

別添1

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

新規 *in vivo* 遺伝毒性試験である *Pig-a* 遺伝子遺伝毒性試験の胎仔を含めた週齢および性差に関する開発研究 (H25-化学-若手-008)

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 堀端 克良

平成26 (2014) 年 3月

別添2

目 次

I. 総括研究報告（別添3）	
新規 <i>in vivo</i> 遺伝毒性試験である <i>Pig-a</i> 遺伝子遺伝毒性試験の胎仔を含 めた週齢および性差に関する開発研究-----	1
堀端克良	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表（別添5）-----	11
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	12

別添 3

I. 総括研究報告

新規 *in vivo* 遺伝毒性試験である *Pig-a* 遺伝子遺伝毒性試験の胎仔を含めた週齢および性差に関する開発研究（H25-化学-若手-008）

研究代表者 堀端克良 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 主任研究官

研究要旨

幼児や妊婦（胎児）は、化学物質の遺伝毒性に対して脆弱であると考えられるが、それを定量的かつ簡便に評価する研究手法は未だに確立されていない。本研究課題では、近年開発された *Pig-a* 遺伝子遺伝毒性試験（以下、*Pig-a* アッセイ）について、性差および週齢差を踏まえた検討を行い、加えて、妊娠動物に遺伝毒性物質を投与した際の胎仔および新生仔における遺伝毒性影響を *Pig-a* アッセイにより評価することでその有用性を検証することを目的とする。

近年開発された *Pig-a* アッセイは米国において産学官の共同研究が実施され、その成果を基に2012年にOECDガイドライン化に向けたSPSFの作成が同意されているが、日本における研究成果を盛り込むことを目指し、日本国内においても産官での共同研究が進められている。これに加えて、本研究課題の推進により得られる研究成果は、*Pig-a* アッセイのOECDガイドライン化に向けた国内外での取り組みに対して、日本国内の研究成果としてアピールすることができる。

A. 研究目的

近年開発された *Pig-a* アッセイは、内在性遺伝子である *Pig-a* 遺伝子を標的としている。*Pig-a* 遺伝子はマウス、ラットそしてヒトなどのほとんどの哺乳動物でX染色体上に座位しており、その遺伝子産物はGPIアンカー生合成の第一段階で機能する。*Pig-a* 遺伝子上に前進突然変異が生じると、GPIアンカーの生合成が阻害され、結果として細胞膜上にGPIアンカー結合タンパク質が提示されなくなる。この原理を利用し、*Pig-a* アッセイではGPIアンカー結合タンパク質欠損赤血球の頻度をフローサイトメーターで実測値として検出し、*Pig-a* 遺伝子変異体頻度を求める。加えて、*Pig-a* アッセイでは遺伝毒性試験のためにトランスジェニック動物など特別な動物を使用する必要がなく、ヒトにも応用可能であり、解析にはマイクロリットル単位のごく微量の末梢血を使用し、また遺伝毒性の蓄積性を踏まえた解析が可能であると考えられ

ている。その一方、*Pig-a* アッセイの有用性については、その特性から反復投与毒性試験への組み込みを勘案し、国内外において成熟ラットを用いた解析が主流であり、また、*Pig-a* アッセイは開発されてからの時間が浅いこともあり、その検出感度の性差、年齢差などは不明である。

応募者はこれまでに、放射線遺伝毒性について雄マウスを用いた *Pig-a* アッセイにより評価した結果、幼若群は成熟群と比較し、高い *Pig-a* 遺伝子変異体頻度の上昇を示すことを明らかにしている。これらのことは、年齢差に応じた遺伝毒性の差を本アッセイにより評価できる可能性を示唆するものである。

幼児や妊婦（胎児）は、化学物質の遺伝毒性に対して脆弱であると考えられるが、それを定量的かつ簡便に評価する研究手法は未だに確立されていない。本研究課題では、化学物質の子どもおよび胎児への遺伝毒性影響を検出可能な評価手法として *Pig-a* アッセイを

提案し、その有用性を明らかにし、そして幼若動物や胎仔に与える遺伝毒性影響を明らかにすることを研究目的とする。本研究計画は三年間の研究計画とし、*Pig-a* アッセイの有用性について初年度は幼若マウスと成熟マウスでの雌雄差と週齢差の比較、次年度と最終年度はマウス胎仔を用いた解析を実施することを目標とする。

B. 研究方法

1群5匹、雌雄それぞれの幼若C57BL/6マウス(離乳後である4週齢)および成熟C57BL/6マウス(8週齢)に、遺伝毒性物質であるエチルニトロソウレア(40 mg/kg)およびベンツピレン(200 mg/kg)を単回腹腔内投与する。投与前2日、投与後1週、2週および4週目に尾静脈より採血を行ない、得られた血液を用いて*Pig-a* アッセイを実施し、遺伝毒性を評価した(図1)。エチルニトロソウレアは代謝活性化無しで遺伝毒性を発揮するが、ベンツピレンは遺伝毒性発揮のために代謝活性化を必要とする。したがって、薬物代謝活性を勘案した遺伝毒性評価ため、この2種の化合物を選択した。

Pig-a アッセイでは、2 μ Lの末梢血を赤血球特異的蛍光抗体およびGPIアンカー結合タンパク質であるCD24特異的蛍光抗体により2重染色し、フローサイトメーターを用いて*Pig-a* 変異体頻度を評価した。他方、*Pig-a* アッセイは造血幹細胞に生じた遺伝毒性を反映する研究手法であり、遺伝毒性物質によりこれらの造血幹細胞の増殖・分化能に影響を受けることでその結果に影響が生じる可能性を考察するために、別途、幼若赤血球特異的発現タンパク質であるCD71特異的蛍光抗体により染色し、フローサイトメーターを用いて造血サイクルの指標である幼若赤血球の頻度を評価した。

各投与群で得られた*Pig-a* 変異体頻度は、Steelの方法により、国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部の背景データ(溶媒投与群、N=95)と比較し、統計学的な解析を実施した。

(倫理面への配慮)

動物を用いた実験は、所属機関における「動物実験の適正な実施に関する規定」、わが国に

おける「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」ならびに厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針に準拠して行った。加えて、試験実施機関による動物実験に関する倫理委員会の承認を得るなど、実験動物に対する動物愛護を配慮の上で実施した。

C. 研究結果

1) 成熟雄マウスにおける*Pig-a* 変異体頻度
成熟雄マウスの*Pig-a* アッセイの結果を図2に示す。成熟雄マウスにおいて、エチルニトロソウレアおよびベンツピレン投与群では、溶媒投与群と比較した場合、投与後2週目以降に有意な*Pig-a* 変異体頻度の上昇が検出された。エチルニトロソウレアおよびベンツピレン投与群における投与後4週目では、投与後2週目と比較した場合、さらに*Pig-a* 変異体頻度の上昇が検出された。

2) 幼若雄マウスにおける*Pig-a* 変異体頻度
幼若雄マウスの*Pig-a* アッセイの結果を図3に示す。幼若雄マウスにおいて、エチルニトロソウレア投与群では、他の投与群と比較した場合、投与後1週目に有意な*Pig-a* 変異体頻度の上昇が検出された。投与後2週目にはエチルニトロソウレアおよびベンツピレン両投与群で有意な*Pig-a* 変異体頻度の上昇が検出された。投与後4週目では、投与後2週目と比較した場合、*Pig-a* 変異体頻度が若干上昇した。投与後4週目ベンツピレン投与群では2週目と比較した場合に平均値では上昇しているような印象を与える結果(図3A)ではあるが、これは外れ値を示す1個体によって平均値が引き上げられた結果によるものであり(図3B)、実際には大幅な上昇は無いと考えられる。

3) 成熟雌マウスにおける*Pig-a* 変異体頻度
成熟雌マウスの*Pig-a* アッセイの結果を図4に示す。成熟雌マウスにおいて、エチルニトロソウレアおよびベンツピレン投与群では、溶媒投与群と比較した場合、投与後2週目以降に有意な*Pig-a* 変異体頻度の上昇が検出さ

れた。エチルニトロソウレアおよびベンツピレン投与群における投与後4週目では、投与後2週目と比較した場合、さらに *Pig-a* 変異体頻度の上昇が検出された。興味深いことに、ベンツピレン投与後4週目ではエチルニトロソウレア投与群の投与後4週目でみられた *Pig-a* 変異体頻度の上昇率よりも大きな上昇率が検出された。

4) 幼若雌マウスにおける *Pig-a* 変異体頻度

幼若雌マウスの *Pig-a* アッセイの結果を図5に示す。幼若雌マウスにおいて、エチルニトロソウレア投与群では、他の投与群と比較した場合、投与後1週目に有意な *Pig-a* 変異体頻度の上昇が検出された。投与後2週目にはエチルニトロソウレアおよびベンツピレン両投与群で有意な *Pig-a* 変異体頻度の上昇が検出された。エチルニトロソウレアおよびベンツピレン投与群における投与後4週目では、投与後2週目と比較した場合、さらに *Pig-a* 変異体頻度の上昇が検出された。

