

「遺伝子改変動物による発がん性試験」について

菅野 純

独立行政法人 労働者健康安全機構
日本バイオアッセイ研究センター

遺伝子改変動物による発がん性試験の概要

【条件】

- 化学物質による多臓器の標的性を総合的に評価できる試験手法
- 長期発がん性試験に比べて、試験期間が大幅に短縮されるもの
- 中期肝発がん性試験で対応が困難な、以下の物質の発がん性調査に適切である
 - ① 肝臓への標的性が弱く、他の臓器への標的性が高い化学物質
 - ② 肝臓への標的性がなく、他の臓器への標的性が疑われる物質
 - ③ 経口ばく露による調査が不能なガス、蒸気又は粉状の化学物質

遺伝子改変動物による発がん性試験の概要

【遺伝子改変動物の選定】

発がんに関わる生物学的分子機構に基づき、大きく3通りのGMマウスモデルが存在する。

- ①細胞増殖促進(所謂、オンコジーン活性化)⇒rasH2
- ②異常細胞除去機能欠失(所謂、アンチ・オンコジーン不活性化)⇒p53+/-
- ③遺伝子変異修復機能欠失⇒XPA-/-

このうち③XPA-/-は、資料3(p8)が示す通り、修復機構全体のごく一部に関わるものであり、守備範囲が皮膚等に限定される。それを補うために、p53+/-との掛け合わせなどが、試行されているが、試験法としての適性は低い。その為、データ蓄積に乏しく、また、XPA-/-マウスの入手が困難である(販売終了)。

遺伝子改変動物による発がん性試験の概要

①rasH2 及び、②p53+/- は、ともに対象臓器、組織が原理的に広く、かつ、多数のデータの蓄積があり、両者の特徴が明らかとなっている。

★従来型の野生ラット、マウスによるがん原性試験における陽性物質に関して、

①rasH2は、

1. 広く、genotoxic, non-genotoxic な化学物質の発がん性を再現している。

② p53+/-は、

1. genotoxicな化学物質の発がん性を再現している。
2. 陰性物質を陽性と判定することが殆ど無いことが知られている。
3. アスベストなど、異物発癌と呼ばれる酸化ストレスが想定される発がん機構に感受性があることが知られている。

★吸入暴露による発がん性も、①②ともに再現することが、一部の典型的な発がん物質について確認されている。

遺伝子改変動物による発がん性試験の概要

【試験基準】①rasH2、及び、②p53+/- の両方を実施。

共通して、吸入6時間/5日/週のばく露を実施する。

- 2週間 用量設定試験：雌雄、一群10*匹、対照、低、中、高用量群
- 4週間 用量設定試験：雌雄、一群10*匹、対照、低、中、高用量群
- 26週間 本試験：雌雄、一群25匹、対照、低、中、高用量群

(*:5匹の場合あり)

【評価基準】

- 個々の試験の陽性判定：対照群と比較して、特定の組織・臓器において腫瘍性病変**が有意に増加し、かつ、用量反応性が認められる場合、全臓器の発生が有意に増加し、かつ、用量反応性が認められる場合、及び、単一の用量群において明らかな増加が認められる場合。（**：発生母地等に共通性のある病変を合計する場合あり）
- 総合判定：①rasH2、及び、②p53+/-の一方、または両方が陽性判定の場合、総合判定を陽性とする。

資料1：期間短縮

Eastmond et al.

