

－非臨床安全性試験に関する研究－

研究分担者：林 真（(財)食品農医薬品安全性評価センター 技術統括部長）
三森 国敏（東京農工大学 農学部 教授）
本間 正充（国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長）
平林 容子（国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長）
中江 大（東京都健康安全研究センター 参事研究員）
小野寺博志（国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官）

研究要旨

非臨床安全性試験に係わる各方法論の国際的な確立、並びにハーモナイゼーションを図ることを目的とし、共同研究による試験研究、およびそれらに関する調査研究を行った。本年度は3年計画の2年目にあたる。本年度は下記の課題の研究を遂行するため、共同研究を行うと共に、国内において班会議を開催し、かつ海外における専門家会議に参加した。

1. 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
2. 遺伝毒性試験バッテリーの最適化に関する研究
3. バイオ医薬品の新しい課題についての調査研究
4. 抗悪性腫瘍薬の非臨床安全性試験方法等の国際的標準化に関する研究
5. 光毒性試験に関する国内外の現状とガイドライン策定についての調査研究

キーワード：国際動向、有効性評価、安全性評価、ハーモナイゼーション、ICH

A. 研究目的

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

(1) 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：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 γ -globinプロモーターとTg.ACを導入したトランスジェニックマウス (Tg.ACマウス) モデル並びに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) モデルが推奨されている。今年度はこれらの遺伝子改変マウスにおける発がん感受性や発がんメカニズムに関する文献収集並びに発がん感受性に関する検討を実施し、その有用性や問題点について考察した。

(2) 遺伝毒性試験バッテリーの最適化に関する研

究：すでに10年以上経過している現行の遺伝毒性試験バッテリーの見直しと、最適化について規制側および産業界で論議が活発化している。ICHの遺伝毒性 (S2) ワーキンググループ (EWG) では、シカゴ、ブラッセル、横浜、ポートランドの会議で、科学論文や、企業のデータを基にした調査研究を行い、議論を重ね、新しい遺伝毒性試験ガイダンス案の策定を行っている。本年度は特に動物愛護の精神に基づく動物試験系の必要性を考慮し、遺伝毒性試験の一般毒性試験への統合などについて検討を行った。

- (3) バイオ医薬品の新しい課題についての調査研究：バイオ医薬品の非臨床安全性試験方法に関する現行S6ガイドラインの基本理念に大きな誤認や修正すべき点に関する指摘はないが、幾つかの項目に関して明確化と拡充が必要であると考えられる。これら項目にかかるAddendumの策定にむけて、情報収集や、関連する諸問題について検討を行い、日本のポジショニングについて協議した。
- (4) 抗悪性腫瘍薬の非臨床安全性試験方法等の国際的標準化に関する研究：抗悪性腫瘍薬の非臨床安全性試験方法については、日米両極とも正式に制定されたガイドラインが存在せず、EUに比較的古いガイダンスが存在しているのみであった。本研究ではICHにおけるS9ガイドライン策定を支援し、日本における同ガイドラインの確立に資する目的で、国内の関係組織から研究協力者の参加を得て、関連情報の収集・解析を行った。
- (5) 光毒性試験に関する国内外の現状とガイドライン策定についての調査研究：我が国における光毒性に関する非臨床安全性評価手法のガイドラインを確立するため、諸外国の情報収集、国内の実態に基づきガイドライン案を作成した。特に本年度製薬協の協力を得て国内外の製薬企業に対し非臨床光毒性試験の実態状況をアンケート方式により調査した。

B. 研究方法

本年度は、がん原性、遺伝毒性、バイオ医薬品、抗悪性腫瘍薬、および光毒性の非臨床安全性試験に

関する各々のガイドラインについて、科学的根拠を得るための研究を行った。尚、これらの作業は、これまで通り産官学の研究者の密接なる協力により行ったものである。研究成果を厚生労働行政に反映させるため、班員による定期的な会合の他に、海外での会議にも参加し、日米欧の専門家との討議を行った。

各研究課題の具体的研究方法は以下の通りである。

- (1) 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：rasH2マウス、p53^{+/+}マウス、Xpaマウス、Tg.ACマウスマウスに関する文献を調査し、これらトランスジェニックマウスの発がん特性に関連した成績をまとめた。これら成績結果から、医薬品のがん原性評価におけるトランスジェニックマウスの有用点や問題点、がん原性評価における本モデル動物の利用可能性を検討した。
- (2) 遺伝毒性試験バッテリーの最適化に関する研究：昨年度までに過去10年間の遺伝毒性試験に関する文献、および企業内部データを調査し、*in vitro*哺乳類細胞試験の検出能力評価、*in vitro*哺乳類細胞試験での最高用量の妥当性の検討、*in vivo*遺伝毒性試験のCmaxの検討を行った。これらの結果を基に、現行ガイダンスの問題点を明らかにし、改訂作業を行った。また、他のガイドラインとの整合性、特にFirst-in-Manに必要な遺伝毒性試験のバッテリーについて検討を行った。
- (3) バイオ医薬品の新しい課題についての調査研究：ポートランド会議でのS6ガイドラインのAddendum作成にかかる合意を受けて、(a)日本のポジショニングについて協議し対応案をまとめた。(b)Addendumの策定に向けた専門家ワーキンググループ (S6(R1) EWG) への参画、議論を行った。(c)S6関連する諸問題について検討の1つとしてバイオ医薬品、特に抗体医薬におけるヒト初回投与量の設定や毒性試験用量の設定に対する考え方についての情報収集を図った。
- (4) 抗悪性腫瘍薬の非臨床安全性試験方法等の国際的標準化に関する研究：S9 EWGに参画し、S9ガイドラインの策定作業に従事した。S9 EWGの作成したS9ガイドライン骨子文書およびstep 2文書

の和訳を行った。また、関連する諸問題として本年度は、非臨床試験に用いる被験物質規格について、JPMAのタスクフォースに事例情報の収集を依頼し、調査を行った。

- (5) 光毒性試験に関する国内外の現状とガイドライン策定についての調査研究：製薬協の協力を得て国内外の製薬企業に対し非臨床光毒性試験の実態状況をアンケート方式により調査した。調査標題は「光安全性評価手順の検討を目的とした基礎データ構築のための調査」とし、製薬協 基礎研究部会 一般毒性継続課題チームにより平成20年9月より10月にかけて実施した。回収された内容は事務局で会社名をコード化した後解析した。さらに、光毒性に関する最新の話題を収集した。

C. 研究結果

- (1) 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：

i) rasH2マウスに関しては、(a)発がん性検出のためのマウス皮膚モデルとしての可能性、(b)遺伝毒性発癌物質による発癌感受性促進メカニズムの検討、(c) Troglitazone (PPAR γ のアゴニスト)の発がん感受性の検討、(d)ウレタンで誘発したrasH2マウスの脾臓血管肉腫に対するトログリタゾンの弱い腫瘍プロモーション作用、(e)発がん感受性における生産施設間の比較、(f)舌癌、食道癌を誘発する4-NQO投与rasH2マウス発癌モデルの化学予防研究としての有用性、などについて報告があった。特に三森らは(c)と(d)の研究において、Troglitazoneの0、3000、6000 ppmの26週間の混餌投与実験で、雌性rasH2マウス全例において脾臓、皮膚、子宮、肺の血管肉腫を認めた。DNAマイクロアレイ、RT-PCRの解析結果から脾臓血管肉腫についてはras/MapKの活性化血管新生関連遺伝子などの高い傾向が認められ、これがrasH2マウスの脾臓血管肉腫に対する促進作用を示すことを考察した。また、ウレタンでイニシエーションしたrasH2マウスに16週間Troglitazoneを混餌投与して、脾臓血管肉腫の増強作用を調べたが、Troglitazoneの脾臓血管肉腫に対するプロモーション作用は非常に小さ

いことがわかった。

- ii) p53^{+/+}マウスに関しては、(a)発がん性評価、(b)発がん抑制・化学予防効果の検討、(c)発がんメカニズム研究、などについて報告があった。(a)ではぶどう等に含有されているがん抑制物質であるresveratrol (3, 5, 4'-trihydroxy-trans-stilbene)の発がん性を短期代替試験法(6ヶ月試験)の標準プロトコルで検討されたが、良性および悪性腫瘍の発生頻度は対照群と同等であった。また、生体異物(プラスチック片)の皮下移植による酸化的ストレスおよびNOストレスの発がんに及ぼす影響の報告もされた。プラスチック片を11週齢のp53(+/-)マウスおよびp53(+/+)マウスに移植したところ、平均46週で79% (30/38)のp53(+/-)マウスの移植片周囲にSarcomaが発生したが、p53(+/+)マウスでは平均56週で腫瘍発生率は10% (1/10)であった。異物発がんSarcomaではLOHが90% (26/29)の高頻度にみられたことから、異物がp53(+/-)マウスの皮下発がんを加速すること、それらに酸化およびNOストレスが関与すること、LOHによるp53機能の喪失が発がんの一部分に寄与している可能性などが示唆された。
- iii) Tg.ACモデルの発がん増強メカニズム解明を含めてTg.ACマウスを用いた新規の研究に関する文献情報は、旧年同様極めて少なかったが、以下の報告があった。(a)胎児期におけるヒ素の経胎盤的曝露による皮膚発がんに対する発がんリスク、(b) Dichloroacetic acid (DCA)のTg.ACマウスとp53 KOマウスにおける発がん感受性、についてである。一般に、p53 KOマウスとTg.ACマウスは肝発がんに関しては通常のげっ歯類を用いた2年間発がん性試験に比べ感受性が弱く、飲料水中に含まれる未知の化合物に対する発がん性評価への利用に関しては注意が必要であると考えられた。
- iv) Xpaマウスを用いて化学物質の発がん性を評価した報告は本年度はなかったが、Xpaマウス及びXpcマウスにおける自然発生腫瘍の相違とその要因に関する検討、長期飼育時のXpaマウスにおける自然発生腫瘍及び精巣病変に関する報告などがあった。Xpa/p53^{+/+}マウスを用いて、タバコの煙

