

200000696A

別添2

厚生科学研究研究費補助金

生活安全総合 研究事業

化学物質の光毒性に係る評価方法に関する研究

平成12年度 総括研究報告書

主任研究者 小野 宏

平成13(2001)年 4月

別添 3

目次

I. 総括研究報告書	1
化学物質の光毒性に係る評価方法に関する研究 小野 宏	
II. 分担研究報告書	
1. 化学物質の光毒性試験法に関する調査研究 小野 宏	7
2. 培養細胞を用いる各種試験法における光毒性の検討 田中 憲穂	9
3. 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 澁谷 徹	15
4. モルモットおよびラットにおける急性光毒性試験法（経口投与） 大原 直樹	23
5. ショウジョウバエを用いる光遺伝毒性試験の研究 原 巧	33
6. 新規一重項酸素検出プローブの開発 長野 哲雄	38
7. 光照射による皮膚細胞突然変異の検出 林 真	46
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	51

化学物質の光毒性に係る評価方法に関する研究

主任研究者 小野 宏 (財)食品薬品安全センター
秦野研究所 所長

研究要旨

本研究では、光照射によって毒性や遺伝毒性が増強される化学物質に対する安全性試験法を確立し、併せてその作用機序を明らかにすることを目的とする。

現在までに、培養細胞や実験動物を用いて、基礎的な実験条件の設定や候補物質のスクリーニングを行ってきた。その結果、多環芳香族炭化水素類などの一般化学物質において光遺伝毒性誘発性が認められ、低濃度においても光照射下で毒性作用を発揮することが明らかになった。そこで、このような現象がどの範囲の化学物質に及ぶのか、またどのような条件で実際の生体に影響を発現するかを、その発生機序の解明を含めて検討する必要がある。光遺伝毒性の作用機序として、光化学反応によるフリーラジカルの発生、関与が想定されるので、化学物質と光照射の同時処理の条件での活性酸素種を高感度に検出する手法の開発を試みた。また、近年、DNAアレイを用いて多数の遺伝子の発現変化を短時間で分析することが可能になった。これを応用し、光遺伝毒性誘発時に生ずる種々の遺伝子の発現変化を調べることで、その作用機序について検討を行った。

実際の生体に対して、この現象がどの程度の健康影響を有するかを評価するために、各種の生物モデルを用いて、光照射の化学物質の毒性への影響についても調査を行った。

分担研究者

小野 宏 (財)食品薬品安全センター
秦野研究所 所長

田中 憲穂 (財)食品薬品安全センター
秦野研究所細胞毒性学研究室 室長

渋谷 徹 (財)食品薬品安全センター
秦野研究所遺伝学研究室 室長

大原 直樹 (財)食品薬品安全センター
秦野研究所薬理学研究室 室長

原 巧 (財)食品薬品安全センター
秦野研究所遺伝学研究室 上級研究員

長野 哲雄 東京大学大学院薬学系研究科
薬品代謝化学教室 生物有機化学 教授

林 真 国立医薬品食品衛生研究所
変異遺伝部 部長

A. 研究目的

化学物質の中には、光照射により、その毒性や遺伝毒性が増強されるものがある。近年、これらの光毒性・光遺伝毒性物質の人体に対する影響が注目されるようになり、OECD や EMEA(The European Agency for the Evaluation of Medical products)で安全性試験ガイドラインの整備が進め

られつつある。しかしながら、現在までのところ、試験系としての本格的評価はなされていない。また、光毒性・光遺伝毒性物質がいかなる機構によって毒性を発現するのか明確にされていない部分が多い。これらの問題を明らかにするため本研究では、

a. 主に既知の光毒性物質を用いて、化学物質の構造とその活性相関を検討した上で、

b. 光毒性発現の様式とその条件について調べ、各種の *in vitro* の試験系を用いてそれぞれの化学物質の毒性作用を評価する。その上で、これらの化学物質を検出する簡便な実験系を確立する。

c. 皮膚細胞での紫外線特異的突然変異や小核誘発をマーカーとして、実験動物を用いて実際の生体への影響を解明し、この現象の発現機構を明らかにすると同時に、最適な評価系を作出する。

d. 確立した評価系を応用し、光毒性・光遺伝毒性物質の作用機序や、遺伝子レベルでの影響について検討を行う。

これらの結果から、光発がんを含むヒトの健康への影響を評価するための基礎データを得ることを目的とする。

B. 研究方法および研究結果

1) 化学物質の光毒性試験法に関する調査研究 (小野)

光照射によって化学物質の毒性が修飾されることの試験法に関する国際的動向の調査のため、OECD 試験法ガイドライン計画と関係する諸会議に出席して、この方面の情報を確実に得ることに努めた。

毒性試験法は、科学の進歩に基づいて、また、動物愛護運動への対応の必要もあって、改良・開発が盛んに試みられており、急性毒性試験については、動物の数と苦痛を最小とするような代替法が従来の試験法に置き替わろうとしている。動物を用いる試験の代替法として *in vitro* 試験法の開発が進められている。*In vitro* 試験法が毒性試験代替法として採用されるまでには、厳しい論理に基づい

た有用性の確認 (Validation) が必要であり、光毒性検査法についても、有用性確認試験が重ねられ、有用性の検討が行われている。そのため相当の時間の経過があったが、ようやく *in vitro* 光毒性試験法の提案が OECD になされた状況となっている。

2) 培養細胞を用いる各種試験法における光毒性の検討 (田中)

本研究では、これまでに培養細胞を用いた、細胞毒性、小核試験、突然変異試験等により、光毒性発現と遺伝毒性について調べ、プラスミドを用いる新しい DNA 切断試験法を報告した。本年度は、

(1) チャイニーズ・ハムスター培養細胞株 CHL/IU を用いた光 *in vitro* 小核試験を用いて、溶解度が異なる C60 および C60-シクロデキストラン包摂体の光遺伝毒性の比較し、化学物質の光遺伝毒性誘発性は、溶液中の分子状態によって変化しうることを明らかにした。

(2) 林 真 博士 (国立医薬品食品衛生研究所) との共同実験により、化学物質の光遺伝毒性誘発の遺伝子レベルでの機序解明に取り組んだ。モデル物質として、リボフラビン (ビタミン B2) を選び、ヒト血液腫瘍由来培養細胞株である TK6 を用いて光遺伝毒性誘発性を調べ、有意に小核が誘発された濃度での種々の遺伝子の発現変化を検索した。

(3) 簡便な *in vivo* 光遺伝毒性試験系として有望と考えられる、げっ歯類を用いた皮膚小核試験について、感度が鈍い問題点を改善すべく、*in vivo* で化学物質処理後、*in vitro* 培養系に移して細胞増殖を誘導する手法を検討し、モデル化学物質のマイトマイシン C 処理を処理した皮膚細胞について、数倍の感度向上を実現した。

3) 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 (渋谷)

本研究では、すでに 皮膚小核試験として、ラット背部皮膚の表皮細胞の小核を検出する試験系が

開発されている方法をマウスに応用し、これに光照射を組み合わせた in vivo 光皮膚小核試験の確立を目指した。

(1) これまで主に in vitro 試験系で光増強作用が知られている 8-Methoxypsoralen (8-MOP) および Chlorpromazine (CPZ) を用いて、C57BL/6 マウスの光皮膚小核試験を実施した。その結果、8-MOP においては光照射によって皮膚小核の誘発に明らかな増強作用が認められた。しかし CPZ では低用量において増強作用が認められたが、高用量では認められなかった。

