

博士論文

薬物代謝の種差及び個人差が医薬品の
遺伝毒性評価に及ぼす影響に関する研究

2020年3月

岸野有紀

Effect of species and interindividual differences
in drug-metabolism on the evaluation of
drug-induced genotoxicity in human

March 2020

Yuki Kishino

略語表

| | |
|---------------------------------------|---|
| anti-BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide | anti-benzo[<i>a</i>]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide |
| BaP | benzo[<i>a</i>]pyrene |
| BaP-7,8-dihydrodiol | benzo[<i>a</i>]pyrene-7,8-dihydrodiol |
| BaP-epoxide | benzo[<i>a</i>]pyrene-epoxide |
| BNF | 5,6-benzoflavone |
| CPA | cyclophosphamide |
| CHL | Chinese hamster lung cell line |
| DMSO | dimethyl sulfoxide |
| G6P·Na ₂ | D- glucose 6-phosphate disodium salt |
| HEPES | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid |
| HTCR | Human Tissue and Cell Research |
| ICH | International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use |
| KCl | potassium chloride |
| 4-keto-CPA | 4-keto-cyclophosphamide |
| LC-MS/MS | liquid chromatography–tandem mass spectrometer |
| 3-MC | 3-methylcholanthrene |
| MCD | 7-methoxycoumarin <i>O</i> -demethylase |
| MgCl ₂ | magnesium chloride |
| NADP·Na | nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt |
| NaHCO ₃ | sodium hydrogen carbonate |
| NTP | National Toxicology Program |
| 9-OH-BaP | 9-hydroxybenzo[<i>a</i>]pyrene |
| OH-BaP-epoxide | hydroxybenzo[<i>a</i>]pyrene-epoxide 1 |
| <i>o</i> -HPA | <i>o</i> -hydroxyphenylacetaldehyde |
| 4-OH-CPA | 4-hydroxycyclophosphamide |
| <i>o</i> -HPAA | <i>o</i> -hydroxyphenylacetic acid |
| PB | phenobarbital |
| PBS | phosphate-buffered saline |
| PCD | 7-propoxycoumarin <i>O</i> -depropylase |
| PhIP | 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i>]pyridine |
| RVC | relative number of viable cells |
| SD | Sprague–Dawley |
| TCRM | Tissue and Cell Research Center Munich, Daiichi Sankyo Europe, GmbH |
| UPLC/TOFMS | ultra-high performance liquid chromatography time-of-flight mass spectrometer |

目次

| | |
|---|----|
| 緒言..... | 1 |
| 第一章 薬物代謝酵素誘導薬による肝 S9 の薬物代謝能の変動と in vitro 小核試験結果に及ぼす影響..... | 8 |
| 第一節 小序..... | 8 |
| 第二節 実験材料及び方法..... | 11 |
| 第三節 実験結果..... | 16 |
| 第四節 考察..... | 23 |
| 第二章 遺伝毒性物質の小核誘発能に対する感受性と薬物代謝の種差..... | 28 |
| 第一節 小序..... | 28 |
| 第二節 実験材料及び方法..... | 29 |
| 第三節 実験結果..... | 32 |
| 第四節 考察..... | 41 |
| 第三章 ヒト肝シトクロム P450 活性と cyclophosphamide の小核誘発能に対する感受性の個人差..... | 44 |
| 第一節 小序..... | 44 |
| 第二節 実験材料及び方法..... | 45 |
| 第三節 実験結果..... | 50 |
| 第四節 考察..... | 66 |
| 総括..... | 68 |
| 発表論文..... | 70 |
| 謝辞..... | 71 |
| 引用文献..... | 72 |

緒言

医薬品開発における非臨床安全性評価の現状と課題

医薬品候補化合物の非臨床安全性評価では、培養細胞や実験動物を用いた非臨床安全性試験を実施し、化合物がもつ毒性の質及び用量相関を明らかにするとともに、ヒトへの外挿性を評価し、ヒトにおける副作用発現リスクを評価及び予測する。更に、非臨床安全性試験結果は、臨床試験における初回投与用量、増量計画、及び投薬中止基準等の試験概要の決定に寄与する。医薬品の非臨床安全性評価方法は、過去の薬害事件、臨床試験における事故、あるいは疫学調査で判明したヒトに対する有害事象等をきっかけに構築及び改良されてきた。これら事件や事故の原因解明と再発防止への取り組みの結果、科学的及び倫理的に適切と考えられる安全性試験実施の指針として、医薬品開発における安全性試験実施に関するガイドライン [International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Safety (S)] が策定されている。

現在の非臨床安全性試験において、動物モデルで認められた毒性所見の約 70%が臨床試験におけるヒト有害事象と一致する (Olson et al., 2000)。一方、臨床試験におけるヒト有害事象が予測不能であった偽陰性及び非臨床安全性試験でみられた毒性所見が臨床試験においてみられない偽陽性がそれぞれ 30%みられるが、その原因としては、薬物代謝又は薬理学的感受性の動物種差の他、動物モデルにおける投与量及び投与期間の不十分さが指摘されている (Olson et al., 2000)。従って、医薬品開発における非臨床安全性試験において、これら偽陰性及び偽陽性を低減し、ヒトにおける有害事象の予測精度を向上させることは重要である。これらを達成するためには、非臨床安全性試験で用いるモデルの改良或いは評価技術の向上が重要な課題である (Sistare and DeGeorge, 2007; Campion et al., 2013)。

医薬品候補化合物の遺伝毒性評価法の現状と課題

遺伝毒性とは、外来性の化学物質、紫外線や電離放射線等の物理的要因、及び活性酸素等

により、DNA 又は染色体の構造及びそれらの量を変化させる性質である。化学物質等により直接 DNA が損傷されると、生体防御反応として DNA の修復が引き起こされる。修復が正常に行われると DNA は元の状態に戻るが、修復が正常に行われず DNA 損傷が残存すると、それを引き金に一過性の染色体異常又は小核が形成される。

小核は、染色体の損傷、欠失、切断などにより生じた染色体の断片が、細胞分裂時に二つの娘核に取り込まれず、細胞質に残存することにより形成される。異常な染色体又は小核を有する細胞は通常はアポトーシス等の生体防御反応により排除されるが、排除されなかった細胞には非可逆的な遺伝子突然変異又は染色体異常が生じる。

これら DNA 損傷、染色体異常及び小核形成、並びに遺伝子突然変異が生じると、体細胞ではがん化の引き金（発がんイニシエーション作用）、生殖細胞では次世代への遺伝的障害の原因となりうる。従って、医薬品開発における遺伝毒性評価は、医薬品候補化合物の発がんリスク及び次世代に対する遺伝的障害リスクの検出において極めて重要である。これらの遺伝毒性の評価に関しては、Ames らが細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）法を開発し、げっ歯類に腫瘍を誘発する化合物（発がん物質）の遺伝毒性を高感度に検出できることを報告した（Ames, et al., 1973）。これ以降、遺伝毒性の検出が発がん作用の予測に有用であることが知られるようになり、DNA 損傷及び修復、染色体の損傷、組換え、及び数的変化、小核形成、遺伝子突然変異などを指標とする複数の遺伝毒性試験が考案及び開発されてきた（Klaassen ed., 2018; OECD 2019）。代表的な遺伝毒性試験を Table 1 に示す。これら遺伝毒性試験のうち、細菌を用いる Ames 試験は抗菌薬や細菌生育を阻害する化合物の評価には不適切であるため、これら化合物の評価には、ほ乳類培養細胞を用いる *in vitro* 試験が有用である。更に、生体内に取り込まれた化合物は、吸収、分布、代謝、排泄の影響を受けるため、*in vitro* 試験に加えて *in vivo* 試験の実施が重要である。これらの知見から、

Table 1 Summary of genotoxicity studies for safety assessment in human

| 試験系 | 試験名 | 評価項目 |
|--------------------------|----------------------------------|--------------------|
| In vitro | 単細胞ゲル電気泳動試験（コメットアッセイ） | DNA 損傷 |
| | 不定期 DNA 合成試験 | DNA 修復 |
| | Umu 試験 | DNA 修復 |
| | 細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験） | 遺伝子突然変異 |
| | 哺乳類培養細胞を用いる HPRT, Xprt 遺伝子突然変異試験 | 遺伝子突然変異 |
| | マウスリンフォーマチミジンキナーゼ試験 | 遺伝子突然変異 及び染色体異常 |
| | 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験 | 染色体異常 |
| | 哺乳類培養細胞を用いる小核試験 | 染色体異常 |
| | 哺乳類培養細胞を用いる姉妹染色分体交換試験 | 染色体異常 |
| | In vivo | 哺乳類アルカリコメットアッセイ |
| げっ歯類の肝臓における不定期 DNA 合成試験 | | DNA 修復 |
| トランスジェニック動物を用いる遺伝子突然変異試験 | | 遺伝子突然変異 |
| げっ歯類の赤血球を用いる小核試験 | | 染色体異常 |
| げっ歯類の骨髄細胞を用いる小核試験 | | 染色体異常 |
| げっ歯類の骨髄細胞を用いる染色体異常試験 | | 染色体異常 |
| げっ歯類の精原細胞を用いる染色体異常試験 | | 染色体異常 |
| マウス転座試験 | | 染色体異常 |

医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンス [ICH S2(R1)] では、医薬品候補化合物の遺伝毒性評価のための組み合わせ試験として、in vitro 遺伝毒性試験 [細菌を用いる復帰突然変異 (Ames) 試験及び哺乳類培養細胞を用いる細胞遺伝学的試験 (染色体異常試験、マウスリンフォーマチミジンキナーゼ試験或いは小核試験)、及びげっ歯類を用いる in vivo 遺伝毒性試験 (げっ歯類の骨髄細胞を用いる小核試験或いは染色体異常試験)] の実施が推奨されている [ICH S2(R1), 2011]。これは、一つの試験で全てのメカニズムの遺伝毒性物質を検出することは不可能なため、上記の試験を組み合わせることにより、医薬品候補化合物の遺伝毒性を総合的に評価し、偽陰性が生じる可能性を低下させるように設定されている。

これら試験のうち、各 in vitro 遺伝毒性試験の発がん予測精度を評価したところ、げっ歯

類に腫瘍を誘発する化合物(発がん物質)を陽性と判定する sensitivity は、Ames 試験で 60.3% (541 化合物中 326 化合物を検出 : 326/541)、染色体異常試験で 80.9% (245/352)、マウスリンフォーマチミジンキナーゼ試験で 80.8% (198/245)、小核試験で 80.9% (72/89) であった (Kirkland, 2005)。また、Ames 試験と染色体異常試験の組み合わせによって sensitivity は 84.1% (407/484)、Ames 試験とマウスリンフォーマチミジンキナーゼ試験の組み合わせで 92.2% (402/436)、Ames 試験と小核試験の組み合わせで 97.0% (361/372)、更に 3 試験を組み合わせると 96.0% (452/471) と増加することが報告された (Kirkland et al., 2005)。また、DNA への直接作用を評価する試験や DNA 傷害を検出するコメットアッセイなどの組み合わせで、更に遺伝毒性物質の検出感度が向上することが報告されている (Brambilla and Martelli, 2004)。なお、in vitro 遺伝毒性試験の組み合わせでも偽陰性を示す化合物の多くは、phenobarbitone 等の肝における代謝酵素誘導作用、clofibrate や bezafibrate 等のペルオキシソーム増殖作用や diethylstilbestrol や estradiol 等のホルモン作用を有するなど遺伝毒性以外のメカニズムでげっ歯類に腫瘍を誘発する化合物(非遺伝毒性発がん物質)であった (Kirkland et al., 2005)。

一方、げっ歯類では腫瘍が誘発されない化合物(非発がん物質)を in vitro 遺伝毒性試験で陰性と判定する specificity は、Ames 試験で 73.9% (130/176)、染色体異常試験で 44.9% (61/136)、マウスリンフォーマチミジンキナーゼ試験で 39.0% (41/105)、小核試験で 30.8% (8/26) であり、Ames 試験と比較して、in vitro 細胞遺伝学的試験(染色体異常、マウスリンフォーマチミジンキナーゼ試験、及び小核試験)で 50%未満と低く、特に小核試験で高頻度に偽陽性が生じることが指摘されている (Kirkland et al., 2005, 2007; Thybaud et al., 2007)。

化合物の遺伝毒性発現における代謝活性化の重要性と課題

遺伝毒性物質の中には直接 DNA に作用する直接的遺伝毒性物質と、生体内で代謝を受けて DNA に反応する間接的遺伝毒性物質があるが、一般には後者が多いことが知られている

(Ames et al., 1973; Paolini et al., 1997)。しかし、*in vitro* 遺伝毒性試験に用いる細菌又は細胞の薬物代謝能は欠如していたり低かったりするために、間接的遺伝毒性物質の評価が困難な場合がある。この欠点を補うため、薬物代謝酵素誘導薬を投与した動物の肝由来の試料を代謝活性化の酵素源として添加し（代謝活性化系）、間接的遺伝毒性物質の検出感度を高めている (Ames et al., 1973; Paolini et al., 1997)。

前述したように *in vitro* の細胞遺伝学試験では陽性結果が得られる頻度が高く、*in vivo* 遺伝毒性試験における陰性結果と一致しない場合が多い (Kirkland et al., 2005, 2007; Thybaud et al., 2007)。これら *in vitro* と *in vivo* 遺伝毒性試験の結果の相違は、種々の要素によって生じていると考えられるが、*in vitro* 及び *in vivo* における薬物代謝の差異が主要因であると考えられている (Ku et al., 2007)。また、*in vitro* 遺伝毒性試験では薬物代謝酵素誘導薬を投与したラットの肝由来試料が代謝活性化のために汎用されているが、薬物代謝には種差があることが知られている (Martignoni et al., 2006)。従って、医薬品候補化合物のヒト及び実験動物における薬物代謝の種差が遺伝毒性の発現に及ぼす影響を明らかにし、ヒトへの外挿性を考慮した遺伝毒性評価及び発がん性予測をすることが肝要である。更に、ヒトの薬物代謝能には大きな個人差があることが報告されており (Tracy et al., 2016)、医薬品候補化合物の遺伝毒性に加え、患者の遺伝毒性物質に対する感受性を規定する要因を臨床試験前に明らかにすることは非臨床安全性評価において重要な課題である。

本研究の目的

以上の知見を踏まえ、本研究では、現在の遺伝毒性評価方法の課題を克服し、医薬品候補化合物のヒトに対する遺伝毒性評価及び発がん性予測を適切に実施する方法の確立を目的に、*in vitro* 遺伝毒性試験の中でも上述した様に特に偽陽性が高い小核試験に焦点をあて、研究を行った。

In vitro 小核試験とは、被験物質曝露中或いは曝露後に、細胞周期のうち、DNA 合成準備

期、DNA 合成期、及び分裂準備期にある細胞の細胞質内における小核を検出する試験法である。また、小核試験は試験操作が簡便で、短期間に多くの化合物を評価することが可能であるため、近年 *in vitro* 細胞遺伝学的試験として汎用されている。

第一章では、*in vitro* 小核試験において高頻度に生じる偽陽性の主要因を明らかにすることで、*in vitro* 小核試験結果を適切に解釈し、誤った陽性判定を回避できると考えた。そこで、*in vitro* 遺伝毒性試験で汎用されるラット肝試料における薬物代謝能の薬物代謝酵素誘導薬投与に伴う変動とその *in vitro* 小核試験結果への影響を評価した。肝試料には肝ホモジネートの 9000 × g 上清画分（肝 S9）で細胞質と小胞体に局在する代謝酵素を含むものを用いた。薬物代謝酵素誘導薬を投与したラット肝 S9 の薬物代謝能の変動はシトクロム P450（CYP）の総タンパク含量、アルコキシル化された coumarin の脱アルキル化活性を指標とした薬物代謝酵素活性、及び各 CYP 分子種のタンパク質発現量により評価した。更に薬物代謝酵素誘導薬の処置及び無処置のラット肝 S9 を用いて *in vitro* 小核試験を実施し、結果の差異が薬物代謝酵素誘導に起因するか否かを調べた。被験物質は様々な CYP 分子種で代謝され、代謝活性化した状態で *in vitro* 細胞遺伝学的試験で陽性となる間接的遺伝毒性物質を選択した。

第二章では、*in vitro* 小核試験結果のヒトへの外挿性を高めるため、遺伝毒性物質に対する感受性と薬物代謝の種差の関連性を明らかにすることで、ヒトにおける遺伝毒性評価のために最適な代謝活性化系の選択が可能になると考えた。そこで、非臨床安全性試験で用いられる実験動物（ラット、マウス、イヌ、及びサル）由来の肝 S9、及びヒト由来の肝 S9 を代謝活性化のために試験系に添加し、*in vitro* 小核試験を実施した。被験物質は、様々な CYP 分子種で代謝され、且つ活性代謝物が *in vitro* 細胞遺伝学的試験で陽性を示す化合物を選択した。また、遺伝毒性発現に種差がみられた化合物については、各動物種の肝 S9 で生じた遺伝毒性代謝物を同定した。

第三章では、*in vitro* 遺伝毒性試験のヒトへの外挿性を高めるため、遺伝毒性物質に対する

る感受性と薬物代謝の個人差が遺伝毒性試験結果に及ぼす影響を明らかにすることで、多様性のあるヒトにおける遺伝毒性評価に最適な代謝活性化系の選択が可能になると考えた。そこで、複数ドナーから摘出した肝ミクロソームを代謝活性化系として用いて、複数の CYP 分子種が代謝に寄与する遺伝毒性発がん物質である cyclophosphamide (CPA) の *in vitro* 小核試験を実施した。また、肝ミクロソームの CYP 活性を測定するとともに、CPA の遺伝毒性代謝物及び触媒する代謝酵素を同定した。

最後に、本研究で得られた知見を基に、現在の遺伝毒性評価方法の課題を克服し、ヒトに対する適切な遺伝毒性評価及び発がん性予測をする新たな手法を提唱した。

第一章 薬物代謝酵素誘導薬による肝 S9 の代謝能の変動と *in vitro* 小核試験結果に及ぼす影響

第一節 小序

医薬品開発における *in vitro* 細胞遺伝学試験では陽性結果が得られる頻度が高く、*in vivo* 遺伝毒性試験における陰性結果と一致しない場合が多い (Kirkland et al., 2005, 2007; Thybaud et al., 2007)。これら *in vitro* と *in vivo* 試験の結果の相違は、*in vitro* 及び *in vivo* における薬物代謝の差異が主要因の一つと考えられている (Ku et al., 2007)。

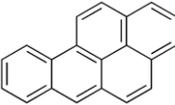
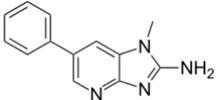
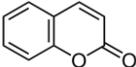
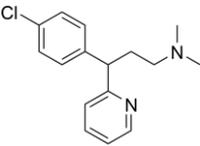
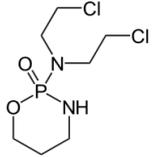
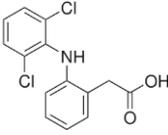
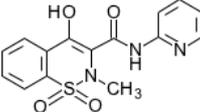
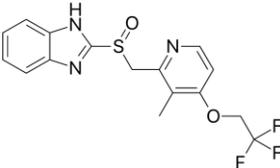
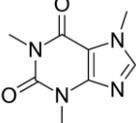
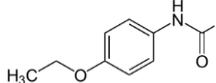
In vitro 遺伝毒性試験における代謝活性化には、Aroclor 1254、又は phenobarbital (PB) と 5,6-benzoflavone (BNF) の組み合わせなどの薬物代謝酵素誘導薬を投与したラットの肝 S9 が汎用されており (Ames et al., 1973; Paolini et al., 1997)、間接的遺伝毒性物質の遺伝毒性を高感度に検出できることが報告されている (Ames et al., 1975; Matsuoka et al., 1979)。これら誘導薬を前処置したラットの肝 S9 では誘導薬を前処置していないラットの肝 S9 と比較すると、CYP1A、CYP2B、及び CYP3A サブファミリー酵素タンパク質の発現量が増加していることが報告されている (Guengerich et al., 1982)。従って、これら肝 S9 を *in vitro* 遺伝毒性試験に用いることは、CYP1A、CYP2B、及び CYP3A サブファミリー酵素で代謝される間接的遺伝毒性物質の遺伝毒性を高感度に検出するために効果的である。

一方、多くの医薬品の代謝に寄与する CYP2C や CYP2D サブファミリー酵素の発現は、誘導薬を前処置したラットの肝 S9 では前処置していないラットの肝 S9 と比較して同等、或いは低下しており (Guengerich et al., 1982)、これら肝 S9 の活用は CYP2C や CYP2D サブファミリー酵素で代謝される間接的遺伝毒性物質の遺伝毒性の評価には適さない可能性もある。更に、CYP2E1 や CYP4A サブファミリー酵素など他の CYP 分子種の発現に対する誘導薬の影響は不明である。

従って、医薬品候補化合物の薬物代謝に寄与する薬物代謝酵素の活性が誘導薬の前処置によってどのように変動するか、及びこれらの薬物代謝酵素活性の変動が医薬品候補化合

物の薬物代謝に与える影響を明らかにすることは重要である。そこで本章では、PB 及びBNF の薬物代謝酵素誘導薬が化合物の薬物代謝及び *in vitro* 遺伝毒性発現に与える影響を明らかにすることを目的とした。本章では、PB 及びBNF を投与したラットの肝 S9 (PB-BNF 処置ラット肝 S9) 及び無処置ラットの肝 S9 (無処置ラット肝 S9) の代謝活性化能の比較、及び両肝 S9 を用いた *in vitro* 小核試験の結果を比較した。被験物質は異なる CYP 分子種で代謝される間接的遺伝毒性物質として benzo[*a*]pyrene (BaP) (Ishidate et al., 1988; McManus et al., 1990)、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) (Knasmuller et al., 1999; McManus et al., 1990)、caffeine (Ishidate et al., 1988; Tassaneeyakul et al., 1993)、coumarin (Born et al., 2002; NTP, 2017)、CPA (Ishidate et al., 1988; Yu et al., 1999)、diclofenac (Brambilla and Martelli, 2009; Yan et al., 2005)、piroxicam (Brambilla and Martelli, 2009; Hobbs and Twomey, 1981)、lansoprazole (Brambilla and Martelli, 2009; Pearce et al., 1996)、及び chlorpheniramine (Brambilla and Martelli, 2009; Yasuda et al., 2002) を、非遺伝毒性物質として phenacetin (NTP, 2017; Tassaneeyakul et al., 1993) を選択した。被験物質の構造式を Table 2 に示す。

Table 2 Structure of test articles assessed in the in vitro micronucleus tests

| Compound | Structure | CAS No. |
|------------------|---|-------------|
| BaP |  | 50-32-8 |
| PhIP |  | 105650-23-5 |
| Coumarin |  | 91-64-5 |
| Chlorpheniramine |  | 113-92-8 |
| CPA |  | 6055-19-2 |
| Diclofenac |  | 15307-79-6 |
| Piroxicam |  | 36322-90-4 |
| Lansoprazole |  | 103577-45-3 |
| Caffeine |  | 58-08-2 |
| Phenacetin |  | 62-44-2 |

第二節 実験材料及び方法

2-1. 被験物質及び媒体

BaP、PhIP、及び caffeine は和光純薬工業株式会社（大阪）、phenacetin、coumarin、CPA、diclofenac、piroxicam、lansoprazole、及び chlorpheniramine は、シグマアルドリッチジャパン合同会社（東京）から購入した。BaP、coumarin、CPA、piroxicam、lansoprazole、及び phenacetin は dimethyl sulfoxide (DMSO、和光純薬工業株式会社) に溶解、或いは懸濁し、PhIP、caffeine、diclofenac、及び chlorpheniramine は注射用水（株式会社大塚製薬工場、徳島）に溶解、或いは懸濁した。

