

ヒト8-オキソグアニンDNAグリコシラーゼであるhOGG1 (human 8-oxoguanine DNA glycosylase 1) をコメットアッセイに応用し、DNA酸化損傷の一つである8-oxo-deoxyguanosine (8-oxo-dG)の検出を試みた。また酸化損傷を抑える目的で抗酸化剤の一つ Glutathione-SH (GSH)を2-NAと同時に投与する群を設けた。

B. 研究方法

B. 1. 投与方法

1週間馴致した7週齢の雄F344ラットを用いた。本系統は発がん性試験で用いられた系統である。2-NAはコーンオイルに混和して用いた。GSHは生理食塩液に均一に懸濁させた。陽性対照EMS (Ethyl methanesulfonate) は生理食塩液に溶解させた。いずれの薬物も動物に強制経口投与した。コメットアッセイと小核試験を同じ動物で行うため、3回投与のプロトコールを採用した。すなわち、初回投与24時間後に2回目投与、その21時間後に3回目投与を行った。用量設定試験は250, 350, 500, 700 mg/kgの用量で行った。その結果に基づき (C. 1. 用量設定試験の死亡率と臨床症状を参照)、本試験では125, 250, 500 mg/kgの3用量を設定した。さらに500 mg/kgとGSH 1000 mg/kgの同時投与群、陰性対照群、および陽性対照群を加えた。なお、陽性対照群は2回強制経口投与を行った。

B. 2. コメットアッセイ

3回投与3時間後に動物を炭酸ガスにより安楽死させ、臓器採取を行った。外側左葉の一部から切り出した肝臓と、半分に切断した膀胱を、冷却したMincing buffer (20 mM EDTA-2Na, 10%

DMSO含有ハンクス平衡塩類溶液 (CaおよびMgイオン不含)、肝臓pH 7.5、膀胱pH 9.0) で洗った後、数十分インキュベートした。その後、組織片は冷却したMincing bufferの中で眼科鉗により20秒刻んだ。得られた細胞懸濁液は数十秒静置した後、上清をコメットアッセイに用いた。残った肝臓外側左葉の一部と膀胱の半分は10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、必要な場合に病理組織学的検査に用いるため保存した。

上清(細胞浮遊液)と0.5%低融点アガロース (NuSieve GTG Agarose, Lonza, Basel, Switzerland) D-PBS溶液を1:10の割合で混和し、予め1.0%正常融点アガロース (GP-42, ナカライテスク株式会社) D-PBS溶液でコーティングしたスライドガラス (松浪硝子工業株式会社) に80 μ L滴下した。寒天が固化した後に、冷却した細胞溶解液 (2.5M NaCl, 100 mM EDTA-2Na, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10) に浸した。1サンプル (1動物1臓器1処理) あたり2枚のスライド標本作製した。

細胞溶解後、DNA酸化損傷を計測する目的でhOGG1コメットを行った。方法はSmith et al., Mutagenesis, 2006を参考にした。スライドを冷却したバッファーF (40mM HEPES, 100mM KCl, 0.5mM EDTA 2K, 0.2 mg/mL BSA, pH 8.0) で2回洗浄後、2箇所区切られたスライド上の1箇所にバッファーFを添加し、コントロールとした。もう1箇所はバッファーFで16 Unit/mLの濃度に調整したhOGG1 (New England BioLabs Inc.,) を添加し、37°C30分反応させ、DNA酸化損傷である8-oxo-dGをDNA切断に変換した後に電気泳動に用いた。

冷却した超純水でスライドを洗浄後、サブマリン型電気泳動槽 (BE-540, 株式会社バイオクラフト, 東京都) に並べ, 予め 4°C に冷えた電気泳動液 (300 mM NaOH, 1 mM EDTA-2Na, pH>13) を標本が完全に浸るまで静かに注いだ。20 分間静置した後, 25 V (0.7 V/cm), 270~300 mA で 20 分間冷蔵暗所 (4°C) の条件下で電気泳動を行った。電気泳動が終了した標本は中和液 (400 mM Tris-HCl, pH 7.5) で 5 分間処理した後, エタノールで 5 分間脱水し乾燥させた。

TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA-2Na, pH 7.5) で 10,000 倍に希釈した SYBR Gold (SYBR® Gold nucleic acid gel stain, Life Technologies Corporation, CA, U.S.A.) を標本に滴下し染色後, 純水で洗浄し, カバーガラスをかぶせた。スライド標本は B 励起のミラーユニットを備えた落射蛍光顕微鏡 (BX51, オリンパス光学株式会社) で観察した。電気泳動によって得られた各組織サンプルの泳動像 (コメット像) は CCD カメラを通して, コメットアッセイ解析装置 (Komet 5.5, Andor Technology plc, Belfast, UK) に取り込んだ後, 画像解析を実施した。2 枚のスライドを用いて, 1 スライドあたり 50 個ずつ, 1 サンプルあたり合計 100 個のコメット像を解析した。計測したパラメーターは DNA 損傷の検出において信頼性の高い測定指標である % tail DNA (像全体に対するテールで検出される蛍光の割合) とした。

各スライド 50 個の % tail DNA の中央値を求め, 2 枚のスライドの中央値の平均値をサンプルごとに算出した。被験物質処理群は Dunnett の多重検定を用いて, 溶媒対照群と統計学的に比較した。陰性対照群と陽性対照物質投与群のデータについては, 等分散性の F 検定を実施し,

等分散であるという判定が出た場合には, Student の t 検定を用いて群間の有意差の有無を調べ, 等分散でない判定が出た場合には, Aspin-Welch の t 検定を行った。なお, いずれの検定法も有意水準を 5% 以下に設定した。