(2) in vivo 光遺伝毒性の発現において、DNA 修復や apoptosis の関与が想定されるために、C57BL/6 マウスを遺伝背景にもつ p53 ノックアウトマウスを導入し、PCR 法を用いてマウス個体での p53 の遺伝子型分析法を検討した。

(3) C57BL/6 マウスを遺伝背景にもつ Pun マウスを導入・育成し、色素網膜上皮のメラニンの有無を観察することによって、細胞単位で遺伝子内組換えを容易に検出出来る試験系の開発を行い、in vivo 光遺伝毒性試験への適用についての検討を行った。

4) ショウジョウバエを用いる光遺伝毒性試験の研究 (原)

これまで、照明装置としてソーラーシュミレーター (SOL500, Dr Hönle) を用いて、光遺伝毒性物質として知られる 8-メキシソラレン (8-MOP) に関して、照射条件等の基礎的な検討を行ってきた。その結果、産卵後 72 時間の 3 齢幼虫を 8-MOP 溶液中に入れ、UVA の照射強度 1 mW/cm^2 で 5 時間の照射 (18 J/cm^2) を行うことにより、翅毛スポット頻度の著しい増加 (約 16 倍) を検出する実験方法を確立した。今年度は、この方法を用いて光遺伝毒性物質であり、光感作性物質としても知られるクロルプロマジン (CPZ) について光遺伝毒性試験を実施した。その結果、サンライトシュミレーターの照射による CPZ の光遺伝毒性は検出されなかった。8-MOP と

CPZ は共に光遺伝毒性物質として知られ、渋谷らが行った微生物を用いる光遺伝毒性試験 (光 Ames 試験) においても陽性結果が得られている。しかし、これらの化合物を容易に検出できる検定菌株の種類が異なっていたことから、両化合物の光遺伝毒性発現メカニズムの相違により、翅毛スポットテストの結果が異なったものと推察される。今後は、どのような発現メカニズムの化合物が、この試験系で検出可能なのかを検討していく必要がある。

5) モルモットおよびラットにおける急性光毒性試験法 (大原)

昨年度までに、急性皮膚光刺激性試験について OECD 化学物質試験法のガイドライン案をもとに多くの化学物質に対応できるような条件を検討し、媒体の選択方法および皮膚への投与方法 (塗布なし皮内投与) をまとめた。今回は、光毒性物質の全身暴露を視野に入れた試験条件を設定するため、モルモットの単回経口投与による、モデル物質 8-MOP の急性光毒性試験法の検討を行ったところ、皮膚塗布法と同様に陽性の反応を得た。また、陽性対照物質として 8-MOP を用いる場合は、中程度の皮膚反応を示す条件、すなわち 10 mg/kg の用量で投与し、投与後約 2 時間に 10 J/cm^2 の線量を照射することが好ましいと考えられた。

また、安全性試験で一般的に用いられるラットにおいても、8-MOP を用いて単回経口投与による急性光毒性試験法を検討し、投与量 30 mg/kg 、照射線量 5 J/cm^2 の条件で投与後約 2 時間に照射を開始した場合に、明確な背部皮膚反応を得た。また、皮膚だけでなく、耳介にも皮膚反応が観察されたが、この場合は、投与後約 1.5 時間に照射を開始することにより、良好な結果を得ることができた。

6) 新規一重項酸素検出プローブの開発 (長野)

一重項酸素は活性酸素種であり、その特徴ある反応性から生理機能が注目されている活性種である。本研究者らは、本厚生科学研究においてこの

活性酸素種をバイオイメーキングとして捉える生細胞蛍光プローブの開発研究を行っている。昨年報告した DPAX は一重項酸素を特異的に捉える蛍光プローブとしては世界で初めてのものであり、操作の簡便さ、特異性など優れた特徴を有していた。しかしながら、生細胞中から一重項酸素を捉えるには更に1桁高い感度が求められていた。今年度この点を重点的に検討した結果、超高感度一重項酸素検出プローブ DMAX の開発に成功した。DMAX を好中球などの細胞系に適応し、生理的条件下での $^1\text{O}_2$ 検出を行った。好中球ではPMA刺激によりMediumの蛍光強度の増加が観察され、生理的条件下での $^1\text{O}_2$ の検出に初めて成功した。

7) 光照射による皮膚細胞突然変異の検出 (林)

紫外線特異的変異であるCCからTTへの変化を、マウス癌抑制遺伝子p53遺伝子を指標として検出するための変異アレル特異的PCR法の確立を行った。p53遺伝子のコドン238にCCからTTの変異を持つマウス皮膚癌細胞株を入手し、変異DNAサンプルを一定濃度で含むサンプルを作成して条件検討を行った結果、CC to TT変異を 10^{-6} という高感度で検出する試験系が確立できた。

一方、新しい試みとして、最近利用可能となったDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析技術を用い、約1000個の遺伝子についてヒト培養細胞株TK6におけるリボフラビンの光毒性発現時に発現の変化を解析したところ、細胞周期関連遺伝子、ミトコンドリア関連遺伝子、Gタンパク関連遺伝子、ユビキチン関連遺伝子、DNA修復酵素などの数種の遺伝子について2倍以上の発現変化が認められた。

C. 考察

田中は、これまでに確立したin vitro光遺伝毒性試験法を用いて、光遺伝毒性物質の溶液中での分子状態が光遺伝毒性誘発性に与える影響について検討を行い、周囲の水分子や酸素分子と相

互作用しやすい状態では、より強い光遺伝毒性を示すことを明らかにした。シクロデキストラン包摂法は、C60以外の化学物質にも適用できることから、光遺伝毒性物質以外にも、水に溶けにくく活性酸素種発生を作用機序とする遺伝毒性物質の評価にも応用可能と考えられる。

また、光遺伝毒性物質の遺伝子レベルでの作用機序を明らかにする研究(本年度・林 真分担研究)において、in vitro試験系で実際の光遺伝毒性作用を調べる役割を担った。

さらに、簡便なin vivo光遺伝毒性試験系として期待されるげっ歯類皮膚小核試験について、in vivoで処理後にin vitro系に細胞を移す方法を検討し、本法の問題点であった、検出感度を向上できることを明らかにした。

渋谷は、これまでに確立した、げっ歯類皮膚細胞を用いたin vivo小核試験の系を用いて、新たに8-メトキシソラレンおよびクロルプロマジンの光遺伝毒性試験を行った。また、DNA修復やapoptosis感受性が低いp53ノックアウトマウスを用いるための予備的な検討を行った。さらに、punマウスをin vivo光遺伝毒性試験に導入するための準備を行った。この実験系は、皮膚以外に光遺伝毒性物質の標的となると考えられる網膜細胞に対する評価系として期待される。

大原は、モルモットおよびラットを用いたin vivo光刺激性試験の試験方法の検討を行った。本年度は、モルモットを用いた試験において、これまでの皮膚塗布に加えて、経口投与による試験条件の検討を行った。通常、in vivo光毒性試験は皮膚塗布によって行われてきたが、経口で化学物質を摂取した場合、暴露が全身に及ぶことから、皮膚塗布による局所的暴露とは異なる作用が生ずるものと考えられるので、化学物質の性質によっては、今回確立した経口投与による試験を実施することが望ましいと考えられる。

