

Table 2. CPZ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	4 / 2000
	12	2 / 2000
	13	3 / 2000
	Total	9 / 6000
	%(Mean±S.D.)	(0.15 ± 0.05)
Negative control 照射	21	2 / 2000
	22	5 / 2000
	23	2 / 2000
	Total	9 / 6000
	%(Mean±S.D.)	(0.15 ± 0.09)
CPZ 0.1% 非照射	31	4 / 2000
	32	5 / 2000
	33	2 / 2000
	Total	11 / 6000
	%(Mean±S.D.)	(0.18 ± 0.08)
CPZ 0.1% 照射	41	21 / 2000
	42	13 / 2000
	43	13 / 2000
	Total	47 / 6000
	%(Mean±S.D.)	(0.78 ± 0.23)** ##
CPZ 1% 非照射	51	11 / 2000
	52	10 / 2000
	53	17 / 2000
	Total	38 / 6000
	%(Mean±S.D.)	(0.63 ± 0.19)**
CPZ 1% 照射	61	10 / 2000
	62	12 / 2000
	63	11 / 2000
	Total	33 / 6000
	%(Mean±S.D.)	(0.55 ± 0.05)**

** : 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)

2. P53 遺伝子

PCR 反応の条件を検討した結果、94°C 1分、65°C 1分30秒、72°C 3分20秒で行えば、*p53* 遺伝子および *neo* 遺伝子を検出する場合ともに、PCR 反応が最適に行われることが明らかとなった。PCR 反応液を電気で移動した結果を Fig. 2 に示す。上記の条件を用い、日本エスエルシーで出生し、当研究所で *p53* 遺伝子に関してヘテロ個体であることが確認された、雄雌5ペアから得られた雄 16 匹、雌 10 匹のマウスについて、*p53* 遺伝子および *neo* 遺伝子の検出によって遺

伝子型を解析した。その結果、雄8匹、雌6匹の計 14 匹は、正常 *p53* 遺伝子のみの野生型 (+/+), 雄7匹、雌2匹の計9匹は、正常 *p53* 遺伝子および *neo* 遺伝子をもつヘテロ型 (+/-) さらに雄1匹、雌2匹は *neo* 遺伝子ののみをもつ (-/-) ホモ型であることが明らかとなった。また、野生型の雄の1匹が水頭症をしめした。ホモ型のマウスのうち、雄1匹は顎下リンパ腺の肥大を呈し、雌の2匹は体型が小さいマウスであった。

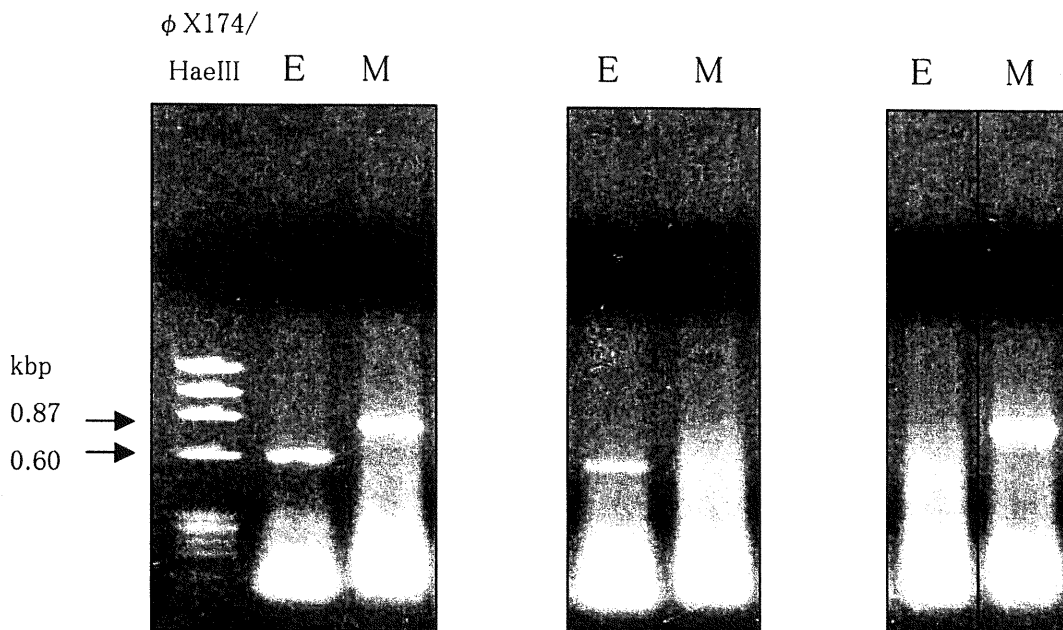


Fig. 2 マウス耳殻より抽出したゲノム DNA を用い、PCR 法により、*p53* 遺伝子の検出を行った (E: endogenous *p53* 遺伝子 M: mutant *p53* 遺伝子)。

(a)ヘテロ個体の例 (b)野生型個体の例 (c)ホモ接合型個体の例

3. Pun マウス

無処理の雄の色素網膜上皮細胞について、復帰変異コロニーおよび復帰細胞を10匹の片眼について観察したところ、それぞれ1から2個の細胞からなる小スポットが観察され、網膜当たりの復

