

題の無いよう慎重に行った。また、本研究班においては「提供されたヒト試料を用いる」および「人を対象とする」研究は行われていないので、ヒトへの倫理面で問題となることはなかった。

### C. 研究結果

(1) rasH2、p53<sup>+/-</sup>、Tg.AC、Xpa及びXpa/p53<sup>+/-</sup>マウスの発がん物質に対する高感受性に関するメカニズム研究についての文献調査を今年度も実施した。これらの動物での発癌増強メカニズムとして、種々の新しい知見が集積されてきているが、未だその全体像を把握するには十分ではなく、今後さらなる研究が必要である。ENUでイニシエートされたrasH2マウス子宮発癌モデルにおいては、子宮腫瘍の発現がethinylestradiol (EE) 投与により抑制され、今までの通常動物におけるEEが子宮腫瘍誘発を促進するとの報告と異なった知見が得られた。

(2) 6種類のモデル化合物を用い、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験と小核試験結果の整合性、さらにマウス骨髄小核試験との結果を比較検討し、小核試験による染色体数的異常検出に関して検討を加えた。その結果、小核試験で染色体数的異常を検出することに関して限界のあることが判明し、今後さらに検討を要することが明らかとなった。

(3) 免疫毒性試験法に関する国内外の動向の調査

免疫毒性試験法に関する文献調査及び国内外の動向調査を行って、関連の追加資料を収集した。ガイダンス（案）検討の参考とした主な追加資料は、以下の通りである。また、昨年度作成したガイダンス中間案に関して、平成14年8月及び平成15年2月に2回の検討会議を開催し、修正を加え、最終案及びその英訳を作成した。

(4) 臨床QT-EWGとの整合の必要を再確認することになり、その結果、臨床QT専門家会議により、相互の評価における理解を図った。その結果、現在討議中の臨床QT評価試験戦略では非臨床QT評価は第一相の試験デザインに対し役割はなく、第二相以下の試験デザインにのみ用いられることが確認された。また、ガイドライン本文に統合リスク評価の項を作成、導入し、試験系の部分をAnnexにする案としてのガ

イドラインがほぼ完成した。今後、現在進行中のプロジェクト結果を解析、討議し、統合評価判断と臨床QT評価試験に対する役割を明確にしてガイドラインの国際的合意をはかる予定である。

(5) 残留溶媒ガイドライン値の改正方法に関する公文书案の部分改正を行い、運営委員会でその改正案が了承された。主な改定点は改正等の提案方法、データの質に関する記載ならびに改正結果の伝達方法の変更である。TetrahydrofuranおよびN-methylpyrrolidoneの改正PDEについては国際的な合意に至った。なお、ethylene glycolに関しては、新提案の代謝に関する資料について、人での安全性を十分保証できないとの見解が同意されたが、提案者からの内容を再検討した結果、ethylene glycolは溶媒としての使用ではなかったため、医薬品中の不純物としての扱いが適切であるとの結論となり、不純物ガイドラインに従って対応するよう勧告した。

### D. 考察

(1) rasH2マウスの高い発癌感受性には導入遺伝子の発現過剰が一次的な要因になっていることが明らかであるが、本モデル動物を化学物質などのがん原性評価に応用していく為には、更にカテゴリーの異なる多くの発癌性物質の成績について病理・分子生物学的解析を実施し、メカニズムの解明をしていくことが必要である。

ENUでイニシエートされたrasH2マウス子宮発癌モデルにおいては、子宮腫瘍の発現が2.5ppmのEE投与により抑制され、今までに野生型動物で報告されているEEの子宮腫瘍を促進するという報告と反対の知見が得られた。p53欠損マウスモデルの医薬品の発がん性評価における有用性は、単に短期モデルであることに留まらず、従来の長期発がん性試験やそれに関連したメカニズム試験では実施が難しかった仮説検証型の実験が比較的容易なことにあると思われる。一方、医薬品の発がん性評価に対して本モデルの利用を推進していくためには、本モデルの生物学的特性や発がん感受性を左右する遺伝的背景や環境要因に関する情報の整備を更に進める必要があると考えられる。

Tg.ACマウスの発がん高感受性について新たな知見が得られている。一方、その高感受性にどのような機序が関与しているかについては不明な点が多く、今後さらなる研究知見の蓄積が必要と思われる。

Xpaマウスでは、遺伝子突然変異の蓄積に至る過程に細胞周期及びapoptosisの制御が関わっており、発癌にTCR及びGGRを含む複数の修復機構に関与する要因により支配されることが明かになった。Xpaマウスの発がん促進には、免疫抑制などの非遺伝的な要因も関与する可能性が示され、このような要因を明確にしてゆく必要があると思われた。一方、Xpaマウスには、DNA障害（DNA附加体形成）に起因すると思われる毒性（DMBAの腹腔内投与による急性毒性、PhIPによる消化管障害、UVBあるいはDMBAによる皮膚の急性炎症など）が野生型マウスに比して強く発現する為に、標準的な毒性試験に用いるには問題があると思われた。

- (2) In vitro における染色体異常誘発性の評価には、現在もほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験が行われている。最近、in vivo同様 in vitro 小核で代替できるのではないかと議論が国際的な場で多くなされている。さらに、小核試験を染色体異常試験の代替法としてだけでなく、染色体の数的異常検出系として注目されるようになってきた。本年度はチャイニーズ・ハムスター細胞株を用いる染色体異常試験において、倍数体を誘発することが知られている化学物質を中心に、in vitroおよびin vivoで小核誘発性が認められるかについて検討した。その結果、倍数性を効率よく誘発する化学物質はin vitroにおいて小核を誘発することが示されたが、in vivoでは小核の誘発はほとんど観察できないことが判明した。また、紡錘体阻害剤であるビンカアルカロイドのヴィンブラスチンを用いた検討で、小核は誘発したが、染色体の異常は構造、数的共に認められなかったこともあり、染色体の数の異常と小核誘発性に関してはさらに検討が必要であることが示唆された。
- (3) 今後は、免疫毒性データの収集及びデータ解析を行う必要がある。その解析結果に基づき、ガイダンス案の修正を検討する。また、今回のガイダンス案の対象から除外した、薬物アレルギー関連の試験法

に関しても、さらに検討を継続する必要がある。

- (4) 本年度は収集し、まとめたコメントを基にガイドライン案の修正を行った。さらにQT評価試験の進め方の修正の合意および統合リスク評価の考え方および文書化の必要性が認識された。統合リスク評価の考え方は臨床QT-専門家との整合の必要を再確認することになり、相互の評価における理解を図った。結果として、現在討議中の臨床QT評価試験戦略では非臨床QT評価は第一相の試験デザインに対し役割はなく、第二相以下の試験デザインにのみ用いられることとなった。非臨床QT評価のヒトにおけるリスクに対する予測性および安全性保証の確実性に関しては現在進行中のデータベース収集プロジェクトによるデータ解析の結果如何であることを両EWG共に認識している。これらの議論を基にガイドライン本文に統合リスク評価の項を作成、導入し、試験系の部分をAnnexにする案としてのガイドラインがほぼ完成し、来年度には国際的合意に達する見込みである。
- (5) 改正公文書の変更事項について、多くの部分が改正された。しかし、提出された毒性試験等のデータを解析評価する上では、GLPの要求が削除された以外に特に変更は行われていない。PDEの改正が行われたtetrahydrofuranおよびN-methylpyrrolidoneに関しては、内容に関する問題（パブリックコメントで意見なし）は全くなかったものの、一部タイプミスや計算方法の記載に不統一な部分があり、不統一な部分に関しては記載上の問題であるため、ライターとして改正した。本PDEの改正に当たり、FDAによるサインオフが実質的に1年以上遅れ、当初は改正公文書の合意がないことを理由にしていたが、合意後も半年以上を要し、今後の対応が懸念される。

## E. 結論

- (1) rasH2、p53<sup>+/-</sup>、Tg.AC、Xpa及びXpa/p53<sup>+/-</sup>マウスの発がん物質に対する高感受性に関するメカニズム研究についての文献調査を今年度も実施した。これらの動物での発癌増強メカニズムとして、種々の新しい知見が集積されてきているが、未だその全体像を把握するには十分ではなく、今後さらなる研究が

必要である。ENUでイニシエートされたrasH2マウス子宮発癌モデルにおいては、子宮腫瘍の発現が ethinylestradiol (EE) 投与により抑制され、今までの EEが子宮腫瘍誘発を促進するという報告とまったく反対の知見が得られた。

