

反復投与肝臓小核試験法

Ryoko Harada (ITR Laboratories Canada Inc.)
Shuichi Hamada (BoZo Research Center Inc.)

Advancing quantitative approaches and genomic applications in genetic toxicology: toward reduction and replacement of conventional rodent mutagenicity and carcinogenicity tests

Carole Yauk, GReAT Lab, Dept. of Biology, University of Ottawa
Paul White and Francesco Marchetti, Health Canada

デュプレックスシーケンス法は新しい遺伝毒性評価法として注目されているが、その評価は未だ定まっていない。そこで、ヘルスカナダとオタワ大学が中心になって、デュプレックスシーケンス法と従来の評価項目での評価結果を比較する共同研究がスタートした。

Methodological details and costs

投与開始は
13~14週齢



Exposure duration and sampling time

28 days

~~60 days~~

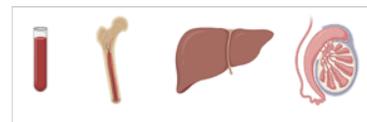
90 days

~~120 days~~

180 days

- MutaMouse males
- Daily exposures to **benzo[b]fluoranthene**
- 5 doses + vehicle controls
- N = 8 per dose group (4 for DS)

At each time point



Conventional endpoints

Established protocols
LacZ mutation (liver, bone marrow, male germ cells)
Pig-a mutation (blood)
Micronucleus frequency (blood)
Histopathology (select time points; liver and lungs)