帰変異細胞数は約 10 個であった。

また、毛色の復帰変異スポット(ベージュ色の毛色に黒色のスポットとして観察出来る)をもつ個体の頻度については、約6%であった。これまでに約250匹について観察したが、生殖細胞に

復帰突然変異を *pun* 遺伝子に起こしたマウスは検出されていない。

D. 考察

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。しかし、CPZ においては、光照射による小核誘発の増強作用は用量によって異なった。すなわち、光照射による小核誘発の増強作用は、用いた化学物質によって異なっていた。今後は、種々の変異原性物質、特に光によって遺伝毒性が増強される可能性のある化学物質について、光小核試験を実施して、データを集積することが課題とされる。また、化学物質の暴露経路による実験についても実施する必要がある。また、今回は 6~7 週齢のマウスを用いたが、より感度を高めるために、代謝回転がより早く、被毛が生える以前の若齢動物を用いる方法についても検討を進めたい。

p53 遺伝子の解析については、PCR 法によって、その遺伝子型が容易に識別できるようになった。今後は、光小核試験について、小核形成に至る過程において、*p53* 遺伝子の関与を調べ、DNA 修復過程や apoptosis の関与、さらに小核形成のメカニズムの解析を実施する予定である。また、近年毒性試験に用いられ始めている DNA chip を用いて、光照射による DNA 修復関連遺伝子の発現を詳細に調べ、他の光毒性との関連についても考察して行きたい。

さらに、光遺伝毒性事象を簡単に検出する、*Pun* マウスを用いて、光照射による色素網膜細胞における遺伝子内組換え頻度の測定も行う予定である。*pun* 遺伝子は *p* 遺伝子が 2 単位重複しているため容易に遺伝子内で組換えを起こし、野生型の *P* 遺伝子に復帰するものである。*pun* マウスを用いて、胎生期に母体経路で投与されたメラニンと結合する性質のある化学物質が、網膜細胞に移行し、新生児期の光照射によって復帰変異を誘発するかどうかを検討する実験も行い、光

毒性の重要なターゲットである網膜に対する作用についても調べて行きたい。

E. 結論

以上の結果から、マウスを用いた光皮膚小核試験が確立出来たものと考えられた。今後は多くの化学物質にこの試験を行い、光遺伝毒性試験の評価に向けて検討を重ねて行きたい。また *p53* 遺伝子ノックアウトマウスの使用が可能となったので、光遺伝毒性試験の発現メカニズムを追求して行きたいと考えている。さらに光毒性の重要なターゲットである網膜についても *Pun* マウスを用いて細胞単位で遺伝子内組換え頻度について検討して行きたい。

F. 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 methylmethanesulfonate, *Mutat. Res.*, 444, 159-166, 1999.
- 2) Kemp., C. J. and Balmain, A. et al., Reduction of p53 gene dosage does not increase initiation but enhances malignant progression of chemically induced skin tumors, *Cell*, 74: 813-822, 1993
- 3) Schiestl, R. H., Aubrecht, J., Khogali, and Carls, N. Carcinogens induce reversion of the mouse pink-eyed unstable mutation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94, 4576-4581, 1981
- 4) Bishop, A.J.R., Kosaras, B., Sidman, R. L., Schiestl, R. H.: Benzo(a)pyrene and x-rays induce reversion of the pink-eyed unstable mutation in the retinal pigment epithelium of mice, *Mutation Res.*, 457, 31-40, 2000.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

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年11月、仙台
- 2) 澁谷 徹、原 巧、松本浩孝、須井 哉:生体内遺伝子内組換え検出系とsiteのPun マウス、日本環境変異原学会第29回大会、2000年11月、仙台

H. 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

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 食品薬品安全センター秦野研究所 薬理学研究室長

研究要旨

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(塗布ないし皮内投与)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急性光毒性試験法の検討を行った。さらに、安全性試験で一般的に用いられるラットにおいても同様に単回経口投与による急性光毒性試験法を検討した。

A. 研究目的

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(塗布ないし皮内投与)をまとめた。

ところで、光毒性として総称されるものの中には、先の皮膚に接触した化学物質による皮膚光刺激性の他に、化学物質の全身曝露による光毒性(いわゆる光線過敏症)という問題もあり、全身曝露された化学物質が皮膚において光刺激性を生じる現象も無視できない。

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、モルモットの経口投与による急性光毒性試験法の検討を行った。さらに、安全性試験で一般的に用いられるラットにおいても同様に経口投与による急性光毒性試験法を検討し、モルモットの試験方法と比較した。

B. 研究方法

1. 使用動物

a)モルモット

7～8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)24 匹(体重 339.9～467.7g)を使用した。動物は、許容温度 21.0～25.0℃、許容湿度 40.0～75.0%、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)に同群2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。

b)ラット

Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD)IGS、SPF] ラット(日本チャールス・リバー)の 15 週齢の雄 10 匹および 17 週齢の雌 30 匹を使用した。動物は、許容温度 21.0～25.0℃、許容湿度 40.0～75.0%、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(220W×270D×190H mm)に1匹ずつ収容し、固型飼料(CE-2、日本クレア)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. 投与検体

