

201131009A

厚生労働科学研究費補助金

食品の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物質の
評価法に関する研究

平成23年度 総括研究報告書

主任研究者 能美 健彦

平成24 (2012)年3月

厚生労働科学研究費補助金

食品の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物質の
評価法に関する研究

平成23年度 総括研究報告書

主任研究者 能美 健彦

平成24 (2012)年3月

目 次

I. 研究報告	
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	----- 1
能美健彦	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 46
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 50

平成 23 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
総括研究報告書

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

主任研究者： 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

一般に発がん物質は、遺伝毒性に基づき発がん性を示す遺伝毒性発がん物質と、ホルモン作用のように非遺伝的なメカニズムで発がんを促進する非遺伝毒性発がん物質に分類される。非遺伝毒性発がん物質については、閾値が存在し、閾値以下の用量であれば使用が認められるのに対し、遺伝毒性発がん物質については、その作用には閾値がないと考され、食品添加物等に発がん性が認められた場合、その作用機序に遺伝毒性が関与していると、一日許容摂取量は設定されず、その使用は禁止となる。だが、ヒトはさまざまな生体防御機能（解毒代謝、DNA 修復、損傷部位の乗り越え DNA 合成等）を備えており、これらが低用量での遺伝毒性物質の作用を抑制し「実質的な閾値」を形成する可能性が考えられる。本研究では、生体防御機能の「実質的な閾値」形成への関与の可能性を検討することを主な目的とする。平成 23 年度は、解毒代謝に関連する *Nrf2* 欠損マウス（青木）、DNA 修復に関連する *Mutyh* 欠損マウス（續）、乗り越え DNA 合成に関わる *Polζ* 欠損ヒト細胞（能美）の発がん感受性あるいは変異感受性について検討した。またヒト細胞染色体の特定箇所へ 1 分子の 8-オキソグアニンを導入する手法を開発し、超低用量域における変異誘発の可能性について検討した（安井）。さらに次世代 DNA シークエンサーを用いてゲノム配列を解読することにより、直接、変異を検出する可能性（山田）、またミスマッチ修復蛋白質を用いて DNA 損傷を検出する手法について検討した（松田）。さらに、これらの研究成果を内外に公開し討論を促進するため、国外から 4 名、国内から 6 名（うち 3 名は当研究班の班員）を招へいし、平成 23 年 11 月 23 日に「第二回遺伝毒性発がん物質の閾値に関する国際シンポジウム」を開催した。

キーワード： 遺伝毒性発がん物質、閾値、DNA 修復、解毒代謝、損傷部位の乗り越え DNA 合成、食品添加物

分担研究者

青木康展	国立環境研究所、環境リスク 研究センター、副センター長
續 輝久	九州大学大学院医学研究院 教授
安井 学	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 主任研究官
山田雅巳	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
松田知成	京都大学工学研究科 准教授

A. 研究目的

遺伝毒性発がん物質とは、DNA と反応することにより突然変異や染色体異常を誘発し、発がん作用を示す物質であり、遺伝毒性発がん物質の作用には、閾値は存在しないと考えられている。このため、食品添加物等に発がん性と遺伝毒性が認められた場合には、原則的に一日摂取許容量 (acceptable daily intake=ADI) は設定されず使用が禁止となる。環境汚染物質等、当該物質への曝露が不可避な遺伝毒性発がん物質については、閾値がないことを前提に、数理モデルを用いて発がんリスクが推定される。

しかしヒトを含む生物には、自らのゲノム DNA を守るための種々の防御機能や生体防御物質が存在しており、これらの生体防御機能や防御物質が、低用量の遺伝毒性発がん物質の作用を抑制し、「実質的な閾値」を形成する可能性が考えられる。遺伝毒性発がん物質が生体に取り込まれたとしても、抗酸化物質等により不活化されたり、グルタチオン抱合酵素やグルクロン酸抱合酵素などの解毒酵素により、代謝的に不活化され体外へと排泄される可能性が考えられる。さらに DNA に反応したとしても、DNA 修復酵素や、損傷部位を乗り越えて複製を続けるトランスレージョン DNA 合成 (以下 TLS

と略)、また DNA 損傷を受けた細胞を死に至らしめて個体としての恒常性を保つアポトーシスなどが、遺伝毒性発がん物質の作用を抑制し、実質的な閾値を形成している可能性が考えられる。

本研究では、解毒代謝能を欠損した *Nrf2* 欠損マウス、DNA 修復能を欠損した *Mutyh* 欠損マウス、TLS 活性に関わる DNA ポリメラーゼを欠損した *Pol* を欠損ヒト細胞を用いて、生体防御機能が「実質的な閾値」形成に寄与する可能性を検討することを主な目的とする。また 1 分子の酸化 DNA 損傷をヒト染色体の特定箇所を導入する手法を開発することにより、1 分子の DNA 損傷が変異に結びつくか否かを検討する。さらに次世代 DNA シークエンサー、ミスマッチ修復蛋白質による新規な変異検出法の開発についても検討する。

今年度は、小麦粉の改良剤として使用されている臭素酸カリウム ($KBrO_3$) を、*Nrf2* 欠損マウスと野生型マウスに飲水投与し、*Nrf2* 欠損マウスが高い致死感受性を示すことを確認した (青木)。*Mutyh* 欠損マウスの $KBrO_3$ に対する発がん感受性を低用量域において検討し、用量効果関係を検討することにより、*Mutyh* 以外にも $KBrO_3$ に対する「事実上の閾値」に関与している可能性を示唆した (續)。また TLS 活性を欠損した *Pol* を欠損ヒト細胞が多様な遺伝毒性発がん物質に対して高い感受性を示すことを明らかにした (能美)。さらに 1 分子の 8-オキソグアニン (8-oxo-Gua) をヒト染色体の特定箇所を導入する手法を確立し、閾値の可能性について論議した (安井)。次世代 DNA シークエンサー、ミスマッチ修復蛋白質によるゲノム解析、DNA 損傷分析を行う手法を検討した (山田、松田)。これらの研究を国内外に発信し、討論を深めるため、平成 23 年 11 月 23 日に東京において「第二回遺伝毒性発がん物質の閾値に関する国際シンポジ

ウム」を開催し、約 200 名の参加者を得た。

B. 研究方法

1) *Nrf2* ノックアウト *gpt delta* マウスへの KBrO_3 の投与

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* (+/-) マウスを作出した。これを *gpt delta* マウスと交配して *Nrf2* (+/-) *gpt* (+/+) マウスを作成し、さらに交配により、*Nrf2* (-/-) *gpt* (+/+) マウスを作成した。 KBrO_3 (シグマ社製) を投与直前にイオン交換水に 0.2、0.6 あるいは 2g/L の用量に溶解して、6 週齢目から 28 日間飲水投与した (青木)。

