

200636048A

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

既存添加物の発がん性等に関する安全性評価研究

平成 18 年度 総括研究報告書

主任研究者 神谷 研二 広島大学原爆放射線医科学研究所

平成 19 年（2007）4 月

目 次

I. 総括研究報告

既存添加物の発がん性等に関する安全性評価研究…………… 1

神谷研二

II. 分担研究報告

モデル動物の開発とばい煎ダイズ抽出物の発がん性等の検索…………… 1

神谷研二

既存添加物の発がん性等に関する安全性評価研究
-モデル動物の開発とばい煎ダイズ抽出物の発がん性等の検索-

主任研究者 神谷研二 広島大学原爆放射線医科学研究所 教授

研究要旨

既存食品添加物は、食品衛生法の改正時に経過措置としてその使用が認められているもので、速やかな安全性の評価が必要である。本研究では、ばい煎ダイズ抽出物のヒトでの生涯摂取を想定した安全性を動物実験により評価する。本検体は、大豆イソフラボンを含み、多様で微弱な生理活性があるためその安全性の評価は、従来の動物実験では難しい。一方、既存添加物の安全性を評価するには多くの検体の発がん性試験を実施する必要があるが、長期発がん性試験を多くの検体で実施する事は時間的にも困難な問題があり現実的でない。そこで、本研究では、最近著しく進歩した自然突然変異を誘発する機構の研究成果を応用して、微量の発がん性を短時間に高感度で検定できるマウス発がんモデルの開発を併せて行う。突然変異を誘発する「損傷乗り越え」DNA ポリメラーゼ *Rev1* 遺伝子を導入した *Rev1* トランスジェニックマウス (*Rev1* マウス) から *Rev1* ホモマウスを樹立した。このマウスは、化学物質投与により短い潜伏期で多数の小腸腫瘍が誘発され、発がん高感受性マウスとなる可能性が示唆された。一方、検体である既存食品添加物の入手が当初の予想に反し困難であったため、実験の遅れを余儀なくされた。

A. 研究目的

既存食品添加物は、平成7年5月の食品衛生法の改正により、天然添加物に対する経過措置として、使用が認められている。法改正時の国会附帯決議で、既存添加物の速やかな安全性の見直しを行い、有害である場合には、使用禁止等の必要な措置を講じるとされた。平成8年度の厚生科学研究等を通じ、既存添加物全489品目のうち109品目については、その基本的安全性を評価するために、新たな反復投与毒性試験などの実施による安全性の検討が必要であるとされた。これを受けて、動物実験による科学的安全性データに欠ける既存添加物うちから、毎年数品目についてラットによる90日間反復投

与毒性試験、及び十数品目について変異原性試験が実施されて来た。さらに、これら両試験の終了した既存添加物の中から長期発がん性試験が実施されている。

本研究では、ばい煎ダイズ抽出物のヒトでの生涯摂取を想定した安全性を動物実験により評価する。ばい煎ダイズ抽出物は、大豆イソフラボンを含み、多様で微弱な生理活性があるためその安全性の評価は従来の動物実験では難しい。また、この検体は、エイムス試験では陰性であるが、哺乳類培養細胞での小核試験は陽性である。この様に、多くの既存添加物の遺伝毒性は明確でないことが多く、その発がん性や遺伝毒性を効率良く検定するためには、高感度な哺乳類の実験モデ

ルが必要である。一方、既存添加物の安全性を検定するにはより多くの検体の発がん性試験を実施する必要があるが、長期発がん性試験には最低 3 年間の期間が必要である。そのため、多くの検体の発がん性試験を実施する事は時間的にも困難な問題があり現実的でない。そこで、検体の発がん性等を効率良くスクリーニングできる哺乳類の動物モデルの開発が求められている。以上を踏まえ、本研究では、最近著しく進歩した自然突然変異を誘発する機構の研究成果を応用して、微量の発がん性を短時間に高感度で検定できるマウス発がんモデルの開発を行う。次いで、本研究で開発する高感度なマウス発がんモデルを用いてばい煎ダイズ抽出物の発がん性等を検索する。

B. 研究方法

本研究では、既存添加物の発がん性や遺伝毒性等を高感度に検定できる遺伝子操作マウス (*Rev1* トランスジェニックマウス等) を開発する。開発したマウスを用いてばい煎ダイズ抽出物に対する発がん性や遺伝毒性を検索し、安全性を評価する。

