

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
平成16年度総括分担研究報告書

一非臨床安全性毒性問題一般に関する研究一

分担研究者：井上 達（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター長）
三森 国敏（東京農工大学 農学部 教授）
林 真（国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長）
澤田 純一（国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 部長）
藤森観之助（医薬品医療機器総合機構 顧問、昭和大学薬学部客員教授）
中澤 憲一（国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長）

研究要旨

共同研究により主として動物及び細胞を用いる試験研究およびそれらに関する調査を行い、前臨床毒性試験、安全性薬理試験に係る各方法論の国際的な確立並びにハーモナイゼーションを図ることを目的とする。本年度は3年計画の1年目にあたる。本年度は下記の課題の研究を遂行するため、共同研究を行うと共に、国内において班会議を開催し、かつ海外における専門家会議等に参加した。

- ・遺伝子改変マウスを用いた短期がん原性試験についての情報収集
- ・ヒト型in vitro遺伝毒性試験系の確立と評価に関する研究
- ・免疫毒性試験法の標準化に関する調査研究
- ・安全性薬理試験（ICH-S7B）の国際的ハーモナイゼーションに関する研究 -1
In vivo電気生理学的測定法による心臓不整脈の評価法に関する研究
- ・安全性薬理試験（ICH-S7B）の国際的ハーモナイゼーションに関する研究 -2
In vitro電気生理学的測定法による心臓不整脈の評価法に関する研究

キーワード：国際動向、有効性評価、安全性評価、ハーモナイゼーション、ICH

A. 研究目的

新医薬品承認審査資料の国際的ハーモナイゼーションならびにガイダンス等のメンテナンス推進のための検討が進められてきている。日・米・欧三極間の医薬品規制にかかる障壁を科学的な裏付けのもとに取り除くために、国内外の共同研究を実施するとともに、新医薬品の研究開発の促進と優れた新医薬品の患者への迅速な提供を図る。また、毒性発現のメカニズムの解明と解釈の統一を図ると共に、それらの成果を行政に反映させるため、基準値やガイドラインの設定を目指す。

(1) ICHで策定された遺伝子改変マウスを用いた短期がん原性試験についてはその有用性が認識されているが、その発がん機序については未だ十分に解明されていない。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CS7BL p53+/-マウス（p53+/-マウス）モデル、活性型v-Ha-ras遺伝子を胎児型 γ -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-/-マウスモデルがあげられる。

本研究班では、今年度もこれらの遺伝子改変マウスを用いた発癌性に関する研究についての文献収集を行い、それらの問題点を明らかにする。

- (2) 遺伝毒性試験のヒトに対するリスク評価への適用を目的とし、ヒト細胞を基礎として（生物学的妥当性）、妥当な遺伝毒性検出エンドポイントからなる（遺伝毒性物質の広域スクリーニング）、同一条件下での試験（試験結果の比較によるメカニズムの解析）をコンセプトとする新しい*in vitro*遺伝毒性検出系の確立を目指す。また、染色体異数性の検出にも重点を置き、数種類の細胞分裂毒について試験を行う。また、異数性誘発物質であるtrichlorfonと、倍数性誘発物質であるcarbendazimをモデル化合物として、ヒト細胞試験系で小核誘発性、DNA損傷、倍数体誘発等の比較も行い、染色体の異数性検出系としてのバリデーションも行う。
- (3) 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等を行い、ICHにおける調和ガイドラインの作成を目的とした免疫毒性試験データ収集を行う。得られた情報を基に、免疫毒性試験ガイドランス（案）を作成する。
- (4) 医薬品の重篤な副作用として近年注目されている心臓の致死的不整脈であるTorsade de Pointes（TdP）誘発を予測的に評価するための非臨床試験法について国際的ハーモナイズした安全性薬理試験のガイドラインを開発するために検討研究を行う。本年度は臨床E14に整合した形でS7Bの改訂ステップ2への到達を目指す。最終的には国際的にハーモナイズされたガイドラインの作成を行うことを目的とする。

B. 研究方法

本年度は、がん原性、遺伝毒性、免疫毒性、安全性薬理試験に関する各々のガイドラインについてさらなる科学的根拠を得るための研究を行った。なお、これらの作業は、これまで通り産官学の研究者の密接なる協力を得て行った。研究成果を厚生労働行政に反映させるため、班員による定期的な会合の他に、海外での会議にも参加し、日米欧の専門家との討議を行った。

各研究課題の具体的研究計画は以下の通りである。

- (1) 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^{+/+}ノックアウトマウス（以下Xpa/p53^{+/+}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、PPARアゴニストの癌原性に関する米国FDAの最近の規制変更についての情報を収集した。

- (2) ヒトリンパ芽球由来のWTK-1細胞を基礎とし、DNA損傷（コメット試験）、染色体異常（小核試験）、遺伝子突然変異（TK遺伝子突然変異試験）からなるマルチエンドポイントの*in vitro*遺伝毒性試験を構築し、そのバリデーションを行った。モデル化合物として、細胞分裂毒であるcolchicine、griseofulvin、vinblastine、および異数性誘発物質であるtrichlorfon、倍数性誘発物質であるcarbendazimを試験した。
- (3) ICH S8 Expert Working Group (EWG) と共同して、三極のガイドランスを調和するために必要とされる免疫毒性試験データの追加収集を行い、データ解析を行った。また、解析結果を参考にして、ICH免疫毒性試験法ガイドライン案を作成した。
- (4) 日本製薬協のQTPRODUCTプロジェクト（山本恵司代表、44製薬企業＋6委託試験機関が参加）により陽性および陰性対照薬物を用いて実施、検討されたアッセイ系のうち、特にイヌ、サルTelemetryおよび活動電位持続時間（APD）Triangular（APD30-90）アッセイに関するデータについて、より詳細な解析によりQTリスク予測性のバリデーションを行った。Telemetryアッセイ系では心機能パラメータと経時的パターン（作用時間曲線）のデータを比較検討した。APDアッセイの検討に関しては各イオン電流構成画分を詳細に比較検討した。用いた薬物はQTリスクが認められないとした薬物として、Amoxicillin、Aspirin、Captopril、Ciprofloxacin、Diphenhydramine、Flecainide、Lidocaine、Nifedipine、dl-Propranolol、Verapamilの10薬物、リスクがあるとした薬物として、Astemizole、Bepidil、Cisapride、Disopyramide、E-4031、Haloperidol、MK-499、Pimozide、Quinidine、Terfenadine、Thioridazine、の11薬物を取り上げ、同時に陰性対照として溶媒、陽性対照としてdl-Sotalololについて少なくとも3用量に関し1 Hzで刺激した摘出モルモッ

ト乳頭筋標本を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究班においては培養細胞を用いる試験研究、文献調査等が主として行われ、倫理面で問題となるようなものではない。一部動物を用いた研究がなされたが、それぞれ実験動物倫理規範の精神をくみ取り、十分問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^{+/-}、Tg.AC、Xpa及びXpa/p53^{+/+}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実施した。rasH2マウスに関して、Watanabeらは、120 mg/kgのENUを単回腹腔内投与し2週後に前胃に発生した三つの扁平上皮がんの遺伝子発現をHIGH-DENSITY OLIGONUCLEOTIDE MICROARRAYを用いて解析し、更にc-Ha-ras geneとMAPKについてmRNAの発現を検索した。対照群のマウスの前胃に比べて、前胃扁平上皮がんでは、416と368の遺伝子がそれぞれ2倍以上にupないしdown regulationされていた。がんの浸潤、転移に関する多くの遺伝子、TGF beta、Matrix metalloproteinasesがup-regulationされており、腫瘍のprogressionを反映していた。RT-PCRでは、導入遺伝子、マウスのHa-ras、N-ras、raf、Mek2、c-fos、junB、c-myc、及びcyclin D1のup-regulationが確認された。これらの結果からrasH2マウスにENUにより誘発された前胃扁平上皮がんの発生にはras-MAPKカスケードの活性化とヒト及びマウスの内在性のras遺伝子のup-regulationが関与していることが確認された。p53^{+/-}マウスでは、他の遺伝子との相互作用についての報告があり、p53欠損にp27欠損が加わると発がんが加速化されたが、p21についてはそのような作用の弱いことが確認されている。また、乳がんの抑制遺伝子として知られているBrca2を欠損させたマウスにおける乳腺腫瘍の潜伏期間は1.6年以上であるが、このマウスとTrp53^{+/-}マウスのF1では同

期間は著しく短縮されたとの報告があった。Tg.ACモデルでは、雌雄のp53 heterozygous zeta globin-promoted Tg.AC (v-Ha-ras) bi-transgenicマウスにBPの20 mg/kgを2回/週、10週間にわたって経口投与し、NACはBP投与2週間前より3%の濃度で飼料中に混じて投与された。その結果、BP投与により胸腺、脾臓などの造血臓器及び前胃の腫瘍発生が増加した。NAC投与により、前胃の乳頭腫と過形成、悪性リンパ腫の肺異性を軽度抑制したことから、この新規のbitransgenicマウスモデルは、発がん検索法として有用である可能性が示唆された。Xpaマウスでは、Xpa及びXpa/p53^{+/-}マウスの発がん感受性に関して、ILCI/HESIの国際共同研究の一環として実施されたXpaマウス及びXpa/p53^{+/-}マウスモデルの9ヶ月間投与による結果が報告された。PPARアゴニストの米国FDAの発癌性評価の変更が報告された。1997年に策定されたICHガイドラインにより、医薬品のがん原性評価には遺伝子改変動物の使用が認められているが、FDAではPPAR γ に対するアゴニストや、 α と γ のデュアルアゴニストには多臓器発癌性があり、その発がん性は動物種を越える可能性が高いことから、遺伝子改変マウスでの評価は困難と判断し、第3相臨床試験開始までに従来のラットとマウスの長期間がん原性試験データを提出すべきであるとの規制に逆戻りした。しかし、肝を標的としてゲッ歯類にのみ発癌性を示すとされるPPAR α アゴニストについても同様に規制する点は、その科学的根拠が明確にされていない。

