	57-63-6	-

アンタゴニストアッセイ用被験物質

No.	Chemical Name	CAS No.	Reference Result
1	Flutamide	13311-84-7	+
2	Prochloraz	67747-09-5	+
3	Vinclozolin	50471-44-8	+
4	Propylthiouracil (PTU)	51-52-5	-
5	Atrazine	1912-24-9	-

表 5 AR STTA バリデーション試験参加施設におけるエッジ効果の検討結果

	CERI	Sumitomo	Hokkaido	NIFDS		
				trial 1	trial 2	trial 3
AVG	3117.8	204832.8	4637.6	302467.5	287767.0	297763.7
SD	101.2	14081.0	195.0	18273.7	23220.0	20411.3
CV(%)	3.2	6.9	4.2	6.0	8.1	6.9

No edge effects in any labs (<10%)

表 6 AR STTA バリデーション試験におけるアゴニストアッセイのリファレンスプレート試験成績

		FI	PC10	DHT (PC10)	DHT (PC50)	Mestanolone (PC10)	Mestanolone (PC50)		
Criteria		>=6.4	>1	-9.87 ~ -12.08	-9.00 ~ -11.03				
TRIAL									
Phase 1	CERI	1	8.38	1.12	-10.76	-9.81	-10.65	-9.62	
		2	8.64	1.08	-10.66	-9.70	-10.56	-9.59	
		3	8.68	1.14	-10.71	-9.75	-10.64	-9.65	
	Sumitomo	1	7.67	1.10	-10.64	-9.59	-10.47	-9.43	
		2	7.35	1.08	-10.77	-9.82	-10.66	-9.60	
		3	8.14	1.12	-10.69	-9.67	-10.57	-9.53	
	Hokkaido	1	7.71	1.07	-10.83	-10.10	-10.79	-9.87	
		2	7.84	1.08	-10.83	-10.08	-10.81	-10.00	
		3	7.40	1.08	-10.83	-10.11	-10.84	-10.08	
	For 3 labs. MEAN				-10.75	-9.85	-10.67	-9.71	
	SD				0.07	0.20	0.13	0.22	
	MEAN+2SD				-10.60	-9.45	-10.41	-9.26	Criteria for Mestanolone
MEAN-2SD				-10.89	-10.25	-10.92	-10.15		
NIFDS		1	7.44	1.07	-10.82	-9.75	-10.69	-9.56	
		2	6.91	1.05	-10.79	-9.80	-10.70	-9.60	
		3	6.94	1.04	-10.64	-9.50	-10.49	-9.35	
For 4 labs. MEAN				-10.75	-9.81	-10.66	-9.66		
SD				0.07	0.20	0.12	0.22		
MEAN+2SD				-10.60	-9.41	-10.42	-9.22		
MEAN-2SD				-10.90	-10.20	-10.90	-10.09		
Phase 2	CERI	1	8.19	1.05	-10.69	-9.70	-10.69	-9.65	
		2	8.18	1.13	-10.78	-9.84	-10.72	-9.72	
		3	8.14	1.04	-10.71	-9.71	-10.71	-9.66	
	Sumitomo	1	7.47	1.06	-10.74	-9.75	-10.62	-9.56	
		2	7.27	1.08	-10.73	-9.76	-10.59	-9.55	
		3	7.56	1.07	-10.76	-9.77	-10.66	-9.59	
	Hokkaido	1	7.41	1.11	-10.82	-10.04	-10.85	-10.02	
		2	7.49	1.09	-10.78	-9.87	-10.74	-9.77	
		3	7.35	1.09	-10.82	-9.97	-10.82	-9.99	
	NIFDS	1	7.42	1.04	-10.54	-9.56	-10.47	-9.49	
		2	7.51	1.06	-10.70	-9.71	-10.61	-9.57	
		3	7.02	1.09	-11.24	-9.78	-10.85	-10.27	
For 4 labs. MEAN				-10.78	-9.79	-10.69	-9.74		
SD				0.16	0.13	0.11	0.24		
MEAN+2SD				-10.45	-9.53	-10.47	-9.26		
MEAN-2SD				-11.10	-10.04	-10.92	-10.22		

