

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 25 年度～27 年度 総合研究報告書

研究代表者 堀端 克良

平成 28 (2016) 年 3 月

別添 2

## 目 次

I . 総合研究報告 ( 別添 3 )	
新規 <i>in vivo</i> 遺伝毒性試験である <i>Pig-a</i> 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 ) -----	2 5
III . 研究成果の刊行物・別刷 -----	2 7

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
（総合）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次世代に与える遺伝毒性影響を *Pig-a* アッセイにより評価することでその有用性を検証した。その結果、*Pig-a* アッセイでは成熟マウスに比べて幼若マウスで早期にかつ高感度に遺伝毒性を検出できること、また、妊娠動物に投与された被験物質由来の遺伝毒性を新生仔においても検出可能であることを明らかにした。また、*Pig-a* アッセイの OECD ガイドライン化に向けた取り組みとして、2014 年には米国をリード国として SPSF が OECD に提出され、そこには日本の協力が明示された。それに伴い、OECD ガイドライン化達成を迅速に進めるためにはラット *Pig-a* アッセイのバリデーション研究の推進が急務となった。*Pig-a* アッセイの OECD ガイドライン化達成は、*Pig-a* アッセイが安全性試験・遺伝毒性試験としての国際的・行政的地位を獲得することにつながる。それは結果的には *Pig-a* アッセイの性差・週齢差や新生仔を含めた有用性を示すという本研究課題の目的・結果が、国際的・行政的地位を有する安全性試験・遺伝毒性試験に基づいて実施されたことを示すことになるため、多種化合物の遺伝毒性評価のためにラット *Pig-a* アッセイを実施した。研究代表者はアクリルアミドの遺伝毒性評価を担当し、全赤血球を標的とした *Pig-a* アッセイおよび幼若赤血球を標的とした PIGRET 法により解析した。その結果、アクリルアミドに関しては本アッセイ系では陰性であることを示した。

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。

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、遺伝毒性試験としての有用性を明らかにし、そして次世代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した。

安全性試験・遺伝毒性試験としての *Pig-a* アッセイの国際的な動向として、これまでに米国および日本の研究グループがその有用性を示してきている。日本国内においては、これまでに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16 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。これらの進展に際し、国内で予想していた時期よりも早急な段階である平成 26 年末に米国をリード国として SPSF (Standard Project Submission Form)が OECD に提出された。そこには日本国内からの貢献が明文化された。こういった *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、早急に日本国内の研究結果を示す必要が生じた。

本研究課題中において、ラットを用いた *Pig-a* アッセイを追加で実施することはすなわちガイドライン化へ向けた国際的な貢献を強く示すことであり、*Pig-a* アッセイが安全性試験・遺伝毒性試験としての国際的・行政的地位を獲得することにつながる。それは結果的には *Pig-a* アッセイの性差・週齢差や新生仔を含めた有用性を示すという本研究課題の目的・結果が、国際的・行政的地位を有する安全性試験・遺伝毒性試験に基づいて実施されたことを示すことになるため、ガイドライン化進展へ向けた必須の作業であるラットを用いた *Pig-a* アッセイによる遺伝毒性評価を併せて実施した。

## B. 研究方法

### *Pig-a* アッセイ

*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。他方、*Pig-a* アッセイは造血幹細胞

に生じた遺伝毒性を反映する研究手法であり、遺伝毒性物質によりこれらの造血幹細胞の増殖・分化能が影響を受けることでその結果に影響が生じる可能性を考察するために、別途、幼若赤血球特異的発現タンパク質である CD71 特異的蛍光抗体により染色し、フローサイトメーターを用いて造血サイクルの指標である幼若赤血球の頻度を評価した。また、ラットを用いる追加実験では、上記の全赤血球を標的とする *Pig-a* アッセイに加えて、幼若赤血球を CD71 特異的蛍光抗体および磁気ビーズを用いて濃縮し、幼若赤血球のみを標的とする *Pig-a* アッセイである PIGRET 法による遺伝毒性評価を合わせて実施した。PIGRET 法は日本国内で開発された独自の手法であり、その有用性を示すことは *Pig-a* アッセイの OECD ガイドライン化へ向けた動向の中で、日本国内の独自性を示す上で非常に重要である。

### 1) 週齢および性差の比較

1群5匹、雌雄それぞれの幼若C57BL/6マウス(離乳後である4週齢)および成熟C57BL/6マウス(8週齢)に、遺伝毒性物質であるエチルニトロソウレア(40 mg/kg)およびベンツピレン(200 mg/kg)を単回腹腔内投与した。投与前2日、投与後1週、2週および4週目に尾静脈より採血を行ない、得られた血液を用いて *Pig-a* アッセイを実施し、遺伝毒性を評価した(図1)。エチルニトロソウレアは代謝活性化無しで遺伝毒性を発揮するが、ベンツピレンは遺伝毒性発揮のために代謝活性化を必要とする。したがって、薬物代謝活性を勘案した遺伝毒性評価ため、この2種の化合物を選択した。

### 2) 胎仔および新生仔の末梢血を用いた *Pig-a* アッセイの検討

胎仔マウス解析の予備的試験として、使用血液量を0.5  $\mu$ Lまで抑制した条件での *Pig-a* アッセイを実施した。また、胎仔や新生仔由来の末梢血中には未分化な赤血球が多く存在し、それらの赤血球が *Pig-a* アッセイに適しているのかわからないため、胎仔や新生仔由来の末梢血を用いた *Pig-a* アッセイの技術基盤を検討した。交配直後の雌マウスのプラグ確認日を0日目として16日目の胎仔(図2、実験区a)、出生後4

日目(図2、実験区b)および出生後11日目(図2、実験区c)の新生仔、各群5匹から採血を行い、*Pig-a*アッセイを実施した。従来のマウス*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*変異体頻度を評価するが、胎仔や新生仔由来の赤血球でのCD24の発現が低い場合に備えて、GPIアンカーそのものに結合することが知られる蛍光FLAERを用いた変法*Pig-a*アッセイを別に実施した。

### 3) 妊娠マウスおよび次世代への遺伝毒性影響評価

妊娠時期に応じて、妊娠前、妊娠初期、中期および後期投与群を設定した(図3、実験区C~F)。妊娠初期、中期および後期投与群では、遺伝毒性物質投与群(母マウス)を各3匹、陰性対照群を各2匹設定した。妊娠前投与群は投与後に交配を行うため、交配動物を確実に得るために遺伝毒性物質投与群を各6匹、陰性対照群を各4匹設定した。交配直後の雌マウスのプラグ確認日を0日目とし、各群それぞれプラグ確認日の4~7日前(妊娠前投与群)、3日目(妊娠初期投与群)、11日目(妊娠中期投与群)、および出産直前の18日目(妊娠後期投与群)に遺伝毒性物質であるエチルニトロソウレア(40 mg/kg)およびベンツピレン(200 mg/kg)を単回腹腔内投与した(図3)。各群の母体からは、交配前3~7日目、および単回投与後5~6週目に尾静脈より採血を行ない、*Pig-a*アッセイを実施した。

仔マウスについては、前項の予備試験の結果から11日齢以降の仔マウスが*Pig-a*アッセイに適していることが判明していたため、妊娠前投与群においては出生後14~17日齢の仔マウス、妊娠中期投与群においては出生後4週齢の仔マウス、そして妊娠後期投与群においては出生後5週齢の仔マウスから採血を行い、得られた血液を用いて*Pig-a*アッセイを実施した。また、妊娠初期投与群ではすべての母マウスで妊娠の継続が見られなかったため、仔マウスを得られず、仔マウスからの採血は実施できなかった(結果の項および表1)。

### 4) ラット*Pig-a*アッセイのOECDガイドライン化へ向けた取り組み

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、各臓器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臓器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日目の半数致死用量である175 mg/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。

#### (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) 週齢および性差の比較

##### 1-1) 成熟雄マウスにおける*Pig-a*変異体頻度

成熟雄マウスの*Pig-a*アッセイの結果を図4に示す。成熟雄マウスにおいて、エチルニトロソウレアおよびベンツピレン投与群では、溶媒投与群と比較した場合、投与後2週目以降に有意な*Pig-a*変異体頻度の上昇が検出さ

れた。エチルニトロソウレアおよびベンツピレン投与群における投与後4週目では、投与後2週目と比較した場合、さらに *Pig-a* 変異体頻度の上昇が検出された。

#### 1-2) 幼若雄マウスにおける *Pig-a* 変異体頻度

幼若雄マウスの *Pig-a* アッセイの結果を図5に示す。幼若雄マウスにおいて、エチルニトロソウレア投与群では、他の投与群と比較した場合、投与後1週目に有意な *Pig-a* 変異体頻度の上昇が検出された。投与後2週目にはエチルニトロソウレアおよびベンツピレン両投与群で有意な *Pig-a* 変異体頻度の上昇が検出された。投与後4週目では、投与後2週目と比較した場合、*Pig-a* 変異体頻度が若干上昇した。投与後4週目ベンツピレン投与群では2週目と比較した場合に平均値では上昇しているような印象を与える結果(図5A)ではあるが、これは外れ値を示す1個体によって平均値が引き上げられた結果によるものであり(図5B)、実際は大幅な上昇は無いと考えられる。

#### 1-3) 成熟雌マウスにおける *Pig-a* 変異体頻度

成熟雌マウスの *Pig-a* アッセイの結果を図6に示す。成熟雌マウスにおいて、エチルニトロソウレアおよびベンツピレン投与群では、溶媒投与群と比較した場合、投与後2週目以降に有意な *Pig-a* 変異体頻度の上昇が検出された。エチルニトロソウレアおよびベンツピレン投与群における投与後4週目では、投与後2週目と比較した場合、さらに *Pig-a* 変異体頻度の上昇が検出された。興味深いことに、ベンツピレン投与後4週目ではエチルニトロソウレア投与群の投与後4週目でみられた *Pig-a* 変異体頻度の上昇率よりも大きな上昇率が検出された。

#### 1-4) 幼若雌マウスにおける *Pig-a* 変異体頻度

幼若雌マウスの *Pig-a* アッセイの結果を図7に示す。幼若雌マウスにおいて、エチルニトロソウレア投与群では、他の投与群と比較した場合、投与後1週目に有意な *Pig-a* 変異体頻度の上昇が検出された。投与後2週目にはエチルニトロソウレアおよびベンツピレン

両投与群で有意な *Pig-a* 変異体頻度の上昇が検出された。エチルニトロソウレアおよびベンツピレン投与群における投与後4週目では、投与後2週目と比較した場合、さらに *Pig-a* 変異体頻度の上昇が検出された。

#### 1-5) 幼若赤血球出現頻度

成熟マウスにおいては、雌雄共に5%前後の幼若赤血球出現頻度であり、雌雄間の差やエチルニトロソウレアおよびベンツピレン投与による影響は特に認められなかった。他方、雌雄ともに幼若マウスにおいては投与直前(4週齢に相当)の幼若赤血球出現頻度が20%以上と高い数値を示した。幼若マウスのすべての投与群において、投与後2週および4週目では各投与群で幼若赤血球出現頻度が成熟マウスと同程度にまで減少することが示された(図8)。幼若雄マウスでのエチルニトロソウレア投与群投与後4週目の幼若赤血球出現頻度でのみ、若干の上昇傾向が見られているが、これは当該投与群で1個体のみ異常値を示した結果である。また、幼若マウスにおいては、成熟マウスと同様に雌雄間の差は認められなかった。

#### 2) 胎仔および新生仔の末梢血を用いた *Pig-a* アッセイの検討

胎仔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 $\mu$ Lでも十分解析可能であることが明らかになった。

他方、プラグ確認日を0日目として16日目の胎仔、すなわち、出生予定3日前の母体から採取した胎仔由来末梢血を用いた *Pig-a* アッセイでは、遺伝毒性物質を投与していないにもかかわらず、解析した5匹全ての胎仔において GPI アンカー結合タンパク質である CD24 を発現していない赤血球が非常に多く検出された(図9、実験区 a)。これらの傾向は出生前3日の胎仔のみではなく、4日齢の新生仔でも持続していたが、11日齢には成熟動物と同様にほぼ全ての赤血球で CD24 の発現が見られた。胎仔や新生仔で見られた赤血球のこれらの特徴が、GPI アンカー結合タン

