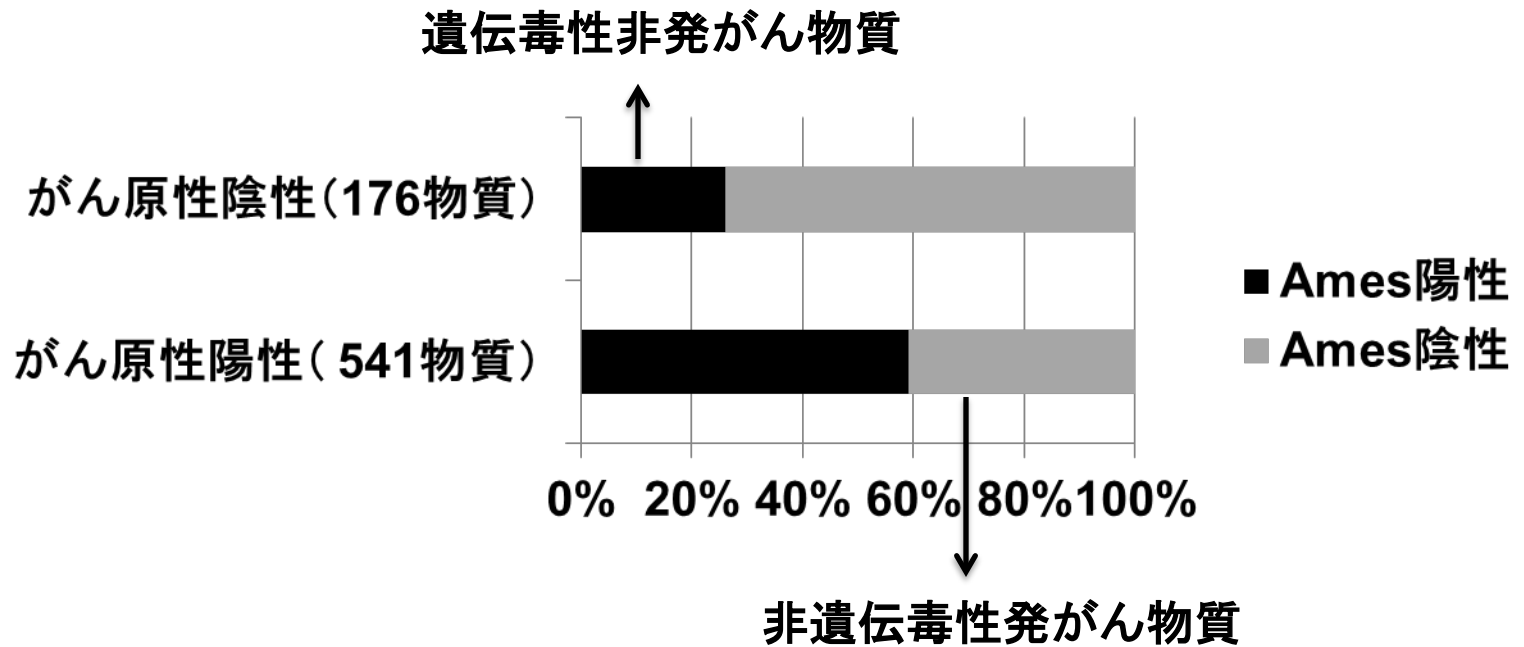


発がん性のスクリーニングの迅速化

—遺伝毒性・発がん性包括試験法—

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
西川秋佳

がん原性試験とAmes試験の一致性



(Kirkland *et al.*, 2005)

一致しない理由

- ・非遺伝毒性発がん物質の存在
- ・同じ土俵の上の試験でない

遺伝毒性試験とがん原性試験の関係(1)

遺伝毒性試験

Ames試験
染色体異常試験
マウス小核試験

通常単回投与
末梢血・骨髓
染色体異常

がん原性試験

ラット2年間試験
マウス1.5年間試験

反復投与
全臓器

遺伝毒性なし

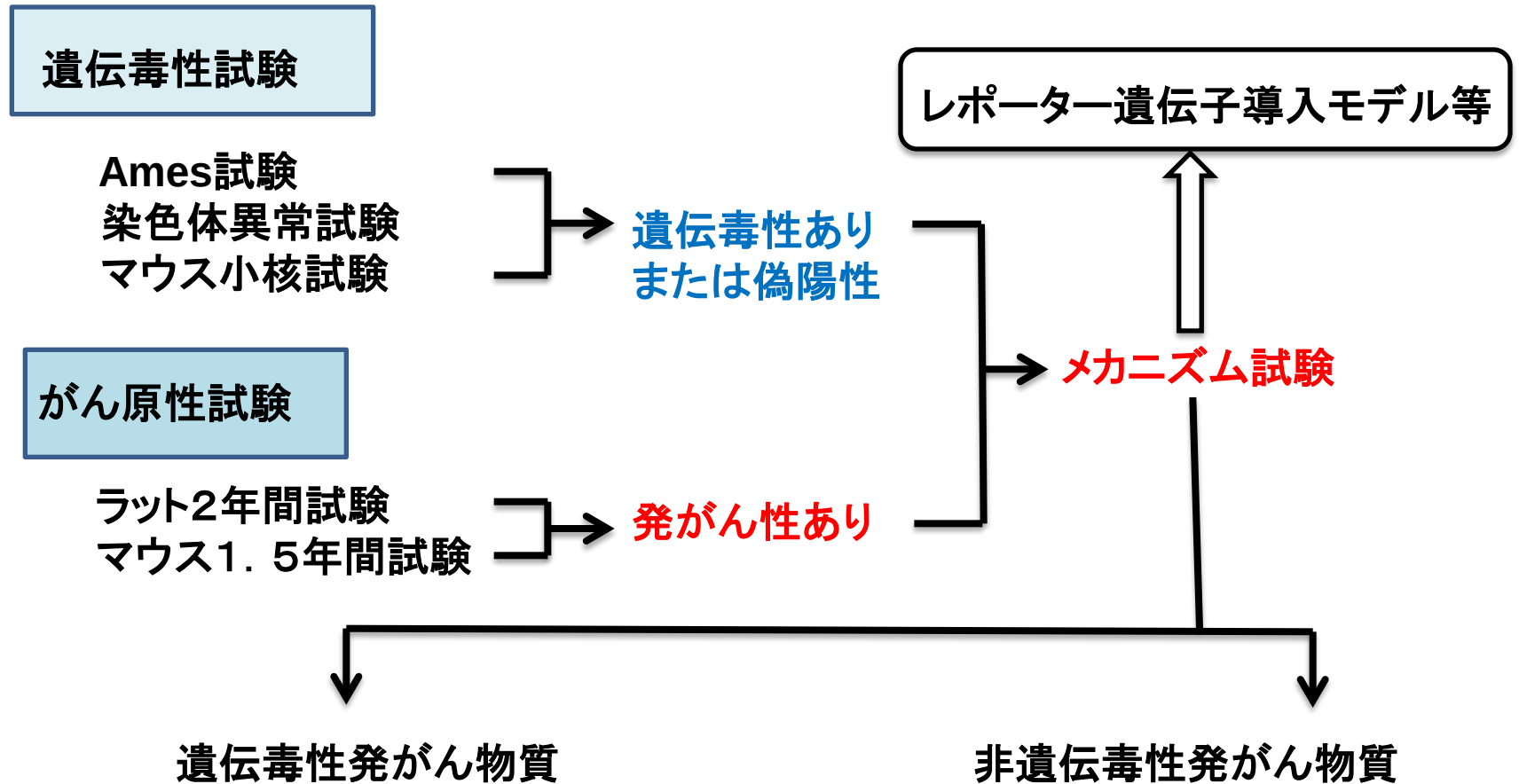
発がん性あり

非遺伝毒性発がん物質

閾値あり

遺伝毒性試験と発がん性試験は全く別の試験

遺伝毒性試験とがん原性試験の関係(2)



