

げる高分子添加剤を添加した非晶質製剤は保存による溶出性の低下が少なく安定であることが示され、水分活性の評価は非晶質製剤の安定性評価法として有用であることが分かった。

ナノ微粒子製剤の過飽和状態における薬物-添加剤相互作用の評価に¹H-NMR 差NOE測定が有用であることが明らかになった。今後、NMR 拡散測定等の他の手法を組み合わせることで、ナノ微粒子の構造および分子状態の詳細な評価を行う必要があると考えられる。また、分散剤の表面自由エネルギーを評価することにより、湿式粉碎による微粒化を支配する分散剤の物性を明らかにできた。さらに物性の異なる薬物について検討を行い、普遍性の確認が必要であると考えられる。

今回確立した CF 混合物を用いる cocrystal 結晶化スクリーニング系は cocrystal の形成を可能にする CF 側の物性(synthon 構造)を短時間に評価できる有用なスクリーニング系であると考えられる。また、従来法と比べて cocrystal の探査に要する時間、工数が大幅に削減され、創薬研究に寄与できるものと考えられる。

(2) 機能性製剤の生物薬剤学的評価法に関する研究

リポソーム製剤、皮膚適用製剤、経口固形製剤の生物薬剤学的評価法について有用な知見を得ることができた。

数多くのリポソーム製剤が上市されたのは、大量生産法、無菌化法、安定化法、薬物の高封入法などの製剤工学的な問題点、体内での安定性や肝臓や脾臓などの細網内皮系 (RES) に取り込まれやすいなどの生物化学的な問題点が徐々に克服されたためと考えられた。また、血清中におけるリポソーム製剤の安定性には組成や内封した薬物との相性が大きく関係し、脂質組成選択の重要性を明らかにした。リポソームに内封された抗がん剤 A の細胞内取り込みはトランスポーターを介さないため、トランスポーター発現の差による抗がん剤効果の個人差を無くせる可能性が示唆された。リポソーム製剤と相互作用を起こすタンパク質に関しては、今まで報告されていないタンパク質が同定され、SPR 解析することで、タンパク質の種類によってリポソームとの相互作用様式が異なる可能性が示唆された。

フロースルーセル法の評価では、経口固形製剤をモデルとして、溶出性に影響する種々の要因を明らかにするとともに、徐放性製剤や難溶性医薬品の溶出性試験へのフロースルーセル法適用の有用性を示唆した。さらに、溶出挙動に基づく血中薬物

濃度推移の予測を可能にする有用なモデル式を確立したが、さらに精度の良い予測を可能するための改良が期待された。

塩基性難溶性薬物の製剤設計では、クエン酸や酒石酸の添加や CD による溶液化により BA が大きく改善されることを明らかにし、皮膚適用製剤に関しては、ヒトとの乖離が大きいラットのような小動物に代わり、ブタを用いた *in vivo*MD 法が、ヒト組織移行性予測において有用であることを明らかにした。

(3) ナノ粒子 DDS 製剤の体内動態に関わる製剤特性研究

ナノ粒子 DDS 製剤である高分子ミセル製剤、リポソーム製剤に関し、薬物放出性、標的性、生体内安定性といった体内動態に影響を及ぼす物性、および動態評価手法に関する研究、さらに生体側の因子に関する研究を行った。

高分子ミセルの内核を構成する高分子鎖の高次構造を制御することによって、ミセルの形成プロセスや物性を制御することに世界で初めて成功した。また、血管の透過性が低く、間質量の多い膵臓がんにおいてはミセルのサイズが 50nm 以下の場合においてのみがん組織の深部にまでミセルが到達できることが明らかになっており(未発表データ)、内核に α -helix 構造を有する DACHPt/m は、膵臓がんに対しても高い有効性を示すことが期待される。

一方、DBD と Nile-Red を蛍光団としてポリマーを調製した結果 FRET 現象が観察されたことにより、両者がミセルを形成していることが示された。これは細胞内におけるミセルの存在を蛍光顕微鏡で観察できるだけでなく、ポリマーがミセルとして存在しているか、経時的にミセルが崩壊しているかなどより詳細な細胞内動態に関する情報が得られると期待される。実際に、本研究においては蛍光標識ナノ粒子を用いて、細胞内におけるナノ粒子の取り込み量に関する半定量的解析や取り込みに及ぼすナノ粒子の物性評価が可能であるなど、細胞内動態の解析手法として共焦点顕微鏡が有用であることが示唆された。

また、生体内におけるナノ粒子 DDS 製剤の薬物放出特性は主要な製剤特性である。本研究で開発したリポソーム製剤の封入率測定システムにより、リポソーム製剤工程確認やドキシソルピシンの放出試験、血中に存在するリポソームに内在するドキシソルピシンと遊離のドキシソルピシンの定量をより簡便に実施することが可能となり、ナノ粒子 DDS

製剤の製剤開発の上で強力なツールになると期待される。

さらに本研究では、医薬品や製剤添加物の体内動態を左右する生体側因子に着目し、その中心的な役割を果たしている薬物トランスポーターの機能解析を行った。遺伝子欠損マウスを用いて解析した結果、薬物トランスポーターOat3は、とくに脳脊髄液中のアニオン性薬物の曝露を決定づける重要なトランスポーターであることが示された。しかし薬物、部位によりOat3欠損の影響は異なり、他のトランスポーターの関与も考えられ、今後さらに異物排泄に働くトランスポーター群を探索、同定していく予定である。

(4) 製剤開発および製造工程管理手法研究

近年の製剤開発の指針として出されたICH Q8ガイドラインでは、科学的な根拠を基にした体系的な製剤開発アプローチ、いわゆるQuality by Designを採用することが奨励されている。そのため、製造プロセスの理解を進めて重要品質特性を把握する技術、製造工程をモニタリングし、重要品質特性をコントロールする技術、そして最終的な製品の品質特性を迅速かつ適切に評価できる技術が必要となると考えられる。本研究では、原薬合成工程におけるラマン分光法やUHPLC/MS、錠剤コーティング工程における近赤外分光法、テラヘルツ分光法が製造工程モニタリング技術として有用であることを示した。これらのモニタリング技術は、製造工程における重要品質特性を把握する技術として有用であるばかりでなく、開発段階における条件検討などの際にも有用な情報を迅速に提供でき、製造プロセスの理解および開発を迅速に進めることができると考えられた。特に、製剤開発においてしばしば問題が生じるスケールアップの際の条件検討にも対応できることが実データにより示された意義は大きいと考えられた。

そして医薬品製造業以外の分野においては既にQuality by Designの考え方が浸透している製造業は多い。本研究で検討を行ったTOF-SIMSは半導体の試験、光励起非破壊検査や超音波非接触測定装置は自動車製造などの試験検査等に使用されており、このような他の業界からの技術導入が有効であると考えられた。また溶出試験におけるステーションナリーバスケット法やPASのように、従来からある分析技術でも測定感度や試験の煩雑さ等の問題から使われていなかった技術についても改善を加えることにより有用な分析技術として活用できることが示され、このような分析技術もまだ多

く存在すると考えられた。これらの技術は今後、製剤設計や製造に活用され、安定した品質の医薬品製造に貢献すると考えられる。

E. 結論

超難溶性薬物製剤、機能性製剤、ナノ粒子DDS製剤等の製剤特性評価法ならびに製造工程評価手法の開発、確立に向けて、

(1) 難溶性薬物製剤物性とその評価法を検討し、1-1) PVPとHPMCは異なるメカニズムによって非晶質ニフェジピンの結晶化を抑制することが分かった。また、水分活性測定による自由水の評価が非晶質製剤の安定性評価に有用であることが分かった。さらに、粒子径の制御が安定な非晶質製剤の設計に重要であることが分かった；

1-2) ¹H-NMR 差NOE測定により、CBZ/HPMCAS固体分散体を水に分散して得られた過飽和溶液の安定化メカニズムに関する知見が得られた。また、湿式粉碎によるナノ微粒子調製において、微粒子化を支配する分散剤の物性を抽出できた；

1-3) CF混合物を用いる効率的なcocrystal結晶化スクリーニング系を確立できた。

(2) 機能性製剤の生物薬剤学的評価法を検討し、2-1) リポソーム製剤に関しては、アクティブターゲティング型リポソーム製剤を調製し、*in vitro*における安定性、物放出能、ターゲティング能など製剤特性を明確にし、リポソーム製剤の評価方法の基礎を築いた。さらに、アクティブターゲティング型リポソームとして十分な機能を有するTf-PEG-リポソームを設計した。また、リポソームと相互作用する血清タンパク質を同定し、それらの結合性の評価のためのSPRを使った相互作用解析法を構築した。

2-2) フロースルーセル法の有用性の検討では、経口固形製剤をモデル薬物として評価し、データ取得ポイントの影響、流路の温度の影響、パドル法との溶出挙動の比較など基礎的な情報を蓄積し、シンク条件下での評価が可能であるため、難水溶性製剤の機能・特性評価にも非常に有用な手法であることが確認された。経口固形製剤の溶出からの血中濃度の予測では、既存のIVIVC構築モデルより優れた改良モデル式を確立した。

2-3) 難溶性塩基薬物の経口製剤設計では、クエン酸や酒石酸の添加、およびCDの添加により溶液とすることにより大きく改善されることを明らかにした。経皮吸収製剤の製剤評価では、ブタMD試験が、様々な組織において連続的に薬物濃

度を測定でき、外用剤の組織移行性研究のための有用なツールであることを示した。

(3) ナノ粒子 DDS 製剤の体内動態に関わる製剤側、生体側の機能評価法を検討し、

3-1) 高分子ミセルの内核を構成する高分子鎖の高次構造を制御することによって、ミセルの形成プロセスや物性を制御することに成功した。また、FRET 現象を利用した高分子ミセルを調製するとともに、蛍光標識ナノ粒子を利用し細胞内動態を観察する評価が有用であることを示した；

3-2) リポソーム製剤の封入率測定システムを構築し、リポソーム製剤工程確認やドキシソルピシンの放出試験、血中に存在する内在／遊離ドキシソルピシンの簡便な定量を可能とした；

3-3) 遺伝子欠損マウスを用い薬物トランスポーター Oat3 の機能解析を行った結果、薬物、部位により動態変動は異なるものの、Oat3 がとくに脳脊髄液中のアニオン性薬物の曝露を決定づける重要なトランスポーターであることを明らかとした。

