

200837006A

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 20 年度 総括研究報告書

研究代表者 神谷 研二

平成 21 年 (2009) 4 月

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 20 年度 総括研究報告書

研究代表者 神谷 研二

平成 21 年 (2009) 4 月

目 次

I.	総括研究報告書.....	1
	既存添加物の発がん性等に関する安全性評価研究 神谷研二	
II.	研究成果の刊行に関する一覧表.....	64
III.	研究成果の刊行物・別刷.....	65

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-

研究代表者	神谷 研二	広島大学原爆放射線医科学研究所	教授
研究協力者	豊島めぐみ	広島大学原爆放射線医科学研究所	助教
研究協力者	本田 浩章	広島大学原爆放射線医科学研究所	教授
研究協力者	習 陽	広島大学原爆放射線医科学研究所	研究員
研究協力者	渡邊 敦光	広島大学原爆放射線医科学研究所	名誉教授
研究協力者	増田 雄司	広島大学原爆放射線医科学研究所	助教

研究要旨

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抽出した食品添加物である。本研究では、ばい煎ダイズ抽出物の長期反復摂取した場合の安全性を動物実験により評価することを目的とした。その為、ばい煎ダイズ抽出物のラットによる1年間反復投与毒性試験を実施した。同時に、既存食品添加物などの安全性を高感度に検定できるマウスモデルの開発を行い、これを用いたばい煎ダイズ抽出物の1年間反復投与試験を実施した。その結果、以下の成果を得た。

- 1) ラットによる1年間反復投与毒性試験では、血液学的検査、血液生化学検査、及び病理学的検査等でばい煎ダイズ抽出物に起因すると考えられる慢性毒性所見は認められなかった。一方、雄ラットで5%、雌ラットでは2.5%以上のばい煎ダイズ抽出物の投与で体重の増加抑制が認められ、それに対応する摂餌量の低下が認められた。以上より1年間反復投与毒性試験におけるばい煎ダイズ抽出物による体重増加抑制の無毒性量は、雄ラット2.5%、雌ラット1.25%であると推定された。
- 2) 最近著しく進歩した自然突然変異の誘発機構の研究成果を応用して、微弱な発がん性等を短期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った。Rev1は、突然変異を誘発する「損傷乗り越え」DNAポリメラーゼである。この遺伝子を両アレルに持つRev1ホモトランスジェニックマウスは、変異原の投与により1カ月間で小腸に多数のmicro-adenomaが誘発され、T細胞受容体の突然変異頻度も有意に増加することから、変異原に対し高感受性であることが判明した。以上より、被験物質の安全性を高感度で迅速に評価できるマウスモデルが確立できた。
- 3) Rev1ホモトランスジェニックマウスを用いて1年間反復投与試験を実施した。その結果、血液学的検査、血液生化学検査、及び病理学的検査等でばい煎ダイズ抽出物の慢性毒性や発がん性を示す所見は認められなかった。一方、雄マウスでは、5%のばい煎ダイズ抽出物の投与で体重の増加抑制が認められ、それに対応する摂餌量の低下が認められた。以上よりこのマウスでの1年間反復投与試験における煎ダイ

ズ抽出物による体重増加抑制の無毒性量は、雄マウス 2.5%であり、雌マウスでは検査値のばらつきのため今後の検討が必要であると推定された。

- 4) 以上のラットとマウスの動物実験から安全性を評価すると、ばい煎ダイズ抽出物の慢性毒性所見は認められない。一方、体重増加抑制の無毒性量は、ラットとマウスではほぼ同程度と推定された。

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、その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、既存食品添加物の中から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。最初に、ラットを用いた1年間反復投与毒性試験によりばい煎ダイズ抽出物の慢性毒性を明らかにする。

一方、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点がある。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や染色体異常試験は陽性である。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。他方、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、微量の発がん性や変異原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慢性毒性や発がん性等を検索する。最後に、ラットとマウスの反復投与動物実験の結果を総合し、ばい煎ダイズ抽出物の安全性評価を行う。最終的には、この成果を厚生労働行政に反映することで、我が国独特のものが多く既存食品添加物に対する安全性の確保に貢献する。

B. 研究方法

本研究では、ラットを用いた1年間反復投与毒性試験によりばい煎ダイズ抽出物の毒性を明らかにする。次いで、ばい煎ダイズ抽出物等の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) 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毒性を検索し、安全性を評価する。

1. 被験物質

ばい煎ダイズ抽出物は日本食品添加物協会より供与されたものを用いた。ばい煎ダイズ抽出物は、使用時までは4°Cで保存した。被験物質を混入した目的の濃度の飲料水を作成し投与した。飲料水の調整は、週2或いは3回行った。

2. ラットおよび飼育条件

F344系ラットを入手し、基礎飼料 (CRF-1: オリエンタル酵母工業 (株)) と水道水で1週間馴化飼育後、健康な雌雄ラットを実験に用いた。飼育は温度21.0~25.0°C、湿度40~70%、換気回数10~25回/時間、蛍光照明12時間に制御された動物室で、ポリカーボネート製ケージ (床敷使用) に2~3匹ずつ収容して行った。

3. ラットによる1年間反復投与毒性試験

1年間反復投与毒性試験では、F344系雌雄ラットを入手し、11日間の馴化飼育後、各実験群を設定した。1年間反復投与毒性試験における各実験群の被験物質投与濃度とラット数を表1に示した。

表1. ラット1年間反復投与毒性試験

	実験群 (添加濃度)	雄ラット (n=60)	雌ラット (n=60)
①	0%	10	10
②	0.63%	10	10
③	1.25%	10	10
④	2.50%	10	10
⑤	5.00%	20	20

実験群として4群の被験物質投与群を設定し5%、2.5%、1.25%、および0.63%の割合でばい煎ダイズ抽出物を混合した飲料水を試験期間中自由に摂取させた。実験の対照群では、雌雄ラット各1群にばい煎ダイズ抽出物を含まない飲料水を与えた。また、基礎飼料 (CRF-1) は、試験期間中自由に摂取させた。一般状態及び死亡動物の有無を毎日観察し、体重、摂餌量、及び摂水量については投与開始後3ヵ月まで週1回、以後は4週に1回測定した。摂餌量、及び摂水量は、体重測定日にケージ単位に、7日分 (最初の1週間は3あるいは4日) の累積摂取量を測定し、計算により1日1匹当たりの摂餌量 (g/ラット/日) と摂水量 (ml/ラット/日) を求めた。被験物質摂取量 (mg/kg/日) は、当該測定日の平均体重、平均摂水量および被験物質添加濃度から、計算により求めた。

