

る全ての生物学的なプロセスが完遂できない（例えば DNA 修復メカニズムにより）低用量域が存在する，という考え方である。

本研究では細菌を用いる復帰突然変異試験法で，野生株と DNA 修復欠損株との間での突然変異頻度を比較した。

B. 研究方法

1. 変異原

N-Ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (ENNG) は Sigma-Aldrich より購入した。2-Nitrofluorene (2-NF) ， 3-chloro-4-(dichloro-methyl)-5-hydroxy-2(5*H*)-furanone (MX) ， sodium azide (AZ) ， *p*-nitro-*o*-phenylenediamine (NPD) は和光純薬工業より購入した。4-Nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) は東京化成工業より購入した。AZ は滅菌水に，他の変異原は dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解させて用いた。

2. 試験菌株

DNA 修復遺伝子の欠損以外については isogenic な菌株セットを用いた。下記にこれらの菌株の特性を示した。

(1) *Salmonella typhimurium*

TA1975: *hisG46, rfa*

TA1535: *hisG46, rfa, uvrB*

YG7104: *hisG46, rfa, uvrB, ogt*

(2) *Salmonella typhimurium*

TA1978: *hisD3052, rfa*

TA1538: *hisD3052, rfa, uvrB*

(3) *Escherichia coli*

WP2: *trpE65*

WP2*uvrA*: *trpE65, uvrA*

3. 復帰突然変異試験

保存菌液を解凍し，5～6 mL のニュートリエントブロスに 5 μ L の接種量で植え，37°C で 15～16 時間振盪培養した菌液を用いた。被験物質溶液 0.1 mL と 0.1 M ナリン酸緩衝液 0.5 mL とテスト菌株の培養液 0.1 mL を試験管に入れ，良く混合し 37°C で 20 分間プレインキュベーションした。2 mL のトップアガーを加え，直ちに最少グルコース寒天プレート上に広げて固めた。プレートを 37°C で 48 時間培養した後，His⁺ または Trp⁺ 復帰変異コロニー数を測定した。試験には各用量に 3 枚のプレート（対照群は 4～5 枚）を用い，その平均値，標準偏差を求めた。

C. 研究結果

1. ENNG の変異原性

アルキル化剤 ENNG では，O⁶-methyl-guanine methyltransferase (MGMT) を欠損した菌株 YG7104 が TA1535 よりもより低い用量で変異コロニーの誘発がみられた。ENNG では，YG7104 が 0.0001～0.03 μ g/plate の用量で陰性対照の 2～170 倍の変異コロニーを誘発したが，TA1535 ではそれらの用量では変異コロニーの誘発はみられず，0.3 μ g/plate 以上の用量から対照の 2 倍以上の誘発が認められた。変異原性が認められた最低用量に 3000 倍の差

があった。一方、ENNG では TA1535 と TA1975 との間の変異コロニーの誘発に大きな差異はみられなかった。(Fig.1)

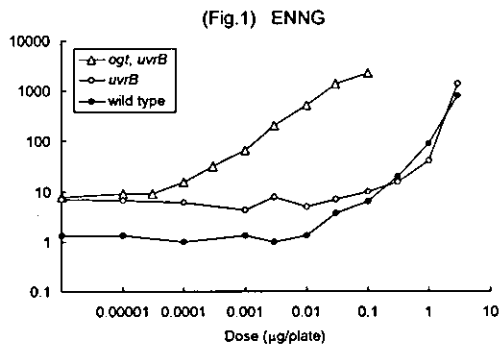


Fig. 1 ENNG

2. MX の変異原性

MX は塩基に付加体を生じる変異原であるが、WP2 $uvrA$ では 0.03~1 µg/plate で陰性対照の 4~40 倍の変異コロニーを誘発したが、野生株 WP2 では 1 µg/plate 以上の用量から変異コロニーの誘発が認められた。変異原性が認められた最低用量におよそ 30 倍の差があった。(Fig.2)

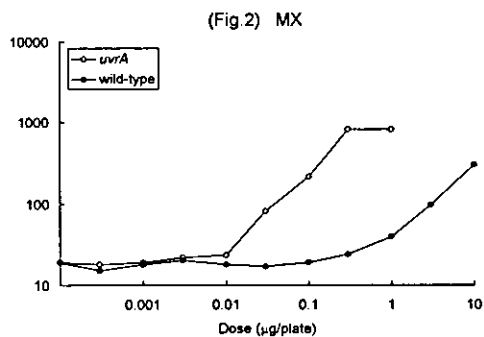


Fig. 2 MX

3. AZ の変異原性

菌体内での代謝で DNA に付加体を生

じると考えられている ZA においても、TA1535 が TA1975 よりもより低い用量で変異コロニーの誘発が認められた。TA1535 株では 0.003 µg/plate 以上の用量で対照の 2 倍以上の変異コロニーを誘発したが、野生株 TA1975 株では 0.3 µg/plate 以上の用量から変異コロニーの誘発が認められ、およそ 100 倍の差が認められた。(Fig.3)

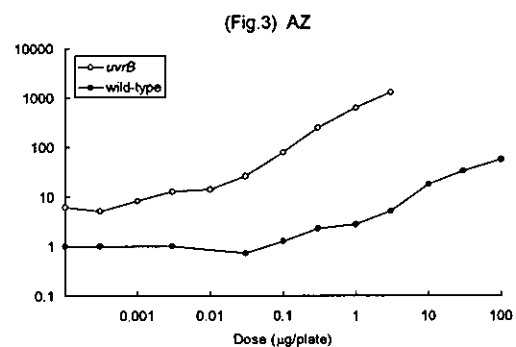


Fig. 3 AZ

4. 2-NF の変異原性

フレームシフト変異を誘発する 2-NF について、ヌクレオチド除去修復欠損株 TA1538 と野生株 TA1978 で比較した。TA1538 株では 0.03 µg/plate 以上の用量で変異コロニーを誘発したが、野生株 TA1978 株では 1 µg/plate 以上の用量から変異コロニーの誘発が認められ、およそ 30 倍の差が認められた。(Fig.4)

5. 4-NQO の変異原性

4-NQO によって誘発されるフレーム

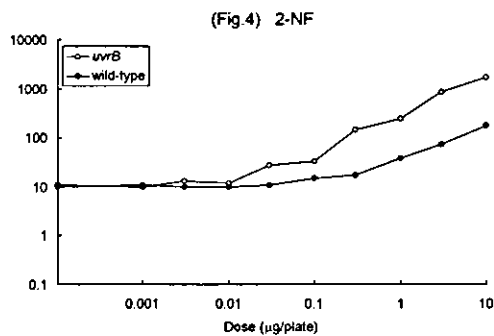


Fig. 4 2-NF

シフト変異についても、TA1538がTA1978よりもより低い用量で変異コロニーの誘発が認められた。TA1538株では0.03 µg/plate以上の用量で変異コロニーを誘発したが、野生株TA1978株では2 µg/plateで変異コロニーの誘発が認められ、およそ60倍の差が認められた。(Fig.5)