Liver Micronucleus assay

Concordance, correlation, potency analysis

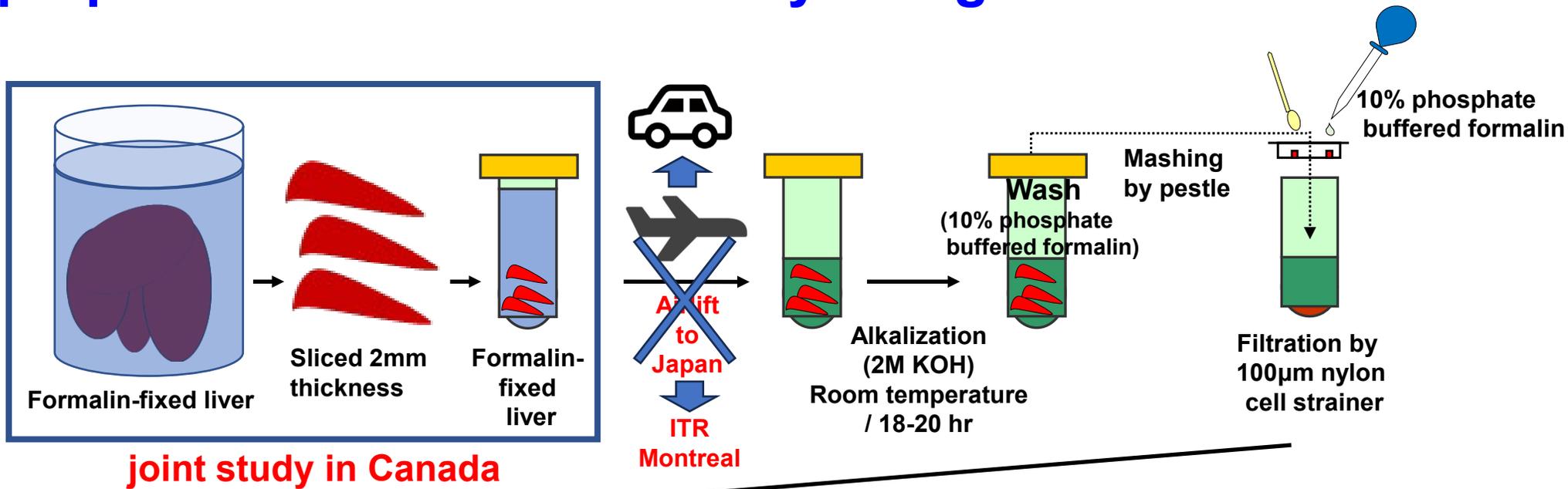
Duplex Sequencing

20 gene mouse mutagenesis panel
LacZ, *cll*, *Pig-A*; Cancer Driver Genes

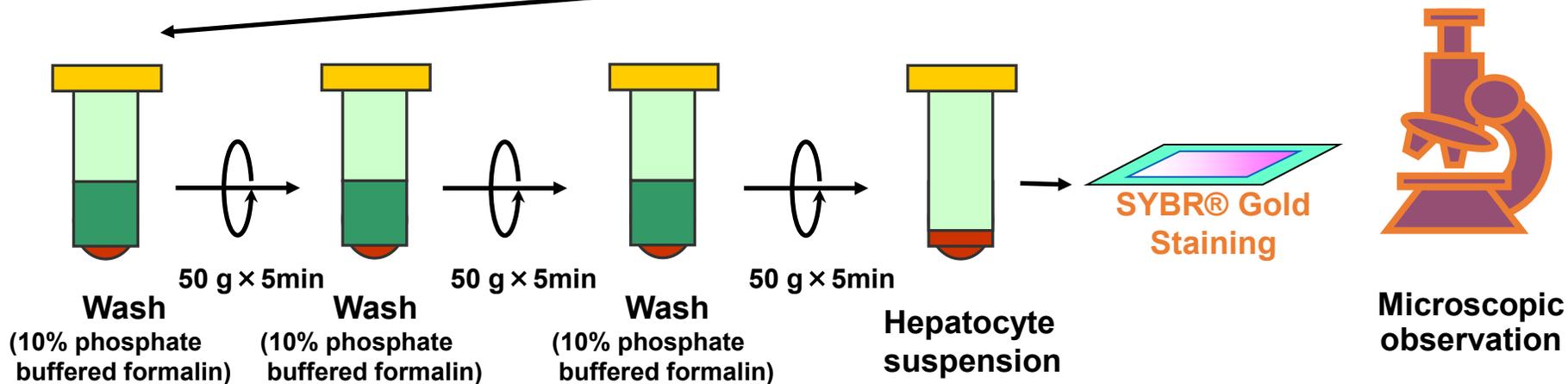
Mutation frequency (genome and locus-specific)
Dose-response analysis
Mutation spectrum analysis
Clonal expansion over time

In the joint project, the administration period is 28-, ~~60~~, 90-, ~~120~~, and 180-days, and sampling is performed after each administration period and evaluated by Duplex Sequencing and Conventional endpoints. We proposed the liver MN assay as one of the Conventional endpoints. Most of our data from the liver MN assay are from 14- and 28-day repeated dose studies, so the data from ~~60~~, 90-, ~~120~~, and 180-day repeated dose studies are important to understand the characteristics and limitations of the liver MN assay.

