

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 9 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 武田 俊一

平成 3 0 ( 2 0 1 8 ) 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	
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-----	10
本間正充	
III．研究成果の刊行に関する一覧表	----- 23

## 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ゆえに、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。本研究は、XPA/XRCC1 2重欠損TK6株を、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）試験に応用した。2重欠損TK6株を使うと、アルキル化剤による変異原性の検出感度が従来のtk試験（野生型TK6株のみを使う）と比べ10倍程度上昇していた。この新しいtk試験を使いオーラミン（Auramine 0）の変異原性を検出できた。

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、まずオーラミンを選択した。オーラミンは、Ames testでは変異原性陽性になるのに、哺乳動物細胞では変異原性陰性になる。この実験結果は、細菌を使ったバイオアッセ

イによる変異原性の偽陽性と一応説明されてきた。

## 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。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。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）。

武田グループは、DNA修復遺伝子の多重欠損株を創る。XRCC1とXPAは、重複したDNA損傷修復機能を持つ。すなわちXRCC1欠損はXPAによって部分的に相補され、一方、XPA欠損はXRCC1によって部分的に相補される。ゆえにXPA/XRCC1 2重欠損株は、XPA欠損株およびXRCC1欠損株よりも多様な変異原性化学物質（様々な種類のDNA損傷を作る）の変異原性を高感度に検出するのに有利である。DNA polymerase (Pol) は、DNA損傷を持った鋳型鎖においてDNA複製が停止したときに、複製DNAポリメラーゼに代わって損傷鋳型鎖を使って正確にDNA合成するDNAポリメラーゼである。Pol が欠損すると、損傷鋳型鎖を使ってDNA合成する時の変異率が増加する。すなわちPol 欠損細胞は、野生型細胞に比べ、化学物質の変異原性をtk試験によってより高感度に検出できる。以上の知見から、武田グループは、XPA/XRCC1/Pol の3重欠損株を創る。

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）ヒトTK6細胞株から遺伝子破壊株の作製

図1は、我々が創った遺伝子破壊株のリストである。このリストは、TK6コンソーシアムというweb site（<http://www.nihs.go.jp/dgm/tk6.html>）に公開されている（図1）。

（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 2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

紫外線損傷やDNA架橋剤（例、抗がん剤、シスプラチ

ン)はヌクレオチド除去修復経路(NER)のみが修復し塩基除去修復経路(BER)は修復できないとされていた。我々は、NERを開始するのに必須なXPAとBERに重要な働きをうるXRCC1に両方を欠損したXPA<sup>-/-</sup>/XRCC1<sup>-/-</sup> TK6細胞を創った。XPA<sup>-/-</sup>/XRCC1<sup>-/-</sup> TK6細胞は、XPA<sup>-/-</sup>細胞よりも紫外線や架橋剤により高い感受性を示した(図4、5)。以上の実験結果から紫外線や架橋剤による損傷が、NERが開始できないにはBERによって修復されると結論した。したがってBERとNERの2重欠損TK6細胞を使った変異原性試験は、多様なDNA損傷を作る化学物質をこの1種類の細胞で検出できるだけでなく、DNA架橋剤を従来の手法に比べて10倍以上の高感度に検出できるのである(本間グループの報告書参照)。

#### (4) XPA/XRCC1/Pol の3重欠損TK6株の作製

XPA/XRCC1/Pol の3重欠損株を数クローン創った。細胞増殖速度は、野生型に比べ20%遅いが、変異原性試験に十分使えることを確認した。3重欠損TK6株を使った変異原性試験(tk試験)を新たに樹立する為に本間グループに譲渡した。

#### (5) 紫外線やDNA架橋剤による損傷を修復する、新規修復経路の発見

従来、紫外線損傷(CPDと6-4光産物)はミトコンドリア(NERが機能しない)では修復されないと考えられてきた。抗体を使った新規紫外線損傷検出方法(CPDと6-4光産物の区別して測定)を使い、紫外線損傷がミトコンドリアDNAにおいて修復されるか否かを調べた。その結果、6-4光産物がミトコンドリアDNAで迅速に修復されていることを発見した(図6)。この修復を過去に見逃したのは、CPDと6-4光産物を区別しないで損傷の量を測定したからである(CPDの方が6-4光産物より数倍多い)。CPDはミトコンドリアDNAの複製を阻害しないが、6-4光産物は阻害する。したがって「6-4光産物がミトコンドリアDNAで迅速に修復されている」ことの発見は、DNA複製を含むミトコンドリアDNA維持機構の理解に重要である。図6の実験結果と生化学的実験結果から図7に示した機構によって、6-4光産物が修復されていると結論した。