投与開始50週前後に尿検査を実施した。検査項目は、尿pH、蛋白、ケトン体、ブドウ糖、潜血、白血球、ウロビリノーゲン、潜血、比重等である。投与開始52週後に全生存動物を剖検した。剖検は、エーテル麻酔下で開腹、腹部大動脈より採血し、瀉血により屠殺後剖検した。諸臓器は、肉眼的に観察した後に摘出し、

脳,下垂体,甲状腺,胸腺,肺,心臓,脾臓,肝臓,副腎,腎臓,子宮,精巣及び卵巣については重量測定後,甲状腺,胃,小腸,大腸については摘出後直ちに10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。その後,各臓器および組織を切り出し,通常の方法によりパラフィン包埋後,薄片を作成し,ヘマトキシリン・エオジン(H.E.)染色を施して,病理組織学的に検索を行った。採血した血液は広島市医師会臨床検査センターに依頼し白血球(WBC),赤血球(RBC),ヘモグロビン(Hg),ヘマトクリット(Ht),血小板(PLT),平均赤血球容積(MCV),平均赤血球血色素量(MCH),平均赤血球血色素濃度(MCHC),ならびに好中球(Neutro),リンパ球(Lymph),単球(Mono),好酸球(Eosino),および好塩基球(Baso)の白血球分画を測定した。また,血清を分離し,総蛋白(TP),アルブミン(ALB),アルブミン・グロブリン比(A/G比),総コレステロール(T-CHO),中性脂肪(TG),尿素窒素(BUN),クレアチニン(CRE),ナトリウム(Na),クロール(Cl),カリウム(K),カルシウム(Ca),グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT),グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT),アルカリフォスファターゼ(ALP), γ -glutamyl transpeptidase(γ -GTP),及び総ビリルビン(T-Bil)を測定した。

4. 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変異原に対する突然変異誘発能を亢進

させた測定系である。この原理を応用して,哺乳類で自然突然変異を誘発する *Rev1* 遺伝子等の機能に注目して,発がん性等を高感度に検出できるモデルマウスの開発を行った。具体的には, *Rev1* トランスジェニックマウスの発がん感受性等の生物学的特性を昨年度に引き続き解析し,このマウスが発がん性等の高感度測定系になるか否か検討した。

4-1. *Rev1* トランスジェニックマウス (*Rev1* マウス) の作成

Rev1 トランスジェニックマウスは,共同研究により作製したものをを用いた。*Rev1* トランスジェニック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 *MTI*(metallothionein I 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 *Ick* 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 のサザンプ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。

4-2. 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ーンを検査し、生まれた全ての F2 世代の仔マウスにトランスジー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。

4-3. 化学物質投与による *Rev1* マウスでの発がん実験

野生型雄マウス、*Rev1* (Hemi, Homo) 雄マウスに出生時から 25mM ZnSO₄ 水を自由摂取させた。各実験群と使用したマウス数を表 2 に示した。6, 7 週齢時に MNU (50mg/kg) を腹腔内投与した。その後終生観察し、小腸腫瘍の解析を行った。具体的には、屠殺後小腸を採取し、ただちに 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定し、アルカリフォスファターゼ染色を行い顕微鏡下で小腸腫瘍の数を計測した。また、写真撮影を行い腫瘍の大きさを測定した。小腸病変は、H.E. 染色を行い病理学的解析を行った。

平成 19 年度に実施した野生型雄マウスと *Rev1* (Hemi, Homo) 雄マウスの小腸における *Rev1* mRNA 発現レベルの結果を再検討するために、再度を *Rev1* mRNA の発現レベルを定量した。雌雄の野生型マウスと *Rev1* (Hemi, Homo) マウスを各々 10 匹用意した。それぞれ 5 匹ずつ 2 群にわけ、前者には水道水を、後者には 25 mM ZnSO₄ 水を 3 週間自由摂取させた。その後、屠殺し小腸を採取し RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。各サ

ンプルを 20 μ g/ml に希釈し QuantiTect[®] SYBR[®]Green RT-PCR (QIAGEN) を用いて 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) により Real-time RT-PCR を行った。*GAPDH* を内部標準とし、*Rev1* の相対的発現レベルを定量した。

4-4. *Rev1* ホモマウスの化学物質に対する短期の発がん感受性の検討:

(1 ヶ月間、及び 2 ヶ月間発がん性試験)

平成 19 年度に実施した *Rev1* マウスの短期間での発がん感受性試験の結果を再検討し、さらに短期間での発がん感受性試験を確立するため、観察期間を 1 ヶ月間と 2 ヶ月間とした短期発がん感受性試験を実施した。5 週齢雄の C57BL/6 野生型マウスと *Rev1* ヘミホモマウス、及び *Rev1* ホモマウスに 25mM ZnSO₄ 水を自由摂取させた。各実験群と使用したマウス数を表 3 と表 4 に示した。6, 及び 7 週齢時に MNU (50mg/kg) を腹腔内投与した。未投与群には 0.9% 生理食塩水を投与した。観察期間を投与後 1 ヶ月又は 2 ヶ月間とした。観察期間終了後剖検し小腸を採取して、ただちに 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した。その後、アルカリフォスファターゼ染色を行い顕微鏡下で小腸腫瘍の数を計測した。また、写真撮影を行い腫瘍の大きさを計測した。小腸病変は、H.E. 染色を行い病理学的解析を行った。

4-5 *Rev1* マウスに誘発された腫瘍のゲノム解析

Rev1 マウスでは、胸腺リンパ腫が誘発される。化学発癌剤や放射線で誘発された胸腺リンパ腫は、そのゲノム変異の特徴が詳細に解析されている優れたモデル腫瘍である。そこで、*Rev1* マウスの特徴

