

F344系 *gpt delta* Tg ラットを用いた遺伝毒性評価法に末梢血小核試験を統合させた試験系で、B[a]Pの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おいて *gpt* および Spi 突然変異体が高頻度で認められた。また、経時的に採取した末梢血中の幼若赤血球における小核が高頻度で出現することが確認できた。以上のことより、本試験系を用いて B[a]P による突然変異と小核誘発がいずれも検出可能であることが明らかとなった(藤居)。 *gpt delta* ラットを用いて TAM の一般毒性、変異原性、発がん性の総合的評価を実施した。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。肝臓の病理組織学的検索、*in vivo* 変異原性の検索及び肝前がん病変マーカーによる発がん性の評価は、これまでに報告されている TAM の肝毒性ならびに遺伝毒性メカニズムを介したラット肝発がん性結果と一致し、本法が統合型毒性試験法として有用な試験系であることが示された(石井)。

《*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) の技術共有化及び遺伝毒性物質を用いての施設間差検証を進め、RBC *Pig-a* アッセイ及び PIGRET 法は技術移行性が良好で、かつ施設間差の再現性が十分に得られる評価系であることを実証した。今後は、*Pig-a* アッセイを他の毒性試験に組み込む実用的なプロトコールを考案していく(本間、木本、伊東、宇野・武藤、真田)。

《代替試験法 G》

pol κ 野生型および pol κ KI *gpt delta* マウスから樹立した MEF を BPDE で処理し、生存率を比較した結果、pol κ KI MEF でわずかな細胞毒性の亢進がみられたが有意な差はなかった。pol κ KI MEF における突然変異体頻度は pol κ 野生型と比較して顕著に高値を示した。今後は pol κ KI MEF における BPDE 誘発変異の特徴を解析し、MEF 細胞での解析がネズミ個体を用いた解析の代替法となり得るか検討する(山田)。可視化 m5S 細胞を用いたライブセルイメージングにより、5 回までの連続する細胞分裂を観察できた。MMC による小核形成のタイミングに濃度依存性があることが示され、低濃度でも 24 時間処理することで、MMC 除去後に効率よく小核が誘導された。ライブセルイメージングによる細胞系譜解析は、従来法では不可能であった小核

の形成過程を追跡できることを示した(杉本)。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、感受性が向上した。96 ウェルマイクロプレートを用いて、反応液分注量を 240 μ L にすることで感受性の向上が認められ、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測定が可能になった。細胞破碎には Bugbuster® を 25% 希釈して用いることで発色強度が上がった。IQ を用いた実験で、この試験系が代替法として使用できることが示唆された(平田)。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zhang, X*, Horibata, K*, Saijo, M*, Ishigami, C, Ukai, A, Kanno, S-I, Tahara, H, Neilan, EG, Honma, M, Nohmi, T, Yasui, A and Tanaka, K, Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and destabilize ERCC6 in transcription-coupled DNA repair, *Nature Genetics*, *in press* (*these authors contributed equally to this work.)
- 2) C. Nakagawa, S. Nishimura, K. Senda-Murata, K. Sugimoto, A Rapid and Simple Method of Evaluating the Dimeric Tendency of Fluorescent Proteins in Living Cells Using a Truncated Protein of Importin α as Fusion Tag. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76. 388-390 (2012)
- 3) Y. Ohashi, H. Iijima, N. Yamaotsu, K. Yamazaki, S. Sato, M. Okamura, K. Sugimoto, S. Dan, S. Hirono, T. Yamori. AMF-26, A Novel Inhibitor of the Golgi System, Targeting ADP-ribosylation Factor 1 (Arf1) with Potential for Cancer Therapy. *J. Biol. Chem.* 287. 3885- 3897 (2012)
- 4) Kimoto, T., Chikura, S., Suzuki, K., Kobayashi, X., Itano, Y., Horibata, K., Honma, M., Dobrovolsky, V.N., Heflich,

- R. H., Miura, D. and Kasahara, Y. Further Development of the Rat Pig-a Mutation Assay: Measuring Rat Pig-a Mutant Bone Marrow Erythroids and a High Throughput Assay for Mutant Peripheral Blood Reticulocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52:774-783 (2011)
- 5) N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Takamune, M. Yamada, M. Muramatsu, K. Masumura, T. Ohta, T. Tanaka, T. Nohmi, Modulatory effects of capsaicin on N-diethylnitrosamine (DEN)-induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* YG7108 and DEN-induced hepatocarcinogenesis in *gpt* delta transgenic rats, *Genes and Environment*, 33, 160-166 (2011)
- 6) N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Muramatsu, K. Masumura, M. Takamune, M. Yamada, T. Ohta, T. Tanaka, T. Nohmi, Chemopreventive effects of silymarin against 1,2-dimethylhydrazine plus dextran sodium sulfate-induced inflammation-associated carcinogenicity and genotoxicity in the colon of *gpt* delta rats, *Carcinogenesis*, 32, 1512-1517 (2011)
- 7) A. Yamamoto, Y. Sakamoto, K. Masumura, M. Honma, T. Nohmi, Involvement of mismatch repair proteins in adaptive responses induced by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine against γ -induced genotoxicity in human cells, *Mutat Res.*, 713, 56-63 (2011)
- 8) N. Koyama, M. Yasui, A. Kimura, S. Takami, T. Suzuki, K. Masumura, T. Nohmi, S. Masuda, N. Kinoshita, T. Matsuda, T. Imai, M. Honma, Acrylamide genotoxicity in young versus adult *gpt* delta male rats, *Mutagenesis*, 26, 545-549 (2011)
- 9) 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)
- 10) C. Nakagawa, K. Inahata, S. Nishimura, K. Sugimoto, Imaging of Mitotic Cell Improvement of a Venus-Based Bimolecular Fluorescence Complementation Assay to Visualize bFos-bJun Interaction in Living Cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 1399-1401 (2011)
- 11) M. Isogai, Y. Kawamoto, K. Inahata, H. Fukada, K. Sugimoto, T. Tada. Structure and characteristics of reassembled fluorescent protein, a new insight into the reassembly mechanisms. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21. 3021-3024 (2011)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) 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)
- 16) 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)
- 17) 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).
- 18) 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) 中川 千雅, 西村 重徳, 村田 香織, 杉本 憲治, importin α 断片をタグに用いた生細胞内での蛍光蛋白質の2量体形成傾向の簡便な評価法, 2012年度農芸化学会大会, 京都(2012.3)
- 2) K. Masumura, N. Osugi, N. Toyoda-Hokaiwado, T. Nohmi, Spontaneous point mutations and deletions accumulate in a different manner with aging of *gpt* delta transgenic mice. The Society of Toxicology 51st Annual Meeting, USA (2012.3)
- 3) K. Masumura, Y. Sakamoto, W. Kumita, M. Honma and T. Nohmi, Identification of genomic insertion sites of λ EG10 DNA in *gpt* delta transgenic mice and rats by high-throughput DNA sequencing, The Society of Toxicology 51st Annual Meeting, USA (2012.3)
- 4) H. Takagi, Y. Nozaki, A. Kawada, M. Yamada, K. Masumura, T. Nohmi, General toxicity study of F344 *gpt* delta transgenic rat for one-year feeding, The Society of Toxicology 51st Annual Meeting, USA (2012.3)
- 5) 大波冴子, 曹永晩, 豊田武士, 堀端克良, 本間正充, 能美健彦, 西川秋佳, 小川久美子. glycidolと3-MCPD及びこれらのエステル化合物におけるラット28日間反復投与試験の影響について. 第28回日本毒性病理学会総会(2012.2)
- 6) T. Suzuki, Y. Kanemaru, N. Toyoda-Hokaiwado, K. Masumura, P. Grúz, N. Adachi, M. Honma, T. Nohmi, The roles of translesion DNA polymerases in bypass across oxidatively damaged DNA lesions, 第34回日本分子生物学会年会, 横浜 (2011.12)
- 7) Saijo, M., Zhang, X., Horibata, K., Ishigami, C., Ukai, A., Kanno, SI., Tahara, H., Neilan, E.G., Honma, M., Nohmi, T., Yasui, A. and Tanaka, K. UVSSA and USP7 cooperate to stabilize CSB in transcription-coupled DNA repair. 第34回日本分子生物学会年会(2011.12)
- 8) 増村健一, トランスジェニック遺伝子突然変異試験の発展とその意義, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011.11)
- 9) 堀妃佐子, 下吉里実, 藤居互, 増村健一, 山田雅巳, F344系統 *gpt* deltaラットを用いた突然変異試験と末梢血小核試験の統合法の検討, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011.11)
- 10) 高木久宜, 野崎祐次, 河田昭彦, 山田雅己, 増村健一, 能美健彦, F344系 *gpt* deltaラットの6ヶ月飼育試験による背景データの取得, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011.11)
- 11) 増村健一, 大杉直弘, 豊田尚美, 能美健彦, *gpt* deltaマウスの加齢に伴う点突然変異および欠失変異の蓄積, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011.11)
- 12) 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, マウスをモデルとした、高頻度に発生する生殖系列突然変異が次世代以降の個体に与