Transgenic rodent mutation models and assays

- Muta™ Mouse
- Big Blue®
- LacZ plasmid mouse
- gpt delta rodents
- Use of the λ cII transgene

(OECD, 2011)

2011年にレポーター遺伝子を導入したげっ歯類による
変異原性試験がガイドライン化された。

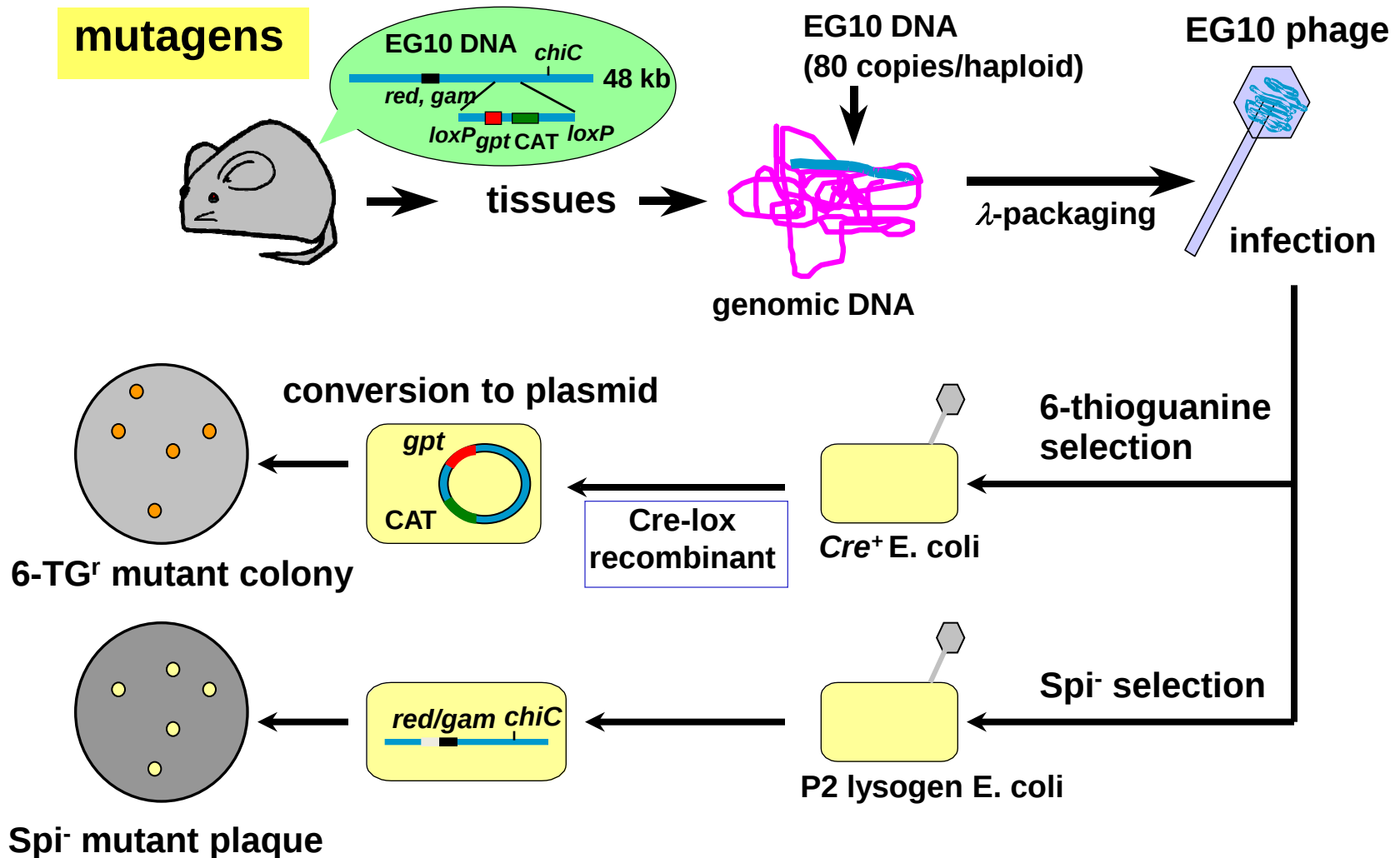


野生型ラット・マウスの亜急性毒性試験(4W-13W)に応用



遺伝毒性・発がん性包括試験
(反復投与毒性＋遺伝毒性＋発がん性スクリーニング)

gpt delta rodent mutagenicity assay



(Nohmi *et al.*, 1996)

GST-P⁺ liver cell foci in *gpt* delta rats given IQ, *N*-nitrosopyrrolidine (NPYR) and di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) for 13 weeks

Groups	Dose (ppm)	No. of rats	Area of foci (mm ² /cm ²)	No. of foci /cm ²	
				Large foci (>20 cells)	Small foci (<20 cells)
IQ	300	5	0.15±0.06^{**}	1.57±0.66^{**}	3.49±1.34^{**}
NPYR	200	5	1.09±1.14[*]	12.2±12.8[*]	11.9±6.5^{**}
DEHP	12,000	5	0.01±0.01	0.05±0.11	0.21±0.12
APAP	10,000	5	0.01±0.01	0.07±0.15	0.55±0.39
Control	-	5	0.01±0.01	0.14±0.19	0.34±0.41

Values are mean±SD

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. Control

(Kanki *et al.*, Mol. Carcinog., 2005)