Page 34

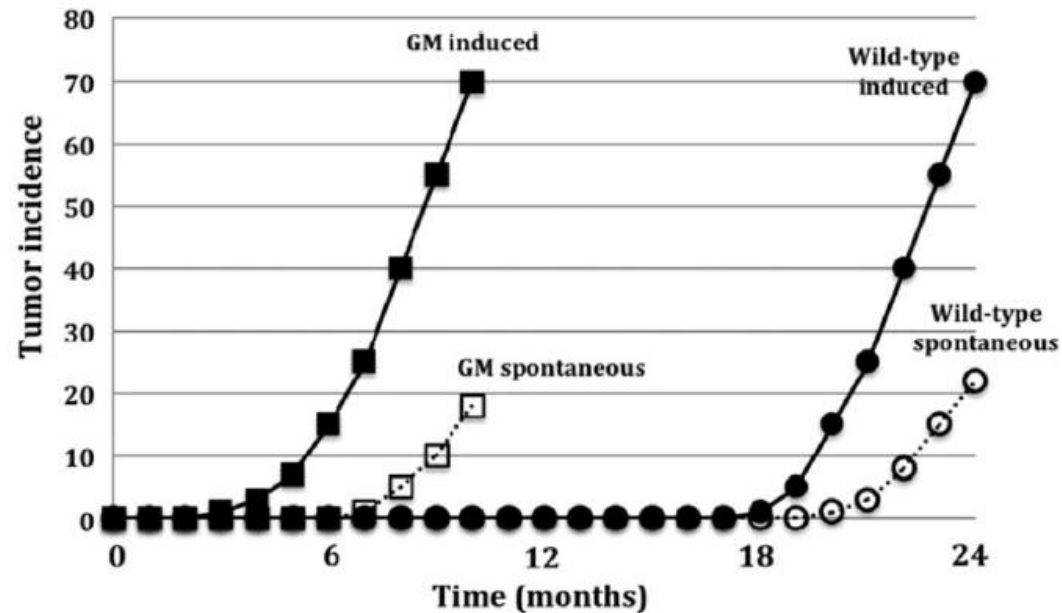


Figure 1.

Generalized time-response curves for spontaneous and chemically-induced tumors in genetically modified and wild type mouse bioassays. (Adapted from Tennant et al., 1999a. Used with permission from the CIIT Centers for Health Research (CIIT) and Byron E. Butterworth).

Eastmond et al. *Crit Rev Toxicol.* 2013 September ; 43(8): 611–631

資料2：従来試験等との一致率

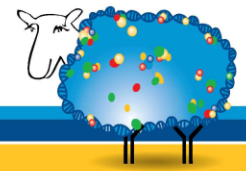
Table 3

Concordance between genetically modified assays, the NTP bioassays and human evaluations.