2-2. 試薬

イーグル MEM 培地は日水製薬株式会社（東京）、仔牛血清は HyClone Laboratories, Inc. (South Logan, UT, USA) より購入した。L-Glutamine、magnesium chloride ($MgCl_2$)、potassium chloride (KCl) は和光純薬工業株式会社、sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$) は株式会社大塚製薬工場、4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) は株式会社同仁化学研究所（熊本）、D- glucose 6-phosphate disodium salt ($G6P \cdot Na_2$) 及び nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt ($NADP \cdot Na$) はシグマアルドリッチジャパン合同会社より購入した。

2-3. ラット肝 S9

ラット肝 S9 はオリエンタル酵母工業株式会社（東京）より購入した。オリエンタル酵母工業株式会社において、7 週齢の雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットに 30 mg/kg の PB、翌日から 60 mg/kg の PB が 3 日間反復投与され、更に翌日に 80 mg/kg の BNF が投与された。BNF 投与 2 日後のラットから摘出された肝臓を用いてホモジネートが調製され、さらに遠心分離 ($9000 \times g$, $4^\circ C$, 20 分) して得られた上清画分 (S9) を PB-BNF 処置ラット肝 S9 と

し、7 週齢の無処置 SD ラットから摘出された肝を用いて調製された S9 を無処置ラット肝 S9 とした。肝 S9 は使用時まで-80°C に保存した。

2-4. ラット肝 S9 の薬物代謝酵素活性及びタンパク質レベルの測定

ラット肝 S9 中の CYP 総タンパク含量は、S9 を亜ジチオン酸ナトリウムで還元のうち、一酸化炭素 (CO) を通気し、波長 490 nm 及び 450 nm における CO 差スペクトルを測定することにより算出した (Omura and Sato, 1964)。タンパク質濃度は、Lowry 法 (Lowry et al., 1951) により測定した。総 CYP 活性の指標として、7-methoxycoumarin *O*-demethylase (MCD)、7-ethoxycoumarin *O*-deethylase (ECD)、及び 7-propoxycoumarin *O*-depropylase (PCD) の活性を、松原らの方法 (Matsubara et al., 1983) に従い、反応により生成される 7-hydroxycoumarin を励起波長 370 nm、蛍光波長 456 nm で測定し、算出した。

ラット肝 S9 中の CYP1A1、CYP1A2、CYP2B1/2、CYP2C6、CYP2C11、CYP2D1、CYP2E1、CYP3A1、CYP3A2、CYP4A、及び NADPH-cytochrome P450 reductase のタンパク質レベルは Western blot 法で測定した。ラット肝 S9 中のタンパク質濃度が 2 mg protein/mL になるよう phosphate-buffered saline (PBS) で調製し、更に Tris-SDS-Mercaptoethanol Sample Loading Buffer (コスモバイオ株式会社、東京) で 1 mg protein/mL になるよう希釈した。この希釈液を 95°C で 5 分間処理したのち、CYP1A1、CYP1A2、CYP2B1/2、CYP2E1、CYP3A1、CYP3A2、及び CYP4A の解析用に 10 µL、CYP2C6、CYP2C11、CYP2D1、及び NADPH-cytochrome P450 reductase の解析用に 3 µL を分取し、7.5% SDS-polyacrylamide gel (フナコシ株式会社、東京) に添加した。各サンプル中のタンパク質を電気泳動法で分離し、Immobilon-P Transfer Membranes (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) に転写したのち、ECL blocking agent (GE ヘルスケアジャパン、東京) でブロッキングした。Immobilon-P Transfer Membranes に対して、一次抗体 [anti-rat CYP1A1 rabbit antibody (メルク株式会社、東京)、anti-rat CYP1A2 sheep antibody (メルク株式会社)、anti-rat CYP2B1/2 rabbit antibody (メルク株式会社)、anti-

rat CYP2C6 mouse antibody (Abcam 株式会社、東京)、anti-rat CYP2C11 rabbit antibody (Fitzgerald Industries International Inc, Concord, MA, USA)、anti-rat CYP2D1 rabbit antibody (メルク株式会社)、anti-rat CYP2E1 rabbit antibody (メルク株式会社)、anti-rat CYP3A1 rabbit antibody (メルク株式会社)、anti-rat CYP3A2 rabbit antibody (メルク株式会社)、anti-rat CYP4A sheep antibody (GE ヘルスケアジャパン株式会社)、anti-rat NADPH-cytochrome P450 reductase sheep antibody (メルク株式会社)、ビオチンラベル化した二次抗体 [biotinylated anti-sheep, mouse, or rabbit antibody (GE ヘルスケアジャパン株式会社)]、及び streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (GE ヘルスケアジャパン株式会社) と反応させた。各測定対象タンパク質と検出抗体との複合体は ECL Western blotting detection reagent (GE ヘルスケアジャパン株式会社) を用いて検出し、フィルム (富士フィルム株式会社、東京) へ露光させ、現像した。フィルムは画像解析装置 (AE-6961、アトー株式会社、東京) を用いて取り込み、画像化した。

PB 及び BNF の CYP 発現変動への寄与を評価するため、対照群として 100 mg/kg の PB を 7 日間反復投与後のラット肝臓、及び 20 mg/kg の 3-methylcholanthrene (3-MC) を 7 日間反復投与後のラット肝臓から調製したマイクロソームを用いた。なお、3-MC は BNF と同じ機序で CYP1A1 及び CYP1A2 のタンパク発現を誘導することが報告されている (Thomas et al., 1983)。ラットの肝マイクロソームの調製は、第一三共株式会社安全性研究所において、研究倫理委員会の承認の下、動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和 48 年 10 月 1 日、法律第 105 号) に準拠して実施した。

2-5. 細胞培養

チャイニーズハムスター肺由来細胞株 (Chinese hamster lung cell line: CHL) は理研バイオリソースセンター (茨城) より入手し、10% 仔牛血清含有イーグル MEM 培地に 2 mM の L-glutamine 及び 25 mM NaHCO₃ を添加した培地で継代培養した。細胞は 5% 二酸化炭素 / 95% 大気、37°C に設定した細胞培養器で培養した。

2-6. In vitro 小核試験

In vitro 小核試験は濃度設定のための予備試験と本試験で構成し、試験毎に被験物質の細胞毒性と小核誘発作用を評価した。

2-6-1. 予備試験

2-6-1-1. 細胞毒性評価

6-well のプラスチックプレートに予め倍加時間が 12~18 時間であることが確認されている CHL 細胞を 1×10^5 cells/2 mL/well で播種し、24 時間培養後、種々の濃度の被験物質を含有する培地で曝露した。代謝活性化系としてラット肝 S9 と電子伝達系に関わる補助因子 (4 mM HEPES、5 mM MgCl₂、33 mM KCl、5 mM G6P·Na₂、及び 4 mM NADP·Na) を混合し、ラット肝 S9 mix を調製した (Matsuoka et al., 1979)。ラット肝 S9 mix は各培養液に S9 の終濃度が 5% となるよう添加した。被験物質の曝露方法は、ラット肝 S9 mix 非存在下で 24 時間被験物質を曝露し、培地交換後 18 時間培養した連続処理法 [24h(-S9)]、PB-BNF 処理ラット肝 S9 mix 存在下で 6 時間被験物質を曝露し、培地交換後 36 時間培養した短時間処理 S9 mix 添加法 [6h(+S9)]、及び S9 mix 非存在下で 6 時間被験物質を曝露し、培地交換後 36 時間培養した短時間処理 S9 mix 非添加法 [6h(-S9)] の 3 条件で実施した (OECD, 2014)。培養終了後、0.01% のトリプシンで細胞を剥離、懸濁し、等量の培地と混和した。遠心分離 (207×g、4°C、5 分) 後、上清を除去し、培地で再懸濁した後、生死細胞オートアナライザー (Vi-CELL XR、Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) で細胞数を計測した。1 濃度につき 2 well を用いて細胞数を計測し、その平均値を算出した。被験物質曝露群の平均細胞数と媒体対照群の平均細胞数を次式にあてはめ、相対生存細胞率 (relative number of viable cells; RVC) を算出した。

$$\text{RVC (\%)} = \text{被験物質曝露群の平均細胞数} / \text{媒体対照群の平均細胞数} \times 100$$

2-6-1-2. 小核誘発作用評価

プラスチックチャンバースライドに CHL 細胞を 5×10^3 cells/500 μ L/chamber で播種し、24 時間培養後、上記細胞毒性評価と同様に被験物質を曝露した。細胞培養終了後、0.075 M の KCl 水溶液を用いて 37°C で 5 分、低張処理後、氷冷した 6% 酢酸/メタノール溶液で固定し乾燥させた。40 μ g/mL アクリジンオレンジ水溶液で細胞を染色し、蛍光顕微鏡の 200 倍率下で観察した。1 濃度につき 2 スライドを作製し、1 スライドにつき 1000 細胞、合計 2000 細胞/濃度を観察し、小核保有細胞数を計測した。

2-6-2. 本試験

予備試験と同様の方法で細胞毒性及び小核誘発作用を評価した。なお、処理法は PB-BNF 処置ラット肝 S9 及び無処置ラット肝 S9 存在下短時間処理法のみ実施した。また本試験における被験物質の濃度は、予備試験における PB-BNF 処置ラット肝 S9 存在下短時間処理法における細胞毒性結果を元に、相対生存細胞率が 50% 付近の用量を含むよう最高濃度を決定し、以下公比 1.1~1.5 で漸減し、合計 4~7 濃度を設定した。各被験物質の曝露濃度を Table 3 に示す。いずれの被験物質とも最高濃度を含む高濃度では析出が認められた。

2-7. 統計学的解析

CYP 総タンパク含量、CYP 活性、相対生存細胞率、及び小核保有細胞数は平均値で記した。小核誘発作用評価における小核保有細胞出現頻度を two-tailed Fischer's exact test で解析し、濃度依存性は Cochran-Armitage trend test で解析した。統計解析には解析ソフト EXSUS (ver 8.1.0、株式会社 CAC クロア、東京) を用いた。統計学的な有意水準は $P < 0.05$ とし、小核保有細胞数が濃度依存的に有意に増加した場合を陽性と判定した。

Table 3 Concentrations of test articles used in the in vitro micronucleus test

| Compound | Concentration ($\mu\text{g/mL}$) |
|------------------|--|
| BaP | 51.4, 92.6, 167, 300 |
| PhIP | 6.22, 8.08, 10.5, 13.7, 17.8, 23.1, 30.0 |
| Coumarin | 234, 281, 338, 405, 486, 583, 700 |
| Chlorpheniramine | 234, 281, 330, 405, 486, 583, 700 |
| CPA | 6.64, 9.30, 13.0, 18.2, 25.5, 35.6, 50.0 |
| Diclofenac | 198, 217, 239, 263, 289, 318, 350 |
| Piroxicam | 502, 603, 723, 868, 1040, 1250, 1500 |
| Lansoprazole | 67.0, 80.4, 96.5, 116, 139, 167, 200 |
| Caffeine | 1480, 2220, 3330, 5000 |
| Phenacetin | 1480, 2220, 3330, 5000 |

第三節 実験結果

3-1. ラット肝 S9 の薬物代謝酵素活性及び CYP タンパク質レベル

PB-BNF 処置ラット肝 S9 における CYP 総タンパク含量、MCD、ECD、及び PCD 活性は、無処置ラット肝 S9 と比較して 4~5 倍高値であった (Fig. 1)。

Western blot 解析の結果、PB-BNF 処置ラット肝 S9 における CYP1A1、CYP1A2、CYP2B1/2、CYP2C6、CYP3A1、CYP3A2、及び NADPH-cytochrome P450 reductase のタンパク質レベルは無処置ラット肝 S9 と比較して高く、CYP2C11 及び CYP2E1 のタンパク発現量は低かった (Fig. 2)。一方、CYP2D1 及び CYP4A では差はみられなかった。

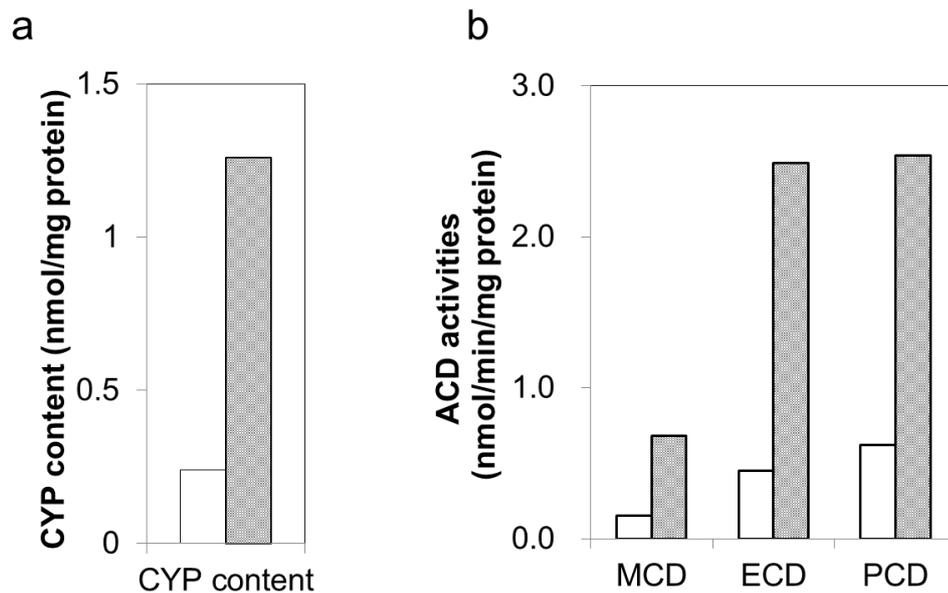


Fig. 1 Increases in CYP content and alkoxy coumarin dealkylase activity in PB-BNF-treated rat S9

CYP contents (a) and alkoxy coumarin *O*-dealkylase (ACD) activity (b) in PB-BNF treated rat S9 were higher than those in untreated rat S9. Results are means (n=2); Open bars, untreated rat S9; gray bars, PB-BNF-treated rat S9

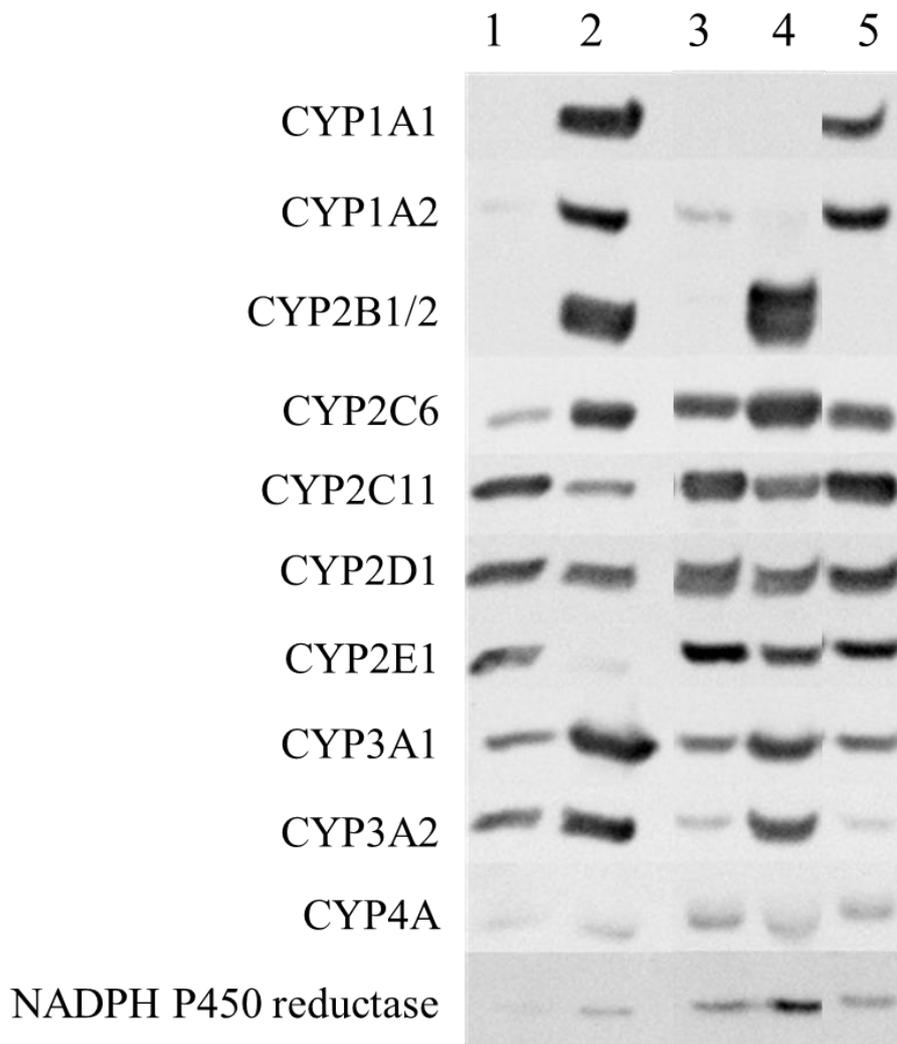


Fig. 2 Western blot analysis of CYP isoforms and NADPH-cytochrome P450 reductase in rat liver fractions

The protein level of CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1/2, CYP2C6, CYP3A1, CYP3A2, and NADPH-cytochrome P450 reductase in PB-BNF-treated rat S9 were higher than those in untreated rat S9. The protein levels of CYP2C11 and CYP2E1 in PB-BNF-treated rat S9 were lower than those in untreated rat S9. 1, untreated rat S9; 2, PB-BNF-treated rat S9; 3, untreated rat liver microsomal fraction; 4, liver microsomal fraction prepared from rats treated with PB; 5, rat liver microsomal fraction pretreated with 3-MC

3-2. In vitro 小核試験

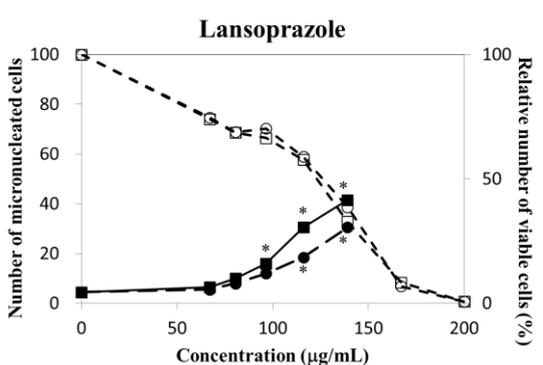
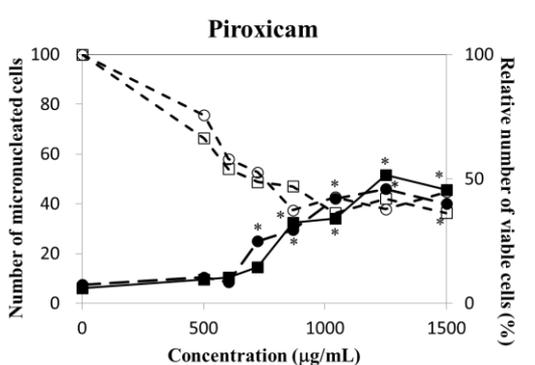
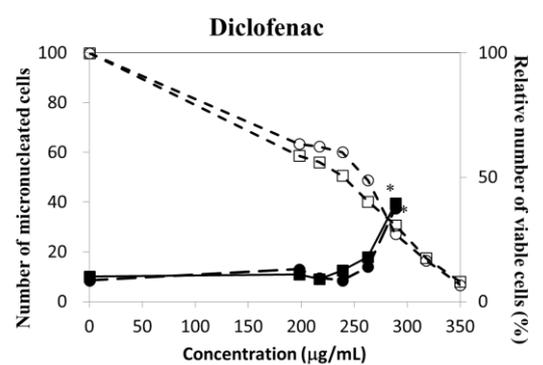
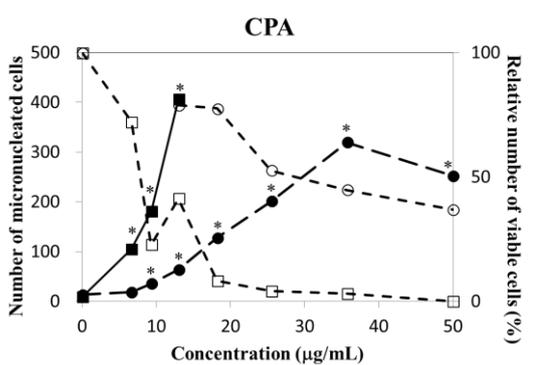
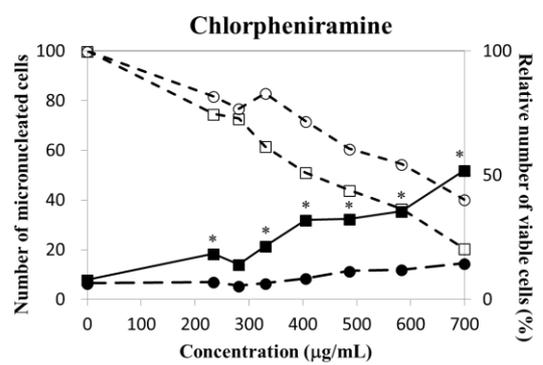
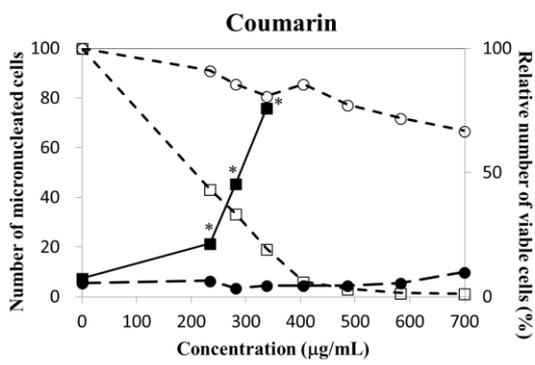
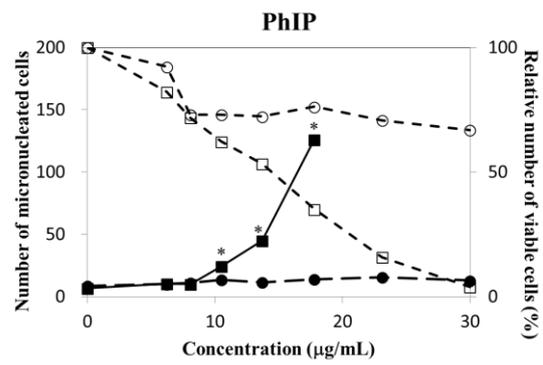
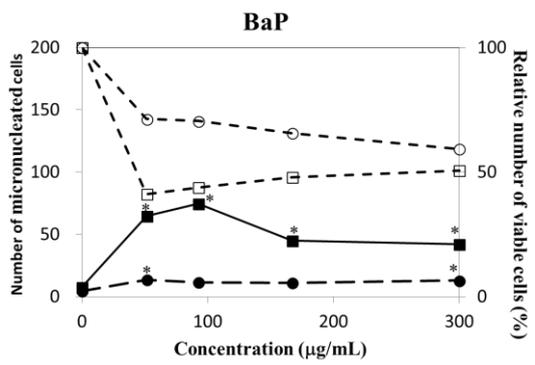
10 化合物を用いた予備試験の結果、BaP、PhIP、coumarin、chlorpheniramine、CPA、diclofenac、piroxicam、及び lansoprazole の 8 化合物は、短時間処理 S9 mix 添加法で小核保有細胞数を増加させたが、連続処理法及び短時間処理 S9 mix 非添加法では、小核保有細胞数を増加させなかった。Caffeine は、短時間処理 S9 mix 添加及び非添加法において、小核誘発作用を示した。Phenacetin は全ての処理法において小核誘発作用を示さなかった (Table 4)。

