

厚生労働科学研究費 補助金

化学物質リスク研究事業

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

平成 2 8 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 武田 俊一

平成 2 8 ( 2 0 1 6 ) 年 5 月

## 目 次

|   |          |
|---|----------|
| I．総括研究報告                                |          |
| 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 | ----- 1  |
| 武田俊一                                    |          |
| II．分担研究報告                               |          |
| オーラミンに対するXRCC1/XPA二重欠損細胞の生存率の測定-----    | 10       |
| 本間正充                                    |          |
| III．研究成果の刊行に関する一覧表                      | ----- 15 |

## 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

研究代表者 武田 俊一 京都大学・教授

### 研究要旨

化学物質審査規制法（化審法）は有害物質を規制する。変異原性（発がん性）は、化学物質が染色体DNAを損傷し、DNA損傷が不正確に修復されることによって起こる。DNA損傷は多種類ある。化審法で規定された変異原性検出試験は、2点の問題がある：感度と特異性が低い、変異原性のメカニズム（化学物質が作るDNA損傷の種類）を解析できない。問題を解決する為に、ヒトTK6細胞（OECDや化審法が変異原性検出試験に利用することが推奨）からDNA損傷修復酵素の遺伝子欠損細胞（DNA修復ミュータント）を作製・利用することを提案する。そして、化審法で規定されたバイオアッセイ（野生型のみを使う）に、DNA損傷修復欠損株も併用することを提案する。この併用試験では、野生型細胞を陰性対照として使う。例えば小核テストでは、DNA修復ミュータントで野生型細胞よりも多く小核が出現したとき、当該化学物質が変異原性陽性と判定する。我々が提案する手法は、従来の手法に比べて、感度と特異性の両方を改善できる。従来の変異原性検出試験は正常（野生型）細胞のみを利用したバイオアッセイであった。野生型細胞は迅速かつ正確にDNA損傷を修復できるが故に、変異原性検出の感度が低いのは当然である。我々は、感度を改善することを目指し、複数種類のDNA損傷修復酵素（例、XRCC1）の欠損株をヒトTK6細胞株から創った。XRCC1欠損TK6株を使い、典型的DNA損傷剤（電離放射線やアルキル化剤）の変異原性を小核テスト（化審法で規定）で解析したところ、検出感度が5-10倍程度上昇していた。我々が提案する手法では、DNA修復ミュータントが野生型細胞よりも多く小核を出現させた場合のみ変異原性陽性と判定する。すなわち、野生型を陰性対照におくことにより変異原性検出試験の特異性を改善できる。本研究は、我々が過去に小核テストで実施したこの研究手法を、化審法で利用が定められたもう1つの変異原性検出試験、チミジンキナーゼ（tk）試験に応用する。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

本間 正充・国立医薬品食品衛生研究所・部長

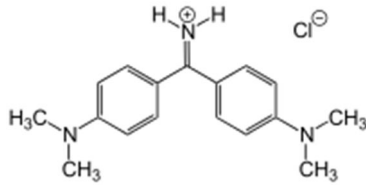
### A．研究目的

化学物質の毒性の中で最も重要なものは発がん性であり、発がんは主に変異原性による。化審法で規定された変異原性検出試験は、感度と特異性があまり高くない（*Mutat. Res.* 588: 47-57, 2005）。化審法で利用が定められた検出試験の1つ、チミジンキナーゼ（tk）試験とは、細胞を化学物質に曝露し、tk酵素をコードする遺伝子（TK遺伝子）を不活性化する変異が入る頻度を定量する、変異原性検出試験である。感度が高くない、転座・組換えを起こす変異原を事実上検出できないという弱点がある一方、特異性が高く、実験手法が簡単という長所がある。感度が高くない原因は、化審法で規定された変異原性検出試験が野生型細胞（DNA損傷・複製を正確かつ

迅速に修復できる）を使うからである。DNA修復・複製ミュータントのtk試験を併用するという最小限の変更によって、既存のtk試験の感度を向上する行政的必要性は高い。

我々の提案は、化審法で規定された変異原性検出試験、tk試験において、野生型細胞に加えDNA修復・複製ミュータントも併用し、変異原性の検出感度を改善することにある。併用により、過去のデータ（野生型細胞のみのtk試験の結果）と比較しながら、有害化学物質のより合理的な規制ができる。本研究の目的は、どのミュータントを併用すれば、tk試験の感度が最も改善するかを決定することにある。

DNA修復・複製ミュータントを併用する新しいtk試験は、その感度が従来のtk試験よりも改善することが期待できる。そこで、菌を使うエイムス試験では陽性を示すが、哺乳類細胞を用いるマウスリンフォーマ試験では陰性を示すような、従来、変異原性偽陽性と一応説明されてきた化学物質を、新しいtk試験を応用するモデル被験物質として選択する。この範疇に属する化学物質として、まずオーラミン（下に化学構造）を選択した。



オーラミンは、繊維製品、革製品、そして紙やインクの着色剤として利用されている色素である（図1）。世界のオーラミン年間売上高は、約1000トン（エチルオーラミンも含む）にのぼる（Gessner et al., Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 7<sup>th</sup> Ed., New York, John Wiley & Sons, Inc., 55pp）。オーラミンの製造工場において職業暴露が問題となり、労働者で膀胱がんが誘発した（Muller A, Z. Urol. Chir., 36, 202-219 (1933)）。

