

Environmental Mutagen Society 37th Annual Meeting (2006.9)

Luan Y., Honma M., Suresh T., Kogi M., Yamaguchi T., Suzuki T. CGH and SNP array are powerful tools for chromosome analysis. Environmental Mutagen Society 37th Annual Meeting (2006.9)

Matsufuji H., Chino M., Hayashi M., Honma M., Yamagata K. Genotoxicity of quercetin in the presence of reactive oxygen species using human lymphoblastoid TK6 cells. Environmental Mutagen Society 37th Annual Meeting (2006.9)

本間正充、鈴木雅雄、谷田貝文夫 染色体切断に対する放射線影響の検討 日本宇宙生物科学会第 20 回大会(2006.9)

梅林志浩、菅澤薫、本間正充、島津徹、鈴木ひろみ、石岡憲昭、岩本正哉、谷田貝文夫 放射線適応応答による突然変異の抑制 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 日本宇宙生物科学会第 20 回大会(2006.9)

Honma M., Sakuraba M., Koizumi T., Takashima Y., Sakamoto H. and Hayashi M., Requirement of p53 for maintenance of chromosome integrity against DNA double strand breaks. DNA Repair 2006 (2006.9)

本間正充 DNA2 本鎖切断修復によるゲノム安定化機構 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)

斉藤美香、高島良生、坂本浩子、林 真、松藤寛、山形一雄、本間正充 簡便な in vitro コメット試験法の確立とその評価 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)

小山直己、加藤竜也、本間正充、林 真、増田修一、木苗直秀 ヒトリンパ芽球トランスジェニック細胞を用いたアクリルアミドおよびグリシダミドの遺伝毒性試験 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)

谷田貝文夫、梅林志浩、鈴木雅雄、岩本正哉 染色体特定部位 DSB の修復:低線量/低線量率ガンマ線照射による影響 日本環境変異

原学会第 35 回大会(2006.11)

高島良生、小泉朋子、櫻庭真弓、林 真、本間正充 ライブセルイメージングによる小核の運命の追跡 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)

松藤寛、千野誠、本間正充、林 真、山形一雄 ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 を用いた亜硝酸ナトリウムと抗酸化剤の複合遺伝毒性 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)

Honma M. DNA double strand break inducing chromosome instability and its genetic consequences. International Conference on Biomarkers in Health and Environmental Management & XXXII Annual Meeting Environmental Mutagen Society of India (2007.1)

Honma M. DNA double strand breaks inducing chromosome instability in p53-deficient human cells. Key Stone Symposia -Genome Instability and Repair (2007.1)

本間正充: 代謝物の遺伝毒性評価 第 34 回日本トキシコロジー学会学術年会(2007.6)

Honma M.: DNA double strand breaks inducing genomic instability in human cells. 13th International Congress of Radiation Research (2007.7)

Yatagai F., Suzuki M., Ishioka N., Ohmori H., and Honma M.: Repair of dsb at a specific site of chromosome: influence of low-dose/low-dose-rate gamma-rays. 13th International Congress of Radiation Research (2007.7)

Honma M.: Genotoxic assessment of drug metabolite and ICH guideline. Chinese National Conference on Drug Toxicology 2007 (2007.8)

Honma M.: A multi-endpoints in vitro genotoxicity test system consisting of Comet, micronuclei, and gene mutation assays. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences (2007.8)

Honma M., Takashima Y., Yasui M., Koyama

N., Koizumi T., Sakuraba M., Sakamoto H., Sugimoto K., and Hayashi M.: Tracing Micronuclei by Fluorescent Live Cell Imaging Analysis. 37th European Environmental Mutagen Society (2007.9)

Honma M.: Genomic instability caused through breakage-fusion-bridge (BFB) cycle in human cells. The 8th International Symposium on Chromosomal Aberrations (2007.10)

Suzuki T., Luan Y., Praba D., Kogi M., Honma M., Koizumi T., Tanabe S., Sato Y., Suzuki K., and Yamaguchi T.: CGH and SNP arrays; as new tools for detailed analysis of chromosome. The 8th International Symposium on Chromosomal Aberrations (2007.10)

Honma M.: The new ICH guideline on Genotoxicity. 2007 Korean National Institute of Toxicological Research International Symposium (2007.10)

Honma M.: Validation of a humanized in vitro genotoxicity test system. 2007 Korean NTP Workshop (2007.10)

安井学、小山直己、高島良生、小泉朋子、櫻庭真弓、坂本浩子、杉本憲治、林 真、本間正充: ライブセルイメージングを用いた γ 線照射による小核形成と追跡 日本放射線影響学会第 47 回大会 (2007.11)

