

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	ラットにおける遺伝毒性・反復投与毒性併合試験法の開発 (課題番号：1104) (研究期間：平成23年度～平成25年度)
主任研究者名	研究者名：西川 秋佳 所属機関：国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター

gpt deltaラットを用いた遺伝毒性・反復投与毒性併合試験法を開発した。試験法の標準化のため、投与期間や系統差を検証し、13週間反復投与による一般毒性検索系としての妥当性を検討した。また、遺伝子改変に伴うゲノムの欠失等の影響を明らかにするため、λE G10の挿入部位を決定した。さらに、加齢に伴う突然変異の蓄積及びクロソナル変異体の影響の有無について検討した。

F344系及びSD系gpt deltaラットにdiethylnitrosamine (DEN) を2～8週間飲水投与した結果、いずれの時点でも最高用量群 (10 ppm) で対照群と比較して有意なgpt遺伝子突然変異頻度及びSpi-欠失変異体頻度の上昇が認められた。一方、di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) 混餌投与群では全ての投与群、全期間で、gpt及びSpi-突然変異頻度は対照群と比較して有意差はなかった。また、gpt deltaラットはF344系、SD系ともに野生型ラットとほぼ同程度の一般毒性を示した。

F344系gpt deltaラットにDEN を13週間飲水投与した結果、一般状態、血清生化学、臓器重量、病理組織等の一般毒性に野生型ラットとの差異はなく、肝前がん病変であるGST-P陽性細胞は投与群において対照群と比較し有意な高値を示したが、その程度は野生型ラットと同程度であった。DENを5週間腹腔内投与後、phenobarbital (PB)を8週間混餌投与した結果、K-ras遺伝子の変異パターンはgptアッセイの変異スペクトラム解析で明らかとなったgpt遺伝子上の遺伝子変異と一致するものであったことから、gpt遺伝子上の遺伝子変異が、がん遺伝子上の遺伝子変異と相関する可能性が示唆された。

遺伝子導入によってラットゲノム配列は71,789塩基分が欠失し、欠失領域中には1遺伝子が存在した。104週齢の肝臓では19週齢と比較して点突然変異頻度が約3倍有意に高く、肝臓において自然突然変異が加齢に伴い蓄積することが示された。点突然変異に関するシーケンス解析の結果、主な自然突然変異のタイプはCpG部位におけるG:C to A:T変異であった。また、老齢個体において、生体の機能低下によって内因性変異原の増加や修復能の低下が生じ、酸化的DNA損傷等を介してG:C to T:A変異や欠失変異が増加する可能性が示唆された。3系統のgpt deltaラット (SD、F344及びWistar Hannover) について肝臓の突然変異頻度を測定した結果、系統差はみられなかった。

以上の成績から、レポーター遺伝子導入動物gpt deltaラットにおける臓器レベルでの検索は、遺伝毒性の標的臓器における直接的な関与の証明となる点で優れており、一般の反復投与毒性に加えて遺伝毒性・発がん性をより精緻かつ短期に予測できる可能性が期待できる。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	ラットにおける遺伝毒性・反復投与毒性併合試験法の開発 (研究期間：平成23年度～平成25年度)
主任研究者名	所属：国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 氏名：西川 秋佳（研究課題番号：1104）

I 研究の期間及び研究目標等

1 研究期間

平成23年～25年度（3年間）

2 研究目的

食品中に存在する化学物質によるヒト健康影響において、発がん性は最も懸念すべきハザードの一つである。特にその作用機序に遺伝毒性が関与する場合には、閾値がないとの前提でリスク評価がなされることから、遺伝毒性の有無を判定することはリスク評価上極めて重要である。しかし、実際には遺伝毒性は、Ames 試験を主体とした細菌を用いた復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験あるいは *in vitro* マウスリンフォーマ試験、およびげっ歯類造血細胞を用いる小核試験などの *in vivo* 試験が標準的試験法の組み合わせとされている。このように発がん性試験とは別々の試験系で評価されるため、標的臓器における発がん機序に対して遺伝毒性がどの程度関与しているかは事実上不明の点が多い。発がん性試験と遺伝毒性試験の結果の組み合わせから、発がん性が陽性の物質を一般に遺伝毒性発がん物質と非遺伝毒性発がん物質に区別するが、最近の研究では遺伝毒性発がん物質でも標的臓器に遺伝毒性が全く関与していないケースや逆に非遺伝毒性発がん物質の中にも組織障害などから2次的に遺伝毒性を生ずるケースが報告されるようになってきた。このような臓器レベルで遺伝毒性を解析できる動物モデルとして、レポーター遺伝子を導入した遺伝子改変動物があり、OECDにおいてもその重要性が大きく評価されており、ガイドライン化されている。

国立衛研が共同開発した *gpt delta* トランスジェニックマウスおよびラットは、突然変異 (*gpt*変異) のみならず、既存のレポーター遺伝子トランスジェニック動物では検出が困難である欠失変異 (Spi変異) も検出可能なレポーター遺伝子がゲノムDNAに組み込まれており、動物個体に起こる遺伝子突然変異を任意の組織において定量的に測定し、誘発された突然変異を塩基配列レベルで解析できる特長を持っている。本研究では、レポーター遺伝子導入動物のうち、*gpt delta* ラットを用いて反復投与毒性試験を実施し、*gpt delta* ラットを用いた反復投与毒性・遺伝毒性の包括的試験法の標準化（投与期間や系統差の検討）を主軸として、13週間反復投与試験による本ラットの発がん性スクリーニングを含む一般毒性検索系としての妥当性の検討および遺伝子変異と誘発病変内遺伝子変異の関連について検討する。また、トランスジェニックラットを反復投与毒性試験に適用する際には、遺伝子改変（レポーター遺伝子 λ EG10 の導入）に伴うラットゲノムの欠失等の影響を明らかにしておくことが非トランスジェニック動物との生物学的同等性を議論する上で重要であ

