

平成 29 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品医薬品等リスク分析研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：化審法で規定された変異原性検出試験（チミジンキナーゼ試験）を改善する手法
の開発

分担研究課題名：XRCC1/XPA二重欠損細胞を用いるチミジンキナーゼ遺伝子変異試験の最適化

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 室長

研究要旨

革や繊維製品，そしてインクの着色剤として利用されているオーラミンは，オーラミン本体（純度約 80 %）以外に Michler's 塩基（オーラミン製造の中間体），および Michler's ケトン（オーラミンの加水分解産物）を数%含有する混合物である。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。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，哺乳類細胞を用いる遺伝毒性試験では，オーラミンの陽性結果は非常に少なく，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。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，DNA 修復に関わる X-ray repair cross complementing 1 (XRCC1) と Xeroderma pigmentosum group A (XPA) タンパク質を欠損させた XRCC1/XPA 二重欠損細胞（ヒトリンパ芽球細胞 TK6 由来）を使って，チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子変異試験を行った。その結果，XRCC1/XPA 二重欠損細胞を用いることによって，代謝活性化されたオーラミンを容易に陽性にすることができた。よって，二重欠損細胞を用いる TK 遺伝子変異試験は，これまで検出できなかった変異原物質に対してもスクリーニング可能であることが分かった。

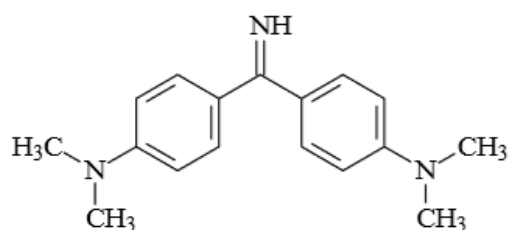
キーワード:チミジンキナーゼ遺伝子変異試験，ミュータント細胞，細胞相対生存率

A．研究目的

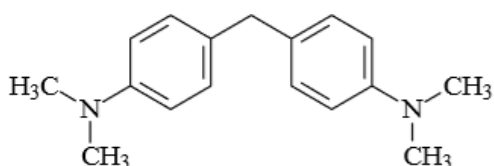
革や繊維製品，そしてインクの着色剤として利用されているオーラミンは，中間生成物を介する2段階工程で製造されるため，オーラミン本体（純度約 80 %）以外に Michler's 塩基（オーラミン製造の中間体），および Michler's ケトン（オーラミンの加水分解産物）を数%含有する混合物である。これらの3つの物質は，齧歯類で多くの部位に腫瘍を誘発することから，

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。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 塩基と Michler's ケトン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

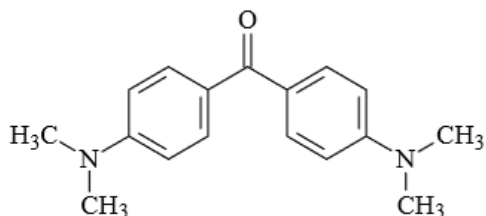
伝毒性試験において陽性である (Some Aromatic Amines, Organic Dyes, and Related Exposures, IARC Monographs Volume 99, 111-135 (2010))。



オーラミン



Michler's 塩基 (オーラミン製造の中間体)



Michler's ケトン (オーラミンの加水分解産物)

図 1.オーラミンの化学構造

しかしながら、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、DNA 修復に関わる X-ray repair cross complementing 1 (XRCC1) と Xeroderma pigmentosum group A (XPA)タンパク質を欠損させた XRCC1/XPA 二重欠損細胞 (ヒトリンパ芽球細胞 TK6 株由来) を使って、チミジンキナー

ゼ (TK) 遺伝子変異試験 (OECD ガイドライン TG490) を実施し、実験条件等の最適化を行った。

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。TK6 細胞、および XRCC1/XPA 二重欠損細胞は、10% 馬血清 (JRH Bioscience)、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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_2)。

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 40, 30, 20, 10, 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、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。陽性対照物質として、代謝活性化条件ではシクロホスファミド (CP, 塩野義製薬株, 注射用エンドトキサン)、および非代謝活性化ではシスプラチン (和光純薬工業株) を使用した。オーラミン処理後、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 50 ml で細胞を分散させ細胞濃度を測定した。その 50 ml (濃度約 4×10^5 cells/ml) の処理細胞は、37 度、5% CO_2 で培養を開始し、TK 遺伝子突然変異に用いた。それとは別に、平板効率 Cloning efficiency (CE) を計算するため (式 1)、約 1.6 cell/ウェルの濃度で 96 ウェル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 4×10^6 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 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ウェル数であり、TW は総ウェル数である。N は、1 ウェル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 2×10^7 cells (表 1) である。

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

TK 遺伝子変異試験では、細胞生存率を調べるために、処理直後に細胞を播く CE0 播種、および処理してから 3 日後に細胞を播く CE3 播種がある。被験物質で処理された直後の細胞相対生存率 $RS0 (\%)$ は、CE0 から算出され、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、 $RS0 = 20 \sim 10\%$ 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った。

また、後述するが $RS0 = 20 \sim 10\%$ では細胞毒性が強い場合は、 $RS0 = 50 \sim 40\%$ となる用量を最大用量として TK 遺伝子変異試験を実施した。

$$RS0 (\%) = \text{処理培養の補正 CE0} / \text{溶媒対照の補正 CE0} \times 100 \quad \dots (式 3)$$

