

令和2年度 厚生労働科学研究費（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性
評価法の確立に関する研究

分担研究課題名：Ames試験陽性のフォローアップのためのヒトTK6細胞を用いたTK遺伝子突然変異
アッセイを使用した証拠の重みアプローチ

分担研究者： 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

細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）と哺乳類の発がん性試験の間で矛盾する結果は、代謝、ゲノム構造、および DNA 修復システムによる種の違いが原因である可能性がある。ヒト細胞を用いた突然変異試験は、Ames 試験で陽性判定となった時のフォローアップ試験として有利であると考えられている。本研究では、突然変異試験で相反する結果（Ames 試験で陽性、げっ歯類発がん性試験で陰性）を持つ 10 種類の化学物質をヒトリンパ芽球 TK6 細胞によるチミジンキナーゼ遺伝子突然変異試験（OECD ガイドライン TG490）で調べた。その結果、10 物質中 2 物質が総合判定で陰性であった（フォローアップ試験として 20%有効）。これらの 8 つの陽性物質のうち 3 つは、S9 無しの同一の非代謝活性化条件にもかかわらず、短時間処理後に陰性、24 時間処理後に陽性であった。その 3 つのうちの 1 物質である 4-ニトロアントラニル酸で処理された TK6 細胞のトキシコプロテオミクスを行い、その試験結果の解釈を考察した。24 時間処理後に発現差のあるタンパク質を使用した分析は、*in vitro* 特異的酸化ストレスが TK6 アッセイにおける偽陽性応答に関与していることが分かった。プロテオミクスなどの新しい技術と組み合わせられていない方法による TK6 アッセイの有用性は、フォローアップ試験として限定的であるとわかったが、それでも Ames 試験での偽陽性結果を減少（20%）させる可能性があった。したがって、トキシコプロテオミクスと組み合わせる TK6 アッセイは、24 時間の特異的反応によって引き起こされた偽陽性の結果を解釈するのに役立つ可能性があり、Ames 試験の偽陽性の減少（20%以上）をもたらすと考えられた。

キーワード:チミジンキナーゼ遺伝子変異試験、Ames 試験、フォローアップ試験

A. 研究目的

Ames 試験陽性の結果は、医薬品等の開発に大きな影響を与え、適切なフォローアップが必要となるが、*in vivo* トランスジェニック試験は負担が大きいと考えられる。少なくともその陽性反応がバクテリア特異的反応である場合、ヒトへの外挿性が低いことを証明し、無駄な *in*

vivo 試験を避けることができる可能性がある。

一方、Ames 試験と発がん性の特異性（Specificity; Ames 試験陰性で発がん性陰性）は 80%程度で有り（Kirkland *et al.*, *Mutat Res* 584, 1-256 (2005)）、これは Ames 試験陽性で発がん性陰性であるものは比較的少ないことを示している。それでも、バクテリア特異的な陽性反

応であり、ヒトの発がんとは無関係なものは存在する。バクテリア特異的な陽性反応として、AMP397 で報告されるようなバクテリア特異的ニトロリダクターゼ反応がある (Suter *et al.*, *Mutat Res* 518, 181-194 (2002))。この酵素が Ames 試験の変異原性に強く関与する場合、他の遺伝毒性試験では陰性を示すことが多く、発がん性のリスクは低い。

実際に、Ames 試験陽性で発がん性陰性の物質にはニトロ芳香族や芳香族アミン類が多いことが知られている。しかしながら、ニトロ芳香族、芳香族アミン類の中には発がん性を示すものも多く存在している。このように、同じ Ames 試験陽性でありながら、何故発がん性の有無に違いがあるのかは不明である。つまり、Ames 試験陽性の非発がん性物質を、ほ乳類細胞を用いた遺伝毒性試験 (チミジンキナーゼ遺伝子変異試験(TK6 アッセイ)) でフォローアップし、ほ乳類細胞でも同様に変異原性を示すかどうかを検証すべきと考えられる。

作用機序を考慮することは、化学物質の安全性評価のための非動物試験系を確立するうえで重要である。経済協力開発機構 (OECD) は、AOP に基づく *in silico* および *in vitro* 情報を組み合わせた AOP および IATA を精力的に開発してきた (Guidance Document for the Use of Adverse Outcome Pathways in Developing Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA). OECD Guidel Test Chem. (2016))。AOP と IATA は、遺伝毒性および規制上の結論の導出を含む証拠の重み (WoE) を基礎とする正確な毒物学的評価に貢献している。化粧品原料の安全性評価のために *in vivo* 試験が禁止されているため、化粧品業界では *in vitro* 試験に基づく WoE アプローチの使用が比較的進んでいる (SCCS Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation 10th revision. Scs. (2018))。さらに、トランスクリプトームやプロテオームなどのオミクス技術は、WoE アプローチの実装において重要な役割を果たす。Ates ら

