

# 新規 *in vivo* 変異原性試験 - コメット試験の検討 -

住友化学(株) 生物環境科学研究所  
松山良子  
緒方敬子  
北本幸子  
太田美佳

## Comet Assay, a New *in vivo* Mutagenicity Test - Regulatory Significance and Scientific Development

Sumitomo Chemical Co., Ltd.  
Environmental Health Science Laboratory  
Ryoko MATSUYAMA  
Keiko OGATA  
Sachiko KITAMOTO  
Mika OOTA

A new *in vivo* mutagenicity test, *in vivo* comet assay, has gained particular world wide attention. The comet assay is a promising technique for evaluating *in vivo* DNA damage to multiple organs with high sensitivity. However, there is no validated testing guideline based on the optimized experimental techniques. Recently, to establish a standardized testing method, an international validation study for *in vivo* comet assay has begun with a view to submitting a new OECD test guideline. In this review, we describe the regulatory trends toward this assay for the evaluation of chemical mutagenicity and our investigation of this testing method.

### はじめに

化学物質の多様化ならびに需要の増加に伴い、使用される化学物質の数・種類・量は増加の一途をたどっている。これらの化学物質の中には、健康に悪影響を及ぼす化学物質も存在する。このような物質による健康被害を防止するためには、化学物質の的確な安全性評価を行い、適切に管理することが重要である。

化学物質による健康への悪影響として最も大きなものは発がん作用と次世代への遺伝的影響であろう。変異原性 (Mutagenicity) とは生物の遺伝物質であるDNAに傷害を及ぼす化学物質の作用である。傷害を直接または間接的に受けたDNAの傷が元通りに修復されないと、遺伝子の突然変異や染色体の異常を生じるが、これらは細胞がん化の引き金の一つとなっている。したがって、変異原性を有する物質は発がん物質である確率が高い。さらに、遺伝子の突然変異や染色体の異常を生じる物質は、生殖細胞においても同様の作用を現し、次世代に対して遺伝子疾患を引き起こすおそれもある。動物を用いる発がん性

や次世代への影響の有無を調べる試験は多額の費用と時間を要することから、次々に開発される全ての化学物質について、発がん性や次世代への影響を調べる試験を行うことは困難である。そのため、発がん性や遺伝的障害作用の有無が判っていない化学物質を取り扱う場合、変異原性はあらかじめ評価しておくべき毒性の一つに挙げられ、様々な化学物質の登録の際にも評価が必要とされている。変異原性試験は、化学物質の変異原性を検出する方法で、ヒトに対する発がんのリスクと次世代の遺伝子疾患のリスクを予測するために行われるものである。種々の機構で引き起こされる変異原性を検出するため、これまでに複数の *in vitro* あるいは *in vivo* の変異原性試験が開発されてきた。指標で分類すると、① 遺伝子突然変異を検出する方法、② 染色体異常を検出する方法、③ 突然変異の初期変化であるDNA損傷性を検出する方法がある。その検出には、細菌、培養細胞、実験動物がそれぞれ用いられる (Table 1)。通常これら試験のいくつかを組み合わせることで、ほとんどの変異原性物質が検出できることがわかっている。

上述したとおり各国の規制では、化学物質 (一般的

**Table 1** List of mutagenicity tests

Materials	Categories of Mutagenicity Tests		
	Gene Mutation	Chromosomal Aberration	DNA Damage & Repair
Bacteria	•Ames Test	*****	•Rec-Assay
Mammalian Cells	•HGPRT Gene Mutation Test •Mouse Lymphoma Assay	•Chromosomal Aberration Test •Sister Chromatid Exchange Assay	•Unscheduled DNA Synthesis Assay
Animals	•Spot Test •Gene Mutation Assay in Transgenic Mice	•Micronucleus Test •Chromosomal Aberration Test •Sister Chromatid Exchange Assay	•Unscheduled DNA Synthesis Assay •Comet Assay

な化学品、医薬品、農薬、防疫薬など)の安全性を確保するため、登録時に変異原性試験の結果を提出することが定められている。近年、登録のための変異原性試験の一つとして、*in vivo* コメット試験(単細胞ゲル電気泳動試験、Single cell gel electrophoresis assay : SCG)が注目されている。*in vivo* コメット試験はDNAの損傷性を検出する試験の一種であり、哺乳動物の様々な臓器から単離した細胞を用いての評価が可能である。他のDNAの損傷を検出する*in vivo* 試験と比べて、比較的操作が簡便であること、他の試験では評価臓器に限られるのに対し、様々な臓器での評価が可能であること、標的臓器のDNA損傷を感度良く検出できると期待されることから、有用性の高い試験になり得ると考えられている。

本稿では、変異原性試験における*in vivo* コメット試験の位置付け、*in vivo* コメット試験を取り巻く国際動向ならびに当研究所における*in vivo* コメット試験の検討を中心に、コメット試験の現状と課題について紹介する。

### 化学物質の変異原性評価と*in vivo* コメット試験

化学物質の遺伝物質への傷害性は、がんの発生あるいは遺伝子疾患と密接に関係している。そのため、変異原性の評価は、化学物質の開発、登録、使用において非常に重要である。特に、動物個体で変異原性を示す物質は、ヒトの正常なDNAや染色体を不可逆的に変化させてしまうおそれがあることから、EU(欧州連合)における化学物質の規制REACH(Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of CHemicals)においては、動物個体で変異原性を示す物質は、重篤なヒト健康被害を及ぼす高懸念物質の一つとして分類され、その他の国においても取り扱いが厳しく規制される。

