

どのような塩基置換等が発生するかを明らかにすることも出来る(変異スペクトル解析)。そこで、Nrf2-K0 マウスと、能美らが開発した *gpt* (guanine phosphoribosyltransferase) 遺伝子をレポーター遺伝子として導入したトランスジェニック動物・*gpt delta* マウスを交配し、Nrf2-K0 *gpt delta* マウスを作出することとした。このマウスに変異原物質を投与することで、DNA 防御機能の低下が、標的臓器の突然変異に与える量的質的な影響、さらに「実質的な閾値」の存在にどの程度影響を与えているかを明らかにできることが期待される。

B. 研究方法

1) Nrf2-K0 *gpt delta* マウスの作出

東北大院医・山本雅之教授より恵与を受け国立環境研究所で維持している Nrf2(+/-) 遺伝型マウス (C57BL バックグラウンド) と *gpt delta* マウスを交配し、Nrf2(+/-) *gpt*(+/-) マウスを作出する。さらに、Nrf2(+/-) *gpt*(+/-) マウスと *gpt delta* マウスを交配して生まれた仔の尾から、アルカリ消化により DNA を抽出した後、PCR により遺伝型を決定して Nrf2(+/-) *gpt*(+/-) マウスを選抜する。さらに、Nrf2(+/-) *gpt*(+/+) マウスの雌雄を交配することで、Nrf2(-/-) *gpt*(+/+) の遺伝型をもつマウス (Nrf2-K0 *gpt delta* マウス) を作出する。

また、本報告で示す Nrf2(-/-) および Nrf2(+/-) マウス肝臓で発生した自然発生突然変異のスペクトル解析は、Nrf2(-/-) 遺伝型マウスと *gpt delta* マウスを交配して得た Nrf2(+/-) *gpt*(+/-) マウスをさらに Nrf2(-/-) マウスと交配して作出した、Nrf2(-/-) *gpt*(+/-) の遺伝型をもつマウス (Nrf2(-/-) マウス) と Nrf2(+/-) *gpt*(+/-)

の遺伝型をもつマウス (Nrf2(+/-) マウス) を用いて行った (Aoki Y. et al. (2009) Cancer Res., 67, 5643-5648)。

2) *gpt* 変異体頻度 (MF) の測定と変異スペクトル解析

11 週齢♂マウス肝臓から RecoverEase DNA isolation kit (Stratagene) を用いてゲノム DNA を採取した。その後、Transpack (Stratagene) を用いて *in vitro* パッケージング反応を行い、ゲノム DNA から λ EG10 をファージ粒子として回収した。ファージは大腸菌 YG6020 に感染させ、6-チオグアニンとクロラムフェニコールを含む培地上に播種し耐性となったコロニー (*gpt* 変異体候補コロニー) を検出した。検出したコロニーは、再度、6-チオグアニンとクロラムフェニコールを含む培地上にストリークして、真の *gpt* 変異体を検出した。回収したファージの一部は適宜希釈した後 YG6020 に感染させ、クロラムフェニコールのみを含む培地上に播種し、耐性コロニー数を計測して回収したレポーター遺伝子の総数を求めた。*gpt* MF は、真の *gpt* 変異体数を回収したレポーター遺伝子数で除して算出した。また、変異体 *gpt* 遺伝子は PCR で増幅した後、DNA シークエンス解析を行い、発生した突然変異の性質 (塩基置換、欠失など) を同定した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1) Nrf2(-/-) および Nrf2(+/-) マウス肝臓で発生した自然発生突然変異のスペクトル解析

Nrf2(-/-)、Nrf2(+/-)、および *gpt* delta (Nrf2(+/+)) マウス肝臓での自然発生 *gpt* MF を調べた結果、それぞれ 1.47, 1.24, 0.72×10^{-5} であり、Nrf2 遺伝子がホモばかりでなくヘテロで欠損しても、自然発生突然変異は wild に比べて有意に増加していた (Aoki Y. et al. (2009) Cancer Res., 67,

5643-5648)。

肝臓の自然発生突然変異のスペクトルを解析したところ、Nrf2(-/-) マウスでは、Nrf2(+/-) マウスで主要な塩基置換であった G:C→A:T transision の発生率が低下し、代わりに G:C→T:A transversion と 1 塩基欠失の割合が増加していた (表 1)。しかし、Nrf2(+/-) マウスでは自然発生 *gpt* MF が Nrf2(-/-) マウスと同程度まで上昇しているにもかかわらず、Nrf2(+/-) マウスとほぼ同様の突然変異スペクトルであった。

表 1 Nrf2-KO マウス肝臓の突然変異スペクトル

Type of mutation in the <i>gpt</i> gene	<i>nrf2^{+/+}</i>		<i>nrf2^{+/-}</i>		<i>nrf2^{-/-}</i>	
	Number	%	Number	%	Number	%
Base substitution						
Transition						
G:C→A:T	6	60	15	50	4	17
A:T→G:C	1	10	1	3	1	4
Transversion						
G:C→T:A	0	0	2	7	5	22
G:C→C:G	0	0	1	3	0	0
A:T→T:A	0	0	2	7	1	4
A:T→C:G	1	1	0	0	0	0
Deletion						
-1	2	20	7	23	8	35
>2	0	0	0	0	2	9
Insertion						
Other	0	0	0	0	0	0
Total	10	100	30	100	23	100

2) Nrf2-KO *gpt delta* マウスの作出
♂Nrf2(+/-) 遺伝型マウス x ♀*gpt delta*
マウス 1ペア、♂*gpt delta* マウス x ♂
Nrf2(+/-) 遺伝型マウス 2ペアを交配し
て得た♂5匹、♀9匹の仔の遺伝型を決定し
たところ、♂4匹、♀3匹が
Nrf2(+/-) *gpt*(+/-) の遺伝型をもつマウス
であった。さらに、♂Nrf2(+/-) *gpt*(+/-)
遺伝型マウス x ♀*gpt delta* マウス 4ペ
ア、♂*gpt delta* マウス x ♀
Nrf2(+/-) *gpt*(+/-) 遺伝型マウス 2ペ
アを交配し、♂19匹、♀16匹の仔を得た。
現在、Nrf2(+/-) *gpt*(+/+) の遺伝型をもつ
マウスを得るために、遺伝型の決定を進めて
いるところである。

D. 考 察

Nrf2 は第 2 相薬物代謝酵素や抗酸化たんぱ
く質の遺伝子発現に必須な転写因子であ
る。Nrf2 が欠損した状態では、薬物代謝酵
素や抗酸化酵素をはじめとした DNA を
防御する機能の活性が低下して、変異原物
質への感受性が増加して突然変異頻度が著
しく上昇し、その結果「実質的な閾値」が
低下あるいは消失する可能性がある。