- (2) 今回の共同研究で用いた6種類の被験物質による染色体の数的異常誘発をin vitroおよびin vivoにおいて検討した。その結果、in vitroで数的異常を効率よく誘発する化学物質は小核も誘発したが、in vivoにおいては染色体の数的異常および小核の誘発は共に観察されなかった。従って、特にin vitroにおける染色体数的異常を誘発する化学物質による小核誘発機構の解明が急務である。
- (3) 平成14年度は、免疫毒性試験法ガイダンス（案）を作成した。また、ICHに提案した免疫毒性データ収集のための調査票の作成を行った。
- (4) 本年度はステップ2に到達したことを受けて、コメント対応によりコメントを収集し、行政サイドのラポーターが日米欧のコメントをまとめ、これを基に専門家会議で協議した。その結果評価試験戦略に

修正を加え、また統合リスク評価の考えを導入し、ガイドライン本文に項として導入し、本文部分は完成に近づいた。統合リスク評価の部分に関してはデータによる評価系のリスク予測と精度を確認する必要が次回専門家会議の課題として残っている。本ガイドラインの国際的合意は来年度中に達成される予定である。

- (5) 残留溶媒ガイドライン値の改正方法に関する公文書、tetrahydrofuranおよびN-methylpyrrolidoneの改正PDE文書がサインオフされた。なお、ethylene glycolに関しては、溶媒としてではなく、医薬品中の不純物としての扱いが適切であるとの結論となり、不純物ガイドラインに従って対応するよう勧告した。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

各協力研究者の報告書を参照。

# 厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業） 分担研究報告書

## 一 遺伝子改変マウスを用いた短期発癌性試験についての情報収集一

分担研究者：三森 国敏（東京農工大学農学部）  
協力研究者：林 裕造（NPO食品保健科学情報交流協議会 理事長）  
玉置 憲一（（財）実験動物中央研究所 副所長）  
臼居 敏仁（（財）実験動物中央研究所 主席研究員）  
広瀬 雅雄（国立医薬品食品衛生研究所 病理部 部長）  
西川 秋佳（国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長）  
菅野 純（国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 部長）  
梅村 隆志（国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官）  
林 真（国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長）  
務台 衛（三菱ウェルファーマ（株）創薬本部安全性研究所 主任研究員）  
青木 豊彦（エーザイ（株）薬理安全性研究所 主幹研究員）  
久田 茂（帝国臓器製薬（株）安全性研究部 主席研究員）

### 研究要旨

rasH2、p53<sup>+/-</sup>、Tg.AC、Xpa及びXpa/p53<sup>+/-</sup>マウスの発がん物質に対する高感受性に関するメカニズム研究についての文献調査を今年度も実施した。これらの動物での発癌増強メカニズムとして、種々の新しい知見が集積されてきているが、未だその全体像を把握するには十分ではなく、今後さらなる研究が必要である。ENUでイニシエートされたrasH2マウス子宮発癌モデルにおいては、子宮腫瘍の発現がethinylestradiol (EE) 投与により抑制され、今までのEEが子宮腫瘍誘発を促進するという報告とまったく反対の知見が得られた。

キーワード： rasH2マウス、p53<sup>+/-</sup>マウス、Tg.ACマウス、Xpa<sup>-/-</sup>マウス

### A. 研究目的

第4回国際ハーモナイゼーション会議（ICH4）[1]における新しいがん原性試験ガイドラインの策定により、我が国では1999年11月に医薬品のがん原性試験ガイドラインが大幅に改定された。このガイドラインでは、従来の長期がん原性試験の他に、トランスジェニック（Tg）やノックアウト（KO）マウスなどの遺伝子改変動物を用いた短期発がん試験モデル、イニシエーション・プロモーションモデルや新生仔動物モデルの中から一つの試験を実施してがん原性を評価することが可能である。現在使用可能な遺伝子改変動物モデ

ルとしては、ヒト型c-Ha-ras遺伝子導入Tgマウス（rasH2マウス）モデル、がん抑制遺伝子p53の片側のアレル（exon5）を欠損させたC57BL p53<sup>+/-</sup>マウス（p53<sup>+/-</sup>マウス）モデル、活性型v-Ha-ras遺伝子を胎児型 $\gamma$ -globinプロモーターとSV40と共に導入したTg.ACマウスモデル、および色素性乾皮症修復遺伝子を欠損させたXPA<sup>-/-</sup>マウスモデルがあげられる。国際生命科学協会（International Life Science Institute; ILSI）のHealth and Environmental Science Institute（HESI）では、遺伝子改変動物のがん原性評価法の有用性についての検証作業を実施し、2000年11月には国際ワークショップ

(ILSI-HESI Workshop on the Evaluation of Alternative Methods for Carcinogenicity Testing) が開催され、その有用性が確認された[2]。しかし、これらのモデルにおいて何故発癌が増強するかについてのメカニズムについては全て明確になっているわけではない。本研究班では、これらの遺伝子改変マウスにおける発癌増強メカニズムがどこまで解明されたかについての文献収集を昨年度に続き行い、それらの問題点を明らかにした。また、rasH2マウスの子宮発癌モデルを用いて ethinylestradiol (EE) の子宮腫瘍修飾作用を検討したので、その成績も報告する。

## B. 研究方法

昨年度に引き続き、CB6F1rasH2マウス、p53 (+/-) およびp53 (-/-) マウス、Tg.ACマウス、Xpaノックアウトマウス（以下Xpaマウス）及びXpa/p53<sup>+/+</sup>ノックアウトマウス（以下Xpa/p53<sup>+/+</sup>マウス）に関する発表論文を収集し、医薬品の発がん性評価における本モデル動物の発がん特性と利用可能性に関する成績をまとめた。また、ENU 120mg/kgを腹腔内投与したrasH2マウスに2.5ppmのEEを24週間（実験1）あるいは6週間（実験2）混餌投与させ、陽性対照として設けたICRマウス群（ENU 50mg/kgを子宮腔内投与した後、2.5ppmのEEを同様に投与）と比較検討した。

## C. 研究結果

rasH2マウス：医薬品安全性試験等の検定用のためには、導入遺伝子の継続的な安定性が保障されなければならないことから、挿入部分を詳細にクローニングし、3コピーが縦列にあり、塩基配列が保存されていた最初の導入された遺伝子と完全に一致していること、15番染色体E3に十数代の繁殖で保存されていることが確認された。さらに詳細な検討で、マウスの染色体の導入部位に百数十bpの欠損が生じ、これも安定的に継代されている事がわかった。既知の遺伝子と一致する塩基配列はこの欠損部位にはないことから挿入変異は無いと考えられた。また各世代毎のコドン12および16の変異も調べ、点突然変異は全くないことも確認され、アッセイモデルとしての基本的条件をこのモデルが有していることが確認された[3]。

rasH2マウスの発がん特性に関する報告では、urethane (UR) による肺の増殖病変に対して、cinnamaldehyde (CNMA) 投与による抑制効果が認められなかったことから、4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) を用いた肺腫瘍でのCNMAの抑制作用を検討したところ肺発がん抑制作用を示したことが報告されている[4]。N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) の単回投与により子宮内膜の腺がんとatypical hyperplasiaが高率に発生することが報告され、子宮内膜がんのモデル動物の可能性が示唆されている[5]。rasH2マウスのURまたはNNKのrasH2マウスでの誘発肺腫瘍に対するGlycerolの修飾作用について検討した報告では、glycerolのプロモーション作用は認められなかったことが報告されている[6]。

rasH2マウスのphenotypeに関する報告としては、rasH2マウスで骨格筋(femoralis pectoralis)で筋肉繊維の軽度であるがdystrophyがみられ10週令、34週令のTgマウスに同程度に見られ、加齢による変化はなさそうであることが記載されている[7]。

ILSI-HESIの国際的バリデーションの結果、遺伝子操作マウスの有用性が認識されてきたことから、企業側から規制側から遺伝子操作マウス発がん性試験を従来のマウス長期発がん性試験にかえて実施すべきとの論調が起きている[8-10]。

子宮発癌モデルを用いた実験1では、ICRマウスにおけるadenocarcinomaの発現率はENU単独群で0%、ENU+EE群で37.5%と有意な差がみられた。Atypical hyperplasia及びendometrial hyperplasiaの発現率も同様にENU+EE群で有意な増加を示した。一方、rasH2マウスでは、ENU単独群においてadenocarcinomaが55.6%、atypical hyperplasiaが33.3%、endometrial hyperplasiaが22.2%の発現率をそれぞれ示したが、ENU+EE群ではこれら子宮増殖性病変の発現は全く認められなかった。実験2では、子宮内膜上皮及び子宮腺上皮におけるエストロゲンレセプター $\alpha$  (ER $\alpha$ )の発現を免疫組織化学的に検索した。ICRマウスではENU単独群でその発現は軽度であったが、ENU+EE群では中等度～高度を示し、増強がみられた。一方、rasH2マウスではENU単独群とENU+EE群間に差はみられなかった。

p53+/-マウス：発がん性検索法としての本モデルの有

用性に関する報告としては、Epstein-Barr virusのED-L2プロモーター (L2) を用いたcyclinD1トランスジェニックマウス (L2D1+マウス) では、口腔および食道の異形成が好発したとの報告があった[11]。さらにこのL2D1+マウスとp53欠損マウスを交配したL2D1+/p53KOマウスで口腔がんおよび食道がんが高率に発生すること、および化学療法剤のSulindacの投薬により発がん率が抑制された。また、p53欠損マウスにmethyl-N-amyl nitrosamineを投与したところ食道がんが誘発された[12]。発がん率はNull (-/-) >Hetero (+/-) >wild (+/+)であり、過半数の癌がp53遺伝子(exon 5-8)の変異を伴っていた。

