

「暴露量をゼロにしない限り、健康リスクもゼロのならない」という理由で、使用を一切認めないという方策がとられてきた。遺伝毒性物質の閾値の有無に関しては議論のあるところであるが、その有無にこだわらず、発がん性、遺伝毒性を定量的にとらえ、他の化学物質のリスクと比較し、ランキング化することの方がリスク評価としては現実的であると考えられる。

我々の生活中には微量ではあるが多くの発がん物質が存在し、その多くは自然の食品中に存在するため避けることは困難である。食品添加物のように避けることが可能である物質が、発がん可能性を持つことが明らかとなった場合、その使用を禁止することはヒトの健康を守る政策上重要であるが、その程度を考慮しないと科学的バランスを欠くことになる。また、禁止することによる2次的影響も考慮する必要がある。我が国では昭和50年に防腐剤であるAF2の発がん性が指摘され、使用禁止になったが、その直後に食中毒の発生率が増加した。そのことは教訓にすべきである。

E. 結 論

アカネ色素はヒト培養細胞 TK6 において、遺伝子突然変異、小核試験で陽性反応を示した。突然変異を2倍増加させる濃度 (DMFD) 2.88mg/ml であり、HEGEP は、

0.034 であった。この値を考慮すると、日常生活において、これまでのようなアカネ色素の摂取がヒトの遺伝毒性、発がんリスクを特に増加させることはないと考えられる。

遺伝毒性のリスクを絶対的数値化によって評価することは困難であるが、他の化学物質との相対リスクを評価することは可能である。日常的に避けられない発がん物質とのリスクの比較は、新たな発がん危険因子を許容できるか、否かを判断する上で、わかりやすい指標になるものと考えられる。

F. 健康危険情報

「なし」

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Honma, M. Generation of loss of heterozygosity and its dependency on p53 status in human lymphoblastoid cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45, 162-176 (2005)
2. Koyama, N., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Hayashi, M., Matsufuji, H., Yamagata, K., Masuda, S., Kinae, N., and Honma, M. Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat. Res.*, (in press)
3. Matura-Eisaki, K., Sakamoto, H., Sofuni,

- T., Hayashi, M. and Honma, M. In vitro genotoxicity of inorganic arsenics and their genotoxic risk through food intake. Environ. Mutat. Res., 27, 153-160 (2005)
2. 学会発表
1. Hakura A., Oka H., Takasaki W., Sasaki YF., Suzuki S, Satoh T., and Honma M., Establishment of humanized in vitro genotoxicity test system: combined system using human cell lines and human S9. The 9th International Conference on Environmental Mutagens, San Francisco, 2005.
 2. Koyama N., Sakamoto H., Sakuraba M., Koizumu T., Takashima Y., Hayashi M., Matsufuji H., Yamagata K., Masuda S., Kinae N. and Honma M., Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. The 9th International Conference on Environmental Mutagens, San Francisco, 2005.
 3. Matsufuji H., Inoue M., Chino M., Honma M., Hayashi M., and Yamagata K., Genotoxicity of quercetin in the presence of oxygen species and human liver S9 in human lymphoblastoid TK6 and WTK-1 cells. The 9th International Conference on Environmental Mutagens, San Francisco, 2005.
 4. Honma M., Takashima Y., Sakuraba M., Koizumi T., Sakamoto H. and Hayashi M., Interallelic homologous recombination and target intergration induced by DNA double strand breaks. The 9th International Conference on Environmental Mutagens, San Francisco, 2005.
 5. Neuwirth EAH, Honma M. and Grosovsky AJ., High frequencies of crossing-over associated with long tract gene conversion in human cells. The 9th International Conference on Environmental Mutagens, San Francisco, 2005.
 6. Takashima Y., Sakuraba M., Koizumi T., Sakamoto H. and Honma M., DNA double strand break repair and cells cycle in human lymphoblastoid cell line. The 9th International Conference on Environmental Mutagens, San Francisco, 2005.
 7. Honma M., Genotoxic risk assessment for synthetic and natural chemicals in foods. The 2nd international Conference on the Modernization of Traditional Chinese Medicine. (2005. 9)
 8. 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本鎖切断修復の細胞周期依存性 日本環境変異原学会第34回大

- 会 (2005.11)
9. 欒洋、本間正充、スレッシュテイルパ
ッテイー、小木美恵子、山口照英、鈴
木孝昌 CGH および SNP アレイを用
いた染色体解析 日本環境変異原学会
第 34 回大会 (2005.11)
 10. 真田和尚、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 日本環境変異原学会
第 34 回大会 (2005.11)
 11. 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 vitro 遺伝毒性 日本
環境変異原学会第 34 回大会 (2005.11)
 12. 本間正充、高島良生、櫻庭真弓、小泉
朋子、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組換
え、および遺伝子ターゲッティング 境
変異原学会第 34 回大会 (2005.11)
 13. 松藤寛、井上真由美、千野誠、本間正
充、林真、山形一雄 ヒトリンパ球細
胞株 TK6 を用いた抗酸化フラボノイ
ドおよびその酸化物の遺伝毒性 境変
異原学会第 34 回大会 (2005.11)
 14. Honma M., Takashima Y., Sakuraba M.,
Koizumi T., Sakamoto H. and Hayashi M.,
Interallelic homologous recombination
and target intergration induced by DNA
double strand breaks. The 22nd Radiation
Biology Center International Symposium.
(2005.9)
 15. 本間正充 ヒト型遺伝毒性試験と、ヒ
ト発がん性の予測 日本動物代替法学
会第 19 回大会 (2006.12)
 16. 本間正充、高島良生、櫻庭真弓、小泉
朋子、坂本浩子、林真 DNA2 本鎖切
断によって誘発されるヒト細胞での相
同組換え反応 第 28 回日本分子生物
学会(2005.12)
 17. 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
ける制限酵素によって切断された
DNA2 本鎖切断修復の細胞周期依存性
第 28 回日本分子生物学会(2005.12)
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
- 「なし」