Slide preparation for liver MN assay using formalin-fixed method

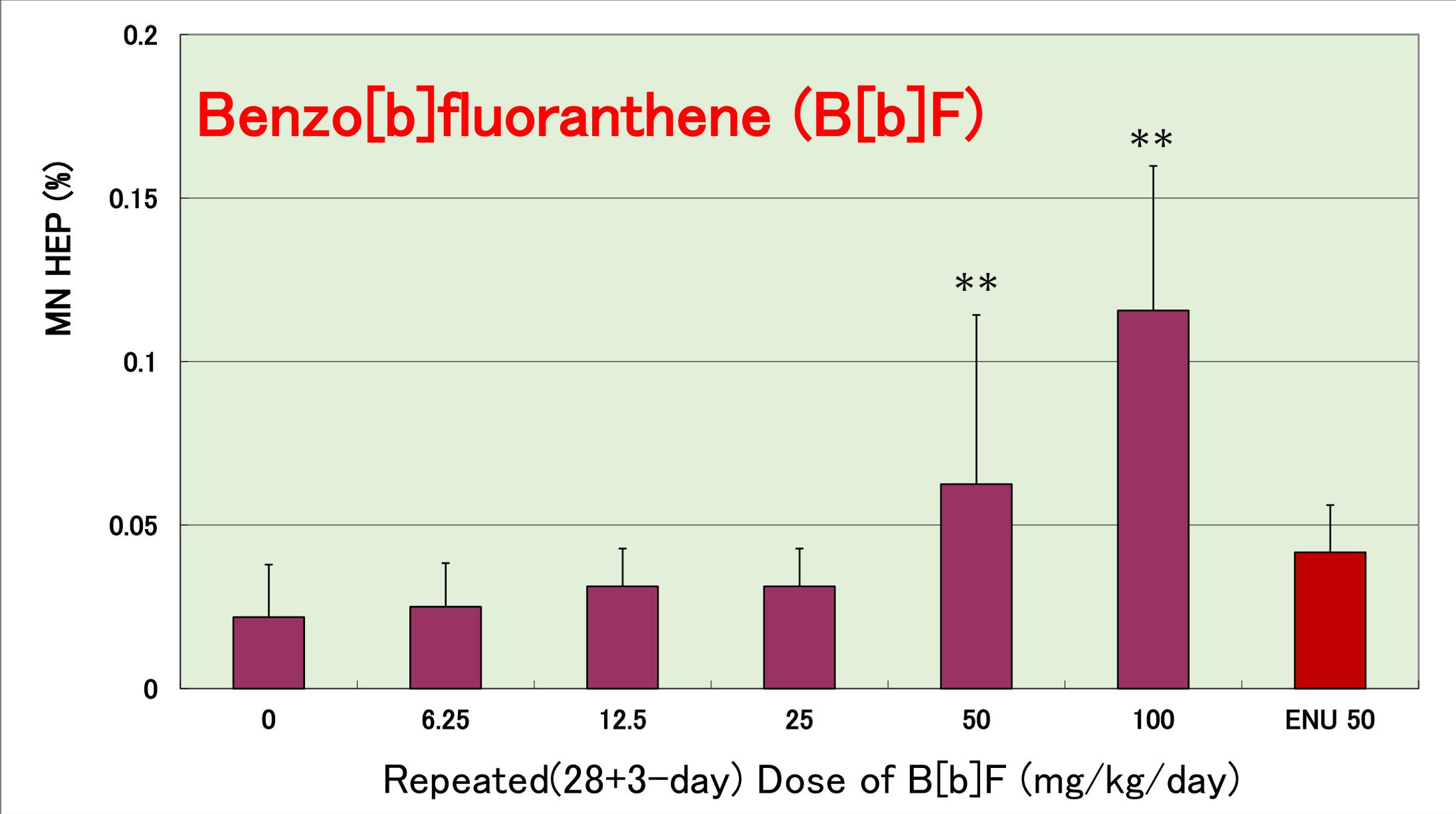


joint study in Canada



Modification of the method by Parton and Garriot, Environ Mol Mutagen, 29, 379-385, 1997.
 The method by Shigano et al., Mutation Research, 800, 35-39, 2016.

