

gpt delta マウス、ラット遺伝子突然変異試験



***gpt delta* マウス**
(C57BL/6J)



***gpt delta* ラット**
(S.D., F344, Wistar-Hannover)

1

変異原性

Mutagenicity

娘細胞あるいは次世代に**伝わる**遺伝情報の変化(例えば突然変異)を誘発する化学物質や物理的因子の性質

遺伝毒性

Genotoxicity

より広義の変異原性。必ずしも娘細胞や次世代には**伝わらない**DNAや染色体の変化(例えばDNA損傷)も含め、DNAや染色体の構造に変化を誘発する化学物質や物理的因子の性質

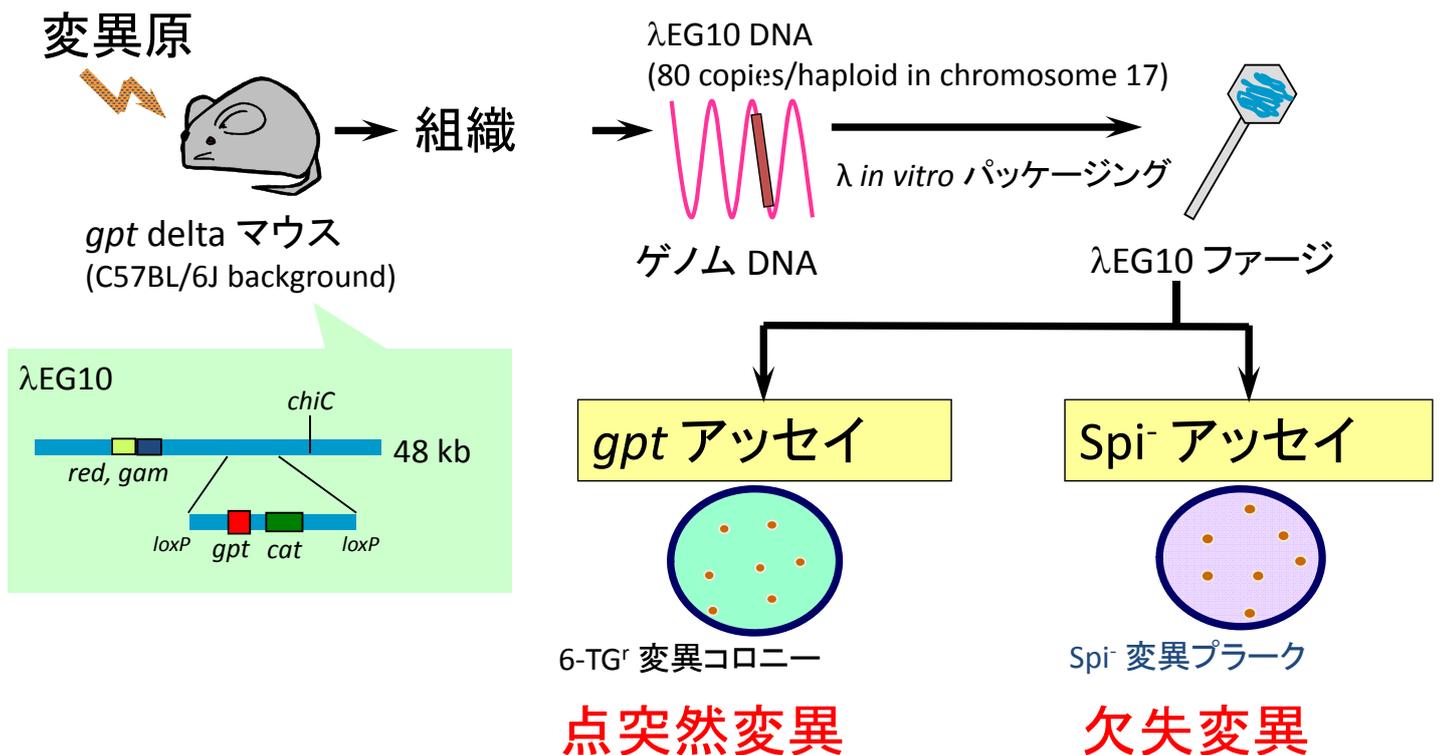
「遺伝毒性発がん物質の作用に閾値はない」と言われるが、本来は「DNAと反応して変異原性を示す発がん物質には閾値がない」とすべき

2

代表的な遺伝毒性試験

	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
変異原性試験 遺伝子突然変異 染色体異常	細菌を用いる復帰突然変異試験 哺乳類細胞を用いる遺伝子突然変異試験 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験 小核試験	トランスジェニックマウス、ラット変異原性試験 マウススポット試験 ショウジョウバエ眼色復帰突然変異試験 小核試験 染色体異常試験
インディケーター試験 DNA付加体検出 DNA損傷と致死 DNA損傷と遺伝子発現 DNA鎖切断 DNA鎖切断 染色体異常 DNA損傷と修復	³² Pポストラベル法 Rec アッセイ SOS試験 アルカリ溶出法 コメットアッセイ 姉妹染色分体交換(SCE)試験 不定期DNA合成(UDS)試験	³² Pポストラベル法 アルカリ溶出法 コメットアッセイ 姉妹染色分体交換(SCE)試験 不定期DNA合成(UDS)試験
生殖細胞遺伝毒性試験 遺伝子突然変異 染色体異常		マウス特定座位試験 ショウジョウバエを用いる伴性劣性致死試験 ESTR突然変異試験 優性致死試験 遺伝性転座試験
その他	細胞形質転換試験	3

gpt delta トランスジェニックマウス変異検出系



Nohmi et al., Environ. Mol. Mutagen., 28, 465-470 (1996)

