

# 博士学位論文

Ames 試験陽性物質に対する  
フォローアップ評価法に関する研究  
－TK6 細胞及びその修復系遺伝子欠損株を用いた  
新しい遺伝毒性評価法の開発－

Study on Follow-up Assessment for Ames Test Positive Compounds  
－ Development of Genotoxicity Evaluation Method  
Using TK6 Cells and Their Repair Gene Deficient Strains －

2022 年 2 月

福田 隆之

## 目次

目次 .....	2
略語 .....	3
要旨 .....	5
序論 .....	9
第1章 標準的な <i>in vitro</i> 突然変異試験 (TK6 アッセイ) による Ames 試験陽性物質のフォローアップ法の確立 .....	15
第1節 緒言 .....	16
第2節 実験材料及び方法 .....	17
第3節 実験結果 .....	26
第4節 考察 .....	41
第2章 DNA 修復機序に基づいた高感度型 TK6 アッセイによる フォローアップ法の確立 (塩基除去修復及びヌクレオチド 除去修復二重欠損株を用いた高感度型 TK6 アッセイの開発) .....	56
第1節 緒言 .....	57
第2節 実験の材料及び方法 .....	60
第3節 実験の結果 .....	62
第3節 考察 .....	69
第3章 改良型 TK6 細胞を用いた遺伝毒性メカニズムの解明 (ヌクレオチド除去修復欠損株を用いた遺伝毒性作用機序解明) .....	74
第1節 緒言 .....	75
第2節 実験の材料及び方法 .....	79
第3節 実験の結果 .....	80
第4節 考察 .....	83
総括 .....	87
謝辞 .....	93
参考文献 .....	95

## 略語

2-AAF	2-acetylaminofluorene
3Rs	Replacement, Reduction, and Refinement
AOP	adverse outcome pathway
B(a)P	benzo[ <i>a</i> ]pyrene
BER	base excision repair
BPDE	Benzo[ <i>a</i> ]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide
CE	cloning efficiency
DEP	differentially expressed proteins
EASE	expression analysis systematic explorer
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EW	empty well
FDR	false discovery rate
GG-NER	global genomic NER
GO	gene ontology
HCA	heterocyclic amine
IATA	integrated approaches to testing and assessment
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
LFQ	label-free quantitation
MDM2	mouse double minute 2 homolog
MeIQx	2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5- <i>f</i> ]quinoxaline
MF	mutant frequency

MG	malachite green
MLA	mouse lymphoma TK assay
MoA	Mode of Action
NEDA	N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride
NER	nucleotide excision repair
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PAHs	polycyclic aromatic hydrocarbons
PBS	phosphate buffered saline
PhIP	2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5- <i>b</i> ]pyridine
PPD	<i>p</i> -phenylenediamine
PSM	peptide spectrum match
PTS	phase transfer surfactant
RS	relative survival
RSG	relative suspension growth
RTG	relative total growth
SCCS	Scientific Committee on Consumer Safety
TC-NER	transcription-coupled NER
TFT	trifluorothymidine
TGR	transgenic rodent mutation assays
TK	Thymidine kinase
TW	total well
UV	ultra violet
WoE	Weight of Evidence

## 要旨

遺伝毒性とは化学物質が細胞の DNA や染色体の構造に変化をもたらす性質であり、DNA 損傷、染色体異常及び遺伝子突然変異の 3 つのエンドポイントに大別される。げっ歯類を用いた発がん性試験との比較研究から、遺伝子突然変異誘発性を検出する細菌を用いた復帰突然変異試験（Ames 試験）と発がん性には高い相関性が見出されている。一般に、遺伝子突然変異誘発性には閾値がないと考えられているため、低用量でも発がんの潜在的リスクを否定できない。したがって、Ames 試験が陽性であった場合は、基本的に医薬品開発の中止が検討される。しかし、Ames 試験陽性物質にもヒト医薬品として有用な化合物が多く含まれていると考えられ、単純な生物学的構造からなる細菌のみでヒトに対する医薬品の突然変異誘発性を決定することには疑念がある。このため、ヒトへの外挿性の高い哺乳類動物細胞を用いた *in vitro* 突然変異試験の開発は重要な課題とされている。

医薬品開発における Ames 試験陽性物質のレスキューには、陽性反応のメカニズムが細菌特異的であり、生体内、とりわけヒトでは起こり得ないことを実証する必要がある。しかしながら、*in vivo* 試験はコストの面で大きな負荷となること、開発スケジュールの大幅な遅延が生じること及び動物福祉の 3Rs（Replacement、Reduction、Refinement）原則に逆行することから、ヒトへの外挿性の高い哺乳類動物細胞を用いた *in vitro* 試験において、本課題の解決を図ることが強く求められている。近年、ヒトリンパ芽球細胞 TK6 は DNA 修復酵素や p53 タンパク質が正常である理由から、各種試験法ガイドラインで使用が推奨されている。そこで、本研究では Ames 試験陽性物質のレスキューから作用機序解明までを網羅した TK6 細胞を用いた *in vitro* 試験による体系的フォローアップスキームの確立を目的とし、以下に示す 3 つの研究を行った。

研究 1 では、短時間処理法（代謝活性化存在下及び非存在下で 4 時間曝露）及び連続処理法（代謝活性化非存在下で 24 時間曝露）における TK6 細胞を用いた遺伝子突然変異試験（TK6 アッセイ）により、芳香族ニトロや芳香族アミンなどの DNA 構造アラートを有する Ames 試験陽性/げっ歯類発がん性試験陰性の 10 物質のレスキューを試みた。その結果、2,5-Diaminotoluene 及び Iodoform の 2 物質はいずれの処理法でも明確な陰性を示したことから、本研究に用いた Ames 試験陽性物質に対する TK6 アッセイのレスキュー率は 20%であり、他の 8 化合物は TK6 アッセイでも Ames 試験同様に遺伝毒性を示すことが明らかとなった。興味深いことに、陽性を示した 8 化合物のうち、HC Blue No.2 及び 4-Nitroanthranilic acid は連続処理法のみで陽性反応を示した。一般に、*in vitro* 遺伝毒性試験では、被験物質処理後の培養液における pH、析出及び外因性の酸化ストレスなど外的影響により、化合物の直接的な DNA への作用ではなく、二次的な作用により偽陽性結果がもたらされることがある。この原因を探る目的で、低用量域まで突然変異頻度（Mutant Frequency : MF）が明確な用量依存性を示した 4-Nitroanthranilic acid（0、400 及び 800 µg/mL）のトキシコプロテオミクス解析を行った。各処理法で顕著に発現していた差次的発現タンパク質（differentially expressed proteins、DEPs）のエンリッチメント解析により、短時間処理法の代謝活性化非存在下とは異なり、連続処理法では酸化ストレス応答に関与することが知られている PDK1、SOD2 及び DIABLO のタンパク質発現量が顕著に上昇することが明らかとなった。一方、連続処理法の 800 µg/mL における Specific DEPs では、短時間処理法の代謝活性化非存在下では発現していた酸化ストレス応答、細胞応答及び DNA 修復応答に関する一連のタンパク質発現量が顕著に低下していた。これらの結果は、連続処理法では酸化ストレスに対する防御能が低下していたことを示唆し、また主要な抗酸化酵素として知られるカタラーゼ及びグ

ルタチオンレダクターゼ (GSR) が用量及び曝露時間に依存して増加していることが明らかとなった。これらの結果から、4-Nitroanthranilic acid の長時間曝露条件では、酸化ストレスの増加が二次的な DNA 損傷を誘発している可能性が強く示唆された。本研究により、標準的な TK6 アッセイのみではレスキューできない Ames 試験陽性物質でもプロテオミクス解析のような新技術を融合することで、遺伝毒性陽性のメカニズムが酸化ストレスなどの二次的作用によるか否かを区別ができることを明らかにした。

次に、TK6 アッセイで陰性を示した Ames 試験陽性物質が、本細胞の低感受性に起因した偽陽性であった可能性を否定するため、研究 2 では DNA 修復機構のメカニズム解析に着眼し、主要な除去修復遺伝子を二重欠損させた *XRCC1<sup>-/-</sup>/XPA<sup>-/-</sup>* 細胞を用いた高感度型 TK6 アッセイの開発を試みた。主要な除去修復機能の二重欠損は、TK6 アッセイの DNA 反応性物質に対する感度を向上させるのみならず、細菌とヒトにおける DNA 修復機構の相違に基づいた特異性についても評価を可能にするものと考えた。本研究により、標準的な TK6 アッセイに遺伝子欠損株を組み合わせることで、Ames 陽性結果が DNA 反応性であるか否かを判別できる評価系を構築した。原核生物から真核生物まで高度に保存された DNA 修復機構である除去修復経路の機能喪失は、化学物質の遺伝毒性誘発能の有無を理解するのみならず、機序解明においても有用であることを明らかにした。

最後に、高感度型 TK6 アッセイにおいて陽性を示した場合の陽性メカニズムの解明を目的とした評価系を構築するため、ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair: NER) 経路におけるサブ経路である全ゲノムヌクレオチド除去修復 (global genomic NER: GG-NER) 及び転写共役ヌクレオチド除去修復 (transcription-coupled NER: TC-NER) の主要遺伝子をそれぞれ欠損させた改良型

TK6 細胞 ( $XPC^{-/-}$ 細胞及び  $CSB^{-/-}$ 細胞) を開発した。発がんメカニズムが異なる代表的な環境変異原に対するこれら改良型 TK6 細胞と TK6 細胞との感受性の比較実験を行った。発がんメカニズムの異なる環境変異原 (化学物質、 $\gamma$ 線、紫外線) に対する NER 欠損細胞の感受性には欠損遺伝子の相違で差が見られた。本試験系における実験結果は、環境変異原の DNA 付加体形成、DNA 修復あるいはアポトーシス機構を反映した結果となり、TK6 アッセイ陽性物質のメカニズム解明に有用であると考えられた。よって、改良型 TK6 細胞を用いた感受性試験は、Ames 試験陽性物質がヒトに DNA 損傷を誘発するか否かをメカニズムベースで判断できる強力なフォローアップツールとなり得ると考えた。

上述の結果から、標準的な TK6 アッセイではレスキューできない医薬品候補化合物でもプロテオミクス解析を組み合わせることで、DNA 反応性によらない二次的影響を排除できる可能性が示唆された。さらに、DNA 修復遺伝子を二重欠損させた高感度型  $XRCCI^{-/-}/XPA^{-/-}$ 細胞で陽性を示した医薬品候補化合物を、改良型 TK6 細胞である  $XPC^{-/-}$ 細胞及び  $CSB^{-/-}$ 細胞を併用して評価することで、発がん性の有無のみならず、作用機序に関する具体的な影響まで推定できる可能性が示唆された。本研究の成果は、Ames 試験陽性により中断された医薬品候補化合物の再開発を促すのみならず、追加で実施する *in vivo* 遺伝毒性試験をも回避できる可能性があり、結果として動物福祉への貢献に繋がることを期待できる。



## 序論

遺伝毒性とは化学物質や UV 及び放射線などの物理的因子が、DNA や染色体あるいはそれらと関連するタンパク質に作用し、変化をもたらす性質を示す。遺伝毒性が体細胞に生じた場合は発がんのリスクとなり、生殖細胞に生じた場合は遺伝性疾患の原因となる。遺伝的变化（エンドポイント）は DNA 損傷、染色体異常及び遺伝子突然変異に大別され、これらは細菌、細胞あるいは動物を用いた遺伝毒性試験によって評価される（Fig. 1）。

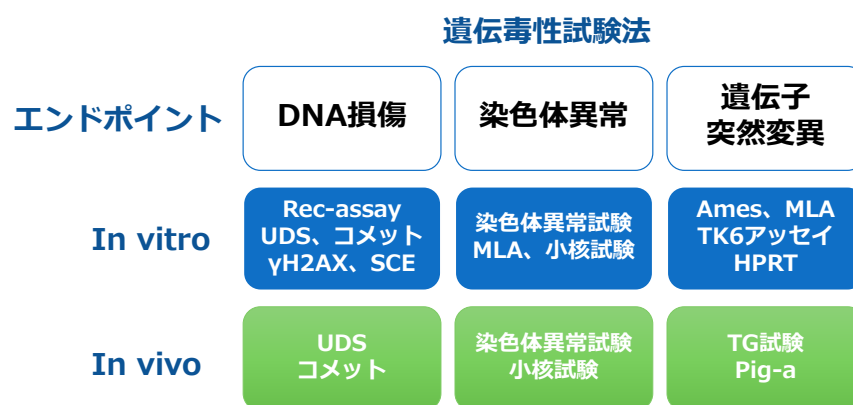


Fig. 1 Genetic endpoints and genotoxicity tests.

UDS: unscheduled DNA synthesis assay, MLA: mouse lymphoma TK assay, and HPRT assay: hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene mutation assay

医薬品の遺伝毒性ガイドラインである International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use（ICH S2(R1)）では、医薬品の承認申請において細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）の結果が陰性であることを承認の前提としている[1]。一般に、Ames 試験陽性物質は DNA に直接的に作用することで、突然変異を誘発し、ひいては発がんを引き起こすと考えられている。また、その反応には閾値がないとされており、1 分子でも存在すればそれががん遺伝子に突然変異を引き起こすため、細胞のがん化をもたらす

すリスクがあると考えられている (ICH M7 ガイドライン、Fig. 2) [2]。すなわち、医薬品の承認申請において、Ames 試験陽性物質は DNA 反応性物質とみなされるため、基本的には開発中止が検討される。Motoyama らは小核誘発能とある種の薬理効果には正の相関があることを見出しており、薬理活性の高い医薬品ほど強い遺伝毒性を示すことを報告している (Fig. 3) [3]。Ames 試験陽性により開発中断された医薬品候補化合物の中にも、薬理作用の強い有用な候補物質が存在する可能性が高いものと思われる。こうした状況下において、薬効面から有用な化合物の開発を継続する場合、そのフォローアップ試験として規制当局から要求される試験が、トランスジェニック動物を用いる遺伝子突然変異試験 (Transgenic Rodent Mutation Assays: TGR 試験) [4]である。しかし、TGR 試験はコストの負担が非常に大きく (市場価格として Ames 試験の 20~30 倍)、試験規模が大きいことから開発スケジュールの大幅な遅延が余儀なくされ、更には多くの動物を追加使用することから動物福祉における 3Rs 原則の点からも推奨されない。Ames 試験の陽性結果をレスキューし、開発を継続させるには、その陽性反応のメカニズムが細菌特異的であり、生体内、特にヒトでは起こり得ないことをメカニズムベースで実証する必要がある。一般に、Ames 試験とげっ歯類の発がん性試験における結果の相違は、DNA 修復機構、酸化ストレスからの防御機構及び代謝反応などの種の違いに起因すると考えられている。

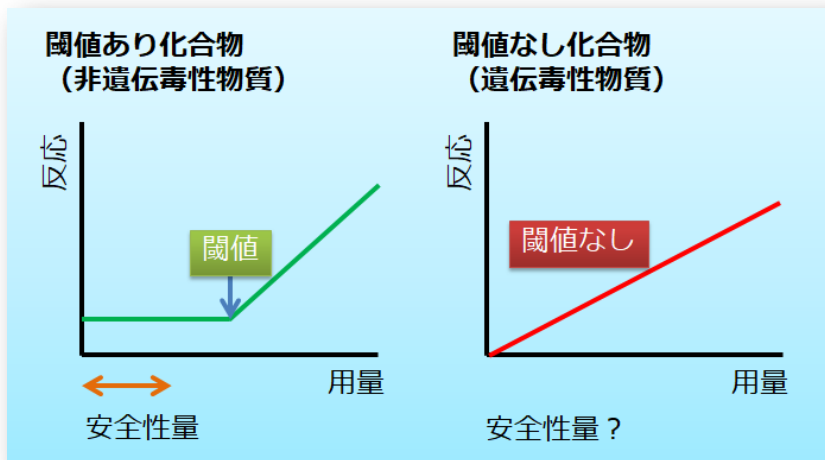


Fig. 2 Models for dose-response curves of non-genotoxic and genotoxic carcinogens.

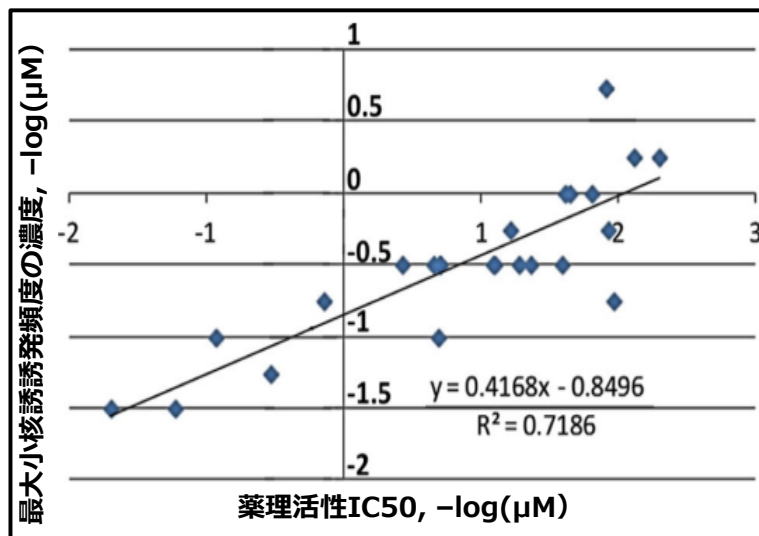


Fig. 3 Relationship between micronucleus induction and pharmacological efficacy.

The vertical axis represents the potency of micronucleus induction, defined as the negative log of the dose that provided the maximum frequency of micronuclei. The horizontal axis shows the pharmacological efficacy, defined as the negative log of the 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) on target enzyme activity.

(Motoyama et al [3])

これまでに、Ames 試験の結果が陽性にもかかわらず、許認可を得た医薬品はいくつか知られている。たとえば、アフリカトリパノソーマ症（睡眠病）の治療薬であるフェキシニダゾールは *in vitro*（ヒトリンパ球を用いた小核試験）及び *in vivo* 遺伝毒性試験（ラットでの *ex vivo* 不定期 DNA 合成試験、マウスでの骨髄小核試験）ではすべて陰性を示したが、Ames 試験のみが陽性であった。Tweats らは、フェキシニダゾールが細菌特異的なニトロ還元酵素反応によって代謝活性化されることを実証した[5]。このように、Ames 試験陽性結果が細菌特異的な反応であり、ヒトに対する発がん性リスクが低いことを作用機序に基づき証明できれば、承認申請において開発継続根拠となり得ることが報告されている。

作用機序の検討は、医薬品の安全性評価において、動物を使用しない試験の確立に他ならない。経済協力開発機構（Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD）は、*in silico* と *in vitro* の情報を組み合わせた「有害事象経路（Adverse outcome pathway: AOP）」と「試験と評価の統合的アプローチ（Integrated approaches to testing and assessment: IATA）」を精力的に開発している[6]。AOP と IATA は、遺伝毒性を含む WoE（Weight of Evidence）に基づく正確な毒物学的評価に貢献し[6][7]、規制上の結論を導き出すことを可能としている。化粧品成分の安全性評価では、*in vitro* 試験に基づく WoE アプローチの使用が進んでいる[8]。たとえば、化粧品のヘアカラー剤として使用されている Basic Brown 17 は、Ames 試験の結果は陽性であるが、マウスのリンパ腫を用いた突然変異試験（TK と HPRT の 2 つの遺伝子座）や哺乳類細胞を用いた *in vitro* 小核試験では陰性である。さらに、3次元再構成ヒト皮膚細胞を用いたコメットアッセイでは陰性である[9][10]。したがって、WoE に基づき、Basic Brown 17 は *in vivo* 遺伝毒性の可能性は極めて低いものと予想され[11]、更なるフォローアップ試験は実施されなかった[9]。さらに、トランスクリプトームやプロテオームなどのオミ

ックス技術は、WoE アプローチを実施する上で重要な役割を果たしており、遺伝子発現や代謝経路について毒性評価に必要な作用機序に関する情報を提供するものと期待される。このように、WoE アプローチは Ames 試験陽性のフォローアップ戦略としても有用であり、動物実験への依存度を低減させながらヒトリスクに対する新たな評価戦略へと着実に移行している。こうした国際動向から、*in vitro* 試験では正常な生体内での機能を再現し得るヒト細胞の遺伝毒性評価への利用が推奨される。そこで、DNA 修復酵素、p53 タンパク質及び薬物代謝酵素の発現が正常であるヒトリンパ芽球細胞 TK6 の遺伝毒性試験への応用は、ヒトへの外挿性を考慮する上で有用ではないかと考えた。TK6 細胞は 17 番染色体長腕上に存在するチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子をヘテロに持つ ( $TK^{+/-}$ )。したがって、活性を持つ TK 遺伝子は 1 コピーしか持たないため薬剤耐性を指標とした前進性遺伝子突然変異系 ( $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$ ) として実用的に用いることができ、実際に OECD TG490 には TK6 細胞を用いた遺伝子突然変異試験 (TK6 アッセイ) として収載されている[12]。選択薬剤としては TK の代謝拮抗剤であるトリフルオロチミジン (trifluorothymidine: TFT) を用いる。TK6 アッセイでは、従来のヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) 遺伝子等を利用した遺伝子突然変異試験と異なり、点突然変異等の比較的小さな遺伝的変異のみならず、染色体レベルにまで及ぶ大きな欠失等の遺伝的変化をも検出できるのが特徴である。加えて、そのような大きな変異をもつ突然変異体を細胞成長速度が遅い変異体 (Slow Growing Mutant: SG 変異体) としてとらえることができる。本研究では本試験法を用いることで、Ames 試験陽性物質のフォローアップから作用機序解明までを網羅した体系的なフォローアップスキームの確立を目的とし、下記 3 つの研究を遂行することにより、本目的の達成を試みた。

研究 1：標準的な *in vitro* 突然変異試験 (TK6 アッセイ) による Ames 試験陽性物質のフォローアップ法の確立 (本論文の第 1 章に記載)

研究 2：DNA 修復機序に基づいた高感度型 TK6 アッセイによるフォローアップ法の確立 (本論文の第 2 章に記載)

研究 3：改良型 TK6 細胞を用いた遺伝毒性メカニズムの解明 (本論文の第 3 章に記載)

研究 1 では Ames 試験陽性/げっ歯類発がん性試験陰性の 10 物質 (Table 1 及び 2) において、短時間処理法及び連続処理法による TK6 アッセイを行い、Ames 試験陽性物質に対するフォローアップ試験としての有用性を検証した。

次に、TK6 アッセイにおける Ames 試験陽性物質の「陰性」結果が細胞の低感受性による偽陰性ではなく科学的に妥当な陰性結果であるかを確認するため、研究 2 では主要な DNA 除去修復機能を二重欠損させた *XRCCI<sup>-/-</sup>/XPA<sup>-/-</sup>* 細胞を用いた高感度型 TK6 アッセイの開発を試みた。遺伝子二重欠損細胞の TK6 アッセイへの組み込みが DNA 反応性物質に対する感度や特異性を改善し得るかを検証した。

最後に、高感度型 TK6 アッセイにおいて Ames 試験陽性物質が「陽性」を示した時の DNA 修復機構の解明を目的とした評価系を構築するため、NER 経路におけるサブ経路である GG-NER 及び TC-NER の主要遺伝子をそれぞれ欠損させた改良型 TK6 細胞 (*XPC<sup>-/-</sup>* 細胞及び *CSB<sup>-/-</sup>* 細胞) を開発した。

本論文では、章ごとに上記研究の成果について詳述し、最後に総括を述べる。

## 第1章 標準的な *in vitro* 突然変異試験 (TK6 アッセイ) による Ames 試験陽性物質のフォローアップ法の確立

---

本章は下記論文に基づいています。

Manabu Yasui, Takayuki Fukuda, Akiko Ukai, Jiro Maniwa, Tadashi Imamura, Tsuneo Hashizume, Haruna Yamamoto, Kaori Shibuya, Kazunori Narumi, Yohei Fujiishi, Emiko Okada, Saori Fujishima, Mika Yamamoto, Naoko Otani, Maki Nakamura, Ryoichi Nishimura, Maya Ueda, Masayuki Mishima, Kaori Matsuzaki, Akira Takeiri, Kenji Tanaka, Yuki Okada, Munehiro Nakagawa, Shuichi Hamada, Akihiko Kajikawa, Hiroshi Honda, Jun Adachi, Kentaro Misaki, Kumiko Ogawa, Masamitsu Honma. Weight of evidence approach using a TK gene mutation assay with human TK6 cells for follow-up of positive results in Ames tests: a collaborative study by MMS/JEMS. *Genes and Environment*. 2020;43:7.

---

## 第1節 緒言

チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子突然変異試験 (TK6 アッセイ) は、ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 において、TK 遺伝子座に誘発された様々な化学物質の変異を検出することができる前進突然変異試験として、2015 年に OECD test guideline No. 490 (OECD TG490) に収載された。TK6 細胞は *O*<sup>6</sup>-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼ (MGMT) を発現していないため、塩基損傷誘発剤を高感度に検出することができる[13]。TK6 細胞は TK のヘテロ接合体であり、TK の機能を不活性化する塩基置換、欠失、平行相同組換えなどの変異を定量的に検出するのに用いることができる[14]。こうした文献情報に基づき、筆者は Ames 試験陽性物質のフォローアップ戦略においては、現在 ICH S2(R1)を中心に哺乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験として広く普及しているげっ歯類細胞を用いたマウスリンフォーマ TK 試験 (mouse lymphoma TK assay: MLA) よりもヒト細胞を用いた TK6 アッセイの方が有用ではないかと考えた。Ames 試験とげっ歯類の発がん性試験との間に矛盾した結果 (陰性 vs 陽性など) がもたらされる要因として、薬物代謝、ゲノム構造、活性酸素防御機構及び DNA 修復機構などの違いがあげられる。TK6 細胞は、細菌とは異なるヒトの代謝酵素を発現し、クロマチン構造を有する。さらに、本細胞は p53 タンパク質関連の機能が正常である[15]。したがって、Ames 試験の陽性結果を精査するための WoE アプローチにおいて、TK6 細胞の遺伝毒性試験への応用は有用であると考えた。しかし、Ames 試験陽性物質に対するフォローアップ試験としての TK6 アッセイの有用性はこれまで評価されていない。そこで本研究では、Ames 試験陽性となった 10 種類の非発がん性化学物質 (Ames 試験陽性かつげっ歯類発がん性試験陰性物質) について、TK6 アッセイを用いて Ames 試験結果のフォローアップ評価を行った。TK6 アッセイは、短時間処理法 (誘導ラット肝 S9 mix 存在下あるいは非存在下で 4 時



間曝露) 及び連続処理法 (S9 mix 非存在下で 24 時間曝露) の条件下で実施した (Fig. 4 及び Table 3)。本研究ではさらに、試験結果の解釈を助け、WoE の有用性を高めるため、トキシコプロテオミクス解析を TK6 アッセイと融合することを検討した。

## 第 2 節 実験材料及び方法

### 細胞の培養

本研究では、ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 は、Japanese Collection of Research Bioresources cell bank 及び American Type Culture Collection から購入した。細胞は 10%非動化馬血清 (JRH バイオサイエンス社)、200 µg/mL ピルビン酸ナトリウム (富士フイルム和光純薬工業株式会社、Thermo Fisher (Gibco))、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン (ナカライテスク株式会社、富士フイルム和光純薬工業株式会社及び Thermo Fisher (Gibco)) を添加した RPMI-1640 培養液 (ナカライテスク株式会社) を用いて、37°C、5%CO<sub>2</sub> で培養した。

### 被験物質処理

本研究に用いた 10 種の被験物質はいずれも Ames 試験陽性かつ発がん性試験陰性の物質である (Table 1)。富士フイルム和光純薬株式会社、東京化成工業株式会社及び Sigma-Aldrich (St.Louis、USA) から購入した。溶媒として 1-Nitronaphthalene にエタノールを使用した以外は、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した (Table 2)。被験物質は適切な溶媒 (DMSO またはエタノール) に溶解後、直接または段階的に希釈して最終濃度の希釈液を調製した。

Table 1 Test substances for the positive results in Ames test and the Negative Results in carcinogenicity studies<sup>a</sup>

No.	Chemical Name	The Positive Results in Bacterial Reverse Mutation Assay			Carcinogenicity Studies
		Without S9	With S9	The Highest Specific Activity <sup>b</sup> and the Strain	
1	4-(Chloroacetyl)-acetanilide	Neg	Pos	600 revertants/mg in TA1538 with S9	Neg
2	2-(Chloromethyl)pyridine HCl	Pos	Pos	98.6 revertants/mg in TA100 with S9	Neg
3	2,6-Diaminotoluene	Neg	Pos	1,703 revertants/mg in TA100 with S9	Neg
4	2,5-Diaminotoluene	Neg	Pos	8,060 revertants/mg in TA98 and 3,840 revertants/mg in TA100 with S9	Neg
5	HC Blue No.2	Pos	Pos	153.6 revertants/mg in TA98 with S9	Neg
6	8-Hydroxyquinoline	Neg	Pos	21,400 revertants/mg in TA97 and 16,000 revertants/mg in TA100 with S9	Neg
7	Iodoform	Pos	Pos	465 revertants/mg in TA98 and 450 revertants/mg in TA100 with S9	Neg
8	4-Nitroanthranilic acid	Pos	Pos	3,600 revertants/mg in TA1535 and 2,830 revertants/mg in TA100 with S9	Neg
9	1-Nitronaphthalene	Pos	Pos	14,700 revertants/mg in TA100 without S9 and 12,500 revertants/mg in TA100 with S9	Neg
10	4-Nitro-o-phenylenediamine	Pos	Pos	41,400 revertants/mg in TA100 without S9	Neg

a Pos Positive, Neg Negative

b Specific activity value indicating that strong mutagenicity is observed in the Ames test is approximately 1000 (revertants / mg) or more, and to be calculated as below  
 Specific activity (revertants / mg) = {(Number of colonies per plate at the dose value) - (Number of colonies per plate in negative control test)} / The dose value (μg) × 1000

Table 2 Test substances and solvents used in this study.