の研究チーム (*Mutagenesis*. 31:453-61 (2016)) は、*in vitro* トランスクリプトミクスアプローチを使用して、*in silico* 分析では陰性であったが Ames 試験では陽性であった化粧品成分の遺伝子毒性予測を評価した。トランスクリプトミクスデータは、遺伝子発現および代謝経路レベルでの毒性評価に必要な機構情報を提供することが報告された。さらに、Kirkland ら (*Mutat Res*. 775-776:55-68 (2014)、*Mutat Res*. 775-776:69-80 (2014)) は、遺伝子発現プロファイリングなどのフォローアップ *in vitro* 試験が、*in vivo* 遺伝毒性または発がん性に対する *in vitro* 遺伝毒性結果のヒトへの関連性の解釈に大いに役立つ可能性があることを報告した。したがって、WoE アプローチは、陽性の Ames 試験のフォローアップ戦略にも役立ち、動物実験への依存を減らしながら、ヒトリスクの新しい評価戦略に着実に移行すると考えられる。

ヒト TK6 細胞は、Ames 試験で陽性の結果を精査するための WoE アプローチに役立つ可能性がある。しかし、この目的のための TK6 アッセイの有用性についてはほとんど知られていない。したがって、本研究では、日本の 10 研究所との共同研究で、Ames 試験陽性である 10 個の非発がん性化学物質を用いて、TK6 アッセイを実施した。アッセイは、短時間処理 (ラット肝臓 S9 の存在下および非存在下で 4 時間) および連続処理 (S9 の非存在下で 24 時間) の処理方法で実施された。さらに、トキシコプロテオミクス分析と TK6 アッセイの統合を検討し、試験結果の解釈と WoE の有用性の向上を見出した。

B. 研究方法

1. 共同研究組織の構築

Ames 試験陽性の非発がん性物質 (10 物質 ; Table 1 参照) が多数におよぶため、日本環境変異原学会の分科会である MMS 研究会で共同研究を提案した。共同研究組織を立ち上げ、TK6

アッセイを分担するために各施設で担当する物質を決定した。

2. TK6 アッセイプロトコールの評価と共有化
共同研究で使用する TK6 アッセイの実験プロトコールは、OECD ガイドライン TG-490 (チミジンキナーゼ遺伝子を用いた哺乳類細胞の *in vitro* 遺伝子突然変異試験) に基づくが、より実験施設間のデータばらつきを最小にするために、実験条件や操作方法をさらに確認・評価し、共同研究組織内で現実的に利用できる実験プロトコールを共有化した。

3. 細胞と培養

TK6 細胞を購入する際は、JCRB 細胞バンク、あるいは the American Type Culture Collection より購入する。細胞は、10% 馬血清 (JRH Bioscience; ロット#16J196)、200 µg/mL ピルビン酸ナトリウム、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン (メーカー問わず) を含む RPMI 培地 (ナカライテスク、あるいはサーモフィッシャー製) で培養した (37 度、5% CO₂)。

4. 被験物質の処理方法

被験物質の処理は、Table 2 に示した方法を参考に実施した。細胞液の濃度や容量は適宜変更して構わないが、処理する細胞数は 2×10^7 cells とした。被験物質を DMSO、あるいはエタノール (メーカー問わず) で溶解後、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 TK6 細胞に暴露し、短時間処理では 4 時間、長時間処理では 24 時間培養した。処理中の振とう・非振とうは、結果への影響が少ないため共同研究施設の自由とした。

用量設定試験は、陰性対照と被験物質は 1 系列で行い、陽性対照は実施しない。本試験は、陰性対照は 2 系列、被験物質は 1 系列で行った。陽性対照物質は、Table 3 に示したように、代謝

活性化条件ではシクロホスファミド (CP)、非代謝活性化条件ではメタンスルホン酸メチル (MMS) の製品と製造ロットを使用した。

被験物質の処理後、遠心分離し、上清を除去後、無血清培地で細胞を洗浄した。遠心分離の条件は、約 1000 rpm、5 分間で実施した。再度、その細胞懸濁液を遠心分離し、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 4×10^5 cells/ml) の処理細胞は、37 度、5% CO₂ で培養を開始し、TK6 アッセイに用いた。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。

5. 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 (N = 1.6 で実施) 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、細胞数消失があるため、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「4. 被験物質の処理方法」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、 2×10^7 cells (Table 2) である。

$$\text{補正 CE} = CE \times \text{処理終了時の細胞数} / \text{処理開始時の細胞数} \quad \dots (式 2)$$

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 播種を実施した。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（DMSO およびエタノール）の生存率を 100 %と定義した。なお、細胞毒性がある場合、 $RS0 = 20 \sim 10\%$ の用量を最高用量として設定した。

もし、 $RS0 = 20 \sim 10\%$ で細胞毒性が強い、あるいは再現性が低い等で試験続行が困難な場合は、後述する $RTG = 20 \sim 10\%$ となる用量を最高用量として TK6 アッセイを実施してもよいこととした。

$$RS0 (\%) = \text{処理培養の補正 CE0} / \text{溶媒対照の補正 CE0} \times 100 \quad \dots (式 3)$$

