

Honma M.: Genomic instability caused through breakage-fusion-bridge (BFB) cycle in human cells. The 8th International Symposium on Chromosomal Aberrations (2007.10)

Suzuki T., Luan Y., Praba D., Kogi M., Honma M., Koizumi T., Tanabe S., Sato Y., Suzuki K., and Yamaguchi T.: CGH and SNP arrays; as new tools for detailed analysis of chromosome. The 8th International Symposium on Chromosomal Aberrations (2007.10)

Honma M.: The new ICH guideline on Genotoxicity. 2007 Korean National Institute of Toxicological Research International Symposium (2007.10)

Honma M.: Validation of a humanized in vitro genotoxicity test system. 2007 Korean NTP Workshop (2007.10)

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 γ 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)

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)

谷田貝文夫、鈴木雅雄、本間正充: 低線量・低線量率 γ 線照射によるヒトリンパ芽球細胞での変異誘発 日本放射線影響学会第 47 回大会 (2007.11)

Koyama N., Yasui M., Sakamoto H., Sakuraba M., Masuda S., Kinase N., Matsuda T, Hayasi M., and Honma M: Genotoxicity of acryamide expressed via metabolic activation in CYP over-expressing human cells. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Yasui M., Suenaga E., Koyama N., Masutani C., Hanaoka F., Gruz P., Shibutani S., Nohmi T., Hayashi M., and Honma M.: Translesion synthesis past 2'-deoxyinosine, a major nitric oxide-induced DNA adduct, by human DNA polymerase η and κ . 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Yatagai F., Matsumoto H., Honma M.: A possible involvement of bystander effects in the repression of spontaneous mutation induction. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Saito M., Matsufuji H., Chino M., Hyashi M., Honma M., and Yamagata K.: Antioxidant activity and potential genotoxicity of flavonoid by using human lymphoblastoid TK6 cells. 1st Asian

Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Arai S., Saito M., Takashima Y., Honma M., and Kojima H.: A new trial for in vitro Comet assay using 3-dimensional human epidermal model. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Kimura A., Sakamoto H., Hayashi M., Saigo K., Tokado H., and Honma M.: Establishment of a robust in vitro Comet protocol using human lymphoblastoid TL6 cells. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Honma M., Yasui M., Koyama N., Koizumi T., Sakuraba M., Sakamoto H., Takashima Y., Sugimoto K., and Hayashi M.: Visualization of micronuclei by fluorescent cell imaging analysis. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Suzuki T., Koizumi T., Prabha D., Luan Y., Honma M., Hamada S., Nakajima M., Watanabe T., and Furihata C.: Collaborative study on the toxicogenomics in JEMS/MMS II:

High-throughput qPCR analysis by TaqMan low density array. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Honma M.: Background issues initiating a revision of the current ICH genotoxicity guidance. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

村田香織、森山英樹、高島良生、本間正充、岡茂範、杉本憲治: マルチカラーライブセルイメージングにより明らかとなった Aurora-B キナーゼ阻害剤 VX-680 の染色体分配ダイナミズムに及ぼす影響 第 30 回日本分子生物学会年会 (2007.12)

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: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。今年度は DNA 修復に基づく閾値について取り上げる。DNA に直接作用するアルキル化剤の中に、明らかに閾値を示すものがある。メチルメタンスルホン酸(MMS)やエチルメタンスルホン酸(EMS)は、培養系ヒトリンパ芽球様細胞に小核を誘発する際、閾値を示す。この閾値発現はHPRT遺伝子変異においてもTK遺伝子変異においても認められた。しかも其の値は、これらの遺伝毒性マーカーの違いに因らず何れも同じであった。さらに、テスト系の感度の差によって変化する事も無かった。一方、メチルニトロソ尿素やエチルニトロソ尿素で誘発される遺伝毒性には閾値は認められなかった。アルキルグアニンDNAアルキルトランスフェラーゼ(AGT)欠損細胞でも、小核誘発に野性型細胞とほぼ同じ閾値が存在し、閾値発現にDNA修復が関与していることは、証明されていない。一方、遺伝毒性発現様式を数式モデルに当てはめ、閾値の有無を評価する方法が提案されている。N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトログアニジンによる変異誘発には閾値があるが、Azideには閾値がないことが示されている。数式モデルは閾値の意味を理解する上で優れた方法と考える。

キーワード:アルキル化剤、閾値、ヒトリンパ芽球細胞、AGT、数式モデル

A. 研究目的

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。本年度は DNA 修復に基づく閾値について取り上げる。昨年度の報告で、遺

伝毒性物質を閾値の立場から4群、A; DNA に直接反応し linear non-threshold (LNT)作用様式を示すもの、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

する物に分類することを述べた。また、DNA に直接反応する(A 群)が、修復に因る閾値が少なくとも *in vitro* で存在する場合を、A' 群に分類した。メチル化剤、エチル化剤といった単純なアルキル化剤でも *in vitro* における遺伝毒性に閾値を示すもの、示さないものがある。関わる修復酵素の細胞内における存在量によって差がでることが、各アルキル化剤のもつ DNA 修飾の特性から示唆されている。これらの研究について報告する。MMS、EMS、MNU および ENU を用いて閾値発現を詳細に検討した Parry のグループの研究を中心に紹介する。

さらに、閾値は、DNA 修復或いは解毒因子の反応性・細胞内量により規定されるものとし、遺伝毒性発現様式をモデル化することにより、低用量での閾値の存在を推定できるということが最近報告された。修復能が十分高いときは閾値が存在することを示した Watanabe の論文を紹介する。