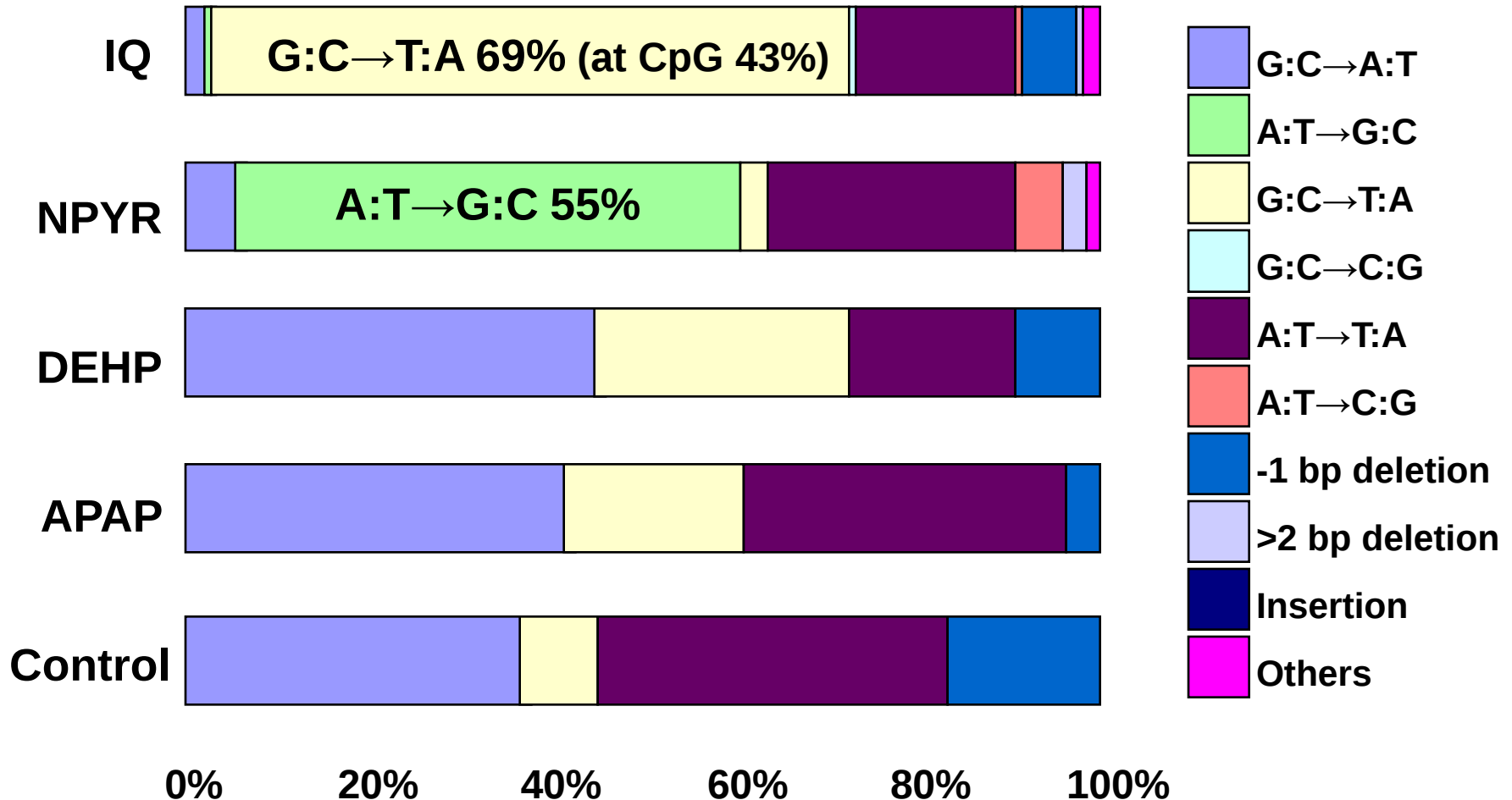
gpt mutant frequency in *gpt* delta rats

Group	No. of rats	Total population	6TG ^r mutants	<i>gpt</i> mutants	<i>gpt</i> mutants - clonality	MF (10 ⁻⁵)
IQ	5	525,000	151	133	89	18.80±4.49*
NPYR	5	1,021,500	60	57	49	5.67±2.45*
DEHP	5	3,247,500	12	9	9	0.33±0.38
APAP	5	3,637,500	20	19	17	0.55±0.56
Control	5	2,976,000	37	19	16	0.55±0.24

* $P < 0.01$ vs. Control.

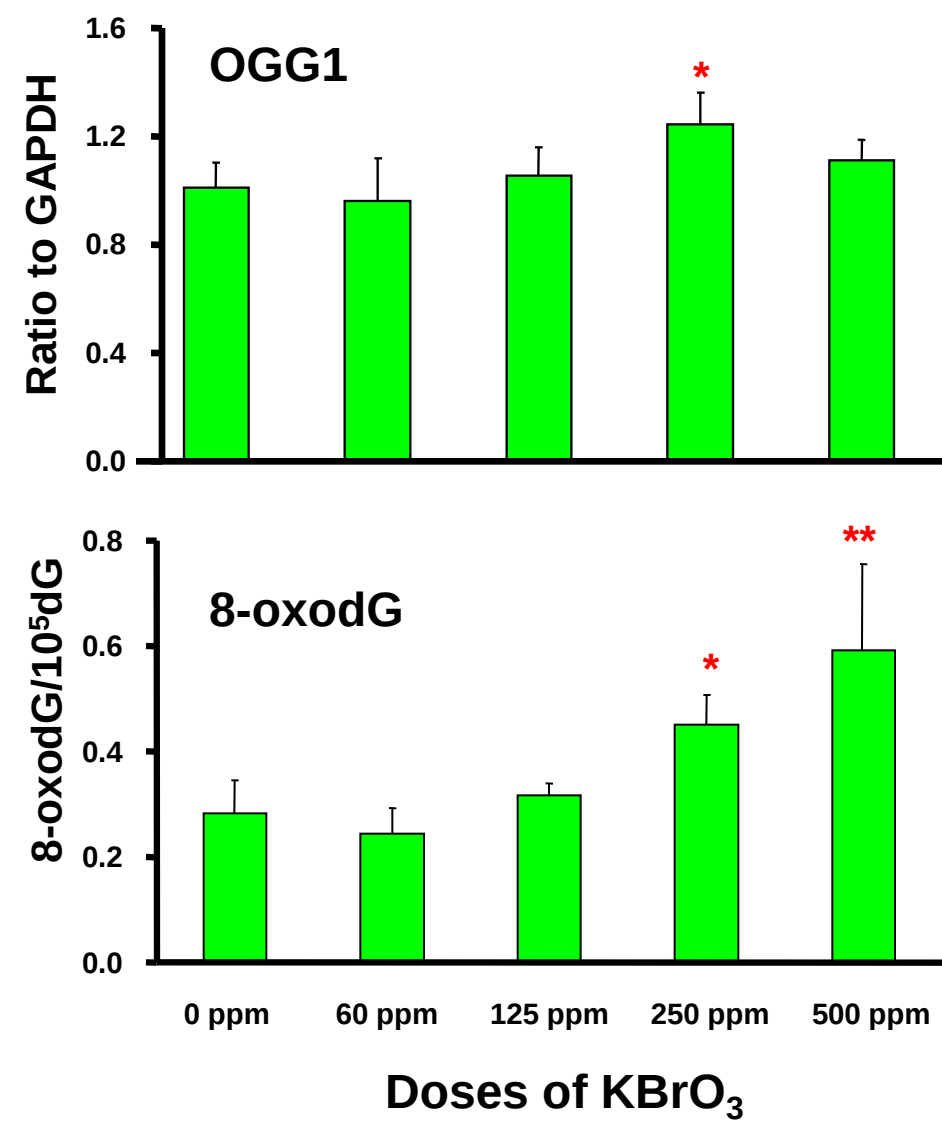
(Kanki *et al.*, Mol. Carcinog., 2005)