試験ガイドラインが整備されている変異原性試験としては、細菌を用いる復帰突然変異試験(Ames試験; Ames test)、哺乳類培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験(HGPRT Gene Mutation Test、あるいは、Mouse Lymphoma Assay)ならびに染色体異常試験(Chromosomal Aberration Test)、げっ歯類(マウスやラット)を用いる小核試験(Micronucleus Test)がある。細菌や培養細胞を用いる試験(*in vitro* 試験)は、簡便で検出感度が高いため、化合物の変異原性ポテンシャルを評価するため必須の試験とされる。しかし、実際ヒトでの安全性を外挿する上では、動物個体を用いた試験(*in vivo* 試験)で化合物の変異原性が認められるかどうかということが、より重要視される。化学物質の変異原性評価においては、これらの試験結果がすべて陰性であれば変異原性がないと判断できるが、いずれか一つでも陽性結果が得られると、さらなる追加試験が要求され、その化学物質の変異原性についての総合評価が求められる。すなわち、感度の高い*in vitro* 試験で陽性の結果が得られた場合、必須試験である第一の*in vivo* 試験(通常小核試験を実施する)において陰性の結果が得られたとしても、生体にとって問題となる変異原性がないと判断するには証拠が不十分とみなされるため、この場合、第二の*in vivo* 試験を用いた評価が必要となる。

これまで第二の*in vivo* 試験としては、げっ歯類を用いる不定期DNA合成試験(UDS試験)やトランスジェニック動物を用いる遺伝子突然変異試験などが推奨されてきた。これらの試験の特徴は、EUの規制当局の一つである英国変異原性諮問委員会(UK COM; Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment)から発表された変異原性に関するガイダンス(Guidance on a strategy for testing of chemicals for mutagenicity)<sup>1), 2)</sup>によると、以下のように評価されている。

#### <UDS試験(試験ガイドライン有り)>

- ・長い利用の歴史と規制当局により妥当性の高い試験として結果を受け入れられた実績がある
- ・修復の誤りや修復されなかった結果として生じた変異原性は検出されない
- ・肝臓以外の組織の利用は限られている

#### <トランスジェニック動物を用いる遺伝子突然変異試験(試験ガイドライン無し)>

- ・十分なDNAが単離できる組織であれば、どの組織でも遺伝子突然変異を検出できる
- ・一般にDNA付加体を測定する方法よりも感度が劣る

・バリデーション（試験の妥当性評価）に関する報告が比較的少なく、組織毎の最適な試験方法が未だ確立されておらず、方法最適化には追加の検討が必要である

これまでUDS試験は第二の*in vivo*試験として最も多く用いられてきたが、肝臓以外の臓器の利用が非常に難しいこと、検出感度の点から陽性となる化合物が極めて少ないことから、UDS試験の有用性に対し一部の規制当局から疑問が投げかけられた。UDS試験の欠点を補うことができる、すなわち、各種臓器で評価でき、感度が比較的良いことが期待されることから、UDS試験に替わる試験として、*in vivo* コメット試験が急速に注目されてきた。

その一つの例として、近年の医薬品の遺伝毒性試験ガイダンスの見直しが挙げられる。2008年4月、日米EU医薬品規制調和国際会議（ICH；International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use）により、医薬品の変異原性試験および解釈に関するガイダンス案S2(R1)（Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2(R1)）<sup>3)</sup>が提案された。このガイダンス改訂案は、変異原性試験の標準的組み合わせの最適化を目的としている。改訂案における標準的組み合わせでは、オプション1およびオプション2が提案され、オプション2の第二の*in vivo*試験の一つとして、コメット試験が推奨された（Table 2）。これら二つのオプションの検出力は同等とし、どちらを選択しても良いとされている。その他、EU/REACH規制（化学物質、2007年施行）のガイダンスにおいて

**Table 2** Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2(R1) (Apr.2008 ICH)

Option 1
i. Ames Test
ii. <i>in vitro</i> Chromosome Aberration Test or <i>in vitro</i> Micronucleus Test or <i>in vitro</i> Mouse Lymphoma tk Gene Mutation Assay
iii. <i>in vivo</i> Micronuclei or <i>in vivo</i> Chromosomal Aberrations Test
Option 2
i. Ames Test
ii. <i>in vivo</i> Micronucleus Test and a second <i>in vivo</i> assay ( Comet assay, Alkaline elution assay, transgenic mouse mutation assays, DNA covalent binding assays, or UDS assay )

\* These two options for the standard battery are considered equally suitable.