2) *Mutylh* 欠損マウスの KBrO_3 に対する感受性の検討

C57BL6/J の遺伝的背景を持つ *Mutylh* 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 *Mutylh* 遺伝子欠損マウスと対照群の野生型マウスを得た。 KBrO_3 (シグマ社製) を純水に溶解し、0.05% 溶液を調製後濾過滅菌し、16 週間自由に飲水させた。消費量については週一回モニターした。発がん実験は、マウスを安楽死させた後、腸管を摘出し 10%ホルマリンで固定後、固定液を 70%に置き換え、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作製し、病理解析を行った (續)。

3) *Polζ* ノックアウトヒト細胞株の樹立と細胞毒性試験

Polζ ノックアウト (KO) 細胞樹立のため *POLZ* (REV3) 遺伝子のエキソン 5 を除くようなターゲティングベクターをエレクトロポレーションにより、ヒトプレ B 細胞

由来の nalm-6 細胞へトランスフェクションし、ハイグロマイシン耐性、ピューロマイシン耐性により、導入遺伝子が染色体上に組み込まれた株をスクリーニングした。染色体上に組み込まれた薬剤耐性遺伝子は、Cre 部位特異的組換え酵素を一過的に発現させることにより除去した。細胞毒性試験には、 KBrO_3 、ベンツピレン ジオールエポキシド (BPDE)、マイトマイシン C (MMC)、*N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン (MNNG) を用いた。薬剤存在下、48 時間、インキュベーター内で培養し、培養後、生存率を測定した。生存率は、ミトコンドリアの脱水素酵素による水溶性ホルマザンの生成量を測定する MTS ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) アッセイにより求めた。(能美)。

4) 8-Oxo-Gua を部位特異的に導入したヒト細胞の樹立と変異頻度の測定

8-Oxo-Gua を特定箇所に導入した直鎖状二本鎖プラスミド (pYTK15^{oxo})、あるいは正常塩基 Gua が入ったコントロールターゲティングベクター (pYTK) 2 μg を、5 × 10⁶ cells/100 μL に調整した TSCER122 細胞に、I-SceI を発現させるベクター (pCBASCE) 50 μg と共にトランスフェクション (Amasa 社製 Cell Line Nucleofactor kit) し、75 cm² の培養フラスコで 3 日間培養 (37°C, 5% CO₂) した。次に、その細胞を 5 × 10³ cells/mL に調製し、HAT 試薬を添加後、96 穴プレート上 (1000 cells/well) でさらに 2 週間培養することによって、復帰細胞のクローン (*TK*+/-) を回収した。その後、各クローンのゲノム DNA を抽出し、8-Oxo-Gua 部位だった周辺のシーケンスを行い、8-Oxo-Gua の突然変異誘スペクトルおよび頻度を決定した (安井)。

5) DNA シークエンサーによる大腸菌ゲノム変異の解析

Escherichia coli AB1157 (野生株; WT) の誘導株である YG2250 (*mutM/mutY* 二重欠損変異株; ΔMY) の単一コロニー4個をそれぞれ LB 培地 10 mL に接種し、24 時間培養した。その培養液の 20 μ L を新しい LB 培地 10 mL に接種することを 24 時間ごとに繰り返し、12 週間継代培養した。1 週間後、4 週間後、8 週間後、12 週間後に 4 本の培養液を 1 本にまとめて集菌し、ゲノム DNA を調製した。TruSeq DNA Sample Prep Kit (Illumina 社) を用いて、ゲノム DNA を断片化して、アダプターライゲーションを行い、アガロースゲル電気泳動で断片を切り出して DNA ライブラリーを調製した。DNA シークエンス解析は、HiSeq2000 を用い、ペアエンド法、解析スケールは 1 レーン当たり 4 サンプルで 1 レーン、読み取り塩基長は 1 リードで 100 塩基 \times 2、総取得データ量は 1 サンプル当たり 5 ギガ (5 \times 10⁹) 塩基以上である (山田)。

6) ミスマッチ修復蛋白質 MLH1 と相互作用する蛋白質の検索

N 末端に FLAG-HA タグをつないだ MLH1 を発現する HeLa S3 細胞を 0.9 mM メチルニトロソ尿素 (MNU) に 24 時間曝露した後、アガロースビーズに結合した抗 FLAG M2 抗体を用いて、核、細胞質の抽出物から、MLH1 複合体を免疫沈降し、FLAG ペプチドで溶出した。SDS-PAGE で MLH1 複合体の構成タンパク質を分離し、バンドごとに切り出した。ゲル内トリプシン消化後、生成したペプチド断片を、nanoLC-ESI-Q-ToF 型質量分析計を用いて解析し、MLH1 と相互作用する蛋白質を同定した (松田)。

(倫理面への配慮)

本研究は、培養細胞、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* (+/+) マウスの KBrO₃ に対する感受性

Nrf2(-/-) *gpt delta* マウス 3 匹に臭素酸カリウムを飲水投与したところ、2g/L 群においては、1 匹が投与 3 週目に死亡した。死亡したマウスを病理解剖したところ、肝小葉中心で実質細胞の膨大と小腸絨毛の上皮細胞での軽微な空胞形成が観察された。2g/L 投与群で死亡例が出たことから、0.6 g/L を *Nrf2*(-/-) *gpt delta* マウスへの投与用量とした。また、これらの結果より、*Nrf2* 欠損により臭素酸カリウムへの感受性が高くなることが明らかになった (青木)。

2) *Mutyh* 欠損マウスの KBrO₃ に対する感受性の検討

遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討するため、従来から用いてきた用量より低用量の 0.05% KBrO₃ を経口投与して発がん実験を行った。0.05% KBrO₃ を投与された *Mutyh* 遺伝子欠損マウス 9 匹の小腸には、腫瘍の発生を認めなかった。前年度までに行った 0.1% および 0.2% 臭素酸カリウムを *Mutyh* 遺伝子欠損マウスに経口投与して行った発がん実験のデータと共に表 1 にまとめて示す (續)。

表1 Mutyh欠損マウスにおけるKBrO₃誘発小腸腫瘍の発生頻度

No of Mutyh mice	KBrO ₃ (%)	No of tumor/mouse (mean±SD)
9	0.05	0
4	0.1	9.0±8.3
4	0.2	60.8±35.0

