

平成 20 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 室長
協力研究者: 木村 葵 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
山本 歩 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

研究要旨

ニトロフラン系化学物質である AF-2 は我が国でかつて豆腐や魚肉ソーセージ、麺類の殺菌剤として使われてきたが、エームス試験での強い変異原性が確認され、またその後げっ歯類での発がん性が報告され使用禁止になった。従って AF-2 は遺伝毒性発がん物質である。しかしながら、エームス試験以外の遺伝毒性に関しては情報が少ない。本研究ではヒト TK6 細胞を用い、AF-2 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。AF-2 はコメット試験ではわずかな DNA 損傷性を示すのみであったが、小核試験、TK 遺伝子突然変異試験では比較的強い遺伝毒性を示した。TK 変異体の遺伝子解析の結果、Hemi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 2 本鎖切断(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わずかな損傷でも閾値は設定できないと考えられる。一方、AF-2 の発がんおよび遺伝毒性リスクも考察した。自然突然変異の 2 倍の突然変異を引き起こす濃度(DMFD)は約 $5 \mu\text{g/ml}$ であり、これは調理食品中に含まれるヘテロサイクリックアミンである IQ と同程度であった。昭和 40 年当時の AF-2 の一日平均摂取量は約 $4.8 \mu\text{g/day}$ と推定されており、HERP(Human Exposure/Rodent Potency)と HEGEP(Human Exposure/Genotoxic Potency)はそれぞれ 0.0004、3.84 と計算される。この数字を考慮すると AF-2 の発がんおよび遺伝毒性リスクはピーナッツ等から摂取する可能性のあるアフラトキシン B1 と同程度と理解された。

キーワード;AF-2 (Furylfuramide)、遺伝毒性、突然変異、リスク

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。従って遺伝毒性試験による遺伝毒性の有無は発がん物質のリスク管理の方向性を決定する上で重要である。一方、遺伝毒性試験は感度が高く、ヒトの発がん性とは無関係と考えられるような陽性反応示すことが多い。このような場合、その陽性反応の程度や意味 (Weight of Evidence; WOE)、遺伝毒性メカニズム (Mode of Action; MOA) の検討が重要である。特に後者の情報によっては遺伝毒性物質であっても、閾値を設定できる場合がある。

ニトロフラン系化学物質である 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)-acrylamide (フリルルラマイド; AF-2) は我が国でかつて豆腐や魚肉ソーセージ、麺類の殺菌剤として使われてきたが、エームス試験での強い変異原性が確認され、またその後マウスでの発がん性が報告され使用禁止になった。従って AF-2 は遺伝毒性発がん物質である。しかしながら、エームス試験以外の遺伝毒性に関しては情報が少ない。本研究ではヒト TK6 細胞を用い、AF-2 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

1) 細胞、AF-2 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 AF-2 (0, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$) で 4 時間処理し、その後、細胞毒性、遺伝毒性を評価した。

2) 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 (コメット試験): 処理直後の細胞をアガロースゲルと混和後、マツナミマ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) で電気泳動を行った。脱水後、Syber Gold で染色し、PERCEPTIVE 社の Comet IV 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 変異体より定法に従い DNA を抽出し、TK 遺伝子内の 4 つに部位を PCR-LOH (loss of heterozygosity) 法によって解析した。また、LOH 変異体に関しては 17 番染色体上に存在する 10 種類の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) AF-2 処理による細胞毒性

TK6 細胞 (10^7) を 0, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ の AF-2 で 4 時間処理し、細胞毒性を評価した (図 1)。細胞毒性は最高用量の 40 $\mu\text{g/ml}$ は 10% 以下の RS、RSG を示し、小核試験、突然変異試験の実行は不可能であった。両試験は 20 $\mu\text{g/ml}$ を最高用量 (RS: 24%、RSG: 16%) として評価を行った。

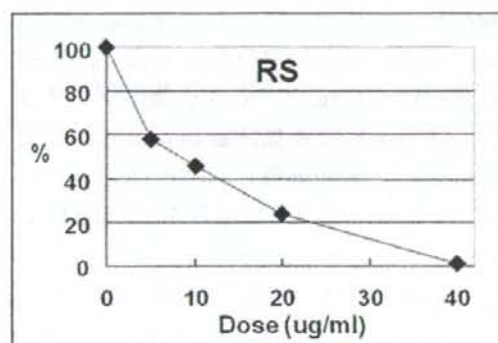


図 1

2) DNA 損傷性 (コメット試験)

最高用量の 20 $\mu\text{g/ml}$ までではコメットの明らかな増加は観察されなかった。一方、極めて高い細胞毒性を示した 40 $\mu\text{g/ml}$ ではわずかなコメットの誘発が観察された。

3) 染色体異常誘発性 (小核試験)

低用量から用量依存的に小核の誘発が観察された。20 $\mu\text{g/ml}$ の最高用量で無処理の 4 倍の小核の誘発が観察されたことから明らかに染色体異常誘発物質である (図 2)。

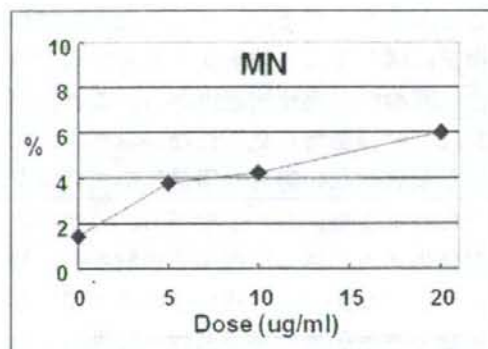


図 2

4) 遺伝子突然変異 (TK 突然変異)

低用量から用量依存的に突然変異の誘発が観察され、20 $\mu\text{g/ml}$ の最高用量で無処理の 10 倍の突然変異の誘発が観察された (図 3)。一方、SG 変異体の割合は用量依存的に低下した。このことは AF-2 は比較的点突然変異等の小さな遺伝的変異を誘発することを示している。

