

## オーラミンに対するXRCC1/XPA二重欠損細胞の生存率の測定

分担研究者： 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長

協力研究者： 安井 学 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

化審法で規定された変異原性検出試験は、2つの問題点がある：感度と特異性が低い、変異原性のメカニズム(化学物質が作るDNA損傷の種類)を解析できない。この問題を解決する為に、ヒトリンパ芽球細胞株TK6からDNA損傷修復酵素の遺伝子欠損細胞(DNA修復ミュータント)を作製し、遺伝毒性試験に利用した。TK6由来のXRCC1/XPA二重欠損細胞はin vitro小核試験で5倍程度検出感度が上昇した。本研究では、この細胞を使って、化審法で規定されているチミジンキナーゼ(TK)遺伝子変異試験を実施し、同様に高い感度が得られるかを検証する。本年度は、前段階として細胞毒性感受性を評価した。モデル被験物質として、オーラミンを用いた。工業用グレードのオーラミンは、齧歯類で肝臓等に腫瘍を誘発させることから、IARCにおいてヒトに対して発がん性がある可能性があるグループ2Bと分類されている。また、エイムス試験では陽性を示すが、哺乳類細胞を用いるマウスリンフォーマ試験では陰性を示す。試験の結果、オーラミンの代謝活性化条件下において、二重欠損細胞の相対生存率は、その野生型(TK6細胞)のそれよりも著しく低下した。一方、非代謝活性化条件下ではその影響は顕著ではなかった。よって、XRCC1/XPA二重欠損細胞は、代謝活性化条件下のオーラミンに対して感受性を示すことが分かった。

キーワード:チミジンキナーゼ遺伝子変異試験, ミュータント細胞, 細胞相対生存率

### A. 研究目的

オーラミンは、繊維製品、革製品、そして、紙やインクの着色剤として利用されている色素である(図1)。世界のオーラミン年間売上高は、約1000トン(エチルオーラミンも含む)にのぼる(Gessner et al., Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 7<sup>th</sup> Ed., New York, John Wiley & Sons, Inc., 55pp)。オーラミンの製造工場において職業暴露が問題となり、労働者で膀胱がんが誘発した(Muller A, Z. Urol. Chir., 36,

202-219 (1933))。また、インドや中国では食品中からオーラミンが検出された(Tripathi et al, Food Contr. 18, 211-219 (2007))。

オーラミンの製造は、中間生成物を介する2段階工程で行われるため、工業用グレードのオーラミン(純度約80%)は、Michler's塩基(オーラミン製造の中間体)とMichler'sケトン(オーラミンの加水分解産物)を数%含有する。これらの3つの物質は、齧歯類で多くの部位に腫瘍を誘発することから、IARCにおいてヒトに

対して発がん性がある可能性がある “ possibly carcinogenic to humans ” (グループ 2B)と分類されている。

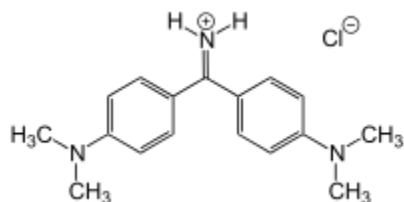


図 1

オーラミンを用いた遺伝毒性試験の情報は、ほとんどが Michler's ケトンと Michler's 塩基を含む工業用グレードのオーラミンを使用しているため、試験結果にばらつきがあるが、全体として見ると、工業用グレードのオーラミンは、代謝活性化条件下のエイムス試験と哺乳類細胞を用いる遺伝毒性試験において陽性である。(Some Aromatic Amines, Organic Dyes, and Related Exposures, IARC Monographs Volume 99, 111-135 (2010))

