

## トランスジェニック動物を用いた遺伝子突然変異試験の動向

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部 増村健一

日本環境変異原学会 MMS研究会 第64回定例会 (2014.06.21)

1

トランスジェニック齧歯類遺伝子突然変異試験  
(TGR試験)の概要

OECDテストガイドライン(TG488)の概要

データベースから見たTGR試験の特徴

最近の動向: TG488の改訂(2013)

2

## トランスジェニック齧歯類遺伝子突然変異試験 (TGR試験)の概要

OECDテストガイドライン(TG488)の概要

データベースから見たTGR試験の特徴

最近の動向: TG488の改訂(2013)

3

## トランスジェニック齧歯類遺伝子突然変異試験 Transgenic Rodent Gene Mutation Assays

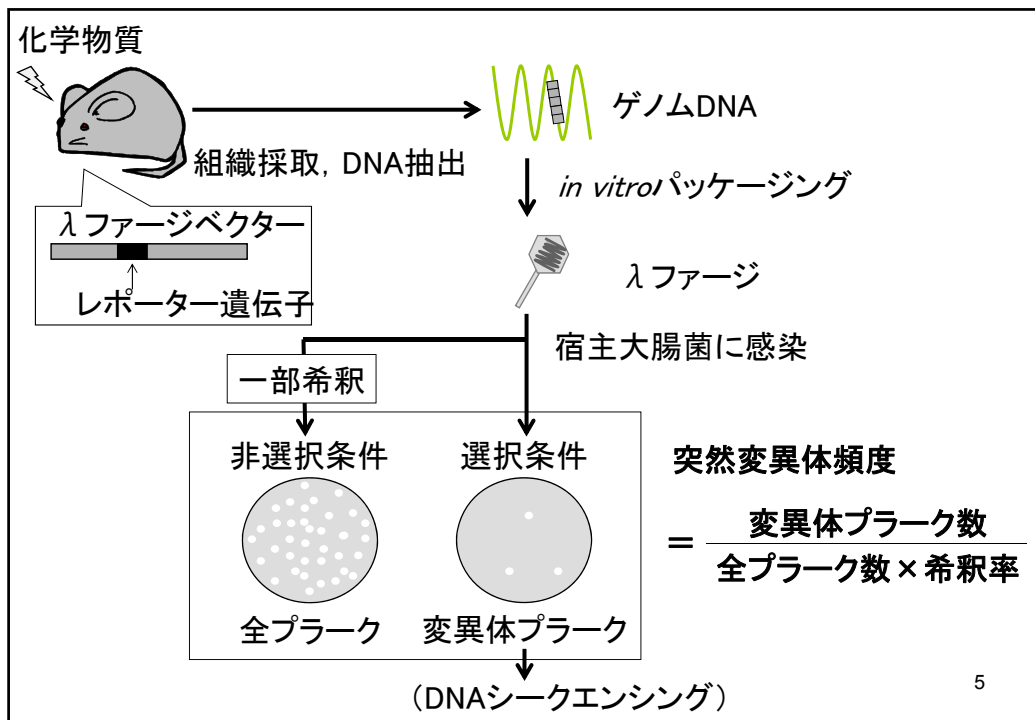
突然変異検出用のレポーター遺伝子として大腸菌やλファージの遺伝子をゲノムに導入して作出したトランスジェニックマウス・ラットを用いる*in vivo*遺伝子突然変異試験。

任意の組織のゲノムDNAからレポーター遺伝子を含む導入遺伝子(λファージやプラスミドベクター)を回収し、宿主大腸菌に戻して、表現型の変化によって遺伝子突然変異を検出する。

検出した突然変異体の数と検索したレポーター遺伝子の総数から、突然変異体頻度(mutant frequency)を算出する。

シーケンス解析により塩基配列変化のデータも得られる。

4



### TGR試験の特長(1)

- ☺ 原理的には個体のあらゆる組織で測定できる。(一定の量・品質のゲノムDNAが必要。) 個体における曝露経路、発がん標的臓器、代謝や薬物動態等を考慮した評価が可能。
- ☺ レポーター遺伝子はゲノム中では発現しない中立な外来遺伝子であるため、内在性遺伝子と異なり選択圧等の影響を受けない。  
→ 化学物質のゲノムDNAに対する突然変異誘発能・蓄積を評価するのに適当。