先の急性皮膚光刺激性試験で用いた陽性対照物質である 8-methoxypsoralen(シグマ・アルドリッチ・ジャパン、以下、8-MOP と略す)をコーン油に懸濁し、投与検体を調製した。投与用量は 10 および 30 mg/kg とし、それぞれ 0.2 および 0.6 w/v%の懸濁液を 5 mL/kg の容量で、投与日の体重を基に投与液量を個体別に算出して投与した。

3. 群構成

a) モルモット

各群2匹とし、投与用量、照射線量および放置時間(投与終了後から照射を開始するまでの時間)別に以下のように設定した。

b) ラット

対照物質であるコーン油を投与した場合は各群2匹、8-MOP を投与した場合は各群3匹とし、投与用量、照射線量および放置時間(投与終了後から照射を開始するまでの時間)別に以下のように設定した。

モルモットの群構成

投与用量 (mg/kg)	照射線量 (J/cm ²)	放置時間 (hours)	動物数
10	5	1.5	2
		2.0	2
		2.5	2
	10	1.5	2
		2.0	2
		2.5	2
30	5	1.5	2
		2.0	2
		2.5	2
	10	1.5	2
		2.0	2
		2.5	2

ラットの群構成

投与用量 (mg/kg)	照射線量 (J/cm ²)	放置時間 (hours)	動物数	
			雄	雌
0	5	2.0	—	3
	10	2.0	2	3
10	5	1.5	—	3
		2.0	—	3
	10	1.5	2	3
		2.0	2	3
30	5	1.5	—	3
		2.0	—	3
	10	1.5	2	3
		2.0	2	3

4. 適用および照射

a) モルモット

あらかじめ(投与日)バリカンとシェーバーを用いて剪毛した動物に、経口カテーテルを用いて検体を投与した。投与後、一定時間経過した後、背部右側をアルミホイルで覆い遮光して(非照射対照)保定器に固定し、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、照射線量(UV-A)が 5ないし 10 J/cm²となるように照射した(UV-A の放射照度は約 4.2 mW/cm²、照射時間は 20 ないし 40 分であった)。

b) ラット

あらかじめ(投与日)バリカンとシェーバーを用いて剪毛した動物に、ラット用経口ゾンデを用いて検体を投与した。投与後、一定時間経過した後、ラット用プラスチック製繁殖ケージ(蓋使用せず、照射装置のガラスフィルターにより逃亡を阻止)に収容し、UV 照射を開始した。光源および照射条件はモルモットと同様とした。

5. 皮膚反応の判定

モルモットでは、照射前(検体適用後)、照射後1、24、48 および 72 時間(=観察第4日)から観察第8日まで背部皮膚について、ラットでは、照射前(検体適用後)、照射後1、24、48 および 72 時間(=観察第4日)から観察第6日まで背部皮膚および耳介について、以下の基準により判定を行った。観察終了後は屠殺剖検し、モルモットでは照射部位の背部皮膚を、ラットでは照射部位の背部皮膚および耳介、ならびに眼球を採材した。

A. 紅斑および痂皮形成

- 0 ー ー 紅斑なし
- 1 ー ー ごく軽度の紅斑(微かに認められる程度)

- 2 ー ー 軽度の紅斑(紅斑が明瞭)
- 3 ー ー 中程度の紅斑
- 4 ー ー 重度の紅斑および痂皮形成(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 ー ー 浮腫なし
- 1 ー ー ごく軽度の浮腫(微かに認められる程度)
- 2 ー ー 軽度の浮腫(隆起がわかる程度)
- 3 ー ー 中程度の浮腫(およそ1mm 程度の隆起)
- 4 ー ー 重度の浮腫(隆起が1mm 以上)

6. データの解析

紅斑および痂皮形成の評点ならびに浮腫の評点の和の平均値を各群毎に算出し、比較した。

C. 研究結果

a) モルモット

10 mg/kg 投与群の中での比較では、投与後照射するまでの時間は、約 2 時間経過した時点で照射を開始した場合にもっとも強い反応が得られ、次いで約 2.5 時間、1.5 時間の順であった。また、照射線量 5 J/cm²では個体差が大きく、皮膚反応が得られない場合もあった。

30 mg/kg 投与群の中での比較では、投与後約 1.5 時間および約 2 時間経過した時点で照射を開始した場合のどちらも強い皮膚反応が得られたが、約 2.5 時間の場合はこれらと比して弱い傾向にあった。また、30 mg/kg 投与群では照射線量が 5 J/cm²と 10 J/cm²のいずれの場合も強い皮膚反応が得られたが、個体によっては、重度の発赤を示し、観察第 8 日(照射日=観察第 1 日)の時点でも広範にわたり痂皮形成が認められた。

b) ラット

対照群の雄では皮膚反応が認められなかったが、雌では、10 J/cm²の線量を照射した動物で投与後 24 時間から 72 時間にかけて発赤が認められた。

8-MOP の 10 mg/kg 投与群の中での比較では、雌雄とも投与後照射するまでの時間が約 1.5 時間よりも約 2 時間の場合でより強い皮膚反応がみられ、耳介の皮膚反応は雄では約 2 時間のほうが、雌では約 1.5 時間のほうが強い反応となった。また、10 mg/kg 投与群では、反応が弱いあるいは認められない個体もあった。