4. TK 遺伝子変異試験、およびその細胞毒性指標 (RSG と RTG)

前述の細胞相対生存率 $RS0$ の他に、被験物質処理による細胞毒性の指標として、式 4 に示す Relative Suspension Growth (RSG) と Relative Total Growth (RTG) を算出した (表 2 ~ 5)。被験物質を処理後、細胞を 3 日間培養する。その際に、浮遊細胞増殖比 1 ($SG1$) は、0 日目から 1 日目の増殖比 (1 日目の細胞濃度 / 0 日目の細胞濃度) で、浮遊細胞増殖比 2 ($SG2$) は 1 日目から 2 日目の増殖比 (2 日目の細胞濃度 / 1 日目の細胞濃度) である。RSG は無処理 / 溶媒対照に対する処理培養の総 SG ($SG1 \times SG2 \times SG3$) である (式 4)。

RTG は、式 5 で示したように、RSG と $RS3$ (式 3 と類似) の積で算出した。

$$RSG = [SG1(\text{処理}) \times SG2(\text{処理}) \times SG3(\text{処理})] / [SG1(\text{対照}) \times SG2(\text{対照}) \times SG3(\text{対照})] \quad \dots (式 4)$$

$$RTG (\%) = RSG \times \%RS3 \quad \dots (式 5)$$

$$RS3 (\%) = \text{処理培養の CE3} / \text{溶媒対照の CE3} \times 100 \quad \dots (式 6)$$

培養 3 日目では、平板効率を求めるための CE3 プレート (CE0 と同様に細胞の CE3 播種を行う) と突然変異体検出用の Mutant Frequency (MF) プレートを作成した。MF プレートは、TFT 試薬 $3 \mu\text{g/ml}$ の存在下で、1 ウェルあたり 40,000 細胞になるように 96 ウェルマイクロプレートに播種した。

生育したコロニーを含むウェルは、培地の色が赤色から黄色に明らかに変わるため、その色調変化でコロニーの有無 (EW) をカウントした。なお、本研究で使用した XRCC1/XPA 二重

欠損細胞は TK6 細胞よりも増殖が遅いため、CE0 プレートは細胞播種 14 日後、CE3 プレート、TFT を含む MF プレートは細胞播種 21 日後にコロニーを観察した。培地に色調変化のあったウェルのコロニーを NG 変異コロニー (Normally growing mutant colonies) としてカウントした。また、この 21 日後ではその MF プレートの各ウェルに 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TFT を 25 μL ずつ再添加し、さらに 7 日間培養した。細胞播種してから計 28 日後、先と同様に培地の色調変化によって生育コロニーを観察し、それを SG 変異コロニー (slowly growing mutant colonies) としてカウントした。

MF プレートの突然変異コロニーは、ポアソン分布に従い、式 7 を用いて算出した。EW は、コロニーを含まないウェル数であり、TW は総ウェル数である。N は、1 ウェル当たりの平均細胞数 (本実験では $N = 40,000$) である。

MF は、下記のように総遺伝子突然変異頻度 (T-MF)、NG コロニーの遺伝子突然変異頻度 (N-MF)、SG コロニーの遺伝子突然変異頻度 (S-MF) の 3 つを算出できる。

$$\text{MF} = [-\ln(\text{EW} / \text{TW}) / N] / \text{処理培養の CE3} \quad \dots (\text{式 } 7)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{N-MF ; } \text{EW}_N = 192 - A \\ \quad \quad \quad \text{TW}_N = 192 \\ \text{S-MF ; } \text{EW}_S = (192 - A) - B \\ \quad \quad \quad \text{TW}_S = 192 - A \\ \text{T-MF ; } \text{EW}_T = 192 - (A + B) \\ \quad \quad \quad \text{TW}_T = 192 \\ \text{(192 個のウェルのうち 21 日後の観察で} \\ \text{NG コロニーを含むウェルが } A \text{ 個, 28 日後} \\ \text{の観察時に SG コロニーのみを含むウェル} \\ \text{が } B \text{ 個出現したとする)} \end{array} \right.$$

C . 研究結果

1 . 遺伝子破壊細胞を用いる TK 遺伝子変異試験の陽性対照物質の決定

本研究では、XRCC1/XPA 二重欠損細胞を TK 遺伝子変異試験に使用するため、その野生株である TK6 細胞の TK 遺伝子変異頻度よりも十分に有意差が得られる陽性対照物質が必要であると考え、シスプラチンの利用を検討した。S9mix 非存在下で、シスプラチン(最終濃度 1.5, 0.9, 0.3, 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)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図 2 左に示した。最小用量の 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では、TK6 細胞は細胞毒性が $\text{RS} = 77\%$ にとどまったが、二重欠損細胞は 31%まで生存率が減少した。次に、 $\text{RS}_0 = 20 \sim 10\%$ となる用量を最大用量 (最終濃度 1.5, 0.9, 0.3, 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)として TK 遺伝子変異試験を行った。その結果、TK6 細胞を用いた時の TK 遺伝子の変異頻度は、用量依存的に緩やかに上昇することが観察された (図 2 右) が、二重欠損細胞を使用した時は陰性対照よりも約 2.5 倍以上 (シスプラチン 0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の TK 遺伝子変異頻度が得られた (図 2 右)。つまり、シスプラチンは非代謝活性化条件における TK 遺伝子変異試験の陽性対照物質として有効であると分かった。なお、代謝活性化条件における陽性対照物質としては、OECD ガイドラインどおり CP を使用し、上と同様の検討をした (図 3)。CP 処理に対して、TK6 細胞と二重欠損細胞のそれぞれの TK 遺伝子変異頻度の上昇に明確な差は見られないが、S9mix によって代謝活性化されたことを示す陽性対照物質としては大変有効であるため、CP を今回の研究においても陽性対照物質とした。

