

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
AOP および IATA に立脚した国際的な安全性評価手法の確立
平成 28 年度分担研究報告書

哺乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験の評価に関する研究

研究分担者 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

OECD の試験ガイドライン (TG490) の運用について検討するため、TK6 細胞を用いた遺伝子突然変異試験を、代謝活性化系非存在下ではメチルメタンサルホン酸 (MMS) を、代謝活性化系存在下ではシクロホスファミド (CP) を用いて、11 機関が実施した。

A. 研究目的

遺伝毒性は、発がん過程の一部である。遺伝毒性を検出するための試験には *in vitro* では細菌を用いる復帰突然変異試験 (Ames 試験) と、哺乳類培養細胞を用いるマウスリンフォーマ試験 (MLA) 染色体異常試験、小核試験、コメット試験がある。*in vivo* ではマウス個体を用いる染色体異常試験、小核試験、コメット試験のほか、トランスジェニックげっ歯類を用いる遺伝子突然変異試験がある。この研究課題では、採択された OECD のテストガイドライン「チミジンキナーゼ遺伝子を用いた哺乳類細胞の *in vitro* 遺伝子突然変異試験」(TG490) について実際にガイドラインに沿って試験を実施し、TG490 の運用について検討することを目的とする。具体的には、マウスリンフォーマ試験とチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子座を用いたヒトリンパ芽球株化細胞試験 (TK6 試験) による同一化合物に対する遺伝子突然変異誘発性の評価、および TK6 試験と他の遺伝子突然変異試験の発がん性のスクリーニング試験としての位置づけを検討する。

B. 研究方法

【細胞】

TK6 細胞、ヒトリンパ芽球様細胞 ; p53 遺伝子は正常で、 θ -メチルグアンニンメチルトランスフェラーゼ (MGMT) 遺伝子を発現していない。凍結保存された細胞を速やかに融解後 50 ~ 200 ml 程度の細胞培養液で、

5% CO₂ 存在下 37 °C で培養し、細胞濃度が 1.5×10^6 /ml 以上にならないように適宜細胞を希釈しながら培養を続け、数日間後、安定した対数増殖期に達したものを使用した。

【試薬等】

馬血清 (SAFC Biosciences; Cat. No. 12449C-500ML) についてロット確認の後、同一ロットを実施機関に配布した。細胞培養液は、上記馬血清を室温状態においたのち 56 °C の湯浴で 60 分間非働化処理したものを 10% 含み、ペニシリン・ストレプトマイシン (Gibco-BRL; Cat. No. 15140) 及びピルビン酸ナトリウム (Gibco-BRL Cat. No. 11840) を、最終濃度がそれぞれ、100 units/mL、100 µg/mL、200 µg/mL になるよう加えた。

TK 変異体の検出にトリフルオロチミジン (TFT; Sigma T2255) を用いた。被験物質として、代謝活性化系非存在下でメチルメタンサルホン酸 (MMS, Sigma-Aldrich 129925-5G) 代謝活性化系存在下で、無水シクロホスファミド (CP, 塩野義製薬 エンドキサン注 100 mg) を、いずれも 5、2.5、1.25、0.625 µg/mL の 4 用量で実施した。但し、一機関は、MMS が 8、5、3、1 µg/mL、CP が 5、3、2、1 µg/mL の用量で実施している。

【操作手順】

- 1 細胞を解凍してフラスコにて 3 日間培養する。以後培養条件はすべて、CO₂ 5%、37 °C である。試験には 2 つのカルチャーを並行して用いた。
- 2 培養後の細胞を計数し、細胞の数を調整して一晩

前培養した。

- 3 細胞数をそろえて、被験物質等で 4 時間処理した。
- 4 処理後すぐに細胞毒性試験用プレート(96ウェル)に細胞播種を実施し、2週間後に黄変ウェルを計数した。これよりPE0を計算。

