

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

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

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 能美 健彦

平成20 (2008)年3月

# 目 次

I. 研究報告		
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	----	1
能美健彦		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	37
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	39

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

主任研究者: 能美健彦 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部室長

## 研究要旨

バクテリアを用いた研究から、酸化的 DNA 損傷によって誘発される塩基置換変異は、DNA 修復機能により抑制され閾値が形成される可能性が示唆された。しかしヒト細胞においては、酸化的 DNA 損傷は塩基置換変異よりも欠失変異を誘発し、閾値が存在したとしても、バクテリアとは異なる機構に基づくことが示された。アルキル化剤による変異誘発に関し、DNA 修復が閾値形成に関与する場合としない場合があることがヒト細胞で報告されている。内因性アルデヒド類(アクロレイン、クロトンアルデヒド)が誘発する DNA 損傷について LC/MS/MS 法で分析し、アルデヒド類が、DNA の塩基以外の箇所(糖、リン酸)にも損傷を与えることを明らかにした。gpt delta トランスジェニックマウス由来の胚繊維芽細胞をクリソタイル(白石綿)に曝露すると、酸化 DNA 損傷を介して欠失変異が誘発された。遺伝毒性発がん物質の閾値は、曝露される細胞の種類、誘発される変異のタイプ、内因性 DNA 損傷の多寡により影響を受けることが示唆された。

キーワード: 遺伝毒性発がん物質、閾値、DNA 修復、酸化 DNA 損傷、内因性変異原、欠失変異

### 分担研究者

山田雅巳	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 主任研究官
本間正充	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
長尾美奈子	共立薬科大学客員教授
松田知成	京都大学地球環境学堂 准教授

クを有するものと考えられている。このため、残留農薬や食品添加物等に遺伝毒性と発がん性を有する物質が認められた場合には、原則的に ADI(一日摂取許容量)を設定することができない。また当該遺伝毒性発がん物質への曝露が不可避である場合には、ユニットリスクという考え方にに基づき、生涯の発がんリスクが推定される。

しかしヒトを含む生物には、さまざまな生体防御物質や防御機構が存在しており、遺伝毒性や遺伝毒性に基づく発がん作用を事実上無毒化し閾値を形成する可能性が予想される。発がん物質や活性酸素種の多くは、グルタチオンを初めとする生体防御物質、抗酸化物質によって不活化される。グルタチオンやグルク

### A. 研究目的

規制科学の分野では、一般に遺伝毒性物質には閾値がないと考えられており、DNA 損傷作用を有する発がん物質は、どのように低用量であってもヒトに対して一定の発がんリス

ロン酸との抱合を触媒するグルタチオン抱合酵素やグルクロン酸抱合酵素は主要な解毒酵素として知られている。さらに DNA が損傷を受けても、これを修復する DNA 修復系の存在や、損傷部位を乗り越えて複製を続けるトランスリジョン DNA 合成、また DNA 損傷を受けた細胞を死に至らしめて個体としての恒常性を保つアポトーシスも、遺伝毒性発がん物質の低用量域での作用を無毒化し、閾値形成に寄与している可能性が考えられる。

本研究では、微生物、ヒト細胞、機器分析の手法により、遺伝毒性発がん物質の閾値形成に寄与する要因を明らかにすることを目的としている。今年度は、酸化 DNA 損傷に対する修復能を欠損した微生物株を用い、その遺伝毒性物質に対する感受性を野生型株と比較し、低用量域における遺伝毒性作用の抑制に、どのような DNA 修復系が関与するかを検討した。またヒト細胞および遺伝毒性を検出する *gpt delta* トランスジェニックマウス由来の胚線維芽細胞を用い、酸化的 DNA 損傷がどのような変異を誘発するかを検討した。当該領域における文献を検索し、遺伝毒性物質の閾値に関する国際的動向を調査した。さらに内因性アルデヒド類による DNA 損傷を分析する手法を開発、遺伝毒性発がん物質の閾値形成機構に関する基盤的研究を推進した。

## B. 研究方法

### 1) バクテリアを用いた遺伝毒性閾値の研究

細菌を用いる復帰突然変異試験 (Ames 試験) に用いられる *Salmonella typhimurium* TA1535 株の 8-ヒドロキシグアニン (8-OH-G)DNA グリコシラーゼを欠損させた株 (YG3001) とエンドヌクレアーゼ III と VIII を欠損させた株 (YG3008) を用いて、臭素酸カリウム ( $\text{KBrO}_3$ ) と L-ペニシラミンの遺伝毒性を検索した (山田)。

### 2) 哺乳類細胞を用いた遺伝毒性閾値の研究

ヒト細胞 TK6 を用いて  $\text{KBrO}_3$  の遺伝毒性を検索した。また変異体を PCR 法により分子解析した (本間)。

### 3) 遺伝毒性閾値に関する国際動向の分析

文献検索によりアルキル化剤の遺伝毒性閾値に関する情報を収集した (長尾)。

### 4) 内因性アルデヒド類による DNA 損傷の分析

アルデヒド類 (アクロレイン、クロトンアルデヒド) と仔牛胸腺 DNA を反応させた後、MN/SPD 法と NucleaseP1 法でデオキシヌクレオシドに分解し LC/MS のフルスキャン分析を行った。アルデヒド暴露 DNA のみに特異的に見られるピークの内、用量-反応相関の見られるものについて、さらに daughter scan 測定を行い、MS/MS スペクトルを得た。ヒト献体臓器由来 DNA (大腸、肝臓、腎臓、皮膚、脾臓、肺) での分析を行ないアルデヒド由来新規および既知の DNA 損傷の検出を試みた (松田)。

### 5) *gpt delta* マウス由来の細胞を用いた遺伝毒性研究

妊娠 14 日目の *gpt delta* マウスから胎児を摘出し培養に供した (MEF 細胞の樹立)。クリソタイル (平均長  $7.8 \mu\text{m}$ 、平均半径  $0.2 \mu\text{m}$ ) を蒸留水に懸濁し、20 ゲージの注射針を用いて 6-8 回混ぜ合わせた。ウェル当たり  $10^5$  細胞を植え、クリソタイルについては血清の存在下で 24 時間、血清の不在下で 15 分、 $37^\circ\text{C}$  で培養した。処理後、MEF 細胞からゲノム DNA を採取し、in vitro パッケージング法によりトランスジーンを  $\lambda$  ファージとして回収し、Spi アッセイにより欠失変異を解析した (能美)。

(倫理面への配慮)

動物実験は当該研究所の倫理規定を遵守して行った。献体臓器 DNA の付加体分析につ

いては、献体提供機関においてインフォームド  
コンセントを得て、当該機関および京都大学  
倫理委員会の承認を得た。

### C. 研究結果

#### 1) バクテリアを用いた遺伝毒性閾値の研究

臭素酸カリウムは、親株(TA1535)では変異  
原性を示さなかったが、8-OH-G DNA グリコシ  
ラーゼを欠損した株(YG3001)では、復帰変異  
株の増加が見られ 2000  $\mu$ g/plate 以上で溶媒  
対照値の2倍を超える値を示した。L-ペニシラ  
ミンは、親株(TA1535)では変異原性を示さな  
かったが、酸化ピリミジン損傷の修復に関わる  
Endo III/VIII を欠損した株(YG3206)では対照  
値の2倍を超える復帰変異株数の増加が観察  
された(山田)。