2 . 遺伝子破壊細胞を用いる TK 遺伝子変異試験の最適化

XRCC1/XPA 二重欠損細胞を TK 遺伝子変異試験に使用するため最適化を行った。まず、図 2 右、図 3 右のグラフで見られるように、二重欠損細胞の自然 TK 遺伝子変異誘発頻度 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) が比較的高いこと (20×10^{-6} を超える時もある) である。この細胞をクレンジング処理すると、図 4 右、および図 5 右で示した例のよ

うに、T-MF を 10×10^{-6} 程度に抑えられたケースもあったが、その野生株である TK6 細胞の自然 TK 遺伝子変異誘発頻度 (T-MF = $3 \sim 8 \times 10^{-6}$) の 2 倍以下に抑えることは困難であることが分かった (現在、二重欠損細胞の自然突然変異頻度の再現性を確認中である)。よって、二重欠損細胞を用いる場合には細胞のクレンジング処理は必須であると考えられた。

次に、TK 遺伝子変異試験 (OECD ガイドライン TG490) では、細胞毒性がある場合、RS0 = 20 ~ 10% の用量を最大用量として実施されるため、本研究もそれに従い行った。しかしながら、感受性を高めた二重欠損細胞にとって、RS0 = 20 ~ 10% の用量設定では毒性が強すぎたため、試験を最後まで継続できないことが頻繁にあった (data not shown)。この結果から、遺伝子破壊細胞を用いる TK 遺伝子変異試験は、OECD ガイドラインに適用することができないことが分かった。よって、本研究では細胞生存率が 50% を超える用量 (RS0 = 50 ~ 40% 程度) を最大用量として TK 遺伝子変異試験をすることにした。

3. 非代謝活性化条件下におけるオーラミンの TK 遺伝子変異試験

S9mix 非存在下で、オーラミン (最終濃度 40, 30, 20, 10, 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 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図 4 左に示した。最小用量の 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では、TK6 細胞はほとんど細胞毒性 (RS = 98%) が観察されないが、二重欠損細胞は 69% まで生存率が減少した。次に、RS0 = 50 ~ 40% となる用量を最大用量 (最終濃度 40, 30, 20, 10, 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) として TK 遺伝子変異試験を行った (図 4 右)。その結果、TK6 細胞を用いた時の変異頻度は全用量で変化がほとんど見られなかった。一方、二重欠損細胞のそれは少し上昇する傾向が観察された。

4. 代謝活性化条件下におけるオーラミンの TK

遺伝子変異試験

S9mix 存在下で、オーラミン (最終濃度 40, 30, 20, 10, 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 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図 5 左に示した。最小用量の 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では、TK6 細胞は細胞毒性が観察されないが、二重欠損細胞は 80% を示し、すべての用量で TK6 細胞の生存率よりも常時低い RS 値だった。次に、RS0 = 50 ~ 40% となる用量を最大用量 (最終濃度 40, 30, 20, 10, 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) として TK 遺伝子変異試験を行った (図 5 右)。その結果、TK6 細胞を用いた時の変異頻度は、用量依存的に緩やかに上昇傾向が見られ、20 ~ 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量でプラトーに達しているように見える。一方、二重欠損細胞のそれは最小用量の 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、明らかに上昇することが確認できた。このことから、二重欠損細胞は、S9mix 存在下でオーラミンを容易に陽性として検出できると考えられた。

D. 考 察

現在も計測中であるが、二重欠損細胞の自然 TK 遺伝子変異誘発頻度は、クレンジング直後は、T-MF = 10×10^{-6} 程度となっているが、細胞ストックのロットによっては 20×10^{-6} を超える場合もあり、安定しなかった。この現象は XRCC1 と XPA 修復タンパク質が欠損していることで、DNA 損傷が自然に蓄積し、TK 遺伝子の自然突然変異頻度を上昇させたためであると予想できる。NG カウントおよび SG カウントによるそれぞれの N-MF や S-MF の値から、前者は小さな塩基変異、後者は染色体レベルの大きな構造異常の誘発を予想できるが、それらの値を見ても、二重欠損細胞のみに、どちらかの MF が上昇するわけではなく、どちらも TK6 細胞よりも値が大きくなっていった。つまり、塩基レベルの小さい変異から染色体レベルの大きな構造異常まで、様々な DNA 損傷が蓄積していると予想できた (表 2 ~ 5)。

OECD ガイドライン (TG490) で規定されて

いる RS0 = 20 ~ 10% の用量では、二重欠損細胞は感受性が強すぎたため、本研究では、細胞生存率が 50% を超える用量 (RS0 = 50 ~ 40% 程度) で TK 遺伝子変異試験を実施した。しかしながら、図 5 右に示したように最大用量の 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では、二重欠損細胞の試験を継続できなかった。つまり、感受性を高めた二重欠損細胞は、RS0 = 50 ~ 40% の用量であっても毒性が強かったと考えられ、より細胞毒性の低い RS=60 ~ 50% 程度 (細胞生存率が 50% を超えない用量) で TK 遺伝子変異試験を実施したほうがよいことが分かった。しかしながら、被験物質が変わると、二重欠損細胞に対する感受性も変わると考えられるため、用量設定試験を行った上で被験物質ごとに最適な用量を予想して、都度に試験を最適化していく必要があると考えられた。