(4) 医薬品の製剤開発時および製造工程においてリアルタイムあるいは超高速に重要品質特性の評価およびモニタリングが可能な分析評価手法を検討し、

4-1) 合成反応における経時変化把握、立体選択性評価ツールとしてラマン分光分析によるモニタリングの有用性が確認できた；

4-2) 近赤外分析法を用いたコーティング工程のリアルタイムモニタリングは製造スケールアップを行っても可能であった；

4-3) 内部蛍光検出法を用いた IMD を用いてバイオパーティクルを常時モニタリングすることで製造環境の微生物汚染を把握することができた；

4-4) 選択的モノ加水分解反応において、UHPLC/MS は迅速な分析時間を達成し、より短時間での工程モニターが可能であった；

4-5) オフラインにおいて時間領域テラヘルツ分光 / イメージング手法によりコーティング工程の経時的評価を行うことが可能であった；

4-6) 高感度光音響分光法の製剤評価への応用の可能性が示唆された；

4-7) ステーションナリーバスケット法を用いることにより溶出挙動の異なる製剤を高精度に識別できる手法を開発した；

4-8) 光励起非破壊検査は錠剤の内部情報探査に適用できた。超音波非接触測定装置は内部情報探査に適用できる可能性があることを示した；

4-9) TOF-SIMS を用いることにより従来法では解析が困難であったステアリン酸マグネシウムの分布が明確に解析できた；

4-10) 処方の違いおよび杵の金属材料の違いにより打錠障害の現れ方に大きな差が生じた。

F. 研究発表

1. 誌上発表

- 1) Miyazaki T., Aso Y., Kawanishi T.: Feasibility of atomic force microscopy for determining crystal growth rates of nifedipine at the surface of amorphous solids with and without polymers. *J. Pharm. Sci.*, in press .
- 2) Miyajima, M., Kusuhara, H., Fujishima, M., Adachi, Y., Sugiyama, Y.: Organic anion transporter 3 mediates the efflux transport of an amphiphathic organic anion, dehydroepiandrosterone sulfate, across the blood-brain barrier in mice. *Drug Metab Dispos*, in press.
- 3) Miyazaki T., Aso Y., Yoshioka S., Kawanishi T.: Differences in crystallization rate of nitrendipine enantiomers in amorphous solid dispersions with HPMC and HPMCP. *Int. J. Pharm.*, **407**, 111-118 (2011).
- 4) Izutsu, K., Yomota, C., Kawanishi, T., Stabilization of liposomes in frozen solutions through control of osmotic flow and internal solution freezing by trehalose. *J. Pharm. Sci.*, E-published (2011)
- 5) 加藤くみ子: ナノテクノロジーを応用した製剤に関する評価とその課題. *薬剤学*, **71**, 114-117 (2011).
- 6) Sakai-Kato, K., Hasegawa, T., Takaoka, A., Kato, M., Toyo'oka, T., Utsunomiya-Tate, N., Kawanishi, T.: Controlled structure and properties of silicate nanoparticle networks for incorporation of biosystem components. *Nanotechnology*, **22**, 205702 (2011).
- 7) Yoshioka, S., Aso, Y.: Molecular Mobility of freeze-dried formulation as determined by NMR relaxation times, and its effects on storage stability. Chap.13. In *Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*, 3rd Ed., Rey, L., May, J.C., Eds. Informa Healthcare, London, pp. 354-371 (2010).
- 8) Wang, B., Cicerone, M. T., Aso, Y., Pikal, M. J.: The impact of thermal treatment on the stability of freeze-dried amorphous pharmaceuticals: II. Aggregation in an IgG1 fusion protein. *J. Pharm. Sci.*,

- 99, 683-700 (2010).
- 9) Sakai-Kato, K., Saito, E., Ishikura, K., Kawanishi, T.: Analysis of intracellular doxorubicin and its metabolites by ultra-high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, **878**, 1466-1470 (2010).
- 10) 四方田千佳子, 柴田寛子, 後発医薬品を語るための知識(2), ファーマテクジャパン, 26, 1861-1867(2010)
2. 学会発表
- 1) 宮崎玉樹, 阿曾幸男, 川西徹:非晶質ニフェジピンの核生成速度および結晶成長速度に及ぼす高分子添加剤の影響.日本薬学会第131年会(2011.3).
- 2) 柴田寛子, 四方田千佳子, 川西徹 細胞培養液中におけるリポソーム製剤の凝集物形成に関する検討 日本薬学会第131年会 (2011.3)
- 3) 加藤くみ子, 水端美保, 大島裕希, 川西徹:製剤に用いられるシリカナノ粒子の物性評価に関する研究.日本薬学会第131年会(2011.3).
- 4) 小出達夫, 眞田則明, 戸津美矢子, 川西徹, 檜山行雄:飛行時間型二次イオン質量分析法 TOF-SIMS を用いた医薬品品質評価に関する研究. 日本薬学会 131 年会(2011.3).
- 5) 米持悦生, 森井譲治, 吉橋泰生, 寺田勝英:医薬品粉体の打錠用杵へのスティッキング特性に及ぼす粉体の表面物性の影響.日本薬学会 131 年会 (2011.3).
- 6) 坂本広明, 森口和信, 小林篤, 松永浩和, 小出達夫, 檜山行雄, 小澤昭夫:ステーションナリーバスケット法を用いた高精度・識別性を有する評価技術の開発.日本薬学会 131 年会(2011.3).
- 7) Miyazaki, T., Aso, Y., Kawanishi, T.: Different polymer content dependence between the nucleation rate and the crystal growth rate in amorphous nifedipine solid dispersions with PVP or HPMC. *AAPS/PSWC* (2010.11).
- 8) Hiroko Shibata, Chikako Yomota, Toru Kawanishi: Basic examination for in vitro release test of drug-encapsulated liposome. *AAPS/PSWC* (2010.11)
- 9) K. Maruyama., Targeted Intracellular Drug Delivery with Liposomes. *AAPS/PSWC* (2010.11)
- 10) Miyajima, M., Kusuhara, H., Kodaira, H., Sugiyama, Y.: Characterizing organic anion transport at the blood-brain barrier. *AAPS/PSWC* (2010.11).
- 11) Miyajima, M., Kusuhara, H., Kodaira, H., Sugiyama, Y.: Transport mechanisms of organic anions at the blood-brain barrier. *Globalization of Pharmaceutics Education Network* (2010.11).
- 12) 丸山一雄 トランスフェリン修飾リポソームによる細胞内送達と癌治療への応用 第17回日本血液代替物学会 (2010.10)
- 13) Koide, T., Kawanishi, T., Hiyama, Y.: Evaluation of granules made by high shear granulation using Raman mapping and imaging techniques. *37th FACSS* (2010.10).
- 14) 加藤くみ子, 齋藤栄子, 竹内豊英, 川西徹:モノリス型キャピラリーカラムを用いたナノ粒子のサイズ分離手法の開発.第21回クロマトグラフィー科学会議(2010.10).
- 15) 遠藤太郎, 松井航, 長門琢也, 長谷川浩二:錠剤コーティングプロセスにおけるコーティング性能のリアルタイムモニタリングに関する考察. 第27回製剤と粒子設計シンポジウム(2010.10).
- 16) 立木秀尚:製剤の溶出試験に関する IVIVC と今後の展望-ジェネリック医薬品開発での IVIVC の利用 第3回日本ファーマコメトリクス研究会 (2010.9)
- 17) Nishiyama, N., Cabral H., Kataoka, K.: Development of smart polymeric micelles for innovative cancer therapy. *World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* (2010.9).
- 18) Sakai-Kato, K., Kawanishi, T.: Current initiatives in Japan for nanomedicines. *First international workshop on nanomedicines* (2010.9).
- 19) 西山伸宏, 村上真美, オラシオ カブラル, 松本有, 片岡一則:高分子ミセルを利用した細胞内薬物分布の時空間制御に基づく耐性がんの克服. 第26回日本 DDS 学会(2010.6).
- 20) 小出達夫:顕微イメージング技術を用いた製剤開発および製造工程管理. 第28回物性物理化学研究会(2010.6).
- 21) 阿曾幸男, 太田鋼, 宮崎玉樹, 川西徹:¹³C-CP/MAS NMR および熱刺激電流測定による乳糖水和物粉砕品の結晶性の検討.日本薬剤学会第25年会(2010.5).
- 22) 西山伸宏, 村上真美, オラシオ カブラル, 松本有, 片岡一則:細胞内環境に応答する白金錯体制がん剤内包高分子ミセルの創製.第59回高分子学会年次大会(2010.5).
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

統合型毒性試験系による安全性評価手法構築に関する研究

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
研究代表者 山田 雅巳

研究要旨 代替試験法として小核試験の可視化、Ames 試験における菌株および新手法の改良、umu 試験のキット化を検討した。遺伝毒性試験としての新規 *Pig-a* アッセイの基盤整備、技術共有を実施した。F344 系 *gpt delta* ラットと他の試験の統合を検討した。

研究分担者

- (1) 大阪府立大学 杉本憲治
- (2) カトリックビジネスエクスパート(株) 藤居 互
- (3) ㈱蛋白精製工業 平田大介
- (4) (財)食品薬品安全センター 須井 哉
秦野研究所
- (5) 国立医薬品食品衛生研究所 本間正充
- (6) 帝人ファーマ(株) 木本崇文
- (7) 第一三共(株) 伊東 悟
- (8) 田辺三菱製薬(株) 宇野芳文
- (9) 科研製薬(株) 真田尚和
- (10) 中外製薬(株) 三島雅之
- (11) 日本エス・エル・シー(株) 高木久宜
- (12) 国立医薬品食品衛生研究所 石井雄二
- (13) 国立医薬品食品衛生研究所 増村健一

A. 研究目的

化学物質の安全性評価は実験動物を用いる毒性試験の結果に基づいて実施されてきたが、動物愛護に対する関心の高まりを受け、近年、動物愛護の観点に基づいて、動物実験に関する 3R (削減-Reduction-, 改善-Refinement-, 代替-Replacement-) を考慮したガイドラインの策定が国際的な流れとして求められている。マルチエンドポイントを組み込んだ統合型遺伝毒性試験系の確立は、医薬品を含む化学物質全般のヒト健康影響を評価している厚生労働行政にとっては喫緊の課題といえる。

本研究課題は 3 つのグループ (G)、代替試験法 G、*Pig-a* アッセイ G、*in vivo* 試験法 G に分けて実施することにした。

1. 動物を用いない、いわゆる代替試験法は 3R の目的に合致し、特にスクリーニングの段階で有用であるため、より精度の高い結果を出せる試験が求められていることから、代替試験法 G は文字通り Replacement を目的にそれぞれ次の

ような試験法を検討する。

(杉本) *in vivo* 小核試験は薬物投与後に特定の組織に由来する細胞に出現する小核の形成頻度を測定する。蛍光タンパク質を用いたライブセルイメージングによりこの *in vivo* 小核試験の代替法を検討する。

(山田) 汎用される、微生物を用いた復帰突然変異試験 (Ames 試験) の菌株 (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (サルモネラ菌)) で、ヒト DNA ポリメラーゼを発現させた遺伝子改変テスターの作製を検討する。

(須井) Ames 試験を、より少量の被験物質で短期間に実施することを目的として、ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験の開発を続けている。

(平田) Ames 試験の欠点を補う遺伝毒性試験法として開発された umu 試験で、ラット glutathione S-transferase (GST) を発現できるようにした *S. typhimurium* NM5004 株を採用し、ジハロアルカンに対して特異的に感受性を高める。

2. *Pig-a* 遺伝子 *in vivo* 突然変異試験法 (以後、*Pig-a* アッセイ) は、動物個体を屠殺する必要が無いために、様々な毒性試験に組み込むことが可能である。*Pig-a* アッセイ G は、*Pig-a* アッセイの技術基盤整備と複数の機関 (国立衛研 (本間)、帝人ファーマ (木本)、田辺三菱製薬 (宇野)、科研製薬 (真田) および第一三共 (伊東)) によるバリデーションを行う。

3. トランスジェニック (Tg) 動物を用いる遺伝毒性試験は臓器特異的な評価が可能な *in vivo* 突然変異検出系であり、その有用性が注目されている。*in vivo* 試験法 G は、国立衛研の能美らが HS 重点研究の中で開発した遺伝毒性検出

用 *gpt delta* Tg マウスおよびラットを用いる遺伝毒性試験にマルチエンドポイントで試験を組み込むことを検討する。

(増村) 改良型 *gpt-delta* マウスにおける *in vivo* 変異原性の基礎データを得るとともに、高感度試験系としての有用性を検討する。*gpt delta* マウスについても加齢による変異蓄積への影響を検討するため1年間の飼育実験を開始した。

(三島) *Pol κ* ノックイン *gpt delta* マウスより樹立した胚線維芽細胞をマイトマイシンC (MMC) で処理しDNA二本鎖切断(DSB)の誘発と修復における *Pol κ* の関与を調べた。

(高木) F344系 *gpt delta* ラットの背景データを得ると共に、WistarHannover系 *gpt delta* ラットの開発を進める。

(藤居) F344系 *gpt delta* ラットに既知発がん物質の Benzo[a]pyrene (B[a]P) を投与し、Tg 突然変異試験と末梢血小核試験の異なるエンドポイントに対する検出力について検討した。

(石井) 発がん性試験と同一条件で試験を実施できる F344系 *gpt delta* ラットを用いて、タモキシフェン (TAM) を13週間混餌投与し、一般毒性試験項目の検索を行う。また、F344系 *gpt delta* ラットの自然発生性腫瘍の背景データの収集を目的として、2年間の長期飼育を行う。