も*in vivo*変異原性試験の一つとして*in vivo*コメット試験の推奨が記載されるようになった。

また、近年、動物愛護の観点より動物実験における3R（Replacement（代替） Reduce（削減） Refinement（改善））はますます重要となってきている。試験の科学的な価値およびヒトのリスク評価の価値が損なわれない範囲において、反復投与毒性試験等への*in vivo*変異原性試験の組み込み、もしくは同じ動物を使い二種類の指標の異なる*in vivo*変異原性試験の同時実施等を可能な限り行うことで、実験動物の使用数を減らすことも推奨されている。*in vivo*コメット試験は必要とする組織サンプル量がわずかであるという点で、他の*in vivo*変異原性試験、一般毒性試験への組み込みが比較的容易である。また、動物種や系統にもこだわらないためトランスジェニック試験のような特殊な遺伝子組み換え動物も不要である。*in vivo*コメット試験は動物実験の3Rの観点からも、第二の*in vivo*試験として期待されている。

今後、世界各国において、化学物質の安全性評価の一環として*in vivo*コメット試験の使用頻度がますます高まると予想される。

## コメット試験とは

コメット試験は、OstlingとJohansonが1984年に開発した、ゲルに包埋した個々の細胞のDNAを電気泳動する方法を基礎としている<sup>4)</sup>。その後、1988年にSinghらがpH13以上のアルカリ液を用いた試験法を<sup>5)</sup>、1990年にOliveらがその改変法を開発し<sup>6)</sup>、アルカリコメット試験の原型が作られた。コメット試験には中性コメット試験（Neutral Comet assay）とアルカリコメット試験（Alkaline Comet assay）がある。中性コメット試験ではpH7-8の中性条件下で電気泳動を行い、主として二本鎖DNAの切断部位、クロスリンク部位の検出が可能である。アルカリコメット試験では、pH13以上の強アルカリ下で電気泳動を行うことで、二本鎖および一本鎖のDNA切断部位、アルカリ不安定部位（Alkali-labile site）、除去修復部位（Excision-repair site）、クロスリンク部位といった多様なDNA損傷を検出することが可能である。なお、現在コメット試験と言えば後者のアルカリコメット試験を意味している。

コメット試験では次のような原理でDNA損傷を検出する。ゲルに包埋し固定した細胞に電流を通すと、マイナスに荷電したDNAは陽極に移動しようとする。このような電気泳動ではDNAは分子量が大きいほど移動しにくく、分子量が小さくなるほど移動しやすくなる。コメット試験はこの電気泳動の原理を利用して、DNA損傷を検出するものである。すなわち



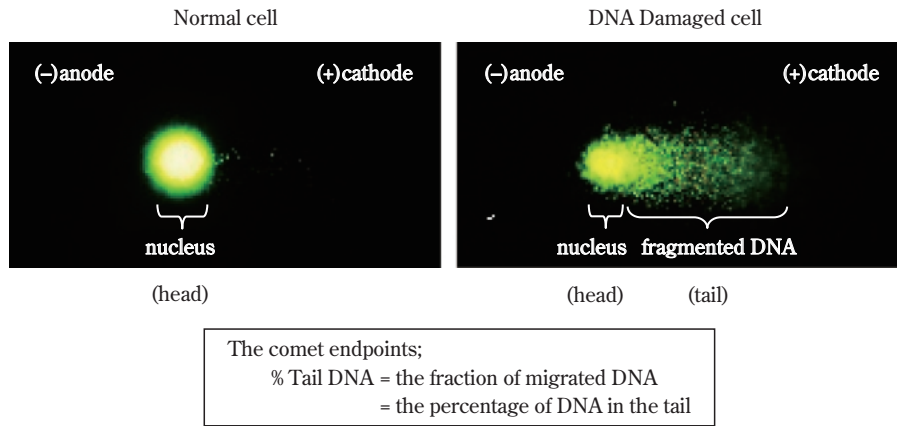


Fig. 1 Single-cell gel electrophoresis assay (Comet assay)

DNAに損傷がない場合、核のDNAは分子量が巨大であるため、ほとんど移動せず核そのままの丸い形を維持する。しかし、DNAに損傷がある場合、損傷により生じたDNA断片は大きさに応じて泳動されるため、コメット（彗星）のような像を呈する（Fig. 1）。

*in vivo* コメット試験の試験手順は、次の通りである。①化合物を動物に投与し、一定時間後、動物から目的の臓器を採取し、細胞を単離する。②細胞をアガロースゲルに包埋し、スライドガラス上に伸展する。③細胞膜を溶解し、強アルカリ下で電気泳動を行う。④DNAを蛍光染色し、蛍光顕微鏡および画像解析装置により、コメット像の蛍光強度を測定する（Fig. 2）。コメット試験の評価は、コメット像を主核部分（Head）と泳動により生じた尾部（Tail）に分け、それぞれの蛍光強度を求め、% Tail DNA（Tail intensity：コメット全体の明るさに対するTailの明るさの比率）を算出し、この値が対照群に対して有意に増加するかどうかで判定する。

*in vivo* コメット試験の利点は、細胞を単離すること

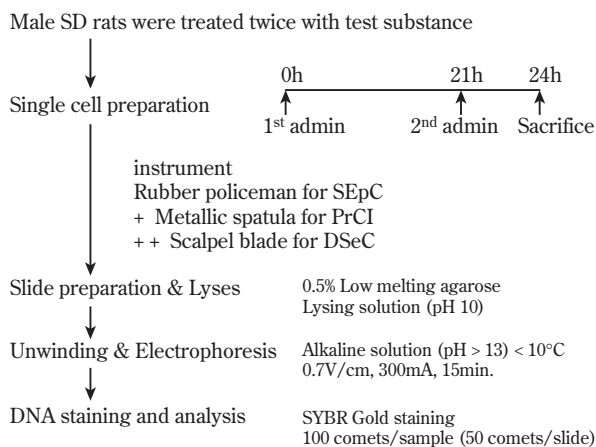


Fig. 2 Alkaline Comet assay

ができれば理論的にはあらゆる臓器を用いることが可能であること、ゲルに包埋した細胞を電気泳動する比較的簡便な方法であること、調べたい臓器のDNA損傷が感度良く検出できると期待されていること、実験動物数の削減にも貢献可能と考えられることである。