TG 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 第四試験室長

協力研究者 島田昌也 （財）食品農医薬品安全性評価センター 第四試験室

藤城雅子 （財）食品農医薬品安全性評価センター 第四試験室

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（TG）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（シヤトルベクター上の *cII* 遺伝子）の突然変異を解析した。アカネ色素投与による遺伝子突然変異頻度は、肝臓で陰性、腎臓では陽性との結果が得られており、これらについては既に報告されている。今回は、アカネ色素に直接暴露されている消化管のうち、小腸（十二指腸）について同様の解析を実施した。その結果、アカネ色素による十二指腸での遺伝子突然変異頻度は媒体対照に比較し統計学的に有意な上昇は認められなかった。

A. 研究目的

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 BlueTM Rat) を用い遺伝子突然変異誘発性の有無を検索した。

B. 研究方法

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 BlueTM 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-IsolatorTM 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十二指腸の凍結組織片 (20~30 mg) をおよび組織破碎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碎液を静かに重層し、 $1900 \times G$ 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、 $1100 \times G$ 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) を加え同様にローテーターを用いて回転混和した後、 $1100 \times G$ 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 殖菌した後、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 (セクション用) に分取した。パッケージング溶液の全量をセクショ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。セクション

ン用チューブについても同様に LB 寒天培地に重層した。セレクション用プレートは 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。出現した変異プラーク数 (セレクション用プレート) を総プラーク数 (タイター用プレート) で除したものが, 当該組織での突然変異頻度となる (Mutant frequency)。

9. 統計方法

各試験群の *cII* 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. 研究結果

各群の十二指腸における *cII* 遺伝子の突然変異頻度についてその総括を Table 1 に, 個体別値を Table 2 に示す。

陰性対照群においては総プラーク数 1,916,100 の内, 変異プラークが 18 出現し, その突然変異頻度は 9.4×10^{-6} , 各個体から求めた突然変異頻度の平均値では 10.0×10^{-6} であった。

アカネ色素処理群での突然変異頻度は 1.0%群で 12.3×10^{-6} (変異プラーク数/総プラーク数: 23/1,876,500), 5.0%群で 15.4×10^{-6} (同: 28/1,823,400) 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。各個体から求めた突然変異頻度の平均値は 1.0 および 5.0%群でそれぞれ 14.0 ならびに 15.7×10^{-6} であった。

一方, 陽性対照群の肝臓における突然変異頻度は, 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⁾。

また, 発がん性に関しては F344 系ラットを用いた 16 週間混餌投与による多臓器中期発がん性試験ではアカネ色素の 2.5 並びに 5.0%のいずれの用量においても発

がんの促進作用は認められなかったとの報告がある⁵⁾。 ACI/SegHsd ラットを用いた 780 日間の発がん性試験においては統計学的な有意差は見られないものの肝臓および腎臓に腫瘍の増加が認められている⁶⁾。

以上の試験結果から明確な根拠は無い

もののアカネ色素が遺伝毒性を示す発がん性物質の可能性も示唆された。そこで今回, 標的臓器での遺伝子突然変異が検出可能なトランスジェニック動物 (Big BlueTM Rat) を用いて肝臓での遺伝子突然変異頻度を調べた。用量は発がん性試験で用いられた 1.0 および 5.0%混餌投与とし 28 日間反復投与後 3 日間の休薬期間を設けた。

アカネ色素に直接暴露されると考えられる消化管のうち,今回は十二指腸について解析を実施した。高用量の 5%群では,突然変異頻度が対照群に比較して僅かに上昇していたが ($p=0.067$, Table 1 参照), 統計学的な有意差は認められなかったことから, 最終的には陰性反応と判断した。小腸は発がんの標的臓器ではないことから,本結果は発がん性試験を補足しているものと考えられた。

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	Small intestine	5	1916100	18	9.4	-
	1		5	1876500	23	12.3	0.2448
	5		5	1823400	28	15.4	0.0672
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.

また, 肝臓については, 1.0 および 5.0% 群のいずれにおいても遺伝子突然変異頻

度の統計学的に有意な増加は認められていない (本厚生労働科学研究費補助金の平

Table 2. Induction of mutation by Madder color in individual rats

Compound	Dose (%)	Organ	Animal ID-No.	Number of plaque forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Mean \pm S.D.
Madder color	0	Small intestine	1001	506,700	3	5.9	10.0 \pm 4.7
			1002	168,300	1	5.9	
			1003	665,100	7	10.5	
			1004	171,900	3	17.5	
			1005	404,100	4	9.9	
	1	Small intestine	1101	498,600	5	10.0	14.0 \pm 5.6
			1102	666,900	6	9.0	
			1103	252,000	4	15.9	
			1104	219,600	5	22.8	
			1105	239,400	3	12.5	
	5	Small intestine	1201	488,700	10	20.5	15.7 \pm 5.5
			1202	405,000	8	19.8	
			1203	410,400	4	9.8	
			1204	105,300	2	19.0	
			1205	414,000	4	9.7	
DMBA a)	20 (mg/kg)	Liver	1301	408,600	36	88.1	78.6 \pm 10.5
			1302	585,900	47	80.2	
			1303	475,200	32	67.3	

a): Positive control (7,12-Dimethylbenz [a] anthracene); a single dose
Sample was prepared at 14-day after the dose.