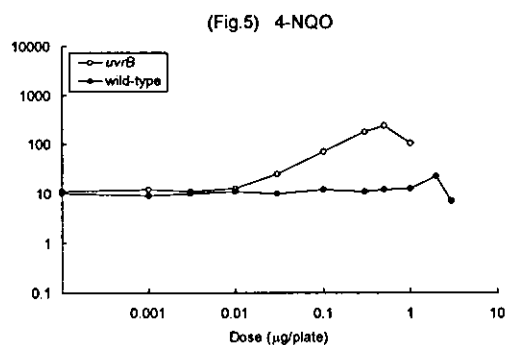


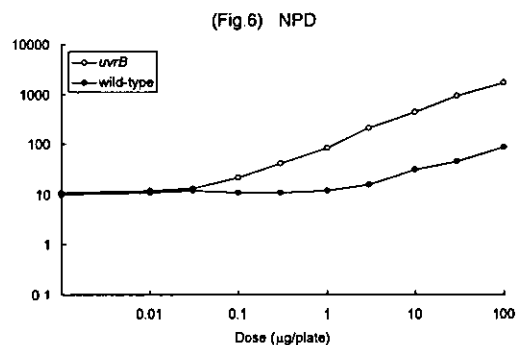
Fig. 5 4-NQO

6. NPDの変異原性

NPDも同様に、TA1538がTA1978よりもより低い用量で変異コロニーの誘発が認められた。TA1538株では0.1 µg/plate以上の用量で変異コロニーを誘発したが、野生株TA1978株では10 µg/plate以上で変異コロニーの誘発が認められ、およそ100

倍の差が認められた。(Fig.6)

Fig. 6 NPD



D. 考察

代表的な突然変異検出系である細菌を用いる復帰突然変異試験について、TA1975, TA1535 (*uvrB*) YG7104 (*uvrB, ogt*)を用い、アルキル化剤の突然変異誘発性を比較した。

また、非アルキル化剤で塩基置換変異を誘発する変異原については、ヌクレオチド除去修復欠損株のTA1535 (*uvrB*) および WP2*uvrA* (*uvrA*) とそれらの野生株であるTA1975 および WP2株を用いて、突然変異誘発性を比較した。一方、フレームシフト変異についてはTA1538 (*uvrB*) 株とその野生株であるTA1978株で比較した。

いずれの場合にもDNA修復欠損株で明らかに変異コロニーを誘発する用量、つまりDNAの障害により突然変異が生じる用量においても、正常なDNA修復能をもつ株では変異コロニーの誘発が認められておらず、生物学的な閾値が存在

することを示唆している。今後、このような考え方が細菌のみならず、他の生物種に拡大できる可能性について検討する必要があると考えられる。

E. 結 論

DNA を直接標的とする変異原物質について細菌を用いる復帰突然変異試験で、DNA 修復能の有無による突然変異誘発の違いを調べた。DNA 修復欠損株で明らかに変異コロニーを誘発する用量においても DNA 修復能をもつ野生株では変異コ

ロニーの誘発が認められておらず、生物学的な閾値が存在すると考えられる。

F. 健康危険情報

「なし」

G. 研究発表

「なし」

H. 知的財産権の出願・登録状況

「なし」

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
分担研究報告書

DNA の酸化的損傷に関する検討

分担研究者 葛西宏 産業医大・産生研・教授

アカネ色素を投与したラットの腎臓 DNA を分離し、酸化的 DNA 損傷の一種 8—ヒドロキシデオキシグアノシンを測定したところ投与量に依存した増加が見られた。

A. 研究目的

アカネ色素は、アカネ科セイヨウアカネの根から得られる着色料で、食品添加物として使用されてきた。しかし、遺伝子突然変異に関する多くの陽性結果が報告され、実験動物の腎臓に対する発がん性も示されていること等から安全性について見直しがされている。本研究では、腎臓に対する発がん性メカニズムを探る目的で、アカネ色素によるラット腎臓の酸化的 DNA 損傷性について検討した。

B. 研究方法

生体内酸化ストレスマーカーである DNA 中の 8-OH-dG を測定することにより、アカネ色素投与により生じる生体内酸化ストレスを検討評価した。実験は、遺伝子突然変異試験に用いた TG ラットから腎臓を摘出して行った。アカネ色素は、混餌法により、1.0, 5.0 wt% の濃度で 28 日間投与した後、3 日間基礎飼料を与えた。腎臓の一部（それぞれ約 0.3g）を、細胞溶解液中でホモジナイズし、細胞核

を遠心分離した。タンパク分解酵素で核膜および核タンパクを破壊した後、ヨウ化ナトリウム法により DNA を抽出。ヌクレアーゼ P₁ 及びアルカリフォスファターゼによりヌクレオシドに分解し、HPLC-電気化学検出器を用いて DNA 中の 8-OH-dG を検出定量した。同時に UV 検出器で試料中の dG 量を定量し、DNA 中の 8-OH-dG 量を、10⁶ dG あたりの値として算出した。HPLC 分析条件は、カラム；Shiseido CAPCELL PAK C18 MG 4.6 mm I.D. x 150 mm, 溶出液；10 mM sodium phosphate (pH 6.7), 8% MeOH, 流速；1.0 ml/min., ECD；ESA Coulochem II; guard cell, +0.35V; detector 1, +0.15V; detector 2, +0.30V, UV；東ソー, UV-8020, 290 nm, 2.56 full scale で行った。

C. 研究結果

DNA 中の 8-OH-dG 量は、10⁶ dG あたり次のようになった。陰性対照 1.22 ± 0.06, アカネ色素 1.0(wt%)投与群 3.74 ± 0.76, 5.0(wt%)投与群 2.14 ± 0.08。いずれも、平

均値±標準誤差, n=6. アカネ色素投与群の値は, 陰性対照に比べ有意に高かった (t 検定, $p < 0.05$). (図 1, 2)

