

毒性試験の中で最も汎用されている Ames 試験のスループット性を高めた FAT 試験の菌株に新しく大腸菌 DNA ポリメラーゼ IV を導入した。その結果、検出効率が向上し、抗菌剤の遺伝毒性を検出が可能となった。また、Ames 試験で陽性、FAT (液体法) で陰性を示した 5 種の NTP 選定化合物について、FAT (寒天法) を行い、いずれにおいても、FAT (液体法) より FAT (寒天法) の方が、Ames 試験の結果との相関性が高かった。FAT (寒天法) は、Ames 試験に比べて被験物質の量が節約できる点からも有用である。

DNA 損傷の乗り越えに関わる Pol κ を不活化させたヒトの細胞を樹立した。Pol κ は B[a]P 等による DNA 損傷の乗り越えに関与していることが示唆されており、多環芳香族炭化水素による変異作用に高い感受性を示すことが期待される。また、細胞内で他の蛋白質と相互作用していることが報告されていることから、KO により Pol κ の発現を止めると、蛋白質間相互作用に影響を与えて、二次的な作用により細胞の感受性が修飾される可能性が考えられた。このため、ポリメラーゼ活性を失った蛋白質を発現する KI 細胞も合わせて樹立し、化学物質に対する感受性 (生存率、突然変異等) を検討した。今後、*in vitro* 小核試験の併用などの可能性を探る。

ポテトチップス等に含まれる遺伝毒性物質として話題を集めた AA は、CYP2E1 により GA に変化し、GA が遺伝毒性を示すとされ、*in vivo* の試験では、AA と GA は肝臓で同程度の突然変異誘発性を示すこと、肝臓での N7-GA-Gua 等の DNA アダクト量に差は見られないことが報告されている。CYP2E1 を発現するトランスジェニック細胞株 (h2E1V2 細胞、MCL-5 細胞) を用いて AA および GA の遺伝毒性を検索したところ、GA は h2E1V2 細胞およびその親細胞 (AHH-1 細胞) に、強い遺伝子突然変異作用を示したが、AA は h2E1V2、MCL-5、AHH-1 いずれに対しても、ほぼ同程度の弱い遺伝毒性を示したのみであった。これらの結果から、h2E1V2 細胞、MCL-5 細胞では、AA から GA への代謝活性化が不十分であるものと結論した。遺伝毒性の発現の違いを説明するため、代謝物による DNA アダクトを解析し、AA が *in vivo* 特異的遺伝毒性物質であることを見出した。したがって、AA のように、CYP2E1 が関与する化学物質に関してはこれまでの *in vitro* 試験のみでの遺伝毒性評価ではその発がん性を見逃している可能性が示唆された。このような遺伝毒性物質を検出できる新規の *in vitro* 試験法の

開発、もしくは *in vivo* 試験を組み込んだストラテジーの構築が望まれる。また、ヒト型薬物代謝酵素を発現するトランスジェニック細胞は S9 の系とは異なり、細胞内での代謝と、その代謝物の影響を評価できるため有用だが、特異性が高いため、その利用には慎重になるべきであろう。

ヒト由来の S9 とラット由来の S9 について代謝活性化能を比較した。2,4-DAT、MeIQx については、両者の間には顕著な差は観察されなかったが、2,6-DAT についてはラットがより高い代謝活性可能を示した。この作用の違いを知るためには、代謝物の同定、定量が必要と考える。従来、汎用されてきた染色体異常試験は *in vitro* 小核試験で代替するという結果を得た。ヒト肝から抽出した DNA の遺伝子多型解析およびヒト肝マイクロゾームの酵素活性測定を実施し、遺伝子多型と酵素活性に相関が認められる肝サンプルを探索し、ラット、雌雄サルの S9 およびヒトマイクロゾームを用いた *in vitro* 小核試験を実施した。代謝活性化系における種差が遺伝毒性試験結果に与える影響を検討した。ヒトのリンパ芽球様細胞に由来する TK6 細胞 (p53 野生型) と、p53 に変異を持つ WTK-1 細胞細胞、さらにマウスの白血病細胞由来の p53 変異 MOLT-4 細胞を用いて、GEM、DXR、CPT の 3 種類の遺伝毒性物質を試験したところ、感度に大きな差は認められなかった。

医薬品候補化合物が実験動物を用いる発がん試験において陽性の結果を与えた場合には、遺伝毒性がその作用機序に関連しているかを明らかにする必要がある。本研究班では、これまでに主任研究者と明治製菓が共同で作出した遺伝毒性検出用の SD 系 *gpt delta* トランスジェニックラットを、発がん試験に汎用される F344 ラットとクロスして樹立された F344 系の *gpt delta* ラットのバリデーションを実施した。トランスジェニック遺伝毒性試験では、これまでに 100 種類の発がん物質について試験が行われ、約 80% の確率で陽性結果を得ることができると報告されているが、非発がん物質については 10 あまりの化合物しか試験されておらず、非発がん物質を陰性と判定することができるかに関心が集まっている。今回は、F344 系の *gpt delta* トランスジェニックラットを用いて、がん原性物質であり、比較的弱い遺伝毒性物質である TMX 及び、TMX の構造類似体であり非遺伝毒性かつ非癌原性物質である TRM の遺伝毒性を、投与

C-11 遺伝毒性評価用トランスジェニックラットのバリデーション

TMX の 13 週間混餌投与 (250、500 ppm) の結果、投与期間を通じて摂餌量の有意な減少がみられ、それに伴う体重の有意な減少、子宮の絶対・相対重量の減少がみられた。病理学的には、子宮内膜の萎縮、閉鎖卵胞数の増加及び黄体数の減少がみられたが、肝臓及び腎臓に異常はみられなかった。TMX の 20 及び 40 mg/kg、3 週間経口投与群において、投与期間を通じて体重の有意な減少が認められた。TRM の 40 mg/kg、3 週間経口投与群において、投与期間を通じて異常はみられず、剖検においても異常はみられなかった。TMX の 13 週間混餌群および TMX の 3 週間経口投与群の *gpt* MF 値、また TMX の 13 週間混餌群および TMX の 3 週間経口投与群の *Spi*⁻ MF 値は、いずれも用量依存的かつ有意に増加した。一方、TRM の *gpt* 及び *Spi*⁻ MF 値は、対照群と比較して有意な増加はみられなかった。

対照群の *Spi*⁻ 変異体は 5 クローンで、うち 4 クローンは 1bp の欠失であった。一方、TMX の 3 週間経口群の *Spi*⁻ 変異体は 79 クローンで、バンドが検出されたクローンでは 1 bp の欠失の頻度が最も多かった。腎臓において TMX の 13 週間混餌群の *gpt* の MF 値および、3 週間経口群の *gpt* の MF 値に有意な差はみられなかった。TMX の 13 週間混餌群の *Spi*⁻ の MF 値及び、3 週間経口群の *Spi*⁻ の MF 値は、対照群・投与群に有意な差はみられなかった。3 週間経口群の腎臓における *gpt* の MF 値及び、3 週間経口群の *Spi*⁻ の MF 値は、対照群と TRM 投与群で有意な差はみられなかった (林)。

C-12 フローサイトメトリーによる *in vivo* 小核試験のバリデーション

CP、MMC 及び生理食塩液を単回投与し、48 時間後の末梢血における小核出現頻度を、フローサイトメトリー及び蛍光顕微鏡を用いて算出した。いずれの測定法においても、誘発された小核を検出することができ、算出した小核出現頻度は、それぞれの方法で類似していたが、フローサイトメトリーでの測定値は若干高い傾向を示した。COL の 1 mg/kg を投与した群では投与後 24 時間をピークとする小核誘発頻度の増加が認められたが、0.5 及び 0.25 mg/kg 投与群においては、いずれの時間においても媒体対照群と同程度であった。VIN の 1 及び 0.5 mg/kg を

投与した群では投与後 24 時間で小核誘発頻度の増加が認められたが、0.25 mg/kg 投与群では、媒体対照群と同程度であった。COL 及び VIN を単回腹腔内投与したところ、いずれも、24、48 及び 72 時間後、用量依存的な体重の減少及び骨髓抑制作用が認められた。同じく 24、48 及び 72 時間後の末梢血における小核出現頻度を、フローサイトメトリー及び顕微鏡を用いて算出した結果、いずれの方法でも、0.5 及び 1.0 mg/kg の COL および VIN 投与群において、投与後 48 時間で小核の有意な増加が認められた。COL 0.5 mg/kg 及び VIN 1.0 mg/kg 投与群における顕微鏡下での核型分類は、Control 群では小型及び大型の小核がそれぞれ 90% 及び 10% であった。一方、COL 0.5 mg/kg 及び VIN 1.0 mg/kg 投与群においては、小型及び大型の小核がいずれの化合物においても、それぞれ約 60% 及び約 40% であった。COL 及び VIN のコメット試験の結果は、肝臓及び骨髓のいずれにおいて % tail DNA の増加が認められなかったのに対して、CP を投与した群においては、% tail DNA の有意な増加が認められた (真田)。

D. 考察

本研究班では、ヒト遺伝子を導入した微生物ハイ・スループット遺伝毒性試験の開発、キット化を目指し、遺伝毒性試験用のヒト細胞の遺伝的改良、ヒト細胞と齧歯類細胞の感受性の比較検討およびヒト由来の S9 の代謝活性化能の検討等に加えて、*gpt delta* トランスジェニックラットと小核試験のバリデーションおよび、*Pol* κ の活性を KI により不活化した *gpt delta* トランスジェニックマウスの作出・バリデーション等を行った。

