

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

西川 秋佳 (にしかわ あきよし)

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長



1978年 3月 岐阜大学医学部卒業
1982年 3月 岐阜大学大学院医学研究科単位修得（病理学専攻）
1982年 4月 高山赤十字病院副部長（中央検査部）
1983年 10月 岐阜大学医学部助手（第一病理学教室）
1985年 4月 岐阜県立健康管理院医長（検査部）
1987年 4月 県立岐阜病院医長（病理診断部）
1989年 10月 米国ネイラー・ダナ研究所化学発癌研究部客員研究員
国立衛生試験所病理部室長、国立医薬品食品衛生研究所病理部長を経て、
2010年より現職。薬事・食品衛生審議会（臨時委員）、内閣府食品安全委員会（専門委員）、中央環境審議会（臨時委員）、日本毒性学会（理事）、日本癌学会（評議員）、日本病理学会（評議員）、日本毒性病理学会（評議員）、日本がん予防学会（評議員）

<研究成果概要>

*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、 λ EG10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ー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に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クエンス解析の結果、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。

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

研究代表者

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

研究分担者

増村健一

梅村隆志

小川久美子

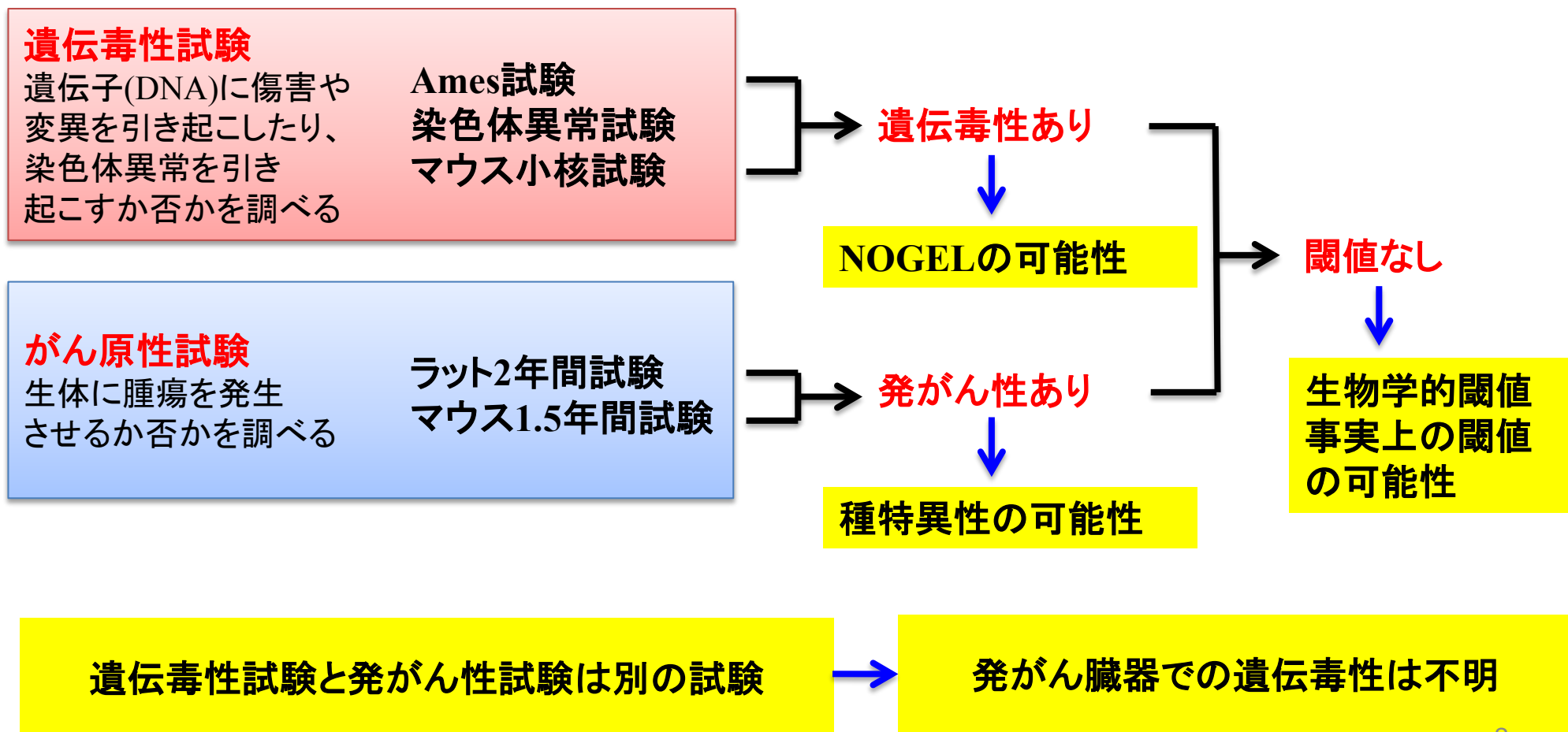
国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部

国立医薬品食品衛生研究所病理部

国立医薬品食品衛生研究所病理部

遺伝毒性発がん物質

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。

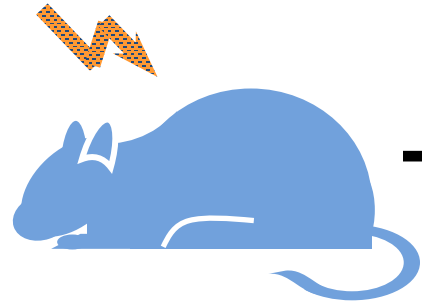


トランスジェニックげっ歯類遺伝子突然変異試験

	動物種	レポーター 遺伝子	回収方法	選別方法
Muta TM	マウス	<i>lacZ</i>	λ <i>in vitro</i> パッケージング	color positive
Big Blue ^R	マウス ラット	<i>lacI</i>	λ <i>in vitro</i> パッケージング	color
<i>lacZ</i> plasmid	マウス	<i>lacZ</i>	リゲーション & エレクトロポ レーション	positive
<i>gpt delta</i>	マウス ラット	<i>gpt</i> & <i>red/gam</i>	λ <i>in vitro</i> パッケージング	positive
Lambda <i>cII</i>	マウス ラット	<i>cII</i>	λ <i>in vitro</i> パッケージング	positive
その他		<i>supF</i> <i>rpsL</i>		

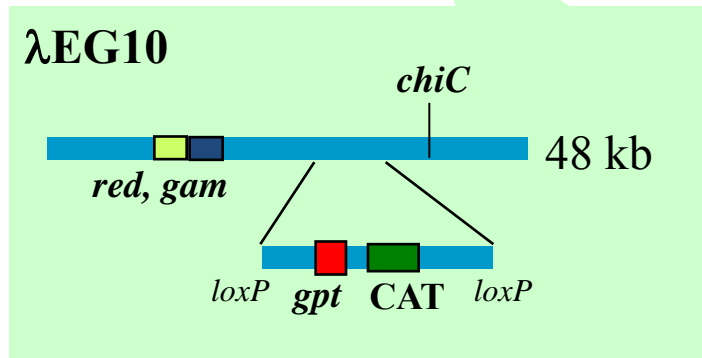
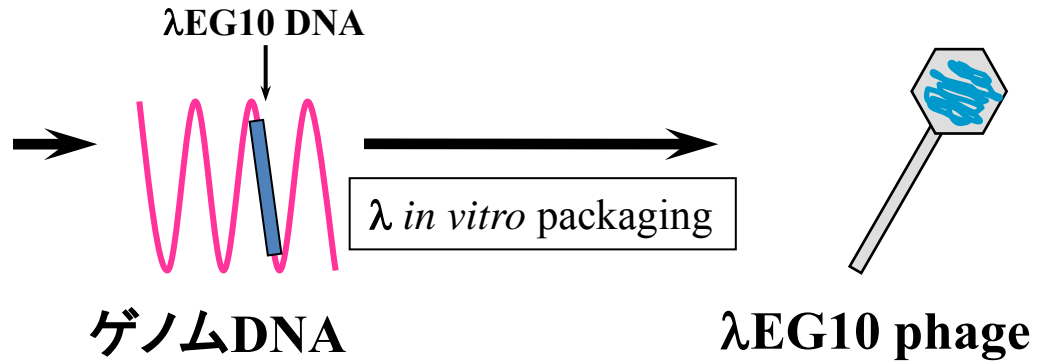
gpt delta トランスジェニックラットを用いた遺伝子突然変異解析

化学物質



gpt delta rat

組織



導入遺伝子λEG10

gpt Assay
(点突然変異)

Spi⁻ Assay
(欠失変異)

研究目的

レポーター遺伝子導入動物である *gpt* delta ラットを用いて反復投与毒性試験を実施し、遺伝毒性と一般毒性の検索に加え、前がん病変の検出を行うことにより、遺伝毒性発がん物質をより精緻に、より短期的に予測できる動物モデルを開発する。

研究項目

遺伝毒性・反復投与毒性併合試験法の開発

遺伝毒性試験や反復投与毒性試験にレポーター遺伝子導入動物を用いるうえでの適切な試験方法や妥当性の検討

*gpt delta*ラットの特徴とレポーター遺伝子を用いて*in vivo* 遺伝毒性を評価することの有用性の検討

レポーター遺伝子導入動物を用いて**遺伝毒性**を評価するための投与期間や、系統差を検討する。

レポーター遺伝子導入動物を用いた**反復投与毒性試験**が可能かどうかを検討する。

導入遺伝子やレポーター遺伝子導入動物に関する基礎的な情報を検討する。

レポーター遺伝子を用いて*in vivo* 遺伝毒性を評価することの有用性の検討する。

遺伝毒性の包括的試験法の標準化

一般毒性検索系としての妥当性

レポーター遺伝子および導入動物の特徴

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

*gpt delta*ラットを用いた遺伝毒性・反復投与毒性の包括的試験の標準化

*gpt delta*ラットを用いた*in vivo*遺伝毒性評価が発がんへの遺伝毒性の関与を検討する上での有用性

*gpt delta*ラットを用いた遺伝毒性・反復投与毒性併合試験法の確立・有用性の検証

1. *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

*gpt delta*ラットを用いた包括的試験法の標準化を目的に、被験物質の投与期間やラット系統差の検討を行う。

2. *gpt delta*ラットの一般毒性検索系としての妥当性の検討

*gpt delta*ラットを用いて反復投与毒性を検索することの妥当性を明らかにするために、*gpt delta*ラットおよびその野生型ラットの差異を検討する。

3. *gpt delta*ラットの詳細なレポーター遺伝子変異の解析

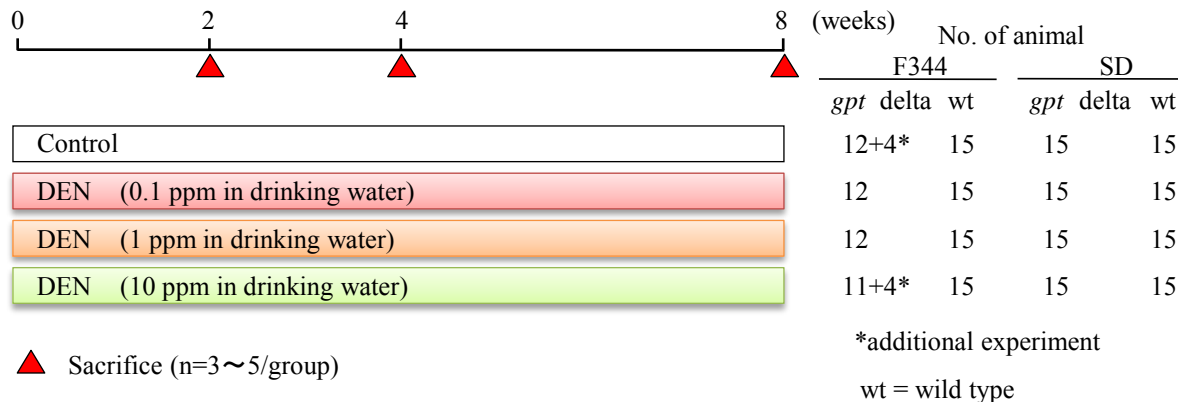
ゲノム中のレポーター遺伝子挿入部位の解析や加齢による自然突然変異頻度の変化や系統間の差異を検討する。

4. *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

*gpt*遺伝子上の遺伝子変異とがん遺伝子上の遺伝子変異との相関性を検討する。

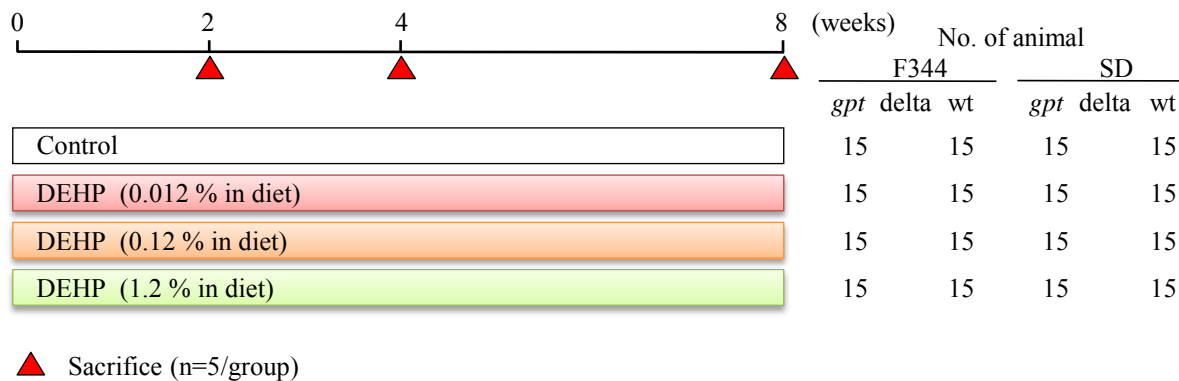
1. *gpt* deltaラット反復投与毒性試験を用いた遺伝毒性の包括的試験法の標準化