Results of repeated dose liver MN assay using B[b]F



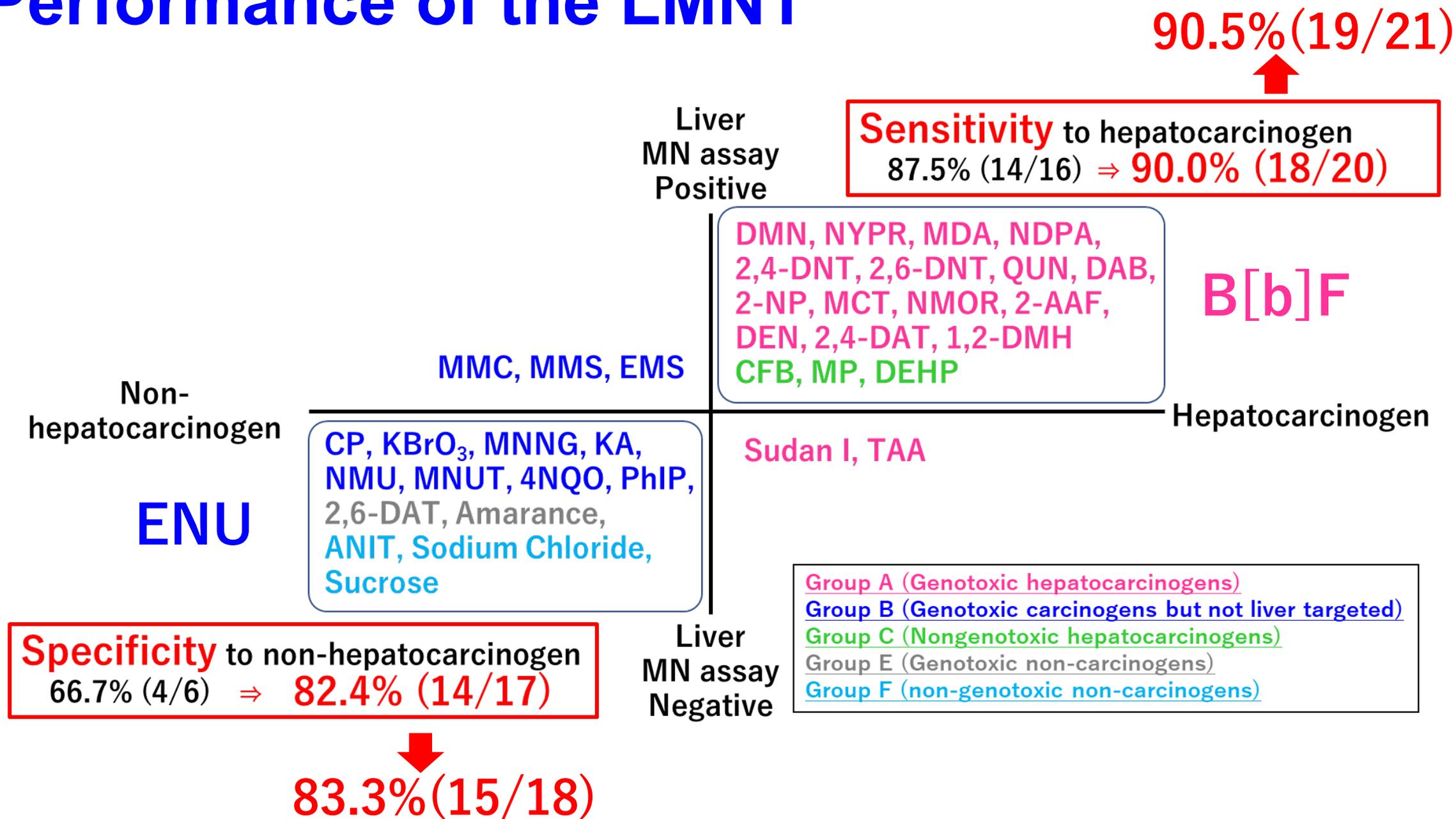
ポジコン**ENU**が陰性になったことについて

- もともと肝小核用のポジコンではなかった。
- 肝臓はENUの発がんターゲットではない。

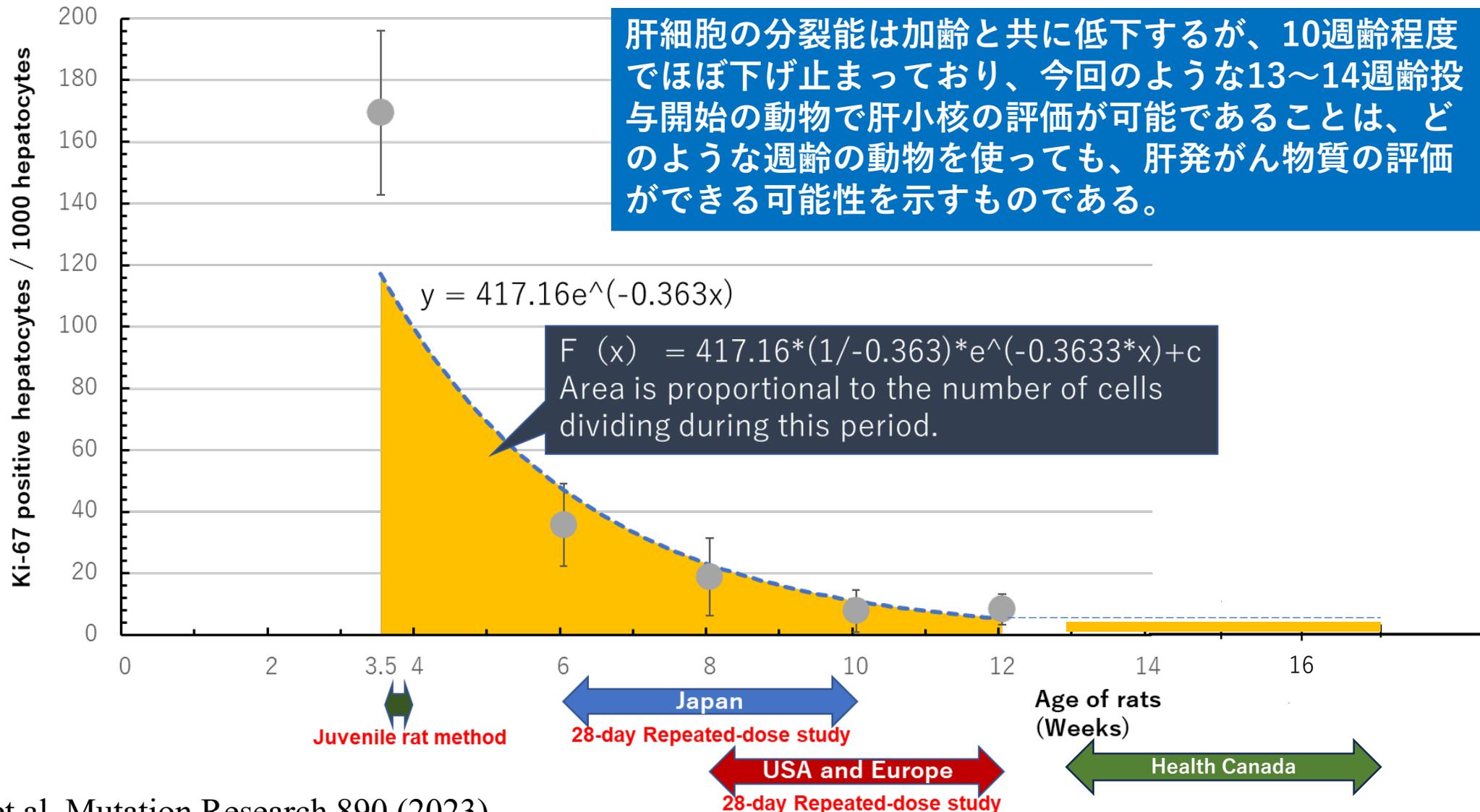
<https://files.toxplanet.com/cpdb/chempages/1-ETHYL-1-NITROSOUREA.html>