No.	Test Substances	CAS No.	Manufacturer, Lot#	Solvent
1	4-(Chloroacetyl)acetanilide	140-49-8	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Lot#KPJ1678	DMSO
2	2-(Chloromethyl)pyridine HCl	6959-47-3	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Lot#7BOQI-IC	DMSO
3	2,6-Diaminotoluene	823-40-5	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Lot#IUL6B	DMSO
4	2,5-Diaminotoluene	95-70-5	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Lot#QFIJE	DMSO
5	HC Blue No.2	33229-34-4	SIGMA-ALDRICH, Lot#STBF9635V	DMSO
6	8-Hydroxyquinoline	148-24-3	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Lot#5PDSI-RB	DMSO
7	Iodoform	75-47-8	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Lot#PDH1055	DMSO
8	4-Nitroanthranilic acid	619-17-0	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Lot#AGM01-AGMQ	DMSO
9	1-Nitronaphthalene	86-57-7	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Lot#BGF8A-MD	Ethanol
10	4-Nitro-o-phenylenediamine	99-56-9	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Lot#NMEDH	DMSO

誘導ラット肝 S9 はオリエンタル酵母工業株式会社及び家田貿易株式会社から購入した。代謝活性化存在下にはシクロホスファミド (CP、富士フィルム和光純薬工業株式会社) を、代謝活性化非存在下にはメタンスルホン酸メチル (MMS、東京化成工業株式会社、Sigma Aldrich [St. Louis、MO]) を陽性対照物質としてそれぞれ使用した (短時間処理法では 3~5 µg/mL、連続処理法では 1~2.5 µg/mL)。

各被験物質を Table 3 に示す組成で細胞に処理し、短時間処理法及び連続処理法でそれぞれ振盪及び静置で被験物質処理を行った。

Table 3 Composition of cell culture for each treatment.

組成	短時間処理法		連続処理法
	代謝活性化非存在下	代謝活性化存在下	代謝活性化非存在下
細胞懸濁液 (約 $2 \times 10^7$ cells)	10 mL	10 mL	10 mL
S9 mix	—	3 mL	—
150 mM KCl	3 mL	—	—
RPMI-10	—	—	39.5 mL
RPMI-0	6.8 mL	6.8 mL	—
溶媒、被験液 あるいは陽性対照液	0.2 mL	0.2 mL	0.5 mL

#### TK6 細胞を用いたチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子突然変異試験 (TK6 アッセイ)

本研究では、OECD TG490 を参考として、フェノバルビタール及び 5, 6-ベンゾフラボン誘導ラット肝 S9 を用いた代謝活性化存在下及び非存在下において、4 時間曝露あるいは 24 時間曝露の条件下で、TK6 アッセイを実施した (Fig. 4)。いずれの被験物質においても、遺伝子突然変異試験 (本試験) に先立ち、本試験の用量を設定するための用量設定試験を実施した。なお、短時間処理法における試験結果が陽性を示した場合、連続処理法は実施しなかった。

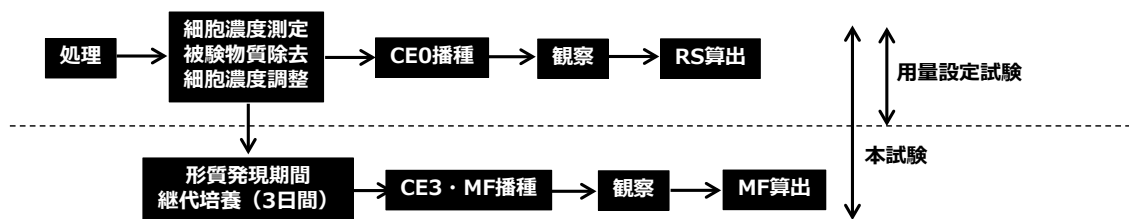


Fig. 4 Schematic of TK6 assay.

被験物質処理後、細胞を遠心分離（1000 rpm、5 分間）し、上清を除去して、血清不含 RPMI 培養液（RPMI-0）または Hank's Balanced Salt Solution で細胞を洗浄した。遠心分離（1000 rpm、5 分間）して上清を除去後、10%馬血清を含む RPMI 培養液（RPMI-10）に細胞（ $2 \times 10^7$  個）を分散させ、細胞濃度を測定した。処理した細胞は、 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 、高湿度の条件下で培養し、TK6 アッセイに使用した。このとき、cloning efficiency（CE）を算出するため、96 ウェルのマイクロプレートで約 1.6 cells/well の細胞濃度で 14 日間培養した。CE はポアソン分布式に基づく式 1 により算出した。empty well（EW）はコロニーを含まないウェルの数、（total well（TW）はウェル総数を示す。N は 1 ウェルあたりの平均細胞数を示す（ $N=1.6$ ）。

$$\text{CE} = -\ln(\text{EW} / \text{TW}) / N \dots \dots \dots \text{[式 1]}$$

さらに、被験物質処理後の細胞毒性の影響を反映させるため、式 2 により CE を補正した。処理終了時の細胞数は、被験物質処理終了時に遠心分離して得られた細胞の数とした。なお、処理開始時の細胞総数は  $2 \times 10^7$  cells であった。

$$\text{Adjusted CE} = \text{CE} \times \text{処理終了時の細胞数} / \text{処理開始時の細胞数} \dots \dots \dots \text{[式 2]}$$

細胞毒性の指標として用いた relative survival (RS) 0 は、陰性対照群及び処理群の CE0 の結果に基づき、式 3 より算出した。なお、陰性対照群の RS0 を 100% とした。

$$RS0 (\%) = \text{処理群の adjusted CE0} / \text{陰性対照群の adjusted CE0} \times 100 \dots\dots [\text{式 3}]$$

用量設定試験において、RS が 20%以下を示す細胞毒性が認められた場合、RS0 が 10~20%を示す用量を最高用量とした。培養液に沈殿がみられず、細胞毒性もまた認められない場合は被験物質の 10 mM あるいは 2 mg/mL のいずれか低い用量とした。細胞毒性指標としては原則 RS0 としたが、RS の使用が困難と判断される被験物質(遅延型毒性を示す物質)では、後述する relative suspension growth (RSG) あるいは relative total growth (RTG) に基づき最高用量を設定した(式 5)。

被験物質を処理してから 3 日間細胞を培養した場合、0 日目から 1 日目までの増殖率(1 日目の細胞濃度 / 0 日目の細胞濃度)を懸濁細胞増殖率 1 (SG1) とした。懸濁細胞増殖比 2 (SG2) は、1 日目から 2 日目までの増殖比(2 日目の細胞濃度 / 1 日目の細胞濃度)とした。RSG 処理群における 3 日間の SG の積を、陰性対照群の同 3 日間の SG の積で除することで算出した(式 4)。RTG は RSG と RS3 の積として算出した(式 5 及び 6)。

培養 3 日目に、CE3 プレートと、突然変異検出用の mutant frequency (MF) プレートを用意した。CE3 プレートは、96 ウェルのマイクロプレートに約 1.6 cells/ウェルの濃度で播種した。MF プレートは、3 µg/mL の TFT (Sigma Aldrich) の存在下で、40,000 cells/ウェルで 96 ウェルマイクロプレートに播種した。

$$\text{RSG} = [\text{SG1 (処理群)} \times \text{SG2 (処理群)} \times \text{SG3 (処理群)}] / [\text{SG1 (陰性対照群)} \times \text{SG2 (陰性対照群)} \times \text{SG3 (陰性対照群)}] \cdots [\text{式 4}]$$

$$\text{RTG (\%)} = \text{RSG} \times \text{RS3} \cdots \cdots [\text{式 5}]$$

$$\text{RS3 (\%)} = \text{処理群における CE3} / \text{陰性対照群における CE3} \times 100 \cdots \cdots [\text{式 6}]$$

MF プレートにおける変異コロニーは、ポアソン分布を用いた式 7 により算出した。EW はコロニーを含まないウェル数、TW はウェルの総数、N は 1 ウェルあたりの平均細胞数 (N=40,000) を示す。

結果の判定は、大森らの方法により行った[16][17]。大森らの方法では、処理法ごとに陰性対照群と被験物質各群 (RS が 10%以上ある群) との間で Dunnett 型の多重比較検定 (有意水準: 0.05、片側) を行い、いずれかの用量で MF に有意な増加が認められた場合は、Simpson-Margolin の方法により Down-turn が見られた用量を検定から除外した。次に用量依存性を確認するため、各群の MF と用量について線形回帰分析 (有意水準: 0.05、片側) を行った。統計学的手法 (大森らの方法) により、被験物質処理群における MF の増加に統計学的有意性が認められ、かつその増加に用量依存性が認められた場合、陽性と判定した。なお、試験の成立基準は評価可能な用量が 4 濃度以上あること、陽性対照群における MF が同時陰性対照群の MF と比較して統計学的に有意に増加することとした。

$$\text{MF} = [-\ln (\text{EW} / \text{TW}) / \text{N}] / \text{CE3} \cdots \cdots [\text{式 7}]$$

## プロテオミクス解析

### 1) サンプルの調製

4-Nitroanthranilic acid の陽性反応のメカニズムを詳細に解析するため、短時間処理法及び連続処理法についてプロテオミクス解析を実施した。4-Nitroanthranilic acid の曝露は TK6 アッセイにおける短時間処理法の代謝活性化非存在下及び連続処理法と同様に行った。用量は化学物質に対する生体反応を明確に評価することを考慮して、細胞毒性が比較的弱い用量 (0、400 及び 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) に限定した。細胞への処理後、遠心分離 (1000 rpm、5 分間) により上清を除去して得た細胞沈査 ( $6 \times 10^6$  cells) を氷冷した Phosphate Buffered Saline (PBS) 10 mL で洗浄し、遠心分離 (1000 rpm、5 分間) を行った (氷上で 2 回繰り返した)。プロテアーゼインヒビターカクテル (Roche) を含む PBS 3 mL、ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) フリー (Roche) に再懸濁し、 $2 \times 10^6$  cells ずつを予め冷却した 2.0 mL チューブ 3 本に分注した。遠心分離後、再び上清を除去し、細胞ペレットを含むチューブを液体窒素に浸して細胞ペレットを凍結させ、 $-80^\circ\text{C}$  で保存した。

凍結した各細胞沈査を phase transfer surfactant (PTS) 緩衝液と混合し、 $95^\circ\text{C}$  で 5 分間煮沸した[18]。さらにライセートを Bioruptor sonicator (Cosmo Bio、Tokyo, Japan) を用いて 3 回 (1 サイクル 15 分間) 超音波処理した。その後、10 mM TCEP (tris(2-carboxyethyl) phosphine) で還元し、20 mM iodoacetamide でアルキル化後、トリプシン (タンパク質量 : 1/50) 及び Lys-C (タンパク質量 : 1/50) で順次  $37^\circ\text{C}$  で 16 時間消化した。ペプチドは遠心分離 (20,000 g、10 分間) し、C18-SCX StageTips で脱塩した[19]。

## 2) LC-MS/MS 分析

UltiMate 3000 Nano LC システム (Thermo Scientific, Bremen, Germany) と HTC-PAL オートサンプラー (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) を Q Exactive ハイブリッド四重極-オービトラップ質量分析計 (Thermo Scientific) に連結して分析した。ペプチドは分析カラム (75  $\mu\text{m}$   $\times$  30 cm, ReproSil-Pur C18-AQ, 1.9  $\mu\text{m}$  resin, Dr. Maisch, Ammerbuch, Germany) に充填し、溶媒 B を 5% から 35% まで 45 分間かけてグラジエント化することにより、280 nL/min の流速で分離した (溶媒 A, 0.1% Formic Acid と 2% acetonitrile; 溶媒 B, 0.1% Formic Acid と 90% acetonitrile)。Q Exactive の装置は、データ依存モードで操作した。Survey full-scan MS spectra ( $m/z$  350-1800) は、 $3 \times 10^6$  のターゲット値までイオンを蓄積後、解像度 70,000 の Orbitrap 分析器で得た。12 個の最も強い多価イオン ( $z \geq 2$ ) を順次  $1 \times 10^5$  ターゲット値まで蓄積し、コリジョンセル内で高エネルギー衝突解離 (HCD) によりフラグ化を行った。質量分析条件は、spray voltage ; 2 kV、heated capillary temperature ; 250°C、normalized HCD collision energy ; 25% であった。MS/MS ion selection threshold は  $2.5 \times 10^4$  カウントとした。分離幅は 2.0 Da とした。

MS データは Andromeda search engine でサポートされている MaxQuant (ver. 1.6.3.3) で処理し、ピーク検出と定量を行った。MS/MS スペクトルを UniProt human database に対して、次のパラメータで検索した。full tryptic specificity、最大 2 個の損失された切断部位、カルバミドメチルシステインの修飾は固定し、N 末端タンパク質のアセチル化とメチオニン酸化の修飾は許容した。検索結果は、タンパク質及び Peptide Spectrum Match (PSM) レベルで FDR (false discovery rate) = 0.01 になる遮断値でペプチドを選別した。



### 3) 発現量の異なるタンパク質の抽出

log<sub>2</sub> LFQ (label-free quantitation) 強度の not a number (NaN) 値はすべて、本研究で観察された LFQ 強度の最小値に概ね相当する-7 に変換した。次に、短時間処理法の代謝活性化非存在下及び連続処理法のそれぞれの処理群における LFQ 強度 (log<sub>2</sub> LFQ 強度の逆数) を、非処理群 (コントロール) の強度で除して、fold change 値を算出した。その後、log<sub>2</sub> fold change を算出した。最後に、log<sub>2</sub> fold change  $\geq 2$  に基づいて、各処理群で顕著に発現していた差次的発現タンパク質 (differentially expressed proteins、DEPs) を同定した。次に、最高用量での繰り返し処理における特異的な効果を分析するために、連続処理法における 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  群の DEPs を他の処理群との log<sub>2</sub> fold change  $\geq 1$  に基づいてさらにスクリーニングした。これにより、24 時間 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  群の特異的な DEPs が特定された。LFQ 強度の log<sub>2</sub> fold change は、R パッケージ (heatmap3) を用いてヒートマップを作成した。

### 4) エンリッチメント解析

DEPs の生物学的プロセスと分子機能を解釈するために、DAVID bioinformatics ver. 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) を用いて、DEPs と関連する GO (Gene Ontology) やパスウェイをアノテーションするためのエンリッチメント解析を行った。具体的には、Gene Ontology (GOTERM\_BP\_DIRECT, GOTERM\_CC\_DIRECT, GOTERM\_MF\_DIRECT) と Protein\_Domains (INTERPRO, PIR\_SUPERFAMILY, SMART) を分析した。さらに、DNA 損傷と酸化ストレスは遺伝毒性試験の結果を解釈する上で重要な Mode of Action (MoA) と考えられたため、GO:0006974 (DNA 損傷刺激に対する細胞応答) や GO:0006979 (酸化ストレスに対する応答) などのいくつかの関連語のエンリッチメントスコア (Expression Analysis

Systematic Explorer: EASE、p 値) は、統計学的に有意でなくてもそれぞれ評価した。統計学的有意性は、 $-\log$  (EASE の p 値) で表し、比較のために棒グラフで図示した。

### 第3節 実験結果

本研究で評価した Ames 試験陽性かつ発がん性陰性の 10 物質における TK6 アッセイの結果を Fig. 5 (No.1~10) 及び Table 4 及び 5 に示した。また、各被験物質における大森らの方法による統計解析の概要を Table 5 に示した。

#### TK6 アッセイにおけるデータの品質

同時陰性対照群の MF の範囲 (最小値~最大値) は短時間処理法の代謝活性化存在下で  $1.7 \times 10^{-6} \sim 16.8 \times 10^{-6}$  (平均値  $6.78 \times 10^{-6}$ ) 代謝活性化非存在下で  $2.5 \times 10^{-6} \sim 16.9 \times 10^{-6}$  (平均値  $6.36 \times 10^{-6}$ ) 及び連続処理法で  $2.3 \times 10^{-6} \sim 15.5 \times 10^{-6}$  (平均値  $9.09 \times 10^{-6}$ ) であった。一方、同時陽性対照群における MF の範囲は、短時間処理法の代謝活性化存在下では  $10.4 \times 10^{-6} \sim 57.8 \times 10^{-6}$  (平均値  $28.6 \times 10^{-6}$ )、代謝活性化非存在下では  $9.4 \times 10^{-6} \sim 71.7 \times 10^{-6}$  (平均値  $30.1 \times 10^{-6}$ )、及び連続処理法では  $18.2 \times 10^{-6} \sim 120 \times 10^{-6}$  (平均値  $61.6 \times 10^{-6}$ ) であった。同時陽性対照群の MF は、同時陰性対照群と比較して、いずれも統計学的に有意な増加を示した ( $p < 0.05$ ) ことから、各々の試験は成立しているものとみなした。同時陰性対照群の MF の範囲は OECD TG490 が推奨する陰性対照背景データ範囲より、僅かに高値を示したものの、実験操作は適切に実施されており、同時陽性対照値よりも有意に増加していることから、被験物質の突然変異誘発性を評価する上で問題となるものではないと考えた。

## 各被験物質の TK6 アッセイの結果

Table 4 Summary of results of TK6 assay for the 10 chemicals

No.	Chemical Name	CAS No.	TK mutation assay <sup>1</sup>			Bacterial reverse mutation assay <sup>2</sup>		MLA (TK gene locus)	
			Without S9	With S9	Long term	Without S9	With S9	Without S9	With S9
1	4-(Chloroacetyl)-acetanilide	140-49-8	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	No data	
2	2-(Chloromethyl)pyridine HCl	6959-47-3	Pos	Pos	NP	Pos	Pos	Pos	Pos
3	2,6-Diaminotoluene	823-40-5	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	No data
4	2,5-Diaminotoluene	95-70-5	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Inconclusive <sup>3</sup>	
5	HC Blue No.2	33229-34-4	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
6	8-Hydroxyquinoline	148-24-3	Neg	Pos	NP	Neg	Pos	Pos	No data
7	Iodoform	75-47-8	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	No data	
8	4-Nitroanthranilic acid	619-17-0	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Equivocal <sup>4</sup>	Pos
9	1-Nitronaphthalene	86-57-7	Pos	Pos	NP	Pos	Pos	No data	
10	4-Nitro-o-phenylenediamine	99-56-9	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos

- 1 Performed in this study. NP: Not applicated
- 2 Taken from Table 1
- 3 Examined as toluene-2, 5-diamine sulfate. The required toxicity (10 to 20% survival compared to the concurrent negative controls) was not reached in the experiments with S9 mix
- 4 Significant difference only at the highest dose of 1200 µg/mL

Table 5 Summary of statistics analysis in each test substance

No	Test Substances	Statistics	Test statistic / Critical value / Significance		
			Short-term treatment		Long-term treatment
			without metabolic activation	with metabolic activation	without metabolic activation
1	4-(chloroacetyl)acetanilide	Dunnett type test	6.203 / 2.160 / p < 0.05	0.404 / 2.160 / p > 0.05	2.522 / 2.160 / p < 0.05
		Trend test	1.433 / 1.645 / p > 0.05	N.A.	0.842 / 1.645 / p > 0.05
2	2-(Chloromethyl)pyridine HCl	Dunnett type test	5.268 / 2.292 / p < 0.05	5.868 / 2.160 / p < 0.05	N.A.
		Trend test	3.417 / 1.645 / p < 0.05	3.912 / 1.645 / p < 0.05	N.A.
3	2,6-Diaminotoluene	Dunnett type test	2.776 / 2.160 / p < 0.05	3.487 / 2.160 / p < 0.05	6.743 / 2.234 / p < 0.05
		Trend test	0.944 / 1.645 / p > 0.05	1.707 / 1.645 / p < 0.05	4.039 / 1.645 / p < 0.05
4	2,5-Diaminotoluene	Dunnett type test	3.189 / 2.448 / p < 0.05	1.587 / 2.160 / p > 0.05	2.209 / 2.340 / p > 0.05
		Trend test	1.571 / 1.645 / p > 0.05	N.A.	N.A.
5	HC blue no.2	Dunnett type test	1.199 / 2.292 / p > 0.05	1.018 / 2.292 / p > 0.05	5.476 / 2.292 / p < 0.05
		Trend test	N.A.	N.A.	2.719 / 1.645 / p < 0.05
6	8-Hydroxyquinoline	Dunnett type test	0.423 / 2.292 / p > 0.05	3.518 / 2.448 / p < 0.05	N.A.
		Trend test	N.A.	4.896 / 1.645 / p < 0.05	N.A.
7	Iodoform	Dunnett type test	1.007 / 2.292 / p > 0.05	1.936 / 2.292 / p > 0.05	2.224 / 2.160 / p < 0.05
		Trend test	N.A.	N.A.	N.A.
8	4-nitroanthranilic acid	Dunnett type test	0.791 / 2.292 / p > 0.05	0.732 / 2.292 / p > 0.05	2.990 / 2.292 / p < 0.05
		Trend test	N.A.	N.A.	4.178 / 1.645 / p < 0.05
9	1-Nitronaphthalene	Dunnett type test	3.038 / 2.381 / p < 0.05	4.071 / 2.234 / p < 0.05	5.750 / 2.292 / p < 0.05
		Trend test	2.296 / 1.645 / p < 0.05	3.173 / 1.645 / p < 0.05	1.709 / 1.645 / p < 0.05
10	4-Nitro-o-phenylenediamine	Dunnett type test	2.435 / 2.234 / p < 0.05	3.458 / 2.234 / p < 0.05	3.866 / 2.340 / p < 0.05
		Trend test	2.615 / 1.645 / p < 0.05	1.593 / 1.645 / p > 0.05	2.800 / 1.645 / p < 0.05

N.A.: not applicable

以下に個々の被験物質における結果を記載する。

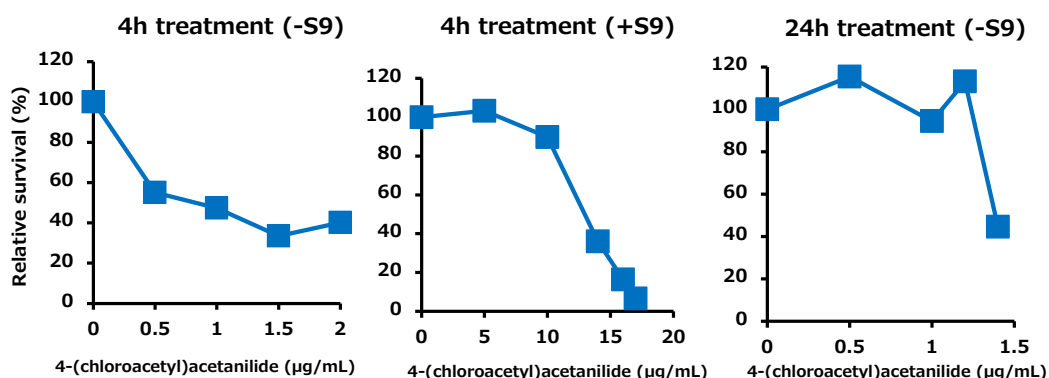
### 4-(Chloroacetyl) acetanilide

用量設定試験の結果に基づき、4-(Chloroacetyl) acetanilide の用量は短時間処理法の代謝活性化存在下では 5、10、14、16 及び 17 µg/mL、代謝活性化非存在下

では 0.5、1、1.5 及び 2 µg/mL 及び連続処理法では 0.5、1.0、1.2 及び 1.4 µg/mL とした。短時間処理法の代謝活性化非存在下における処理群の MF は陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加を示したが、統計学的には有意な用量依存性は認められなかった (Fig. 5 (1) 及び Table 4、5)。このため、代謝活性化非存在下の条件である連続処理法において本反応の再現性を確認したところ、処理群の MF は陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加を示し、統計学的には有意な用量依存性は認められなかった (Fig. 5 (1) 及び Table 4、5)。短時間処理法の代謝活性化非存在下及び連続処理法では、統計学的には用量依存性は認められなかったものの、MF の増加は陰性対照群の 2 倍以上を示していたこと、代謝活性化非存在下では同様の増加傾向を示しており、2 つの実験間で再現性が認められたことから、本結果に基づき総合的に判断して 4-(Chloroacetyl) acetanilide は陽性と判定した。

## [No.1] 4-(chloroacetyl)acetanilide

### Cytotoxicity assay



### Mutation assay

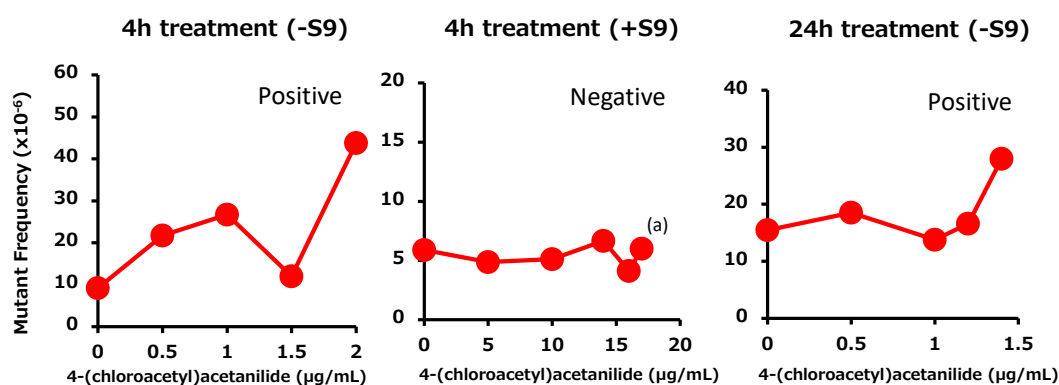


Fig. 5 (1) Relative survival and mutant frequency in TK6 assay for the 10 chemicals.

According to the OECD guidelines (TG490), dose finding tests were conducted before the main TK6 assays. The short- and long-term treatments were conducted for 4 h (+/-S9 mix) and 24 h (-S9 mix), respectively. The main tests were conducted so that the highest concentration was set at a concentration where the RS was from 10 to 20%. Experiments and statistical analysis were conducted as described in Materials and Methods. (a) indicates the data of MF excluded from the statistical judgment because RS was below 10%.

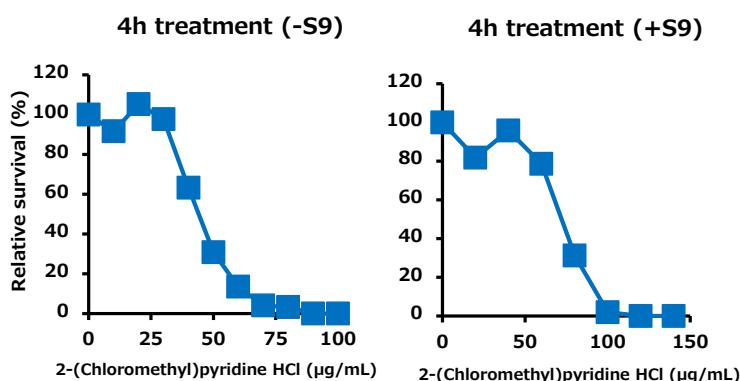
## 2-(Chloromethyl) pyridine HCl

本試験の結果、短時間処理法の代謝活性化存在下では  $100 \mu\text{g/mL}$  で、代謝活性化非存在下では  $60 \mu\text{g/mL}$  で約 80%の細胞毒性が認められた (Fig. 5 (2))。OECD TG490 は細胞毒性を強く発現する用量では非特異的な陽性反応を誘発する可能性があるため、RS が 10%未満を示す用量は解析から除外することを推奨してい

る。よって、RS が 10%以上を示す用量を評価対象として、大森らの方法によって結果を解析した結果、代謝活性化の有無によらず処理群の MF は陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加を示し、かつ用量依存的な増加が認められたため、短時間処理法において陽性と判定した (Fig. 5 (2) 及び Table 4、5)。なお、短時間処理法で陽性が確定したため、連続処理法は実施しなかった。本試験の結果から、2-(Chloromethyl) pyridine HCl は陽性と判定した。

### [No.2] 2-(Chloromethyl)pyridine HCl

#### Cytotoxicity assay



#### Mutation assay

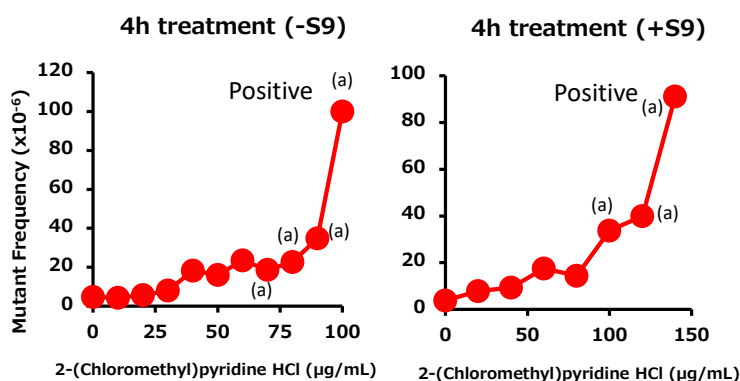


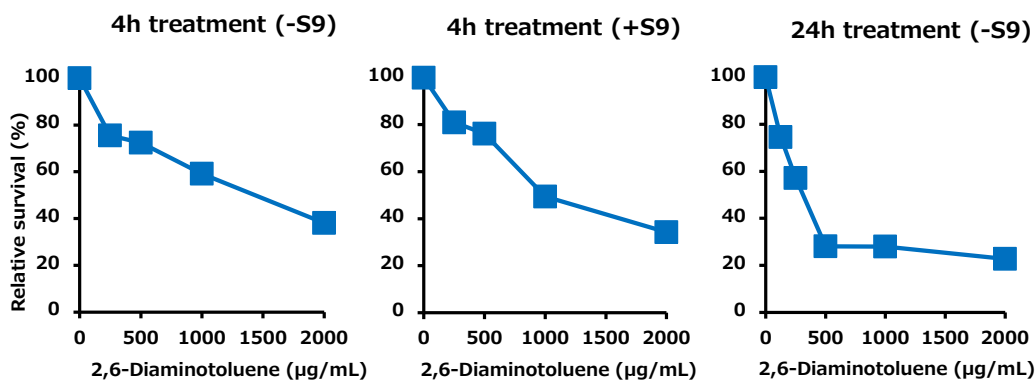
Fig. 5 (2) Relative survival and mutant frequency in TK6 assay for the 10 chemicals (continued).