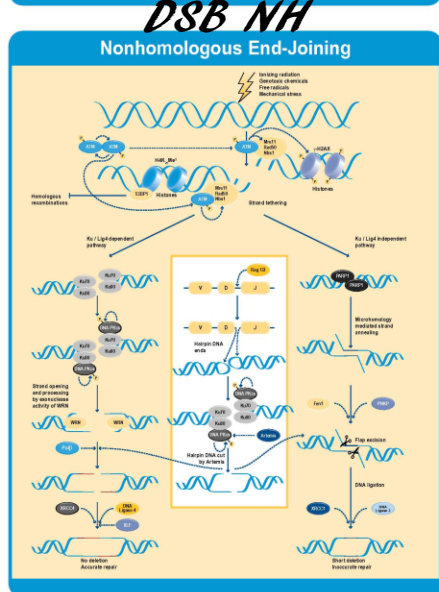
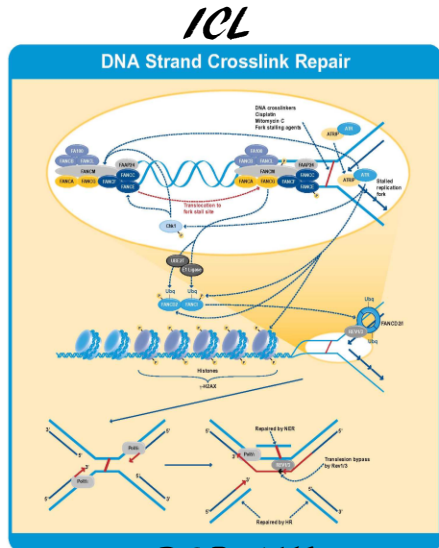
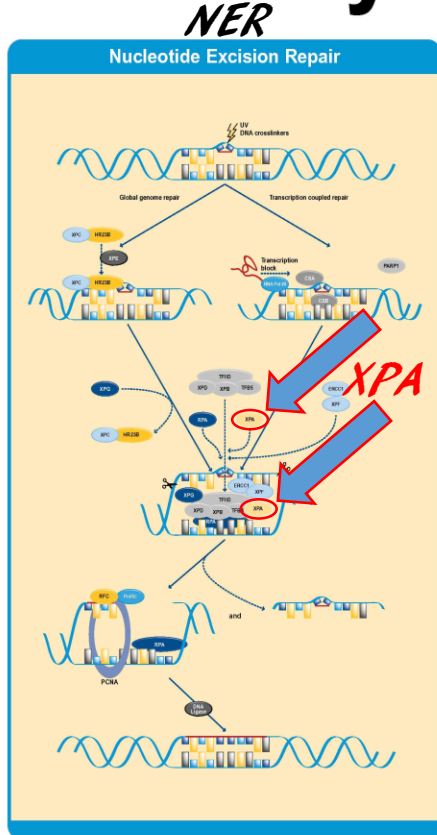
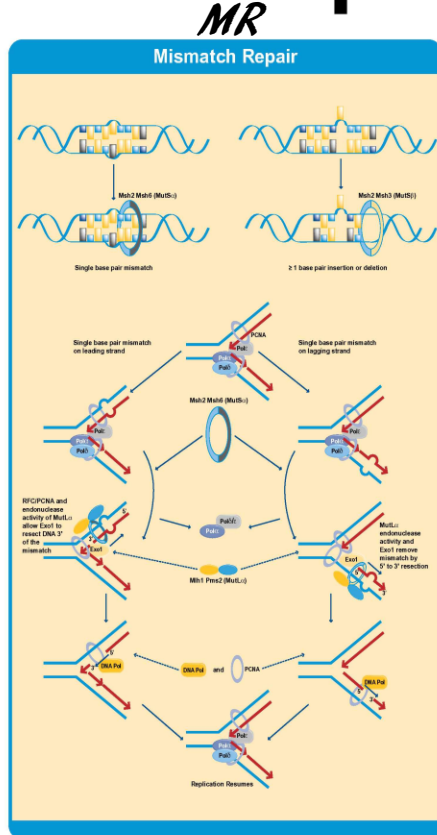
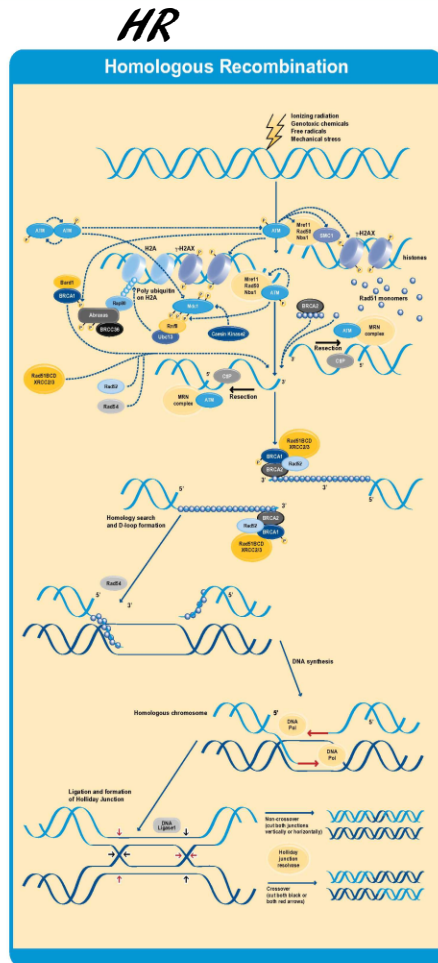
Model	Positive	Negative	Overall
Concordance with NTP mouse carcinogens			
<i>Trp53^{+/-}</i>	7/20 (35%)	10/10 (100%)	17/30 (57%)
Tg.AC	12/23 (52%)	8/10 (80%)	20/33 (61%)
<i>rasH2</i>	16/20 (80%)	7/8 (88%)	23/28 (82%)
Concordance with trans-species mouse and rat carcinogens			
<i>Trp53^{+/-}</i>	5/14 (36%)	9/9 (100%)	14/23 (61%)
Tg.AC	7/14 (50%)	8/10 (80%)	15/24 (63%)
<i>rasH2</i>	14/16 (88%)	7/8 (88%)	21/24 (88%)
Concordance with known or likely human carcinogens			
<i>Trp53^{+/-}</i>	6/14 (43%)		
Tg.AC	8/12 (67%)		
<i>rasH2</i>	12/14 (86%)		

Eastmond et al. *Crit Rev Toxicol.* 2013 September ; 43(8): 611–631

「遺伝子改変動物による発がん性試験」について 2016-01-16 JBRC



DNA Repair Pathways



www.abcam.com/nuclearsignal

Abcam in the USA
 Abcam Inc.
 1 Kendall Square, Ste 341
 Cambridge,
 MA 02139-1517 U.S.A.
 Tel: 1-617-225-2272
 Toll free: 1-888-77-ABCAM
 Toll free Fax: 1-866-735-9884