一方、問題点としては*in vivo* コメット試験に関するガイドラインは未だ制定されておらず、標準化された試験法がないことである。実施方法は各研究者に委ねられており、これまで実施されているコメット試験のデータに影響する手法のバリエーションも多く、結果の判定法も様々であった。この試験を信頼できる*in vivo* 試験として位置付けるためには、試験法の標準化が必要不可欠である。また、動物実験における3Rの観点から無駄な試験の実施をさけるためにも、統一された信頼できる試験法の確立ならびにガイドライン化が必須である。

### JaCVAM 国際バリデーション試験

*in vivo* コメット試験法の標準化の必要性が高まる中、遺伝毒性試験方法に関する国際ワークショップ（IWGTP；International Workshop on Genotoxicity Test Procedures）、コメット試験国際ワークショップ（ICAW；International Comet Assay Workshop）において、コメット試験の標準法について議論がなされた。各ワークショップにおける議論ならびに実施機関における試験法のバリエーションがTiceら（2000）<sup>7)</sup> およびHartmannら（2003）<sup>8)</sup> より報告され、*in vivo* コメット試験は標準法の確立に向け動き出した。

このような状況下、*in vivo* コメット試験国際バリデーションが日本代替法評価センター（JaCVAM；Japanese Center for Validation of Alternative Method）主催で、2006年8月に開始された。この国際バリデーション試験は以下機関の協賛を受け、実施されている。

- ・日本環境変異原学会/MMS研究会 (MMS/JEMS ; Japanese Environmental Mutagen Society/Mammalian Mutagenicity Study Group)
- ・欧州代替法評価センター (ECVAM ; European Center for the Validation of Alternative Methods)
- ・米国代替法評価センター (ICCVAM ; Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)
- ・毒性試験代替法評価センター (NICEATM ; NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods)

本国際バリデーション試験の目的は、*in vivo* コメット試験の変異原性評価能を検証し、プロトコルの標準化を行うことである。最終目標は*in vivo* コメット試験のOECD試験ガイドライン化の提案である。2008年までにバリデーション試験Phase1～3がリードラボにより実施され、試験方法・試験成立条件の検討等がなされた。さらにメインのバリデーション試験Phase4の実施へ向け、参加機関の募集が行われた。

当研究所ではEU/REACH規制や、農業、防疫薬における数年先の規制動向をにらみ、*in vivo* コメット試験の重要性に着目しており、プロアクティブに国際バリデーション試験を活用したいと考えた。国際バリデーション参加を通じて、UDS試験やトランスジェニック試験と比較して有用な試験系であるかどうか確認できること、常に最新の技術やプロトコルの入手が容易になること、さらに外部機関との人脈構築により、正確かつタイムリーな情報収集が可能となると考え、当研究所もこれに参加の意思を示した。バリデーション試験Phase4への参加要件は以下の通りであった。

- 1) GLP施設であること
- 2) コメット画像解析装置を保有すること
- 3) 5化合物以上の*in vivo* コメット試験評価経験
  - \* 3) について、*in vivo* コメットアッセイの経験が少ない機関は、以下のプレバリデーション試験を実施し、JaCVAM組織下のバリデーション運営委員会 (VMT ; Validation Management Team) へデータを提出。VMTによる審査を経て国際バリデーション試験への参加資格を取得。
  - プレバリデーション1, 2 : 陽性対照 エチルメタンスルホン酸(EMS) 2試験
  - プレバリデーション3, 4 : コード化された2化合物

しかしながら、当研究所では 1) および 2) の参加要件を満たしたが、3) の5化合物以上のコメット試験の評価経験がなかったため、プレバリデーション試験を実施した。プレバリデーション試験の実施に

あたり、腺胃を用いたコメット試験の手法についていくつか検討を行った。検討内容については次項で詳述する。検討の結果、プレバリデーション1および2 (陽性対照を用いた*in vivo* コメット試験) を実施し、溶媒対照 (SC) 群の評価基準、および、陽性対照群の評価基準を満たし、当所において問題なく*in vivo* コメット試験が実施できることを確認した (Fig. 3, 4) さらにはプレバリデーション3および4 (コード化合物を用いた*in vivo* コメット試験) のデータをVMTへ提出し、国際バリデーション試験への参加資格を取得した。

当社を含む国内外の参加機関が決定し、2009年5月よりバリデーション試験Phase4 (13機関による30-50化合物の評価) が開始された。バリデーション試験Phase4は2010年末を終了目標とし、現在進行中である。