残りの細胞を洗って検体を除きフラスコに戻したら、24、48、72時間後に細胞を計測し、そのつど細胞濃度を調整した。
- 5 3日間の発現時間をおいた後、TK遺伝子突然変異頻度検出用プレート(MFプレート)と平板効率を求めるためのプレート(PE3プレート)に細胞播種を実施し、2週間後に、黄変ウェルを計数する(normally-growing mutant: NG)
- 6 MFプレートに再びTFTを添加し、さらに14日間培養し、新たに黄変したウェルを数える(slowly-growing mutant: SG)
- 7 検体処理直後(PE0)およびTFTプレート播種時(PE3)に、同時に細胞の平板効率を算出し、細胞毒性の指標とした。NGおよびSG変異体の数を合計した総変異体数から突然変異体頻度を計算した。

(倫理面への配慮)

培養細胞を用いた実験で該当しない。

C. 研究結果

参加した11機関のうち、2機関は適切な結果が得られず、9機関(B、C、E、K、L、N、O、S、T)の結果をまとめた(表1)。うち1機関は代謝活性化系存在下で適切な結果が得られなかった。機関Nの外れ値を除いた溶媒対照の平板効率の平均は、代謝活性化系非存在下で 92.3 ± 18.8 (%)代謝活性化系存在下で 81.9 ± 13.8 (%)だった。PE0とPE3の分布を図1(a)(b)に示した。

5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で処理した場合のTK突然変異体頻度を機関別にまとめた(表2)。平均は、代謝活性化系非存在下、溶媒対照で $8.2 \pm 6.0 (X10^{-6})$ 陽性対照物質のMMSで $44.2 \pm 19.1 (X10^{-6})$ であった。代謝活性化系存在下では、溶媒対照で $6.3 \pm 5.2 (X10^{-6})$ 陽性対照物質のCPで $32.6 \pm 28.1 (X10^{-6})$ であった。平均値としては、いずれも陽性対照物質が溶媒対照の約5倍の値を示し、十分な高頻度が得られていたが、図2に示したように、ばらつきが大きく、 $70 (X10^{-6})$ を超える2機関と、 $40 (X10^{-6})$ 以下で誘発が不十分なその他の機関とに二極化していた。

細胞毒性の結果を図3に示した。MMSでは十分な細胞

毒性を示していたが、CPでは機関によって不十分な結果であった。同時に突然変異体頻度も低く両者には相関があった。

D. 考察

文献(Honma et al., Mutat Res, 374, 89-98, 1997)では、TK6細胞ではPEが70~130%, TK自然突然変異体頻度が $3 \sim 10 \times 10^{-6}$ に収まるのが適切であるとされている。今回の平均値は、PEが-S9mixで 92.3 ± 18.8 (%) +S9mixで 81.9 ± 13.8 (%) またTK自然突然変異体頻度は、-S9mixで $8.2 \pm 6.0 (X10^{-6})$ +S9mixで $6.3 \pm 5.2 (X10^{-6})$ だったことから、おおむね良好な結果と考えられる。

TK自然突然変異体頻度が高い機関は代謝活性化系の有無にかかわらず同じ機関だったので、プロトコルに記載されていない点についての、操作の違いを確認する必要がある。特に、代謝活性化系存在下の結果は、S9mixのロットとの相関があることから、血清のみならず、S9mixのロットの確保も必要と考えられた。

E. 結論

11機関で実施したTK6細胞を用いた遺伝子突然変異試験のプロトコルは、安定した結果を得るために、修正が必要な箇所があると考えられる。

F. 健康危険情報

特筆すべきものは無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

- 1) Wada, K., Kato, Y., Ohnuma-Koyama, A., Takahashi, N., Yamada, M., Matsumoto, K.: 2-Nitroanisole-induced oxidative DNA damage in Salmonella typhimurium and in rat urinary bladder cells, Mutation Research, 816, 18-23, 2017.
- 2) Kimoto, T., Horibata, K., (省略30名), Yamada, M., and Honma, M.: The PIGRET assay, a method for measuring Pig-a gene mutation in reticulocytes, is reliable as a short-term in vivo genotoxicity test:

Summary of the MMS/JEMS-collaborative study across 16 laboratories using 24 chemicals, Mutation Research, 811: 3-15, 2016.

