

b)制限酵素によるDSBの多くはおそらくエラーフリー型のNHEJによって修復され、突然変異を引き起こさない。

リスク評価においてb)の結論は重要である。しかしながら、外来性変異原によるDSBは制限酵素と異なり末端ヌクレオチド、もしくは糖鎖の損傷を伴い複雑である。今後はより実際に近いモデルの構築と、この系を用いたDSB修復に関与する修復酵素の機能解析を行う。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

F. 研究発表

1. 論文発表

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.*, 603, 151-158 (2006)

Oka, H., Ikeda, K., Yoshimura, H., Ohuchida, A., Honma, M. Relationship between p53 status and 5-fluorouracil sensitivity in 3 cell lines. *Mutat. Res.*, 606, 52-60 (2006)

Umebayashi, Y. Honma, M., Abe, T., Ryuto, H. Suzuki, H., Shimazu, T., Ishioka, N., Iwaki, M., Yatagai, F. Mutation induction after low-dose carbon-ion beam irradiation of frozen human cultured cells. *Biological Sci. in Space*, 19, 237-241 (2006)

Burlinson, B., Tice, RR., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, SY., Collins, AR., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, TS., Nakajima, M., Sasaki, YF., Thybaud, V., Uno, Y., Vasquez, M., and Hartmann, A. Fourth International

Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup *Mutat. Res.*, 627, 31-35 (2007)

Moore, MM., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, J., Burlinson, B., Cifone, M., Clark, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, J., Muster, W., Pant, K., Kidd, DA., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, Jr. LF., Thakur, AK., and Van Goethem, F. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, recommendations for 24-h treatment. *Mutat. Res.*, 627, 36-40 (2007)

Ku, WW., Bigger, A., Brambilla, G., Glatt, H., Gocke, E., Guzzie, PJ., Hakura, A., Honma, M., Martus, H-J., Obach, RS., and Roberts, R. Strategy for genotoxicity testing—Metabolic considerations *Mutat. Res.*, 627, 59-77 (2007)

Wang, J., Chen, T., Honma, M., Chen, L., Moore, M. 3'-Azido-3'-deoxythymidine induces deletions in L5178Y mouse lymphoma cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, in press (2007)

2. 学会発表

本間正充 In vitro コメット試験は遺伝毒性のエビデンスになりうるか？日本環境変異原学会MMS研究会第49回定例会 (2006.5)

Honma M., Sakuraba M., Koizumi T., Takashima Y., Sakamoto H. and Hayashi M., Error-prone and error-free nonhomologous end-joining for repairing DNA double strand breaks in human cells. 36th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (2006.7)

Honma M., Yamakage K. *In vitro* Comet assay—A possible candidate as a member of the standard test battery. JaCVAM/MMS Joint Seminar -Pros & Cons of Comet Assay- (2006.8)

本間正充、高島良生、安井学、谷田貝文夫、鈴木雅雄、林 真 低放射繊維による相同組換え修飾効果 日本放射線影響学会第 46 回大会 (2006.9)

谷田貝文夫、梅林志浩、本間正充、阿部知子、鈴木ひろみ、島津徹、石岡憲昭、岩本正哉 ISS 利用実験計画:宇宙環境の突然変異に及ぼす影響の推定 日本放射線影響学会第 46 回大会 (2006.9)

高島良生、櫻庭真弓、小泉朋子、坂本浩子、安井学、林 真、本間正充 ヒト細胞に誘導された DNA 二重鎖切断修復とその細胞周期依存性 日本放射線影響学会第 46 回大会 (2006.9)

Kohara A., Ozawa Y., Ohtani A., Shioda S., Takeuchi K., Morita K., Hirano T., Honma M., Suzuki T., Masui T., Mizusawa H. High resolution genomic analysis of immortal human cells and tumor cells using array-based comparative genomic hybridization. Environmental Mutagen Society 37th Annual Meeting (2006.9)

Luan Y., Honma M., Suresh T., Kogi M., Yamaguchi T., Suzuki T. CGH and SNP array are powerful tools for chromosome analysis. Environmental Mutagen Society 37th Annual Meeting (2006.9)

Matsufuji H., Chino M., Hayashi M., Honma M., Yamagata K. Genotoxicity of quercetin in the presence of reactive oxygen species using human lymphoblastoid TK6 cells. Environmental Mutagen Society 37th Annual

Meeting (2006.9)

本間正充、鈴木雅雄、谷田貝文夫 染色体切断に対する放射線影響の検討 日本宇宙生物科学会第 20 回大会(2006.9)

梅林志浩、菅澤薫、本間正充、島津徹、鈴木ひろみ、石岡憲昭、岩本正哉、谷田貝文夫 放射セン適応応答による突然変異の抑制 ISS 利用実験計画:宇宙環境の突然変異に及ぼす影響の推定 日本宇宙生物科学会第 20 回大会(2006.9)

Honma M., Sakuraba M., Koizumi T., Takashima Y., Sakamoto H. and Hayashi M., Requirement of p53 for maintenance of chromosome integrity against DNA double strand breaks. DNA Repair 2006 (2006.9)

本間正充 DNA2 本鎖切断修復によるゲノム安定化機構 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)

斉藤美香、高島良生、坂本浩子、林 真、松藤寛、山形一雄、本間正充 簡便な *in vitro* コメット試験法の確立とその評価 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)

小山直己、加藤竜也、本間正充、林 真、増田修一、木苗直秀 ヒトリンパ芽球トランスジェニック細胞を用いたアクリルアミドおよびグリシダミドの遺伝毒性試験 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)

谷田貝文夫、梅林志浩、鈴木雅雄、岩本正哉 染色体特定部位 DSB の修復:低線量/低線量率ガンマ線照射による影響 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)

高島良生、小泉朋子、櫻庭真弓、林 真、本間正充 ライブセルイメージングによる小核の運命の追跡 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)

松藤寛、千野誠、本間正充、林 真、山形一雄 ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 を用いた亜硝酸ナトリウムと抗酸化剤の複合遺伝毒性 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)

Honma M. DNA double strand break inducing chromosome instability and its genetic consequences. International Conference on Biomarkers in Health and Environmental Management & XXXII Annual Meeting Environmental Mutagen Society of India (2007.1)

Honma M. DNA double strand breaks inducing chromosome instability in p53-deficient human cells. Key Stone Symposia -Genome Instability and Repair (2007.1)

G. 知的所有権の取得状況

特になし

平成 18 年度 厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
分担研究報告書

研究課題名:食品添加物等における遺伝毒性評価のための戦略構築に関する研究

分担研究課題名:遺伝毒性閾値に関する国際動向の分析

分担研究者:長尾 美奈子 共立薬科大学客員教授

研究要旨

遺伝毒性発がん物質の遺伝毒性における閾値の評価の仕方に関する国際的な動向を調べる目的で文献検索を行なった。欧州アカデミーが提言している閾値発現の機構に基く遺伝毒性物質の分類に従い、閾値があると考えられる物質について個々に考察した。その結果、欧州アカデミーの提言による4群、A [DNA に直接反応し linear non-threshold (LNT)], B (LNT として取り扱われているが作用様式不明な物)、C (実用的閾値が存在する物) および D (間接作用によるもので閾値が存在) に分類することが、閾値の存在を確認する上で適切であると判断するに至った。ただし DNA に直接作用する物質に、修復に因る閾値が少なくとも *in vitro* で存在するので、それらを A' 群に分類することを提言する。A' 群に属す化合物がどの位あるか、*in vivo* で閾値が確認できるかが今後の問題である。また、B 群に属すアクリルアミドは、*in vivo* における遺伝毒性に関するデータが蓄積されつつあり、遺伝毒性が発がんの原因になっているかについては現在研究が進められている。環境中には B 群に属す発がん物質が多々あると考える。閾値の有無を含めて遺伝毒性発現機構の不明確な物質の個々の機構解明を詳細に行ない、データを蓄積することにより、食品添加物を含め環境中の弱い遺伝毒性発がん物質をより正確に評価できるようにすることが重要と考える。