- がん原性試験は陽性
- 発がん標的臓器：脳・消化管・十二指腸（雌）
脳・消化管・十二指腸・甲状腺濾胞・末梢神経系（雄）
- 肝臓での発がん報告はない（幼若動物では肝発がんの報告あり）
- 肝臓をターゲットとしない発がん物質の多くが肝小核試験では陰性を示す

Performance of the LMNT



13~14週齢投与開始でも肝発がん物質を検出出来たことについて



まとめ

- ヘルスカナダ・オタワ大学を中心とした国際共同研究に、肝臓小核試験として参加し、28-days、90-days、180-days反復投与群のうち、先ず、28-days反復投与群の肝臓小核誘発性を評価した。
- B[b]Fは、50mg/kg/day群、100mg/kg/day群で陽性結果となり、高週齢（13～14週齢）投与開始の動物を使っても、4週間反復投与を行えば、肝臓における小核誘発性の評価が可能であった。
- 肝臓を発がんターゲットとしない発がん物質（ENU）は肝臓小核試験では陰性となった。
- 今後、90-days、180-days反復投与群（動物実験は完了）の評価を行う予定。

IWGTの推奨プロトコールを論文化する提案 (by IWGT steering committee)

The IWGT steering committee have started to discuss topics for the 2026 meeting in Edinburgh, UK. We had a thought regarding the liver MN. As efforts to move this towards an OECD test guideline have stalled we thought perhaps we could develop a comprehensive best practice and recommendations for conduct of the liver MN. Something similar was prepared for Comet (Tice et al 2000) and also for Pig-a (Dertinger et al 2021).

OECDガイドライン化前にIWGT推奨プロトコールを作成した例

Comet :

(Tice et al 2000 [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3%3C206::AID-EM8%3E3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3%3C206::AID-EM8%3E3.0.CO;2-J))

Pig-a :

(Dertinger et al 2021 <https://doi.org/10.1002/em.22427>)

8th IWGTで指摘されたポイント

加齢の影響：

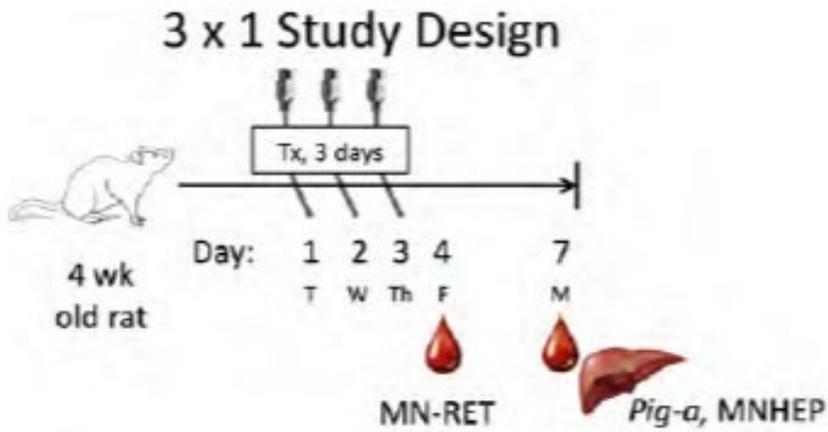
細胞増殖の阻害または誘導は、8週齢ラットを用いた場合の肝臓小核試験の感度に、より顕著な影響を及ぼす可能性がある。この懸念に対処するためには、**2,6-DNT**のような**増殖阻害剤**を用いた追加試験が有用である。

分裂の評価：

WGは、肝細胞の細胞増殖を測定するための有糸分裂活性マーカーとしてKi-67が信頼できることを認めた。しかし、**PCNA**のような他の細胞増殖マーカーを評価することは、調査する価値がある。

Results: 2,6-DNT

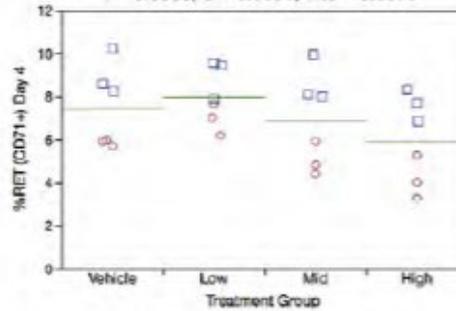
- No MN-RET response
- No *Pig-a* response
- Robust MNHEP response