30 mg/kg 投与群の中での比較では、10 mg/kg と同様に投与後照射するまでの時間が約 1.5 時間よりも約 2 時間の場合でより強い皮膚反応がみられたが、耳介の皮膚反応は雄では約 1.5 時間と約 2 時間で大差はなく、雌では約 1.5 時間のほうが強い反応となった。

以上のことから、モルモットでは、30 mg/kg の用量で 8-MOP を投与し、投与後約 2 ないし 2.5 時間に 10 J/cm² の線量を照射した場合により強い反応が得られることが明らかとなったが、30 mg/kg の用量を投与した場合、個体によっては重度の皮膚反応を呈し、試験系を確認するための陽性対照群としては適さない(試験系に異常があった場合の検出感度が下がる)と考えられたため、陽性対照群としては、10 mg/kg の用量で 8-MOP を投与し、投与後約 2 時間に 10 J/cm² の線量を照射することが好ましいと考えられた。

ラットでは、雌の対照群で 10 J/cm² の線量を照射することにより皮膚反応が認められたことから、照射線量は 5 J/cm² とし、確実に反応が認められる 30 mg/kg の用量を用い、背部皮膚反応を観察する場合は、投与後約 2 時間に、耳介の皮膚反応を観察する場合は、投与後約 1.5 時間に照射を開始する場合に良好な結果が得られると判断した。

D. 今後の方針

安全性試験でマウスとともによく用いられるラットについて、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たため、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の可能性が考えられる。また、この他に今回は紫外線(UV-A)を線量として用いたが、この他に自然の光に近い光源(サンシミュレーター)を用いた同様の試験も検討する必要があると考えられた。なお、今回採材した眼球については、全身照射することによる角膜への影響を確認する上で、追って組織学的検査を実施する。

Table 1
 Single dose oral phototoxicity test of 8-methoxypsoralen in guinea pigs
 Grading of skin reaction in individual males

Dose (mg/kg)	Irradiation dose (J/cm ²)	The time before the irradiation (hours)	Grading of skin reaction (no UV-irradiation) ¹⁾									
			Observation time									
			pre.	1hr.	24hr.	48hr.	72hr.	4days	5days	6days	7days	8days
10	5	1.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	1.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	5	1.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	1.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Dose (mg/kg)	Irradiation dose (J/cm ²)	The time before the irradiation (hours)	Grading of skin reaction (UV-irradiation) ¹⁾									
			Observation time									
			pre.	1hr.	24hr.	48hr.	72hr.	4days	5days	6days	7days	8days
10	5	1.5	0	0	2.0	4.0	4.0	2.0	1.0	0	0	1.5
		2.0	0	0	3.0	3.0	3.0	2.0	1.5	0	0	0.5
		2.5	0	0	1.0	1.5	1.5	1.5	1.0	0	0	0
	10	1.5	0	0	4.0	3.5	3.5	3.5	2.5	2.5	2.5	2.5
		2.0	0	0	5.5	5.0	4.5	3.5	2.5	1.0	0.0	2.0
		2.5	0	0	6.0	4.0	3.0	3.0	2.0	1.0	1.5	3.0
30	5	1.5	0	0	6.0	4.0	3.5	2.5	3.0	3.0	3.5	4.5
		2.0	0	0	6.0	4.5	4.5	4.5	4.0	4.0	2.5	3.5
		2.5	0	0	3.0	5.0	3.5	4.0	1.5	1.5	1.5	2.5
	10	1.5	0	0	6.0	6.0	6.0	6.0	5.5	4.0	3.5	4.5
		2.0	0	0	6.0	4.0	4.0	4.0	3.5	4.0	4.0	4.0
		2.5	0	0	3.5	4.0	4.5	4.5	3.0	2.5	2.5	3.5

1), Mean score of skin reaction (erythema and eschar formation value + edema formation value)

Table 2-1

Single dose oral phototoxicity test of 8-methoxypsoralen in rats

Grading of skin reaction in males

Dose (mg/kg)	Irradiation dose (J/cm ²)	The time before the irradiation (hours)	Grading of skin reaction ¹⁾						
			Observation time						
			pre.	1hr.	24hr.	48hr.	72hr.	4days	5days
0	10	2.0	0	0	0	0	0	0	0
10	10	1.5	0	0	0	0	0.5	1.0	1.0
		2.0	0	0	0	0.5	0.5	1.5	2.0
30	10	1.5	0	0	0	1.5	0.5	1.0	1.5
		2.0	0	0	0	1.0	1.5	1.5	2.0

Dose (mg/kg)	Irradiation dose (J/cm ²)	The time before the irradiation (hours)	Grading of skin reaction (pinnae) ¹⁾						
			Observation time						
			pre.	1hr.	24hr.	48hr.	72hr.	4days	5days
0	10	2.0	0	0	0	0	0	0	0
10	10	1.5	0	0	0	1.5	4.0	3.5	3.5
		2.0	0	0	0	5.0	3.0	3.0	3.5
30	10	1.5	0	0	0	3.0	4.0	3.0	3.5
		2.0	0	0	0	2.0	5.0	2.5	3.0

1), Mean score of skin reaction (erythema and eschar formation value + edema formation value)