3) Pol ζ KO ヒト細胞株の遺伝毒性物質に対する感受性

Pol ζ KO 株は、BPDE、MMC、KBrO₃、MNNG に対して高い致死感受性を示した(図1)(能美)。

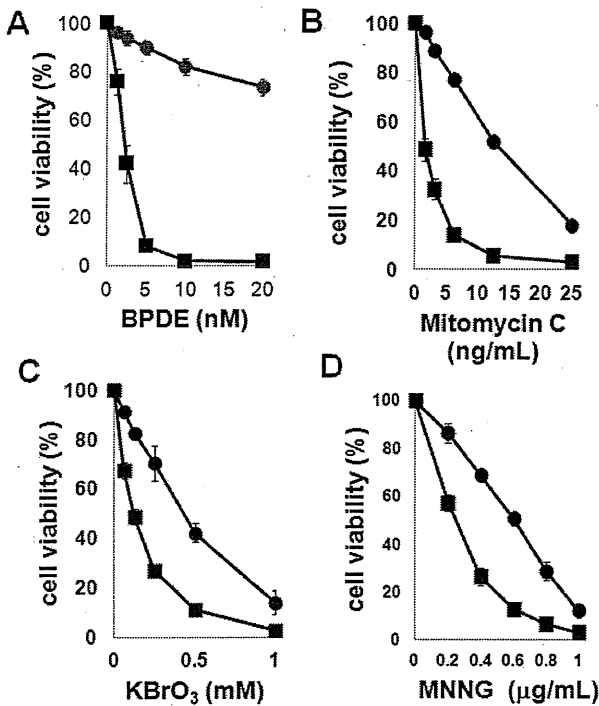


図1 野生型と KO 細胞株の BPDE (A)、MMC (B)、KBrO₃ (C) および MNNG (D) に対する致死感受性の比較。(●), 野生型細胞; (■), KO 細胞

4) 染色体中に導入した1分子の8-oxo-Guaが誘発する変異

8-Oxo-Gua が導入された部位周辺をシーケンスした結果、668 細胞中 526 から正常塩基 Gua (79%) が検出されたが、60

から G:C → T:A (9.0%), 18 から G:C → C:G (2.7%)、23 から一塩基欠失 (3.4%) が検出された。その他(2.2%)として、一塩基挿入や G:C → A:T 塩基置換も低頻度で見つかった。1分子の8-Oxo-Gua は、17.3%の頻度で各種点突然変異を誘発することが判明した。一方、コントロールとして pYTK15 を導入した時は、ほとんど点突然変異は検出されなかった(安井)。

4) 大腸菌ミューテーター株の変異スペクトル

1、4、8、12週目に同定された変異の数は、順に34、41、51、50個で、増加傾向にあった。同一箇所起きた変異を1つの変異と考えると88個の変異が同定され、そのうち塩基置換は47個だった(47/88=53%)。塩基置換の中ではG:C塩基対の変異が41個と大半を占め、最も多かったのはG:CからT:Aへのトランスバージョン(34個)で、塩基置換の70%を占めた。残りの41個は挿入または欠失で、挿入は34個のうち29個が1塩基の挿入であった。挿入のうち80%は、GまたはCの挿入であった。これに対して、欠失は7個全部が2塩基以上の欠失であった(山田)。

5) ミスマッチ修復蛋白質複合体の解析

MNUに曝露された細胞の核および細胞質に存在するMLH1複合体を解析した。その結果、MLH1と相互作用する蛋白質はMNU処理により大きく変化し、処理時に核においてMLH1はBRCA1、FANCI、MSH2、MSH6などのDNA修復酵素と相互作用することが示された。細胞質のMLH1はCdc2、CDK2、PA2G4などの細胞周期に関わる蛋白質、BAXやCASP9、NFkB2などのアポトーシスに関わる蛋白質と相互作用することが示された(松田)。

6) 第二回遺伝毒性発がん物質の閾値に関する

る国際シンポジウムの開催

本研究班の研究成果を国内外に公表するとともに、他の研究者との意見交換を促進するため、平成23年11月23日に一橋記念講堂（東京都千代田区）において「第二回遺伝毒性発がん物質の閾値に関する国際シンポジウム」を開催した。講演者として、国内から6名（うち3名は本研究班班員）、国外から4名（米国2名、スイス1名、英国1名）を招へいた。約200名の参加を得て、活発な論議が交わされた。

D. 考 察

Nrf2は第2相薬物代謝酵素や抗酸化蛋白質の遺伝子発現に必須な転写因子である。Nrf2が欠損すると、薬物代謝酵素や抗酸化酵素の発現が低下し「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マウスを、小腸での発がん実験の標準投与量（2g/L）で4週間投与すると死亡例が認められた。一方、野生型マウスでは死亡例は認められなかった。これらの結果は、Nrf2の欠損により、KBrO₃への感受性が上昇したことを示すものであり、この感受性の上昇は、KBrO₃投与による発生する活性酸素種への感受性が上昇したことによると考えらる。Nrf2-KO *gpt delta* マウスは、活性酸素種に対する閾値を決定する上で適切な実験系である可能性が示された（青木）。

前年度までに行った小規模な発がん実験の結果では、0.2%臭素酸カリウムを投与された *Mut*yh 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は1個体当たり 60.8 ± 35.0 で、0.1%臭素酸カリウムを投与された *Mut*yh 遺伝子欠損マウスの平均腫瘍発生頻度は1個体当たり 9.0 ± 8.3 で、0.2%臭素酸カリウム投与群と比較すると、約6.7分の1に減少していたが、顕著な腫瘍発生頻度の上昇が認められた。今回の実験で明らかになったように、0.05%臭素酸

カリウム投与群では全く腫瘍の発生が認められなかった。これらの結果は、*Mut*yh 遺伝子が欠損した個体でも酸化剤の発がん性に関して「閾値」が存在することを示唆している（續）。

今回、hPol ζ KO細胞を樹立し、各種の遺伝毒性発がん物質に対する致死感受性について野生型株と比較を行い、KO細胞株がBPDE、MMC、KBrO₃、MNNGに対して野生型株よりも高い感受性を示すことを明らかにした。以上の結果は、hPol ζ が、遺伝毒性物質により誘発される多様なDNA損傷のTLSに幅広く関与していることを示唆している。昨年度に樹立したhPol κ KO株は、H₂O₂において野生型と比較して生存率が有意に低下していた。今回、hPol ζ KO細胞を用いてH₂O₂に対する感受性を検討したが、hPol ζ KO細胞は野生型細胞と同程度の感受性を示した。これらの結果は、酸化ストレスに対するDNA防御に関して、異なったPolが関与していることを示唆している（能美）。

極低用量の酸化的な暴露を想定し、1分子の8-Oxo-Guaをヒト培養細胞のゲノムに導入して、その細胞に与える遺伝的な影響を調べた。その結果、わずか1分子のDNA付加体であっても、約20%の確率で突然変異を誘発することを明らかにした。これは、“遺伝毒性発癌物質の作用には絶対的な閾値が無い”という従来からの考え方を支持している。一方、約80%の8-Oxo-Guaは変異を起こさなかった。これはDNA修復により8-Oxo-Guaが除去されたり、誤りのないトランスリージョンDNA合成により8-Oxo-Guaの向かい側にCが挿入された可能性が考えられる。約80%の8-Oxo-Guaが変異に結びつかなかったという結果は、「実際的な閾値の存在」を示唆しており、この「実際的な閾値」の形成には、DNA修復や誤りのないトランスリージョンDNA合成が関与している可能性を示している（安井）。