本間正充、櫻庭真弓、林 真: DNA マイクロアレイによる放射線損傷領域のゲノムマッピング 日本放射線影響学会第 47 回大会 (2007.11)

谷田貝文夫、鈴木雅雄、本間正充: 低線量・低線量率 γ 線照射によるヒトリンパ芽球細胞での変異誘発 日本放射線影響学会第 47 回大会 (2007.11)

Koyama N., Yasui M., Sakamoto H., Sakuraba M., Masuda S., Kinase N., Matsuda T, Hayasi M., and Honma M: Genotoxicity of acrylamide expressed via metabolic activation in CYP over-expressing human cells. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Yasui M., Suenaga E., Koyama N., Masutani C., Hanaoka F., Gruz P., Shibutani S., Nohmi T., Hayashi M., and Honma M.: Translesion synthesis past 2'-deoxyinosine, a major nitric oxide-induced DNA adduct, by human DNA polymerase η and κ . 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Yatagai F., Matsumoto H., Honma M.: A possible involvement of bystander effects in the repression of spontaneous mutation induction. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Saito M., Matsufuji H., Chino M., Hyashi M., Honma M., and Yamagata K. : Antioxidant activity and potential genotoxicity of flavonoid by using human lymphoblastoid TK6 cells. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Arai S., Saito M., Takashima Y., Honma M., and Kojima H.: A new trial for in vitro Comet assay using 3-dementional human epidermal model. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Kimura A., Sakamoto H., Hayashi M., Saigo K., Tokado H., and Honma M.: Establishment of a robust in vitro Comet protocol using human lymphoblastoid TL6 cells. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Honma M., Yasui M., Koyama N., Koizumi T., Sakuraba M., Sakamoto H., Takashima Y., Sugimoto K., and Honma M.: Visualization of micronuclei by fluorescent cell imaging analysis. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society

(2007.11)

Suzuki T., Koizumi T., Prabha D., Luan Y., Honma M., Hamada S., Nakajima M., Watanabe T., and Furihata C.: Collaborative study on the toxicogenomics in JEMS/MMS II: High-throughput qPCR analysis by TaqMan low density array. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Honma M.: Background issues initiating a revision of the current ICH genotoxicity guidance. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society) (2007.11)

村田香織、森山英樹、高島良生、本間正充、岡茂範、杉本憲治: マルチカラーライブセルイメージングにより明らかとなった Aurora-B キナーゼ阻害剤 VX-680 の染色体分配ダイナミズムに及ぼす影響 第 30 回日本分子生物学会年会(2007.12)

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)

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)

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)

Honma, M. Genome Mapping of Damaged Chromosome Regions Induced by Ionizing Irradiation Using DNA Microarray Analysis. 38th European Environmental Mutagen Society (2008.9)

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)

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)

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)

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)

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)

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)

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)

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)

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)

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)

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)

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)

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
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なった。先ず重要なことは、「閾値」の定義を明確にすることである。閾値は検出限界NO(A)ELとは異なる概念であること、用量相関を semi-log 表示する場合は、近似曲線を数式で表さない限り判定不可能であることは明確であると考え。次に遺伝毒性物質の閾値発現に関し、欧州アカデミーが提言している機構に基づく分類法は、理解し易く適切である。そこでは、A[DNA に直接反応し linear non-threshold(LNT)を示す物]、B(LNT として取り扱われているが作用様式不明な物)、C[内因性にも存在し防御機構があり practical threshold が存在する物]および D(間接作用によるもので閾値が存在する物)に分類している。ただしDNAに直接作用する物質の中に、*in vitro*で修復に因る閾値を示すものがあるので、それらを A'群に分類することを提言する。A'群にメチルメタンスルホン酸(MMS)、エチルメタンスルホン酸(EMS)、MNNGが分類される。一方、同じアルキル化剤でもメチルニトロソ尿素やエチルニトロソ尿素は閾値を示さない。A'群が存在することは重要な知見である。また、遺伝毒性発がん物質の発がん性における閾値について検討し、一つの物質が多臓器に発がんを誘発する場合、閾値を示す臓器、示さない臓器があることを明らかにした。遺伝的背景の異なるヒトにおける閾値の有無を評価するのに適切な動物モデル系が存在するかは不明である。遺伝毒性発がん物質のLNT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A'群に属す物質は動物種、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、線形、N(A)EL、臓器、修復、間接作用、代謝・解毒

A. 研究目的

遺伝毒性発がん物質は、現在、食品添加物等としての使用は禁止されている。この規制の原点は遺伝毒性には閾値が認められないことから、細胞当たり1セットしかないDNAに傷をつける物質の使用を禁止しようというものである。なお、25,000匹のマウスを用いたAAFの発がん実験で、肝発がんに関値が認められなかったことも、判断根拠の一