Table 3. Mutant frequency of *cII* gene in transgenic rats after Madder color treatment on liver and kidney

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		5	2461500	50	20.3	0.3056
	5		5	2668500	49	18.4	0.4993
	0	Kidney	5	4040100	102	25.2	-
	1		5	2946600	113	38.3*	0.0014
	5		5	3036600	115	37.9*	0.0018

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

成 16 年度分担研究報告書). 混餌投与において腎臓並びに肝臓に腫瘍を誘発することが確認されているが, 本結果から肝臓での発がんは遺伝毒性に起因しているとのデータは得られなかった (Table 3 参照).
一方, 厚生労働科学研究費補助金 (厚生労働科学特別研究事業) のトランスジェニックラットを用いたアカネ色素の発

がん標的臓器における遺伝毒性に関する研究 (主任研究者: 広瀬雅雄 (国立医薬品食品衛生研究所)) において, 本研究で使用したラットの腎臓について同様の遺伝子突然変異の解析を実施した. 腎臓については遺伝子突然変異の統計学的に有意な増加が認められ, 発がんとの関連が示唆されている⁹⁾ (Table 3 参照).

また、乳がん、卵巣がん等、多臓器に発がん性を示す DMBA 処理群では、肝臓において十分な陽性反応 ($p < 0.0000$) が得られていることから、当該試験は適正に実施されたものと判断した。

E. 結論

アカネ色素は十二指腸に対して遺伝子突然変異を誘発しないものと判断した。

引用文献

- 1) Asanoma M, Miyabe M, Skabe Y (1984): Mutagenicity of natural food additives in *Salmonella typhimurium*. Nagoya Eisei Kenkyuhohou, 30, 53-57.
- 2) 蜂谷紀之, 滝澤行雄, 河村太郎, 館野周之, 坂部美雄, 麻野間正晴, 野田正男, 石崎睦夫, 石橋武二, 黒田孝一 (1985): 天然添加物の急性毒性および各種変異原性の概要. トキシコロジーフォーラム, 8, 91-105.
- 3) 石館基, 滝澤行雄, 坂部美雄, 石崎睦夫, 館正知 (1986): 食品添加物の変異原性試験成績 (その 7). トキシコロジーフォーラム, 9, 628-633.
- 4) Pognisky B, Westendorf J, Blomeke B, Marquardt H, Hewer A, Glover PL, Phillips DH (1991). Evaluation of DNA-binding activity of hydroxylanthraquinones occurring in *Rubia tinctorum* L. Carcinogenesis, 12, 1265-1271.
- 5) Hagiwara A, Kawabe M, Tanaka H, Kokubo Y, Sano M, Tamano S, Kadota T, Nakamura M, Imaida K (1997). Two different constituents of Madder color lack tumor promoting or carcinogenic potential in a medium-term multi-organ carcinogenesis bioassay in rats. Jpn. J. Food Chem., 4: 99-106.
- 6) Westendorf J, Pfau W, Schute A (1998). Carcinogenicity and DNA adduct formation observed on ACI rats after long-term treatment with madder root, *L. Rubia tinctorum*. Carcinogenesis, 19, 2163-2168.
- 7) Thybaud V, Dean S, Nohmi T, de Boer J, Douglas GR, Glickman BW, Gorelick NJ, Heddle JA, Heflich RH, Lambert I, Martus HJ, Mirsalis JC, Suzuki T, Yajima N (2003): In vivo transgenic mutation assays. Mutation Res., 540(2), 141-51.
- 8) Kastenbaum, M.A., and K. O. Bowman (1970): Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutation Res., 9, 527-549.
- 9) 広瀬雅雄 (2005): アカネ色素の発がん機構に関する実験的研究. 平成 16 年度総括研究報告書

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」

研究成果の刊行に関する一覧表

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Asada, S., Sasaki, K., Tanaka, N., Takeda, K., Hayashi, M., Umeda, M.	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 Research	588	7-21	2005
Asano, N., D. Torous, C. Tometsko, S. Dertinger, T. Morita and M. Hayashi	Practical threshold for micronucleated reticulocyte induction observed for low doses of mitomycin C, Ara-C and colchicine	Mutagenesis	21	15-20	2006
Kasai, H., M. Maekawa, K. Kawai, K. Hachisuka, Y. Takahashi, H. Nakamura, R. Sawa, S. Matsui, T., Matsuda	4-Oxo-2-hexenal, a mutagen formed by ω -3 fat peroxidation, causes DNA adduct formation in mouse organs	Industrial Health	43	699-701	2005
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	28	31-7	2006
Kawai, K., K. Matsuno, 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
Koyama, N., H. Sakamoto, M. Sakuraba, T. Koizumi, Y. Takashima, M. Hayashi, H. Matsufuji, K. Yamagata, M. Shuichi, N. Kinai M. Honma	Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells	Mutation Research	603	151-158	2006