6. TK6 アッセイの本試験、および細胞毒性指標（RSG と RTG）の測定

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）も同時に算出した。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）とした。RSG は無処理 / 溶媒対照に対する処理培養の総 SG（ $SG1 \times SG2 \times SG3$ ）とした（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

行った）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、培地のフェノールレッド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。CE0 と CE3 プレート、および TFT を含む MF プレートは細胞播種してから 14 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、その MF プレートの各ウェルに $30 \mu\text{g/mL}$ TFT 試薬を $25 \mu\text{L}$ ずつ再添加し、さらに 14 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であり、本実験では $N = 40,000$ を使用した。

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 つを算出した。

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

N-MF ; $EW_N = 192 - A$

$TW_N = 192$

S-MF ; $EW_S = (192 - A) - B$

$TW_S = 192 - A$

T-MF ; $EW_T = 192 - (A + B)$

$TW_T = 192$

(192 個のウェルのうち 14 日後の観察で NG コロニーを含むウェルが A 個、28 日後の観察時に SG コロニーのみを含むウェルが B 個出現したとする)

統計解析方法に関して、TK6 アッセイの本試験は、陰性対照を 2 系列、被験物質を 1 系列で行い、修飾されたダネット検定、ダウンターンデータを検出するシンプソン・マーゴリン検定、および、トレンド検定による大森法 (Omori *et al.*, *Mutat Res* 517, 199-208 (2002); Simpson *et al.*, *Biometrika*. 73, 589-96 (1986)) を用いて統計解析を実施した。

7. プロテオミクス分析

各凍結細胞ペレットを PTS (相間移動界面活性剤) バッファーと混合し、95° C で 5 分間煮沸した (Masuda *et al.*, *J Proteome Res*. 7, 731-40 (2008)). 細胞ライセートを Bioruptor ソニケーター (Cosmo Bio) でさらに 3 回超音波処理した (1 サイクルあたり 15 分)。次に、サンプルを 10 mM TCEP (トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン) で還元し、20 mM ヨードアセトアミドでアルキル化し、続いてトリプシン (タンパク質重量 : 1/50) および Lys-C (タンパク質重量 : 1/50) で 37° C で 16 時間反応した。ペプチドは、20,000 g で 10 分間遠心分離し、C18-SCX StageTips で脱塩した (Adachi *et al.*, *Anal Chem*. 88, 7899-903 (2016)).

LC-MS / MS は、UltiMate 3000 Nano LC システム (Thermo Scientific) と HTC-PAL オートサンプラー (CTC Analytics) を Q Exactive ハイブ

リッド四重極-Orbitrap 質量分析計 (Thermo Scientific) に接続することによって実施した。ペプチドを分析カラム (75 μ m $\times$ 30 cm, ReproSil-Pur C18-AQ、樹脂 1.9 μ m) にロードし、280 nL / min の流速で分離した。溶媒 B の 5% から 35% までの 45 分の勾配 (溶媒 A、0.1%FA および 2%アセトニトリル、溶媒 B、0.1%FA および 90%アセトニトリル)。Q Exactive は、DDA モードで操作した。サーベイフルスキャン MS スペクトル (350~1800 m/z) は、イオンが 3×10^6 のターゲット値に蓄積された後、70,000 の分解能で Orbitrap によって取得した。Dynamic exclusion は 10 秒に設定した。最も強力な 12 個の乗算された荷電イオン ($z \geq 2$) は、 1×10^5 のターゲット値まで順次蓄積され、最大注入時間 120 ms、分解能 35,000 の高エネルギー衝突解離 (HCD) によってコリジョンセル内でフラグメント化した。典型的な質量分析条件は、スプレー電圧は 2 kV、加熱されたキャピラリー温度は 250°C、正規化された HCD 衝突エネルギーは 25% で実施した。MS / MS イオン選択 threshold は 2.5×10^4 カウントに設定された。2.0 Da の分離幅が選択した。

Raw MS データは、ピークの検出と定量化のために MaxQuant (バージョン 1.6.3.3) によって処理した。MS/MS スペクトルは、検索パラメーターとして、完全なトリプシン特異性は、最大 2 つの切断部位の欠落、固定修飾としてシステイン残基のカルバミドメチル化を設定した、また、可変修飾として N 末端タンパク質アセチル化とメチオニン酸化を設定した。UniProt ヒトデータベースに対して検索した。検索結果は、タンパク質および PSM レベルで 0.01 の最大 FDR (誤検出率) にフィルタリングした。

8. 発現変動解析

Log 2 LFQ 強度のすべての NaN 値は -7 に変換した (本研究で観察された LFQ 強度の最小値とほぼ同等の値)。次に、LFQ 強度 (log2 LFQ 強度の真数) をサンプル処理グループに、それぞ

