

- cardiovascular disease: INTERMAP study. *Journal of Proteome Research*, 9, 6647–6654.
- Yu, Z., Kastenmüller, G., He, Y., et al. (2011). Differences between human plasma and serum metabolite profiles. *PLoS ONE*, 6, e21230.
- Yu, Z., Zhai, G., Singmann, P., et al. (2012). Human serum metabolic profiles are age dependent. *Aging Cell*, 11, 960–967.
- Zineh, I., & Huang, S. M. (2011). Biomarkers in drug development and regulation: A paradigm for clinical implementation of personalized medicine. *Biomarkers in Medicine*, 5, 705–713.
- Zucker, M. B., & Nachmias, V. T. (1985). Platelet activation. *Arteriosclerosis*, 5, 2–18.

薬物相互作用に影響を及ぼす遺伝子多型と  
その人種差前川京子 Keiko MAEKAWA 国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部第2室室長  
佐井君江 Kimie SAI 国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部第1室室長

## はじめに

医薬品開発においては、副作用発現や有効性の変動要因となり得る薬物相互作用の有無について、適正に試験し評価することが求められている。近年、薬物代謝酵素のみならずトランスポーターに関する研究の進展に伴い、被験薬の薬物動態に対する、これらの分子の影響を定量的に評価するための検討方法を提示した薬物相互作用ガイドラインの改定が欧州、米国および我が国の規制当局で進められている。一方、薬物動態関連分子の中には、活性変化をもたらす遺伝子多型が存在し、患者の遺伝的要因が薬物相互作用を増強する事例も報告されている。さらに一部の遺伝子多型には、その頻度に大きな人種差・民族差が認められることから、今後加速する医薬品の国際共同開発においても、特に遺伝子多型の人種差を考慮した適正な薬物相互作用の評価が重要となる。本稿では、人種差が注目されている薬物動態関連分子の遺伝子多型を取り上げ、これらの薬物相互作用への影響について事例を含めて概説する。

## 2 薬物動態関連分子の遺伝子多型

ゲノム配列上には、約1,000塩基に1か所以上の塩基置換や、挿入・欠損等の遺伝子多型があり、また一定の長さの配列について、その繰り返し回数が異なるコピー数多型等も知られている。これらの多型は、遺伝子の発現量(mRNA量)やタンパク質機能(酵素であれば酵素活性)に影響を及ぼすことがあり、薬物代謝酵素やトランスポーター等の遺伝子多型は、薬物応答性の個人差や人種差の原因となり得る。<sup>1,2)</sup> 医薬品開発段階においても被験薬の体内動態に影響する遺伝子多型、およびその頻度の人種差を

念頭に臨床試験を行う必要がある。現在、我が国で改定が進められている“医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン”においても「遺伝子多型を考慮した薬物相互作用」に関する記述が検討されている(2014年3月時点)。以下では、薬物相互作用に関して特に考慮すべき主要な遺伝子多型を取り上げ、その人種差・民族差について解説する。

## 1. Cytochrome P 450 2 C 9(CYP 2 C 9)

CYP 2 C 9は、ワルファリンやフェニトイン等の治療域の狭い医薬品を含め、現在処方されている医薬品の約15~20%の代謝に関与する。活性低下を伴う多型として、\*2(430 C>T, Arg 144 Cys)と\*3(1075 A>C, Ile 359 Leu)が知られ、\*2は東アジア人にはほとんど見いだされず、\*3の頻度も白人と比較して低い(表1)。なお両多型による活性低下の程度は、基質薬により異なることにも留意したい。<sup>3)</sup>

## 2. CYP 2 C 19

CYP 2 C 19は、ヒト肝臓P 450量に占める割合が1%に過ぎないが、<sup>4)</sup> プロトンポンプ阻害剤等、多くの医薬品の代謝に関与する。活性欠損型の重要な多型に、\*2(681 G>A, スプライス異常)と\*3(636 G>A, Trp 212 X)があり、これらの頻度に大きな人種差が認められる(表1)。日本人では、\*2および\*3のホモ接合(\*2/\*2または\*3/\*3)および複合ヘテロ接合(\*2/\*3)の割合は約16%に達し、約6人に1人がCYP 2 C 19活性をほとんど有しない低代謝型(poor metabolizer: PM)であるのに対し、白人では大多数が通常の活性を有する高代謝型(extensive metabolizer: EM)であり、PMはわずか2%である。また\*3については、東アジア圏内においても民族差があることに注意したい。

表1 機能変化を伴う主な薬物代謝酵素およびトランスポーターの遺伝子多型と人種差

遺伝子名	アレル <sup>a)</sup> または ハプロ タイプ	多型位置 <sup>b)</sup>	アミノ酸 置換等	アレル頻度 <sup>c)</sup>					機能変化
				東アジア人			白人	アフリカ人	
				日本人	韓国人	中国人			
CYP2C9	*2	430 C>T	Arg 144 Cys	ND <sup>d)</sup>	ND	0.001	0.140	0.022	活性低下
	*3	1075 A>C	Ile 359 Leu	0.029	0.036	0.037	0.064	0.018	活性低下
CYP2C19	*2	681 G>A	Splice defect	0.293	0.275	0.292	0.145	0.185	活性欠損
	*3	636 G>A	Trp 212 X	0.124	0.088	0.042	<0.001	0.004	活性欠損
	*17	-3402 C>T, -806 C>T	Increased transcription	0.011	0.012	0.010	0.188	0.235	活性上昇
CYP2D6	*3	775 delA	Arg 259 Glyfs	ND	ND	ND	0.018	0.002	活性欠損
	*4	IVS 3-1 G>A	Splice defect	0.003	0.004	0.002	0.205	0.057	活性欠損
	*5	CYP 2 D 6 deleted	—	0.058	0.060	0.060	0.025	0.033	活性欠損
	*6	454 delT	Trp 152 Glyfs	ND	ND	<0.001	0.011	0.002	活性欠損
	*10	100 C>T	Pro 34 Ser	0.379	0.455	0.526	0.018	0.042	活性低下
CYP3A5	*3	IVS 3-237 A>G	Splice defect	0.762	0.759	0.737	0.955	0.318	活性欠損
UGT1A1	*6	211 G>A	Gly 71 Arg	0.155	0.220	0.205	0.003	ND	活性低下
	*28	-54_-39 [A(TA) <sub>n</sub> TAA] > [A(TA) <sub>n</sub> TAA]	—	0.110	0.115	0.127	0.340	0.401	発現低下
		*5							
SLCO1B1	*15 *17 <sup>e)</sup>	521 T>C	Val 174 Ala	0.139	0.136	0.127	0.161	0.048	活性低下
ABCG2	—	421 C>A	Gln 141 Lys	0.313	0.284	0.315	0.105	0.027	発現低下

a) CYP アレル命名委員会による定義(<http://www.cypalleles.ki.se/>)

b) 開始コドン ATG の A を +1 とする。

c) Kurose K. *et al.*, *Drug Metab. Pharmacokin.*, 27, 9-54 (2012).