Maekawa, M., K. Kawai, Y. Takahashi, H. Nakamura, T. Watanabe, R. Sawa, K. Hachisuka, 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
Matsura-Eisaki, K., Sakamoto, H., Sofuni, T., Hayashi, M. Honma, M	In vitro genotoxicity of inorganic arsenics and their genotoxic risk through food intake	Environ. Mutat. Res.	27	153-160	2005
Nakajima, M., S. Shimada, M. Nagai, F. Mizuhashi, C. Sugiyama, S. Masuda, M. Hayashi N. Kinai	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	2005
Suzuki, H., N. Ikeda, K. Kobayashi, Y. Terashima, Y. Shimada, T. Suzuki, T. Hagiwara, S. Hatakeyama, K. Nagaoka, J. Yoshida, Y. Saito, J. Tanaka, M. Hayashi	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)	Mutation Research	583	133-145	2005
Torous, D., N. Asano, C. Tometsko, S. Sugunan, S. Dertinger, T. Morita, M. Hayashi	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	2006
Watanabe-Akanuma, M., T. Ohta,	Inhibitory effects of NADH/NADPH in S9mix on photo-mutagenicity of thiabendazole following UVA-irradiation in E. coli	Environ. Mutagen Res.	27	7-12	2005

Watanabe-Akanuma, M., T. Ohta, Y. F. Sasaki	A novel genotoxic aspect of thiabendazole as a photomutagen in bacteria and cultured human cells	Toxicol. Lett.	158	213-219	2005
林 真	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	環境変異原研究	27	13-20	2005
林 真, 田中憲穂	既存添加物 43 品目の遺伝毒性試験	食衛誌	46	177-184	2005
祖父尼俊雄, 能美健彦, 太田敏博, 林真	遺伝毒性: DNA 直接作用物質に閾値は存在するのか	環境変異原研究	27	61-73	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)

Shin Asada^{a,b}, Kiyoshi Sasaki^a, Noriho Tanaka^{a,*},
Ken Takeda^b, Makoto Hayashi^c, Makoto Umeda^a

^a Laboratory of Cell Toxicology, Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, Japan

^b Department of Hygiene Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, Japan

^c Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, Japan

Received 21 October 2004; received in revised form 7 July 2005; accepted 20 July 2005

Abstract

Cell transformation assay using BALB/c 3T3 cells, C3H10T1/2 cells and others, can simulate the two-stage carcinogenesis utilized for formation of transformed foci. A sensitive cell transformation assay for tumor initiators as well as promoters has been developed using a v-Ha-*ras*-transfected BALB/c 3T3 cell line, Bhas 42; these cells are regarded as initiated in the two-stage paradigm of carcinogenesis. To distinguish between initiation and promotion, the initiation assay involves a 2-day treatment of low-density cells, obtained one day after plating, with a test chemical, and the promotion assay involves treatment of near-confluent cells with a test chemical for a period of 12 days (Day 3–14). When Bhas 42 cells were treated with tumor initiators, *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine and 3-methylcholanthrene, transformed foci were induced in the initiation assay but not in the promotion assay. In contrast, tumor promoters, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate, lithocholic acid and okadaic acid, gave negative responses in the initiation assay but positive responses in the promotion assay. The results were reproducible with various treatment protocols. Sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons were examined using both assays. Benzo[*a*]pyrene and 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene induced focus formation only in the initiation assay. Increase of focus formation was observed in the promotion assay with benzo[*e*]pyrene, benzo[*ghi*]perylene, 1-nitropyrene and pyrene. Benz[*a*]anthracene, benz[*b*]anthracene, chrysene and perylene showed positive responses in both initiation and promotion assays. Results of initiation and promotion assays of acenaphthylene, anthracene, coronene, 9,10-diphenylanthracene, naphthalene and phenanthrene were negative or equivocal. The present Bhas assays for the detection of either/both initiating and promoting activities of chemicals are sensitive and of high performance compared with other cell transformation assays.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Transformation; Bhas 42 cells; Complete carcinogen; Initiation and promotion

1. Introduction

Chemical carcinogens can be divided into two categories, i.e., initiators and promoters, based on the two-stage model of carcinogenesis [1,2]. Most initiators can be detected by various genotoxicity tests, the results

* Corresponding author. Present address: 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa 257-8523, Japan. Tel.: +81 463 82 0773; fax: +81 463 82 0773.

E-mail address: tanaka.n@fdsc.or.jp (N. Tanaka).

of which are used for carcinogenicity prediction and for regulatory purposes by authorities [3,4]. In the case of tumor promoters, several methods have been proposed [5], but none of them have been routinely used for regulatory purposes. Therefore, to develop a method for detection of non-genotoxic carcinogens with various mechanisms of action is a major challenge for the safety evaluation of chemicals [5,6]. The utilization of additional screening tests covering a wide range of carcinogenic processes has advantage before contemplating *in vivo* long-term carcinogenicity experiments for chemical safety assessment.

The cell transformation assays using BALB/c 3T3 cells [7,8] and C3H10T1/2 cells [9,10] can simulate the process of two-stage animal carcinogenesis [11,12]. Formation of transformed foci is the consequence of the complex process of transforming cells to a malignant state. Since these assays can detect both initiating and promoting activities [13,14], their inclusion as screening tools is anticipated to be useful for detection of not only tumor initiators but also tumor promoters such as non-genotoxic carcinogens. In spite of this expectation, cell transformation assays have not been accepted as a routine screening method, because of the laborious and time-consuming procedure compared with the routine genotoxicity assays [15].

We have developed a sensitive cell transformation assay for detecting tumor promoters using Bhas 42 cells [16] that was established by Sasaki et al. [17]. The cells, v-Ha-*ras*-transfected BALB/c 3T3 cells, are considered as initiated in the two-stage transformation paradigm [18]. The assay method has many advantages, e.g., high sensitivity, short experimental period, use of smaller amounts of materials, and simplicity of the procedure.

