

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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)

平成 26 年度 総括研究報告書

研究代表者 堀端 克良

平成 27 (2015) 年 3 月

別添 2

目 次

I . 総括研究報告 (別添 3)

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----- 1
堀端克良

II . 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添 5) ----- 7

III . 研究成果の刊行物・別刷 ----- 9

平成26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、性差および週齢差を踏まえた検討を行い、加えて、妊娠動物に遺伝毒性物質を投与した際の胎仔および新生仔における遺伝毒性影響を *Pig-a* アッセイにより評価することでその有用性を検証することを目的とする。

近年開発された *Pig-a* アッセイは米国および日本において産学官の共同研究が実施され、その成果を基に 2014 年に米国をリード国として OECD ガイドライン化に向けた SPSF が OECD に投稿された。本 SPSF には日本の協力が明示されている。本アッセイの OECD ガイドライン化達成に向け、本研究課題の推進により得られる研究成果は、日本国内の研究成果としてアピールすることができる。

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

への組み込みを勘案し、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。

研究代表者はこれまでに、幼若群は成熟群と比較し、高い *Pig-a* 遺伝子変異体頻度の上昇を示すことを明らかにしている。これらのことは、年齢差に応じた遺伝毒性の差を本アッセイにより評価できる可能性を示唆するものである。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、そして幼若動物や胎仔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する。本研究計画は三年間の研究計画とし、*Pig-a* アッセイの有用性について初年度は幼若マウスと成熟マウスでの雌雄差と週齢差の比較を行っ

た。今年度と最終年度はマウス胎仔を用いた解析を実施することを目標とした。

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 17 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する。

B. 研究方法

胎児マウス解析の予備的試験として、使用血液量を 0.5 μ L まで抑制した条件での *Pig-a* アッセイを実施した。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* 変異体頻度を評価した。

MMS 研究会内でのラットを用いた共同研究では、日本国内独自の取り組みとして、全赤血球を標的とした RBC *Pig-a* アッセイに加えて、幼若赤血球を標的とした PIGRET 法を開発し、各機関内でエチルニトロソウレア (40 mg/kg および 10mg/kg 単回強制経口投与) を用いたバリデーション研究を実施し、線形回帰分析により各機関間の相関性を解析した。その後、各参加機関が分担し 24 種の化学物質の遺伝毒性評価を上記 RBC *Pig-a* アッセイおよび PIGRET 法により評価した。研究代表者は 24 種の化学物質中でアクリルアミドの遺伝毒性評価を担当した。経口投与後 7 日目での半数致死用量である 175mg/kg を最大容量とし、137.5 mg/kg、100 mg/kg、50 mg/kg および 25 mg/kg の用量で一群 6 匹 8 週齢雄の F344 ラットに強制経口投与し、投与前、投与後 1 週、2 週および 4 週目に尾静脈より採血し、RBC *Pig-a* アッセイおよび PIGRET 法により遺

伝毒性を評価した。陽性対照として、エチルニトロソウレア (40 mg/kg) 投与群も同時に設定した。

各投与群で得られた *Pig-a* 変異体頻度は、Steel の方法により、国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部の背景データ (溶媒投与群、N=95) と比較し、統計学的な解析を実施した。

(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) 極微量末梢血を用いた *Pig-a* アッセイ

胎児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。

2) ラットを用いた RBC *Pig-a* アッセイおよび PIGRET 法による遺伝毒性評価

研究代表者自らが RBC *Pig-a* アッセイおよび PIGRET 法の技術講習会を共同研究参加全機関に対して実施し、各参加機関それぞれの技術移管達成度を各機関において確認するバリデーション試験の線形回帰分析結果を図 1 に示す。両アッセイとも、全ての参加機関で強い正の相関が見られた。また、研究代表者が実施したアクリルアミドの遺伝毒性評価結果を図 2 に示す。アクリルアミドに関しては、両アッセイとも有意な差は検出されなかった。