B. 3. 骨髓小核試験

コメットアッセイの動物から臓器を取り出すと同時に小核試験用に片側大腿骨を摘出した。摘出した大腿骨の一端からウシ胎仔血清 (GIBCO®, Life Technologies Corporation, CA, U.S.A.) を注入し, 骨髓細胞を遠沈管へ洗い出した。骨髓細胞浮遊液を遠心分離し, 余分の血清を廃棄した。遠沈管に残った少量の血清に細胞を再浮遊させた。骨髓細胞浮遊液の小滴をスライドグラスに取り, カバーガラスを用いて細胞を均等に塗抹した。各動物あたり 2 枚の塗抹標本を作製した。骨髓細胞を十分乾燥させた後, 標本はメタノールで 5 分間固定した。1 動物につき 1 枚の標本を観察時にアクリジンオレンジ液 50 µg/mL で染色し, 1/15 M リン酸緩衝液で洗浄後, カバーガラスをかけ落射蛍光顕微鏡で観察した (Hayashi et al., *Mutat Res.*, 1983)。残りの 1 枚は予備標本とした。

標本はコメットアッセイと同様に B 励起のミラーユニットを備えた落射蛍光顕微鏡下 1000 倍にて観察を行い, 小核を有する多染性赤血球の出現頻度と骨髓抑制の指標である多染性赤血球の割合を調べた。小核を有する多染性赤血球の出現頻度 (小核出現頻度) については, 多染性赤血球を 4000 個観察し, その中で小核を持った多染性赤血球を数え, 下記の計算式に従って小核出現頻度 (%) を求めた。また, 多染性赤血球の割合については, 多染性赤血球と正

染性赤血球をあわせて 1000 個観察し、その中に占める多染性赤血球の割合 (%) を下記の計算式に従って求めた。

$$\text{小核出現頻度 (\%)} = \frac{\text{MNPCE}}{\text{PCE}} \times 100$$

多染性赤血球の割合 (%)

$$= \frac{\text{PCE}}{\text{PCE} + \text{NCE}} \times 100$$

MNPCE : 小核を有する多染性赤血球数

PCE : 多染性赤血球数

NCE : 正染性赤血球数

アクリジンオレンジ染色による小核の判定は、1) 赤血球中に存在している核であること、2) 大きさが成熟赤血球の直径 1/2 以下であること、および 3) 近接する白血球の核と同じ染色性 (緑色) をしていることを基準とした。多染性赤血球は赤色であるのに対して、正染性赤血球は染色されず黒く抜けた像として観察した。

B. 4. *Pig-a* アッセイ

日本エスエルシー株式会社で処置されたラットから採取された血液を *Pig-a* アッセイに使用した。以下に概要を示す。Slc:WistarHannover/Rcc-Tg (*gpt delta*) ラット、9 週齢の雄、25 匹に 87.5, 175, 350 mg/kg の用量で 28 日間の反復経口投与が行われた。陽性対照は ENU の 50 mg/kg を用いて 5 日間反復経口投与が行われた。投与前、投与 1, 2, 4 週間後の動物から採血が行われ、その血液を

Pig-a アッセイに用いた。赤血球をモノクローナル抗体 CD59 および HIS49 (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) で染色し、GPI アンカーと会合する CD59 が欠損し、かつ HIS49 で染色された赤血球をフローサイトメトリー (FACS verse) で調べることで、*Pig-a* 変異細胞を検出した。赤血球を 100 万個測定し、その中で CD59 陰性赤血球の数をカウントした。*Pig-a* 変異頻度を CD59 陰性赤血球数/全赤血球数で求め、陰性対照群と被験物質投与群との間で統計解析を行った。統計解析は Bartlett 検定 (等分散の検定) を行ない、 $p > 0.05$ の場合は Dunnett 検定を実施した。 $p < 0.05$ の場合は Steel 検定を実施した。

<倫理面への配慮>

当該試験は一般財団法人残留農薬研究所動物実験規程に基づいて実施した。

C. 研究結果

C. 1. 用量設定試験の死亡率と臨床症状

用量設定試験は 250, 350, 500, 700 mg/kg で行った。その結果、2 回目投与後 1 時間に 700 mg/kg 投与群で昏睡等の症状により安楽死処分された。その他の群では死亡例は認められなかった。なお、安楽死処分は動物が耐え難い苦痛を伴っていると判断されたため、当研究所動物実験規程に基づいて実施した。

臨床症状を Table 1 に示す。250 mg/kg 群に一般状態の異常は観察されなかった。350 mg/kg 群は自発運動低下と左目閉眼が観察された。500 mg/kg 群では自発運動低下と軟便が観察された。700 mg/kg 群では立毛、自発運動低下、脱毛、流涙、尾の蒼白、削瘦、歩行失調、起立

不能、自発運動消失、体温下降、昏迷、昏睡が観察された。

C. 2. 本試験

C. 2. 1. 本試験の死亡率と臨床症状

本試験は 125, 250, 500 mg/kg および 500 mg/kg と GSH 1000 mg/kg の同時投与群の 4 群に加え、陰性対照群、陽性対照群を用いた。全例で死亡例は認められなかった。臨床症状を Table 2 に示す。125 および 250 mg/kg 群に一般状態の異常は観察されなかった。500 mg/kg 群には立毛、自発運動低下、流涙、歩行失調、消瘦が観察された。500 mg/kg と GSH 同時投与群では 500 mg/kg 群の症状に加え円背位が観察された。よって本試験は十分に高い用量で試験が実施されたものと考えられた。

C. 2. 2. 体重変化

体重変化を Table 3 に示す。陰性対照群の平均体重は投与前に比べて増加した。一方、2-NA 投与群は 500 mg/kg 群と 500 mg/kg と GSH 同時投与群で平均体重が投与前に比べて低下した。よって体重変化の点でも本試験は十分に高い用量で試験が実施された事が示された。陽性対照群の平均体重は投与前に比べてわずかに減少した。

C. 2. 3. コメットアッセイ結果

C. 2. 3. 1. 膀胱

膀胱コメットアッセイの結果を Table 4 と Fig. 1 に、個体別結果を Table 6 に示す。

バッファーを処理したスライドでは、投与群の平均% tail DNA は 125 mg/kg 投与群で 4.48, 250 mg/kg 投与群で 1.63, 500 mg/kg 投与群で