## 2, 6-Diaminotoluene

連続処理法では 2000  $\mu\text{g/mL}$  で 80%以上の細胞毒性が認められた。短時間処理法の代謝活性化存在下及び連続処理法の代謝活性化非存在下における処理群の MF は陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加を示し、かつ有意な用量依存性を示した (Fig. 5 (3) 及び Table 4、5)。したがって、本試験の結果から、2,6-Diaminotoluene は陽性と判定した。

### [No.3] 2,6-Diaminotoluene

#### Cytotoxicity assay



#### Mutation assay

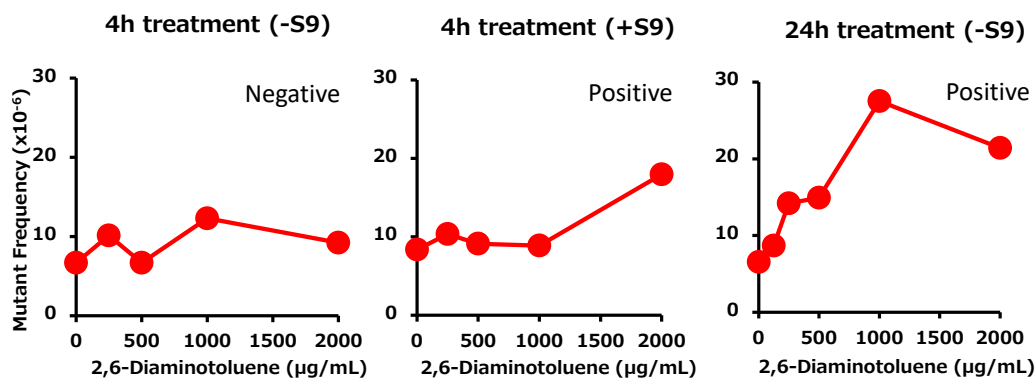


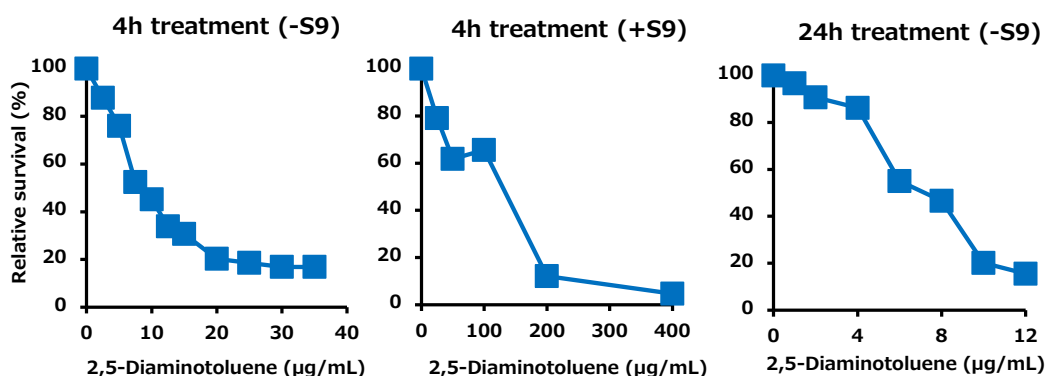
Fig. 5 (3) Relative survival and mutant frequency in TK6 assay for the 10 chemicals (continued).

## 2, 5-Diaminotoluene

本試験の結果、短時間処理法の代謝活性化存在下では 200  $\mu\text{g/mL}$ 、代謝活性化非存在下では 20.0  $\mu\text{g/mL}$  連続処理法では 10.0  $\mu\text{g/mL}$  で約 80%の細胞毒性が認められた (Fig. 5 (4))。短時間処理法の代謝活性化存在下では RS が 10%以上を示す用量を評価対象として、大森らの方法によって結果を解析した。突然変異試験の結果、いずれの処理条件下においても処理群の MF は陰性対照群と比較して、統計学的に有意な増加を示さなかった (Fig. 5 (4) 及び Table 4、5)。したがって、本試験の結果から、2, 5-Diaminotoluene は陰性と判定した。

### [No.4] 2,5-Diaminotoluene

#### Cytotoxicity assay



#### Mutation assay

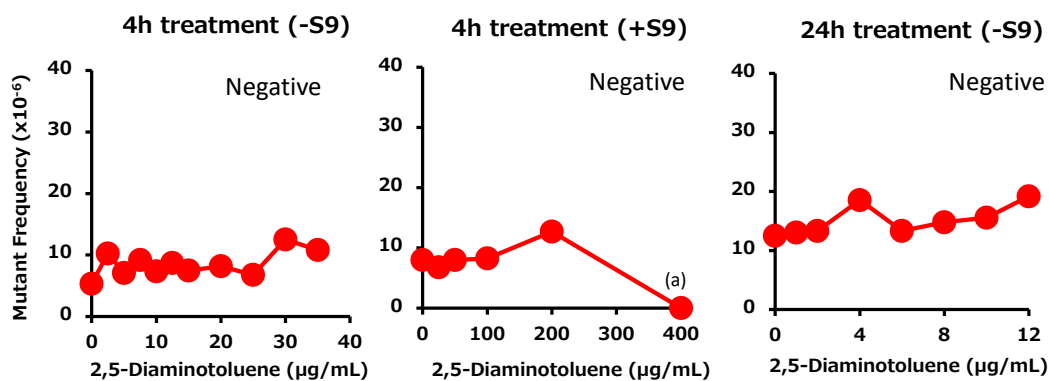


Fig. 5 (4) Relative survival and mutant frequency in TK6 assay for the 10 chemicals (continued).

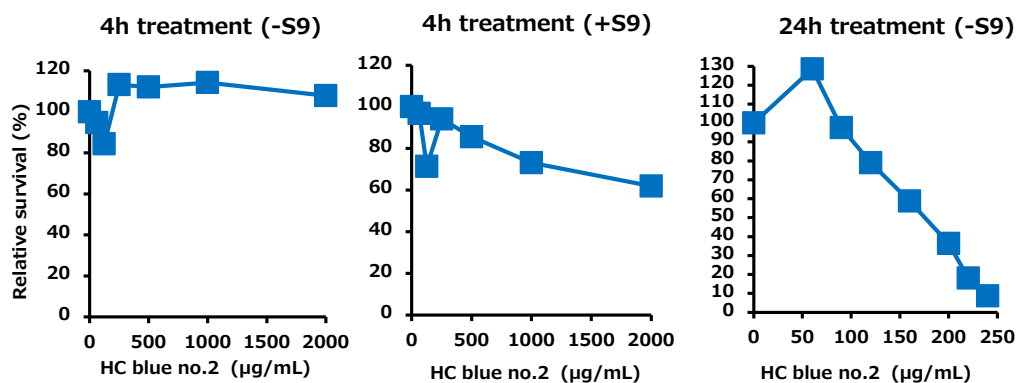


## HC Blue No.2.

本試験において、短時間処理法の代謝活性化非存在下では細胞毒性は認められなかったものの、代謝活性化存在下では 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で約 40%、連続処理法では 220  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で約 80%の細胞毒性がそれぞれ確認された (Fig. 5 (5))。大森らの方法において、短時間処理法では代謝活性化の有無によらず処理群の MF は陰性対照群と比較して、統計学的に有意な増加を示さなかった (Fig. 5 (5) 及び Table 4、5)。一方、連続処理法では処理群の MF は陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加を示し、かつ有意な用量依存性を示した (Fig. 5 (5) 及び Table 4、5)。したがって、本試験の結果から、HC Blue No.2 は陽性と判定した。

[No.5] HC blue no.2

Cytotoxicity assay



Mutation assay

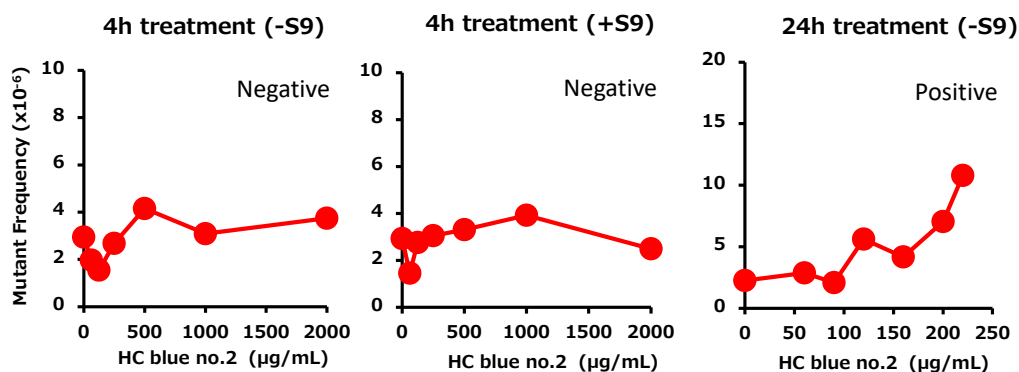


Fig. 5 (5) Relative survival and mutant frequency in TK6 assay for the 10 chemicals (continued).

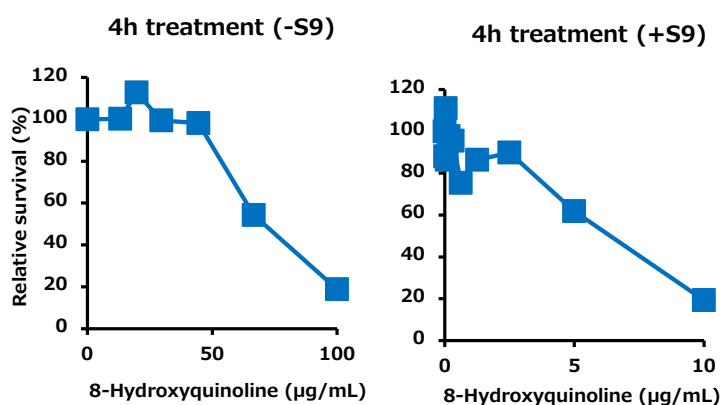
8-Hydroxyquinoline

本試験の結果、RS が 10~20%を示す用量は短時間処理法の代謝活性化存在下及び代謝活性化非存在下でそれぞれ 10.0 µg/mL 及び 100 µg/mL であり、その時の RS は 19.3%及び 18.9%であった (Fig. 5 (6))。短時間処理法の代謝活性化存在下では処理群の MF は陰性対照群と比較して、統計学的に有意な増加を示さなかったが、代謝活性化存在下では陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加

を示し、かつ有意な用量依存性を示した (Fig. 5 (6) 及び Table 4、5)。したがって、本試験の結果から、8-Hydroxyquinoline は陽性と判定した。なお、短時間処理法で陽性が確定したため、連続処理法は実施しなかった。

### [No.6] 8-Hydroxyquinoline

#### Cytotoxicity assay



#### Mutation assay

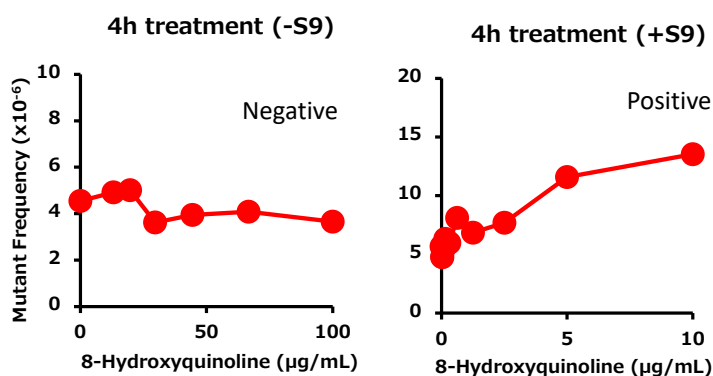


Fig. 5 (6) Relative survival and mutant frequency in TK6 assay for the 10 chemicals (continued).

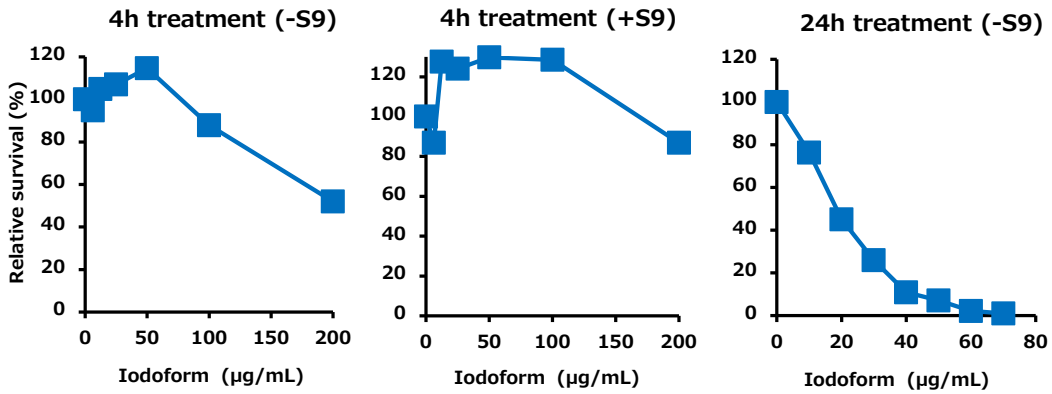
#### Iodoform

連続処理法では 40.0 µg/mL で強い細胞毒性を示した (RS : 10.9%)。一方、短時間処理法では代謝活性化の有無によらず 80%以上の細胞毒性は認められな

ったが、形質発現期間中に強い細胞毒性を示したため、RS が 10～20%の用量では MF を評価できなかった。そこで、形質発現期間中の遅延型の細胞毒性を考慮して、毒性指標を RTG に変更して追加試験を行った。その結果、短時間処理法の代謝活性化存在下では 200 µg/mL、代謝活性化非存在下では 100 µg/mL でそれぞれ細胞毒性を示し、そのときの RTG はそれぞれ 20.1%及び 19.1%であった (Fig. 5 (7))。突然変異試験の結果、連続処理法の高用量域 (50～70 µg/mL) では、MF の用量依存的な増加が観察されが、いずれも RS が 10%未満であったため、大森らの方法による統計解析の対象外とした (Fig. 5 (7) 及び Table 4、5)。評価可能な用量において、短時間処理法及び連続処理法ともに大森らの方法による解析では陰性の判定基準を示したため、本試験の結果から、Iodoform は陰性と判定した。

## [No.7] Iodoform

### Cytotoxicity assay



### Mutation assay

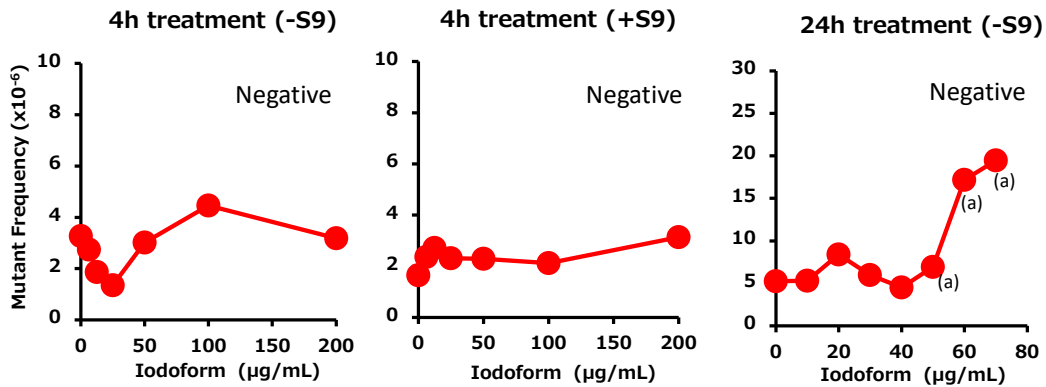


Fig. 5 (7) Relative survival and mutant frequency in TK6 assay for the 10 chemicals.(continued).

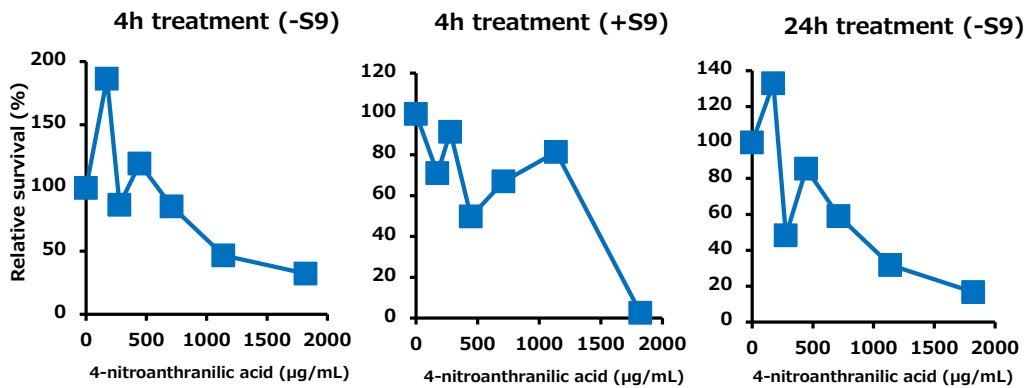
### 4-Nitroanthranilic acid

短時間処理法の代謝活性化存在下では 1821 µg/mL で約 100%、代謝活性化非存在下では 1138 及び 1821 µg/mL で 50%以上の細胞毒性がそれぞれ認められた。連続処理法では 1821 µg/mL で 80%以上の細胞毒性が認められた。短時間処理法の代謝活性化存在下では RS が 10%以上を示す用量を評価対象として、大森らの方法によって結果を解析した。突然変異試験の結果、短時間処理法では代謝活性

化の有無によらず処理群の MF は陰性対照群と比較して、統計学的に有意な増加を示さなかった。一方、連続処理法では処理群の MF は陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加を示し、かつ有意な用量依存性を示した (Fig. 5 (8) 及び Table 4、5)。したがって、本試験の結果から、4-Nitroanthranilic acid は陽性と判定した。

### [No.8] 4-nitroanthranilic acid

#### Cytotoxicity assay



#### Mutation assay

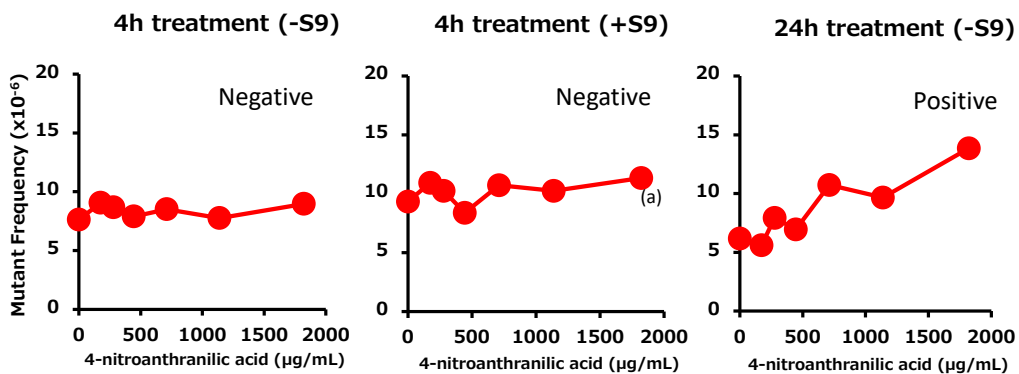


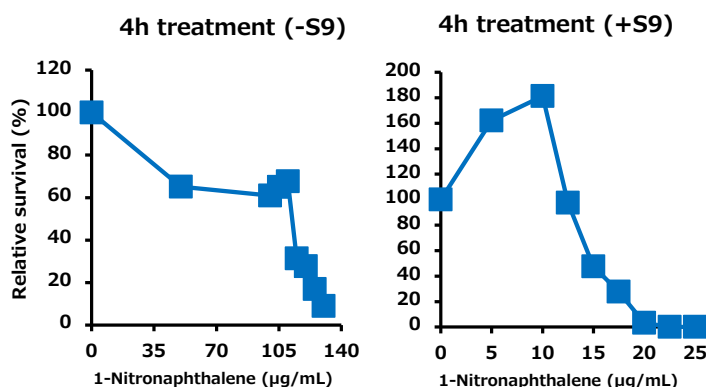
Fig. 5 (8) Relative survival and mutant frequency in TK6 assay for the 10 chemicals (continued).

## 1-Nitronaphthalene

本試験の結果、80%の細胞毒性を示した用量は短時間処理法の代謝活性化存在下では 17.5~20 µg/mL、代謝活性化非存在下では 120~125 µg/mL であった (Fig. 5 (9))。短時間処理法の代謝活性化非存在下では RS が 10%以上を示す用量を評価対象として、大森らの方法によって結果を解析した。突然変異試験の結果、短時間処理法では代謝活性化の有無によらず MF は陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加を示し、かつ有意な用量依存性を示した (Fig. 5 (9) 及び Table 4、5)。したがって、本試験から、1-Nitronaphthalene は陽性と判定した。なお、短時間処理法で陽性が確定したため、連続処理法は実施しなかった。

## [No.9] 1-Nitronaphthalene

### Cytotoxicity assay



### Mutation assay

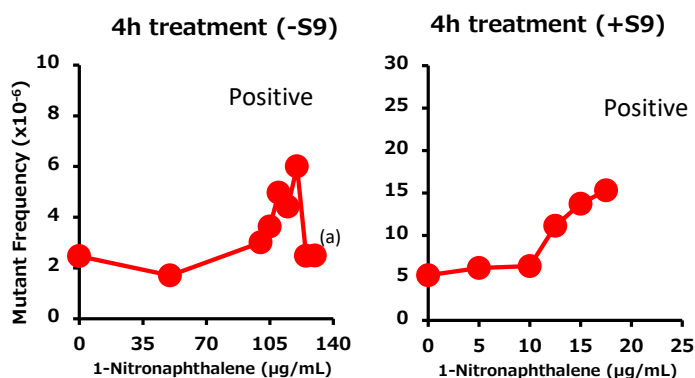


Fig. 5 (9) Relative survival and mutant frequency in TK6 assay for the 10 chemicals (continued).

### 4-Nitro-*o*-phenylenediamine

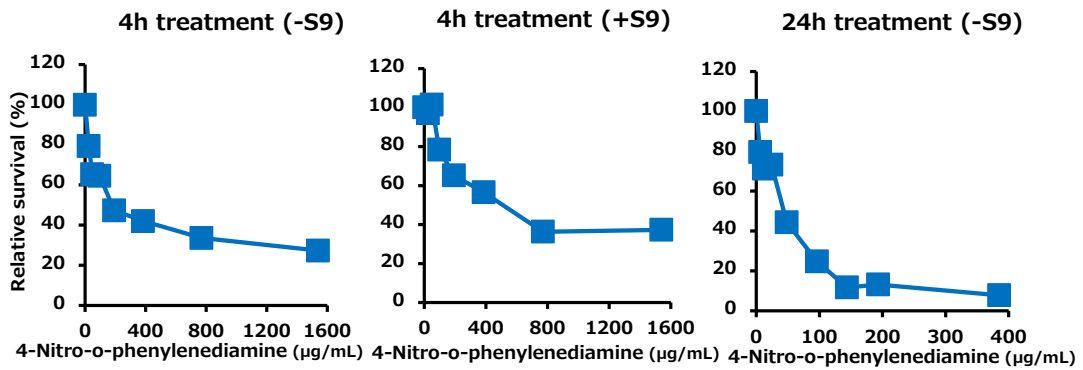
いずれの処理条件でも用量依存的な RS の減少が認められ、80%以上の細胞毒性は連続処理法の 144  $\mu\text{g/mL}$  以上で認められた。連続処理法では RS が 10%以上を示す用量を評価対象として、大森らの方法によって結果を解析した。突然変異試験の結果、短時間処理法及び連続処理法で MF は陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加を示し、かつ有意な用量依存性を示した (Table 4、5)。したがって、本試験の結果から、4-Nitro-*o*-phenylenediamine は陽性と判定した。なお、



短時間処理法における 770 及び 1540  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では細胞毒性に起因して MF 用プレート  
の観察が実施できなかつたため、これらの用量は評価より除外した (Fig. 5  
(10) 及び Table 4、5)。

### [No.10] 4-Nitro-o-phenylenediamine

#### Cytotoxicity assay



#### Mutation assay

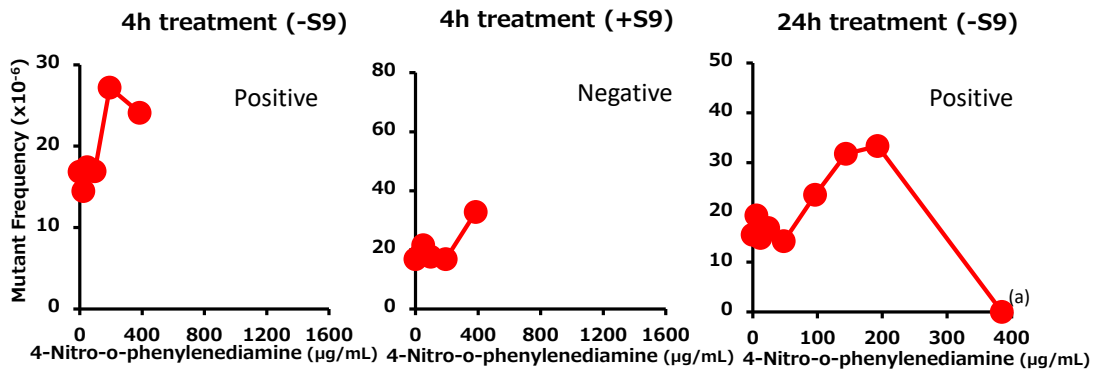


Fig. 5 (10) Relative survival and mutant frequency in TK6 assay for the 10 chemicals (continued).