Abcam in Europe
 Abcam plc,
 332 Cambridge Science Park
 Milton Road,
 Cambridge,
 CB4 0WN U.K.
 Tel: +44 1223 696000
 Fax: +44 1223 696001

Abcam in Japan
 Abcam K.K.
 Kajiyacho Access Building
 1-2-8 Saga, Koto-ku,
 Tokyo 135-0031
 Japan
 Tel: +81 3 6805 8450
 Fax: +81 3 6805 8451

Featured DNA Repair antibodies

<p>ab29 PCNA antibody Formaldehyde fixed mouse tissue sections stained with ab29 at 1/6000 dilution.</p>	<p>ab32138 PARP antibody Paraffin-embedded sections of human brain stained with ab32138 at 1/25 dilution.</p>	<p>ab2888 ATM antibody HeLa cells stained with ab2888 at 1/200 dilution.</p>	<p>ab2893 gamma H2A.X (phospho S139) antibody Pachytene spermatocytes stained with ab2893 at 1/200.</p>
--	---	--	---

資料4:現時点での文献調査 (103化学物質について情報あり)

Chemical	CAS No	IAR	NTP	NCI/NTP	Genotoxic	p53 +/-	Tg.AC	RasH2	administration route	mouse	Rat	Human	Reference	
		group	ROC	bioassays	(Sal; Mn)			Carcinogeni city(NTP)		Site ^{a)}	Carcinogeni city(NTP)	Site ^{a)}		NTP ^{b)}
1,2-Dimethylhydrazine	540-73-8							+(Yamamoto S. 1998)	iv(single)				Usui (2001)	
4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone(NNK)	64091-91-4							+(Yamamoto S. 1998)	p(1/wk for 2wks)				Usui (2001)	
Triethanolamine	102-71-6	3	Not listed	±; -, ia; ia d (NTP 1999g)	-, -	NT	-d (Spalding et al. 1999)	NT					Pritchard (2003)	
4-Vinyl-1-cyclohexene diepoxide	106-87-6	2B				e/+	0	+		+	MS	+	Sk RC	Eastmond (2013)
4-Vinyl-1-cyclohexene diepoxide	106-87-6	2B	Reasonable	+, +; +; +d (NTP 1989a)	+, +	+d (Tennant et al. 1995)	(Tennant et al. 1995)	+d (Yamamoto et al. 1998b)						Pritchard (2003)
2-Chloroethanol	107-07-3	NE				0	-	0		-			NL	Eastmond (2013)
2-Chloroethanol	107-07-3	NE	Not listed	-, -, -, -d (NTP 1985a)	+, -	NT	-d (Spalding et al. 1999)	NT						Pritchard (2003)
Acetic anhydride	108-24-7	NE	Not listed	NT	-, NT	NT	-d (Spalding et al. 1999)	NT						Pritchard (2003)
Resorcinol	108-46-3	3				-	+	-		-		-	NL	Eastmond (2013)
Resorcinol	108-46-3	3	Not listed	-, -, -, -g (NTP 1992b)	-, +	-g (Eastin et al. 1998)	+d (Eastin et al. 1998)	-g (Maronpot et al. 2000)						Pritchard (2003)
Phenol	108-95-2	3				0	-	-		-		-	NL	Eastmond (2013)
Phenol	108-95-2	3	Not listed	-, -, -, -dw (NCI/NTP 1980)	-, +	NT	-d (Spalding et al. 1999)	NT						Pritchard (2003)
Cholestyramine	11041-12-6	NE	Not listed	NT	NT; NT	NT	NT	-f (Yamamoto et al. 1998b)						Pritchard (2003)
Cholestyramine	11041-12-6	NE						-	Food					Usui (2001)
Pyridine	110-86-1	3				-	-	0		+	Li	+	Ki NL	Eastmond (2013)

