

Ikrアッセイのように、薬力学的作用のスクリーニングあるいは安全性モニタリング等、他の目的がある場合で、安全性薬理試験として申請しない試験にはGLPは適用しない。

ヒトでのTdPのリスクを非臨床試験により予測可能なのかということがS7Bの論議の焦点であった。ヒトでTdPリスクの可能性のある化合物とない化合物についての日本製薬協QTPRODUCT及びILSI/HESIによる非臨床データ解析を基に、インビトロIkrアッセイ (hERG) における10 μ M以下の濃度でIC50を示す場合を陽性、APDアッセイ (APD30-90) における有意な濃度依存的なIC10増加を陽性と見なすことが可能と考えており³)、インビトロIkrアッセイ及びインビトロQTアッセイの相補的評価によりTdPリスクの潜在的な可能性のある医薬品を予測可能との認識で合意された。

非臨床試験の結果が一概にヒトにおけるリスク陰性とか陽性を意味するものではなく、統合的評価が重要である。非臨床評価の役割を考慮すると、主要アッセイ系で両結果共に明らかに効果を示さず、クラス効果を含め他に懸念がない化合物の場合は臨床においてもTdPリスクの可能性はほとんどないと主張できると考えている。

D. 考察

(1) rasH2マウス及びp53 \pm マウスについて、urethaneに対する発がん感受性の差を検討し、遺伝子改変マウスの発がん標的臓器は背景系統の遺伝的影響を強く受けていることが確認された。この報告は、遺伝子改変マウスを用いた発がん性評価を実施する場合に、臓器標的性に関する考察において重要と思われる。

従来、p53 \pm マウスは遺伝毒性物質に対して高い発がん感受性を示すと言われてきた。しかし、見直しを行うとp53 \pm マウスの遺伝毒性発がん物質に対する感受性には強弱があること、それには被験物質の用量や標的臓器性の違いだけでなく、正常に機能している片側アレルが直接的な作用部位になり変異が生じる場合と、ゲートキーパーとしてのp53遺伝子

の機能へ影響する場合とは異なることが示唆された。

Tg.ACマウスでは、皮膚に強い刺激性を有する化合物を使用する場合に、刺激による二次的な皮膚腫瘍発生がみられる可能性があることが複数の報告から示唆された。またEGFRを阻害することにより、紫外線照射による皮膚腫瘍の発生を抑制すること、p53遺伝子の変異とH-ras遺伝子の活性化が皮膚発がん過程において相乗的に作用することが明らかとなった。

Xpaマウス及びXpa/p53 \pm マウスでは、DESの9ヶ月間投与の結果が報告され、Xpa/p53 \pm マウスの発がん感受性がXpaマウスよりも高い場合があることが示された。TCRを欠損したCsbマウスではDNA障害の修復過程でRNAポリメラーゼIIの機能が停止してアポトーシスが誘発される。2-AAF誘発腫瘍の発生率はXpc>Xpa>Csb>野生型の順であったが、導入したLacZ遺伝子における変異誘発性にはこれらのマウス間で差がみられなかった。これらの結果から、CsbマウスではTCR欠損によるアポトーシス誘発のために発がん感受性が増加せず、さらに、Xpcマウスに比してXpaマウスの発がん感受性が低いと考えられた。

PPARアゴニストに関するFDAのがん原性評価では、PPARアゴニストは複数の動物種に、雌雄両性において、多臓器に腫瘍を誘発することが示された。現在、ILSI/HESIによるPPAR agonist projectでワーキンググループを編成し、産官学が一体となってPPARアゴニストによる発がん性についてのMOAのフレームワークを構築すると共にヒトに対するリスク評価に向けた活動を開始したことから、その活動成果が待たれる。また、遺伝子改変マウスの使用規制については、その科学的正当性について今後も注意深く追及していくべきである。

(2) 異数性誘発物質による小核の誘発はp53の状態にかかわらず観察されたのに対して、それを原因とする突然変異がp53正常細胞ではほとんど観察されないことは、p53によるスピンドルチェックポイントが、染色体の分配が終了し、細胞の分裂が開始するとき働くことを示唆している。これまでの知見から、

p53変異細胞での異数性の誘発機構として以下のことが考察される。染色体の分配異常が起きると、一旦分裂しかけた細胞が、再び融合し (regression)、これが倍数性細胞の出現の原因となる。p53変異細胞では倍数性細胞でセントロゾームの増幅が起こり、倍数性だけでなく、異数性の出現の要因となる。また、p53変異細胞ではアポトーシスが働きにくいいため、このような異常細胞が集団中から排除されない。CAR、TRIによって誘発される小核の多くは、染色体の不分離によるものと考えられるが、それら小核のほとんどは、上記のチェックポイント、アポトーシス機構によって修復、もしくは排除されるものと考えられる。

- (3) 今回のICHガイドラインの対象から除外された薬物アレルギー関連の試験法に関しても、現行国内ガイドラインの改訂に向けて、今後、さらに調査を継続する必要がある。
- (4) 本会議で討議したPublic commentからの主要な項目を挙げると、Regional differenceに関わる重要な項目として非臨床試験のtimingがある。S7B EWGの非臨床結果は統合的リスク評価の一部として、その後の臨床試験の計画や解釈を支えるものとなりうるという考えから、ヒトに始めて投与する前に試験を行うことを配慮すべきとした。次にRegional differenceに関わるもう一つの重要な項目としてGLPの適用がある。QT間隔延長リスクは生命維持機能における医薬品の重篤な作用の評価であり、かつ十分に管理された試験が必要であるとの考えから、S7BEWGは原則GLPの適用が望ましいと考えており、GLPの理念と推奨についてはS7Aと同様に考えるものとした。ICHステップ4では非臨床および臨床QT延長評価ガイドラインは、意図的に地域差を受け入れられる妥協表現にしている。QT延長評価に関わる試験について実施上の問題が残っている。QT延長評価に関して、非臨床ガイドラインの役割を認めるか、認めないかにより、実施上の解釈の自由が残っている。QT評価の分野は医薬品開発における近年の大きな関心も加わり、実用的な技術進歩が期待される状況であり、将来、追加データの蓄積により評価戦略の見直しと改訂をICHでは考慮に入れている。

E. 結 論

- (1) rasH2マウス及びp53+/-マウスを用いた発がん性試験を実施する場合には、背景系統が遺伝子改変マウスの発がん特性に大きな影響を与えることに留意が必要であると考えられた。p53+/-マウスを用いた発がん性試験では、被験物質の発がん標的性や片側p53アレルへの変異を生じさせるか否かという発がんメカニズムの違いにより発がん物質検出感度が異なることが示された。Tg.ACマウスモデルでは、強い刺激性を有する化合物では二次的に陽性結果が得られる場合があることが示された。一方、皮膚腫瘍発生機序解明に対するモデルとしての有用性も期待された。Xpaマウスの発がん感受性については、Xpa/p53+/-マウスやXpcマウスに比して劣る場合があること、Xpaマウスの高発がん感受性は主にGGRに依存し、TCR欠損はアポトーシスを誘発し、急性炎症や免疫抑制を引き起こすことから、がん原性試験での使用には余り適さないことが示された。

PPARアゴニストのがん原性に関しては、PPAR agonist projectの活動やヒトに対するリスク評価への取り組みが期待される。遺伝子改変マウスの使用規制については、その科学的正当性についてさらに追求すべきであると考えられた。

- (2) ヒトリンパ芽球細胞株TK6とWTK-1を用いて、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。モデル化合物としてTRIとCARを試験し、それら化合物の染色体異数性誘発活性の程度と、そのメカニズムを解析した。TRI、CARはDNAに直接損傷を与えず、高率に小核を発生させた。一方、TK遺伝子突然変異はWTK-1細胞のみで観察されたことから、遺伝毒性はp53に依存し、その変異体の大部分は染色体全部の喪失によるものであった。CARは異数性の高誘発は小核のFISH解析からも指示された。以上のことからCARはaneugenとしての性質が強く、TRIはaneugenだけでなくclastogenの性質も持つものと考えられた。

p53の状態が違うTK6、WTK-1細胞を用いて、遺伝毒性の反応性を比較し、TK変異体の遺伝子解析、小核のFISH解析を行うことによって、異数性誘発物質の同定とその強さの評価が可能である。これら試験

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17年度分担研究報告書

一 遺伝子改変マウスを用いた短期発がん性試験についての情報収集一

研究協力者：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)創薬本部研究推進部主任研究員）
久田 茂（あすか製薬(株)川崎研究所安全性・代謝研究部部長）
青木 豊彦（エーザイ(株)安全性研究所所長）

