

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

### 第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

### 第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

### 第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

### 第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

### 第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

### 第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

# 目 次

## 第1分野

### 課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

## 第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG 1 蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 ……	124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 ……	129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 ……	134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 ……	142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 ……	148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 ……	152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 ……	156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 ……	160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 ……	167
 第3分野			
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 ……	175
KH31025	生薬及び漢方処方の科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 ……	185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤 由起子 ……	194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 ……	200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用－非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立－	吉里 勝利 ……	210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 ……	218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 ……	226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 ……	235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 ……	243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 ……	252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 ……	257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ ……	261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルゲンによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルゲンによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 ……	410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 ……	418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 ……	422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 ……	428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 ……	431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 ……	437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 ……	442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 ……	452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 ……	459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 ……	464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 ……	466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 ……	471
第6分野			
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 ……	479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 ……	500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 ……	511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 ……	516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 ……	524
第7分野			
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 ……	531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 ……	540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 ……	548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

## 第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性・安全性に関する研究



## ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション

所属 国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部

研究者 本間 正充

### 研究要旨

遺伝毒性試験はこれまで主として、遺伝毒性物質、もしくは潜在的発がん性物質のハザードの同定に用いられてきた。遺伝毒性試験が、ヒトに対する遺伝毒性リスクの評価に用いられる可能性を追求するために、われわれはヒト細胞、ヒト代謝系を基礎とする *in vitro* 遺伝毒性試験系を確立した。これは、ヒトリンパ芽球細胞株 WYK-1 と、ヒト肝臓由来の S9 を用いたヒト型試験系であり、エンドポイントとして、コメット試験(COM)、小核試験(MN)、チミジンキナーゼ遺伝子をターゲットとした遺伝子突然変異試験(TK)から成る。それぞれの最適試験条件を検討し、試験プロトコルを確立し、代謝活性化を必要とする 17 の化合物について試験を行い、本試験系をバリデーションした。この中には 4 つのヒトに対する発がん物質(Group1)、10 の齧歯類発がん物質(Group2)が含まれる。本ヒト型試験系では Group1 をほとんど陽性と判定できたが、Group2 のいくつかは陰性を示した。また、Group2 にはヒト S9 の系で特に強い陽性反応を示すものがあつた。これらの結果はヒト型試験系が、ヒトでの発がん反応性を反映するものであると同時に、齧歯類の試験では検出できないようなヒトの遺伝毒性を検出できる可能性を示すものである。ヒト型試験系は、ヒトでの発がん性、遺伝毒性のリスク評価に利用できることが期待できる。

### 分担研究者

- (1) 八戸工業高等専門学校物質工学科  
佐々木有
- (2) エーザイ株式会社研究開発本部  
築館一男
- (3) 大鵬薬品工業安全性研究所  
大内田昭信
- (4) 三共株式会社安全性研究所  
高崎 渉

### A. 研究目的

これまで、様々な生物系（原核生物、真核生物、*in vitro*、*in vivo*等）を利用し、様々なエンドポイント（遺伝子突然変異、染色体異常、DNA 損傷等）からなる遺伝毒性試験が開発され、利用されてきた。これら遺伝毒性試験の目的の一つとして、発がん性物質を広くスクリーニングし、発がん性潜在物質を同定することがある。この目的のためには、発がん性物質に対して予言性の高い試験、およびそれら試験を組み合わせたバッテリー試験が重要である。発がん性物

質のスクリーニングのための代表的な *in vitro* の試験法としては、エームス試験、ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験 (CA)、マウスリンフォーマ TK 試験 (MLA) などがある。Zeiger らは、NCI/NTP データベースにある齧歯類発がん性物質の 54% をエームス試験で陽性と判定でき、一方、CA、MLA ではそれぞれ、52%、74% の検出力をもつと報告している。MLA の高い発がん物質検出能力は Mitchell らによっても報告されている。彼女らの用いた NTP/Gene-TOX のデータベースからの解析では、MLA は、ほぼ 100% の検出力で齧歯類発がん性物質を陽性と判定できる。しかしながら、MLA は発がん性物質に対して高い感受性を持つ一方、非発がん物質をも陽性と判定してしまう可能性が高い。齧歯類発がん性物質、非発がん性物質の両者を考慮した予言率は、エームス試験が 65%、CA、MLA がそれぞれ 58%、57% である。これらの結果から現在、エームス試験が最も齧歯類発がん性試験の結果と相関性の高い遺伝毒性試験であるとされている。エームス試験を Golden standard とし、CA、MLA を組み合わせることにより多くの発がん物質のスクリーニングが可能である。この考えは我が国、および欧米において、基本的なコンセンサスであり、医薬品、一般化学物質、農薬、食品添加物等の遺伝毒性試験のガイドラインに反映されている。