しかしながら、エイムス試験でオーラミンの陽性結果は数多く存在するが、一方、陽性を示す哺乳類細胞を用いる遺伝毒性試験の報告は非常に少ない。Amacher らの報告では、オーラミンはマウスリンフォーマ試験で代謝、非代謝活性化条件下ともに陰性である (Amacher et al., *Mutat. Res.* 72, 447-474 (1980))。そこで本研究では、哺乳類細胞を用いる遺伝子変異試験の感度を上げるために、*in vitro* 小核試験で 5 倍程度検出感度が上昇することが確認されている TK6-XRCC1/XPA 二重欠損細胞を使って、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子変異試験で行われる細胞相対生存率 (Relative survival; RS) を測定した。

## B. 研究方法

### 1. 細胞と培養

XRCC1/XPA 二重欠損細胞は、京都大学医学部 武田俊一教授から分与された。ヒトリンパ芽球細胞 TK6、および XRCC1/XPA 二重欠損細胞

は、10% 馬血清 (JRH Bioscience), 200 µg/mL ピルビン酸ナトリウム (和光純薬工業株), 100 U/mL ペニシリン, 100 µg/mL ストレプトマイシン (ナカライテスク株) を含む RPMI 培地 (ナカライテスク株) で培養した (37 度, 5% CO<sub>2</sub>)。

### 2. オーラミンの暴露

オーラミン (和光純薬工業株, CAS NO. 2465-27-2) を注射用水 (株大塚製薬工場) で溶解後 (最終濃度 50, 75, 100, 125 µg/mL), 表 1 のように S9mix (オリエンタル酵母工業株) の存在下, あるいは非存在下 (150 mM KCl) において, 対数増殖期にある細胞 (TK6 あるいは二重欠損細胞) に暴露し, 4 時間振盪培養した。処理後, 遠心分離 (1000 rpm, 5 分間) し, 上清を除去後, 無血清培地で細胞を洗浄した。再度, 遠心分離 (1000 rpm, 5 分間) し, 上清を除去後, 10% 血清を含む培地で細胞を分散させ細胞濃度を測定した。細胞濃度を 8 cells/mL に希釈し, 約 1.6 cell/well の濃度で 96 well マイクロプレートで 2 週間培養した。

表 1. オーラミンの暴露処理

細胞液 (約 4×10 <sup>6</sup> cells/mL)	5 mL
RPMI-0 (無血清培地)	3.3 mL
S9 mix あるいは 150 mM KCl	1.5 mL
被験液 (オーラミン)	0.2 mL
処理容量	10 mL

### 3. 細胞相対生存率の測定

細胞のコロニー形成率である Cloning efficiency (CE) は、ポアソン分布の式に従い、式 1 を用いて算出した。EW は、コロニーを含まない well 数であり、TW は総 well 数である。N は、1 well 当たりの平均細胞数 (本実験では N = 1.6) である。

$$CE = -\ln(EW / TW) / N \quad \dots (式 1)$$

また、暴露処理中の細胞毒性が強い場合など、

細胞消失があるため、次の計算式(式2)でCEを補正した。“処理終了時の細胞数”は、前述の2.オーラミンの暴露において処理終了時の遠心分離後に得られた細胞数である。“処理開始時の細胞数”は、本研究では  $2 \times 10^7$  cells (表1)である。

$$\text{補正 CE} = \text{CE} \times \text{処理終了時の細胞数} / \text{処理開始時の細胞数} \quad \dots(式2)$$

被験物質で処理された培養の細胞相対生存率RS(%)は、次の式3で計算した。陰性対照(注射用水)の生存率を100%と定義した。なお、TK遺伝子変異試験は、細胞毒性がある場合、RS=20~10%の用量を最大用量として実施されるため、本研究においてもそれに従い生存率実験を行った。

$$\text{RS}(\%) = \text{処理培養の補正 CE} / \text{溶媒対照の補正 CE} \times 100 \quad \dots(式3)$$