研究要旨

rasH2、p53^{+/−}、Tg.AC及びXpaマウスの発がん性に関する文献調査を実施した。rasH2マウスやp53^{+/−}マウスの発がん感受性や発生腫瘍のスペクトラムには、背景系統が大きな影響を与えていることが示された。また、p53^{+/−}マウスでは、発がんメカニズムの違いにより発がん物質検出感度が異なることが示され、遺伝毒性発がん物質であっても検出できない場合があることが明らかにされた。Tg.ACマウスでは、強い刺激性を有する化合物を用いた場合、二次的に陽性結果が得られる場合があることが示された。Xpaマウスの高発がん感受性は主にGGRに依存し、TCR欠損はアポトーシスを誘発し、急性炎症や免疫抑制を引き起こすことから、がん原性試験での使用には余り適さないことが示された。PPARアゴニストに関する米国FDAのがん原性評価については、発がん機序解明やヒトに対するリスク評価に向けた研究プロジェクトが発足されたことなど、現在の状況についての情報収集を行った。

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、遺伝子改変動物の使用が認められており、ヒト型c-Ha-ras遺伝子導入トランスジェニックマウス（rasH2マウス）モデル、がん抑制遺伝子p53の片側アレル（exon5）を欠損させたC57BLp53ノックアウトマウス（p53^{+/−}マウス）モデル、活性型v-Ha-ras遺伝子を胎児型globinプロモーター

とSV40と共に導入したTg.AC トランスジェニックマウス（Tg.ACマウス）モデル及び色素性乾皮症修復遺伝子を欠損させたXpaノックアウトマウス（XPA^{+/−}マウス、以下Xpaマウス）モデルが推奨されている。しかし、これらの遺伝子改変マウスの発がん機序については不明な点も多く残されている。本研究班では、今年度もこれらの遺伝子改変マウスにおける発がん感受性

系は、メカニズムを根拠とする遺伝毒性の評価に有用であると考えられる。

(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、免疫毒性試験データの追加収集を継続した。また、ICHの免疫毒性試験ガイドライン案(Step 4文書)の作成を行った。

(4) 本年度の成果はRegional differenceの容認により臨床E14に矛盾しない形で非臨床S7B文書がステップ4に到達したことである。本年5月のICHブリュッセル会議にて、それぞれICHステップ4文書(「ヒト医薬品の心室再分極時間遅延(QT間隔延長)作用の潜在的可能性に関する非臨床評価」(S7B)及び「非

抗不整脈薬のQT/QTc間隔の延長及び催不整脈作用の潜在的可能性の臨床評価」(E14))として合意に至った。日米欧で予想される実施上の問題については、申請資料作成等において問題が起こる可能性は残されており、今後IWGでQ&Aの形で解決すべく協議を行うことが決定している。

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。

や発がんメカニズムに関する文献を収集し、その有用性や問題点について考察した。また、PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) アゴニストのがん原性評価に関して、昨年より米国FDAで規制が変更されたことを受け、FDAにおけるPPARアゴニストのがん原性評価の現状について情報収集した。

B. 研究方法

rasH2マウス：昨年度に引き続き、rasH2マウスに関する諸文献を調査し、本マウスの発がん特性に関連した成績をまとめた。

p53^{+/-}マウス：p53^{+/-}マウスの発がん感受性に関するメカニズム研究の文献報告を調査し、医薬品のがん原性評価におけるp53^{+/-}マウスの有用性や問題点についてまとめた。

Tg.ACマウス：昨年度に引き続き、Tg.ACマウスに関する研究状況を調査し、医薬品のがん原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。

Xpaマウス：昨年度に引き続き、Xpaマウス及びXPA^{-/-}/p53^{+/-}マウス（以下Xpa/p53^{+/-}マウス）について、これらのマウスモデルの高発がん感受性に関わる要因について文献調査した。

PPARアゴニストに関する米国FDAのがん原性評価：PPARアゴニストの多くは現在医薬品として開発中であり、文献報告は少ないため、FDA CDER (Center for Drug Evaluation and Research) のweb site上及びILSI/HESI (International Life Science Institute, Health and Environmental Sciences Institute) のPPAR Agonist Projectを中心に情報収集した。

C. 研究結果

(1) rasH2マウス

Ozakiらは、rasH2マウス、p53^{+/-}マウス及びそれら野生型や背景系統を用いて、urethaneの26週間の短期がん原性試験を実施し、発がん感受性の検討を行った。その結果、p53^{+/-}マウスでは肝臓の血管腫が67%にみられ、無処置対照のp53^{+/-}マウス（0%）に比べ有意に高頻度であった。p53^{+/-}マウスや背景系統（C57BL/6）マウスの肝臓には血管肉腫はみられなかったが、ペリオシス（血管拡張）が27-40%にみられた。一方、これらの

マウスの肺には、増殖性病変は観察されなかった。対照的に、rasH2マウス、野生型であるnon-Tgマウス及び背景系統マウス（BALB/c）では、肝臓における増殖性病変はrasH2マウスで1/15例にみられた血管肉腫を除き発生はなかったが、肺ではすべての系統に腫瘍を含む増殖性病変が高頻度に認められた。以上より、p53^{+/-}マウス及びrasH2マウスの発がん標的臓器は、背景系統の発がん臓器感受性の遺伝的特徴を受け継いでいることが示唆された[1]。文献[2]では、rasH2マウスの発がんメカニズムを解明する目的で、*N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) 誘発前胃扁平上皮癌における遺伝子発現をhigh density oligonucleotide microarrayを用いて解析し、更に導入遺伝子とRas-mitogen activated protein kinase (MAPK) 経路に関する分子についてRT-PCRによる検討を加えた。前胃扁平上皮癌では、TGFβやmatrix metalloproteinasesのような腫瘍の浸潤や転移に関わる遺伝子が多数変動しており、腫瘍の悪性を反映していた。また、腫瘍組織では導入遺伝子、マウスHa-ras、N-ras、raf、Mek2、c-fos、c-myc、junB、cyclin D1の発現上昇が認められ、rasH2マウスの前胃腫瘍の発生には、導入遺伝子及びマウス内在性ras遺伝子の発現上昇とRas-MAPK経路の活性化が関与することが示唆された。rasH2マウスの発がん感受性を検討するために、*N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosoamine (DHPN) をrasH2マウスには0、20、200ppm、同腹のnon-Tgマウスには0、200ppmの用量で26週間飲水投与した実験では、200ppm投与群において、rasH2、non-Tgマウスともに肝臓の血管肉腫、肺腺腫・腺癌、気管上皮の扁平化や過形成・乳頭腫が高率に誘発された。rasH2マウスではこれらの病変に加えて前胃、尿道、唾液腺導管の過形成・乳頭腫の発生も認められた。肺のRT-PCR解析では、DHPN投与による導入遺伝子及びマウスras遺伝子の発現変動は認められなかった。これらの結果から、rasH2マウスはDHPNに高い感受性を示し、従来の標的臓器だけでなく前胃、尿道、唾液腺導管にも腫瘍発生が認められることが分かった[3]。

(2) p53^{+/-}マウス

発がん感受性に関する研究：Tsukamotoらは、p53^{+/-}、p53^{+/-}及びp53^{+/-}マウスの様々な遺伝毒性発がん物質に対する感受性について、これまで公表されている文献

を比較検討した。その結果、調査対象のすべての遺伝毒性発がん物質に対して、p53^{-/-}マウスは感受性を示した。一方、p53^{+/-}マウスの発がん感受性は臓器ごとに異なり、発がん過程におけるp53の変異の関わり方や正常な片側遺伝子の機能発現の異常が生じるメカニズムにより感受性が異なることが明らかになった。すなわち、p53の変異が高頻度にみられる扁平上皮癌、移行上皮癌、肉腫及びリンパ腫を誘発する発がん物質に対してはp53^{+/-}マウスは発がん感受性があるのに対し、p53遺伝子が直接の発がん標的ではなく発がん過程のゲートキーパーとして関与する腺胃、大腸、肺、乳腺腺腫及び肝細胞癌については、p53^{+/-}マウスは感受性が低いという分類が可能であった[4]。

大腸発がんの感受性に関する研究：Huらは、大腸発がん物質であるアゾキシメタン(AOM)を用い、p53^{-/-}、p53^{+/-}及びp53^{+/+}マウスの発がん感受性の差を検討した。無処置の場合、小腸と大腸の陰窩あたりのアポトーシス細胞数にはp53の状態の違いはみられなかった。一方、AOM処置によりp53^{+/+}マウスではアポトーシス細胞数が著しく増加したが、p53^{-/-}マウスでは無処置と同程度であり、p53^{+/-}マウスはその中間であった。また、AOM処置後25-30週の大腸癌の頻度は、p53^{+/+}、p53^{+/-}及びp53^{-/-}マウスで、それぞれ30%、72%、100%であった[5]。さらに、アポトーシス惹起作用を有するNSAIDであるSulindacを上述のAOMモデルに適用したところ、p53^{+/+}及びp53^{+/-}マウスでは大腸上皮のアポトーシスが統計学的に有意に亢進し、AOM誘発大腸発がんはp53^{+/+}、p53^{+/-}及びp53^{-/-}マウスで抑制された[6]。以上より、p53の機能不全に関連するアポトーシス抑制が大腸癌誘発に関連すること、Sulindacはアポトーシス亢進作用によりAOM誘発大腸発がんを抑制することが示唆された。

