

Table 17
Incidence and number of hyperplastic and neoplastic lesions in the lung (experiment I)

Group	Treatment	No. of animals	Hyperplasia		Adenoma		Carcinoma		Total tumor	
			Incidence (%)	Multiplicity	Incidence (%)	Multiplicity	Incidence (%)	Multiplicity		
1	0	15	15 (100)	29.1±11.3	6 (40.0)	0.5±0.8	1 (6.7)	0.1±0.3	7 (46.7)	0.6±0.8
2	0.03%	15	15 (100)	20.2±6.2	1 (6.7)	0.1±0.3	1 (6.7)	0.1±0.3	2 (13.3)	0.1±0.4
3	2%	15	15 (100)	24.6±7.6	5 (33.3)	0.4±0.6	1 (6.7)	0.1±0.3	6 (40.0)	0.5±0.6

Table 13

Effects of Kojic acid and IQ on body weight (g)

Treatment	No. of animals	week									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
DMBDD+											
0	13	107.47	130.84	145.99	134.20	132.64	154.09	183.69	198.17	208.71	222.85
0.01%IQ	13	107.95	129.94	143.23	132.04	127.88	149.51	177.29	193.34	203.91	213.53
2.0%Kojic acid	14	107.55	129.49	144.47	140.05	139.43	154.17	181.52	192.35	201.11	107.55
DMBDD-											
0	6	132.27	167.47	199.60	225.95	248.27	266.48	285.60	297.10	309.32	323.05
0.01%IQ	6	133.05	169.58	200.62	226.40	248.45	265.87	287.52	296.75	307.58	318.22
2.0%Kojic acid	6	132.22	166.03	196.13	221.23	241.15	253.87	273.35	274.12	288.88	132.22

Table 13 (continued)
Effects of Kojic acid and IQ on body weight (g)

Treatment	No. of animals	week																
		10	11	12	13	14	15	16	17	18								
DMBDD+																		
0	13	232.73	237.25	243.10	248.33	252.32	257.45	262.89	270.15	263.38								
0.01%IQ	13	226.74	230.30	236.26	240.41	244.12	246.62	250.92	256.46	251.27								
2.0%Kojic acid	14	210.45*	218.97*	221.64*	227.36*	235.85*	236.01*	237.58*	243.77*	246.36*								
DMBDD-																		
0	6	334.88	341.03	350.53	359.68	365.23	369.57	377.32	387.13	381.32								
0.01%IQ	6	329.28	333.42	343.02	351.53	352.47	362.37	368.42	378.92	374.68								
2.0%Kojic acid	6	296.05*	304.33*	310.62*	320.10*	327.37*	329.47*	334.02*	339.42*	347.95*								

*Significantly different from control group.

Table 14

Water intake (g/day/rat)

Treatment	No. of animals	week								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
DMBDD+										
0	13	19.71	16.79	15.11	10.14	10.39	14.32	16.77	16.00	16.16
0.01%IQ	13	16.03	16.03	14.14*	8.81	9.82	12.98	15.10	14.30	14.21
2.0%Kojic acid	14	13.08	15.65	16.53	10.52	11.13	12.99	15.11*	14.56	13.77*
DMBDD-										
0	6	18.93	20.42	22.52	21.47	22.02	21.66	21.24	22.34	22.11
0.01%	6	18.51	19.47	21.67	20.79	21.53	21.22	20.79	20.81	20.63
2.0%Kojic acid	6	17.77	19.28	20.28*	19.84*	19.98	19.32	20.43	18.87	20.37

*Significantly different from control group.

Table 14 (continued)

Water intake (g/day/rat)

Treatment	No. of animals	week																
		10	11	12	13	14	15	16	17	18								
DMBDD+																		
0	13	15.19	14.78	16.32	14.76	13.98	14.47	13.68	14.88	15.58								
0.01%IQ	13	13.44	14.45	15.21	13.71	13.14	13.40	14.06	13.52	13.86								
2.0%Kojic acid	14	13.43	13.12*	13.91*	14.58	12.85	12.98	12.92	12.97	13.04								
DMBDD-																		
0	6	20.49	21.06	22.22	19.97	18.93	20.43	19.69	17.93	20.38								
0.01%IQ	6	18.27	19.70	22.51	20.04	18.93*	19.81*	19.92	21.04*	21.19*								
2.0%Kojic acid	6	19.79	17.85	21.38	18.36	17.83	17.99*	17.84	17.82	18.71*								

*Significantly different from control group.