YG2250 株が欠失している *mutM/mutY* 遺伝子は 8-Oxo-Gua に対する修復酵素をコードしており、G から T へのトランスバージョン変異が増大すると予想された。実際、G から T へのトランスバージョン変異は塩基置換変異の約 70% をしめる。予想に反して、+G の挿入変異が 1 週目から増加しており、その生成機構に興味を持たれる (山田)。

MNU の曝露により DNA 損傷が起こると、MLH1 の一部は、核から細胞質に移行し、細胞周期やアポトーシスに関連する多様な複合体を形成することが示唆された (松田)。

E. 結論

解毒代謝 (*Nrf2*)、DNA 修復 (*Mutyh*)、TLS (*POL2*) に関与する遺伝子を不活化させたマウスあるいはヒト細胞を用い、遺伝毒性物質に対する感受性を検討し、それぞれが感受性要因として重要な役割をはたし、遺伝毒性発現に関する「事実上の閾値」形成に関与している可能性を示唆した。また 1 分子の 8-Oxo-Gua をヒト細胞の特定箇所に導入する技術を確立し、その変異頻度を測定した。さらに次世代 DNA シークエンサーによる変異検出法、ミスマッチ修復蛋白質の DNA 損傷に基づく挙動変化について検討した。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) A. Furuhashi, K. Hasunuma, Y. Aoki, Y. Yoshioka and H. Shiraishi, Application of chemical reaction mechanistic domains to an ecotoxicity QSAR model, the KASHINhou Tool for Ecotoxicity (KATE). SAR QSAR Environ. Res., 22, 505-523 (2011)
- 2) J. Kawahara, C. Tanaka, C. Tanaka, Y. Aoki and J. Yonemoto, Estimation of daily inhalation rate in preschool children using a tri-axial accelerometer: a pilot study. Sci. Total Environ. 409, 3073-3077 (2011)
- 3) 青木康展 改正「化審法」の施行 フォルマシア 47(9) 895-870 (2011).
- 4) T.-H. Lim, R. Fujikane, S. Sano, R. Sakagami, Y. Nakatsu, T. Tsuzuki, M. Sekiguchi and A. Hidaka, Activation of AMP-activated protein kinase by MAP01 and FLCN induces apoptosis triggered by alkylated base mismatch in DNA. DNA Repair, 11, 259-266 (2012)
- 5) T. Tsuzuki, J. Piao, T. Isoda, K. Sakumi, Y. Nakabeppu and Y. Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice (Note). Health Physics, 100, 293-294 (2011)
- 6) 大野みずき, 續輝久, DNA 修復酵素遺伝子-酸化的 DNA 損傷の修復系を中心として-, 「疾患モデルマウス表現型解析指南-標準解析から専門解析まで」(山村研一/若菜茂晴 編), 中山書店, pp. 339-345, pp. 466-467 (2011)
- 7) T. Kamigaito, T. Noguchi, K. Narumi, R. Takashima, S. Hamada, H. Sanada, M. Hasuko, H. Hayashi, K. Masumura and T. Nohmi, Evaluation of the *in vivo* mutagenicity of nickel subsulfide in the lung of F344 gpt delta transgenic rats exposed by intratracheal instillation: A collaborative study for the *gpt* delta transgenic rat mutation assay, Genes and Environ., in press.

- 8) H. Sui, R. Ohta, T. Shiragiku, A. Akahori, K. Suzuki, M. Nakajima, H. Hayashi, K. Masumura and T. Nohmi, Evaluation of *in vivo* mutagenicity by 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene in liver of F344 *gpt* delta transgenic rat dosed for 28 days: a collaborative study of the *gpt* delta transgenic rat mutation assay, *Genes and Environ.*, in press.
- 9) Y. Kawamura, H. Hayashi, O. Tajima, S. Yamada, T. Takayanagi, H. Hori, W. Fujii, K. Masumura and T. Nohmi, Evaluation of the genotoxicity of aristolochic acid in the kidney and liver of F344 *gpt* delta transgenic rat using a 28-day repeated-dose protocol: a collaborative study of the *gpt* delta transgenic rat mutation assay, *Genes and Environ.*, in press.
- 10) M. Jin, A. Kijima, Y. Suzuki, D. Hibi, T. Inoue, Y. Ishii, T. Nohmi, A. Nishikawa, K. Ogawa and T. Umemura, Comprehensive toxicity study of safrole using a medium-term animal model with *gpt* delta rats, *Toxicol.*, 290, 312-321 (2011)
- 11) N. Toyoda-Hokaiwadol, Y. Yasui, M. Takamune, M. Yamada, M. Muramatsu, K. Masumura, M., T. Ohta, T. Tanaka and T. Nohmi, Modulatory effects of capsaicin on N-diethylnitrosamine (DEN)-induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* YG7108 and DEN-induced hepatocarcinogenesis in *gpt* delta transgenic rats, *Genes and Environ.*, 33, 160-166 (2011)
- 12) N. Toyoda-Hokaiwadol, Y. Yasui, M. Muramatsu, K. Masumura, M. Takamune, M. Yamada, T. Ohta, T. Tanaka and T. Nohmi, Chemopreventive effects of silymarin against 1,2-dimethylhydrazine plus dextran sodium sulfate-induced inflammation-associated carcinogenicity and genotoxicity in the colon of *gpt* delta rats, *Carcinogenesis*, 32, 1512-1517 (2011)
- 13) D. Hibi, Y. Suzuki, Y. Ishii, M. Jin, M. Watanabe, Y. Sugita-Konishi, T. Yanai, T. Nohmi, A. Nishikawa and T. Umemura, Site-specific *in vivo* mutagenicity in the kidney of *gpt* delta rats given a carcinogenic dose of ochratoxin A, *Toxicol. Sci.*, 122, 406-414 (2011)
- 14) A. Yamamoto, Y. Sakamoto, K. Masumura, M. Honma and T. Nohmi, Involvement of mismatch repair proteins in adaptive responses induced by *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine against γ -induced genotoxicity in human cells, *Mutat. Res.*, 713, 56-63 (2011)
- 15) N. Koyama, M. Yasui, A. Kimura, S. Takami, T. Suzuki, K. Masumura, T. Nohmi, S. Masuda, N. Kinase, T. Matsuda, T. Imai and M. Honma, Acrylamide genotoxicity in young versus adult *gpt* delta male rats, *Mutagenesis*, 26, 525-529 (2011)
- 16) A. Sassa, T. Ohta, T. Nohmi, M. Honma and M. Yasui, Mutational specificities of brominated DNA adducts catalyzed by human DNA polymerases, *J. Mol. Biol.*, 406, 679-686 (2011)
- 17) P. Hakulinen, A. Yamamoto, N. Koyama, W. Kumita, M. Yasui and M. Honma, Induction of TK mutations in human lymphoblastoid TK6 cells by the rat carcinogen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX). *Mutat. Res.*