キーワード:LNT、修復による閾値、代謝・解毒による閾値、間接作用による閾値、作用様式不明物質、アクリルアミド

A. 研究目的

遺伝毒性発がん物質の遺伝毒性に閾値が存在するか否かは、ADI 設定が可能か否かの重要な問題に関わる。

閾値の存在の有無を議論する場合、閾値の定義がきわめて曖昧である。閾値(threshold) が形容詞 practical, real, apparent, statistical, alleged 等、を伴うと、例え夫々はっきり定義されていても、その意味するところはヒトによって微妙に異なる。むしろ閾値が生ずる根拠をは

っきりさせることにより、どういう意味の閾値が存在するかを明確に出来る。欧州アカデミーでは、発がん物質を、遺伝毒性閾値の発現の様式から4群に分類することを試みている。表-1に示すように、この分類の仕方は非常に明確で、我が国の安全性評価の際にも有用と思われる。しかし、この分類で取り上げられていない閾値発現の機構があると思われる。それは DNA 修復機構による閾値の発現である。DNA を標的とする遺伝毒性発がん物質には、

1つのDNA 傷害が突然変異に至るため閾値が無いと考えられている。しかし、細胞にはDNA 修復機構が存在する。例えば10個の傷がありそのうち9個は修復され残りの1個の傷が突然変異を引き起こすとする。細胞DNAに傷が入った場合、初めから9個までの傷は完

全に修復され10番目の傷が突然変異にいたる場合は、明らかに閾値が存在することになる。修復による閾値が明らかに存在する場合がある。しかし、傷の任意の90%が修復され任意の10%が変異に至る場合は、閾値は存在しないことになる。

表-1. 欧州アカデミーによる遺伝毒性発がん物質の閾値発現機構による分類

A. 閾値なし (Linear non-threshold, LNT)	B. 不明 (LNTとして取り 扱う)	C. 実用的閾値あり (Practical/apparent threshold)	D. 閾値あり (Perfect/real statistical threshold)
イオン化放射線	アクリルアミド	ホルムアルデヒド	TCDD
塩化ビニール	砒素	酢酸ビニール	紡錘体阻害剤
4-アミノビフェニール	アクリロニトリル	ROS	トポイソメラーゼ阻害剤
ジエチルニトロソアミン			ホルモン
アフラトキシン B1			
NNK			

Bolt et al (2004)より。

D 群の DNA に直接作用しない化合物の遺伝毒性には閾値が存在することは極めて明確であり、閾値の存在に疑義をはさむ余地はないと思われる。また、現在安全性の評価にもこの概念は取り入れられている。

本報告書では A' 群に分類すると適当と思われるメチル化剤や UV による傷害に対する DNA 修復による閾値の発現、C 群の practical/apparent threshold を示すと評価されているホルムアルデヒドおよび酢酸ビニールについて閾値発現の機構について紹介する。また、B 群(作用様式不明)に属し、閾値が存在するか否か不明であり現在其のリスク評価に関わる研究が盛んに行なわれているアクリルアミドについて現状を紹介する。

B. 研究方法

文献検索により情報を収集した。

(倫理面への配慮)

本研究では該当するものはない。

C. 研究結果

1. DNA 修復による閾値

a) UV 照射:

色素性乾皮症 (XP) 患者および正常のヒト線維芽細胞を UVC (254 nm) 照射し、誘発される HPRT 変異を検討した結果、図-1 に示すように正常ヒト線維芽細胞では明らかに閾値の存在が示された (Maher et al, 1979)。XP 患者の線維芽細胞と比較して明らかな閾値が認められるので、この閾値には少なくとも修復が関与していると考えられる。

UV による DNA 傷害には活性酸素が関与しているため閾値があるという説もあるが (Bolt et al, 2004)、その場合は XP 線維芽細胞で閾値が存在するはずである。この点については明らかにされていない (図-1)。

野生型細胞で認められる閾値が発現するお

もな機構は DNA 修復であると考えられる。

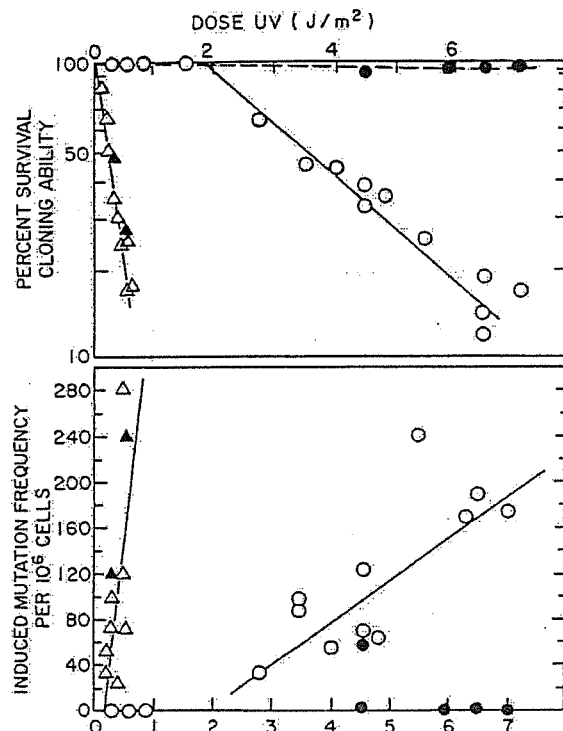


図-1 ヒト線維芽細胞の UV 照射による HPRT 変異誘発 ○ 正常人の細胞、△ XP 患者の細胞 Maher et al, 1979 より。

b) メチル化剤: MNNG についても修復による閾値の存在が、バクテリア (Sofuni et al, 2005) およびヒト線維芽細胞 (Day et al., 1980) で明らかにされている。MMS については Parry ら (2004) が、培養細胞における小核の誘発に明らかな閾値があることを示している (図-2)。塩基置換についても閾値が存在する。

ジメチルニトロソアミンはヒト発がんに関わる因子として重要である。メチル化剤には共通して閾値が存在するのか、*in vivo* でも閾値は確認できるのか、明らかにする必要がある。なお、MNNG をマウスに経口投与し、胃粘膜において *lacZ* 変異が誘発されることは確認されているが (Brault et al, 1999)、閾値の有無については不明である。

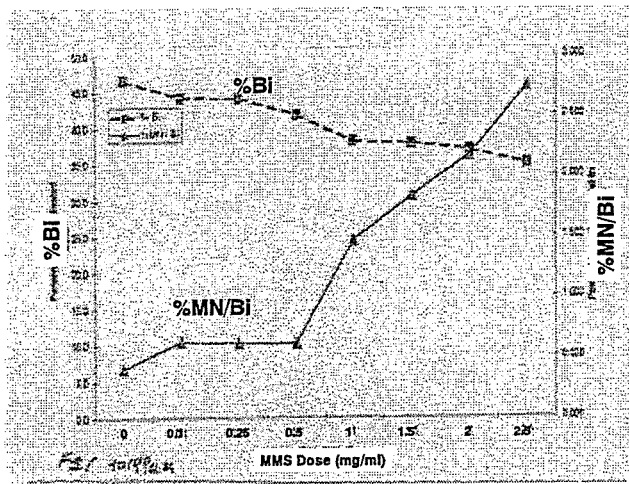


図-2. MMS によってヒトリンパ球細胞 AHH-1 に誘発される小核

Bi, 2 核細胞; MN, 小核細胞
Parry et al, 2004 より。

2. 解毒機構による閾値

表-1でC群に属す化合物は、内因性の遺伝毒性発がん物質関連化合物である。

a) ホルムアルデヒド HCHO:

ホルムアルデヒド (FA) は IARC によりヒト発がん物質に分類されている。ラットの長期発がん試験で鼻腔腫瘍が誘発されている。

遺伝毒性としては、サルモネラ菌に対し変異原性を示す (Temcharoen and Thilly, 1983)。また、哺乳動物細胞では染色体異常、小核 (MN)、SCE を誘発する (Ma and Harris, 1988; Merk and Speit, 1999)。また、ヒトリンパ球細胞では TK および HPRT 変異が誘発される (Crosby et al, 1988)。DNA-たんぱく質 cross-link (DPC)、 N^6 -hydroxymethyl-dA, N^6 -hydroxymethyl-dG, N^6 -hydroxymethyl-dC (Zhong and Hee, 2004) を生成することが明らかにされている。DPC は組織中の FA 暴露による発がんリスク評価のマーカーとして使われている。DPC は MN、染色体異常誘発に関わる。DPC は修復除去されるが XP は関与していない。しかし、XP では MN が高率に誘発される。マウスリンパ腫細胞 (L5178Y) では 62.5 μ M

(1.86 μ g/ml, 2h 暴露) 以上で small colony が誘発される (Speit and Merk, 2002)。V79 細胞における SCE および HPRT 変異は 250 μ M (7.5 μ g/ml) 以上で検出されており、閾値の存在が考えられる (Merk and Speit, 1999)。

FA はセリンおよびグリシンの代謝の際に体内で生成される。ヒトおよびラットを含む哺乳動物における血中濃度は 100 μ M (3 ppm) であり、種々の細胞で FA 濃度が 100-400 μ M で DNA 傷害を誘発することが示されている。FA は GSH 依存性にデヒドロゲナーゼにより解毒される。従って細胞内の GSH 解毒能力を超えると、毒性が出ると考えられる。

健常人より得た血液細胞を *in vitro* で FA 処理し、MN および SCE の誘発を検討した結果、図-3に示すように MN は 100 μ M までは誘発されなかった。SCE についても 100 μ M まで誘発されなかった。つまり閾値が認められた (Schmid and Speit, 2007)。

空気中の FA が 2ppm を超えるとラット日粘膜における DPC が急峻に増加する。吸入に関する研究ではラットでは 6ppm 以上で、ヒトでは 4ppm 以上で腫瘍が誘発される。

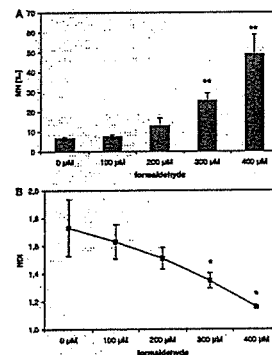


図-3. 健常人血液細胞における FA による MN の誘発。

採取した血液細胞を PHA 存在下で 44 時間培養後 FA を加え、24 時間後の MN を測定。

Schmid and Speit, 2007 より。

ラットの気道粘膜における標識 FA の DNA への共有結合は2ppmと6ppmの間で急峻に増加する。ラットの気道粘膜における標識 FA の DPC への取り込みは5ppm以下で直線性が失われる。

リスク評価に当たっては直線的な外挿をするべきでないと言われている。それには

- ① FA-DNA の共有結合による相互作用は sublinear である。
 - ② FA は内因性に存在するので、生理的なレベルが存在する。
 - ③ 速やかに解毒される。
 - ④ FA の毒性は接触部位に限られている。
- などの理由が挙げられている (Bolt, 2003)。

一般人の 0.1 ppm の暴露は安全であると提言されている (BfR, 2006)。

b) 酢酸ビニール $\text{CH}_3\text{COOCH}=\text{CH}_2$:

Vinyl acetate (VA) はラットおよびマウスへの MTD (体重増加が10%遅れる) を超える量の経口投与により、口腔、食道、前胃に腫瘍が誘発される。また、600 ppm の長期吸入により鼻腔の腫瘍が誘発される。

VA はサルモネラ菌に対しては変異原性を示さないが哺乳動物細胞で SCE および染色体異常を誘発する。

VA は carboxylesterase により酢酸とアセトアルデヒド (AA) 分解され、AA はさらに aldehyde dehydrogenase により酢酸に代謝される。AA はリジンおよびグアニンと反応し、DPC を生成する。この反応は酢酸濃度が高くなり pH が酸性になるに従って促進される。

AA および酢酸は内因性に存在し、AA の血中レベルは 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。ヒトが 1ppm の VA を吸入した場合の鼻腔基底細胞における濃度は血中のバックグラウンドレベルの 1/3 と計算され、これは CHO 細胞における SCE 誘発最低濃度 (3.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の 1/30 である。染色体異常誘発にはさらに高濃度を必要とする。SCE は突然変異を誘発する DNA 傷害のマー

カーとしては適切なものではなく、過剰に高感受性と考えられる。染色体異常誘発にはより高濃度が必要であるが、3.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を閾値レベルと考えている。50ppm の VA に暴露させたラットの嗅覚器官基底細胞の AA の濃度は 1.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、腫瘍は誘発されない。最も安全性を見込んで 50 ppm を閾値レベルとされている (Hengstler et al., 2003)。

職業暴露限界レベルは米国、ドイツでは 10 ppm、フランス 8.5 ppm、ポーランド、ロシアで 2.8 ppm と規定されている。また、生涯暴露量としては 0.4-1.0 ppm が推奨されている (Bogdanffy et al., 1999)

3. 閾値の存在が不明な場合

アクリルアミド $\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$:

Acrylamide (ACA) は B 群に属す。雄ラットに飲水投与 (0.1, 0.5, 1.0, 2.0 3.0 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$) で甲状腺腫、腺がんおよび乳腺腺維腺腫、腺がんが誘発された。マウスでは強制経口投与で肺腺腫が雌雄で対照群に比べて増加している。発がん性としては弱い。

ACA は CYP2E1 によりグリシダミド

(Glycidamide, GA, $\text{H}_2\text{COCHCONH}_2$) に代謝されて、DNA と直接反応することが明らかにされている。GA と DNA が反応し、

N7-(carbamoyl-ethyl)-guanine (N7-GA-Gua) および

N3-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-adenine が主な付加体として生成される (Besaratnia and Pfifer, 2005)。

ラット肝 S9 では CYP2E1 活性はみとめられず、*in vitro* では細胞毒性が出ない濃度では遺伝毒性は検出されない。しかし、ヒト気管支上皮およびマウス胚線維芽細胞では付加体を形成し、後者では *cI* 導入遺伝子に塩基置換型の変異を誘発する。一方 GA は LNT 型の遺伝毒性を示し、Ames テスト、ヒトリンパ芽球細胞 TK アッセイ、Comet アッセイなどで全て陽性である。*In vivo* では 0.75 - 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重