表7 AR STTA バリデーション試験におけるアンタゴニストアッセイのリファレンスプレート試験成績

TRIAL	FI	RTA 0.1uM HF	HF (IC30)	HF (IC50)	BPA (IC30)	BPA (IC50)		
Criteria	>=5.0	<= 46	-6.41 ~ -8.37	-6.17 ~ -7.80	-4.48 ~ -7.52	-4.29 ~ -7.05		
Phase 1	CERI	1	7.07	3.91	-7.36	-6.92	-5.76	-5.47
		2	7.29	2.81	-7.44	-6.99	-5.88	-5.56
		3	7.43	3.99	-7.41	-6.97	-5.78	-5.49
	Sumitomo	1	5.44	4.02	-7.55	-7.10	-5.92	-5.58
		2	5.54	6.97	-7.28	-6.82	-5.74	-5.40
		3	6.00	2.09	-7.63	-7.19	-5.88	-5.56
	Hokkaido	1	6.91	7.19	-6.93	-6.62	-5.53	-5.21
		2	6.56	4.39	-7.10	-6.72	-5.71	-5.42
		3	7.19	4.85	-7.17	-6.76	-5.61	-5.31
	NiFDS	1	5.49	6.32	-7.59	-7.14	-6.00	-5.58
		2	4.95	5.46	-7.78	-7.49	-6.13	-5.76
		3	5.05	7.24	-7.83	-7.40	-6.29	-5.74
		MEAN			-7.42	-7.01	-5.85	-5.51
		SD			0.27	0.27	0.21	0.16
		MEAN+2SD			-6.88	-6.48	-5.42	-5.18
	MEAN-2SD			-7.97	-7.54	-6.28	-5.83	
Phase 2	CERI	1	6.46	3.25	-7.60	-7.18	-5.85	-5.55
		2	6.18	2.87	-7.37	-6.92	-5.92	-5.59
		3	6.28	2.84	-7.40	-6.98	-5.89	-5.58
	Sumitomo	1	5.73	3.47	-7.65	-7.21	-5.85	-5.53
		2	5.94	4.33	-7.37	-6.88	-5.81	-5.48
		3	5.37	3.11	-7.62	-7.23	-5.97	-5.63
	Hokkaido	1	6.40	2.24	-7.19	-6.78	-5.55	-5.28
		2	7.66	4.46	-7.31	-6.84	-5.65	-5.38
		3	7.33	5.26	-7.11	-6.73	-5.57	-5.29
	NiFDS	1	5.69	1.26	-7.81	-7.40	-6.20	-5.75
		2	5.43	1.73	-7.77	-7.36	-5.97	-5.64
		3	5.44	2.30	-7.71	-7.32	-5.92	-5.60
	CERI add	4	5.46	-0.12	-7.48	-7.06	-5.82	-5.52
		MEAN			-7.49	-7.07	-5.84	-5.52
		SD			0.22	0.23	0.18	0.14
	MEAN+2SD			-7.05	-6.61	-5.49	-5.25	
	MEAN-2SD			-7.93	-7.53	-6.20	-5.80	