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. ヒト培養細胞系細胞におけるアルキル化剤の作用様式

a) MMS および EMS

Doak らは、ヒトリンパ芽球様細胞 AHH-1(TK⁺) を用いて先ず小核誘発における用量反応性を検討した。

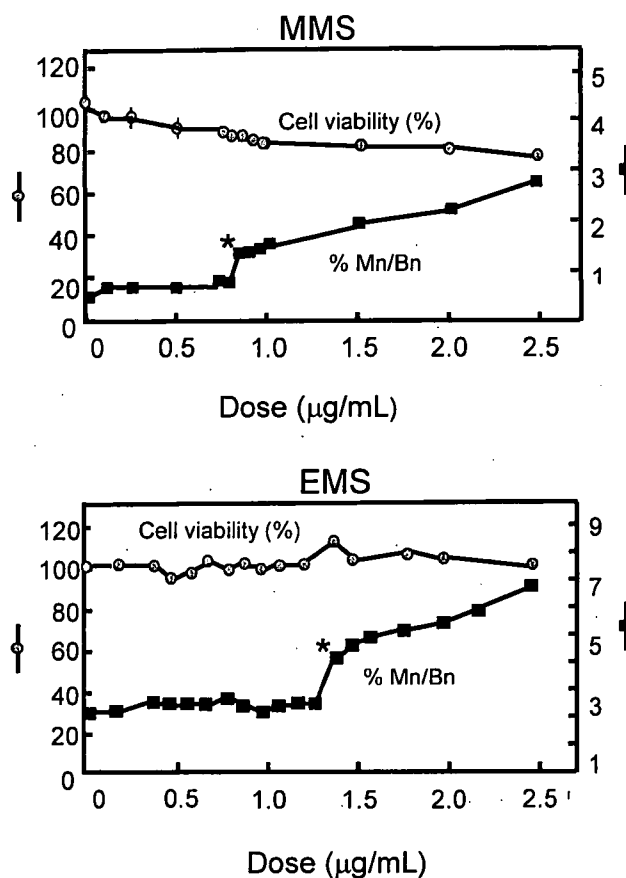


図-1. MMS および EMS による小核誘発用量効果:ヒトリンパ芽球様細胞 AHH-1 用いた。

* : one-way ANOVA-Dunnett's posthoc test によりBGと有意差を示した最初の濃度

図-1に示すように MMS (methylmethane sulfonate) および EMS (ethylmethane sulfonate)、いずれの場合も明らかな閾値の存在を、真数グラフ表示により示している。MMS は 0.80 µg/mL までとそれ以上の濃度で、明らかに異なる用量反応性を示しており、0.80 µg/mL までは小核誘発率において BG(background)との差は認められない。次の測定点 0.85 µg/mL で BG と有意差

を持って小核誘発が認められている (LOEL, Lowest observed effect level)。EMS では 1.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が閾値と認められる。

次に同じ細胞で *HPRT* 遺伝子変異誘発に及ぼす用量効果を検討している。図-2に示すように、真数表示グラフにより、MMS および EMS いずれの場合も閾値の存在が認められる。閾値は小核の場合とほぼ同じ濃度の 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。LOEL として認められた濃度はそれぞれ 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および 1.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、これらの濃度では BG の 3 倍および 5 倍の変異が誘発されている。

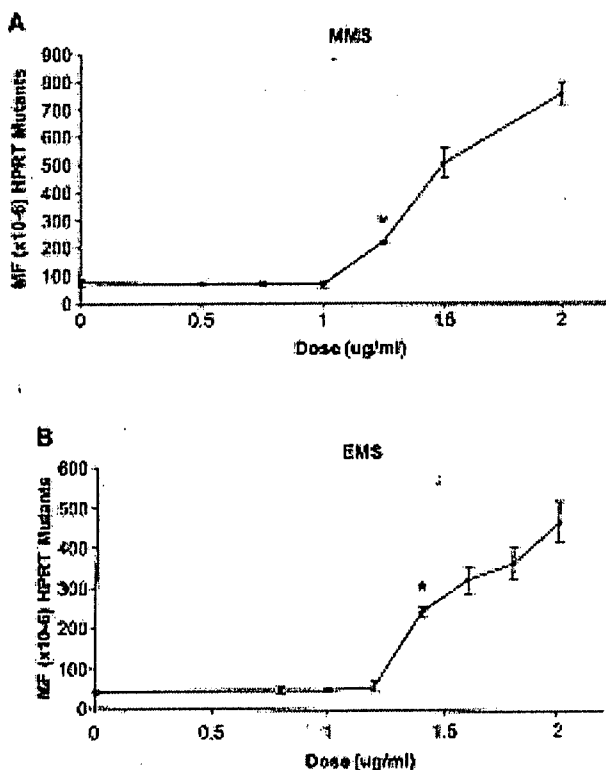


図-2 AHH-1 細胞における MMS および EMS により誘発される *HPRT* 変異の用量効果

アッセイ条件によって、すなわち変異検出系の感受性によって、この閾値および LOEL が変化するかについて検討を加えている。薬剤で処理したあと選択培地中の細胞濃度を、標準 ($4 \times 10^5/\text{mL}$) の半分の $2 \times 10^5/\text{mL}$ および 1.5 倍の $6 \times 10^5/\text{mL}$ で検討しているが、いずれも 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までは BG レベルであり、LOEL は 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった (図-3)。この図から明らかなように突然変異率が高く検出される条件を用いても同じ閾値および LOEL が得られることから、著者らは真の閾値と考えている。