ダブルノックアウトマウスに関する報告として以下の文献があった。

①塩基除去修復に関わる酵素であるPoly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) をノックアウトしたPARP-1 (-/-) / p53 (-/-) マウスは、PARP-1 (+/+) / p53 (-/-) マウスを比べ自然発生腫瘍の発生が遅延し、PARP-1 (-/-) /p53nullマウス由来の線維芽細胞の形質転換能はPARP-1 (+/+) / p53 (-/-) マウスより低かった[13]。また、iNOSの発現とNOの産生について前者は後者より著しく低下していることから、両マウスの発がん感受性の違いにはPARP-1の欠損が関与していると考えられた。

②T細胞レセプターの構成タンパクであるT-cell receptor beta chain (TCRβ) の欠損は、消化管粘膜の免疫系の破綻を介して消化管の炎症を引き起こすと考えられており、TCRβ欠損マウスはヒトの潰瘍性大腸炎のモデルとして確立されている[14]。このTCRβ欠損マウスとp53欠損マウスを交配し得られたTCRβ (-/-) /p53nullマウスにおいて、浸潤性大腸腺がんが高率に発生した。

③Thrombospondin-1 (TSP1) は、様々な機能を介在する細胞外Ca結合タンパクであり、発がんプログレッションの抑制作用を持つことが知られている[15]。TSP1とp53のダブルノックアウトマウスを用いた検討では、TSP1欠損による自然発生腫瘍の発現時期の早期化(潜伏時間の長期化、TSP1 (-) /p53 (-/-) < TSP1 (+) /p53 (-/-) やTSP1 (-) /p53 (+/-) < TSP1 (+) /p53 (+/-)) がみられたが、発生腫瘍の型や発生頻度には有意な影

響はみられなかった。

p53欠損マウスの系統差を検討するため、BALB/cとDBA/2を背景としたp53 (-/-) マウスの自然発生腫瘍を比較したところ、両者ともリンパ腫が高率に発生したが、特にBALB/cでのみ血管肉腫が比較的高率にみられた[16]。また、同じ2系統を背景としたp53 (+/-) マウスに放射線照射するモデルでBALB/cにのみ乳がんが高率発生した。自然発生腫瘍の早期発現期に近い10ヶ月齢のp53 (+/-) マウスにカロリー摂取制限を施したところ、Ad libitum (AL) 摂餌に比べ制限給餌により腫瘍発現時期が有意に遅延した[17]。

p53 (-/-) マウス皮膚由来の線維芽細胞における薬剤耐性に関わるmultidrug transporter (P-glycoprotein, P-gp) およびその遺伝子であるMdr1の発現量は、野生型マウス由来のそれに比べ高かった[18]。このp53 (-/-) マウス由来線維芽細胞のP-gp発現量は野生型p53遺伝子の導入によって抑制的に制御された。すなわち、一部の臓器ではP-gpの発現制御にp53が関与していることが示唆された。

Tg.ACマウス: Tg.ACモデルのがん原性代替試験法としての有用性の限界からか発がん増強メカニズム解明を含めた新規の研究に関する文献情報は極めて少なかったが、Tg.ACモデルに関する成績を網羅したreview articleがFDA CDERから報告され[19]。

Wrn遺伝子(ゲノムの安定性維持に関する遺伝子であり、ヒトのpremature ageingや発がんを引き起こす常染色体劣性遺伝病であるWerner症候群の関連遺伝子)の突然変異マウスと交配したTg.ACマウス(Tg.AC/WrnΔhel/Δhel)に自然発生的に前胃乳頭腫が発生し、Tg.AC導入遺伝子の発現が認められた。一方、WrnΔhel/Δhelマウスに前胃乳頭腫の発生は認められなかった。また、Tg.ACマウスの導入遺伝子が、hypermethylationやgene silencingに関与する高度に繰り返しの多い構造であるLine-1 elements中に挿入されており、本マウスにおける腫瘍発生には、遺伝的不安定性が重要な要因であることが示唆された[20]。

Tg.ACマウスとK6/ODCマウス(表皮角化細胞にOrnithine decarboxylase (ODC) 遺伝子を高度に発現したtransgenicマウス[21]を交配させて作成したdouble transgenicマウス(ODC/rasマウス)では10週齢以降で

は約70～80%の発生頻度と若齢でも自然発生的に皮膚腫瘍が発生した。また、 $\alpha$ -difluoromethylornithine (DMFO、ODC阻害剤)をODC/rasマウスに投与すると自然発生皮膚腫瘍の発生を抑制しDMFOはTg.ACマウスにおいても皮膚創傷による皮膚乳頭種の発生も抑制した。従って、ODCの過剰発現と活性化したv-Ha-rasの発現が協調して早期に皮膚腫瘍を誘導したものと考えられた[22]。

Tg.ACマウスの皮膚腫瘍発生/導入遺伝子の発現と加齢の関係を調べたところ、週齢が高くなるに従って、Tg.ACマウスにおける皮膚腫瘍発生の発生頻度は高くなった。この腫瘍発生と加齢との関係は、TPA処置、皮膚創傷、UV照射いずれの処置を行ったTg.ACマウスでも同様であった。また、TPA処理後の導入遺伝子の発現もマウスの週齢が高くなるに従ってより早期から認められた。従って、Tg.ACマウスにおける皮膚発がんプロモーション作用の感受性と導入遺伝子の発現には加齢依存的な感受性があることが明らかとなった[23]。

TPAの媒体を用いてTg.ACマウスに皮膚塗布した後の皮膚乳頭腫発生への影響を調べたところ、アセトンやアルコール系媒体に比べ非アルコール系媒体(DMSO、オリーブ油)を用いた場合、腫瘍発生の遅延・減弱がみられた[24]。また、有機溶媒の水分含量についても配慮が必要で媒体中の水分含量が14%以上では皮膚の保湿性(wettability)に影響を及ぼし、被験物質が均一に分布できなくなるため試験結果が異なる原因となることが示唆された[19]。実際、reserpineにおける試験では20%DMSOを含むアセトンが媒体として用いられているため、陰性の結果が得られているものの疑問が残っている[25]。

Xpaノックアウトマウス：発がん感受性に関して、Takahashiら[26]は、XPA<sup>-/-</sup>マウス(Xpaマウス)、XPA<sup>+/-</sup>及び<sup>+/+</sup>マウス(C3H/HeN congenic line)を無処置で16ヶ月齢まで飼育し、また、Aflatoxin B1 (AFB1)を0.6及び1.5mg/kg b.w.の用量で7日齢に単回投与し、11ヶ月齢まで発生する肝腫瘍を比較した。その結果、無処置群では、Xpaマウスの肝腫瘍発生率及び個体当たりの腫瘍数はいずれも、XPA<sup>+/-</sup>及び<sup>+/+</sup>マウスに比して有意に高かった。また、AFB1投与群においても、Xpaマ

ウスの肝腫瘍発生率及び個体当たりの腫瘍数はいずれもXPA<sup>+/-</sup>及び<sup>+/+</sup>マウスに比して有意に高かった。

van Oostenら[27]は、Xpaマウス(Global repair: GGR及びtranscription coupled repair: TCRの両者が欠損)、Xpcマウス(GGRの欠損)及びCsbマウス(TCRの欠損)に、UVB(250及び2000J/m<sup>2</sup>)を照射した後の照射部位の表皮細胞(keratinocyte)について、apoptosisの発生、細胞周期及び病理組織像を検討した。その結果、Xpa及びCsbマウス(共通してTCRが欠損)では照射部位の表皮細胞にapoptosisが発生し、caspase-3陽性細胞数が増加したが、G2期の細胞数は増加しなかった。一方、Xpcマウスではapoptosis及びCaspase-3陽性細胞数の増加はみられなかったが、照射24時間後からS期及びG2期の細胞数が増加した。野生型マウスでは、UVB照射後にS期の細胞が増加したが、G2期の細胞数は増加しなかった。これらの事実から、TCRの存在下ではDNA障害細胞がS期に入り、apoptosisの発生が抑制され、GGR活性がなければG2期で細胞周期が停止することが示された。従って、Xpcマウスでは、photolesionを含むDNA障害が長時間保持され、mismatch repairによりDNA障害が修復されると考えられた。一方、XpaマウスやCsbマウスではTCRの欠損により、DNA障害を受けた細胞がS期に入らずにapoptosisに陥り、表皮細胞の過形成が発生することが明らかになった。加齢によりHprt遺伝子の変異がXpcマウスで顕著に増加するがXpaマウスでは増加せず、Xpa/p53<sup>+/-</sup>マウスでは増加する事実も、XpcマウスではbulkyなDNA附加体がapoptosisにより除去されないことに関連するものと思われた[28]。