Table 15

Food intake (g/day/rat)

Treatment	No. of animals	week								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
DMBDD+										
0	13	8.28	10.64	7.15	5.29	7.13	11.86	12.50	12.14	12.71
0.01%IQ	13	8.29	10.30	7.05	4.73	6.52	10.44*	11.77	11.79	12.20
2.0%Kojic acid	14	8.67	10.89	8.16	6.21	7.42	10.43	12.57	11.71	12.37
DMBDD-										
0	6	13.74	14.11	15.24	15.40	16.88	16.37	16.32	15.56	16.77
0.01%	6	14.48	15.04	15.21	15.34	17.12	15.99	15.72	15.53	16.73
2.0%Kojic acid	6	13.73	15.12	15.26	15.58	16.61	12.73	15.96	13.68	16.18

*Significantly different from control group.

Table 15 (continued)
Food intake (g/day/rat)

Treatment	No. of animals	week															
		10	11	12	13	14	15	16	17	18							
DMBDD+																	
0	13	12.23	11.87	12.47	10.79	10.59	10.69	10.87	11.59	11.31							
0.01%IQ	13	11.72	11.94	12.36	10.67	10.96	10.41	10.78	11.22	11.76							
2.0%Kojic acid	14	10.75	11.02	11.65	10.56	10.67	10.55	10.67	10.80	9.92							
DMBDD-																	
0	6	15.70	15.73	16.88	15.04	14.85	14.46	15.16	15.77	15.96							
0.01%IQ	6	16.07	15.69	18.27	14.69	14.90	14.73	14.95	15.82	16.94							
2.0%Kojic acid	6	13.66	13.47	16.56	15.30	13.89	13.30	13.35	14.09	15.09							

Table 16

Intake of IQ and Kojic acid

Treatment	No. of animals	Total intake (mg/kg b.w.)	Average intake (mg/kg b.w./day)
DMBDD+			
0	13	0	0
0.01%IQ	13	611.7	4.9
2.0%Kojic acid	14	139704.0	1108.8
DMBDD-			
0	6	0	0
0.01%IQ	6	692.1	5.5
2.0%Kojic acid	6	143587.0	1139.6

Table 17
Effects Kojic acid and IQ on final body weight (g)

Treatment	No. of animals	Final body weight (g)
DMBDD +		
0	13	263.4 ± 17.1
0.01%IQ	13	263.4 ± 17.1
2%Kojic acid	14	238.2 ± 24.3 *
DMBDD --		
0	6	381.3 ± 15.3
0.01%IQ	6	374.7 ± 19.0
2.0%Kojic acid	6	340.7 ± 17.6 *

*Significantly different from control group.

Table 18

Data on organ weights

Treatment	No. of animals	Liver		Kidney	
		Absolute (g)	Relative (g)	Absolute (g)	Relative (g)
DMBDD+					
0	13	5.47±0.60	2.22±0.11	1.79±0.11	0.73±0.11
0.01%IQ	13	6.17±1.06 *	2.50±0.16*	1.79±0.11	0.73±0.03
2.0%Kojic acid	14	6.16±1.10 *	2.50±0.21*	1.52±0.10 *	0.62±0.04 *
DMBDD-					
0	6	9.57±0.71	3.88±0.11	2.12±0.13	0.86±0.11
0.01%IQ	6	10.58±0.74 *	4.29±0.18 *	2.17±0.16	0.88±0.03
2.0%Kojic acid	6	9.87±0.68 *	4.01±0.22 *	1.92±0.12 *	0.78±0.04 *

*Significantly different from control group.

Table 18 (continued)

Data on organ weights

Treatment	No. of animals	Spleen		Heart	
		Absolute (g)	Relative (g)	Absolute (g)	Relative (g)
DMBDD+					
0	13	1.12±0.14	0.46±0.01	0.89±0.08	0.36±0.05
0.01%IQ	13	1.14±0.11	0.46±0.02	0.88±0.05	0.36±0.01
2.0%Kojic acid	14	1.09±0.15*	0.44±0.03*	0.75±0.05*	0.31±0.01*
DMBDD-					
0	6	0.68±0.06	0.27±0.01	0.91±0.04	0.37±0.01
0.01%IQ	6	0.68±0.02	0.28±0.02	0.92±0.05	0.37±0.05
2.0%Kojic acid	6	0.77±0.08*	0.31±0.03*	0.89±0.05*	0.36±0.01

*Significantly different from control group.