の範囲で精子 DNA の付加体は log/log モードで直線関係を示した。マウスへの ACA の腹腔内投与(0-15 mg/kg, 17.5-100 mg/kg)により誘発される末梢血における MN は直線的な用量相関を示し、低濃度でより急な容量相関性を示したと報告されている。しかし、その活性は弱く 60 mg/kg および 100 mg/kg で、夫々対照群の2倍および 2.5 倍である (Abramsson-Zetterberg, 2003) (図-4)。この MN は染色体切断によるもので倍数性異常によるものでないことが明らかにされている。

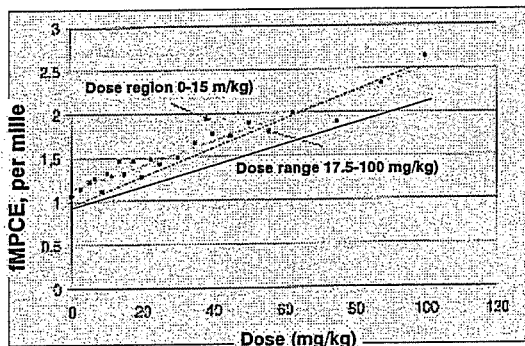


図-4. ACA の腹腔内投与による骨髄 MN の誘発 Abramsson-Zetterber (2003)より。

マウスに ACA を 3-4 週間飲水経口投与し、リンパ球の *Hprt* 遺伝子変異を検討したものでは 0, 20, 100 mg/kg/day 投与群3点で直線的相関性を示す。しかし、同じ動物の肝臓の *cII* 変異では 100 mg/L (20 mg/kg/day) (4週投与)では対照群と全く差が無く、500 mg/L (100mg/kg/day) (3週投与)で対照群の2倍になる。閾値があると思われる (図-5)。

マウスに 1 mg/kg/day になるように飲水投与した場合、主な付加体である N7-GA-Gua は 14日の投与でプラトーに達しそのレベルは $380/10^8$ スクレオチドであることから (Doerge et al, 2005)、100 mg/L 投与群では付加体はできていたと考えられる。

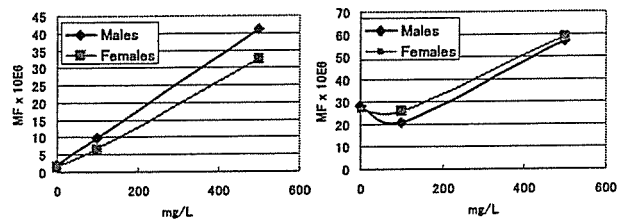


図-5. ACA をマウスに3-4週飲水投与して誘発される、リンパ球 *Hprt* 変異(左)および肝 *cII* 変(右)。Manjonatha et al (2006)のデータに基く。

これらの遺伝毒性の情報に基き、ACA の発がん性が遺伝毒性に由来するかの検討が、2年間連続飲水投与したラットについて行なわれている。甲状腺腫瘍の発がん率は 2 mg/kg/day 投与群で、対照群の 1.5% に対し16%に増加している。一方骨髄における MN の誘発は、対照群が 0.2% であるのに対し、2 mg/kg /day ではせいぜい 0.21% であると計算される。このことから、少なくとも甲状腺腫には遺伝毒性は関与していないであろうと提言されている (Allen et al, 2005)。

D. 考察

欧州アカデミーが提言しているように、遺伝毒性発がん物質を遺伝毒性閾値発現モードから分類すると閾値の存在が明確になる。しかし、A 群に属す化合物にも修復による閾値が明らかに存在するので、それらを A' 群と分類する。ここでは A, A', B, C, D の5種類に分類する。A', C および D に分類される物質の遺伝毒性には閾値が存在する。In vitro で閾値が確認された物質については、in vivo における閾値の確認が必須であろう。A' に分類した MNNG、MMS および UV については in vivo で閾値が証明されていない点留意する必要がある

る。また、修復による閾値の発現がある化合物についてさらに検討する必要がある。

B群に属する化合物は遺伝毒性が弱い。本報告書では触れなかったが、アクリロニトリルは *in vitro* では遺伝毒性が認められるが、*in vivo* では検出されていない。アクリルアミドは遺伝毒性発がん物質であるが、発がんに遺伝毒性が関わるか否か、現在多くの研究が行なわれている (Besaratina and Pfeifer GP, 2007)。

現在B群に分類されている化合物は少ないが、環境中にはB群に属すると思われる弱い遺伝毒性発がん物質が多く存在し、安全性を重視する観点から使用されていないものが存在すると考えられる。

例えばOPPは *in vitro* で細胞毒性に依存して遺伝毒性が発現することが示された結果、現在は使用が可能になっている。また、その結果細胞毒性に依存して発現する遺伝毒性は評価の対象外とすることが確定した。

閾値の有無を含めて遺伝毒性発現機構の不明確な物質の個々の機構解明を詳細に行ない、データを蓄積することにより、食品添加物を含め環境中の弱い遺伝毒性発がん物質をより正確に評価できるようになると考える。

E. 結論

遺伝毒性発がん物質の閾値の発現には、DN付加体形成後の修復による閾値、遺伝毒性物質の代謝・解毒により細胞内の濃度を低下させるために生ずる practical な閾値、DNAには直接反応せず、2次的にDNAに傷害を示す間接作用による閾値に分類できる。

しかし、環境中にアクリルアミドのように遺伝毒性および発がん性を示しながら、発がんが遺伝毒性に起因しているか否か不明なものがある。それらの作用機構を分子レベルで解明することが重要である。

F. 健康危機情報 特になし

G. 引用論文

Abramsson-Zetterberg L. The dose-response relationship at very low doses of acrylamide is linear in the flow cytometer-based mouse micronucleus assay. *Mutation Res*, 535 215-22, 2003.

Allen B, Zeiger E, Lawrence G, Friedman M, Shipp A. Dose-response modeling of *in vivo* genotoxicity data for use in risk assessment: some approaches illustrated by an analysis of acrylamide. *Reg Toxicol Pharmacol.* 41, 6-27, 2005.

Besaratinia A, Pfeifer GP. DNA adduction and mutagenic properties of acrylamide. *Mutat Res* 580, 31-40, 2005.

Besaratinia A, Pfeifer GP. A review of mechanisms of acrylamide carcinogenicity. *Carcinogenesis*, 2007.

BfR (Federal Institute for Risk Assessment)
(2006) Assessment of the carcinogenicity of formaldehyde Opinion of BfR No. 023/2006 March 30, 2006.
http://www.bfr.bund.de/cm/238/assessment_of_the_carcinogenicity_of_formaldehyde.

Bogdanffy MS, Sarangapani R, Plowchalk DR, Jarabek AM, Andersen ME. A biologically-based risk assessment for vinyl acetate-induced cancer and noncancer toxicity. *Toxicol Sci.* 51, 19-35, 1999.

Bolt HM. Genotoxicity-threshold or not? Introduction of cases of industrial chemicals.