れ未処理（コントロール）グループ（4 時間および 24 時間処理グループ）の強度で割ることにより、倍率変化値を計算した。次に、 $\log 2$ 倍の変化を計算した。最後に、各サンプル処理グループで顕著に発現変動したタンパク質 (DEP) が、 $\log 2$ 倍以上の変化したものを同定した。次に、最高用量での連続処理における特異的影響を分析するために、24 時間 800 $\mu\text{g/mL}$ グループの DEP を、24 時間 800 $\mu\text{g/mL}$ グループと他のグループが 1 以上の間の $\log 2$ 倍変化したものについてさらにスクリーニングした。これにより、24 時間 800 $\mu\text{g/mL}$ グループの特異的 DEP を特定した。LFQ 強度の $\log 2$ 倍の変化を使用して、R パッケージ (heatmap3) を使用するヒートマップを生成した。エンリッチメント解析は、DEP の生物学的プロセスと分子機能を解釈するために使用した。DAVID bioinformatics v6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) は、DEP に関連する GO (Gene Ontology) 用語と経路に注釈を付けるために使用された。

9. 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 欠損細胞を用いる TK6 アッセイ

4-ニトロアントラニル酸の 24 時間処理における酸化ストレスの遺伝毒性を調べるために、すでに構築済みの OGG1 (8-oxoguanine DNA glycosylase 1) 欠損 TK6 細胞を用いて TK6 アッセイを実施した。過酸化水素などの陽性対照物質を 4 時間処理しても OGG1 欠損細胞のフェノタイプを確認できなかったため、本研究では、前述と同様の方法で、過酸化水素と 4-ニトロアントラニル酸の 24 時間処理を実施した。

C. 結果と考察

1. 陰性対照および陽性対照コントロールデータ

陰性対照コントロールの MF は、S9mix 非存在下の短時間処理では $2.5 \sim 16.9 \times 10^{-6}$ (平均 6.36×10^{-6})、S9mix 存在下の短時間処理では $1.7 \sim 16.8 \times 10^{-6}$ (平均 6.78×10^{-6}) あった。S9mi

x 非存在下の 24 時間処理の場合は $2.3 \sim 15.5 \times 10^{-6}$ (平均 9.09×10^{-6}) だった。国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部のヒストリカルデータにおいて、自発的変異頻度は $4 \sim 10 \times 10^{-6}$ であり、これらの平均値は OECD TG490 による基準をほぼ満たしていると考えられた。

さらに、同時陽性対照の MF は、S9mix 非存在下の短時間処理の MMS で $9.4 \sim 71.7 \times 10^{-6}$ (平均 30.1×10^{-6})、S9mix 存在下の短時間処理の CP で $10.4 \sim 57.8 \times 10^{-6}$ (平均 28.6×10^{-6}) だった。S9mix 非存在下の 24 時間処理中の MMS では、 $18.2 \sim 120 \times 10^{-6}$ (平均 61.6×10^{-6}) だった。したがって、同時陽性対照は、同時陰性対照と比較して統計的に有意な増加を示した。

2. Ames 試験陽性の物質をフォローアップするための TK6 アッセイの有用性

Figure 1 および Table 4 に示したとおり、10 物質中 2 物質が総合判定で陰性であった（フォローアップ試験として 20%有効）。この共同研究で使用された 10 試験物質は、ほとんどがアミノ基またはニトロ基を含む多環式芳香族化合物だった。化学構造の特性（被験物質の官能基の有無、Ames 試験陽性となる濃度や比活性値など）を調べて、規則性または TK6 アッセイの結果との相関関係を調べた。残念ながら、それらの特性と本研究で得られた変異原性の結果との間に規則性は見つけることができなかった。

TK6 アッセイでは、2,5-ジアミノトルエンとヨードホルムの 2 つの物質が陰性であり（フォローアップ試験として 20%有効）、残りの 8 つの物質が陽性であった（Figure 1、および Table 4）。これらの物質のうち 7 つは L5178Y 細胞を使用したマウスリンフォーマ試験 (MLA) によって報告され、消費者安全科学委員会 (SCCS) および National Toxicology Program (NTP) データベースによって陰性および陽性と報告された 2,5-ジアミノトルエンの「inconclusive」判断

を含む7つすべてが陽性の結果を示した (Table 4)。p53 を有する TK6 細胞と比較して、p53 欠損の L5178Y 細胞は、紡錘体チェックポイントの破壊とアポトーシスのために紡錘体阻害剤に対してより感受性が高いと考えられる

(Honma M et al., *Environ Mol Mutagen.* 52, 373-84(2011))。さらに、Whitwell らは、ヒト TK6 細胞の使用は、*in vitro* アッセイでの偽陽性結果を減らすのに役立ち、げっ歯類の L5178Y 細胞よりも好ましいと報告している (Whitwell et al., *Mutat Res* 789-790, 7-27 (2015))。この研究では 2,5-ジアミノトルエンが陰性であるため、TK6 アッセイは、Ames 試験の偽陽性結果のフォローアップに役立つ可能性を示していると考えられる。