る。このため、ゲノム中に複数コピー導入されているλEG10の挿入部位を決定する。レポーター遺伝子のコピー数の分析を行い、標的組織からの回収効率に関する基礎データを得る。試験期間が長期に渡る場合、遺伝子突然変異が誘発された細胞が分裂する（クローナル変異体）ことにより突然変異頻度が見かけ上高く見積もられる可能性が指摘されているため、F344系統*gpt delta*ラットの2年間飼育を行い、加齢に伴う突然変異の蓄積およびクローナル変異体の影響の有無を明らかにする。

このように、レポーター遺伝子導入動物における臓器レベルでの検索は、遺伝毒性の標的臓器における直接的な関与の証明となる点で優れており、一般の反復投与毒性に加えて遺伝毒性・発がん性をより精緻により短期に予測できる可能性が期待できる。

3 研究体制 （※研究項目ごと個別課題ごとに研究担当者及び所属機関名を記入すること。）

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
ラットにおける遺伝毒性・反復投与毒性併合試験法の開発	<i>gpt delta</i> ラット反復投与毒性試験を用いた遺伝毒性の包括的試験法の標準化	西川秋佳(国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター) 小川久美子(国立医薬品食品衛生研究所・病理部)
	<i>gpt delta</i> ラットの一般毒性検索系としての妥当性の検討 <i>gpt delta</i> ラットにおける遺伝子変異と誘発病変内遺伝子変異の比較	梅村隆志(国立医薬品食品衛生研究所・病理部)
	<i>gpt delta</i> ラットの詳細なレポーター遺伝子変異の解析	増村健一(国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部)

4 倫理面への配慮について

動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所実験動物倫理委員会の承認に基づき実施する。特に、動物愛護の精神に則って動物飼育を行い、動物の処置には倫理規定に十分配慮し、実験終了時、安楽死においても深麻酔下、苦痛に配慮する。また、申請者ならびに研究協力者の健康保持のため、本研究で被験物質として使用する化合物、各実験で使用する薬品は、安全キャビネット等で厳重に注意して取り扱う。

II 研究内容及び成果等

1 研究内容及び方法

(1) 研究項目名：*gpt delta* ラット反復投与毒性試験を用いた遺伝毒性の包括的試験法の標準化（研究担当者名：西川秋佳 所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター、小川久美子 所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所 病理部）

diethylnitrosamine (DEN) は 10、1 および 0.1 ppm で飲水投与、di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) は 1.2、0.12、0.012% で混餌投与し、対照としてそれぞれの無処置群を設定した。F344 系及び SD 系の雄性 *gpt delta* ラットと、それぞれの雄性野生型ラット各 15 匹に投与し、投与開始後 2 週、4 週および 8 週にて各群 5 匹ずつ解剖を行った。ただし DEN 投与群の F344 系 *gpt delta* ラットは予定数の動物を確保できなかったため、0.1 および 1 ppm 投与群および無処置群を 12 匹、10 ppm 投与群を 11 匹とし、投与開始後 2 週、4 週にて各群 4 匹ずつ解剖し、残りを 8 週に解剖した。10 ppm 投与群の 8 週時点の動物が 3 匹になってしまうため、10 ppm の 8 週投与群およびその無処置群を各 4 匹ずつ追加で実施した。これらの追加動物のデータを本試験のデータと比較したところ、各項目について同程度の結果が得られていたので、以下に示すデータは追加動物のデータを本試験に合算して統計処理を行ったものである。投与期間中は一般状態を観察するとともに週 1 回体重を測定した。投与期間終了後に 16 時間絶食させ深麻酔下で開腹し、腹部大動脈から血液生化学検査のための血液採取を行ったのち放血により安楽死させ、肝臓組織における *gpt assay* および *Sp1 assay* を行うための凍結標本、および一般毒性評価と免疫組織化学的染色に供する主要臓器のホルマリン固定標本を採取した。全身についての一般毒性および肝臓を用いた GST-P 陽性巣の発生については、*gpt delta* ラットと野生型ラットの結果を比較し、*gpt delta* ラットに特異的な変化が見られるのか否かについて検討した。*gpt* および *Sp1 assay* については、肝臓から DNA を抽出し、レポーター遺伝子の変異について細菌のコロニー形成およびプラーク形成能を指標に変異頻度を検討した。さらに、遺伝子変異が検出された場合は塩基配列を特定し、変異スペクトラムを解析した。これらの結果について、投与期間および系統間において比較し、いずれが最適かを検討した。

(2) 研究項目名：*gpt delta* ラットの一般毒性検索系としての妥当性の検討（研究担当者名：梅村隆志 所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所 病理部）

反復投与毒性試験における *gpt delta* ラットの一般毒性検索系としての妥当性を検討するために、F344 系 *gpt delta* ラットとその背景系統である F344 系ラットを用いて DEN またはフランの反復投与毒性試験を実施し、一般毒性発現ならびに肝発がん感受性について遺伝子型間で比較した。DEN を被験物質とした検討では、6 週齢の雄性 F344 系 *gpt delta* ラットおよび F344 系ラットに DEN を 0、0.1、1 または 10 ppm の濃度で 13 週間飲水投与した。投与終了後に麻酔下にて採血し、血液学的検査および血清生化学的検査を行った。さらに、主要臓器を摘出後、重量測定および病理組織学的検査を実施し、発がん性の評価のために肝臓における GST-P 陽性細胞巣の定量的解析を行った。フランを被験物質とした検討では、6 週齢の雄性 F344 系 *gpt delta* ラットおよび F344 系ラットにコーン油に混じたフランを 0、0.1、1 または 10 mg/kg 体重/day (1 日 1 回週 5 日) の用量で 13 週間強制経口投与を行った。投与終了後に麻酔下にて採血し、血液学的検査ならびに主要臓器を摘出し、臓器重量を評価した。

(3) 研究項目名：*gpt delta* ラットにおける遺伝子変異と誘発病変内遺伝子変異の比較

(研究担当者名：梅村隆志 所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所 病理部)

レポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットは、レポーター遺伝子である *gpt* 遺伝子を用いて化学物質の遺伝子突然変異を定量的に測定することができ、さらにその変異スペクトラムの特徴を明らかにできることから、化学物質の遺伝毒性の評価やその発がん機序の解析に有用であると考えられている。本研究では、遺伝毒性肝発がん物質の投与により誘発される *gpt delta* ラットの *gpt* 遺伝子上の遺伝子変異と前がん病変あるいは腫瘍組織内におけるがん遺伝子の遺伝子変異パターンを比較検討し、レポーター遺伝子上の遺伝子変異とがん遺伝子変異パターンの相関性を検討することを目的とした。

6 週齢雄 F344 系 *gpt delta* ラットに遺伝毒性肝発がん物質である DEN を 40 mg/kg 体重の用量で、週 1 回、5 週間腹腔内投与または同じく遺伝毒性肝発がん物質である 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) を 300 ppm の濃度で 5 週間混餌投与した。対照群には生理食塩水を週 1 回、5 週間腹腔内投与した。投与終了後、それぞれのラットの肝臓を摘出し、*gpt* アッセイを行った。また、肝前がん病変である GST-P 陽性巣および肝腫瘍の誘導を目的として、DEN または MeIQx を同条件で投与後に、肝発がんプロモーターである phenobarbital (PB) を 500 ppm の濃度で混餌投与した。対照群には生理食塩水を週 1 回、5 週間腹腔内投与後に、500 ppm PB あるいは基礎食を自由摂取させた。GST-P 陽性巣をエンドポイントとする群は実験開始 13 週後に肝臓を摘出した。肝腫瘍をエンドポイントとする群においては、DEN + PB 処置群は実験開始 40 週後に MeIQx + PB 処置群に関しては、実験開始 52 週後に肝臓を摘出し、肉眼的に認められた肝結節および周囲正常肝をそれぞれ採取した。GST-P 陽性巣内のがん遺伝子変異を検討するために、DEN + PB 処置群および MeIQx + PB 処置群の実験開始 13 週後解剖群の肝臓を用いて新鮮凍結切片を作成し、抗 GST-P 抗体を用いた免疫組織化学染色を実施後に、レーザーマイクロダイセクション法にて GST-P 陽性巣および GST-P 陰性領域をそれぞれ採取し DNA を抽出した。抽出した DNA サンプルを用いて *K-Ras* 遺伝子の exon 1 および exon 2 ならびに β -*catenin* 遺伝子の exon 3 を対象とした PCR および direct sequence を実施し、GST-P 陽性細胞巣内のがん遺伝子の遺伝子変異を解析した。

(4) 研究項目名：*gpt delta* ラットの詳細なレポーター遺伝子変異の解析 (研究担当者名：増村健一 所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部)

gpt delta ラットゲノム中の λ EG10 挿入部位を解析するため、雄 F344 *gpt delta* ラットの肝臓からゲノム DNA を精製した。DNA を断片化してインサート長 3kb のメイトペアライブラリーを作製し、SOLIDTM システムを用いた網羅的シーケンス解析を行った。また、自然突然変異について比較検討するため、104 週齢および 19 週齢の F344 *gpt delta* ラット雌雄の肝臓からゲノム DNA を抽出し、*gpt* 遺伝子点突然変異体の頻度測定と変異スペクトルの解析および Spi 欠失変異頻度の測定を行った。さらに、*gpt delta* ラットの系統別背景データ取得のため、3 系統の *gpt delta* ラット (SD、F344 および Wistar Hannover) について 19 週齢雄個体の肝臓を用いた遺伝子突然変異頻度の測定、変異スペクトルの解析および Spi 欠失変異頻度の測定を行った。

2 研究成果、考察、今後の課題

(1) 研究項目名：***gpt delta*** ラット反復投与毒性試験を用いた遺伝毒性の包括的試験法の標準化 (研究担当者名：小川久美子 所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所 病理部)

DEN 投与群、DEHP 投与群ともに投与期間中、死亡例はなく、一般状態においてもすべての動物において異常所見は観察されなかった。どちらの被験物質もおおむね投与濃度の公比に比例した摂取量であった。F344 系、SD 系ともに ***gpt delta*** ラットは野生型ラットと比較して初期体重が低い傾向があった。投与期間中の体重については DEN 投与群と対照群では有意な差は認められなかったが、DEHP 投与群では最高用量群 (1.2%) において投与期間の後半に体重低下傾向が見られ、F344 系 ***gpt delta*** ラットの 4 週、SD 系 ***gpt delta*** ラットの 3~8 週、および SD 系野生型ラットの 4、8 週で有意な体重低下が認められた。DEN 投与群ではすべての期間、群において主要臓器 (肝、腎、心臓、肺、胸腺、脾臓、副腎、精巣) の相対重量で無処置対照群との間に有意な差は認められなかった。DEHP 投与群では F344 系、SD 系ともに野生型ラット、***gpt delta*** ラットのいずれも最高用量群 (1.2%) で対照群と比較して相対肝重量の有意な増加が認められ、2、4、8 週全ての時点において F344 系野生型ラットで 1.9~2.0 倍、F344 系 ***gpt delta*** ラットで 1.6~2.0 倍、SD 系野生型ラットで 1.7~1.9 倍、SD 系 ***gpt delta*** ラットで 1.7~1.9 倍であった。さらに中間用量群でも一部の系統・投与期間 (F344 野生型 0.12% 2~4 週、0.012% 4 週、SD 野生型 0.12% 4 週、SD ***gpt delta*** 2~4 週) では有意な増加が認められた。また全ての系統のラットで最高用量群 (1.2%) において対照群と比較して相対腎重量の有意な増加が認められ、2、4、8 週全ての時点において F344 系野生型ラットで 1.1~1.2 倍、F344 系 ***gpt delta*** ラットで 1.1~1.2 倍、SD 系野生型ラットで 1.1~1.2 倍、SD 系 ***gpt delta*** ラットで 1.1~1.3 倍であった。その他の臓器重量について F344 および SD 各系統の野生型ラットと ***gpt delta*** ラットの同一条件における比較では散発的に有意な差が見られたが、いずれも用量・投与期間等に相関性がないことから偶発的な差異であると考えられた。DEN 投与群では IP、Na、Cl で散発的に有意な差が見られたが、用量・投与期間等に相関性がないことから偶発的な差異であると考えられた。DEHP 投与群では最高用量群 (1.2%) において 2、4、8 週いずれの時点でも対照群と比較して有意な血清アルブミン、A/G 比の増加が認められ、全期間を通じて血清アルブミンの増加程度は F344 系野生型ラットで 1.2 倍、F344 系 ***gpt delta*** ラットで 1.2~1.3 倍、SD 系野生型ラットで 1.1~1.2 倍、SD 系 ***gpt delta*** ラットで 1.1 倍であり、A/G 比の増加程度は F344 系野生型ラットで 1.5~1.7 倍、F344 系 ***gpt delta*** ラットで 1.8~2.0 倍、SD 系野生型ラットで 1.7 倍、SD 系 ***gpt delta*** ラットで 1.3~1.6 倍であった。8 週投与群ではこれらに加えて ALP の有意な増加または増加傾向が認められ、F344 系野生型ラットで 1.3 倍、F344 系 ***gpt delta*** ラットで 1.3 倍、SD 系野生型ラットで 1.6 倍、SD 系 ***gpt delta*** ラットで 1.4 倍であった。これらの変化は F344 系、SD 系いずれにおいて