5) 幼若赤血球出現頻度

成熟マウスにおいては、雌雄共に5%前後の幼若赤血球出現頻度であり、雌雄間の差やエチルニトロソウレアおよびベンツピレン投与による影響は特に認められなかった。他方、雌雄ともに幼若マウスにおいては投与直前

(4週齢に相当)の幼若赤血球出現頻度が20%以上と高い数値を示した。幼若マウスのすべての投与群において、投与後2週および4週目では各投与群で幼若赤血球出現頻度が成熟マウスと同程度にまで減少することが示された(図6)。幼若雄マウスでのエチルニトロソウレア投与群投与後4週目の幼若赤血球出現頻度でのみ、若干の上昇傾向が見られているが、これは当該投与群で1個体のみ異常値を示した結果である。また、幼若マウスにおいては、成熟マウスと同様に雌雄間の差は認められなかった。

D. 考察

1) 成熟マウスの雌雄の比較

エチルニトロソウレア投与群では *Pig-a* 変異体頻度および幼若赤血球出現頻度両者で雌

雄の差は見られないことから、成熟マウスではエチルニトロソウレアの遺伝毒性検出感度において、*Pig-a* アッセイの検出感度の雌雄差はないと考えられる。

ベンツピレン投与群においては、投与後2週目までは *Pig-a* 変異体頻度および幼若赤血球出現頻度両者で雌雄差は認められておらず、幼若赤血球出現頻度においても投与後4週目で雌雄差は認められていない。しかし、投与後4週目でのベンツピレン投与群雌マウスでの *Pig-a* 変異体頻度は、雄マウスと比較して高値を示した。その理由の1つとして、ベンツピレンは遺伝毒性を発揮するためには代謝活性化を受ける必要があることから、ベンツピレン代謝活性化における雌雄差の結果、投与後4週目での *Pig-a* 変異体頻度の差となって現れたと考えられる。しかしながら、投与後2週目での性差が認められていないことから、他の複合要因も影響していることは否定できない。しかし、後述の幼若マウスではこういった違いが認められていないことから、投与後4週目で見られた雌マウスでの *Pig-a* 変異体頻度の上昇は成熟雌マウス特有の現象である可能性が高いと考えられる。

2) 幼若マウスの雌雄の比較

幼若マウスにおいては、エチルニトロソウレアおよびベンツピレン投与群両者で雌雄差は認められない。従って、幼若マウスにおいては *Pig-a* アッセイの検出感度の雌雄差はないと考えられる。成熟雌雄マウスの結果と合わせて考察すると、成熟マウスのみでベンツピレンの遺伝毒性検出感度に性差が認められていること、また、ベンツピレンは遺伝毒性を発揮するために代謝活性化が必要であることから、ベンツピレンの遺伝毒性検出感度については成熟雌マウスで特異的に活性が上昇している代謝活性化能が関与していると考えられる。

3) 週齢差の比較

エチルニトロソウレア投与群において、成熟群では雌雄ともに投与後2週目以降で遺伝毒性を検出したのに対し、幼若群では雌雄ともに投与後1週目で有意な遺伝毒性を検出し

た。その理由として、雌雄共に投与時（4週齢）における幼若赤血球頻度が非常に高いことから、この時期のマウスは高い造血能を持つことが考えられ、それが原因となって幼若群では早期の遺伝毒性検出が可能となっていると考えられる。他方、ベンツピレンにおいても統計学的有意差は認められていないが同様の傾向、すなわち幼若群での早期遺伝毒性検出性が見られている。従って、ベンツピレン投与群幼若群においても投与用量を増加させることで統計学的に有意に早期検出が可能であると考えられる。

E. 結論

今年度得られた研究成果によって、①遺伝毒性試験方法としての *Pig-a* アッセイとして見た場合、幼若動物を用いる方が感受性の高い試験を実施できる可能性が高いこと、②化学物質の遺伝毒性影響の視点から見た場合、成熟期よりも幼若期の方がより強い遺伝毒性影響を受ける可能性が高いこと、の2点が明らかになった。これにより、上記①については、*Pig-a* アッセイを実施する場合には使用動物の開始週齢をそれぞれの試験研究目的に応じて吟味した上で実施すべきであるということをも提案するものであり、今後本アッセイを活用していく上で重要な情報となる。また、上記②については、幼若期における化学物質暴露に対する遺伝毒性リスクは成熟期よりも高いことを示唆するものであり、重要なリスク評価情報となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

K. Horibata, A. Ukai, T. Kimoto, T. Suzuki, N. Kamoshita, K. Masumura, T. Nohmi, M. Honma, Evaluation of in vivo genotoxicity induced by N-ethyl-N-nitrosourea, benzo[a]pyrene, and 4-nitroquinoline-1-oxide in the *Pig-a* and *gpt* assays, *Environmental and*

Molecular Mutagenesis, 54(9), 747-54 (2013)

T. Kimoto, K. Horibata, S. Chikura, K. Hashimoto, S. Itoh, H. Sanada, S. Muto, Y. Uno, M. Yamada, M. Honma, Interlaboratory trial of the rat *Pig-a* mutation assay using an erythroid marker HIS49 antibody, *Mutation Research*, 755(2), 126-34 (2013)

2. 学会発表

堀端克良, 共同研究報告 II:*Pig-a*, MMS 研究会第 62 回定例会, 諏訪 (2013.5)

堀端克良, 第 6 回 IWGT 報告および共同研究進捗報告:*Pig-a* アッセイ, MMS 研究会第 63 回定例会, 岡山 (2013.11)

K. Horibata, S. Ishikawa, A. Ukai, A. Sugano, M. Honma, ESTABLISHMENT OF HUMAN PIG-A ASSAY AND APPLICATION TO GENOTOXICITY MONITORING OF CANCER CHEMOTHERAPEUTIC PATIENTS, 11th International Conference on Environmental Mutagens, Brazil (2013.11)

堀端克良, 鵜飼明子, 木本崇文, 鴨下渚, 本間正充, ラットを用いた *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 42 回大会, 岡山 (2013.11)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

