

through breakage-fusion-bridge (BFB) cycle in human cells. The 8<sup>th</sup> International Symposium on Chromosomal Aberrations (2007.10)

- 51) T. Suzuki, Y. Luan, D. Praba, M. Kogi, M. Honma, T. Koizumi, S. Tanabe, Y. Sato, K. Suzuki, T. Yamaguchi, CGH and SNP arrays; as new tools for detailed analysis of chromosome. The 8<sup>th</sup> International Symposium on Chromosomal Aberrations (2007.10)
- 52) M. Honma, The new ICH guideline on Genotoxicity. 2007 Korean National Institute of Toxicological Research International Symposium (2007.10)
- 53) M. Honma, Validation of a humanized in vitro genotoxicity test system. 2007 Korean NTP Workshop (2007.10)
- 54) 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  $\gamma$  線照射による小核形成と追跡 日本放射線影響学会第 50 回大会 (2007.11)
- 55) 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 50 回大会 (2007.11)
- 56) 谷田貝文夫、鈴木雅雄、本間正充: 低線量・低線量率  $\gamma$  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 50 回大会 (2007.11)
- 57) N. Koyama, M. Yasui, H. Sakamoto, M. Sakuraba, S. Masuda, N. Kinae, T. Matsuda, M. Hayashi, M. Honma, Genotoxicity of acryamide expressed via metabolic activation in CYP over-expressing human cells. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- 58) M. Yasui, E. Suenaga, N. Koyama, C. Masutani, F. Hanaoka, P. Gruz, S. Shibutani, T. Nohmi, M. Hayashi, M. Honma, Translesion synthesis past 2'-deoxyinosine, a major nitric oxide-induced DNA adduct, by human DNA polymerase  $\eta$  and  $\kappa$ . 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- 59) F. Yatagai, H. Matsumoto, M. Honma, A possible involvement of bystander effects in the repression of spontaneous mutation induction. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- 60) M. Saito, H. Matsufuji, M. Chino, M. Hayashi, M. Honma, K. Yamagata, Antioxidant activity and potential genotoxicity of flavonoid by using human lymphoblastoid TK6 cells. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- 61) S. Arai, M. Saito, Y. Takashima, M. Honma, H. Kojima, A new trial for in vitro Comet assay using 3-dimensional human epidermal model. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- 62) A. Kimura, H. Sakamoto, M. Hayashi, K. Saigo, H. Tokado, M. Honma, Establishment

- of a robust in vitro Comet protocol using human lymphoblastoid TL6 cells. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- 63) M. Honma, M. Yasui, N. Koyama, T. Koizumi, M. Sakuraba, H. Sakamoto, Y. Takashima, K. Sugimoto, M. Hayashi, Visualization of micronuclei by fluorescent cell imaging analysis. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- 64) T. Suzuki, T. Koizumi, D. Prabha, Y. Luan, M. Honma, S. Hamada, M. Nakajima, T. Watanabe, C. Furihata, Collaborative study on the toxicogenomics in JEMS/MMS II: High-throughput qPCR analysis by TaqMan low density array. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- 65) M. Honma, Background issues initiating a revision of the current ICH genotoxicity guidance. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens & 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society, (2007.11)
- 66) 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)
- 67) K. Nishimura, Y. Totsuka, M. Terasaki, K. Mukaisyo, T. Hattori, T. Matsuda, T. Sugimura, K. Wakabayashi, Analysis of DNA adducts derived from *N*-nitroso bile acid conjugates in rat duodenogastric reflux model. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens and 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society, Kitakyushu, November, 2007.
- 68) R.A. Kanaly, H. Nagayoshi, T. Hanaoka, T. Matsuda, Utilization of the adductome approach to assess DNA damage in human liver tissue. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens and 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- 69) H. Takemura, H. Uchiyama, M. Morita, H. Sakakibara, T. Ohura, H. Nagayoshi, T. Matuda, T. Amagai, R. Kuruto, K. Shimoi, A selective inhibitor of CYP1B1, chrysoeriol. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens and 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society, (2007.11)
- 70) P.-H. Chou, H. Nagayoshi, S. Matsui, M. Nakamura, T. Matsuda, AhR activation and metabolic degradation of quinoline disperse dyes—disperse yellow 54 and disperse yellow 64. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens and 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- 71) R. Nishi, M. Kaneko, T. Matsuda, S. Matsui, The behavior of DNA-damaging agents and AhR ligands in petrochemical industrial wastewater treatment plant. 1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens and 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- 72) H. Nagayoshi, T. Matsuda, S. 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 (2007.11)
- 73) H. Nagayoshi, R.A. Kanaly, T. 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, Kyoto (2007.12)
- 74) T. Nohmi, Asbestos and other environmental toxic chemicals, The 5<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations in Antalya, Turkey (2007.5)
- 75) T. Nohmi, Roles of Y-family DNA polymerases in mutagenesis via the misincorporation of oxidized dNTPs, The 3<sup>rd</sup> Japan US DNA repair meeting in Sendai, Japan(2007.5)
- 76) 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, 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(2007.7).
- 77) T. Nohmi, Validity of in vivo genotoxicology, 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, in Tokyo, Japan, (2007.8)
- 78) T. Nohmi, DNA repair as a constituent of thresholds of genotoxicity, 37<sup>th</sup> European Environmental Mutagen Society, Basel, Switzerland (2007.9)
- 79) T. Nohmi, The role of Y-family DNA polymerase in oxidative mutagenesis, 38<sup>th</sup> Annual Meeting of Environmental Mutagen Society in Atlanta, USA (2007.10)
- 80) Y. Totsuka, R. Nishigaki, T. Takamura-Enya, T. Nohmi, T. Sugimura, K. Wakabayashi, Formation of RNA adduct with a novel endogenous mutagen and carcinogen, aminophenylnorharman, 38<sup>th</sup> Annual Meeting of Environmental Mutagen Society in Atlanta, USA (2007.10)
- 81) 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 (2007.10)
- 82) M. Ikeda, K. Masumura, Y. Sakamoto, B. Wang, M. Neno, K. Sakuma, I. Hayata, 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 (2007.11)
- 83) Y. Shimada, M. Nishimura, S. Kakinuma, K.Yamauchi, T. Imaoka, Y. Shang, T. Nohmi, I. Kawaguchi, 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 (2007.11)
- 84) M. Ikeda, K. Masumura, K. Matsui, H.