725, 43-49 (2011)

- 18) H. Sugimura, H. Tao, M. Suzuki, H. Mori, M. Tsuboi, S. Matsuura, M. Goto, K. Shinmura, T. Ozawa, F. Tanioka, N. Sato, Y. Matsushima, S. Kageyama, K. Funai, P.H. Chou and T. Matsuda, Genetic susceptibility to lung cancer, *Front Biosci (Schol Ed)* 3, 1463-1477 (2011)
 - 19) K. Shinmura, M. Goto, M. Suzuki, H. Tao, H. Yamada, H. Igarashi, S. Matsuura, M. Maeda, H. Konno, T. Matsuda and H. Sugimura, Reduced expression of MUTYH with suppressive activity against mutations caused by 8-hydroxyguanine is a novel predictor of a poor prognosis in human gastric cancer, *J. Pathol.*, 225, 414-423 (2011)
 - 20) S. Matsuda, S. Matsui, Y. Shimizu and T. Matsuda, Genotoxicity of colloidal fullerene C(60), *Environ. Sci. Technol.*, 45, 4133-4138 (2011)
 - 21) K. Kato, E. Yamamura, M. Kawanishi, T. Yagi, T. Matsuda, A. Sugiyama and Y. Uno, Application of the DNA adductome approach to assess the DNA-damaging capability of in vitro micronucleus test-positive compounds, *Mutat. Res.*, 721, 21-26 (2011)
- ASSOCIATION OF THEORETICAL AND COMPUTATIONAL CHEMISTS WATOC 2011 Santiago de Compostela, Spain July 2011
- 2) 古濱彩子, 青木康展, 白石寛明, 部分電荷に基づく毒性予測 QSAR 式の開発 第 39 回構造活性相関シンポジウム, 野田 November 2011.
 - 3) 青木康展, 松本理, 能美健彦, 大気汚染物質による *gpt delta* マウス肺中の突然変異とヒト肺がん組織中 p53 遺伝子の突然変異の比較, 日本環境変異原学会第 40 回大会, 東京 (2011.11)
 - 4) Y. Aoki, Health risk assessment of air pollutants: Air pollutant genotoxicity and its enhancement on suppression of phase II drug-metabolizing enzymes. 2nd International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds, Tokyo, November 23, 2011.
 - 5) 大野みずき, 中西恵美, 續輝久, マウス小腸における放射線誘発酸化損傷塩基の解析, 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜 (2011.12)
 - 6) 中津可道, 朴晶淑, 松本載恭, 磯田拓郎, 作見邦彦, 中別府雄作, 續輝久, 酸化 DNA 損傷修復系の異常と発がん, 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜 (2011.12)
 - 7) T. Tsuzuki, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of Mutyh-deficient mice: the effect of low-level exposure to KBrO₃, 2nd International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds, Tokyo, November 23, 2011..
 - 8) 大野みずき, 中西恵美, 續輝久, マウス腸管における放射線誘発酸化 DNA 損傷の解析, 日本環境変異原学会第 40 回

2. 学会発表

- 1) A. Furuhashi, Y. Aoki, H. Shiraishi, A reaction between alpha beta unsaturated carbonyl chemical substance, a water molecule, and thiol moiety in biomolecule: aiming to eco-toxicity prediction. Ninth Triennial Congress of the WORLD

- 大会, 東京 (2011.11)
- 9) 大野みずき, 中西恵美, 續輝久, マウス小腸における放射線誘発酸化損傷塩基の解析, 日本放射線影響学会第54大会, 神戸 (2011. 11)
 - 10) 大野みずき, 作見邦彦, 古市正人, 中西恵美, 續輝久, 中別府雄作, 8-oxoguanine はDNA 鎖切断を誘発することで減数分裂期の相同染色体組換え頻度を上昇させる, 日本遺伝学会第83会大会, 京都 (2011. 9)
 - 11) T. Tsuzuki, J. Piao, N. Matsumoto and Y. Nakatsu, Antitumorigenic effects of p53 and mismatch DNA repair system on oxidative stress-induced intestinal tumors in mice, 14th International Congress of Radiation Research, Warszawa, Poland August 28 - September 1, 2011.
 - 12) M. Ohno, M. Nakanish and T. Tsuzuki, A study of radiation-induced oxidative DNA damage and its repair in mouse tissues, 14th International Congress of Radiation Research, Warszawa, Poland August 28 - September 1, 2011.
 - 13) T. Nohmi, K. Masumura, P Gruz, N. Toyoda-Hokaiwado, M. Takamune, N. Niimi, T. Suzuki, Y. Kanemaru, M. Yasui, M. Yamada, M. Honma, N. Adachi and A. Nishikawa, Genotoxic thresholds: identification of mutations in vivo and mechanistic studies in vitro, 2nd International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds, Tokyo, November 23, 2011.
 - 14) A. Yamamoto, Y. Sakamoto, K. Masumura, M. Honma and T. Nohmi, Critical roles of mismatch repair proteins in modulation of genotoxicity of gamma-irradiation in human cells by pretreatments with *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine at low doses, 14th International Congress of Radiation Research, Warszawa, Poland August 28 - September 1, 2011.
 - 15) 張 雪, 堀端克良, 西條将文, 石上智愛, 鵜飼明子, 菅野新一郎, Neilan, E. G., 田原栄俊, 本間正充, 能美健彦, 安井 明, 田中亀代次, 転写と共役したDNA修復機構を欠損する紫外線高感受性症候群の原因遺伝子の同定, 第34回日本分子生物学会年会, 横浜 (2011.12)
 - 16) 西條将文, 張 雪, 堀端克良, 石上智愛, 鵜飼明子, 菅野新一郎, 田原栄俊, Neilan, E. G., 本間正充, 能美健彦, 安井 明, 田中亀代次, 転写と共役したDNA修復機構においてUVSSAとUSP7は協調的にCSBを安定化する, 第34回日本分子生物学会年会, 横浜 (2011.12)
 - 17) 鈴木哲矢, 兼丸祐紀, 豊田 (外岩戸) 尚美, 増村健一, ピーター・グルーズ, 足立典隆, 本間正充, 能美健彦, 酸化的損傷を持つDNAを乗り越える際の損傷乗り越えDNAポリメラーゼの役割, 第34回日本分子生物学会年会, 横浜 (2011.12)
 - 18) 山田雅巳, 増村健一, 能美健彦, 次世代シーケンサーを用いた大腸菌ミューター株のゲノムに蓄積する突然変異の解析, 第34回日本分子生物学会年会, 横浜 (2011.12)
 - 19) 安井学, 佐々彰, 鴨下渚, 松田知成, 太田敏博, 能美健彦, 本間正充, 8-クロログアニンDNA付加体を含むオリゴマーの構築とその誤塩基対形成機構に関する研究, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011.11)