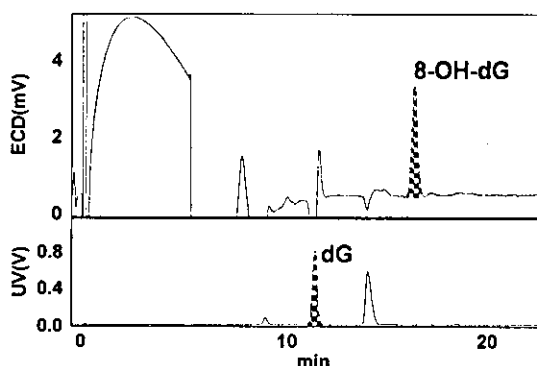


図1 HPLC-ECDによるアカネ色素投与ラット腎臓 DNAの8-OH-dG分析

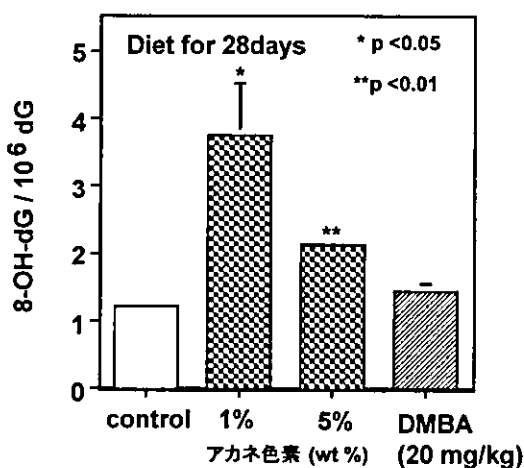


図2 アカネ色素投与ラット腎臓 DNAの8-OH-dGレベル

D. 考 察

アカネ色素の投与によって腎臓 DNA 中の 8-OH-dG 量が陰性対照に比べて有意に増えていることから, アカネ色素の 28 日間経口摂取により, 生体内酸化ストレスが亢進し, 腎臓 DNA に酸化損傷が起こったと考えられる。アカネ色素がラットの腎臓に対して発がん性を示すことが報告され, そ

の腎臓がんにはアカネ色素の腎臓傷害性やイニシエーション作用も関与している可能性が示唆されているが, 今回の結果を合わせて考えると, 腎臓での酸化ストレス亢進が, その一要因となっている可能性がある。アカネ色素 1%含有餌の方が 5%含有餌よりも 8-OH-dG 増加量が多かったが, これは 1%餌の方が生体内酸素濃度との比率からフリーラジカルを生じ易かったためと考えられる。アカネ色素によるラット腎臓の酸化 DNA 損傷の機構解明を含め, 今後さらに詳細な検討が必要と考えられる。また, 実験動物を用いた結果を評価する際, 系統差が議論されることがあるが, 今回用いた TG ラットの腎臓 DNA 中の 8-OH-dG 量 (陰性対照群で 10^6 dG あたり 1.22) は, 実験動物としてよく用いられる他系統のラットと比較して同程度であり, DNA 中の 8-OH-dG を指標とした生体内酸化ストレス実験に用いる動物として, 系統上の問題はないと思われる。

現在, 当研究室では臓器 DNA 中の 8-OH-dG のみならずラット, マウス尿中の 8-OH-dG および塩基 8-OH-Gua の測定が可能となっており今後食品添加物による酸化 DNA 損傷の誘発, あるいは抗酸化物質によるその抑制を調べる上で有用と考えられる。

E. 結 論

アカネ色素を含む餌 28 日間投与によりラット腎臓 DNA に酸化損傷がみられた。発がん性との関連が示唆され, さらに詳細な検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hirano, T., Kawai, K., Ootsuyama, Y., Orimo, H., Kasai, H. Detection of a mouse OGG1 fragment during caspase-dependent apoptosis: Oxidative DNA damage and apoptosis. *Cancer Sci.*; 95:634-638 (2004)
- 2) Orimo H, Mei N, Boiteux S, Tokura Y, Kasai H. Analysis of 8-Hydroxyguanine (8-OH-Gua) Released from DNA by the Formamidopyrimidine DNA Glycosylase (Fpg) Protein: A Reliable Method to Estimate Cellular Oxidative Stress. *J. Radiat. Res. (Tokyo)*.;45:455-60 (2004)
- 3) Svoboda, P. and Kasai, H., Simultaneous HPLC analysis of 8-hydroxydeoxyguanosine and 7-methylguanine in urine from humans and rodents, *Anal. Biochem.*, 334, 239-250 (2004)

- 4) Hori M, Fujikawa K, Kasai H, Harashima H, Kamiya H. Dual hydrolysis of diphosphate and triphosphate derivatives of oxidized deoxyadenosine by Orf17 (NtpA), a MutT-type enzyme. *DNA Repair (Amst)*. 4:33-9 (2005)

2. 学会発表 準備中

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

分担研究報告書

アカネ色素のラット腎臓および肝臓における不定期 DNA 合成試験
—高濃度単回投与における組織学的影響—

分担研究者 田中 憲穂 (財)食品薬品安全センター秦野研究所遺伝毒性部長

天然着色料として使用されているアカネ色素は、ラットを用いた発がん試験により腎臓に発がん性を示す事が示唆されており、腎臓において DNA 付加体も検出されている。しかし、そのがん化のメカニズムについては、遺伝的傷害に基づくものであるとの明確な確証は得られていない。そこで本実験では、肝臓や腎臓において DNA 傷害が生じているかを確認するため、ラットを用いる *in vivo* UDS 試験を実施する事とし、本年度は、試験条件を設定するため、アカネ色素の高濃度単回投与による肝臓、腎臓での組織学的な毒性発現を調べ投与量と処理後の時間などについての情報を得た。また、陽性対照として用いる Dimethylnitrosamine (DMN) について予備的な UDS 試験を試みた。その結果、DMN は経口投与では投与 2 時間で腎臓での UDS が最も高く、4~6 時間で取り込みは減少した。アカネ色素の 1000 mg/kg および 2000 mg/kg 単回経口投与により投与後 3~6 時間で、腎臓の近位尿細管上皮細胞において、核の大小不同が観察された。一方、肝臓では 2000 mg/kg 投与 3 時間後の 1 例において、単細胞壊死が観察され、アポトーシスの誘導が認められた。以上の結果より、腎臓がアカネ色素の標的臓器になっている事が強く示唆された。

A. 研究目的

天然着色料として使用されているアカネ色素は、ラットを用いた発がん試験により腎臓に発がん性を示す事が示唆されている。一方、遺伝毒性に関しては、細菌を用いた復帰変異試験では陽性、枯草菌による DNA 修復試験 (Rec-assay) では弱い陽性、マウスを用いた小核試験では陰性、ラットおよびマウスの肝細胞を用

いた DNA adduct 試験では陽性の報告があり、発がんのメカニズムとして遺伝毒性に起因する可能性が示唆されている。

そこで本実験では、肝臓や腎臓において直接 DNA 傷害が生じているかを確認するため、ラットを用いる *in vivo* UDS 試験を実施する事とした。

本年度は、その試験条件を設定するため、アカネ色素の高濃度単回経口投与に

よる肝臓、腎臓での病理組織学的な変化とアポトーシスの誘発などを調べ、投与量、処理後の時間、陽性対照として用いる Dimethylnitrosoamine (DMN) についての情報を得た。

