

図1 マラリア感染マウス赤血球を用いたモデル実験における期待値と実測値のスキヤタグラム

を示した。MMC, Ara-C 及び COL の3つの化合物の最高投与量でのP値は0.01以下であった (Fisher's exact test). また、マニュアル観察とフローサイトメトリーの解析結果とは同じような曲線を描き、また解析細胞数が増加につれマウス間のバラツキが減少することが示された。

#### D. 考察

フローサイトメトリーによる検出力については、Malを用いた段階希釈モデルで解析した結果、理論値と実測値が解析細胞を増やすことにより、相関性が飛躍的に上昇し、1Mの解析細胞数では理論値れることがわかった。このことは、観察

と実測値がほぼ同一直線上にプロットされ細胞数を多くすることにより、

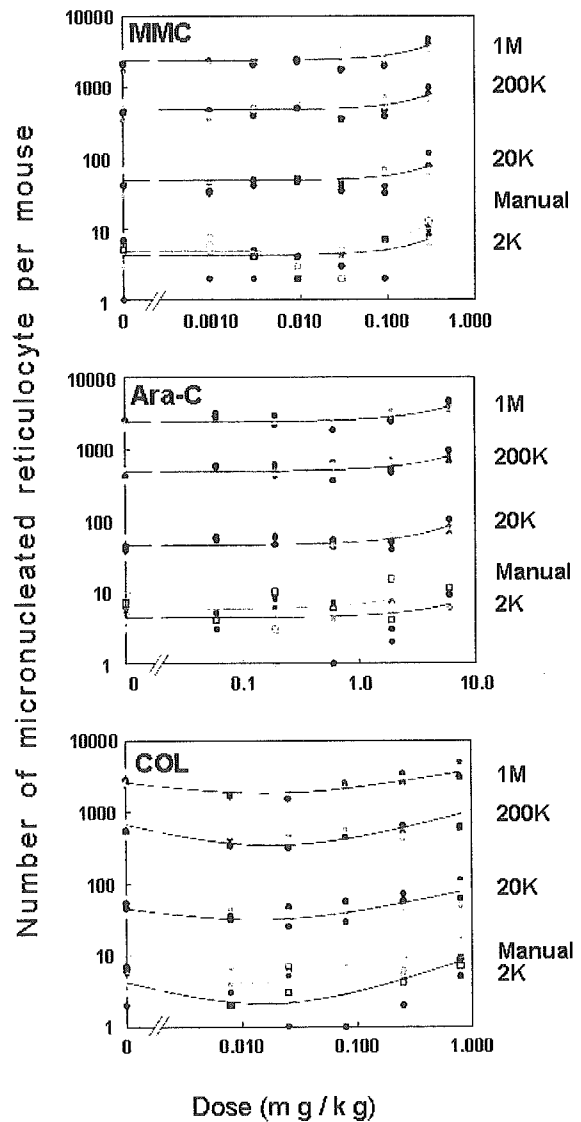


図2 MMC, Ara-C 及び COLの用量関係曲線

真の値により近づくことを意味していると考えられた。

マニュアル観察による小核を持つ網赤血球の頻度がフローサイトメトリー

表 1 マニュアル観察ならびにフローサイトメトリーによる小核を持つ網赤血球の頻度 (%)

Chemical	Dose mg/kg	Manual		Flow cytometry		
		2K	2K	20K	200K	1M
MMC	0	0.22±0.06	0.23±0.16	0.25±0.09	0.23±0.06	0.23±0.05
	0.00095	0.33±0.06	0.17±0.04	0.21±0.05	0.24±0.06	0.24±0.05 <sup>a</sup>
	0.00300	0.24±0.08	0.25±0.11	0.27±0.05	0.25±0.05	0.25±0.05 ‡
	0.00948	0.24±0.17	0.22±0.09	0.28±0.04	0.27±0.03 ‡	0.27±0.04 ‡
	0.03000	0.20±0.06	0.22±0.08	0.24±0.08	0.19±0.08	0.23±0.08
	0.09480	0.35±0.14	0.27±0.10	0.25±0.08	0.28±0.07 ‡	0.27±0.06 ‡
	0.30000	0.64±0.15 **; ‡	0.36±0.10	0.40±0.11 *; ‡	0.41±0.06 **; ‡	0.39±0.05 **; ‡
Ara-C	0.000	0.32±0.10	0.21±0.05	0.21±0.05	0.23±0.04	0.22±0.02
	0.060	0.26±0.15	0.19±0.07	0.24±0.07	0.24±0.07	0.24±0.07
	0.190	0.28±0.18	0.30±0.06	0.23±0.06	0.25±0.04 †	0.25±0.03 †
	0.600	0.32±0.03	0.21±0.13	0.25±0.05	0.27±0.05 ‡	0.27±0.05 ‡
	1.890	0.42±0.21	0.24±0.11	0.29±0.07 ‡	0.29±0.05 ‡	0.28±0.04 ‡
	6.000	0.81±0.38 **; ‡	0.34±0.10 **	0.41±0.11 *; ‡	0.39±0.09 *; ‡	0.39±0.09 *; ‡
COL	0.00000	0.32±0.08	0.22±0.10	0.25±0.05	0.27±0.05	0.28±0.06
	0.00800	0.18±0.11	0.21±0.09	0.22±0.06	0.22±0.04	0.22±0.03
	0.02520	0.31±0.13	0.16±0.09	0.20±0.04	0.22±0.04	0.21±0.04
	0.08000	0.13±0.08	0.22±0.11	0.23±0.06	0.21±0.05	0.21±0.03
	0.25200	0.34±0.19	0.21±0.08	0.28±0.05	0.26±0.04	0.27±0.05
	0.80000	0.56±0.19 **; ‡	0.41±0.14	0.41±0.13 ‡	0.44±0.13 ‡	0.44±0.13 ‡

Data are shown as mean±SD (%) of 5 mice.

Fisher's exact test (all groups) †: Significantly difference at 5%; ‡:1%; No mark: not significant

Student's t-test (20K, 200K, 1M groups) \*: Significantly difference at 5%; \*\*: 1%

a: Only 881389 instead of 1M cells were analyzed in one of 5 mice.