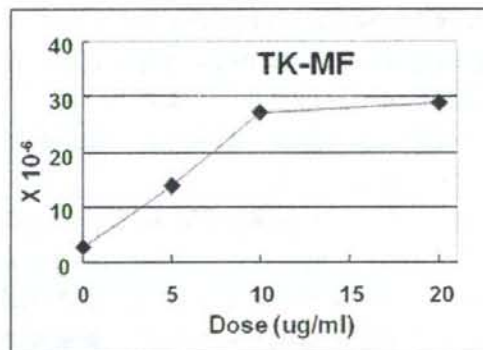


図 3

5) TK 変異体の遺伝子解析

AF-2 処理 (20 $\mu\text{g/ml}$) によって得られた TK mutant 88 clones (NG mutant: 24 clones、SG mutant: 64 clones) の genome DNA (約 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調整済み) を使用した。88 clones の突然変異体の内、33 clones は点突然変異と考えられる Non-LOH タイプであった。残りの 55 clones は LOH タイプの突然変異体であった。これら LOH タイプの突然変異体が、欠失タイプなのか、組換えタ

イブなのか明らかにする為に、次に 4 mix LOH 解析を試みた。解析の結果、55 LOH mutants の内、31 clones が Hemi-Type、24 clones が Homo-Type であった。

D. 考察

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。

かつて食品添加物として広く使用されていた AF-2 についてヒト培養細胞 TK6 を用いて、アルカリコメットアッセイ、in vitro 小核試験及び TK 遺伝子突然変異試験を実施した。その結果、弱い DNA 初期障害性と、顕著な染色体異常及び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、Hemi 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 2 本鎖切断 (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わずかな損傷でも閾値は設定できないと考えられる。

AF-2 の遺伝毒性に関しては多くの報告がある。エームス試験では当初、TA1535、TA1536、TA1537、TA1538 では陰性であったが、その後 TA100、TA98 で陽性の報告がされた。他に vitro ではヒトリンパ球細胞での染色体異常、チャイニーズハムスター細胞、酵母細胞での遺伝子突然変異、遺伝子変換の誘発などが報告されている。一方、in vivo での遺伝毒性に関しては報告が少ない。AF-2 は当初、発がん性試験では陰性であったが、その後、高用量の投与でマウスでの胃ガン、ラットでの乳ガン、ハムスターのほほでの発がんが報告された。妊娠マウスへの AF-2 の投与により胎児に高頻度で肺がんを引き起こすことも報告されているが、AF-2 では優性致死試験では陰性と

報告されている。概して、*in vitro* 特にエームス試験で、強い変異原性を示すのに対して、それに対応するような強い *in vivo* での遺伝毒性、発がん性は見られない。AF-2 は S9 存在下ではエームス試験で陰性、培養細胞での染色体異常試験では著しく変異原性が減じる。従って、生体内では速やかに代謝を受け、解毒、排泄されるものと考えられる。S9 非存在下でのエームス試験での強い変異原性は、おそらくバクテリアの持つ高いニトロリダクターゼ活性に由来するものと推測される。ニトロ基の還元によって生じたヒドロキシアミノ基は DNA と強い反応性を示す。このように、ニトロ基のもつ芳香族化合物には、エームス試験でのみ変異原性を示すものが多く、これらの遺伝毒性の評価には注意を要する。従って、AF-2 の高い変異原性はエームス試験特有の性質によるものであり、これを持って変異原性の強さを論じることは危険である。培養細胞も活性は低い、ニトロリダクターゼ活性を有し、これが主な染色体異常の原因と考えられ、やはり *in vitro* 特異的な反応が関与するものと考えられる。しかしながら、培養細胞では S9 存在下でも染色体異常が高濃度で観察されることから、ニトロ基の還元以外の別の遺伝毒性メカニズムの関与が考えられる。アクリルアミド基を一方に持ち、これもまた遺伝毒性、発がん性が懸念されている。

これまで我々はアクリルアミドの非代謝活性化系での乳類遺伝毒性メカニズムとして、2 本鎖切断の誘発を報告してきた。今回の、AF-2 の遺伝子突然変異誘発性、突然変異スペクトルはアクリルアミドのそれに極めて類似しており、新しい遺伝毒性メカニズムの解明が待たれる。

一方、AF-2 の発がんおよび遺伝毒性リスクも考察した。AF-2 はエームス試験自然突然変異の 2 倍の突然変異を引き起こす濃度

(DMFD) は約 $5 \mu\text{g/ml}$ であり、これは調理食品中に含まれるヘテロサイクリックアミン IQ と同程度であった。昭和 40 年当時の AF-2 の一日平均摂取量は約 $4.8 \mu\text{g/day}$ と推定されており、HERP (Human Exposure/Rodent Potency) と HEGEP (Human Exposure/Genotoxic Potency) はそれぞれ 0.0004、3.84 と計算される。この数字を考慮すると AF-2 の発がんおよび遺伝毒性リスクはピーナッツ等から摂取する可能性のあるアフラトキシン B1 と同程度と理解される。

E. 結論

かつて防腐剤として使用されてきた AF-2 はヒト培養細胞においても染色体異常誘発性、遺伝子突然変異誘発性を示した。突然変異体の多くは欠失型突然変異を示し、AF-2 による遺伝毒性メカニズムとして DNA の 2 本鎖切断の関与が考えられた。DNA の 2 本鎖切断は非相同型接合 (NHEJ) によって修復されるが、ほぼ確実に欠失型遺伝子突然変異もたらす。従って、閾値を設定できず、微量の摂取でも遺伝毒性のハザードは否定できない。2 本鎖切断の可能性を含め、そのメカニズムの解明が必要である。

