

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究

重点研究報告書（Ⅱ）

目 次

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 ……	589
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 ……	636
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 ……	656
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 ……	671
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 ……	680
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 ……	691
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 ……	707
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 ……	720
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 ……	728
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 ……	740
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 ……	761
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 ……	772
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 ……	783
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 ……	795
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 ……	814
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 ……	826
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 ……	836
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 ……	839
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 ……	919
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 ……	939
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の確立に関する研究	乾 賢一 ……	951
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 ……	966

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 ……	979
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 ……	1000
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 ……	1021
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 ……	1042
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 ……	1054
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 ……	1070
KHB1201	タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発	竹森 洋 ……	1080
KHB1202	家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発	寺尾 恵治 ……	1086
KHC1203	弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究	大隈 邦夫 ……	1090
KHC1204	チオレドキシシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発	井上 達 ……	1096
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子 ……	1106
KHD1205	ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究	阿久津英憲 ……	1111
KHD2207	ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究	後藤 雄一 ……	1115

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、本研究班ではヒト細胞、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。ここでのヒト型試験とは、ヒトリンパ芽球細胞株 TK6、もしくは WTK-1 と、ヒト肝臓由来の S9 を用いた *in vitro* 試験系であり、遺伝毒性の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、その後、試験系の検出能力をバリデーションし、既存の遺伝毒性試験データと比較した。第 1 期共同研究では代謝活性化を必要としない 14 の染色体異常誘発物質について TK6、WTK-1 両細胞を用いて試験した。14 化合物には 4 種類の典型的遺伝毒性物質と、10 種類のエームス試験陰性の染色体異常誘発物質が含まれる。4 つの遺伝毒性物質は、両細胞の 3 つのエンドポイントで明らかな陽性を示したが、10 の染色体異常誘発物質の遺伝毒性は、細胞、および試験系によって異なる反応性を示した。全体的には、MN が最も感度の高いエンドポイントであり、また、WTK-1 は TK6 より陽性と判定しやすい傾向にあった。TK6 と WTK-1 の違いは、p53 の状態の違いを反映しているものと予想される。第 2 期共同研究では、代謝活性化を必要とする 17 の化合物について試験を行った。細胞は WTK-1 を用い、S9 非存在下、ラット非誘導 S9、ラット誘導 S9、ヒトプール S9、ヒト高活性 S9 の 5 種類の試験条件下で本試験系をバリデーションした。17 の化合物中には 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。ヒト型試験系は、齧歯類の試験では検出できないようなヒト遺伝毒性の検出と、ヒトにおける発がんリスクの予測に利用できる可能性があり、医薬品開発に利用できるだけでなく、染色体異常や、突然変異のメカニズムの解明にも有用と考えられる。

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、岡宏昭

(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、候補化合物を絞り込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當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路法や、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當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。ラットーマウス間、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。

妥当な選択としては、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。

具体的には、代謝活性化を必要としない 14 の化学物質に対し、ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 と WTK-1 を用い、上記エンドポイントについて遺伝毒性試験を実施した。14 化合物には 4 種類の典型的遺伝毒性物質と、10 種類のエームス試験陰性の染色体異常誘発物質が含まれる。また、代謝活性化を必要とする 17 の化合物についても同様に試験を行った。細胞は WTK-1 を用い、S9 非存在下、ラット非誘導 S9、ラット誘導 S9、ヒトプール S9、ヒト高活性 S9 の 5 種類の試験条件下で本試験系をバリデーションした。さらには、ヒト型試験系の有用性を評価、検証するための追加実験も行った。

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。基本的な試験系は、細胞としてヒトリンパ芽球細胞株 TK6、WTK-1 を用い、ヒト代謝系として、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)

ヒト培養細胞 TK6、WTK-1 を用いた TK 遺伝子突然変異検出系を確立する。14 のモデル化合物に対して TK 試験の実施し、その評価を行った。また、WTK-1 細胞、ヒト S9 からなる代謝活性化を必要とするヒト型試験法での TK 遺伝子突然変異検出系を確立した。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った。