つになっていると推定される。これらの規制が現在の科学的知識をもってしても正しいか見直すことを目的とする。

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. 研究結果

1. 閾値有無の評価における問題点

閾値の定義が不明確で、閾値ではない概念に閾値という用語を、形容詞をつけて用いることが多い。形容詞の意味する内容もそれぞれ異なる。閾値はリスク管理に関わる問題であり、定義を明確にしておかないと、誤った結論を導く可能性がある。

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は典型的な例を算術スケール(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閾値有無の可能性が容易に判定できる。しかしSemi-log表示した(C)と(D)では、閾値の有無を判定することは困難である。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。

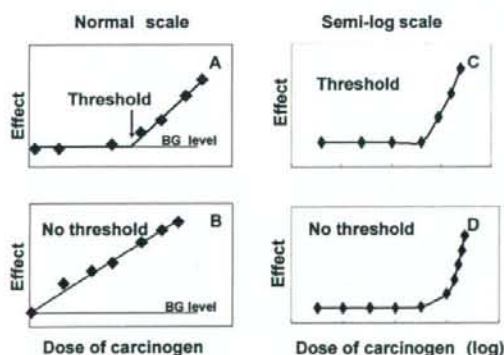


図-1. 線形による閾値有無の判定

b) 閾値とNO(A)ELの関係

NO(A)ELは検出限界であって閾値と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優位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の毒性評価にNO(A)ELを用いているに過ぎない。

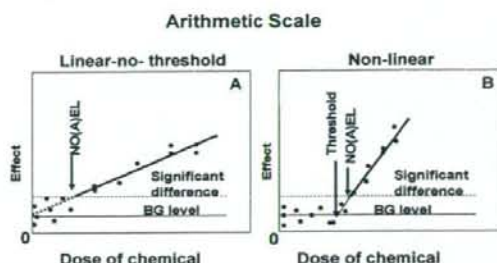


図-2. NO(A)ELと閾値の関係

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。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、遺伝的にもそれぞれ異なる60億の人間におけるリスク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と考える(1)。

2. 遺伝毒性発がん物質の閾値発現機構による分類

欧州アカデミーでは、発がん物質を、遺伝毒性閾値の発現の様式から4群に分類することを試みている(2)。表-1に示すように、この分類の仕方は非常に明確で、我が国の安全性評価の際にも有用と思われる。しかし、この分類で取り上げられていない閾値発現の機構があると思われる。それはDNA修復機構による閾値の発現である。DNAを標的とする遺伝毒性発がん物質では、1つのDNA傷害が突然変異に至るため閾値が無いと考えられている。しかし、細胞にはDNA修復機構が存在する。例えば10個の傷がありそのうち9個は修復され残りの1個の傷が

突然変異を引き起こすとする。細胞 DNA に傷が入った場合、初めから9個までの傷は完全に修復され10番目の傷が突然変異にい

たる場合は、明らかに閾値が存在することになる。修復による閾値が明らかに存在する場合がある。これらを A' 群に分類する。

表-1. 欧州アカデミーによる遺伝毒性発がん物質の閾値発現機構による分類

A. 閾値なし (Linear non-threshold, LNT)	B. 不明 (LNT として取り 扱う)	C. 実用的閾値あり (Practical/apparent threshold)	D. 閾値あり (Perfect/real statistical threshold)
イオン化放射線	アクリルアミド	ホルムアルデヒド	TCDD
塩化ビニール	砒素	酢酸ビニール	紡錘体阻害剤
4-アミノピフェニール	アクリロニトリル	ROS	トポイソメラーゼ阻害剤
ジエチルニトロソアミン			ホルモン
アフラトキシン B1			
NNK			

Bolt et al (2004) (2) より。

3. A群化合物の *in vivo* 遺伝毒性における閾値

A 群に属すると考えられる化合物の *in vivo* 遺伝毒性の用量相関に関する最近の報告について検討を加えた。

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* 変異誘発では 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-3) (3)。

MMC または Ara-C を腹腔内投与し、末梢血の小核誘発を、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系でも、閾値の存在は示されなかった(図-4) (4)。