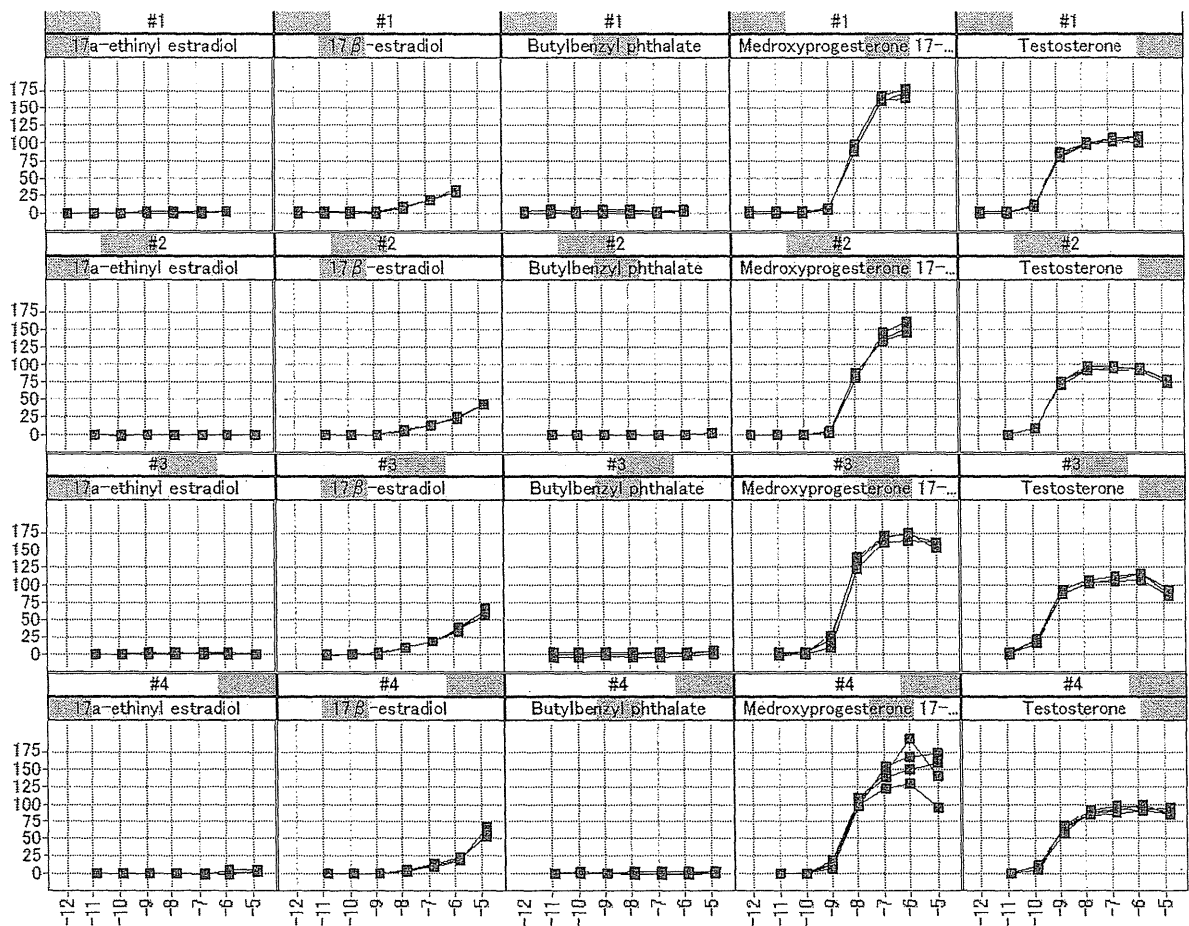


図 6 AR STTA バリデーションフェーズ 2 におけるアゴニスタッセイによるコード化合物測定結果の施設間比較

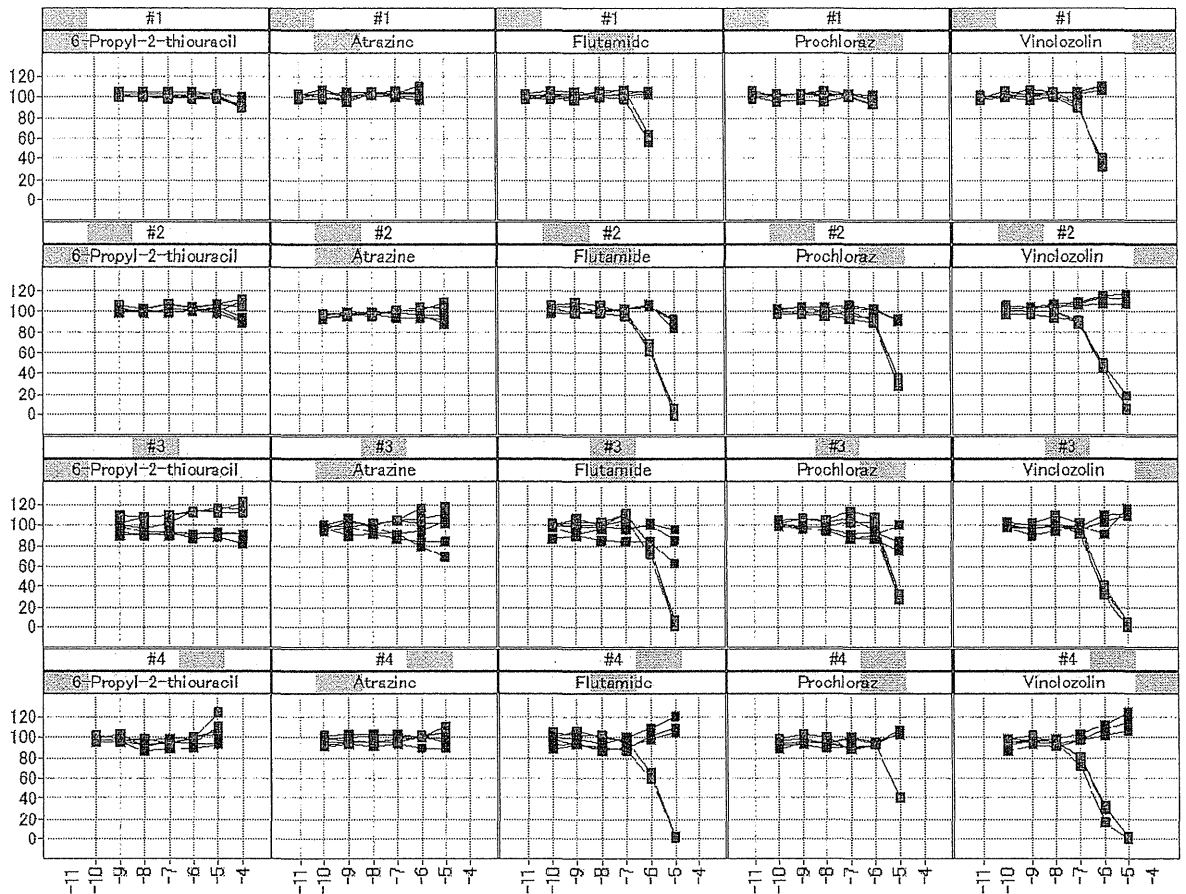


図 7 AR STTA バリデーションフェーズ 2 におけるアンタゴニストアッセイによるコード化合物測定結果の施設間比較

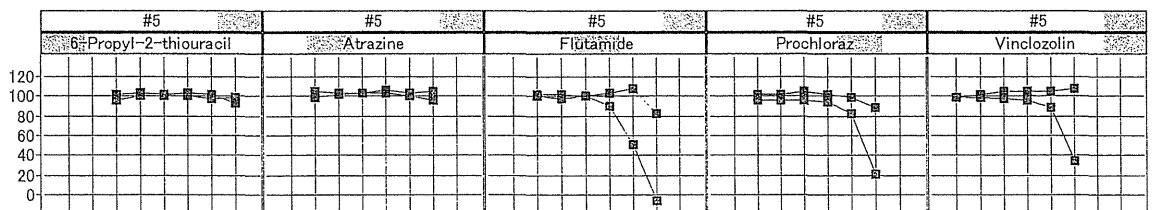


図 8 図 7 の施設#1 における、高濃度での追加測定結果

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・胃腸管小核試験の当該標的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み込み可能性を評価した結果、良好な施設間再現性ならびに発がん物質検出性、加えて 28 日間毒性試験への組み込み可能性が示され、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

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。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り、反復投与一般毒性試験に組み込みへの可能性も検討する。

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。また、そのうちの 6 つの発がん物質については、胃腸管における小核誘発性も評価した。本検討に先立ち、代表的モデル化合物を用いた施設間再現性の検討を単純線形回帰モデルにより実施した。

B. 研究方法

肝臓および胃腸管を用いる反復投与小核試験の実施は、日本環境変異原学会哺乳動物試験研究会（MMS 研究会）に委託した。

C. 研究結果

肝臓における小核誘発性の評価では、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髄/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。一方、肝臓を標的臓器としない遺伝毒性発がん物質 6 物質中 4 物質が陰性となり、反復投与肝小核試験の肝発がん物質に対する感度ならびに臓器特異性の高さが示された。また、施設間再現性も良好であった ($R^2=0.78$)。なお、病理組織学的知見と肝重量ならびに肝小核誘発性の間に明瞭な関連性を見出すことはできなかった。胃腸管における小核性の評価では、腺胃を用いた小核試験において、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が、結腸を用いた小核試験においては、検討した 6 物質のいずれも陰性であった。陰性対照 (28 日間投与) における小核細胞の平均出現頻度は、肝臓では $0.06 \pm 0.06\%$ 、腺胃では $0.08 \pm 0.06\%$ 、結腸では $0.18 \pm 0.13\%$ であり、骨髄での頻度 (約 0.2%) と比べ、肝臓および腺胃では低かった。

D. 考察

肝臓および胃腸管小核試験ともに、対象標的臓器発がん物質に対する高い感受性および特異性が示され、本試験法の有用性ならびに基本プロコールの妥当性が示された。一方、非発がん物質や異数性誘発物質についての検証数は少なく、引き続き検討が必要である。また、ホルマリン固定細胞からの小核観察可能性、至適観察細胞数、陽性対照の設定方法、対象臓器における細胞毒性評価の必要性等に関する検討が必要である。さらに、本試験法の国際的認知度のより一層の向上が望まれる。

E. 結論

肝臓および胃腸管を用いる多臓器小核試

験の有用性が示され、基本プロトコールが構築できた。より頑健な試験法として確立するには、更なる検討が必要である。

F. 研究発表

<森田 健>

1. 論文発表

- 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) 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

- 5) 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.
- 6) 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, 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, Kawasaki 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.
- 2) 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.
- 3) Morita T.: Recent collaborative studies by JEMS.MMS – A repeated-dose micronucleus assay, 2012, 3rd ACEM (Asian Conference on Environmental Mutagens).
- 4) 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, Kawasaki 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).
- 5) 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
 - 6) 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
 - 7) 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, Kawasako 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.
 - 8) 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, Kawasako 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.
 - 9) Takeshi Morita: Micronucleus test other than bone marrow/peripheral blood and liver, 2013, 6th International Workshop on Genotoxicity Testing.
 - 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, Kawasako 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) 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.

12) 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.

<林 真>

1. 論文発表

- 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) 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.

- 4) 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) (in press)

2. 学会発表

- 1) 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., Kawasaki, 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.
- 2) 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.
- 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., Kawasaki, 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.
- 4) Uno, F., Tanaka, J., Takai, M., Masumori, S., Takami, S., Wako, Y., Kawasaki, 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.
- 5) 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
- 6) 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.
- 7) 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.

- 8) 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.