Diethylnitrosamine (DEN): 遺伝毒性肝発がん物質



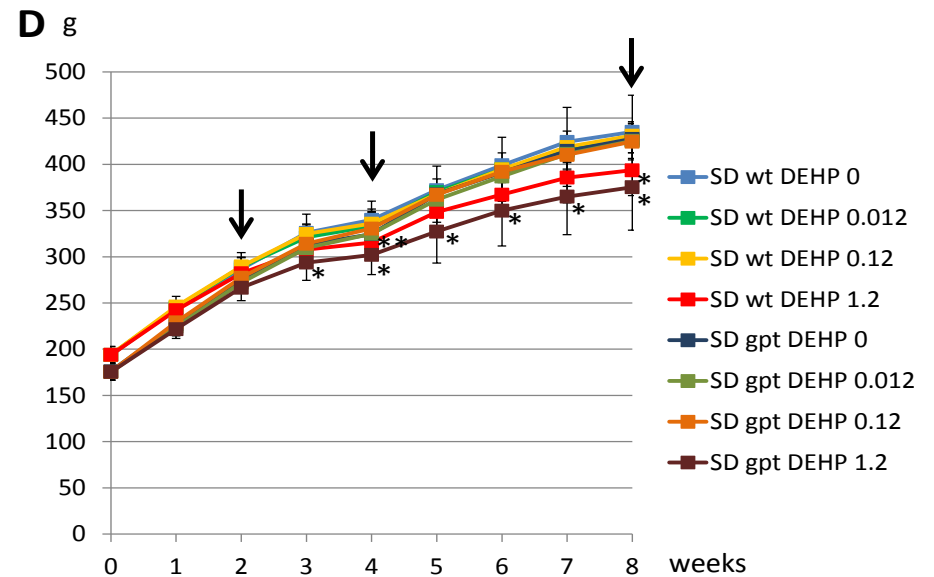
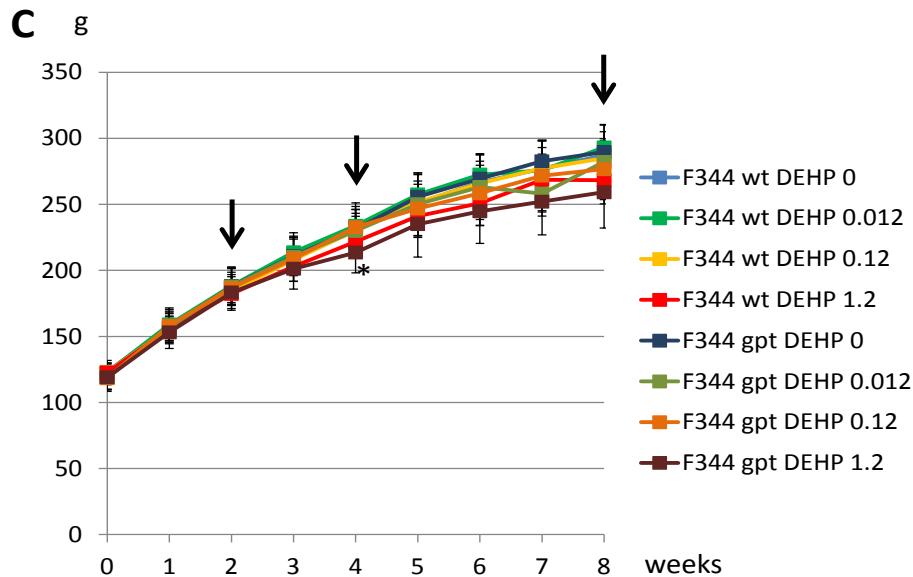
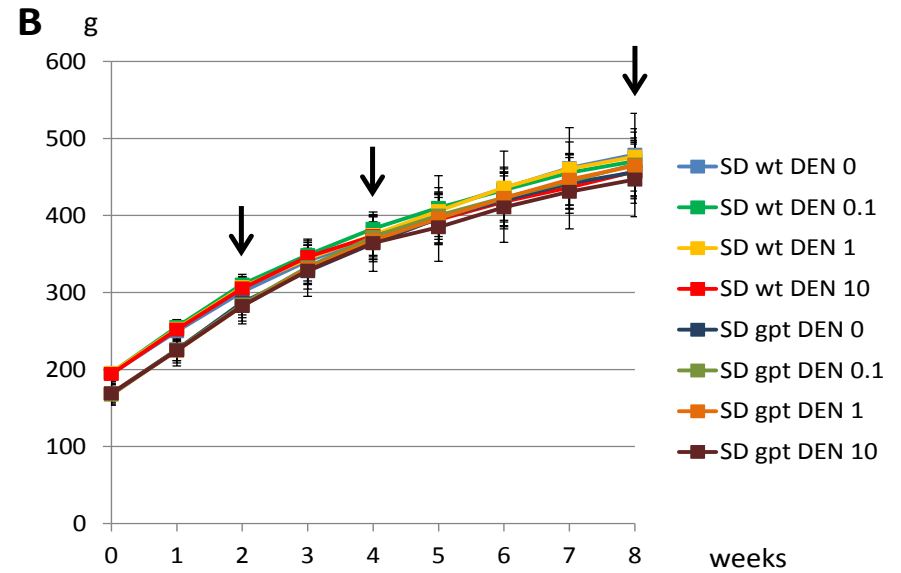
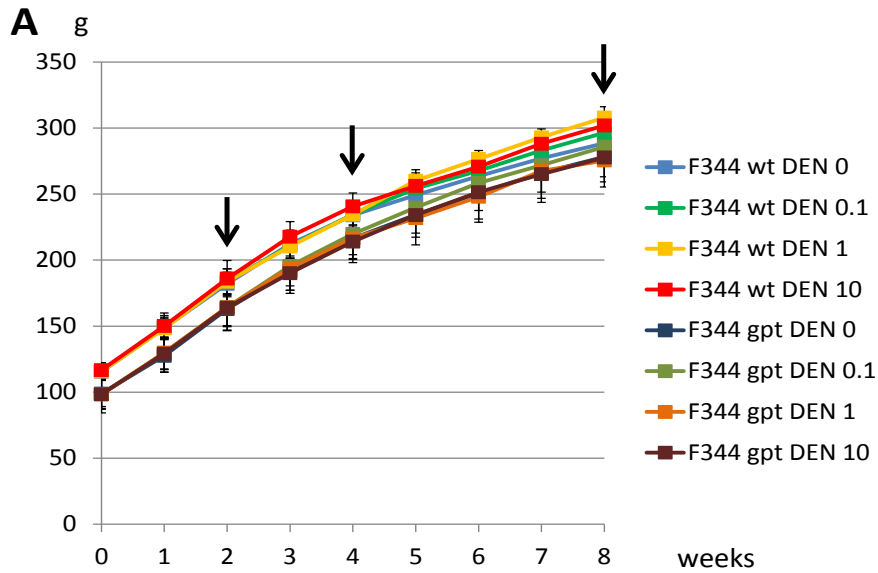
Examination : Histopathology, Serum Biochemistry, IHC of GST-P in liver, *gpt*/*Spi* assay

Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): 非遺伝毒性肝発がん物質



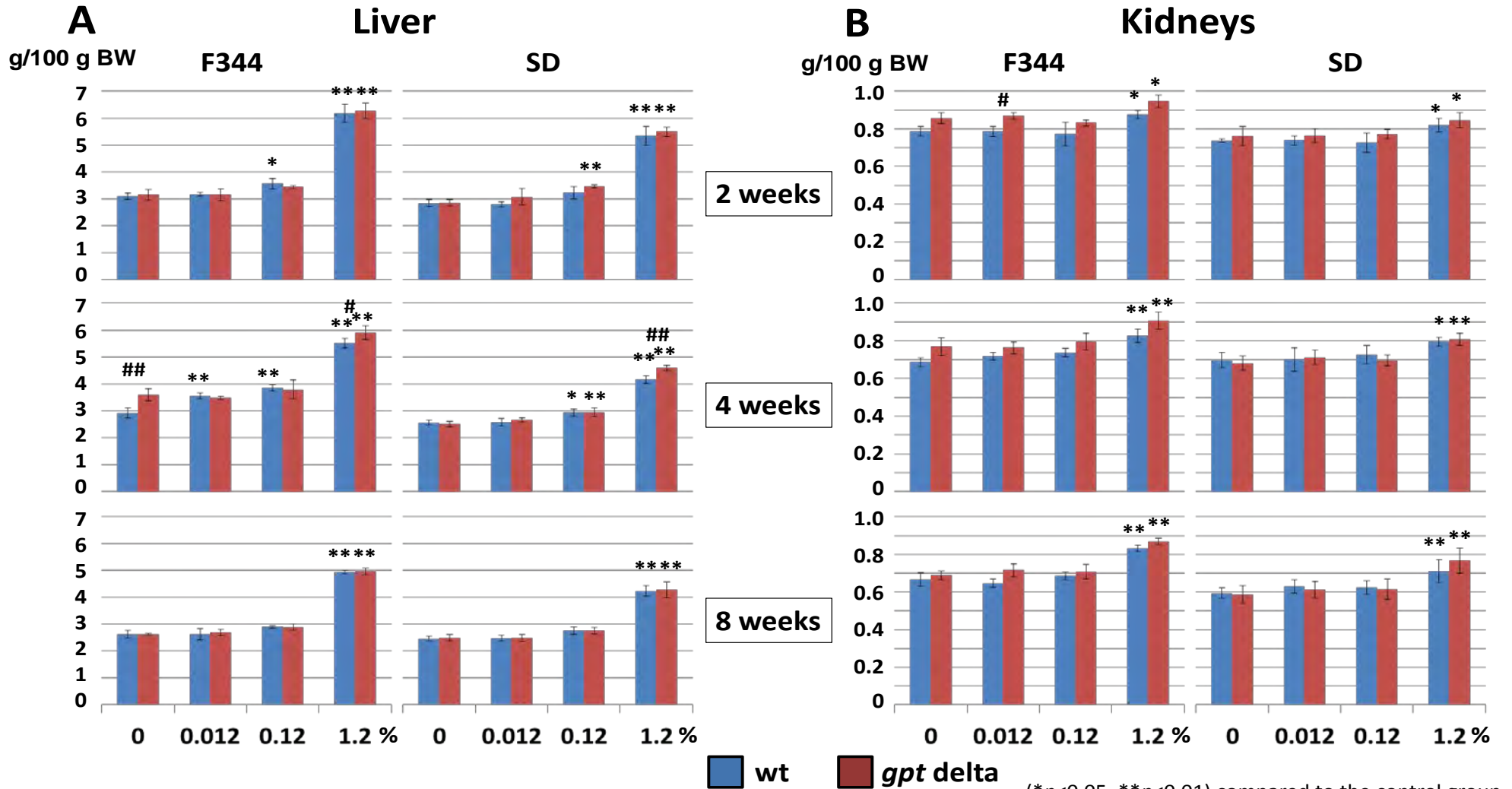
Examination : Histopathology, Serum Biochemistry, *gpt*/*Spi* assay

DEN投与ラットおよびDEHP投与ラットの体重



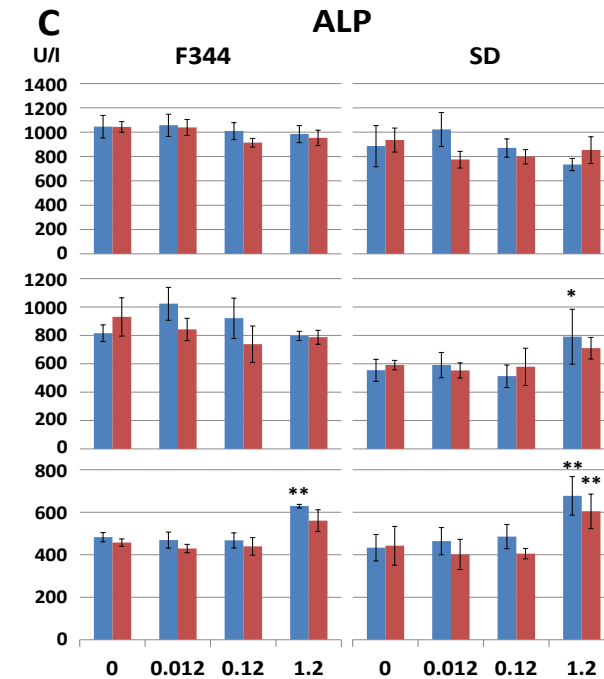
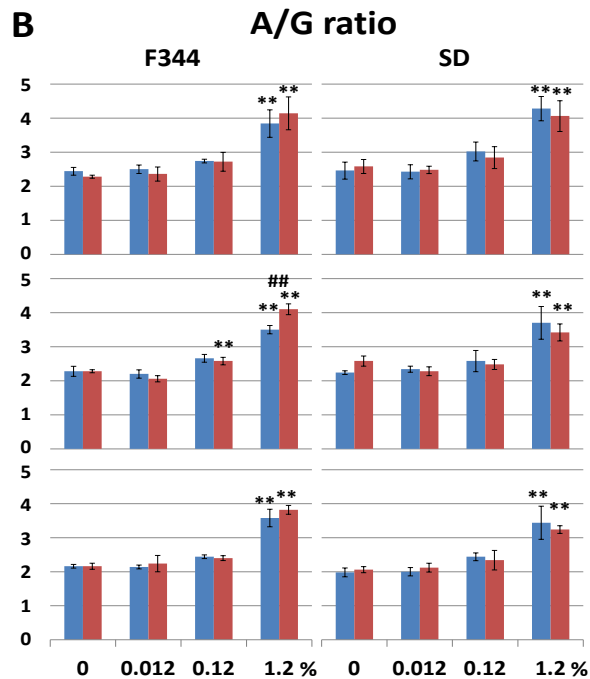
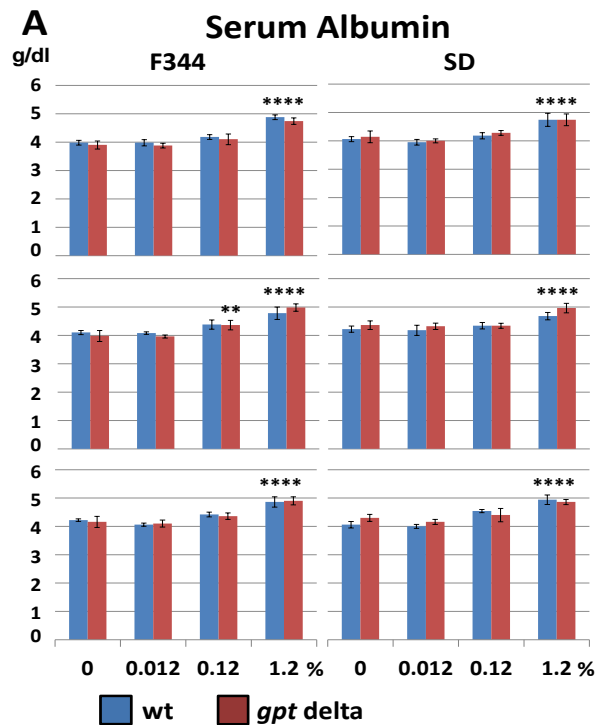
(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) compared to the control group