#### 2) 哺乳類細胞を用いた遺伝毒性閾値の研究

KBrO<sub>3</sub> によって誘発された変異体 39 クロー  
ンの変異部位を解析した。その結果、90%のク  
ローンで TK 遺伝子の消失(LOH)が観察され  
た。LOH は染色体間の相同組換えによるもの、  
大きな欠失によるものに分類できるが、KBrO<sub>3</sub>  
はほとんど後者によるものであった(本間)。

#### 3) 遺伝毒性閾値に関する国際動向の分析

遺伝毒性物質の閾値に関する文献を調査  
し、アルキル化剤であっても閾値が観察される  
物質(MMS、EMS)と、閾値が観察されない物  
質(MNU、ENU)のあることを明らかにした。また  
遺伝毒性物質の閾値について検討する際  
には、数理モデルを用いることが有用であること  
を示した(長尾)。

#### 4) 内因性アルデヒドによる DNA 損傷の解析

アクロレイン暴露により特異的に見られたピ  
ークは、MN/SPD 法においては 33 個、  
NucleaseP1 法では 27 個認められた。そのうち  
3 個および 2 個がそれぞれ既知の塩基付加体  
であった。クロトンアルデヒド由来 DNA 付加体

は、MN/SPD 法においては 7 個中 5 個、  
NucleaseP1 法では 23 個中 2 個が文献報告の  
ある既知の付加体であった。

ヒト臓器由来 DNA 中からこれら新規および  
既知の DNA 損傷の検出を試みた結果、アク  
ロレインやクロトンアルデヒドが誘発するプロパノ  
デオキシグアノシンが多くのサンプルから検出  
された。一方、 $m/z$  404>160 で検出できるアク  
ロレイン由来新規 DNA 付加体は、ヒト肝臓・腎  
臓 DNA 中から検出された。また、 $m/z$  320>  
204 で検出できるクロトンアルデヒド由来新規  
DNA 付加体がヒト肺 DNA 中から検出された  
(松田)。

#### 5) 動物個体を用いた遺伝毒性研究

MEF 細胞における無処理群の Spi<sup>-</sup> mutant  
frequency (MF) は  $4.69 \pm 1.80 \times 10^{-6}$  であった。  
クリソタイルで処理すると 0.5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> と 1  $\mu$   
g/cm<sup>2</sup> では用量依存的に MF が増大し、1  $\mu$   
g/cm<sup>2</sup> では無処理群に比べて MF が 2.4 倍上  
昇した。無処理群およびクリソタイル 1  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>  
処理群から 93 個および 74 個の Spi<sup>-</sup> 変異体を  
採取し、その変異スペクトルを解析した。その  
結果、クリソタイル処理により 2 kb 以上の欠失  
変異体頻度が 5 倍以上増大していることが明  
らかになった。またカタラーゼをクリソタイル処  
理の際に共存させると、その Spi<sup>-</sup> MF は無処  
理群のレベルまで低下した。カタラーゼ単独  
処理では Spi<sup>-</sup> MF に影響を与えなかった(能  
美)。

### D. 考 察

化学物質の遺伝毒性に閾値が存在するかを  
明らかにするため、DNA 修復能を欠損したバ  
クテリアを用いて、その用量効果曲線を野生  
型株と比較した。その結果、DNA に酸化損傷  
を誘発する KBrO<sub>3</sub> の変異原性は酸化損傷グ  
アニンの修復に関与する 8-OH-G DNA グリコ  
シラーゼにより抑制され、L-ペニシラミンにつ  
いては、酸化ピリミジンの修復に関与する

Endo III/VIII により抑制されることが明らかになった。次年度は、機器分析により DNA 損傷を同定しその定量を行う予定である(山田)。

KBrO<sub>3</sub> はバクテリアには 8-OH-G の形成を介した塩基置換変異を誘発したが、ヒト TK6 細胞を用いた解析から、ヒト細胞においては塩基置換変異よりも、欠失変異を誘発することが明らかになった。KBrO<sub>3</sub> は生体内で DNA に 8-OH-G を生成するが、同時に 2 本鎖切断も引き起こすと考えられる。一般に DNA 中の 8-OH-G は OGG1(8-OH-G DNA glycosylase) による塩基除去修復機構によって修復される。この修復機構はエラーフリー型で突然変異をもたらさない。一方、DNA の 2 本鎖切断は非相同型接合によって修復され、これは遺伝子の欠失をもたらす。このことは DNA の酸化損傷がもたらす突然変異には閾値が存在するかもしれないが、閾値形成機構は変異のタイプによって異なることを示唆している。遺伝毒性の閾値論を論じる場合、その頻度だけでなく、どのようなタイプの遺伝的変異であるかを明らかにすることが重要である(本間)。

ある種のアルキル化剤による変異誘発には閾値が存在することは実験事実もかなり蓄積してきている。だが、どのような修飾特性を示す物質が閾値を示すのかについては、未だ解明されていない。また、in vivo での閾値発現についても研究結果が待たれる(長尾)。

フルスキャン分析で得られたピークの daughter scan 測定結果を見ると、塩基付加体に特徴的な 116 のニュートラルロスが見られたピークは少数で、多くのピークは塩基付加体以外の DNA 損傷であると推測された。また、*m/z* 404>160 で検出できるアクロレイン由来新規 DNA 付加体が、ヒト組織中で検出されたことにより、重要な DNA 損傷である可能性が高いことが示唆された(松田)。

アスベストがヒトに対して発がん性を示すことは明らかであるが、この発がん性がどのような機構によるのかは明らかではない。アスベスト

は不活性な鉱物であり、化学発がん物質のように DNA と反応して付加体を形成することは考えられない。しかし、本研究で示したように、アスベストに由来する酸化ラジカルが DNA を損傷し、これに基づく染色体異常や突然変異が発がんの基礎となっている可能性は大きい。本研究の結果は、酸化ラジカルのうち過酸化水素が遺伝毒性に関与している可能性を示唆している。過酸化水素は、DNA 塩基の修飾だけでなく、DNA の一本鎖切断、二本鎖切断も誘発する。どのような機構によりアスベストが酸化ラジカルを生ずるかは不明であるが、アスベスト表面に付着した金属の作用や、in vivo においては慢性炎症が酸化ラジカル発生の原因として考えられる(能美)。

## E. 結論

遺伝毒性の閾値形成には、DNA 修復の関与が考えられるが、誘発される変異のタイプや遺伝毒性物質の種類により閾値形成機構は異なることが示唆された。内因性遺伝毒性物質による DNA 損傷の解析は、低用量域での遺伝毒性のリスクを考える上で重要である。*gpt delta* トランスジェニックマウスおよびその MEF 細胞は、遺伝毒性物質の閾値形成機構を究明する際に有用である。