- Kohno, K. Sakuma, T. Tanaka, T. Kamataki, 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 9<sup>th</sup> International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis (ICMAA-2007) in Jeju island, Korea (2007.12)
- 85) 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 (2008.1)
- 86) 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)
- 87) M. Yamada, K. Matsui, T. Nohmi, Development of a tester strain sensitive to chemicals inducing oxidative pyrimidines, 38<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society in Croatia (2008.9)
- 88) 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)
- 89) 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)
- 90) 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)
- 91) M. Honma, Genome Mapping of Damaged Chromosome Regions Induced by Ionizing Irradiation Using DNA Microarray Analysis. 38<sup>th</sup> European Environmental Mutagen Society in Croatia (2008.9)
- 92) 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)
- 93) 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)
- 94) 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)
- 95) 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-オキシグアニン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)
- 96) 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)
- 97) 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)
- 98) 木村葵、坂本浩子、西郷和彦、洲加本孝幸、本間正充:*In vitro* コメントアッセイプロトコ

- ルの検証 日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)
- 99) J. Wang, J. Sawyer, M. Honma, T. Chen, M. Moore, 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)
- 100) 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)
- 101) 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)
- 102) 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)
- 103) 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)
- 104) 安井学、N. Suzuki、本間正充、S. Shibusaki、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)
- 105) M. Nagao, Extrapolation of the animal carcinogenesis threshold to humans. International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds in Tokyo (2008.7)
- 106) 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)
- 107) T. Matsuda, Robert A. Kanaly, 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. 38<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society in Croatia (2008, 9)
- 108) 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 (2008, 12)
- 109) 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)
- 110) 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 (2008, 12)
- 111) 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 (2008, 12)
- 112) 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 (2008, 12)

- 113) J. Adachi, K. Kihara, 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)
- 114) R. Nishi, Y. Totsuka, K. Wakabayashi, 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)
- 115) H. Takemura, A. Matsui, M. Morita, H. Sakakibara, T. Matsuda, 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)
- 116) H. Nagayoshi, M. Oka, Y. Yukawa, K. Hori, Y. Suwa, A. Yokoyama, M. Muto, 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)
- 117) P.H. Chou, H. Sugimura, K. Kawai, H. Kasai, 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)
- 118) K. Kawai, P.-H. Chou, T. Matsuda, S. Matsui, 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)
- 119) 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)
- 120) 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)
- 121) 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)
- 122) T. Nohmi, Transgenic in vivo genotoxicity assays: basic features and the possible applications, 14<sup>th</sup> Alexander Hollaender Course on Genetic Toxicology: Genomic and Proteomic Approaches & Special Workshop on Arsenic Exposure Assessment in India (2008, 12)
- 123) 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)
- 124) T. Nohmi, Recent topics of mutation research with *gpt* delta mice and rats, 39<sup>th</sup> Annual Meeting of Environmental Mutagen Society in Puerto Rico (2008, 10)
- 125) M. Ikeda, K. Masumura, Y. Sakamoto, B. Wang, M. Neno, K. Sakuma, I. Hayata, A. Yamamoto, M. Honma, T. Nohmi, *gpt* delta transgenic mice for in vivo genotoxicity assays: application for analysis of combined effects of radiation and chemicals, the 7<sup>th</sup> Japan-France Workshop on Radiation Biology in Chiba (2008, 10)
- 126) Y. Totsuka, T. Ichinose, K. Hiyoshi, T. Kato, S. Masuda, T. Nohmi, T. Sugimura, K. Wakabayashi, Genotoxicity of nanoparticles in *in vivo* mutation assay systems, 38<sup>th</sup> European Environmental Mutagen Society in

Croatia (2008, 9).