3.07, 2-NA と GSH 同時投与群で 2.49 であり、% tail DNA が 4.33 を示した溶媒対照群と比べて、有意な増加は認められなかった。一方、EMS を処理した陽性対照群における平均% tail DNA は 16.88 であり、溶媒対照群と比べて統計学的に有意な増加が認められた。

hOGG1 を処理したスライドでは、投与群の平均% tail DNA は 125 mg/kg 投与群で 9.09, 250 mg/kg 投与群で 9.47, 500 mg/kg 投与群で 21.90, 2-NA と GSH 同時投与群で 13.76 であり、% tail DNA が 5.19 を示した溶媒対照群と比べて、500 mg/kg 投与群で有意な増加が認められた。一方、EMS を処理した陽性対照群における平均% tail DNA は 23.71 であり、溶媒対照群と比べて統計学的に有意な増加が認められた。

C. 2. 3. 2. 肝臓

肝臓コメットアッセイの結果を Table 5 と Fig. 2 に、個体別結果を Table 6 に示す。

バッファーを処理したスライドでは、投与群の平均% tail DNA は 125 mg/kg 投与群で 1.03, 250 mg/kg 投与群で 1.14, 500 mg/kg 投与群で 1.12, 2-NA と GSH 同時投与群で 1.03 であり、% tail DNA が 0.90 を示した溶媒対照群と比べて、有意な増加は認められなかった。一方、EMS を処理した陽性対照群における平均% tail DNA は 31.55 であり、溶媒対照群と比べて統計学的に有意な増加が認められた。

hOGG1 を処理したスライドでは、投与群の平均% tail DNA は 125 mg/kg 投与群で 1.56, 250 mg/kg 投与群で 1.75, 500 mg/kg 投与群で 1.71, 2-NA と GSH 同時投与群で 1.47 であり、% tail DNA が 1.29 を示した溶媒対照群と比べて、有意な増加は認められなかった。一方、EMS を処理

した陽性対照群における平均% tail DNA は 36.79 であり、溶媒対照群と比べて統計学的に有意な増加が認められた。

C.2.4 骨髄小核試験結果

C.2.4.1 小核出現頻度

小核出現頻度の結果を Table 7 に、個別別結果を Table 8 に示す。

陰性対照群における小核出現頻度は 0.200% であった。それに対して、検体投与群の小核出現頻度は 0.180~0.280% であり、いずれの用量群においても陰性対照群と比べて有意な増加は認められなかった。一方、EMS を投与した陽性対照群の小核出現頻度は 2.605% であり、有意な増加が認められた。

C.2.4.2 多染性赤血球の割合

多染性赤血球の割合を Table 7 に、個別別結果を Table 8 に示す。

陰性対照群における多染性赤血球の割合が 57.32% であったのに対して、検体投与群の多染性赤血球の割合は 54.74~58.40% であり、いずれの用量群においても被験物質による有意な骨髄抑制は認められなかった。EMS を投与した陽性対照群の多染性赤血球の割合は 55.94% であり、有意な骨髄抑制は認められなかった。

C.3. *Pig-a* アッセイ結果

投与群別の結果を Table 9 に、個別別の結果を Table 10 に示す。投与前、投与開始 1, 2, 4 週後の全ての期間において、陰性対照群における平均 CD59 陰性赤血球は 0.0~1.2 の範囲であった。それに対して、2-NA の平均 CD59 陰性赤血球は 0.0~1.4 であり、いずれの期間のい

れの用量群においても陰性対照群と比べて有意な増加は認められなかった。一方、陽性対照 EMS の投与群では投与開始 2 週目から平均 CD59 陰性赤血球は 31.2 と有意な増加が認められ、4 週目は 73.4 とさらに増加していた。

D. 考察

膀胱コメットアッセイは通常の条件下では陰性であり、膀胱にアダクトは確認されなかった。これは既知の報告とも一致している³⁾。一方、hOGG1 を処理すると高用量群で強い DNA 損傷が認められた。すなわち膀胱で DNA 酸化損傷がおき、8-oxo-dG が生成されることが、2-NA による膀胱発がん原因の一つと考えられた。

2-NA のニトロ基がアミノ基となった物質に o-Anisidine (OA) があり、2-NA 同様に膀胱発がん物質である。OA と 2-NA の共通の代謝物 N-(2-methoxyphenyl)hydroxylamine が i.p. 投与されたラット膀胱 DNA にアダクトを作ると報告されている (Naiman et al., *Mutat Res.*, 2011)。以前の我々のデータでは OA をラットに経口投与した膀胱コメットアッセイ陰性であった (Wada et al., *Mutat. Res.*, 2014)。さらに別の報告では OA 膀胱にアダクトを検出しなかったと報告があり (Ashby et al., *Carcinogenesis*, 1994)、そこでは酸化損傷が示唆されている。事実 OA は酵母でフリーラジカルを生成し、酸化損傷を引き起こすと報告がある (Brennan et al., *Mutat. Res.*, 1999)。今回 2-NA は膀胱で酸化損傷を強く引き起こした。これらのデータから、2-NA と OA の共通代謝物 N-(2-methoxyphenyl)hydroxylamine が水酸基をもつ構造から、恐らく膀胱において DNA 酸化損傷を引き起こす事が、発がんメカニズム

の一つと考えられる。事実、抗酸化剤 GSH を同時投与した際に DNA 損傷が減少すること、および膀胱は肝臓より細胞内グルタチオン濃度が低く、抗酸化作用が弱い (Mohandas et al., Cancer. Res., 1984) というデータからも裏付けられる。よって、2-NA の膀胱発がんのメカニズムは、既知の報告にある DNA 付加体によるものだけではなく、DNA 酸化損傷が存在するためと考えると *in vitro* での弱い遺伝毒性を説明でき合理的である。今後、膀胱の遺伝子突然変異の解析を行い、酸化損傷由来の変異が検出されるか否かを確かめる必要がある。