Nrf2-KO *gpt delta* マウスは、薬物代謝酵
素や抗酸化酵素が閾値の決定に関与してい
るかを明らかにするのに適切な実験動物で
あると考えられた。そこで、このマウスを
作出して、体内で発生する突然変異を解析
し、実験系としての有効性を確認すること
とした。

以前行った解析の結果、肝臓とは異なり、
肺では Nrf2(-/-) マウスでのみ Nrf2(+/-)
マウスと比べて自然発生 *gpt* MF が有意に上
昇した。しかし、精巣では Nrf2(-/-)、
Nrf2(+/-) とともに上昇は認められなかった

(Aoki Y. et al. (2009) Cancer Res., 67,

5643-5648)。

変異スペクトル解析の結果、Nrf2(-/-) マウ
ス肝臓では、以前の肺での解析でも認めら
れたのと同様に、G:C→T:A transversion
の発生が上昇していた (表 1)。しかし、
Nrf2(+/-) マウスの肝臓では、Nrf2(-/-) と
同程度まで突然変異頻度が上昇しているに
もかかわらず、G:C→T:A transversion の
割合は上昇しなかった。Nrf2(+/-) マウス肝
臓と Nrf2(-/-) マウス肝臓では自然突然変
異の発生メカニズムが異なっている可能性
がある。

G:C→T:A transversion は活性酸素種が核
酸塩基に反応した酸化ヌクレオチドの一種
8-oxodG が生成されることにより発生する
ものである。この結果は、Nrf2(-/-) マウス
の肝臓や肺などの臓器内では、活性酸素種
の発生が著しく亢進していることを示して
いる。Nrf2-KO *gpt delta* マウスは、抗酸
化酵素の閾値決定への関与を検証するのに
適切な実験系であることが示唆された。

Nrf2 が欠損した *gpt delta* マウスの解析に
あたっては、以前は Nrf2(-/-) *gpt*(+/-) の
遺伝型をもつマウスを作出して実験に供し
ていた。しかしながら、Nrf2(-/-) *gpt*(+/-)
マウスを系統として維持していくことは難
しいため、Nrf2(+/-) *gpt*(+/+) の遺伝型をも
つマウスを作出し、さらに交配して生まれ
た Nrf2(-/-) の遺伝型をもつマウスを
Nrf2-KO *gpt delta* マウスとして実験に供
することとした。

今後は、Nrf2-KO *gpt delta* マウスに活性
酸素種を生成する遺伝毒性発がん物質を、
発がんを誘導するレベル投与して、突然変
異発生とその閾値に活性酸素種生成の亢進
が、どのような影響を与えるか明らかにし
ていく。

E. 結 論

Nrf2(-/-)マウス肝臓では、G:C→T:A transversionの発生が上昇していた。この塩基置換は、活性酸素種が核酸塩基に反応した8-oxodGの生成により発生するものである。Nrf2-KO *gpt* delta マウスは活性酸素種が発生する条件下での突然変異発生の解析に適した実験動物である。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hashimoto A.H., Amanuma K., Masumura K., Nohmi T., Aoki Y. (2009) In vivo mutagenesis caused by diesel exhaust in the testis of *gpt* delta transgenic mice. *Genes Environ.*, 31 (1), 1-8
- 2) Aoki Y., Hashimoto A.H., Amanuma K., Matsumoto M. (2010) Potency of air pollutants at DNA adduct formation and assessment by in vivo mutagenesis. In DNA adduct formation, detection and mutagenesis. (ed. Alvarez E. and Cunha R.) Nova Science Publishers. 143-153.

2. 学会発表

- 1) Aoki Y. Enhanced in vivo mutations in the lung of phase II enzyme-suppressed mice. X International Conference on Environmental Mutagens. Firenze, Italy, August 2009.
- 2) Aoki Y. Assessment of in vivo mutagenesis induced by environmental chemicals using transgenic animals for detecting mutagens. 2nd

International Conference on Environmental Health Science. Seoul, Korea, October 2009.

- 3) Aoki Y., Hashimoto A.H., Amanuma K., Matsumoto M., Masumura K., Nohmi T. In vivo mutagenesis induced by the air pollutants in the testis of *gpt* delta transgenic mice. 21st Century Advances in the Molecular Toxicology of Environmental Chemicals and Pathogenesis of Disease, HORIBA International Conference, CDBIM Symposium, 21st Century Advances in the Molecular Toxicology of Environmental Chemicals and Pathogenesis of Disease, Tokyo, Japan, October 2009
- 4) Aoki Y., Matsumoto M., Relationship between carcinogenic potency and in vivo mutagenicity of tested chemicals, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS), Shizuoka, November 2009
- 5) 青木康展 (2009) 有害大気汚染物質に関わる大気環境基準(指針値)設定におけるリスク評価. 日本リスク研究学会第22回年次大会, 東京 November 2009.
- 6) Aoki Y., Hashimoto A.H., Matsumoto M., Sugawara Y., Goto S., Masumura K., Nohmi T. Benzo[a]pyrene-Induced Mutagenesis in the Lungs of Young and Old Mice: Young Mice Are Highly Susceptible. CCT Meetings PPTOX II: Role of Environmental Stressors in the Developmental Origins of Disease, Miami Beach, USA, December 2009

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：食品添加物における遺伝毒性発がん物質の評価法に関する研究

分担研究者： 續 輝久 九州大学大学院医学研究院基礎医学部門
生体制御学講座 基礎放射線医学（分子遺伝学）分野 教授

研究要旨

遺伝子突然変異のレポーターとして大腸菌 *rpsL* 遺伝子を導入した *Mutyh* 遺伝子欠損マウスを用いて、酸化ストレスを誘発する目的で臭素酸カリウムを飲水投与による発がん実験と誘発変異の解析を行い、*Mutyh* 遺伝子欠損マウスに臭素酸カリウムを投与すると、小腸に腫瘍が多発し、主要な突然変異は G:C → T:A 変異であることを明らかにした。以上の結果から、*Mutyh* 遺伝子マウスへ臭素酸カリウムを投与する発がん・突然変異誘発の実験系は、遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討する上で有用な試験系であると考えられる。

キーワード：臭素酸カリウム、*Mutyh* 遺伝子、*rpsL* トランスジェニックマウス

A. 研究目的

遺伝毒性物質の作用には一般に閾値がないとされており、どのように微量であってもヒトに対してリスクを示すと考えられている。このため遺伝毒性を示す発がん物質には ADI (Acceptable Daily Intake) が設定されず、食品添加物等に発がん性が認められた場合、その発生機序に遺伝毒性が関与するかは、行政上重要な問題になっている。だが、ヒトにはさまざまな生体防御機能 (DNA 修復、解毒代謝、損傷乗り越え DNA 合成、アポトーシスなど) が備わっており、ある限度 (閾値) 以下の作用は、事実上無