得られた試験結果を既存の遺伝毒性データ、発がん性試験データと比較し、全体の試験系能力についての評価を行った。また、その評

価を検証するために追加試験を適宜行った。

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)

ヒト培養細胞 TK6、WTK-1 を用いたコメット試験を確立した。14 のモデル化合物に対してコメット試験の実施し、その評価を行った。ラット、マウス由来の S9 を用い、一部のモデル化合物に対してコメット試験を実施し、その評価を行った。

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)

ヒト代謝系の導入のため、ヒト S9 を用いて、モデル化合物について、エームス試験、マウスリンフォーマ試験を実施し、その評価を行った。また、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、その評価を行った。

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・岡宏昭)

ヒト培養細胞 TK6、WTK-1 を用いた小核試験を確立した。14 のモデル化合物に対する小核試験の実施し、その評価を行う。代謝拮抗剤をモデル化合物として、DNA の代謝が関与するヒトと齧歯類での遺伝毒性の発現メカニズムの違いについて研究を行った。

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)

ヒト型 *in vitro* 遺伝毒性試験系に最適な細胞を選択し、その性質を解析し、遺伝毒性試験を行うに必要な試験条件、バックグラウンド

データ等の評価を行った。キノリン化合物をモデル化合物として、薬物代謝が関与するヒトと齧歯類での遺伝毒性の発現メカニズムの違いについて研究を行った。

6. MMS 共同研究による試験の実施

多くの試験化合物を用いたバリデーションスタディーのため協力研究者を募り、共同研究の形で試験を実施した。これには、日本環境変異原学会・ほ乳類変異原性試験研究会 (MMS) の協力を得た。共同研究は3期に分けて実施された (1期:代謝活性化を必要としない14化合物、第2期:代謝活性化を必要とする17化合物、第3期:代謝活性化を必要とする27化合物)。それぞれの共同研究での参加機関、参加者を表1、2、3に示す。

7. 試験検体

第1期:代謝活性化を必要としない14化合物。試験を行った14化合物を表4に示す。14化合物には4種類の典型的遺伝毒性物質と、10種類のエームス試験陰性の染色体異常誘発物質が含まれる。

第2期:試験を行った代謝活性化を必要とする17化合物を表5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。

第3期:試験を行った代謝活性化を必要とする17化合物を表6に示す。これら化合物の中には構造が極めて類似しているにもかかわらず、齧歯類発がん性試験で試験結果が異なる18化合物が含まれる。

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. ヒト細胞試験法の評価 (第1期)

1-1. ヒト細胞の選択 (高崎)

細胞の扱いやすさ、普及性、遺伝毒性試験に対する適用性、メカニズム解析のための遺伝学的特徴から、ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 と、WTK-1 を試験用細胞として選択した。

1-2. 試験プロトコールの確立 (高崎、本間、佐々木、大内田、岡)

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ールであった。

1-3. 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 (MMS) について、25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。

1-4. 14化合物の試験結果 (本間、佐々木、大内田、岡)

14化合物に対し、ヒト型試験系でCOM、MN、TKを実施した。表7に示す。

1-5. ヒト肝S9の遺伝毒性試験への適用 (築館)

プールしたヒト肝由来S9、および高い薬物代謝活性をもつヒト肝由来S9を用いて、エームス試験、マウスリンフォーマ試験を実施したところ、ラットS9と比較し、量的、質的に反応性に違いが認められた。

2. ヒト型代謝試験系の評価 (第2期)

2-1. 試験プロトコールの確立 (高崎、本間、

佐々木、築館、大内田、岡)

ヒト型代謝系として、ヒト肝臓由来 S9 (2 種) と、対照としてラット肝由来 S9 (2 種) を用いた。ヒト由来 S9 は約 30 名のヒト肝臓から調整されたプール S9 と、生前薬物治療により活性化を受けた高活性 S9 である。ラットは誘導型、非誘導同型 S9 である。これら S9 の薬物代謝活性を表 8 に示す。代謝活性化が必要な系においても、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ールであった。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。