D. 考察

1) 極微量末梢血を用いた *Pig-a* アッセイ

本予備試験の結果から、胎児から得られる微量末梢血で *Pig-a* アッセイが実施可能であ

る予測を立てることができたため、次年度での解析への目処をつけることができた。

2) ラットを用いた RBC *Pig-a* アッセイおよび PIGRET 法による遺伝毒性評価

バリデーション試験では各参加機関全てで正の相関が得られたため、両アッセイの技術移管は達成されたと判断される。今後、各機関において 24 種の化合物の遺伝毒性を分担して評価し、*Pig-a* アッセイの OECD ガイドライン化達成に向け、米国に協力する形で日本国内の貢献を示す。

上記に関連したアクリルアミドの遺伝毒性評価について、RBC *Pig-a* アッセイおよび PIGRET 法では陰性であったが、米国で先行して実施されている別手法の *Pig-a* アッセイの結果と同様の結果であり、RBC *Pig-a* アッセイおよび PIGRET 法における再現性を示すことができたと考えられる。他方、トランスジェニック動物を用いた他のアクリルアミド遺伝毒性報告では陽性を示す場合があることが報告されている。*Pig-a* アッセイでは原理的に標的臓器が造血系のみであることから、造血系はアクリルアミドの遺伝毒性に関する標的臓器ではないと考えられる。

E. 結論

これまでに得られたマウスを用いた研究成果によって、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、化学物質の遺伝毒性影響の視点から見た場合、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、の 2 点が明らかになった。これにより、上記については、*Pig-a* アッセイを実施する場合には使用動物の開始週齢をそれぞれの試験研究目的に応じて吟味した上で実施すべきであるということを提案するものであり、今後本アッセイを活用していく上で重要な情報となる。また、上記については、幼若期における化学物質暴露に対する遺伝毒性リスクは成熟期よりも高いことを示唆するものであり、重要なリスク評価情報となる。

加えて、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

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. *Mutat Res.* in press.

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

Horibata K, Ukai A, Honma M. Evaluation of Rats' In Vivo Genotoxicity Induced by N-ethyl-N-nitrosourea in the RBC *Pig-a*, PIGRET, and gpt Assays. *Genes and Environment.* (2014) 36, 199-202.

Wakasugi M, Sasaki T, Matsumoto M, Nagaoka M, Inoue K, Inobe M, Horibata K, Tanaka K, Matsunaga T. Nucleotide Excision Repair-dependent DNA Double-strand Break Formation and ATM Signaling Activation in Mammalian Quiescent Cells. *J Biol Chem.* (2014) 289, 28730-28737.

Onami S, Cho YM, Toyoda T, Horibata K, Ishii Y, Umemura T, Honma M, Nohmi T, Nishikawa A, Ogawa K. Absence of in vivo genotoxicity of 3-monochloropropane-1,2-diol and associated fatty acid esters in a 4-week comprehensive toxicity study

using F344 gpt delta rats. *Mutagenesis*.
(2014) 29, 295-302.

2. 学会発表

堀端克良, 鵜飼明子, 本間正充,
MMS/*Pig-a* 共同研究: アクリルアミドの
遺伝毒性評価, 日本環境変異原学会第 43
回大会, 東京 (2014.12)

山田雅巳, 堀端克良, 鵜飼明子, 木本崇
文, 千蔵さつき, 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, 濱田修一, 山本美佳, 堀妃佐子,
堤絵梨, 和田邦生, 前田晃央, 小坂瑞樹,
木村葵, 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, 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
に関する短期試験への有用性: MMS 共同
研究報告, 日本環境変異原学会第 43 回大
会, 東京 (2014.12)

堀端克良, 共同研究報告 I: *Pig-a* assay
進捗状況報告, 哺乳動物試験研究会第 65
回定例会, 東京 (2014.12)

堀端克良, 鵜飼明子, 石川恵生, 菅野絢
子, 木本崇文, 本間正充, マウス、ラッ
トおよびヒト由来のごく微量末梢血を用
いて解析可能な *Pig-a*/ *PIG-A in vivo*
突然変異試験法, 第 37 回日本分子生物学
学会年会, 横浜 (2014.11)

