

団・学校法人北里研究所.

発明者：花輪壽彦，日向須美子，合田幸広，日向昌司，天倉吉章，好村守生.

ヒトにおける安全性確保のための、非臨床・ 臨床開発における評価・予測系の開発

国立医薬品食品衛生研究所
医薬安全科学部
黒瀬 光一

研究要旨：副作用リスクの予測と安全性評価に関して次の項目に関して研究を行い、成果を得た。(1) 医薬品のインビトロアレルギー性予測系の開発, (2) ヒト iPS 細胞を用いた小腸上皮・成熟肝細胞の分化およびその評価, (3) 安全性バイオマーカーの探索・同定と診断法の開発

研究分担者

- 1) 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部
前川京子
- 2) 積水メディカル(株) つくば研究所
森 篤雄
- 3) 田辺三菱製薬(株) 薬物動態研究所
丹羽卓朗
- 4) 東京大学大学院 薬学系研究科
楠原洋之
- 5) 理化学研究所
杉山雄一
- 6) 岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科
埴岡伸光
- 7) 九州大学大学院 農学研究院
田代康介
- 8) Meiji Seika ファルマ(株) 医薬研究所
土屋敏行
- 9) 第一三共(株) 薬物動態研究所
渡邊伸明
- 10) 名古屋市立大学大学院 薬学研究科
松永民秀
- 11) プレシジョン・システム・サイエンス(株)
上田哲也

A. 研究目的

医薬品開発過程の早期にヒトにおける安全性評価を適切に行うことができれば、開発候補薬の効率的で的確な絞り込みや安全性確保のための対策が創薬のより早い段階において可能となり、開発期間や開発費の削減、さらには、より安全な医薬品供給の促進が期待される。そこで、本研究では、参加企業のニーズを含む医薬品開発上の必要性を踏まえ、非臨床開発過程と臨床開発過程それぞれに関して近々に対処すべき課題に関して研究を行い、両過程を通じた副作用リスクの予測と安全性評価系の開発をめざすことを目的とした。すなわち、非臨床過程では、医薬品のインビトロアレルギー性予測系の

開発、およびヒトiPS細胞を用いた小腸上皮・成熟肝細胞の作製およびその評価をおこない、臨床過程においては、安全性バイオマーカー (BM) の探索・同定と診断法の開発を目的とする。

B. 研究方法

1) 非臨床開発過程

1-1) インビトロアレルギー性評価系の検討

h-CLAT (human Cell Line Activation Test) は基本的に定法 (Sakaguchi et al., Toxicology in Vitro, 20, 774-784 2006) に従った。細胞は ATCC 社から購入したヒト単球性白血病由来細胞株 (TIB-202) を用い、10%牛胎児血清 (Biowest), 0.05mM 2-melcaptoethanol (GIBCO) を添加した RPMI1640 (GIBCO) 培地で培養した。細胞は購入直後に大量調製を行った後、一旦、凍結保存し、使用にあたっては、凍結融解後 2 週間から 2 カ月間のものを用いて、細胞濃度が 1×10^6 cells/mL を超えないように継代培養した。被験物質は、陽性コントロールを $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, DNCB (2,4-dinitro chlorobenzene), 陰性コントロールを SDS (sodium dodecyl sulfate) とし、被験物質として以下の物質を用いた: Troglitazone (WAKO), Diazepam (WAKO), (\pm)-Chlorpheniramine maleate salt (SIGMA), (S)-(+)-Clopidogrel hydrogensulfate (SIGMA), trans-4-(Aminomethyl)-cyclohexanecarboxylic Acid (Tranexamic Acid) (東京化成工業), Cefazolin Sodium Salt (東京化成工業), Fenofibrate (SIGMA), Gemcitabine (WAKO), Sibutramine Hydrochloride Monohydrate (WAKO). h-CLAT の判定は下式より Relative fluorescence intensity (RFI) を算出し、CD86

の RFI \geq 150 又は CD54 の RFI \geq 200 をアレルゲン性陽性の基準とした。3 回の試験の内 2 回以上陽性と判定された化合物を、陽性と判断した。定法に準じ、以下の条件下で h-CLAT の判定を行った。①溶媒対照群での細胞生存率が 90%以上、②少なくとも 4 用量で細胞生存率が 50%以上、③CV75 (細胞生存率 75%の被験物質濃度) 付近の濃度において、DNCB および Ni で陽性基準を満たし、SDS で陰性基準を満たす。さらに、細胞生存率 50%以下のサンプルの RFI は判定の対象としなかった。また、CV75 が得られない場合は、被験物質の最大溶解濃度から公比 1.2 で 8 doses をとり、アッセイを行った。

4 遺伝子 (TNF- α , IL-8, IFN- α , IFN- β) の感作物質応答性

96 穴プレートを用い、 3×10^4 cells/well の THP-1 細胞に、CV75 で感作性 (アレルゲン性) 物質 {Ni, DNCB, Albendazole (ABZ)} および陰性対照物質 (SDS) を暴露し、各暴露時間 (2, 4, 6 時間) 経過後、Roche RealTime ready Cell Lysis Kit により RNA ライセートを作成した。続いて、TAKARA One Step SYBR PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time)を用いて 4 遺伝子 (TNF- α , IL-8, IFN- α , IFN- β) および内部標準として GAPDH 遺伝子を用い、ABI PRISM 7500 にてリアルタイム RT-PCR を行い、比較 Ct 法による $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (相対値) を算出し、各遺伝子の応答性を評価した。

IL-8 遺伝子の発現制御領域のクローニングとレポーターアッセイ系の構築

THP-1 細胞より抽出したゲノム DNA をもとに IL-8 遺伝子の発現制御領域 (-5059~+144) を PCR 法によりクローニングし、レポーターベクターである pNL1.3[secNluc](プロメガ)にサブクローニングし、pNL/IL-8 を作成した。インサートの両端から one pass シーケンシングを行い、目的のクローンであることを確認した。リポフェクション法により THP-1 細胞にトランスフェクションし、感作性物質 (Ni) によるレポーター遺伝子の発現誘導をルミノメーターにて測定した。

1-2) ヒト iPS 細胞を用いた小腸上皮・成熟肝細胞の分化およびその評価。

ヒト iPS 細胞から腸管細胞への分化

まず、activin A 含む培地で 3 日間、fibroblast growth factor 2 を含む培地で 4 日間培養した。その後、Y-27632 を 10 μ M となるよう添加し、5% CO₂/95% air 条件下 CO₂ インキュベーター中 37°C で 60 分間処理した後、細胞を Accutase で剥離し、あらかじめ、ヒ

ト iPS 細胞用培地で 30 倍に希釈した GFR Matrigel でコーティングした細胞培養用 24 ウェルプレートに播種した (Y-27632 は播種後 24 時間培地に添加した)。細胞播種後、epidermal growth factor を含む培地で 19 日間培養した。分化誘導終了後、細胞を回収し、各マーカー遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法にて解析した。また、分化誘導のある期間に低分子化合物 (A, B, C, D, E) を単独もしくは複数添加して分化誘導を行った。

DNA マイクロアレイ解析

分化誘導後、0, 3, 7, 17, 26 日目の培養細胞に対して、培地を除去後、0.5ml Trizol を加え、RNA を抽出し、RNeasy カラム (Qiagen) にて精製し、DNA マイクロアレイ解析の試料として用いた。RNA の純度及び回収量は、吸光スペクトル及び変性アガロースゲル電気泳動によって測定した。RNA 200ng を鋳型として、low-input Quick Amp Labeling Kit (one color) (Agilent) を用いて Cyanine3 ラベル化 aRNA を調製した。このラベル化 aRNA をプローブとして、Human whole genome ver.2.0(8X44K) (Agilent 社) を用いて遺伝子発現プロファイルを収集した。ハイブリダイゼーションは Agilent 社が提供しているプロトコルに従った。

遺伝子発現データ解析

DNA マイクロアレイ解析の結果を用いた遺伝子発現データ解析や細胞分化マーカー解析は、ingenuity systems の IPA (interactive pathway analysis) を用いて行った。

薬物代謝酵素誘導実験

1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ もしくは rifampicin をそれぞれ 10 nM もしくは 40 μ M となるよう添加し、細胞回収前に 48 時間処理した。

Sucrase-isomaltase の免疫蛍光染色

分化誘導終了後、細胞を固定し、膜透過処理およびブロッキングを行った。その後、一次抗体および二次抗体で処理し、核染色を行った後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

ペプチドの取り込み実験

25 μ M β -Ala-Lys-AMCA (蛍光ラベルされたジペプチド) を 5% CO₂/95% air 条件下 CO₂ インキュベーター中 37°C で 4 時間処理した。その後、sucrase-isomaltase の免疫蛍光染色を行った。

ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化

ヒト iPS 細胞を activin A 処理することで内胚葉に分化させ、dimethyl sulfoxide にて肝芽細胞に分化誘導し、oncostatin M, dexamethasone, hepatocyte growth

factor によって成熟させる方法にて肝細胞への分化を行った。また分化の際に、低分子化合物を含む変法 L-15 培地を用いる時期を検討し、培地中に添加する血清を fetal bovine serum (FBS) 群と KnockOut Serum Replacement (KSR) 群に分けた。また低分子化合物濃度及び血清濃度を検討し、各々が分化に与える影響について検討した。

2) 臨床開発過程

安全性BMの探索・同定と診断法の開発

2-1) 肝CYP3A4, 腎薬物トランスポーターの薬物間相互作用に関連したバイオマーカー。

肝ミクロソームを用いたDX-619によるMBI (mechanism-based inhibition) 活性の評価 ヒト肝ミクロソームにおけるmidazolamの1'-hydroxylation活性を、DX-619 (第一三共) の添加濃度、preincubation時間を変えて測定した。CYP3A4とDX-619に関する見かけの乖離定数 (K_i) および最大不活化速度定数 (k_{inact}) は、Kanamitsuらの方法(Kanamitsu et al Drug Metab Dispos. 28(4):467-74, 2000)に従い求めた。同様の実験を、CYP3A4発現系 (CYP3A4 Supersomes®) を用いて実施した。

血漿中cortisolならびに尿中6β-OHFの定量

Phase1 検体 (血漿・尿) を用いて、血漿中のcortisol濃度の時間推移、6β-OHFの尿中排泄量を、LC-MS/MSを用いて測定した。さらに、血漿中6β-OHF濃度の時間推移も測定し、6β-OHFの腎クリアランス($CL_{renal,6\beta-OHF}$)も測定した。

強制発現系を用いたin vitro輸送実験

すでに構築したOAT3, OCT2, MATE1, MATE2-K発現系をin vitro輸送実験を行った。典型基質をポジティブコントロールとして、6β-OHFの細胞内取り込みを37°Cで測定した。MATE1, MATE2-Kの輸送活性測定の際には、通常条件に加えて、NH₄Cl処理により、外向きプロトン勾配存在下においても、輸送活性を評価した。典型的阻害剤による阻害効果により、細胞内取り込みに対する各トランスポーターの特異性を確認した。

2-2) GST-KOマウスを用いたメタボロミクス解析

Gstm1-, Gstt1-ノックアウトマウス

Gstm1-, Gstt1-ノックアウトマウスは、第一三共株式会社安全性研究所において、常法であるES細胞の相同組換え法により、C57BL/6Jと129S1系統の掛け合わせとして維持されたものを使用した。胆汁は、9週齢の野生型, homozygousのそれぞれのマウスから、16時間絶食後、麻酔下で胆嚢カニキュレーションを行って採取し、使用までは約-80°Cの冷凍庫中で

保管した。

メタボロミクス解析

解析試料：マウス胆汁 (♂)

- 野生型 (WT) : n = 6
- Gstm1-, Gstm1-ノックアウト (D) : n = 6
- Gstm1-ノックアウト (M1) : n = 6
- Gstt1-ノックアウト (T1) : n = 6