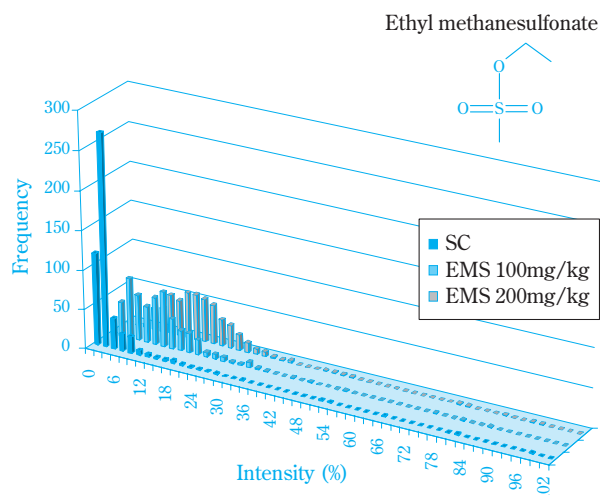


Fig. 3 DNA damage in liver induced by EMS

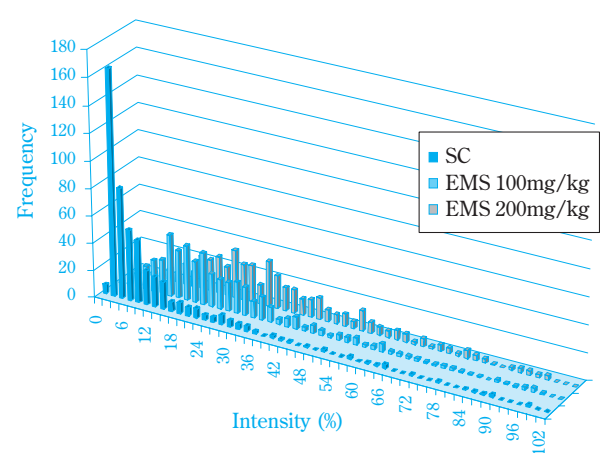


Fig. 4 DNA damage in glandular stomach induced by EMS

腺胃を用いた *in vivo* コメット試験の検討

*in vivo* コメット試験のバリデーション試験で用いられる標的器官/組織は、肝臓と腺胃である。肝臓は代謝において主要な役割をしており、化学物質の全身的影響を調べるための代表的な器官である。胃は経口投与で最初に直接化合物と接触し、化合物が比較的高濃度で存在すると考えられ、化学物質の直接作用および局所作用を調べるための代表的な器官である。この二つの器官/組織のうち、肝臓は比較的均一な細胞構造の集まりであるため、細胞の採取場所についてはあまり考慮する必要はないが、分化した細胞が層の構造をとる腺胃からコメット試験で評価すべき細胞を単離する方法について、詳細な検討がこれまでなされていなかった。

始めに腺胃組織の構造を説明する。腺胃の粘膜は食道や前胃に隣接する噴門腺、胃粘膜の主体をなす胃底腺および十二指腸に続く幽門腺粘膜より構成される (Fig. 5)。腺胃の粘膜層は大きく分けて、被覆上皮、峽部 (増殖帯)、腺部から成る。各腺の胃内腔側表面から少し深い所に位置する腺峽部の増殖帯の未分化細胞 (PrCI : Proliferating cell zone in isthmus) は、分裂増殖した後、成熟しながら胃内腔側表面の被覆上皮 (SEpC : Surface epithelial cell zone) もしくはより深い腺部 (DSeC : Differentiated secretory cell zone) へと移動する (Fig. 6)。胃粘膜細胞の寿命は、腺部 (DSeC) の壁細胞や主細胞は200日程度だが、被覆上皮細胞 (SEpC) は3日程度と考えられている。これは腺胃が粘液を出す組織であり、被覆上皮細胞は粘液とともに数日で新しい細胞に置き換えられるためである。そのため、被覆上皮細胞は細胞死 (アポトーシス) の起こった細胞を多く含む部分となる。コメット試験ではアポトーシスによるDNA切断と変異原性によるDNA損傷を区別できない。さらに、被覆上皮細胞の寿命自体が短いことから、この細胞が将来がん化する頻度は低く、変異原性の評価対象としては適切ではないと考えられる。一方、被覆上皮細胞の下層にある増殖帯の細胞は未分化で細胞分裂が盛んであることから、この細胞がDNA損傷を受けることでがん細胞のもととなりうる危険性の高い細胞と考えられる。すなわちこの未分化細胞 (PrCI) を *in vivo* コメット試験の標的細胞とすべきであると考えられた。

腺胃から被覆上皮細胞を除き、未分化細胞を単離する方法についてVMTより提示されたバリデーションプロトコールでは、各研究者の力加減や感覚に依存するところが大きく、また、この方法で実際に未分化細胞だけが採取されているのかの確認もなされていなかった。そこで、当研究所において腺胃を用

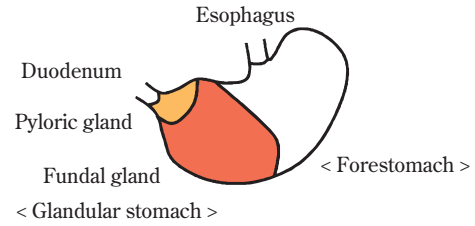
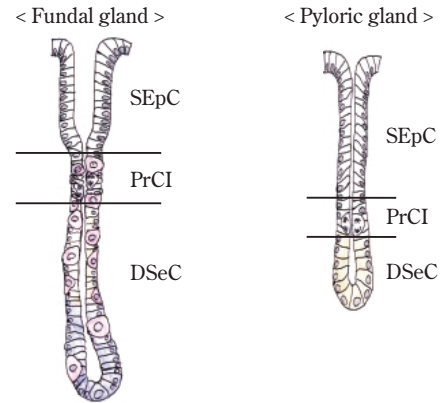