バク質である CD24 のみが未発現であるのか、GPI アンカーそのものが形成されていないのかを明らかにするために、GPI アンカーを直接認識する FLAER (図 10、上) を用いた変法 *Pig-a* アッセイにより同様の解析を実施した。その結果、抗 CD24 抗体を用いた結果と同様であり、胎仔や新生仔で見られた多数の CD24 を発現していない赤血球は GPI アンカーそのものが形成されていないことが明らかになった (図 10、下)。

また、これらの胎仔のほぼ全ての赤血球では幼若赤血球マーカーである CD71 を発現していたが、出生後 4 日目、11 日目と日数を追うごとに CD71 発現幼若赤血球の頻度の減少が見られたが、成熟動物と比べて明らかに高い頻度を保っていた (図 9)。

### 3) 妊娠マウスおよび次世代への遺伝毒性影響評価

交配各群と得られた仔数を表 1 に示す。妊娠前投与群 (表 1、実験区 C) では、投与後 7 日目まで交配を継続したが、プラグを確認できない個体が見られた。また、妊娠が継続しないものや食殺が見られた。妊娠初期投与群 (表 1、実験区 D) ではすべてのプラグ確認済みマウスで妊娠が継続しなかった。妊娠中期および後期投与群 (表 1、実験区 E および F) では、一部で母マウスによる食殺や妊娠の非継続が見られたものの、平均的な出産仔数を得た。

妊娠前投与群の *Pig-a* 変異体頻度および幼若赤血球頻度をそれぞれ図 11 および図 12 に示す (図中、それぞれの家系を点線で区切って示す)。陰性対照群と比較し、エチルニトロソウレアおよびベンツピレン投与群両者の多くの母マウスでは *Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られたが、一部の母マウスは陰性対照群と同等であった。また、ベンツピレン投与群では投与前に高い外れ値を示す個体が 1 例見られた。他方、仔マウスの *Pig-a* 変異体頻度は背景値と同等であった (図 11)。また、すべての仔マウスは母マウスに比べて非常に高い幼若赤血球頻度を示した (図 12)。また、母マウスの幼若赤血球頻度への投与による影響は検出されなかった (図 12)。

妊娠初期投与群の *Pig-a* 変異体頻度および幼若赤血球頻度をそれぞれ図 13 および図 14 に示す。本群では仔マウスは得られていないが、陰性対照群と比較し、エチルニトロソウレアおよびベンツピレン投与群両者の母マウスでは *Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られた (図 13)。また、母マウスの幼若赤血球頻度への投与による影響は検出されなかった (図 14)。

妊娠中期投与群の *Pig-a* 変異体頻度および幼若赤血球頻度をそれぞれ図 15 および図 16 に示す。エチルニトロソウレア投与群の母マウスでは 3 個体中 2 個体で *Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られた。仔マウスでは、個体差が大きいものの、非常に高い *Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られた。また、*Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られなかった母マウス由来の仔マウスでも非常に高い *Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られた。ベンツピレン投与群の母マウスでは 3 個体中 2 個体で *Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られた。仔マウスでは、*Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られなかった (図 15)。すべての仔マウスは母マウスに比べて高い幼若赤血球頻度を示した (図 16)。また、母マウスの幼若赤血球頻度への投与による影響は検出されなかった (図 16)。

妊娠後期投与群の *Pig-a* 変異体頻度および幼若赤血球頻度をそれぞれ図 17 および図 18 に示す。エチルニトロソウレア投与群の母マウスでは 3 個体中 2 個体で非常に弱い *Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られた。仔マウスでは、個体差が大きいものの、非常に高い *Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られた。また、*Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られなかった母マウス由来の仔マウスでも非常に高い *Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られた。ベンツピレン投与群の母マウスでは 3 個体中 2 個体で *Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られた。仔マウスでは *Pig-a* 変異体頻度の上昇が見られなかった (図 17)。一部の仔マウスは母マウスに比べて若干高い幼若赤血球頻度を示したが、多くは成熟動物のレベルであった (図 18)。また、母マウスの幼若赤血球頻度への投与による影響は検出されなかった (図 18)。

#### 4) ラット *Pig-a* アッセイの OECD ガイドライン化へ向けた取り組み

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 19 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 20 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) 週齢および性差の比較

###### 1-1) 成熟マウスの雌雄の比較

エチルニトロソウレア投与群では *Pig-a* 変異体頻度および幼若赤血球出現頻度両者で雌雄の差は見られないことから、成熟マウスではエチルニトロソウレアの遺伝毒性検出感度において、*Pig-a* アッセイの検出感度の雌雄差はないと考えられる。

ベンツピレン投与群においては、投与後 2 週目までは *Pig-a* 変異体頻度および幼若赤血球出現頻度両者で雌雄差は認められておらず、幼若赤血球出現頻度においても投与後 4 週目で雌雄差は認められていない。しかし、投与後 4 週目でのベンツピレン投与群雌マウスでの *Pig-a* 変異体頻度は、雄マウスと比較して高値を示した。その理由の 1 つとして、ベンツピレンは遺伝毒性を発揮するためには代謝活性化を受ける必要があることから、ベンツピレン代謝活性化における雌雄差の結果、投与後 4 週目での *Pig-a* 変異体頻度の差となって現れたと考えられる。しかしながら、投与後 2 週目での性差が認められていないことから、他の複合要因も影響していることは否定できない。しかし、後述の幼若マウスではこういった違いが認められていないことから、投与後 4 週目で見られた雌マウスでの *Pig-a* 変異体頻度の上昇は成熟雌マウス特有の現象である可能性が高いと考えられる。

###### 1-2) 幼若マウスの雌雄の比較

幼若マウスにおいては、エチルニトロソウレアおよびベンツピレン投与群両者で雌雄差は認められない。従って、幼若マウスにおいては *Pig-a* アッセイの検出感度の雌雄差はないと考えられる。成熟雌雄マウスの結果と合わせて考察すると、成熟マウスのみでベンツピレンの遺伝毒性検出感度に性差が認められていること、また、ベンツピレンは遺伝毒性を発揮するために代謝活性化が必要であることから、ベンツピレンの遺伝毒性検出感度については成熟雌マウスで特異的に上昇している代謝活性化能が関与していると考えられる。

##### 1-3) 週齢差の比較

エチルニトロソウレア投与群において、成熟群では雌雄ともに投与後 2 週目以降で遺伝毒性を検出したのに対し、幼若群では雌雄ともに投与後 1 週目で有意な遺伝毒性を検出した。その理由として、雌雄共に投与時（4 週齢）における幼若赤血球頻度が非常に高いことから、この時期のマウスは高い造血能を持つことが考えられ、それが原因となって幼若群では早期の遺伝毒性検出が可能となっていると考えられる。他方、ベンツピレンにおいては、統計学的有意差は認められていないが同様の傾向、すなわち幼若群での早期遺伝毒性検出性が見られている。これらの差は、本実験条件では統計学的な有意差を伴っていないが、これまでのマウス *Pig-a* アッセイに関する施設背景データを考慮した場合、個体数を増加させることで有意差が出ると思われる傾向である。従って、ベンツピレン投与群幼若群においても個体数を増加させることで統計学的に有意に早期検出が可能であると考えられる。

##### 2) 胎仔および新生仔の末梢血を用いた *Pig-a* アッセイの検討

胎仔および新生仔の末梢血を用いた予備試験の結果から、胎仔や 4 日齢由来の末梢血赤血球の多くはそもそも GPI アンカーを発現していないことが明らかとなった。*Pig-a* アッセイでは、フローサイトメーターを用いて  $1 \times 10^6$  個以上の赤血球を直接カウントし、その内の *Pig-a* 変異体、すなわち GPI アンカー欠



損赤血球の数を実測値として計測することで *Pig-a* 変異体頻度を求める。従って、被験物質が未投与であるにも関わらず GPI アンカーを形成していない赤血球が多数含まれることから、胎仔や 4 日齢由来の末梢血は *Pig-a* アッセイには不向きであり、*Pig-a* アッセイには 11 日齢以降の新生仔から得られた末梢血を用いる必要があることが明らかになった。

### 3) 妊娠マウスおよび次世代への遺伝毒性影響評価

妊娠前に遺伝毒性物質を投与した群では、*Pig-a* アッセイにより母マウスで遺伝毒性を検出したにもかかわらず、仔マウスでは全く検出していない。従って、この時期に投与されたエチルニトロソウレアおよびベンツピレンは新生仔へ遺伝毒性影響を与えないか、または *Pig-a* アッセイでは検出できない可能と考えられる。

妊娠初期に遺伝毒性物質を投与した群では、陰性対照群を含めてすべての群で妊娠を継続できなかった。従って、この時期の妊娠動物への腹腔内投与自体が妊娠継続を阻害したと考えられる。

妊娠中期にエチルニトロソウレアを投与した群では、個体差があるものの、母マウスよりも強い遺伝毒性が仔マウスで検出された。また、幼若赤血球の頻度も仔マウスでは高いことから、仔マウスの高い造血活性が強い *Pig-a* 変異体頻度の上昇に結びついた可能性が考えられる。事実、幼若マウスに直接遺伝毒性物質を投与した際も同じ傾向が見られている。ベンツピレン投与群の仔マウスでは *Pig-a* 変異体頻度の上昇が確認できなかった。ベンツピレンは遺伝毒性を発揮するために代謝活性化が必要であることから、この時点の胎仔マウスはその代謝活性化能を有さないか低いこと、もしくは胎仔マウスが暴露されていないことが考えられる。しかし、食殺により 2 家系で仔マウスが全例死亡したため、解析に用いたのは 1 家系のみであり、確定的な結果とは言えず、複数の家系での解析が必要である。

妊娠後期にエチルニトロソウレアを投与した群の仔マウスでは、妊娠中期に投与した群

と同様に強い変異体頻度の上昇が見られた。幼若赤血球の頻度は母マウスと同じ程度まで低下していたが、実際にエチルニトロソウレアに暴露された時期は採血時よりも前の高造血活性の時期であるので、仔マウスの高い造血活性が強い *Pig-a* 変異体頻度の上昇に結びついた可能性が考えられる。興味深いことに、妊娠後期にエチルニトロソウレアを投与した群の母マウスで見られた *Pig-a* 変異体頻度の上昇は非常に小さいものであった。今回の結果からは理由は不明であるが、妊娠後期に投与されたエチルニトロソウレアは多くが胎児へ移行したか、または母乳や羊水等により母体外へ排出されるなどして、母マウスへの暴露が低くなった可能性も考えられる。同様に仔マウスへの暴露経路として母乳の影響も考えられるが、この点を明らかにするには、未投与の代理母を用いた解析が必要であると考えられる。ベンツピレン投与群の仔マウスでは *Pig-a* 変異体頻度の上昇が確認できなかった。これらは前述の妊娠中期の結果と同様であり、代謝活性化能や暴露の問題などが考えられる。また、食殺や妊娠非継続により解析に用いたのは 1 家系のみであり、確定的な結果とは言えず、複数の家系での解析が必要である。

以上のことから、妊娠の中期や後期に遺伝毒性物質に暴露された母マウス由来の仔マウスは遺伝毒性影響を受け、それを *Pig-a* アッセイにより解析が可能であることが示された。

### 4) ラット *Pig-a* アッセイの OECD ガイドライン化へ向けた取り組み

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。

*Pig-a* アッセイの OECD ガイドライン化に向けた動きとして、すでに報告された内容から *Pig-a* アッセイの有用性を検証する、いわゆる後ろ向き研究で進められていくことが合意されている。研究代表者のこれらの研究内容はすでに国際論文に受理されており、急遽追加実施した研究であったがその目的が達成された。

## 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、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、妊娠中期および後期に母マウスが遺伝毒性物質に暴露された場合、その影響は仔マウスに強く現れること、これらの *in vivo* 遺伝毒性について、極微量の末梢血を用いる内在性遺伝子を標的とした *Pig-a* アッセイで検出できること、の4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し、また、上記については、妊娠期の母体における化学物質暴露に対する遺伝毒性リスクは仔に強く影響することを示すものであり、重要なリスク評価情報となる。上記については、ヒトを含めたリスク評価手法に適応できることを示唆する。

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。ガイドライン化の達成は結果的には *Pig-a* アッセイの性差・週齢差や新生仔を含めた有用性を示すという本研究課題の目的・結果が、国際的・行政的地位を有する安全性試験・遺伝毒性試験に基づいて実施されたことを示すことになる

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Horibata K, Ukai A, Honma M. Evaluation of mutagenicity of acrylamide using RBC *Pig-a* and PIGRET assays by single peroral dose in rats. *Mutation Research*, (2016) *in press*

Johnson GE, Yamamoto M, Suzuki Y, Adachi H, Kyoya T, Takasawa H, Horibata K, Tsutsumi E, Wada K, Kikuzuki R, Yoshida I, Kimoto T, Maeda A, Narumi K. Measuring Reproducibility of Dose Response Data for the *Pig-a* Assay using Covariate Benchmark Dose Analysis. *Mutation Research*, (2016) *in press*

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. *Mutation Research*, (2015) 783, 23-35.