しかしながら、本来スクリーニングを目的とした遺伝毒性試験は、発がん性を有する可能性のある物質の同定であるにもかかわらず、エームス試験で陽性となった医薬品候補化合物のほとんどは発がん性が疑われ、その後の詳細な試験がされることもなく候補化合物からはずされることが多い。安全性サイドからすれば、妥当なやり方ではあるが、その遺伝毒性メカニズムや、人に対する安全性を評価しないまま、候補化合物を葬る盲目的なやり方は、非科学的であるばかりではなく、その候補化合物のもつ

薬効の潜在性を考えると、人間の健康の向上に大きな損失をもたらすことにもなりうる。

遺伝毒性試験のもう一つの目的は、試験結果から被験物質の特徴を明らかにすることである。このためには遺伝毒性の発現メカニズムを考慮した試験と、それら試験の組み合わせが重要と考えられる。特に近年、エームス試験が陰性にもかかわらず、齧歯類動物で発がん性を示す化合物が多く報告されている。これら化合物は、非 DNA 損傷性、もしくはバクテリアにはない生体反応等により遺伝毒性を発現するものと予想される。ほ乳類細胞を用いた DNA 損傷性や、染色体異常、突然変異誘発性が、これら化合物の発がん性を説明できる可能性がある。また、場合によっては染色体異常や (構造異常、数的異常等)、突然変異 (点突然変異、欠失、組換え等) のタイプを解析することが、遺伝毒性の発現メカニズム、最終的には発がんメカニズムの解明に役立つものと考えられる。

メカニズムに基づき被験物質のもつ遺伝毒性の特徴を明らかにすることは、その物質の遺伝毒性のリスク評価に利用できる可能性がある。これまでの遺伝毒性試験は、先に述べたようにスクリーニングによって発がん性潜在物質を同定することが主な目的であった。医薬品の開発において、遺伝毒性試験は、あくまでも発がん性試験の予備試験であり、候補化合物を絞り混むことにより発がん性試験にかかるコストと時間を削減することを目的としている。一般化学物質においては発がん性試験、遺伝毒性試験の両者のデータが存在し、両者に矛盾が生じた場合には、発がん性試験の結果が優先される。Zeiger によれば NTP データベースには、齧歯類発がん性試験において非発がん性物質とされた化合物が 172 あるが、そのうち 38 がエームス試験陽性であり、12 化合物についてはエームス試験だけでなく、CA、MLA においても強い陽性反応を示ことが報告されており、そのいくつかは一般化学物質として利用されて

いる。このことは遺伝毒性試験の結果から、化学物質の危険性が示唆されても、発がん性試験が陰性である限り、リスク評価には全く反映されないことを示している。遺伝毒性の発現メカニズムが明らかになれば、たとえ齧歯類動物での発がん性試験が陰性であっても、そのリスクを科学的に評価することが可能であると考えられる。同様に、齧歯類動物での発がん性試験の結果が、人に対する発がん性のリスクを完全に反映している科学的根拠はない。メカニズムに基づき、遺伝毒性試験の結果と発がん性試験のデータを正当に評価することが重要であり、このような手法が最終的に人に対する安全性の担保になるものと考えられる。