本試験の結果、BaP、PhIP、coumarin、及び chlorpheniramine は、PB-BNF 処置ラット肝 S9 mix 存在下で小核保有細胞数を有意に増加させ、これら化合物のうち、PhIP、coumarin、及び chlorpheniramine の小核誘発作用には用量依存性が認められた。一方、BaP、PhIP、coumarin、及び chlorpheniramine は、無処置ラット肝 S9 存在下では小核を誘発しなかった (Fig. 3)。更に、これら 4 化合物は、PB-BNF 処置ラット肝 S9 存在下では、無処置ラット肝 S9 存在下と比較して強い細胞毒性を示した。CPA は、PB-BNF 処置ラット肝 S9 及び無処置ラット肝 S9 の存在下で、用量依存的な小核誘発作用及び細胞毒性を示したが、これら小核誘発作用及び細胞毒性はいずれも PB-BNF 処置ラット肝 S9 存在下で強かった (Fig. 3)。Diclofenac、piroxicam、lansoprazole、及び caffeine は、いずれの S9 存在下においても用量依存的な小核誘発作用及び細胞毒性を示したが、これら作用について両 S9 間で顕著な差はなかった。Phenacetin は両 S9 存在下において、小核保有細胞を増加させなかった。なお、PB-BNF 処置ラット肝 S9 を添加した短時間処理法における小核誘発作用及び細胞毒性は、いずれの化合物においても予備試験及び本試験で再現性が確認された。

Table 4 Summary of preliminary test for evaluation of micronucleus induction by 10 compounds

| Compound | Treatment | | |
|------------------|-----------|----------|-----------|
| | 6h (+S9) | 6h (-S9) | 24h (-S9) |
| BaP | + | - | - |
| PhIP | + | - | - |
| Coumarin | + | - | - |
| Chlorpheniramine | + | - | - |
| CPA | + | - | - |
| Diclofenac | + | - | - |
| Piroxicam | + | - | - |
| Lansoprazole | + | - | - |
| Caffeine | + | + | - |
| Phenacetin | - | - | - |

6h (+S9) , short treatment with rat S9 pretreated the combination of PB and BNF; 6h (-S9) , short treatment without S9; 24h (-S9) , continuous treatment without S9



(Continued)

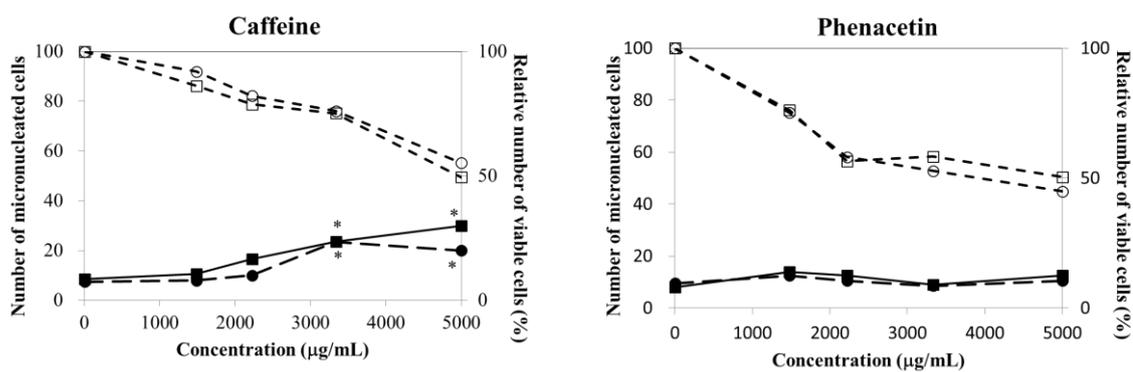


Fig. 3 In vitro micronucleus test of 10 compounds with a PB-BNF-treated rat S9 and untreated rat S9

The results are represented as mean (n=2). Open circles and squares indicate the RVC (%) of cultured cells with untreated rat S9 and PB-BNF-treated rat S9, respectively. Closed circles and squares indicate the micronucleus induction with untreated and PB-BNF-treated rat S9, respectively. For PhIP, coumarin, CPA, diclofenac, and lansoprazole, the dose levels between PB-BNF-treated S9 and untreated S9 or dose levels evaluated for RVC and micronucleus induction were different based on their cytotoxicity. * $P < 0.01$: Significantly different from the control by two-tailed Fishers' exact test.

第四節 考察

本章では、PB-BNF 処置ラット肝 S9 が、複数のラット又はヒト CYP 分子種により代謝される化合物の *in vitro* 小核試験結果に与える影響を評価した。ヒトにおいて医薬品の代謝に寄与する主要な CYP 分子種は、CYP3A4/5、CYP2D6、CYP2Cs、CYP1A2、CYP2E1、CYP2A6、及び CYP2B6 (Guengerich, 2003) であり、これらのラットにおいて同じサブファミリーに属する分子種は、CYP1A2、CYP2C6、CYP2C11、CYP2D1、CYP2E1、CYP3A1、及び CYP3A2 である。本章では、これら CYP とともに多くの間接的遺伝毒性物質の代謝活性化酵素として知られている CYP1A1 及び CYP2B1/2 に着目して解析した。その結果、PB-BNF 処置ラット肝 S9 では、CYP の総活性指標である MCD、ECD、及び PCD 活性が増加し、CYP1A1、CYP1A2、CYP2B1/2、CYP2C6、CYP3A1、CYP3A2、及び NADPH-cytochrome P450 reductase のタンパク質レベルが増加していた。一方、CYP2D1 及び CYP4A のタンパク質レベルに変動はなく、CYP2C11 及び CYP2E1 のタンパク質レベルは低下していた。この結果は、BNF が CYP1A1 及び CYP1A2 の発現を亢進し、CYP2C11 の発現を抑制する報告 (Guengerich et al., 1982) と一致する。更に、PB が CYP2B1/2、CYP2C6、及び CYP3A の発現を亢進し、CYP2C11 を抑制するという報告 (Guengerich et al., 1982) とも一致する。これらの報告を考慮すると、本章で得られた PB-BNF 処置ラット肝 S9 中の CYP タンパク質レベルにおいて、BNF は CYP1A1 及び CYP1A2 含量の亢進に、PB は CYP2B1/2、CYP2C6、CYP3A1、及び CYP3A2 含量の亢進及び CYP2C11 含量の抑制に寄与することが示唆された。

In vitro 小核試験において、PB-BNF 処置ラット肝 S9 存在下では BaP、PhIP、CPA、coumarin、及び chlorpheniramine の小核誘発作用は、無処置ラット肝 S9 のそれと比較して強かった。BaP、CPA、及び PhIP は、それぞれ CYP1A1、CYP2C6、及び CYP1A2 によって遺伝毒性代謝物を生成することが報告されており (Clarke and Waxman, 1989; McManus et al., 1990; Yu et al., 1999)、本章では PB-BNF 処置ラット肝 S9 では、これら CYP 分子種のタンパク質レベルが高いことを見出している。また、これら化合物は *in vivo* の遺伝毒性試験及び発がん性

試験で陽性を示すことから (NTP, 2017 Okada et al., 2013; Shirai et al., 1997)、本章で用いた PB-BNF 処置ラット肝 S9 を用いることで、これら化合物の遺伝毒性及び発がん性を高感度に予測可能であることが示された。

Coumarin はラットにおいて CYP2E1 及び CYP1A により、細胞障害性を有する *o*-hydroxyphenylacetaldehyde (*o*-HPA) に代謝される (Born et al., 2002)。また、ラット肝ミクロソーム中の CYP2B1 は coumarin を *o*-HPA に代謝することが報告されている (Peter et al., 1991)。従って、PB-BNF 処置ラット肝 S9 存在下では、PB 及び BNF 処置によって過剰発現した CYP1A1/2 及び CYP2B1/2 が *o*-HPA 生成量を亢進し、その結果、小核誘発作用を増強したと推察される。このことは、PB-BNF 処置ラット肝 S9 が CHL の細胞毒性を増強したことから支持される。一方、マウス骨髄及び末梢血中における小核試験、及びラット肝臓における不定期 DNA 合成試験のいずれにおいても、coumarin は遺伝毒性を誘発しなかった (Api, 2001; NTP, 2017; Edwards et al., 2000)。ラットにおいて *o*-HPA は速やかに *o*-hydroxyphenylacetic acid (*o*-HPAA) に解毒される (Vassallo et al., 2004) ことから、*o*-HPA の生成量の差異が in vitro 及び in vivo 試験結果の相違の一因である可能性が示された。

Chlorpheniramine は、げっ歯動物において遺伝毒性及び発がん性を示さないことが報告されている (NTP, 2017)。これら in vivo の試験結果と本章における in vitro 結果の相違のメカニズムは明らかではないが、両試験条件下における被験物質の曝露レベルの相違に加えて chlorpheniramine の代謝に寄与する CYP 分子種の差異が一因である可能性がある。即ち、ラットにおける chlorpheniramine の主代謝経路は立体選択的な *N*-demethylation であり、この反応は CYP2C11 を介する (Nomura et al., 1997) が、PB-BNF 処置ラット肝 S9 では CYP2C11 含量は低かった。一方、ラット肝ミクロソーム中の CYP1A 及び CYP2B は、chlorpheniramine の代謝に寄与することが報告されているが (Nomura et al., 1997)、PB-BNF 処置ラット肝 S9 では、CYP1A 及び CYP2B 含量が高いことから、これら CYP 分子種により生成された代謝物が小核誘発を生じた可能性が示された。

Diclofenac、piroxicam、lansoprazole、及び caffeine は PB-BNF 処置の有無に関わらず、ラット肝 S9 存在下において小核誘発作用を示した。従って、これら化合物は PB-BNF 処置の影響を受けない薬物代謝酵素で代謝され、遺伝毒性を発現することが示唆された。一方、これら化合物は *in vivo* の遺伝毒性試験において陰性結果を示した (Brambilla and Martelli, 2009, Gris et al., 2008, TOXNET, 2017, Aeschbacher et al., 1986)。これら *in vivo* と *in vitro* の試験結果の相違は、両試験条件下における被験物質の曝露レベルの相違に加えて、*in vivo* では、*in vitro* 試験条件下で生成された遺伝毒性代謝物が、更に代謝又は解毒されることによって生体では遺伝毒性を示さない可能性が示された。

Phenacetin はいずれのラット肝 S9 存在下においても小核誘発作用を示さなかった。これは過去に報告された肝 S9 を用いた *in vitro* 遺伝毒性試験結果と一致する (De Flora et al., 1985)。しかし、phenacetin はマウス骨髄及び末梢血中の小核保有細胞を増加させ (Higashikuni et al., 1992)、ラットにおいて発がん性を示すことが報告されている (Johansson, 1981)。また、Aroclor 1254 を投与したハムスターの肝 S9 を用いるとその遺伝毒性を検出可能である (De Flora et al., 1985)。これらのことから、本試験で用いたラット肝 S9 は phenacetin の *in vitro* 遺伝毒性評価には適切でない可能性が考えられた。

本章で評価した化合物の *in vitro* 小核試験結果と既に報告されている *in vivo* 遺伝毒性試験及びがん原性試験結果、並びに各化合物の *in vivo* における主な薬物代謝酵素と PB-BNF 処置による発現変動の関係を Table 5 に纏め、評価した化合物を Type A から Type D に分類した。PB-BNF 処置ラット肝 S9 は、BaP、CPA、PhIP のように PB-BNF 処置により発現が増加する代謝酵素で代謝される間接的遺伝毒性物質 (Type A) の遺伝毒性ポテンシャルを高感度に検出するために効果的であった。一方、coumarin 及び chlorpheniramine のような Type B 化合物は、CYP2C11 及び CYP2E1 のように PB-BNF 処置で低下する代謝酵素による代謝が主代謝経路であることから、誘導薬処置のラット肝 S9 を用いた *in vitro* 評価は生体と異なる薬物代謝プロファイルを示すことが示唆された。従って、*in vitro* 遺伝毒性試験において偽

陽性結果を回避するためには、医薬品候補化合物の薬物代謝に及ぼす誘導薬の影響を明らかにすることが重要である。

本章では *in vitro* での小核誘発に寄与する代謝物及びその生成に関与する薬物代謝酵素を明らかにすることにより、*in vivo* での遺伝毒性発現の予測及びヒトにおける外挿性が向上することを示した。また、*in vitro* 遺伝毒性評価時には、頻用されている PB-BNF 処置ラット肝 S9 を代謝活性化系として用いた場合、化合物の薬物代謝が *in vivo* と異なるケースでは、本章で用いたような誘導薬非投与のラット肝 S9 等、*in vivo* での薬物代謝をより反映する代謝活性化系を選択することの重要性が示された。

Table 5 Summary of in vitro micronucleus test and in vivo studies

| Compound | In vitro micronucleus test ^a | | | | In vivo studies ^b MNT | Metabolic profile | |
|------------------|---|----|------------|-----|-------------------------------------|----------------------|---------------------------------|
| | Short | | Continuous | | | Major isoform in rat | Expression in PB-BNF-treated S9 |
| | PB-BNF | UT | non | non | | | |
| Type A | | | | | | | |
| CPA | + | + | - | - | + | CYP2C6 | ↑ |
| BaP | + | - | - | - | + | CYP1A1 | ↑ |
| PhIP | + | - | - | - | +/- | CYP1A2 | ↑ |
| Type B | | | | | | | |
| Coumarin | + | - | - | - | - | CYP2E1 | ↓ |
| | | | | | | CYP1A | ↑ |
| Chlorpheniramine | + | - | - | - | - | CYP2C11 | ↓ |
| Type C | | | | | | | |
| Diclofenac | + | + | - | - | - | CYP2C11 | ↓ |
| Piroxicam | + | + | - | - | - | N.D. | N.D. |
| Lansoprazole | + | + | - | - | - | N.D. | N.D. |
| Caffeine | + | + | + | - | - | CYP1A2 | ↑ |
| Type D | | | | | | | |
| Phenacetin | - | - | - | - | + | CYP1A2 | ↑ |

Based on the results of the present in vitro micronucleus tests (a) and previous in vivo studies (b), the test compounds were categorized into 4 groups: Type A, the positive results with PB-BNF-treated rat S9 consistent with the in vivo positive results; Type B, the positive results with PB-BNF-treated rat S9 inconsistent with the in vivo results; Type C, the positive results with PB-BNF-treated and untreated rat S9s inconsistent with the in vivo negative results; Type D, the negative results with PB-BNF-treated and untreated rat S9s inconsistent with the in vivo positive results.

PB-BNF, with PB-BNF-treated rat S9; UT, with untreated rat S9; none, without S9; *, the results of cell transformation assay and dominant lethal assay; MNT, in vivo genotoxicity study; N.D., not determined; +, judged as positive; -, judged as negative; +/-, both positive and negative results.

第二章 遺伝毒性物質の小核誘発能に対する感受性と薬物代謝の種差

第一節 小序

薬物の毒性発現は、標的発現臓器及び標的タンパク質に対する親和性、感受性、或いは薬物の体内動態の差に起因して、その有無や重篤度は動物種間で異なる (Gonzalez and Shah, 2008; Wang et al., 2007; Eberhart et al., 1991; Fujiwara et al., 2018)。従って、医薬品の非臨床安全性評価では複数の動物種を用いて毒性試験を実施し、薬理及び薬物動態の種差を考慮し、ヒトへの毒性リスクを総合的に評価及び予測している。

医薬品の発がん性予測に重要な役割を果たす遺伝毒性試験では、*in vivo* 試験と *in vitro* 試験を組み合わせることで化合物の遺伝毒性を総合的に評価している [ICH S2 (R1), 2011]。 *In vivo* 遺伝毒性試験ではラットやマウスのげっ歯類が汎用されており、*in vitro* 遺伝毒性試験では代謝活性化系として、薬物代謝酵素誘導薬を処置したラットの肝 S9 が汎用されている。更に、発がん性試験では、ラット及びマウスのげっ歯類が用いられている。一方、イヌやサル等の非げっ歯類を用いた長期の反復投与毒性試験において、発がん性を示唆する増殖性変化がみられる場合もある。このように、細胞や実験動物を用いた遺伝毒性、或いは発がん性試験を基にヒトの発がんリスクを評価及び予測するためには、医薬品候補化合物の薬物代謝の種差及び得られた試験結果のヒトへの外挿性を考慮することが重要である。そこで本章では、*in vitro* 遺伝毒性試験のヒトへの外挿性を高めるため、遺伝毒性物質の薬物代謝の種差が遺伝毒性試験結果に及ぼす影響を明らかにし、ヒトにおける遺伝毒性評価に最適な代謝活性化系を選択することを目的とした。そのため、非臨床安全性評価で用いられる実験動物種であるラット、マウス、サル、及びイヌ由来の肝 S9、並びにヒト由来の肝 S9 を代謝活性化系として用いて *in vitro* 小核試験を実施し、遺伝毒性発現の種差が各動物種の薬物代謝の差異に起因するかを評価するとともに、ヒトへの外挿性について評価した。

第二節 実験材料及び方法

2-1. ラット、マウス、サル、イヌ、及びヒト肝 S9

ラット肝 S9 は、7 週齢の雄性 SD ラットの 3 例から摘出された肝を用いて調製された肝 S9 をオリエンタル酵母工業株式会社より購入した。ヒト肝 S9 は、50 名のドナーから摘出した肝を用いて調製された研究目的に用途が限定されている肝 S9 を Becton Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, USA) より購入した。マウス、サル、及びイヌの肝 S9 は、第一三共株式会社安全性研究所において、研究倫理委員会の承認の元、動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和 48 年 10 月 1 日、法律第 105 号) に準拠して調製した。C3H/HeNCrIcrIj マウス、カニクイサル、及び Narc:ビーグルイヌは、それぞれ日本チャールズリバー株式会社 (神奈川)、ハムリー株式会社 (茨城)、及びオリエンタル酵母工業株式会社より購入した。7 週齢の雄性 C3H/HeNCrIcrIj マウス 20 例、3 歳及び 5 歳の雌雄各 1 例のカニクイサル、3 歳及び 6 歳の雌雄各 1 例のビーグルイヌから麻酔下で肝臓を摘出し、液体窒素で凍結した。肝臓摘出後の動物は、腹大動脈 (マウス)、或いは腋窩及び大腿部動静脈 (サル及びイヌ) を切断し、放血によって安楽死させた。凍結肝試料を融解し、1.15 w/v% の KCl 水溶液を添加して、氷上でホモジナイズした。このホモジネートを 4°C、9000 × g で 20 分間遠心分離し、その上清を混合し、プール肝 S9 として保管した。

2-2. 被験物質及び媒体

BaP は和光純薬工業株式会社、coumarin、CPA、diclofenac、piroxicam、lansoprazole、及び chlorpheniramine はシグマアルドリッチジャパン合同会社から購入した。BaP、coumarin、CPA、piroxicam、及び lansoprazole は DMSO に溶解、或いは懸濁し、diclofenac 及び chlorpheniramine は注射用水に溶解、或いは懸濁した。

2-3. ラット、マウス、サル、イヌ、及びヒトの肝 S9 を用いた in vitro 小核試験

プラスチックチャンバースライドに CHL 細胞を 5×10^3 cells/500 μ L/chamber で播種し、24 時間培養後、種々の濃度の被験物質を含有する培地を細胞に曝露した。代謝活性化系としてラット、マウス、サル、イヌ、及びヒト肝 S9 と電子伝達系に関わる補助因子 (4 mM HEPES、5 mM $MgCl_2$ 、33 mM KCl、5 mM $G6P \cdot Na_2$ 、及び 4 mM $NADP \cdot Na$) を混合し、それぞれの肝 S9 mix を調製した。肝 S9 mix は各培養液における肝 S9 終濃度が 5% となるよう添加した。各動物種の肝 S9 mix 存在下で被験物質を細胞に 6 時間曝露し、培地交換後 18 時間培養した (OECD、2014)。各被験物質処理濃度は第一章で実施した予備試験の細胞毒性結果を基に、相対生存細胞率が 50% 付近の用量を含むよう最高濃度を設定し、以下公比 1.1~1.7 で漸減し、計 5~11 濃度を設定した。各被験物質の濃度を Table 6 に記す。培養終了後、Cell Counting Kit-8 (株式会社同仁化学研究所) を用いて細胞毒性を評価した (Ishiyama et al., 1997; Tominaga et al., 1999)。相対生存細胞率は被験物質処理群及び対照群の 450 nm 及び 650 nm 波長における吸光度の差の割合を算出した。細胞毒性評価終了後、第一章の 2-6-1-2. 小核誘発作用評価と同様の方法で標本を作成し、小核保有細胞数を計測した。

Table 6 Concentrations of test articles used in the in vitro micronucleus test

| Compound | Concentration (μ g/mL) |
|------------------|--|
| BaP | 12.4, 21.1, 35.9, 61.1, 104, 176, 300 |
| CPA | 0.348, 0.627, 1.13, 2.03, 3.66, 6.58, 9.88, 14.8, 22.2, 33.3, 50.0 |
| Coumarin | 206, 309, 463, 649, 833, 1000 |
| Diclofenac | 76.5, 115, 172, 208, 248, 272, 300 |
| Piroxicam | 311, 404, 525, 683, 888, 1154, 1500 |
| Lansoprazole | 41.4, 53.9, 70.0, 91.3, 118 |
| Chlorpheniramine | 120, 180, 270, 405, 486, 583, 700 |

2-3. BaP 及び CPA の各動物肝 S9 存在下における代謝物解析

BaP 及び CPA の小核誘発作用に種差がみられたことから、この原因を明らかにするため、BaP 及び CPA の代謝物解析を実施した。BaP 又は CPA の 50 µg/mL を各動物種の肝 S9 mix と混合し、in vitro 小核試験と同条件で 6 時間インキュベートした。インキュベート終了後、混合液を 3 倍量のメタノールで除タンパク処理し、抽出された代謝物を ultra-high performance liquid chromatography time-of-flight mass spectrometer (UPLC/TOFMS, ACQUITY UPLC/LCT Premier; Waters Corporation, Milford, MA, USA)を用いて定量した。各測定対象は ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm I.D., 1.7 µm, Waters Corporation) に負荷し、0.1%ギ酸水溶液及び 0.1%ギ酸メタノール溶液を移動相としたリニアグラジエントで分離した。グラジエント条件として、2%メタノール含有の移動相で 1 分間送液し、その後 6 分間かけてメタノールの含有率を 98%にし、98%メタノール含有移動相で 10 分間送液した。測定対象の検出条件には、ポジティブモード及びネガティブモードにおいて、フルスキャンモードを用い、質量電荷比 (m/z) が 100~1000 の範囲の測定対象物質を探索した。クロマトグラム上に検出されたピークの保持時間、 m/z 、及びピーク強度を UPLC/TOFMS から得られたデータセットを抽出、標準化、及び可視化するオープンソースのソフトウェアとして広く用いられている MZmine 2 (Pluskal et al., 2010) を用いて解析した。BaP 及び CPA の各代謝物は、クロマトグラム上のピークの精密質量及び分子式を元に決定した。更に、CPA の代謝物は、liquid chromatography–tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) (Waters 2795 Separations Module/Quattro micro; Waters Corporation) を用いてマススペクトルを解析した。CPA の代謝物の抽出液を XTerra MS C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm I.D., 5 µm, Waters Corporation) に負荷し、上記の UPLC-TOFMS と同様の移動相組成で分離し、プロダクトイオンスキャン法でイオンフラグメントパターンを検出した。得られたフラグメントを用いて各代謝物の構造式を推定した。