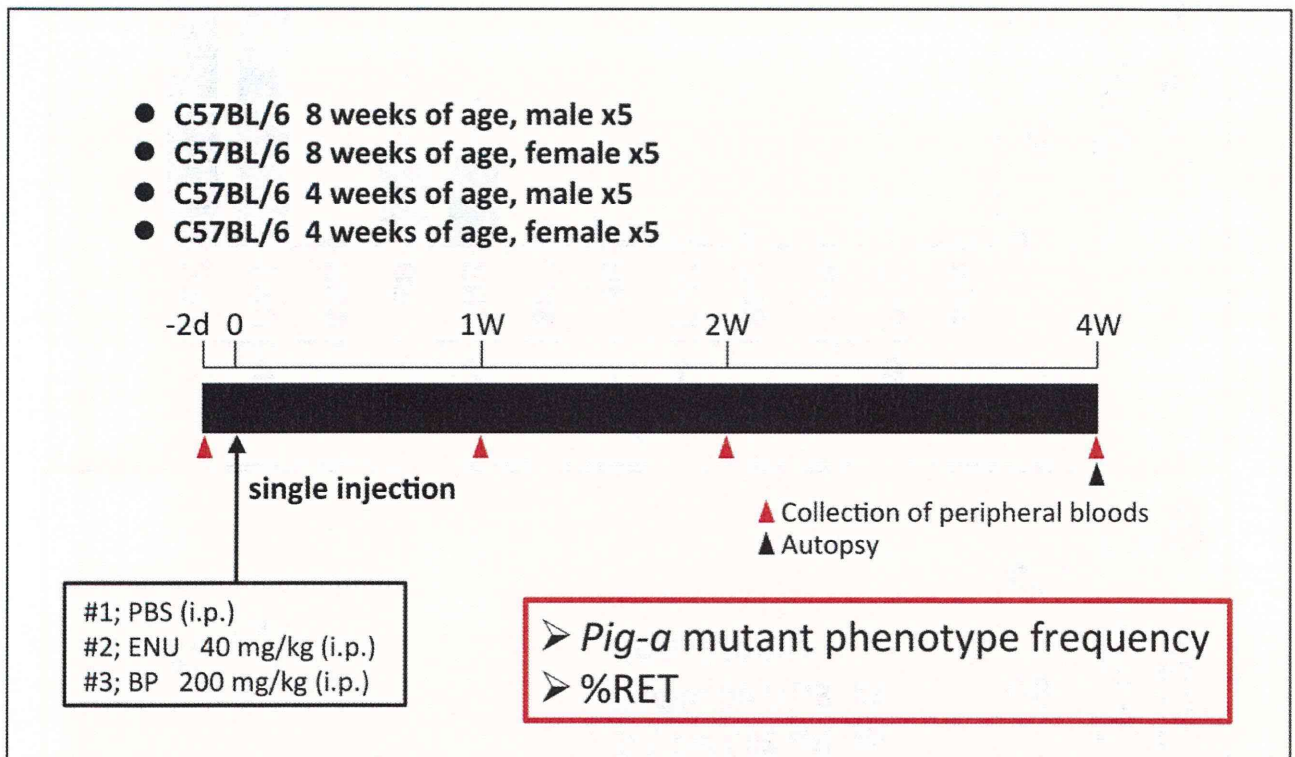


図 1. *Pig-a*アッセイ投与群構成とスケジュール

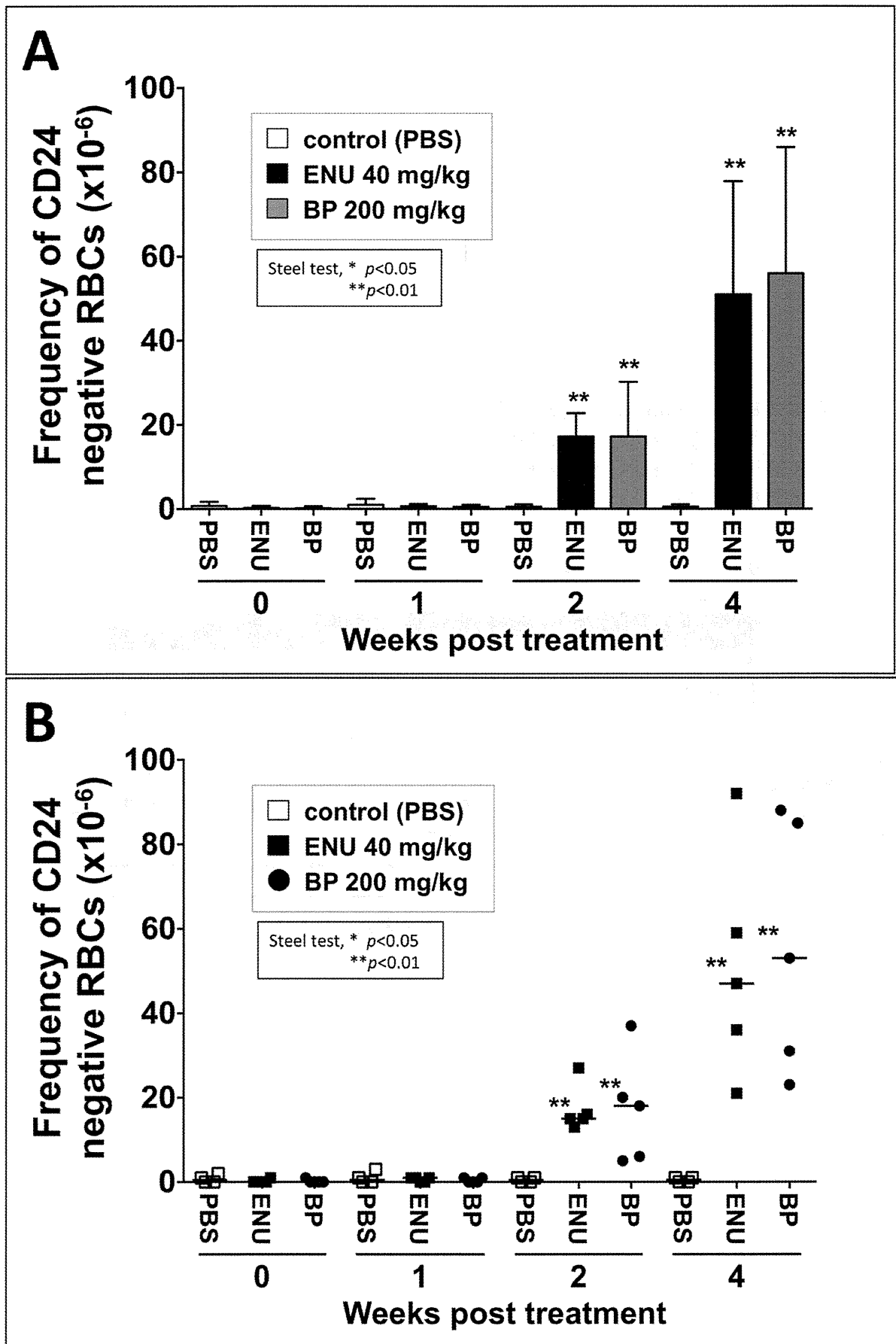


図 2. 成熟雄マウスにおける *Pig-a* 変異体頻度 (A, 平均値と標準偏差; B, 各個体の散布図)

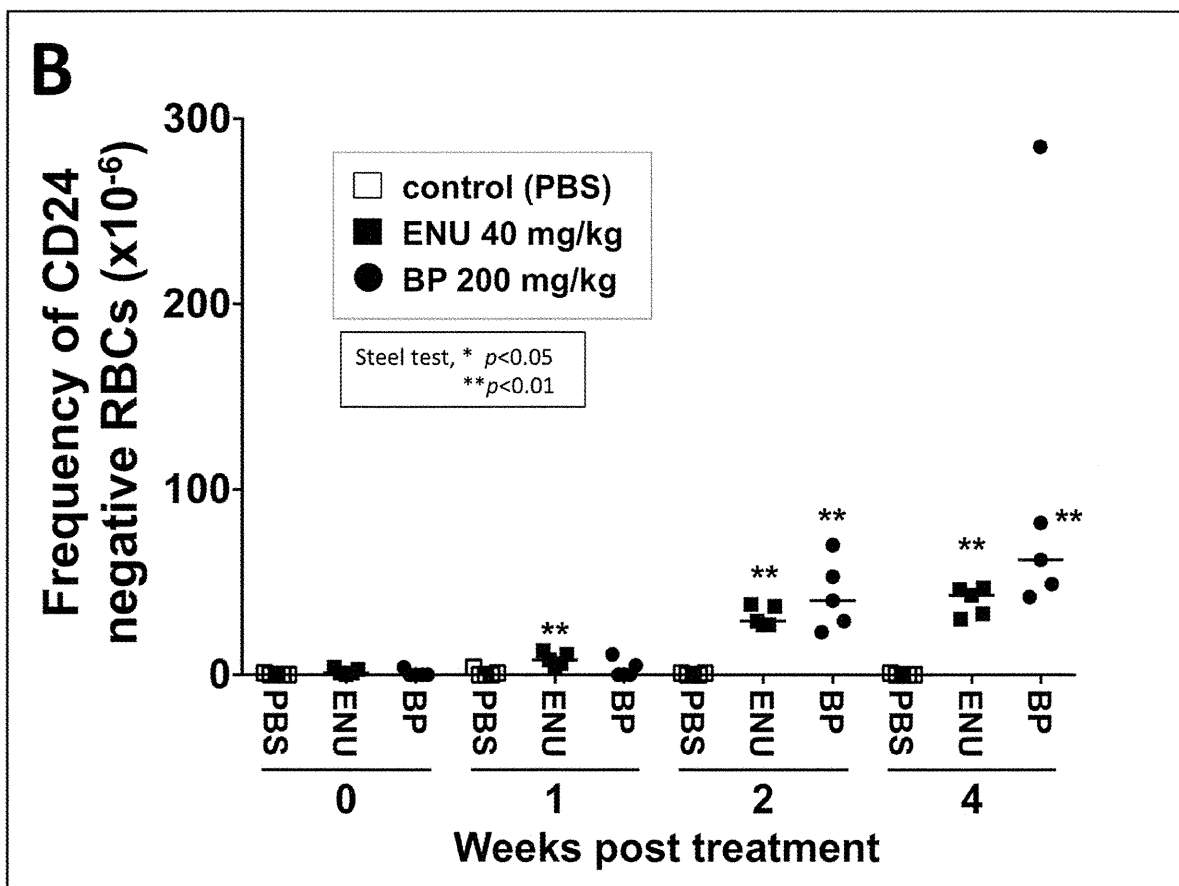
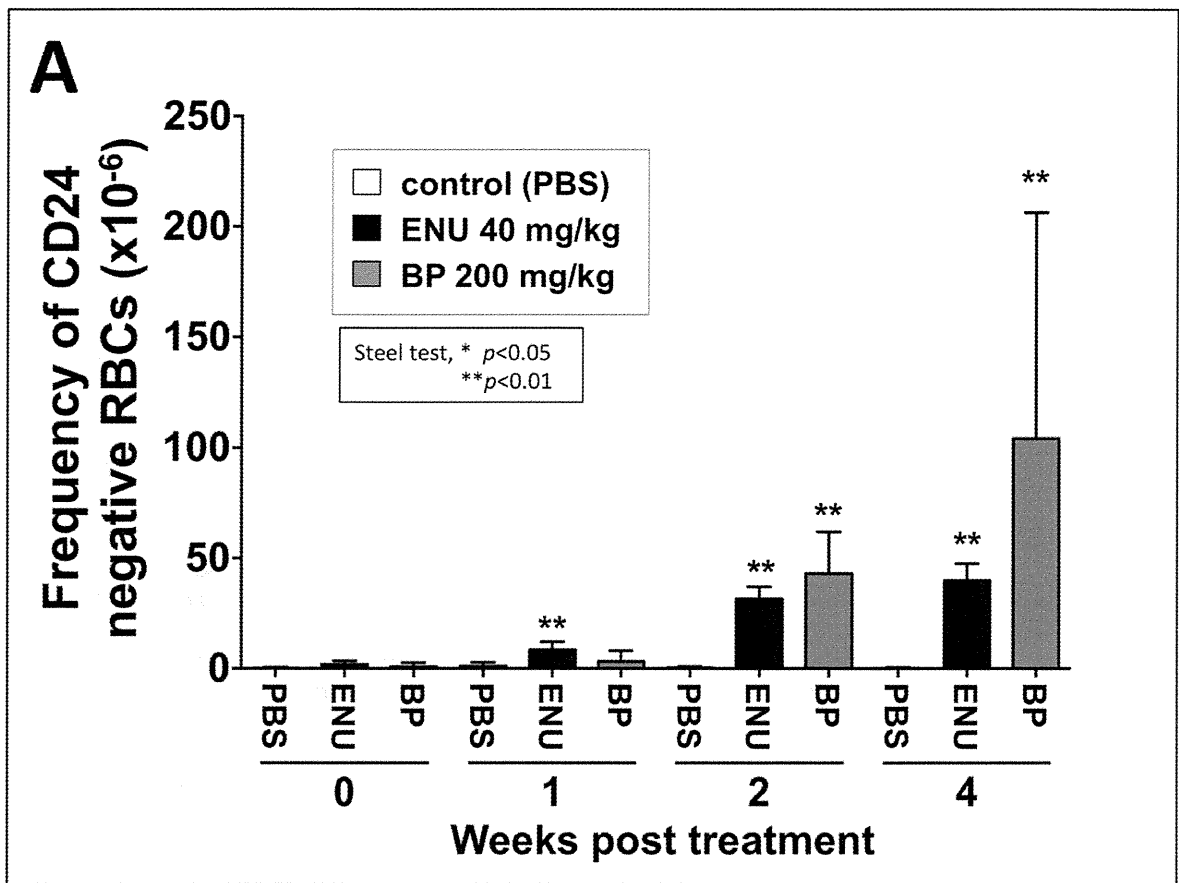