以上 *in vitro* で LNT 型の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。

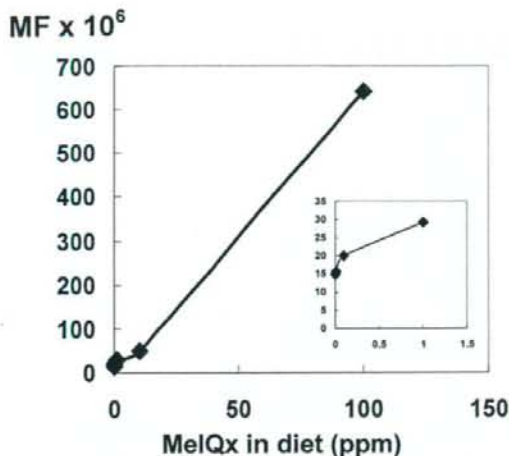


図-3. MeIQx 投与によるラット肝臓における *Lac I* transgene の変異。

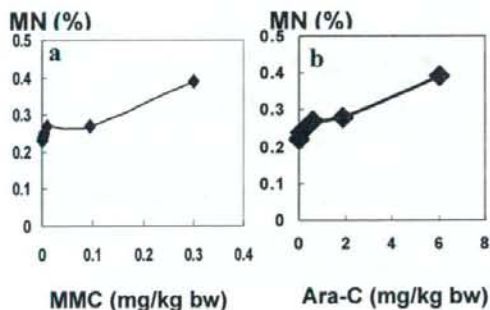


図-4. MMCおよび Ara-C による小核誘発の用量相関

4. *In vitro* 遺伝毒性で閾値を示すもの (A'群)

A'群に分類されるものが存在する。図-5に示すように MMS (methyl methane-sulfonate) および EMS (ethyl methane-sulfonate) いずれの場合も、ヒト培養リンパ芽球細胞における小核誘発において閾値が存在することが、算術グラフ表示により示されている (5)。測定点 0.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で BG と有意差を持って小核誘発が認められている。EMS では 1.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が閾値と認められる。

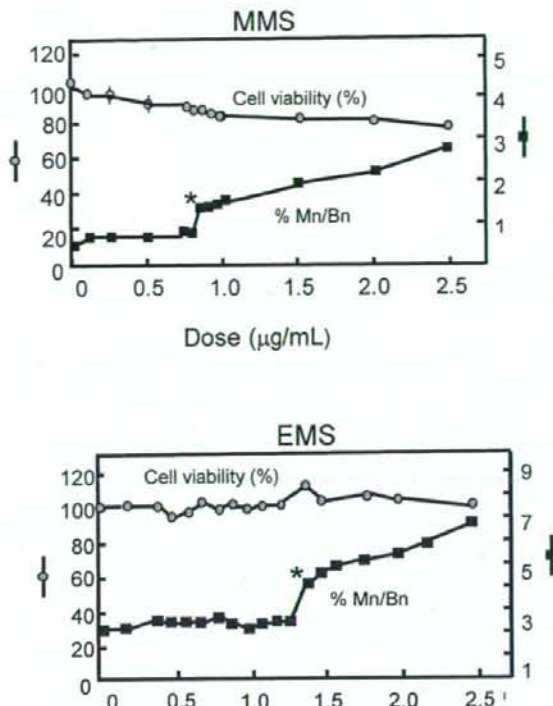


図-5. MMS および EMS による小核誘発用量効果:ヒトリンパが球様細胞 AHH-1を用いた (5)

* : one-way ANOVA-Dunnett's posthoc test によりBGと有意差を示した最初の濃度

MMS や EMS と同じように DNA のメチル化またはエチル化修飾を行なう MNU および ENU の小核誘発では、MMS や EMS と異なり閾値の存在は認められない。

遺伝毒性マーカーに HTPR 変異を用いても同様の結果が得られる。

N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン は Ames 試験 (6) およびヒト線維芽細胞 (7) で閾値を示すことが報告されている。

また、UV 照射においても遺伝毒性発現に閾値が存在することが報告されている (8)。

これらDNAと直接反応する因子の中で *in vitro* で閾値の存在が認められるものについての *in vivo* における用量相関は報告がないが、*in vivo* でも閾値を示すことが期待される。その場合、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ため、早急に解決されるべき問題と考える。

5. 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優位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(9-11)。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(図-6a)。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LNTとするのが妥当であると考えられた(9-11)(図-6b)。ここで重要なことは臓器によって閾値の有無は変化することである。