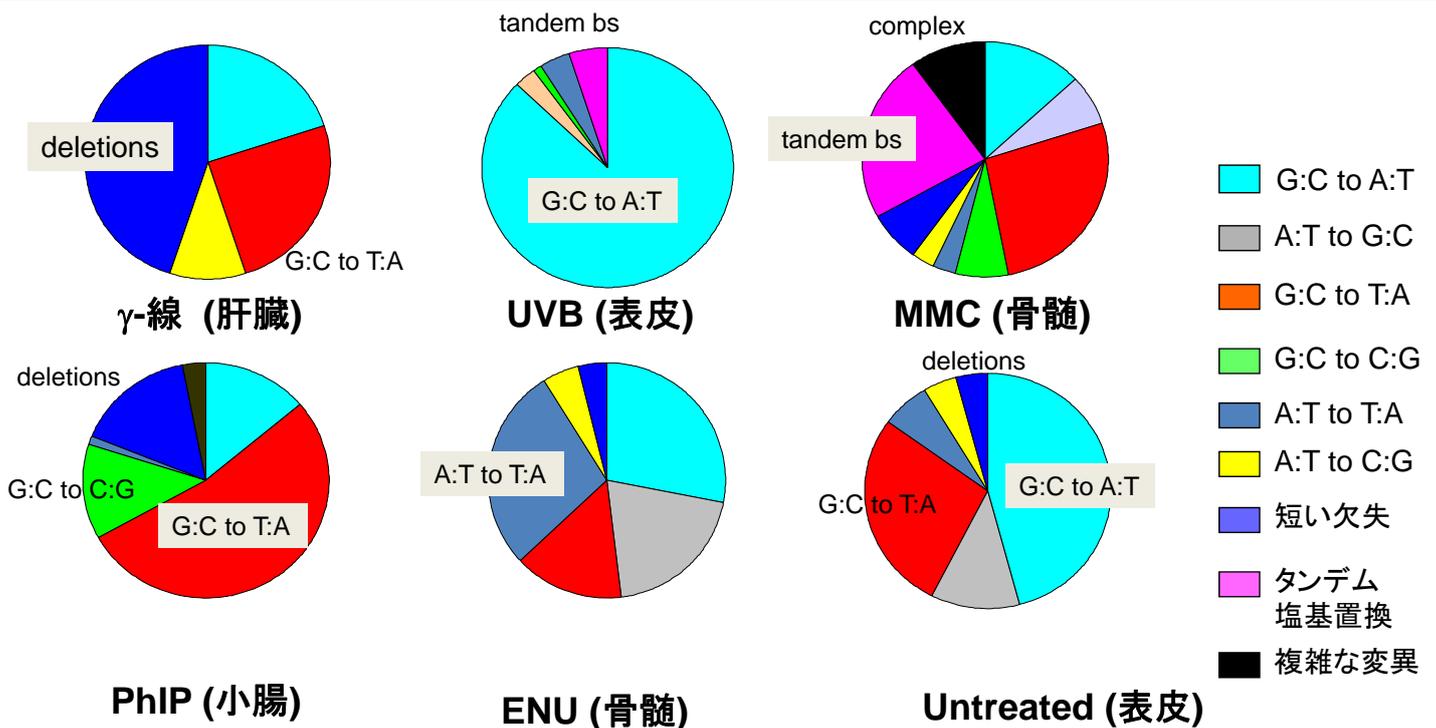
Nohmi et al., Mutat. Res., 455, 191-215 (2000)

大腸菌 *gpt* 遺伝子

- 大腸菌 *gpt* 変異体は6-thioguanine を用いてポジティブに選択できる(6-TG selection)
- 大腸菌 *gpt* 遺伝子のコード領域は456 塩基対
- 大腸菌 *gpt* 遺伝子が導入されたチャイニーズハムスターAS52細胞は *in vitro* 遺伝毒性試験に汎用されている

5

gpt 点突然変異のスペクトル

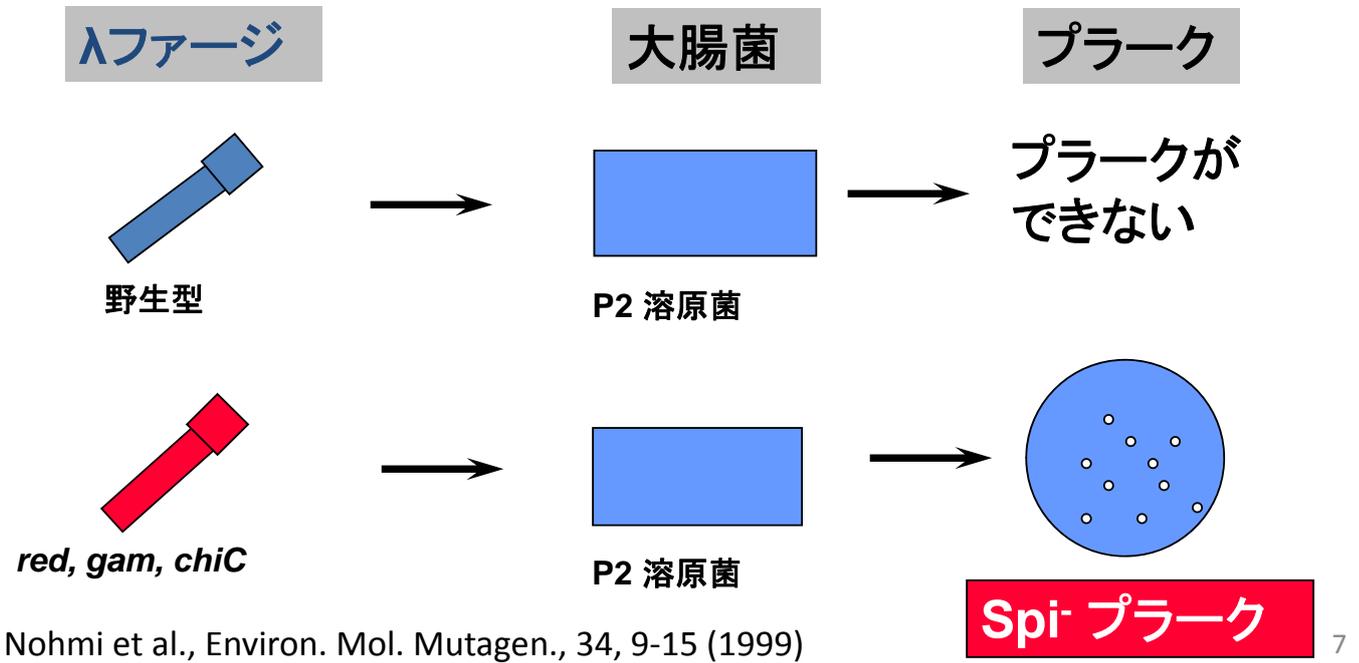


Nohmi and Masumura, Adv. Biophysics, 38, 97-121 (2004)