微生物を用いる遺伝毒性試験の中でも、umu 試験は一日で試験を済ませることができ、データベースも比較的豊富であることから、ハイ・スループット試験として有用である。この試験系で各種のヒト薬物代謝酵素 CYP を発現させた菌株を作製し、さらにマイクロプレート法を改良して高感度化した。代謝酵素を発現させて菌の濃度を調整したのち、超冷凍保存することで、測定に要する時間が約 3 時間短縮されること、菌の濃縮率は 12.5% 程度が最適であることを確認し、キット化を進めた。この系は発現させる薬物代謝酵素を変えることで、化合物が変異原性を示すために、どの代謝酵素が働くのかというメカニズム研究にも応用できる。遺伝

期間の長短に関わらず精度良く評価できた。以上のことより、*gpt delta* ラットを用いた遺伝毒性試験は様々な医薬品開発ステージにおいて評価化合物の遺伝毒性リスク評価及び癌原性予測に有用である可能性が考えられた。もし、創薬初期に実施される4週間反復投与毒性試験を、トランスジェニック動物を用いて実施し、一般毒性に加えて遺伝毒性を同時に評価できれば、これまで Ames 試験を用いた遺伝毒性スクリーニングでドロップアウトしていた開発候補品の安全性をよりの確に科学的な検証が行えることになる。より厳しさを増す医薬品候補の創出に対して有効な1つの解決手段となりうるものと期待される

この他、ラットを用いる小核試験で良好な結果を得られたことから、遺伝子突然変異と小核誘発を同一個体で観察できるようになり、動物数の削減がはかれるものと期待される。中でも、フローサイトメトリーを用いた小核測定法は、現行の顕微鏡下での観察と比べ非常に簡便な方法であることから、小核試験を一般毒性試験に組み込み、医薬品開発におけるハイ・スループット化と3Rを同時に進めることが可能となる。*Pol κ*をKI法により不活化した *gpt delta* トランスジェニックマウスを作出し、MMC 処理により GpG サイトに形成された intrastrand cross-link を *pol κ* が正確に複製していること、*pol κ* が non-homologous end-joining (NHEJ) による二本鎖切断 (DSB) 修復過程において重要な役割を持つことが示唆される結果を得た。このようなメカニズム研究は、発がん性のメカニズムを知る上で特に重要である。

以上のごとく、本研究班では、各グループがそれぞれのモデル生物（微生物、ヒト細胞、マウス・ラット）を用いながら、同一の化合物あるいは同一の遺伝子に着目して研究することにより、それぞれの試験系の有用性に検討を加えリスク評価に貢献する代替法試験の基盤的研究を推進した。

E. 結論

遺伝毒性分野における代替法の確立を目的に、ヒト薬物代謝酵素を発現するハイ・スループット微生物試験菌株を確立し、キット化に向けて菌株保存条件、培養培地の影響等を精査した。ヒト細胞に遺伝的改良を加え、薬物代謝酵素発現、もしくはDNAポリメラーゼのノックイン、

ノックアウトなどのトランスジェニック細胞を樹立し評価した。酵素誘導 S9 の有用性と限界、ヒト肝ミクロゾームにおける薬物代謝酵素の SNP 解析結果と小核誘発性の相関についても検討した。ヒトの培養細胞を用いて既存の試験法が適用できることを確認した。さらに、発がん性と遺伝毒性の相関を検討するための F344 *gpt delta* トランスジェニックラットのバリデーションを進めた。ラットにおける小核試験、コメント試験との組合せを検討した。新規の遺伝毒性試験系として、ヒト細胞にて不活化させた *Pol κ* を KI 法で導入したトランスジェニック細胞株および、*gpt delta Pol κ* KI トランスジェニックマウスを樹立し、評価した。

代替毒性試験法の開発にあたっては、*in vitro* 試験のみではなく、適切な *in vivo* 試験を併用することが重要である。また、*in vivo* 試験の実施にあたっては、*gpt delta* トランスジェニックラットなどを使用することにより、一般毒性試験と遺伝毒性試験を統合し、(遺伝)毒性試験に用いる動物数の削減に努めるべきである。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koyama, N., Yasui, M., Oda, Y., Suzuki, S., Satoh, T., Suzuki, T., Matsuda, T., Masuda, S., Kinoshita, N., Honma, M., Genotoxicity of acrylamide *in vitro*: Acrylamide is not metabolically activated in standard *in vitro* systems, *Environ Mol Mutagen.* (in press)
- 2) Toyoda-Hokaiwado, N., Inoue, T., Masumura, K., Hayashi, H., Kawamura, Y., Kurata, Y., Takamune, M., Yamada, M., Sanada, H., Umemura, T., Nishikawa, A., Nohmi, T., Integration of *in vivo* genotoxicity and short-term carcinogenicity assays using F344 *gpt delta* transgenic rats: *in vivo* mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene structural isomers, *Toxicol. Sci.*, 114, 71-78 (2010)
- 3) Eastmond, D.A., Hartwig, A., Anderson, D., Anwar, W.A., Cimino, M.C., Dobrev, I., Douglas, G.R., Nohmi, T., Phillips, D.H., Vickers, C., Mutagenicity testing for

- chemical risk assessment, *Mutagenesis*, 24, 341-349 (2009)
- 4) Oda, Y., Hirayama, T., Watanabe, T., Genotoxic activation of the environmental pollutant 3,6-dinitrobenzo[*e*]pyrene in *Salmonella typhimurium umu* strains expressing human cytochrome P450 and *N*-acetyltransferase, *Toxicology Letters Research*, 188, 258-262 (2009)
 - 5) Sui, H., Kawakami, K., Sakurai, N, Hara, T., Nohmi, T., Improvement and evaluation of high throughput fluctuation Ames test using 384-well plate with *Salmonella typhimurium* TA100 and TA98, *Genes and Environment*, 31, 47-55 (2009)
 - 6) Oda, Y., Watanabe, T., Terao, Y., Nukaya, H., Wakabayashi, K., Genotoxic activation of 2-phenylbenzole-type compounds by human cytochrome P4501A1 and *N*-acetyltransferase expressed in *Salmonella typhimurium umu* strains, *Mutat. Res.*, 654, 52-57 (2008)
 - 7) Nishikawa, A., Umemura, T., Ishii, Y., Tasaki, M., Okamura, T., Inoue, T., Masumura, K., Nohmi, T., *In vivo* approaches to study mechanism of action of genotoxic carcinogens, *Genes and Environ.*, 30, 120-124 (2008)
 - 8) Oda, Y., Watanabe, T., Yamazaki, H. and Hirayama, T. Genotoxic activation of the environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone by human cytochrome P450 enzymes expressed in *Salmonella typhimurium umu* tester strains, *Genes and Environ.*, 29: 146-152, (2007)
 - 9) Takeiri, A., Mishima, M., Tanaka, K., Shioda, A., Hrada, A., Masumura, K., Nohmi, T. Mutation spectra in cisplatin- and transplatin-treated GDL1 cells clarified the different mode of action of these compounds in mammalian cells, *Genes and Environ.*, 29: 89-99 (2007)
 - 10) Tweats, D.J., Blakey, D., Heflich, R.H., Jacobs, A., Jacobsen, S.D., Morita, T., Nohmi, T., O'donovan, M.R., Sasaki, Y.F., Sofuni, T. and Tice, R. Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory in vivo tests I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards, *Mutat. Res.*, 627: 78-91 (2007)
 - 11) Tweats, D.J., Blakey, D., Heflich, R.H., Jacobs, A., Jacobsen, S.D., Morita, T., Nohmi, T., O'donovan, M.R., Sasaki, Y.F., Sofuni, T., Tice, R., Report of the IWGT working group on strategy/interpretation for regulatory in vivo tests II. Identification of in vivo-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test, *Mutat. Res.* 627: 92-105 (2007)
 - 12) Nohmi, T., Novel DNA polymerases and novel genotoxicity assays, *Genes and Environ.*, 29: 75-88 (2007)
 - 13) Burlinson, B., Tice, RR., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, SY., Collins, AR., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, TS., Nakajima, M., Sasaki, YF., Thybaud, V., Uno, Y., Vasquez, M., and Hartmann, A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup *Mutat. Res.*, 627: 31-35 (2007)
 - 14) Moore, MM., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, J., Burlinson, B., Cifone, M., Clark, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, J., Muster, W., Pant, K., Kidd, DA., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O' Donovan, M., Riach, C., Stankowski, Jr. LF., Thakur, AK., and Van Goethem, F. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, recommendations for 24-h treatment. *Mutat. Res.*, 627: 36-40 (2007)
 - 15) Ku, WW., Bigger, A., Brambilla, G., Glatt, H., Gocke, E., Guzzie, PJ., Hakura, A., Honma, M., Martus, H-J., Obach, RS., and Roberts, R. Strategy for genotoxicity testing- Metabolic considerations *Mutat.*