も *gpt delta* ラットは野生型ラットとほぼ同程度の変化を示していた。また DEHP 投与群では T-Bil、Cre、Glu、TG、TP、Na の変動が一部で見られたが、用量相関性がなく偶発的な変動と考えられる。また F344 および SD 各系統の野生型ラットと *gpt delta* ラットの同一条件における比較では散発的に有意な差が見られたが、いずれも用量・投与期間等に相関性がないことから偶発的な差異であると考えられた。

F344 系、SD 系それぞれの *gpt delta* ラット肝臓からゲノム DNA を抽出し、主に点突然変異を検出する *gpt* アッセイと、主に欠失変異を検出する *Spi* アッセイを実施した。DEN 投与群では F344 系、SD 系ともに 2、4、8 週いずれの時点でも最高用量群（10 ppm）で対照群と比較して有意な *gpt* 遺伝子突然変異頻度の上昇が認められた。それぞれの時点での最高用量群の *gpt* 遺伝子突然変異頻度の平均値は F344 系で 21.3×10^{-5} (2 週)、 46.0×10^{-5} (4 週)、 51.2×10^{-5} (8 週)、SD 系で 15.7×10^{-5} (2 週)、 39.9×10^{-5} (4 週)、 53.5×10^{-5} (8 週) であり、2 週と 4 週では F344 系で 2.15 倍、SD 系で 2.54 倍とどちらの系統でもほぼ投与期間に比例して 2 倍以上突然変異頻度が上昇しているのに対し、4 週と 8 週では F344 系で 1.14 倍、SD 系で 1.34 倍とほぼ同程度の変異頻度を示した (図 1)。*Spi* アッセイにおいても、DEN 投与群は F344 系、SD 系ともに 2、4、8 週いずれの時点でも最高用量群（10 ppm）で対照群と比較して有意な変異体頻度の上昇が認められたが、*gpt* 突然変異頻度とは異なり投与期間に比例して変異体頻度の上昇が認められた (図 1)。これらの遺伝子突然変異頻度には F344 系と SD 系の間で有意な差はみられなかった。一方で DEHP 投与群では全ての群、全期間で、*gpt* および *Spi* いずれの突然変異頻度にも対照群と比較して有意な差は認められなかった (図 2)。