AF-2 の発がんおよび遺伝毒性リスクを考察した。自然突然変異の 2 倍の突然変異を引き起こす濃度 (DMFD) は約 $5 \mu\text{g/ml}$ であり、これは調理食品中のヘテロサイクリックアミン IQ と同程度である。昭和 40 年当時の AF-2 の一日平均摂取量は約 $4.8 \mu\text{g/day}$ と推定されており、HERP と HEGE はそれぞれ 0.0004、3.84 と計算される。AF-2 の発がんおよび遺伝毒性リスクは、ピーナッツ等から摂取するアフラトキシン B1 と同程度と理解された。遺伝毒性メカニズムと WOE (Weight of Evidence) を考慮すると、AF-2 の発がん、遺伝毒性リスクは高くないと考えられる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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) Yasui, M., Suenaga, E., Koyama, N., Masutani, C., Hanaoka, F., Gruz, P., Shibutani, S., Nohmi T., Hayashi, M., and Honma, M. 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)
- 3) Yatagai, F., Suzuki, M., Ishioka, N., Ohmori, H., Honma, M. 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, 439-44 (2008)
- 4) Nohmi, T., Toyoda-Hokaiwado, N., Yamada, M., Masumura, K., Honma, M., and Fukushima, S. International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds. *Genes and Environment*, 30, 101-107 (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)
2. 学会発表
 - 1) 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)
 - 2) 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)
 - 3) Honma, M. Ultimate Threshold and Genetic Consequence of A Single Double Strand Break in Human Cells. International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds (2008.7)
 - 4) Honma, M. Genome Mapping of Damaged Chromosome Regions Induced by Ionizing Irradiation Using DNA Microarray Analysis. 38th European Environmental Mutagen Society (2008.9)
 - 5) 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)
 - 6) 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)
 - 7) 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)

- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) Wang, J., Sawyer, J., Honma, M., Chen, T., and Moore, M. The Mouse Lymphoma Assay detects recombination, deletion, and aneuploidy. 日本環境変異原学会第37回大会 (2008.12)
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) 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)
- 16) 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)
- 17) 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)

H. 知的所有権の取得状況

特になし

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: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 慶応義塾大学薬学部 客員教授

研究要旨

遺伝毒性発がん物質の発がん性および遺伝毒性に於ける閾値の有無をこれまで報告されているデータを用いて評価した。論文に見られる問題点として、semi-log 表示の用量相関線形から安易に閾値の存在を評価する、検出系の検出限界を閾値と表現することがあげられる。本研究における閾値有無の判定では、算術スケールの座標にデータをプロットし、その線形から linear-no-threshold であるか non-linear であるかを判定し、前者では閾値は存在しないとした。後者では、用いた動物の数、用量の間隔を考慮し、閾値が示唆された、または閾値存在の可能性が示されたと判定した。AAF は腎発がんでは閾値が示唆されたが、肝発がんでは閾値は認められない。PhIP は大腸発がんでは閾値存在の可能性があるが、乳腺およびリンパ性白血病では閾値は認められない。特定の発がん物質の作用モードは臓器により異なりうることが明らかになった。発がん物質の標的臓器が動物種によって変化すること、ヒトにおける遺伝的多様性を考えると、発がん物質の閾値有無判定に適した実験動物系の存在は不明である。これらの結果から、現在用いられている遺伝毒性発がん物質の linear-no-threshold の取り扱いは妥当であると考え。低濃度の暴露リスク管理に関しては VSD (Virtually Safe Dose) または TTC (Threshold of Toxicological Concern) が適切であろう。ただし、環境中には遺伝毒性発現に閾値を示す場合があり、そのような物質は動物種、臓器に関わらず発がん性に閾値が存在する可能性がある。この点についてさらに研究を推進する必要がある。

キーワード:閾値、算術座標軸、線形、N(A)EL、AAF、PhIP、臓器

A. 研究目的

遺伝毒性発がん物質の発がん性および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った。本年度は遺伝毒性発がん物質 AAF、食品に含まれる発がん物質 PhIP および MeIQx について報告されたデータを用いて発がんにおける閾値の有無を検討した。ま

た、*in vitro* で linear-no-threshold な用量相関性を示し、閾値を示さない遺伝毒性物質、MeIQx、マイトマシン (MMC) および 1-β-D-アラビノフラノシルシトシン (Ara-C) の *in vivo* 遺伝毒性発現における閾値の有無を検討した。

閾値の有無の評価については、データ解析に問題があり、用量相関性に関する生代

ータを semi-log または log-log スケールで表示し、線形から評価するなど、正しく評価されていない場合がある。

本報告では、算術スケールを用いて、報告されている発がん性、前がん病変誘発性、*in vivo* 遺伝毒性に閾値が存在するか否か、評価の見直しを行なった。

また、閾値は、毒性の検出限界[NO(A)EL]とは無関係である点について解説する。

一方、これまでの報告で、ある種の遺伝毒性物質の *in vitro* における遺伝毒性発現に閾値が存在することが明らかにされている(1)。遺伝毒性発現に閾値のある物質は、発がん性において閾値を発現することは容易に予測できる。しかし、現在用いられている食品添加物等のリスク評価には、遺伝毒性における閾値の有無の検討は行なわれていない。遺伝毒性に於ける閾値存在の有無を明確にすることの重要性について言及した。

B. 研究方法

文献検索により情報を収集する一方、報告されている論文のデータ解析法に検討を加え、問題点を整理した。

(倫理面への配慮)

本研究では該当するものはない。

C. D. 研究結果と考察

1. 閾値有無の評価における問題点

a) 用量・反応相関の表示法

一般に閾値の有無の判定は、用量・反応相関図における線形から判定される。図-1は典型的な閾値有りおよび無しを、算術スケール(AおよびB)および semi-log スケール(CおよびD)で表示してある。(A)と(B)では明らかに線形が異なり

linear-no-threshold か、non-linear で閾

値の存在する可能性があるか、容易に判定が付く。しかしSemi-log 表示した(C)と(D)の線形の違いから、閾値の有無を判定することは難しい。この場合、数式で表せる近似曲線を示した上で閾値の有無を評価する必要がある。