- 127) T. Nohmi, Possible Mechanisms of Practical Genotoxic Thresholds, International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds in Tokyo (2008, 7).
- 128) 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)
- 129) Y. Ishii, T. Okamura, M. Tasaki, T. Inoue, T. Nohmi, T. Umemura, 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)
- 130) Y. Totsuka, T. Kato, S. Masuda, T. Nohmi, T. Sugimura, K. Wakabayashi, Genotoxicity of nanoparticles in *in vivo* assay systems, 第37回日本環境変異原学会 (2008, 12)
- 131) N. Toyoda-Hokaiwado, T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, T. Umemura, A. Nishikawa, 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)
- 132) 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)
- 133) 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)
- 134) 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 25<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology (2009. 1)

#### H. 知的所有権の取得状況

平成18年5月12日

特許第3799445号

発明の名称: 突然変異検出用トランスジェニッククラットとその作製方法およびそれを用いた突然変異試験法

出願人: 国立医薬品食品衛生研究所長

発明者: 能美健彦、増村健一、神藤康弘、林宏行

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 変異遺伝部 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数種類について、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 種類の酸化損傷 DNA 修復系をそれぞれ欠損させた株を作製し、修復系を保持している菌株(TA1535)の結果と比較した。いずれの化学物質に対しても、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

食品中に含まれる微量の化学物質である食品添加物等の安全性に多くの国民が注意を払うようになって来た。しかし問題となる化学物質が発がん性を示す場合、そのリスク評価は困難である。多くの発がん性化学物質の健康リスクを評価する場合、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、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。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。

だが生体には 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、がんに至るような突然変異にならない可能性がある。

本研究では、酸化損傷を引き起こす物質の変異原性を、バクテリアを用いた試験により調べる。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 8-ヒドロキシグアニン(8-OHG)DNA グリコシラーゼを欠損した株(YG3001 と YG3008)と、主として酸化ピリミジンの除去に働く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)を欠損した株(YG3206 と YG3216)を作製し、当該修復系に関して野生型の菌株と比較することで遺伝毒



性物質の閾値形成に及ぼす DNA 修復系の影響について考察する。

## B. 研究方法

### 1) 使用した化学物質

臭素酸カリウム (KBrO<sub>3</sub>, CAS No. 7758-01-2)、L-ペニシラミン (CAS No. 1113-41-3)、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)、システイン (CAS No. 52-90-4)。

### 2) 菌株作製

Ames 試験株である *Salmonella typhimurium* (以下サルモネラ) TA1535 株を親株に、8-OHG DNA グリコシラーゼをコードする *mutM* 遺伝子にカナマイシン耐性遺伝子のカセットを挿入して YG3001 株を作製した。TA1535 の染色体上にある Endo III をコードする *nth* 遺伝子にフレームシフト変異を導入して、さらに Endo VIII をコードする *nei* 遺伝子にクロラムフェニコール耐性遺伝子のカセットを挿入する方法で *nei* 遺伝子を欠損させた株を YG3206 とした (表1)。*nth* 遺伝子周辺を PCR で増幅し、制限酵素サイトの消失により、フレームシフト変異を確認した。*nei* 遺伝子周辺を PCR で増幅し、断片のサイズと *EcoRI* による切断で遺伝子の破壊を確認した。

表1 使用菌株一覧

菌株名	<i>mutM</i>	<i>nth</i>	<i>nei</i>	pKM101
TA1535	+	+	+	no
YG3001	-	+	+	no
YG3206	+	-	-	no

### 3) 酵素活性の測定

作製した菌株 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 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。O.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 1, 3, 10 μg protein を含む量をそれぞれ基質 (1 pmol) と反応液 (10 μL) 中で混合し、37°C 30 分間反応させた。15% アクリルアミド変性ゲルにて、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)、さらに親株の TA1535 と、大腸菌 AB1157 株の細胞破砕液を同様の条件で処理して用いた。

### 4) 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。MB については、代謝活性化するために、りん酸緩衝液の代わりに S9mix 0.5 mL を用いた。

### 5) 可視光の照射条件

NR と MB については可視光を照射して Ames 試験を行った。最小培地にまところまでは実験室の照明 (蛍光灯) を消して行い、その後、インキュベーター内の蛍光灯を点灯したまま 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。

(倫理面への配慮)

本研究はバクテリアを用いた実験なので配慮の対象ではない。

### C. 研究結果

#### 1) YG3206 株におけるエンドヌクレアーゼ活性の消失

作製した菌株について、遺伝子の欠損に加えて、酵素活性の消失を確認した。

TA1535 と YG3206 の比較から YG3206 では EndoIII 活性および EndoVIII 活性が消失していることが確認できた。

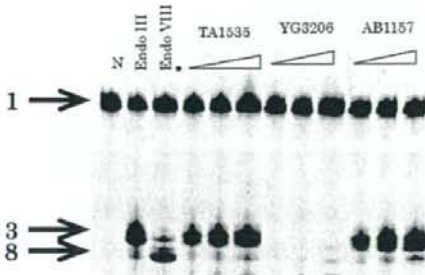


図1 エンドヌクレアーゼ活性

矢印1:未処理のバンド、矢印3:EndoIIIによる反生成物、矢印8:EndoVIIIによる反応生成物

#### 2) KBrO<sub>3</sub>の変異原性

TA1535 株において最高用量(5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ )まで復帰変異株数が溶媒対照値(12)を超えなかったのに対して、YG3001 株では、1000 $\mu\text{g}/\text{plate}$  から最高用量まで用量依存的に復帰変異株数の増加が見られ、2000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上で溶媒対照値(20)の2倍を超える復帰変異株数が計測された(図2左)。