Table 18 (continued)
Data on organ weights

Treatment	No. of animals	Thyroid		Adrenal	
		Absolute (mg)	Relative (mg)	Absolute (mg)	Relative (mg)
DMBDD+					
0	13	10.2±1.8	0.004±0.001	43±4	0.017±0.002
0.01%IQ	13	11.0±1.4	0.004±0.002	44±6	0.018±0.002
2.0%Kojic acid	14	152.6±36.7 *	0.062±0.020 *	59±7 *	0.024±0.001 *
DMBDD-					
0	6	20.7±2.8	0.008±0.001	42±12	0.017±0.002
0.01%IQ	6	24.0±6.2	0.010±0.002	47±6	0.019±0.001
2.0%Kojic acid	6	110.7±17.4 *	0.010±0.002 *	54±7 *	0.022±0.001 *

*Significantly different from control group.

Table 18 (continued)
Data on organ weights

Treatment	No. of animals	Testis	
		Absolute (g)	Relative (g)
DMBDD—			
	0	3.12±0.07	0.83±0.04
0.01%IQ	6	3.11±0.08	0.82±0.03
2.0%Kojic acid	6	3.06±0.10*	0.90±0.03*

*Significantly different from control group.

Table 19

Development of GST-P positive foci in livers (Diameter $\geq 0.2\text{mm}$) (experimental 2)

Treatment	No. of animals	No. of foci (No./cm ²)	Area of foci (mm ² /cm ²)
DMBDD+			
0	13	2.9 ± 1.8	0.295 ± 0.186
0.01%IQ	13	11.6 ± 7.5 *	0.755 ± 0.440 *
2.0%Kojic acid	14	6.8 ± 3.6 *	0.697 ± 0.427 *
DMBDD-			
0	6	0.0 ± 0.0	0.000 ± 0.000
0.01%IQ	6	0.0 ± 0.0	0.000 ± 0.000
2.0%Kojic acid	6	0.0 ± 0.0	0.000 ± 0.000

*Significantly different from control group.

Table 20
Incidence and number of liver lesions in male C57BL/6J mice

DEN	Test chemical	Altered cell foci		
		Incidence (%)	No. (No./mouse)	Tumor
+	-	9/9 (100)	2.5 ±2.2	0
+	2% Dammar resin	8/10 (80)	1.3 ±1.0	0
+	0.03% IQ	7/10 (70)	1.5 ±1.3	0
-	-	0	0	0

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発に関する研究
平成 22 年度分担研究報告書

gpt delta ラットを用いた *in vivo* 変異原性試験

研究分担者：魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科 講師

研究要旨

本研究は、食品中の化学物質、特に食品添加物等の遺伝毒性と発がん性を短期的、かつ包括的に検出できる新しい発がんリスク評価法の開発の一環として、*in vivo* 変異原性が検索可能な *gpt delta* ラットおよびマウスを用いた多臓器発がん性試験法の変異原性評価における有用性を検討することを目的とする。本年度では、ダンマル樹脂、2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)、およびコウジ酸の *gpt delta* ラットを用いた 18 週間多臓器発がん性試験で得られた肝臓組織を用いて、点突然変異を検出する *gpt* アッセイおよび欠失変異を検出する Spi⁻アッセイを施行し、これら被検物質の変異原性を検討した。また、*gpt delta* マウスにおけるダンマル樹脂および IQ の変異原性についても同様に検討した。その結果、ダンマル樹脂が *gpt* アッセイおよび Spi⁻アッセイの両方とも陰性であることから、肝臓においては変異原性を示さないことが明らかとなった。一方、遺伝毒性発がん物質である IQ が両アッセイとも陽性であり、変異原性を有することが確認された。これらの結果は、この 2 物質の変異原性に関するこれまでの報告と一致していた。また、遺伝毒性の有無が明らかでないコウジ酸を検討した結果、変異原性を有しない可能性が強く示唆された。さらに、*gpt delta* ラットを用いた 18 週多臓器発がん性試験法ではこれらの物質の肝発がんプロモーション作用が認められ、これまでの F344 ラットを用いた発がん性試験の結果と一致した結果が得られた(鰐淵分担報告書参照)。以上の結果より、本試験法では、発がん性の評価と *in vivo* 変異原性の検討を合わせて実施できると同時に、化学物質の発がん性に対する遺伝毒性の寄与についても検討することができると考えられる。なお、*gpt delta* マウスにおけるダンマル樹脂および IQ の変異原性の解析は現在進行中である。