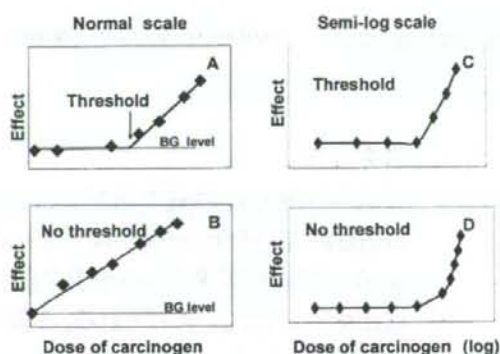


図-1. 線形による閾値有無の判定

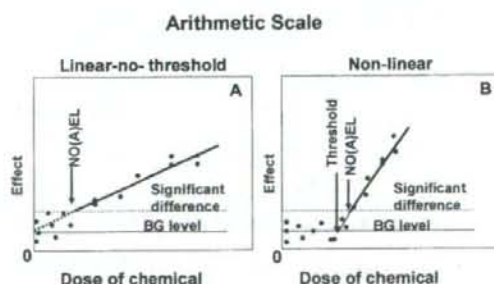


図-2 NO(A)ELと閾値の関係

b) 閾値と NO(A)EL の関係

閾値と検出限界である NO(A)EL の関係であるが、これらは関係の無い概念である。図-2に示すように、閾値があっても無くても有意差を持ってその作用が検出されない濃度つまり NO(A)EL は当然存在する。現在用いられている規制法では、リスク管理上、遺伝毒性発がん物質でないものは、使

用可能なので、それらの毒性評価にNO(A)ELを用いているに過ぎない。

c) 低濃度への外挿による閾値有無の推定

実験系の精度の限界から、低濃度における効果を正確に知る事は殆ど不可能である。例えば骨髄小核試験にフローサイトメトリーを用いて測定することにより個体における効果を高精度に測定できることが最近示されたが(2)。しかし、個体間の差位は依然として残る。個体間の差位を如何に取り扱うべきか未だ解決されていない問題である。特に発がん性に於ける閾値の有無の研究は、一群1,000匹の動物を使って発がん性が無いことが証明されても、遺伝的にも異なる60億の人間におけるインパクトは明らかにできない。従って、現実的には低用量の反応は高濃度からの外挿により推定することになるのではないと思われる。

2. AAF発がんにおける閾値

米国において24,192匹のBalb/cマウス

を用いて背景発がん率より1%以上増加したものが有意差をもって検出できる発がん実験系で、AAFの発がんにおいて閾値があるか否か検討された(3-5)。

腎腫瘍誘発率の線形はnon-linear(原点を通る直線ではない)で、閾値の存在が示唆される(図-3a)。

一方肝腫瘍誘発においては33ヶ月の実験データから得られる近似直線は原点を通らずそのX軸切片は3ppmであるが、この値は実験期間の延長ともに縮小し、34ヶ月では原点を通ると演繹された。従って肝腫瘍誘発においてはlinear-no-threshold(閾値無し)とするのが妥当であると考えられた(5-7)(図-3b)。

ここで重要なことは(a)実験期間によ

て線形は変化し、肝臓の場合は実験期間を十分とることでnon-linearがlinear-no-thresholdに

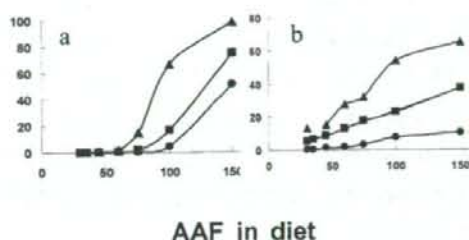


図-3. AAFのマウスにおける発がん。(●) 18ヶ月;(■) 33ヶ月;(▲) 36ヶ月。a. 腎腫瘍;b. 肝腫瘍

なること、(b)臓器によって閾値の有無は変化することである。

3. PhIP発がんにおける閾値

PhIPは乳腺、前立腺、大腸、造血系に発がん性を示す。用いられた動物数は30匹、実験期間は2年間の報告されたデータを用いて、AAFの場合と同様の手法で、閾値の有無に関する評価を行なった。一つの発がん実験で乳腺、造血系および大腸における造腫瘍性の用量相関性が示されている(8)。

a) 乳腺発腫瘍

雌ラットにおける用量相関性はlinear-no-thresholdの線形を示し、閾値の存在は示されなかった(図-4a)。

b) リンパ性白血病

雌雄ともlinear-no-thresholdの線形を示し、閾値の存在は示唆されていない(図-4b)。

c) 大腸腫瘍およびACF

大腸腫瘍誘発性はnon-linearな線形を示し、閾値の存在が示唆される(図-4c)。しかし、図4-dに示すように前がん病変

ACFの誘発は linear-no-threshold の線形を示した。図には示してないが 0.001, 0.01, 0.1, 1 ppm でも実験は行なわれている(9)。しかし個体差が大きく 10 ppm 以下では variation coefficient (標準偏差値/平均値)が2以上であり、10 ppm 以下のデータからは、線形に関する情報は得られない。Variation coefficient が2以下である 50 ppm 以上のデータを用いて検討した。閾値の存在は示されていなかった。閾値を示す段階が ACF 誘発と造腫瘍性との間にあると考えられた。

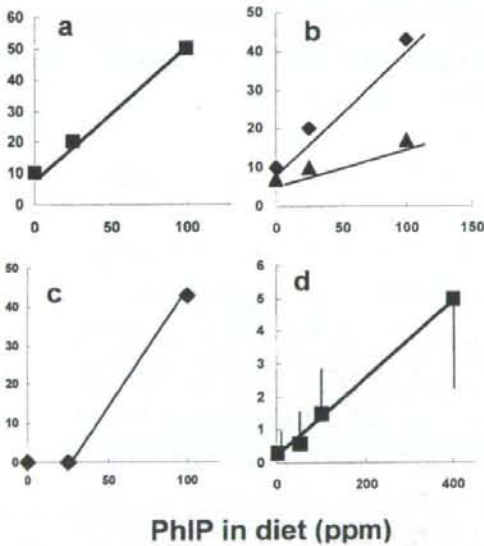


図-4. PhIP のラットにおける neoplastic または preneoplastic 変化誘発における用量相関性。(a-c) 2年投与。(d) 16週投与。(a) 乳腺腫瘍誘発率、雌；(b) リンパ性白血病誘発率、■ 雄、▲ 雌；(c) 大腸腫瘍誘発率、雄；(d) 雄大腸における前がん病変 ACF の大腸当たりの個数。

4. MeIQx 発がんにおける閾値

a) MeIQx による肝腫瘍および前がん病変
ラット肝腫瘍誘発性については2年間投

与の実験は一例あるが(10)、用量の間隔が広すぎて閾値に関する情報の得られていない。

前がん病変については GST-P 陽性変化をマーカーにした用量相関が報告されている(11)。用量相関率が 10 ppm 近傍で顕著に変化することから、閾値の存在が示唆される。従って、腫瘍誘発性にも閾値の存在が推定された。

5. 臓器による用量相関モードの変化

PhIP による大腸発がんでは閾値の存在が示唆されたが、乳腺、造血系では閾値は存在しないと考えられた。AAF では腎発がんでは閾値が示唆されたが、肝発がんでは閾値の存在は示されなかった。従って同じ遺伝毒性発がん物質でも臓器によって作用モードが異なることは、発がん物質に共通した性質であると推定される。これらの結果を表-1に纏めた。

表-1. 発がん物質閾値のまとめ

発がん物質	動物種	臓器	閾値
AAF	マウス	腎臓	+
		肝臓	-
PhIP	ラット	乳腺	-
		全身性 (リンパ性白血病)	-
		大腸	+?
MeIQx	ラット	肝臓*	+?