2-2. 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 (サイクロフォスファミド: 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) の至適濃度は 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。

2-3. 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 9 に示す。

3. ヒト型代謝試験系の評価 (第 3 期)

第 3 期 27 化合物については、全試験はまだ終了していない。小核試験は 24 化合物、TK 突然変異は 21 化合物で実施された。

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 (TK6、WTK-1) を基礎とした、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ールを検討し、バックグラウンドデータを評価した。25 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る。

試験系の検出能力をバリデーションするため 14 の染色体異常誘発物質について試験し、その結果を既存の遺伝毒性データと比較した。14 化合物には 4 種類の典型的遺伝毒性物質と、10 種類のエームス試験陰性の染色体異常誘発物質が含まれる。4 つの遺伝毒性物質は、両細胞の 3 つのエンドポイントで明らかな陽性を示したが、10 の染色体異常誘発物質の遺伝毒性は、細胞、および試験系によって異なる反応性を示した。全体的には、MN が最も感度の高いエンドポイントであり、また、WTK-1 は TK6 より陽性と判定しやすい傾向にあった。TK6 と WTK-1 の違いは、p53 の状態の違いを反映しているものと予想される。

ヒト型試験系ではヒト代謝系の導入が重要であるが、これに関しては、ヒト肝 S9 の遺伝毒性試験における特徴を検討した。ヒト培養

細胞株 WTK-1 と、ヒト肝臓由来 S9 を用いた代謝活性化系を用い、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)のプロトコールの最適試験プロトコールを検討し、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 はサイクロフォスファミド (CP) に対する反応性が著しく異なることから、ラット-ヒト、誘導-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 の濃度もそれに合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、Bentizine、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。

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。

医薬品の開発において、遺伝毒性試験は発がん性のスクリーニング試験としての利用されている。しかしながら、齧歯類発がん性試験と、遺伝毒性試験の結果に乖離が生じる場合がある。この場合は、発がん性の試験結果が優先される。発がん性陽性で、医薬品としての開発がなされなければ、安全性サイドからは問題ないが、遺伝毒性が強い陽性にもかかわらず、発がん性陰性の場合、その安全性に問題があるかもしれない。特に、ヒト型

試験において強い陽性を示す場合は、その発がん性、遺伝毒性が齧歯類細胞、動物では検出されにくいヒト特異的反応であることが考えられる。2AAがヒトにおいて強い遺伝毒性を示したことは重要であり、今後このような化合物の特徴を明らかにする必要がある。

第3期の共同研究ではこの点を明らかにするために、遺伝毒性が高いにもかかわらず齧歯類発がん性試験で異なる結果をもたらす類似化合物について試験を行った。ジアミノトルエン、フェニレンジアミン、アニシジン等の化合物が典型的な例であるが(表10)、これまでのところ、これら化合物はヒト代謝系、齧歯類代謝系とも同様に強い遺伝毒性を示した。この結果は、これら化合物の発がん性の違いには薬物代謝以外の要因が関与していること、齧歯類発がん性試験陰性でも、そのヒトに対する遺伝毒性や発がん性は否定できないことを示すものである。今後、このようなデータを整理するとともに、細胞、代謝以外の要因を取り込んだ、予見性の高いヒト型試験法の開発が望まれる。

E. 結論

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が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-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であり、研究ツールとしての利用価値も高いものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

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)

Oka, H., Ikeda, K., Yoshimura, H., Ohuchida, A., Honma, M. Relationship between p53 status and 5-fluorouracil sensitivity in 3 cell lines. *Mutat. Res.*, 606, 52-60 (2006)

2. 学会発表

本間正充 In vitro コメット試験は遺伝毒性
のエビデンスになりうるか？日本環境変異原
学会 MMS 研究会第 49 回定例会 (2006.5)