d) ND : not detected

e) 521 T>C (Val 174 Ala) を含む 3 種のハプロタイプ OATP1B1\*5 (-11187 G-388 A-521 C), \*15 (-11187 G-388 G-521 C), \*17 (-11187 A-388 G-521 C) を含む。

### 3. CYP2D6

CYP 2 D 6 は医薬品の 25% 以上を代謝し、主要な基質として、タモキシフェンおよびコデイン等がある。CYP 2 D 6 には、100 種以上のアレル(遺伝子多型上の対立遺伝子の 1 つ)、またはその組み合わせであるハプロタイプが知られ(<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>)、発現量や活性に影響する多型も多い。白人に多い多型に、\*4 (スプライス異常)があり、一方、日本人を含む東アジア人には低活性型の\*10 が多く、次いで全欠損型の\*5 も認められる(表 1)。これらのアレルの組み合わせにより、代謝活性がほとんど消失した PM は、東アジア人では約 1% であるが、白人では 7~10% と高頻度である。<sup>5)</sup>

### 4. CYP3A5

CYP 3 A サブファミリーに属する CYP 3 A 5 は、

CYP 3 A 4 と類似した基質特異性を有し、医薬品の約半数を代謝する。CYP 3 A 5 の発現量の個人差は極めて大きく、これは主にスプライス異常を引き起こす\*3 (イントロン 3 の多型 IVS 3-237 A>G) に起因する。<sup>6)</sup> 本多型の頻度は、白人では 95% 以上、東アジア人では約 75% である(表 1)。\*3 をホモ接合体(\*3/\*3)で有するヒトにおいて、免疫抑制薬タクロリムスの薬物動態の変化が報告されているが、臨床問題となる影響は一般的に少ないとされている。<sup>5)</sup>

### 5. UDP-グルクロン酸転移酵素 1A1 (UDP-glucuronosyltransferase 1A1: UGT1A1)

UGT の分子種の 1 つである UGT 1 A 1 は、抗がん剤イリノテカンの活性代謝物 SN-38 や骨粗しょう症治療薬ラロキシフェン等のグルクロン酸抱合に関与している。活性低下を引き起こす\*6 (211 G>

A, Gly 71 Arg)の頻度は、東アジア人で特徴的に高く(表1)、一方で、プロモーター領域(-54\_-39)のTA反復回数の多型(通常6回が7回に増幅)で発現低下をもたらす\*28は、白人や黒人で多く、東アジア人の約3~4倍の頻度である(表1)。

#### 6. 有機アニオントランスポーターポリペプチド1B1 (Organic anion transporting polypeptide 1B1: OATP1B1)

OATP1B1は、肝細胞の血管側膜に特異的に発現し、HMG-CoA還元酵素阻害剤や抗がん剤メトトレキサート等の多くの薬物の肝取り込みに関与する。<sup>7)</sup> OATP1B1をコードする遺伝子である solute carrier organic anion transporter family member 1B1(*SLCO1B1*)には、発現量の減少と輸送活性の低下を引き起こす多型として521 T>C(Val 174 Ala)が知られており、黒人では頻度が低いが、東アジア人のアレル頻度は約14%であり、白人とほぼ等しい(表1)。一方、日本人でアレル頻度約60%で見いだされる388 A>G(Asn 130 Asp)は、発現系や基質に依存して輸送活性への影響が異なる。<sup>7)</sup> 両多型によるハプロタイプのうち、521 T>C(Val 174 Ala)を含む\*5(388 A-521 C)および\*15(388 G-521 C)をホモ接合またはヘテロ接合で有する場合、OATP1B1の基質となる多くの薬物の血中濃度-時間曲線下面積(area under the blood concentration-time curve: AUC)が上昇することが知られている。<sup>7)</sup> なお521 T>C(Val 174 Ala)多型に加え、本遺伝子のプロモーター部位に変異(-11187 G>A)を有するハプロタイプ\*17(-11187 A-388 G-521 C)も報告されている。<sup>8)</sup>

#### 7. 乳癌耐性蛋白 (Breast cancer resistance protein: BCRP)

BCRPは、肝臓や小腸の管腔側膜に発現し、イリノテカンの代謝物であるSN-38およびSN-38 G等の胆汁または消化管排泄に関与している。本トランスポーターをコードする *ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2)* 遺伝子には50種類以上の多型が報告されているが、<sup>9)</sup> タンパク発現量の低下を伴う421 C>A(Gln 141 Lys)は、東アジア人で頻度が高く(表1)、スルファサラジンやロスバスタチンのAUCの上昇等、臨床上的有用性が示されている。<sup>9)</sup>

## 遺伝子多型を考慮した薬物相互作用の検討

被験者の遺伝子型により、特定の酵素またはトランスポーターにより引き起こされる薬物相互作用の程度(阻害または誘導)が異なることがあり、臨床薬物相互作用試験の実施にあたり遺伝子型により層別化したデザインが有用な場合がある。一般に、ある被験薬の主要な消失経路(酵素またはトランスポーター)の活性が正常であるEM(トランスポーターに関しては高活性型)の方が、活性が欠損または低下しているPM(同上、低活性型)と比較して、当該経路の阻害薬を併用した際の被験薬のAUCの上昇率(クリアランスの減少率)は顕著である(以下、EM—当該経路阻害剤による影響)。しかし注意すべき点として、PMではEMと比較して単独投与における薬物の血中濃度は高く、代替経路の代謝または排泄を阻害する薬剤と併用された場合には、更に血中濃度は高くなり、安全性の問題が生じる可能性がある(以下、PM—代替経路阻害剤による影響)。以下に、主要消失経路にかかわる遺伝子多型について、EMまたはPMが顕著に影響を受ける薬物相互作用の事例を紹介する。

### 1. CYP2C9の遺伝子多型と薬物相互作用

#### フルルビプロフェンとフルコナゾール(EM—当該経路阻害剤による影響)

健常人において、非ステロイド性抗炎症剤フルルビプロフェン(CYP2C9基質)の薬物動態に対する抗真菌薬フルコナゾール(CYP2C9阻害剤)による相互作用が検討された。CYP2C9の野生型(\*1/\*1)および低活性型のCYP2C9\*3のヘテロ接合体(\*1/\*3)では、フルコナゾール投与後のフルルビプロフェンのAUCは、投与前のそれぞれ3.2および2.4倍に上昇したが、CYP2C9\*3ホモ接合体(\*3/\*3)ではAUCに変化は認められなかった。<sup>10)</sup>