毒化される可能性が考えられる。

放射線照射や遺伝毒性を示すある種の化学物質は、生体に活性酸素種を発生させる。活性酸素種は生体高分子を酸化し、発がんや老化を引き起こす。様々な酸化的損傷の中で、核酸のグアニン塩基の酸化体 8-オキシグアニン (8-oxoG) は遺伝情報保持及び伝達に異常を引き起こす点で最も重要である。8-oxoG はシトシンと同程度にアデニンとも対合できるので、DNA 中の 8-oxoG は突然変異の原因となる。8-oxoG による突然変異生成に対処するために生物は種々の酵素系を持っている。ヒトでは、OGG1 が DNA 中

の 8-oxoG を取り除き、MUTYH が 8-oxoG に対して取り込まれたアデニンを除去する。また MTH1 はヌクレオチドプール中に生じた 8-oxo-dGTP を分解し、DNA 複製の際に 8-oxoG が DNA へ取り込まれるのを防いでいる。我々はこれらの酵素の遺伝子を欠損したマウスを樹立し、これらのマウスでは自然発がんが上昇していることを示し、酸化 DNA 損傷が自然発がんの要因であることを明らかにしてきた。

本研究では、酸化 DNA 損傷に起因する突然変異抑制機能を欠いた *Mutyh* 遺伝子欠損マウスに臭素酸カリウムを投与し、その突然変異誘導・発がん感受性を野生型と比較することにより、遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討するための試験系の樹立を行った。

B. 研究方法

1) *Mutyh* 遺伝子欠損マウスの飼養

C57BL6/J の遺伝的背景を持つ *Mutyh* 遺伝子欠損マウスのヘテロ接合体同士の掛け合わせにより *Mutyh* 遺伝子欠損マウスと対照群の野生型マウスを得た。また突然変異解析のため大腸菌 *rpsL* トランスジェニックマウスとの掛け合わせにより、レポーターである *rpsL* 遺伝子を持つ *Mutyh* 遺伝子欠損マウスと対照群の野生型マウスを得た。マウスの飼養等は九州大学動物実験規則に従って実施した。

2) 臭素酸カリウム溶液の投与

臭素酸カリウム (Sigma) を純水に溶解し、0.2% 溶液を調製後濾過滅菌し、マウスの飲料水とした。投与は発がん解析には 16 週間、突然変異解析には 4 週間の自由飲水で行い、消費量は週一回モニターした。

3) 発がん実験

マウスを安楽死させた後、腸管を摘出して 10%ホルマリンを用いて固定した。その後、固定液を 70%エタノールに置換えて、腸粘膜を実体顕微鏡下で観察し、腫瘍の形成を確認した。検出した腫瘍から病理切片を製作し、病理解析を行った。

4) *rpsL* 突然変異の解析

臭素酸カリウムを投与したマウスの小腸粘膜層から DNeasy kit (Qiagen) を用いてゲノム DNA を採取した。*Ban*II (TaKaRa) で切断後、T4 DNA リガーゼを用いて *rpsL* 遺伝子を持つ pSSW プラスミドの再環状化を行い、ゲノム DNA から回収した。pSSW は大腸菌 DH10B にエレクトロポレーション法で導入し、カナマイシン・ストレプトマイシン選択培地に播種し、突然変異体の検出を行った。また、一部をカナマイシン選択培地に播種し、マウスゲノムから回収した総プラスミド数を算出した。カナマイシン・ストレプトマイシン選択培地上のコロニー数を回収した総コロニー数で除して突然変異頻度を算出した。*rpsL* 変異体については PCR 法を用いて増幅し、ダイレクトシーケンシング法でそれぞれの突然変異の種類と頻度を決定した。

5) 統計的手法

すべての測定値について平均値と標準偏差を求め、統計的な有意差は Fisher's exact test により評価した。

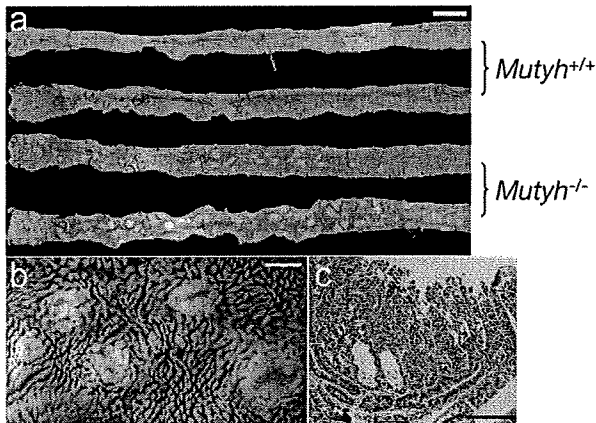
(倫理面への配慮)

本研究で使用した細胞はマウス由来の細胞であり、倫理上問題はない。また、全ての実験は九州大学の実験指針に準拠して行った。

C. 研究結果

1) 臭素酸カリウム誘発消化管発がん

これまでの自然発生腫瘍の解析では、*Mutyh* 遺伝子欠損マウスでは、小腸・大腸における腺腫・腺癌の発生頻度が野生型マウスに比べて有意に上昇していた。今回、酸化ストレスを与えた条件下での消化管における腫瘍発生につき、生後4週齢のマウスに0.2%臭素酸カリウム溶液を16週間連続飲水投与して調べた結果、*Mutyh* 遺伝子欠損マウスの十二指腸・空腸で多数の上皮性腫瘍の発生を認めた(第1図)。臭素酸カリウムを投与した野生型マウス雌9匹および*Mutyh* 遺伝子欠損マウス雌8匹に生じた1個体当たりの平均腫瘍数はそれぞれ 1.0 ± 0.7 , 51.0 ± 28.4 であった。

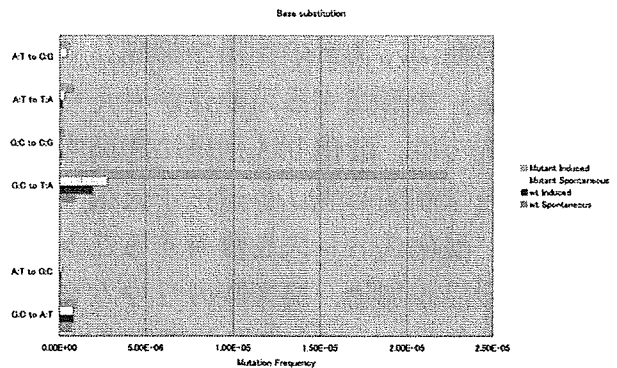


第1図 臭素酸カリウム誘発小腸腫瘍

2) 臭素酸カリウム誘発突然変異

0.2%臭素酸カリウム溶液を生後4週齢のマウスに4週間連続飲水投与した後、突然変異固定のため2週間純水を飲水投与し、マウス小腸粘膜層からゲノムDNAを調整して突然変異の解析を行った。その結果、臭素酸カリウムを投与した野生型マウス雌4匹および*Mutyh* 遺伝子欠損マウス雌5匹の小腸粘膜での突然変異頻度は平均でそれぞれ $8.94 \pm 3.99 \times 10^{-6}$, $31.55 \pm 10.31 \times 10^{-6}$ であり、対象群と比較して*Mutyh* 遺伝子欠損マウスにおいて、臭素酸カリウム誘発突