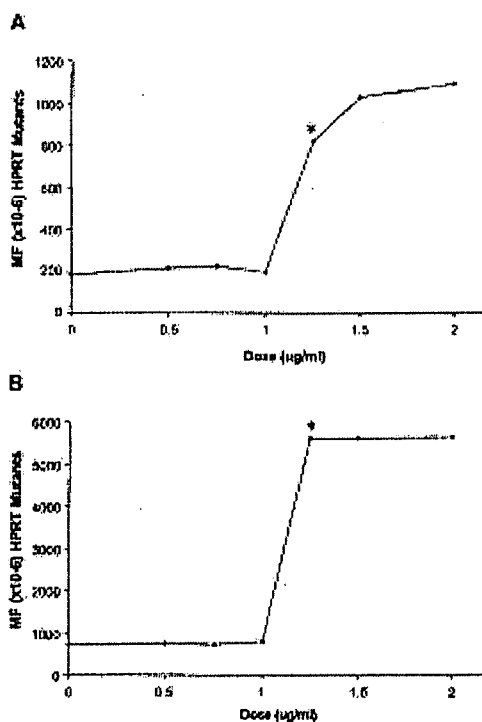


図-3. 異なる変異アッセイ条件下における MMS の変異誘発用量効果

A: 変異選択培地における細胞濃度を 2×10^5

B: 変異選択培地における細胞濃度を 6×10^5

さらに同じ細胞を使って *TK* 遺伝子変異誘発の用量効果を MMS について検討しており、閾値が 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、LOEL は 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であることを明らかにしている。*TK* 遺伝子座位では *HPRT* 遺伝座位に比べて約10倍の BG 変異が認められるが、閾値および LOEL は同じであること示されている。尚、*TK* 変異の BG が高い理由には *HPRT* 変異の高率な致死作用が上げられている。

b) MNU および ENU

MMS や EMS と同じように DNA のメチル化またはエチル化修飾を行なう MNU および ENU の小核誘発能の用量効果曲線を図-4に示す。MMS や EMS と異なり閾値の存在は認められない。

同様に *HPRT* 遺伝子変異をマーカーに用量効果を検討した結果でも閾値の存在は認められていない。

c) DNA修復酵素の閾値発現における関与

MMS や EMS によってグアニンの ϕ 位にアルキル化が起こることが突然変異誘発の原因になっており、その修飾された DNA を修復する酵素の作用により閾値が生じた可能性が考えられる。そこで MMS による遺伝毒性誘発に関わる閾値発現におけるアルキルグアニン DNA アルキルトランスフェラーゼ (AGT) の関与を検討している。細胞はヒトリンパ芽球様細胞で、MT1 (AGT^{-/-}, TK^{+/+}, MSH^{+/+}) 細胞を用いている。その結果小核の誘発には AHH-1 細胞とほぼ同じ濃度の閾値が認められている。*HPRT* 遺伝子

変異や *TK* 遺伝子変異における閾値発現における AGT の役割は今後の研究に期待される。

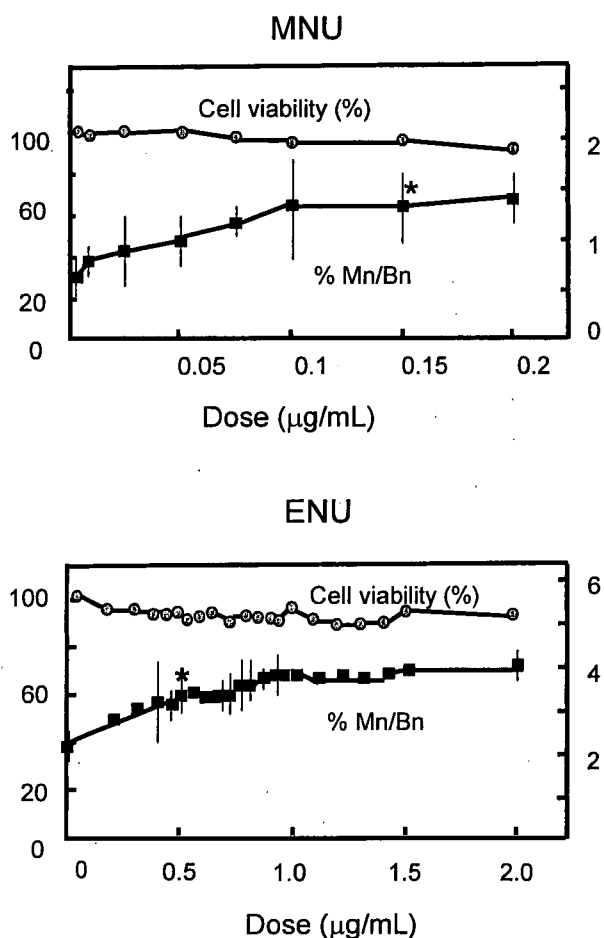


図-4. AHH-1細胞におけるMNUおよびENUによる小核誘発の用量効果

*: one-way ANOVA-Dunnett's posthoc testによりBGと有意差を示した最初の濃度

2. 遺伝毒性発現様式のモデル化による閾値の有無を評価する方法

Watanabeは、AmesテストではLNTモデルが適合すると考えられるが、修復・解毒が十分高い時は低用量では閾値が認められると考え、それを数式モデ

ルで示している。解毒(修復を含む)因子の結合は以下のように表わせる。

$$Kd = [X][F] / [X:F]$$

X; free compound

F; free factor

X:F; compound combined with the factor

ここで解毒能(detoxification capacity)をCとすると

$$C = F + X:F$$

$$Kd = (x - X:F)(C - X:F) / X:F$$

x; 用量

$$x = X + X:F$$

となりKdはX:Fの2次式で表せる。

毒性(y)は、Aを比活性とすれば

$$y = A(x - X:F)$$

Kdを求めることが出来る。一方、Kdが種々の値をとることを想定して用量効果を示したのが図-5である。Kdが小さい場合、すなわち解毒が高率に行なわれる場合は、閾値が存在することになる。

さらにBGのレベルの影響、毒性が飽和するレベルあること等を考慮してモデルを組んでいる。

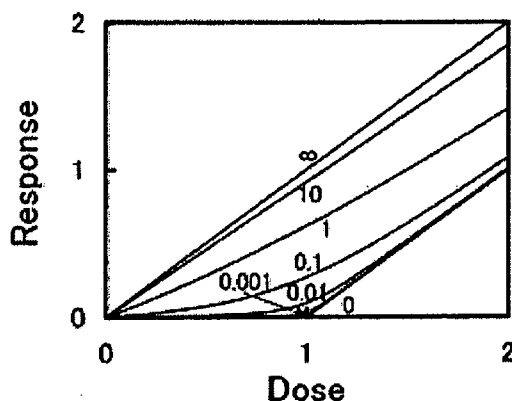


図-5. 種々のKdの場合の毒性用量効果

YG7108(Δogt , Δada)とTA1535株をMNNG処理した場合に、YG7108では閾値が認められないが、TA1535では認められる。誘発変異/用量の用量効果を調べると、閾値の存在を明らかに示すことができる(図-6)。しかし、これは閾値様のものであり、実は毒性発現がある。ちなみにKdを0.0001 μg 、解毒能Cを0.75 μg (実測値に基づく)と仮定し、YG7108のデータから算出するとその毒性発現量は、図-6に示すように μg 当たり8変異ということである。