連続処理法でのみ陽性を示した 4-Nitroanthranilic acid のプロテオミクス解析

TK6 アッセイにおいて、連続処理法でのみ陽性を示した 4-Nitroanthranilic acid

及び HC Blue No.2 では、いずれも細胞毒性を強く発現する用量で MF の有意な増加が認められた。一般に、*in vitro* 遺伝毒性試験では、被験物質処理後の培養液における pH、析出及び外因性の酸化ストレスなど外的影響により、偽陽性結果がもたらされることがある。そこで、代謝活性化存在下及び非存在下や曝露時間によらず、同様の細胞毒性発現の兆候を示し、低用量まで濃度依存的に MF の増加が確認された 4-Nitroanthranilic acid の遺伝子突然変異のメカニズムを解析するため、代謝活性化非存在下における短時間処理法及び連続処理法についてプロテオミクス解析を実施した。4-Nitroanthranilic acid のプロテオミクス解析の結果、log<sub>2</sub> fold change of  $\geq 2$  の基準により、DEP は短時間処理法の代謝活性化非存在下(4 時間処理)では 400  $\mu\text{g/mL}$  及び 800  $\mu\text{g/mL}$  でそれぞれ 359 個及び 506 個、連続処理法 (24 時間処理) では 400  $\mu\text{g/mL}$  及び 800  $\mu\text{g/mL}$  でそれぞれ 358 個及び 420 個の計 1078 個同定された (Fig. 6 及び 7)。さらに、連続処理法の 800  $\mu\text{g/mL}$  とその他の処理群との log<sub>2</sub> fold change  $\geq 1$  に基づいて、168 個の specific DEPs を同定した (Fig. 6 及び 7)。DEPs のエンリッチメント解析により、短時間処理法の代謝活性化非存在下では 800  $\mu\text{g/mL}$  で転写、細胞ストレス及び細胞分裂に関連するタンパク質の発現レベルが顕著に上昇していることが明らかになった (たとえば、GO:0034244 : RNA ポリメラーゼ II プロモーターからの転写伸長の負の制御、GO:0008631 : 酸化ストレスに応答する内在性アポトーシスシグナル伝達経路、GO:0051301 : 細胞分裂、GO:2000145 : 細胞運動の制御など) (Table 6)。さらに、発現が低下したタンパク質を解析したところ、rRNA のプロセッシングや細胞分裂に関連するタンパク質が同定された (例えば、GO:0000462 : トリシストロン rRNA 転写物 (SSU-rRNA、5.8S rRNA、LSU-rRNA) からの SSU-rRNA の成熟や、GO:0051301 : 細胞分裂など)。なお、TK6 細胞における陰性対照群の薬物代謝酵素のタンパク質発現解析より、O-アセチル化に関

連する *N*-acetyltransferase の発現は確認されたものの、P450、Amine *N*-oxidase 及び FMO のタンパク質発現は検出限界以下であったことから、TK6 細胞の薬物代謝活性は非常に低いものであることが確認された。

特定の GO term を処理群間でターゲット解析したところ (Fig. 7)、GO:0006974 (DNA 損傷性に対する細胞応答)、GO:0006979 (酸化ストレスに対する応答)、GO:0006281 (DNA 修復) の P 値は 0.05 以下で、有意差は認められなかった。逆に、GO:0008631 : intrinsic apoptotic signaling pathway in response to oxidative stress のエンリッチメントスコア (-log (p-value)) は、連続処理法の 800 µg/mL における DEP と specific DEP で急激に増加しており、酸化ストレスとの関与が示唆された。連続処理法の 800 µg/mL では、3 つのタンパク質 ([Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 1, mitochondrial phosphoinositide-dependent kinase 1: PDK1, superoxide dismutase 2, mitochondrial: SOD2、direct IAP-binding protein with low PI: DIABLO) のうち、GO:0008631 : intrinsic apoptotic signaling pathway in response to oxidative stress に属するものが含まれていた (Fig. 6 及び 7)。これらのタンパク質の発現レベルは、24 時間の処理後にのみ上昇している。さらに、SOD2 の発現量は用量依存的に上昇し、PDK1 と DIABLO は 800 µg/mL でのみ発現量が上昇した。

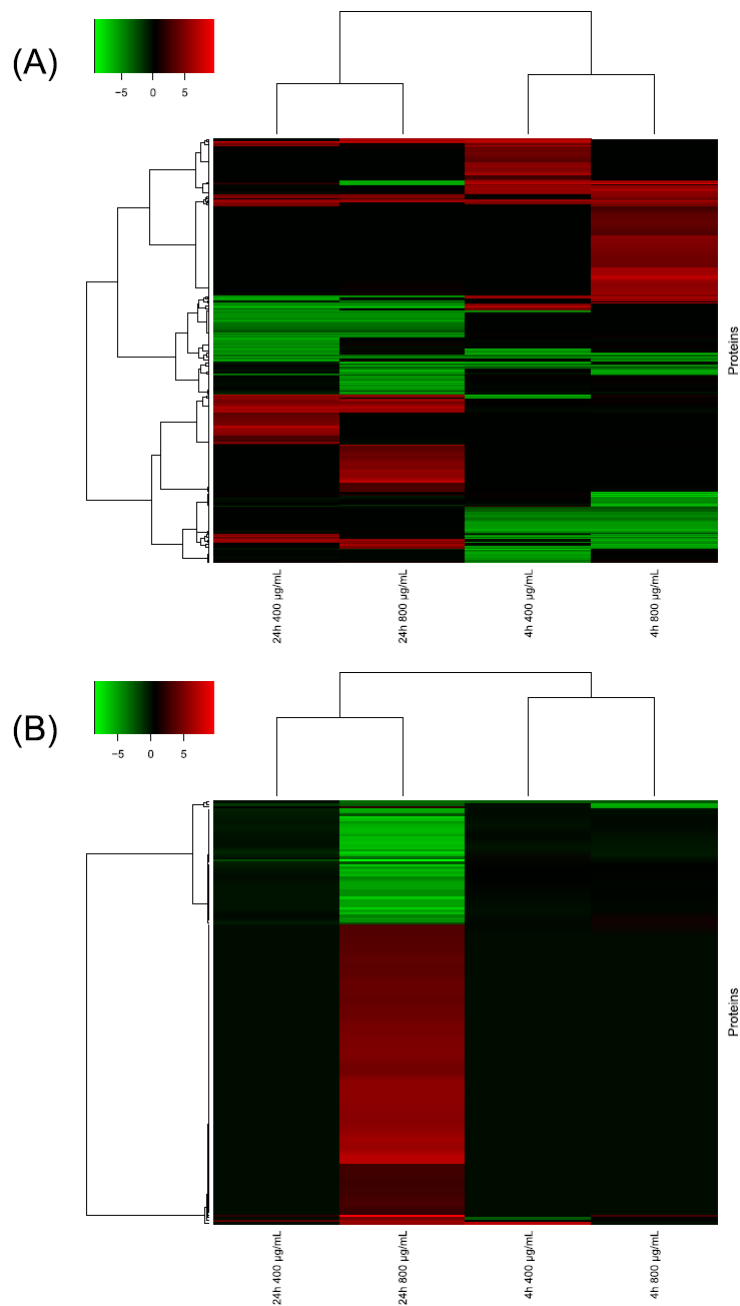


Fig. 6 Differentially expressed proteins (DEP) identified in TK6 cells exposed to 4-nitroanthranilic acid.

- (A) A total of 1078 DEPs that differentially expressed compared to control groups were identified based on a  $\log_2$  fold change of  $\geq 2$ . Effects of treatment time are greater than that of dose.
- (B) A total of 168 specific DEPs that differentially expressed compared to other groups were further extracted from the 420 DEPs in 24 h 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  group based on a  $\log_2$  fold change of  $\geq 1$  Relative survival and mutant frequency in TK6 assay for the 10 chemicals.

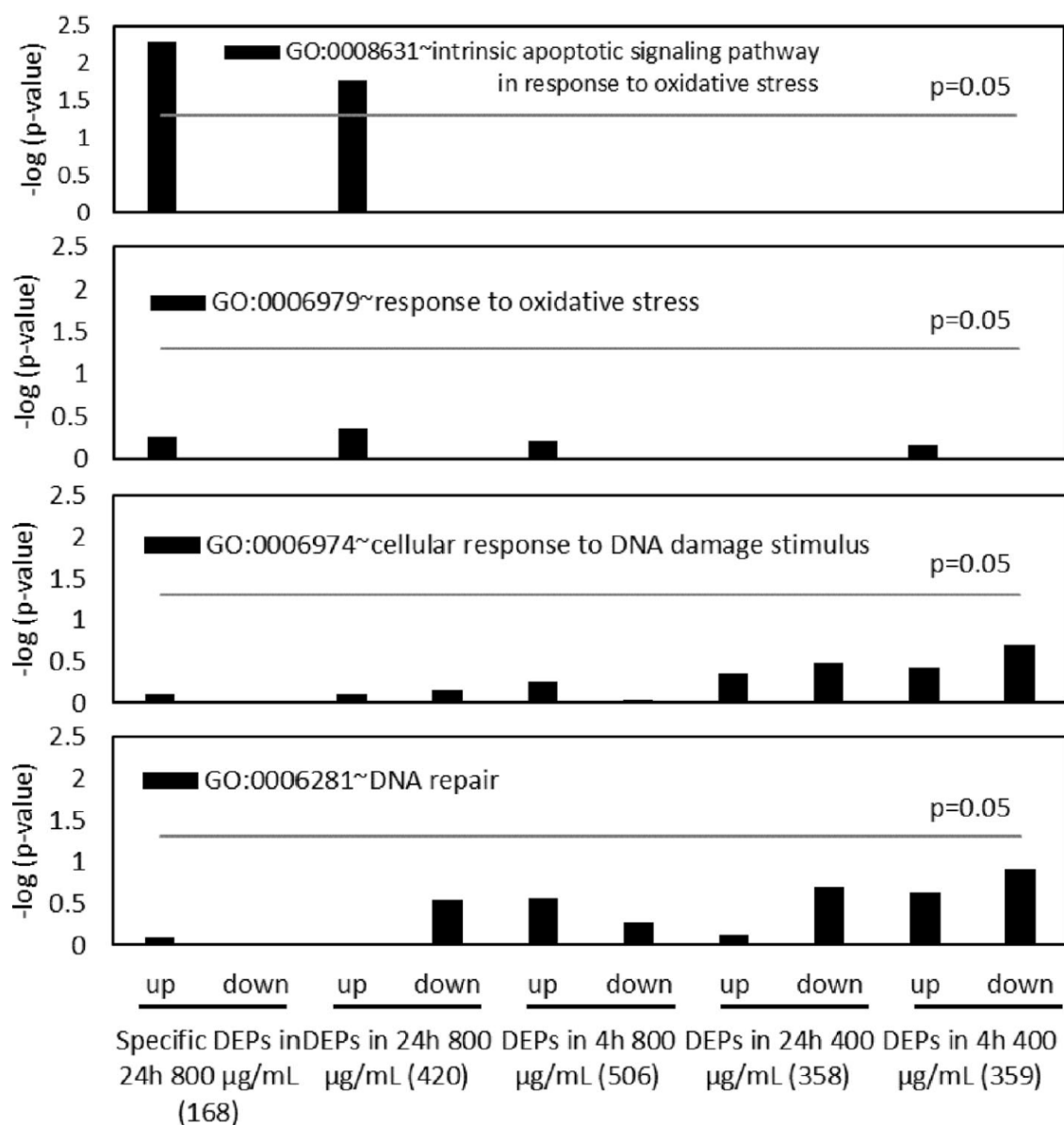


Fig. 7 Target gene ontology analysis for TK6 cells exposed to 4-nitroanthranilic acid for 24 h.

Whereas no significance was found in GO:0006974 (cellular response to DNA damage stimulus), GO:0006281 (DNA repair), and GO:0006979 (response to oxidative stress), statistically significance was found in GO:0008631 ~ intrinsic apoptotic signaling pathway in response to oxidative stress among DEPs in 24 h 800  $\mu\text{g/mL}$  group and specific DEPs in 24 h 800  $\mu\text{g/mL}$  group, indicating involvement with oxidative stress. A total of 1078 DEPs (4 h 400  $\mu\text{g/mL}$  group: 359 proteins, 4 h 800  $\mu\text{g/mL}$  group: 506 proteins, 24 h 400  $\mu\text{g/mL}$  group: 358 proteins, and 24 h 800  $\mu\text{g/mL}$  group: 420 proteins) were shown as parentheses.

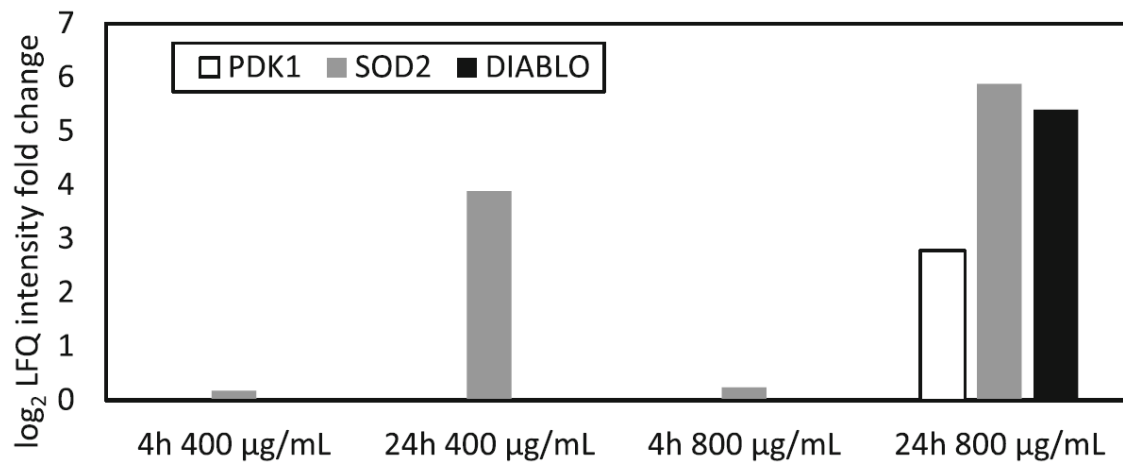


Fig. 8 Protein expression levels of the intrinsic apoptotic signaling pathway in response to oxidative stress by the 24 h treatment of 4-nitroanthranilic acid.

PDK1, SOD2, DIABLO that belong to GO:0008631 ~ intrinsic apoptotic signaling pathway in response to oxidative stress were drastically elevated only at the 24 h treatment of 4-nitroanthranilic acid, especially in the 800 µg/mL group

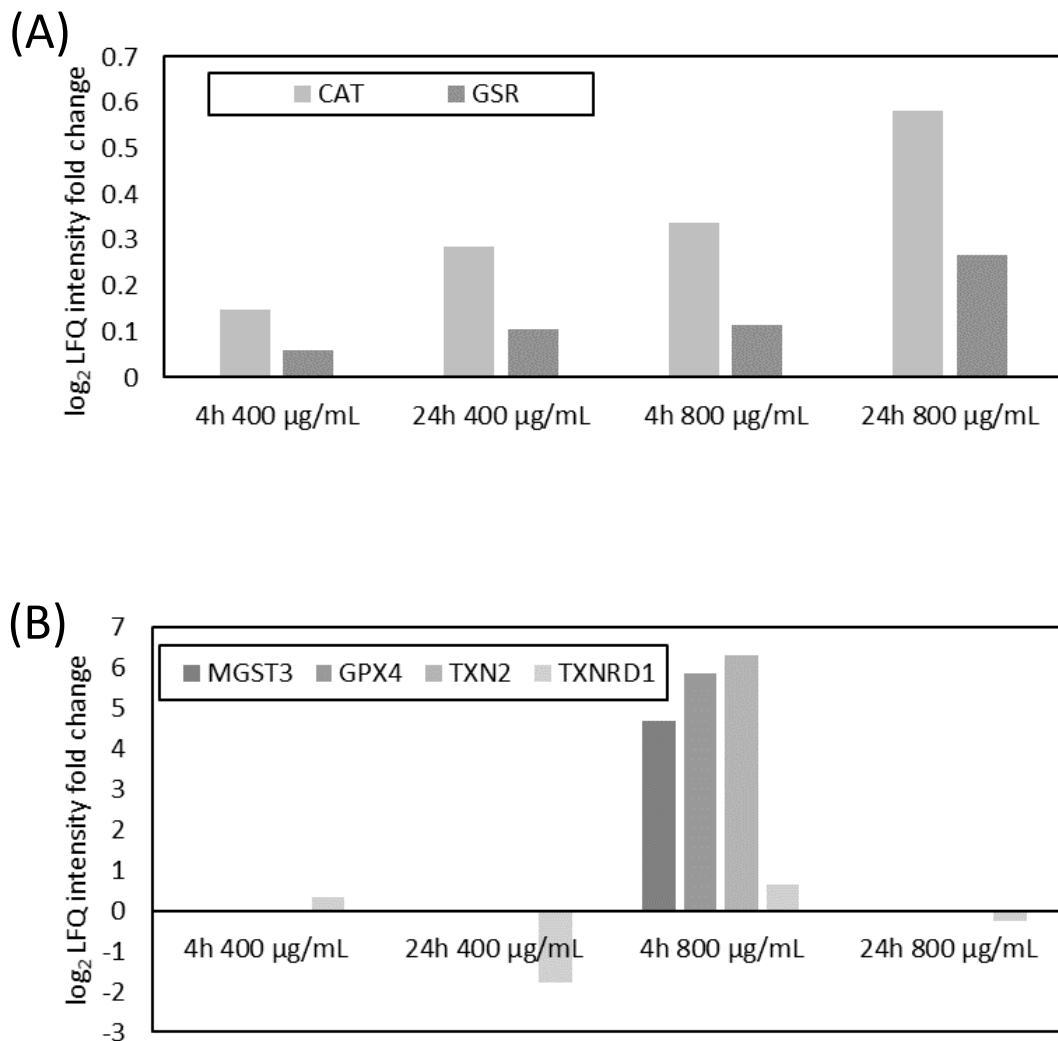


Fig. 9 Protein expression levels of the major antioxidant enzymes in response to oxidative stress by the 24 h treatment of 4-nitroanthranilic acid.

- (A) CAT and GSR are all involved in response to oxidative stress. A dose- and time-dependent increasing tendency of major antioxidant enzymes was confirmed in the proteomics analysis.
- (B) The prominent decrease of several antioxidant enzymes (GPX4, MGST3, TXN2, TXNRD1, etc.) at 24 h in contrast to 4 h in the proteomics analysis may reflect such depletion.

#### 第4節 考察

##### Ames 試験陽性物質のフォローアップとしての TK6 アッセイの有用性

Kirkland らは、EURL European Centre for the Validation of Alternative Methods

(ECVAM) の Ames 試験陽性物質のデータベースを用いて、Ames 試験陽性物質に対するフォローアップに最適な試験の組み合わせを検討した[20][21]。本データベースにより、遺伝子突然変異と染色体構造異常（あるいは異数性）の両エンドポイントをそれぞれ検出する 2 種類の *in vitro* 培養細胞試験で陰性結果が得られれば、*in vivo* で遺伝毒性や発がん性を示す物質が 2.3% と極めて低いことが明らかにされた[20][21]。EURL ECVAM は、上記調査結果に基づき、Ames 試験陽性物質のフォローアップ戦略として、2 種類のエンドポイントによる *in vitro* 培養細胞試験に、*in vitro* メカニズム解析試験を組み合わせた評価スキームを提案している[20][21]。序論で示した Basic Brown 17 もまた ECVAM のフォローアップ戦略に基づいて *in vitro* 試験が実施され、消費者安全科学委員会 (SCCS) より Ames 試験陽性物質でありながら、許認可を受けている。したがって、筆者は国際動向を鑑みて、遺伝子突然変異試験のカテゴリーとしてげっ歯類細胞を用いる MLA や HPRT 試験ではなく、p53 機能が正常であるヒト細胞である TK6 細胞を用いた突然変異試験の有用性を探ることは大いなる意義をもつものと考え、Ames 試験陽性-発がん性陰性の 10 物質について TK6 アッセイを行った。

本研究の結果、Ames 試験陽性 10 物質のうち、TK6 アッセイでは 2,5-Diaminotoluene 及び Iodoform の 2 物質が陰性結果を示した (Fig. 5 (4)、(7) 及び Table 5、6)。一般に、Ames 試験とげっ歯類の培養細胞を用いた遺伝子変異試験では、原理上、両試験の結果が一致する可能性が高いと考えられている。よって、Ames 試験陽性物質のフォローアップとしては、げっ歯類培養細胞試験でも陽性を示す可能性が高いことから、これらの試験は適切ではないと考えられている[22][23]。事実、本研究で陽性を示した被験物質でもげっ歯類の培養細胞試験を用いた MLA で判定が不確実 (Equivocal、Inconclusive) な 2,5-Diaminotoluene や 4-Nitroanthranilic acid を含む 8 物質すべてが陽性を示した (Table 3)。MLA に用



いる L5178Y 細胞は、p53 欠損であることが知られているため、紡錘体チェックポイント及びアポトーシス誘導能に脆弱性がみられると考えられる。このため、本細胞株ではアポトーシス誘導により異常細胞を効率よく排除できずに変異細胞が蓄積し、さらに DNA 反応性とは関係なく紡錘体阻害剤に対してより高感受性を示すことから、偽陽性が頻発することが知られている[24]。こうした情報に基づき、Whitwell らは、*in vitro* 試験法における偽陽性の発生率の低減化を図るためには、げっ歯類由来の L5178Y 細胞よりもヒト由来の TK6 細胞の使用を推奨している[24]。これらの理由より、ほ乳類培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験としては、MLA よりも TK6 アッセイの方が有用であると考えられる。本研究で使用した被験物質の多くが DNA 構造アラートとしてアミノ基やニトロ基を持つ多環芳香族化合物であり、細菌では DNA 反応性と考えられるため、p53 が正常に機能する TK6 細胞を用いた遺伝子突然変異試験により、2 物質をレスキューできたことには意義があり、新規性の高い結果と考えられる。

本研究では、2,5-Diaminotoluene の結果が明確な陰性を示したことから、Ames 試験の偽陽性結果をフォローアップする手法として、TK6 アッセイは MLA よりも優れている可能性があることを見出した。2, 6-Diaminotoluene 及び 2, 5-Diaminotoluene は類縁化合物であり、いずれも非発がん性物質と報告されているが、本研究における TK6 アッセイでは結果に相違が認められた (Fig. 5 (3) 及び (4))。一般的な肝ミクロソームの代謝 (誘導ラット肝 S9 mix など) では、P450 により arylamines が hydroxylamines に酸化され、acetyltransferase により O-アセチル化され acetoxarylaminines に変換される。さらにこれが自然に分解されて arylnitrenium ions となり、DNA 付加体を形成する[25][26]。くわえて、arylaminines は amine N-oxidase 及び flavin-containing monooxygenase (FMO) により hydroxylamines に代謝される[27]。TK6 細胞は P450 タンパク質をわずかに発現

することが報告されている[28]が、本研究においては、陰性対照群におけるプロテオミクス解析の結果、*O*-アセチル化に関連する *N*-acetyltransferase の発現は確認されたものの、P450、amine *N*-oxidase 及び FMO のタンパク質発現は検出限界以下であった。これらの結果は、TK6 細胞では代謝活性化存在下の連続処理において、arylamines の酸化を介した arylnitrenium ions による DNA 付加体形成の可能性が示唆される[26]。さらに、活性酸素を媒介とした DNA 損傷の誘発も考えられる[26][29][30][31]。したがって、2,6-Diaminotoluene の TK6 アッセイにおける陽性反応は、Arylnitrenium ions による DNA 付加体形成が関与している可能性が考えられた。これと同様に、2,5-Diaminotoluene が DNA 反応性物質ならば、ADME 機能を有さない TK6 細胞でも同様に陽性結果を示すものと考えられた。しかし、実際には TK6 アッセイで陰性結果を示しており、Ames 試験における 2,5-Diaminotoluene の遺伝子突然変異誘発性は薬物代謝に依存するものではなく、2,5-Diaminotoluene の DNA 付加体に対する修復機構が細菌とヒトで異なることを示唆するものである。実際、Ames 試験では、代謝活性化存在下において 2,6-Diaminotoluene 及び 2,5-Diaminotoluene 共に陽性を示すが、2,5-Diaminotoluene の突然変異誘発性は 2,6-Diaminotoluene よりも低いことが報告されている[32]。このことから、本研究における短時間処理法の代謝活性化存在下及び連続処理法において、2,6-Diaminotoluene は突然変異誘発性を示したが 2,5-Diaminotoluene は陰性となった理由として、Arylnitrenium ions による DNA 付加体形成の量が、2,6-Diaminotoluene よりも 2,5-Diaminotoluene の方が少ないために、検出限界以下に至ったのではないかと考えた。さらに、TK6 アッセイで陽性を示した 6 物質 (4-(Chloroacetyl)acetanilide、2-(chloromethyl) pyridine HCl、2,6-Diaminotoluene、8-Hydroxyquinoline、1-Nitronaphthalene、4-Nitro-*o*-phenylenediamine) は、*in vivo* 遺伝毒性試験 (染色体異常試験、小核試験あるいは TGR 試験など) では陰性を示

すことが報告されている[32][34][35][36][37][38][39]。その理由に *in vitro* で誘発された遺伝毒性は、生体では ADME（吸収、分布、代謝及び排泄）によって排除されることがあげられており、これが生体で発がん性を示さない理由と説明されている[32][34][35][36][37][38][39]。

標準的方法による TK6 アッセイは、本研究に用いた Ames 試験の結果が陽性の 10 物質に対して 2 物質（20%）をレスキューした。このことは、開発が中断している Ames 試験陽性の医薬品候補化合物の開発継続に希望を見出せる結果であると考えられる。しかし、TK6 アッセイにおける陰性結果は、ヒトと細菌の DNA 修復機構の違いを反映した真の陰性を示すものか、単に TK6 細胞の感受性が低いために偽陰性を示しているのかの根拠としては乏しいものである。そこで、筆者はこれを判別する手法として、DNA 修復機構を欠損させた高感度型細胞を用いた TK6 アッセイが有用であると考えた。第 2 章では高感度型 TK6 アッセイの開発について詳述する。

**Table 6** Enrichment analysis of 168 specific DEPs in the treatment of 4-nitroanthranilic acid (24-h 800 µg/mL group)

A) Up-regulated proteins				
Category	Term	Count	P-Value	
INTERPRO	IPR016239:Ribosomal protein S6 kinase II	4	5.7377E-06	
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0005515~protein binding	88	1.7420E-05	
PIR_SUPERFAMILY	PIRSF000606:ribosomal protein S6 kinase II	4	3.2222E-05	
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0016301~kinase activity	10	6.7995E-05	
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005739~mitochondrion	22	2.1570E-04	
SMART	SM00133:S_TK_X	5	3.2906E-04	
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005829~cytosol	39	4.3120E-04	
INTERPRO	IPR000961:AGC-kinase, C-terminal	5	5.3307E-04	
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005654~nucleoplasm	34	6.5767E-04	
INTERPRO	IPR017892:Protein kinase, C-terminal	4	1.0360E-03	
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005759~mitochondrial matrix	9	1.7035E-03	
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0034244~negative regulation of transcription elongation from RNA polymerase II promoter	3	2.7144E-03	
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005737~cytoplasm	51	2.7796E-03	
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0008631~intrinsic apoptotic signaling pathway in response to oxidative stress	3	5.0854E-03	
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005840~ribosome	6	5.3823E-03	
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0044822~poly(A) RNA binding	17	7.8807E-03	
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005743~mitochondrial inner membrane	9	1.0130E-02	
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005793~endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment	4	1.0932E-02	
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0001701~in utero embryonic development	6	1.1424E-02	
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0016020~membrane	25	1.1522E-02	
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0005524~ATP binding	20	1.1781E-02	
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0010628~positive regulation of gene expression	7	1.1794E-02	
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0051301~cell division	8	1.3434E-02	
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0043555~regulation of translation in response to stress	2	1.4360E-02	
INTERPRO	IPR027417:P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase	13	1.4642E-02	
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0004672~protein kinase activity	8	1.6128E-02	
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0000287~magnesium ion binding	6	1.6834E-02	
GOTERM_BP_DIRECT	GO:2000145~regulation of cell motility	3	1.7225E-02	
INTERPRO	IPR018199:Ribosomal protein S4e, N-terminal, conserved site	2	1.9912E-02	
INTERPRO	IPR013845:Ribosomal protein S4e, central region	2	1.9912E-02	
INTERPRO	IPR013843:Ribosomal protein S4e, N-terminal	2	1.9912E-02	
INTERPRO	IPR000876:Ribosomal protein S4e	2	1.9912E-02	
INTERPRO	IPR000633:Vinculin, conserved site	2	1.9912E-02	
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006368~transcription elongation from RNA polymerase II promoter	4	2.4228E-02	
INTERPRO	IPR001033:Alpha-catenin	2	2.6461E-02	
INTERPRO	IPR023321:PINIT domain	2	2.6461E-02	
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0032021~NELF complex	2	2.6727E-02	
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0048487~beta-tubulin binding	3	2.8233E-02	
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0019673~GDP-mannose metabolic process	2	2.8516E-02	
SMART	SM00220:S_TKc	7	3.1873E-02	
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0030521~androgen receptor signaling pathway	3	3.5175E-02	
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0061665~SUMO ligase activity	2	3.5909E-02	
PIR_SUPERFAMILY	PIRSF002116:ribosomal protein S4a/S4e	2	3.6795E-02	
INTERPRO	IPR002942:RNA-binding S4 domain	2	3.9430E-02	

Table 6 Enrichment analysis of 168 specific DEPs in the treatment of 4-nitroanthranilic acid (24-h 800 µg/mL group) (continued)

B) Down-regulated proteins			
Category	Term	Count	P-Value
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0022627~cytosolic small ribosomal subunit	3	4.1660E-02
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0043620~regulation of DNA-templated transcription in response to stress	2	4.2470E-02
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0046939~nucleotide phosphorylation	2	4.2470E-02
INTERPRO	IPR017441:Protein kinase, ATP binding site	7	4.2799E-02
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0007507~heart development	5	4.3421E-02
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0016887~ATPase activity	5	4.4923E-02
INTERPRO	IPR000719:Protein kinase, catalytic domain	8	4.5081E-02
INTERPRO	IPR006077:Vinculin/alpha-catenin	2	4.5850E-02
INTERPRO	IPR004181:Zinc finger, MIZ-type	2	4.5850E-02
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0003723~RNA binding	9	4.6741E-02
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0030521~androgen receptor signaling pathway	3	3.5175E-02
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0061665~SUMO ligase activity	2	3.5909E-02
PIR_SUPERFAMILY	PIRSF002116:ribosomal protein S4a/S4e	2	3.6796E-02
INTERPRO	IPR002942:RNA-binding S4 domain	2	3.9430E-02
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0022627~cytosolic small ribosomal subunit	3	4.1660E-02
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0043620~regulation of DNA-templated transcription in response to stress	2	4.2470E-02
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0046939~nucleotide phosphorylation	2	4.2470E-02
INTERPRO	IPR017441:Protein kinase, ATP binding site	7	4.2799E-02
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0007507~heart development	5	4.3421E-02
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0016887~ATPase activity	5	4.4923E-02
INTERPRO	IPR000719:Protein kinase, catalytic domain	8	4.5081E-02
INTERPRO	IPR006077:Vinculin/alpha-catenin	2	4.5850E-02
INTERPRO	IPR004181:Zinc finger, MIZ-type	2	4.5850E-02
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0003723~RNA binding	9	4.6741E-02
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005730~nucleolus	13	5.6756E-07
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0044822~poly(A) RNA binding	15	7.7589E-07
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006364~rRNA processing	7	1.2377E-05
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005634~nucleus	27	4.8117E-05
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0032040~small-subunit processome	4	8.1428E-05
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005737~cytoplasm	25	2.7500E-04
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005654~nucleoplasm	17	4.8730E-04
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0000462~maturation of SSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)	3	2.7542E-03
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0005515~protein binding	34	2.8755E-03
INTERPRO	IPR006709:Small-subunit processome, Utp14	2	4.9512E-03
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005815~microtubule organizing center	4	5.9735E-03
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0051301~cell division	5	1.0237E-02
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0034388~Pwp2p-containing subcomplex of 90S preribosome	2	1.6782E-02
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0002726~positive regulation of T cell cytokine production	2	2.4156E-02
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0070062~extracellular exosome	13	3.0865E-02
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0030490~maturation of SSU-rRNA	2	3.3659E-02
INTERPRO	IPR017986:WD40-repeat-containing domain	4	4.0034E-02
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0022904~respiratory electron transport chain	2	4.7743E-02
INTERPRO	IPR015943:WD40/YVTN repeat-like-containing domain	4	4.8605E-02

