

平成27年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究報告書

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、妊娠動物に遺伝毒性物質を投与した際の次世代に与える遺伝毒性影響を *Pig-a* アッセイにより評価することでその有用性を検証した。その結果、*Pig-a* アッセイでは成熟マウスに比べて幼若マウスで早期にかつ高感度に遺伝毒性を検出できること、また、妊娠動物に投与された被験物質由来の遺伝毒性を新生仔においても検出可能であることを明らかにした。

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勧告し、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。

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、そして次世代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した。

加えて、*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をアピールするため、日本環境変異原学会の分科会である哺乳動物試験研究会（MMS 研究会：Mammalian Mutagenicity Study Group）に参画する機関中 16 機関が参加する共同研究を実施しており、研究代表者は総括世話人の役割を担っている。これらの日本国内の取り組みが評価され、平成 26 年末に米国をリード国として OECD に提出された SPSF (Standard Project Submission Form) に日本の貢献が明記された。それに伴い、上記共同研究を早期に達成する必要が生じたため、ラットを用いた *Pig-a* アッセイによる

遺伝毒性評価を併せて実施した。

本年度は最終年度であり、妊娠動物に遺伝毒性物質を投与した際の次世代に与える遺伝毒性影響を *Pig-a* アッセイにより評価することでその有用性を検証した。

B. 研究方法

1) 胎仔および新生仔の末梢血を用いた *Pig-a* アッセイの検討

Pig-a アッセイでは、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・分化能が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。

胎仔や新生仔由来の末梢血中には未分化な赤血球が多く存在し、それらの赤血球が *Pig-a* アッセイに適しているのか不明であるため、胎仔や新生仔由来の末梢血を用いた *Pig-a* アッセイの技術基盤を検討した。交配直後の雌マウスのプラグ確認日を 0 日目として 16 日目の胎仔 (図1、実験区 a)、出生後 4 日目 (図1、実験区 b) および出生後 11 日目 (図1、実験区 c) の新生仔、各群 5 匹から採血を行い、*Pig-a* アッセイを実施した。従来のマウス *Pig-a* アッセイでは、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* 変異体頻度を評価するが、胎仔や新生仔由来の赤血球での CD24 の発現が低い場合に備えて、GPI アンカーそのものに結合することが知られる蛍光 FLAER を用いた変法 *Pig-a* アッセイを別に実施した。

2) 妊娠マウスおよび次世代への遺伝毒性影響評価

妊娠時期に応じて、妊娠前、妊娠初期、中期および後期投与群を設定した (図2、実験区

C~F)。妊娠初期、中期および後期投与群では、遺伝毒性物質投与群 (母マウス) を各 3 匹、陰性対照群を各 2 匹設定した。妊娠前投与群は投与後に交配を行うため、交配動物を確実に得るために遺伝毒性物質投与群を各 6 匹、陰性対照群を各 4 匹設定した。交配直後の雌マウスのプラグ確認日を 0 日目とし、各群それぞれプラグ確認日の 4~7 日前 (妊娠前投与群)、3 日目 (妊娠初期投与群)、11 日目 (妊娠中期投与群)、および出産直前の 18 日目 (妊娠後期投与群) 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) を単回腹腔内投与した (図2)。各群の母体からは、交配前 3~7 日目、および単回投与後 5~6 週目に尾静脈より採血を行ない、*Pig-a* アッセイを実施した。

仔マウスについては、前項の予備試験の結果から 11 日齢以降の仔マウスが *Pig-a* アッセイに適していることが判明していたため、妊娠前投与群においては出生後 14~17 日齢の仔マウス、妊娠中期投与群においては出生後 4 週齢の仔マウス、そして妊娠後期投与群においては出生後 5 週齢の仔マウスから採血を行い、得られた血液を用いて *Pig-a* アッセイを実施した。また、妊娠初期投与群ではすべての母マウスで妊娠の継続が見られなかったため、仔マウスを得られず、仔マウスからの採血は実施できなかった。

(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) 胎仔および新生仔の末梢血を用いた *Pig-a* アッセイの検討

胎仔マウスから得られる末梢血量はごく微

量であるため、本アッセイ系で解析可能な最少末梢血量を予備的試験として解析した結果、0.5 μ Lでも十分解析可能であることが明らかになった。

他方、母マウスのプラグ確認日を0日目として16日目の胎仔、すなわち、出生予定3日前の母体から採取した胎仔由来末梢血を用いた *Pig-a* アッセイでは、遺伝毒性物質を投与していないにもかかわらず、解析した5匹全ての胎仔において GPI アンカー結合タンパク質である CD24 を発現していない赤血球が非常に多く検出された(図3、実験区 a)。これらの傾向は出生前3日の胎仔のみではなく、4日齢の新生仔でも持続していたが、11日齢には成熟動物と同様にほぼ全ての赤血球で CD24 の発現が見られた。胎仔や新生仔で見られた赤血球のこれらの特徴が、GPI アンカー結合タンパク質である CD24 のみが未発現であるのか、GPI アンカーそのものが形成されていないのかを明らかにするために、GPI アンカーを直接認識する FLAER(図4、上)を用いた変法 *Pig-a* アッセイにより同様の解析を実施した。その結果、抗 CD24 抗体を用いた結果と同様であり、胎仔や新生仔で見られた多数の CD24 を発現していない赤血球は GPI アンカーそのものが形成されていないことが明らかになった(図4、下)。

また、これらの胎仔のほぼ全ての赤血球では幼若赤血球マーカーである CD71 を発現していたが、出生後4日目、11日目と日数を追うごとに CD71 発現幼若赤血球の頻度の減少が見られたが、成熟動物と比べて明らかに高い頻度を保っていた(図3)。

2) 妊娠マウスおよび次世代への遺伝毒性影響評価

交配各群と得られた仔数を表1に示す。妊娠前投与群(表1、実験区 C)では、投与後7日目まで交配を継続したが、プラグを確認できない個体が見られた。また、妊娠が継続しないものや食殺が見られた。妊娠初期投与群(表1、実験区 D)ではすべてのプラグ確認済みマウスで妊娠が継続しなかった。妊娠中期および後期投与群(表1、実験区 E および F)では、一部で母マウスによる食殺や妊娠の非