Fig. 5 Compartmentalization of rat's gastric mucosa



SEpC : Surface epithelial cell zone, containing columnar epithelial cells  
 PrCI : Proliferating cell zone in isthmus  
 DSeC : Differentiated secretory cell zone, containing differentiated secretory cells

Fig. 6 Target cells of glandular stomach

いた *in vivo* コメット試験について以下の検討を実施した。

<腺胃からの細胞採取方法検討>

まず、腺胃から目的の細胞を採取する方法を検討した。細胞採取器具として、ラバースクレーパー (IWAKI, Cell Scraper, ディッシュプレート用を使用) 金属ヘラ、メスを用いた。細胞採取器具、掻き取りの強さ・回数を変えることで腺胃のどの層まで剥離されているか検討を行った。剥離層の確認は、掻き取り後の組織を用いて病理標本作製し、病理組織学的検査により行った。その結果、ラバースクレーパーのみを用いて掻き取りを行った場合、掻き取りの強さ・回数を増やしても、粘膜表面にある被覆上皮細胞 (SEpC) は剥離されるが、増殖帯の未分化細胞はほとんど剥離されないことが判明した。そこで、ラバースクレーパーを用いて被覆上皮細胞をきれいに除去した後、さらに金属ヘラを用いて掻き取りを行った。この方法により目的の細胞である未分化細胞 (PrCI) のみを剥離することができた。また、ラバースクレーパーと金属ヘラで掻き取りを行った後、メスを用いて掻



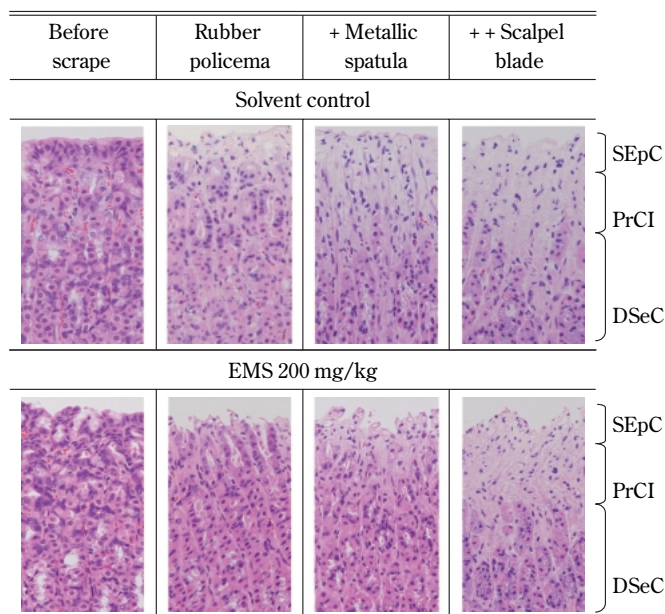


Fig. 7 Histopathological analysis -Fundal gland

き取りを行うと、増殖帯の下層の腺部 (DSeC) を剥離できた (Fig. 7)。

<腺胃の各層の細胞を用いた *in vivo* コメット試験>

細胞採取器具の検討により、被覆上皮細胞 (SEpC)、増殖帯の未分化細胞 (PrCI)、増殖帯下層腺部の細胞 (DSeC) をそれぞれ採取することができたため、目的の細胞である増殖帯の未分化細胞と目的外の細胞でのコメット試験評価への影響について検討を実施した。被験物質には陽性対照であるEMSを用い、同じ動物から胃底腺の被覆上皮細胞、増殖帯の未分化細胞、増殖帯下層腺部の細胞懸濁液をそれぞれ調製し、コメット試験により細胞層毎のDNA損傷性の比較を行った。その結果、溶媒対照群はDNAが損傷を受けていないにも関わらず、被覆上皮細胞の% Tail DNA値は未分化細胞、腺部の細胞と比較して高い値を示した。これは、被覆上皮細胞は細胞死 (アポトーシ

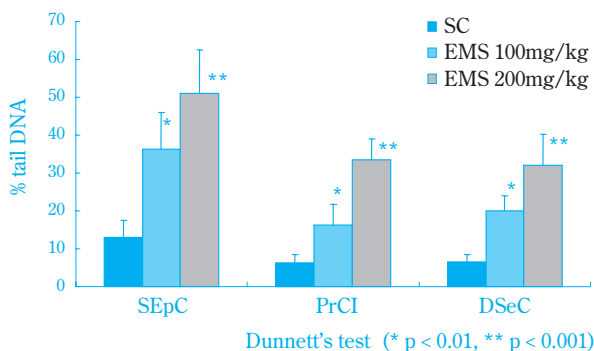


Fig. 8 DNA damage of the layers in fundal glands induced by EMS

ス) を起こした細胞を多く含んでいるため、DNAが化合物による損傷を受けていなくても、アポトーシスによるDNAの断片化が起きているためと考えられる。また、陽性対照群はいずれの細胞を用いた場合でも、溶媒対照群に対して有意な増加が認められ、用量依存性も認められた。なお、陽性対照群の増加の割合はいずれの細胞でも大差はなかった (Fig. 8)。