MN-RET Assay

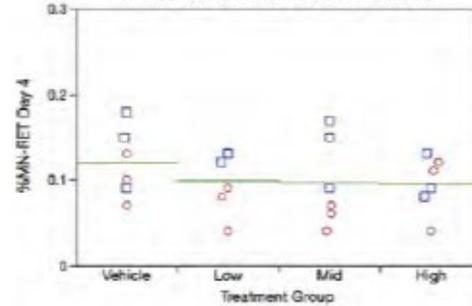
A %RET (CD71+)

Whole Model Effect Test Results (p values):
T = 0.0053, S < 0.0001, TxS = 0.3870



B %MN-RET

Whole Model Effect Test Results (p values):
T = 0.5260, S = 0.0033, TxS = 0.3840



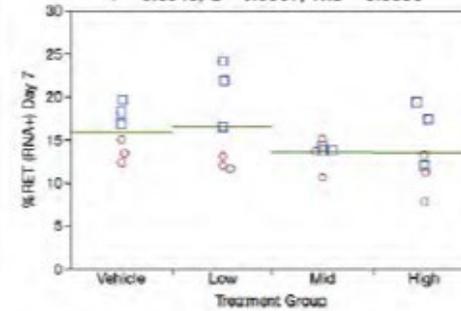
Study Details

- 2,6-Dinitrotoluene
- Study ID No. LR180612D
- 3 days x 1 cycle
- Low = 25, Mid = 50, High = 100 mg/kg/day

Pig-a Assay

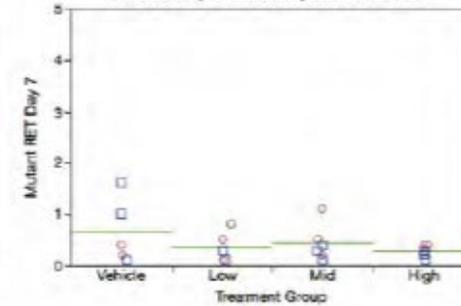
C %RET (RNA+)

Whole Model Effect Test Results (p values):
T = 0.0943, S < 0.0001, TxS = 0.0880



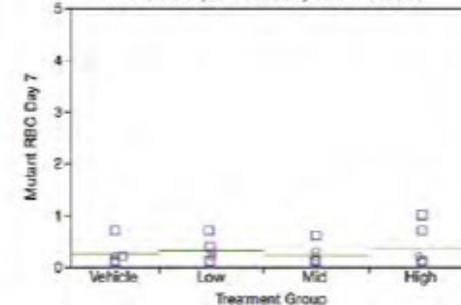
D Mutant RET Freq.

Whole Model Effect Test Results (p values):
T = 0.8364, S = 0.3902, TxS = 0.5430



E Mutant RBC Freq.

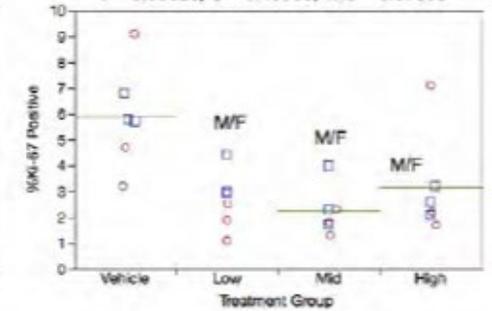
Whole Model Effect Test Results (p values):
T = 0.7525, S = 0.1052, TxS = 0.8063



MNHEP Assay

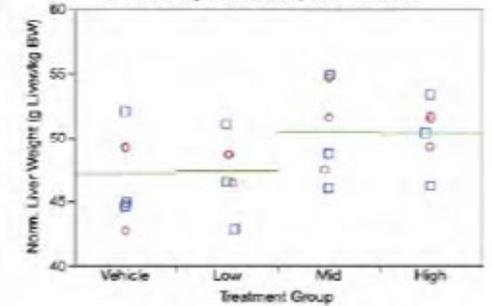
F %Ki-67+

Whole Model Effect Test Results (p values):
T = 0.00623, S = 0.49906, TxS = 0.57899