2-4. 統計学的解析

In vitro 小核試験における小核保有細胞出現頻度を two-tailed Fischer's exact test で解析し、濃度依存性は Cochran-Armitage trend test で解析した。統計解析には解析ソフト EXSUS (ver 8.1.0、株式会社 CAC クロア) を用いた。統計学的な有意水準は $P < 0.05$ とし、小核保有細胞数が用量依存的に有意に増加した場合を陽性と判定した。代謝物解析では、3 回の繰り返し測定で検出された各代謝物のイオン強度の平均値及び標準偏差で記し、Turkey の多重検定で解析した。統計解析には解析ソフト EXSUS を用いた。統計学的な有意水準は $P < 0.05$ とし、代謝物の生成量と小核保有細胞数の相関は回帰分析により相関係数 R を算出した。これら解析には、Microsoft Excel 2013 add-ins (Microsoft Corporation, Redmond WA, USA) を用いた。

第三節 実験結果

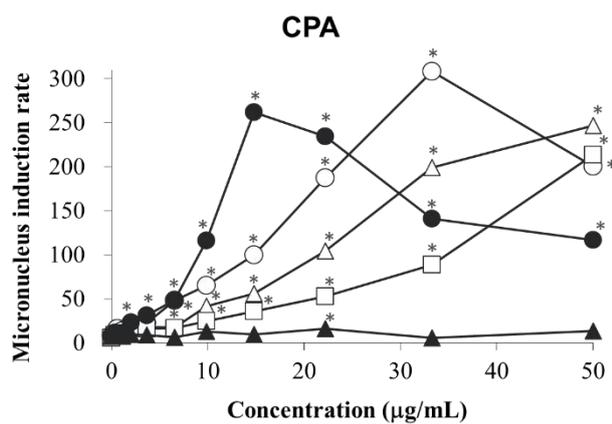
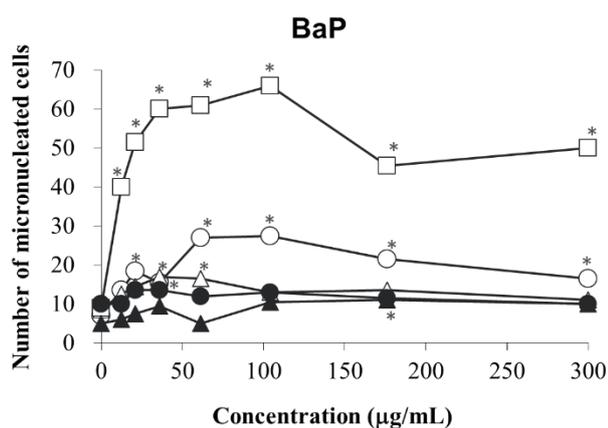
3-1. In vitro 小核試験

評価した 7 化合物のうち BaP と CPA による小核誘発能には顕著な種差がみられた (Fig. 4)。BaP は、ラット、マウス、サル、及びヒトの肝 S9 存在下で濃度依存的な小核誘発作用を示し、その誘発作用は、サル肝 S9 存在下で最も強かった。一方、BaP はイヌ肝 S9 存在下では小核誘発作用を示さなかった。CPA は、ラット、マウス、サル、及びイヌ肝 S9 存在下で濃度依存的な小核誘発作用を示したが、ヒト肝 S9 存在下では濃度依存的な小核誘発作用はみられなかった。なお、BaP 及び CPA は、最高濃度まで相対生存細胞率が 50% を下回るような細胞毒性を示さなかった (Fig. 4)。

Coumarin、diclofenac、piroxicam、及び lansoprazole は全ての動物種の肝 S9 存在下で小核保有細胞数を増加させ、その小核誘発作用に種差はみられなかった (Fig. 5)。なお coumarin 及び lansoprazole は相対生存細胞率が約 50% 近傍を示す細胞毒性が認められる濃度を含んでいたが、diclofenac 及び piroxicam は最高濃度においても細胞毒性はみられなかった。

Chlorpheniramine は全ての動物種の肝 S9 存在下で、相対生存細胞率が約 50%近傍を示す濃度においても小核保有細胞数を増加させなかった (Fig. 5、Fig. 6)。

A



B

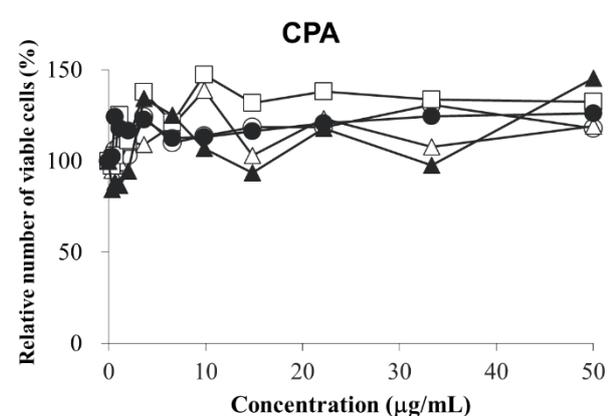
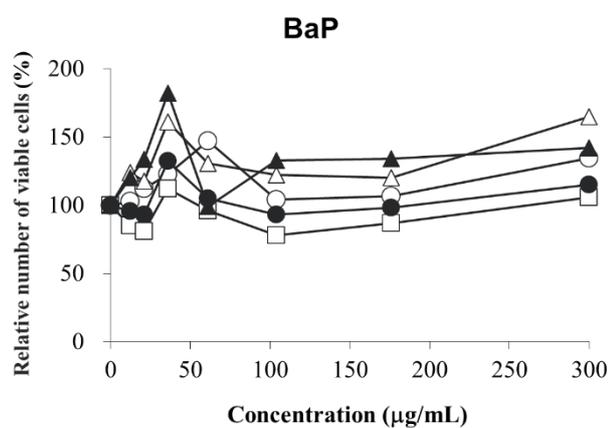


Fig. 4 In vitro micronucleus induction and cytotoxicity by BaP and CPA with rat, mouse, monkey, dog, and human liver S9

A, in vitro micronucleus induction; B, cytotoxicity. The results represent the mean (n=2). Open circle, rat liver S9; open triangle, mouse liver S9; open square, monkey liver S9; closed circle, dog liver S9; closed triangle, human liver S9.

* $P < 0.05$: significantly different from the vehicle control by two-tailed Fisher's exact test.

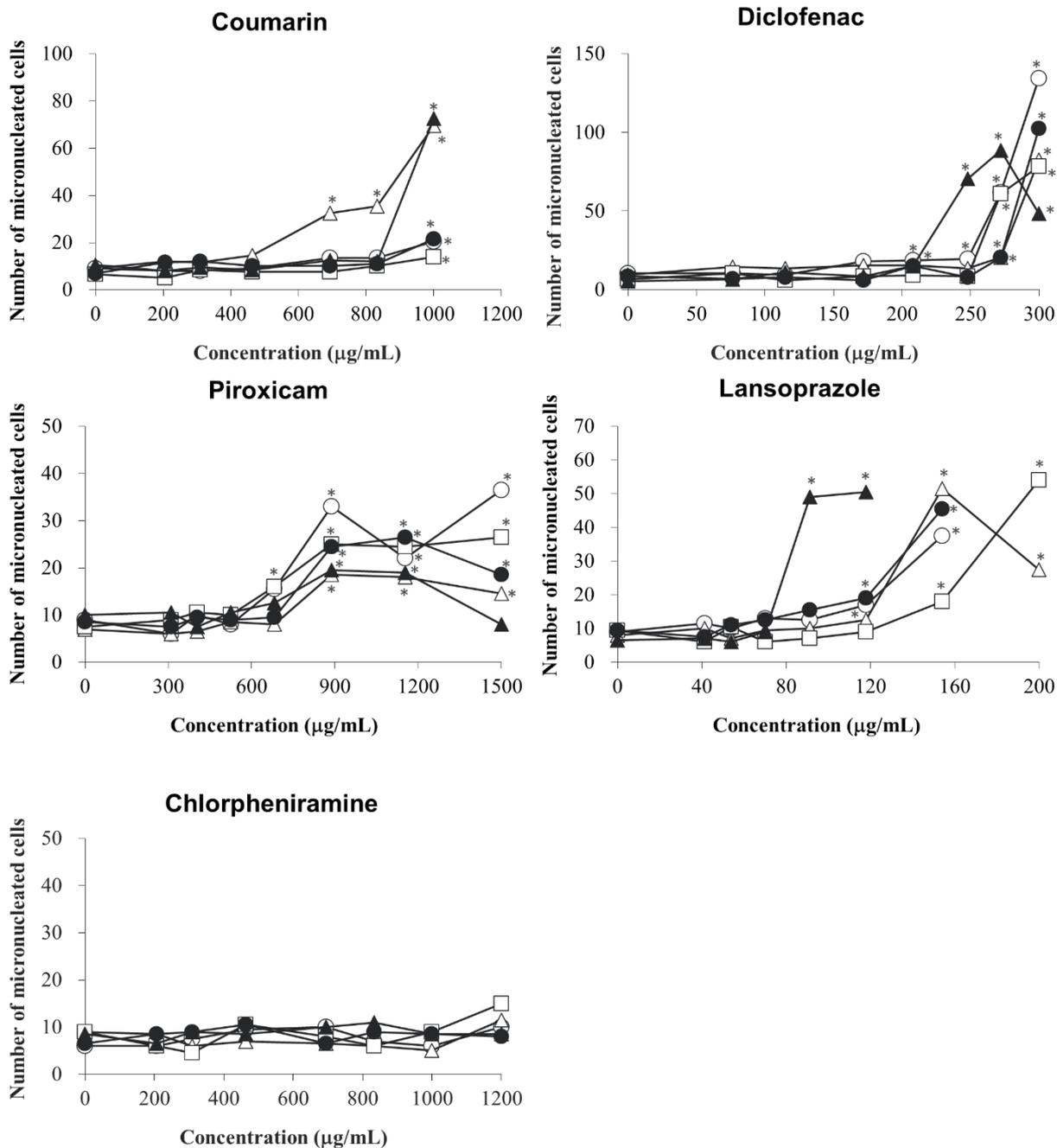


Fig. 5 In vitro micronucleus induction by coumarin, diclofenac, piroxicam, lansoprazole, and chlorpheniramine with rat, mouse, monkey, dog, and human liver S9

The results represent the mean (n=2). Open circle, rat liver S9; open triangle, mouse liver S9; open square, monkey liver S9; closed circle, dog liver S9; closed triangle, human liver S9.

* $P < 0.05$: significantly different from the vehicle control by two-tailed Fisher's exact test.

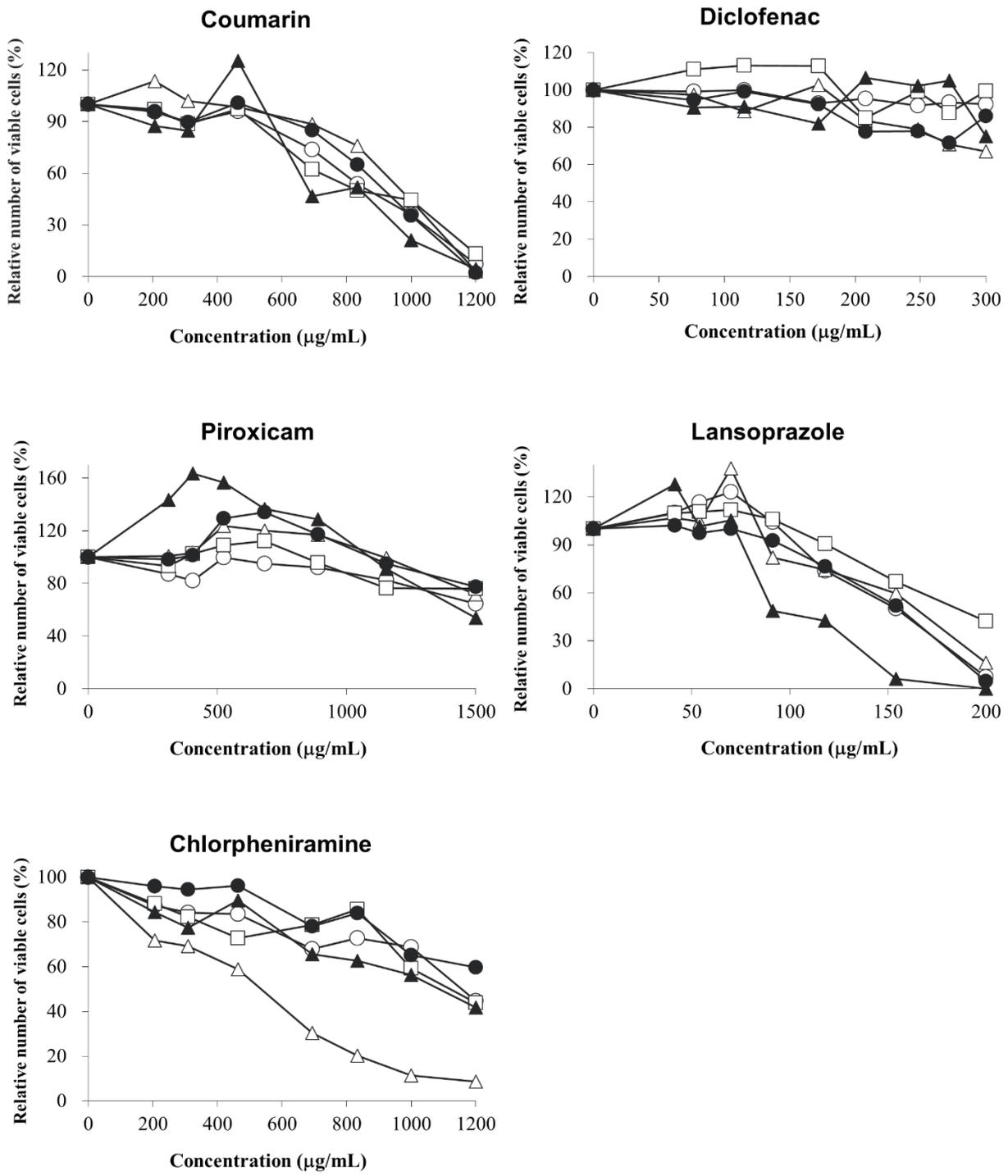


Fig. 6 Cytotoxicity by coumarin, diclofenac, piroxicam, lansoprazole, and chlorpheniramine with rat, mouse, monkey, dog, and human liver S9
 The results represent the mean (n=2). Open circle, rat liver S9; open triangle, mouse liver S9; open square, monkey liver S9; closed circle, dog liver S9; closed triangle, human liver S9.

3-2. BaP 及び CPA の代謝物解析

各動物種の肝 S9 存在下で生成した BaP 代謝物を解析したところ、benzo[*a*]pyrene-epoxide (BaP-epoxide)、9-hydroxybenzo[*a*]pyrene (9-OH-BaP)、benzo[*a*]pyrene-7,8-dihydrodiol (BaP-7,8-dihydrodiol)、hydroxybenzo[*a*]pyrene-epoxide 1 (OH-BaP-epoxide 1)、OH-BaP-epoxide 2、及び OH-BaP-epoxide 3 の 6 種類の代謝物と推定された (Fig. 7)。これら代謝物のうち、BaP-epoxide、9-OH-BaP、BaP-7,8-dihydrodiol、及び 3 種の OH-BaP-epoxide はサル肝 S9 で最も多く生成したが、ヒト肝 S9 では最も少なかった。また、各種肝 S9 存在下での BaP 小核誘発作用と 3 種の OH-BaP-epoxide の生成量に正の相関、あるいはその傾向が認められた (Fig. 8)。

各動物種の肝 S9 存在下で生成した CPA 代謝物として、4-hydroxycyclophosphamide (4-OH-CPA)、carboxyphosphamide、4-keto-cyclophosphamide (4-keto-CPA)、及び phosphamide mustard が検出された (Fig. 9)。これら代謝物のうち、4-OH-CPA 及び phosphamide mustard はイヌ肝 S9 含有培養液で最も多く生成された。なお、サル肝 S9 含有培養液中では、CPA の含量が顕著に低下し、carboxyphosphamide 及び 4-keto-CPA 量が顕著に増加した (Fig. 9)。

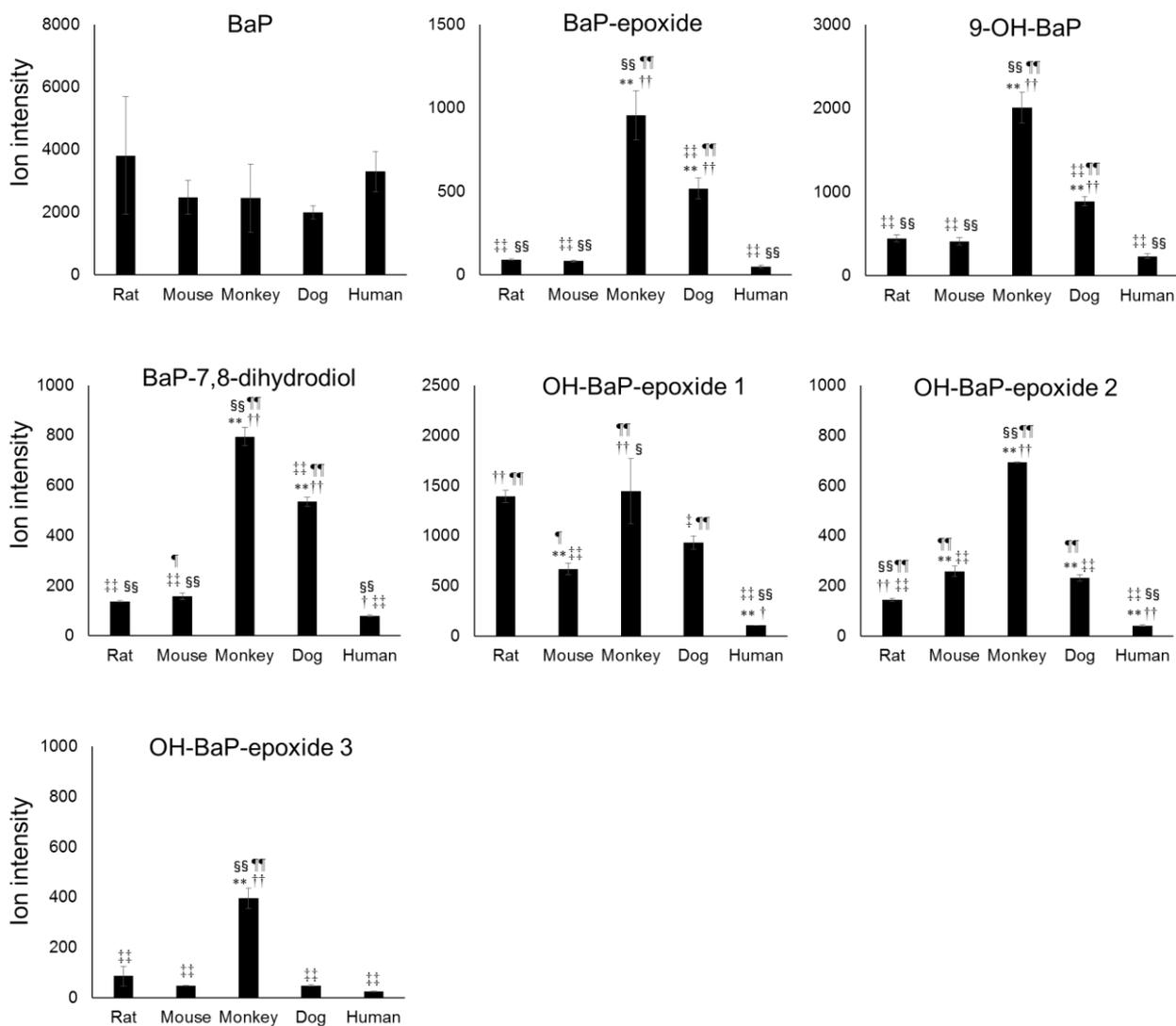


Fig. 7 Metabolic profile of benzo[*a*]pyrene in the assay system with rat, mouse, monkey, dog, and human liver S9

Values represent the means \pm standard deviation ($n=3$). Tukey's multiple comparison test was carried out:

** $P < 0.01$: significantly different from the rat liver S9; † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$: significantly different from the mouse liver S9; ‡ $P < 0.05$, ‡‡ $P < 0.01$: significantly different from the monkey liver S9; §§ $P < 0.01$: significantly different from the dog liver S9; ¶ $P < 0.05$, ¶¶ $P < 0.01$: significantly different from the human liver S9.

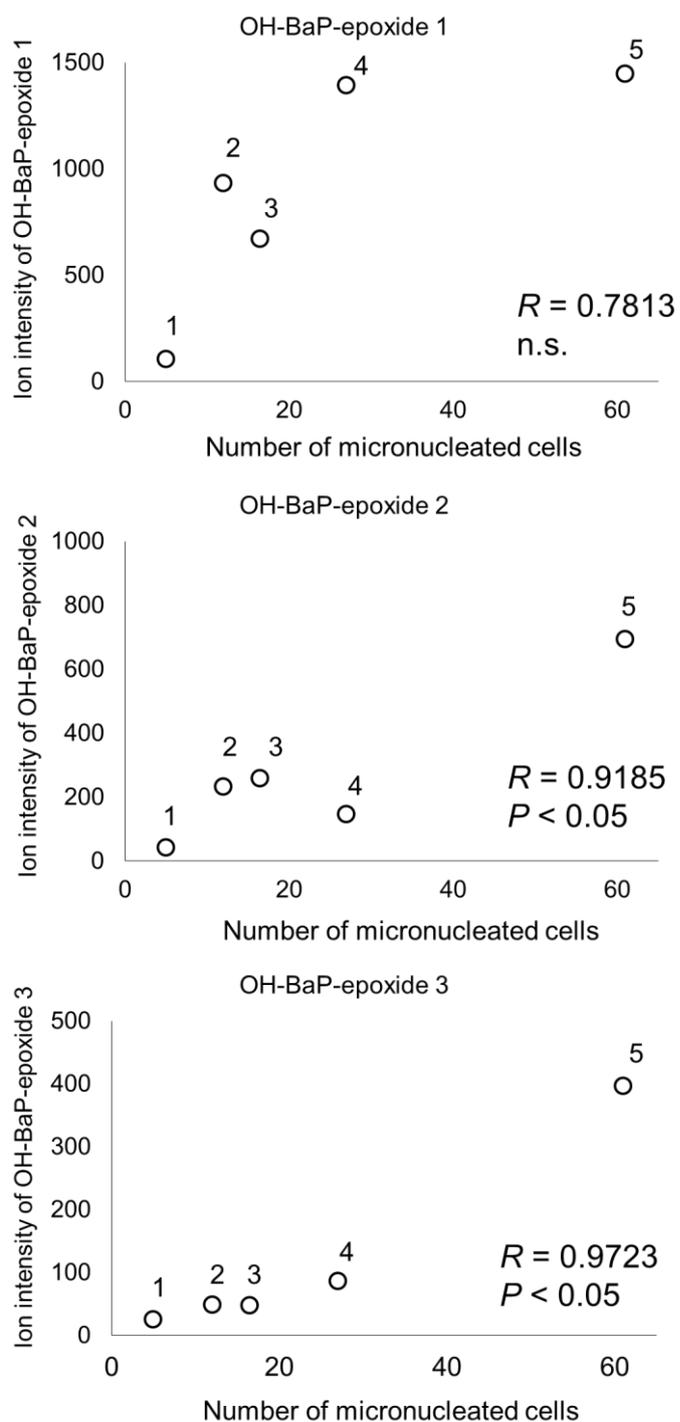


Fig. 8 Relationship between the ion intensity of OH-BaP-epoxides and micronucleus induction by BaP in the presence of rat, mouse, monkey, dog, and human liver S9

1: human liver S9, 2: dog liver S9, 3: mouse liver S9, 4: rat liver S9, 5: monkey liver S9

$P < 0.05$: significantly correlated between the amount of OH-BaP-epoxide and the number of micronucleated cells evaluated by regression analysis.