- Toxicol Lett. 140-141, 43-51, 2003.
- Bolt, HM, Foth H, Hengster JG, Degen GH. Carcinogenicity categorization of chemicals—new aspects to be considered in a European perspective. Toxicol Lett 151, 29-41, 2004.
- Braut D, Renault D, Tombolan F, Thybaud V. Kinetics of induction of DNA damage and lacZ gene mutations in stomach mucosa of mice treated with α -propiolactone and *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, using single cell gel electrophoresis and Muta Mouse models. Environ Mol Mutagen. 34, 182-9, 1999.
- Crosby RM, Richardson KK, Craft TR, Benforado KB, Liber HL, Skopek TR. Environ Mol Mutagen, 12, 155-66, 1988.
- Day RS III, Ziolkowski CHJ, Scudiero DA, Meyer SA, Lubiniecki AA, Girardi AJ, Galloway SM, Bynum GD. Defective repair of alkylated DNA by human tumour and S40 transformed human cell strains Nature 288, 724-7, 1980.
- Doerge DR, Gamboa da Costa G, McDaniel LP, Churchwell MI, Twaddle NC, Beland F. DNA adducts derived from administration of acrylamide and glycidamide to mice and rats. Mutat Res, 580, 131-141, 2005.
- Hengstler JG, Bogdanffy MS, Bolt MH, Oesch F. Challenging dogma: Thresholds for genotoxic carcinogens? The case of vinyl acetate. Ann Re Toxicol 43, 485-520, 2003.
- Ma TH, Harris MM, Review of the genotoxicity of formaldehyde. Mutat Res. 196, 37-59, 1988.
- Maher VM, Dorney DJ, Mendrala AL, Konze-thomas B, McCormick J. DNA excision-repair processes in human cells can eliminate the cytotoxic and mutagenic consequences of ultraviolet irradiation. Mutat Res, 62 311-33, 1979.
- Manjanatha MG, Aidoo A, Shelton SD, Bishop ME, McDaniel LP, Lyn-Cook LE, Doerge DR. Genotoxicity of acrylamide and its metabolite glycidamide administered in drinking water to male and female Big Blue mice. Environ Mol Mutagen 47, 6-17, 2006
- Merk O, Speit G. Detection of crosslinks with comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. Environ Mol Mutagen 33 167-72, 1999.
- Parry JM, Fowler P, Quick E, Parry EM. Investigation into the biological relevance of in vitro clastogenic and aneuploidogenic activity. Cytogenet Genome Res 104, 283-8, 2004.
- Schmid O, Speit G. Genotoxic effects induced by formaldehyde in human blood and implications for the interpretation of biomonitoring studies, Mutagenesis, 22, 69-74, 2007.
- Sofuni T, Nohmi T, Ohta T, Hayashi M. Genotoxicity: Is a threshold concept applicable to evaluate the mutagenic activity of DNA-targeting substance? Environ Mutagen Res. 61-73, 2005.
- Speit G and Merk O. Evaluation of mutagenic

effects of formaldehyde in vitro: detection of crosslinks and mutations in mouse lymphoma cells, *Mutagenesis*, 17, 183-7, 2002.

Temcharoen P, Thilly WG. Toxic and mutagenic effects of formaldehyde in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res.* 119, 89-93, 1983

Zhong W. *Mutation Res.*
Formaldehyde-induced DNA adducts as biomarker of *in vitro* human nasal epithelial cell exposure to formaldehyde. 563, 13-24, 2004.

H. 研究発表

1. 論文発表

Ishikawa, S, Sasaki Y, Kawaguchi S, Mochizuki M, Nagao M. Characterization of genotoxicity of Kojic acid by mutagenicity in *Salmonella* and micronucleus induction in rodent liver. *Genes Environ*, 28, 31-37, 2006.

Fukuda H, Tsuchiya N, Hara-Fujita K, Takagi S, Nagao M, Nakagama H. Induction of abnormal nuclear shapes in two distinct modes by overexpression of serine/threonine protein phosphatase 5 in HeLa cells. *J Cell Biochem.* 2006 Dec 14

2. 国際会議発表

Nagao M, Do we have enough data to demonstrate the presence of threshold in mutagenicity induced by genotoxic carcinogens? International Symposium-Threshold of Carcinogenicity and Genotoxicity, March 15-16, 2006, International Conference Center Kobe.

H. 知的所有権の取得状況

特になし

平成18年度 厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
分担研究報告書

研究課題名:食品添加物等における遺伝毒性評価のための戦略構築に関する研究

分担研究課題名: 食品中DNA損傷性物質によるDNA付加体解析法の開発

分担研究者: 松田知成 京都大学地球環境学堂 助教授

研究要旨

抗酸化剤などの食品添加物による遺伝毒性削減効果を評価する手法を開発するため、食品中の代表的な遺伝毒性物質である過酸化脂質由来のアルデヒド、グリオキサール、アクロレイン、クロトンアルデヒド、および *trans*-4-Hydroxy 2-nonenal (HNE)が生成するDNA付加体に着目しその定量法を開発した。アクロレイン由来の2種類の付加体、8-OH-Acro-dG および 6-OH-Acro-dG、クロトンアルデヒド由来の付加体 CdG、HNE が生成するDNA付加体 ϵ dA、グリオキサールが生成する付加体 Glyoxal-dG の標準品とその安定同位体を合成し、LC/MS/MSを用いた同位体希釈法による、5成分一斉分析系を確立した。いずれの付加体も感度よく検出することができ、今後、食品添加物による遺伝毒性削減効果を実用的なレベルで検証できると思われる。

キーワード: LC/MS/MS、DNA付加体、アクロレイン、クロトンアルデヒド、グリオキサール

A. 研究目的

食品中には様々な遺伝毒性物質が存在している。食品添加物によりその毒性を軽減することができれば非常に意義深い。そこで、食品添加物による遺伝毒性削減効果を評価する手法が重要になってくる。食品中の遺伝毒性物質のうち、過酸化脂質が特に重要である。そこで本研究では脂質の酸化によって生じる代表的なアルデヒド、グリオキサール、アクロレイン、クロトンアルデヒド、および *trans*-4-Hydroxy 2-nonenal (HNE)が生成するDNA付加体に着目しその定量法を開発した。

B. 研究方法

(1) 付加体標準品の合成

アクロレインとデオキシグアノシン(dG)を

反応させ、2種類の付加体、

8-OH-1, N^2 -propano-2'-deoxyguanosine (8-OH-Acro-dG)および

6-OH-1, N^2 -propano-2'-deoxyguanosine

(6-OH-Acro-dG)を得た。また、クロトンアルデヒドとdGを反応させ、

α -Me- γ -OH-1, N^2 -propano-2'-

deoxyguanosine (CdG)を得た。HNEが生成するDNA付加体、1, N^6 -etheno-deoxyadenosine

(ϵ dA)は、2-クロロアセトアルデヒドとデオキシアデノシン(dA)を反応させて作成した。グリ

オキサールが生成するDNA付加体、

3-(2'-deoxy- β -D-erythro-

pentofuranosyl)-5,6,7-trihydro-6,7-dihydroxyimidazo-[1,2- α]purine-9-one (Glyoxal-dG)は、

グリオキサールとdGを反応させて作成した。ま

た、dA および dG の代わりに安定同位体である [$^{15}\text{N}_5$]dA、[$^{15}\text{N}_5$]dG を用いて同様の反応を行い、それぞれの安定同位体を作成し、これを質量分析における内部標準とした。

(2) DNA の消化方法

子牛胸腺 DNA はシグマより購入した。DNA 試料 20 μg に一定量の内部標準を加え、マイクロコッカスヌクレアーゼとスプリーンホスホジエステラーゼで 3'-モノヌクレオチド体にし、アルカリフォスファターゼでヌクレオシドとした。反応液にメタノールを加え、酵素や塩を沈殿させ、上澄みを乾燥後水に溶解し、サンプルとした。

(3) 質量分析による定量

Waters-Micromass 社製 Quatro UltimaTM Pt 四重極タンデム質量分析器で分析した。測定は ESI ポジティブモードで、MRM モードで行った。親イオンと娘イオンの m/z の設定は以下の通りである。

