

平成 30 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
異試験の有用性の検討

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

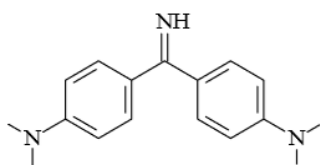
これまでに、変異原性の検出感度を上げるために DNA 修復に関わる Xeroderma pigmentosum group A (XPA)と X-ray repair cross complementing 1 (XRCC1)タンパク質を欠損させた XPA/XRCC1 二重欠損細胞（ヒトリンパ芽球細胞 TK6 由来のミュータント）を使用する新しいチミジンキナーゼ遺伝子（TK）変異試験を確立した。本年度では、再現性の高い TK 変異試験を実施することが可能となり、実際にオーラミン、マラカイトグリーン、ナフチルエチレンジアミン、パラフェニレンジアミン（Ames 試験陽性だが哺乳類を用いる遺伝毒性試験等で陰性あるいは偽陽性を示す物質）をモデル化合物として TK 変異試験を実施し、どれくらい検出感度を改善できるか明らかにすることを目的とした。その結果、マラカイトグリーンとナフチルエチレンジアミンは、+/-S9mix 両条件下で TK 変異頻度を上昇させることはなく陰性であった。一方、オーラミンについては、XPA/XRCC1 二重欠損細胞を用いると +/-S9mix 両条件下で TK 変異頻度が顕著に上昇し、容易に陽性となった。また、非代謝活性化条件下のパラフェニレンジアミンについては、野生型細胞では陰性であったが、XPA/XRCC1 二重欠損細胞では TK 変異頻度がわずかに上昇し、統計的に有意に陽性となることが分かった。以上のことから、従来の TK 変異試験に比べ XPA/XRCC1 二重欠損細胞を用いることによって約 5 倍程度の感度を上げることができた。

A. 研究目的

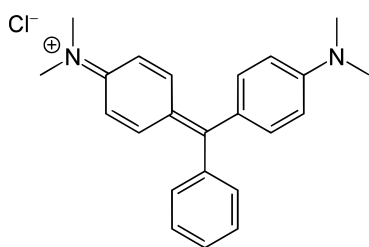
昨年度までに、野生型 TK6 細胞のみを使って調べる従来のチミジンキナーゼ遺伝子（TK）変異試験の方法に加え、変異原性の検出感度を上げるために DNA 修復に関わる Xeroderma pigmentosum group A (XPA)と X-ray repair cross complementing 1 (XRCC1)タンパク質を欠損させた XPA/XRCC1 二重欠損細胞（ヒトリンパ芽

球細胞 TK6 由来のミュータント）を使用する新しい TK 変異試験の条件設定、および最適化を行った。そのことにより、本年度は再現性の高い TK 変異試験を実施することが可能となり、実際にオーラミン、マラカイトグリーン、ナフチルエチレンジアミン、パラフェニレンジアミン（Ames 試験陽性だが哺乳類を用いる遺伝毒性試験で陰性あるいは偽陽性を示す物質）をモ

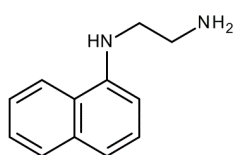
デル化合物 (図 1) として, XPA/XRCC1 二重欠損細胞を用いる TK 変異試験が, どれくらい検出感度を改善できるか明らかにすることを目的とする。



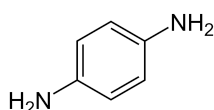
オーラミン (CAS 2465-27-2)



マラカイトグリーン (CAS 569-64-2)



ナフチルエチレンジアミン (CAS 1465-25-4)



パラフェニレンジアミン (CAS 624-18-0)

図 1. 本研究で使用したモデル化合物の化学構造式

B. 研究方法

1. 細胞と培養

TK6 細胞, および XPA/XRCC1 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% CO₂)。

2. 被験物質

Ames 試験陽性だが哺乳類を用いる遺伝毒性試験等で陰性あるいは偽陽性を示す化合物として, EURL ECVAM Genotoxicity and Carcinogenicity Consolidated Database of Ames Positive Chemicals (<https://ec.europa.eu/jrc/en/scientific-tools/Ames>) のデータベースを参照に, オーラミン, マラカイトグリーン, ナフチルエチレンジアミン, パラフェニレンジアミンをモデル化合物 (図 1) として選んだ。