### 2. CYP2C19の遺伝子多型と薬物相互作用

#### 1) ランソプラゾールとフルボキサミン(EM—当該経路阻害剤による影響)

プロトンポンプ阻害剤のランソプラゾールは、主としてCYP2C19およびCYP3A4で代謝される。CYP2C19に対して強い阻害作用を有するフ

ルボキサミンと併用した際の本剤のAUCは、CYP2C19のEMではプラセボ併用群の3.8倍に上昇したが、CYP2C19のPMではフルボキサミン併用による影響を受けないことが報告されている。<sup>11)</sup>

## 2) ポリコナゾールとエリスロマイシン(PM-代替経路阻害剤による影響)

アゾール系抗真菌剤のポリコナゾールは、主にCYP2C19およびCYP2C9、さらに寄与は少ないもののCYP3A4で代謝される。マクロライド系抗生物質でCYP3A4の阻害作用を有するエリスロマイシンと本剤との相互作用に関する中国人を対象にした研究において、<sup>12)</sup> CYP2C19のPM(\*2/\*2もしくは\*2/\*3)では、エリスロマイシンの併用により、プラセボ併用時と比較してポリコナゾールのAUCが有意に増大し、経口クリアランスが低下するものの、EM(\*1/\*1)ではエリスロマイシン併用による影響を受けないことが示された。これは、CYP2C19のPMではEMと比較してポリコナゾール代謝に対するCYP3A4の寄与が増大しており、CYP3A4阻害薬との併用による代替代謝経路の遮断が、ポリコナゾールの全身曝露の増大を引き起こしたためと考えられる。CYP2C19のPMの頻度は、前述のように日本を含む東アジア人で高く、ポリコナゾールの副作用である肝毒性の発生に注意が必要である。

### 3. CYP2D6の遺伝子多型と薬物相互作用

#### 1) デシプラミンとパロキセチン(EM-当該経路阻害剤による影響)

選択的セロトニン再取り込み阻害剤パロキセチンはCYP2D6の基質であるとともに、CYP2D6の阻害作用を有する。CYP2D6で代謝されるデシプラミン(既に日本と欧州では発売中止)と本剤を併用した際、CYP2D6のEMではデシプラミンの総クリアランスがパロキセチン非併用時の20%に減少する。一方、CYP2D6のPMではデシプラミンの総クリアランスに対するパロキセチン併用の影響は認められないことが報告されている。<sup>13)</sup>

#### 2) トルテロジンとケトコナゾール(PM-代替経路阻害剤による影響)

ムスカリン受容体拮抗薬であり、過活動膀胱治療薬として用いられるトルテロジンはCYP2D6に

よりフェニル基5位のメチル基が酸化され、トルテロジンと同程度の薬理活性を持つ5-ヒドロキシメチル体(5-HM)を生成する。トルテロジンおよび5-HMは、さらにCYP3A4により代謝されて不活性化する(図1)。CYP2D6のPMでは、5-HMは血清中にほとんど検出されず、トルテロジンの総血清中濃度はEMと比較して高値を示す。しかし、抗ムスカリン作用はCYP2D6多型によりほとんど影響を受けないことから、本剤の薬理活性には、トルテロジンと5-HMの非結合形血清中濃度の合計(非結合形活性体濃度)が寄与すると推定されている。<sup>14)</sup> 一方、CYP2D6のPMでは、代替経路にかかわるCYP3Aの阻害薬の併用でトルテロジン全身曝露が顕著に増大する。例えば、CYP2D6のPM(\*3, \*4, \*5のホモ保有者)に、本剤とCYP3Aの強力な阻害剤である抗菌薬ケトコナゾールを併用した場合、本剤の経口クリアランスが、ケトコナゾール非併用時の40%に低下し、AUCが2倍以上増加することが報告されている。<sup>15)</sup> なおケトコナゾールは、我が国では経口薬としては未承認であるが、欧州では、肝障害発症リスクが高いことから最近、販売が中止された。米国では、肝障害のほか副腎不全、さらに薬物相互作用の問題から、ケトコナゾールに厳しい使用制限を設けている。

### 4. OATP1B1の遺伝子多型と薬物相互作用

#### 1) アトルバスタチンとリファンピシン(高活性型-当該経路阻害剤による影響)

SLCO1B1低活性型の多型である521T>C(Val174Ala)について、抗高脂血症薬アトルバスタチン(OATP1B1基質)の薬物動態に対する抗結核薬リファンピシン(OATP1B1阻害剤)併用による影響が検討された。リファンピシンの単回経口投与により、アトルバスタチンのAUCは521T>C(Val174Ala)の遺伝子型依存的に変化し、521TT, 521TCおよび521CCの保有者では、リファンピシン非併用時と比較してそれぞれ833, 468および330%になることが報告されている。<sup>16)</sup>

#### 2) レバグリニドとシクロスポリン(高活性型-当該経路阻害剤による影響)

経口糖尿病薬のレバグリニドは、OATP1B1により肝に取り込まれ、CYP2C8およびCYP3A4

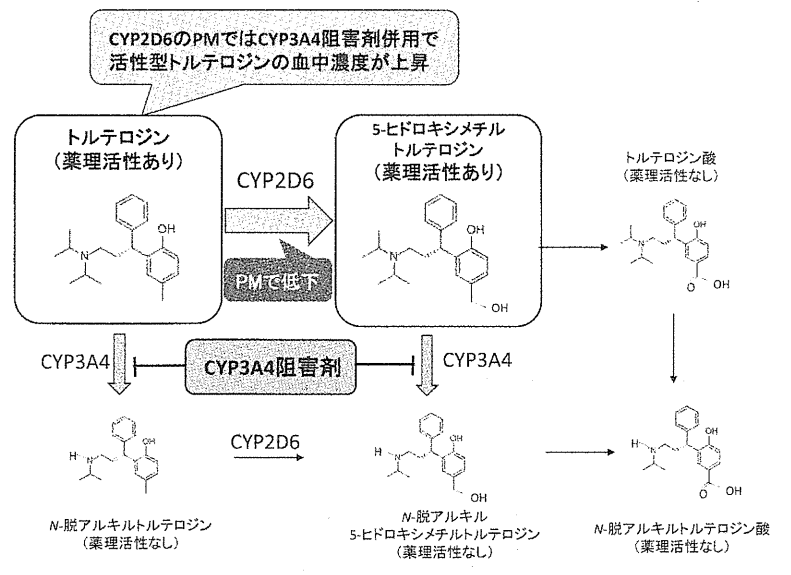


図1 トルテロジン代謝に及ぼす CYP 3 A 4 阻害剤の影響(CYP 2 D 6 の PM が相互作用を顕著に受ける例)

トルテロジンの主代謝にかかわる CYP 2 D 6 の PM では、代替経路の阻害剤(CYP 3 A 4 阻害剤)により、活性体(非結合形トルテロジン)の AUC が顕著に増大する。

により代謝される。CYP 3 A 4 および OATP 1 B 1 の阻害剤であるシクロスポリンとの併用により、レパグリニドの AUC は上昇するが、その上昇率は、*SLCO1B1* の 521 TC の保有者の方が、521 TT の保有者と比較して 42% 低いことが報告されている。<sup>17)</sup>

