

## P-081

Evaluation of *in vivo* gene mutation with etoposide using *Pig-a* and PIGRET assays

Mika Yamamoto, Akihiro Wakata

Drug Safety research Laboratory, Astellas Pharma Inc.

*Pig-a* assay using endogenous *Pig-a* gene as a reporter of mutation is expected as new *in vivo* mutation assay. *Pig-a* assay using mature erythrocytes requires 4 weeks after single dose to detect mutation. In contrast, newly developed PIGRET assay using reticulocytes is considered to have potential to detect mutation sensitively 1 week after dosing and expected as short term *in vivo* genotoxic study.

We conducted *Pig-a* and PIGRET assays with etoposide, genotoxic carcinogen as the JEMS/MMS collaborative study and compared the results. Etoposide was intravenously given once to SD rats at doses of 0, 5, 10, and 20 mg/kg. We conducted *Pig-a* mutant analysis in both assays 1, 2 and 4 weeks after dosing. Severe myelosuppression was induced 2 days after dosing in all dosing groups. Neither assays showed increase of *Pig-a* mutant frequency at all dosing groups. Both results were negative and had hardly any difference. It was concluded that etoposide had no potential to induce gene mutation *in vivo*.

Pig-a および PIGRET assay によるエトポシドの *in vivo* 遺伝子突然変異試験

山本美佳、若田明裕

アステラス製薬株式会社 研究本部 安全性研究所

内在性の *Pig-a* 遺伝子をレポーターとした *Pig-a* assay は新しい *in vivo* 遺伝子突然変異試験である。成熟赤血球を用い、突然変異の検出に単回投与後約 4 週を要するが、最近開発された幼若赤血球を用いる PIGRET assay は投与後 1 週間から高感度で突然変異が検出できる可能性があり、*in vivo* 短期遺伝毒性試験として期待されている。

我々は、JEMS/MMS 研究会のラット *Pig-a*/PIGRET assay 共同研究の一環として、遺伝毒性がん原物質であるエトポシドを用いて *Pig-a* 及び PIGRET assay を行い、両者の結果を比較した。

エトポシドは雄 SD ラットに 0 (溶媒), 5, 10, 20 mg/kg の用量で単回静脈内投与した。投与 1, 2 および 4 週間後に採血し、*Pig-a* および PIGRET assay により突然変異頻度を測定した。その結果、投与 2 日後に全投与群で強い細胞増殖抑制を示したが、いずれの投与群においても *Pig-a* 変異体頻度の増加は見られず、両者とも陰性で結果に差がなかった。エトポシドは *in vivo* で遺伝子突然変異を有さないと示唆された。

## P-082

Evaluation of *in vivo* mutagenicity of AAs and AZT with PIGRET and RBC *pig-a* assays

Hisakazu Sanada, Tomoka Ohsumi, Michi Nakamura,

Naomi Koyama, Yutaka Yonezawa

Kaken Pharmaceutical Co., Ltd. Pharmacokinetics and Safety Department

As a part of the MMS collaborative study, mutagenicity of Aristolochic Acids (AAs) and Azidothymidine (AZT) was examined using PIGRET and RBC *pig-a* assays. Eight-week old Crl:CD(SD) male rats were orally single-administrated with AAs at 15, 30 and 60 mg/kg and AZT at 500, 1000 and 2000 mg/kg, and both assays were conducted using peripheral blood obtained at 7, 14 and 28 days after administration. In the AAs groups, a significant increase in mutation frequency was observed at 60 mg/kg at 28 day after administration in RBC *pig-a* assay and observed at same dose from 7 day after administration in PIGRET assay. On the other hand, no increase in mutation frequency was observed in the AZT groups. From the above results, mutagenicity of AAs and AZT was judged as positive and negative, respectively. In addition, PIGRET assay could detect the mutagenicity earlier than RBC *pig-a* assay, suggesting PIGRET assay is considered to be possible to evaluate the mutagenicity in a short period.

PIGRET 及び RBC *pig-a* 法を用いた AAs 及び AZT の *in vivo* 変異原性評価

真田尚和、大隅友香、中村美智、小山直美、米澤豊

科研製薬株式会社 薬物動態・安全性部

MMS 共同研究の一環として、PIGRET 法及び RBC *pig-a* 法を用いて、Aristolochic Acids (AAs) 及び Azidothymidine (AZT) の *pig-a* 遺伝子突然変異誘発性を評価した。8 週齢の Crl:CD(SD) 雄ラットに AAs を 15, 30 及び 60 mg/kg の用量で、AZT を 500, 1000 及び 2000 mg/kg の用量で単回経口投与し、投与 7, 14 及び 28 日後に尾静脈より採取した血液を用いてアッセイを行った。その結果、AAs 投与群において、RBC *pig-a* 法では投与 28 日後に 60 mg/kg の用量で突然変異頻度の有意な増加が認められたのに対し、PIGRET 法では同用量で投与 7 日目から増加が認められた。一方、AZT ではいずれのアッセイにおいても突然変異頻度の増加は認められなかった。以上より、AAs 及び AZT の *pig-a* 遺伝子突然変異誘発性は、それぞれ陽性及び陰性と判断した。また、PIGRET 法では RBC *pig-a* 法と比較し、早期に突然変異頻度の増加を検出できたことから、PIGRET 法は短期間での評価が可能であると考えられた。