

200837009A

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20年度 総括研究報告書

主任研究者 能美 健彦

平成21(2009)年3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

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20年度 総括研究報告書

主任研究者 能美 健彦

平成21 (2009)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	----- 46
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 48

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 部長

研究要旨

酸化 DNA 損傷に基づく塩基置換変異は、DNA 修復機能により抑制され実際的な閾値が形成されうことを示した(山田)。一方、DNA 二重鎖切断に基づく欠失変異は、その修復が誤りがちであるため閾値は設定できないことを示唆した(本間)。発がん実験のデータを解析することにより、同一物質であっても臓器により発がんの機構が異なり、閾値が存在する臓器と閾値が存在しない臓器のあることを明らかにした(長尾)。バクテリアの修復欠損株と野生型株を用い、低用量の遺伝毒性物質が複数存在すると相加効果を現すことを示した(太田)。アクリルアミドの DNA 付加体を低用量域で定量する新規な分析手法を確立した(松田)。動物個体において遺伝毒性を検出する F-344 系 *gpt delta* トランスジェニックラットを用い、発がんの標的臓器で遺伝毒性を検出できることを明らかにした(能美)。遺伝毒性発がん物質の閾値は、誘発される変異のタイプや臓器・細胞により異なること、遺伝毒性物質であるか否かの判定には、発がんの標的臓器において遺伝毒性を検出・解析することが重要であ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、発がん標的臓器、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 室長
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	慶応義塾大学薬学部 客員教授
太田敏博	東京薬科大学 生命科学部 教授
松田知成	京都大学地球環境学堂 准教授

A. 研究目的

一般に遺伝毒性物質の作用には閾値がないとされ、DNA 損傷作用を有する発がん物質は、どのように微量であってもヒトに対して発がんリスクを負わせるものと考えられている。このため、食品添加物、残留農薬、動物用医薬品等に遺伝毒性と発がん性が認められた場合には、原則的に ADI(一日摂取許容量)は設定されず使用が禁止となる。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(例えば環境汚染物質)には、閾値がないことを前提に、数理モデルを用いて生涯の発がんリスクが推定されている。

しかしヒトを含む生物は、種々の生体防御

機能や生体防御物質を有しており、遺伝毒性作用や遺伝毒性に基づく発がん作用に対しても、その作用を抑制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レージョン 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、実際的な閾値を形成している可能性が考えられる。

本研究では、バクテリア、ヒト細胞、トランスジェニックラット、機器分析等の手法により、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 損傷に基づく塩基置換変異と、DNA 二重鎖切断に基づく欠失変異について閾値の存在について検討し、変異のタイプにより閾値の有無が異なる可能性を示唆した。また低用量域で複数の遺伝毒性物質が存在する場合の複合効果について検討した。さらに低用量域でのアクリルアミド DNA 付加体の分析手法を確立した。遺伝毒性発がん物質の閾値についてデータ解析を行い、同一の発がん物質であっても臓器により閾値の有無が異なることを明らかにした。発がん試験に汎用される F344 系ラットで遺伝毒性を検出する F344gpt delta ラットに、発がん物質と

構造の類似した非発がん物質を投与してその予測性を吟味し、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-ハイドロキシグアニン (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 (YG3206) を用いて、メチレンブルー (MB)、ニュートラルレッド (NR)、L-システインの遺伝毒性を検索した。MB と NR の遺伝毒性は可視光存在下で試験した (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 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2) の遺伝毒性を検索した。また変異体を PCR 法等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

文献検索およびデータ解析によりアセチルアミノフルオレン (AAF)、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)、2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) の発がん性に関する用量効果曲線を検討した (長尾)。

4) 低用量域での変異原性の複合作用

Salmonella typhimurium TA100 株とその *uvr*⁺株(TA1975P)を用いて、AF-2, 3-chloro-4-(dichloro-methyl)-5-hydroxy-2 (5*H*)-furanone (MX), 4-nitro-quinoline *N*-oxide (4-NQO), sodium azide (Azide), *N*-(trichloromethylthio)-4-cyclohexane-1, 2- dicarboximide (Captan), 1-nitropyrene (NP) を単独あるいは6化合物を共存させて遺伝毒性を検索した(太田)。

5) アクリルアミド誘発 DNA 付加体定量法の開発

アクリルアミドから生ずる *N*7-(2-carbamoyl-2-hydroxy-ethyl)-guanine (*N*7-GA-Gua)およびその安定同位体は Gamboa da Costa らの方法(Chem. Res. Toxicol., 16, 1328-1337, 2003)に従い合成した。LC/MS/MS は Waters-Micromass 社の Quattro Ultima Pt を用い、HPLC のカラムは Shim-pack XR-ODS(75×3.0mm)を用いた(松田)。