A. 研究目的

環境中には多くの発がん物質が存在し、ヒト発がんの原因と目されており、食品を介しての化学物質曝露はそのなかでも大きな要因となっている。しかし、食品中化学物質の発がん性評価を含めた安全性評価の検討は未だ不十分である。これは、現在の発がん性評価法は動物試験だけでも 2 年間という長期的検討が必要であり、莫大な経費および多数の動物数を要することから、多くの食品添加物等に対応することが困難なためである。一方、変異原は *in vitro* の変異原性試験により決められてきたが、変異原性が陰性であるにも関わらず、発がん性を有する物質が多数見つかってきており、*in vitro* の変異原性試験と発がん性との間に解離がみられているのも事実である。本研究は、食品中の化学物質、特に食品添加物等の遺伝毒性と発がん性を短期的、かつ包括的に検出可能な新しい発がんリスク評価法の開発の一環として、*in vivo* 変異原性が検索可能な *gpt delta* ラットおよびマウスを用いた多臓器発がん性試験法の変異原性評価における有用性を検討する。本年度では、前年度に引き続き、既知ラット肝発がん物質で

あるダンマル樹脂について、*gpt delta* ラットを用いた 18 週間多臓器発がん性試験で得られた肝臓組織を用いて、*in vivo* 変異原性試験である *gpt* アッセイと Spi⁻アッセイを施行し、その変異原性を検討した。また、既知遺伝毒性発がん物質である 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)、および肝発がん促進作用が確認されたが遺伝毒性の有無が明らかではないコウジ酸の *gpt delta* ラット肝における変異原性を同様な手法で検討した。さらに、C57BL/6J 系 *gpt delta* マウスにおけるダンマル樹脂および IQ の変異原性の検討を行った。

B. 研究方法

1. *gpt delta* ラットにおけるダンマル樹脂の *in vivo* 変異原性の検討

ダンマル樹脂の *gpt delta* ラットを用いた 18 週間多臓器発がん性試験の DMBDD(イニシエーション処置)単独投与群、DMBDD→2%ダンマル樹脂群、2%ダンマル樹脂単独投与群および無処置群について(鰐淵分担報告書参照)、肝における変異頻度を *gpt* および Spi⁻アッセイ法を用いて検討し

た。なお、*gpt* アッセイでは点突然変異を、*Spi*⁻ アッセイでは欠失変異を明らかにできる試験法である。

2. *gpt delta* ラットにおける IQ およびコウジ酸の *in vivo* 変異原性の検討

ダンマル樹脂の *gpt delta* ラットを用いた 18 週間多臓器発がん性試験の 0.01%ダンマル樹脂単独投与群、2%コウジ酸単独投与群および無処置群について（鱒淵分担報告書参照）、肝における変異頻度を *gpt* および *Spi*⁻ アッセイ法を用いて検討した。

3. C57BL/6J 系 *gpt delta* マウスにおけるダンマル樹脂および IQ の変異原性の検討

6 週齢の雄性 C57BL/6J 系 *gpt delta* マウスに基礎飼料、2%ダンマル樹脂および 0.03% IQ をそれぞれ 12 週間投与し、実験開始後 14 週で肝臓における *gpt* および *Spi*⁻ アッセイを行った。

4. *gpt* および *Spi*⁻ アッセイ

gpt アッセイでは、肝臓凍結組織から RecoverEase™ DNA Isolation Kit を用いて DNA を抽出した。*in vivo* パッケージングには、Transpack Packaging Extrac を用いて、抽出した DNA からトランスジーン λ EG10 をファージ粒子として回収した。Cre 組み換え酵素を発現している大腸菌 YG6020 株の菌液に回収したファージを加え、37°C 20min（静置）の後、37°C 20min（振とう）にて回収ファージを大腸菌 YG6020 株に感染させた。感染後の YG6020 菌液を 6-TG と chloramphenicol (Cm) を含む M9 寒天培地にまいて 37°C で 2 日間培養を行い、*gpt* 遺伝子が不活化している変異体のコロニーを得た。また、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換コロニー数は 6-TG を含まない M9 寒天培地にまいて生じたコロニー数によって求めた。突然変異数は、6-TG を含む寒天培地にまいて生じたコロニー数から、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換コロニー数で除して算出した。