G. 知的所有権の取得状況
特になし。

表 1

Participants of the 1st phase collaborative study

No.	Laboratory	Investigators
1	An-Pyo Center	K. Masumori, M. Kikuchi
2	Bozo Research Center INC	M. Ozaki
3	Daiichi Pharmaceutical Co. Ltd	S. Nakayama
4	Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd	C. Hirogaki, H. Ohishi
5	Eisai Co. Ltd.	A. Hakura
6	FDSC, Hatano Research Institute	S. Wakuri, N. Tanaka
7	GlaxoSmithKline K.K.	T. Morita
8	Hachinohe National College of Technolog	Y.F. Sasaki
9	Japan Bioassay Research Center	M. Asakura
10	Japan Food Research Laboratories	Y. Cho, H. Sato
11	Japan Oilstuff Inspectors' Corporation	Y. Nakamura
12	Japan Tobacco Inc.	S. Sato
13	Kissei Pharmaceutical Co. Ltd	K. Kobayashi
14	Lion Corporation	Y. Yamamoto
15	Meiji Seika Kaisha Ltd	M. Nagasawa, H. Hayashi
16	Menicon Co. Ltd.	H. Sugiki
17	Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd	Y. Nakagawa
18	National Institute of Health Sciences	H. Sakamoto, T. Omori, M. Honma
19	Nippon Shinyaku Co. Ltd	Y. Yamashita
20	Olympus Optical Co. Ltd	T. Ohtsuka, K. Miura, T. Sofuni
21	Shin Nippon Biomedical Laboratories Ltd	K. Saigo
22	Taiho Pharmaceutical Co. Ltd	H. Oka, A. Ohuchida
23	Takeda Chemical Industry Ltd	T. Hashizume
24	Tanabe Seiyaku Co. Ltd	M. Aoki, N. Miyata
25	Yamanouchi Pharmaceutical Co. Ltd	A. Wakata

表 2**Participants of the 2nd phase collaborative study**

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

表 3**Participants of the 3rd phase collaborative study**

No.	Laboratory	Investigators
1	An-Pyo Center	K. Masumori
2	Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd	C. Hirogaki
3	Eisai Co. Ltd.	A. Hakura
4	FDSC, Hatano Research Institute	S. Wakuri
5	Hachinohe National College of Technolog	Y.F. Sasaki
6	Kissei Pharmaceutical Co. Ltd	K. Kobayashi
7	Mitsui Chemical Inc	J. Nishi
8	National Institute of Health Sciences	H. Sakamoto, M. Honma
9	Nihon University	H. Matsufuji
10	Sankyo Co. Ltd.	W. Takasaki, K. Hashimoto, T. Hasegawa
11	Shin Nippon Biomedical Laboratories Ltd	K. Saigo, A. Kimura, Y. Ono
12	Shionogi & Co. Ltd	K. Kondo
13	Taiho Pharmaceutical Co. Ltd	H. Oka, A. Ohuchida
14	Teijin Pharma Ltd	K. Taniguch, Y. Nakai
15	Toyama Chemical	N. Kito
16	UBE Scientific Analysis Laboratory inc.	K. Takeshita