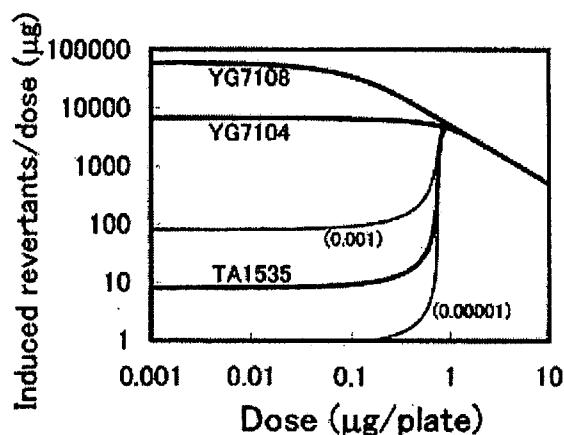


図-6. MNNGによる変異誘発/用量に対する用量効果

Sodium azideの場合、誘発変異/用量の用量効果(図-7)からもわかるように、閾値はない。

用量効果を示す場合「誘発変異/用量」の用量効果をしめすことが、閾値の有無を評価するのに適切と思われる。

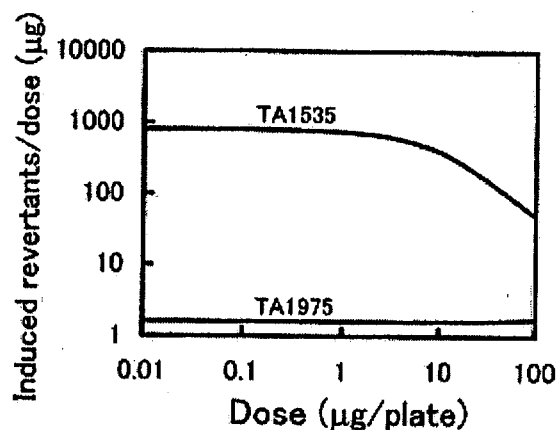


図-7. AZによる変異誘発/用量に対する用量効果

D. 考察

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。確かに閾値を発現するMMS、EMSとMNU、ENUとでは、DNA修飾の特性が異なるが、MNGを含めてどういうタイプの修飾特性を示す物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。

数式モデルを用いた閾値有無の評価は、「閾値」の意味する内容を伝えることの難しさを解決してくれる重要な方法である。「閾値」の持つ社会的意義からして

も、多くのヒトが共通の理解に到達することも閾値研究の上で重要な問題である。

F. 健康危機情報

特になし

G. 引用論文

Doak SH, Jenkins GJS, Johnson GE, Quick E, Parry EM, Parry JM. Mechanistic influence for mutation induction curves after exposure to DNA-reactive carcinogens. *Cancer Res.* 2007; 67: 3904-11.

Jenkins GJS, Doak SH, Johnson GE, Quick E, Waters EM, Parry JM. *Mutagenesis.* 2005; 20: 389-98.

Watanabe M, Threshold-like dose-response relationships in a modified linear-no-threshold model: application of experimental data and risk evaluation, *Genes & Environ.*, in press.

H. 研究発表

1. 論文発表
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:LC/MS/MSを用いたDNA付加体の解析

分担研究者: 松田知成 京都大学工学研究科 准教授

研究要旨

変異原物質の閾値の問題を議論する上で、内因性のDNA損傷のレベルを調べることは重要である。脂質過酸化により生じる内因性アルデヒド類が引き起こすDNA損傷について、塩基損傷については多くの報告があるが、糖、リン酸部の修飾については不明な点が多い。そこで本研究では、アルデヒド暴露したDNAをLC/MSのフルスキャン分析し、塩基損傷以外のDNA損傷の有無について調査した。その結果、これらのアルデヒド類はDNAの塩基以外の箇所にも損傷を与える可能性が示唆された。LC/MS/MS分析により、 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付加体であるがヒト肺DNA中から検出され、これら新規付加体の重要性が示唆された。

キーワード: アルデヒド類、DNA付加体、LC/MS/MS、バイオマーカー、生体影響、酸化損傷

A. 研究目的

変異原物質の閾値の問題を議論する上で、内因性のDNA損傷のレベルを調べることは重要である。脂質過酸化により生じる内因性アルデヒド類が引き起こすDNA損傷について、塩基損傷については多くの報告があるが、糖、リン酸部の修飾については不明な点が多い。そこで本研究では、アルデヒド暴露したDNAをLC/MSのフルスキャン分析し、塩基損傷以外のDNA損傷の有無について調査した。

B. 研究方法

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法という2種類の方法でデオ

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。このスペクトル情報からMRM測定系を確立した。そして、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。なお、献体臓器DNAの採取、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とり、当該機関および京都大学において倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

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。

D. 考察

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派で、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。同じ DNA 試料を使っても、MN/SPD 法と NucleaseP1 法では検出されるピークのパターンが異なっていた。これは、DNA のうちバルキナーな塩基付加体の近傍が NucleaseP1 消化に抵抗性であるためと考えられる。検出されたピークの中には、付加体近傍のリン酸エステル結合の切れ残りによるダイマーらしきピークもいくつか見られたが、それでは説明できないピークも数多く見られた。これより、糖やリン酸部の付加体が出来ている可能性が示唆された。また、 m/z 404>160 で検出できるアクロレイン由来新規 DNA 付加体は塩基付加体でない可能性が高いが、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。