After establishing the promotion assay using Bhas cells, various chemicals including tumor initiators were examined for their potency of tumor-promoting activity. Some initiators are known to have tumor promotion capacity in animal experiments (complete carcinogens). However, *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) and 3-methylcholanthrene (MCA), as examples of initiators, did not show clear positive response in our preliminary study. In the promotion assay, Bhas cells were treated with these chemicals when the cells were near confluence. Since initiators need several cell divisions for fixation of gene mutation [19–21], we designed a new treatment protocol in which cells were seeded at a lower density and allowed to divide several times in culture dishes after treatment with test chemicals.

In the present work, tumor initiators and promoters were examined in the newly developed protocol with various treatment schedules in order to define the most

effective protocol for detection of initiators and promoters. The effect of repeated treatment with MCA at initiating and/or promoting period with several time Schedules was compared with that of 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) as a model promoter. In addition, several polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were tested with the novel protocol to validate the assay.

2. Materials and methods

2.1. Cell cultures

Minimum essential medium (MEM) was obtained from Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan. Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 (DMEM/F12) was purchased from GIBCO Laboratories, Grand Island, NY. Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Moredun, Bulimba, Australia.

Bhas 42 cells were routinely cultured in MEM supplemented with 10% FBS (M10F) in a humidified 5% CO₂ incubator at 37 °C. The cells were subcultured using 0.25% trypsin (GIBCO) before reaching confluence. For transformation assays, Bhas 42 cells were cultured in DMEM/F12 supplemented with 5% FBS (DF5F).

2.2. Chemicals

Acenaphthylene, benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P), benzo[*ghi*]perylene (B[*ghi*]P), coronene, 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA), lithocholic acid (LCA), MCA, naphthalene, okadaic acid, perylene, phenanthrene and pyrene were obtained from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan). Anthracene, benz[*a*]anthracene (B[*a*]A), benz[*b*]anthracene (B[*b*]A) and MNNG were obtained from Kanto Chemical (Tokyo, Japan). Aflatoxin B₁ (AFB₁), benzo[*e*]pyrene (B[*e*]P) and TPA were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Chrysene was obtained from Avocado Research Chemicals (Lancashire, UK), 1-nitropyrene (1-NP) from Aldrich (St. Louis, MO), and 9,10-diphenylanthracene (9,10-DPhA) from Merck (Rahway, NJ). These chemicals except for coronene were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; Wako Pure Chemical Industries); coronene was suspended in 0.5% carboxymethylcellulose sodium salt solution (CMC-Na; Wako Pure Chemical Industries). Final concentrations of these solvents in experimental medium were adjusted to less than 0.1% in the case of DMSO or less than 1% in the case of CMC-Na.

2.3. Cell growth assay

Cell growth assays, using the standard crystal violet absorption method [22], were applied to dose range finding for initiation and promotion assays. Additionally, the cell growth assay was performed concurrently with every transformation assay. In the case of initiation assay, cell numbers were adjusted to 2 × 10³ cells/mL in M10F and the cell suspension was seeded onto 24-well microplates at 0.5 mL per well (Day 0). Three wells were prepared for each test concentration. After a 24 h