## 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) Hidaka, K., Yamada, M., Kamiya, H., Masutani, C., Harashima, H., Hanaoka, F., Nohmi, T., Specificity of mutations induced by incorporation of oxidized dNTPs into DNA by human DNA polymerase  $\eta$ . DNA Repair, 7, 497-506 (2008)

- 2) Nohmi, T., Yamada, M., Grúz, P., DNA Repair and DNA damage tolerance in archaeal bacteria: Extreme environments and genome integrity, *Archaea: New models for prokaryotic biology*, edited by P. Blum, Norwich, UK, Horizon Press, 147-169, 2008.
- 3) Honma, M., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Sakamoto, H., Hayashi, M., Non-homologous end-joining for repairing I-SceI-induced DNA double strand breaks in human cells. *DNA Repair*, 6, 781-188 (2007)
- 4) Luan, Y., Suzuki, T., Palanisamy, R., Takashima, Y., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Koizumi, T., Saito, M., Matsufuji, H., Yamagata, K., Yamaguchi, T., Hayashi, M., Honma, M., Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC>TA transversion in human cells. *Mutat. Res.*, 619, 113-123 (2007)
- 5) Misaki, K., Kawami, H., Tanaka, T., Handa, Y., Nakamura, M., Matsui, S., Matsuda, T., Aryl hydrocarbon receptor ligand activity of polycyclic aromatic ketones and polycyclic aromatic quinones. *Environ. Toxicol. Chem.*, 26, 1370-1379 (2007)
- 6) Matsuda, T., Matsumoto, A., Uchida, M., Kanaly, R., Misaki, K., Shibutani, S., Kawamoto, T., Kitagawa, K., Nakayama, K.I., Tomokuni, K., Ichiba, M., Increased formation of hepatic  $N^2$ -ethylidene-2'-deoxyguanosine DNA adducts in aldehyde dehydrogenase 2 knockout mice treated with ethanol. *Carcinogenesis*, 28, 2363-2366 (2007)
- 7) Kanaly, R.A., Matsui, S., Hanaoka, T., Matsuda, T., Application of the adductome approach to assess intertissue DNA damage variations in human lung and esophagus. *Mutat. Res.*, 625, 83-93 (2007)
- 8) Umemura, T., Kuroiwa, Y., Tasaki, M., Okamura, T., Ishii, Y., Kodama, Y., Nohmi, T., Mitsumori, K., Nishikawa, A., Hirose, M., Detection of oxidative DNA damage, cell proliferation and in vivo mutagenicity induced by dicyclanil, a non-genotoxic carcinogen, using *gpt* delta mice. *Mutat. Res.*, 633, 46-54 (2007)
- 9) Aoki, Y., Hashimoto, A.H., Akanuma, K., Matsumoto, M., Hiyoshi, K., Takano, H., Masumura, K., Itoh, K., Nohmi, T., Yamamoto, M., Enhanced spontaneous and benzo(a)pyrene-induced mutations in the lung of Nrf2-deficient *gpt* delta mice. *Cancer Res.*, 67, 5643-5648 (2007)
- 10) Takeiri, A., Mishima, M., Tanaka, K., Shioda, A., Harada, A., Masumura, K., Nohmi, T., Mutation spectra in cisplatin- and transplatin-treated GDL1 cells clarified the different mode of action of these compounds in mammalian cells. *Genes and Environ.*, 29, 89-99 (2007)
- 11) Xu, A., Smilenov, L.B., He, P., Masumura, K., Nohmi, T., Yu, Z., Hei, T.K., New insight into intrachromosomal deletions induced by chrysotile in *gpt* delta transgenic. *Environ. Health Perspective*. 115, 87-92 (2007)
- 12) Ikeda, M., Masumura, K., Sakamoto, Y., Wang, B., Neno, M., Sakuma, K., Hayata, I., Nohmi, T., Combined genotoxic effects of radiation and a tobacco-specific nitrosamine in the lung of *gpt* delta transgenic mice. *Mutat. Res.*,

## 2. 学会発表

- 1) 山田雅巳、松井恵子、能美健彦、酸化ピリミジン損傷を誘発する変異原を高感度に検出する新規なサルモネラ株、日本環境変異原学会第36回大会/アジア環境変異原学会第1回大会(2007.11)
- 2) 山田雅巳、日高勝彦、紙谷浩之、益谷央豪、原島秀吉、花岡文雄、能美健彦、ヒトDNAポリメラーゼ $\eta$ が酸化dNTPを取り込むことで誘発される突然変異の特異性について、第79回日本遺伝学会年会(2007.9)
- 3) Honma, M., DNA double strand breaks inducing genomic instability in human cells. 13<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research (2007.7)
- 4) Honma, M., A multi-endpoints in vitro genotoxicity test system consisting of Comet, micronuclei, and gene mutation assays. 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences (2007.8)
- 5) Honma, M., Takashima, Y., Yasui, M., Koyama, N., Koizumi, T., Sakuraba, M., Sakamoto, H., Sugimoto, K., Hayashi, M., Tracing Micronuclei by Fluorescent Live Cell Imaging Analysis. 37<sup>th</sup> European Environmental Mutagen Society (2007.9)
- 6) Honma, M., Genomic instability caused through breakage-fusion-bridge (BFB) cycle in human cells. The 8<sup>th</sup> International Symposium on Chromosomal Aberrations (2007.10)
- 7) 安井学、小山直己、高島良生、小泉朋子、櫻庭真弓、坂本浩子、杉本憲治、林真、本間正充、ライブセルイメージングを用いた $\gamma$ 線照射による小核形成と追跡 日本放射線影響学会第47回大会 (2007.11)
- 8) 本間正充、櫻庭真弓、林真、DNAマイクロアレイによる放射線損傷領域のゲノムマッピング 日本放射線影響学会第47回大会 (2007.11)
- 9) Koyama, N., Yasui, M., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Masuda, S., Kinae, N., Matsuda, T., Hayasi, M., Honma, M., Genotoxicity of acryamide expressed via metabolic activation in CYP over-expressing human cells. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- 10) Yasui, M., Suenaga, E., Koyama, N., Masutani, C., Hanaoka, F., Gruz, P., Shibutani, S., Nohmi, T., Hayashi, M., Honma, M., Translesion synthesis past 2'-deoxyinosine, a major nitric oxide-induced DNA adduct, by human DNA polymerase  $\eta$  and  $\kappa$ . 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- 11) Kimura, A., Sakamoto, H., Hayashi, M., Saigo, K., Tokado, H., Honma, M., Establishment of a robust in vitro Comet protocol using human lymphoblastoid TL6 cells. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- 12) Honma, M., Yasui, M., Koyama, N., Koizumi, T., Sakuraba, M., Sakamoto, H.,