を解析する一助として、誘発された胸腺リンパ腫のゲノム変異の特性を解析した。

a) 胸腺リンパ腫の遺伝子変異の解析

マウスに誘発した胸腺リンパ腫では、*Kras*や*Notch1*遺伝子の変異が多数報告されている。*Kras*と*Notch1*はがん遺伝子であり、*Kras*はcodon 12の変異がhot spotとして高頻度に検出されている。また、*Notch1*はC末端領域のPESTドメインにおける変異が多数報告されている。

野生型マウス、*Rev1*トランスジェニックマウスにMNU投与を行い、誘発された胸腺リンパ腫の組織一部を採取し、RNeasy Mini kit (QIAGEN)によりtotal RNAを抽出した。その後Super Script™ III First-Strand (Invitrogen)を用いて逆転写反応によりcDNAを合成した。合成したcDNAを鋳型とし、以下のprimerを用いてPCR反応を行い、*Kras*のhot spotを含む領域、及び*Notch1*のPESTドメインを含む領域における突然変異頻度、及び変異スペクトラムをApplied Biosystems 3130xlを用いて解析した。使用したprimerは、以下の通りである。

Kras-2-F: 5'-AGAGAGGCTGCTGAAAATGA-3'

Kras-2-R: 5'-ACCCTGTCTTGCTTTGCTGA-3'

N-pest-F: 5'-TGGCAACACAGCTCACCT-3'

N-pest-R: 5'-GGCAGTGTTCTGTGGAAA-3'

b) アレーCGH法による網羅的ゲノム解析

野生型マウスと*Rev1*トランスジェニックマウスにMNU投与を行い、誘発された胸腺リンパ腫の一部組織を採取し、DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN)によりDNAを抽出した。抽出したDNAは

その後、エタノール沈殿により再精製し、DNA 500 ngを制限酵素Alu I, Rsa Iを用いて酵素消化した。その後、random primerを添加し、Exo-Klenow反応にてCy3標識およびCy5標識DNAを合成した。標識したDNAをMouse Genome CGHマイクロアレイキット 244K (Agilent)にハイブリダイゼーションし、Agilent Microarray Scannerを用いてCy3及びCy5に最適な波長でスキャンし画像を取得した。得られた画像は専用解析ソフト (Agilent Feature Extraction およびCGH Analytics)を用いて解析し、全ゲノムのコピー数解析を行った。また、ゲノム量が足りないサンプルに関しては、WGA法によるDNA増幅を行った後、前述と同様の方法にてaCGH解析を行った。CGH analyticsの解析条件は、ADM-2, Threshold=6.0で行った。

5. *Rev1*ホモマウスを用いた1年間反復投与試験

変異原に対し発がん高感受性の*Rev1*ホモマウスを樹立した。このマウスを用いてばい煎ダイズ抽出物の毒性や発がん性の検索するため、1年間反復投与と試験を行った。

雌雄の*Rev1*ホモマウスは、以下の様に準備した。雄*Rev1*ホモマウス約30匹、雌*Rev1*ホモマウス約90匹を1:3の比率でケージに入れ、2週間交配させた。得られた仔マウスの中から、出生日のずれが1週間以内になるマウスを用いた。3週齢の健康な雌雄マウス各60匹に25mM ZnSO₄水を自由摂取させ、6週齢より実験を開始した。飼育は、温度21.0~25.0°C、湿度40~70%、換気回数10~25回/時間、蛍光

照明 12 時間に制御された動物室で行い、ポリカーボネート製ケージ（床敷使用）に 5 匹ずつ收容し、固型飼料(MF)を自由摂取させた。焙煎ダイズ抽出物は日本食品添加物協会より供与されたものを用いた。食品添加物として飲料水に含有される最高濃度である 5%を最高用量群として設定し、それ以下の用量を公比 2 で減じ、2.5、1.25、0.63%とした。対照群には水道水を投与し、被験物質調整時に新しい水に交換した。

表 5 マウス 1 年間反復投与試験

	実験群 (添加濃度)	雄マウス (n=60)	雌マウス (n=60)
①	0%	10	10
②	0.63%	10	10
③	1.25%	10	10
④	2.50%	10	10
⑤	5.00%	20	20

被験物質は、使用時まで 4℃で保存し、週 2 回調製し混水投与した。各実験群の被験物質投与濃度とマウス数を表 5 に示した。試験では、一般状態及び死亡動物の有無を毎日観察し、体重及び摂餌量及び飲水量については投与開始後週一回測定した。なお、摂餌量及び飲水量は、給餌或いは給水量から残餌或いは残水量を差引いた量として算出し計算により 1 日 1 匹あたりの摂餌量(g/マウス/日)及び飲水量(ml/マウス/日)を求めた。被験物質摂取量(g/kg/日)は、当該測定日の平均体重、平均摂水量および被験物質添加濃度から、計算により求めた。

動物実験の観察期間を 12 ヶ月間として、投与開始 12 ヶ月後に全生存動物を屠殺剖

検し、器官・組織の肉眼的観察及び病理組織学的検索を行った。剖検の方法や病理標本の作製は、ラット 1 年間反復投与毒性試験と同様に行った。剖検に先立ち生存マウスを採血し血液学的検査と血液生化学検査を行った。マウス 1 匹から採血できる量が少ないため、血液学的検査と血液生化学検査では、5 匹のマウスから採血した血液を合わせて検体とした。血液学的検査と血液生化学検査、及び尿検査の項目はラット 1 年間反復投与毒性試験と同一である。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実施した。

6. 統計学的解析

体重、摂餌量、飲水量、血液学的検査、血清生化学的検査及び臓器重量の各測定値について群毎に平均値及び標準偏差を求めた。実験群の統計解析では各群間の直接比較検定 (χ^2 検定など) と、対照群と投与群で多重比較検定 (Dunnnett の検定など) を行った。いずれの検定においても有意水準は危険率 5%以下とした。

(倫理面への配慮)

本申請研究には組換え DNA 実験が含まれているため、「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したがって承認を得ている。遺伝子組換えマウスの作製と飼育は、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」等に従い、広島大学に実験計画を申請し、承認を得て実施した。動物の取り扱いに関しては、広島大学実験動物取り扱い指針にしたがい、動物の苦痛を