## B．研究方法

### 武田グループ

武田グループはDNA修復・複製TK6ミュータントの作製を担当する。Rad18とDNA polymerase (Pol )の欠損TK6細胞およびDNA polymerase 校正機能欠損TK6細胞(Pol )を作製する。さらにXPAとXRCC1の2重欠損TK6細胞を創る（それぞれの1重欠損は作製済み）。

以下に上記の各DNA修復・複製ミュータントを作製する理由を解説する。変異原性化学物質は、必ずDNA損傷を作り、その損傷が不正確にDNA修復・複製される時に損傷が変異に変換される。ゆえに損傷を正確にDNA修復・複製する経路を遺伝子破壊によって人工的に機能低下させてやれば、tk試験によって変異原性を検出する感度は高まる。塩基除去修復に機能するXRCC1とヌクレオチド除去修復に機能するXPAは、互いに独立して損傷塩基を正確に修復する。ユビキチン化酵素、Rad18とDNA polymerase (Pol )およびDNA polymerase (Pol )校正機能は、いずれも損傷した鋳型鎖をDNA合成酵素が正確に複製するのに貢献する。これらの遺伝子破壊細胞では、野生型TK6細胞に比べて、変異原性化学物質が変異を起こしやすくその変異がtk試験によって検出されやすくなる（感度が上がる）。

遺伝子破壊は、遺伝子破壊のための相同組換えプラスミド（+薬剤選択マーカー）とCRISPR/Cas9、ガイドRNAを同時にTK6細胞に導入した後、薬剤選択して出現したコロニーの中で両対立遺伝子ともに破壊されたクローンを選ぶ。予想された遺伝子破壊が起

こっていることは、RT-PCRおよびその産物の塩基配列決定により確認する。さらに候補クローンのDNA損傷剤に対する感受性を調べ、目的通りの遺伝子破壊が起こっていることを最終確認する。

### 本間グループ

本間は、野生型TK6細胞を使って実施する従来型tk試験に加えてDNA修復・複製TK6ミュータントも併用する新規tk試験を応用するモデル被験物質として、オーラミンを用いた。工業用グレードのオーラミンは、齧歯類で肝臓等に腫瘍を誘発させることから、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、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)）。本間は、武田からXPA<sup>-/-</sup>/XRCC1<sup>-/-</sup> TK6細胞を既に譲渡された。そしてまずオーラミンに対する感受性を野生型とXPA<sup>-/-</sup>/XRCC1<sup>-/-</sup>の各TK6細胞の間で比較した。

（倫理面への配慮）

該当なし

## C．研究結果

### 武田グループ

（1）Rad18欠損TK6細胞（RAD18<sup>-/-</sup>細胞）の作製とその表現型の確認

図1 AはRAD18<sup>-/-</sup>細胞の作製手法を示す。作製したRAD18<sup>-/-</sup>細胞は予想通りにアルキル化剤（シスプラチン）に感受性を示すことを確認した（図1 C）。

（2）Pol 欠損TK6細胞（POL<sup>-/-</sup>細胞）の作製とその表現型の確認

図2はPOL<sup>-/-</sup>細胞の作製手法を示す。作製したPOL<sup>-/-</sup>細胞は予想通りに紫外線に感受性を示すことを確認した（図3）。

( 3 ) XPA, XRCC1 二重欠損TK6細胞( *XPA*<sup>-/-</sup>/*XRCC1*<sup>-/-</sup> 細胞 ) の作製とその表現型の確認

*XPA*<sup>-/-</sup>細胞と*XRCC1*<sup>-/-</sup>細胞は既に作製済みであった。作製した*XPA*<sup>-/-</sup>/*XRCC1*<sup>-/-</sup>細胞は予想通りにシスプラチンに対し*XPA*<sup>-/-</sup>細胞および*XRCC1*<sup>-/-</sup>細胞よりもさらに高い感受性を示すことを確認した(図4)。すなわち予想通りの二重欠損細胞ができていることを確認できた。さらに予想外のことには*XPA*<sup>-/-</sup>/*XRCC1*<sup>-/-</sup>細胞が*XPA*<sup>-/-</sup>細胞より高い紫外線感受性を示すことを確認した(図5)(論文作成中)。

( 4 ) Pol 校正機能欠損TK6細胞( *POL* *D269A*<sup>-/-</sup> 細胞 = *POL* *exo*<sup>-/-</sup> 細胞 ) の作製とその表現型の確認

図6は*POL* *D275A*<sup>-/-</sup>細胞の作製手法を示す。*D269A*とは、*POL* 遺伝子のN末端から269番目にあるアスパラギン酸がアラニンに置換されるような点変異が片方の対立遺伝子にノックインされたことを示す。*Pol* は、細胞の増殖に必須であるので、*D269A*の点変異をノックインするには3ステップのゲノム編集を行う必要があった(図6)。作製した*POL* *exo*<sup>-/-</sup>細胞は予想通りにシタラビンに感受性を示すことを確認した(図7)。シタラビンは、ヌクレオシドアナログの抗がん剤でありAra-Cとも呼ばれ、急性骨髄性白血病の治療に第一選択薬として使われる。シタラビンは、DNA合成酵素*Pol* によってDNA鎖3'末端に取り込まれても、校正機能によってすぐに除去される限りDNA複製を停止させずDNAの損傷を起こさない。ゆえにシタラビン感受性は、*POL* *exo*<sup>-/-</sup>細胞が当初の計画通り作製できたことを意味する。