(2) WTK-1細胞を基礎とするヒト細胞試験系を用いて細胞分裂毒(COL、VBL、GSF)の試験を行った結果、COLでは細胞毒性は20 ng/mLにおいて、強い細胞毒性が現れ、その後、TK-MF、MNが濃度依存的に増加した。コメットはいずれの濃度においても陽性反応は見られなかった。VBL、GSFは細胞毒性が十分に表れないにもかかわらず、TK-MF、MNの誘発が認められた。VBLと、GSFのTK-MF、MNの反応性は極めて類似していた。また、両化合物ともコメットは全ての用量において陰性であった。TF、またはMBCで細胞を24時間処理し、小核、倍数体、コメットの頻度を測定した。TFは濃度依存的に細胞

毒性を示し、25 μ g/mL以上において小核を誘発した。一方、倍数性の出現頻度、コメット細胞の出現頻度の増加は認められなかった。MBC処理では1 μ g/mL以下の比較的細胞毒性が弱い用量からも小核の顕著な誘発が見られた。倍数体細胞の出現は2 μ g/mL以上で濃度依存的に観察された。コメット細胞の誘発は最高用量でも認められなかった。このようなTFの小核誘発、MBCの小核誘発および倍数性細胞の誘発はCHL/IU細胞でも観察された。

(3) 得られた免疫毒性試験データは一覧表形式にまとめられ、平成16年11月に横浜において開催されたEWG会議で詳細に解析された。64化合物に関する免疫毒性試験成績が寄せられたが、評価を行うに当たって不十分なデータ及び細胞毒性を示す抗がん剤を除き、45化合物が評価に用いられた。標準的毒性試験(STS)の結果と追加の免疫毒性試験(AIS)の結果の相関を解析したところ、27の化合物で一致した結果(カテゴリーA及びB)が得られ、12化合物で、STSのみ陽性(カテゴリーD)となり、6化合物(13%)でAISのみ陽性(カテゴリーC)の結果が得られた。また、データの偏りが無いことを確認するために追加解析も行った。最終的に、得られた結果は、STSが一次スクリーニングとして優れており、その他の懸念要因を考慮して、追加の免疫毒性試験を行えば効率的に免疫毒性を検出しようことが示唆された。これらのデータは、三極のガイダンスまたはガイダンス案の調和を図る上で非常に参考になると判断され、ICH運営委員会に報告するとともに、詳細な解析結果を論文として公表することとなった。免疫毒性がS8として正式なICHのトピックとなり、EWGが構成された後は、ICH免疫毒性試験ガイドライン案作成のため、試験法の標準化及び免疫毒性試験実施の必要条件に関して、頻繁な電話会議及び電子メール交換により議論を重ねた。その後、平成16年11月に横浜で開催されたEWG会議において最終的合意が得られ、Step 2の免疫毒性試験法ガイドライン案が作成された。

(4) QTPRODUCT (JPMA プロジェクト) およびLSI/HESIのデータを解析した最終的な結論としてhERGアッセイと同様に、APDアッセイには偽陽性及

び擬陽性として3/10 (Flecainide、propranololとVerapamil:共に強いINa抑制がある。)、およびfalse negativeが2/11 (PimozideとTerfenadine: INaおよびICaに特に影響なし) あったが、これまでの研究結果からhERGアッセイはfalse negativeが10/11 (dl-Sotalol) と若干低い、false positiveは5/10 (Ciprofloxacin、Diphenhydramine、Flecainide、Propranolol、Verapamil) であり、APD Triangularアッセイより高い。従ってhERG擬陽性の場合にFollow upアッセイとして有効と考えられる。さらにAPDアッセイは関連するイオン電流に関する情報を同時に得ることが出来、結果の解釈に有用であるとのS7B-EWGの結論に達した。麻酔イヌにおける反応は未変化体を検討する限り、Telemetry覚醒イヌよりも安定した結果とより高い感度(反応)が得られる。検討した11の陽性薬物に関して麻酔イヌ静脈内投与により100%の陽性を示した。Telemetry覚醒イヌ経口投与においてはHaloperidolを除く10薬物で陽性を示した。In vivo unbound血漿濃度とIn vitro濃度に相関性が高い可能性のある薬物は、hERGの場合、Astemizole、Cisapride、E-4031、Thioridazineの4陽性薬物(4/8)であり、APD30-90の場合にはE-4031だけ(1/8)であった。一方、total血漿濃度とIn vitro濃度に相関性が可能性として考えられる薬物は、hERGの場合、Astemizole、Bepidil、Terfenadine、Thioridazineの4薬物(4/8)であり、APD30-90の場合にはBepidil、Thioridazineの2薬物(2/8)である。従って、In vitroアッセイの場合血中濃度を考慮した安全域でリスクを考えることにはあまり意味はないものと考えられた。

D. 考 察

(1) 遺伝子改変動物は、医薬品の癌原性評価に2000年から使用され始めてきている。特に米国では、長期連用を予定している新しい医薬品に対して、p53ノックアウトマウスが使用されてきており、in vivo遺伝毒性による発癌リスクの可能性を否定するために有効とされている。一方、このp53ノックアウトマウス以外には、世界ではrasH2マウスが頻繁に使用されており、この系については、その発癌増強メカニズム

が徐々に明らかにされつつある。製薬企業体では、これらの遺伝子改変マウスを用いて新薬の開発をしてきているところであるが、最近、米国FDAではPPARアゴニストについては遺伝子改変マウスでは癌原性の評価は困難と判断して、これらのカテゴリーに入る新薬については厳しい規制をかけ始めた。この動きは、1997年にICHで提案された医薬品の癌原性評価に関するガイドラインから逸脱するものであり、その科学的正当性について何が遺伝子改変マウスで評価を不適切にしているかを今後注意深く追求していくべきである。

- (2) WTK-1細胞からなるヒト型試験系は、コメット試験、小核試験、TK遺伝子突然変異からなるマルチエンドポイントの試験系であり、理論的にはそれぞれDNAの初期損傷、その後の細胞分裂に伴うゲノムの視覚的異常、最終的なゲノム情報の変化を連続的にとらえることができる系である。これまで典型的なmutagen、およびclastogenについて試験をし、既存の遺伝毒性データとほぼ同程度の検出能力をもつことから、新たな遺伝毒性試験系として認知されつつある。COL、VBL、GSFは細胞分裂毒であり、直接DNAに損傷を与えず、細胞分裂に関与するタンパク質に結合し、染色体不分離などを介して、染色体の数的異常を引き起こすと考えられている。これら化合物は、小核試験、TK遺伝子突然変異試験においても陽性を示した。また、異数性誘発物質 (trichlorfon) と倍数性誘発物質 (carbendazim) においても同様の結果が得られた。コメット試験ではこれら化合物は陰性であったことから、本試験系は新たなin vitro遺伝毒性試験としてだけでなく、染色体数的異常誘発物質の検出にも有効であることが示された。
- (3) ICHガイドライン案へのコメントに対応し、Step 3文書を作成する必要がある。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、さらに調査を継続する必要がある。
- (4) これまでのhERGアッセイの解析結果と比較すると、hERGアッセイはfalse negativeは低い、false positiveはAPD Triangularアッセイ (APD30-90) より高い。一方、APD TriangularアッセイはFalse positive

およびfalse negativeが20%程度あるが、hERGあるいはin vivoアッセイ擬陽性の場合にFollow upアッセイとして有効と考えられる。hERGアッセイはQuinidineを除き、In vivoアッセイで認められたCmaxとほぼ同じオーダーの濃度で陽性を示したが、APD30-90アッセイはIn vivoアッセイよりかなり高濃度まで検討する必要がある。In vitroでの結果をIn vivo血漿濃度に比してSafety Marginを取るには問題がある。QTcの検討は血中被験物質あるいはその代謝物濃度の時間的推移 (動態、特にそれぞれのtmax時点の計測) を考慮して、解析する必要があると思われる。また覚醒イヌでは薬物処理イヌの薬理作用による影響と共に、処理イヌにおける行動が同室溶媒群のベースラインにも影響している可能性が示唆されており、より正確にQTc延長を予測するためには溶媒群を同時に行い、対応する時点での差を取ることが必要と思われる。

E. 結論

- (1) rasH2マウスモデルの発がん感受性に関する文献から、更に検証試験は必要であるが、このモデルは医薬品のヒトに対する発がん性予測に適したモデルであると考えられる。Trp53欠損マウスを医薬品の発がん性評価に適用する場合には、マウスの系統や栄養状態が発がん標的臓器や発がん頻度に大きな影響を与えることを認識する必要がある。一方、Trp53欠損マウスと他遺伝子のダブルノックアウトモデルを用いた研究、発がん前段階のDNAメチル化に関する研究あるいはTrp53欠損マウスを用いた遺伝毒性研究の成果は、本モデルを用いたがん原性試験の結果解釈のためのメカニズム研究の可能性を示すものとして今後も注目する必要がある。Tg.ACマウス及びp53欠損マウスとTg.ACマウスの両方の特性を有するbi-transgenicマウスのがん原性試験代替法としての有用性や発がん高感受性について新たな知見が得られている。また、皮膚腫瘍発生機序解明に対するモデルとしての利用も期待される。Xpaマウスは、GGRに加えてTCRが欠損していることから、DNAの転写活性の高い細胞ではTCRによるDNA障害の修復が阻害されてアポトーシスが誘発されるために、

GGR欠損マウスであるXpcマウスに比して発癌感受性が低く、細胞障害が発生しやすいと結論される。p53^{-/-}マウスとクロスさせたXpa/p53^{-/-}マウスでは、TCRの欠損により発生するアポトーシスが抑制されるために、Xpaマウスに比して発癌感受性が増すことが明らかになってきた。今回の米国FDAのPPARアゴニストに対する規制の変更は、1997年にICHで提案された医薬品の癌原性評価に関するガイドラインから逸脱するものであり、その科学的正当性について注意深く追求していくべきである。