- 20) 須井哉, 川上久美子, 奥富弘子, 山田雅巳, 能美健彦, ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験法の検討7, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011. 11)
- 21) 高木久宜, 野崎祐次, 河田昭彦, 山田雅巳, 増村健一, 能美健彦, F344系 *gpt delta* ラットの6ヶ月飼育試験による背景データの取得, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011. 11)
- 22) 増村健一, 大杉直弘, 豊田尚美, 能美健彦, *gpt delta* マウスの加齢に伴う点突然変異および欠失変異の蓄積, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011. 11)
- 23) 堀端克良, 鵜飼明子, 木本崇文, 鈴木哲矢, 鴨下渚, 能美健彦, 本間正充, Pig-a アッセイとトランスジェニック突然変異試験の組合せに関する研究, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011. 11)
- 24) 内村有邦, 日高裕子, 増村健一, 能美健彦, 三浦郁生, 若菜茂晴, 八木健, マウスをモデルとした、高頻度に発生する生殖系列突然変異が次世代以降の個体に与える影響の解析, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011. 11)
- 25) 鈴木哲矢, Petr Grúz, 足立典隆, 本間正充, 能美健彦, 忠実度ないし活性を低下させたDNAポリメラーゼ ϵ を発現するヒト細胞株の樹立と遺伝毒性物質に対する感受性, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011. 11)
- 26) 兼丸祐紀, 鈴木哲矢, 新見直子, Petr Grúz, 松元郷六, 足立典隆, 本間正充, 能美健彦, DNAポリメラーゼ κ 遺伝子改変ヒト細胞を用いた遺伝毒性物質に対する感受性の検討, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011. 11)
- 27) 本山茂記, 竹入章, 和田直子, 寺社下浩一, 三島雅之, 新見直子, Petr Grúz, 増村健一, 山田雅巳, 能美健彦, MitomycinCによるDNA二本鎖切断の誘発に対するDNA polymerase κ の役割, 日本環境変異原学会第40回大会, 東京 (2011. 11)
- 28) 堀端克良, 増村健一, 能美健彦, 本間正充, *gpt delta* トランスジェニックマウス由来初代培養肝細胞を用いることで薬物代謝活性を考慮した *in vitro* 遺伝毒性試験, 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2011, 10)
- 29) 金美蘭, 鈴木裕太, 日比大介, 井上智紀, 石井雄二, 能美健彦, 西川秋佳, 梅村隆志, F344 *gpt delta* ラットを用いた包括的毒性試験法によるメチルオイケノールの *in vivo* 遺伝毒性の検索, 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2011, 10)
- 30) 増村健一, 大杉直弘, 豊田尚美, 高木久宜, 能美健彦, *gpt delta* マウスの肝臓及び精巣に蓄積する加齢に伴う点突然変異及び欠失変異の解析, 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2011, 10)
- 31) 大波冴子, 曹永晚, 豊田武士, 堀端克良, 本間正充, 能美健彦, 西川秋佳, 小川久美子, Glycidol と 3-MCPD 及びこれらのエステル化合物における Pig-A 遺伝子突然変異試験と小核試験を用いた *in vivo* 遺伝毒性学的検討, 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2011, 10)
- 32) 鈴木裕太, 木島綾希, 日比大介, 金美欄, 石井雄二, 能美健彦, 梅村隆志, 西川秋佳, Estragole のラットにおける発がん性および遺伝毒性の検討, 第38回日本トキシコロジー学会学術年会, 横浜 (2011, 7)
- 33) 金美欄, 鈴木裕太, 日比大介, 木島綾希, 石井雄二, 能美健彦, 西川秋佳, 梅村隆志, Safrole, piperonyl butoxide

- または estragole で処理した F344 ラットの肝臓における遺伝子発現プロファイルの比較, 第 38 回 日本トキシコロジー学会 学術年会, 横浜 (2011, 7)
- 34) 小山直己, 安井学, 木村葵, 高見成昭, 鈴木拓也, 増村健一, 能美健彦, 増田修一, 木苗直秀, 松田知成, 今井俊夫, 本間正充, *gpt delta* トランスジェニックラットを用いたライフステージ (週齢) を考慮したアクリルアミドの遺伝毒性評価, 第 38 回 日本トキシコロジー学会 学術年会, 横浜 (2011, 7)
- 35) Yasui, M., Sassa, A., Kamoshita, N., Matsuda, T., Ohta, T., Nohmi, T., and Honma, M.; Miscoding events during DNA synthesis past 8-chloroguanine DNA adduct. 日本環境変異原学会第 40 回大会 (2011. 11)
- 36) Yasui, M., Kamoshita, N., and Honma, M.; Tracking a single DNA adduct in targeted mutagenesis. 第 34 回日本分子生物学会 (2011. 12)
- 37) 山田雅巳、酸化ヌクレオチドの取り込みによる突然変異に関する DNA ポリメラーゼ、日本環境変異原学会第 40 回大会、シンポジウム 1 (2011. 11)
- 38) 堀妃佐子、下吉里実、藤居互、増村健一、山田雅巳、F344 系統 *gpt delta* ラットを用いた突然変異試験と末梢血小核試験の統合法の検討、日本環境変異原学会第 40 回大会 (2011. 11)
- 39) 竹内 智規, 松田 俊, 足立 淳, 服部 友美, 井倉 正枝, 井倉 毅, 松田 知成 (2011) BN/SDS-PAGE を用いた MLH1 複合体の解析, 日本環境変異原学会第 40 回大会 (2011. 11)
- 40) 宋 明芬, 李 云善, 河井 一明, 松田 知成, 葛西 宏 (2011) フリーラジカル機構を介した発がんプロモーター cumene hydroperoxide によるマウス皮膚 DNA のメチル化, 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2011, 10)
- 41) 石野 孔祐, 加藤 竜也, 松田 知成, 戸塚 ゆ加里, 中釜 斉 (2011) ナノマテリアルによりマウス肺に誘発される DNA 付加体の網羅的解析, 日本環境変異原学会第 40 回大会 (2011. 11)
- 42) 新村 和也, 五十嵐 久喜, 後藤 正憲, 陶 弘, 山田 英孝, 松浦 駿, 松田 知成, 小川 博, 梶村 春彦 (2011) ヒト肺癌における脱アミノ化酵素 AID の異常発現と変異誘導性, 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2011, 10)
- 43) 松田 俊, 足立 淳, 井原 賢, 田沼 延公, 島 礼, 井倉 正枝, 井倉 毅, 松田 知成 (2011) ピルビン酸キナーゼ PKM2 とダイオキシン受容体 AhR の相互作用の機能解明, 日本環境変異原学会第 40 回大会 (2011. 11)
- 44) 小山 倫浩, 余 旭勝, 辻 真弓, 田中 政幸, 松田 知成, 浦本 秀隆, 田中文啓, 川本 俊弘. (2011) エタノール摂取によるアルデヒド脱水素酵素 2 ノックアウトマウスの体重変動と生存率, 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2011, 10)
- 45) 加藤 杏子, 山田 勉也, 武藤 重治, 山村 英二, 松田 知成, 杉山 明男. (2011) ラットを用いた骨髄小核試験における DNA アダクトーム解析, 日本環境変異原学会第 40 回大会 (2011. 11)
- H. 知的所有権の取得状況
なし