B. 研究方法

《代替試験法 G》

(杉本) ライブセルイメージング装置には、電動式 XY ステージに対応した器械を用いた。ステージトップインキュベーター内に水補給装置を設置し、光源にはハロゲンランプを、細胞の観察には40倍の対物レンズを、画像の取得には超高感度の EM-CCD カメラを用いた。可視化細胞には、m5S (mCherry-H3 A14-6) 株のパッセージ7のものを使用した。炭酸ガスインキュベーター内で一晚培養した細胞を、終濃度 300 nM のマイトマイシンC で4時間処理した。薬物を除去した後、ライブセルイメージング装置にて、6分間隔で65時間タイムラプス観察を行った。小核の形成頻度は、一定時間後の取得画像中に見いだされる小核を持つ細胞の割合とした。

(山田) ヒト DNA *pol η* をコードする遺伝子の使用コドンをも最適化したヒト DNA *pol η* をコードするプラスミドを作製し、pYG8626とした。次に、構築したプラスミドとベクターをそれぞれ Ames 試験菌株 TA1535 株に導入し YG5198、YG5201 とし

た。これらの試験菌株の一夜培養液を IPTG (終濃度 0.2 mM) およびカナマイシン (終濃度 25 μg/mL) を加えた培地に植えて、37°C で3時間振盪培養し、遠心分離により集めたペレットを同量の 0.9% 食塩水で洗い、再度遠心分離した後、5分の1量の 0.9% 食塩水に懸濁して、1 mL ずつ5つの滅菌シャーレに分注し、UV-C を菌体に照射した (0、2、4、8、10 J/m²)。致死感受性は回収した照射菌液を 0.9% 食塩水で希釈して、突然変異誘発性は、希釈せずに 150 μL ずつプレートに播いた。プレートは 37°C で培養し、48時間後にコロニー数 (復帰変異株数) を計測し、3枚の平均値を求めた。

(須井) 菌株には Ames 試験菌株 TA100 株および TA98 株を用いた。FAT の実験方法は、384 ウェルプレートを用いた Sui ら (2009) の方法 (改良法 FAT) によった。TA100 株では、前培養後の菌液の希釈率を通常どおりの1倍に加えて、4倍、1/2倍、1/4倍の合計4段階とした。TA98 株でも4段階の菌液を用意した。被験物質による処理 (プレインキュベーション、PI) には 24 ウェルプレートを用い、37°C、170 rpm で90分間振盪した。24 ウェルプレートの使用ウェル数は、菌量 (4倍) では4ウェル/用量、それ以外の菌量では3ウェル/用量とした。S9 mix 中の S9 濃度は 10% とした。被験物質は、S9 mix 非存在下で AF-2 と 4NQO、S9 mix 存在下で 2-AA と B[a]P を用いた。PI 後は、24 ウェルプレートの各ウェルにインジケータ培地を 2.5 mL 加えて処理液を調製した。24 ウェルプレートの1ウェル中の処理液を、384 ウェルプレートに分注した (60 μL/ウェル×48ウェル、合計3枚)。分注後、384 ウェルプレートをチャック付ビニール袋に入れ、37°C で3日間静置培養した。PI 後の分注操作の検討には、2菌株ともに、通常菌量に調製した試験菌液を使用し、S9 mix 非存在下は AF-2 を S9 mix 存在下は 2AA を用いた。24 ウェルプレート (1枚) の1ウェル中の処理液を、384 ウェルマイクロプレートのウェルあたり 60 μL で48ウェル、合計3枚に分注する通常条件 A、96 ウェルマイクロプレートのウェルあたり 120 μL で24ウェル、合計6枚に分注する条件 B、96 ウェルマイクロプレートのウェルあたり 240 μL で12ウェル、合計3枚に分注する条件 C を比較した。分注後は、384 ウェルプレートあるいは96穴ウェルプレートをチャック付ビニール袋に入れ、37°C で3日間静置培養した。FAT の判定は、復帰突然変異が生じたウェルでは菌が増殖して pH が下がることにより、発色試薬の bromocresol purple が紫色から黄色に変色する原理を用い、目視により行う。

(平田) 使用菌株 *S. typhimurium* NM5004 株は、大

阪府公衆衛生研究所(現 中国科学院生態環境研究中心)の小田美光博士より譲渡された。この菌株には glutathione *S*-transferase(GST)を発現するプラスミドが導入されている。任意に選択した10個のコロニーから1,3-ジクロロアセトンに対して最も感度のよい株を選んだ。キットに添付する菌量を決定するため、1,2-dibromoethane(和光純薬)など5種類の被験物質の最小検出濃度を調べた。

《*Pig-a*アッセイG》(本間・木本・伊東・宇野・真田)

1) *Pig-a*アッセイ技術の共有化

*Pig-a*遺伝子を標的とした*Pig-a*アッセイでは、実験動物から簡便に得られる血液サンプル(赤血球)のGPIアンカー結合型膜タンパク質提示の有無をフローサイトメーターによりハイ・スループットかつ定量的に検出することで、容易に*Pig-a*遺伝子突然変異頻度を算出することができる。

この測定原理に基づき*Pig-a*アッセイを確立した帝人ファーマから、4施設(国立衛研、第一三共、田辺三菱製薬、科研製薬)に対して*Pig-a*アッセイプロトコールが配布され、技術共有を図った。初期試験として、帝人ファーマにおいて代表的な遺伝毒性物質であるエチルニトロソウレア(ENU)をSDラット(雄、7週齢)に0または40 mg/kgで単回投与し、2週間後に採取した末梢血サンプルを得た。測定に必要な蛍光標識抗体(抗HIS49-biotin、Streptavidin-APC及び抗CD59-FITC)が血液サンプルと共に他施設に配布され、それぞれが*Pig-a*アッセイを実施した。

2) ENU投与ラットを用いた*Pig-a*アッセイの施設間差の検証

前出の技術共有結果を踏まえ、末梢血全赤血球を測定対象とした*Pig-a*アッセイの施設間差検証を行った。各施設でSDラット(雄、6~7週齢)にENUを0, 10, 40 mg/kgで投与し、投与後0, 2, 4週目に採血した末梢血サンプルを用いて*Pig-a*変異頻度を評価した。また、投与2日目にも採血を行い、末梢血サンプルを用いた小核誘発性を任意で評価した。

《in vivo 試験法G》

1) *Polκ*ノックイン*gpt delta*マウスの自然突然変異および加齢による変異蓄積の検討(増村)

雄12週齢の*Polκ*ノックイン(*Polκ* KI)および*Polκ*野生型(*Polκ* WT)マウスの肝臓および精巣からゲノムDNAを抽出し、*gpt*アッセイに

より点突然変異体頻度、Spiアッセイにより欠失変異体頻度を測定した。得られた変異体のシーケンス解析を行い変異部位を決定した。

4、26、52および78週齢の雄*gpt delta*マウスから主要臓器を採材し、肝臓と精巣について点突然変異頻度を測定した。*Polκ* KIマウスについて1年間の飼育実験を開始した。

2) *Polκ*ノックイン*gpt delta*マウス胚線維芽細胞を用いたMMCの遺伝毒性の検討(三島)

Polκ KIおよび*Polκ* WTの*gpt delta*マウスより13.5日齢の胎児から胚線維芽細胞(それぞれ*Polκ* KI MEFおよび*Polκ* WT MEF)を作成し、凍結保存した。約1週間培養して96wellプレートへ播種した細胞にMMCを2 μg/mLを最高用量として公比2で11段階の用量で24時間処理した。1-5日後に経時的に細胞を固定し、抗H2AX(Ser139)抗体で蛍光染色し、細胞あたりの蛍光強度を測定した。

3) F344系*gpt delta*ラットの背景データ作成(高木)

6週齢のF344系*gpt delta*ラットおよび対照群としてF344系ラットを雌雄各20匹、計80匹を用いた。飼料は5002 Certified Rodent Dietを、飲水は塩素消毒した井戸水をそれぞれ自由摂取させた。体重は週1回測定した。一般状態および死亡動物の有無は毎日観察し、試験開始13週後に全生存動物を安楽死させ試験を終了した。体重、臓器重量の測定、血液学的検査および血液化学的検査を行った。各器官を採取しホルマリン固定を行った。

4) F344系*gpt delta*ラットを用いたB[a]PのTg突然変異試験および末梢血小核試験(藤居)

6週齢のF344系統*gpt delta*雄性ラットを用いた。飼料(CE-2)および水道水は自由に摂取させた。B[a]Pはオリーブ油溶液とし、投与量は0(陰性対照)、62.5、125 mg/kgとした。陽性対照のENUはPBS(pH6.0)溶液とし、投与量は10 mg/kgとした。1群6匹のラットに1日1回、28日間(day0からday27まで)の強制経口投与を行った。投与前日(day-1)およびday3, 14, 28に末梢血を採取した。day3以降の採血は前日の投与から24時間後に実施した。末梢血小核試験は、day-1, 3, 14およびday28に採取した末梢血中の小核を含む網状赤血球(MN-RET)を、*In vivo* Rat MicroFlow PLUS Kitを用い、フローサイトメーターを使用して測定した。1検体あたり2万個のRET(網状赤血球)を計測してMN-RETの出現頻度を算出した。投与最終日より3日後に

組織を採取し-80℃で凍結保存した。臓器重量の測定、血液学的検査および血液生化学的検査を実施した。骨髄および大腸における点突然変異頻度を *gpt* アッセイにより測定した。

5) F344系 *gpt delta* ラットを用いた TAM の 13 週間反復投与試験 (石井)

6 週齢の雌性 F344 *gpt delta* ラット 40 匹を各群 10 匹ずつ、対照群、TAM および PCP 単独投与群、TAM と PCP 併用投与群の計 4 群に配した。TAM は 500 ppm[#] の濃度で CRF-1 粉末基礎飼料混餌投与とした (*投与開始直後から摂餌量の低値ならびに著しい体重増加抑制が認められたため、投与開始 5 週目に投与濃度を 400 ppm に変更した)。PCP は 13 週間、200 ppm の濃度で粉末飼料混餌投与とした。TAM と PCP の併用投与はそれぞれを単独投与群と同様の濃度で混餌投与した。動物は剖検日前日より一晩絶食させ、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈から採血後、屠殺・剖検した。臓器重量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査および病理組織学的検索を行った。肝臓の GST-P 陽性肝細胞巢の量的解析およびコメントアッセイを実施した。肝臓の一部は *gpt* アッセイおよび Spi⁻ アッセイ用の試料として凍結保存した。左大腿骨から骨髄を採取し小核を観察した。また、6 週齢の雌雄 F344 系 *gpt delta* ラット各 75 匹および対照群として野生型の雌雄 F344 ラット各 75 匹を CRF-1 固形基礎飼料と水道水で飼育したものについて自然発生腫瘍の検索をした。一般状態の観察を連日実施し、体重は開始から 13 週目までは毎週 1 回、14 週目以降からは毎月 1 回測定した。(石井)

(倫理面への配慮)

動物実験は、各参加機関における動物実験委員会の承認に基づき、動物実験の適正な実施に関する規定等を遵守して実施した。

C. 研究結果

《代替試験法 G)》

(杉本) 核・染色体を可視化した近 2 倍体の核型を示すマウス胎児線維芽細胞株 (m5S) が分裂する様子をライブセルイメージングの手法を用いて解析した。複数の視野の画像を取得することにより、一度の観察において 100 個程度の細胞を観察することが、また、超高感度のカメラを用いることで、65 時間にも及ぶタイムラプス観察を行うことがそれぞれ可能となり、一つの細胞について連続して最長 5 回の細胞分裂をする様子を捉えることができた。この「トランス

ジェニック蛍光細胞」ライブ観察による小核の割合は通常培養条件下での小核の発生頻度と変わらなかった。マイトマイシン C 処理後の小核形成頻度は、時間が経過するにつれて上昇し、60 時間後では約 14% に達した。これは小核試験に汎用される CHL/IU 細胞での発生頻度と同程度であった。3 回まで連続して細胞分裂する細胞に注目し、生きた細胞を用いての小核形成過程を調べたところ、形成過程には多様な形態がみられた。