Chemical	CAS No	IARC			p53 +/-	RasH2	mouse		Rat		Human
		group	(Sal)	(Mn)			Site	Site	Carcinogenicity (NTP)	Site ^{a)}	
Benzene	71-43-2	1	+	+	+	Inhalation Thymic lymphoma	+	MS	+	MS	
Triethylenethiophosphoram	52-24-4	1	+	NT	0		+	MS	+	MS	
Cupferron	135-20-6	2A	+	NT	0		+	MS	+	MS	
Glycidol	556-52-5	2A	+	+	-		+	MS	+	GS	
N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)	70-25-7	2A	+	NT	0		+	Sk	+		
Procarbazine	366-70-1	2A	+	+	0	e/+	+	MS	+	MS	
1,4-Dioxane	123-91-1	2B	+	-	0	e/+	+	Li	+	MS	
4,4'-Thiodianiline	139-65-1	2B	+	NT	0	0	+	MS	+	MS	
4-Vinyl-1-cyclohexene diepoxide	106-87-6	2B	+	+	e/+	Skin	+	MS	+	Sk	
Chloroform	67-66-3	2B	-	+	e/e/+		+	Li	+	Ki	
Ethyl acrylate	140-88-5	2B	-	-	0		+	FS	+	FS	
Ethylene thiourea	96-45-7	2B	-	NT	0		+	MS	+	Thy	
o-Cresidine	120-71-8	2B	+	-	+	Urothelial	+	MS	+	MS	
Phenolphthalein	77-09-8	2B	-	+	+	Thymic lymphoma	+	MS	+	MS	
Urethane	51-79-6	2B	+	+	+	Liver	+	MS	0		
5-Nitro-o-toluidine	99-55-8	3	+	NT	0		+	He, Li	-		
Di(2-ethylhexyl)phthalate	117-81-7	3	-	-	-/e/e		+	Li	+	Li	
Furfural	98-01-1	3	-	NT	0		+	Li	+	Bi	
Dimethylbenzanthracene(1,2,3,4)	57-97-6	NE	+	+	+	0	+	Sk	0		

+	19	42%
-	11	24%
	15	33%
	45	

Chemical	CAS No	IARC			p53 +/-	RasH2	mouse		Rat		Human
		group	(Sal)	(Mn)			Site	Site	Carcinogenicity (NTP)	Site ^{a)}	
p-Anisidine	90-04-0	3	+	-	-		+		-	-	
8-Hydroxyquinoline	148-24-3	3	+	-	-		+		-(usui 2001)	-	-
Phenol	108-95-2	3	-	+	0		+		-	-	
Resorcinol	108-46-3	3	-	+	-		+		-	-	
Xylenes (mixed)	1330-20-7	3	-	NT	0		+		-	-	
1-Chloro-2-propanol	127-00-4	NE			-		+		0	-	-
2,6-Toluenediamine dihydrochloride	820-40-5	NE	+	-	-		+		0	-	-
Diisopropylcarbodiimide	693-13-0	NE	-	+	-		+		0	-	-
D-Mannitol	69-65-8	NE	-	-	-		+		-	-	-
Oleic acid diethanolamine	93-83-4	NE	-	NT	-		+		0	-	-
Rotenone	83-79-4	NE	-	NT	-		+		-	-	-
TCDD	1746-01-6	1	-	NT	-		+		0	+	MS
2,4-Diaminotoluene	95-80-7	2B	+	-	e/-/e		+		0	+	MS
Bromodichloromethane	75-27-4	2B			-		+		0	+	Li, Ki
Chloroprene	126-99-8	2B	-	-	-		+		0	+	MS
Pentachlorophenol	87-86-5	2B	-	-	-		+		0	+	MS
1,1,2-Trichloroethane	79-00-5	3	-	-	0		+		-	+	MS
4-Nitro-o-phenylenediamine	99-56-9	3	+	±	0		+		e	-	-
D-Limonene	5989-27-5	3	-	NT	-		+		0	-	+
Methylolacrylamide	924-42-5	3	-	-	-		+		0	+	MS
Pyridine	110-86-1	3	-	-	-		+		0	+	Li
Reserpine	50-55-5	3	-	-	-		+		-	+	MS
6-Nitrobenzimidazole	94-52-0	NE	+	NT	0		+		-	+	Li
Coconut oil acid diethanolamine	68603-42-9	NE	-	+	-		+		0	+	MS
Lauric acid diethanolamine	120-40-1	NE	-	-	-		+		0	e/+	Li
Methylphenidate	298-59-9	NE	-	NT	-		+		0	e/+	Li