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*. (2015) 60, 259-265.

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.

Horibata K, Ukai A, Kimoto T, Suzuki T, Kamoshita N, Masumura K, Nohmi T, Honma M, Evaluation of in vivo genotoxicity induced by N-ethyl-N-nitrosourea, benzo[a]pyrene, and 4-nitroquinoline-1-oxide in the Pig-a and gpt assays, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 54(9), 747-54 (2013)

Kimoto T, Horibata K, Chikura S, Hashimoto K, Itoh S, Sanada H, Muto S, Uno Y, Yamada M, Honma M, Interlaboratory trial of the rat Pig-a mutation assay using an erythroid marker HIS49 antibody, *Mutation Research*, 755(2), 126-34 (2013)

## 2. 学会発表

堀端克良, 山田雅巳, 鶴飼明子, 木本崇文, 千藏さつき, 三浦大志郎, 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, 瀧田修一, 山本美佳, 堀妃佐子, 堤絵梨, 和田邦生, 前田晃央, 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, 藤石洋平, 福田隆之, 鈴木裕太, 後藤玄, 森田健, 本間正充, *Pig-a/PIGRET* アッセイの短期試験としての有用性: MMS 共

同研究報告, 日本環境変異原学会第44回大会, 福岡 (2015.11)

堀端克良, *Pig-a* アッセイ, 哺乳動物試験研究会第67回定例会, 福岡 (2015.11)

Horibata K, Yamada M, Ukai A, Kimoto T, Chikura S, Miura D, Itoh S, Muto S, Uno Y, Sanada H, Takashima R, Shigano M, Takasawa H, Hamada S, Yamamoto M, Hori H, Tsutsumi E, Wada K, Maeda A, Kikuzuki R, Ogiwara Y, Kyoya T, Adachi H, Uematsu Y, Yoshida I, Narumi K, Fujiishi Y, Fukuda T, Suzuki Y, Goto K, Morita T, Honma M, Interlaboratory Trial of the PIGRET Assay As a Short-term Genotoxicity Test: Collaborative Study by Mammalian Mutagenicity Study (MMS) Group of Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS), Environmental Mutagen Society 46th Annual Meeting, USA (2015.9)

堀端克良, 共同研究報告 I: *Pig-a* アッセイ, 哺乳動物試験研究会第66回定例会, 栃木 (2015.6)

堀端克良, 鶴飼明子, 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, 鶴飼明子, 木本崇文, 千藏さつき, 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, 瀧田修一, 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, 鷓飼明子, 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)

堀端克良, 第 6 回 IWGT 報告および共同研究進捗報告: *Pig-a* アッセイ, MMS 研究会第 63 回定例会, 岡山 (2013.11)

Horibata K, Ishikawa S, Ukai A, Sugano A, Honma M, ESTABLISHMENT OF HUMAN *PIG-A* ASSAY AND APPLICATION TO GENOTOXICITY MONITORING OF CANCER CHEMOTHERAPEUTIC PATIENTS, 11th International Conference on Environmental Mutagens, Brazil (2013.11)

堀端克良, 鷓飼明子, 木本崇文, 鴨下渚, 本間正充, ラットを用いた *Pig-a* アッセイとトランスジェニック突然変異試験の組合せに関する研究, 日本環境変異原学会第 42 回大会, 岡山 (2013.11)

堀端克良, 共同研究報告 II: *Pig-a*, MMS 研究会第 62 回定例会, 諏訪 (2013.5)

#### 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

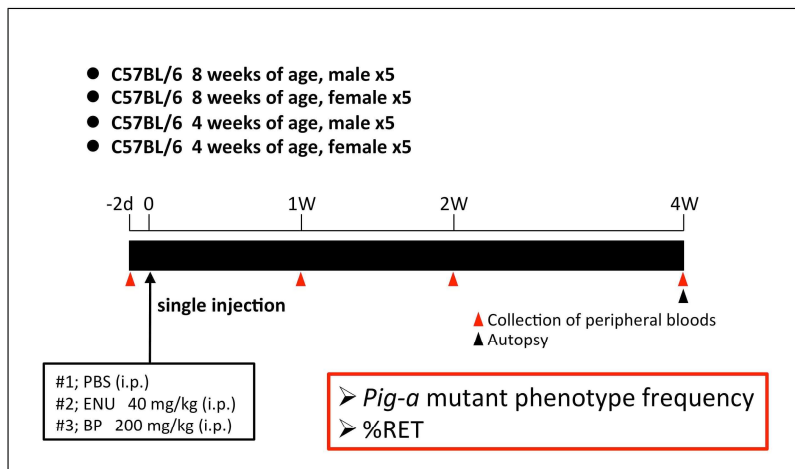


図1.週齢および性差の比較に関する*Pig-a*アッセイ投与群構成とスケジュール

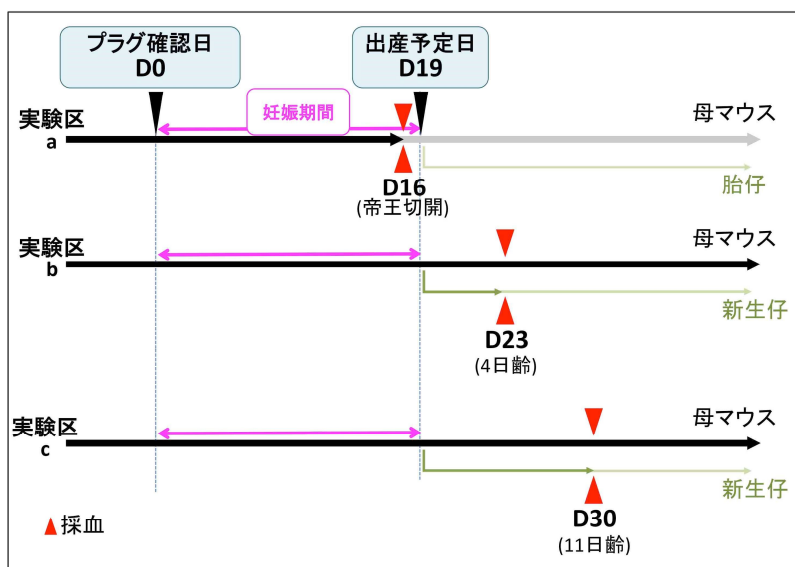


図2.胎仔および新生仔の末梢血を用いた*Pig-a*アッセイの検討(予備試験)投与群構成とスケジュール

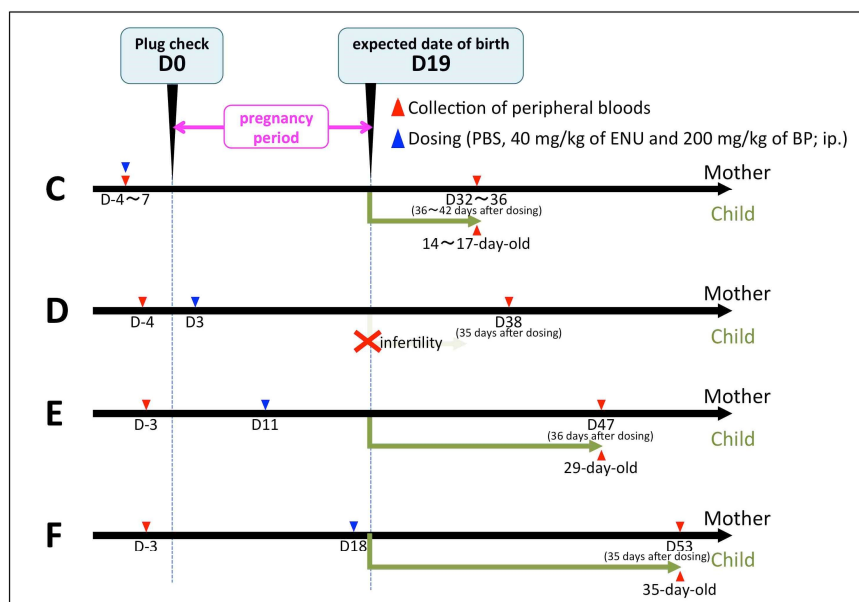


図3.妊娠マウスおよび次世代への遺伝毒性影響評価の投与群構成とスケジュール

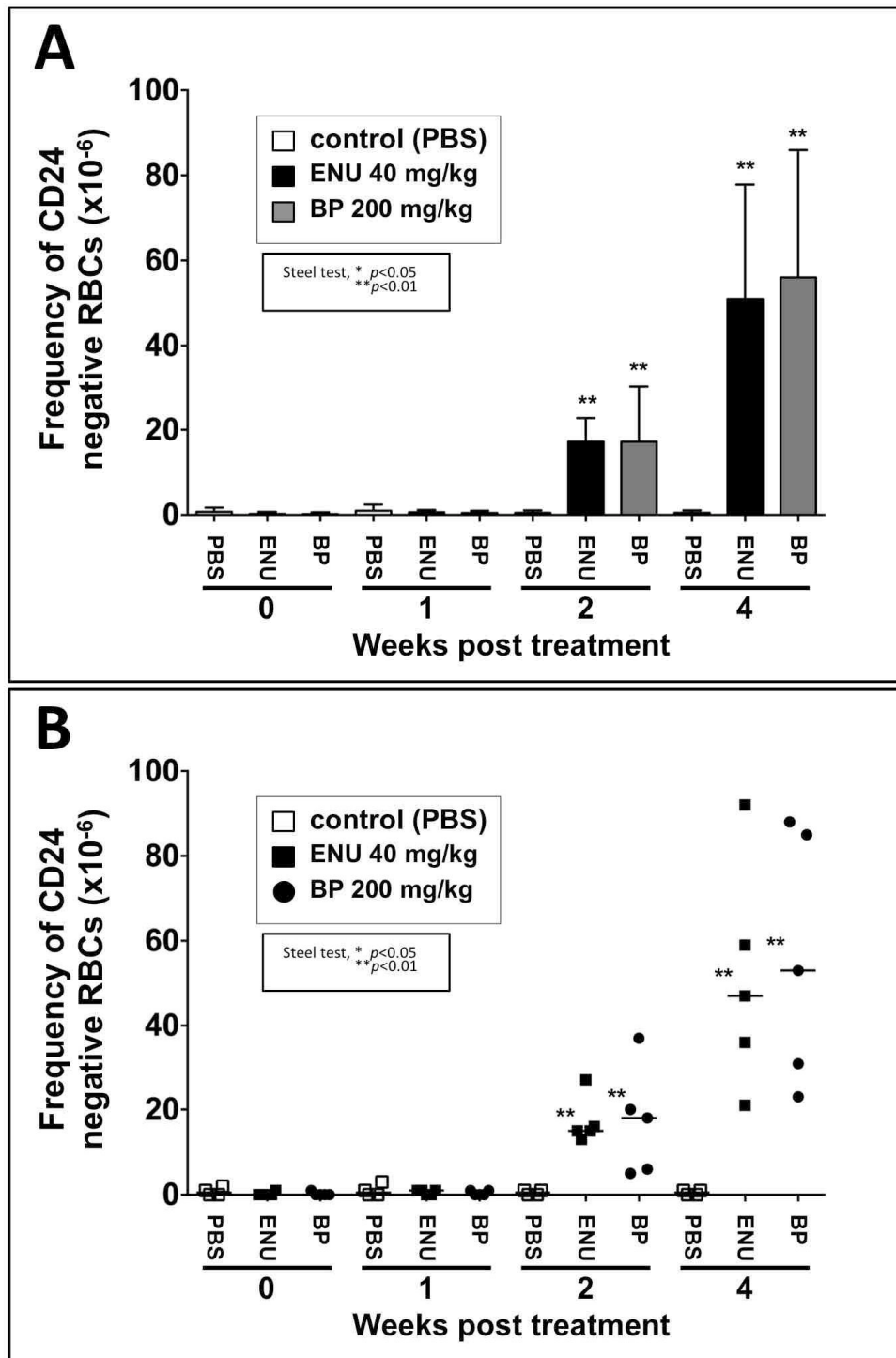


図4.成熟雄マウスにおける*Pig-a*変異体頻度(A,平均値と標準偏差; B,各個体の散布図)