2. 学会発表

- 1) Niimi, N., Gruz, P., Iizumi, S., Adachi, N., Koyama, H., Nohmi, T., Establishment of human cell lines lacking the catalytic activity of DNA polymerase kappa involved in translesion DNA synthesis, The 40th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Foundation (2009, 11)
- 2) Niim, N., Sassa, A., Katafuch, A., Gruz, P., Fujimoto, H., Bonala, R.-R., Johnson, F., Ohta, T., Nohmi, T., A crucial role for the steric gate amino acid tyrosine 112 in efficient mismatched-primer extension by human DNA polymerase κ , ASM Conferences, DNA Repair and Mutagenesis, (2009.6)
- 3) Oda, Y., Kojima, Y., Human immunodeficiency virus type-1 vpr Induces SOS function and homologous recombination in bacteria, 日本環境変異原学会第 38 回大会 (2009.11)
- 4) Oda, Y., Hori, H., Fujii, W., Evaluation of high-throuput *umu* test system using tester strains expressing human cytochrome P450 enzymes, 10th ICEM, (2009.8)
- 5) 堀妃佐子、藤居互、小田美光、ヒト型薬物代謝酵素を発現する *umu* 試験菌株を用いた遺伝毒性試験のハイスループット化の検討、日本環境変異原学会第 38 回大会 (2009.11)
- 6) Hirata, D., Mochida, H., Oda, Y., Attempt of genotoxicity test kit using *umu* tester strain expressing human cytochrome P450 enzyme, 日本環境変異原学会第 38 回大会 (2009.11)
- 7) 須井 哉、川上久美子、桜井徳子、奥富弘子、太田亮、能美健彦、ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験法の検討 5、日本環境変異原学会第 38 回大会 (2009.11)
- 8) Honma, M., Koyama, N., Kimura, A., Yasui, M., Takami, S., Takahashi, M., Imai, T., Yamamoto, Y., Kumita, W., Masumura, K., Masuda, S., Kinae, N., Matsuda, T., Nohmi, T., Child-adult differences in evaluation of *in vivo* genotoxicity of acrylamide, 48th Annual Meeting for Society of Toxicology (2009.3)
- 9) Kimura, A., Sakamoto, H., Saigo, K., Sukamoto, T., Honma, M., Establishment of simple *in vitro* Comet Assay Protocol, 48th Annual Meeting for Society of Toxicology (2009.3)
- 10) Koyama, N., Kimura, A., Yasui, M., Takami, S., Takahashi, M., Inoue, K., Yoshida, M., Imai, T., Shibutani, M., Suzuki, T., Yamamoto, A., Kumita, W., Masumura, K., Horibata, K., Masuda, S., Kinae, N., Nohmi, T., Honma, M., Child-adult difference in evaluation of *in vitro* genotoxicity of acrylamide, 10th ICEM (2009.8)
- 11) Honma, M., Takashima, Y., Sakuraba, M., Koizumi, T., Sakamoto, H., Hayashi M., DNA double strand break repair pathways and its dependence on cell cycle phases in human lymphoblastoid cells, Environmental Mutagen Society 40th Annual Meeting (2009.10)
- 12) 本間正充、*In vitro* 遺伝毒性試験における最高用量と細胞毒性の評価、日本環境変異原学会第 38 回大会 (2009.11)
- 13) 小山直己、木村葵、安井学、高見成昭、高橋美和、井上薫、吉田緑、今井俊夫、渋谷淳、鈴木拓也、増村健一、堀端克良、増田修一、木苗直秀、松田知成、能美健彦、本間正充、ライフステージ (週齢) を考慮したアクリルアミドの多臓器遺伝毒性評価、日本環境変異原学会第 38 回大会 (2009.11)
- 14) Kishino, Y., Hasegawa, T., Arakawa, S., Shibaya, Y., Takasaki, W., Yamoto, T., Sanbuissho, A., Manabe, S., Characterization of induced rat S9 for appropriate extrapolation from *in vitro* to *in vivo* in genotoxicity studies, 10th ICEM (2009, 8)
- 15) 井上知紀、豊田尚美、田崎雅子、岡村俊也、石井雄二、増井則夫、能美健彦、梅村隆志、西川秋佳：ビタミン E 活性を有する Tocotrienol 併用投与に diethylnitrosamine 誘発ラット肝の *in vivo* 変異原性および前がん病変に対する予防効果、がん予防大会 2009 (2009.6)

- 16) 井上知紀、田崎雅子、石井雄二、岡村俊也、鈴木裕太、増井則夫、能美健彦、梅村隆志、西川秋佳、Tocotrienol 投与によるラット肝 *in vivo* 変異原性ならびにプロモーション作用の検索. 第36回日本トキシコロジー学会学術年会 (2009. 7)
- 17) Inoue, T., Tasaki, M., Ishii, Y., Okamura, T., Suzuki, Y., Jin, M., Hibi, D., Nohmi, T., Umemura, T., Nishikawa, A., Lack of *in vivo* mutagenicity and tumor-promotion activity in the livers of rats treated with tocotrienol, 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009. 10)
- 18) 井上知紀、日比大介、豊田尚美、田崎雅子、岡村俊也、金美蘭、鈴木裕太、石井雄二、能美健彦、梅村隆志、西川秋佳: F344 系 *gpt* delta ラットを用いた DEN 誘発肝の *in vivo* 変異原性ならびに前がん病変に対するトコトリエノールの修飾効果、第26回日本毒性病理学会 (2010. 2)
- 19) 真田尚和、櫻田直美、米澤 豊、入山昌美、本間正充、Colchicine 及び Vinblastine のラット末梢血を用いた小核試験 日本環境変異原学会第38回大会 (2009. 11)
- 20) N. Toyoda-Hokaiwado, T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, T. Umemura, A. Nishikawa, T. Nohmi, Applying F344 *gpt* delta transgenic rat for *in vivo* genotoxicity study of structural isomer 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene, The 25th Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology (2009. 1)
- 21) Y. Oda, T. Watanabe, Y. Terao, H. Nukaya and K. Wakabayashi, Genotoxic activation of 2-phenylbenzotriazole-type compounds by human cytochrome P450 1A1 and N-acetyltransferase expressed in *Salmonella typhimurium* umu strains, The 37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (37th JEMS) (2008, 12)
- 22) S. Hagio, S. Ogo, M. Kawanishi, T. Watanabe, Y. Oda and T. Yagi, Evaluation of genotoxicity of 3,6-dinitrobenzo [e]pyrene in human cell lines, The 37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (37th JEMS) (2008, 12)
- 23) D. Hirata, H. Mochida and Y. Oda, Attempt of genotoxicity test kit using umu tester strains expressing human cytochrome P450 enzyme, The 37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (37th JEMS) (2008, 12)
- 24) H. Hori, W. Fujii and Y. Oda, Evaluation of high-throughput genotoxicity test system using umu tester strain expressing human cytochrome P450 enzyme, The 37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (37th JEMS) (2008, 12)
- 25) T. Nohmi, *gpt* delta transgenic mouse and rat for analysis of *in vivo* mutagenesis, The 37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (37th JEMS) (2008, 12)
- 26) N. Koyama, A. Kimura, M. Yasui, S. Takami, M. Takahashi, T. Imai, A. Yamamoto, W. Kumita, K. Masumura, S. Masuda, N. Kinoue, T. Matsuda, T. Nohmi and M. Honma, Child-adult differences in evaluation of *in vivo* genotoxicity of acrylamide, The 37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (37th JEMS) (2008, 12)
- 27) H. Sui, K. Kawakami, N. Ohyama, H. Okutomi, R. Ohta and T. Nohmi, Further improvement of high-throughput fluctuation Ames test (Part IV), The 37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (37th JEMS) (2008, 12)
- 28) N. Toyoda, T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi, Difference in mutagenicity of structural isomers 2,4-DAT and 2,6-DAT in the target organ for carcinogenicity of F344 *gpt* delta transgenic rat, The 37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (37th JEMS) (2008, 12)
- 29) T. Nohmi, Recent Topics of Mutation Research with *gpt* delta Mice and Rats,

39th Annual Meeting of Environmental Mutagen Society in Puerto Rico, October 2008.

- 30) N. Toyoda, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, T. Inoue, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi, in vivo mutagenicity of structural isomers 2,4-DAT and 2,6-DAT in F344 gpt delta transgenic rat, 第67回日本癌学会学術総会 (2008, 10)
- 31) Niimi, N. and Nohmi, T. Generation and characterization of human cells knocked-in and knocked-out of DNA polymerase kappa, 1st Asian Conference on Environmental Mutagens (1st ACEM)/ 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (36th JEMS), November 2007.
- 32) Koyama N., Yasui M., Sakamoto H., Sakuraba M., Masuda S., Kinoshita N., Matsuda T, Hayashi M., and Honma M: Genotoxicity of acryamide expressed via metabolic activation in CYP over-expressing human cells. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007,11)
- 33) Nohmi, T. Validity of in vivo genotoxicology, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, in Tokyo, Japan, August 2007.
- 34) 本間正充: 代謝物の遺伝毒性評価 第34回日本トキシコロジー学会学術年会 (2007. 6)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

代替毒性試験法の評価と開発に関する研究

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
研究者 能美 健彦

研究要旨 遺伝毒性試験用微生物株およびヒト細胞株を遺伝的に改変し、発がん物質を効率良く検出する *in vitro* 試験系を構築した。 *gpt delta* トランスジェニックラット、マウスのバリデーションを進め、代替毒性試験法の基盤的研究を推進した。

分担研究者

- (1) 近畿大学大学院 小田美光
- (2) サントリービジネスサポート(株) 藤居 互
- (3) 株蛋白精製工業 平田大介
- (4) (財)食品薬品安全センター-秦野研究所 須井 哉
- (5) 国立医薬品食品衛生研究所 本間正充
- (6) 第一三共(株)安全性研究所 伊東 悟
- (7) 大鵬薬品工業(株)徳島研究所 岡 宏明
- (8) 中外製薬(株)富士御殿場研究所 三島雅之
- (9) 国立医薬品食品衛生研究所 西川秋佳
- (10) 明治製薬(株)医薬研究所 林 宏行・川村祐司
- (11) 科研製薬(株)総合研究所 真田尚和

A. 研究目的

安全性評価の分野において、動物実験をできる限り *in vitro* 試験（培養細胞）で代替（Replacement）し、実験動物を用いる場合には、使用する頭数の削減（Reduction）、また一匹あたりの動物からより多くの有用情報を得るなどの工夫（Refinement）を行うことが強く求められている。すでに欧州共同体は、化粧品の安全性評価に関して 2009 年から実験動物を使ったデータを基本的に受け入れないことを表明しており、医薬品の安全性評価に関しても、上記の 3R（Reduction, Refinement, Replacement）を念頭に、安全性評価に関わる試験方法を再吟