B. 研究方法

1) DMN の処理条件の確定

F-344 系雄性ラット (F-344:DuCrj, 厚木生産センター) 12 匹を 6 週齢で購入し、以下に示す群構成で 400 mg/kg の Dimethylnitrosamine (DMN) を単回強制経口 (p.o.) あるいは単回腹腔内 (i.p.) 投与した。各動物は屠殺 30 分前に 18.5 MBq の ³H-thymidine を静脈内投与し、肝臓および腎臓を採取して 2% パラホルムアルデヒド・2.5% グルタルアルデヒド固定液で固定した。各組織片を電子顕微鏡用 Quetol-651 樹脂に包埋して約 1.5 μm の厚切り切片を作製して、Kodak NTB 乳剤を塗布し、2 週間露出後に Kodak デクトールで現像した。各切片をトルイジンブルー染色し、肝臓では小葉中間帯肝細胞、腎臓では近位尿細管上皮細胞および遠位尿細管上皮細胞の核内グレイン数をそれぞれ 100 細胞カウントした。

群構成

群	処置	動物番号
第 1 群	p.o. 2 時間群	1-3
第 2 群	p.o. 4 時間群	4-6
第 3 群	p.o. 6 時間群	7-9
第 4 群	i.p. 群	10-12

2) アカネ色素高濃度単回投与による影響

F-344 系雄性ラット (F-344:DuCrj, 厚木

生産センター) 15 匹を 6 週齢で購入し、以下に示す群構成で 2000 および 1000 mg/kg のアカネ色素ならびに 400 mg/kg の DMN を単回強制経口投与した。各動物はペントバルビタールナトリウム麻酔後に放血屠殺して、腎臓および肝臓を採取した。各器官から定法に従って病理組織標本 (HE) 作製して観察するとともに、*in situ* アポトーシス検出キット (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いた TUNEL 法によるアポトーシスの検出を行った。

群構成

群	処置	動物番号
第 1 群	対照群 (DW, 3hr)	1-3
第 2 群	2000 mg/kg, 6hr	4-6
第 3 群	2000 mg/kg, 3hr	7-9
第 4 群	1000 mg/kg, 3hr	10-12
第 4 群	DMN 400 mg/kg, 3hr	13-15

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、動物愛護にかんする 3R の精神に基づき実験を実施した。実験計画は、分担研究者の所属する、(財) 食品薬品安全センター秦野研究所動物実験倫理委員会により、当該研究計画が動物愛護に基づき倫理上適切であることを確認されたものである。

C. 研究結果および考察

1) DMN の処理条件の確定 (表 1)

肝臓

経口投与では、投与 2 および 4 時間後に比べ、投与 6 時間で核内のグレイン数が減少した。腹腔内投与では、差は認められなかった。

表 1 DMN400 mg/kg 単回投与後の肝臓・腎臓での核内グレイン数

After administration (hr)	Animal No.	No. of grain			
		Liver	Kidney		
			P	D	
2 hr	1	69	25	37	
	2	46	30	25	
	3	56	39	32	
	Mean	57.0	31.3	31.3	
	SD	11.5	7.1	6.0	
4 hr	4	54	19	12	
	5	60	21	15	
	6	63	15	8	
	Mean	59.0	18.3	11.7	
	SD	4.6	3.1	3.5	
6 hr	7	37	18	12	
	8	38	8	16	
	9	35	12	16	
	Mean	36.7	12.7	14.7	
	SD	1.5	5.0	2.3	
ip-2 hr	10	53	19	18	
ip-4 hr	11	43	10	11	
ip-6 hr	12	69	20	12	

P: Proximal tubular epithelium

D: Distal tubular epithelium

表 2 アカネ色素単回投与後の肝臓と腎臓における病理組織所見

Group	Control			2000 mg/kg			2000 mg/kg			1000 mg/kg			DMN 400 mg/kg		
Exposed period	3 hr			6 hr			3 hr			3 hr			3 hr		
No. of animals	3			3			3			3			3		
Grade	-	±	+	-	±	+	-	±	+	-	±	+	-	±	+
(Kidney)															
Anisonucleosis, proximal tubule	3	0	0	0	3	0	0	3	0	2	1	0	1	2	0
(Liver)															
Single cell necrosis, hepatocyte	3	0	0	3	0	0	2	1	0	3	0	0	0	3	0
Alteration, nuclear	3	0	0	3	0	0	3	0	0	3	0	0	0	3	0
Ground glass appearance	3	0	0	3	0	0	3	0	0	3	0	0	0	2	1

-, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe

表3 アカネ色素単回投与後の TUNEL 法によるアポトーシスの検出

Group	Control				2000 mg/kg				2000 mg/kg				1000 mg/kg				DMN 400 mg/kg			
Exposed period	3 hr				6 hr				3 hr				3 hr				3 hr			
No. of animals	3				3				3				3				3			
Grade	-	±	+	++	-	±	+	++	-	±	+	++	-	±	+	++	-	±	+	++
Proximal tubular epithelium	3	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0
(Liver)																				
Hepatocyte	0	3	0	0	0	3	0	0	0	1	2	0	0	3	0	0	0	0	2	1

-, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe

腎臓

近位尿細管上皮細胞および遠位尿細管上皮細胞ともに投与2時間後が4時間および6時間に比べ高値を示した。腹腔内投与では、経口投与に比べ低値を示す傾向があった。

2) アカネ色素高濃度単回投与による影響 (表2, 表3)

腎臓では、アカネ色素2000 mg/kg投与群の6および3時間の全例、1000 mg/kg投与群の投与3時間の1例、DMN 400 mg/kg投与群の2例の皮質内帯すなわち皮髄境界部の近位尿細管上皮細胞において、核の大小不同が認められた(写真1-3)。

肝臓では、2000 mg/kg投与群の投与3時間後の1例に単細胞壊死が観察された以外、変化は認められなかった。DMN 400 mg/kg投与群では、肝細胞の単細胞壊死、クロマチンが核膜辺縁に凝集する核変化およびすりガラス状変化が認められた(写真4-5)。

TUNEL法によるアポトーシスの検出では、アカネ色素2000 mg/kg投与群の投与3時間後の2例に軽度の増加が、DMN 400 mg/kg投与群に軽度から中等度の増加が認められた(写真6-8)。

以上の結果から、アカネ色素のラット腎臓および肝臓におけるUDS試験を実施

するにあたり、DMNが陽性対照として使用可能であることが確認された。一方、アカネ色素の高濃度単回投与により、腎臓では近位尿細管上皮細胞の核の大小不同が観察され、これまでに実施されている慢性毒性試験あるいは癌原性試験の結果と一致する所見であった。肝臓では、2000 mg/kg投与群の投与3時間で肝細胞にアポトーシスが誘発され、6時間で減少したことから、少なくともDNAの断片化は引き起こされており、その後修復できない細胞はアポトーシスとして淘汰されたものと考えられた。従って、腎臓では核の変化、肝臓ではDNAの断片化が惹起されたことから、UDS誘発の可能性はきわめて高いと考えられた。