6) 動物個体を用いた遺伝毒性研究

7 週齢の雄 F344 *gpt* delta ラットに 2,4-diaminotoluene (2,4-DAT, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm)を一群 5 匹、13 週間混餌投与した。500 ppm 投与群は、毒性影響のため 9 週以降は 400 ppm に用量を下げた。2,6-DAT は、500 ppm の用量で 13 週間混餌投与した。肝臓と腎臓の *gpt* 変異頻度(MF)を測定した(能美)。

(倫理面への配慮)

本研究は、バクテリア、培養細胞、実験動物を用いたものであり、ヒトに関する倫理上の問題はない。また、全ての実験は、遺伝子組換え実験、動物実験に関する所内の規定に準拠して行った。

C. 研究結果

1) バクテリアを用いた遺伝毒性閾値の研究

NR は、可視光非存在下ではいずれの株に対しても変異原性を示さなかったが、可視光照射下において 8-OH-G DNA グリコシラーゼを欠損した YG3001 株に対して変異原性を示した。MB も可視光存在下において YG3001 株に対して用量依存的に復帰株数の増加を示した。一方、L-システインは、YG3001 株や親株の TA1535 に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)に対しては用量依存的に復帰変異株数を増加させた(山田)。

2) 哺乳類細胞を用いた遺伝毒性閾値の研究

TK6 ヒト細胞を用いる遺伝子突然変異試験において、AF-2 は低用量域から用量依存的に突然変異を誘発し、20 μ g/ml の最高用量で無処理群の 10 倍の突然変異の誘発が観察された。AF-2 処理(20 μ g/ml)によって得られた TK 変異体 88 クローン (Normal growth (NG)変異体、24 クローン; Slow growth (SG)変異体、64 クローン) のゲノムDNAについて分子解析を行った。88 クローンの内、33 クローン(38%)は点突然変異

と考えられる非 LOH 型突然変異であった。残りの 55 クローンは DNA 二重鎖切断に基づく突然変異と考えられ、31 クローン(35%)は欠失型突然変異(ヘミ型 LOH)、24 クローン(27%)は組換え型突然変異(ホモ型 LOH)であった(本間)。

3) 遺伝毒性閾値に関する国際動向の分析

米国で行われた 25,000 匹あまりの Balb/c マウスを用いた AAF の発がんに関する文献(J. Environ. Pathol. Toxicol., 3, 1-7, 1980; 3, 55-68, 1980; 3, 179-183, 1980)を調査し、AAF の発がんに関する閾値は、肝臓では認められないが、腎臓では存在が示唆されることを明らかにした。PhIP の発がん性に関する自身のデータを吟味し、乳腺、造血系(リンパ性白血病)では閾値は認められないが、大腸腫瘍では閾値の存在が示唆されることを報告した(長尾)。

4) 低用量域での変異原性の複合作用

TA1975P 株において見かけ上、変異原性が検出されない用量($\mu\text{g}/\text{plate}$)として AF-2, 0.02; MX, 0.05; 4-NQO, 0.2; Azide, 0.2; NP, 0.5; Captan, 1 を設定した。uvr 機能を欠いた TA100 株では、上記の用量において著しい復帰変異コロニー数の増加が見られた。設定した用量の各変異原を混合し TA1975P 株で変異原性を検索した。変異原単独処理では変異原性は検出されなかったが、6 種類を混合した場合、対照に較べ統計学的有意差をもって変異原性が検出された(太田)。

5) アクリルアミド誘発 DNA 付加体定量法

の開発

Gamboa da Costa らの方法をもとに N7-GA-Gua の定量法を改良し、N7-GA-Gua の DNA からの脱離条件を 37°C 48 時間とした。この条件で国立衛研本間博士より供与されたアクリルアミド投与ラットの各臓器における N7-GA-Gua を定量し、良好な用量-応答関係を得た(松田)。

6) 動物個体を用いた遺伝毒性研究

肝臓の *gpt* MF は、2,4-DAT 投与群においては非投与群に比較して有意に増加し、125ppm 投与群において非投与群の約 2 倍、250ppm および 500ppm 投与群で約 7 倍高い値を示した。一方、2,6-DAT は、500ppm 投与群において、非投与群に比べ低い値を示した。腎臓においては、2,4-DAT、2,6-DAT とともに、非投与群と同様の *gpt* MF を示した(能美)。

D. 考察

NR と MB は可視光照射下において、用量依存的に 8-OH-G DNA グリコシラーゼを欠損した YG3001 株に突然変異を誘発したが、野性型株(TA1535)では突然変異の誘発は観察されなかった。一方、L-システインは、酸化ピリミジンの修復に関与する Endo III/VIII を欠損した YG3206 株に突然変異を誘発したが、TA1535 株では突然変異の誘発は観察されなかった。NR と MB は可視光照射下においても YG3206 株に変異を誘発せず、L-システインは YG3001 株には変異を誘発しなかった。これらの結果は、NR と MB は可視光照射下において DNA 上に 8-OH-G を形成し、L-システインは酸化ピリミジン損傷を誘発することを示唆