E. 結論

今回用いた網羅的解析手法によって、アルデヒド類が誘発する塩基付加体以外の DNA 損傷が少なからず存在することが明らかとなった。今後はこれらの構造決定が必要である。

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

- (1) Misaki K, Suzuki M, Nakamura M, Handa H, Iida M, Kato T, Matsui S, Matsuda T. : Aryl Hydrocarbon Receptor and Estrogen Receptor Ligand Activity of Organic Extracts from Road Dust and Diesel Exhaust Particulates. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2008
- (2) Kanaly RA, Matsui S, Hanaoka T, Matsuda T. : Application of the adductome approach to assess intertissue DNA damage variations in human lung and esophagus, *Mutation Research 625 (2007) 83-93*
- (3) Kentaro Misaki, Hirofumi Kawami, Tota Tanaka, Yoji Handa, Masafumi Nakamura, Saburo Matsui, and Tomonari Matsuda*: Aryl hydrocarbon receptor ligand activity of polycyclic aromatic ketones and polycyclic aromatic quinones, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 26, No. 7, pp. 1370-1379, 2007
- (4) Matsuda T*, Matsumoto A, Uchida M, Kanaly R, Misaki K, Shibutani S, Kawamoto T, Kitagawa K, Nakayama KI, 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(11):2363-6, 2007.

- (5) Misaki, Kentaro; Matsui, Saburo; Matsuda, Tomonari: Metabolic Enzyme Induction by HepG2 Cells Exposed to Oxygenated and Non-oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Chem. Res. Toxicol.*, 20, 277-283, 2007
- (6) 一瀬豊日、北川恭子、松野康二、松田知成、小山倫浩、川本俊弘:「アセトアルデヒドにより生成する付加体と臓器障害」、日本アルコール精神医学雑誌、第14巻第1号、2007年

2. 学会発表

- (1) Koichi Nishimura, Yukari Totsuka, Masaru Terasaki, Ken-Ichi Mukaisyo, Takanori Hattori, Tomonari Matsuda, Takashi Sugimura, Keiji Wakabayashi: Analysis of DNA adducts derived from *N*-nitroso bile acid conjugates in rat duodenogastric reflux model. *1st Asian Conference on Environmental Mutagens and 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society*, 29-30th November, 2007, Kitakyushu, Japan
- (2) Robert A, Kanaly, Haruna Nagayoshi, Tomoyuki Hanaoka, Tomonari Matsuda: Utilization of the adductome approach to assess DNA damage in human liver tissue. *1st Asian Conference on Environmental Mutagens and 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society*, 29-30th November, 2007, Kitakyushu, Japan
- (3) Hitomi Takemura, Harue Uchiyama, Maki Morita, Hiroyuki Sakakibara, Takeshi Ohura, Haruna Nagayoshi, Tomonari Matuda, Takeshi Amagai, Ryoko Kuruto, Kayoko Shimoi: A selective inhibitor of CYP1B1, chrysoeriol. *1st Asian Conference on Environmental Mutagens and 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society*, 29-30th November, 2007, Kitakyushu, Japan
- (4) Pei-Hsin Chou, Haruna Nagayoshi, Saburo Matsui, Masafumi Nakamura, Tomonari Matsuda: AhR Activation and Metabolic Degradation of Quinoline DisperseDyes-Disperse Yellow 54 and Disperse Yellow 64. *1st Asian Conference on Environmental Mutagens and 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society*, 29-30th November, 2007, Kitakyushu, Japan
- (5) Ryuhei Nishi, Makoto Kaneko, Tomonari Matsuda, Saburo Matsui: The behavior of DNA-damaging agents and AhR ligands in petrochemical industrial wastewater treatment plant. *1st Asian Conference on Environmental Mutagens and 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society*, 29-30th November, 2007, Kitakyushu, Japan
- (6) Haruna Nagayoshi, Tomonari Matsuda, Saburo Matsui: The effect of CYP1A1 on AhR ligand activity using novel yeast reporter gene assay system. *1st Asian Conference on Environmental Mutagens and 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society*, 29-30th November, 2007, Kitakyushu, Japan
- (7) Haruna Nagayoshi, Robert A, Kanaly, Tomonari Matsuda: Comparison of Cumulative DNA Damage in Human Organs by the Newly Developing Adductome Approach, *4th Joint Meeting of the Society for Free Radical Research Australasia and Japan*, 1-5th Dec, 2007, Kyoto, Japan

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: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マウス由来の胚繊維芽細胞にアスベスト(クリソタイル 白石綿)を曝露し、誘発される欠失変異を解析した。アスベストは用量依存的に欠失変異頻度を上昇させ、その変異スペクトルは過酸化水素処理して得られる変異と近似していた。以上の結果から(1)アスベストによる発がん機構には酸化的 DNA 損傷に基づく遺伝毒性が関与すること(2) *gpt delta* トランスジェニックマウスは欠失変異を検出する有用な試験系であることが示唆された。

キーワード: アスベスト、欠失変異、*gpt delta* トランスジェニックマウス

A. 研究目的

アスベストは繊維状の鉱物であり、その断熱性、耐久性、耐薬品性、絶縁性と安価ゆえに、建造物の床、壁、天井の断熱材、絶縁材などとして汎用されてきた。我が国においても 1970 年から 1990 年代半ばまで、毎年 20 万トン以上が輸入され、これまでに輸入されたアスベストの総量は 1,000 万トン以上と推定されている。しかしアスベストは肺がん、中皮腫をはじめ、各種の疾病の誘発と関連しており、IARC(International Agency for Research on Cancer, Lyon, France)はアスベストをグループ 1(ヒトに対する発がん性を有する物質)と分類している。アスベストによる健康被害は、職業曝露に留まらず、アスベスト工場の近郊に住む住民やアスベスト工場の労働者の家族にも及んでおり、アスベストによる健康被害は社会問題にもなっている。アスベストによる肺がん