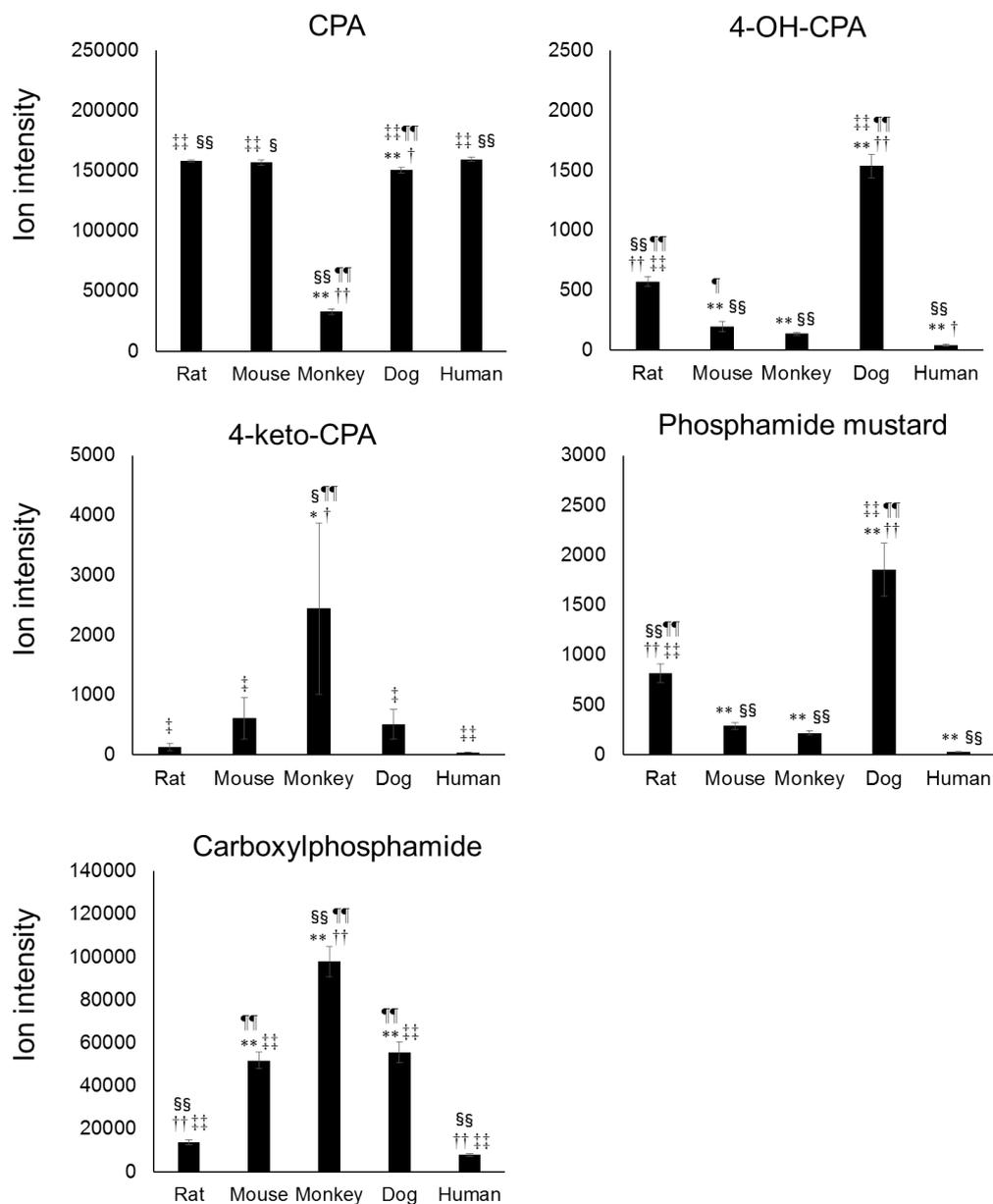


Fig. 9 Metabolic profile of CPA in the presence of rat, mouse, monkey, dog, and human liver S9

Values represent the means \pm standard deviation ($n=3$). Tukey's multiple comparison test was carried out: $*P < 0.05$, $**P < 0.01$: significantly different from the rat liver S9; $\dagger P < 0.05$, $\dagger\dagger P < 0.01$: significantly different from the mouse liver S9; $\ddagger P < 0.05$, $\ddagger\dagger P < 0.01$: significantly different from the monkey liver S9; $\S\S P < 0.01$: significantly different from the dog liver S9; $\P P < 0.05$, $\P\P P < 0.01$: significantly different from the human liver S9.

第四節 考察

本章では、*in vitro* 遺伝毒性試験でみられる陽性結果のヒトへの外挿性を評価するため、非臨床安全性試験で用いられるラット、マウス、サル、及びイヌ、並びにヒト由来の肝 S9 を用いて 7 種の遺伝毒性物質に対する小核誘発能の種差を評価した結果、BaP 及び CPA の小核誘発能には顕著な種差がみられた。

BaP は、CYP1A1 により BaP-epoxide に代謝され、BaP-7,8-dihydrodiol 或いは 9-hydroxy-BaP を経て anti-benzo[*a*]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide (anti-BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide) 或いは 9-hydroxybenzo[*a*]pyrene-4,5-epoxide に代謝される。これらエポキシドは、DNA と付加体を形成することが報告されている (Hodek et al., 2013; Baird et al., 2005)。また、ラット肝では CYP1A2 を介した BaP 代謝物が DNA と付加体を形成することが報告されている (Hodek et al., 2013)。本章において、BaP を各種動物由来の肝 S9 と反応させると、いずれの肝 S9 においても 3 種の OH-BaP-epoxide が生成され、その量はサル肝 S9 で最も多かった。また、BaP の小核誘発能がサル肝 S9 で最も強かったこと、及び 3 種類の OH-BaP-epoxide 生成量と小核保有細胞数に相関関係が認められたことから、いずれの種においても OH-BaP-epoxides が DNA と付加体を形成し、小核の誘発を惹起していることが強く示唆された。

本章では、これまでに報告されている代謝物のうち、BaP-epoxide、BaP-7,8-dihydrodiol、9-hydroxy-BaP、OH-BaP-epoxide が検出されたが、OH-BaP-epoxide のいずれの位置が水酸化、或いはエポキシ化しているか同定していない。また、anti-BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide は未検出だったことから、いずれの代謝物がどのタイプの DNA 付加体を形成しているかは不明である。しかし、Hodek らは、anti-BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide 或いは 9-hydroxy-BaP-4,5-epoxide 以外の代謝物由来 DNA 付加体の存在を示唆しており、今回検出された OH-BaP-epoxides のいずれかがその代謝物である可能性が考えられた。

CPA は、ヒトでは CYP3A4/5 により 2-dechloroethylcyclophosphamide と chloroacetaldehyde

に代謝される。また CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、及び CYP3A4/5 により 4-OH-CPA に代謝され、aldophosphamide との相互変換を経て phosphamide mustard と acrolein に代謝されることが報告されている (Moore, 1991; Ekhart et al., 2008)。一方、4-OH-CPA は carboxyphosphamide に、aldophosphamide は 4-keto-CPA への解毒経路も報告されている (Moore, 1991; Ekhart et al., 2008)。Phosphamide mustard は DNA に直接作用し、そのアルキル化作用により DNA との架橋構造体を形成する (Moore, 1991)。更に、DNA 架橋体は高頻度で突然変異を誘発することが報告されている (Anderson et al. 1995)。また、CPA は、ラットやマウスにおいてもヒトと同じ経路で代謝されることが報告されている (Chen, et al., 2014; Ramirez, et al., 2019)。本章では、CPA の小核誘発能及び遺伝毒性代謝物の生成量はイヌ肝 S9 において最も高かった。CPA は、イヌの CYP2B11 により 4-OH-CPA に代謝されるが、CYP2B11 の CPA の 4 位の水酸化活性は、同じサブファミリーに属するヒト CYP2B6 及びラット CYP2B1 の活性より高いことが報告されている (Ramirez, et al., 2019)。従って、イヌ肝 S9 存在化で phosphamide mustard 及び 4-OH-CPA の生成量、並びに CPA の小核誘発作用が最も強かったことから、CPA による遺伝毒性代謝物の生成量と小核誘発能の種差は、CPA の 4 位の水酸化活性の種差に起因することが示唆された。一方、CPA の遺伝毒性代謝物の生成量及び小核誘発作用はヒト肝 S9 で最も弱かった。これまで、ヒト肝 S9 の代謝酵素活性には大きな個人差があり、これらの活性の違いが *in vitro* 遺伝毒性試験結果の相違に関連していることが報告されている (Hakura et al., 2003)。本章ではヒト肝 S9 の個人差の影響を小さくするため、50 ドナー由来の肝 S9 をプールしたヒト肝 S9 を用いた。従って、本試験で用いたヒト肝 S9 存在下における CPA の小核誘発作用は他の動物種と比較して弱いことが示された。このことから、CPA の遺伝毒性代謝物への代謝活性の種差が遺伝毒性発現の種差の原因と考えられた。一方で、ヒト由来の肝試料は、その調製条件による薬物代謝活性の低下も疑われることから、異なるロットのヒト肝 S9 を用いた再現性確認の実施が重要である。なお、サル肝 S9 は CPA を 4-OH-CPA に代謝した後、carboxyphosphamide 及び

4-keto-CPA への解毒能が他の動物種の肝 S9 と比較して強いことが示された。

Coumarin、diclofenac、及び piroxicam の代謝経路には種差があることが報告されているが (Lake, 1999; Rietjens et al., 2008; Tang et al. 1999; John, 1979; Klopas et al., 1998; Hobbs and Twomey, 1981)、本章において、これら化合物の小核誘発能に種差は認められなかったことから、これら化合物の小核誘発に寄与する遺伝毒性代謝物の生成に種差がないことが示唆された。

Chlorpheniramine は、PB-BNF 処置ラット肝 S9 存在下で小核を誘発するが、無処置ラット肝 S9 存在下では小核を誘発しないことを第一章で報告している。これらの小核試験結果の違いは、PB 及び BNF 処置によって発現が変動した CYP 分子種によって生成される遺伝毒性代謝物の量の差に起因することが第一章で示唆されている。また、chlorpheniramine は *in vivo* において遺伝毒性も発がん性も示さないことが報告されている (NTP, 2017)。従って、PB-BNF 処置ラット肝 S9 存在下での chlorpheniramine の小核誘発作用のヒトにおける外挿性はないと考えられる。

以上、BaP 及び CPA の小核誘発能の種差は、薬物代謝の種差に起因することが示された。また、BaP や CPA の場合、非げっ歯類の肝 S9 を用いると高感度で遺伝毒性を検出できることが示され、これら肝 S9 を用いた代謝活性化系はヒトにおける遺伝毒性及び発がんリスクを検出するための有用なツールとなることが示された。一方、これら薬物代謝の相違により、非げっ歯類を用いた長期の反復投与毒性試験において、ヒトでは起こらない増殖性変化等の結果が得られることも予測されることから、ヒトへの外挿性を注意深く評価することが重要である。従って、医薬品候補化合物のヒトにおける遺伝毒性評価には、ヒトの薬物代謝を反映し、その検出感度も考慮した適切な代謝活性化系を選択することの重要性が示された。

第三章 ヒト肝シトクロム P450 活性と cyclophosphamide の小核誘発能に対する個人差

第一節 小序

ヒトにおいて医薬品の代謝に寄与する主要な CYP 分子種として、CYP3A4/5、CYP2D6、CYP2Cs、CYP1A2、CYP2E1、CYP2A6 や CYP2B6 が知られており (Guengerich, 2003)、これら CYP 分子種の酵素活性には一塩基多型 (SNP) 等によって大きな個人差があることが報告されている (Autrup, 2000)。また、CYP2D6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP3A5、CYP1A2、CYP2A6、及び CYP2B6 では、SNP の種類と表現型、並びにそれらの発現頻度は多様であり (Ingelman-Sundberg, et al., 2007)、これらが医薬品の薬物動態に影響を及ぼし、効果と副作用の発現の個人差の要因になっている (Autrup, 2000)。

遺伝毒性の分野においては、薬物代謝酵素の種差の問題から、ヒト肝 S9 を用いる *in vitro* 遺伝毒性評価系の確立と有用性の議論がここ数十年トピックスとなっている (Johnson et al., 1996、Hakura et al., 1999)。また、薬物代謝酵素活性の個人差が遺伝毒性の発現に影響を及ぼすことも報告されている (Hakura et al., 1999)。一方、薬物代謝酵素活性の個人差と間接的遺伝毒性物質の遺伝毒性の強さに相関はなく (Hakura et al., 2003)、薬物代謝酵素活性の個人差がどのように遺伝毒性発現に寄与しているかは不明な点が多い。

そこで本章では、*in vitro* 遺伝毒性試験のヒトへの外挿性を高めるため、遺伝毒性物質に対する感受性と薬物代謝の個人差が遺伝毒性試験結果に及ぼす影響を明らかにし、多様性のあるヒトにおける遺伝毒性評価に最適な代謝活性化系を選択することを目的とした。そのため、78 ドナー由来の肝から調製されたマイクロソームを用いてヒト肝薬物代謝能の個人差を明らかにするとともに、SNP との関連を解析した。なお、本章では、ヒト肝における医薬品代謝に寄与し、多くの基質医薬品の血中濃度に個人差を生じることが知られている CYP1A2、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、及び CYP3A4 に焦点をあてた。また、これら肝薬物代謝能の個人差が遺伝毒性発がん物質である CPA の *in vitro* 小核試験結果に及ぼす影響を評価した。CPA は主に CYP2B6 により 4-OH-CPA に代謝され、aldophosphamide

との相互変換を経て phosphamide mustard と acrolein に代謝されるが、この 4-OH-CPA への代謝には CYP2C9、CYP2C19、及び CYP3A4/5 の関与も報告されている (Moore, 1991; Ekhart et al., 2008)。このように、CPA は医薬品の血中濃度の個人差に寄与する複数の代謝酵素により代謝されることから、各代謝酵素活性の個人差と *in vitro* 小核試験結果への影響を明確化できると考えた。その結果、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、及び CYP3A4 の活性と CPA の小核誘発作用との間に相関がみられたことから、これら CYP 分子種の組換え酵素 (薬物代謝酵素発現系) を用いて *in vitro* 小核試験を実施するとともに、CPA の代謝に寄与する代謝酵素及び遺伝毒性を発現する原因代謝物の同定を試みた。

第二節 実験材料及び方法

2-1. ヒト肝試料

ヒト肝試料の入手、ミクロソームの調製、及び DNA 単離は Tissue and Cell Research Center Munich, Daiichi Sankyo Europe, GmbH (TCRM; Munich, Germany) で実施された。ヒト肝試料は、Human Tissue and Cell Research (HTCR; Regensburg, Germany)、Kaly-Cell (Plobsheim, France)、及び Biopredic international (Saint Gregoire, France) より購入した。これら肝試料は、各施設において、ヒト組織の使用に関する倫理委員会の承認を取得し、また、使用に関する患者の同意が得られている。本章で用いた肝試料は、転移癌患者の部分肝切除後に正常組織部分を液体窒素で凍結したものを用いた。肝試料の提供患者の内訳は、男性 48 名、女性 30 名であり、年齢は 29~90 歳の範囲で、人種は不明である。

2-2. ヒト肝組織からのミクロソームの調製

凍結肝細胞を融解し、氷上において 1.15 w/v % の KCl 溶液でホモジナイズした後、温度を 4°C に設定し、677 × g で 10 分間、次いで 6942 × g で 10 分間、更に 10864 × g で 10 分間遠心分離した (Biofuge 22R; Heraeus Holdings GmbH, Hanau, Germany)。その上清を、更に

111912 × g で 60 分間超遠心し (Beckman LE-70; Beckman Coulter Inc, Indianapolis, IN, USA)、ペレットを 20%スクロース含有 1.15 w/v %の KCl 水溶液に再懸濁した。

2-3. ミクロソームにおける CYP 酵素活性測定

ヒト肝ミクロソームにおける CYP1A2、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、及び CYP3A4 の酵素活性の指標として、phenacetin *O*-deethylase、bupropion hydroxylase、diclofenac 4'-hydroxylase、*S*-(+)-mephenytoin 4'-hydroxylase、bufuralol 1'-hydroxylase、及び 6β-testosterone hydroxylase 活性を測定した。それぞれの基質及び定量する代謝物を下表に示す (Table 7)。各基質濃度はミカエリス定数 (K_m) 未満となる 50、80、10、50、10、及び 100 μM を設定した。各肝ミクロソームとそれぞれの基質を混合して 37°C で 10 分間インキュベート後、50% アセトニトリルメタノール溶液で除タンパク処理して測定対象代謝物を抽出し、LC-MS/MS (Waters 2795 Separations Module/Quattro micro API) に注入して定量した。抽出液は CAPCELL PAK C₁₈ MGII column (100 mm × 2.0 mm I.D., 5 μm, Waters Corporation) に負荷し、メタノール/蒸留水/ギ酸/酢酸アンモニウム=950/50/2/0.385 [v/v/v/w] (移動相 A) 及びメタノール/蒸留水/ギ酸/酢酸アンモニウム=50/950/2/0.385 [v/v/v/w] (移動相 B) の 2 種類の移動相を用いてリニアグラジエント法で分離した。Acetaminophen、hydroxybupropion、(±)-4'-hydroxymephenytoin、1-hydroxybufuralol、及び 6β-hydroxytestosterone の分離において、移動相 B で送液を開始し、30 秒間かけて移動相 A が 80%の割合になるよう送液した。その後、移動相 A を 80%に維持したまま 5 分 30 秒間送液し、移動相 B のみで 4 分間送液した。4'-Hydroxydiclofenac の分離において、移動相 A 及び B が 50%となる割合で送液を開始し、5 分間かけて移動相 A が 100%の割合になるよう送液した。その後、移動相 A を 100%に維持したまま 1 分間送液し、移動相 A 及び B が 50%となる割合で 4 分間送液した。各測定対象はポジティブモードにおいて、multiple reaction monitoring モードでスキャンし、各プレカーサーイオン及びプロダクトイオンは下表に示す (Table 7) ように設定した。

Table 7 Analytical conditions for the enzymatic activity of each CYP isoform

| Isoform | Substrate | Metabolite | Precursor ion [M+H] ⁺ | Product ion [M+H] ⁺ |
|---------|-----------------|---------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| CYP1A2 | Phenacetin | Acetaminophen | 151.8 | 110.3 |
| CYP2B6 | Bupropion | Hydroxybupropion | 256.1 | 238.2 |
| CYP2C9 | Diclofenac | 4'-Hydroxydiclofenac | 312.1 | 230.2 |
| CYP2C19 | (S)-Mephenytoin | (±)-4'-Hydroxymephenytoin | 236.2 | 150.7 |
| CYP2D6 | Bufralol | 1-Hydroxybufuralol | 278.2 | 185.9 |
| CYP3A4 | Testosterone | 6β-Hydroxytestosterone | 305.1 | 269.0 |

各 CYP の酵素活性を以下の式で算出した。

酵素活性 (pmol/min/mg protein) = 代謝物定量値 (μM) / インキュベーション時間 (分) /
各ミクロソームにおけるタンパク濃度 (mg/mL)

2-4. SNP 解析

DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) を用いて DNA を抽出及び精製した。薬物代謝・トランスポーター遺伝子解析用マイクロアレイ (Drug Metabolism Enzymes and Transporters ; DMET Plus™, Affymetrix Inc, Santa Clara, CA, USA) を用いて各 DNA サンプルを解析した。各 DNA サンプルの遺伝子多型位置及びハプロタイプについては、DMET Plus Premier Pack のプローブセットを用いて同定し、DMET Console ver.1.3 software を用いて genotype call、haplotype call、gene activity、及び phenotype call を解析及び決定した。予測 gene activity 及び phenotype call については、Allele Translation File (DMET_Plus.v1.20120731.translations) 及び Metabolizer Bin File (DMET_Plus.v1.20120316_Affymetrix.metabolizer) を用いて決定した。Genotype call 及び haplotype call から DMET で算出される gene activity の関係を Table 8 に示す。本解析システムの性能について、平均 call rate は 99%以上、リファレンスサンプルとの平均一致率は 99.5%以上、再現率は 99.8%以上である (Hu et al., 2012)。

Table 8 Defined gene activity expected with genotype call and haplotype call in DMET Plus™

| CYP1A2 | CYP2B6 | CYP2C9 | CYP2C19 | CYP2D6 | CYP3A4 |
|------------|---------------|-------------|----------------|--------------|-------------|
| *1: Normal | *1: Normal | *1: Normal | *1: Normal | *1: Normal | *1: Normal |
| | *2: Unknown | *2: Reduced | *2: None | *2: Normal | *3: Normal |
| | *4: Increased | *3: Reduced | *17: Increased | *3: None | *10: Normal |
| | *5: Reduced | *4: Normal | | *4: None | |
| | *6: Reduced | *5: Reduced | | *6: None | |
| | *7: Normal | | | *9: Reduced | |
| | *11: Reduced | | | *10: Reduced | |
| | *14: Reduced | | | *41: Reduced | |
| | *15: Reduced | | | | |
| | *22: Unknown | | | | |

Unknown, not defined the type of gene activity in DMET Plus™

2-5. 肝ミクロソームを用いた in vitro 小核試験

78 ドナー中 52 ドナーのミクロソームを用いて CPA の in vitro 小核試験を実施した。プラスチックチャンバースライドに CHL 細胞を 5×10^3 cells/500 μ L/chamber で播種し、24 時間培養後、13.3、18.6、26.0、36.4、51.0、71.4、及び 100 μ g/mL の CPA を含有する培地を添加した。各ドナーのミクロソームと電子伝達系に関わる補助因子 (4 mM HEPES、5 mM MgCl₂、33 mM KCl、5 mM G6P·Na₂、及び 4 mM NADP·Na) を混合したミクロソーム mix を調製し、各培養液におけるミクロソーム終濃度が 5% となるよう添加した。CPA を細胞に 6 時間曝露し、培地交換後、更に 18 時間培養した。培養終了後、第一章 2-6-1-2.小核誘発評価と同様の方法で、小核保有細胞数を計測した。被験物質曝露群の平均小核保有細胞数と媒体対照群の平均小核保有細胞数を以下の式にあてはめ、小核誘発率を算出した。

小核誘発率 (micronucleus induction rate) (%)

= 被験物質曝露群の平均小核保有細胞数 / 媒体対照群の平均小核保有細胞数 \times 100

2-6. ヒト薬物代謝酵素発現系を用いた in vitro 小核試験

ヒト CYP を発現させた BD Supersome™ シリーズ (CYP2B6、CYP2C9*1、CYP2C19、CYP2D6*1、及び CYP3A4 の各分子種と電子伝達系システム、NADPH-cytochrome P450

reductase、及び cytochrome b_5 を共発現させた細胞から調製したマイクロソーム) を Becton Dickinson and Company より購入した。BD Supersome™ シリーズは、バキュロウイルスベクターを用いて、各 CYP 遺伝子を昆虫細胞に組み込み、タンパク発現させて調製されたマイクロソームである。対照として、BD Supersome™ (Sf9 昆虫細胞コントロール) を用いた。BD Supersome™ (Sf9 昆虫細胞コントロール) は NADPH-cytochrome P450 reductase、及び cytochrome b_5 のみを発現させた細胞から調製したマイクロソームである。In vitro 小核試験は、本章 2-5. 肝マイクロソームを用いた in vitro 小核試験と同様に実施し、CPA の曝露濃度は 1.47、2.65、4.76、8.57、15.4、27.8、及び 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。