Spi⁻ アッセイでは、*in vivo* パッケージングによりファージを回収するまでの手法は *gpt* アッセイと同様に行った。P2 溶原菌に回収したファージを加え、37°C 20min（静置）により回収したファージを P2 溶原菌に感染させた後、 λ トリプティック寒天培地にまいて 37°C で一晩培養し、*Spi*⁻ 変異体プラークを得た。また、非溶原菌に感染させ、全ファージが溶菌してプラーク作ることににより回収プラーク数を求めた。突然変異体頻度は変異プラーク数を回収ファージ数で除して算出した。

5. 統計学的解析

遺伝子の変異頻度について F 検定による等分散検定を行った。等分散の場合は Student's t-test 検定を行い、不等分散の場合は Welch t-test 法による両側検定を行った。

C. 研究結果

1. *gpt delta* ラットにおけるダンマル樹脂の変異原性

[非 DMBDD 処置群における変異原性]

gpt アッセイの結果を Table 1 に示した。*gpt* 遺伝子の突然変異頻度が無処置群では $6.2 \pm 2.3 (\times 10^6)$ 、2%ダンマル樹脂単独投与群では $7.2 \pm 4.2 (\times 10^6)$ であった。*gpt* 遺伝子の突然変異頻度は、無処置群と比較し、2%ダンマル樹脂投与群において有意な変化を認めなかった。

また、*gpt* 遺伝子の変異スペクトラを Table 2 に示した。Base substitution において、Transition 変化である G:C to A:T 変化は無処置群では 27.9%、2%ダンマル樹脂単独投与群では 40%、A:T to G:C 変化は無処置群では 6.6%、2%ダンマル樹脂単独投与群では 10.0% であった。また、同じ Base substitution において Transversion 変化である G:C to T:A 変化は無処置群では 39.3%、2%ダンマル樹脂単独投与群では 21.7%、G:C to C:G 変化は無処置群では 3.3%、2%ダンマル樹脂単独投与群では 3.3%、A:T to T:A 変化は 3.3%、2%ダンマル樹脂単独投与群では 3.3%、A:T to C:G 変化は無処置群では認められず、2%ダンマル樹脂単独投与群では 1.7% であった。deletion において、1bp 欠失変化は無処置群では 11.5%、2%ダンマル樹脂単独投与群では 16.7%、2bp 以上の欠失変化は無処置群では 1.6%、2%ダンマル樹脂単独投与群では認められなかった。これら変異スペクトラは無処置群と比較し、2%ダンマル樹脂投与群において特異的な有意な変化を認めなかった。

Spi⁻ アッセイの結果を Table 3 に示した。red/gam 遺伝子の突然変異体頻度 (MF: mutant frequency) が無処置群では $5.7 \pm 2.2 (\times 10^6)$ 、2%ダンマル樹脂単独投与群では $5.8 \pm 2.8 (\times 10^6)$ であった。無処置群および 2%ダンマル樹脂投与群において有意な変化を認めなかった。

[DMBDD 処置群における変異原性]

gpt アッセイの結果を Table 4 に示した。*gpt* 遺伝子の突然変異頻度が DMBDD 単独投与群では $395.3 \pm 119.5 (\times 10^6)$ 、DMBDD \rightarrow 2%ダンマル樹脂投与群では $322.7 \pm 70.9 (\times 10^6)$ であった。*gpt* 遺伝子の突然変異頻度は DMBDD 単独投与群と

比較し、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群において有意な変化を認めなかった。

gpt 遺伝子の変異スペクトラを Table 5 に示した。Base substitution において、Transition 変化である G:C to A:T 変化は DMBDD 単独投与群では 25.0%、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群では 24.0%、A:T to G:C 変化は DMBDD 単独投与群では 27.1%、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群では 18.7% であった。また、同じ Base substitution において Transversion 変化である G:C to T:A 変化は DMBDD 単独投与群では 10.4%、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群では 14.7%、G:C to C:G 変化は DMBDD 単独投与群では 2.1%、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群では 4.0%、A:T to T:A 変化は DMBDD 単独投与群では 20.8%、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群では 24.0%、A:T to C:G 変化は DMBDD 単独投与群では 14.6%、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群では 8.0% であった。deletion において、1bp 欠失変化および 2bp 以上の欠失変化は DMBDD 単独投与群では認められず、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群では 1bp 欠失変化は 4.0%、2bp 以上の欠失変化は 2.7% であった。これら変異スペクトルは DMBDD 単独投与群および DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群において特異的な有意な変化を認めなかった。