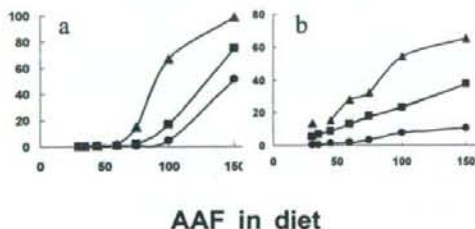


図-6. AAFのマウスにおける発がん(11)。(●) 18ヶ月;(■) 18ヶ月;(▲) 33ヶ月。a. 腎腫瘍;b. 肝腫瘍

PhIP による発がんでも乳腺、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た(図-7)。

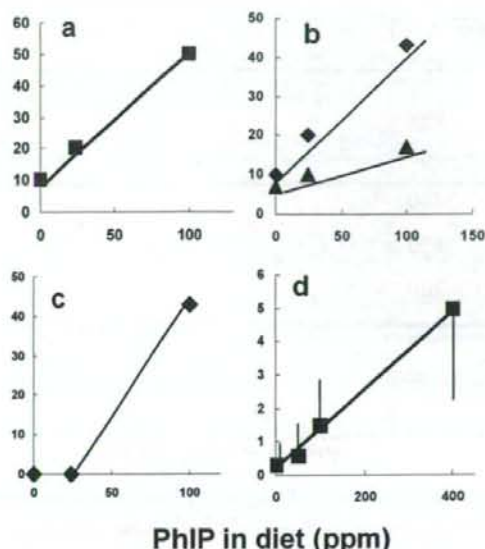


図-7. PhIPのラットにおけるneoplastic(12)またはpreneoplastic(13)変化誘発における用量相関性。(a-c)2年投与。(d)16週投与。(a)乳腺腫瘍誘発率、雌;(b)リンパ性白血病誘発率、■ 雄、▲ 雌;(c)大腸腫瘍誘発率、雄;(d)雄大腸における前がん病変ACFの大腸当たりの個数。

以上、同一の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に示す。

表-2. 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	+?
		肝臓*	+?

閾値の有無は用量相関の線形より求めた(1)。

+: 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

E. 結論

DNAに直接作用する遺伝毒性発がん物質の遺伝毒性は*in vivo*でも閾値を示さない。それらの腫瘍誘発モードは化学物質、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LNT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。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LNTの取り扱い(14)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)(15)を導入することが実際のであろう。

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。それらは、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。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

G. 引用論文

1. Nagao M, Ishikawa S, Nakagama H, Watanabe M. Extrapolation of the animal carcinogenesis threshold to humans. *Genes Environ.* 2008, 30, 160-165.
2. Bolt, HM, Foth H, Hengster JG, Degen GH. Carcinogenicity categorization of chemicals—new aspects to be considered in a European perspective. *Toxicol Lett* 151, 29-41, 2004.
3. 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.
4. 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.
5. Doak SH, Jenkins GJS, Johnson GE, Quick E, Parry EM, Parry JM. Mechanistic influence for mutation induction curves after exposure to DNA-reactive carcinogens. *Cancer Res.* 2007; 67: 3904-11.
6. Sofuni T, Nohmi T, Ohta T, Hayashi M. Genotoxicity: Is a threshold concept applicable to evaluate the mutagenic activity of DNA-targeting substance? *Environ Mutagen Res.* 61-73, 2005.
7. Day RS 3rd, Ziolkowski CH, Scudiero DA, Meyer SA, Lubiniecki AS, Girardi AJ, Galloway SM, Bynum GD. Defective repair of alkylated DNA by human tumour and SV40-transformed human cell strains. *Nature.* 1980; 288: 724-7.
8. Maher VM, Dorney DJ, Mendrala AL, Konze-Thomas B, McCormick JJ. DNA excision-repair processes in human cells can eliminate the cytotoxic and mutagenic consequences of ultraviolet irradiation. *Mutat Res.* 1979; 62: 311-23.
9. Cairns T. The ED01 study: introduction, objectives, and experimental design. *J Environ Pathol Toxicol.* 1980; 3: 1-7.
10. Gaylor DW. The ED01 study: Summary and conclusions. *J Environ Pathol Toxicol.* 1980; 3: 179-83.
11. 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
12. 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.

13. 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.
14. U.S. Environmental Protection Agency. Guidelines for carcinogen risk assessment; 2005 Mar. Report EPA/630/P-03/001F.
15. 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)

H. 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) Ishikawa, S, Sasaki Y, Kawaguchi S, Mochizuki M, Nagao M. Characterization of genotoxicity of Kojic acid by mutagenicity in Salmonella and micronucleus induction in rodent liver. *Genes Environ*, 28, 31-37, 2006.
- ##### 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 Tokyo, July 22-23, 2008
 - 2) Nagao M, Do we have enough data to demonstrate the presence of threshold in mutagenicity induced by genotoxic carcinogens? International Symposium-Threshold of Carcinogenicity and Genotoxicity, March 15-16, 2006, International Conference Center Kobe.