Glyoxal-dG, 326.3 \rightarrow 210.3; [$^{15}\text{N}_5$] Glyoxal-dG, 331.3 \rightarrow 215.3; Acro-dGs, 324.3 \rightarrow 208.3; [$^{15}\text{N}_5$] Acro-dGs, 329.3 \rightarrow 213.3; CdG, 338.0 \rightarrow 222.0; [$^{15}\text{N}_5$] CdG, 343.0 \rightarrow 227.0; ϵ dA, 275.9 \rightarrow 159.9; [$^{15}\text{N}_5$] ϵ dA, 280.9 \rightarrow 164.9

(倫理面への配慮)

今回の実験では特に必要はない。

C. 研究結果

上記 DNA 付加体の混合液の希釈列を作り、250fg から 50pg を LC/MS/MS に打ち込んで分析を行った。それぞれの希釈列には一定量の安定同位体を加え内部標準とした。検量線の R^2 値はいずれも 0.999 以上であった。また、いずれの付加体においても 250fg でピークが検出された。これは、10 μg の DNA を使った場合、 10^8 塩基当たり 2-3 付加体が検出できる感度であった。

子牛胸腺 DNA にグリオキサール、アクロレイン、およびクロトンアルデヒドを 0.1%(v/v) になるように加え、1 時間反応させ付加体の量を測定した。それぞれ 10^8 塩基当たり、3300 (Glyoxal-dG)、680 (8-OH-Acro-dG)、50 (6-OH-Acro-dG)、830 (CdG) 個の付加体が検出された。これより、グリオキサールの付加体形成能が非常に高いこと、また、アクロレインと DNA の反応物は 8-OH-Acro-dG が主要なものであることがわかった。

D. 考 察

今回調べた付加体のうち、4 種類はプロパノ付加体、1 種類はエセノ付加体であったが、いずれも LC/MS/MS と相性がよく、高感度で測定することができた。今回開発した系を用いて、抗酸化剤などの食品添加物による遺伝毒性防御効果を評価できるようになるだろう。

E. 結 論

脂質過酸化によって生じる DNA 付加体 5 種類を LC/MS/MS を用いて同時定量する系を開発した。10 μg の DNA を使った場合、 10^8 塩基に 2-3 付加体が検出できる感度があり、実際の生体サンプルの測定も可能だと思われる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Misaki, K.; Matsui, S.; Matsuda, T.: Metabolic Enzyme Induction by HepG2 Cells Exposed to Oxygenated and Non-oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Chem. Res. Toxicol.*, 20, 277-283, 2007

- (2) 乙部史子、周佩欣、松井三郎、小田美光、
松田知成「HPLC-バイオアッセイを用いた下水処理排水中の DNA 損傷性および AhR リガンド活性の解析」*環境工学研究論文集*、第 43 巻、113-118, 2006
- (3) P.H. Chou, S. Matsui, K. Misaki, T. Matsuda: Isolation and Identification of Xenobiotic Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands in Dyeing Wastewater, *Environ. Sci. Technol.*, 41, 652-657, 2007
- (4) T. Matsuda, H. Yabushita, R.A. Kanaly, S. Shibutani, and A. Yokoyama: Increased DNA Damage in ALDH2-Deficient Alcoholics, *Chem. Res. Toxicol.*, 19 (10), 1374-1378, 2006
- (5) S. Y. Kim, N. Suzuki, Y. R. S. Laxmi, A. Umemoto, T. Matsuda, and S. Shibutani: Antiestrogens and the Formation of DNA Damage in Rats: A Comparison, *Chem. Res. Toxicol.*, 19, 852-858, 2006
- (6) P.H. Chou, S. Matsui, T. Matsuda: Detection and identification of dyes showing AhR-binding affinity in treated sewage effluents, *Wat.Sci.Tech.*,53(11), 35-42, 2006
- (7) RA. Kanaly, T. Hanaoka, H. Sugimura, H. Toda, S. Matsui, T. Matsuda: Development of the adductome approach to detect DNA damage in humans, *Antioxid Redox Signal.*,8(5-6), 993-1001, 2006

G. 知的所有権の取得状況

特になし

平成 18 年度 厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
分担研究報告書

研究課題名:食品添加物等における遺伝毒性評価のための戦略構築に関する研究

分担研究課題名:動物個体を用いた遺伝毒性研究

分担研究者: 能美健彦 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部第二室 室長

研究要旨

個体において遺伝毒性を検出する *gpt delta* トランスジェニックラット(Sprague Dawley 系)に臭素酸カリウムを投与し、発がん標的臓器である腎臓と非標的臓器である肝臓の変異を解析した。臭素酸カリウムの投与により、腎臓の *gpt* 点突然変異頻度は約 2 倍、Sp_i欠失変異頻度は約 4 倍増加した。変異のうちわけを調べると、点突然変異としては G:C→A:T 変異、欠失変異としては 1 塩基欠失と 1kb 以上の大きな欠失が増大していた。非標的臓器である肝臓では、点突然変異、欠失変異ともに変異頻度の上昇は認められなかった。これらの結果は (1) 発がん物質の遺伝毒性を検索する際には、発がんの標的臓器において遺伝毒性を調べることが重要であること (2) 酸化ストレス発がんにおいては G:C→A:T 変異や欠失変異が重要な役割をはたすこと (3) 発がんの標的臓器において遺伝毒性を検出する *gpt delta* トランスジェニックラットが有用であることを示唆している。

キーワード: 酸化ストレス発がん、発がん標的臓器、*gpt delta* トランスジェニックラット、欠失変異

A. 研究目的

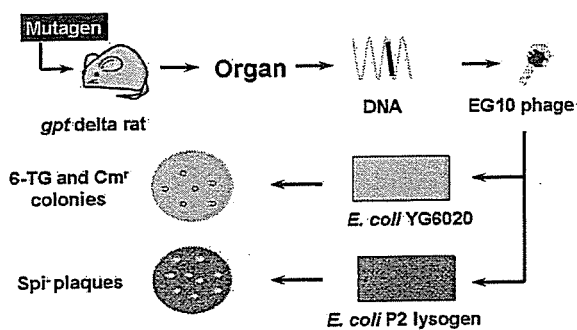
ヒトは 1 日 1 細胞当たり 10^{12} 個の酸素分子を消費すると言われており、生体に取り込まれた酸素の大部分は水にまで還元され、その過程で ATP の生産に利用される。だが約 1% の酸素はスーパーオキシド、過酸化水素、水酸化ラジカルなど活性酸素種(ROS)に転換する。ROS は反応性が高く、DNA、蛋白質、細胞膜などの生体高分子を損傷し、発がんをはじめとしたさまざまな疾病を誘発する。また ROS は通常の酸素代謝以外に、細胞が放射線や化学物質に曝露されることによっても生成する。このため生体には ROS を不活化する酵素(カタラーゼやスーパー不均化酵素)や、ROS と反

応することにより生体高分子の損傷を抑止する分子(グルタチオン)が存在する。また DNA 上に酸化損傷が起きても、その大部分は DNA 修復酵素(8-ヒドロキシグアニン(8-OH-G) DNA グリコシラーゼなど)により除去される。さらに DNA 配列の変化が起きた場合には、配列変化が固定されて突然変異に至るのを防ぐ仕組み(8-OH-G:アデニン DNA グリコシラーゼやミスマッチ修復系)が生体内には備わっている。したがって酸化ストレスを誘発する遺伝毒性発がん物質については、メカニズムから考えて、その発がんや遺伝毒性作用に閾値が存在すると予想される。だが個体(in vivo)において閾値の存在や機構を明らかにするためには、