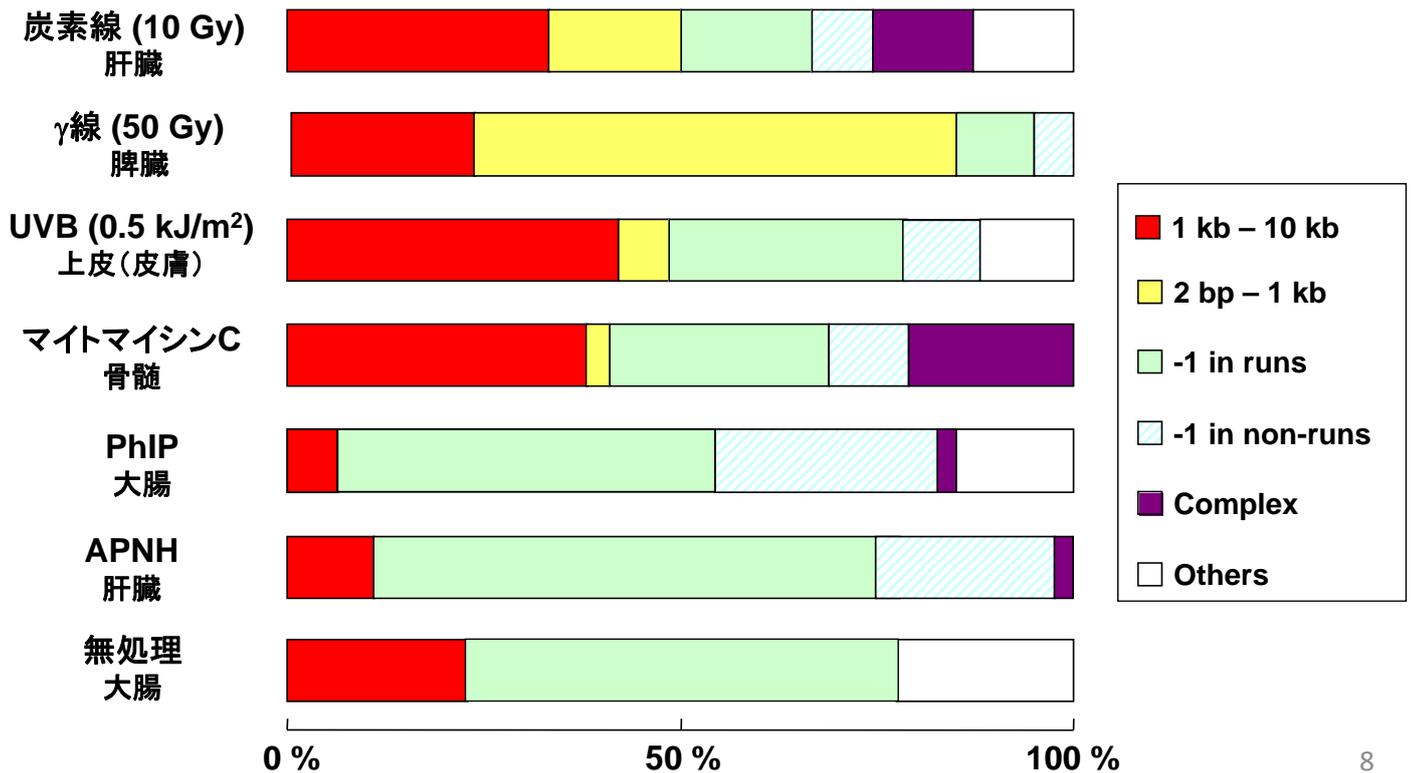
Nohmi and Masumura, Environ. Mol. Mutagen., 45, 150-161 (2005)