図7に示した感受性試験から*Pol* 校正機能は、DNA鎖3'末端に取り込まれたシタラビン(Ara-C)の他に、DNA鎖3'末端に取り込まれたLamivudine(抗レトロウイルス薬)やAZT(第一世代の抗AIDSウイルス薬)も効率よく除去出来ることが解った。

## 本間グループ

S9mix非存在下で、オーラミン(最終濃度50, 75, 100, 125 µg/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8に示した。最高用量の125 µg/mLでは、TK6細胞は4つコロニー数が見られたが、そのRS値は、二重欠損細胞と共にゼロであった。用量を下げると両細胞ともにコロニー形成が観察された。それに従い、RS値も用量依存

的に回復し、50 µg/mLの用量で、両細胞ともRS値は約20%程度であった。

S9mix存在下で、オーラミン(最終濃度50, 75, 100, 125 µg/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9に示した。TK6細胞は、最高用量125 µg/mLで7つコロニーを観察することができたが、二重欠損細胞は、最高用量125と100 µg/mLの2つの用量で死滅した。また、50 µg/mLの用量では、TK6細胞は陰性対照群の約半分の相対生存率(RS = 48%)があったが、二重欠損細胞のRS値は、著しく低く10%程度であった。このことから、TK6と二重欠損細胞のRSには約5倍程度の差があり、S9mix存在下で二重欠損細胞は感受性を有すると考えられた。以上の実験結果からオーラミンは肝臓で代謝されその代謝産物がDNA損傷を起こすと結論した。

## D. 考察

Rad18は*Pol* を活性化する。そして*Pol* は紫外線損傷の他にも多様な塩基損傷を持つ鋳型鎖を正確にDNA合成できる。したがって、*RAD18*<sup>-/-</sup>細胞と*POL* *exo*<sup>-/-</sup>細胞では多様な塩基損傷を起こす変異原性化学物質が点変異を起こしやすい。ゆえに*RAD18*<sup>-/-</sup>細胞と*POL* *exo*<sup>-/-</sup>細胞は、塩基損傷を起こす変異原性化学物質をtk試験によって検出するのに向いている。

オーラミンのDNA損傷の機構についても不明であるが、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てきた。一方、本実験結果からオーラミンによるDNA損傷がXRCC1あるいはXPAによってDNA修復されていることが予想される。すなわちオーラミンによるDNA損傷は、DNA鎖切断だけでなく、塩基損傷も起こしていることが明らかになった。

## E. 結論

*XRCC1/XPA* 二重欠損細胞(*XPA*<sup>-/-</sup>/*XRCC1*<sup>-/-</sup>細胞)は、代謝活性化されたオーラミンに対して感受性を示すことが分かった。よって、二重欠損細胞をtk遺伝子変異試験に用いれば、*XRCC1*あるいは*XPA*修復遺伝子

が関与する遺伝毒性物質を感度良く検出できると考えられる。

#### F．健康危険情報

該当なし

#### G．研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tsuda M, Terada K, Ooka M, Kobayashi K, Sasanuma H, Fujisawa R, Tsurimoto T, Yamamoto J, Iwai S, Kadoda K, Akagawa R, Huang SN, Pommier Y, Sale JE, Takeda S, Hirota K. (2017) The dominant role of proofreading exonuclease activity of replicative polymerase in cellular tolerance to cytarabine (Ara-C). Oncotarget (in press)

##### 2. 学会発表

該当なし

#### H．知的財産権の出願・登録状況

該当なし

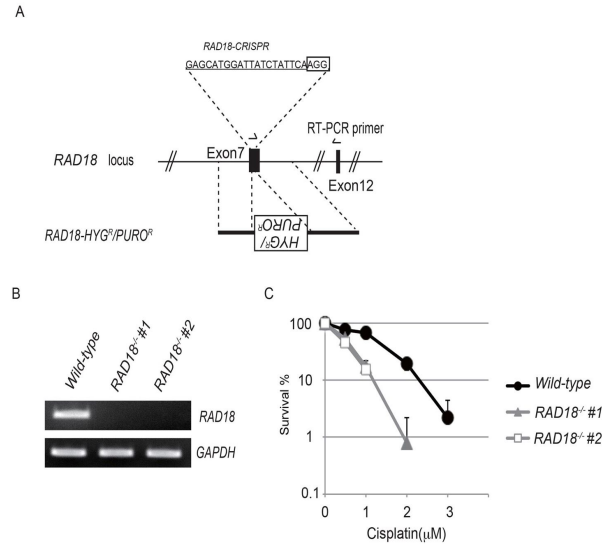


図1 (A) *RAD18*<sup>-/-</sup> 細胞の作製方法、(B) RT-PCRによる遺伝子破壊 (#1, #2クローン) の確認、(C) シスプラチン感受性試験結果。