している。また、野性型株(TA1535)においては、8-OH-G および酸化ピリミジン損傷は効率よく修復され、これらの損傷に基づく変異誘発が抑制されることを示している。今回用いた試験菌株は、いずれも塩基置換を検出する菌株であり、今回の結果は、酸化DNA損傷に基づく塩基置換変異の誘発に対しては、DNA修復系が事実上の閾値形成に貢献する可能性を示唆している(山田)。

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。一方、放射線などによって引き起こされるDNAの二本鎖切断(DSB)は、哺乳類細胞では非相同型接合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。食品添加物として使用されていたAF-2について、ヒト培養細胞TK6を用いてTK遺伝子突然変異試験を実施した。その結果、遺伝子突然誘発性が確認できた。TK変異体の遺伝子解析の結果、ヘミ型LOH突然変異の増加が見られ、AF-2の遺伝毒性メカニズムとしてDSBの誘発が示唆された。DSBの修復はエラー発生型であり、高頻度で突然変異を引き起こすため、僅かな損傷でも閾値は設定できないと考えられる(本間)。

発がん物質の作用モードは化学物質、動物の種類、臓器によって異なる。ある臓器で閾値を示唆する非直線的な用量相関を示しても、他の臓器では直線閾値無しの発がんモードを示すことがAAFのみならず

PhIPでも示された。ヒトにおける発がん物質の閾値を実証する実験系が存在しない状況を考えると、遺伝毒性発がん物質については、安全サイドに立って「直線閾値なし」とすることは妥当であると考えられる。その上で低濃度の発がん物質の取り扱いにはvirtually safe dose (VSD) または threshold of toxicological concern (TTC)という考えを導入することが实际的であろう。しかし、環境中には遺伝毒性発現において閾値を示すものが存在するようである。遺伝毒性については「直線閾値無し」と考えるためか、用量相関に関する情報は余り多くない。用量相関を良く検討し、有用な物質の有効利用を図ることが大切であると考えられる(長尾)。

遺伝毒性発がん物質の低用量域におけるリスクを評価する際に出てくる問題の一つが、複合効果、特に相乗作用に関する危惧である。げっ歯類を用いた*in vivo*遺伝毒性試験で、この問題について実験を行ったデータを出すことが重要であるが、その実施は容易ではない。今回のバクテリアを用いた試験では、変異原性に対する加算効果が認められたが、明らかな相乗作用は認められなかった。今後、異なる変異原の組み合わせ、あるいは複合効果が報告されている変異原の組み合わせにおいて、単独では変異原性を示さない用量域での複合作用がどのように現れるのか、調べていく必要がある(太田)。

食品中のアクリルアミドは、アスパラギン酸と還元糖がメイラード反応を起こし形成される。ポテトチップスなどには平均1200 μ g/kg含まれている。成人一人一日当たりのアクリルアミド摂取量は約140 μ gとする報告がある。アクリルアミドは体内で、CYP2E1

の働きにより反応性の高いグリンドアミドに変化し、DNA 付加体を形成する。今年度は、アクリルアミドの引き起こすDNA付加体のうち *N7-GA-Gua* の既存の定量法を改良し、感度、信頼性を向上させた。この手法でアクリルアミドを経口投与したラットの各臓器でDNA付加体が検出された。本手法はアクリルアミド毒性メカニズムの解明に役立つと考えられる(松田)。

F344 *gpt delta* ラットに構造の類似した発がん物質(2,4-DAT)と非発がん物質(2,6-DAT)を投与し、標的臓器(肝臓)と非標的臓器(腎臓)での遺伝毒性を検索した。その結果、2,4-DAT のみに肝臓で変異頻度の上昇を認めた。腎臓では2,4-DAT、2,6-DAT ともに遺伝毒性を示さなかった。以上の結果は、F344 *gpt delta* ラットが、遺伝毒性を発がんの標的臓器において検出する可能性を示している(能美)。

E. 結論

誘発される変異のタイプや、発がんが誘発される臓器の種類により閾値形成機構は異なることが示唆された。低用量域での遺伝毒性発がん物質のリスクを評価する際には、複数の物質の加算効果を考慮し、DNA損傷を定量することが重要である。F344 *gpt delta* トランスジェニックラットは、当該物質による発がんが遺伝毒性に基づくものか否かを判定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