閾値の有無は用量相関の線形より求めた。

+: 閾値の存在が示唆された。

-: 閾値は存在しない。

+?: 閾値存在の可能性が示された。

*: 前がん病変

6. In vivo 遺伝毒性における閾値

一般に遺伝毒性には閾値がないと考えられ、そのことが遺伝毒性発がん物質のリス

ク評価の際に、閾値がないとして食品添加物等における使用禁止の根拠の一つになっている。そこで遺伝毒性に関する *in vivo* における用量相関に関する最近の報告について検討を加えた。

a) MeIQx による *LacI* 突然変異

Big Blue ラットに MeIQx を含む餌を 16 週投与した場合の肝臓における *Lac I* 変異誘発の用量相関が報告されている (11)。餌中濃度が 0.001 ppm ~ 100 ppm を 10 倍の間隔でテストしてある。Full scale を 100 ppm にしても、1 ppm (挿入図) にしても閾値の存在は認められない (図-5)。

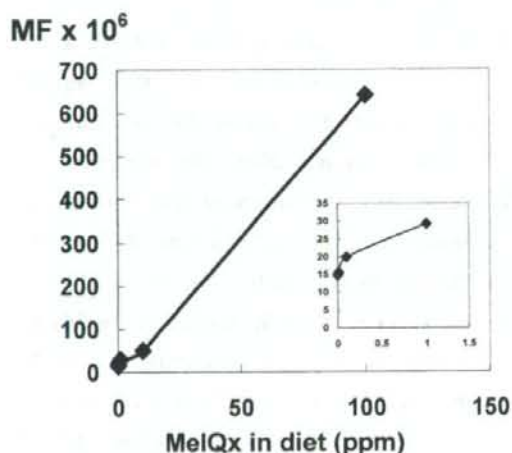


図-5. MeIQx 投与によるラット肝臓における *Lac I* transgene の変異。

b) 遺伝毒性物質小核誘発における閾値

MMC または Ara-C を腹腔内投与し、末梢血の小核誘発について用量相関を検討した論文が報告されている (2)。フローサイトメーターを用い一個体から 10^6 個の細胞を解析している極めて精度の高い実験である。個体差は明らかに存在するが、variation coefficient は決して高いものではなく、いずれも 0.25 以下である。線形から practical threshold の存在が報告されて

いるが (2)、下記に示すように、算術スケールの線形からは閾値の存在は示されなかった (6、図6)。

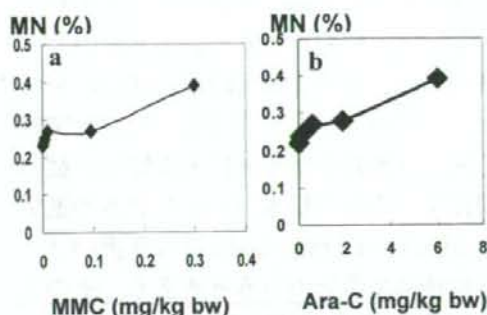


図-6. MMC および Ara-C による小核誘発の用量相関

以上 *in vitro* で linear-no-threshold な用量相関を示すような遺伝毒性物質は *in vivo* でも閾値を示さないと考えられる。しかし、MNNG、methyl methanesulfonate, ethyl methanesulfonate, UV は *in vitro* で、用量相関の線形から明らかに閾値が存在することが報告されている (1)。これら *in vitro* で閾値を示す遺伝毒性物質は *in vivo* でも閾値を示すことが期待されるが、*in vivo* における閾値の有無に関する報告は無い。In vivo で遺伝毒性に閾値が示されれば発がん性においても、動物種、臓器に関わらず閾値の発現が期待される。

E. 結論

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ことが明らかである。たとえ有る特定の化学物質がある臓器で閾値を示唆する non-linear な用量相関を示しても、他の臓器では linear-no-threshold 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。実験動物で自然発がんする臓器では linear-no-threshold モードを示す可能性も考えら

れるが、アフラトキシンB1はラットに肝がんを誘発し、そのモードはlinearであると報告されている(12)。なお、ラット肝の自然発がん率は極めて低い。一方、化学物質の発がん標的臓器は動物種により異なることがしばしば観察される。これらのことを鑑みるに、極めて遺伝的に多様性に富むヒトにおける発がん物質閾値の問題を実証する実験系が存在するとは考え難い。従って現在用いられているUS-EPAの推奨するlinear-no-thresholdの取り扱い(13)は極めて妥当であると考え。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)

(14)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。それらについてはさらに検討を加えることにより、発がん性において動物種、臓器に関わりなく閾値を示す可能性がある。遺伝毒性についてはlinear-no-thresholdと考えるためか、用量相関に関する情報は余り多くない。この点良く検討し、有用な物質の有効利用を図ることが大切であると考え。