6

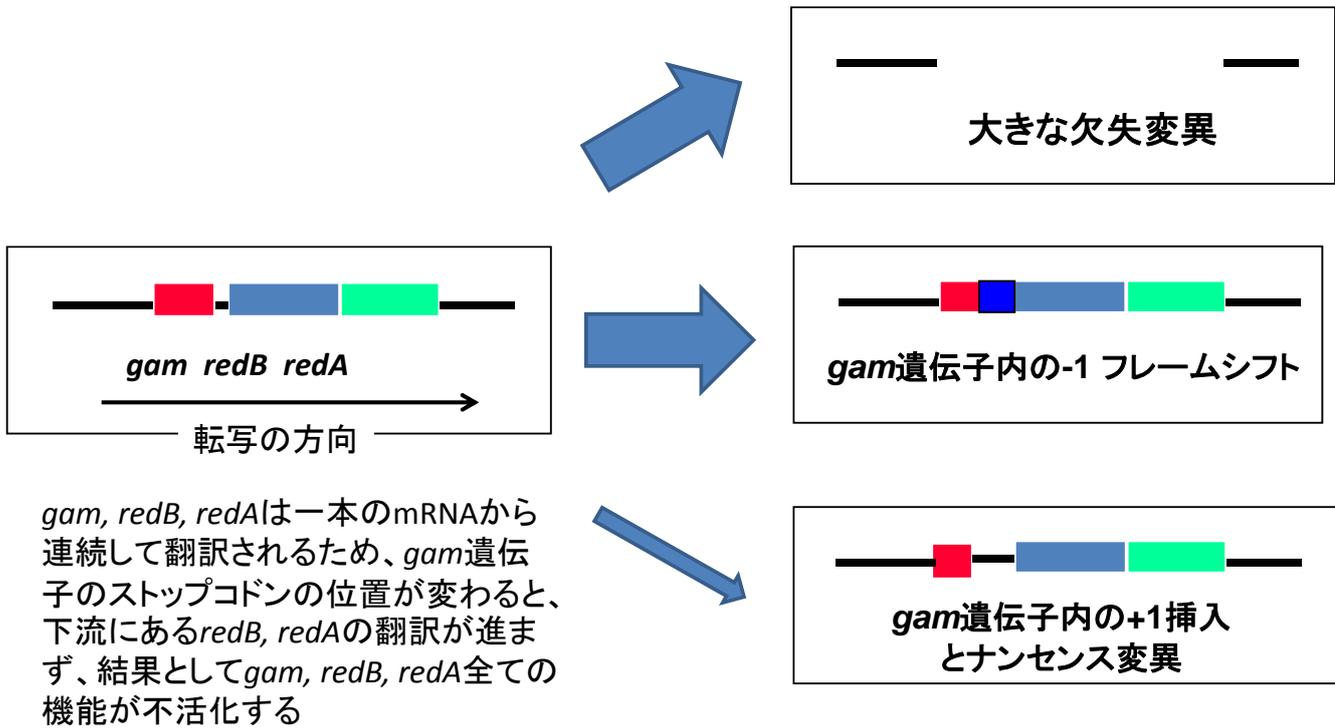
Spi⁻ (Sensitive to P2 Interference) 選択法



Spi⁻ 欠失変異のスペクトル

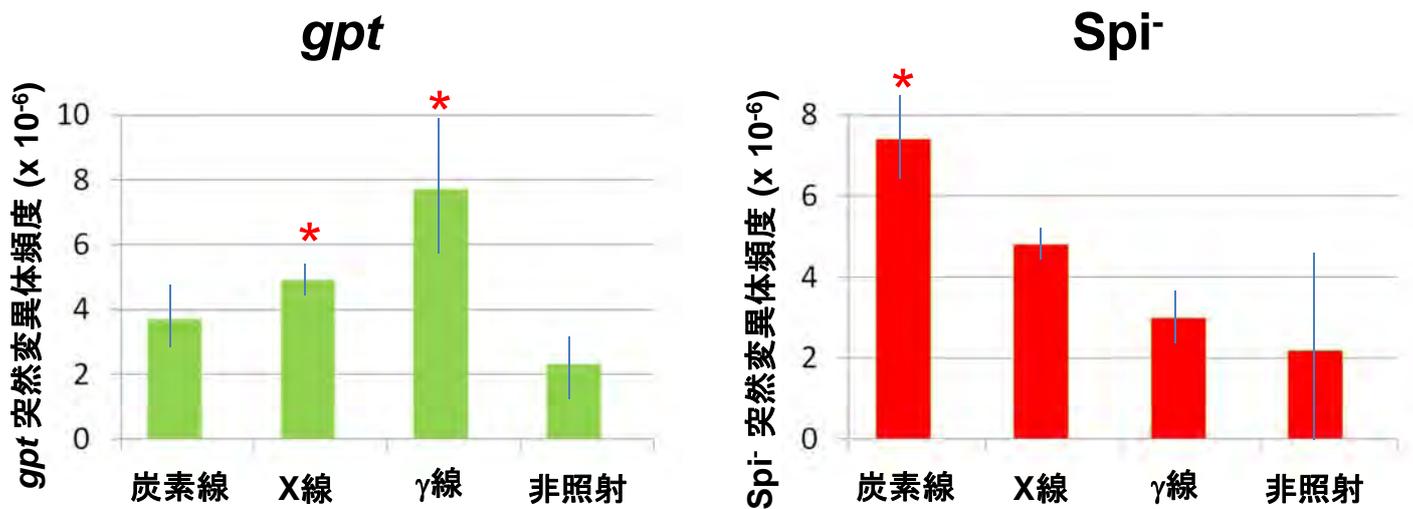


Spi⁻ アッセイで検出される変異の種類



9

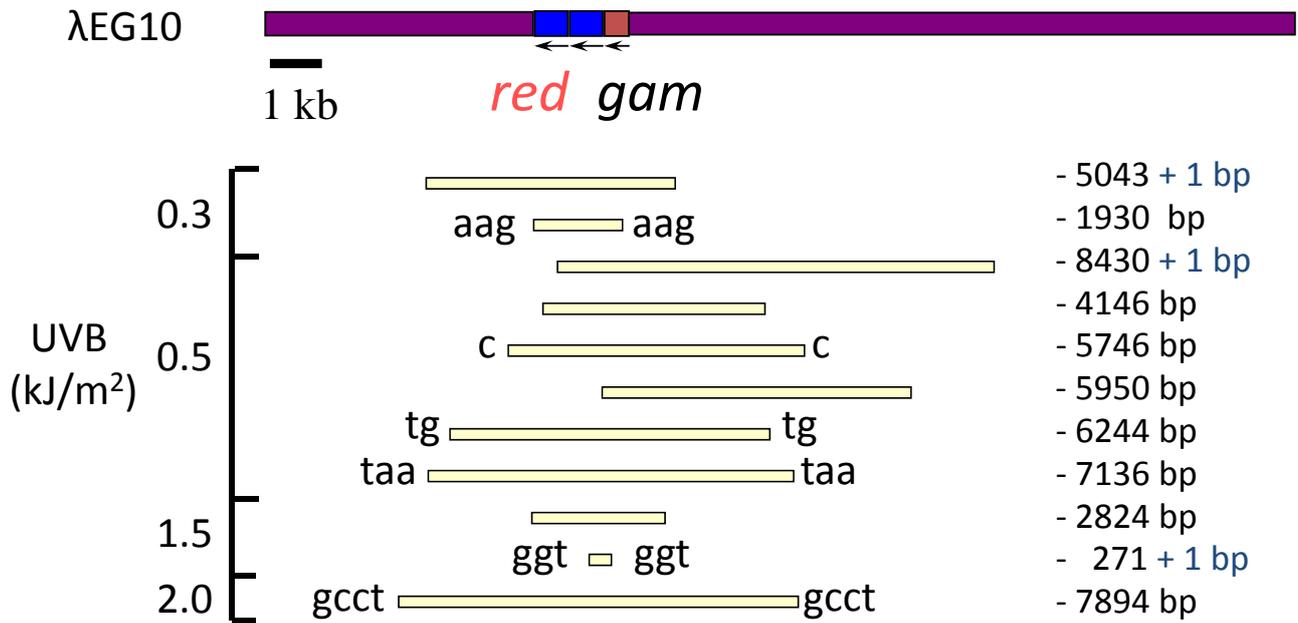
炭素線照射はSpi⁻ 変異体頻度のみを有意に上昇させる



* P < 0.05

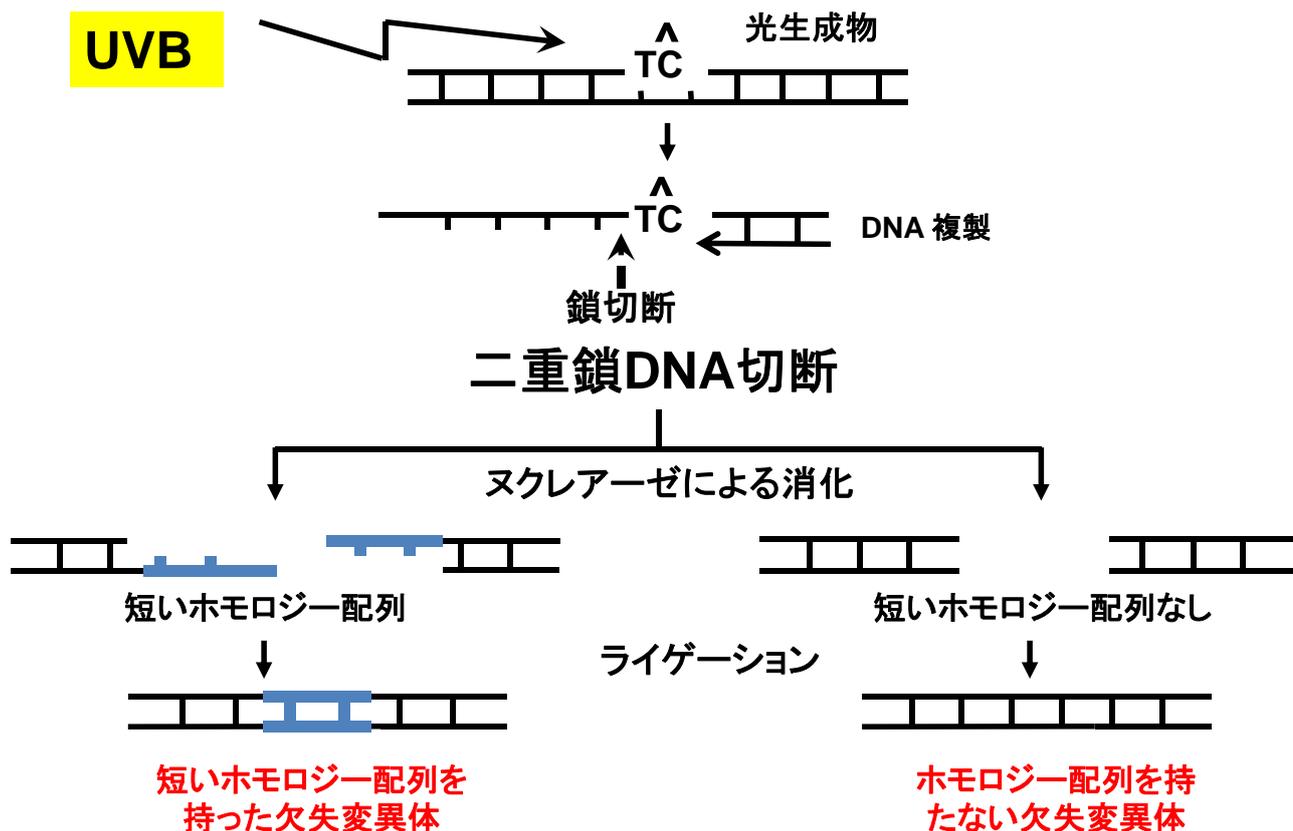
Masumura et al., Environ. Mol. Mutagen., 40, 207-215, 2002