その他：骨髄機能不全とがん易発性を示す常染色体劣性遺伝病であるファンconi貧血の原因遺伝子の1つであるFancd2のノックアウトマウス(Fancd2^{-/-}マウス)は上皮系腫瘍を好発する。この遺伝子の機能をさらに解明するためp53ノックアウトマウスとのダブルノックアウトマウス(Fancd2^{-/-}/p53^{-/-}マウス)が作出された。このマウスではp53^{-/-}マウスに好発する肉腫や同マウスに比較的少ない乳腺及び肺の腺癌の早期誘発がみられた。また、Fancd2^{-/-}マウス由来の線維芽細胞ではDNA

障害後にS期細胞増殖停止が起こるが、Fancd2^{-/-}/p53^{-/-}マウスではS期停止は起こらず、染色体の異数性増加や染色体交換が生じた[7]。ヘアレスp53^{+/-}マウスを用いたUVB照射実験では、皮膚発がんにおいてヘアレスp53^{+/+}マウスに比べて明らかな違いがみられた。900J/m²の照射ではp53^{+/-}マウスの方がp53^{+/+}マウスより腫瘍発生が早かったが、450J/m²の照射では顕著な差はみられなかったことから、高い照射量条件のUVB発がんのみp53アレルの欠損が関与していると考えられた。皮膚腫瘍の悪性度はp53^{+/-}マウスの方が野生型より高く、p53^{+/+}マウスで大多数であるp53アレルのC→T点突然変異はp53^{+/-}マウスでは少なかった[8]。

(3) Tg.ACマウス

薬剤の皮膚透過性を亢進するよう分子設計された有機化合物であるSEPA 0009を50、1500mg/kgの用量で、Tg.ACマウスとFVB/N野生型マウスに毎日経皮投与した結果、高用量群では投与第1週より高度かつ慢性的な刺激が認められ、増殖亢進、アポトーシスの増加及び創傷に伴うkeratin 6の発現を伴っていた。投与6週よりSEPA 0009高用量群のTg.ACマウスには皮膚乳頭腫の発生が、投与9週より乳頭腫におけるtransgeneの発現が認められた。一方、低用量群には皮膚における刺激も乳頭腫の発生も認められず、野生型マウスではいずれの投与群においても乳頭腫の発生は認められなかった。これらの結果から、SEPA 0009により誘発された発がん性は慢性かつ強力な刺激性に伴う二次的なものと考えられた[9]。Doiらは、工業的に広く使用されている多機能アクリレートであるtrimethylolpropane triacrylate (TMPTA)とpentaerythritol triacrylate (PETA)の発がん性を調べる目的で、Tg.ACマウス(hemizygous)にTMPTAとPETAをそれぞれ0.75、1.5、3、6及び12 mg/kgの用量で6ヶ月間経皮投与した。これとは別にB6C3F1マウスに同じ用量を3ヶ月間経皮投与した結果、皮膚の慢性炎症を伴う過形成性、変性性及び壊死性病変が投与量依存性に認められ、TMPTAとPETAには皮膚刺激性があることが示唆された。Tg.ACマウスでは、3 mg/kg以上で用量依存性に投与部位における皮膚乳頭腫の発生と出現時期の短縮が認められ、皮膚乳頭腫には炎症性変化を伴っていた。以上より、TMPTAとPETA投与による皮膚病変の発達には慢性炎

症が関与し、Tg.ACマウスにおける用量依存的な皮膚乳頭腫の発生から、TMPAとPETAの発がん性が示唆された[10]。

Epidermal growth factor receptor (EGFR) は紫外線照射により皮膚の細胞で活性化される。EGFR阻害剤であるAG1478は、紫外線による皮膚のEGFR、c-Jun NH2-terminal kinase、extracellular signal-regulated kinases、p38 kinase、phosphatidylinositol 3-kinaseの活性化を阻害する。雌のTg.ACマウス (homozygous) に紫外線を照射する前にAG1478 150mg/kgを経皮投与すると、紫外線照射によるEGFRの活性化を阻害し、皮膚乳頭腫の発生個数及びサイズがそれぞれ50、80%減少した。また、AG1478 150mg/kgを紫外線照射前に腹腔内投与しても皮膚乳頭腫の発生に対する抑制効果が認められた。EGFRの阻害により、紫外線照射によって引き起こされる細胞増殖が抑制され、apoptoticな細胞死の増加、皮膚過形成の発生の遅延がみられた[11]。皮膚腫瘍発生過程におけるH-rasとp53の相乗的な相互作用を検索するため、Tg.ACマウスと変異したp53遺伝子 (Ala¹³⁵Val、コドン135の点突然変異) を持つp53^{val135/wt}マウスを交配し、活性化H-ras遺伝子と変異p53遺伝子を併せ持つマウス (Tg.AC×p53^{val135/wt}) を作製した。このF1雌マウスにbenzo(a)pyrene (BaP) 100nmolを週2回塗布し、5ヵ月後に屠殺剖検した。皮膚腫瘍は、野生型 (p53^{wt/wt}Hras^{wt/wt}) が26%に対して、p53^{wt/wt}Hras^{TGAC/wt}、p53^{val135/wt}Hras^{wt/wt}、p53^{val135/wt}Hras^{TGAC/wt}マウスでそれぞれ75%、77%及び100%の発生頻度であった。また、個体当たりの腫瘍数は、野生型の0.33個に対して、p53^{wt/wt}Hras^{TGAC/wt}、p53^{val135/wt}Hras^{wt/wt}、p53^{val135/wt}Hras^{TGAC/wt}マウスでそれぞれ1.54、1.96及び3.08個であった。また腫瘍の大きさでは、野生型に比べp53^{wt/wt}Hras^{TGAC/wt}、p53^{val135/wt}Hras^{wt/wt}、p53^{val135/wt}Hras^{TGAC/wt}マウスでそれぞれ7、48及び588倍に増大した。病理組織学的に野生型マウスの皮膚腫瘍は乳頭腫が高分化型の扁平上皮癌であったが、p53^{wt/wt}Hras^{TGAC/wt}、p53^{val135/wt}Hras^{wt/wt}、p53^{val135/wt}Hras^{TGAC/wt}マウスではほとんどが浸潤性の扁平上皮癌であった。特にp53^{val135/wt}Hras^{TGAC/wt}マウスでは、成長が速く、浸潤度も著しいものであった。Microarray解析では、apoptosis、cell cycle arrest、ras-mitogen-activated protein kinase pathwayに影響を及ぼすことにより、皮膚

発がん過程に関与していると考えられた。以上より、p53の変異とH-rasの活性化が皮膚発がんに対して相乗的に作用することが示された[12]。

(4) Xpaマウス

Xpaマウス及びXpa/p53^{+/+}マウスの発がん感受性：Diethylstilbestrol (DES) に対するXpaマウス、Xpa/p53^{+/+}マウス及び野生型マウスの発がん感受性について報告があった[13]。Xpaマウスには0、100、300及び1500ppbの濃度で、野生型マウス及びXpa/p53^{+/+}マウスには0及び1500ppbの濃度でDESを9ヶ月間混飼投与した結果、1500ppb投与群では野生型マウス及びXpaマウスに下垂体腺腫、骨肉腫 (Xpaマウス)、T細胞リンパ腫及び精巣間細胞腺腫が発生したが、両マウス間に発生率の差はみられなかった。一方、Xpa/p53^{+/+}マウスの腫瘍発生率は野生型マウス及びXpaマウスに比して高く、その差は骨肉腫の発生率の増加に起因した。高発がん感受性の機序：DNA除去修復 (nucleotide excision repair、NER) のsubpathwayであるglobal genome repair (GGR) 及びtranscription-coupled repair (TCR) の関与を検討するため、GGR欠損マウス (Xpc)、TCR欠損マウス (Csb) 及び両者欠損マウス (Xpa) に、2-AAFを300ppmの濃度で混飼投与した。その結果、Xpa及びXpcマウスで肝細胞腫瘍が高率に発生したが、Csbマウスには発生せず、Xpaマウスにおける肝細胞腫瘍発生率 (25%) がXpcマウス (53%) に比して低かったことから、GGR欠損が腫瘍発生の促進に関与し、TCRの欠損は肝細胞腫瘍発生に対して抑制的に作用することが示された。膀胱腫瘍発生に関しても同様の結果が得られた。これらのマウスにLacZ遺伝子を導入し、2-AAFによる遺伝子変異誘発率について検討したが、3マウス間で差は認められなかった[14]。UVB照射によるcyclobutane pyrimidine dimers (CPD) の形成は、UV照射による皮膚発がんの初期段階と考えられている。一方、UVAはキノロン剤に対して光生物学的反応 (photobiologic reactions) を誘発する。Itoらは、キノロン系合成抗菌剤であるLomefloxacin (LFLX) の存在下でUVA照射により形成されたCPDが、LFLXの光発がんに関与するかどうかをXpaマウス及び野生型マウスを用いて検討した[15]。その結果、XpaマウスではLFLX 0.5mg経口投与+総量75J/cm²のUVA照射により5週間で皮膚腫瘍が