人に対するリスク評価のためには、メカニズムと同様に、試験系の生物学的妥当性も重要である。先に挙げた *in vitro* の試験は、細菌や齧歯類動物由来の細胞による試験であるが、これら試験は、元来、化学物質等の DNA、もしくは染色体への影響の有無を、簡便に、迅速に、そして再現性がよく、かつ信頼できる方法として開発、確立された方法である。これら試験法の多くが、1970 年以降の細胞遺伝学の進歩と共に開発され、当時の生物学的ツールとして、バクテリアや、齧歯類不死化細胞が利用しやすかったことが、試験法の開発に繋がったことは想像に難しくない。また、代謝活性化により遺伝毒性を発現する化学物質の試験に関しては、細胞をマウス腹腔内に投与宿主経由法や、ラット肝臓由来 S9 と同時に処理する方法が考案されたが、これも実験動物としてマウスやラットが利用し易かったからに他ならない。しかしながら、これら試験法が、人に対する化学物質の影響を正当に評価し得るのかどうかは疑問であり、これは動物実験を用いた全ての安全性試験の共通した問題である。齧歯類動物を用いた発がん性試験はラットと、マウスで行われているが、両者の試験結果の一致率は 70%程度であり、また、齧歯類動物に発がん性を示す化学物

質の大部分は、サルを用いた発がん性試験で陰性を示すことが報告されている。ラット-マウス間、齧歯類-サル間での発がん性に対するこのような大きな感受性の違いは、ヒト-バクテリア、ヒト-齧歯類細胞の違いは、おそらくそれ以上に大きいことを想像させるものであり、これまでの遺伝毒性試験系を用いて、人に対する影響の評価する生物学的正当性をほとんど無にするものである。

人に対する影響は、人を用いて評価するのが最も妥当な考えであるが、有害影響を人で評価することは許されないことは当然である。しかしながら、*in vitro* の試験として、ヒト由来細胞、ヒト由来組織を用いることは可能である。近年の医学、生物学の進歩により様々なヒト組織から生物学的実験に利用可能なヒト細胞株が樹立されている。世界最大の細胞バンクである American Type Culture Collection (ATCC) に寄託されているヒト細胞株は 2000 種類を超え、世界中の研究者がこれら細胞を医学研究に利用している。また、ヒト臓器、組織に関しては National Disease Research Interchange (NDRI) を通じて、廃棄処分される手術組織の残余部分や、医学的理由で移植に不適合と判定された臓器などが研究者に供給されている。このようなヒト細胞、ヒト組織を用いた研究により、生体機能や、疾病メカニズムが解明された例は枚挙に遑無く、また、新たな医薬品等の開発に利用された例も少なくない。これら研究資源は、人類が健康に、永続的に繁栄するための貴重な財産である。一方、これらヒト細胞、ヒト組織を用いて化学物質の安全性を評価する系を開発する試みは多くない。その理由として、先に述べたように、遺伝毒性試験を含む安全性試験はあくまでもハザードの同定であり、それには簡便で迅速に結果がでる方法が好まれるからである。医薬品の開発においては、新たな薬理作用などの発見は医薬品の付加価値を生み、そのための研究開発には様々な努力が払われる

が、毒性などの有害影響は出ること自体が恐れられている。有害影響の研究のために新たな試験系を開発することは、あまり魅力的な仕事ではない。

安全性を保証する立場から言えば、感度の高い試験法を採用し、生物学的妥当性はなくとも、人に対する危険性を過度に評価し、安全性を保証する手段が有効であるのかもしれない。しかし、先にも述べたが生物学的妥当性や、科学的根拠が曖昧なまま、人に対する危険性を過度に評価することは、非科学的であるだけでなく、逆に、人の健康や福祉に対して不利益をもたらす可能性がある。また、盲目的に既存の試験系に頼ることは、新たな危険要因が発生しても、それに対応できず、危険な状態にさらされてしまうこともあり得る。

適切な選択としては、現在の科学的知見、および入手可能で最も有用性の高い生物学的材料を基にして、人に対する遺伝毒性を、科学的メカニズムから評価するための試験を行い、そこで得られた結果から、人に対して安全性を保証するシステムを構築することである。本研究では、ヒト培養細胞、ヒト代謝系を基礎とし、遺伝毒性の発現メカニズムを考慮した最適なエンドポイント（コメット試験(COM)、小核試験(MN)、チミジンキナーゼ遺伝子をターゲットとした遺伝子突然変異試験(TK))の組み合わせからなるヒト型 *in vitro* 遺伝毒性試験法を構築し、そのバリデーションを行うことを目的とする。最終的には、あらたな試験法として国際的に認知させ、医薬品や、化学物質の安全性確保のための行政活動に反映させることを目指す。昨年度はヒト細胞株による基本的な試験系を確立し、14の染色体異常誘発物質を試験したが、本年度はこの系にヒト型代謝活性化系（ヒト肝由来 S9）を加えて、試験系を評価した。評価には代謝活性化を必要とする 17 化合物を試験した。この中には 4 つのヒトに対する発がん物質(Group1)、10 の齧歯類発がん