DEHP投与ラットの相対肝・腎重量



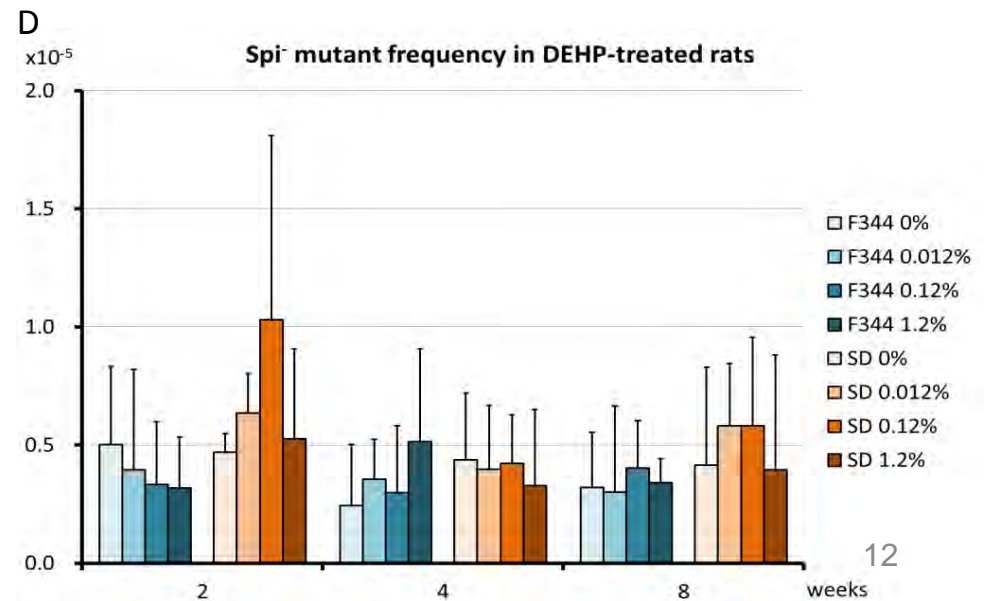
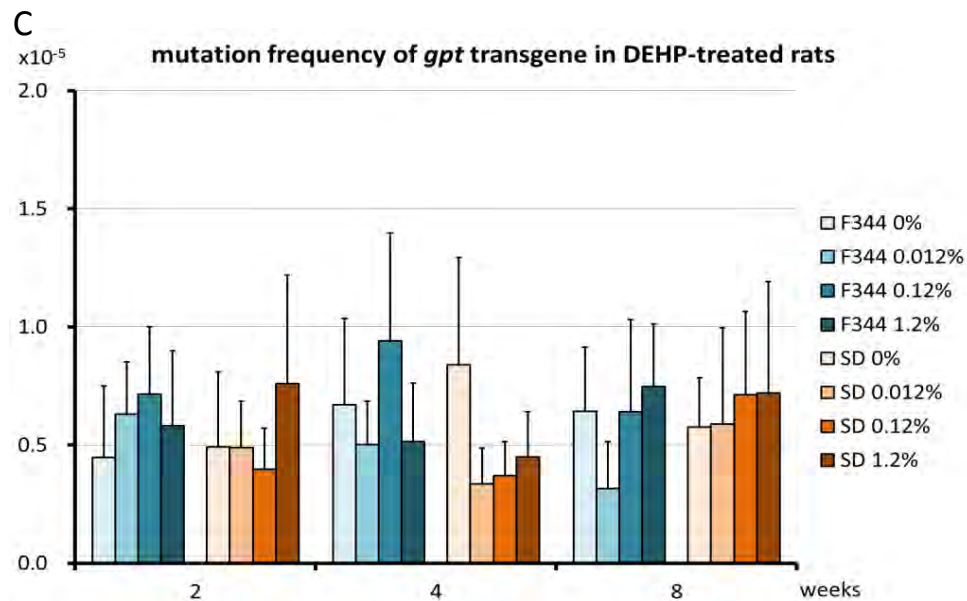
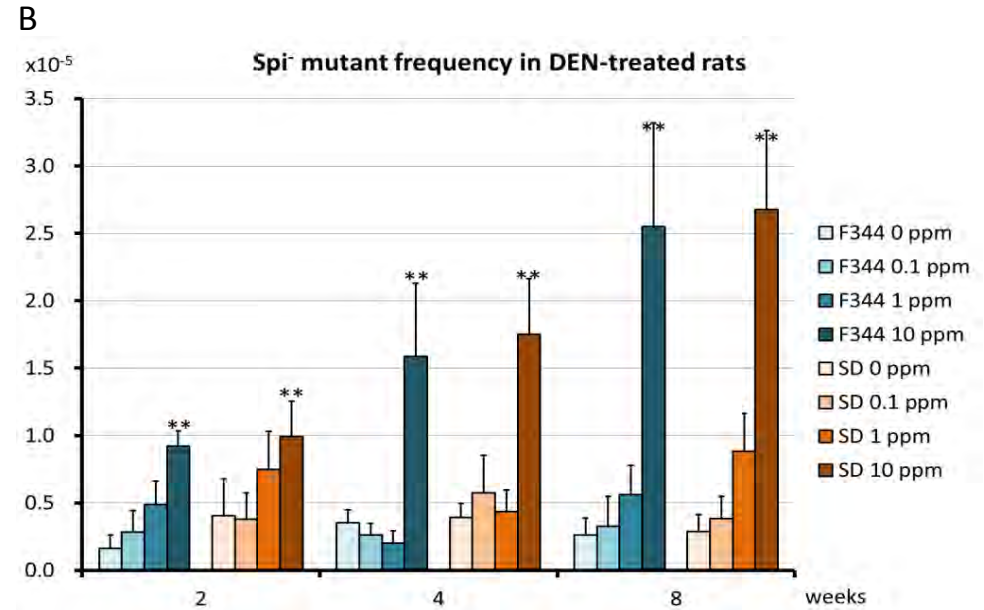
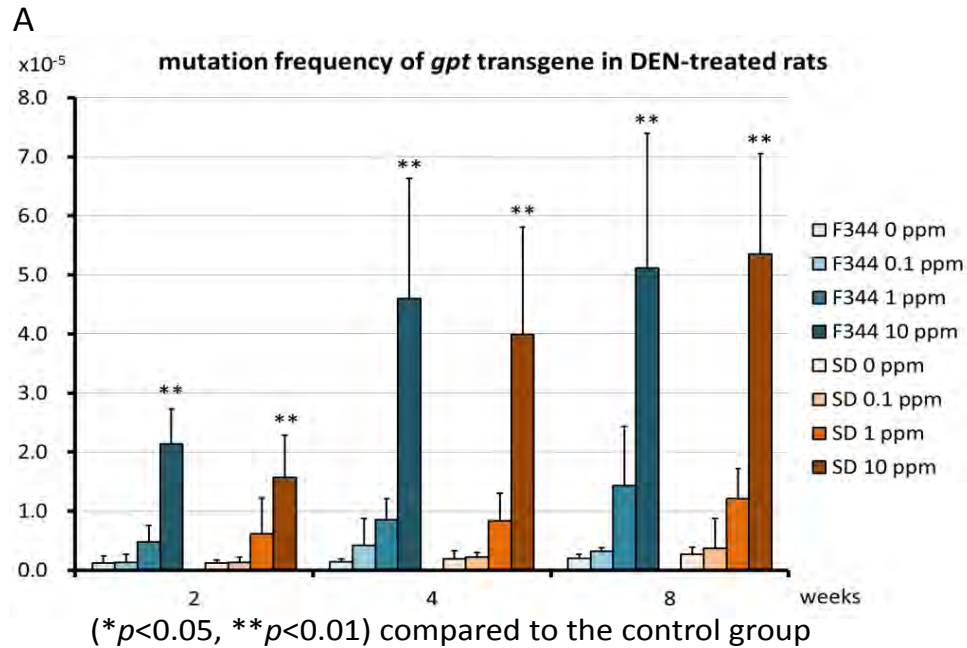
(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) compared to the control group
 (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$) between wt and gpt delta rats

DEHP投与ラットの血清アルブミン、A/G比、ALP



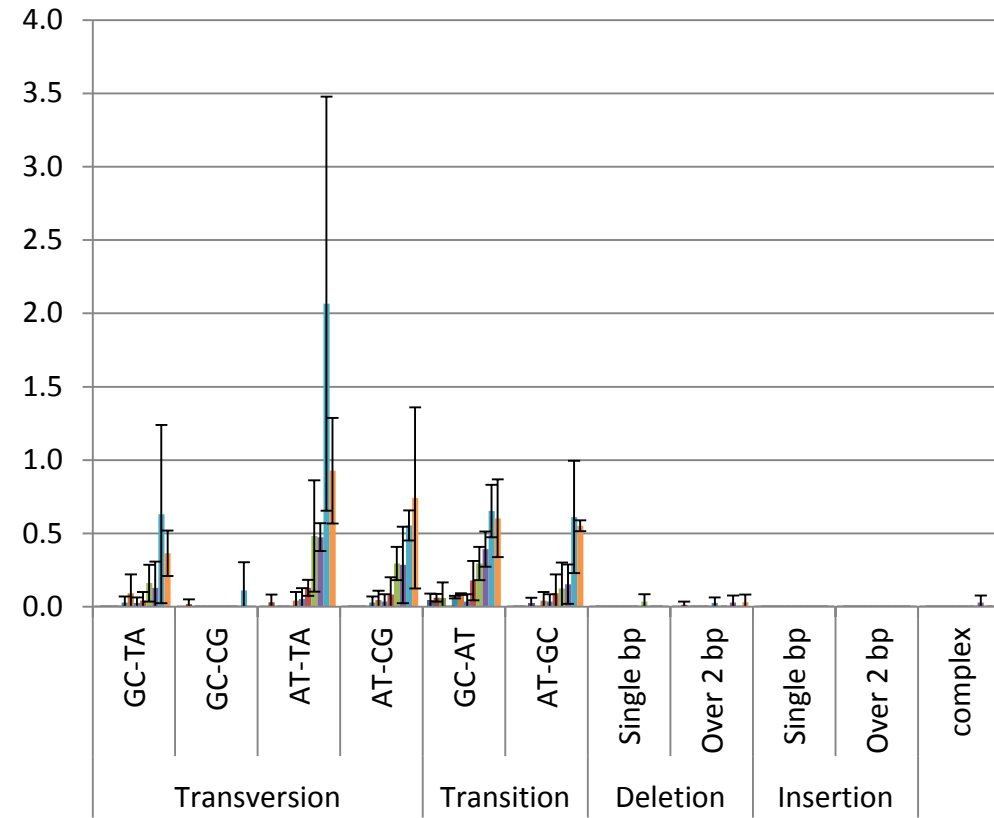
(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) compared to the control group
 (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$) between wt and *gpt delta* rats

gpt deltaラット肝臓における突然変異頻度



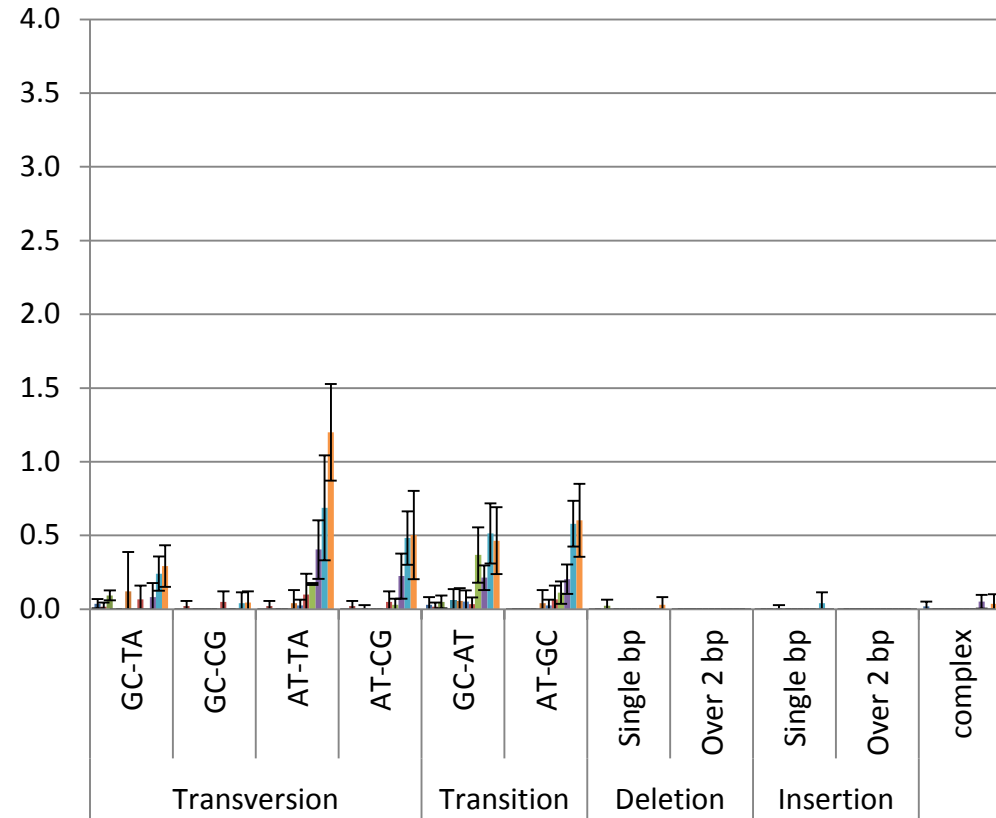
gpt 遺伝子突然変異スペクトラム

F344



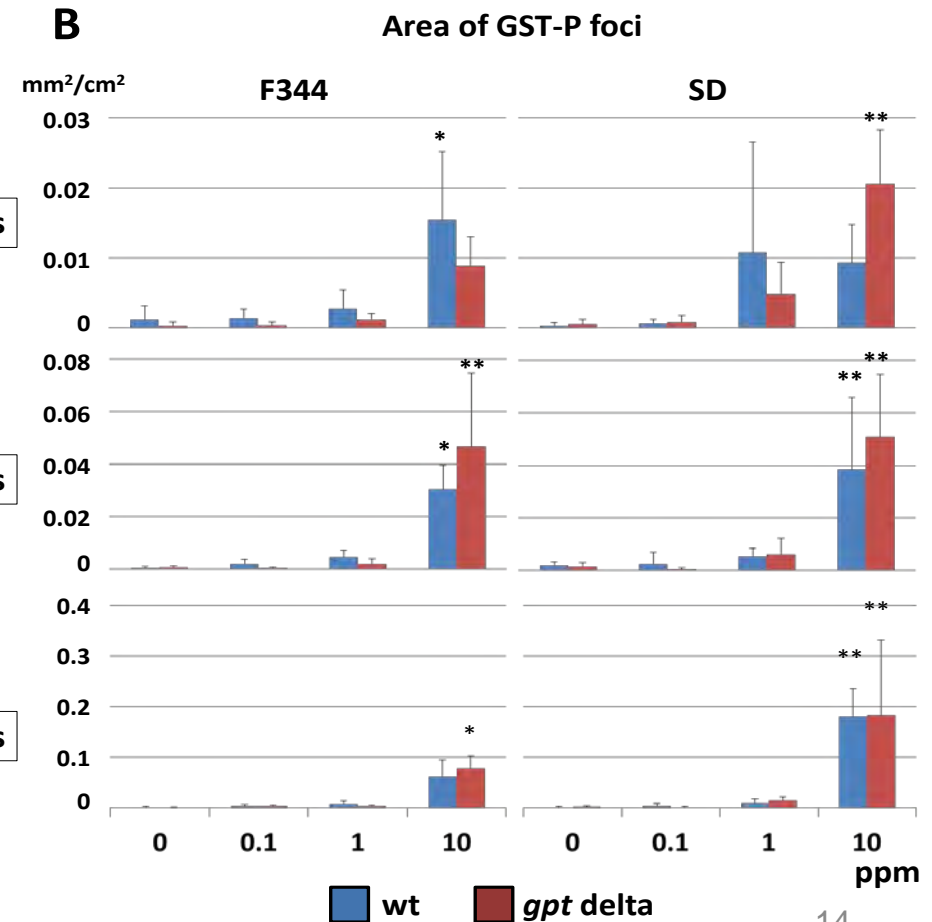
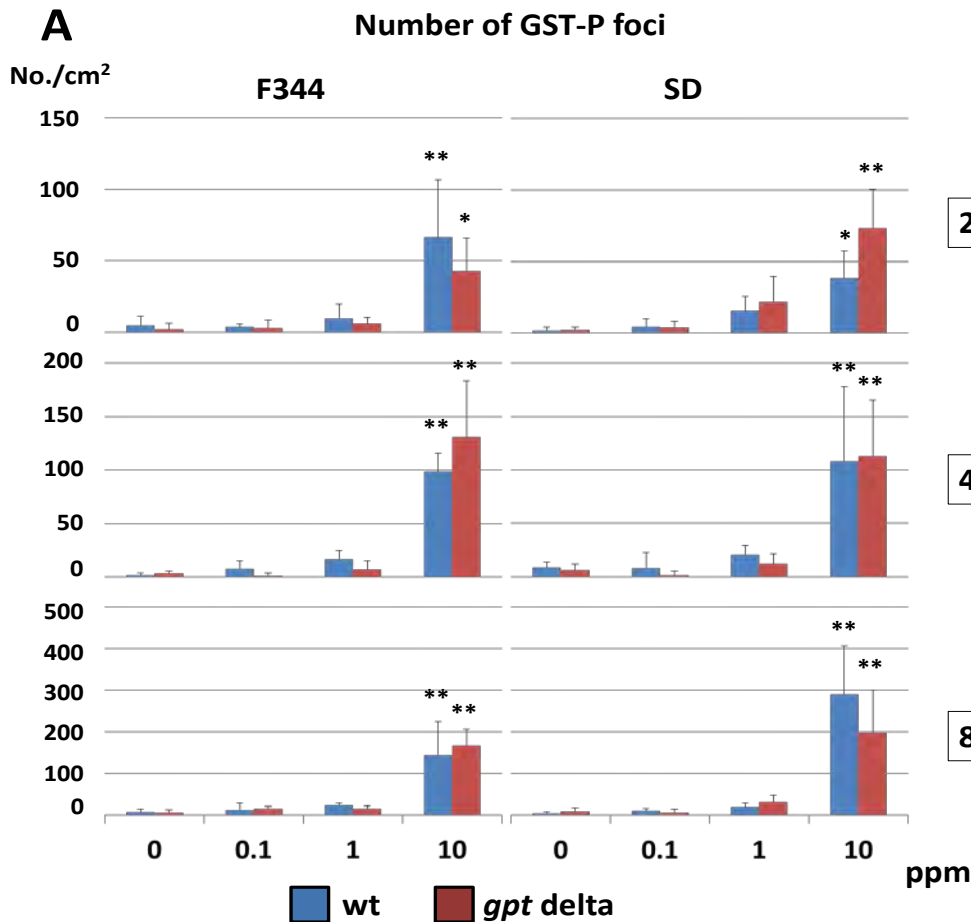
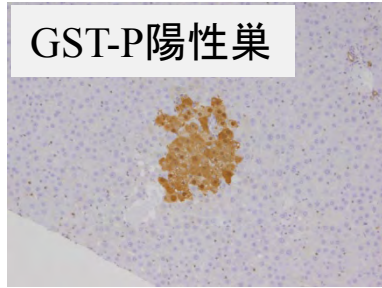
- F344 0 ppm 2 weeks ■ F344 0 ppm 4 weeks ■ F344 0 ppm 8 weeks
- F344 0.1 ppm 2 weeks ■ F344 0.1 ppm 4 weeks ■ F344 0.1 ppm 8 weeks
- F344 1 ppm 2 weeks ■ F344 1 ppm 4 weeks ■ F344 1ppm 8 weeks
- F344 10 ppm 2 weeks ■ F344 10 ppm 4 weeks ■ F344 10 ppm 8 weeks