gpt mutation spectra in *gpt* delta rats

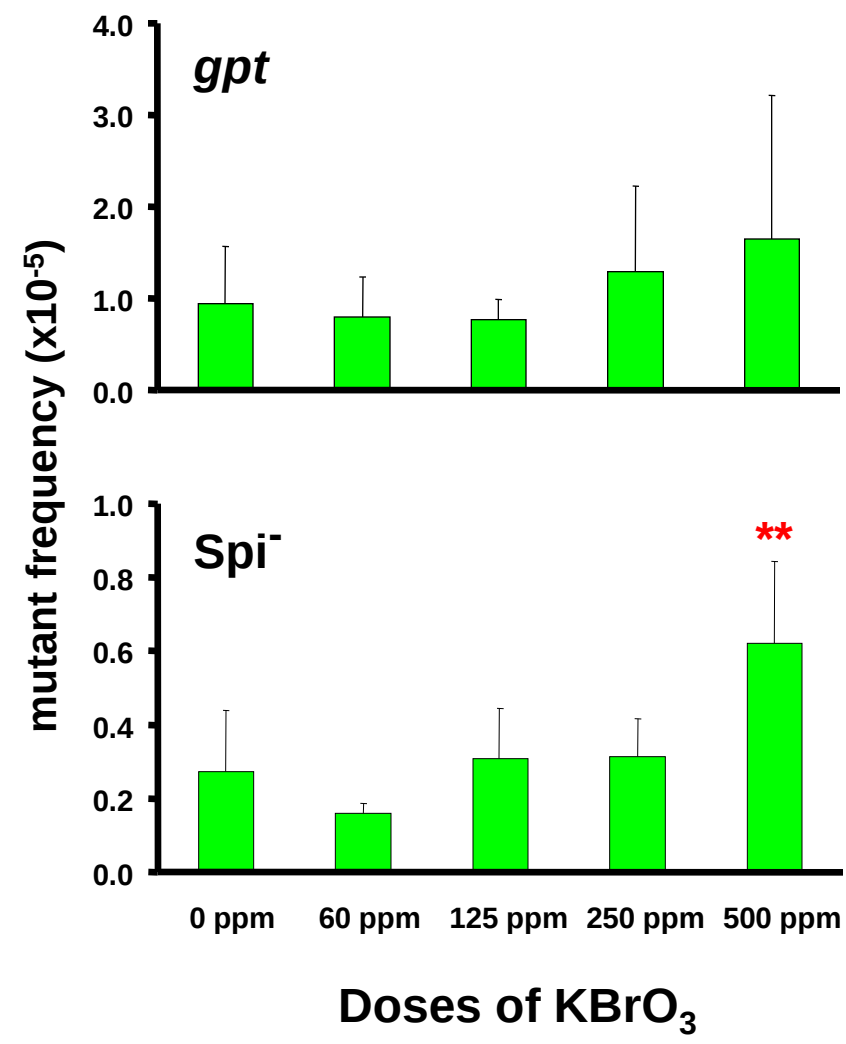


(Kanki *et al.*, Mol. Carcinog., 2005)

Dose response of OGG1, 8-oxodG and mutant frequency in kidneys of rats given potassium bromate (KBrO₃) for 13 wks

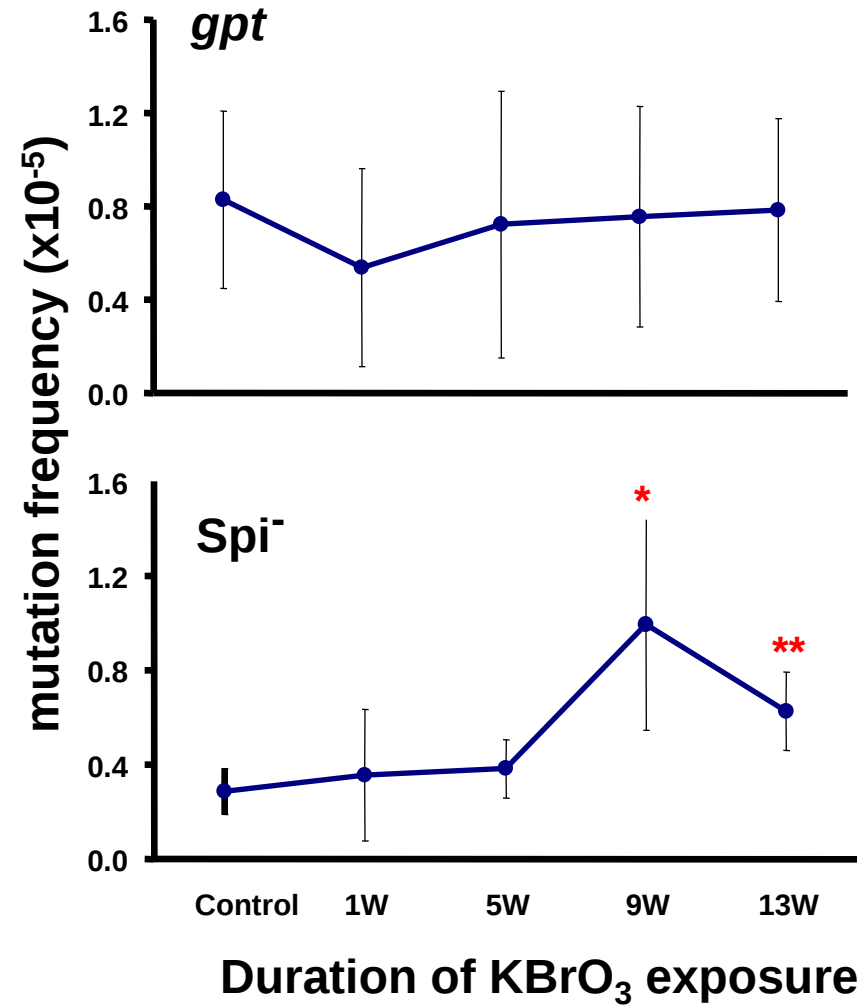
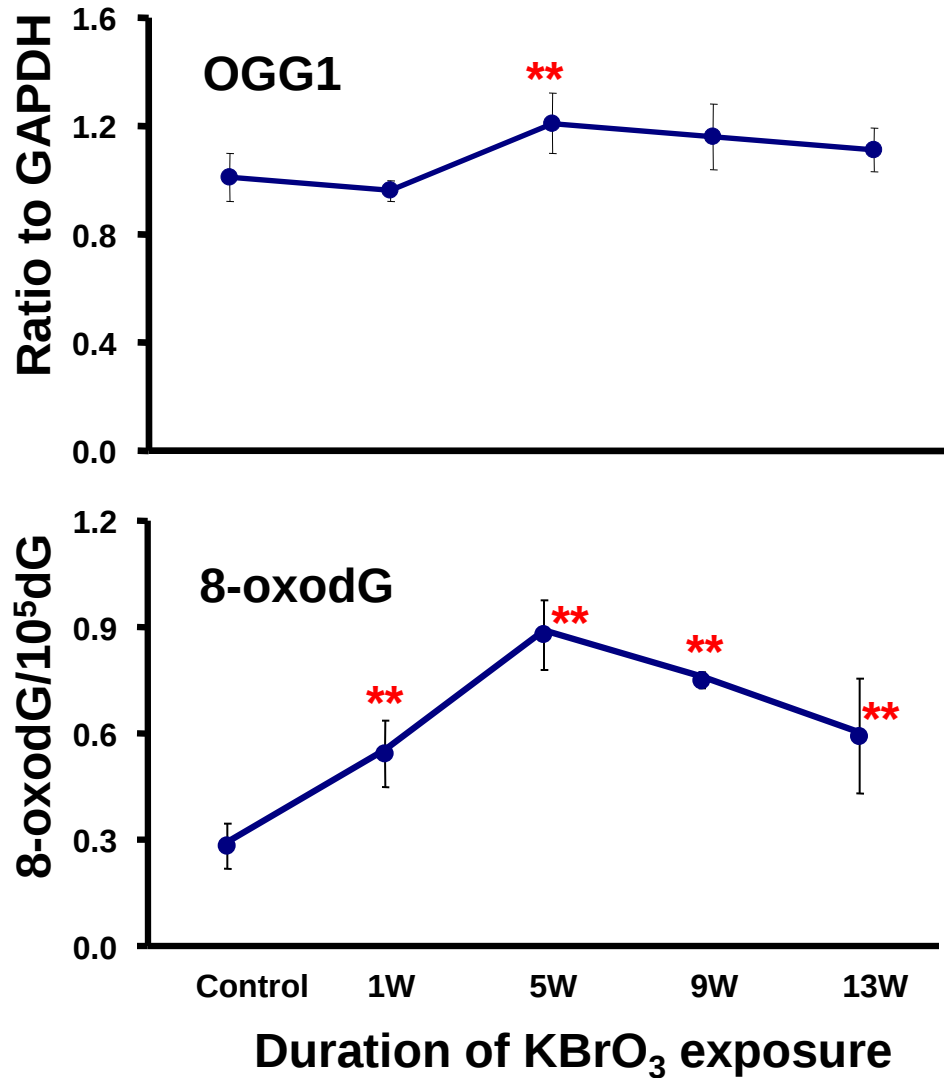


