

JaCVAM第2回ワークショップ

日時:平成21年4月17日(金)13:30-17:30

場所:国立医薬品食品衛生研究所 11号館3階講堂

後援:日本動物実験代替法学会

参加費:無料(定員100名、参加のお申し込みは workshop@jacvam.jpで受付いたします)

演題および演者

開会挨拶 井上 達(国立医薬品食品衛生研究所)

座長 井上 達(国立医薬品食品衛生研究所)

13:35-14:30 バリデーション研究とは何か? & 国際動向

小島 肇(国立医薬品食品衛生研究所)

座長 秋田正治(鎌倉女子大学)

14:30-15:00 コメットアッセイの国際バリデーション研究

林 真(財食品農医薬品安全性評価センター)

15:00-15:30 形質転換試験のバリデーション研究

酒井綾子(財食品薬品安全センター)

休憩

座長 大野泰雄(国立医薬品食品衛生研究所)

16:00-16:30 内分泌かく乱物質スクリーニングの国際バリデーション研究

小野 敦(国立医薬品食品衛生研究所)

16:30-17:00 眼刺激性試験STEバリデーション研究

坂口 斉(花王株式会社)

17:00-17:30 培養皮膚モデルバリデーション研究

小島 肇(国立医薬品食品衛生研究所)

閉会挨拶 大野泰雄(国立医薬品食品衛生研究所)



JaCVAMワークショップ開催事務局

〒158-8501

東京都世田谷区上用賀1-18-1

国立医薬品食品衛生研究所 薬理部

新規試験法評価室内 workshop@jacvam.jp

バリデーション研究と何か？& 国際動向

小島 肇 (国立医薬品食品衛生研究所)

2008年、国際的な代替法の協力組織として、米国の NICEATM (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) /ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)、EU の ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) /ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee)、Health Canada そして JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) を合わせた 4 局の上部組織が ICATM (International Cooperation on Alternative Test Methods) 設立に合意した。この組織の目的は国際的なバリデーション研究を推進し、専門家による第三者評価を合同で行い、さらに行政的な試験法の受入れを加速させることである。

ICATM ができて今後どう変わるか、変わっていかねばならないかも、もちろん重要である。しかし、その前に OECD Guidance document No.34 に記載されているバリデーション研究の内容を確認するとともに、日本で過去に実施されたバリデーション研究を検証し、日本のバリデーション研究の長短所について考察した。

コメットアッセイの国際バリデーション研究

林 真（財団法人食品農医薬品安全性評価センター）

コメットアッセイは化学物質等の DNA 損傷性を検出する方法として開発され、汎用されるようになってきた。本手法は細胞が分裂している必要もなく、細胞または核をばらばらに出来れば、どのような細胞集団にも適用可能である。すなわち、培養細胞をはじめ、生体から取り出した組織から細胞を単離することにより、試験を実施することが出来る。この方法は特に *in vivo* の手法として注目されている。前述のごとく、細胞集団の種類に制限がないので、いかなる組織も標的組織として用いることが出来る。この利点を生かし、発がんのメカニズムの検討においても、がんの標的臓器で遺伝毒性を検討することが出来る。現在、すでに、化学物質の安全性評価においてコメットアッセイは用いられており、各種申請書類に含められる他、調査会等での指示事項としてコメットアッセイの追加実施が要求されることもある。ただし、本手法には公的なガイドラインはなく、手法の統一がなされていない。偽陽性が多すぎるとの批判もあり、手法の確立、統一をはじめ結果の評価、解釈の標準化が求められている。2006 年度の厚生科学研究費補助金によるバリデーション研究が開始された。開始当初から国際的なバリデーション研究を目指し、EU の ECVAM と米国の ICCVAM, NICEATM の代表者にマネジメントチームのメンバーとして参加して頂き、まさに国際的なバリデーション研究を開始することが出来た。これまでに Phase I, Phase II, Phase III と 3 段階の国際共同研究を終了し、標準的なプロトコルの作成、試験の acceptance criteria 等を確立することが出来た。本年度から大規模な国際バリデーション研究 (Phase IV) が開始されることになる。共同研究の参加者についても、事前に技術レベルの確認を行い、問題なく質の高い試験を実施することが出来る機関を選択した。Phase IV では、先ず 4 種類のモデル化合物を用い、施設間差を再度評価、確認した後、化学物質の数を増やして手法自体の評価を行う予定である。なお、ICH S2(R1)においても、コメットアッセイは注目されており、特に、反復投与の一般毒性に組み込んだ手法が注目されている。現在、製薬業界と受託機関を中心に、反復投与毒性試験に組み込んだコメットアッセイ評価のための共同研究が進行中である。4 月中にはデータが出そろい、解析が行われて 6 月の横浜会議において最終的に議論され、ガイドラインに取り込むことを決定する。この、ICH のための共同研究においても、標準的プロトコルとして JaCVAM の手法が採用されており、我々の共同研究が果たしている役割は大きいものがある。

形質転換試験のバリデーション研究

酒井綾子（財団法人食品薬品安全センター）

形質転換試験は、細胞の悪性化に伴う形態の変化をエンドポイントとしている。化学物質の発がん性予測において、遺伝子に直接損傷を与える遺伝毒性だけでなく、発がんプロモーターのように遺伝毒性試験では検知できない発がん促進作用にも感受性を示すことから注目されている。形質転換試験にはいくつかの種類があるが、一般的な方法の一つにフォーカス法がある。フォーカス法は、細胞が悪性化し、増殖の接触阻止能を失い、重なり合い増殖を起こして生じるフォーカスを測定する方法で、従来 BALB/c 3T3 細胞や C3H10T1/2 細胞を用いて実施されてきた。これらの細胞を用いる場合、遺伝毒性を主作用とする発がん物質の試験では、培養の初期に被験物質で処理し、その後は通常の培地で培養を続ければよいが、発がんプロモーターの試験では、実験動物における 2 段階発がん試験に類似した 2 段階形質転換試験を実施する必要がある。すなわち、培養の初期に既知発がん物質（発がんイニシエーター）の近閾値濃度で処理した後、被験物質による処理をしばらく続け、さらに培養する。試験に 6～8 週間を要し、規模も大きく費用が嵩むことから、発がん性予測のためにルーチンに利用されるには至っていない。

佐々木（食薬センター）らは、国立衛研在職中に BALB/c 3T3 細胞に v-Ha-ras 遺伝子を導入して Bhas 42 細胞を樹立した¹⁾。この細胞は、2 段階発がんモデルでいうイニシエートされた細胞であると見なされている。大森（神奈川衛研）らは、この細胞を用いて発がんプロモーション作用検出系としての短期形質転換試験を開発した²⁾。次いで浅田（食薬センター）らは、この形質転換試験に少し変更を加えて発がんイニシエーション作用を検出できる方法を発表した³⁾。こうして、発がんイニシエーション作用を検出するためのイニシエーション試験と発がんプロモーション作用を検出するための発がんプロモーション試験とで構成される Bhas 42 細胞形質転換試験（本法）が開発された⁴⁾。イニシエーション試験では、細胞を低密度で播種し、培養の初期に被験物質で処理することにより、DNA に受けた損傷が定常期に至る前の数回の細胞分裂を経て変異として遺伝子に固定される。プロモーション試験では、より高い細胞密度で播種し、定常期に入るほんの少し前から被験物質処理を開始する。本法では、プロモーション作用検出のために既知イニシエーターによるイニシエーション処理を必要とせず、培養期間は 3 週間、培地の血清濃度は 5% でよく、1 濃度に 6-ウェルプレート 1 枚を使用して行う。従来法に比べて簡便かつコストパフォーマンスのよい方法である。

我々は、ヒ素化合物を対象とした研究から、本法のイニシエーション作用に対する感受性は、BALB/c 3T3 細胞を用いる従来法にほぼ等しく、プロモーション作用に対する感受性は、BALB/c 3T3 細胞 2 段階形質転換試験で 3-methylcholanthrene によるイニシエーション処理を施した場合にほぼ等しいことを明らかにした⁵⁾。同時に、この研究によって、Bhas 42 細胞は、形質転換試験においてイニシエートされた細胞として行動することが確

認された。

インハウスバリデーションを目的として現在までに本法を 85 物質に適用した。結果を他の *in vitro* 試験の結果と比較したところ、本法は、Ames 試験陰性あるいは Ames 試験では検出しにくい発がん物質をよく検出することが明らかになった。この 85 物質に本法適用の結果がすでに報告されている物質も加えて、発がん性の有無が明らかな 101 物質（発がん物質，65；非発がん物質，36）の結果から発がん性予測法としてのパフォーマンスを計算したところ、concordance, 72%；sensitivity, 71%；specificity, 75%；positive predictivity, 84%；negative predictivity, 59%；false positive, 25%；false negative, 29% となり、specificity と positive predictivity が優れていることが分かった。

本法を OECD テストガイドラインに提案すべく多施設間バリデーション研究を実施中である。解析を終えたプレバリデーション研究には、6 施設が参加し、コード化した 9 物質を血清、細胞、培地などのロットを揃えた条件で試験した⁶⁾。結果は、まずまずであったが、解析過程でバリデーション研究遂行上の素朴な疑問も生じた。それらの疑問点を提示して参加者の皆様からのご意見・アドバイスを伺いたいとも考えている。

謝辞：本研究は、NEDO によるプロジェクト研究の一環として行われた。

参考文献

- 1) K. Sasaki, H. Mizusawa, M. Ishidate, *Jpn. J. Cancer Res.* **79**, 921 (1988).
- 2) K. Ohmori, K. Sasaki, S. Asada, N. Tanaka, M. Umeda, *Mutat. Res.* **557**, 191 (2004).
- 3) S. Asada, K. Sasaki, N. Tanaka, K. Takeda, M. Hayashi, M. Umeda, *Mutat. Res.* **588**, 7 (2005).
- 4) A. Sakai, *AATEX* **13** (Special Issue), 367 (2008).
- 5) D. Muramatsu, K. Sasaki, S. Kuroda, K. Hayashi, N. Tanaka, A. Sakai, *Mutation Res.* in press (2009).
- 6) N. Tanaka, K. Sasaki, K. Hayashi, A. Sakai, S. Asada, D. Muramatsu, S. Kuroda, F. Mizuhashi, M. Nagai, H. Suzuki, T. Imamura, M. Asada, H. Satoh, A. Sakamoto, R. Nakao, H. Hirose, N. Ishii, M. Umeda, *AATEX*, in press (2009).

内分泌かく乱物質スクリーニングの国際バリデーション研究

小野 敦（国立医薬品食品衛生研究所）

化学物質の毒性評価における従来の手法は、時間やコストがかかることや動物福祉の面などから、毒性メカニズムに即した効率的かつ倫理的な新規試験法が求められている。OECD では、新規試験法についてバリデーション基準を作成しているが、様々な試験法について OECD 基準を満たすバリデーションを行うことは容易ではない。JaCVAM では、行政的有用性が推定される新規試験法についてのバリデーションを推進しており、その一つとして OECD 内分泌かく乱物質評価タスクフォースにより示されたコンセプトフレームワークレベル 2 に分類される 2 種の内分泌かく乱性 *in vitro* 試験法について OECD ガイドライン化にむけた国際バリデーションを実施している。

HeLa 法は、我が国で開発された HeLa9903 細胞をベースとした ER α レポーターアッセイ法であり、アゴニスト検出法については既に終了したバリデーション結果をもとに OECD ガイドライン化がほぼ終了している。JaCVAM では、アゴニスト検出法ガイドラインピアレビューにおいて要望されたアンタゴニスト検出法について ECVAM および米国 EPA の共同のもと国内 3 施設、欧州、韓国の 5 施設における 3Task からなる国際バリデーション試験を開始した。Task1 では試験系セットアップのためアゴニストアッセイによる標準物質の測定を実施し、全施設で評価基準を満たす結果を得た。引き続き Task2 では、アンタゴニストアッセイ標準物質の測定を実施した結果、海外ラボでは標準物質の評価基準をクリア出来ず、原因究明のための追加検証により、その原因が培養液調整に用いた水であることが明らかとなった。現在、国内 3 施設は Task2 を終了し、海外施設に先行して Task3 を実施している。

一方、Lumi-cell 法は、米国で開発された ER α レポーターアッセイ試験法で、米国 ICCVAM で作成されたプロトコールをもとに ECVAM、JaCVAM の共同のもと日米欧の 3 施設の参加により、4 フェーズからなるアゴニスト・アンタゴニスト双方のバリデーションを実施している。フェーズ I では、標準物質の 10 回繰り返し測定を行った結果、施設間で測定値に差はあるものの施設内変動は許容範囲内であることが示された。結果をもとに各施設における経歴データベースを構築しフェーズ II における品質評価基準を決定した。フェーズ 2 では、この品質評価基準に従い、アゴニスト・アンタゴニスト試験をコード化された各 4 物質について実施したが、多くの不採用データが出たことから品質評価項目の見直しを行った。引き続きフェーズ IIb ではアゴニスト、アンタゴニスト試験各 8 物質の測定を実施した結果、不採用データは少なくなったもののアンタゴニスト試験において、多くの化合物で 3 施設の評価が一致せず、現在、その原因を明らかにするための追加試験を実施している。

眼刺激性試験 STE バリデーション研究

坂口 斉 (花王株式会社)

【はじめに】

STE (Short Time Exposure) 試験は、ウサギ角膜由来の SIRC 細胞に被験物質を一定濃度、5 分間曝露した際の細胞生存率をエンドポイントとした簡便な眼刺激性試験代替法で、Draize 試験との高い一致性が報告されている (参考文献)。そこで、STE 試験の技術易習得性を確認するとともに、盲検試料を用いて施設間再現性と予測性 (Globally Harmonized System (GHS) の刺激区分との一致性) を評価するため、日本動物実験代替法学会において、5 施設 (株式会社カネボウ化粧品、株式会社コーセー、ピアス株式会社、ポーラ化成工業株式会社、ライオン株式会社) によるバリデーション研究を実施した。

【検討内容】

以下に示す 2 つの内容を評価した。

1. 標準物質 3 化合物 (Sodium lauryl sulfate (SLS)、Calcium Thioglycollate (CT)、Tween 80 (TW80)) の評価を行い、試験の技術易習得性の確認を行う。

2. 同じ盲検試料 25 化合物を評価し、施設間再現性と予測性を評価する。

まず初めに、標準物質 3 化合物に関して、生理食塩水を溶媒とし 5%、0.5%、0.05% 溶液を作成し、3 回の実験を行った。そして、その平均細胞生存率と、STE 試験の予測モデル (5% 及び 0.05% 試料液結果) で得られた眼刺激性ランク分類結果を、試験法提案施設の背景データと比較した。次に盲検試料 25 物質を、5% 試料液で評価し、STE 試験における刺激物、非刺激物の刺激区分を行い、その刺激区分と GHS の刺激物、非刺激物の区分との一致性を評価した。さらに STE 試験の予測モデル (5% 及び 0.05% 試料液結果) を用いた眼刺激ランクと GHS 区分 (Category1、Category2 及び非刺激物) との一致性を評価した。併せて施設間での再現性も評価した。

【結果】

標準物質 3 化合物に関しては、評価施設の各濃度における平均細胞生存率は背景データとほぼ同じであった。また、2 濃度の平均生存率によるランクは、試験法提案施設を含むすべて施設で同一であった。これより、技術易習得性が確認された。盲検試料 25 化合物に関しては、5% 試料液で評価した STE 試験による刺激区分と GHS の刺激物、非刺激物の区分は良く対応した。また、5% 及び 0.05% 試料液での STE 試験による眼刺激性ランクと GHS の区分 (Category1、Category2 及び非刺激物) も良く対応した。また、これら結果の施設間再現性も概ね良好であった。

以上から、STE 試験の技術易習得性及び高い施設間再現性、予測性が確認でき、STE 試験が簡便で有用な眼刺激性試験代替法と考えられた。

【参考文献】

Takahashi Y. et al., 2008. Development of the short time exposure (STE) test: an in vitro eye irritation test using SIRC cells. *Toxicology in Vitro*. 22, 760-770.

培養皮膚モデルバリデーション研究

小島 肇 (国立医薬品食品衛生研究所)

EU では 2007 年、培養皮膚モデル EPISKIN を用いた皮膚刺激性試験代替法が ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee) の認証を得た。この EPISKIN プロトコールに従い、日本製の培養皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL24 の有用性を検証するため、日本動物実験代替法学会バリデーション委員会が皮膚刺激性試験代替法のバリデーション研究を公募した。結果として、多数の施設から応募があり、その中から厳しい基準をクリアした 7 施設の協力を得てバリデーション研究を行うことになった。

2008 年 4 月に第一回実行委員会を開催し、5 月に技術講習会、6-7 月にラウリル硫酸ナトリウム 5%水溶液の他に、エタノール、グリセリン、Naphthalen acetic acid の 3 物質を用いた予備試験を実施した。この試験をクリアしたすべての施設の協力を得たバリデーション研究では、ECVAM performance standard に記載されている 20 のうち、日本で入手可能な 19 物質をコード化して配布し、9 月より開始された。測定指標は MTT による細胞生存率および MTT+IL-1 α とした。

本バリデーション研究の目的は、培養皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験で得られる皮膚刺激性の判定が、複数の施設間でどの程度一致するか (施設間再現性)、EPISKIN で得られた判定結果とどの程度一致するか (同等性)、動物実験結果とどの程度一致するか (代替可能性) という 3 つの課題への解答を多施設での実験を通して評価することである。

その結果、すべての施設で施設内および施設間再現性の高い結果を求めることができた。MTT と動物実験結果との比較によれば、正確性は 71%、感度は 64%、特異度は 79% であった。IL-1 α は必ずしも必要な指標でなかった。EPISKIN と比較して感度はやや劣ると考えられた。

謝辞

JaCVAM 第2回ワークショップは日本動物実験代替法学会の後援を頂き開催しました。日本動物実験代替法学会の皆様には厚く御礼申し上げます。

JaCVAM 運営委員会

JaCVAM HP 情報

JaCVAM 第2回ワークショップの発表原稿は JaCVAM の HP に掲載予定です。
どうぞ御活用ください。

<http://jacvam.jp/>