味することが喫緊の課題である。

医薬品の遺伝毒性評価には、一般に(1)微生物(2)哺乳類細胞(3)マウス（小核試験）を用いることが ICH ガイドラインで求められている。しかし(1)微生物遺伝毒性試験については、より少量の試料で試験結果を得ることのできるハイ・スループット化が求められている。(2)哺乳類細胞を用いる試験については、動物に対し発がん性を示さないにもかかわらず陽性となる物質（偽陽性）が少ないことから試験細胞株の遺伝的改良が望まれている。(3)小核試験においては、血液系の細胞に対する遺伝毒性のみが評価の対象となるため、多臓器において遺伝毒性を評価する試験、例えばトランスジェニック遺伝毒性試験法の確立が望まれている。特に発がん試験で汎用される F344 ラットを基にした試験系の確立が有用であると考えられている。

本研究班では、班全体を 3つのグループに分け、第一グループではヒト遺伝子を導入した微生物ハイ・スループット遺伝毒性試験の開発をめざし（小田、藤居、平田、須井）、第二グループでは遺伝毒性試験用のヒト細胞の遺伝的改良およびヒト細胞と齧歯類細胞の感受性の比較検討を行い（能美、本間、伊東、岡）、第三グループでは *gpt delta* トランスジェニック

ラットと小核試験のバリデーション、および DNA 損傷部位の乗り越え DNA 合成に関わるヒト DNA ポリメラーゼ κ (pol κ) の活性をノックイン (KI) により不活化した *gpt delta* トランスジェニックマウスバリデーションを進めている (三島、西川、林、真田)。本研究の推進により、医薬品の遺伝毒性、発がん性評価における 3R が前進し、動物数を削減しつつ安全な医薬品を社会に供給することが可能となる。

B. 研究方法

B-1 微生物を用いた高感度・迅速な遺伝毒性ハイ・スループット試験の構築研究

umu 試験には、*Salmonella typhimurium* (以下サルモネラと略す) OY1022/1A1、OY1022/1A2、OY1022/1B1、OY1022/3A4 を用いた。これらの株は、バクテリアのニトロ還元酵素とアセチル転移酵素が不活化したサルモネラ株 TA1535NR/1, 8-DNP に、CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP3A4 のいずれかと NADPH-P450 還元酵素を発現するプラスミドを導入して樹立した。ベクターのみを導入した OY1022/pCW を陰性対照菌株とした。またヒトのアセチル転移酵素 NAT1 および NAT2 を発現する株 NM6001 および NM6002、陰性対照株の NM6000 を用いた。被験物質には合成した 3,6-dinitrobenzo[*e*]pyrene (DNB[*e*]P) を用いた。umu 試験は既存の方法に準じた (小田)。

B-2 ヒト型高感度 umu テスト株のバリデーション

サルモネラ TA1535 株に、CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP3A4 のいずれかと NADPH-P450 還元酵素、バクテリアのアセチル転移酵素を発現するプラスミドを導入して樹立した OY1002/1A2、OY1002/1A1、OY1002/1B1、OY1002/3A4 を用いた。試験に用いた化合物は、4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO)、2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

(AF-2)、2-aminofluorene (2-AF)、2-aminoanthracene (2-AA)、3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-1)、3-amino-1-dimethyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-2)、2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ)、2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoline (MeIQ)、2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx)、benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P)、2-amino-6-methyldipyrido[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazole (Glu-P-1) である。培養は全て 37°C で行った。薬剤を含む LB 培地で 37°C、一夜振盪培養した菌液を得た。A) 試験管法: OD₆₀₀0.3 の培養液 1ml と被験物質調製液 10 μ l を試験管で 2 時間培養し、濁度を A₆₀₀ で測定した後、従来の方法で β -ガラクトシダーゼ活性を算出した。B) 改良マイクロプレート法: 菌液を TGlyT 培地で 50 倍希釈し、37°C で 3 時間振盪培養した後、1mM IPTG、0.5 mM δ -aminolevulinic acid、250 μ L/L trace elements を添加し、更に 37°C で 1 時間振盪培養した。96 穴マイクロプレートに被験物質調製液 4 μ l と上記の菌液 96 μ l を加え、3 時間振盪培養し、菌液の濁度 (595 nm) を測定した。別のプレートで菌液 10 μ l と Z-緩衝液 90 μ L、PopCulture Reagent 5 μ l を攪拌後、室温で 10 分放置した。発色基質として CPRG 溶液を 10 μ l 加え、37°C、8-10 分間静置後、1M 炭酸ナトリウムを 100 μ l で反応を停止し、吸光度 (570 nm) を測定した (藤居)。

B-3 ヒト型高感度 umu 試験菌株のキット化

試験菌株として、サルモネラ OY1002/1A1、OY1002/1A2、OY1002/3A4、OY1002/1B1 の 4 種類を使った。凍結用保存培地に交換した菌液のペレットを得た後、保存培地を加えて 50%、25%、16.8%、12.5%、10%、8.4% の濃縮菌液を調製し、0.5 ml ずつ滅菌済みプラスチックチューブに分注し、アセトンドライアイスで急速冷凍して

-80℃に保存した。被験物質には、IQ、Trp-P-1、Trp-P-2、MeIQ、MeIQx、Glu-P-1、2-AF、B[a]P、2-AA の 9 種類を用いた。凍結した菌体を室温で解凍し、37℃に加温した TGlyT 培地を 1 菌体あたり 11 ml 加えて umu 試験に供した (平田)。

B-4 ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験の実用化

Ames 試験で陽性、fluctuation Ames test (FAT) (液体法) で陰性を示した 5 種類の NTP 選定化合物、3,4-diaminotoluene (NTP-85)、3-ethylamino-4-methylphenol (NTP-132)、8-hydroxyquinoline sulfate (NTP-163)、9-nitroanthracene (NTP-195)、4-nitro-*m*-phenylenediamine (NTP-200) について、2 菌株 (TA100 および TA98 株) を用いる Ames 試験および FAT (寒天法) を行った。384 ウェルプレートで、プレインキュベーションした反応液をトップアガーと混和した後、最少グルコース寒天培地上に上層しコロニー数を計測する「寒天法」と、黄変したウェル数を計測する従来からの FAT「液体法」を比較した (須井)。

B-5 DNA ポリメラーゼ遺伝子の改変による代替毒性試験法の改良に関する研究

Pol κ の活性中心部に存在する 198 番目のアスパラギン酸 (198D) と 199 番目のグルタミン酸 (199E) をアラニンに置換したヒト Nalm-6 ノックイン (KI) 細胞と、活性中心が存在するエクソン 6 を欠失させたノックアウト (KO) 細胞を用いて、細胞毒性と突然変異誘発性を調べた。ヒドロキシ尿素 (HU)、B[a]P は 4 時間、過酸化水素 (H₂O₂) は 1 時間処理し *HPRT* 遺伝子突然変異頻度 (MF) と平板効率を算出した。B[a]P 処理は、ラット肝 9,000 x g 上清 (S9、キッコーマン) と co-factor を添加した S9 mix の存在下で行った (能美)。

B-6 ヒト型遺伝毒性試験のリスクアセスメ

ントへの応用

ヒトリンパ芽球細胞株 TK6、AHH-1 と、CYP2E1 を高発現するトランスジェニックヒト細胞 h2E1v2 を用いた。各細胞は、用時調製した acrylamide (AA) と glycidamide (GA) で 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。また、AA による主たる DNA アダクトである *N7*-GA-Gua を LC/MS/MS により測定した (本間)。

B-7 ヒト型遺伝毒性試験における遺伝子多型を考慮したリスクアセスメント

代謝活性化系として、7 週齢の雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットの肝臓から調製した S9、40~50 月齢の雄および雌サルの肝臓から調製した S9 と、正常人の肝臓から調製したミクロゾームを用いた。ABI の TaqMan probe セットを用いた PCR 法による遺伝子多型解析を、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 の各変異アレルについて実施した。CHL/IU 細胞を coumarin (COU) および lansoprazole (LAN) または陰性対照物質で 6 時間処理し、処理開始から 18 時間後に標本を作製し、*in vitro* 小核試験に供した。各濃度あたり 2000 個の細胞を観察し、小核保有細胞の数を記録した (伊東)。

B-8 ヒト培養細胞と齧歯類培養細胞の遺伝毒性試験における感受性の差の検討

Gemcitabine 塩酸塩、(GEM)、doxorubicin 塩酸塩 (DXR)、camptothecin (CPT) を、マウスリンフォーマ細胞 (MOLY) とヒト TK6 由来の p53 不活化細胞 WTK-1 の浮遊液に添加し、MOLY では 48 時間、WTK-1 およびヒトリンパ芽球細胞 TK6 では 72 時間振とう培養した後、細胞を洗浄し新しい培地中で培養して (発現期間)、マイクロプレート法の TK assay に供した。細胞生存率測定

用プレート (PE2 あるいは PE3 プレート) のコロニー数及び発現期間中の細胞増加率より相対総細胞増加率 (RTG) を計算した。MF 測定用プレートのコロニー数より MF 値を計算した(岡)。

B-9 遺伝子改変哺乳類細胞を用いた遺伝毒性スクリーニング法の開発

Pol κ の 198D と 199E をともにアラニンに置換した、*gpt delta pol κ KI* マウスおよび *gpt delta* マウスのそれぞれにマイトマイシン C (MMC) を 1 mg/kg/day の用量で 5 日間反復腹腔内投与した。MMC 投与群については、投与 5 日目まで後肢背中側静脈より経時的に採血し、末梢血中の小核保有幼若赤血球の出現頻度を調べた。最終投与から 1 週間後に骨髄を採取し、6-thioguanine (6TG) セレクションおよび Spi⁻セレクションにより変異頻度の測定を実施した。さらに、変異のスペクトラムも解析した(三島)。