*, ** $P < 0.05, 0.01$ vs. 0 ppm



(Umemura *et al.*, Cancer Sci., 2006)

Time course of OGG1, 8-oxodG and mutant frequency in kidneys of rats given 500 ppm potassium bromate

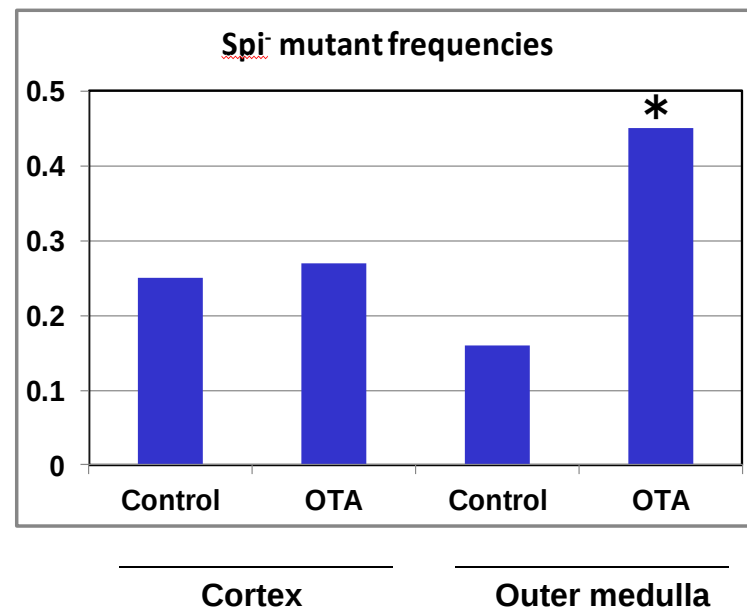
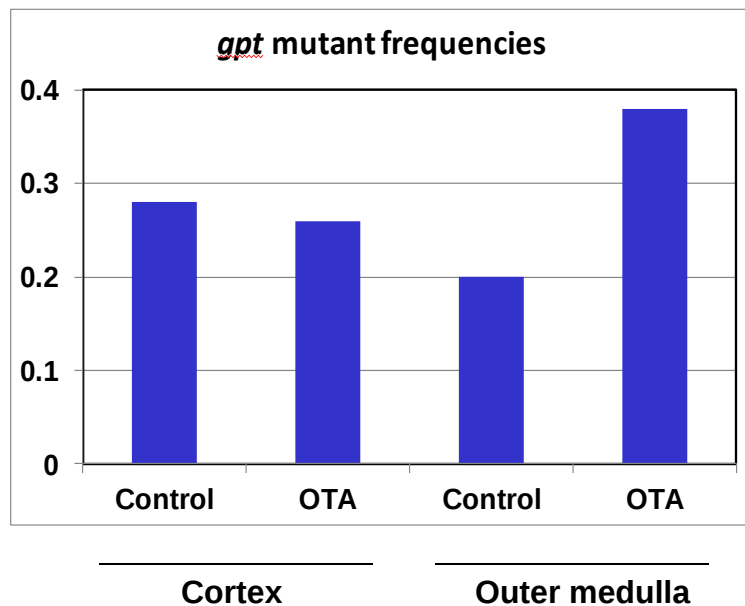


*****, ****** $P < 0.05$, 0.01 vs. Control

(Umemura *et al.*, Cancer Sci., 2006)

gpt deltaラットを用いたオクラトキシンAの包括試験

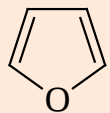
オクラトキシンA (OTA): マイコトキシン
ラットに腎発がん性、マウスに肝・腎発がん性
遺伝毒性陽性・陰性 (?)