Table 2-2
Single dose oral phototoxicity test of 8-methoxypsoralen in rats

Grading of skin reaction in females

Dose (mg/kg)	Irradiation dose (J/cm ²)	The time before the irradiation (hours)	Grading of skin reaction ¹⁾						
			Observation time						
			pre.	1hr.	24hr.	48hr.	72hr.	4days	5days
0	5	2.0	0	0	0	0	0	0	0
	10	2.0	0	0	1.3	1.3	1.0	0	0
10	5	1.5	0	0	0	0.3	1.7	1.0	1.0
		2.0	0	0	0.7	2.0	2.0	2.0	2.0
	10	1.5	0	0	0	0	1.0	1.3	2.0
		2.0	0	0	0	1.0	2.0	2.0	2.0
30	5	1.5	0	0	0	1.0	0.7	1.7	2.0
		2.0	0	0	0	1.0	2.0	2.3	2.0
	10	1.5	0	0	0	1.0	1.0	1.7	1.0
		2.0	0	0	0	0.7	0.7	0.7	1.0

Dose (mg/kg)	Irradiation dose (J/cm ²)	The time before the irradiation (hours)	Grading of skin reaction (pinnae) ¹⁾						
			Observation time						
			pre.	1hr.	24hr.	48hr.	72hr.	4days	5days
0	5	2.0	0	0	0	0	0	0	0
	10	2.0	0	0	0	0	0	0	0
10	5	1.5	0	0	0	1.3	1.3	1.7	2.3
		2.0	0	0	0	0	0	0	0
	10	1.5	0	0	0	1.7	2.3	3.0	3.0
		2.0	0	0	0	0.3	0.3	1.3	1.7
30	5	1.5	0	0	0	1.7	5.0	3.0	3.0
		2.0	0	0	0	0.7	0	2.3	2.0
	10	1.5	0	0	0	5.0	5.0	3.7	3.0
		2.0	0	0	0	3.7	3.7	4.3	3.0

1), Mean score of skin reaction (erythema and eschar formation value + edema formation value)

Appendix 1

Single dose oral phototoxicity test of 8-methoxypsoralen in guinea pigs

Grading of skin reaction in individual males

Dose (mg/kg)	Irradiation dose (J/cm ²)	The time before the irradiation (hours)	Animal No.	Grading of skin reaction (no UV-irradiation) ¹⁾										
				----- Observation time -----										
				pre.	1hr.	24hr.	48hr.	72hr.	4days	5days	6days	7days	8days	
10	5	2.5	1	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0
			2	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0
	10	2.5	3	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0
			4	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0
	5	2.0	5	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0
			6	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0
	10	2.0	7	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0
			8	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0
	5	1.5	9	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0
			10	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0
	10	1.5	11	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0
			12	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0
30	5	2.5	13	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	
			14	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	
	10	2.5	15	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	
			16	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	
	5	2.0	17	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	
			18	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	
	10	2.0	19	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	
			20	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	
	5	1.5	21	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	
			22	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	
	10	1.5	23	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	
			24	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	

Dose (mg/kg)	Irradiation dose (J/cm ²)	The time before the irradiation (hours)	Animal No.	Grading of skin reaction (UV-irradiation) ¹⁾										
				----- Observation time -----										
				pre.	1hr.	24hr.	48hr.	72hr.	4days	5days	6days	7days	8days	
10	5	2.5	1	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0
			2	0·0	0·0	2·0	2·1	2·1	2·1	1·1	0·0	0·0	0·0	
	10	2.5	3	0·0	0·0	3·3	3·1	2·1	2·1	1·1	1·1	1·1	1·3	1·3
			4	0·0	0·0	3·3	3·1	2·1	2·1	1·1	0·0	0·1	1·1	1·1
	5	2.0	5	0·0	0·0	3·2	2·1	2·1	1·1	1·1	0·0	0·0	0·0	0·0
			6	0·0	0·0	1·0	2·1	2·1	1·1	1·0	0·0	0·0	1·0	1·0
	10	2.0	7	0·0	0·0	3·3	3·2	3·2	3·2	2·2	1·1	0·0	1·1	1·1
			8	0·0	0·0	3·2	3·2	3·1	1·1	1·0	0·0	0·0	1·1	1·1
	5	1.5	9	0·0	0·0	2·1	3·2	3·1	1·1	1·0	0·0	0·0	1·1	1·1
			10	0·0	0·0	1·0	2·1	3·1	1·1	1·0	0·0	0·0	1·0	1·0
	10	1.5	11	0·0	0·0	3·3	1·0	1·0	1·0	1·0	0·0	0·0	0·0	0·0
			12	0·0	0·0	2·0	3·3	3·3	3·3	3·3	2·3	2·3	2·3	2·3
30	5	2.5	13	0·0	0·0	2·2	3·2	3·1	3·1	2·1	2·3	1·2	1·2	1·2
			14	0·0	0·0	2·0	3·2	2·1	3·1	1·1	0·0	0·0	1·1	1·1
	10	2.5	15	0·0	0·0	3·3	3·2	3·3	3·3	3·2	2·3	2·3	2·3	2·3
			16	0·0	0·0	1·0	2·1	2·1	2·1	1·0	0·0	0·0	1·1	1·1
	5	2.0	17	0·0	0·0	3·3	3·3	3·3	3·3	3·2	2·3	1·3	1·3	1·3
			18	0·0	0·0	3·3	2·1	2·1	2·1	2·1	1·2	0·1	1·2	1·2
	10	2.0	19	0·0	0·0	3·3	2·2	2·2	2·2	2·1	2·3	1·3	1·3	1·3
			20	0·0	0·0	3·3	2·2	2·2	2·2	2·2	1·2	1·3	1·3	1·3
	5	1.5	21	0·0	0·0	3·3	3·2	2·2	2·2	2·1	1·3	1·3	1·4	1·4
			22	0·0	0·0	3·3	2·1	2·1	2·1	2·1	1·1	1·2	2·2	2·2
	10	1.5	23	0·0	0·0	3·3	4·3	4·3	4·3	4·3	1·3	1·3	1·4	1·4
			24	0·0	0·0	3·3	3·2	3·2	3·2	2·2	1·3	0·3	1·3	1·3