UVB照射によって誘発される大きな欠失



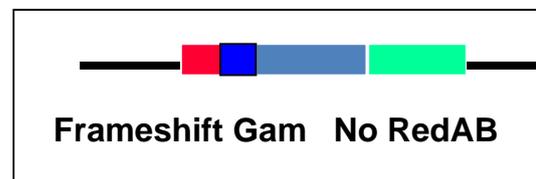
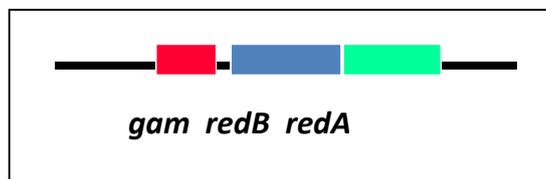
Horiguchi et al., Cancer Res., 61, 3913-3918, 2001

UVB照射による欠失変異誘発のメカニズム



Spi- 変異体の-1フレームシフトの多くは連続した塩基部分で起こる

AAAAAA	→	AAAAA	1 mutants
AAAAA	→	AAAA	4 mutants
GGGG	→	GGG	1 mutant
CC	→	C	1 mutant
tgCAtc	→	tgctc	1 mutant
cgGcag	→	cgcag	1 mutant



13

種特異的な発がん物質

ラットにのみ発がん性を示す物質

Azobenzene*
 Bromoform*
 Chlorothalonil
 Chlorowax
 Cytembena*
 N,N'-Diethylthiourea
 3,3'-Dimethoxybenzidine-4,4'-diisocyanate*
 Dimethyl morpholinophosphoramidate
 2,4-Dinitrotoluene*
 Malonaldehyde, Na salt
 Methyl carbamate
 Nickel subsulfide
 Nitrilotriacetic acid, 3Na, H₂O
 N-Nitrosodiphenylamine
 Pivalolactone*

* Ames positive

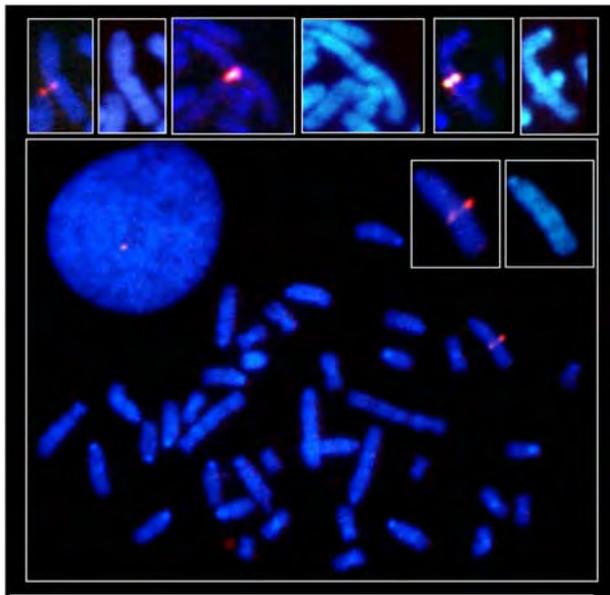
マウスにのみ発がん性を示す物質

2-Aminobiphenyl HCl*
 Benzaldehyde
 Bis(2-chloro-1-methylethyl)ether*
 Captan*
 Chlordane
 Chlorodibromomethane*
 4-Chloro-o-toluidine HCl
 5-Chloro-o-toluidine
 p,p'-DDE
 Diethanolamine
 Di(2-ethylhexyl)adipate
 N-Methylolacrylamide
 Methylphenidate HCl
 6-Nitrobenzimidazole*
 Ozone*
 Zearalenone