D. 結論

アカネ色素の高濃度単回投与による肝臓、腎臓での組織学的な毒性発現を調べたところ、1000mg/kgおよび2000mg/kg単回経口投与により、投与後3~6時間で腎臓の近位尿細管上皮細胞において、核の大小不同が観察された。一方、肝臓では2000mg/kg投与3時間後の1例において、単細胞壊死が観察され、アポトーシスの誘導が認められた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kiyomi Ohmori, Kiyoshi Sasaki, Shin Asada, Noriho Tanaka and Makoto Umeda: An assay method for the prediction of tumor promoting potential of chemicals by the use of Bhas 42 cells, *Mutation Res.*, 557, 191-202 (2004).
- 2) 田中憲穂： 医療用具の製品化を目的とした前臨床試験，バイオマテリアル-生体材料- 22:320-327 (2004).
- 3) 田中憲穂：照射食品の遺伝的安全性試験，*食品照射*， 39: 13-27(2004).
- 4) 田中憲穂：照射食品の生物学的安全性，*Food and Food ingredients Journal of Japan*, 209 (2004).
- 5) Agneta Rosengre, Linda Faxius, Noriho Tanaka, Mika Watanabe, Lars Magnus Bjursten, Comparison of implantation and cytotoxicity testing for initial toxic biomaterials, *Journal of Biomedical Materials Research*, in press (2005).
- 6) Ryo Kurihara, Fujio Shiraishi, Noriho tanaka, Shinya Hashimoto, Presence and estrogenicity of anthracene derivatives in coastals Japanese waters, *Environmental Toxicology and Chemistry*, in press (2005).
- 7) Shin Asada, Kiyoshi Sasaki, Noriho Tanaka, Ken Takeda, Makoto Hayashi and Makoto Umeda, Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay using v-Ha-ras-Transfected BALB/c 3T3 Cells (Bhas 42 Cells), *Mutation Res.*, 投稿中

2. 学会発表

- 1) 田中憲穂：生殖細胞および培養細胞を用いた遺伝毒性試験法の開発と国際標準化への貢献，(学会賞講演) 日本環境変異原学会，2004年11月，長崎
- 2) 浅田晋，佐々木澄志，山陰康次，田中憲穂，梅田誠：Bhas42細胞を用いた抗形質転換作用検出系の確立とその応用，日本環境変異原学会，2004年11月，長崎
- 3) 中川ゆづき，田中憲穂：In vitro小核試験およびプラスミドDNA切断性試験を用いたコウジ酸の光遺伝作用の検討，日本環境変異原学会，2004年11月，長崎
- 4) 田中憲穂，板垣宏，今井弘一，大野泰雄，大森崇，岡本裕子，川端留美，小島肇夫，土肥孝彰，藤田百合子，畑尾正人，笛木修，若栗忍，吉村功：酵母光生育阻害試験および赤血球光溶血試験を用いた光阻害試験：バッテリーのバリデーション及び評価委員会での検討中間報告，日本動物実験代替法学会，2004年11月，長崎
- 5) 吉村功，板垣宏，大野泰雄，大森崇，岡本裕子，川端留美，小島肇夫，田中憲穂，谷川浩子，土肥孝彰，長谷川靖司，藤田百合子，穂谷昌利，森真輝，若栗忍，：酵母-赤血球試験の光毒性試験代替法としてのバリデーション研究，日本動物実験代替法学会，2004年11月，長崎
- 6) 本郷有克，若栗忍，石川陽一，梅田誠，田中憲穂：基礎代謝としてのグルコース取り込みを指標とする細胞毒性試験，日本動物実験代替法学会，2004

年 11 月，長崎

- 7) 渡辺美香，小林美和子，若栗忍，佐々木澄志，山陰康次，倉田信弘，田中憲穂：試験法および細胞種の違いによる細胞毒性試験結果の検討，日本動物実験代替法学会，2004 年 11 月，長崎
- 8) 北垣雅人，若栗忍，板垣宏，田中憲穂，豊田英一：急性毒性試験代替法の検討（2）II.2 施設間における急性毒性試験を予測するための 2 種の細胞毒性試験の評価，日本動物実験代替法学会，2004 年 11 月，長崎
- 9) 若栗忍，北垣雅人，板垣宏，田中憲穂，豊田英一：急性毒性試験代替法の検討（2）I.2 施設間における 2 種の細胞

