

令和7年度 厚生労働科学研究費 補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安全性評価新規解析手法の開発研究
分担研究課題名: 第Ⅱ相薬物代謝も勘案した*in vitro*小核試験系の構築とそのゲノム安全性評価に関する研究

研究分担者： 安井 学 国立医薬品食品衛生研究所 ゲノム安全科学部 室長

研究要旨

発がん性定量評価を可能とするような新しい指標をゲノム安全性の観点から見出し、それらを活用した評価手法を開発するとともに、新手法と既存の発がん性試験結果等との定量定性的な相関性を明らかにすることを目標とする。遺伝毒性物質の活性化や解毒に関して、第Ⅱ相薬物代謝酵素が重要な役割を担うにも関わらず、これまでの*in vitro*遺伝毒性試験ではその代謝酵素の機能がほとんど勘案されていない。本研究では、ラット肝S9の第Ⅰ相代謝酵素だけでなく、第Ⅱ相代謝酵素（硫酸転移酵素（SULT））を機能させるため、その補因子 3'-ホスホアデノシン-5'-ホスホ硫酸（PAPS）を補充した*in vitro*小核試験系を構築することからはじめ、代謝酵素機能の有無で変化するDNA損傷応答（小核形成能）を同定・定量し、*in vitro*と*in vivo*ギャップの原因を明らかにすることで発がん性定量評価の予測向上に寄与する。SULTの抱合作用によって遺伝毒性活性化することが知られているアリストロキア酸Iに対して、PAPS補充した*in vitro*小核試験を実施した結果、既知通りPAPS補充群は、非補充群よりも小核細胞数（DNA損傷性）を増強させることが分かった。PAPS補充する*in vitro*小核試験系をほぼ構築できたと考えられるが、2倍程度の小核細胞数を誘発させられる陽性対照物質は見出されておらず、より多くの小核細胞数を誘発させる強い遺伝毒性化学物質を引き続き探索する予定である。

A. 研究目的

薬物代謝の第Ⅰ相、および第Ⅱ相代謝酵素は、遺伝毒性物質の活性化や解毒に重要な役割を担う。しかし、*in vitro*遺伝毒性試験では第Ⅱ相代謝酵素の機能がほとんど勘案されておらず、*in vitro*と*in vivo*試験結果のギャップを生じさせる要因の一つと考えられる。本研究では、ラット肝S9の第Ⅰ相および第Ⅱ相代謝酵素を機能させるため、それらの補因子を補充した*in vitro*小核試験系を構築し、代謝酵素機能の有無で変化するDNA損傷応答（*in vitro*小核試験）を同定・定量し、先のギャップの原因を明らかにすることで発がん性定量評価の予測向上

に寄与する。

令和7年度は、第Ⅱ相薬物代謝酵素の硫酸転移酵素（SULT）を機能させる補因子PAPSを補充した*in vitro*小核試験系を構築するために、PAPS補充、あるいはPAPS合成系（PAPS-Generating System; PGS）を用いて小核細胞の誘発が2倍程度に増加する陽性対照物質を探索した。その候補物質として、アリストロキア酸I（AA-I）を用いた。AA-Iの発がん性情報について、AA-Iを含む製剤を服用した患者で腎障害（AAN）と上部尿路上皮癌が高頻度にみられたこと、さらにバルカン腎症関連の尿路上皮癌でもアリストロキア酸由来DNA付加体と特徴的変

異が検出され、原因物質としての因果性が強く支持されたことがある (Nortier JL et al., N Engl J Med. 342, 1686-92 (2000)、Grollman AP et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 104, 12129-34 (2007))。アリストロキア酸のばく露と上部尿路上皮癌の関連が示され、IARCはアリストロキア酸をヒトに対する発がん性あり (Group 1) と評価している (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 100A)。AA-Iの発がん性は、少なくともSULTが関与していると考えられ、AA-IのDNA付加体を増加させることがよく知られている (Sidorenko et al. Carcinogenesis 35, 1814 - 22 (2014)、Hashimoto et al. Carcinogenesis 37, 647 - 55 (2016)、Arlt et al. Arch Toxicol. 91, 1957-75 (2017))。

B. 研究方法

1. 細胞と培養

ヒトリンパ芽球細胞TK6株は、10% 馬血清 (サーモフィッシャー)、200 μ 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 μ 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) で培養された。培養は、37度、5% CO₂濃度存在下で行った。