通常のコメットアッセイでは 2-NA は陰性であった。コメットアッセイは DNA 切断やアダクトを検出する系である。8-oxo-dG は、アルカリ条件下で切断に変換されにくい損傷、すなわちコメットアッセイにおいて検出が困難な DNA 損傷であるということが今回分かった。今後、酸化損傷が疑われる OA や、酸化損傷物質としてすでに知られている臭素酸カリウム、酸化損傷のデータが少ないカドミウムクロライドなどの遺伝毒性物質を hOGG1 コメットで確認してみる必要がある。

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。小核試験は骨髄の染色体異常を検出する試験である。一般的に経口投与された被験物質は生体内で、吸収、代謝、体内循環、排泄という過程を経るが、体内循環以降に薬物または代謝物に暴露される膀胱などの臓器は、小核試験によって検出しにくい可能性が高い。例えば OA は小核試験で陰性である (Ashby et al., Mutat. Res., 1993)。小核試験単独では骨髄以外に作用を示す発がん物質を見逃す可能性があり、今回のテーマである 2 つの *in vivo* 試験の組み合わせが極めて重要である。2-NA は通常のコメットアッセイで陰性であったことから、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示唆された。

ん物質を見逃す可能性があり、今回のテーマである 2 つの *in vivo* 試験の組み合わせが極めて重要である。2-NA は通常のコメットアッセイで陰性であったことから、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示唆された。

E. 結論

以上の結果より、hOGG1 処理により、2-NA の膀胱発がんメカニズムに DNA 酸化損傷が示唆された。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示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表等

論文発表等

1) なし

学会発表等

1) なし

報道発表等

1) なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) なし

Table 1 Individual clinical observation in the dose range-finding test

Treatment	Dose (mg/kg)	Time after the first administration (hr)						
		First day		Second day			Third day	
		1	4	24	25	28	45	48
2-NA	250 x 3	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-
	350 x 3	-	D	-	-	-	D	-
		-	-	-	-	-	D	-
		-	D, Li	-	-	-	D	-
	500 x 3	-	D	-	-	-	D, L	-
		-	D	-	-	-	D, L	-
		-	D	-	-	-	D	-
	700 x 3	D	A, D, P	A, D, Em, La	C, E			
		-	D	-	A, Lo, S	Em, Hy, Lo, Pa	D, Em, P	An, Em, Lo, Lf
		-	D, P	-	P	Lo	D, Em, P	At, Em, Lo, Lf

2-NA: 2-Nitroanisole

- : No abnormalities detected

A : Ataxic gait

An : Ananastasia

C : Coma

D : Decrease in spontaneous motor activity

E : Euthanasia

Em : Emaciation

Hy : Hypothermia

L : Loose stool

La : Lacrimation

Lf : Loss of fur

Li : Lid closure (left)

Lo : Loss of spontaneous motor activity

P : Piloerection

Pa : Pale skin (tail)

S : Stupor

Table 2 Individual clinical observation in the main test

Treatment	Dose (mg/kg)	Time after the first administration (hr)						
		First day		Second day			Third day	
		1	4	24 *	25	28	45	48
Vehicle (Corn oil)	0 x 3	-	-	-	-	-	-	- E
		-	-	-	-	-	-	- E
		-	-	-	-	-	-	- E
		-	-	-	-	-	-	- E
		-	-	-	-	-	-	- E
2-NA	125 x 3	-	-	-	-	-	-	- E
		-	-	-	-	-	-	- E
		-	-	-	-	-	-	- E
		-	-	-	-	-	-	- E
		-	-	-	-	-	-	- E
	250 x 3	-	-	-	-	-	-	- E
		-	-	-	-	-	-	- E
		-	-	-	-	-	-	- E
		-	-	-	-	-	-	- E
		-	-	-	-	-	-	- E
	500 x 3	D	-	-	-	A, D, Em, P	Em	D, E, Em, P
		D	-	-	-	A, D, Em, P	Em	D, E, Em, P
		D	-	-	-	A, D, Em, P	D, Em	A, D, E, Em, P
		D, La	-	P	D, P	A, D, Em, P	Em	D, E, Em, P
		D, La	-	P	D, P	A, D, Em, P	Em	A, D, E, Em, P
2-NA GSH	500 x 3	-	-	-	-	A, D, Em, H, P	Em	D, E, Em, P
		-	-	-	-	A, D, Em, H, P	Em	D, E, Em, P
	1000 x 3	-	-	-	-	A, D, Em, P	Em	D, E, Em, P
		D	-	-	-	A, D, Em, P	Em	A, D, E, Em, P
		D	-	-	-	A, D, Em, P	Em	D, E, Em, P
EMS	200 x 2	/	/	-	-	-	-	- E
		/	/	-	-	-	-	- E
		/	/	-	-	-	-	- E
		/	/	-	-	-	-	- E
		/	/	-	-	-	-	- E