- Takashima, Y., Sugimoto, K., Hayashi, M., Visualization of micronuclei by fluorescent cell imaging analysis. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- 13) Honma, M., Background issues initiating a revision of the current ICH genotoxicity guidance. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- 14) Nishimura, K., Totsuka, Y., Terasaki, M., Mukaisyo, K., Hattori, T., Matsuda, T., Sugimura, T., Wakabayashi, T., Analysis of DNA adducts derived from *N*-nitroso bile acid conjugates in rat duodenogastric reflux model. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- 15) Kanaly, R.A., Nagayoshi, H., Hanaoka, T., Matsuda, T., Utilization of the adductome approach to assess DNA damage in human liver tissue. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- 16) Takemura, H., Uchiyama, H., Morita, M., Sakakibara, H., Ohura, T., Nagayoshi, H., Matuda, T., Amagai, T., Kuruto, R., Shimoi, K., A selective inhibitor of CYP1B1, chrysoeriol. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- 17) Chou, P.-H., Nagayoshi, H., Matsui, S., Nakamura, M., Matsuda, T., AhR Activation and Metabolic Degradation of Quinoline DisperseDyes–Disperse Yellow 54 and Disperse Yellow 64. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- 18) Nishi, R., Kaneko, M., Matsuda, T., Matsui, S., The behavior of DNA-damaging agents and AhR ligands in petrochemical industrial wastewater treatment plant. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- 19) Nagayoshi, H., Matsuda, T., Matsui, S., The effect of CYP1A1 on AhR ligand activity using novel yeast reporter gene assay system. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- 20) Nagayoshi, H., Kanaly, R.A., Matsuda, T., Comparison of Cumulative DNA Damage in Human Organs by the Newly Developing Adductome Approach, 4<sup>th</sup> Joint Meeting of the Society for Free Radical Research Australia and Japan (2007, 12)
- 21) Nohmi, T., Asbestos and other environmental toxic chemicals, The 5<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations (2007, 5)
- 22) Nohmi, T., Roles of Y-family DNA polymerases in mutagenesis via the misincorporation of oxidized dNTPs, The 3<sup>rd</sup> Japan US DNA repair meeting (2007, 5)
- 23) Ono, T., Okudaira, N., Uehara, Y., Matsumoto, T., Oghiso, Y., Tanaka, K., Ichinohe, K., Nakamura, S., Tanaka, S., Kagawa, N., Fujikawa, K., Ootsuyama, A., Norimura, T., Nohmi, T., Dose and dose

- rate dependency in radiation-induced mutation in liver and spleen of gpt-delta mice, 13th International Congress of Radiation Research (ICRP) (2007, 7)
- 24) Nohmi, T., Validity of in vivo genotoxicology, 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences (2007, 8)
- 25) Nohmi, T., DNA repair as a constituent of thresholds of genotoxicity, 37<sup>th</sup> European Environmental Mutagen Society (2007, 9)
- 26) Nohmi, T., Development of bacteria genotoxicity assays: past, present and future perspective, VIII Congresso Brasileiro de Mutagenese Carcinogenese e Teratogenese Ambiental (SBMCTA 2007) (2007, 10)
- 27) Nohmi, T., The role of Y-family DNA polymerase in oxidative mutagenesis, 38<sup>th</sup> Annual Meeting of Environmental Mutagen Society (2007, 10)
- 28) Totsuka, Y., Nishigaki, R., Takamura-Enya, T., Nohmi, T., Sugimura, T., Wakabayashi, K., Formation of RNA adduct with a novel endogenous mutagen and carcinogen, aminophenylnorharman, 38<sup>th</sup> Annual Meeting of Environmental Mutagen Society (2007, 10)
- 29) Shimada, Y., Nishimura, M., Kakinuma, S., Yamauchi, K., Imaoka, T., Shang, Y., Nohmi, T., Kawaguchi, I., Doi, M., Dose dependency of combined effects of ionizing radiation and other agents on cancer induction, New Nuclear Research Symposium, Biological Responses to Low Dose Radiation (2007, 11)
- 30) Ikeda, M., Masumura, K., Sakamoto, Y., Wang, B., Neno, M., Sakuma, K., Hayata, I., Nohmi, T., Suppression of radiation-induced large deletions by combined treatments with a tobacco-specific nitrosamine in the lung of gpt delta transgenic mice, New Nuclear Research Symposium, Biological Responses to Low Dose Radiation (2007, 11)
- 31) Ikeda, M., Masumura, K., Matsui, K., Kohno, H., Sakuma, K., Tanaka, T., Kamataki, T., Nohmi, T., Chemopreventive effects of nobiletin, a citrus constituent, against the genotoxicity of NNK, a tobacco-specific nitrosamine, in the lung of gpt delta transgenic mice, The 9<sup>th</sup> International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis (ICMAA-2007) (2007, 12)
- 32) Nohmi, T., Development of in vivo genotoxicity assays with transgenic mice and rats, International Symposium on the Predictive, Preventive and Mechanistic Mutagenesis & XXXIII EMSI Annual Meeting (2008, 1)

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

平成 19 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:バクテリアを用いた遺伝毒性閾値の研究

分担研究者: 山田 雅巳 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

### 研究要旨

化学物質が誘発する突然変異(主に塩基置換)に閾値が存在するかどうかを検討するため、酸化剤として用いられる化学物質数種類について、バクテリアを用いた遺伝毒性試験である Ames 試験を実施した。2つの酸化損傷 DNA 修復系をそれぞれ欠損させた株と、修復系を保持している菌株(TA1535)の結果とを比較した。いずれの化学物質に対しても、DNA 修復系を欠損させた株では TA1535 で変異原性が見られない低用量で復帰変異株数の増加が観察された。さらに、低用量で復帰変異株数の増加を示す条件は物質ごとに異なっていた。以上の結果は、用いた化学物質による DNA 上の傷は突然変異として固定される前に修復され、DNA 損傷を引き起こす遺伝毒性物質に閾値が存在する可能性を示唆すると考える。

キーワード; 閾値、Ames 試験、DNA グリコシラーゼ、突然変異

#### A. 研究目的

食品中に含まれる微量の化学物質である食品添加物等の安全性に多くの国民が注意を払うようになって来た。しかし問題となる化学物質が発がん性を示す場合、そのリスク評価は困難である。多くの発がん性化学物質の健康リスクを評価する場合、実証的な理由を付してこれ以下であれば健康影響が見られないというレベル、すなわち「閾値」のない線形の用量反応モデルが用いられてきた。その後、がんの発生メカニズムに関する理解が進み、遺伝子に直接損傷を与えない非遺伝毒性発がん物質には、他の毒性同様に閾値を設定することができるとの考えが定着してきている。

このように、ある一定レベル以下の非遺伝毒

性発がん物質に実質的な発がんリスクはないものと考えられている一方で、遺伝毒性を持つ発がん物質には、「暴露量をゼロにしない限り、がんを引き起こすリスクはゼロにならない」という思想がある。これに従えば、使用禁止という形でしか規制できない。