G. 知的所有権の取得状況

なし。

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

In vitro 発がん性試験である Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験では、形質転換した細胞からなるコロニー (形質転換巣) を形態学的に半陽性とするが、我々は 96 ウェルで培養・処理した Bhas42 細胞を過酸化水素処理することにより正常細胞を死滅させ、過酸化水素耐性を示す形質転換細胞を生細胞率として吸光度で測定する方法を開発した。形質転換細胞のあるウェルを陽性と判定する吸光度の値 (カットオフ値) を 0.06~0.13 として、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 Bhas42 細胞を用いる形質転換試験では、播種した細胞が単層状態で増殖し、コンフルエントになると増殖が停止 (接触阻止) するが、形質転換した細胞はこの接触阻止作用から逸脱し、コロニー (形質転換巣) を形成する。形質転換したコロニーの判定は肉眼観察により形態学的に行われることから、観察者の主観に左右される可能性がある。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。

過酸化水素処理後の吸光度の測定結果の評価方法を検討し、最適な評価方法の結果を従来法の観察法や遺伝毒性試験および発がん性試験の結果と比較し、我々が開発した吸光度測定による客観的評価法の妥当性を検証した。

B. 研究方法

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、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後、ギムザ染色し、肉眼観察により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⁾に従い、100 個以上の細胞からなる形質転換巣で、紡錘形をなして周囲の細胞とは異なる細胞形態 (spindle-shaped)、細胞質が塩基性 (濃い紫色) に濃染 (basophilic)、ランダムな配列で互いに交差 (criss-cross)、積み重なりあった細胞の増殖 (piling-up)、増殖を停止し単層の細胞層に浸潤 (invasive growth) の条件を有する形質転換巣を陽性形質転換巣として計数した。陰性 (溶媒) 対照群と化合物処理群の形質転換巣を有する陽性ウェルの数について、多重性を考慮した χ^2 検定を行い、連続した 2 濃度で有意となった場合を陽性、1 濃度のみ有意となった場合を疑陽性と判定した。また、バリデーショントラックと同様に、陰性 (溶媒) 対照群の陽性ウェルの数が、イニシエーション試験では 15 ウェル以下、プロモーション試験では 20 ウェル以下を試験成立条件とした。

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。すなわち、96ウェルの吸光度の平均値を求め、陰性(溶媒)対照群と化合物処理群の平均値についてダネットの検定を行う方法と、陽性と判定するための吸光度の値(カットオフ値)を設定し、陽性ウェルの数について、多重性を考慮した χ^2 検定を行う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。

C. 研究結果

接触阻止作用によって正常細胞は単層を維持しているが、形質転換した細胞はその作用から逸脱し多層となる(図2)。この状態の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顕微鏡観察によっても明らかである(図2)。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。培養終了後に過酸化水素処理し、24時間培養終了後WST-8を添加し吸光度を測定したプレートと吸光度測定後のプレートをメタノール固定・ギムザ染色したプレートを比較すると各ウェルの色の濃さが良く一致している(図3)。そこで、MNNG処理したプレートについて観察法と各ウェルの吸光度の分布を比較すると、形質転換巣の増加に伴い、高い吸光度を示すウェル数が増加することが分かる(図4)。

しかしながら、形質転換巣が存在するウェルが必ずしも高い吸光度を示さないことから、陰性対照プレート(52プレート)について、陰性ウェルと陽性ウェルの吸光度の分布を調べた。その結果、陰性ウェルおよび陽性ウェルの平均吸光度はそれぞれ0.011および0.36であり、明らかに異なる値を示したが、両者の吸光度範囲が重なり、吸光度の値によって形質転換巣の有無を明確に区別することは困難であった(図5)。そこで、プレートあたりの陽性ウェルの数と陽性ウェルの吸光度の値を検討し、陰性ウェルの0.21%(10ウェル/4668ウェル)が陽性ウェルとなる0.12をカットオフ値とし、観察法により判定した結果を96ウェルの吸光度の平均値と0.12以上の吸光度を示した陽性ウェル数の結果と比較した。その代表例として、発がん物質である2-acetylaminofluoreneと非発がん物質である1-naphthylamineの結果をそれぞれ図6および図7に示したが、吸光度の平均値およびカットオフ値の判定結果は必ずしも観察法と一致しなかった。

さらに化合物数を増やし、8つの発がん物質と4つの非発がん物質の計12物質について3つの判定法の比較を行った(表1)。その結果、従来の観察法と比較した場合、平均値法ではイニシエーション試験で3物質、プロモーション試験で2物質の計5物質が不一致の結

果となり、カットオフ値法では、イニシエーション試験で1物質、プロモーション試験で2物質の計3物質が不一致の結果となった。

吸光度の平均値を用いる方法に比べ、カットオフ値を用いる方が観察法との一致率が高かったが、設定したカットオフ値0.12の妥当性を検証するために、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8)。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2)。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3)。代表例として、発がん物質である2-acetylaminofluoreneと非発がん物質であるcaffeineの結果をそれぞれ図9および図10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。