Spi⁻アッセイの結果を Table 6 に示した。red/gam 遺伝子の MF が DMBDD 単独投与群では $152.8 \pm 41.2 (\times 10^6)$ 、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群では $157.0 \pm 38.7 (\times 10^6)$ であった。DMBDD 単独投与群および DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群において有意な変化を認めなかった。

2. *gpt delta* ラットにおける IQ およびコウジ酸の変異原性

gpt アッセイの結果を Table 7 に示した。*gpt* 遺伝子の突然変異頻度が無処置群では $3.6 \pm 1.0 (\times 10^{-6})$ 、0.01% IQ 単独投与群では $27.9 \pm 8.3 (\times 10^{-6})$ 、2.0% コウジ酸単独投与群では $5.8 \pm 2.4 (\times 10^{-6})$ であった。*gpt* 遺伝子の突然変異頻度は、無処置群と比較して、0.01% IQ 投与群で有意に増加したが、2.0% コウジ酸単独投与群では有意な差は認められなかった。*gpt* 遺伝子の変異スペクトラの解析は現在進行中である。

Spi⁻アッセイの結果を Table 8 に示した。red/gam 遺伝子の MF が無処置群では $1.8 \pm 0.5 (\times 10^{-6})$ 、0.01% IQ 単独投与群では $7.4 \pm 2.6 (\times 10^{-6})$ 、2.0% コウジ酸単独投与群では $2.9 \pm 1.1 (\times 10^{-6})$ であった。0.01% IQ 投与群で有意に増加したが、2.0% コウジ酸単独投与群では有意な差は認められなかった。

3. C57BL/6J 系 *gpt delta* マウスにおけるダ

ンマル樹脂および IQ の変異原性

ダンマル樹脂および IQ の単独投与した *gpt delta* マウス肝における変異頻度を *gpt* assay および Spi⁻アッセイ法を用いて現在検索中である。

D. 考察

本研究では、被検物質の *in vivo* 変異原性を、点突然変異を検出する *gpt* アッセイおよび欠失変異を検出する Spi⁻アッセイによって検討した。ダンマル樹脂における *gpt* アッセイおよび Spi⁻アッセイの結果、いずれのアッセイも陰性であった。これらのことより、ダンマル樹脂は *in vivo* 変異原性を示さないことが明らかとなった。また、ダンマル樹脂は Ames 試験、染色体試験およびマウス小核試験の各変異原性試験でも陰性であり、変異原性は認められなかった。本研究は既知の変異原性試験と一致した結果を得た。

遺伝毒性発がん物質である IQ に関して、*gpt* アッセイにおける点突然変異の指標である *gpt* 遺伝子の突然変異体頻度は、無処置群と比較して、IQ 投与群において有意な増加が認められた。また、Spi⁻アッセイにおける欠失変異の指標である red/gam 遺伝子の変異体頻度も無処置群と比較して、IQ 投与群において有意な増加が認められた。これらのことより、IQ は点突然変異および欠失変異の両方の変異を誘発することが明らかとなり、変異原性を有することが確認された。一方、コウジ酸投与群では、*gpt* および Spi⁻アッセイの両方とも、変異頻度が対照群と比較して有意な差は認められず、変異原性を有しない可能性が強く示唆された。現在、*gpt* 遺伝子の変異スペクトラの解析中であり、遺伝子レベルでのコウジ酸の変異原性の有無を確認し、今後報告する予定である。

E. 結論

gpt delta ラットを用いた 18 週多臓器発がん性試験法で、ダンマル樹脂、IQ およびコウジ酸の変異原性を検討した。ダンマル樹脂は変異原性を示さないことが明らかとなった。一方、遺伝毒性発がん物質である IQ は変異原性が確認された。本試験法は短期的試験であるが、これまでのこの 2 物質の変異原性に関する長期試験報告と一致した結果を得ることができた。さらに、発がん促進作用が確認されているが遺伝毒性の有無が明らかではないコウジ酸に関して検討した結果、変異原性を有しない可能性が強く示唆された。現在、*gpt* 遺伝子の変異スペクトラの解析中であり、その変異原性の有無がより明確になると期待される。さらに、本試験法ではこれらの物質の肝発がんプロモーション作用が認められ、これまでの F344 ラットを用いた発がん性試験の結果と一致

した結果が得られた(鰐淵分担報告書参照)。以上の結果より本試験法では、発がん性の評価と *in vivo* 変異原性の検討を合わせて実施できると同時に、化学物質の発がん性に対する遺伝毒性の寄与についても、より短期的に検討することができると考えられる

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Doi, K., Sakai, K., Tanaka, R., Toma, K., Yamaguchi, T., Wei, M., Fukushima, S. and Wanibuchi, H.: Chemopreventive effects of 13alpha, 14alpha-epoxy-3beta-methoxyserratane-21 beta-ol (PJJ-34), a serratane-type triterpenoid, in a rat multi-organ carcinogenesis bioアッセイ. *Cancer Lett.*, 289: 161-169(2010).