Wijnhovenら[29]は、前述の3系統のマウスにDMBAを単回腹腔内投与して、Hprt及びAprt遺伝子の点突然変異、LOH変異、及びSCEの発生について比較し、発がん感受性との関連性を検討した。その結果、野生型及びXpcマウスはDMBA 40mg/kg群で全例が生存したのに対して、Xpa及びCsbマウスでは1/20の用量から死亡し、DMBAの毒性発現に大きな差がみられた。Xpcマウスでは、Hprt及びAprt遺伝子の変異がheterozygous動物(XPC<sup>+/-</sup>)に比して約2倍に増加し、GGRがDMBA附加体の除去に関与していることが伺われた。また、SCEの発生頻度は、Xpcマウスに比してCsb及びXpaマ

ウスで高く、細胞毒性の強さ及び染色体間組換えの発生頻度は、NER欠損例における発がん感受性の差（XP患者の発癌感受性が高く、TCR欠損によるCockayne syndrome患者では腫瘍発生が増加しない。また、Csbマウスの発癌感受性はXpマウスに比して低い）と相関しなかった。

Rebelら[30]は、p53（変異p53、抗体Pab240、Novocastra）陽性巣（以下、p53<sup>+</sup> foci）数が皮膚発がんを予測する有用な指標であることを、Hairless SKH1マウス、Hairless Xpaマウス及びHairless p53<sup>+/+</sup>マウスに対するUVB照射による皮膚発がん系を用いて示した。

Boonstraら[31]は、Xpa、Xpc、及びCbsマウスを用いてUVB照射による免疫修飾を比較した。3系統のマウスにおける免疫能（リンパ球サブセット、マイトジェンに対する増殖性及びサイトカイン産生能など）には差がみられなかった。一方、UVB照射群では、Xpaマウスのみ、Th1型の接触過敏症反応及びUVB照射局所のリンパ節におけるIFN- $\gamma$ 産生の抑制がみられた。また、LPS刺激によるTNF- $\alpha$ 及びIL-10産生は、Xpa及びCsbマウスで有意に促進され、リンパ節（UVB照射部位の所属リンパ節）細胞数は、Xpaマウスで顕著に増加したが、Xpcマウスには増加がみられなかった。

Miyauchi-Hashimotoら[32]は、DMBA皮膚塗布による免疫能の修飾について検討した。Xpaマウスにおいて、DMBA塗布耳介の肥厚、DMBA塗布皮膚におけるLangerhans細胞の減少（炎症の亢進と考えられる）、接触過敏症反応の抑制、DMBA塗布皮膚におけるPGE<sub>2</sub>、IL-10及びTNF- $\alpha$ の産生、及び血清IL-10濃度の増加が野生型マウスに比してより顕著に認められた。

Rebelら[33]は、ODC阻害剤であるdifluoromethylornithineの飲水投与により、hairless XpaマウスにおけるUVB誘発皮膚発がんが有意に抑制されたことを報告した。

Dingら[34]は、Xpaマウスの線維芽細胞においてRAの産生能が低く、CYP1A1 mRNAの発現も低レベルであり、紫外線誘発皮膚癌細胞におけるRA受容体の発現も低レベルであったことを報告した。

#### D. 考 察

ILSI-HESIの2001年に行われた国際バリデーション

研究の総括で、従来の長期がん原性試験におけるマウスの成績に比べて遺伝子操作マウスによるヒト発がん物質の検出がかなり高率且つ信頼性が高いことは衆目の認めるところとなっている。中でもrasH2とp53ノックアウトの2モデルの有用性はかなり認識されてきた。しかしながら、新しいモデルであることから、バイオアッセイのプロトコールの標準化、発がんメカニズムに関する導入遺伝子の役割、使用するマウスの詳細かつ厳密な遺伝的背景等発がん成績の解釈に決定的影響を与える因子の解明を望む声も大きくなってきており、これらの点を明確にすべき研究が今後必要である。

EEの子宮発癌修飾作用に関する実験では、子宮腫瘍における細胞増殖活性及びER $\alpha$ の発現はICRマウスと異なることが示唆され、rasH2マウスにおける子宮発癌の抑制には細胞回転の異常やER $\alpha$ を介さないような作用が関連している可能性が考えられた。

p53欠損マウスモデルは、上部消化管を標的部位とした発がんを検出できること、ダブルノックアウトマウスの研究成果から本モデルが創薬標的分子に関連した発がん性が懸念される場合の発がん性検討に効果的であることが示唆された。また、本モデルの発がん感受性は遺伝的背景（系統）や動物の栄養条件等にも影響を受け、また臓器毎の発がん感受性にも差異があることが示唆されることから、これらに配慮した試験条件の設定と試験成績の解釈が必要であると考えられる。

Tg.ACマウスにおける腫瘍発生にはゲノムの不安定性が重要な要因であること、ODCの過剰発現とv-Ha-rasの発現活性化が協調することにより皮膚腫瘍発生を促進することが示唆された。また、皮膚発癌腫瘍プロモーション作用およびv-Ha-ras導入遺伝子誘導には加齢依存的な感受性があること、さらに、薬物を皮膚塗布する場合、媒体の種類により試験成績に影響を及ぼすことが示唆された。

Xpaマウスでは、野生型マウスではみられない遺伝子突然変異が蓄積することが示されている。NERの主要な経路の一つであるTCRはapoptosis誘発を抑制し、DNA障害が発生した細胞をS期からG2期に導き、GGRの作用がない場合には細胞周期が停止する。Xpaマウスでは、TCRの欠損によりDNA障害の発生した細胞がS期に移行せず、apoptosisが誘発されて過形成が発生す

る。これが皮膚発がんを促進する要因の一つと思われた。また、DMBAの腹腔内投与により、Xpaマウス及びCsbマウスには、Xpcマウスあるいは野生型マウスに比して強い毒性が発現し、SCEも高頻度で認められた、TCRを欠いたヒトCockayne syndrome (CS) 患者やCsbマウスは、ヒトXp患者あるいはXpマウスに比して発がん感受性が低い、上述の毒性発現及びSCE発生頻度の差とは関連しなかった。Xpaマウスの免疫担当細胞のサブセット構成及び機能には野生型との差がみられなかったが、UVBあるいはDMBAで処置したXpaマウスには、細胞性免疫反応の抑制ならびに急性的な炎症及び炎症性サイトカイン産生の亢進がみられたとの研究があった。PGE<sub>2</sub>産生促進が免疫抑制の要因と考えられ、Xpaマウスの発がん促進機序の一つである可能性が考えられた。また、Xpaマウスではレチノイン酸の産生能が低く、Xpaマウスの発がん促進に寄与する可能性が示された。

## E. 結論

rasH2マウスの高い発癌感受性には導入遺伝子の発現過剰が一次的な要因になっていることが明らかであるが、本モデル動物を化学物質などのがん原性評価に応用していくためには、更にカテゴリーの異なる多くの発癌性物質の成績について病理・分子生物学的解析を実施し、メカニズムの解明をしていくことが必要である。

ENUでイニシエートされたrasH2マウス子宮発癌モデルにおいては、子宮腫瘍の発現が2.5ppmのEE投与により抑制され、今までに報告されているEEの子宮腫瘍を促進するという報告と反対の知見が得られた。

p53欠損マウスモデルの医薬品の発がん性評価における有用性は、単に短期モデルであることに留まらず、従来の長期発がん性試験やそれに関連したメカニズム試験では実施が難しかった仮説検証型の試験が比較的容易なことにあると思われる。一方、医薬品の発がん性評価に対して本モデルの利用を推進していくためには、本モデルの生物学的特性や発がん感受性を左右する遺伝的背景や環境要因に関する情報の整備を更に進める必要があると考えられる。