2-NA: 2-Nitroanisole

GSH: Glutathione-SH

EMS: Ethyl methanesulfonate

- : No abnormalities detected

A : Ataxic gait

D : Decrease in spontaneous motor activity

E : Euthanatized for sampling

Em : Emaciation

H : Hunchback position

La : Lacrimation

P : Piloerection

* : The first administration in the EMS-treated group

Table 3 Body weight in the main test

Treatment	Dose (mg/kg)	Body weight (g)							
		Initial			Terminal			Gain	
Vehicle (Corn oil)	0 x 3		144.4			149.2			4.8
			143.3			150.1			6.8
			153.8			161.2			7.4
			148.5			153.3			4.8
			156.9			164.5			7.6
			149.4	±	5.9	155.7	±	6.8	6.3
	125 x 3		163.9			166.4			2.5
			153.2			156.5			3.3
			161.7			162.8			1.1
			158.2			160.7			2.5
			145.1			146.2			1.1
			156.4	±	7.5	158.5	±	7.8	2.1
2-NA	250 x 3		149.9			154.9			5.0
			157.4			162.5			5.1
			155.2			158.5			3.3
			142.3			147.9			5.6
			156.4			155.4			-1.0
			152.2	±	6.3	155.8	±	5.4	3.6
	500 x 3		147.1			132.4			-14.7
			152.5			144.4			-8.1
			159.1			149.6			-9.5
			145.8			133.3			-12.5
			157.9			145.7			-12.2
			152.5	±	6.1	141.1	±	7.8	-11.4
2-NA GSH	500 x 3 1000 x 3		142.3			137.8			-4.5
			148.0			143.0			-5.0
			156.0			145.0			-11.0
			150.6			145.6			-5.0
			151.4			143.4			-8.0
	149.7	±	5.0	143.0	±	3.1	-6.7	±	2.8
EMS	200 x 2		156.4			153.9			-2.5
			147.6			146.9			-0.7
			150.8			151.2			0.4
			152.0			149.1			-2.9
			152.1	±	3.3	150.7	±	2.7	-1.4

Mean ± Standard deviation

2-NA: 2-Nitroanisole

GSH: Glutathione-SH

EMS: Ethyl methanesulfonate

Table 4 Comet assay in the urinary bladder

Treatment	Dose (mg/kg)	% Tail DNA (mean \pm S.D.)			
		Buffer		hOGG1	
Corn oil	0 \times 3	4.33	\pm 6.69	5.19	\pm 6.03
	125 \times 3	4.48	\pm 4.48	9.09	\pm 8.71
2-NA	250 \times 3	1.63	\pm 0.15	9.47	\pm 1.81
	500 \times 3	3.07	\pm 1.13	21.90	\pm 7.08 **
2-NA + GSH	500 \times 3	2.49	\pm 0.30	13.76	\pm 6.73
	1000 \times 3				
EMS	200 \times 2	16.88	\pm 5.54 *	23.71	\pm 8.10 **

2-NA: 2-Nitroanisole

GSH: Glutathione-SH

EMS: Ethyl methanesulfonate

hOGG1: human 8-oxoguanine DNA glycosylase 1

Five animals per group.

The mean % tail DNA was statistically compared with the vehicle control group.

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

Table 5 Comet assay in the liver

Treatment	Dose (mg/kg)	% Tail DNA (mean \pm S.D.)			
		Buffer		hOGG1	
Corn oil	0 \times 3	0.90	\pm 0.16	1.29	\pm 0.35
	125 \times 3	1.03	\pm 0.16	1.56	\pm 0.22
2-NA	250 \times 3	1.14	\pm 0.25	1.75	\pm 0.16
	500 \times 3	1.12	\pm 0.35	1.71	\pm 0.22
2-NA + GSH	500 \times 3	1.03	\pm 0.19	1.47	\pm 0.62
	1000 \times 3				
EMS	200 \times 2	31.55	\pm 3.49 ***	36.79	\pm 3.42 ***

2-NA: 2-Nitroanisole

GSH: Glutathione-SH

EMS: Ethyl methanesulfonate

hOGG1: human 8-oxoguanine DNA glycosylase 1

Five animals per group.

The mean % tail DNA was statistically compared with the vehicle control group.

***, $p < 0.001$.

Table 6

Individual values of the comet assay

Treatment	Dose (mg/kg)	% Tail DNA			
		Urinary bladder		Liver	
		Buffer	hOGG1	Buffer	hOGG1
Vehicle (Corn oil)	0 x 3	1.01	1.44	0.99	1.41
		0.98	1.52	1.05	1.59
		2.44	5.48	0.74	1.06
		0.98	1.96	0.99	1.58
		16.25	15.55	0.72	0.79
2-NA	125 x 3	9.05	13.54	0.95	1.47
		1.11	1.81	1.20	1.46
		1.60	2.86	0.81	1.42
		9.71	22.32	1.05	1.95
		0.94	4.95	1.13	1.49
	250 x 3	1.77	6.36	1.27	1.99
		1.48	10.64	1.40	1.63
		1.80	9.88	1.22	1.81
		1.58	10.83	0.75	1.60
		1.51	9.64	1.07	1.73
500 x 3	1.88	14.07	1.31	1.86	
	2.71	17.26	1.11	1.58	
	3.22	19.93	0.71	1.64	
	2.63	31.27	1.59	2.01	
	4.90	27.01	0.87	1.48	
2-NA + GSH	500 x 3	2.11	10.19	1.04	1.04
		2.61	18.08	1.16	2.47
	1000 x 3	2.30	23.43	0.95	0.86
		2.52	9.62	1.24	1.41
		2.90	7.50	0.76	1.57
EMS	200 x 2	13.13	15.79	32.01	33.72
		12.03	15.69	30.26	34.03
		17.88	25.09	31.45	35.48
		15.43	27.27	27.19	39.27
		25.94	34.70	36.83	41.47

2-NA: 2-Nitroanisole

GSH: Glutathione-SH

EMS: Ethyl methanesulfonate

hOGG1: human 8-oxoguanine DNA glycosylase 1

Table 7 Bone marrow micronucleus test

Treatment	Dose (mg/kg)	Micronucleated reticulocytes (%)			Reticulocytes (%)		
Corn oil	0 × 3	0.200	±	0.085	57.32	±	10.61
	125 × 3	0.255	±	0.054	58.16	±	11.31
2-NA	250 × 3	0.280	±	0.119	58.00	±	8.01
	500 × 3	0.230	±	0.105	54.74	±	6.25
2-NA + GSH	500 × 3	0.180	±	0.096	58.40	±	5.39
EMS	1000 × 3	2.605	±	0.810	55.94	±	16.91
	200 × 2						