本研究において、非代謝活性化条件下では明らかな TK 遺伝子変異頻度の上昇は観察されなかった (図 4) が、代謝活性化条件下では低用量域から変異頻度が上昇し、それは用量依存的であった (図 5)。この結果から、オーラミンの変異原性は代謝活性化によって誘発されることが明らかになった。オーラミンを用いたエイムス試験、ほ乳類細胞を用いる遺伝毒性試験において、陽性を示すのは代謝活性化条件下のみであり、本研究の結果と一致している。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 損傷の構造や形成機構についても不明であるが、最近、オーラミンが細胞の核に蓄積しやすいとの報告があり、等温滴定量熱計を用いて、オーラミンと DNA の結合性についてモデリングが行われた (Tung et al, *Environ. Toxicol.* 32, 2379-2391 (2017))。オーラミンのメチルアミノ基が熱力学的観点から DNA との結合に重要であることが示されたが、DNA

付加体などの構造物については言及されておらず、オーラミンの DNA 損傷性および DNA 付加体については未知のままである。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。本研究で得られたオーラミンの NG カウント、および SG カウントによるそれぞれの N-MF や S-MF の値 (表 2 ~ 5) から、前者は小さな塩基変異、後者は染色体レベルの大きな構造異常の誘発を予想できるが、二重欠損細胞だけに見られる規則的な上昇する値はなく、TK6 細胞と特徴的な差はないと考えられた (代謝活性化条件下)。以上のことから、オーラミンは塩基レベルの小さい DNA 損傷から染色体異常レベルの大きな DNA 損傷まで、多種多様な DNA 損傷を形成させ、それらが XRCC1 あるいは XPA による DNA 修復に強く関与していることが明らかとなった。

E. 結論

XRCC1/XPA 二重欠損細胞を用いる TK 遺伝子変異試験によって、代謝活性化されたオーラミンを容易に陽性にする事ができた。よって、二重欠損細胞を用いる TK 遺伝子変異試験は、これまで検出できなかった変異原物質に対してもスクリーニング可能であることが分かった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 福田隆之, 中村真生, 佐藤亮佑, 藤原聖, 佐々彰, 鵜飼明子, 武田俊一, 安井学, 本間正充; TK6 及びその DNA 修復遺伝子破壊変異体を用いた高感度遺伝毒性試験法の開発
第 46 回日本環境変異原学会, 東京 (2017 年 11 月)
- 2) Takayuki Fukuda, Maki Nakamura, Ryosuke Sato, Sho Fujiwara, Akira Sassa, Akiko Ukai, Shunichi Takeda, Manabu Yasui, Masamitsu Honma; Highly sensitive genotoxicity test system for detection of ames-positive compounds in TK6 and its DNA repair mutants.
12th International Conference of Environmental Mutagens, 韓国 (2017 年 11 月)

H. 知的所有権の取得状況

なし

陽性対照の条件検討(非代謝活性化)

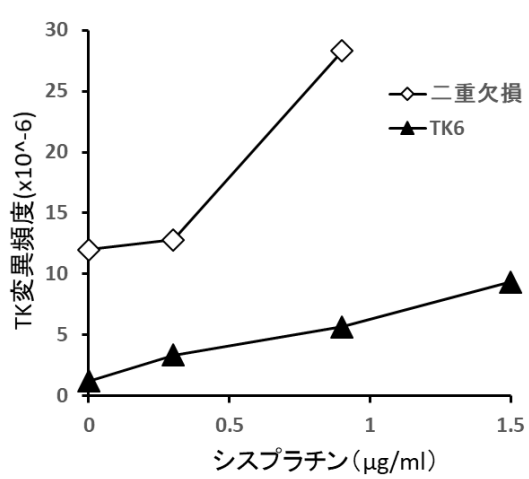
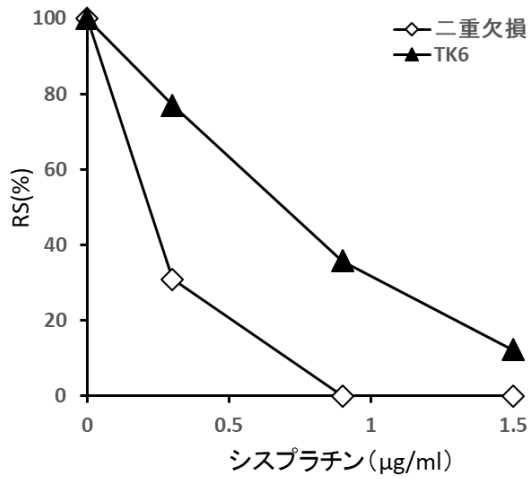


図 2 . 陽性対照物質シスプラチン処理に対する細胞相対生存率および TK 遺伝子変異頻度

陽性対照の条件検討(代謝活性化)