## C. 研究結果

### 1. 非代謝活性化条件下のオーラミンの細胞毒性

S9mix非存在下で、オーラミン(最終濃度50, 75, 100, 125 µg/mL)を4時間処理したときのTK6、および二重欠損細胞の生存率実験の結果を表2と図2に示した。最高用量の125 µg/mLでは、TK6細胞は4つコロニー数が見られたが、そのRS値は、二重欠損細胞と共にゼロであった。用量を下げると両細胞ともにコロニー形成が観察された。それに従い、RS値も用量依存的に回復し、50 µg/mLの用量で、両細胞ともRS値は約20%程度であった。

### 2. 代謝活性化条件下のオーラミンの細胞毒性

S9mix存在下で、オーラミン(最終濃度50, 75, 100, 125 µg/mL)を4時間処理したときのTK6、および二重欠損細胞の生存率実験の結果を表3と図3に示した。TK6細胞は、最高用量

125 µg/mLで7つコロニーを観察することができたが、二重欠損細胞は、最高用量125と100 µg/mLの2つの用量で死滅した。また、50 µg/mLの用量では、TK6細胞は陰性対照群の約半分の相対生存率(RS=48%)があったが、二重欠損細胞のRS値は著しく低く10%程度であった。このことから、TK6と二重欠損細胞のRSには約5倍程度の差があり、S9mix存在下で二重欠損細胞は感受性を有すると考えられた。

表2. オーラミンの非代謝活性化条件下の生存率実験結果

TK6				
処理用量 (µg/mL)	総well数	コロニー数	補正CE	RS (%)
陰性対照	192	136	0.71	100
50	96	30	0.19	26
75	96	21	0.10	14
100	96	16	0.03	4
125	96	4	0.00	0

### 二重欠損細胞

処理用量 (µg/mL)	総well数	コロニー数	補正CE	RS (%)
陰性対照	192	127	0.61	100
50	96	25	0.12	19
75	96	16	0.05	9
100	96	0	0.00	0
125	96	0	0.00	0

表3. オーラミンの代謝活性化条件下の生存率実験結果

TK6

処理用量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	総well数	コロニー数	補正CE	RS (%)
陰性対照	192	140	0.71	100
50	96	49	0.34	48
75	96	32	0.19	27
100	96	13	0.07	10
125	96	7	0.03	4

#### 二重欠損細胞

処理用量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	総well数	コロニー数	補正CE	RS (%)
陰性対照	192	128	0.67	100
50	96	15	0.08	12
75	96	3	0.01	2
100	96	0	0.00	0
125	96	0	0.00	0

#### D. 考察

オーラミンが陽性を示すエイムス試験や細胞を用いる遺伝毒性試験は、すべて代謝活性化条件下である。また、*in vivo* でオーラミンの主なターゲット組織は、代謝酵素が存在する肝臓である。オーラミンの代謝物の構造や毒性を把握したいところであるが、残念ながら、オーラミンの代謝、吸収、排泄に関する論文報告は無い (Some Aromatic Amines, Organic Dyes, and Related Exposures, IARC Monographs Volume 99, 111-135 (2010))。

オーラミンの DNA 損傷の機構についても不明であるが、オーラミンで陽性を示すエイムス試験菌株が、フレームシフト型の TA98 と TA1538、塩基置換型の TA1535 (Zeiger et al, *Environ. Mol. Mutagen*, 19 Suppl 21; 2-141(1992), Parodi et al, *Carcinogenesis*, 2, 1317-1326 (1981), Varella et al, *Food Chem. Toxicol.* 42, 2029-2035 (2005)) の両方であることから、DNA 鎖切断や DNA 付加体など多様な DNA 損傷が関与していると考えられる。さらに *in vivo* 実験においても、肝臓や腎臓で DNA の断片化が検出された報告 (Parodi et al, *Carcinogenesis*, 2, 1317-1326 (1981), Kitchin et al, *Toxicology*, 88, 31-49 (1994))