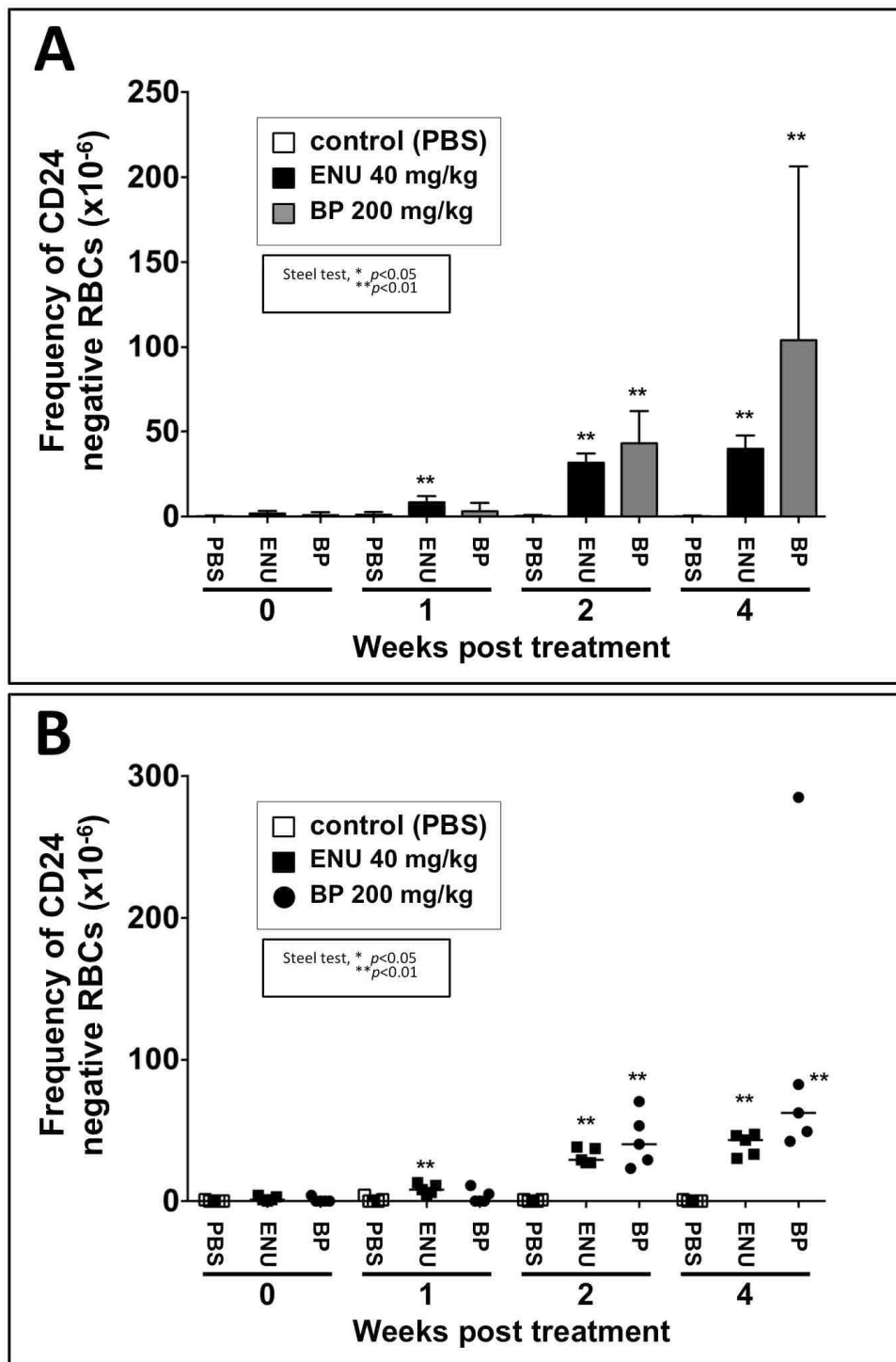


図5.幼若雄マウスにおける*Pig-a*変異体頻度(A,平均値と標準偏差; B,各個体の散布図)

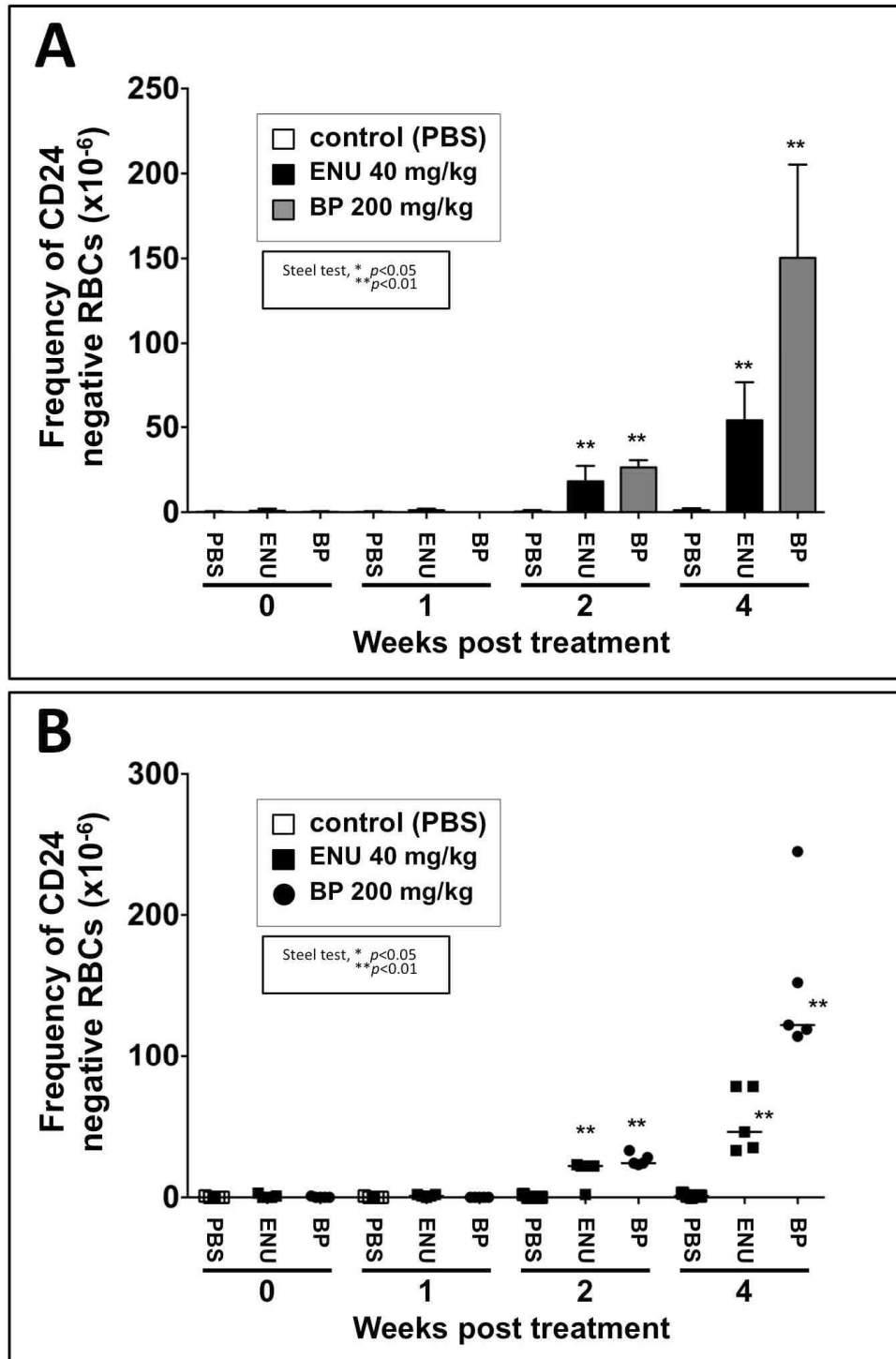


図6.成熟雌マウスにおける*Pig-a*変異体頻度(A,平均値と標準偏差; B,各個体の散布図)



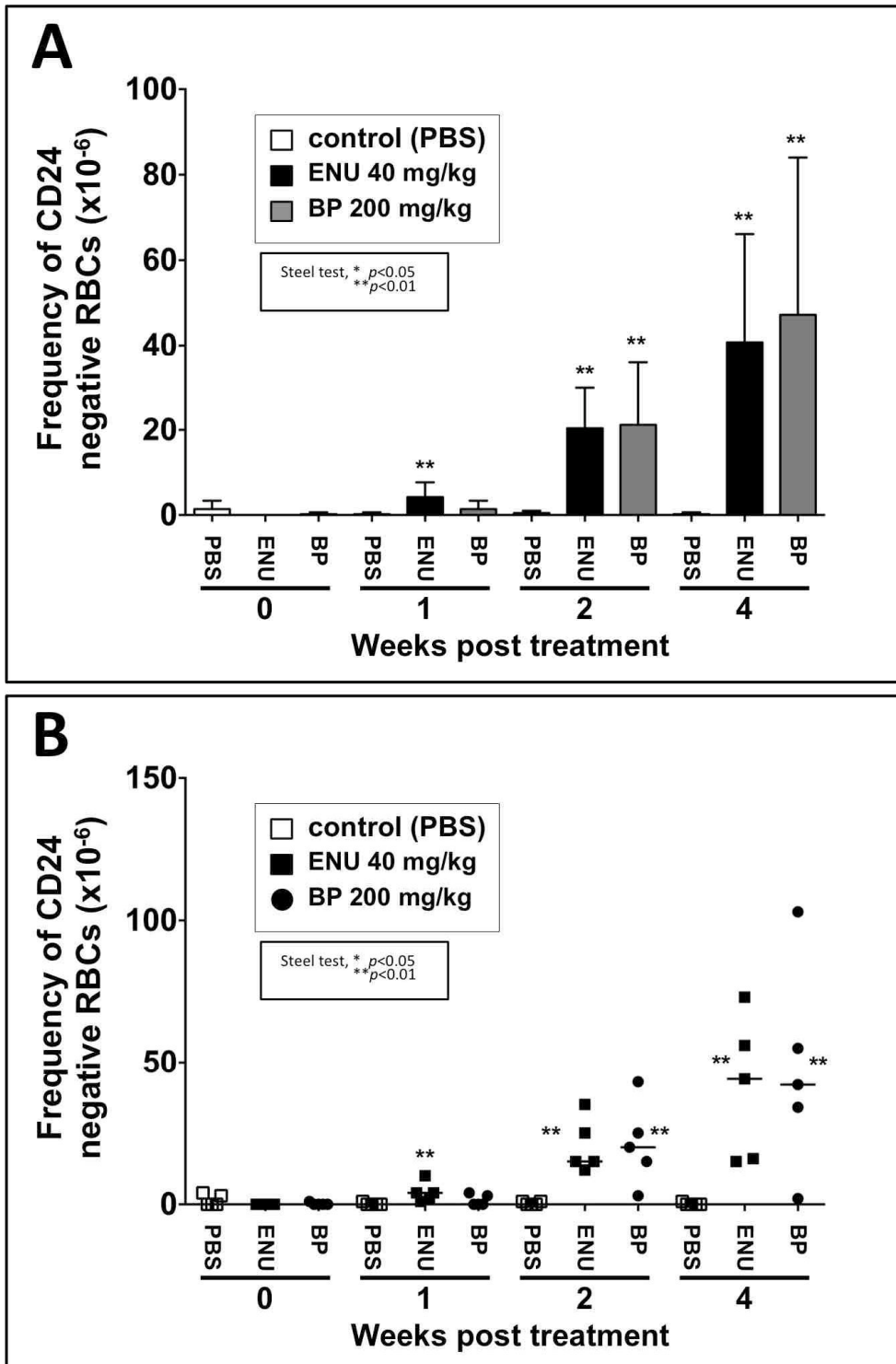


図7.幼若雌マウスにおける*Pig-a*変異体頻度(A,平均値と標準偏差; B,各個体の散布図)