3. 二重欠損細胞を用いる TK 変異試験

TK 変異試験は, OECD ガイドライン (TG490) を参考に, 用量設定試験から始め, 本試験の順に実施した。処理細胞数は 10⁷ 細胞, 処理時間は 4 時間, 陽性対照物質はシスプラチン (非代謝活性化条件) とシクロホスファミド (代謝活性化条件) を使用した。TK 変異試験の本試験の陰性対照群は 2 系列, 被験物質群は 1 系列で実施した。形質発現期間は 3 日間とした。統計解析は大森法 (Omori et al., *Mutat. Res.* 517,199-208 (2002).) を用いた。

4. 一重欠損細胞を用いる *in vitro* 小核試験

XRCC1 あるいは XPA の一重欠損細胞を用いる小核試験は, OECD ガイドライン TG487 の哺乳類細胞を用いた *in vitro* 小核試験に従って実施した。被験物質の処理時間は 4 時間, 小核試験の標本は 48 時間後に作成した。細胞毒性指標は, 処理してから 24 時間後の Relative Increase Cell Count (RICC) を下記の式を用いて算出した。陰性対照の RICC を 100% と定義した。

$$\text{RICC}(\%) = \frac{\text{処理した培養細胞における細胞数の増加}}{\text{対象培養細胞における細胞数の増加}} \times 100$$

野生型細胞, および 2 種類の欠損細胞を同時に使用することから, 至適用量を幅広く採用し, RICC が 30~70% となる用量を最高用量として

試験した。統計解析は、陰性対照群の小核発生頻度と被験物質のそれとの間でフィッシャー確率検定を行い、有意水準レベルを5%とした。有意差のあった用量群にアスタリスク*を付した(図7および図9)。

C. 研究結果

1. XPA/XRCC1 二重欠損細胞を用いる TK 変異試験

本研究で TK 変異試験を実施した4物質のうち、マラカイトグリーンとナフチルエチレンジアミンに対する各細胞生存率は、野生型細胞を用いても、二重欠損細胞を用いても顕著な差は観察されなかった(+/-S9 mix 両条件下)。また、それらを用いて TK 変異試験した結果、+/-S9 mix 両条件下で TK 変異頻度を上昇させることはなく、よって、マラカイトグリーンとナフチルエチレンジアミンは、陰性であることが分かった。

一方、オーラミンに対する細胞生存率は、野生型細胞よりも二重欠損細胞を用いた時の方が、+S9 mix 条件下でわずかに感受性を示した(図2左)。オーラミンの TK 変異試験結果は、+/-S9 mix 両条件下において野生型細胞で TK 変異頻度が緩やかな増加を示し陽性だった。また、二重欠損細胞の TK 変異頻度は顕著に増加し、明らかな陽性の結果が得られた(図3)。

次に、パラフェニレンジアミンに対する細胞生存率は、S9 mix を使用しない非代謝活性化条件下において、野生型細胞よりも二重欠損細胞がより高い感受性を示した(図4右)。TK 変異試験を実施した結果(図5)、野生型細胞では +/-S9 mix 両条件下で陰性と判定されたが、感受性を高めた二重欠損細胞を用いると非代謝活性化条件下において陽性になることが分かった(+S9 mix 条件下の実験は少しばらつきがあったため、再試験する予定)。以上の結果から、野生型細胞のみを用いる従来の TK 変異試験に比べて、XPA/XRCC1 二重欠損細胞を用いた方が、変異原物質の検出感度を明らかに上昇