SD



- SD 0 ppm 2 weeks ■ SD 0 ppm 4 weeks ■ SD 0 ppm 8 weeks
- SD 0.1 ppm 2 weeks ■ SD 0.1 ppm 4 weeks ■ SD 0.1 ppm 8 weeks
- SD 1 ppm 2 weeks ■ SD 1 ppm 4 weeks ■ SD 1ppm 8 weeks
- SD 10 ppm 2 weeks ■ SD 10 ppm 4 weeks ■ SD 10 ppm 8 weeks

DEN投与ラット肝臓におけるGST-P陽性巣数および面積



(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) compared to the control group

1. *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

- 遺伝毒性肝発がん物質であるDENをF344系*gpt* deltaラットおよびSD系*gpt* deltaラットに2、4または8週間投与した結果、両系統のラットで何れの投与期間においても*gpt*およびSpi-変異体頻度は用量依存的に増加し、高用量群において有意な上昇が認められた。一方、非遺伝毒性肝発がん物質であるDEHPを投与した結果、何れの系統および投与期間においても*gpt*およびSpi-変異体頻度の有意な上昇は認められなかった。
- DEN投与群において認められた*gpt*変異体頻度の上昇は、投与期間が長いほど高値を示したが、その程度は何れの投与期間においてもF344系*gpt* deltaラットおよびSD系*gpt* deltaラット間でほぼ同程度であった。
- DEN投与群で認められたGST-P陽性巣の数および面積はF344系*gpt* deltaラットおよびSD系*gpt* deltaラットともに、何れの投与期間においても高用量群において有意な上昇が認められた。さらに、その程度は投与期間が長いほど高値を示したが、*gpt* deltaラットとその野生型間において有意な差異は認められなかった。

gpt deltaラットを用いて反復投与試験を行った結果、遺伝毒性および発がん性は投与期間に関わらず検出でき、その程度は投与期間が長いほど顕著であったことから、*gpt* deltaラットは遺伝毒性を短期間で検出できる有用な手段であり、*gpt* deltaラットを遺伝毒性・反復投与毒性併合試験法に用いることは可能であると考えられた。

1. *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

*gpt delta*ラットを用いた包括的試験法の標準化を目的に、被験物質の投与期間やラット系統差の検討を行う。

2. *gpt delta* ラットの一般毒性検索系としての妥当性の検討

gpt delta ラットを用いて反復投与毒性を検索することの妥当性を明らかにするために、*gpt delta*ラットおよびその野生型ラットの反復投与毒性の差異を検討する。

3. *gpt delta*ラットの詳細なレポーター遺伝子変異の解析

ゲノム中のレポーター遺伝子挿入部位の解析や加齢による自然突然変異頻度の変化や系統間の差異を検討する。

4. *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

*gpt*遺伝子上の遺伝子変異とがん遺伝子上の遺伝子変異との相関性を検討する。

2. *gpt delta* ラットの一般毒性検索系としての妥当性の検討

*gpt delta*ラットとその背景系統F344ラットにDENを反復投与し、一般毒性ならびに肝発がん性について遺伝子型間で比較した。

STRAIN: F344 *gpt delta* rat and F344 rat

SEX: Male

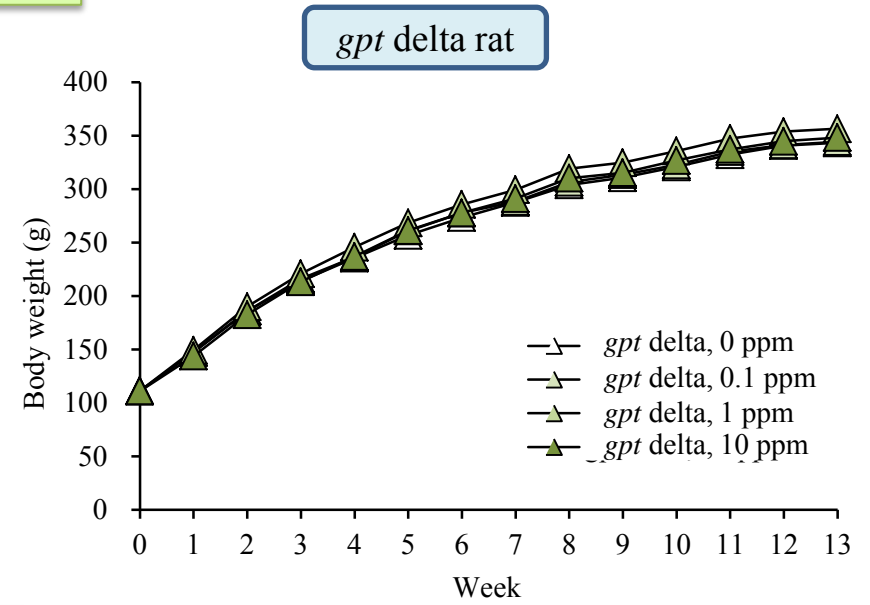
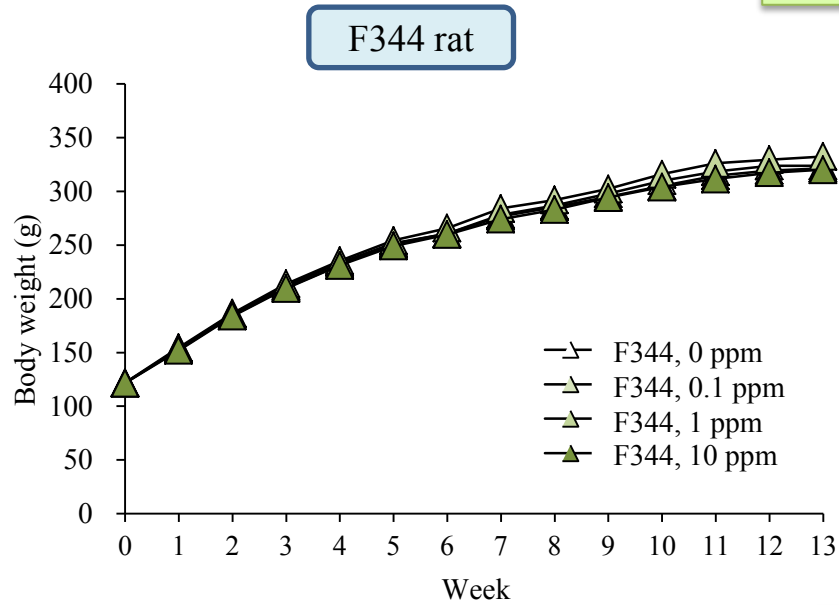
AGE OF START: 6-week-old

			(weeks)
F344	<i>gpt delta</i>	0	13
10	10	0 ppm DEN (ultrapure water)	
10	10	0.1 ppm DEN in drinking water	
10	10	1 ppm DEN in drinking water	
10	10	10 ppm DEN in drinking water	

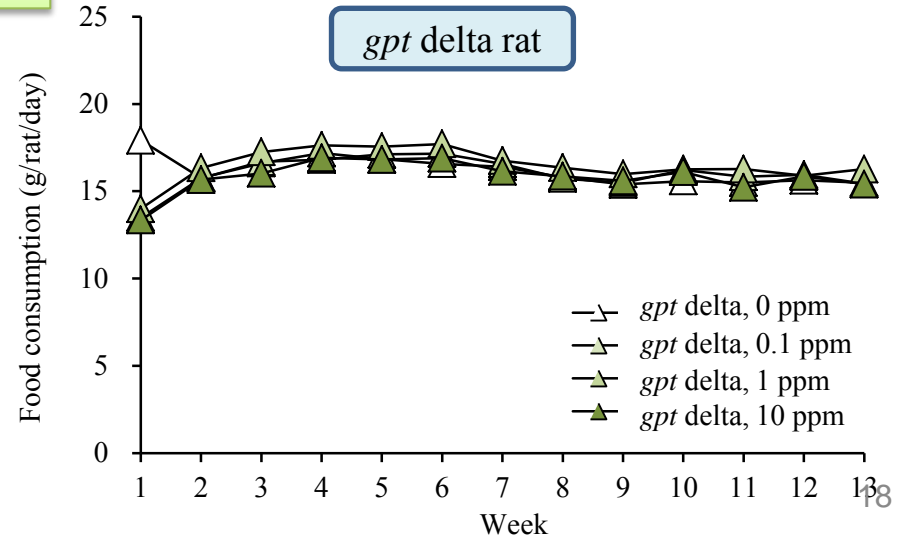
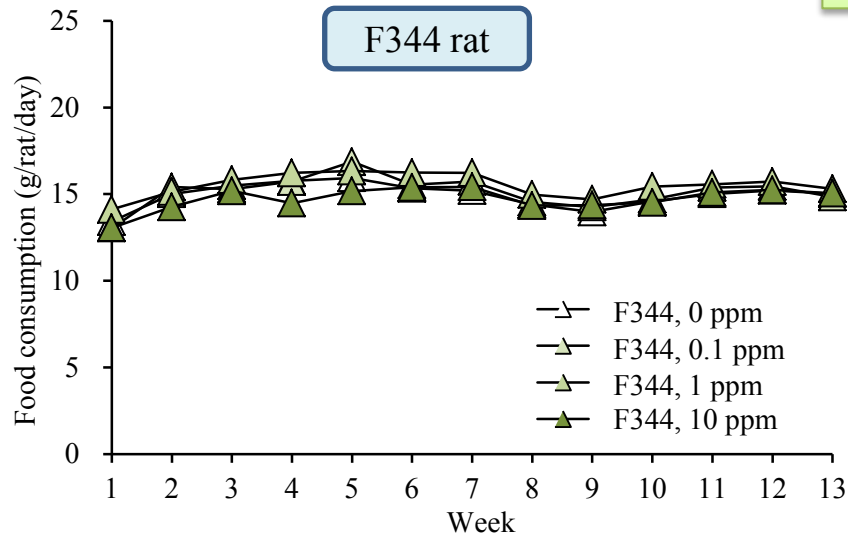
Examination: in-life parameters, hematology, serum biochemistry, organ weight histopathology (liver), quantitative analysis of GST-P positive foci

体重増加曲線と摂餌量

体重増加曲線



摂餌量



臟器重量

	F344				<i>gpt delta</i>			
	0 ppm	0.1 ppm	1 ppm	10 ppm	0 ppm	0.1 ppm	1 ppm	10 ppm
Final body weights (g)	317 ± 18	314 ± 19	324 ± 20	313 ± 18	334 ± 15	335 ± 28	347 ± 15	339 ± 11
Organ weights								
Absolute weights (g)								
Brain	1.92 ± 0.07	1.95 ± 0.05	1.93 ± 0.03	1.93 ± 0.04	1.96 ± 0.06	1.94 ± 0.06	1.95 ± 0.03	1.93 ± 0.05
Thymus	0.25 ± 0.04	0.27 ± 0.05	0.27 ± 0.04	0.27 ± 0.05	0.26 ± 0.04	0.27 ± 0.05	0.25 ± 0.03	0.24 ± 0.03
Lungs	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.05	1.02 ± 0.03	1.02 ± 0.04	1.03 ± 0.07	1.03 ± 0.08	1.04 ± 0.05	1.03 ± 0.07
Heart	0.86 ± 0.05	0.87 ± 0.05	0.89 ± 0.07	0.90 ± 0.08	0.88 ± 0.05	0.90 ± 0.07	0.90 ± 0.08	0.88 ± 0.05
Spleen	0.66 ± 0.02	0.66 ± 0.04	0.67 ± 0.02	0.69 ± 0.04	0.66 ± 0.03	0.67 ± 0.04	0.68 ± 0.04	0.69 ± 0.03
Liver	7.79 ± 0.65	7.72 ± 0.55	7.87 ± 0.45	8.02 ± 0.58	8.58 ± 0.65	8.33 ± 0.76	8.72 ± 0.54	8.67 ± 0.42
Adrenals	0.044 ± 0.005	0.043 ± 0.005	0.044 ± 0.002	0.040 ± 0.003	0.044 ± 0.005	0.044 ± 0.003	0.046 ± 0.003	0.043 ± 0.004
Kidneys	1.87 ± 0.12	1.91 ± 0.13	1.90 ± 0.06	1.88 ± 0.13	1.92 ± 0.12	2.05 ± 0.14	2.03 ± 0.12	1.95 ± 0.07
Testes	3.04 ± 0.20	3.02 ± 0.16	3.03 ± 0.24	3.09 ± 0.19	2.98 ± 0.17	3.08 ± 0.21	3.09 ± 0.14	3.03 ± 0.12
Relative weights (g/100g b.w.)								
Brain	0.61 ± 0.02	0.62 ± 0.03	0.60 ± 0.04	0.62 ± 0.03	0.59 ± 0.03	0.58 ± 0.04	0.56 ± 0.02	0.57 ± 0.02
Thymus	0.079 ± 0.012	0.086 ± 0.015	0.084 ± 0.009	0.087 ± 0.018	0.078 ± 0.012	0.080 ± 0.012	0.072 ± 0.009	0.071 ± 0.011
Lungs	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.02
Heart	0.27 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.26 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.26 ± 0.02	0.26 ± 0.02
Spleen	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01
Liver	2.45 ± 0.09	2.46 ± 0.09	2.43 ± 0.07	2.56 ± 0.09	2.56 ± 0.09	2.49 ± 0.10	2.51 ± 0.09	2.56 ± 0.08
Adrenals	0.014 ± 0.0010	0.014 ± 0.0015	0.014 ± 0.0009	0.013 ± 0.0010	0.013 ± 0.0014	0.013 ± 0.0012	0.013 ± 0.0012	0.013 ± 0.0012
Kidneys	0.59 ± 0.02	0.61 ± 0.03	0.59 ± 0.04	0.60 ± 0.02	0.58 ± 0.03	0.61 ± 0.02**	0.58 ± 0.02	0.58 ± 0.02
Testes	0.96 ± 0.04	0.96 ± 0.04	0.94 ± 0.11	0.99 ± 0.06	0.89 ± 0.05	0.92 ± 0.03	0.89 ± 0.04	0.90 ± 0.05

** $p < 0.01$ vs. 0 ppm

血液学的検査および血清生化学的検査

血液学的検査

	F344				gpt delta			
	0 ppm	0.1 ppm	1 ppm	10 ppm	0 ppm	0.1 ppm	1 ppm	10 ppm
WBC (x10 ² /μL)	40.5 ± 14.0	48.6 ± 15.6	41.5 ± 7.0	41.1 ± 10.1	38.4 ± 12.0	37.0 ± 8.5	33.1 ± 6.1	29.1 ± 3.2
RBC (x10 ³ /μL)	869.6 ± 45.0	944.1 ± 42.9 **	920.2 ± 37.7 *	941.4 ± 37.8 **	889.4 ± 53.4	910.4 ± 51.1	875.7 ± 26.1	916.4 ± 33.2
HGB (g/dL)	15.1 ± 0.9	15.8 ± 0.6 *	15.5 ± 0.4	15.7 ± 0.6	15.0 ± 1.0	15.3 ± 0.7	14.8 ± 0.2	14.8 ± 0.4
HCT (%)	47.6 ± 2.4	51.4 ± 2.4 **	50.1 ± 1.8 *	50.9 ± 2.0 **	47.7 ± 2.5	48.8 ± 2.6	46.8 ± 1.5	48.3 ± 2.0
MCV (fL)	54.7 ± 0.5	54.5 ± 0.2	54.4 ± 0.4	54.1 ± 0.4 **	53.7 ± 0.5	53.6 ± 0.4	53.5 ± 0.4	53.3 ± 0.3
MCH (pg)	17.4 ± 0.3	16.8 ± 0.5 **	16.8 ± 0.4 **	16.6 ± 0.2 **	16.9 ± 0.2	16.8 ± 0.5	16.9 ± 0.3	16.4 ± 0.3 **
MCHC (g/dL)	31.7 ± 0.5	30.8 ± 0.9	30.9 ± 0.7 *	30.8 ± 0.4 **	31.5 ± 0.5	31.4 ± 0.9	31.6 ± 0.6	30.7 ± 0.6
PLT (x10 ⁴ /μL)	62.2 ± 5.2	64.6 ± 7.2	64.5 ± 2.2	69.6 ± 9.5	66.9 ± 7.6	67.2 ± 5.4	66.5 ± 3.4	74.2 ± 3.9 *