継続が見られたものの、平均的な出産仔数を得た。

妊娠前投与群の *Pig-a* 変異体頻度および幼若赤血球頻度をそれぞれ図5および図6に示す(図中、それぞれの家系を点線で区切って示す)。陰性対照群と比較し、エチルニトロソウレアおよびベンツピレン投与群両者の多くの母マウスでは *Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られたが、一部の母マウスは陰性対照群と同等であった。また、ベンツピレン投与群では投与前に高い外れ値を示す個体が1例見られた。他方、仔マウスの *Pig-a* 変異体頻度は背景値と同等であった(図5)。また、すべての仔マウスは母マウスに比べて非常に高い幼若赤血球頻度を示した(図6)。また、母マウスの幼若赤血球頻度への投与による影響は検出されなかった(図6)。

妊娠初期投与群の *Pig-a* 変異体頻度および幼若赤血球頻度をそれぞれ図7および図8に示す。本群では仔マウスは得られていないが、陰性対照群と比較し、エチルニトロソウレアおよびベンツピレン投与群両者の母マウスでは *Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られた(図7)。また、母マウスの幼若赤血球頻度への投与による影響は検出されなかった(図8)。

妊娠中期投与群の *Pig-a* 変異体頻度および幼若赤血球頻度をそれぞれ図9および図10に示す。エチルニトロソウレア投与群の母マウスでは3個体中2個体で *Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られた。仔マウスでは、個体差が大きいものの、非常に高い *Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られた。また、*Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られなかった母マウス由来の仔マウスでも非常に高い *Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られた。ベンツピレン投与群の母マウスでは3個体中2個体で *Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られた。仔マウスでは、*Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られなかった(図9)。すべての仔マウスは母マウスに比べて高い幼若赤血球頻度を示した(図10)。また、母マウスの幼若赤血球頻度への投与による影響は検出されなかった(図10)。

妊娠後期投与群の *Pig-a* 変異体頻度および幼若赤血球頻度をそれぞれ図11および図12に示す。エチルニトロソウレア投与群の母マ

ウスでは3個体中2個体で非常に弱い *Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られた。仔マウスでは、個体差が大きいものの、非常に高い *Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られた。また、*Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られなかった母マウス由来の仔マウスでも非常に高い *Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られた。ベンツピレン投与群の母マウスでは3個体中2個体で *Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られた。仔マウスでは *Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られなかった(図11)。一部の仔マウスは母マウスに比べて若干高い幼若赤血球頻度を示したが、多くは成熟動物のレベルであった(図12)。また、母マウスの幼若赤血球頻度への投与による影響は検出されなかった(図12)。

D. 考察

1) 胎仔および新生仔の末梢血を用いた *Pig-a* アッセイの検討

胎仔および新生仔の末梢血を用いた予備試験の結果から、胎仔や4日齢由来の末梢血赤血球の多くはそもそも GPI アンカーを発現していないことが明らかとなった。*Pig-a* アッセイでは、フローサイトメーターを用いて 1×10^6 個以上の赤血球を直接カウントし、その内の *Pig-a* 変異体、すなわち GPI アンカー欠損赤血球の数を実測値として計測することで *Pig-a* 変異体頻度を求める。従って、被験物質が未投与であるにも関わらず GPI アンカーを形成していない赤血球が多数含まれることから、胎仔や4日齢由来の末梢血は *Pig-a* アッセイには不向きであり、*Pig-a* アッセイには11日齢以降の新生仔から得られた末梢血を用いる必要があることが明らかになった。

2) 妊娠マウスおよび次世代への遺伝毒性影響評価

妊娠前に遺伝毒性物質を投与した群では、*Pig-a* アッセイにより母マウスで遺伝毒性を検出したにもかかわらず、仔マウスでは全く検出していない。従って、この時期に投与されたエチルニトロソウレアおよびベンツピレンは新生仔へ遺伝毒性影響を与えないか、または *Pig-a* アッセイでは検出できない可能と考えられる。

妊娠初期に遺伝毒性物質を投与した群では、陰性対照群を含めてすべての群で妊娠を継続できなかった。従って、この時期の妊娠動物への腹腔内投与自体が妊娠継続を阻害したと考えられる。

妊娠中期にエチルニトロソウレアを投与した群では、個体差があるものの、母マウスよりも強い遺伝毒性が仔マウスで検出された。また、幼若赤血球の頻度も仔マウスでは高いことから、仔マウスの高い造血活性が強い *Pig-a* 変異体頻度の上昇に結びついた可能性が考えられる。事実、幼若マウスに直接遺伝毒性物質を投与した際も同じ傾向が見られている。ベンツピレン投与群の仔マウスでは *Pig-a* 変異体頻度の上昇が確認できなかった。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、この時点の胎仔マウスはその代謝活性化能を有さないか低いこと、もしくは胎仔マウスが暴露されていないことが考えられる。しかし、食殺により2家系で仔マウスが全例死亡したため、解析に用いたのは1家系のみであり、確定的な結果とは言えず、複数の家系での解析が必要である。

妊娠後期にエチルニトロソウレアを投与した群の仔マウスでは、妊娠中期に投与した群と同様に強い変異体頻度の上昇が見られた。幼若赤血球の頻度は母マウスと同じ程度まで低下していたが、実際にエチルニトロソウレアに暴露された時期は採血時よりも前の高造血活性の時期であるので、仔マウスの高い造血活性が強い *Pig-a* 変異体頻度の上昇に結びついた可能性が考えられる。興味深いことに、妊娠後期にエチルニトロソウレアを投与した群の母マウスで見られた *Pig-a* 変異体頻度の上昇は非常に小さいものであった。今回の結果からは理由は不明であるが、妊娠後期に投与されたエチルニトロソウレアは多くが胎児へ移行したか、または母乳や羊水等により母体外へ排出されるなどして、母マウスへの暴露が低くなった可能性も考えられる。同様に仔マウスへの暴露経路として母乳の影響も考えられるが、この点を明らかにするには、未投与の代理母を用いた解析などが必要であると考えられる。ベンツピレン投与群の仔マウ

スでは *Pig-a* 変異体頻度の上昇が確認できなかった。これらは前述の妊娠中期の結果と同様であり、代謝活性化能や暴露の問題などが考えられる。また、食殺や妊娠非継続により解析に用いたのは1家系のみであり、確定的な結果とは言えず、複数の家系での解析が必要である。

以上のことから、妊娠の中期や後期に遺伝毒性物質に暴露された母マウス由来の仔マウスは遺伝毒性影響を受け、それを *Pig-a* アッセイにより解析が可能であることが示された。