1. 発がん性や突然変異誘発能を高感度に検定できるモデルマウスの開発

エイムス試験は、自然突然変異を誘発する遺伝子群の機能亢進により細菌の突然変異率を亢進させた測定系である。この原理に基づき自然突然変異を誘発する *Rev1* 遺伝子等の機能に注目して、*Rev1* トランスジェニックマウス等の発がん性等を高感度に検出できるマウスモデルの開発を行う。

1) *Rev1* トランスジェニックマウス

(*Rev1* マウス) の樹立

Rev1 マウスは、共同研究により作製したものをを用いた。*Rev1* マウスの具体的な作製法は、次の通りである。プロモーターとして約 2kb の MT1(metallothionein1 enhancer/promoter)を用い、その下流に 3750bp の *Rev1* cDNA および SV40 由来の splicing+polyA signal を付加したものを Injection fragment とした。同様に胸腺で遺伝子発現を誘導できる lck promoter を組み込んだベクターを用いた Injection fragment を作製した。マウス系統は C57BL/6 マウスを使用し、マウス受精卵前核に injection fragment を注入し、偽妊娠させた recipient マウスの卵管に移植し仔マウスを得た。ファウンダーマウスの同定は tail DNA のサザンブロットにより行った。これらのファウンダーマウスを C57BL/6 と交配してラインを確立し、PCR によりトランスジェン発現の確認を行い、以下の実験に用いた。

2) 導入した *Rev1* 遺伝子を両アレルに持つ *Rev1* ホモマウスの樹立

上記で得られた *Rev1* マウス同士を交配し、仔マウス (F1 世代) を得た。この仔マウスを野生型 C57BL/6 マウスと交配し、F2 世代の仔マウスを得た。F2 世代の仔マウスのトランスジェンを検査し、生まれた全ての F2 世代の仔マウスにトランスジェンが確認できた場合に、その親マウスを「導入した *Rev1* 遺伝子」を両アレルに持つ *Rev1* ホモマウスとした。

3) *Rev1* ホモマウスの化学物質に対する発がん感受性の検討

樹立した *Rev1* ホモマウスを用いて、化学物質投与による発がん感受性を検討した。マウスに 25mM ZnSO_4 含有飲水を摂取させ *Rev1* の発現誘導を行った。その後、化学物質を投与し長期観察により腫瘍の発生を観察した。小腸腫瘍の解析は、マウスを解剖後、小腸を 10%ホルムアルデヒドで固定後、アルカリフوسفターゼ染色を行い、実体顕微鏡下で腫瘍数を測定した。

2. ばい煎ダイズ抽出物に対する発がん性や遺伝毒性の検索

変異原に対し発がん高感受性のマウスを樹立し、ばい煎ダイズ抽出物に対する発がん性や遺伝毒性の検索を開始する。試験では、一般状態の観察（毎日）、体重測定（週 1 回）、摂餌量測定（週 1 回）を投与期間中に実施する。

ばい煎ダイズ抽出物の発がん性試験では、動物実験の期間を 12 ヶ月以内として剖検を実施する。剖検時の検査項目として血液学的検査（赤血球数、白血球など 10 数項目）、血液生化学的検査（GOT、GPT など 20 数項目）、臓器重量測定（肝臓、腎臓など 10 項目近く）、及び組織学的検査を含む病理学的検査（全臓器）を実施する。全臓器の肉眼的観察により腫瘍病変の検索を行い、特に小腸とリンパ系の病変については、腫瘍病変の有無のみならず特殊染色（アルカリフوسفターゼ染色、免疫染色など）を行いより詳細な検索を行う。これらの検査を総合し、ばい煎ダイズ抽出物の安全性評価を行う。

倫理面への配慮

遺伝子組み換えマウスの使用、及び組換え DNA 実験は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づき、広島大学組換え DNA 実験安全管理規定に従って承認手続きを行い、機関承認実験として承認された。動物実験は広島大学動物実験指針を遵守して行う。動物からの採血や解剖においては麻酔下で行うなどの動物への苦痛を軽減するなどの配慮を行う。