*, **: $p < 0.05, 0.01$ vs. 0 ppm

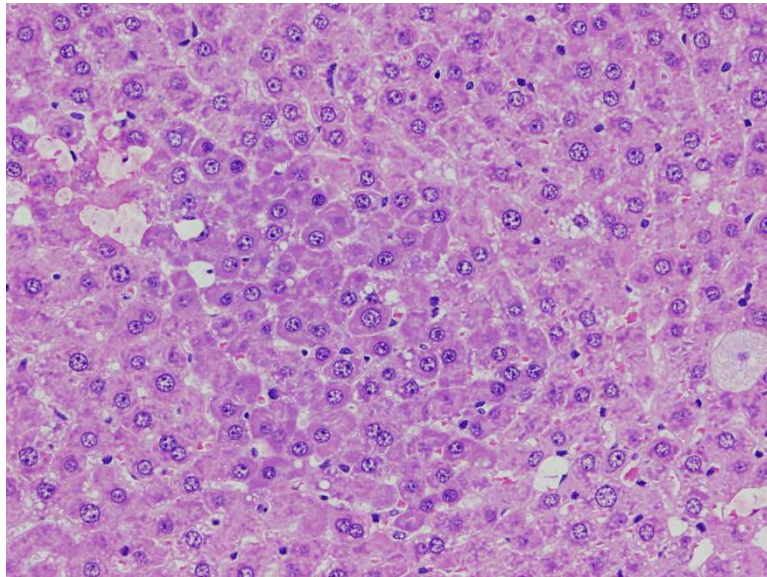
血清生化学的検査

	F344				gpt delta			
	0 ppm	0.1 ppm	1 ppm	10 ppm	0 ppm	0.1 ppm	1 ppm	10 ppm
TP (g/dL)	6.1 ± 0.2	5.9 ± 0.1	6.0 ± 0.2	6.1 ± 0.3	6.1 ± 0.2	6.0 ± 0.2	6.1 ± 0.2	6.0 ± 0.2
A/G	2.0 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.2 ± 0.1 *	2.1 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.9 ± 0.1 *	2.2 ± 0.1
ALB (g/dL)	4.1 ± 0.1	4.0 ± 0.1	4.0 ± 0.2	4.2 ± 0.2	4.1 ± 0.1	4.0 ± 0.2	4.0 ± 0.1	4.1 ± 0.1
T-Bil (mg/dL)	0.039 ± 0.007	0.034 ± 0.008	0.040 ± 0.007	0.043 ± 0.008	0.037 ± 0.005	0.043 ± 0.005 *	0.037 ± 0.005	0.040 ± 0.005
T-Cho (mg/dL)	64 ± 3	64 ± 6	66 ± 7	65 ± 6	63 ± 4	67 ± 5	63 ± 4	59 ± 7
Glu (mg/dL)	166 ± 36	170 ± 22	180 ± 24	169 ± 29	189 ± 44	201 ± 36	180 ± 21	168 ± 25
TG (mg/dL)	110 ± 25	104 ± 19	110 ± 27	100 ± 14	151 ± 41	120 ± 40	136 ± 34	93 ± 22 **
PL (mg/dL)	111 ± 7	108 ± 7	107 ± 10	108 ± 8	115 ± 9	113 ± 12	112 ± 9	103 ± 10 *
BUN (mg/dL)	17.8 ± 0.7	16.5 ± 0.6	16.2 ± 1.3 *	17.0 ± 1.7	20.7 ± 1.5	18.5 ± 0.9	17.6 ± 1.4 **	17.0 ± 1.5 **
CRN (mg/dL)	0.28 ± 0.01	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.28 ± 0.04	0.30 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.02
Ca (mg/dL)	10.0 ± 0.3	9.7 ± 0.2	9.9 ± 0.2	10.1 ± 0.3	9.8 ± 0.3	9.9 ± 0.3	10.0 ± 0.2	10.1 ± 0.2
P (mg/dL)	5.6 ± 0.1	5.5 ± 0.2	5.5 ± 0.4	5.9 ± 0.5	5.8 ± 0.4	5.8 ± 0.3	5.8 ± 0.4	5.7 ± 0.2
Na (mEq/dL)	145 ± 1	143 ± 1 **	144 ± 1 *	143 ± 1 **	143 ± 1	143 ± 1	142 ± 1	143 ± 1
K (mEq/dL)	4.2 ± 0.1	4.2 ± 0.2	4.2 ± 0.2	4.3 ± 0.4	4.4 ± 0.1	4.4 ± 0.2	4.5 ± 0.2	4.4 ± 0.2
Cl (mEq/dL)	105 ± 1	104 ± 1	105 ± 1	104 ± 1	103 ± 1	103 ± 1	103 ± 1	104 ± 1
AST (IU/L)	83 ± 8	78 ± 9	75 ± 10	77 ± 11	82 ± 14	74 ± 5	80 ± 9	80 ± 12
ALT (IU/L)	47 ± 6	45 ± 6	43 ± 6	45 ± 7	53 ± 9	49 ± 5	48 ± 4	48 ± 6
ALP (IU/L)	384 ± 25	366 ± 22	339 ± 29 **	338 ± 26 **	421 ± 31	379 ± 30	353 ± 19 **	350 ± 28 **
γ-GTP (IU/L)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND 20

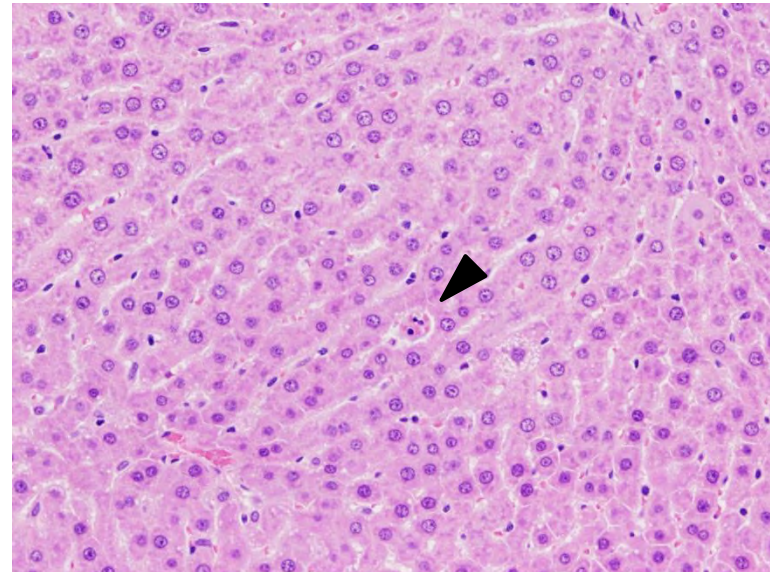
ND, Not detected. *, **: $p < 0.05, 0.01$ vs. 0 ppm

肝臓の病理組織学的検査

Organs	Findings	F344				<i>gpt</i> delta			
		0 ppm	0.1 ppm	1 ppm	10 ppm	0 ppm	0.1 ppm	1 ppm	10 ppm
No. of animal		10	10	10	10	10	10	10	10
Liver	Single cell necrosis	0	2	3	7	0	3	4	5
	Hepatocyte, necrosis, focal	0	0	1	0	0	0	1	1
	Focus of cellular alteration, basophilic, diffuse	0	0	0	7	0	0	0	8

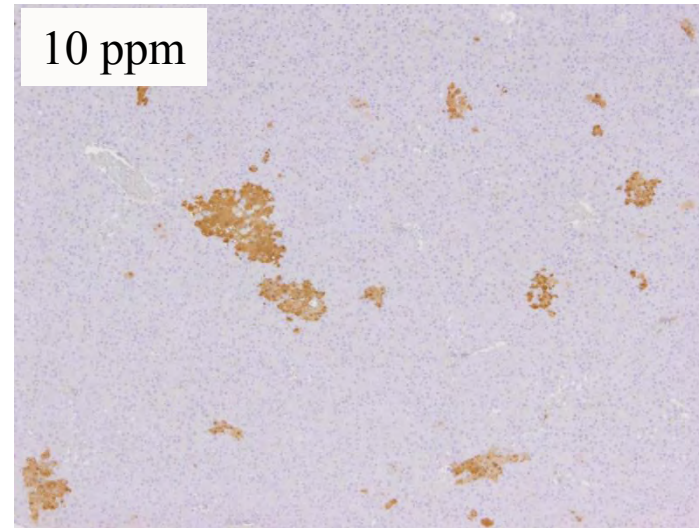
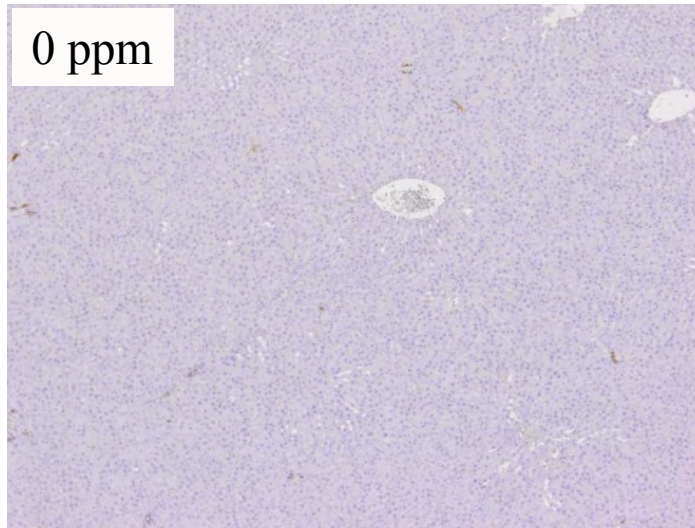


Focus of cellular alteration

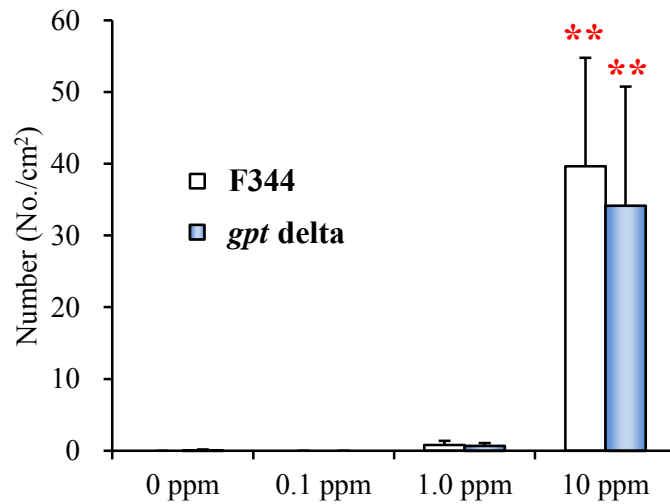


Single cell necrosis

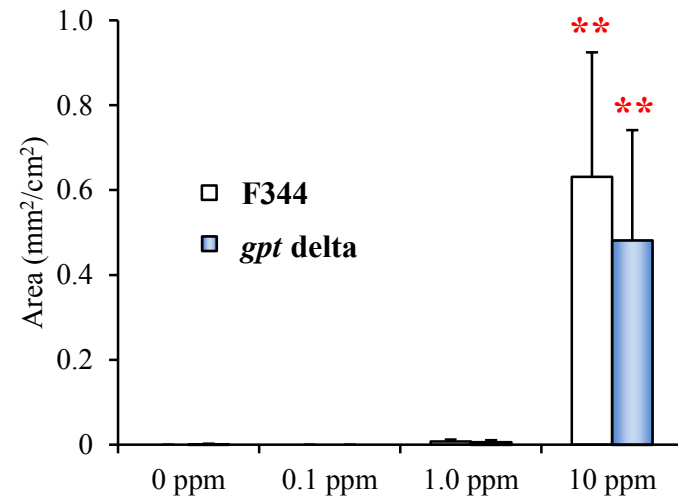
肝臓のGST-P陽性細胞巢定量的解析



Number



Area



2. *gpt delta* ラットの一般毒性検索系としての妥当性の検討

- *gpt delta*および野生型ラットにDENを13週間投与した結果、何れのラットにも投与に起因する体重・摂餌量の変化はなく、血液学的検査、血清生化学的検査ならびに臓器重量測定に毒性学的意義のある変化は認められなかった。
- 病理組織学的検査の結果、肝細胞の単細胞壊死、巣状壊死および好塩基性変異肝細胞巢の発生が認められたが、その発生頻度において両遺伝子型間に有意な差は認められなかった。また、GST-P陽性細胞巢の定量的解析の結果、両遺伝子型ともに投与群において、その数および面積ともに有意な高値を示し、その程度も遺伝子型間で同程度であったことから、DENの肝発がん性に対する感受性に両遺伝子型間に差異はないと考えられた。
- DENの一般毒性ならびに発がん性に関して、F344系*gpt delta*ラットおよびF344系ラット間で特異的な差異は認められなかったことから、一般毒性検索を目的とした反復投与試験にF344系*gpt delta*ラットを用いることは妥当であると考えられた。

F344系*gpt delta*ラットおよびF344系ラットにDENを13週間反復投与した結果、DENの一般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。

1. *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

*gpt delta*ラットを用いた包括的試験法の標準化を目的に、被験物質の投与期間やラット系統差の検討を行う。

2. *gpt delta*ラットの一般毒性検索系としての妥当性の検討

*gpt delta*ラットを用いて反復投与毒性を検索することの妥当性を明らかにするために、*gpt delta*ラットおよびその野生型ラットの反復投与毒性の差異を検討する。

3. *gpt delta*ラットの詳細なレポーター遺伝子変異の解析

ゲノム中のレポーター遺伝子挿入部位の解析や加齢による自然突然変異頻度の変化や系統間の差異を検討する。

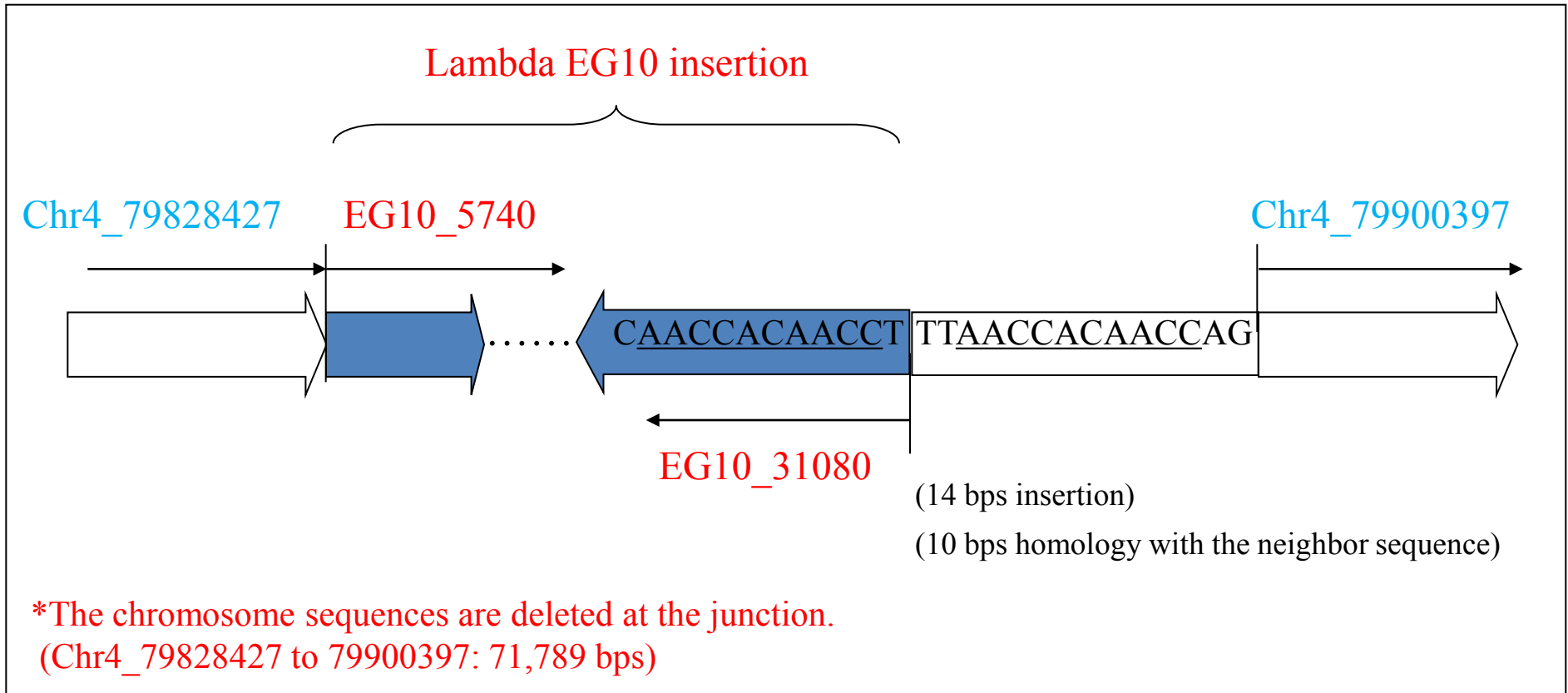
4. *gpt delta*ラットにおける遺伝子変異と誘発病変内遺伝子変異の比較