を模したaldehydes mixtureを間欠暴露及び持続暴露させて、鼻腔腫瘍の発生を検討した結果が2008年の文献として収載されていたが、これについては昨年度報告で紹介した。

(2) 遺伝毒性試験バッテリーの最適化に関する研究：

- i) EWGでこれまでの遺伝毒性試験バッテリーの問題点を調査し、以下の主な点について改訂するガイダンスが提案された。(a)これまでの2つのガイダンスS2Aと、S2Bを一つにまとめるS2(R1)。(b) バクテリアを用いた復帰突然変異試験では、明らかな陰性の場合繰り返し試験の必要はない。(c) 哺乳類培養細胞を用いた*in vitro*試験での最高用量を1mMに低減化する。(d) 哺乳類培養細胞を用いた*in vitro*試験として小核試験を代替としてもよい。(e) 2つのバッテリー試験をオプションで選択することができる。1つはこれまで通りの哺乳類培養細胞を用いた*in vitro*試験を含むバッテリーであり(オプション1)、もう一つは含まないバッテリーである(オプション2)。ただし、後者は、2つの*in vivo*試験が要求される。(f) *In vivo*試験では試験ごとの陽性対象を設定する必要はない。

一方、*in vivo*試験の実施に当たっては動物愛護精神を重要視し、一般毒性試験に組み入れ(integration)が論議された。すなわち、動物での十分な暴露量が証明されれば、一般毒性試験に組み入れることができる。

- ii) 改訂ガイダンス(S2R1)は2008年2月にステップ2に上がり、日本語への翻訳作業が行われた。翻訳された改訂ガイダンスは厚生労働省のホームページで公開され、パブリックコメントの募集が行われた。その後、2008年6月、オレゴン州ポートランドにおいてステップ4に至るために論議を重ねた。新しいガイダンスのバッテリー試験での2つの*in vivo*試験の実施が要求されているが、第2の*in vivo*試験としては、肝臓を用いることが最も適切であることが合意された(コメント試験など)。また、動物愛護の現在の潮流に逆行することのないように、一般毒性試験に組み入れ(integration)や、複数の試験の同時実施

(combination)などが論議された。しかしながら、肝臓でのコメント試験はプロトコール上組み入れが困難であること、またその経験が少ないことから、共同研究の実施が提案された。

- iii) 一方、ガイダンスの改訂に伴う臨床試験実施のための遺伝毒性試験のタイミングについてはM3のEWGメンバーと協議を行った。また、探索的臨床試験、単回投与試験に必要な遺伝毒性試験に関しては別に定めた。

(3) バイオ医薬品の新しい課題についての調査研究：

- i) 日本のポジショニングについての協議：S6ガイドラインのAddendum作成にかかる5項目について、JPMAワーキンググループの作成による案文をもとに、それぞれの項目における日本のポジショニングについて協議し、日本側の対応案をまとめた。

①Species Selection (動物種選択)：バイオ医薬品は、ヒト生体内に存在するタンパク質の一次構造もしくは類似構造を、対応する鋳型DNAを元に生合成するものであり、ヒト型タンパク、あるいはヒト型タンパク誘導体として開発される。その結果、対象医薬品候補物質については種間交差性がなく、ヒト特異的なものであることも少なくないことから、バイオ医薬品の毒性試験では、被験物質が薬理学的/生物学的活性を示す適切な動物種(relevant animal)を選択することが重要となる。

②Study design (試験デザイン)：バイオ医薬品の非臨床安全性試験では、個々のバイオ医薬品にあわせた適切な試験デザインが求められていることから、ここでは、毒性試験のデザインにおける試験用量設定、反復投与毒性試験の試験期間および回復性試験についての留意点についてまとめた。

③Reproductive/developmental toxicity (生殖発生毒性試験)：生殖発生毒性試験における留意点としては、a) 予定される臨床適用からみた必要性の検討、b) NHPを用いた生殖発生毒性試験における問題点の検討、c) 相同タンパクや遺伝子改変

動物利用の可能性の検討、が挙げられた。

④Carcinogenicity (がん原性評価) : ここで対象としているバイオ医薬品は、タンパク製剤であり、膜を通過して細胞内へ移行することは原則としてないこと、従って、DNAや染色体に直接作用することは考えられないことから、遺伝毒性は基本的にはないこと、発がん性があるとするならば、それはEpigeneticな機構によるプロモーター作用であることが前提となる。

⑤Immunogenicity (免疫原性評価) : バイオ医薬品の投与によりヒトで生じる抗体は、その薬理作用や生物活性、副作用に何ら影響を与えないものから、内因性のタンパクを中和して重篤な副作用を示すものまで様々である。そこで、臨床においては、薬物のリスクに応じた詳細な免疫原性評価戦略が提案されている (EMA/CHMP/BMWP/14327 (2006))。

ii) ICHにおけるバイオ医薬品の非臨床安全性試験法ガイドライン (S6ガイドライン) のAddendumの策定に向けた専門家ワーキンググループへの参画 (S6(R1) EWG) : 5つの検討項目のそれぞれについて業界専門家によるプレゼンテーションなどによる最新のデータの紹介、各極の考え方の紹介とパーティ間での相違点の同定、各項目のAddendumドラフト作成グループの編成が行われた。

iii) S6(R1) EWGでの議論に関連する諸問題の検討 : 本研究グループは、S6(R1) EWGでの議論に関連する諸問題について適宜検討を進めている。本年度は、東京薬科大学薬学部 医療薬学科 臨床薬効解析学教授 山田安彦博士を招聘し、バイオ医薬品、特に抗体医薬におけるヒト初回投与量の設定や毒性試験用量の設定に対する考え方についての情報を収集した。

(4) 抗悪性腫瘍薬の非臨床安全性試験方法等の国際的標準化に関する研究 :

i) S9 EWGへの参画 : S9 EWGは、ポートランド会議においてS9ガイドライン骨子文書、ブリュッセル会議においてS9ガイドラインステップ2文書をそれぞれ作成した。S9ガイドラインステップ2

文書の要点は、以下の通りである。

- 末期または進行期がん患者の治療を目的とした低分子医薬品およびバイオ医薬品のみに適用。
 - 安全性薬理については、一般毒性試験に含めることができ、臨床試験サポートのための単独実施が不要。
 - 一般毒性については、臨床試験サポートのための無毒性量 (NOAEL) または無作用量 (NOEL) 算定不要。
 - 初回ヒト投与 (FIH) 試験サポートのための一般毒性試験における投与スケジュール例を提示。
 - 生殖発生毒性評価には一般毒性試験の生殖器毒性情報を利用。
 - 胚・胎児毒性評価は、妊婦・妊娠可能女性の潜在リスク予測に有用で、承認申請時までには留意。
 - 受胎能試験および出生前/出生後試験は不要。
 - 遺伝毒性試験は通常不要。がん原性試験も不要。
 - 免疫毒性は一般毒性試験において評価。
 - FIH試験開始用量設定において、全身投与するほとんどの剤では動物投与量を体表面積換算して算出し、アゴニストである蛋白剤では最小薬効用量 (MABEL) の使用を考慮。
 - 臨床試験において、治療期間を継続した場合に新たな毒性試験は不要だが、投与間隔を短縮する場合は単一動物種での適切な毒性試験が必要。
 - 反復投与毒性試験の最長期間はほとんどの場合3か月間で十分であるが、3ヶ月間試験の成績はphase III実施前に必要。
 - 併用投与を予定する剤については、個々の毒性が明確で、併用投与に関する薬理学的データが臨床試験実施前に提供され、特段の必要性が指摘されていなければ通常不要。
 - 小児における臨床試験のための幼若動物試験は、非臨床試験結果および成人安全性情報に基づく特段の要求がない場合、通常不要。
 - 代謝物に関する毒性試験は通常不要。
 - 不純物についてはケースバイケース対応。
- ii) S9ガイドライン文書の和訳 : 本研究グループは、S9ガイドライン骨子文書およびステップ2文書の和訳を行った。ステップ2文書和訳版は、日