また、新たにラットを用いた光毒性試験系について検討し、陽性対照物質の経口投与によって

背部皮膚および耳介に反応を得ることができた。耳介を利用することにより刈毛せず光毒性反応が検出できることから、今後、通常の反復投与毒性試験の中での光毒性試験の利用や、間欠照射による光毒性試験の実施などの応用が考えられる。

原は、これまでに簡便な *in vivo* 光遺伝毒性試験として、ショウジョウバエ翅毛スポットテストが応用可能であることを明らかにしてきた。本年度は、代表的な光遺伝毒性物質であるクロルプロマジンについて試験を行ったが、本法では陰性の結果を得た。このことから、これまでに陽性の結果を得ている 8-MOP とは、光遺伝毒性発現メカニズムの相違によることが推察された。今後は、どのような発現メカニズムの化合物が、この試験系で検出可能なのかを検討していく必要がある。

長野は、これまでに開発してきた一重項酸素検出プローブに、さらなる改良を加えた DMAX を新たに合成した。これを好中球に適応した結果、PMA 刺激による一重項酸素生成を検出することができた。これは好中球からの一重項酸素生成を初めて明らかにしたものである。このプローブの開発にあたっては、始めに合理的な分子設計を行うべく分子軌道計算に基づき蛍光の発光原理を精査した。その結果 photo-induced electron transfer (PET) 機構に基づく発光原理を明らかにした。上記の DMAX はこの原理により開発されたものである。この PET 機構に基づくプローブ開発法は一重項酸素以外のプローブを開発する上においても適用できる一般法となる。

林は、分子生物学的手法を用いて、p53 遺伝子の紫外線特異的な DNA 傷害を検出する系の開発を行い、変異アレル特異的 PCR 法を用いて、変異 p53 を含む混合サンプルから、 10^{-6} という高感度で変異を検出できることを明らかにした。この結果は、本法により、微量のバイオプシーサンプルから、紫外線による変異を検出できる可能性を開く物である。また、新たに DNA アレイ法を用いて、リボフラビン

によって光遺伝毒性を誘発された培養細胞株について、種々の遺伝子の発現変化を検索し、大きく発現量の変化する遺伝子は見つからなかったが、いくつかの遺伝子について2倍を越える変化が得られた。これらの遺伝子がどのように光毒性の発現と関連しているかは、再現性を含め今後さらに解析例を増やして検討を進める必要がある。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. Gocke, E., Mueller, L., Guzzie, P.J., Brendler-Schwaab, S., Bulera, S., Chignell, C.F., Henderson, L.M., Jacobs, A., Murli, H., Snyder, R.D., Tanaka, N., Consideration on photochemical genotoxicity: Report of the international workshop of genotoxicity test procedure working group, *Env. Mol. Mutagenesis*, vol 35, 173-184, 2000
2. Rational design of fluorescein-based fluorescence probes. -Mechanism-based design of a maximum fluorescence probe for singlet oxygen-, Tanaka, K., Miura, T., Umezawa, N., Urano, Y., Kikuchi, K., Higuchi, T., Nagano, T., *J. Am. Chem. Soc.*, in press.
3. Okuda, K., Hirata, T., Hirobe, M., Nagano, T., Mochizuki, M., Mashino, T., Synthesis of various water-soluble C60 derivatives and their superoxide-quenching activity, *Fullerene science and technology*, 8, 89-104, 2000
4. Ohno, T., Suzuki, N., Dokoh, T., Urano, Y., Kikuchi, K., Hirobe, M., Higuchi, T., Nagano, T., Remarkable axial thiolate ligand

effect on the oxidation of hydrocarbons by active intermediate of iron porphyrin and cytochrome P450, J. of Inorganic Biochemistry, 82, 123-125, 2000

5. Suzuki, T., Wang, X., Miyata, Y., Saeki, K., Kohara, A., Kawazoe, Y., Hayashi, M., Sofuni, T., Hepatocarcinogen quinoline induces G:C to C:G transversion in the cII gene in the liver of lambda/lacZ transgenic mice (Muta Mouse), Mutation Research, 456, 73-81, 2000
6. Itoh, T., Suzuki, T., Nishikawa, A., Furukawa, F., Takahashi, M., Wnag, X., Sofuni, T., Hayashi, M., In vivo genotoxicity of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in lacI transgenic (Big Blue) mice, Mutation Research, 468, 19-25, 2000
7. Sato, M., Wada, K., Marumo, H., Nagao, T., Imai, K., Ono, H., Influence of corn oil and diet on reproduction and kidney in female sprague-dawley rats, Toxicological science, 56, 156-164, 2000
8. Effect of butyl benzyl phthalate in sprague-dawley rats after gavage administration: a teo-generation reproductive study, Nagao, T., Ohta, R., Marumo, H., Shindo, T., Yoshimura, S., Ono, H., Reproductive toxicology, 14, 513-532, 2000

2. 学会発表

1. 関 誠、須井 哉、原 巧、澁谷 徹，マウス皮膚小核試験を用いた光遺伝毒性の検出、日本環境変異原学会第29回大会、2000、仙台

2. 中川 ゆづき, 林 久実子, 田中 憲穂, 光遺伝毒性物質の魚類およびマウスを用いる in vivo 検出系の開発、日本環境変異原学会第29回大会、2000、仙台

3. 小原有弘, 鈴木孝昌, 西川秋佳, 古川文夫, 広瀬雅雄, 大和田智彦, 本間正充, 林 真, p53 ノックアウトマウスを用いた MeIQX の変異原性解析、日本薬学会第 120 年会、1999、岐阜

1. 化学物質の光毒性試験法に関する調査研究

小野 宏 食品薬品安全センター秦野研究所 所長

研究要旨

光照射によって化学物質の毒性が修飾されることの試験法に関する国際的動向の調査のため、OECD 試験法ガイドライン計画と関係する諸会議に出席して、この方面の情報を確実に得ることに努めた。

毒性試験法は、科学の進歩に基づいて、また、動物愛護運動への対応の必要もあって、改良・開発が盛んに試みられており、急性毒性試験については、動物の数と苦痛を最小とするような代替法が従来の試験法に置き替わろうとしている。動物を用いる試験の代替法として in vitro 試験法の開発が進められている。In vitro 試験法が毒性試験代替法として採用されるまでには、厳しい論理に基づいた有用性の確認 (Validation) が必要であり、光毒性検査法についても、有用性確認試験が重ねられ、有用性の検討が行われている。そのため相当の時日の経過があったが、ようやく in vitro 光毒性試験法の提案が OECD になされた状況となっている。

A. 研究目的

化学物質の利用における安全性を確保するためには、適切な方法でその毒性を確認し、その情報に基づいて適切な取扱い法を考慮しておくことが基本的な作業であり、化学物質の光毒性に関しても情報が必要なことは同様である。しかし、化学物質の光毒性に関しては、まずその試験法の確立が必要であり、それは化学物質利用の国際性から見て、国際的に承認された、標準的な試験法であることが必要である。この研究では、国際的に標準化された化学物質試験法に関する調査を行い、光毒性を含めた化学物質の安全性評価のために情報を提供することを目的とした。