サンプル前処理

- 上記の各胆汁試料(50 μL)を精製水 450 μL で希釈し、遠心後(4°C, 15000 rpm, 5 min)の上清を試料溶液とした。

測定および解析

- UPLC(Waters Corp.) / LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) にて ESI-positive モードで測定した LC/MS データを SIEVE (Thermo Fisher Scientific) でアライメント実施後、Simca-P (Umetrics)を用いて WT に対するノックアウト群での変動因子を抽出した。

• UPLC 測定条件

カラムは Acquity BEH C18, 2.1 mm I.D. x 50 mm, 流速は 0.35 ml/min とし、移動相は 0.1%ギ酸-アセトニトリル系でアセトニトリル濃度を 0 分から 5.5 分までで 0%から 90%までリニアグラジェントで変化させ、0.5 分から 8 分まで MS データ取り込みした。各試料溶液の注入量は 5 μL とした。

2-3) 遺伝子多型とタイピング系の開発

タイピング系

日本人において *HLA-A*31:01* と強い連鎖不平衡 ($r^2=0.79$, $D'=0.95$) を示すことが報告されている rs1633021 を対象とし、polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)法による迅速タイピング系を構築した。中国系アメリカ人の健康人の臍帯血由来ゲノム DNA は AllCells 社(Emeryville, CA, USA)より購入した。SJS/TEN 発症患者は、SJS/TEN 遺伝子解析研究班 (the Japan Severe Adverse Reactions (JSAR) research group) および国立衛研により集積された。

副作用と相関する遺伝子多型の探索

副作用発症患者の検体及び臨床情報は、全国の不特定病院から収集した。イマチニブに関しては、2005年7月より2009年3月まで新潟大学にて投薬治療を受けた切除不能あるいは再発性のGIST患者で、患者本人から文書による同意を得られた50名を対象とした。血液検体より抽出したゲノムDNAを用い、薬物代謝酵素CYP3A4及び薬物トランスポ

ーターABCBI 及び ABCG2 の遺伝子多型のうち、機能変化を示す数種の多型及びハプロタイプタグ多型を、直接シーケンス法・一塩基プライマー伸長法・TaqMan 法等によりタイピングした。イマニチブ治療による有害事象・有害反応の評価は CTCAE ver.3.0 日本語訳 JCOG/JSCO 版を用いて行い、有害事象・有害反応の発現と遺伝子多型およびハプロタイプとの関連性を解析した

2-4) 安全性バイオマーカーの迅速検出系の開発

BIST (Beads in Straw Tip) の作製

ヒトのゲノム配列と相同性の低い 31-37 mer のオリゴヌクレオチド (TAG) を設計し、合成した。合成したオリゴヌクレオチドを、非磁性ビーズと EDC 存在化で反応させ、粒子表面に固定した。18 種類の異なる配列を持つオリゴヌクレオチドを固定した反応ビーズを、キャピラリーチップに封入した。SNP 解析では、2 個のビーズを使って判定する。製造した BIST は、将来性を考慮し、最大 9SNP が同時解析できる仕様とした。

rs9263726 と rs2734583 の BIST 解析

(1) Allele Specific PCR とラベル化反応

PCR と BIST で型を判定するためのラベル化反応を同時に行う、Allele Specific PCR を Applied Biosystems 社のサーマルサイクラーVerti[®] 200 を用いて反応を行った。Primer は、rs9364726 の A アレル検出用を 0.75 pmol、G アレル検出用を 7.5 pmol と 7.5 pmol の増幅用 Primer と、rs2734583 の T アレル検出用 15 pmol と C アレル検出用 15 pmol と 15 pmol の増幅用 Primer を添加した。

(2) BIST 解析

PCR 産物を、BIST 内に封入した TAG 配列を固相したビーズと反応させ、遺伝子型を判定した。BIST との反応には、Magtration System 12GC を用いた。反応容器にハイブリダイゼーションバッファー、洗浄 & ブロッキングバッファー、抗体試薬、洗浄バッファーを 100 μ l ずつ入れ、ハイブリダイゼーションバッファーに 95°C で 5 分間の Denature をさせた、5 μ l の PCR 産物を添加した。ハイブリダイゼーションバッファーには、MES buffer をベースとし 25%ホルムアミド、1 M NaCl 等を入れ、PCR 産物の 1 本鎖化を保たれるようにした。洗浄 & ブロッキングバッファーには、TE Buffer をベースに 1 M NaCl とブロッキング剤としてブロックエースを入れた。抗体試薬は、Roche 社の POD 標識抗ジゴキシゲニンポリクローナル抗体、Fab フラグメントを使用した。

反応後の BIST に 40 μ l の POD 発光基質を吸引し、

BIST 専用の測定機として開発した BISTnner でビーズ発光の有無を解析した。基質には、Thermo Scientific 社の Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究には、市販の或いは公的バンクより頒布されるヒト由来細胞 (より得られた DNA) を用いており、必要に応じて「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、各研究実施機関で研究倫理審査委員会の承認が得られた後、解析を行った。市販されているヒト由来試料等を用いる場合には、インフォームドコンセントを得て正当に採取された検体であることを購入時に業者に確認した。また、本研究で取り扱うヒト検体については、既に研究実施機関の倫理委員会の承認を得ており、被験者の同意も適正に得ている。なお、本研究は「ヒト iPS 細胞又はヒト組織幹細胞からの生殖細胞の作成を行う研究に関する指針」等の倫理的な指針には抵触しない。動物実験は、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」等を遵守して実験を行なわれた。以上、倫理的な問題はない。

C. 研究結果

1) 非臨床開発過程

h-CLAT による医薬品のインビトロアレルギー性評価系の検討

試験を試みた医薬品 9 物質のうち次の 7 物質 (Troglitazone, Diazepam, (\pm)-Chlorpheniramine maleate salt, (S)-(+)-Clopidogrel hydrogensulfate, Tranexamic Acid, Gemcitabine, Sibutramine) については CV75 が得られたが、Cefazolin と Fenofibrate に関しては CV75 が得られなかったため、それぞれ規定最高濃度の 5mg/ml あるいは最高溶解濃度の 0.236mg/ml を最大 dose として、h-CLAT を実施した。7 物質 (Diazepam, (\pm)-Chlorpheniramine maleate salt, (S)-(+)-Clopidogrel hydrogensulfate, Tranexamic Acid, Cefazolin Sodium Salt, Gemcitabine, Sibutramine Hydrochloride Monohydrate については陽性判定となった。また、2 物質 (Troglitazone, Fenofibrate) については陰性判定となった。

4 遺伝子 (TNF- α , IL-8, IFN- α , IFN- β) の感作物質応答性

免疫応答に関与する 4 遺伝子について、感作性 (アレルギー性) 物質応答性をリアルタイム RT-PCR 法で検討した。IFN- β に関しては、感作物質応答性はほとんど見られなかったが、他の 3 遺伝子に関し

ては応答性が認められた。特に IL-8 に関しては調べた 3 物質 (Ni, DNCB, ABZ) いずれに対しても非常に高い応答性が認められた。

IL-8 遺伝子のレポーターアッセイ系の構築

感作性物質に対して非常に高い応答性を示す IL-8 の遺伝子発現を指標にしたレポータージーンアッセイ系を構築するため、まず、THP-1 細胞のゲノム DNA より IL-8 遺伝子の転写開始点近傍から約 5kb 上流を PCR 法にてクローニングし、分泌型発光蛋白ベクターにサブクローニングし、pNL/IL-8 を作製した。これを THP-1 細胞に一過性にトランスフェクションし、Ni 暴露 6 時間での発現誘導を確認した。

1-2) ヒト iPS 細胞を用いた小腸上皮・成熟肝細胞の分化およびその評価。

ヒト iPS 細胞から腸管細胞への分化

分化させた腸管上皮細胞において腸管幹細胞のマーカである LGR5 や腸管上皮に特異的なマーカである sucrase-isomaltase の発現がみとめられた。また、CYP3A4 (成人における主要な薬物代謝酵素) や SLC15A1/PEPT1 (ペプチドトランスポーター)、SLC46A1/PCFT (葉酸トランスポーター) など薬物代謝や薬物輸送に関わる遺伝子類の発現もみとめられた。CDX2, dipeptidyl peptidase-4 (DPP4), SLC46A1/PCFT に関してはヒト成人小腸と同程度の発現レベルであった。なかでも、sucrase-isomaltase については遺伝子発現だけでなく、免疫蛍光染色により蛋白の発現も確認された。さらに、sucrase-isomaltase が発現している細胞においてペプチドの取り込みが観察された。

次に、より効率的な分化誘導法の確立を目指して、各種低分子化合物の腸管細胞への分化誘導に対する効果を検討した。その結果、5 種類の低分子化合物を併用することで、sucrase-isomaltase, SLC15A1/PEPT1 および CYP3A4 の発現がそれぞれ 9.2 倍、3.9 倍および 15 倍上昇した。また、1 α -25 ジヒドロキシビタミン D₃ 処理により CYP3A4 の発現誘導がみとめられた。さらに、低分子化合物 C, D, E を併用することでコントロールの 21 倍上昇した CYP3A4 発現が、1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ の処理で、さらに 10.7 倍の遺伝子発現誘導がみとめられた。

細胞分化誘導過程におけるマーカー遺伝子の変動

iPS 細胞を用いて、腸管上皮幹細胞分化誘導処理後、0, 3, 7, 17, 26 日目の培養細胞から RNA を抽出し、細胞における遺伝子発現変動を DNA チップにより解析した。解析対象とする遺伝子は、(1) 未分化、及び (2) 小腸上皮細胞の分化段階、のマーカー遺

伝子群とし、ingenuity systems の IPA (interactive pathway analysis) データベースを用いて選抜した、発生初期特異的、及び、消化管と小腸をキーワードとして遺伝子を選抜した結果、未分化マーカーとして、22 遺伝子、小腸上皮マーカーとして、27 遺伝子を選抜した。まず、未分化マーカー遺伝子は、小腸上皮細胞への分化誘導過程において、細胞分化誘導後、7 日目までは穏やかに減少し、17 日目から 26 日目まで急激に減少し、約 20 分の 1 まで低下した。また、ES 細胞において未分化マーカー遺伝子の代表として知られる NANOG, SOX2, POU5 などを解析したところ、分化誘導後、7 日目において既に急激な減少が見られ、26 日目まで急激な減少が継続していた。これにより、腸管上皮への分化誘導処理によって、iPS 細胞が分化状態に移行していることが判明した。次に、小腸上皮マーカー遺伝子及び消化管マーカー遺伝子を解析したところ、解析した 22 種類の遺伝子がすべて、分化誘導 17 日目以降発現誘導されていることが明らかとなり、iPS 細胞が誘導処理によって小腸細胞様へと分化していることが明らかとなった。

細胞分化誘導によって発現が変化した遺伝子による細胞状態の推定

細胞分化誘導後、発現が大きく変動した遺伝子群から、IPA データベースを用いて機能解析を行い、誘導された細胞の状態を推定した。まず、細胞分化誘導後、30 倍以上発現が減少した遺伝子群の生理的な機能分類を行った。その結果、減少した遺伝子群は、Behavior, Embryonic Development, Tissue Development, Cardiovascular System Development and Function などに機能分類されている遺伝子を有意に含んでいること、ただし、各機能分類内での遺伝子機能から未分化状態と関連する遺伝子群を有意に含んでいることが判明した。また、減少した遺伝子群の相互関係を解析した結果、未分化状態特異的な遺伝子群が含まれていることが判明した。これら IPA による生理的機能解析の結果は、iPS 細胞が未分化状態から分化状態に移行していることを強く示唆している。次に、細胞分化誘導後、30 倍以上発現が上昇した遺伝子群の生理的機能分類を行った。その結果、Digestive System Development and Function, Tissue Development, Embryonic Development, Cardiovascular System Development and Function, Endocrine System Development and Function などに機能分類される遺伝子を有意に含んでおり、特に、Digestive System Development and Function に分類さ