Tg.ACマウスの発がん高感受性について新たな知見

が得られている。一方、その高感受性にどのような機序が関与しているかについては不明な点が多く、今後さらなる研究知見の蓄積が必要と思われる。

Xpaマウスでは、遺伝子突然変異の蓄積に至る過程に細胞周期及びapoptosisの制御が関わっており、発癌にTCR及びGGRを含む複数の要因により支配されることが明かになった。Xpaマウスの発がん促進には、免疫抑制などの非遺伝的な要因も関与する可能性が示され、このような要因を明確にしてゆく必要があると思われた。一方、Xpaマウスには、DNA障害 (DNA附加体形成) に起因すると思われる毒性 (DMBAの腹腔内投与による急性毒性、PhIPによる消化管障害、UVBあるいはDMBAによる皮膚の急性炎症など) が野生型マウスに比して強く発現する為に、標準的な毒性試験に用いるには問題があると思われた。

## REFERENCES

- 1) D'Arcy, P.F., Harron, D.W.G. (1998) Proceedings of the Fourth International Conference on Harmonization, Queen's University of Belfast, N. Ireland.
- 2) ILSI/HESI Alternatives to Carcinogenicity Testing Project (2001) Toxicol. Pathol. 29 (suppl.): 1-351.
- 3) Suemizu H. et al. (2002) Transgene stability and feature of rasH2 mice as an animal model for short-term carcinogenicity testing. Mol. Carcinog. 34: 1-9.
- 4) Imai T., et al. (2002) Inhibitory effects of cinnamaldehyde on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung carcinogenesis in rasH2 mice. Cancer Lett. 175: 9-16.
- 5) Watanabe T. et al. (2002) Rapid induction of uterine endometrial proliferative lesions in transgenic mice carrying a human prototype c-Ha-ras gene (rasH2 mice) given a single intraperitoneal injection of N-ethyl-N-nitrosourea. Cancer Lett. 188: 39-46.
- 6) Itoh J., et al. (2002) Lack of modifying effect of glycerol in pulmonary carcinogenesis in rasH2 mice induced by urethane or 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). J. Toxicol. Pathol. 15: 215-220.

- 7) Tsuchiya T. et al. (2002) Skeletal myopathy in transgenic mice carrying human prototype c-Ha-ras gene. *Toxicol. Pathol.* 30: 501-506.
- 8) Alden C. et al. (2002) Application of genetically altered models as replacement for the lifetime mouse bioassay in pharmaceutical development. *Toxicol. Pathol.* 30: 135-138.
- 9) Morton D. et al. (2002) The Tg rasH2 mouse in cancer hazard identification. *Toxicol. Pathol.* 30: 139-146.
- 10) van der Laan et al. (2002) The in vivo rodent test systems for assessment of carcinogenic potential. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 36 122-125.
- 11) Opitz GO. et al. (2002) A mouse model of human oral-esophageal cancer. *J Clin Investigation* 110: 761-769.
- 12) Shirai N. et al. (2002) Elevated susceptibility of the p53 knockout mouse esophagus to methyl-N-amyl nitrosamine carcinogenesis. *Carcinogenesis* 23: 1541-1547.
- 13) Conde C. et al. (2001) Loss of poly(ADP-ribose) polymerase-1 causes increased tumor latency in p53-deficient mice. *EMBO Journal* 20: 3535-3543.
- 14) Funabashi H. et al. (2001) Establishment of a Tcrb and Trp53 genes deficient mouse strain as an animals model for spontaneous colorectal cancer. *Exp. Anim.* 50: 41-47.
- 15) Lawler J. et al. (2001) Thrombospondin-1 gene expression affects survival and tumor spectrum of p-53-deficient mice, *Am J Pathol*, 159: 1949-1956.
- 16) Backlund MG. et al. (2001) Impact of ionizing radiation and genetic background on mammary tumorigenesis in p53-deficient mice. *Cancer Res*, 61: 6557-6582.
- 17) Berrigan D. et al. (2002) Adult-onset calorie restriction and fasting delay spontaneous tumorigenesis in p53-deficient mice, *Carcinogenesis*, 23: 817-822.
- 18) Bush JA and Gang Li (2002) Regulation of the Mdr1 isoforms in a p53-deficient mouse model, *Carcinogenesis*, 32: 1603-1607.
- 19) Sistare FD. Et al. (2002) Evaluation of the Tg. AC transgenic mouse assay for testing the human carcinogenic potential of pharmaceuticals-Practical pointers, mechanistic clues, and new questions. *Int J Toxicol* 21: 65-79.
- 20) Leder A. et al. (2002) Genetic interaction between the unstable v-Ha-ras transgene (Tg.AC) and the murine Werner syndrome gene: transgene instability and tumorigenesis. *Oncogene* 21:6657-6668.
- 21) Chen Y. et al.: (2000) K6/ODC transgenic mice as a sensitive model for carcinogen identification, *Toxicol Lett.* 116: 27-35.
- 22) Smith MK. et al. (1998) Co-operation between follicular ornithine decarboxylase and v-Ha-ras induces spontaneous papillomas and malignant conversion in transgenic skin. *Carcinogenesis*, 19: 1409-1415.
- 23) Battalora MS. et al.: (2001) Age-dependent skin tumorigenesis and transgene expression in the Tg.AC (v-Ha-ras) transgenic mouse, *Carcinogenesis*, 22: 651-659.
- 24) Stoll RE. et al. (2001) Dermal Carcinogenicity in transgenic mice: Effect of vehicle on responsiveness of hemizygous Tg.AC mice to phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA). *Toxicol Pathol.* 29:535-540.
- 25) Eastin WC. et al.: (2001) Tg.AC genetically altered mouse: Assay working group overview of available data. *Toxicol. Pathol.* 29 (Suppl.): 60-80.
- 26) Takahasi Y. et al. (2002). Enhanced spontaneous and aflatoxin-induced liver tumorigenesis in xeroderma pigmentosum group A gene-deficient mice. *Carcinogenesis*, 23: 627-633.
- 27) van Oosten M. et al. (2000) Differential role of transcription-coupled repair in UVB-induced G2 arrest and apoptosis in mouse epidermis. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 97:11268-73.
- 28) Wijnhoven, SWP et al. (2000). Age-dependent spontaneous mutagenesis in Xpc mice defective in nucleotide excision repair. *Oncogene*, 19: 5034-5037.

- 29) Wijnhoven SW. et al. (2001). DMBA-induced toxic and mutagenic responses vary dramatically between NER-deficient Xpa, Xpc and Csb mice. *Carcinogenesis*, 22:1099-106.
- 30) Rebel H. et al. (2001). Early p53-positive foci as indicators of tumor risk in ultraviolet-exposed hairless mice: kinetics of induction, effects of DNA repair deficiency, and p53 heterozygosity. *Cancer Res*, 61:977-83.
- 31) Boonstra A. (2001) Differential ultraviolet-B-induced immunomodulation in XPA, XPC, and CSB DNA repair-deficient mice. *J Invest Dermatol*, 117:141-6.
- 32) Miyauchi-Hashimoto H et al. (2001) Carcinogen-induced inflammation and immunosuppression are enhanced in xeroderma pigmentosum group A model mice associated with hyperproduction of prostaglandin E2. *J Immunol*, 166: 5782-91.
- 33) Rebel H et al. (2002) Suppression of UV carcinogenesis by difluoromethylornithine in nucleotide excision repair-deficient Xpa knockout mice. *Cancer Res*, 62:1338-42.
- 34) Ding J. et al. (2001) Low synthesis of retinoic acid due to impaired cytochrome P450 1a1 expression in mouse xeroderma pigmentosum fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol* 33:603-12.
- F. 健康危険情報  
特になし
- G. 研究発表  
1. 論文発表： なし  
2. 学会発表： なし
- 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. 実用新案登録： なし

# 厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業） 分担研究報告書 －In vitro小核試験の確立と結果の評価に関する研究－

分担研究者：林 真（国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部長）  
協力研究者：本間 正充（国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長）  
祖父尼俊雄（ノバスジーン(株) 代表取締役社長）  
田中 憲穂（(財)食品薬品安全センター秦野研究所 副部長）  
若田 明裕（山之内製薬(株)安全性研究所 主任研究員）  
森田 健（グラクソ・スミスクライン(株) 課長）  
浜田 修一（エスエス製薬(株)中央研究所 副主任研究員）  
宮島 博文（塩野義製薬(株)新薬研究所 研究員）  
小林 一男（キッセイ薬品工業(株)安全性研究所 副主任研究員）  
荒木 春美（富山化学工業(株)安全性研究所 主任研究員）  
内藤 寿英（三菱ウェルファーマ(株)安全性研究所 主任）  
島田 弘康（第一製薬(株)安全性管理部 グループ長）  
大内田昭信（大鵬薬品工業(株)製薬センター 安全性研究所長）