毒性試験の安定性，日本動物実験代替法学会，2004 年 11 月，長崎

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

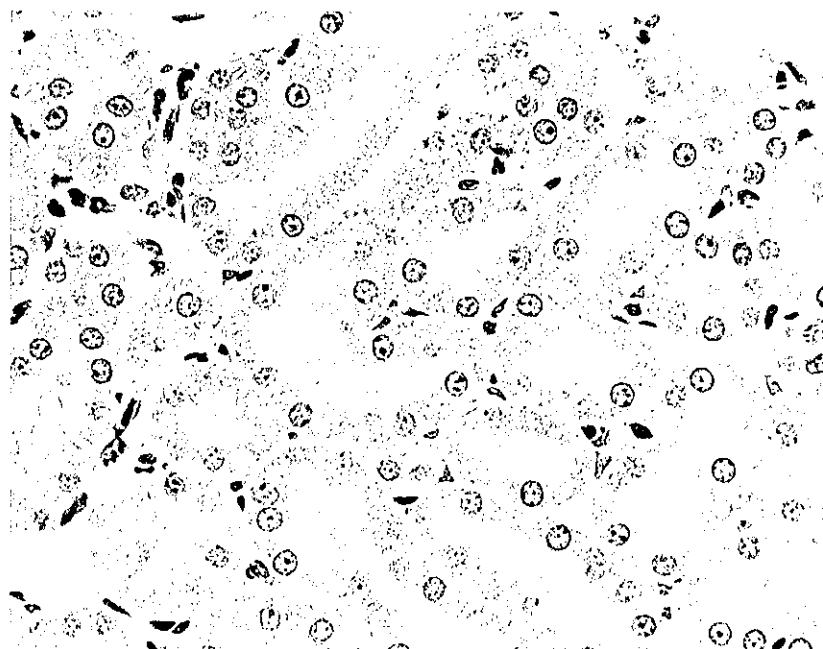


写真1 対照群の腎臓。HE染色、350倍。

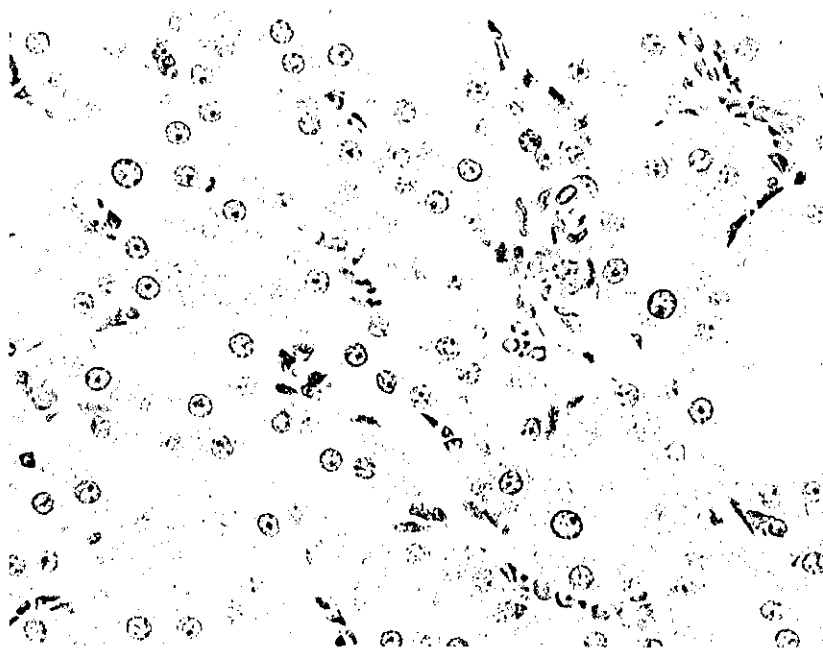


写真2 アカネ色素2000 mg/kg投与群、投与6時間後の腎臓。近位尿細管上皮細胞核の大小不同がみられる。HE染色、350倍。

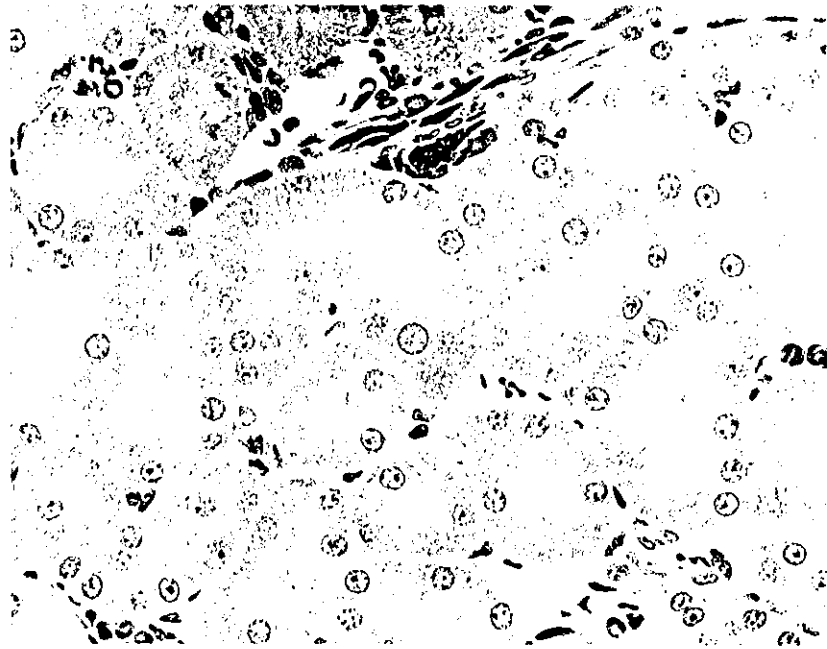


写真 3 DMN 400 mg/kg投与群、投与3時間後の腎臓。近位尿細管上皮細胞核の大小不同がみられる。HE染色、350倍。

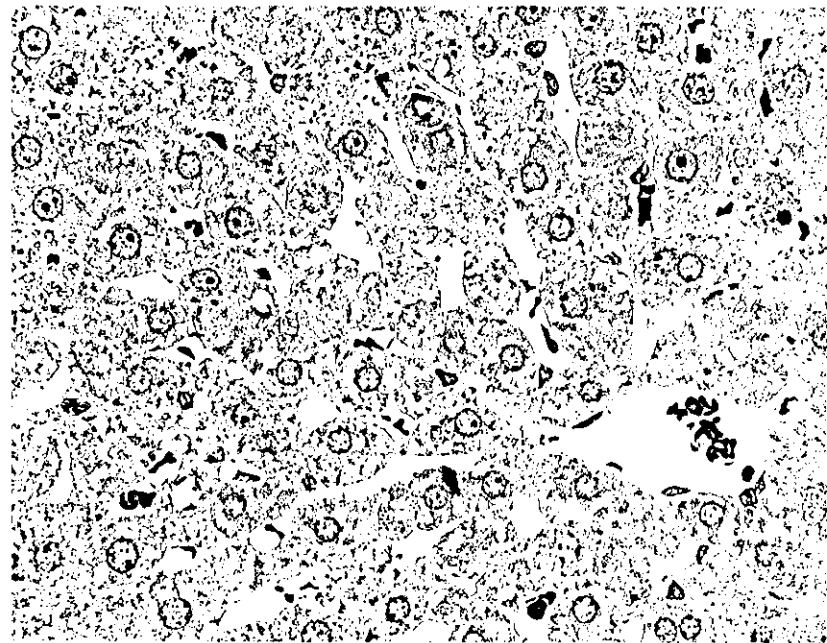


写真 4 DMN 400 mg/kg投与群、投与3時間後の肝臓。肝細胞の単細胞壊死、核の変化近およびすりガラス状変化がみられる。HE染色、350倍。

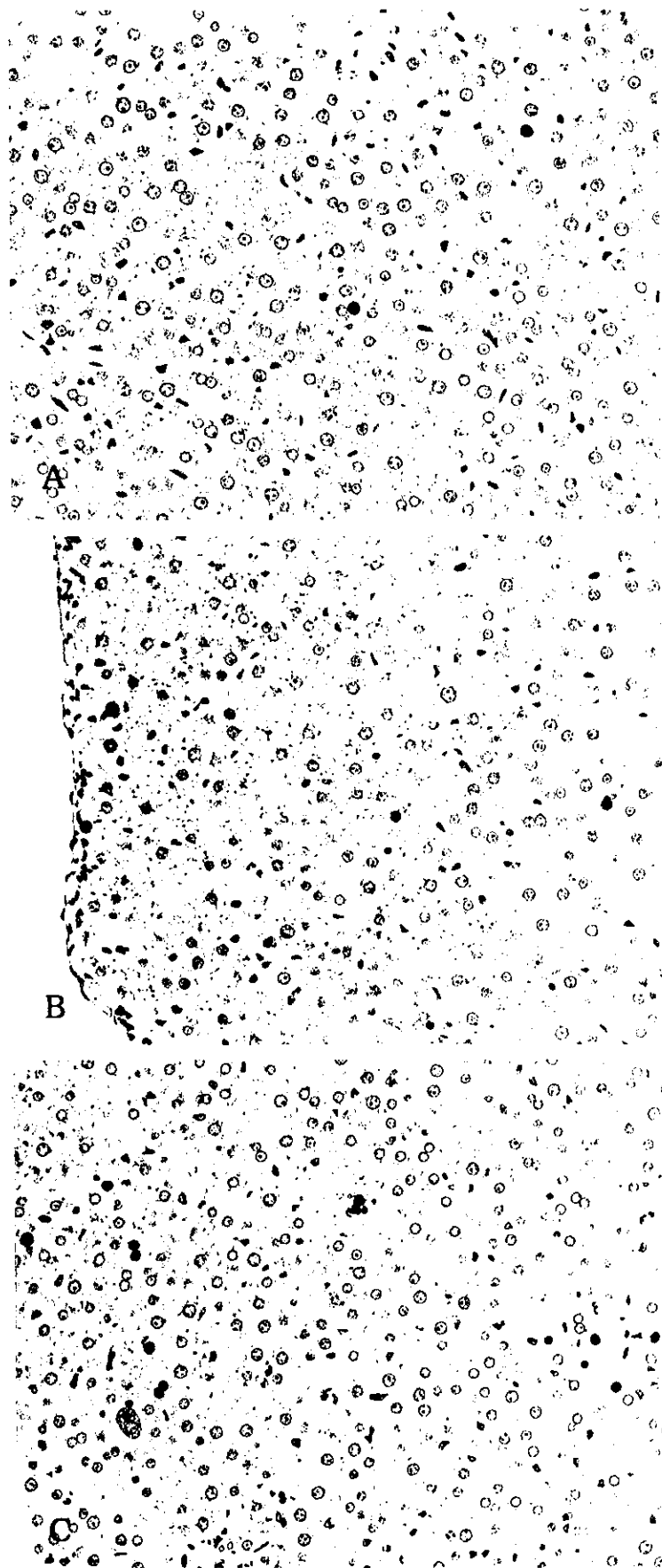


写真 5

TUNEL法によるアポトーシスの検出。

A:対照群の肝細胞(グレード±)。

B:アカネ色素2000 mg/kg投与群、投与3時間後の肝細胞(グレード+)。

C:DMN 400 mg/kg投与群、投与3時間後肝細胞(グレード++)。各320倍。

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
分担研究報告書

トランスジェニックラットを用いる *in vivo* 遺伝毒性試験に関する研究

分担研究者 中嶋 圓 (財) 食品農医薬品安全性評価センター 第三試験室長
協力研究者 菊池正憲 (財) 食品農医薬品安全性評価センター 遺伝毒性グループ
島田昌也 (財) 食品農医薬品安全性評価センター 遺伝毒性グループ

本研究は、天然の着色料であるアカネ色素のラット肝臓に対する生体内遺伝毒性の有無を検索することを目的とした。多臓器中期発がん性試験においてアカネ色素は陰性との報告があるが、最近の研究結果からラットの腎臓並びに肝臓においては腫瘍を誘発すると考えられている。そこでトランスジェニックラット (Big Blue™ Rat) を用いて標的臓器での遺伝子突然変異誘発性を検索した。混餌法による 28 日間の反復投与後に導入遺伝子 (シャトルベクター上の *cH* 遺伝子) の突然変異を解析した結果、アカネ色素による肝臓での遺伝子突然変異頻度は媒体対照に比較し明確な上昇は認められなかった。

A. 目的

アカネ色素 (Madder color) は、アカネ科の西洋アカネの根から抽出される色素で、性状としては赤褐色粉末で水、アルコールに溶解し、熱、光に対して非常に安定な物質である。