B-10 *gpt delta* マウスを用いた環境化学物質の発がん機序解明へのアプローチ

6 週齢の雄性 F344/N *gpt delta* トランスジェニックラットに tocotrienol (TTE) を混餌投与 (1%) した。対照群及び diethylnitrosamine (DEN) 単独群には被験物質を含まない飼料を同期間自由に摂取させた。DEN は 20 mg/kg を試験開始より週 1 回の頻度で計 13 回腹腔内投与した。13 週間後、体重、臓器重量、肝 DNA 中の 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベル、*gpt* MF ならびに変異コロニーのスペクトラム解析、GST-P 陽性肝細胞巣、肝細胞 PCNA 陽性率及び細胞周期関連タンパク (*cyclin D1* 及び *cyclin E1*) の mRNA ならびにタンパク発現量を解析し、統計処理、有意差検定を実施した (西川)。

B-11 遺伝毒性評価用トランスジェニックラットのバリデーション

Tamoxifen (TMX) を 13 週間混餌投与又は 3 週

間反復経口投与、toremifene (TRM) を 3 週間反復経口投与した。凍結腎臓及び凍結肝臓から、ゲノム DNA を抽出し、 λ EG10 レポーター遺伝子を入フェージとして回収した。腎臓由来の DNA については *gpt* アッセイと Spi⁻アッセイを実施し、TMX 及び TRM 投与群の腎臓における塩基置換変異と欠失変異の頻度を算出した。肝臓サンプルは、TMX を 3 週間反復経口投与した群のもので、得られた Spi⁻変異体の全てについて、PCR とシーケンス反応により欠失部位を特定した(林)。

B-12 フローサイトメトリーによる *in vivo* 小核試験のバリデーション

8 週齢の雄性 Crl:CD(SD) ラットに対して、cyclophosphamide (CP) を経口単回投与、colchicine (COL)、vinblastine (VIN) は腹腔内単回投与した。それぞれの投与群において、投与から 24、48 及び 72 時間後に、フローサイトメトリー測定のための採血を行った。末梢血小核試験では、すべての投与群において、尾静脈より約 60 μ L の血液を採取し、1 サンプルにつき CD71 陽性幼若赤血球 20,000 個をカウントし、その中で小核を有する細胞を算出した。同時に全赤血球に対する幼若赤血球の割合を骨髄増殖抑制の指標として算出した。コメットアッセイでは、COL、VIN 及び CP を小核試験と同様の投与経路にて 1 日 1 回、21 時間間隔で 2 日間投与した。肝臓及び骨髄を用いて、各群 100 個の細胞を観察し % tail DNA を測定した(真田)。

(倫理面への配慮) 全ての動物実験は、実施施設における「動物実験管理に関する指針」に従い、動物実験管理委員会の承認を受けて実施された。ヒト培養細胞ならびに微生物を用いる実験は、倫理面の問題はないものと判断した。

C. 研究結果

C-1 微生物を用いた高感度・迅速な遺伝毒性試験の構築研究

DNB[e]Pによる *umuC* 遺伝子発現のヒト型 CYP 酵素の関与を調べるために、OY1022/1A1、OY1022/1A2、OY1022/1B1、OY1022/3A4 および OY1022/pCW 株の感受性を比較した。DNB[e]P (3 nM) に対する感受性は、CYP3A4、CYP1A2、CYP1A1 を発現する株が CYP1B1 を発現する株や対照株よりも高く、DNB[e]P の代謝活性化には CYP3A4、CYP1A2、CYP1A1 の関与が示唆された。次にヒト N-アセチル転移酵素の関与を明らかにするために、NM6001、NM6002 菌株および親株 NM6000 を用いて、DNB[e]P による *umuC* 遺伝子誘導の感受性を調べた。その結果、NAT2 発現株 (NM6002) が NAT1 発現株 (NM6001) よりも強く *umuC* 遺伝子を誘導し、NAT2 の関与が示唆された (小田)。

C-2 ヒト型高感度 *umu* テスト株のバリデーション

OY1002/1A2、OY1002/1A1、OY1002/1B1、OY1002/3A4 株を用いて、代謝活性化されて遺伝毒性を示す 20 物質を評価した結果、OY1002/1A2 が Glu-P-1、IQ、MeIQ、MeIQx、2-AF、2-AA に対して高い感受性を示し、CYP1A2 が代謝活性化に関与している可能性を示唆した。試験管法と改良マイクロプレート法における顕著な差は見出されなかった (藤居)。

C-3 ヒト型高感度 *umu* テスト株のキット化

濃縮率を変えて凍結保存したサルモネラ OY1002/1A2 を用い、IQ に対する *umu* 試験を行った結果から、最適な菌の濃縮率は 12.5% と結論した。OY1002/1A1、OY1002/3A4、OY1002/1B1 について濃縮率 12.5% で測定用菌株を作製し、IQ を含む 9 種類の被験物質について *umu* 試験を実施した。IQ ではすべての菌において、Trp-P-1 では OY1002 / 1 A1 および OY1002 / 1 A2 において、2-AF、2-AA、Glu-P-1、MeIQ、MeIQx は OY1002/

1 A2 において、コントロールの 2 倍以上の発色が観察された (平田)。

C-4 ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験の実用化

今回使用した 5 化合物のいずれにおいても、FAT (寒天法) の方が FAT (液体法) よりも、Ames 試験の結果との相関性が高かった。TA98 株を用いる FAT (寒天法) では、5 化合物全てについて陽性結果を得たが、FAT (液体法) では、NTP-85、NTP-163、NTP-195 の 3 化合物が陰性であった (須井)。

C-5 DNA ポリメラーゼ遺伝子の改変による代替毒性試験法の改良に関する研究

HU に対して、3 株 (KI、K0、野生型) は 50-400 μg の用量で生存率が約 20% に低下したが、それ以上用量をあげても生存率は低下せず、株間に顕著な差は見られなかった。MF の増加は 3 株とも見られなかった。B[a]P に対して、3 株は S9 mix の存在下 2.4 μg の用量でいずれも死滅し、その感受性に株間で差は見られなかった。MF は用量に応じて増加したが、株間の顕著な差は見られなかった。H₂O₂ に対して、3 株は 30 μM の用量で生存率が顕著に低下した。なかでも K0 株は、野生型および KI 株に比べて有意に低い生存率を示した。しかし、MF の増加は見られず、株間にも顕著な差は見られなかった (能美)。

C-6 ヒト型遺伝毒性試験のリスクアセスメントへの応用

h2E1v2 と親株の AHH-1 を AA で 24 時間処理後、DNA を回収して N7-GA-Gua のアダクトを測定した。2.8 mM まで処理したが、両細胞ともにアダクトは検出されなかった。TK6 細胞を S9 存在下、および非存在下で、AA で 4 時間処理し、DNA を回収し、N7-GA-Gua のアダクトを測定した。15 mM

まで処理して、S9 存在下と、非存在下での差は認められなかったが、S9 の存在に有無にかかわらず、ごく僅かであるがアダクトは生成し、その生成量には濃度依存性が認められた。同様に TK6 を GA で 4 時間処理し (S9 非存在下)、DNA を回収し、N7-GA-Gua のアダクトを測定した。アダクト生成量は濃度依存的であり、その量は AA の場合に比べて 50 倍以上も高かった(本間)。

C-7 ヒト型遺伝毒性試験における遺伝子多型を考慮したリスクアセスメント

ヒト肝 DNA の遺伝子多型解析をしたところ、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 のヘテロ変異アレルを持つ肝サンプル、および CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19、CYP2D6 のホモ変異アレルを持つ肝サンプルを見出した。誘導剤を投与しないラット、雌雄サル S9 および遺伝子多型をもたずかつ酵素活性の低下が認められないヒト肝ミクロゾームを用いて *in vitro* 小核試験を実施した。いずれの代謝活性化システムにおいても LAN による小核誘発性が認められたが、雌雄サル S9 は他の代謝活性化システムよりその作用は弱かった。一方 COU では、いずれの代謝活性化システムにおいても小核誘発性が認められ、その出現率は同等であった。COU のげっ歯類 (マウスおよびラット) での代謝プロファイルは、ヒトおよびサルとは大きく異なると報告されているが、本実験では代謝活性化系における種差の影響は認められなかった (伊東)。

C-8 遺伝毒性試験に使用される細胞株の感受性に関する研究

細胞毒性の指標として RTG を用いた TK assay の結果、GEM、DXR に対する細胞毒性の感受性は、MOLY 細胞 > WTK-1 細胞 > TK6 細胞の順であった。CPT に対する細胞毒性も MOLY 細胞で最も強く現れた。DXR、CPT いずれの化合物に対する MF は、全ての細胞で明らかに増加したが、各細胞

の遺伝子突然変異検出力には顕著な差は見られなかった (岡)。

C-9 遺伝子導入哺乳類細胞を用いた遺伝毒性スクリーニング法の開発

Pol κ KI マウスおよび *gpt delta* マウス (以下、野生型マウスと記す) で、末梢血中幼若赤血球における小核出現頻度は、MMC 投与により投与前と比較して有意に増加し、pol κ KI マウスの値は、野生型マウスの値を僅かに上回った。*gpt* アッセイの結果、野生型マウスの 6-TG 耐性の MF 値は、MMC 投与により対照群と比較して 1.7 倍高い値を示したが、有意差は認められなかった。これに対して pol κ I マウスでの MF は MMC 投与により対照群と比較して 3.5 倍に有意に増加した。変異スペクトルについて、野生型マウス、pol κ KI マウスともに MMC 投与により G→T の 1 塩基置換および GpG におけるタンデム塩基置換が増加した。タンデム塩基置換の変異頻度に着目すると pol κ KI マウスでは野生型マウスと比較して約 3 倍高値を示した。Spi⁻ アッセイの結果、野生型マウスでの MF 値は、MMC 投与による増加がみられなかったが、pol κ KI マウスでの MF 値は MMC 投与により対照群の 2.4 倍に有意に増加した。変異スペクトラムを解析した結果、野生型マウスでは MMC 投与により大きな欠失の変異頻度が対照群の約 3 倍に増加したのに対して、pol κ KI マウスでは増加が認められなかった。pol κ KI マウスでは、MMC 投与により -1G および -1C の 1 塩基欠失が対照群と比較してそれぞれ約 2 倍および約 3 倍に増加したが、野生型マウスではこの増加は認められなかった。また、対照群での変異について、pol κ KI マウスでは野生型マウスと比較して約 3 倍高い頻度で、-1G の 1 塩基欠失が誘発された (三島)。