14

λEG10 DNAを導入したトランスジェニックラットの樹立

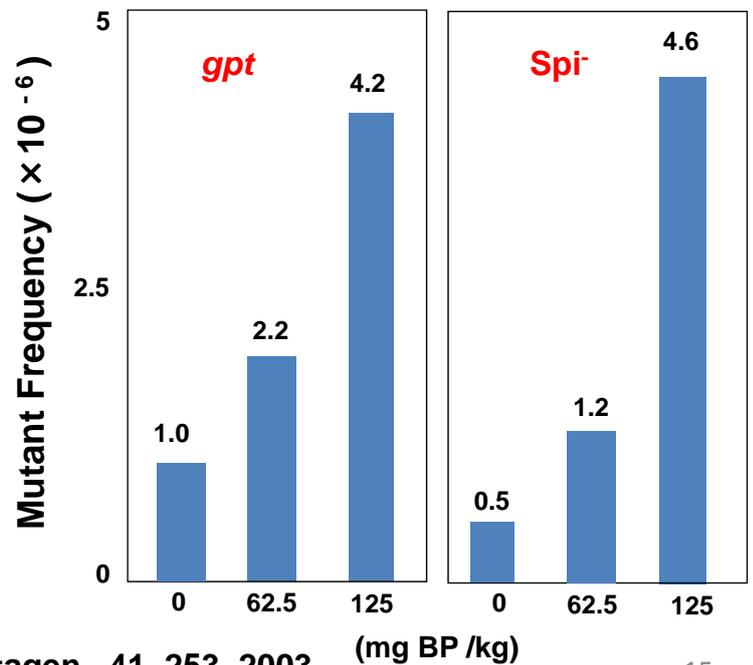
Sprague-Dawley background



Chromosome 4q24-q31

Hayashi et al., Env. Mol. Mutagen., 41, 253, 2003

Benzo[a]pyrene

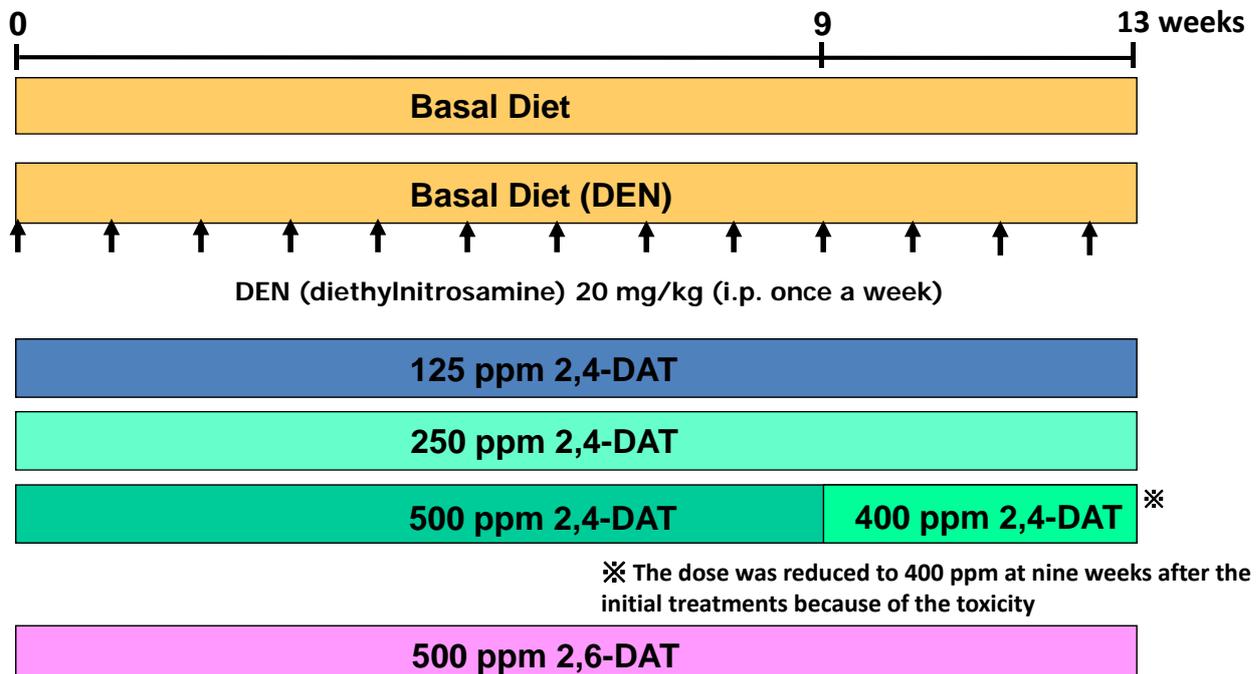


15

F344 *gpt* deltaラットを用いた *in vivo* 変異原性試験

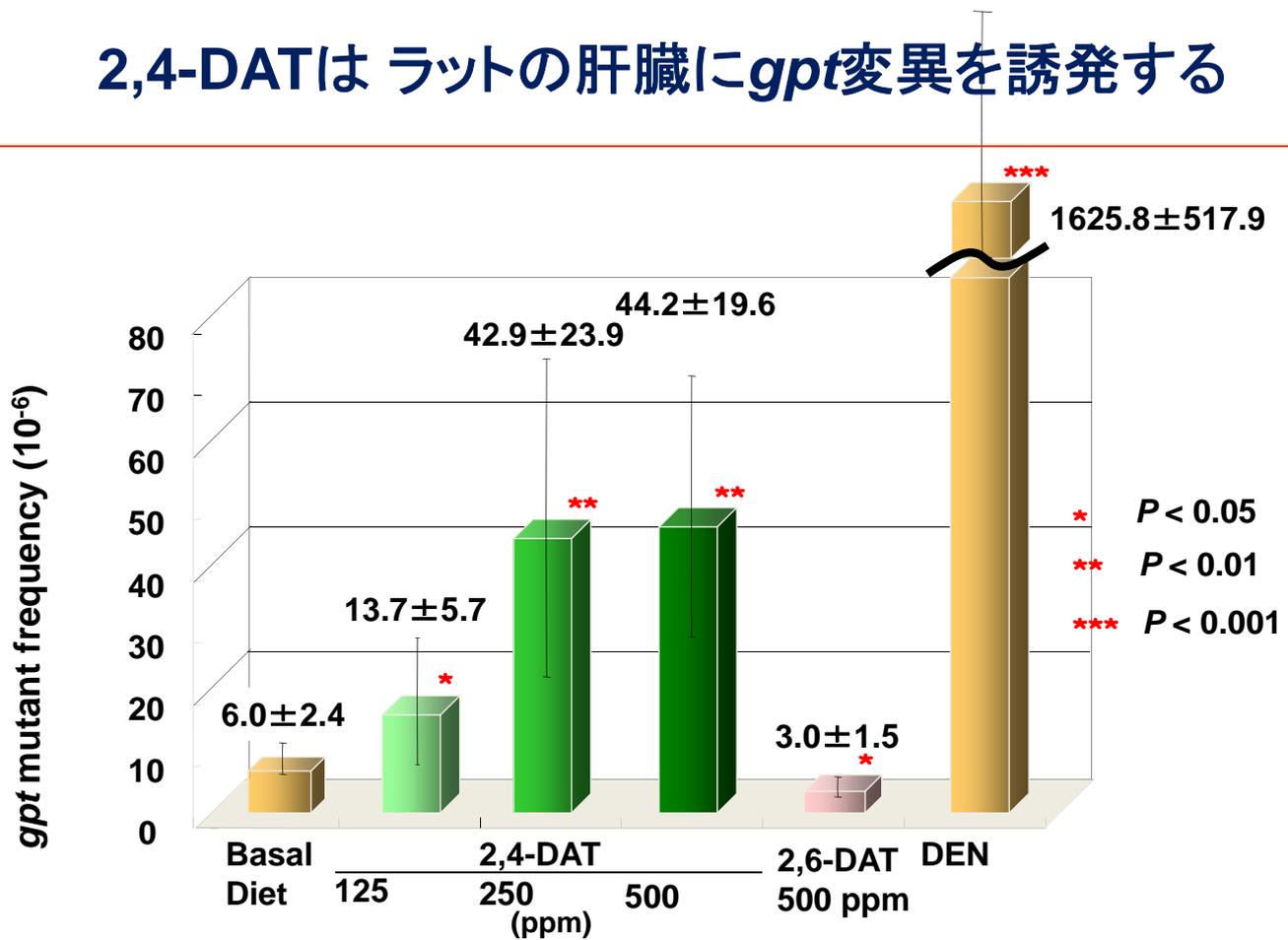
Toyoda-Hokaiwado, Toxicol. Sci., 114, 71-78 (2010)