Mean ± Standard deviation

2-NA: 2-Nitroanisole

GSH: Glutathione-SH

EMS: Ethyl methanesulfonate

*** : Significantly different from the concurrent vehicle control at $p \leq 0.001$

Table 8

Individual values of the micronucleus test

Substance	Dose (mg/kg)	MNPCE/PCE	PCE/(PCE+NCE)
		%	%
Vehicle (Corn oil)	0 x 3	0.100	67.9
		0.225	49.7
		0.125	45.7
		0.250	54.3
		0.300	69.0
2-NA	125 x 3	0.225	66.5
		0.225	48.5
		0.325	69.1
		0.200	43.8
		0.300	62.9
	250 x 3	0.350	67.9
		0.300	57.8
		0.075	47.5
		0.375	63.3
		0.300	53.5
500 x 3	0.300	52.7	
	0.225	62.7	
	0.050	48.7	
	0.300	59.9	
	0.275	49.7	
2-NA + GSH	500 x 3	0.050	56.6
		0.300	50.4
	1000 x 3	0.125	59.7
		0.200	60.3
EMS	200 x 2	0.225	65.0
		3.775	72.9
		2.300	38.0
		1.550	48.9
		2.575	44.9
		2.825	75.0

2-NA: 2-Nitroanisole

GSH: Glutathione-SH

EMS: Ethyl methanesulfonate

MNPCE : Number of micronucleated polychromatic erythrocytes

PCE : Number of polychromatic erythrocytes

NCE : Number of normochromatic erythrocytes

Table 9 Pig-a assay

Treatment	Dose (mg/kg)	Ave. No. of CD59 negative red blood cells ($\times 10^{-6}$)			
		Days			
		-2	7	14	28
Corn oil	0 x 28	0.2 \pm 0.4	0.4 \pm 0.5	1.2 \pm 1.6	0.0 \pm 0.0
	87.5 x 28	1.2 \pm 0.8	0.6 \pm 0.9	0.4 \pm 0.5	0.2 \pm 0.4
2-NA	175 x 28	0.6 \pm 1.3	0.2 \pm 0.4	0.0 \pm 0.0	0.2 \pm 0.4
	350 x 28	1.4 \pm 1.1	0.2 \pm 0.4	0.2 \pm 0.4	0.0 \pm 0.0
EMS	200 x 5	1.2 \pm 1.6	2.4 \pm 1.7	31.2 \pm 7.9 **	73.4 \pm 14.3 **

2-NA: 2-Nitroanisole

EMS: Ethyl methanesulfonate

Table 10 Individual values of the pig-a assay

Treatment	Dose (mg/kg)	CD59 negative red blood cells ($\times 10^{-6}$)			
		Days			
		-2	7	14	28
Vehicle (Corn oil)	0 x 28	1	0	4	0
		0	1	0	0
		0	0	1	0
		0	1	1	0
		0	0	0	0
2-NA	87.5 x 28	1	2	1	0
		1	1	0	1
		0	0	0	0
		2	0	0	0
		2	0	1	0
	175 x 28	0	0	0	0
		0	0	0	0
		3	0	0	0
		0	1	0	0
		0	0	0	1
	350 x 28	3	0	0	0
		2	1	0	0
		1	0	0	0
1		0	0	0	
0		0	1	0	
EMS	50 x 5	1	2	41	71
		1	5	26	88
		4	1	28	69
		0	3	38	86
		0	1	23	53

2-NA: 2-Nitroanisole

EMS: Ethyl methanesulfonate

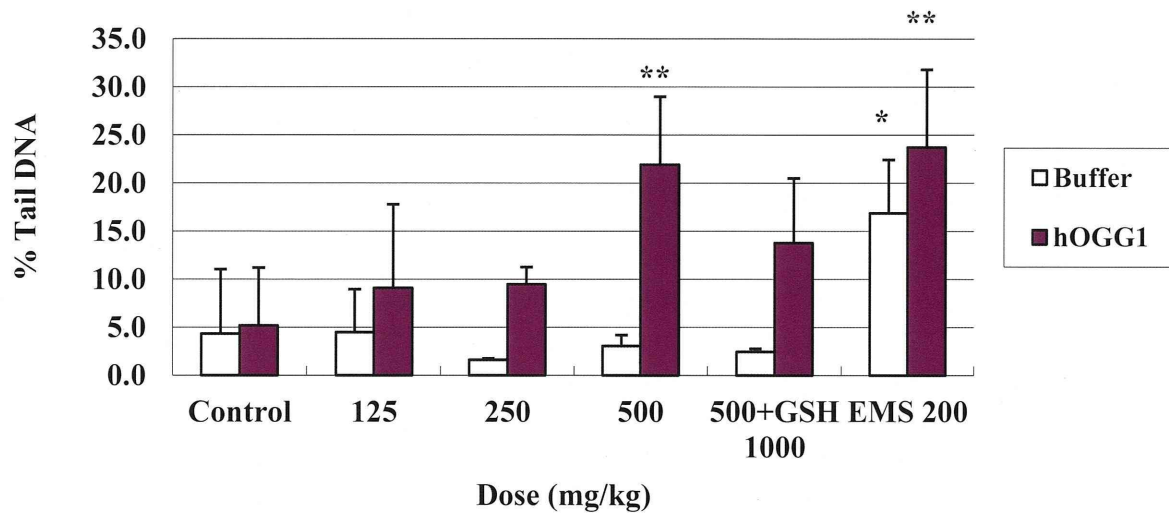


Fig. 1 The results of the normal and hOGG1 comet assay in the urinary bladder. The mean % tail DNA was statistically compared with the vehicle control group. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