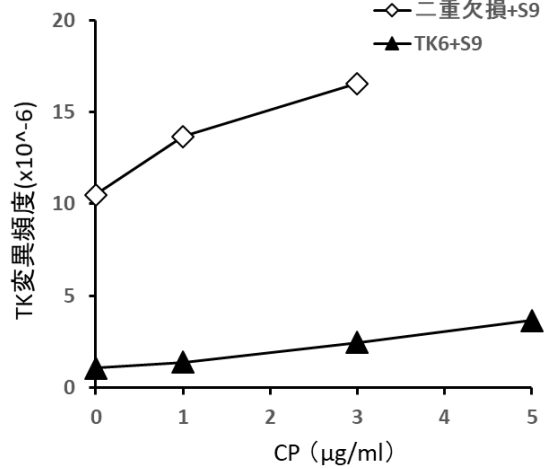
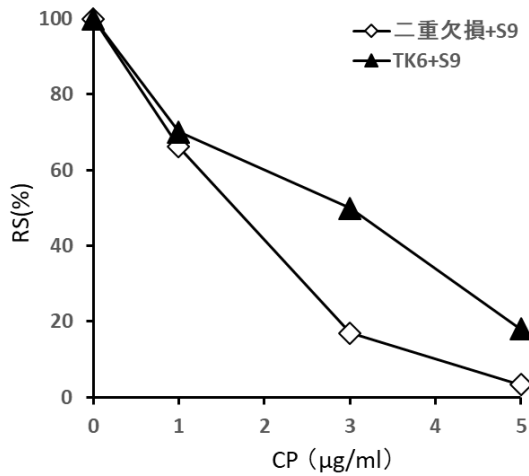


図 3 . 陽性対照物質 CP 処理に対する細胞相対生存率および TK 遺伝子変異頻度

非代謝活性化条件

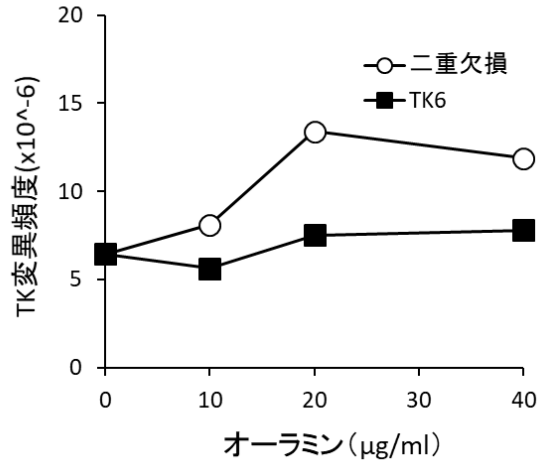
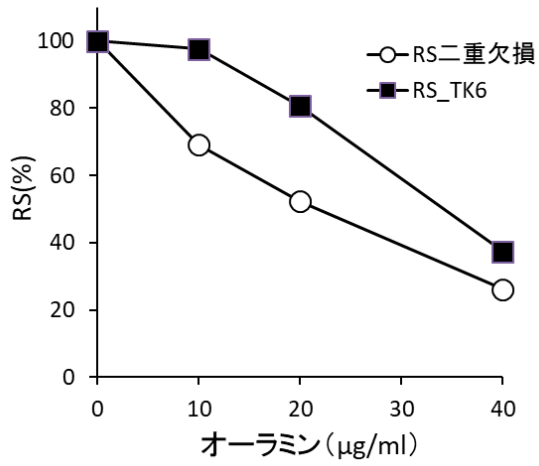


図4 . S9mix 非存在下のオーラミンに対する細胞相対生存率および TK 遺伝子変異頻度

代謝活性化条件

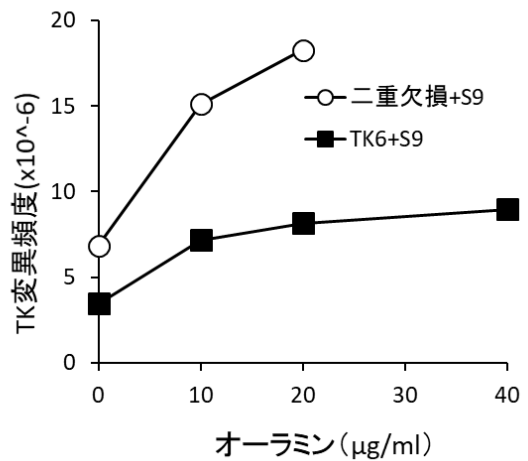
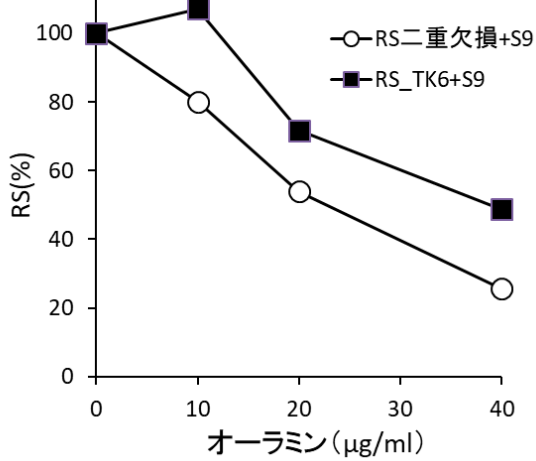


図5 . S9mix 存在下のオーラミンに対する細胞相対生存率および TK 遺伝子変異頻度

表 2 . TK6 細胞を用いた TK 遺伝子変異試験 (非代謝活性化条件)