Male F344 *gpt* delta rat 7 week old



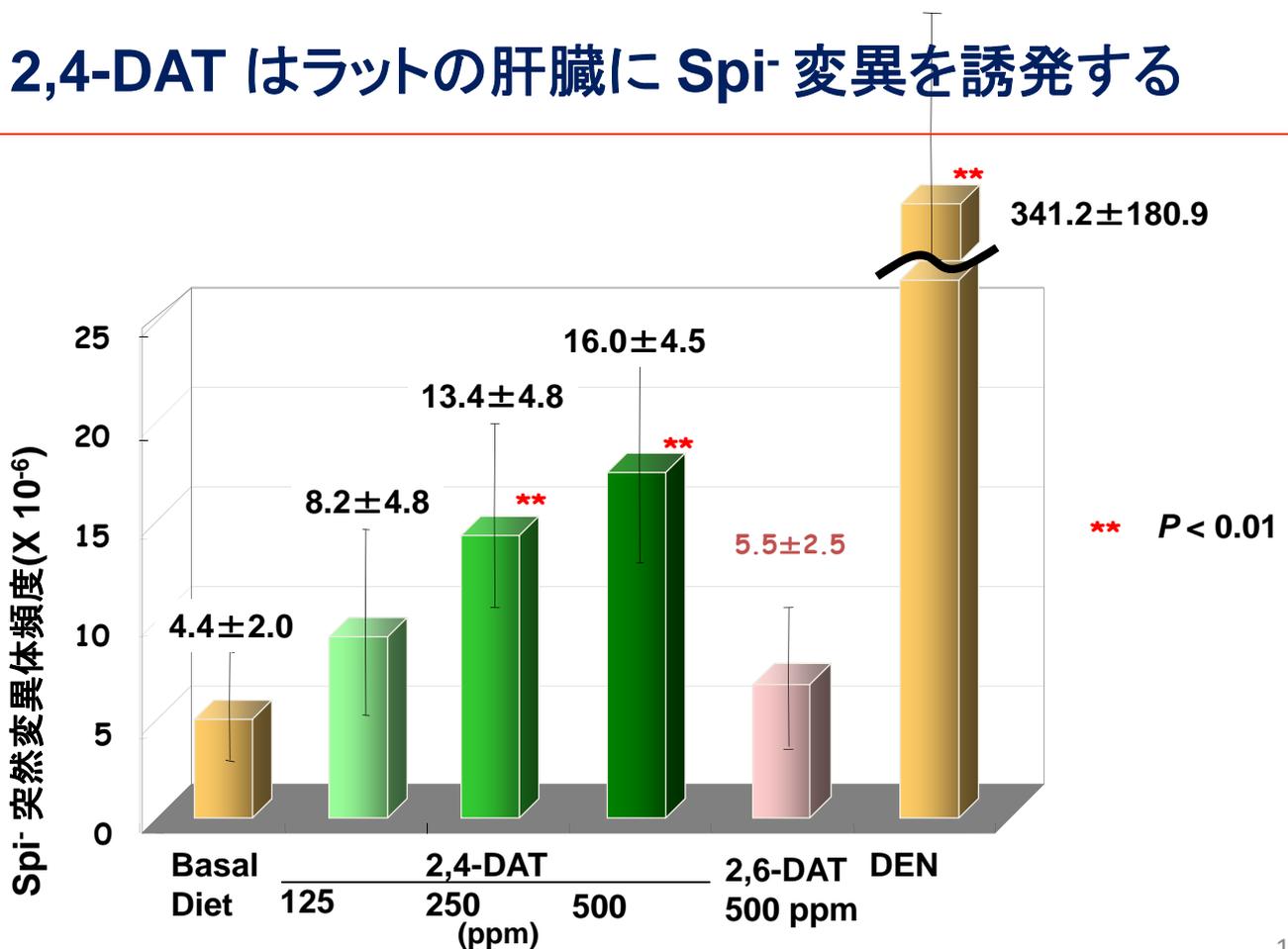
* The dose was reduced to 400 ppm at nine weeks after the initial treatments because of the toxicity

2,4-DATはラットの肝臓にgpt変異を誘発する



17

2,4-DATはラットの肝臓にSpi⁻変異を誘発する



18

2,4-DAT によって誘発される Spi⁻ 変異の多くは-1 フレームシフトである

	Basal diet			500 ppm 2,4-DAT		
	No.	%	SMF ^b (x10 ⁻⁶)	No.	%	SMF ^a (x10 ⁻⁶)
-1bp frameshift	12	60.0	2.66	15	71.4	11.41
GGGG → GGG	1	5.0	0.22	2	9.5	1.52
GGG → GG	1	5.0	0.22	0	0.0	0.00
GG → G	0	0.0	0.00	2	9.5	1.52
CCCC → CCC	0	0.0	0.00	2	9.5	1.52
CCC → CC	0	0.0	0.00	1	4.8	0.77
CC → C	1	5.0	0.22	1	4.8	0.77
C → del.	2	10.0	0.44	0	0.0	0.00
AAAAAA → AAAAA	3	15.0	0.67	2	9.5	1.52
AAAAA → AAAA	3	15.0	0.67	3	14.3	2.29
AAA → AA	0	0.0	0.00	1	4.8	0.77
AA → A	0	0.0	0.00	1	4.8	0.77
TTT → TT	1	5.0	0.22	0	0.0	0.00
Large deletion	5	25.0	1.11	1	4.8	0.77
2bps – 1kb	1	5.0	0.22	0	0.0	0.00
> 1kb	4	20.0	0.89	1	4.8	0.77
Others	3	15.0	0.67	5	23.8	3.80
Total	20	100	4.43	21	100	15.98

^aSMF; Specific Mutant Frequency.

19

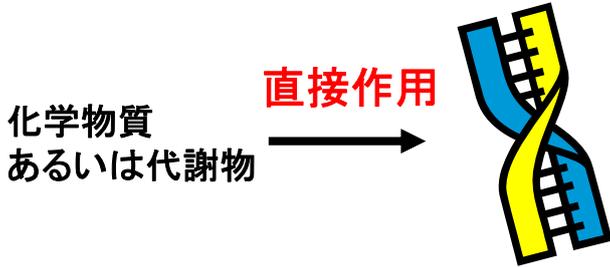
まとめ

- トランスジェニック遺伝子突然変異試験は、マウス、ラットの全ての臓器、組織で、突然変異を検出でき、変異を分子解析することができる変異検出系である。
- *gpt delta* マウス、ラットで用いられている *gpt* アッセイは主に塩基置換変異などの点突然変異を検出し、Spi⁻ アッセイは主に欠失変異を検出する。
- 突然変異のメカニズムを知るためには、*gpt*、Spi⁻ 変異体の分子解析が重要である。
- *gpt delta* マウスはC57BL/6Jを背景とし、*gpt delta* ラットはS.D., F-344, Wistar-Hannover を遺伝的背景として樹立されている。
- F344ラットは発がん試験に汎用されているため、F344 *gpt delta* ラットは、試験化合物が発がんの標的臓器に、突然変異を誘発するか否かを検討する際に有用である。

20

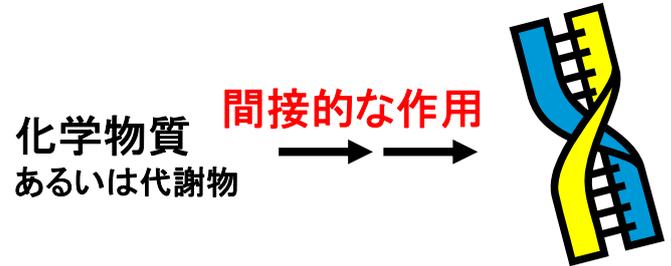
発がん物質は、遺伝毒性発がん物質と非遺伝毒性発がん物質に分類される

遺伝毒性発がん物質



- DNAと直接反応する発がん物質
- Ames試験 + DNA反応性の官能基 +
- ラットとマウスの両方に発がん性を示す
- 複数の臓器に発がん性を示す

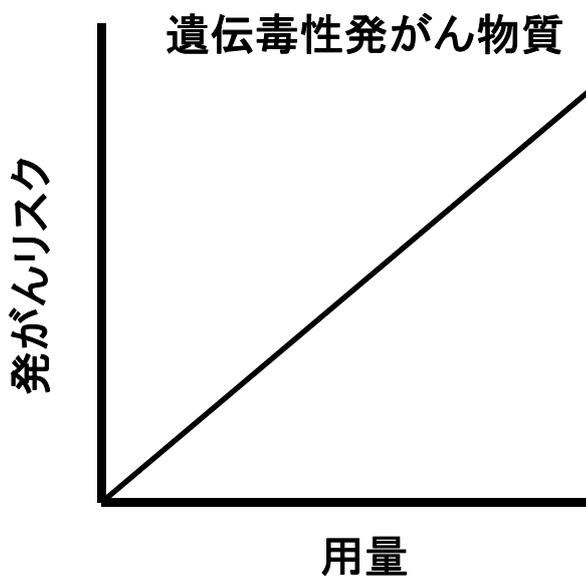
非遺伝毒性発がん物質



- DNAの構造や遺伝子発現に間接的に影響を与える発がん物質。さまざまなメカニズム、たとえば細胞増殖、細胞毒性、ホルモン作用、DNAメチル化などにより、発がんを促進する。
- Ames試験 - DNA反応性の官能基 -
- ラットあるいはマウスの一方の種の一臓器に発がん性を示す