- える影響の解析, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011.11)
- 13) 本山茂記, 竹入章, 和田直子, 寺社下浩一, 三島雅之, 新見直子, Petr Grúz, 増村健一, 山田雅巳, 能美健彦, Mitomycin CによるDNA二本鎖切断の誘発に対するDNA polymerase κ の役割, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011.11)
- 14) 堀端克良, 鶴飼明子, 木本崇文, 鈴木哲矢, 鴨下渚, 能美健彦, 本間正充. *Pig-a*アッセイとトランスジェニック突然変異試験の組合せに関する研究. 日本環境変異原学会第40回大会 (2011, 11)
- 15) 木本崇文, 堀端克良, 武藤重治, 真田尚和, 橋本和之, 伊東悟, 宇野芳文, 本間正充. ラット末梢血を用いる*Pig-a*アッセイ共同研究: 測定技術の共有化と施設間差に関する研究報告. 日本環境変異原学会第40回大会 (2011, 11)
- 16) 川喜多 愛, 村田 香織, 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(2), 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011.11)
- 17) 須井哉, 川上久美子, 奥富弘子, 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7. 日本環境変異原学会第40回大会, 2011年11月(東京)
- 18) K. Horibata, A. Ukai, K. Masumura, T. Nohmi, M. Honma, In vitro genotoxicity tests using primary hepatocytes, Environmental Mutagen Society 42nd Annual Meeting, Canada (2011.10)
- 19) Kimoto, T., Horibata, K., Muto, S., Sanada, H., Hashimoto, K., Itoh, S., Uno, Y. and Honma, M. A Japanese Collaborative Study on Rat Pig-a Assay; Report on a Transferability of the Assay Method and Interlaboratory Difference. Environmental Mutagen Society 42nd Annual Meeting, Montreal(2011,10)
- 20) Kimoto, T., Chikura, S., Suzuki, K., Kobayashi, X., Itano, Y., Horibata, K., Honma, M., Dobrovolsky, V.N., Heflich, R.H., Miura, D. and Kasahara, Y. Further Development of the Rat Pig-a Mutation assay: Measuring Rat Pig-a Mutant Bone Marrow Erythroids and a High Throughput Assay for Mutant Peripheral Blood Reticulocytes. Environmental Mutagen Society 42nd Annual Meeting, Montreal(2011.10)
- 21) 堀端克良, 増村健一, 能美健彦, 本間正充, In vitro genotoxicity assay using primary hepatocytes derived from *gpt* delta transgenic mouse, 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2011.10)
- 22) 増村健一, 大杉直弘, 豊田尚美, 高木久宜, 能美健彦, *gpt* deltaマウスの肝臓及び精巣に蓄積する加齢に伴う点突然変異及び欠失変異の解析, 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2011.10)
- 23) 大波冴子, 曹永晚, 豊田武士, 堀端克良, 本間正充, 能美健彦, 西川秋佳, 小川久美子. Evaluation of in vivo genotoxicity of glycidol and 3-MCPD and associated esters, using Pig-A and micronucleus assays. 第70回日本癌学会学術総会 (2011.10)
- 24) T. Nohmi, A. Yamamoto, Y. Sakamoto, K. Msumura, M. Honma, Critical roles of mismatch repair proteins in modulation of genotoxicity of gamma-irradiation in human cells by pretreatments with *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*'-nitrosoguanidine at low doses, 14th International Congress of Radiation Research, Poland (2011.8)
- 25) 木本崇文, 千蔵さつき, 鈴木久美子, 小林小梅, 板野泰弘, Vasily N. Dobrovolsky, Robert H. Heflich, 堀端克良, 本間正充, 三浦大志郎, 笠原義典. 新規in vivo遺伝子突然変異評価系 (*Pig-a* アッセイ) の検討: 骨髄エリスロイド及び末梢血網状赤血球を用いる*Pig-a*アッセイの開発. 第38回日本トキシコロジー学会学術年回 (2011.7)
- 26) Zhang, X., Horibata, K, Saijo, M., Ishigami, C., Ukai, A., Kanno, SI., Neilan, E.G., Tahara, H., Honma, M., Nohmi, T., Yasui, A. and Tanaka, K. Molecular cloning of the gene for UV-Sensitive Syndrome with deficiencies in Transcription-coupled DNA repair. Conference: Response to DNA damage: from molecular mechanism to human disease, Netherlands(2011.4)
- 27) 川喜多 愛, 日野 詩愛里, 村田 香織, 杉

- 本憲治, 可視化した核型安定細胞株 (m5S とCHL/IU) のライブセルイメージングによる細胞系譜解析, 第63回日本細胞生物学会大会, 札幌 (2011.5)
- 28) 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年度農芸化学学会大会, 京都 (2011.3)
- 29) 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年度農芸化学学会大会, 京都 (2011.3)
- 30) 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)
- 31) 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)
- 32) 豊田尚美, 安井由美子, 村松美那, 増村健一, 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)
- 33) 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)
- 34) 堀端克良, 鵜飼明子, 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)
- 35) 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)
- 36) 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)
- 37) 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ん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)
- 38) 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)
- 39) 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, ディー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)
- 40) 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)
- 41) 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巢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)
- 42) 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)
- 43) 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)
- 44) 堀端克良, 鶴飼明子, 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)
- 45) 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)
- 46) 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)
- 47) 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)
- 48) 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)
- 49) 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)
- 50) 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)
- 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
(出願中)
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

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 F344系 *gpt delta* ラットと他の試験の統合を検討した。遺伝毒性試験としての新規 Pig-a アッセイプロトコールの確定および技術共有が完了した。代替試験法として小核試験の可視化、Ames 試験における新手法の改良、umu 試験の改良を検討した。

研究分担者

- (1) 大阪府立大学 杉本憲治
- (2) サントリービジネスエクスパート(株) 藤居 亙
- (3) (株)蛋白質精製工業 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) 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) 武藤重治
- (9) 科研製薬(株) 真田尚和
- (10) 中外製薬(株) 竹入 章
- (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。近年、動物愛護に対する関心の高まりを受け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考える。

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

1. 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2年間の飼育実験の結果を解析した。

(竹入) *Pol κ*ノックイン *gpt delta* マウスより樹立した胚線維芽細胞(MEF)の遺伝毒性評価系としての可能性を検討する目的で、既知変異原物質であるbenzo[a]pyrene (B[a]P), benzo[a]pyrene-dihydrodiol epoxide (BPDE)で細胞を処置し、リン酸化H2AX(γ H2AX)を指標としてDNA損傷の検出を検討した。合わせ *Pol κ*欠損の効果も調べた。

(高木)現在メインで使用されているF344系 *gpt delta* Tgラットに対して一般毒性試験に準じた背景データ作成を行い、統合型遺伝毒性試験系として有用なモデル動物であることを証明する。

(藤居)F344系統 *gpt delta* Tgラットによる遺伝毒性評価系に統合する評価系として末梢血小核試験を選択し、ラット既知発がん物質であるB[a]Pを用いて、小核と突然変異の異なるエンドポイントに対する検出力を検証する。

(石井)① *gpt delta* ラットを用いた一般毒性 *in vivo*変異原性ならびに発がん性の同時評価の可能性を検討する目的で、タモキシフェン

(TAM) 及びペンタクロロフェノール (PCP) を単独又は併用投与した *gpt delta* ラットの肝臓について、病理組織学的検索、肝細胞前がん病変の指標である glutathione S-transferase placental form (GST-P) 陽性細胞巢の定量解析ならびに *gpt* 及び Spi⁻ 変異頻度解析を実施する。②F344 *gpt delta* ラットの 104 週間の飼育を終了し、剖検観察後、主要臓器について重量を測定する。

2. *Pig-a* 遺伝子突然変異を利用した *in vivo* 突然変異試験法 (以後、*Pig-a* アッセイと略) は、末梢血を用いて遺伝子突然変異誘発性を評価できる方法であることから、動物愛護(3R)を考慮して従来の遺伝毒性試験あるいは反復投与毒性試験に組み込むことが出来る点で有用性が期待されている。

本研究では、参加する共同研究機関 (国立衛研、田辺三菱製薬、第一三共、科研製薬、帝人ファーマ) にて *Pig-a* アッセイの技術共有化を実施し、代表的な遺伝毒性物質を用いて *Pig-a* アッセイの施設間差検証を行った。

3. 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。そこで代替試験法 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。

(山田) 作出した pol κ ノックイン (pol κ KI) *gpt delta* マウスから MEF を樹立し、ベンツピレンを用いて曝露実験を行った。pol κ 野生型および pol κ KI 細胞株の突然変異誘発能に関する基礎データを得るとともに、*in vitro* 変異原性試験系としての有用性を検討した。

(杉本) ライブセルイメージングによる解析方法を利用し *in vivo* 小核試験の代替法を確立することを目的に、今年度は、小核形成のパターンの薬剤濃度依存性を調べる。マイトマイシン C (MMC) を短時間処理した場合と、低濃度で長時間処理した場合を比較、検討した。