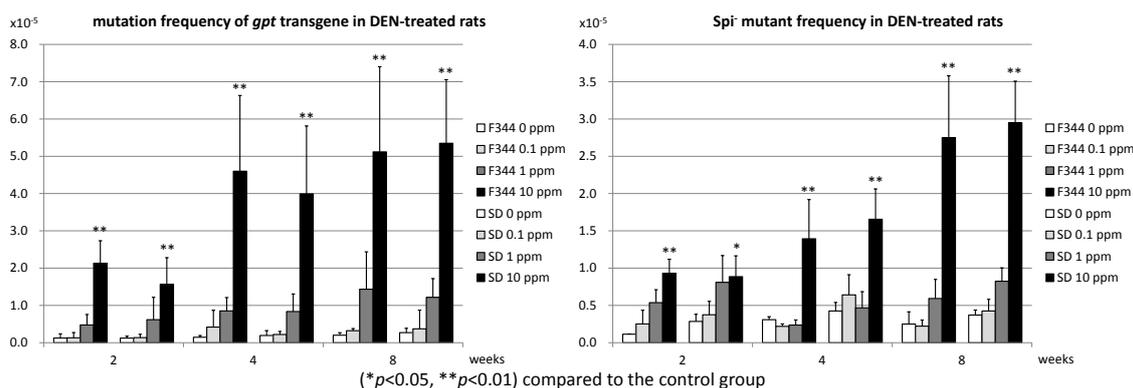


図1. DEN投与ラット肝臓における突然変異頻度

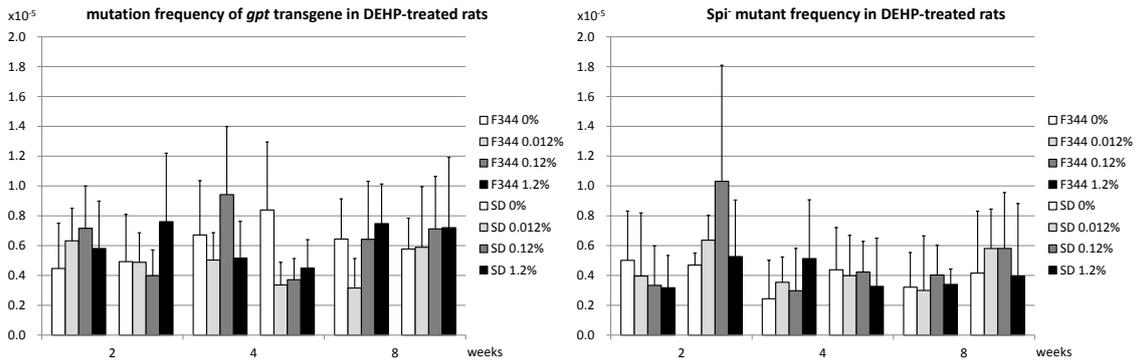


図 2. DEHP 投与ラット肝臓における突然変異頻度

野生型ラットと *gpt delta* ラットの DEN 誘発遺伝毒性を比較するため、肝臓の前がん病変である GST-P 陽性巣の数および面積を解析した。2 週投与では細胞数個以上の GST-P 陽性巣がほとんど見られなかったため、本研究では陽性巣と判定するための細胞数に閾値を設けず、1 細胞であっても陽性とカウントした。F344 系、SD 系ともに、野生型ラット、*gpt delta* ラットいずれにおいても全ての投与期間において最高用量群で対照群と比較して有意な GST-P 陽性巣数の増加が認められ、投与期間に比例して陽性巣数の増加が認められた (図 7A)。GST-P 陽性巣の面積は数に比べてばらつきが大きく、最高用量群でも対照群と比較して統計上の有意差がつかない群があったが、全体としては GST-P 陽性巣数と同様に、最高用量群で有意な増加または増加傾向が見られた (図 7B)。また同一条件の *gpt delta* ラットと野生型ラットの間では GST-P 陽性巣の数および面積いずれも有意な差はみられなかった。

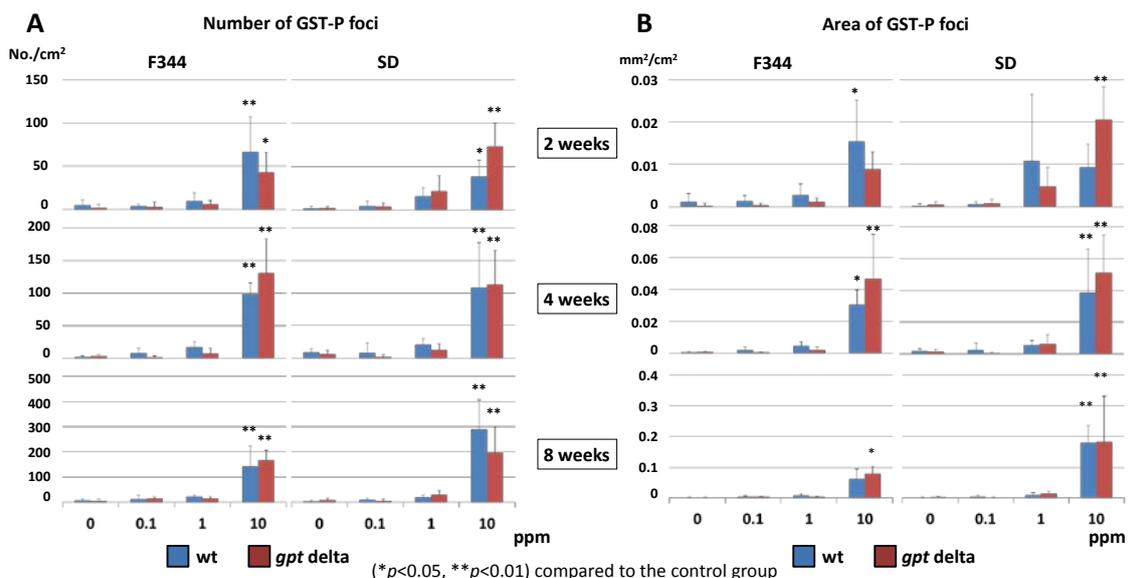


図 3. DEN 投与ラット肝臓における GST-P 陽性巣数および面積

F344系、SD系いずれの系統の *gpt delta* ラットも、DEN 投与による体重、臓器重量、血液生化学等の変化は見られなかった。DEHP 投与では最高用量群（1.2%）で体重減少、肝および腎相対重量の増加、血清アルブミンおよび A/G 比、ALP の増加が見られた。体重減少傾向は全てのラットで見られたものの F344 系より SD 系ラットでより顕著で、SD 系 *gpt delta* ラットは野生型ラットよりもより顕著な傾向が見られた。これは本試験では *gpt delta* ラットと野生型ラットは同腹の動物ではなく、SD 系 *gpt delta* ラットは野生型ラットより初期体重が低かったものの投与 8 週目（14 週齢）では同程度となったこと、すなわち体重増加率が野生型よりも高かったことから体重増加抑制の影響を受けやすかったためであると推測される。一方、肝および腎相対重量の増加、血清アルブミンおよび A/G 比、ALP の増加についてはどちらの系統でも *gpt delta* ラットと野生型ラットで同程度の変化が見られた。これらの結果から、特に SD 系では *gpt delta* ラットと野生型ラットの初期体重差が大きかったため体重に関連する指標については野生型ラットよりも顕著な影響を受けた可能性があるが、その他の一般毒性については F344 系、SD 系ともに *gpt delta* ラットは野生型と同程度の反応を示すことが示唆された。遺伝毒性については遺伝毒性肝発がん物質である DEN の投与により全濃度（0.1~10 ppm）、全期間（2, 4, 8 週）において F344 系と SD 系の *gpt delta* ラットはほぼ同程度の *gpt* 遺伝子突然変異頻度および *Spi* 変異体頻度の上昇を示し、非遺伝毒性肝発がん物質である DEHP の投与ではいずれのラットも *gpt* 遺伝子突然変異頻度および *Spi* 変異体頻度の変動は見られなかった。また *gpt delta* ラットは DEN 投与により肝臓の前がん病変である GST-P 陽性巣を全濃度、全期間において野生型ラットと同程度に発現した。以上の結果から *gpt delta* ラットは F344 系、SD 系ともに野生型ラットとほぼ同程度の一般毒性および遺伝毒性を示すと考えられ、これらのラットを用いた反復投与毒性・遺伝毒性併合試験法が実施可能であることが示唆された。