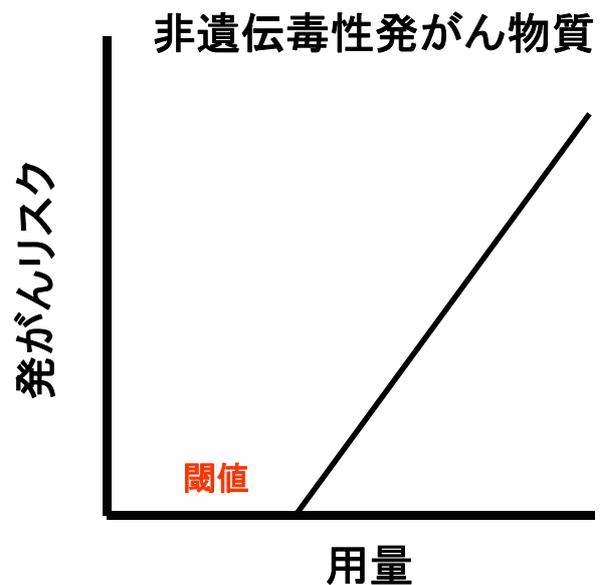
21

遺伝毒性発がん物質の作用には閾値が存在しないと考えられている



食品添加物、農薬、動物用医薬品としてのADIは設定されない

ADI: 一日許容摂取量

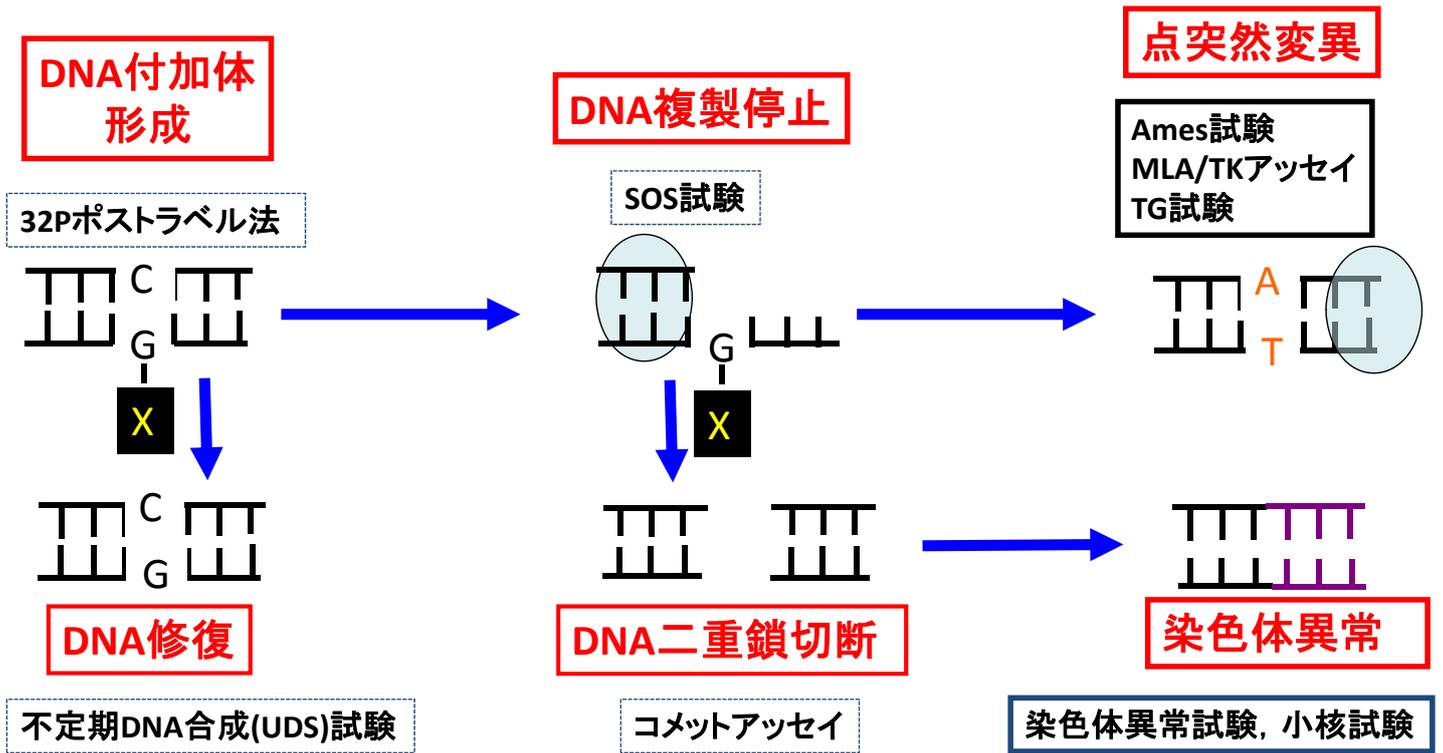


ADIはNOAELに基づいて設定される

NOAEL: no-observed adverse effect level (無毒性量)

22

異なった遺伝毒性試験は異なった事象を観察している



遺伝毒性試験バッテリーの再構築

これまでの組合せ

- 1) Ames test
- 2) in vitro CA or MLA
- 3) in vivo MN

ICH S2(R1)

ICH = International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use

第二の選択肢

- 1) Ames test
- 2) in vivo MN
- 3) Second in vivo assay

トランスジェニック(TG)マウス, ラット遺伝毒性試験 による発がん物質の予測

No. of carcinogens	90
No. of positives	70
No. of negatives	20
Sensitivity (%)	78
No. of non-carcinogens	13
No. of negatives	10
Specificity (%)	77

TG試験で陰性となった発がん物質

1,2:3,4-diepoxbutane; 1,2-dichloroethane; TCDD; 5-bromo-2'-deoxyuridine; acrylonitrile; arsenite trioxide; carbon tetrachloride; di(2-ethylhexyl)phthalate; dimethylarsinic acid; d-limonene; heptachlor; hydrazine sulfate; methyl bromide; methyl clofenapate; metronidazole; nickel subsulfide; TPA; sodium saccharin; trichloroethylene

TG試験で陽性となった非発がん物質

4-AAF, acetic acid, sucrose

Detailed review of transgenic rodent mutation assays
I.B. Lambert et al., Mutat. Res., 590, 1-280 (2005) 25