1. 論文発表

- 1) T. Nohmi, N. Toyoda-Hokaiwado, M. Yamada, K. Masumura, M. Honma, S. Fukushima, International symposium on genotoxic and carcinogenic thresholds, Genes Environ., 30, 101-107 (2008)
- 2) F. Yatagai, Y. Umebayashi, M. Honma, K. Sugawara, Y. Takayama and F. Hanaoka, Mutagenic radioadaptation in a human lymphoblastoid cell line, Mutat. Res., 638, 48-55 (2008)
- 3) M. Yasui, E. Suenaga, N. Koyama, C. Masutani, F. Hanaoka, P. Gruz, S. Shibutani, T. Nohmi, M. Hayashi and M. Honma, Miscoding properties of 2'-deoxyinosine, a nitric oxide-derived DNA Adduct, during translesion synthesis catalyzed by human DNA polymerases, J. Mol. Biol., 377, 1015-1023 (2008)
- 4) F. Yatagai, M. Suzuki, N. Ishioka, H. Ohmori and M. Honma, Repair of I-SceI Induced DSB at a specific site of chromosome in human cells: influence of low-dose, low-dose-rate gamma-rays, Radiat. Environ. Biophys., 47, 439-444 (2008)
- 5) 本間正充、遺伝毒性物質に閾値はあるのか？ファルマシア, 45, 143-148 (2009)

- 6) M. Nagao, S. Ishikawa, H. Nakagama and M. Watanabe, Extrapolation of the animal carcinogenesis threshold to humans, *Genes Environ.*, 30, 160-165 (2008)
- 7) T. Sakai, S. Tokishita, K. Mochizuki, A. Motomiya, H. Yamagata and T. Ohta, Mutagenesis of uracil-DNA glycosylase deficient mutants of the extremely thermophilic eubacterium *Thermus thermophilus*, *DNA Repair*, 7, 663-669 (2008)
- 8) H. Nagayoshi, A. Matsumoto, R. Nishi, T. Kawamoto, M. Ichiba and T. Matsuda, Increased formation of gastric *N*²-ethylidene-2'-deoxyguanosine DNA adducts in aldehyde dehydrogenase-2 knockout mice treated with ethanol, *Mutat. Res.*, 673, 74-77 (2009)
- 9) Y. Okamoto, P.H. Chou, S.W. Kim, N. Suzuki, Y.R. Laxmi, K. Okamoto, X. Liu, T. Matsuda and S. Shibutani, Oxidative DNA damage in XPC-knockout and its wild mice treated with equine estrogen, *Chem. Res. Toxicol.*, 21, 1120-1124 (2008)
- 10) K. Misaki, M. Suzuki, M. Nakamura, H. Handa, M. Iida, T. Kato, S. Matsui and T. Matsuda, Aryl Hydrocarbon Receptor and Estrogen Receptor Ligand Activity of Organic Extracts from Road Dust and Diesel Exhaust Particulates, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 55, 199-209 (2008)
- 11) A. Shibata, D. Maeda, H. Ogino, M. Tsutsumi, T. Nohmi, H. Nakagama, T. Sugimura, H. Teraoka and M. Masutani, Role of Parp-1 in suppressing spontaneous deletion mutation in the liver and brain of mice at adolescence and advanced age, *Mutat. Res.*, in press.
- 12) A.H. Hashimoto, K. Amanuma, K. Masumura, T. Nohmi and Y. Aoki, in vivo mutagenesis caused by diesel exhaust in the testis of *gpt* delta transgenic mice, *Genes Environ.*, 31, 1-8 (2009)
- 13) T. Umemura, M. Tasaki, A. Kijima, T. Okamura, T. Inoue, Y. Ishii, Y. Suzuki, N. Masui, T. Nohmi and A. Nishikawa, Possible participation of oxidative stress in causation of cell proliferation and in vivo mutagenicity in kidneys of *gpt* delta rats treated with potassium bromate, *Toxicol.*, 257, 46-52 (2009)
- 14) K. Masumura and T. Nohmi, Spontaneous mutagenesis in rodents: spontaneous gene mutations identified by neutral reporter genes in *gpt* delta transgenic mice and rats, *J. Health Sci.*, 55, 40-49 (2009)
- 15) 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.*, 640, 27-37 (2008)
- 16) T. Nohmi, Possible mechanisms of practical thresholds for genotoxicity, *Genes Environ.*, 30, 108-113 (2008)
- 17) A. Nishikawa, T. Umemura, Y. Ishii, M. Tasaki, T. Okamura, T. Inoue, K. Masumura and T. Nohmi, in vivo approaches to study mechanism of action of genotoxic carcinogens, *Genes Environ.*, 30, 120-124 (2008)
2. 学会発表
- 1) 山田雅巳、高宗万希子、松井恵子、能美健彦、改変 Ames 試験菌株を用いた内在性の変異原物質の検索とその変異誘発機構に関する研究、日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)
- 2) M. Yamada, K. Matsui, T. Nohmi, Development of a tester strain sensitive to chemicals inducing oxidative pyrimidines, 38th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society in Croatia (2008.9)
- 3) 本間正充:医薬品に不純物として含まれる遺伝毒性物質の分類と許容量 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会(2008.6)
- 4) 本間正充:ICH における新しい遺伝毒性試験ガイドライン(S2R1)と試験実施タイミング 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会(2008.6)
- 5) M. Honma, Ultimate Threshold and Genetic Consequence of A Single Double Strand Break in Human Cells. International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds in Tokyo (2008.7)
- 6) M. Honma, Genome Mapping of Damaged Chromosome Regions Induced by Ionizing Irradiation Using DNA Microarray Analysis. 38th European Environmental Mutagen Society in Croatia (2008.9)
- 7) 鈴木孝昌、小木美恵子、小原有弘、本間正充、田邊思帆里、山口照英:SNP および CGH マイクロアレイを用いた c-myc 遺伝子増幅に関する詳細解析 第 67 回日本癌学会総会(2008.10)
- 8) 谷田貝文夫、菅澤薫、榎本秀一、本間正充:DSB 修復効率からの適応応答の追求 日本放射線影響学会第 51 回大会(2008.11)
- 9) 本間正充:DNA 二本鎖切断修復と遺伝的不安定性 日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)
- 10) 安井 学、本間正充:ヒトリンパ球細胞のゲノム内に導入させた 8-オキソグアニン1分子の突然変異誘発能 日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)