*gpt*遺伝子上の遺伝子変異とがん遺伝子上の遺伝子変異との相関性を検討する。

ゲノム中のトランスジーン挿入部位の解析

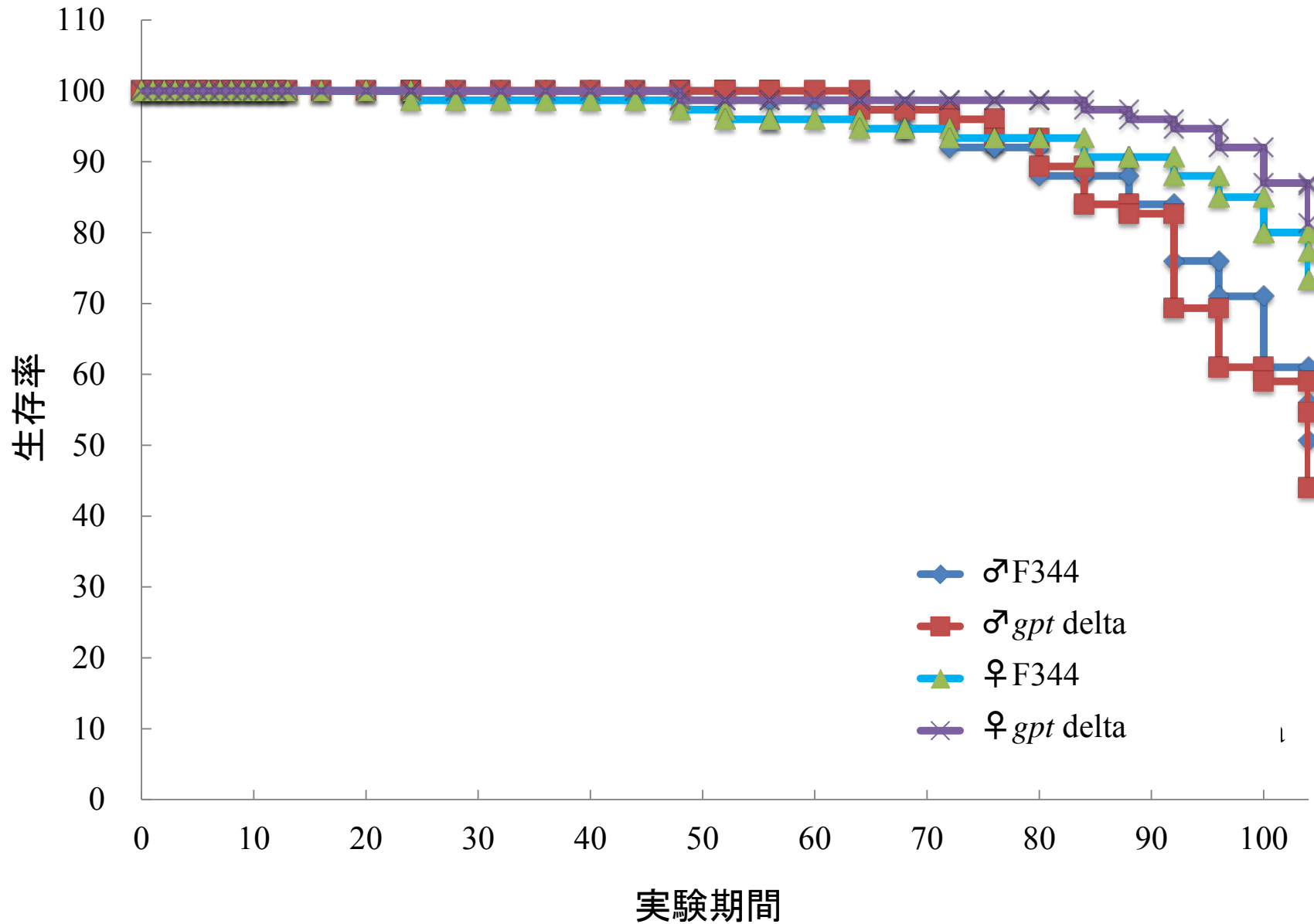
次世代シーケンサーを用いて、導入遺伝子 λ EG10の挿入位置の配列を決定した。

Lambda EG10 transgenes are integrated in chromosome 4 of *gpt* delta rat (F344 background).



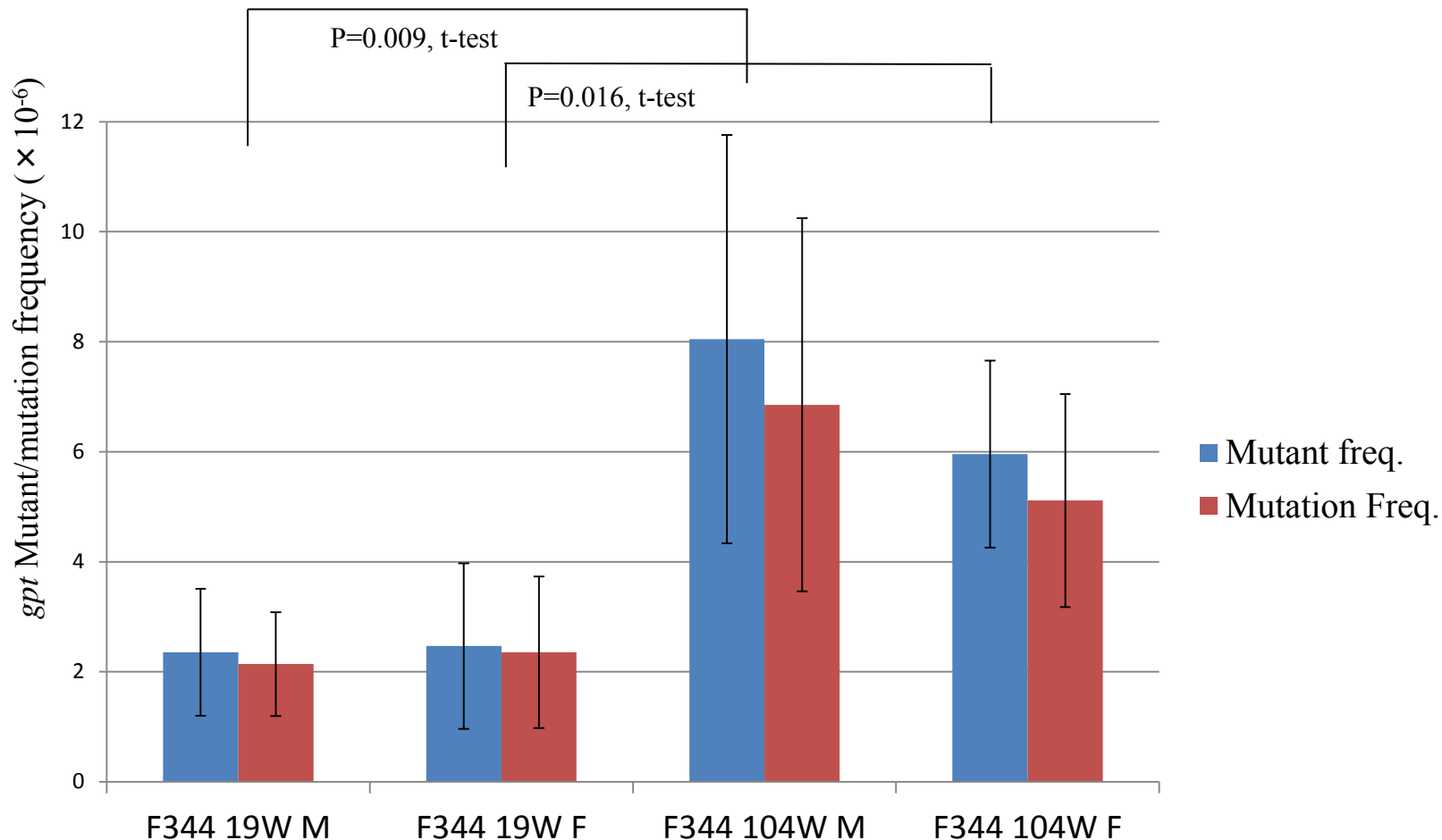
挿入部位におけるゲノム欠失(72 kb、1遺伝子含む)および導入遺伝子の断片化が確認された。

F344 *gpt* delta ラット2年間飼育実験の生存率



自然突然変異の蓄積の検討

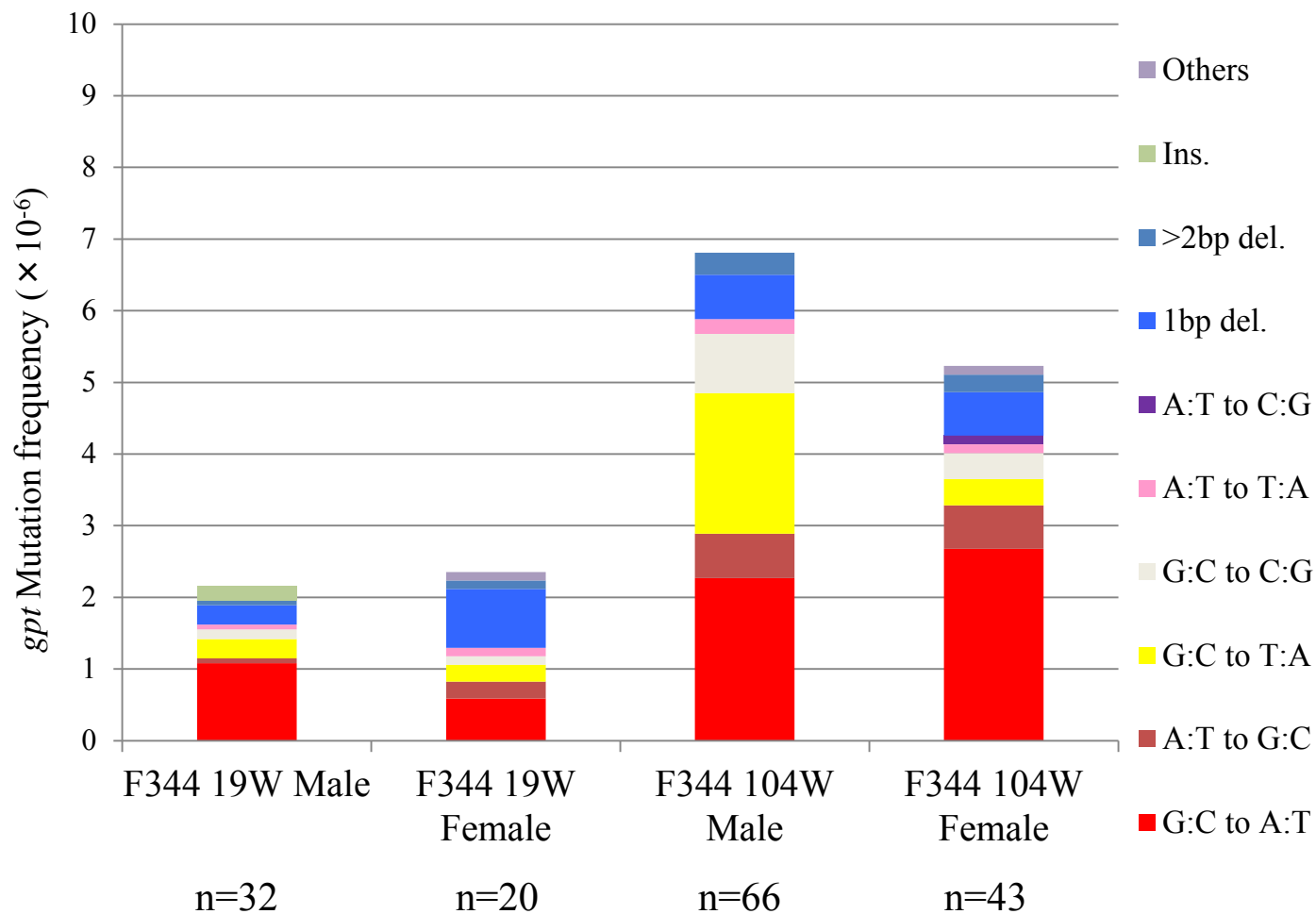
Point mutations in liver of F344 *gpt* delta rats



F344 *gpt* deltaラット肝臓の*gpt*点突然変異頻度は、19週齢と比較して104週齢では約3倍に増加した。

自然突然変異の蓄積の検討

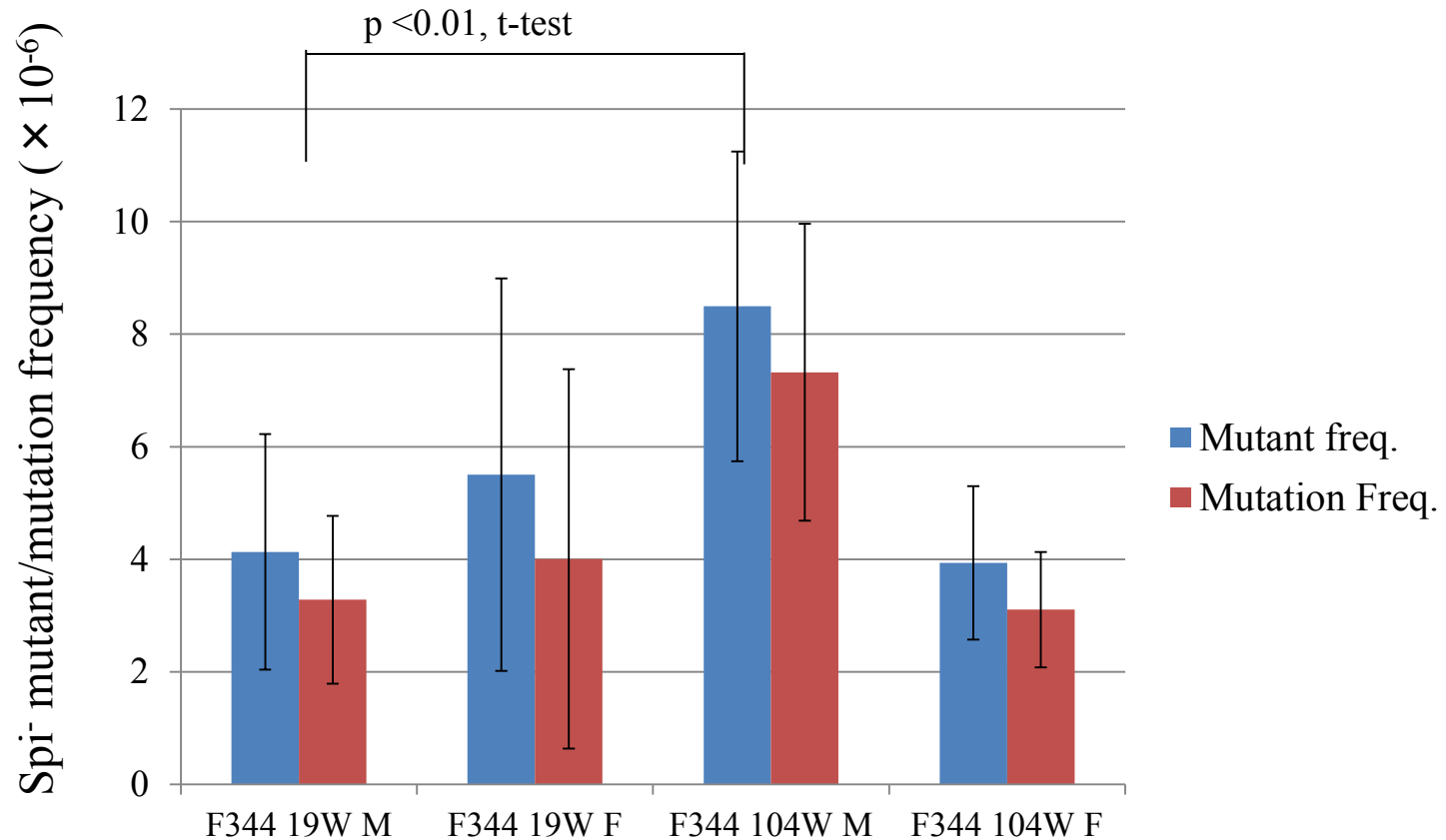
gpt Mutation spectra in liver of F344 *gpt* delta rats