表 4

Testing chemicals in the 1st phase collaborative study

No.	Chemical Name	BRM	Reference	CA (Str./Pol.)	Reference	MLA	Reference
1	N-Aminoethyl ethanolamine (AEEA)	-	Leung (1994)	-/+L	Unpublished paper	+	Honma et al. (1999a)
2	Bleomycin sulfate (BLM)	+	Nakamura et al. (1987)	+/	Au et al. (1980)	+	Doerr et al. (1989)
3	Camptothecin (CMP)	+	Storer et al. (1996)	+/	Mosesso et al (2000)	+	Backer et al. (1990)
4	Colchicine (COL)	-	Mortelmans et al. (1998)	+/+	Galloway et al. (1987)	+L	Honma et al. (1999b)
5	Cytocine arabinoside (Ara C)	-	Zeiger et al. (1987)	+/-	Ishidate (1987)	+	Honma et al. (1999a)
6	5-Fluorouracil (5FU)	-	Yajima et al. (1981)	+/-	Yajima et al. (1981)	+	Honma et al. (1999a)
7	Griseofulvin (GSF)	-	Wehner et al. (1978)	+/	Larizza et al. (1974)	+	Honma et al. (1999a)
8	Hexamethyl phosphoramidate (HMPP)	-	Asby et al. (1985)	+/-	Ishidate (1987)	+	Honma et al. (1999a)
9	Hydroxyurea (HU)	-	Bruce and Heddle (1979)	+/	Sherwood et al. (1988)	+	Honma et al. (1999a)
10	Methotrexate (MTX)	-	Seino et al. (1978)	+/	Mondello et al. (1984)	+	Honma et al. (1999a)
11	N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)	+	McCann et al. (1984)	+/	Walton et al. (1984)	+	Overly et al. (1996)
12	Monocrotaline (MCT)	-	Yamanaka et al. (1979)	-/	Umeda and Saito (1971)	+	Honma et al. (1999a)
13	4-Nitroquinoline 1-oxide (4NQO)	+	Nakano et al. (1982)	+/	Walton et al. (1984)	+	Overly et al. (1996)
14	Vinblastine sulfate (VBL)	-	Heddle and Bruce (1977)	+/+	Segawa et al. (1979)	+L	Honma et al. (1999b)

BRM, bacterial reverse mutation assay; CA, chromosome aberration assay; MLA, mouse lymphoma assay; Str./Pol., structural changes/polyploidy; +, positive; +L, only positive in 24 or 48h treatment; -, negative

表 5

Testing chemicals in the 2nd phase collaborative study

No.	Chemicals	IARC Group	Charactor	Genotoxicity ^{a)}		
				SAL	ABS	MLA
1	Benzo[<i>a</i>]pyrene	2A	Aromatic hydrocarbon	+		+
2	Benzidine	1	Aromatic amine	+	+	
3	2-Naphthylamine	1	Aromatic amine	+		+
4	Phenacetine	2A	Antipyretic	+	+	
5	IQ	2A	Heterocyclic amine			
6	2,4-Diaminotoluene	2B	Aromatic amine	+	+	+
7	AF-2	2B	Nitro-compound			
8	4-Aminoazobenzene	2B	Azo-compound	+	+	
9	Azobenzene	3	Azo-compound	+	-	
10	2-Aminoanthracene	nc	Aromatic amine	+		
11	1-Aminopyrene	nc	Aromatic amine			
12	Cyclophosphamide	1	Anti-cancer drug	+	+	+
13	<i>N</i> -Nitroso-di- <i>n</i> -butylamine	2B	Nitrosamine	+	+	
14	Benzene	1	Aromatic hydrocarbon	-	+	+
15	<i>N</i> -Nitrosodimethylamine	2A	Nitrosamine	+		
16	Acrylamide	2A	Vinyl-compound	-	+	+
17	Styrene	2B	Vinyl-compound	-	+	

a) from Handbook of Carcinogenic Potency and Genotoxicity Databases (Gold and Zeiger)

表 6

Testing chemicals in the 3rd phase collaborative study

No.	Chemicals	CARC.	Ames	ABS	Others	IARC
1	2,5-diaminotoluene SO4	-	+	+	MLA+, SCE+	
2	2,6-diaminotoluene 2HCl	-	+	+	MLA+, SCE+	
3	<i>p</i> -phenylenediamine HCl	-	+	+	MLA+, SCE+	
4	2-chloro- <i>p</i> -phenylenediamine SO4	-	+	+	SCE+	
5	8-hydroxyquinoline	-	+	+	MLA+, SCE+	
6	4-acetylamino fluorene	-	+	+	MLA+, SCE+	
7	1-naphthylamine	-	+	+	SCE+	
8	4-nitroanthranic acid	-	+	+	MLA+, SCE+	
9	2-aminoanthraquinone	-	+			3
10	anthracene	-	+		MLA+	
11	quercetin	-	+	+	SCE+	3
12	amaranth	-				3
13	<i>p</i> -anisidine	E	+	+	MLA+, SCE+	
14	2-acetylamino fluorene	+	+	+	MLA+, SCE+	
15	2-amino-3,4-dimethylimidazo [4,5- <i>f</i>]quinoline (MeIQ)	+				2B
16	2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5- <i>f</i>]quinoxaline (MeIQx)	+				2B
17	2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i>]pyridine (PhIP)	+				2B
18	4-chloro- <i>o</i> -phenylenediamine	+	+	+	MLA+, SCE+	
19	2-acetylamino fluorene	+	+	+	MLA+, SCE+	
20	quinoline	+	+	+	MLA+, SCE+	
21	chlorambucil	+	+			1
22	azathioprine	+	+			1
23	1-nitropyrene	+				2B
24	monocrotaline	+	+	+	MLA+	
25	aflatoxine B1	+				1
26	2-nitro- <i>p</i> -phenylenediamine	+	+	+	MLA+, SCE+	
27	<i>o</i> -anisidine	+	+		MN-	