【参考】Tg.ACの問題点

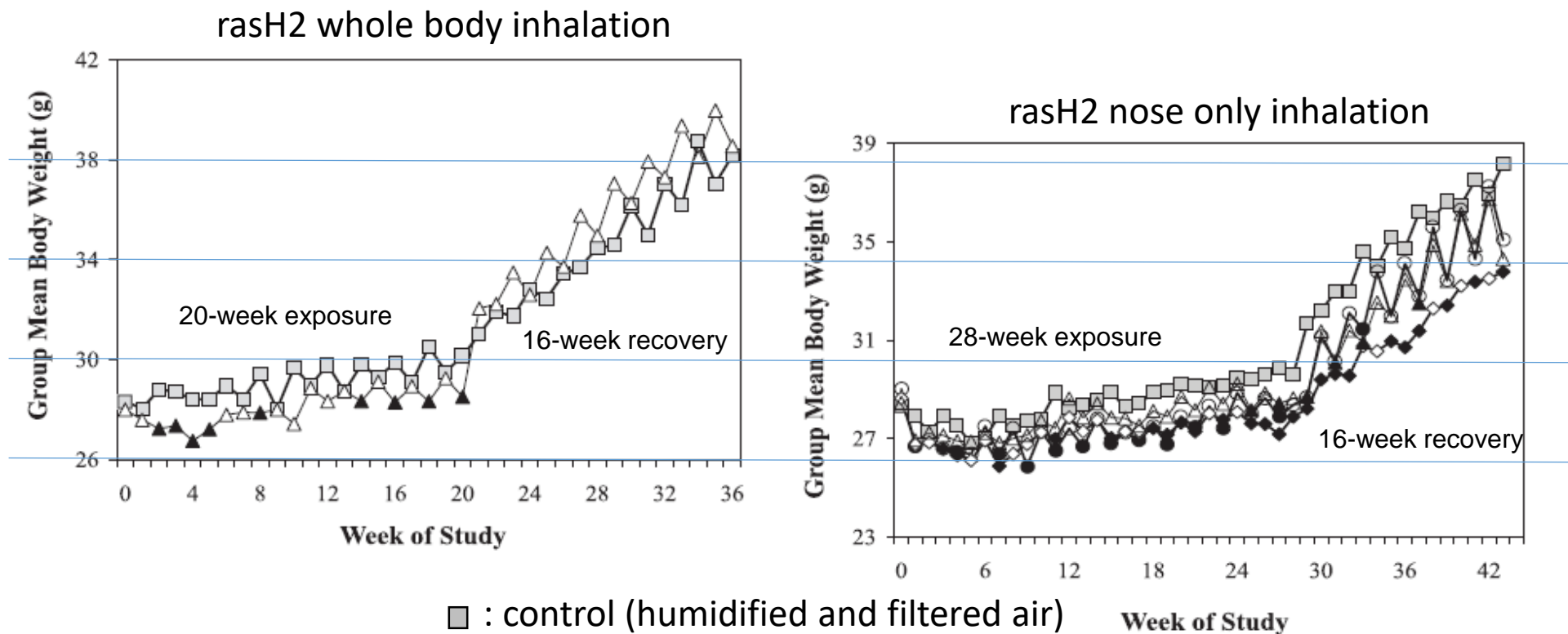
- PCRではTransgeneの存在が確認できるにも拘らず、発がん不応性である個体(non-responder)が高率に見つかる。
- Transgeneの配列にヘアピン構造を取りやすい部分があり、その部分の配列が欠損することが高頻度で起こることによる。
- PCRでは、部分欠損の有無が確認できないことから、応答個体(responder)を確認するためには、サザンプロットなどによる塩基配列の確認が必要。

【参考】用量設定に野生型マウスを用いるか否か

- **Differences in toxicity indicate that caution be used in substituting wild-type mice for transgenic mice for range-finding studies to select doses for p53+/- cancer studies.**

(Nephrotoxicity and Hepatotoxicity Induced by Inhaled Bromodichloromethane in Wild-Type and p53-Heterozygous Mice. Vincent R. Torti,* Alison J. Cobb,* Jeffrey I. Everitt,* Marianne W. Marshall,* Gary A. Boorman,† and Byron E. Butterworth*,
TOXICOLOGICAL SCIENCES **64**, 269–280 (2001))

【参考】吸入：全身曝露 vs 鼻部曝露



Lung Tumorigenicity in A/J and rasH2 Transgenic Mice Following Mainstream Tobacco Smoke Inhalation
Geoffrey M. Curtin,¹ Mark A. Higuchi, Paul H. Ayres, James E. Swauger, and Arnold T. Mosberg.
TOXICOLOGICAL SCIENCES 81, 26–34 (2004)

※:結論： 全身曝露の方が好ましい。体重増加抑制の影響が強く出た。肺の病理組織診断が必須。