2. *in vitro*小核試験

原則としてOECDガイドラインTG487に従って実施した。被験物質の処理時間は3時間、回復時間は約22時間として小核標本作製した。ラット肝S9とコファクターは、家田貿易株式会社から購入した。PAPS試薬は、富士フイルム和光純薬工業から購入した。PGS系は、主にWatabeらの論文を参考にして、実験条件を決めた (Watabe T. et al., Science 215, 403-5 (1982)、Mori M. et al., J Pharmacobiodyn 9, 1036 - 9 (1986)、Weththasinghe SA. et al., Drug Test Anal. 10, 330-9 (2018))。PGSで使用されるATPとNa₂SO₄は、富士フイルム和光純薬、MgCl₂

はNIPPON GENEから購入した。AA-Iはシグマアルドリッチから購入した。陽性対照物質は、シクロホスファミド (CP) (東京化成工業株式会社) を使用した。細胞毒性指標は、処理してから24時間後の相対的細胞集団倍加数 (Relative Population Doubling: RPD) を採用し、その値が50%程度となる用量を最大用量として本試験を実施した。小核細胞の分析は、40 μ g/mLアクリジンオレンジ (Sigma-Aldrich) を使用し、B励起による蛍光顕微鏡 (400倍) で観察した。各用量1000細胞あたりの小核細胞をカウントし、これを2回繰り返すことによって、被験物質1回の処理に対して合計2000細胞 (1000 x 2細胞) を観察した。統計分析のために、被験物質を少なくとも2回処理し、合計3000から4000細胞あたりの小核細胞数を調べた。処理群における有意差検定では、2～3回の小核試験 (計3000～6000細胞あたりの小核保有細胞を計測) を実施し、t検定 (有意水準5%) を行った。

(倫理面の配慮)

*In vitro*小核試験は培養細胞株を用いるため、個人情報保護および生命倫理に関する規定には抵触しない。

C. 研究結果、および考察

1. AA-Iの用量設定試験

*In vitro*小核試験の用量設定試験は、AA-IをDMSOに溶解させ、2 mg/mLを最高用量として公比3で実験を行った。最終濃度222 μ g/mL以上で析出が観察された。RPD値が40～50%となる至適用量が74.1～222 μ g/mLの間にあることが分かった (Fig. 1)。また、300 μ M PAPSを補充する予備実験において、非補充群よりも補充群の細胞毒性が非常に増強されることが判明したため、RPD値が50%付近となる用量を至適用量として定義することにした。よって、AA-Iの至適用量は74.1 μ g/mLとして実験をすすめた (Fig. 1)。

2. PAPS補充量、およびPGS補充量に対する細胞毒性と小核細胞数の変化

74.1 $\mu\text{g/mL}$ AA-IのRPD値が約50%であることを起点として、PAPS補充（0、150、300、600 μM ）、あるいはPGS補充（0、2、4、8 mM（ATP濃度））したときの細胞毒性（RPD）と小核細胞数を計測した（Fig. 2 AおよびD）。PAPS試薬は比較的高価であるため、研究予算の都合から600 μM を最大とした。RPD値は、PAPSおよびPGSともに、補充量が増加しても約50 %付近で推移した。一方、小核細胞数については、PGS補充量を増やすと24個から36個（1000細胞あたり）へ増加したが、PAPS補充群は、補充量から600 μM に増加させたとき、わずか19個から23個（1000細胞あたり）だった。その4個の増加は、PGS補充群2 mM以下の効率（6個の増加に相当）であり、300~600 μM PAPS補充量程度ではAA-Iの小核形成を検出することが難しいことが分かった（Fig. 2 AおよびD）。また、PAPS自体の安定性は高くないため反応するまでに一部が分解している可能性も考えられる。

3. PAPS補充、およびPGS補充によるAA-Iの細胞毒性の比較

300 μM PAPS補充（研究費予算の都合から300 μM を採用）、および8 mM PGS補充の実験条件において、各補充の有無におけるAA-I用量に対する細胞毒性を測定した（Fig. 2BおよびE）。その結果、74.1 $\mu\text{g/mL}$ AA-I用量のとき、PAPS補充群は55.2%、PAPS非補充群は58.4%であった。つまり、PAPS補充群および非補充群の各RPD値には、有意な差が無かった。一方、74.1 $\mu\text{g/mL}$ AA-I用量のとき、PGS補充群は42.8 %、PGS非補充群は63.8 %であった。PGS群のRPD値は明らかに非補充群のそれよりも増強しており、統計的にも有意差が得られた（Fig. 2 E）。