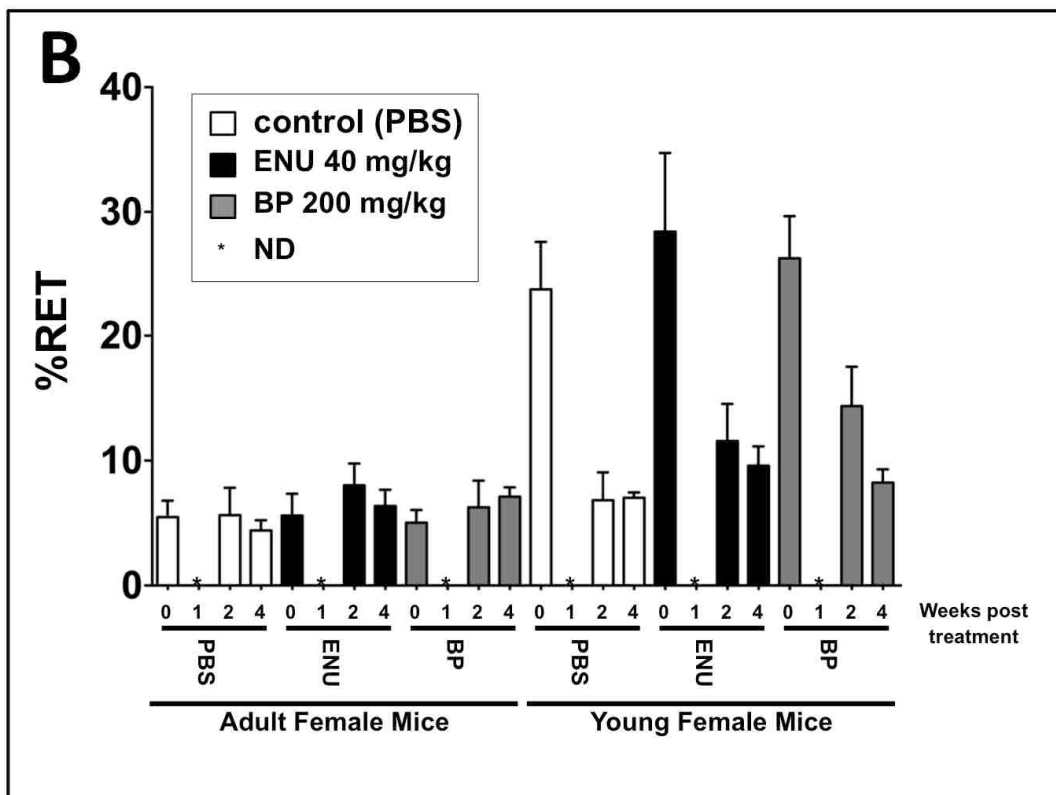
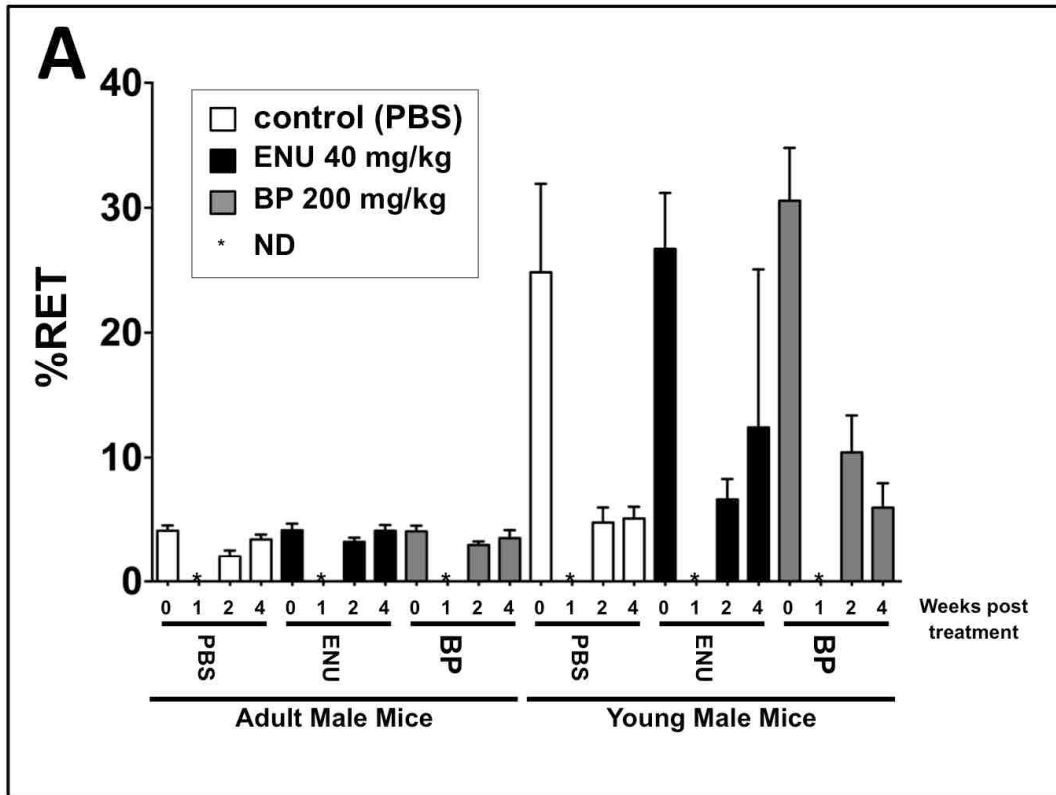


图8.幼若赤血球出現頻度(A,雄; B,雌)

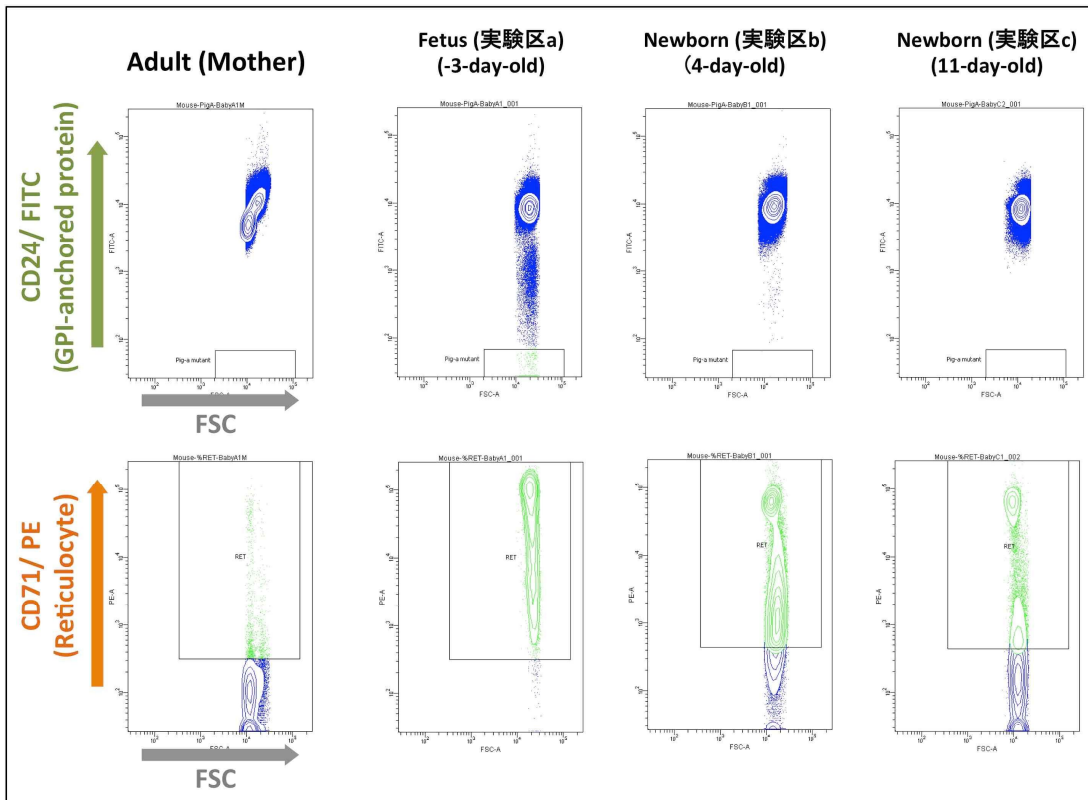


図9.胎仔および新生仔の末梢血を用いたPig-aアッセイの検討

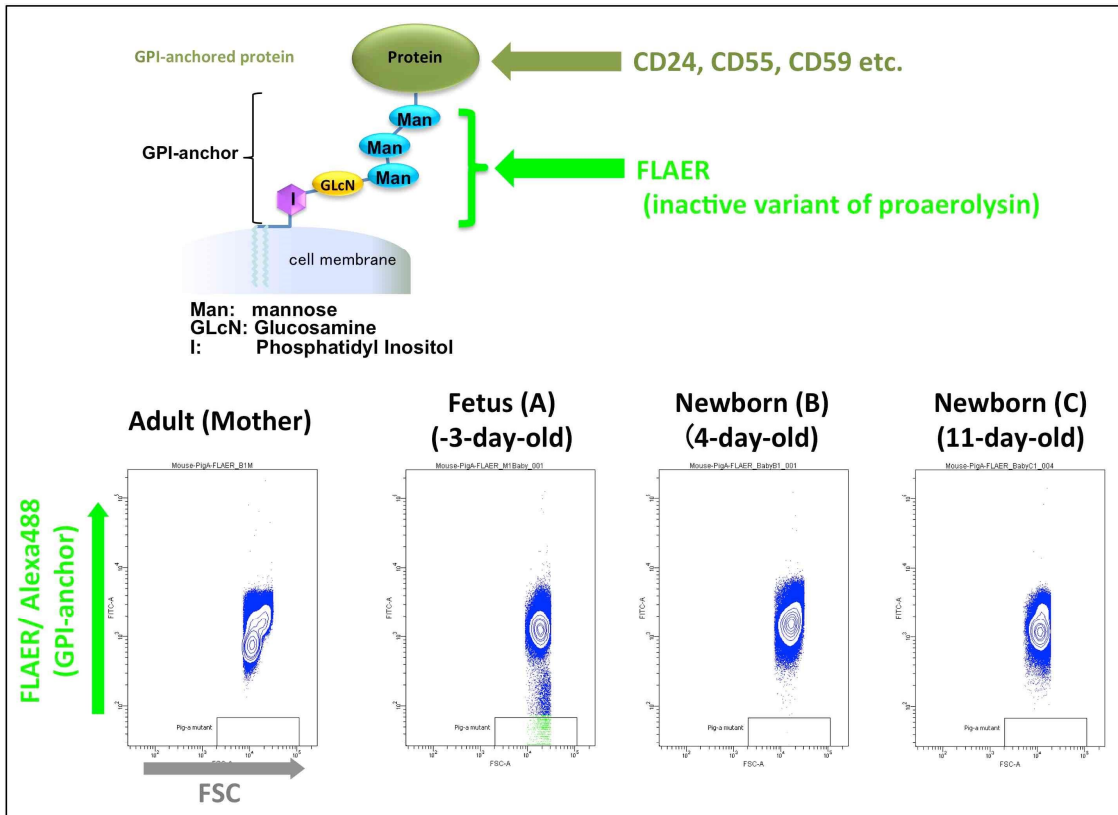


図10.FLAERを用いた胎仔および新生仔の末梢血を用いたPig-aアッセイの検討

表1.交配結果

Experimental group	Dosing	Mother ID	No. of Newborn	
			♂	♀
C	PBS	C-P1A	5	4
		C-P1B	1	6
		C-P2A	5	5
		C-P2B	3	3
	ENU	C-E1A	no plug	
		C-E1B	cannibalized	
		C-E2A	5	4
		C-E2B	no plug	
		C-E3A	no plug	
		C-E3B	no plug	
	BP	C-B1A	5	5
		C-B1B	infertility	
		C-B2A	2	1
		C-B2B	infertility	
		C-B3A	no plug	
C-B3B		infertility		
D	PBS	D-P1	infertility	
		D-P2	infertility	
	ENU	D-E1	infertility	
		D-E2	infertility	
		D-E3	infertility	
	BP	D-B1	infertility	
		D-B2	infertility	
D-B3		infertility		
E	PBS	E-P1	infertility	
		E-P2	cannibalized	
	ENU	E-E1	2	4
		E-E2	4	3
		E-E3	4	3
	BP	E-B1	cannibalized	
		E-B2	3	3
E-B3		cannibalized		
F	PBS	F-P1	infertility	
		F-P2	1	5
	ENU	F-E1	6	3
		F-E2	5	3
		F-E3	1	5
	BP	F-B1	cannibalized	
		F-B2	4	2
F-B3		infertility		