#### (6) シスプラチンの腎毒性はミトコンドリアDNAの損傷による

Top1mt欠損TK6細胞株の解析から、ミトコンドリアにのみ存在するトポイソメラーゼ1(Top1mt)はDNA架橋を修復することが解った。DNA架橋は、抗がん剤(例、シスプラチン、マイトマイシンC)として広く使われている。我々は、シスプラチンの腎毒性はミトコン

ドリアDNAの損傷が原因か否かを調べた。そしてTop1mt<sup>-/-</sup>マウスはシスプラチンに感受性であり尿細管上皮が強く障害されることを確認した。Top1mt<sup>-/-</sup>マウスは、ミトコンドリアDNAを障害する化学物質を検出するのに有効であると結論した。

#### 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

合計100種類以上のDNA修復酵素の欠損株をTK6から創り、その情報を公開した。既に国内の3社から欠損株の譲渡依頼があり、京都大学の手続きにのっとり譲渡した。

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POL<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。以上の理由から、XPA/XRCC1の2重欠損TK6株に比べ、XPA/XRCC1/Pol の3重欠損TK6株を使えば、tk試験による変異原性の検出感度をさらに数倍改善しうる。

シスプラチンは、DNA複製を邪魔することによって増殖細胞（悪性腫瘍を含む）を殺す。シスプラチンが増殖しない細胞（腎臓尿管や末梢神経）にどのような機序で副作用を発揮するか、従来解析しようがなかった。我々は、ミトコンドリアDNA修復にのみ関与する酵素（ミトコンドリア特異的トポイソメラーゼ1 = Top1mt）が欠損したマウスを米国NIHから譲渡してもらった。この欠損マウスを解析すれば、シスプラチンの、ミトコンドリアDNA毒性を特異的に解析できる。

行政や化学産業のニーズは、コンピューター（AI）により新規化合物の化学構造から変異原性を予測することである。この予測（QSARと呼ばれる）の為に、質の高い学習データが必要である。現在のところ、AIの学習データには世界中で本間博士らが収集したAmes testの結果（~20,000化合物）が使われている。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変異原性検出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。この範疇の化学物質が「変異原性偽陽性」ではなく陽性であることが証明できれば、学習データの質を高めることができる。

#### E．結論

*XRCC1/XPA* 二重欠損細胞（*XPA*<sup>-/-</sup>/*XRCC1*<sup>-/-</sup>細胞）は、tk試験に応用した場合に、化学物質の変異原性の検出感度が10倍上がることを確認した。tk試験は特異性が高く比較的容易であることから、化審法で規定され従来型tk試験（野生型のみを使う）に二重欠損細胞を使うtk試験を併用すると、従来型tk試験の感度を大きく改善できる。

Top1mt欠損マウスは、休止期の細胞から成る様々な臓器（神経、腎臓、肝臓、筋肉など）でミトコンドリアDNAを損傷することによって毒性を発揮する化学物質を同定するのに有用である。

#### F．健康危険情報

該当なし

#### G．研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Liton KS, Kim S, Kang H, Akter S, Choi K, Sakuma T, Yamamoto T, Sasanuma H, Hirota K,

Nakamura J, Honma M, Takeda S. (2018) Differential micronucleus frequency in isogenic human cells deficient in DNA repair pathways is a valuable indicator for evaluating genotoxic agents and their genotoxic mechanisms. *Environ Mol Mutagen.* (in press)

- 2) 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* 8 (20): 33457-33474.

##### 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

Table 2; TK6 mutants (Feb. 2017)