3. トキシコプロテオミクス

本研究の8つの陽性物質のうち3つ (2,6-ジアミノトルエン、HC ブルーNo. 2、および4-ニトロアントラニル酸) は、興味深いことに、短時間処理後に陰性、24 時間処理後に陽性だった (Table 4)。両処理法ともに、S9 の非存在下での同一の処理条件であるにも関わらず、結果が異なった。つまり、わずか 20 時間の延長された処理時間で、これらの物質の判定は陰性から陽性に変化した (Table 4)。その原因を明らかにするために、4-ニトロアントラニル酸 (0, 400, 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を用いてトキシコプロテオミクスを実施した。その結果、合計 1078 の DEP (4 時間 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群: 359 タンパク質、4 時間 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群: 506 タンパク質、24 時間 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群: 358 タンパク質、24 時間 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群: 420 タンパク質) は、 $\log_2$ の 2 倍以上の変化に基づいて同定され。さらに、24 時間 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群と他の群 ≥ 1 の間の $\log_2$ 2 倍以上の変化に基づいて、24 時間 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群の 420 DEP から 168 個の特異的 DEP が抽出された。

Figure 2 に示したとおり、群間の特定の GO 用語のターゲット分析では、GO:0006974 (DNA 損傷刺激に対する細胞応答)、GO:0006979 (酸

化ストレスに対する応答)、および GO:0006281 (DNA 修復) の P 値は 0.05 未満であり、有意差が無かった。一方、GO:0008631 酸化ストレスに応答したアポトーシスシグナル伝達経路のスコアは、24 時間 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群の DEP および 24 時間 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群の特異的 DEP で劇的に増加した。つまり、その結果は、24 時間処理のみで 4-ニトロアントラニル酸による酸化ストレスの関与を示していた。

24 時間 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群の DEP では、酸化ストレスに応答した GO:0008631 (アポトーシスシグナル伝達経路) の中の 3 つのタンパク質 ([ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (アセチル転移)] キナーゼイソザイム 1、ミトコンドリアホスホイノシチド依存性キナーゼ 1: PDK1、スーパーオキシドジスムターゼ 2 (ミトコンドリア): SOD2、低 PI における直接 IAP 結合タンパク質: DIABLO) が含まれていた (Figure 3)。これらのタンパク質の発現レベルは、24 時間処理後にのみ上昇した。さらに、SOD2 の発現レベルは用量依存的に上昇し、PDK1 と DIABLO は 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でのみ上昇した (Figure 3)。これらのタンパク質は、すべて酸化ストレスへの応答に関与した。主要な抗酸化酵素 (カタラーゼおよび GSR) の用量および時間依存性の増加傾向についても、プロテオミクス分析で確認された。おそらく、短時間処理後、TK6 細胞のグルタチオンや関連酵素などの抗酸化防御は ROS 損傷を抑制することができたが、長時間処理では、抗酸化酵素の枯渇による酸化ストレスの増加が予想された。

酸化ストレスは、*in vitro* での特異的な遺伝毒性の一般的なメカニズムと考えられている。一般的に、*in vivo* での哺乳動物組織は、培養中の細胞よりも優れた抗酸化防御を示す可能性が高い。このような場合、ROS の生成を介して遺伝毒性を誘発する化学物質は、DNA に直接損傷を与えるが、閾値があると予想される (Kirkland et al., *Mutagenesis* 22:161-75 (2007))。本研究で見出された酸化ストレスに関与する DEP は、同様

に矛盾する試験結果を持つ他の化学物質で、DEP が観察されるかどうかを確認するために、さらなる研究解析が必要である。同じ特徴が観察された場合、これらのタンパク質（または遺伝子）または ROS の定量化は、作用機序 (MOA) の観点から *in vitro* での特異的陽性結果を識別するための有望な解決策を提供できる。

また、予備実験として、4-ニトロアントラニル酸の 24 時間処理における酸化ストレスの遺伝毒性を調べるために、すでに構築済みの OGG1 欠損細胞を用いて TK6 アッセイを実施した (Figure 4)。コントロール実験として、過酸化水素を 24 時間処理した時、OGG1 欠損細胞および TK6 細胞ともに最適用量 (RS=10~20%) が 70~80 μM 付近であり、有意差が無いと考えられた（一度の実験のため、再実験が必要となる）。本試験を 80 μM 最高用量で実施した結果、OGG1 欠損細胞の MF は、TK6 細胞のそれよりも明らかに上昇し、有意差があると考えられた（一度の実験のため、再実験が必要となる）。データを示さないが過酸化水素 4 時間処理では、OGG1 欠損と TK6 細胞の間には有意な差が無かった。

一方、4-ニトロアントラニル酸を 24 時間処理した結果、OGG1 欠損と TK6 細胞の MF は、未処理群のそれよりも 2 倍以上に上昇し、どちらも陽性判定であるが、OGG1 欠損と TK6 細胞の間には有意な差が無かった (Figure 4)。前述のトキシコプロテオミクスでは、800 $\mu\text{g/mL}$ の 4-ニトロアントラニル酸を使用し、DEP 分析で酸化ストレス応答を確認したが、それよりも高い濃度 (1138.4 $\mu\text{g/mL}$) で TK6 アッセイを実施したため、OGG1 欠損細胞は MF を有意に上昇させると予想していたが、そうではなかった。その原因として、OGG1 タンパク質の主な役割は、DNA 付加体 8-オキシグアニンを DNA から除去修復することであり、4-ニトロアントラニル酸は、8-オキシグアニンだけでなく、他の DNA 付加体も形成させたかもしれない (8-オキシグアニンは、OGG1 欠損した細胞であっても、ミ