最小限に留めるよう処置を行った。また、本申請研究には放射性同位元素を使用する実験が含まれているため「放射性同位元素等による放射線障害の防止に関する法律」に基づき広島大学原爆放射線医科学研究所放射線障害予防規定にしたがって承認を得て行った。

C. 研究結果

1. ラットによる1年間反復投与毒性試験

1-1. 一般状態

試験期間中の動物の一般状態は、いずれの実験群においてもばい煎ダイズ抽出物の投与に起因すると考えられる特記すべき変化は認められなかった。

1-2. 体重

試験期間中の各群の体重推移を図 1-1 と図 1-2、及び表 6 に示した。雄ラットでは、5%群で投与開始後 54 週間目に体重の増加抑制が認められた。また、雌ラットでは、2.5%群で投与開始 10 週間目から、5%群で投与開始 9 週間目から体重の増加抑制が認められた。雌雄ラット共に認められた体重の増加抑制は、0%群に対して統計学的に有意であり、雌ラットの体重増加抑制は、試験終了まで同様な推移であった。以上より、ばい煎ダイズ抽出物のラットにおける体重増加抑制の無毒性量は、雄ラットで 2.5%、雌ラットでは、1.25%と推定された。

1-3. 摂餌量、摂水量および被験物質摂取量

各群の摂餌量、及び摂水量の推移を表 7 と表 8、及び図 2-1 と図 2-2、及び図 3-1 と図 3-2 に示した。摂餌量では、44 週目から雄ラットの 2.5%以上投与した群で

摂餌量の低下傾向を認めた。雌ラットでは、39 週目から 2.5%以上投与した群で摂餌量の低下傾向を認めた。一方、摂水量については、雄ラットでは大きな変動は認められず、雌ラットでは、2.5%以上投与した群で 44 週目から摂水量の低下傾向を認めた。

試験期間中におけるラット一匹一日当たりの平均の摂餌量と摂水量、及び体重 1kg 一日当たりの被験物質摂取量を表 9 に示した。ラット一匹一日当たりの平均摂餌量は、雄ラットでは有意差を認めなかった。しかし、雌ラットでは 2.5%以上投与した群の平均摂餌量は、有意に低下した。一方、ラット一匹一日当たりの平均摂水量では、雄ラットの 1.25%群以上、雌ラットでは 1.25%群と 2.5%群で有意な摂水量の低下を認めた。しかし、これらの低下範囲は軽度で、ばい煎ダイズ抽出物の一日当たりの平均摂取量は、被験物質の用量段階にほぼ関連していた。

1-4. 尿検査

表 10 に結果を示した。検査項目のウロビリノーゲンとブドウ糖では、対照群に比べ異常値を認めなかった。白血球、蛋白質、潜血、pH、比重及びケトン体では、散発的な異常値を認めたが、対照群に比べ有意差が無く、この異常値には被験物質の用量依存性は認められなかった。

1-5. 血液学的検査および血液生化学的検査

血液学的及び血液生化学的検査の結果を表 11 と表 12 に示した。血液学的検査では、0%群に対する有意差検定の結果、5%雄ラット群で Ht、MCV、及び MCHC で有意差を認めたが、各値の変動は正常範囲

内の変化であった。また、雌ラットでは、0%群に対し有意差を示す検査値は認められなかった。一方、血液生化学的検査では、雄ラットの2.5%以上の群のGOT、及び5%群のALPとBUNの値に对照群に比べ有意差を認めた。しかし、これらの値は、全て对照値より低下する値であり、その変動も正常範囲に止まった。また、5%群の電解質(Na, K, Ca)の値で有意差を認めたが何れも正常範囲の値であった。同様に、雌ラットでは、5%群のTP, Alb, 及びT-Cho値に有意差を認めたが何れも正常範囲の値であった。一方、5%群の γ -GTPは、对照群に比べ軽度の増加を認めた。その他、雌雄ラットいずれにおいてもいくつかの検査項目で有意差が認められたが、これらの値はすべて正常範囲であり、明らかな用量相関性は認められなかった。

1-6. 臓器重量

実験終了時におけるラット臓器の絶対重量および相対重量比の結果を表13と表14にそれぞれ示した。0%群に対する有意差検定の結果、雌雄ラットともにいくつかの臓器で有意差が認められた。雄ラットでは、5%群の脳、及び肝臓、雌ラットでは、0.63%群の肝臓と腎臓、2.5%群の腎臓、子宮、及び下垂体、5%群の肝臓と子宮で有意差を認めた。しかし、これら臓器重量の相対重量比では、5%雄ラット群の脳以外は雌雄ラット共に全て有意差を認めなかった。これらの値の変動範囲はごく軽度であり、その範囲も生物学的に正常範囲であった。

1-7. 病理組織学的検索

剖検時に認められた各実験群における

全ラットの肉眼的所見を表15に示した。各実験群では、对照群に比べ有意差のある異常所見は認められなかった。また、検体の投与と相関する異常所見も認められなかった。表16-1と表16-2に実験期間を終了後に剖検した全ラットに観察された全ての非増殖性、および増殖性病変を記載した。種々の臓器・組織に非増殖性、および増殖性病変が観察された。しかし、非腫瘍性病変の発生頻度には、被験物質の明確な容量依存性は認められなかった。

一方、腫瘍性病変としては肺腺腫、下垂体腫瘍、甲状腺旁濾胞細胞腺腫、脂肪腫、及び子宮の血管腫や腺腫が認められた。これらの腫瘍の発生頻度は、低頻度で对照群に比べ有意差を認めなかった。また、その発生頻度には、被験物質の明確な容量依存性は認められず、被験物質投与の影響を示唆する所見は得られなかった。同様に増殖性病変としては、肺胞上皮過形成、胆管増生、下垂体過形成、旁濾胞細胞過形成、扁平上皮過形成、子宮内膜過形成等が認められたが、その発生頻度は、低頻度で对照群に比べ有意差を認めなかった。また、その発生頻度には、被験物質の明確な容量依存性は認められなかった。