(山田) 紫外線照射による致死感受性は、IPTG の添加、無添加による影響がなく、DNA pol η 発現プラスミドの有無による差も生じなかった。いずれも 4 J/m² で 25% 程度、8 J/m² で 3% 程度の生存率であった。紫外線による突然変異誘発率 (IMF) は、IPTG 無添加の条件では、DNA pol η をコードするプラスミドを導入しても、ベクターのみでも、同程度の IMF であった。一方、IPTG 添加の条件では、DNA pol η が発現していると考えられる条件で、ベクターのみ導入した場合の約 2 倍の IMF が得られた。

(須井) AF-2、4NQO とともに、2 菌株で PI 時間 90 min (通常条件) のとき、0.1 倍において最低用量から明瞭な陽性結果が得られた。また、PI 時間の増加に伴って陽性反応の減少が認められた。4NQO は TA98 株で 0.1 倍において生育阻害が認められたが、PI 時間の違いによる差はなかった。2AA は、2 菌株で PI 時間 90 min (通常条件) では、1 倍 (通常条件) において最も強い陽性反応を示し、PI 時間の増加に伴って陽性反応の減少が認められた。B[a]P は 2 菌株で PI 時間 90 min (通常条件) では 0.5 倍において最も強い陽性反応が認められ、PI 時間の増加に伴って陽性反応の減少が認められた。

分注条件については、条件 A~C における各菌株 (S9 mix 非存在下および存在下) の陰性対照値は、2 菌株 (S9 mix 非存在下および存在下) とも「A ≤ B < C」であった。S9 mix 非存在下 2 菌株ともに、AF-2 に対して陽性反応は同程度であった。一方、S9 mix 存在下 2 菌株ともに 2AA に対して 96 穴プレート (120 μL/ウェル) の方が、低用量 (0.1 μg/mL) における陽性反応が明瞭であった。

(平田) *umu* 試験において、最も活性の高いコロニーを選択するため、1,3-dichloroacetone を被験物質として *umu* 試験を実施し、10 コロニーの中から最も活性が高いものを選んだ。それを用いてキットに供する菌液量の検討を行った。50ml 遠沈管で菌液を遠心して菌体を回収し、凍

結保存用の培養液に置換した。その際に添加する保存培地の添加量を調整し、濃縮率 20%、30%、40%、50%について現行のキットの試験手順で試験した結果、40%がもっともよい結果だった。

《*Pig-a* アッセイ G》(本間・木本・伊東・宇野・真田)

1) *Pig-a* アッセイ技術の共有化

帝人ファーマ提供プロトコールと送付サンプルおよび抗体を用いて、各施設で *Pig-a* アッセイを行った結果を表 1 に示す。各施設において、陰性対照群 (ENU 0 mg/kg) に対し ENU 40 mg/kg での明確な *Pig-a* 変異頻度の増加が認められた。一方で、陰性対照群の *Pig-a* 変異頻度バックグラウンド値は施設間のバラつきが大きかった。

バックグラウンド値を低く抑えることは突然変異誘発性評価における検出感度を高める上で重要な点であることから、解決策を共同研究者間で協議した結果、測定プロトコールの *Pig-a* 変異細胞を検出する領域の設定を各施設で一定となるように工夫することが最良と考えられ、補正用サンプルが *Pig-a* 変異陰性細胞として 99.0% プロットされるように領域を調節し、表 1 の陰性対照群の結果を再解析したところ、各施設ともバックグラウンドが 10×10^{-6} 以下になることが示され、最大で 13 倍あった施設間差が 4 倍にまで縮小した。

2) ENU 投与ラットを用いた *Pig-a* アッセイの施設間差検証

ENU を投与してから経時的に *Pig-a* 変異頻度が増加し、またその増加は用量依存的であることが確認された。今年度に各施設で取得されたデータは次年度に集約され、共同で考察する予定である。

3) *Pig-a* アッセイの技術基盤整備 (木本)

ENU 投与後 1 週目及び 2 週目に RBCs、RETs 及び BMEs の *Pig-a* 変異頻度を測定した結果、RETs の *Pig-a* アッセイでは、陰性対照群 (PBS) で低バックグラウンド値を達成すると共に、ENU 投与群では RBCs や BMEs に比べて *Pig-a* 変異頻度が高値を示した。BMEs の *Pig-a* アッセイでは、ENU 投与群で投与後 1 週目から明確な *Pig-a* 変異頻度の増加が認められた。各パラメーター (RBCs、RETs 及び BMEs) の相関性を比較したところ、RETs と BMEs で最も高い正の相関性 ($r^2=0.8316$) が得られた。

4) 他の試験との併用の検討

4) - 1 *gpt-delta* トランスジェニックマウスを用いた *Pig-a* アッセイ (本間)

陰性対照群 (ENU 0 mg/kg) に対し ENU 40 mg/kg で *Pig-a* 変異頻度の明らかな増加。投与後 7 週時点においても *Pig-a* 変異頻度の増加が明確に

維持された。

4) - 2 *in vivo* 末梢血小核評価との組合せの検討 (宇野)

10 mg/kg 以上の ENU の投与により、投与 2 日目に用量の増加に伴って小核を有する RET の頻度が増加した。

《*in vivo* 試験法 G》

(増村) 雄 12 週齢の *Pol κ* ノックイン *gpt delta* マウスにおける *gpt* 点突然変異体頻度は、肝臓と比較して精巣で有意に低い値を示した。両臓器において *Pol κ* KI と *Pol κ* WT の間に点突然変異頻度および変異タイプの違いは認められなかった。*Spi*-欠失変異体頻度は精巣と肝臓で差はみられなかった。肝臓、精巣ともに *Pol κ* KI では *Pol κ* WT と比較して欠失変異頻度が約 2 割高かった。*Pol κ* KI では 1 塩基欠失の頻度が *Pol κ* WT と比較して若干高かったが有意な差は認められなかった。次に、*gpt delta* マウスを通常飼料 CRF-1 で飼育し、4、26、52 および 78 週齢の肝臓と精巣について *gpt* アッセイを行い、点突然変異頻度を測定した。肝臓の点突然変異頻度は 4 週齢に対して 26 週齢では 1.5 倍、52 週齢では 2.2 倍、78 週齢では 3.4 倍と加齢に伴う増加が認められた。一方、精巣では加齢による変異頻度の有意な増加は認められなかった。肝臓、精巣ともに G:C→A:T トランジションおよび欠失が主な変異タイプであった。

(三島) *Pol κ* KI MEF および *Pol κ* WT MEF いずれの胚線維芽細胞においても、MMC 処置後 24 時間後に H2AX 蛍光強度が増加した。*Pol κ* WT MEF では処置後 5 日目までに徐々に蛍光強度が減少した。一方、*Pol κ* KI MEF では 5 日後においても蛍光強度は高い値を維持した。

(高木) F344 系 *gpt delta* ラットの背景データ作成については、13 週の試験期間を通じて全群に死亡動物は認められなかった。体重は雄で対照群に比して Tg 群で有意に高い推移が認められた。雌では試験期間を通じて群間に有意な変動は認められなかった。血液学的・血液生化学的検査、器官重量において Tg 群と対照群に若干の差異が確認されたが、いずれも当社において過去に採集された F344/N の背景データ値の許容範囲であった。

(藤居) F344 系 *gpt delta* ラットを用いた B[a]P の Tg 突然変異試験は、B[a]P 投与群において、投与初期より用量依存的な体重増加抑制が認められた。臓器重量は、心臓、肝臓、腎臓において用量依存的な低下が認められた。ENU

投与群においても投与初期より体重増加抑制が認められた。臓器重量においては、測定対象とした全ての臓器で顕著な低下が認められた。末梢血小核試験の結果、B[a]P 投与群においては day3 より用量依存的な MN-RET の増加が認められ、経時的に頻度が上昇する傾向が認められた。網状赤血球の割合は、day3 の B[a]P 投与群において、用量依存的かつ顕著な減少が認められた。Day14 以降は回復傾向を示し、投与最終日における B[a]P 125 mg/kg 投与群においては、陰性対照群を超える割合の網状赤血球が認められた。ENU 投与群は、day3 から顕著な MN-RET の増加が認められ、day28 で最も高値に検出された。また、投与最終日より 3 日後に採材した骨髄および大腸について *gpt* アッセイを行い、点突然変異頻度を測定した。骨髄については、陰性対照群と比べて、B[a]P 62.5 mg/kg 投与群で 9 倍、125 mg/kg 投与群で 17 倍、ENU 投与群で 46 倍の変異頻度の上昇が認められた。大腸については、B[a]P 62.5 mg/kg 投与群で 4 倍、125 mg/kg 投与群で 10 倍、ENU 投与群で 59 倍の変異頻度の上昇が認められた。

(石井) F344 系 *gpt delta* ラットを用いた TAM の 13 週間反復投与試験は TAM および TAM+PCP 群で投与開始 1 週目から著しい体重増加抑制が認められ、有意な低値となった。TAM の投与濃度を変更した 5 週目から試験終了までの期間では体重増加率は対照群とほぼ同様となった。1 日当りの平均摂餌量は対照群に比べ TAM および TAM+PCP 群で低値を示した。1 日あたりの TAM 摂取量は TAM および TAM+PCP 群で差は認められなかった。血液学的検査の結果、対照群と比較して、TAM、PCP および TAM+PCP 群で HGB の有意な増加と、MCH および MCHC の有意な減少が認められ、TAM 群では MCV の有意な増加と PLT の有意な減少が、PCP 群と TAM+PCP 群では MCV の減少が認められた。臓器実重量では、TAM 群および TAM+PCP 群で肺、脾臓、心臓、卵巣の重量の有意な減少と、副腎の重量の有意な増加が認められた。また、腎重量は TAM 群のみで、胸腺重量は TAM+PCP 群のみで有意に減少した。肝臓におけるコメントアッセイの結果、対照群と比較して tail length、tail intensity (%) および tail moment のいずれの指標も群間に有意な変化は認められなかった。また、F344 系 *gpt delta* ラットの自然発生腫瘍の検索については、現在投与開始から 84 週目を経過し、動物実験を継続中である。

D. 考察

《代替試験法 G》

(杉本) 解析に使用した m5S(mCherry-H3 A14-6)株は、ライブセルイメージングに適しており、連続する複数回の細胞分裂の様子を観察することで、生きた細胞を用いた細胞系譜解析を行うことが可能となった。また、多点でタイムラプス観察を行うことで、実際の小核試験において必要とされるような、一度に多くの細胞を取り扱うことが可能となったことから、2 回目以降の分裂で初めて起こる染色体分配の異常をわずかに 1 回の観察において比較的容易に検出する手段が得られた。今後 *in vivo* 小核試験の代替法を確立できるものと期待できた。細胞が生きたまま 3 回以上続けて分裂できるような緩やかな処理条件にてマイトマイシン C 処理による小核の形成過程を詳細に解析したところ、予想どおり、2 回目以降の細胞分裂においてはじめて小核が形成される例が見いだされた。一方、ライブセルイメージング解析ならではの注意点として、照射される光による毒性の問題が挙げられる。今回は超高度感度のカメラを用い、励起波長として可視光を使用し、細胞分裂が 5 回継続できるようなできるだけ微弱な光照射条件下で実験を行った。長時間にわたるタイムラプス観察のため、わずかでも光照射の影響が細胞に蓄積されている可能性については否定できない。光の強さと細胞毒性の関係については次年度に検討する。

(山田) 今回用いた系では、用いた菌株が *uvrB* 遺伝子を欠損していることから、紫外線照射により生じた損傷が DNA 上で修復されずに残って、検出感度を上げている。また、DNA polV を保持したままであることから、pol η だけでなく、pol V も紫外線により生じた DNA 損傷を乗り越える可能性がある。ヒト DNA pol η を発現する株 YG5198 では、ベクターのみをもつ株 YG5201 でのおよそ 2 倍の IMF が示された。この系は復帰突然変異を調べているため、該当箇所に紫外線による損傷ができてそこに pol η が働けば、誤りがちな複製をする pol V のみが働いているときに比べて IMF は下がると考えられる。しかし、損傷がない該当箇所を pol η が複製する際に損傷に依存しない複製エラーを引き起こせば、逆に IMF は上がることになる。サルモネラの DNA pol と、ヒト DNA pol η を共存させた今回の条件では、両方が合算された結果であると考えられ、解釈は難しいが、少なくとも、ベクターのみ導入した条件とは異なる(高い) IMF

