

The Study on Development of the Photo-Reverse Mutation Test for Evaluating Chemical Toxicity

藤島, 沙織

<https://hdl.handle.net/2324/1441034>

出版情報：九州大学, 2013, 博士（理学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

The Study on Development of the Photo-Reverse Mutation Test for Evaluating Chemical Toxicity

(化学物質毒性評価のための光遺伝毒性試験開発に関する研究)

藤 島 沙 織

論文内容の要旨

太陽光に含まれる紫外線の人体に対する様々な影響が明らかになるに従って、太陽光の有害作用が問題視されるようになってきた。過度の紫外線は、日焼けや DNA 損傷、免疫機能低下、光老化、及び皮膚がんなど、化学的、生化学的に重大な影響を伴った細胞応答を引き起こす。さらに、太陽光に曝される事により毒性が発現する、もしくは促進される化学物質（光毒性物質）の存在が明らかとなり、その科学的な安全性評価が求められるようになった。光毒性物質は我々の身の周りにも存在しており、特に、意図的に生体に暴露される「くすり」はその代表的な化学物質であり、それらの光毒性評価は非常に重要である。さらには、DNA や染色体などの遺伝形質を担う物質に影響を及ぼす作用、すなわち、遺伝毒性を示す光遺伝毒性物質の評価は、遺伝毒性が発がんを予測するための重要な毒性であることから、特に重要である。

光毒性を評価する試験法としては、主として医薬品、及び化粧品の光毒性を評価するために整備された「光細胞毒性試験」が、世界標準法として OECD テストガイドラインに掲載されており、*in vivo*における動物やヒトの急性光毒性を予測するための試験として利用されている。一方、光遺伝毒性試験については、試験法の標準化について国際的調和が図られてきたものの、テストガイドラインは未だ制定されていない。

本研究では、遺伝子突然変異を検出するための遺伝毒性試験の一つである「細菌を用いる復帰突然変異試験（通称「Ames 試験」）を使用し、適切な試験条件を設定して、光遺伝毒性物質を検出するための「光復帰突然変異試験（光 Ames 試験）」の開発に取り組んだ。また、既存の光細胞毒性試験とこの光 Ames 試験の併用試験系を構築し、優れた感染症治療薬であるが、副作用として光毒性が問題視されているキノロン化合物について、その光細胞毒性、及び光遺伝毒性の評価を試みた。なお、評価試験に用いたキノロン化合物については、その化学構造と毒性発現との相関を解析するため、キノリン骨格に多様な置換基を持つ 14 物質を取り上げた。さらに、キノロン化合物による光毒性発現メカニズムを解明するため、光照射されたキノロン化合物からの活性酸素種（ROS）の測定、及び光分解解析を実施した。光細胞毒性試験で「光細胞毒性あり」、かつ、光 Ames 試験で「光遺伝毒性あり」と判定されたキノロン化合物 4 種（クリナフロキサシン、エノキサシン、ロメフロキサシン、及びスパルフロキサシン）については、その光細胞毒性、及び光遺伝毒性の発現メカニズムをさらに詳細に解析するため、各光毒性試験の実験系を改良し、光照射後の分解産物による毒性試験を実施した。その結果、化学物質を細胞又は菌株の共存下で光照射した場合にみられた毒性が変化するパターンが見出された。得られた実験結果から、光細胞毒性、及び光遺伝毒性を示すキノロン化合物の毒性発現メカニズムについて考察し、その差異を明らかにした。本博士論文では、以下のような章立てに従って、研究の経緯、及び結果を記述した。

第一章では、光 Ames 試験の構築に際して、その背景となる遺伝毒性試験、及び Ames 試験の原理等について簡単に紹介し、試験条件設定に関する検討として、至適な光照射条件（光照射時間、及び光照射強度）を決定するための菌株の細胞生存率、及び変異誘発率確認を実施した。光 Ames 試験には、Ames 試験に一般的に使用される 5 種の菌株 (*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA102、TA1535、及び TA1537) を用いるため、それぞれの菌株について、至適な光照射条件を設定した。また、試験系としての有効性を確認するための陽性対照物質の試験条件も設定し、既知の光毒性物質 3 種 (7,12-ジメチルベンズ[a]アントラセン、エノキサシン、及び 3,5,4'-トリブチルサリチルアニリド) を用いた試験条件の妥当性確認も実施した。その結果、本研究で構築した光 Ames 試験の試験条件により、3 物質の光毒性が適切に再現性よく検出できることが明らかとなり、確立した試験系の妥当性が実証された。

第二章では、選択した 14 種類のキノロン化合物を用いて、既存の試験法である光細胞毒性試験、及び本研究にて新しく構築・開発した光 Ames 試験を実施し、その結果を評価・議論した。試験の結果、光細胞毒性試験では 14 物質中 12 物質が「光毒性あり」と判定されたものの、光 Ames 試験では、光照射により化学物質の菌株への毒性や変異誘発力が増強する又は減弱する物質も見出された。さらに、光毒性試験結果とキノロン化合物の化学構造（置換基）との関係から、光毒性発現に関わる置換基についても考察した。本研究により、光照射されたキノロン化合物の毒性発現パターンは様々であり、既存の光細胞毒性試験の結果からは光遺伝毒性試験の結果を予測することはできないことが明らかとなった。そのため、光毒性を適切に評価するためには、既存の光細胞毒性試験に我々が開発した光 Ames 試験を組み合わせることで有用性が示された。

第三章では、第二章で実施したキノロン化合物の光細胞毒性、及び光遺伝毒性試験の結果を受け、さらに、キノロン化合物の光毒性発現メカニズムを解析した。光毒性反応のメカニズムは、主として、ラジカル反応であるタイプ I、一重項酸素を発生するタイプ II、及び励起された化学物質自身が直接反応するタイプ III の 3 つのタイプに分類される。そこで、光照射されたキノロン化合物からの ROS（一重項酸素、及びスーパーオキシドアニオン）の検出、キノロン化合物の光照射分解の HPLC 解析を実施した。ROS アッセイの結果、キノロン化合物についても、ROS の光毒性への関与が確認され、その影響はスーパーオキシドアニオンよりも一重項酸素によるものが大きいことが確認された。光分解解析の結果からは、光分解を受けやすいキノロン化合物の化学構造に関する知見が得られた。また、4 種のキノロン化合物（クリナフロキサシン、エノキサシン、ロメフロキサシン、及びスパルフロキサシン）については、光照射後の分解産物による光細胞毒性及び光遺伝毒性が評価できる試験を実施し、得られた結果を比較・検討することにした。その結果、光細胞毒性試験では主に化学物質が分解して生成した分解産物の毒性が現れることが初めて明らかとなった。一方、光 Ames 試験では分解産物の影響よりも菌株が化学物質と光に同時に暴露されることにより発生する ROS や反応中間体、一時的に励起した化学物質そのものの影響が主に寄与していると考えられた。また、スパルフロキサシンは、他のキノロン化合物とは異なる特殊な光毒性の挙動を示すことが明らかとなった。スパルフロキサシンは ROS や光分解産物を生成せず、光に同時暴露される時のみに毒性を発現する物質であった。

本研究において、光照射された化学物質による遺伝毒性を適切、及び高感度に検出できる優れた光 Ames 試験の確立に成就した。また、14 種のキノロン化合物を用いた光細胞毒性、及び光遺伝毒性の評価から、これらの毒性や毒性発現メカニズムには様々なパターンの組み合わせがあるため、光毒性を適切に評価するには、既存の試験法である光細胞毒性試験に、本研究で開発した光 Ames 試験を組み込み、併用することがきわめて重要であることが判明した。