させられることが分かった。

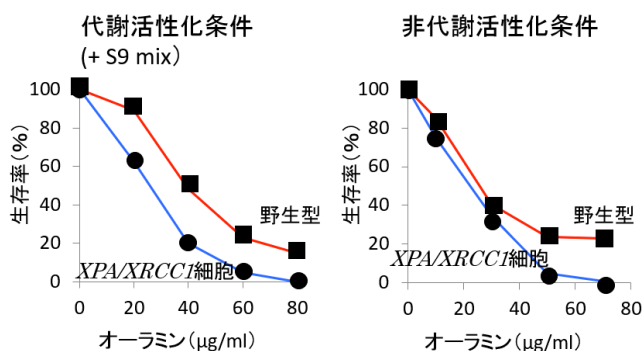


図2. オーラミンに対する細胞生存率

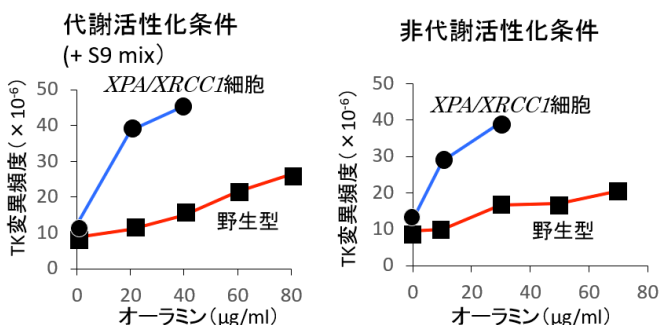


図3. オーラミンの TK 変異試験結果

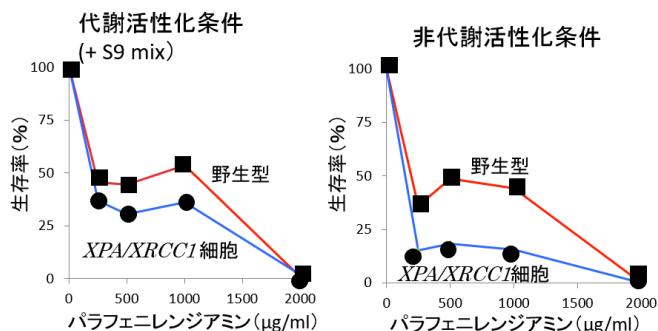


図4. パラフェニレンジアミンに対する細胞生存率

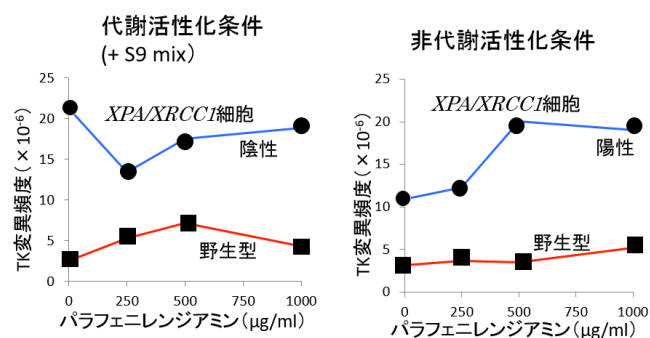


図5. パラフェニレンジアミンの TK 変異試験結果

2. XPA および XRCC1 一重欠損細胞を用いる小核試験

TK 変異試験で陽性であったオーラミンとパラフェニレンジアミンの遺伝毒性メカニズムを調べるために、XPA あるいは XRCC1 一重欠損細胞を用いて小核試験を実施した。オーラミンに対しては、TK 変異試験で明らかに陽性となったように、小核試験においても使用したすべての細胞で、代謝活性化の有無に関わらず陽性であった(図7)。その際、XPA および XRCC1 一重欠損細胞、並びに野生株細胞の小核発生頻度は、どれも類似していた。

パラフェニレンジアミンの小核試験の結果、非代謝活性化条件の XPA 一重欠損細胞を用いたときだけ、10 $\mu\text{g/ml}$ 用量でかろうじて有意差が得られた(図9右)。この結果は、TK 変異試験の陽性結果(図5右)と一致した。また、S9 を添加した代謝活性化条件の XRCC1 細胞を用いた時の小核発生頻度が用量依存的に増加したが、統計的有意差はなかった(図9左)。この時の最高用量群の細胞毒性(RICC=約70%)は比較的弱かったため(図8左)、さらに高い用量では、陽性になる可能性があった(現在、2回目の小核試験を実施している)。