## プロテオミクス解析による MoA 解析：酸化ストレスの解明

TK6 アッセイにおいて連続処理法のみで陽性を示した 4-nitroanthranilic acid について、その原因を探るためプロテオミクス解析を実施した。DEPs のエンリッチメント解析により、4-nitroanthranilic acid の長時間曝露が誘発する細胞毒性及び遺伝子突然変異の増加には、酸化ストレスが関与していることが示唆された

(Fig. 8)。短時間処理法の代謝活性化非存在下とは異なり、連続処理法では酸化ストレス応答に関与することが知られている PDK1、SOD2 及び DIABLO のタンパク質発現量が顕著に上昇することが明らかとなった。一方、連続処理法の 800  $\mu\text{g/mL}$  における Specifics DEPs では、短時間処理法の代謝活性化非存在下では発現していた酸化ストレス応答、細胞応答及び DNA 修復応答に関する一連のタンパク質発現量が顕著に低下していた。これらの結果は、連続処理法では酸化ストレスに対する防御能が低下していたことを示唆する (Fig. 9)。また、主要な抗酸化酵素として知られるカタラーゼ及びグルタチオンレダクターゼ (GSR) が用量及び曝露時間に依存して増加していることが明らかとなった (Fig. 9)。このことは、短時間処理法ではグルタチオンや抗酸化酵素による防御機構が亢進していたが、連続処理法では活性酸素と抗酸化機能の均衡が崩れたため、酸化ストレスへの応答因子や抗酸化酵素が枯渇し、最終的には酸化的 DNA 損傷が生じたものと推察する。実際に、プロテオミクス解析において、いくつかの抗酸化酵素 (GPX4、MGST3、TXN2 及び TXNRD1 など) が連続処理法において顕著に減少していることが確認されたことから、上記の抗酸化酵素枯渇に関する仮説を支持するものと考えられる (Fig. 9)。しかし、生体では培養細胞よりも優れた抗酸化機能を有すると考えられるため、酸化ストレスによる DNA 損傷は *in vitro* 遺伝毒性試験に特異的なメカニズムと考えられている。活性酸素の産生を介して遺伝毒性を誘発する化学物質には閾値が存在すると考えられているため、MoA が明らかとなればリスク分析が適用できる[40]。本研究より、標準型 TK6 アッセイにプロテオミクス解析を融合することで、TK6 アッセイのみでは救済できない医薬品に対しても、MoA アプローチを駆使することで、陽性反応が二次的影響であったかを検証することができる。これにより、TK6 アッセイによる偽陽性の発生頻度をさらに低減することが可能となる。ただし、より詳細に陽性反応

が活性酸素による二次的影響であることを検証するためには、これらのタンパク質や Reactive oxygen species (ROS) の定量化は有用となると考える。

## 小括

本研究により、標準的方法による TK6 アッセイは、Ames 試験陽性物質におけるフォローアップ試験として 10 化合物中 2 化合物 (20%) をレスキューし、有用であると考えられた。さらに、連続処理法でのみ特異的に陽性反応を示した 4-Nitroanthranilic acid では、プロテオミクス解析を組み合わせることで評価することにより、用量及び曝露時間に伴って酸化ストレス応答に関するタンパク質が増加することを明らかにした。これらの結果から、4-Nitroanthranilic acid では長時間曝露が酸化ストレスを増強させることで直接的な DNA 損傷ではなく、酸化ストレスを介した二次的な DNA 損傷を誘発する変異機構を見出した。したがって、オミックス技術と TK6 アッセイを統合することで、MoA に基づいて TK6 アッセイの偽陽性の発生頻度を低減できる可能性を見出した。本手法はレギュラトリーサイエンスにおいては、ガイドラインに公定化された標準的手法に加えて、新しい技術の組み合わせをすることで、従来は解明できなかった偽陽性の証拠を提供する上で極めて有用であることを示唆する。

以上から、本研究より TK6 アッセイは Ames 試験陽性を理由に開発が中断されている医薬品のうち、20%以上をレスキューできる可能性を見出した。しかし、TK6 アッセイのみでは試験法が低感度であるために偽陰性を示している可能性を否定できないため、除去修復能を完全に欠損した遺伝子破壊細胞を用いた TK6 アッセイより高感度かつ高特異性をメカニズムベースで検証できる手法の開発が必要であることも明らかにされた。

第2章 DNA修復機序に基づいた高感度型 TK6 アッセイによるフ  
ォローアップ法の確立  
(塩基除去修復及びヌクレオチド除去修復二重欠損株を用  
いた高感度型 TK6 アッセイの開発)

---

本章は下記論文に基づいています。

Akira Sassa<sup>†</sup>, Takayuki Fukuda<sup>†</sup>, Akiko Ukai, Maki Nakamura, Ryosuke Sato, Sho Fujiwara, Kouji Hirota, Shunichi Takeda, Kei-Ichi Sugiyama, Masamitsu Honma, Manabu Yasui. Follow-up genotoxicity assessment of Ames-positive/equivocal chemicals using the improved thymidine kinase gene mutation assay in DNA repair-deficient human TK6 cells. *Mutagenesis*. 2021; 36(5):331-338.

<sup>†</sup> A.S. and T.F. contributed equally to this work.

---



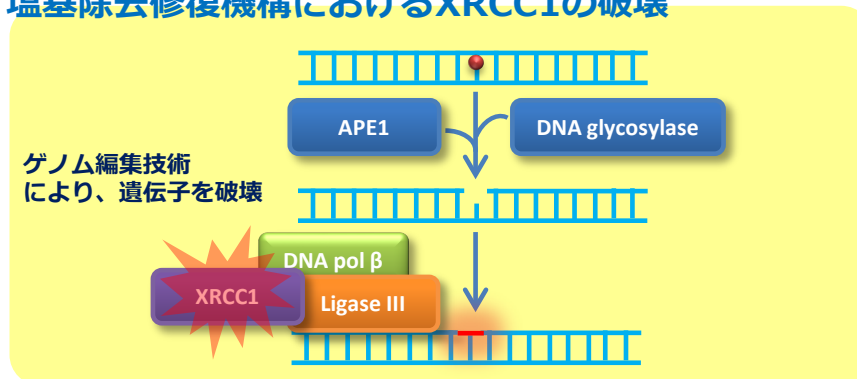
## 第1節 緒言

化学物質による DNA 損傷には、小規模な塩基損傷、バルキーDNA 付加体、DNA 鎖切断など様々な種類の化学修飾がある。DNA 損傷の大部分は、DNA 修復機構によって効率よく修復されるため、細胞における DNA 修復機能の状態は、医薬品の安全性評価の感度と特異性に大きく影響する[41]。したがって、従来の標準的な *in vitro* 試験法を改良することで、DNA 修復能と化学物質の遺伝毒性誘発性との関連性を解明することは非常に重要である。Ames 試験に用いる菌株は DNA 修復系を遺伝的に不活化しているため、仮に Ames 試験で陽性を示す化学物質でも、哺乳類を用いた *in vitro* あるいは *in vivo* 試験では遺伝毒性や発がん性を示さないことがある。このように試験間で結果が相反する場合、特に哺乳類細胞においては化学物質によって誘発された DNA 損傷が細胞内の DNA 修復機構によって修復されることにより、試験法の感度が著しく低下している可能性があり、*in vivo* では遺伝毒性を示す可能性も否定はできない。本理由から、標準的な遺伝毒性試験では明確な結果を示さない化学物質に対して、DNA 修復機構の解明に基づいて明確な結果を得ることができる高感度型 *in vitro* 遺伝毒性試験が必要である。さらに、哺乳類細胞を用いる *in vitro* 遺伝毒性試験では、ある種の細胞株において偽陽性の結果が高い頻度で生じることが試験間における結果の不一致に拍車をかけている。例えば、癌抑制因子である p53 タンパク質は、化学物質による突然変異誘発の重要な調節因子であるため、p53 が欠損した細胞ではアポトーシス応答能が低下し、一酸化窒素による突然変異誘発が増強されることが知られている[42]。しかし、p53 欠損細胞を用いた標準的な遺伝毒性試験では、偽陽性が高頻度で得られる問題が懸念されている[43][44]。このように p53 の欠損は化学物質の遺伝毒性予測の特異性低下につながるため、DNA 反応性に対する特異性を低下させることなく、*in vitro* 遺伝毒性試験の感度を向上させる

ことが必要である。

最近、TK6 細胞（野生型）と、塩基除去修復（base excision repair, BER）経路とヌクレオチド除去修復（nucleotide excision repair, NER）経路にそれぞれ関与する XRCC1 と XPA を欠損させたゲノム編集 TK6 細胞（*XRCC1<sup>-/-</sup>/XPA<sup>-/-</sup>*）との比較から、代表的な遺伝毒性物質を高感度に検出できることが報告された[45][46]。BER 経路は、主に塩基のアルキル化、酸化、脱アミノ化などの小規模な DNA 塩基損傷を修復する経路である（Fig. 10）。DNA 一本鎖切断修復に関わる足場タンパク質である XRCC1 は BER 経路において主要なタンパク質であることが知られている（Fig. 10）[47]。一方、NER 経路は紫外線によって誘発されるシクロブタンピリミジン二量体や、外因性の化学物質や医薬品によって形成される共有結合性の DNA 付加体など、様々なバルキーDNA 付加体の除去に関連している（Fig. 10）[48]。XPA は NER プロセスに不可欠な中核成分であり、その機能が失われると NER 活性が完全に失われる[48]。XPA が存在しない場合、XRCC1 はヘリックスを破壊するバルキーDNA 付加体の除去に貢献する[49]。これら両遺伝子を破壊した細胞を用いた TK6 アッセイでは、従来の標準的な TK6 アッセイに比べて、アルキル化剤による突然変異頻度が有意に高く（2~8 倍）検出された[45]。このように、*XRCC1<sup>-/-</sup>/XPA<sup>-/-</sup>*細胞は、広範囲の化学物質の遺伝毒性をより高い感度と特異性で評価できるだけでなく、そのメカニズムをより深く理解するためにも使用できる。

### 塩基除去修復機構におけるXRCC1の破壊



### ヌクレオチド除去修復機構におけるXPAの破壊

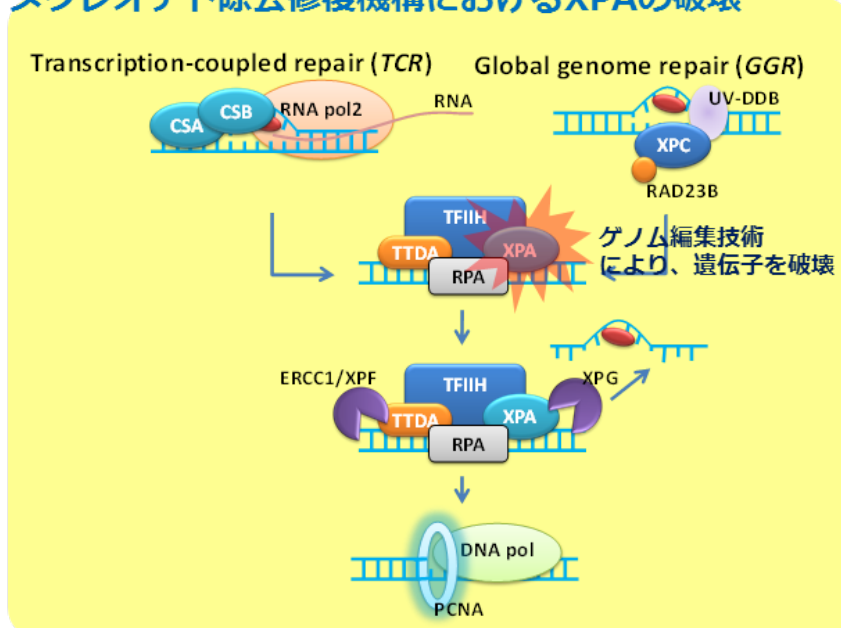


Fig. 10 Schematic of base-pair excision repair sub-pathway and nucleotide excision repair sub-pathways.

そこで、本研究では Ames 試験陽性物質であるが、他の試験結果と不一致がみられる *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (NEDA)、*p*-phenylenediamine (PPD)、Auramine 及び malachite green (MG) の 4 物質に着目した (Fig. 11)。NEDA は Ames 試験ではハムスター肝 S9 の代謝活性化条件下で遺伝子毒性を示すことが報告されているが[50]、チャイニーズハムスター卵巣細胞では遺伝子変異や小核誘導は認められなかった[51]。染毛剤に広く使用されている有機化合物

である PPD は、Ames 試験においてラット肝 S9 の存在下で TA1538 株特異的に強い遺伝毒性を示す[52]。PPD は MLA でも陽性を示すが[53]、F344 ラットを用いた *in vivo* のフォローアップ試験では遺伝毒性を示さなかった[54]。Auramine は MLA では陰性であるが、Ames 試験陽性物質である[55][56][57]。しかし、*in vivo* 姉妹染色体交換試験、*in vivo* 小核試験、*in vivo* コメットアッセイではいずれも陽性を示した[58][59]。殺菌剤である MG は、魚類や甲殻類の治療薬として使用されている有機合成染料である。MG は Ames 試験では代謝活性化において遺伝毒性を示す[60]。MG の遺伝毒性は *in vivo* では評価されていない[61]。これらの被験物質のうち、Auramine は強力な発がん物質に分類されているが[62]、その他の被験物質はマウスにおける発がん性は確認されていない (Table 7) [63][64][65]。このように、異なる遺伝毒性試験法の結果が相反することは、化学物質の正確な安全性評価を難しくしている。そこで標準的な TK6 アッセイに *XRCCI*<sup>-/-</sup>/*XPA*<sup>-/-</sup>細胞を組み込むことにより、これらの被験物質がヒトにおいて遺伝毒性を有するかどうかを検証した。

## 第 2 節 実験の材料及び方法

### 細胞培養

ヒトリンパ芽球系 TK6 細胞株は、10%非動化済み馬血清 (ニチレイバイオサイエンス株式会社)、200 µg/mL ピルビン酸ナトリウム、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを添加した RPMI-1640 培地 (ナカライテスク株式会社) を用いて、37°C、5%CO<sub>2</sub> で培養した。*XRCCI*<sup>-/-</sup>/*XPA*<sup>-/-</sup>細胞は既報[45]の通りに樹立した。

## 被験物質処理

本研究に用いた Auramine、NEDAP 及び PD は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した (Fig. 11)。Malachite green (MG) は富士フィルム和光純薬株式会社 (日本、大阪) から購入した (Fig. 11)。Auramine、NEDA 及び PPD は DMSO に、MG は注射用水 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場) に溶解した。被験物質は適切な溶媒に溶解後、直接または段階的に希釈して最終濃度の希釈液を調製した。

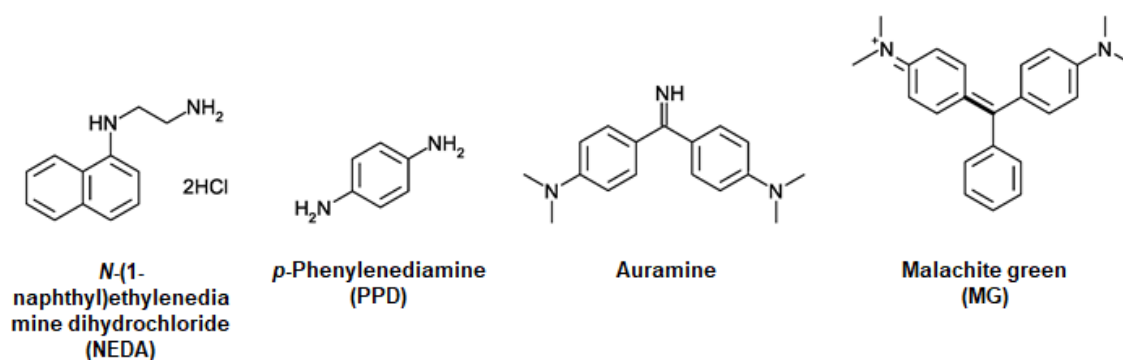


Fig. 11 Chemical structures of Ames-positive compounds.

被験物質による細胞処理は、50 mL のプラスチック遠心管に  $5 \times 10^5$  cells/mL の細胞密度で 20 mL の細胞懸濁液を調製し、代謝活性化のために 4.5% の濃度で誘導ラット肝 S9 mix (オリエンタル酵母工業株式会社及び株式会社ボゾリサーチセンター) の存在下または非存在下で、異なる濃度の被験物質を処理した。その後、本遠心管を穏やかに振盪しながら 37°C で 4 時間処理後、RPMI-1640 培地で 2 回洗浄し、RS を調べるために、前項で述べたように 96 マイクロウェルプレートに播種した。

## 高感度型 TK6 アッセイ

被験物質処理後の TK6 細胞及び *XRCCI*<sup>-/-</sup> / *XPA*<sup>-/-</sup> 細胞における細胞懸濁液を用

いて、第1章 第2節 実験の材料及び方法における「TK6細胞を用いたチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子突然変異試験 (TK6 アッセイ)」の項と同様な方法で TK6 アッセイを実施した。ここでは、*XRCCI*<sup>-/-</sup>/*XPA*<sup>-/-</sup>細胞を用いた TK6 アッセイを「高感度型 TK6 アッセイ」と名付けた。

### 第3節 実験の結果

4 被験物質における高感度型 TK6 アッセイの結果を Fig. 12 ~ 15 及び Table 7 に示した。

#### NEDA

代謝活性化存在下及び非存在下において、異なる濃度の NEDA (50~200 µg/mL) を TK6 細胞及び *XRCCI*<sup>-/-</sup>/*XPA*<sup>-/-</sup>細胞に処理した。標準的 TK6 アッセイと同様 (第1章 第1節参照) に、細胞毒性及び突然変異誘発性の指標にそれぞれ RS 及び MF を用いた。その結果、いずれの細胞株でも代謝活性化の有無によらず細胞毒性の強度は同等であった (Fig. 12)。突然変異試験の結果、いずれの細胞株においても代謝活性化の有無によらず各処理群の MF は陰性対照群と比較して有意な増加を示さなかった (Fig. 12)。

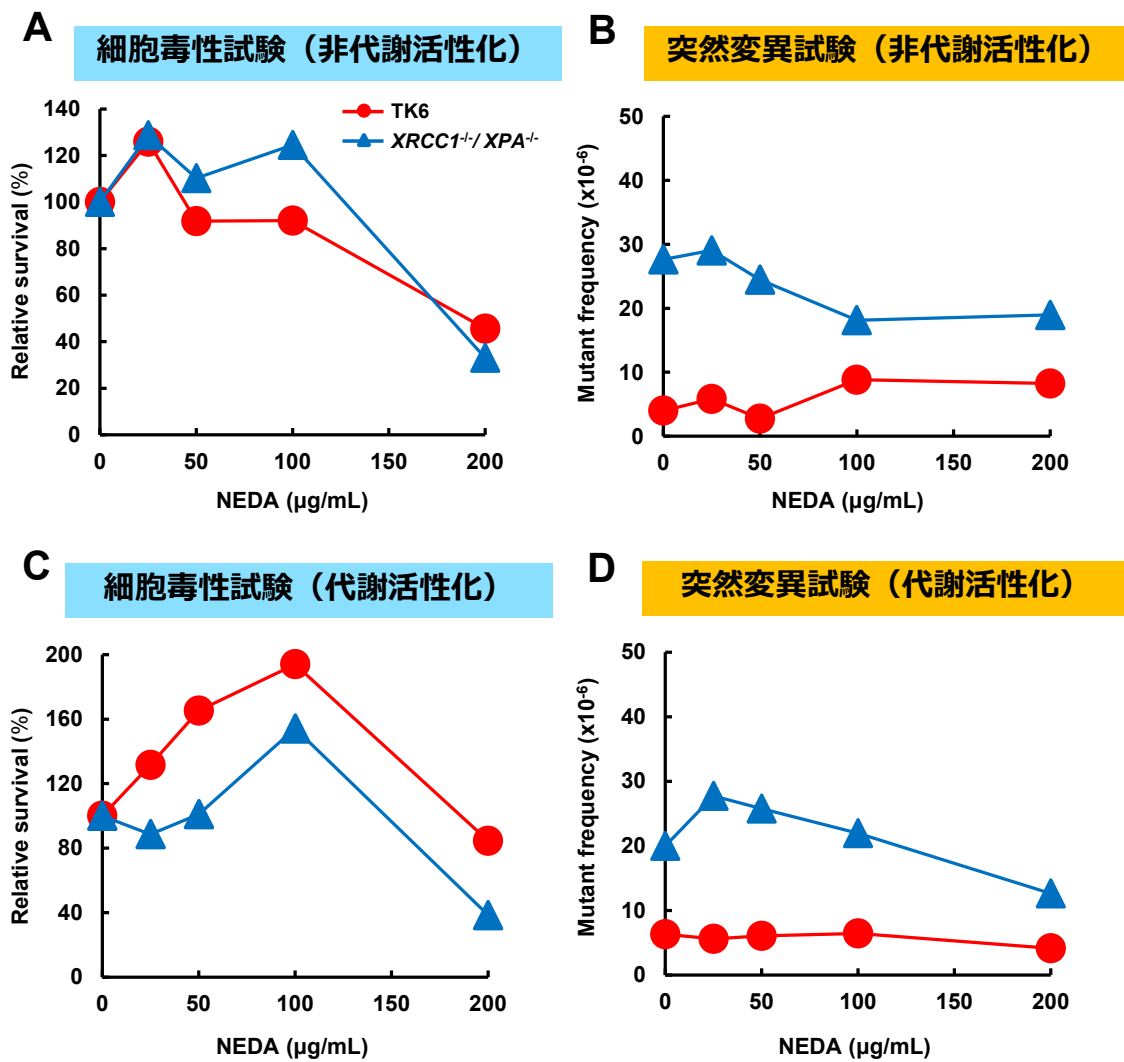


Fig. 12 Cytotoxic and genotoxic responses of wild-type and *XRCC1*<sup>-/-</sup>/*XPA*<sup>-/-</sup> TK6 cells exposed to NEDA.

Cytotoxicity and genotoxicity were expressed as relative survival (%) and mutant frequency ( $\times 10^{-6}$ ) after treatment with NEDA without metabolic activation (A and B) or in the presence of S9 mix (C and D).

Representative result from at least two independent experiments was shown.

## PPD

細胞毒性試験の結果、代謝活性化存在下では最高用量の2000 µg/mLでRSが20%以下を示したことから (Fig. 13)、突然変異試験では2000 µg/mLまで検討し

た。一方、代謝活性化非存在下ではより強い細胞毒性を示したことから、最高用量を 1000  $\mu\text{g/mL}$  として突然変異試験を実施した。突然変異試験の結果、いずれの細胞株においても代謝活性化の有無によらず各処理群の MF は陰性対照群と比較して有意な増加を示さなかった (Fig. 13)。

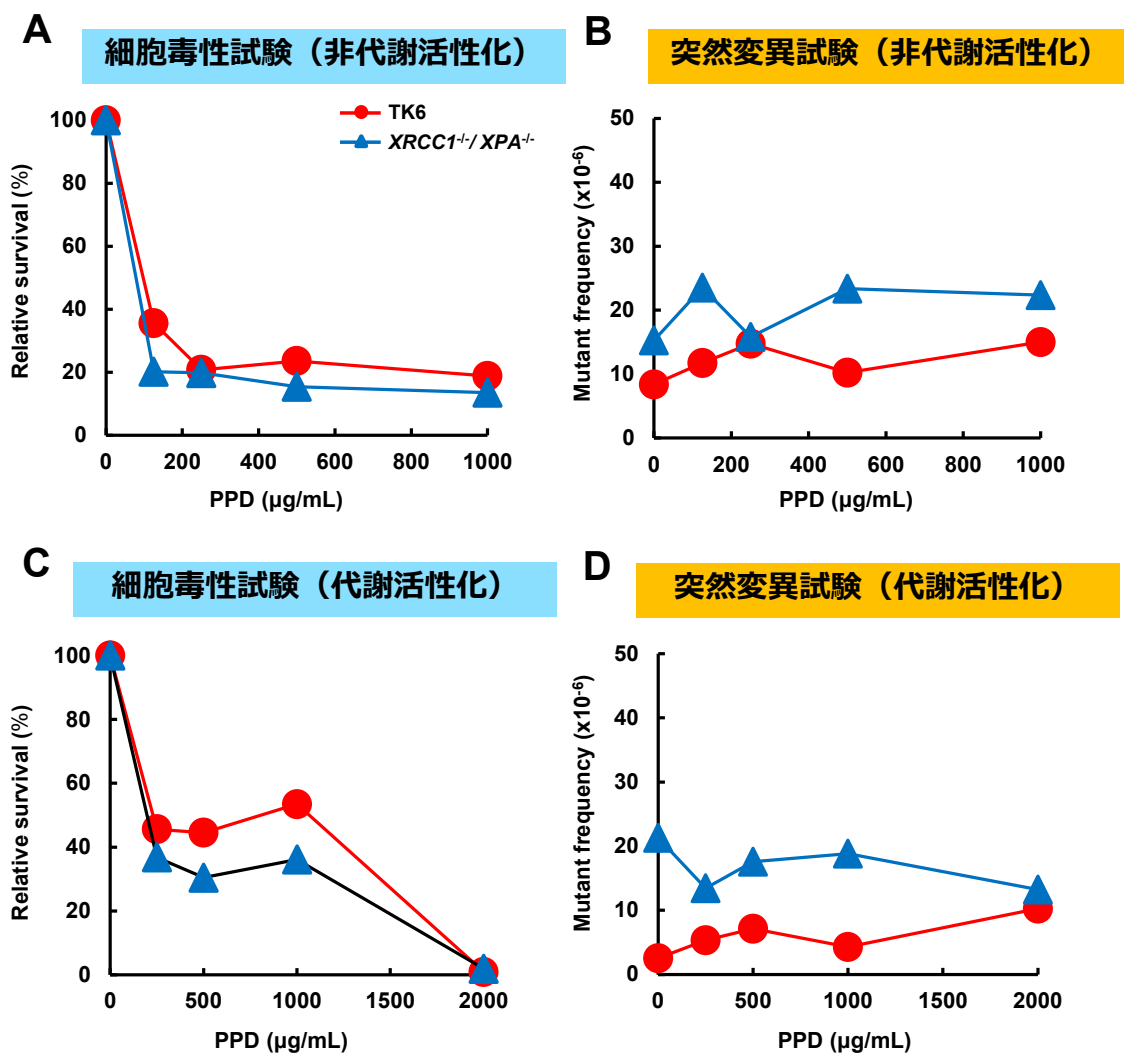


Fig. 13 Cytotoxic and genotoxic responses of wild-type and *XRCC1*<sup>-/-</sup>/*XPA*<sup>-/-</sup> TK6 cells exposed to PPD.

Cytotoxicity and genotoxicity were expressed as relative survival (%) and mutant frequency ( $\times 10^{-6}$ ) after treatment with PPD without metabolic activation (A and B) or in the presence of S9 mix (C and D). Representative result from at least two independent experiments was shown.



## Auramine

Auramine はジフェニルメタン系色素であり、ヒトへの発がん性の可能性が指摘されている。そこで、高感度型 TK6 アッセイを用いて Auramine の突然変異誘発性を検討した。TK6 細胞及び *XRCCI*<sup>-/-</sup>/*XPA*<sup>-/-</sup>細胞を細胞毒性が強く発現する用量から毒性が見られない用量まで処理した（短時間処理法の代謝活性化存在下では 10~70 µg/mL、代謝活性化非存在下では 20~80 µg/mL）。いずれの細胞株においても、用量依存的に RS の減少が認められた（Fig. 14）。本試験の結果、いずれの細胞株においても代謝活性化の有無によらず各処理群の MF は陰性対照群と比較して有意な増加を示し、かつ用量依存性が認められた。代謝活性化存在下では TK6 細胞に対する *XRCCI*<sup>-/-</sup>/*XPA*<sup>-/-</sup>細胞の MF は 70 µg/mL 及び 80 µg/mL でそれぞれ 2 倍及び 2.5 倍に増加した（Fig. 14）。短時間処理法の代謝活性化存在下では TK6 細胞に対する *XRCCI*<sup>-/-</sup>/*XPA*<sup>-/-</sup>細胞の MF は 10 µg/mL 及び 20 µg/mL でそれぞれ 3 倍及び 4 倍と、より低濃度で顕著な増加を示した。これらの結果は、DNA 除去修復能を完全に欠損した *XRCCI*<sup>-/-</sup>/*XPA*<sup>-/-</sup>細胞を TK6 アッセイに用いることで、Auramine の突然変異誘発性を検出する感度が著しく向上することを明確に示唆している。

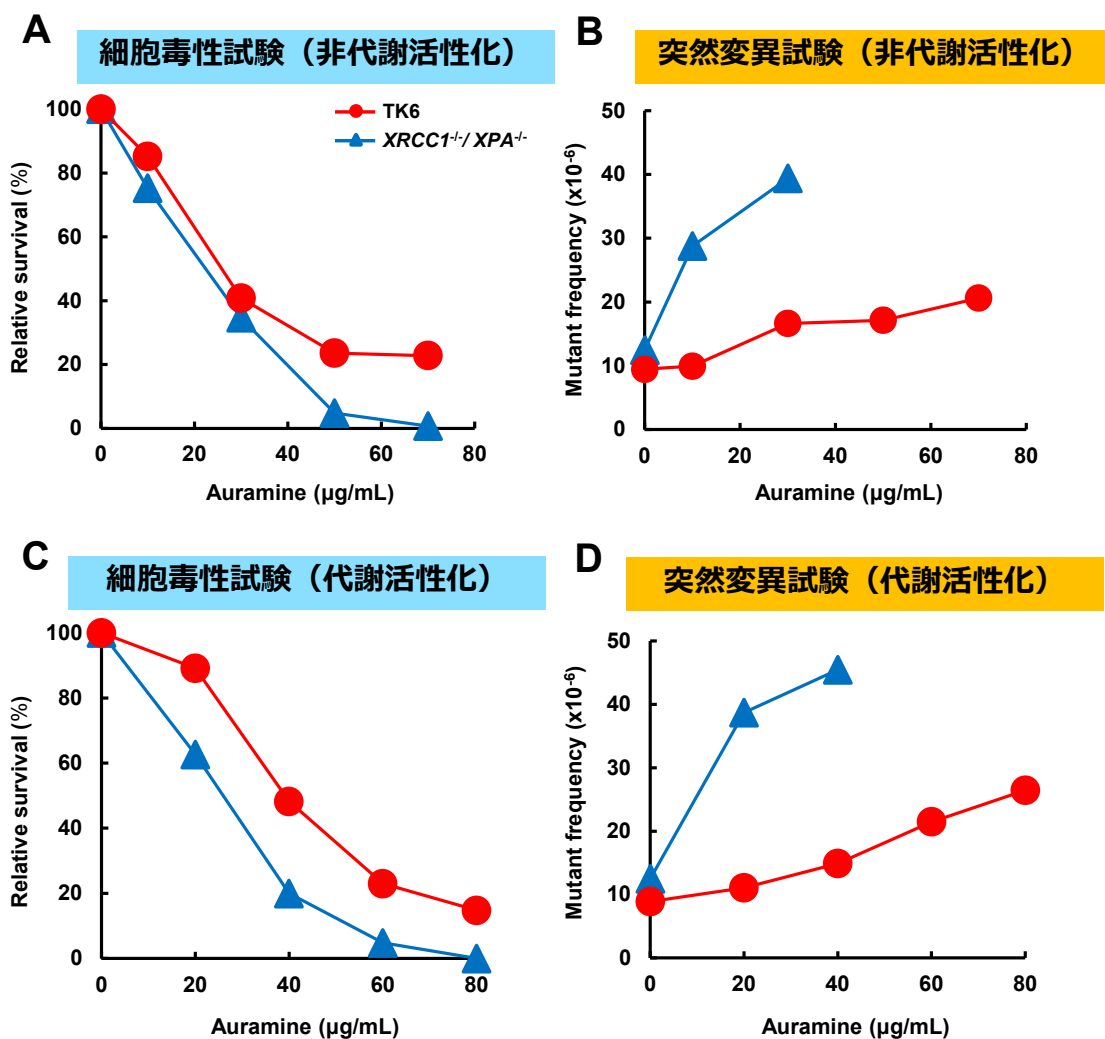


Fig. 14 Cytotoxic and genotoxic responses of wild-type and *XRCC1*<sup>-/-</sup>/*XPA*<sup>-/-</sup> TK6 cells exposed to Auramine.