点突然変異の主要なタイプはG:C to A:T, G:C to T:A, 1塩基欠失等であり、加齢によって増加した。104週齢の雄ではG:C to T:A変異の顕著な増加がみられた。

自然突然変異の蓄積の検討

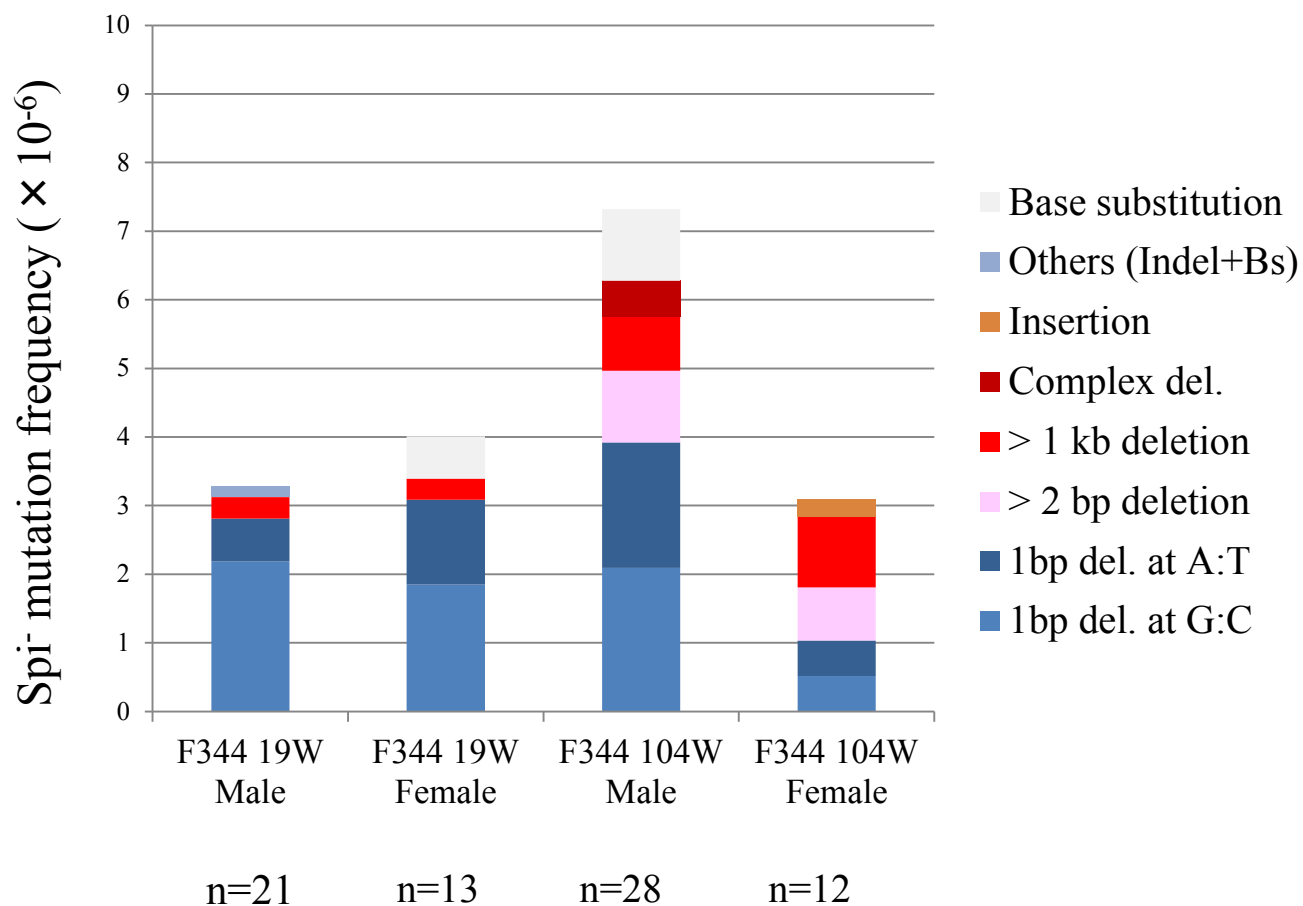
Deletions in liver of F344 *gpt* delta rats



F344 *gpt* deltaラット肝臓のSpi-欠失変異頻度は、19週齢と比較して104週齢の雄で2倍に増加した。

自然突然変異の蓄積の検討

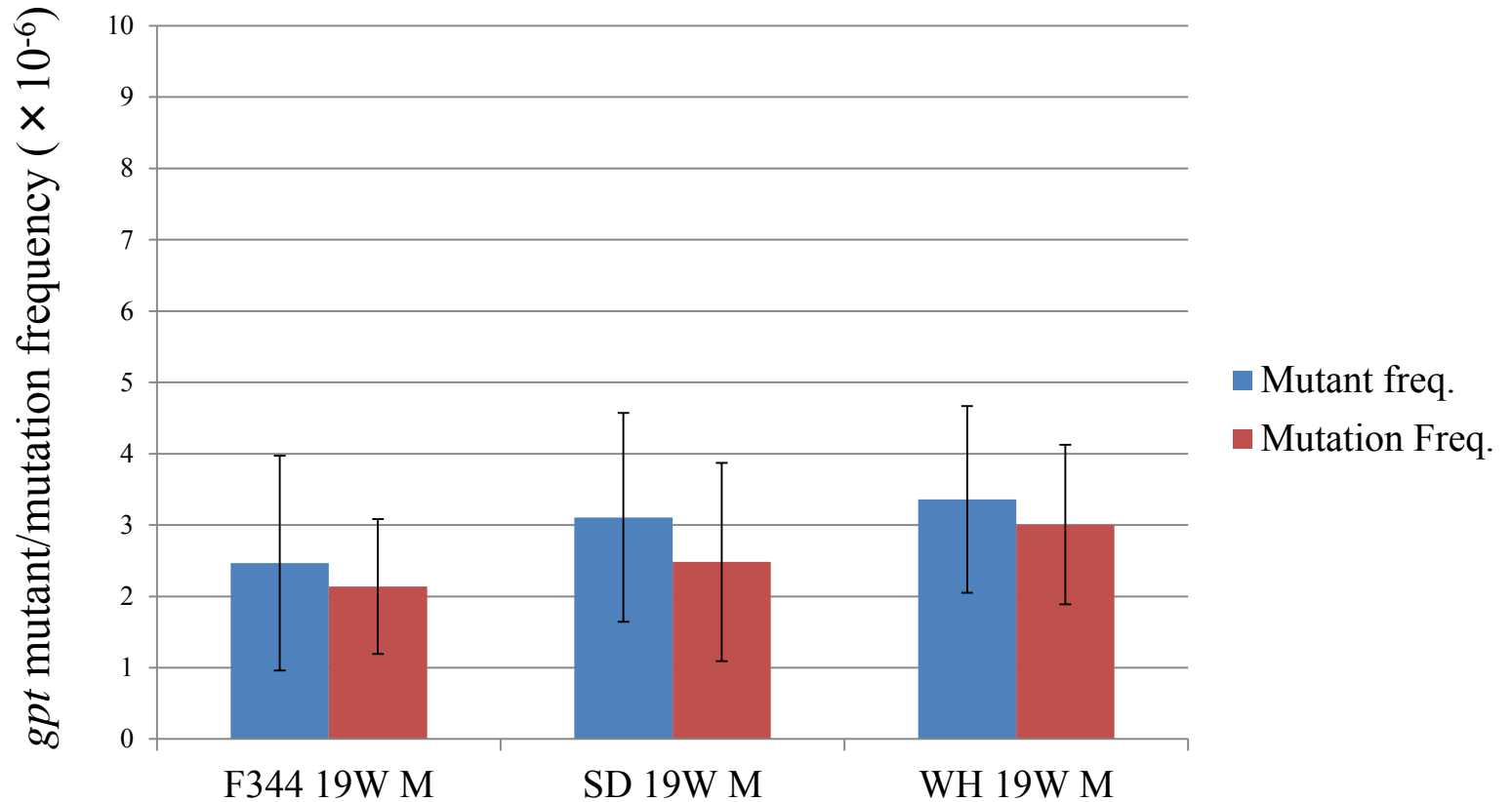
Spi^r mutation spectra in liver of F344 *gpt* delta rats



104週齢の雌雄ラット肝臓では2 bps～数kbの欠失変異が増加した。

系統差の検討

gpt Mutant/mutation frequencies in liver of male *gpt* delta rats (F344, SD and WistarHannover)

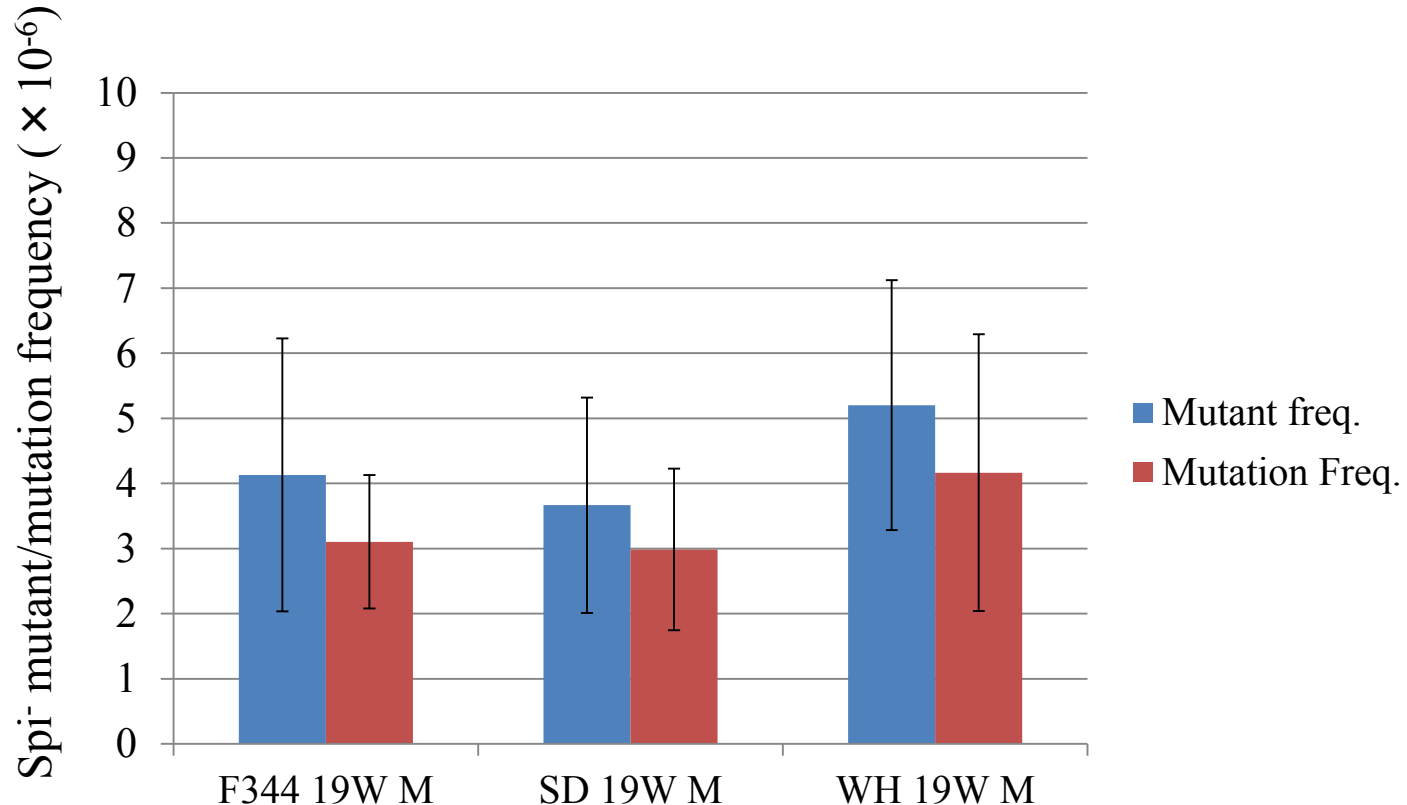


19週齢F344, SD, WistarHannover雄ラットの肝臓における*gpt*点突然変異頻度に系統差はみられなかった。

系統差の検討

Spi⁻ mutant/mutation frequencies in liver of male *gpt* delta rats

(F344, SD and WistarHannover)



19週齢のF344, SD, WistarHannover雄ラットの肝臓におけるSpi⁻欠失変異頻度に系統差はみられなかった。

3. *gpt delta*ラットの詳細なレポーター遺伝子変異の解析

- *gpt delta*ラットゲノムのトランスジーンλEG10の挿入部位を決定した。挿入部位には72 kbのゲノム欠失が認められた。導入遺伝子のコピー数は約10コピーと推定された。
- F344 *gpt delta*ラットの肝臓の点突然変異頻度は19週齢と比較して104週齢では2~3倍に増加し、104週齢の雄ではG:C to T:A変異が顕著に増加した。また、104週齢の雌雄で2 bps~数kbの欠失変異が増加した。
- 104週齢においても、検出された自然突然変異の多くは独立した*de novo*変異であり、クローン性の変異体の影響は限定的であった。
- 3系統の*gpt delta*ラット(SD, F344, Wistar Hannover)における自然突然変異頻度に明らかな系統差は認められなかった。