- 3) Sugiyama, K., Yamada, M., Awogi, T., Hakura, A.: The strains recommended for use in the bacterial reverse mutation test (OECD guideline 471) can be certified as non-genetically modified organisms, Genes and Environment, 38: 2, 2016.

2. 学会発表

- 1) 山田雅巳、森田健：遺伝毒性評価における染色体異常試験の要否を問う、日本環境変異原学会第45

回大会 シンポジウム、2016年

- 2) Yamada, M., Matsuda, S., Matsuda, T.: Application of single-molecule real-time (SMRT™) sequencing technology to mutation assay, 45th European Environmental Mutagenesis & Genomics Society, 2016

H. 知的財産所有権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

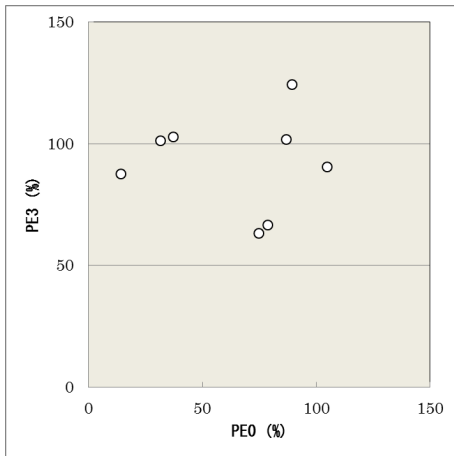
3. その他

なし

表 1 溶媒対照における処理直後 (PE0) と発現 72 時間後 (PE3) の平板効率 (± S9mix 条件)

-S9	B	C	E	K	L	N	O	S	T
PE0	104.8	31.7	74.8	14.3	37.3	363.8	86.7	89.3	78.6
PE3	90.5	101.3	63.1	87.6	102.9	110	101.7	124.3	66.7
+S9	B	C	E	K	L	N	O	S	T
PE0	130.9	50.1	56.1		39.1	388	65.7	70.2	106.5
PE3	108.2	93.1	67.9		81.6	114.3	76.8	80.5	64.9

(a) 代謝活性化系非存在下 (-S9)



(b) 代謝活性化系存在下 (+S9)

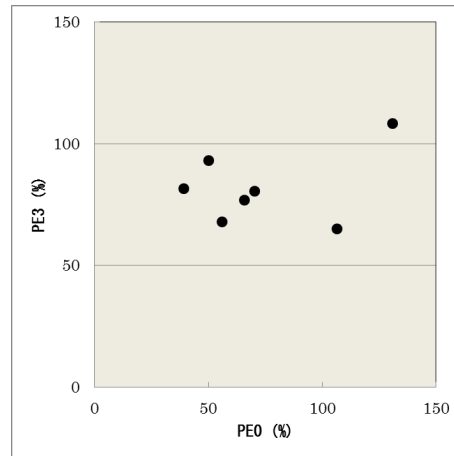


図 1 溶媒対照における処理直後 (PE0) と発現 72 時間後 (PE3) の平板効率の分布

表 2 溶媒対照 (N; 生理食塩水) と陽性対照物質 (MMS/CP) についての突然変異体頻度 (X10⁻⁶)

-S9	B	C	E	K	L	N	O	S	T
N	6.0	18.0	5.8	19.5	8.8	2.6	3.6	6.4	2.8
MMS	30.0	69.4	40.7	41.5	85.5	28.8	23.6	36.3	41.7
+S9	B	C	E	K	L	N	O	S	T
N	3.2	16.9	0		11.2	2.7	2.6	5.0	8.5
CP	-	76.5	7.9		66.8	19.0	7.9	17.3	-