(須井) 改良法 FAT の感受性に対する影響を調べるため、黄変ウエル出現に必要な 1 ウエル当たりの復帰変異菌数に着目し、改良法 FAT の試験条件を検討した。

(平田) umu 試験の検出効率を上げる目的で 5 種類の Lysis buffer で細胞を破碎し、 β -ガラクトシダーゼ活性を比較する。pKJB7/1A1 と

pKJB7/1A2 を導入した株を、代謝活性化を必要とする変異原物質 IQ および、直接変異原である 4-NQO で処理した。

B. 研究方法

《in vivo 試験法 G》

1) *gpt delta* マウスの加齢による変異蓄積および、Pol κ ノックイン *gpt delta* マウスの自然突然変異の検討 (増村)

4、26、52、78 および 104 週齢の雄 *gpt delta* マウスから主要臓器を採材して凍結保存した。肝臓と精巣について *gpt* アッセイによって点突然変異頻度を、Spi⁻ アッセイによって欠失変異体頻度を測定した。また、雌雄 52 週齢の Pol κ ノックイン (Pol κ KI) および Pol κ 野生型 (Pol κ WT) マウスの肝臓および精巣からゲノム DNA を抽出し、これらについても *gpt* アッセイおよび Spi⁻ アッセイによって点突然変異体頻度および欠失変異体頻度を測定した。

2) Pol κ ノックイン *gpt delta* MEF を用いた遺伝毒性の検討 (竹入)

gpt delta pol κ KI マウス (mutant pol κ homo/ λ EG10 homo) および *gpt delta* マウス (野生型 pol κ homo/ λ EG10 homo) より調製した MEF (それぞれ pol κ KI MEF および pol κ 野生型 MEF) を用いた。MEF を約 1 週間培養し、96 well プレートへ播種した翌日、B[a]P、BPDE をそれぞれ 50 μ g/mL、2 μ mol/L を最高用量として、以下公比 2、11 段階の用量で処理した。処理時間は BPDE は 24 時間、B[a]P はラット肝 S9mix 存在下で 4 時間とした。DNA 損傷は、細胞を γ H2AX (Ser139) の発現を抗体により蛍光染色し、細胞あたりの蛍光強度を ArrayScan HCS Reader (Thermo) で測定して調べた。

3) F344 系 *gpt delta* ラットの背景データ作成 (高木)

13 週間飼育試験については、昨年度ホルマリンにより固定処理を行った臓器より、定法に従いヘマトキシレン・エオジン (H. E.) 染色切片を作製し、病理組織学的検索を実施した。26、52 週間飼育試験については、6 週齢の F344 系 *gpt delta* と対照群雌雄各 40 匹について 12 時間明暗サイクルで飼育した。試験開始 26 週、52 週後に、それぞれ各群 20 匹、計 80 匹ずつ安楽死させた。各種臓器の重量測定およびホルマリン固定し、さらに、病理組織学的検索を実施した。統計学的処理方法としては、2 群間の等分散について分散比の F 検定を行い、等分散であれば

Student の *t* 検定、非等分散であれば
Aspin-Welch の *t* 検定を、有意水準を 5% で実施
した。

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)

被験物質として B[a]P を、陽性対照として
N-methyl-*N*-nitrosourea (ENU) を、ラット体重
1 kg あたり 5 ml の投与溶液を用時調製し、1
群あたり 6 匹のラット (開始時 6 週齢) に 1 日
1 回、28 日間 (day1-28) の強制経口投与を行っ
た。B[a]P はオリーブ油を溶媒とし、0 (陰性対
照)、62.5、125 mg/kg の投与量となるように調
製した。ENU (陽性対照) は PBS (pH6.0) を溶媒と
し、10 mg/kg の投与量となるように調製した。
末梢血の採取は、全例について投与前日 (day0)
および day4, 15, 29 に実施した。Day4 以降の採
血は、前日の投与から 24 時間後に実施した。投
与最終日より 3 日後に、麻酔下で腹大動脈より
採血した後、臓器を摘出し重量を測定した。採
取した組織は -80°C で凍結保存し、血液につい
ては、血液学的検査および血液生化学的検査を
実施した。末梢血小核試験、*gpt* アッセイ (点突
然変異検出)、Spi-アッセイ (欠失突然変異検出)
は定法に従った。

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)

① 6 週齢の雌性 F344 *gpt delta* ラットに TAM 及
び PCP をそれぞれ 500 ppm 及び 200 ppm の濃度
で 13 週間単独又は併用投与した。各臓器は肉眼
的に観察後摘出し、主要臓器の重量を測定した。
加えて、各種臓器を 10% 中性緩衝ホルマリン液
にて固定し、常法に従いパラフィン切片を作製
し、ヘマトキシリンエオジン染色を施した。肝
臓については、GST-P 免疫染色を施し、GST-P
陽性肝細胞巢の定量的解析を実施した。外側左
葉の一部は *gpt* 及び Spi- assay 用のサンプルと
して液体窒素により凍結後、-80°C で保存した
(ここまでは昨年度実施)。血清生化学的検査は、
SRL 社 (東京) に委託し、点突然変異及び欠失
突然変異を *gpt* アッセイ及び Spi-アッセイによ
り調べた。② 動物は 6 週齢の雌雄 F344 系 *gpt*
delta ラットおよび対照群としてその野生型の
雌雄 F344 ラットを飼育した。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。各
臓器は肉眼的に観察後摘出し、主要臓器の重量
を測定した。その他の臓器も含め、10% 中性緩衝
ホルマリン液にて固定し、常法に従いパラフィ

ン切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン染色
を施し、病理組織学的検索を行った (石井)

《*Pig-a* アッセイ G》 (本間・木本・伊東・武藤・真
田)

Pig-a は GPI アンカー合成に必須の遺伝子で
あり、X 染色体上に位置している。*Pig-a* 遺伝子
上に変異が生じると、GPI アンカーが合成され
なくなり、その結果細胞表面上に GPI アンカー
タンパクが発現しなくなる。*Pig-a* アッセイは
この原理を利用し、GPI アンカータンパク (赤
血球では CD59) を認識する蛍光標識抗体で末梢
血赤血球を処理した後、フローサイトメーター
を用いて *Pig-a* 変異細胞 (CD59 陰性、GPI アン
カーが発現していない細胞) の出現頻度を評価
する系である。

1) *Pig-a* アッセイの技術共有化

末梢血全赤血球を用いた *Pig-a* アッセイ (RBC
Pig-a アッセイ) 及び網状赤血球 (RET) に特化
した *Pig-a* アッセイ (PIGRET 法) の 2 つを共同
研究機関で技術共有するため、開発元である帝
人ファーマで詳細な測定プロトコールを作成し、
技術共有を進めた。

2) 遺伝毒性物質投与ラットを用いた *Pig-a* アッ
セイの施設間差検証

SD ラット (雄、7 週齢) に ENU を 0, 10, 40 mg/kg、
または Dimethyl benzantracene (DMBA) を 0, 20,
40 及び 60 mg/kg、または
4-Nitroquinoline-1-Oxide (4-NQO) を 0, 25, 50
及び 100 mg/kg で投与した。投与後 4 週目まで定
期的に採血した末梢血サンプルを用いて RBC
Pig-a アッセイ及び一部の機関で PIGRET 法を実
施し、*Pig-a* 変異頻度を測定した。また、末梢血サ
ンプルの一部を国立衛研に送付し、採血翌日の末
梢血サンプルを用いた RBC *Pig-a* アッセイを国立
衛研で実施した。

《代替試験法 G》

(山田) ① 変異型 *pol κ* をホモで持つ *pol κ* KI
gpt delta マウス (16-20 週齢) を交配させ、13.5
日胚より *pol κ* KI *gpt delta* MEF を樹立した。
セミコンフルエントになるまで 1~3 日程度培
養した後、細胞を -80°C で凍結保存した。樹立
した MEF については、由来する胎児組織からゲ
ノム DNA を抽出し、PCR によって遺伝子型が *pol*
κ KI ホモ体であることを確認した。また、野生
型 *pol κ* を持つ *gpt delta* マウスからも同様に
MEF を樹立した。② 本研究ではベンツピレン代
謝活性化体のベンツピレンジオールエポキシド

(BPDE)を使用した。96 ウェルプレートに 1×10^4 個の MEF 細胞をまき、5 時間後に 10 nM, 50 nM, 100 nM の BPDE, および溶媒 (DMSO) のみを添加し、 $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ 条件下で 19 時間曝露させた。曝露終了後に培地を交換し、MTS assay によって細胞の生存率を測定した。各細胞株で一用量あたり 3 ウェル使用した。さらに、細胞毒性が認められた BPDE 50 nM の用量で各細胞株を処理し、回収した細胞からゲノム DNA を抽出して *gpt* アッセイによって点突然変異体頻度を測定した。