F. 健康危機情報

特になし

-引用論文-

- 長尾美奈子 遺伝毒性閾値に関する国際的動向の分析 厚生労働省研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業。平成20年3月 p 21-26.
- Asano N, Torous DK, Tometsko CR, Dertinger SD, Morita T, Hayashi M. Practical threshold for micronucleated reticulocyte induction observed for low doses of mitomycin C, Ara-C and colchicine. *Mutagenesis*. 2006; 21: 15-20.
- Cairns T. The ED01 study: introduction, objectives, and experimental design. *J Environ Pathol Toxicol*. 1980; 3: 1-7.
- Gaylor DW. The ED01 study: Summary and conclusions. *J Environ Pathol Toxicol*. 1980; 3: 179-83.
- Farmer JH, Kodell RL, Greenman DL, Shaw GW. Dose and time response model for the incidence of bladder and liver neoplasms in mice fed 2-acetylaminofluorene continuously. *J Environ Pathol Toxicol*. 1980; 3: 55-68
- Nagao M, Ishikawa S, Nakagama H, Watanabe M. Extrapolation of the animal carcinogenesis threshold to humans. *Genes Environ*. 2008, 30, 160-165.
- Hayes AW., *Principles and Methods of Toxicology*, 4th ed. Taylor & Francis, Philadelphia; 2001.
- Hasegawa R, Sano M, Tamano S, Imaida K, Shirai T, Nagao M, Sugimura T, Ito N. Dose-dependence of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) carcinogenicity in rats. *Carcinogenesis*. 1993; 14: 2553-7.
- Fukushima S, Wanibuchi H, Morimura K, Iwai S, Nakae D, Kishida H, Tsuda H, Uehara N, Imaida K, Shirai T, Tatematsu M, Tsukamoto T, Hirose M, Furukawa F. Existence of a threshold for induction of aberrant crypt foci in the rat colon with low doses of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *Toxicol Sci*. 2004; 80: 109-14.
- Murai T, Mori S, Kang JS, Morimura K, Wanibuchi H, Totsuka Y, Fukushima S. Evidence of a threshold-effect for

2-amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5-f]-
quinoxaline liver carcinogenicity in
F344/DuCrj rats. Toxicol Pathol.
2008; 36: 472-7.

H. 知的所有権の取得状況
特になし

11. Hoshi M, Morimura K, Wanibuchi H, Wei M, Okochi E, Ushijima T, Takaoka K, Fukushima S. No-observed effect levels for carcinogenicity and for in vivo mutagenicity of a genotoxic carcinogen. Toxicol Sci. 2004; 81: 273-9.
12. Wogan GN, Paglialunga S, Newberne PM. Carcinogenic effects of low dietary levels of aflatoxin B1 in rats. Food Cosmet Toxicol. 1974; 12: 681-5.
13. U.S. Environmental Protection Agency. Guidelines for carcinogen risk assessment; 2005 Mar. Report EPA/630/P-03/001F.
14. ILSI Europe: Threshold of toxicological concern (TTC): A tool for assessing substances of unknown toxicity present at low levels in the diet. By S Barlow. ILSI Europe Concise Monograph series. Brussels, Belgium. ISBN 1-57881-188-0 (2005)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagao M., Ishikawa S, Nakagama H, Watanabe M. Extrapolation of the animal carcinogenesis threshold to humans. Genes Environ. 2008; 30: 160-165.

2. 学会発表

- 1) Nagao M. Extrapolation of the animal carcinogenesis threshold to humans. International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds, held in

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:低用量域での変異原性の複合作用

分担研究者: 太田敏博 東京薬科大学・生命科学部・環境分子生物学研究室 教授

研究要旨

変異原 6 種類について、サルモネラ菌 TA100 (DNA 除去修復欠損株)、およびの TA1975P (DNA 除去修復野生株) に対する変異原性の検出限界用量を調べることで、DNA の付加体は生成するが DNA 修復により実質的に突然変異が生じないと推定される用量を求めた。次に 6 種類の変異原をこの用量で混合して、TA1975P 株に対して変異原性が現れるか否かを調べた。その結果、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。これは DNA 付加体の総量に加算効果が現れたために、DNA 除去修復が完全に行われず、変異原性が検出されたと解釈された。調べた限りでは、明らかな相乗効果は認められなかったことから、変異原性の実質的な閾値の設定に際しては、複合作用が大きな問題になることはないと考えられた。

キーワード: 変異原性、閾値、複合影響

A. 研究目的

化学物質の安全性評価において、DNA を直接標的とする遺伝毒性発がん物質には安全な閾値が存在しないという考え方が原則となっているが、細胞には DNA 修復機構があり、DNA に付加体形成などの損傷が生成しても、直ちに突然変異生成に繋がるわけではない。遺伝毒性発がん物質であっても、DNA 修復などの細胞機能により突然変異の発現が検出できない(自然突然変異頻度以下の)低用量域が存在するので、これを実質的な閾値として安全性評価に適用する考え方もある。その場合、多種類の変異原による複合影響については充分考慮する必要が

あるが、これを *in vivo* 試験で実験的に解析することは容易ではない。

これまで、変異原性が十分に現れる高用量域での変異原の相乗効果、加算効果など複合作用についての報告は数多くあるが、これら高用量域での複合作用がそのまま低用量においても外挿できるとは限らない。食品などに存在する変異原の量は極微量であり、安全性評価で問題とするのは極低用量領域での複合作用の有無である。そこで、実験条件設定のコントロールが容易な微生物を用いた変異原性試験で変異原の複合効果の有無についてまず調べることが有用であると思われる。

B. 研究方法

1) 菌株の作成

変異原性試験に一般的に用いられているサルモネラ菌 TA100 株はヌクレオチド除去修復遺伝子の一つ (*uvrB*) が欠失した DNA 修復能欠損変異株である。このヌクレオチド除去修復遺伝子が野生型 (*uvrB*) であること以外は、TA100 株と同一の遺伝的特性を有する TA1975/pKM101 (以下 TA1975P と記載) 株を作成した。B. N. Ames より入手した TA1975 (*hisG46*, *rfa*) 株と大腸菌 WP2000 (*trpE*, *pro*, *lac*)/pKM101(*mucAB*, *Amp^R*) の菌液を混合培養し、接合によってプラスミド pKM101 を TA1975 株に移した。