C-10 *gpt delta* マウスを用いた環境化学物質の発がん機序解明へのアプローチ

病理組織学的検査の結果、TTE 併用投与群のみ肝海綿状変性を伴った GST-P 陰性の結節性肝細胞過形成病変が高頻度に認められた。

8-OHdG レベルは DEN 単独群で対照群に比べ有意に上昇したが、TTE 併用投与による影響は認められなかった。*gpt* MF ならびに変異コロニーのスペクトラム解析の結果、DEN 単独群では GC-TA 及び AT-TA トランスバージョン変異を伴う *gpt* MF の有意な上昇が認められたが、TTE 併用投与による影響は認められなかった。*cyclin D1* の mRNA 発現量は DEN 単独群及び TTE 併用投与群で変化は認められなかったのに対し、*cyclin E1* の mRNA 発現量は TTE 併用投与群で対照群及び DEN 単独群に比べ有意に上昇した。さらに *cyclin E1* のタンパク発現量は DEN 単独群で対照群に比べ有意に上昇し、TTE の併用投与でさらに上昇した (西川)。

C-11 遺伝毒性評価用トランスジェニックラットのバリデーション

昨年度の研究で、TMX はラット肝において *gpt* および Spi-MF の上昇を示したが、TRM では変異原性は検出されなかった。今年度は、肝臓の Spi-変異体についてシーケンス解析を行った。対照群の Spi-変異体は 5 クローンで、そのうち、4 クローンは *gam* 遺伝子内の小さな欠失であり、残りの 1 クローンは PCR でバンドが検出さず複雑な欠失であることが示唆された。TMX3 週間経口群の Spi-変異体は 79 クローンで、そのうち、一塩基欠失と考えられる変異が 66 クローン、約 2~4.5 kb の比較的大きな欠失は 6 クローンだった。残りの 7 クローンについては PCR によってバンドが検出されなかった。PCR でバンドが検出された 72 クローンについてシーケンスを解析した結果、TMX 群、対照群ともに 1 bp の欠失の頻度が最も高かったが、TMX 群では 2 bp 以上の欠失も観察された。腎臓における遺伝毒性は、TMX の 13 週間混餌群と、3 週間経口群に

ついて、*gpt* MF 値および Spi-MF 値に有意な差はみられなかった。TRM の 3 週間経口群の腎臓における *gpt* の MF 値と Spi-の MF 値も、対照群と TRM 投与群で有意な差はみられなかった (林)。

C-12 フローサイトメトリーによる in vivo 小核試験のバリデーション

COL 及び VIN を単回腹腔内投与し、末梢血における小核出現頻度を、フローサイトメトリー及び顕微鏡を用いて算出した結果、いずれの方法でも、0.5 及び 1.0 mg/kg の COL および VIN 投与群において、投与後 48 時間で小核の有意な増加が認められた。コメット試験の結果の %tail DNA について、COL 及び VIN の肝臓及び骨髄のいずれにおいても増加が認められなかったのに対して、CP を投与した群においては有意な増加が認められた (真田)。

D. 考察

医薬品を含む化学物質の安全性評価は、ラット、マウスなど動物を用いる毒性試験の結果に基づいて行われてきたが、近年、*in vitro* (培養細胞) で動物試験を代替 (Replacement) する手法の確立が求められている。また、動物を用いる際にも、動物数の削減 (Reduction) と、同一の個体からより多くの有用情報を得ること (Refinement) が求められている。だが、動物を用いた試験結果の全てを、培養細胞で代替できるかについては不明な点も多く、医薬品の安全性を考える上で代替毒性試験法の評価が重要な課題である。また、動物数の削減、有用情報の取得を可能にするためには、新しい実験動物の作出も必要で、それに伴いバリデーションの作業が発生する。

本研究班では、班全体を 3 つのグループに分け、第 1 グループではヒト代謝酵素遺伝子を導入した微生物ハイスループット遺伝毒性試験の開発、第 2 グループでは、発がん物質をよりの

確に検出するヒト細胞株の創出と評価、第3グループでは、F344 *gpt delta* トランスジェニックラットの有用性の検討を軸に、遺伝毒性試験全体を再構築することを目指した。

第一のグループでは、umu 試験菌株に4種類のヒト薬物代謝酵素を導入した新規試験菌株 OY1022/1A1、OY1022/1A2、OY1022/1B1、OY1022/3A4 を作製した。DNB[e]P の遺伝毒性作用における CYP の役割を検討し、CYP3A4、CYP1A2、CYP1A1 の関与を示唆した(小田)。ヒト CYP を発現する umu 試験菌株を用いて、従来の試験管法と同等の感度を得られるマイクロプレート umu 試験法を確立した(藤居)。また、キット化の条件を検討し、CYP 酵素を発現させてから菌株を超冷凍保存することで、umu 試験の実施時間を短縮させることができることを示した(平田)。Ames 試験で陽性、FAT(液体法)で陰性を示した5種の NTP 選定化合物について、FAT(寒天法)で試験を行い、FAT(寒天法)の有用性を明らかにした。FAT(寒天法)は、Ames 試験に比べて少量の被験物質で試験を実施できる(須井)。

第二グループでは、*pol κ* の野生型、KI 細胞株、KO 細胞株について、生存率、突然変異等を比較した。*pol κ* KO 細胞は H₂O₂ に感受性を示し、この細胞株が酸化 DNA 損傷の検出に有効である可能性を示した(能美)。遺伝毒性の発現の違いを説明するため、代謝物による DNA アダクト生成検討し、*in vivo* に比べ *in vitro* では AA の遺伝毒性が検出しにくいことを示した。AA のように、CYP2E1 が関与する化学物質に関しては、*in vitro* 試験ではその遺伝毒性を検出しにくい場合が報告されている(例えばウレタン)。CYP2E1 で代謝活性化される遺伝毒性物質を高感度に検出できる新規の *in vitro* 試験法の開発、もしくは *in vivo* 試験を組み込んだストラテジーの構築が望まれる(本間)。*in vitro* 小核試験を用いて、ヒト、サル、ラット肝臓ミクロソームの代謝活性化に関する種差を検討したが、代謝全体のプロファイルの違い(ヒト、サル対ラット、マウス)が、必ずしも *in vitro* 小核試験の結果に反映されるものではないことを示した(伊東)。ヒトのリンパ芽球様細胞に由来する TK6 細胞(*p53* 野生型)と、*p53* に変異を持つ WTK-1 細胞、さらにマウスの白血病細胞由来の *p53* 変異 MOLY 細胞を用いて、GEM、DXR、CPT の3種類の遺伝毒性物質を試験し、*p53* が不活化した MOLY 細胞で細胞毒性が強く現れることを示し、野生型 *p53* を持つ細胞の重要性を示唆した(岡)。

第三グループでは、作出した *gpt delta pol κ* KI マウスおよび *gpt delta* ラット等のバリデーションを進めた。MMC で処理した *pol κ* KI マウスにおいて GpG サイトでのタンデム塩基置換の変異頻度が増加したことから、GpG サイトに形成された *intrastrand cross-link* を *pol κ* が正確に複製していることが示唆された。また、同じく、Spi⁻ アッセイの結果から、*pol κ* が二重鎖切断 DNA の修復において重要な役割を持つことが強く示唆された(三島)。*gpt delta* ラットを用いた実験で、DEN によって引き起こされる 8-OHdG 及び *gpt* MF の上昇に対する TTE 併用投与の影響は認められず、DEN 誘発肝発がん TTE が抑制効果を示す可能性は低いと考えられた(西川)。癌原性物質であり遺伝毒性物質である TMX の遺伝毒性を、発がんの標的臓器である肝臓で検出できたことから、*gpt delta* ラットを用いた遺伝毒性試験は、様々な医薬品開発ステージにおいて評価化合物の遺伝毒性リスク評価及び癌原性予測に有用である可能性が考えられた。たとえば、創薬初期に実施される4週間反復投与毒性試験にトランスジェニック動物を用い、一般毒性と遺伝毒性を同時に評価することにより、より少数の動物を用いてより迅速にその遺伝毒性を評価できるものと期待される(林)。フローサイトメトリーを用いた小核測定法は、現在行われている顕微鏡下での観察と比

べ簡便な方法であり、一般毒性試験に組み込める可能性もあることから、医薬品開発におけるハイ・スループット化と動物愛護の観点においてもその有用性が期待できる（真田）。

以上、本研究班では、各グループがそれぞれのモデル生物（微生物、ヒト細胞、マウス・ラット）を用いて、それぞれの試験系に検討を加え、有用性を高め、ヒトに対する遺伝毒性リスク評価に貢献する基盤的研究を推進した。

E. 結論

最終年度は、遺伝毒性分野における代替法の確立を目的に、主に以下の点を達成した。

- ①ヒト薬物代謝酵素を発現するハイ・スループット微生物遺伝毒性試験（umu 試験）のキット化
- ②薬物代謝酵素発現トランスジェニックヒト細胞を用いて、アクリルアミドが *in vivo* 特異的遺伝毒性物質であることを明らかにした
- ③ *gpt delta pol κ KI* マウスを樹立し、*pol κ KI* マウスが MMC に対して高い感受性を示すことを明らかにした。
- ④ TMX を用い F344 *gpt delta* ラットの有用性を示した。