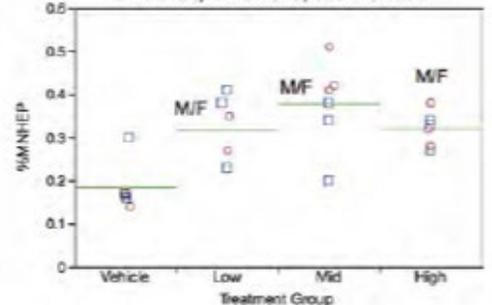
G Norm. Liver Weight

Whole Model Effect Test Results (p values):
T = 0.2076, S = 0.6006, TxS = 0.9819



H %MNHEP

Whole Model Effect Test Results (p values):
T = 0.0004, S = 0.7945, TxS = 0.1288



Images from Dertinger *et al.*, Environ. Mol. Mutagen., v60, 2019

Summary

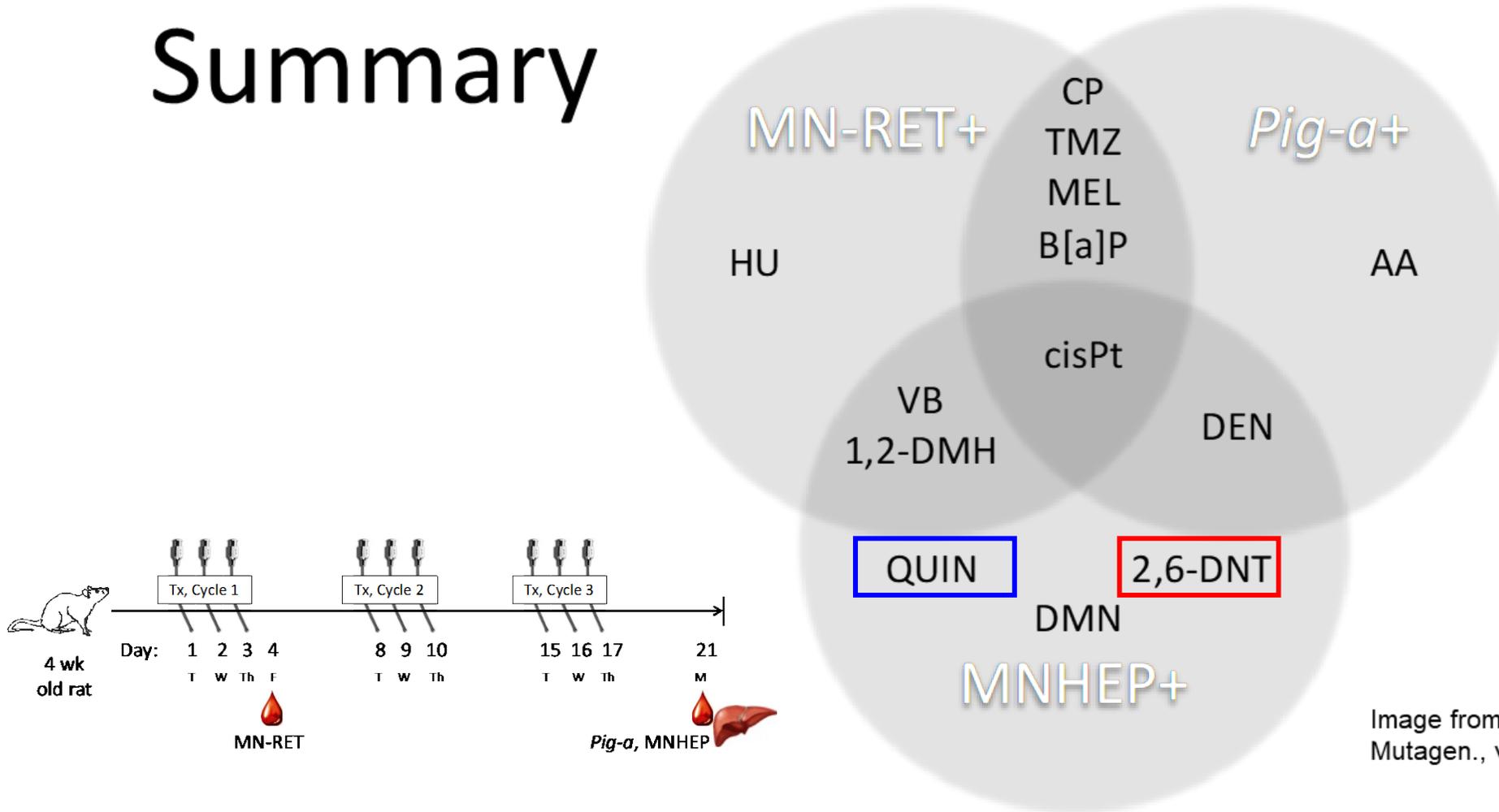
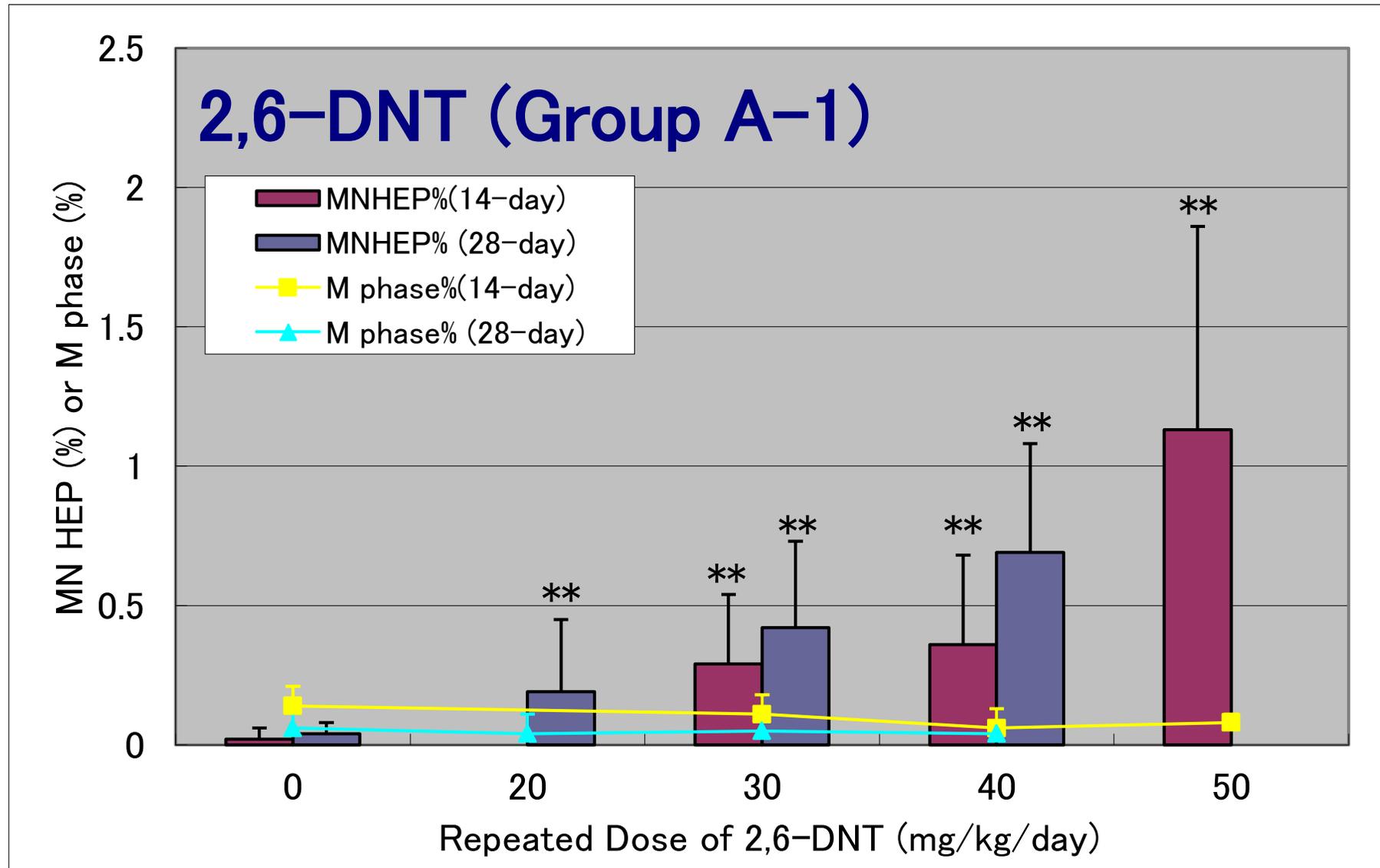