- 11) 小山直己、木村葵、安井学、高見成昭、高橋美和、今井俊夫、山本歩、汲田和歌子、増村健一、増田修一、木苗直秀、松田知成、能美健彦、本間正充: ライフステージを考慮したアクリルアミドの多臓器遺伝毒性評価 日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)
- 12) 斉藤美香、松藤寛、千野誠、林真、本間正充、山形一雄: 過酸化水素によって誘導されたヒトリンパ芽球細胞 TK6 の細胞増殖と遺伝毒性に対する天然抗酸化物質の保護効果 日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)
- 13) 木村葵、坂本浩子、西郷和彦、洲加本孝幸、本間正充: *In vitro* コメットアッセイプロトコールの検証 日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)
- 14) 谷田貝文夫、高橋昭久、本間正充、鈴木ひろみ、大森克徳、関真也、橋爪藤子、島津徹、榎本秀一、大西武雄、石岡憲昭: 宇宙実験: 放射線影響の LOH 検出系による解析 日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)
- 15) 鈴木孝昌、小泉朋子、本間正充、中嶋圓、濱田修一、渡辺貴志、降旗千恵: トキシコゲノミクスに関する JEMS/MMS 共同研究 II: 遺伝子傷害性発癌物質の迅速スクリーニング系としての TaqMan Low Density Array の評価 日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)
- 16) 本間正充、櫻庭真弓、汲田和歌子、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 日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)
- 17) 中嶋圓、鈴木雅也、田中仁、本間正充、林真: *In vitro* コメットアッセイ国際バリデーションデータ解析に関する一考察 日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)
- 18) 安井学、Suzuki, N.、本間正充、Shibutani, S.: 一酸化窒素によって形成する DNA 付加体の誤塩基対形成メカニズム 第 31 回分子生物学会(2008.12)
- 19) M. Nagao, Extrapolation of the animal carcinogenesis threshold to humans. International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds in Tokyo (2008.7)
- 20) T. Ohta, Additive mutagenic effects of DNA damages formed by multiple mutagens at virtually non-mutagenic dose-level of each, International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds in Tokyo (2008.7)
- 21) T. Matsuda, Robert A. Kanaly and Pei-Hsin Chou: DNA adductomics: global survey of DNA damage in human tissues. ECNIS WP6 workshop on new developments: biomarkers of complex mixtures and use of 'omics' technology. 38th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society in Croatia (2008, 9)

- 22) T. Matsuda, R. Nishi, Y. Totsuka and K. Wakabayashi: Analysis of DNA adducts in the lung of mice exposed to multi-wall carbon nanotube(MWCNT).環境ホルモン学会第11回研究発表会 (2008, 12)
- 23) 川西優喜, 西田裕, 石井宏, 菅野毅治, Robert Fuchs, 松田知成, 高村岳樹, 八木孝司: 大気汚染物質 3-ニトロベンズアントロンによる DNA 付加体の生成と TLS・突然変異, 第31回日本分子生物学会年会 (2008, 12)
- 24) K. Kato, E. Yamamura, M. Kawanishi, T. Yagi and T. Matsuda, A. Sugiyama and Y. Uno: Significance of DNA adductome analysis in vitro micronucleus test. 第37回日本環境変異原学会 (2008, 12)
- 25) K. Kawai, P.-H. Chou, M. Inoue, T. Matsuda and H. Kasai: Detection of 4-OHE-DNA adducts in human lung tissue. 第37回日本環境変異原学会 (2008, 12)
- 26) R.A. Kanaly, P.-H. Chou, H. Nagayoshi, H. Sugimura and T. Matsuda: Detection and evaluation of DNA adducts in human pancreas and spleen by the DNA adductomics methodology. 第37回日本環境変異原学会 (2008, 12)
- 27) J. Adachi, K. Kihara and T. Matsuda: Unbiased quantification of oxidative modifications of cysteine thiols by double labeling approach using isotope amino acids and affinity tags (DLIAA). 第37回日本環境変異原学会 (2008, 12)
- 28) R. Nishi, Y. Totsuka, K. Wakabayashi and T. Matsuda: Analysis of DNA adducts in the lung of mice exposed to multi-wall carbon nanotube. 第37回日本環境変異原学会 (2008, 12)
- 29) H. Takemura, A. Matsui, M. Morita, H. Sakakibara, T. Matsuda and K. Shimoi: Inhibition of Benzo[a]pyrene-DNA adducts by chrysoeriol, a dietary methoxyflavonoid, in MCF-7 cells. 第37回日本環境変異原学会 (2008, 12)
- 30) H. Nagayoshi, M. Oka, Y. Yukawa, K. Hori, Y. Suwa, A. Yokoyama, M. Muto and T. Matsuda: Availability of DNA damage, N²-ethylidene-dG as a biomarker of acetaldehyde exposure. 第37回日本環境変異原学会 (2008, 12)
- 31) P.-H. Chou, H. Sugimura, K. Kawai, H. Kasai and T. Matsuda: Simultaneous analysis of various oxidative DNA adducts in human tissues using LC-MS/MS. 第37回日本環境変異原学会 (2008, 12)
- 32) K. Kawai, P.-H. Chou, T. Matsuda, S. Matsui and H. Kasai: 4-Oxo-2-hexenal-dA adduct formation in DNA in vitro and in mouse organs. 第67回日本癌学会学術総会 (2008, 10)
- 33) 松田知成: LC/MS/MSを用いたDNA損傷研究法, 第35回BMSコンファレンス (2008, 7)
- 34) 松田知成, 周佩欣, 永吉晴奈: HPLC-バイオアッセイ法による新規環境汚染物質の単離同定, 第17回環境化学討論