(A) の1行目がゲノム編集に使ったガイドRNA配列、2行目が *RAD18* 遺伝子座のゲノム配列、3行目がノックアウト用組換えプラスミドの構造を示す。HYG<sup>R</sup>とPURO<sup>R</sup>は選択マーカー遺伝子。これらのマーカー遺伝子を両方の *RAD18* 対立遺伝子のエキソン7にノックインすることによって、両対立遺伝子の遺伝子破壊を行う。(A) の矢印は (B) RT-PCR で使ったプライマーを示す。(C) の感受性試験は、1個1個ばらばらにした細胞を、シスプラチンを含むメチルセルロース添加培地にまきこんで実施した。縦軸はコロニー形成効率 (まきこんで2週間目)、横軸はシスプラチン濃度を示す。

#### Generation of *Polh*<sup>-/-</sup> TK6 cells

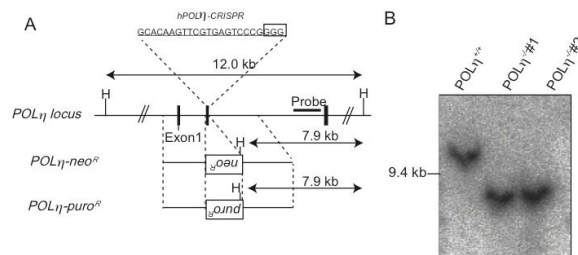


図2 (A) *POLH*<sup>-/-</sup> 細胞の作製方法、(B) ゲノムDNAのサザンブロットによる遺伝子破壊 (#1, #2クローン) の確認

(A) の1行目がゲノム編集に使ったガイドRNA配列、2行目が *POLH* 遺伝子座のゲノム配列、3行目と4行目がノックアウト用組換えプラスミドの構造を示す。NEO<sup>R</sup>とPURO<sup>R</sup>は選択マーカー遺伝子。(B) HindIII制限酵素で野生型細胞と#1, #2クローンのゲノムDNAをそれぞれ切断し、電気泳動し、(A) で示したプローブDNAでサザンブロットハイブリダイゼーションした。NEO<sup>R</sup>とPURO<sup>R</sup>が両対立遺伝子のエキソン2にそれぞれノックインすると、正常な *POLH* 遺伝子座由来の12kbのバンドが消え、7.9kbのバンドが出現する。

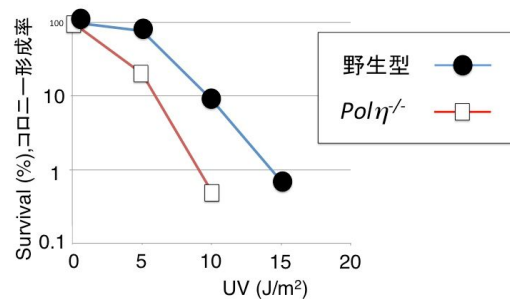


図3 紫外線感受性の試験結果。

野生型細胞と *POL*<sup>-/-</sup> 細胞を最小限量のPBSバッファーで懸濁し、横軸に示した線量の紫外線を照射した。そして1個1個ばらばらにした細胞をメチルセルロース添加培地にまきこんだ。2週間後にコロニー数をカウントした。縦軸の100%は紫外線を照射しないときのコロニー数である。Polは、紫外線損傷の他にも多様な塩基損傷を持つ鋳型鎖を正確にDNA合成できる。したがって、*POL*<sup>-/-</sup> 細胞は多様な塩基損傷を起こす変異原性化学物質をtk試験によって検出するのに向いているはずである。

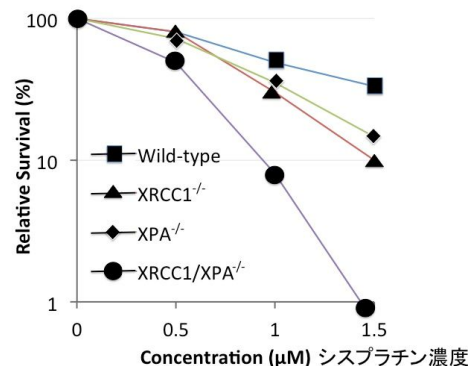


図4 シスプラチン感受性試験結果

1個1個ばらばらにした細胞を、シスプラチンを含むメチルセルロース添加培地にまきこんだ。まきこんで2週間目にコロニー数をカウントした。縦軸はコロニー形成の相対効率（100%はシスプラチン処理なしの時のコロニー数）、横軸はシスプラチン濃度を示す。

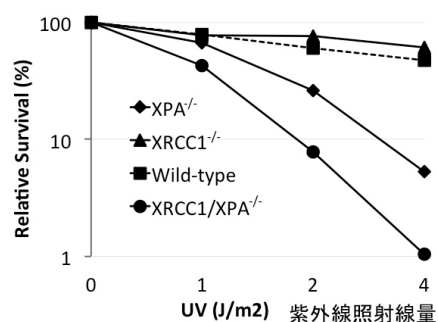


図5 紫外線感受性の試験結果

野生型細胞と図に示した遺伝子破壊細胞を最小限のPBSバッファーで懸濁し、横軸に示した線量の紫外線を照射した。そして1個1個ばらばらにした細胞をメチルセルロース添加培地にまきこんだ。2週間後にコロニー数をカウントした。縦軸の100%は紫外線を照射しないときのコロニー数である。このデータは、ヌクレオチド除去修復が全く機能しない時に限って塩基除去修復が紫外線損傷の修復に貢献することを示唆する。