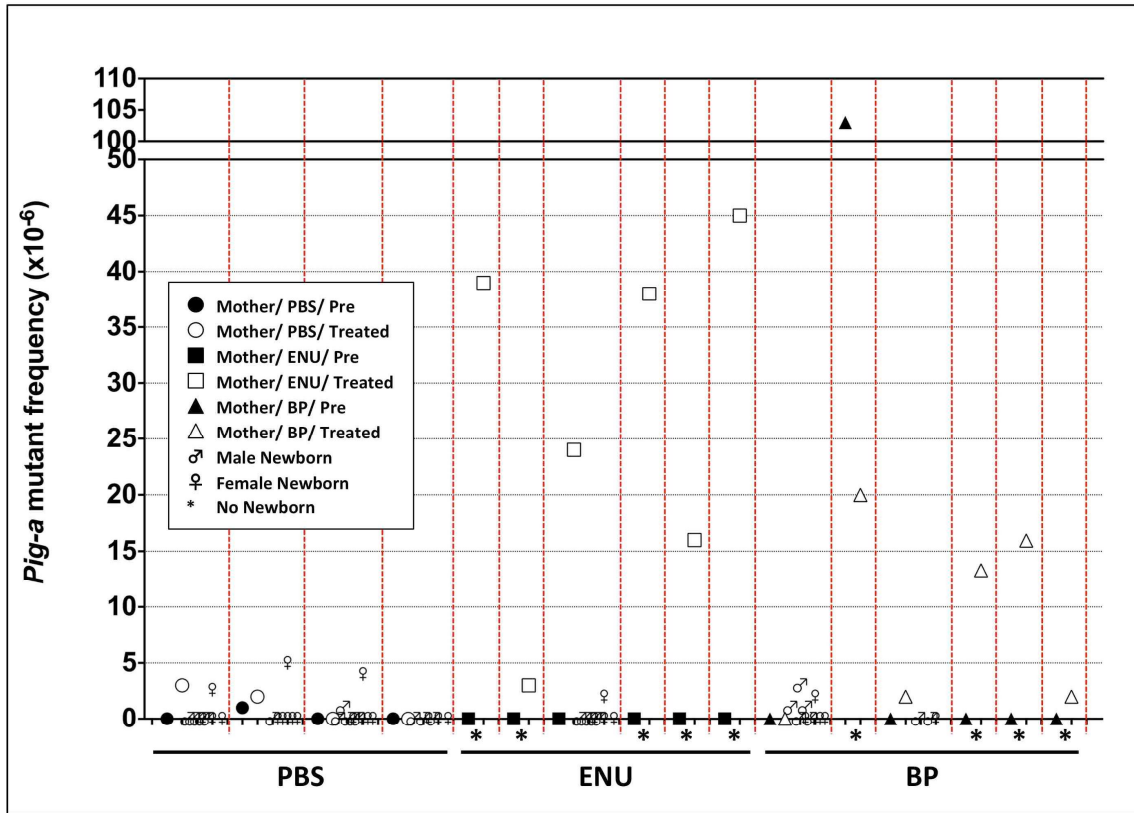


図11.妊娠前投与群における母および仔マウスの*Pig-a*変異体頻度

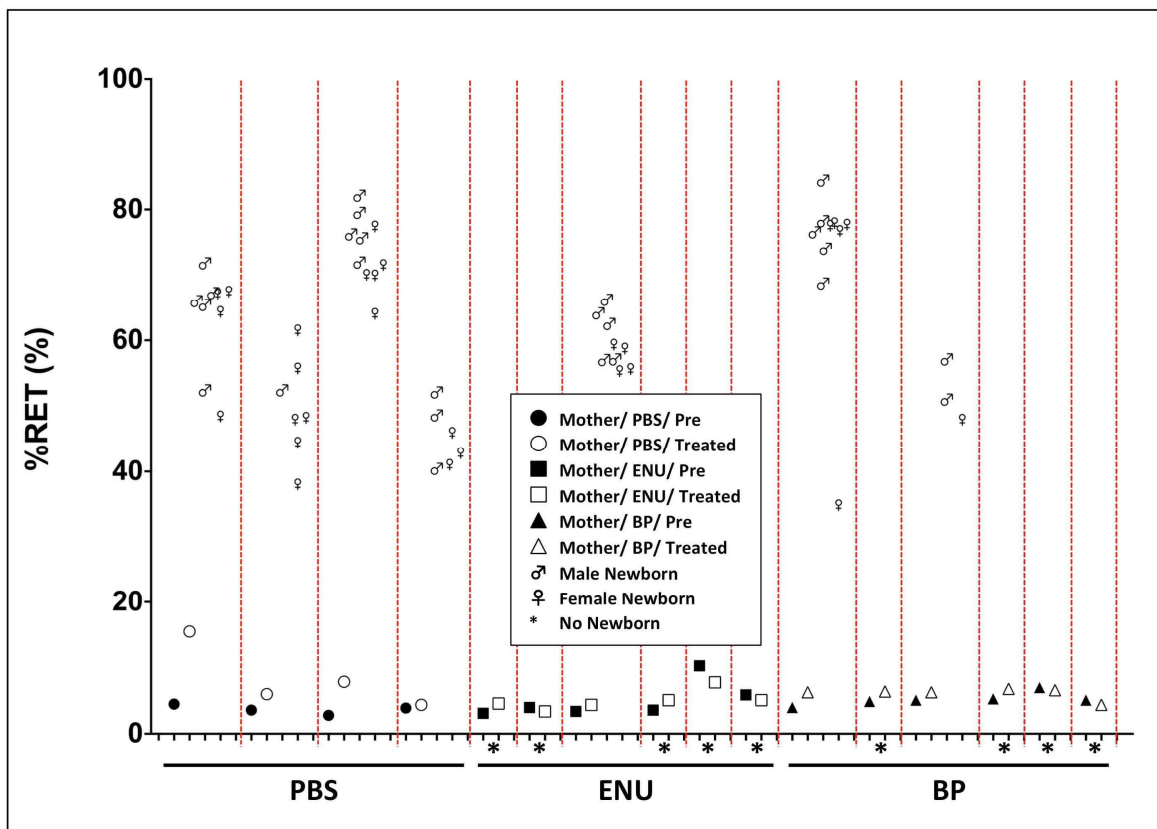


図12.妊娠前投与群における母および仔マウスの幼若赤血球頻度

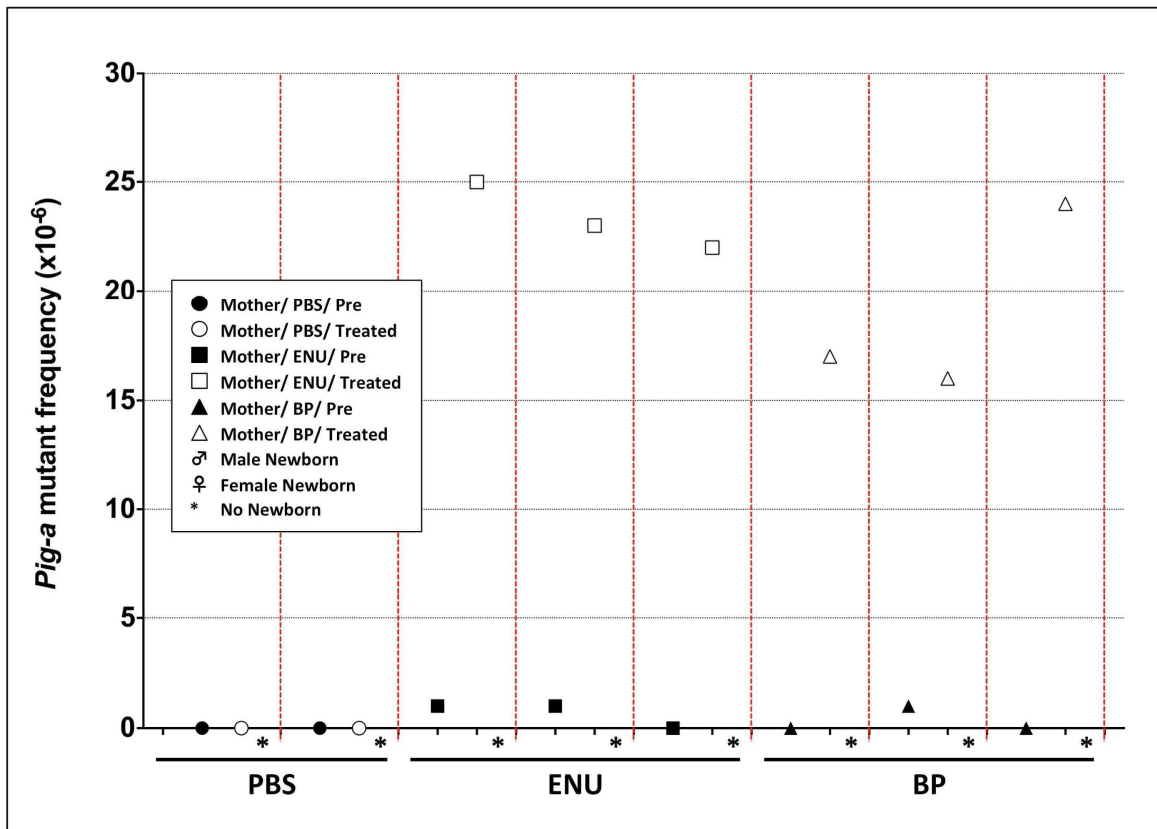


図13.妊娠初期投与群における母マウスの*Pig-a*変異体頻度

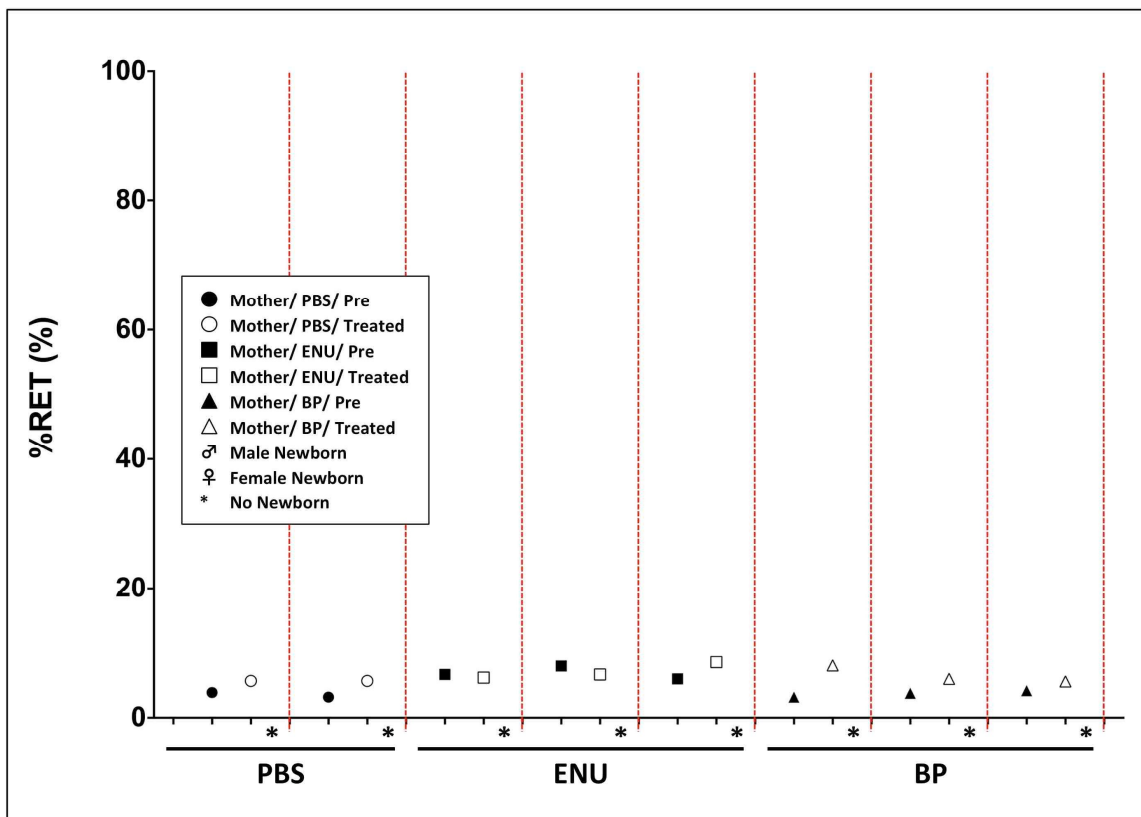


図14.妊娠初期投与群における母マウスの幼若赤血球頻度

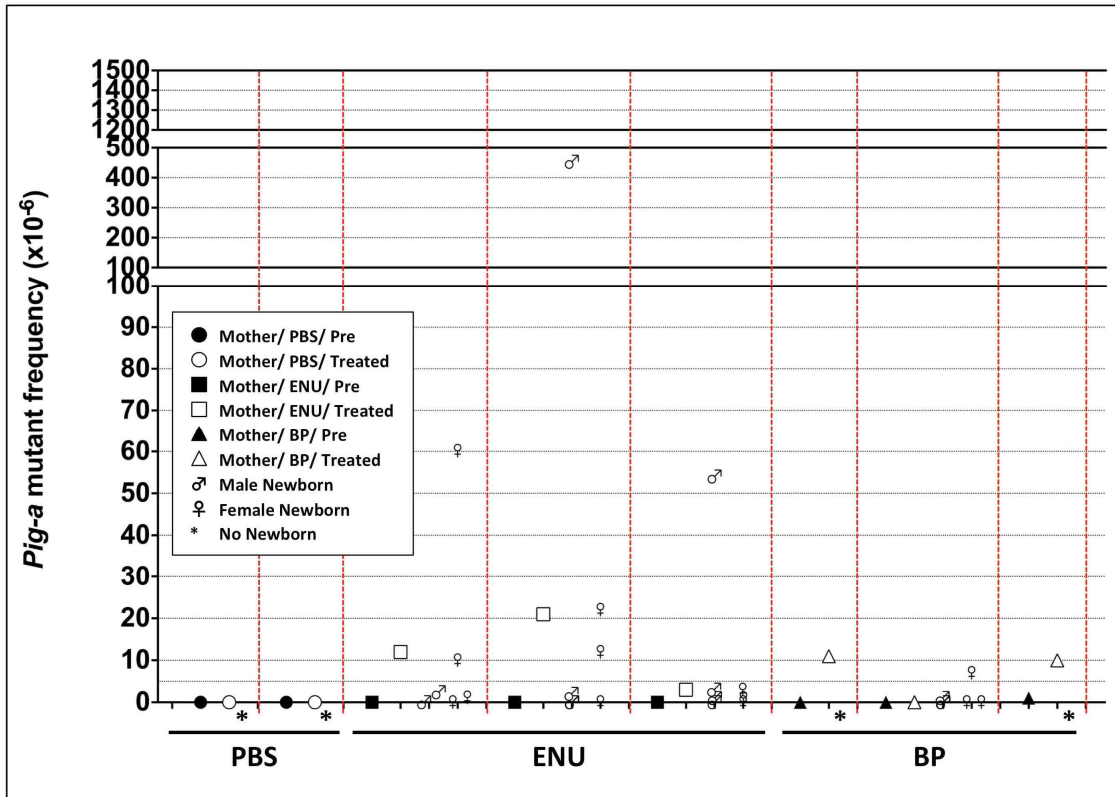


図15.妊娠中期投与群における母および仔マウスの*Pig-a*変異体頻度

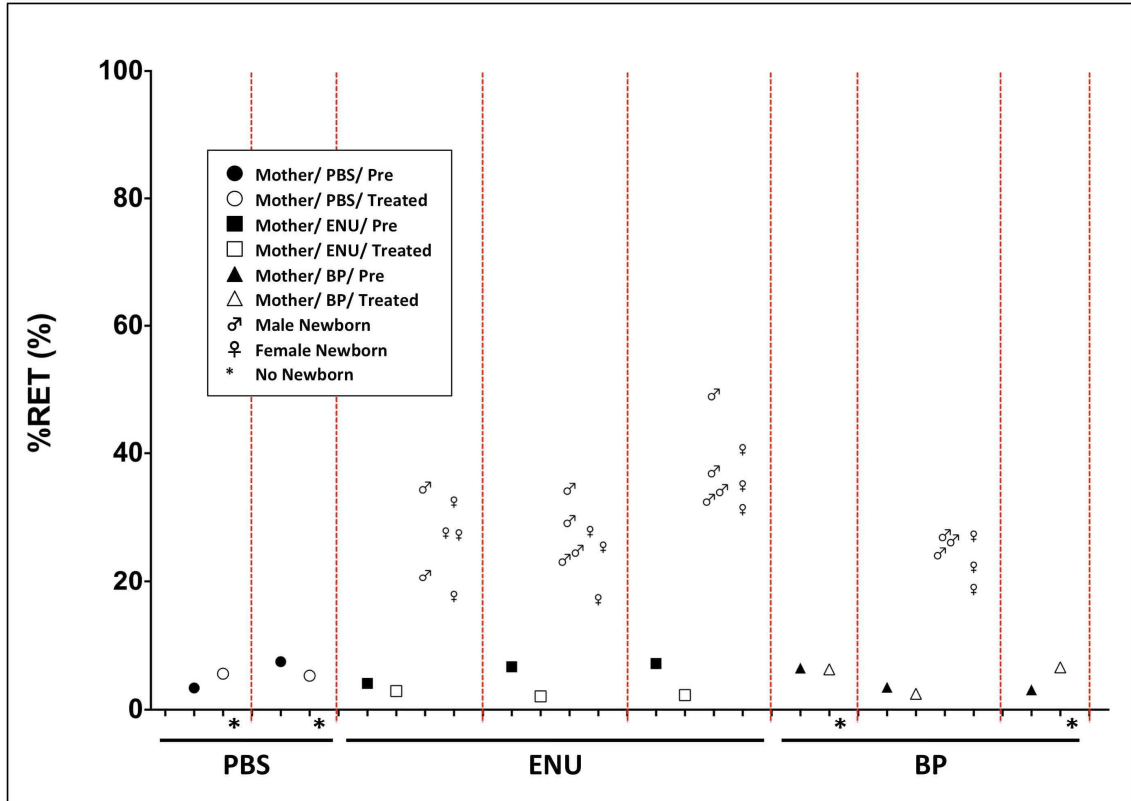


図16.妊娠中期投与群における母および仔マウスの幼若赤血球頻度

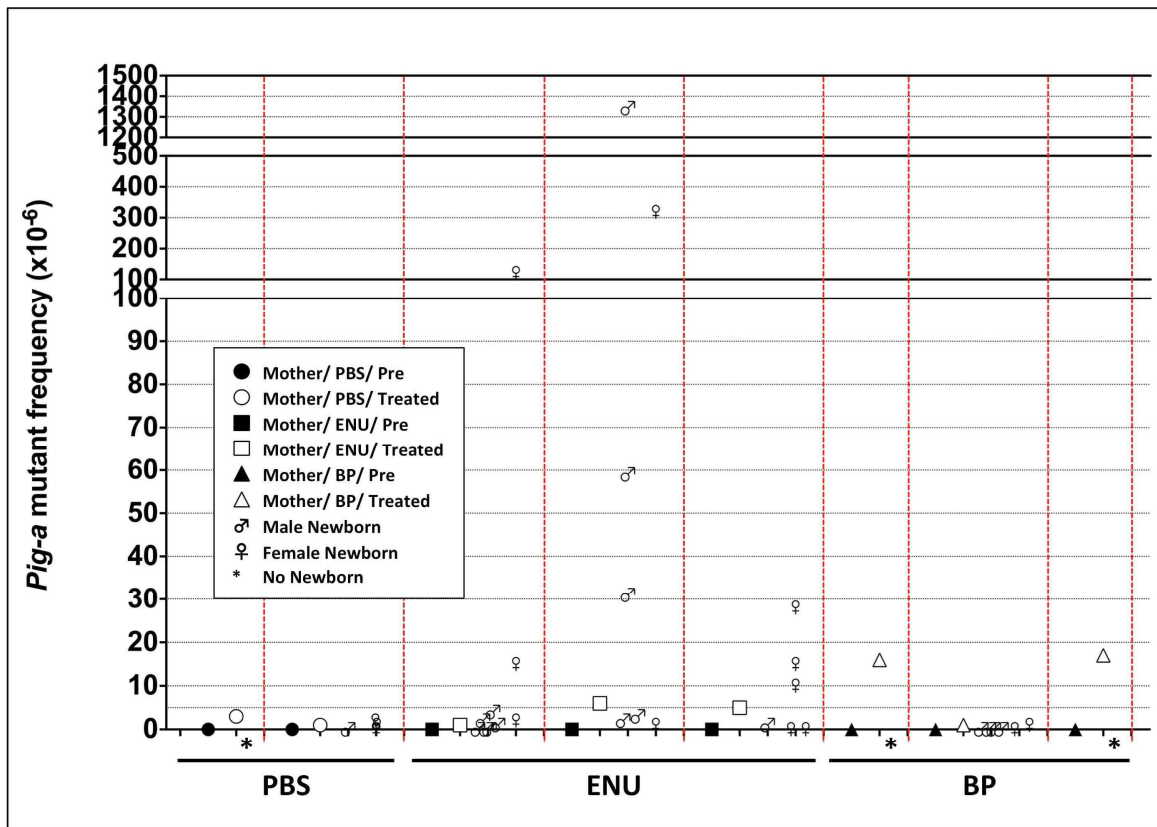


図17.妊娠後期投与群における母および仔マウスのPig-a変異体頻度

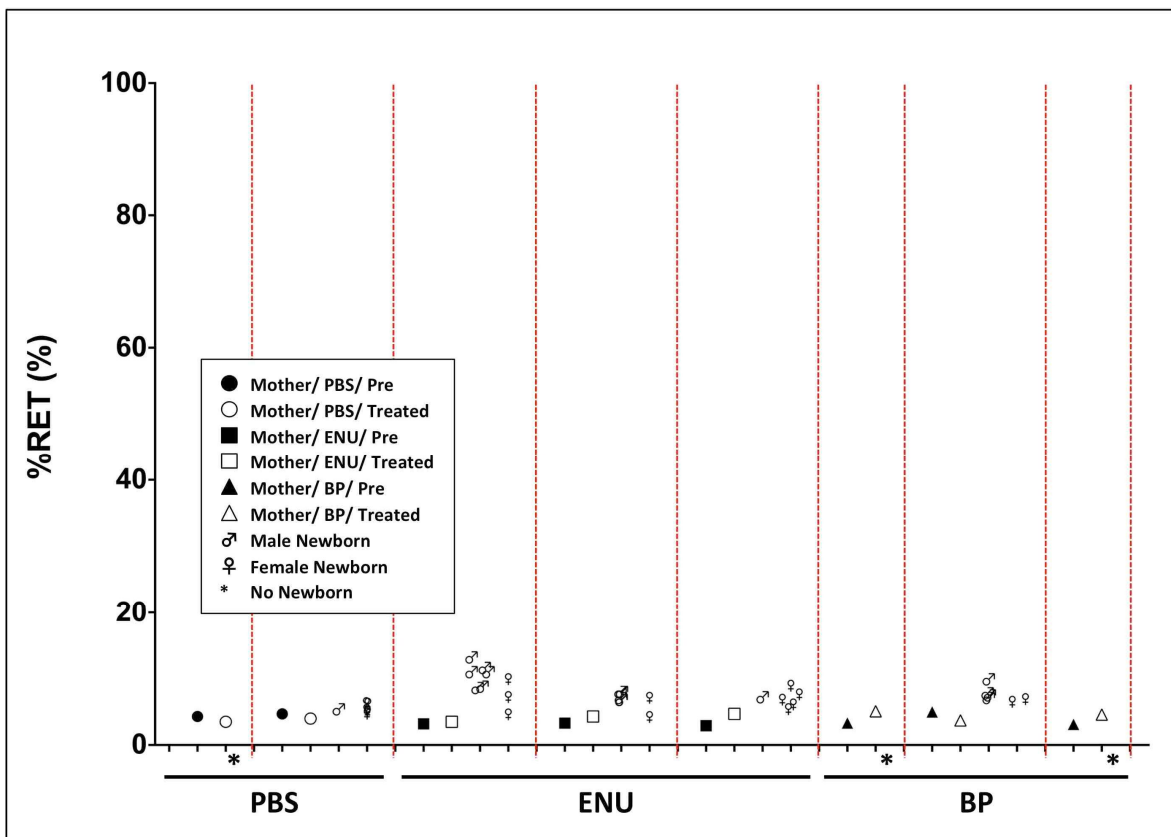


図18.妊娠後期投与群における母および仔マウスの幼若赤血球頻度



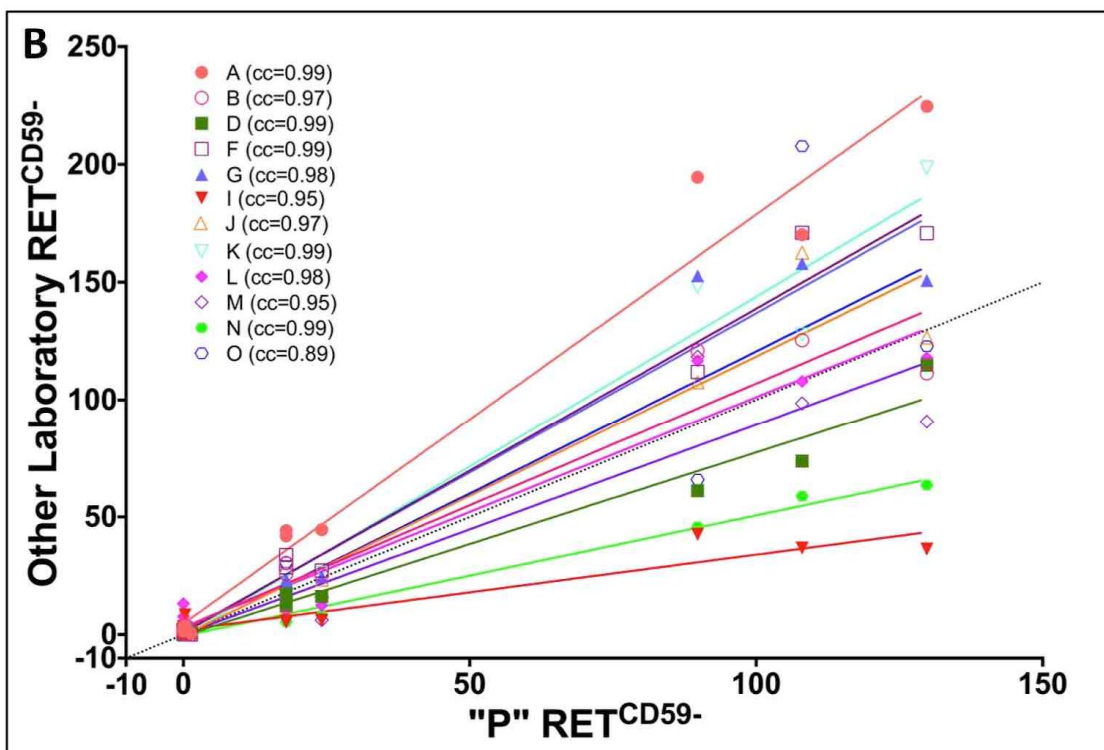
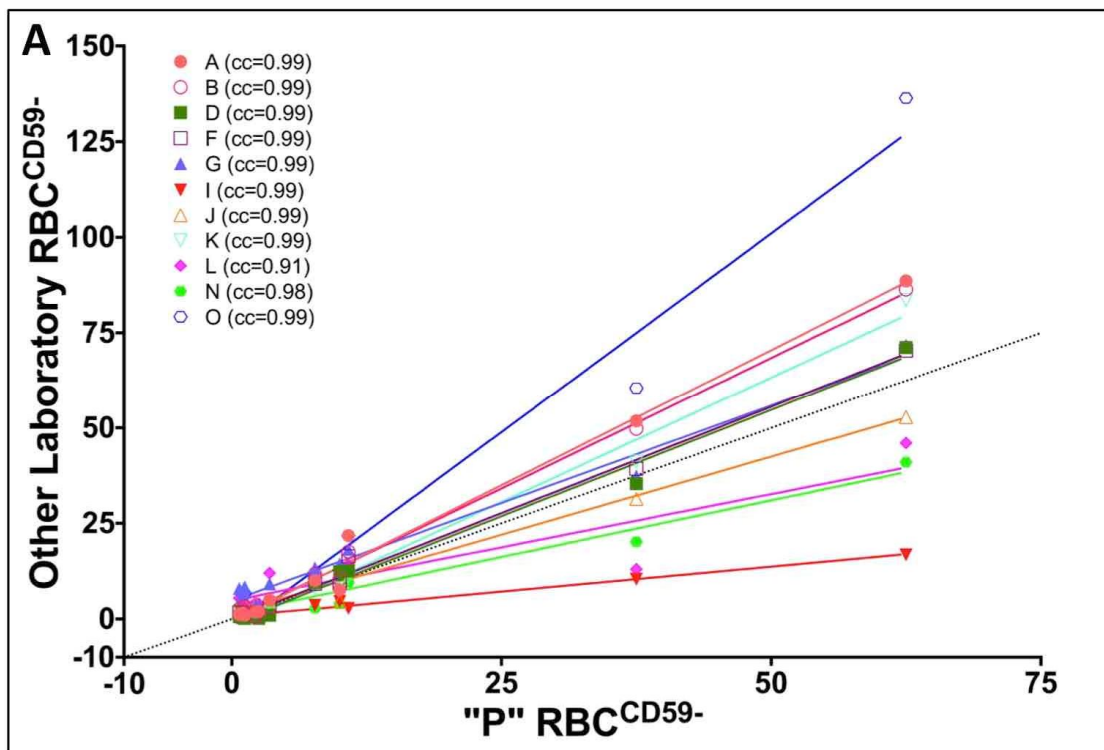


図19.線形回帰分析と相関係数(A, RBC *Pig-a*アッセイ. B, PIGRET法)

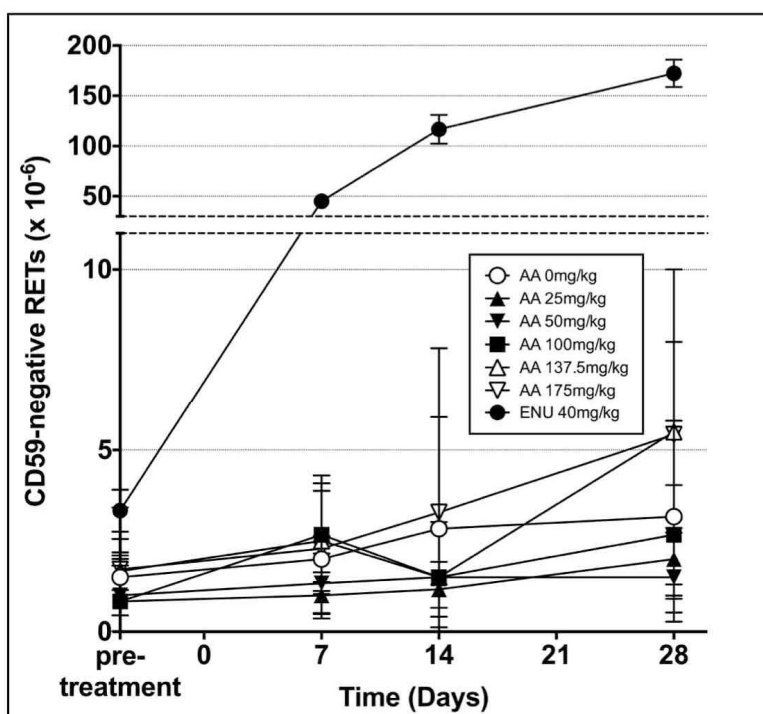
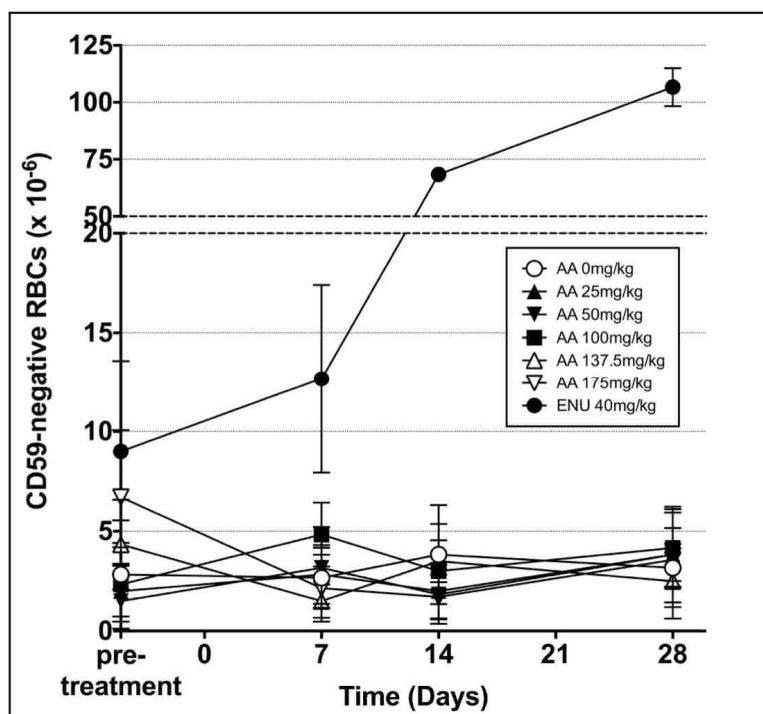


図20.ラットを用いたアクリルアミドの遺伝毒性評価(A, RBC *Pig-a*アッセイ. B, PIGRET法)