だが生体には DNA 修復を初めとするさまざまな防御機能があり、遺伝毒性物質の引き起こす損傷レベルが低ければ、がんに至るような突然変異にならない可能性がある。

本研究では、バクテリアを用いた試験により酸化損傷を引き起こす物質の変異原性を調べる。塩基除去修復の最初の段階に働く DNA グリコシラーゼのうち、主として酸化プリン除去に働く 8-ヒドロキシグアニン(8-OHG) DNA

グリコシラーゼを欠損した株と、主として酸化ピリミジンの除去に働くエンドヌクレアーゼ III (Endo III) およびエンドヌクレアーゼ VIII (Endo VIII) を欠損した株を用いて、当該修復系に関して野生型の菌株と比較することで遺伝毒性物質の閾値形成に及ぼす DNA 修復系の影響について考察する。

## B. 研究方法

### 1) 使用した化学物質

臭素酸カリウム (KBrO<sub>3</sub>) - 食品添加物、CAS No. 7758-01-2、L-ペニシラミン- ペニシリンの分解物、酸化剤、CAS No. 1113-41-3、過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) - CAS No. 7722-84-1。

### 2) 使用した菌株

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium TA1535 を親株とした、その改変株 YG3001、YG3206、TA100、YG3008、YG3216 を使用した。遺伝子の欠損もしくはプラスミドの保持については表 1 に示すとおり。

表 1 使用菌株一覧

菌株名	<i>mutM</i>	<i>nth</i>
TA1535	+	+
YG3001	-	+
YG3206	+	-
TA100	+	+
YG3008	-	+
YG3206	+	-

### 3) Ames 試験

Ames 試験は以下の条件で行った。段階希釈した化学物質の水溶液 0.1 mL、試験菌株の一夜培養液 0.1 mL、りん酸緩衝液 0.5 mL を試験管内で混合し、37°C の湯浴で 20 分間振とう後、2 mL の軟寒天培地を加えて最小培地 (プレート) にまき広げた。プレートを 37°C のインキュベーターで 48 時間培養後、コロニー数を計測した。

(倫理面への配慮)

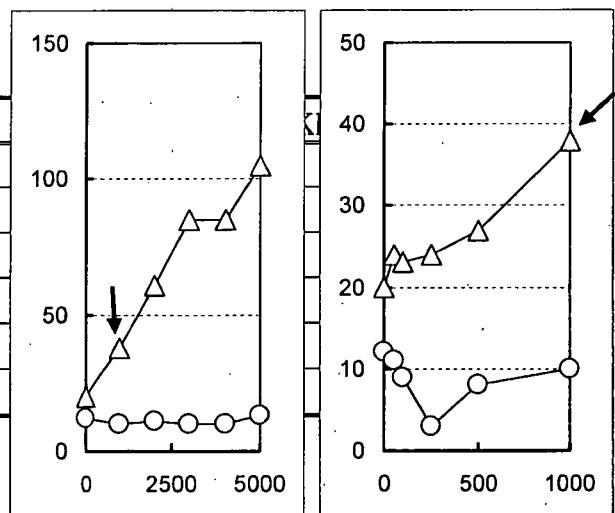
本研究は細菌を用いた実験なので配慮の対象ではない。

## C. 研究結果

### 1) KBrO<sub>3</sub>

TA1535 株において最高用量 (5000 µg/plate) まで復帰変異株数が溶媒対照値 (12) を超えなかったのに対して、酸化プリンを修復する DNA グリコシラーゼを欠損した YG3001 株においては、1000 µg/plate から最高用量まで用量依存的に復帰変異株数の増加が見られ、2000 µg/plate 以上で溶媒対照値 (20) の 2 倍を超える復帰変異株数が計測された (図 1 左)。

次に、1000 µg/plate を最高用量に 50 µg/plate まで用量を下げても同様の試験を行った。YG3001 株では、低用量でも用量依存的に復帰株数が変化した (図 1 右)。



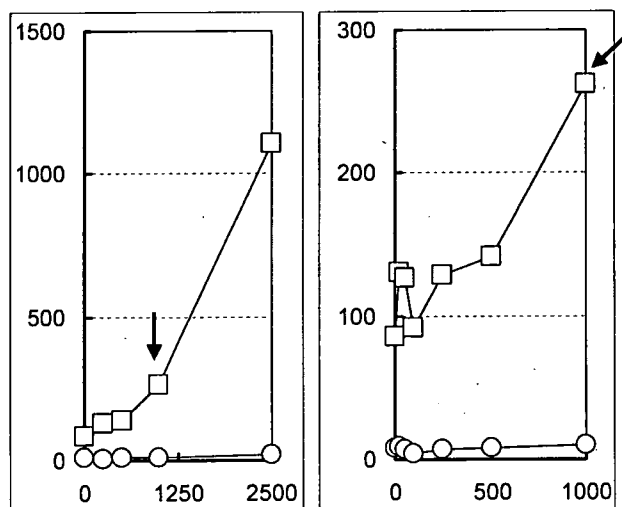
第 1 図 KBrO<sub>3</sub> の変異原性  
横軸 KBrO<sub>3</sub> の濃度 (µg/plate)、縦軸ヒスチジン非要求性復帰変異株数 (コロニー数/plate)。○: TA1535、△: YG3001。

### 2) L-ペニシラミン

TA1535 株において 1000 µg/plate まで復帰

変異株数が溶媒対照値(8)を超えなかったのに対して、酸化ピリミジン修復系を欠損した YG3206 株においては、250 $\mu\text{g}/\text{plate}$  から最高用量まで用量依存的に復帰変異株数の増加が見られた。1000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上で溶媒対照値(86)の2倍を超える復帰変異株数が計測された(図2左)。

次に、1000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  を最高用量に25  $\mu\text{g}/\text{plate}$  まで用量を下げて同様の試験を行った。YG3206 株では、低用量でも用量依存的な復帰変異株数の変化が観察された(図2右)。



第2図 L-ペニシラミンの変異原性  
横軸 L-ペニシラミンの濃度 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )、縦軸ヒスチジン非要求性復帰変異株数(コロニー数/ $\text{plate}$ )。○:TA1535、□: YG3206。

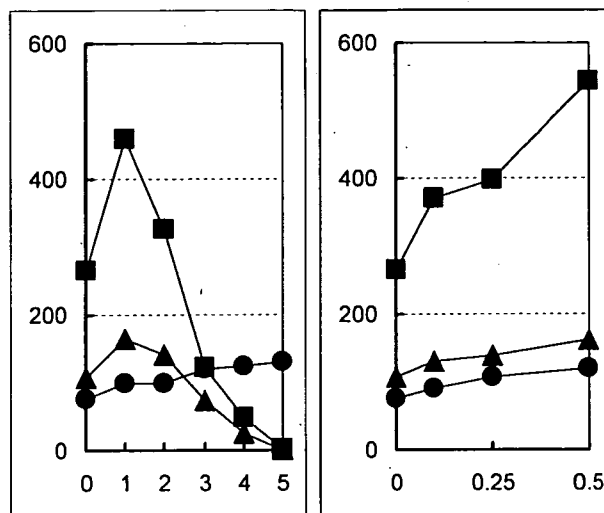
### 3) $\text{H}_2\text{O}_2$

本物質については、損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼをコードするプラスミド pKM101 を保持する菌株のセットについての結果を示す(図3)。