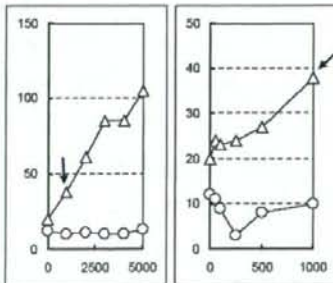


図2 KBrO<sub>3</sub>の変異原性

横軸、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/ $\text{plate}$ )。○:TA1535、△:YG3001。矢印は同じ用量の値を示す。

次に、1000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  を最高用量に 50  $\mu\text{g}/\text{plate}$  まで用量を下げて同様の試験を行った。YG3001 株では、低用量でも用量依存的に復帰株数が変化した(図2右)。

#### 3) L-ペニシラミンの変異原性

TA1535 株において 1000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  まで復帰変異株数が溶媒対照値(8)を超えなかったのに対して、YG3206 株においては、250  $\mu\text{g}/\text{plate}$  から最高用量まで用量依存的に復帰変異株数の増加が見られた。1000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上で溶媒対照値(86)の2倍を超える復帰変異株数が計測された(図3左)。

次に、1000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  を最高用量に 25  $\mu\text{g}/\text{plate}$  まで用量を下げて同様の試験を行った。YG3206 株では、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3右)。

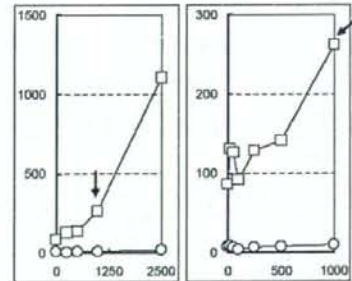


図3 L-ペニシラミンの変異原性

横軸、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/ $\text{plate}$ )。○:TA1535、□:YG3206。

#### 4) 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。TA1535 においては 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  まで用量を上げても変異原性は観察されなかったが(図4左)、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4右)。

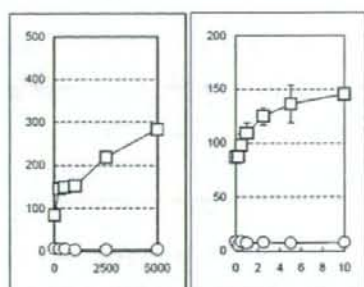


図4 システインの変異原性

横軸、濃度(µg/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。

5) 可視光線を照射したNR、MBの変異原性  
可視光線照射下、0.5 µg/plateを最高用量にNRの変異原性を(図5左)、5 µg/plateを最高用量にMBの変異原性を(図5右)、TA1535およびYG3001で調べた。YG3001株においてのみ、用量依存的に復帰株数が増加し、TA1535では増加が観察されなかった濃度で、用量依存的な復帰株数の増加が観察された(図5)。

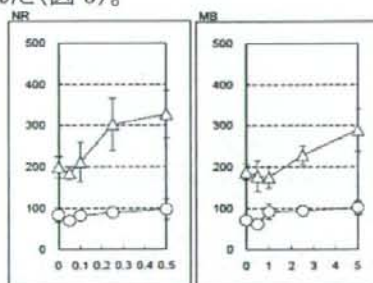


図5 NR、MBの変異原性

横軸:濃度(µg/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。MBはS9mixによる代謝活性化を用いて試験した。

#### D. 考察

KBrO<sub>3</sub>は8-OHG DNAグリコシラーゼを欠損した株(YG3001)では、復帰変異株の増加が見られ、5000 µg/plateで対照値の約5倍まで増加した。NRとMBも可視光照射条件下で、

用量依存的にYG3001で復帰変異株数の増加が観察された。このことは、これらの物質がDNA上に8-OHGを生じさせるという報告と符合する。

レペニシラミンおよびシステインはEndo III/VIIIの欠損株では顕著に、復帰変異株数の増加が観察された。このことは、レペニシラミンの作用で生じるDNA損傷がピリミジンを標的としたものであると予想される。

今回用いたいずれの化合物も、それぞれの働きで形成される損傷を修復する系を欠損した株では、低用量まで下げても復帰変異株数が増加していた。このことは、細胞ではある程度の濃度までは修復系の酵素活性により、化学物質の作用が突然変異に関して事実上無作用に等しくなることを示唆する。

以上を踏まえ、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、内因性・外因性の変異原によって生じた酸化損傷は、DNA修復系が処理できる範囲であれば必ずしも突然変異に至らないことを示す。酸化剤は代謝活性化を経ずにDNAに損傷を与えるものが多く、細菌を用いた実験結果はヒトを含む他の生物における作用を推測するに足るものと考えられる。

#### F. 健康危機情報

省略

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Matsui K, Yamada M, Imai M, Yamamoto K,