発生し、野生型マウスでは、LFLXP 0.5mg経口投与+総量345J/cm²のUVA照射により23週間で皮膚腫瘍が発生した。免疫組織化学的検討により、LFLXの投与後にUVAを照射したいずれのマウスからもCPDが検出されたが、野生型マウスでは早期にCPDが消失した。また、XpaマウスではLFLX投与後UVA照射により、皮膚に強い炎症が発生した。UVB照射によりXpcマウスの表皮には4倍体細胞が蓄積するが[16]、これはUV照射後にアポトーシスに移行することなくS期に入り、細胞周期がG2期ではなくS期後期で停止すること、及びXpc/Msh2^{-/-}マウスを用いた解析から、この細胞周期停止にはmismatch修復(MMR)に関与するMsh2蛋白が関与することが確認された[17]。一方、このような現象はTCRが欠損したXpa及びCsbマウスにはみられなかった。Xpaマウスでは皮膚へのUV照射後に、p53遺伝子のホットスポットの変異を伴いp53蛋白の発現が増加した領域(p53パッチ)が発生することが報告されている[18]。ヘアレスマウスでは、p53パッチにおいてUV照射に特徴的なp53遺伝子の変異(C→T、CC→TT等)が検出され、扁平上皮癌にみられた変異と質的な差はなかった。UV照射によるp53パッチの発生数及び皮膚扁平上皮癌の発生頻度はXpa>Xpc>Csbの順であり、UV照射による皮膚発がんにはGGR欠損が重要であることが示された[19]。また、UVB照射によりメラノサイトが増殖することがあるが、ヘアレスSKH-2マウスに比してXpaマウスでは、皮膚紅斑を誘発させる量のUVBの1回照射によりメラノサイトの増殖がより高度に発生することが示され、UVBの分割照射やUVA-I照射ではこれらの変化は発生しなかった[20]。毒性発現の修飾：XpaマウスではUVB照射や発がん物質塗布により、免疫抑制(表皮ランゲルハンス細胞の減少、細胞性免疫の抑制)や急性炎症が発生することが以前から報告されている。HorioらはXpaマウスを含めて、UVB照射皮膚に発生する反応について総括した[21]。XpaマウスではUV照射後にTCRの欠損により急性炎症が発生すること、表皮ランゲルハンス細胞数が大きく減少し回復が遅いこと、接触過敏反応がUVB照射により抑制されること、PGE2の産生やCOX2 mRNAの発現が亢進すること等が概括された。また、皮膚化学発がんにおいても同様であることが示された。すな

わち、dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)の塗布によりDNA附加体が形成され、その除去にXPA蛋白が必要であること、DMBA塗布によりXpaマウスに皮膚がんが発生すること、表皮ランゲルハンス細胞の消失及び接触過敏反応の抑制がXpaマウスで強く発現すること、ならびにXpaマウスでPGE2、IL10及びTNF α 産生が促進されることが示された。UVBの免疫抑制作用については、UVB照射マウスにおいて移植腫瘍の拒絶が抑制されることが示された[22]。野生型マウス及びXpaマウスの皮膚に同系腫瘍細胞(UVB照射Xpaマウスの皮膚腫瘍由来)を移植した後の腫瘍細胞の増殖及び拒絶には両マウス間で差がみられなかったが、UVB照射(計75mJ/cm²/2日)後に腫瘍細胞を移植した場合には、Xpaマウスで腫瘍細胞の増殖が促進されて拒絶されず、腫瘍組織へのNK細胞及びCD8+細胞の浸潤が阻害された。その他に、NER欠損マウスでは増殖活性の高い造血細胞におけるDNA障害が修復されないことにより、造血障害や腫瘍が発生する可能性が考えられる。Xpaマウスでは、4週齢の骨髄におけるコロニー形成細胞数は野生型マウスと差がなく、52週齢では野生型に比べ軽度減少することが示され、NERの欠損のみでは造血機能に対する影響は軽度であると考えられた[23]。

(5) PPARアゴニストに関する米国FDAのがん原性評価

FDA CDERでは、合計11のPPARアゴニスト(γ アゴニスト5種、 α/γ デュアルアゴニスト6種)におけるがん原性試験の成績を公表し、8/11化合物が複数の動物種及び系統で、雌雄両方において多臓器に腫瘍を誘発することを示している[24-27]。これはEPA[28]やIARC[29]の基準からすれば、“probable human carcinogens”に分類されることになり、FDAではPPARアゴニストのがん原性評価に対して、ラットとマウスの2年間のがん原性試験の実施を推奨し、遺伝子改変マウスモデルなどの代替試験法による評価を規制している。また、FDAは6ヶ月以上の臨床試験開始前に2年間のがん原性試験の報告書提出を求めると共に、Investigator BrochureやInformed Consent FormにPPARアゴニストがげっ歯類を用いたがん原性試験で陽性所見が認められているとの共通的な記述を含めることを推

奨している。いくつかのPPARアゴニストは、げっ歯類を用いたがん原性試験において、全ての投与量（推定最大臨床用量と同じ用量）で腫瘍所見が認められたことから開発を断念している。PPARアゴニストに遺伝毒性がないことは明らかであり、遺伝毒性の観点から腫瘍発生に対する発現機序（Mode of Action、MOA）を説明するデータは不十分である。しかしながら、腫瘍の発生が見られた臓器・組織は既知のPPARの分布している部位と一致すること、発がん強度はPPARアゴニスト作用の強さと相関することから、受容体を介した発がんメカニズムを無視することは出来ない。PPARアゴニストによるげっ歯類のがん原性に関する共通の理解とヒトに対するリスクを検討することを目的として、2004年にPPAR Inter-industry Consortiumが組織され、2005年にはILSI HESI PPAR Agonist Projectが発足した。ILSI HESI PPAR Agonist ProjectではPPAR Inter-industry Consortium加盟企業を含む多くの日米欧の製薬企業と欧米の官学が参画し、PPARアゴニストにより発生する腫瘍のうち、①膀胱腫瘍、②血管肉腫、③線維肉腫/脂肪肉腫についてワーキンググループを編成し、MOAのフレームワークを構築すると共にヒトに対するリスク評価に向けた活動を開始した。

D. 考 察

rasH2マウス及びp53^{+/+}マウスについて、urethaneに対する発がん感受性の差を検討し、遺伝子改変マウスの発がん標的臓器は背景系統の遺伝的影響を強く受けていることが確認された。この報告は、遺伝子改変マウスを用いた発がん性評価を実施する場合に、臓器標的性に関する考察において重要と思われる。rasH2マウスの発がんメカニズムに関しては、従来理論的に示唆されてきたras遺伝子の発がんメカニズムがmicroarray、RT-PCRによる遺伝子発現解析により示されたことは貴重な成果であり、今後への大きな足がかりになるものである。また、DHPNに対する発がん感受性の検討では、rasH2マウスがDHPNに対して高い感受性を示すことやrasH2マウス特異的な腫瘍発生が明らかとなった。

従来、p53^{+/+}マウスは遺伝毒性物質に対して高い発がん感受性を示すと言われてきた。しかし、見直しを行

うとp53^{+/+}マウスの遺伝毒性発がん物質に対する感受性には強弱があること、それには被験物質の用量や標的臓器性の違いだけでなく、正常に機能している片側アレルが直接的な作用部位になり変異が生じる場合と、ゲートキーパーとしてのp53遺伝子の機能へ影響する場合とは異なることが示唆された。また、p53^{+/+}マウスにおけるAOM誘発大腸発がんにはアポトーシス抑制が関与しているという報告もp53^{+/+}マウスの発がん機序の臓器特異性を示す一例となるものと考えられる。これらの報告は、p53^{+/+}マウスが遺伝毒性物質の発がん性を完全には検出できないことを示唆すると共に、被験物質の臓器標的性と動物側の感受性ならびに感受性に影響する発がんメカニズムの理解が重要であることを示す重要な知見であると考えられる。一方、Fandc2^{+/+}/p53^{+/+}ダブルノックアウトやヘアレスp53^{+/+}マウスにみられた発がんに関わる様々な特性は、p53遺伝子の発がんへの関わり的重要性を改めて示している。特に後者についてはp53^{+/+}マウスを経皮投与による発がん性試験や光発がん性の検討等に应用展開する上で役立つ情報であると思われた。

