

| | | |
|---------|---|---------------|
| 称号及び氏名 | 博士（獣医学） | 笠本 佐和子 |
| 学位授与の日付 | 平成30年5月31日 | |
| 論文名 | Basic Studies on the Strategy for Simultaneous Detection of Multiple-endpoint in Genotoxicity (遺伝毒性の複数エンドポイントを同時検出するための試験戦略に関する基礎研究) | |
| 論文審査委員 | 主査 | 山手 丈至 |
| | 副査 | 杉浦 喜久弥 |
| | 副査 | 笹井 和美 |
| | 副査 | 八木 孝司（理学系研究科） |

論文要旨

序 文

私たちは約 **10** 万種類の化学物質の恩恵を受けて日常の生活を営んでいる。ただ、それらの中には人に対して健康危害を及ぼす恐れのあるものも有る。化学物質の持つ有用性と有害性とを常に考慮しておく必要がある。化学物質には、医薬品、農薬、食品添加物等の食品関連物質、工業化学品等多くの種類が有り、それぞれが異なる法律により、人々の健康を守るための安全性確保を求められている。本研究では、特性としての有害性を検出する部分に焦点を当て、正確かつ効率的に行われるための試験系の改良、確立を図ることを目的とした。有害性の検出は、多くの細胞や動物を用いた安全性試験を実施し、その結果を人に外挿することで行われている。安全性試験の **1** つに遺伝毒性試験があり、次世代への悪影響を評価すると共に、がん原性の予測、発がん機序の解明に用いられている。

遺伝毒性試験には、**DNA** 損傷性、遺伝子突然変異、染色体異常などを検出するために開発された多くの試験系がある。ガイドライン等で評価に必要な試験系が限定されているが、科学の進歩に伴い、試験系の改良、計測の自動化等の

新しい試みがなされている。また、近年、欧米を中心に動物愛護・動物福祉の運動が大きくなっており、遺伝毒性の分野においても **Reduction, Refinement, Replacement (3R's)** への対応の要求が強くなっている。例えば、動物試験代替法 (**Replacement**) の観点からは、長期発がん性試験の **in vitro** 代替法として、培養細胞を用いた形質転換試験が開発・改良され、安全性試験を行う受託研究機関を中心に大々的なバリデーション試験が実施された。また、使用する動物数を削減 (**Reduction**) する 1 つの手段として、動物を用いる遺伝毒性試験を単独で行うのではなく、複数の試験を組み合わせる (コンビネーション)、または、他の毒性試験に遺伝毒性のエンドポイントを組み込む (インテグレーション) 戦略がとられ始めている。組み合わせや組み込みを行う場合には、それぞれの試験系が最適な試験条件下で行われることが重要課題である。

このような背景を基に、本研究では遺伝毒性の複数エンドポイントを同時検出するための試験戦略に関する基礎的な研究を行った。組み合わせまたは組み込みに最も実用的な試験として、**DNA** 損傷性を検出する単細胞ゲル電気泳動 (コメット) 試験と染色体異常を検出する **in vivo** 小核試験を選択した。標本作製の頑健性を高めることにより適用臓器の幅を広げることも重要な技術革新となることから、第 1 章では、コメット試験における試験材料 (細胞懸濁液) の取り扱いを検討し、保管条件および許容保存時間を明らかにした。第 2 章では、小核試験における観察の機械化 (フローサイトメトリの導入) について検討した。第 3 章では、コメット・小核コンビネーション試験の結果の評価、解釈に重要な背景データの構築について検討を行った。これら一連の研究により得られた成果は、化学物質の安全性評価を行う研究機関において、より精度の高い遺伝毒性試験を効率よく行う上で有用な情報を提示している。

第 1 章 コメット試験における細胞懸濁液の保存時間に関する研究

コメット試験における細胞単離から標本作製までの時間は、**OECD (Organization for Economic Co-operation and Development)** の試験ガイドライン等において概ね 1 時間以内と記載されているが、その根拠となるデータは調べた限りでは見つかっていない。コンビネーション試験で、かつ複数の臓器を評価する場合、1 時間以内に標本作製を行うには多数の作業が必要となり、通常の研究室では動物福祉を考慮したコンビネーション試験の実施を断念せざるを得ない。試験結果に影響を及ぼさない許容時間を検討することにより、延長が可能となれば、試験条件の制約が大幅に改善できる。そこで、単離した細胞の保存条件および許容保存時間を検討した。許容時間の検討のため、ラットから臓器 (肝臓および腺胃) を摘出して細胞を単離後、細胞懸濁液を氷冷または冷蔵にて保存し、**2, 4, 8** および **24** 時間後にそれぞれ標本作製し、細胞単離後 1 時間以内に作製した対照標本と比較した。各保存時間の標本の **% tail DNA (DNA 損傷の指標)** の値を比較した結果、冷蔵保存で **4** 時間、氷冷保存で **8** 時間以内であれば試験結果に影響しないことが明らかになった。この成果は、