れる遺伝子群を最も有意 ($P=0.000001$ 程度) に含んでいたことから、消化管細胞への分化が有意に起こっていると判断できる。しかしながら、遺伝子間のネットワーク推定を行うと、内分泌系の遺伝子群も多く含まれていることが明らかとなった。これは、細胞分化誘導した iPS 細胞に小腸上皮以外の細胞が含まれていることを示している可能性がある。

ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化

分化後の細胞について mRNA 発現解析を行ったところ、胎児肝細胞マーカーである alpha-fetoprotein (AFP)、胎児の主要な薬物代謝酵素である CYP3A7、成熟肝細胞マーカーである albumin (ALB)、成人の主要な薬物代謝酵素である CYP3A4、CYP3A5 等の発現が認められた。これらの mRNA 発現量は、血清として FBS を用いた低分子化合物を含む変法 L-15 培地を、使用時期 S2 で添加した群において最も高い発現量を示し、当研究室で従来用いていた方法 (従来法) と比較して AFP で 3 倍、CYP3A7 で 48 倍、ALB で 23 倍、CYP3A4 で 14 倍、CYP3A5 で 3 倍増加した。また、これらの細胞は肝細胞の形態学的な特徴である多核の形態を示した。これらの変法 L-15 培地に含まれる低分子化合物及び FBS 濃度の最適な条件決定のために、低分子化合物及び FBS 濃度をそれぞれ異なる全 9 群の組み合わせにおいて、使用時期 S2 で添加し肝細胞への分化誘導を行った。25 日間分化させた細胞の mRNA 発現解析を行ったところ、従来法と比較して ALB、CYP3A4、CYP3A5、CYP3A7 の発現はほぼ全ての群で増加した。CYP3A4 に関しては、従来法と比較し F 群及び G 群でそれぞれ約 9 倍の発現量の増加が認められた。一方、核内受容体である pregnane X receptor (PXR) の発現には大きな変動はなく、より成熟した肝細胞のマーカーである TAT の発現量は低下する傾向が認められた。分化した F 群及び G 群の細胞の形態学的変化及び ALB を免疫蛍光染色した細胞を顕微鏡下で観察したところ、従来法と比較して細胞が単層で多核であり、ほぼすべての細胞で ALB 陽性像が認められた。

2) 臨床開発過程

安全性 BM の探索・同定と診断法の開発

2-1) 肝 CYP3A4、腎薬物トランスポーターの薬物間相互作用に関連したバイオマーカー。

肝ミクロソームを用いた DX-619 による MBI 活性の評価

DX-619 による midazolam 1'-hydroxylation 阻害能は、濃度ならびに pre-incubation 時間依存的であった。

一方、DX-619 以外のキノロン薬については levofloxacin, sparfloxacin, および trovafloxacin において、preincubation による有意な活性低下が認められたものの、いずれも 20%未満の活性低下にとどまった。CYP3A4 Supersomes®においても、DX-619 による preincubation 時間依存的な阻害が認められたことから、DX-619 は CYP3A4 の mechanism-based inhibitor であると結論した。DX-619 の K_i および k_{inact} はそれぞれ $67.9 \pm 7.3 \mu\text{M}$ および $0.0730 \pm 0.0033 \text{ min}^{-1}$ と算出された。

数値モデルに基づいた肝 CYP3A4 活性の推定と $CL_{6\beta\text{-OHF}}$ との比較

DX-619 投与時 (1200 mg, 反復 15 日投与) の肝臓中 CYP3A4 含量に関する PBPK model を構築したところ、肝臓中 CYP3A4 を最大で平時の 25-53%にまで低下させると予測された。Phase I 検体を用いて、 $CL_{6\beta\text{-OHF}}$ を測定した結果、DX-619 投与 day 1 では、 $CL_{6\beta\text{-OHF}}$ の若干の低下が認められた ($P=0.0546$)。DX-619 投与 15 日後では、 $CL_{6\beta\text{-OHF}}$ は placebo 群と比較して最大 27%に低下した。本結果は、上記 PBPK model の予測結果とほぼ一致した。

$6\beta\text{-OHF}$ の腎排泄における相互作用

$6\beta\text{-OHF}$ の血漿中非結合型薬物分率を測定し、その尿中排泄量と血漿中濃度 AUC から腎クリアランス ($CL_{\text{renal},6\beta\text{-OHF}}$) を算出した。Placebo 群における $CL_{\text{renal},6\beta\text{-OHF}}$ は 84.8 ± 27.3 (day 1) および 78.0 ± 24.3 (day 15) であり、非結合型薬物分率から推定される $6\beta\text{-OHF}$ の糸球体ろ過速度 (20.4 ml/min) よりも高く、 $6\beta\text{-OHF}$ が尿細管分泌を受けていることを示している。さらに DX-619 投与によって $CL_{\text{renal},6\beta\text{-OHF}}$ は糸球体ろ過速度近くまで低下しており、 $6\beta\text{-OHF}$ の尿細管分泌が DX-619 によって完全に阻害された可能性がある。 $6\beta\text{-OHF}$ の OAT1、OAT3 および OCT2 発現細胞への取り込み活性を評価した。hOAT3 および hOCT2 への $6\beta\text{-OHF}$ への取り込みは vector 導入細胞と比較して有意であり、hOAT3 においては probenecid (1 mM) によってその取り込みが有意に阻害された。hOAT1 導入細胞での取り込みは vector 導入細胞と比較して有意な差は認められなかった。 $6\beta\text{-OHF}$ の hOAT3 への取り込みの濃度依存性を評価し、速度論的パラメータを算出した。 $6\beta\text{-OHF}$ の hOAT3 への取り込みは飽和性を示し、その K_m および V_{max} はそれぞれ、 $183 \pm 25 \mu\text{M}$ および $782 \pm 45 \text{ pmol/min mg protein}$ と算出された。hMATE1 への $6\beta\text{-OHF}$ への取り込みは NH_4Cl 条件下、非条件下ともに vector 導入細胞と比較して有意であり、その取

り込みは pyrimethamine (10 μ M) によって有意に阻害された. 一方, hMATE2-K では 6 β -OHF は NH₄Cl 条件下においてのみ vector 導入細胞と比較して有意な取り込みを示し, その取り込みは pyrimethamine によって有意に阻害された. 6 β -OHF の hMATE1 への取り込みは 1 min まで直線的に増加した. さらに, 6 β -OHF の hMATE1 および hMATE2-K への取り込みの濃度依存性を評価したところ, いずれも取り込みは 100 μ M まで直線的に増加した.

2-2) GST-KO マウスを用いたメタボロミクス解析.

Score plot, Loading plot

野生型 (WT) と M1/T1 (DKO), WT と M1, WT と T1 を比較し Score plot 解析を行った. KO 群と WT 群はそれぞれのクラスター形成が見られ, PC1 軸 (X 軸) に対して左右に良好に分離した. また, 同様に Loading plot 解析もおこなった.

2-3) 遺伝子多型とタイピング系の開発.

タイピング系

開発した PCR-RFLP 法では, rs1633021 T>C を挟む 301 bp の DNA 断片を増幅した後, Tru 9I による制限酵素消化により多型の有無を判定した. すなわち, PCR 増幅産物が T アレルを含む場合は, 183 bp と 118 bp の 2 つの断片に消化され, C アレルを含む場合は, 制限酵素消化を受けずに 301bp の断片が検出された. 中国系アメリカ人健常者及び SJS/TEN 発症患者のゲノムを用いて, PCR-RFLP 法による rs1633021 のタイピングを行ったところ, 明瞭なタイピング結果が得られた. また, PCR-RFLP 法による解析結果は直接シーケンス法による結果による結果と完全に一致したことから, 結果は正確であり, 今回確立した方法によるタイピング系は有用であることが示された. さらに HLA-A タイプが既知の SJS/TEN 発症日本人患者 79 名のゲノム DNA (HLA-A*31:01 ホモ接合体保因者 2 名, HLA-A*31:01 ヘテロ接合体保因者 35 名を含む) を用いて開発した PCR-RFLP 法により rs1633021 のタイピングを行ったところ, rs1633021 と HLA-A*31:01 は強い連鎖不平衡 ($r^2=0.7355$, $D' = 0.9204$) にあることを確認した.

副作用と相関する遺伝子多型の探索

医薬品による重篤副作用を発症した患者の検体の収集は, 順調に進んだ. イマチニブによる主要な G3 以上の有害事象は, 血液毒性及び皮膚症状 (皮疹) であった. G3 以上の白血球・好中球減少に ABCB1 の多型 (IVS26+59T>G, $P=0.0291$) 及びハプロタイプ (ABCB1*8, $p=0.0391$) が有意に相関した. 皮膚症

状 (皮疹) の発現に ABCG2 の多型 (421C>A, Q141K, $p=0.0432$) が有意に相関した.

2-4) 安全性バイオマーカーの迅速検出系の開発.

BIST (Beads in Straw Tip) の作製

作製した BIST ビーズに固定した TAG オリゴヌクレオチドと, ビオチン化ラベルした相補な TAG オリゴヌクレオチドを Magstration System 12GC でハイブリダイゼーション反応させ, ビーズのシグナル有無を確認した. 結果, 目的の位置に特異的なシグナルが確認できた.

rs9263726 と rs2734583 の BIST 解析

最初に代表的な 3 タイプ (rs9263726 と rs2734583 が共に野生型, ヘテロ型, 変異型) の検体を BIST で解析したところ, 遺伝子型と一致した. 各反応工程に要した時間は, PCR が 2 時間, BIST での解析時間が 30 分と, 計 2.5 時間程度であった. 次に, ゲノム検体を約 20 ng/ μ l になるよう滅菌水で希釈し, その希釈したゲノム検体の 1 μ l を BIST で解析した. BIST での判定結果は, Taqman 法による解析結果と, 全て, 一致することが確認できた. しかし, 検体によっては, PCR の非特異増幅由来だと考えられるシグナルがわずかに検出され, これまでに行っていた遺伝子型 (変異型, ヘテロ型, 野生型) のカットオフ値では, 検体によっては解析結果が Taqman 法での解析結果と一致しない結果となり, カットオフ値の見直しが必要であった.