投与期間について検討すると、1.2% DEHP 投与による一般毒性は肝臓および腎臓の重量増加と、血清アルブミン、A/G 比の上昇が全期間を通じてほぼ同程度認められ、一方で有意な体重減少は 3 週以降、ALP の増加は 8 週で観察された。ただし ALP の増加は 8 週において最大の SD 系野生型ラットでも 1.6 倍と軽度であった。10 ppm DEN 投与による遺伝毒性は *gpt* 遺伝子突然変異頻度と *Spi* 変異体頻度の上昇、GST-P 陽性巣数および面積の増加が 2 週から有意に認められ、投与期間に比例してさらなる上昇、増加が見られた。ただし、*gpt* 遺伝子突然変異頻度については 4 週と 8 週では大きな違いは見られなかった。

これらの結果から、被験物質を適切な量で投与すれば主要な一般毒性および遺伝毒性を 2~4 週間の投与で検出可能であることが示唆された。4 週間の反復投与毒性試験はすでに化審法で採用されて広く用いられており、同じ投与期間であれば過去のデータとの比較検討も容易であること等の利点も考慮すると、4 週間の投与期間で *gpt delta* ラットを用いた反復投与毒性・遺伝毒性併合試験法が実施可能であると示唆されたことは本試験法の普及において重要であると考えられる。

（2）研究項目名：*gpt delta* ラットの一般毒性検索系としての妥当性の検討（研究担当者名：梅村隆志 所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所 病理部）

DEN の用量を 0、0.1、1 または 10 ppm の濃度で 13 週間飲水投与した結果、F344 系 *gpt delta* ラットおよびその背景系統である F344 系ラットともに DEN 投与に起因する一般状態の変化、摂餌量、体重および臓器重量の変化は認められなかった。血液学的検査および血清生化学的検査の結果、F344 系 *gpt delta* ラットおよび F344 系ラットともに DEN の投与に起因する毒性学的意義のある変化は認められなかった。肝臓の病理組織学的検索の結果、DEN 投与群において肝細胞の単細胞壊死や好塩基性変異肝細胞巢の発生が認められたが、その発生頻度は両遺伝子型間で差異は認められなかった。DEN の肝発がん性の差異の有無を検討するために、肝臓を用いて肝前がん病変である GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を行った結果、両遺伝子型とも GST-P 陽性細胞巢の数、面積ともに 10 ppm 投与群において対照群に比較し有意な高値を示したが、その程度は同程度であった。以上の結果から、DEN の毒性および発がん性に対する F344 系 *gpt delta* ラットおよび F344 系ラット間の特異的な差異はないと考えられた。

フランを 0、0.1、1 または 10 mg/kg 体重/day (1 日 1 回週 5 日) の用量で、13 週間強制経口投与した結果、F344 系ラットにおいてフラン投与に起因する一般状態、摂餌量および体重の変化は認められなかった。血液学的検査の結果、F344 系ラットの 10 mg/kg 体重投与群において、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット値の有意な低値および平均赤血球容積、平均赤血球血色素量および血小板数の有意な高値が認められた。臓器重量では、F344 系ラットの肝臓、脾臓の絶対・相対重量の有意な高値および腎臓、脳および精巣の相対重量の高値が認められた。一方、F344 系 *gpt delta* ラットを用いたフラン反復投与毒性試験は、実験 6 週目に起きた動物飼育上の事故により実験の継続が困難となったため、中止した。そのため、今回の研究では、フラン投与に起因する毒性変化に対する感受性を遺伝子型間で同一実験条件下では比較することはできなかったが、過去に我々が実施した F344 系雄 *gpt delta* ラットを用いたフラン反復投与実験 (2 または 8 mg/kg 体重、1 日 1 回週 5 日 13 週間強制経口投与) 結果を用いて両遺伝子型間の比較を行った。その結果、F344 系雄 *gpt delta* ラットの高用量群においても、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量および血小板数の有意な高値および肝臓・脾臓・腎臓の相対臓器重量の高値が認められていることから、フラン投与に起因したこれら変化に対する両遺伝子型間の感受性に差異はないことが考えられた。さらに、F344 系 *gpt delta* ラット肝臓では、病理組織学的に胆管線維症、胆管増生ならびに卵円形細胞増生が用量相関性を持って高頻度に認められていたことから、本研究においても病理組織学的な検索を加えることでフランに対する両遺伝子型間の毒性感受性の比較はある程度可能であると考えられた。

以上、DEN ならびにフランを用いた 13 週間反復毒性試験の結果から、F344 系 *gpt delta* ラットおよび F344 系ラットにおいて DEN の毒性および発がん性に対する遺伝子型間の特異的な差異はないと考えられた。また、フランについても特段の差異はない可能性が示された。

(3) 研究項目名 : *gpt delta* ラットにおける遺伝子変異と誘発病変内遺伝子変異の比較
(研究担当者名 : 梅村隆志 所属機関名 : 国立医薬品食品衛生研究所 病理部)

雄性 F344 系 *gpt delta* ラットに DEN を 40 mg/kg 体重の用量で、週 1 回、5 週間腹腔内投与または MelQx を 300 ppm の濃度で 5 週間混餌投与したラット肝臓における *gpt* アッセイの結果、DEN および MelQx 投与群における *gpt* 遺伝子変異体頻度 (MF) は対照群に比較して有意な高値を示した。*gpt* 遺伝子突然変異体のスペクトラム解析の結果、DEN 投与群では、A:T to T:A、A:T to C:G transversion および G:C to A:T、A:T to G:C transition 変異頻度が対照群に比較して有意に上昇した。これらの変異が変異全体に占める割合はそれぞれ A:T to T:A (35.7%)、A:T to C:G (12.2%)、G:C to A:T (20.4%)、A:T to G:C (18.4%)であった。また、MelQx 投与群では G:C to T:A transversion および 1 塩基欠失変異が対照群に比較して有意に高頻度に認められ、これらの変異が変異全体に占める割合は G:C to T:A (47.9%)、1 塩基欠失(29.4%)であった。