スマッチ修復経路などのバックアップ機構で修復される)。また、プロテオミクス手法は、TK6 アッセイの MF が変動しなくても、酸化ストレス応答など高感度に細胞内生体防御機構を検出できるのかもしれない。

D. 結 論

プロテオミクスなど新しい技術と組み合わせない方法の TK6 アッセイの有用性は、フォローアップ試験として限定的であるとわかったが、それでも Ames 試験での偽陽性結果を減らす (20%) のに役立つ可能性があった。

さらに、*in vitro* 特異的遺伝毒性は長時間処理で顕著に示されたが、偽陽性化合物のプロテオミクスにより、長時間処理中の酸化ストレスによって引き起こされる遺伝毒性の作用機序が明らかになった。

したがって、オミクス技術と TK6 アッセイの統合は、24 時間処理特異的な陽性における不規則な結果の解釈に寄与する可能性があり、Ames 試験のフォローアップで偽陽性をさらに減少 (20%以上) させることにつながると考えられた。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yasui M, Fukuda T, Ukai A, Maniwa J, Imamura T, Hashizume T, Yamamoto H, Shibuya K, Narumi K, Fujiishi Y, Okada E, Fujishima S, Yamamoto M, Otani N, Nakamura M, Nishimura R, Ueda M, Mishima M, Matsuzaki K, Takeiri A, Tanaka K, Okada Y, Nakagawa M, Hamada S, Kajikawa A, Honda H, Adachi J, Misaki K, Ogawa K, Honma M. ; Weight of evidence approach using a TK gene mutation assay with human TK6 cells for follow-up of positive results in Ames tests: a

collaborative study by MMS/JEMS. Genes Environ. 43(1):7 (2021). doi: 10.1186/s41021-021-00179-1. PMID: 33676587.

2. 学会発表

- 1) 安井 学, 鵜飼明子, 本田大士, 山田雅巳, 鈴木孝昌; ヒト肝及びラット肝 S9 の比較プロテオーム解析. 日本環境変異原学会第 49 回大会 (2020.11.27).
- 2) 福田隆之, 鵜飼明子, 西村諒一, 中村真生, 佐々 彰, 安井 学; TK6 細胞を用いた *in vitro* 小核試験結果における MGMT 遺伝子発現の役割. 日本環境変異原学会第 49 回大会 (2020.11.27).

G. 知的所有権の取得状況

なし

Table 1. Participantes and test substances in the collaborative study

No.	Participating Laboratories	Investigators	Test Substances	CAS No.	Manufacturer, Lot#	Solvent
1	Ina Research Inc.	Tadashi Imamura	4-(Chloroacetyl)acetanilide	140-49-8	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Lot#KPJ1678	DMSO
2	Japan Tobacco Inc.	Tsuneo Hashizume, Haruna Yamamoto, Kaori Shibuya	2-(Chloromethyl)pyridine HCl	6959-47-3	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Lot#7BOQI-IC	DMSO
3	Yakult Central Institute	Kazunori Narumi, Yohei Fujiishi, Emiko Okada	2,6-Diaminotoluene	823-40-5	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Lot#UL6B	DMSO
4	Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan	Saori Fujishima	2,5-Diaminotoluene	95-70-5	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Lot#QFIJE	DMSO
5	Astellas Pharma Inc.	Mika Yamamoto, Naoko Otani	HC Blue No.2	33229-34-4	SIGMA-ALDRICH, Lot#STBF9635V	DMSO
6	BoZo Research Center Inc.	Takayuki Fukuda, Maki Nakamura, Ryoichi Nishimura	8-Hydroxyquinoline	148-24-3	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Lot#5PDSI-RB	DMSO
7	BioSafety Research Center Inc.	Maya Ueda	Iodoform	75-47-8	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Lot#PDH1055	DMSO
8	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd	Masayuki Mishima, Kaori Matsuzaki, Akira Takeiri, Kenji	4-Nitroanthranilic acid	619-17-0	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Lot#AGM01-AGMQ	DMSO
9	TEIJIN PHARMA LIMITED	Yuki Okada, Takafumi Kimoto	1-Nitronaphthalene	86-57-7	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Lot#BGF8A-MD	Ethanol
10	LSI Medience Corporation	Munehiro Nakagawa, Shuichi Hamada, Akihiko Kajiwar	4-Nitro-o-phenylenediamine	99-56-9	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Lot#NMEDH	DMSO

Table 2. 被験物質の処理例

細胞液(約 4×10 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	0.2 mL
処理容量	10 mL