C. 研究結果

1. 発がん性や突然変異誘発能を高感度に検索できるモデルマウスの開発

両側のアレルに *Rev1* 遺伝子を持っている *Rev1* ホモ(homo)マウスは、交配実験により確認した。*Rev1* ホモマウス群、*Rev1* ヘミ(hemi)マウス群、及び野生型マウス群に化学物質投与し腫瘍等の発生を観察した。化学物質投与後、約 100 日目より、*Rev1* ホモマウス群、*Rev1* ヘミマウス群、及び野生型マウス群ともに、小腸上部に腫瘍発生が認められた。剖検時におけるマウス一匹あたりの腫瘍数を検討したところ、*Rev1* ホモマウス群では、野生型マウス群および *Rev1* ヘミマウス群と比較し、腫瘍数が有意に増加していることが明らかになった (χ^2 検定: $P < 0.001$)。Autopsy をしたマウスの小腸をアルカリフوسفターゼで染色することで小腸腫瘍を明確化し腫瘍数を正確に数えた。図 1 に示のように横軸に生存日数、縦軸に小腸の腫瘍数をプロットしてみると *Rev1* の発現量が多い *Rev1* ホモマウス群では、野生型マウス群および *Rev1* ヘミマウス群に比

べ、短い潜伏期で明らかに腫瘍数の増加傾向があり、そのため、*Rev1* ホモマウス群では早期に死亡することが明らかになった。

一方、胸腺で *Rev1* が高発現するマウスを樹立するため *lck promoter* を用いたトランスジェニックラインの樹立を試みた。しかし、今年度は、胸腺で *Rev1* が強く発現するマウスは得られなかった。

2. ばい煎ダイズ抽出物に対する発がん性や遺伝毒性の検索

検体である既存食品添加物の入手が当初の予想に反し大変困難であった。このため、既存食品添加物を長期反復投与する動物実験による発がん性試験は開始出来なかった。実験の遅れを余儀なくされたが、最終的にばい煎ダイズ抽出物を長期反復投与するための準備を完了した。

D. 考察

既存添加物は、平成7年5月の食品衛生法の改正にともなう経過措置として、使用が認められているものである。既存添加物の多くは、それ自体もしくはその起源が、長年食用に供されていた等の経験はあるものの、安全性の面から見れば動物実験などによる毒性試験などの科学的な安全性データに欠けるものが少なくない。そこで、既存添加物の発がん性等を効率良くスクリーニングできる哺乳類の動物モデルの開発が求められている。本研究では、最近著しく進歩した自然突然変異を誘発する機構の研究成果を応用して、微量の発がん性を短時間に高感度で検定できるマウス発がんモデルの開発を行う。

近年の分子遺伝学的解析の結果、がんはがん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異に

より生じる遺伝子病であり、遺伝子の突然変異のうち、点突然変異が遺伝子変異の誘発に重要であることが明らかになった。この様な突然変異の誘発は、哺乳類においても細菌や酵母と同様に「損傷乗り越え DNA 合成」(translesion DNA 合成)をする特殊な DNA ポリメラーゼによって行われる事が明らかにされた。さらに、高発がん性の色素性乾皮症バリエーション(XPV)の原因遺伝子産物が「損傷乗り越え」DNA ポリメラーゼであるポリメラーゼ η である事が明らかにされ、「損傷乗り越え DNA 合成」とがん化との関係が世界中で注目されている。Y ファミリーDNA ポリメラーゼによる DNA 合成は校正修復の機能を持たず、また、DNA 塩基間の対合を無視する様式のものが多いため、必然的に誤りの多い DNA 合成となる。我々は、Y ファミリー DNA ポリメラーゼのひとつである *Rev1* に着目し、突然変異の発生機構を明らかにしてきた。*Rev1* は BRCT ドメイン、deoxycytidyl transferase 活性ドメイン、他の DNA ポリメラーゼとの結合能を有する結合ドメインの3つから構成され、酵母やマウス、ヒトなどで広く保存されている。

本研究では、*Rev1* が「誤りがちな DNA 合成」することで突然変異を誘発することに注目し、発がん性や突然変異誘発能を高感度に検索できるモデルマウスを開発を試みた。具体的には、エイムス試験の原理を用いたマウスモデルの開発であり、*Rev1* トランスジェニックマウス等の遺伝子操作マウスを用いて既存添加物の発がん性や遺伝毒性を高感度で検定できるモデルマウスの樹立である。