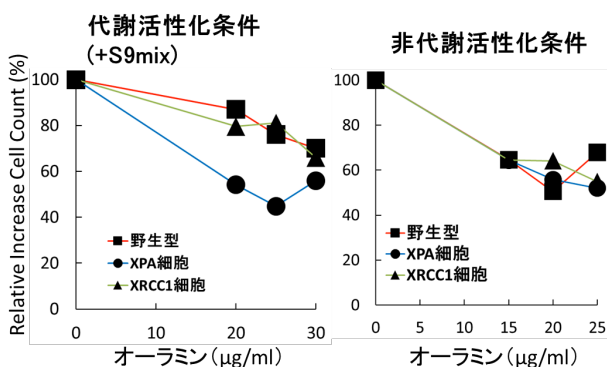


図6. オーラミンに対する細胞毒性指標 RICC

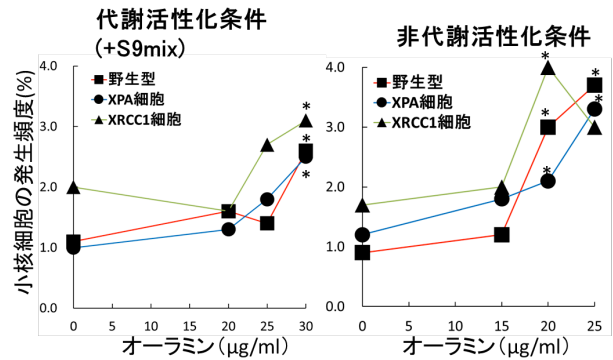


図7. オーラミンの小核試験結果

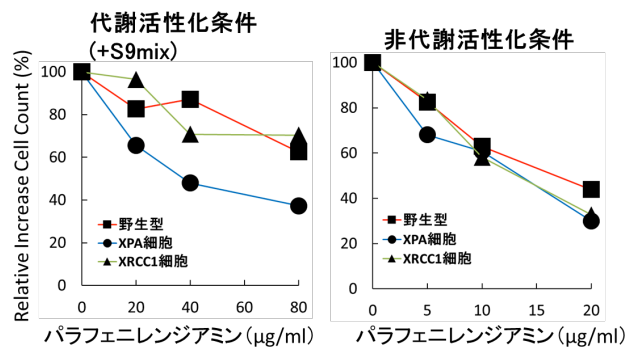


図8. パラフェニレンジアミンに対する細胞毒性指標 RICC

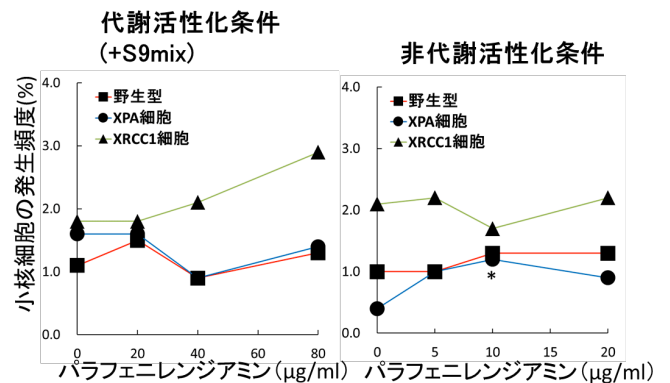


図9. パラフェニレンジアミンの小核試験結果

D. 考察

図2および図4で示した通り、細胞生存率データでは、野生型細胞と二重欠損細胞の間で大きな差が得られなかったが、遺伝子変異をエンドポイントとすると、オーラミンの場合は非常に明確な差が得られることが分かった(図3)。XPA/XRCC1 二重欠損細胞を用いることによって、約3~5倍の検出感度が改善されたと考えられた。しかしながら、図5右に示したパラフ

フェニレンジアミンに対しては、TK 変異試験において二重欠損細胞は、野生型細胞よりもわずかに検出感度が上がっただけであった。このことから、検出感度はやはり被験物質の変異原性メカニズムに大きく依存すると考えられた。つまり、検出感度を上昇させる要因として、被験物質が XPA か XRCC1 修復タンパクの働きに関与していること、そして、XPA か XRCC1 欠損によって蓄積した DNA 損傷が、他の DNA 修復バックアップ機構によって除去されないことが、TK 変異頻度を上昇させると考えられた。