一方、ばい煎ダイズ抽出物には、ダイズイソフラボンが含まれ弱いエストロゲン作用を有する可能性がある。そこで、雄ラットの精巣の萎縮状態と精細管の直径を測定した。その結果、精巣の萎縮は認められず、精細管の直径では、对照群が $2.28 \pm 0.01\text{mm}$ に対し5%群でも $2.28 \pm 0.01\text{mm}$ であり有意差を認めなかった。こ

の様に検索した全ての臓器において、0%群に比べ、ばい煎ダイズ抽出物の投与群に特異的な変化は認められなかった。以上より、ばい煎ダイズ抽出物の投与量に相関して変化する病理組織学的な病変は認められなかった。

2. 被験物質の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

2-1. 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

Rev1 マウス同士を交配し、両側のアレルに *Rev1* 遺伝子を持っている *Rev1* ホモマウス (*Rev1*Tg(Homo)) を樹立した。

2-2. 化学物質投与による *Rev1* マウスでの発がん実験

雄マウスに MNU を投与後の野生型マウスと *Rev1*(Hemi, Homo) マウスにおける小腸腫瘍の数、大きさを表 2 に示した。*Rev1* ホモマウスでは野生型マウスや *Rev1* ヘミマウスに比べ早期にかつ高頻度の小腸腫瘍の形成がみられた。表 2 に示す様に小腸腫瘍の平均個数は、野生型マウス 29.3 個、*Rev1* ヘミ(Hemi)マウス 44.3 個、及び *Rev1* ホモ(Homo) マウス 64.6 個であり、*Rev1* ホモマウスでは野生型や *Rev1* ヘミマウスに比べ有意に多数の腫瘍発生を認めた ($p < 0.01$)。また、*Rev1* ホモマウスに誘発された小腸腫瘍のサイズも野生型や *Rev1* ヘミマウスに比べ有意に大きいことも明らかになった。また、小腸腫瘍の中で腺癌が占める割合も *Rev1* ホモマウス、*Rev1* ヘミマウス、野生型マウスの順に多い傾向があることが示された。図 4 に小腸腺癌の組織像を示した。

図 5 に野生型マウスと *Rev1*(Hemi,

Homo)マウスの小腸における *Rev1* mRNA レベルを Real-time RT-PCR 法により定量した結果を示した。今回の実験では、 $ZnSO_4$ 水投与による *Rev1*(Hemi, Homo)マウスの小腸における *Rev1* mRNA の発現では、有意な誘導が認められなかった。しかし、 $ZnSO_4$ 水投与の有無に拘わらず、*Rev1*ヘミ及びホモマウス共に、野生型マウスに比較して有意に高い *Rev1* mRNA の発現を認めた。さらに、*Rev1* ホモマウスでの *Rev1* mRNA の発現は、*Rev1*ヘミマウスより有意に高く、小腸における *Rev1* mRNA の発現は、gene dose に相関して増加することが明らかとなった。

2-3. *Rev1* ホモマウスの化学物質に対する短期の発がん感受性の検討

(1ヶ月間、及び2ヶ月間発がん性試験)

雄の野生型マウスと *Rev1*(Hemi, Homo) マウスに MNU を投与し、1ヶ月間観察した後に剖検したマウスに誘発された小腸腫瘍の数、大きさを表 3 に示した。表 3 に示す様に MNU 投与後わずか1ヶ月後に小腸に micro-adenoma が誘発されることが明らかになった。図 6 は、小腸のアルカリホスファターゼ染色による弱拡大の所見であり、図 7 は、H.E 染色による micro-adenoma の病理像である。未投与群では、野生型マウスと *Rev1* ホモマウス間で腫瘍の数、大きさに顕著な差はみられなかった。MNU 投与群では、野生型マウスの平均腫瘍数は 20.6 個、*Rev1* ヘミマウスでは 17.2 個で両者に有意差を認めなかった。しかし、*Rev1* ホモマウスの平均腫瘍個数は 58.2 個で野生型マウスや *Rev1* ヘミマウスに比べ有意に多数の腫瘍発生を認めた (表 3, 図 8-A) ($p < 0.01$)。腫瘍の

大きさについても同様の傾向を認めた。即ち、腫瘍サイズの平均値は、野生型マウス 0.77mm, *Rev1* ヘミマウス 0.78 mm で両者に有意差を認めなかった(表 3, 図 8-B)。しかし, *Rev1* ホモマウスの腫瘍サイズは, 平均 0.87 mm で, 野生型マウスや *Rev1* ヘミマウスに比べ有意に大きい腫瘍が誘発された ($p < 0.01$)。両群ともに腫瘍の大きさにばらつきがみられたため, 腫瘍サイズの分布を図 8-B に示した。

Rev1 マウスに MNU を投与後, 2 ヶ月目に剖検した場合の小腸腫瘍の誘発においても, 1 ヶ月目に剖検した場合と同様な傾向が認められた。結果を表 4 と図 9-A, B に示した。

2-4 *Rev1* マウスに誘発された腫瘍のゲノム解析

a) 胸腺リンパ腫の遺伝子変異の解析

胸腺リンパ腫の遺伝子変異を解析し, その結果を表 17 に示した。野生型マウスの胸腺リンパ腫では, 20 例中 6 例 (30%), *Rev1* トランスジェニックマウスの胸腺リンパ腫では 34 例中 12 例 (35%) で *Kras* 遺伝子の点突然変異が検出された。*Notch1* PESTドメインでは, 野生型マウスでは, 20 例中 2 例 (10%), *Rev1* トランスジェニックマウスでは 34 例中 5 例 (14.7%) で点突然変異が検出された。

Kras と *Notch1* 遺伝子の 2 つの遺伝子で検出された突然変異頻度は, 野生型マウスの胸腺リンパ腫では 20 例中 8 例 (40%), *Rev1* トランスジェニックマウスの胸腺リンパ腫では 34 例中 17 例 (50%) と, *Rev1* トランスジェニックマウスの方が高頻度に検出されたが, 有意な差はみられなかった。