No.	Gene name	Ref.	Laboratory	No.	Gene name	Ref.	Laboratory
1	53BP1		KYOTO	71	PDIP38, XPA		KYOTO
2	53BP1, BRCA1		KYOTO	72	PIAS1		KYOTO
3	53BP1, MRE11,		KYOTO	73	PIAS1, PIAS4		KYOTO
4	ALC1		KYOTO, TOKYO	74	PIAS1, PIAS4		KYOTO
5	ALC1, PARP1		KYOTO	75	PIAS1, PIAS4, POLH		KYOTO
6	APLF		TOKYO	76	PIAS1, PIAS4, POLH, XPA		KYOTO
7	APRF, XRCC1		TOKYO	77	PIAS1, PIAS4, XPA		KYOTO
8	ATRAX		KYOTO	78	PIAS4, XPA		KYOTO
9	BLM	6	NIHS	79	PMS2		KYOTO
10	BLM, EXO1		KYOTO	80	POLB		NIHS
11	BLM, MLH1		KYOTO	81	POLD1		KYOTO
12	BLM, MLH3		KYOTO	82	POLD3		TOKYO
13	BLM, MUS81		KYOTO	83	POLE		KYOTO
14	BLM, SMARCA1		KYOTO	84	POLH		KYOTO
15	BLM, XPF		KYOTO	85	POLH, PrimPol		KYOTO, TOKYO
16	BRCA1		KYOTO	86	POLH, PrimPol, RAD54		KYOTO, TOKYO
17	BRCA1, REV7		KYOTO	87	POLH, RAD18, XPA		KYOTO, TOKYO
18	CtIP	8	KYOTO	88	POLH, RAD54		KYOTO, TOKYO
19	CtIP, MRE11		KYOTO	89	POLH, XPA		KYOTO
20	DNA2 +/-		KYOTO	90	POLL		KYOTO
21	DNA-PKcs	9	KYOTO	91	POLQ		KYOTO, TOKYO
22	DNA-PKcs, SMARCA1	9	KYOTO	92	PrimPol		KYOTO, TOKYO
23	ERCC6		NIHS	93	RAD18		KYOTO
24	EXO1		KYOTO	94	RAD18, XPA		KYOTO
25	EXO1, FAN1		KYOTO	95	RAD51AP1		KYOTO
26	FAN1		KYOTO	96	RAD51AP1, RAD54		KYOTO
27	FANCC		KYOTO	97	RAD51AP1, RAD54, RAD54B		KYOTO
28	FANCD2	11	KYOTO	98	RAD54	8, 9, 10	KYOTO
29	GEN1		KYOTO, HIROSHIMA	99	RAD54B		KYOTO
30	GEN1, MLH3		KYOTO	100	RECQL5		HIROSHIMA
31	GEN1, MLH3, PMS2		KYOTO	101	REV3		KYOTO, TOKYO
32	GEN1, MUS81		KYOTO	102	REV7		KYOTO
33	GEN1, RAD54		KYOTO	103	RNASEH2A		KYOTO
34	LIG4	9, 10	KYOTO	104	RNF8		KYOTO
35	LIG4, POLQ		KYOTO, TOKYO	105	RPA, SMARCA1		KYOTO
36	LIG4, POLQ, RAD54		KYOTO, TOKYO	106	SLX1		KYOTO
37	LIG4, RAD54		KYOTO	107	SLX4		HIROSHIMA
38	LIG4, RNF8		KYOTO	108	SMARCA1		KYOTO
39	LIG4, SMARCA1	9	KYOTO	109	SMARCA1	9	KYOTO
40	MLH1		KYOTO	110	SPARTAN		KYOTO, TOKYO
41	MLH1, MLH3		KYOTO	111	TDP1	10	KYOTO
42	MLH1, MLH3, PMS2		KYOTO	112	TDP1, TDP2		KYOTO
43	MLH1, MUS81		KYOTO	113	TDP2	10, 12	KYOTO
44	MLH1, PMS2		KYOTO	114	TIR1		KYOTO
45	MLH3		KYOTO	115	WRN		HIROSHIMA
46	MLH3, PMS2		KYOTO	116	XPA	13	KYOTO, NIHS
47	MRE11	8	KYOTO	117	XPC		NIHS
48	MRE11, P53		KYOTO	118	XPF		KYOTO
49	MRE11, TDP1		KYOTO	119	XRCC1		KYOTO
50	MRE11, TDP2	10	KYOTO				
51	MRE11, TIR		KYOTO	Original cell line and its derivatives			
52	MSH2		KYOTO				
53	MSH6		NIHS	TK6 (TK+/-)	1, 2	NIHS, *	
54	MUS81		KYOTO	TSCE5 (TK+/-)	3, 4	NIHS	
55	MUS81, PMS2		KYOTO	TSCE105 (TK+/-)	5	NIHS	

図1 (TK6細胞から作製したDNA損傷修復ミュータントのリスト)

KYOTO と書かれている遺伝子破壊細胞は武田研究室で作られ、NIHS と書かれている細胞は本間研究室で作られた。

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

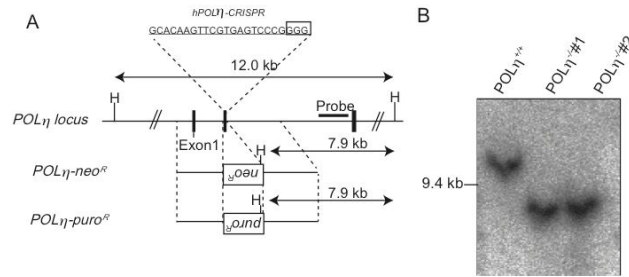


図2 (A) *POL*<sup>-/-</sup>細胞の作製方法、(B) ゲノムDNAのサザンブロットによる遺伝子破壊 (#1, #2クローン)の確認

(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*POL* 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*PUROR<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*PUROR<sup>r</sup>*が両対立遺伝子のエクソン2にそれぞれノックインすると、正常な*POL* 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。