物質(Group2)が含まれる。

## B. 研究方法

研究目的を達成するための分担研究者は以下の研究について分担し、研究を行い、主任研究者がとりまとめた。基本的な試験としては、ヒトリンパ芽球細胞株 WTK-1 を用い、代謝活性化に必要な S9 としてはラット非誘導 S9、ラット誘導型 S9、ヒトプール S9、ヒト高活性 S9(lot#HLS-059)を用いた。

### 1. ヒト型遺伝毒性試験系における TK 遺伝子突然変異試験の評価の評価（本間正充）

WTK-1 細胞、ヒト S9 からなるヒト型試験法での TK 遺伝子突然変異検出系を確立する。一部のモデル化合物について実際に試験を行い、全 17 のモデル化合物に対して試験の評価を行う。

### 2. ヒト型遺伝毒性試験系における DNA 損傷試験の評価（佐々木有）

ヒト型試験法でのコメット試験を確立する。一部のモデル化合物に対してコメット試験を実施し、その評価を行う。

### 3. ヒト型遺伝毒性試験におけるヒト代謝系の評価（築館一男）

ヒト代謝系のバリデーションのため、齧歯類発がん物質であるヘテロサイクリックアミンをモデル化合物として試験を実施し、その評価を行う。

### 4. ヒト型遺伝毒性試験における小核試験の評価（大内田昭信）

ヒト型試験法での小核試験を確立する。モデル化合物に対して試験の評価を行う。

### 5. ヒト型遺伝毒性試験での代謝活性化の最適条件の検討と、バックグラウンドデータの評価（高崎渉）

サイクロフォスファミド(CP)を、代謝活性化を必要とする陽性コントロールとし、本試験法の最適条件を選択すると同時に、バックグラウンドデータの蓄積を行う。

## 6. MMS 共同研究による試験の実施

17 の試験化合物の実際の MN、TK 試験については、日本環境変異原学会・ほ乳類変異原性試験研究会 (MMS) の協力により 16 の研究機関で分担して行った。共同研究参加機関、参加者を表 1 に示す。

## 7. 試験検体

試験を行った代謝活性化を必要とする 17 化合物を表 2 に示す。この中には 3 つのヒトに対する発がん物質(Group1)、10 の齧歯類発がん物質(Group2)が含まれる。

### 倫理面への配慮

本研究は既に樹立されている培養細胞、および HAB より分与されたヒト S9 を用いたものである。そのため、倫理面への問題はないものと判断される。

## C. 試験結果

### 1. 試験プロトコルの確立 (高崎、本間、佐々木、大内田)

代謝活性化が必要な系に置いても、基本的な処理時間、発現時間は、代謝活性化を必要としない系と同様な条件が最適であることが示された。すなわち、試験検体処理 4 時間、処理後 0 時間に COM、48 時間に MN、72 時間に TK を行うことが最適プロトコルであった。また、S9 の濃度についても検討を行ったが、ラット S9 と同様 5%・S9 (S9mix として 15%) が多くの化学物質に対して最適濃度であることが示された。

### 2. バックグラウンドデータの評価 (高崎)

陰性対照 (生理食塩水)、陽性対照 (CP) について、16 機関で MN、TK 試験を行い、その結果を比較した。ほぼ、一定したデータが得られ、試験の成立が確認された。また、陽性対照 (CP) の最適濃度は S9 の種類によって違うことが示され、それぞれ、ラット非誘導(100ug/ml)、ラット誘導(3ug/ml)、ヒトプール S9(500ug/ml)、ヒト高活性 S9(lot#HLS-059) (500ug/ml) で用いることが推奨された。