Kras と *Notch1* 遺伝子で検出された変異スペクトラムは, 野生型マウスの胸腺リンパ腫では, G:C > A:T 変異が 6 例, G:C > T:A 変異が 1 例, G:C > C:G 変異が 1 例であった。また, *Rev1* トランスジェニックマウスの胸腺リンパ腫における変異スペクトラムは, それぞれ G:C > A:T 変異が 13 例, G:C > T:A 変異が 1 例, G:C > C:G 変異が 1 例であった。変異スペクトラムには, 野生型マウス, *Rev1* トランスジェニックマウスに差は見られなかった。

b) アレーCGH 法による網羅的ゲノム解析

野生型マウスの胸腺リンパ腫 10 例, *Rev1* トランスジェニックマウスの胸腺リンパ腫 9 例を用いてアレーCGH (aCGH) 解析を行った。各プローブの Cy5/ Cy3 比を log2 比に変換し, 正常値と異なる log2 比を示す probe 数が 10 個以上続く領域を異常領域として表 18, 19, 及び 20 に示した。

野生型マウスの胸腺リンパ腫 10 例のうち, *c-Myc* 遺伝子を含む 15 番染色体のトリソミーが 6 例 (60%) (図 10, 表 21), *TCRB* 遺伝子を含む 6 番染色体 qB1 領域の片アレル欠失が 1 例 (10%), 両アレル欠失が 5 例 (50%) (図 11, 表 22), *Bcl11b* 遺伝子を含む 12 番染色体 qF1 領域の片アレル欠失が 2 例 (20%) (表 23), *Pten* 遺伝子を含む 19 番染色体 qC1 領域の両アレル欠失が 2 例 (20%) 検出された(表 24)。

一方, *Rev1* トランスジェニックマウスの胸腺リンパ腫 9 例のうち, *c-Myc* 遺伝子を含む 15 番染色体のトリソミーが 7 例 (78%) (図 10, 表 21), *TCRB* 遺伝子を含む 6 番染色体 qB1 領域の片アレル欠失

が 1 例 (11%), 両アレル欠失が 5 例 (56%)(図 11, 表 22), *Bcl11b* 遺伝子を含む 12 番染色体 qF1 領域の片アレル欠失が 1 例 (11%)(表 23), *Pten* 遺伝子を含む 19 番染色体 qC1 領域の両アレル欠失が 1 例 (11%)であった(表 24)。

また, 14 番染色体 qC1 領域は, 野生型マウス, *Rev1* トランスジェニックマウスすべてのサンプルにおいて欠失が検出された(図 12)。そのうち, 野生型マウスで 3 例が片アレル欠失, 7 例が両アレル欠失であったのに対して, *Rev1* トランスジェニックマウスの胸腺リンパ腫は全てアレル欠失であった(表 25)。胸腺リンパ腫発症に重要な役割をしていると考えられている *Ikaros*, *p53*, *Notch1*, *Notch3* 領域の増幅および欠失は検出されなかった。

3. *Rev1*ホモマウスによる1年間反復投与試験

3-1. 一般状態

試験期間中の *Rev1*ホモマウスの一般状態は良好であり, いずれの実験群においてもばい煎ダイズ抽出物の投与に起因すると考えられる特記すべき変化は認められなかった。

3-2. 体重

試験期間中の各群の体重推移を図 13-1, 図 13-2 と表 26 に示した。雄 *Rev1*ホモマウスでは, 5%群で検体の投与開始後 39 週間目から体重の増加抑制が認められた。一方, 雌 *Rev1*ホモマウスでは, 0.63%群で体重の増加抑制が認められたが, 統計的な検定の結果, 有意差を認めなかった。同様に他の実験群に於いても統計的に有

意な体重の増加抑制を認めなかった。以上より, ばい煎ダイズ抽出物の *Rev1*ホモマウスにおける体重増加抑制の無毒性量は, 雄マウスで 2.5%と推定された。

3-3. 摂餌量, 摂水量および被験物質摂取量

各群の摂餌量, 及び摂水量の推移を表 27 と図 14-1, 図 14-2, 及び表 28 と図 15-1, 図 15-2 に示した。摂餌量では, 5%雄マウス群で 56 週目から摂取量の軽度の低下傾向を認めた。雌マウスでも摂取量の軽度の変動を認めたが, 被験物質摂取量と関連する特定の傾向を認めなかった。一方, 摂水量については, 雄マウスでは 1.25%以上投与した群で 52 週目から摂取量の軽度の増加傾向を認めた。雌マウスでは, 52 週目以後に 0.63%以上投与した群で摂水量の増加傾向を認めた。

試験期間中における *Rev1*ホモマウス一匹一日当たりの平均の摂餌量と摂水量, 及び体重 1kg 一日当たりの被験物質摂取量を表 29 に示した。*Rev1*ホモマウス一匹一日当たりの平均摂餌量は, 雌雄マウスともに各実験群で有意差を認めなかった。一方, *Rev1*ホモマウス一匹一日当たりの平均摂水量では, 雄マウスの 1.25%群と 5%群, 雌マウスの 0.63%群, 1.25%群, 及び 5%群で有意に増加した。しかし, これらの増加範囲は軽度で, ばい煎ダイズ抽出物の一日当たりの平均摂取量は, 被験物質の用量段階にほぼ関連していた。

3-4. 尿検査

表 30 に尿検査の結果を示した。検査項目のウロビリノーゲン, ブドウ糖, 及びケトン体では, 異常値を認めなかった。白血球, 蛋白質, 潜血, 比重, 及び pH,

では、対照群に比べ散発的な異常値を認めしたが、対照群に比べ有意差が無く、この異常値には被験物質の用量依存性は認められなかった。

3-5. 血液学的検査および血液生化学的検査

血液学的及び血液生化学的検査の結果を表 31 と表 32 に示した。血液学的検査では、雄 *Rev1* ホモマウスの好中球と単球に値の変動を認めしたが、変動値には被験物質の用量依存性は認められなかった。同様に、雌 *Rev1* ホモマウスの血小板、白血球、及び好中球の値の変動を認めしたが、変動値には被験物質の用量依存性は認められなかった。一方、血液生化学的検査では、雄 *Rev1* ホモマウスの 1.25%以上の投与群でトリグリセライドと総コレステロール値の低下傾向を認めしたが、何れも正常範囲内の変化であった。雌 *Rev1* ホモマウスでは、1.25%以上の投与群で GPT 値の低下傾向を認めしたが、何れも正常範囲内の変化であった。その他、雌雄 *Rev1* ホモマウス共に軽度の検査値の変動を認めしたが、変動値には被験物質の用量依存性は認められなかった。