B. 研究方法

OECD 試験法ガイドライン計画の会議に出席して、国際的な試験法の動向に関して情報を得た。当ガイドライン計画では、各加盟国の代表 (National Co-ordinator) が年 1 回程度会議 (National Co-ordinators Meeting of the Test Guidelines Programme; NCM と略記する) を Paris の OECD 本部で開いており、2000 年度は 5 月 17-19 日に開かれた。個々の試験法の検討には、NCM とは別に、専門家会議 (Experts Meeting)、あるいは諮問専門家会議 (Consultation Meeting) が開かれて、科学的にも妥当な方法であることの確認を行った上で試験法の更新や新設を行っている。今年度は NCM のほかに、急性毒性試験代替法に関する専門家会議が開かれたので、それに参加した。

C. 研究結果

1. OECD 試験法ガイドライン計画第 12 回各国代表者会議 (NCM)

1) 計画進捗状況

- ・長期毒性試験と癌原性試験のガイドライン(451, 452, 453)の改定案は起草中。
- ・皮膚感作性試験の新法, 局所リンパ節試験 (Local Lymph Node Assay; LLNA)は, 英国で Validation が行われ, 米国でも ICCVAM が Workshop を開いてこの方法を支持する結論を出した。試験法の提案の準備中。
- ・光毒性試験(in vitro 3T3 NRU)の提案は, 意見聴取のため回覧中。
- ・皮膚腐蝕性試験代替法(TER 法) の提案も, 意見聴取のため回覧中。
- ・生殖発生毒性試験では, 「出生前発生毒性試験(旧催奇形性試験)」と「二世世代繁殖試験」の改定中。「二世世代」には, 精巣と卵巣の組織検査, 性周期, 精子検査が加えられるほか, ホルモン測定が加えられるが, 性周期の観察は選択項目になる。

2) 動物愛護問題

急性毒性試験や局所刺激性試験等の動物愛護対応の試験法検討が進められる一方, 一般的に動物実験を包括する指針文書「人道的判断基準 Guidance Document for the Humane Endpoints」の作成が進められている。会議での議論では, この文書がもつばら実験用の哺乳動物について書かれており, 他の実験動物(鳥類, 魚類, 両生類, ミズ, ミジンコ等がある)には触れていないこと, 「動物の苦痛」への対応として, それを回避することか, 苦痛を早期に判定して操作を中断することか方向が別れること, 実験の目的との折り合いをどうつけるか, などの問題点がある。

2. 急性経口毒性試験の諮問会議

OECD 化学物質試験法ガイドライン計画における急性経口毒性試験法をめぐる問題に対する指名専門家の第 2 回諮問会議 “The Second Consultation Meeting on Acute Oral Toxicity Testing” が 2000 年 8 月 28-29 日 Paris で開かれた。因みに, 第 1 回諮問会議は 1999 年 3 月に Arlington (米国 Virginia 州)で開かれており, さらにその前年 1998 年 4 月に専門家会議が Roma で開かれている。NCM においては, 急性毒性試験の代替法の採択を契機として従来の試験法(TG 401)の廃棄が討議されてきた。さきの Arlington 会議では, 代替法としての 3 試験法の問題点が論議され, それぞれ改定を要することが認められ, また急性経口毒性試験を行うための指針文書の作成が促された。

今回の Paris における会議には, 急性経口毒性試験(TG 401)の 3 種の代替法(420, 423, 425)の改定案, および急性毒性試験の実施に関する指針文書原案の改定案が提出され, それぞれ「専門家の立場から」試験法の原理的な問題, 動物愛護の考慮, 用語の問題までの検討が加えられた。採択されて間もないのに改定する目的は,

- (1) 別途合意された OECD の化学物質分類法 (GHS; Globally Harmonized System for the Classification of Chemicals)に合わせて各試験法の設定用量の調整を行うこと,
- (2) 試験は使用動物数を減らすため, 雌雄いずれか片性で行うように改めること,
- (3) 3 試験法の間で出来るだけ用語, 表現を合わせるようにすること, そして,
- (4) 従来の急性経口毒性試験法(401)の廃止に向けて条件を整えること, であった。

各試験法について改定の要点の説明が行われ, 問題点が議論された。

分担研究報告書

2. 培養細胞を用いる各種試験法における光毒性の検討

田中 憲穂 食品薬品安全センター秦野研究所 細胞毒性学研究室長

研究要旨

本研究では、これまでに培養細胞を用いた、細胞毒性、小核試験、突然変異試験等により、光毒性発現と遺伝毒性について調べ、プラスミドを用いる新しい DNA 切断試験法を報告した。本年度は、チャイニーズ・ハムスター培養細胞株 CHL/IU を用いた光 *in vitro* 小核試験を用いて、(1)溶解度が異なる C60 および C60-シクロデキストラン包摂体の光遺伝毒性の比較、(2)リボフラビンの光遺伝毒性の分析を行った。また、これまでに簡便な *in vivo* 光遺伝毒性試験として検討を加えてきた、げっ歯類皮膚小核試験について、遺伝毒性検出感度向上のための実験法の改良を試みた。

A. 研究目的

本研究では、培養細胞等を用いた光毒性・遺伝毒性検出法の検討を行い、光源や照射方法などの基礎的な実験条件を確立した。本年度は、これまでの研究結果を応用し、光変異原の分子状態による遺伝毒性発現の変化と、光遺伝毒性によって引き起こされる遺伝子レベルの変化について、検討を始めた。

(1) C60 は炭素原子がフラレン構造をとるサッカーボール状の分子であり、様々な分野で新素材として利用されつつある。また、C60 は光照射により活性酸素種を発生することが知られていることから、光遺伝毒性作用を持つことが予測されていた。C60 は疎水性であり、非常に溶解性が低い。近年、宮田直樹 博士(国立医薬品食品衛生研究所・有機化学)により、シクロデキストラン包摂体にすることで、極性溶媒への溶解度を高めることができることが明らかにされた。そこで、培養細胞を用いた *in vitro* 光小核試験により、単体

の C60 と、C60-シクロデキストラン包摂体の光遺伝毒性誘発性を比較し、分子の溶解状態が光遺伝毒性発現に与える影響を検討した。

(2) 近年、DNA アレイを用いたハイスループット試験法により、多数の遺伝子の発現変化を短時間に分析することが可能になった。本研究では、既知の光遺伝毒性物質であるリボフラビン(ビタミン B₂)をモデル化合物とし、林 真 博士(国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝)の実施による遺伝子発現変化の検索(本年度報告書)と共同し、*in vitro* 光小核試験によって光遺伝毒性誘発性を調べた。

(3) *in vitro* 光遺伝毒性実験系による結果を評価する上での大きな問題は、実験動物やヒトにおける *in vivo* での光遺伝毒性作用についての報告が極めて少なく、*in vitro* 試験系の妥当性に対するバリデーションが難しいことである。そのため、実験動物を用いた簡便な *in vivo* 光遺伝毒性試験法を確立し、データを蓄積することが重要であ

る。簡便な in vivo 光遺伝毒性試験に応用可能と考えられる試験法として、西川(ライオン株式会社)らが開発した、げっ歯類皮膚小核試験法が挙げられる¹⁾。この方法により、代表的な遺伝毒性物質の検出が可能であり、光遺伝毒性物質の検出にも応用可能であることが報告されている(平成 11 年度、渋谷分担報告書)。しかしながら、陽性反応が得られるのが非常に高濃度であり、検出感度の向上が望まれる。そこで、in vivo で処理した皮膚細胞を in vitro 系に移す折衷的な試験法について検討を行い、検出感度の向上を試みた。