適切なモデル動物の構築が必要である。

個体において遺伝毒性を検出する試みは、 λ *lacI* 遺伝子を導入した Big Blue マウスやラットを用いて行われてきた。だが *lacI* 遺伝子は点突然変異(塩基置換や小さな欠失や挿入)を検出することはできるが、1 kb 以上の大きな欠失変異や染色体転座などを検出するには適していない。我々はこれまでに、個体において点突然変異と欠失変異を検出する新規な *gpt delta* トランスジェニックラット(Sprague Dawley 系)を樹立し、そのバリデーションを進めてきた。このラットにはトランスジーンとして 4 番染色体に数コピーの λ EG10 DNA が挿入されている。 λ EG10 には、欠失変異を検出するためのレポーターである *red/gam* 遺伝子と、点突然変異を検出するためのレポーターである *gpt* 遺伝子が組み込まれている。したがって異なったレポーターを用いることにより、欠失変異と点突然変異を別個に検出することができる。

本研究では、*gpt delta* トランスジェニックラットに臭素酸カリウムを飲水投与し、その発がん標的臓器(腎臓)と非標的臓器(肝臓)における遺伝毒性を検討した。



第1図 *gpt delta* トランスジェニックラットを用いた遺伝毒性試験法の概要

B. 研究方法

8) 臭素酸カリウムの投与とトランスジーンの回収

5 週齢の雄 *gpt delta* トランスジェニックラッ

ト(各群 10 匹)に臭素酸カリウムを飲水にて 500ppm を 12 週間連続投与した。腎臓と肝臓からゲノム DNA を採取し Transpack (Stratagene)を用いて λ ファージの *in vitro* パッケージング反応を行い、ゲノム DNA から λ EG10DNA をファージ粒子として回収した。

9) *gpt* 点突然変異の検出と解析

回収したファージ粒子を大腸菌 YG6020 に感染させ 6-チオグアニン(6-TG)とクロラムフェニコール(Cm)を含む培地上で生育するコロニーを単離した。単離したコロニーについては、再度、6-TG と Cm を含むプレートにストリークして生育することを確認した。またファージ粒子の懸濁液を適宜希釈した後に YG6020 株に感染させ、Cm のみを含む培地上で生育するコロニー数を計測した。Cm プレートで生育したコロニー数に希釈倍率を掛けて回収した総ファージ数(あるいは回収した総トランスジーン数)を求めた。6-TG と Cm に耐性となったコロニー数を総ファージ数で除して *gpt* 変異頻度(MF)を算出した。6-TG と Cm に耐性となったコロニーの *gpt* 遺伝子配列を決定して変異部位を同定した。

3) *Spi* 欠失変異の検出と解析

ファージは P2 lysogen (大腸菌 XL-1 Blue MRA(P2) 株)に感染させ、*Spi* プラークの候補を検出した。*Spi* プラークの候補については、さらに他の P2 溶原菌(大腸菌 WL95 株)に感染させ、*red/gam* 遺伝子機能が不活化した真の *Spi* プラークを検出した。またパッケージング反応後の懸濁液を、適宜希釈した後に P2 ファージが溶原化していない大腸菌 XL-1 Blue MRA 株に感染させて、総プラーク数を算出した。真の *Spi* プラーク数を回収した総プラーク数で除して *Spi* MF を算出した。*Spi* 変異体については、PCR 法を用いて 1 kb 以上の大きな欠失とそれ以下の小さな欠失に分類し、さらにシーケンス解析を組み合わせることで変異体の欠

失部位を同定した。

4) 統計的手法

平均値と標準偏差を求め、統計的な有意差は Student's *t*-test により評価した。

(倫理面への配慮)

全ての実験は国立医薬品食品衛生研究所の倫理規定に準拠して行った。

C. 研究結果

1) 臭素酸カリウム処理により誘発される点突然変異

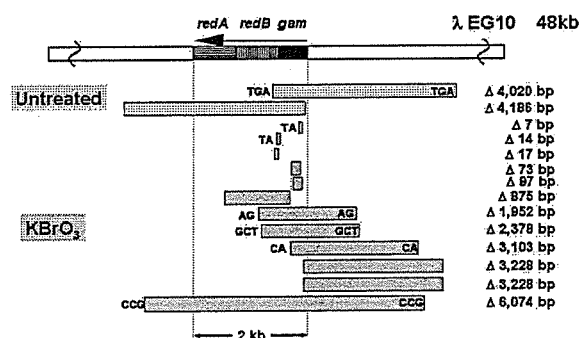
腎臓における *gpt* MF は、臭素酸カリウム投与群では $9.44 \pm 4.67 \times 10^{-6}$ であったのに対し、非投与群では $3.97 \pm 2.38 \times 10^{-6}$ であり、投与により MF は 2 倍以上増加した ($P=0.02$, $n=5$)。シーケンス解析により、投与により G:C→A:T 変異が 6 倍(投与群 3.21×10^{-6} に対して非投与群 0.54×10^{-6})、A:T→T:A 変異が 2.5 倍 (3.01×10^{-6} に対し 1.26×10^{-6}) 増加していることが明らかになった。G:C→T:A 変異は、投与により増加しなかった (0.6×10^{-6} に対し 1.08×10^{-6})。

肝臓における *gpt* MF は、臭素酸カリウム投与群では $7.33 \pm 6.36 \times 10^{-6}$ であったのに対し、非投与群では $8.78 \pm 6.98 \times 10^{-6}$ であり、有意な MF の増加は認められなかった ($P=0.4$, $n=5$)。

2) 臭素酸カリウムにより誘発される欠失変異

腎臓における *Spi* MF は、投与群では $5.39 \pm 2.49 \times 10^{-6}$ であったのに対し、無投与群が $1.30 \pm 0.45 \times 10^{-6}$ であり、投与により MF は約 4 倍増加した ($P=0.006$, $n=5$)。PCR 法とシーケンス解析により変異のうちわけを調べると、臭素酸カリウムの投与により 1 塩基欠失が 4~8 倍、2 塩基以上の大きさの欠失は 10 倍以上増加していた。1 塩基欠失の 2/3 は、A(アデニ

ン)あるいは T(チミン)が 2 から 6 塩基連続して並ぶ配列からの欠失であった。2 塩基以上の欠失変異体の半分は 1 kb 以上の大きな欠失であった(第 2 図)。1 kb 以上の大きな欠失の頻度を投与群と非投与群で比較すると、臭素酸カリウム投与により約 6 倍頻度が增大していた。大きな欠失変異体には、末端に短い相同配列を持つものと、持たないものが含まれていた。



第 2 図 臭素酸カリウム(KBrO₃)処理により誘発された欠失変異

肝臓における *Spi* MF は、臭素酸カリウム投与群では $1.70 \pm 1.54 \times 10^{-6}$ に対し、非投与群では $1.70 \pm 1.00 \times 10^{-6}$ であり、有意な MF の増加は認められなかった ($P=0.50$, $n=5$)。

D. 考察

臭素酸カリウムは、酸化剤として主にパンの製造過程で使われてきたが、ラットに対して腎細胞腫瘍を誘発することが明らかにされ、現在では食品添加物としては事実上使用されていない。臭素酸カリウムの発がん作用の興味深い点は、臓器特異性や種差が顕著であることである。臭素酸カリウムは、腎臓に対しては発がん作用を示すものの肝臓に対しては発がん性を示さない。また飲水投与するとラットの腎臓には効率よく腫瘍を発生するが、その作用はマウスやハムスターでは弱いか認められないほどである。また臭素酸カリウムは DNA に酸