## おわりに

近年の薬物動態学・薬理ゲノム学研究所の進展により、薬物動態に影響する遺伝子多型とその人種差、ならびに遺伝子多型の薬物相互作用への寄与に関する情報が蓄積してきた。本稿で紹介した事例から、特に CYP 2 D 6, CYP 2 C 9, CYP 2 C 19, OATP 1 B 1 (*SLCO1B1*) 等が主要消失経路である被験薬については、臨床薬物相互作用試験において遺伝子多型解析を実施し、多型情報を考慮した相互作用の評価を行うことが有用な場合がある。この際、一部の遺伝子多型の頻度には、東アジア人と白人との間に人種差が、さらには東アジア地域内においても民族差が存在することに留意すべきであろう。今後、アジア地域を含む多地域での国際共同治験が加速すると考えられるが、その推進においても、遺伝

子多型の人種差・民族差の情報を十分に活用しながら、薬物相互作用の適正な評価を行うことが重要となるであろう。また、これらの遺伝子多型の人種差が、実臨床下での安全性・有効性の人種差にどの程度寄与しているのかの評価を含め、更に情報の蓄積が必要と考えられる。

## 引用文献

- 1) Kurose K. *et al.*, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 27, 9-54 (2012).
- 2) Ingelman-Sundberg M. *et al.*, *Pharmacol. Ther.*, 116, 496-526 (2007).
- 3) Kirchheiner J., Brockmoller J., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 77, 1-16 (2005).
- 4) Inoue K. *et al.*, *Pharmacogenetics*, 7, 103-113 (1997).
- 5) Gardiner S. J., Begg E. J., *Pharmacol. Rev.*, 58, 521-590 (2006).
- 6) Kuehl P. *et al.*, *Nat. Genet.*, 27, 383-391 (2001).
- 7) Niemi M. *et al.*, *Pharmacol. Rev.*, 63, 157-181 (2011).
- 8) Niemi M. *et al.*, *Pharmacogenet. Genomics*, 15, 303-309 (2005).
- 9) Ieiri I., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 27, 85-105 (2012).
- 10) Kumar V. *et al.*, *Drug Metab. Dispos.*, 36, 1242-1248 (2008).
- 11) Yasui-Furukori N. *et al.*, *J. Clin. Pharmacol.*, 44, 1223-1229 (2004).
- 12) Shi H. Y. *et al.*, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 66, 1131-1136 (2010).
- 13) Brosen K. *et al.*, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 44, 349-355 (1993).
- 14) Brynne N. *et al.*, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 63, 529-539 (1998).
- 15) Brynne N. *et al.*, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 48, 564-572 (1999).
- 16) He Y. J. *et al.*, *Clin. Chim. Acta*, 405, 49-52 (2009).
- 17) Kajosaari L. I. *et al.*, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 78, 388-399 (2005).



201433008A (3/4)

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）

医薬品・医療機器の実用化促進のための  
評価技術手法の戦略的開発  
(H26-創薬-一般-008)

平成26年度 委託業務成果報告書  
第3/7分冊 研究分担報告書

テーマ1-2 リスク評価のための信頼性の高い  
in vivo 遺伝毒性評価スキームの確立

担当責任者：山田 雅巳 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部  
担当責任者：高木 久宜 日本エスエルシー株式会社  
担当責任者：松元 郷六 (一財)残留農薬研究所  
担当責任者：真田 尚和 科研製薬株式会社  
担当責任者：堀 妃佐子 サントリービジネスエキスパート株式会社



本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）による委託業務として、国立医薬品食品衛生研究所（斎藤嘉朗）が実施した平成26年度「医薬品・医療機器の実用化促進のための評価技術手法の戦略的開発」の成果を取りまとめたものです。

## 目 次

### I. 委託業務成果報告（業務項目）

テーマ総括、リスク評価のための *in vivo* 遺伝毒性評価  
スキームの構築 . . . . . 1

山田 雅巳（国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部）

トランスジェニック動物試験と他の *in vivo* 試験の組合  
せ研究 . . . . . 5

高木 久宜（日本エスエルシー株式会社）

コメットアッセイ・小核試験等の *in vivo* 試験の組合せ  
研究 . . . . . 11

松元 郷六（（一財）残留農薬研究所）

医薬品遺伝毒性評価のための新規 *Pig-a* アッセイと他の  
*in vivo* 試験の組合せ研究 . . . . . 29

真田 尚和（科研製薬株式会社）

医薬品遺伝毒性評価に用いる効率的な *in vivo* 試験の組  
合せ研究 . . . . . 35

堀 妃佐子（サントリービジネスエキスパート株式会社）

II. 学会等発表実績 . . . . . 43

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）  
委託業務成果報告書（業務項目）

担当研究課題 テーマ総括、リスク評価のための *in vivo* 遺伝毒性評価スキームの構築

担当責任者 山田雅巳 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部室長

研究要旨 ラット膀胱発がん物質である 2-ニトロアニソール (2-NA) について、TK 遺伝子突然変異試験を実施し陽性の結果を得た。同様に、Ames 試験を実施し、復帰変異コロニーのゲノム配列を解析し、突然変異を複数検出した。これらの結果は、2-NA が *in vitro* では遺伝毒性を示すというこれまでの報告と符合する。さらに、本年度グループ内で実施した、2-NA、タモキシフェン、1,2-ジメチルヒドラジンの三種類の発がん物質についての、対象臓器とエンドポイントが異なる遺伝毒性試験の結果を総合的に考察し、「未知の化合物の場合、*in vivo* 試験の組合せの第一選択は小核試験（骨髄もしくは末梢血）と TG 試験（肝臓）がよい」という仮説を立てた。

研究協力者

松田知成 京都大学 准教授  
増村健一 国立医薬品食品衛生研究所 室長  
鵜飼明子 国立医薬品食品衛生研究所 研究補助員

A. 研究目的

ICH ガイドライン S2 (R1) に、遺伝毒性試験の標準的組合せとして、*in vitro* 遺伝子突然変異試験 (Ames 試験) と、二つ以上の *in vivo* 試験法を選択して遂行するオプションが追加された。しかし、試験法により標的臓器、投与期間、サンプリング時期等が異なることから、実際にどの組み合わせが適切であるかに関しては十分なデータがなく、開発現場では標準的評価スキームの構築が求められている。本研究は、特徴的な化合物について異なる試験を実施し、化合物のリスク評価に最適な試験法の組み合わせを確立することを、3年間の目標とする。

ラット膀胱発がん物質である 2-ニトロアニソール (2-NA)、ラット肝発がん物質のタモキシフェン (TXF)、Ames 試験陰性のラット結腸発がん物質 1,2-ジメチルヒドラジン (DMH) を用い、