## TGR試験の特長(2)

- ☺ 遺伝子突然変異は不可逆変化であり、DNA中に安定的に蓄積するため長期間の影響を見ることが可能。
- ☺ 突然変異体のシーケンス解析によって変異スペクトラムの情報が得られる。
- 😊 他の遺伝毒性指標との組み合わせの可能性。
- 😊 特定のトランスジェニック動物を使用する。(マウス、ラット)

7

## 遺伝毒性試験バッテリーにおける位置づけ

	遺伝子突然変異 gene mutation	染色体異常 clastogenicity
<i>In vitro</i>	<b>Ames試験</b> 培養細胞を用いた突然変異試験	<b>染色体異常試験</b> 小核試験
<i>In vivo</i>	<b>TGR突然変異試験</b> スポットテスト(毛色、目)、 内在性遺伝子 ( <i>Hprt</i> , <i>Aprt</i> , <i>Dlb-1</i> , <i>Pig-a</i> )	<b>小核試験</b>

8

TGR試験の種類			
	Reporter genes	Recovery and selection methods	References
<b>Muta<sup>TM</sup>Mouse</b>	<i>lacZ</i>	Lambda <i>in vitro</i> packaging Color selection and Positive selection	Gossen et al., 1989 Vijg and Douglas, 1996
<b>Big Blue<sup>R</sup> mouse and rat</b>	<i>lacI</i>	Lambda <i>in vitro</i> packaging Color selection	Kohler et al., 1990
<b>LacZ plasmid mouse</b>	<i>lacZ</i>	Ligation and electroporation Positive selection	Boerrigter et al., 1995
<b><i>gpt</i> delta mouse and rat</b>	<i>gpt</i> , <i>red/gam</i>	Lambda <i>in vitro</i> packaging Positive selection	Nohmi et al., 1996
<b>Lambda <i>cII</i> selection</b> (Muta <sup>TM</sup> Mouse and Big Blue <sup>R</sup> rodents)	<i>cII</i>	Lambda <i>in vitro</i> packaging Positive selection	Jakubczak et al., 1996
<b>Other systems</b>	<i>supF</i> , <i>rpsL</i> , φX174 phage		Leach et al., 1996 Gondo et al., 1996 Malling et al., 2001

トランスジェニック齧歯類遺伝子突然変異試験  
(TGR試験)の概要

**OECDテストガイドライン(TG488)の概要**

データベースから見たTGR試験の特徴

最近の動向: TG488の改訂(2013)

## TGR試験の開発(1989～)

**International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT):**

*In vivo* transgenic mutation assays. Heddle et al., *Environ Mol Mutagen*. 2000; 35: 253-259.

*In vivo* transgenic mutation assays. Thybaud et al., *Mutat Res*. 2003; 540: 141-151.

Detailed review of transgenic rodent mutation assays. Lambert et al., *Mutat Res*. 2005; 590: 1-280.

## TGR試験の評価および推奨プロトコルの提案

**OECD: Detailed Review Paper On Transgenic Rodent Mutation**

**Assays**, Series On Testing And Assessment Number 103, OECD, Paris, July 23, 2009.

## ～2007年のTGR関連学術文献データのレビュー

**OECD GUIDELINE 488:**

**Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays** (28 July 2011)

**OECD GUIDELINE 488:**

**Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays** (26 July 2013)

OECD/OCDE

488

Adopted:  
28 July 2011

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALSTransgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays

TG488: トランスジェニックげっ歯類の体細胞および生殖細胞を用いた遺伝子突然変異試験

8. TGR gene mutation assays for which sufficient data are available to support their use in this TG are: *lacZ* bacteriophage mouse (Muta<sup>TM</sup>Mouse); *lacZ* plasmid mouse; *gpt* delta (*gpt* and *Spi*<sup>-</sup>) mouse and rat; *lacI* mouse and rat (Big Blue<sup>®</sup>), as performed under standard conditions. In addition, the *cII* positive selection assay can be used for evaluating mutations in the Big Blue<sup>®</sup> and Muta<sup>TM</sup>Mouse models. Mutagenesis in the TGR models is normally assessed as mutant frequency; if required, however, molecular analysis of the mutations can provide additional information (see Paragraph 24).