D. 考察

1) 非臨床開発過程

医薬品のインビトロアレルゲン性予測系の開発

アレルギー性副作用の報告のある医薬品 7 物質 (Troglitazone, Diazepam, (\pm)-Chlorpheniramine maleate salt, (S)-(+)-Clopidogrel hydrogensulfate, Tranexamic Acid, Cefazolin Sodium Salt, Gemcitabine) については Troglitazone を除いて陽性となった. また, Fenofibrate と Sibutramine の 2 物質については, FDA から報告された臨床での薬疹発症件数及び頻度に関する論文 (Toxicology 193, 203-217, 2003) によると, 100 万単位の販売数に対する薬疹報告件数 (reporting index) が 0 であり, 陰性となることが期待されたが, Fenofibrate は陰性となり Sibutramine は陽性となった. 今後さらに, h-CLAT のアレルゲン性予測に対する有用性を見極めるには, より多くの評価結果が必要であると考えられる. h-CLAT では CD54 と CD86 の発現上昇を指標にしているが, より適切なマーカー分子によるアッセイ系を開発

する必要性を考え、今回、免疫応答に関与する4遺伝子(TNF- α , IL-8, IFN- α , IFN- β)について、感受性(アレルゲン性)物質(Ni, DNCB, ABZ)に対するTHP-1における応答性を調べた。このうち特にIL-8の応答性が非常に高い(280倍)ことが判明したことから、IL-8の遺伝子発現に対する分泌型のレポーターアッセイ系を構築した。Niに対してレポーターアッセイを行ったところ誘導が確認できた。しかしながら、Ni暴露によるTHP-1内在性IL-8の誘導率と比較するとレポーターアッセイでの誘導率は非常に低い。その理由として、今回ベクターに導入したIL-8の転写調節領域が誘導活性を十分に反映していない事が考えられるが、今後の検証が必要である。また、皮膚感受性物質に対するIL-8の発現誘導も報告されており、医薬品に対するアレルゲン性においてもマーカーとなりうると期待されるので、今後検証を行っていききたい。

ヒトiPS細胞を用いた小腸上皮・成熟肝細胞の分化およびその評価

本研究で今回我々が行った分化誘導法で分化させた細胞では腸管細胞に発現するさまざまな遺伝子類だけでなく、腸管での薬物動態に関わる薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの発現もみとめられたことから、分化させた細胞は腸管細胞様細胞であることが示唆された。また、腸管上皮特異的なマーカーであるsucrase-isomaltaseが発現している細胞において、小腸管腔内からのペプチドの取り込みに関わるトランスポーターの基質の取り込みもみとめられたことや、1 α ,25-dihydroxyvitamin D3によりCYP3A4の顕著な発現誘導がみとめられたことから、分化誘導した腸管細胞様細胞は遺伝子発現だけでなく腸管上皮に特徴的な機能や性質を有していることが明らかとなった。さらに、分化誘導をする際にある低分子化合物を用いることで、腸管細胞への分化が促進され、さらに複数の低分子化合物を併用することで、相乗的な効果がみとめられ、その有用性が示された。細胞分化誘導を行ったiPS細胞の特性解析の一環として、細胞分化誘導処理過程における遺伝子発現プロファイルを解析した。細胞分化マーカーを用いた解析においても、発現変化パターンからの細胞状態推定においても、分化誘導を行った細胞は、未分化状態から分化状態に移行していることが判明した。一方、分化状態の解析では、小腸上皮細胞が分化していることが明らかとなったが、小腸上皮以外の細胞種も含まれている可能性があることが判明した。今後、分化誘導によって得られた

細胞が、薬物動態予測系として使用可能かという観点で解析を行う必要があると考えられる。肝細胞への分化において、分化させた細胞は各種肝細胞マーカーを発現したことから、ヒトiPS細胞が肝細胞様細胞へ分化したことが示唆された。これらの遺伝子発現量は低分子化合物を含む変法L-15培地を適切な時期に用いることで増加したことから、今回用いた低分子化合物を含む変法L-15培地は肝細胞への分化を促進したことが示唆された。また、肝細胞への分化を行う培地には、KSRよりもFBSの添加が適していることが示唆された。さらに詳細な条件の検討を行った結果、ALB遺伝子発現において顕著な差は認められなかったものの、F群及びG群でCYP3A4の遺伝子発現が増加した。さらに、これらの群ではほぼ全ての細胞がALB陽性を示したことから、高い効率でヒトiPS細胞から肝細胞様細胞を得ることができたと考えられた。

2) 臨床開発過程

安全性BMの探索・同定と診断法の開発

2-1) 肝CYP3A4、腎薬物トランスポーターの薬物間相互作用に関連したバイオマーカー

DX-619による肝CYP3A4に対するMBIに対して、MBIに関連したin vitroパラメータならびに薬効用量での血漿中濃度の時間推移から推定した肝CYP3A4の低下は、健常人被験者で観察されたCL_{6 β -OHF}の低下とは、ほぼ一致していた。一方で、6 β -OHFを用いる際の問題点も見いだした。6 β -OHFのヒト腎クリアランスは糸球体ろ過速度($f_b \cdot GFR$)よりも大きく、尿細管分泌を受けることが明らかになった。CL_{6 β -OHF}は6 β -OHFの尿中排泄量に基づいて算出されるため、6 β -OHFのCL_{renal,6 β -OHF}/全身クリアランス比もCL_{6 β -OHF}に組み込まれている。DX-619投与時CL_{renal,6 β -OHF}は著明に低下することから、6 β -OHFの全身クリアランスに占める腎排泄経路の割合に応じて、CL_{6 β -OHF}の解釈が変わる。仮に、尿中排泄経路がpredominantである場合、生成した6 β -OHFは最終的に全て尿中へと排泄されることから、腎排泄過程の相互作用は、十分な尿回収時間が設けられていればCL_{6 β -OHF}の解釈に影響を与えない。一方、他の経路之寄与が腎排泄経路よりも大きい場合は、CL_{renal,6 β -OHF}の低下に伴いCL_{6 β -OHF}も低下することになるため、腎排泄経路に対する影響も考慮する必要がある。DX-619の場合、CL_{renal,6 β -OHF}の低下と、CL_{6 β -OHF}の低下はほぼ同定度であり、肝CYP3A4に対する阻害活性を評価するためには、6 β -OHFの排泄経路の解明が不可欠である。6 β -OHFの尿細管分

泌に関わる候補トランスポーターとして、OAT3, MATE1, MATE2-K を見いだした。輸送方向から、基底膜側の取り込み過程では、OAT3 がもっとも寄与率が高いものと期待され、尿中排泄経路には MATE1, MATE2-K の関与が想定される。OAT3, MATE に対しては、それぞれ probenecid, pyrimethamine が、薬物間相互作用を生じる薬物として知られており、これらの薬物投与が $CL_{renal,6\beta-OHF}$, $CL_{6\beta-OHF}$ に与える影響を評価することで、前述の疑問に答えることができる。また、 $6\beta-OHF$ が新たに OAT3, MATE1/MATE2-K の新たな内因性プローブとなる可能性が示唆された。

2-2) GST-KO マウスを用いたメタボロミクス解析
3 群共通で変動したピークは WT に対していずれも顕著に減少しており、M1 と T1 の KO により先の代謝が亢進されたと考えられる。DKO と M1 または T1 で共通して変動したピークはそれぞれ M1 または T1 を KO することにより変動したピークであると考えられる。DKO と M1 共通では 3 群同様にこれらの変動ピークは主として WT に対して顕著に減少しており、ノックアウトにより代謝が亢進されたと考えられる。一方で、DKO と T1 および M1 と T1 共通ではこれらの変動ピークは主として WT に対して顕著に増加しており、代謝がブロックされ蓄積した結果と考えられた。その他、単群のみで変動が見られたピークは DKO と M1 ではいずれも WT に対して減少が見られたが T1 のみでは増加が見られた。WT に対する変動ピークとして、TIKO では増加、MIKO では減少する傾向が見られた。

2-3) 遺伝子多型とタイピング系の開発.

タイピング系

*HLA-A*31:01* は、白人、台湾の漢民族、韓国人、日本人等の民族でカルバマゼピンによる薬疹発症のリスク因子であることが報告されている。大関らは、網羅的遺伝子多型解析により、*HLA-A* 領域の 163kb 上流に存在する遺伝子多型 rs1633021 が、日本人において *HLA-A*31:01* と強い連鎖不平衡 ($r^2=0.79$, $D'=0.95$) にあることを報告しており、この遺伝子多型は *HLA-A*31:01* のサロゲートマーカーとなりうる。そこで、今回、日本人におけるカルバマゼピン誘発性 SJS/TEN 発症の回避のためのスクリーニングへの応用を目指して、*HLA-A*31:01* と強い連鎖不平衡にある rs1633021 を対象に迅速タイピング系を構築した。HLA-A タイプが既知の SJS/TEN 発症患者 79 名のゲノム DNA を用いて本法を適用したところ、大関らの報告と一致して、rs1633021 と *HLA-A*31:01*

は強い連鎖不平衡 ($r^2=0.7355$, $D'=0.9204$) にあることを確認した。

副作用と相関する遺伝子多型の探索

引き続き、医薬品による重篤副作用を発症した患者検体の収集を行い、行政施策上、有用なゲノムバイオマーカーを同定する予定である。また、イマチニブ治療による副作用発現に薬物動態関連分子の遺伝子多型が関与している可能性が示唆された。今後は、イマチニブの体内動態に関与する他の遺伝子の多型についても解析が必要であり、関連性が見出された多型に関しては、簡便なタイピング系を構築する予定である。

2-4) 安全性バイオマーカーの迅速検出系の開発

BIST 遺伝子解析手法を用いる rs9263726 と rs2734583 の 2 SNPs の迅速検出法は、65 検体において遺伝子型と一致する結果を得ることができ、手法の精度が確認できた。また、ゲノム検体からの解析時間は、2.5 時間程度と、迅速な遺伝子解析手法を開発することができた。しかし、検体によっては、遺伝子判定のカットオフ値を変える必要があったことから、カットオフ値を決定するために多数の検体による検証を続ける必要がある。

E. 結論

h-CLAT に関しては、陽性が期待される薬物 7 物質中 6 物質を陽性として検出し、また、陰性が期待される薬物 2 物質中 1 物質を陰性として検出できた。今後、さらなる化合物評価を実施していく予定である。また、アレルギー性評価において新たなマーカー分子候補である IL-8 のレポーターアッセイ系を構築した。

ヒト iPS 細胞から腸管細胞様の細胞を分化誘導することができた。また、分化させた腸管細胞様細胞はペプチドの輸送機能も有することが示された。さらに、分化誘導の際に複数の低分子化合物を用いることで、腸管細胞への分化誘導を促進させることが可能であることも明らかとなった。iPS 細胞から小腸上皮細胞への分化誘導が DNA チップを用いた遺伝子発現プロファイルの解析により評価可能であることが明らかになった。また、分化誘導された細胞は、明らかに分化状態に移行しており、また、小腸上皮細胞に分化していることが明らかとなった。

ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化においては、低分子化合物を含む変法 L-15 培地及び FBS の添加により、肝細胞への分化促進あるいは iPS 細胞由来肝細胞の純度を向上させることが明らかとなった。

肝 CYP3A4, 腎薬物トランスポーターの薬物間相互作用に関連したバイオマーカーとして, cortisol の CL6 β -OHF, 6 β -OHF の腎クリアランスを明らかにした。

Gstm1 および Gstt1 欠損マウス胆汁のメタボロミクス解析において, GST ノックアウト状態の違いにより, 野生型マウスと異なる内因性物質やその代謝物が変動していることを示唆する結果が得られた。

日本人においてカルバマゼピン誘発性 SJS/TEN 発症のリスク因子である *HLA-A*31:01* と強い連鎖不平衡 ($r^2=0.7355$, $D' =0.9204$) を示すサロゲートマーカー多型 rs1633021T>C につき, PCR-RFLP 法による迅速タイピング系を構築した。消化管間質腫瘍患者のイマチニブ治療による副作用発現に対して関与が示唆される薬物動態関連分子の遺伝子多型を見出した。

重症薬疹の発症と関連する 2 か所の遺伝子多系 (rs9263726 と rs2734583) について, BIST を使用した簡易な遺伝子解析手法を開発でき, この遺伝子解析手法を取り入れること遺伝子型の迅速検出の可能性を示すことができた。