Tg.ACマウスでは、皮膚に強い刺激性を有する化合物を使用する場合に、刺激による二次的な皮膚腫瘍発生がみられる可能性があることが複数の報告から示唆された。またEGFRを阻害することにより、紫外線照射による皮膚腫瘍の発生を抑制すること、p53遺伝子の変異とH-ras遺伝子の活性化が皮膚発がん過程において相乗的に作用することが明らかとなった。

Xpaマウス及びXpa/p53^{+/+}マウスでは、DESの9ヶ月間投与の結果が報告され、Xpa/p53^{+/+}マウスの発がん感受性がXpaマウスよりも高い場合があることが示された。TCRを欠損したCsbマウスではDNA障害の修復過程でRNAポリメラーゼIIの機能が停止してアポトーシスが誘発される。2-AAF誘発腫瘍の発生率はXpc > Xpa > Csb > 野生型の順であったが、導入したLacZ遺伝子における変異誘発性にはこれらのマウス間で差がみられなかった。これらの結果から、CsbマウスではTCR欠損によるアポトーシス誘発のために発がん感受性が増加せず、さらに、Xpcマウスに比してXpaマウスの発がん感受性が低いと考えられた。キノロン系抗菌剤であるLFLXの存在下でUVA照射すると、Xpaマウスでは

皮膚発がんが促進された。また、皮膚発がんの初期段階と考えられているCPDが長時間残存することが示され、CPDに対する修復の欠損がLFLXの光発がんに大きく関与することが示唆された。UV照射後の皮膚に形成されるp53パッチの発生数は、Xpa>Xpc>Csb>野生型マウスの順であり、皮膚がん感受性との相関性がみられた。TCR欠損動物では、アポトーシスの発生により、UVB照射後のp53パッチ形成やその後のがん化が促進されないと考えられた。UVB照射によりXpcマウスの表皮には4倍体細胞が蓄積するが、細胞周期はG2期ではなくS期の後期で停止することが示された。一方、このような現象はTCRが欠損したXpa及びCsbマウスにはみられなかった。GGR欠損マウスでは発生したDNA障害が修復されずに細胞周期がS期に入るが、ミスマッチ修復(MMR)に関与するMsh2蛋白によりDNAの障害部位が認識されて、細胞周期がS期後期で停止するものと考えられ、さらにMsh2の欠損を導入することにより、細胞周期が停止せずに進行して変異が定着し、発がん感受性が高まる可能性が示された。このように、NER欠損マウスにおけるUVBや化学物質による発がん過程では、GGR欠損によりDNA障害が修復されない細胞が増加して発がんを促進するが、TCR欠損マウスではDNA障害が生じた細胞にアポトーシスが発生するために腫瘍発生率が増加しない可能性が報告された。さらに、TCR欠損マウスで報告されているUVB照射や発がん物質の塗布後の免疫抑制や急性炎症に関して、XpaマウスではUVB照射後に移植腫瘍細胞の増殖が促進され、NK細胞やCD8+細胞の腫瘍組織への浸潤が阻害されるとの報告があり、このような免疫抑制がXpaマウスにおける皮膚腫瘍発生の促進因子の一つである可能性が考えられる。また、NERの欠損により、増殖活性の高い造血系への影響が懸念されるが、Xpaマウスに関しては、造血機能に対する影響は軽度であると考えられた。

PPARアゴニストに関するFDAのがん原性評価では、PPARアゴニストは複数の動物種に、雌雄両性において、多臓器に腫瘍を誘発することが示された。現在、ILSI/HESIによるPPAR agonist projectでワーキンググループを編成し、産官学が一体となってPPARアゴニストによる発がん性についてのMOAのフレームワークを

構築すると共にヒトに対するリスク評価に向けた活動を開始したことから、その活動成果が待たれる。また、遺伝子改変マウスの使用規制については、その科学的正当性について今後も注意深く追及していくべきである。

E. 結論

rasH2マウス及びp53^{+/+}マウスを用いた発がん性試験を実施する場合には、背景系統が遺伝子改変マウスの発がん特性に大きな影響を与えることに留意が必要であると考えられた。また、rasH2マウスの発がんメカニズム解析についてはmicroarray、RT-PCRによる遺伝子発現解析が有用であり、今後の方向を示唆するものであった。p53^{+/+}マウスを用いた発がん性試験では、被験物質の発がん標的性や片側p53アレルへの変異を生じさせるか否かという発がんメカニズムの違いにより発がん物質検出感度が異なることが示された。遺伝毒性発がん物質であっても検出できない場合があることが明らかにされたことは、本マウスを用いた発がん性試験の結果解釈に重要な知見である。Tg.ACマウスモデルでは、強い刺激性を有する化合物では二次的に陽性結果が得られる場合があることが示された。一方、皮膚腫瘍発生機序解明に対するモデルとしての有用性も期待された。Xpaマウスの発がん感受性については、Xpa/p53^{+/+}マウスやXpcマウスに比して劣る場合があること、Xpaマウスの高発がん感受性は主にGGRに依存し、TCR欠損はアポトーシスを誘発し、急性炎症や免疫抑制を引き起こすことから、がん原性試験での使用には余り適さないことが示された。

PPARアゴニストのがん原性に関しては、PPAR agonist projectの活動やヒトに対するリスク評価への取り組みが期待される。遺伝子改変マウスの使用規制については、その科学的正当性についてさらに追求すべきであると考えられた。

参考文献

- Ozaki M, Ozaki K, Watanabe T, Uwagawa S, Okuno Y and Shirai T: Susceptibility of p53 Knockout and rasH2 transgenic mice to urethane-induced lung carcinogenesis are inherited from their original strains. *Toxicol. Pathol.*, 33: 267-271 (2005).
- Okamura M, Sumida K, Muto T, Kashida, Machida N, Watanabe T and Mitsumori K: Analysis of gene expression profiles of forestomach tumors in rasH2 mice initiated with *N*-ethyl-*N*-nitrosourea. *Arch. Toxicol.*, 78: 688-696 (2004).
- Okamura M, Moto M, Kashida Y, Machida N and Mitsumori K: Carcinogenic susceptibility to *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) in rasH2 mice. *Toxicol. Pathol.*, 32: 474-481 (2004).
- Tsukamoto T, Hirata A and Tatematsu M: Susceptibility of heterozygous and nullizygous p53 knockout mice to chemical carcinogens: Tissue dependence and role of p53 gene mutations. *J. Toxicol. Pathol.*, 18: 121-134 (2005).
- Hu Y, Leu RKL and Young GP: Absence of acute apoptotic response to genotoxic carcinogens in p53-deficient mice is associated with increased susceptibility to azoxymethane-induced colon cancer. *Int. J. Cancer*, 115: 561-567 (2005).
- Hu Y, Leu RKL and Young GP: Sulindac corrects defective apoptosis and suppresses azoxymethane-induced colonic oncogenesis in p53 knockout mice. *Int. J. Cancer*, 116: 870-875 (2005).
- Houghtaling S, Granville L, Akkari Y, Torimaru Y, Olson S, Finegold M and Grompe M: Heterozygosity for p53 (Trp53^{+/-}) accelerates epithelial tumor formation in fanconi anemia complementation group D2 (Fancd2) knockout mice. *Cancer Res.*, 65: 85-91 (2005).
- van Kranen HJ, Westerman A, Berg RJ, Kram N, van Kreijl CF, Wester PW and de Gruijl FR: Dose-dependent effects of UVB-induced skin carcinogenesis in hairless p53 knockout mice. *Mutat. Res.*, 571: 81-90 (2005).
- Fuhrman J, Shafer L, Repertinger S, Chan T and Hansen LA: Mechanisms of SEPA 0009-induced tumorigenesis in v-ras (Ha) transgenic Tg.AC mice. *Toxicol. Pathol.*, 33: 623-630 (2005).
- Doi AM, Hailey JR, Hejtmancik M, Toft JD II, Vallant M and Chhabra RS: Topical application of representative multifunctional acrylates produced proliferative and inflammatory lesions in F344/N rats and B6C3F1 mice, and squamous cell neoplasms in Tg.AC mice. *Toxicol. Pathol.*, 33: 631-640 (2005).
- El-Abaseri TB, Fuhrman J, Trempus C, Shendrik I, Tennant RW and Hansen LA: Chemoprevention of UV light-induced skin tumorigenesis by inhibition of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.*, 65: 3958-3965 (2005).
- Zhang Z, Yao R, Li J, Wang Y, Boone CW, Lubet RA and You M: Induction of invasive mouse skin carcinomas in transgenic mice with mutations in both H-ras and p53. *Mol. Cancer Res.*, 3: 563-574 (2005).
- McAnulty PA and Skydsgaard M: Diethylstilbestrol (DES): carcinogenic potential in Xpa^{-/-}, Xpa^{-/-}/p53^{+/-}, and wild-type mice during 9 months' dietary exposure. *Toxicol. Pathol.*, 33: 609-620 (2005).
- Hoogervorst EM, van Oostrom CT, Beems RB, van Bentem J, van den Berg J, van Kreijl CF, Vos JG, de Vries A and 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).
- Itoh T, Miyauchi-Hashimoto H, Sugihara A, Tanaka K and Horio T: The photocarcinogenesis of antibiotic Lomefloxacin and UVA radiation is enhanced in xeroderma pigmentosum group A gene-deficient mice. *J. Invest. Dermatol.*, 125: 554-559 (2005).
- van Oosten M, Rebel H, Friedberg EC, van Steeg H, van der Horst GT, van Kranen HJ, Westerman A, van Zeeland AA, Mullenders LH and de Gruijl FR: Differential role of transcription-coupled repair in UVB-induced G2 arrest and apoptosis in mouse epidermis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97: 11268-11273 (2000).