3R を考える時に、F344 *gpt delta* ラットの有用性の証明は重要である。F344 *gpt delta* ラットを4週間反復毒性試験あるいは13週間発がん予備試験に組み込むことにより、一般毒性と遺伝毒性を同時に評価することにより、毒性試験に用いるラット頭数の削減が実現できる。また、同試験に小核試験を組み込むことで、多様な毒性情報を同一個体から取得することが可能となる。統合的な（遺伝）毒性試験は、今後のトキシコロジーの流れになると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Toyoda-Hokaiwado, N., Inoue, T., Masumura, K., Hayashi, H., Kawamura, Y., Kurata, Y., Takamune, M., Yamada, M., Sanada, H., Umemura, T., Nishikawa, A., Nohmi, T., Integration of *in vivo* genotoxicity and short-term carcinogenicity assays using F344 *gpt delta* transgenic rats: *in vivo* mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene structural isomers, *Toxicol. Sci.*, 114, 71-78 (2010)
- 2) Katafuchi, A., Sassa, A., Niimi, N., Gruz, P., Fujimoto, H., Masutani, C., Hanaoka, F., Ohta, T., Nohmi, T., Critical amino acids in human DNA polymerases ϵ and κ involved in erroneous incorporation of oxidized nucleotides, *Nucleic Acids Res.*, 38, 859-867 (2010)
- 3) Fukuda, H., Takamura-Enya, T., Masuda, Y., Nohmi, T., Seki, C., Kamiya, K., Sugimura, T., Masutani, C., Hanaoka, F., Nakagama, H., Translesional DNA synthesis through a C8-guanyl adduct of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) *in vitro*: Rev1 inserts dC opposite the lesion and DNA polymerase κ potentially catalyzes extension reaction from the 3'-dC terminus, *J. Biol. Chem.*, 284, 25585-25592 (2009)
- 4) Salem, A.M., Nakano, T., Takuwa, M., Matoba, N., Tsuboi, T., Terato, H., Yamamoto, K., Yamada, M., Nohmi, T., Ide, H., Genetic analysis of repair and damage tolerance mechanisms for DNA-protein crosslinks in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 191, 5657-5668 (2009)
- 5) Valent, A., Perugini, G., Nohmi, T., Rossi, M., Ciaramella, M., Inhibition of translesion DNA polymerase by archaeal reverse gyrase, *Nucleic Acids Res.*, 37, 1287-4295 (2009)
- 6) Niimi, N., Sassa, A., Katafuchi, A., Grúz, P., Fujimoto, H., Bonala, R.R., Johnson, F., Ohta, T., Nohmi, T., The steric gate amino acid tyrosine 112 is required for efficient mismatched-primer extension by human DNA polymerase κ , *Biochem.*, 48, 4239-4246 (2009)
- 7) Galhardo, R.S., Do, R., Yamada, M., Friedberg, E.C., Hastings, P.J., Nohmi, T., Rosenberg, S.M., DinB up-regulation is the sole role of the SOS response in

- stress-induced mutagenesis in *Escherichia coli*, Genetics, 182, 55-68 (2009)
- 8) Eastmond, D.A., Hartwig, A., Anderson, D., Anwar, W.A., Cimino, M.C., Dobrev, I., Douglas, G.R., Nohmi, T., Phillips, D.H., Vickers, C., Mutagenicity testing for chemical risk assessment, Mutagenesis, 24, 341-349 (2009)
- 9) Masumura, K., Nohmi, T., Spontaneous mutagenesis in rodents: Spontaneous gene mutations identified by neutral reporter genes in *gpt* delta transgenic mice and rats, J. Health Sci., 55, 40-49 (2009)
- 10) Oda, Y., Hirayama, T., Watanabe, T., Genotoxic activation of the environmental pollutant 3,6-dinitrobenzo[*e*]pyrene in *Salmonella typhimurium umu* strains expressing human cytochrome P450 and *N*-acetyltransferase, Toxicology Letters Research, 188, 258-262 (2009)
- 11) Sui, H., Kawakami, K., Sakurai, N., Hara, T., Nohmi, T., Improvement and evaluation of high throughput fluctuation Ames test using 384-well plate with *Salmonella typhimurium* TA100 and TA98, Genes and Environment, 31, 47-55 (2009)
- 12) Takashima Y, Sakuraba M, Koizumi T, Sakamoto H, Hayashi M, Honma M., Dependence of DNA double strand break repair pathways on cell cycle phase in human lymphoblastoid cells, Environ Mol Mutagen., 815-822 (2009)
- 13) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N., Moore, M.M., The mouse lymphoma assay detects recombination, deletion, and aneuploidy, Toxicol Sci. 109, 96-105 (2009)
- 14) Yatagai, F., Sugasawa, K., Enomoto, S., Honma, M., An approach to estimation from DSB repair efficiency, J. Radiat. Res., 50, 407-413 (2009)
- 15) Koyama, N., Yasui, M., Oda, Y., Suzuki, S., Satoh, T., Suzuki, T., Matsuda, T., Masuda, S., Kinoue, N., Honma, M., Genotoxicity of acrylamide *in vitro*: Acrylamide is not metabolically activated in standard *in vitro* systems, Environ Mol Mutagen. (in press)

2. 学会発表

- 1) 新見直子、飯泉晋、足立典隆、小山秀機、能美健彦、ヒト細胞におけるDNAポリメラーゼκの機能解析、第32回日本分子生物学会年会(2009, 12)
- 2) Niimi, N., Gruz, P., Iiizumi, S., Adachi, N., Koyama, H., Nohmi, T., Establishment of human cell lines lacking the catalytic activity of DNA polymerase kappa involved in translesion DNA synthesis, The 40th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Foundation (2009, 11)
- 3) Katafuchi, A., Sassa, A., Niimi, N., Gruz, P., Fujimoto, H., Masutani, C., Hanaoka, F., Ohta, T., Nohmi, T., Erroneous incorporation of oxidized nucleotides by Y-family DNA polymerases, 10th ICEM, (2009.8)
- 4) Niimi, N., Sassa, A., Katafuchi, A., Gruz, P., Fujimoto, H., Bonala, R.-R., Johnson, F., Ohta, T., Nohmi, T., A crucial role for the steric gate amino acid tyrosine 112 in efficient mismatched-primer extension by human DNA polymerase κ, ASM Conferences, DNA Repair and Mutagenesis, (2009.6)
- 5) Oda, Y., Kojima, Y., Human immunodeficiency virus type-1 vpr Induces SOS function and homologous recombination in bacteria, 日本環境変異原学会第38回大会 (2009.11)
- 6) Kawachi, Y., Oda, Y., Miyazawa, M., Inhibitory effect of monoterpenes on nicotine metabolism, 日本環境変異原学会第38回大会 (2009.11)
- 7) Oda, Y., Hori, H., Fujii, W., Evaluation of high-throughput *umu* test system using tester strains expressing human cytochrome P450 enzymes, 10th ICEM, (2009.8)
- 8) 堀妃佐子、藤居 亙、小田美光、ヒト型薬物

- 代謝酵素を発現する *umu* 試験菌株を用いた遺伝毒性試験のハイスループット化の検討、日本環境変異原学会第 38 回大会 (2009.11)
- 9) Hirata, D., Mochida, H., Oda, Y., Attempt of genotoxicity test kit using *umu* tester strain expressing human cytochrome P450 enzyme, 日本環境変異原学会第 38 回大会 (2009.11)
- 10) 須井 哉、川上久美子、桜井徳子、奥富弘子、太田亮、能美健彦、ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験法の検討 5、日本環境変異原学会第 38 回大会 (2009.11)
- 11) Honma, M., Kumita, W., Sakuraba, M., Demonstration of ionizing irradiation inducing genomic instability via breakage-fusion-bridge cycle in human cells by CGH-microarray, Keystone symposia "Genome Instability and DNA Repair (2009.3)
- 12) Honma, M., Koyama, N., Kimura, A., Yasui, M., Takami, S., Takahashi, M., Imai, T., Yamamoto, Y., Kumita, W., Masumura, K., Masuda, S., Kinase, N., Matsuda, T., Nohmi, T., Child-adult differences in evaluation of *in vivo* genotoxicity of acrylamide, 48th Annual Meeting for Society of Toxicology (2009.3)
- 13) Kimura, A., Sakamoto, H., Saigo, K., Sukamoto, T., Honma, M., Establishment of simple *in vitro* Comet Assay Protocol, 48th Annual Meeting for Society of Toxicology (2009.3)
- 14) Honma, M., DNA double strand break repair and genomic stability, The 14th Academic Conference of Chinese Environmental Mutagen Society (2009.7)
- 15) Uno, Y., Kojima, H., Honma, M., Tice, R., Corvi, R., Schechtman, L., Hayashi, M., *In vivo* Comet assay: update on going international validation coordinated by JaCVAM, 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009.8)
- 16) Yasui, M., Koyama, N., Koizumi, T., Sakuraba, M., Takashima, Y., Hayashi, M., Sugimoto, K., Honma, M., Life cycle of micronucleus analyzed by confocal live cell imaging, 10th ICEM (2009.8)
- 17) Koyama, N., Kimura, A., Yasui, M., Takami, S., Takahashi, M., Inoue, K., Yoshida, M., Imai, T., Shibutani, M., Suzuki, T., Yamamoto, A., Kumita, W., Masumura, K., Horibata, K., Masuda, S., Kinase, N., Nohmi, T., Honma, M., Child-adult difference in evaluation of *in vitro* genotoxicity of acrylamide, 10th ICEM (2009.8)
- 18) Suzuki, T., Kohara, A., Ramadan, A., Kikuchi, Y., Honma, M., Hayashi, M., Comparative study of *in vitro* genotoxicity of ochratoxin A and aristolochic acid as a causative for Balkan endemic nephropathy, 10th ICEM (2009.8)
- 19) Honma, M., Yamakage, K., Burlingson, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., Hayashi, M., Nakajima, M., Suzuki, M., Corvi, R., Uno, Y., Schechtman, L., Tice, R., Kojima, H., International validation study of the *in vitro* alkaline comet assay, 10th ICEM (2009.8)
- 20) Hirose, A., Kamata, T., Yamazaki, T., Sato, K., Yamada, M., Ono, A., Fukumoto, T., Okamura, H., Mirokuji, Y., Honma, M., Validation of the (Q)SAR combination approach for mutagenicity prediction of flavour chemicals, 10th ICEM (2009.8)
- 21) Honma, M., The new ICH guidance on genotoxicity, International Conference on Environment, Occupational & Lifestyle Concern-Transdisciplinary Approach (2009.9)
- 22) Honma, M., Takashima, Y., Sakuraba, M., Koizumi, T., Sakamoto, H., Hayashi, M., DNA double strand break repair pathways and its dependence on cell cycle phases in human lymphoblastoid cells, Environmental Mutagen Society 40th Annual Meeting (2009.10)
- 23) 本間正充、*In vitro* 遺伝毒性試験における最高用量と細胞毒性の評価、日本環境変異原学会第 38 回大会 (2009.11)
- 24) 小山直己、木村葵、安井学、高見成昭、高橋美和、井上薫、吉田緑、今井俊夫、渋谷淳、鈴木拓也、増村健一、堀端克良、増田