F. 研究発表

研究発表

1. 論文発表

- 1) Imamura Y, Murayama N, Okudaira N, Kurihara A, Inoue K, Yuasa H, Izumi T, Kusuhara H, Sugiyama Y. Effect of the Fluoroquinolone Antibacterial Agent DX-619 on the Apparent Formation and Renal Clearances of 6 β -Hydroxycortisol, an Endogenous Probe for CYP3A4 Inhibition, in Healthy Subjects. *Pharm Res.* 30(2):447-57 (2013)
- 2) Kusuhara H, Miura M, Yasui-Furukori N, Yoshida K, Akamine Y, Yokochi M, Fukizawa S, Ikejiri K, Kanamitsu K, Uno T and Sugiyama Y Effect of Coadministration of Single and Multiple Doses of Rifampicin on the Pharmacokinetics of Fexofenadine Enantiomers in Healthy Subjects. *Drug Metab Dispos*, 41(1):206-13 (2013).
- 3) Imai S, Kikuchi R, Kusuhara H and Sugiyama Y DNA Methylation and Histone Modification Profiles of Mouse Organic Anion Transporting Polypeptides. *Drug Metab Dispos*, 41(1):72-8 (2013)
- 4) Ito S, Kusuhara H, Kumagai Y, Moriyama Y, Inoue K, Kondo T, Nakayama H, Horita S, Tanabe K, Yuasa H and Sugiyama Y N-Methylnicotinamide Is an Endogenous Probe for Evaluation of Drug-Drug Interactions Involving Multidrug and Toxin Extrusions (MATE1 and MATE2-K). *Clin Pharmacol Ther* 92:635-641, 2012.
- 5) Yoshida K, Maeda K and Sugiyama Y Hepatic and Intestinal Drug Transporters: Prediction of Pharmacokinetic Effects Caused by Drug-Drug Interactions and Genetic Polymorphisms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 53:581-612 (2013)
- 6) 打田光宏, 土屋 敏行, 宇梶 真帆, 斎藤 嘉朗, 黒瀬 光一: Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) を用いた医薬品のアレレルゲン性評価. *Immuno Tox Letter*. Vol. 17, No. 2 (通巻 34 号), 5-6, 2012
- 7) Kurose K, Koizumi T, Nishikawa J, Maekawa K, Saito Y. :Quality requirements for genomic DNA preparations and storage conditions for a high-density oligonucleotide microarray. *Biol. Pharm. Bull.* 35 (10), 1846-1848, 2012
- 8) Sasaki T, Takahashi S, Numata Y, Narita M, Tanaka Y, Kondo Y, Matsunaga T, Ohmori S, Nagata K: Hepatocyte nuclear factor 6 activates the transcription of CYP3A4 in hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells. *Drug Metabol Pharmacokin*, in press.
- 9) 宮下雪子, 上田哲也: 核酸検査の自動化に対応する全自動遺伝子解析装置の開発, *細胞* Vol 45 (3), 2013
- 10) Hanioka N, Iwabu H, Hanafusa H, Nakada S, Narimatsu S. Expression and inducibility of UDP-glucuronosyltransferase 1As in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012;110(3):253-258.
- 11) Hanioka N, Tanaka S, Moriguchi Y, Narimatsu S. Stereoselective glucuronidation of carvedilol in human liver and intestinal microsomes. *Pharmacology* 2012;90(3-4):117-124.
- 12) Hanioka N, Nonaka Y, Saito K, Kataoka H, Narimatsu S. Effect of aflatoxin B1 on UDP-glucuronosyltransferase mRNA expression in HepG2 cells. *Chemosphere* 2012;89(5):526-529.
- 13) Nagaoka K, Hanioka N, Ikushiro S, Yamano S, Narimatsu S. The effects of N-glycosylation on the glucuronidation of zidovudine and morphine by UGT2B7 expressed in HEK293 cells. *Drug Metab Pharmacokin* 2012;27(4):388-397.
- 14) Hanioka N, Takahara Y, Takahara Y, Tanaka-Kagawa T, Jinno H, Narimatsu S. Hydrolysis of di-n-butyl phthalate, butylbenzyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate in human liver microsomes. *Chemosphere* 2012;89(9):1112-1117
- 15) Maekawa K, Nishikawa J, Kaniwa N, Sugiyama E, Koizumi T, Kurose K, Tohkin M and Saito Y: Development of a rapid and inexpensive assay for detecting a surrogate genetic polymorphism of HLA-B*58:01: a partially predictive but useful biomarker for allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis in Japanese. *Drug Metab Pharmacokin*. 27:447-450 (2012).
- 16) 斎藤嘉朗, 前川京子, 鹿庭なほ子, 日本人を対象にしたゲノム・メタボローム解析によるバイオマーカー探索, *ファームステージ* 6: 1-4, (2012)

- 17) 須藤チエ, 前川京子, 瀬川勝智, 花谷忠昭, 佐井君江, 斎藤嘉朗: 医薬品重篤副作用報告からみる薬物性肝障害の最近の動向. 国立医薬品食品衛生研究所報告 133 :66-70(2012).

2.学会発表

- 1) 打田光宏, 土屋 敏行, 宇梶 真帆, 斎藤 嘉朗, 黒瀬 光一: Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) を用いた医薬品のアレルギー性評価. 第 19 回日本免疫毒性学会学術大会 (2012 年 9 月, 東京)
- 2) 吉橋幸美, 近藤祐樹, 三森佳代, 杉山留理, 岩尾岳洋, 金濱吉範, 牧与志幸, 松永民秀. ヒト人工多能性幹細胞の肝細胞への分化における変法 L-15 培地及び血清の効果. 第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡), 2012 年 12 月.
- 3) 岩尾岳洋, 中村克徳, 永田清, 松永民秀. ペプチド輸送機能を有するヒト iPS 細胞由来腸管細胞の作製. 日本薬物動態学会第 27 回年会 (千葉), 2012 年 11 月.
- 4) Takahiro Iwao, Kiyoshi Nagata, Tamihide Matsunaga. Differentiation into functional enterocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. 19th Microsomes and Drug Oxidations (MDO) and 12th European Regional International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX) Meeting (Noordwijk aan Zee, The Netherlands), June 2012.
- 5) 三宅祐加, 真弓慶, 神野透人, 香川(田中)聡子, 埴岡伸光, 成松鎮雄: ミニブタ UGT1A1 の cDNA クローニング及び酵素機能. 第 53 回日本生化学会中国・四国支部例会, 岡山, 2012 年 5 月 18-19 日.
- 6) 畠山和久, 花房弘之, 松永民秀, 黒瀬光一, 斎藤嘉朗, 埴岡伸光, 成松鎮雄: ヒト iPS 細胞由来肝細胞様細胞における UDP-グルクロン酸転移酵素の発現解析. 第 53 回日本生化学会中国・四国支部例会, 岡山, 2012 年 5 月 18-19 日.
- 7) 古川由貴, 岸直樹, 神野透人, 香川(田中)聡子, 埴岡伸光, 成松鎮雄: 変異型 UGT1A8 酵素の機能: 7-ヒドロキシ-4-トリフルオロメチルクマリンを基質に用いた解析. 第 53 回日本生化学会中国・四国支部例会, 岡山, 2012 年 5 月 18-19 日.
- 8) 山本康平, 向井麻莉菜, 岸直樹, 埴岡伸光, 香川(田中)聡子, 神野透人, 成松鎮雄: ヒト及びカニクイザル UDP-グルクロン酸転移酵素 1A9 の酵素機能比較第. 51 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 松江, 2012 年 11 月 10-11 日.
- 9) 高原有香, 高原佑輔, 埴岡伸光, 成松鎮雄: フタル酸ジエステル類の代謝に関する加水分解酵素の種差. 51 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 松江, 2012 年 11 月 10-11 日.
- 10) 伊豆野祥太郎, 埴岡伸光, 綾野賢, 江尻洋子, 内藤真策, 成松鎮雄: Expression profiling of UDP-glucuronosyltransferases in HepG2 and MCF-7 cells cultured on micro-space plates. 日本薬物動態学会第 27 回年会, 千葉, 2012 年 11 月 20-22 日.
- 11) 伊豆野祥太郎, 埴岡伸光, 綾野賢, 江尻洋子, 内藤真策, 成松鎮雄: Expression profiling of UDP-glucuronosyltransferases in HepG2 and MCF-7 cells cultured on micro-space plates. 日本薬物動態学会第 27 回年会, 千葉 (, 2012 年 11 月 20-22 日.
- 12) 古川由貴, 岸直樹, 神野透人, 香川(田中)聡子, 埴岡伸光, 成松鎮雄: Effect of UDP-glucuronosyltransferase 1A8 polymorphism on raloxifene glucuronidation. 日本薬物動態学会第 27 回年会, 千葉, 2012 年 11 月 20-22 日.
- 13) 三宅祐加, 真弓慶, 神野透人, 香川(田中)聡子, 埴岡伸光, 成松鎮雄: cDNA cloning and functional characterization of miniature pig UDP-glucuronosyltransferase 1A1. 日本薬物動態学会第 27 回年会, 千葉, 2012 年 11 月 20-22 日.
- 14) 前川 京子, 西川 潤, 鹿庭 なほ子, 杉山 永見子, 小泉 朋子, 黒瀬 光一, 頭金 正博, 斎藤 嘉朗: 日本人におけるアロプリノール誘因性重症薬疹発症の危険因子 HLA-B*58:01 のサロゲートマーカー多型を対象としたタイピング系の構築, 第 39 回日本毒性学会学術年会 (2012.7) (仙台)
- 15) 斎藤嘉朗, 鹿庭なほ子, 杉山永見子, 黒瀬光一, 前川京子: 臨床的に重要な副作用のゲノム解析に関する取り組みの現況と今後のメタボロミクス解析の必要性等について. 第 39 回日本毒性学会学術年会 (2012.7) (仙台)

G. 知的所有権の所得状況

1. 特許取得

出願日: 平成 25 年 2 月 26 日

出願番号: 特願 2013-036434

発明の名称: 人工多能性幹細胞を腸管

上皮細胞へ分化誘導する方法

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

安全性評価手法の新機軸：統合型毒性試験

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
山田 雅巳

研究要旨 トランスジェニック動物を用いる遺伝毒性試験と一般毒性試験を統合した試験法について基礎データ取得した。Pig-a 試験法は、民間を中心に改良法の国内・国際バリデーション研究を進めた。in vitro 試験法のキット化、及び遺伝毒性メカニズムに基づく代替法の開発等に取り組み一定の結果を得た。

研究分担者

- (1) 大阪府立大学 杉本憲治
- (2) ナトリビジネエキパート㈱ 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秦野研究所
須井 哉
- (5) 国立医薬品食品衛生研究所 堀端克良
- (6) 帝人ファーマ㈱ 木本崇文
- (7) 帝人ファーマ㈱ 千蔵さつき
- (8) 第一三共㈱ 伊東 悟
- (9) 田辺三菱製薬㈱ 武藤重治
- (10) 科研製薬㈱ 真田尚和
- (11) 中外製薬㈱ 竹入 章
- (12) 日本エス・エル・シー㈱ 高木久宜
- (13) 国立医薬品食品衛生研究所 石井雄二
- (14) 国立医薬品食品衛生研究所 増村健一

A. 研究目的

医薬品等化学物質の安全性評価には、これまで実験動物を多く使用する毒性試験が実施されてきている。その中で、全組織での評価が可能な Tg 動物を用いる遺伝毒性試験法が広まりつつあり、in vivo 遺伝子突然変異試験として、2011年に OECD ガイドラインが公開された。この試験法を一般毒性試験にも応用できるように、これまでの HS 官民共同研究で F344 系統 *gpt*-delta Tg ラットが開発された経緯がある (Environ Mol Mutagen, 41, 253-9, 2003)。一方、ICH ガイドラインにおいて医薬品の遺伝毒性評価の際に実施が求められている①微生物を用いる復帰突然変異試験②哺乳類細胞を用いる染色体異常試験③マウスを用いる小核試験のうち①②は、動物を用いず、短時間に試験結果を得ることができる in vitro 試験法である。中でも、医薬品の開発初期において、少ない化合物量で多検体のスクリーニング試験を行うための

微生物を用いた変異原性試験のハイスループット化、キット化等が強く望まれているが、まだルーチン化には至っていない。その他に、新規 in vivo 試験法として、微量の血液サンプルで簡便に測定可能な Pig-a 試験法が注目されている。これまでの研究成果から改良法も検討され、国際バリデーション研究にむけての有用な知見が得られており (Environ Mol Mutagen, 52, 774-783, 2011)、今後は官民共同による標準化が求められる。