* $P < 0.05$ vs. Control

(Hibi *et al.*, Toxicol. Sci., 2011)

gpt deltaラットを用いたFuranの包括試験

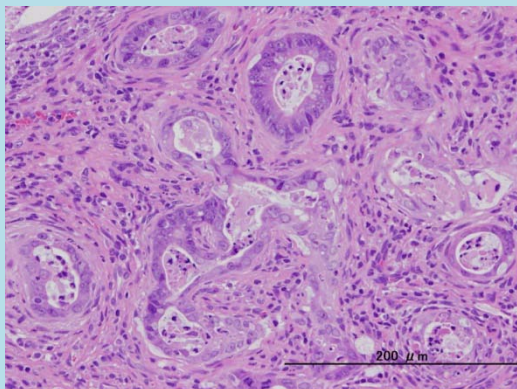


Furan

- ✓ 香料として使用されるFuran誘導体の基本骨格の一つ。
- ✓ **げっ歯類において、肝発がん性。** → グループ2B (IARC)

- ・ ラット: 肝細胞癌、肝胆管癌
- ・ マウス: 肝細胞癌

✓ 病理組織学的検索



尾状葉特異的な胆管線維症の誘発

✓ *In vivo*変異原性(肝臓)

- *gpt* およびSpi⁺ MFs : 陰性
- *In vivo* 小核試験(骨髓) : **陽性**

✓ 前がん病変の検索(GST-P免疫組織化学的検索)

- GST-P陽性肝細胞巢の数および面積 : **増加**

胆管線維症が尾状葉特異的に認められたことから、葉毎の変異原性解析を含めた検討が必要と考えられた。

gpt deltaラットを用いたfuranの肝臓葉毎の*in vivo*変異原性評価

✓ **尾状葉(胆管線維症誘発部位)**

- *gpt* およびSpi⁺ MF : 陰性

✓ **外側左葉**

- *gpt* およびSpi⁺ MF : 陰性

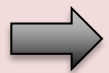
gpt deltaマウスを用いたFuranの包括試験

投与期間	肝臓病理組織学的検索		<i>In vivo</i> 遺伝毒性試験		
	被膜下炎症細胞浸潤	巣状肝細胞壊死	小核試験 (骨髓)	comet assay (肝臓)	変異原性試験 (肝臓)
4 weeks	♂ : 1/5例、♀ : 3/5例	♂ : 0/5例、♀ : 0/5例	♂ : 陽性 ♀ : 陰性	—	<i>gpt</i> MF : 陰性 Spi ⁺ MF : 陰性
13 weeks	♂ : 5/5例、♀ : 5/5例	♂ : 1/5例、♀ : 0/5例	陰性	陰性	<i>gpt</i> MF : 陰性 Spi ⁺ MF : 陰性

Furanの*gpt* deltaラットを用いた併合試験により、肝臓において胆管線維症が誘発された。

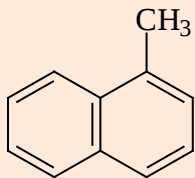
肝臓全体および葉毎の解析の結果、Furanのラット肝臓における遺伝毒性は陰性であった。

Furanのマウス肝臓における遺伝毒性は陰性と考えられた。



Furan誘発肝発がん機序に遺伝毒性メカニズムは関与していない可能性が示唆された。

gpt deltaマウスを用いた1-Methylnaphthalene の包括試験



1-Methylnaphthalene (1-MN)

- 香料、有機材料の不完全燃焼で発生する多環芳香族炭水素の一つ
- **マウス肺発がん性**
- 姉妹染色分体交換試験(SCE) : 陽性 あるいは陰性

✓ 病理組織学的検査

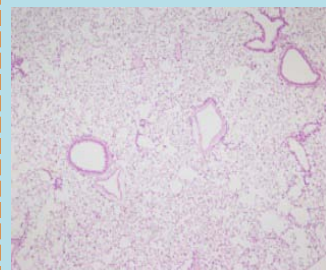
標的臓器である肺に著変なし。

✓ 細胞増殖活性の検索

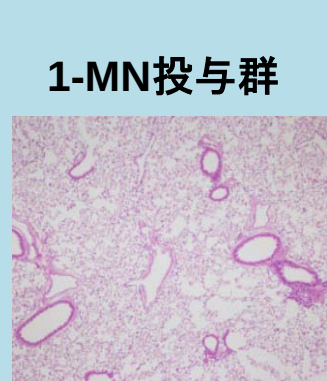
PCNA 陽性細胞率は対照群との間に有意差なし。

✓ *In vivo*変異原性の検索

gpt およびSpi⁻ MFsは雌雄ともに有意差なし。



対照群



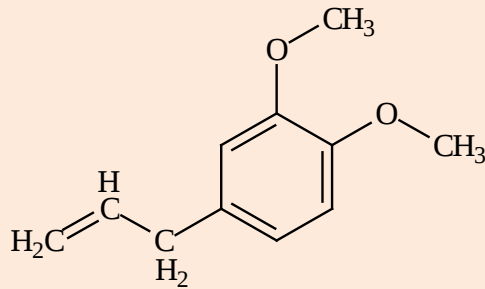
1-MN投与群

・肺において細胞増殖活性の亢進は認められず、同系統のマウス用いた過去の報告と一致。

・ 肺の*in vivo*変異原性評価の結果、*gpt*及びSpi⁻ assayにおいて陰性。

⇒ 1-MN誘発肺発がん機序に遺伝毒性メカニズムは関与しないことを示唆。

gpt deltaラットを用いた1-Methyleugenolの包括試験



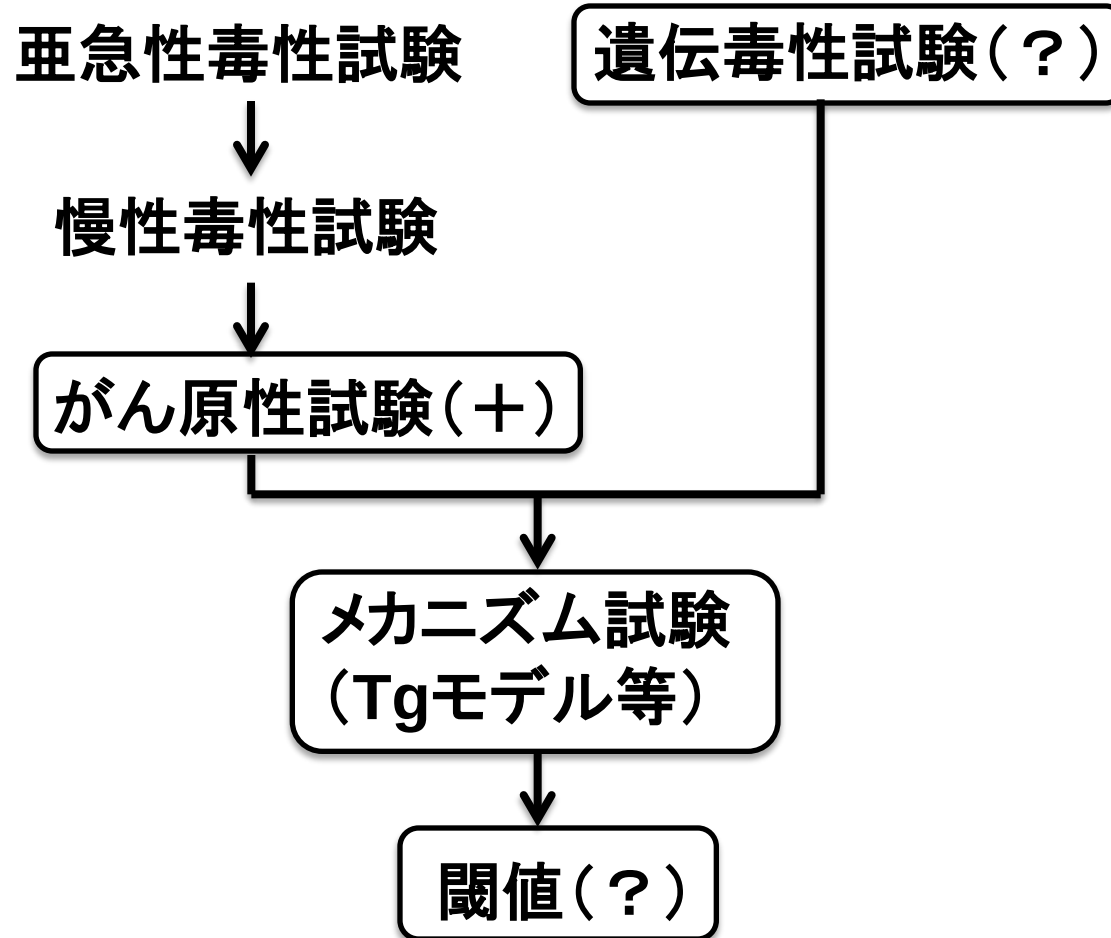
1-Methyleugenol (MEUG)

