

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	脇田隆宇	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

研究期間 平成16年4月～平成19年3月

研究要旨

ヒト型遺伝毒性試験として、ヒト細胞、ヒト代謝系(S9)を基礎とするマルチエンドポイント(コメット試験、小核試験、TK遺伝子突然変異試験)試験系を確立し、そのバリデーションを行った。本ヒト型試験系は、ヒトにおける発がん性を適正に予測することができる。

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、岡宏昭

(4) 三共株式会社安全性研究所

高崎 渉

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。

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。

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

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

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。

このような背景の元、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重要性が求められている。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（コメント試験(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。

B. 研究方法

研究目的を達成するための分担研究者は結

果の項に示した研究を分担し、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。また、バリデーションスタディーでは日本環境変異原学会・ほ乳類変異原性試験研究会(MMS)の協力を得て、延べ57社の協力を得て実施された。

(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。

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。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。

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、バックグランドデータを評価した。

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, Phenacetone, 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。

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。

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-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

Zhan, L., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Wu, D., Zhang, L., Suzuki, T., Hayashi, M. and Honma, M. Genotoxicity of microcystine-LR

in human lymphoblastoid cells. *Mutat. Res.*, 557, 1-6 (2004)

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)

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

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

G. 知的所有権の出願・取得状況

特になし

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅱ)

平成19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