これらを踏まえ、本研究は次の3つを達成目標とする。(1)安全性評価手法の新機軸となる、Tg ラットを用いた統合型毒性試験法および評価手法の確立 (2) in vitro 代替試験系を多方面から改良し、これまでの HS 重点研究により開発された FAT 改良法 (Genes Environ, 31, 47-55, 2009) のルーチン化、umu 試験のキット化、Tg 蛍光細胞を用いた小核試験に替わる新たな毒性評価法 (Cell Cycle, 7, 477-483, 2008) の開発の検討。(3) Pig-a アッセイ (Environ Mol Mutagen, 49, 614-621/622-630, 2008) の標準化および、統合型遺伝毒性試験への組み込みの検討。

B. 研究方法

(1) Tg ラット・マウスを用いた統合型毒性試験法および評価手法の確立

[石井] F344 系 *gpt* delta ラットを用いた一般毒性・遺伝毒性統合試験

①6週齢の雄性 F344 *gpt* delta ラットおよび野生型 F344 ラットに ES を 3、30 及び 300 mg/kg/day の用量で 4 週間強制経口投与した。主要臓器を肉眼的に観察後摘出し、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後、ヘマトキシリンエオジン染色を施した。各臓器の残りは ES 特異的 DNA 付加体

の測定及び *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。ES 特異的 DNA 付加体の測定は、各臓器から抽出した DNA をヌクレアーゼ P1 及びアルカリフォスファターゼ処理によりデオキシヌクレオシドまで分解し、ES-3' -A⁶-dG、ES-3' -8-dG 及び ES-3' -A⁶-dA 付加体を液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) にて測定した。②6 週齢の雌雄 F344 *gpt* delta ラット各 75 匹及び対照群としてその野生型の雌雄 F344 ラット各 75 匹を日本エスエルシー株式会社より購入し、CRF-1 固形基礎飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社) と水道水で 104 週間飼育した。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、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。

[藤居] F344 系 *gpt* delta ラットを用いた Tg 突然変異試験と多臓器小核試験の統合

7 週齢の F344 系統 *gpt* delta 雄性ラットを使用した。被験物質 Benzo[a]pyrene (B[a]P) はオリーブ油を溶媒とし、0 (陰性対照)、31.25 および 62.5 mg/kg の投与量とし、1 群あたり 6 匹のラットに 1 日 1 回、28 日間 (day1-28) の強制経口投与を行った。投与前日 (day0) および day4, 15, 29 に末梢血を採取した。投与最終日の翌日および 3 日後に肝臓、大腸、骨髄を摘出し、-80°C で凍結保存した。末梢血、骨髄、肝臓、大腸 (結腸) の小核試験および骨髄と大腸の *gpt* アッセイ (点突然変異検出) を定法に従い実施した。

[高木] WistarHannover 系 *gpt* delta ラットの背景データ作成

5 週齢雌雄の Slc:WistarHannover/Rcc -Tg(*gpt* delta) (以下 WH-TG) およびそのバックグラウンドである Slc:WistarHannover/Rcc (以下 WH-WT) を用いて 13 および 26 週間飼育試験を行った。飼料は 5002 Certified Rodent Diet (PMI Nutrition International : U. S. A.) を、飲水は塩素消毒した井戸水を自由摂取させた。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、26 週後に各群 20 匹を安楽死させた。血液学的検査、血清生化学的検査に加えて、各種臓器の重量測定およびホルマリン固定を行い、病理組織学的検索を実施した。

[増村] *gpt* delta マウスおよび *Pol* κ KI マウスの自然突然変異の検討

4、26、52、78 および 104 週齢の雄 *gpt* delta マウスの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測定した。雌雄 52 週齢の *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について点突然変異頻度を測定した。得られた変異体の塩基配列解析を行って突然変異を同定した。同一個体同一組織から複数の同一変異が検出された場合は、クローナル変異の可能性を除き、独立した突然変異数を計算して突然変異頻度 (*gpt* mutation frequency) を算出した。突然変異をタイプ別に集計し点突然変異スペクトルを作成した。

[竹入] *Pol* κ KI *gpt* delta マウスを用いた遺伝毒性評価に関する研究

Pol κ KI *gpt* delta マウスおよび *gpt* delta マウスに、MMC または CDDP をそれぞれ 1 または 3 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回、5 日間反復腹腔内投与した。MMC 投与群は DNA 傷害の評価に供することを目的として、最終投与の 3 時間後に安楽死させ、全身諸臓器を採取した。CDDP 投与群では、遺伝子突然変異を評価することを目的として、最終投与から 1 あるいは 4 週間の休薬 (変異発現期間) の後に、主要臓器を採取する試験デザインとした。DNA 傷害はヒストン H2AX のリン酸化を指標に、病理組織学的検索と合わせて評価し、遺伝子突然変異の誘発頻度は、*gpt* アッセイおよび *Spi*⁻ アッセイによって評価する予定。

(2) *in vitro* 代替試験系を多方面から改良

[杉本] トランスジェニック蛍光細胞を用いた小核試験代替法の確立

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である m5S (mCherry-H3 A14-6) のパッセージ 6 (染色体数は 41 本で細胞の 7 割以上がこの染色体数を維持) を分注し、凍結保存したものを使用した。細胞の培養には 15%FBS 添加の D-MEM 培地を用い、薬物処理に際しては、あらかじめ 35mm のガラスボトムディッシュまたは 3 ウェルプレートに植え、炭酸ガスインキュベーター内で 1 晩培養したものをを用いた。ダウノルビシンは DMSO で希釈したものを終濃度になるように培地に加えた。新たな培地と交換することで薬物を除去した後、ガラスボトムディッシュを顕微鏡保温装置に設置し、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 ステージを用いて多点観察することで、各ウェルあたり複数の視野の画像を取

得した。連続して2回の細胞分裂する細胞系統に注目し、細胞分裂までに要する時間（細胞分裂間時間、1細胞周期に要する時間）を求めた。細胞周期を1.5倍に遅延する薬剤濃度 $ECC_{1.5}$ は、細胞系譜解析により最初の分裂から次の分裂までに要する時間（分裂間時間）をライブセルイメージングにより測定し、細胞の倍加時間が、未処理の場合の1.5倍になる濃度（Elongation of Cell Cycle by 1.5 fold, $ECC_{1.5}$ ）とし、具体的にはグラフを作成して求めた。

[山田] 突然変異誘発能をヒト型にシフトした遺伝毒性試験法の研究

エームス試験の標準株の一つである TA1535 の β -メチルグアニンDNAメチル転移酵素を欠損させた株、YG7108（アルキル化剤に特異的に高い感受性を示す）を用いて、アルキル化剤であるエチルニトロソ尿素（ENU）について従来の手法でエームス試験を実施した。溶媒（ジメチルスルホキシド、DMSO）対照と50および250 μ g/plateのENUで処理したプレートからそれぞれランダムに4個ずつ復帰変異コロニーを選び、それぞれについて一夜培養液を用意し、ゲノムDNAを調製した。DNAシーケンズ解析：ホールゲノムDNAの塩基配列は、ハイ・スループットDNAシーケンサーMiSeq（Illumina, San Diego, CA）による1回のランで解析した。塩基配列データはfastqファイルで編集し、CLC Genomics Workbench ver. 5 software（CLC bio A/S, Aarhus, Denmark）を用いて解析した。まず、生データを検体名で分類し、クオリティスコアの低いデータを排除した。次にその整理されたデータを参照配列である NC_003197（*S. typhimurium* str. LT2 chromosome, complete genome, 4,857,432 bp）、AY046276（IncN plasmid R46, complete sequence, 50,969 bp）および、CP003387（*S. typhimurium* str. 798 plasmid p798_93, complete sequence, 93,877 bp）に対してマッピングを行った。上記で得られた溶媒対照のゲノムの4つの配列情報を比較し、共通している配列をYG7108の基本配列とした。各サンプルの配列情報を基本配列比較し、異なる配列を突然変異とした。

[須井] 実用的ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験の構築

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）に従い、*S. typhimurium* TA100株およびTA98株を用いて、下記の条件で実施した。

検討1：一夜培養液について、10倍濃縮、希釈無し、4倍希釈の3条件を用いた。

検討2：混合液を調製した後の被験物質の処理として、A～Cの3つ（後述）を比較した。菌液の調製は、各菌株の凍結保存液を、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のち、検討1については、TA100とTA98で異なる条件（※1）で調製したが、検討2については2菌株とも全培養液を希釈/濃縮せず用いた。※1 TA100株では、前培養菌液（通常）、NBで希釈した希釈菌液（0.1倍）あるいは、前培養菌液を3,500 rpmで遠心後、元の1/4容量のNBに戻した濃縮菌液（4倍）0.325 mLに対してexposure medium（Exp.）を12.345 mLの割合で加えて試験菌液とした。TA98株では、前培養菌液（通常）、NBで希釈した希釈菌液（0.1倍）あるいは、前培養菌液を3,500 rpmで遠心後、元の1/4容量のNBに戻した濃縮菌液（4倍）を3,500 rpmで遠心し、上清を捨てた後に等容量のMicro F溶液に菌を再懸濁した。再懸濁菌液1.3 mLに対してExp.を11.37 mLの割合で加えて試験菌液とした。*Micro F溶液は塩類溶液の一種で、Exp.はMicro F溶液に、ヒスチジン、ビオチンおよびグルコースをそれぞれ0.2 μ g/mL、8 μ g/mLおよび0.8%の濃度で添加したものである。被験物質による処理は、検討1では24ウェルマイクロプレートを用いた。S9 mix非存在下では、各ウェルにジメチルスルホキシド（DMSO）あるいは、被験物質調製液10 μ Lおよび試験菌液490 μ Lを加えた。用いた被験物質は、S9 mix非存在下、2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide、4-Nitroquinoline 1-oxide、2-Aminobiphenyl。S9 mix存在下では、各ウェルにDMSOあるいは、被験物質調製液10 μ L、試験菌液415 μ LおよびS9 mix 75 μ Lを加えた。マイクロプレートをP. I.（37°C、170 rpmで90分間回転振盪）した後、マイクロプレートのウェルにInd.（※2）を2.5 mLずつ加えて処理液とした。それを384ウェルマイクロプレートに分注後、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。マイクロプレートのウェル数/条件は、3（0.1倍および通常）あるいは4ウェル（4倍）とした。S9 mix中のS9濃度は10%とした。用いた被験物質は2-Aminoanthracene、Benzo[a]pyrene、Cyclophosphamide monohydrate、2-Acetylaminofluorene。※2：Micro F溶液に発色試薬bromocresol purple（25 μ g/mL）とhistidine、biotinおよびglucoseを添加したもの。検討2では、混合液を調製した後、24ウェルマイクロプレートを用いて、上述のA～C、3種の方法で被験物質の処理を行った。S9 mix非存在下ではAF-2を、S9 mix存在下では2AA

を用いた。(方法 A) 混合液を調製後、トッパアガー (0.05 mM ビオチン含む) を加え、最少グルコース寒天培地 (2 枚) へ上層した。(方法 B) PI 後、トッパアガー (0.05 mM ビオチン含む) を加え、最少グルコース寒天培地 (2 枚) へ上層した。(方法 C) PI 後、NB 液体培地 5 mL を加えて本培養 (37°C、170 rpm、3.5 時間) を行った。本培養液を 0.1 M リン酸緩衝液で洗菌後、元と等容量の 0.1 M リン酸緩衝液に戻して菌懸濁液を調製した。洗菌後の菌懸濁液 0.7 mL にトッパアガー (0.05 mM ビオチン含む) を加え、最少グルコース寒天培地 (1 枚) へ上層した。最少グルコース寒天培地は、37°C で 2 日間静置培養した。判定は以下の方法による。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。検討 1 の判定は、目視による黄変ウェル数の計測で、培養後、黄変ウェルの数を 48 ウェルごとに計測した後、同一菌液における平均黄変ウェル数を算出し、平均黄変ウェル数から、黄変ウェル出現頻度 (%) を算出した。検討 2 における変異コロニー数の計測は、コロニーアナライザー (型式: CA-11、システムサイエンス) あるいは目視により行った。同一方法における 2 枚の平板上の復帰変異コロニー数の平均値を算出した。