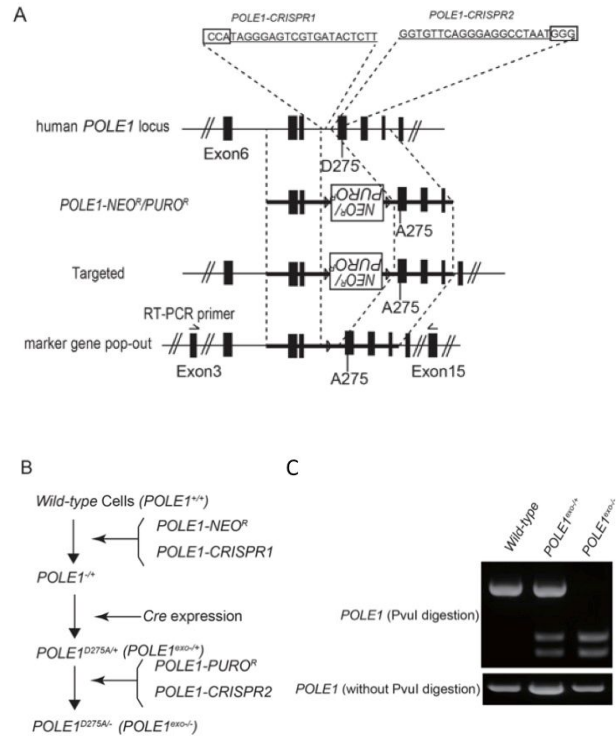


図6 Pol 校正機能欠損TK6細胞 ( $POL^{D269A/-}$  細胞 =  $POL^{exo-/-}$  細胞) の作製

(A) Pol は4種類の分子から成るホロ酵素である。4種類のうちのp261と呼ばれる最大分子量のタンパクに校正機能の活性中心が存在する。1行目はPol p261の遺伝子座の構造を示す。この遺伝子座にD269Aのアミノ酸置換をするためのノックアウト用組換えプラスミドを2種類作った(2行目:  $hPOL^{neo/puro}$ )。それぞれのノックアウト用組換えプラスミドを個別にノックインするために、ガイドRNA ( $hPOL^{CRISPR1}$ ,  $hPOL^{CRISPR2}$ )を2種類準備した(1行目の上)。ノックアウト用組換えプラスミド、ガイドRNA、CRISPR/Cas9を同時に野生型細胞に導入した。そして野生型p261遺伝子座のイントロンに選択マーカーが挿入した(Targetedの3行め)細胞を作った。選択マーカーが挿入されると、その対立遺伝子が破壊される。この細胞にCre組換え酵素を一過性発現することによって選択マーカー遺伝子を除去する(marker gene pop-outの4行め)。この時にD269Aの点変異は残される( $POL^{D269A}$ 対立遺伝子ができる)。この対立遺伝子は、校正機能が欠損したPolを発現する。

(B)  $POL^{D269A/-}$ 細胞の作製法。野生型( $POL^{+/+}$ )細胞にノックアウト用組換えプラスミドを導入し、 $POL^{+/+}$ 細胞を作り(A)の1行めから3行めに転換)その後選択マーカーを除去し(A)の3行めから4行めに転換) $POL^{D269A/+}$ 細胞を作る。その後野生型の+対立遺伝子を破壊し(A)の1行めから3行めに転換) $POL^{D269A/-}$ 細胞を作る。

(C) RT-PCRによるD269Aの点変異のノックインの確認。(A)の矢印で示されたプライマーを使い、野生型、 $POL^{D269A/+}$ 、 $POL^{D269A/-}$ の各細胞由来のmRNAをRT-PCRした。RT-PCRの結果できたDNAを電気泳動した。上の試料はPvuI制限酵素でこのDNAを切断してから電気泳動し、下の試料はPvuIでDNAを切断しないで電気泳動した。PvuIは、D269Aの点変異が挿入された遺伝子から生成したmRNA由来のcDNAのみ切断できる。一番右の試料ではD269Aの点変異が両対立遺伝子にノックインされたことが判る。

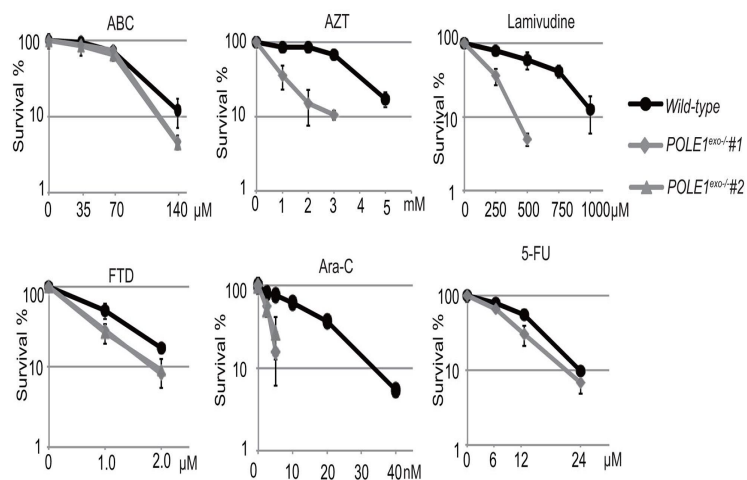


図7 Pol 校正機能欠損TK6細胞 ( $POL^{exo-/-}$  細胞の2つのクローン、#1,#2)と野生型細胞の薬剤感受性  
1個1個ばらばらにした細胞を、6種類の薬剤の1つを含むメチルセルロース添加培地にまきこんで実施した。  
まきこんで2週間目にコロニー数をカウントした。縦軸はコロニー形成の相対効率(100%はシスプラチン処理  
なし)、横軸は薬剤の濃度を示す。6種類の薬剤はすべてヌクレオシドアナログと呼ばれる範疇の薬剤である。