8. 本テストガイドラインでの使用を裏付ける十分なデータがあるのは、Muta<sup>TM</sup>Mouse、*lacZ* plasmidマウス、*gpt* delta (*gpt*および*Spi*<sup>-</sup>)マウスおよびラット、ならびにBig Blue<sup>R</sup>マウスおよびラットを用いた試験で、かつ標準的な条件下で実施されたものである。また、Big Blue<sup>R</sup>とMuta<sup>TM</sup>Mouseでは*cII*セレクション法を用いることができる。...

12

## TG488の概要

### (1) 動物実験

1群5匹以上、通常は雄を使用。

陰性対照群、3用量の投与群、陽性対照群を設ける。

(熟練施設は陽性対照群の代わりに既知の陽性対照DNAを使用可。)

経口投与。(他の曝露経路も使用可だが、腹腔内投与は推奨されない。)

28日間連投し、最終投与の3日後に組織採取。

最高用量は最大耐量(MTD)、または限度用量。(投与期間が28日間の場合は1000 mg/kg体重/日、14日間以下の場合には2000 mg/kg体重/日。)

13

### (2) 採取組織、変異解析組織の選択

採取組織の選択は、試験の実施理由、既存の変異原性、発がん性または毒性データに基づいて行なう。参考のできる情報がない場合は、増殖の速い組織、増殖の遅い組織および接触部位の組織を代表するものとする。

変異解析する組織の選択は、1)投与経路または最初の接触部位(経口投与では腺胃、吸入投与では肺、局所投与では皮膚など)、および2)一般毒性試験で得られた情報と考察に基づいて行なう。発がん性の知見があればその標的組織を考慮する。

参考のできる情報がない場合は、肝臓および少なくとも1種類の分裂の速い組織(腺胃、骨髄など)を解析する。多くの場合、上記の必要条件は注意深く選択した2種類の組織を解析することで達成できるが、ときには3種類以上が必要となることもある。

14

### (3) 変異解析の概要

DNAサンプルあたりの総プラーク数または総コロニー数の最適値は、ある突然変異体頻度のもとで十分な数の変異体を検出できる統計的確率によって決まる。

(通常、1サンプルあたり数10万～100万個程度のプラークを検索することが必要)

データは個体単位で集計する。

陽性結果の判定基準は、突然変異体頻度の用量依存性のある増加や、単一の用量群における突然変異体頻度の明らかな増加などがある。結果の生物学的意味をまず考慮すべきである。適切な統計手法を用いることもできる。(動物を単位とする。)

塩基配列解析は必須ではない。しかし、大きな個体間のばらつきが認められたときは塩基配列データが役立つことがある。

15

### TGR試験法の課題

1)ガイドラインの推奨プロトコルに準じたデータが乏しい。  
28日間投与等の条件を満たした試験データが少なく、推奨プロトコルの妥当性の検証が十分でない可能性がある。

#### 2)トランスジェニック動物の生物学的同一性

トランスジェニック動物の毒性、発がん性等は、同系統の非トランスジェニック動物と同等か？(導入遺伝子による大きな影響はないと考えられるが、証明はされていない。)

(TG488:用量段階は、同じ曝露経路で一般毒性を評価した用量設定試験の結果に基づいて、または既存の亜急性毒性試験の結果に基づいて設定する。用量設定試験で同系統の非トランスジェニック動物を用いてよい。)

16



## TGR試験法の課題(つづき)

### 3)他の(遺伝)毒性試験との統合

28日間反復投与毒性試験との統合には、プロトコルの問題や、使用動物の生物学的同一性の問題がある。

28日間反復投与では1回あたり投与量が低くなるため、短期の遺伝毒性試験との統合が難しい。

### 4)コストの問題

*In vitro*パッケージングを効率的に行うため、長鎖DNAの調製が必要。パッケージング試薬が高価。

→簡便で汎用性の高い長鎖DNA抽出法や安価なパッケージング試薬の供給が望まれる。

17

トランスジェニック齧歯類遺伝子突然変異試験  
(TGR試験)の概要

OECDテストガイドライン(TG488)の概要

データベースから見たTGR試験の特徴

最近の動向: TG488の改訂(2013)

18

**OECD Detailed Review Paper (2009)の収録データ(1)****3180の測定データ:**

うち約50%が21種の物質由来であり、その全てが  
発がん物質。(ENUだけでデータ全体の13%を占める。)