本における厚生労働省によるS9ガイドラインのパブリックコメント募集に利用された。

(5) 光毒性試験に関する国内外の現状とガイドライン策定についての調査研究：

アンケート調査の結果では38社（回答率：58%）の回答を得た。回答会社中79%では何らかの方法で光安全性評価を行った経験があり、光安全性に対する評価が特殊な事例でないことが伺われた。また、評価を行った企業のうち実施あるいは委託経験の試験の種類としては光毒性試験が93%、次いで光遺伝毒性43%であり光がん原性試験は17%にとどまった。化合物に対する光毒性試験実施基準を設けていると回答した会社は7%と少なく、多くは化合物の特性をケースバイケースで考慮し光毒性試験の実施の有無を判断している。組織分布に関して実施基準を設けている例として、皮膚・眼等の組織内薬物濃度が血中濃度より高値を示した場合、あるいは投与後35日に薬物が残留し、皮膚または目いずれかの組織中濃度と血中濃度比が5以上の場合、また組織分布と体内消失速度を考慮した設定となっていた。また、自社で実施可能な光毒性試験については、回答のあった会社（19社）のうち*in vivo*ではモルモット（63%）、*in vitro*では3T3細胞を用いた（47%）光毒性試験が主で、本邦でガイドラインに掲載されている皮膚光感作性試験は58%であった。しかし、光がん原性試験については実施可能な自社施設はなかった。光安全性評価ガイドラインの必要性については92%が必要であると回答したが、必要ないとした理由には欧米ガイドラインを参照できるとの回答や非臨床試験では十分な光リスク評価は期待できないとの意見であった。現行の皮膚光感作性試験について63%は新たなガイドラインへの組み入れを希望している。一方、26%では廃止し新たな組み入れは必要ないとしている。

D. 考 察

(1) 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：

rasH2マウスにおける同系列物質の発がん特性は今後さらに検討を深められるべきものと考え、

現状の成績ではこの系列の物質に対する発がん反応性は、格段に高いという知見は得られていない。

p53⁺マウスを用いた研究からは、Resveratorolの発がん性評価に*Trp53*(+/-)マウスを用いた短期発がん性試験が適用された事例から、米国において省資源タイプの発がん性評価手法として、大規模な臨床試験を実施する前に適用可能な試験法として選択可能と考えられていることが示唆された。一方、発がんモデルとして、酸化ストレスやNO等の発がん修飾因子、発がんプロモーション作用の指標の検討、発がん抑制や化学予防効果の検討などにp53ノックアウトマウスの活用が進んでいる。

Tg.ACマウスは、通常のげっ歯類を用いるに比べ感受性が弱く、飲料水中に含まれる未知の化合物に対する発がん性評価への利用に関しては注意が必要であることが示唆された。

Xpaマウスでは、成長及び性成熟の遅延や神経障害の異常などの発生が他のNER欠損マウスに比して軽度であるが、ヒトXPの病態研究における良いモデルになると考えられる。

(2) 遺伝毒性試験バッテリーの最適化に関する研究：

改訂ガンダンスではほ乳類細胞を用いた*in vitro*試験を含まないオプションの実施が可能であるが、この場合2つ*in vivo*試験が要求される。小核試験はこれまで汎用されている試験であり、これを第一の試験とした場合、第2の試験としては異なるエンドポイントであること、造血系以外の臓器であることが重要である。現状を考えた場合、肝臓でのコメット試験が適切であると考えられた。ガイダンスではこれら試験をできるだけ一般毒性試験に組み入れ、さらなる動物の利用をできるだけ避けることを要求しているが、その経験は少ない。この問題を解決するために米国、EUの製薬メーカーが中心となり共同研究が組織され、28日間最終投与3時間後のコメット試験 (integration) のバリデーションが進行中である。一方、日本では2つの*in vivo*試験である小核試験とコメット試験を同時に行う共同研究 (combination) が実施されている。Integrationもcombinationも動物愛護に貢献できると考えられる。

このようなバリデーション試験結果を評価し2つの *in vivo* 試験（小核試験、コメット試験）が動物愛護の精神に沿って無理なく実行されることが示されれば改訂ガイダンスは2009年5月のEWG（横浜）でステップ4に上がる予定である。

(3) バイオ医薬品の新しい課題についての調査研究：

バイオ医薬品の毒性評価は、薬理学的/生物学的活性を示す動物種を用いて実施すべきであり、適切な動物種が一種存在すれば、原則その種での評価で十分と考えられる。

毒性試験の最高用量は血中濃度に基づく推定最高臨床用量の5倍程度、あるいは薬力学的反応がプラトーに達する用量の数倍を目安に設定することが適切であろう。また、科学的根拠に基づいた最高用量で毒性変化が認められない場合には、さらに高い用量で毒性評価する必要はない。長期反復投与毒性試験の試験期間は原則として6ヶ月が適切であるが、毒性の懸念の程度に応じてより短期あるいは長期の試験にすることもある。回復性試験に際しては、観察された毒性所見を薬理作用など様々な側面から考察し、試験の必要性や適切な試験デザインを決定する。

バイオ医薬品の生殖発生毒性評価において、NHPのみが適切な動物種と考えられる場合には、NHPを用いた試験が第一選択であると考えられる。

バイオ医薬品のがん原性リスクは、二次的ながん細胞を増殖させる作用に基づくものであり、周辺情報を最大限利用し、ヒトでのがん原性リスク評価を総合的に行うことが大切である。がん原性リスク評価のために非臨床試験を行う場合については、用量および時間依存性の検討、および先行バイオマーカーの探索を行うことが重要である。

(4) 抗悪性腫瘍薬の非臨床安全性試験方法等の国際的標準化に関する研究：

本年度はS9ガイドラインのステップ2到達を至上命題としたため、関連する諸問題に関する本研究グループ独自の活動が限定されたものとなった。研究結果に述べた同ガイドライン文書の和訳は日本における事業遂行に貢献できた、非臨床試験に用いる

被験物質規格に関する調査結果は同ガイドライン文書の修文に結実するなど、本研究グループ独自の活動は本年度も一定の成果を得たものと考えている。

S9ガイドラインの策定は、現在、各極において行われているパブリックコメント募集が終了次第の段階に入る。本研究グループとしては同ガイドラインの今後の策定作業と、策定後の日本における確立に、ため来年度に向けてS9 EWGへの貢献と関連する諸問題の調査・検討を続けている。

(5) 光毒性試験に関する国内外の現状とガイドライン策定についての調査研究：

欧米の光安全性評価ガイダンスをもとに、本邦においても承認申請のために光安全性評価が広く行われていることが把握できた。また本邦においても、科学的根拠に基づくガイドライン制定が求められていることもわかった。

今回の調査から意見として各局のガイドラインでは薬剤が特定波長（290-700nm）内に吸収がある場合または局所分布の有無が光毒性試験の実施基準となっているが、その基準設定・提示の希望が多くあった。今後は、この点に関して議論を行ってゆく必要があるであろう。さらに実施基準に吸収波長を有する薬剤はEMAガイドラインで推奨している *in vitro* 3T3 NRU試験の感度が高すぎる点が指摘されている。*In vivo* 試験のヒトへの外挿性試験も含め検討を要する点と思われる。また、ガイドラインの必要性は高く今後、得られた情報を基に動物愛護を考慮にいたった積極的な代替法の評価も必要と考える。

E. 結 論

(1) 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：

rasH2マウスでは、医薬品の発がん性評価を実施したものは把握できなかったが、本モデルが発がん性評価、化学子防等の検討に広く用いられている事が把握できた。p53^{-/-}マウスに関しては、医薬品についてのTrp53(+/-)マウスを用いた短期発がん性試験の利用状況については把握することができなかったが、本モデルが発がん性評価、発がん修飾研究、発がん抑制や化学子防等の検討・評価に広く応用されてい

ることを把握できた。Tg.ACマウスに関しては、ある種の化合物に対しては、通常のげっ歯類を用いた2年間がん原性試験に比べ感受性が弱い場合があり、未知の化合物に対する発がん性を検出するために遺伝子改変マウスモデルを使用することに関しては注意が必要である。Xpaマウスについては、DNA障害の蓄積に関連した病態の検討に有用と考えられ、酸化的DNA障害を除去するXPC蛋白の欠損によりXpcマウス肺腫瘍発生率がXpaマウスに比して高いと考えられることなどが示された。

(2) 遺伝毒性試験バッテリーの最適化に関する研究：

これまでのICHでの遺伝毒性試験ガイダンスでの問題点を明らかにし、ガイダンスの改訂を行った。改訂ガイダンスのバッテリー試験は、オプションとして2つが選択できる。1つはこれまで通り哺乳類培養細胞を用いた*in vitro*試験を含むバッテリーであり、もう一つは含まないバッテリーである。ただし、後者は、2つの*in vivo*試験が要求される。この*in vivo*試験としては小核試験(造血組織)、コメット試験(肝臓)が推奨される。また、これら*in vivo*試験はできるだけ一般毒性試験に組み入れるか、同時に行うことによりこれまで以上に動物愛護に配慮する。

(3) バイオ医薬品の新しい課題についての調査研究：

ICHにおけるS6ガイドラインの明確化と拡充の為

光毒性の非臨床安全性試験の実施手法等に関し、既にガイドラインを策定している諸外国の例を参考にし、日本における当該ガイドライン案の策定する準備を開始した。

(4) 抗悪性腫瘍薬の非臨床安全性試験方法等の国際的標準化に関する研究：

抗悪性腫瘍薬の非臨床安全性試験方法の国際的標準化について、日本として規制当局と製薬業界の意志を統一し、S9 EWGにおける議論に参加し、その中で発生する諸問題について検討を行い、一定の成果を得た。S9ガイドラインの策定作業は遅くとも平成22年早期におけるステップ4到達を目指して続行中であり、本研究グループは来年度以降も粛々と研究を進めていく予定である。