- Nohmi T, Specificity of replicative and SOS-inducible DNA polymerases in frameshift mutagenesis: Mutability of *Salmonella typhimurium* strains overexpressing SOS-inducible DNA polymerases to 30 chemical mutagens. DNA Repair, (2006) 5, 45-478
- 2) Mazaki M, Kataoka K, Kinouchi T, Vinitketkumnuen U, Yamada M, Nohmi T, Kuwahara T, Akimoto S, Ohnishi Y, Inhibitory effects of caraway (*Carum carvi* L.) and its component on *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*'-nitrosoguanidine-induced mutagenicity. J. Med. Invest., (2006) 53,123-133
- 3) Yamada M, Matsui K, Nohmi T, Development of a bacterial hyper-sensitive tester strain for specific detection of the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. Genes & Environ., (2006) 28, 23-30
- 4) Yamada M, Nunoshiwa T, Shimizu M, Grúz P, Kamiya H, Harashima H, Nohmi T, Involvement of Y-Family DNA polymerases in Mutagenesis by oxidized nucleotides in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., (2006) 188, 4992-4995
- 5) Barone F, McCulloch SD, Macpherson P, Maga G, Yamada M, Nohmi T, Minoprio A, Mazzei F, Kunkel TA, Karran P, Bignami M, Replication of 2-hydroxyadenine-containing DNA and recognition by human MutS $\alpha$ . DNA Repair, (2007) 5, 355-366
- 6) Hidaka K, Yamada M, 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 $\eta$ . DNA Repair, (2008) 7, 497-506
- 7) Nohmi T, Yamada M, Grúz P, DNA Repair and DNA damage tolerance in archaea: Extreme environments and genome integrity, Archaea: New models for prokaryotic biology, pp.147-169, (2008) Norwich, UK, Caister Academic Press.
- 8) Nohmi T, Toyoda-Hokaiwado N, Yamada M, Masumura K, Honma M, Fukushima S, International symposium on genotoxic and carcinogenic thresholds, Genes & Environ., (2008) 30, 101-107
2. 学会発表
- 1) Yamada M, Matsui K, Imai M, Yamamoto K, Nohmi T, Roles of replicative and specialized DNA polymerases in frameshift mutagenesis, 第29回日本分子生物学会年会(2006.6)
- 2) Yamada M, Matsui K, Nohmi T, Control of multiple DNA polymerases dealing with lesions induced by environmental mutagens, 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (2006.7)
- 3) 山田雅巳, 布柴達男、清水雅富、Petr Grúz、紙谷浩之、原島秀吉、能美健彦 大腸菌における酸化ヌクレオチドの取り込みとY-ファミリーDNAポリメラーゼの関与、日本遺伝学会第78回大会(2006.9)
- 4) 山田雅巳、松井恵子、能美健彦 多環芳香族炭化水素の変異原性を高感度、特異的に検出するバクテリアテスター株の開発、第65回日本癌学会学術総会(2006.9)
- 5) 山田雅巳、松井恵子、能美健彦 酸化変異原を高感度に検出するバクテリアテスタ

一株の開発、日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)

6) Yamada M, Hidaka K, Kamiya H, Masutani C, Harashima H, Hanaoka F, Nohmi T, Specificity of mutations associated with misincorporation of oxidized dNTPs by human DNA polymerase  $\eta$  in vitro, Gordon Research Conference-Mammalian DNA Repair (2007.2)

7) 山田 雅巳, 日高 勝彦, 紙谷 浩之, 益谷 央豪, 原島 秀吉, 花岡 文雄, 能美 健彦, ヒト DNA ポリメラーゼ  $\eta$  が酸化 dNTP を取り込むことで誘発される突然変異の特異性について, 第 79 回日本遺伝学会年会 (2007.9)

8) 山田雅巳, 松井恵子, 能美健彦, 酸化ピリミジン損傷を誘発する変異原を高感度に検出する新規なサルモネラ株, 日本環境変異原学会第 36 回大会/アジア環境変異原学会第 1 回大会 (2007.11)

9) Yamada, M, Matsui, K, Nohmi, T, Development of a tester strain sensitive to chemicals inducing oxidative pyrimidines, 38<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (2008.9)

10) 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)

#### H. 知的所有権の取得状況

- |           |    |
|-----------|----|
| 1. 特許取得   | 無し |
| 2. 実用新案登録 | 無し |
| 3. その他    | 無し |

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: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

## 研究要旨

化学物質が引き起こす遺伝毒性メカニズムとして DNA の二本鎖切断障害(DSB)がある。この DSB に閾値が存在するか、または DSB を引き起こす食品添加物に閾値が設定できるかを哺乳類細胞を用いた遺伝毒性試験系を用いて検討した。まず、制限酵素により DSB を発生するモデル細胞を用いて DSB の修復様式を解析した。ヒト細胞 TSCE5 と TSCER2 はゲノム中に制限酵素 *I-SceI* を一つだけでもトランスジェニック細胞である。この細胞に *I-SceI* 発現ベクターを導入することにより、确实 DSB を導入する系を確立した。この系では DSB のほとんどは非同型接合(NHEJ)機構によって修復され、その約 3%は大小の DNA の欠失をもたらしたが、97%は変異をもたらさず修復されると考えられた。臭素酸カリウム( $\text{KBrO}_3$ )と AF-2 は齧歯類動物で発がん性を示し、またバクテリア、哺乳類細胞でも遺伝毒性を示す。 $\text{KBrO}_3$  は DNA に酸化損傷を引き起こし、DNA アダクトの一つである 8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)を生成し、点突然変異を引き起こすと言われているが、ヒト TK6 細胞では DSB が主たる変異であることが示された。また、AF-2 も同様に DSB が主たる変異の要因であった。制限酵素と異なり化学物質によって誘発された 2 本鎖切断のかかなりの部分は欠失を引き起こすため閾値の設定は困難であると考えられた。遺伝毒性の閾値論を論じる場合、その頻度だけでなく、どのようなタイプの遺伝的変異であることを明らかにすることが重要である。キーワード;DNA 二本鎖切断(DSB)、DNA 修復、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を示すことが多い。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。