や中皮腫の誘発には、長い潜伏期(20-40年)があり、今後さらに患者数が増加するものと予想されている。

その明確な発がん性にもかかわらず、アスベストの発がん機構は、必ずしも明確ではない。アスベスト繊維の太さや、生体内における耐久性、繊維表面の反応性などが、その発がん性に影響を与えることが知られている。また、ある種のアスベストについては、ヒトや齧歯類の培養細胞に染色体異常や姉妹染色分体交換を誘発する。したがって、アスベストが誘発する DNA 損傷とこれに基づく遺伝毒性(点突然変異、染色体異常、欠失、転座など)が、アスベスト発がんの機構の一つとして考えられる。

アスベストの遺伝毒性を個体(in vivo)において検出する試みは、 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おり、弱い遺伝毒性が検出されている。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マウスを樹立し、そのバリデーションを進めてきた。このマウスにはトランスジーンとして染色体当たり 80 コピー、合計 160 コピーの λ EG10 DNA がマウス染色体に挿入されている。*gpt delta* マウスを用い、放射線や多数の化学物質について点突然変異と欠失変異が検索され、複数の臓器で多様な変異を検出できることが明らかにされている。特に λ EG10 DNA 中の *red/gam* 遺伝子をレポーターとする Spi^- アッセイにより、1 kb 以上の大きさの欠失変異を効率よく検出できる点に *gpt delta* マウス遺伝毒性試験の特徴がある。

本研究では、*gpt delta* トランスジェニックマウス由来の胚繊維芽(mouse embryonic fibroblast MEF)細胞にアスベスト(クリソタイル白石綿)を曝露し、誘発される欠失変異を Spi^- アッセイを用いて解析した。またアスベスト曝露に伴う二重鎖 DNA 切断をヒストン γ H2A のリン酸化を指標に検討した。

B. 研究方法

6) MEF 細胞の培養

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。細胞培養は、5 %炭酸ガス存在下、37°C、15 %熱変性牛胎児血清とペニシリン(100 U/mL)、ストレプトマイシン(50 μ g/mL)を含むダルベッコ改変イーグル培地(Gibco-BRL)で行った。

7) クリソタイルの調製

クリソタイル(平均長 7.8 μ m、平均半径 0.2 μ 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。混合液はオートクレーブ滅菌し、適宜希釈して細胞への曝露に用いた。

8) 細胞毒性の測定

ウェル当たり 10⁵ 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、過酸化水素については血清の不在下で 15 分、37°C で培養した。培養液を交換した後、5 mg/mL の MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 溶液を 200 μ L 加え、さらに 4 時間培養した。培養終了後、上清を採取し 1 mL の酸性イソプロパノールを加えて不溶性のフォルマザンを可溶化し、570 nm の吸収を測定した。

9) Spi^- 変異体頻度(MF)の測定

クリソタイルあるいは過酸化水素で処理後、MEF 細胞から RecoverEase DNA isolation kit (Stratagene)を用いてゲノム DNA を採取した。その後、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 EG10 をファージ粒子として回収した。ファージは大腸菌 XL-1 Blue MRA(P2) 株(Stratagene)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、MEF 細胞から回収した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、さらに PCR 法を用いて 2 kb 以上の大きな欠失とそれ以下の小さな欠失に分類し、それぞれの変異頻度を算出した。

10) γ -H2AX リン酸化の測定

MEF 細胞をクリソタイル(1 or 2 μ g/cm²)で 24 時間処理した後、2 % paraformaldehyde で固定しマウス γ -H2AX に対するモノクロー

ナル抗体(Upstate)と fluorescein isothiocyanate (FITC)ラベルした二次抗体 (Sigma-Aldrich)で染色した。10 μ g/mL propidium iodide(PI)と 40 μ g/mL の RNaseA を含む 0.5 mL 溶液に細胞を懸濁し、4°Cで 30 分以上インキュベートした。488 nm のアルゴン・レーザーで励起した PI と FITC の蛍光を FACSCalibur cytometer で測定した。

11) 統計的手法

すべての測定値について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)

本研究で使用した細胞はマウス由来の細胞であり、倫理上問題はない。また、全ての実験は研究所の倫理規定に準拠して行った。

C. 研究結果

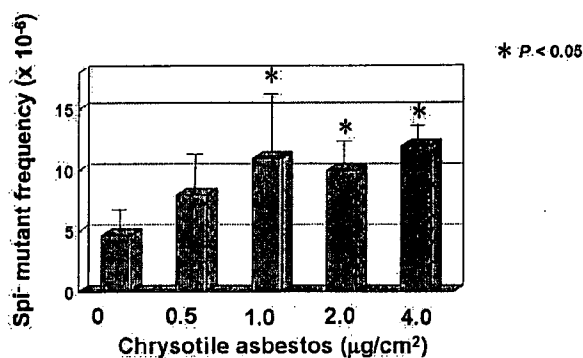
1) クリソタイルによる細胞毒性

MTT は水溶性であるが生細胞中で不溶性のフォルマザンに代謝される。この還元反応は、生細胞中では起こるが死細胞ではおこらないため、MTT 法は生存率測定の指標として汎用されている。MEF 細胞を 0.5~6 μ g/cm² のクリソタイルで 24 時間処理すると、用量依存的に生存率の低下が観察された。無処理の生細胞数を 100 とすると、クリソタイル 0.5、1、2 μ g/cm² での相対生存率は 86、71、41%であった。

2) クリソタイル処理による Spi⁻ MF の増大

MEF 細胞における無処理群の Spi⁻ 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 μ g/cm² と 1 μ g/cm² では用量依存的に MF が増大し、1 μ g/cm² では無処理群に比べて MF が 2.4 倍上昇した (11.4×10^{-6} vs 4.69×10^{-6}) (第 1 図)。1 μ g/cm² 以上の用量で