今年度は、*Rev1* トランスジェニックマウスから両側のアレルに *Rev1* 遺伝子を持っている *Rev1* ホモ(homo)マウスを樹立し、化学物質の投与による発がん感受性を検討した。その結果、*Rev1* ホモマウスでは、短い潜伏時間で多数の小腸腫瘍が誘発されることが明らかとなった。この事は、*Rev1* ホモマウスが、発がん高感受性マウスとして優れた特徴を持ったモデルマウスとなる可能性を示唆している。また、小腸上部におけるマウスあたりの腫瘍数は、*Rev1* のコピー数が多い *Rev1* ホモマウス群では、野生型マウス群や *Rev1* ヘミ(hemi)マウス群より増加していた。この事は、小腸の腫瘍発生に *Rev1* の gene dose effect が存在する可能性を示唆する。今後、*Rev1* の発現量と小腸腫瘍の発生の関連性についてさらに検討を進める予定である。

一方、胸腺リンパ球は、突然変異の解析(TCRの変異解析など)や発がん感受性(胸腺リンパ腫)を観察する上で最も優れた臓器である。そこで、胸腺で*Rev1*が高発現するトランスジェニックマウスの作製を共同研究で行った。しかし、胸腺での*Rev1*が高発現するマウスは得られなかった。トランスジーンがゲノム上サイレントの部位に挿入された可能性が考えられた。

本研究の検体であるばい煎ダイズ抽出物は、大豆の種子を脱脂し、ばい煎したものより熱時水で抽出し、蛋白質をエタノールで除去したもので、マルトールを主成分とする。大豆を原料とするため大豆イソフラボンを含み、多様な生理活性があり、その安全性の検索が必要である。この検体は、エイムス試験では陰性であ

るが、哺乳類培養細胞での小核試験は陽性である。また、ラットを用いた動物実験である13週間反復投与試験では、投与したばい煎ダイズ抽出物に起因した変化は認められていない。これと同様に、多くの既存食品添加物は、明確な遺伝毒性を示すものは少なく、それ故、検体の科学的根拠に基づく安全性評価が難しくなっている。特にばい煎ダイズ抽出物は、多様な生理活性を有する大豆イソフラボンを含むことから、生涯摂取した場合の人体影響については慎重に評価する必要があるが、現時点でこれに答える資料はない。この様な微弱な人体影響を検定するには、多数の動物を用いた動物実験に依らざるを得ないが、その作用が非常に微弱な場合は、現実的には実験不可能な数の動物数が必要になってくる。そこで、本研究では、この様な微弱な人体影響を高感度に検定できるマウスモデルの開発を試みている。本研究により既存添加物の安全性を高感度に検定できるモデルマウスが樹立でき、それを活用・利用すれば以下のことが可能となる。(1)多数の既存添加物の遺伝毒性や発がん性等に関する安全性を高感度で迅速に評価できるマウスモデルが開発できる。(2)ばい煎ダイズ抽出物を長期摂取した場合の発がん性を含む影響について科学的根拠に基づいた安全性の検索が可能となり、既存添加物の国際的レベルでの安全性評価が進む。(3)国民の既存添加物ひいては食に対する不安を解消するのに役立ち、安全な食料に対する国民の信頼性を高めることで豊かな食生活の確保と国民の健康・保険の増進に貢献できる。

本年度の研究では、検体である既存食品

添加物の入手が当初の予想に反し大変困難であったため、実験の遅れを余儀なくされた。しかし、平成 19 年度の実験に向けた基礎的な準備ができたので、これをバネとして研究を加速していきたい。

E. 結論

ばい煎ダイズ抽出物のヒトでの生涯摂取を想定した安全性を動物実験により評価することを目的に実験を実施した。本検体は、大豆イソフラボンを含み、多様で微弱な生理活性があるためその安全性の評価は、従来動物実験では難しい。そこで、本研究では、最近著しく進歩した自然突然変異を誘発する機構の研究成果を応用して、微量の発がん性を短時間に高感度で検定できるマウス発がんモデルの開発を併せて行う。突然変異を誘発する「損傷乗り越え」DNA ポリメラーゼ *Rev1* 遺伝子を導入した *Rev1* トランスジェニックマウス (*Rev1* マウス) から *Rev1* ホモマウスを樹立した。このマウスは、化学物質投与により短い潜伏期で多数の小腸腫瘍が誘発され、発がん高感受性マウスとなる可能性が示唆された。一方、検体である既存食品添加物の入手が当初の予想に反し困難であったため、実験の遅れを余儀なくされた。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案特許：なし
3. その他：なし

図1 *Rev1*ホモマウスの化学物質に対する発がん感受性の検討