- (2) ヒトリンパ芽球由来のWTK-1細胞を基礎とし、コメット試験、小核試験、TK遺伝子突然変異試験からなるヒト型*in vitro*遺伝毒性検出系を構築した。本試験系は互いの試験結果を比較し、遺伝毒性の特徴を推測することが可能である。細胞分裂毒である、COL、VBL、GFBで試験を行った結果、小核試験でこれら化合物を効率的に検出できることが明らかとなった。本試験系の染色体異数性検出能力を確認するため異数性誘発物質であるTFと倍数性誘発物質MBCを用い、小核誘発率と、倍数性誘発率等を検討した。その結果、両物質とも小核を誘発したが、倍数性を誘発したのはMBCのみであった。これらの結果は、異数性のみを誘発する物質も小核試験で検出できることを示すものである。
- (3) 日米欧の免疫毒性試験ガイドラインの国際調和を目的として、免疫毒性データの追加収集及び解析を行った。得られたデータを参考に、ICHの免疫毒性

試験ガイドライン案 (Step 2文書) の作成及び翻訳を行った。

- (4) 本年度には、非臨床QTアッセイデータの精査による最終解析評価の結果、S7B-EWGとして非臨床アッセイはQT延長の検出感度と信頼性を十分有しているものと再確認し、非臨床QT評価結果の臨床QT評価戦略における活用を提案した。一方、FDAは7品目の審査資料の調査により臨床QT評価基準に則り、陽性と判断した4品目中の2品目が非臨床QT評価 (hERGおよび*In vivo* QTアッセイ) 試験で陰性であったことから、非臨床QT評価試験ではヒトQT/QTc延長を予測できないと判断した。その結果相互に整合した形でのステップ2到達の可能性が一旦なくなったが、US国内規制の緊急性の問題とも相まって、FDAによりE14およびS7BにRegional Difference (地域差) の容認の導入の提案のあること、ICH整のための継続理由もあり、両EWGおよびSCの合意の下に、両E14/S7Bドキュメントはステップ2となり、現在コメント対応下にある。今後、各日米欧内あるいは間の規制上の実施に伴う問題の討議と解決が大きな問題になる可能性がある。

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（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
平成16年度分担研究報告書

— 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 —

分担研究者：三森 国敏（東京農工大学農学部教授）
協力研究者：玉置 憲一（(財)実験動物中央研究所副所長）
白居 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)研究本部安全性研究所主任研究員）
青木 豊彦（エーザイ(株)安全性研究所川島研究室室長）
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*^{+/-}、Tg.AC、*Xpa*^{-/-}マウスの発がん性についての文献調査を実施した。rasH2マウスの発癌増強機序として、導入遺伝子のみならず、内因性のras遺伝子の過発現も重要な要因になっていることが確認された。*p53*^{+/-}マウスについては、他遺伝子とのダブルノックアウトモデルを用いた研究、発がん前段階のDNAメチル化に関する研究や*p53*欠損マウスを用いた遺伝毒性研究などが報告されており、これらは本モデルを用いたがん原性試験の結果解釈のためのメカニズム解明に重要であり、今後もこの領域の研究に注目していく必要がある。Tg.ACマウスについては、*p53*欠損マウスとTg.ACマウスの両方の特性を有するbitransgenicマウスのがん原性試験代替法としての有用性や発がん高感受性について新たな知見が得られた。*Xpa*マウスは、TCRが欠損していることから、DNA障害の修復が阻害されてアポトーシスが誘発されるため、GGR欠損の*Xpc*マウスに比して発癌感受性が低く、細胞障害が発生しやすいと結論される。PPARアゴニストの癌原性に関する米国FDAの最近の規制変更についての情報を収集した。

キーワード：rasH2マウス、*p53*^{+/-}マウス、Tg.ACマウス、*Xpa*^{-/-}マウス

A. 研究目的

医薬品のがん原性評価には、最近トランスジェニック (Tg) やノックアウト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が用いられている。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*^{+/-}マウス (*p53*^{+/-}マウス) モデル、活性型v-Ha-ras遺伝子を胎児型 κ -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*^{-/-}マウスモデルがあげられる。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、今年度もこれらの遺伝子改変マウスを用いた発癌性に関する研究についての文献収集を行い、それらの問題点を明らかにした。

B. 研究方法

1. rasH2マウス：昨年度に引き続き、がん原性短期代替試験法の試験モデルの一つであるrasH2マウスに関する研究状況および公表論文を調査し、本モデル動物の発がん特性に関連した成績をまとめた。
2. p53^{+/-}マウス：昨年度に引き続き、Trp53欠損マウスに関する研究状況を調査し、医薬品の発がん性評価における本モデル動物の利用可能性に関する成績をまとめた。
3. Tg.ACマウス：昨年度に引き続き、Tg.ACトランスジェニックマウス (Tg.ACマウス) に関する研究状況を調査し、医薬品の発がん性評価における本モデル動物の利用可能性に関する成績をまとめた。
4. Xpa^{-/-}マウス：昨年度に引き続き、XPA^{-/-}マウス (以下Xpaマウス) 及びXPA^{-/-}/p53^{+/-}マウス (以下Xpa/p53^{+/-}マウス) に関する研究状況を文献調査により調査した。
5. PPARアゴニストの米国FDAの発癌性評価の変更: PPARアゴニストの癌原性に関する米国FDAの最近の規制変更についての情報を収集した。

C. 研究結果

1. rasH2マウス

rasH2マウスの発がん促進機序を検討するため、ethylnitrosourea (ENU) の単回投与とbeta-estradiol 3-benzoateを追加投与したマウスに誘発された14の腫瘍について導入遺伝子の変異とexpression profileについて検討した。導入遺伝子のcodon12の変異は検出しなかったが、codon61の変化は、すべての肺腺がん、皮膚扁平上皮がん、前胃扁平上皮がんに認められた。導入遺伝子のmRNAレベルはrasH2マウスの肝細胞におけるmRNAレベルと比較して明らかに上昇した。この結果からcodon61の変異と導入遺伝子の発現増加がrasH2マウスの発がん過程において重要な役割を演じている

ことが明らかとなった[1]。子宮発がんのethinylestradiol (EE) の腫瘍促進作用を検索するために、rasH2とICRマウスにENU 120mg/kgを腹腔内、50mg/kg bwを子宮内に投与し、実験1では、2.5または0 ppmのEEを混飼で24週間、実験2では6週間投与した。実験1のICRマウスでは、腺がんの発生頻度は、ENU単独およびENU+EE群では0%および37.5%であった。この差は推計学的に有意であった。ENU+EE群におけるatypical hyperplasiaとendometrial hyperplasiaについてもENU単独群に比べて有意に高かった。一方、rasH2マウスではENU+EE群の子宮内膜増殖病変は全く認められなかったが、ENU単独群では子宮腺がん (55.6%)、異形過形成 (33.3%)、内膜過形成 (22.2%) が認められた。ENU+EE投与のICRマウスの子宮腺がん、異形過形成のPCNAは高値であったが、ENU単独投与のrasH2マウスでは正常内膜の値と同じであった。実験2で、ICRマウスのENU+EE群の子宮内膜、腺上皮のestrogen受容体alpha (ER-alpha) の免疫組織化学染色の程度は中等度乃至顕著であった。しかしENU単独群では軽度であった。rasH2マウスでは、ENU+EE投与群とENU投与群でER-alpha発現の差はなかった。2.5ppmのEEはENUでinitiateしたrasH2の子宮発がんを逆的に抑制した[2]。rasH2マウスにおける発がん性の検討のため、飲水中に0、20、200ppmのN-bis (2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN) をrasH2マウスに、0、200ppmのDHPNを同腹のnon-Tgマウスに26週間投与した。rasH2マウスとnon-Tgマウスの200ppm投与群では腫瘍が多発し、死亡が早期に見られた為、20週までに全例剖検し、病理学的検索とRT-PCRの為の採材をした。肝血管肉腫の他に、前胃、尿道、唾液腺導管の腫瘍がrasH2マウスの200ppm群で見られた。RT-PCRでは、mRNAの発現は、導入ヒトras遺伝子、マウスras遺伝子間に差はなかった。rasH2マウスはDHPNに高感受性であり、標的器官は前胃、唾液腺、腎盂であることが判った[3]。Reserpineは従来のラット、マウスの長期発がん性試験では陽性の結果であり、メカニズム的にはnon-genotoxic rodent carcinogen、putative non-human carcinogenの範疇に入る発がん物質である。この物質に対するrasH2マウスの発がん感受性を検索するため、reserpineを混飼でrasH2マウスに0、2.5、5および10ppm、non-Tgマウスには

0、10ppmの用量で26週間投与した。rasH2マウス、non-Tgの各群に基礎飼料のみを与え、陰性対照群とした。MNUを単回腹腔内投与し陽性対照とした。Reserpine投与による特異的な過形成、腫瘍は認められなく、reserpineはnon-human carcinogenと結論した[4]。rasH2マウスの子宮発がんに対する ethynil estradiol (EE) の抑制メカニズムを解明する為、rasH2マウスに120mg/kgのENUを腹腔内に単回投与し、2.5ppmのEEを6週間投与した。rasH2マウスの子宮ではENU投与とEEの継続投与で、Estrogen反応性及び細胞増殖に係わる多数の遺伝子が活性化された。それら遺伝子は estrogen receptor alphaに関連するもの、cyclin E、Cyclin dependent kinase (CDK4)、CDDK Inhibitor、TGF beta、TGF beta receptor、Insulin-like growth factor (IGF)であった。ENU+EE投与rasH2マウスでは、estrogen分解の亢進、ER-alphaなどのdown regulationが認められた。一方、ENU+EE投与ICRマウスではエストロゲン分解の減速、ER alphaのup-regulation、TGFbeta、serine/threonine kinase、smad3、ER alphaのup-regulationがみられた。ENUでinitiateし、EEを投与したrasH2マウスでは、これらのgeneの変動が子宮発がんの抑制に中心的に働いていると考えられた[5]。rasH2マウスの発がんのメカニズムを解明する目的で、120mg/kgのENUを単回腹腔内投与し20週後に前胃に発生した三つの扁平上皮がんの遺伝子発現をHIGH-DENSITY OLIGONUCLEOTIDE MICROARRAYを用いて解析し、更にc-Ha-ras geneとMAPKについてmRNAの発現を検索した。対照群のマウスの前胃に比べて、前胃扁平上皮がんでは、416と368の遺伝子がそれぞれ2倍以上にupないしdown regulationされていた。がんの浸潤、転移に関する多くの遺伝子、TGF beta、Matrix metalloproteinasesがup-regulationされており、腫瘍のprogressionを反映していた。RT-PCRでは、導入遺伝子、マウスのHa-ras、N-ras、raf、Mek2、c-fos、junB、c-myc、及びcyclin D1のup-regulationが確認された。これらの結果からrasH2マウスにENUにより誘発された前胃扁平上皮がんの発生にはras-MAPKカスケードの活性化とヒト及びマウスの内在性のras遺伝子のup-regulation が関与していることが実証された[6]。