2-7. ヒト薬物代謝酵素発現系における CPA の代謝物解析

CPA の終濃度が 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう培地に添加後、BD Supersome™ (CYP2B6、CYP2C9*1、CYP2C19、CYP2D6*1、及び CYP3A4) と混合し、本章 2-6. ヒト薬物代謝酵素発現系を用いた in vitro 小核試験と同じ条件で 6 時間インキュベートした。インキュベート後、混合液を 3 倍量のメタノールで除タンパク処理し、抽出された代謝物を UPLC/TOFMS (ACQUITY UPLC/LCT Premier; Waters Corporation)を用いて定量した。各測定対象は ACQUITY UPLC BEH C_{18} column (100 mm \times 2.1 mm I.D., 1.7 μm , Waters Corporation) に負荷し、0.1%ギ酸水溶液及び 0.1%ギ酸メタノール溶液を移動相としたリニアグラジエント法で分離した。グラジエント条件として、2%メタノール含有の移動相で 1 分間送液し、その後 6 分間かけてメタノールの含有率を 98%にし、98%メタノール含有移動相で 10 分間送液した。測定対象の検出条件には、ポジティブモード及びネガティブモードにおいて、フルスキャンモード法を用い、質量電荷比 (m/z) が 100~1000 の範囲の測定対象物質を探索した。クロマトグラム上に検出されたピークの保持時間、 m/z 、及びピーク強度を MZmine 2 (Pluskal et al., 2010) を用いて解析した。更に、LC-MS/MS システム (Waters 2795 Separations Module/Quattro micro; Waters Corporation) を用いて各代謝物のマススペクトルを解析した。CPA の代謝物の抽出液

を Xterra MS C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm I.D., 5 μm, Waters Corporation) に負荷し、上記の UPLC-TOFMS と同様の移動相組成で分離し、プロダクトイオンスキャン法でイオンフラグメントパターンを検出した。得られたフラグメントを用いて各代謝物の構造式を推定した。

2-8. 統計学的解析

各 CYP 分子種の酵素活性及び CPA の代謝物量は平均値及び標準偏差で表し、CPA の代謝物量は Dunnett's multiple comparison test により統計学的解析を実施した。統計解析には解析ソフト SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いた。CYP の酵素活性と小核誘発率の関係については、Pearson's correlation coefficient を算出して解析した。統計解析には解析ソフト SAS を用いた。ヒト肝ミクロソーム及びヒト薬物代謝酵素発現系を用いた in vitro 小核試験に関しては、CPA 処理群の小核誘発率を two-tailed Fischer's exact test で解析し、濃度依存性は Cochran-Armitage trend test で解析した。統計解析には解析ソフト EXSUS (ver 8.1.0、株式会社 CAC クロア) を用いた。統計学的な有意水準は $P < 0.05$ とし、小核誘発率が有意に増加し、且つ用量依存性が認められた場合を陽性と判定した。また、CYP の酵素活性と遺伝子から予想される表現型の関係は、箱ひげ図で表し、箱の下端、中央、及び上端はそれぞれ第一四分位点、中央値、及び第三四分位点を表す。箱の長さは四分位範囲 (inter-quartile range ; IQR) を示し、箱から伸びるひげの長さは $1.5 \times \text{IQR}$ を表し、はずれ値は箱の端から $1.5 \times \text{IQR}$ の距離より外側の点として表した。統計学的解析には Steel's multiple comparison test を実施し、解析ソフト SAS を用いた。

第三節 実験結果

3-1. ヒト肝ミクロソームにおける各 CYP 分子種の酵素活性の個人差

ヒト肝ミクロソームにおける CYP1A2、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、及び CYP3A4 の酵素活性には個体間差があり、特に CYP2B6、CYP2C19、及び CYP2D6 における

個体間差は他の分子種と比較して顕著であった (Fig. 10)。一方、これら酵素活性には性別、年齢、化学療法を除いた投薬、及び化学療法の有無による差異はなかった (Table 9)。なお、78 ドナー中、CYP2C9 は 77 ドナー、CYP3A4 は 74 ドナー由来の肝ミクロソーム中の活性測定が可能であった。

各 CYP 遺伝子における SNP 解析の結果、野生型 (*1) と異なるアレルをもつドナーが複数存在したが、CYP1A2 及び CYP3A4 では全てのドナーが extensive metabolizer (EM) であることが示唆された (Table 10)。他方、CYP2C9 では intermediate metabolizer (IM) 或いは EM であることが示唆された (Table 10)。CYP2B6、CYP2C19、及び CYP2D6 はほぼ全てのドナーが IM、EM 或いは ultra-rapid metabolizer (UM) に分類されたが、一部のドナーでは表現型が分類できなかった (Table 10)。CYP2B6、CYP2C19、及び CYP2D6 の酵素活性は予測される表現型と相関し、EM 或いは UM の酵素活性は poor metabolizer (PM) 或いは IM の酵素活性と比較して高値であった (Fig. 11)。

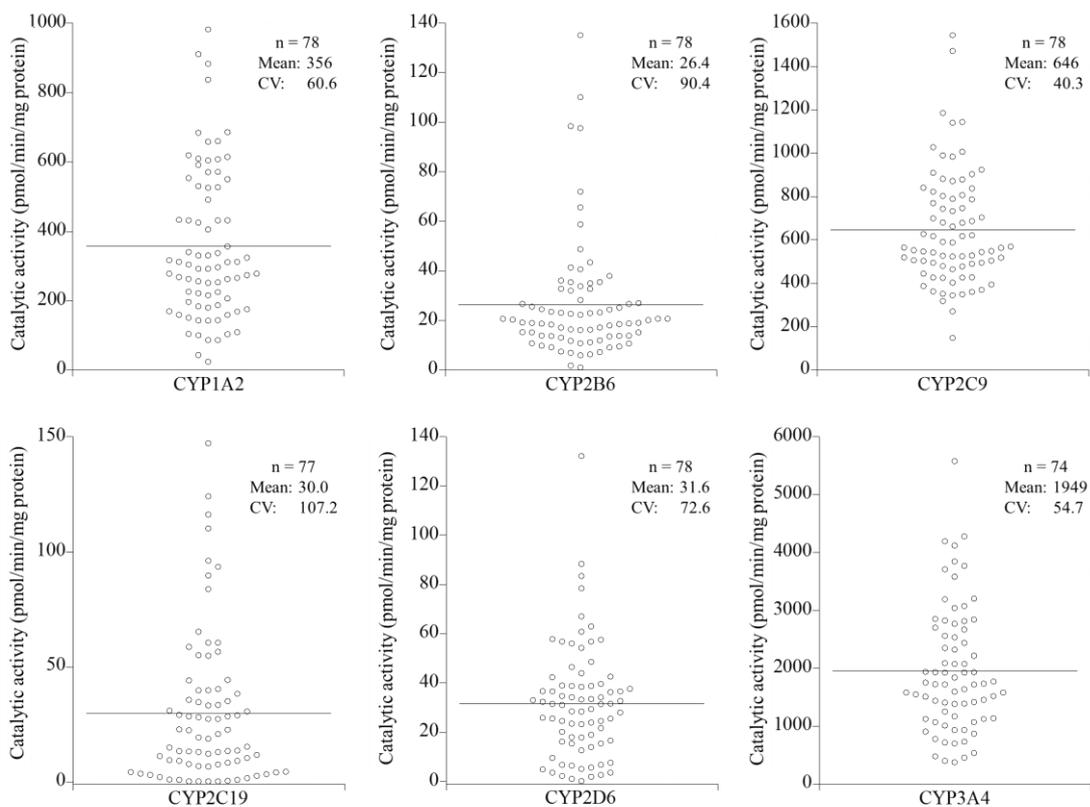


Fig. 10 Inter-individual variation in enzymatic activity of six CYP isoforms in human liver samples

The enzymatic activity of CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4 of each donor is represented by dot plots. Bar represents the mean values.

CV, coefficient of variance

Table 9 Summary of the enzymatic activity of each CYP isoform with respect to gender, age, medication, and chemotherapy

| Isoform | Enzymatic activity (pmol/min/mg protein) | | | | | | Age |
|---------|--|------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------|
| | Gender | | Medication* | | Chemotherapy | | R |
| | Male (n=48) | Female (n=30) | Yes (n=45) | No (n=33) | Yes (n=25) | No (n=54) | |
| CYP1A2 | 353/300 | 365/299 | 304/266 | 431/342 | 320/270 | 372/307 | -0.1022 |
| CYP2B6 | 23.9/18.8 | 30.6/23.5 | 26.5/18.2 | 26.3/21.3 | 24.9/19.3 | 27.1/19.6 | 0.0141 |
| CYP2C9 | 674/575 | 601/546 | 614/557 | 692/606 | 600/549 | 666/601 | -0.0202 |
| CYP2C19 | 29.9/14.0 | 29.2/27.0 | 25.6/13.0 | 35.4/28.8 | 19.2/11.0 | 34.2/27.7 | -0.3744 |
| CYP2D6 | 36.7/33.2 | 23.3/25.4 | 30.1/31.4 | 33.7/28.7 | 34.3/32.1 | 30.4/28.7 | 0.0356 |
| CYP3A4 | 1887/1627 | 2046/2065 | 1737/1554 | 2260/2074 | 1688/1511 | 2067/1764 | -0.1936 |

The values of each enzymatic activity represented mean/median

R: correlation coefficient.

*: excluded chemotherapy

Table 10 Allelic classification of CYP genes and expected phenotypes of each CYP in human liver samples

| Sample No. | CYP1A2 | | CYP2B6 | | CYP2C9 | | CYP2C19 | | CYP2D6 | | CYP3A4 | |
|------------|------------|--------------------|------------|--------------------|-----------------|--------------------|------------|--------------------|--------------------------|--------------------|------------|--------------------|
| | DMET Call# | expected phenotype | DMET Call# | expected phenotype | DMET Call# | expected phenotype | DMET Call# | expected phenotype | DMET Call# | expected phenotype | DMET Call# | expected phenotype |
| DK1 | *1A/*1F | EM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM | *4/*6 | PM | *1/*1 | EM |
| DK2 | *1F/*1F | EM | *1/*4 | UM or EM | *1/*3 | EM or IM | *1/*1 | EM | *4/*4 | PM | *1/*1 | EM |
| DK3 | *1A/*1F | EM | *1/*5 | EM or IM | *1/*1 | EM | *2A/*2B | PM | *1/*4 | IM | *1/*1 | EM |
| DK4 | *1F/*1F | EM | *2/*6 | unknown | *1/*1 | EM | *1/*17 | UM or EM | *1/*2 | EM | *1/*1 | EM |
| DK5 | *1A/*1F | EM | *1/*6 | EM or IM | *1/*2 | EM or IM | *1/*2B | IM | *1/*6 | IM | *1/*1 | EM |
| DK6 | *1A/*1F | EM | *1/*1 | EM | *1/*3, *3/*5 | EM or IM | *1/*1 | EM | *1/*2 | EM | *1/*1 | EM |
| DK7 | *1A/*1F | EM | *1/*1 | EM | *1/*3 | EM or IM | *1/*17 | UM or EM | *4/*4,*4/*10, *10/*10 | IM or PM | *1/*3 | EM |
| DK8 | *1F/*1F | EM | *6/*6 | IM | *1/*1 | EM | *2A/*17 | Not PM | *2/*2 | EM | *1/*1 | EM |
| DK9 | *1A/*1F | EM | *1/*1 | EM | *1/*3 | EM or IM | *1/*1 | EM | *1/*2 | EM | *1/*1 | EM |
| DK10 | *1A/*1F | EM | *1/*6 | EM or IM | *1/*1 | EM | *2B/*17 | Not PM | *1/*41 | EM or IM | *1/*1 | EM |
| DK11 | *1A/*1F | EM | *1/*1 | EM | *1/*2 | EM or IM | *1/*17 | UM or EM | *2/*10 | EM or IM | *1/*1 | EM |
| DK12 | *1F/*1F | EM | *1/*6 | EM or IM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM | *2/*4 | IM | *1/*1 | EM |
| DK13 | *1F/*1F | EM | *2/*6 | unknown | *1/*1 | EM | *17/*17 | UM | *1/*2 | EM | *1/*1 | EM |
| DK14 | *1A/*1F | EM | *1/*5 | EM or IM | *1/*1 | EM | *1/*2A | IM | *2/*2 | EM | *1/*1 | EM |
| DK15 | *1A/*1F | EM | *11/*15 | IM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM | *1/*4 | IM | *1/*1 | EM |

| | | | | | | | | | | | | |
|------|---------|----|---------|----------|-------|----------|---------|----------|--------|----------|-------|----|
| DK16 | *1F/*1F | EM | *1/*1 | EM | *1/*3 | EM or IM | *1/*17 | UM or EM | *1/*4 | IM | *1/*1 | EM |
| DK17 | *1A/*1F | EM | *1/*6 | EM or IM | *1/*1 | EM | *1/*2A | IM | *2/*2 | EM | *1/*1 | EM |
| DK18 | *1A/*1F | EM | *1/*1 | EM | *1/*2 | EM or IM | *1/*1 | EM | *2/*41 | EM or IM | *1/*1 | EM |
| DK19 | *1F/*1F | EM | *1/*1 | EM | *1/*2 | EM or IM | *1/*17 | UM or EM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM |
| DK20 | *1A/*1F | EM | *2/*6 | unknown | *1/*2 | EM or IM | *1/*17 | UM or EM | *1/*2 | EM | *1/*1 | EM |
| DK21 | *1A/*1F | EM | *1/*6 | EM or IM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM | *2/*2 | EM | *1/*1 | EM |
| DK22 | *1F/*1F | EM | *1/*1 | EM | *1/*3 | EM or IM | *1/*1 | EM | *2/*4 | IM | *1/*1 | EM |
| DK23 | *1F/*1F | EM | *1/*6 | EM or IM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM | *2/*2 | EM | *1/*1 | EM |
| DK24 | *1A/*1F | EM | *1/*5 | EM or IM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM | *1/*4 | IM | *1/*1 | EM |
| DK25 | *1A/*1F | EM | *1/*6 | EM or IM | *1/*1 | EM | *1/*17 | UM or EM | *1/*1 | EM | *1/*3 | EM |
| DK26 | *1F/*1F | EM | *1/*1 | EM | *1/*2 | EM or IM | *1/*1 | EM | *2/*4 | IM | *1/*1 | EM |
| DK27 | *1A/*1A | EM | *1/*5 | EM or IM | *1/*2 | EM or IM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM |
| DK28 | *1A/*1F | EM | *11/*22 | unknown | *1/*1 | EM | *1/*17 | UM or EM | *1/*41 | EM or IM | *1/*1 | EM |
| DK29 | *1F/*1F | EM | *2/*6 | unknown | *1/*2 | EM or IM | *1/*2A | IM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM |
| DK30 | *1A/*1F | EM | *1/*6 | EM or IM | *1/*1 | EM | *1/*2A | IM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM |
| DK31 | *1F/*1F | EM | *2/*5 | unknown | *1/*1 | EM | *1/*17 | UM or EM | *1/*4 | IM | *1/*1 | EM |
| DK32 | *1F/*1F | EM | *1/*6 | EM or IM | *1/*2 | EM or IM | *1/*1 | EM | *2/*4 | IM | *1/*1 | EM |
| DK33 | *1F/*1F | EM | *1/*2 | Not PM | *1/*1 | EM | *17/*17 | UM | *3/*4 | PM | *1/*1 | EM |
| DK34 | *1F/*1F | EM | *1/*6 | EM or IM | *1/*2 | EM or IM | *1/*1 | EM | *2/*41 | EM or IM | *1/*1 | EM |
| DK35 | *1A/*1F | EM | *1/*2 | Not PM | *1/*1 | EM | *1/*17 | UM or EM | *2/*4 | IM | *1/*1 | EM |
| DK36 | *1F/*1F | EM | *1/*1 | EM | *1/*2 | EM or IM | *1/*1 | EM | *1/*4 | IM | *1/*1 | EM |
| DK37 | *1F/*1F | EM | *6/*6 | IM | *1/*1 | EM | *2B/*17 | Not PM | *2/*10 | EM or IM | *1/*1 | EM |

| | | | | | | | | | | | | |
|------|---------|----|--------|----------|-----------------|----------|---------|----------|--------|----------|-------|----|
| DK38 | *1A/*1A | EM | *1/*6 | EM or IM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM | *1/*4 | IM | *1/*1 | EM |
| DK39 | *1A/*1A | EM | *1/*5 | EM or IM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM | *1/*4 | IM | *1/*1 | EM |
| DK40 | *1A/*1F | EM | *1/*2 | Not PM | *1/*1 | EM | *2B/*17 | Not PM | *1/*3 | IM | *1/*3 | EM |
| DK41 | *1F/*1F | EM | *1/*1 | EM | *1/*2 | EM or IM | *1/*1 | EM | *4/*9 | IM or PM | *1/*1 | EM |
| DK42 | *1A/*1F | EM | *2/*4 | Not PM | *1/*1 | EM | *1/*17 | UM or EM | *2/*2 | EM | *1/*1 | EM |
| DK43 | *1A/*1A | EM | *1/*11 | EM or IM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM | *1/*2 | EM | *1/*1 | EM |
| DK44 | *1F/*1F | EM | *1/*6 | EM or IM | *1/*1 | EM | *1/*17 | UM or EM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM |
| DK45 | *1A/*1F | EM | *6/*6 | IM | *1/*1 | EM | *1/*2A | IM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM |
| DK46 | *1F/*1F | EM | *1/*6 | EM or IM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM | *1/*41 | EM or IM | *1/*1 | EM |
| DK47 | *1F/*1F | EM | *1/*6 | EM or IM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM | *2/*4 | IM | *1/*1 | EM |
| DK48 | *1A/*1F | EM | *1/*1 | EM | *1/*2, *2/*4 | EM or IM | *1/*17 | UM or EM | *1/*41 | EM or IM | *1/*1 | EM |
| DK49 | *1A/*1A | EM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM | *17/*17 | UM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM |
| DK50 | *1A/*1F | EM | *6/*6 | IM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM | *1/*4 | IM | *1/*1 | EM |
| DK51 | *1F/*1F | EM | *1/*6 | EM or IM | *1/*3 | EM or IM | *1/*1 | EM | *1/*2 | EM | *1/*3 | EM |
| DK52 | *1A/*1F | EM | *1/*1 | EM | *1/*3 | EM or IM | *1/*17 | UM or EM | *2/*3 | IM | *1/*1 | EM |
| DK53 | *1A/*1F | EM | *1/*5 | EM or IM | *1/*11 | EM or IM | *1/*2A | IM | *1/*4 | IM | *1/*1 | EM |
| DK54 | *1F/*1F | EM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM | *1/*2A | IM | *1/*4 | IM | *1/*1 | EM |
| DK55 | *1A/*1F | EM | *2/*6 | unknown | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM | *1/*41 | EM or IM | *1/*1 | EM |
| DK56 | *1A/*1F | EM | *1/*6 | EM or IM | *1/*1 | EM | *1/*2A | IM | *1/*4 | IM | *1/*1 | EM |
| DK57 | *1F/*1L | EM | *6/*14 | IM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM | *2/*41 | EM or IM | *1/*1 | EM |

| | | | | | | | | | | | | |
|------|---------|----|-----------------|-----------------|-------|----------|---------|----------|--------|----------|--------------------------|----|
| DK58 | *1F/*1F | EM | *1/*6 | EM or IM | *1/*1 | EM | *1/*2A | IM | *4/*4 | PM | *1/*1 | EM |
| DK59 | *1F/*1F | EM | *1/*7, *5/*6 | Not PM or IM | *1/*1 | EM | *17/*17 | UM | *4/*41 | IM or PM | *1/*1 | EM |
| DK60 | *1A/*1F | EM | *6/*22 | unknown | *1/*2 | EM or IM | *1/*17 | UM or EM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM |
| DK61 | *1A/*1F | EM | *1/*1 | EM | *1/*2 | EM or IM | *1/*17 | UM or EM | *1/*2 | EM | *1/*1 | EM |
| DK62 | *1F/*1F | EM | *1/*4 | UM or EM | *1/*1 | EM | *1/*17 | UM or EM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM |
| DK63 | *1F/*1F | EM | *1/*5 | EM or IM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM | *1/*2 | EM | *1/*1 | EM |
| DK64 | *1F/*1F | EM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM | *1/*17 | UM or EM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM |
| DK65 | *1F/*1F | EM | *1/*2 | Not PM | *1/*1 | EM | *1/*2A | IM | *1/*2 | EM | *1/*1 | EM |
| DK67 | *1F/*1F | EM | *1/*1 | EM | *1/*2 | EM or IM | *1/*1 | EM | *4/*41 | IM or PM | *1/*1 | EM |
| DK68 | *1F/*1F | EM | *1/*6 | EM or IM | *1/*3 | EM or IM | *1/*2A | IM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM |
| DK69 | *1F/*1F | EM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM | *1/*2A | IM | *2/*4 | IM | *1/*1 | EM |
| DK70 | *1F/*1F | EM | *1/*6 | EM or IM | *1/*1 | EM | *2A/*17 | Not PM | *4/*41 | IM or PM | *1/*1 | EM |
| DK71 | *1F/*1F | EM | *1/*6 | EM or IM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM | *3/*4 | PM | *1/*1 | EM |
| DK72 | *1F/*1F | EM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM | *1/*2B | IM | *1/*41 | EM or IM | *1/*1 | EM |
| DK73 | *1A/*1F | EM | *1/*2 | Not PM | *1/*1 | EM | *1/*17 | UM or EM | *1/*2 | EM | *1/*1 | EM |
| DK74 | *1F/*1F | EM | *1/*6 | EM or IM | *1/*3 | EM or IM | *1/*2A | IM | *1/*41 | EM or IM | *1/*1 | EM |
| DK75 | *1A/*1F | EM | *4/*6 | Not PM | *1/*1 | EM | *2A/*17 | Not PM | *1/*1 | EM | *1/*1,*1/*1 0,*10/*10 | EM |
| DK76 | *1F/*1F | EM | *1/*7, *5/*6 | Not PM or IM | *1/*1 | EM | *1/*17 | UM or EM | *1/*4 | IM | *1/*1 | EM |

| | | | | | | | | | | | | |
|------|---------|----|-------|----------|-------|----------|--------|----|--------|----------|-------|----|
| DK77 | *1A/*1F | EM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM | *1/*1 | EM | *4/*4 | PM | *1/*1 | EM |
| DK78 | *1F/*1F | EM | *1/*5 | EM or IM | *1/*3 | EM or IM | *1/*2A | IM | *2/*41 | EM or IM | *1/*1 | EM |

#: DMET Plus known call; PM: poor metabolizer, IM: intermediate metabolizer, EM: extensive metabolizer, UM: ultra-rapid metabolizer