が得られたことから、ヒト DNA pol η がサルモネラ菌の中で活性を持っていると考えてよいだろう。

次年度は、pol η のカウンターパートが働かない条件、すなわち、DNA pol IV を欠損した菌株を作製し、それに pYG8626 を導入して pol η の働きを検討する。さらに、Pol η は C 末端を欠損させた形でも DNA pol 活性を持つことが報告されている。より小さい方がバクテリアの中で働きやすくなることも考えられるため、C 末端を欠失したたんぱく質の発現も検討する。

(須井) 4 種の既知変異原物質について、菌数を変えて改良法 FAT を行った結果、S9 mix 非存在下の 2 化合物については、2 菌株ともに、従来の 0.1 倍の菌数を含む菌液を用いることで陽性反応の向上が認められた一方で、S9 mix 存在下においては、2 菌株ともに、化合物によって最適な菌数にばらつきが見られた。PI 時間については、2 菌株の S9 mix 非存在下および存在下ともに、従来 (90 min) よりも長くすることにより、陰性対照値の増加および化合物処理ウェルにおける黄変ウェル出現率の減少が認められた。これらの結果は、陰性対照値に対する化合物処理ウェル間における黄変ウェル出現率の差が小さくなる、検出感度が低下することを示唆している。従って、回転振盪の場合、PI 時間は従来と同じ時間 (90 min) が最適な条件と考えられる。次に、PI 後の処理液の分注操作については、384 ウェルマイクロプレートを用いる従来の条件 A から条件 C、96 ウェルマイクロプレート (240 μ L/ウェル \times 12 ウェル)、への変更では、陰性対照値が明らかに増加し、検出感度が低下したが、条件 A から条件 B、96 ウェルマイクロプレート (240 μ L/ウェル \times 24 ウェル、への変更では、陰性対照値のわずかな増加が認められるものの、処理ウェルにおける黄変ウェル数のばらつきの減少および低用量から陽性結果が認められた (2 菌株の S9 mix 存在下)。また、マニュアルでの分注操作に要する時間が従来に比べて半分以下となり、労力が軽減された。

(平田) *S. typhimurium* NM5004 は、S9mix 費存在下、GST を添加しない条件でジハロアルカンに対して感受性を示したことから、菌体内で GST を産生し、ジハロアルカン代謝することが示唆された。これにより *S. typhimurium* NM2009 では測定が困難であったジハロアルカンの遺伝毒性の検出が可能になった。S9 非存在下で遺伝毒性を示す AF-2 を同時に測定したことで、GST 代謝活性が必要な遺伝毒性物質のみ

でなく、これまで NM2009 株で測定してきた物質も測定が出来ることが示唆された。今回測定した azathiopurine のような免疫抑制剤や抗がん剤においてアルキル化によって作用する薬剤は多く、これらの変異原性を測定するには NM5004 株は有効であると考ええる。

《*Pig-a* アッセイ G》

1) *Pig-a* アッセイ技術の共有化については、帝人ファーマで確立された *Pig-a* アッセイのプロトコールに従い解析することで、ほぼ同一の結果が得られたことから技術の共有化は達成できたと考えられる。各施設間で見られた陰性対照値 (バックグラウンド値) の開きは使用機種の違いが原因ではなく、*Pig-a* 変異陰性細胞の解析の際に共通ルール「補正用サンプルが *Pig-a* 変異陰性細胞として絶対値が 99.0% にプロットされるように領域を調節すること」を定めることで解決した。この定義は、ラットのみならずマウスにおいても適用できると考えられ、今後の国際バリデーションにも有用であろう。

2) ENU 投与ラットを用いた *Pig-a* アッセイの施設間差検証により、すべての ENU 投与群において投与後 4 週目で最も強い変異頻度の上昇が確認できた。また、投与量による相関性、すなわち ENU 40 mg/kg 投与群と ENU 10 mg/kg 投与群の用量相関性も投与後 4 週目に現れることが明らかになった。以上より高感度の遺伝毒性検出のためには投与後 2 週目の採血よりも、4 週目の採血の方が適していると考えられる。今回は 4 週目以降の解析は行っておらず、4 週目以降でいつまでの期間に相関性が保持されるのかといったことは、今後の検討課題である。

3) (木本) 新たに確立を試みた RETs 及び BMEs の *Pig-a* アッセイは、新たな評価系として十分に期待できると考えられた。特に RETs を対象とした手法は、バックグラウンド値も低く、かつ測定母集団も変異頻度を評価するのに十分な 100 万細胞とすることができる点で、*in vivo* における遺伝子突然変異誘発性を評価するための有効な手法になると期待される。特に反復投与毒性試験における血液サンプルで RETs の *Pig-a* アッセイを実施できることは、遺伝毒性リスクを効率的かつ正確に評価できる画期的な方法になりえるだろう。

4) *Pig-a* アッセイによる遺伝毒性検出感度や、化学物質による遺伝毒性発現の特異性を明らかにするために、今後は遺伝毒性誘発機序の異なる、突然変異誘発化合物および染色体異常

誘発化合物を用いて、*Pig-A* 変異組み合わせ評価の有用性を検証する必要があると考えられる。

《*in vivo* 試験法 G》

(増村) *Pol κ* ノックアウト *gpt delta* マウスでは他の DNA ポリメラーゼが代替的に TLS に働いている可能性を排除できない。本研究で用いた *Pol κ* KI マウスは、不活化した *Pol κ* がタンパクとして存在しているため、*Pol κ* の影響をより詳細に解析することが可能と考えられる。ノックアウトマウスで野生型と比べて変異頻度の増加がみられたのは 40 週齢を超えた時点であることから、*Pol κ* KI マウスにおいて加齢とともに蓄積する突然変異への影響を検討することが必要と考える。加齢が自然突然変異に与える影響を雄 *gpt delta* マウスを用いて検討した結果、点突然変異の加齢による蓄積には臓器特異性があることが示唆された。精巣で点突然変異の蓄積が見られなかったことは、精巣では内在性変異原への曝露や DNA 損傷のレベルが低い可能性や、生殖組織では何らかの防御・修復機能が働き変異の蓄積が起こりにくい可能性が考えられた。(増村)

(三島) これまでの *Pol κ* KI マウスを用いた研究結果 (三島ら) から、*Pol κ* は GpG に形成された *intrastrand cross-link* における TLS において *fidelity* の高い DNA 複製に関与することが示唆されている。さらに *Pol κ* WT マウスにおいて MMC 投与によって誘発される 大きな欠失変異が *Pol κ* KI マウスでは誘発されなくなったことから、三島らは *Pol κ* が DSB 修復機構の一つである *non-homologous end-joining* (NHEJ) に関与するという仮説を提唱した。MEF を用いた今回の結果は、*Pol κ* KI MEF では MMC によって誘発される DSB の修復が *Pol κ* WT MEF と比較して遅延することを示唆しており、仮説を支持する結果と言える。

(高木) 雄の Tg 群で確認された体重増加は、現在実施中の別の F344 系 *gpt delta* ラットの飼育試験のデータおよび同施設で過去に採集した F344 ラットの背景データと比較検討した結果、動物のロット差によるものと推察された。同条件で繁殖されている雌の試験では両群に有意な体重差は確認されていない。臓器重量、血液検査結果、血液化学検査結果においても、複数の項目の変動が確認されている。これらはいずれも、施設の過去の背景データや受託試験での対照群のデータで類似した値を確認していることから、偶発的な変動であると判断した。Tg 群の

脾臓、胸腺において、絶対重量、相対重量共に有意な減少が確認されており、今回の変動は偶発的であると判断したが、今後、免疫系への影響の可能性を考慮に入れて研究を進める。

(藤居) Tg ラット遺伝毒性試験において OECD ドラフトガイドラインに則した試験スケジュール (28 日間反復投与を行い、投与最終日より 3 日後に採材) での評価例はまだ報告例が少なく、F344 系統 *gpt delta* ラットを用いて、B[a]P および ENU の強制経口投与によって骨髄および大腸で明瞭な陽性結果が得られたことは重要な知見である。B[a]P、ENU 投与群でいずれも陰性対照群と比較し体重増加率が約 1/2 に低下しており、各種臓器における臓器重量低下および種々の血液検査項目における顕著な変動が認められていることから、MTD に相当する用量で投与されたものと判断できる。B[a]P 投与群における突然変異頻度は骨髄と大腸では同程度の増加を示したが、骨髄の方がやや高値であった。投与期間によって細胞のターンオーバーおよび毒性影響が異なり、変異誘発能に影響している可能性が考えられた。末梢血小核試験は投与 2~3 日後の比較的短期間に検出のピークが認められる系だが、今回評価を行った B[a]P と ENU は、いずれも 28 日間連続投与最終日の翌日に最も高い MN-RET の増加が認められた。その理由として、投与初期は被験物質の毒性により RET が顕著に減少したが、投与後期には骨髄細胞の産生が回復したため、小核誘発が高頻度に検出されたことが考えられた。

(石井) F344 系 *gpt delta* ラットを用いて TAM と SULT 活性の阻害剤である PCP の単独および併用投与試験 (13 週間反復投与試験) を実施した。体重の推移で観察された TAM 群および TAM+PCP 群で体重増加抑制は、TAM 混餌飼料に対する忌避に起因するものと考えられた。血液検査、血液化学検査で、いくつかの指標に認められた変化は TAM 投与に起因したものでないと考えている。TAM 群で認められた様々な臓器重量の有意な変化は、いずれも体重の低値に起因すると考えられた。これらの変化に対する PCP 投与の修飾効果は認められなかった。コメットアッセイは、tail intensity (%), tail moment および tail length においていずれの投与群でも陰性の結果となった。コメットアッセイの基本的な実験プロトコールでは、被験物質は単回~数回の強制経口投与で行い、投与後 4 ならびに 24 時間後にアッセイを実施する。今回は混餌による反復投与であり、一般毒性試験プロトコールに準じ

て、剖検日前日より約 18 時間の絶食をかけている点が違う。この相違点は本実験条件下で実施するコメットアッセイの検討課題であろう。さらに、F344 系 *gpt delta* ラットの自然発生腫瘍の検索については、雌の体重の推移および生存率の推移に遺伝子型間で差は認められず、雄では F344 *gpt delta* ラットにおいて若干の体重の低値が認められた。生存率の推移には差は認められておらず、その原因については試験終了後に実施する病理組織学的検索の結果をもって考察する。

E. 結論

《代替試験法 G》

可視化 m5S 細胞を用いて、5 回までの連続する細胞分裂を観察できた。また、マイトマイシン C 処理後の小核形成の過程の詳細を解析するとともに、小核を持つ細胞のその後の運命を追跡できた (杉本)。ヒト DNA pol η を発現する遺伝子改変テスターを作製し、紫外線、UV-C、に対する致死感受性および突然変異誘発性を調べた。ヒトの DNA ポリメラーゼがエームス試験菌で活性を持つことが示唆された (山田)。FAT に用いる菌数を従来の 0.1 倍量に変更することにより、改良法 FAT の感受性が向上する可能性が示唆された。 μ プレート を 96 ウェルにして、反応液の分注量を 240 μ L/ウェルに変更することにより、感受性の向上が認められ、さらに分注操作の労力が軽減された (須井)。ラット GST を発現できるプラスミドを *S. typhimurium* NM2009 株に導入して作製した NM5004 株で、測定が困難であったジハロアルカンなどのアルキル化剤等の遺伝毒性を測定することができた。(平田)。

《*Pig-a* アッセイ G》

新規遺伝毒性試験法として注目される *Pig-a* 遺伝子を利用した *Pig-a* 遺伝子 *in vivo* 突然変異試験法 (*Pig-a* アッセイ) について 5 施設で技術共有し、施設間格差の検討を行った。解析方法に共通ルールを設定することで施設間格差を小さくした。合わせて、測定法の改良と他の遺伝毒性試験との組合せも検討した (本間・木本・伊東・宇野・真田)。