コメント試験における作業時間の制限を緩和し、コンビネーションまたはインテグレーション試験を推進することに繋がる有用な基礎データとなる。

第2章 フローサイトメトリを用いる小核計測の研究

第1節 フローサイトメトリと顕微鏡観察による結果の同等性

最近のガイドライン等の改訂により、各試験の検出力が議論され、より多くの細胞を観察、解析する必要が指摘されてきた。その目的のために、観察の自動化、特に短時間に多くの細胞を解析可能なフローサイトメトリの導入が検討されている。しかし、機械化によって得られるデータの正確性に関する評価が十分に行われていないのが現状である。第1節では、従来の顕微鏡観察による試験結果とフローサイトメトリによる試験結果の比較検討を行った。

小核誘発物質である **Cyclophosphamide (CP)** をラットに **5, 10, 15 mg/kg** の用量で単回投与し、投与後 **48** 時間に末梢血を採取した。**MicroFlowplus Kit** を用いて血液サンプルを **2** セット調製し、フローサイトメトリによる小核赤血球計測を行った。また、通常顕微鏡観察による小核計測を実施し、フローサイトメトリによる計測結果と比較した。その結果、フローサイトメトリによる小核計測と顕微鏡観察による従来法との間には同等性があることを示すことができた。

第2節 研究室間でのフローサイトメトリ計測結果の再現性

第1節において調製した血液サンプルの一方を、アメリカの **MicroFlowplus Kit** 開発メーカーである **Litron** 社に空輸して、フローサイトメトリによる小核赤血球計測を行った。当研究室（安評センター）と **Litron** 社とは異なるフローサイトメーターを用いたが、両研究室の小核赤血球出現頻度に良好な相関性 ($r2 = 0.97$) が認められ、海外の異なる研究室においても再現性を確保でき、かつ今回検討したフローサイトメトリの計測手法には高い有用性があることが示された。

第3節 陰性対照としての各種媒体および陽性対照物質投与によるフローサイトメトリを用いる小核試験データの収集

第3節では、試験結果の評価、解釈に重要な役割を果たす陰性対照および陽性対照群のデータ蓄積を行った。陰性対照としては **corn oil, olive oil, 0.5%CMC** 溶液、**0.5%MC** 溶液を、陽性対照としては、小核試験で使用される **CP**、コメント試験で使用される **ethyl methanesulfonate** および肝小核試験で使用される **diethylnitrosamine** を用いた。その結果、背景データの構築に有用なデータが得られた。

第3章 コメント・小核コンビネーション試験と単独試験の背景データの比較検討

試験が正当に実施されたとしても、結果の評価および解釈が重要である。陰性対照と統計学的に比較する手法が一般的に用いられているが、生物学的な意義を評価するには背景データとの比較が重要な位置を占める。コメット試験および小核試験は単独の試験としては頻繁に実施されており、背景データが存在する。しかし、コメット・小核コンビネーション試験となると、試験実施上の細かい点で単独での試験とは差があり、コンビネーション試験での背景データが求められることになる。背景データの構築には多大な労力と時間、さらに実験動物が必要であるが、現存のデータを有効活用することにより、短期間で試験系を確立することができる。そこで、コメット・小核コンビネーション試験の陰性対照データを収集し、当研究室で蓄積してきた単独のコメット試験および小核試験の背景データと比較することにより、単独試験での背景データがコンビネーション試験結果の評価解釈に使用可能か否かを検討した。コメット試験においては、肝臓および腺胃における陰性対照群の% **tail DNA** はコンビネーション試験と単独試験とで大きな差がないとする有意義な成果が得られた。骨髄における小核出現頻度についても、単独試験と同様の値を示すことが確認できた。したがって、コンビネーション試験の評価解釈に当たって既存の背景データが利用可能であることを初めて明らかにした。

結 論

1. ガイドラインに従ったコメット試験における細胞懸濁液の保存は約 **1** 時間以内との技術的な制約があったが、冷蔵で **4** 時間、氷冷で **8** 時間以内であれば試験結果 (% **tail DNA**) に影響しないことが判明し、実験の技術的制約を緩和することができた。
2. 小核試験における小核を有する赤血球の計測においては、通常顕微鏡による計測とフローサイトメトリによる計測結果が同等であることを示した。また、新しい試験法のバリデーションにおいて重要である研究室間における結果の再現性においては、海外の研究室においても良好な再現性を得ることができた。上述の技術的な問題を解決した上で、フローサイトメトリによる小核試験の媒体対照データを用いて背景データを蓄積した。
3. コメット・小核コンビネーション試験の背景データとして、単独試験の背景データが利用できることを初めて明らかにした。
4. 今回の研究結果は、遺伝毒性の複数エンドポイントを同時検出する上で非常に有用である。さらに、使用動物数の削減に貢献するとともに、複数のエンドポイントを同時に評価し、総合的な観点から遺伝毒性の解釈を可能にするものである。
5. 以上、遺伝毒性試験に関する今回の基礎的な研究により得られた手法と成果は、化学物質の安全性、特に発がん性を評価する上で有用な情報を提示するものとする。