B. 研究方法

1. C60 の光遺伝毒性

C60 および、C60-シクロデキストラン包摂体(以降、C60-CD と表記する)は、宮田直樹 博士より提供を受けた。細胞には チャイニーズ・ハムスターCHL/IU 細胞を用い、処理前日に 35mm ディッシュに 1×10^6 細胞/ディッシュで植え込んだ。処理当日に培養液をダルベッコリン酸緩衝液と交換し、C60 あるいは C60-CD を添加した。C60 はジメチルスルホキシドに懸濁あるいは溶解し 1 vol%、C60-CD は蒸留水に溶解して 10 vol% 添加した。C60-CD の濃度は、シクロデキストランを含まない濃度に換算した。添加後、CO₂ インキュベータ内で 1 時間静置して前処理し、光照射を行った。光照射には、ソーラーシミュレータ(SOL500, Dr Hönlle)を用いて、UVA 1.6mW/cm²にて 50 分照射した(UVA 5J/cm²)。照射後、培地に置換し、22 時間培養した。細胞を剥離し、血球計算板で細胞数を計測して細胞毒性の指標とした。残りの細胞から、定法に従って小核標本作製した。小核標本はアクリジンオレンジ染色し、1 濃度群当たり 1000 細胞観察した。

2. リボフラビンの光遺伝毒性

細胞には、ヒト血液腫瘍由来の TK6 細胞を用

いた。細胞は、ダルベッコリン酸緩衝液に 1.1×10^5 細胞/mL の密度で懸濁し、各濃度群それぞれ 60mm ディッシュ 2 枚に 5mL ずつ分注した。リボフラビンは蒸留水に溶解し、10 vol% 添加した。CO₂ インキュベータ内で 1 時間静置して前処理し、光照射を行った。光照射には、ソーラーシミュレータ(SOL500, Dr Hönlle)を用いて、UVA 1.6mW/cm²にて 50 分照射した(UVA 5J/cm²)。照射後、培地を加えて 1×10^5 細胞に希釈した。

DNA アレイで分析する細胞は、照射終了から 3 時間後に凍結保存した。同時に、96 well プレートに 1.6 細胞/well で播種したものを、溶媒対照群は 2 プレート、処理群は 1 プレートずつ用意し、10 日後まで培養して細胞毒性の指標とした。小核標本に用いる細胞は、照射終了から 23 時間後まで培養し、定法に従って小核標本作製した。小核標本はアクリジンオレンジ染色し、1 濃度群当たり 1000 細胞観察した。

3. 高感度なげっ歯類皮膚小核試験法の開発

動物には、SPF/VAF マウス Crj: CD-1 (ICR) の雄を用いた。7-8 週齢の個体の背部を毛刈りし、アセトン:オリーブオイル(4:1)に溶解したマイトマイシン C を 2x3 cm の領域に 0.2mL 塗布した。塗布は、1 日 1 回行い、これを 3 日間繰り返した。各濃度群あたり、2 個体を用いた。塗布開始から 4 日後に動物を安楽死させ、皮膚辺を切り出した。皮膚辺は、脂肪層をメスで除き、3mm 幅程度の短冊に細切し、4°C の 0.25% トリプシンに 15 時間浸した。ピンセットを用いて表皮を剥離し、10%CS を含む MEM に移し、室温で 1 時間アジテーションして表皮細胞を分散した。一部の細胞は、そのまま定法に従って小核標本作製した。残りの細胞のうち、約 1.5×10^6 細胞を表皮培養用培地に再懸濁し、60mm ディッシュに播種した。表皮培養用培地は、DMEM:F-12 (3:1) 5%FCS に、以下の添加物を加えた物を用いた²⁾。

ファイブロネクチン	333ng/mL
ヒドロコルチゾン	400 ng/mL
ヒト組替型上皮成長因子	10 ng/mL
インシュリン	5 µg/mL
コレラ毒素	1x10 ⁻⁹ M
リイオドチロニン	2x10 ⁻⁹ M
ペニシリン	100 U/mL
カナマイシン	0.1 mg/mL
アムホテリシン B	0.25 µg/mL

播種後 48 時間で細胞を剥離し、定法に従って小核標本を作製した。小核の観察は、各個体から 1000 細胞、すなわち各濃度群あたり 2000 細胞について行った。

C. 研究結果および考察

1. C60 の光遺伝毒性

C60 および C60-CD の光遺伝毒性試験の結果を Fig. 1 に示した。非照射では、用いた最高濃

度の 100 µg/mL でも毒性、遺伝毒性ともに認められなかった (Fig. 1 では省略)。一方、光照射群では、C60 は 0.25 µg、C60-CD は 0.00391 µg 以上で有意な光小核誘発性は認められた (Fisher exact probability test, $p = 0.05$)。また、光細胞毒性誘発性にも明らかに差が認められ、C60-CD は C60 と比べて強い光毒性・光遺伝毒性誘発性を有することが示された。シクロデキストランが光毒性・光遺伝毒性誘発性を有さないことは、予備実験で確認されているので (データは示さない)、C60 の分子状態の差によって、光毒性・光遺伝毒性が増強されたことが示唆された。C60 は、活性酸素種を産生することによって光遺伝毒性を誘発することが知られていることから、溶解度が上がることにより、周囲の水や酸素分子をラジカル化しやすくなった可能性が考えられる。