E. 結論

最終年度である今年度で得られたマウスを用いた研究成果によって、妊娠中期および後期に母マウスが遺伝毒性物質に暴露された場合、その影響は仔マウスに強く現れること、これらの *in vivo* 遺伝毒性について、極微量の末梢血を用いる内在性遺伝子を標的とした *Pig-a* アッセイで検出できること、の2点が明らかになった。上記については、妊娠期の母体における化学物質暴露に対する遺伝毒性リスクは仔に強く影響することを示すものであり、重要なリスク評価情報となる。上記については、ヒトを含めたリスク評価手法に適用できることを示唆する。加えて、初年度および次年度で得られた研究成果により、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や、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などが明らかになっている。これらの3年間の研究成果から、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* アッセイの有用性が明らかになり、かつ、次世代に与える遺伝毒性影響が明らかになった。また、上記のマウスの結果に加えて、次年度に追加実施したラットを用いた日本国内の *Pig-a* アッセイ共同研究の推進により、本アッセイの OECD ガイドライン化に向けた日本国内の貢献を強く示すことができる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Horibata K, Ukai A, Honma M. Evaluation of mutagenicity of acrylamide using RBC *Pig-a* and PIGRET assays by single peroral dose in rats. *Mutation Research*, (2016) *in press*

Johnson GE, Yamamoto M, Suzuki Y, Adachi H, Kyoya T, Takasawa H, Horibata K, Tsutsumi E, Wada K, Kikuzuki R, Yoshida I, Kimoto T, Maeda A, Narumi K. Measuring Reproducibility of Dose Response Data for the *Pig-a* Assay using Covariate Benchmark Dose Analysis. *Mutation Research*, (2016) *in press*

Gollapudi BB, Lynch AM, Heflich RH, Dertinger SD, Dobrovolsky VN, Froetschl R, Horibata K, Kenyon MO, Kimoto T, Lovell DP, Stankowski Jr LF, White PA, Witt KL, Tanir JY. The *in vivo* *Pig-a* assay: A report of the International Workshop On Genotoxicity Testing (IWGT) Workgroup. *Mutation Research*, (2015) 783, 23-35.

Horibata K, Kono S, Ishigami C, Zhang X, Aizawa M, Kako Y, Ishii T, Kosaki R, Saijo M, Tanaka K. Constructive rescue of TFIIF instability by an alternative isoform of XPD derived from a mutated XPD allele in mild but not severe XP-D/CS. *J Hum Genet*. (2015) 60, 259-265.

2. 学会発表

堀端克良, 山田雅巳, 鵜飼明子, 木本崇文, 千藏さつき, 三浦大志郎, 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, 瀧田修一, 山本美佳, 堀妃佐子, 堤絵梨, 和田邦生, 前田晃央, 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, 藤石洋平, 福田隆之, 鈴木裕太, 後藤玄, 森田健, 本間正充, *Pig-a*/PIGRET アッセイの短期試験としての有用性: MMS 共同研究報告, 日本環境変異原学会第44回大会, 福岡 (2015.11)

堀端克良, *Pig-a* アッセイ, 哺乳動物試験研

研究会第 67 回定例会，福岡 (2015.11)

Horibata K, Yamada M, Ukai A, Kimoto T, Chikura S, Miura D, Itoh S, Muto S, Uno Y, Sanada H, Takashima R, Shigano M, Takasawa H, Hamada S, Yamamoto M, Hori H, Tsutsumi E, Wada K, Maeda A, Kikuzuki R, Ogiwara Y, Kyoya T, Adachi H, Uematsu Y, Yoshida I, Narumi K, Fujiishi Y, Fukuda T, Suzuki Y, Goto K, Morita T, Honma M, Interlaboratory Trial of the PIGRET Assay As a Short-term Genotoxicity Test: Collaborative Study by Mammalian Mutagenicity Study (MMS) Group of Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS), Environmental Mutagen Society 46th Annual Meeting, USA (2015.9)

堀端克良，共同研究報告 I: *Pig-a* アッセイ，哺乳動物試験研究会第 66 回定例会，栃木 (2015.6)