3-6. 臓器重量

実験終了時における *Rev1* ホモマウス臓器の絶対重量および相対重量比の結果を表 33 と表 34 にそれぞれ示した。0%群に対する有意差検定の結果、雌雄 *Rev1* ホモマウスともにいくつかの臓器で有意差が認められた。雄マウスの絶対臓器重量では、0.63%以上の投与群での胸腺と 2.5%群の精巣での重量減少が認められた。しかし、雌マウスの絶対臓器重量では、対照群に比べ有意な臓器重量の変動は認め

られなかった。絶対臓器重量の減少が認められた臓器の相対重量比では、雄マウスの 1.25%群と 5%群の胸腺と 2.5%群の精巣で有意差を認めた。その他、臓器重量の相対重量比では、散発的な有意差のある変動値を認めた。しかし、これらの値の変動範囲はごく軽度であり、検体の投与量と相関する変動はみとめられなかった。その範囲も生物学的に正常範囲であった。

3-7. 病理組織学的検索

剖検時に認められた各実験群における全マウスの肉眼的所見を表 35 に示した。各実験群では、対照群に比べ有意差のある異常所見は認められなかった。また、被験物質の投与と相関する以上所見も認められなかった。

実験期間を終了後に剖検した全マウスに観察された全ての非増殖性、および増殖性病変を表 36-1 と表 36-2 に記載した。種々の臓器・組織に非増殖性、および増殖性病変が観察された。しかし、非腫瘍性病変の発生頻度には、被験物質の明確な容量依存性は認められなかった。一方、腫瘍性病変としては非胸腺リンパ腫、肝腫瘍、胃乳頭腫、腎臓乳頭腫、脾臓癌、肉腫及び脂肪腫等が認められた。これらの腫瘍の発生頻度は、各実験群当たり非胸腺リンパ腫の 2 例、肝腫瘍の 3 例を除くと各腫瘍で 1 例であり、何れも低頻度で対照群に比べ有意差を認めなかった。また、その発生頻度には、被験物質の明確な容量依存性は認められず、被験物質投与の影響を示唆する所見は得られなかった。同様に増殖性病変としては、肺胞上皮過形成、胆管増生、旁濾胞細胞過形

成、扁平上皮過形成等が認められたが、その発生頻度は、極めて低頻度で対照群に比べ有意差を認めなかった。また、その発生頻度には、被験物質の明確な容量依存性は認められなかった。以上より、ばい煎ダイズ抽出物の投与量に相関して変化する病理組織学的な病変は認められなかった。

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。本研究では、既存食品添加物の中から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した。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（ゲニステイン、ダイゼイン）が含まれ、これらイソフラボンには、弱いエストロゲン作用がある。ダイズイソフラボンは、動物実験で乳癌の抑制作用や促進作用、肺癌や大腸癌の促進作用が報告されている。また、ダイズフラボノイドは、トポイソメラーゼⅡを阻害し、骨髄性やリンパ性白血病の原因遺伝子の一つである *MLL* 遺伝子異常を誘発することが知られている。一方、ばい煎ダイズ抽出物の変異原性については、

Ames 試験は陰性であるが、*in vitro* の染色体異常試験や小核試験は陽性であり、その遺伝毒性は必ずしも明確ではない。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。この様な複雑な生理活性を有するばい煎ダイズ抽出物を長期反復摂取した場合の慢性毒性や発がん性に関するデータは無く、早急に検討する必要がある。そこで、本研究では、先ずラットを用いた1年間反復投与毒性試験によりばい煎ダイズ抽出物の慢性毒性を解析した。

1年間反復投与毒性試験では、ばい煎ダイズ抽出物に起因すると考えられる体重を除く一般状態の変化は試験期間を通して認められなかった。ラットの体重では、ばい煎ダイズ抽出物の摂取と相関する体重増加抑制が認められ、その無毒性量は、雄ラットで2.5%、雌ラットでは、1.25%と推定された（表6、図1-1、1-2）。一方、ラット1日当たりの平均摂取量は、雄ラットでは5%群で低下傾向にあり、雌ラットでは2.5%群以上で有意に低下していた（表7、9、図2-1、2-2）。従って、この体重増加抑制は、ラット1日当たりの平均摂取量と相関していることから、その原因として一義的には摂取量の減少によるものと推定された。

血液生化学的検査では、雄ラットのGOT（2.5%以上）の低下やALPとBUNの低下（5%群）等、雌ラットの5%群で γ -GTPの増加やTP、ALB、及びT-choの低下が認められた（表12）。血液学的検査では、雄ラットの5%群のみにHtとMCVの増加、及びMCHCの低下が認められた（表11）。

しかし、これらの値の変動範囲はごく軽度であり、その範囲も生物学的に正常範囲で、他の関連する病理所見などのパラメーターにも変化が認められなかったことから毒性学的意義に乏しい変化と考えられた。肉眼的な剖検所見では、被験物質の投与と関連する各臓器の変化は認められず、対照群との間に差を認めなかった。臓器重量では、各臓器の絶対重量値に雌雄ラットともにいくつかの臓器で有意差が認められた(表 13)。これらの値の変動範囲はごく軽度であり、その範囲も生物学的に正常範囲であった。また、これら臓器重量の相対重量比では、5%雄ラット群の脳以外は雌雄ラット共に全て有意差を認めなかった(表 14)。さらに、臓器の病理学的解析からも被験物質の投与と関連する病理所見や血液生化学所見は認められないことより、臓器重量の変動は、主にラット体重の変動に相関するもので、毒性学的意義は無いものと考えられた。

病理組織学的検査では、種々の臓器・組織に非増殖性、および増殖性病変が観察された(表 16-1, 16-2)。しかし、これらの病変の発生頻度は、非常に低く、被験物質の明確な容量依存性は認められなかった。一方、腫瘍性病変としては肺腺腫、下垂体腫瘍、甲状腺旁濾胞細胞腺腫、脂肪腫、及び子宮の血管腫や腺腫が認められた。しかし、これらの腫瘍の発生頻度も極めて低頻度で、対照群に比べ有意差を認めなかった。また、その発生頻度には、被験物質の明確な容量依存性は認められず、被験物質投与の影響を示唆する所見は得られなかった。この様に、