吸光度法で陽性と判定されるウェルと観察法で陽性と判定されるウェルが異なることから、形態学的に形質転換細胞と判定できないが、過酸化水素に耐性を示す細胞をクローニングし、その足場依存性を軟寒天コロニー形成試験で検討した。その結果、過酸化水素に耐性を示した細胞は軟寒天中でコロニーを形成することから、過酸化水素耐性細胞には前がん状態の細胞が含まれることが示唆された (表4)。

D. 考察

In vitro 発がん性試験である形質転換試験に用いる BALB3T3 細胞または Bhas 42 細胞は、正常な状態ではコンフルエントになると接触阻害作用により単層の状態では細胞の増殖が停止するが、がん化した場合は、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かなりの時間が必要となる。

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

この方法の有効性を確認するために、同一プレートについて、従来の観察法、吸光度測定による平均値法、陽性ウェルを判定する吸光度のカットオフ値法の結果を比較した。その結果、同一プレートの結果にもかかわらず3つの方法はいずれも完全には一致しなかったが、カットオフ値を設定することにより発がん性試験結果との一致率が観察法より高くなることが示唆された。そこで、吸光度のカットオフ値を細かく設定して適切な値を検討したが、観察法の陽性ウェルとカットオフ値による陽性ウェルが完全に一致する値は得られなかったことから、結果が安定する0.09~0.13のカットオフ値の結果を比較することによりこの方法の有効性を検証した。その結果、発がん物質の検出率は観察

法および吸光度法ともに82%以上と高い値を示したが、観察法と吸光度法を比較すると、エームス試験陰性の発がん物質はすべてプロモーションアッセイで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。

肉感観察の場合、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。

E. 結論

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
 - 1) 書籍
なし

2) 雑誌

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.

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.

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.

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.

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)

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)

2. 学会発表

Kohji Yamakage, Dai Muramatsu, Shoko Arai, Nobuko Endo, Kiyoshi Sasaki; Evaluation method in Bhas 42 cell transformation assay selecting transformed foci using hydrogen peroxide, H₂O₂, 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC9), ALTEX proceedings, 3, 2, 2014, (Prague, Czech Republic).

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, p20, 2014, (Prague, Czech Republic).

Wakuri, S., Saito, R., Sasaki, K., Gondo, M., Endo, N., Sui H. and Yamakage, K.: Comparison of mouse primary hepatocyte spheroids formation on Cell-able™ plates with various feeder cells, 9th World Congress in Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC9), ALTEX proceedings, 3, p107, 2014, (Prague, Czech Republic).

山影康次、鈴木紀之、斎藤幸一、渡辺美香、池田直弘、柳和則、大森 崇、小島 肇、田中憲穂：産業利用促進を目指した新規 in vitro 発生毒性試験の応用研究-Hand1-Luc Embryonic Stem Cell Test (Hand1-Luc EST) の開発と検証試験の進捗状況-、2014 年、日本動物実験代替法学会第 27 回大会(横浜)

木村 裕、渡辺美香、鈴木紀之、岩城知子、山影康次、斎藤幸一、中島芳浩、藤村千鶴、近江谷克裕、酒井綾子、丸谷あおい、大森 崇、山崎晶次郎、小島 肇、田中憲穂、相場節也：IL-8 Luc assay の施設間差試験およびデータセットの作製研究、2014 年、日本動物実験代替法学会第 27 回大会(横浜)

丸谷あおい、相場節也、木村 裕、渡辺美香、鈴木紀之、山影康次、斎藤幸一、中島芳浩、近江谷克裕、山崎晶次郎、小島 肇、田中憲穂、坂口 斉、板垣 宏、小林 眞弓、森 梓、大森 崇 1: IL-8 Luc assay におけるばらつきを考慮した 3 つの判定基準の検討、2014 年、日本動物実験代替法学会第 27 回大会(横浜)

堤 祐介、蘆田菜希、陳 鵬、土居 壽、埴 隆夫、渡辺美香、山影康次：金属アレルギーパッチテスト試薬開発に向けた Ti イオン溶液の作製と皮膚感作性の評価、2014 年、日本金属学会秋期(第 155 回)講演大会(名古屋)

堤 祐介、岡本寛之、渡辺美香、山影康次、蘆田菜希、陳 鵬、土居 壽、三浦宏之、松村光明、埴 隆夫：腐食試験および細胞を用いた試験によるチタンイオンの金属アレルギー性の検討、2014 年、日本バイオマテリアル学会第 36 回大会(東京)

大森崇、簾内桃子、中村香織、池田英史、鄭美淑、山影康次、萩野滋延、小島肇：SIRC-CVS試験を用いた眼刺激性評価代替法の国際バリデーション研究（II）、2013年、第26回日本動物実験代替法学会