### 3. 17 化合物の試験結果 (本間、羽倉、大内田)

代謝活性化を必要とする 17 化合物をについて MN、TK を実施した。その結果を表 3 に示す。

## D. 考察

人に対する化学物質の遺伝毒性を正しく評価することを目的とし、ヒト培養細胞株 WTK-1 と、ヒト肝臓由来 S9 からなる新しい *in vitro* 遺伝毒性試験系を確立した。本試験系はコメット試験(COM)、小核試験(MN)、チミジンキナーゼ遺伝子をターゲットとした遺伝子突然変異試験(TK)の 3 つのエンドポイントから成り、同一試験条件下でのこれら遺伝毒性試験の結果を比較することが可能である。それぞれの最適試験プロトコルを検討し、バックグラウンドデータを評価した。16 機関で安定したデータが得られたことから、遺伝毒性試験系として普及できうるものと判断された。それぞれの S9 は CP に対する反応性が著しく異なることから、ラットーヒト、誘導ー非誘導でその活性が著しく異なる。従って、陽性対照としての CP の濃度もそれにあわせて帰る必要がある、CP の遺伝毒性から見た代謝活性化能は、ラット誘導 S9>ラット誘導型 S9>ヒト高活性 S9>ヒトプール S9 である。

試験系の検出能力をバリデーションするため 17 の代謝活性化を必要とする化学物質について試験を行った。これらの全てはエームス試

験、染色体異常試験、MLA のいずれかで陽性反応を示す。17 化合物のなかで、CP、2-NA、Benzidine、Benzene はヒトに対して発がん性を有することが報告されている (Group1)。このうち、3/4 (2-NA, Benzidine, CP) は陽性となり、Benzene は疑陽性であった。Group2A に属する化合物のうち、4/5 (DMN, Acrylamide, Phenacetine, IQ) の変異原性が陽性と判断され、BaP は疑陽性か陰性であった。Group2B に属する化合物のうち、3/5 の変異原性が陽性 (2,4-Diaminotoluene, 4-Aminoazobenzene, AF-2) と判断され、2/5 は疑陽性か陰性 (DBN, Styrene) であった。Group3 に属する Azobenzene の変異原性は陰性であった。これらの結果、多くの IARC 発癌物質、特に Group1 に属する化合物の変異原性が *in vitro* 試験系では検出しにくい Benzene を除いて陽性になったこと、Group 3 に属する Azobenzene が陰性であったことから、ヒトでの発がん性データと比較的相関を示し、本試験系のヒト型試験としての有用性が示唆された。IARC で未分類の 2AA と 1-AP は陽性反応を示し、本試験系からもこれら化合物のヒトに対するリスクが示唆された。

今回、TK 遺伝子突然変異の方が小核より陽性を示しやすい傾向があった。この理由として、(1)WTK-1 ヒト細胞では、小核より TK 遺伝子突然変異が誘発されやすい、或いは(2)本試験系における小核誘発能を評価する実験条件が最適ではないと考えられる。今後、このための実験や他の細胞での試験系との比較考察が必要と考える。ただし、TK 遺伝子突然変異と小核誘発能が陽性になった化合物については、各 S9 に対する相対的反応性は概して似ていた。

ヒト S9 とラット S9 による TK 遺伝子突然変異と小核頻度に大きな差が見出された化合物があった。ただし、Ames 試験で観察された数よりその割合は少なかった。

TK 遺伝子突然変異と小核頻度の HLS-059

と Human S9(pooled)による差の大きい化合物はあまりなかった。一方、Ames 試験では大きな個人差が見られたが、この要因として (1) 試験法の差か (2) S9 のドナー差 (HLS-059 と HLS-014 の差) が考えられた。

一概には言えないものの、多くの化合物の TK 遺伝子突然変異と小核頻度に関しては、酵素誘導ラット S9  $\geq$  非誘導ラット S9  $\geq$  HLS-059  $\geq$  Human S9(pool)の関係が成り立つ。一方、2AA と Acrylamide はこの関係から外れた。この結果は、以前行われた Ames 試験の結果 (酵素誘導ラット S9  $\geq$  HLS-014  $\geq$  非誘導ラット S9  $\geq$  Human S9(pool)、HLS-014  $\geq$  HLS-059 の関係がある) とよく一致していると考えられる。