《*in vivo* 試験法 G》

Pol κ KI マウスの肝臓および精巣における自然突然変異頻度は、点突然変異は Pol κ WT と差がなかったが、欠失変異は Pol κ KI で若干高い傾向が見られた。*gpt delta* マウスの肝臓では点突然変異頻度が加齢に伴い有意に増加したが、

精巣では有意な増加が認められなかった (増村)。Pol κ KI MEF 細胞を用いた実験結果より、Pol κ が DSB 修復においても何らかの重要な役割を持つ可能性が示唆された (三島)。F344 系 *gpt delta* ラットの 13 週の飼育試験の結果、体重、血液学的・血液化学的検査、器官重量において若干の差異が確認されたが、いずれも F344 ラット背景データ値の許容範囲であった (高木)。F344 系 *gpt delta* ラットを用いた遺伝毒性試験に末梢血小核試験を統合させた試験系を用いて、B [a]P の遺伝毒性評価を行った。28 日間反復経口投与を行い最終投与の 3 日後に採材した骨髄と大腸について *gpt* 突然変異頻度が増加した。また、末梢血中の幼若赤血球における小核の出現頻度の増加が確認された (藤居)。TAM と SPCP を用いて F344 *gpt delta* ラットへの 13 週間投与試験を実施し、臓器重量、血液学的検査について検索した。肝臓のコメットアッセイは TAM 群を含むすべての投与群で陰性であった (石井)。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Horibata, A. Ukai, N. Koyama, A. Takagi, J. Kanno, T. Kimoto, D. Miura, A. Hirose, M. Honma, Fullerene (C60) is negative in the *in vitro* Pig-a gene mutation assay. *Genes and Environment* 33, 27-31 (2011)
- 2) K. Masumura, Y. Sakamoto, M. Ikeda, Y. Asami, T. Tsukamoto, H. Ikehata, Y. Kuroiwa, T. Umemura, A. Nishikawa, M. Tatematsu, T. Ono, T. Nohmi, Antigenotoxic effects of p53 on spontaneous and UVB-induced deletions in the epidermis of *gpt delta* transgenic mice, *Environ. Mol. Mutagen.*, 52, 244-252 (2011)
- 3) N. Koyama, M. Yasui, Y. Oda, S. Suzuki, T. Satoh, T. Suzuki, T. Matsuda, S. Masuda, N. Kinane, M. Honma, Genotoxicity of acrylamide *in vitro*: Acrylamide is not metabolically activated in standard *in vitro* systems. *Environ Mol Mutagen.* 52, 12-19 (2011)
- 4) A. Sheh, C.W. Lee, K. Masumura, B.H. Rickman, T. Nohmi, G.N. Wogan, J.G. Fox, D.B. Schauer, Mutagenic potency of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa of mice is determined by sex and

- duration of infection, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107, 15217-15222 (2010)
- 5) M. Facciotti, L. Pang, F. Lo, K. Whitehead, T. Koide, K. Masumura, M. Pan, A. Kaur, D. Larsen, D. Reiss, L. Hoang, E. Kalisiak, T. Northen, S. Trauger, G. Siuzdak, N. Baliga, Large scale physiological readjustment during growth enables rapid, comprehensive and inexpensive systems analysis, BMC Systems Biology, 4, 64 (2010)
 - 6) N. Okudaira, Y. Uehara, K. Fujikawa, N. Kagawa, A. Ootsuyama, T. Norimura, K. Saeki, T. Nohmi, K. Masumura, T. Matsumoto, Y. Oghiso, K. Tanaka, K. Ichinohe, S. Nakamura, S. Tanaka, T. Ono, Radiation dose-rate effect on mutation induction in spleen and liver of *gpt* delta mice, Radiat. Res., 173, 138-147 (2010)
 - 7) K. Sugimoto, S. Tone, Imaging of Mitotic Cell Division and Apoptotic Intra-Nuclear Processes in Multicolor. in "Live Cell Imaging, Methods and Protocols" ed. by Dmitri B. Papkovsky. Methods Mol. Biol., Vol. 591, 135-146 (2010)
 - 8) M. Yasui, N. Koyama, T. Koizumi, K. Senda-Murata, Y. Takashima, M. Hayashi, K. Sugimoto, M. Honma. Live cell imaging of micronucleus formation and development. Mutation research 692, 12-18 (2010).
 - 9) N. Toyoda-Hokaiwado, T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa, T. Nohmi, 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. 学会発表
- 1) 村田 香織, 川喜多 愛, 杉本 憲治, 生きた細胞を5色で観察するための蛍光タンパク選択とそのフィルター系の検討, 2011年度農芸化学会大会, 京都 (2011.3)
 - 2) 中川 千雅, 稲畑 和人, 西村 重徳, 杉本 憲治, BiFC法における黄色蛍光蛋白質 Venus の非特異的蛍光回復の抑制, 2011年度農芸化学会大会, 京都 (2011.3)
 - 3) K. Masumura, N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Muramatsu, M. Takamune, M. Yamada, T. Tanaka, T. Nohmi, Chemopreventive effects of silymarin on 1,2-dimethylhydrazine-induced mutagenesis and carcinogenesis in the colon of *gpt* delta transgenic rats, The Society of Toxicology 50th Annual Meeting, USA (2011.3)
 - 4) T. Nohmi, N. Toyoda-Hokaiwado, T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa, Genotoxicity and pre-neoplastic lesions induced by 2,4-diaminotoluene in the liver of F344 *gpt* delta transgenic rats, The Society of Toxicology 50th Annual Meeting, USA (2011.3)
 - 5) 豊田尚美, 安井由美子, 村松美那, 増村健二, 高宗万希子, 山田雅巳, 田中卓二, 能美健彦, *gpt* delta transgenic ratにおけるシリマリンの化学予防効果, 第27回日本毒性病理学会学術集会, 大阪 (2011.1)
 - 6) 日比大介, 木島綾希, 北澤隆宏, 鈴木裕太, 金 美蘭, 石井雄二, 増井則夫, 能美健彦, 小西良子, 梅村隆志, 西川秋佳, オクラトキシンAの腎発がん機序に対する遺伝毒性メカニズムの関与, 第27回日本毒性病理学会学術集会, 大阪 (2011.1)
 - 7) 鈴木裕太, 石井雄二, 木島綾希, 日比大介, 金 美蘭, 児玉幸夫, 能美健彦, 梅村隆志, 西川秋佳, Estragoleマウス肝発がん機序への遺伝子障害性メカニズムの関与, 第27回日本毒性病理学会, 大阪 (2011.1)
 - 8) 北澤隆宏, 鈴木裕太, 木島綾希, 日比大介, 金 美蘭, 石井雄二, 能美健彦, 梅村隆志, 西川秋佳, 食品中CYP1A2誘導剤の複合投与によるestragoleの*in vivo*変異原性への影響, 第27回日本毒性病理学会, 大阪 (2011.1)
 - 9) 金 美蘭, 鈴木裕太, 日比大介, 井上知紀, 石井雄二, 能美健彦, 梅村隆志, 西川秋佳,

- F344 *gpt delta*ラットを用いた包括的試験法によるestragoleの*in vivo*変異原性への影響, 第27回日本毒性病理学会, 大阪 (2011. 1)
- 10) M. Yamada, M. Takamune, A. Katafuchi, T. Nohmi, Novel Salmonella strains for Ames test that can detect pyrimidine damage in DNA, 2nd ACEM, Pattaya (2010.12)
- 11) K. Masumura, N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Muramatsu, M. Takamune, M. Yamada, T. Tanaka, T. Nohmi, Chemopreventive effects of silymarin on mutagenesis and carcinogenesis in *gpt delta* transgenic rats, 2nd ACEM, Pattaya (2010. 12)
- 12) 堀端克良, 鶯飼明子, 木本崇文, 三浦大志郎, 本間正充: 内在性遺伝子であるPig-a遺伝子を標的とした*in vivo*遺伝子変異試験 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会, 神戸 (2010. 12)
- 13) A. Uchimura, Y. Hidaka, K. Masumura, T. Nohmi, I. Miura, S. Wakana, T. Yagi, Effects of a high spontaneous mutation rate in mammalian germline by using mutator mice modified replicative DNA polymerase δ , 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会, 神戸 (2010. 12)
- 14) 山田雅巳, 高宗万希子, 能美健彦, 香辛料成分カプサイシンによる変異原性修飾効果について, 日本環境変異原学会第39回大会, つくば (2010. 11)
- 15) 川喜多 愛, 村田 香織, 阿波谷 貴代, 児玉靖司, 杉本 憲治, マウスm5S細胞株を用いた小核の形成過程のライブセルイメージング, 日本環境変異原学会第39回大会, つくば (2010. 11)
- 16) 須井哉, 川上久美子, 桜井徳子, 奥富弘子, 太田亮, 山田雅巳, 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6. 日本環境変異原学会第39回大会, つくば (2010. 11)
- 17) 村松美那, 豊田尚美, 安井由美子, 増村健一, 高宗万希子, 山田雅巳, 田中卓二, 太田敏博, 能美健彦, *gpt delta*トランスジェニックラットを用いたシリマリンとカプサイシンの化学予防効果の検討, 日本環境変異原学会第39回大会, つくば (2010. 11)
- 18) 本山茂記, 竹入章, 和田直子, 寺社下浩一, 三島雅之, 新見直子, ピーター・グルーズ, 増村健一, 山田雅巳, 能美健彦, DNA polymerase κ 遺伝子ノックイン *gpt delta* マウスにおいてmitomycin Cによって骨髄に誘発された変異の解析, 日本環境変異原学会第39回大会, つくば (2010. 11)
- 19) 佐藤陽美, 阪下由香利, 増村健一, 古山昭子, 平野靖史郎, 能美健彦, 青木康展, デイゼルナノ粒子長期曝露により*gpt delta*マウス肺・肝臓に誘導される突然変異, 日本環境変異原学会第39回大会, つくば (2010. 11)
- 20) 青木康展, 佐藤陽美, 中島大介, 影山志保, 阪下由香利, 柳澤利枝, 後藤純雄, 松下秀鶴, 増村健一, 能美健彦, 大気中の粒子状物質抽出物が*gpt delta*マウス肺中で示す変異原性: 2009年つくば市内, 1989年バンコク市内の試料について, 日本環境変異原学会第39回大会, つくば (2010. 11)
- 21) 蓮子雅之, 増村健一, 豊田尚美, 猪股智夫, 能美健彦, *gpt delta*マウスを用いたシクロフォスファミド曝露による肝臓と精巣の遺伝子突然変異の検討, 日本環境変異原学会第39回大会, つくば (2010. 11)
- 22) 大杉直弘, 増村健一, 豊田尚美, 猪股智夫, 能美健彦, *gpt delta*トランスジェニックマウスを用いた加齢による自然突然変異の蓄積の検討, 日本環境変異原学会第39回大会, つくば (2010. 11)
- 23) 増村健一, 豊田尚美, 蓮子雅之, 村松美那, 新見直子, ピーター・グルーズ, 竹入章, 寺社下浩一, 三島雅之, 能美健彦, DNAポリメラーゼ κ ノックインマウスにおける自然突然変異の解析, 日本環境変異原学会第39回大会, つくば (2010. 11)
- 24) 内村有邦, 日高裕子, 増村健一, 能美健彦, 三浦郁生, 若菜茂晴, 八木健, DNAポリメラーゼ δ 変異マウスを利用した高い生殖系列突然変異率が後世代に及ぼす影響の解析, 日本環境変異原学会第39回大会, つくば (2010. 11)
- 25) 堀端克良, 鶯飼明子, 増村健一, 能美健彦, 本間正充, *gpt delta*トランスジェニックマウス由来初代培養肝細胞を用いた*in vitro*遺伝毒性試験, 日本環境変異原学会第39回大会, つくば (2010. 11)
- 26) M. Honma, The Principal Approaches to