然変異突然変異頻度の顕著な上昇を認めた。



第2図 臭素酸カリウム誘発突然変異

突然変異体からPCR法を用いて*rpsL* 遺伝子を増幅し、ダイレクトシーケンス法でそれぞれの突然変異の種類を決定したところ、8-oxoGに起因すると考えられるG:C→T:Aトランスポージョン変異が、野生型マウスでは 1.89×10^{-6} , *Mutyh* 遺伝子欠損マウスでは 22.16×10^{-6} の頻度で検出された(第2図)。野生型マウスおよび*Mutyh* 遺伝子欠損マウス小腸粘膜におけるG:C→T:Aトランスポージョン変異の自然突然変異頻度はそれぞれ 0.84×10^{-6} , 2.74×10^{-6} であり、0.2%臭素酸カリウム溶液を4週間連続飲水投与することにより、G:C→T:Aトランスポージョン変異の頻度が野生型マウスでは2.25倍、*Mutyh* 遺伝子欠損マウスでは8.09倍上昇した。

D. 考察

遺伝毒性物質の作用には閾値がないとされるため、遺伝毒性に基づく発がん作用が検出された場合には、食品添加物等にはADIが設定されない。しかし、福島昭治博士(現、日本バイオアッセイ研究センター所長)らの系統的な研究により、遺伝毒性発がん物質であっても「事実上の閾値」(それ以下では有意な発がん頻度の上昇が見られない用量)のあることが示唆されている(Carcinogenesis, 26, 1835-1845, 2005)。

ヒトにはさまざまな生体防御機構（DNA 修復、解毒代謝、誤りのない損傷乗り越え DNA 合成、アポトーシス等）が存在し、これらが遺伝毒性発がん物質の作用を抑制し「事実上の閾値」を形成する可能性が考えられる。本研究では、酸化 DNA 損傷に起因する突然変異を抑制する *MutYh* 遺伝子欠損マウスを用い、酸化ストレスを負荷することが知られる食品添加物、臭素酸カリウムを投与する実験を行い、DNA 修復が遺伝毒性に関する「事実上の閾値」形成に貢献する可能性について検討するための試験系樹立の可能性を検討した。

0.2%臭素酸カリウムを投与された *MutYh* 遺伝子欠損マウスでは野生型に比べて小腸での発がん頻度が約 50 倍、酸化 DNA 損傷である 8-oxoG に起因すると考えられる G:C→T:A トランスバージョン変異の発生頻度が約 12 倍上昇していた。これらの結果は、*MutYh* 遺伝子欠損マウスと臭素酸カリウム投与を組み合わせた発がん・突然変異誘発の実験系が、遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討するうえで有用な試験系であることを示している。今回の実験結果でも *MutYh* 遺伝子産物が酸化剤の遺伝毒性に関する「事実上の閾値」形成に貢献する可能性を示唆している。しかしながら、今回投与した 0.2%の臭素酸カリウムは野生型マウスでも発がん頻度と突然変異頻度の上昇をもたらしている。今後、臭素酸カリウムを低用量域で投与することにより、発がん・突然変異を検討して行く必要がある。

E. 結論

MutYh 遺伝子マウスへ臭素酸カリウムを投与する発がん・突然変異誘発の実験系は、遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討するうえで有用な試験系であると考えられる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Komori, T. Takagi, M. Sanada, T-H. Lim, Y. Nakatsu, T. Tsuzuki, M. Sekiguchi and M. Hidaka, A novel protein, MAP01, that functions in apoptosis triggered by 06-methylguanine mispair in DNA, *Oncogene*, 28, 1142-1150 (2009)

2. 学会発表

- 1) Teik-How Lim, Masumi Hidaka, Yoshimichi Nakatsu, Mutsuo Sekiguchi, Teruhisa Tsuzuki, Characterization of Map01-defective mutant that is unable to induce apoptosis triggered by alkylated DNA damage 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009. 12. 09.
- 2) Masumi Hidaka, Kayoko Komori, Yasumitsu Takagi, Masayuki Sanada, Teik-How Lim, Yoshimichi Nakatsu, Teruhisa Tsuzuki, Mutsuo Sekiguchi, MAP01 plays a role in the induction of apoptosis to preserve genome integrity from environmental stress, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009. 12. 10.
- 3) 大野みずき, 作見邦彦, 古市正人, 岡素雅子, 續輝久, 中別府雄作, 酸化的 DNA 損傷に起因する染色体変異とその抑制機構, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009. 12. 10.
- 4) 大野みずき, 作見邦彦, 古市正人, 續輝久, 中別府雄作, 酸化的 DNA 損傷と生殖細胞ゲノム変異, 日本環境変異学会 第 38 回大会, 2009. 11. 26.

- 5) 大野みずき, 作見邦彦, 古市正人, 續輝久, 中別府雄作, 酸化的 DNA 損傷と生殖細胞ゲノム変異, 日本放射線影響学会第 52 大会, 2009.11.11.
- 6) Teruhisa Tsuzuki, Jingshu Piao, Takuro Isoda, Kunihiro Sakumi, Yusaku Nakabeppu, Yoshimichi Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice, The 40th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund “Cancer and DNA Repair”, 2009.11.10.
- 7) 續輝久, 磯田拓郎, 朴晶淑, 作見邦彦, 中別府雄作, 中津可道, 酸化ストレス誘発がんの抑制に關与する分子機構の解明-*MutYh* 遺伝子欠損マウスにおける消化管がんの解析を中心として-, 日本生化学会第 82 回大会, 2009.10.24.
- 8) 續輝久, 酸化ストレス誘発がんの抑制に關与する分子機構の解明-*MutYh* 遺伝子欠損マウスにおける消化管がんの解析を中心として-, 第 51 回日本消化器病学会大会, 2009.10.15.
- 9) 松本戴恭, 朴晶淑, 中津可道, 前原喜彦, 續輝久, Trp53 欠損マウスを用いた KBrO₃ 投与による酸化ストレス誘発小腸腫瘍の解析, 第 68 回日本癌学会学術総会, 2009.10.01.
- 10) 中津可道, 松本戴恭, 朴晶淑, 續輝久, 酸化ストレス誘発消化管発癌抑制における癌関連遺伝子の働き, 日本遺伝学会第 81 回大会, 2009.09.16.
- 11) 日高真純, 高木康光, 真田正幸, Lim Teik-How, 中津可道, 續輝久, 関口睦夫, アルキル化損傷誘導アポトーシス経路で機能する MAP1 タンパク質複合体, 日本遺伝学会第 81 回大会, 2009.09.16.
- 12) 大野みずき, 作見邦彦, 古市正人, 續輝久, 中別府雄作, 酸化損傷塩基の修復能を欠損するマウスにおける継世代的影響の解析, 日本遺伝学会第 81 回大会, 2009.09.16.
- 13) Teruhisa Tsuzuki, Jingshu Piao, Takuro Isoda, Kunihiro Sakumi, Yusaku Nakabeppu, Yoshimichi Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice, 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM), 2009.08.23.
- 14) Teruhisa Tsuzuki, Jingshu Piao, Takuro Isoda, Kunihiro Sakumi, Yusaku Nakabeppu, Yoshimichi Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice, 3rd ASM Conference on DNA Repair and Mutagenesis, 2009.06.01.
- 15) Masumi Hidaka, Kayoko Komori, Yasumitsu Takagi, Masayuki Sanada, Teik-How Lim, Yoshimichi Nakatsu, Teruhisa Tsuzuki, Mutsuo Sekiguchi, A new member of genes, Map1, involve in O₆-methylguanine-induced apoptosis, 3rd ASM Conference on DNA Repair and Mutagenesis, 2009.06.01.
- 16) Jingshu Piao, Takuro Isoda, Yoshimichi Nakatsu, Kunihiro Sakumi, Yusaku Nakabeppu, Teruhisa Tsuzuki, Susceptibility of various types of DNA repair-deficient mice to