Suzuki, S., Arnold, L. L., Pennington, K. L., Kakiuchi-Kiyota, S., Wei, M., Wanibuchi, H. and Cohen, S. M.: Effects of pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, on the urine and urothelium of the rat. *Toxicol Sci.*, 113:349-357(2010).

Fukushima, S., Wei, M., Kakehashi, A. and Wanibuchi, H.: Thresholds for genotoxic carcinogens: Evidence from mechanism-based carcinogenicity studies. *Cancer Risk Assessment*, 8:207-221(2010).

Tago, Y., Wei, M., Ishii, N., Kakehashi, A. and Wanibuchi, H.: Evaluation of the subchronic toxicity of dietary administered *Equisetum arvense* in F344 rats. *J Toxicol. Pathol.*, 23:245-251(2010).

Wei, M., Wanibuchi H, Nakae D, Tsuda H, Takahashi H, Hirose M, Totsuka M, Tatematsu M, Fukushima S. Low-dose carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in rats: Evidence for the existence of no-effect levels and a mechanism involving p21Cip/WAF1. *Cancer Sci.*, 102:88-94(2011).

Kakehashi, A., Ishii, N., Shibata, T., Wei, M., Okazaki, E., Tachibana, T., Fukushima, S. and Wanibuchi, H.: Mitochondrial prohibitins and septin 9 are implicated in the onset of rat hepatocarcinogenesis. *Toxicol. Sci.*, 119:61-72(2011).

Chusiri, Y., Wongpoomchai, R., Kakehashi, A., Wei,

M., Wanibuchi, H., Vinitketkumnuan, U. and Fukushima, S.: Non-genotoxic mode of action and possible threshold for hepatocarcinogenicity of コウジ酸 in F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 49(2):471-6(2011).

Hoshi, H., Sawada, T., Uchida, M., Saito, H., Iijima, H., Toda-Agetsuma, M., Wada, T., Yamazoe, S., Tanaka, H., Kimura, K., Kakehashi, A., Wei, M., Hirakawa, K. and Wanibuchi, H.: Tumor-associated MUC5AC stimulates *in vivo* tumorigenicity of human pancreatic cancer. *International journal of oncology* 38(3):619-627(2011).

Ishii, N., Wei, M., Kakehashi, A., Doi, K., Yamano, S., Inaba, M. and Wanibuchi, H.: Enhanced urinary bladder, liver and colon carcinogenesis in Zucker diabetic fatty rats in a multi-organ carcinogenesis: Evidence for mechanisms involving activation of PI3K signaling and impairment of p53 on urinary bladder carcinogenesis. *J Toxicol Pathol.* 24: 1-12(2011).

2. 学会発表

魏 民、山野荘太郎、石井真美、梯アンナ、鰐淵英機: ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットを用いた浸潤性膀胱がんモデルの開発. 第99回日本病理学会総会、東京都(2010年4月)

山野荘太郎、梯アンナ、石井真美、魏 民、鰐淵英機: QSTAR Elite LC-MS/MSを用いたマウス肺腫瘍におけるプロテオーム解析. 第99回日本病理学会総会、東京都(2010年4月)

石井真美、魏 民、梯アンナ、山野荘太郎、若狭研一、鰐淵英機: ベリニ管癌の一例検例. 第99回日本病理学会総会、東京都(2010年4月)

魏 民、金川明裕、田尻正喜、山田貴宣、山野荘太郎、梯アンナ、鰐淵英機: ヒ素膀胱発がん原因物質の探索: 新規ヒ素代謝物ジメチルモノチオアルシン酸の同定およびその膀胱上皮細胞に及ぼす影響の検討. 第25回発癌病理研究会、松島市(2010年8月)

魏 民、石井真美、北野光昭、多胡善幸、福島昭治、鰐淵英機: IQの発がん性には実際の閾値が存在する. 第69回日本癌学会学術総会、大阪市(2010年9月)