DEN または MelQx 投与後、PB 投与により発生した肝前がん病変内のがん遺伝子の変異解析を目的に、*K-ras* 遺伝子 (exon 2)を対象にした PCR および direct sequence 法による塩基配列解析を行い遺伝子変異の検索を行った。DEN + PB 群のラット 2 例から、それぞれ 10 個の GST-P 陽性細胞巢および GST-P 陰性領域の DNA を抽出し、解析を実施したところ、GST-P 陽性細胞巢において *K-ras* codon 61 の変異が 1 例で認められ、その変異パターンは、*gpt* 上に DEN 投与で高頻度に認められた変異パターンの 1 つである A:T to C:G 変異であった。GST-P 陰性領域においては、*K-ras* (exon 2)に遺伝子変異は認められなかった。また、*K-ras* 遺伝子 (exon 1)および β -catenin (exon 3)を標的とした遺伝子変異検索を実施したが、今回の検討ではマイクロダイセクション標本からの DNA 抽出法や PCR 条件の最適化が出来ず、今後の検討課題となった。さらに、MelQx + PB 群において認められた GST-P 陽性細胞巢は、DEN + PB 群で認められた GST-P 陽性細胞巢に比較して数、面積ともに小さく、DNA 抽出や PCR を実施するための充分量のサンプルをマイクロダイセクションにより採取することが困難であったことから、観察時期を遅らせるなどの工夫が必要であると考えられた。

以上、DEN + PB 群において認められた *K-ras* 遺伝子の変異パターンは、*gpt* アッセイの変異スペクトラム解析で明らかとなった *gpt* 遺伝子上の遺伝子変異と一致するものであったことから、*gpt* 遺伝子上の遺伝子変異ががん遺伝子上の遺伝子変異と相関する可能性が示唆された。しかし、今回の実験条件では検出できるがん遺伝子の変異頻度が低く、さらに複数の発がん物質での検討や他のいくつかのがん遺伝子での解析ができなかったことから、サンプル採取の時期、DNA 抽出法や PCR 条件の最適化の検討が必要であると考えられた。

(4) 研究項目名 : *gpt delta* ラットの詳細なレポーター遺伝子変異の解析 (研究担当者名 : 増村健一 所属機関名 : 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部)

雄F344 *gpt delta*ラットの肝臓からゲノムDNAを精製し、断片化して網羅的シーケンス解析を行った。インサートの両末端50塩基の解析を行い、約9.9億リードを得た。導入遺伝子 λ EG10の参照配列 (48 kb) に対してマッピングを行った後、インサートの片側のみが導入遺伝子配列にマッピングされたリードを抽出した。さらに、メイトペアの逆側となるリードをラットゲノム参照配列に対してマッピングした。ゲノム配列上の1箇所のみマッ

ピングされるリードの分布を集計したところ、4番染色体の79~80 Mbに単一のピークが得られた。各リードの位置情報から、ゲノムの約72 kbの範囲内に導入遺伝子が挿入されていると推定された。挿入位置近傍のラットゲノム側と λ EG10側にPCRプライマーを設定し、PCR増幅産物をシーケンスして挿入部位の最終配列を決定した。導入遺伝子によってラットゲノム配列は71,789塩基分が欠失し、欠失領域中には1遺伝子（Snx10: sorting nexin 10）が存在した。*gpt delta*ラットの入遺伝子の有無を判定するためのgenotyping用プライマーを設計した。導入遺伝子にマッピングされたリード数からレポーター遺伝子のコピー数を算出した。導入遺伝子配列とラットゲノム配列に片側ずつマッピングされるメイトペア数は上流側で95、下流側で59、平均77であった。一方、両側が導入遺伝子にマッピングされるメイトペア数の塩基あたりの平均値はおよそ819であった。従って導入コピー数は $819/77 \approx 11$ と算出された。ただし、基準となる塩基の位置によって計算誤差が大きく、導入遺伝子の断片化等が明らかになったため、正確なコピー数の確定には至らなかった。

104週齢のF344 *gpt delta*ラット雌雄の肝臓からゲノムDNAを抽出し、*gpt*遺伝子点突然変異体頻度の測定を行った。対照群として19週齢のF344 *gpt delta*ラットにおいて同様に点突然変異頻度を測定した。19週齢の肝臓の点突然変異頻度は、雄で 2.4×10^{-6} 、雌で 2.5×10^{-6} であり、雌雄差はみられなかった。104週齢の肝臓における点突然変異頻度は、雄で 8.0×10^{-6} 、雌で 6.0×10^{-6} であり、有意差はないものの雄で若干高い傾向が認められた。104週齢の肝臓では19週齢と比較して点突然変異頻度が約3倍有意に高く、肝臓において自然突然変異が加齢に伴い蓄積することが示された。点突然変異に関するシーケンス解析の結果、主な自然突然変異のタイプはCpG部位におけるG:C to A:T変異であった。変異スペクトルは19週齢及び104週齢で共通の特徴を示したが、104週齢の雄のみでG:C to T:A変異の増加が認められた。同一個体サンプルから同一変異体が複数得られた場合、これらは突然変異を持った細胞が分裂したクローンの可能性があるため、自然突然変異の蓄積におけるクローナル変異の影響を検討した。突然変異体頻度（クローナル変異を含む）と突然変異頻度（クローナル変異を含まない）を比較した結果、104週齢におけるクローナル変異の影響は雄で15%、雌で14%であり、一方、19週齢では雄で9%、雌で5%であった。このことは、加齢に伴いクローナル変異がわずかに増加する可能性を示唆しているが、その程度はわずかであり、検出された点突然変異のほとんどが独立した変異であることが示された。さらに、Spi欠失変異頻度の測定を行った。19週齢の肝臓の欠失変異体頻度は、雄で 4.1×10^{-6} 、雌で 5.5×10^{-6} であり、雌雄差はみられなかった。104週齢の肝臓における欠失変異体頻度は、雄で 8.2×10^{-6} 、雌で 3.7×10^{-6} であり、104週齢の雄で欠失変異頻度が約2倍有意に高かった。欠失変異のシーケンス解析の結果、19週齢における主な変異タイプは1塩基欠失であった。104週齢では1塩基欠失の比率は減少し、一方で2塩基~数kbの欠失変異の比率が増加した。シーケンスした変異体数が限られるものの、これらの特徴は雌雄に共通してみられた。