図3. 幼若雄マウスにおける*Pig-a*変異体頻度 (A, 平均値と標準偏差; B, 各個体の散布図)

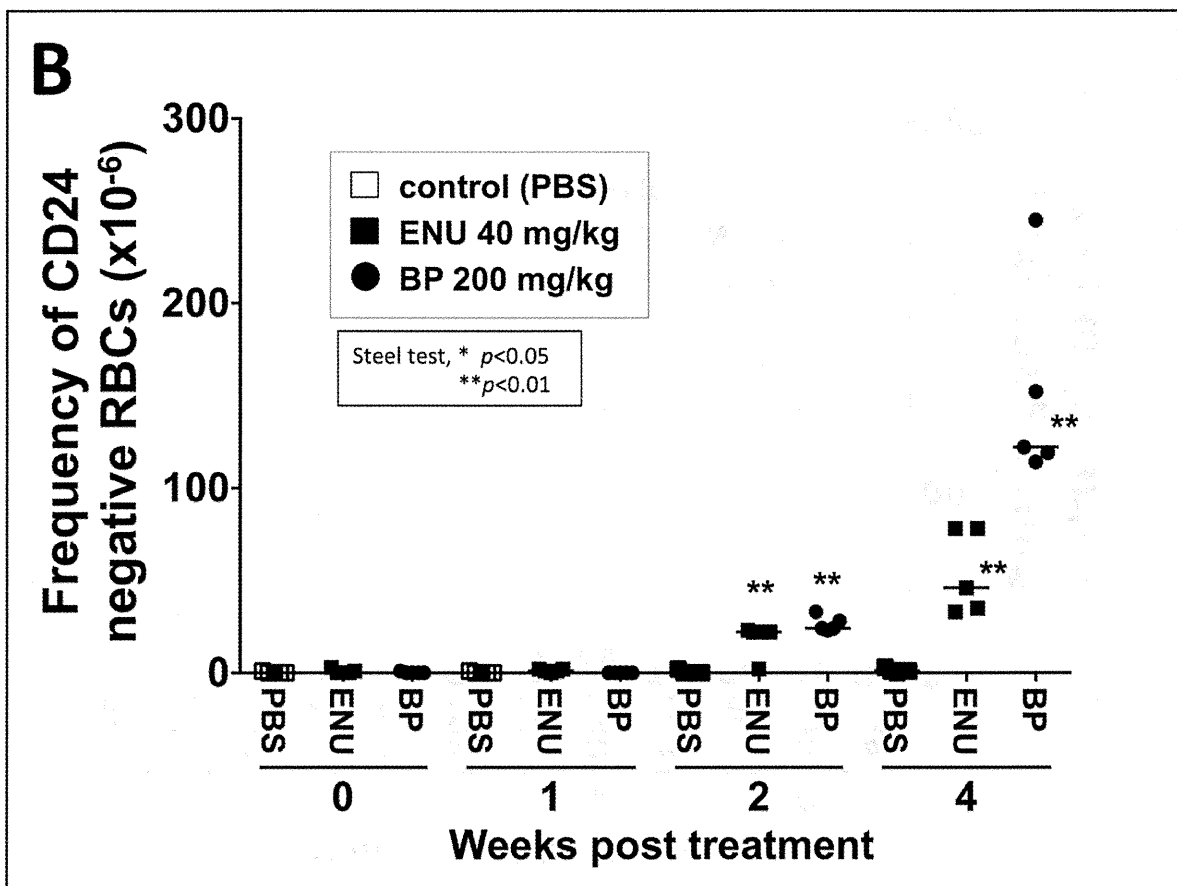
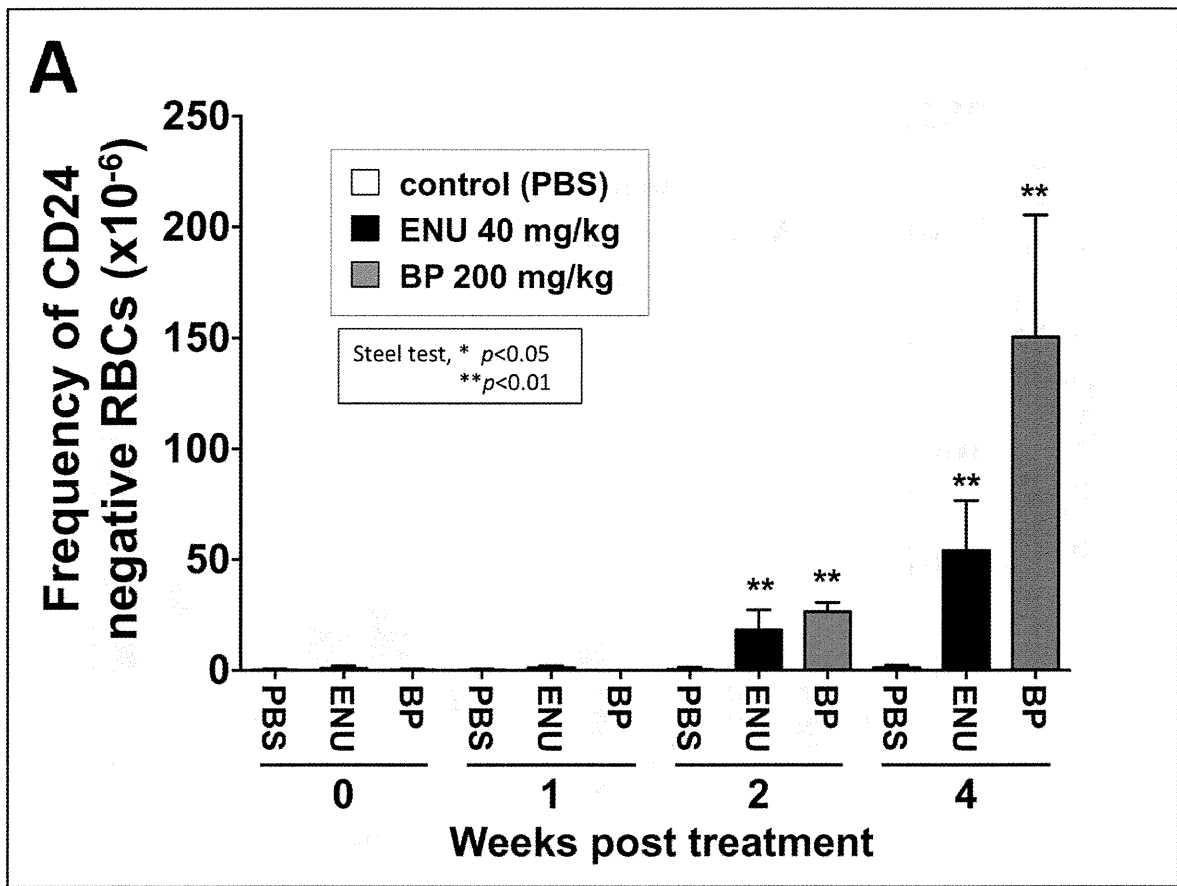