<胃底腺および幽門腺を用いた *in vivo* コメット試験>

腺胃は、噴門腺、胃底腺および幽門腺より構成される。*in vivo* コメット試験のパリデーショナルプロトコルでは、胃底腺および幽門腺を区別せずに腺胃細胞を採取する。発がん物質に対する感受性は胃底腺より幽門腺の方が高いという報告<sup>9)</sup>があったことから、胃底腺および幽門腺のそれぞれから増殖帯の未分化細胞を採取し、*in vivo* コメット試験評価への影響を検討した。幽門腺についても、ラバースクレーパーにより被覆上皮細胞を剥離後、金属ヘラにより増殖帯の未分化細胞を剥離した。幽門腺における剥離層の確認は、掻き取り後の組織を用いて病理標本作製し、病理組織学的検査により行った (Fig. 9)。

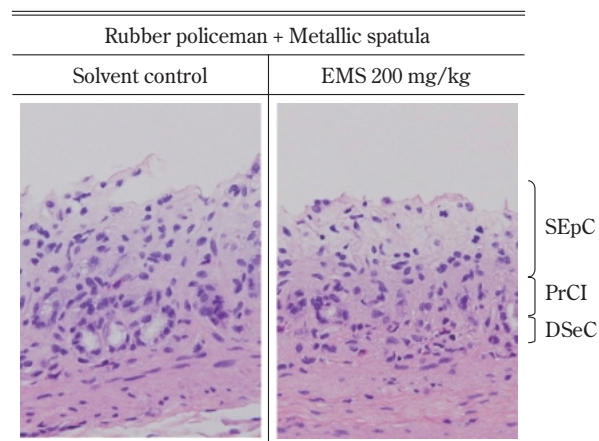


Fig. 9 Histopathological analysis -Pyloric gland

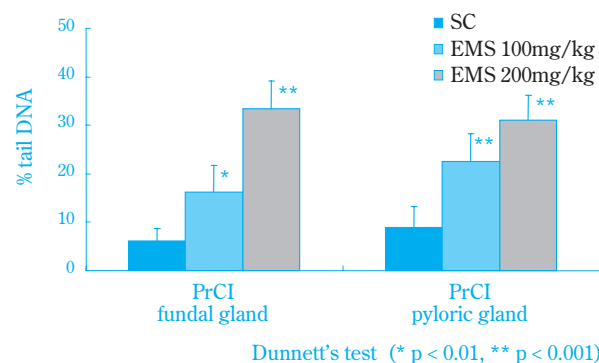
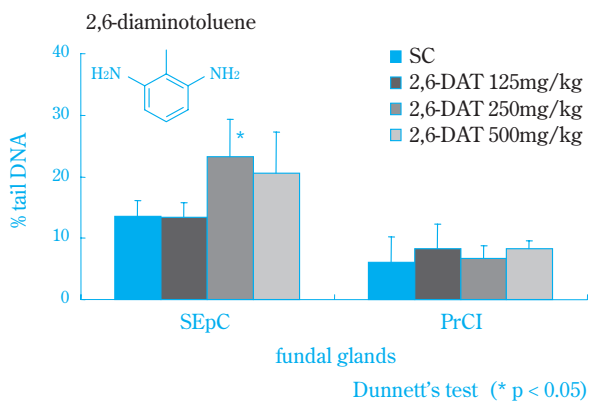


Fig. 10 DNA damage in the fundal gland and the pyloric gland induced by EMS

その結果、胃底腺および幽門腺の溶媒対照群、陽性対照群の% Tail DNA値は同程度であり、DNA損傷性の違いは認められなかった (Fig. 10)。

#### < 2,6-DATを用いた *in vivo* コメット試験 >

陽性対照EMSを用いた検討結果から、被覆上皮細胞は未分化細胞と比較して、溶媒対照群、陽性対照群ともに% Tail DNA値が高値を示すことが明らかとなった。これは被覆上皮細胞が胃内腔側表面に位置することや、アポトーシスを起こした細胞を多く含んでいることが関係していると考えられる。被覆上皮細胞が評価に用いられた場合、試験の感受性や結果に影響を及ぼす懸念がある。そこで、明らかな陽性を示すEMS以外の化合物では試験の感受性にどのような影響を及ぼすかを調べるため、さらに被覆上皮細胞と未分化細胞を用いて検討を行った。被験物質は2,6-DAT (2,6-diaminotoluene、Cas No. 823-40-5)を用いた。2,6-DATのこれまで得られている知見では、多くの *in vitro* 変異原性試験は陽性であるが、ほとんどの *in vivo* 変異原性試験は陰性で、発がん性は認められていない。また、2,6-DATの *in vivo* コメット試験についてSekihashiら (2002)<sup>10)</sup>による報告では、ラットおよびマウスの臓器 (胃、大腸、肝、腎、膀胱、肺、脳、骨髄) のいずれにおいても有意な増加は認められていない。そこで被覆上皮細胞および未分化細胞を用いた *in vivo* コメット試験を行った結果、増殖帯の未分化細胞では2,6-DAT投与群と溶媒対照群とで有意な変化は認められなかったが、被覆上皮細胞では2,6-DAT投与群 (250mg/kg) において溶媒対照群と比較して有意な増加が認められた (Dunnnett's test, 片側,  $p < 0.05$ ) (Fig. 11)。被覆上皮細胞はアポトーシスの起こった細胞を多く含むため、アポトーシス細胞含量のふれが結果に影響し、偶発的に有意差がついたものかもしれない。あるいはこの結果は、胃表面にある被覆上皮細胞では、2,6-DATの影響でDNA