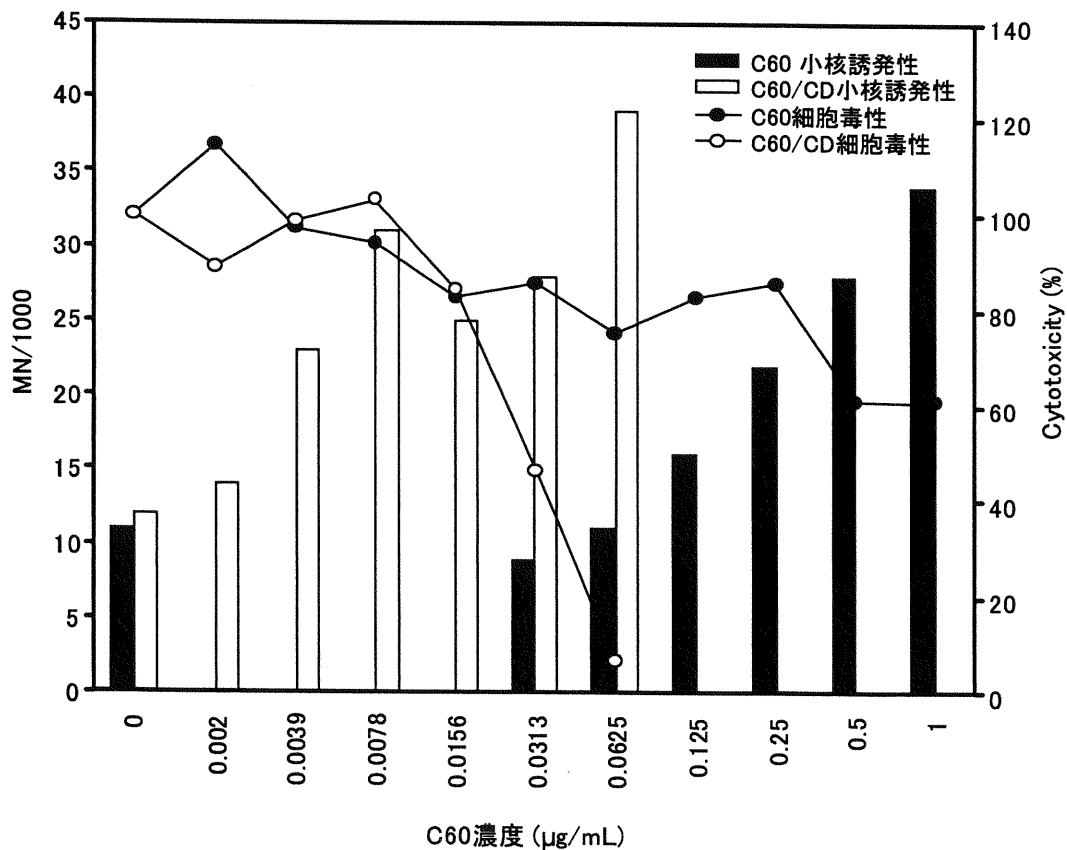


Fig. 1 C60 および C60-シクロデキストラン包摂体の光毒性・光遺伝毒性誘発性

2. リボフラビンの光遺伝毒性

リボフラビンの光毒性・光遺伝毒性試験の結果をFig.2に示す。リボフラビンは、非照射条件下では200 µg/mL程度で染色体構造異常を誘発することが知られているが、本試験によって、光照射条件下では0.5 µg/mLで有意な遺伝毒性を示すことが明らかになった。非照射と照射間では、最低有効濃度に400倍の差が有ることから、リボフラビンには明白な光遺伝毒性誘発性があるものと結論した。1 µg/mLを越える濃度域では、アクリジ

ンオレンジ染色で細胞質のRNAの染色が認められなかったため、DNAマイクロアレイでの分析には、1 µg/mL処理群を用いた(DNAアレイの分析結果は、本年度の林分担研究報告書を参照)。

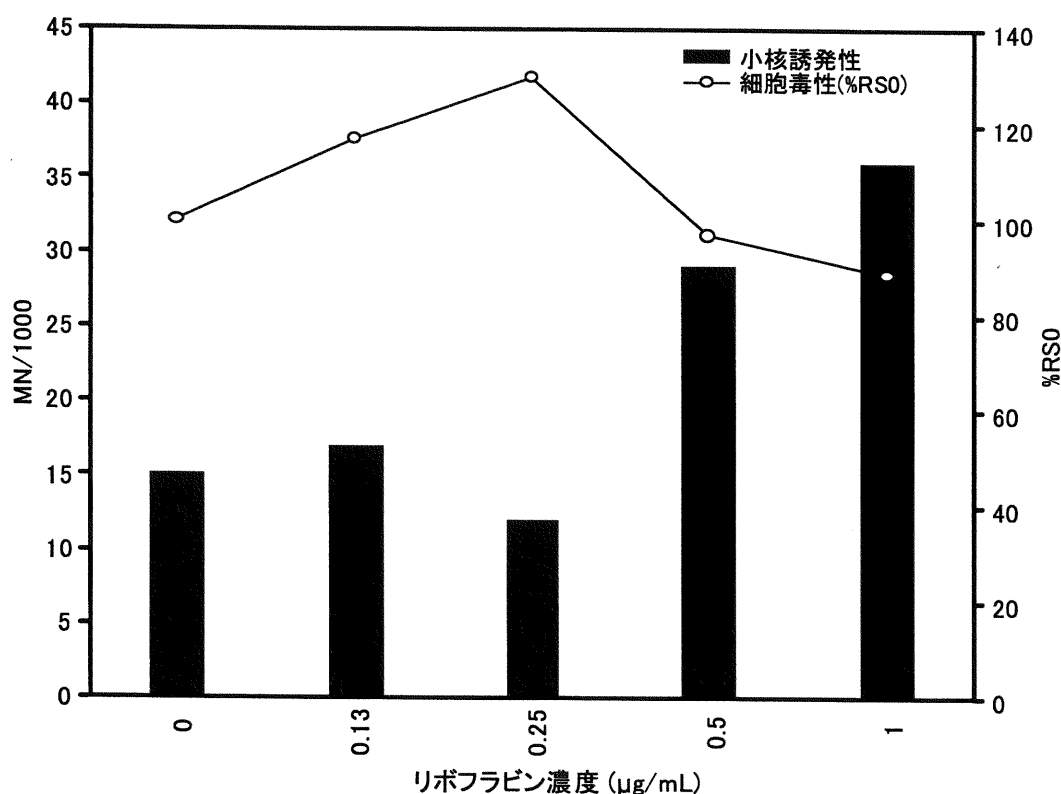


Fig.2 リボフラビンの光毒性・光遺伝毒性誘発性

3. 高感度なげっ歯類皮膚小核試験法の開発

Fig.3に示すように、皮膚細胞をin vitro系に移し、48時間培養することによって、マイトマイシンCの遺伝毒性を、数倍の感度で検出することが可能であった。in vivo系のみで標本を作製した

場合に小核形成率が低い原因として、分裂可能な基底細胞のうち休止期にある細胞や、分化が進んで分裂を停止した細胞の割合が多いことが考えられる。今回用いた培地にはプロモータ成分が含まれており、分裂促進されたことや、分化し

た細胞がディッシュに付着せずに除かれたことが、感度向上の理由と考えられる。

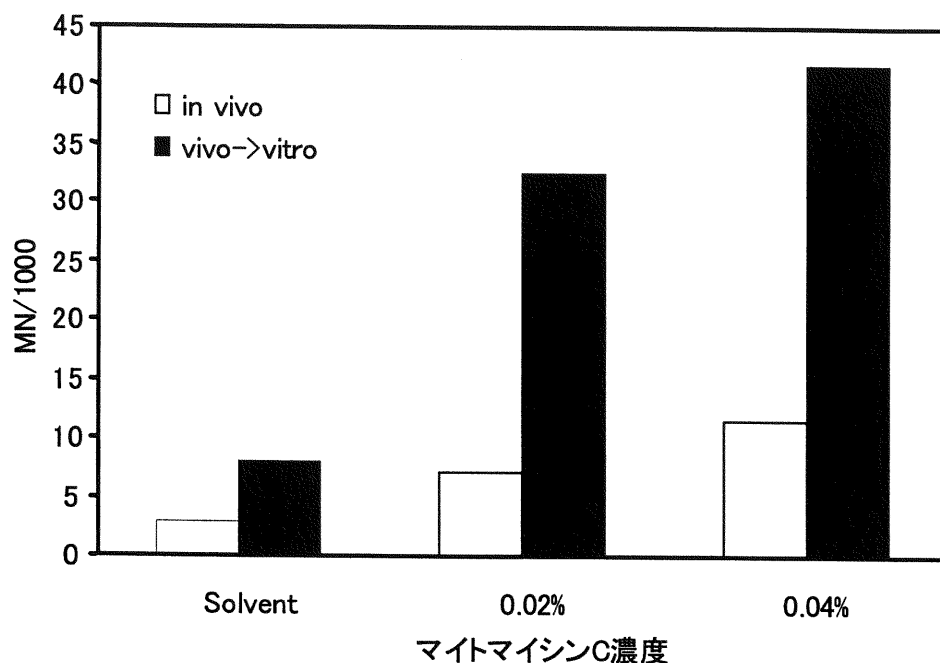


Fig.3 マイトマイシン C の in vivo 皮膚小核試験

D. 結論

(1) C60 と、C60-シクロデキストラン包摂体の光小核誘発性を比較したところ、溶解度の高い包摂体が、より低濃度で光遺伝毒性を示し、分子状態によって誘発性が変わることが示された。また、この方法は、光毒性・光遺伝毒性のみならず、水に溶けにくい検体の毒性・遺伝毒性の評価にも応用可能と考えられる。