Image from Dertinger *et al.*, Environ. Mol. Mutagen., v60, 2019

Abbreviations

Aristolochic acids (AA), Benzo[a]pyrene (B[a]P), Cisplatin (cisPt), Cyclophosphamide (CP), Diethylnitrosamine (DEN), 1,2-Dimethylhydrazine-2HCl (1,2-DMH), Dimethylnitrosamine (DMN), 2,6-Dinitrotoluene (2,6-DNT), Hydroxyurea (HU), Melphalan (MEL), Temozolomide (TMZ), Quinoline (QUIN), and Vinblastine (VB)

MMS共同研究の結果



分裂指標の比較

分裂の指標	発現時期	半減期	剖検時の何日前の分裂が予想できるか？
Mitotic Index	M期の中期	M期終期には消失	30分前
Ki-67	G0期以外の全ての細胞核に出現	1時間	1～2日前？
PCNA	G1後期からS初期に出現	20時間	2～3日前？

ラットの肝細胞が1回の細胞周期を完了するのに24～48時間を要する

今後の対応

加齢の影響：

2,6-DNT を用いた4週間反復投与肝臓小核試験を6週齢投与開始と8週齢投与開始で実施し、増殖阻害剤投与時の加齢の影響についてデータをとる。

⇒実施機関を募集

分裂の評価：

里本らの論文（Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 890 (2023) 503658）では3.5、6、8、10、12週齢ラットの肝細胞の細胞増殖をKi-67を用いて測定した。この動物の肝臓標本を用いてPCNA染色を行い、肝臓小核試験における分裂指標としてのPCNAの評価を行う。

⇒ボゾリサーチで実施予定