対象臓器とエンドポイントが異なる *in vivo* 遺伝毒性試験を実施した結果を考察してこれらの物質による発がんの可能性を捕捉できる二種類の *in vivo* 試験の組合せの仮説を立てる。

上記遺伝毒性試験のうち、2-NA による *in vitro* 遺伝子突然変異試験の結果及び、Ames 試験の復帰変異株のゲノム DNA 解析の結果を得る。

B. 研究方法

B.1 培養細胞を用いた TK assay

2-NA (東京化成工業㈱) を用いて、代謝活性化系存在下及び非存在下で *in vitro* 遺伝子突然変異試験 TK assay を実施した。ヒトリンパ芽球細胞 (TK6) を用いて、コールターカウンターによる細胞濃度の計測により 2-NA の細胞毒性をしらべ、処理用量は最高を 1.0 µg/mL とし、公差 0.1 で 5 段階と決定した。処理直後と、処理 3 日後の細胞を対象にトリフルオロチミジン耐性を指標にした突然変異コロニーをそれぞれ 2 週間後 (標準増殖コロニー) と 4 週間後 (増殖遅延コロニー) に測定した。同時に細胞毒性も測定した。溶媒であるジメチルスルホキ

シド (DMSO、ナカライテスク) を陰性対照に、アルキル化剤であるメチルメタンスルホン酸 (MMS、10 µg/mL、和光純薬工業株) を陽性対照に用いた。

## B.2 ゲノム DNA の解析

変異コロニーの選択は、まず TA100 株を用いて、2-NA について、代謝活性化系存在下 (+S9) 及び非存在下 (-S9) で、プレインキュベーション法により Ames 試験を実施した。その後、溶媒対照 (DMSO) と 313 及び 1,250 µg/plate の 2-NA 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 (±S9 x 3 用量 x 4 個ずつ=計 24 個) を選び、それぞれのゲノム DNA を調製した。DNA 塩基配列の解析のため、ハイ・スループット DNA シークエンサー-MiSeq (Illumina, USA) による 1 回のランを実施した。塩基配列データは fastaq ファイルで編集し、CLC Genomics Workbench ver. 5 software (CLC bio A/S, Denmark) を用いて解析した。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後、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。

### <倫理面への配慮>

細菌と培養細胞を用いた *in vitro* の試験なので該当しない。

## C. 研究結果

### C.1 培養細胞を用いた TK assay

S9 代謝活性化系非存在下での *Tk* 遺伝子突然変異頻度は、陰性対照では  $6.0 \times 10^{-6}$  であり、2-NA 処理細胞で用量依存的に増加し、0.9 µg/mL で  $45.2 \times 10^{-6}$  だった (図 1)。S9 代謝活性化

系存在下での *Tk* 遺伝子突然変異頻度は、陰性対照では  $3.9 \times 10^{-6}$ 、2-NA 処理細胞では用量依存的に増加し、0.9 µg/mL で  $16.1 \times 10^{-6}$  だった (図 1)。変異体コロニーの内訳としては、標準増殖コロニーよりも、増殖遅延コロニーが多く観察された。

### C.2 ゲノム DNA の解析

2-NA における Ames 試験の結果は、代謝活性化系の有無にかかわらず用量依存的に復帰変異株数が増加し、陽性であった。しかしながら、復帰変異株数の増加は陰性対照の数倍程度で強い誘発性は無いものと考えられた (data not shown)。次に、ゲノム DNA 上の突然変異の数は、0、313、1,250 µg/plate の用量に対して、代謝活性化系非存在下ではゲノム当たり、0.25、0、0.5 個、代謝活性化系存在下ではゲノム当たり、0.25、0.5、0.75 個だった (表 1)。

## D. 考察

### D.1 培養細胞を用いた TK assay

2-NA は TK assay において 0.9 µg/mL までは用量依存的に突然変異頻度が増加したが、その上の用量 1.0 µg/mL (最高用量) では代謝活性化系非存在下、存在下ともに陽性コロニーの形成が見られなかった。したがって、2-NA による遺伝子突然変異誘発作用は認められたが、毒性により細胞が生存できなくなって死滅する割合が高いと考えられる。

### D.2 ゲノム DNA の解析

表 1 の結果は用量相関もあり、陰性対照はこれまでの蓄積データから 0.25 付近の数値と考えるとよい。2-NA 処理によりゲノム上に突然変異が誘発されたと考えてよい。

### D.3 テーマ総括

表 1 に今年度実施した三つの発がん物質についての試験の結果一覧を示す。遺伝子突然変異を検出する試験である *Pig-a* assay や、DNA 損傷性を検出するコメット試験、さらに染色体異常を検出する小核試験 (骨髄・末梢血) は、い

ずれも陰性の結果であった。一方、同じ遺伝子突然変異を検出する試験でも TG 試験では肝臓を用いた場合、どの化合物も陽性になった。小核試験では、二化合物で対象臓器を肝臓にして実施した場合に陽性の結果を得た。用いた化合物はいずれも発がん物質だが、標的臓器が異なる。にもかかわらず、肝臓の小核試験と肝臓の TG 試験ではいずれも陽性の結果を得たことは、肝臓が遺伝毒性試験に感受性が高いことを示唆している。TG 試験のデータベースによると、TG データがある化合物 123 のうち、肝臓のデータがあるものが 92 で、そのうち陽性が 62、すなわち発がん物質の 68%が肝臓の TG 試験陽性という事である。ICH S2(R1)における選択肢 2で「2種類の異なる組織における *in vivo* 遺伝毒性試験を推奨していること」を勘案すると、組合せの一つはその感度の高さから肝臓を用いた TG 試験がよく、もう一つは、組織とエンドポイントが異なることから、末梢血もしくは骨髄を用いる小核試験がよいと考えられる。そこで、次年度は肝臓の TG 試験の結果が無い発がん物質を中心に、*in vivo* 試験の組合せを実施し、この仮説を検証する。

#### E. 結論

2-NA を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異試験が陽性であったこと、2-NA で処理した細菌のゲノム上に複数の突然変異が検出されたことから、既知の報告 Ames 試験および染色体異常試験の陽性の結果も含めて、2-NA は *in vitro* の試験では陽性になる物質であることが確認できた。

本年度実施した、2-NA、TXF、DMH の三種類の発がん物質についての、対象臓器とエンドポイントが異なる遺伝毒性試験の結果を総合的に考察し、「未知の化合物の場合、*in vivo* 試験の組合せの第一選択は小核試験（骨髄もしくは末梢血）と TG 試験（肝臓）がよい」という仮説を立てた。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表等