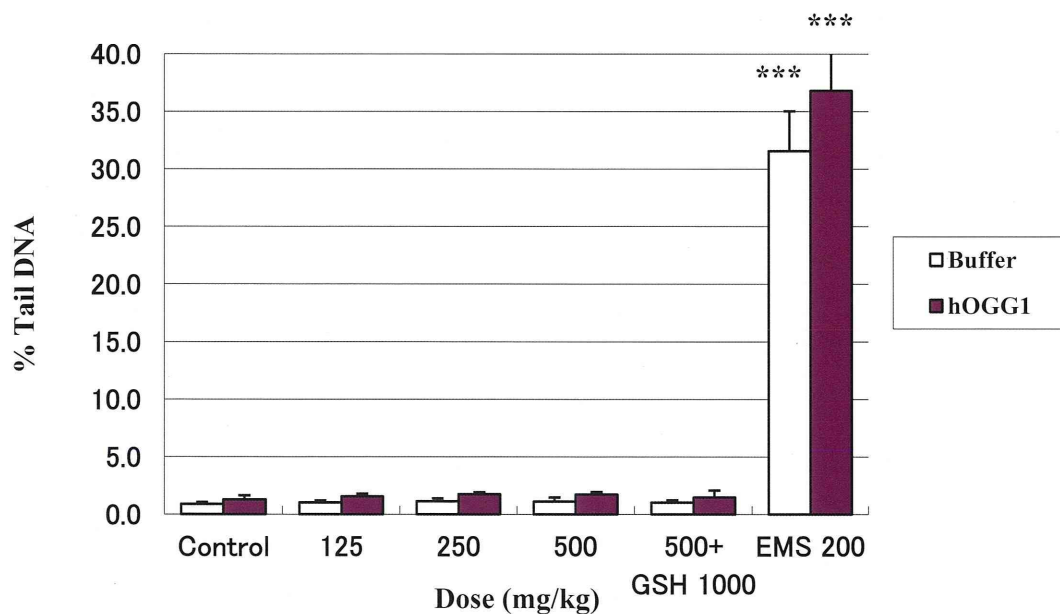


Fig. 2 The results of the normal and hOGG1 comet assay in the liver. The mean % tail DNA was statistically compared with the vehicle control group. ***, $p < 0.001$.

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 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

担当責任者 真田尚和 科研製薬株式会社 研究員

研究要旨 本研究では、タモキシフェンの遺伝毒性評価として、同一動物を用いて末梢血及び肝臓を対象とし、突然変異を含めた複数のエンドポイントを有する組合せ評価を行った。末梢血を用いた小核試験及び *Pig-a* 遺伝子突然変異試験では陰性と判断されたが、肝臓を用いた小核試験では小核誘発頻度の有意な増加が認められ、タモキシフェンの遺伝毒性を検出することが可能であった。したがって、タモキシフェンのように発がん過程に代謝活性が必要な化合物については肝臓での評価が有用であり、本組合せ評価は、直接的遺伝子障害性のみではなく、代謝過程を含めた包括的な遺伝毒性評価が期待される。

研究協力者

大隅友香 科研製薬株式会社 研究員
岡本美奈子 科研製薬株式会社 研究員
宮下泰志 科研製薬株式会社 研究員
入山昌美 科研製薬株式会社 技術者

エンドポイントでの評価を行うことは、化合物の発がん性をより正確に予測する上で重要であると考えられる。今回の検討では、造血細胞を用いた *in vivo* 小核試験に加え、イニシエーション過程においてより後期に位置する遺伝子突然変異の検出が可能な *Pig-a* 遺伝子突然変異試験を実施した。さらに、染色体異常をエンドポイントとし、代謝物評価への有用性が期待される肝細胞を用いた小核試験を同時に実施した。現在、両評価系とも複数の遺伝毒性化学物質を用いて、単回あるいは短期間投与のみではなく反復投与を含め有用性が検討されている。

A. 研究目的

近年、ICH S2 ガイドラインが改訂され、従来の Ames 試験、げっ歯類を用いる *in vivo* 小核試験ならびに哺乳類培養細胞を用いた *in vitro* 試験の組合せに加えて、オプション 2 として培養細胞を用いた *in vitro* 試験の代わりとして第 2 の *in vivo* 試験を加えた評価が可能となった。コメント試験は化学物質の曝露による DNA 初期損傷を検出できる系であり、OECD ガイドライン化されるとともに、第 2 の *in vivo* 試験として推奨されている。一般的に、発がん過程では DNA の損傷、染色体異常に続く突然変異の誘発が発がんにつながる。したがって、複数のエ

本検討では、間接的な遺伝子損傷、特に発がん過程に代謝を必要とする化合物に着目し、抗悪性腫瘍剤の一種であり、抗エストロゲン受容体阻害作用を有するタモキシフェンの評価を実施した。

B. 研究方法

動物は雄性 Cr1:CD (SD) ラットを日本チャー

ルス・リバー株式会社から購入し、6週齢で使用した。Tamoxifen citrate (和光純薬工業株式会社、Lot No. CKK7437) を 0.5w/v% Methyl Cellulose (和光純薬工業株式会社、Lot No. LAF2959) に懸濁させ 250、125、62.5 及び 31.3 mg/kg の用量で 3 日間反復経口投与を行い、最終投与後 2 日目に末梢血小核試験、7、14 及び 28 日目に *Pig-a* 遺伝子突然変異試験、28 日目に肝臓小核試験を実施した。さらに投与後の一般状態観察及び体重測定を実施した。

末梢血小核試験では、尾静脈より血液を採取後、Microflow Plus Kit (Litron Laboratories LTD) にて、フローサイトメーター (FACS Calibur, Becton Dickinson) を用いて測定した。小核は 1 個体あたり、20000 個の多染性赤血球 (PCE) を測定し、小核を有する PCE (MNPCE) の出現頻度を算出した。また、骨髄増殖への影響を検討するため、多染性赤血球数を血液検査装置 (ADVIA、バイエル) にて測定した。

Pig-a 遺伝子突然変異試験では、全血を測定対象とした RBC *pig-a* 法及び多染性赤血球を測定対象とした PIGRET 法を用いた。RBC *pig-a* 法では、血液 3 μ L を 0.2 mL の PBS(-) と混和し、FITC 抗 CD59 抗体 (BD Bioscience, Lot No. 80767) 及び erythroid marker である APC 抗 erythroid cells 抗体 (HIS49 抗体, BD Bioscience, Lot No. 06165) と室温下で 1 時間反応させた。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解析に用いた。