- van Oosten M, Stout GJ, Backendorf C, Rebel H, de Wind N, Darroudi F, van Kranen HJ, de Gruijl FR and Mullenders LH: Mismatch repair protein Msh2 contributes to UVB-induced cell cycle arrest in epidermal and cultured mouse keratinocytes. *DNA Repair*, 4: 81-89 (2005).
- Rebel H, Mosnier LO, Berg RJ, Westerman-de Vries A, van Steeg H, van Kranen HJ and de Gruijl FR: 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: 977-983 (2001).
- Rebel H, Kram N, Westerman A, Banus S, van Kranen HJ and de Gruijl FR: Relationship between UV-induced mutant p53 patches and skin tumours, analyzed by mutation spectra and by induction kinetics in various DNA-repair-deficient mice. *Carcinogenesis*, 26: 2123-2130 (2005).
- van Schanke A, Jongsma MJ, Bisschop R, van Venrooij GM, Rebel H and de Gruijl FR: Single UVB overexposure stimulates melanocyte proliferation in murine skin, in contrast to fractionated or UVA-1 exposure. *J. Invest. Dermatol.*, 124: 241-247 (2005).
- Horio T, Miyauchi-Hashimoto H and Okamoto H: DNA damage initiates photobiologic reactions in the skin. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 4: 709-714 (2005).
- Miyauchi-Hashimoto H, Sugihara A, Tanaka K and Horio T: Ultraviolet radiation-induced impairment of tumor rejection is enhanced in xeroderma pigmentosum A gene-deficient mice. *J. Invest. Dermatol.*, 124: 1313-1317 (2005).
- Prasher JM, Lalai AS, Heijmans-Antonissen C, Ploemacher RE, Hoeijmakers JH, Touw IP and Niedernhofer LJ: Reduced hematopoietic reserves in DNA interstrand crosslink repair-deficient ERCC1^{-/-} mice. *EMBO J.*, 24: 861-871 (2005).
- EI-Hage J: Preclinical and clinical safety assessments for PPAR agonists, DIA meeting, Washington DC (2004).
- EI-Hage J: PPAR agonist carcinogenicity, FDA CDER News along the Pike, 10: 5-6 (2004).
- EI-Hage J: Peroxisome proliferation- activated receptor agonists: Carcinogenicity findings and regulatory recommendations. International Atherosclerosis Society Symposium on PPAR. Monte Calro (2005).
- EI Hage, J: Toxicity Profiles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) Agonists and Preclinical Safety Profile for Muraglitazar, Endocrinologic and Metabolic Drugs Advisory Committee, September 9 (2005).
- US Environmental Protection Agency. Guidelines for carcinogen risk assessment. Federal Register 51 (185): 33992 (1986).
- WHO International Agency for Research on Cancer. Preamble to the IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. (www-cie.iarc.fr, final update 18 Aug, 2004)
- F. 健康危険情報**
特になし
- G. 研究発表**
論文発表：なし
学会発表：なし
- H. 知的所有権の取得状況**
特許取得：なし
実用新案登録：なし
その他：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17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（三菱化学安全性科学研究所）
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（アステラス製薬(株) 安全性研究所）
若田 明裕（アステラス製薬(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

新しいin vitro遺伝毒性検出系の1つとして、染色体異数性の誘発に注目し、ヒトリンパ芽球細胞株を用いた異数性誘発物質検出系の開発と、それを用いた染色体異数性誘発機構の解析を行った。ヒトリンパ芽球細胞株TK6とWTK-1は同一細胞株由来であるが、WTK-1はp53遺伝子に突然変異を持つp53変異細胞株である。p53はスピンドルチェックポイントに関与し、染色体の分配機構は厳密に制御されているため、p53正常細胞であるTK6では染色体の異数化は起こらないが、WTK-1では頻繁に起こる。従って、両細胞の反応性を比較することにより異数性誘発物質を同定することができる。農薬であり、染色体の数的異常を高頻度に誘発するとされているカルベンダジム（CAR）とトリクロロフォン（TRI）の2化合物について、両細胞で遺伝毒性を比較した。24時間処理後にコメット試験、小核試験、TK突然変異誘発頻度を検討した。両物質ともコメットは陰性、小核は陽性を示したが、TK

突然変異はWTK-1のみで陽性を示した。WTK-1でのTK変異体を遺伝子レベルで解析したところ、TRIでは染色体全体の消失だけでなく、構造異常によるTK遺伝子の変異が観察された。一方、CARのほとんどの変異体は染色体全体の消失によるものであった。このことは、CARは異数性誘発活性のみを持つaneugenであるのに対して、TRIはaneugenとclastogenの両者の性質を持つことを示している。両化合物によって誘発された小核をセントロメアプローブによるFISHで解析したところ、CAR誘発の小核の70%はセントロメア陽性であり、この説を裏付けるものであった。

TK6とWTK-1細胞での遺伝毒性を分子生物学的、細胞遺伝学的に解析することにより、異数性誘発物質の同定と、その程度を解析できることが明らかとなった。

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している。特に本年度は、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いた。

農薬として使われているトリクロロフォン（TRI）と、カルベンダジム（CAR）は染色体の数的異常を引き起こすことが知られている。TRIは生殖細胞で染色体の数的異常を引き起こし、ヒトではダウン症を引き起こす可能性が疫学的調査から指摘されている。また、CARはマウス精子に倍数性を誘発する。しかしながら、これら化合物の遺伝毒性や発がん性との関係は明らかではない。これら化合物をモデルとして、染色体異数性誘発の程度の評価と、メカニズムを明らかにすることを本年度の研究の目的とする。

研究にはヒトリンパ芽球細胞株TK6とWTK-1を用いた。我々はこれまでこれら細胞を基礎としてヒト型*in vitro*遺伝毒性試験の構築を試みてきた。両細胞は同一細胞株由来であるが、WTK-1はp53遺伝子に突然変異を持つp53変異細胞株である。p53はスピンドルチェックポイントに関与し、染色体の分配機構は厳密に制御されている。従って、p53正常細胞であるTK6では染色体の分配は厳密に制御されており、染色体の異数化はまれにしか起こらない。一方、WTK-1ではその機能が不完全で、遺伝的に不安定となっているため染色体の異数化が高頻度に起こる。両者の反応性を比較することにより異数性誘発物質を同定することが期待できる。

B. 研究方法

1. 試験化合物

トリクロロフォン (TRI, 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。カルベンダジム (CAR, 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。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TK6、WTK-1細胞を用いた。細胞の培養には、NaHCO₃ (2mg/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°C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、細胞濃度を調整しフラスコに播種し、用時調製した化合物溶液を1%添加し、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

TRIもしくはCARで処理直後の細胞を、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 μL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 μL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1 V/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 μg/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 μL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. 小核試験

TRIもしくはCARで処理した細胞を正常培地で48時間培養し、小核の標本を作製した。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グラスに滴下し、小核標本を作製した。観察直前に20 μg/mLのアクリジンオレンジ溶液をスライドグ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。

6. TK遺伝子突然変異試験

処理終了直後と発現時間 (3日間) 終了時に細胞懸濁液の一部を用いて、1.6cells/wellになるように細胞を再播種し、コロニー形成率 (それぞれPE0およびPE3) を算出した。また、処理終了直後から発現時間終了ま

での間毎日細胞数を計測し、各濃度における相対増殖率 (RSG) を算出した。処理終了3日 (発現時間終了) 後に、2000cells/wellとなるように細胞を播種し、3 μ g/mLトリフルオロチミジン (TFT) 中で選択培養し、12日目に突然変異コロニー (TFT耐性コロニー) の数を計数し、突然変異率を算出した。溶媒対照群については2フラスコを用い、各フラスコにつき96ウェルプレートを4枚 (計8枚)、その他の処理群では各群1フラスコにつき2枚のプレートを用いた。