TA100 株において最高用量の 5  $\mu\text{g}/\text{plate}$  まで緩やかな復帰変異株数の増加が観察された。一方、酸化プリン修復系、酸化ピリミジンの修復系をそれぞれ欠損した株、YG3008 と YG3216 株においては、いずれも 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  を超える用量で致死感受性を示した(図3左)。

次に、0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$  を最高用量に 0.1

$\mu\text{g}/\text{plate}$  まで用量を下げて同様の試験を行った。YG3216 株では、低用量でも用量依存的な復帰変異株数の変化が観察され、0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$  で溶媒対照値(265)の2倍を超える復帰変異株数を示した(図3右)。



第3図  $\text{H}_2\text{O}_2$  の変異原性  
横軸  $\text{H}_2\text{O}_2$  の濃度 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )、縦軸ヒスチジン非要求性復帰変異株数(コロニー数/ $\text{plate}$ )。●:TA100、▲:YG3008、■: YG3216。

### D. 考察

今回用いたいずれの化合物も、それぞれの働きで形成される損傷を修復する系を欠損した株では、低用量まで下げても復帰変異株数が増加していた。このことは、細胞ではある程度の濃度までは修復系の酵素活性により、化学物質の作用が突然変異に関して事実上無作用に等しくなることを示唆する。

$\text{KBrO}_3$  は親株および、Endo III/VIII の欠損株では変異原性を示さないが、8-OHG DNA グリコシラーゼを欠損した株 (YG3001) では、250  $\mu\text{g}/\text{plate}$  辺りから復帰変異株の増加が見られ、5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  で対照値の約5倍まで増加した。このことは、 $\text{KBrO}_3$  が DNA 上に 8-OHG を生じさせるという報告と符合する。

L-ペニシラミンは  $\text{KBrO}_3$  と異なり、親株および 8-OHG DNA グリコシラーゼを欠損した株では変異原性を示さないが、Endo III/VIII の欠

損株では顕著に、復帰変異株数の増加が観察された。このことは、L-ペニシラミンの作用で生じる DNA 損傷がピリミジンを標的としたものであると予想される。最終年度は、機器分析によりその損傷を同定できればと考えている。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>は致死性が強く、pKM101を保持しない株ではほとんど、復帰変異株数の増加が見られなかった(data not shown)。低用量での復帰変異株数は、修復系を欠損した場合、欠損しない場合の3倍を超えていたことから、低用量での修復系の働きはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の変異原性を抑制することに関して特に重要な働きをしていると考えられる。TA1535とYG3008で用量依存的に緩やかな復帰変異株数の増加が見られたが、YG3216では顕著な増加が見られたことからH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の作用で生じるDNA損傷がピリミジンを標的としたものであることが示唆された。

## E. 結論

本研究結果は、内因性の変異原によって生じた酸化損傷は、DNA修復系が処理できる範囲であれば必ずしも突然変異に至らないことを示す。酸化剤は代謝活性化を経ずにDNAに損傷を与えるものが多く、バクテリアを用いた実験結果はヒトを含む他の生物における作用を推測するに足るものと考えられる。

## F. 健康危機情報

省略

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Hidaka, K., Yamada, M., Kamiya, H., Masutani, C., Harashima, H., Hanaoka, F., Nohmi, T., Specificity of mutations induced by incorporation of oxidized dNTPs into DNA by human DNA polymerase  $\eta$ . DNA Repair, 7, 497-506 (2008)

Nohmi, T., Yamada, M., Grúz, P., DNA Repair and DNA damage tolerance in archaeal

bacteria: Extreme environments and genome integrity, Archaea: New models for prokaryotic biology, edited by P. Blum, Norwich, UK, Horizon Press, 147-169, 2008.

### 2. 学会発表

山田雅巳、松井恵子、能美健彦、酸化ピリミジン損傷を誘発する変異原を高感度に検出する新規なサルモネラ株、日本環境変異原学会第36回大会/アジア環境変異原学会第1回大会(2007.11)

山田 雅巳、日高 勝彦、紙谷 浩之、益谷 央豪、原島 秀吉、花岡 文雄、能美 健彦、ヒトDNAポリメラーゼ $\eta$ が酸化dNTPを取り込むことで誘発される突然変異の特異性について、第79回日本遺伝学会年会(2007.9)

## H. 知的所有権の取得状況

- |           |    |
|-----------|----|
| 1. 特許取得   | 無し |
| 2. 実用新案登録 | 無し |
| 3. その他    | 無し |

平成 19 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:哺乳類細胞を用いた遺伝毒性閾値の研究

分担研究者: 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部第一室 室長

### 研究要旨

食品添加物である臭素酸カリウム( $\text{KBrO}_3$ )は齧歯類動物で強い発がん性を示し、またバクテリア、哺乳類細胞でも遺伝毒性を示す。 $\text{KBrO}_3$ は DNA に酸化損傷を引き起こし、DNA アダクトの一つである 8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)を生成する。この大部分は正常に修復されるが、一部は G:T トランスバージョンを引き起こすことが、*in vitro* 実験系から推察されている。本研究ではヒト TK6 細胞を用い、 $\text{KBrO}_3$  の遺伝毒性を、DNA 損傷性、染色体異常誘発性、遺伝子突然変異誘発性の観点から調査した。 $\text{KBrO}_3$  は全てのエンドポイントで用量依存性の陽性反応を示したことから、ヒト細胞に於いても遺伝毒性を示すことが明らかとなった。しかしながら、突然変異体の遺伝子解析ではほとんどの変異体は大きな欠失を示し、予想された G:T トランスバージョンの出現は極めてまれであった。 $\text{KBrO}_3$  はアルカリコメットだけでなく、中性コメットでも陽性を示したことから、生体内での  $\text{KBrO}_3$  の遺伝毒性の本質は酸化損傷による 8-OHdG ではなく、DNA の 2 本鎖切断の関与が考えられた。一般に DNA 中の 8-OHdG は Ogg1 による塩基除去修復機構によって修復される。この修復機構はエラーフリー型で突然変異をもたらさない。一方、DNA の 2 本鎖切断は非相同型接合(NHEJ)によって修復され、これは遺伝子の欠失をもたらす。このことは DNA の酸化損傷がもたらす突然変異には閾値が存在するかもしれないが、2 本鎖切断では閾値が無いことを示唆するものである。遺伝毒性の閾値論を論じる場合、その頻度だけでなく、どのようなタイプの遺伝的変異であることを明らかにすることが重要である。

キーワード;臭素酸カリウム( $\text{KBrO}_3$ )、酸化損傷、DNA 修復、閾値、

#### A. 研究目的

食品の安全性に対して、多くの国民が関心を寄せている今日、食品添加物等の食品中に含まれる微量の化学物質の安全性が問題となっている。特にその

問題となる化学物質が発がん性を示す場合は、その評価が困難であることが多い。多くの発がん性化学物質に関しては、健康リスクを評価する場合、理論的、実証的理由から、これ以下であれば健康