化学物質が引き起こす遺伝毒性メカニズムとして DNA の二本鎖切断障害(DSB)がある。本研究ではこの DSB に閾値が存在するか、または DSB を引き起こす化学物質に閾値が設定できるかを哺乳類細胞を用いた遺伝毒性試験系を用いて明らかにすることを本研究の目

的とする。DSB を発生するモデル細胞として制限酵素部位 I-SceI を一つだけでもトランスジェニック細胞 (TSCE5、TSCER2) を樹立して、DSB の遺伝的運命を明らかにした。DSB を誘発する化合物としては食品添加物である臭素酸カリウム (KBrO<sub>3</sub>) と AF-2 をモデル化合物として遺伝毒性メカニズムの明らかにし、閾値の設定が可能かどうかを検討した。

## B. 研究方法

### 1) 細胞

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。この細胞から TSCE5 と、TSCER2 細胞を樹立した。TSCE5 細胞は TK+アレルのエクソン 5 の約 100bp 上流に、I-SceI 部位をもつ。また、TSCER2 は TSCE5 より得られたエクソン 5 に点突然変異をもつコンパウンドヘテロ型 (TK-/-) の TK 変異体である。両細胞に I-SceI 発現ベクター (pCMV3xnlS-I-SceI) を導入した。導入には Amaxa 社の Nucleofector を用いた。発現ベクター導入後 72 時間まで経時的にベクターの発現をモニターした。発現ベクターには HA タグがついているため、抗 HA 抗体を用いたフローサイトメリーにより、I-SceI を発現する細胞の割合を測定できる。

### 2) 突然変異体の検出 (TSCE5、TSCER2)。

TSCE5 ではその DSB が NHEJ によって修復されると、欠失が生じ、細胞は TK 欠失変異体として検出される。一方、TSCER2 では相同染色体間で組換え修復 (HR) が起きると、野生型 TK 遺伝子が生じ、細胞は TK 復帰変異体として検出される。両細胞はそれぞれ TFT 耐性、HAT 耐性として検出できる。また、TSCE5 細胞では薬剤耐性を指標としない非選択クローンも無作為に回収し、遺伝子レベルで突然変異を解析した。

### 3) 細胞毒性、遺伝毒性 (TK6 を用いた化学物質による遺伝毒性評価)

**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、マツナミマス

コ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 CometIV 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。

4) 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。変異が確認されたクローンに関しては塩基配列を決定し、欠失様式を検討した。

(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、倫理上問題は無い。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) TSCE5、TSCER2 細胞での DSB の運命

5X10<sup>6</sup> の TSCE5 細胞に 50ug の pCMV3xnlS-I-SceI ベクターを Amaxa-Nucleofector により導入し、その後 I-SceI を発現する細胞をフローサイトメリーにより経時的に観察した。その結果、発現細胞は 12 時間をピークとして 72 時間まで観察された。約 70% の細胞が I-SceI を発現し、DSB が引き起こされていると考えられた。

ベクター導入後 72 時間に TSCE5 は TFT 存在下で、TSCER2 は HAT 存在下で 96 穴プレートの再はん種し、2 週間後に薬剤耐性細胞の出現を観察した。TSCE5 の突然変異頻度

は約 1%、TSCER2 は約 0.01%であった。このことから、DSB の 99%は NHEJ によって修復されることが示唆された。

また、薬剤耐性を利用しないで、非選択ランダムクローンでの突然変異の検出を試みた。926 の非選択クローンを解析した結果 29(3.3%)に変異が観察された。これら変異クローンの約 80%は 60bp 以下の小さな欠失であり、14%はそれ以上の大きな欠失であった。組換えによる変異クローンが 1 つ(3.5%)観察された。

短い欠失をもつ TSCE5 変異体の I-SceI 領域をシーケンスし、NHEJ による結合領域を解析した。欠失は 10bp 以下がほとんどで、結合領域に 1~4bp のマイクロホモロジーを含んでいた。連続する同一ヌクレオチド内の 1bp 欠失や、1bp の挿入、または 50bp の欠失に 9bp の逆向き配列が挿入された複雑な変異体も観察された。これらの結果は、DSB 修復はマイクロホモロジーを介した NHEJ のメカニズムが主であることを示している。DSB の修復は、できるだけ欠失領域を小さくすることにより遺伝的安定性を保つものと予想された。

## 2) $KBrO_3$ の遺伝毒性と DSB の関与

TK6 細胞 ( $5 \times 10^6$ ) を 0.5~5mM の  $KBrO_3$  で 4 時間処理し、細胞毒性、遺伝毒性を評価した。低毒性量に於いても、全ての遺伝毒性エンドポイントで陽性を示したことから強い遺伝毒性が示唆された。また、コメット試験ではアルカリコメットだけでなく中性コメットでも陽性反応が得られたこと、TK 遺伝子突然変異では SG 変異体が多く観察されたことから、 $KBrO_3$  の主たる DNA の損傷は DSB によるものであることが予想された。