平成23年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の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：DNA防御機能抑制条件下での体内突然変異の解析

分担研究者： 青木康展 独立行政法人国立環境研究所
環境リスク研究センター 副センター長

研究要旨

第2相薬物代謝酵素や抗酸化たんぱく質の発現が抑制された状態では、酸化ヌクレオチドなどのDNA付加体の生成が促進されて、突然変異発生頻度が上昇し、「実質的閾値」が低下する可能性がある。これを検証する実験系として、第2相薬物代謝酵素等の遺伝子発現に必須な転写因子であるNrf2が欠損した*gpt delta* マウス (Nrf2(-/-)*gpt*(+/+)) の作出を進めた。

Nrf2(-/-)マウスの活性酸素種への感受性を明らかにするために、酸化的DNA付加体の生成を亢進し、小腸で癌を生成することが知られる臭素酸カリウムを飲水投与した。標準的な用量(2 g/l)で4週間飲水投与したところ、Nrf2(-/-)-*gpt delta*では投与期間中に死亡個体が認められたため、投与用量の設定実験を行った。その結果、0.6 g/lを用量として設定して投与を行い、小腸発生した突然変異体頻度の解析を行った。

キーワード：遺伝毒性発がん物質、活性酸素種、Nrf2、ノックアウトマウス、*gpt delta* トランスジェニックマウス

A. 研究目的

薬物代謝酵素やDNA修復系などDNA防御機能が抑制された動物の臓器では、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、「実質的な閾値」が低下あるいは消失する可能性がある。

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を、遺伝子導入技術により欠損させたNrf2-KOマウスでは、薬物代謝酵素誘導をはじめとしたDNA付加体の生成を抑制する

機能が低下している。一方、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は、標的臓器で発生した突然変異を検出する最もよい方法である。この方法では、化学物質に曝露した動物の臓器からλファージDNA上に載せたレポーター遺伝子を、*in vitro*パッケージング法によりλファージ粒子として回収して大腸菌に感染させ、動物個体で起きた変異を、大腸菌を用いて検出する。また、検出された変異体をDNAシーケンス解析することで、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を明らかにでき、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。

本研究では、酸化ストレスを誘導することが知られる臭素酸カリウムの投与が、臭素酸カリウムによる発がんの標的臓器であるマウス小腸での突然変異頻度に及ぼす影響を解析した。

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*(+/-)マウスを作出した。次に、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法により遺伝型を決定し、選抜された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)を作出した。

投与実験に用いる動物を多数得るためには、出生数が少ないNrf2欠損マウスを母マウスとしないよう交配する必要がある。そこで、Nrf2(-/-) *gpt delta* マウスと対照動物であるNrf2(+/+) *gpt delta* マウス

の作出は、原則として♂Nrf2(-/-) *gpt*(+/+)と♀Nrf2(+/-) *gpt*(+/+)の交配、および♂Nrf2(+/-) *gpt*(+/+)と♀Nrf2(-/-) *gpt*(+/+)の交配により行った。

2) 遺伝型の決定

Nrf2 (+) の遺伝型は *Nrf2* 遺伝子の 5' 側と 3' 側をプローブとした PCR により、Nrf2 (-) の遺伝型は *Nrf2* 遺伝子の 5' 側と *Nrf2* 遺伝子をノックアウトに導入した *lacZ* 遺伝子をプローブとして PCR により増幅した産物 (それぞれ 700 bp と 400 bp) をゲル電気泳動により検出して同定した。

また、*gpt* 遺伝子については、*gpt*(+) は λ EG10 が導入されている 17 番染色体の配列を Forward、 λ EG10 の配列を Reverse とした PCR により、*gpt*(-) は 17 番染色体の配列を Forward と Reverse とした PCR 産物により (それぞれ 360 bp と 970 bp) 同定した。

3) 臭素酸カリウムの投与

臭素酸カリウム (シグマ社製) を投与直前にイオン交換水に溶解し、Nrf2(-/-)マウスへの投与用量設定には 0.2, 0.6 あるいは 2g/l の濃度で、Nrf2(-/-) *gpt*(+/+)マウスへの投与には 2g/l の用量で、6 週齢目から 28 日間飲水投与した。小腸、肝臓などの臓器は、酸化付加体測定と病理の観察には最終投与日の翌日に解剖し、採取した。*gpt* 変異体頻度測定には 2 週間後に臓器を採取した。小腸については、小腸上皮組織をセルスクレーパーで掻き取りゲノム DNA 抽出用の試料とした。採取した臓器や組織は -80°C 保存した。病理観察用の臓器は中性ホルマリンで直ちに固定した。

4) 病理観察

固定臓器をパラフィン包埋した後、顕微鏡観察用の組織切片を作成して、HE 染色、

および 4-hydroxynonenal の免疫染色を行った。

5) 8-oxo-dG など酸化 DNA 付加体の分析

小腸上皮組織を Pronase K と RNase A で消化した後、2-プロパノール沈殿によりゲノム DNA を得た。ヌクレオシドの質量分析を松田知成博士（京都大学）に依頼した。

6) *gpt* 変異体頻度 (MF) の測定と変異スペクトル解析

マウス臓器から 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-KO *gpt* delta マウスの作出

♂ Nrf2(-/-) *gpt*(+/+) と ♀ Nrf2(+/-) *gpt*(+/+) 8 ペアの交配の結果、Nrf2(+/-) ♂7 匹、♀6 匹、Nrf2(-/-) ♂13 匹、♀13 匹、および、♂Nrf2(+/-) *gpt*(+/+) と ♀Nrf2(-/-) *gpt*(+/+) 7 ペアの交配の結果、Nrf2(+/-) ♂9 匹、♀7 匹、Nrf2(-/-) ♂4 匹、♀14 匹の後代が作出され、雄マウスを投与実験に用いた。