[平田] ヒト型薬物代謝酵素を発現する umu 試験菌株の検討

解析ソフト MacVector で CYP1A2 のアミノ酸配列から抗体特異性が高い部分を検索し、そのうち 2 か所について合成ペプチドを作製した。N-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimide を架橋剤として、合成されたペプチドと抗原性刺激の高いキャリアタンパク質である Keyhole Limpet Hemocyanine とをそれぞれ結合して 2 種類の抗原蛋白を作製した。それらを等量と、Complete Freund's adjuvant とを混合してエマルジョンにし、ウサギ (日本白色種) の背部に 2 週間隔で計 6 回接種して、抗ヒト CYP1A2 ウサギ抗血清を得た。得られた抗血清は ELISA 法で抗原特異性の確認を行い、力価の有無および抗原特異性の強弱を確認したのち、抗原カップリングアフィニティーカラムで精製した。次に、ヒト型 CYP1A2 を発現するプラスミドを保持する株 *Salmonella typhimurium* OY1002/1A2 を培養し、CYP1A2 を発現させるために 1 mM イソプロピル-β-チオガラクトピラノシドおよび、5 mM δ-アミノレブロン酸と トレースエレメントを添加したのち、37°C 1 時間培養後、氷冷して集菌し、リゾチーム、10% Bugbuster® 溶液で処理後上清を回収して、超遠心で得られたペレッ

トをウェスタンブロットに供した。

(3) Pig-a アッセイの標準化および、統合型遺伝毒性試験への組み込みの検討

◎Pig-a 遺伝子突然変異試験

(1) Pig-a アッセイ

- 血液 3 μL を 0.2 mL の PBS (-) と混和し、抗ラット CD59 抗体および抗ラット HIS49 抗体と室温下で 1 時間反応させ、3000 r. p. m. で 5 分間 (室温) 遠心分離し、上清の除去及び沈査の攪拌を行う。
- Streptavidin- Allophycocyanin を含む PBS (-) 2 mL と 15 分間、室温で反応させる。
- 反応後、室温、3000 r. p. m. で 5 分間、遠心分離し、上清を除去した後、PBS (-) に再懸濁したものを pig-a 遺伝子突然変異の解析に用いる。

(2) PIGRET

- 血液 80 μL を 100 μL の PBS (-) と混和し、3 mL の Lympholyte-Mammal を用いて白血球を分離させる。
- 2500 r. p. m. で 20 分間 (室温) 遠心分離し、抗ラット CD71 抗体と 4°C で 15 分間反応させた後、2 mL の IMag™ Buffer を加え、3000 r. p. m. で 5 分間 (室温) 遠心した。
- 上清除去後、50 μL の PE Particles Plus-DM を加えて 4°C で 15 分間処理。
- 1 mL の IMag Buffer を加え、BD IMagnet™ を用いて 6 分間静置し、CD71 陽性赤血球を濃縮する。同様の操作を 2 分間ずつ 2 回繰り返す、200 μL の PBS (-) を加える。
- その後、上記 (1) の手法で抗ラット CD59 抗体及び抗ラット HIS49 抗体と反応させたものを解析する。

(3) 解析方法

測定は、Becton Dickinson FACS Calibur フローサイトメーターを用いて、FITC 標識抗ラット CD59 抗体、PE 標識抗ラット CD71 抗体及び APC で標識した抗ラット HIS49 抗体と反応させた細胞を、アルゴンレーザー光 (488 nm) で励起し、それぞれ FL1 (530/30 nm)、FL2 (650 nm) 及び FL4 (653/669 nm) で蛍光を検出し、CellQuest 3.3 software を用いて解析した。測定開始時には、抗ラット CD59 抗体及び抗ラット HIS49 抗体あるいは抗ラット CD71 抗体の単染色サンプル及び非染色サンプルを用いてキャリブレーションを行う。

(4) 評価

全赤血球 100 万個に対する CD59 陰性赤血球数

の出現頻度 (Mutation Frequencies: MF) を求め、媒体対照群と各用量の被験物質群との有意性について Dunnett 型の多重比較 (片側 5%) を行った。

○反復投与毒性試験への組み込みプロトコールの検討および単回投与試験との比較

[千藏] Cyclophosphamide (CP)

SD ラット (雄、7 週齢、N=6/group) に CP の単回経口投与 (20、50 mg/kg) もしくは、28 日間反復経口投与 (2.5、5、10 mg/kg/day) を実施し、投与前および投与後 7、14、28 日目に採取した血液を用いて *Pig-a* アッセイおよび PIGRET 法により変異頻度データを取得した。合わせて一般状態観察し体重測定を行った。Day 29 に安楽死処置し、腹部大動脈より採取した血液を用いて臨床検査を実施した。

[伊東] Ethyl methanesulfonate (EMS)

SD ラット (雄、7 週齢、各群 5 匹) に EMS の単回経口投与 (360、720 mg/kg) もしくは反復経口投与 (25、50、100 mg/kg/day) を実施し、投与前および投与後 7、14 日目 (反復経口投与については 28 日目も) に尾静脈より採取した血液を用いて、*Pig-a* アッセイ (反復経口投与) および PIGRET 法 (単回経口投与) により MF を取得した。

[武藤] Methyl methanesulfonate (MMS)

SD ラット (雄、6 週齢) に MMS の単回経口投与 (50、100、200 mg/kg) もしくは反復経口投与 (7.5、15、30 mg/kg/day) を実施し、投与前および投与後 7、14、28 日目に尾静脈より採取した血液を用いて、*Pig-a* アッセイおよび PIGRET 法により MF を取得した。さらに、末梢血小核試験に用いるため、上記とは別に単回投与試験、28 日間反復投与試験においてそれぞれ投与開始 2 日後、4 日後に尾静脈より採血した。

[真田] 4,4'-methylene dianiline (MDA)

SD ラット (雄、6 週齢) に MDA の単回経口投与 (各群 5 匹、13、40、120、240 mg/kg) もしくは反復経口投与 (各群 6 匹、4.4、13、40、120 mg/kg/day) を実施し、投与前および投与後 7、14、28 日目に尾静脈より採取した血液を用いて、*Pig-a* アッセイおよび PIGRET 法により MF を取得した。

いずれの試験においても陽性対照物質として ENU を単回経口投与 (40 mg/kg) し、7、14 日後に採血し同様にアッセイに供した。

○*Pig-a* アッセイによる放射線遺伝毒性評価 [堀端]

C57BL/6 マウス (雄、8 もしくは 3 週齢、一群

5 匹) にガンマ線を、0、2、4 Gy の単回照射した群と、20 mGy/22h/day および 400 mGy/22h/day で 28 日間連続照射した群とについて、それぞれ照射前、照射後 2、4、8-10 週に尾静脈より採血を行ない *Pig-a* アッセイを実施した。陽性対照群として ENU (40 mg/kg) を単回強制経口投与した。放射線照射による造血サイクルへの影響を評価するために、抗 CD71 抗体を用いて幼若赤血球の割合を調査し、骨髄抑制をモニターした。マウスへの放射線照射は環境科学技術研究所生物影響研究部の協力を得て実施した。

○*gpt-delta* トランスジェニックラットを用いる *Pig-a* アッセイおよび PIGRET 法 [堀端]

WistarHannover を遺伝的背景とする *gpt-delta* ラット (雄、8 週齢、一群 5 匹) に ENU (40 mg/kg) を単回強制経口投与し、投与前、投与後 1、2、4 週目に尾静脈より採血した。得られた末梢血サンプルを用いて PIGRET 法により幼弱赤血球の *Pig-a* MF を算出した。加えて、従来の *Pig-a* アッセイにより全赤血球の *Pig-a* MF を算出した

(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

(1) Tg ラット・マウスを用いた統合型毒性試験法および評価手法の確立

[石井] ①F344 *gpt delta* ラット及び野生型 F344 ラットともに ES 高用量群で体重増加抑制が認められた。病理組織学的検索の結果、F344 *gpt delta* ラット及び野生型 F344 ラットともに、高用量群の肝臓において肝細胞の単細胞壊死、oval cell の浸潤及び核分裂像が高頻度に認められた。主要臓器における ES 特異的 DNA 付加体量は、F344 *gpt delta* ラット及び野生型 F344 ラットともに、ES-3' -8-dG、ES-3' -N²-dG 及び ES-3' -N⁶-dA は肝臓において低用量群から検出され、投与量依存的に増加した。その生成量は ES-3' -N⁶-dA が最も多く、続いて ES-3' -N²-dG、ES-3' -8-dG の順であった。また、腎臓及び肺においても付加体が検出されたが、その生成量は肝臓の 1/10 以下であった。

②雄性野生型 F344 ラットおよび F344 *gpt delta* ラット各 50 例について病理組織学的検索を実施した。F344 *gpt delta* ラットにおいて副

腎の pheochromocytoma の発生率が野生型 F344 ラットと比較して有意な高値を示した。その他の腫瘍の発生率に遺伝子間で差は認められなかった。

[藤居] B[a]P 投与最終日の翌日 (day29) および 3 日後 (day31) に採材した骨髄、肝臓および大腸について点突然変異体頻度を測定した。骨髄および肝臓における *gpt* 変異体頻度は、B[a]P 投与によって用量依存的かつ有意な増加が認められた。同一組織における day29 と day31 の変異体頻度には殆ど差異は認められなかった。末梢血小核試験では B[a]P 62.5 mg/kg 群において投与後全期間において MN-RET の顕著な増加が認められた。day31 では day29 に比べて小核の出現頻度が低下する傾向が認められた。骨髄、肝臓および大腸について顕著な小核誘発は認められなかった。F344 系雄性ラットに B[a]P を 125 mg/kg/day を最高用量とし 28 日間反復投与を行い、投与翌日に採材した骨髄、肝臓および大腸について小核試験を実施したところ、骨髄では用量依存的な小核誘発が認められた。肝臓および大腸での小核誘発は認められなかった。

[高木] WistarHannover 系 *gpt delta* ラットの飼育試験期間を通じ、対照群に比して雌雄とも Tg 群で有意に高い推移が認められた。血液学的検査結果において、雌雄共に有意な変動が散見された。血液化学的検査結果において、雌の一部指標に有意な減少が確認された。雌の WH-TG の器官重量において一部変動が認められた。病理組織学的検査においては、雌雄共に WH-WT に発生することが知られている所見が WH-TG においても確認された。

[増村] *gpt delta* マウス肝臓の点突然変異頻度は加齢に伴って増加した。自然突然変異における主要な点突然変異のタイプは G:C to A:T 変異であり、うち 3~6 割が CpG サイトでの変異であった。精巣では加齢による点突然変異頻度の有意な増加は認められなかった。主要な点突然変異は G:C to A:T 変異であり、うち 3~9 割が CpG サイトでの変異であった。変異スペクトルの特徴に加齢による明らかな差は認められなかった。また、52 週齢のマウス肝臓における主要な点突然変異は、*Pol κ*WT では G:C to A:T 変異であり、うち 5 割が CpG サイトでの変異であった。一方 *Pol κ*KI の主要な点突然変異は G:C to T:A 変異であり、次いで G:C to C:G、G:C to A:T 変異であった。変異スペクトルに明らかな雌雄差は認められなかった。精巣における主要

な点突然変異は、*Pol κ*WT、*Pol κ*KI とともに G:C to A:T 変異であった。

[竹入] *Pol κ* KI *gpt delta* マウスおよび *gpt delta* マウスに、MMC または CDDP を 5 日間反復腹腔内投与した。MMC 投与群は DNA 傷害の評価に供することを目的として、最終投与の 3 時間後に安楽死させ、全身諸臓器を採取した。CDDP 投与群では、最終投与から 1 あるいは 4 週間の休薬 (変異発現期間) の後に主要臓器を採取する試験計画であり、現在までに休薬 1 週間の群までの臓器採取が終了した。