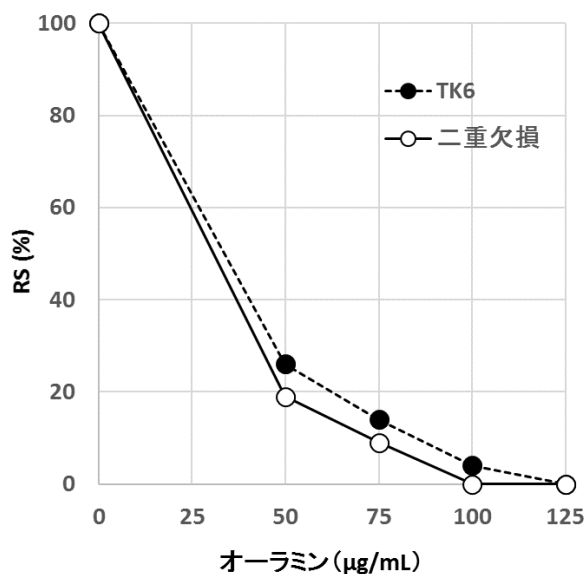


図8 S9mix 非存在下のオーラミンに対する細胞相対生存率

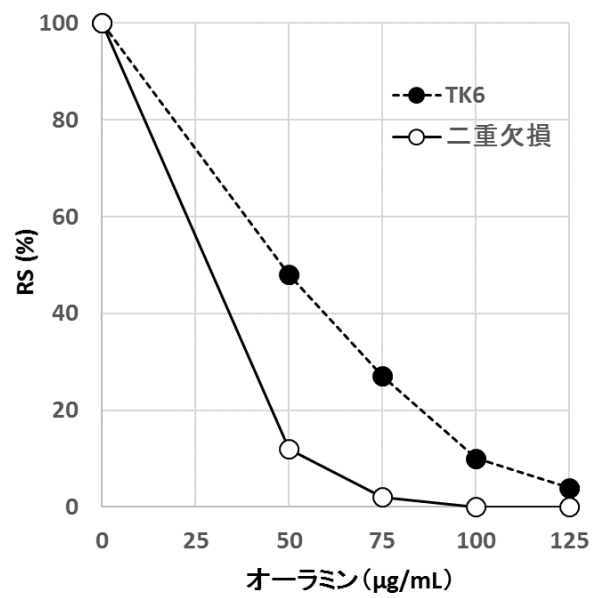


図9 S9mix 存在下のオーラミンに対する細胞相対生存率

## オーラミンに対するXRCC1/XPA二重欠損細胞の生存率の測定

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 主任研究官

### 研究要旨

化審法で規定された変異原性検出試験は、2つの問題点がある：感度と特異性が低い、変異原性のメカニズム（化学物質が作るDNA損傷の種類）を解析できない。この問題を解決する為に、ヒトリンパ芽球細胞株TK6からDNA損傷修復酵素の遺伝子欠損細胞（DNA修復ミュータント）を作製し、遺伝毒性試験に利用した。TK6由来のXRCC1/XPA二重欠損細胞はin vitro小核試験で5倍程度検出感度が上昇した。本研究では、この細胞を使って、化審法で規定されているチミジンキナーゼ（TK）遺伝子変異試験を実施し、同様に高い感度が得られるかを検証する。本年度は、前段階として細胞毒感受性を評価した。モデル被験物質として、オーラミンを用いた。工業用グレードのオーラミンは、齧歯類で肝臓等に腫瘍を誘発させることから、IARCにおいてヒトに対して発がん性がある可能性があるグループ2Bと分類されている。また、エイムス試験では陽性を示すが、哺乳類細胞を用いるマウスリンフォーマ試験では陰性を示す。試験の結果、オーラミンの代謝活性化条件下において、二重欠損細胞の相対生存率は、その野生型（TK6細胞）のそれよりも著しく低下した。一方、非代謝活性化条件下ではその影響は顕著ではなかった。よって、XRCC1/XPA二重欠損細胞は、代謝活性化条件下のオーラミンに対して感受性を示すことが分かった。

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

オーラミンは、繊維製品、革製品、そして、紙やインクの着色剤として利用されている色素である（図1）。世界のオーラミン年間売上高は、約1000トン（エチルオーラミンも含む）にのぼる（Gessner et al., Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 7<sup>th</sup> Ed., New York, John Wiley & Sons, Inc., 55pp）。オーラミンの製造工場において職業暴露が問題となり、労働者で膀胱がんが誘発した（Muller A, Z. Urol. Chir., 36,

202-219 (1933)）。また、インドや中国では食品中からオーラミンが検出された（Tripathi et al, Food Contr. 18, 211-219 (2007)）。