- 修一、木苗直秀、松田知成、能美健彦、本間正充、ライフステージ（週齢）を考慮したアクリルアミドの多臓器遺伝毒性評価、日本環境変異原学会第 38 回大会（2009.11）
- 25) 安井学、小山直己、高島良生、林真、杉本憲治、本間正充；共焦点ライブセルイメージングによって明らかとなった小核のライフサイクル、日本環境変異原学会第 38 回大会（2009.11）
- 26) 鈴木孝昌、小原有弘、ラマダン・アリ、菊池裕、本間正充、林真、バルカン腎症の原因物質としてのアリストロキア酸およびオクラトキシン A、日本環境変異原学会第 38 回大会（2009.11）
- 27) 谷田貝文夫、高橋昭久、本間正充、鈴木ひろみ、大森克徳、関真也、橋爪藤子、鵜飼明子、島津徹、榎本秀一、堂前直、大西武雄、石岡憲昭；国際宇宙ステーション利用実験、ヒト培養細胞の突然変異解析から宇宙環境の生物影響を解明する試み、日本環境変異原学会第 38 回大会（2009.11）
- 28) 山本歩、本間正充、Unconectable I-SceI サイトの挿入による放射線損傷様二本鎖 DNA 切断の修復機構の解析、日本放射線影響学会第 52 回大会（2009.11）
- 29) 安井学、本間正充、8-オキシグアニン 1 分子のゲノム内における突然変異誘発能の解析系の確立；低線量電離放射線の暴露モデルとして、日本放射線影響学会第 52 回大会（2009.11）
- 30) 本間正充、山影康次、Burlingson, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., 林真、中嶋圓、鈴木雅也、Corvi, R., 宇野芳文、Schechtman, L., Tice, R., 小島肇；In vitro アルカリコメットアッセイ国際バリデーション研究、第 22 回日本動物実験代替法学会総会（2009.11）
- 31) The new paradigm of genotoxicity testing in regulatory science -ICH guideline and IWGT consensus-The 1st International Symposium on the Drug Safety Evaluation（2009.12）
- 32) Kishino, Y., Hasegawa, T., Arakawa, S., Shibaya, Y., Takasaki, W., Yamoto, T., Sanbuissho, A., Manabe, S., Characterization of induced rat S9 for appropriate extrapolation from *in vitro* to *in vivo* in genotoxicity studies, 10th ICEM（2009, 8）
- 33) 井上知紀、豊田尚美、田崎雅子、岡村俊也、石井雄二、増井則夫、能美健彦、梅村隆志、西川秋佳；ビタミン E 活性を有する Tocotrienol 併用投与に diethylnitrosamine 誘発ラット肝の *in vivo* 変異原性および前がん病変に対する予防効果、がん予防大会 2009（2009.6）
- 34) 井上知紀、田崎雅子、石井雄二、岡村俊也、鈴木裕太、増井則夫、能美健彦、梅村隆志、西川秋佳、Tocotrienol 投与によるラット肝 *in vivo* 変異原性ならびにプロモーション作用の検索、第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会（2009.7）
- 35) Inoue, T., Tasaki, M., Ishii, Y., Okamura, T., Suzuki, Y., Jin, M., Hibi, D., Nohmi, T., Umemura, T., Nishikawa, A., Lack of *in vivo* mutagenicity and tumor-promotion activity in the livers of rats treated with tocotrienol, 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association（2009.10）
- 36) 井上知紀、日比大介、豊田尚美、田崎雅子、岡村俊也、金美蘭、鈴木裕太、石井雄二、能美健彦、梅村隆志、西川秋佳；F344 系 *gpt* delta ラットを用いた DEN 誘発肝の *in vivo* 変異原性ならびに前がん病変に対するトコトリエノールの修飾効果、第 26 回日本毒性病理学会（2010.2）
- 37) 真田尚和、櫻田直美、米澤 豊、入山昌美、本間正充、Colchicine 及び Vinblastine のラット末梢血を用いた小核試験 日本環境変異原学会第 38 回大会（2009.11）
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

ファーマコゲノミクス情報に基づいた医薬品の有効性及び安全性評価系の開発と医薬品開発への応用

所属 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部
研究者 黒瀬 光一
研究期間 平成 19 年 4 月～平成 22 年 3 月

研究要旨 比較的頻度の高い主要薬物代謝動態関連分子につき遺伝子多型の機能影響を明らかにし、医薬品開発において考慮すべき重要多型を明らかにした。候補遺伝子解析・網羅的遺伝子多型解析を行い、抗うつ薬の有効性・安全性と関連のある SNP 候補を見出した。PGx 試験のための支援・評価システムについては大阪圏の医療機関において構築し、患者試料の収集を行った。

研究分担者

- 1) 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 齋藤嘉朗
- 2) 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 佐井君江
- 3) 積水メディカル(株) つくば研究所 森 篤雄
- 4) 田辺三菱製薬(株) 薬物動態研究所 丹羽卓朗
- 5) 兵庫医療大学 (大阪大学薬学研究科) 東 純一
- 6) 岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 埴岡伸光
- 7) 関西医科大学 精神神経科 奥川 学
- 8) 明治製菓 (株) 医薬総合研究所 平塚一幸
- 9) 薬効ゲノム情報 (株) 伊藤継孝
- 10) 鹿児島大学フロンティアサイエンス 研究推進センター 佐藤正宏
- 11) ファイザー(株) 中央研究所 岩崎一秀

A. 研究目的

厚生労働省厚生科学審議会では、2010 年頃までにファーマコゲノミクス (PGx) に基づく医薬品の評価手法を確立する、という目標を提示している。それを踏まえ、本研究では、PGx 情報を活用した適切な患者個別化薬物治療を実現するために、薬物応答性の個体差に関わる遺伝子要因を検出・解析して、その医薬品開発における重要性を評価すると共に、医薬品開発・臨床応用に即した PGx 情報の効率的活用法の開発を目的とした。薬物応答性の個人差や人種差は、薬物応答性分子の遺伝子多型に基づく機能の差異に起因し、それにより薬物体内動態や受容体の量的・質的变化がもたらされることが、近年明らかになってきた。本研究では、まず薬物動態関連分子の機能変化を引き起こし得る比較的頻度の高い多型について、その機能影響を評価し、医薬品開発において考慮すべき重要多型を明らかにし、一覧を作

成する。さらにこれらに関しては、臨床における評価が可能となるよう迅速タイピング系をあわせて開発する。他方、遺伝子の違いに起因する個人差を幅広く検索するためには、対象遺伝子を限定せず、ゲノム網羅的に調べることも必要であると考えられる。そこで、近年投与患者が増加している抗うつ薬 (SSRI、SNRI) を例として、関連する候補遺伝子多型に加えて、全ゲノムに渡り網羅的に多型解析し、薬効や副作用の発現と相関する薬物応答性分子の遺伝子多型を副作用発症群と対照群、有効例と無効例とで比較・解析して、その有用性を検討する。また、PGx 試験の実施に必要な支援・評価システムも併せて構築する。

B. 研究方法

① 遺伝子多型のインビトロ機能解析

CYP2C9 の 3 多型及び CYP3A4 の 2 多型に関しては、cDNA に変異導入後、シトクロム P450 還元酵素 (POR) と共発現し得る様に組換えバキュロウィルスを調製し、Sf21 細胞に感染させて変異型酵素及び POR を発現し、マイクロソーム画分を用いて酵素活性を測定した。また CYP2C8 の 2 多型については、酵母発現系を用いて発現した。CYP2C9 についてはジクロフェナク (DIC)、ロサルタン (LOS)、グリメピリド (GLM) を基質として HPLC または HPLC-MS 系にて、CYP3A4 についてはパクリタキセル (PTX)、アトルバスタチン (ATV)、カルバマゼピン (CBZ)、ミダゾラム (MDZ)、イリノテカン (IRI)、テルフェナジン (TER) を基質として HPLC-MS/MS または HPLC-MS 系にて、CYP2C8 については PTX を基質として HPLC 系にて、それぞれ代謝物の生成量を測定した。

② 有用遺伝子多型の一覧作成

国立衛研で解析し公表した結果に加えて、文献検