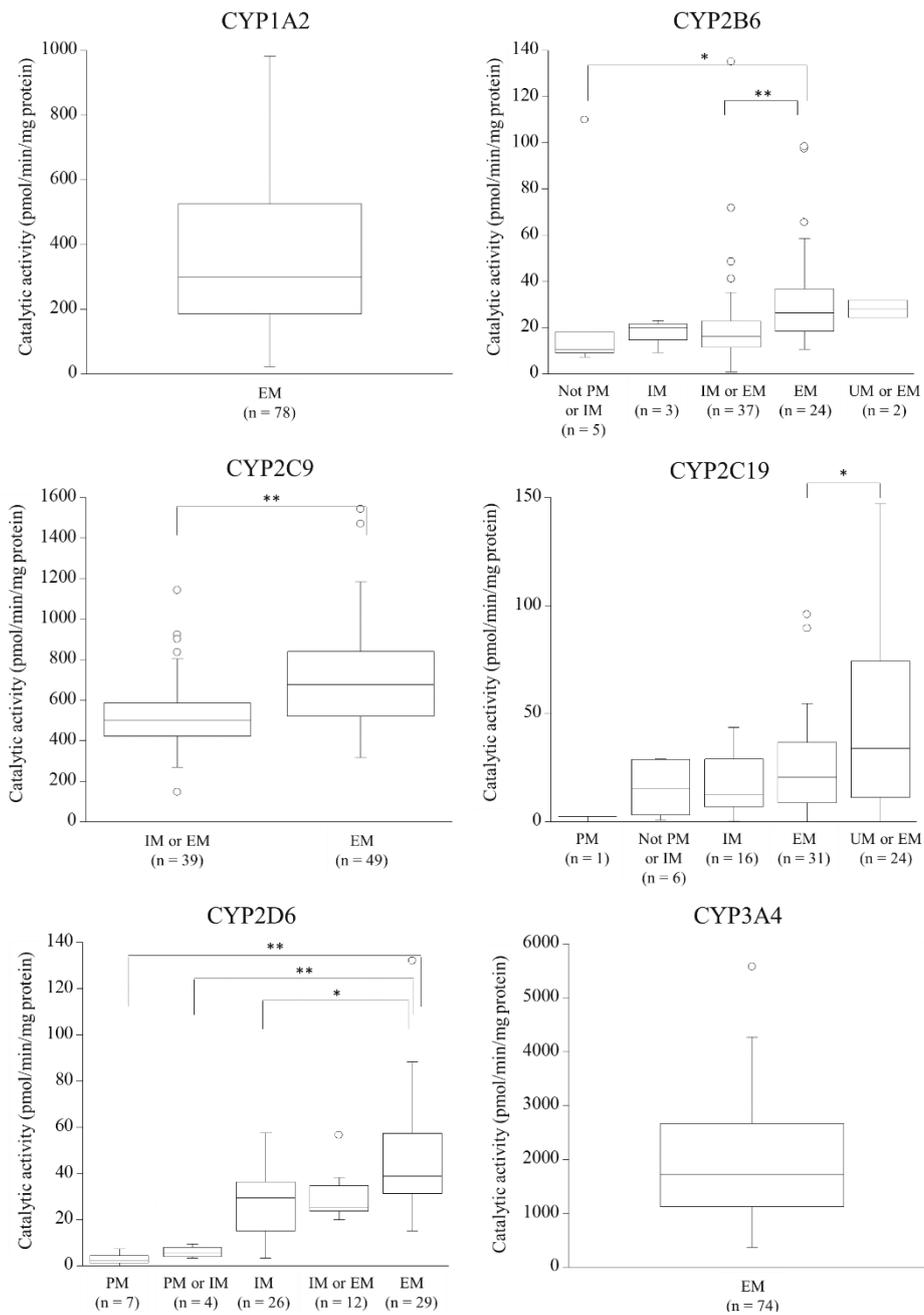


Fig. 11 Relationship between the enzymatic activity of CYP isoforms and their metabolic phenotypes

Each enzymatic activity was represented as a boxplot with respect to each metabolic phenotype. In each plot, the whiskers represent $1.5 \times$ inter-quartile range and the boxes represent the 25th, 50th, and 75th percentiles. The outliers are plotted above the whiskers.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: obtained upon multiple comparisons with the extensive metabolizer group by Steel's test

3-2. In vitro 小核試験

52 ドナーのヒト肝由来ミクロソームを用いて CPA の *in vitro* 小核試験を実施した結果、52 ドナー中 47 ドナーで濃度依存的な小核誘発作用が認められた (Fig. 12)。一方、5 ドナーでは CPA による小核誘発作用は認められなかった。CPA の小核誘発能と CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、及び CYP3A4 の酵素活性には正の相関が認められたが、CYP1A2 及び CYP2D6 ではそのような相関は認められなかった (Fig. 13)。

次に、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、及び CYP3A4 の薬物代謝酵素発現系 (組換え酵素) を用いて、CPA の *in vitro* 小核試験を実施した結果、CYP2B6、CYP2C19、及び CYP3A4 の発現系では、CPA は濃度依存的に小核誘発作用を示した (Fig. 14)。また、CPA による小核保有細胞数の有意な増加が認められた最低濃度は、CYP2B6、CYP2C19、及び CYP3A4 の発現系添加時には、それぞれ 2.65、4.76、及び 15.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。一方、CYP2C9 及び CYP2D6 の発現系添加時には、CPA による小核誘発はみられなかった (Fig. 14)。

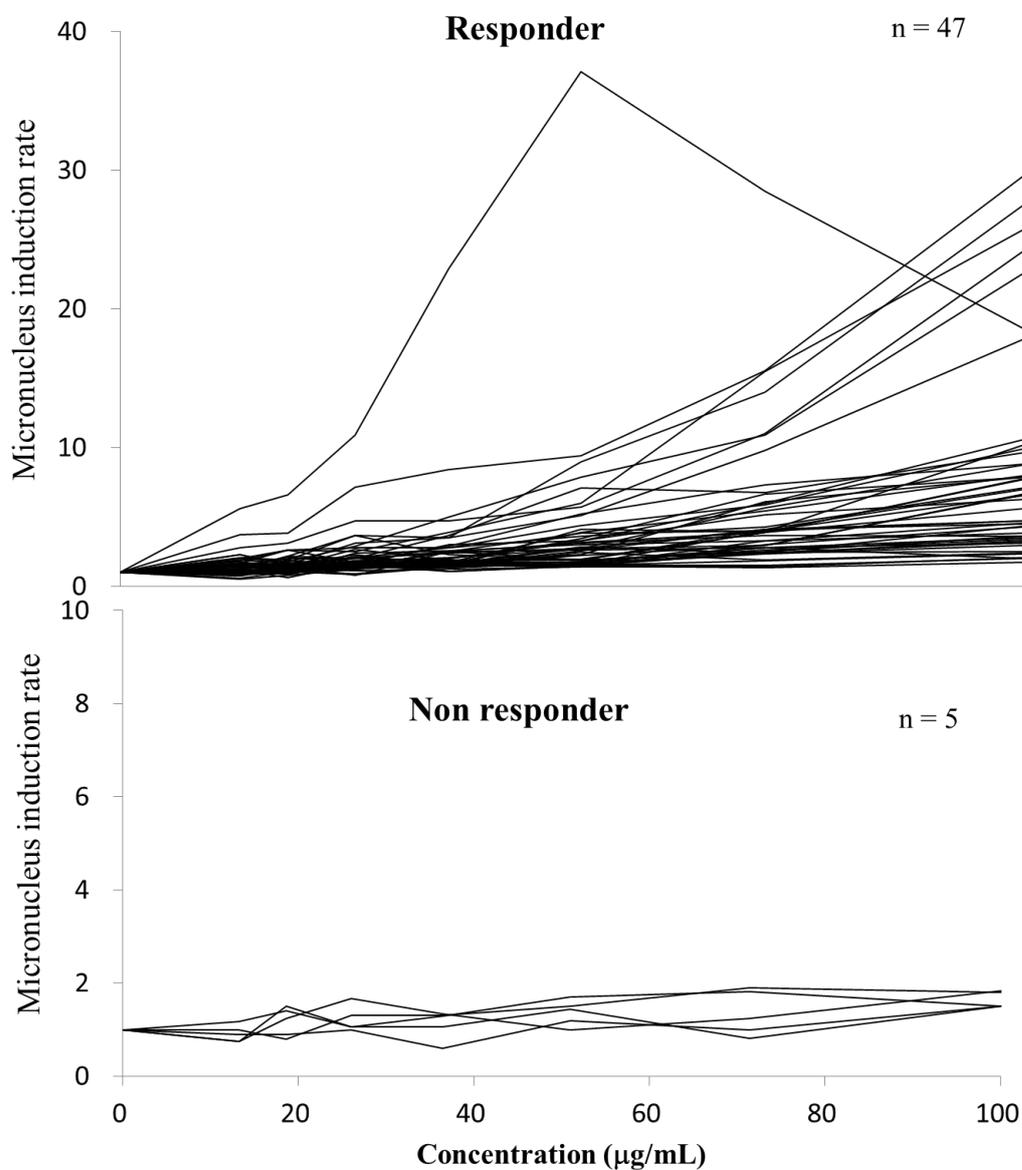


Fig. 12 Inter-individual variation in micronucleus induction caused by CPA with human liver samples

Micronucleus induction rate of each donor was expressed by a dose-response line.

The results represent mean (n=2). Responders and non-responders were identified based on the *P* value < 0.05 obtained upon pairwise comparisons with the control group by Fisher's exact test and dose-dependency by Cochran-Armitage trend test.

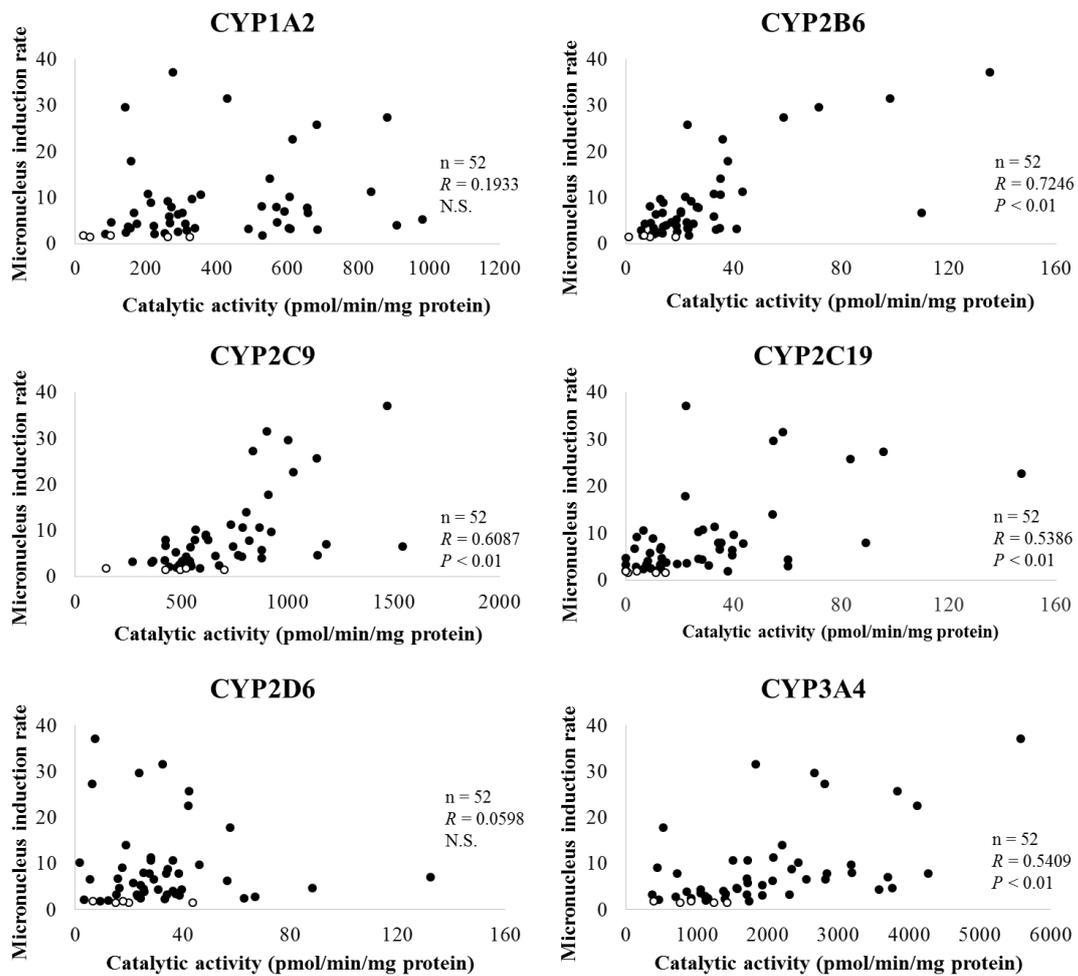


Fig. 13 Relationships between the activity of CYP isoforms and micronucleus induction by CPA in human liver samples

The relationships were statistically evaluated by Pearson's correlation analysis. Open circle, non-responder; solid circle, responder.

R: correlation coefficient, N.S.: not significant

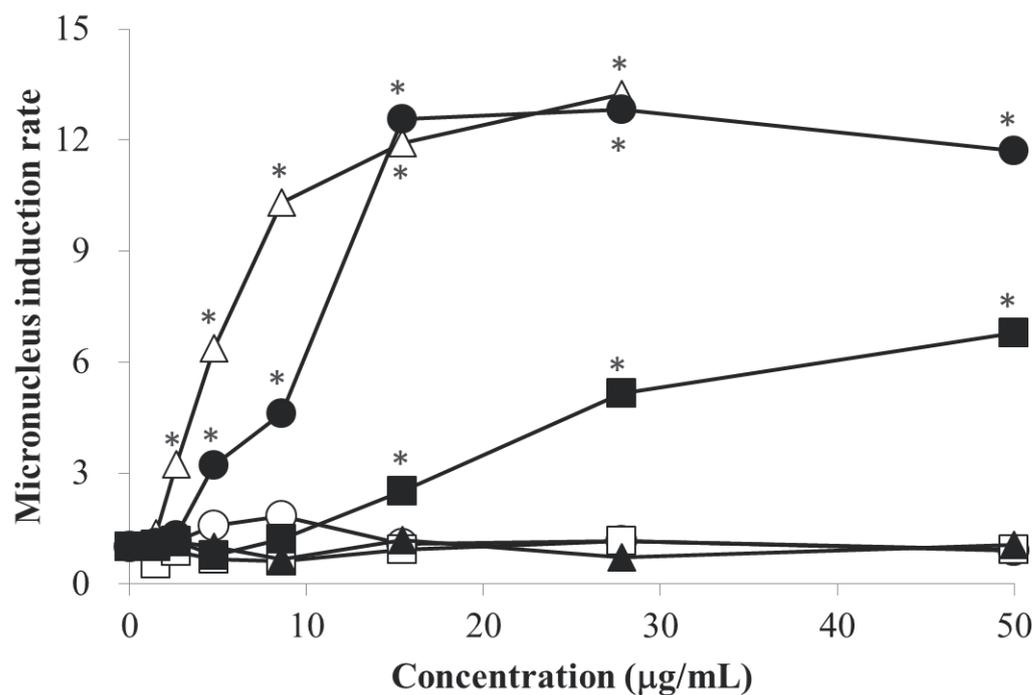


Fig. 14 Micronucleus induction by CPA with individual CYP expression system

The results represent mean (n=2). Open circle, BD Supersome™ of control vector; open triangle, BD Supersome™ of CYP2B6; open square, Supersome™ of CYP2C9; closed circle, BD Supersome™ of CYP2C19; closed triangle, BD Supersome™ of CYP2D6; closed square, BD Supersome™ of CYP3A4

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: obtained upon pairwise comparisons with the control group by Fisher's exact test.

3-3. CYP 分子種による CPA の代謝解析

CYP2B6 発現系では、CPA 残存量は対照群と比較して有意に減少し、4-OH-CPA、carboxyphosphamide、4-keto-CPA、及び phosphamide mustard 量が顕著に増加した (Fig. 15)。

CYP2C19 及び CYP3A4 発現系でも同様に、対照群と比較して 4-OH-CPA、carboxyphosphamide、及び phosphamide mustard の生成量が有意に増加、或いは増加傾向が認められたが、それら生成量は CYP2B6 発現系と比較して低値だった (Fig. 15)。一方、CYP2C9 及び CYP2D6 の発現系では、対照群と比較していずれの代謝物の生成量に変動はみられなかった (Fig. 15)。

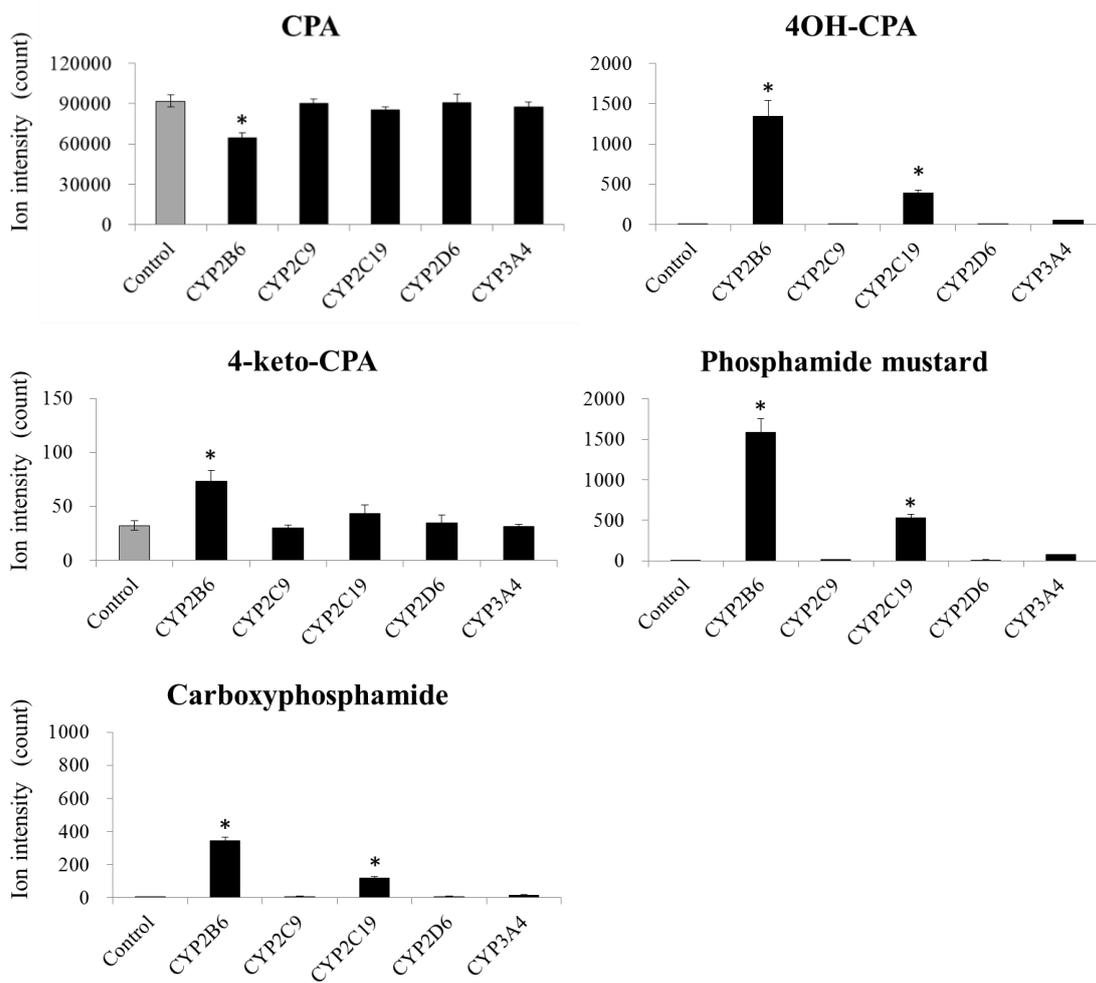


Fig. 15 Profiles of CPA metabolites formed with expression systems of CYP isoforms

Values represent the means \pm standard deviation (n=3). Control, BD Supersome™ of control vector; CYP2B6, BD Supersome™ of CYP2B6; CYP2C9, Supersome™ of CYP2C9; CYP2C19, BD Supersome™ of CYP2C19; CYP2D6, BD Supersome™ of CYP2D6; CYP3A4, BD Supersome™ of CYP3A4

* $P < 0.01$, vs. control group by Dunnett's test.

第四節 考察

ヒト肝 S9 では代謝活性の個人差が大きく、このことがヒト肝 S9 を用いた遺伝毒性試験での結果のばらつきの原因と考えられている (Hakura et al., 2003)。従って、十分な数のドナー数を用いて、医薬品候補化合物の遺伝毒性と個人差を定量化するとともに、CYP 活性の個人差と医薬品候補化合物の遺伝毒性の関係を明確にすることは重要である。そこで本章では、これらの課題を解決するため、各 CYP 遺伝子で報告されている SNP の出現頻度を鑑み、50 例以上 (52 人) のドナーから調製された肝ミクロソームを用いてヒト肝 CYP 活性の個人差と CPA による小核誘発能の関係を解析した。

78 ドナーの各 CYP 分子種の酵素活性と SNP による表現型には既報 (Ingelman-Sundberg et al., 2007) と同様に一部相関がみられた。また、それら表現型を決定付ける各 CYP 遺伝子の野生型アレル及び代表的な変異アレル (例えば *CYP2B6**2、*4、*5、*6、*CYP2C9**2、*3、*CYP2C19**2、*3、*17 及び *CYP2D6**2、*4、*41) の発現頻度はドイツ人或いは Caucasian において報告されている発現頻度と類似していた (Kirchheiner et al., 2003; Ingelman-Sundberg et al., 2007)。これらドナーの肝ミクロソームを用いた小核試験では、CPA の小核誘発能に大きな個人差がみられ、小核誘発がみられないドナーも含まれていた。この個人差は *CYP2B6*、*CYP2C9*、*CYP2C19*、及び *CYP3A4* の活性の個人差と相関しており、CYP の活性が遺伝毒性物質に対する感受性の規定因子の一つであることが示唆された。

CPA の代謝経路としては、*CYP3A4/5* により 2-dechloroethylcyclophosphamide 及び chloroacetaldehyde に代謝される経路と主に *CYP2B6* により 4-OH-CPA に代謝される経路がある (Moore 1991; Ekhardt et al., 2008)。4-OH-CPA への代謝には、他にも *CYP2C9*、*CYP2C19*、及び *CYP3A4/5* が関与することが報告されている (Moore 1991; Ekhardt et al., 2008)。また、ヒトに投与された CPA の 70~80% が 4-OH-CPA に代謝され、aldophosphamide との相互変換を経て phosphamide mustard と acrolein に代謝されることが報告されている (Ekhardt et al., 2008)。更に、phosphamide mustard は DNA に直接作用し、そのアルキル化作用により DNA

との架橋構造体を形成し (Moore 1991)、これは高頻度で突然変異を誘発することが報告されている (Anderson et al., 1995)。これら報告と本章で示された結果から、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、及び CYP3A4 の代謝活性の個人差によって 4-OH-CPA 及び phosphamide mustard の生成効率に個人差が生じ、CPA の小核誘発能に個人差が発生することが示唆された。そこで、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、及び CYP3A4 の発現系を用いて小核誘発能の評価及び生成される代謝物の定量解析を実施したところ、CYP2B6、CYP2C19、及び CYP3A4 の発現系では小核誘発作用がみられ、4-OH-CPA 及び phosphamide mustard を含む代謝物の生成が確認された。興味深いことに、4-OH-CPA 及び phosphamide mustard を高濃度で生成した発現系ほど、低濃度から小核を誘発した。一方、上述したように肝ミクロソームを用いた *in vitro* 小核試験では小核誘発能と CYP2C9 活性に相関が認められたが、CYP2C9 の発現系添加時には、CPA の小核誘発は認められず、4-OH-CPA 及び phosphamide mustard も検出されなかった。この原因は不明であるが、今回、薬物代謝酵素発現系として用いた BD Supersomes™ の CPA の 4 位水酸化活性は CYP2B6、CYP2C19、及び CYP3A4 の順で高く、CYP2C9 では比較的低いこと (Roy et al., 1999) や CPA 濃度により酵素活性が異なること (Roy et al., 1999) が関係している可能性が示された。