(5) 光毒性試験に関する国内外の現状とガイドライン策定についての調査研究：

光毒性の非臨床安全性試験の実施手法等に関し、アンケートの結果を基に本邦におけるガイドライン案の策定を開始する必要があると考える。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

各分担研究者の報告書を参照。

— 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 —

研究分担者：三森 国敏（東京農工大学農学部教授）
研究協力者：臼居 敏仁（（財）実験動物中央研究所センター長）
大西 保行（（財）実験動物中央研究所バイオメディカル部室長）
西川 秋佳（国立医薬品食品衛生研究所病理部部長）
平林 容子（国立医薬品食品衛生研究所毒性部室長）
梅村 隆志（国立医薬品食品衛生研究所病理部室長）
能美 健彦（国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部部長）
務台 衛（田辺三菱製薬（株）研究本部安全性研究所所長）
久田 茂（あすか製薬（株）開発研究センター安全性研究部部長）
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マウスでは、医薬品の発がん性評価を実施したものは把握できなかったが、本モデルが発がん性評価、化学予防等の検討に広く用いられている事が把握できた。p53^{+/+}マウスに関しては、医薬品についての*Trp53*(+/+)マウスを用いた短期発がん性試験の利用状況については把握することができなかったが、本モデルが発がん性評価、発がん修飾研究、発がん抑制や化学予防等の検討・評価に広く応用されていることを把握できた。Tg.ACマウスに関しては、ある種の化合物に対しては、通常のげっ歯類を用いた2年間がん原性試験に比べ感受性が弱い場合があり、未知の化合物に対する発がん性を検出するために遺伝子改変マウスモデルを使用することに関しては注意が必要である。XPAマウスについては、XpaマウスはDNA障害の蓄積に関連した病態の検討に有用と考えられ、Xpaマウスの特性に関連して、酸化的DNA障害を除去するXPC蛋白の欠損によりXpcマウス肺腫瘍発生率がXpaマウスに比して高いと考えられることなどが示された。

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 γ -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）モデル並びに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や発がんメカニズムに関する文献収集並びに発がん感受性に関する検討を実施し、その有用性や問題点について考察した。

B. 研究方法

rasH2マウス：発がん性短期代替法の試験モデルのひとつであるrasH2マウスを用いた短期発がん性試験に関する研究の文献報告を調査し、医薬品の発がん性評価におけるrasH2マウスの有用性、試験モデルとしての特徴および留意点についてまとめた。

p53^{+/+}マウス：発がん性短期代替試験法の試験モデルのひとつであるTrp53 (+/-)マウスを用いた短期発がん性試験に関連する研究の文献報告を調査し、医薬品の発がん性評価におけるTrp53 (+/-)マウスの有用性、試験モデルとしての特徴および留意点についてまとめた。

Tg.ACマウス：昨年度に引き続きがん原性短期代替試験法の試験モデルのひとつであるTg.ACトランスジェニックマウス (Tg.ACマウス) に関する研究状況を調査し、医薬品の発がん性評価における本モデル動物の利用可能性に関する成績をまとめた。

Xpaマウス：昨年度に引き続き、がん原性短期代替試験法のバリデーション研究に用いられているXPA^{+/+}マウス (以下Xpaマウス) 及びXPA^{+/+}/p53^{+/+}マウス (以下Xpa/p53^{+/+}マウス) に関する研究状況を文献により調査し、これらのマウスモデルにおける高発がん感受性に関わる要因について検討した。

C. 研究結果

1. rasH2マウス

発がん性検出のためのマウス皮膚モデル[1]：Tg.ACマウス、rasH2マウスおよびSENCARマウスを用いて、皮膚発ガンモデルとしての可能性を比較検討し、薬物塗布後に観察される浮腫や上皮過形成などの初期変化とその後の腫瘍化との関連についても検討した。まずTg.ACマウスとrasH2マウス、従来から皮膚がんのプロモーション作用の検討に汎用されてきたSENCARマウスの、種々の化学物質に対する反応性を比較し、各々のマウスの発がんメカニズムを文献調査した。Tg.ACマウスにVehicle formulation

(アクリル酸ポリマーをベースとし、propylene glycol、nonionic surfactants (非イオン性界面活性剤)、paraben preservative (防腐剤) などを含む基剤) を塗布したところ、数週間で浮腫が起き、上皮の肥厚も確認された。また、Vehicle formulationに加えてactive pharmaceutical ingredient (API、局所用抗生物質を含む薬物。長期試験で発がん性がないことを確認済) を塗り続けたところ、Tg.ACマウスでは用量依存性に皮膚腫瘍が形成された。次に、Vehicle formulation + APIを塗布した3系統のマウスにおいて、皮膚の初期変化が、皮膚発がんの指標として有効であるか否かを検討した。それぞれのマウスの皮膚にVehicle formulationのみ、Vehicle formulation + APIを(6~8週間)塗った場合の変化を組織学的に観察した結果、Tg.ACマウスで観察された浮腫は他の2系統よりもやや強かったものの、いずれの系統でも軽度の上皮過形成あるいは炎症像が観察された。また、上皮の厚さはいずれのマウスでも約2倍に肥厚していた。以上の結果から、発がん性のある薬物はこれら3系統のマウスにおいて炎症、過形成の原因となると考えられ、これらのマウスは同じメカニズムで薬物の発癌性を予測できる可能性が示された。

遺伝毒性発癌物質によるrasH2マウス発癌感受性促進メカニズムの検討[2]：岡村らは、遺伝毒性発がん物質である7, 12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) を雄rasH2マウス20匹のうち15匹に単回腹腔内投与した。6週間の後、無処置rasH2マウスの正常前胃、DMBA投与rasH2マウスの正常前胃、DMBA投与rasH2マウスの前胃に生じた扁平上皮癌について、マイクロアレイおよびRT-PCRにより分析した。結果を既報データである*N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) による前胃扁平上皮癌およびウレタンによる肺腺腫の分子データと比較したところ、ENUによる前胃扁平上皮癌に近いことがわかった。DMBAによる扁平上皮癌では導入ヒトHa-ras遺伝子の過剰発現が認められ、rasH2マウスの発癌感受性促進には導入遺伝子が重要な役割を果たしていることが示唆された。DMBAによる扁平上皮癌ではマウスの内因性ras遺伝子 (Ha-ras、N-ras、Ki-ras) 発現量も上昇しており、前胃扁平癌の発生を助けているものと予測

された。rasパスウェイにおける下流分子である*c-fos*、*c-myc*、*junB*、*cyclin D1*に加えて、*osteopontin*、*Cks1b*、*Tpm1*、*Reck*、*gelsolin*、*amphiregulin*等の遺伝子はこの三種の発癌物質による悪性腫瘍で発現量が変化（TPM1、*Reck*、*Gelsolin*はDown regulate、他はUp regulate）しており、*rasH2*マウスにおける腫瘍の成長を補助しているものと考えられた。

rasH2マウスにおけるTroglitazone (PPAR γ のアゴニスト)の発がん感受性の検討[3]：*rasH2*マウスはPPAR α アゴニストのような非遺伝毒性物質についても感受性を示すことが報告されている。米国FDAはPPAR γ ないし α/γ アゴニストの発がん感受性はP53(+/-)マウスでは評価出来ないことからこれらの医薬品の発がん性評価には従来のラットやマウスを用いた2年間がん原性試験のデータの提出を要求するという規制を開始した。このような背景のもと、本研究ではTroglitazoneの*rasH2*マウスにおける感受性を検討する為に、0、3000、6000 ppmの濃度で26週間の混餌投与実験を行った。その結果、投与群の雌性*rasH2*マウス全例において脾臓、皮膚、子宮、肺の血管肉腫が認められた。6000ppm投与群の雌性*rasH2*マウスの脾臓血管肉腫とノーマルの脾臓よりオリゴヌクレオチドマイクロアレイ解析を行った。Ras/MAPK pathway activation、angiogenesis、cell cycleなどのいくつかの遺伝子でup-regulatedが確認された。アレイのデータを検証するためにup-regulateしていたいくつかの遺伝子についてRT-PCRが実施したところ、血管系腫瘍が6000ppm投与群で誘発された。脾臓血管肉腫についての遺伝子解析ではras/MapKの活性化血管新生関連遺伝子などの高い傾向が認められた。Troglitazoneは*rasH2*マウスの脾臓血管肉腫に対して、促進作用を示すことが考察された。

ウレタンで誘発した*rasH2*マウスの脾臓血管肉腫に対するトログリタゾンの弱い腫瘍プロモーション作用[4]：Troglitazone (TRG)の腫瘍プロモーション作用を検討することを目的として、ウレタン (UR)でイニシエーションした*rasH2*マウスに16週間TRGを混餌投与して、脾臓血管肉腫の増強作用を調べた。UR単独群、UR+TRG群では投与後9ないし13週後に肺腺腫あるいは脾臓血管肉腫によって動物が死亡し