論文発表等

なし

学会発表等

- 1) 堀妃佐子, 田中康浩, 堤絵梨, 百南綾華, 増村健一, 山田雅巳, 藤居互, 北川義徳: DMH を用いた F344 系統 *gpt delta* ラット突然変異試験と小核試験 (末梢血、骨髄、肝臓、大腸) の統合法の検討. 日本環境変異原学会第 43 回大会 (2014. 12、東京).
- 2) 山田雅巳, 堀端克良, 鶴飼明子, 木本崇文, 千藏さつき, 伊東悟, 武藤重治, 宇野芳文, 真田尚和, 高島理恵, 志賀野美幸, 高沢博修, 濱田修一, 山本美佳, 堀妃佐子, 堤絵梨, 和田邦生, 前田晃央, 小坂瑞樹, 木村葵, 菊月隆太, 荻原庸介, 京谷恭弘, 足立秀樹, 上松泰明, 吉田唯真, 成見香瑞範, 福田隆之, 鈴木裕太, 後藤玄, 森田健, 本間正充: *Pig-a*/PIGRET アッセイに関する短期試験への有用性: MMS 共同研究報告. 日本環境変異原学会第 43 回大会 (2014. 12、東京).
- 3) 須井哉, 川上久美子, 根岸沙記, 増渕恵美, 園原啓太, 山田雅巳: ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験法の検討 9. 日本環境変異原学会第 43 回大会 (2014. 12、東京).
- 4) Yamada M, Takamune M, Matsuda T.: Novel mutation assay with non-selective protocol using a next-generation DNA sequencer. 4th Asian Conference for Environmental Mutagen Society (2014. 12、Kolkata, India).

報道発表等

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

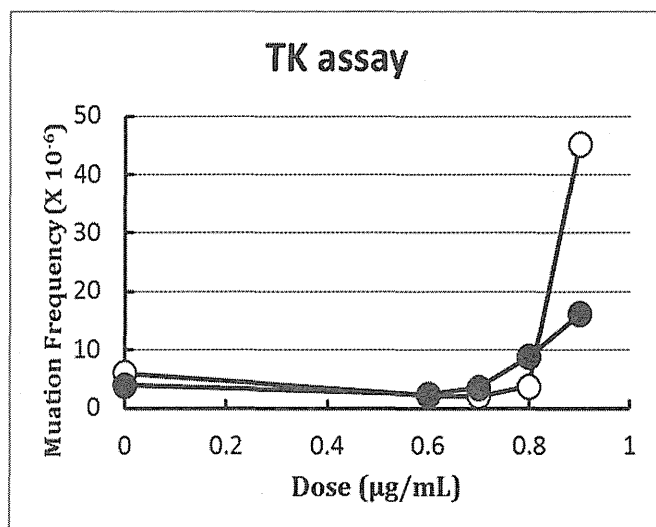


図1 2-NA の TK assay ○: -S9、●: +S9

表1 2-NA 処理した Ames 試験復帰変異株のゲノム DNA 解析

2-NA (µg/plate)	-S9		+S9	
	検出された 突然変異の数 <sup>※1</sup>	ゲノム当たり の変異数 <sup>※2</sup>	検出された 突然変異の数 <sup>※1</sup>	ゲノム当たり の変異数 <sup>※2</sup>
0	5 (4)	0.25	5 (4)	0.25
313	3 (3 <sup>※3</sup> )	0	6 (4)	0.5
1,250	6 (4)	0.5	7 (4)	0.75

※1 ()内は  
His<sup>+</sup>の復帰変異、  
4クローンずつ

調べたので4。

※2 His<sup>+</sup>の復帰変異を除く

※3 His<sup>+</sup>の復帰変異が確認できなかった。サプレッサー変異もなく、理由は不明。

担当研究課題

トランスジェニック動物試験と他の *in vivo* 試験の組み合わせ

担当責任者 高木 久宜 日本エスエルシー株式会社 専務取締役

研究要旨

2-ニトロアニソール(*o*-nitro anisole)の点突然変異誘発性を、動物レベルでは11週齢の雄性Slc:WistarHannover/Rcc-Tg(*gpt delta*)ラットを用いて28日間の反復強制経口投与を行い*gpt*アッセイにより検出し、細菌レベルでは復帰突然変異試験(Ames試験)により検出を行った。また、Ames試験については、既存の報告との整合性を検証した。

*gpt*アッセイでは肝臓における点突然変異体頻度は陰性対照群と比較して低用量群で3.56倍、中用量群で2.79倍、高用量群で4.49倍を示し、用量依存性は明らかでないものの、複数の投与群で有意なMF増加が見られたことから、陽性と判定した。なお、膀胱における突然変異頻度は、ゲノムDNA抽出量ならびにパッケージング効率が低値であったため、点突然変異体頻度の検出までに至らなかった。Ames試験では既存の報告と同様に、*Salmonella typhimurium* TA100菌株において、明確な復帰突然変異の用量依存的な誘発が認められた。

研究協力者

増村健一 国立医薬品食品衛生研究所 室長  
園 明 日本エスエルシー株式会社 顧問  
大杉直弘 日本エスエルシー株式会社 係長

2-ニトロアニソールは用量設定試験結果により0, 87.5, 175または350mg/kg体重/day(1日1回)の用量でコーン油に混和して28日間の反復強制経口投与を各群5匹に行い、陽性対照群として*N*-エチル-*N*-ニトロソウレア(ENU)を50mg/kg体重/dayの用量で5匹に5日間(1日1回:2-ニトロアニソール投与開始日同日を1日目とした)の腹腔内投与を行った。投与期間中は一般状態を観察するとともに週1回体重、摂餌量および摂水量を測定した。投与終了後3日目にイソフルランにより全身麻酔後、深麻酔下で開腹し腹大動脈より放血により安楽死させ、主要臓器を採材、重量測定後に液体窒素に浸せ

A. 研究目的

2-ニトロアニソールについて動物体細胞レベルでの点突然変異誘発性を*gpt*アッセイにより検出し、Ames試験では既知の報告と同様な結果が得られるかの検証を行う。

B. 研究方法

B1. *gpt*アッセイ

きして凍結材料を作成した。陽性対照群は投与終了後 26 日目に試験群と同様に主要臓器採材および凍結を行った。肝臓から“RecoverEase™ DNA Isolation Kit”でゲノム DNA を抽出し、*gpt* 遺伝子点突然変異体の頻度測定を行った。膀胱のゲノム DNA 抽出は同キットでは推奨されていないためフェノールクロロホルム抽出にて行った。

## B2. Ames 試験

Ames 試験ではアセトンを溶媒とし、*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537 菌株（以下 TA98、TA100、TA1535、TA1537 菌株）および *Escherichia coli* WP2uvrA 菌株（以下 WP2uvrA 菌株）を用いて、代謝活性化法を用いない場合と用いた場合についてプレインキュベーション法によって試験を行った。用量設定試験の結果から、本試験では 2-ニトロアニソールの 2500  $\mu$ g/プレート を最高用量とし、以下公比 2 で除した 5 用量を設定した。