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) 菌株の作製

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) 株を作製した。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-(dichloro-methyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX, 分析用標準品, 和光純薬工業); 4-nitro-quinoline 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枚のプレートを持ちいた。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株では著しい復帰突然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:食品中化学物質が引き起こす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

食品中遺伝毒性物質が引き起こす DNA 損傷の生体内における定量的な情報は、いまだ不足している。本研究では、食品中化学物質が引き起こす様々な DNA 付加体の定量法開発を試みた。LC/MS/MS を用いて、過酸化脂質由来の 12 種類の DNA 付加体の同時定量法、および、アクリルアミド DNA 付加体の測定法を開発した。これらの手法は、今後食品の安全を考える上で貢献すると考えられる。

キーワード: DNA 付加体、LC/MS/MS、定量法、過酸化脂質、アルデヒド、アクリルアミド

A. 研究目的

食品中には様々な遺伝毒性物質が存在している。これらの引き起こす DNA 損傷の構造や生物学的意義は徐々に明らかになりつつあるが、生体内 DNA 損傷の定量的な情報はいまだ不足している。本研究では、食品中化学物質が引き起こす様々な DNA 付加体の定量法を開発した。

B. 研究方法

食品中脂質の過酸化により生じる各種アルデヒド類、アクロレイン、クロトンアルデヒド、4-oxo-2-hexenal、4-oxo-2-nonenal、また、アスパラギン酸と還元糖のメイラード反応により生成するアクリルアミドの引き起こす DNA 付加体の標準品とその安定同位体を合成し、LC/MS/MS による測定 of 最適条件を検討した。

C. 研究結果

過酸化脂質由来の 12 種類の DNA 付加体の同時定量系を確立した。測定対象付加体は、8-oxo-dG、1,N⁶-etheno-dA、クロトンアルデヒド-dG 付加体(CdG)、アクロレイン-dG 付加体(8-OH-PdG、6-OH-PdG)、

4-oxo-2-hexenal 付加体(4-OHE-dG、4-OHE-dA、4-OHE-dC、4-OHE-medC)、4-oxo-2-nonenal 付加体(Heptanone-1,N⁶-etheno-dG、heptanone-1,N⁶-etheno-dA、heptanone-3,N⁶-etheno-dC)である。

また、脱塩基を引き起こすアクリルアミド DNA 付加体、N⁷-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-guanine (N⁷-GA-Gua)の測定法について検討し、従来法よりも感度と信頼性の高い方法を確立した。

D. 考察

本研究で確立した 12 種類の過酸化脂質由来 DNA 付加体一斉測定法を用いて、様々なヒト臓器 DNA 中の付加体の定量を進めているが、測定したすべての DNA 付加体がヒト臓器から検出されている。今後は、食品中の過酸化脂質がどの程度これら付加体の形成に寄与するかを動物実験等で調べる必要がある。

また、本研究で確立したアクリルアミド付加体の定量法を用いて、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 *N*-GA-Gua を測定した結果、きれいな用量-応答関係が得られた。この手法は、今後、食品中アクリルアミドの毒性発現メカニズムの解明に寄与すると考えられる。

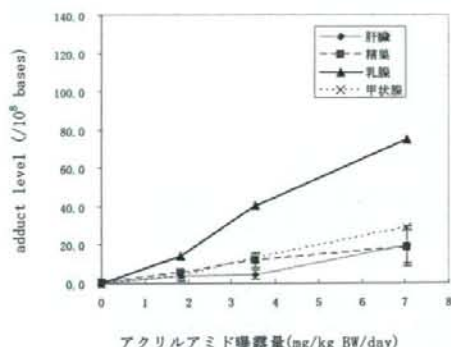


図 アクリルアミドを経口投与したラットの各臓器中 *N*-GA-Gua レベル。

E. 結論

食品に含まれる過酸化脂質由来の 12 種類の DNA 付加体の同時定量法、およびアクリルアミド DNA 付加体の定量法を確立した。これらの手法は、今後食品の安全を考える上で貢献すると考えられる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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

- 4) Kanaly RA, Matsui S, Hanaoka T, Matsuda T.: Application of the adductome approach to assess intertissue DNA damage variations in human lung and esophagus, *Mutation Research* 625 (2007) 83-93
- 5) Kentaro Misaki, Hirofumi Kawami, Tota Tanaka, Yoji Handa, Masafumi Nakamura, Saburo Matsui, and Tomonari Matsuda: Aryl hydrocarbon receptor ligand activity of polycyclic aromatic ketones and polycyclic aromatic quinones, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 26, No. 7, pp. 1370-1379, 2007
- 6) Matsuda T, Matsumoto A, Uchida M, Kanaly R, Misaki K, Shibutani S, Kawamoto T, Kitagawa K, Nakayama KI, Tomokuni K, Ichiba M.: Increased formation of hepatic N2-ethylidene-2'-deoxyguanosine DNA adducts in aldehyde dehydrogenase 2 knockout mice treated with ethanol, *Carcinogenesis*, 28(11):2363-6, 2007.
- 7) Misaki, Kentaro; Matsui, Saburo; Matsuda, Tomonari: Metabolic Enzyme Induction by HepG2 Cells Exposed to Oxygenated and Non-oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Chem. Res. Toxicol.*, 20, 277-283, 2007
- 8) 乙部史子、周佩欣、松井三郎、小田美光、松田知成*「HPLC-バイオアッセイを用いた下水処理排水中の DNA 損傷性および AhR リガンド活性の解析」環境工学研究論文集、第 43 巻、113-118, 2006
- 9) P.H. Chou, S. Matsui, K. Misaki, T. Matsuda: Isolation and Identification of Xenobiotic Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands in Dyeing Wastewater, *Environ. Sci. Technol*, 41, 652-657, 2007
- 10) Tomonari Matsuda, Hisatoshi Yabushita,