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

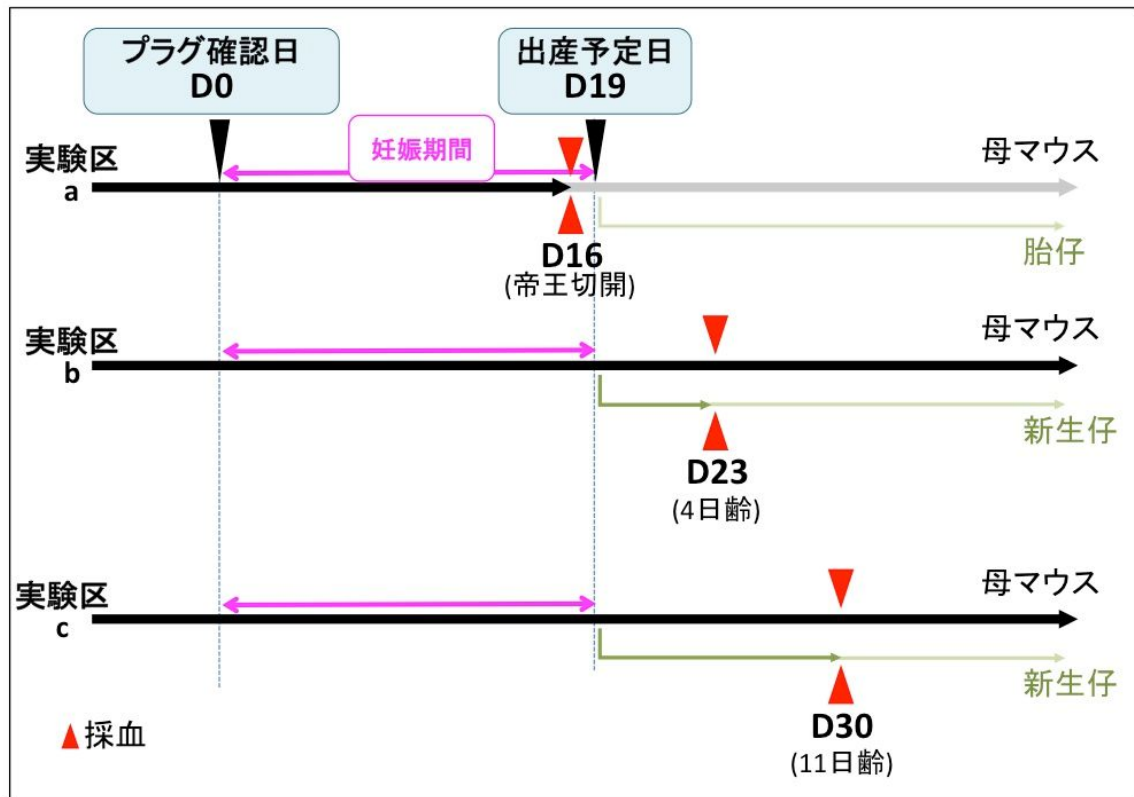


図1.胎子および新生仔の末梢血を用いたPig-aアッセイの検討(予備試験)投与群構成とスケジュール

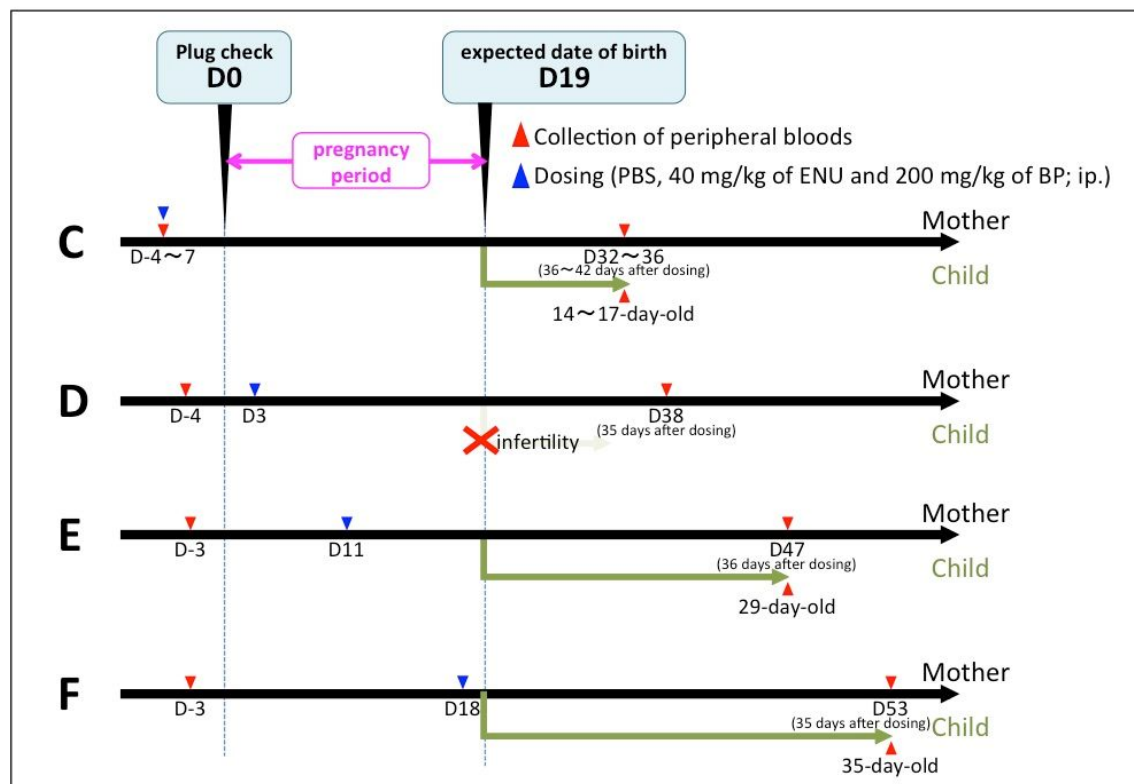


図2.妊娠マウスおよび次世代への遺伝毒性影響評価の投与群構成とスケジュール

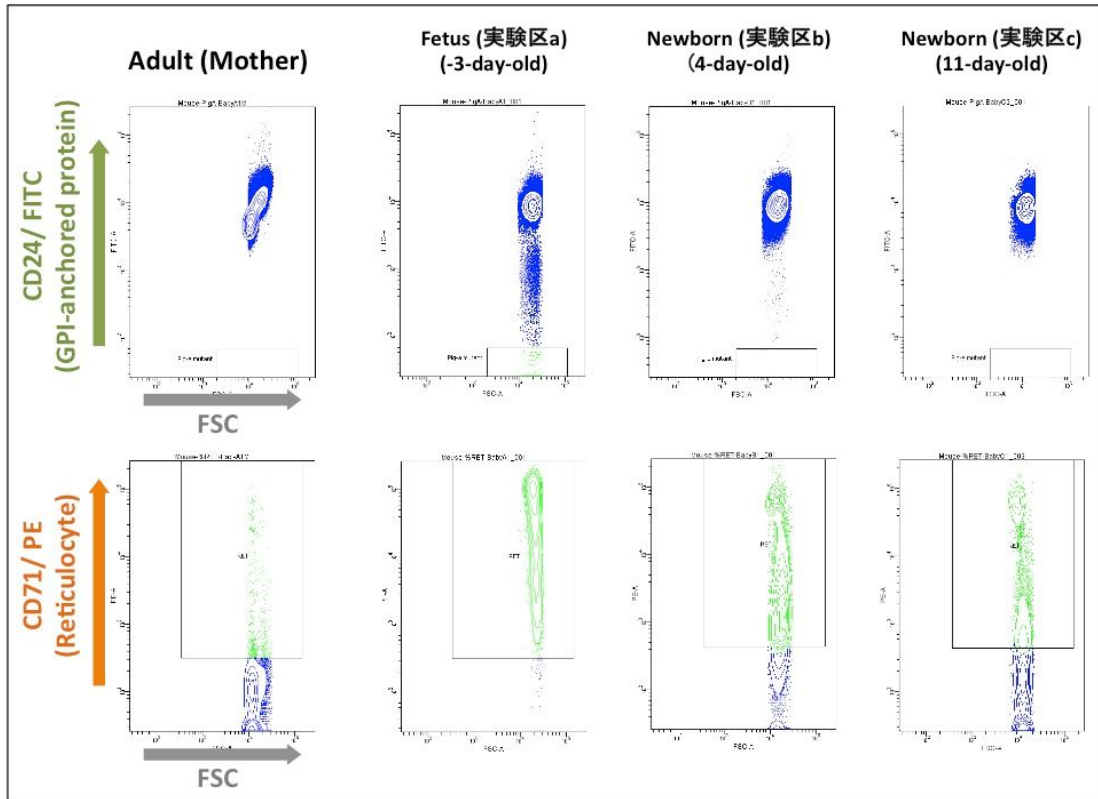


図3.胎児および新生児の末梢血を用いた*Pig-a*アッセイの検討

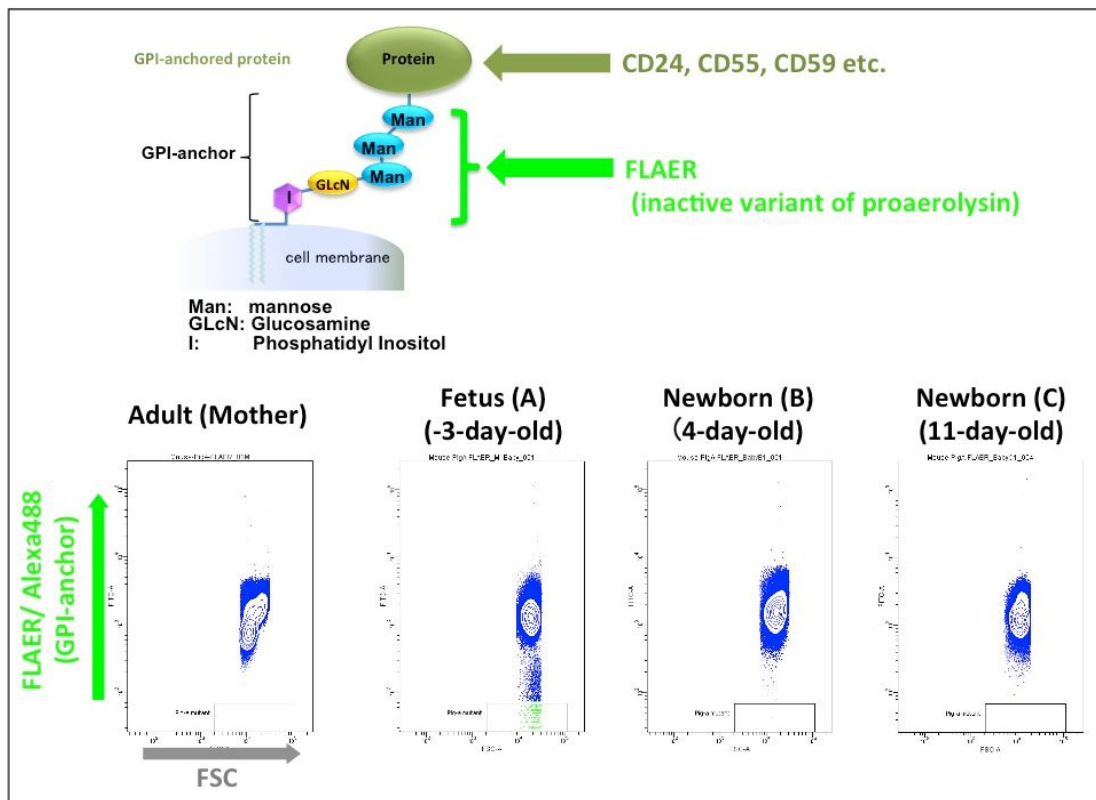


図4.FLAERを用いた胎児および新生児の末梢血を用いた*Pig-a*アッセイの検討

表1.交配結果

Experimental group	Dosing	Mother ID	No. of Newborn	
			♂	♀
C	PBS	C-P1A	5	4
		C-P1B	1	6
		C-P2A	5	5
		C-P2B	3	3
	ENU	C-E1A	no plug	
		C-E1B	cannibalized	
		C-E2A	5	4
		C-E2B	no plug	
		C-E3A	no plug	
		C-E3B	no plug	
	BP	C-B1A	5	5
		C-B1B	infertility	
		C-B2A	2	1
		C-B2B	infertility	
		C-B3A	no plug	
C-B3B		infertility		
D	PBS	D-P1	infertility	
		D-P2	infertility	
	ENU	D-E1	infertility	
		D-E2	infertility	
		D-E3	infertility	
	BP	D-B1	infertility	
		D-B2	infertility	
D-B3		infertility		
E	PBS	E-P1	infertility	
		E-P2	cannibalized	
	ENU	E-E1	2	4
		E-E2	4	3
		E-E3	4	3
	BP	E-B1	cannibalized	
		E-B2	3	3
E-B3		cannibalized		
F	PBS	F-P1	infertility	
		F-P2	1	5
	ENU	F-E1	6	3
		F-E2	5	3
		F-E3	1	5
	BP	F-B1	cannibalized	
		F-B2	4	2
F-B3		infertility		