アカネ色素の遺伝毒性に関しては *in vitro* 試験の Ames 試験で陽性¹⁾、Rec-assay においても弱い陽性²⁾、*in vivo* 試験のマウス小核試験で陰性³⁾、さらにラットを用いた DNA 付加体試験において、腎臓、肝臓、消化管系で付加体が生じたとの報告がある⁴⁾。一方発がん性に関しては F344 系ラットを用いた 16 週間混餌投与の多臓器中期発がん性試験において、腫瘍の誘発促進は認められていないとの報

告がある⁵⁾。しかしながら、最近 780 日間の反復投与による発がん性試験では統計学的に有意ではないものの肝臓と腎臓に腫瘍の増加が見られたとの報告がある⁶⁾。DNA 付加体が生じていること、複数の臓器で腫瘍の発生が増加していることから、メカニズムとして遺伝毒性に起因するかを検討するため、トランスジェニックラット (Big Blue™ Rat) を用い遺伝子突然変異誘発性の有無を検索した。

B. 方法

1. 被験物質

国立医薬品食品衛生研究所から提供を受けたアカネ色素 (Lot No. : 040723, 含量 : Ruberythric acid 換算で 16.85%) 並び

にデキストリンを試験に用いた。提供されたアカネ色素並びにデキストリンは使用時まで室温で保管した。

2. 使用動物

4 あるいは 6 週齢の雄 Big Blue™ Rat [F344] を Taconic 社 (Germantown, NY : 米国) より購入し、1 週間の検疫・馴化ののち、5 あるいは 7 週齢のラットを試験に用いた。

3. 飼育条件

動物は温度 24.5±2.5°C, 湿度 55±20%, 照明 12 時間 (7:00 点灯, 19:00 消灯), 換気回数 1 時間あたり 8 回に設定したラット飼育室 (組替え DNA 実験指針; 昭和 54 年 8 月 27 日内閣総理大臣決定, 平成 3 年 9 月 24 日改訂による物理的封じ込めに係わる施設) で飼育した。

Micro-Isolator™ System (Lab Products Inc.) ラックを使用し、飼育ケージに動物を 1 匹ずつ収容した。粉末飼料 (基礎飼料, 放射線滅菌改良 NIH 公開ラット, マウス飼料: オリエンタル酵母工業株式会社) を自由摂取させた。また、水道水を自動給水ノズルより自由摂取させた。

4. 被験物質添加飼料の調製

被験物質添加飼料は基礎飼料にアカネ色素を添加し数分間混和することにより調製した。ただし、本被験物質は粉末状に保つために 30% の割合でデキストリンが添加されていることから、1% 混入試料の調製時には 1.2% のデキストリンを添加した。被験物質添加飼料は週 1 回調製し、室温にて保存した。