### <倫理面への配慮>

動物実験は日本エスエルシー株式会社実験動物福祉委員会の承認に基づき実施した。特に動物福祉 3 R 原則に則って動物飼育、動物実験を行い、動物の処置には倫理規定に十分配慮し、実験中、実験終了時ならびに安楽死においても苦痛に配慮した。また、申請者ならびに研究協力者の健康保持のため本研究で使用する被験物質、各実験で使用する薬品は安全キャビネット等で厳重に注意して取り扱った。

## C. 研究結果

### C1. *gpt* アッセイ

2-ニトロアニソールを 0, 87.5, 175 または

350mg/kg 体重/day (1 日 1 回) の用量で、28 日間の反復強制経口投与を行ったラット肝臓における *gpt* アッセイの結果、*gpt* 遺伝子点突然変異体頻度は陰性対照群 (0 mg/kg 体重/day) で  $7.77 \times 10^{-6}$ 、低用量群 (87.5mg/kg 体重/day) で  $27.68 \times 10^{-6}$ 、中用量群 (175 mg/kg 体重/day) で  $21.66 \times 10^{-6}$ 、高用量群 (350 mg/kg 体重/day) で  $34.89 \times 10^{-6}$  であった。陰性対照群と比較してそれぞれ 3.56 倍、2.79 倍、4.49 倍の変異体頻度を示した。ANOVA-Dunnett's test により、低用量群と高用量群は有意に高い *gpt* MF 値であるという結果を得た。中用量群のみ有意差が付かなかった ( $p=0.08$ ) が、これは対照群の SD が大きいためと思われる (図 1)。

膀胱における *gpt* アッセイはゲノム DNA 抽出量の不足およびパッケージング効率が低値であったため点突然変異頻度の測定は出来なかった。

### C2. Ames 試験

用量設定試験では、2-ニトロアニソールの最高用量を 5000  $\mu$ g/プレート として、以下 2500、1250、625、313 および 156  $\mu$ g/プレートの計 6 用量を設定した。その結果、2500  $\mu$ g/プレート以上の用量で代謝活性化法の有無にかかわらず、すべての菌株に著しい生育阻害が認められた。TA100 菌株では、溶媒対照群に比較して 2-ニトロアニソールの 156~1250  $\mu$ g/プレートの用量域で非代謝活性化系 (-S9 mix) では最大約 4.5 倍の、代謝活性化系 (+S9 mix) では最大約 3.5 倍の用量依存的なコロニー数の増加が認められた。

用量設定試験の結果から、本試験では、2500  $\mu$ g/プレート を最高用量として、以下、公比 2 で除した 5 用量を設定した。その結果、用量設定



試験と同様に TA100 菌株においては、溶媒対照群に比較して 2-ニトロアニソールの 78.1~625  $\mu\text{g}$ /プレート の用量域で、非代謝活性化系 (-S9 mix) では最大約 4.5 倍、代謝活性化系 (+S9 mix) では最大約 3.0 倍の用量依存的なコロニー数の増加が認められた。また、本試験の代謝活性化系 (+S9 mix) では、TA1535 菌株 および WP2uvrA 菌株で、313 および 625  $\mu\text{g}$ /プレート においてコロニー数の増加が認められたが、その他の処理法および菌株では用量設定試験および本試験でコロニー数の増加は認められなかった。

なお、用量設定試験では 2500  $\mu\text{g}$ /プレート 以上で、本試験では 1250  $\mu\text{g}$ /プレート 以上で一部の菌株に散発的にコロニー数の増加が認められたが、著しい菌の生育阻害下で生じた微細なコロニーの増加に基づくものであり、revertants ではない可能性が高いことから結果の評価から除外した。(図 2)

#### D. 考察

##### D1. *gpt* アッセイ

用量依存性は明らかでないものの、複数の投与群で有意な MF 増加が見られたことから、陽性と判定される。なお、陽性対照群では顕著な MF 増加が認められ、アッセイは適切に行われたと考える。

膀胱については高分子、高純度なアッセイに適するゲノム DNA を抽出できなかった原因として、膀胱そのものが小さな臓器であり膀胱粘膜が微小组織であるためと推察される。

##### D2. Ames 試験

TA100 菌株における復帰突然変異コロニー数の増加は、代謝活性化系の有無にかかわらず用量依存的に認められ、用量設定試験と本試験で良

好な再現性が認められたことから、2-ニトロアニソールは同菌株において復帰突然変異誘発性を有すると判断した。同様な結果は既存の報文にも報告されている。なお、本試験の代謝活性化系で TA1535 菌株と WP2uvrA 菌株にコロニー数の増加が認められた事について、一部の報文では 2-ニトロアニソールが TA1535 菌株において復帰突然変異誘発性を有すると報告されているが、一定の反応傾向は認められていない。また、WP2uvrA 菌株については 2-ニトロアニソールの報文はなかった。これらの菌株は、復帰突然変異誘発性を有すると判断された TA100 菌株と同様に塩基対置換型突然変異の検出用菌株であることから、復帰突然変異を誘発した可能性も否定できないが、用量設定試験と本試験の間に再現性が認められなかったことから、今回の試験結果からは 2-ニトロアニソールの両菌株での突然変異誘発性の判断は難しいと考えられた。