の MF は、無処理群に比べて有意差を示した ($P < 0.005$)。



第 1 図 クリソタイル処理による Spi⁻ MF の増大

3) Spi⁻ 変異体の分子解析

無処理群およびクリソタイル 1 μ g/cm² 処理群から 93 個および 74 個の Spi⁻ 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、無処理群では 10 個 (11%) が 2 kb 以上の欠失変異体であったのに対し、処理群では 17 個 (23%) が 2 kb 以上の欠失変異体であった。この割合 (11% と 23%) と、それぞれの Spi⁻ MF (4.69×10^{-6} と 11.4×10^{-6}) をかけあわせ、無処理群およびクリソタイル処理群における 2 kb 以上の欠失変異体頻度を求めた。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 (2.6×10^{-6} vs 0.5×10^{-6} , $P < 0.005$)。これに対して 2 kb 以下の欠失 (その大部分は 1 塩基の欠失である) は、クリソタイル処理により約 2 倍増大した。これらの結果から、クリソタイルが誘発する欠失は、主に 2 kb 以上の欠失であることが示唆された。

4) 変異誘発への酸化ラジカルの関与

アスベストによる変異誘発には酸化ラジカルの関与が示唆されている。そこで MEF 細胞をクリソタイル (1 μ g/cm²) あるいは過酸化水素 (2.4 mM) で処理し、その生存率と Spi⁻ MF を測定した。生存率はクリソタイル処理の場合 71%、過酸化水素処理の場合 69% であった。Spi⁻ MF は、いずれも無処理群 ($4.69 \pm 1.42 \times 10^{-6}$) の 2

倍以上の値を示したが両者の間に有意な差はなかった。またカタラーゼ(5,000 U/mL)をクリソタイル処理あるいは過酸化水素処理の際に共存させると、そのSpi⁻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⁻MFに影響を与えなかった。PCR法により2 kb以上の欠失変異体を同定しその頻度を求めると、無処理群では $0.5 \pm 0.16 \times 10^{-6}$ であったが、クリソタイル処理群では $2.6 \pm 0.93 \times 10^{-6}$ 、過酸化水素処理群では $3.2 \pm 1.34 \times 10^{-6}$ であった。これらの結果は、クリソタイル処理による欠失変異の誘発に酸化ラジカルが関与していることを示唆している。

5) MEF細胞における γ -H2AXの誘発

DNAに二重鎖切断が誘発されるとヒストンH2AXのセリン139のリン酸化が起こる。MEF細胞をクリソタイル(1ないし $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)で処理した後にH2AXのリン酸化をフローサイトメーターで測定した。その結果、クリソタイル処理した細胞では抗 γ -H2AX抗体とより多く反応することが明らかになった。また、この反応はクリソタイル処理の際にカタラーゼを共存させると抑制された。これらの結果は、クリソタイル処理により生ずる酸化ラジカルがDNAを損傷しDNA二本鎖切断を誘発することを示している。

D. 考 察

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。アスベスト処理した*lacI*トランスジェニックラットにおいて8-hydroxydeoxyguanosine

の増大が報告されている。本研究の結果は、カタラーゼがSpi⁻欠失変異やDNA二本鎖切断を抑制したことから、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処理により酸化ラジカルが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。

DNA鎖の切断に基づくDNAの再編成(欠失、転座などの染色体異常)は、発がんの有力な機構である。本研究で用いた*gpt delta*トランスジェニック動物ではSpi⁻検出法を用いて、欠失変異体を効率よく検出することができる。これまでに検出された最も大きな欠失変異体の大きさは9.6kbであり、Spi⁻の多くがキロベースサイズの欠失変異体であることを示唆している。しかし、このマウスの17番染色体には λ EG10(約48kb)が80コピータンデムに並んで挿入されている(合計の挿入サイズは3.8kb)ため、複数のコピーにまたがって大きな(メガ)サイズの欠失がおこっても、見かけ上は10kb以下の欠失変異体となってしまう。したがって、今回検出されたキロベースサイズの欠失変異体も、実際にはより大きな欠失変異体である可能性がある。今後は、アスベストの誘発変異を抑制する物質の検索に、*gpt delta*トランスジェニックマウスまたそのMEF細胞を使用していきたいと考える。

E. 結 論

アスベストによる発がん機構には酸化的DNA損傷に基づく遺伝毒性が関与すること、*gpt delta*トランスジェニックマウスは欠失変異を検出する有用な試験系であることが示唆さ

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) K. Yamauchi, S. Kakinuma, S. Sudo, S. Kito, Y. Oota, T. Nohmi, K. Masumura, M. Nishimura and Y. Shimada, Differential effects of low- and high-dose X-rays on N-ethyl-N-nitrosourea-induced mutagenesis in thymocytes of B6C3F1 *gpt*-delta mice, *Mutat. Res.*, in press.
- 2) A.H. Hashimoto, K. Amanuma, K. Hiyoshi, Y. Sugawara, S. Goto, R. Yanagisawa, H. Takano, K. Masumura, T. Nohmi and Y. Aoki, Mutations in the lungs of *gpt* delta transgenic mice following inhalation of diesel exhaust, *Environ. Mol. Mutagen.*, 48, 682-693 (2007)
- 3) T. Umemura, Y. Kuroiwa, M. Tasaki, T. Okamura, Y. Ishii, Y. Kodama, T. Nohmi, K. Mitsumori, A. Nishikawa and M. Hirose, 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)
- 4) Y. Aoki, A.H. Hashimoto, K. Akanuma, M. Matsumoto, K. Hiyoshi, H. Takano, K. Masumura, K. Itoh, T. Nohmi and M. Yamamoto, Enhanced spontaneous and benzo(a)pyrene-induced mutations in the lung of Nrf2-deficient *gpt* delta mice, *Cancer Res.*, 67, 5643-5648 (2007)
- 5) A. Takeiri, M. Mishima, K. Tanaka, A. Shioda, A. Hrada, K. Masumura and T. Nohmi, 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)
- 6) A. Xu, L.B. Smilenov1, P. He, K. Masumura, T. Nohmi, Z. Yu and T.K. Hei, New insight into intrachromosomal deletions induced by chrysotile in *gpt* delta transgenic, *Environ. Health Perspective*, 115, 87-92 (2007)
- 7) 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)
- 8) 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)