図 4. 成熟雌マウスにおける *Pig-a* 変異体頻度 (A, 平均値と標準偏差; B, 各個体の散布図)

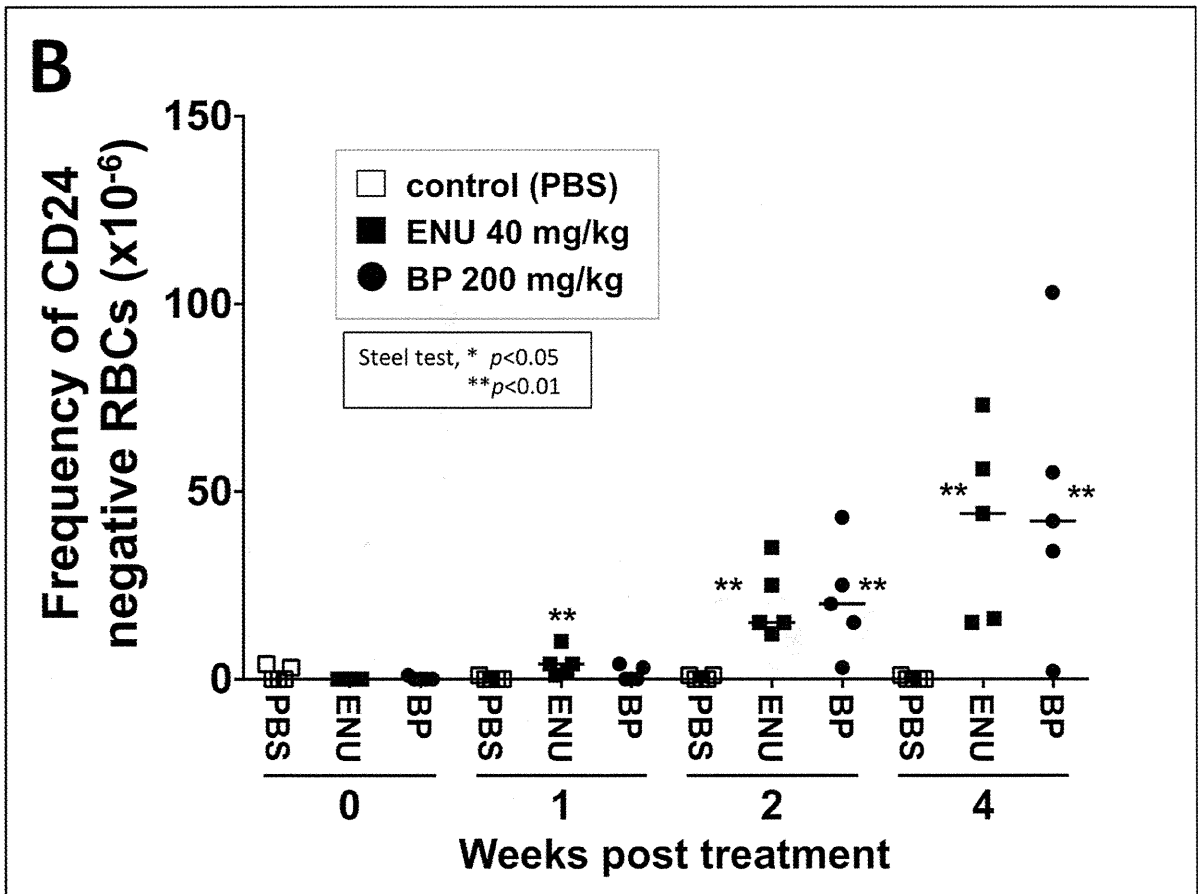
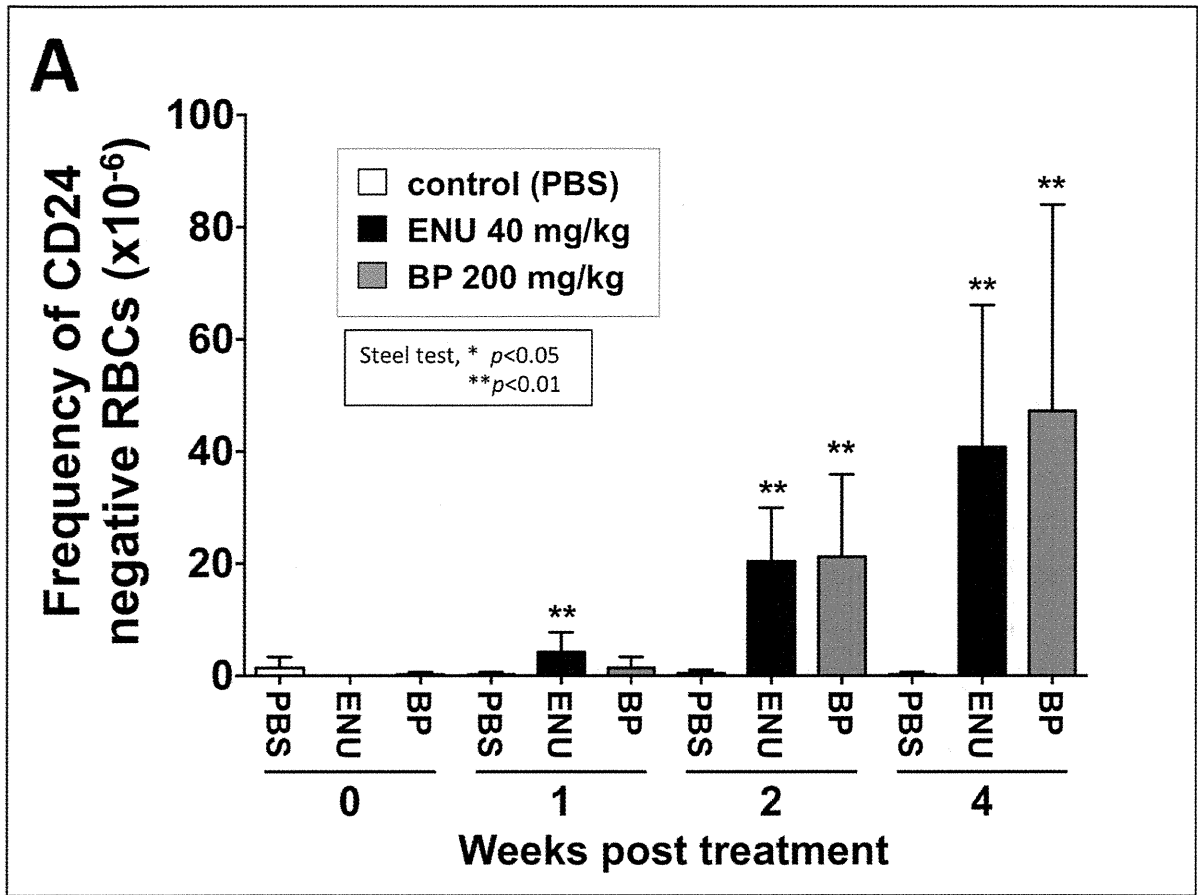


図 5. 幼若雌マウスにおける *Pig-a* 変異体頻度 (A, 平均値と標準偏差; B, 各個体の散布図)