表 7

Results of the 1st phase collaborative study

No.	Chemicals	TK		MN		COM		BR	CA	MLA
		TK6	WTK-1	TK6	WTK-1	TK6	WTK-1			
1	AEEA	-	±	±	±	+	+	-	±	±
2	BLM	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	CMP	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	COL	-	±	+	+	-	-	-	+	±
5	AraC	+	+	+	+	-	-	-	+	+
6	5FU	-	-	-	+	-	+	-	+	+
7	GSF	-	±	+	+	-	±	-	+	+
8	HMPP	-	-	-	-	-	-	-	+	+
9	HU	+	+	-	-	-	-	-	+	+
10	MTX	-	+	+	±	+	±	-	+	+
11	MNNG	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	MCT	+	+	+	+	-	-	-	-	+
13	4NQO	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	VBL	-	+	+	+	-	-	-	+	±

-: Negative +: Positive ±: Weak positive

表 8

Characteristics of human and rat S9

	Contents (pmol /mg protein)		Enzyme activity (pmol /min/mg protein)		
	Total P450	b5	Ethoxyresorufin O-deethylation ¹⁾	Chlorzoxazone ²⁾ 6-hydroxylation	Testosterone 6 β -hydroxylation ³⁾
Human S9 (pooled)	44 (1.0)	210 (1.0)	90 (1.0)	487 (1.0)	824 (1.0)
Human S9 (HLS -059)	134 (3.0)	137 (0.65)	547 (6.1)	429 (0.88)	1590 (1.9)
Normal rat S9	247 (5.6)	533 (2.5)	-16- 313 (3.5)	431 (0.89)	1176 (1.4)
Induced rat S9	715 (16)	313 (1.5)	4670 (52)	1295 (2.7)	2733 (3.3)

Each value represents specific activity for 1) CYP1A1/2, 2) CYP2E1 and 3) CYP3A, respectively. Figures in parentheses indicate the ratio relative to human S9 (pooled).

表 9

Results of the 2nd phase collaborative study

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

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

*Symbols shown indicate relative potencies with each chemical.

表 10

Carcinogens and non-carcinogens in the 3rd phase collaborative study

Carcinogen	Tumor	Non-Carcinogen
A 2,4-diaminotoluene (TR-162)	male: -, female: +(liver)	2,5-diaminotoluene (TR-126) 2,6-diaminotoluene (TR-200)
B 2-nitro- <i>p</i> -phenylenediamine (TR-169)	male: -, female: +(liver)	<i>p</i> -phenylenediamine (TR-174)
4-chloro- <i>o</i> -phenylenediamine (TR-63)	male: +(liver), female: +(liver)	2-chloro- <i>p</i> -phenylenediamine (TR113)
2,6-dichloro- <i>p</i> -phenylenediamine (TR219)	male: +(liver), female: +(liver)	4-nitro- <i>o</i> -phenylenediamine (TR-180)
C 2AAF		4AAF
D quinoline		8-hydroxyquinoline (TR-276)
E <i>o</i> -anisidine (TR-89)	male: +(bladder), female: +(bladder)	<i>p</i> -anisidine (TR-116; equivocal)
F β -naphtylamine		α -naphtylamine

TR: technical report in NTP