(杉本) m5S(mCherry-H3A14-6) (マウス胎児線維芽細胞株 (m5S) 由来のトランスジェニック蛍光細胞) を使用した。染色体数は 41 本で、パッセージ 6 までは蛍光が失われず、また細胞の 7 割以上がこの染色体数を維持することを確認した。細胞は 15%FBS 添加の D-MEM 培地にて、炭酸ガスインキュベータ内で一晚培養後に、水で希釈した MMC を加え (終濃度 150, 300, 450 nM) 4 時間処理した。培地交換の際に薬物を除去し、ライブセルイメージング装置で、6 分間隔で 65 時間継続してタイムラプス観察を行った。電動式 XY ステージを用いて複数の視野の画像を取得した。

(須井) FAT の実験方法は、384 ウェルマイクロプレートを用いた sui ら (2009) の方法 (改良法 FAT) によった。ただし、菌株はアミノ酸非要求性になった TA100 および TA98 株を用いた。また、試験菌液としては前培養菌液をニュートリエントブロス No. 2 (NB) 溶液で希釈し、Nutrient Broth No. 2 (NB, Oxoid) に接種し、 37°C で 10 時間往復振とう培養して静止期初期の菌液を得た。なお、Micro F 溶液は塩類溶液の一種で、Exp. は Micro F 溶液に、histidine、biotin および glucose をそれぞれ 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および 0.8% の濃度で添加している。0.1 mol/L リン酸緩衝液 0.5 mL に各希釈菌液 0.1 mL および NB トップアガー 2 mL を加えて攪拌したのち、最少グルコース寒天平板培地上へ上層した (2 枚/希釈菌液)。最少グルコース寒天平板培地を 37°C で 2 日間静置培養したのち、生成したコロニー数を計測して各希釈菌液中の生菌数の濃度 (個/mL) を求めた。また、生菌数の濃度から、384 ウェルマイクロプレートあるいは、96 ウェルマイクロプレートの 1 ウェル中に含まれる菌数を求めた。プレインキュベーション (PI) の条件は、24 ウェルマイクロプレートを 37°C 、170 rpm で 90 分間回転の振盪培養とした。静置培養の条件は、分注後、384 ウェルマイクロプレートあるいは 96 穴ウェルマイクロプレートをチ

ャック付ビニール袋に入れ、 37°C で 3 日間とした。復帰突然変異菌を含むウェル中では菌が増殖して 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。黄変ウェル数の計測は、目視により行った。

(平田) β -gal 活性を効率よく検出するため、次の 5 種類の細胞を破碎する Lysis buffer について効果を比較した。① 50mM Tris-HCl (pH8.0)、10% グリセロール、0.1% TritonX-100、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Lysozyme、1mM phenyl-methylsulfonyl-fluoride、② 10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA、1% TritonX-100、150mM NaCl、0.1% SDS、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Lysozyme、③ 22.52 g Urea、9.52g Thio urea、0.304g Tris、0.0896g TCEP HCl、1.868g Protein Inhibitor、6.25% グリセロール、12.5mg/ml n-octylglucoside、④ Z-緩衝液/0.06M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.04M $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.01M KCl、0.001M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1% SDS/に 0.1% TritonX-100 と 0.045 ml/ml 1M DTT を添加したもの、⑤ 10x Bugbuster® (Novagen 社製)。発色基質クロロフェノールレッド- β -D-ガラクトピラノシドを 0.1M phosphate buffer (pH7.0) で希釈し、4.0mg/ml に調製した。各ウェルに 10 μl ずつ添加して軽く振とうし、 37°C 、15 分間発色させた後、1M Na_2CO_3 を 100 μl ずつ添加して反応を停止後、O.D.₅₇₀ を計測した。

(倫理面への配慮)

ヒトのサンプルを用いた実験は実施していない。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

《in vivo 試験法 G》

(増村) *Pol* κ KI *gpt* delta マウスの自然突然変異頻度の検討については、52 週齢マウスの肝臓における点突然変異体頻度が、雌雄とも *Pol* κ KI では野生型に対して約 7-8 倍の有意な増加がみられたが雌雄の差はなかった。雄の精巣においては *Pol* κ KI では有意差はないものの野生型に対して増加傾向 (約 2 倍) が観察された。

(竹入) *Pol* κ KI MEF および *pol* κ 野生型 MEF いずれにおいても、B[a]P, BPDE 処理により γ H2AX による蛍光強度が増加し、DNA 損傷の検出が可能であった。蛍光強度はいずれの化合物においても、*pol* κ 野生型 MEF と比較して、*pol* κ

KI MEF で高い値が得られた。特に B[a]P では $\text{pol } \kappa$ KI と $\text{pol } \kappa$ 野生型との差が顕著であった。

(高木) F344 系 *gpt delta* ラットの背景データ作成については、52 週の試験期間を通じ、雄のみ Tg 群で有意に高い推移が認められた。血液学的検査、血液化学的検査、器官重量のほかに病理組織学的検査を行った。雄において、肝臓の小肉芽腫、心臓の線維化、骨髄の萎縮等が観察された。雌においては、肝臓の小肉芽腫、心臓の線維化、骨髄の萎縮等のほか、子宮の嚢胞状過形成が観察された。

(藤居) 体重、臓器重量ともに、B[a]P 投与群においても、陽性対照群においても、増加が抑制されていた。B[a]P 投与群において、血液中の赤血球、白血球、血小板、ヘモグロビン、ヘマトクリット値は用量依存的な低値が、血清中の総タンパク、総コレステロール、トリグリセリド、遊離脂肪酸の低下、A/G 比、総ビリルビン、BUN、クレアチニン、無機リン、マグネシウム、ナトリウムについては顕著な高値が認められた。末梢血小核試験の結果は、B[a]P 投与群においては day4 より用量依存的な網状赤血球

(MN-RET) の増加が認められ、経時的に出現頻度が上昇する傾向が認められた。骨髄における *gpt* 変異体頻度は、B[a]P 投与群で骨髄、大腸共に、10 倍前後の増加が認められたのに対して、骨髄における Spi 変異体頻度は、B[a]P 投与群のみで高値が認められ、ENU 投与では認められなかった。

(石井) ①血清生化学的検査の結果、TAM 群では A/G、BUN、Na、K、 γ -GTP、Glu を除くすべての項目で対照群に対して有意な変化が認められた。また、PCP+TAM 群においても A/G、Na、K、AST、 γ -GTP、Glu を除くすべての項目で有意な変化が認められた。肝臓について病理組織学的検索を実施した結果、TAM 群では全例で小葉辺縁部の肝細胞肥大と局所の肝細胞変性・壊死像が認められた。TAM+PCP 群においても同様の病変が認められたものの、その頻度に差は認められなかった。また PCP 群においては小葉辺縁部の肝細胞肥大のみが認められた。TAM 群では肝 GST-P 陽性細胞集の数ならびに面積は有意に上昇した。TAM+PCP 群においても対照群に比べ有意な上昇が認められたものの、TAM 群との間に差は認められなかった。*gpt* 変異頻度は、TAM 群では肝臓において対照群の約 30 倍、*red/gam* 変異頻度は約 17 倍の有意に増加した。また、TAM+PCP 群においても対照群に比べ有意な増加

が認められたものの、TAM 群との間に差は認められなかった。② *gpt delta* ラット試験期間中の途中死亡数は 84 週目以降増加したが、生存率については雌雄ともに遺伝子型間で差は認められなかった。最終体重は雄性 *gpt delta* ラットで有意な低値が認められた。解剖時の剖検所見では、雌雄のラットに脾臓及び肝臓の腫大、下垂体腫大、腎臓の腫大、乳腺を含む皮下腫瘤及び精巣腫大が認められ、雄性ラットでは腎臓及び精巣の腫大が、雌性ラットでは下垂体腫大及び乳腺を含む皮下腫瘤が高頻度に認められたが、何れの発生頻度にも遺伝子型間に差は認められなかった。

《*Pig-a* アッセイ G》(本間・木本・伊東・宇野・真田)

1) *Pig-a* アッセイの技術共有化

帝人ファーマで RBC *Pig-a* アッセイ及び PIGRET 法の詳細な測定プロトコールを作成し、各研究機関に送付した。帝人ファーマで採血したサンプルを各機関へ送付し、各機関で RBC *Pig-a* アッセイを実施して技術共有化を検討した。その結果、いずれの機関でも陰性対照群に対し ENU 40 mg/kg での明確な *Pig-a* 変異細胞 (CD59 陰性細胞) 数の増加が認められた。また、初回測定結果では各機関で陰性対照群の値にバラつきが認められたが、測定機器における *Pig-a* 変異細胞を検出する領域の設定を各機関で一律 (補正サンプルが 99.0% 囲まれる範囲) となるように工夫して再解析したところ、各機関とも目標値 (10×10^{-6} 以下) が達成できた。

PIGRET 法は帝人ファーマによるデモンストラーションを行った後、一部の参加機関では施設間差検証の際に PIGRET 法を実施した。

2) 各種化合物を用いた *Pig-a* アッセイの施設間差検証

各機関の RBC *Pig-a* アッセイの結果を比較したところ、いずれの化合物も投与用量に応じた *Pig-a* 変異細胞 (CD59 陰性細胞) 数の増加が投与後 2 週目以降より認められた。また、各機関で採取した末梢血サンプルを国立衛研に送付し、翌日国立衛研で測定した結果と、各機関での結果を比較したところ、反応性に差がなかった。また一部の機関で実施した PIGRET の測定結果は、いずれも投与後 1 週目以降より、投与用量に応じた *Pig-a* 変異細胞 (CD59 陰性細胞) 数の増加が認められた。RBC *Pig-a* アッセイと PIGRET の反応性の比較したところ、PIGRET で投与後 1 週目より明確な *Pig-a* 変異細胞 (CD59 陰性細胞)