2) 変異原

S9mix による代謝活性化を必要としない直接変異原で、DNA に付加体を形成し塩基対置換型の突然変異を誘発することが報告されているものから選択した。さらにその DNA 付加体の修復にヌクレオチド除去修が関与していると考えられている以下の 6 種類の変異原を用いた。2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, (AF-2, >98%, 和光純薬工業) ; 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX, 分析用標準品, 和光純薬工業) ; 4-nitroquinoline N-oxide (4-NQO, >98%, 東京化成工業) ; sodium azide (Azide, >98%, ナカライテスク) ; N-(trichloromethylthio)-4-cyclohexane-1,2-dicarboximide, (Captan, 分析用標準品, 和光純薬工業) ; 1-nitropyrene (NP, >98%, 東京化成工業)。Azide は滅菌純水に溶解させた。他の 5 種類の変異原は Dimethylsulfoxide (DMSO) に溶かして用いた。

3) 復帰突然変異試験

標準的なプレインキュベーション法を用いた。0.5 mL のリン酸緩衝液 (100mM, pH7.4)

に 6 種類の変異原溶液をそれぞれ 0.005-0.02 mL 添加し、溶媒の DMSO の総量がいずれの用量でも 0.1 mL となるように DMSO を加えて調整した。また、変異原を単独で処理する場合も、溶媒の DMSO 量が 0.1 mL となるように調整した。Nutrient broth で培養した菌液を 0.1 mL 添加して混合し、37°C で 20 分間ゆるやかに振とうして処理を行った。トップアガー (0.05 mM His, Bio 含有) 2 mL を加えて、最少合成培地のプレートにまいた。2 日間 37°C で培養後、His⁺復帰突然変異コロニーを数えた。

用量設定試験では各用量 4 枚のプレートをもちいた。複合影響を調べる実験は 3 回行い、それぞれ各用量 6, 10, 12 枚のプレートを用いて実験した。データの統計学的な有意差検定には Dunnett の検定を用いて評価した。

C. 研究結果

1) 用量の選択

ヌクレオチド除去修復に関して野生型である TA1975P 株を用い、各変異原に対する用量反応曲線を調べた。AF-2 では 0.001-0.5 μ g/plate、MX では 0.002-1 μ g/plate、4-NQO では 0.01-5 μ g/plate、その他は 0.1-20 μ g/plate の範囲において公比 2 で行った。その結果、TA1975P 株において見かけ上、変異原性が検出されない用量 (μ g/plate) として AF-2, 0.02; MX, 0.05; 4-NQO, 0.2; Azide, 0.2; NP, 0.5; Captan, 1 が設定された。一方で、上記の用量においては TA100 株では著しい復帰変異コロニー数の増加が見られた。このことは、上記の用量でも DNA の付加体は形成されており、DNA 修復能が欠損した TA100 株では突然変異が誘発されるが、DNA 修復能を有する TA1975P 株では付加体を取り除いているため突然変異が生じないと解釈された。

2) 複合影響

用量設定した各変異原を混合し TA1975P 株で変異原性を検索した。比較対照として各々の変異原単独で TA1975P 株を処理した。溶媒対照と較べた結果、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。検出された変異原性の強さは、それぞれの変異原の用量を 6 倍したときの活性にほぼ一致していたことから、極低用量域においても DNA 損傷には加算性があることが判った。つまり、DNA 付加体の総量に加算効果が現れたために、DNA 除去修復が完全に行われず、その結果として弱い変異原性が検出されたと解釈された。

D. 考察

発がんとの関連において、その発がんメカニズムに遺伝毒性が関与するか否かは、評価上重要な位置を占めている。これまで遺伝毒性発がん物質には一日摂取許容量 (ADI) や耐容一日摂取量 (TDI) は設定できないと評価されてきている。しかし、発がん臓器と *in vivo* での遺伝毒性との相関は必ずしも明確ではなく、発がん過程に遺伝毒性が関与しているか否かの判断は難しく、研究者によっても評価基準が異なる。近年、遺伝毒性においても量的概念を導入し、遺伝毒性発がん物質であっても現実的な閾値を設定することの是非が問われている。

この議論の中で必ず出てくる問題の一つが遺伝毒性の複合効果、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、評価上重要であるが、その実施は容易ではない。今回の微生物を用いた試験では、DNA の付加体形成に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。

E. 結論

極低用量で 6 種類の変異原を混合して、変異原性の複合効果を調べた。DNA 付加体の総量の加算効果と考えられるレベルの強さの変異原性が検出された。しかし、明らかな相乗効果は認められなかったことから、変異原性の実質的な閾値の設定に際しては、複合作用が大きな問題になることはないと考えられた。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakai, T., 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)

2. 学会発表

- 1) Ohta, T., 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, Japan, July, 2008.

H. 知的所有権の取得状況

特になし

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:アクリルアミド誘発DNA付加体定量法の開発

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

アクリルアミドの成人一日の摂取量は約 140 μg である。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シドアミドに変化し、DNA 付加体を形成することが知られており、その遺伝毒性を正確に評価することは食品の安全を守るために重要である。本研究ではアクリルアミドの引き起こす DNA 付加体、*N*7-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。

キーワード: アクリルアミド、DNA 付加体、*N*7-GA-Gua

A. 研究目的

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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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 μg 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シドアミドに変化し、DNA 付加体を形成する。

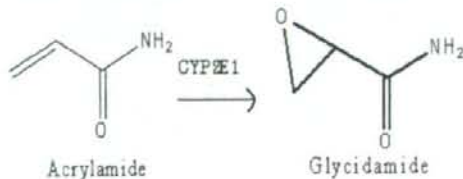


図1 アクリルアミドとグリシドアミド

アクリルアミドの曝露により生成される DNA 付加体には、アデニン由来の

M-(2-carboxy-2-hydroxy-ethyl) 2'-deoxyadenosine (*M*-GA-dA)、*N*3-(2-carbamoyl-2-hydroxy-ethyl)-adenine (*N*3-GA-Ade)、およびグアニン由来の *N*7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-guanine (*N*7-GA-Gua) の 3 つが確認されている。また、これらの DNA 付加体の生成量は *N*7-GA-Gua > *M*-GA-dA > *N*3-GA-Ade の順であることが知られている⁸⁾。