丸谷あおい、相場節也、木村裕、渡辺美香、鈴木紀之、岩城知子、山影康次、齋藤幸一、中島芳浩、近江谷克裕、山崎晶次郎、小島肇、田中憲穂、小林眞弓、森梓、大森崇：IL-8 Luc assayにおけるばらつきを考慮した判定基準の提案、2013年、第26回日本動物実験代替法学会

木村裕、藤村千鶴、渡辺美香、齋藤るみ子、鈴木紀之、岩城知子、山影康次、齋藤幸一、中島芳浩、近江谷克裕、酒井綾子、丸谷あおい、大森崇、山崎晶次郎、小島肇、田中憲穂、相場節也：IL-8 Luc assayの施設間差試験およびデータセットの作製、2013年、第26回日本動物実験代替法学会

若栗忍、齋藤るみ子、佐々木澄志、榎藤麻衣子、遠藤伸子、須井哉、山影康次：フィーダー細胞の違いによる Cell-able™ プレート上のマウス初代肝細胞スフェロイドにおける肝機能の検討、2013年、第26回日本動物実験代替法学会

山影康次：化学物質の安全性評価：遺伝毒性としての染色体異常試験、2012年、染色体学会第63回（2012年度）年会主催 市民公開講座

高橋俊孝、中川ゆづき、豊泉友康、田島恵理、西村哲治、本間正充、山影康次：カーボンナノチューブの CHL/IU 培養細胞を用いた染色体異常試験（その2）、2012年、第41回日本環境変異原学会大会

山影康次、高橋俊孝、生悦住 茉友、須井 哉、川上久美子、松本浩孝、豊泉友康、根岸沙記、古田雅一：放射線照射によるトリグリセリド分解生成物（2-アルキルシクロブタン類）の遺伝毒性および発がん性、2012年、第41回日本環境変異原学会大会

木村 裕、渡辺美香、齋藤るみ子、鈴木紀之、岩城知子、金子 愛、高田めぐみ、田中裕美、渡辺 文、山影康次、齋藤幸一、中島芳浩、近江谷克裕、酒井綾子、大森 崇、山崎晶次郎、小島 肇、田中憲穂、相場節也：IL-8 Luc assay の施設間差試験-Phase I, Phase IIaの結果ならびに今後の展望-、2012年、第25回日本動物実験代替法学会

渡辺美香、小林美和子、生悦住茉友、山影康次：LabCyte EPI-Model を用いた JIS L 1918 繊維製品の皮膚一次刺激性試験、2012年、第25回日本動物実験代替法学会

簾内桃子、福田隆之、池田英史、鄭美淑、大森 崇、5 田中裕美、山影康次、萩野滋延、小島 肇：SIRC-CVS 試験を用いた眼刺激性評価代替法の国際バリデーション研究(I)、2012年、第25回日本動物実験代替法学会

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

3. その他

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

化合物	96ウェル法 ¹⁾						遺伝毒性 ^{2,3)}		発がん性 ^{2,3)}
	H ₂ O ₂ (OD)				観察法				
	0.12		平均値 ¹⁾						
	Ini	Pro	Ini	Pro	Ini	Pro	Ames	Others	
2-Acetylaminofluorene	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MNNG	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-Azacididine	+	-	±	-	+	-	+	+	+
Dibenz[a,h]anthracene	+	±	+	±	+	±	+	+	+
Mitomycin C	+	±	+	-	+	-	+	+	+
Lithocholic acid	-	+	-	±	-	+	-	MLA±	+
Methapyrilene HCl	-	+	-	+	-	+	-	+	+
Styrene oxide	±	-	±	-	-	-	+	+	+
1-Naphthylamine	±	-	±	-	±	-	+	+	-
Caffein	-	-	±	-	-	-	-	CA+	-
Ampicillin sodium salt	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D(-)-Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ini: Initiation, Pro: Promotion, -: 有意差なし, ±: 1濃度のみ有意,

+: 連続した2濃度で有意, , CA: 染色体異常試験, MN: in vivo小核試験

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

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

	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
■	5	31	0.72	0	60	132	0.92	12	31	0.88	1	37	68	0.75
■	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3 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)														Ames	Others			
	0.06		0.07		0.08		0.09		0.1		0.11		0.12				0.13		
Ini	Pro	Ini	Pro	Ini	Pro	Ini	Pro	Ini	Pro	Ini	Pro	Ini	Pro	Ini	Pro				
2-Acetylaminofluorene	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
MNNG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Phorbol 12,13-didecanoate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd	
5-Azacytidine	+	NS	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	
Sterigmatocystin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	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	NS	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	±	-	w±	MN+	
Phenol	NS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Eugenol	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
Caffeine	-	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

表4 過酸化水素耐性細胞 (Bhas preT 細胞) の腫瘍原性 (軟寒天コロニー形成能)