Table 3. 陽性対照物質の情報

非代謝活性化	名称：メタンスルホン酸メチル(MMS) ロット番号：M0369 製造元：東京化成工業株式会社 製品コード：M0369
代謝活性化	名称：シクロホスファミド水和物(CP) ロット番号：PTR2478 製造元：和光純薬工業株式会社 販売コード：030-12953

Table 4. Summary of Results of TK gene mutation assay for the 10 chemicals

No.	Chemical Name	CAS No.	TK mutation assay ^{*1}			Bacterial reverse mutation assay		MLA (TK gene locus)	
			Without S9	With S9	Long term	Without S9	With S9	Without S9	With S9
1	4-(Chloroacetyl)-acetanilide	140-49-8	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	No data	
2	2-(Chloromethyl)pyridine HCl	6959-47-3	Pos	Pos	NP	Pos	Pos	Pos	Pos
3	2,6-Diaminotoluene	823-40-5	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	No data
4	2,5-Diaminotoluene	95-70-5	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Inconclusive ^{*2}	
5	HC Blue No.2	33229-34-4	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
6	8-Hydroxyquinoline	148-24-3	Neg	Pos	NP	Neg	Pos	Pos	No data
7	Iodoform	75-47-8	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	No data	
8	4-Nitroanthranilic acid	619-17-0	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Equivocal ^{*3}	Pos
9	1-Nitronaphthalene	86-57-7	Pos	Pos	NP	Pos	Pos	No data	
10	4-Nitro-o-phenylenediamine	99-56-9	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos

^{*1} performed in this study. NP; Not applicated.

^{*2} examined as toluene-2,5-diamine sulfate. The required toxicity (10-20% survival compared to the concurrent negative controls) was not reached in the experiments with S9mix