(2) *in vitro* 代替試験系を多方面から改良

[杉本] ダウノルビシンを細胞周期を停止させない濃度 (25, 50, 100 nM) で 24 時間処理し、薬剤を除去して 48 時間後の小核の形成頻度を調べた結果。25 nM でコントロール (1.2%) の約 2 倍となり、薬剤の濃度に依存して上昇し、100 nM では 2 倍 (14.4%) までになった。取得した画像をもとに、薬剤除去後に起こる最初の細胞分裂から次の細胞分裂までに要する時間 (分裂間時間) を未処理と比較したところ、処理群は細胞周期はそのまま、100 nM 処理において最初の分裂が起こるまでの時間が長くなっていた。100 nM 処理後の小核の形成頻度は、薬剤除去後においても上昇し、24 時間後に 25% に達した後、小核を持つ細胞の割合は減少し、除去後 5 日目で 3% になった。ECC_{1.5} で 24 時間処理し、除去後 24 時間での小核の形成頻度は、マイトマイシン C とダウノルビシンについては 10 倍以上になったのに対して、細胞同調に用いられているアフィディオリン、チミジンについては上昇がみられなかった。

[山田] エームス試験の復帰変異コロニー数は、ENU の用量 0、50、250 μg/plate に対して、プレート当たり平均 17、3、250、8、953 個だった。一方、ゲノム上で検出された突然変異の数は各用量 4 つのコロニーからの合計が、1、35、229 個とほぼ用量に相関していた。検出された突然変異の 5% は AT から GC へのトランジションであったが、残りはすべて GC から AT へのトランジションだった。それぞれの用量で検出された突然変異の平均値は 0.25、9、58 個/ゲノムだった。

[須井] 検討 1 : 菌数を従来の 0.1 倍量および 4 倍量に変更し陽性反応への影響を調べた結果、S9 mix 存在下では、被験物質により強い陽性反応が認められる濃度は異なっていたが、S9 mix 非存在下では、2 化合物とも通常の 0.1 倍量の菌液の場合に最も強い陽性反応が認められた。

検討2：本培養を行うことにより、2菌株ともに全体的に復帰変異コロニー数が増加した。また、増加の程度は、2菌株ともに被験物質処理した時の方が大きかった。

[平田]試験採血により抗体力価が十分にあることを確認した(抗血清 \geq ×8,000)のち、*S. typhimurium* OY1002/1A2 および NM2009 の菌体上清について、ウェスタンブロットを行った。CYP1A2 を発現する株では約 50,000 kDa のバンドが検出されたのに対して、陰性対照の CYP1A2 を発現しない親株 NM2009 株ではバンドは検出されなかった。

(3) Pig-a アッセイの標準化および、統合型遺伝毒性試験への組み込みの検討

○反復投与毒性試験への組み込みプロトコールの検討および単回投与試験との比較

[千蔵] Cyclophosphamide (CP)

単回投与では CP 投与に起因した体重変動、一般状態の大きな異常は認められなかった。血液学的検査及び血液生化学的検査でも CP に起因した変化は認められなかった。*Pig-a* MF は *Pig-a* アッセイでは 14 日後に、PIGRET 法では 7 日後に統計学的に有意な変化が認められた。一方、28 日間反復投与では高用量群で体重増加抑制が認められ、24 日後以降は統計学的に有意であった。一般状態は CP 投与に起因した変化は認められなかったが、28 日目に一部で死亡が認められた。血液生化学的検査についても CP 投与に起因したものと考えられる変化が観察された。*Pig-a* MF については、*Pig-a* アッセイ、PIGRET いずれの方法でも統計学的な有意差は認められなかった。

[伊東] Ethyl methanesulfonate (EMS)

28 日間反復経口投与で実施した *Pig-a* アッセイによる、*Pig-a* MF は、投与 2 週目から増加傾向を示し、100 mg/kg で最終投与の翌日において陰性対照群の約 3 倍の MF を示した。

単回経口投与で実施した PIGRET アッセイによる *Pig-a* 遺伝子の MF は、720 mg/kg で投与後 1 週目に顕著な高値を示し、投与後 2 週目には半減したが、陰性対照群より高い値を示していた。360 mg/kg では、投与後 1 および 2 週目とも陰性対照群の約 2 倍程度の MF を示した。

[武藤] Methyl methanesulfonate (MMS)

28 日間反復投与した場合、*Pig-a* アッセイではいずれの採血ポイントおよび MMS 投与量でも *Pig-a* MF に変化はなく、MMS が誘発する遺伝子

変異原性は検出されなかった。PIGRET アッセイでは、30 mg/kg の投与群において、投与開始 7 および 28 日後、有意に *Pig-a* MF が増加した。一方、単回投与した場合、*Pig-a* アッセイでは投与 14 日後から、PIGRET アッセイでは投与 7 日後から *Pig-a* MF が増加した。末梢血小核評価との組み合わせの検討については、反復投与試験において、30 mg/kg の投与量で末梢血小核の出現頻度に増加傾向が認められたが有意ではなかった。一方、単回投与試験では、50 mg/kg で有意ではないが MN-RET の出現頻度の増加傾向が認められ、100 mg/kg にて有意に増加した。200 mg/kg では強い骨髄抑制が認められた。

[真田] 4,4'-methylene dianiline (MDA)

単回投与では *Pig-a* アッセイおよび PIGRET 法いずれにおいても、明らかな MF の増加は認められなかった。

反復投与後の HIS49/CD59 法による MF の結果、MDA 投与群では、投与 14 日目において 13 mg/kg 以上の投与群で用量依存的に MF の増加が認められた。投与 7 日目及び 28 日目における MF は、40 mg/kg 投与群のみで、増加傾向を示した。PIGRET 法による MF の結果、MDA 投与群では、投与 7 日目において、13 mg/kg 以上の投与群で用量依存的に MF の増加が認められ、40 mg/kg 投与群で 23.9×10^{-6} で最も高値を示した。投与 14 日目では 40 mg/kg 投与群のみで 11.2×10^{-6} と有意な MF の増加が認められたが、投与 28 日目では MF の増加は認められなかった。

○*Pig-a* アッセイによる放射線遺伝毒性評価 [堀端]

単回照射群においては、2 Gy 照射後 2 週目に成熟マウスにおいて大きく増加した *Pig-a* 変異体頻度は照射後 4 週で低下した。幼若群では認められた *Pig-a* 変異体頻度の増加は非常に小さかった。4 Gy 照射群の *Pig-a* 変異体頻度は、成熟群では変化が見られなかったが、幼弱群では照射後 2 週、4 週目に、個体差は大きいものの大きな増加がみられた。放射線照射による骨髄抑制からの回復については、幼若群および成熟群いずれも 2 Gy では若干、4 Gy では強く検出された。陽性対照群の結果から、成熟マウスに比較して幼若群でより強く *Pig-a* 変異体頻度が増加し、造血サイクルについては骨髄抑制からの回復性が若干検出された。幼若マウスは成熟マウスと比較し、投与の有無に関係なく幼若時 (3 週齢から 5 週齢時) において、造血サイクルが活性化していた。

28 日間連続照射群においては、いずれの照

射群でも幼若群において連続する *Pig-a* 変異体頻度の増加が認められ、それらは放射線照射量と正の相関を示し、28 日間の照射終了後、緩やかに正常状態への回復が見られた。成熟群においては、ほとんど変化が認められなかったが、20 mGy/22h/day の照射群において、照射終了後 6 週目に 1 個体のみ強い *Pig-a* 変異体頻度の増加が認められた。造血サイクルについては 20 mGy/22h/day 照射群では成熟群および幼若群の両者でほとんど変化が見られなかったが、400 mGy/22h/day 照射群では成熟群および幼若群の両者で放射線照射による骨髄抑制からの連続する回復性が検出された。

○*gpt-delta* トランスジェニックラットを用いる *Pig-a* アッセイおよび PIGRET 法[堀端]

幼若赤血球を標的とする PIGRET 法では、ENU 単回投与後 1 週目で強い *Pig-a* 変異体頻度の上昇が認められたが、従来の *Pig-a* アッセイではほとんど変化が認められなかった。投与後 2 週目において、PIGRET 法および *Pig-a* アッセイの両者で強い *Pig-a* 変異体頻度の増加が認められたが、PIGRET 法ではより強く検出した。投与後 4 週目においても 2 週目と同様の遺伝毒性を検出した。

D. 考察

(1) Tg ラット・マウスを用いた統合型毒性試験法および評価手法の確立

[石井] ①F344 *gpt delta* ラットと野生型 F344 ラットの ES に対する反応性を比較した。F344 *gpt delta* ラットでは、ES 高用量群において投与開始 2 週目から有意な体重増加抑制が認められた。高用量群において肝臓及び腎臓相対重量の有意な増加が認められた。ES の発がん標的臓器である肝臓では、高用量群において肝細胞の単細胞壊死、oval cell の浸潤及び核分裂像が高頻度に認められた。これらの変化は野生型 F344 ラットにおいても同様に認められ、遺伝子型間で差は認められなかった。ES 特異的 DNA 付加体は両遺伝子型の肝臓において低用量群から検出され、投与量依存的に増加した。各付加体の生成量も両遺伝子型で一致したことから、ES の生体内分布や代謝活性化過程に遺伝子型間の差はないと考えられた。②雄性 F344 *gpt delta* ラット及び野生型 F344 ラット各 50 例の病理組織学的検索を実施した。雄性 F344 *gpt delta* ラットにおいて副腎の pheochromocytoma の発生率が有意な高値を示した。副腎の相対重量が雄性 F344 *gpt delta* ラットで有意な高値を示し

たが、これは pheochromocytoma の発生率の上昇によるものと考えられた。その他の腫瘍の発生率には差は認められなかった。試験期間中の体重の推移において、試験開始 10 週目から雄性 F344 *gpt delta* ラットで有意な低値が認められた。これらの変化の生物学的意義については、残りの症例の病理組織学的解析をもって考察する。

[藤居] 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、投与最終日より 3 日後に採材) に加え、一般毒性試験や反復投与小核試験の剖検のタイミングと合わせた最終投与翌日の 2 点をサンプリング時期に設定し、骨髄、肝臓、大腸で *gpt* アッセイを実施したところ、いずれもサンプリング時期による突然変異体頻度の差異は殆ど認められなかった。このことは、サンプリング時期を最終投与翌日としても検出力に問題はなく、突然変異試験に種々の試験の統合が可能であることを示唆する結果であると考えている。骨髄については、31.25 mg/kg 群の *gpt* 変異体頻度が最終投与 3 日後で若干の減少傾向が認められた。毒性が強く休薬することにより急激に細胞増殖が起こる組織や、ターンオーバーの早い組織においては、反復投与後のサンプリング時期は休薬期間を設けない方がむしろ検出力が高まることも考えられた。また、*gpt delta* ラットへの B[a]P 投与により、今回評価した臓器全てにおいて顕著な *gpt* 突然変異体の用量依存的な増加が認められたが、小核誘発は末梢血のみで認められ、同一個体で点突然変異と小核誘発について異なる結果を示した。非 Tg ラットを用いた試験において、肝小核および大腸小核誘発は認められなかったことから、Tg/非 Tg 動物に関わらず、本試験条件下では B[a]P による肝臓および大腸小核誘発は検出されないものと考えられた。

[高木] 雄の WH-TG の有意な体重減少は、試験後半より試験終了時まで確認された。過去に採集した Slc:WistarHannover/Rec の背景データを用いて対照群の体重推移を確認したところ、本試験で確認された体重の変動は、ロット差によるものであると推察した。血液学的検査結果において雌雄共に有意な変動が散見されたが、偶発的なものと判断した。血液化学的検査結果において確認された変動は、ロット差である可能性が示唆された。器官重量の変動は、過去の背景データからも毒性学的意義は乏しいと判断した。これらは 1 年飼育試験を加味して来年度に再考する予定である。病理組織学的検査では、