- Genotoxic Hazard Assessment of Nanomaterials in Japan, Genotoxicity of Nanomaterials: Refining Strategies and Tests for Hazard Identification Workshop in 41st Annual Meeting of Environmental Mutagen Society (2010・10)
- 27) N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Muramatsu, K. Masumura, M. Takamune, M. Yamada, T. Ohta, T. Tanaka, T. Nohmi, Chemopreventive effects of silymarin, a plant constituent, against the carcinogenicity of dimethylhydrazine plus dextran sodium sulfate in the colon of *gpt* delta transgenic rats, International Conference on Mechanisms of Antimutagens and Anticarcinogens, Brazil (2010.9)
- 28) 豊田尚美, 安井由美子, 増村健一, 村松美那, 田中卓二, 能美健彦, *gpt* delta transgenic ratにおける化学発がんに対するカプサイシンとシリマリンの化学予防効果, 日本癌学会第69回大会, 大阪 (2010.9)
- 29) 石井雄二, 鈴木裕太, 日比大介, 金 美蘭, 児玉幸夫, 能美健彦, 梅村隆志, 西川秋佳, アクリルアミドの*in vivo*突然変異誘発性における酸化的DNA損傷の関与, 日本癌学会第69回大会, 大阪 (2010.9)
- 30) 日比大介, 鈴木裕太, 金 美蘭, 石井雄二, 能美健彦, 梅村隆志, 西川秋佳, Furan肝発がん誘発機序における遺伝毒性メカニズムの関与, 日本癌学会第69回大会, 大阪 (2010.9)
- 31) 梅村隆志, 金 美蘭, 鈴木裕太, 日比大介, 井上知紀, 石井雄二, 児玉幸夫, 能美健彦, 西川秋佳, *gpt* deltaマウスを用いた包括的毒性試験法による1-メチルナフタレンの*in vivo*遺伝毒性の検索, 日本癌学会第69回大会, 大阪 (2010.9)
- 32) 鈴木裕太, 日比大介, 石井雄二, 金 美蘭, 梅村隆志, 能美健彦, 西川秋佳, 食品中のCYP1A2誘導剤によるIQの変異原性および発がん性の修飾効果, 日本癌学会第69回大会, 大阪 (2010.9)
- 33) 金 美蘭, 鈴木裕太, 日比大介, 井上知紀, 石井雄二, 能美健彦, 梅村隆志, 西川秋佳, サフロール投与F344 *gpt* deltaラット肝における遺伝毒性と酸化的DNA損傷の検索, 日本癌学会第69回大会, 大阪 (2010.9)
- 34) M. Yamada, K. Matsui, M. Takamune, A. Katafuchi, T. Nohmi, Sensitive detection of oxidative damages using BER-deficient Ames tester strains, EEMS2010, Oslo (2010.9)
- 35) M. Honma, K. Horibata, T. Takahashi, S. Asada, T. Hara, Y. Nakagawa, A. Ikeda, K. Yamakage, A. Hirose, In vitro chromosome aberration and cell transformation tests on fullerren and multi-wall carbon nanotubes. European Environmental Mutagen Society 2010, (2010.9)
- 36) Y. Ishii, D. Hibi, Y. Suzuki, M. Jin, N. Masui, T. Nohmi, Y. Konishi, T. Uemura, A. Nishikawa, *in vivo* mutagenicity of ochratoxin A using *gpt* delta rats, The XII International Congress of Toxicology, Spain (2011.7)
- 37) 本間 正充, 遺伝毒性試験とその科学的リレバンス第11回日本トキシコロジー学会生涯教育講演会 (2010.6)
- 38) 鈴木裕太, 木島綾希, 日比大介, 金 美蘭, 石井雄二, 児玉幸夫, 能美健彦, 梅村隆志, 西川秋佳, *gpt* deltaマウスを用いた食品添加物estragoleの*in vivo*変異原性の解析, 第37回日本トキシコロジー学会, 沖縄 (2010.6)
- 39) 日比大介, 木島綾希, 鈴木裕太, 金 美蘭, 石井雄二, 増井則夫, 能美健彦, 小西良子, 梅村隆志, 西川秋佳, *gpt* deltaラットを用いたオクラトキシシンAの*in vivo*変異原性の解析, 第37回日本トキシコロジー学会, 沖縄 (2010.6)
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
(以下準備中)
細胞毒性検査方法, 特願 2010-151462
細胞毒性検査方法, 特願 2010-255097
「磁気ビーズ濃縮法を利用した *Pig-a* 変異網状赤血球の測定法」
 3. その他
なし

抗体医薬品の製造方法、品質特性解析法及び試験法の開発

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
 研究代表者 川崎 ナナ

研究要旨 抗体医薬品の製法開発、品質・安全性確保のための共通基盤技術として、①標準的糖鎖試験法、②結合活性測定法、③凝集体評価法の開発を行った。標準的糖鎖試験法として、2-アミノベンザミド誘導体化及び順相 HPLC 法について9機関共同で評価した結果、良好な室内及び室間再現精度が得られたことから、糖鎖試験法として適用可能であることを確認した。表面プラズモン共鳴法を用いたFc受容体の結合親和性測定法を検討し、試験法として採用するときの課題と方策を抽出した。光散乱法は、様々な粒子径の凝集体の測定が可能であり、凝集体に関する工程内管理試験及び試験法として有用であることを確認した。また、ヒトIgG特異的結合ペプチド固定化センサーチップを用いて、凝集過程の初期反応を高感度で検出する方法を開発した。

研究分担者

- | | | |
|------------------------|--------------|-------|
| (1) 国立医薬品食品衛生研究所 | 生物薬品部 | 石井 明子 |
| (2) 国立医薬品食品衛生研究所 | 生物薬品部 | 新見 伸吾 |
| (3) (独)医薬品医療機器総合機構 | | 荒戸 照世 |
| (4) 協和発酵キリン(株)生産本部 | バイオ生産技術研究所 | 柳原 繁弘 |
| (5) 中外製薬(株) CMC 開発部 | | 岡本寿美子 |
| (6) (財)化学及血清療法研究所菊池研究所 | 試作研究部 | 中島 和幸 |
| (7) アステラス製薬(株) 製剤研究所 | 製剤分析研究室 | 森 啓太郎 |
| (8) 大日本住友製薬(株) 技術研究本部 | 分析研究所 マネージャー | 佐藤 貴之 |
| (9) エーザイ(株) 筑波研究所 | 主幹研究員 | 四方 靖 |
| (10) (株)ベネシス研究開発本部 | 大阪研究所 | 村上 弘次 |
| (11) 近畿大学薬学部 | | 掛樋 一晃 |
| (12) 鹿児島大学理工学研究科 | | 伊東 祐二 |

A. 研究目的

多くの抗体医薬品が癌や自己免疫疾患等に対して優れた治療効果を上げており、抗体医薬品開発に対する世界中の期待や関心が高まっている。抗体医薬品開発・製造の特徴は、抗体基本骨格の高い共通性を生かした共通の技術を利用できることである。共通する基盤技術としての工程管理手法、品質特性解析法及び試験法を開発することは、抗体医薬品開発の促進、品質、有効性及び安全性の

確保、承認申請/審査業務の基盤整備及び迅速化に不可欠である。

抗体医薬品の作用は、標的分子に結合して生体内反応を抑制する中和作用、及び標的細胞上の抗原に結合し、抗体依存性細胞傷害活性や補体依存性細胞傷害活性を示す抗腫瘍作用の2つに分けられる。生体内でこれらの機能が適切に発揮されること、かつ、安全性が担保されるためには、一次構造の同一性はもとより、糖鎖などの翻訳後修飾が適切になされていること、適切な生物活性を有していること、凝集体及び変性体の形成が適切にコントロールされていることなどを工程もしくは製品で管理する必要がある。

抗体医薬品の糖鎖部分は、高次構造の安定性、体内動態、生理活性の調節、抗原性などに関与する場合がある。その一方で、糖鎖不均一性は培養条件の変動により変化することから、工程パラメータ、工程内管理試験、または規格試験により、糖鎖不均一性の恒常性が担保される必要がある。欧米薬局方では、糖鎖試験法の整備が進められているが、日本国内では糖鎖試験法の標準化は行われておらず、抗体医薬品に適した標準的糖鎖試験法の整備が急がれている。

抗体の生物活性には、Fab領域における抗原との結合、並びにFc領域とFcγ受容体や補体との結合を介した細胞傷害活性が関与する。さらに、Fc領域と新生児型Fc受容体(neonatal Fc receptor; FcRn)との結合は、血中半減期の制御に関わる。したがって、抗体医薬品の生物活性評価においては、これらの分子との結合活性に基づいた試験法

を策定すべきと考えられる。

凝集体の生成は、免疫原性及び有効性低下の原因となるため、厳密に管理しなければならない。抗体医薬品の精製工程には通常、プロテイン A クロマトグラフィーと酸性溶液による溶出工程が含まれているため、凝集体が生成されやすい。また、一回の投与量が多いため高濃度（数十 mg/ml）で処方されることも、製剤化や保存の過程で凝集体が産生されやすい要因となっている。凝集体を管理するための高感度試験法や、凝集体を効率的に除去する方法の開発が必要である。

本研究の目的は、抗体医薬品の品質・安全性確保につながる共通技術として、① 標準的糖鎖試験法、② 結合活性測定法、③ 凝集体管理法の開発を行うことである。本年度は、標準的糖鎖試験法の一つとして、2-アミノベンズアミド (2AB) 誘導体化及び順相 HPLC 蛍光検出法について具体的な分析手順を作成し、標準的試験法としての妥当性を多機関共同研究により評価した。結合性試験法として、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を採用し、抗体医薬品の FcRn 結合性に関する試験法案の作成と、その実行可能性の検討を行った。凝集体の高感度測定法として光散乱法に着目し、抗体医薬品における凝集体の工程内管理試験、製剤化および貯蔵を含めた最終産物の評価試験としての有用性を検討した。また、特異的ペプチドを用いて、凝集体形成過程の解析及び特異的に検出する方法の開発を行った。

B. 研究方法

1. 糖鎖分析/糖鎖プロファイリングの共同研究

(1) 試料及び試薬等

マウスミエローマ細胞 (SP2/0) 産生抗体医薬品 X を機関 A にて購入し、ゲル濾過にて脱塩し、分注、凍結乾燥し、各機関に配布した。その他の試薬は、各機関にて高純度なものを購入し使用した。

(2) 糖鎖分析/プロファイリング分析手順

1) 糖鎖の遊離

抗体 100 μ g を、50 μ L の pH 7.2 の 50 mM リン酸緩衝液中で、PNGaseF 5 mU を 37°C で作用させた (1 単位は、至適条件下で毎分 1 μ mol の基質を変化させることができる酵素量とする)。

2) 遊離糖鎖の精製

糖鎖試料を ENVI-Carb C、100 mg 固相抽出カートリッジ (シグマアルドリッチ) に通し、水 0.5 mL で二回洗い込んだ。水 2 mL を通した後、5 mmol/L 酢酸アンモニウムを含む 50% アセトニトリル 1 mL で糖鎖を溶出した。

3) 2AB 誘導体化

誘導体化試液は、2-ピコリンボラン 22 mg に、2AB 10 mg にメタノール/酢酸混液 (10:1) 200 μ L を加え、加温して溶かした。遊離糖鎖を含む乾固物に誘導体化試液 5 μ L を加えて混和し、65°C で 2 時間加温した。

4) 過剰試薬の除去

誘導体化した糖鎖試料に 0.5 mL のアセトンを加えよく混合した。13,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を吸引除去した。沈殿物を減圧で乾燥させた。

5) 液体クロマトグラフィー

試料は、水または水/アセトニトリル混液 (50%) に溶解した。カラムには、TSK gel Amide 80 (2.0 X 150 mm, 3 μ m) を用い、移動相には、A: 100 mmol/L 酢酸アンモニウム pH 4.5, B: アセトニトリルを用いた。誘導体化糖鎖は、有機溶媒濃度を減少させるグラジエントにより溶出した。分離した糖鎖は、励起波長 330 nm, 蛍光波長 420 nm にて検出した。