**228の被験物質:**

うち118の発がん物質、36の非発がん物質を含む。

**動物モデル:**

約82%がBig Blue<sup>R</sup> とMuta<sup>TM</sup>Mouse。

約14%がlacZ plasmid mouseとgpt delta。

cIIアッセイは全体の約8%。

ラットは全体の5%以下。

19

**OECD Detailed Review Paper (2009)の収録データ(2)****投与方法:**

腹腔内投与40%、強制経口23%、混餌13%

(以下は飲水、照射、吸入、塗布など)

約半数が単回投与の実験。65%が投与期間5日以内。

**解析組織:**

多い順に肝臓、骨髄、肺、雄生殖組織(精巣・精子)、腸、  
脾臓、皮膚、腎臓、etc.

20

OECDのDRP (2009) に収録された2007年までのTGR試験関連学術文献データ、および2008年以降に厚生労働省が委託試験等で行ったTGR試験データを基に、化学物質等の発がん性とTGR試験結果の相関を検討した。

陽性を陽性と評価するsensitivity、  
陰性を陰性と評価するspecificity、  
全体の一致率 concordance  
を計算した。

Total 260 records: Carcinogen 123, noncarcinogen 23, carcinogenicity unknown 65, combined exposure 49

(※今回の集計では、発がんの種差および性差は考慮していない。)

21

「発がん性物質」かつ「発がん標的組織でのTGR dataあり」  
102件

		TGR positive	TGR negative
	125	85	40
carcinogen	102	77	25
non-carcinogen	23	8	15

		(%)
sensitivity	$77/102 =$	<u>75.5</u>
specificity	$15/23 =$	<u>65.2</u>
concordance	$(77+15)/125 =$	<u>73.2</u>

22

「発がん性物質」かつ「TGR dataあり」

123件

(=102件+TGR解析組織が発がん標的でない21件)

	146	TGR positive 99	TGR negative 47
carcinogen	123	91	32
non-carcinogen	23	8	15
		(%)	
sensitivity	91/123 =	<u>74.0</u>	
specificity	15/23 =	<u>65.2</u>	
concordance	(91+15)/146 =	<u>72.6</u>	

23

「発がん性物質」かつ「TGRデータのある発がん標的臓器全てで

TGR陰性」: 25物質

(いわゆる非遺伝毒性発がん物質カテゴリに相当)

Liver

carcinogen

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin  
Acetaminophen  
Carbon tetrachloride  
Chloroform  
Clofibrate  
Di(2-ethylhexyl)phthalate  
Flumequine  
Heptachlor  
Methyl clofenapate  
Phenobarbital  
3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX)  
Hydrazine sulphate  
Trichloroethylene (with and without epichlorohydrin)

Liver以外

3-Nitrobenzanthrone  
Arsenite trioxide  
Chrysene  
Nickel subsulphide  
Dimethylarsinic acid  
Saccharin, sodium  
D-limonene  
17-B-Estradiol  
Methyl bromide  
3-Amino-1-methyl-5Hpyrido(4,3-b)indole (Trp-P-2)  
High-fat diet  
Phorbol-12-myristate-13-acetate (TPA)

24

## Ames試験とTGR試験の陽性判定率

「発がん性物質」かつ「TGR dataあり」

123件

		TGR positive	TGR negative	sensitivity
	123	91	32	74.0%
Ames positive	87	74	13	
Ames negative	32	15	17	
Ames nd	4	2	2	concordance
sensitivity	73.1%			76.4%