intestinal tumorigenesis induced by potassium bromate, 2nd Asian Congress of Radiation Research (ACRR 2009), 2009.05.18.

G. 知的所有権の取得状況
特になし

平成 21 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発がん物質の評価法に関する研究

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

DNA 損傷部位の乗り越えに関わるトランスリージョン合成 (TLS) 型 DNA ポリメラーゼは遺伝毒性からの防御に関わる因子のひとつであり、その欠損や不活化は環境中の変異原物質に高い感受性を示すことが予想される。本研究では、TLS 合成ポリメラーゼのひとつであるポリメラーゼ κ ($\text{pol } \kappa$) を特異的に不活化した $\text{pol } \kappa$ ノックイン *gpt delta* ダブルトランスジェニックマウスを樹立し、そのバックグラウンドレベルの変異頻度を測定した。 $\text{pol } \kappa$ の不活化はマウスの生存および繁殖に影響を与えなかった。今回検索した肝臓と精巣では、その変異頻度に野生型と差は認められず、*gpt* 遺伝子の変異スペクトラムも野生型との大きな違いは認められなかった。今後はベンツピレンなどの環境変異原物質を投与した時の感受性を検討すると共に、加齢の影響なども検討し、遺伝毒性発がん物質を高感度に検出する有用な試験系の確立に努めていく。

キーワード: TLS 型 DNA ポリメラーゼ、ポリメラーゼ κ ノックイン、*gpt delta* トランスジェニックマウス

A. 研究目的

我々は、発がんを検出する実験動物の標的臓器（発がんが起こる臓器）において遺伝毒性を検出する最も信頼できる手法として、変異検出用のレポーター遺伝子を導入したトランスジェニック動物遺伝毒性試験法を確立した。*gpt delta* トランスジェニック動物は点突然変異と欠失変異を検出することができ、現在までに C57BL6/J マウス、SD ラットおよび F344 ラットの三系統を確立した。環境中には、化石燃料の不完全燃焼により生ずるベンツピレン (BP) に代表される多環芳香族炭化水素 (PAH) などの、環

境汚染物質が数多く存在し、DNA に損傷を与えることが知られている。DNA 損傷部位の乗り越えに関わるトランスリージョン合成 (TLS) 型 DNA ポリメラーゼは、遺伝毒性からの防御に関わる生体因子のひとつであり、損傷部位で進行を停止する複製型 DNA ポリメラーゼに代わって損傷部位での DNA 合成を担うことで遺伝毒性の回避に寄与している。Pol κ は TLS 型 DNA ポリメラーゼのひとつであり、その欠損は環境化学物質や活性酸素などの遺伝毒性に高い感受性を示すことが予想される。そこで、本研究では、新規に作出した Pol κ のポリメラーゼ活性を

特異的に不活化させたノックインマウスを *gpt delta* マウスと交配して $pol \kappa$ ノックイン *gpt delta* マウスを作製し、BP 等の変異原曝露実験を行い、肝臓・精巣などに対する変異作用を検討する。本研究年度においては、 $pol \kappa$ ノックイン *gpt delta* マウスを確立し、各臓器におけるバックグラウンドレベルの自然突然変異頻度を検索した。

B. 研究方法

1) $pol \kappa$ ノックインマウスの樹立

マウス DNA $pol \kappa$ の活性中心の 2 アミノ酸、アスパラギン酸とグルタミン酸をそれぞれアラニンに置換した変異 $pol \kappa$ 遺伝子配列の一部、ネオマイシン耐性遺伝子および一対の loxP 配列を含むターゲティングベクターをマウス ES 細胞に導入して組換えを行った後、Cre /loxP 組換えによってネオマイシン耐性遺伝子を除去した。得られた遺伝子組換え体は、変異 $pol \kappa$ 遺伝子および 1 つの loxP 配列を持つ点のみ野生型と異なる (図 1)。

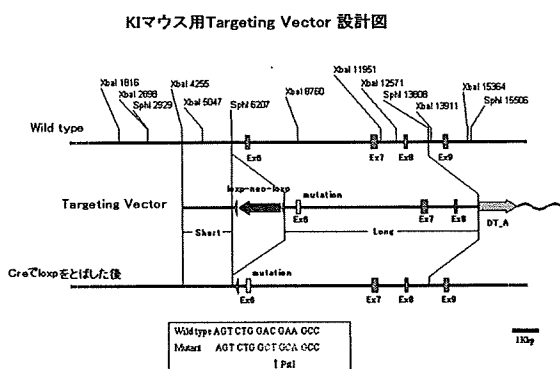


図 1 $pol \kappa$ ノックインマウスの樹立

2) $pol \kappa$ ノックイン *gpt delta* マウスの樹立

作成した F1 マウスに変異検出用の *gpt delta* マウスを交配しダブルトランスジェニック動物を得る。その後、交配により *gpt delta* のホモバックグラウンドの $pol \kappa$ ノ

ックイン ($pol \kappa$ KI) マウスを作出した。

3) 動物実験

ベンゾ[a]ピレン (BP) を用いた遺伝毒性試験を行う為の基礎実験として、溶媒の検討を行った。検討溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を採用した。In vivo で腹腔内投与で遺伝毒性の報告のある BP の最も低い濃度としては 50 mg/kg b.w. の報告があり (T.R. Skopek et al., Environ. Mol. Mutagen., 28, 376-384, 1996)、10 ml/kg b.w. の DMSO に溶解可能であったことから、10 ml/kg b.w. DMSO の予備投与試験を施行した。12 週令の雄性 $pol \kappa$ (KI/KI) *gpt delta* マウスと $pol \kappa$ (wild) *gpt delta* マウス各 5 匹に 10 ml/kg b.w. DMSO を単回腹腔内投与した。動物は翌日屠殺し、剖検時に肝臓および精巣の凍結サンプルを採取した。