1) Erythema and eschar formation value and edema formation value are shown in the left and the right, respectively, in each column for observation time.

Appendix 2-1

Single dose oral phototoxicity test of 8-methoxypsoralen in rats

Grading of skin reaction in individual males

Dose (mg/kg)	Irradiation dose (J/cm ²)	The time before the irradiation (hours)	Animal No.	Grading of skin reaction ¹⁾						
				Observation time						
				pre.	1hr.	24hr.	48hr.	72hr.	4days	5days
0	10	2.0	1	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0
			2	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0
10	10	1.5	3	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	1·0	1·0
			4	0·0	0·0	0·0	0·0	1·0	1·0	1·0
		2.0	5	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	1·0	2·0
			6	0·0	0·0	0·0	1·0	1·0	2·0	2·0
30	10	1.5	7	0·0	0·0	0·0	2·1	1·0	1·0	2·0
			8	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	1·0	1·0
		2.0	9	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	1·0	2·0
			10	0·0	0·0	0·0	1·1	2·1	2·0	2·0

Dose (mg/kg)	Irradiation dose (J/cm ²)	The time before the irradiation (hours)	Animal No.	Grading of skin reaction (pinnae) ¹⁾						
				Observation time						
				pre.	1hr.	24hr.	48hr.	72hr.	4days	5days
0	10	2.0	1	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0
			2	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0
10	10	1.5	3	0·0	0·0	0·0	2·1	3·2	0·0	0·0
			4	0·0	0·0	0·0	0·0	2·1	0·0	0·0
		2.0	5	0·0	0·0	0·0	3·2	3·1	0·0	0·0
			6	0·0	0·0	0·0	3·2	2·0	0·0	0·0
30	10	1.5	7	0·0	0·0	0·0	3·2	3·2	3·0	3·1
			8	0·0	0·0	0·0	1·0	2·1	2·1	2·1
		2.0	9	0·0	0·0	0·0	1·1	3·2	2·0	2·1
			10	0·0	0·0	0·0	1·1	3·2	2·1	2·1

1) Erythema and eschar formation value and edema formation value are shown in the left and the right, respectively, in each column for observation time.

Appendix 2-2

Single dose oral phototoxicity test of 8-methoxypsoralen in rats

Grading of skin reaction in individual females

Dose (mg/kg)	Irradiation dose (J/cm ²)	The time before the irradiation (hours)	Animal No.	Grading of skin reaction ¹⁾						
				Observation time						
				pre.	1hr.	24hr.	48hr.	72hr.	4days	5days
0	5	2.0	11	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0
			12	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0
			13	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0
	10	2.0	14	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0
			15	0·0	0·0	2·0	2·0	1·0	0·0	0·0
			16	0·0	0·0	2·0	2·0	2·0	0·0	0·0
10	5	1.5	17	0·0	0·0	0·0	0·0	1·0	1·0	1·0
			18	0·0	0·0	0·0	0·0	2·1	1·0	1·0
			19	0·0	0·0	0·0	1·0	1·0	1·0	1·0
	10	2.0	20	0·0	0·0	1·1	2·0	2·0	2·0	2·0
			21	0·0	0·0	0·0	2·0	2·0	2·0	2·0
			22	0·0	0·0	0·0	2·0	2·0	2·0	2·0
			23	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	2·0
	10	1.5	24	0·0	0·0	0·0	0·0	2·0	1·0	2·0
			25	0·0	0·0	0·0	0·0	1·0	1·0	2·0
		2.0	26	0·0	0·0	0·0	1·0	2·0	2·0	2·0
27			0·0	0·0	0·0	1·0	2·0	2·0	2·0	
			28	0·0	0·0	0·0	1·0	2·0	2·0	
30	5	1.5	29	0·0	0·0	0·0	1·0	1·0	2·0	2·0
			30	0·0	0·0	0·0	1·0	1·0	2·0	2·0
			31	0·0	0·0	0·0	1·0	0·0	1·0	2·0
		2.0	32	0·0	0·0	0·0	1·0	2·1	2·1	2·0
			33	0·0	0·0	0·0	1·0	2·0	2·0	2·0
			34	0·0	0·0	0·0	1·0	1·0	2·0	2·0
	10	1.5	35	0·0	0·0	0·0	1·0	1·0	2·0	1·0
			36	0·0	0·0	0·0	1·0	1·0	2·0	1·0
			37	0·0	0·0	0·0	1·0	1·0	1·0	1·0
		2.0	38	0·0	0·0	0·0	1·0	1·0	1·0	1·0
			39	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	0·0	1·0
			40	0·0	0·0	0·0	1·0	1·0	1·0	1·0

1) Erythema and eschar formation value and edema formation value are shown in the left and the right, respectively, in each column for observation time.