数の増加が認められた。DMBA 投与の結果は、RBC *Pig-a* アッセイでは投与後 4 週目に向かって DMBA 投与群の反応が増加するのに対し、PIGRET では投与後 1 または 2 週目で最大値を示し、投与後 4 週目では低下する傾向が認められた。4-NQO 投与の結果も、PIGRET の感度が高かった。

《代替試験法 G》

(山田) ① *pol κ* KI *gpt delta* マウスについては、二腹よりそれぞれ 8 個の胚由来の MEF を樹立し凍結保存した。*pol κ* 野生型 *gpt delta* マウスについては、一腹より 5 個の胚由来の MEF を樹立した。② *pol κ* 野生型および *pol κ* KI *gpt delta* MEF 細胞株を BPDE で処理し、生存率の測定 (MTS assay) を行ったところ、それぞれ系統由来の異なる 3 種の細胞株いずれも、用量依存的に生存率が低下した。50 nM および 100 nM では *pol κ* KI の方が BPDE に対する感受性が高く、*pol κ* 野生型に比較して生存率が低かったが、その差は 10% 程度とわずかであり、全体の傾向として *pol κ* KI と *pol κ* 野生型は同様の生存率の変化を示した。

さらに、生存率が 20~30% 低下した 50 nM BPDE の条件で細胞を処理し、回収した細胞からゲノム DNA を抽出してレポーター遺伝子を回収し、*gpt* 遺伝子に生じた突然変異の頻度を測定した。MEF からのレポーター遺伝子の回収効率 (パッケージング効率) は全体に低くばらつきが大きかった。溶媒処理群の MEF 細胞における *gpt* 点突然変異体頻度は、*pol κ* KI において 10 倍以上の有意な増加がみられた (*pol κ* 野生型は 3 系統、*pol κ* KI は 2 系統由来の平均値)。50 nM BPDE 処理群における *gpt* 点突然変異体頻度は、*pol κ* KI が野生型の約 2 倍であった。

(杉本) MMC (150, 300, 450 nM) で 4 時間処理し、その後の細胞分裂時の小核形成をライブセルイメージング観察した。300 nM で処理した場合、48 時間後の小核形成率は 11% であった。処理濃度が低いと小核の形成頻度が低く、イメージング解析できる細胞数が少ないが 150 nM では 2 回目以降の細胞分裂で小核を形成するものの割合が多かった。低濃度の MMC (50 nM、100 nM) で処理した場合、コントロールと比較して細胞の増殖に影響なく、処理時間に応じて小核の形成頻度が増加した。また、この低濃度長時間処理における小核形成の過程について、先と同様に解析したところ、100 nM では大部分が (17/24) 1 回目の細胞分裂時に小核を形成したが、50 nM では半数以上 (8/12) が 2 回目以降の分

裂になってはじめて小核を形成した。

(須井) 384 ウェルマイクロプレートを使用した結果、TA100 の、S9 mix 非存在下、存在下では、黄変ウェル出現頻度 (%) が 100% となる最少の復帰変異菌数/ウェルはそれぞれ、59 個/ウェル、50 個/ウェルであった。TA98 の、S9 mix 非存在下では、黄変ウェル出現頻度 (%) が 100% となる最少の復帰変異菌数/ウェルは 829 個/ウェルであったが、S9 mix 存在下では、復帰変異菌数が 18 個以上/ウェルで、黄変ウェル出現率が 100%[#] であった。次に、96 ウェルマイクロプレートを使用した結果、TA100 の、S9 mix 非存在下、存在下では、復帰変異菌数が 14 個以上/ウェルおよび、12 個以上/ウェルで、ともに黄変ウェル出現率が 100%[#] であった。TA98 (S9 mix 非存在下) では、黄変ウェル出現頻度 (%) が 100% となる最少の復帰変異菌数/ウェルは 1658 個/ウェル、復帰変異菌数が 315 個以下/ウェルで、黄変ウェル出現率は 0% であった。TA98 (S9 mix 存在下) では、復帰変異菌数が 37 個以上/ウェルで、黄変ウェル出現率が 100%[#] であった。[#]黄変ウェル出現率が 100% の場合、黄変ウェル出現頻度 (%) が 100% となる最少の復帰変異菌数/ウェルは算出できない。

(平田) 検出効率を上げる目的で 5 種類の Lysis buffer で細胞を破碎したが、Bugbuster[®] 以外では β -ガラクトシダーゼ活性が検出されなかった。 β -ガラクトシダーゼ活性が確認された Bugbuster[®] について、通常の 10% 希釈よりも 25% 希釈で発色強度が高かった。pKJB7/1A1 と pKJB7/1A2 を導入した株を、代謝活性化を必要とする変異原物質 IQ および、直接変異原である 4-NQO で処理し、Bugbuster[®] で溶菌させて umu 試験を実施した結果、IQ は pKJB7/1A2 の菌の方が β -ガラクトシダーゼ活性が高かったが、4-NQO はいずれの株も同程度の活性を示した。

D. 考察

《*in vivo* 試験法 G》

(増村) ① 加齢が自然突然変異に与える影響を 4~102 週齢の雄 *gpt delta* マウスを用いて検討した。肝臓では *gpt* 点突然変異頻度が加齢とともに 78 週齢まで有意に増加したが、精巣では 4~78 週齢の突然変異頻度に有意な差は認められなかったことから点突然変異の加齢に伴う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から、精巣では外因性および内因性変異原への曝露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誘発、蓄積が起りにくい可能性が考えられた。肝臓において加齢の影響が点突然変異にみられたが欠失変異にはみられなかったことは、変異誘発メカニズムの違いを反映していると考えられ、リスク評価の観点からも興味深い。2年を超える老齢時にはそれまでの加齢に伴う変異蓄積とは異なる老化現象を反映した変異が誘発されている可能性が示唆される結果を得た。②TLS型DNAポリメラーゼはDNA損傷部位でのDNA合成を担っており、その不活化は誘発される突然変異のタイプや頻度に影響を及ぼす可能性がある。52週齢の*Pol κ*KIマウスの自然突然変異頻度は、雄雌ともに*Pol κ*KIが*Pol κ*WTよりも高い値を示した。*Pol κ*不活化による感受性の増加の程度は臓器により異なっていた（肝臓は高く、精巣は低い）。自然突然変異の原因として、食餌由来の外因性変異原や、呼吸に伴う酸化的DNA損傷等の内因性変異原の関与が考えられる。*Pol κ*KIマウスでは低用量の変異原の長期曝露の影響を高感度に検出できる可能性が示唆された。今後は*Pol κ*KIマウスにおいて誘発された突然変異の特徴について解析を進める。

（竹入）B[a]Pは肝代謝酵素によりBPDEをはじめとした活性代謝物となり、これがグアニンの2位に付加体を形成する。*pol κ*はこの付加体におけるTLSに関与することが示唆されている。H2AXのリン酸化はDNA二本鎖切断を含むDNA損傷や、DNA複製フォークの持続的な阻害によって誘発されることが知られている。今回の結果から、MEFを用いた γ H2AX評価系が、これらの化合物によるDNA損傷を検出可能であることが示された。また、*pol κ*はこれらの化合物のDNA付加体部位でのTLSに関与し、DNA複製フォークの停止およびこれに続くDNA二本鎖切断の誘発を防いでいることが示唆された。つまり、*pol κ*KI MEFを用いることでDNA損傷の検出感度が増加する可能性が示された。

（高木）本試験で確認された体重の変動は、各種データに基づき総合的に判断した結果、ロット差によるものであると推察した。絶対器官重量、血液学的検査結果および血液化学的検査において、雌雄共に散見された有意な変動は、相対重量や週齢間での相関性が確認されないことから、偶発的な変動であると判断した。病理組織学的検査では、雌雄共F344/Nの長期飼育で発生することが知られている所見がF344系*gpt-delta*においても確認された。以上より、

F344系*gpt-delta*はバックグラウンドであるF344/Nと同等の性質を持ち合わせていると考えられる。

（藤居）今回の検討結果より、F344系*gpt delta* Tgラットを用い、OECDガイドラインに従い、B[a]Pを28日間反復投与した動物において、骨髄、大腸における*gpt*、*Spi*⁻変異体頻度、および末梢血幼若赤血球の小核の誘発率はいずれも顕著に高く検出されたことから、本試験系は、同一個体でB[a]Pによる点突然変異、欠失変異、染色体異常を十分な感度をもって検出可能であることが明らかとなった。OECD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。げっ歯類を用いたB[a]Pの反復投与末梢血小核試験について、今回の評価で、投与4日目で用量依存的かつ明瞭なMN-RETの増加が示されており、少なくともF344系*gpt delta*ラットはB[a]Pの小核発現を比較的感度良く検出可能な系であると言える。ただし、末梢血以外の組織の小核試験やコメントアッセイ等の*in vivo*遺伝毒性試験の多くの評価において、検出力のピークは最終投与後数時間～2日程度と考えられており、3日後での評価は検出力が低下することが懸念される。Tg動物を用いた突然変異試験に他の*in vivo*評価系を組み込むことは3Rの観点からも有用であるが、今後、更に統合可能な試験を拡充するにあたっては、サンプリング時期の違いによる各種エンドポイントの検出力について検討する必要がある。