## 研究要旨

In vitro小核試験はin vitro染色体異常試験の代替法としてだけでなく、染色体の数的異常を検出するための試験法として期待されている。近年、化学物質の安全性評価における遺伝毒性に関する考え方、遺伝毒性選出のための戦略に関する議論が多くなされている。その中で注目されるのが、染色体の数的な異常、特に異数性に関するもので、遺伝子突然変異、染色体の構造異常とならんで基本的な指標の1つとするものである。染色体数的異常の検出系として小核試験を用いることが考えられている。小核試験で染色体構造異常が検出できることは充分検証されているが、数的異常に関してはピンカアルカロイドのように細胞の分裂装置に強く作用し、倍数体を誘発する化学物質が小核を誘発する、というデータは在るが、その作用機構も含め、詳細な検討がなされていないのが現実である。今回はほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験と小核試験結果の整合性、さらにマウス骨髄小核試験との結果を比較検討し、小核試験による染色体数的異常検出に関して検討を加えた。その結果、小核試験で染色体数的異常を検出することに関して限界のあることが判明し、今後さらに検討を要することが明らかとなった。

キーワード： 遺伝毒性試験、染色体数的異常、in vitro小核試験、in vivo小核試験

## A. 研究目的

本共同研究の目的はin vitro小核試験法を確立することにあり、結果に影響を与える種々の実験条件について

て検討を加えるとともに、モデル化合物を用いてバリデーションを行うことにある。今回は小核試験で染色体の数的異常を的確かつ正確に検出できるかを検討す

ることを目的とした。

## B. 研究方法

数的異常を誘発する化学物質を中心に作用機序の異なる染色体異常誘発物質を選択し、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、in vitro小核試験、およびin vivo小核試験を行い、結果を比較検討した。

表 1 試験化合物

化合物名	CAS No	略 称
Mitomycin C	50-07-7	MMC
Ethyl vanilline	121-32-4	EV
p-Nitrotoluene	99-99-0	pNT
Thiabendazole	148-79-8	TBZ
Diethylstilbestrol	56-53-1	DES
Narcotine	128-62-1	NH

細胞はチャイニーズハムスター肺由来細胞CHL/IUを、また、in vivoでの検討にはBDF1マウスを用いた。

1) チャイニーズ・ハムスター細胞株CHL/IUを用い、pNT、DES、NHについて倍数体の出現頻度を求めた。代謝活性化系は用いずに、48時間の連続処理を行い、通常の染色体標本作製した。各濃度群において100

個の分裂中期細胞を観察し、倍数体の出現頻度を求めた。

2) チャイニーズ・ハムスター細胞株CHL/IUを用い、MMC、DES、NH、TBZ、EV、およびpNTについて、サイトカラシンB (Cyt-B) 存在下で2核細胞中に出現する小核細胞の出現頻度を求めた。処理時間は24時間とした。

3) In vivoでの影響を検討するために、MMC、EV、pNT、TBZ、DES、NHをBDF1雄マウスの腹腔内に投与し、24時間後に動物を屠殺して幼若赤血球中に出現する小核細胞の誘発頻度を、個体あたり1000細胞の観察を基に計数した。

4) さらに、in vivoで染色体の数的異常が誘発されるかを検討するため、EV、pNT、TBZ、DES、NHをBDF1雄マウスの腹腔内投与し、6、24、48時間後に動物を屠殺し、骨髓中の分裂細胞200個を群あたり観察して倍数体の出現頻度を求めた。

## C. 研究結果

それぞれの実験結果を表2～4にまとめる。

1) チャイニーズ・ハムスター細胞株を用いた倍数体および染色体構造異常の出現頻度を表2に示す。表2の内、pNT、DES、NHに関する試験2以外のデータは同一細胞を用いて検討した文献<sup>1)</sup>からの引用である。

表2 チャイニーズ・ハムスター細胞株を用いた倍数体と構造異常の誘発

Chemical	Dose (μg/mL)	Treatment time (h)	Observed cell No.	Polyploid (%)	Structural aberrations (%)
MMC	Saline	48	100	1	1
	0.008	48	100	1	4
	0.04	48	100	0	42
	0.02	48	100	0	97
Diethylstilbestrol (DES)	DMSO	48	200	1	1
	5	48	200	1	1
	7.5	48	200	33	1
	10	48	200	85	4
試験2	7.5	48	100	15	ne
	15	48	100	89	ne
	30	48	100	20	ne
Narcotine (NH)	Saline	48	100	0	0
	15	48	100	9	0
	30	48	100	67	2
	60	48	100	97	14
試験2	22.5	48	72	18	ne
	45	48	40	50	ne
	90	48	34	74	ne
Thiabendazole (TBZ)	None	48	100	0	4
	15	48	100	0	2
	30	48	100	9	3
	45	48	100	74	4
Ethyl vanilline (EV)	Saline	48	100	0	2
	125	48	100	2	2
	250	48	100	43	2
	500	48	100	1	2
p-nitrotoluene (pNT)	DMSO	48	100	0	1
	62.5	48	100	3	0
	125	48	100	7	2
	250	48	100	53	2
試験2	125	48	100	0	ne
	250	48	100	3	ne
	500	48	100	8	ne

ne : not evaluated

試験2以外は文献1)からの引用

2) Cyt-Bを用いる一般的な方法で、チャイニーズ・ハムスター細胞株を用いて2核細胞中の小核を有する細胞の出現頻度を求めた結果を表3に示す。用量反応関係は明確ではないが、無処理対照群と比較して、小核を有する細胞の出現頻度が上昇していることが分かる。ただし、pNTに関しては、小核細胞の頻度は対照群と同様であり、小核誘発性は認められな

った。

3) MMC、EV、pNT、TBZ、DES、NHを腹腔内に単回投与し、投与24時間後の骨髄における小核誘発性の結果を表4に示す。In vitroでは倍数体や小核の誘発が認められた被験物質に関しても小核の誘発は観察されなかった。

表3 チャイニーズ・ハムスター細胞株を用いたin vitro小核試験

Chemical	Cyt-B (µg/mL)	Dose (µg/mL)	treatment time (h)	Observed cell No.	No. of main nucleus			MN Frequency (%) (in Bi-nucleated cells)
					Single nucleus (%)	Bi nuclei (%)	Multiple nuclei (%)	
Non	+	0	24	500	6.8	63.2	30	2.2
MMC	+	0.1	24	500	17	74.8	8.2	9.9
Diethylstilbestrol (DES)	+	7.5	24	500	24	48.6	27.4	9.5
	+	15	24	500	78.2	3.2	18.6	25
	+	30	24	500	97.4	1.2	1.4	0
Narcotine (NH)	+	22.5	24	500	13.2	23	63.8	44.3
	+	45	24	500	8.2	4.8	87	50
	+	90	24	500	72.4	1.8	25	55.6
Thiabendazole (TBZ)	+	22.5	24	500	42.8	38.6	18.6	5.2
	+	45	24	500	64.2	21.4	14.4	8.4
	+	90	24	500	97.8	1	1.6	37.5
Ethyl vanilline (EV)	+	125	24	500	61.6	38.4	10	13
	+	250	24	500	93.2	3.6	3.2	0.1
	+	500	24	500	96.8	3.2	0	0
			24	500				
p-nitrotoluene (pNT)	+	125	24	500	33.2	83	3.8	2.2
	+	250	24	500	89	9.4	1.6	2.1

表4 マウス骨髄における小核誘発性

Chemical	Dose (mg/kg)	Sampling time (h)	Animal No.	Obsrved cell No.	Frequency of MNPCE (%)	Ratio of PCE (%)
Olive oil	0	24	5	5000	0.08	-
MMC		24	5	5000	3.2	-
Ethyl vanilline (EV)	125	24	5	5000	0.24	41.9
	250	24	5	5000	0.18	46
	500	24	5	5000	0.2	39.7
	1000	24	3	3000	0.27	23.4
p-nitrotoluene (pNT)	125	24	5	5000	0.5	40.6
	250	24	5	5000	0.12	39.2
	500	24	5	5000	0.16	41.3
	1000	24	5	5000	NT	
Thiabendazole (TBZ)	125	24	5	5000	0.04	38.5
	250	24	5	5000	0.28	36.7
	500	24	5	5000	0.2	34.1
	1000	24	5	5000	NT	
Diethylstilbestrol (DES)	12.5	24	5	5000	0.24	50
	25	24	5	5000	0.18	48.2
	50	24	5	5000	0.22	50
	100	24	5	5000	0.28	41.7
Narcotine (NH)	150	24	5	5000	0.22	45.6
	300	24	5	5000	0.22	37.3
	600	24	4	4000	0.18	47.8
	1200	24	5	5000	0.26	45.7