分担研究報告書

5. 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 上級研究員

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、光遺伝毒性試験として確立することを目的としている。

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。

A. 研究目的

in vivo の組織における作用を調べることが重要である。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。ショウジョウバエの翅毛スポットテストは *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¹⁾。Negishi ら²⁾はこの試験系により、8-メキシソラレン (8-MOP) が *in vivo* でも光遺伝毒性を示すことを明らかにした。

本研究ではこれまでに、照明装置として UVA を含むサンライトシュミレーター (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)についても、この試験系で検出可能か否かを検討するために、光遺伝毒性試験を実施した。

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*, *iv*; *spa^{pol}*)の雌と、炎毛系統(*flr3/TM3*, *Ser*)の雄を交配し F1 個体を実験に用いた(図1)。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 CPZ の入ったシャーレに移して光照射を行った。飼育温度は 25±1°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. CPZ 処理および光照射

上記の幼虫を、1.5 mL の 0.25M スクロース液(媒体)または CPZ 懸濁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ュミレーター(SOL500, Dr Hönle)を用いた。UVA の照射強度は Dr Hönle の測定器では 1 mW/cm² (Topcon 製の測定器では 1.6-1.7 mW/cm²)とし、非照射群と 5 時間照射群を設けた。5 時間照射群の照射量は 18 J/cm² に相当する。

3. 標本作製

照射後の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(図1)。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か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ロット(SS)および大シングルスロット(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(図2)。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、陰性対照群(非照射: 0 μg/mL)とその他の群、および照射: 0 μg/mL 群とその他の照射群の間で、Kastenbaum and Bowman の表(1970)により有意差検定を行った。