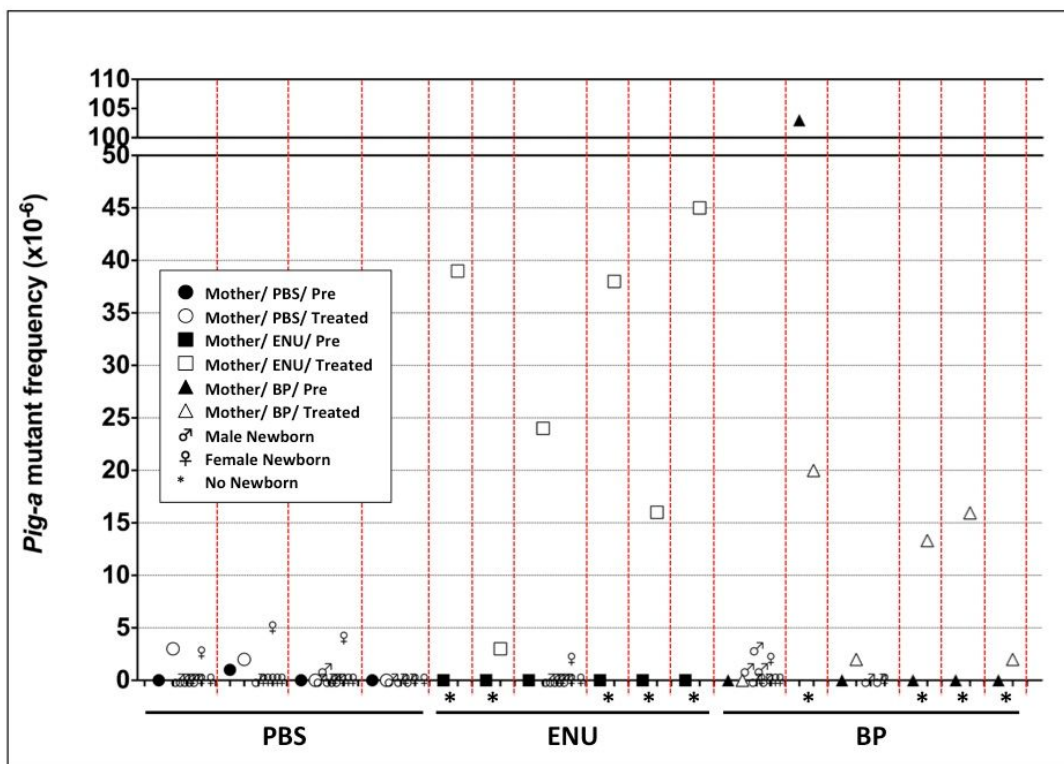


図5.妊娠前投与群における母および仔マウスの*Pig-a*変異体頻度

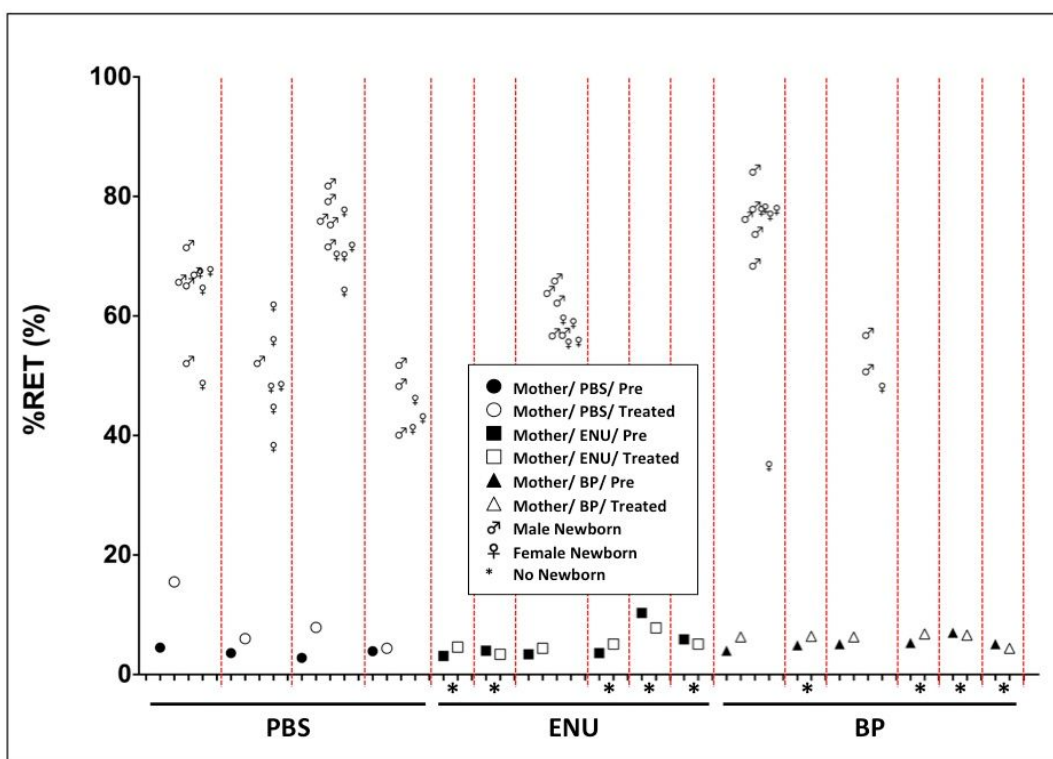


図6.妊娠前投与群における母および仔マウスの幼若赤血球頻度

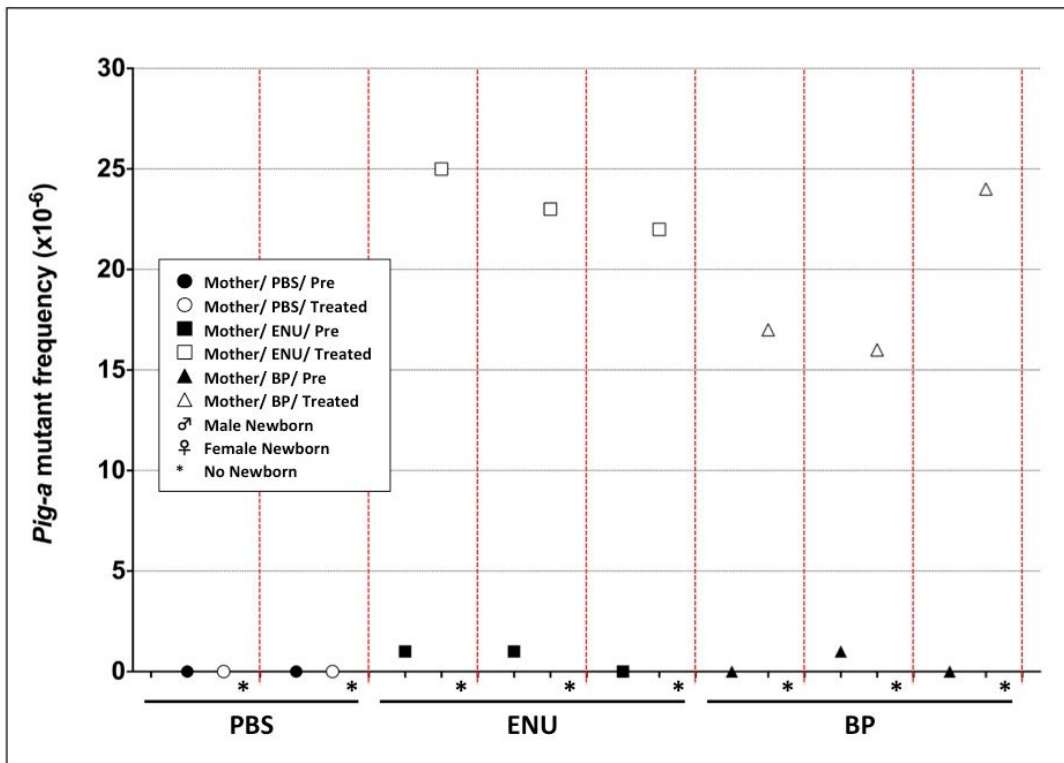