4) 変異解析用 DNA の抽出とファージ粒子の回収

肝臓および精巣から RecoverEase DNA isolation kit (Stratagene) を用いてゲノム DNA を採取した。その後、Transpack (Stratagene) を用いて in vitro パッケージング反応を行い、ゲノム DNA から λ EG10 をファージ粒子として回収した。

5) *gpt* 変異体頻度 (MF) の測定

ファージを大腸菌 YG6020 に感染させ、6-チオグアニンとクロラムフェニコールを含む培地上に播種し耐性となったコロニー (*gpt* 変異体候補コロニー) を検出した。検出したコロニーは、再度、6-チオグアニンとクロラムフェニコールを含む培地上にストリークして、真の *gpt* 変異体を検出した。回収したファージの一部は適宜希釈した後 YG6020 に感染させ、クロラムフェニコール

のみを含む培地上に播種し、耐性コロニー数を計測して回収したレポーター遺伝子の総数を求めた。*gpt* MF は、真の *gpt* 変異体数を回収したレポーター遺伝子数で除して算出した。変異体由来の PCR 産物のシーケンス解析を行い、変異スペクトラムを解析した。

6) Spi⁻変異体頻度 (MF) の測定

ファージを P2 溶原菌である XL-1 Blue MRA P2 に感染させ、培地上に播種し P2 interference 耐性 (Spi⁻) となったプラークを検出した。検出したプラークの懸濁液を、XL-1 Blue MRA, XL-1 Blue MRA P2 および WL95 P2 をそれぞれ播種したプレートに滴下し、全てのプレートで明らかなプラークを形成する真の Spi⁻変異体を検出した。回収したファージの一部は適宜希釈した後 XL-1 Blue MRA に感染させ、培地上に播種し、形成されたプラーク数を計測して回収したレポーター遺伝子の総数を求めた。Spi⁻ MF は、真の Spi⁻変異体数を回収したレポーター遺伝子数で除して算出した。

7) 統計的手法

すべての測定値について平均値と標準偏差を求め、統計的な有意差は Student's *t*-test により評価した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1) pol κ ノックイン *gpt delta* マウスの樹立

交配により、pol κ ノックイン *gpt*

delta マウスを作出した。*gpt delta* ホモの pol κ ノックインマウスの産仔は、雌雄ともに各遺伝子型の割合はメンデルの法則に従って得られた。pol κ は、DNA 損傷部位の乗り越えに関わるトランスリージョン合成 (TLS) 型 DNA ポリメラーゼであり、その不活化により変異の蓄積のおそれがあるため、今後の系統維持にはヘテロ (pol κ (KI/+)) の遺伝子型を持つ pol κ ノックイン *gpt delta* ホモマウスを使用する。

2) DMSO 投与予備試験

10 ml/kg b.w. DMSO を単回腹腔内投与したマウスは、翌日には DMSO の急性毒性によると考えられる瀕死の状態であったため切迫屠殺した。以上より、DMSO は投与溶媒としては採用せず、本試験では BP はオリーブオイルを用いた懸濁液で投与を行う予定である。

3) 肝臓および精巣の *gpt* 遺伝子自然突然変異解析

肝臓の *gpt* MF、精巣の *gpt* MF は、共に pol κ (KI/KI) と野生型のあいだで有意な差は認められなかった。一方、pol κ の不活化の有無に関わらず、肝臓に対して精巣で変異の頻度が低い傾向が認められた。

第 1 表 肝臓の *gpt* MF

	<i>gpt</i> MF (10 ⁻⁶)	<i>p</i> value
pol κ (KI/KI)	6.6 ± 1.2	0.343
Wild	8.3 ± 8.9	

第 2 表 精巣の *gpt* MF

	<i>gpt</i> MF (10 ⁻⁶)	<i>p</i> value
pol κ (KI/KI)	2.1 ± 1.2	0.238
Wild	2.8 ± 1.6	

gpt MF は 5 匹の値の平均値 ± 標準偏差を示す

各群の MF の非投与群に対する統計的有意差を t テストにより検定した。

シーケンス解析により変異のスペクトラムを解析したが、遺伝子型の違いによるスペクトラムの違いは認められなかった。

第 3 表 *gpt* 変異スペクトラム

<i>gpt</i> mutation spectra								
	polκ KI (liver)		Wild (liver)		polκ KI (testis)		Wild (testis)	
	total	%	total	%	total	%	total	%
Base substitution								
Transition								
G:C → A:T	8	16.3	11	36.6	9	30.0	13	46.4
CpG-site	3		7		3		5	
A:T → G:C	5	10.2	1	3.2	1	3.3	0	0.0
Transversion								
G:C → T:A	16	30.6	7	22.6	7	23.9	7	25.0
G:C → C:G	4	8.2	1	3.2	2	6.7	2	7.1
A:T → T:A	5	10.2	1	3.2	0	0.0	0	0.0
A:T → C:G	1	2.0	4	12.9	0	0.0	1	3.6
Deletion								
	8	16.3	6	16.1	8	26.7	6	17.9
-1bp	8		3		7		5	
>2bp	0		2		1		0	
Insertion								
	2	4.1	0	0.0	1	3.3	0	0.0
Others								
	1	2.0	1	3.2	2	6.7	0	0.0
Total No. of Mutations (clonal mutations)								
	49	100	31	100	30	100	28	100

4) 肝臓および精巣の Spi⁻ MF 変異解析

肝臓の Spi⁻ MF、精巣の Spi⁻ MF は、いずれもバックグラウンドレベルではあるが、共に polκ (KI/KI) で野生型に対し僅かに高い傾向が認められた。