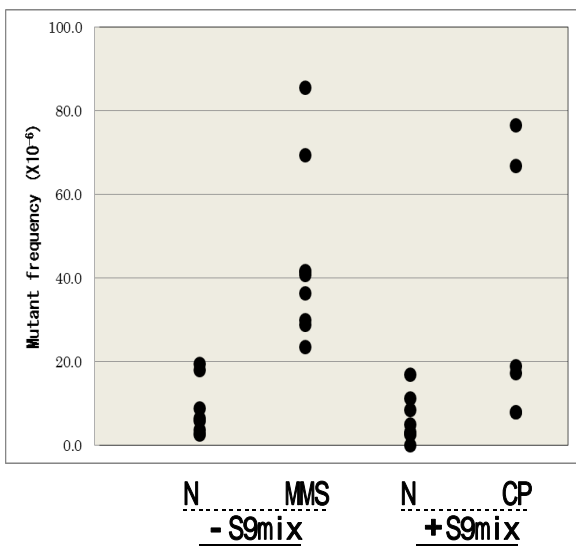


図 2 溶媒対照 (N) と陽性対照物質 (MMS/CP) についての突然変異体頻度
 溶媒は生理食塩水を用いた。MMS、CP はいずれも 5 µg/mL を用いた。

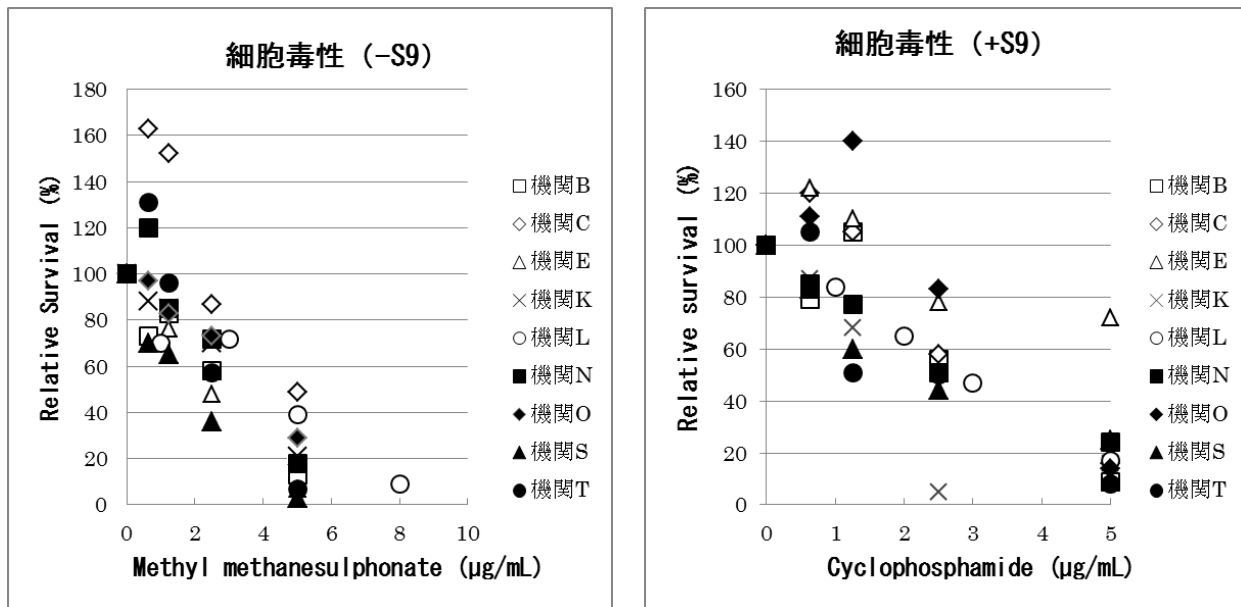


図3 TK6 アッセイにおける細胞毒性 (±S9mix 条件)