- 香料、alkoxy関連物質
- **げっ歯類において肝発がん性**
→ group 2B (IARC)
- 遺伝毒性メカニズムの関与は不明

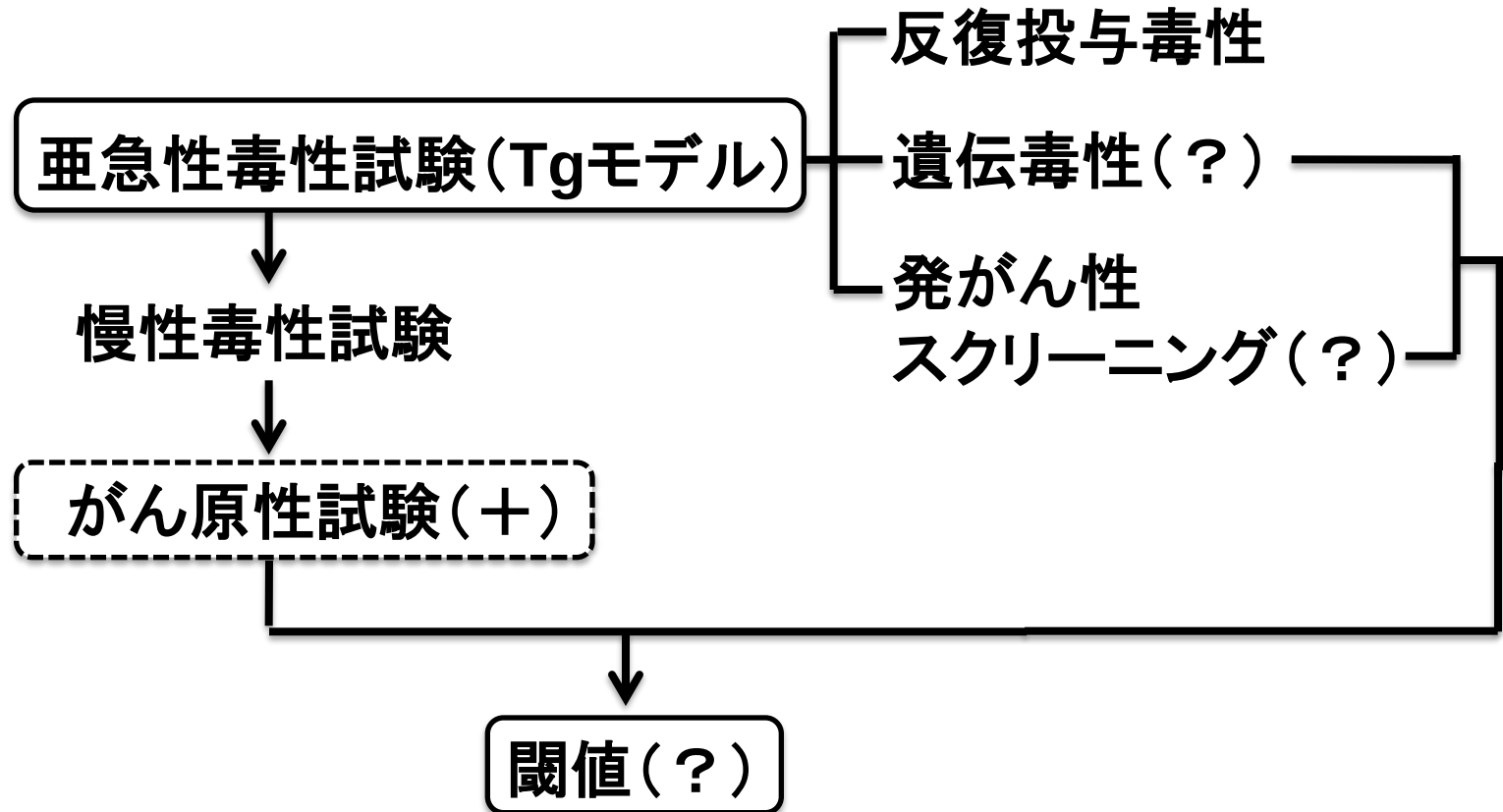
- ✓ **病理組織学的検査**
標的臓器である肝臓に著変なし。
- ✓ **細胞増殖活性の検索**
雌雄ともに高用量群において肝臓のPCNA陽性細胞率が有意に増加。
- ✓ **肝前がん病変マーカーの検索**
雌雄ともに高用量群においてGST-P陽性細胞が有意に増加。
- ✓ ***In vivo*変異原性の検索**
雌雄ともに高用量群において肝臓の*gpt* およびSpi⁺ MFsが有意に増加。