## E. 結論

代表的 IARC 発癌物質の多く、特に IARC Group1 に属する化合物の変異原性が Benzene を除いて本試験系で陽性になった。これらの結果から、本試験系 (ヒト培養細胞/ヒト S9) のヒトに対する遺伝毒性評価系として利用が期待される。

本試験で得られた結果から、ヒトに対する遺伝毒性を再評価したほうがよいと思われる化合物が示唆された。例えば、BaP, IQ, DBN などは、これまで酵素誘導ラット S9 を用いた Ames 試験において強い陽性を示すことが示されてきたが、ヒト S9 を用いた本系においては遺伝毒性は比較的低いことが示された。一方、逆に IARC 未分類の 2AA はヒト S9 存在下ではラット S9 存在下よりかなり強い変異原性を示した。これら類縁化合物の遺伝毒性に関してはより慎重な評価が求められる。

3 種類の遺伝毒性のエンドポイントは遺伝毒性物質の特徴によりその反応性が大きく異なる。これらエンドポイントの比較から、本系は遺伝毒性発現メカニズムの解明のためにも有用な試験系であると考えられる。

本共同研究は、今後、発がん物質だけでなく、非発がんー遺伝毒性物質などについても検討を行い、ヒトに対する遺伝毒性の評価を目的とした、新しいリスク評価系の構築を目指す。本共同研究で確立したヒト型遺伝毒性試験系は、簡便で、再現性があり、これまでの遺伝毒性試験結果と一致した。本試験系は、ヒト型遺伝毒性試験系として、人に対する安全性を担保しうる試験系であり、今後医薬品開発に利用できる。今後、国際的に認知させ、医薬品や、化学物質の安全性確保のための行政活動に反映させることを目指したい。また、試験法としてだけでなく、DNA損傷、染色体異常、突然変異等のメカニズムの解明にも有用と考えられ、研究ツールとしての利用価値も高い。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Honma, M. Generation of loss of heterozygosity and its dependency on p53 status in human lymphoblastoid cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45, 162-176 (2005)

Koyama, N., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Hayashi, M., Matsufuji, H., Yamagata, K., Masuda, S., Kinae, N., and Honma, M. Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat. Res.*, 603, 151-158 (2006)

Matsura-Eisaki, K., Sakamoto, H., Sofuni, T., Hayashi, M. and Honma, M. In vitro genotoxicity of inorganic arsenics and their genotoxic risk through food intake. *Environ. Mutat. Res.*, 27, 153-160 (2005)

### 2. 学会発表

Hakura A., Oka H., Takasaki W., Sasaki YF., Suzuki S, Satoh T., and Honma M., Establishment

of humanized in vitro genotoxicity test system: combined system using human cell lines and human S9. 9<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens. (2005.9)

Koyama N., Sakamoto H., Sakuraba M., Koizumu T., Takashima Y., Hayashi M., Matsufuji H., Yamagata K., Masuda S., Kinae N. and Honma M., Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. 9<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens. (2005.9)

Matsufuji H., Inoue M., Chino M., Honma M., Hayashi M., and Yamagata K., Genotoxicity of quercetin in the presence of oxygen species and human liver S9 in human lymphoblastoid TK6 and WTK-1 cells. 9<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens. (2005.9)

Honma M., Takashima Y., Sakuraba M., Koizumi T., Sakamoto H. and Hayashi M., Interallelic homologous recombination and target intergration induced by DNA double strand breaks. 9<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens. (2005.9)

Neuwirth EAH, Honma M. and Grosovsky AJ., High frequencies of crossing-over associated with long tract gene conversion in human cells. 9<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens. (2005.9)

Takashima Y., Sakuraba M., Koizumi T., Sakamoto H. and Honma M., DNA double strand break repair and cells cycle in human lymphoblastoid cell line. 9<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens. (2005.9)

Honma M., Genotoxic risk assessment for synthetic and natural chemicals in foods. The 2<sup>nd</sup> international Conference on the Modernization of Traditional Chinese Medicine. (2005. 9)