^{*3} Significant difference only at the highest dose of 1200 µg/mL

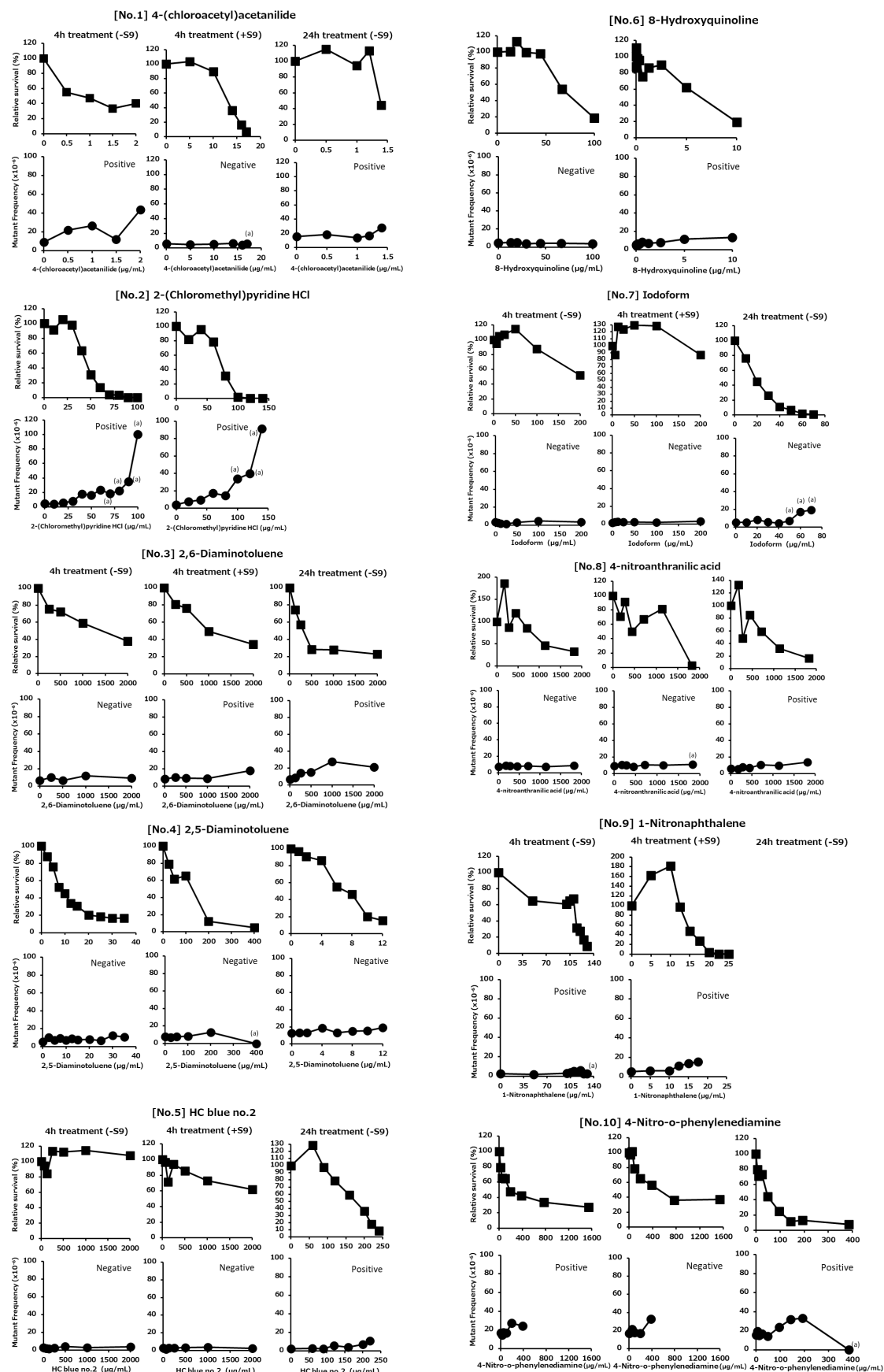


Figure 1. 各研究施設が実施した 10 種類の各化学物質の TK6 アッセイにおける相対生存率と変異頻度

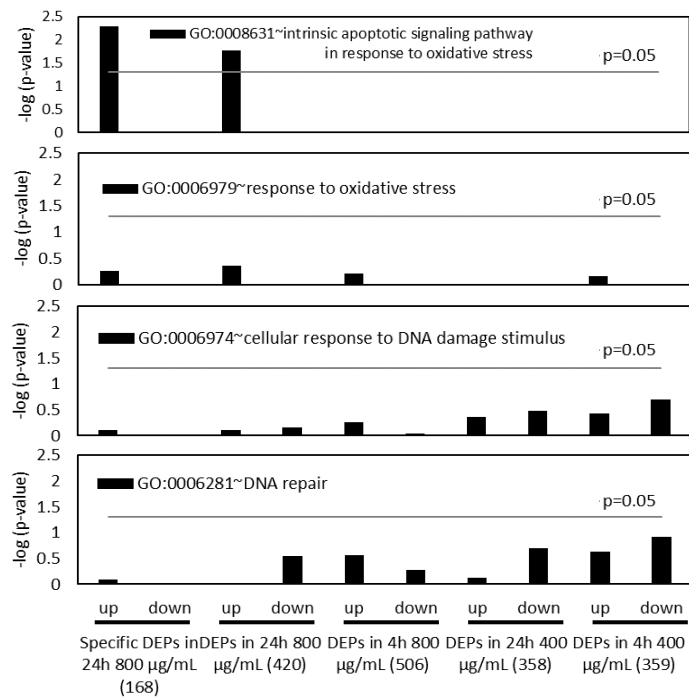


Figure 2. 4-ニトロアントラニル酸に 24 時間曝露された TK6 細胞の標的遺伝子オントロジー分析

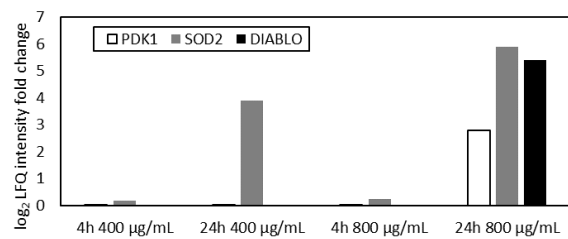


Figure 3. 4-ニトロアントラニル酸の 24 時間処理による酸化ストレスに応答した内因性アポトーシスシグナル伝達経路のタンパク質発現レベル

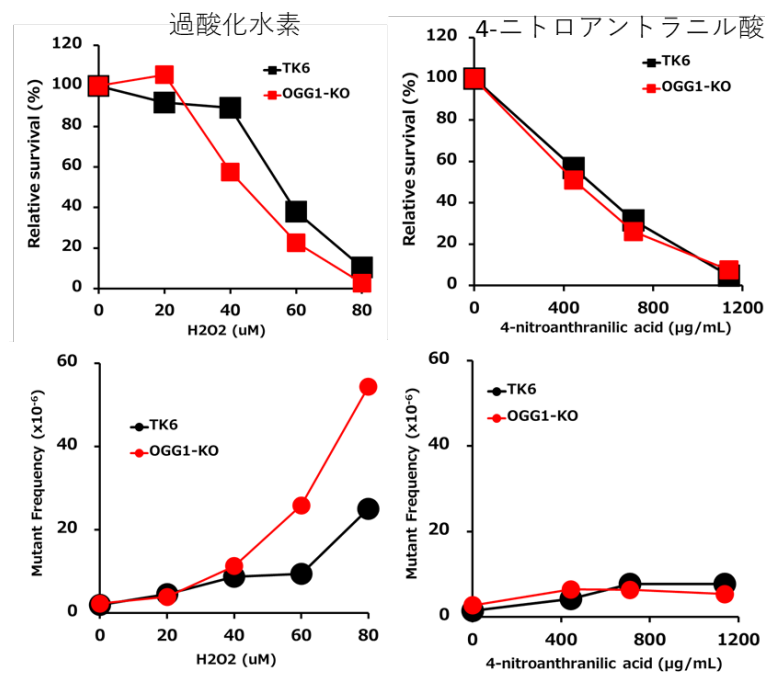


Figure 4. OGG1 欠損細胞を用いる TK6 アッセイ(24 時間処理)