第 4 表 肝臓の Spi⁻ MF

	Spi ⁻ MF (10 ⁻⁶)	p value
polκ (KI/KI)	5.3 ± 0.8	0.038
Wild	4.0 ± 1.2	

第 5 表 精巣の Spi⁻ MF

	Spi ⁻ MF (10 ⁻⁶)	p value
polκ (KI/KI)	5.2 ± 1.6	0.076
Wild	4.0 ± 0.5	

gpt MF は 5 匹の値の平均値 ± 標準偏差を示す

各群の MF の非投与群に対する統計的有意差を t テストにより検定した。

gpt MF 解析で認められたような、精巣と肝臓間での変異頻度の違いは認められなかった。

D. 考 察

発がん物質は、DNA と反応して突然変異や染色体異常を起こす遺伝毒性発がん物質と、遺伝毒性以外のメカニズム（細胞増殖、ホルモン作用など）で発がん作用を示す非遺伝毒性物質発がん物質に分類され、遺伝毒性物質発がん物質には閾値がないとされている。従って、微量の遺伝毒性物質であっても、*in vivo* で、感度よく、その変異原性を検出できる有用な試験法が必要とされている。化合物に暴露された場合に、がんが発生する臓器には特異性があるため、トランスジェニック動物モデルの遺伝毒性試験を使用することで、様々な臓器における遺伝毒性を一個体の動物で検索することが出来る。polκ を欠損した (KO) マウスでは、自然突然変異の頻度が加齢に伴い、腎臓、肝臓および肺で上昇していることが報告されている (Stancel et al., DNA repair, 8, 1355-62, 2009)。その一方で脾臓と精巣では自然突然変異頻度の上昇は認められなかった。polκ は、精巣での高発現が報告されており (S. Velasco-Miguel et al., DNA Repair, 2, 91-106, 2003)、精巣におけるその働きが注目される。本研究で用いた polκ ノックインマウスの週令は 12 週であり、

比較的若い。KO では 20 週を超えたマウスで検討が行われており、変異頻度に二倍以上の差がつくのは 40 週を超えた老齢マウスであることから、pol κ ノックインマウスにおいても、加齢の影響とともに蓄積する変異の検出を検討する予定である。KO では、発生時より pol κ が欠損しているため、他の Y-family polymerase が代替的に働いている可能性を排除できない。本研究で樹立した pol κ ノックイン *gpt delta* ダブルトランスジェニックマウスは、不活化した pol κ がタンパクとして存在しているため、より pol κ の機能を詳細に解析することが可能だと考えられる。DNA ポリメラーゼの発現にも組織特異性が存在することから、pol κ ノックイン *gpt delta* マウスを用いて *in vivo* での遺伝毒性試験を行うことで、各組織での pol κ のメカニズム解析が進むことも期待される。

E. 結論

我々が樹立した pol κ ノックイン *gpt delta* マウスの自然突然変異頻度は、肝臓と精巣において、今回検討した週令では野生型と比較して差がないことが明らかとなった。DNA 損傷部位の乗り越えに関わる TLS 型 DNA ポリメラーゼである pol κ のポリメラーゼ活性を特異的に不活化させても、マウスの生存や生殖能力に明らかな影響を与えないことも明らかとなった。TLS 型 DNA ポリメラーゼの不活化は、DNA に損傷が与えられた時に生じる突然変異の頻度を変化させると考えられるので、本ダブルトランスジェニックマウスの環境変異原物質への感受性を明らかにするために、今後の研究を進め、環境変異原物質の高感度検出系の確立を目指していく。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) RS. Galhardo, R. Do, M. Yamada, EC. Friedberg, PJ. Hastings, T. Nohmi and SM. Rosenberg, DinB upregulation is the sole of the SOS response in stress-induced mutagenesis in *Escherichia coli*, *Genetics.*, 182, 55-68 (2009)
- 2) N. Niimi, A. Sassa, A. Katafuchi, P. Gruz, H. Fujimoto, RR. Bonala, F. Johnson, T. Ohta and T. Nohmi, The steric gate amino acid tyrosine 112 is required for efficient mismatched-primer extension by human DNA polymerase kappa, *Biochemistry.*, 48, 4239-4246 (2009)
- 3) A. Shibata, D. Maeda, H. Ogino, M. Tsutsumi, T. Nohmi, H. Nakagama, T. Sugimura, H. Teraoka and M. Masutani, Role of Parp-1 in suppressing spontaneous deletion mutation in the liver and brain of mice at adolescence and advanced age, *Mutat. Res.*, 664, 20-27 (2009)
- 4) A.H. Hashimoto, K. Amanuma, K. Masumura, T. Nohmi and Y. Aoki, *in vivo* mutagenesis caused by diesel exhaust in the testis of *gpt delta* transgenic mice, *Genes and Environ.*, 31, 1-8 (2009)
- 5) DA. Eastmond, A. Hartwig, D. Anderson, WA. Anwar, MC. Cimino, I. Dobrev, GR. Douglas, T. Nohmi, DH. Phillips and C. Vickers, Mutagenicity testing for

- chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme, *Mutagenesis.*, 24, 341-349 (2009)
- 6) AM. Salem, T. Nakao, M. Takuwa, N. Matoba, T. Tsuboi, H. Terato, K. Yamamoto, M. Yamada, T. Nohmi and H. Ide, Genetic analysis of repair and damage tolerance mechanisms for DNA-protein cross-links in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 191, 5657-5668 (2009)
- 7) H. Fukuda, T. Takamura-Enya, Y. Masuda, T. Nohmi, C. Seki, K. Kamiya, T. Sugimura, C. Masutani, F. Hanaoka and H. Nakagama, Translesional DNA synthesis through a C8-guanyl adduct of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in vitro: REV1 inserts dC opposite the lesion, and DNA polymerase kappa potentially catalyzes extension reaction from the 3' -dC terminus, *J. Biol. Chem.*, 284, 25585-25592 (2009)
- 8) Y. Totsuka, T. Higuchi, T. Imai, A. Nishikawa, T. Nohmi, T. Kato, S. Masuda, N. Kinoue, K. Hiyoshi, S. Ogo, M. Kawanishi, T. Yagi, T. Ichinose, N. Fukumori, M. Watanabe, T. Sugimura and K. Wakabayashi, Genotoxicity of nano/microparticles in in vitro micronuclei, in vivo comet and mutation assay systems, *PartFibre. Toxicol.*, 6, 23-33 (2009)
- 9) A. Katafuchi, A. Sassa, N. Niimi, P. Gruz, H. Fujimoto, C. Masutani, F. Hanaoka, T. Ohta and T. Nohmi, Critical amino acids in human DNA polymerases {eta} and {kappa} involved in erroneous incorporation of oxidized nucleotides, *Nucleic. Acids. Res.*, 38, 859-867 (2010)
- 10) N. Toyoda-Hokaiwado, T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi, Integration of in vivo genotoxicity and short-term carcinogenicity assays using F344 gpt delta transgenic rats: in vivo mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene structural isomers, *Toxicol. Sci.*, 114, 71-78 (2010).
- 11) N. Okudaira, Y. Uehara, K. Fujiwara, N. Kagawa, A. Ootsuyama, T. Norimura, K. Saeki, T. Nohmi, K. Masumura, T. Matsumoto, Y. Oghiso, K. Tanaka, K. Ichinohe, S. Nakamura, S. Tanaka and T. Ono, Radiation dose-rate effect on mutation induction in spleen and liver of gpt delta mice, *Radiat. Res.*, 173, 138-147 (2010)