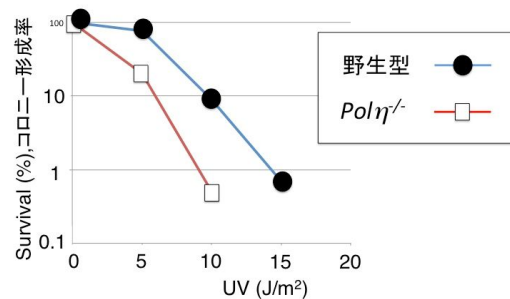


図3 紫外線感受性の試験結果。

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。

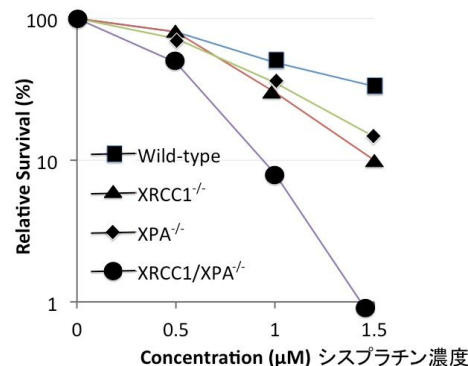


図4 シスプラチン感受性試験結果

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。

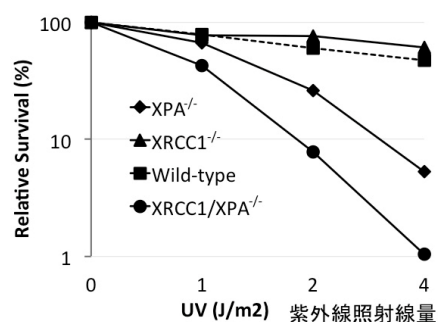


図5 紫外線感受性の試験結果

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。

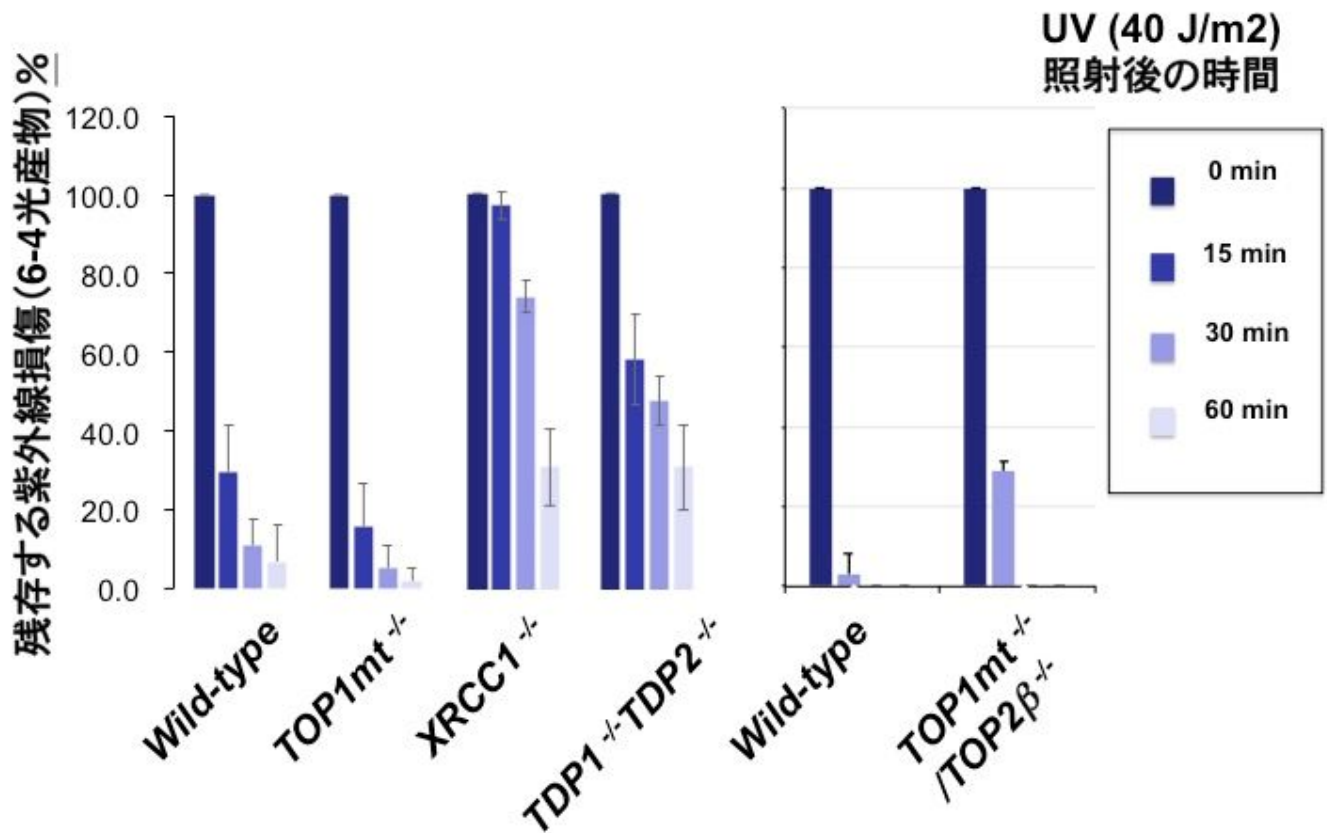


図6 ミトコンドリアDNAに生成された紫外線損傷は修復される

紫外線損傷は、6-4 光産物 (6-4PP) と cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) と呼ばれる 2 種類がある。図に示した遺伝子型の TK6 細胞に 2 J/m<sup>2</sup> の紫外線照射した後に、直後、15 分、30 分、60 分にミトコンドリア DNA に存在する CPD と 6-4 光産物を定量した。