2. 学会発表

- 1) T. Nohmi, Development of in vivo genotoxicity assays with transgenic mice and rats, International Symposium on the Predictive, Preventive and Mechanistic Mutagenesis & XXXIII EMSI Annual Meeting in Aligarh, India, January

- 2008.
- 2) M. Ikeda, K. Masumura, K. Matsui, H. Kohno, K. Sakuma, T. Tanaka, T. Kamataki and T. Nohmi, 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 9th International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis (ICMAA-2007) in Jeju island, Korea, December 2007.
 - 3) Y. Shimada, M. Nishimura, S. Kakinuma, K. Yamauchi, T. Imaoka, Y. Shang, T. Nohmi, I. Kawaguchi and M. Doi, Dose dependency of combined effects of ionizing radiation and other agents on cancer induction, New Nuclear Research Symposium, Biological Responses to Low Dose Radiation in Tokyo, Japan, November 2007.
 - 4) M. Ikeda, K. Masumura, Y. Sakamoto, B. Wang, M. Neno, K. Sakuma, I. Hayata and T. Nohmi, 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 in Tokyo, Japan, November 2007.
 - 5) T. Nohmi, Development of bacteria genotoxicity assays: past, present and future perspective, VIII Congresso Brasileiro de Mutagenese Carcinogenese e Teratogenese Ambiental (SBMCTA 2007), in Angra dos Reis, Brazil, October 2007.
 - 6) T. Nohmi, The role of Y-family DNA polymerase in oxidative mutagenesis, 38th Annual Meeting of Environmental Mutagen Society in Atlanta, USA, October 2007.
 - 7) Y. Totsuka, R. Nishigaki, T. Takamura-Enya, T. Nohmi, T. Sugimura and K. Wakabayashi, Formation of RNA adduct with a novel endogenous mutagen and carcinogen, aminophenylnorharman, 38th Annual Meeting of Environmental Mutagen Society in Atlanta, USA, October 2007.
 - 8) T. Nohmi, DNA repair as a constituent of thresholds of genotoxicity, 37th European Environmental Mutagen Society, Basel, Switzerland, September 2007.
 - 9) T. Nohmi, Validity of in vivo genotoxicology, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, in Tokyo, Japan, August 2007.
 - 10) T. Ono, N. Okudaira, Y. Uehara, T. Matsumoto, Y. Oghiso, K. Tanaka, K. Ichinohe, S. Nakamura, S. Tanaka, N. Kagawa, K. Fujikawa, A. Ootsuyama, T. Norimura and T. Nohmi, Dose and dose rate dependency in radiation-induced mutation in liver and spleen of gpt-delta mice, 13th International Congress of Radiation Research (ICRP) in San Francisco, USA, July 2007.
 - 11) T. Nohmi, Asbestos and other environmental toxic chemicals, The 5th International Conference on Environmental Mutagens in Human

Populations in Antalya, Turkey, May 2007.

- 12) T. Nohmi, Roles of Y-family DNA polymerases in mutagenesis via the misincorporation of oxidized dNTPs, The 3rd Japan US DNA repair meeting in Sendai, Japan, May 2007.

G. 知的所有権の取得状況

特になし

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
Hidaka K, <u>Yamada M</u> , 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 η	DNA Repair	7	497-506	2008
Nohmi T, <u>Yamada M</u> , Grúz P	DNA Repair and DNA damage tolerance in archaeal bacteria: Extreme environments and genome integrity	Archaea: New models for prokaryotic biology		147-169	2008
<u>Honma M.</u> , 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
Luan Y, Suzuki T, Palanisamy R, Takashima Y, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Saito M, Matsufuji H, Yamagata K, Yamaguchi T, Hayashi M, <u>Honma M</u>	Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC>TA transversion in human cells	Mutat. Res.	619	113-123	2007
Misaki K, Kawami H, Tanaka T, Handa Y, Nakamura M, Matsui S, <u>Matsuda T</u>	Aryl hydrocarbon receptor ligand activity of polycyclic aromatic ketones and polycyclic aromatic quinones	Environ. Toxicol. Chem.	26	1370-1379	2007
<u>Matsuda T</u> , Matsumoto A, Uchida M, Kanaly R, Misaki K, Shibutani S., Kawamoto T, Kitagawa K, Nakayama KI, 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
Kanally RA, Matsui S, Hanaoka T, <u>Matsuda T.</u>	Application of the adductome approach to assess intertissue DNA damage variations in human lung and esophagus	Mutat. Res.	625	83-93	2007

Umemura T, Kuroiwa Y, Tasaki M, Okamura T, Ishii Y, Kodama Y, <u>Nohmi T</u> , 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 <i>gpt</i> delta mice	Mutat. Res.	633	46-54	2007
Ikeda M, Masumura K, Sakamoto Y, Wang B, Neno M, Sakuma K, Hayata I, <u>Nohmi T</u>	Combined genotoxic effects of radiation and a tobacco-specific nitrosamine in the lung of <i>gpt</i> delta transgenic mice.	Mutat Res.	626	15-25	2007
Aoki Y, Hashimoto AH, Akanuma K, Matsumoto M, Hiyoshi, K, Takano H, Masumura K, Itoh K, <u>Nohmi T</u> , Yamamoto M	Enhanced spontaneous and benzo(a)pyrene-induced mutations in the lung of Nrf2-deficient <i>gpt</i> delta mice	Cancer Res.	67	5643-5648	2007
Takeiri A, Mishima M, Tanaka K, Shioda A, Harada A, Masumura K, <u>Nohmi T</u>	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
Xu A, Smilenov LB, He P, Masumura K, <u>Nohmi T</u> , Yu Z, Hei TK	New insight into intrachromosomal deletions induced by chrysotile in <i>gpt</i> delta transgenic	Environ. Health Perspective.	115	87-92	2007