2. p53^{+/-}マウス

- ① 病態モデル研究：Fujiiらは潰瘍性大腸炎のモデル確立のためにデキストラン硫酸 (DSS) をp53欠損マウスに投与した。その結果、大腸腫瘍がp53^{-/-}マウスで100%、p53^{+/-}と野生型[p53^{+/+}]でそれぞれ46%、13%の頻度で発生すること、DSSを投与したp53欠損マウスに生じた腫瘍は表在型であり、K-rasの変異がなく、またβカテニンの細胞膜から胞体や核への局在転移がある点で、ヒトの潰瘍性大腸炎患者で見られる腫瘍と同一の特徴であったことを見出した[7]。NagataらはRIKENのp53^{-/-}マウスに*Helicobacter pylori* (HP) を感染させる実験を行い、非感染p53^{-/-}マウスや感染野生型マウスに比べて、感染p53^{-/-}マウスでは胃粘膜の慢性活動性の炎症像や過形成、上皮の細胞増殖活性亢進やTUNEL陽性細胞の増加がみられたことを報告した[8]。Paniらは、Trp53^{-/-}マウスと野生型マウスに21日間エタノールを投与し、p53^{-/-}マウスではエタノールに起因する肝毒性が観察されなかったが、特徴的な異形成像がみられたこと、野生型ではエタノール負荷でアポトーシスが亢進すると逆にp53^{-/-}マウスでは抑制傾向がみられたと報告した[9]。また、Finnbergらは代表的な肝発がん物質であるジエチルニトロソアミン (DEN) をTrp53^{+/-}マウスと野生型マウスに週1回の頻度で20週にわたり投与した結果を解析し、両マウスで肝変異細胞巢の発現には差がみられず、変異細胞巢の中でp53陰性巢の占める割合が野生型では73%であるのに対し、Trp53^{+/-}マウスでは17%であったことを報告した[10]。この結果から彼らは、Trp53^{+/-}マウスにおいて正常組織におけるアポトーシス抑制がp53陰性巢の増殖を抑制している可能性を示唆し、本モデルを用いた短期発がん性試験が遺伝毒性肝発がん物質を検出できない可能性を示唆した。
- ② 腫瘍に影響を与える因子について：Hurstingらのグループは、摂取カロリーの制限によりTrp53欠損マウスの自然発生腫瘍（主にリンパ腫）の発現の潜伏期間が延長することを報告し、カロリー制限下で血中IGF-Iとレプチンレベルの低下、幼若リンパ球のアポトーシス亢進が生じていることを見出した[11、12]。マウスの背景系統による特徴的な腫瘍発生の報

告としては、次の2報が注目された。Balb/c-Trp (+/-) マウスでは乳腺腫瘍の頻度が高く乳腺腫瘍およびその他の腫瘍においてLOHも高頻度にみられるのに対し、129/SvやC57BL/6x129/Svを背景系統にすると乳腺腫瘍はみられず腫瘍におけるLOHの頻度も低いことから、自然発生乳腺腫瘍および自然発生腫瘍における高頻度なLOHはBalb/c系統の遺伝的特徴であることが示唆された[13]。また、Trp53^{-/-}・NF^{-/-}マウスにおいて背景系統がC57bL/6の場合には星状膠細胞腫が高率に発生するのに対し129S4/SvJaeの場合には同腫瘍は発生しないという報告があった[14]。

③ p53と他の遺伝子の相互作用について:がん抑制遺伝子であるp53、p27およびp21の発がんに関する相互作用について、p53欠損にp27欠損が加わると発がんが加速化されるがp21についてはそのような作用は弱いとの報告があった[15]。また、乳がんの抑制遺伝子として知られているがBrca2を欠損させたマウスにおける乳腺腫瘍の潜伏期間は1.6年以上であるが、このマウスとTrp53^{+/-}マウスのF1では同期間は著しく短縮されたことが報告された[16]。細胞周期(S期)やアポトーシス誘導に関わる転写因子であるE2f1の抑制はTrp53^{-/-}マウスの生存率を延長させるとの報告もあった[17]。また、TatemachiらはNO合成酵素の欠損がTrp53欠損マウスの胸腺リンパ腫を抑制する反面、非胸腺型リンパ腫の発生を促進すると報告している[18]。その他、Trp53欠損マウスを用いてメルファランのin vivo遺伝毒性試験であるComet Assay(標準法および変法)が試みられ、4週あるいは26週投与後の骨髄、肝臓、小腸および末梢血で陽性結果が得られた[19]。また、Parkらは7週齢のTrp53欠損マウスにおけるDNAメチル化の程度について検索し、胸腺および肝臓においてメチル化のレベルが上昇しているが、Igf2-IH19 lociに着目すると胸腺においてメチル化の低下がみられたと報告している[20]。

3. Tg.ACモデル

Benzo (a) pyrene (BP) を投与したTg.ACマウスに発生した皮膚腫瘍におけるras transgeneの発現を検索した[21]。雌のTg.ACマウス (homozygous) に10、20

及び40 μ gを週2回、25週間にわたって投与した。その結果、対照群及びBP 10 μ g投与群では皮膚腫瘍の発生は認められなかったが、20 μ g投与群では40%に皮膚乳頭腫、20%に扁平上皮癌が発生し、40 μ g投与群では全例に皮膚乳頭腫が、80%に扁平上皮癌が発生した。ras transgeneの発現はin situ hybridizationを用いて検索され、全ての皮膚腫瘍についてその発現が基底細胞増殖帯に局在して証明されたことから、BPはTg.ACマウスにおいてBPは用量依存的な発がん性を示し、BPの発がんにはras transgeneの発現が関与することが示唆された。2、3、7、8-tetrachlorodebenzo-p-dioxin (TCDD) をTg.ACマウスに皮膚塗布することにより、皮膚乳頭腫が発生することが明らかになっている。本試験では、TCDDの経皮投与による皮膚乳頭腫発生の用量相関関係と経口投与による皮膚腫瘍発生を検討し、投与経路の違いによる曝露量と腫瘍発生について比較した[22]。雌のTg.ACマウス (heterozygous) にTCDDの5、17、36、76、121、166、355及び760ng/kg (2.1、7.3、15、33、52、71、152及び326ng/kg/day)に相当)を週3回経皮的に、また、75、321、893ng/kgを週5回強制経口で26週間投与した。その結果、投与経路に関係なく経皮、経口両者で投与量に相関して皮膚乳頭腫の発生頻度が増加し、また、発生時期は用量依存的により早期に認められた。皮膚扁平上皮癌の発生頻度の増加は経皮投与の52ng/kg以上、経口投与の893ng/kgで認められ、皮膚腫瘍発生には、経皮に比べ経口投与でより高い用量のTCDDを必要とした。投与量と皮膚中のTCDD濃度に線形の相関があるにもかかわらず、皮膚のTCDD濃度から比較すると皮膚腫瘍の発生頻度は経皮投与に比べ、経口投与で低かった。以上、Tg.ACマウスは経皮投与に比べ経口投与においてTCDDに対する感受性は低かったものの、皮膚腫瘍発生はただ単に皮膚塗布した部位での局所的な反応ではなく、曝露量に対応することが証明された。投与経路による反応の違いは、試験期間中の皮膚へのTCDDの薬物動態的な違いによるものと考えられた。

Ron (Receptuer d'Origine Nantaise) は、macrophage-stimulating proteinあるいはhepatocyte growth factor (HFG) -like proteinによって活性化するreceptor tyrosine kinase (TK) の1つある。近年の研究

より、Ronは皮膚の恒常性維持に重要な役割を演じており、また、Ronが過剰発現することにより発がん性を示すことが明らかとなった。そこで、Ronシグナルが皮膚発がんをプロモートするとの仮説の元に以下の実験を行った[23]。RonのTKドメインを欠損したマウスTK^{-/-}とTg.ACマウスを交配して得られたマウスTK^{-/-} Tg.AC^{+/-}に2.5 μgの12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)を週1回背部皮膚に塗布した。対照群として、TK^{+/+} Tg.AC^{+/-}マウスに同様の処置を行なった。その結果、対照群に比べ、皮膚乳頭腫の細胞増殖及び乳頭腫の体積の減少が認められた。さらに、Ronタンパク発現が乳頭腫形成過程で増強された。乳頭腫の発生したマウスを48週間モニターした結果、Ron受容体シグナルの消失によって、悪性腫瘍に進展する乳頭腫の割合が有意に減少すると共に、その他の悪性腫瘍の発生も有意に低かった。従って、Ronシグナルは乳頭腫の成長及び悪性化を助長することが示された。p53欠損マウスとTg.ACマウスの両方の特性を有する新規のbitransgenicマウス(p53 heterozygous zeta globin-promoted Tg.AC (v-Ha-ras) bitransgenic mouse model)の有用性について検討された[24]。雌雄のp53 heterozygous zeta globin-promoted Tg.AC (v-Ha-ras) bitransgenicマウスにBPの20mg/kgを2回/週、10週間にわたって経口投与し、その後18週間まで経過観察した後、腫瘍発生プロファイルを比較した。対照群には同様にコーン油のみを投与した。その結果、Tg.ACの遺伝型として、乳頭腫(皮膚および前胃)、扁平上皮癌(皮膚、唾液腺導管)、歯牙腫(エナメル上皮腫、歯芽腫など)、赤芽球性白血病の発生が認められた。乳頭腫の発生頻度は、無処置動物では約9%であった。P53^{+/-}の遺伝型として、リンパ腫と肉腫の発生が認められた。Tg.ACとP53^{+/-}の遺伝型に共通の腫瘍としては、悪性リンパ腫とFVB/N系統由来と考えられる肺腺腫の発生が認められた。bitransgenicマウスにユニークな腫瘍として、乳腺癌(腺癌、扁平上皮癌)、耳下腺癌、子宮の平滑筋肉腫の発生が認められた。BP投与により前胃の乳頭腫、雌で、胸腺リンパ腫の発生が増加した(約30%)。ras及びp53遺伝子の変異は腫瘍中でよく認められることから、このbitransgenic modelは今後この2つの遺伝子の相互作用

