

<共同研究 21>

研究題名： *Pig-a* アッセイ共同研究

研究目的： *Pig-a* アッセイは MMS 研究会会員の三浦大志郎博士が米国 NCTR FDA との共同研究を通じて 2008 年に開発した新規の *in vivo* 突然変異試験である。末梢血中の赤血球を評価対象とし、内在性遺伝子である *Pig-a* を遺伝毒性試験の標的遺伝子としてフローサイトメトリー法を用いて得られた *Pig-a* 変異体細胞（GPI アンカータンパク陰性細胞）の出現頻度を元に、化学物質暴露による *in vivo* 突然変異誘発性を評価する。微量の末梢血を評価対象とすることから、他の毒性試験に用いられる個体で遺伝毒性を同時評価することが可能であり、動物福祉 3R の精神を考慮した試験法である。本共同研究は、ラット末梢血を用いる全赤血球を標的とした *Pig-a* アッセイ及び網状赤血球に特化した PIGRET 法について技術共有化し、共同研究成果を論文化して国際的に広く公表することを目的として開始された。

研究期間： 2012 年～実施中

研究成果： 試験法の技術共有化は国立衛研が中心となり、合計 16 機関が参画した。まず全赤血球を標的とした *Pig-a* アッセイ及び PIGRET 法について参加機関での試験機関差検証を行い、十分な技術共有化が達成できていることを確認した。続いて日本で開発された PIGRET 法の有用性について検証した。実際に遺伝毒性物質・非遺伝毒性物質からなる 24 化合物についてラットに単回投与した後、経日的に末梢血を採取して *Pig-a* 変異体頻度を評価した結果、PIGRET 法は全赤血球を標的とした *Pig-a* アッセイよりも早期に *Pig-a* 変異頻度の増加を検出可能であることを立証した。以上の検討成果は Mutation Research 誌（Volume 811, 15 November 2016）に MMS 研究会による *Pig-a* アッセイ/PIGRET 法に関する特集号として収載されている。*Pig-a* アッセイについては現在 OECD 試験ガイドライン化に向けた取り組みが米国を中心に進められている。試験ガイドライン化にあたっては本共同研究成果も大きく寄与しており、MMS 研究会会員からワーキンググループにも参画中である。

発表論文：

- 1) Kimoto T, Horibata K, Miura D, Chikura S, Okada Y, Ukai A, Itoh S, Nakayama S, Sanada H, Koyama N, Muto S, Uno Y, Yamamoto M, Suzuki Y, Fukuda T, Goto K, Wada K, Kyoya T, Shigano M, Takasawa H, Hamada S, Adachi H, Uematsu Y, Tsutsumi E, Hori H, Kikuzuki R, Ogiwara Y, Yoshida I, Maeda A, Narumi K, Fujiishi Y, Morita T, Yamada M, Honma M. The PIGRET assay, a method for measuring *Pig-a* gene mutation in reticulocytes, is reliable as a short-term *in vivo*

- genotoxicity test: Summary of the MMS/JEMS-collaborative study across 16 laboratories using 24 chemicals. *Mutat Res.* 2016 Nov 15; 811: 3-15.
- 2) Suzuki Y, Goto K, Nakayama Y, Saratani M, Takata T, Okamoto T, Okazaki S. Evaluation of a single-dose PIGRET assay for acetaminophen in rats compared with the RBC *Pig-a* assay. *Mutat Res.* 2016 Nov 15; 811: 16-20.
 - 3) Chikura S, Okada Y, Kimoto T, Kaneko H, Miura D, Kasahara Y. Report on the rat *Pig-a* assay using an anti-rat erythroid marker HIS49 antibody in a single dose study of 1,2-dimethylhydrazine. *Mutat Res.* 2016 Nov 15; 811: 21-28.
 - 4) Yamamoto M, Wakata A. Evaluation of in vivo gene mutation with etoposide using *Pig-a* and PIGRET assays. *Mutat Res.* 2016 Nov 15; 811: 29-34.
 - 5) Adachi H, Uematsu Y, Yamada T. Evaluation of the RBC *Pig-a* and PIGRET assays using single doses of hydroxyurea and melphalan in rats. *Mutat Res.* 2016 Nov 15; 811: 35-42.
 - 6) Kyoya T, Hori M, Terada M. Evaluation of the in vivo mutagenicity of melamine by the RBC *Pig-a* assay and PIGRET assay. *Mutat Res.* 2016 Nov 15; 811: 43-48.
 - 7) Yoshida I, Matsumoto A, Sakai Y, Harada Y, Hashizume T. Pyrene did not induce gene mutation in red blood cell *Pig-a* assay and PIGRET assay in rats. *Mutat Res.* 2016 Nov 15; 811: 49-53.
 - 8) Horibata K, Ukai A, Honma M. Evaluation of mutagenicity of acrylamide using RBC *Pig-a* and PIGRET assays by single peroral dose in rats. *Mutat Res.* 2016 Nov 15; 811: 54-59.
 - 9) Yoshida I, Matsumoto A, Sakai Y, Harada Y, Hashizume T. Red blood cell *Pig-a* assay and PIGRET assay in rats with azathioprine. *Mutat Res.* 2016 Nov 15; 811: 60-64.
 - 10) Sanada H, Ohsumi T, Koyama N, Miyashita T, Hashimoto K. Evaluation of the PIGRET assay in rats by single oral dosing with azidothymidine. *Mutat Res.* 2016 Nov 15; 811: 65-69.
 - 11) Wada K, Nishino R, Fukuyama T, Matsumoto K. Evaluation of the PIGRET assay as a short-term test using a single dose of diethylnitrosamine. *Mutat Res.* 2016 Nov 15; 811: 70-74.
 - 12) Shigano M, Ishii N, Takashima R, Harada H, Takasawa H, Hamada S. Results of rat *Pig-a*/PIGRET assay with a single