2. 学会発表

- 1) T. Nohmi, Possible mechanisms underlying practical threshold for genotoxic carcinogens, The 10th International Conference on Environmental Mutagens (10th ICEM), Firenze, Italy (2009. 8)
- 2) Y. Totsuka, T. Nohmi, T. Kato, S. Masuda, N. Kinoue, M. Kawanishi, T. Yagi, T. Sugimura, K. Wakabayashi, Genotoxicity of nanoparticles in *in vitro* micronuclei, *in vivo* comet and mutation assay systems, The 10th International Conference on

- Environmental Mutagens (10th ICEM), Firenze, Italy (2009. 8)
- 3) N. Koyama, A. Kimura, M. Yasui, S. Takami, M. Takahashi, K. Inoue, M. Yoshida, T. Imal, M. Shibutani, T. Suzuki, A. Yamamoto, W. Kumita, K. Masumura, K. Horibata, S. Masuda, N. Kinase, T. Matsuda, T. Nohmi, M. Honma, Child-adult differences in evaluation of *in vivo* genotoxicity of acrylamide, The 10th International Conference on Environmental Mutagens (10th ICEM), Firenze, Italy (2009. 8)
 - 4) K. Masumura, N. Toyoda-Hokaiwado, T. Inoue, T. Umemura, A. Nishikawa, T. Nohmi, *In vivo* mutagenicity of structural isomers 2,4-DAT and 2,6-DAT in the target organ for carcinogenicity in F344 *gpt* delta transgenic rat, The 10th International Conference on Environmental Mutagens (10th ICEM), Firenze, Italy (2009. 8)
 - 5) Y. Totsuka, T. Imai, A. Nishikawa, T. Nohmi, M. Kawanishi, T. Yagi, T. Ichinose, T. Sugimura, K. Wakabayashi, Genotoxicity of nanoparticles in *in vitro* micronuclei, *in vivo* comet and mutation assay systems, The 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009. 10)
 - 6) Y. Suzuki, T. Okamura, D. Hibi, Y. Ishii, M. Jin, T. Umemura, T. Nohmi, A. Nishikawa, Combined effects of food-derived CYP1A2 inducers on *in vivo* mutagenicity of IQ, The 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009. 10)
 - 7) T. Inoue, M. Tasaki, Y. Ishii, T. Okamura, Y. Suzuki, M. Jin, D. Hibi, T. Nohmi, T. Umemura, A. Nishikawa, Lack of *in vivo* mutagenicity and tumor-promotion activity in the livers of rats treated with tocotrienol, The 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009. 10)
 - 8) M. Yamada and T. Nohmi, Screening of endogenous mutagens using YG3206, modified Ames tester strain, The 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009. 10)
 - 9) N. Toyoda, T. Inoue, K. Masumura, T. Umemura, A. Nishikawa, T. Nohmi, The aromatic amine 2,4-DAT induced point mutations in the target organ of carcinogenicity in F344 *gpt* delta rat, The 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009. 10)
 - 10) T. Umemura, Y. Ishii, T. Inoue, M. Jin, Y. Suzuki, D. Hibi, Y. Kodama, T. Nohmi, A. Nishikawa, Facilitative effects of simultaneous administration of flumequine on *in vivo* mutagenicity of MeIQx, The 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009. 10)
 - 11) R. Ohta, H. Sui, T. Shiragiku, A. Akahori, M. Nakajima, H. Hayashi, K. Masumura, T. Nohmi, Collaborative study of the *gpt* delta transgenic rat mutation assays: 1) Distinguishable of hepatic carcinogens from a non-carcinogen, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th

- JEMS) (2009. 11)
- 12) O. Tajima, S. Yamada, Y. Kawamura, H. Hayashi, T. Takayanagi, H. Hori, W. Fujii, K. Masumura, T. Nohmi, Collaborative study of the *gpt* delta transgenic rat mutation assays: 2) Evaluation of genotoxicity of aristolochic acid, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS) (2009. 11)
 - 13) T. Noguchi, T. Kamigaito, K. Narumi, R. Takashima, S. Hamada, H. Sanada, K. Masumura, M. Hasuko, T. Nohmi, Collaborative study of the *gpt* delta transgenic rat mutation assays: 3) Evaluation of genotoxicity of Nickel subsulfide by intratracheal instillation, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS) (2009. 11)
 - 14) H. Sui, K. Kawakami, N. Sakurai, H. Okutomi, R. Ohta and T. Nohmi, Further improvement of high-throughput fluctuation Ames test (Part V), The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS) (2009. 11)
 - 15) N. Koyama, A. Kimura, M. Yasui, S. Takami, M. Takahashi, K. Inoue, M. Yoshida, T. Imai, M. Shibutani, T. Suzuki, K. Masumura, S. Masuda, N. Kinoue, T. Matsuda, T. Nohmi and M. Honma, Difference between child-adult in evaluation of *in vivo* genotoxicity of acrylamide, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS) (2009. 11)
 - 16) Y. Matsumoto, Y. Totsuka, S. Masuda, T. Kato, T. Nohmi, S. Goto, T. Sugimura, K. Wakabayashi, *In vivo* genotoxicity induced by nanoparticles, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS) (2009. 11)
 - 17) H. Ide, A. Salem, T. Nakano, M. Takuwa, H. Terato, K. Yamamoto, M. Yamada and T. Nohmi, Genetic analysis of repair and damage tolerance mechanisms for DNA-protein crosslinks, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS) (2009. 11)
 - 18) P. Gruz, M. Takamune, M. Yamada and T. Nohmi, Detection of UV-mutagenesis in umuDC-deficient strain of Escherichia coli expressing human DNA polymerase η , The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS) (2009. 11)
 - 19) K. Masumura, T. Nohmi, Inserted position of lambda EG10 transgene on *gpt* delta transgenic mouse genome, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS) (2009. 11)
 - 20) AM. Salem, T. Nakano, M. Takuwa, H. Terato, K. Yamamoto, M. Yamada, T. Nohmi and H. Ide, Repair and damage tolerance mechanisms for DNA-protein crosslinks in Escherichia coli, The 52nd Annual Meeting of the Japan Radiation Research Society (2009. 11)
 - 21) A. Katafuchi, A. Sassa, P. Gruz H.

- Fujimoto, C. Masutani, F. Hanaoka and T. Nohmi, The activity of 8-oxo-dGTP incorporation of human DNA polymerase η and κ , The 52nd Annual Meeting of the Japan Radiation Research Society (2009. 11)
- 22) N. Niimi, S. Iizumi, N. Adachi, H. Koyama and T. Nohmi, Roles of DNA polymerase kappa in UV- and chemically-induced mutagenesis in human cells, The 32nd Annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan. (2009. 12)
- 23) T. Nohmi, Development and validation of in vivo genotoxicity assay using transgenic animals, Special lecture I, The 26th Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology (2010. 2)
- 24) N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Muramatsu, K. Masumura, T. Tanaka and T. Nohmi, Chemopreventive effects of capsaicin and silymarin in F344 gpt delta transgenic rat, The 26th Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology (2010. 2)

H. 知的所有権の取得状況

特になし