の機序解明に有用なモデルとなる可能性がある。また、このbitransgenic modelを用いてPBの影響と抗酸化剤N-acetyl-L-cysteine (NAC)の腫瘍発生に対する影響を検討した[25]。雌雄のp53 heterozygous zeta globin-promoted Tg.AC (v-Ha-ras) bitransgenicマウスにBPの20mg/kgを2回/週、10週間にわたって経口投与し、NACはBP投与2週間前より3%の濃度で飼料中に混じて投与し、その後18週間まで経過観察した後、屠殺剖検し、病理組織学的検査を実施した。その結果、BP投与により胸腺、脾臓などの造血臓器及び前胃の腫瘍発生が増加した。NAC投与により、前胃の乳頭腫と過形成、悪性リンパ腫の肺転移を軽度抑制したことから、この新規のbitransgenicマウスモデルは、発がん検索法として有用である可能性が示唆された。

4. Xpa^{-/-}マウス

① Xpaマウス及びXpa/p53^{+/-}マウスの発がん感受性:ILCI/HESIの国際共同研究の一環として実施されたXpaマウス及びXpa/p53^{+/-}マウスモデルの9ヶ月間投与による結果が報告された[26]。雌雄各群15匹のXpaマウス、Xpa/p53^{+/-}マウス及び野生型マウス(C57BL/6)にhaloperidol、reserpine (nongenotoxic rodent carcinogen, putative human noncarcinogen)、phenacetin (genotoxic rodent carcinogen, suspected human carcinogen)及びD-mannitol (noncarcinogen in rodent and human)が39週間混飼投与された。高用量はMTDで、haloperidolは25mg/kg diet (25ppm)、reserpineは7.5mg/kg diet (7.5ppm)、phenacetinは0.75%、D-mannitolは10%であったが、いずれの化合物でも生存率への影響はなかった。Haloperidol、reserpine及びD-mannitolでは、両マウスでがん原性が陰性で、対照群と同等の低い腫瘍発生率を示した。Phenacetinの結果はequivocalであり、Xpa/p53^{+/-}マウスの1例にrenal tubular adenomaが発生し、低頻度で近位尿管過形成(Xpa 2例、Xpa/p53^{+/-} 1例)、Xpa及びXpa/p53^{+/-}マウスの全例に近位尿管上皮細胞の巨大核がみられた。Hoogervorstら[27]は、Xpa及びXpa/p53^{+/-}マウスにB[a]Pを混飼投与(75ppm)すると共に、肺において細胞増殖は誘導するが細胞障害性を示さない濃度(0.8ppm)のオゾン吸入曝露させた。投与期間は13週間でその後投与開始後6ヶ月

まで無処置で飼育した。その結果、B[a]Pを投与した何れのマウスにも前胃の扁平上皮乳頭腫（SCP）及び扁平上皮癌（SCC）が高率に発生したが、オゾン併用投与群では、これらの腫瘍発生率に影響せず、肺腫瘍も誘発されなかった。また、肺においてオゾンの併用投与により、細胞分裂が亢進し、B[a]PのDNA附加体が増加したが、LacZレポーター遺伝子の変異は増加しなかった。

② Xpaマウスの発がん感受性に対するp53欠損の影響：NERとp53は細胞の癌化を阻止しているが、Xpaマウスにおける2-AAFによる腫瘍発生がp53欠損の状態により修飾されることが示された[28]。すなわち、p53^{+/-}マウスでは2-AAFにより膀胱腫瘍が発生するが、Xpaマウスでは膀胱腫瘍が増加せず、Xpa/p53^{+/-}マウスでは高率に膀胱腫瘍が発生した。2-AAFの短期投与によるアッセイでは、Xpa/p53^{+/-}マウスの膀胱において細胞分裂には大きな変化がみられないもののアポトーシスの頻度が減少し、LacZレポーター遺伝子の変異が増加した。一方、2-AAFによる肝細胞腫瘍の発生は、DNA修復の欠損に依存し、Xpaマウスにおいて肝細胞腫瘍が増加したが、p53^{+/-}マウス及びXpa/p53^{+/-}マウスにおける肝細胞腫瘍はXpaマウスに比して低く、アポトーシスの減少及びLacZ遺伝子変異の増加はみられなかった。しかし、Xpa/p53^{-/-}マウスでは肝臓における細胞分裂及びLacZ遺伝子変異がp53^{-/-}マウスに比して顕著に増加した。従って、程度の差こそあれ、DNA修復能の欠損に、p53遺伝子ノックアウトを導入してアポトーシスを誘発を抑制させることにより、遺伝子突然変異が増加し、発癌が促進されることが示された。C3H/HeNを背景とするXpaマウスにおいてもp53^{+/-}を導入すると腫瘍発生が促進されることが示された[29]。Xpaマウスとp53^{+/-}マウス（背景、C57BL/6 25%、CBA 75%）をクロスし、Xpa/p53^{-/-}、Xpa/p53^{+/-}及びXpa/p53^{+/+}が作製された。4-NQOにより発生した舌腫瘍は、発生率には差がみられないものの、Xpaマウスでは50週において、Xpa/p53^{+/-}マウスでは25週において100%扁平上皮癌（SCC）となった。一方、Xpa/p53^{-/-}マウスでは、13週齢において胸腺腫が発生し、舌腫瘍の発生はみられなかった。Xpa/p53^{+/-}

マウスに発生した舌SCCでは、p53遺伝子に変異がみられず、舌腫瘍発生の促進は、p53の変異によるものではなく、haploinsufficiencyによるものと考えられた。GGR欠損マウスであるXpcマウス、TCR欠損マウスであるCsbマウス及びその両者を欠損したXpaマウスに2-AAFを投与（300ppm混飼投与）して、腫瘍発生におけるNERの関与が検討された[30]。その結果、腫瘍はXpa及びXpcマウスのみが発生し、GGRの欠損が腫瘍発生につながることを示された。また、Xpcマウスに比してXpaマウスにおける腫瘍発生率が低いことから、TCRの欠損は腫瘍発生を抑制すると考えられた。これらの傾向は肝腫瘍で顕著であったが、膀胱腫瘍でもみられた。しかし、2-AAFの短期投与後のLacZ遺伝子変異は、Xpa、Xpc及びCsbマウスで同レベルであり、腫瘍発生率の差とは異なっていた。一方、BPを投与したXpaマウスでは、リンパ腫が高率に発生し、脾臓でLacZ遺伝子の変異が増加したが、Csbマウスではリンパ腫の発生及び脾臓におけるLacZ遺伝子の変異は野生型マウスと同程度であった[35、36]。このように、LacZレポーター遺伝子の変異と発癌性との関連性は発癌物質により異なっていた。総説[31]においても、Xpaマウスにp53ノックアウトを導入すると、腫瘍発生開始が促進されることが記載されている。さらに、UV、DMBA、B[a]P、AFB1、4-NQOによる腫瘍発生がまとめられた。

③ 毒性発現との関連：TCRの欠損により、アポトーシスが誘発され、PhIPによる消化管障害やUVによる免疫抑制が増悪されること等が知られていたが、今回は、UVBによるLangerhans細胞の変化とNERとの関連に関する成績が報告された[32]。UVB照射により接触過敏症反応が抑制されるが、これは抗原提示細胞であるLangerhans細胞が照射部位から消失する（表皮から離脱して所属リンパ節に遊走することにより発生する。TCRを欠損したCsbマウスでは、接触過敏症の抑制（以下、免疫抑制）及びLangerhans細胞の減少が顕著であり、Xpaマウスでも同様に抑制されたが、GGRのみに欠陥のあるXpcマウスでは免疫抑制及びLangerhans細胞の減少は軽度であった。また、文献[33]は、神経組織におけるbase-exchange repair（BER）及びNERの毒性物質に対する防御作用

を検討したものである。小脳ニューロン及びアストロサイトを培養し、chloroacetaldehyde (CAA) 及び alkylating agent 3-methylxiprosin (Me-Lex) を培地に添加して細胞生存率、DNA断片化(TUNEL染色)、グルタチオンレベル等を測定した。その結果、神経細胞ではBER及びNERがCAA及びMe-Lexに対して防御作用を示したが、アストロサイトはこれらの化合物に対してinsensitiveであった。従って、野生型マウスに比してXpaマウスでは、神経毒性にも注意を払う必要があることが示された。TCRが阻害された場合に、NERとは関連しない転写も広範に阻害され、酸化的な障害につながると言われている。文献[34]では、Csbマウス胚の線維芽細胞のionizing radiationやバラコートに対する感受性がXpaマウス由来の細胞に比して高いことが示されており、アポトーシスの誘導とともに、TCR欠損マウスで毒性発現が強い一つの要因と考えられた。