6) 糖鎖プロファイルの評価

糖鎖プロファイルの評価は、FG0-2 及び M5 等の主要糖鎖並びに α Gal 構造及び NeuGc を含む微量糖鎖などのうち、15 ピークを選択し、ピーク高さの比 (FG0 を 100 とした) を求めた。

(2) 多機関共同研究のデータ処理

$n = 3 \times 2$ 日の分析を行い、主要な 15 個のピークについて溶出時間、ピーク高さ及びピーク高さの比を求めた。分散分析によりピーク高さの比について、室内再現精度及び室間再現精度を推定した。

2. SPR 法による抗体医薬品の FcRn 結合性試験法

(1) 試料及び試薬

ヒト FcRn 細胞外ドメイン原液は鈴木らの方法 (J. Immunol. 184, 1968, 2010) に従って調製した。対照物質、親和性確認用物質、被験物質 1-4 は、抗体医薬品あるいは Fc 融合タンパク質医薬品の市販製剤を用いた。

(2) FcRn 結合性試験法の作成

アミンカップリングによりセンサーチップ CM5 に FcRn を固定化した。ランニングバッファーとして 50 mM リン酸ナトリウム / 150 mM 塩化ナトリウム (pH 6.0)、再生バッファーとして 100 mM トリス / 200 mM 塩化ナトリウム (pH 8.0) を用いた。アナライトの希釈液は、ランニングバッファーを用いて調製した。流速は 20 μ l/min とし、送液時間は、結合フェーズ 120 秒間、解離フェーズ 150 秒間、再生フェーズ 240 秒間とした。得られたセンサーグラムは、BIA evaluation software を用いて、bivalent analyte RI=0 モデルにより解析した。解離速度定数 K_D に関する精度を指標に、最適なりガンド固定化量を検討した。

(3) 共同研究

予備試験として、対照物質の K_D 値を 6 回測定して各フローセルにおける併行精度を求めた。本試験では、対照物質、被験物質 1-4 の K_D 値を求め、対照物質に対する被験物質の K_D 値の比を算出し、精度を評価した。

(4) 装置

SPR 解析装置として、Biacore 3000 及び Biacore T200 を用いた。

3. 凝集体の評価技術に関する研究

3.1. 光散乱法による凝集体の評価技術

(1) 試料及び試薬等

市販ヒト IgG の凍結乾燥品及びヒト化モノクローナル抗体製剤溶液は、それぞれ実験開始時に 25 mM クエン酸ナトリウム溶液で、0.25 mg/ml 及び 0.1 mg/ml に希釈した。

(2) 凝集体の生成

市販ヒト IgG 及びヒト化モノクローナル抗体製剤溶液は、①温度 (4°C, 25°C, 37°C, 65°C) ②室温での回転子による攪拌 (ガラスバイアル中 200rpm で 1 時間, 2 時間) ③室温での振とう (ガラスバイアル及びポリプロピレンチューブチューブ中 320rpm あるいは 640rpm で 6 時間) ④凍結融解の物理的ストレスで処理した。

(3) 凝集体の分析

サンプルの粒子径及びその相対分布は Malvern 社の粒子径、ゼータ電位、分子量測定装置により測定した。

3.2. 酸変性構造体の特異的検出法の開発

(1) 試料

ヒト IgG1 抗体としてトラスツズマブ (ハーセプチン, 中外製薬) を購入した。また、ランダムペプチドライブラリの中から、ヒト IgG1 に極めて特異的に結合する 2 種類のペプチド (タイプ I, II) を得た。

(2) SPR 解析

ヒト IgG 特異的結合ペプチド、タイプ I 並びにタイプ II ペプチドは、N 末端に NH₂-PEG4 によるリンカーを付加し、アミンカップリングキット (GE Healthcare) を用いて、センサーチップ CM5 へ固定化した。分析は、Biacore2000 を用いて、HBS-EP 緩衝液 (pH7.4) を移動相として、流速 50 μ l/min, 25°C で行った。

(3) 液体クロマトグラフィー

イオン交換並びにサイズ排除クロマトグラフィーは、イオン交換カラム Protein-Pak Hi Res Q, サイズ排除カラム ACQUITY BEH200, SEC (Waters) を用いて行った。

(倫理面への配慮)

市販品を試料として用いていること、動物を使用していないことから、特に配慮を必要としない。

C. 研究結果

1. 糖鎖分析/糖鎖プロファイリングの共同研究

(1) 共同研究分析手順の作成

機関 A にて、1 回の分析に用いる抗体量を 100 μ g として、PNGaseF を用いた糖鎖遊離条件、遊離糖鎖の精製方法、2AB 誘導体化の条件、過剰試薬の除去方法、順相液体クロマトグラフィーの条件の検討、共同研究プロトコル作成、並びにバリデーションを行った。

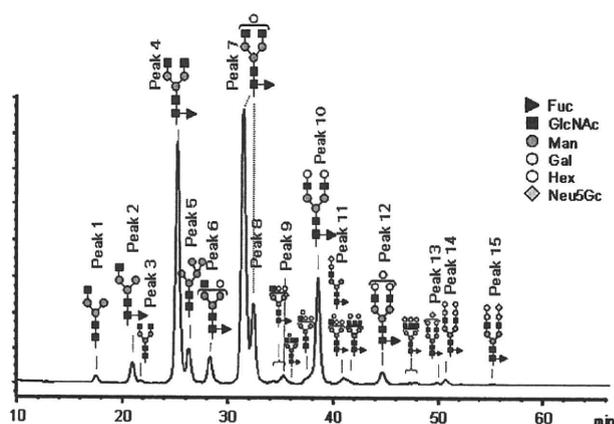


図1. 代表的な抗体糖鎖プロファイル

(2) 多機関共同研究

共通糖鎖試料を用いて、システムの再現性の確認を行った。検討の対象とした 15 個のピークについて、いずれの機関も繰り返し分析時の保持時間 (分) の標準偏差は、1.0 以内であった。各ピークの溶出時間は、システム容量の違いなどに影響されるので、機関間では比較的ばらついていたが、最初のピークが溶出してから各ピークが溶出するまでの時間の機関間の差は、最大でも 3.5 分以内 (ピーク 14 及び 15) であった。クロマトグラムは機関間で分解能に若干の違いがあるものの、ピーク 4 に対するピーク高さ比は、お互いに非常に類似していた。ピーク高さ比の繰り返し精度は良好であり、微量糖鎖においても概ね 10% 以内であった。15 個のピークの高さの和に対するピーク 4 の高さの割合は、約 29% (28.2~33.0%) であった。

次に、抗体試料を用いて、 $n=3 \times 2$ 日の分析を行い、糖鎖分析/プロファイリング法の実行可能性の検証を行った。(表 1)。各糖鎖ピークのピーク高さ比の室内及び室間再現精度を求めたところ、室内再現精度は 10% 以下 (ほとんどの場合 5% 以下) であり、室間再現精度は、ピーク 3 及び 13 を除くと、20% 以下であった。比較的大きな室間

再現精度となったのは、各機関の HPLC で得られたクロマトグラフのピーク形状の違い及びピークの重なり（分解能の違い）によると思われる。ピーク 3 及び 13 では、分離が不十分な機関において、すぐ隣のピークの影響を受けたと思われる。以上の結果から、各機関内で得られたピーク高さ比は、機関内では非常に再現性が高いこと、機関間では比較的再現性はあるものの装置の性能によっては、分離の悪いピークでばらつきがあることが確認された。

なお、機関 G においては、分離条件の改善を行ったところ、多機関と同様のピーク高さ比が得られた。機関 J は高耐圧のカラムを用いて高压送液が可能な HPLC (UHPLC) にて分析したこと、また、機関 G は HPLC システムに問題が認められたことから、参考データとした。機関 D はグラジエント条件が異なるので、保持時間については参考データとした。

2. SPR 法による抗体医薬品の FcRn 結合性試験法

(1) FcRn 結合性試験法原案の作成

1) 試験条件の設定

機関 A において Biacore 3000 を用いて試験条件の設定を行った。併行精度として、同じセンサーチップで対照物質の K_D を 6 回測定したときの相対標準偏差 (RSD) が 5% 程度となることを確認した。対照物質と被験物質について解離定数 K_D を測定したところ、リガンド固定化量が 47-5300 RU の場合は K_D の RSD が 50% 以上であったが、250-500RU の範囲では 20% 程度であった。対照物質に対する K_D の比を結合性の指標とした場合は RSD が 10% 以下になった。また、固定化量が 250-500RU の範囲では、理論曲線とセンサーグラムの一致に関する指標となる Chi2 値が 40 以下であった。以上より、試験法におけるリガンド固定化量の範囲は 250-500RU とし、被験物質の FcRn 結合性は、対照物質の K_D と被験物質の K_D の比を指標として評価することとした。また、システム適合性を下記のように設定した。

システムの性能

- ・リガンド固定化量が 250-500 RU である。
- ・各フローセルの測定結果から算出された K_D 値の平均値が、対照物質 < 親和性確認用物質 1 < 親和性確認用物質 2 の順である。
- ・各解析の Chi2 が 40 以下である。

システムの再現性

- ・親和性確認用物質 1 及び親和性確認用物質 2 について、それぞれ 3 つのフローセルから得られた K_D を対照物質の K_D との比で表し、RSD を算出するとき、0% 以下である。

(2) FcRn 結合性試験の実行可能性の検証

作成した SPR 試験法原案に基づき、3 機関での共同研究を実施した。予備試験として併行精度を求めた結果、機関 A では同一フローセルにおける 6 回の測定結果の RSD が 6% 程度、機関 B では 10% 程度となった。機関 C では、低濃度アナライトのセンサーグラムのフィッティングが良好でなく、ほとんどが Chi2 が 40 以上となるデータとなった。また、各フローセルの測定結果の RSD が 17~74% となったため、本試験を実施しなかった。

機関 A では、2 種類の装置を用いて試験を実施した。機関 A-1 は Biacore 3000、機関 A-2 は Biacore T200、機関 B は Biacore T200 による試験結果である。どの被験物質に関しても、各実験における RSD は、機関 A (機関 A-1, A-2) では 10% 程度までであり、機関 B では 20% までとなった。各機関の装置で 2 回ずつ実施した試験の結果を合わせて評価した空間における再現精度は、被験物質被験物質 1, 2, 3, 4, について、RSD としてそれぞれ 7.9%, 15.6%, 11.7%, 18.8% となった。

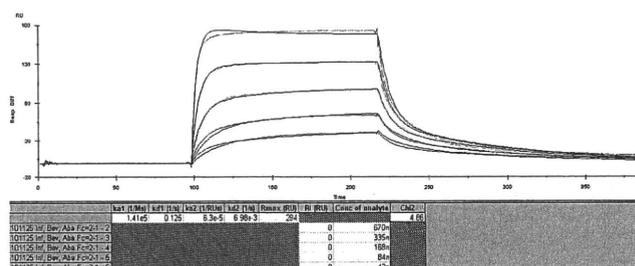


図2. FcRn結合性試験 対象物質のセンサーグラム

3. 凝集体の評価技術に関する研究

3.1. 光散乱法

(1) 保存温度が凝集体の形成に及ぼす作用

市販ヒト IgG において 4°C 一日保存で粒子径約 9nm の位置に単量体が約 93% 存在し、粒子径約 200nm の位置に凝集体が 7.2% 存在した。サンプルの調製直後でも同様の結果が得られた。25°C で 1 日保存すると粒子径約 1500nm の位置に凝集体がシフトした。37°C 1 日の保存条件でも同様な結果が得られた。65°C 15 分の処理で単量体のほとんどが粒子径約 30nm にシフトした。ヒトモノクローナル抗体製剤においては、コントロールでは粒子径約 6.19nm の位置に単一のバンドがみられ凝集体は観察されなかった。65°C 10 分の処理により粒子径 1987nm の位置に凝集体が 2.5% 形成された。さらに、15 分の処理により粒子径 324.8nm の位置に凝集体が約 13% 増加した。

(2) 攪拌が凝集体の形成に及ぼす作用

市販ヒト IgG において、攪拌により、1 時間で