2) 臭素酸カリウムの投与

昨年度の予試験として、長期間投与により癌が発症する用量である 2 g/l の臭素酸カリウムを 2 匹の ♂Nrf2(-/-) *gpt* delta マウスに飲水投与したところ、2 匹とも 4 週間の投与期間中に体重が減少し、死亡した。そこで、投与用量を設定するために 1 群 3 匹の Nrf2(-/-) マウスに臭素酸カリウムを 0.2, 0.6, 2 g/l の用量で、対照として 1 群 3 匹の Nrf2(+/-) マウスに 2 g/l の用量で投与した。

その結果、2 g/l を投与した Nrf2(-/-) マウスの内 1 個体が投与 3 週目で死亡した。そこで、0.6 g/l を Nrf2(-/-) *gpt* delta マウスへの投与用量とした。また、これらの結果より、Nrf2 欠損により臭素酸カリウムへの感受性が高くなることが明らかになった。

3) 病理観察

臭素酸カリウムを投与した Nrf2(-/-) マウスの臓器を HE 染色したところ、最高用量 (2 g/l) 投与の Nrf2(-/-) マウスにおいて肝小葉中心で実質細胞の膨大と小腸絨毛の上皮細胞での軽微な空胞形成が観察された。また、4-hydroxynonenal の免疫染色を行ったところ、同じく最高用量投与の Nrf2(-/-)

マウス肝で染色に陽性の小胞が肝実質細胞内に観察された。

4) DNA 付加体の生成

臭素酸カリウムを投与した Nrf2(-/-)マウスの小腸上皮組織から抽出したゲノム DNA に、8-oxo-dG, etheno-dA, 4-ONE-dG の生成は観察された。しかし、臭素酸カリウム投与、あるいは Nrf2 欠損に依存した有意な DNA 付加体量の増加は認められなかった。

5) *gpt* MF

1 群 5 匹の Nrf2(-/-) *gpt* delta マウス、および対照として 1 群 5 匹の Nrf2(+/+) *gpt* delta マウスに 0.6 g/1 の用量で臭素酸カリウムを 28 日間投与した。投与後、小腸上皮組織を回収し *gpt* アッセイにより突然変異体を解析した。

各群 3 個体の解析を行った段階では、Nrf2 欠損、および臭素酸カリウムの投与により、それぞれの対照群に比べて突然変異体発生頻度の上昇がみられたものの、統計的に有意ではなかった。(表 1)

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系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(-/-)マウスの臓器内では、活性酸素種の発生が亢進し、酸化 DNA 付加体の生成が上昇していると考えられた。そこで、Nrf2(-/-) *gpt* delta マウスに、8-oxodG を産生することが知られる臭素酸カリウムを経口投与し、標的臓器(小腸)における突然変異頻度がどの程度上昇するかを定量的

に明らかにしようとした。

臭素酸カリウムを小腸での発がん実験の標準投与量(2g/1)の用量で 4 週間投与したが、Nrf2(-/-)マウスに死亡例が認められた。また、病理観察の結果、最高用量(2g/1)投与の Nrf2(-/-)マウスにおいて肝小葉中心で実質細胞の膨大と小腸絨毛の上皮細胞での軽微な空胞形成が観察され、4-hydroxynonenal 染色により、陽性の小胞が肝実質細胞内に観察された。

これらの結果は、Nrf2 の欠損により、臭素酸カリウムへの感受性が上昇することを示すものであり、この感受性の上昇は、臭素酸カリウム投与による発生する活性酸素種への感受性が上昇したことによると考えられた。しかしながら、臭素酸カリウム投与、あるいは Nrf2 欠損に依存した有意な DNA 付加体量の増加は認められなかった。

Nrf2 欠損により、臭素酸カリウムへの感受性が上昇し、Nrf2-KO *gpt* delta マウスは、抗酸化酵素の活性が、活性酸素種への感受性と閾値決定への関与を検証するのに適切な実験系である可能性が示されたものの、その突然変異発生頻度に及ぼす影響を検出する条件は詳細に検討する必要がある。

E. 結 論

活性酸素種を誘導する化合物である臭素酸カリウムを Nrf2(-/-)マウスに投与すると死亡例が求められ、また、発がんの標的臓器である小腸などに病的変化が観察されたことから、Nrf2-KO *gpt* delta マウスは酸化ストレスに対する感受性が高く、酸化ストレスが亢進した状態での突然変異発生の解析に適した実験動物であると考えられる。

しかし、標準の投与用量である 2 g/1 では死亡例などの明確な影響が認められた。しかし、用量を 0.6 g/1 に下げ、標準の投与期間である 28 日間投与した場合には、

Nrf2 欠損、および臭素酸カリウムの投与による、対照群に比べた明確な *gpt* MF の上昇は観察されていない。今後は、突然変異頻度を解析すること、および、投与期間を3ヶ月に延長してより臭素酸カリウムの影響を観察し易くするなどの検討が必要である。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 22) Furuhashi A., Hasunuma K., Aoki Y., Yoshioka Y., Shiraishi H. (2011) Application of chemical reaction mechanistic domains to an ecotoxicity QSAR model; the KASHINHOU Tool for Ecotoxicity (KATE). SAR QSAR Environ. Res., 22, 505-523
 - 23) Kawahara J., Tanaka C., Tanaka C., Aoki Y., Yonemoto J. (2011) Estimation of daily inhalation rate in preschool children using a tri-axial accelerometer: a pilot study. Sci. Total Environ. 409, 3073-3077.
 - 24) 青木康展 改正「化審法」の施行 フォルマシア 47(9) 895-870.
2. 学会発表
 - 46) Furuhashi A., Aoki Y., Shiraishi H. (2011) A reaction between alpha beta unsaturated carbonyl chemical substance, a water molecule, and thiol moiety in biomolecule: aiming to eco-toxicity prediction. Ninth Triennial Congress of the WORLD ASSOCIATION OF THEORETICAL AND COMPUTATIONAL CHEMISTS WATOC 2011 Santiago de Compostela, Spain July 2011
 - 47) 古濱彩子、青木康展、白石寛明 部分電荷に基づく毒性予測 QSAR 式の開発 第39回構造活性相関シンポジウム 野田 November 2011.
 - 48) 松本理、青木康展、能美健彦、大気汚染物質による *gpt* delta マウスは意中の突然変異とヒト肺がん組織中 p53 遺伝子の突然変異の比較日本環境変異原学会 第40回大会 東京 November 2011.
 - 49) Aoki Y. Health risk assessment of air pollutants: Air pollutant genotoxicity and its enhancement on suppression of phase II drug-metabolizing enzymes. International Symposium on genotoxicity and carcinogenic thresholds. Tokyo November 2011.

H. 知的所有権の取得状況 特になし