影響が見られないレベル、すなわち閾値のない線形の用量反応モデルが用いられてきた。しかしながら、近年、がんの発生メカニズムに関する理解から、発がん物質のなかでも、遺伝子に直接損傷を与えない非遺伝毒性発がん物質に関しては、他の毒性同様に閾値を設定することができるとの考えが定着し、ある一定レベル以下の非遺伝毒性発がん物質に関しては、実質的に発がんリスクはないものと考えられている。

一方、遺伝毒性を持つ発がん物質に関しては、「暴露量をゼロにしない限り、がんを引き起こすリスクはゼロにならない」という思想のため、規制するならば使用を禁止するほかはないため、その発がん性を認めることができず、逆に化学物質の規制が進まないといった矛盾が生じている。しかしながら、ヒトを含む生体にはさまざまな防御機能(DNA修復、解毒代謝、アポトーシスなど)が備わっており、遺伝毒性物質であっても、その損傷レベルが低ければ、がんを引き起こすような突然変異にならない可能性も考えられる。特に、突然変異を引き起こす内的、外的DNA損傷の1つである酸化的傷害に関しては、それに対抗する防御機能として塩基除去修復によりそのほとんどが正常に修復されると考えられている。このような修復機構はエラーフリー型修復と呼ばれている。一方、放射線などによって引き起こされるDNAの2本鎖切断(DSB)は、哺乳類細胞では非相同型接合(Non-Homologous End-Joining; NHEJ)によって主に修復される。この修復経路は欠失等の突然変異をもたらすエラー

発生型の修復経路である。

食品添加物である臭素酸カリウム( $\text{KBrO}_3$ )は齧歯類動物で強い発がん性を示し、またバクテリア、哺乳類細胞でも遺伝毒性を示す。 $\text{KBrO}_3$ はDNAに酸化損傷を引き起こし、DNAアダクトの一つである8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)を生成する。8-OHdGはG:Tトランスマージョンを引き起こすことが、*in vitro*実験系から推察されている。従って、生体内では高濃度暴露により酸化損傷修復が完全でない場合は点突然変異を誘発し、低濃度では変異を誘発しない、つまり閾値が存在することが予想される。本研究ではヒトTK6細胞を用い、 $\text{KBrO}_3$ の遺伝毒性を、DNA損傷性、染色体異常誘発性、遺伝子突然変異誘発性の観点から調査し、その遺伝毒性の発現に閾値が存在するかを明らかにした。

## B. 研究方法

### 4) 細胞、 $\text{KBrO}_3$ 処理

チミジンキナーゼ(TK)遺伝子をヘテロ(TK+/-)に持つヒトリンパ芽球細胞株TK6を用いた。細胞を $\text{KBrO}_3$ (0.5~5mM)で4時間処理し、その後、細胞毒性、遺伝毒性を評価した。

### 5) 細胞毒性、遺伝毒性

細胞毒性:処理後の細胞のコロニー形成率(RS)、および72時間の相対増殖率(RSG)から細胞毒性を評価した。

DNA損傷試験(コメットアッセイ):処理直後の細胞をアガロースゲルと混和後、マツナミマスコートスライドにマウントした。DNA変性処理を行った後、アルカリ条件下(アルカリコメット)、もしくは中性条件



下(中性コメット)で電気泳動を行った。脱水後、Syber Gold で染色し、PERCEPTIVE 社の CometIV を用いてコメット尾部の%DNA 量を測定した。

小核試験: 検体処理後、細胞を 48 時間培養し、定法に従って小核試験を行った。1000 個の細胞を観察し、小核に出現頻度を求めた。

遺伝子突然変異試験: 検体処理後、細胞を 72 時間培養し、TFT 存在下で細胞を 96 穴プレートにはん種し、TFT 耐性を獲得した TK 変異細胞の出現頻度を求めた。変異細胞は増殖性の早い NG 変異体と、遅い変異体 SG 変異体に分類した。

3) 変異体の遺伝子解析: TK 変異体の TK 遺伝子を PCR によって解析し、LOH(loss of heterozygosity)の有無を確認した。LOH 変異体に関しては 17 番染色体上に存在する多型性マーカーを用いてさらに解析し、染色体上の LOH の範囲を同定した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用したヒト細胞は株化細胞で、国際的に広く普及している細胞であり、倫理上問題はない。また、全ての実験は本研究所倫理規定に準拠して行った。

## C. 研究結果

### 1) $KBrO_3$ による細胞毒性、遺伝毒性

TK6 細胞 ( $5 \times 10^6$ ) を 0.5~5mM の  $KBrO_3$  で 4 時間処理し、細胞毒性、遺伝毒性を評価した(図 1)。細胞毒性、遺伝毒性とも用量依存的に増加した。低毒性量に於いても、全ての遺伝毒性エンドポイントで陽性を示したことから強い遺伝

毒性が示唆された。また、コメット試験ではアルカリコメットだけでなく中性コメットでも陽性反応が得られたこと、TK 遺伝子突然変異では SG 変異体が多く観察されたことから、 $KBrO_3$  による DNA 損傷は DNA の 2 本鎖切断(DSB)によるものであることが予想された。

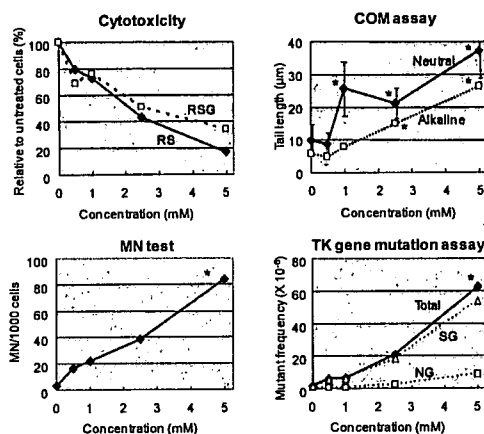


図 1

### 2) TK 変異体の遺伝子解析

2.5mM  $KBrO_3$  によって誘発された TK 変異体 39 クローン(NG:8, SG:31)の TK 遺伝子を解析した。その結果、90%のクローンで TK 遺伝子の消失(LOH)が観察された。これは、自然誘発変異体(75%)、アルキル化剤である EMS 誘発変異体(28%)での頻度に比べて明らかに高く、放射線誘発変異体(88%)に匹敵する。LOH は染色体間の相同組換えによるもの、大きな欠失によるものに分類できるが、 $KBrO_3$  はほとんど後者によるものが多かった(図 2)。

LOH の範囲を 17 番染色体上に散在する多型性マーカーを指標にマッピングを行った。欠失は 1Mb から 40Mb におよび、もっとも多いタイプは 17 番染色体長腕末端から 1/4 までの約 30Mb の末端型