4. PAPS補充、およびPGS補充によるAA-Iの小核細胞数の比較

300 μM PAPS補充、および8 mM PGS補充の条件において、それぞれ補充の有無におけるAA-I用量に対する小核細胞数を測定した（Fig. 2CおよびF）。その結果、74.1 $\mu\text{g/mL}$ AA-I用量のとき、PAPS補充群は79個、PAPS非補充群は63個（4000細胞あたり）であった。その1用量だけで統計的有意差が認められたが、その他の用量群では有意差は無かった（Fig. 2C）。一方、PGS実験では、74.1 $\mu\text{g/mL}$ AA-I用量のとき、PGS補充群は86個、PGS非補充群は55個（3000細胞あたり）であった。PGS補充群の小核細胞数は明らかに非補充群のそれよりも増強しており、74.1 $\mu\text{g/mL}$ 以上の複数の用量群で統計的有意差が得られた（Fig. 2F）。陽性対照物質としてCPを用いたが、小核試験においてS9機能がワークしたかを確認するためであり、CPはPAPS補充によって小核細胞数を増やすことはない。つまり、PGSを利用した本研究で小核細胞数の増加が認められたAA-Iが、PAPS補充型*in vitro*小核試験の陽性対照物質として有力な候補であると言える。しかしながら、非補充群の小核細胞数と比較すると30~40%程度しか増加しないため、2倍程度等より多くの小核細胞を形成させる強力な遺伝毒性物質を探索する必要がある。

以上のことから、PAPS試薬では不十分だが、PGSを用いることにより、ラットS9中に含まれるSULTの機能を十分に利用した*in vitro*小核試験を実施できることが分かった。

*In vitro*試験の最大のメリットは、早く安価に化学的な作用機序を明確化できることである。本研究においては、*in vitro*でPAPS合成を行えるPGS補充による小核試験において、もし、PGS補充で陽性、PGS非補充で陰性となった場合、PGSの有無だけで陽性陰性に違いが示されるため、その被験物質は、SULTのPAPS抱合化によって、遺伝毒性が活性化（陽性）したことを証明できる。単に*in vitro*試験で陽性になっただけでなく、代謝酵素機能の有無で変化するDNA損傷応

別添 4

答の原因が明らかになることで発がん性の定量性の予測向上、およびその作用機序も理解することができる。

AA-Iの発がんには、少なくともSULTの関与が明らかとされている (Sidorenko et al. Carcinogenesis.35, 1814-22 (2014); Hashimoto et al. Carcinogenesis 37, 647-55 (2016); Arlt et al. Arch Toxicol. 91, 1957-75 (2017))。今回、PGS補充した*in vitro*小核試験でも遺伝毒性が活性化されたことが確認 (Fig. 2F) でき、既報と一致したため、現段階において、本実験系は有用であると考えられた。

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

D. 結論

ラット肝S9存在下の条件で、SULTの補因子PAPSを合成する系を*in vitro*小核試験に補完することによって、PGS補充型の*in vitro*小核試験系をほぼ構築できたと考えられた。一方、そのための陽性対照物質が必要であるが、非補充群に対して、補充群が約2倍程度の小核細胞数を誘発させられる陽性対照物質を見つけることができていない。より多くの小核細胞数を誘発させる強い遺伝毒性化学物質を引き続き探索したいと考えている。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

G.1. 論文発表

なし

G.2 学会発表

1. 安井学、鵜飼明子、本間正充、杉山圭一；Ames 試験で強い陽性を示す香料物質 6-メトキシキノリンのグルタチオン補充型 TK6 試験によるフォローアップ. 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会、静岡市 (2025.11.23)