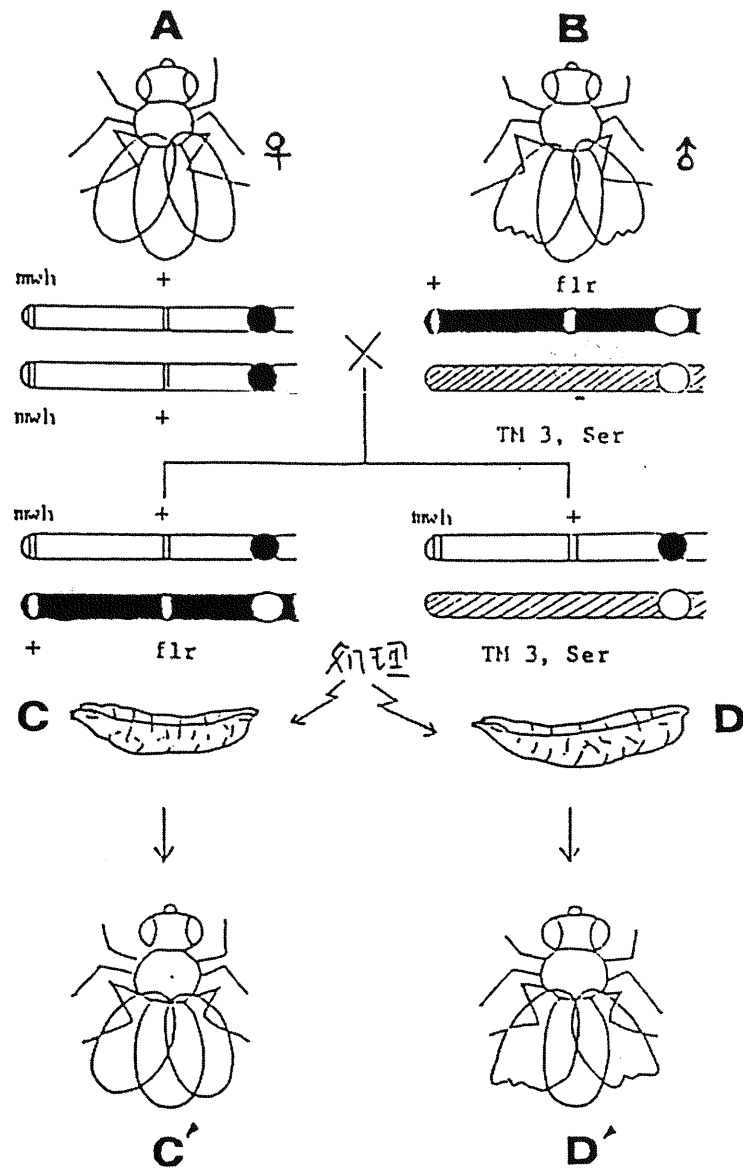


図1. シロジョウバエ翅毛スポットテストの概要

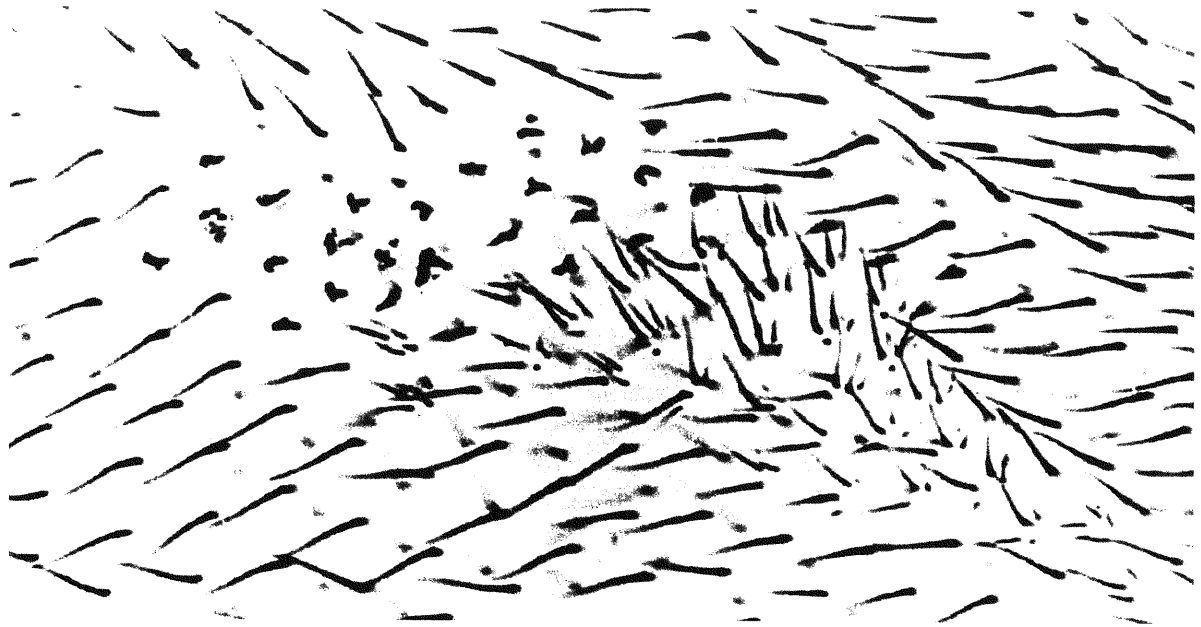


図2. ふたごスポット(TS)の形態

C. 研究結果

翅毛スポットの観察結果を表に示す。サンライトシュミレーター照射の有無に関わらず、陰性対照群(非照射:0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)と照射:0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群との間の翅毛スポット頻度の統計学的な有意差は認められなかった。照射:0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群では、陰性対照群より小シングルスポット、大シングルスポットおよび全スポットがやや高い値を示したが、有意差は認められなかった。

照射群においては、CPZ の用量に依存して小シングルスポットおよび全スポットが減少する傾向がみられ、照射:0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群と照射:100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群との間には有意差が認められた。照射:0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群では、陰性対照群と比較して有意差は認められなかったものの、これ以前の実験結果においても、常に陰性対照値より高い翅毛スポット頻度を示したことから、僅かながら翅毛スポットが誘発されているものと考えられる。照射

後の CPZ 溶液は、褐色に帯色しており、照射:100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群ではかなり暗色を呈していたので、CPZ の用量に依存して翅毛スポット頻度が減少したのは、照射光が CPZ 溶液に吸収されたためと推察される。

D. 考察

これまで、サンライトシュミレーター(SOL500, Dr Hönle)を用いて、ショウジョウバエの翅毛スポットテストによる光遺伝毒性試験の開発を行ってきた。非照射で8-MOP処理を行った場合には、翅毛スポットの誘発は認められなかったが、照射した場合には8-MOPの用量に依存した翅毛スポットの顕著な誘発が認められ、光遺伝毒性が検出された。しかし、本年度に行ったCPZの場合には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、これらの化合物の遺伝毒性を、容易に検出する検定菌株の種類は異なっていた。8-MOPはサルモネラ菌の TA102 や大腸菌の WP2/pKM101 で容易に検出されるのに対して、CPZ はサルモネラ菌の TA98 で容易に検出された。したがって、これらの化合物が示す光遺伝毒性の発現メカニズムが異なるものと考えられる。翅毛スポットテストによる光遺伝毒性試験で、8-MOP のみに光遺伝毒性が検出されたのは、両化合物の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。

E. 結論

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は、光遺伝毒性物質の 8-MOP を検出できたが、CPZ は検出できなかった。その理由としては、光遺伝毒性の発現メカニズムの相違が考えられる。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。

F. 引用文献

- 1) Graf, U., Würigler, 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.
- 2) 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.

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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

6. 新規一重項酸素検出プローブの開発一

分担研究者 長野哲雄 東京大学大学院薬学系研究科・教授

研究要旨

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ジ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。そして本プローブ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、初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 photoinduced 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。

A 研究目的

一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) は活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) の一種で、その反応性の高さ及び特異な反応性から一酸化窒素 (NO) と同様、生体厚生科学研究報告書38内での機能が注目されている分子である。しかしこれまで生理的条件下、 $^1\text{O}_2$ を特異的かつ高感度

に検出する方法はなかった。このような中、ごく最近当研究室で $^1\text{O}_2$ の蛍光プローブDPAX類の開発に成功した。DPAX類は $^1\text{O}_2$ との反応による蛍光強度の増加を検出原理とした初めての $^1\text{O}_2$ 蛍光検出プローブである。しかし、DPAX類は生理的条件下 $^1\text{O}_2$ を検出するのに十分な感度を有していなかった。そこで我々は