PIGRET 法では、血液 80 μ L を 5 μ L の PE 抗 CD71 抗体 (BD Pharmingen, Lot No. 83067) と 4°C で 15 分間反応させた後、IMagTM Buffer (Becton Dickinson, Lot No. 16379) を加え、

室温、3000 r. p. m. で 5 分間遠心した。上清除去後、PE Particles Plus-DM (Becton Dickinson, Lot No. 12501) を 4°C で 15 分間処理した。IMag Buffer を加え、BD IMagnetTM (Becton Dickinson) を用いて CD71 陽性赤血球を分離した。同操作を 2 回繰り返した後、200 μ L の PBS(-) に再懸濁させた。以降、RBC *pig-a* 法に準じて抗 CD59 抗体及び抗 HIS49 抗体と室温で 30 分間反応させ、解析に用いた。

測定はフローサイトメーターを用い、解析には CellQuest 3.3 software を使用した。RBC *pig-a* 法では単細胞を選択後、HIS49 陽性となる赤血球の内、CD59 陰性となるものを変異体とした。PIGRET 法では単細胞を選択後、HIS49 及び CD71 陽性となる多染性赤血球の内、CD59 陰性となるものを変異体とした。評価は、全赤血球あるいは多染性赤血球 100 万個に対する変異体の比率 (Mutation Frequencies) で表した。

肝臓小核試験は、投与終了翌日にイソフルラン吸入麻酔下で放血死させ、外側左葉の約 1 g を採取した。Hanks' Balanced Salt Solution で洗浄した後、37°C で 1 時間、コラゲナーゼ (100U/mL、ヤクルト株式会社、Lot No. 121026-01) と反応させた。ピペッティングにて細胞を解した後、ガーゼ及びセルストレーナー (径 70 μ m) にて濾過し肝細胞懸濁液を得た。懸濁液の 3 倍容の 10% 中性ホルマリンを添加し、室温、500 r. p. m. で 2 分間、遠心して上清を除去した後、同操作を再度繰り返した。観察は Acridine orange と DAPI 液で染色し、UV 励起下で行った。1 個体 2000 個の肝細胞に対する小核含有肝細胞数の出現頻度を算出した。加えて分裂期細胞数を計測し、2000 個の肝細胞に対する割合を算出した。

<倫理面への配慮>

本実験は、動物実験の実施に関する規程（科研製薬株式会社）及びその他の関係法令を遵守して、承認された動物実験計画に従って実施した。

C. 結果

一般状態観察では、125 mg/kg 以上の用量において、死亡動物及び脱毛が認められた。体重推移は投与 10 日後に、62.5 mg/kg 以上の用量においてコントロール群と比較し有意な低下が認められ、用量に依存した（図 1）。投与 16 日以降では有意な体重の低下を認めるものの、体重増加量はコントロールと同様であった。

末梢血での多染性赤血球比率は、コントロール群と比較し、投与 2 日後（小核試験時）で 31.3 mg/kg 以上の用量で有意に低下した（図 2）。本比率の低下は投与 7 日後も持続したが、投与 14 日以降ではいずれの用量においても低下は認められなかった。

末梢血小核試験では、いずれの用量においても、コントロール群と比較し、小核出現頻度の増加は認められなかった（図 3）。同様に、*Pig-a* 遺伝子突然変異試験においても RBC *pig-a* 法及び PIGRET 法のいずれも突然変異頻度の増加は認められなかった（表 1、2）。一方で、肝臓小核試験では、62.5 mg/kg 以上の用量で、コントロール群と比較し用量依存的な小核出現頻度の増加が認められた（図 4）。分裂期肝細胞の割合は、コントロールと同様であった。

D. 考察

本研究は ICH S2 ガイドラインの改訂に伴い、タモキシフェンの遺伝毒性評価として、末梢血及び肝臓を対象とし、突然変異を含めた複数の

エンドポイントを有する組合せ評価を行った。125 mg/kg 以上の用量では死亡動物が認められ（各 1 例/6 例）、31.3 mg/kg 以上の用量において、体重増加の抑制が認められたことから、用量設定は妥当であると考えられた。肝臓を用いた小核試験では 62.5 mg/kg 以上の用量で、小核誘発頻度の増加が認められた。本結果はタモキシフェンの肝臓がん誘発作用を支持するものであり、これまでの種々の遺伝子改変動物を用いた遺伝毒性試験結果と一致するものであった。一方で、末梢血を対象とした小核試験及び *Pig-a* 遺伝子突然変異試験においては陰性となった。これまで、マウスを用いた骨髄小核試験では陽性と判断されており、本結果とは異なるものであった。この原因については明らかではないが、代謝の種差あるいは骨髄増殖抑制が影響している可能性が考えられた。以上より、タモキシフェンのような発がん過程に代謝を必要とする化合物では肝臓での評価が有用かつ必要であると考えられた。本組合せは、異なった組織を用いて、突然変異を含めた複数のエンドポイントでの評価が可能であり、直接的遺伝子傷害作用のみならず、代謝作用を含めた包括的な遺伝毒性評価につながると期待される。また、本検討では同一動物から複数の情報を得ることができるため、動物愛護を考慮した評価系であると考えられる。

E. 結論

本研究では、タモキシフェン短期間投与後の遺伝毒性評価として、同一動物を用いて末梢血及び肝臓を対象とし、突然変異を含めた複数のエンドポイントでの評価を実施した。末梢血を用いた小核試験及び *Pig-a* 遺伝子突然変異試験

では陰性と判断されたが、肝臓を用いた小核試験では陽性となり、タモキシフェンの遺伝毒性を検出することが可能であった。したがって、タモキシフェンのように発がん過程に代謝活性が必要な化合物については肝臓での評価が有用であり、今回検討した組合せ評価では、包括的な遺伝毒性評価が期待される。

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