細胞	接着培養		軟寒天培養		
	播種数 (個/dish)	コロニー数 (個/dish)	播種数 (個/dish)	コロニー数 (個/dish)	コロニー 形成率 (%) *
BALB/c 3T3	100	64.3	10000	0	0
Bhas 42	100	48.3	10000	30.3	0.6
Bhas preT-1	100	54.0	1000	98.7	18.3
Bhas preT-2	100	52.7	1000	135.7	25.8
Bhas preT-3	100	58.3	1000	64.0	11.0
Bhas preT-4	100	51.0	1000	24.7	4.8
Bhas TPA-1	100	32.3	100	33.3	103.1

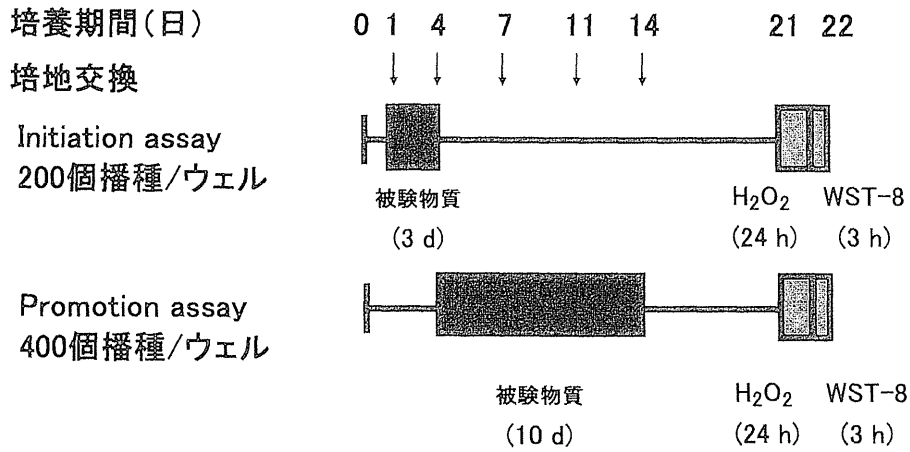


図1 過酸化水素処理後の吸光度測定による形質転換試験の試験プロトコール

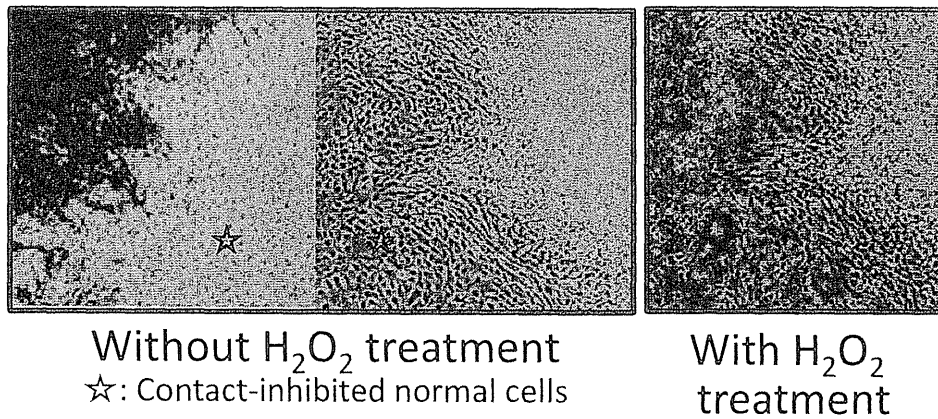


図2 過酸化水素処理前後の正常細胞と形質転換巣

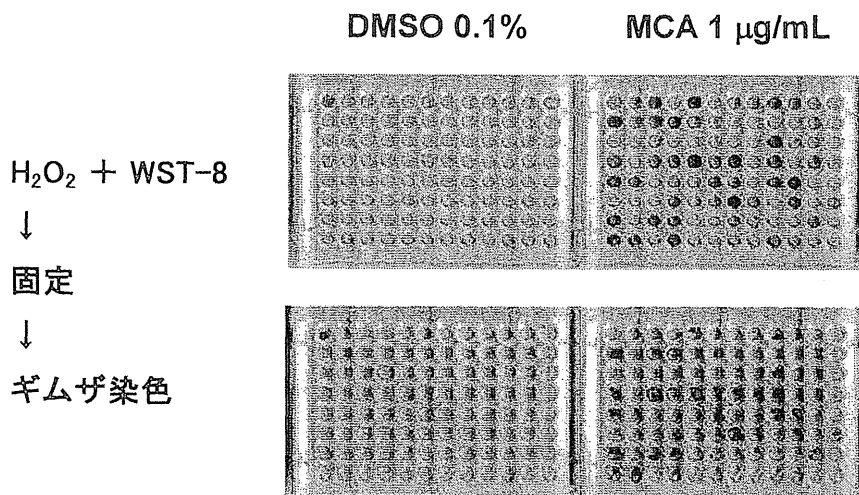


図3 過酸化水素処理したプレートの生細胞測定法 (WST-8) とギムザ染色の比較