**Fig. 11** DNA damage of the layers in fundal gland induced by 2,6-DAT

損傷が起きていることを示唆するものかもしれない。しかし、たとえ被覆上皮細胞でDNA損傷が生じていたとしても、この細胞の寿命は3日程度であり、細胞のターンオーバーが早いことを考慮すると、将来このDNA損傷が発がんにつながるとは考えにくい。発がん性のスクリーニングを目的とし、胃を用いて化合物の変異原性を調べる上では、DNA損傷をうけることでがん細胞となりうる確度の高い未分化細胞を用いることが適切と考える。実際、2,6-DATには発がん性は認められておらず、被覆上皮細胞のコメット試験結果より、DNA損傷が認められなかった未分化細胞のコメット試験結果の方が発がん性試験結果と関連していると考えられる。2,6-DATは一例ではあるが、目的外の被覆上皮細胞が混入すると正しい結果の得られない場合のあることを示唆している。適切な細胞を用いることで、発がん性のスクリーニングという試験の意義だけでなく、国際バリデーションにおいても精度の向上に寄与し、試験系の信頼性向上にもつながると考える。当研究所における検討により、被覆上皮細胞を除き、増殖帯の未分化細胞を採取する方法を確立したことは、今後の *in vivo* コメット試験の有用性を確認していく上でも意義深いと考える。

#### おわりに

変異原性を有する化学物質はDNAの構造や機能に直接あるいは間接的に影響を与え、その結果、DNA損傷やDNA修復、遺伝子の突然変異や染色体異常を引き起こす。遺伝子突然変異や染色体異常は、発がんや催奇形性等、様々な疾病を引き起こす引き金となる。化学物質の変異原性の評価において、*in vivo* コメット試験は、これまで第二の *in vivo* 試験として最も多く実施されてきた不定期DNA合成試験 (UDS試験) に替わる試験として、注目が高まっている。EUではすでに化合物の登録に *in vivo* コメット試験のデータ要求を行っている規制当局もあり、各国の規制当局も *in vivo* コメット試験の有用性に注目するようになってきた。 *in vivo* コメット試験を第二の妥当な *in vivo* 試験として定着させるために、試験法の最適化ならびに標準化が必要不可欠である。今後、 *in vivo* コメット試験の有用性が確認され、OECD試験ガイドライン化されると、これまで以上に規制当局からのデータ要求が増えると予想される。

当研究所では、規制動向をすばやく感知し、OECDガイドライン化を視野に入れた *in vivo* コメット試験国際バリデーション試験の参加の機会を捉え、プレバリデーション試験を行い、背景データを蓄積した。また、試験方法の最適化のため、腺胃細胞の採取方法について検討を行い、最も適切な部位と考えられ



る増殖帯の未分化細胞の採取法を確立した。当研究所では、2009年から開始されたコメット試験国際バリデーション試験へ参画するとともに、今後の世界的な動向に着目し、*in vivo* コメット試験の変異原性評価能を適切に検証していきたいと考える。

## 引用文献

- 1) Committee on mutagenicity of chemicals in food, consumer products and the environment (COM), "UK COM Guidance on a strategy for testing of chemicals for mutagenicity", (2000).
- 2) 浅野間 光治, 荒木 春美, 大澤 浩一, 中井 康晴, 林 宏行, 若田 明裕, 森田 健, *Environ. Mutagen Res.*, 25, 45 (2003).
- 3) International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH), "Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2(R1)", (2008).
- 4) O. Ostling and K. J. Johanson, *Biochem Biophys Res Commun.*, 123 (1), 291 (1984).
- 5) N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice and E.L. Schneider., *Exp Cell Res.*, 175 (1), 184 (1988).
- 6) P.L. Olive, J.P. Banáth and R.E. Durand, *Radiat Res.*, 122 (1), 86 (1990).
- 7) R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.-C. Ryu and Y. F. Sasaki, *Environ Mol Mutagen.*, 35 (3), 206 (2000).
- 8) A. Hartmann, E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, A. Smith, G. Speit, V. Thybaud and R R Tice, *Mutagenesis*, 18 (1), 45 (2003).
- 9) 伊東 信行 (編著) "最新 毒性病理学", 中山書店 (1994), p. 127.
- 10) K. Sekihashi, A. Yamamoto, Y. Matsumura, S. Ueno, M. Watanabe-Akanuma, F. Kassie, S. Knasmüller, S. Tsuda and Y.F. Sasaki, *Mutat Res.*, 517 (1-2), 53 (2002).

## PROFILE



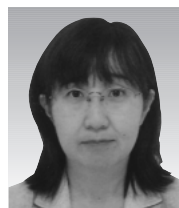
松山 良子  
*Ryoko MATSUYAMA*  
住友化学株式会社  
生物環境科学研究所  
研究員



北本 幸子  
*Sachiko KITAMOTO*  
住友化学株式会社  
生物環境科学研究所  
主席研究員



緒方 敬子  
*Keiko OGATA*  
住友化学株式会社  
生物環境科学研究所  
研究員



太田 美佳  
*Mika OOTA*  
住友化学株式会社  
生物環境科学研究所  
主席研究員