その結果、CPD は修復されないが、6-4PP は修復されることが解った。XRCC1<sup>-/-</sup> 細胞や TDP1<sup>-/-</sup>/TDP2<sup>-/-</sup> 2 重欠損細胞、ミトコンドリア型 Top1<sup>-/-</sup>/Top2<sup>-/-</sup> 2 重欠損細胞では野生型に比べ修復が遅れていることから、6-4 光産物の修復にはミトコンドリアでは XRCC1、TDP1、TDP2、トポイソメラーゼの各修復酵素が関与していることがわかる。

## 紫外線損傷とシスプラチン損傷

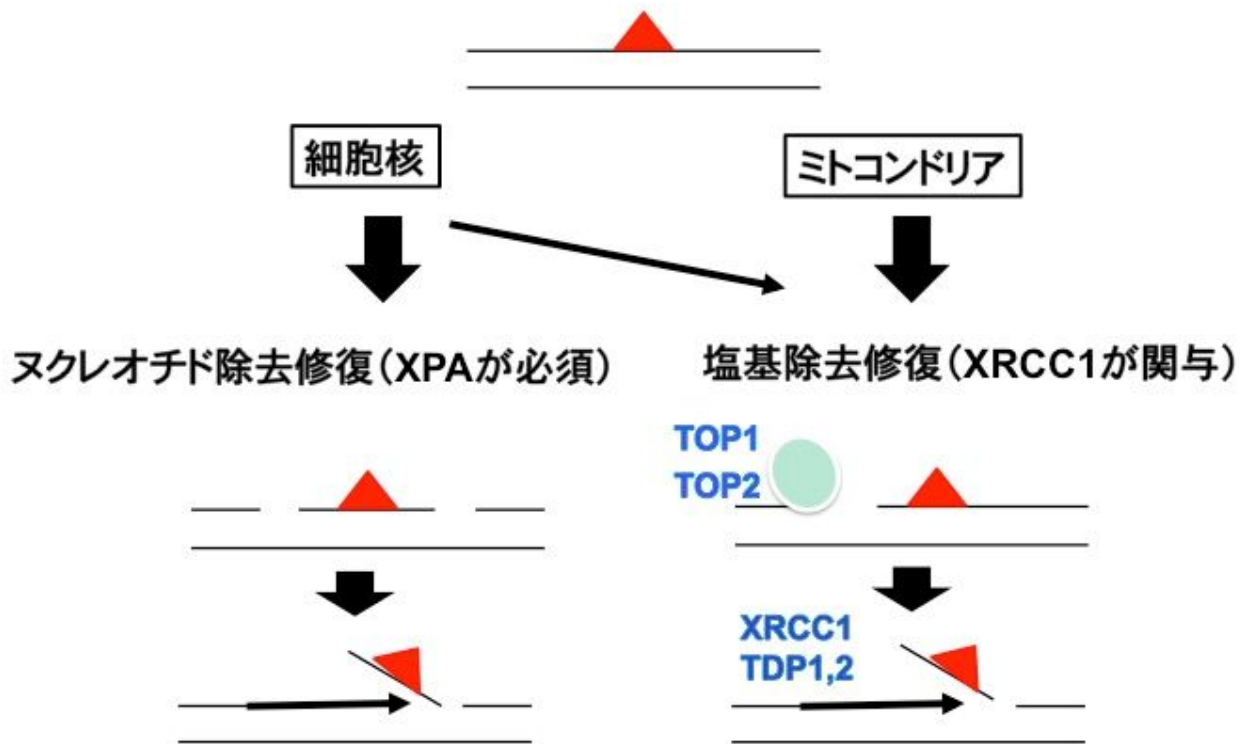


図7 ミトコンドリアDNAに生成された紫外線損傷は修復される

紫外線損傷は、6-4 光産物 (6-4PP) と cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) と呼ばれる 2 種類がある。6-4 光産物は、ミトコンドリアにおいて図の機序で修復される。修復は、トポイソメラーゼ (TOP1 もしくは TOP2) が紫外線損傷付近の DNA において 1 本鎖切断を起こすことから始まる。1 本鎖切断は、塩基除去修復経路が修復する。この修復のときに、紫外線損傷も除去されることを生化学的実験で確認した。1 本鎖切断に共有結合したトポイソメラーゼは、TDP1 や TDP2 と呼ばれる加水分解酵素が除去する。