5. 投与方法および投与期間

多臓器中期発がん性試験での用量は 5.0 および 2.5% であること、さらには本被験物質が食品添加物であることを考慮した結果、5.0% を高用量とし、以下 1.0% の計 2 用量を被験物質処理群として設定した。また、トランスジェニック動物を用いる遺伝子突然変異試験での投与期間に関しては Thybaud 等が 28 日間の反復投与を推奨している⁷⁾。したがって、アカネ色素 1.0 および 5.0% の 2 用量について 1 群 6 匹のマトランスジェニックラットを用い 28 日間の混餌投与を行った。最終投与 3 日後に各個体から腎臓、肝臓および十二指腸を摘出し、速やかに液体窒素で凍結した後、-80°C で保存した。

陽性対照群にはオリブ油に溶解した 7, 12-ジメチルベンズ [a] アントラセン (DMBA) 20 mg/kg を 1 回投与した。投与後 14 日に各器官を摘出した。

6. ゲノム DNA の抽出

ダウンス型ホモジナイザーに肝臓の凍結組織片 (20~30 mg) をおよび組織破砕用緩衝液を加えホモジナイズした。あらかじめ 0.5 mol/L ショ糖溶液を入れて氷令しておいた遠心管に上記の組織破砕液を静かに重層し、1900×G で 10 分間遠心した。RNase 含有ダウンス緩衝液および Proteinase K 溶液を加えて静かに混和転倒し、3 時間程度 50°C で保温し消化させた。等量のフェノール/クロロホルム混液 (容量比 1:1) を加え 10 分間ローテーターを用いて回転混和した後、1100×G で 10 分間遠心した。上層の水層を回収し、本

操作を2回繰り返した。回収した水相と等量のクロロホルム/イソアミルアルコール混液（容量比24:1）を加え同様にローターを用いて回転混和した後、1100×Gで10分間遠心した。上層の水層にエタノールを徐々に加えることによりゲノムDNAを析出させた。析出したゲノムDNAに適量のTE緩衝液を加え、一晚室温に放置し溶解させた。

7. 試験菌株の準備

バッフル付三角フラスコに30 mLのLB培養液、マルトース水溶液（200 mg/mL）ならびに1 mol/L硫酸マグネシウム水溶液をそれぞれ300 µLずつ添加したのち、大腸菌 hfl⁻株（G1225）懸濁液50 µLを接種した。30°C、120回/分の振盪条件で一晩培養し、前培養液とした。あたらしいバッフル付三角フラスコに新鮮なLB培養液100 mLおよびマルトース水溶液ならびに1 mol/L硫酸マグネシウム水溶液をそれぞれ1 mLを添加し、次いで先の前培養液を1 mL 接種した後、同様に4時間培養を続けた。培養終了後、菌懸濁液を10分間遠心分離（1000 r/min）した。上清を捨て、10 mmol/Lの硫酸マグネシウムを含むLB培養液を用いて再懸濁した後、試験に使用するまで4°Cで保管した。

8. ゲノムDNAのパッケージング

6.で調製したゲノムDNA溶液をTranspack（Stratagene）を用いて *in vitro* パッケージング反応を行った。

あらかじめ準備しておいた大腸菌懸濁液を総プラーク算出用（タイター用）ならびに突然変異算出用（セレクトオン用）

に分取した。パッケージング溶液の全量をセレクトオン用チューブに加えた後、室温に30分間放置してファージを大腸菌に感染させた。本溶液を30 µLとり10 mmol/Lの硫酸マグネシウムを含むLB培養液で10倍希釈した。本溶液30 µLをタイター用チューブに加えて攪拌した後、LB寒天培地に全量を重層した。セレクトオン用チューブについても同様にLB寒天培地に重層した。セレクトオンプレートは24.5°C、タイター用プレートは37°Cでそれぞれ48時間培養した後、出現したプラーク数を計数した。プラーク数が400,000に達するまで上記のパッケージング操作を繰り返した。

9. 統計方法

各試験群のcφ遺伝子の突然変異頻度は条件付き二項検定（Kastenbaum and Bowmanの推計学的方法⁸⁾：有意水準上側0.05）を用いて有意差を判定した。

10. 判定基準

被験物質処理群において統計学的な有意差が認められた場合、陽性と判定した。ただし、最終的な判定は試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行った。

（倫理面の配慮）：本研究では実験動物としてラットを用いているが、動物の飼育および取り扱い等動物を使用するに際しては、「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、平成11年12月22日改正）」、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準（昭和55年3月27日総理府告示第6号、平成14年5月28

日一部改正)」および「(財)食品農医薬品安全性評価センター 動物実験に関する指針(平成15年12月1日)」を順守しており、動物愛護上の配慮が十分にされている。また、ヒト組織利用の倫理上問題となることはない。

C. 結果

各群の肝臓における *cII* 遺伝子の突然変

異頻度について Table 1 および 2 に示す。

陰性対照群においては総プラーク数 2,779,200 の内、変異プラークが 50 出現し、その突然変異頻度は 18.0×10^{-6} 、各個体の平均値では 18.3×10^{-6} であった。

アカネ色素処理群での突然変異頻度は一数：50/2,461,500)、5.0%群で 18.4×10^{-6}

(同：49/2,668,500) であり、陰性対照群と比較していずれの投与群とも統計学的に有意な増加は認められなかった。各個体の平均値は 1.0 および 5.0% でそれぞれ

20.1 ならびに 19.2×10^{-6} であった。

一方、陽性対照群の突然変異頻度は 78.2×10^{-6} (同：115/1,469,700) に増加しており、媒体対照群に比べて統計学的に有意 ($p < 0.01$) な増加が認められた。各個体の平均値は 78.6×10^{-6} であった。

D. 考察

アカネ色素について細菌を用いた復帰突然変異試験 (Ames 試験) および枯草菌を用いた DNA 修復試験 (Rec assay) で陰性あるいは陽性等、合い異なる結果が報告されているが^{1,2)}、*in vitro* の遺伝毒性試験として総合的には陽性と判断されている。*In vivo* 試験の場合、マウス小核試験で陰性であったが³⁾、ラットを用いた DNA 付加体試験において、腎臓、肝臓、消化管系で付加体が生じたとの報告がある⁴⁾。

Table 1. Mutant frequency of *cII* gene in transgenic rats after Madder color treatment

Compound	Dose (%)	Organ	Number of animals	Number of plaques	Number of mutants	Mutant Frequency ($\times 10^{-6}$)	p-value
Madder color	0	Liver	5	2779200	50	18.0	-
	1	Liver	5	2461500	50	20.3	0.3056
	5	Liver	5	2668500	49	18.4	0.4993
DMBA ^{a)}	20 (mg/kg)	Liver	5	1469700	115	78.2*	0.0000

* : $p \leq 0.05$, significant difference from control (Kastenbaum and Bowman method, upper-tailed)

a): Positive control (7,12-dimethylbenz[a]anthracene). A single dose samples were prepared at 14-days after the dose.