5. PPARアゴニストの米国FDAの発癌性評価の変更

1997年に策定されたICHガイドラインにより、医薬品のがん原性評価には遺伝子改変動物の使用が認められているが、FDAではPPAR γ や α と γ のデュアルアゴニストには多臓器発癌性があり、その発がん性は動物種を越える可能性が高いことから、遺伝子改変マウスでの評価は困難と判断し、第3相臨床試験開始までに従来のラットとマウスの長期間がん原性試験データを提出すべきであるとの規制に逆戻りした。しかし、肝を標的としてゲツ菌類のみ発癌性を示すPPAR α アゴニストについても同様に規制する点は、その科学的根拠は明確にされていない。

D. 考 察

rasH2マウスの発がん感受性に関わるメカニズムの研究報告が主体であった。多臓器発がん物質であるDHPNを用いた短期発がん性実験では、肝臓、肺、前胃、唾液腺導管、尿道などに腫瘍を誘発し遺伝子毒性を持つ化合物に対してrasH2マウスが高発がん感受性を有することがあらためて示された。ENUにbeta-estradiol -3-benzoateを追加投与したマウスに誘発された肺、皮膚、前胃腫瘍では導入遺伝子の発現増加と導入遺伝子のコドン16における点突然変異がみとめ

られ、rasH2マウスの発がん過程に重要な役割をしていることが明らかになって来た。rasH2マウスの発がんのプロセスの解析にmicroarrayがはじめて使われた結果の報告があり、複雑な多数の遺伝子の正負の関わり等が明らかになってきている。

DSSによる大腸発がんに関する成績は、p53欠損モデルが非遺伝毒性による影響でも早期に発がんを起こすことを明らかにし、しかも腫瘍の特徴がヒト病態に類似している点で、本モデルを大腸発がんの懸念に対して適用できる可能性を示唆している。一方、HP菌感染、エタノール投与およびDEN投与の実験は、アポトーシス機構が正常に働かないという本モデルの特徴が、医薬品の毒性発現に野生型と異なった反応を引き起こす事例として重要である。一方、DENの実験に関しては、投与用量や頻度の点に発がん性試験の条件として適切ではない可能性も考えられる。類縁化合物であるジメチルニトロソアミンを0.0005%の濃度で本モデルに飲水投与したところ肝血管肉腫が発生したとの報告もあることから、発がん性評価の点からはDENの標的細胞を肝細胞と限定する必要はないとも考えられる。摂取カロリーの制限の影響やマウスの背景系統の違いによる発がん部位や頻度への影響に関しては、これまでも報告があったとおりであり、今後もp53欠損モデルに影響を与える因子として注目していく必要があるものと思われる。ダブルノックアウト動物によるp53の機能解析に関する報告は、p53の発がん過程における重要性を示しているだけでなく、医薬品の薬理作用が試験成績に影響を及ぼす可能性も示唆していると思われる。メルファランはNIEHSが実施したTrp53^{+/-}マウスを用いた6ヶ月発がん性試験(0.3と1.5mg/kg、ip、3/wk)において陽性結果が得られている。Comet Assayにおいても陽性成績がみられたことは、短期発がん性試験との組合せで医薬品の発がん性評価ができる可能性を示してされたと考えられる。また、発がん前段階の変化としてのDNAメチル化については、類似の知見が積み重なれば、発がん機序検討の項目となりえる指標であると思われる。

Tg.ACマウスにおけるBPの発がん性については、ras transgene発現に依存すること、receptor tyrosine kinaseの1つであるRonのシグナルは乳頭腫の成長及び悪性

化を助長することが示唆された。また、p53欠損マウスとTg.ACマウスの両方の特性を有する新規のbitransgenicマウスの今後の発がん機序解明に有用なモデルとなる可能性が示唆された。

ILSI/HESI共同研究におけるXpaマウス及びXpa/p53^{+/-}マウスの9ヶ月間投与による成績が報告されたが、遺伝毒性発癌物質であるphenacetineに対する結果はequivocalであり、非遺伝毒性げっ歯類発癌物質であるreserpineによる発癌性は認められなかった。また、Xpaマウス及びXpa/p53^{+/-}マウスにオゾン吸入暴露させて肺胞上皮細胞の細胞分裂を亢進させても、B[a]Pの経口投与により肺腫瘍は誘発されなかった。GGR及びTCRの両者を欠損するXpaマウスにおける2-AAF経口投与による膀胱腫瘍及び4NQO経口投与による舌腫瘍に関しては、p53^{+/-}を導入してアポトーシスを誘導を低下させることにより発癌が促進されることが示された。また、2-AAF経口投与による膀胱腫瘍及び肝腫瘍は、GGRを欠くXpcマウスで高率に発生し、TCRを欠くCsbマウスやGGR及びTCRの両者を欠くXpaマウスでは発生率が低く、TCRの欠損により腫瘍発生が抑制されることが示された。TCR欠損が腫瘍発生を抑制する機序としては、TCRがDNA複製の盛んな部位におけるDNA修復機構であり、TCR欠損CsbマウスではDNA障害部位においてDNA polymerase IIが脱落してアポトーシスが誘発されるために、腫瘍細胞の除去及び腫瘍細胞の増殖抑制がおこることが考えられる。この様な理由により、Csbマウス及びXpaマウスにおける細胞毒性は、GGR欠損Xpcマウスに比して強く発現すると考えられる。また、2-AAFによる発癌性に差がみられるにも関わらず、Xpa、Xpc及びCsbマウスでLacZ遺伝子の変異に差がみられず、腫瘍発生のパターンとは異なった。発癌とLac遺伝子変異の相関性は発癌物質により異なり、その理由は不明である。TCR欠損によりアポトーシスが誘発されることから、XpaマウスやCsbマウスではUV照射による急性皮膚炎やPhIPによる消化管障害が増悪することが報告されたが、免疫毒性の増悪や酸化ストレスに対する高感受性も示された。一方、TCRの欠損によりアポトーシスが誘発され、腫瘍発生が抑制されることから、XpcやCsbにp53^{+/-}を導入してアポトーシスを誘導を低下させることにより、化学発癌が促

進されることが期待される。

遺伝子改変動物は、医薬品の癌原性評価に2000年から使用され始めてきている。特に米国では、長期連用を予定している新しい医薬品に対して、p53ノックアウトマウスが使用されてきており、in vivo遺伝毒性による発癌リスクの可能性を否定するために有効とされている。一方、このp53ノックアウトマウス以外には、世界ではrasH2マウスが頻繁に使用されており、この系については、その発癌増強メカニズムが徐々に明らかにされつつある。製薬企業体では、これらの遺伝子改変マウスを用いて新薬の開発をしてきているところであるが、最近、米国FDAではPPARアゴニストについては遺伝子改変マウスでは癌原性の評価は困難と判断して、これらのカテゴリーに入る新薬については厳しい規制をかけ始めた。この動きは、1997年にICHで提案された医薬品の癌原性評価に関するガイドラインから逸脱するものであり、その科学的正当性について何が遺伝子改変マウスで評価を不適切にしているかを今後注意深く追求していくべきである。

E. 結論

rasH2マウスモデルの発がん感受性に関する文献から、更に検証試験は必要であるが、このモデルは医薬品のヒトに対する発がん性予測に適したモデルであると考えられる。Trp53欠損マウスを医薬品の発がん性評価に適用する場合には、マウスの系統や栄養状態が発がん標的臓器や発がん頻度に大きな影響を与えることを認識する必要がある。一方、Trp53欠損マウスと他遺伝子のダブルノックアウトモデルを用いた研究、発がん前段階のDNAメチル化に関する研究あるいはTrp53欠損マウスを用いた遺伝毒性研究の成果は、本モデルを用いたがん原性試験の結果解釈のためのメカニズム研究の可能性を示すものとして今後も注目する必要がある。Tg.ACマウス及びp53欠損マウスとTg.ACマウスの両方の特性を有するbitransgenicマウスのがん原性試験代替法としての有用性や発がん高感受性について新たな知見が得られている。また、皮膚腫瘍発生機序解明に対するモデルとしての利用も期待される。Xpaマウスは、GGRに加えてTCRが欠損していることから、DNAの転写活性の高い細胞ではTCRによるDNA障害

の修復が阻害されてアポトーシスが誘発されるために、GGR欠損マウスであるXpcマウスに比して発癌感受性が低く、細胞障害が発生しやすいと結論される。p53^{+/-}マウスとクロスさせたXpa/p53^{+/-}マウスでは、TCRの欠損により発生するアポトーシスが抑制されるために、Xpaマウスに比して発癌感受性が増すことが明らかになってきた。

今回の米国FDAのPPARアゴニストに対する規制の変更は、1997年にICHで提案された医薬品の癌原性評価に関するガイドラインから逸脱するものであり、その科学的正当性について注意深く追求していくべきである。