表5 マウス骨髄における倍数対の誘発

Chemical	Dose (mg/kg)	Animal No.	Observed cell No.	Frequency of ploid (%)		
				6hr	24hr	48hr
Olive oil	0	2	200	1.6	NT	NT
Ethyl vanilline (EV)	250	2	200	0.5	1.5	0
	500	2	200	0	0.5	1
	1000	2	200	1	0	1
p-nitrotoluene (pNT)	125	2	200	0	1.5	3.5
	250	2	200	1.5	1.5	0.5
	500	2	200	3	1.5	0.5
Thibendazole (TBZ)	200	2	200	0	0	3.5
	400	2	200	0.5	0.5	0
	600	2	200	0.5	0	0.5
Diethylstilbestrol (DES)	150	2	200	1.5	0	2.5
	300	2	200	0.5	0	0
	450	2	200	0	0	0
Narcotine (NH)	600	2	200	0	0	2
	1200	2	200	0.5	0	0
	1800	2	200	0.5	3	0

4) EV、pNT、TBZ、DES、NHを腹腔内単回投与後、6、24、48時間後の骨髄細胞における倍数体誘発頻度を表5にまとめる。表4に示した小核誘発性の結果同様、骨髄細胞において倍数体の誘発性は確認されなかった。

#### D. 考 察

げっ歯類を用いるin vivo小核試験は染色体異常試験と同等に被験物質の染色体異常誘発性を評価する系として、広く用いられるようになってきた<sup>2、3)</sup>。In vitroにおける染色体異常誘発性の評価には、現在もほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験が行われている。しかし、染色体異常を顕微鏡下に評価するためには、多くの知識と経験が要求され、人材不足が目立つようになってきた。そこで、in vitro においても、分裂中期像を観察するのではなく、小核誘発性で代替できるのではないかとの議論が起こってきた。最近、ICHを始め、国際的な場でin vitro 小核試験に関する議論が多くなされている。

さらに、小核試験を染色体異常試験の代替法としてだけでなく、染色体の数的異常検出系として注目されるようになってきた。英国の健康省の諮問機関であ

るCommittee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment (COM) が2000年の12月にガイダンス<sup>4)</sup>を発表し、その中で数的異常の重要性を強調している。さらに、数的異常の検出系として小核試験の有用性を述べており、小核試験が一躍脚光を浴びるようになってきた。

これまで本研究班において、in vitro小核試験の確立を図ってきた。理論上の問題はないが、解決されなければならない手技的な問題が多く残されている。さらに本試験系による染色体の数的異常検出に関して検討を加える必要が出てきた。そこで、本年度はチャイニーズ・ハムスター細胞株を用いる染色体異常試験において、倍数体を誘発することが知られている化学物質を中心に、in vitroおよびin vivoで小核誘発性が認められるか否かについて検討した。

その結果、倍数性を効率よく誘発する化学物質はin vitroにおいて小核を誘発することが示されたが、in vivoでは小核の誘発はほとんど観察できなかった。In vitroでは効率よく染色体の数的異常を検出するが、in vivoでは実際に数的異常が誘発されているにもかかわらず、小核の誘発として観察されなかったのか、in vivoでは染色体の数的異常が誘発されないのかについて検

討した。その結果、投与6、24、48時間後に骨髓細胞における倍数体の出現頻度を解析したが、その誘発は観察されなかった。

最近、遺伝毒性的メカニズム以外にも小核を誘発する可能性のあることが、アポトーシスに関連する事象として報告<sup>5)</sup>された。また、紡錘体阻害剤であるビンカアルカロイドのヴィンブラスチンを用いた検討で、小核は誘発したが、染色体の異常は構造、数的共に認められなかったこともあり、染色体の数の異常と小核誘発性に関してはさらに検討が必要であることが示唆された。

## E. 結論

今回の共同研究で用いた6種類の被験物質による染色体の数的異常誘発をin vitroおよびin vivoにおいて検討した。その結果、in vitroで数的異常を効率よく誘発する化学物質は小核も誘発したが、in vivoにおいては染色体の数的異常および小核の誘発は共に観察されなかった。従って、特にin vitroにおける染色体数的異常を誘発する化学物質による小核誘発機構の解明が急務である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Honma, M., S. Tadokoro, H. Sakamoto, H. Tanaba, M. Sugimoto, Y. Furuichi, T. Satoh, T. Sofuni, M. Goto, and M. Hayashi (2002), Chromosomal instability in B-lymphoblastoid cell lines from Werner and Bloom syndrome patients, *Mutat. Res.*, 520, 15-24.
- 2) Kirsch-Volders, M., T. Sofuni, M. Aardema, S. Albertini, D. Eastmond, M. Fenech, M. Ishidate, Jr., S. Kirchner, E. Lorge, T. Morita, H. Norppa, J. Surrallés, A. Vanhauwaert, and A. Wakata (2003), Report from the in vitro micronucleus assay working group, *Mutat. Res.* (in press)

### 2. 学会発表

- 1) 阪本浩子、桜庭真弓、小原有宏、鈴木孝昌、林真、

本間正充：ヒト肝由来培養細胞株を用いた小核試験と、遺伝子突然変異試験に有用なトランスジェニック細胞の作製

第31回日本環境変異原学会、東京、2002年11月27-29

- 2) Zhan, L., T. Suzuki, H. Sakamoto, T. Koizumi, M. Sakuraba, M. Hayashi, and M. Honma: Genotoxicity of microcystin-LR in vitro and in vivo  
第31回日本環境変異原学会、東京、2002年11月27-29
- 3) Wakata, A. : Results from a Japanese study on micronucleus data obtained with and without cytochalasin-B  
3rd IWGT, Plymouth, June 28-29, 2002.
- 4) 祖父尼俊雄：Plymouth報告（3rd IWGT），in vitro micronucleus assay  
MMS研究会第41回定例会、平成14年7月19-20.

## H. 参考資料

- 1) Sofuni, T. (ed) Data Book of Chromosomal Aberrations by Chemicals.
- 2) Kirsch-Volders, M., A. Elhajouji, E. Cundari and P. V. Hummelen (1997). The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction, *Mutat. Res.*, 392, 19-30.
- 3) Kirsch-Volders, M., T. Sofuni, M. Aardema, S. Albertini, D. Eastmond, M. Fenech, M. Ishidate, Jr., E. Lorge, H. Norppa, J. Surrallés, W. von der Hude and A. Wakata (2000). Report from the in vitro micronucleus assay working group, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35, 167-172.
- 4) Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment (COM) (2000). Guidance on a strategy for testing of chemicals for mutagenicity.
- 5) Meintieres, S., A. Biola, M. Pallardy and D. Marzin (2003). Using CTLL-2 and CTLL-2 bcl2 cells to avoid interference by apoptosis in the in vitro micronucleus test, *Environ. Mol. Mutagen.*, 41, 14-27.

# 厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業） 分担研究報告書 －免疫毒性試験法の標準化に関する調査研究－

分担研究者：澤田 純一（国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部長）  
協力研究者：大澤 基保（帝京大学薬学部 教授）  
今井 俊夫（国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長）  
手島 玲子（国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 室長）  
中村 和市（塩野義製薬株式会社 新薬研究所 主管研究員）  
筒井 尚久（三菱ウェルファーマ株式会社 安全性研究所 グループマネージャー）  
久田 茂（帝国臓器製薬株式会社 安全性研究部 主席研究員）  
牧 栄二（ヤンセンファーマ株式会社 研究開発本部データ管理部 部長）

## 研究要旨

免疫毒性試験法に関する国内外の動向調査を行うと同時に、免疫毒性試験法ガイダンスに関する中間案をさらに検討し、ガイダンス（案）を作成した。また、ICHに提案した医薬品等の免疫毒性データ収集のための調査票の作成を行った。

キーワード：免疫毒性試験法、ガイダンス（案）

## A. 研究目的

免疫毒性試験法に関する文献調査及び国内外の動向調査を行い、得られた情報を基に、国際的な動向を踏まえた免疫毒性試験法ガイダンス（案）を作成する。

## B. 研究方法

免疫毒性試験法に関する国内外の動向調査を行った。得られた情報等を基に、昨年度に作成した免疫毒性試験法ガイダンス中間案に関して、2回の検討会議を開き、ガイダンス（案）としてまとめた。

今年度においては、ヒトまたは動物の組織を研究対象としなかったため、倫理面への配慮に関する該当事項はない。

## C. 研究結果

### 1. 免疫毒性試験法に関する国内外の動向の調査

免疫毒性試験法に関する文献調査及び国内外の動向調査を行って、関連の追加資料を収集した。ガイダン

ス（案）検討の参考とした主な追加資料は、以下の通りである。

FDA/CDER: Immunotoxicology Evaluation of Investigational New Drugs. October, 2002.

Hasting, K. L.: Int. Immunopharmacol., 2, 1613-1618, 2002.