Robert A. Kanaly, Shinya Shibutani, and Akira Yokoyama: Increased DNA Damage in ALDH2-Deficient Alcoholics, *Chem. Res. Toxicol.*, 19 (10), 1374-1378, 2006

- 11) Sung Yeon Kim, Naomi Suzuki, Y. R. Santosh Laxmi, Atsushi Umemoto, Tomonari Matsuda, and Shinya Shibutani: Antiestrogens and the Formation of DNA Damage in Rats: A Comparison, *Chem. Res. Toxicol.*, 19, 852-858, 2006
 - 12) P.H. Chou, S. Matsui, T. Matsuda: Detection and identification of dyes showing AhR-binding affinity in treated sewage effluents, *Wat.Sci.Tech.*, 53(11), 35-42, 2006
 - 13) RA. Kanaly, T. Hanaoka, H. Sugimura, H. Toda, S. Matsui, T. Matsuda: Development of the adductome approach to detect DNA damage in humans, *Antioxid Redox Signal.*, 8(5-6), 993-1001, 2006
2. 学会発表
- 1) Tomonari Matsuda, Ryuhei Nishi, Yukari Totsuka, Keiji 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
 - 2) 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
 - 3) Kyoko Kato, Eiji Yamamura, Masanobu Kawanishi, Takashi Yagi, Tomonari Matsuda, Akio Sugiyama, Yoshifumi 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
 - 4) Kazuaki Kawai, Pei-Hsin Chou, Masaaki Inoue, Tomonari Matsuda, Hiroshi 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
 - 5) Robert A. Kanaly, Pei-Hsin Chou, Haruna Nagayoshi, Haruhiko Sugimura, Tomonari 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
 - 6) Naoki Koyama, Aoi Kimura, Manabu Yasui, Shigeaki Takami, Miwa Takahashi, Toshio Imai, Ayumi Yamamoto, Wakako Kumita, Kenichi Masumura, Shuichi Matsuda, Naohide Kinae, Tomonari Matsuda, Takehiko Nohomi, Masamitsu Honma: Child-adult differences in evaluation of in vivo genotoxicity of acrylamide. 第37回日本環境変異原学会、沖縄、2008年12月4日~6日
 - 7) Jun Adachi, Keishi Kihara, Tomonari 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、沖縄、2008年12月4日~6日
 - 8) Ryuhei Nishi, Yukari Totsuka, Keiji Wakabayashi, Tomonari 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、沖縄、2008年12月4日~6日
 - 9) Hitomi Takemura, Asako Matsui, Maki Morita, Hiroyuki Sakakibara, Tomonari Matsuda, Kayoko 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、沖縄、2008年12月4日~6日
 - 10) Haruna Nagayoshi, Megumi Oka, Yoshiyuki Yukawa, Kimiko Hori, Yoshihide Suwa, Akira Yokoyama, Manabu Muto, Tomonari Matsuda: Availability of DNA damage, N2-ethylidene-dG as a biomarker of acetakdehyde exposure. 第37回日本環境変異原学会、沖縄、2008年12月4日~6日