REFERENCES

- 1) Toyosawa K., Tanaka K., IMAI T., Yasuhara K., Koujitani T., Hirose M., and Mitsumori K.: Mutation and Overexpression of the Transgene in Ethylnitrosourea-Induced Tumors in Mice Carrying a Human Prototype c-Ha-*ras* Gene. *Toxicol. Pathol.* 31: 491-495 (2003).
- 2) Watanabe T., Kashida Y., Ueda M., Onodera H., Takizawa T., Hirose M., and Mitsumori K.: Inhibition by Ethinylestradiol of *N*-Ethyl-*N*-Nitrosourea-Initiated Uterine Carcinogenesis in Transgenic Mice Carrying a Human Prototype C-Ha-*ras* Gene (rasH2 Mice). *Toxicol. Pathol.* 31: 496-505 (2003).
- 3) Okamura M., Moto M., Kashida Y., Machida N., and Mitsumori K.: Carcinogenic Susceptibility to *N*-bis(2hydroxypropyl)nitrosoamine (DHPN) in rasH2 Mice. *Toxicol. Pathol.* 32: 474-481 (2004).
- 4) Imaoka M., Satoh H., and Furuhashi K.: Lack of Carcinogenicity of Reserpine in Transgenic Mice Carrying a Human Prototype c-Ha-*ras* Gene (RasH2 Mice). *J. Toxicol. Pathol.* 17:95-103 (2004).
- 5) Watanabe T., Sumida K., Muto T., Kashida Y., Watanabe T., and Mitsumori K.: Analysis of Gene Expression Profile on Uterine Tumorigenesis Initiated with *N*-ethyl-*N*-nitrosourea and Inhibited by Ethinylestradiol in rasH2 Mice. *J. Toxicol. Pathol.* 17:155-164 (2004).
- 6) Okamura M., Sumida K., Muto T., Kashida Y., Machida N., Watanabe T. and Mitsumori K.: Analysis of gene expression profiles of forestomach tumors in rasH2 mice initiated with *N*-ethyl-*N*-nitrosourea. *Archiv. Toxicol.* 78: 688-696 (2004).
- 7) Fujii S, Kawamata H, Takada J, et al.: Development of colonic neoplasia in p53 deficient mice with experimental colitis induced by dextran sulphate sodium. *Gut* 53: 710-716 (2004).
- 8) Nagata J, Kijima H, Takagi A, et al.: *Helicobacter pylori* induces chronic active gastritis in p53-knockout mice. *Int. J. Mol. Med.* 12: 773-777 (2004).
- 9) Pani G, Fusco S., Colavitti R., et al.: Abrogation of hepatocyte apoptosis and early appearance of liver dysplasia in ethanol-fed p53-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 325: 97-100 (2004).
- 10) Finnberg N., Stenius U and Högberg J: Heterozygous p53-deficient (^{+/-}) mice develop fewer p53-negative preneoplastic focal liver lesions in response to treatment with diethylnitrosamine than do wild-type (^{+/+}) mice. *Cancer Lett.* 207: 148-155 (2004).
- 11) Hursting SD, Lavigne JA, Berrigan D, et al.: Diet-gene interactions in p53-deficient mice: Insulin-like growth factor-1 as a mechanistic target. *J. Nutr.* 134: 2482S-2486S (2004).
- 12) Patel A, Nunez NP, Perkins SN, et al.: Effects of energy balance on cancer in genetically altered mice. *J. Nutr.* 134: 3394S-3398S (2004).
- 13) Blackburn AC, McLary SC, Naeem R., et al.: Loss of heterozygosity occurs via mitotic recombination in trp53^{+/-} mice and associates with mammary tumor susceptibility of the BALB/c strain. *Cancer Res.* 64: 5140-5147 (2004).
- 14) Reilly KM, Tuskan RG, Christy E, et al.: Susceptibility to astrocytoma in mice mutant for Nf1 and Trp 53 is linked to chromosome 11 and subject to epigenetic effects. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 101: 13008-13013 (2004).
- 15) Philipp-Staheli J., Kim KH, Liggitt D, et al.: Distinct roles for p53, p27^{kip1}, and p21^{Cip1} during tumor

- development. *Oncogene* 23: 905-913 (2004).
- 16) Cheung AMY, Elia A, Tsao MS, et al.: Barca 2 deficiency does not impair mammary epithelium development but promotes mammary adenocarcinoma formation in p53^{+/-} mutant mice. *Cancer Res.* 64: 1959-1965 (2004).
 - 17) Wikonkal NM., Remenyik E., Knezevic D. et al.: Inactivation E2f1 reverts apoptosis resistance and cancer sensitivity in Trp53-deficient mice. *Nature cell Biol.* 5: 655-660 (2004).
 - 18) Tatemachi M, Tazawa H., Masuda M., et al.: Suppression of thymic lymphomas and increased nonthymic lymphomagenesis in Trp53-deficient mice lacking inducible nitric oxide synthase gene. *Int. J. Cancer* 111: 819-828 (2004).
 - 19) Cordelli E, Cinelli S, Lascialfari A, et al.: Melphalan-induced DNA damage in p53^{+/-} and wild type mice analysed by the comet assay. *Mutat. Res.* 550: 133-143 (2004).
 - 20) Park IY, Sohn BH, Choo JH, et, al.: Deregulation of DNA methyltransferases and loss of parental methylation at the insulin-like growth factor II (Igf2)IH19 loci in p53 knockout mice prior to tumor development. *J. Cell. Biochem.* 12: in press. (2004).
 - 21) Lee BM, Kim HS, Kim IS, et al.: Ras transgene expression in Tg-AC mice treated with Benzo(a)pyrene. *Biol.Pharm. Bull.* 26: 733-735 (2003).
 - 22) Wyde ME, Braen APJM, Hejtmancik M, et al.: Oral and dermal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces cutaneous papillomas and squamous cell carcinomas in female hemizygous Tg.AC transgenic mice. *Toxicol. Sci.* 82: 34-45 (2004).
 - 23) Chan EL, Peace BE, Collins MH, et al.: Ron tyrosine kinase receptor regulates Papilloma growth and malignant conversion in a murine model of skin carcinogenesis. *Oncogene* 23, Nov. (2004).
 - 24) Martin KR, Jokinen MP, Honeycutt HP, et al.: Tumor spectrum in the p53 heterozygous zeta globin-promoted Tg.AC (v-Ha-ras) bitransgenic mouse model. *Toxicol. Pathol.* 32: 418-425 (2004a).
 - 25) Martin KR, Jokinen MP, Honeycutt, et al.: Tumor profile of novel p53 heterozygous Tg.AC (v-Ha-ras) bitransgenic mice treated with benzo(a)pyrene and fed dietary N-acetyl-L-cysteine (NAC). *Toxicol. Sci.* 81: 293-301 (2004b).
 - 26) Lina BA, Woutersen RA, Bruijntjes JP, van Benthem J, van den Berg JA, Monbaliu J, Thoolen BJ, Beems RB, van Kreijl CF. Evaluation of the Xpa-deficient transgenic mouse model for short-term carcinogenicity testing: 9-month studies with haloperidol, reserpine, phenacetin, and D-mannitol. *Toxicol. Pathol.* 32: 192-201 (2004).
 - 27) Hoogervorst EM, de Vries A, Beems RB, van Oostrom CT, Wester PW, Vos JG, Bruins W, Roodbergen M, Cassee FR, Vijg J, van Schooten FJ, van Steeg H. Combined oral benzo[a]pyrene and inhalatory ozone exposure have no effect on lung tumor development in DNA repair-deficient Xpa mice. *Carcinogenesis* 24: 613-619 (2004).
 - 28) Hoogervorst EM, van Oostrom CT, Beems RB, van Benthem J, Gielis S, Vermeulen JP, Wester PW, Vos JG, de Vries A, van Steeg H. p53 heterozygosity results in an increased 2-acetylaminofluorene-induced urinary bladder but not liver tumor response in DNA repair-deficient Xpa mice. *Cancer Res.* 64: 5118-5126 (2004).
 - 29) Ide F, Kitada M, Sakashita H, Kusama K, Tanaka K, Ishikawa T. p53 haploinsufficiency profoundly accelerates the onset of tongue tumors in mice lacking the xeroderma pigmentosum group A gene. *Am. J Pathol.* 163: 1729-1733. (2003).
 - 30) Hoogervorst EM, Oostrom CT, Beems RB, Benthem J, Berg J, Kreijl CF, Vos JG, Vries A, van Steeg H. 2-AAF-induced tumor development in nucleotide excision repair-deficient mice is associated with a defect in global genome repair but not with transcription coupled repair. *DNA Repair* 4: 3-9 (2005).

- 31) Ishikawa T, Zhang SS, Qin X, Takahashi Y, Oda H, Nakatsuru Y, Ide F. DNA repair and cancer: lessons from mutant mouse models. *Cancer Sci.* 95: 112-117 (2004).
- 32) Kolgen W, van Steeg H, van der Horst GT, Hoeijmakers JH, van Vloten WA, de Gruij FR, Garssen J. Association of transcription-coupled repair but not global genome repair with ultraviolet-B-induced Langerhans cell depletion and local immunosuppression. *J. Invest. Dermatol.* 121: 751-756 (2003).
- 33) Kisby GE, Lesselroth H, Olivas A, Samson L, Gold B, Tanaka K, Turker MS. Role of nucleotide- and base-excision repair in genotoxin-induced neuronal cell death. *DNA Repair* 3: 617-627 (2004).
- 34) de Waard H, de Wit J, Gorgels TG, van den Aardweg G, Andressoo JO, Vermeij M, van Steeg H, Hoeijmakers JH, van der Horst GT. Cell type-specific hypersensitivity to oxidative damage in CSB and XPA mice. *DNA Repair* 2: 13-25 (2003).
- 35) de Vries A, Dolle ME, Broekhof JL, Muller JJ, Kroese ED, van Kreijl CF, Capel PJ, Vijg J, and van Steeg H. Induction of DNA adducts and mutations in spleen, liver and lung of XPA-deficient/lacZ transgenic mice after oral treatment with benzo[a]pyrene: correlation with tumor development. *Carcinogenesis* 18: 2327-2332 (1997).
- 36) Wijnhoven SW, Kool HJ, van Oostrom CT, Beems RB, Mullenders LH, van Zeeland AA, van der Horst GT, Vrieling H, van Steeg H. The relationship between benzo[a]pyrene-induced mutagenesis and carcinogenesis in repair-deficient Cockayne syndrome group B mice. *Cancer Res.* 60: 5681-5687 (2001).