図7.妊娠初期投与群における母マウスの*Pig-a*変異体頻度

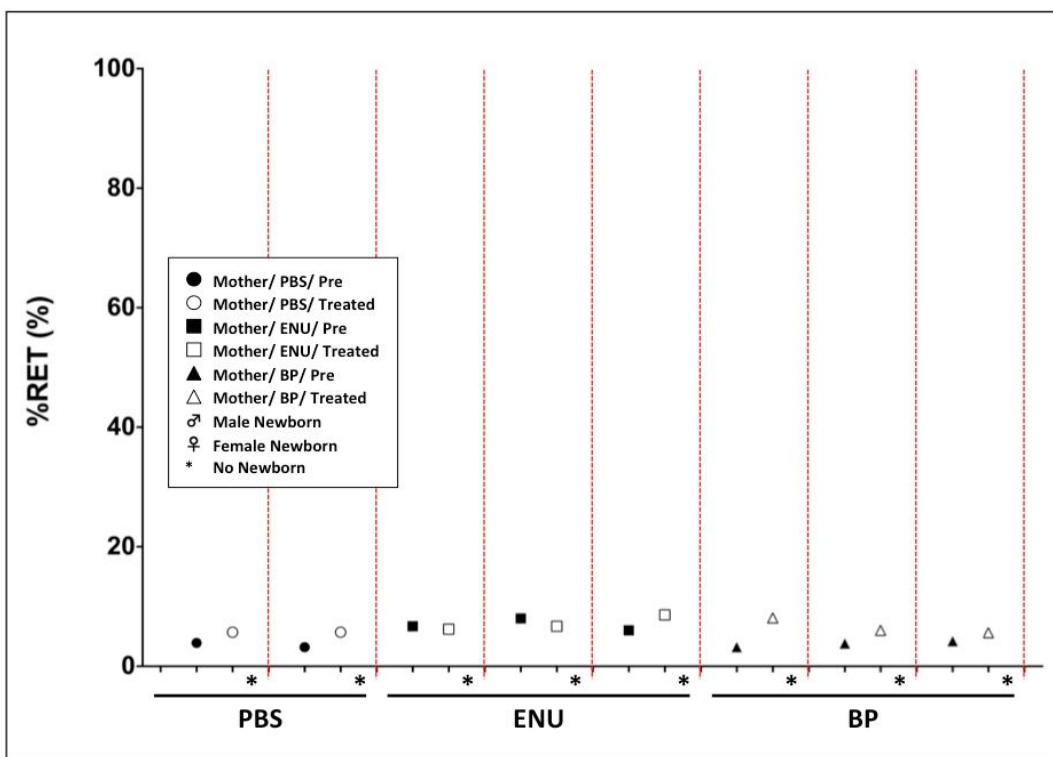


図8.妊娠初期投与群における母マウスの幼若赤血球頻度

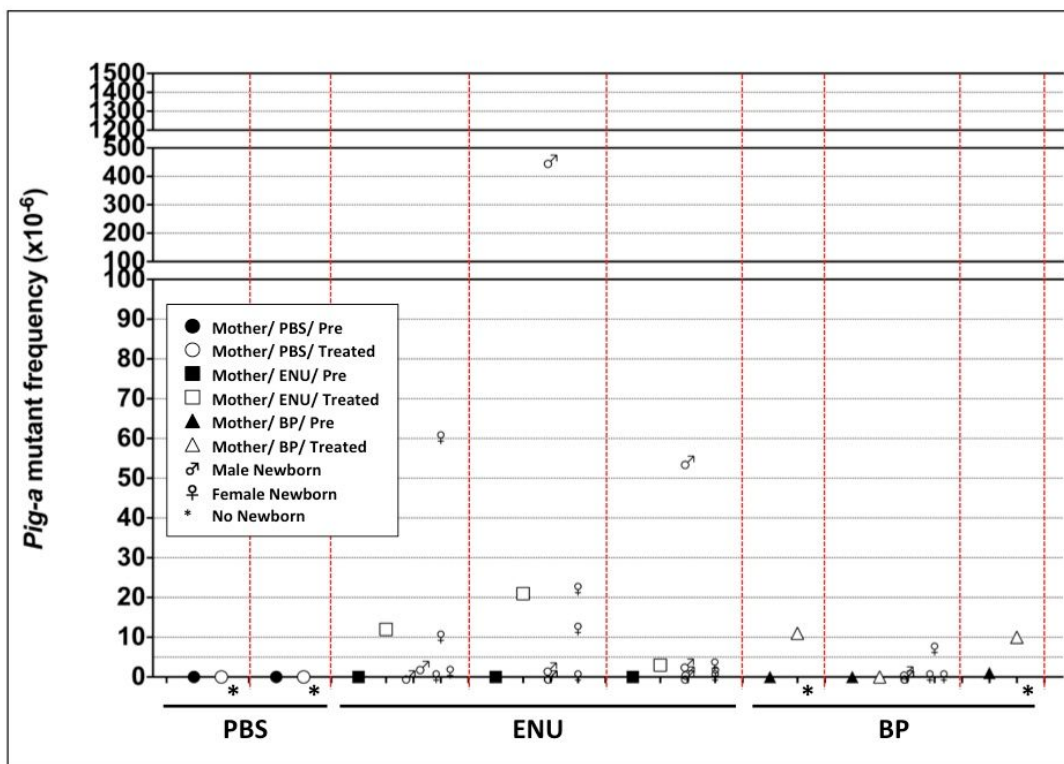


図9.妊娠中期投与群における母および仔マウスの*Pig-a*変異体頻度

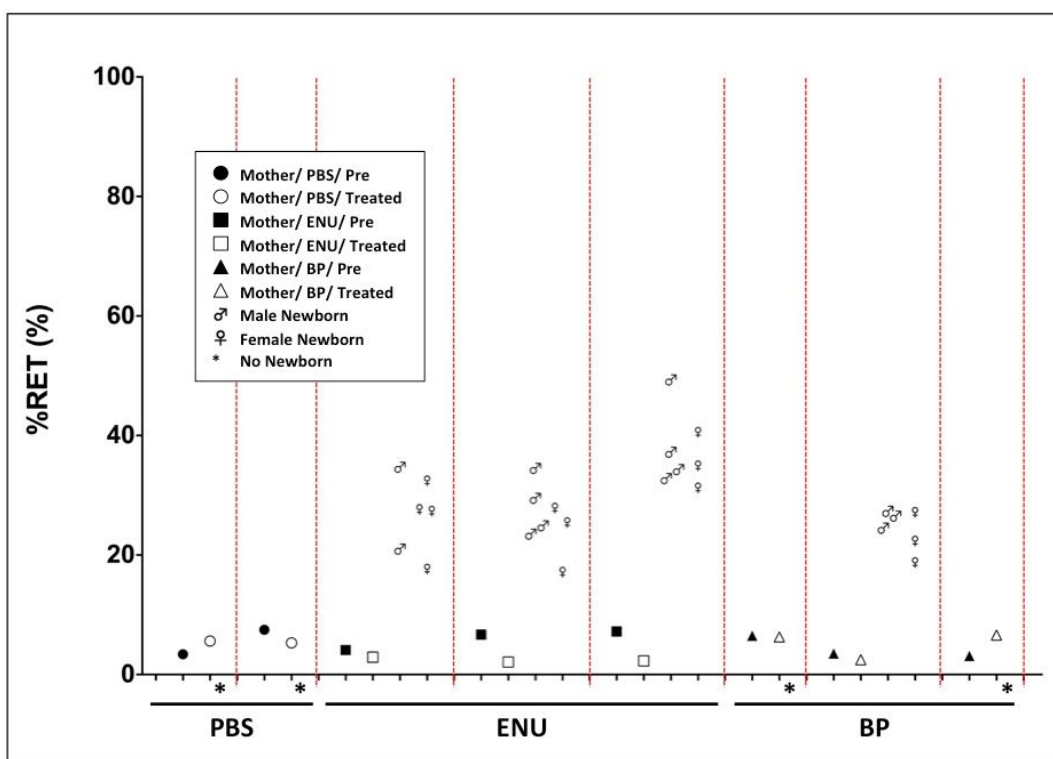