- 会 (2008, 6)
- 35) 松田知成、周 佩欣、河井一郎、葛西宏:DNAアダクトーム解析による過酸化脂質由来DNA塩基損傷の網羅的解析、第61回日本酸化ストレス学会学術集会 (2008, 6)
- 36) T. Nohmi, Transgenic *in vivo* genotoxicity assays: basic features and the possible applications, 14th Alexander Hollaender Course on Genetic Toxicology: Genomic and Proteomic Approaches & Special Workshop on Arsenic Exposure Assessment in India (2008, 12)
- 37) T. Nohmi, Combined genotoxic effects of a methylating agent and radiation on human cells, New Nuclear Research Symposium, Biological Responses to Low Dose Radiation (2008, 11)
- 38) T. Nohmi, Recent topics of mutation research with *gpt* delta mice and rats, 39th Annual Meeting of Environmental Mutagen Society in Puerto Rico (2008, 10)
- 39) M. Ikeda, K. Masumura, Y. Sakamoto, B. Wang, M. Neno, K. Sakuma, I. Hayata, A. Yamamoto, M. Honma and T. Nohmi, *gpt* delta transgenic mice for *in vivo* genotoxicity assays: application for analysis of combined effects of radiation and chemicals, the 7th Japan-France Workshop on Radiation Biology in Chiba (2008, 10)
- 40) Y. Totsuka, T. Ichinose, K. Hiyoshi, T. Kato, S. Masuda, T. Nohmi, T. Sugimura and K. Wakabayashi, Genotoxicity of nanoparticles in *in vivo* mutation assay systems, 38th European Environmental Mutagen Society in Croatia (2008, 9).
- 41) T. Nohmi, Possible Mechanisms of Practical Genotoxic Thresholds, International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds in Tokyo (2008, 7).
- 42) T. Nohmi, *gpt* delta transgenic mouse and rat for analysis of *in vivo* mutagenesis, 第37回日本環境変異原学会 (2008, 12)
- 43) Y. Ishii, T. Okamura, M. Tasaki, T. Inoue, T. Nohmi, T. Umemura and A. Nishimura, *in vivo* mutagenicity of madder color and its constituents using *gpt* delta rats, 第37回日本環境変異原学会 (2008, 12)
- 44) Y. Totsuka, T. Kato, S. Masuda, T. Nohmi, T. Sugimura and K. Wakabayashi, Genotoxicity of nanoparticles in *in vivo* assay systems, 第37回日本環境変異原学会 (2008, 12)
- 45) N. Toyoda-Hokaiwado, T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi, Difference in mutagenicity of structural isomers 2,4-DAT and 2,6-DAT in the target

organ for carcinogenicity of F344 *gpt* delta transgenic rat, 第37回日本環境変異原学会 (2008, 12)

- 46) N. Toyoda-Hokaiwado, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, H. Sanada, T. Inoue, T. Umemura, A. Nishikawa, T. Nohmi, In vivo mutagenicity of structural isomers 2,4-DAT and 2,6-DAT in F344 *gpt* delta transgenic rat, 第67回日本癌学会学術総会 (2008, 10)
- 47) K. Masumura, Y. Sakamoto, M. Ikeda, T. Tsukamoto, H. Ikehata, Y. Kuroiwa, T. Umemura, A. Nishikawa, M. Tatematsu, T. Ono, T. Nohmi, p53 suppresses deletions in the epidermis of mice unirradiated or irradiated with low doses of UVB, 第67回日本癌学会学術総会 (2008, 10)
- 48) N. Toyoda-Hokaiwado, T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, T. Umemura, A. Nishikawa, T. Nohmi, Applying F344 *gpt* delta transgenic rat for in vivo genotoxicity study of structural isomer 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene, The 25th Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology (2009. 1)