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（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
平成16年度分担研究報告書

－ヒト型in vitro遺伝毒性試験系の確立と評価に関する研究－

分担研究者：林 真（国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部）
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）
益森 勝志（(財)食品農医薬品安全性安評センター）
森田 健（国立医薬品食品衛生研究所・安全情報部）
浅野 哲秀（日東電工(株) 安全性試験センター）
浜田 修一（エスエス製薬(株) 中央研究所）
伊東 悟（第一製薬(株) 安全性研究所）
祖父尼俊雄（元国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部）
山本 美佳（藤沢薬品工業(株) 安全性研究所 探索毒性）
若田 明裕（山之内製薬(株) 安全性研究所）
宮島 博文（塩野義製薬(株) 新薬研究所安全性研究部門）
小林 一男（キッセイ薬品工業(株) 安全性研究所）
荒木 春美（富山化学工業(株) 総合研究所）
今井 聖子（明治製菓(株) 医薬開発部門 動態安全性研究所）
岡 宏昭（大鵬薬品工業(株) 安全性研究所）
笠松 俊夫（花王(株)）
松元 郷六（(財)残留農薬研究所 毒性部）
山村 英二（三菱ウェルファーマ(株) 安全性研究所）
馬場 博（三菱ウェルファーマ(株) 安全性研究所）
西田 壯司（(株)鎌倉テクノサイエンス 生物試験業務部）
田中 憲穂（(財)食品薬品安全センター 秦野研究所）
山影 康次（(財)食品薬品安全センター 秦野研究所）

研究要旨

ヒトリンパ芽球由来のWTK-1細胞を基礎としたヒト型in vitro遺伝毒性検出系を構築した。本試験系は、コメット試験、小核試験、TK遺伝子突然変異試験からなり、すべて同一処理条件下で行うため、互いの試験結果を比較し、遺伝毒性の特徴を解析することが可能である。本試験系を用いて細胞分裂毒である、colchicine、griseofulvin、vinblastineで試験を行った結果、小核試験でこれら化合物を効率的に検出できることが明らかとなった。本試験系の染色体異数性検出能力をバリデートするため、マウス精子における異数性誘発物質（trichlorfon）と倍数性誘発物質（carbendazim）の2化合物を用い、24時間処理後のコメット試験によるDNA損傷、小核誘発率、倍数性誘発率等を検討した。その結果、両物質とも小核を誘発したが、倍数性を誘発したのはcarbendazimのみであった。この結果はチャイニーズハムスター細胞においても確認された。これらの結果は、trichlorfonのような異数性の

みを誘発する物質も小核試験で検出できることを示すものである。また、本試験系により、コメット試験の結果との比較から、化学物質の異数性誘発の特徴を推定できるものと考えられる。

しかしながら、今回の両化合物の試験結果は、昨年度の試験結果と反応性に大きな違いがあり、今後、試験の再現性の確認と、細胞遺伝学的解析の再検討が必要と考えられる。

キーワード：遺伝毒性試験、ヒト細胞、染色体異数性

A. 研究目的

1997年のICHでの協議において、医薬品の遺伝毒性の評価に関して、染色体異常試験の代替としてマウスリンフォーマTK試験が認められた。その結果、*in vitro*試験として、細菌を用いる復帰突然変異試験+ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、もしくは、細菌を用いる復帰突然変異試験+マウスリンフォーマTK試験の選択が可能となった。しかしながら、これらの組み合わせ、および試験結果の評価には多くの問題が含まれている。

第1に、染色体異常試験の代替として認められたマウスリンフォーマTK試験は、理論的には遺伝子突然変異試験であり、復帰突然変異試験との組み合わせは、明らかに重複があること。第2に、試験条件が異なるため、各試験結果を比較し、化学物質の特徴を推定することが不可能であること。第3に、バクテリアや齧歯類の細胞を人に対する安全性評価に用いる妥当性が曖昧であること。第4に、これらの組み合わせで、染色体の数的な異常を検出できるかが不明であること、などが挙げられる。特に、最後の染色体の異数性は、発がんや、次世代に対する遺伝病の原因として最近特に懸念されており、染色体異常試験の代替として、小核試験の導入がトピックとして提案されている。また、小核試験に加えて、小核をキネトコア（染色体の動原体）抗体あるいは動原体特異的プローブで標識するFISH法のガイドライン化についても検討議題となりつつある。

以上のような背景から、1) ヒト細胞を基礎として（生物学的妥当性）、2) 妥当な遺伝毒性検出エンドポイントからなる（遺伝毒性物質の広域スクリーニング）、3) 同一条件下での試験（試験結果の比較によるメカニズムの解析）をコンセプトとする新しい*in vitro*遺伝

毒性検出系の確立を目指す。特に本研究では、第4の問題点でもある染色体異数性の検出にも重点を置き、数種類の細胞分裂毒について試験を行った。また昨年度、マウス精子に異数性を誘発し、しかもヒトにおけるダウン症候群高発生率の原因物質と考えられているtrichlorfonと、マウス精子に倍数性を誘発するcarbendazimの2化合物を用いて小核誘発性を検討したが、今回も引き続きこれらをモデル化合物として小核誘発だけでなく、DNA損傷、倍数体誘発等の比較も行い、染色体の異数性検出系としての*in vitro*小核試験のバリデーションを行った。

B. 研究方法

1. 試験化合物

Colchicine (COL, CAS No.: 64-86-8, 分子量: 399.4, シグマ)、Vinblastine sulfate (VBL, CAS No.: 865-21-4, 分子量811.1, 和光純薬工業)、Griseofulvin (GSF, CAS No.: 126-07-8, 分子量: 352.8, シグマ)、Trichlorfon (TF, CAS No.: 52-68-6, 分子量: 257.4, 和光純薬工業) は水に溶解したことから、日局注射用水に溶解して試験に用いた。Carbendazim (MBC, CAS No.: 10605-21-7, 分子量: 191.18, ロット番号: MLH9040, 和光純薬工業) は水に不溶でジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解したことから、DMSOに溶解して試験に用いた。いずれも培養液に対して1%添加した。

2. 細胞

ヒトリンパ芽球由来のWTK-1細胞を用いた。WTK-1細胞の培養には、NaHCO₃ (2 mg/mL)、抗生物質（ペニシリン: 100units/mL、ストレプトマイシン: 100 μg/mL）、ピルビン酸ナトリウム (200 μg/mL) および56℃で30分間非動化した馬血清（ロット番号:

002002A, JRH Biosciences) を10%添加したRPMI1640培地を用いてCO₂インキュベーター(5% CO₂, 37°C)内で培養した。

3. 被験物質処理

増殖期のWTK-1細胞を振とうにより単一細胞にして細胞数を計数し、細胞濃度を調整(突然変異試験では 2×10^5 個/mL、それ以外は 1×10^5 個/mL)してプラスチックディッシュ又はフラスコに播種し、用時調製した化合物溶液を1%添加し、4時間、もしくは24時間連続処理した。処理終了後、細胞懸濁液の一部を用いて、コールターカウンタで細胞数を測定し、細胞毒性作用の指標となる相対生存率(RS)測定のために細胞をプレーティングした(後述)。残りの細胞懸濁液については、後述の各実験に用いた。各群1つの細胞懸濁液を用いて処理を行い、必要に応じてその細胞懸濁液の一部を採取して、それぞれの実験に用いた。

4. コメット試験

細胞は、氷冷したリン酸緩衝液(0.02% EDTA 2Naを含む)に懸濁し、約2万細胞/50 μ Lに調整して細胞浮遊液とした。全面フロストスライドガラス(マツナミ)に1.0% Low melting point agarose (SeaPlaque GTG、タカラバイオ)でプレコーティングした。50 μ Lの1.0% low melting point agarose と等量の細胞浮遊液を混和して0.5%の寒天濃度とし、プレコーティングしたスライドガラスに滴下し、すばやくカバーガラス(イワキガラス)を被せて寒天をひろげた。作製した標本を、細胞溶解液(0.5M NaCl, 100mM EDTA 2Na(pH8.0)、10mM Tris (pH7.4)、10% DMSO、1% Triton X-100、氷冷)に最低1時間浸した。標本を泳動液(300mM NaOH、10mM EDTA 2Na、pH約13)で満たした水平型電気泳動槽に約20分間静置してアンワインディング処理した。次いで、25V(約1V/cm)定電圧の条件で約25分間電気泳動した。泳動液は、アンワインディング開始時に約6°Cに調整し、その後は泳動槽を循環冷却水で冷却して、泳動終了時に約13°Cになるようにコントロールした。その後、標本を氷冷した400mM Tris塩酸緩衝液(pH7.4)で約20分間中和し、20 μ g/mLのエチジウムブロマイド溶液(10mM Tris塩酸緩衝液pH7.4に溶解)

を100 μ L滴下して染色し、カバーガラスを被せた。515-560nmの励起フィルターと590nm以下の反射光を吸収するフィルターを装備した蛍光顕微鏡を用い、200倍の倍率で500個の細胞を観察した。

5. 小核の分析

COL、VBL、GSFは4時間処理後、正常培地で48時間培養し小核の標本作製した。TF、MBCは24時間処理直後に標本作製を行った。培養細胞液を遠心して上澄を捨て、0.075M KCl水溶液を加えて室温で低張処理を行い、固定液(メタノール:氷酢酸=3:1, v/v)を静かに加えた。遠心(1000~1500rpm、約5分)による固定液の更新を2回繰り返したのち、細胞を少量の固定液に浮遊させ、その懸濁液を伸展器上であらかじめ約30°Cに暖めてあるスライドガラスに滴下し、小核標本作製した。標本をコード化し、観察直前に20 μ g/mLのアクリジンオレンジ溶液をスライドガラス上に滴下して染色し、B励起による蛍光顕微鏡下で1000~2000細胞あたりの小核を有する細胞の数を計数した。なお、小核および分裂細胞の分析は2回行った実験の両方について、2機関で行った(1000細胞/群/機関)。

6. 染色体数の分析

TF、MBCに関しては標本作製時の2時間前に、染色体分析用に細胞懸濁液の一部を採取し、コルセミドを最終濃度が0.1 μ g/mLとなるように添加した。培養終了後、培養液を捨て、遠沈(1000~1500rpm、約5分)後、0.075M KCl水溶液を加え、約30分間低張処理を行った。低張処理後、固定液(メタノール:氷酢酸=3:1, v/v)を加えて細胞を固定した。数回固定液を交換して十分に固定したのち、少量の固定液に懸濁させた細胞浮遊液をスライドガラス上に滴下し、自然乾燥させた。作製したスライド標本を3vol%ギムザ液(pH6.8の1/15Mリン酸緩衝液で希釈調製)で染色し、200個の分裂中期細胞について、染色体数を顕微鏡下で計数した。

7. TK遺伝子を指標とした突然変異試験

処理終了直後と発現時間(3日間)終了時に細胞懸