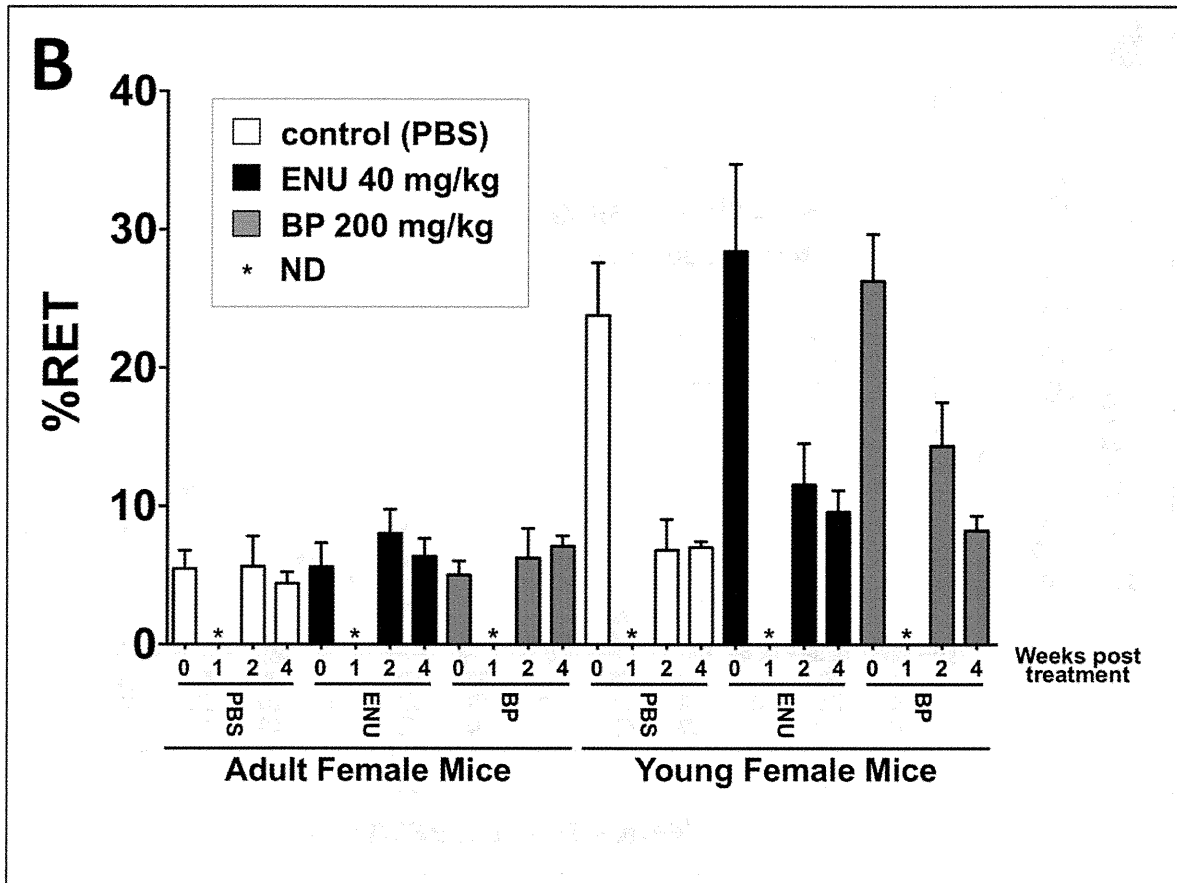
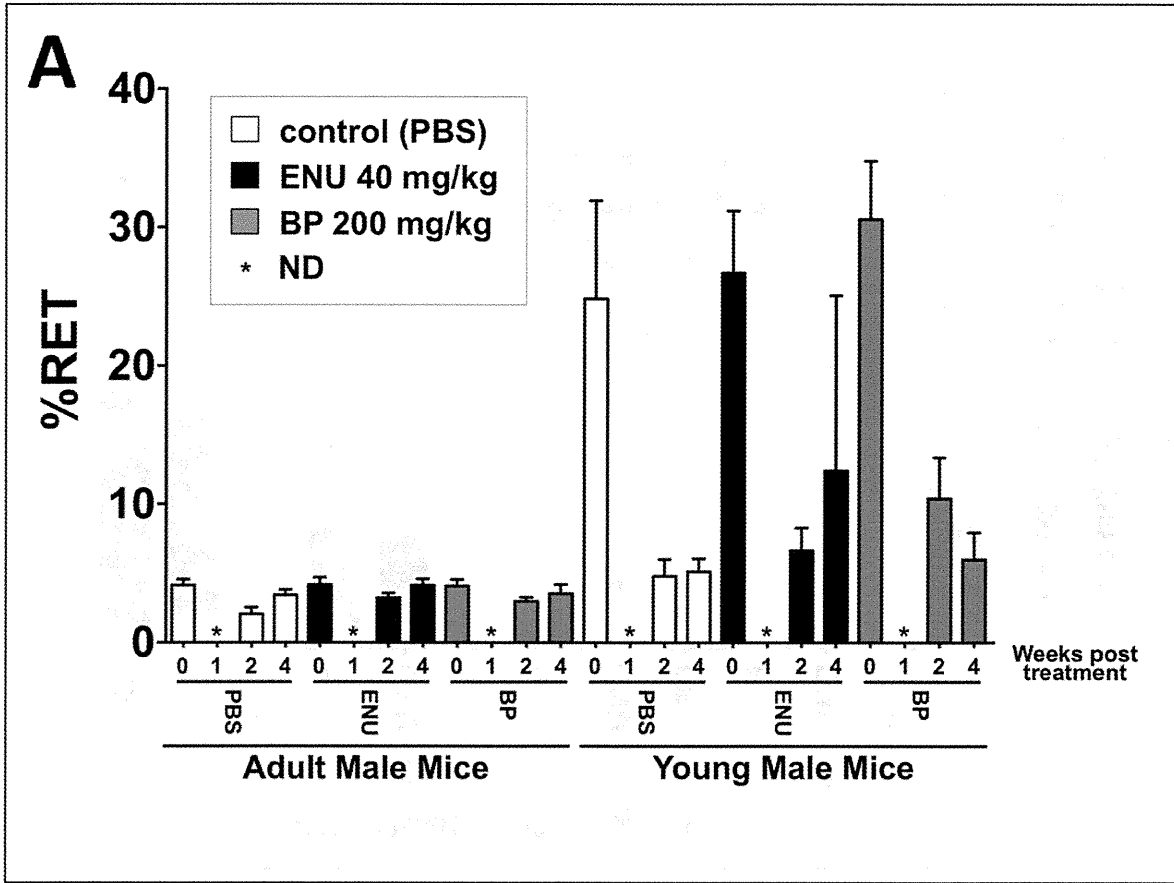


图 6. 幼若赤血球出現頻度 (A, 雄; B, 雌)

別添 5

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当無し							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
K. Horibata, A. Ukai, T. Kimoto, T. Suzuki, N. Kamoshita, K. Masumura, T. Nohmi, M. Honma	Evaluation of in vivo genotoxicity induced by N-ethyl-N-nitrosourea, benzo[a]pyrene, and 4-nitroquinoline-1-oxide in the Pig-a and gpt assays	<i>Environmental and Molecular Mutagenesis</i>	54(9)	747-54	2013
T. Kimoto, K. Horibata, S. Chikura, K. Hashimoto, S. Itoh, H. Sanada, S. Muto, Y. Uno, M. Yamada, M. Honma	Interlaboratory trial of the rat Pig-a mutation assay using an erythroid marker HIS49 antibody	<i>Mutation Research</i>	755(2)	126-34	2013

III. 研究成果の刊行物・別刷

Research Article

Evaluation of *In Vivo* Genotoxicity Induced by *N*-Ethyl-*N*-nitrosourea, Benzo[*a*]pyrene, and 4-Nitroquinoline-1-oxide in the *Pig-a* and *gpt* Assays

Katsuyoshi Horibata,^{1*} Akiko Ukai,¹ Takafumi Kimoto,² Tetsuya Suzuki,¹
Nagisa Kamoshita,¹ Kenichi Masumura,¹ Takehiko Nohmi,¹ and
Masamitsu Honma¹

¹Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences,
Setagaya-ku, Tokyo, Japan

²TEIJIN Pharma Ltd, Tokyo, Japan

The recently developed *Pig-a* mutation assay is based on flow cytometric enumeration of glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor-deficient red blood cells caused by a forward mutation in the *Pig-a* gene. Because the assay can be conducted in nontransgenic animals and the mutations accumulate with repeat dosing, we believe that the *Pig-a* assay could be integrated into repeat-dose toxicology studies and provides an alternative to transgenic rodent (TGR) mutation assays. The capacity and characteristics of the *Pig-a* assay relative to TGR mutation assays, however, are unclear. Here, using transgenic *gpt* delta mice, we compared the *in vivo* genotoxicity of single oral doses of *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU, 40 mg/kg), benzo[*a*]pyrene (BP, 100 and 200 mg/kg), and 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO, 50 mg/kg) in the *Pig-a* (peripheral blood) and

gpt (bone marrow and liver) gene mutation assays. *Pig-a* assays were conducted at 2, 4, and 7 weeks after the treatment, while *gpt* assays were conducted on tissues collected at the 7-week terminal sacrifice. ENU increased both *Pig-a* and *gpt* mutant frequencies (MFs) at all sampling times, and BP increased MFs in both assays but the *Pig-a* MFs peaked at 2 weeks and then decreased. Although 4NQO increased *gpt* MFs in the liver, only weak, non-significant increases (two- or threefold above control) were detected in the bone marrow in both the *Pig-a* and the *gpt* assay. These findings suggest that further studies are needed to elucidate the kinetics of the *Pig-a* mutation assay in order to use it as an alternative to the TGR mutation assay. Environ. Mol. Mutagen. 54:747–754, 2013. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: transgenic rodent mutation assays; glycosylphosphatidylinositol anchor; red blood cells; genotoxicity

INTRODUCTION

Since gene mutations are implicated in the etiology of cancer and other human diseases, *in vivo* genotoxicity tests are important as public health management tools. One such tool is the transgenic rodent (TGR) mutation assay, which quantitatively measures the accumulation of mutations in all organs, including germ cells [Nohmi et al., 2000]. The TGR mutation assay fulfills a need for a practical and widely available *in vivo* test for the assessment of gene mutation; the assay has been recommended by regulatory authorities for safety evaluations [COM, 2011; ICH, 2011] and international guidelines have been published describing the conduct of the assay [OECD488, 2011].