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。

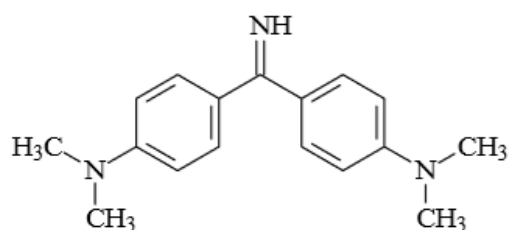
キーワード:チミジンキナーゼ遺伝子変異試験，ミュータント細胞，細胞相対生存率

## A．研究目的

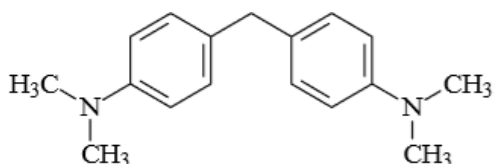
革や繊維製品，そしてインクの着色剤として利用されているオーラミンは，中間生成物を介する2段階工程で製造されるため，オーラミン本体（純度約 80 %）以外に Michler's 塩基（オーラミン製造の中間体），および Michler's ケトン（オーラミンの加水分解産物）を数%含有する混合物である。これらの3つの物質は，齧歯類で多くの部位に腫瘍を誘発することから，

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

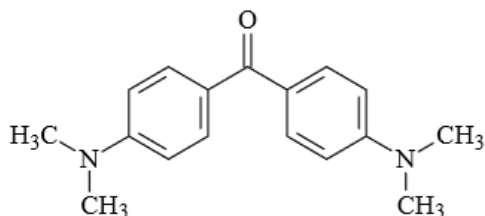
伝毒性試験において陽性である (Some Aromatic Amines, Organic Dyes, and Related Exposures, IARC Monographs Volume 99, 111-135 (2010))。



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 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% CO<sub>2</sub>)。

### 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 µg/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  $4 \times 10^5$  cells/ml) の処理細胞は、37 度、5% CO<sub>2</sub> 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 $4 \times 10^6$ 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 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  $2 \times 10^7$  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  $\mu\text{g/mL}$  TFT を 25  $\mu\text{L}$  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。

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

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

## 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  $\mu\text{g/mL}$ ) 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  $\mu\text{g/mL}$  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  $\mu\text{g/mL}$ ) 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  $\mu\text{g/mL}$ ) 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  $\mu\text{g/mL}$ ) が比較的高いこと ( $20 \times 10^{-6}$  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  $10 \times 10^{-6}$  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  $\mu\text{g/mL}$ ) 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  $\mu\text{g/mL}$  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  $\mu\text{g/mL}$ ) 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  $\mu\text{g/mL}$ ) 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  $\mu\text{g/mL}$  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  $\mu\text{g/mL}$ ) 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  $\mu\text{g/mL}$  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  $\mu\text{g/mL}$  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 =  $10 \times 10^{-6}$  程度となっているが、細胞ストックのロットによっては  $20 \times 10^{-6}$  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 µg/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。

## 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)

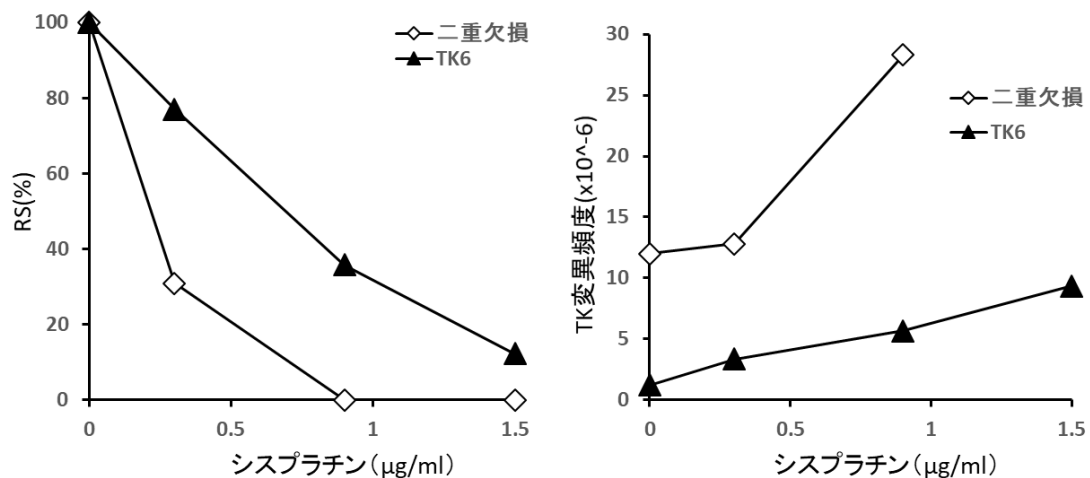


図 2 . 陽性対照物質シスプラチン処理に対する細胞相対生存率および *TK* 遺伝子変異頻度

陽性対照の条件検討(代謝活性化)