7. TK変異体の遺伝子解析

TK遺伝子突然変異体細胞をクローニングし、定法に従いDNAを抽出した。TK遺伝子のエクソン4の多型性部位を、コントロールである β グロビン部位と共に定量的PCRを行い、GeneScan解析により Loss of heterozygosity (LOH) 型突然変異の有無と、タイプを同定した。LOH変異体に関してはさらに17番染色体に散在する13の多型性遺伝マーカーを用いて解析し、LOHの領域を染色体上にマッピングした。

8. 小核のFISH解析

小核標本については、ヒト動原体特異的プローブであるSTARFISHプローブ (Human Pan-Centromeric

Chromosome Paint-Cy3 label, Cambio社) を用い、定法の手順で前処理およびハイブリダイゼーションを行い、DAPIでカウンター染色したのち、蛍光顕微鏡下で分析を行った。コード化した状態で各群50個の小核について、動原体シグナル陽性的小核の数をカウントした。

(倫理面への配慮)

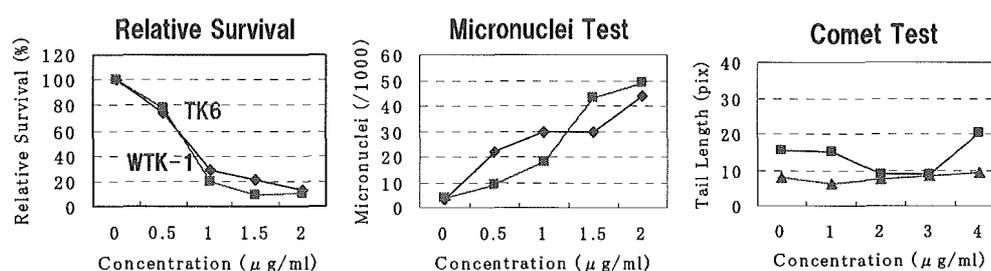
本研究で使用したヒト細胞は米国American Type Culture Collection (ATCC) に登録済みの株化細胞で、国際的に広く普及している細胞であり、倫理上の問題は無い。また、全ての実験は本研究所倫理規定に準拠して行った。

C. 研究結果

1. TRI, CARのヒト型in vitro試験系での遺伝毒性試験結果

TRIとCARの細胞毒性 (RS)、小核 (MN)、コメット (COM) の結果を図1に、TK遺伝子突然変異 (TK-MF) を図2に示す。各試験化合物で細胞を24時間処理し、その直後に細胞毒性とコメットを測定し、48時間後、と72時間後にそれぞれ小核と、TK遺伝子突然変異を測定した。TRIとCARはTK6、WTK-1細胞に対して同程度の細胞毒性を引き起こし、それに応じて同程度の小

a) Carbendazim



b) Trichlorfon

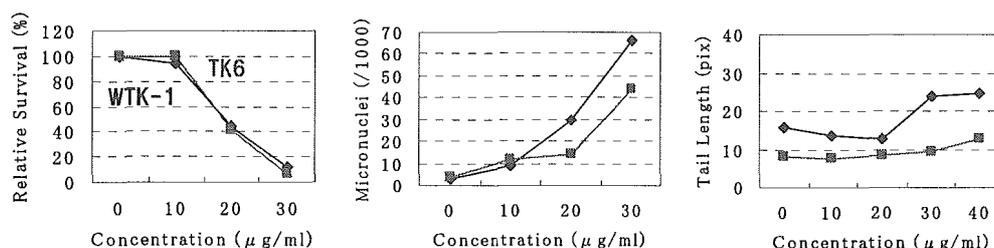
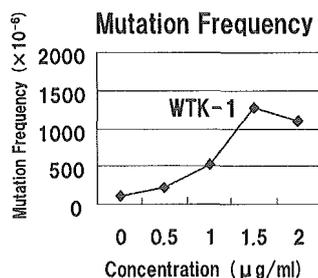
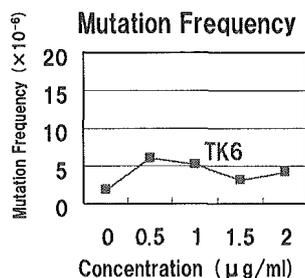


図1

a) Carbendazim



b) Trichlorfon

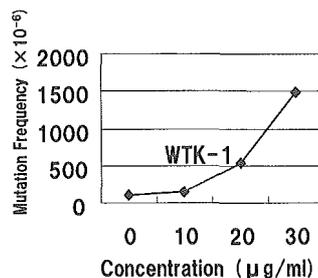
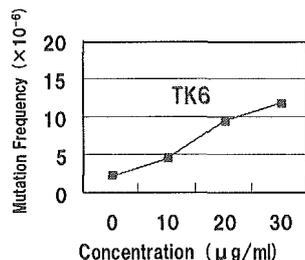


図 2

核の誘発を示した。両化合物とも小核の誘発は顕著であり、最大で4-7%の細胞に小核が観察された。一方、コメット試験では細胞毒性が強いにも関わらず、ほとんど陽性傾向は見られなかった。この無反応性は両細胞で見られた。

TK突然変異は、TRIはWTK-1で強い陽性、TK6で弱い陽性反応が見られた。一方、CARはWTK-1での誘発は顕著であったものの、TK6では陰性であった。これらのことから、両化合物ともDNAに直接損傷を与えない遺伝毒性物質であるが、その発現様式は異なり、p53の状況に依存することが明らかとなった。

2. TRIとCARによる遺伝子突然変異の特徴

両化合物がWTK-1細胞でTK突然変異を誘発したことから、この変異体をクローニングし、遺伝子解析を行った。TK遺伝子の多型部位を利用しLOH解析を行ったところ、TRI変異体の100%、CAR変異体の95%がLOHを示した。このことから、両化合物とも点突然変異は誘発しない、非DNA損傷性化合物であり、この結果はコメット試験の結果を支持するものである。また、LOHの範囲を17番染色体上に散在する多型性マーカーでマッピングしたところ、TRIはTK近傍の小さなLOHから、17番染色体全ての大きなLOHまで様々な変異体が観察されたのに対して、CARのLOHの90%は17

番染色体全てのLOHであった。このことから、CARは染色体の喪失による突然変異を特異的に引き起こしていることが示された。一方、TRIはこのような突然変異以外に、欠失や相同染色体間の組換えによる突然変異をも引き起こすことが考えられた。

3. TRIとCARによる小核の特徴

TRIもしくはCARで引き起こされたWTK-1での小核を、セントロメDNAをプローブとしたFluorescence in situ hybridization (FISH) により解析した。自然出現小核の30%にセントロメアシグナルが観察されたのに対して、TRI誘発小核で40%、CAR誘発小核で65%にシグナルが観察された (図3)。この結果は、CAR、TRIと

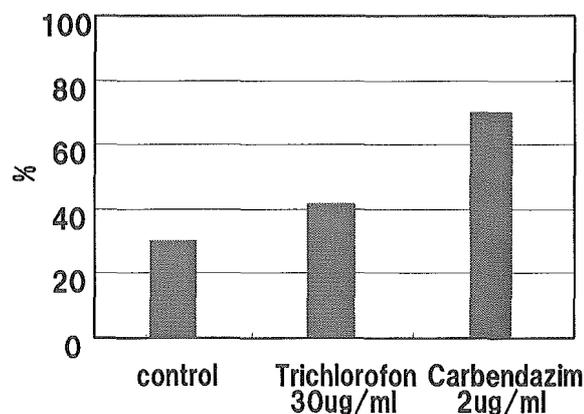


図 3

も染色体の不分離によって小核を誘発し、その程度はCARがかなり高いことを示している。

D. 考 察

TK6、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。

遺伝毒性の指標の一つとして染色体の異数化の誘発がある。コルヒチンやビンブラスチンなどの細胞分裂毒は、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、一般に、細菌による復帰突然変異試験陰性、染色体異常が陽性である。しかしながら、染色体異常の結果は倍数性を指標とした結果であり、異数性がこれら化合物によって誘発されたかは明らかではない。

染色体の異数性はがん細胞に高頻度に観察される。これら異数性は細胞の癌化に伴う、遺伝的不安定性の1つであり、癌の原因というよりも、癌の結果であるとの説が強い。しかしながら、染色体の消失はがん抑制遺伝子のヘテロ接合性消失のメカニズムの一つであり、また染色体の増加はがん遺伝子の増幅を引き起こし、がん発生に深く関与している。がん以外でも、ダウン症、ターナー症など先天的な遺伝性疾患においても、染色体の数的異常は、構造異常よりも高頻度に認められる。このようなことから、欧米では最近、染色体の数的異常を念頭に置いた遺伝毒性検出の重要性が論議されている。