#### E. 結論

##### E1. *gpt* アッセイ

本試験において用量依存性は明らかでないが、2-ニトロアニソールの肝臓での点突然変異誘発性の検出が可能であることが示唆された。膀胱については今後の検討課題とする。

##### E2. Ames 試験

2-ニトロアニソールは、TA100 菌株において代謝活性化系の有無にかかわらず明確な復帰突然変異の誘発が認められ既存の報告と同様の結果が得られた。

F. 健康危機情報、  
なし

G. 研究発表等

論文発表等

なし

学会発表等

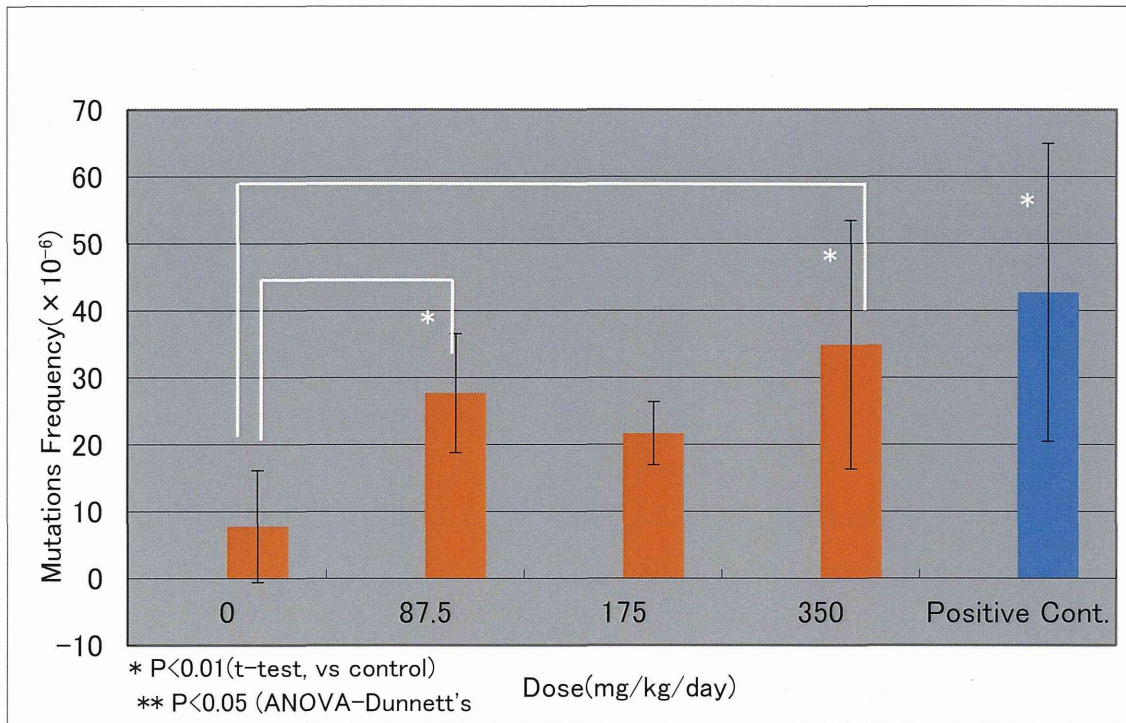
なし

報道発表等

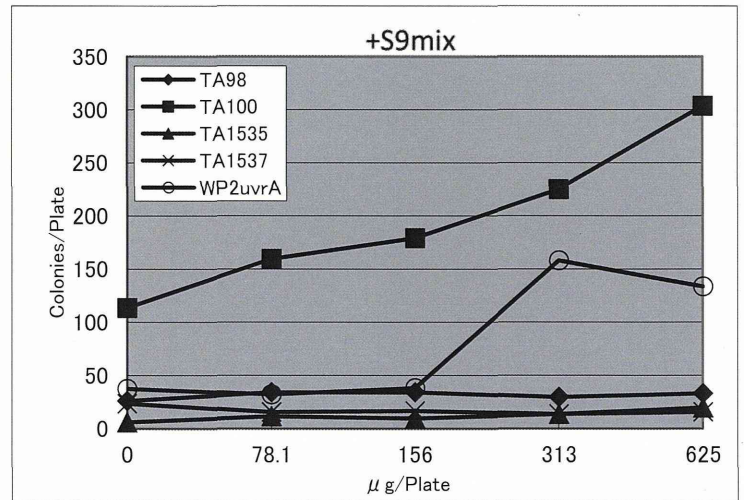
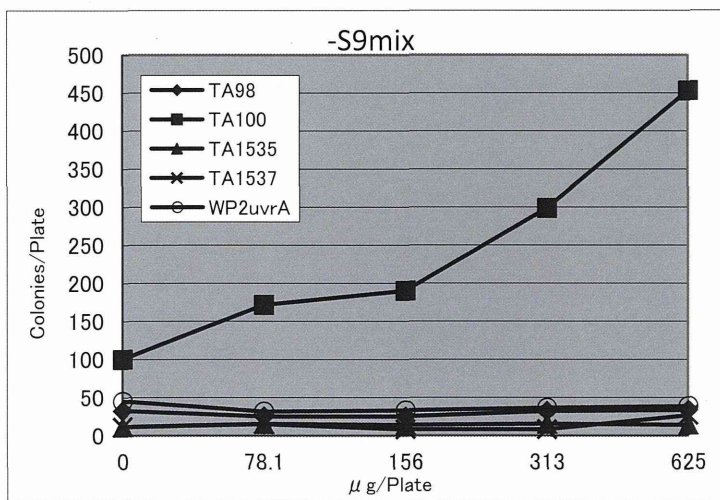
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



☒ 1 Mutation frequency of *gpt* transgene in 2-nitro anisole-treated rat (liver)



☒ 2 Induction of reverse mutations in Salmonella and *E. coli* tester strains with 2-nitro anisole

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）  
委託業務成果報告書

担当研究課題 コメットアッセイ・小核試験等の *in vivo* 試験の組合せ研究

担当責任者 松元 郷六 一般財団法人残留農薬研究所 毒性部副部長兼遺伝毒性研究室長

研究要旨 F344 ラットを用いた膀胱と肝臓におけるコメットアッセイおよび骨髄小核試験によって、2-ニトロアニソール (2-NA) の遺伝毒性評価を行った。さらに 2-NA を投与された遺伝子改変ラットから得た血液で *Pig-a* アッセイを行った。その結果、膀胱コメットアッセイは陰性であったが、8-オキソグアニン DNA グリコシラーゼである hOGG1 を用いて DNA 酸化損傷の検出を試みた結果、陽性であった。肝臓コメットアッセイ、肝臓 hOGG1 コメットアッセイ、骨髄小核試験、および *Pig-a* アッセイは全て陰性であった。以上の結果より、DNA 酸化損傷が 2-NA の膀胱発がんにかかわっている事が示唆された。小核試験と通常のコメットアッセイでは 2-NA の遺伝毒性を検出できなかったことから、試験の組み合わせとして別の試験系、例えば *in vivo* で遺伝子突然変異を検出する試験系などの必要性があると考えられた。

研究協力者

一般財団法人残留農薬研究所

和田 邦生 遺伝毒性研究室主任研究員  
竹澤 祐造 遺伝毒性研究室主任技師  
阿部 美咲樹 遺伝毒性研究室主任技師  
林 宏一 神経毒性研究室主任技師  
西野 里沙子 急性・免疫毒性研究室研究員

ある 2-NA をモデル化合物として、*in vivo* 試験であるコメットアッセイと小核試験を同一動物で行った。さらに、2-NA を 28 日反復経口投与されたラットから採取された血液を用いて、新規の *in vivo* 遺伝毒性試験である *Pig-a* アッセイを行った。これらの試験データから、感度、検出可能時期の点から最適な試験法の組合せを検討した。

A. 研究目的

2-ニトロアニソール (2-NA) は F344 ラットに膀胱、腎臓、および大腸に腫瘍を引き起こす (Irwin et al., *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1996)。また、復帰突然変異試験において陽性の遺伝毒性物質である (Haworth et al., *Environ. Mutagen.*, 1983)。本研究は、遺伝毒性物質で

過去に、SD ラットを用いた 2-NA の膀胱コメットアッセイで陰性の報告がある (Wada et al., *Mutat. Res.*, 2012)。コメットアッセイは DNA 切断、アダクト等を検出するが、2-NA において、コメットアッセイでは検出感度が低い別のタイプの DNA 損傷を引き起こしている可能性も考えられた。そこで我々は DNA 酸化損傷に着目し、