Table 1 Cell growth during treatment & expression time (-S9)

TK6	Conc. (ug/mL)	Cell conc. ($\times 10^5$ /mL) during treatment		Cell conc. ($\times 10^5$ /mL) during expression						Daily cell growth				
				Day 0		Day 1		Day 2		Day 3	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1
		Before	After	Start	Before	After	Before	After	End				$\times 2 \times 3$	
H ₂ O	0		27.4	4.0	8.5	4.0	10.3	4.0	8.7	2.13	2.58	2.17	11.92	1.000
Auramin	10		21.7	4.0	6.8	4.0	11.3	4.0	9.7	1.71	2.83	2.44	11.75	0.986
-S9	20	22.2	23.9	4.0	6.1	4.0	9.5	4.0	8.1	1.52	2.38	2.03	7.35	0.617
	40		22.6	4.0	3.3	3.3	7.5	4.0	8.0	0.82	2.29	1.99	3.73	0.313
Cisplatin	0.8		27.2	4.0	6.0	4.0	6.1	4.0	7.6	1.50	1.52	1.90	4.32	0.363

Comments:
RSG: Relative suspension growth

Table 2 Cell viability on Day 0 (-S9)

TK6	Conc. (ug/mL)	Positive well no.			Total well no.	Negative well no.	CE0 (%)	Adjusted CE3(%)	RS0 (%)
		Plate 1	Plate 2	Total					
H ₂ O	0	79	79	158	192	34	108.2	133.5	100.0
Auramin	10	83		83	96	13	125.0	122.1	91.5
-S9	20	74		74	96	22	92.1	99.1	74.2
	40	53		53	96	43	50.2	51.1	38.3
Cisplatin	0.8	49		49	96	47	44.6	54.7	41.0

Comments:
CE: Cloning efficiency
RS: Relative survival

Table 3 Cell viability on Day 3 (-S9)

TK6	Conc. (ug/mL)	Positive well no.			Total well no.	Negative well no.	CE3 (%)	Adjusted CE3(%)	RS0 (%)
		Plate 1	Plate 2	Total					
H ₂ O	0	70	70	140	192	52	81.6	100.8	100.0
Auramin	10	73		73	96	23	89.3	87.3	86.6
-S9	20	76		76	96	20	98.0	105.5	104.7
	40	66		66	96	30	72.7	74.0	73.4
Cisplatin	0.8	81		81	96	15	116.0	142.1	141.1

Comments:
RTG: Relative total growth

Table 4 Count of mutant colonies (-S9)

TK6	Conc. (ug/mL)	Positive well no.														
		Plate 1			Plate 2			Plate 3			Plate 4			Plate 5		
		N	S	Total	N	S	Total	N	S	Total	N	S	Total	N	S	Total
H ₂ O	0	10	1	11	10	1	11	10	1	11	11	1	12			0
Auramin	10	14	3	17	14	4	18			0			0			0
-S9	20	21	3	24	21	4	25			0			0			0
	40	18	1	19	19	1	20			0			0			0
Cisplatin	0.8	40	10	50	40	11	51			0			0			0

Table 5 Mutation frequency (-S9)

TK6	Conc. (ug/mL)	Positive well no.			Total well no.	Negative well no.	CE3	Mut. freq. ($\times 10^6$)			%SG
		N	S	Total				N-MF	S-MF	T-MF	
H ₂ O	0	41	4	45	384	339	1.0	2.8	0.3	3.1	9.4
Auramin	10	28	7	35	192	157	0.9	4.5	1.2	5.8	21.7
-S9	20	42	7	49	192	143	1.1	5.8	1.1	7.0	16.2
	40	37	2	39	192	153	0.7	7.2	0.4	7.7	5.7
Cisplatin	0.8	80	21	101	192	91	1.4	9.5	3.7	13.1	27.8

Comments:
MF: Mutation frequency; N: Normally growing colony; S: Slowly growing colony; T: Total
%SG: Ratio of S-MF to T-MF

表3. 二重欠損細胞を用いたTK 遺伝子変異試験 (非代謝活性化条件)

Table 1 Cell growth during treatment & expression time (-S9)

二重破壊株	Conc. (ug/mL)	Cell conc. ($\times 10^5$ /mL) during treatment		Cell conc. ($\times 10^7$ /mL) during expression						Daily cell growth				
				Day 0		Day 1		Day 2		Day 3		Day 1	Day 2	Day 3
		Before	After	Start	Before	After	Before	After	End				$\times 2 \times 3$	
H ₂ O	0	22.7	22.7	4.0	6.5	4.0	8.2	4.0	7.6	1.62	2.06	1.91	6.35	1.000
Auramin	10	18.3	18.3	4.0	6.6	4.0	7.9	4.0	7.9	1.65	1.98	1.97	6.41	1.010
-S9	20	20.1	20.1	4.0	4.0	4.0	10.0	4.0	7.0	1.01	2.49	1.74	4.37	0.688
	40	20.5	20.5	4.0	2.6	2.6	6.1	4.0	6.9	0.64	2.36	1.73	2.62	0.413
Cisplatin	0.8	23.5	23.5	4.0	2.9	2.9	1.7	1.7	2.8	0.71	0.59	1.67	0.70	0.110

Comments:

RSG: Relative suspension growth

Table 2 Cell viability on Day 0 (-S9)