一方、染色体の異数性は、著しい遺伝的不安定性を与えるため、スピンドルチェックポイントの監視機構によって厳しく制御されている。この制御にはp53が関与していることが知られている。実際p53正常細胞では染色体の異数化は起こり難いが、p53変異細胞では、セ

ントロゾームの増幅により、異数性、倍数性細胞が出現しやすい。チャイニーズハムスター細胞を初めとする多くの培養細胞はp53に異常を持っており、これらの細胞を用いたin vitro試験は、細胞分裂毒を初めとするある種の化学物質に対して高い感受性を示す。正常細胞と異なるこのような反応性の違いから、p53変異細胞の結果の解釈には注意が必要である。

TK6と、WTK-1細胞は同一起源由来細胞であるが、WTK-1はp53に変異をもつ。従って、両細胞の性質を比較することによりp53の役割、特に染色体異数化の関係を明らかにすることができる。今回、我々は異数性もしくは倍数性誘発物質と考えられているTRIと、CARの遺伝毒性を比較した。両物質はともに農薬として開発されたが、TRIはダウン症候群高発生率の原因物質であることが示唆されており、CARについては抗ガン剤としての開発が検討されている。両者の異数性、もしくは倍数性の誘発は主としてマウス生殖細胞で報告されている。

今回の我々の結果では、TRI、CARともコメット試験陰性であったことから、両化合物はDNAに直接損傷をもたらさないものと考えられた。しかしながら、小核は有意に誘発することから、染色体異常は引き起こす。一方、TK遺伝子突然変異試験においては、TRIはTK6、WTK-1の両細胞で陽性を示したものの、CARはWTK-1のみで突然変異の誘発を認めた。TK変異体の遺伝子解析の結果、WTK-1での突然変異のほとんどはTK遺伝子が存在する17番染色体全体の喪失によるものであったことから、CARによる突然変異の本体は染色体の不分離による異数化が原因であることが予想された。CARのこの突然変異誘発特異性はp53正常細胞であるTK6では観察されないことからこの考えは指示される。また、セントロメアプローブによるFISHでもCARによって誘発された小核の65%に陽性シグナルが観察されたことからCARが高頻度に染色体異数性を誘発することが示された。

一方、TRIで誘発されたTK変異体のすべてはLOHタイプであったが、異数性によるものの割合は自然誘発変異体の割合と同程度であった。LOHは組換え、欠失によるものが多く、典型的なclastogenの性質を反映している。しかしながら、コメット陰性で、非LOHタイ

プ（点突然変異体）はほとんど観察されなかったことから、極めて特殊な遺伝毒性の発現様式を持つものと考えられる。

異数性誘発物質による小核の誘発はp53の状態にかかわらず観察されたのに対して、それを原因とする突然変異がp53正常細胞ではほとんど観察されないことは、p53によるスピンドルチェックポイントが、染色体の分配が終了し、細胞の分裂が開始するときに働くことを示唆している。これまでの知見から、p53変異細胞での異数性の誘発機構として以下のことが考察される。染色体の分配異常が起きると、一旦分裂しかけた細胞が、再び融合し（regression）、これが倍数性細胞の出現の原因となる。p53変異細胞では倍数性細胞でセントロゾームの増幅が起こり、倍数性だけでなく、異数性の出現の要因となる。また、p53変異細胞ではアポトーシスが働きにくいため、このような異常細胞が集団中から排除されない（図4）。CAR、TRIによって誘発される小核の多くは、染色体の不分離によるものと考えられるが、それら小核のほとんどは、上記のチェックポイント、アポトーシス機構によって修復、もしくは排除されるものと考えられる。

E. 結論

ヒトリンパ芽球細胞株TK6とWTK-1を用いて、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。モデル化合

物としてTRIとCARを試験し、それら化合物の染色体異数性誘発活性の程度と、そのメカニズムを解析した。TRI、CARはDNAに直接損傷を与えず、高率に小核を発生させた。一方、TK遺伝子突然変異はWTK-1細胞のみで観察されたことから、遺伝毒性はp53に依存し、その変異体の大部分は染色体全部の喪失によるものであった。CARは異数性の高誘発は小核のFISH解析からも指示された。以上のことからCARはaneugenとしての性質が強く、TRIはaneugenだけでなくclastogenの性質も持つものと考えられた。

p53の状態が違うTK6、WTK-1細胞を用いて、遺伝毒性の反応性を比較し、TK変異体の遺伝子解析、小核のFISH解析を行うことによって、異数性誘発物質の同定とその強さの評価が可能である。これら試験系は、メカニズムを根拠とする遺伝毒性の評価に有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Suzuki, H., N. Ikeda, K. Kobayashi, Y. Terashima, Y. Shimada, T., Suzuki, T. Hagiwara, S. Hatakeyama, K. Nagaoka, J. Yoshida, Y. Saito, J. Tanaka and M. Hayashi (2005) Evaluation of liver and peripheral

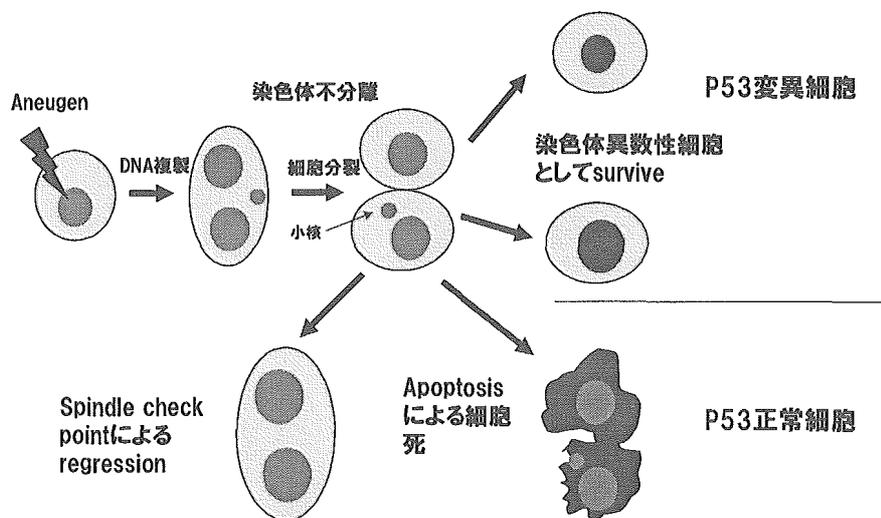


図4

- blood micronucleus assays with 9 chemicals using young rats: A study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS) *Mutat. Res.*, 583, 133-145.
- Hayashi, M. (2005) げっ歯類を用いる小核試験の基礎研究ならびにその行政面への応用 *Environ. Mutagen Res.*, 27, 13-20.
- Torous, D., N. Asano, C. Tometsko, S. Sugunan, S. Dertinger, T. Morita and M. Hayashi (2006) Performance of flow cytometric analysis for the micronucleus assay- a reconstruction model using serial dilutions of malaria infected cells with normal mouse peripheral blood. *Mutagenesis*, 21, 11-13.
- Asano, N., D. Torous, C. Tometsko, S. Dertinger, T. Morita and M. Hayashi (2006) Low dose effects in the induction of micronucleated reticulocytes on mitomycin C, Ara-C, and colchicine by Acridine Orange supravital staining and flow cytometric methods. *Mutagenesis*, 21, 15-20.
- Sofuni, T., T. Nohmi, T. Ohta and M. Hayashi (2005) Genotoxicity : Is a threshold concept applicable to evaluate the mutagenic activity of DNA-targeting substances !? *Environ. Mutagen Res.*, 27, 61-73 (in Japanese).
- Nakajima, M., S. Shimada, M. Nagai, F. Mizuhashi, C. Sugiyama, S. Masuda, M. Hayashi and N. Kinae (2005) 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone [MX] shows initiating and promoting activities in a two-stage BALB/c 3T3 cell transformation assay. *Mutagenesis*, 20, 375-379.
- Asada, S., K. Sasaki, N. Tanaka, K. Takeda, M. Hayashi and M. Umeda (2005) Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/c 3T3 cells (Bhas 42 cells). *Mutat. Res.*, 588, 7-21.
- Hayashi, M., E. Kamata, A. Hirose, M. Takahashi, T. Morita and M. Ema (2005) In silico assessment of chemical mutagenesis in comparison with results of Salmonella microsome assay on 909 chemicals. *Mutat. Res.*, 588, 129-135.
- Koyama, N., H. Sakamoto, M. Sakuraba, T. Koizumi, Y. Takashima, M. Hayashi, H. Matsufuji, K. Yamagata, M. Shuichi, N. Kinae and M. Honma. Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat. Res.* (in press)
- G. 知的所有権の取得状況
特許取得：なし