- dose regimen of 1,3-propane sultone and 2-acetyl aminofluorene. *Mutat Res.* 2016 Nov 15; 811: 75-79.
- 13) Koyama N, Yonezawa Y, Nakamura M, Sanada H. Evaluation for a mutagenicity of aristolochic acid by *Pig-a* and PIGRET assays in rats. *Mutat Res.* 2016 Nov 15; 811: 80-85.
 - 14) Kikuzuki R, Sato H, Fujiwara A, Takahashi T, Ogiwara Y, Sugiura M. Evaluation of the RBC *Pig-a* assay and the PIGRET assay using benzo[a]pyrene in rats. *Mutat Res.* 2016 Nov 15; 811: 86-90.
 - 15) Maeda A, Takahashi K, Tsuchiyama H, Oshida K. Evaluation of red blood cell *Pig-a* assay and PIGRET assay in rats using chlorambucil. *Mutat Res.* 2016 Nov 15; 811: 91-96.
 - 16) Suzuki Y, Goto K, Nakayama Y, Saratani M, Takata T, Okamoto T, Okazaki S. Evaluation of a single-dose PIGRET assay for cisplatin in rats compared with the RBC *Pig-a* assay. *Mutat Res.* 2016 Nov 15; 811: 97-101.
 - 17) Itoh S, Hattori C, Nakayama S, Hanamoto A. PIGRET assay can detect mutagenicity of ethyl methanesulfonate much earlier than RBC *Pig-a* assay. *Mutat Res.* 2016 Nov 15; 811: 102-105.
 - 18) Itoh S, Hattori C, Nakayama S, Hanamoto A. Evaluation of in vivo mutagenicity of isopropyl methanesulfonate by RBC *Pig-a* and PIGRET assays. *Mutat Res.* 2016 Nov 15; 811: 106-109
 - 19) Chikura S, Okada Y, Kimoto T, Kaneko H, Miura D, Kasahara Y. The rat *Pig-a* assay using an erythroid HIS49 antibody in a single dose study of isopropyl p-toluenesulfonate. *Mutat Res.* 2016 Nov 15; 811: 110-116.
 - 20) Muto S, Yamada K, Kato T, Ando M, Inoue Y, Iwase Y, Uno Y. Evaluation of the mutagenicity of alkylating agents, methylnitrosourea and temozolomide, using the rat *Pig-a* assay with total red blood cells or reticulocytes. *Mutat Res.* 2016 Nov 15; 811: 117-122.
 - 21) Tsutsumi E, Momonami A, Hori H, Kitagawa Y. Evaluation of single-dose RBC *Pig-a* and PIGRET assays in detecting the mutagenicity of thiotepa in rats. *Mutat Res.* 2016 Nov 15; 811: 123-128.
 - 22) Narumi K, Fujiishi Y, Okada E, Ohyama W. Detection of *Pig-a* gene mutants in rat peripheral blood following a single urethane treatment: A comparison of the RBC *Pig-a* and PIGRET assays. *Mutat Res.* 2016 Nov 15; 811: 129-134.
 - 23) Johnson GE, Yamamoto M, Suzuki Y, Adachi H, Kyoya T, Takasawa H, Horibata K, Tsutsumi E, Wada K, Kikuzuki R,

- Yoshida I, Kimoto T, Maeda A, Narumi K. Measuring reproducibility of dose response data for the *Pig-a* assay using covariate benchmark dose analysis. *Mutat Res.* 2016 Nov 15; 811: 135-139.
- 24) Chikura S, Kimoto T, Itoh S, Sanada H, Muto S, Horibata K. Standard protocol for the total red blood cell *Pig-a* assay used in the interlaboratory trial organized by the Mammalian Mutagenicity Study Group of the Japanese Environmental Mutagen Society. *Genes and Environment* 2019 41:5 <https://doi.org/10.1186/s41021-019-0121-z>