による解析結果より高めに観察されることが示された。これはマニュアルでは、顕微鏡下で網赤血球を Type I, II および III に分類される集団を観察対象としているのに対し、フローサイトメトリーでは未成熟赤血球に発現する CD71 陽性細胞を解析対象にするためによる差であると考えられた。フローサイトメトリーによる解析では 2K 細胞ではバラツキも大きく、むしろ 20K 以上の細胞の解析が適当と考えられた。

200K あるいは 1M の解析において、細胞を「単位」として考えた場合には、ごく僅かな差でも統計学的 (Fisher's exact test) には差があると結論できると考えられた。しかしながら、1M もの細胞を解析した場合は、個体 (マウス 1 匹) ごとその値 (小核を持つ網赤血球の頻度) の分布は正規分布とほぼ近似すると仮定できた。すなわち個体を「単位」として考えた場合には、低用量域の小核の誘発頻度は個体ごとのバラツキの範囲に入る

ことが確認できた。DNA クロスリンク剤である MMC 及び DNA の代謝拮抗剤である Ara-C は低用量域での小核誘発性は個体間のバラツキの範囲であり、誘発性は認められなかった。一方、細胞分裂の際の紡錘体阻害作用を持つ COL は DNA に直接作用しないので、「閾値」があるとされていたが、本研究においても COL は低用量域では小核誘発性は認められず、「閾値」が存在することを再確認できた。すなわち DNA に直接作用する化学物質でも、低用量域において小核誘発性が個体間のバラツキの範囲に入ることが明らかになり、現実的（生物学的）な「閾値」と見なすことが可能であると考えられた。

#### E. 結 論

フローサイトメトリーを小核試験に応用することにより、マニュアル観察（蛍光顕微鏡）では取り扱うことの出来ない観察細胞数(200K あるいは 1M)を比較的短時間に解析することが可能になった。しかも統計学的な検出力を高め、より真の値に近づくことが可能であることが確認できた。また統計学的な検出力が高くなり、同時に観察細胞の母数が大きくなることにより個体ごとの小核誘発は近似的に正規分布すると見なすことができた。その結果、低用量域での小核誘発は個体間のバラツキの範囲に入り、低用量投与群間の小核誘発性に有意な差はないことが認められた。

DNA と直接作用のない COL では、閾値があることを再確認することができた。同時に DNA に直接作用する MMC 及び

Ara-C においても現実的な閾値（或いは生物学的な閾値）が存在すると考えることのできる事実を確認できた。

#### F. 健康危険情報

「なし」

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Suzuki, H., N. Ikeda, K. Kobayashi, Y. Terashima, Y. Shimada, T. Suzuki, T. Hagiwara, S. Hatakeyama, K. Nagaoka, J. Yoshida, Y. Saito, J. Tanaka and M. Hayashi (2005) Evaluation of liver and peripheral blood micronucleus assays with 9 chemicals using young rats: A study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/ Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS), *Mutat. Res.*, 583, 133-145.
- 2) Hayashi, M. (2005) げっ歯類を用いる小核試験の基礎研究ならびにその行政面への応用, *Environ. Mutagen Res.*, 27, 13-20.
- 3) Sofuni, T., T. Nohmi, T. Ohta and M. Hayashi (2005) Genotoxicity : Is a threshold concept applicable to evaluate the mutagenic activity of DNA-targeting substances !? *Environ. Mutagen Res.*, 27,

- 61-73 (in Japanese).
- 4) Nakajima, M., S. Shimada, M. Nagai, F. Mizuhashi, C. Sugiyama, S. Masuda, M. Hayashi and N. Kinae (2005) 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone [MX] shows initiating and promoting activities in a two-stage BALB/c 3T3 cell transformation assay, *Mutagenesis*, 20, 375-379.
  - 5) Asada, S., K. Sasaki, N. Tanaka, K. Takeda, M. Hayashi and M. Umeda (2005) 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), *Mutat. Res.*, 588, 7-21.
  - 6) M. Hayashi, E. Kamata, A. Hirose, M. Takahashi, T. Morita and M. Ema (2005) In silico assessment of chemical mutagenesis in comparison with results of Salmonella microsome assay on 909 chemicals, *Mutat. Res.*, 588, 129-135.
  - 7) Torous, D., N. Asano, C. Tometsko, S. Sugunan, S. Dertinger, T. Morita and M. Hayashi (2006) Performance of flow cytometric analysis for the micronucleus assay— a reconstruction model using serial dilutions of malaria infected cells with normal mouse peripheral blood, *Mutagenesis*, 21, 11-13.
  - 8) Asano, N., D. Torous, C. Tometsko, S. Dertinger, T. Morita and M. Hayashi (2006) Practical threshold for micronucleated reticulocyte induction observed for low doses of mitomycin C, Ara-C and colchicine, *Mutagenesis*, 21, 15-20.
  - 9) Koyama, N., H. Sakamoto, M. Sakuraba, T. Koizumi, Y. Takashima, M. Hayashi, H. Matsufuji, K. Yamagata, M. Shuichi, N. Kinae and M. Honma (2006) Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells, *Mutat. Res.* 603, 151-158.
2. 学会発表
    - 1) M. Hayashi : Strategy for evaluation and interpretation of genotoxicity for food and related chemicals, The Int Conf Environ & Genet Damage, The 12th Congress of the CEMS (Chongqing, People's republic of China), 中国重慶, 2005.
    - 2) 林 真 : Ames試験の結果をin silicoでいかに予測出来るか, またその精度は?, MMS研究会セミナー, 東京, 2005.
    - 3) 林 真, 鎌田栄一 : 化学物質安全性評価の為にカテゴリーアプローチ, 第一回カテゴリーシンポジウム, 東京, 2005.
    - 4) 林 真 : 毒性病理学に期待する— 遺伝毒性の立場から —, 第21回毒性病理学会, 浜松, 2005.
    - 5) 広瀬明彦, 鎌田栄一, 高橋美加, 森田 健, 江馬 眞, 林 真 : In silico評価系を用いる化学物質遺伝毒性検出の戦略, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
    - 6) 高島良生, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 坂本