（石井）①F344*gpt delta*ラットを用いた統合型毒性試験法の有用性を検討するため、13週間のTAMの投与を実施した。血清生化学的検査では、様々な項目で有意な変化が認められたものの、アルカリフォスファターゼ（ALP）の上昇を除き、特筆すべきものはなかった。TAMの発がん標的臓器である肝臓について病理組織学的検査を実施した結果、TAM群ではすべての動物で小葉辺縁部の肝細胞肥大と軽度の肝障害が認められ、ALPの上昇はこれに起因した変化であると考えられた。ラット肝前がん病変の指標であるGST-P陽性肝細胞巣はTAM投与群で数、面積ともに有意に上昇し、TAMのラット肝発がん性を支持する結果であった。*gpt*及び*Spi*⁻ assay

による肝臓の *in vivo* 変異原性評価では点突然変異頻度を示す *gpt* MFs ならびに欠失変異頻度を示す *red/gam* MFs ともに有意な上昇が認められ、BigBlue ラットでの報告と符合した。また、TAM+PCP 群では、いずれの検索項目においても TAM 群と同様の変化が認められ、SULT 阻害剤である PCP 併用投与の影響は認められなかった。②F344 *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た2年間の飼育を終了したが、病理組織学的検索結果が出ていないので、これについては考察できない。

《*Pig-a* アッセイ G》

1) *Pig-a* アッセイの技術共有化

RBC *Pig-a* アッセイの技術共有化に関して、測定機器における *Pig-a* 変異細胞を検出する領域の設定を一律（補正サンプルが 99.0% 囲まれる範囲）にしたところ、いずれの機関も陰性対照群の平均値が目標値（ 10×10^{-6} 以下）を達成できた。この共通ルールを用いることで、施設間差を小さくすることに成功した。PIGRET 法の技術共有化も達成されたと考えられる。

2) 各種化合物を用いた *Pig-a* アッセイの施設間差検証

各機関で遺伝毒性物質を単回投与し、*Pig-a* アッセイによる *in vivo* 突然変異誘発性を投与4週目まで評価した結果、いずれの機関においても投与用量に応じた *Pig-a* 変異細胞数の経時的な増加が認められた。衛研での測定結果も含め、施設間差も同等であると考えられた。また RBC *Pig-a* アッセイと PIGRET 法では、*Pig-a* 変異細胞数が最大値を示す時期に違いが認められた。PIGRET 法において、DMBA または 4-NQO 投与後 2-4 週目で *Pig-a* 変異頻度の低下傾向が認められたのは、投与後初期に発生した赤芽球由来の *Pig-a* 変異細胞が成熟赤血球へと分化したことに関連した変化であると考えられた。PIGRET 法では RBC *Pig-a* アッセイでは検出できなかった投与用量で *Pig-a* 変異細胞数の増加を検出することができ、かつ投与後 1 週目で明らかかな増加を検出できることから、RBC *Pig-a* アッセイよりも短期間かつ高感度に遺伝毒性リスクを評価する手法として期待できるだろう。

《代替試験法 G》

（山田）*pol κ* KI *gpt delta* マウスは安定に系統維持されており、不妊・胎生致死等は認めていない。今回樹立した MEF においても、樹立の際に目立った系統差は認められなかった。DNA

損傷部位の乗り越えに関わる TLS 型 DNA ポリメラーゼは、遺伝毒性からの防御に関わる生体因子のひとつであり、損傷部位で進行を停止する複製型 DNA ポリメラーゼに代わって損傷部位での DNA 合成を担う。このため、その不活化は誘発される突然変異の頻度やタイプに影響を及ぼす可能性がある。TLS 型 DNA ポリメラーゼの一つである Pol κ はマウスの精巣等において高発現が認められており、*pol κ* KI マウスから樹立した培養細胞を用いることで高感受性かつ簡便なスクリーニング系を構築できる可能性がある。MEF 細胞の遺伝子突然変異体頻度を測定した結果、*pol κ* KI 細胞における突然変異体頻度は *pol κ* 野生型と比較して顕著に高値を示した。複数の系統に由来する細胞株間でパッケージング効率および突然変異体頻度の値のばらつきが大きく、培養細胞系における変異原物質の処理条件にはさらなる条件検討が必要である。

（杉本）m5S(mCherry-H3A14-6)株は、長時間のライブセルイメージングに適しており、連続する5回の細胞分裂の様子を再現性よく観察することできる。従来の処理方法(150nM)では、薬剤を除去後の2回目細胞分裂で小核を生じる傾向が見られたが、小核の形成頻度は低く、観察できる細胞数は限られていた。より低濃度(50-100nM)で長時間処理し、細胞周期全体を通して薬剤を処理することで、小核の形成効率が増加した。50nMにおいては、24時間の処理で、ほぼすべての細胞が薬剤の存在下で細胞周期を1周した。個体を用いる動物試験においては、細胞の生死というよりは、細胞の増殖の程度の微妙な差の方が、毒性としては重要なものかもしれない。ライブセルイメージング技術を用いて数世代にわたり細胞を追跡し、薬剤の存在下、その細胞増殖への様子が直接モニタリングできるだろう。

（須井）菌株にはアミノ酸非要求性になった TA100 および TA98 を用い、菌数を変えて、静置培養には、384 ウェルマイクロプレートおよび 96 ウェルマイクロプレートを用いて改良法 FAT (S9 mix 非存在下および存在下) を実施した。①黄変ウェル出現のためには、1 ウェル中に複数個の復帰変異菌が必要であること、②黄変ウェル出現に必要な最少の復帰変異菌数/ウェルは、使用するマイクロウェルプレート、菌株および S9 mix の有無により異なることが分かった。このことは、PI 後の反応液の分注条件（液量/ウェル、菌数/ウェルおよび分注ウェル数）は、FAT の感度に強い影響を及ぼすことを示唆して

いる。TA98 の S9 mix 非存在下について、384 ウェルマイクロプレートおよび 96 ウェルマイクロプレートのいずれにおいても、黄変ウェル出現には、他の条件と比べて非常に多くの復帰変異菌数/ウェルが必要であることが明らかとなった。このことは、FAT の感度が必ずしも Ames 試験 (TA98 の S9 mix 非存在下) のレベルに達していないことを意味する。

(平田) 検出効率を上げる目的で5種類の Lysis buffer で細胞を破碎したが、Bugbuster®以外では β -ガラクトシダーゼ活性が検出されなかった。その原因としては、検討した Lysis buffer では細胞が破碎されなかったこと、Lysis buffer 中の成分が β -ガラクトシダーゼの活性を阻害したことが考えられる。Bugbuster®については、通常の 10%希釈よりも 25%希釈で使用すると発色強度が高くなったことから、Bugbuster®については、細胞が破碎されたものの、buffer 中の成分が β -ガラクトシダーゼの活性を阻害している可能性が考えられた。代謝活性化を必要とする変異原物質 IQ の場合、pKJB7/1A2 を導入した菌の方が pKJB7/1A1 を導入した菌に比して感受性が高かった。このことは、IQ を代謝活性化する分子種は 1A2 であることと矛盾がなく、この試験系が代替法として使用できることを示唆する。また直接変異原である 4-NQO はいずれも同等の活性を示し、変異原性を示すのに代謝活性化が必要ないことと矛盾しなかった。

E. 結論

《*in vivo* 試験法 G》

gpt delta マウスを用いた結果より、加齢に伴う点突然変異の蓄積には臓器特異性があり、点突然変異と欠失変異で加齢の影響が異なることが示唆された。52 週齢時点で *Pol* κ KI マウスが突然変異高感受性であることが示唆された。(増村)。MEF を用いた H2AX リン酸化の評価系は B[a]P、BPDE による DNA 損傷の検出が可能であり、*pol* κ KI MEF を用いることで DNA 損傷の検出感度がさらに増加する可能性が示唆された(竹入)。F344/NS1c-Tg(*gpt-delta*)と、そのバックグラウンドである F344/NS1c を 1 年にわたり飼育しデータを比較した結果、F344 系 *gpt-delta* ラットは F344/N と同様な背景データを有する動物として、統合型毒性試験系に供することができることが示唆された(高木)。遺伝毒性試験用 F344 系 *gpt delta* Tg ラットを用いた遺伝毒性評価法に末梢血小核試験を統合させ