図10.妊娠中期投与群における母および仔マウスの幼若赤血球頻度

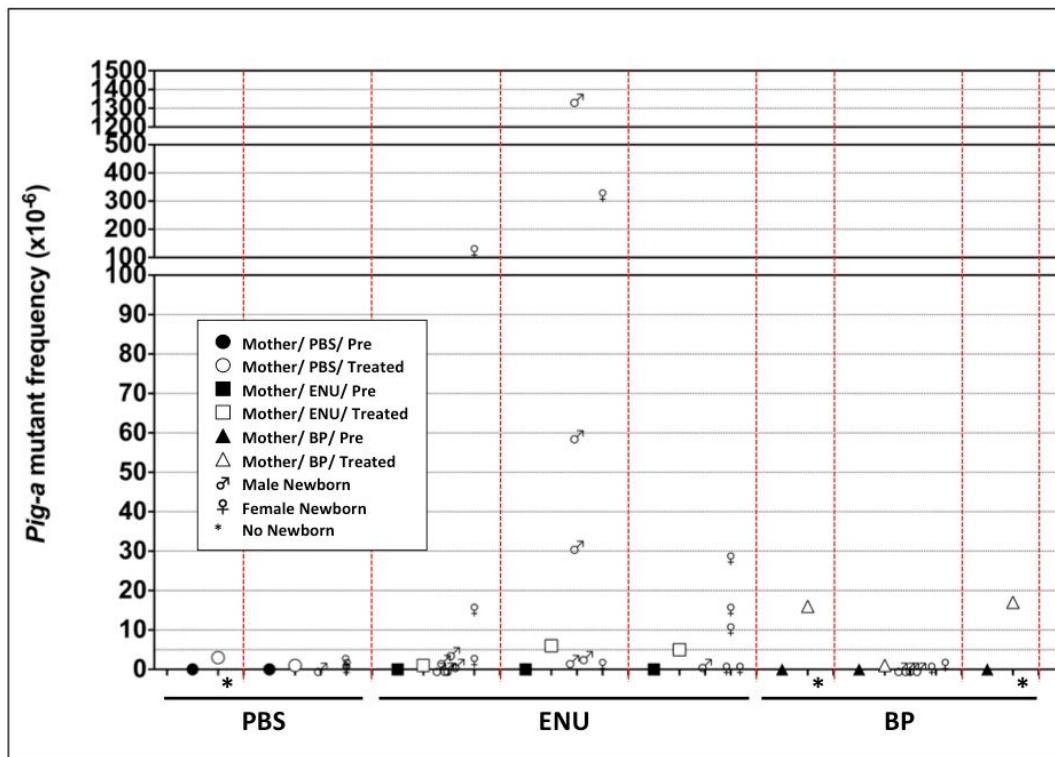


図11.妊娠後期投与群における母および仔マウスの*Pig-a*変異体頻度

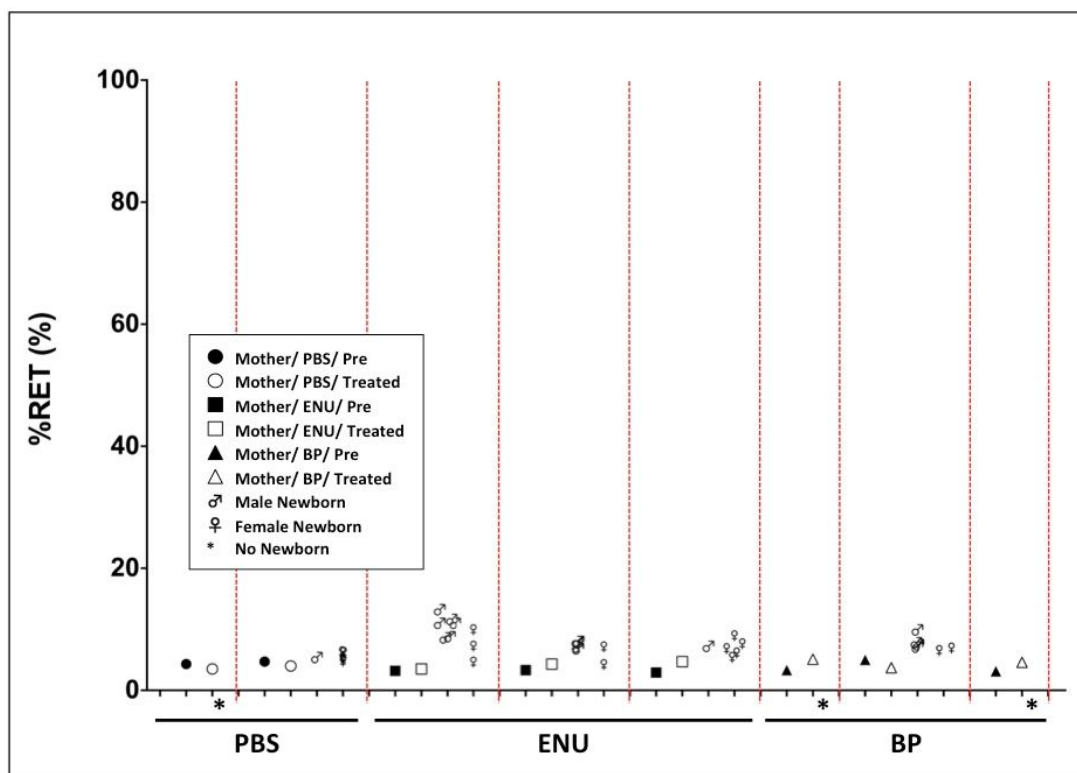


図12.妊娠後期投与群における母および仔マウスの幼若赤血球頻度