- 浩子, 林 真, 本間正充: ヒト細胞におけるDNA二本鎖切断修復の細胞周期依存性, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 7) 木本崇文, 坂本浩子, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 高島良生, 小林恒文, 笠原義典, 林 真, 本間正充: ヒトリンパ芽球細胞TK6を用いたフラボノイド系サプリメント化合物の*in vivo*遺伝毒, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 8) 真田尚和, 坂本浩子, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 高島良生, 林 真, 本間正充: P53に依存したスピンドルポイズンの*in vitro*遺伝毒性, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 9) 本間正充, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 高島良生, 坂本浩子, 林 真: DNA2本鎖切断によって誘発される相同染色体間組み換え, および遺伝子ターゲティング, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 10) 高島良生, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 坂本浩子, 林 真, 本間正充: ヒト細胞におけるDNA2本鎖切断の細胞周期依存性, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 11) 鈴木 洋, 小川いずみ, 寺島ゆかり, 島田 康, 齋藤由希子, 田中 仁, 林 真: 幼若ラット肝細胞小核試験: 系統差の検討, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 12) 浅野哲秀, D. Torous, S. Dertinger, C. Tometsko, 森田 健, 林 真: AOおよびフローサイトメトリーを用いた低用量域での小核誘発について, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 13) 森田 健, 祖父尼俊雄, 林 真, 田中憲穂, 中嶋 圓, 中西良文, 樋口政純, 石光 進, 小嶋 靖, 佐々木史歩, 森川馨: GHSにおける生殖細胞変異原性物質の分類, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 14) 広瀬明彦, 鎌田栄一, 高橋美加, 森田 健, 林 真: *In silico*評価系を用いる化学物質遺伝毒性検出の戦略, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 15) 松藤 寛, 井上真由美, 千野 誠, 本間正充, 林 真, 山形一雄: ヒトリンパ芽球細胞TK6を用いた酸化フラボノイド及びその酸化生成物の遺伝毒性, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 16) 林 真, 鎌田栄一, 広瀬明彦, 高橋美加, 森田 健, 江馬 眞: 化学物質の安全性評価における(Q)SARの利用, 日本動物実験代替法学会第19回大会, 2005
- 17) Norihide Asano, Dorothea Torous, Carol R. Tometsko, Stephen D. Dertinger, Takeshi Morita, and Makoto Hayashi: Low dose effects in the MNRetS induction by acridine orange supravital staining and flow cytometric methods, The 9th International Conference on Environmental Mutagens, San Francisco, 2005.
- 18) Dorothea Torous, Norihide Asano, Makoto Hayashi, Stephen Dertinger, Takeshi Morita, Carol Tomesko, and Siva Sugunan: Performance and power of flow cytometric micronucleus scoring, The 9th

International Conference on Environmental Mutagens, San Francisco, 2005.

19) 林 真：遺伝毒性の閾値を考える，国際シンポジウム「環境因子，遺伝毒性発がん物質の閾値：安全と安心の接点をめざして」，神戸 (2006).

20) Makoto Hayashi: The in vivo rodent erythrocyte micronucleus assay (Automated scoring), The British Toxicology Society &

The United Kingdom Environmental Mutagen Society Joint Congress, Warwick (2006).

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

「なし」

天然物配糖体の変異原性の検出法の確立

分担研究者 長尾 美奈子（共立薬科大学 客員教授）

現在既存添加物の成分規格および使用基準の設定が順次行われている。既存添加物の多くは植物由来であり、有効成分あるいは共存する成分が配糖体として存在する。生体では配糖体はアグリコンに加水分解されて吸収されるので、*in vitro* 遺伝毒性試験系には、配糖体をアグリコンに変換する実験系を組み入れることにより、遺伝毒性はより正確に測定できることが期待される。基質特異性の比較的低いしかも市販されている Hesperidinase を用いて、glycosidase 処理の方法および有効性について検討した。Hesperidinase 10mg/mL 中 40°C、2時間の処理が Rutin、Isoquercitrin およびアカネの変異原性検出に適当であることが判った。この方法は、哺乳細胞を用いた *in vitro* 試験にも応用可能であり、既存添加物遺伝毒性評価への取り入れを検討する必要があると思われる。

A. 研究目的

天然物を主体とする既存添加については、1995年の法改正に伴い、成分規格および使用基準の設定が順次行われている。既存添加物の多くは植物由来であり、その結果、有効成分あるいは共存する成分が配糖体として存在することが考えられる。配糖体の多くは、ヒトの口中バクテリア<sup>1)</sup>、ヒトやラットの小腸粘膜に存在するラクターゼ・フロリジンヒドロラーゼ<sup>2)</sup>や腸内細菌によりアグリコンとなり生体内に吸収され遺伝毒性をはじめ、種々

の生理活性を示す。しかし、*in vitro* における遺伝毒性検出のために現在用いられている方法では、glycosidase 処理が義務付けられていない為、アグリコンにたとえ遺伝毒性が有っても、それが検出されないことが起こりうる。そこで、*in vitro* 遺伝毒性系に glycosidase 処理する過程を組み入れる方法の検討を行った。

既存添加物として使用されていたアカネ色素にラットに対する腎発がん性が認められ、遺伝毒性による発がん機構が示唆されたことから、2004年7月に既存添

加物名簿から削除された。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、アリザリンおよびルベルトリン酸を主成分とし、ルシジン、ルビアジン、ルシジン-3-プリメヴェロシドも含有する。

In vitro における遺伝毒性に関しては、非配糖体であるルシジン、アリザリンおよびルビアジンは、サルモネラ菌に対し強い変異原性を示すことが報告されている<sup>2, 3)</sup>。しかし、配糖体であるルシジン-3-プリメヴェロシドの遺伝毒性検出には、β-グリコシダーゼの供給源として、ラット腸内細菌の超音波破碎抽出物の添加を必要とするという報告と<sup>4, 5)</sup>、S9 mix 存在下では、配糖体であるルシジン-3-プリメヴェロシドも変異原性を示すという報告がある<sup>6)</sup>。

いずれにしても、既存添加物の in vitro における遺伝毒性を検出する標準法には、配糖体を加水分解するためにβ-グリコシダーゼ処理を組み入れる必要がある。そこで本研究では、糖に対する特異性が比較的低いことが知られており<sup>7,8)</sup>、しかも市販されているため、テスト系に組み入れやすいと考えられる市販されている *Penicillium* より得られた Hesperidinase をアッセイ系に組み入れることを検討した。