たため、16週後に全動物を剖検した。その結果、UR単独群の脾臓重量(体重比)は無処置群よりも有意に増加したが、UR+TRG群とは差がなかった。また、UR単独群とUR+TRG群では全ての個体で脾臓血管肉腫と肺腺腫が観察され、無処置群よりも有意に増加していたが、UR単独群とUR+TRG群間では差がなかった。脾臓血管肉腫の免疫染色によって、PCNA陽性細胞の数を比較したところ、UR単独群とUR+TRG群のPCNA陽性細胞数は無処置群よりも有意に増加しており、UR+TRG群のPCNA陽性細胞がUR単独群よりも多かったが両者間の差は有意ではなかった。血管新生に関与するVEGFR1 (vascular endothelial growth factor receptor 1)、VEGF-C、VEGFR2およびTie2遺伝子、MAPKカスケード活性化に関与する*c-fos*遺伝子、細胞周期 (cell cycle) に関与する*cyclin D1*遺伝子などは、UR単独群およびUR-TRG群で、無処置群よりも有意に高かった。しかし、UR単独群とUR-TRG群間で有意な差があったのはTie2のみであった。UR+TRG群でTie2が多く発現していたことから、ウレタンでイニシエーションされた*rasH2*マウスの脾臓血管肉腫は、TRG投与によって若干増強されたものと思われた。しかし、ウレタンによって80%のマウスで脾臓と肺の腫瘍が誘発されることがすでに報告されていることから、TRGの血管腫瘍プロモーション作用を検討するには、今回の実験ではウレタンのイニシエーション作用が強すぎたものと考えられた。今回の実験条件では*rasH2*マウスにおけるTRGの脾臓血管肉腫に対するプロモーション作用は非常に小さいことがわかった。この点において、遺伝子改変動物はPPAR γ アゴニストの発がん性試験には利用できないというFDAの主張を裏付ける結果となったが、*rasH2*マウスでのPPARアゴニストの実験をもっと実施する必要があると考えられた。また、血管新生に関連する遺伝子の一部が*rasH2*マウスにおけるTRGの脾臓血管肉腫のプロモーションに関与している可能性が示された。

*rasH2*マウスの発がん感受性における生産施設間の比較[5]：短期発がん性試験に用いる*rasH2*マウスは日本クレア社および米国のTaconic社の2ヶ所の施設で生産され供給されている。今回、両社施設生

産動物の発がん感受性を比較するために、N-methyl-nitrosourea (MNU)を75mg/kg腹腔内に単回投与した。その結果、MNU投与群では、投与開始9-12週目から誘発腫瘍による死亡個体あるいは切迫屠殺する個体が見られ、試験終了時の生存率は両施設とも6.7%であった。溶媒群において、腫瘍性変化として肺、脾臓、前胃、皮膚に良性腫瘍が散見された。非腫瘍性変化として、大腿筋に骨格筋症が両施設生産動物において高率に認められたが、両施設間に差は認められなかった。MNU投与群においては、腫瘍性変化として前胃乳頭腫、悪性リンパ腫がクレア産・タコニック産ともに頻発して見られたが、両施設間で差は認められなかった。その他皮膚腫瘍や肺腫瘍の発生率にも両施設間の差は認められなかった。また、クレア生産マウスに認められた腎臓、脾臓の血管腫はrasH2マウスにおける自然発生腫瘍の頻度の範囲内であった。MNU投与群に見られた前胃潰瘍は、乳頭腫、扁平上皮癌に起因する二次的变化と考えられた。また、レトロスペクティブな見地から、rasH2マウスの発がん感受性は開発から20年経過した現在も高い再現性を持って維持されていると考えられた。

舌癌、食道癌を誘発する4-NQO投与rasH2マウス発癌モデルの化学予防研究としての有用性[6]：舌癌および食道癌を誘発する4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO)を20ppm飲料水に入れ、rasH2マウスおよびnon-tgマウスに2週、4週、6週および8週間飲ませ、24週後に剖検をした。その結果、4-NQOを8週間与えた群ではrasH2マウスの舌に100%、食道に60%の腫瘍が発現した。その他の群でも舌と食道に腫瘍、新生物、形成障害の病変が発生し、前胃の腫瘍も1例に認められた。Non-tgマウスには腫瘍や病変は認められなかった。また、免疫組織化学的検査で病変部より高率にEPレセプターが観察された。正常な扁平上皮細胞には観察されなかった。この結果をもとに、化学予防研究への応用を試みた。4-NQO入りの飲料水を8週間飲ませた後、1週間後から高コレステロール血症の治療薬pitavastatinをdose別に混合した飼料を15週間与え、24週後に剖検した。その結果、pitavastatin混合飼料の摂取により、pitavastatin

を与えなかったgroupと比較し、舌および食道の腫瘍発生率は有意に下がった。また、PCNA、cyclin D1、EPレセプターの発現も有意に低下した。本研究でrasH2マウスは4-NQOの発癌誘発、pitavastatinによる腫瘍発生率低下の研究に有効であり、上部消化器官の前臨床化学予防研究の発癌モデル候補として有用性が証明された。

2. p53^{+/+}マウス

p53ノックアウトマウスを用いた発がん性評価：Hornらはp53(+/-)マウスを用い、ぶどう等に含有されているがん抑制物質であるresveratrol (3, 5, 4'-trihydroxy-trans-stilbene)の発がん性を短期代替試験法(6ヶ月試験)の標準プロトコールで検討した(resveratrol: 0, 1000, 2000, 4000 mg/kg/day、陽性対照物質p-cresidine: 400mg/kg/day) [7]。生存率は、resveratrol低用量群に影響はなかったが、中および高用量群では被験物質の消化管への固着に起因する生存率の低下がみられた。生存例では、体重増加、摂餌、症状に被験物質の影響はみられなかったが、用量依存的に肝重量の増加と血清コレステロールの増加が雌雄にみられた。また、軽度な貧血が高用量群の雄のみに観察された。病理組織学的にはresveratrol群に水腎症と膀胱上皮過形成がみられたが、良性および悪性腫瘍の発生頻度は対照群と同等であった。一方、p-cresidine群では膀胱がんが雌雄で増加した。これらの成績から、resveratrolを最大耐量まで投与した条件で発がん性はないものと結論した。

Tazawaらはp53(+/-)マウスを用い、生体異物(プラスチック片)の皮下移植による酸化的ストレスおよびNOストレスの発がんに及ぼす影響を検討した[8]。10x5x1mmのプラスチック片を11週齢のp53(+/-)マウスおよびp53(+/+)マウスに移植したところ、平均46週で79% (30/38)のp53(+/-)マウスの移植片周囲にSarcomaが発生したが、p53(+/+)マウスでは平均56週で腫瘍発生率は10% (1/10)であった。偽手術群ではSarcomaの発生はみられなかった。また、20% (2/10)の非移植p53(+/-)マウスでも77, 81および84週時に計3ヶ所にSarcomaが発生した。これらのSarcomaについて酸化およびNOストレスマーカーの

免疫組織化学染色を実施したところ、異物発がんのSarcomaの方が自然発生Sarcomaに比べ、腫瘍細胞および周囲の炎症細胞の染色強度が高かった。さらには、異物発がんSarcomaではLOHが90% (26/29)の高頻度にみられた。これらの成績は、異物がp53(+/-)マウスの皮下発がんを加速すること、それらに酸化およびNOストレスが関与することを示しており、LOHによるp53機能の喪失も発がんの一部分に寄与している可能性も示唆された。

ClarkらはMicrocystin-LR (MCLR) の発がんプロモーション作用をp53(-/-)マウスを用いて検討した[9]。p53(-/-)マウスと対照の野生型マウスにMCLRを28日間投与したところ、p53(-/-)マウスの肝臓で過形成や異形成、Ki-67や細胞分裂指標であるリン酸化ヒストンH3の免疫染色強度の増加がみられた。p53(-/-)マウスの肝臓の発現遺伝子解析では、細胞回転制御や細胞増殖に関連する遺伝子の発現増加が対照群にくらべ顕著であった。これらの成績は、p53による細胞回転の制御が、MCLRの致死量近傍用量での慢性投与による発がんプロモーションに重要であることが示唆された。2006年10月以降に公表された論文では、p53ノックアウトマウスを用いた化学物質の発がん性評価に関する文献情報は見当たらなかった。一方、p53ノックアウトマウスを用いた短期発がん性試験の成績解釈に有用と思われる報告がみられた。

p53ノックアウトマウスを用いた発がん抑制・化学予防効果の検討: Mukawaらは大腸炎誘発発がんへのCox2阻害剤であるetodolacの抑制効果についてp53(-/-)マウスを用いて検討した[10]。p53(-/-)マウスはデキストラン硫酸 (DSS) により大腸炎を惹起させ、etodolacの有無による大腸腫瘍の頻度を比較した。DSS+etodolacでの腫瘍発生頻度は84%であったのに対し、DSSのみでは100%、etodolacのみおよび無処置対照では腫瘍発生はみられなかった。腫瘍個数(マウス)でもDSS+etodolacでは1.29個に対し、DSSのみでは3.0個と抑制効果は有意 ($p < 0.01$)であった。大腸潰瘍スコアでは両群に差はなかった。これらの成績はetodolacの大腸発がんの化学予防効果を示唆するものと考えられた。