た試験系で、B [a]P の 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おいて *gpt* および Spi 突然変異体が高頻度で認められた。また、経時的に採取した末梢血中の幼若赤血球における小核が高頻度で出現することが確認できた。以上のことより、本試験系を用いて B[a]P による突然変異と小核誘発がいずれも検出可能であることが明らかとなった(藤居)。*gpt delta* ラットを用いて TAM の一般毒性、変異原性、発がん性の総合的評価を実施した。肝臓の病理組織学的検索、*in vivo* 変異原性の検索及び肝前がん病変マーカーによる発がん性の評価は、これまでに報告されている TAM の肝毒性ならびに遺伝毒性メカニズムを介したラット肝発がん性結果と一致し、本法が統合型毒性試験法として有用な試験系であることが示された(石井)。

《*Pig-a* アッセイ G》

本研究では *Pig-a* アッセイの技術共有化及び遺伝毒性物質を用いての施設間差検証を進め、RBC *Pig-a* アッセイ及び PIGRET 法は技術移行性が良好で、かつ施設間差の再現性が十分に得られる評価系であることを実証した。今後は、*Pig-a* アッセイを他の毒性試験に組み込む実用的なプロトコールを考案していく(本間・木本・伊東・宇野・真田)。

《代替試験法 G》

pol κ 野生型および *pol* κ KI *gpt delta* マウスから樹立した MEF を BPDE で処理し、生存率を比較した結果、*pol* κ KI MEF でわずかな細胞毒性の亢進がみられたが有意な差はなかった。*pol* κ KI MEF における突然変異体頻度は *pol* κ 野生型と比較して顕著に高値を示した。今後は *pol* κ KI MEF における BPDE 誘発変異の特徴を解析し、MEF 細胞での解析がマウス個体を用いた解析の代替法となり得るか検討する(山田)。可視化 m5S 細胞を用いたライブセルイメージングにより、MMC による小核形成のタイミングに濃度依存性があることが示された。短時間(4 時間)処理では小核形成がほとんど見られないような低濃度でも長時間(24 時間)処理することで、MMC 除去後に効率よく小核が誘導された。ライブセルイメージングによる細胞系譜解析は、従来の固定した細胞を用いる小核試験では不可能であった小核の形成過程を追跡できるため、今後の応用が期待される(杉本)。反応液の分注条件(液量/ウェル、菌数/ウェルおよび分注ウエ

ル数)を検討することにより、FAT の感受性のさらなる向上が期待される結果を得た(須井)。細胞破碎には Bugbuster® を 25%希釈して用いることで発色強度が上がった。IQ を用いた実験で、代謝活性化系が予想どおり働いて IQ の突然変異誘発性が検出できたことから、この試験系が代替法として使用できることが示唆された(平田)。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zhang, X*, Horibata, K*, Saijo, M*, Ishigami, C, Ukai, A, Kanno, S-I, Tahara, H, Neilan, EG, Honma, M, Nohmi, T, Yasui, A and Tanaka, K, Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and destabilize ERCC6 in transcription-coupled DNA repair, *Nature Genetics*, *in press* (*these authors contributed equally to this work.)
- 2) C. Nakagawa, S. Nishimura, K. Senda-Murata, K. Sugimoto, A Rapid and Simple Method of Evaluating the Dimeric Tendency of Fluorescent Proteins in Living Cells Using a Truncated Protein of Importin α as Fusion Tag. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76. 388-390 (2012)
- 3) Y. Ohashi, H. Iijima, N. Yamaotsu, K. Yamazaki, S. Sato, M. Okamura, K. Sugimoto, S. Dan, S. Hirono, T. Yamori. AMF-26, A Novel Inhibitor of the Golgi System, Targeting ADP-ribosylation Factor 1 (Arf1) with Potential for Cancer Therapy. *J. Biol. Chem.* 287. 3885- 3897 (2012)
- 4) Kimoto, T., Chikura, S., Suzuki, K., Kobayashi, X., Itano, Y., Horibata, K., Honma, M., Dobrovolsky, V.N., Heflich, R.H., Miura, D. and Kasahara, Y. Further Development of the Rat Pig-a Mutation Assay: Measuring Rat Pig-a Mutant Bone Marrow Erythroids and a High Throughput Assay for Mutant Peripheral Blood Reticulocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52:774-783 (2011)
- 5) N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Takamune, M. Yamada, M. Muramatsu, K. Masumura, T. Ohta, T. Tanaka, T. Nohmi, Modulatory effects of capsaicin on N-diethylnitrosamine (DEN)-induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* YG7108 and DEN-induced hepatocarcinogenesis in *gpt delta* transgenic rats, *Genes and Environment*, 33, 160-166 (2011)
- 6) N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Muramatsu, K. Masumura, M. Takamune, M. Yamada, T. Ohta, T. Tanaka, T. Nohmi, Chemopreventive effects of silymarin against 1,2-dimethylhydrazene plus dextran sodium sulfate-induced inflammation-associated carcinogenicity and genotoxicity in the colon of *gpt delta* rats, *Carcinogenesis*, 32, 1512-1517 (2011)
- 7) A. Yamamoto, Y. Sakamoto, K. Masumura, M. Honma, T. Nohmi, Involvement of mismatch repair proteins in adaptive responses induced by *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine against γ -induced genotoxicity in human cells, *Mutat Res.*, 713, 56-63 (2011)
- 8) N. Koyama, M. Yasui, A. Kimura, S. Takami, T. Suzuki, K. Masumura, T. Nohmi, S. Masuda, N. Kinase, T. Matsuda, T. Imai, M. Honma, Acrylamide genotoxicity in young versus adult *gpt delta* male rats, *Mutagenesis*, 26, 545-549 (2011)
- 9) 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)
- 10) C. Nakagawa, K. Inahata, S. Nishimura, K. Sugimoto, Imaging of Mitotic Cell Improvement of a Venus-Based Bimolecular Fluorescence Complementation Assay to Visualize bFos-bJun Interaction in

Living Cells. Biosci. Biotechnol. Biochem. 75, 1399-1401 (2011)

- 11) M. Isogai, Y. Kawamoto, K. Inahata, H. Fukada, K. Sugimoto, T. Tada. Structure and characteristics of reassembled fluorescent protein, a new insight into the reassembly mechanisms. Bioorg. Med. Chem. Lett. 21. 3021-3024 (2011)

2. 学会発表

- 1) 中川 千雅, 西村 重徳, 村田 香織, 杉本憲治, importin α 断片をタグに用いた生細胞内での蛍光蛋白質の2量体形成傾向の簡便な評価法, 2012年度農芸化学学会大会, 京都 (2012.3)
- 2) K. Masumura, N. Osugi, N. Toyoda-Hokaiwado, T. Nohmi, Spontaneous point mutations and deletions accumulate in a different manner with aging of *gpt delta* transgenic mice. The Society of Toxicology 51st Annual Meeting, USA (2012.3)
- 3) K. Masumura, Y. Sakamoto, W. Kumita, M. Honma and T. Nohmi, Identification of genomic insertion sites of λ EG10 DNA in *gpt delta* transgenic mice and rats by high-throughput DNA sequencing, The Society of Toxicology 51st Annual Meeting, USA (2012.3)
- 4) H. Takagi, Y. Nozaki, A. Kawada, M. Yamada, K. Masumura, T. Nohmi, General toxicity study of F344 *gpt delta* transgenic rat for one-year feeding, The Society of Toxicology 51st Annual Meeting, USA (2012.3)
- 5) 大波冴子, 曹永晩, 豊田武士, 堀端克良, 本間正充, 能美健彦, 西川秋佳, 小川久美子. glycidol と 3-MCPD 及びこれらのエステル化合物におけるラット 28 日間反復投与試験の影響について. 第 28 回日本毒性病理学会総会 (2012.2)
- 6) 山田雅巳, 増村健一, 能美健彦, 次世代シーケンサーを用いた大腸菌ミューテーター株ゲノムに蓄積する突然変異の解析, 第34回日本分子生物学会年会, 横浜 (2011.12)
- 7) T. Suzuki, Y. Kanemaru, N. Toyoda-Hokaiwado, K. Masumura, P. Grúz, N. Adachi, M. Honma, T. Nohmi, The roles of translesion DNA polymerases in bypass across oxidatively damaged DNA lesions, 第34回日本分子生物学会年会, 横浜 (2011.12)
- 8) Zhang, X., Horibata, K, Saijo, M., Ishigami, C., Ukai, A., Kanno, SI., Neilan, E.G., Tahara, H., Honma, M., Nohmi, T., Yasui, A. and Tanaka, K. Molecular cloning of the gene for UV-sensitive syndrome with deficiencies in transcription-coupled DNA repair. 第34回日本分子生物学会年会 (2011.12)
- 9) Saijo, M., Zhang, X., Horibata, K., Ishigami, C., Ukai, A., Kanno, SI., Tahara, H., Neilan, E.G., Honma, M., Nohmi, T., Yasui, A. and Tanaka, K. UVSSA and USP7 cooperate to stabilize CSB in transcription-coupled DNA repair. 第34回日本分子生物学会年会 (2011.12)
- 10) 増村健一, トランスジェニック遺伝子突然変異試験の発展とその意義, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011.11)
- 11) 堀妃佐子, 下吉里実, 藤居互, 増村健一, 山田雅巳, F344系統 *gpt delta*ラットを用いた突然変異試験と末梢血小核試験の統合法の検討, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011.11)
- 12) 高木久宜, 野崎祐次, 河田昭彦, 山田雅巳, 増村健一, 能美健彦, F344系 *gpt delta*ラットの6ヶ月飼育試験による背景データの取得, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011.11)
- 13) 増村健一, 大杉直弘, 豊田尚美, 能美健彦, *gpt delta*マウスの加齢に伴う点突然変異および欠失変異の蓄積, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011.11)
- 14) 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, マウスをモデルとした、高頻度に発生する生殖系列突然変異が次世代以降の個体に与える影響の解析, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011.11)
- 15) 本山茂記, 竹入章, 和田直子, 寺社下浩一, 三島雅之, 新見直子, Petr Grúz, 増村健一, 山田雅巳, 能美健彦, Mitomycin CによるDNA二本鎖切断の誘発に対するDNA polymerase κ の役割, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011.11)
- 16) 堀端克良, 鵜飼明子, 木本崇文, 鈴木哲矢,