審査結果の要旨

私たちの生活環境には約 10 万種類の医薬品や農薬などの化学物質が存在する。化学物質の開発においては、その有害性を把握するための安全性試験が必須である。細胞や動物を用いた安全性試験の一つに遺伝毒性試験があり、次世代への悪影響やがん原性の予測、および発がん機序の解明に用いられている。遺伝毒性試験には、DNA 損傷性、遺伝子突然変異、染色体異常などの試験系があり、科学の進歩に伴いそれらの試験系の精度や効率性を高めるための新たな技術開発が常に求められている。また、近年、欧米を中心に動物愛護・動物福祉の運動が拡大しており、遺伝毒性試験の分野においても **Reduction、Refinement、Replacement** (3R's) への対応が要求されている。使用する動物数を削減する一つの手段として、動物を用いる遺伝毒性試験を単独で行うのではなく、複数の試験を組み合わせる (コンビネーション)、または、他の一般毒性試験に遺伝毒性のエンドポイントを組み込む (インテグレーション) 戦略が検討され始めている。そのような組み合わせや組み込みを行うためには、精度の高いデータを得る最適な試験条件を探究しておくことが必須であり、毒性試験を行う研究施設では現在重要な研究課題となっている。

この一連の研究は、組み合わせまたは組み込みに最も実用的な試験として、DNA 損傷性を検出する単細胞ゲル電気泳動 (コメット) 試験と染色体異常を検出する *in vivo* 小核試験を選択し、遺伝毒性の複数エンドポイントを同時検出するための新たな試験戦略の確立を目指すことを目的に行われている。得られた成績は、精度の高い遺伝毒性試験を効率よく行う上で有用な新たな手法や情報を提示している。

第 1 章では、コメット試験における細胞懸濁液の保存条件および試験結果に影響を及ぼさない保存時間の検討を行っている。ラットから臓器 (肝臓および腺胃) を摘出して細胞を単離後、細胞懸濁液を氷冷または冷蔵にて保存し、**2、4、8** および **24** 時間後にそれぞれの標本を作製し、細胞単離後 **1** 時間以内に作製した対照標本と比較している。各保存時間の標本の **% tail DNA** (DNA 損傷性の指標) の値を比較検討した結果、冷蔵保存で **4** 時間、氷冷保存で **8** 時間以内であれば試験結果に影響しないことが判明した。この成果は、これまで概ね **1** 時間以内とされていた作業時間の制限を大幅に緩和し、大量のサンプルの検査を効率良く行う上での新たな手法を提示するとともに、コンビネーションまたはインテグレーション試験を推進することに繋がる有用な基礎データとなっている。

第 2 章第 1 節では、小核試験を他の毒性試験に組み込む上での新たな手法としてフローサイトメトリによる計測について、その有用性を従来の顕微鏡観察による結果と比較検討している。ラットに小核毒性のある **Cyclophosphamide** を **5、10、15 mg/kg** の用量で単回投与し、投与後 **48** 時間に末梢血を採取してフローサイトメトリおよび顕微鏡観察による小核赤血球計測を行っている。そ

の結果、フローサイトメトリによる小核計測と顕微鏡観察による従来法との間には有意差がないことを明らかにしている。また、第 2 節では、研究所間でのフローサイトメトリ計測結果の再現性を検討している。同じ動物から採取した血液サンプルを海外の研究所に空輸し、異なるフローサイトメーターを用いて小核計測を行い、国内の自身の研究所の結果と比較している。その結果、小核赤血球出現頻度に良好な相関性 ($r^2 = 0.97$) があることを示している。この成果は、フローサイトメトリの計測手法には高い有用性があることと、地理的に離れた研究室間でも再現性を担保できることを初めて提示している。さらに、第 3 節では、一般毒性試験に使用される陰性対照としての各種媒体および遺伝毒性試験での各種陽性対照物質の投与により得られた小核試験サンプルを用いてフローサイトメトリによる基盤データの構築を試みている。得られた成果は、フローサイトメトリにより小核試験を行う上で、国際的に広く利用可能な参照データを提供している。

第 3 章では、コメット・小核コンビネーション試験を 13 試験実施し、単独のコメット試験または小核試験で得られたデータと比較解析している。その結果、コメット試験においては、肝臓および腺胃における陰性対照群の % tail DNA はコンビネーション試験と単独試験との間で有意差がないとする成果を得ている。骨髄における小核出現頻度についても、単独試験と同様の値を示すことを確認している。このような比較試験による背景データの構築には多大な労力と時間、さらに実験動物が必要であるが、本研究で得られた成果はコンビネーション試験の評価解釈に当たって既存の単独試験の背景データが利用可能であることを提示している。

以上より、本研究は、安全性試験における使用動物数の削減に貢献する新たな手法に加えて、遺伝毒性試験での複数エンドポイントを同時検出する上で参照となる有用なデータを提示している。特に、新たな技術に基づいたコメット・小核コンビネーション試験の評価の精度と効率性を高めることに繋がる大規模の解析データの提示はこれまでにない成果である。このように、今回の一連の研究により得られた手法と成果は、先進国で広く行われている化学物質の安全性試験の基盤研究に大きく貢献するものである。よって、本論文の審査並びに学力確認の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。