Cytotoxicity and genotoxicity were expressed as relative survival (%) and mutant frequency ( $\times 10^{-6}$ ) after treatment with auramine without metabolic activation (A and B) or in the presence of S9 mix (C and D). The data on mutant frequencies were statistically analysed using the Omori's method. Representative result from at least two independent experiments is shown.

## MG

MG の遺伝毒性メカニズムは活性酸素の産生を介して細胞毒性を発現することで、二次的に DNA 損傷を誘発するものと考えられている[65][67]。MG の遺伝毒性及び発がん性に関しては、*in vitro* 及び *in vivo* の試験法の違いにより、相反

する結果が得られている。MG は Ames 試験では陽性であったが[60]、マウスでは遺伝毒性や発がん性は検出されていない[63][68]。しかし、ラットの発がん性試験では腫瘍の発生率がわずかに増加した[69]ことから、MG の発がん性をラットからヒトに外挿することは疑問である。そこで、MG の活性酸素を介した突然変異誘発性の可能性を検証するため、TK6 細胞及び *XRCCI*<sup>-/-</sup>/*XPA*<sup>-/-</sup>細胞の TK6 アッセイを行った。

短時間処理法の代謝活性化存在下では、TK6 細胞及び *XRCCI*<sup>-/-</sup>/*XPA*<sup>-/-</sup>細胞のいずれでも用量依存性のある強い細胞毒性を発現した (Fig. 15)。さらに、TK6 アッセイにおける形質発現期間では、細胞増殖が著しく阻害されたため、低用量 (0.2 µg/mL 及び 0.4 µg/mL) のみで突然変異試験が可能であった (Fig. 15)。短時間処理法の代謝活性化存在下では細胞毒性が減衰したため、突然変異試験は 2 ~ 8 µg/mL の量量において評価した (Fig. 15)。突然変異試験では代謝活性化の有無によらず TK6 細胞及び *XRCCI*<sup>-/-</sup>/*XPA*<sup>-/-</sup>細胞において、各処理群の MF は陰性対照群と比較して有意な増加を示さなかった。したがって、本結果から、MG はヒト細胞においては非 DNA 反応性物質であると考えられ、これまでの *in vivo* の試験結果と一致した[61]。

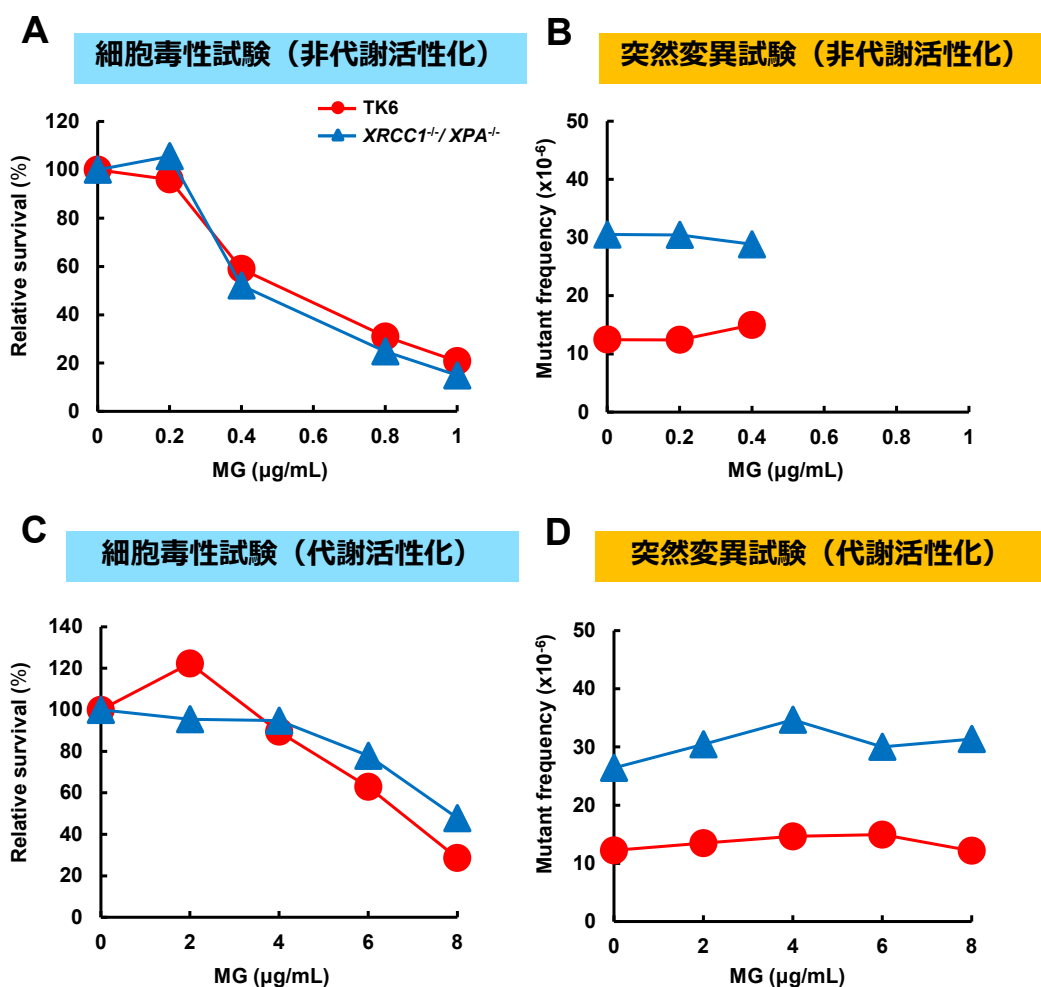


Fig. 15 Cytotoxic and genotoxic responses of wild-type and *XRCC1*<sup>-/-</sup>/*XPA*<sup>-/-</sup> TK6 cells exposed to MG.

Cytotoxicity and genotoxicity were expressed as relative survival (%) and mutant frequency (×10<sup>-6</sup>) after treatment with MG without metabolic activation (A and B) or in the presence of S9 mix (C and D). Representative result from at least two independent experiments is shown.

Table 7 Overview of results in genotoxicity and carcinogenicity studies

Chemical name	CAS No.	Ames	MLA / HPRT <sup>a</sup>	TK6 assay		Carcinogenicity
				Wild type	Mutant	
NEDA	1465-25-4	+ <sup>c</sup>	- <sup>d</sup>	-	-	-
PPD	106-50-3	+	+	-	-	-
Auramine	2465-27-2	+	-	+	+ <sup>f</sup>	+
MG	569-64-2	+	ND <sup>e</sup>	-	-	-

a MLA / HPRT: *in vitro* mammalian gene mutation assay using mouse lymphoma TK assay or HPRT study in chinese hamster ovary cells. b TK (*XRCC1*<sup>-/-</sup>/*XPA*<sup>-/-</sup>): TK6 assay using *XRCC1*<sup>-/-</sup>/*XPA*<sup>-/-</sup> cells in this study. c +: Positive. d -: Negative. e ND: not determined. F High sensitive

本研究では、Ames 試験陽性物質である NEDA、PPD、Auramine 及び MG について、高感度型 TK6 アッセイを実施した。その結果、NEDA、PPD 及び MG は TK6 細胞と *XRCCI*<sup>-/-</sup>/*XPA*<sup>-/-</sup>細胞ともに陰性を示したが、Auramine は陽性を示した。NEDA 及び PPD は *in vitro* 小核試験や MLA では概ね陰性結果が示されていることから、TK6 細胞と *XRCCI*<sup>-/-</sup>/*XPA*<sup>-/-</sup>細胞で陰性を示したことは、ヒト細胞ではこれらが非 DNA 反応性物質であることを示しており、更にげっ歯類を用いた発がん性試験の結果が陰性であることから、Ames 試験の陽性結果は細菌特異的な DNA 反応性によるものと推察された。一方、Auramine は Ames 試験陽性物質であるが、*in vivo* 姉妹染色体交換試験、*in vivo* 小核試験及び *in vivo* コメットアッセイではいずれも陽性を示し、さらにげっ歯類を用いた発がん性試験でも陽性を示していることから、高感度型 TK6 アッセイの陽性結果と考え合わせると、Auramine の発がん性メカニズムは遺伝毒性機序によるものと推察される。

#### 第 4 節 考察

本研究ではゲノム編集技術により DNA 修復能遺伝子を欠損した TK6 遺伝子欠損株を用いて、Ames 試験陽性物質として知られる NEDA、PPD、Auramine 及び MG の 4 物質について高感度型 TK6 アッセイを実施した。

TK6 細胞及び *XRCCI*<sup>-/-</sup>/*XPA*<sup>-/-</sup>細胞において、代謝活性化存在下及び非存在下のいずれの条件下でも NEDA は明確な陰性結果を示した。この結果は、NEDA がヒト細胞では非変異原性であることを示唆するものであり、既報の発がん性試験陰性の結果と一致し、NEDA が非遺伝毒性発がん物質であることを裏付ける [65]。NEDA は Ames 試験陽性物質として知られるもののハムスター肝 S9 mix 存在下でのみ陽性を示しており、ラット肝 S9 mix では検出されなかった [50] ことを鑑みると、Ames 試験の陽性結果は薬物代謝酵素の種差に依存した偽陽性であ

る可能性があると考えられる。

PPD の高感度型 TK6 アッセイでは、いずれの細胞株においても代謝活性化の有無によらず各処理群の MF は陰性対照群と比較して有意な増加を示さなかったため (Fig. 13)、陰性と判定された。したがって、本結果は PPD がヒト細胞において非 DNA 反応性であることを示唆する。ヒトのケラチノサイトにおいて、PPD と過酸化水素を共処理すると、細胞内の活性酸素種 (ROS) の産生を介して DNA 損傷が促進されることが報告されている[65]。このことから、内因性の活性酸素によって誘発される遺伝毒性は PPD のみでは不十分であると推察された。*XRCCI<sup>-/-</sup>/XPA<sup>-/-</sup>*細胞は、様々な酸化的 DNA 損傷の修復に関与する BER 及び NER 経路の両方を欠損している[70][71][72][73][74][75]。これら機能を完全に欠損しているにもかかわらず *XRCCI<sup>-/-</sup>/XPA<sup>-/-</sup>*細胞では突然変異の指標である MF は増加しなかったことは (Fig. 13)、PPD が生理的条件下では DNA 塩基損傷やバルキー-DNA 付加物を誘発しないことを示唆する。さらには、これらの結果は活性酸素が豊富に存在しない曝露条件では哺乳類に遺伝毒性を誘発しないという結果を補完するものである。なお、MLA では PPD の遺伝毒性誘発性は陽性結果を示すことが報告されているが、これはマウスリンパ腫細胞 (L5178Y 細胞) が p53 変異タンパク質を発現していることで、酸化的 DNA 損傷が誘発された細胞がアポトーシス誘導されずに変異細胞として生存したことによると考えられる。本研究から、TK6 細胞において、BER と NER のいずれの機能が失われていても、正常 p53 存在下では PPD が陰性であったことは、この結果を合理的に説明し得るものと考えられる。

Auramine の高感度型 TK6 アッセイではいずれの細胞株においても代謝活性化の有無によらず各処理群の MF は陰性対照群と比較して有意な増加を示し、かつ用量依存性が認められた。本結果は、DNA 除去修復能を完全に欠損した

*XRCCI<sup>-/-</sup>/XPA<sup>-/-</sup>*細胞を TK6 アッセイに用いることで、Auramine の突然変異誘発性を検出する感度が著しく向上することを明確に示唆するものである。上述したとおり、TK6 アッセイと同様に TK 遺伝子座の突然変異をレポーターとする MLA では Auramine の突然変異誘発性は検出されていないが、これは短時間処理法の代謝活性化存在下のみ実施されていたことによっているのかも知れない[55]。Auramine の遺伝毒性は、Ames 試験においては代謝活性化存在下でのみ確認されている[56][57]。一方で、哺乳類培養細胞を用いた *in vitro* 遺伝毒性試験で陽性を示した試験法では代謝活性化の必要性に一貫性が見られていない。しかし、TK6 アッセイでは代謝活性化の有無によらずに陽性を示したこと、さらに *XRCCI<sup>-/-</sup>/XPA<sup>-/-</sup>*細胞では MF の増加が顕著に増強されたことを鑑みると、Auramine ではその未変化体が突然変異誘発性を有しているものと考えられ、TK6 アッセイでは効率よく検出できる可能性が示唆された。本結果は、ヒト細胞において、Auramine が BER や NER によって修復される可能性のある酸化的 DNA 損傷やバルキーDNA 付加物などの DNA 損傷を誘発することを示唆する。高感度型 TK6 アッセイの結果は、Auramine の *in vivo* 発がん性の誘発が内因性 DNA 修復システムで修復されなかった DNA 損傷の変異原性に起因する可能性を示唆するものである[62]。

MG の遺伝毒性メカニズムは、直接的な変異原性機序によらず活性酸素の産生を介して細胞毒性を発現することで、二次的に DNA 損傷を誘発するものと考えられている[65][67]。MG の遺伝毒性及び発がん性に関しては、*in vitro* 及び *in vivo* の試験法の違いにより、相反する結果が得られている。MG は Ames 試験では陽性であったが[60]、マウスでは遺伝毒性や発がん性は検出されていない[63]。しかし、ラットの発がん性試験では腫瘍の発生率がわずかに増加した[69]ことから、MG の発がん性をラットからヒトに外挿することは疑問である。高感度型 TK6

アッセイの結果、突然変異試験では代謝活性化の有無によらず TK6 細胞及び *XRCCI<sup>-/-</sup>/XPA<sup>-/-</sup>*細胞において、各処理群の MF は陰性対照群と比較して有意な増加を示さなかった。したがって、本結果から、MG はヒト細胞においては非 DNA 反応性物質であると考えられ、これまでの *in vivo* での試験結果と一致した[61]。MG は非遺伝毒性物質であることが示唆されているが、MG の主要な還元代謝物で半減期の長いロイコマラカイトグリーン (LMG) は、*in vivo* で遺伝毒性を示すことが知られている[61][76]。哺乳類では、MG は腸内細菌によって LMG に還元されることが報告されている[77]。ラットでみられた腫瘍頻度の増加は、MG が特定の環境下で LMG に還元されたことに起因する可能性も考えられる。腸内細菌と Ames 試験菌株の薬物代謝酵素の種類については不明であるが、両細菌に特異的な還元酵素の発現に共通性を見出すことができれば、Ames 試験と TK6 アッセイとの結果の相違を合理的に説明できる可能性がある。

## 小括

本研究において、TK6 アッセイの結果が陰性を示した NEDA、PPD 及び MG は *XRCCI<sup>-/-</sup>/XPA<sup>-/-</sup>*細胞でも同様に陰性を示した。この結果は Ames 試験陽性結果が細菌特異的な作用機序によることを示唆し、発がん性試験の結果と考え合わせると、ヒト細胞では非 DNA 反応性であると考えられる。いずれの細胞株でも TK6 アッセイにおいて陽性を示した Auramine は、Ames 試験や発がん性試験との結果と合致することから、DNA 反応性発がん物質である可能性が高い。Auramine による DNA 修復は細菌からヒトまで共通の DNA 修復系により修復されると理解できる。

標準的な *in vitro* 遺伝毒性試験では、使用菌株の薬物代謝能の相違や試験法の低特異性などの理由から限界がある。原核生物から真核生物まで高度に保存さ



れた DNA 修復機構である BER 経路と NER 経路は、様々な DNA 損傷の除去に関連していることが知られているため[78]、本研究においてこの 2 つの経路における重要な遺伝子を破壊した細胞株を TK6 アッセイに組み込むことは、化学物質の遺伝毒性誘発性を評価するのみならず、DNA 修復機構の相違に基づく機序解明に特異性を高めることができることを明らかにした[45]。本研究の成果より、高感度型 TK6 アッセイによる医薬品の安全性評価は、医薬品の潜在的な遺伝毒性誘発性を特異的に評価する上で極めて有用であると考えられた。

以上から、高感度型 TK6 アッセイは細菌とヒトにおける DNA 修復メカニズムの相違に基づき、TK6 アッセイの陰性結果に科学的信頼性を与えるものと考えた。また DNA 反応性を高感度に検出できることから、偽陰性の低減にも寄与するものとする。

### 第3章 改良型 TK6 細胞を用いた遺伝毒性メカニズムの解明 (ヌクレオチド除去修復欠損株を用いた遺伝毒性作用機序 解明)

---

本章は下記論文に基づいています。

Akira Sassa, Takayuki Fukuda, Akiko Ukai, Maki Nakamura, Michihito Takabe, Takeji Takamura-Enya, Masamitsu Honma, Manabu Yasui. Follow-up genotoxicity assessment of Ames-positive/equivocal chemicals using the improved thymidine kinase gene mutation assay in DNA repair-deficient human TK6 cells. *Genes and Environment*. 2019; 41:15.

---

## 第1節 緒言

細胞内の DNA は、太陽からの紫外線、電離放射線、医薬品、食品に含まれる化学物質、内因性の酸化ストレスなど、さまざまな環境因子に絶えずさらされている。このような DNA 損傷の蓄積は、ゲノムの不安定性を増大させるため、細胞の生存に悪影響を及ぼし、ひいては細胞の変質や腫瘍化を引き起こす可能性がある。ゲノムの完全性を維持するために、哺乳類細胞は特定の種類の DNA 損傷に対する複数の DNA 修復系を有している。特に、ヌクレオチド除去修復 (NER) は、DNA 損傷に対する防御機構としては最も重要な修復経路と考えられる。

NER は遺伝毒性物質によって誘発されるバルキーDNA 付加体の除去に関与する [79]。この過程で NER は、紫外線 (ultra violet: UV) によって誘発されるシクロブタンピリミジン二量体、ヘテロサイクリックアミン (Heterocyclic amine: HCA) や多環芳香族炭化水素 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: PAHs) などの発がん物質によって形成される共有結合 DNA 付加体、DNA 架橋、内因性活性酸素種による酸化的 DNA 損傷など、ほぼ無限の種類の DNA 付加体を認識することができる。したがって、NER 機構の機能不全は細胞死やゲノムへの変異導入など、発がんを誘発する下流のシグナル経路に応答することで、遺伝毒性物質の細胞毒性や DNA 損傷性の影響を増強させることが予想される。

NER は全ゲノムヌクレオチド除去修復 (GG-NER) と転写共役ヌクレオチド除去修復 (TC-NER) の 2 つのサブ経路に分類される (Fig. 16) [80]。GG-NER は転写領域と非転写領域を含むゲノム全体から DNA 付加体を認識して除去する。一方、TC-NER は活発に転写されるゲノム上の遺伝子座で転写を阻害する DNA 付加体を除去する役割を担う。哺乳類の GG-NER では色素性乾皮症グループ C (Xeroderma pigmentosum group C: XPC) が最初の損傷認識ステップに関与している [81]。XPC をコードする遺伝子に変異が生じると、GG-NER の欠損により、

がん化し易い表現型となることが知られている[82]。一方、TC-NER は DNA 付加部位で RNA ポリメラーゼ II の伸長が停止することで活性化される。その後、コケイン症候群タンパク質 A (Cockayne syndrome protein A: CSA) とコケイン症候群タンパク質 B (Cockayne syndrome protein B: CSB) が TC-NER を開始する。GG-NER と TC-NER は転写因子 IIIH (Cockayne syndrome protein B: TFIIH) 複合体の損傷部位へのリクルートに続いて、共通のタンパク質成分を用いて DNA 付加体周辺のヌクレオチドの切除を行い、その後ギャップフィリングとライゲーションを行って反応を完了する (Fig. 16)。これらの NER サブ経路の役割は異なるため、GG-NER または TC-NER を特異的に破壊することで、DNA 付加体の細胞毒性と DNA 修復経路のクロストークの基礎となるメカニズムを解明することが期待できる。

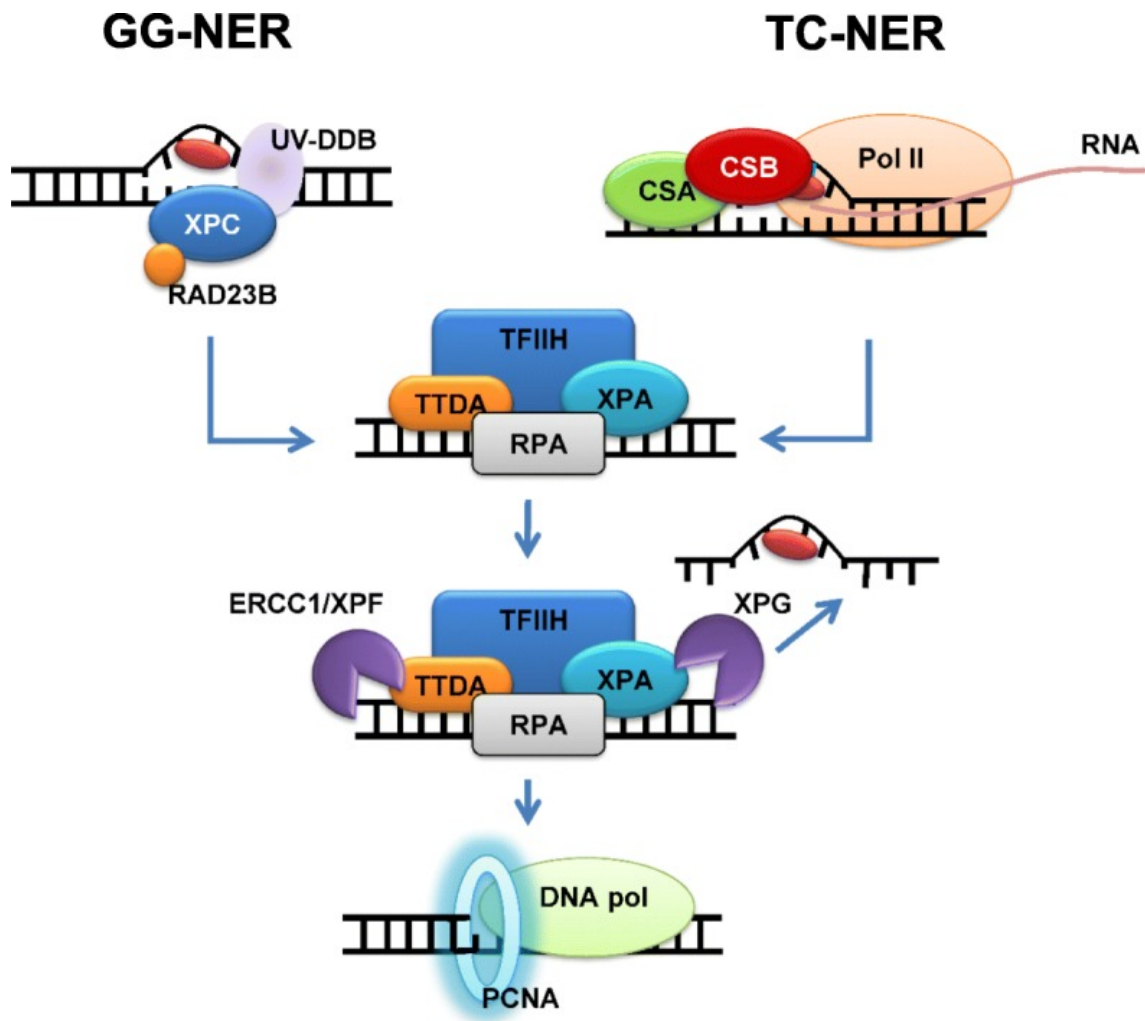


Fig. 16 Schematic of nucleotide excision repair sub-pathways.