MEUGの肝発がん機序に、遺伝毒性メカニズムと細胞増殖活性の亢進が関与している。

現行の安全性試験



遺伝毒性・発がん性包括試験



参考文献

- 1: Jin M, Kijima A, Hibi D, Ishii Y, Takasu S, Matsushita K, Kuroda K, Nohmi T, Nishikawa A, Umemura T. In vivo genotoxicity of methyleugenol in gpt delta transgenic rats following medium-term exposure. *Toxicol Sci.* 2012 (in press).
- 2: Tasaki M, Kuroiwa Y, Inoue T, Hibi D, Matsushita K, Ishii Y, Maruyama S, Nohmi T, Nishikawa A, Umemura T. Oxidative DNA damage and in vivo mutagenicity caused by reactive oxygen species generated in the livers of p53-proficient or -deficient gpt delta mice treated with non-genotoxic hepatocarcinogens. *J Appl Toxicol.* 2012 Sep 12. doi: 10.1002/jat.2807.
- 3: Suzuki Y, Umemura T, Ishii Y, Hibi D, Inoue T, Jin M, Sakai H, Kodama Y, Nohmi T, Yanai T, Nishikawa A, Ogawa K. Possible involvement of sulfotransferase 1A1 in estragole-induced DNA modification and carcinogenesis in the livers of female mice. *Mutat Res.* 2012 (in press).
- 4: Jin M, Kijima A, Suzuki Y, Hibi D, Ishii Y, Nohmi T, Nishikawa A, Ogawa K, Umemura T. In vivo genotoxicity of 1-methylnaphthalene from comprehensive toxicity studies with B6C3F1 gpt delta mice. *J Toxicol Sci.* 2012;37(4):711-21.
- 5: Suzuki Y, Umemura T, Hibi D, Inoue T, Jin M, Ishii Y, Sakai H, Nohmi T, Yanai T, Nishikawa A, Ogawa K. Possible involvement of genotoxic mechanisms in estragole-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Arch Toxicol.* 2012 Oct;86(10):1593-601.
- 6: Jin M, Kijima A, Suzuki Y, Hibi D, Inoue T, Ishii Y, Nohmi T, Nishikawa A, Ogawa K, Umemura T. Comprehensive toxicity study of safrole using a medium-term animal model with gpt delta rats. *Toxicology.* 2011 Dec 18;290(2-3):312-21.
- 7: Hibi D, Suzuki Y, Ishii Y, Jin M, Watanabe M, Sugita-Konishi Y, Yanai T, Nohmi T, Nishikawa A, Umemura T. Site-specific in vivo mutagenicity in the kidney of gpt delta rats given a carcinogenic dose of ochratoxin A. *Toxicol Sci.* 2011 Aug;122(2):406-14.
- 8: Okamura T, Ishii Y, Suzuki Y, Inoue T, Tasaki M, Kodama Y, Nohmi T, Mitsumori K, Umemura T, Nishikawa A. Effects of co-treatment of dextran sulfate sodium and MeIQx on genotoxicity and possible carcinogenicity in the colon of p53-deficient mice. *J Toxicol Sci.* 2010 Oct;35(5):731-41.
- 9: Okamura T, Ishii Y, Suzuki Y, Inoue T, Tasaki M, Kodama Y, Nohmi T, Mitsumori K, Umemura T, Nishikawa A. Enhancing effects of carbon tetrachloride on in vivo mutagenicity in the liver of mice fed 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx). *J Toxicol Sci.* 2010 Oct;35(5):709-20.
- 10: Masumura K, Sakamoto Y, Ikeda M, Asami Y, Tsukamoto T, Ikehata H, Kuroiwa Y, Umemura T, Nishikawa A, Tatematsu M, Ono T, Nohmi T. Antigenotoxic effects of p53 on spontaneous and ultraviolet light B--induced deletions in the epidermis of gpt delta transgenic mice. *Environ Mol Mutagen.* 2011 Apr;52(3):244-52. doi: 10.1002/em.20610.

- 11: Tasaki M, Umemura T, Suzuki Y, Hibi D, Inoue T, Okamura T, Ishii Y, Maruyama S, Nohmi T, Nishikawa A. Oxidative DNA damage and reporter gene mutation in the livers of gpt delta rats given non-genotoxic hepatocarcinogens with cytochrome P450-inducible potency. *Cancer Sci.* 2010 Dec;101(12):2525-30. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01705.x.
- 12: Toyoda-Hokaiwado N, Inoue T, Masumura K, Hayashi H, Kawamura Y, Kurata Y, Takamune M, Yamada M, Sanada H, Umemura T, Nishikawa A, Nohmi T. Integration of in vivo genotoxicity and short-term carcinogenicity assays using F344 gpt delta transgenic rats: in vivo mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene structural isomers. *Toxicol Sci.* 2010 Mar;114(1):71-8.
- 13: Totsuka Y, Higuchi T, Imai T, Nishikawa A, Nohmi T, Kato T, Masuda S, Kinai N, Hiyoshi K, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Ichinose T, Fukumori N, Watanabe M, Sugimura T, Wakabayashi K. Genotoxicity of nano/microparticles in in vitro micronuclei, in vivo comet and mutation assay systems. *Part Fibre Toxicol.* 2009 Sep 3;6:23.
- 14: Umemura T, Tasaki M, Kijima A, Okamura T, Inoue T, Ishii Y, Suzuki Y, Masui N, Nohmi T, Nishikawa A. Possible participation of oxidative stress in causation of cell proliferation and in vivo mutagenicity in kidneys of gpt delta rats treated with potassium bromate. *Toxicology.* 2009 Mar 4;257(1-2):46-52.
- 15: Kuroiwa Y, Yamada M, Matsui K, Okamura T, Ishii Y, Masumura K, Tasaki M, Umemura T, Mitsumori K, Nohmi T, Hirose M, Nishikawa A. Combined ascorbic acid and sodium nitrite treatment induces oxidative DNA damage-associated mutagenicity in vitro, but lacks initiation activity in rat forestomach epithelium. *Toxicol Sci.* 2008 Aug;104(2):274-82.
- 16: Umemura T, Kuroiwa Y, Tasaki M, Okamura T, Ishii Y, Kodama Y, Nohmi T, Mitsumori K, Nishikawa A, Hirose M. Detection of oxidative DNA damage, cell proliferation and in vivo mutagenicity induced by dicyclanil, a non-genotoxic carcinogen, using gpt delta mice. *Mutat Res.* 2007 Sep 1;633(1):46-54.
- 17: Umemura T, Kanki K, Kuroiwa Y, Ishii Y, Okano K, Nohmi T, Nishikawa A, Hirose M. In vivo mutagenicity and initiation following oxidative DNA lesion in the kidneys of rats given potassium bromate. *Cancer Sci.* 2006 Sep;97(9):829-35.
- 18: Kuroiwa Y, Umemura T, Nishikawa A, Kanki K, Ishii Y, Kodama Y, Masumura K, Nohmi T, Hirose M. Lack of in vivo mutagenicity and oxidative DNA damage by flumequine in the livers of gpt delta mice. *Arch Toxicol.* 2007 Jan;81(1):63-9.
- 19: Nishikawa A, Sai K, Okazaki K, Son HY, Kanki K, Nakajima M, Kinai N, Nohmi T, Trosko JE, Inoue T, Hirose M. MX, a by-product of water chlorination, lacks in vivo genotoxicity in gpt delta mice but inhibits gap junctional intercellular communication in rat WB cells. *Environ Mol Mutagen.* 2006 Jan;47(1):48-55.

- 20: Kanki K, Nishikawa A, Masumura K, Umemura T, Imazawa T, Kitamura Y, Nohmi T, Hirose M. In vivo mutational analysis of liver DNA in gpt delta transgenic rats treated with the hepatocarcinogens N-nitrosopyrrolidine, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, and di(2-ethylhexyl)phthalate. *Mol Carcinog*. 2005 Jan;42(1):9-17.
- 21: Masumura K, Horiguchi M, Nishikawa A, Umemura T, Kanki K, Kanke Y, Nohmi T. Low dose genotoxicity of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) in gpt delta transgenic mice. *Mutat Res*. 2003 Nov 10;541(1-2):91-102.
- 22: Nishikawa A, Suzuki T, Masumura K, Furukawa F, Miyauchi M, Nakamura H, Son HY, Nohmi T, Hayashi M, Hirose M. Reporter gene transgenic mice as a tool for analyzing the molecular mechanisms underlying experimental carcinogenesis. *J Exp Clin Cancer Res*. 2001 Mar;20(1):111-5.