

比較的多く誘発することが示された(図2)。以前、薬物代謝能のないTK6細胞ではAAはLOH型突然変異を、GAは点突然変異をが多く誘発することが示された(図2)ことから、AAはMCL-5細胞でGAに変換されたことを示すものである。以上のことから、AAの代謝経路は、CYP2E1以外にも酵素が存在している可能性が考えられた。今後、他の酵素(CYP1A2、CYP2A3、CYP3A4、mEpoxide hydrolase等)を責任酵素として考え研究する必要がある。AAの代謝経路の解明が、新しい解毒方法の確立に重要と考えられる。

In vivoでのAAの遺伝毒性の特徴を明らかにするために、gptデルタトランスジェニックラットを用いて多臓器、マルチエンドポイントの遺伝毒性試験を行った。AAを28日間飲水投与し、肝臓、精巣における遺伝子突然変異、血液、精巣の小核、肝臓のコメット試験を行った。肝臓でのコメット試験によるDNA損傷(図3)と、投与開始後48時間で骨髓、末梢血での用量依存的な小核頻度の増加が観察された(図4)。一方、28日間投与後では骨髓、末梢血での小核の誘発は観察されなかった。この原因として、長期投与により解毒能が活性化され、小核試験のような一過性の遺伝毒性発現が抑制されたことが考えられる。DNA損傷試験であるコメット試験は、初期DNA損傷を検出するため解毒能、修復能に影響を受けず、また、突然変異は解毒能が獲得される以前の変異も固定され残っている。従って、AAのような化合物の長期投与による遺伝毒性の評価にはコメット試験、遺伝子突然変異試験が有効であるのかもしれない。

今後、遺伝子突然変異誘発の検討、および遺伝毒性試験結果と、DNAアダクト量の

相関を明らかにする。さらに、幼若ラットを用いた試験も行い、ライフステージの違いによる遺伝毒性感受性の差も検討する予定である。

E. 結論

CYP2E1を発現するサルモネラ菌株、ヒト培養細胞を用いた試験の結果から、CYP2E1単独ではAAからGA代謝は進行しないことが明らかとなった。一方、5種類の薬物代謝酵素を発現するMCL-5細胞(CYP1A2、CYP2A3、CYP3A4、CYP2E1、mEpoxide hydrolase)を用いてAAを試験したところ、非酵素発現細胞と比較し、高いTK突然変異の誘発を認め、そこでの変異スペクトルは非トランスジェニック細胞でのGAの突然変異スペクトルと一致した。このことはMCL-5細胞ではAAからGAの代謝が起きていることを示すものである。他の薬物代謝酵素の関与や、CYP2E1とその酵素との共同での代謝がAAの遺伝毒性発現に重要である。現在、責任酵素の同定を試みている。

gptデルタトランスジェニックラットを用いたin vivoでのAAの遺伝毒性試験で、28日間投与後の肝臓でのコメットによるDNA損傷、投与初期での骨髓、末梢血での小核の増加が確認された。今後、遺伝子突然変異、さらに、幼若ラットを用いた試験も行い、ライフステージの違いによる遺伝毒性感受性の差も検討する。

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., Sugasawa, 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. 13th 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. 13th 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. 6th 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. 37th European Environmental Mutagen Society (2007.9)
- 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., Kinoshita N., Matsuda T., Hayashi M., and Honma M.: Genotoxicity of acrylamide 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 Honma 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)

Honma M., Yasui M., Koyama N., Koizumi T., Sakuraba M., Sakamoto H., Takashima Y., Sugimoto K., and Hayashi M.: Genotoxic Responses by Live Cell Imaging Analysis International Conference on Toxic Exposure

Related Biomarker, Genome and Health Effects (2008.1)

Honma M., Takashima Y., Sakuraba M., Koizumi T., Sakamoto H., and Hayashi M. Inter-allelic homologous recombination and target integration induced by DNA double strand break Key Stone Symposium ” DNA Repair and Recombination ” (2008.2)

G. 知的所有権の取得状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	該当なし						

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
Kurebayashi, H., Ohno, Y.	Metabolism and cytotoxicity of acrylamide in isolated rat hepatocytes: protective effects of GSH precursors.	Drug Metabolism Reviews	39, S1	246	2007
Woo, G-H., Shibutani, M., et al.	Lack of preventive effects of dietary fibers or chlorophyllin against acrylamide toxicity in rats.	Food Chem. Toxicol.	45, 8	1507-1515	2007
Takahashi, M., Shibutani, M., et al.	Pathological assessment of the nervous and male reproductive systems of rat offspring exposed maternally to acrylamide during the gestation and lactation periods - a preliminary study.	J. Toxicol. Sci.	33, 1	11-24	2008