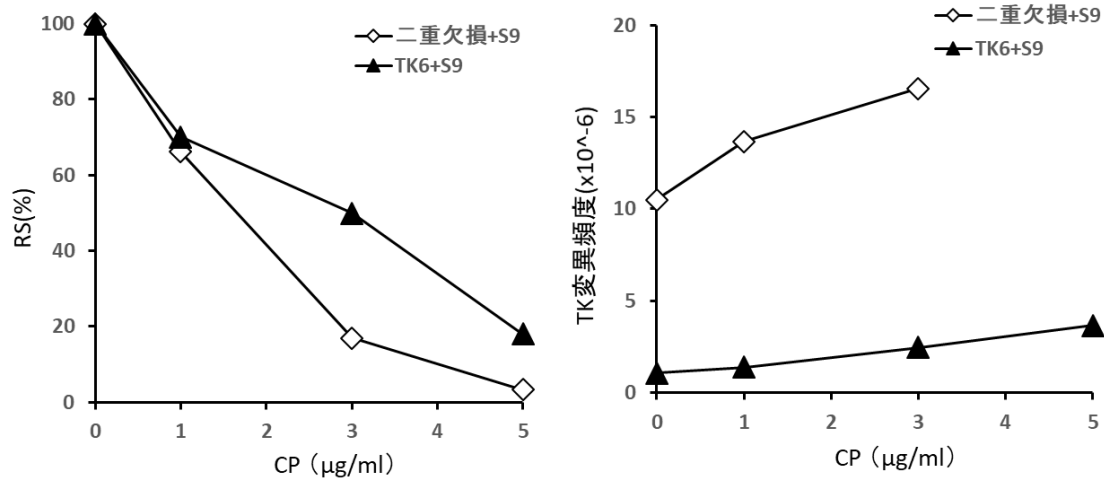


図 3 . 陽性対照物質 CP 処理に対する細胞相対生存率および *TK* 遺伝子変異頻度

非代謝活性化条件

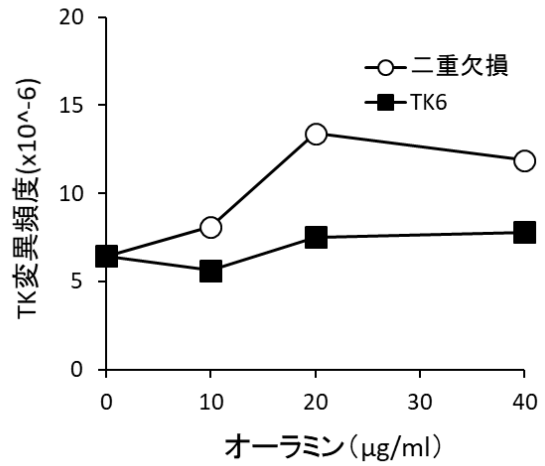
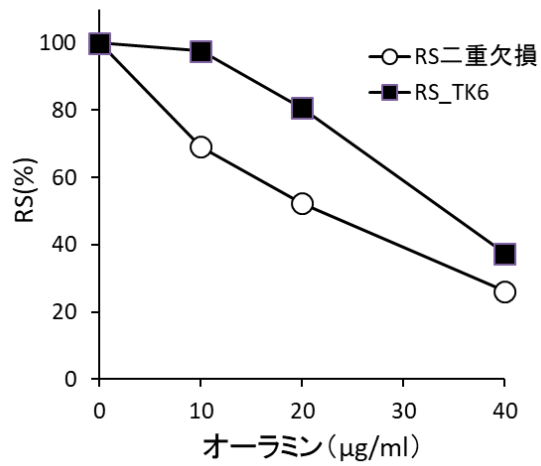