Huらはアゾキシメタン (AOM) 誘発大腸発がん

に対するsphingomyelin (SM) の化学予防効果をp53(+/-)マウスとp53(+/+)マウスの比較により検討した[11]。両マウスに0.1%SMを4週間混餌投与した後、AOMを単回投与した6時間後に屠殺した。SMを投与した両マウスで、SMase活性上昇と有意な細胞増殖抑制 ($P < 0.05$) がみられたがアポトーシス指標への効果はなかった。また、両マウスで腫瘍発生抑制傾向はみられなかった。

Dunphyらは、エストロゲン (E) とプロゲステロン (P) の乳腺発がんへの抑制効果について、p53(+/+)、p53(+/-)およびp53(-/-)マウスを用いた比較検討を行い、E+P処置の乳腺発がん抑制効果、電離放射線誘発アポトーシスの頻度はE+P処置で高くなること、その中でもp53(+/+) > p53(+/-) > p53(-/-)の順であること、雌p53(+/-)マウスの乳腺発がんは未経産マウスの方が経産マウスより早く生じること等を明らかにした[12]。

p53ノックアウトマウスを用いた発がんメカニズム研究: Aichlerらはp53(+/-)マウスにTGF α を過剰発現させた膵臓発がんモデルマウス (Ela-TGF- α p53(+/-)マウス) を用い、セレン欠乏と膵臓発がんについて検討した[13]。セレン欠乏は膵臓腫瘍の頻度や発生時期には影響しなかったが、セレン欠乏食群で発生した腫瘍の分化度は通常食にくらべて有意 ($p > 0.0005$) に低く、食餌中のセレン濃度の発がんへの新たな影響が明らかにされた。

ZhangらはAurora Aキナーゼの発がん過程 (特に悪性化) への影響を検討するためにp53(+/+)またはp53(-/-)マウスにAurora Aキナーゼをコンディショナルに過剰発現させたマウスモデルを用いた[14]。これらマウス由来のprimary mouse embryonic fibroblasts (MEFs) の多核化はAurora A発現下で増加した。in vivoでもAurora A発現下でヒトのatypical ductal hyperplasiaに類似した前がん性変化が増加したががん化には至らず、同時に細胞の老化とp16の発現増加がみられた。これらの成績は、本実験モデル条件での乳腺発がんにおいて、Aurora Aの過剰発現のみでは悪性化進展に不十分であり、p53とp16の両者が発がん抑制に深く関わっていることが示唆された。

TNFは発がん促進的に働くだけでなく、条件によっては抑制作用があることが知られている。一方、ヒトでは抗TNF療法の稀な合併症としてリンパ腫発生が知られている。Kuprashらは、TNFとTNF関連するサイトカインであるlymphotoxin α (LT) の自然発生発がんへの影響を検討するため、p53ノックアウトマウス (p53(+/-)およびp53(-/-)) とTNF、LT、TNFレセプターおよびTNF/LTとのダブルノックアウトマウスを用いた検討を行った[15]。その結果、これらのダブルノックアウトマウスと対照のp53ノックアウトマウスの間に生存率や発現腫瘍スペクトラムの顕著な変化はみられず、本実験系ではリンパ腫の発生とTNFの発現抑制の間には関連性は見出されなかった。

3. Tg.ACマウス

Tg.ACモデルの発がん増強メカニズム解明を含めてTg.ACマウスを用いた新規の研究に関する文献情報は、旧年同様極めて少なかった。

胎児期におけるヒ素の経胎盤的曝露による皮膚発がんに対する発がんリスク[16]：皮膚発がんに対して、ヒ素は、皮膚発がんにおける重要な標的である皮膚幹細胞 (KSC) の分化を阻止することによって細胞増殖に影響を及ぼすことが*in vitro* で明らかとなっていることから、v-Ha-rasの活性化を介して皮膚発がん感受性のあるTg.ACマウスにヒ素を経胎盤的に曝露し、その際の皮膚発がんへの影響を検討した。妊娠したTg.ACマウスに亜ヒ酸ナトリウム (NaAsO₂) を0 (対照)、42.5あるいは85ppmの濃度で飲料水に混じ、妊娠8-18日の間投与した。生まれた新生児は生後4週で離乳した後、TPA 2.0 $\mu\text{g}/\text{head}$ あるいは媒体のアセトンのみを週二回、36週間背部皮膚に投与した。TPA単独投与では皮膚乳頭種と扁平上皮癌 (SCC) の発生がみられた。このTPA単独群に比べ、胎児期亜ヒ酸に曝露されたマウスでは、SCCの頻度および数は亜ヒ酸濃度に依存して有意に増加した。TPA前に亜ヒ酸を投与した個体では真皮や筋層への腫瘍細胞の浸潤や細胞分裂像の増加が認められ悪性度が高く、細胞増殖遺伝子*cyclin D*の発現増加、腫瘍抑制遺伝子*p16*の発現減少が認められ

た。TPA単独投与で発生したSCCにおけるv-Ha-rasのm-RNAの発現量は、対照群の皮膚のそれに比べ約4.5倍であったが、亜ヒ酸を胎児期に投与されたTPA投与群では約14倍も高かった。また、TPA単独に比べ、ヒ素+TPA投与の個体の乳頭種及びSCCともv-Ha-ras遺伝子の発現量は約3倍であった。Tg.ACマウスの皮膚発がん過程において、皮膚の幹細胞におけるv-Ha-ras導入遺伝子の活性化は非常に重要な事象であり、ヒ素+TPA投与群の個体に発生した腫瘍のv-Ha-rasの過剰発現は腫瘍反応の増加に関与していることを示唆している。また、KSCの特異的なマーカーである*CD34* m-RNAの発現はTPA単独群に比べ、ヒ素+TPA投与の乳頭種及びSCCで著明に増加した。また、皮膚幹細胞増殖に関する重要な遺伝子である*Rac1*の発現量もTPA単独群に比べ、ヒ素+TPA投与の乳頭種及びSCCでは約3.5倍に増加した。*in vitro*試験で、SCCにおける*Rac1*遺伝子の過剰発現はSCC細胞の悪性形質の維持に重要であることが既に明らかになっており、本試験でも皮膚腫瘍中*CD34*と*Rac1*タンパクでの発現は、mRNAの発現と同様に、TPA単独群の腫瘍中の発現に比べ、ヒ素+TPA投与群に発生した乳頭種とSCCでは、より著明に発現していた。以上より、胎児期におけるヒ素の経胎盤的曝露は、ヒ素それ自体は皮膚腫瘍発生に関して作用を示さないが、皮膚幹細胞のシグナル発現や細胞増殖動態を歪めることによって皮膚腫瘍発現を促進し、胎児期のヒ素曝露による成人期での皮膚発がんの標的は皮膚幹細胞であることが示唆された。

Dichloroacetic acid (DCA) のTg.ACマウスとp53 KOマウスにおける発がん感受性[17]：Dichloroacetic acid (DCA) は飲料水消毒薬中の不純物の一つであり、マウス及びラットの2年間のがん原性試験で肝腫瘍が発生することが分かっているが、今回Tg.AC及びp53 KOマウスモデルを用いて試験を実施した。飲水投与試験として、雌雄の7-8週齢のTg.ACマウスあるいは6-7週齢のp53 KOマウスを用い、DCAの0、500、1000あるいは2000 mg/Lの濃度の水を26あるいは41週間、飲料水として与えた。経皮投与試験として、雌雄の6週齢のTg.ACマウスを用い、DCAの0、31.25、125あるいは500 mg/kgを皮膚に26ある

いは39週間（5回/週）塗布し、対照群には媒体（水：アセトン）を同様に投与した。その結果、飲水投与試験では、Tg.ACマウスの1000 mg/Lの雄でのみ肺腺腫の増加が認められた。p53 KOマウスでは、2000 mg/Lまで発がん性を示唆する所見は認められなかった。Tg.ACマウスの経皮投与試験では、39週投与群の500 mg/kgの雌雄で皮膚乳頭腫の増加が認められたが、26週投与群では認められなかった。NTP Report中では、結論として「DCAはp53 KOマウスでは腫瘍発生は認められず、Tg.ACマウスの試験でのみ弱陽性の反応が得られた。DCAはげっ歯類を用いた他の複数の長期試験で発がん性が認められており、これらの遺伝子改変マウスはある種の発がん物質の検出に対しては感受性がない。」としている[18]。以上のことから、p53 KOマウスとTg.ACマウスは肝発がんに関しては通常のげっ歯類を用いた2年間発がん性試験に比べ感受性が弱く、飲料水中に含まれる未知の化合物に対する発がん性評価への利用に関しては注意が必要である。

4. Xpaマウス

本年度は、Xpaマウスを用いて化学物質の発がん性を評価した報告はなかったが、Xpaマウス及びXpcマウスにおける自然発生腫瘍の相違とその要因に関する検討、長期飼育時のXpaマウスにおける自然発生腫瘍及び精巣病変に関する報告など、があった。Xpa/p53^{-/-}マウスを用いて、タバコの煙を模したaldehydes mixtureを間欠暴露及び持続暴露させて、鼻腔腫瘍の発生を検討した結果[19]が2008年の文献として記載されていたが、これについては昨年度報告で紹介した。