In GG-NER, XPC and RAD23B complex with UV-damaged DNA-binding protein (UV-DDB) participate in the primary DNA damage recognition and recruitment of TFIIH complex. TC-NER is initiated by the stalling of RNA polymerase II (PolII) at the site of the DNA adduct. CSA and CSB are required for the removal of the stalled PolII and the assembly of the NER factors. Following the recruitment of the TFIIH complex to the DNA adduct site, both GG-NER and TC-NER share the same core NER factors, including ERCC1/XPF, XPG, and replication machinery [PCNA and DNA polymerase (DNA pol)], as depicted

XPC と CSB は癌抑制因子である p53 の機能制御に関与することが知られている。例えば、CSB は p53 と相互作用し、p53 のユビキチン化を促進する[83]。CSB が欠損すると、p53 が蓄積され、シスプラチンに対する細胞の感受性が高まる [83]。CSB の ATPase ドメインは、紫外線によって誘発されるアポトーシス応答

に重要な役割を果たしている[85]。XPCは mouse double minute 2 homolog (MDM2)との相互作用を通じて、p53の分解プロセスにも関与している[86]。さらに、XPCはカスパーゼ2の抗アポトーシスアイソフォームの負の制御を介して、DNA損傷によるアポトーシス応答を促進することが知られている[87]。これらの知見に基づき、NERの主要因子であるCSB及びXPCは、高度に損傷した細胞の除去と回復可能な細胞の修復との間の均衡の調節に関与していることが示唆されている。したがって、NERサブ経路の機能喪失は環境中の遺伝毒性物質への曝露による有害な影響を引き起こす可能性があり、ひいては細胞に対する感受性に大きく影響を及ぼすものと考えた。

そこで、NERサブ経路の主要因子であるXPCまたはCSBの機能を欠損させたヒトリンパ芽球細胞TK6細胞（改良型TK6）を開発し、それぞれGG-NERまたはTC-NERの機能を特異的に阻害した。これらの細胞を用いて、既に細胞のがん化のメカニズムが詳細に解析されている紫外線（UVC）、ベンゾ[a]ピレン（B(a)P）などのPAH類、2-アミノ-3,8-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline (MeIQx), 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP)、DNA鎖切断を誘発する $\gamma$ 線、2-acetylaminofluorene (2-AAF)の6種類の環境変異原に対する細胞の感受性変化を指標に、DNA損傷誘発メカニズムの評価に使用可能かを検証した。その結果、GG-NER及びTC-NER欠損TK6細胞は、各種環境変異原に対して、新たな知見を含めて概ね各々の毒性発現メカニズムを反映した細胞応答を示したことから、TK6アッセイで陽性を示した医薬品におけるDNA損傷、ひいては発がんメカニズムの一端を明らかにするために有用なツールであることが示された。

## 第2節 実験の材料及び方法

### 細胞培養

本研究では、TK6 細胞と遺伝的背景が同等であるヒトリンパ芽球細胞 TSCER122 細胞を使用した[88]。細胞は RPMI-1640 (ナカライテスク社製) に 10% 馬血清 (ニチレイバイオサイエンス社製)、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、200 µg/mL ピルビン酸ナトリウムを加え、37°C、5% CO<sub>2</sub>、100%湿度の条件下で培養した。

### XPC<sup>-/-</sup>及び CSB<sup>-/-</sup>細胞の作製

本研究において使用した XPC<sup>-/-</sup>細胞と CSB<sup>-/-</sup>細胞は、共同研究者により CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて作製された[78]。

### 各種環境変異原処理

#### 1) 紫外線照射

細胞を洗浄し、フェノールレッドを含まない RPMI-1640 で再懸濁した。細胞 (2.5×10<sup>6</sup> cells) を 5 mL の培養液に懸濁させ、10 cm シャーレに入れて UVC (0、0.5、1.0、1.5、2.0 J/m<sup>2</sup>) に照射した。

#### 2) 被験物質処理

本研究に用いた MeIQx 及び PhIP は富士フイルム和光純薬株式会社 (日本、大阪) から購入した。B(a)P は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。2-AAF は東京化成工業株式会社 (日本、東京) から入手した。すべての被験物質は DMSO に溶解した。被験物質は適切な溶媒に溶解後、直接または段階的に希釈して最終濃度の希釈液を調製した。

被験物質による細胞処理は、50 mL のプラスチック遠心管に  $5 \times 10^6$  cells/mL の細胞密度で 10 mL の細胞懸濁液を調製し、代謝活性化のために 4.5% の濃度で誘導ラット肝 S9 mix (オリエンタル酵母工業株式会社及び株式会社ボゾリサーチセンター) の存在下で、異なる濃度の被験物質を処理した。その後、本遠心管を穏やかに振とうしながら 37°C で 3 時間処理後、RPMI-1640 培地で 2 回洗浄した。

### 3) $\gamma$ 線照射

Gammacell 40 Exactor (MDS Nordion, Canada) を用いて、細胞を  $\gamma$  線 (0、0.25、0.75 及び 1 Gy) に照射した。

## 96 ウェルプレートへの細胞播種

各環境変異原処理後、細胞を 96 マイクロウェルプレートに 8 cells/mL (1.6 細胞/ウェル) の細胞密度で播種し、温度 37°C、加湿及び 5% CO<sub>2</sub> の条件下で 14 日間培養した。培養後、各ウェルにおけるコロニーの有無を指標に計測し、第 1 章と同様に式 1~3 を用いて細胞生存率 (RS) を測定した。

## 統計解析

Tukey's 多重比較検定を用いて、同じ線量あるいは濃度で WT、*XPC*<sup>-/-</sup>細胞あるいは *CSB*<sup>-/-</sup>細胞の各細胞間で RS を検定した (有意水準: 1% 及び 5%、両側検定)。

## 第 3 節 実験の結果

各種環境変異原に対する各種細胞株の感受性試験の結果を Fig. 17 に示した。



## 紫外線照射

紫外線照射における GG-NER 及び TC-NER 欠損による細胞感受性の影響を確認するため、WT、*XPC*<sup>-/-</sup>細胞及び *CSB*<sup>-/-</sup>細胞の各細胞株における UVC 照射に対する感受性を比較した。Fig. 17 に示すように *XPC*<sup>-/-</sup>と *CSB*<sup>-/-</sup>の両細胞は、TK6 細胞に比較して高感受性を示した。特に、*XPC*<sup>-/-</sup>細胞は *CSB*<sup>-/-</sup>細胞に比較して UVC による細胞傷害作用に対して重篤な表現型を示した。

## B(a)P

B(a)P は煙草に含まれる強力な多環芳香族炭化水素 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: PAHs) の発がん物質で、有機物の不完全燃焼によって生成される [89]。B(a)P は反応性中間体である benzo [a] pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide (BPDE) に代謝され、細胞内でバルキーDNA 付加物を形成する [90]。NER サブ経路の欠損における B(a)P 曝露の影響を確認するため、化学物質に曝露した後の細胞生存率を測定した。その結果、B(a)P に対する細胞感受性は、*CSB*<sup>-/-</sup>細胞において劇的に増強された [3 µg/mL 及び 6 µg/mL の B(a)P で有意 ( $p < 0.01$ )] (Fig. 17)。一方、*XPC*<sup>-/-</sup>細胞の細胞感受性は WT よりもわずかに高く、6 µg/mL の B(a)P 処理群でのみで有意であった ( $p < 0.05$ )。これらの結果から、*XPC*<sup>-/-</sup>細胞は *CSB*<sup>-/-</sup>細胞に比べて B(a)P に対する抵抗性が高いことが明らかになった。

## MeIQx

MeIQx は加熱処理された肉や魚に含まれる HCA である。MeIQx 曝露による GG-NER または TC-NER 欠損への影響を検討した。*CSB*<sup>-/-</sup>細胞では 250 µg/mL で有意な感受性を示した ( $p < 0.01$ ) (Fig. 17)。一方、*XPC*<sup>-/-</sup>細胞における感受性はむしろ野生型と比較しても低い傾向にあり、すべての用量 (150、250 及び 250

μg/mL) で有意な感受性増加は見られなかった。

## PhIP

MeIQx 同様に PhIP も HCA であり、よく知られた食品発がん物質である。PhIP は、主にグアニンの C8 位に結合し、バルキーな NA 付加体を誘発することが知られている[91]。他の遺伝毒性物質とは対照的に、*XPC*<sup>-/-</sup>細胞は PhIP 処理に対して 3 つの細胞株の中で最も高い感受性を示した [2 及び 3 μg/mL の PhIP で有意 ( $p < 0.05$ )] (Fig. 17)。*CSB*<sup>-/-</sup>細胞は、WT と *XPC*<sup>-/-</sup>の中間の感受性を示した。

## γ線

Csb 遺伝子を破壊したマウス胎児線維芽細胞 (Mouse Embryonic Fibroblast: MEF) は、電離放射線に対して高感受性を示すことが報告されている[105]。そこで XPC 及び CSB の欠損が TK6 細胞における γ線照射の細胞毒性に関与しているかを評価した。いずれの細胞においても γ線の線量依存的に RS が低下した (Fig. 17)。*CSB*<sup>-/-</sup>細胞の γ線に対する感受性は野生型よりもわずかに高かったが、いずれの細胞株間にも生存率に有意な差は認められなかった。

## 2-AAF

2-AAF はフルオレンの変異原性誘導体であり、バルキーDNA 付加体を形成することが知られている[92]。XPC または CSB の欠損が 2-AAF による細胞毒性にどのように影響するかを検討した。(Fig. 17) に示すように、2-AAF (3.3、11 及び 33 μg/mL) に曝露しても、*XPC*<sup>-/-</sup>及び *CSB*<sup>-/-</sup>細胞の細胞感受性に影響はみられなかった。さらに 2-AAF の処理濃度の増加に伴い、培養液に沈殿が生じた。

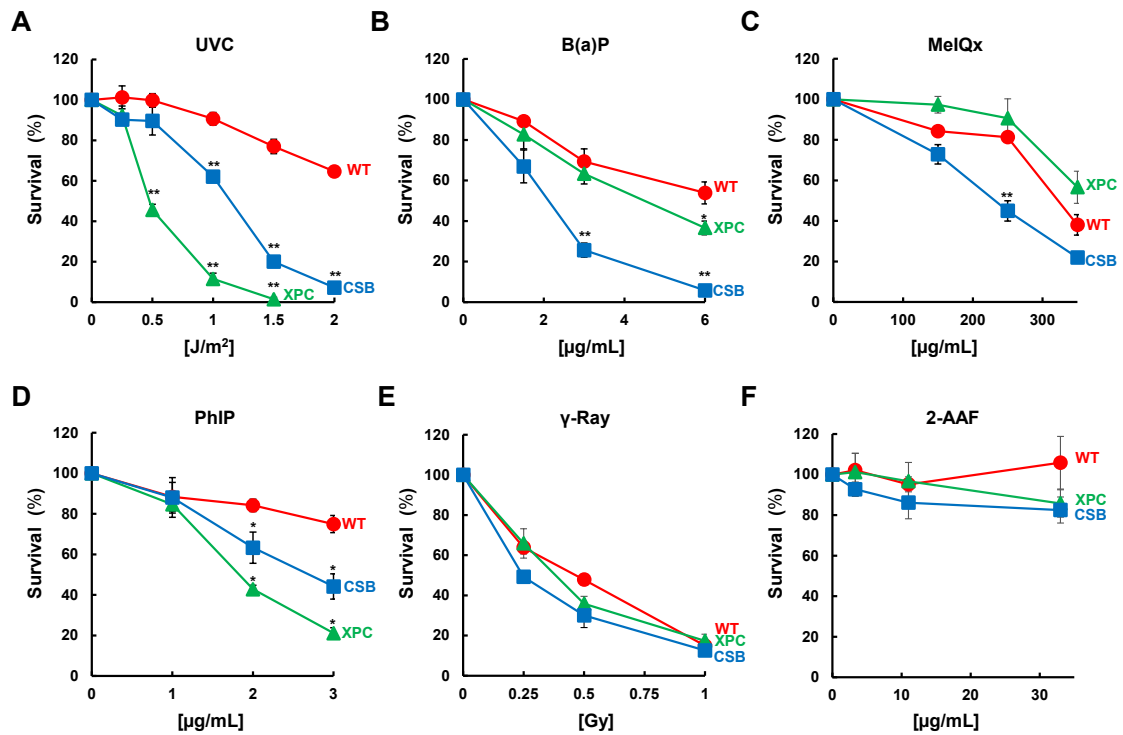


Fig. 17 Cytotoxicity of genotoxic agents in XPC- and CSB-deficient human TK6 cells. Survival of WT (circles), *XPC*<sup>-/-</sup> (triangles), and *CSB*<sup>-/-</sup> (squares) cells was shown after exposure to UVC (A), B(a)P (B), MelQx (C), PhIP (D),  $\gamma$ -ray (E), and 2-AAF (F). Values presented are means  $\pm$  SEM of 2–4 independent experiments. Experiments were performed as described in Materials and Methods. Significant differences are indicated by asterisks (\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ).

#### 第4節 考察

紫外線照射における研究では、*Xpc*<sup>-/-</sup>と*Csb*<sup>-/-</sup>のマウス細胞はその種類によって紫外線に対する感受性が異なることが報告されている。*Csb*<sup>-/-</sup>マウス胚性線維芽細胞 (MEF) 及びケラチノサイトは*Xpc*<sup>-/-</sup>細胞に比べて紫外線に対する感受性が高いが、*Xpc*<sup>-/-</sup>胚性幹細胞は*Csb*<sup>-/-</sup>細胞に比べて紫外線に対する感受性が高い [93][94]. 前者の場合、紫外線照射に対する*Csb*<sup>-/-</sup>細胞の感受性が上昇する理由は、*Csb*<sup>-/-</sup>細胞のアポトーシス応答性が上昇しているためと考えられる [89][94]. 後者の場合、*Csb*の欠損は*Xpc*の欠損よりも紫外線による突然変異率が高くなり [93]、

その結果、DNA 損傷を受けた細胞が増殖する。このように、ヒト血液由来の TK6 細胞では、NER サブ経路の中でも、CSB の欠損のみではなく、XPC の欠損もまた紫外線に曝露された際の細胞生存に悪影響を及ぼすことが明らかとなった。本細胞が UVC に強く反応するのは、ヒトではこれらの NER に関連する遺伝子がアポトーシス応答を介して高度に損傷した異常細胞を選択的に排除する役割を担っているからであると考えられる[86]。

細胞内でバルキーDNA 付加物を形成する benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide (BPDE) をヒト細胞に曝露すると、XPC、XPF、XPG 及び DDB2 などの NER 遺伝子の発現が p53 依存的に上昇することが報告されている[94]。しかし、CSB の発現は BPDE に曝露されても増加しないことが報告されている[94]。これらの知見と我々の結果を合わせると、XPC は TC-NER が非存在下では、DNA 損傷によるアポトーシス応答を介して高度な損傷を受けた細胞を排除する上で主要な役割を果たしていると考えられる。これまでの報告では、DNA 損傷性ストレスに反応して、*Csb*<sup>-/-</sup>細胞ではアポトーシス応答のレベルが上昇するが、*Xpc*<sup>-/-</sup>マウス細胞では上昇しないことが示唆されている[89][94]。

MeIQx において、*CSB*<sup>-/-</sup>細胞では 250 µg/mL で有意な感受性を示した一方で、*XPC*<sup>-/-</sup>細胞では感受性はむしろ野生型と比較しても低い傾向にあった。この結果は、MeIQx によって誘発された酸化的 DNA 損傷の量によって説明できる。ラットにおける低用量の MeIQx では MeIQx-DNA 付加体の形成が確認されている[96]。しかし、当該報告では MeIQx の投与量の増加に伴い、組織内において酸化的 DNA 塩基損傷である 7,8-ジヒドロ-8-オキソグアニン (8-oxoG) の量が有意に上昇することが示されている[96]。酸化的 DNA 損傷の修復に CSB が関与しており[97][98][99]、CSB 患者由来の細胞は、酸化的 DNA 損傷に対して高感受性を示すことが報告されている[104]。さらに *CSB*<sup>-/-</sup>でみられる MeIQx の感受性増加は

酸化 DNA 損傷の修復能の欠如によるものと予想される。したがって、*CSB*<sup>-/-</sup>細胞では MeIQx に対する感受性が向上する一方で、*XPC*<sup>-/-</sup>細胞では感受性が低下することは、*CSB* による酸化的 DNA 損傷の修復と *XPC* によるアポトーシス誘発の 2 つの事象に起因すると考えられる。以上より、TC-NER の機能喪失が、ヒト細胞における MeIQx の細胞毒性を強める役割を果たすことが示唆された。

PhIP では、*CSB*<sup>-/-</sup>細胞は WT と *XPC*<sup>-/-</sup>の中間の感受性を示したが、*Xpc* ノックアウトマウスと野生型の間で PhIP 処理に対する感受性に差がないとする先行研究とは対照的である[100]。この相違は、以前に報告されたように、げっ歯類と比較してヒトでは GG-NER が生体恒常性維持により重要であることに起因すると考えられる[102]。TK6 細胞を PhIP に曝すと p53 の活性化が誘導されるが、これはバルキーな DNA 付加体を形成する他の遺伝毒性物質でも同様である[103]。PhIP の場合、*XPC* は、p53 の分解を介して細胞死を抑制する役割を果たしていると考えられる[85]。したがって、今回の結果は、GG-NER の機能消失が、PhIP-DNA 付加体が蓄積することによる細胞毒性の発現に重要であることを示している。PhIP は、バルキーな DNA 付加体だけでなく、DNA 二本鎖切断 (DSB) も誘導することが報告されており[104]、NER 欠損細胞における PhIP の毒性増強は、PhIP 処理時に DSB が形成されることに起因する可能性もある。そこで次に、DSB を誘発する  $\gamma$  線を照射した後の各細胞株の細胞生存率を調べた。

本研究では、*CSB*<sup>-/-</sup>細胞の  $\gamma$  線に対する感受性は野生型よりもわずかに高かったが、いずれの細胞株間にも生存率に有意な差は認められなかった。*CSB* と *XPC* は DSB 修復に一定の役割を果たしている可能性が指摘されているが[105]、これらの NER 因子の欠損は TK6 細胞における  $\gamma$  線の細胞毒性に大きな影響を与えなかった。

以上の結果から、化学物質による DNA 損傷の修復に最も寄与すると考えられ

る NER 経路の不活性化は、代表的な環境変異原によるメカニズムを反映したものであることが明らかとなったため、本法は各細胞感受性の相違から遺伝毒性メカニズムの一端を解釈し得る有用なツールになると考える。

## 小括

本研究ではバルキーDNA 付加体を形成するいくつかの環境変異原によって引き起こされる細胞毒性に対する GG-NER 及び TC-NER の不活性化の影響を評価した。NER 欠損細胞では、遺伝毒性物質への曝露に対する感受性に差が見られ、その差は形成される DNA 付加体とそれに続く修復やアポトーシスのメカニズムに依存していた。これらの結果から、本研究で樹立した GG-NER 及び TC-NER 欠損細胞は、標準的な遺伝毒性試験と組み合わせて、医薬品の細胞毒性が各段階に關与するメカニズムを調べるのに有用であると考えられる。例えば、CS/XP 患者の神経変性などの症状と、日常生活における環境化学汚染物質への慢性的な曝露との相関関係はいまだ不明である。したがって、これらの細胞は NER 欠損に關連する薬剤や化学物質への曝露のリスクを評価するためのツールとなることを意味しているため、TK6 アッセイにおいて陽性を示した場合のメカニズム解明に有用である可能性が考えられた。これらの方法論は、遺伝毒性物質に対する NER 因子の詳細な防御機能に光を当て、化学物質のリスク評価の改善に貢献することが期待される。

## 総括

### 本フォローアップスキームの有用性

本研究では、Ames 試験陽性物質のフォローアップから作用機序解明まで網羅した体系的なフォローアップスキームの確立を目指し、標準的な TK6 アッセイによる Ames 試験陽性物質のフォローアップ法の確立、DNA 修復機序に基づいた高感度型 TK6 アッセイによるフォローアップ法の確立ならびに改良型 TK6 細胞を用いた遺伝毒性メカニズムの解明からなる 3 つの研究を実施した。

まず、本研究に用いた Ames 試験陽性かつ発がん性試験陰性物質（10 物質）のうち、TK6 アッセイは 2 物質（20%）のレスキューに成功したことから、有用な医薬品候補化合物の再開発を促進できる可能性が示唆された。連続処理法の 24 時間処理条件下のみで MF が用量依存的に増加し、すべての処理条件で同程度に強い細胞毒性が認められた 4-Nitroanthranilic acid について、プロテオミクス解析を行った。その結果、24 時間処理のみ酸化ストレスに応答する内在性アポトーシスシグナル経路のタンパク質発現レベルが有意に上昇したことから、長時間曝露では ROS を介した非特異的な DNA 損傷が誘発されている可能性が示唆された。これにプロテオミクス解析によって MoA が実証可能であった連続処理法において二次的に陽性反応を示した 2 物質を陰性とみなすことができれば、本研究に用いた Ames 試験陽性物質に対するレスキュー率は 40%（10 物質中 4 物質）に上昇し、TK6 アッセイは Ames 試験陽性物質のフォローアップ評価としては有用であることが確認される。

第二に、Ames 試験陽性物質において TK6 アッセイで陰性を示す物質が科学的に妥当な陰性結果であるかを確認するため、主要な除去修復機能を二重欠損させた細胞を用いた高感度型 TK6 アッセイの開発を試みた。TK6 アッセイで陰性を示した NEDA、PPD 及び MG は二重欠損細胞でも同様に陰性であった。この

結果は Ames 試験陽性結果が細菌特異的な反応によるものと考えられ、発がん性試験の結果と考え合わせると、これらの化合物における Ames 試験陽性結果はヒトでは非 DNA 反応性とみなせると考えられた。一方、いずれの細胞でも陽性を示した Auramine は Ames 試験陽性の結果と考え合わせると、DNA 反応性発がん物質の可能性が高いと考えられた。以上から、高感度型 TK6 アッセイは DNA 修復メカニズムの相違に基づき、TK6 アッセイの陰性結果に科学的信頼性を与えるものと考えた。また DNA 反応性を高感度に検出できることから、偽陰性の低減にも寄与するものと考えた。

最後に、高感度型 TK6 アッセイで陽性を示した場合、医薬品の開発継続は困難であるが、より詳細にメカニズムを探ることは、今後の開発に有用な情報を与える可能性がある。GG-NER では XPC を、TC-NER では CSB をそれぞれ欠損させた  $XPC^{-/-}$  及び  $CSB^{-/-}$  細胞を用い、既に作用機序が明らかな代表的な環境変異原により、評価系の妥当性を検討した。その結果、 $CSB^{-/-}$  細胞は UVC、B(a)P 及び MeIQx に対して高い感受性を示した。 $XPC^{-/-}$  細胞は野生株と比較し、UVC に高い感受性を示したが、B(a)P と MeIQx には感受性を示さなかった。他の環境変異原とは対照的に、PhIP に対する  $XPC^{-/-}$  細胞の感受性は  $CSB^{-/-}$  細胞よりも有意に高かった。本研究ではヌクレオチド除去修復欠損株である改良型 TK6 細胞 ( $XPC^{-/-}$  及び  $CSB^{-/-}$  細胞) を用いて代表的な環境変異原が各細胞に示す感受性の違いを指標とすることで、短期間で発がん性のメカニズムを予測するデータが得られるかを検討した。本研究では代表的な環境変異原においても、DNA 付加体形成、DNA 修復あるいはアポトーシス機構に反映した結果を本システムで再現できたと考える。したがって、本結果から、改良型 TK6 細胞は、高感度型 TK6 アッセイの陽性結果における MoA を調べるためには有用であると考えられる。



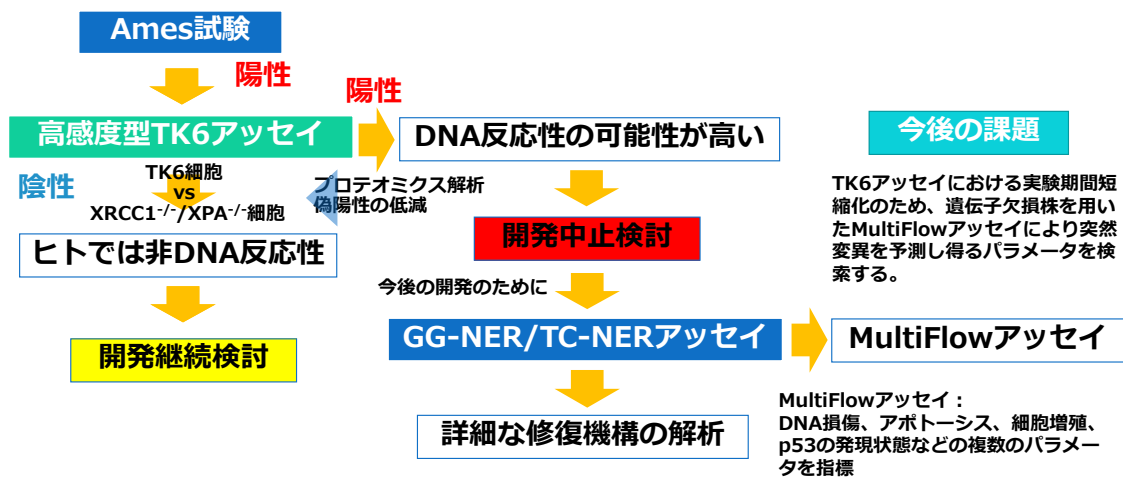


Fig. 18 Proposed schematic based on the mode of action for Ames-positive compounds

本研究より、OECD TG490 に記載された標準型 TK6 アッセイと除去修復能が欠損した遺伝子欠損株 (*XRCC1*<sup>-/-</sup>/*XPA*<sup>-/-</sup>細胞) を用いた高感度型 TK6 アッセイを組み合わせることで、DNA 反応性物質を高感度かつ特異的に検出できることを明らかにした。本研究の結果から、Ames 試験陽性物質のフォローアップから作用機序解明までを網羅した体系的なフォローアップスキームを提案する (Fig. 18)。本スキームに従えば、医薬品の遺伝毒性評価において、Ames 試験の結果が陽性を示した場合、TK6 細胞及び *XRCC1*<sup>-/-</sup>/*XPA*<sup>-/-</sup>細胞を組み合わせることで、DNA 修復能の相違に基づき Ames 試験陽性物質がヒトに対して DNA 反応性を示すか否かを評価することが可能となった。本試験法の科学的妥当性を評価するために用いた被験物質は、いずれも Ames 試験陽性物質であるが、Auramine のみがげっ歯類発がん性試験で陽性を示す。実験の結果、Auramine は標準型 TK6 アッセイで陽性を示し、かつ高感度型 TK6 アッセイではより強い突然変異誘発性を示した。本結果は、発がん性物質である Auramine

が遺伝毒性発がんの機序に基づいて、細菌及びヒトに共通して突然変異誘発性を示したこと、さらに除去修復能を完全に欠損した遺伝子欠損細胞においてより強力な遺伝毒性を示したことに意義がある。この結果は Auramine が DNA 反応性物質であることを示唆するものであり、Auramine が医薬品であれば開発中止の選択が妥当であろう。この場合、Fig. 18 のフォローアップスキームにおいては、次のステップとして Auramine の遺伝毒性や発がん性メカニズムを調べるため、ヌクレオチド除去修復系を欠損した改良型 TK6 細胞 ( $XPC^{-/-}$  及び  $CSB^{-/-}$  細胞) を用いた感受性試験を実施する。代表的な遺伝毒性発がん物質を用いた検討では、発がんメカニズムを反映した結果がえられていることから、高感度型 TK6 アッセイにおいて陽性を示す医薬品のメカニズム解明に寄与できる。開発継続が困難とはなった医薬品について、Ames 試験、高感度型 TK6 アッセイ及び改良型 TK6 細胞感受性試験の結果は今後の開発に有用な示唆を与えるものと期待される。

一方、NEDA、PPD 及び MG については、高感度型 TK6 アッセイにおいても陰性を示したことから、非 DNA 反応性とみなすことができると考える。実際に、発がん性試験と一致した結果が得られており、これらが医薬品であれば開発継続が検討されることも可能であると考えられる。本研究により、Ames 試験陽性により中断された医薬品候補化合物の再開発を促すのみならず、追加で実施する *in vivo* 遺伝毒性試験をも回避できる可能性がある。結果として動物福祉への貢献に繋がることを期待できる。現在、Ames 試験のフォローアップ試験として推奨される TGR 試験における Ames 試験陽性物質 (56 物質) との一致率は 86% である [106]。一方、TK6 アッセイにおいては、本研究では Ames 試験陽性物質 14 物質 (第 1 章 10 物質、第 2 章 4 物質) に対して 9 物質が陽性を示したため、一致率は 64% と計算された。また、高感度型 TK6 アッセイの発がん性試験との一致

率は、本研究の 4 物質に Ibrahim らの報告（遺伝毒性発がん性物質 4 物質）を合わせた 8 物質に対する一致率は 8 物質（100%）[45]であった。TK6 アッセイの Ames 試験陽性物質に対する一致率は決して高くはないが、開発が中断された医薬品をレスキューできる可能性がそれだけ高いことを示唆するものである。実際、本研究では標準型 TK6 アッセイにプロテオミクス解析を組み合わせると遺伝毒性非発がん物質 10 物質のうち 4 物質をレスキューできることが明らかとなったため、上記の Ames 試験陽性物質に対する一致率が 64%であったことは妥当であると考ええる。

これらの結果から、Ames 試験陽性物質に対する TK6 アッセイの感度は高くはないものの、高感度型 TK6 アッセイとの組み合わせにより十分フォローアップ試験として成り立つことが確認されたと考える。

### 本フォローアップスキームの限界

本研究により、標準法による TK6 アッセイ及び DNA 修復遺伝子欠損株を用いた高感度型 TK6 アッセイにおいて、Ames 試験陽性物質が陰性を示した場合、当該被験物質が DNA 反応性物質（Direct mutagen）のポテンシャルを有さないことが示唆され、またプロテオミクス解析を組み合わせることで、*in vitro* に特異的にみられる培養環境に起因した二次的な DNA 損傷が疑われた場合でもそれを除外できる可能性があるため、当該被験物質に実質的な閾値を設定でき、医薬品開発が継続できるという有用性が見出された。しかしながら、化学発がんの特徴に臓器特異性があげられることから、生体組織における複雑な生物反応を考慮した評価には、*in vivo* 試験による病理組織学検査や薬物動態のデータなどを用いて統合的に判断することが尚も重要であると考ええる。特に、特定の臓器や組織に何らかの毒性兆候を示す被験物質の場合、DNA 損傷によらない機序を介し

た化学発がんが生じる可能性も否定できない。一方で、マウスを用いた TGR 試験ではあらゆる組織の細胞における被験物質の影響を調べることができる有用性があり、本スキームの限界を補填するものである。

本研究では、発がん性や発がんメカニズムが明らかなモデル化合物を用いて、TK6 細胞を用いたフォローアップ法の有用性について評価したものであり、これを実際に新規フォローアップ評価として承認申請用の試験として導入するためには、検討する化学物質の種類や数を増やして、*in vivo* データとの比較を行いながら、さらなるデータの蓄積を行うことが必要である。これは今後の課題の一つである。

## 展望

TK6 アッセイは *in vitro* 遺伝毒性試験では長期試験に属し、その実験期間は 2 か月にも及ぶため、より簡便に突然変異を予測する手法の開発が今後の課題である。今後のさらなる深化系としては、今回開発した遺伝子欠損株を用いたマルチエンドポイントの MultiFlow アッセイ (MultiFlow アッセイは DNA 損傷、アポトーシス、細胞増殖、p53 の発現状態などの複数のパラメータを指標) は有用性が高いと考える[107]。改良型 TK6 細胞を用いた細胞毒性試験と MultiFlow アッセイを融合することで、突然変異に替わる新しいマーカーの探索は今後の重要な課題であると考えている。

## 謝辞

本稿を終えるに臨み、教育的ならびに科学的にご指導、ご鞭撻を賜りました日本大学大学院薬学研究科 環境衛生学研究室 戸塚 ゆ加里 教授に深く感謝するとともに、厚くお礼申し上げます。

また、本論文の作成にあたり、副査としてご指導、ご鞭撻を賜りました日本大学大学院薬学研究科 健康衛生学研究室 榛葉 繁紀 教授、環境衛生学研究室 加藤 孝一 教授ならびに生化学研究室 小林 俊亮 教授に心より感謝申し上げます。

本研究において、国立医薬品食品衛生研究所 副所長 本間 正充 博士を筆頭に、同変異遺伝部長 杉山 圭一 博士、同変異遺伝部 室長 安井 学 博士ならびに同変異遺伝部 鶴飼 明子 氏には遺伝毒性研究の基礎から応用までご指導、ご鞭撻を賜りましたこと深く感謝するとともに、厚くお礼申し上げます。

さらに、本研究において、遺伝子欠損株の作製及び研究のご助言にご協力、ご指導ならびにご鞭撻を賜りました千葉大学大学院 理学研究院 生物学研究部門 クロマチン代謝制御研究室 佐々 彰 博士に心より感謝申し上げます。

本研究の一部は、日本環境変異原ゲノム学会/哺乳動物試験 (MMS) 研究会で実施された「TK6 細胞を用いる共同研究」の投稿論文の結果に基づいており、本共同研究にご参加、ご協力いただき、本論文への研究成果使用のご承諾をいただいた皆様には厚くお礼申し上げます。

さらに、外部研究機関との共同研究に基づく本研究の実施についてご理解をいただきました株式会社ボゾリサーチセンター 山内 久実 社長、山内 弘 副社長、同研究所総括特別顧問・東京農工大学名誉教授 三森 国敏 博士、同研究部統括責任者 岡崎 修三 専務執行役員、同運営管理者 田村一利 常務執行役員、同営業部 堀内 収 執行役員に深く感謝申し上げます。

また、本稿の作成において、ご指導、ご鞭撻ならびに本論文のご校閲をも賜りました株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 研究部 ディレクター 濱田修一 博士に深く感謝申し上げます。

本稿の最終化に際して、品質管理の観点から詳細なご校閲を賜りました株式会社ボゾリサーチセンター 信頼性保証責任者 井筒 稔 執行役員に厚くお礼申し上げます。

そして、本研究において、株式会社ボゾリサーチセンターの受託試験業務で多忙の中、高度な実験技術でご協力、ご支援を頂きました株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 中村 真生 氏、高部 道仁 氏、佐藤 亮佑 氏、西村 諒一 氏ならびに研究部の皆様に厚くお礼申し上げます。

最後に、本論文の作成において蔭で支えてくれた家族に深く感謝します。

## 参考文献

- [1] ICH guideline S2(R1): Genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. ICH harmonised tripartite guideline. 2012.
- [2] ICH guideline M7: Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities to limit potential carcinogenic risk. ICH harmonised tripartite guideline. 2014.
- [3] Shigeki M, Akira T, Kenji T, Asako H, Kaori M, Junko T, Saori M, Etsuko F, Masayuki M, Advantages of evaluating  $\gamma$ H2AX induction in non-clinical drug development. *Genes and Environment*. 2018; 40: 10.
- [4] OECD. Test No. 488: Transgenic rodent somatic and germ cell gene mutation assays. OECD guidelines for the testing of chemicals. OECD. Paris. 2020.
- [5] Tweats D, Bourdin Trunz B, Torreele E. Genotoxicity profile of fexinidazole--a drug candidate in clinical development for human African trypanomiasis (sleeping sickness). *Mutagenesis*. 2012;27(5):523-532.
- [6] OECD. Guidance document for the use of adverse outcome pathways in developing Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA). Series on Testing & Assessment No. 260. Environment, Health and Safety. Environment Directorate. OECD. 2017.
- [7] Fujita Y, Honda H, Yamane M, Morita T, Matsuda T, Morita O. A decision tree-based integrated testing strategy for tailor-made carcinogenicity evaluation of test substances using genotoxicity test results and chemical spaces. *Mutagenesis*. 2019; 34(1): 101-109.
- [8] European Commission. SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), SCCS notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation 10th revision: SCCS; 2018.