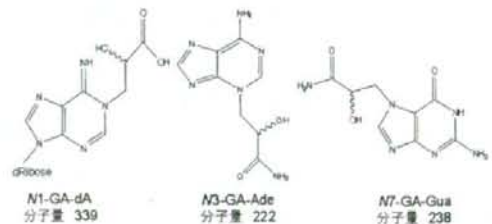


図2 アクリルアミドにより生成される DNA 付加体

N7-GA-Gua は容易に DNA から脱離し、脱塩基部位を作る。*N7*-GA-Gua の測定法については Gamboa da Costa によってすでに開発されている。しかし、脱離のカイネティクス、塩基の安定性などの情報が不足しており、十分に信頼できる方法とは言えなかった。そこで、本研究ではこれらを詳細に検討し、信頼性の高い測定法を開発した。

B. 研究方法

N7-GA-Gua およびその安定同位体は Gamboa da Costa らの方法に従い合成した。LC/MS/MS は Waters-Micromass 社の Quattro Ultima Pt を使い、HPLC のカラムは Shim-pack XR-ODS (75×3.0mm) を用いた。

C. 研究結果

(1) *N7*-GA-Gua 標準品の安定性

Gamboa da Costa らの方法では *N7*-GA-Gua を DNA から脱離させるために、100°C で 10 分間インキュベートしている。そこで、まず、*N7*-GA-Gua 自体が 100°C で安定かどうかの確認を行った。*N7*-GA-Gua の標準品を 100°C で 10、20、30 分間インキュベートし、LC/MS/MS で定量した。その結果、*N7*-GA-Gua のピークは時間を追うごとに直線的に減少し、100°C 10 分間の条件では、初期値の 7% 減少することが分かった。一方、37°C で同様の検討を行った結果、48 時間でも安定であった。

(2) *N7*-GA-Gua の DNA からの脱離条件の検討。

Gamboa da Costa らの脱離条件では、付加体の一部が熱で壊れてしまうことが分かったので、よりマイルドな 37°C での脱離条件を検討した。牛胸腺 DNA をグリシドアミドで処理して付加体を形成させ、37°C でインキュベートして *N7*-GA-Gua の DNA からの脱離を LC/MS/MS で定量した。*N7*-GA-Gua の DNA からの脱離は 48 時間まで増え続け、以

後頭打ちになった。この、37°C 48 時間による脱離条件と、Gamboa da Costa らの 100°C 10 分間の脱離条件を比較すると、37°C 48 時間の条件の方が約 1.7 倍多くの *N7*-GA-Gua を回収できた。そこで、*N7*-GA-Gua の DNA からの脱離条件を 37°C 48 時間とした。

(3) DNA 精製法の検討

Gamboa da Costa らの方法では、DNA 精製にキアゲンのキットを用いているが、この精製過程で 50°C 2 時間でのインキュベートが必要である。そこで、この条件で *N7*-GA-Gua がどのぐらい DNA から脱離してしまうか検討した。その結果、50°C で 2 時間インキュベートすると全体の 60% の *N7*-GA-Gua が DNA から脱離してしまうことが明らかとなった。そこで、このプロトコールを 37°C 3 時間に変更した。これによる *N7*-GA-Gua のロスは全体の 20% に抑えることができる。

(4) 動物実験サンプルでの測定

以上のように、DNA 精製法、*N7*-GA-Gua の DNA からの脱離条件を改良し、より感度の高い測定方法を確立した。この方法を用いて、国立医薬品食品衛生研究所の本間博士の研究室でアクリルアミドを経口投与した 11 週齢のラットの各臓器における *N7*-GA-Gua を測定した結果、きれいな用量-応答関係が得られた。

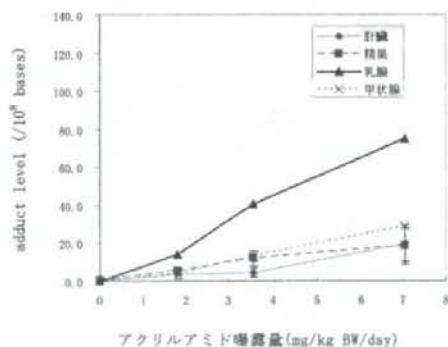


図3 アクリルアミドを経口投与したラットの各臓器中 *N7*-GA-Gua レベル。

D. 考察

本実験条件での *N7-GA-Gua* の検出感度は、 $100 \mu\text{g}$ の DNA を用いた場合、 10^8 塩基に数個のレベルであり、アクリルアミドの安全性を評価する上で、十分高感度であると考えられる。

E. 結論

アクリルアミドによる DNA 損傷、*N7-GA-Gua* の測定法を改良し、より感度が高く信頼性のあるプロトコルを確立した。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagayoshi H, Matsumoto A, Nishi R, Kawamoto T, Ichiba M, Matsuda T: Increased formation of gastric N2-ethylidene-2'-deoxyguanosine DNA adducts in aldehyde dehydrogenase-2 knockout mice treated with ethanol., *Mutation Research*, 673, 74-77, 2009
- 2) Okamoto Y, Chou PH, Kim SY, Suzuki N, Laxmi YR, Okamoto K, Liu X, Matsuda T, Shibutani S.: Oxidative DNA damage in XPC-knockout and its wild mice treated with equine estrogen., *Chem Res Toxicol.* 2008 May;21(5):1120-4. Epub 2008 May 1.
- 3) 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.* 55, 199-209, 2008

2. 学会発表

- 1) 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. 21 Sept. ,2008, Cavtat, Croatia
- 2) T. Matsuda, R. Nishi, Y. Totsuka, 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、東京、2008年12月13日~14日
- 3) 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、神戸、2008年12月9日~12日
- 4) K. Kato, E. Yamamura, M. Kawanishi, T. Yagi, T. Matsuda, A. Sugiyama, Y. Uno: Significance of DNA adductome analysis in vitro micronucleus test. 第37回日本環境変異原学会、沖縄、2008年12月4日~6日
- 5) K. Kawai, P.-H. Chou, M. Inoue, T. Matsuda, H. Kasai: Detection of 4-OHE-DNA adducts in human lung tissue. 第37回日本環境変異原学会、沖縄、2008年12月4日~6日
- 6) R. A. Kanaly, P.-H. Chou, H. Nagayoshi, H. Sugimura, 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、沖縄、2008年12月4日~6日
- 7) N. Koyama, A. Kimura, M. Yasui, S.