EMA: Note for Guidance on Non-clinical Local Tolerance Testing of Medical Products. CPMP/SWP/2145/00, Nov. 21, 2000.

### 2. 免疫毒性試験法ガイダンス（案）の作成

昨年度作成したガイダンス中間案に関して、平成14年8月及び平成15年2月に2回の検討会議を開催し、修正を加え、最終案及びその英訳を作成した。作成したガイダンス（案）を以下に示した。

免疫毒性試験ガイダンス（案）

本ガイダンスは、医薬品の安全性の適正な評価に資

するために、医薬品の承認申請等のために行われる免疫毒性試験の標準的な実施方法を示したものである。しかし、全ての医薬品について、一律の免疫毒性試験を行うことは合理的ではない場合もあり、対象とされる医薬品の特性に応じて、最適な試験法を用いることが重要である。

#### [背景]

免疫系は、細菌やウイルス等の外来の病原体や体内に発生した癌細胞の除去を行う等、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。免疫機能の低下が、日和見感染や腫瘍の発症を招きやすいことは、先天性免疫不全症や後天性免疫不全症候群（AIDS）の例で、よく知られている。免疫系への有害作用（免疫毒性）が他の毒性と異なる点は、それ自体が直接投薬患者の生存そのものを脅かすというよりも、外来性病原体の侵襲や内在性癌細胞の発生により、初めてその有害性が明示される点である。医薬品の承認申請に係る非臨床の免疫毒性試験に関しては、その必要性が指摘されていたものの、免疫系を構成する細胞群及びそれらの相互作用が複雑であること、免疫機能の評価項目が非常に多岐にわたること、マウス以外の試験動物、特に、通常の毒性試験で用いられるラットにおける免疫機能試験法の評価が充分に行われていなかったこと等の事情もあり、その設定等が遅れていた。しかし、ここ10年の間に、国際的な共同研究も含めて免疫毒性試験法の評価も進み、ラットを用いる免疫毒性試験法に関しても、十分に実用に耐える段階に至っている。

本ガイドランスでは、免疫毒性を有する多くの化学物質が反復投与毒性試験の免疫毒性関連検査項目において異常を示すことを利用し、原則として、反復投与毒性試験の結果に基づき免疫毒性が疑われる場合に、さらに免疫毒性試験を行うこととした。

#### [本ガイドランスの適用範囲及び対象薬物]

免疫毒性には、免疫機能抑制、アレルギー、自己免疫、及びその他の免疫機能異常亢進が含まれるが、本ガイドランスでは、被験薬物に特異的な免疫反応（薬物アレルギー及び薬物特異的自己免疫）は対象としない（注1）。

表1のいずれかに該当する場合には、本ガイドランスに基づき、免疫毒性試験を実施すること。なお、生物

製剤及びバイオテクノロジー応用医薬品に関しては、本ガイドランスの対象としない。

#### [本ガイドランスの目的]

薬物の免疫毒性の検出及びその性質の検討を効率的に行うためには、予想される免疫毒性に応じた最適な試験法の選択及びプロトコールの設定が必要とされる。本ガイドランスの目的は、非臨床免疫毒性試験を行う際に参考とすべき手順及び検査項目の選択基準を示すことである。

本ガイドランスにおいては、免疫毒性を検出する試験として、従来より用いられている反復投与毒性試験に加えて、第1段階免疫毒性試験（第1段階試験）及び第2段階免疫毒性試験（第2段階試験）を設けた。反復投与毒性試験に含まれる免疫毒性関連の検査項目及び第1段階試験の主な目的は、免疫系に対する直接又は間接の毒性を示す薬物のスクリーニングである。第1段階試験においては、同時に体液性免疫への影響を知ることが可能とされる。また、第2段階試験の目的は示された免疫毒性を質的及び量的に明らかにすることである。

なお、免疫毒性試験の実施方法に関しては、技術的な進歩も速く、本ガイドランスに記載された試験法よりも優れた方法が開発されることが予想される。試験の実施に当たっては、本ガイドランスを参照すると同時に、常に最新の技術を取り込み、検査法の改良に努めることが望まれる。

#### [検査項目の選択]

本ガイドランスで示された検査項目は、最小限必要と考えられるものであり、被験薬物の性質に応じて、適宜、検査項目を追加することも考慮すべきである。

反復投与毒性試験における免疫毒性関連検査項目は、器官重量、血液検査（血液学的検査及び血液化学的検査）及び病理組織学的検査の中の免疫系に関連する項目である。また、反復投与毒性試験において、末梢血のリンパ球サブセット検査又は脾臓の免疫組織化学的検査の項目を追加して行うことが勧められる（表2-1）。反復投与毒性試験の免疫毒性関連検査または追加の検査により異常が認められた場合（注2）には、免疫毒性試験を実施する。

免疫毒性試験は、2段階に分けて行われる。第1段

階試験では、抗体産生の検査及び脾臓及び胸腺の器官重量測定等の検査(表2-II)を実施する。NK細胞活性の検査を第1段階試験に、追加してもよい。

第1段階試験で異常が認められない場合には、第2段階試験を行う必要はない。第1段階試験により異常が認められる場合には、反復投与毒性試験の結果も考慮に入れ、適切な検査項目(表2-III)を含む第2段階試験を実施する。第2段階試験においては、示された免疫毒性の性質を明らかにすることが必要とされるが、特に影響を受ける細胞または免疫機能の同定と影響の強さを明らかにすることが重要である。

反復投与毒性試験において明確な免疫毒性が認められ、且つ、その毒性の性質から第1段階試験を行う必要性が低いと判断される場合(注3)には、第2段階試験を直接行ってもよい。

必要に応じ、免疫毒性の可逆性を検討するため、異常が認められた項目について、回復性試験を行う。

#### [試験実施の時期]

第1段階試験は、通常反復投与毒性試験の後に行われるが、可能であれば、反復投与毒性試験と同時に行うことができる。第1段階試験は、原則として、臨床試験開始以前に行う。第2段階試験は、その必要に応じて、適切な時期に行う。

#### [試験プロトコール]

第1段階試験プロトコールは、以下の条件に従う。第2段階試験が必要とされる場合には、その目的に最も適したプロトコールを設定する。

1. 動物種、性及び週齢：反復投与毒性試験の免疫毒性関連検査または追加の検査により異常が認められた動物と同一の種、系統、性及び週齢を用いることが望ましい(注4)。反復投与毒性試験において雌雄差が認められなかった場合、雌雄いずれか一方の動物を用いることができる(注5)。
2. 動物数：1群8匹以上とし、統計学上十分な数の動物数を設定する。各群への割り付けには、適切な無作為抽出法を用いる。
3. 投与経路：原則として、臨床適用経路とする。
4. 用量段階：原則として、3段階以上の投与群を設け、別に対照群を置く。反復投与毒性試験の免疫毒性関連検査又は追加の検査により異常が認められた用量

を参考に、用量段階を設定する(注6)。

5. 対照群：溶媒のみを投与する陰性対照群を置く。必要に応じて、無投与対照群(注7)又は陽性対照群(注8)を加えることを考慮する。

6. 投与期間：原則として、反復投与毒性試験に準ずる投与期間を採用する。投与は原則として週7日とする。

7. 観察等：一般状態の観察及び体重測定を行う。

#### [免疫毒性関連検査項目]

反復投与毒性試験及び免疫毒性試験において対象とされる免疫毒性関連検査項目を表2にまとめて示した。これらの検査項目より、被験薬物の性質及び試験の目的に応じて、必要な項目を選択し、適切な試験プロトコール1)を設定すること。

#### (注)

注1：遅延型の薬物アレルギーに関しては、皮膚感作性試験のガイドラインが既に設定されているが、即時型薬物アレルギーのよい予知試験法は、現在のところ未確立である。

注2：表1の第1項(1)において免疫毒性が疑われる場合を指す。免疫毒性関連検査における異常とは、当該検査において投与群と陰性対象群の間に統計学的に有意の相違が認められることを指すが、試験動物における基準値等の範囲及び変動を考慮する。

注3：例えば、末梢血の好中球の減少のみ認められ、その他の異常が認められない場合等を指す。

注4：通常、ラットまたはマウスを用いる。

注5：同一ケージで複数の雄性動物を飼育する場合には、闘争等の飼育上の問題が生じないように、ケージの大きさ等を考慮すべきである。

注6：高用量群に用いる用量は、対照群と比較して体重抑制が10%以上でない用量とする。高用量群で十分な異常が認められ、低用量群で異常が認められないように用量を設定し、用量反応関係が得られることが望ましい。高用量群における異常の変化が小さく、明らかに3段階の用量を用いる必要がない場合には、2段階の用量の投与群を用いてもよい。

注7：通常は必要とされないが、用いる溶媒が免疫毒