H. 知的所有権の取得状況

なし

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 室長

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を選んで、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。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

国内外で起こるさまざまな事件を通じて、食品の安全性が国民に注目されるようになった。異物混入はもとより、食品本来の成分以外のものではあるが、合法的に添加されている化学物質についても関心が高まり、その安全性を再検討するべきときが来ている。

中でも、問題となる化学物質が発がん性を示す場合にそのリスク評価は困難である。発がん性化学物質の健康リスクを評価する場合、多くは閾値のない線形の用量反応モデルが用いられてきた。「閾値」とは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で定義されるものである。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、「曝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が、物質の有用性を考慮すれば、それが必ずしも正しい措置とは限らない場合もあるだろう。

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、突然変異は必ずしもがんには至らない。

本研究では、バクテリアを用いた試験により特に、酸化損傷を引き起こす物質の変異原性を調べている。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のが 8-ヒドロキシグアニン (8-OHG) DNA グリコシラーゼであり、主として酸化ピリミジンの除去に働くのは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) である。今年度は、作製した後者の欠損株の酵素活性の低下を確認した。また、光照射により変異原性を示す物質や、生体成分であるアミノ酸について、変異原性を検討した。

B. 研究方法

1) 使用した化学物質

ニュートラルレッド (NR, CAS No. 553-24-2)、メチレンブルー (MB, CAS No. 61-73-4)、L-システイン (CAS No. 52-90-4)。

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 を使用した。遺伝子の欠損については表 1 に示した。

表 1 使用菌株一覧

菌株名	<i>mutM</i>	<i>nth</i>	<i>nei</i>	pKM101
TA1535	+	+	+	-
YG3001	-	+	+	-
YG3201	+	+	-	-
YG3203	+	-	+	-
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。

4) 可視光の照射条件

非照射、照射条件ともに最小培地にまくところまでは実験室の照明 (蛍光灯) を消して行い、その後、照射条件の培地のみ、インキュベーター内の蛍光灯を点灯して 48 時間培養した。その際、プレートは 2 枚以上重ねなかった。蛍光灯の照度は 750 ルクスであった。

5) 酵素活性の測定

用いた菌株 (TA1535、YG3201、YG3203、YG3206) の細胞破砕液に含まれる、DNA 中のチミングリコールを除去するエンドヌクレアーゼ活性を以下の方法で測定した。基質にはアデニンと対になるように設計したチミングリコールを含む二本鎖オリゴ DNA (5'-Cy3-CTC GTC AGC ATC TTgC ATC ATA CAG TCA GTG-3' 3'-GAG CAG TCG TAG AAG TAG TAT GTC AGT CAC-5') を用いた。チミングリコールを含む側の鎖の 5' 末端を Cy3 でラベルし、可視化できるようにした。0. D. 600nm が 0.6-0.7 に達した培養液から細胞破砕液を調製し総蛋白質量を測定して、1、3、10 μ g protein をそれぞれ基質 (1 pmol) と反応液 (10 μ L; 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA、100 mM NaCl、0.1 mg/ml BSA) 中で混合し、37°C 30 分間反応させた。泳動バッファー (10 mg/ml ブルーデキストラン、10 mM EDTA、98% ホルムアミド) を加えて反応を停止させ、95°C 5 分間加熱急冷後、15% アクリルアミド変性ゲル (8 M 尿素) にて、未反応の基質と切断生成物を分離した。イメージアナライザー Molecular Imager FX Pro System (BioRad 社製) にて Cy3 を検出し、Quantity One ソフトウェア (BioRad 社製) で画像解析した。

対照実験として、New England Biolabsのエンドヌクレアーゼ III (1 unit) とエンドヌクレアーゼ VIII (10 units)、さらに大腸菌 AB1157 株の細胞破碎液を同様の条件で処理して用いた。

(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) NR

2.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を最高用量に NR の変異原性を TA1535 および YG3001 で調べた。可視光線非照射の条件ではいずれの株でも変異原性は観察されなかった (図 1 左)。一方、可視光線照射条件にて、同様の実験を行った場合、YG3001 株においてのみ、0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以下の低用量でも、用量依存的な復帰株数の変化が観察された (図 1 右)。