The recently developed *Pig-a* gene mutation assay is a powerful and potentially useful tool for evaluating *in vivo* genotoxicity that may complement the TGR assay [Miura

et al., 2008a,b,2009]. Because the *Pig-a* gene is on the X-chromosome and involves the first step of glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor biosynthesis, single mutations in the *Pig-a* gene can result in the loss of

Grant sponsor: Health and Labour Sciences Research Grants; Grant number: H24-Chemical-Appointed-009; H25-Chemical-Young-008.

Grant sponsor: Japan Health Science Foundation; Grant number: KHB1209.

*Correspondence to: Katsuyoshi Horibata, Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan. E-mail: horibata@nihs.go.jp

Received 9 October 2012; provisionally accepted 14 August 2013; and in final form 20 August 2013

DOI 10.1002/em.21818

Published online 18 September 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

expression of GPI-anchored proteins, a phenotype that can be detected by flow cytometric evaluation with only a few μL of peripheral blood cells [Miura et al., 2009]. Additionally, *Pig-a* mutation appears to function in an apparently neutral manner, and the accumulated effects of repeat exposures can be evaluated. A standardized protocol for conducting and interpreting the assay, as well as the accuracy of the assay, however, have not been established, and the target organ for the assay currently is limited only to blood cells.

In this study, we performed the *Pig-a* assay and the *gpt* assay in the same animals and compared the performance of the two assays in detecting three known mutagens. We also developed a flow cytometric strategy for defining *Pig-a* mutant cells. This report describes the performance, effectiveness and advantages of the *Pig-a* assay in comparison with the *gpt* assay.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Chemicals

We dissolved *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU, Sigma-Aldrich Japan, Tokyo) in phosphate-buffered saline (PBS) (pH 6.0) at 10 mg/mL. Benzo[*a*]pyrene (BP, Wako Pure Chemical, Osaka) was suspended in olive oil at 10 mg/mL (for 100 mg/kg treatment) or 20 mg/mL (for 200 mg/kg treatment). 4-Nitroquinoline-1-oxide (4NQO, Sigma-Aldrich Japan, Tokyo) was suspended at 5 mg/mL in olive oil.

Antibodies

We obtained anti-mouse TER119 antibody for erythroid cell staining (clone TER-119, PE-Cy7-conjugated) and anti-mouse CD24 antibody (clone M1/69, FITC-conjugated) from BioLegend Japan (Tokyo).

Treatment of Mice

Animal experiments were conducted humanely according to the regulations of the Animal Care and Use Committee of the National Institute of Health Sciences (NIHS), Tokyo, and with their permission. *gpt* Delta C57BL/6J transgenic male mice were bred and maintained at the NIHS animal facility. They were housed individually under specific pathogen-free conditions with a 12-hr light–dark cycle and given tap water and autoclaved CRF-1 pellets (Oriental Yeast Co., Tokyo) *ad libitum*. At 8 weeks of age, five mice per group were given a single oral administration of ENU (40 mg/kg), BP (100 mg/kg or 200 mg/kg), 4NQO (50 mg/kg), or PBS (the negative control). Peripheral blood (18 μL) was withdrawn from a tail vein 2, 4, and 7 weeks after the treatments and used for the *Pig-a* assay. At 7 weeks, all mice were killed and bone marrow and liver samples were collected for the *gpt* assay.

Pig-a Mutation Assay

The *Pig-a* assay was performed with some modification of previously described methods [Miura et al., 2008a; Phonethpawth et al., 2008; Horibata et al., 2011; Kimoto et al., 2011]. Briefly, EDTA (dipotassium salt) was dissolved in distilled water to make a 12% solution and used as an anticoagulant. Peripheral blood (18 μL) was mixed with 2 μL EDTA solution. Two microliters of the blood/EDTA mixture was suspended in 0.2 mL PBS, and labeled with 1 μg each of anti-mouse TER119 and anti-mouse CD24 antibodies. The cells were incubated for

1 hr in the dark at room temperature, centrifuged (1000g, 5 min), resuspended in 2 mL PBS, and examined using a FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences Japan, Tokyo). After gating for single cells, about 1×10^6 TER119-positive cells were analyzed for the presence of surface CD24, and the *Pig-a* mutant frequency (MF) was calculated as previously described [Horibata et al., 2011].

Gating Strategy for *Pig-a* Assay

Red blood cells (RBCs) were stained with anti-TER119, an antibody that specifically recognizes RBCs, and anti-CD24, an antibody used to detect GPI-anchored protein, as previously reported [Keller et al., 1999; Phonethpawth et al., 2008; Horibata et al., 2011; Kimoto et al., 2011]. Single cells, including RBCs and white blood cells (WBCs), were gated by light scatter (Fig. 1A). TER119-positive cells from this population (Fig. 1B) were analyzed further for the presence of the GPI-anchored CD24 antigen on the cell surface. The FITC-fluorescence intensities of RBCs without FITC-conjugated anti-CD24 were distributed as shown in Figure 1C, defining a gate that included 100% of lower FITC intensities of RBCs as “*Pig-a* mutant RBCs.” This gating most likely included a number of events that were not true RBC *Pig-a* mutants, and therefore, to avoid artifactually inflating *Pig-a* MFs, we refined the gate for “*Pig-a* mutant RBCs” as the area encompassing a maximum of 99.0% of the lower RBC FITC staining intensities only (Figs. 1D and 1E).

gpt Mutation Assay

We extracted high molecular weight genomic DNA from liver and bone marrow cells using a Recover Ease DNA Isolation Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), rescued lambda EG10 phages using Transpack Packaging Extract (Agilent Technologies) and conducted the *gpt* mutation assay as previously described [Nohmi et al., 2000]. *gpt* MFs were calculated by dividing the number of confirmed 6-thioguanine-resistant colonies by the number of colonies with rescued plasmids [Nohmi et al., 2000].

Statistical Analyses

The Kruskal–Wallis nonparametric test was used for comparisons among multiple groups at each time point. When significant differences were observed in the Kruskal–Wallis test, the Steel test was performed as a *post hoc* analysis for comparisons between the responses in the negative control and each treated group. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism6 (GraphPad Software, La Jolla, CA) and Excel Statistics 2012 (Social Survey Research Information, Tokyo, Japan). For these analyses, a *P*-value of <0.05 was considered significant and two-tailed tests were performed.

Power analyses were performed using GraphPad StatMate2 software. GraphPad StatMate2 estimates the statistical power of detecting a difference between two sets of observations using an unpaired *t*-test (two-tailed). For these estimates, observations from our historical vehicle control data ($n = 95$, male C57BL/6 mice, 3–12 weeks of age, mean \pm SD: 0.41 ± 0.91) were used to generate the power estimates (at the 80 and 95% level) of detecting true increases of 2-, 3-, etc., fold over the historical vehicle control MF at an $\alpha = 0.05$. SigmaPlot 12.5 also was used to estimate the effect of increasing the number of animals assayed on the power.

We also hypothesized that the power of the assay would be influenced by the number of erythrocytes interrogated for each sample, with the variability in the measurements, reflected in the SDs of mean *Pig-a* MFs for groups. In order to evaluate this effect, we determined assay power when the number of animals per group was 5 and the SDs of the mean control MF ranged from 0.1 to 15, comparing to the historical vehicle control ($n = 95$, SD = 0.91). Again, the historical vehicle control