図4 . S9mix 非存在下のオーラミンに対する細胞相対生存率および TK 遺伝子変異頻度

代謝活性化条件

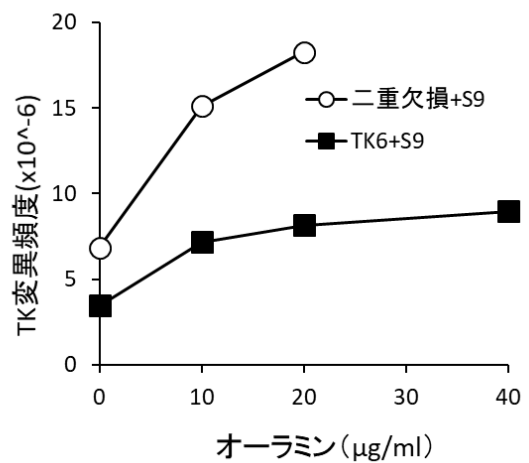
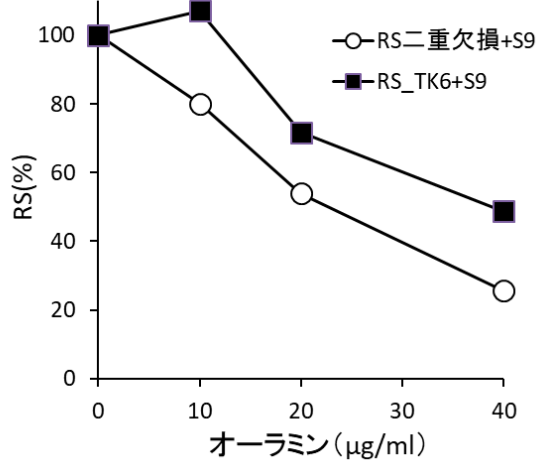


図5 . S9mix 存在下のオーラミンに対する細胞相対生存率および TK 遺伝子変異頻度

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. (×10 <sup>5</sup> /mL) during treatment		Cell conc. (×10 <sup>5</sup> /mL) during expression						Daily cell growth				
				Day 0		Day 1		Day 2		Day 3	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1 ×2×3
		Before	After	Start	Before	After	Before	After	End					
H <sub>2</sub> O	0	22.2	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		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 CE(%)	RS0 (%)
		Plate 1	Plate 2	Total					
H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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. (×10 <sup>-6</sup> )			%SG
		N	S	Total				N-MF	S-MF	T-MF	
H <sub>2</sub> 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. (×10 <sup>5</sup> /mL) during treatment		Cell conc. (×10 <sup>5</sup> /mL) during expression						Daily cell growth				
				Day 0	Day 1		Day 2		Day 3	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	RSG
		Before	After	Start	Before	After	Before	After	End					
H <sub>2</sub> O	0	22.2	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	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	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	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	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	Negative	CE0	Adjusted	RS0
		Plate 1	Plate 2	Total	well no.	well no.	(%)	CE(%)	(%)
H <sub>2</sub> 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	Negative	CE3	Adjusted	RS0
		Plate 1	Plate 2	Total	well no.	well no.	(%)	CE3(%)	(%)
H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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	Negative	CE3	Mut. freq. (×10 <sup>-6</sup> )			%SG
		N	S	Total	well no.	well no.		N-MF	S-MF	T-MF	
H <sub>2</sub> 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. (×10 <sup>5</sup> /mL) during treatment		Cell conc. (×10 <sup>5</sup> /mL) during expression						Daily cell growth				
				Day 0		Day 1		Day 2		Day 3	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1 ×2×3
		Before	After	Start	Before	After	Before	After	End					
H <sub>2</sub> O	0	22.2	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	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
+S9	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 <sub>2</sub> O	0	76	76	152	192	40	98.0	124.1	100.0
Auramin	10	74		74	96	22	92.1	115.7	93.3
+S9	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 <sub>2</sub> O	0	75	76	151	192	41	96.5	122.1	100.0
Auramin	10	76		76	96	20	98.0	123.2	100.9
+S9	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 <sub>2</sub> O	0	11	1	12	11	1	12	11	1	12	11	1	12			0
Auramin	10	21	2	23	21	3	24			0			0			0
+S9	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. (×10 <sup>-6</sup> )			%SG
		N	S	Total				N-MF	S-MF	T-MF	
H <sub>2</sub> O	0	44	4	48	384	336	1.2	2.5	0.2	2.7	8.9
Auramin	10	42	5	47	192	145	1.2	5.0	0.7	5.7	12.1
+S9	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. (×10 <sup>5</sup> /mL) during treatment		Cell conc. (×10 <sup>5</sup> /mL) during expression						Daily cell growth				
				Day 0	Day 1		Day 2		Day 3	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1 ×2×3	RSG
		Before	After	Start	Before	After	Before	After	End					
H <sub>2</sub> O	0	19.8	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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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. (×10 <sup>-6</sup> )			%SG
		N	S	Total				N-MF	S-MF	T-MF	
H <sub>2</sub> 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



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
Liton KS, Kim S, Kang H, Akter S, Choi K, Sengul T, Yamakura T, Sasanuma H, Hirota K, Nakamura J, Honma M, Takeda S.	Differential micronucleus frequency in isogenic human cells deficient in DNA repair pathways is a valuable indicator for evaluating genotoxic agents and their genotoxic mechanisms.	Environ Mol Mutagen.	in press		2018
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.	The dominant role of proofreading exonuclease activity of replicative polymerase in cellular tolerance to cytarabine (Ara-C).	Oncotarget	8 (20)	33457-33474	2017