- [9] Committee S. ScCs CS. Scientific Committee on Consumer Safety Basic Brown 17 COLIPA n ° B007. 2014.
- [10] Pfuhrer S, Pirow R, Downs TR, Haase A, Hewitt N, Luch A, Merkel M, Petrick C, Said A, Schäfer-Korting M, Reisinger K. Validation of the 3D reconstructed human skin comet assay, an animal-free alternative for following-up positive results from standard *in vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*. 2021; 36(1): 19-35.
- [11] SCCP. ADDENDUM to the SCCS's notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation, 8th revision. The SCCS adopted this Addendum on 9 April 2014 by written procedure, SCCS/1501/12. 2014.
- [12] OECD Test No. 490: *In vitro* mammalian cell gene mutation tests using the thymidine kinase gene: OECD guidelines for the testing of chemicals, OECD. Paris. 2016.
- [13] Danam RP, Howell SR, Brent TP, Harris LC. Epigenetic regulation of *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase gene expression by histone acetylation and methyl-CpG binding proteins. *Mol Cancer Ther*, 2005; 4: 61-69.
- [14] Lorge E, Moore MM, Clements J, O'Donovan M, Fellows, MD, Honma M, Kohara A, Galloway S, Armstrong MJ, Thybaud V, Gollapudi B, Aardema MJ, and Tanir JY. Standardized cell sources and recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing. *Mutat Res*. 2016; 809: 1-15.
- [15] Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability an evolving hallmark of cancer. *Nature Rev Mol Cell Biol*. 2010; 11:220-228.
- [16] Omori T, Honma M, Hayashi M, Honda Y, Yoshimura I. A new statistical method for evaluation of L5178Ytk<sup>+/-</sup> mammalian cell mutation data using microwell method. *Mutat Res*. 2002; 517:199-208.



- [17] Simpson DG and Margolin BH. Recursive nonparametric testing for dose-response relationship subject to downturns at high dose. *Biometrika*. 1986; 73:589-596.
- [18] Masuda T, Tomita M, Ishihama Y. Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. *J Proteome Res*. 2008; 7:731-740.
- [19] Adachi J, Hashiguchi K, Nagano M, Sato M, Sato A, Fukamizu K, Ishihama Y, Tomonaga T. Improved proteome and phosphoproteome analysis on a cation exchanger by a combined acid and salt gradient. *Anal Chem*. 2016; 88:7899-903.
- [20] Kirkland D, Zeiger E, Madia F, Gooderham N, Kasper P, Lynch A, Morita T, Ouedraogo G, Parra Morte JP, Pfuhler S, Rogiers V, Schulz M, Thybaud V, van Bentem J, Vanparys P, Worth A, Corviet R. Can *in vitro* mammalian cell genotoxicity test results be used to complement positive results in the Ames test and help predict carcinogenic or *in vivo* genotoxic activity? I. Reports of individual databases presented at an EURL ECVAM Workshop. *Mutat Res*. 2014; 775-776: 55-68.
- [21] Kirkland D, Zeiger, Madia F, Corviet R. Can *in vitro* mammalian cell genotoxicity test results be used to complement positive results in the Ames test and help predict carcinogenic or *in vivo* genotoxic activity? II. Construction and analysis of a consolidated database. *Mutat Res*. 2014; 775-776: 69-80.
- [22] Kirkland D, Aardema M, Henderson L, Müller L. Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens: I. sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutat Res*. 2005; 584: 1-256.
- [23] Zeiger E. Identification of rodent carcinogens and noncarcinogens using genetic toxicity tests: premises, promises, and performance. *Regul Toxicol*

Pharmacol. 1998; 28(2): 85-95. doi: 10.1006/rtp.1998.1234.

- [24] Whitwell J, Smith R, Jenner K, Lyon H, Wood D, Clements J, Aschcroft-Hawley K, Gollapudi B, Kirkland D, Lorge E, Pfuhrer S, Tanir JY, Thybaud V. Relationships between p53 status, apoptosis and induction of micronuclei in different human and mouse cell lines *in vitro*: Implications for improving existing assays. *Mutat Res.* 2015; 789-790: 7-27.
- [25] Martin CN, Beland FA, Roth RW, Kadlubar FF. Covalent binding of benzidine and n-acetylbenzidine to dna at the c-8 atom of deoxyguanosine *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Res.* 1982; 42:2678-2686.
- [26] Murata M, Kawanishi S. Mechanisms of oxidative DNA damage induced by carcinogenic arylamines. *Front Biosci.* 2011; 16:1132-1143.
- [27] Ziegler DM, Ansher SS, Nagata T, Kadlubar FF, Jakoby WB. *N*-methylation: potential mechanism for metabolic activation of carcinogenic primary arylamines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85:2514-2517.
- [28] McGregor DB, Edwards I, Roland Wolf C, Forrester LM, Caspary WJ. Endogenous xenobiotic enzyme levels in mammalian cells. *Mutat Res.* 1991; 261: 29-39.
- [29] Zanoni TB, Hudari F, Munnia A, Peluso M, Godschalk RW, Zanoni MVB, Den Hartog GJM, Bast A, Barros SBM, Maria-Engler SS, Hageman GJ, Oliveira DPD. The oxidation of *p*-phenylenediamine, an ingredient used for permanent hair dyeing purposes, leads to the formation of hydroxyl radicals: oxidative stress and DNA damage in human immortalized keratinocytes. *Toxicol Lett.* 2015; 239: 194-204.
- [30] Chao MW, Kim MY, Ye W, Ge J, Trudel LJ, Belanger CL, Skipper PL, Engelward BP, Tannenbaum SR, Woganet GN. Genotoxicity of 2,6- and 3,5-dimethylaniline in cultured mammalian cells: the role of reactive oxygen species. *Toxicol Sci.* 2012;

130:48-59.

- [31] Chao MW, Erkekoglu P, Tseng CY, Ye W, Trudel LJ, Skipper PL, et al. Intracellular generation of ROS by 3,5-dimethylaminophenol: persistence, cellular response, and impact of molecular toxicity. *Toxicol Sci.* 2014; 141: 300-313.
- [32] Hatch FT, Knize MG, Colvin ME. Extended quantitative structure-activity relationships for 80 aromatic and heterocyclic amines: structural, electronic, and hydrophobic factors affecting mutagenic potency. *Environ Mol Mutagen.* 2001; 38: 268-291. Environmental
- [33] Protection Agency. Provisional peer reviewed toxicity values for 2,6-Toluenediamine. 2005.
- [34] Morita T, Hamada S, Masumura K, Wakata A, Maniwa J, Takasawa H, Yasunaga K, Hashizume T, Honma M. Evaluation of the sensitivity and specificity of *in vivo* erythrocyte micronucleus and transgenic rodent gene mutation tests to detect rodent carcinogens. *Mutat Res.* 2016; 802: 1-29.
- [35] National Toxicology Program. Testing Status of 4-(Chloroacetyl) acetanilide 10592-P, No.223043.  
Available from: [https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/testpgm/status/ts-10592-.html?utm\\_source=direct&utm\\_medium=prod&utm\\_campaign=ntpgolinks&utm\\_term=ts-10592-p](https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/testpgm/status/ts-10592-.html?utm_source=direct&utm_medium=prod&utm_campaign=ntpgolinks&utm_term=ts-10592-p). Accessed 22 Dec 2020.
- [36] National Toxicology Program. Testing status of 2-Chloromethylpyridine hydrochloride 10738-C, No.145263, 448657, A65556, 861777, and 145263, NTP.  
Available from: [https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/testpgm/status/ts-10738-c.html?utm\\_source=direct&utm\\_medium=prod&utm\\_campaign=ntpgolinks&utm\\_term=ts-10738-c](https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/testpgm/status/ts-10738-c.html?utm_source=direct&utm_medium=prod&utm_campaign=ntpgolinks&utm_term=ts-10738-c). Accessed 22 Dec 2020.

- [37] National Toxicology Program. Testing status of 8-Hydroxyquinoline 10598-N, No. 470651, 592699, 616445, 375977, 980523, and 470651.  
Available from: [https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/testpgm/status/ts-10598-n.html?utm\\_source=direct&utm\\_medium=prod&utm\\_campaign=ntpgolinks&utm\\_term=ts-10598-n](https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/testpgm/status/ts-10598-n.html?utm_source=direct&utm_medium=prod&utm_campaign=ntpgolinks&utm_term=ts-10598-n). Accessed 22 Dec 2020.
- [38] National Toxicology Program. Testing status of 1-Nitronaphthalene 10425-R, No. 153730.  
Available from: [https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/testpgm/status/ts-10425-r.html?utm\\_source=direct&utm\\_medium=prod&utm\\_campaign=ntpgolinks&utm\\_term=ts-10425-r](https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/testpgm/status/ts-10425-r.html?utm_source=direct&utm_medium=prod&utm_campaign=ntpgolinks&utm_term=ts-10425-r). Accessed 22 Dec 2020.
- [39] National Toxicology Program. Testing status of 4-Nitro-*o*-phenylenediamine 10476-J, No. 704945, 549927, A82327, and 704945, NTP.  
Available from: [https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/testpgm/status/ts-10476-j.html?utm\\_source=direct&utm\\_medium=prod&utm\\_campaign=ntpgolinks&utm\\_term=ts-10476-j](https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/testpgm/status/ts-10476-j.html?utm_source=direct&utm_medium=prod&utm_campaign=ntpgolinks&utm_term=ts-10476-j). Accessed 22 Dec 2020.
- [40] Kirkland DJ, Aardema M, Banduhn N, Carmichael P, Fautz R, Meunier JR, Pfuhrer S. *In vitro* approaches to develop weight of evidence (WoE) and mode of action (MoA) discussions with positive *in vitro* genotoxicity results. *Mutagenesis*. 2007; 22: 161-175.
- [41] Corvi R, and Madia F. *In vitro* genotoxicity testing-Can the performance be enhanced? *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2017; 106: 600-608.
- [42] Kim WJ, Beardsley DI, Adamson AW, Brown, KD. The monofunctional alkylating agent *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine triggers apoptosis through p53-

- dependent and -independent pathways. *Toxicology and applied pharmacology*. 2005; 202, 84-98.
- [43] Fowler P, Smith K, Young J, Jeffrey L, Kirkland D, Pfuhler S, Carmichael P. Reduction of misleading ("false") positive results in mammalian cell genotoxicity assays. I. Choice of cell type. *Mutat Res*. 2012; 742: 11-25.
- [44] Honma M, Hayashi M. Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environ Mol Mutagen*. 2011; 52, 373-384.
- [45] Ibrahim MA, Yasui M, Saha LK, Sasanuma H., Honma M, Takeda S. Enhancing the sensitivity of the thymidine kinase assay by using DNA repair-deficient human TK6 cells. *Environ Mol Mutagen*. 2021; 61, 602-610.
- [46] Saha LK, Wakasugi M, Akter S, Prasad R, Wilson SH, Shimizu N, Sasanuma H, Huang SN, Agama K, Pommier Y, Matsunaga T, Hirota K, Iwai S, Nakazawa Y, Ogi T, Takeda S. Topoisomerase I-driven repair of UV-induced damage in NER-deficient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2020; 117: 14412-14420.
- [47] Caldecott KW. DNA single-strand break repair. *Experimental cell research*. 2014; 329, 2-8.
- [48] Kusakabe M, Onishi Y, Tada H, Kurihara F, Kusao K, Furukawa M, Iwai S, Yokoi M, Sakai W, Sugawara K. Mechanism and regulation of DNA damage recognition in nucleotide excision repair. *Genes and environment: the official journal of the Japanese Environmental Mutagen Society*. 2019; 41: 2.
- [49] Sugitani N, Sivley RM, Perry KE, Capra JA, Chazin, WJ. XPA: A key scaffold for human nucleotide excision repair. *DNA repair*. 2016; 44: 123-135.

- [50] Mortelmans K, Haworth S, Lawlor T, Speck W, Tainer B, Zeiger, E. Salmonella mutagenicity tests: II. Results from the testing of 270 chemicals. Environmental mutagenesis. 1986; 8: 1-119.
- [51] Oshiro Y, Piper CE, Balwierz PS, Soelter SG. Chinese hamster ovary cell assays for mutation and chromosome damage: data from non-carcinogens. Journal of applied toxicology: JAT. 1991; 11: 167-177.
- [52] Garner RC, Nutman CA. Testing of some azo dyes and their reduction products for mutagenicity using Salmonella typhimurium TA 1538. Mutat Res. 1977; 44: 9-19.
- [53] Mitchell AD, Rudd CJ, Caspary WJ. Evaluation of the L5178Y mouse lymphoma cell mutagenesis assay: intralaboratory results for sixty-three coded chemicals tested at SRI International. Environ Mol Mutagen. 1988; 12:37-101.
- [54] Imaida K, Ishihara Y, Nishio O, Nakanishi, K., and Ito, N. Carcinogenicity and toxicity tests on *p*-phenylenediamine in F344 rats. Toxicology letters. 1983;16, 259-269.
- [55] Amacher DE, Paillet SC, Turner GN, Ray VA, Salsburg DS. Point mutations at the thymidine kinase locus in L5178Y mouse lymphoma cells. II. Test validation and interpretation. Mutat Res. 1980; 72: 447-474.
- [56] Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K. Salmonella mutagenicity tests: V. Results from the testing of 311 chemicals. Environ Mol Mutagen. 1992; 19, 2-141.
- [57] Varella SD, Pozetti GL, Vilegas W, Varanda EA. Mutagenic activity of sweepings and pigments from a household-wax factory assayed with Salmonella typhimurium. Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association. 2004; 42: 2029-2035.

- [58] Tong W, Zhou C, Huang P, Ma J, Chang Y. Integration of micronucleus, comet, and Pig-a gene mutation endpoints into rat 15-day repeat-treatment studies: Proof-of-principle with Auramine O. *Mutat Res*, 2019; 846: 403072.
- [59] Parodi S, Santi L, Russo P, Albini A, Vecchio D, Pala M, Ottaggio L, Carbone A. DNA damage induced by auramine O in liver, kidney, and bone marrow of rats and mice, and in a human cell line (alkaline elution assay and SCE induction). *Journal of toxicology and environmental health*. 1982; 9: 941-952.
- [60] Clemmensen S, Jensen JC, Jensen NJ, Meyer O, Olsen P, Wurtzen G. Toxicological studies on malachite green: a triphenylmethane dye. *Archives of toxicology*, 1984; 56: 43-45.
- [61] Mittelstaedt RA, Mei N, Webb PJ, Shaddock JG, Dobrovolsky VN, McGarrity LJ, Morris SM, Chen T, Beland FA, Greenlees KJ, Heflich RH Genotoxicity of malachite green and leucomalachite green in female Big Blue B6C3F1 mice. *Mutat Res*. 2004; 561: 127-138.
- [62] Nesnow S, Argus M, Bergman H, Chu K, Frith C, Helmes T, McGaughy R, Ray V, Slaga TJ, Tennant R, Weisburger E. Chemical carcinogens. A review and analysis of the literature of selected chemicals and the establishment of the Gene-Tox Carcinogen Data Base. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res*. 1987; 185: 1-195.
- [63] Culp SJ. NTP technical report on the toxicity studies of malachite green chloride and leucomalachite green (CAS Nos. 569-64-2 and 129-73-7) administered in feed to F344/N rats and B6C3F1 mice. Toxicity report series. 2004; 1-F10.
- [64] National Toxicology Program. Bioassay of *p*-phenylenediamine dihydrochloride for possible carcinogenicity. National Cancer Institute carcinogenesis technical

report series. 1979; 174: 1-107.

- [65] National Toxicology, P. Bioassay of *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride for possible carcinogenicity. National Cancer Institute carcinogenesis technical report series. 1979; 168: 1-103.
- [66] Panandiker A, Maru GB, Rao KV. Dose-response effects of malachite green on free radical formation, lipid peroxidation and DNA damage in Syrian hamster embryo cells and their modulation by antioxidants. *Carcinogenesis*. 1994; 15: 2445-2448.
- [67] Fessard V, Godard T, Huet S, Mourot A, Poul JM. Mutagenicity of malachite green and leucomalachite green in *in vitro* tests. *Journal of applied toxicology: JAT*. 1999; 19: 421-430.
- [68] Culp SJ, Mellick PW, Trotter RW, Greenlees KJ, Kodell RL, Beland FA. Carcinogenicity of malachite green chloride and leucomalachite green in B6C3F1 mice and F344 rats. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2006; 44: 1204-1212.
- [69] Mitrowska K, Posyniak A, Zmudzki J. The effects of cooking on residues of malachite green and leucomalachite green in carp muscles. *Analytica chimica acta*. 2007; 586: 420-425.
- [70] Zanoni TB, Hudari F, Munnia A, Peluso M, Godschalk RW, Zanoni MV, den Hartog GJ, Bast A, Barros SB, Maria-Engler SS, Hageman GJ, de Oliveira DP. The oxidation of p-phenylenediamine, an ingredient used for permanent hair dyeing purposes, leads to the formation of hydroxyl radicals: Oxidative stress and DNA damage in human immortalized keratinocytes. *Toxicology letters*. 2015; 239: 194-204.



- [71] Kropachev K, Ding S, Terzidis MA, Masi A, Liu Z, Cai Y, Kolbanovskiy M, Chatgialiloglu C, Broyde S, Geacintov NE, Shafirovich V. Structural basis for the recognition of diastereomeric 5',8-cyclo-2'-deoxypurine lesions by the human nucleotide excision repair system. *Nucleic acids research*. 2014; 42: 5020-5032.
- [72] Harvengt, C. Drugs recently released in Belgium. Filgrastim--terbinafine. *Acta clinica Belgica*. 1992; 47: 217-222.
- [73] Sassa A, Kamoshita N, Kanemaru Y, Honma M, Yasui M. Xeroderma Pigmentosum Group A Suppresses Mutagenesis Caused by Clustered Oxidative DNA Adducts in the Human Genome. *PloS one*. 2015; 10: e0142218.
- [74] Sassa A, Tada H, Takeishi A, Harada K, Suzuki M, Tsuda M, Sasanuma H, Takeda S, Sugasawa K, Yasui M, Honma M, Ura K. Processing of a single ribonucleotide embedded into DNA by human nucleotide excision repair and DNA polymerase eta. *Scientific reports*. 2019; 9: 13910.
- [75] Reardon JT, Bessho T, Kung HC, Bolton PH, Sancar A. *In vitro* repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997; 94: 9463-9468.
- [76] Henderson AL, Schmitt TC, Heinze TM, Cerniglia CE. Reduction of malachite green to leucomalachite green by intestinal bacteria. *Applied and environmental microbiology*. 1997; 63: 4099-4101.
- [77] Morita R, Nakane S, Shimada A, Inoue M, Iino H, Wakamatsu T, Fukui K, Nakagawa N, Masui R, Kuramitsu S. Molecular mechanisms of the whole DNA repair system: a comparison of bacterial and eukaryotic systems. *J Nucleic Acids*.

2010; 179594.

- [78] Sassa A, Fukuda T, Ukai A, Nakamura M, Takabe M, Takamura-Enya T, Honma M, Yasui M. Comparative study of cytotoxic effects induced by environmental genotoxins using XPC- and CSB-deficient human lymphoblastoid TK6 cells. *Genes and environment: the official journal of the Japanese Environmental Mutagen Society*. 2019; 41: 15.
- [79] Kusakabe M, Onishi Y, Tada H, Kurihara F, Kusao K, Furukawa M, Iwai S, Yokoi M, Sakai W, Sugawara K. Mechanism and regulation of DNA damage recognition in nucleotide excision repair. *Genes Environ*. 2019; 41:2.
- [80] Iyama T, Wilson DM., 3rd DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*. 2013; 12: 620-636.
- [81] Scharer OD. Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013; 5.
- [82] Melis JP, Luijten M, Mullenders LH, van Steeg H. The role of XPC: implications in cancer and oxidative DNA damage. *Mutat Res*. 2011; 728:107-117.
- [83] Latini P, Frontini M, Caputo M, Gregan J, Cipak L, Filippi S, Kumar V, Velez-Cruz R, Stefanini M, Proietti-De-Santis L. CSA and CSB proteins interact with p53 and regulate its Mdm2-dependent ubiquitination. *Cell Cycle*. 2011;10: 3719-3730.
- [84] Stubbert LJ, Smith JM, McKay BC. Decreased transcription-coupled nucleotide excision repair capacity is associated with increased p53- and MLH1-independent apoptosis in response to cisplatin. *BMC Cancer*. 2010; 10: 207.
- [85] Balajee AS, Proietti De Santis L, Brosh RM, Jr, Selzer R, Bohr VA. Role of the ATPase domain of the Cockayne syndrome group B protein in UV induced apoptosis. *Oncogene*. 2000; 19: 477-489.

- [86] Krzeszinski JY, Choe V, Shao J, Bao X, Cheng H, Luo S, Huo K, Rao H. XPC promotes MDM2-mediated degradation of the p53 tumor suppressor. *Mol Biol Cell*. 2014; 25: 213-221.
- [87] Wang QE, Han C, Zhang B, Sabapathy K, Wani AA. Nucleotide excision repair factor XPC enhances DNA damage-induced apoptosis by downregulating the antiapoptotic short isoform of caspase-2. *Cancer Res*. 2012; 72: 666-675.
- [88] Yasui M, Kanemaru Y, Kamoshita N, Suzuki T, Arakawa T, Honma M. Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome. *DNA Repair (Amst)*. 2014; 15:11-20.
- [89] Phillips DH, Grover PL. Polycyclic hydrocarbon activation: bay regions and beyond. *Drug Metab Rev*. 1994; 26: 443-467.
- [90] Jeffrey AM, Weinstein IB, Jennette KW, Grzeskowiak K, Nakanishi K, Harvey RG, Autrup H, Harris C. Structures of benzo(*a*)pyrene-nucleic acid adducts formed in human and bovine bronchial explants. *Nature*. 1977; 269: 348-350.
- [91] Lin D, Kaderlik KR, Turesky RJ, Miller DW, Lay JO, Jr, Kadlubar FF. Identification of *N*-(Deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*] pyridine as the major adduct formed by the food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*] pyridine, with DNA. *Chem Res Toxicol*. 1992; 5: 691-697.
- [92] Poirier MC, True B, Laishes BA. Determination of 2-acetylaminofluoreneadducts by immunoassay. *Environ Health Perspect*. 1983; 49: 93-99.
- [93] de Waard H, Sonneveld E, de Wit J, Esveldt-van Lange R, Hoeijmakers JH, Vrieling H, van der Horst GT. Cell-type-specific consequences of nucleotide excision repair deficiencies: embryonic stem cells versus fibroblasts. *DNA Repair (Amst)*. 2008; 7: 1659-1669.

- [94] Stout GJ, Oosten M, Acherrat FZ, Wit J, Vermeij WP, Mullenders LH, Gruijl FR, Backendorf C. Selective DNA damage responses in murine *Xpa*<sup>-/-</sup>, *Xpc*<sup>-/-</sup> and *Csb*<sup>-/-</sup> keratinocyte cultures. *DNA Repair (Amst)*. 2005; 4: 1337-1344.
- [95] Christmann M, Boisseau C, Kitzinger R, Berac C, Allmann S, Sommer T, Aasland D, Kaina B, Tomicic MT. Adaptive upregulation of DNA repair genes following benzo(*a*) pyrene diol epoxide protects against cell death at the expense of mutations. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44: 10727-10743.
- [96] Fukushima S, Gi M, Kakehashi A, Wanibuchi H, Matsumoto M. Qualitative and quantitative approaches in the dose-response assessment of genotoxic carcinogens. *Mutagenesis*. 2016; 31: 341-346.
- [97] Menoni H, Wienholz F, Theil AF, Janssens RC, Lans H, Campalans A, Radicella JP, Martejijn JA, Vermeulen W. The transcription-coupled DNA repair-initiating protein CSB promotes XRCC1 recruitment to oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res*. 2018; 46: 7747-7756.
- [98] Tuo J, Chen C, Zeng X, Christiansen M, Bohr VA. Functional crosstalk between hOgg1 and the helicase domain of Cockayne syndrome group B protein. *DNA Repair (Amst)*. 2002; 1: 913-927.
- [99] Osterod M, Larsen E, Le Page F, Hengstler JG, Van Der Horst GT, Boiteux S, Klungland A, Epe B. A global DNA repair mechanism involving the Cockayne syndrome B (CSB) gene product can prevent the *in vivo* accumulation of endogenous oxidative DNA base damage. *Oncogene*. 2002; 21: 8232-8239.
- [100] Dianov G, Bischoff C, Sunesen M, Bohr VA. Repair of 8-oxoguanine in DNA is deficient in Cockayne syndrome group B cells. *Nucleic Acids Res*. 1999; 27: 1365-1368.

- [101] Klein JC, Beems RB, Zwart PE, Hamzink M, Zomer G, van Steeg H, van Kreijl CF. Intestinal toxicity and carcinogenic potential of the food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*] pyridine (PhIP) in DNA repair deficient XPA<sup>-/-</sup> mice. *Carcinogenesis*. 2001; 22: 619-626.
- [102] van der Horst GT, Meira L, Gorgels TG, de Wit J, Velasco-Miguel S, Richardson JA, Kamp Y, Vreeswijk MP, Smit B, Bootsma D, Hoeijmakers Jan HJ, Friedberg EC. UVB radiation-induced cancer predisposition in Cockayne syndrome group a (Csa) mutant mice. *DNA Repair (Amst)*. 2002; 1: 143-157.
- [103] Duc R, Leong-Morgenthaler PM. Role of p53 and mismatch repair in PhIP-induced perturbations of the cell cycle. *Journal of chromatography. B*. 2004; 802:183-187.
- [104] Mimmler M, Peter S, Kraus A, Stroh S, Nikolova T, Seiwert N, Hasselwander S, Neitzel C, Haub J, Monien BH, Nicken P, Steinberg P, Shay JW, Kain B, Fahrner J. DNA damage response curtails detrimental replication stress and chromosomal instability induced by the dietary carcinogen PhIP. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44: 10259-10276.
- [105] de Waard H, de Wit J, Andressoo JO, van Oostrom CT, Riis B, Weimann A, Poulsen HE, van Steeg H, Hoeijmakers JH, van der Horst GT. Different effects of CSA and CSB deficiency on sensitivity to oxidative DNA damage. *Mol Cell Biol*. 2004;24:7941–7948.
- [106] Morita T, Hamada S, Masumura K, Wakata A, Maniwa J, Takasawa H, Yasunaga K, Hashizume T, Honma M. Evaluation of the sensitivity and specificity of *in vivo* erythrocyte micronucleus and transgenic rodent gene mutation tests to detect rodent carcinogens. *Mutat Res*, 2016;802:1–29.
- [107] Bryce SM, Bernacki DT, Bemis JC, Dertinger SD. Genotoxic mode of action

predictions from a multiplexed flow cytometric assay and a machine learning approach. *Environ. Mol. Mutagen.* 2016; 57: 171–189.