*gpt delta*ラットの系統別背景データの取得のため、3系統の*gpt delta*ラット（SD、F344およびWistar Hannover）について19週齢雄個体の肝臓における突然変異頻度の測定を行った。肝臓の*gpt*点突然変異頻度は、それぞれ 2.4×10^{-6} （F344）、 2.5×10^{-6} （SD）および 3.0×10^{-6} （Wistar Hannover）であり、系統差はみられなかった。主な自然突然変異の

タイプはCpG部位におけるG:C to A:T変異およびG:C to T:A変異であり、変異スペクトルの特徴は共通であった。また、Spi欠失変異頻度は、それぞれ 4.1×10^{-6} (F344)、 3.5×10^{-6} (SD) および 5.1×10^{-6} (Wistar Hannover) であり、系統差はみられなかった。G:C塩基対およびA:T塩基対の1塩基欠失、2塩基～数kbの欠失変異が主に見られたが、明らかな系統差は認められなかった。

遺伝毒性試験用*gpt delta*ラットは突然変異検出用レポーター遺伝子AEG10が4番染色体に約10コピー導入されたトランスジェニックラットである。挿入部位ではラットゲノムが約72kb欠失しており、欠失領域には機能未知の1遺伝子が含まれることがわかった。トランスジェニックラットの生物学的同等性を考える上で重要な知見である。なお、*gpt delta*ラットはヘテロ体で系統維持されており、遺伝毒性試験に使用する際の影響は認められていない。*gpt delta*ラットの自然突然変異（点突然変異および欠失変異）の特徴について肝臓を用いて評価した。肝臓における点突然変異は19週齢と比較して104週齢では2～3倍増加し、点突然変異の加齢による蓄積が認められた。19週齢では雌雄差がみられなかったのに対して、104週齢では雄でG:C to T:A変異の増加が認められた。G:C to T:A変異は酸化的DNA損傷によって誘発される変異の一つと考えられている。欠失変異は、104週齢の雄のみ変異頻度が約2倍有意に高かった。104週齢では2塩基～数kbの欠失変異が増加する傾向がみられた。104週齢時には雄の生存率が雌より低く、雄で老化の影響がより顕著に表れていると考えられる。老齢個体において、生体の機能低下によって内因性変異原の増加や修復能の低下が生じ、酸化的DNA損傷等を介してG:C to T:A変異や欠失変異が増加する可能性が示唆された。自然突然変異におけるクロナル変異の影響を検討した結果、加齢に伴い蓄積する点突然変異の大部分は独立した変異であり、突然変異頻度の評価におけるクロナル変異の影響は限定的であることが示唆された。ただし、特定個体のみが高い変異頻度を示すいわゆるjackpot変異については別の配慮が必要と考えられる。系統別背景データ取得のため、3系統の*gpt delta*ラット (SD、F344およびWistar Hannover) について19週齢雄の肝臓の突然変異頻度を測定した結果、点突然変異、欠失変異ともに同等の値を示した。シーケンスした変異体数が限られるものの、検出された変異の特徴に明らかな系統差は認められなかった。3系統の*gpt delta*ラットはバッククロスで作られているため、同一のレポーター遺伝子をゲノムの同じ部位に持っている。今回の結果から、3系統のラットにおける自然突然変異の特徴に明らかな差はないことが示唆された。

III 本研究を基に発表した論文等

1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト

該当なし

2 本研究を基にした学会発表の実績

赤木純一、曹永晩、豊田武士、大波冴子、水田保子、鈴木勇、能美健彦、西川秋佳、小川久美子. *gpt delta* ラットを用いた反復投与毒性・遺伝毒性併合試験法の妥当性について. 第36回日本分子生物学会年会 神戸 (2013.12)

赤木純一、曹永晩、豊田武士、大波冴子、水田保子、鈴木勇、能美健彦、西川秋佳、小川久美子. F344系およびSD系*gpt delta*ラットを用いた反復投与毒性・遺伝毒性併合

試験法の標準化研究. 第 30 回日本毒性病理学会年次学術集会 徳島 (2014.1)
赤木純一、曹永晩、豊田武士、大波冴子、水田保子、鈴木勇、能美健彦、西川秋佳、小川久美子. 遺伝毒性肝発がん物質 DEN と非遺伝毒性肝発がん物質 DEHP の投与による『*gpt delta* ラットを用いた反復投与毒性・遺伝毒性併合試験法』の標準化研究. 平成 25 年度個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ 大津 (2014.2)
高須伸二、石井雄二、松下幸平、黒田顕、木島綾希、横尾諭、能美健彦、小川久美子、梅村隆志. F344 系 *gpt delta* ラットおよび F344 系ラットにおける DEN の一般毒性および肝発がん性の比較. 第 30 回日本毒性病理学会学術集会 徳島 (2014.1)
増村健一、豊田尚美、石井雄二、梅村隆志、能美健彦、西川秋佳、本間正充. *gpt delta* ラット肝臓における自然突然変異および加齢に伴う変異蓄積の検討. 第72回日本癌学会学術総会 横浜 (2013.10)
K. Masumura, N. Toyoda-Hokaiwado, N. Osugi, Y. Ishii, T. Umemura, H. Takagi, A. Nishikawa, T. Nohmi, M. Honma, Spontaneous point mutations and deletion increased with aging in *gpt delta* transgenic mice and rats, 11th International Conference on Environmental Mutagens, Brazil (2013.11)

3 特許及び特許出願の数と概要

該当なし

4 その他 (各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等)

該当なし

IV 主任研究者による研究全体の自己評価

項目	評価結果	評価コメント
1 研究の妥当性	5	
2 研究目標の達成度	4	
3 研究成果の有用性	5	
合計	14	
総合コメント		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述する。