H. 知的財産権の出願・登録状況

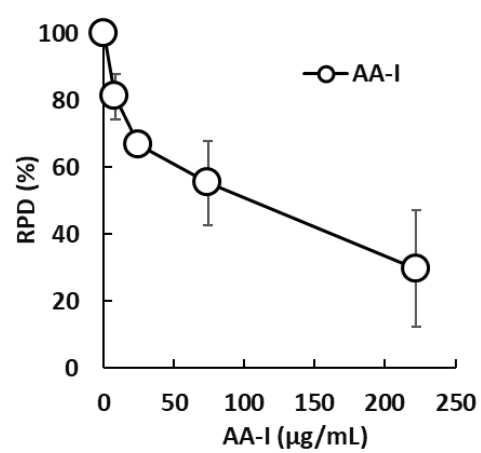


Fig. 1 RPDを用いたAA-Iの用量設定試験

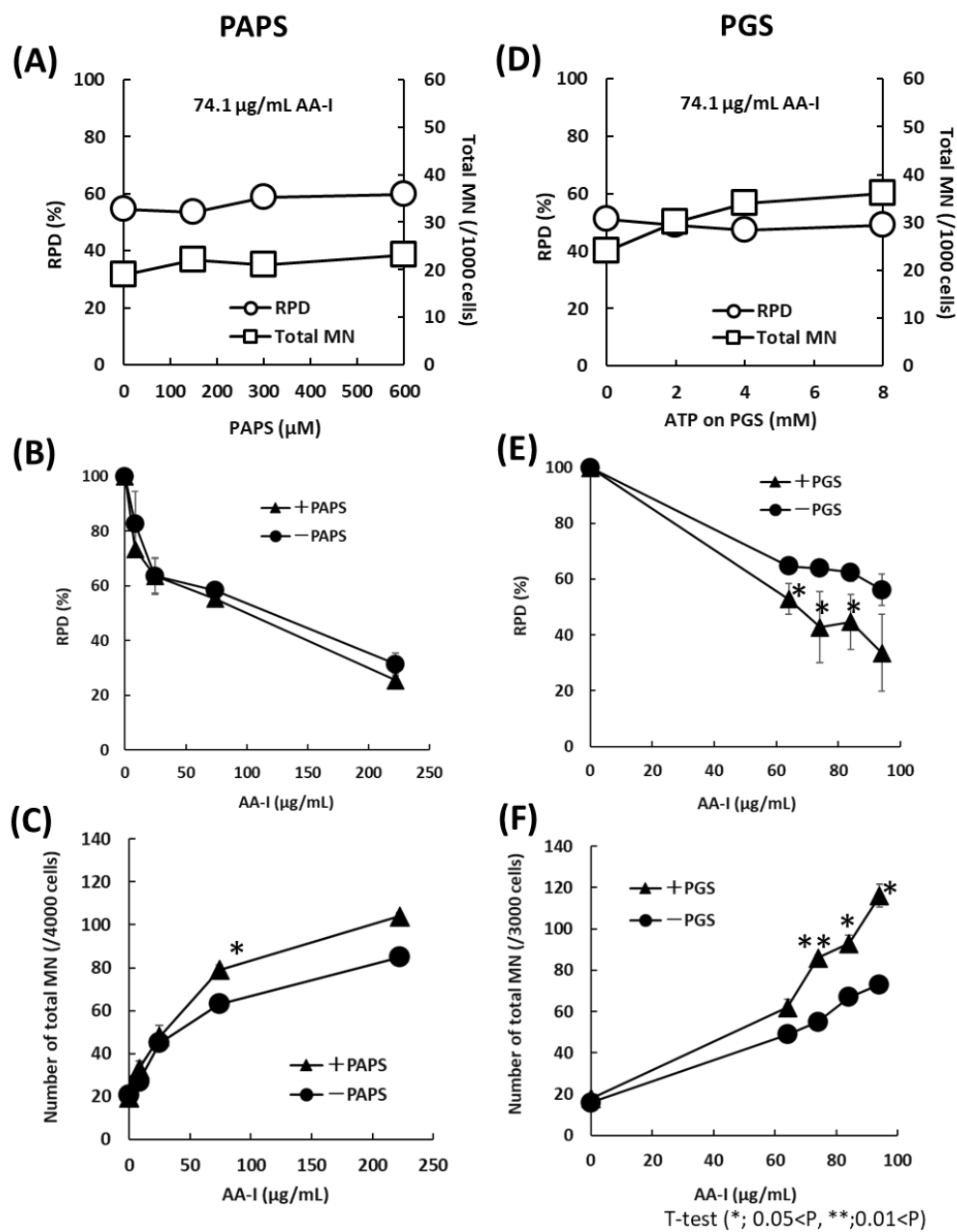


Fig. 2 PAPSおよびPGS補充によるAA-Iの小核形成能の比較