(2) 光遺伝毒性物質の遺伝子レベルでの作用機序を明らかにするために、リボフラビンをモデル物質として、その光遺伝毒性誘発性を評価した。光遺伝毒性誘発性が認められた濃度域で、DNA アレイを用いた発現解析を行ったところ、細胞周期関連遺伝子、ミトコンドリア関連遺伝子、Gタンパク関連遺伝子、ユビキチン関連遺伝子、DNA 修復酵素などの遺伝子に発現変化が認められた(本年度の林分担研究報告書を参照)。

(3) げっ歯類を用いた in vivo 小核試験におい

て、皮膚細胞分離後に in vitro 培養系に移すことにより、感度が数倍向上することが示された。今後、in vitro で光遺伝毒性陽性でありながら、in vivo 皮膚小核試験で陰性の結果を得た検体(クロルプロマジン等、本年度の渋谷分担研究報告書を参照)などについて、評価を行っていきたい。

E. 引用文献

- 1) Nishikawa, T., Haresaku, M., Adachi, K., Masuda, M., and Hayashi, M. Study of rat skin in vivo micronucleus test : data generated by mitomycin C and methyl methanesulfonate, *Mutat. Res.*, 444, 159-166, 1999.
- 2) He, S. and Baker, R.S.U, Initiating Carcinogen, Triethylenemelamine, Induces Micronuclei in Skin Target Cells: *Env. Mol.*

Mutagenesis, 14, 1-5, 1989,

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Gocke, E., Mueller, L., Guzzie, P.J.,
Brendler-Schwaab, S., Bulera, S., Chignell,
C.F., Henderson, L.M., Jacobs, A., Murli, H.,
Snyder, R.D., Tanaka, N., Consideration on
photochemical genotoxicity: Report of the
international workshop of genotoxicity test
procedure working group, Env. Mol.
Mutagenesis, vol 35, 173-184, 2000

2. 学会発表

- 1) 中川 ゆづき, 林 久実子, 田中 憲穂, 光遺
伝毒性物質の魚類およびマウスを用いる in
vivo 検出系の開発、日本環境変異原学会第2
9回大会、2000年11月、仙台

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

3. 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

澁谷 徹 食品薬品安全センター秦野研究所 遺伝学研究室長

研究要旨

本研究では、すでに皮膚小核試験として、ラット背部皮膚の表皮細胞の小核を検出する試験系が開発されている方法をマウスに応用し、これに光照射を組み合わせた *in vivo* 光皮膚小核試験の確立を目指した。これまで主に *in vitro* 試験系で光増強作用が知られている 8-Methoxypsoralen (8-MOP) および Chlorpromazine (CPZ) を用いて、C57BL/6 マウスの光皮膚小核試験を実施した。その結果、8-MOP においては光照射によって皮膚小核の誘発に明らかな増強作用が認められた。しかし CPZ では低用量において増強作用が認められたが、高用量では認められなかった。これらの結果から、光皮膚小核試験が *in vivo* 光遺伝毒性試験として確立出来たものと結論された。また、*in vivo* 光遺伝毒性の発現において、DNA 修復や apoptosis の関与が想定されるために、C57BL/6 マウスを遺伝背景にもつ *p53* ノックアウトマウスを導入し、PCR 法を用いてマウス個体での *p53* の遺伝子型分析法を確立出来た。さらに C57BL/6 マウスを遺伝背景にもつ *Pun* マウスを導入・育成し、色素網膜上皮のメラニンの有無を観察することによって、細胞単位で遺伝子内組換えを容易に検出出来る試験系の開発を行い、*in vivo* 光遺伝毒性試験への適用についての検討を行った。

A. 研究目的

近紫外線照射によって遺伝毒性が発現または増強される化学物質を検出する方法として、皮膚の表皮細胞を標的とした *in vivo* 試験系の開発が重要である。皮膚を用いる試験系としては、これまでに Nishikawa らは、ラットの背部皮膚を用いて、経皮投与された変異原性物質によって誘発された表皮細胞の小核を検出する試験系を開発している¹⁾。本研究では、修復欠損などの遺伝子レベルで変異体が多く知られており、またそれらにつ

いての遺伝子改変動物も作出されているマウスを用いて光皮膚小核試験を確立することとした。

そこで、これまで主に *in vitro* 試験系で光増強作用が知られている 8-Methoxypsoralen (8-MOP) および Chlorpromazine (CPZ) を用いて、C57BL/6 マウスの光皮膚小核試験を実施した。また、今後、光遺伝毒性試験において、DNA 修復過程の関与を検討するために C57BL/6 マウスを背景とする *p53* ノックアウトマウス²⁾ を京都大学放射線生物研究センターの丹羽先生から導入し

た。p53 遺伝子欠損ホモ型は繁殖能が低くホモ接合体に固定出来ないので、毎世代ヘテロ個体同士を交配し、マウス個体ごとに PCR 法によって遺伝子型を分析する必要がある。そこでそれらを確実に解析出来るように実験手技の向上を目指し、ヘテロ個体同士の交配によって得られた子孫について遺伝子型の分析試験を実施した。さらに、上皮色素網膜細胞のスポットの有無を観察することによって、遺伝子内組換えを細胞単位で観察出来る *Pun* マウス³⁾を育成し、その観察法を確立し、それらの光遺伝毒性試験への適用についての検討を開始した。

B. 研究方法

1. 皮膚小核試験

6~7週齢の雄 C57BL/6 マウスを用いた。麻酔下でマウスの背部被毛を剃り、約3cm平方の皮膚剃毛部に2段階の用量の 8-MOP あるいは CPZ を0.1mL 塗布した。溶媒にはアセトン・オリーブオイル(1:4)を用いた。同一の塗布を行ったマウスを非照射群および照射群に分け、照射群のみにソーラーシュミレーター Suntest CPS (Atlas) を用い、UVA 2.0W/cm² で30分間光照射をした。非照射群には照射を行わなかった。照射2日後にマウスを放血致死させた後、皮膚剃毛部を採取した。採取した皮膚を幅 1~2mm程度の短冊状に細切し、冷蔵庫内で約15時間トリプシン処理し、表皮を剥離した。剥離した表皮は、10%子牛血清添加イーグル MEM 培地(GIBCO)内で攪拌し、得られた表皮細胞分散液を濾過、遠心し表皮細胞を分離した。細胞は、75mM KCl で低張処理を行い、カルノア液で固定した。細胞懸濁液を適量スライドガラスに滴下して小核標本とした。標本をアクリジンオレンジ染色し、蛍光顕微鏡を用いて400倍で観察した。

観察には、個々の核および細胞質全体が明確に認識でき、主核が壊れていない表皮細胞(細胞質が赤色)を選び、同一のマウスについて2

名の観察者が各1000個、合計2000個の表皮細胞を観察した。小核の判定条件は、直径が主核の1/2以下で、主核から完全に分離もしくは接触しているもので輪郭が識別可能かつ主核と同色調を呈するものとし、1細胞に複数の小核が見られた場合にも1個の小核として、小核を有する細胞数を求めた。