が複数あり、オーラミンの代謝物は DNA 鎖切断を形成させると考えられる。XRCC1/XPA 二重欠損細胞を用いた本研究でも、S9mix 存在下の代謝活性化条件下のときに、二重欠損細胞が感受性を示したことから、オーラミンの DNA 損傷が、XRCC1 あるいは XPA による DNA 修復に参与していることが予想される。すなわちオーラミンによる DNA 損傷は、DNA 鎖切断だけでなく、DNA 付加体も形成していることが明らかである。以上の結果から、工業用グレードのオーラミンは、多種多様な DNA 損傷を形成させていると考えられた。

#### E. 結論

XRCC1/XPA 二重欠損細胞は、代謝活性化されたオーラミンに対して感受性を示すことが分かった。よって、二重欠損細胞を tk 遺伝子変異試験に用いれば、XRCC1 あるいは XPA 修復遺伝子が関与する遺伝毒性物質を感度良く検出できると考えられる。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Suzuki T, Yasui M, Honma M; Mutator phenotype and DNA double-strand break repair in BLM helicase-deficient human cells. *Mol. Cell Biol.* **36**, 2877-2889 (2016)

##### 2. 学会発表

- 1) 鈴木愛, Bonnaud P, 佐々彰, 安井学, 宮本明, 本間正充; 8-oxoG 付加数の異なる DNA に対する修復タンパク hOGG1 の高速化量子分子動力学法による親和性評価. 第 45 回日本環境変異原学会, つくば(2016年11月)

#### H. 知的所有権の取得状況

なし

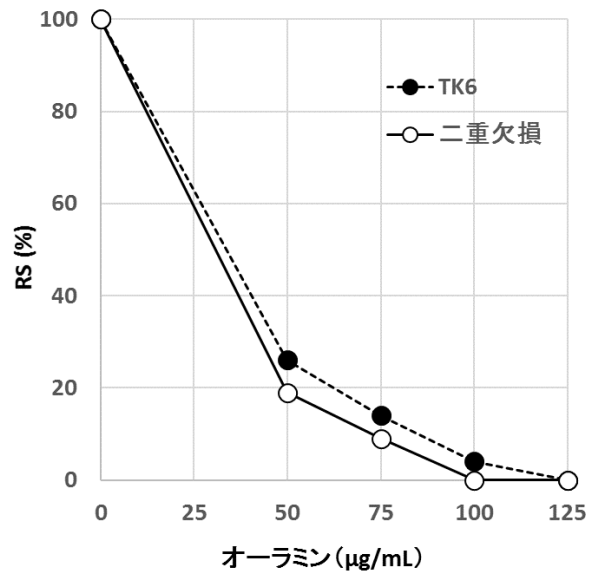


図 2 . S9mix 非存在下のオーラミンに対する細胞相対生存率

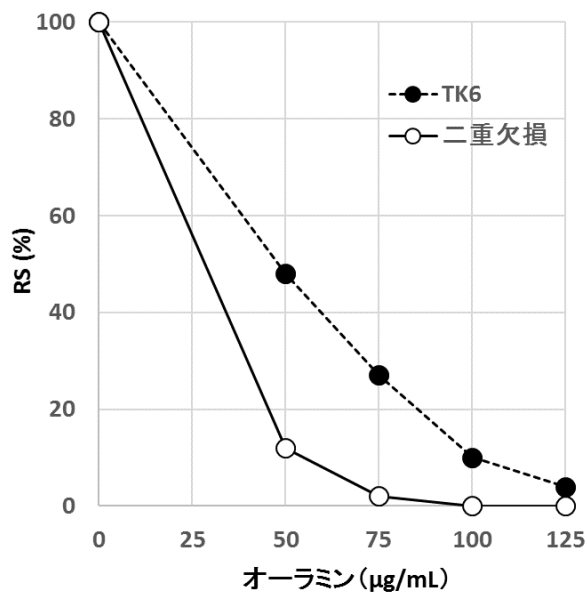


図 3 . S9mix 存在下のオーラミンに対する細胞相対生存率