## B. 研究方法

Hesperidinase (18 unit/g, from *Penicillium*

species) は Sigma より購入した。なお、1unit の Hesperidinase は毎分 1.0 μmole の還元糖を pH3.8, 40°C でヘスペリジンより遊離する活性単位を示す。Rutin (quercetin-3-O-Glc-Rha) は和光純薬より、isoquercitrin (Quercetin-3-O-Glc) は関東化学工業より購入した。アカネ色素 (デキストリン 30%を含有)、アルカネット、ウイキョウ抽出物、レイシ、およびユウカリは、食品添加物用標品を国立医薬品食品衛生研究所林真博士より供与を受けた。Hesperidinase は 0.45mL の 10mM クエン酸—20mM 磷酸 2 ナトリウム (pH4.0) に溶解し用いた。試験化合物を 50μL の DMSO に溶解し、0.45mL の Hesperidinase 溶液を加え、40°C で 2 時間インキュベートした後、20μL の 30 mM NaOH で中和し、0.43mL の DMSO を加えて変異原テストのサンプルとした。サルモネラ菌 TA100 および TA98 を用いて、preincubation 法により変異原性を検討した。

## C. 研究結果

### 1. Hesperidinase 処理条件の検討

1). 至適酵素量の検討：Rutin および Isoquercitrin をテスト化合物として種々の濃度の Hesperidinase を用いて至適酵素量を検討した。Hesperidinase 処理時における酵素量には 0、2、6、10 mg/mL を用いた。変異原性は TA98、S9 mix 存在下でテストした。結果を図-1 に示す。Rutin およ



び Isoquercitrin はいずれも Hesperidinase 処理によりはじめて変異原性が検出され、Hesperidinase の濃度依存的に活性は増加

した。しかし、Rutin の場合、10mg/mL では飽和に近い状態にあることが示された (図 - 1)。

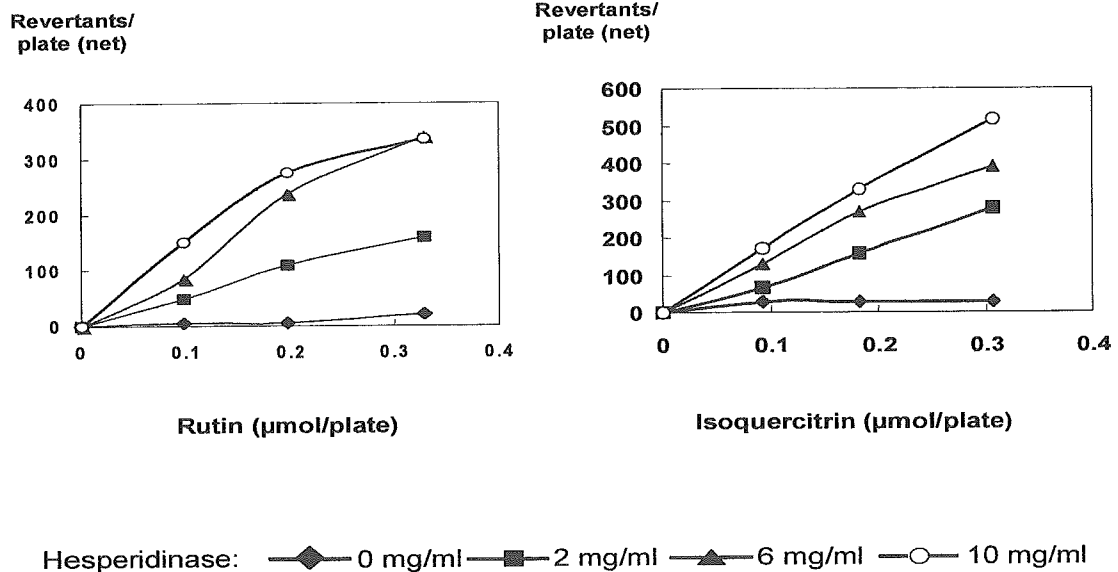


図-1. ルチンおよびイソクエルチトリンの Hesperidinase 処理による変異原性の出現: Rutin および Isoquercitrin を種々の濃度の Hesperidinase と 2 時間インキュベートした後、TA98 を用いて S9mix 存在下プレインキュベーション法により変異原性をテストした。

2). 酵素処理時間の検討: Hesperidinase の濃度を 10 mg/mL に設定し、処理時間を 1.0、1.5、2.0、2.5 時間に設定し、至適処理時間を検討した結果を図 - 2 に示す。反応は 2.5 時間までほぼ直線的に進行すると思われた。しかし、2 時間処理でも変異原性は十分発現すると考えられた。以上の結果に基づき、テスト化合物を 10 mg/mL の濃度の Hesperidinase と 2 時間インキュベートした後、preincubation 法によ

り変異原性をテストすることとした。

## 2. 既存添加物の変異原性

### 1). アカネ色素

標準法でテストした場合と、Hesperidinase 処理を行った場合の TA100 および TA98 に対する変異原性を図 - 3 に示す。TA100 の場合、- S9 mix の方が + S9 mix より変異原性は高かったが、いずれの場合も hesperidinase 処理により、顕著な変異原性の増加が認められた。また、TA98

では hesperidinase 処理によって変異数は増加したが、自然突然変異数の 2 倍以上にはならなかった。なお、自然突然変異

数は TA100 without S9 mix, 201: TA100 with S9 mix, 198: TA98 without S9 mix, 45: TA98 with S9 mix, 60 であった。