Xpa及びXpcマウスの自然発生腫瘍の相違[20]：スクレオチド除去修復（NER）の二つの経路（global genome repair：GGR及びtranscription-coupled repair：TCR）が欠損したXpaマウス、GGRのみが欠損したXpcマウス、及び野生型マウスを生涯飼育したところ、Xpcマウスの生存率が野生型マウスに比して有意に低下した。両マウスの腫瘍発生スペクトルは異なり、Xpcマウスで肺腫瘍の発生率が増加し、肺における遺伝子変異の頻度も増加した。しかし、両マ

ウスにおける肝細胞腫瘍の発生率には差が認められず、肝臓における遺伝子変異の発生頻度も同程度であった。一方、これらのマウスの胎児線維芽細胞を培養して、酸素に対する感受性を検討したところ、Xpcマウスの胎児線維芽細胞が酸素に対して高い感受性を示した。

Xpaマウスの加齢に伴う自然発生腫瘍と精巣病変[21]：XPA遺伝子のエクソン4をノックアウトしたCBA/C57BL6/CD-1をバックグラウンドとするXpaマウスを長期間飼育して、自然発生病変を検討した。Xpaマウスでは、高度の精子形成異常を伴う精細管萎縮が6ヶ月齢以降に発生し、12ヶ月齢以降には自然発生腫瘍が野生型マウスに比して増加し、肺腺癌、血管肉腫、悪性リンパ腫、扁平上皮癌及び腎細胞癌等の悪性腫瘍が発生した。Xpaマウスの大脳重量も低値を示したが、行動異常や組織学的変化は認められなかった。

Xpaマウス由来の線維芽細胞及びES細胞におけるDNA修復機序の相違[22]：未分化細胞及び分化細胞におけるDNA修復機序の相違を検討するために、TCRが欠損したCsbマウス、GGRが欠損したXpcマウス、並びにGGR及びTCRが欠損したXpaマウス由来の線維芽細胞及びES細胞を用いて、UV照射によるアポトーシス誘発や遺伝子変異蓄積における差異が検討された。アポトーシス誘発に関しては、Xpa及びCsbマウス由来の線維芽細胞がXpcマウス由来の線維芽細胞に比してUV感受性が高く、Xpcマウス由来の線維芽細胞におけるUV感受性は野生型マウスと同等のレベルであった。一方、ES細胞では、Xpa及びXpcマウス由来のES細胞におけるUV感受性が高く、Csbマウス由来のES細胞におけるUV感受性は野生型マウスと同等のレベルであった。さらに、Xpa及びXpcマウス由来のES細胞には、UV照射による明らかなS期の遅延が認められたが、Csbマウス由来のES細胞ではUV照射によるS期の遅延は明らかではなかった。一方、CsbマウスのES細胞では、他のマウス由来のES細胞に比して、UV照射により遺伝子変異が高率に誘発された。

発がん性の検討以外の目的でXpaマウスが使用された報告[23]：Xpaマウス及び野生型マウスを用いて、

Cisplatinの副作用の一つである末梢神経障害（peripheral polyneuropathy）発生の程度と末梢神経組織（後根神経節細胞）におけるplatinum-DNA附加体の蓄積量との関連性が示された。

D. 考察

rasH2マウスを用いた研究では、今年度報告した6編に前年度までの文献を含めてみわたすと、(1)発がんメカニズムの検討、(2)PRARアゴニストに対する発がん性の検討、(3)化学予防を含む個別の臓器がんモデルとしての利用が、このモデルにおける研究の方向であるように見受けられる。rasH2マウスにおける同系列物質の発がん特性は今後さらに検討を深められるべきものと考え、現状の成績ではこの系列の物質に対する発がん反応性は、格段に高いという知見は得られていない。

p53^{-/-}マウスを用いた研究からは、Resveratorolの発がん性評価に*Trp53*(+/+)マウスを用いた短期発がん性試験が適用された事例から、米国において省資源タイプの発がん性評価手法として、大規模な臨床試験を実施する前に適用可能な試験法として選択可能と考えられていることが示唆された。一方、発がんモデルとして、酸化ストレスやNO等の発がん修飾因子、発がんプロモーション作用の指標の検討、発がん抑制や化学予防効果の検討などにp53ノックアウトマウスの活用が進んでいる。これは、一般的な動物実験系としての認知度が上がってきたことを示唆するものと思われる。p53ノックアウトマウスと別の遺伝子のダブルノックアウトマウスでの研究報告も例年どおりみられた。これらは化学合成の低分子医薬品の発がん性評価と関連は薄い、RNAi等の核酸医薬やバイオロジクス創薬においては、創薬標的遺伝子とp53のダブルノックアウトマウスを活用も発がんリスク評価のツールとして、将来的には選択肢の中に考慮する必要がでてくる可能性もあると思われる。

Tg.ACマウスを用いた研究からは、胎児期におけるヒ素の経胎盤的曝露による皮膚発がんに対する発がんリスクに関して、ヒ素それ自体は皮膚腫瘍発生に関して作用を示さないものの、皮膚幹細胞のシグ

ナル発現や細胞増殖動態を歪めることによって皮膚腫瘍発現を促進し、胎児期のヒ素曝露による成人期での皮膚発がんの標的には皮膚幹細胞であることが示唆された。また、飲料水の消毒薬由来の不純物の一つで、マウス及びラットの2年間のがん原性試験で肝腫瘍が発生することが分かっているDichloroacetic acid (DCA) について、Tg.ACマウスとp53 KOマウスを用いて試験を実施した結果、いずれのモデルにおいても肝発がん性は示されず、通常のげっ歯類を用いた2年間発がん性試験に比べ感受性が弱く、飲料水中に含まれる未知の化合物に対する発がん性評価への利用に関しては注意が必要であることが示唆された。

Xpaマウスについては、GGR及びTCRが欠損したXpaマウス、GGRが欠損したXpcマウス、並びにこれらの野生型マウスを生涯飼育し、肝細胞腫瘍発生率及び肝臓における遺伝子変異の頻度を比較した結果、これらのマウスにおける差異は認められなかった。しかし、Xpcマウスにおける肺腫瘍発生率は他のマウスに比して高く、当該マウスの胎児線維芽細胞は他のマウスに比して酸素に対する高い感受性を示した。XPC蛋白は酸化的DNA傷害の除去に関与すると言われ、XPC蛋白が欠損したXpcマウスの肺において酸化的DNA障害による遺伝子変異が蓄積し、Xpaマウスに比して肺腫瘍の発生率が増加したと考えられた。XPA遺伝子のエクソン4をノックアウトしたCBA/C57BL6/CD-1をバックグラウンドとするXpaマウスを長期間飼育したところ、野生型マウスに比して早期から腫瘍発生率が増加し、肺腺癌、血管肉腫、腎細胞癌等の悪性腫瘍が発生した。XPA遺伝子のエクソン4及び5をノックアウトしたC57BL6をバックグラウンドとしたXpaマウスを長期間飼育した場合には、肺腺腫及び肝細胞腺腫等の良性腫瘍の発生率が増加することが報告されており、これらの2種類のXpaマウスにおける自然発生腫瘍の相違はバックグラウンドとなるマウス系統の腫瘍発生傾向を反映したものと考えられた。Xpaマウスでは、成長及び性成熟の遅延や神経障害の異常などの発生が他のNER欠損マウスに比して軽度であるが、ヒトXPの病態研究における良いモデルになると考えられる。しかし、

Xpaマウスがヌクレオチド除去修復の欠損による発がん感受性の増加に加えて、ヒトXP患者に類似した病態を誘発する可能性を有することは、短期発癌モデルとしての適性に疑問が持たれた。色素乾皮症(XP)、Cockayne症候群や硫黄欠乏性毛髪発育異常症等の疾患では老化促進や神経障害が発生し、NER欠損によるDNA障害の蓄積やそれに伴うアポトーシスの増加が病態に関連すると言われている[24、25]。Xpaマウスを含む各種のNER欠損マウスはこれらの病態のモデルとして検討されているが、Cisplatinによる神経障害がDNA障害の蓄積と関連することがXpaマウスを用いて示され、XpaマウスはDNA障害の蓄積に関連した病態の検討に有用と考えられた。

E. 結論

rasH2マウスについては、本年度の文献調査では、医薬品（候補物質）の発がん性評価を実施したものは把握できなかったが、本モデルが発がん性評価、化学子防等の検討に広く用いられている事が把握できた。

p53^{+/+}マウスモデルに関しては、本年度の文献調査では、医薬品についての*Trp53*(+/+)マウスを用いた短期発がん性試験の利用状況については把握することができなかったが、本モデルが発がん性評価、発がん修飾因子研究、発がん抑制や化学子防等の検討・評価に広く応用されていることを把握できた。

Tg.ACマウスについては、ヒ素の胎児期における経胎盤的曝露による皮膚発がんリスクに関する機序と標的の解明に関して、Tg.ACマウスが用いられた。また、Tg.ACマウスやp53 KOマウスはある種の化合物に対しては、通常のげっ歯類を用いた2年間がん原性試験に比べ感受性が弱い場合があり、未知の化合物に対する発がん性を検出するために遺伝子改変マウスモデルを使用することに関しては注意が必要である。