2.5mM  $KBrO_3$  によって誘発された TK 変異体 39 クローン (NG:8, SG:31) の TK 遺伝子を解析した。その結果、90%のクローンで TK 遺伝子の消失 (LOH) が観察された。これは、自然誘発変異体 (75%)、アルキル化剤である EMS 誘発変異体 (28%) での頻度に比べて明らかに高く、放射線誘発変異体 (88%) に匹敵する。LOH は染色体間の相同組換えによるもの、大きな欠失によるものに分類できるが、 $KBrO_3$  はほとんど後者によるものが多かった。

LOH の範囲を 17 番染色体上に散在する多型性マーカーを指標にマッピングを行った。欠

失は 1Mb から 40Mb におよび、もっとも多いタイプは 17 番染色体長腕末端から 1/4 までの約 30Mb の末端型欠失であった。このタイプの変異は自然誘発突然変異体にはあまり観察されないが、放射線誘発変異体には多く観察される。

## 3) AF-2 遺伝毒性と DSB の関与

TK6 細胞 ( $10^7$ ) を 0, 5, 10, 20, 40ug/ml の AF-2 で 4 時間処理し、細胞毒性を評価した。細胞毒性は最高用量の 40ug/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 20ug/ml を最高用量 (RS:24%, RSG:16%) として評価を行った。

最高用量の 20ug/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 40ug/ml ではわずかなコメットの誘発が観察された。また、低用量から用量依存的に小核の誘発が観察された。20ug/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。

遺伝子突然変異においては低用量から用量依存的に突然変異の誘発が観察され、20ug/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。一方、SG 変異体の割合は用量依存性に低下した。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。

AF-2 処理 (20  $\mu$ 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  $\mu$ g/ $\mu$ l に調整済み) を使用した。88 clones の突然変異体内、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、組換えタイプ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。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DSBは、哺乳類細胞では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。

#### 1) TSCE5、TSCER2細胞での制限酵素によるDSBの運命について

今回の我々の研究では、制限酵素によって誘発されたDSBの99%がNHEJによって修復されHRの関与はわずかに1%であった。このDSBの大部分はNHEJによって小さな欠失を引き起こした。これまで放射線にDSBは数Kb

～数Mbの大きな欠失を起こすと考えられてきた。しかしながら、これら放射線の結果は数グレイ以上の高線量で生じる複数のDSBからなる結果であり、一つのDSB結果を反映するものではない。我々のI-SceIの系はゲノム中にたった一つのDSBを発生させる系であり、これは0.5センチグレイに相当する。この線量での突然変異を観察した例はこれまでにない。

一つのDSBが変異体の欠失領域は極めて小さいことは、大部分のDSBは欠失を起こさず結合することを想像させる。特に制限酵素によるのりしろをもつDNA断片は、そのまま結合し、元通りになる可能性が高い。しかしながら、放射線によって生じるDSBのDNA断片はこのようなきれいな構造を持つとは考えにくい。そのような場合は、やはり短い欠失をもたらすのかもしれない。そのような場合でもその欠失をできるだけ小さくするように働くものと考えられる。NHEJはDSBを修復するだけでなく、DSBによって生じるDNAの欠失をできるだけ小さく抑さえ、DSBが引き起こす可能性がある染色体レベルの大きな欠失や、転座が起こるのを抑えているのかもしれない。

これらの研究結果は、少なくとも制限酵素によって生じたDSBは必ずしも突然変異をもたらさないか、仮に引き起こしたとしても、がん導くような大きな遺伝子変異にはならない可能性を示すものである。

#### 2) KBrO<sub>3</sub>の遺伝毒性とDSBの関与について

KBrO<sub>3</sub>は発がん性物質であり、齧歯類を用いた研究では、イニシエーション、プロモーション作用とも有することが知られている。一方、遺伝毒性に関してはin vitroでコメット、小核、染色体異常の誘発は明らかであるが、Hprt遺伝子突然変異に関しては弱い陽性、もしくは陰性と報告されている。今回、我々の研究で、KBrO<sub>3</sub>はTK遺伝子の突然変異試験で強い陽性反応を示した。一般に、Hprt遺伝子突然変異では大きな欠失型の突然変異を検出できない。TK遺伝子で陽性を示したことは、KBrO<sub>3</sub>は主として欠失型の突然変異を引き起こすことを示唆するものである。突然変異体の遺伝子解析の結果はこのことを裏付ける。すなわち、KBrO<sub>3</sub>誘発変異体の90%はLOH変異体であり、コピー数解析、マイクロサテライトマーカーによ

る染色体解析から、その多くは30Mb以上の末端型欠失変異であった。この変異スペクトルは放射線のそれと類似しており、 $KBrO_3$ は主としてDNAの2本鎖切断を介して突然変異を引き起こすことが予想された。コメット試験でもアルカリ条件下だけでなく、中性条件下でも陽性を示したことはこの仮説を支持する者である。