- 11) Pei-Hsin Chou, Haruhiko Sugimura, Kazuaki Kawai, Hiroshi Kasai, Tomonari 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、沖縄、2008年12月4日~6日
- 12) Kazuaki Kawai, Pei-Hsin Chou, Tomonari Matsuda, Saburo Matsui, and Hiroshi 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、名古屋、2008年10月28日~30日
- 13) 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、福島県、2008年7月6日~9日
- 14) 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、神戸、2008年6月11日~13日
- 15) 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、京都、2008年6月19日~20日
- 16) Tomonari 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
- 17) Koichi Nishimura, Yukari Totsuka, Masaru Terasaki, Ken-Ichi Mukaisyo, Takanori Hattori, Tomonari Matsuda, Takashi Sugimura, Keiji Wakabayashi: Analysis of DNA adducts derived from N-nitroso bile acid conjugates in rat duodenogastric reflux model. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens and 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society, 29-30th November, 2007, Kitakyushu, Japan
- 18) Robert A, Kanaly, Haruna Nagayoshi, Tomoyuki Hanaoka, Tomonari Matsuda: Utilization of the adductome approach to assess DNA damage in human liver tissue. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens and 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society, 29-30th November, 2007, Kitakyushu, Japan
- 19) Hitomi Takemura, Harue Uchiyama, Maki Morita, Hiroyuki Sakakibara, Takeshi Ohura, Haruna Nagayoshi, Tomonari Matsuda, Takeshi Amagai, Ryoko Kuruto, Kayoko Shimoi: A selective inhibitor of CYP1B1, chrysoeriol. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens and 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society, 29-30th November, 2007, Kitakyushu, Japan
- 20) Pei-Hsin Chou, Haruna Nagayoshi, Saburo Matsui, Masafumi Nakamura, Tomonari Matsuda: AhR Activation and Metabolic Degradation of Quinoline Disperse Dyes-Disperse Yellow 54 and Disperse Yellow 64. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens and 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society, 29-30th November, 2007, Kitakyushu, Japan
- 21) Ryuhei Nishi, Makoto Kaneko, Tomonari Matsuda, Saburo Matsui: The behavior of DNA-damaging agents and AhR ligands in petrochemical industrial wastewater treatment plant. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens and 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society, 29-30th November, 2007, Kitakyushu, Japan
- 22) Haruna Nagayoshi, Tomonari Matsuda, Saburo 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, 29-30th November, 2007, Kitakyushu, Japan

23) Haruna Nagayoshi, Robert A, Kanaly,
Tomonari 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, 1-5th Dec, 2007, Kyoto, Japan

G. 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:動物個体を用いた遺伝毒性研究

分担研究者: 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

個体において遺伝毒性を検出するトランスジェニック遺伝毒性試験の有用性について検討した。平成 18 年度は、Sprague Dawley 系 *gpt delta* ラットに臭素酸カリウムを投与し、発がんの標的臓器である腎臓と非標的臓器である肝臓の変異を解析した。腎臓では点突然変異(主に G:C→A:T)と欠失変異(1 塩基欠失と 1kb 以上の大きな欠失)頻度が上昇していたが、肝臓ではいずれの変異頻度も上昇していないことを明らかにした。平成 19 年度は、*gpt delta* マウス由来の胚繊維芽細胞にアスベスト(クリソタイル 白石綿)を曝露し、誘発される欠失変異を解析した。アスベストによる欠失は過酸化水素による欠失と類似しており、アスベストによる発がんには酸化的 DNA 損傷に基づく遺伝毒性が関与することを示唆した。平成 20 年度は、F-344 系の *gpt delta* トランスジェニックラットに、発がん物質である 2,4-dianimotoluene (2,4-DAT)と非発がん物質である 2,6-dianimotoluene (2,6-DAT)を投与し、発がんの標的臓器(肝臓)と非標的臓器(腎臓)で点突然変異頻度を測定した。肝臓では、2,4-DAT 投与群で変異頻度の上昇が観察されたが、2,6-DAT では変異頻度は増加しなかった。腎臓では、全ての投与群で変異頻度は増加しなかった。以上の結果から、*gpt delta* トランスジェニック遺伝毒性試験系は、発がんの標的臓器で変異を検出し、発がん物質の作用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と結論した。

キーワード:遺伝毒性発がん物質、発がん標的臓器、*gpt delta* トランスジェニック遺伝毒性試験、遺伝毒性の閾値

A. 研究目的

化学物質の発がん性は、一般に実験動物(ラット、マウス)を用いて判定される。化学物質が発がん性を示す機構はさまざまであるが、最も良く理解されている機構は遺伝毒性を介する発がん機構である。遺伝毒性発がん物質は、化学物質そのものあるいはその代謝物が DNA と反応して付加体、塩基修飾、DNA 鎖切断などを誘発し、これが原因となって突然変異を起こす。複数の突然変異が、発がん遺伝子

や発がん抑制遺伝子に起こると、細胞はがん化し無限増殖能を獲得すると考えられている。

こうした遺伝毒性に基づいて発がん作用を示す物質は「遺伝毒性発がん物質」と呼ばれ、それ以外のメカニズム(細胞増殖の促進やホルモン作用等)で発がん作用を示す「非遺伝毒性発がん物質」とは区別されている。規制科学の分野では、「遺伝毒性発がん物質の作用には閾値がない」とされ、どのように低用量の曝露であってもヒトに対して発がんリスクを負わ