オーラミンの製造は、中間生成物を介する2段階工程で行われるため、工業用グレードのオーラミン（純度約80%）は、Michler's 塩基（オーラミン製造の中間体）とMichler's ケトン（オーラミンの加水分解産物）を数%含有する。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。

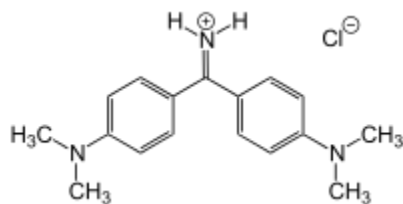


図 1

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 ケトンと Michler's 塩基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))

しかしながら、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、一方、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、in vitro 小核試験で 5 倍程度検出感度が上昇することが確認されている TK6-XRCC1/XPA 二重欠損細胞を使って、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子変異試験で行われる細胞相対生存率 (Relative survival; RS) を測定した。

## 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。ヒトリンパ芽球細胞 TK6、および XRCC1/XPA 二重欠損細胞

は、10% 馬血清 (JRH Bioscience), 200  $\mu\text{g/mL}$  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  $\mu\text{g/mL}$  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%  $\text{CO}_2$ )。

### 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 50, 75, 100, 125  $\mu\text{g/mL}$ )、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。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% 血清を含む培地で細胞を分散させ細胞濃度を測定した。細胞濃度を 8 cells/mL に希釈し、約 1.6 cell/well の濃度で 96 well 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 $4 \times 10^6$ 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 Cloning efficiency (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 well 数であり、TW は総 well 数である。N は、1 well 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  $2 \times 10^7$  cells (表1) である。

補正CE = CE × 処理終了時の細胞数 / 処理開始時の細胞数  
 ……(式2)

被験物質で処理された培養の細胞相対生存率RS(%)は、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、RS = 20 ~ 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い生存率実験を行った。

RS (%) = 処理培養の補正CE / 溶媒対照の補正CE × 100  
 ……(式3)

## C．研究結果

### 1．非代謝活性化条件下のオーラミンの細胞毒性

S9mix 非存在下で、オーラミン(最終濃度 50, 75, 100, 125 µg/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表2と図2に示した。最高用量の125 µg/mLでは、TK6細胞は4つコロニー数が見られたが、そのRS値は、二重欠損細胞と共にゼロであった。用量を下げると両細胞ともにコロニー形成が観察された。それに従い、RS値も用量依存的に回復し、50 µg/mLの用量で、両細胞ともRS値は約20%程度であった。

### 2．代謝活性化条件下のオーラミンの細胞毒性

S9mix 存在下で、オーラミン(最終濃度 50, 75, 100, 125 µg/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表3と図3に示した。TK6細胞は、最高用量

125 µg/mLで7つコロニーを観察することができたが、二重欠損細胞は、最高用量125と100 µg/mLの2つの用量で死滅した。また、50 µg/mLの用量では、TK6細胞は陰性対照群の約半分の相対生存率(RS = 48%)があったが、二重欠損細胞のRS値は著しく低く10%程度であった。このことから、TK6と二重欠損細胞のRSには約5倍程度の差があり、S9mix存在下で二重欠損細胞は感受性を有すると考えられた。

表2．オーラミンの非代謝活性化条件下の生存率実験結果

| TK6          |        |       |      |        |
|--------------|--------|-------|------|--------|
| 処理用量 (µg/mL) | 総well数 | コロニー数 | 補正CE | RS (%) |
| 陰性対照         | 192    | 136   | 0.71 | 100    |
| 50           | 96     | 30    | 0.19 | 26     |
| 75           | 96     | 21    | 0.10 | 14     |
| 100          | 96     | 16    | 0.03 | 4      |
| 125          | 96     | 4     | 0.00 | 0      |

### 二重欠損細胞

| 処理用量 (µg/mL) | 総well数 | コロニー数 | 補正CE | RS (%) |
|--------------|--------|-------|------|--------|
| 陰性対照         | 192    | 127   | 0.61 | 100    |
| 50           | 96     | 25    | 0.12 | 19     |
| 75           | 96     | 16    | 0.05 | 9      |
| 100          | 96     | 0     | 0.00 | 0      |
| 125          | 96     | 0     | 0.00 | 0      |

表3．オーラミンの代謝活性化条件下の生存率実験結果

## TK6

| 処理用量<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 総well数 | コロニー数 | 補正CE | RS (%) |
|------------------------------|--------|-------|------|--------|
| 陰性対照                         | 192    | 140   | 0.71 | 100    |
| 50                           | 96     | 49    | 0.34 | 48     |
| 75                           | 96     | 32    | 0.19 | 27     |
| 100                          | 96     | 13    | 0.07 | 10     |
| 125                          | 96     | 7     | 0.03 | 4      |

## 二重欠損細胞

| 処理用量<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 総well数 | コロニー数 | 補正CE | RS (%) |
|------------------------------|--------|-------|------|--------|
| 陰性対照                         | 192    | 128   | 0.67 | 100    |
| 50                           | 96     | 15    | 0.08 | 12     |
| 75                           | 96     | 3     | 0.01 | 2      |
| 100                          | 96     | 0     | 0.00 | 0      |
| 125                          | 96     | 0     | 0.00 | 0      |