1. *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

*gpt delta*ラットを用いた包括的試験法の標準化を目的に、被験物質の投与期間やラット系統差の検討を行う。

2. *gpt delta*ラットの一般毒性検索系としての妥当性の検討

*gpt delta*ラットを用いて反復投与毒性を検索することの妥当性を明らかにするために、*gpt delta*ラットおよびその野生型ラットの差異を検討する。

3. *gpt delta*ラットの詳細なレポーター遺伝子変異の解析

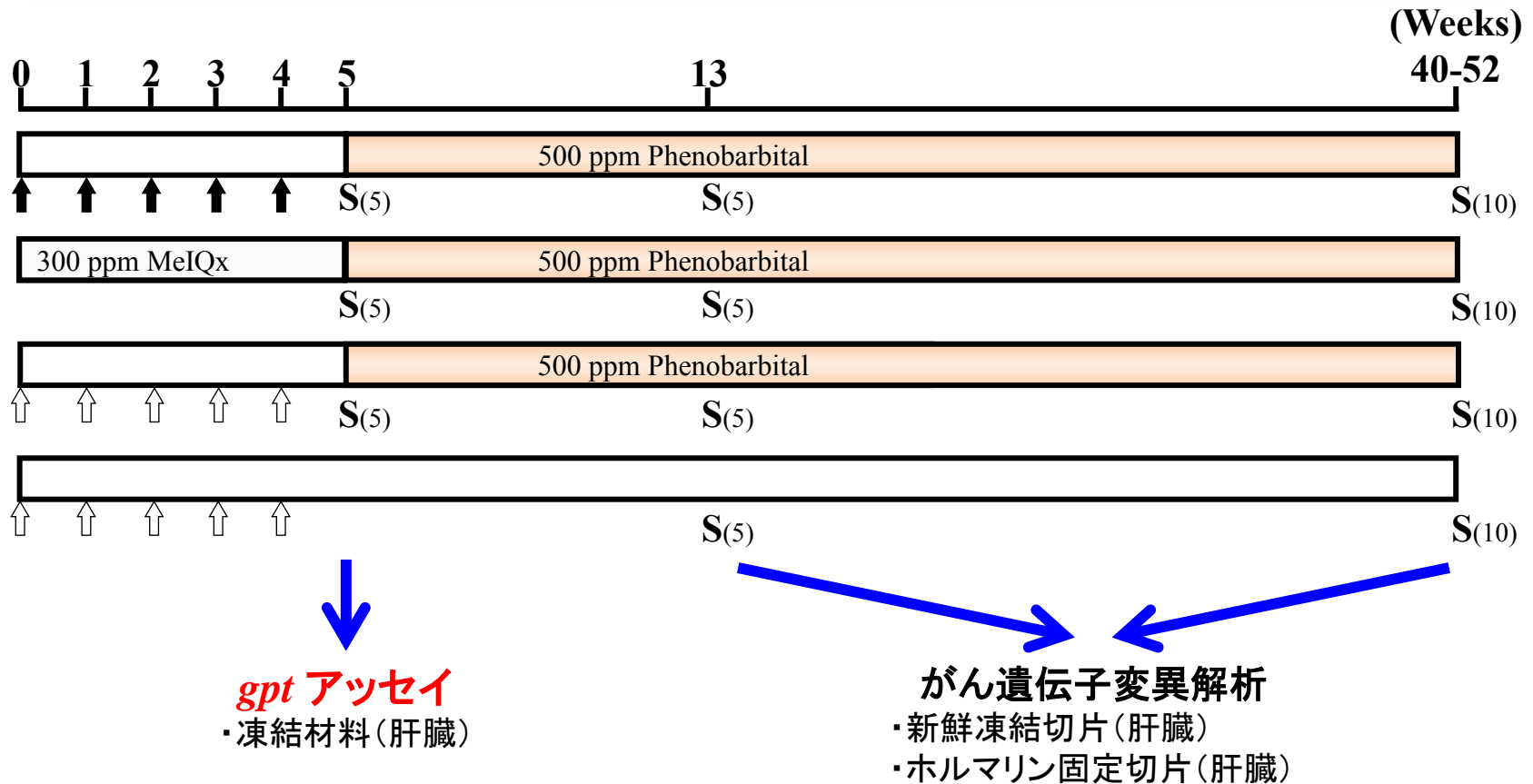
ゲノム中のレポーター遺伝子挿入部位の解析や加齢による自然突然変異頻度の変化や系統間の差異を検討する。

4. *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

*gpt*遺伝子上の遺伝子変異とがん遺伝子上の遺伝子変異との相関性を検討する。

4. *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

遺伝毒性肝発がん物質の投与により誘発される*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た。



↑ : Diethylnitrosamine (DEN) (40 mg/kg, i.p) (遺伝毒性肝発がん物質) ↑ : Saline S : Sacrifice

□ : 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx) (遺伝毒性肝発がん物質)

gpt assayおよびgpt変異体スペクトラム解析

gpt assay

Treatment	Animal No.	Cm ^R colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
	11	2.66	30	11.30	
	12	1.97	26	13.19	
DEN	13	2.17	41	18.90	17.89±6.20**
	14	2.10	57	27.18	
	15	2.22	42	18.89	
	21	2.62	30	11.45	
	22	2.91	19	6.54	
MeIQx	23	1.75	29	16.61	9.73±4.35**
	24	2.80	18	6.43	
	25	3.02	23	7.63	
	31	13.23	6	0.45	
	32	10.26	5	0.49	
Saline	33	12.56	2	0.16	0.26±0.21
	34	14.81	3	0.20	
	35	9.90	0	0.00	

** : p < 0.01 vs. saline group

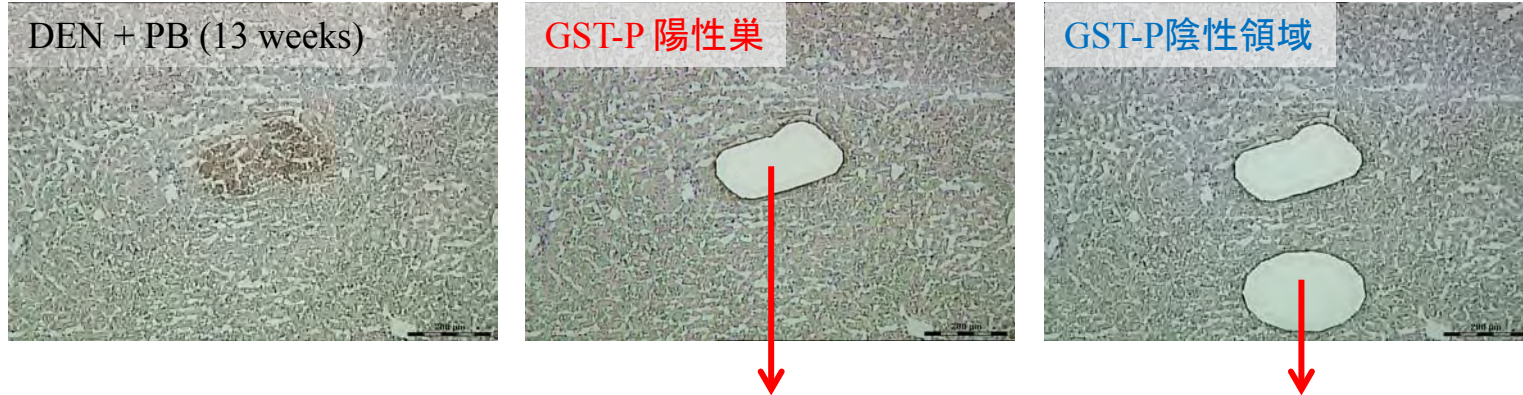
gpt変異体スペクトラム解析

	DEN		MeIQx		Saline	
	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)
Base substitution						
Transversions						
G:C-T:A	19 (9.7)	1.73±0.63	57 (47.9)	4.67±2.19**	4 (25.0)	0.08±0.17
G:C-C:G	2 (1.0)	0.17±0.24	3 (2.5)	0.26±0.25	1 (6.3)	0.02±0.03
A:T-T:A	70 (35.7)	6.33±2.15**	4 (3.4)	0.30±0.50	1 (6.3)	0.02±0.04
A:T-C:G	24 (12.2)	2.26±1.41*	1 (0.8)	0.07±0.15	0	-
Transitions						
G:C-A:T	40 (20.4)	3.70±1.37**	6 (5.0)	0.42±0.29	7 (43.8)	0.10±0.13
A:T-G:C	36 (18.4)	3.24±1.56**	2 (1.7)	0.18±0.26	1 (6.3)	0.02±0.04
Deletions						
Single bp	1 (0.5)	0.09±0.21	35 (29.4)	2.98±1.94**	1 (6.3)	0.02±0.03
Over 2 bp	0	-	4 (3.4)	0.33±0.33	1 (6.3)	0.01±0.03
Insertions	0	-	0	-	0	-
Complexes	4 (2.0)	0.37±0.40	7 (5.9)	0.53±0.49	0	-
Total	196	17.89±6.20	119	9.73±4.35	16	0.26±0.21

*, ** p < 0.05, 0.01 vs. saline group

マイクロダイセクション法を用いたがん遺伝子変異解析

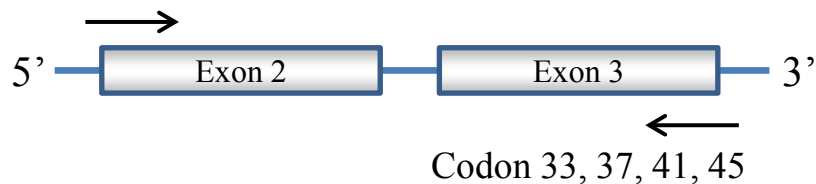
1. レーザーマイクロダイセクション法による組織の回収およびDNA抽出



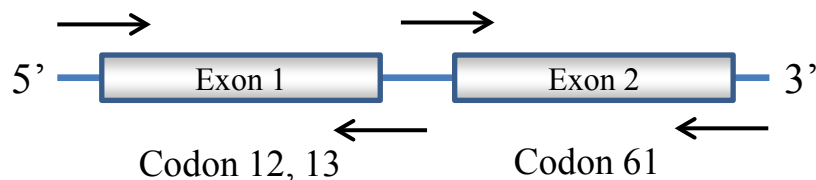
レーザーマイクロダイセクション法にてGST-P陽性細胞巣またはGST-P陰性領域を採取し、DNAを抽出

2. PCR法による遺伝子増幅

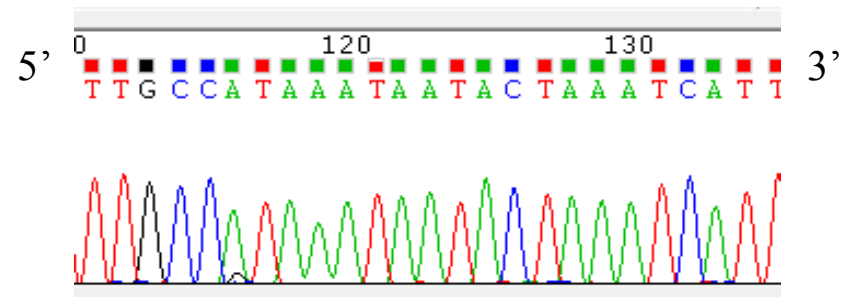
β-catenin



K-ras



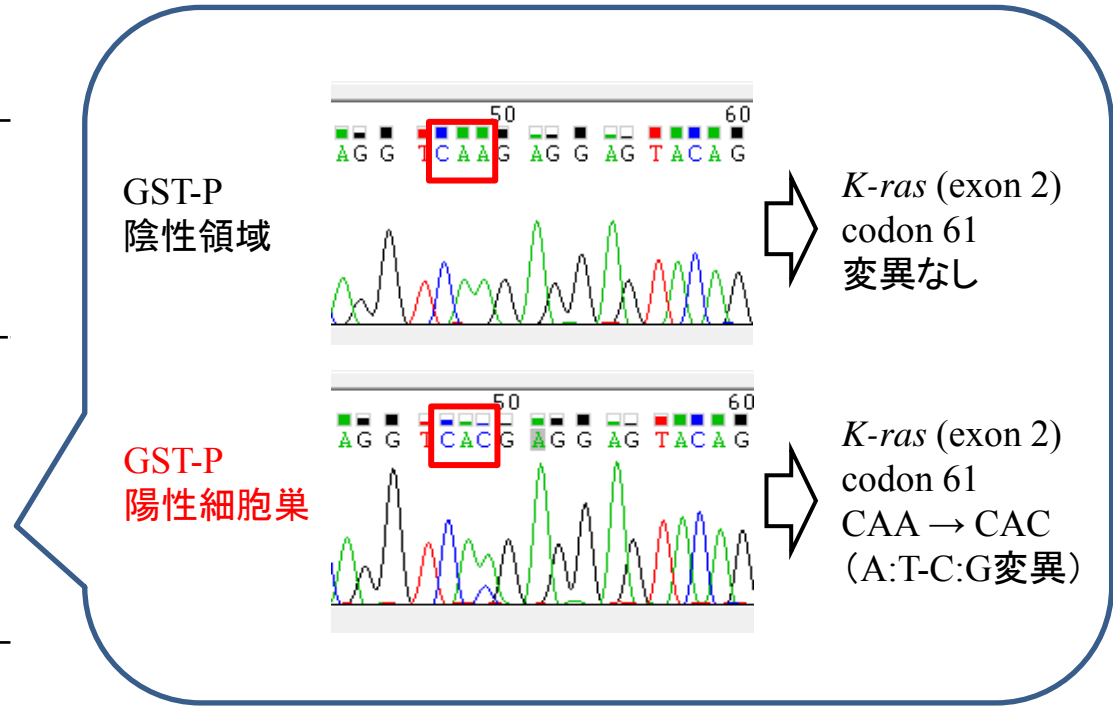
3. Direct sequence法による遺伝子配列解析



がん遺伝子変異解析

DEN + PB群の*K-ras* (exon 2) 遺伝子変異頻度

	No. of animals	No. of foci	Mutation frequency (%)
GST-P negative lesion	2	20	0 / 20 (0)
GST-P positive foci	2	20	1 / 20 (5)



DEN + PB群のGST-P陽性細胞巢において*K-ras* (exon2) codon 61変異が1例で認められ、その変異パターンは、A:T-C:G変異であった。一方、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。

4. *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

- *gpt* deltaラットにDENを週1回、5週間腹腔内投与またはMeIQxを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MeIQx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*変異体スペクトラム解析の結果、DEN投与群では、A:T-T:A、A:T-C:G transversionおよびG:C-A:T、A:T-G:C transition 変異頻度が対照群に比較して有意に上昇した。また、MeIQx投与群ではG:C-T:A transversionおよび一塩基欠失変異が対照群に比較して有意な高頻度で認められた。
- DEN+PB群において認められたGST-P陽性細胞巢のがん遺伝子変異解析を行ったところ、*K-ras* (exon 2) codon 61に変異が1例認められ、その変異パターンはA:T-C:G変異であった。この変異パターンは、DEN投与により高頻度に認められる*gpt*遺伝子上の変異パターンの1つであったことから、*gpt*遺伝子上の遺伝子変異とがん遺伝子上の遺伝子変異の変異パターンは相関する可能性が示唆された。
- しかし、MeIQx+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法により採取することが困難であった。さらに、*K-ras*遺伝子 (exon 1)および β -*catenin*遺伝子(exon 3)を標的とした遺伝子変異検索のためのDNA抽出法やPCR条件の最適化が困難であったことから、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。今後、サンプル採取の時期、DNA抽出法やPCR条件の最適化のさらなる検討が必要であると考えられた。

DEN+PB群のGST-P陽性細胞巢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。

まとめ

遺伝毒性・反復投与毒性併合試験法の開発

遺伝毒性試験や反復投与毒性試験にレポーター遺伝子導入動物を用いるうえでの適切な試験方法や妥当性の検討

*gpt delta*ラットの特徴とレポーター遺伝子を用いて*in vivo* 遺伝毒性を評価することの有用性の検討

- ・投与期間に関わらず、遺伝毒性発がん物質の遺伝毒性、発がん性が評価可能
- ・投与期間に関わらず、非遺伝毒性発がん物質ではレポーター遺伝子変異頻度の増加は認められない
- ・投与期間が長いほど影響が顕著
- ・遺伝毒性、発がん性の程度に系統間の特異な差は認められない

- ・F344系*gpt delta*ラットおよびF344系ラットにDENを13週間反復投与した結果、DENの一般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

- ・トランスジーンの挿入部位を同定、コピー数を推定
- ・加齢によって自然突然変異は増加し、G:C to T:A変異や2 bps~数kbの欠失変異が増加
- ・加齢で見られる自然突然変異の多くは*de novo*変異で、クローン性の変異体の影響は限定的
- ・自然突然変異頻度に明らかな系統差は認められない

- ・GST-P陽性巢内の*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

*gpt delta*ラットを用いて、13週間遺伝毒性試験を行うことは可能であると考えられる。

*gpt delta*ラットを用いて、13週間反復投与毒性試験にて一般毒性を評価することは妥当であると考えられる。

*gpt delta*ラットの導入遺伝子の基礎的な情報を提供し、加齢による影響を明らかにした。

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。

*gpt delta*ラットを用いて反復投与毒性試験を行い、一般毒性、遺伝毒性、発がん性を評価する包括的試験を標準化

*gpt delta*ラットを用いた*in vivo* 遺伝毒性の評価と発がんへの関与を検討するうえでの基礎的知見・有用性を検証

*gpt delta*ラットを用いた遺伝毒性・反復投与毒性併合試験法の確立

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。

遺伝毒性・反復投与毒性併合試験