二重破壊株	Conc. (ug/mL)	Positive well no.			Total well no.	Negative well no.	CE0 (%)	Adjusted CE(%)	RS0 (%)
		Plate 1	Plate 2	Total					
H ₂ O	0	69	70	139	192	53	80.5	82.3	100.0
Auramin	10	65		65	96	31	70.6	58.2	70.8
-S9	20	57		57	96	39	56.3	51.0	62.0
	40	36		36	96	60	29.4	27.1	33.0
Cisplatin	0.8	20		20	96	76	14.6	15.5	18.8

Comments:

CE: Cloning efficiency

RS: Relative survival

Table 3 Cell viability on Day 3 (-S9)

二重破壊株	Conc. (ug/mL)	Positive well no.			Total well no.	Negative well no.	CE3 (%)	Adjusted CE3(%)	RS0 (%)
		Plate 1	Plate 2	Total					
H ₂ O	0	70	71	141	192	51	82.9	84.7	100.0
Auramin	10	72		72	96	24	86.6	71.4	84.3
-S9	20	66		66	96	30	72.7	65.8	77.7
	40	74		74	96	22	92.1	85.0	100.4
Cisplatin	0.8	69		69	96	27	79.3	83.9	99.1

Comments:

RTG: Relative total growth

Table 4 Count of mutant colonies (-S9)

二重破壊株	Conc. (ug/mL)	Positive well no.														
		Plate 1			Plate 2			Plate 3			Plate 4			Plate 5		
		N	S	Total	N	S	Total	N	S	Total	N	S	Total	N	S	Total
H ₂ O	0	13	5	18	13	5	18	14	5	19	14	5	19			0
Auramin	10	20	3	23	21	3	24			0			0			0
-S9	20	26	5	31	26	5	31			0			0			0
	40	34	0	34	34	0	34			0			0			0
Cisplatin	0.8	63	5	68	63	6	69			0			0			0

Table 5 Mutation frequency (-S9)

二重破壊株	Conc. (ug/mL)	Positive well no.			Total well no.	Negative well no.	CE3	Mut. freq. ($\times 10^6$)			%SG
		N	S	Total				N-MF	S-MF	T-MF	
H ₂ O	0	54	20	74	384	310	0.8	4.5	1.8	6.3	29.2
Auramin	10	41	6	47	192	145	0.7	8.4	1.4	9.8	14.4
-S9	20	52	10	62	192	130	0.7	12.0	2.8	14.8	19.0
	40	68	0	68	192	124	0.9	12.9	0.0	12.9	0.0
Cisplatin	0.8	126	11	137	192	55	0.8	31.8	5.4	37.2	14.6

Comments:

MF: Mutation frequency; N: Normally growing colony; S: Slowly growing colony; T: Total

%SG: Ratio of S-MF to T-MF

表 4 . TK6 細胞を用いた TK 遺伝子変異試験 (代謝活性化条件)

Table 1 Cell growth during treatment & expression time (+S9)

TK6	Conc. (ug/mL)	Cell conc. ($\times 10^5$ /mL) during treatment		Cell conc. ($\times 10^5$ /mL) during expression						Daily cell growth				
				Day 0		Day 1		Day 2		Day 3	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1
		Before	After	Start	Before	After	Before	After	End	$\times 2 \times 3$				
H ₂ O	0	28.1	4.0	7.5	4.0	10.6	4.0	8.8	1.88	2.65	2.20	10.97	1.000	
Auramin +S9	10	27.9	4.0	8.2	4.0	9.0	4.0	8.8	2.05	2.25	2.21	10.17	0.927	
	20	27.0	4.0	7.5	4.0	8.6	4.0	9.1	1.87	2.14	2.27	9.07	0.827	
	40	25.3	4.0	5.3	4.0	9.1	4.0	8.3	1.33	2.27	2.07	6.22	0.567	
CP	3	25.8	4.0	2.7	2.7	7.2	4.0	6.7	0.67	2.70	1.66	3.00	0.274	

Comments:

RSG: Relative suspension growth

Table 2 Cell viability on Day 0 (+S9)

TK6	Conc. (ug/mL)	Positive well no.			Total well no.	Negative well no.	CE0 (%)	Adjusted CE(%)	RS0 (%)
		Plate 1	Plate 2	Total					
H ₂ O	0	76	76	152	192	40	98.0	124.1	100.0
Auramin +S9	10	74		74	96	22	92.1	115.7	93.3
	20	64		64	96	32	68.7	83.5	67.3
	40	53		53	96	43	50.2	57.2	46.1
CP	3	46		46	96	50	40.8	47.4	38.2

Comments:

CE: Cloning efficiency

RS: Relative survival

Table 3 Cell viability on Day 3 (+S9)

TK6	Conc. (ug/mL)	Positive well no.			Total well no.	Negative well no.	CE3 (%)	Adjusted CE3(%)	RS0 (%)
		Plate 1	Plate 2	Total					
H ₂ O	0	75	76	151	192	41	96.5	122.1	100.0
Auramin +S9	10	76		76	96	20	98.0	123.2	100.9
	20	71		71	96	25	84.1	102.3	83.7
	40	66		66	96	30	72.7	82.8	67.8
CP	3	63		63	96	33	66.7	77.6	63.5

Comments:

RTG: Relative total growth

Table 4 Count of mutant colonies (+S9)