対照群に比べばい煎ダイズ抽出物に起因すると考えられる特異的な病理学的変化は認められず、組織レベルでもばい煎ダイズ抽出物の毒性所見は認められなかった。

ところで、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。このような微弱な生物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。しかし、その作用が非常に微弱な場合は、さらに多数の動物が必要になり、現実的には実験は非常に困難である。そこで、本研究のもう一つの目的は、このような微弱な人体影響を高感度に検定できる哺乳類の高感度なモデル動物の開発である。そのため本研究では、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期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った。

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。このよう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(Y ファミ

リー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ント(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 合成を行うため、結果的に突然変異を誘発することになる。エイムス試験は、この様な自然突然変異を誘発する遺伝子の機能を亢進させた測定系である。

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、突然変異の誘発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の開発を試みた。具体的には、エイムス試験の原理を応用して、既存添加物の発がん性や遺伝毒性を高感度に検定できるモデルマウスとしての*Rev1* トランスジェニックマウスの樹立である。

Rev1 トランスジェニックマウスから両側のアレルに *Rev1* 遺伝子を有する *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、多数の小腸腫瘍が誘発されることが明らかとなった(表2)。小腸腫瘍の発生と *Rev1* mRNA の発現との関係を検討した。その結果、*Rev1* mRNA の発現量は、野生型マウスから *Rev1* ヘミマウス、*Rev1* ホモマウス、の順に増加しており、*Rev1* mRNA の発現量と *Rev1* の gene dose が相関することが明らかとなった(図5)。さらに、この発現量と誘発された小腸腫瘍の個数が相関することが明らかになった(表2, 表4)。この事は、小腸の腫瘍発生に *Rev1* が強い関与をなし、gene dose effect が存在する可能性を示唆する。以上の結果は、*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。そこで、より効率的な発がんモデルを開発する目的で、化学物質を投与後、短期間での小腸腫瘍の誘発を再検討した。その結果、*Rev1* ホモマウスは、最短で1カ月という短い期間で野生型マウスに比べ有意に多数の腫瘍が誘発されることが明らかとなった(表3, 図6, 7, 8)。従って、*Rev1* ホモマウスは、短期間に高感度で検体の遺伝毒性や発がん性を検定できるモデルマウスとしての機能を有することが判明した。

平成19年度に実施した *Rev1* ホモマウスの生物学的特性、特に突然変異誘発に対する感受性を明らかにする目的で、T細胞受容体(TCR)突然変異体の発生頻度を測定した。その結果、MNU 投与により誘発される突然変異頻度は、リンパ節、脾臓ともに *Rev1* ホモマウスの方が、野生型マウスよりも高い値を示し、リンパ節では有意に高い結果が得られた。このこと

は、*Rev1* は MNU により誘発される突然変異を促進することを示唆する。*Rev1* は、損傷による複製阻害時に損傷を乗り越えることで細胞死を回避する修復機構で働くことと推定されている。*Rev1* は、この損傷乗り越え時に誤った塩基を挿入することで突然変異を誘発している可能性が考えられる。そこで、*Rev1* ホモマウスに誘発された胸腺リンパ腫のゲノム変異を解析した (表 17)。*Kras* と *Notch1* PEST の遺伝子変異頻度は、両者共に *Rev1* ホモマウスの方が野生型マウスより高い傾向が認められた。しかし、遺伝子変異スペクトラムの解析では、*Rev1* の deoxycytidyl transferase 活性によるシトシンの挿入による特徴的な点突然変異の増加は認められなかった。一方、*Rev1* ホモマウスに誘発された胸腺リンパ腫の網羅的なゲノム解析を行うため、アレーCGH 法による解析を行った (表 18-25、及び図 10, 11, 12)。その結果、本方法は網羅的に染色体欠失や増幅を効率よく検出できることが示された。しかし、本方法に於いても *Rev1* ホモマウスに特徴的なゲノム変異は同定出来なかった。この様に、*Rev1* ホモマウスに誘発される腫瘍では特徴的なゲノム変異は同定出来なかったが、このマウスは変異原による突然変異誘発に対する感受性が高いことが明らかとなった。

以上より、*Rev1* ホモマウスは、既存添加物の遺伝毒性や発がん性を短期間で高感度に検定できるマウスモデルになると考えられた。そこで、*Rev1* ホモマウスを用いてばい煎ダイズ抽出物の 1 年間反復投与試験を実施し、慢性毒性や発がん性の検索を行った。

1 年間反復投与試験では、ラットと同様にばい煎ダイズ抽出物に起因すると考えられる一般状態の変化は認められなかった。マウスの体重においても、ばい煎ダイズ抽出物の摂取と相関する体重増加抑制が認められ、その無毒性量は、雄マウスで 2.5% と推定された (表 26, 図 13-1, 13-2)。マウス 1 日当たりの平均摂取量は、雄マウスでは 5% 群で低下傾向にあることから、その原因として一義的には摂取量の減少によるものと推定された (表 27, 29)。一方、雌マウスでは、対照群と有意差が検出できなかった。この一因は、0.63% 群の体重増加抑制が他の群に比べ特に強いためにはい煎ダイズ抽出物の摂取との相関性が検出出来なかった可能性があり、雌マウスの無毒性量は今後の検討課題である。

血液生化学的検査、及び血液学的検査では、マウスから採取できる血液量が少量のため複数のマウス検体を合わせて解析した。そのため各検査値の有意差は検出できなかった (表 31, 32)。しかし、各実験群におけるこれらの値の変動範囲はごく軽度であり、その範囲も生物学的に正常範囲であり、他の関連する病理所見などのパラメーターにも変化が認められなかった事から、これらの検査値に毒性的所見はないものと考えられた。肉眼的な剖検所見では、被験物質の投与と相関する各臓器の変化は認められず、対照群との間に差を認めなかった。臓器重量では、雄マウスの胸腺と精巣の絶対重量値に有意差が認められた (表 33, 34)。ばい煎ダイズ抽出物を投与した群の胸腺と精巣の重量は、全て正常範囲内であり、