- 鴨下渚, 能美健彦, 本間正充. *Pig-a*アッセイとトランスジェニック突然変異試験の組合せに関する研究. 日本環境変異原学会第40回大会 (2011. 11)
- 17) 木本崇文, 堀端克良, 武藤重治, 真田尚和, 橋本和之, 伊東悟, 宇野芳文, 本間正充. ラット末梢血を用いる*Pig-a*アッセイ共同研究: 測定技術の共有化と施設間差に関する研究報告. 日本環境変異原学会第40回大会 (2011. 11)
- 18) 川喜多 愛, 村田 香織, 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(2), 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011. 11)
- 19) 須井哉, 川上久美子, 奥富弘子, 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7. 日本環境変異原学会第40回大会, 2011年11月 (東京)
- 20) K. Horibata, A. Ukai, K. Masumura, T. Nohmi, M. Honma, In vitro genotoxicity tests using primary hepatocytes, Environmental Mutagen Society 42nd Annual Meeting, Canada (2011. 10)
- 21) Kimoto, T., Horibata, K., Muto, S., Sanada, H., Hashimoto, K., Itoh, S., Uno, Y. and Honma, M. A Japanese Collaborative Study on Rat Pig-a Assay; Report on a Transferability of the Assay Method and Interlaboratory Difference. Environmental Mutagen Society 42nd Annual Meeting, Montreal (2011, 10)
- 22) Kimoto, T., Chikura, S., Suzuki, K., Kobayashi, X., Itano, Y., Horibata, K., Honma, M., Dobrovolsky, V. N., Heflich, R. H., Miura, D. and Kasahara, Y. Further Development of the Rat Pig-a Mutation assay: Measuring Rat Pig-a Mutant Bone Marrow Erythroids and a High Throughput Assay for Mutant Peripheral Blood Reticulocytes. Environmental Mutagen Society 42nd Annual Meeting, Montreal (2011. 10)
- 23) 堀端克良, 増村健一, 能美健彦, 本間正充, In vitro genotoxicity assay using primary hepatocytes derived from *gpt delta* transgenic mouse, 第70回日本癌学会学術総会、名古屋 (2011. 10)
- 24) 増村健一、大杉直弘、豊田尚美、高木久宜、能美健彦、*gpt delta*マウスの肝臓及び精巣に蓄積する加齢に伴う点突然変異及び欠失変異の解析, 第70回日本癌学会学術総会、名古屋 (2011. 10)
- 25) 大波冴子、曹永晩、豊田武士、堀端克良、本間正充、能美健彦、西川秋佳、小川久美子、Evaluation of in vivo genotoxicity of glycidol and 3-MCPD and associated esters, using Pig-A and micronucleus assays, 第70回日本癌学会学術総会 (2011. 10)
- 26) T. Nohmi, A. Yamamoto, Y. Sakamoto, K. Msumura, M. Honma, Critical roles of mismatch repair proteins in modulation of genotoxicity of gamma-irradiation in human cells by pretreatments with *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine at low doses, 14th International Congress of Radiation Research, Poland (2011. 8)
- 27) 木本崇文、千蔵さつき、鈴木久美子、小林小梅、板野泰弘、Vasily N. Dobrovolsky、Robert H. Heflich、堀端克良、本間正充、三浦大志郎、笠原義典、新規in vivo遺伝子突然変異評価系 (*Pig-a* アッセイ) の検討: 骨髄エリスロイド及び末梢血網状赤血球を用いる *Pig-a*アッセイの開発. 第38回日本トキシコロジー学会学術年会(2011. 7)
- 28) Zhang, X., Horibata, K, Saijo, M., Ishigami, C., Ukai, A., Kanno, SI., Neilan, E. G., Tahara, H., Honma, M., Nohmi, T., Yasui, A. and Tanaka, K. Molecular cloning of the gene for UV-Sensitive Syndrome with deficiencies in Transcription-coupled DNA repair. Conference: Response to DNA damage: from molecular mechanism to human disease, Netherlands (2011. 4)
- 29) 川喜多 愛、日野 詩愛里、村田 香織、杉本 憲治、可視化した核型安定細胞株 (m5SとCHL/IU) のライブセルイメージングによる細胞系譜解析、第63回日本細胞生物学会大会、札幌 (2011. 5)
- 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
特許申請中
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
研究期間 平成22年4月～平成24年3月

研究要旨 抗体医薬品の品質・安全性確保のための共通基盤技術として、①糖鎖試験法、②結合性試験法、及び③凝集体評価法の開発と標準化を行った。①中性糖鎖の試験法として、2-アミノベンザミド標識(2AB)逆相及び親水性相互作用 HPLC、HPAEC/PAD、8-アミノピレン-1,3,6-トリスルホン酸標識(APTS)/キャピラリー電気泳動(CE)及びMSが適していることを明らかにし、抗体医薬品の糖鎖試験法として特に優れている2AB/HPLCとCEを用いた標準的抗体糖鎖試験法を策定した。②表面プラズモン共鳴法(SPR)を用いた標準的Fc受容体(FcRn)結合親和性試験法を策定した。③動的光散乱法を用いた凝集体評価法及び酸変性抗体除去用ペプチドカラムを開発した。本標準法を基に、日局①中性糖鎖試験法、及び②SPRを用いた結合試験法原案を作成し、日局原案作成委員会に提出する予定である。

研究分担者

- | | |
|----------------------|-------|
| (1) 国立衛研 生物薬品部 | 石井 明子 |
| (2) 国立衛研 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 | 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 | 中島 和幸 |
| (7) アステラス製薬(株)製剤研究所 | 森 啓太郎 |
| (8) 大日本住友製薬(株)技術研究本部 | 佐藤 貴之 |
| (9) エーザイ(株) 筑波研究所 | 四方 靖 |
| (10) (株)ベネシス研究開発本部 | 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。抗体医薬品開発の特徴は、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。品質管理においても、共通性の高い品質管理手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/審査業務の迅速化につながるものと期待される。

バイオ医薬品の品質管理のポイントは、重要品質特性(CQA)を明らかにし、CQAを確保するために適切な工程パラメータ、工程内管理試験、規格及び試験法を設定することである。抗体医薬品に共通するCQA候補に、①抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)や補体依存性細胞傷害活性(CDC)、並びに免疫原性に関与する糖鎖構造/不均一性、②薬理

作用や体内動態制御に関わる標的分子やFc受容体への結合親和性、及び③免疫原性との関連性が指摘されている凝集体があり、これらを詳細に解析し、管理・試験するための手法の開発と標準化が望まれている。そこで本研究では、①糖鎖、②結合親和性、及び③凝集体評価法の開発と標準化を行った。①では、各種HPLC、CE、及びMS等による中性オリゴ糖及びグリコフォーム試験、②ではSPRによる結合親和性試験、及び③では動的光散乱等による凝集体評価法と凝集体形成に関する酸変性体を除去するカラムを開発した。

B. 研究方法

B1. 糖鎖試験法

SP2/0細胞産生抗体製剤からPNGase Fにより糖鎖を遊離した。〈HPLC〉糖鎖を2AB標識し、TSKgel Amide 80カラムを用いた親水性相互作用HPLC、及びHypersil ODSを用いた逆相HPLCで分離し、蛍光検出した(ex 330 nm, em 420 nm)。〈CE〉糖鎖をAPTS誘導体化後、フューズドシリカキャピラリーを用い30 kVで泳動し、蛍光検出した(ex 488 nm, em 520 nm)。〈MS〉ESI Q-TOF MSにより測定した。n=3で2日間分析し、再現性を評価した。

B2. 結合親和性試験

CHO細胞の培養上清由来ヒトFcRn細胞外ドメインを固定し、Biacore 3000及びBiacore T200を用いて、市販の抗体製剤類を流速30 µl/minで流し、結合120秒、解離150秒、再生30秒としてセンサーグラムを取得した。Bivalent analyte RI=0モデルにより解析し、解離定数 K_D を算出した。