2. p53 遺伝子解析

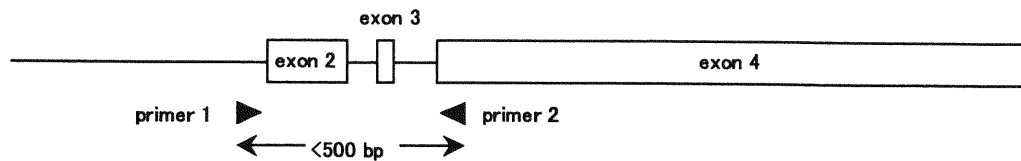
雄雌のヘテロ *p53* ノックアウトマウスの交配によって得られたマウスの耳介の一部をイアーパンチでくり抜き、DNA抽出を行うまで凍結保存した。凍結保存した耳介より、PureGene™ キットを用いてゲノムDNAの抽出を行った。抽出したゲノムDNAを用いてPCR反応を行った。正常 *p53* 遺伝子を検出するために、*p53* 遺伝子のエクソン2の上流である非翻訳領域にプライマー1を、エクソン4領域内にプライマー2を設定してPCR反応を行った。また、*neo* 遺伝子を検出するために、プライマー2および *neo* 遺伝子領域内に設定したプライマー3を用いてPCR反応を行った (Fig. 1)。反応はともに、94°C 1分、65°C 1分30秒、72°C 3分20秒を35サイクル行った。それぞれのPCR産物は1%のアガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色を行った。用いたPCRプライマーの塩基配列を以下に示す。

1: (5' -AAT TGA CAA GTT ATG CAT CCA TAC AGT ACA-3')

2: (5' -ACT CCT CAA CAT CCT GGG GCA GCA ACA GAT-3')

3: (5' -GAA CCT GCG TGC AAT CCA TCT TGT TCA ATG-3')

(1) endogenous *p53* 遺伝子



(2) mutant *p53* 遺伝子

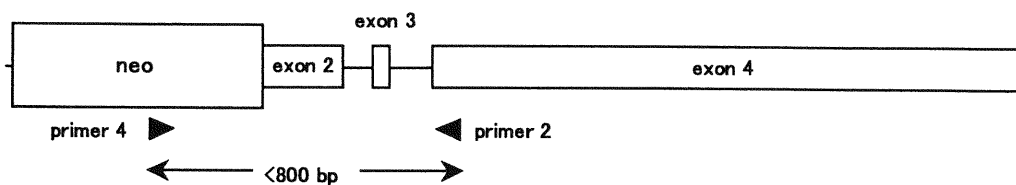


Fig. 1 PCR法による、*p53* 遺伝子の検出。

(1) endogenous *p53* 遺伝子の検出 (2) mutant *p53* 遺伝子の検出

3. *Pun* マウス

Pun マウスはアメリカ Jackson Laboratory で C57BL/6 系統から自然突然変異によって得られたマウスがその起源である。これを京都大学放射線生物研究センターの丹羽太貫先生が導入し、自家繁殖によって維持されていた。この *Pun* マウスを SPF にするために、日本エスエルシーに送付し、帝王切開によって SPF とした。この内の雄3匹を当センターに導入し、系統維持していた雌 C57BL/6 マウスと交配し、得られた F1雌を *Pun* マウスと交配し、ホモの *Pun* マウスを作成した。系統維持もこの交配によって行った。

色素網膜の復帰変異細胞の同定には、Bishop らの方法⁴⁾を用いた。すなわち、マウスを致死させ、両眼球を摘出し、4%パラホルマリン液で固定した。角膜を切り、水晶体を取り出した後、再度パラホルマリン液で固定した後、網膜を静かにはがし、周囲から切れ込みをいれ、0.1%ゼラチンをたらししたスライドガラス上に置き、カバーガラスで押えるようにしてバルサムで封入した。

細胞の観察は、低倍率の顕微鏡を用いて全色素網膜の復帰変異細胞を算定した。

C. 研究結果

1. 皮膚小核試験

8-MOP の結果を Table 1 に示した。小核出現頻度は、溶媒のみを塗布した非照射群で 0.13% であり、照射によって増加しなかった。非照射の 8-MOP 0.0005 % および 0.005 % 群では、出現頻度はそれぞれ 0.10 % 0.21 % でありわずかに増加したのみであった。光照射群では、8-MOP 0.0005 % および 0.005 % 群のいずれにおいても非照射群に比べて出現頻度は顕著に増加し、0.005%群の1匹では5%にも達した。8-MOP の用量ごとに非照射群と光照射群での小核出現頻度について Kastenbaum and Bowman の表を用いて検定をしたところ、いずれの用量においても、光照射群で 0.1% 水準で有意に増加していた。また、照射群では明らかな用量依存性も認められた。以上の結果から、8-MOP は光照射によって遺伝毒性作用が増強されるものと考えられた。

CPZ の結果を Table 2 に示した。小核出現頻度は、溶媒のみを塗布した非照射群で 0.15% であり、照射によって増加しなかった。非照射の

CPZ の1%群では、出現頻度は増加した。光照射によって、0.1%群では小核は4倍以上に増加したが、1%群では増加せず、0.1%群と比べてむしろ減少した。以上から、CPZ においては、光照射による小核誘発の増強作用はCPZ の用量によって

異なった。

以上の結果から、光照射による増強作用は、8-MOP および CPZ との間で異なった結果が得られた。

Table 1. 8-MOP塗布による皮膚小核発現における光照射の影響

群	個体 番号	小核含有細胞数 / 観察細胞数
Negative control 非照射	11	3 / 2000
	12	3 / 2000
	13	3 / 2000
	14	1 / 2000
	Total	10 / 8000
	%(Mean ± S.D.)	(0.13 ± 0.05)
Negative control 照射	21	2 / 2000
	22	2 / 2000
	23	1 / 2000
	24	3 / 2000
	Total	8 / 8000
	%(Mean ± S.D.)	(0.10 ± 0.04)
8-MOP 0.0005% 非照射	31	3 / 2000
	32	0 / 2000
	33	5 / 2000
	34	1 / 2000
	Total	9 / 8000
	%(Mean ± S.D.)	(0.11 ± 0.11)
8-MOP 0.0005% 照射	41	8 / 2000
	42	17 / 2000
	43	9 / 2000
	44	5 / 2000
	Total	39 / 8000
	%(Mean ± S.D.)	(0.49 ± 0.26)** ##
8-MOP 0.005% 非照射	51	1 / 2000
	52	4 / 2000
	53	7 / 2000
	54	5 / 2000
	Total	17 / 8000
	%(Mean ± S.D.)	(0.21 ± 0.13)
8-MOP 0.005% 照射	61	16 / 2000
	62	15 / 2000
	63	33 / 2000
	64	101 / 2000
	65	45 / 2000
Total	210 / 10000	
	%(Mean ± S.D.)	(2.10 ± 1.76)** ##

** : Negative controlと比較して、1%水準で有意差があった。

(Kastenbaum and Bowmanの数表より)

: 同用量の非照射群と比較して、1%水準で有意差があった。

(Kastenbaum and Bowmanの数表より)