以上、本章では肝代謝能の個人差が CPA の遺伝毒性代謝物の生成量を変動させ、遺伝毒性発現の規定因子であることを示した。特に CYP2B6 及び CYP2C19 のように、代謝活性の個人差が大きい CYP 分子種で代謝される医薬品は、ヒトにおける遺伝毒性発現の個人差が大きいことが示唆された。従って、医薬品候補化合物のヒトにおける遺伝毒性を適切に評価するためには、被験物質の代謝経路とその遺伝毒性代謝物を生成する代謝酵素の同定が重要となる。そしてそれらの代謝酵素活性を左右する遺伝子多型の頻度を考慮し、リスク評価対象となる患者群に応じて、適切な肝試料を選択することが重要であることが示された。

総括

本研究では、現在の遺伝毒性評価方法の課題を抽出及び回避し、医薬品候補化合物のヒトに対する遺伝毒性及び発がん性予測を適切に実施する方法の確立を目的とした。

第一章では、*in vitro* 遺伝毒性試験で頻用されている薬物代謝酵素誘導薬による肝 S9 の代謝能の変動とそれが *in vitro* 小核試験結果に及ぼす影響を解析した。その結果、薬物代謝酵素誘導薬が、特定の CYP 分子種の発現を増加或いは抑制し、*in vivo* と異なる代謝を受けることで偽陽性結果を引き起こす可能性があることを示した。このような *in vitro* 試験での偽陽性結果を回避し、遺伝毒性リスクを適切に評価するためには、医薬品候補化合物の薬物代謝を十分に理解し、*in vivo* 代謝環境を反映する適切な代謝活性化系を選択することが重要である。本章で示したように、誘導薬が医薬品候補化合物の薬物代謝を変動させることが明らかの場合、誘導薬を投与していない動物から調製された代謝活性化系を用いた *in vitro* 試験系による遺伝毒性リスク評価を実施すべきである。

第二章では、遺伝毒性物質の小核誘発能に対する感受性の種差と薬物代謝の種差の関連性を解析した結果、小核誘発能の種差が薬物代謝の種差に起因することを示した。また、一部の化合物では、*in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験では使用されないイヌやサルといった非げっ歯動物の肝 S9 を用いると高感度で遺伝毒性を検出できることを明らかにし、これら肝 S9 を代謝活性化に用いることがヒトにおける遺伝毒性及び発がんリスクを検出するための有用であることを示した。一方、薬物代謝の種差により、非げっ歯類を用いた長期の反復投与毒性試験において、ヒトでは起こらない増殖性変化等の結果が得られることも予測されることから、ヒトへの外挿性を適切に評価することが重要である。

なお、本章で示したように、ヒト肝 S9 では非臨床試験で用いる動物種の肝 S9 と比較して、遺伝毒性代謝物の生成量が少なく、遺伝毒性代謝物の小核誘発作用の検出力が弱い場合があることも留意すべきである。このような場合、本章で示したように、よりヒトに近い薬物代謝を示す非臨床試験で用いる動物種の肝 S9 を用いた *in vitro* 遺伝毒性試験の実施が、

ヒトにおける遺伝毒性及び発がんリスクの予測精度を高めると考えられる。

第三章では、遺伝毒性物質の小核誘発能に対する個人差の原因を検討した結果、肝代謝能の個人差が遺伝毒性代謝物の生成量を変動させ、遺伝毒性発現の規定因子となることを示した。これまでもヒト肝 S9 を用いた遺伝毒性評価では、個人差を最小化するためにプールサンプルを用いた検討や比較的多くのドナー数を用いた評価などが提唱されている (Johnson et al., 1996、Hakura et al., 1999)。しかし、医薬品候補化合物のヒトにおける遺伝毒性を適切に評価するためには、被験物質の代謝経路とその遺伝毒性代謝物を生成する代謝酵素の同定が重要である。更に、それらの代謝酵素活性を左右する遺伝子多型の頻度を考慮し、評価対象となる患者群に応じて、適切な肝試料を選択することが重要である。

以上、本研究で得られた知見を基に医薬品候補化合物の遺伝毒性ポテンシャルを検出し、ヒトに対する遺伝毒性及び発がんリスクを適切に予測及び評価するための新たな手法を提唱した。本研究で得られた科学的知見に基づき、医薬品候補化合物の遺伝毒性リスクを適正且つ迅速に予測、評価及び判断することで、ヒトに対する遺伝毒性及び発がんリスクの低い医薬品の創製に貢献できると期待する。

発表論文

本論文は以下の原著論文を基に作成したものである。

1. **Kishino, Y.** Hasegawa, T. Arakawa, S, Shibaya, Y. Yamoto, T. Mori, K. (2019): Effect of the metabolic capacity in rat liver S9 on the positive results of in vitro micronucleus tests. *Journal of Toxicological Sciences*, **44**, 145–153.
2. **Kishino, Y.** Hasegawa, T. Kato, A. Nishiya, Y. Rozhnal, V. Watanabe, K. Takasaki, W. Yamoto, T. Mori, K. (2019): Effect of inter-individual variability in human liver cytochrome P450 isozymes on cyclophosphamide-induced micronucleus formation. *Mutation Research*, **838**, 37–45.
3. **Kishino, Y.** Hasegawa, T. Yamoto, T. Mori, K.: Species differences in micronucleus induction of the representative clastogens associated with its metabolic profile. *Journal of Toxicological Sciences*, **44**, 701–709.

謝辞

本研究において、格別たる御指導と御高閲を賜りました静岡県立大学大学院薬学研究院衛生分子毒性学講座教授 吉成 浩一先生に謹んで深く御礼申し上げます。

本論文の審査にあたり、有益な御助言を賜りました静岡県立大学大学院薬学研究院臨床薬剤学講座教授 賀川 義之先生、静岡県立大学大学院薬学研究院薬理学講座教授 石川 智久先生、静岡県立大学大学院薬学研究院薬剤学講座教授 尾上 誠良先生に厚く御礼申し上げます。

本研究全般にわたり、終始丁寧な御指導と御高閲を賜りました第一三共株式会社安全性研究所長 森 和彦博士、及び製品情報部 矢本 敬博士に心より感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、有益な御指導と御助言を賜りました第一三共株式会社研究開発本部長 高崎 渉博士、安全性研究所第六グループ長 三井田 宏明博士、及び薬事監査部 渡邊 稔之博士に心より感謝致します。

本研究の遂行に際し、多大なるご助言およびご協力を頂きました第一三共株式会社安全性研究所 長谷川 智子氏、柴谷 由佳梨氏、松岡 美帆氏、下田 瞳氏、玉井 聡氏、片岡 広子氏、薬物動態研究所 渡辺 恭子氏、西矢 由美博士、安全管理推進部 荒川 真悟博士、開発薬事部 五十嵐 美由紀博士、株式会社 RD ノバーレトランスレーショナル研究部 加藤 亜矢子氏、後藤 大輝博士、Daiichi-Sankyo Europe GmbH, Veronika Rozhnal 博士に感謝致します。

引用文献

- Aeschbacher, H.U., Meier, H., Jaccaud, E. (1986): The effect of caffeine in the in vivo SCE and micronucleus mutagenicity tests. *Mutat. Res.*, 174, 53–58.
- Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E., Lee, F.D. (1973): Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 70, 2281–2285.
- Ames, B.N., McCann, J., Yamasaki, E. (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 31, 347–364.
- Anderson, D., Bishop, J.B., Garner, R.C., Ostrosky-Wegman, P., Selby, P.B. (1995): Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. *Mutat. Res.*, 330, 115–181.
- Api, A.M. (2001): Lack of effect of coumarin on the formation of micronuclei in an in vivo mouse micronucleus assay. *Food Chem. Toxicol.*, 39, 837–841.
- Autrup, H. (2000): Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat. Res.*, 464, 65–76.
- Baird, W.M., Hooven, L.A., Mahadevan, B. (2005): Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbone-DNA adducts and mechanism of action. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45, 106–114.
- Beaune, P., Lemestre-Cornet, R., Kremers, P., Albert, A., Gielen, J. (1985): The salmonella/mammalian microsome mutagenicity test: comparison of human and rat livers as activating system. *Mutat. Res.*, 156, 139–146.
- Born, S.L., Caudill, D., Filter, K.L., Purdon, M.P. (2002): Identification of the cytochromes P450 that catalyze coumarin 3,4-epoxidation and 3-hydroxylation. *Drug Metab. Dispos.*, 30, 483–487.
- Brambilla, G., Martelli, A. (2009): Update on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed pharmaceuticals. *Mutat. Res.*, 681, 209–229.
- Campion, S., Auberecht, J., Boekelheide, K., Brewster, D., Vaidya, V.S., Anderson, L., Burt, D., Dere, E., Hwang, K., Pacheco, S., Saikumar, J., Schomaker, S., Sigman, M., Goodsaid, F. (2013): The current status of biomarker for predicting toxicity. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 9, 1391–1408
- Chen, C-S., Lin, J.T., Goss, K.A., He, Y., Halpert, J.R., Waxman, D.J. (2004): Activation of the anticancer prodrugs cyclophosphamide and ifosfamide: identification of cytochrome P450 2B enzymes and site-specific mutants with improved enzyme kinetics. *Mol. Pharmacol.*, 65, 1278–1285.
- Clarke, L., Waxman, D.J. (1989): Oxidative metabolism of cyclophosphamide: identification of the hepatic monooxygenase catalysts of drug activation. *Cancer Res.*, 49, 2344–2350.
- Eberhart, D.C., Gemzik, B., Halvorson, M.R., Parkinson A. (1991): Species differences in the toxicity

- and cytochrome P450 3A-dependent metabolism of digitoxin. *Mol. Pharm.*, 40, 859–867.
- Edwards, A.J., Price, R.J., Renwick, A.B., Lake, B.G. (2000): Lack of effect of coumarin on unscheduled DNA synthesis in the in vivo rat hepatocyte DNA repair assay. *Food Chem. Toxicol.*, 38, 403–409.
- Ekhart, C., Doodeman, V.D., Rodenhuis, S., Smith, P., H.M., Beijnen, J.H., Huitema, A.D.R. (2008): Influence of polymorphisms of drug metabolizing enzymes (CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, GSTA1, GSTP1, ALDH1A1 and ALDH3A1) on the pharmacokinetics of cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide. *Pharmacogenet. Genomics*, 18, 515–523.
- Fujiwara, R., Yoda, E., Tukey, R.H. (2018): Species differences in drug glucuronidation: humanized UDP-glucuronosyltransferase 1 mice and their application for predicting drug glucuronidation and drug-induced toxicity in humans. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 33, 9–16.
- Gonzalez, F.J., Shah, Y.M. (2008): PPAR α : Mechanism of species differences and hepatocarcinogenesis of peroxisome proliferators. *Toxicol.*, 246, 2–8.
- Gris, J.H., Dragonetti, M.A., Fernández, B.M., Sicardi, S.M. (2008): Evaluation of the mutagenic potential of piroxicam, meloxicam and their precursors using in vivo micronucleus test. *Informacion Tecnologica*, 19, 83–88.
- Glatt, H.R., Meinel, W. (2005): Sulfotransferases and acetyltransferases in mutagenicity testing: technical aspects, *Method Enzymol.*, 400, 230–249.
- Glatt, H.R. (2005): Activation and inactivation of carcinogens by human sulfotransferases in: G.M. Pacific, M.W.H. Coughtrie (Eds.), *Human Sulfotransferases*, Taylor & Francis, London, pp. 281–306.
- Guengerich, F.P. (2003): Cytochromes P450, drugs, and disease. *Mol. Interv.*, 3, 194–204.
- Guengerich, F.P., Dannan, G.A., Wright, S.T., Martin, M.V., Kaminsky, L.S. (1982): Purification and characterization of liver microsomal cytochromes P-450: Electrophoretic, spectral, catalytic, and immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital or B-naphthoflavone. *Biochemistry*, 21, 6019–6030.
- Hakura, A., Suzuki, S., Satoh, T. (1999): Advantage of the use of human liver S9 in the Ames test. *Mutat. Res.*, 438, 29–36.
- Hakura, A., Suzuki, S., Sawada, S., Sugihara, T., Hori, Y., Uchida, K., Kerns, W.D., Sagami, F., Motooka, S., Satoh, T. (2003): Use of human liver S9 in the Ames test: assay of three procarcinogens using human S9 derived from multiple donors. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 37, 20–27.
- Hobbs, D.C., Twomey, T.M. (1981). Metabolism of piroxicam by laboratory animals. *Drug Metab. Dispos.*, 9, 114–118.
- Hodek, P., Koblihova, J., Kizek, R., Frei, E., Arlt, V.M., Stiborova, M. (2013): The relationship between DNA adduct formation by benzo[a]pyrene and expression of its activation enzyme

- cytochrome P450 1A1 in rat. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 36, 989–996.
- Hu, Y., Ehli, E.A., Nelson, K., Bohlen, K., Lynch, C., Huizenga, P., Kittlerlsrud, J., Soundy, T.J., Davies, G.E. (2012): Genotyping performance between saliva and blood-derived genomic DNAs on the DMET array: a comparison. *PLoS ONE*, 7, 1–5.
- ICH Harmonised tripartite guideline. (2011): Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2(R1). Available at: <http://www.ich.org/products/guidelines/safety/article/safety-guidelines.html>.
- Ingelman-Sundberg, M., Sim, S.C., Gomez, A., Rodriguez-Antona, C. (2007): Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetics, pharmacoeigenetics and clinical aspects. *Pharmacol. Ther.*, 116, 496–526.
- Ishidate, M.Jr., Harnois, M.C., Sofuni, T. (1988): A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures. *Mutat. Res.*, 195, 151–213.
- Ishiyama, M., Miyazono, Y., Sasamoto, K., Ohkura, Y., Ueno, K. (1997): A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta*, 44, 1299–1305.
- Johansson, S. (1981): Carcinogenicity of analgesics: long-term treatment of Sprague-Dawley rats with phenacetin, phenazone, caffeine and paracetamol (acetamidophen). *Int. J. Cancer*, 27, 521–529.
- John, V.A. (1979): The pharmacokinetics and metabolism of diclofenac sodium (Voltarol) in animals and man. *Rheumatol. Rehabil.*, 2, 22–37.
- Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R., Galloway, S.M. (1996): Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assay and comparison with phenobarbital/b-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 51–59.
- Kirchheiner, J., Klein, C., Meineke, I., Sasse, J., Zanger, U.M., Mürdter, T.E., Roots, I., Brockmoller, J. (2003): Bupropion and 4-OH-bupropion pharmacokinetics in relation to genetic polymorphisms in CYP2B6. *Pharmacogen.*, 13, 619–626.
- Kirkland, D., Aardema, M., Henderson, L., Muller, L. (2005): 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.*, 584, 1–256.
- Kirkland, D., Pfuhler, S., Tweats, D., Aardema, M., Corvi, R., Darroudi, F., Elhajouji, A., Glatt, H., Hastwell, P., Hayashi, M., Kasper, P., Kirchner, S., Lynch, A., Marzin, D., Maurici, D., Meunier, J.R., Muller, L., Nohynek, G., Parry, J., Parry, E., Thybaud, V., Tice, R., Van Benthem, J., Vanparrys, P., White, P. (2007): How to reduce false results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of ECVAM Workshop. *Mutat. Res.*, 628, 31–55.
- Klaassen, C.D. Ed. (2018): Casarett, Doull's Toxicology: The basic science of poisons, 9th ed.
- Klopas, A., Panderi, I., Parissi-Poulou, M. (1998): Determination of piroxicam and its major

- metabolite 5-hydroxyproxicam in human plasma by zero-crossing first-derivative spectrophotometry. *J. Pharmaceu. Biomed. Anal.*, 17, 515–524.
- Knasmuller, S., Schwab, C.E., Land, S.J., Wang, C.Y., Sanyal, R., Kundi, M., Parzefall, W., Darroudi, F. (1999): Genotoxic effects of heterocyclic aromatic amines in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis*, 14, 533–539.
- Ku, W.W., Bigger, A., Brambilla, G., Glatt, H., Gocke, E., Guzzie, P.J., Hakura, A., Honma, M., Martus, H.J., Obach, R.S., Roberts, S. (2007): Strategy for genotoxicity testing – Metabolic consideration. *Mutat. Res.*, 627, 59–77.
- Lake, B.G. (1999): Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food Chem. Toxicol.*, 37, 423–453.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265–275
- Martignoni, M., Groothuis, G.M.M., Kanter, R. (2006): Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin. Drug Metab.*, 2:6, 875–894.
- Matsubara, T., Otsubo, S., Yoshihara, E., Touchi, A. (1983): Biotransformation of coumarin derivatives (2) oxidative metabolism of 7-alkoxycoumarin by microsomal enzymes and a simple assay procedure for 7-alkoxycoumarin O-dealkylase. *Jpn. J. Pharmacol.*, 33, 41–56.
- Matsuoka, A., Hayashi, M., Ishidate M.Jr. (1979): Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro. *Mutat. Res.*, 66, 277–290.
- McManus, M.E., Burgess, W.M., Veronese, M.E., Huggett, A., Quattrochi, L.C., Tukey, R.H. (1990): Metabolism of 2-acetylaminofluorene and benzo(a)pyrene and activation of food-derived heterocyclic amine mutagens by human cytochromes P-450. *Cancer. Res.*, 50, 3367–3376.
- Moore, M.J. (1991): Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clin. Pharmacokinet.*, 20, 194–208.
- National Toxicology Program. Available at: <http://ntp.niehs.nih.gov/> (accessed 2017-1-20)
- Nomura, A., Sakurai, E., Hikichi, N. (1997): Stereoselective N-demethylation of chlorpheniramine by rat-liver microsomes and the involvement of cytochrome P450 isozymes. *J. Pharm. Pharmacol.*, 49, 257–262.
- OECD test guideline (2019): OECD Test Guidelines for the Chemicals. OECD Publishing, Available at: <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>
- OECD test guideline (2014): Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. OECD Publishing, Available at: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264224438-en>.
- Okada, E., Fujiishi, Y., Narumi, K., Yasutake, N., Ohyama, W. (2013): A four-day oral treatment regimen for simultaneous micronucleus analyses in the glandular stomach, colon, and bone marrow of rats. *Mutat. Res.*, 758, 87–94.

- Olson, H., Betton, G., Robinson, D., Thomas, K., Monro, A., Kolaja, G., Lilly, P., Sanders, J., Sipes, G., Bracken, W., Dorato, M., Van Deun, K., Smith, P., Berger, B., Heller, A. (2000): Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 32, 56–67.
- Omura, T., Sato, R. (1964): The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes 1. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, 239, 2370–2378.
- Paolini, M., Cantelli-Forti, G. (1997): On the metabolizing systems for short-term genotoxicity assays: a review. *Mutat. Res.*, 387, 17–34.
- Pearce, R.E., Rodrigues, A.D., Goldstein, J.A., Perkinson, A. (1996): Identification of the human P450 enzymes involved in lansoprazole metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 277, 805–816.
- Peters, M.M.C.G., Walters, D.G., Van Ommen, B., Van Bladeren, P.J., Lake, B.G. (1991): Effect of inducers of cytochrome P-450 on the metabolism of [3-¹⁴C] coumarin by rat hepatic microsomes. *Xenobiotica*, 21, 499–514.
- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., Orešič, M. (2010): MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*, 11, 395.
- Ramirez, D.A., Collins, K.P., Aradi, A.E., Conger, K.A., Gustafson, D.L. (2019): Kinetics of cyclophosphamide metabolism in humans, dogs, cats, and mice and relationship to cytotoxic activity and pharmacokinetics. *Drug Metab. Dispos.*, 47, 257–268.
- Rietjens, I.M., Boersma, M.G., Zaleska, M., Punt, A. (2008): Differences in simulated liver concentrations of toxic coumarin metabolites in rats and different human populations evaluated through physiologically based biokinetic (PBBK) modelling. *Toxicol. In Vitro*, 22, 1890–1901.
- Roy, P. Yu, L.J. Crespi, C.L. Waxman, D.J. (1999): Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles. *Drug Metab. Dispos.*, 27, 655–666.
- Shirai, T., Sano, M., Tamano, S., Takahashi, S., Hirose, M., Futakuchi, M., Hasegawa, R., Imaida, K., Matsumoto, K., Wakabayashi, K., Sugimura, T., Ito, N. (1997): The prostate: a target for carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) derived from cooked foods. *Cancer Res.*, 57, 195–198.
- Sistare, F.D., DeGeorge, J.J. (2007): Preclinical predictors of clinical safety: opportunities for improvement. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 82, 210–214.
- Tang, W., Stearns, R.A., Bandiera, S.M., Zhang, Y., Raab, C., Braun, M.P., Dean, D.C., Pang, J., Leung, K.H., Doss, G.A., Strauss, J.R., Kwei, G.Y., Rushmore, T.H., Chiu, S.H.L., Baillie, T.A. (1999): Studies on cytochrome P-450-mediated bioactivation of diclofenac in rats and in human hepatocytes: identification of glutathione conjugated metabolites. *Drug. Metab. Dispos.*, 27, 365–

372.

- Tassaneeyakul, W., Birkett, D.J., Veronese, M.E., McManus, M.E., Tukey, R.H., Quattrochi, L.C., Gelboin, H.V., Miners, J.O. (1993): Specificity of substrate and inhibitor probes for human cytochromes P450 1A1 and 1A2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 265, 401–407.
- Thomas, P.E., Reik, L.M., Ryan, D.E., Levin, W. (1983): Induction of two immunochemically related rat liver cytochrome P-450 isozymes, cytochrome P-450c and P-450d, by structurally diverse xenobiotics. *J. Biol. Chem.*, 258, 4590–4598.
- Thybaud, V., Aardema, M., Clements, J., Dearfield, K., Galloway, S., Hayashi, M., Kram, H., Kirkland, D.J., MacGregor, D., Marzin, J.T., Ohyama, D., Schuler, W., Suzuki, M., Zeiger, E. (2007): Strategy for genotoxicity testing: hazard identification and risk assessment in relation to in vitro testing. *Mutat. Res.*, 627, 41–58.
- Tracy, T.S., Chaudhry, A.S., Prasad, B., Thummel, K.E., Schuetz, E.G., Zhong, X., Tien, Y., Jeong, H., Pan, X., Shireman, L.M., Sontherimer, J.T., Lin, Y.S. (2016): Interindividual variability in cytochrome P450-mediated drug metabolism. *Drug metab. Dispos.*, 44, 343–351.
- Tominaga, H., Ishiyama, M., Ohseto, F., Sasamoto, K., Hamamoto, T., Suzuki, K., Watanabe, M. (1999): A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal. Commun.*, 36, 47–50.
- TOXNET TOXICOLOGY DATA NETWORK. Available at <https://toxnet.nlm.nih.gov> (accessed 2017-1-20)
- Vassallo, J.D., Hicks, S.M., Daston, G.P., Lehman-McKeeman, L.D. (2004): Metabolic detoxification determines species differences in coumarin-induced hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.*, 80, 249–257.
- Wang, T., Shankar, K., Ronis, M.J., Mehendale, H.M. (2007): Mechanisms and outcomes of drug- and toxicant-induced liver toxicity in diabetes. *Crit. Rev. Toxicol.*, 37, 413–459.
- Yan, Z., Li, J., Huebert, N., Caldwell, G.W., Du, Y., Zhong, H. (2005): Detection of a novel reactive metabolite of diclofenac: evidence for CYP2C9-mediated bioactivation via arene oxide. *Drug Metab. Dispos.*, 33, 706–713.
- Yasuda, S.U., Zannikos, P., Young, A.E., Fried, K.M., Wainer, I.W., Woosley, R.L. (2002): The roles of CYP2D6 and stereoselectivity in the clinical pharmacokinetics of chlorpheniramine. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 53, 519–525.
- Yu, L.J., Drewes, P., Gustafsson, K., Brain, E.G.C., Hecht, J.E.D., Waxman, D.J. (1999): In vivo modulation of alternative pathways of P-450-catalyzed cyclophosphamide metabolism: impact on pharmacokinetics and antitumor activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 288, 928–937.