TK6	Conc. (ug/mL)	Positive well no.														
		Plate 1			Plate 2			Plate 3			Plate 4			Plate 5		
		N	S	Total	N	S	Total	N	S	Total	N	S	Total	N	S	Total
H ₂ O	0	11	1	12	11	1	12	11	1	12	11	1	12			0
Auramin +S9	10	21	2	23	21	3	24			0			0			0
	20	21	1	22	22	2	24			0			0			0
	40	20	2	22	20	2	22			0			0			0
CP	3	37	6	43	37	6	43			0			0			0

Table 5 Mutation frequency (+S9)

TK6	Conc. (ug/mL)	Positive well no.			Total well no.	Negative well no.	CE3	Mut. freq. ($\times 10^6$)			%SG
		N	S	Total				N-MF	S-MF	T-MF	
H ₂ O	0	44	4	48	384	336	1.2	2.5	0.2	2.7	8.9
Auramin +S9	10	42	5	47	192	145	1.2	5.0	0.7	5.7	12.1
	20	43	3	46	192	146	1.0	6.2	0.5	6.7	7.4
	40	40	4	44	192	148	0.8	7.0	0.8	7.9	10.2
CP	3	74	12	86	192	106	0.8	15.7	3.5	19.1	18.1

Comments:

MF: Mutation frequency; N: Normally growing colony; S: Slowly growing colony; T: Total

%SG: Ratio of S-MF to T-MF

表5. 二重欠損細胞を用いたTK遺伝子変異試験(代謝活性化条件)

Table 1 Cell growth during treatment & expression time (+S9)

二重破壊株	Conc. (ug/mL)	Cell conc. ($\times 10^5$ /mL) during treatment		Cell conc. ($\times 10^5$ /mL) during expression						Daily cell growth						
		Before	After	Day 0		Day 1		Day 2		Day 3		Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	RSG
				Start	End	Before	After	Before	After	Before	After					
H ₂ O	0	19.4	4.0	6.9	4.0	8.2	4.0	7.5	1.73	2.04	1.87	6.62	1.000			
Auramin	10	19.2	4.0	4.3	4.0	9.5	4.0	7.8	1.08	2.36	1.95	4.97	0.751			
+S9	20	18.8	4.0	2.1	2.1	4.1	4.0	9.9	0.53	1.92	2.48	2.54	0.383			
	40	18.3	4.0	0.5	0.5	0.5	0.5	1.5	0.12	0.97	3.14	0.37	0.056			
CP	3	21.1	4.0	6.2	4.0	9.0	4.0	8.0	1.54	2.24	2.01	6.94	1.048			

Comments:

RSG: Relative suspension growth

Table 2 Cell viability on Day 0 (+S9)

二重破壊株	Conc. (ug/mL)	Positive well no.			Total well no.	Negative well no.	CE0 (%)	Adjusted CE(%)	RS0 (%)
		Plate 1	Plate 2	Total					
H ₂ O	0	86	86	172	192	20	141.4	138.5	100.0
Auramin	10	82		82	96	14	120.3	116.7	84.2
+S9	20	71		71	96	25	84.1	79.8	57.6
	40	46		46	96	50	40.8	37.7	27.2
CP	3	51		51	96	45	47.4	50.5	36.4

Comments:

CE: Cloning efficiency

RS: Relative survival

Table 3 Cell viability on Day 3 (+S9)

二重破壊株	Conc. (ug/mL)	Positive well no.			Total well no.	Negative well no.	CE3 (%)	Adjusted CE3(%)	RS0 (%)
		Plate 1	Plate 2	Total					
H ₂ O	0	75	75	150	192	42	95.0	93.1	100.0
Auramin	10	78		78	96	18	104.6	101.5	109.0
+S9	20	74		74	96	22	92.1	87.4	93.9
	40	69		69	96	27	79.3	73.3	78.7
CP	3	75		75	96	21	95.0	101.2	108.8

Comments:

RTG: Relative total growth

Table 4 Count of mutant colonies (+S9)

二重破壊株	Conc. (ug/mL)	Positive well no.														
		Plate 1			Plate 2			Plate 3			Plate 4			Plate 5		
		N	S	Total	N	S	Total	N	S	Total	N	S	Total	N	S	Total
H ₂ O	0	16	6	22	16	6	22	16	6	22	16	6	22			0
Auramin	10	34	10	44	35	11	46			0			0			0
+S9	20	45	2	47	45	2	47			0			0			0
	40			0			0			0			0			0
CP	3	51	1	52	51	2	53			0			0			0

Table 5 Mutation frequency (+S9)

二重破壊株	Conc. (ug/mL)	Positive well no.			Total well no.	Negative well no.	CE3	Mut. freq. ($\times 10^6$)			%SG
		N	S	Total				N-MF	S-MF	T-MF	
H ₂ O	0	64	24	88	384	296	0.9	4.9	2.1	7.0	30.0
Auramin	10	69	21	90	192	102	1.0	11.0	4.6	15.6	29.6
+S9	20	90	4	94	192	98	0.9	18.1	1.1	19.2	5.9
	40	0	0	0	192	192	0.7	0.0	0.0	0.0	#DIV/0!
CP	3	102	3	105	192	87	1.0	18.7	0.8	19.6	4.3

Comments:

MF: Mutation frequency; N: Normally growing colony; S: Slowly growing colony; T: Total

%SG: Ratio of S-MF to T-MF

*継続不可のためデータ無し