高島良生、櫻庭真弓、小泉朋子、坂本浩子、林真 本間正充 ヒト細胞における DNA2 本鎖切断修復の細胞周期依存性 日本環境変異原学会第 34 回大会 (2005.11)

欒洋、本間正充、スレッシュテイルパッテイー、小木美恵子、山口照英、鈴木孝昌 CGH および SNP アレイを用いた染色体解析 日本環境変異原学会第 34 回大会 (2005.11)

真田和尚、坂本浩子、櫻庭真弓、小泉朋子、高島良生、林真、本間正充 p53 に依存したスピンドルポイズンの *in vitro* 遺伝毒性 日本環境変異原学会第 34 回大会 (2005.11)

木本崇文、坂本浩子、櫻庭真弓、小泉朋子、高島良生、小林恒文、笠原義典、林真、本間正充 ヒトリンパ球細胞 TK6 を用いたフラボノイド系サプリメント化合物の *in vitro* 遺伝毒性 日本環境変異原学会第 34 回大会 (2005.11)

本間正充、高島良生、櫻庭真弓、小泉朋子、坂本浩子、林真 DNA2 本鎖切断によって誘発される相同染色体組換え、および遺伝子ターゲティング 境変異原学会第 34 回大会 (2005.11)

松藤寛、井上真由美、千野誠、本間正充、林真、山形一雄 ヒトリンパ球細胞株 TK6 を用いた抗酸化フラボノイドおよびその酸化物の遺伝毒性 境変異原学会第 34 回大会 (2005.11)

Honma M., Takashima Y., Sakuraba M., Koizumi

T., Sakamoto H. and Hayashi M., Interallelic homologous recombination and target intergration induced by DNA double strand breaks. The 22<sup>nd</sup> Radiation Biology Center International Symposium. (2005.9)

本間正充 ヒト型遺伝毒性試験と、ヒト発がん性の予測 日本動物代替法学会第 19 回大会 (2006.12)

本間正充、高島良生、櫻庭真弓、小泉朋子、坂本浩子、林真 DNA2 本鎖切断によって誘発されるヒト細胞での相同組換え反応 第 28 回日本分子生物学会(2005.12)

高島良生、櫻庭真弓、小泉朋子、坂本浩子、林真、本間正充 ヒト細胞における制限酵素によって切断された DNA2 本鎖切断修復の細胞周期依存性 第 28 回日本分子生物学会 (2005.12)

#### G. 知的所有権の取得状況

なし



表 1  
Participants of the collaborative study

No.	Laboratory	Investigators
1	An-Pyo Center	Masumori K., Kikuchi M.
2	Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd	Hirogaki T., Ohishi H.
3	Eisai Co. Ltd.	Hakura A.
4	Food an Drug Safety Center Hatano Institute	Wakuri S., Tanaka N.
5	Hachinohe National College of Technology	Sasaki Y.
6	Japan Tobacco Inc.	Ozaki M.
7	Kissel Pharmaceutical Co. Ltd	Kobayashi K.
8	Lion Corporation	Yamamoto Y.
9	Meiji Seika Kaisha Ltd	Nagasawa M.
10	National Institute of Health Sciences	Sakamoto H., Honma M.
11	Nippon Shinyaku Co. Ltd	Tamura H.
12	Sankyo Co. Ltd	Hyogo A., Hasegawa T., Watanabe Y.
13	Shin Nippon Biomedical Laboratories Ltd	Saigo K.
14	Shionogi & Co. Ltd	Kondo K.
15	SS Pharmaceutical Co. Ltd	Hamada S.
16	Taiho Pharmaceutical Co. Ltd	Oka H., Ohuchida A.