25

In carcinogen, "Ames positive" and "TGR negative": 13

Chemical	Carcinogenicity targets	TGR	Targets performed in TGR
Hydrazine sulphate	liver, lung	-	Tg negative in bone marrow, liver, lung
Phenobarbital	liver	-	Tg negative in liver
3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX)	liver, lung	-	Tg negative in liver, lung Tg negative in glandular stomach, liver
Methyl bromide	stomach	-	Tg negative in caecum, colon, small intestine
3-Amino-1-methyl-5Hpyrido(4,3-b)indole (Trp-P-2)	small intestine	-	Tg negative in liver, stomach
Sodium nitrite	liver	-	Tg negative in liver
Malachite green	liver	-	Tg negative in bone marrow, ovarian granulosa
1,2:3,4-Diepoxybutane	nasal mucosa, lung, skin, Harderian gland	na (-)	Tg negative in liver, testes Tg negative in bone marrow, brain, lung, splenic lymphocytes, testicular germ cells
1,2-Dichloroethane	stomach, subcutaneous tissue, vascular system, mammary gland, lung, uterus	na (-)	Tg negative in heart, mammary gland
Acrylonitrile	ear/Zymbal's gland, nervous system, oral cavity, small intestine, mammary gland, nasal cavity	na (-)	Tg negative in liver
Genistein	uterus	na (-)	Tg negative in stomach
Kojic acid	thyroid	na (-)	
Metronidazole	pituitary gland, testes, liver, mammary gland, lung, haematopoietic system	na (-)	

26

In carcinogen, "Ames negative" and "TGR positive": 15

Chemical	Carcinogenicity targets	TGR	Targets performed in TGR
[4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio]acetic acid (AKA Wyeth 14,643)	liver	+	Tg positive in liver
Benzene	lung, haematopoietic (bone marrow, lymphocytes and T-cells) tissues	+	Tg positive in bone marrow, lung, spleen, negative in liver
Oxazepam	liver	+	Tg positive in liver
Procarbazine HCl (Natulan)	lung, haematopoietic (bone marrow, lymphocytes and T-cells) tissues	+	Tg positive in bone marrow, kidney, lung, spleen, testes, negative in brain, liver
Uracil	bladder	+	Tg positive in bladder
Comfrey	liver	+	Tg positive in liver
Cyproterone acetate	liver	+	Tg positive in liver
Dicyclanil	liver	+	Tg positive in liver
Tamoxifen	liver	+	Tg positive in liver
Amosite asbestos	lung	+	Tg positive in lung
Crocidolite asbestos	lung	+	Tg positive in lung, omentum
Ferric nitrilotriacetate	kidney	+	Tg positive in kidney
Hexachlorobutadiene	kidney	+	Tg positive in kidney, negative in bone marrow, liver
Acrylamide	nervous system, peritoneal cavity, thyroid, clitoral gland, mammary gland, oral cavity	na (+)	Tg positive in bone marrow, negative in liver, testicular germ cell
CC-1065	lung	na (+)	Tg positive in liver 27

## まとめ

- ・TGR試験と発がん性の一致率は72.6%。
- ・被験物質の選択バイアスが大きいと、傾向の一般性を評価するのは難しい。
- ・発がん標的とTGR解析臓器が異なる場合はsensitivityが低下する可能性がある。
- ・発がん標的でのTGR陰性結果はいわゆる非遺伝毒性メカニズムを示唆する→規制現場での重要性。

### Carcinogenicity v.s. TGR

		Tg positive	Tg negative
	146	99	47
carcinogen	123	91	34
non-carcinogen	23	8	15

Sensitivity 74.0%  
 Specificity 65.2%  
 Concordance 72.6%

(溶媒13物質を追加した場合は  
 specificity=77.8%、  
 concordance=74.8%)

### Ames v.s. TGR (in carcinogen)

		Tg positive	Tg negative
	123	91	32
Ames positive	87	76	13
Ames negative	32	15	17
Ames n.d.	4	2	2

Concordance 76.4%

28

トランスジェニック齧歯類遺伝子突然変異試験  
(TGR試験)の概要

OECDテストガイドライン(TG488)の概要

データベースから見たTGR試験の特徴

**最近の動向: TG488の改訂(2013)**

29

#### OECD GUIDELINE 488:

**Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays** (26 July 2013)

2013年のTG488改訂では、主に生殖細胞変異原性の検出に関する記述が一部変更された。

#### 2011

18. Healthy young adult animals (8-10 weeks old at start of treatment) are randomly assigned to the control and treatment groups...

#### 2013

18. Healthy young **sexually mature** adult animals (**8-12 weeks old** at start of treatment) are randomly assigned to the control and treatment groups...

30

## 2011

32. ...The time for the progression of developing germ cells from spermatogonial stem cells to mature sperm reaching the vas deferens is ~41 days for the mouse and ~57 days for the rat. Following a 28 day exposure with a subsequent 3 day sampling period, accumulated sperm collected from the vas deferens will represent a population of cells exposed during approximately the latter half of spermatogenesis, which includes the meiotic and postmeiotic period, but not the spermatogonial or stem cell period. In order to adequately sample cells in the vas deferens that were spermatogonial stem cells during the exposure period, additional sampling times at around 8 weeks minimum (rats) or 6 weeks minimum (mice) are required.