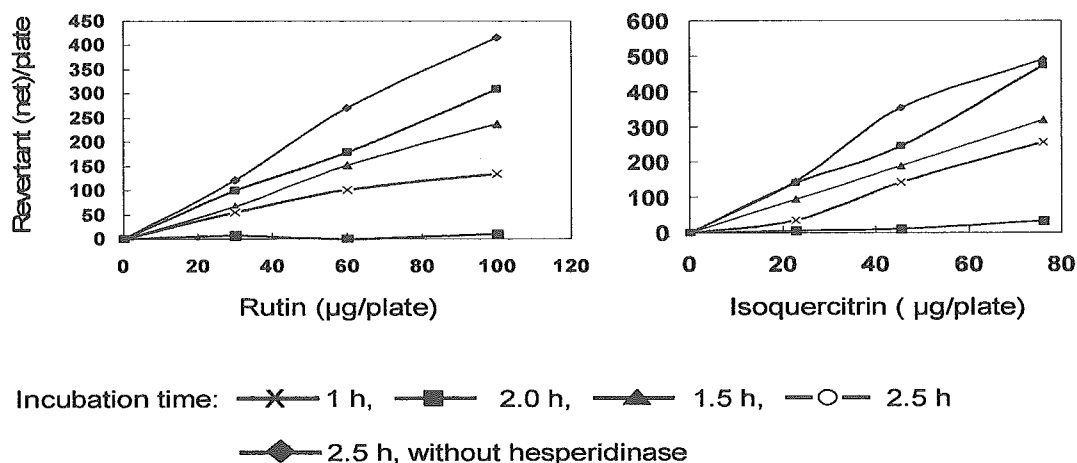


図-2. Rutin および Isoquercitrin に対する hesperidinase 処理時間の変異原性発現に対する影響。Hesperidinase は 10 mg/mL で用いた。

2). その他の既存添加物  
アルカネット、ウイキョウ抽出物、レイシおよびユーカリは 500 µg/plate まで、hesperidinase 処理をおこなっても変異原性は検出されなかった。

#### D. 考 察

配糖体である Rutin および Isoquercitrin の変異原性は、Hesperidinase 処理によりはじめて検出され、Hesperidinase 処理は配糖体をアグリコンに変換するのに有用で

あることが確認された。さらに、平成 16 年まで既存添加物名簿に記載されていたアカネ色素についても、Hesperidinase 処理により顕著な遺伝毒性の増加が確認された。アカネ色素の場合、アグリコンであるルシジンも含まれており、それに遺伝毒性があるため、Hesperidinase 処理を行わなくてもある程度の遺伝毒性が検出されたと考えられる。植物由来のサンプルではアグリコンあるいは配糖体で存在する割合はいろいろ異なることが考えられ、またその割合は抽出等精製濃縮過程

で変化することが考えられる。実験過程もサンプルを Hesperidinase で前処理するのみであり、極めて簡単な手法であり、哺乳類細胞を用いたテスト系への応用も

できる。従って、植物由来サンプルについては、Hesperidinase 処理による遺伝毒性の検出を追加するべきであると考え

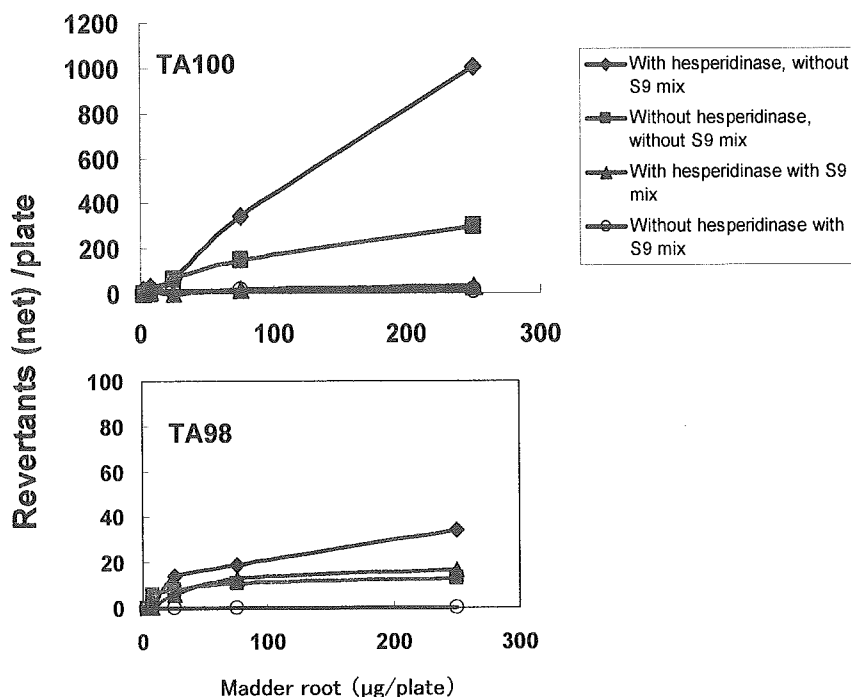


図-3 アカネ色素 (madder root)の変異原性に対する Hesperidinase の作用. アカネ色素 (madder root)は 30%のデキストリンを含有する。

## E. 結論

植物由来のサンプルではアグリコンあるいは配糖体で存在する割合はいろいろ異なることが考えられ、またその割合は抽出等精製濃縮過程で変化することが考えられる。Hesperidinase で前処理が、配糖体をアグリコンに変換するのに有用であることが確認された。極めて簡単な手法であり、哺乳類細胞を用いたテスト系への応用も可能であり、植物由来サンプルについては、Hesperidinase 処理による

遺伝毒性の検出を追加するべきであると考え

## 参考文献

1. Walle T, Browning AM, Steed LL, Reed SG, Wall UK. Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. J Nutr .2005, 135: 48-52.
2. Wilkinson AP, Gee JM, Dupont MS, Needs PW, Mellon FA, Williamson G,

Johnson IT. Hydrolysis by lactase phlorizin hydrolase is the first step in the uptake of daizein glucosides by rat small intestine in vitro. *Xenobiotica*, 2003, 33: 255-64.

3. 内閣府食品安全委員会 アカネ色素に係る食品健康影響評価に関する審議結果 (平成16年7月2日)

4. Brown JP, Dietrich PS. Mutagenicity of anthraquinone derivatives in the Salmonella/microsome test: activation of anthraquinone glycosides by enzymic extracts of rat cecal bacteria. *Mutat Res.*, 1979, 66: 9-24.

5. Tikanen L, Matsushima M, Natori S. Mutagenicity of anthraquinones in the Salmonella preincubation test. *Mutat res.* 1983, 116: 297-304.

6. Blomeke B, Poginsky B, Schmutte C, Marquardt H, Wstendorf J. Formation of genotoxic metabolites from anthraquinone glycosides, present in *Rubia tinctorum* L. *Mutat Res*, 1992, 265:263-72.