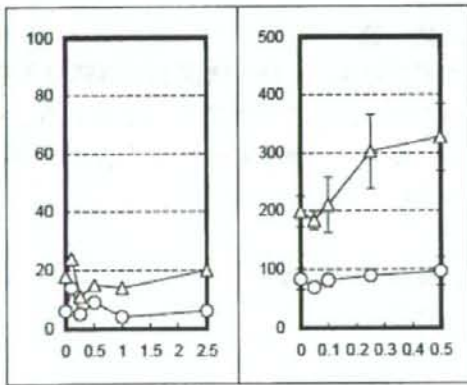


図 1 NR の変異原性

左：可視光線非照射。右：可視光線照射条件。横軸：NR 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/plate)。○：TA1535、△：YG3001。

2) 可視光線を照射した MB

光照射により変異原性を示すことが知られる MB を用いて、5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を最高用量に 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ まで用量を下げ可視光線照射条件下で 1) と同様の試験を行った。YG3001 株で用量依存的に復帰株数が増加したが、TA1535 では増加が観察されなかった (図 2)。

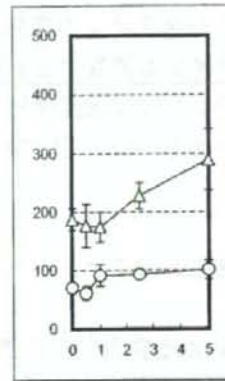


図 2 MB+可視光線の変異原性

横軸 MB 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/plate)。○：TA1535、△：YG3001。

3) システイン

生体成分の 1 つであるアミノ酸について変異原性を調べた。10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以下の濃度で、システインの変異原性を TA1535 及び YG3206 について調べた。TA1535 においては 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ まで用量を上げて変異原性は観察されなかったが、YG3206 では 1-10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で用量依存的に復帰変異株数の増加が見られた。

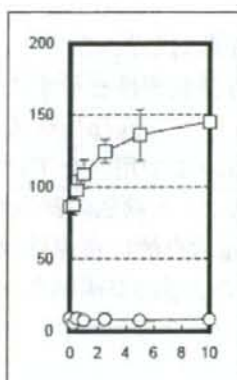


図3 システインの変異原性

横軸システインの濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)、
縦軸ヒスチジン非要求性復帰変異株数
(コロニー数/plate)。○: TA1535、□: YG3206。

4) YG3206 株におけるエンドヌクレアーゼ活性の消失

本研究を始めるに当たり作製した菌株について、遺伝子の欠損は確認していたが、今年度は酵素活性について消失を確認した。

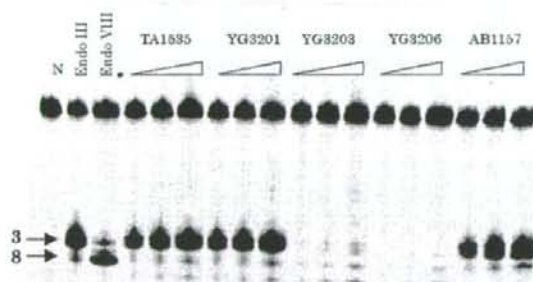


図4 エンドヌクレアーゼ活性

N: 未処理のバンド、3: Endo III による反生成物、8: Endo VIII による反応生成物

TA1535 と YG3203、YG3201 と YG3206 の比較から YG3203 と YG3206 では Endo III 活性が消失していることが確認できた。大腸菌に比べてサルモネラの Endo VIII の活性は低く、YG3201 と TA1535 では Endo VIII の切断活性の差が見えないが、YG3203 と YG3206 では差が見られた。変異原性試験に用いた

YG3206 ではピリミジン酸化損傷を除去するエンドヌクレアーゼの活性が消失していると考えられる。

D. 考察

化合物により形成されると考えられる損傷を修復する系を欠損した株で、用量依存的に変異原性が増加する傾向にあった用量で、野生株では全く変異原性が観察されなかった。このことは、突然変異に関して事実上無作用に等しくなる化学物質の濃度があるということを示唆している。

曝露量が低いものであれば、修復系の働きを考慮した上でリスクを決定することが必要になるかもしれない。そのためには、化合物の反応性などから DNA にどのような付加体が形成されるのか？また、それを修復する系があるのか？修復するとすればどの程度の効率なのか？など、メカニズムに基づいた判断が重要になるだろう。

E. 結論

本研究結果は、DNA 修復系が処理できる範囲であれば、化学物質により生じると考えられる DNA の損傷が必ずしも突然変異に至らないことを示す。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nohmi, T., Toyoda-Hokaiwado, N., Yamada, M., Masumura, K., Honma, M., Fukushima, S., International symposium on genotoxic and carcinogenic thresholds, Genes & Environ., 30, 101-107 (2008)

2. 学会発表

- 1) 山田雅巳、高宗万希子、松井恵子、能美健彦、改變 Ames 試験菌株を用いた内在性の変異原物質の検索とその変異誘発機構に関する研究、日本環境変異原学会第37回大会 (2008.12)
- 2) Yamada, M., Matsui, K., Nohmi, T.,
Development of a tester strain sensitive to chemicals inducing oxidative pyrimidines, 38th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (2008.9)

H. 知的所有権の取得状況

特になし