化損傷を誘発することが明らかにされており、臭素酸カリウムを飲水投与するとラットの腎臓のDNA中に8-OH-Gが増大する。このため臭素酸カリウムは酸化DNA損傷を介してラット特異的に腎臓腫瘍を誘発するユニークなモデル化合物として注目されてきた。

今回の研究で、我々は臭素酸カリウム投与によりラットの腎臓に塩基置換変異と欠失変異が誘発されることを明らかにした。鋳型DNA鎖上の8-OH-Gは複製の際にC(シトシン)以外にA(アデニン)とも対合するため、DNA上に8-OH-Gが形成されるとG:C塩基対が2回の複製を経てA:T塩基対に変異する。臭素酸カリウムは腎臓に8-OH-Gを誘発することから、当初、8-OH-Gに由来するG:C→T:A変異が増大することを予想した。だがG:C→T:A変異は増大せず、G:C→A:T変異やA:T→T:A変異が増大していた。この結果は、鋳型鎖上の8-OH-GにAが対合しても、このAを除去する修復系(8-OH-G:アデニン DNA グリコシラーゼやミスマッチ修復系)が存在するため、*in vivo*においてはG:C→T:A変異が強く抑制されることを示している。5-ヒドロキシウラシルやウラシルグリコールは、シトシンの酸化と脱アミノ化により生じG:C→A:T変異を誘発することが知られている。酸化ストレスに基づく発がんにおいては、むしろ8-OH-G以外の酸化損傷が重要な役割をはたしているのかもしれない。

今回、*red/gam* 遺伝子をレポーターとするSpi⁺選択法を用いることにより、臭素酸カリウム投与によりさまざまな大きさの欠失変異が誘発されることを明らかにした。1 kb以上の大きな欠失は、変異体の連結部分に短い相同配列を持っており、DNAの二重鎖切断が起きた後にDNA鎖が一部消化され、その後連結することにより生じた変異体と考えられる。腎臓に酸化損傷を誘発する鉄ニトリロ酢酸を*gpt delta* マウスに投与した際にも同様な欠失変異が生じており、酸化ストレスは塩基置換だけでなく、DNA鎖の切断に基づく、より大きな染色体変

異(例えば欠失)を誘発しているものと考えられる。

臭素酸カリウムによる発がんには顕著な臓器特異性があるが、今回、発がんの標的臓器(腎臓)と非標的臓器(肝臓)で遺伝毒性を検索すると、腎臓では上記した塩基置換や欠失が検出されたが、肝臓では何らの変異も検出されなかった。この結果は、発がん物質の遺伝毒性を検索する際には、その標的臓器において変異を調べることを重要であることを示している。現行の遺伝毒性試験ガイドラインでは、マウスの骨髄(あるいは末梢血)を用いる小核試験や、ラットの肝臓を用いる不定期DNA合成(UDS)試験が推奨されているが、肝臓や骨髄以外が発がんの標的である場合には、*gpt delta* ラットなどを用いて標的臓器における遺伝毒性を精査することが重要と考える。臭素酸カリウムをはじめ発がん物質には種差を示すものが多いが、同一のレポーター遺伝子をマウス(C57BL/6J)とラット(S.D., Fischer)に導入した*gpt delta* 遺伝毒性試験は発がん物質の種差の解明にも有用である。

E. 結論

酸化ストレス発がんを誘発する臭素酸カリウムを*gpt delta* ラットに投与し、発がんの標的臓器(腎臓)と非標的臓器(肝臓)の変異を検索した。臭素酸カリウムは、腎臓ではG:C→A:T変異などの塩基置換変異やさまざまな大きさの欠失変異を誘発したが、肝臓に対しては遺伝毒性を示さなかった。これらの結果から(1)発がんの標的臓器において遺伝毒性を調べることの重要性(2)酸化ストレス発がんにおいてはG:C→A:T変異や欠失変異が重要な役割をはたすこと(3)*gpt delta* トランスジェニックラットの有用性が示された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) M. Ikeda, K. Masumura, Y. Sakamoto, B. Wang, M. Neno, K. Sakuma, I. Hayata and T. Nohmi, Combined genotoxic effects of radiation and a tobacco-specific nitrosamine in the lung of *gpt* delta transgenic mice, *Mutat. Res.*, 626, 15-25 (2007)
- 2) Y. Kuroiwa, T. Umemura, A. Nishikawa, K. Kanki, Y. Ishii, Y. Kodama, K. Masumura, T. Nohmi and M. Hirose, Lack of in vivo mutagenicity and oxidative DNA damage by flumequine in the livers of *gpt* delta mice, *Arch. Toxicol.*, 81, 63-69 (2007)
- 3) D.J. Tweats, D. Blakey, R.H. Heflich, A. Jacobs, S.D. Jacobsen, T. Morita, T. Nohmi, M.R. O'donovan, Y.F. Sasaki, T. Sofuni and R. Tice, Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory in vivo tests I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards, *Mutat. Res.*, 627, 78-91 (2007)
- 4) D.J. Tweats, D. Blakey, R.H. Heflich, A. Jacobs, S.D. Jacobsen, T. Morita, T. Nohmi, M.R. O'donovan, Y.F. Sasaki, T. Sofuni and R. Tice, Report of the IWGT working group on strategy/interpretation for regulatory in vivo tests II. Identification of in vivo-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test, *Mutat. Res.* 627, 92-105 (2007)
- 5) T. Umemura, K. Kanki, Y. Kuroiwa, Y. Ishii, K. Okano, T. Nohmi, A. Nishikawa and M. Hirose, In vivo mutagenicity and initiation following oxidative DNA lesion in the kidneys of rats given potassium bromate, *Cancer Sci.*, 97, 829-835 (2006)
- 6) A. Takeiri, M. Mishima, K. Tanaka, A. Shioda, A. Harada, K. Watanabe, K. Masumura, T. Nohmi, A newly established GDL1 cell line from *gpt* delta mice well reflects the in vivo mutation spectra induced by mitomycin C, *Mutat. Res.*, 609, 102-115 (2006)
- 7) L. Jiang, Y. Zhong, S. Akatsuka, Y. Liu, K.K. Dutta, W. Lee, J. Onuki, K. Masumura, T. Nohmi and S. Toyokuni, Deletion and single nucleotide substitution at G:C in the kidney of *gpt* delta transgenic mice after ferric nitrilotriacetate treatment, *Cancer Sci.*, 97, 1159-1167 (2006)
- 8) M. Ikeda, K. Masumura, K. Matsui, H. Kohno, K. Sakuma, T. Tanaka and T. Nohmi, Chemopreventive effects of nobiletin against genotoxicity induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in the lung of *gpt* delta transgenic mice, *Genes and Environ.* 28, 84-91 (2006)
- 9) A.H. Hashimoto, K. Amanuma, K. Hiyoshi, H. Takano, K. Masumura, T. Nohmi and Y. Aoki, in vivo mutagenesis in the lungs of *gpt*-delta transgenic mice treated intratracheally with 1,6-dinitropyrene, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47, 277-283 (2006)
- 10) A. Nishikawa, K. Sai, K. Okazaki, H.Y. Son, K. Kanki, M. Nakajima, N. Kinoshita, T. Nohmi, J.E. Trosko, T. Inoue and M. Hirose, MX, a by-product of water chlorination, lacks in vivo genotoxicity in *gpt* delta mice but inhibits gap junctional intercellular communication in rat WB cells, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47, 48-55