Table 1
Results of initiation and promotion assays for initiators and promoters

Chemical	Concentration	S9 mix	Initiation assay		Promotion assay	
			Number of foci/well	Cell viability	Number of foci/well	Cell viability
MNNG	0 µg/mL	–	5.3 ± 1.8	100.0	1.5 ± 0.5	100.0
	0.002 µg/mL	–	N.E.		1.5 ± 1.2	96.4
	0.005 µg/mL	–	N.E.		1.2 ± 1.0	96.1
	0.01 µg/mL	–	N.E.		1.3 ± 1.5	95.8
	0.02 µg/mL	–	4.0 ± 1.8	90.6	1.2 ± 0.4	98.4
	0.05 µg/mL	–	5.8 ± 2.9	90.8	1.0 ± 1.3	97.4
	0.1 µg/mL	–	5.5 ± 1.9	88.7	1.7 ± 1.2	93.1
	0.2 µg/mL	–	6.7 ± 2.9	62.1		tox.
	0.5 µg/mL	–	10.0 ± 2.6	69.6		tox.
1 µg/mL	–	12.0 ± 1.5	57.0		tox.	
MCA	0 µg/mL	–	3.0 ± 1.1	100.0	1.5 ± 0.5	100.0
	0.002 µg/mL	–	N.E.		1.0 ± 0.9	93.6
	0.005 µg/mL	–	N.E.		1.3 ± 0.5	89.7
	0.01 µg/mL	–	N.E.		1.2 ± 0.4	85.5
	0.02 µg/mL	–	2.7 ± 2.0	61.6	1.8 ± 0.8	88.7
	0.05 µg/mL	–	3.7 ± 2.0	65.6	1.5 ± 1.0	84.7
	0.1 µg/mL	–	6.2 ± 2.6	62.7	2.0 ± 1.3	69.2
	0.2 µg/mL	–	8.2 ± 1.9	79.6		tox.
	0.5 µg/mL	–	9.7 ± 2.1	45.2		tox.
1 µg/mL	–	11.8 ± 4.0	35.8		tox.	
AFB1	0 µg/mL	–	3.0 ± 1.1	100.0	1.5 ± 0.5	100.0
	0.02 µg/mL	–	N.E.		1.5 ± 0.8	95.9
	0.05 µg/mL	–	2.5 ± 1.5	64.2	0.7 ± 1.2	91.5
	0.1 µg/mL	–	1.8 ± 1.2	48.8	0.7 ± 0.5	85.2
	0.2 µg/mL	–	3.0 ± 1.7	49.3	0.5 ± 0.8	87.4
	0.5 µg/mL	–	3.5 ± 1.5	44.7	0.7 ± 0.5	86.0
	1 µg/mL	–	2.5 ± 0.5	24.5	1.3 ± 0.8	73.4
	2 µg/mL	–	0.8 ± 1.0	12.5		tox.
AFB1	0 µg/mL	+	3.2 ± 1.5	N.E.	N.E.	
	0.05 µg/mL	+	3.7 ± 1.6	N.E.	N.E.	
	0.1 µg/mL	+	4.2 ± 1.5	N.E.	N.E.	
	0.2 µg/mL	+	4.8 ± 3.3	N.E.	N.E.	
	0.5 µg/mL	+	4.7 ± 1.8	N.E.	N.E.	
	1 µg/mL	+	14.3 ± 2.4	N.E.	N.E.	
	2 µg/mL	+	11.7 ± 2.8	N.E.	N.E.	
TPA	0 ng/mL	–	4.3 ± 1.0	100.0	2.8 ± 0.4	100.0
	2 ng/mL	–	2.3 ± 0.5	97.5	9.0 ± 1.3	100.0
	5 ng/mL	–	2.7 ± 1.2	92.8	12.7 ± 1.0	92.7
	10 ng/mL	–	2.5 ± 1.0	93.8	17.2 ± 2.2	95.9
	20 ng/mL	–	1.3 ± 0.8	97.6	26.0 ± 3.0	105.5
	50 ng/mL	–	2.2 ± 0.8	96.8	28.7 ± 3.3	111.1
	100 ng/mL	–	0.8 ± 1.3	90.0	27.3 ± 2.9	112.2
LCA	0 µg/mL	–	3.0 ± 1.1	100.0	4.2 ± 0.8	100.0
	0.5 µg/mL	–	2.5 ± 2.2	91.2	6.5 ± 1.9	99.3
	1 µg/mL	–	3.2 ± 1.6	84.1	7.8 ± 1.0	94.7
	2 µg/mL	–	2.2 ± 1.8	89.4	7.2 ± 2.2	94.0
	5 µg/mL	–	2.0 ± 1.3	125.7	11.7 ± 1.4	101.1
	10 µg/mL	–	2.8 ± 1.2	117.7	16.5 ± 1.0	91.0
	20 µg/mL	–	3.8 ± 1.9	109.7	31.8 ± 3.1	79.7
Okadaic acid	0 ng/mL	–	4.3 ± 1.4	100.0	4.2 ± 0.8	100.0
	0.2 ng/mL	–	2.0 ± 1.1	87.5	N.E.	
	0.5 ng/mL	–	3.0 ± 0.6	96.0	N.E.	
	1 ng/mL	–	3.3 ± 2.2	105.5	4.8 ± 2.5	97.1

Table 1 (Continued)

Chemical	Concentration	S9 mix	Initiation assay		Promotion assay	
			Number of foci/well	Cell viability	Number of foci/well	Cell viability
	2 ng/mL	–	3.5 ± 1.2	114.5	5.8 ± 1.6	90.1
	4 ng/mL	–	N.E.		4.3 ± 1.9	70.7
	5 ng/mL	–	3.0 ± 1.4	89.0	N.E.	
	6 ng/mL	–	N.E.		7.0 ± 3.1	56.8
	8 ng/mL	–	N.E.		7.7 ± 1.5	40.3
	10 ng/mL	–	3.5 ± 2.4	98.0	12.5 ± 1.4	37.0

N.E., not experimented; tox.: toxic.

cultivation, cells were treated with a fresh medium containing a test chemical. The cells were fixed with a 10% formalin on Day 3 and stained with a 0.1% crystal violet (CV) solution. CV was extracted from stained cells in each well with 0.5 mL of a solution containing 0.02 mol/L hydrochloric acid in 50% ethanol. Optical density of CV extracted from stained cells was measured at 540 nm, and the results were expressed as percentage of absorbance compared to the solvent control culture.

In the growth testing for the promotion assay, cell numbers were adjusted to 2×10^4 cells/mL in DF5F and seeded onto 24-well microplates at 0.5 mL per well. After a 3-day cultivation, medium was replaced with the one containing a test chemical. Cells were then fixed and stained on Day 7, and optical density of CV extracted from stained cells was measured as above.

2.4. Transformation assay for initiating activity (Bhas initiation assay)

The procedure for the initiation assay using BALB/c 3T3 cells [23] was adopted for the present Bhas initiation assay. Cell numbers were adjusted to 2×10^3 cells/mL in M10F and the cells were seeded onto each well of six-well microplates in 2 mL amounts (Day 0). Six wells were prepared for each test concentration. After a 24 h cultivation, cells were treated with a fresh medium containing a test chemical. Culture medium was replaced with DF5F without test chemical on Day 3; thereafter, culture medium was changed twice a week with fresh DF5F without test chemical. On Day 24, the cells were fixed with methanol and stained with a 5% Giemsa solution. Transformed foci were judged from morphological characteristics: deep basophilicity, dense multilayering of cells, and random orientation of cells at the edge of foci.

2.5. Transformation assay for promoting activity (Bhas promotion assay)

Bhas promotion assay was conducted according to the procedure reported by Ohmori et al. [16]. Cell numbers were adjusted to 2×10^4 cells/mL in DF5F and seeded onto each well of six-well microplates in 2 mL amounts (six wells

per test concentration) (Day 0). Medium was replaced with fresh medium containing a test chemical on Day 3, Day 7 and Day 10, and then with fresh medium without the test chemical on Day 14. On Day 21, the cells were fixed with methanol and stained with a 5% Giemsa solution for focus counting.

2.6. Metabolic activation in initiation assay

In the case of metabolic activation of AFB₁, cultures of Bhas 42 cells were started under the same conditions as those of the initiation assay. Three wells were prepared for each test concentration. After a 24 h incubation, cells were treated with AFB₁ together with S9 mix which contained 5% rat S9 (Kikkoman, Chiba, Japan), 2 mM HEPES (Sigma Chemical Co.), 5 mM MgCl₂, 33 mM KCl, 5 mM glucose-6-phosphatase (Sigma Chemical Co.) and 4 mM β-NADP⁺ (Oriental Yeast, Osaka, Japan). After a 3 h treatment, all plates were washed with phosphate-buffered saline and provided fresh M10F. The culturing was continued until Day 24 and the cells were fixed and stained for focus counting.

2.7. Transformation assay with various schedule of treatments

Cells were seeded onto six-well microplates as with the initiation assay. MCA (100 ng/mL) or TPA (50 ng/mL) was added at various time schedules during cell-growth phase (initiation stage) and/or stationary phase (promotion stage). Three wells were prepared for each set of conditions. Cells were cultivated until Day 24, and then fixed and stained for focus counting.

2.8. Statistical analysis and criteria of judgment

Results of initiation and promotion assays were evaluated as follows. After *t*-test analysis, chemicals showing significant increase ($p < 0.05$) of focus number at more than two consecutive concentrations were judged positive. Chemicals showing statistically significant effect at only one concentration were considered equivocal. Negatives were those which induced no statistically significant increase of transformed foci at any concentrations tested.

3. Results

3.1. Establishment of initiation assay

Preliminary examination with MNNG and MCA in the Bhas promotion assay revealed little response in the formation of transformed foci. Then, an experimental

procedure was designed in which Bhas 42 cells were seeded at one-tenth lower cell density (2×10^3 cells/mL) than in the promotion assay (2×10^4 cells/mL), a procedure that will permit cells to divide several times after the treatment with test chemicals. With the protocol described in Section 2.4, MNNG and MCA induced a significant number of foci (Fig. 1A and C).

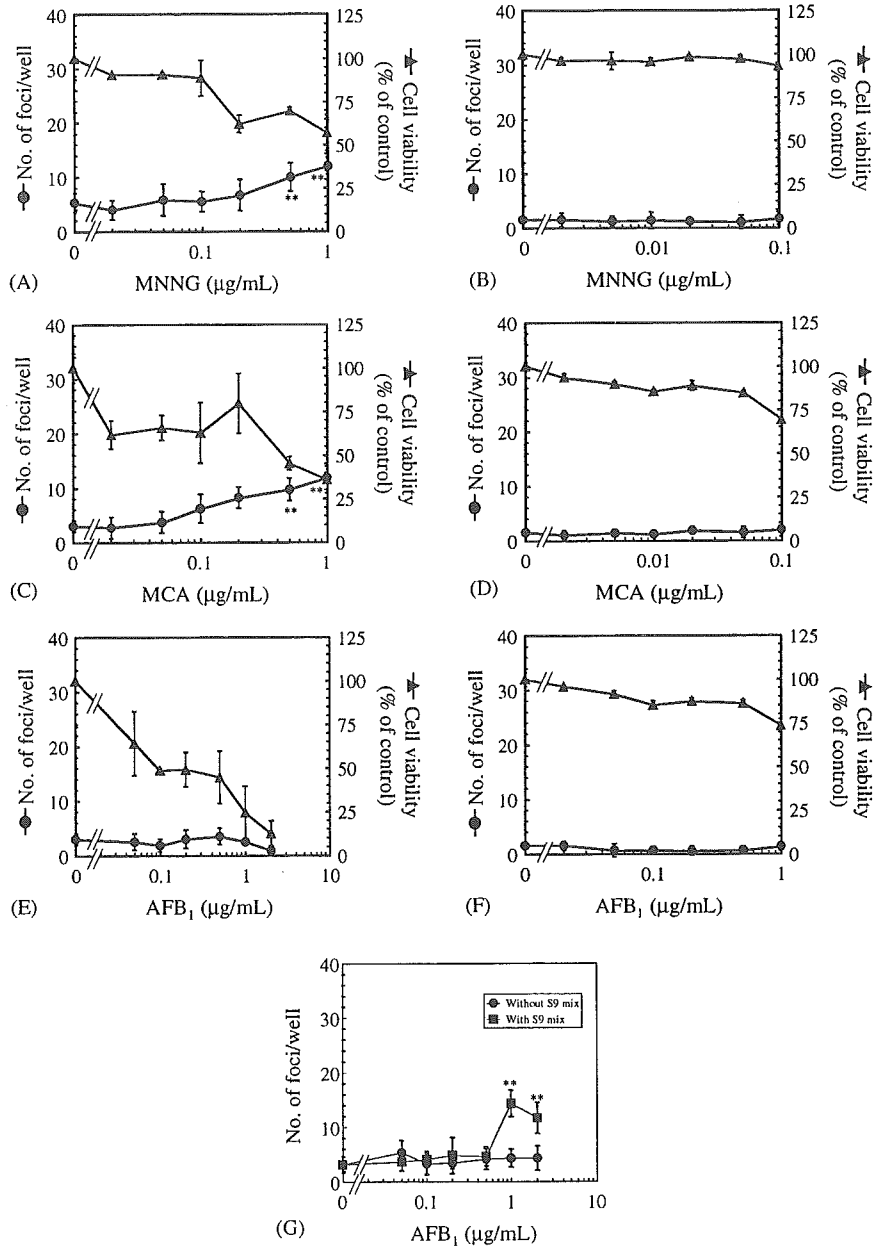


Fig. 1. Results of transformation assays of initiators. A, C and E show results of initiation assay and B, D and F show results of promotion assay. G shows result of metabolic activation in AFB₁ initiation assay. **p* < 0.05, compared with solvent control. ***p* < 0.01, compared with solvent control.

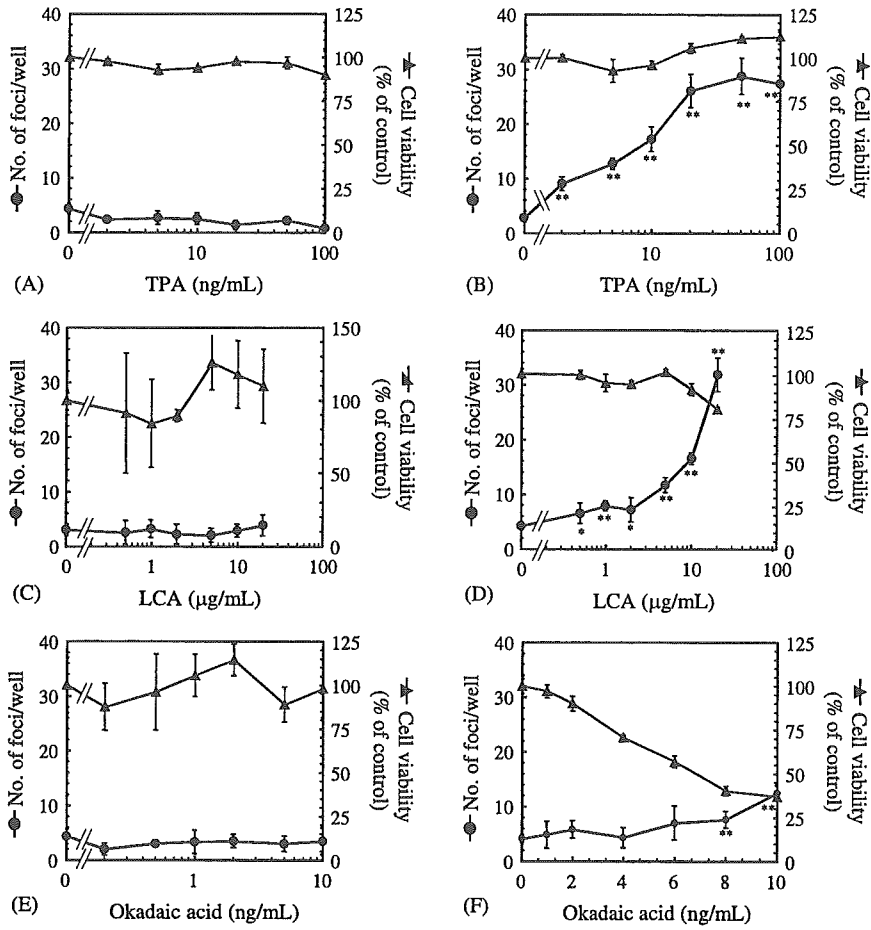


Fig. 2. Results of transformation assays of promoters. A, C and E show results of initiation assay and B, D and F show results of promotion assay. **p* < 0.05, compared with solvent control. ***p* < 0.01, compared with solvent control.

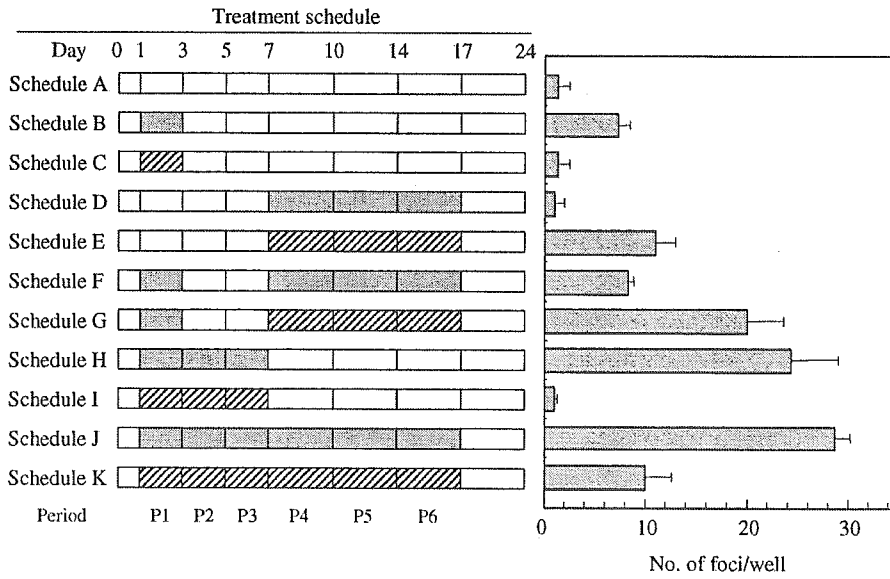


Fig. 3. Result of transformation assay under various time schedules. In treatment schedule, solid blocks represent treatment with 100 ng/mL MCA and diagonal blocks represent treatment with 50 ng/mL TPA.