欠失であった。このタイプの変異は自然誘発突然変異体にはあまり観察されないが、放射線誘発変異体には多く観察される。

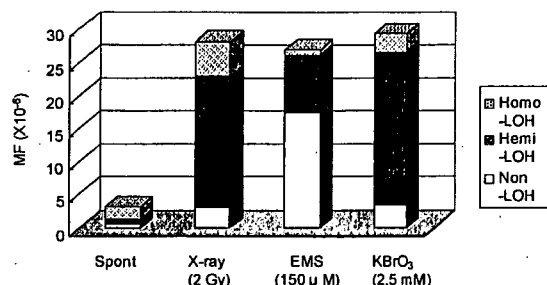


図2

#### D. 考 察

KBrO<sub>3</sub>は発がん性物質であり、齧歯類を用いた研究では、イニシエーション、プロモーション作用とも有することが知られている。一方、遺伝毒性に関しては *in vitro* でコメット、小核、染色体異常の誘発は明らかであるが、Hprt 遺伝子突然変異に関しては弱い陽性、もしくは陰性と報告されている。今回、我々の研究で、KBrO<sub>3</sub>は TK 遺伝子の突然変異試験で強い陽性反応を示した。一般に、Hprt 遺伝子突然変異では大きな欠失型の突然変異を検出できない。TK 遺伝子で陽性を示したことは、KBrO<sub>3</sub>は主として欠失型の突然変異を引き起こすことを示唆するものである。突然変異体の遺伝子解析の結果はこのことを裏付ける。すなわち、KBrO<sub>3</sub>誘発変異体の90%は LOH 変異体であり、コピー数解析、マイクロサテライトマーカーによる染色体解析から、その多くは30Mb以上の末端型欠失変異であった。この変異スペクトルは放射線のそれと類似しており、KBrO<sub>3</sub>は主としてDNAの2本鎖切断を介して突然変異を引き

起こすことが予想された。コメット試験でもアルカリ条件下だけでなく、中性条件下でも陽性をしめしたことはこの仮説を支持する者である。

KBrO<sub>3</sub>はDNAに酸化損傷を引き起こし、DNAアダクトの一つである8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)を生成することが知られている。この大部分は正常に修復されるが、一部はG:Tトランスバージョンを引き起こすことが、*in vitro* 実験系から推察されていることから、これがKBrO<sub>3</sub>の遺伝毒性と、発がん性の本質と理解されている。しかしながら、培養細胞、齧歯類動物での遺伝子突然変異の研究からは8-OHdGの量と突然変異には相関関係が認められず、また8-OHdGと発がん性にもあまり相関関係がない。このことは、KBrO<sub>3</sub>の遺伝毒性、発がん性には8-OHdG以外の機構が存在することを示唆する。今回の我々の結果が示すように、それにはDNAの2本鎖切断の関与が考えられた。

KBrO<sub>3</sub>は生体内でDNAに8-OHdGを生成するが、同時に2本鎖切断も引き起こすと考えられる。一般にDNA中の8-OHdGはOgg1による塩基除去修復機構によって修復される。この修復機構はエラーフリー型で突然変異をもたらさない。一方、DNAの2本鎖切断は非相同型接合(NHEJ)によって修復され、これは遺伝子の欠失をもたらす。このことはDNAの酸化損傷がもたらす突然変異に誘発には閾値が存在するかもしれないが、2本鎖切断では閾値が無いことを示唆するものである。遺伝毒性の閾値論を論じる場合、その頻度だけでなく、どのよ

うなタイプの遺伝的変異であることを明らかにすることが重要であるかもしれない。

## E. 結論

小麦粉改良材剤であるKBrO<sub>3</sub>はヒト培養細胞で強いDNA損傷性、染色体異常誘発性、遺伝子突然変異誘発性を示した。突然変異体のほとんどは大きな欠失型突然変異を示し、予想されたG:Tトランスバージョンの出現は極めてまれであった。KBrO<sub>3</sub>は中性コメットでも陽性を示したことから、生体内でのKBrO<sub>3</sub>の遺伝毒性の本質は酸化損傷による8-OHdGではなく、DNAの2本鎖切断の関与が考えられた。8-OHdGは塩基除去修復機構によって修復される。この修復機構はエラーフリー型で突然変異をもたらさない。一方、DNAの2本鎖切断は非相同型接合(NHEJ)によって修復され、これは遺伝子の欠失をもたらす。このことはDNAの酸化損傷がもたらす突然変異に誘発には閾値が存在するかもしれないが、2本鎖切断では閾値が無いことを示唆するものである。遺伝毒性の閾値論を論じる場合、その頻度だけでなく、どのようなタイプの遺伝的変異であることを明らかにすることが重要である。

## 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

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.*, 48, 248-257 (2007)

Honma, M., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Sakamoto, H., and Hayashi, M. Non-homologous end-joining for repairing I-SceI-induced DNA double strand breaks in human cells. *DNA Repair*, 6, 781-188 (2007)

Luan Y, Suzuki T, Palanisamy R, Takashima Y, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Saito M, Matsufuji H, Yamagata K, Yamaguchi T, Hayashi M, Honma M. Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC>TA transversion in human cells. *Mutat. Res.*, 619, 113-123 (2007)

Newwirth, E., Honma, M., and Grosovsky, A., Interchromosomal crossover in human cell is associated with long gene conversion tracts. *Mol. Cell. Biol.*, 27, 5261-5274 (2007)

Yatagai, F, Umebayashi, Y., Suzuki, M., Abe, T., Suzuki, H., Shimazu, T., Ishioka, N., Iwaki, M, and Honma, M. Influence of low-dose and low-dose-rate ionizing radiation on mutation induction in human cells. *Advan. Space Res.*, 40, 470-473 (2007)

Yatagai, F., Umebayashi, Y., Honma, M., Sugawara, K., Takayama, Y., and Hanaoka, F. Mutagenic radioadaptation in a human lymphoblastoid cell line.

*Mutat. Res.*, 638, 48-55 (2008)

## 2. 学会発表

本間正充: 代謝物の遺伝毒性評価 第34回日本トキシコロジー学会学術年会 (2007.6)

Honma M.: DNA double strand breaks inducing genomic instability in human cells. 13<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research (2007.7)

Yatagai F., Suzuki M., Ishioka N., Ohmori H., and Honma M.: Repair of dsb at a specific site of chromosome: influence of low-dose/low-dose-rate gamma-rays. 13<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research (2007.7)

Honma M.: Genotoxic assessment of drug metabolite and ICH guideline. Chinese National Conference on Drug Toxicology 2007 (2007.8)

Honma M.: A multi-endpoints in vitro genotoxicity test system consisting of Comet, micronuclei, and gene mutation assays. 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences (2007.8)

Honma M., Takashima Y., Yasui M., Koyama N., Koizumi T., Sakuraba M., Sakamoto H., Sugimoto K., and Hayashi M.: Tracing Micronuclei by Fluorescent Live Cell Imaging Analysis. 37<sup>th</sup> European Environmental Mutagen Society (2007.9)