金川明裕、魏 民、田尻正喜、仲谷慎也、武下正憲、吉田 香、鰐淵英機: DMA^v誘発ラット膀胱発癌におけるDMMTA^vの役割. 第69回日本癌学会学術総会、大阪市(2010年9月)

大保ゆみ、魏 民、山野莊太郎、謝 暁利、星 学、神吉将之、鰐淵英機：gpt delta rat を用いたダンマル樹脂の *in vivo* 変異原性および発がん修飾作用の検討. 第 69 回日本癌学会学術総会, 9 月 22-24 日、大阪市 (2010 年 9 月)

山田貴宣、魏 民、豊田武士、金川明裕、仲谷慎也、陳 慶義、鰐淵英機：ラファノブラシカにおけるピロリ菌感染胃炎の修飾作用. 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪市 (2010 年 9 月)

花田庄司、梯アンナ、山野莊太郎、丁 奎光、魏 民、西山典利、鰐淵英機：質量分析に基づいた肺扁平上皮癌のプロテオーム特性. 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪市 (2010 年 9 月)

丁 奎光、梯アンナ、山野莊太郎、花田庄司、魏 民、西山典利、鰐淵英機：ヒト肺腺癌の有用な新規腫瘍マーカーとしての AGR2. 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪市 (2010 年 9 月)

櫻井靖高、横井雅幸、塚本徹哉、立松正衛、魏 民、鰐淵英機、花岡文雄：UVB 照射 DNA の損傷乗り越え複製における DNA ポリメラーゼイータとイオタの生体内での役割. 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪市 (2010 年 9 月)

金川明裕、魏 民、田尻正喜、吉田 香、圓藤吟史、鰐淵英機：DMA^v 誘発ラット膀胱発癌における DMMTA^v の役割～代謝経路の解明及び、膀胱上皮細胞に与える影響の検討～. 第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市 (2011 年 1 月)

魏 民、梯 アンナ、石井真美、北野光昭、福島昭治、鰐淵英機：IQ の低用量域における発がん性：閾値の存在. 第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市 (2011 年 1 月)

田尻正喜、魏 民、梯 アンナ、山野莊太郎、加藤実、鰐淵英機：Diphenylarsinic acid のラットにおける慢性毒性および発がん性の検討. 第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市 (2011 年 1 月)

多胡善幸、仲谷和記、魏 民、山田貴宣、太田成男、中島裕司、鰐淵英機：水素水による TAA 誘発ラット肝線維化の抑制効果. 第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市 (2011 年 1 月)

武下正憲、山野莊太郎、梯 アンナ、石井真美、蟹江尚平、魏 民、鰐淵英機：NASH-HCC 発症 STAM マウスにおける病理組織学的解析. 第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市 (2011 年 1 月)

謝 暁利、魏 民、梯 アンナ、山田貴宣、大保ゆみ、林 修次、鰐淵英機：マウス二段階肝発がんモデルを用いた IQ の肝発がん性の検討. 第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市 (2011 年 1 月)

梯 アンナ、石井真美、山野莊太郎、魏 民、神吉将之、鰐淵英機：マウス肝発がんにおける新規バイオマーカー候補分子の検討. 第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市 (2011 年 1 月)

大保ゆみ、魏 民、田尻正喜、謝 暁利、増村健一、能美健彦、鰐淵英機：gpt delta rat を用いたダンマル樹脂の *in vivo* 変異原性および発がん修飾作用の検討. 第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市 (2011 年 1 月)

山田貴宣、魏 民、豊田武士、金川明裕、仲谷慎也、星 学、鰐淵英機：新規野菜ラファノブラシカによるピロリ菌誘発胃炎の抑制. 第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市 (2011 年 1 月)

山野莊太郎、魏 民、梯 アンナ、多胡善幸、丁 奎光、陳 慶義、鰐淵英機：マウス肺扁平上皮癌の早期発癌過程における気管支肺胞幹細胞の関与. 第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市 (2011 年 1 月)

山田貴宣、魏 民、梯 アンナ、山野莊太郎、鰐淵英機：ジフェニルアルシン酸による肝発がん促進作用及びその機序. 第 10 回分子予防環境医学研究会、京都市 (2011 年 1 月)

金川明裕、魏 民、吉田 香、圓藤吟史、鰐淵英機：ヒ素膀胱発がんの原因物質の検索：新規ヒ素代謝物ジメチルモノチオアルシン酸の産生経路の解明およびその膀胱上皮細胞に及ぼす影響の検討. 第 16 回ヒ素シンポジウム、旭川市 (2011 年 2 月)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし