

場合、トリス緩衝液の約 2 倍に達し、Ofloxacin の光遺伝毒性をより感度良く検出できることが示された (Fig. 2)。以上の結果より、スクリーニング試験

に用いる緩衝液はダルベッコリン酸緩衝液とした。

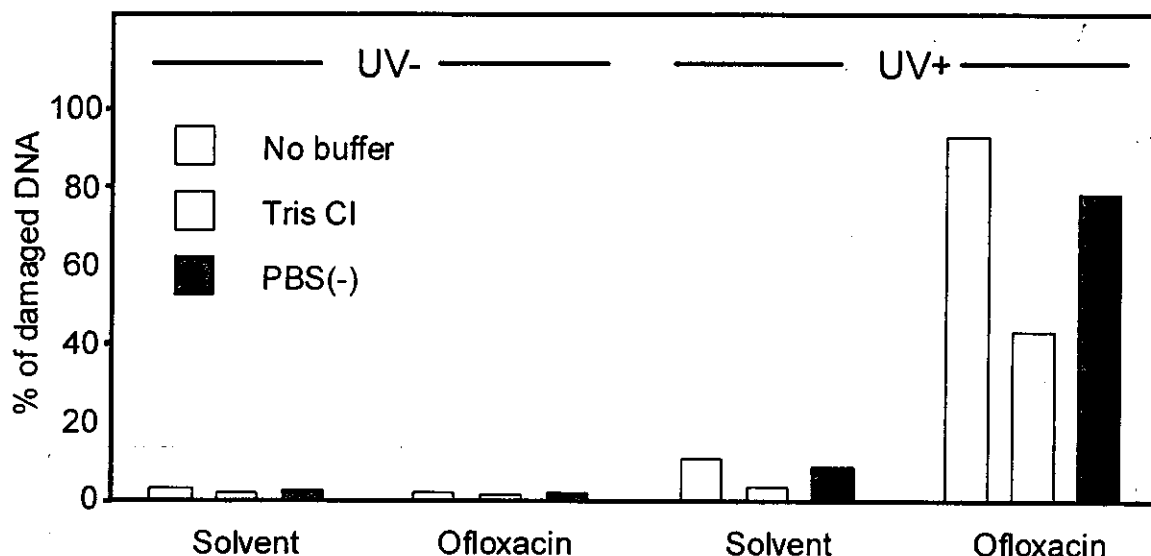


Fig. 2 緩衝液の影響

プラスミド切断性に対する緩衝液の影響を、PBS(-)および 10mM Tris 塩酸緩衝液 (pH7.2)の 2 種類について検討した。Ofloxacin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)存在下で、 $3\text{J}/\text{cm}^2$ の照射を行ったところ、PBS(-)が Ofloxacin の作用を感度良く検出できることが示された。

3. 非極性溶媒の検討

多環芳香族炭化水素など、検体が水に不溶の場合、非極性溶媒に溶解して反応液に加える必要がある。細胞を用いた *in vitro* 試験では、溶媒そのものの毒性が結果に影響するのを避けるため、一般にエタノール、ジメチルスルホキシド (DMSO)、アセトンのいずれかを 1%以下の容量で用いられ、中でも毒性が比較的低い DMSO が用いられることが多い。しかしながら、DMSO は一重項酸素のラジカルスカベンジャーであることが知られており、既知の光毒性物質の中には、Rose Bengal など一重項酸素生成が作用機序であることが知られているものもあることから、高感度の試験法では、溶媒

のスカベンジャー効果により、光毒性検出感度が低下することが懸念される。そこで、上記のエタノール、DMSO、アセトンの 3 種について、2.項と同様に、モデル光毒性物質として、Ofloxacin を用いて DNA 切断に与える影響を検討した。その結果、DMSO を溶媒に用いた場合、極端に DNA 切断性が抑制され、陰性レベルにまで低下することが判明した。エタノールとアセトンは大差なかったが、アセトンの方がやや抑制が少なく、非極性溶媒を加えない場合と比較しても、ほぼ同レベルであった (Fig. 3)。以上の結果より、スクリーニング試験に用いる極性溶媒はアセトンとした。

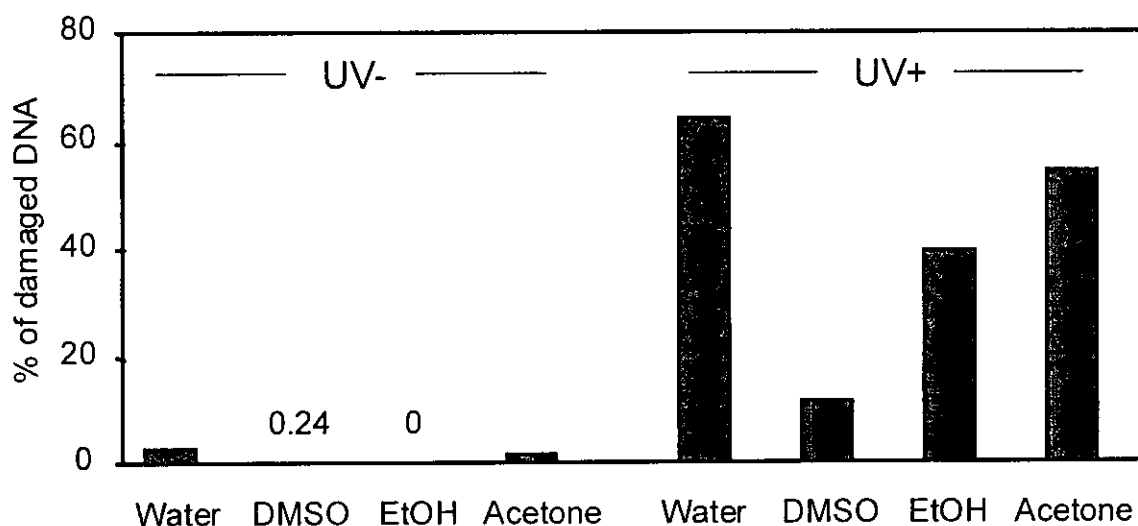


Fig. 3 非極性溶媒の検討

Oxfloxacin を 4 種の溶媒(蒸留水、DMSO、エタノール、アセトン)に溶解し、1%(v/v)になるように添加し、最終濃度を 100 μ g/mL とした。非照射では、溶媒による影響は認められなかったが 3J/cm² で照射を行ったところ、DMSO、エタノールを溶媒に用いた場合、Oxfloxacin の DNA 切断性が阻害されることが明らかになった。

4. 一般化学物質等の光 DNA 切断性スクリーニング

53 種類の化学物質の結果を Fig 4 に示した。いくつかの検体では、高濃度で DNA がスメア化したため、最高濃度を下げて実験を行った。また、非照射条件で DNA 切断が認められた場合も、同様に最高濃度を下げて実験を行った。アクリジンオレンジについては、検体とプラスミド DNA を混合した段階で沈殿を生じたため、高濃度での泳動は行えなかった。

プラスミド切断性の陽性判定については、まだ確立された方法は存在しないが、今回用いた検体については、光非照射群、照射群の間いずれも DNA に切断が認められなかった検体と、非照射群で DNA 切断の認められない濃度域で光照射群に DNA 切断が観察された検体の 2 種類に分かれたことから、前者は光毒性陰性、後者は光毒性陽性とした。結果の判定については、今回得られた溶媒対照の背景データ (Fig. 5) から、おおよそ 2 項

分布に従うことが示唆されたので、今後、背景データを蓄積するとともに、検定法の検討も行っていきたい。

D. 考察

プラスミド切断性試験の有用性を評価するため、in vivo での結果が得られている 32 検体について、プラスミド切断性試験との相関を検討した (Table 2)。その結果、陽性予測率は 91%、陰性予測率は 75% と、非常に高い一致率を示し、ヒトや動物などに対する光毒性・遺伝毒性物質の作用を効果的に予測できることが示唆された。

それらの内訳を Table 3 に示した。in vivo で陽性の報告がある検体のうち、プラスミド切断試験で検出できなかったのは、ニュートラルレッドおよびピレンの 2 検体であった。ニュートラルレッドについては、光照射、非照射両方において、高濃度で DNA の崩壊が認められたため評価がでず、陰性の結果となったと考えられる。ピレンについては、

CHL/IU 細胞を用いた *in vitro* 光小核試験で光による遺伝毒性の増強が認められていることから、プラスミド切断性試験で検出できなかった原因につ

いて検討を加えて、実験系の改良を進めていきたい。

**Table 2. Plasmid relaxation assay:
COMPARISON OF *IN VITRO* AND *IN VIVO* CLASSIFICATIONS**

		<i>in vivo</i> classification			
		photo-toxic	non-photo-toxic	unclear	total
<i>in vitro</i> classification	phototoxic	20	2	1	23
	non-phototoxic	2	6	1	9
	total	22	8	2	32

table statistics for the shadowed 2 x 2 table

<i>sensitivity:</i>	91%	<i>prevalence:</i>	2.75
<i>specificity:</i>	75%		
<i>positive predictivity:</i>	91%		
<i>negative predictivity:</i>	75%		
<i>accuracy:</i>	87%		
<i>chi²:</i>	0.00	(>> 3.8)	

一方、*in vivo* で陰性の結果が報告されている検体のうち、プラスミド切断性で陽性となったのは、ヘキサクロロフェンとペンタクロロフェノールの2検体であった。ヘキサクロロフェンについては、CHL/IU 細胞を用いた *in vitro* 光小核試験で光による遺伝毒性の増強が認められ、また、ペンタクロロフェノールでは遺伝毒性の増強はみられなかったが、処理後 24 時間で光による細胞毒性の増強が認められた。他の *in vitro* 試験でも光毒性が認められたことから、これらの検体は *in vitro* の実験系でのみ、陽性の結果が得られる検体である可能

性が考えられる。

以上の結果から、プラスミド DNA 切断性試験によって、化学物質のヒトや動物に対する光毒性を効率的にスクリーニングできるが、化学物質の特性や実験系の制限に起因する偽陽性、偽陰性の結果も生じうることから、他の *in vitro*、*in vivo* の試験や、関連物質との構造的相関からの予測と組み合わせた、段階的スクリーニングを行うことによって、より効率的かつ高精度な予測が可能になるものと考えられる。

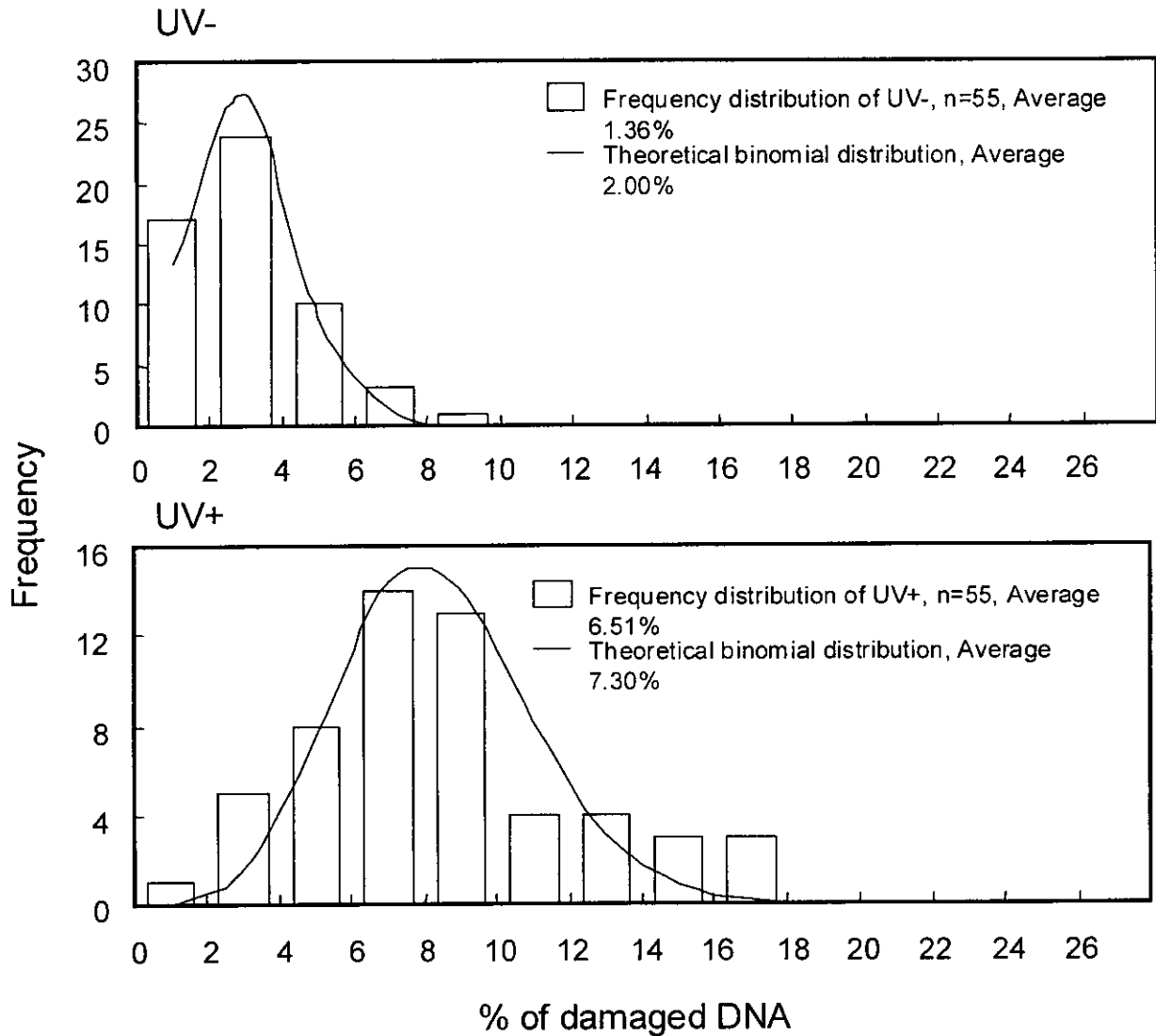


Fig 5 光照射群および非照射群の溶媒対照背景データと理論2項分布

E. 結論

光遺伝毒性物質の、より簡便な検出法として、プラスミドの切断を指標とした方法を応用し、53 種類のモデル化合物を用いてその有用性を検討した。その結果、動物や人体に対する光毒性作用の有無が報告されている 32 種の化学物質について、in vivo の結果と比較したところ、陽性予測率 91%、陰性予測率 75%と非常に良く一致した。このことから、光毒性物質の簡便なスクリーニング系として、プラスミドを用いる光毒性試験が有用であることが

示された。

F. 引用文献

- 1) Oroskar, A., Gasparro, F., Peak, M., Relaxation of supercoiled DNA by aminomethyl trimethylpsoralen and UV photons: Action spectrum., Photochemistry and Photobiology, Vol. 57, 648-654, 1993.
- 2) Spielmann, H., Balls, M., Brand, M., Doring,

Holzhtutter, Kalweit, S., Klecak, G., Eplattenier, H. L., Liebch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W. J. W., Pfanenbecker, Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. and Willshaw, A. (1994) EEC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: first results obtained with a BALB/C 3T3 cell phototoxicity assay, Toxic. In Vitro, 8, 4, 793-796.

G. 研究発表

1. 論文発表

準備中

2. 学会発表

- 1) 中川ゆづき、若栗忍、滝川優子、田中憲穂、
プラスミド切断による光(遺伝)毒性物質の検出、
日本環境変異原学会第27回大会、1998

分担研究報告書

3. 微生物を用いる光遺伝毒性試験の確立

分担研究者 渋谷 徹 食品薬品安全センター 秦野研究所 遺伝学研究室室長

研究要旨

光照射によって変異原性が発現または増強される化学物質の検出法について、突然変異誘発性の検出に広く用いられている検定菌を用いた系の応用を試みた。まず、照射線量を1から9Jとして、菌液のみに照射を行い、誘発される変異コロニー数が非照射対照群に比べ2倍以上に増加せず、さらに生菌数が明らかに減少しない線量域を設定した。この線量域で文献を参考にし、適当な陽性対照物質の選定を行った。これらの結果から使用する検定菌とそれらに用いる照射線量および陽性対照物質の選定を行った。

A. 研究目的

微生物を用いて、光照射によって変異原性が発現または増強される化学物質の検出法の確立は重要である。しかし、微生物を用いるいわゆる光遺伝毒性試験法については、これまでに公表されている研究論文はそれほど多くない。そのため、国際的に定まった試験法はいまだ確立されておらず、その統一化が望まれている。そこで、突然変異誘発性の検出に広く用いられている検定菌を用いて試験系の応用を試みることにした。まず、照射線量を1から9Jとして、菌液のみに照射を行い、誘発される変異コロニー数の増加と生菌数の減少とを指標として、照射線量域を設定した。つぎに、この線量域のもとで文献を参考にし、用いる陽性対照物質の選定を行った。これらの結果から使用する検定菌とそれらに用いる照射線量および陽性対照物質を決定し、微生物を用いる光遺伝毒性試験法について、試験方法を提案する。

B. 研究方法

1. 使用菌株

Ames 試験で広く用いられている *Salmonella typhimurium* TA100、TA98、TA1535、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA と、UV 耐性の菌株の中から、酸化型や架橋型による変異を検出できる *Salmonella typhimurium* TA102 と、*Escherichia coli* WP2/pKM101 を検定菌として用いた。

これらの菌は解凍後、前培養した菌液を遠心沈殿し、リン酸ナトリウム緩衝液で洗菌、遠心沈殿したのち、リン酸ナトリウム緩衝液に再懸濁させたものを使用菌液とした。

2. 照射線量の検討および試験方法

上記菌株について、0.2J～9J の範囲で照射を行った。照射には Dr. Hönle の照射装置 (SOL500) を用いた。

径 35mm の小シャーレに菌液 1.35ml、滅菌

水 0.15ml を入れて混和した後、照射した。照射後、リン酸ナトリウム緩衝液 0.5ml の入った小試験管に、照射した菌液を 0.1ml 移しとり、2ml のトップアガーと混和し、最少グルコース寒天平板上に流し固めた。同時に生菌数を調べるため、照射した菌液を生理食塩水を用いて段階希釈し、2ml の Nutrient Broth トップアガーと混和し、最少グルコース寒天上に流し固めた。37°C で 48 時間培養した後、復帰変異コロニー数と生菌数をカウントした。

3. 陽性対照物質の選定

Chetelatら(1993)、Hendersonら(1994)および Jose ら (1979)などの文献を参考にし、8-Methoxypsoralen (8-MOP: 和光純薬工業) および Chlorpromazine (CPZ: Sigma Chemical) の 2 物質を 陽性対照物質とし、TA100、TA98、TA102、WP2/pKM101 の 4 菌株を用いて検討を行った。

実験には、径 35mm の小シャーレに、洗菌した菌液 1.35ml と、8-MOP は Dimethyl-sulfoxide (和光純薬工業)、CPZ は滅菌水を溶媒としてそれぞれの濃度に調製したものを 0.15ml ずつ入れて混和し、照射を行った。照射後の試験方法は前述と同様に行った。

C. 研究結果

1. 使用菌株および照射線量

各菌株と照射線量の関係を表1に示した。TA100、TA1535、WP2uvrA、TA98 および TA1537 について 3J~9J の範囲で照射を行ったところ、3J 以上の照射では生菌数がかなり減少した(図1-1)。この5菌株はUV感受性であり、UV照射による菌への強い影響が十分に考えられる検定菌であった。そこで5菌株の中から変異原性物質についての感受性が高いとされるTA100とTA98のみを選び、照射線量をさげて再検討を行った。TA102とWP2/pKM101はUVに耐性であるため、1~7Jで検討を行った(図1-2および1-3)。

その結果、TA100では3J以上で変異コロニー数がコントロール値の2倍以上に、TA102では5J以上で変異コロニー数がコントロール値の約1.5倍になった。生菌数には明らかな変化は認められなかった。TA98とWP2/pKM101では変異コロニー数に変化は認められなかったが、生菌数はTA98では1Jで、WP2/pKM101では7Jでコントロール値に比べて80%以下に減少した。

表1 各菌株における照射線量の検討

照射線量 (J)	UV感受性菌株					UV耐性菌株	
	塩基対置換型			フレームシフト型		塩基対置換型	
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA102	WP2/pKM101
0.2				○			
0.3				○			
0.5	○			○			
1	○			△		○	○
3	○*	×	△	×	×	○	○
5	○*	×	△	×	×	○*	○
7	△	×	×	×	×	○*	△
9	×	×	×	×	×		

○: 生菌数に変化なし
 △: 生菌数が80%以下に減少
 ×: 生菌数が50%以下に減少
 *: 変異コロニー数が高くなった線量

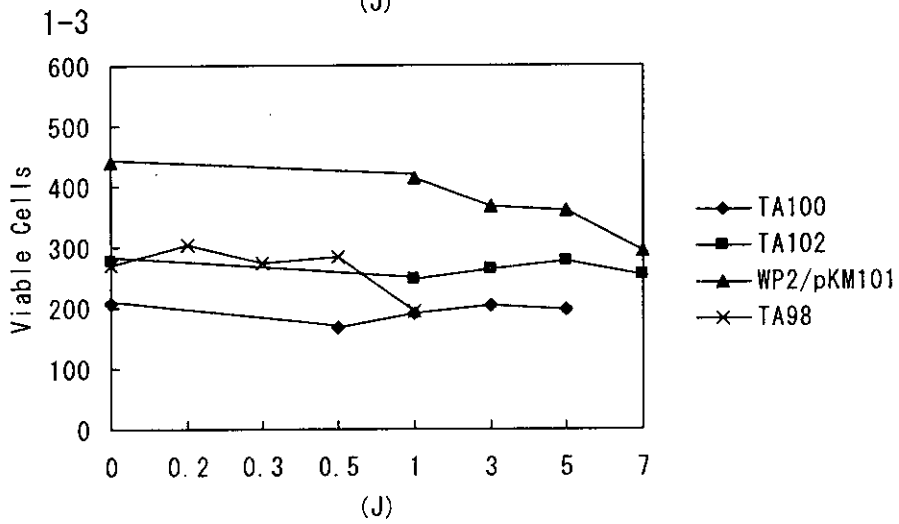
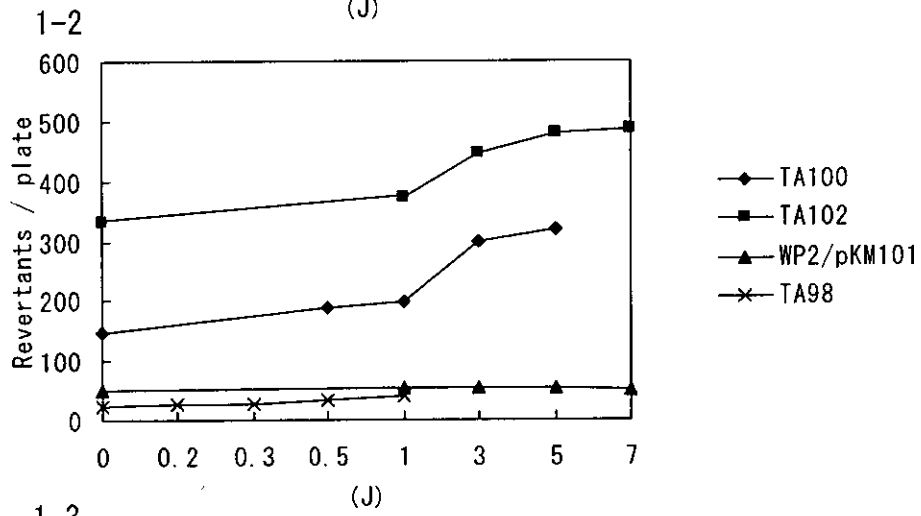
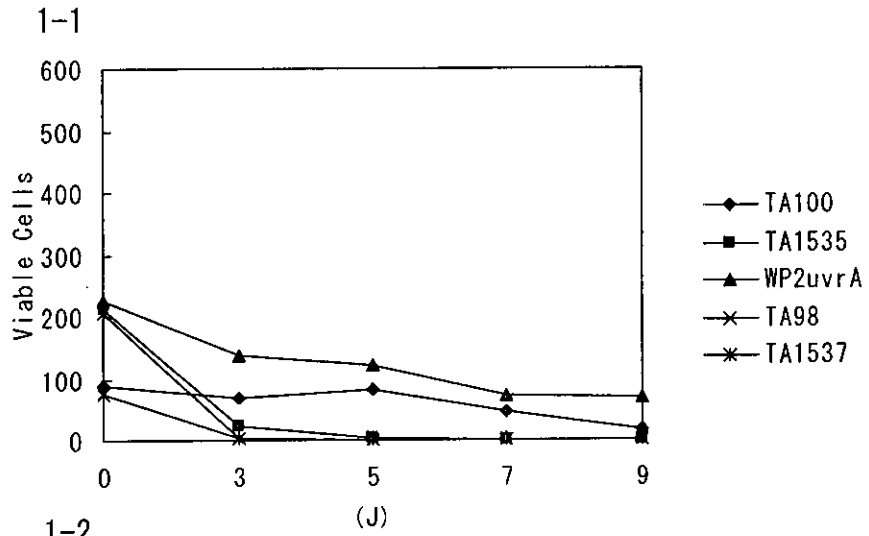


図1. 各照射線量における生菌数の変動と変異コロニー数への影響

2. 陽性対照物質

1) 8-MOP

TA100 および TA98 においては 0.001~1.0 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で 3 線量で照射を行ったところ、ともに変異コロニー数の増加は認められなかった(図2-1および2-2)。TA102 および WP2/pKM101 においては 0.0125~0.05 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で 3 線量で照射を行ったところ、ともに変異コロニー数に増加が認められ、0.05 $\mu\text{g/ml}$ 、3J でプラトーに達した(図2-3および2-4)。

2) CPZ

TA102 においては 0.1~100 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で 3 線量で照射を行ったが、変異コロニー数の増加は認められなかった(図3-1)。TA100

および TA98 においては 2.5~10 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で 3 線量で照射を行ったところ、ともに変異コロニー数に増加が認められ、TA100 では 5 $\mu\text{g/ml}$ 、1J もしくは 10 $\mu\text{g/ml}$ 、0.5J 付近で、TA98 では 10 $\mu\text{g/ml}$ 、0.5J でプラトーに達した(図3-2および3-3)。WP2/pKM101 においては 0.1~100 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で 3 線量で照射を行ったところ、10 $\mu\text{g/ml}$ 、1J でのみ変異コロニー数に増加が認められたため、さらに 1~80 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で 3 線量で照射を行ったところ、10 $\mu\text{g/ml}$ 、1J でコントロール値の 2 倍以上となり、再現性も認められた(図3-4および3-5)。ただし、菌の生育阻害が強く認められた(図3-6)。

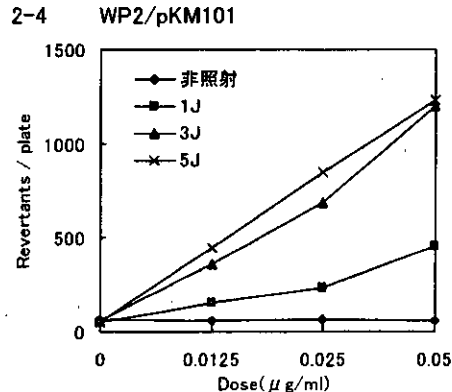
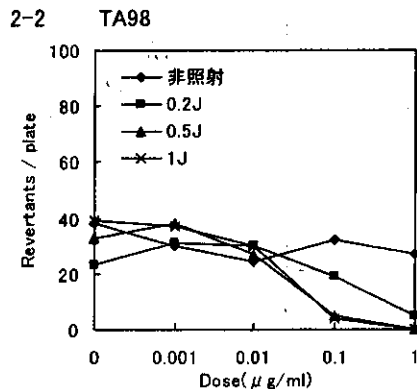
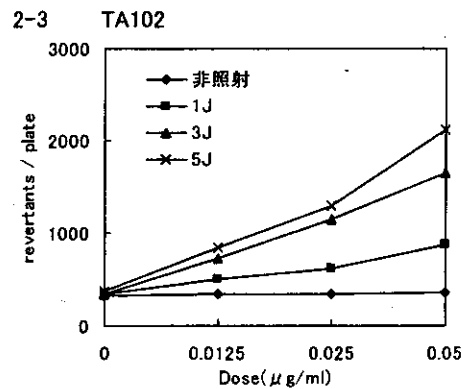
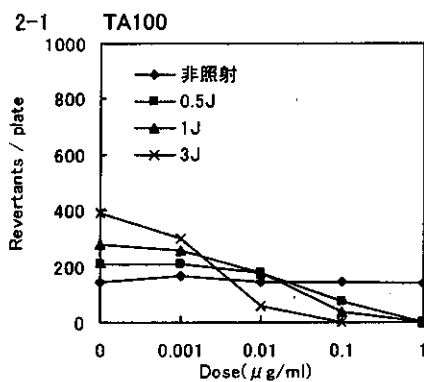


図2. 各菌株の8-MOP への感受性

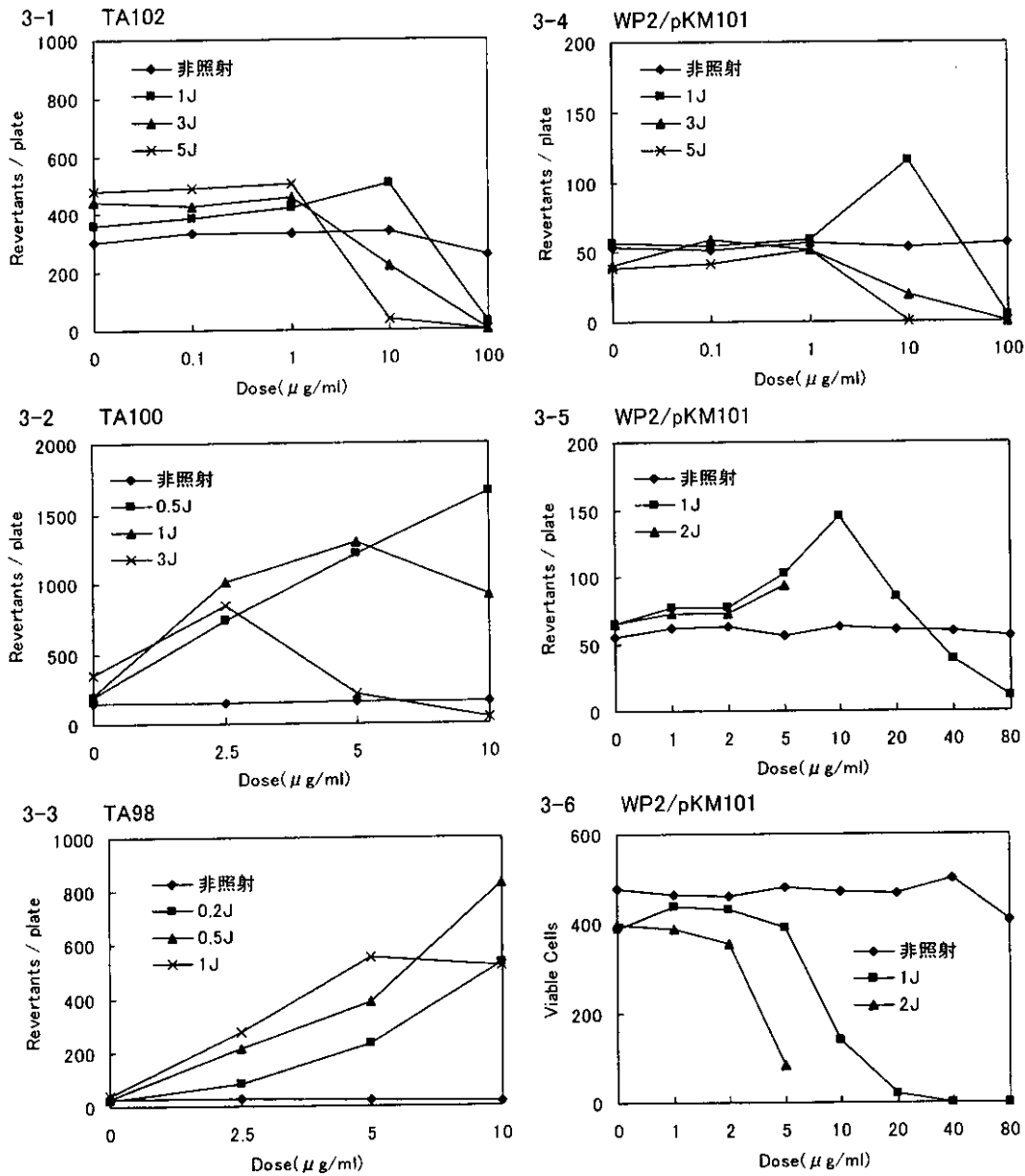


図3. 各菌株のCPZ への感受性

D. 考察

検定菌と用いる照射線量の検討結果については表1にまとめた。UV 感受性株においては、

その耐性株に比べて照射による生菌数の減少はいちじるしく高線量での試験は不可能と考えられた。TA1535 および TA1537 について

は、低線量域で抗菌性が強く現われ使用できないものと判断した。TA100 では陽性対照物質として CPZ を用いた結果、照射線量が3から5J の範囲で線量のみによる復帰変異コロニー数が約2倍程度に増加したもののそれ以下の線量では試験が可能であると考えられた。同様に TA98 では、陽性対照物質として CPZ を用いた結果、照射線量が1J 以下の線量は試験が可能であると考えられた。

一方、UV 耐性株である TA102 と WP2/pKM101 では、陽性対照物質として 8-MOP を用いた結果、1J から 5J の線量範囲で明らかな陽性反応が認められ、試験の実施は可能であると考えられた。

E. 結論

照射線量の検討より、TA100、TA98 では照射線量を下げることによって、また TA102、WP2/pKM101 では 3J 付近において Ames 試験の実施が可能であることがわかった。TA100 および TA98 では陽性対照物質として CPZ が、TA102 および WP2/pKM101 では陽性対照物質として 8-MOP が最適であると考えられた。また、TA1535 および TA1537 については、低線量域で抗菌性が強く現われ使用できないものと判断した。さらに、実際の試験にあたっては、被験物質の用量を数段階設定するとともに、照射線量についても、数線量を設定することが望ましいと考えられた。

F. 引用文献

1)Chetelat, A., Albertini, S., Dresp, J.H., Strobel, R. and Gocke, E. , Photomutagenesis test development: 1. 8-Methoxypsoralen, chlorpromazine and sunscreen compounds in bacterial and

yeast assays., *Mutat. Res.*, Vol. 292, 2241-250, 1993.

2)Henderson, L., Fedyk, J., Bourner,C., Windebank, S., Fletcher, S. and Lovell, W., Photomutagenicity assays in bacteria: factors affecting assay design and assessment of photomutagenic potential of para-aminobenzoic acid., *Env. Molec. Mutagen.*, vol.9, 459-465, 1994.

3) Jose, J.G., Photomutagenesis by chlorinated phenothiazine tranquilizers., *Med. Sci.*, vol.76, 469-472, 1979.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第28回日本環境変異原学会で発表予定

分担研究報告書

4. ショウジョウバエを用いる光遺伝毒性試験の研究

分担研究者 原 巧 食品薬品安全センター 秦野研究所 遺伝学研究室

研究要旨

本研究は、*in vivo* の変異原性試験の中では検出感度が高く、比較的簡便なショウジョウバエ翅毛スポットテストを、光毒性試験として確立することを目的としている。

今年度は、UVA を含むサンライトシュミレーター (SOL500, Dr Hönle) を用いて、最適な照射条件の検討を行った。キイロショウジョウバエの多翅毛系統の雌と炎毛系統の雄を交配し、F₁ 個体を実験に用いた。3齢幼虫期に光照射を行い、羽化した成虫の翅を顕微鏡下で観察し、異常な翅毛の集まりである、翅毛スポットを計数した。翅毛スポットには、多翅毛または炎毛の小シングルスポットおよび大シングルスポットと、多翅毛と炎毛のスポットが隣接したふたごスポットがある。

UVA の照射強度は 1mW/cm² とし、非照射群、3 時間照射群 (10.8 J/cm²) および 5 時間照射群 (18.0 J/cm²) を設けた。いずれのスポットの頻度も、用量に依存した増加傾向を示したが、統計学的な有意差は大シングルスポットと全種類のスポットの合計でのみ認められた。3時間照射群では、大シングルスポットおよび全種類のスポットの合計の頻度がそれぞれ非照射群の約9倍および約2倍に増加した。この照射量は全スポットを基準にすれば適切であるが、大シングルスポット (LS) を基準にすれば高すぎるものと判断される。今後は、8-methoxypsoralen 等の *in vivo* 光遺伝毒性物質を用いて、この試験系の最適な照射条件を検討する予定である。

A. 研究目的

これまで *in vitro* の各種の試験系を用いて、多くの光遺伝毒性物質が検出されてきたが、これらの化合物の人間における安全性を評価するためには、*in vivo* の組織における作用を調べるのが重要である。しかし、今までに *in vivo* の試験系により光遺伝毒性を評価された化合物は少ない。Negishi ら¹⁾はショウジョウバエの翅毛スポットテストにより、8-methoxypsoralen が *in vivo* でも光遺伝毒性を示すことを明らかにした。この試験系は *in vivo* の変異原性試験の中では検出感度が高く、比較的簡便である²⁾。

本研究は、光遺伝毒性試験としてのショウジョウ

バエ翅毛スポットテストを確立し、*in vitro* 光遺伝毒性物質について、*in vivo* での光遺伝毒性作用を調べることを目的として行っている。

今年度は、UVA を含むサンライトシュミレーター (SOL500, Dr Hönle) を用いて、適切な照射条件の検討を行った。

B. 研究方法

1. ショウジョウバエの系統および飼育方法

キイロショウジョウバエの多翅毛系統 (mwh, jv; spa^{md}) の雌と、炎毛系統 (fir³/TM3, Ser) の雄を交配し F₁ 個体を実験に用いた。インスタント培地に 10 時間産卵させ、72±5 時間後に 3 齢幼虫を培地

から分離して光照射を行った。飼育温度は $25 \pm 1^\circ\text{C}$ であった。光照射時を除いて幼虫の飼育は暗所で行った。

2. 光照射

上記の幼虫を、1mL の 0.25M スクロース液が入ったプラスチック製シャーレ(直径約 3cm)に移して光照射を行った。照射には UVA を含むサンライトシミュレーター (SOL500, Dr Hönle) を用いた。UVA の照射強度は $1\text{mW}/\text{cm}^2$ とし、非照射群、3 時間照射群および 5 時間照射群を設けた。3 時間照射群の照射量は $10.8 \text{ J}/\text{cm}^2$ 、5 時間照射群の照射量は $18.0 \text{ J}/\text{cm}^2$ に相当する。

3. 標本作製

照射後幼虫をインスタント培地に移して飼育を続けた。羽化した成虫は、70%エタノール中で保管した。成虫には翅形が丸い個体と、翅形が切れ込んだ個体がある。翅形が丸い個体は、マーカー遺伝子である多翅毛 (mwh) および炎毛 (flr3) の突然変異に関して、共にヘテロ接合になっていて、幼虫期に突然変異が起きると翅毛スポットを生じる。この個体の翅を先の細いピンセットで切り離し、スライドグラス上に並べて Faure 液で封入した。

4. 標本観察

400 倍の顕微鏡下で、異常な翅毛の集まりである翅毛スポットの観察を行った。翅毛スポットには、多翅毛または炎毛の小シングルスポット (SS) および大シングルスポット (LS) と多翅毛と炎毛のスポットが隣接したふたごスポット (TS) がある。SS と LS は

染色体組換え、遺伝子突然変異および染色体の小欠失により生じるが、TS は染色体組換えのみから生じる。観察結果はスポットの種類ごとに集計した。

5. 有意差検定

スポットの種類ごと、および全種類のスポットの合計 (全スポット) について、非照射群と各照射群の間で、Kastenbaum and Bowman の表 (1970) により有意差検定を行った。

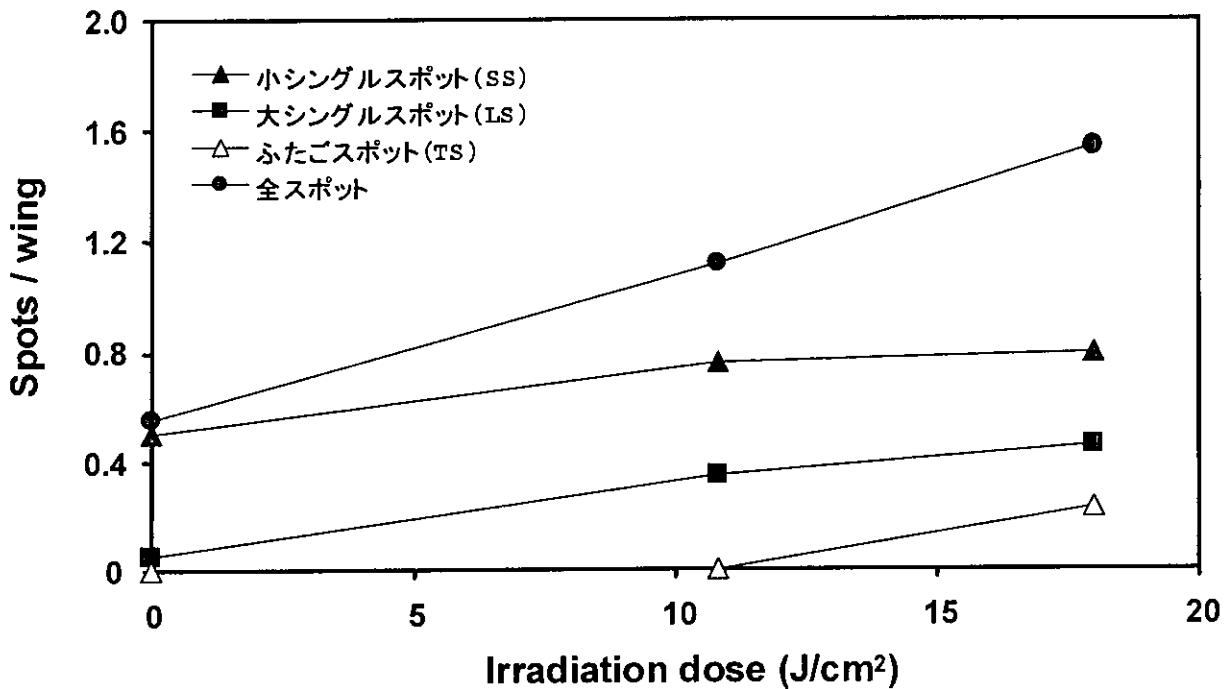
C. 研究結果

翅毛スポットの観察結果を表に、用量反応曲線を図に示す。非照射群では、観察されたスポットはほとんど SS で、全スポットの頻度は 0.55 (翅 1 枚当たり 0.55 個) であった。SS は照射時間に依存して直線的な増加を示し、 $18.0 \text{ J}/\text{cm}^2$ 照射群ではスポット頻度が非照射群の 1.7 倍となったが、統計学的に有意な増加は認められなかった。LS も同様に直線的な増加を示し、 $10.8 \text{ J}/\text{cm}^2$ 照射群と $18.0 \text{ J}/\text{cm}^2$ 照射群で 5% 水準で有意な増加を示した。 $10.8 \text{ J}/\text{cm}^2$ 照射群ではスポット頻度が非照射群の約 7 倍、 $18.0 \text{ J}/\text{cm}^2$ 照射群では約 9 倍の頻度であった。TS は、非照射群と $10.8 \text{ J}/\text{cm}^2$ 照射群では観察されなかったが、 $18.0 \text{ J}/\text{cm}^2$ 照射群の頻度は 0.23 であった。全スポットも直線的な増加を示し、 $10.8 \text{ J}/\text{cm}^2$ 照射群では 5% 水準、 $18.0 \text{ J}/\text{cm}^2$ 照射群では 1% 水準で有意な増加を示した。3 時間照射群では非照射群の約 2 倍、 $18.0 \text{ J}/\text{cm}^2$ 処理群では非照射群の約 3 倍の頻度であった。

表 サンシミュレータ照射による翅毛スポットの誘発

照射線量	観察枚数	小シングルスポット		大シングルスポット		ふたごスポット		全スポット	
		数	頻度	数	頻度	数	頻度	数	頻度
$0 \text{ J}/\text{cm}^2$	20	10	0.50	1	0.05	0	0.00	11	0.55
$10.8 \text{ J}/\text{cm}^2$ ($1\text{mW}/\text{cm}^2$, 3時間)	17	13	0.76	6	0.35	0	0.00	19	1.12
$18.0 \text{ J}/\text{cm}^2$ ($1\text{mW}/\text{cm}^2$, 5時間)	13	11	0.85	6	0.46	3	0.23	20	1.54

図 Dose response curve of spot frequency



以上の結果から、サンライトシュミレーターの光照射による、LS の誘発が明らかとなった。また、SS と TS についても明瞭な増加傾向が認められたことから、サンプルサイズが小さかったために、有意差が得られなかったものと推察される。照射群のスポット頻度から非照射群のスポット頻度を差し引いた誘発スポット頻度は、LS、SS、TS の順に高かった。

D. 考察

ショウジョウバエ翅毛スポットテストによる、光遺伝毒性試験を確立するためには、適切な照射量を選ぶことが重要である。前臨床試験の国際的なハーモナイゼーションのために、先ごろ開かれた IWGTP においては、光遺伝毒性試験の照射量としては、小さな遺伝毒性効果を示す用量、または何らかの光毒性を示す用量が適切であると報告している。本研究の結果では、UVA 1 mW/cm² の3時間照射 (10.8 J/cm²) で LS および全スポットの頻度が有意に増加し、LS では非照射群の約 7 倍、

全スポットでは約2倍の値を示した。したがって、この照射量は全スポットを基準にすれば適切であるが、LS を基準にすれば高すぎることになる。今後は、8-methoxypsoralen 等の in vivo 光遺伝毒性物質を用いて、この試験系の最適な照射量を検討する予定である。

翅毛スポットが UVB によって誘発されることは、以前から知られており、また UVA によっても誘発されることが、Negishi ら¹⁾により示されている。本研究に用いた光源は、トプコン社製の線量計による比較では、UVB が UVA の20分の1程度の線量しか含まれていなかった。したがって、本研究で誘発された翅毛スポットは主に UVA によるものと考えられた。しかし、本研究と Negishi らの研究は、同じショウジョウバエの系統を用い、ともに産卵の約 72 時間後に照射しているにもかかわらず、詳細な点が異なっている。本研究の5時間照射群 (UVA の照射量 18 J/cm²) では、LS の頻度が非照射群の約9倍に増加したが、SS では 1.7 倍にしか増加

しなかった。これに対して、Negishi らの結果では、ほぼ同等の照射量である12時間処理(UVA の照射量約 19 J/cm²)で、両スポットとも非照射群の約2倍に増加していた。

Negishi ら実験では、UVB はほとんど含まれていなかったが、本研究では若干の UVB が含まれていた。したがって、両実験結果の相違は照射光のスペクトラムの違いによる可能性が高い。もう一つの可能性としては、照射スケジュールの違いが考えられる。本研究では1mW/cm²の UVA を5時間照射したのに対し、Negishi ら実験では約 0.45 mW/cm²のUVAを12時間照射している。この違いが、誘発されるスポットの違いを生じたのかもしれない。

E. 結論

サンライトシュミレーター(SOL500, Dr Hönle)を用いて、ショウジョウバエ翅毛スポットテストによる光遺伝毒性試験を行う場合には、UVA 1 mW/cm²の3時間照射(10.8 J/cm²)で遺伝毒性効果を示すことがわかった。しかし、スポットの種類によってその効果の程度が異なるため、最適な照射量を定めるためには 8-methoxypsoralen 等の in vivo 光遺伝毒性物質を用いた検討を行う必要がある。

F. 引用文献

- 1) Negishi, T., Tanabe, F. and Hayatsu, H., The genotoxicity of UVA irradiation in *Drosophila melanogaster* and the synergistic action of 8-methoxypsoralen and UVA., *Carcinogenesis*, Vol. 13, 1433-1436, 1992
- 2) Graf, U., Wügler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B. and Kale, P.G., Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Environ. Mutagen.*, Vol. 6, 153-188, 1984.

G. 研究発表

1. 論文発表
準備中
2. 学会発表
準備中

分担研究報告書

5. 哺乳動物を用いる変異原性試験に対する光照射の影響に関する研究

分担研究者 渋谷 徹 食品薬品安全センター 秦野研究所 遺伝学研究室室長

研究要旨

近年、種々の化学物質曝露に起因する突然変異が、しばしば紫外線照射により修飾されることが知られ、そのため光照射による遺伝毒性の増強が問題視されている。本研究では、哺乳動物生体内において、光遺伝毒性検出法を確立する研究の一環として、トランスジェニックマウス試験 (TG マウス試験) の皮膚における試験に着目した。その予備試験として、種々の操作段階における条件の検討を開始した。今回はTGマウスを用いて皮膚のDNA単離を試みた。

A. 研究目的

種々の化学物質曝露に起因する突然変異は、しばしば紫外線照射により修飾されることが知られ、光照射による遺伝毒性の増強が問題視されている。しかし、これらについての光遺伝毒性試験のほとんどは *in vitro* での試験系で実施されており、動物の生体内での試験方法はいまだ確立されていない。

本研究では、哺乳動物生体内において、優れた光遺伝毒性検出法を確立する研究の一環として、遺伝子突然変異試験としては、皮膚における *in vivo* 変異原性試験法に着目した。その予備試験として、今回は TG マウスを用いて皮膚からの DNA 単離を試みた結果を報告する。

B. 研究方法

供試動物として、LacZ 遺伝子を導入した遺伝子改変マウス (C57BL/6、雄、15 週令) を用いた。動物は、7,12-dimethylbenz[a]anthracene (和光純薬、以下、DMBA) の腹腔内投与 (20mg/kg) または陰性対照 (同容量のオリブオイルを投与) を各 2 匹ずつ用いた。屠殺後に剃毛し、採取した背部皮膚は、

DNA 抽出時まで -80°C 以下で凍結保存した。DNA 抽出法として、Puregene DNA isolation kit (Gentra 社) を用いる方法 (以下、Puregene 法) およびフェノール/クロロホルムで抽出をおこなう方法 (以下、フェノクロ法) をそれぞれ適用し、その結果を比較した。

1) Puregene 法; 1 サンプルあたり、約 20mg の皮膚組織を用いた。皮膚は、先端が細い鋏刀およびピンセットを用いて細切し、ホモジナイズ後、 65°C の細胞溶解液中にて 60 分間インキュベートした。その後、Rnase 処理し、 37°C で 60 分間インキュベートし、蛋白沈降液を加えて遠心分離し、上清をイソプロパノールと混和させて DNA を抽出した。さらに、エタノールを用いて、抽出した DNA を洗い、DNA 溶解液を 1 サンプルあたり $20\mu\text{l}$ 加えた後、室温下で一昼夜放置し、DNA 含量測定機 (GeneQuant、Pharmacia Biotech 社) を用いて各サンプルの DNA 含量を測定した。

2) フェノクロ法; 1 サンプルあたり、約 100mg の皮膚組織を用いた。皮膚は、先端が細い鋏刀およびピンセットを用いて細切し、ホモジナイズ後、ProteinaseK を加えて、 50°C 下にて、一昼夜インキ

ュベートした。その後、フェノール:クロロホルム混液を加え混和させた後、遠心分離後に上層を分取する操作を繰り返し、上層の DNA 含有部分を分別した。それにエタノールを加えて DNA を析出させ、釣り上げた可視 DNA 塊をエタノールで洗浄後、TE-4 緩衝液を 1 サンプルあたり 100 μ l 加えた後、室温で一昼夜放置し、DNA 含量測定機を用いて各サンプルの DNA 含量を測定した。

C. 研究結果

Puregene 法では、DMBA 投与例および対照例の各 2 例のいずれも可視 DNA 塊を確認し、それらを DNA 含量測定に供した。フェノクロ法では、対照例の 1 例において、可視 DNA 塊を確認できなかったが、陰性対照の他の 1 例および DMBA 投与例の 2 例についてはそれを確認出来、これら 3 例を DNA 含量測定に供した。含量成績を表 1 に示す。

表 1 抽出法による DNA の回収率の比較

抽出法	サンプル	吸光度 (260 nm)	純度	含量 (μ g/mL)
Puregene	Cont-1	0.140	3.48	1050
Puregene	Cont-2	0.160	2.92	1200
Puregene	DMBA-1	0.077	18.73	552
Puregene	DMBA-2	0.132	3.55	947
Phenochlo	Cont-1	0.062	1.89	1051
Phenochlo	DMBA-1	0.026	0.90	492
Phenochlo	DMBA-2	0.086	1.94	1619

D. 考察

今回の抽出に用いた方法は、いずれも TG マウスの DNA 単離に汎用されるが、皮膚は比較的細胞数(密度)が疎であり、線維や角質層などに富むことを考慮し、今回は通常よりも組織採取量を多く、また、細胞溶解処理を長時間処理した。しかし、フェノクロ法の 4 サンプル中 1 サンプルからは DNA を回収できなかった。また、両抽出法とも、DNA 含量測定結果にばらつきがみられ、方法のさらなる工夫が課題とされた。なお、puregene 法はフェノクロ法よりも簡便な操作で実施できるため、この方法で確実に DNA 単離ができることが望ましいと考えられる。今後は、採取組織量の再検討および効果的な細切ならびにホモジナイズ方法を検討すべきといえる。

なお、今回の操作に用いたサンプルについて

は、さらにパッケージング効率の判定、NC、PC の突然変異率などの測定を実施し、基礎的なデータを蓄積させていく予定である。

また、生体内での皮膚の染色体異常を検出する試験系として、ラット皮膚小核試験の導入をライオン株式会社との共同研究で開始した。この方法は TG マウス試験に比べると比較的簡単に実施することができる。これら 2 つの方法を併用することにより、哺乳動物生体内における光遺伝毒性を遺伝子突然変異および染色体異常の 2 つの観点から試験することが出来ることになる。

E. 結論

マウス皮膚から DNA の単離が可能となった。しかし、両抽出法ともに、DNA 含量測定結果にばらつきがみられ、方法のさらなる工夫が課題とさ

れた。なお、Puregene 法はフェノクロ法よりも簡便な操作で実施できるため、この方法で確実に DNA 単離ができることが望ましいと考えられる。今後は、採取組織量の再検討および効果的な細切ならびにホモジナイズ方法を検討すべきといえる。

なお、今回の操作に用いたサンプルについては、さらにパッケージング効率の算定さらに陰性対照および陽性対照での突然変異率の測定を行い、基礎的なデータを蓄積してゆく予定である。

F. 引用文献

1. Gossen, J.A., DeLeeuw, W.J., Tan, E.C., Zwarthoff, F., Berends, F., Lohman, D.L., Knook, D.L. and Vjig, J., Efficient rescue of integrated shuttle vectors from transgenic mouse: A model for studying mutations in vivo, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, Vol. 86, 7971-7975, 1989
2. Hachiya, N., Yajima, N., Hatakeyama, S., Yunno, K., Okada, M, Umeda.Y., Wakata, A. and Motohashi, Y. , Induction of lacZ mutation by 7,12-dimethylantracene in various tissues of transgeneic mice, Mutat. Res., in press

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

分担研究報告書

6. 実験動物を用いる光毒性試験における照射条件の検討

分担研究者 大原 直樹 食品薬品安全センター秦野研究所 薬理学研究室室長

研究要旨

先に、数種類の既知の光毒性物質についてモルモットにおける急性皮膚光刺激性成績と培養細胞による光毒性試験成績とを比較した。その結果、モルモットにおける急性皮膚光刺激性試験について、成績とは別に、媒体が異なる物質間での皮膚の透過性の相違、有色の被験物質への対応、限度試験とする濃度、in vivo の試験成績と in vitro の試験成績との比較を行う場合のパラメータ等の問題点が明らかとなった。今回はこの中の媒体についての問題を解決する目的で、適用方法の検討を行い、適切な適応条件を設定した。

A. 研究目的

培養細胞による光毒性試験法の有用性を検討する目的で、モルモットにおける急性皮膚光刺激性試験を実施し、成績の比較を行ったが、比較する上でモルモットにおける急性皮膚光刺激性試験について1. 溶媒の問題(脂溶性の高い溶媒であるか否かで皮膚への浸透性が変わるため、溶媒により検出感度がかかなり低下することが予想された)、2. 色素の問題(有色素の被験物質を塗布した場合、照射した紫外線が減弱する可能性がある)、3. 濃度の問題(光毒性の有無を判断する上で、限度試験における用量をどのように設定するのか)、4. in vivo の試験成績と in vitro の試験成績との比較方法の問題(in vivo の照射量は必要十分量であるため、照射線量をもって比較することに意味があるのか)等が明らかとなった。今回は、この中の1. 溶媒の問題を検討するため、陽性対照物質を用いて通常行う塗布の他に適用方法を検討した。

B. 研究方法

1. 使用動物

5週齢の雄の Hartley 系 (Std:Hartley、クリーン動物)モルモット(日本エスエルシー)を購入し、検疫と飼育環境への順化を兼ねて5日間飼育した後、一般状態に異常の認められなかった動物 12 匹(体重 362~382g)を使用した。動物は、温度 23 ± 2℃、湿度 45~60%、換気回数約 15 回/時、照明 12 時間(7時~19 時)に制御された飼育室内で、金属製金網床ケージ(350W×500D×210H mm)に1匹ずつ収容し、固型飼料(RC4、オリエンタル酵母)と水道水(秦野市水道局給水)を自由に摂取させて飼育した。

2. 適用物質

本試験における適用物質は、OECD 化学物質試験法ガイドライン案〔第7号、急性皮膚光刺激性試験(B)、1994 年3月 25 日〕に従って、その陽性対照物質である 0.005% 8-methoxypsoralen (シグマ・アルドリッチ・ジャパン、95 v/v%エタノールに溶解した)とした。

3. 群構成

対照群として通常の塗布を行う群を設定し、適用経路の検討を行う群として角化層剥離(セロハンテープで角化層の表層を剥離)および擦搔(注射針で皮膚に#型をつけた)を行った後に塗布を行う群と、皮内投与群を設定した。動物数は各群3匹とし、検疫終了時の体重に基づいて体重別層化無作為抽出法により行った。

4. 適用および照射

あらかじめ(検体適用前 24 時間以内)バリカンとシェーバーを用いて剪毛した動物の背部皮膚に $1.5 \times 1.5 \text{ cm}$ の検体適用部位を6か所(左右各3段)設け、角化層剥離群および擦搔群にはそれぞれの処置を施した。各群とも、この検体適用部位の下段から順に、適用後照射までの時間が 45、30 および 15 分となるように検体を各 0.05 mL、マイクロピペットを用いて適用した。適用検体を自然乾燥させた後、背部右側をアルミホイルで覆い遮光して(非照射対照)UV 照射を開始した。光源にはUV-A 灯を14本(医療用紫外線照射装置デルマレイ、東芝)用い、照射距離約 50 cm で照射線量(UV-A)が 10 J/cm^2 となるように照射した(UV-A の放射照度は約 5.1 mW/cm^2 、照射時間は 32 分 41 秒であった)。

5. 皮膚反応の判定

照射前(検体適用後)、照射後1、24、48 および 72 時間にそれぞれの適用部位について次の基準により判定を行った。

A. 紅斑および痂皮形成

- 0 - 紅斑なし
- 1 - ごく軽度の紅斑(微かに認められる程度)
- 2 - 軽度の紅斑(紅斑が明瞭)
- 3 - 中程度の紅斑
- 4 - 重度の紅斑および焼痂形成(赤紫色の紅斑、皮膚の深部にまで損傷:虚血・出血・痂皮形成)

B. 浮腫形成

- 0 - 浮腫なし
- 1 - ごく軽度の浮腫(微かに認められる程度)
- 2 - 軽度の浮腫(隆起がわかる程度)
- 3 - 中程度の浮腫(およそ1mm 程度の隆起)
- 4 - 重度の浮腫(隆起が1mm 以上)

6. データの解析

各動物の適用部位毎に、照射後 24、48 および 72 時間における検体適用部位の評点を合計し、3で除して刺激性指数(照射部位:光刺激性指数、非照射部位:一次刺激性指数)を算出した。さらに各群ごとに、照射部位の光刺激性指数の平均値を算出し、光刺激性の判定を行った。

C. 研究結果

皮内投与群を除く各群で非照射部位での一次刺激性は認められず、照射部位での光刺激性指数は表1の通りであった。なお、皮内投与群では非照射部位で紅斑が認められたため、刺激性指数は算出しなかった。

表1の結果から、角化層の表層を剥離してから適用した場合、より安定した良好な結果が得られることが示唆された。また、適用後照射までの時間が15分という短時間でも30分の場合と同様の結果が得られることが明らかとなった。

また、照射から適用までの時間が短時間でも良好な結果となることが明らかとなったため、皮膚への浸透時間が異なる溶媒に対応する方法として、0.05 mL の検体を2度に分けて(0.025 mL/回)適応し、1度に適応した場合と比較することとし、同じく5週齢の雄の Hartley 系モルモット6匹を用いて、次のような実験を行った。すなわち、動物を3匹ずつ2つに分け、初めの3匹は上段を1回適用部位、下段を2回適用部位とし、残りの3匹はその逆の上段を2回適用部位、下段を1回適用部位とした。