表 2  
Test Chemicals

No.	Chemicals	IARC Group	Charactor	Genotoxicity <sup>a)</sup>			Ames TA100 (revertants/ $\mu$ g/plate) <sup>b)</sup>		
				SAL	ABS	MLA	Rat -Induce	HLS -014	Human-pooled
1	Benzo[a]pyrene	2A	Aromatic hydrocarbon	+		+	470	310	$\pm$
2	Benzidine	1	Aromatic amine	+	+		Nt	Nt	Nt
3	2-Naphthylamine	1	Aromatic amine	+		+	Nt	Nt	Nt
4	Phenacetine	2A	Antipyretic	+	+		Nt	Nt	Nt
5	IQ	2A	Heterocyclic amine				18000	6000	340
6	2,4-Diaminotoluene	2B	Aromatic amine	+	+	+	0.044	$\pm$	0
7	AF-2	2B	Nitro-compound				15000	31000	41000
8	4-Aminoazobenzene	2B	Azo-compound	+	+		4.6	1.4	0
9	Azobenzene	3	Azo-compound	+	-		5.1	2.9	0
10	2-Aminoanthracene	nc	Aromatic amine	+			1500	24000	22000
11	1-Aminopyrene	nc	Aromatic amine				390	190	$\pm$
12	Cyclophosphamide	1	Anti-cancer drug	+	+	+	0.51	0.14	0.054
13	<i>N</i> -Nitroso-di- <i>n</i> -butylamine	2B	Nitrosamine	+	+		52*	0.52*	$\pm$ *
14	Benzene	1	Aromatic hydrocarbon	-	+	+	Nt	Nt	Nt
15	<i>N</i> -Nitrosodimethylamine	2A	Nitrosamine	+			5.1*	39*	28*
16	Acrylamide	2A	Vinyl-compound	-	+	+	0	0	0
17	Styrene	2B	Vinyl-compound	-	+		0	0	0

a) from Handbook of Carcinogenic Potency and Genotoxicity Databases (Gold and Zeiger) b) from BMS collaborative study  
\* YG7108, Nt: Not tested

表 3  
Summary of results

No.	Chemicals	P450 family Involved in activation	IARC Group	Results of TK-mutation assay*					Category	Results of MN assay*					Category
				Rat-I	Rat-N	Hum-H	Hum-P	-S9		Rat-I	Rat-N	Hum-H	Hum-P	-S9	
1	Benzo[a]pyrene	IA1	2A	++	+	-	-	-	1	-	-	-	-	-	6
2	2,4-Diaminotoluene	1A2	2B	+	+	+	+	+	2	(+)	(+)	-	-	(+)	6
3	2-Aminanthracene	1A2	nc	+	+	++	++	+	6	-	-	-	-	-	6
4	1-Aminopyrene	1A2	nc	++	+	+	+	+	2	(+)	+	(+)	+	+	3
5	IQ	1A2	2A	+	(+)	(+)	(+)	(+)	1	++	+	+	(+)	-	2
6	AF-2	1A2	2B	+	+	+	+	++	3	+	(+)	(+)	-	++	1
7	4-Aminoazobenzene	1A2	2B	++	+	+	+	-	2	+	+	+	+	-	3
8	N-Nitrosodimethylamine	2E1	2A	++	+	+	+	Nt	2	(+)	-	(+)	(+)	Nt	6
9	N-Nitroso-di-n-butylamine	2B1	2B	+	-	-	(+)	-	1	+	-	(+)	-	(+)	1
10	Acrylamide	2E1	2A	+	+	-	+	+	3	+	++	+	++	+	3
11	Styrene	2E1	2B	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-	-	6
12	Cyclophosphamide	2A6	1	++	+	+	+	+	2	+++	++	++	-	+	2
13	Benzene	2E1	1	-	-	-	-	-	6	(+)	(+)	-	-	-	6
14	Phenacetine	1A2	2A	+	+	+	+	-	3	(+)	(+)	(+)	(+)	-	6
15	Azobenzene	1A2	3	-	+	-	-	-	1	-	-	-	-	-	6
16	2-Naphthylamine	1A2	1	+	+	+	+	-	3	++	+	++	+	-	3
17	Benzidine	1A2	1	+	+	+	+	-	3	+	+	+	+	(+)	3

\*Symbols shown indicate relative potencies with each chemical.

Category

1 Genotoxic only in rat S9, no or little genotoxic in human S9

2 More genotoxic in rat S9 than in human S9

3 Similar genotoxicity in rat and human S9

4 More genotoxic in human S9 than in rat S9

5 Genotoxic only in human S9, no or little genotoxic in rat S9

6 No or little genotoxic in both rat and human S9

---

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社