Xpaマウスモデルについては、XpaマウスはむしろDNA障害の蓄積に関連した病態の検討に有用と考えられ、Xpaマウスの特性に関連して、以下の情報が得られた。すなわち、1) 酸化的DNA障害を除去

するXPC蛋白の欠損によりXpcマウス肺腫瘍発生率がXpaマウスに比して高いと考えられること、2) Xpaマウスの自然発生腫瘍は遺伝的背景の影響を受けること、3) 長期飼育により精巣病変や大脳重量の低値が発生しヒトXP患者の病態との類似性がみられること、4) ES細胞及び線維芽細胞ではDNA修復の機序が異なるが、Xpaマウス由来のES細胞及び線維芽細胞はいずれもUV感受性が高くUVにより著しいアポトーシスが誘発されることが示された。

参考文献

- 1) Lynch D, Svoboda J, Putta S, Hofland HE, Chern WH, Hansen LA. : Mouse skin models for carcinogenic hazard identification: Utilities and Challenges. *Toxicol. Pathol.*, 35: 853-864 (2007).
- 2) Okamura M, Unami A, Moto M, Muguruma M, Ito T, Jin M, Oishi Y, Kashida Y, Mitsumori K. The possible mechanism of enhanced carcinogenesis induced by genotoxic carcinogens in rasH2 mice. *Cancer letter*, 245: 321-330, (2007).
- 3) Jin M, Takahashi M, Moto M, Muguruma M, Ito K, Watanabe K, Kenmochi Y, Kono T, Hasumi K, Mitsumori K. : Carcinogenic susceptibility of rasH2 mice to troglitazone. *Arch. Toxicol.*, 81: 883-894, (2007).
- 4) Jin M, Matsumoto S, Dewa Y, Nishimura J, Saekusa Y, Hasumi K, Mitsumori K. : Extremely weak tumor-promoting effect of troglitazone on splenic hemangiosarcomas in rasH2 mice induced by urethane. *Arch. Toxicol.*, 82: 771-777, (2008).
- 5) Machida K, Urano K, Yoshimura M, Tsutsumi H, Nomura T, Usui T. : Carcinogenic comparative study on rasH2 mice produced by two breeding facilities. *J Toxicol. Sci.*, 33: 493-501, (2008).
- 6) Miyamoto S, Yasui Y, Kim M, Sugie S, Murakami A, Ishigamori-Suzuki R, Tanaka T. : A novel rasH2 mouse carcinogenesis model that highly susceptible to 4-NQO-induced tongue and esophageal corcinogenesis is useful for preclinical chemoprevention studies. *Carcinogenesis*, 29:

- 418-426, (2008).
- 7) Horn TL, Cwik MJ, Morrissey RL, Kapetanovic I, Crowell JA, Booth TD, McCormick DL. : Oncogenicity evaluation of resveratrol in p53^{+/-} (p53 knockout) mice. *Food Chem. Toxicol.*: 45: 55-63 (2007).
 - 8) Tazawa H, Tatemichi M, Sawa T, Gilbert I, Ma N, Hiraku Y, Donehower LA, Ohgaki H, Kawanishi S, Ohshima H. : Oxidative and nitrate stress caused by subcutaneous implantation of a foreign body accelerates sarcoma development in Trp53^{+/-} mice. *Carcinogenesis* 28: 191-198 (2007).
 - 9) Clark SP, Ryan TP, Searfoss GH, Davis MA, Hooser SB. : Chronic microcystin exposure induces hepatocytes proliferation with increased expression of mitotic and cyclin-associated genes in P53-deficient mice. *Toxicol. Pathol.* 36: 190-203 (2008).
 - 10) Mukawa K, Fujii S, Tominaga K, Yoshitake N, Abe A, Kono T, Sekikawa A, Fukui H, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Ono Y, Shinoda M, Hiraishi H, Fujimori T. : Inhibitory effects of the cyclooxygenase-2 inhibitor, etodolac, on colitis-associated tumorigenesis in p53-deficient mice treated with dextran sulfate sodium. *Oncology Reports* 19: 393-399 (2008).
 - 11) Hu Y, Le Leu RK, Belobrajdic D, Young GP. : The potential of sphingomyelin as a chemopreventive agent in AOM-induced colon cancer model: wild-type and p53^{+/-} mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 52: 558-566 (2008).
 - 12) Dunphy KA, Blackburn AC, Yan H, O'Connell LR, Jerry DJ. : Estrogen and progesterone induce persistent increases in p53-dependent apoptosis and suppress mammary tumors in BALB/c-Trp53^{+/-} mice. *Breast Cancer Res.* 10: R43 (2008).
 - 13) Aichler M, Algül H, Behne D, Hölzlwimmer G, Michalke B, Quintanilla-Martinez L, Schmidt J, Schmid RM, Brielmeier M. : Selenium status alters tumour differentiation but not incidence or latency of pancreatic adenocarcinomas in Ela-TGF- α p53^{+/-} mice. *Carcinogenesis* 28: 2002-2007 (2007).
 - 14) Zhang D, Shimizu T, Araki N, Hirota T, Yoshie M, Ogawa K, Nakagata N, Takeya M, Saya H. : Aurora A overexpression induces cellular senescence in mammary gland hyperplastic tumors developed in p53-deficient mice. *Oncogene* 27: 4305-4314 (2008).
 - 15) Kuprash DV, Qin Z, Ito D, Grivennikov SI, Abe K, Drutskaya LN, Blankenstein T, Nedospasov SA. : Ablation of TNF or lymphotoxin signaling and the frequency of spontaneous tumors in p53-deficient mice. *Cancer Lett.* 268: 70-75 (2008).
 - 16) Waalkes MP, Liu J, Germolec DR, Trempus CS, Cannon RE, Tokar EJ, Tennant RW, Ward JM, Diwan BA. : Arsenic Exposure In utero Exacerbates Skin Cancer Response in Adulthood with Contemporaneous Distortion of Tumor Stem Cell Dynamics. *Cancer Res* 68: 8278-8285 (2008).
 - 17) Kissling GE, Malarkey DE, Vallant MK, Johnson JD, Hejtmancik MR, Herbert RA, Boorman GA. : Evaluation of Dichloroacetic Acid for Carcinogenicity in Genetically Modified Tg.AC Hemizygous and p53 Haploinsufficient Mice. *Toxicol Sci* 107: 19-26 (2009).
 - 18) NTP report on the toxicology studies of dichloroacetic acid (CAS No. 79-43-6) in genetically modified (FVB Tg.AC hemizygous) mice (dermal and drinking water studies) and carcinogenicity studies of dichloroacetic acid in genetically modified [B6.129-Trp53(tm1Brd) (N5) haploinsufficient] mice (drinking water studies)., *Natl Toxicol Program Genet Modif Model Rep.* Apr;(11):1-168 (2007).
 - 19) Cassee FR, de Burbure CY, Rambali B, Vleeming W, van de Kuil A, van Steeg H, Fokkens PH, van Amsterdam JG, Dormans JA, Opperhuizen A. : Subchronic inhalation of mixtures of cigarette smoke constituents in Xpa^{-/-}p53^{+/-} knock-out mice: a comparison of intermittent with semi-continuous

- exposure to acetaldehyde, formaldehyde, and acrolein. *Food Chem Toxicol* 46: 527-536 (2008).
- 20) XPCMelis JP, Wijnhoven SW, Beems RB, Roodbergen M, van den Berg J, Moon H, Friedberg E, van der Horst GT, Hoeijmakers JH, Vijg J, van Steeg H. : Mouse models for xeroderma pigmentosum group A and group C show divergent cancer phenotypes. *Cancer Res* 68 :1347-1353 (2008).
- 21) Nakane H, Hirota S, Brooks PJ, Nakabeppu Y, Nakatsu Y, Nishimune Y, Iino A, Tanaka K. : Impaired spermatogenesis and elevated spontaneous tumorigenesis in xeroderma pigmentosum group A gene (Xpa)-deficient mice. *DNA Repair (Amst)*. 2008 Sep 30.
- 22) de Waard H, Sonneveld E, de Wit J, Lange RE, Hoeijmakers JH, Vrieling H, van der Horst GT. : Cell-type-specific consequences of nucleotide excision repair deficiencies: Embryonic stem cells versus fibroblasts. *DNA Repair (Amst)* 7 :1659-1669 (2008).
- 23) Dzagnidze A, Katsarava Z, Makhalova J, Liedert B, Yoon MS, Kaube H, Limmroth V, Thomale J. : Repair capacity for platinum-DNA adducts determines the severity of cisplatin-induced peripheral neuropathy. *J Neurosci* 27: 9451-9457 (2007).
- 24) Niedernhofer LJ. : Tissue-specific accelerated aging in nucleotide excision repair deficiency. *Mech Ageing Dev* 129: 408-415 (2008).
- 25) Cleaver JE and Revet I. : Clinical implications of the basic defects in Cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum and the DNA lesions responsible for cancer, neurodegeneration and aging. *Mech Ageing Dev* 129 :492-497 (2008).