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
Horibata K, Ukai A, Honma M	Evaluation of mutagenicity of acrylamide using RBC Pig-a and PIGRET assays by single peroral dose in rats	<i>Mutation Research</i>	In press	In press	2016
Johnson GE, Yamamoto M, Suzuki Y, Adachi H, Kyoya T, Takasawa H, <u>Horibata K</u> , Tsutsumi E, Wada K, Kikuzuki R, Yoshida I, Kimoto T, Maeda A, Narumi K	Measuring Reproducibility of Dose Response Data for the <i>Pig-a</i> Assay using Covariate Benchmark Dose Analysis	<i>Mutation Research</i>	In press	In press	2016
Gollapudi BB, Lynch AM, Heflich RH, Dertinger SD, Dobrovolsky VN, Froetschl R, <u>Horibata K</u> , 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>	783	23-35	2015

<u>Horibata K.</u> , Kono S, Ishigami C, Zhang X, Aizawa M, Kako Y, Ishii T, Kosaki R, Saijo M, Tanaka K.	Constructive rescue of TFIIF 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>	60(5)	259-65	2015
<u>Horibata K.</u> , 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, <u>Horibata K.</u> , 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, <u>Horibata K.</u> , 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
<u>Horibata K.</u> , Ukai A, Kimoto T, Suzuki T, Kamoshita N, Masumura K, Nohmi T, Honma M.	Evaluation of in vivo genotoxicity induced by N-ethyl-N-nitrosourea, benzo[a]pyrene, and 4-nitroquinoline-1-oxide in the Pig-a and gpt assays	<i>Environmental and Molecular Mutagenesis</i>	54(9)	747-54	2013
Kimoto T, <u>Horibata K.</u> , Chikura S, Hashimoto K, Itoh S, Sanada H, Muto S, Uno Y, Yamada M, Honma M.	Interlaboratory trial of the rat Pig-a mutation assay using an erythroid marker HIS49 antibody	<i>Mutation Research</i>	755(2)	126-34	2013