このことから本研究では、XPA あるいは XRCC1 一重欠損細胞を用いて小核試験を実施することにより、TK 変異試験で陽性であったオーラミンとパラフェニレンジアミンの変異原性メカニズムを調べた。図 7 に示した通り、オーラミンによって形成する小核は、XPA と XRCC1 の両方の一重欠損細胞、並びに野生株細胞に対して、また、+/- S9 mix 両条件下で観察された。この結果は、オーラミンで陽性を示す Ames 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)) の両方であることと一致している。すなわち、オーラミンによって 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。今回の実験では、おそらく XPA と XRCC1 一重欠損細胞と野生株細胞の間で小核発生頻度には、有意差は無いと考えられるが、両方の一重欠損の DNA 修復タンパク質がオーラミンの DNA 損傷の修復に関与していることが予想される。残念ながら、オーラミンの代謝物や DNA 付加体構造の詳細はわかっていない (Some Aromatic Amines, Organic Dyes, and Related Exposures, IARC Monographs Volume 99, 111-135 (2010))。

TK 変異試験の非代謝活性化条件下で陽性になったパラフェニレンジアミンを小核試験し

た結果、非代謝活性化条件下の XPA 一重欠損細胞を用いた時のみ、統計的に有意に小核発生頻度が上昇することが分かった (図 9 右)。XRCC1 一重欠損細胞の小核発生頻度には変化がなかった (図 9 右)。つまり、パラフェニレンジアミンによる TK 変異試験の陽性は、おそらく XPA 修復タンパク質がパラフェニレンジアミンの DNA 損傷の修復に関与しており、それが欠損することにより当該 TK 変異試験で検出できたと考えられる (図 5 右)。既報では、パラフェニレンジアミンの DNA 損傷は、酸化的 DNA 損傷によって種々の遺伝毒性で陽性を示すと考えられている (Zanoni *et al.*, *Toxicol. Lett.* 239, 194-204 (2015); Qin *et al.*, *Food Chem. Toxicol.* 123, 424-430 (2019))。今回明らかになった XPA 欠損細胞で小核発生頻度が上昇したことから、パラフェニレンジアミンはバルキー DNA 付加体を形成させる可能性が示唆されるが、その DNA 付加体の研究に関する報告例は今のところない。

E. 結論

野生型 TK6 細胞のみを使って調べる従来の TK 変異試験と比べ、XRCC1/XPA 二重欠損細胞を用いると約 5 倍程度感度を上げることができた。新しい TK 変異試験の確立によって、モデル化合物であるオーラミンとパラフェニレンジアミン (Ames 試験陽性だが哺乳類を用いる遺伝毒性試験で陰性あるいは偽陽性を示す化合物) の変異原性を証明することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sassa A, Yasui M, Honma M. (2019) Current perspectives on mechanisms of ribonucleotide incorporation and processing in mammalian DNA. *Genes and Environment* 41:3. doi: 10.1186/s41021-019-0118-7.

2. 学会発表

- 1) 安井学, 鵜飼明子, 福田隆之, 馬庭二郎, 山本春菜, 今村匡志, 藤島沙織, 大谷尚子, 成見香瑞範, 松崎香織, 岡田祐樹, 中川宗洋, 上田摩弥, 小川久美子, 本間正充:Ames 試験陽性のフォローアップに関するチミジンキナーゼ遺伝子突然変異試験の有用性の検討:MMS 共同研究の報告. 日本環境変異原学会第47回大会(2018.11.2)
- 2) 竹入章, 松崎香織, 田中健司, 小川久美子, 安井学, 本間正充, 三島雅之:Ames 試験陽性のフォローアップとしての TK6 細胞を用いた γ H2AX 評価系の有用性検討;MMS 共同研究オプション項目の報告. 日本環境変異原学会第47回大会(2018.11.1)

G. 知的所有権の取得状況

なし