## 2013

32. ...The time for the progression of developing germ cells from spermatogonial stem cells to mature sperm reaching the vas deferens/cauda epididymis is ~49 days for the mouse and ~70 days for the rat. Following a 28-day exposure with a subsequent three day sampling period, accumulated sperm collected from the vas deferens/cauda epididymis will represent a population of cells exposed during approximately the latter half of spermatogenesis, which includes the meiotic and postmeiotic period, but not the spermatogonial or stem cell period. In order to adequately sample cells in the vas deferens/cauda epididymis that were spermatogonial stem cells during the exposure period, an additional sampling time at a minimum of 7 weeks (mice), or 10 weeks (rat), after the end of treatment is required.

31

雄生殖細胞が精原幹細胞から成熟精子になり精巣上体尾部/輸精管に到達するまでの期間＝マウス～49日、ラット～70日

## 2011

33. Cells extruded from seminiferous tubules after 28 days of exposure comprise a mixed population enriched for all stages of developing germ cells. Sampling these cells for gene mutation detection does not provide as precise an assessment of the stages at which germ cell mutations are induced as can be obtained from sampling spermatozoa from the vas deferens (since there is a range of cell stages sampled, and there will be some somatic cells contaminating the cell population). However, mutations induced in all stages of male germ cell development can be detected after a 28 day exposure by sampling spermatozoa from the vas deferens and developing germ cells from the seminiferous tubules of the same animals at a single 3 day sampling time.

28日間投与の3日後に、輸精管から精子細胞を、精細管から成熟過程の生殖細胞を採取すれば、全てのステージの生殖細胞の変異を検出できる

## 2013

33. Cells extruded from seminiferous tubules after a 28 + 3 day regimen comprise a mixed population enriched for all stages of developing germ cells. Sampling these cells for gene mutation detection does not provide as precise an assessment of the stages at which germ cell mutations are induced as can be obtained from sampling spermatozoa from the vas deferens/cauda epididymis (since there is a range of germ cell types sampled from the tubules, and there will be some somatic cells contaminating this cell population). However, sampling cells from seminiferous tubules in addition to spermatozoa from the vas deferens/cauda epididymis following only a 28 + 3 day regimen would provide some coverage of cells exposed across the majority of phases of germ cell development, and may be useful for detecting some germ cell mutagens.

32

28日間投与の3日後に、輸精管から精子細胞を、精細管から生殖細胞を採取すると、成熟過程の大部分のステージで曝露された細胞をある程度カバーでき、ある程度の生殖細胞変異原の検出に有用であろう



6th IWGT (Brazil, Oct 31 – Nov 2, 2013)において、  
生殖細胞遺伝毒性試験に関するワークショップが開かれた。

### TGR関連の話題

- ・生殖細胞遺伝毒性の試験法のひとつとしてTGRは有用だが、  
28+3のプロトコルでは生殖細胞変異原性の検出力が不十分である可能性
- ・精原幹細胞から成熟精子までの期間を考慮して長期の発現時間を設定すると、体細胞変異原性とは別実験になってしまう。
- ・同一個体で体細胞&生殖細胞遺伝毒性を評価する方法の必要性
- ・体細胞&生殖細胞変異原性を検出するためのプロトコルの最適化の検討

33

### まとめと展望

TGR突然変異試験は、有用性の高い*in vivo*突然変異試験であり、規制の場でも重要な役割を果たすことが期待される。しかし、ガイドラインに準拠したデータは十分でない。

一般毒性試験および発がん試験が個体の全身を検索するのに対して、TGR試験は一部の組織のみを検索するため、発がん性との相関を調べるためには、発がん性試験と同条件(用量等)で発がん標的組織の遺伝毒性を検討することが望ましい。

TGR試験を生殖細胞変異原性の評価に用いるには、試験法の最適化を含めた議論が必要である。

*In vivo*遺伝毒性と発がん性の定量的評価への応用。

34

ご静聴ありがとうございました。

※本発表中の一部のデータは、厚生労働科学研究費補助金  
(H24-食品-一般011)の助成を受けて行われた。

35