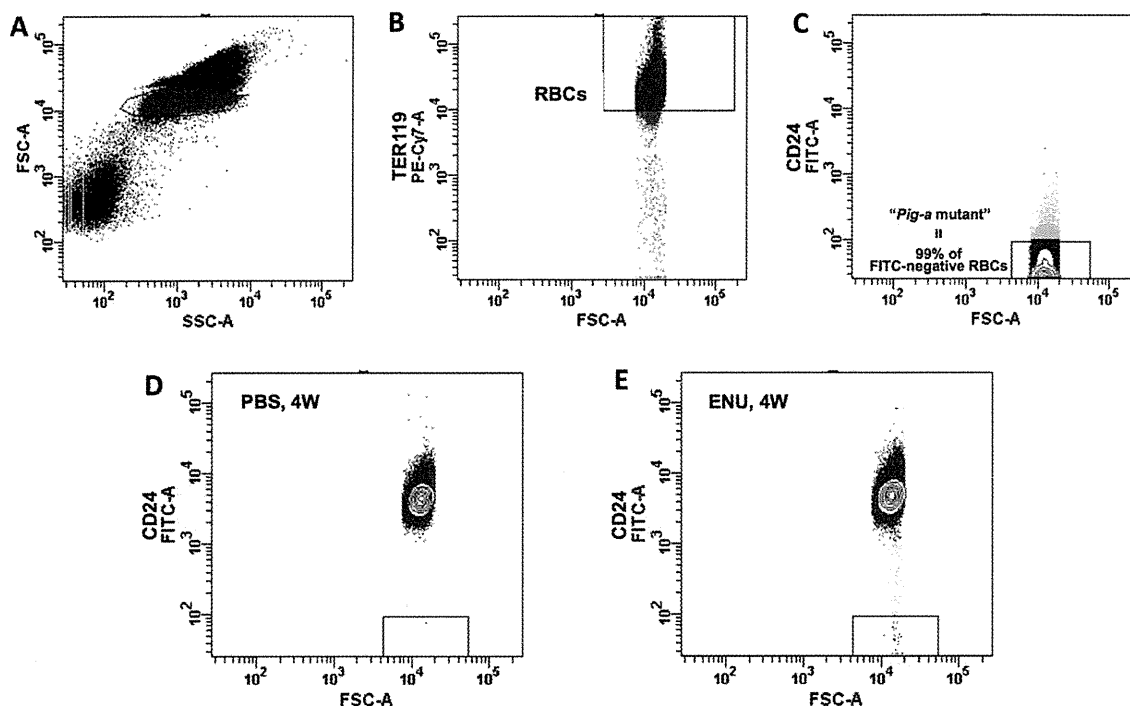


Fig. 1. Flow cytometric analysis of mouse peripheral blood. **A:** Single cell populations were gated and further analyzed with anti-TER119 antibody. **B:** TER119-negative WBCs were excluded from the cell population gated in (A). TER119-positive RBCs were further analyzed with and without anti-CD24 antibody. **C:** TER119 positive cells were analyzed without anti-CD24 antibody staining so as to mimic *Pig-a* mutant RBCs.

Pig-a mutant RBCs were defined by a gate encompassing at least 99% of lower intensities of FITC fluorescence associated with RBCs without anti-CD24 staining. **D,E:** Typical cytograms detecting *Pig-a* mutants. Approximately 1×10^6 TER119-positive cells derived from PBS- (D) or ENU- (E) treated mice were analyzed for CD24 expression.

MF (0.41×10^{-6}) was used as the control MF: minimal detectable fold-increases over vehicle control were calculated by dividing each estimated minimal detectable increase by the mean value of our historical vehicle control MF.

RESULTS

Pig-a Assay

The *Pig-a* mutant (CD24-negative) RBC population identified by flow cytometry after PBS or ENU treatment is shown in Figure 1D and 1E. MFs in the ENU-treated mice were significantly increased and the increase was modestly dependent upon time (mean \pm SD for the PBS: 2 weeks after treatment, $0.80 \pm 0.45 \times 10^{-6}$; 4 weeks after treatment, $0.40 \pm 0.55 \times 10^{-6}$; and 7 weeks after treatment, $0.80 \pm 1.30 \times 10^{-6}$; mean \pm SD for mice treated with 40 mg/kg ENU: 2 weeks after treatment, $23.00 \pm 6.96 \times 10^{-6}$; 4 weeks after treatment, $29.40 \pm 6.11 \times 10^{-6}$; and 7 weeks after treatment, $29.60 \pm 13.58 \times 10^{-6}$) (Fig. 2A).

In the case of 4NQO-treated mice, the average frequencies were more than twofold greater than controls at each of the time points studied (mean \pm SD for mice treated with 50 mg/kg 4NQO: 2 weeks after treatment,

$2.60 \pm 4.72 \times 10^{-6}$; 4 weeks after treatment, $1.00 \pm 1.00 \times 10^{-6}$; and 7 weeks after treatment, $2.20 \pm 4.38 \times 10^{-6}$) (Fig. 2B). Although there were no significant differences between the control and treated mice, there was relatively large range for the *Pig-a* MFs in individual 4NQO-treated mice (Fig. 2B, e.g. minimum MF was 0×10^{-6} and maximum MF was 11×10^{-6}). These results prompted us to conduct power analyses. At the 2-, 4-, and 7-week sampling times, the power of the assay to detect a significant increase in *Pig-a* MF after 4NQO-treatment was only 12%, 18%, and 10%, respectively, whereas the statistical power of the assay to reject the null hypothesis (i.e. no difference between control and treatment groups) and detect a significant increase in MF in the ENU-treated group was >95–99% at each of the sampling points.

Significant increases in *Pig-a* MF were observed for both BP doses at 2 weeks after treatment (Figs. 2C and 2D). For the mice treated with 100 mg/kg BP, the frequencies diminished with time, and no increase was evident 7 weeks after treatment (mean \pm SD for mice treated with 100 mg/kg BP: 2 weeks after treatment, $9.25 \pm 2.63 \times 10^{-6}$; 4 weeks after treatment, $3.00 \pm 2.16 \times 10^{-6}$; and 7 weeks after treatment, $0.50 \pm 1.00 \times 10^{-6}$; with

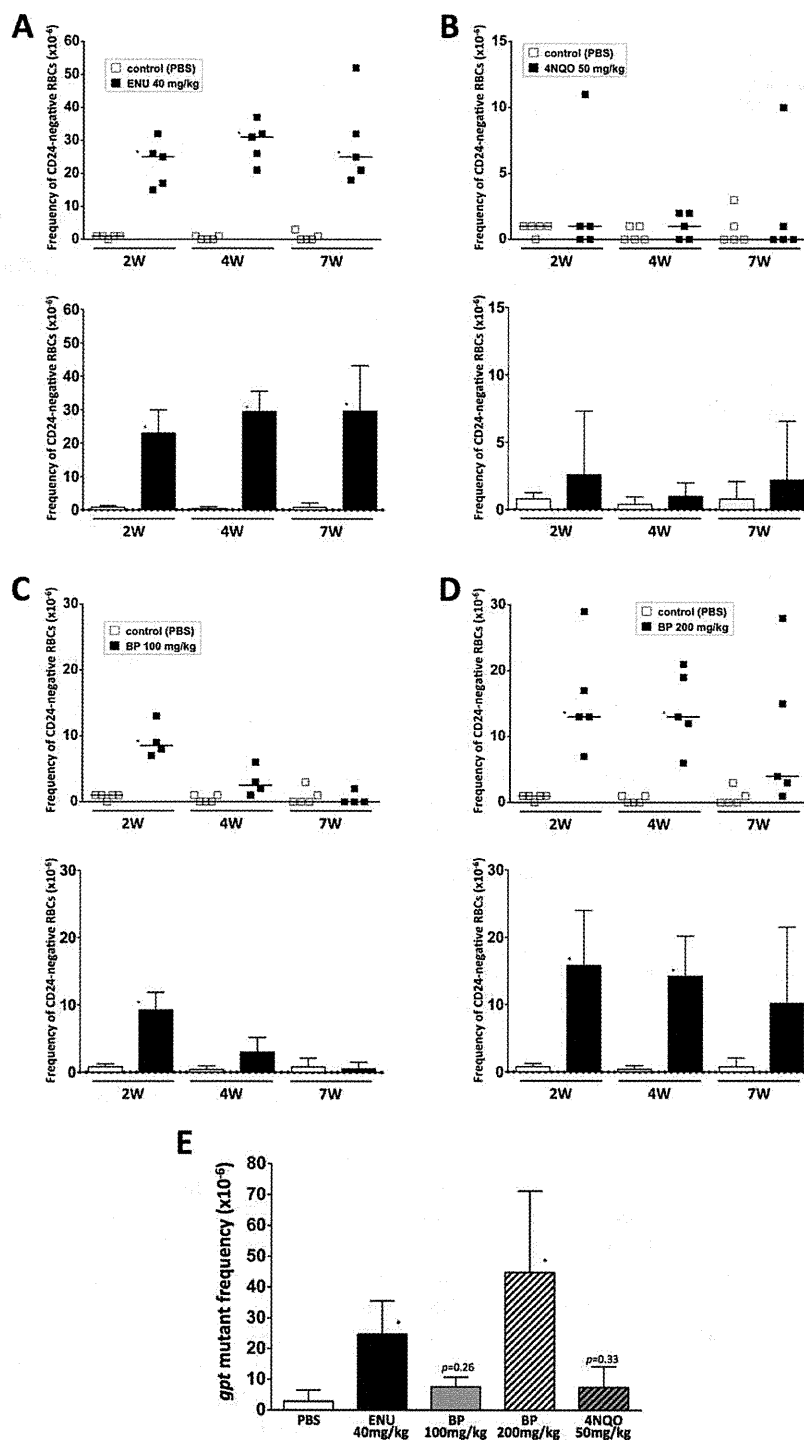


Fig. 2. Comparative analyses of *Pig-a* mutation in peripheral blood RBCs and *gpt* mutation in bone marrow cells. At 2, 4, and 7 weeks after treatment with (A) 40 mg/kg ENU, (B) 50 mg/kg 4NQO, (C) 100 mg/kg BP, or (D) 200 mg/kg BP, or PBS solvent, peripheral blood was withdrawn from the tail vein and analyzed by flow cytometry for the presence

of CD24 on the surface of RBCs. Upper panels of (A)–(D): scatter plots with median bars. Lower panels of (A)–(D): the mean \pm SD. (E) Seven weeks after treatment, all mice were killed and their bone marrow cells were isolated for the *gpt* assay. Frequencies are the mean \pm SD of five animals per treatment group. * $P < 0.05$.