$KBrO_3$ はDNAに酸化損傷を引き起こし、DNAアダクトの一つである8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)を生成することが知られている。この大部分は正常に修復されるが、一部はG:Tトランスペアジョンを引き起こすことが、*in vitro* 実験系から推察されていることから、これが $KBrO_3$ の遺伝毒性と、発がん性の本質と理解されている。しかしながら、培養細胞、齧歯類動物での遺伝子突然変異の研究からは8-OHdGの量と突然変異には相関関係が認められず、また8-OHdGと発がん性にもあまり相関関係がない。このことは、 $KBrO_3$ の遺伝毒性、発がん性には8-OHdG以外の機構が存在することを示唆する。今回の我々の結果が示すように、それにはDNAの2本鎖切断の関与が考えられた。

$KBrO_3$ は生体内でDNAに8-OHdGを生成するが、同時に2本鎖切断も引き起こすと考えられる。一般にDNA中の8-OHdGはOgg1による塩基除去修復機構によって修復される。この修復機構はエラーフリー型で突然変異をもたらさない。一方、DNAの2本鎖切断は非相同型接合(NHEJ)によって修復され、これは遺伝子の欠失をもたらす。このことはDNAの酸化損傷がもたらす突然変異に誘発には閾値が存在するかもしれないが、2本鎖切断では閾値が無いことを示唆するものである。遺伝毒性の閾値論を論じる場合、その頻度だけでなく、どのようなタイプの遺伝的変異であることを明らかにすることが重要であるかもしれない。

### 3) AF-2 遺伝毒性とDSBの関与について

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*in 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、ニトロ基の持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が、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。

## E. 結論

制限酵素によりDSBを発生するモデル細胞を用いてDSBの修復様式を解析したが、この系ではDSBのほとんどは非相同型接合(NHEJ)機構によって修復されるが、その約3%は大小のDNAの欠失をもたらした。残り97%はエラーフリー型のNHEJによって修復され、突然変異を引き起こさない。しかしながら、外来性変異原によるDSBは制限酵素と異なり末端ヌクレオチド、もしくは糖鎖の損傷を伴い複雑であり、これらDSBの大部分は突然変異を誘発するものと考えられる。KBrO<sub>3</sub>とAF-2は齧歯類動物で発がん性を示し、またバクテリア、哺乳類細胞でも遺伝毒性を示す。KBrO<sub>3</sub>はDNAに酸化損傷を引き起こし、DNAアダクトの一つである8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)を生成し、点突然変異を引き起こすと言われているが、ヒトTK6細胞ではDSBが主たる変異であることが示された。また、AF-2も同様にDSBが主たる変異の要因であった。制限酵素と異なり化学物質によって誘発された2本鎖切断のかなりの部分は欠失を引き起こすため閾値の設定は困難であると考えられる。遺伝毒性の閾値論を論じる場合、その頻度だけでなく、どのようなタイプの遺伝的変異であることを明らかにすることが重要である。

## F. 健康危機情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Koyama, N., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Hayashi, M., Matsufuji, H., Yamagata, K., Masuda, S., Kinae, N., and Honma, M. Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat. Res.*, 603, 151-158 (2006)
- 2) Oka, H., Ikeda, K., Yoshimura, H., Ohuchida, A., Honma, M. Relationship between p53 status and 5-fluorouracil sensitivity in 3 cell lines. *Mutat. Res.*, 606, 52-60 (2006)
- 3) Umebayashi, Y., Honma, M., Abe, T., Ryuto, H., Suzuki, H., Shimazu, T., Ishioka, N., Iwaki, M., Yatagai, F. Mutation induction after low-dose carbon-ion beam irradiation of frozen human cultured cells. *Biological Sci. in Space*, 19, 237-241 (2006)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) Wang, J., Chen, T., Honma, M., Chen, L., Moore, M. 3'-Azido-3'-deoxythymidine induces deletions in L5178Y mouse lymphoma cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, in press (2007)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) 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)
- 16) 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  
 本間正充 *In vitro* コメット試験は遺伝毒性のエビデンスになりうるか? 日本環境変異原学会 MMS 研究会第 49 回定例会 (2006.5)
- Honma M., Sakuraba M., Koizumi T., Takashima Y., Sakamoto H. and Hayashi M., Error-prone and error-free nonhomologous end-joining for repairing DNA double strand breaks in human cells. 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (2006.7)
- Honma M., Yamakage K. *In vitro* Comet assay—A possible candidate as a member of the standard test battery. JaCVAM/MMS Joint Seminar -Pros & Cons of Comet Assay- (2006.8)
- 本間正充、高島良生、安井学、谷田貝文夫、鈴木雅雄、林 真 低放射線による相同組換え修飾効果 日本放射線影響学会第 46 回大会 (2006.9)
- 谷田貝文夫、梅林志浩、本間正充、阿部知子、鈴木ひろみ、島津徹、石岡憲昭、岩本正哉 ISS 利用実験計画: 宇宙環境の突然変異に及ぼす影響の推定 日本放射線影響学会第 46 回大会 (2006.9)
- 高島良生、櫻庭真弓、小泉朋子、坂本浩子、安井学、林 真、本間正充 ヒト細胞に誘導された DNA 二重鎖切断修復とその細胞周期依存性 日本放射線影響学会第 46 回大会 (2006.9)
- Kohara A., Ozawa Y., Ohtani A., Shioda S., Takeuchi K., Morita K., Hirano T., Honma M., Suzuki T., Masui T., Mizusawa H. High resolution genomic analysis of immortal human cells and tumor cells using array-based comparative genomic hybridization.