## D. 考 察

オーラミンが陽性を示すエイムス試験や細胞を用いる遺伝毒性試験は、すべて代謝活性化条件下である。また、*in vivo* でオーラミンの主なターゲット組織は、代謝酵素が存在する肝臓である。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 損傷の機構についても不明であるが、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。さらに *in vivo* 実験においても、肝臓や腎臓で DNA の断片化が検出された報告 (Parodi et al, *Carcinogenesis*, 2, 1317-1326 (1981), Kitchin et al, *Toxicology*, 88, 31-49 (1994))

が複数あり、オーラミンの代謝物は DNA 鎖切断を形成させると考えられる。XRCC1/XPA 二重欠損細胞を用いた本研究でも、S9mix 存在下の代謝活性化条件下のときに、二重欠損細胞が感受性を示したことから、オーラミンの DNA 損傷が、XRCC1 あるいは XPA による DNA 修復に参与していることが予想される。すなわちオーラミンによる DNA 損傷は、DNA 鎖切断だけでなく、DNA 付加体も形成していることが明らかである。以上の結果から、工業用グレードのオーラミンは、多種多様な DNA 損傷を形成させていると考えられた。

## E. 結 論

XRCC1/XPA 二重欠損細胞は、代謝活性化されたオーラミンに対して感受性を示すことが分かった。よって、二重欠損細胞を tk 遺伝子変異試験に用いれば、XRCC1 あるいは XPA 修復遺伝子が関与する遺伝毒性物質を感度良く検出できると考えられる。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

## 1. 論文発表

- 1) Suzuki T, Yasui M, Honma M; Mutator phenotype and DNA double-strand break repair in BLM helicase-deficient human cells. *Mol. Cell Biol.* **36**, 2877-2889 (2016)

## 2. 学会発表

- 1) 鈴木愛, Bonnaud P, 佐々彰, 安井学, 宮本明, 本間正充; 8-oxoG 付加数の異なる DNA に対する修復タンパク hOGG1 の高速化量子分子動力学法による親和性評価. 第 45 回日本環境変異原学会, つくば(2016 年 11 月)

## H. 知的所有権の取得状況

なし

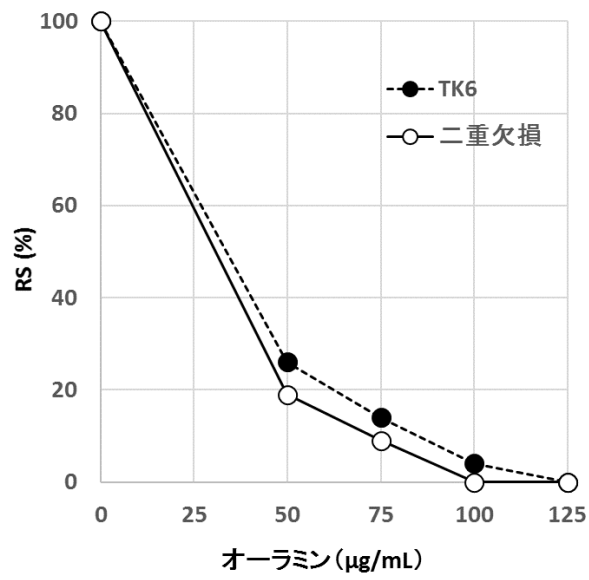


図 2 . S9mix 非存在下のオーラミンに対する細胞相対生存率

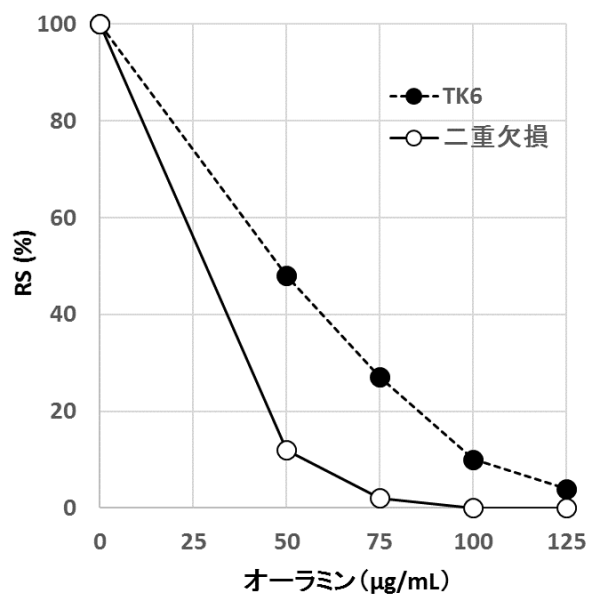


図 3 . S9mix 存在下のオーラミンに対する細胞相対生存率



研究成果の刊行に関する一覧表

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  |
|--|---|---------------|----------|-----------|------|
| Tsuda M, Terada K, Ooka M, Kobayashi K, Saito H, Furukawa R, Tsurimoto T, Yamamoto J, Iwai S, Kadoda K, Akagawa R, Huang SN, Pommier Y, Sale JE, Takeda S, Hirota K. | The dominant role of proofreading exonuclease activity of replicative polymerase in cellular tolerance to cytarabine (Ara-C). | Oncotarget    | in press |           | 2017 |
| Suzuki T, Yasui M, Honma M   | Mutator phenotype and DNA double-strand break repair in BLM helicase-deficient human cells                                    | Mol Cell Biol | 36       | 2877-2889 | 2016 |