Horibata K, Honma M. ESTABLISHMENT OF
HUMAN *PIG-A* ASSAY AND APPLICATION TO
GENOTOXICITY MONITORING OF CANCER
CHEMOTHERAPEUTIC PATIENTS, 第 73 回日
本癌学会学術総会, 横浜 (2014.9)

堀端克良, 共同研究報告 I: *Pig-a* assay
進捗状況報告, 哺乳動物試験研究会第 64
回定例会, 熱海 (2014.6)

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

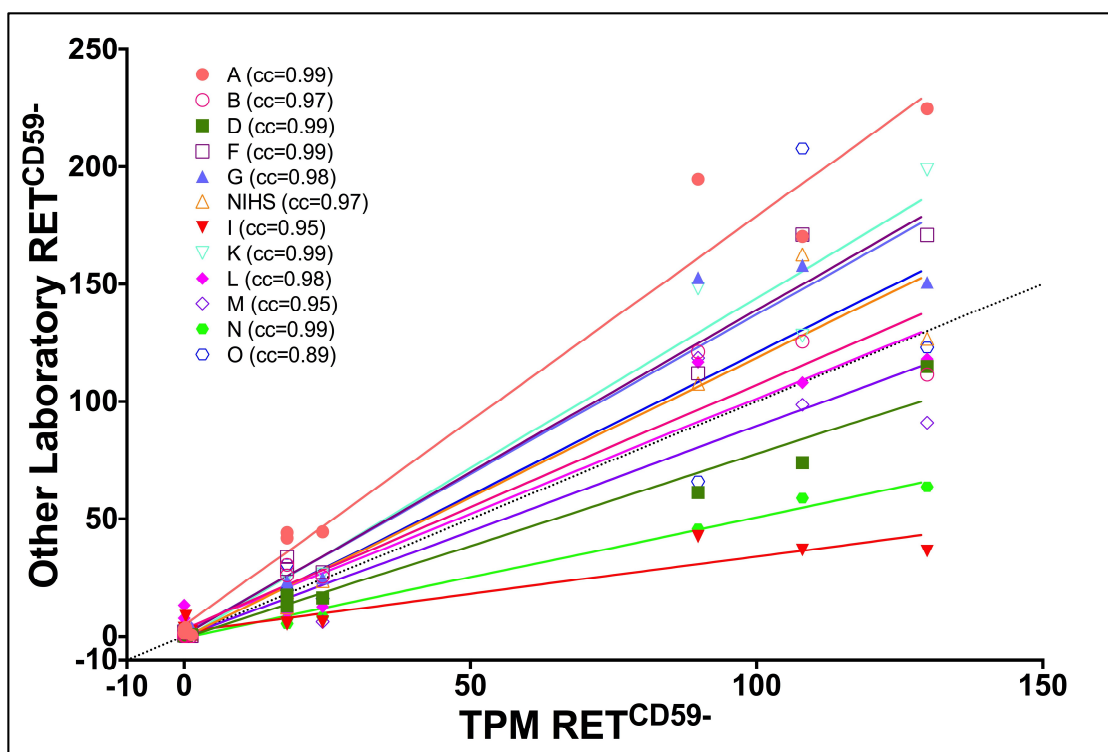
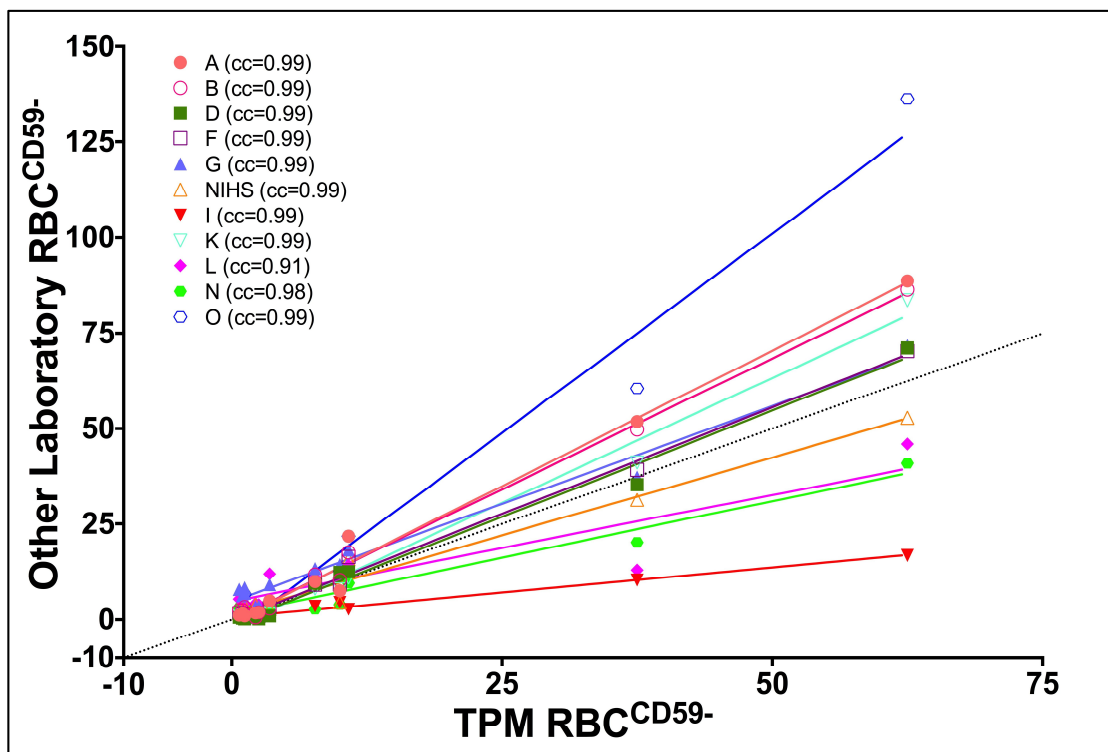