7. Nagao M, Morita N, Yahagi T, Shimizu M, Kuroyanagi M, Fukuoka M, Yoshihira K, Natori S, Fujino T, Sugimura T. Mutagenicities of 61 flavonoids and 11 related compounds. *Environ. Mutagenesis*, 1981; 3: 401-19.

8. Tamura G, Gold C, Ferro-Luzzi A, Ames BN. Fecalase: A model for activation of dietary glycosides to mutagens by intestinal flora. *Proc Natl Acad Sci* 1980; 77: 4961-65.

## F. 健康危険情報

「なし」

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Ochiai M, Sugimura T, Nagao M. Modification of the <sup>32</sup>P-postlabeling method to detect a single adduct species as a single spot. *Methods Mol Biol.* 2005, 291:13-19.

2) Kitamura K, Nagao M, Hayatsu H, Morita M. Effect of chlorophyllin-chitosan on excretion of dioxins in a healthy man. *Environ Sci Technol.* 2005; 39 :1084-91.

3) Ishikawa S, Sasaki YF, Kawaguchi S, Michizuki M, Nagao M. Characterization of genotoxicity of kojic acid by mutagenicity in *Salmonella* and micronuclei induction in rodent liver. *Genes and Environ.* 2006, 28: 31-7.

4) Fukuda H, Katahira M, Tanaka E, Enokizono Y, Tsuchiya N, Higuchi K, Nagao M, Nakagama H. Unfolding of higher DNA structures formed by the d(CGG) triplet repeat by UP1 protein. *Genes Cells.* 2005; 10: 953-62.

### 2. 学会発表

1) Direct Genotoxic Carcinogen の閾値をリスク評価にどう取り入れるか International Symposium-Threshold of

carcinogenicity and genotoxicity ( 2006,  
March 15-16, Kobe)

Ⅱ. 知的財産権の出願・登録状況  
「なし」

## 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

不飽和脂肪酸の過酸化反応によって生成する新規変異原物質 4-oxo-2-hexenal (4-OHE) を加熱調理食品中から初めて検出した。食品 1 グラムあたり数十マイクログラムの 4-OHE を含む場合もあり、ヒト発がんへの関与が注目される。

### A. 研究目的

食事は発癌の主な原因の一つであるとされており、食品中の変異原物質を同定し除去する事は有効な癌予防につながると思える。脂肪の摂り過ぎは、がん・成人病の危険因子であるが、なかでも、不飽和度の高い脂質は過酸化を起こしやすく、過酸化脂質の多い食品の多量摂取は有害である。この脂質過酸化による起因する DNA 損傷も広い意味での酸化的損傷と見ることが出来る。我々は最近、食品中に含まれる多価不飽和脂肪酸の酸化に伴って生じる新規変異原物質 4-oxo-2-hexenal (4-OHE) を見出した。4-OHE をマウスに経口投与すると、消化管の組織を中心に DNA 付加体を生じる。4-OHE の摂取がヒトの健康に与える影響は大きいと考えられ、食品中の

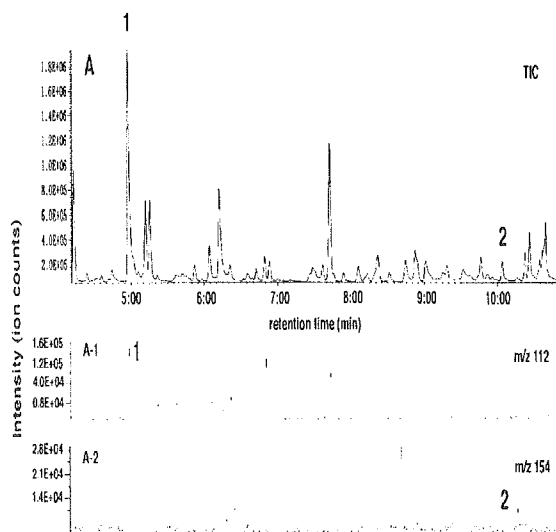
4-OHE 含量を調べることを目的とした。

### B. 研究方法

食品 1 g を密栓できるガラス容器中で、2 ml の酢酸エチルエステルと混合し、4℃ で 16 時間抽出した。抽出液を酢酸エチルエステルで 5 倍希釈した後、GC-MS により 4-OHE を定量した。GC-MS 装置は、Hewlett-Packard HP 6890 ガスクロマトグラフィーと JEOL JMS-BU 20 質量分析計を用いた。ガスクロマトグラフィーのカラムには、CP-CIL5CB (Chromopack) を使用し、サンプル注入後、60℃ に 1 分保った後、150℃ まで 1 分間に 10℃、270℃ まで 1 分間に 40℃ 昇温した。4-OHE の定量は selected ion monitoring 法により、定量には分子イオン  $m/z$  112、確認にはフラグメントイオン  $m/z$  83 を用いた。

### C. 研究結果

焼き魚（サンマ）の分析例を図1に示した。4-OHE（ピーク1）が明瞭に観察できたのに対して、類似化合物4-oxo-2-nonenal（4-ONE）はノイズレベルであった。図1. 焼き魚（サンマ）



抽出物のマスクロマトグラム (SIM)

A: total ion chromatogram

A-1: m/z 112 A-2: m/z 154

今回分析を行った食品中の4-OHE含量を表1にまとめた。加熱調理した魚（イワシ、サンマ、サバ、サケ）から多量の4-OHEが検出された。また、油炒めした野菜からも比較的少量の4-OHEが検出された。これに対して、調理した牛、豚、鶏肉からは4-OHEは検出されなかった。サンマ1匹を焼いたときに発生する煙を集めて分析したところ、31  $\mu\text{g}$  の4-OHEが検出された。4-ONEに関しては、魚、野菜の加熱調理品から若干検出されたが、その量は4-ONEに比べて少量であった。

表1 食品中の4-OHEと4-ONE含量

Food	Cooking method	4-OHE ( $\mu\text{g/g}$ )	4-ONE*
【fish】			
sardine (dried)	broiled	14.97	N.D.**
sardine	fritter (salad oil)	7.09	N.D.
	boiled	8.54	N.D.
salmon	sauteed (salad oil, butter)	3.67	1/5
saury	broiled	1.09 - 70.18 (n=8, mean 13.86)	N.D.
mackerel	broiled	12.12	1/30
	boiled	5.49	N.D.
【meat】			
chicken	char-grilled	N.D.	N.D.
pork	fried (salad oil)	N.D.	N.D.
	char-grilled	N.D.	N.D.
beef	fried (beef tallow oil)	N.D.	N.D.
	fried (salad oil)	N.D.	N.D.
	fried (seasoned)	N.D.	N.D.
【vegetable】			
spinach	fried (perilla oil)	5.28	1/5
	fried (salad oil)	4.40	1/2
squash	fried (salad oil)	2.08	N.D.
【other】			
snack (broad bean)		N.D.	N.D.
snack (corn)		N.D.	N.D.

\*approximate relative amount of 4-ONE to 4-OHE (molar ratio)

\*\*N.D. ; not detected

### D. 考察

本研究で初めて、4-OHEが食品中に含まれることを示した。4-OHEは、 $\omega$ -3不飽和脂肪酸のモデル過酸化反応によって見出され、*Salmonella thphimurium* に対する変異原性やDNAに対する付加体生成が認められている。さらに、動物実験においてマウス消化管組織にDNA付加体を形成することも分かっており、今回、ヒトが日常口にする食品中に検出されたことから、ヒト発がんへの関与が懸念される。4-OHEは $\omega$ -3不飽和脂肪酸の酸化によって生成すると考えられ、事実 $\omega$ -3不飽和脂肪酸を多く含む魚、野菜の加熱

調理食品から多く検出された。その量は、加熱調理食品の代表的変異・発がん物質とされているヘテロサイクリックアミン類の1000倍近い。また、これまで脂質過酸化に伴って生成するアルデヒドとして、4-hydroxy-2-nonenal や 4-OHE が広く研究されてきた。しかし、これらは $\omega$ -6 不飽和脂肪酸から生成すると考えられ、食品中には少量しか存在しなかった。近年、 $\omega$ -3 不飽和脂肪酸は、その抗酸化作用等から摂取が推奨されているが、一方では非常に酸化されやすい脂質でもある。今後4-OHEについて、発がん性を含めヒトの健康への影響を慎重に調査する必要があると考える。

#### E. 結論

脂質過酸化によって生成する新規変異原物質を加熱食品中に見出した。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) H. Kasai, M. Maekawa, K. Kawai, K. Hachisuka, Y. Takahashi, H. Nakamura, R. Sawa, S. Matsui and T. Matsuda: 4-Oxo-2-hexenal, a mutagen formed by  $\omega$ -3 fat peroxidation, causes DNA adduct formation in mouse organs. *Industrial Health*, 43, 699-701, 2005

- 2) M. Maekawa, K. Kawai, Y. Takahashi, H. Nakamura, T. Watanabe, R. Sawa, K. Hachisuka, and H. Kasai: Identification of 4-Oxo-2-hexenal and Other Direct Mutagens Formed in Model Lipid Peroxidation Reactions as dGuo Adducts. *Chemical Research in Toxicology*, 19, 130-138, 2006
- 3) K. Kawai, K. Matsuno and H. Kasai: Detection of 4-oxo-2-hexenal, a novel mutagenic product of lipid peroxidation, in human diet and cooking vapor. *Mutation Research*, 603(2), 186-192, 2006

##### 2. 学会発表

- 1) K.Kawai, M.Maekawa, K.Hachisuka, M.Matsui, T.Matsuda and H.Kasai : 4-Oxo-2-Hexenal In Cooked Foods And DNA Adduct Formation In Mouse Organs After Oral Administration, 9<sup>th</sup> ICEM (San Francisco, U.S.A.) 2005
- 2) M.Maekawa, K.Kawai, K.Hachisuka, Y.Takahashi, H.Nakamura, R.Sawa and H.Kasai : Identification Of 4-Oxo-2-Hexenal As A dG Adduct In A Model Lipid Peroxidation Reaction And Its Mutagenicity To TA 100 And 104. 9<sup>th</sup> ICEM (San Francisco, U.S.A.) 2005.
- 3) 河井一明、前川宗之、松田知成、松井三郎、葛西宏：過酸化脂質由来変異原によるマウス臓器 DNA 付加体の形成 第64回日本癌学会学術総



会（札幌）平成17年9月

- 4) 前川宗之、河井一明、葛西宏：過酸化脂質モデル反応により生成する変異原・dG 付加体の構造 第64回日本癌学会学術総会（札幌）平成17年9月
- 5) 河井一明、前川宗之、松井三郎、松田知成、高橋良和、中村光、澤竜一、葛西宏：4-Oxo-2-hexenal as a novel lipid peroxide product: mutagenicity, DNA adduct formation and presence in human diet 日本環境変異原学会第34回大会（東京）平成17年11月

#### 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

タール系食用色素の **in vivo** 遺伝毒性評価における投与形態の影響に関する検討

分担研究者 佐々木有 八戸工業高等専門学校・物質工学科・教授

研究協力者 川口恵未 八戸工業高等専門学校・総合科学科・非常勤講師

赤色2号、赤色 102 号はいずれも癌原性試験では陰性と報告されているにも関わらず、コメットアッセイでは陽性であり結果には大きな乖離が見られた。この原因の一つとして投与形態の違いが考えられた。すなわち、発癌性は長期の混餌または混水投与によって検出されるが、コメットアッセイに限らず **in vivo** の遺伝毒性は、一般に、最大耐量での1回の強制投与により評価されてきた。そこで本研究ではこのような投与形態の違いが及ぼす **in vivo** コメットアッセイの結果への影響を検討した。赤色2号、赤色 102 号はいずれも1回の強制経口投与では結腸等で陽性であった。しかし、混水投与では1日の投与では陽性であったものの投与期間の延長（最大6日間）とともに陰性となる傾向にあった。一方、肝癌原性のDABの場合、1回の強制経口投与では癌原性標的臓器の肝ではなく、消化管粘膜で陽性であった。混餌投与では1日の投与では全臓器で陰性、投与期間の延長（最大6日間）とともに肝で陽性となる傾向が、消化管粘膜では投与期間の延長と共に陰性となる傾向がみられた。このことから1週間程度の自由摂取による遺伝毒性のデータのほうが、1回の強制投与よりも癌原性試験の結果と乖離しない傾向にあると考えられる。

A. 研究目的

昨今、食品に含まれる食品添加物などの安全性に対する国民の関心が高い。中でも食品添加物の発癌性は重要な安全性項目の一つである。発癌性が実験的に示唆されたような添加物の ADI 設定を巡って、その発癌性が遺伝毒性メカニズムによるものか否かが問題となる。以前、我々は

国内で使用されているタール系食用色素に **in vivo** 遺伝毒性がみられることをコメットアッセイによって示した [1]。特に、これらのタール系食用色素はコメットアッセイでは結腸粘膜に対して強い遺伝毒性を示した。しかしながら、我々が **in vivo** 遺伝毒性を示したタール系食用色素は、いずれも長期発癌試験では発癌性はない

ことが報告されている。このように *in vivo* 遺伝毒性と長期発癌試験の結果の間に大きな乖離が存在するのであれば、実験的に示唆された発癌性が遺伝毒性メカニズムによるものか否かを判断することを困難にすると推測される。本年度の研究はタール系食用色素においてコメットアッセイによる *in vivo* 遺伝毒性と長期発癌試験の結果に大きな乖離が生じた一因を探ることを目的とした。

コメットアッセイによる *in vivo* 遺伝毒性と長期発癌試験の結果の乖離の原因の一つとして両試験の間の投与方法の相違が考えられる。すなわち、コメットアッセイに限らず *in vivo* 遺伝毒性試験は最大耐量に近い高用量で単回の強制投与で行われるのが一般的である。しかし、長期発癌試験では混餌または混水で長期の暴露が行われる。Yuan et al. は安息香酸が混餌投与では発癌性陽性、強制経口投与では発癌性陰性であることを示した[2]。彼等は安息香酸を強制経口投与した場合には混餌投与の場合よりも安息香酸の解毒経路が飽和状態になってしまいやすいとしている。このような結果は、投与形態が実験結果を左右する大きな要因になり得ることを示唆する。発癌性陰性を示したタール系食用色素の長期発癌試験は混餌または混水投与によって行われたものであり、遺伝毒性陽性を示したコメットアッセイは強制経口投与によるものである[1,4,5]。そこで、投与形態の相違が結果の大きな乖離の一因となったか否かの検証

を目的として、混水投与によるコメットアッセイによってタール系食用色素の遺伝毒性を改めて検討した。

## B. 研究方法

### 1. 実験に供した食用色素等

我々が *in vivo* コメットアッセイによって結腸粘膜に遺伝毒性を示した食用色素の中からアゾ系の赤色2号(東京化成工業)、赤色102号(東京化成工業)を用いた。対照としてかつてバターイエローとして用いられたもののラットで肝発癌性が示され[6]使用が禁止されたアゾ系食用色素である *p*-dimethylaminoazobenzene (DAB、和光純薬工業)を用いた。

実験には雄 ddY マウス(日本エスエルシー、7週齢)を1週間の馴化の後、供した。

### 2. 飼育条件

動物は温度 20 - 24 °C、照明 12 時間(8:00 点灯、20:00 消灯)で飼育した。飼育ケージに動物を 4 匹ずつ収容し、粉末飼料(オリエンタル酵母工業)および水道水を自由に摂取させた。

### 3. 投与方法および投与期間

#### 3-1. 強制経口投与による実験

赤色 2 号、赤色 102 号はいずれも水に溶かして用量 2000 mg/kg で1群 4 匹のマウスに 1 回強制経口投与した。DAB はオリーブオイルに溶解して用量 100 mg/kg で1群4匹のマウスに1回強制経口投与した。いずれの場合も投与容量は 10 mL/kg とした。投与の 3, 24 時間後に各個体から腺胃、結腸、肝、腎、膀胱、肺、脳、骨髄の 8 臓器を摘出し、

コメットアッセイに供した [3]。

### 3-2. 混水投与による実験

赤色 2 号、赤色 102 号はいずれも 3-5% の 104 週間混餌投与で発癌性を示さないことが報告されている [4,5]。本研究では赤色 2 号、赤色 102 号を 0、0.5、2.5% で飲水に溶かして、1、2、4、6 日間、1 群 4 匹のマウスに投与した。なお、DAB は 280 ppm、560 ppm の濃度で、同期間、混餌投与した。

1、2、4、6 日間の投与の後、各個体から腺胃、結腸、肝、腎、膀胱、肺、脳、骨髄の 8 臓

器を摘出し、コメットアッセイに供した [3]。なお、マウスの屠殺は午前 10 時頃とした。

### C. 研究結果

コメットアッセイの結果を Table 1 に示した (混餌、混水投与では低濃度群の結果は省略した)。最大 6 日間の投与期間中に動物の死亡例はみられなかった。また、食用色素を 2.5% で混水投与したときの赤色 2 号と赤色 102 号の摂取用量は各々、2692.4 mg/kg/day、4061.3

Table 1 Daily intake of food dyes and drinking water and weight gain in mice dosed food colors in the drinking water

Chemicals	Concentration (%)	Mean daily intake			Mean weight gain for 6 days (g/mouse)
		Chemical (mg/kgBW)	Water (ml/mouse)	Diet (g/mouse)	
Food Red 2	0	0	6.92	-	2.30
	0.5	859.3	6.15	-	2.33
	2.5	4555.4	6.54	-	1.23
Food Red 102	0	0	6.15	-	3.98
	0.5	574.6	4.04	-	3.51
	2.5	4061.3	6.92	-	3.14
DAB	0	0	-	7.69	3.03
	0.028	54.0	-	8.08	1.95
	0.056	114.4	-	8.85	1.51

mg/kg/day で強制経口投与によるコメットアッセイで用いた用量の 2000 mg/kg を上回るものであったが (Table 1)、最大 6 日間の投与期間において体重の減少はみられなかった。混水投与では、投与 1、2 日目には腺胃、結腸等で Migration の有意な増大がみられたが、投与 4、6 日目には全臓器で Migration の有意な増大はみられなかった。

赤色 2 号と赤色 102 号において 24 時間の混水投与と強制一回経口投与の結果を比較した。強制経口投与では 2000 mg/kg の一回投与 3 時間後に腺胃、結腸等で Migration の有意な増大がみられた。マウスの飲水の概日パターンを考慮すると、混水投与の場合の屠殺 (標本作製) は摂水量の多い時間帯の 3-6 時間後と推定される。すなわち、混水投与に