図1. 線形回帰分析と相関係数 (上, RBC *Pig-a*アッセイ. 下, PIGRET法)

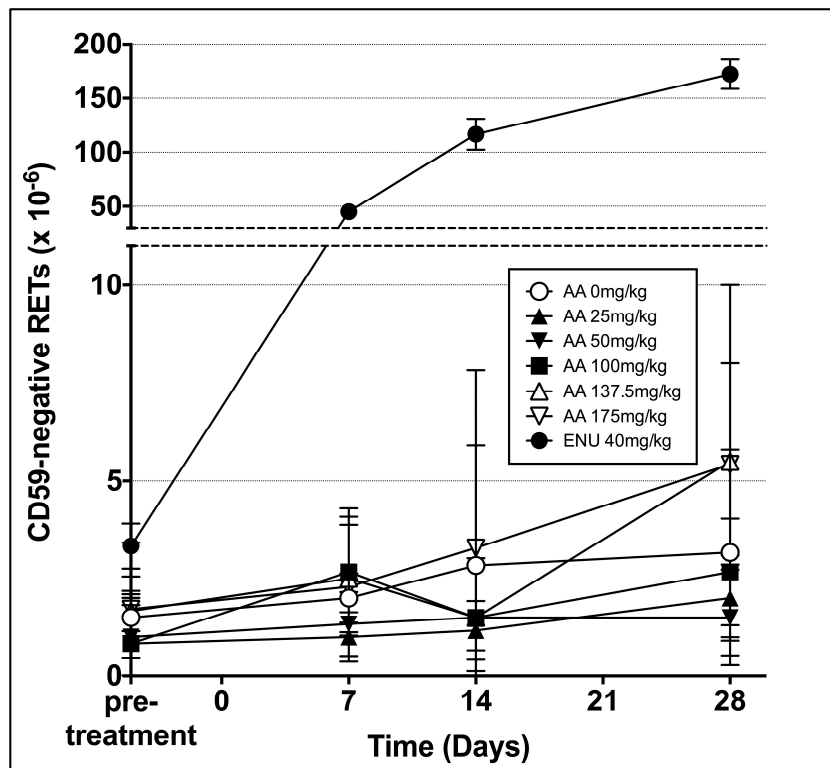
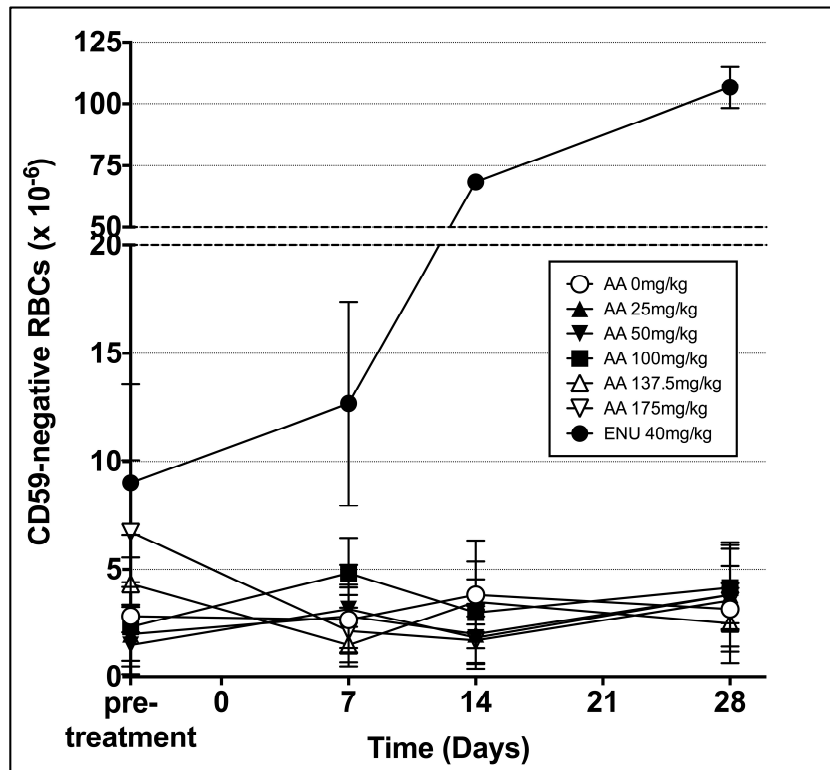


図2.ラットを用いたアクリルアミドの遺伝毒性評価(上, RBC Pig-aアッセイ. 下, PIGRET法)

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当無し							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	<i>Mutation Research</i>	in press	in press	2015
Horibata K, Kono S, Ishigami C, Zhang X, Aizawa M, Kako Y, Ishii T, Kosaki R, Saijo M, Tanaka K.	Constructive rescue of TFIIH instability by an alternative isoform of XPD derived from a mutated XPD allele in mild but not severe XP-D/CS.	<i>Journal of Human Genetics</i>	in press	in press	2015
Horibata K, Ukai A, Honma M	Evaluation of Rats' In Vivo Genotoxicity Induced by N-ethyl-N-nitrosourea in the RBC Pig-a, PIGRET, and gpt Assays.	<i>Genes and Environment</i>	36	199-202	2014

Wakasugi M, Sasaki T, Matsumoto M, Nagaoka M, Inoue K, Inobe M, Horibata K, Tanaka K, Matsunaga T.	Nucleotide Excision Repair-dependent DNA Double-strand Break Formation and ATM Signaling Activation in Mammalian Quiescent Cells.	<i>The Journal of Biological Chemistry</i>	289	28730-7	2014
Onami S, Cho YM, Toyoda T, Horibata K, Ishii Y, Umemura T, Honma M, Nohmi T, Nishikawa A, Ogawa K.	Absence of in vivo genotoxicity of 3-monochloropropane-1, 2-diol and associated fatty acid esters in a 4-week comprehensive toxicity study using F344 gpt delta rats.	<i>Mutagenesis</i>	29	295-302	2014