

- Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology (2010. 2)
- 45) ピーターグルーズ、山田雅巳、高宗万希子、能美健彦、ヒト DNA ポリメラーゼ η をコードする大腸菌 *umuDC* 欠損株における紫外線による誘発突然変異の検出、日本環境変異原学会第 38 回大会 (2009. 11)
- 46) S. Muto, K. Kato, E. Yamamura, M. Kawanishi, T. Yagi, T. Matsuda, A. Sugiyama and Y. Uno (2009) Significance of DNA adductome analysis in in vitro micronucleus test, In 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM), p 120, Firenze, Italy.
- 47) T. Matsuda, H. Nagayoshi, M. Oka, Y. Yukawa, K. Hori, T. Kawamoto, M. Muto, and T. Oyama (2009) ALDH2 genotype is critical for DNA adducts formation in mice treated with alcohol and acetaldehyde, In 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM), p 200, Firenze, Italy.
- 48) S. Matsuda, S. Matsui and T. Matsuda (2009) Approach to toxicity evaluation of C60 fullerene using several in vitro methods, In 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM), p 213, Firenze, Italy.
- 49) N. Koyama, A. Kimura, M. Yasui, S. Takami, M. Takahashi, K. Inoue, M. Yoshida, T. Imai, M. Shibutani, T. Suzuki, A. Yamamoto, W. Kumita, K. Matsumura, K. Horibata, S. Masuda, N. Kinae, T. Matsuda, T. Nohmi, and M. Honma (2009) Child-adult differences in evaluation of *in vivo* genotoxicity of acrylamide, In 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM) p 212, Firenze, Italy.
- 50) M. Kawanishi, H. Nishida, H. Ishii, T. Kanno, T. Takamura, T. Matsuda, and T. Yagi (2009) Formation, DNA repair, and TLS of 3-nitrobenzanthrone-derived DNA adducts, In 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM) p 179, Firenze, Italy.
- 51) M. Ihara, M. Yasui, S. Matsui, Shibutani and T. Matsuda (2009) Frequent incorporation of formaldehyde derived N2-methyl-2'-deoxyguanosine triphosphate into DNA during DNA synthesis catalyzed by bacterial and mammalian DNA polymerase, In 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM) p 213, Firenze, Italy.
- 52) P.-H. Chou, S. Kageyama, S. Matsuda, K. Kanemoto, Y. Sasada, M. Oka, K. Shinmura, H. Mori, K. Kawai, H. Kasai, H. Sugimura and T. Matsuda (2009) Detection of lipid peroxidation-induced DNA adducts caused by 4-oxo-2-nonenal and 4-oxo-2-hexenal in human autopsy tissues, In 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM) p 157, Firenze, Italy.
- 53) J. Adachi, K. Kihara, and T. Matsuda (2009) Oxidative modificomics analysis of cysteine thiols, In 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM) p 199, Firenze, Italy.
- 54) 萩尾ら (2009) 大気汚染物質 3-ニトロベンズアントロンによる DNA 付加体の生成および修復の効率, In 日本環境変

- 異原学会第 38 回大会, 静岡.
- 55) 松田(2009) LC/MS/MS を用いた DNA 付加体の網羅的解析に関する研究, In 日本環境変異原学会第 38 回大会, 静岡.
- 56) 小山ら (2009) ライフステージ (週齢) を考慮したアクリルアミドの多臓器遺伝毒性評価, In 日本環境変異原学会第 38 回大会, 静岡.
- 57) M. Honma, W. Kumita and M. Sakuraba: Demonstration of ionizing irradiation inducing genomic instability via breakage-fusion-bridge cycle in human cells by CGH-microarray. Keystone symposia "Genome Instability and DNA Repair (2009. 3)
- 58) M. Honma, N. Koyama, A. Kimura, M. Yasui, S. Takami, M. Takahashi, T. Imai, Y. Yamamoto, W. Kumita, K. Masumura, S. Masuda, N. Kinae, T. Matsuda and T. Nohmi: Child-adult differences in evaluation of in vivo genotoxicity of acrylamide. 48th Annual Meeting for Society of Toxicology (2009. 3)
- 59) A. Kimura, H. Sakamoto, K. Saigo, T. Sukamoto and M. Honma: Establishment of simple in vitro Comet Assay Protocol. 48th Annual Meeting for Society of Toxicology (2009. 3)
- 60) M. Honma: DNA double strand break repair and genomic stability. The 14th Academic Conference of Chinese Environmental Mutagen Society (2009. 7)
- 61) M. Honma: The new ICH guidance on genotoxicity, The 5th National Congress of Chinese Society of Toxicology (2009. 8)
- 62) Y. Uno, H. Kojima, M. Honma, R. Tice, R. Corvi, L. Schechtman and M. Hayashi: In vivo Comet assay: update on going international validation coordinated by JaCVAM.
- 63) M. Yasui, N. Koyama, T. Koizumi, M. Sakuraba, Y. Takashima, M. Hayashi, K. Sugimoto and M. Honma: Life cycle of micronucleus analyzed by confocal live cell imaging. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009. 8)
- 64) N. Koyama, A. Kimura, M. Yasui, S. Takami, M. Takahashi, K. Inoue, M. Yoshida, T. Imai, M. Shibutani, T. Suzuki, A. Yamamoto, W. Kumita, K. Masumura, K. Horibata, S. Masuda, N. Kinae, T. Nohmi and M. Honma: Child-adult difference in evaluation of in vitro genotoxicity of acrylamide. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009. 8)
- 65) T. Suzuki, A. Kohara, A. Ramadan, Y. Kikuchi, M. Honma, and M. Hayashi: Comparative study of in vitro genotoxicity of ochratoxin A and aristolochic acid as a causative for Balkan endemic nephropathy. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009. 8)
- 66) M. Honma, K. Yamakage, B. Burlingson, P. Escobar, K. Pant, A. Kraynak, M. Hayashi, M. Nakajima, M. Suzuki, R. Corvi, Y. Uno, L. Schechtman, R. Tice, and H. Kojima: International validation study of the in vitro alkaline Comet assay. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009. 8)
- 67) Hirose, A., Kamata, T., Yamazaki, T., Sato, K., Yamada, M., Ono, A., Fukumoto, T., Okamura, H., Mirokuji, Y., and Honma, M.: Validation of the (Q)SAR combination approach for mutagenicity prediction of flavour chemicals. 10th

International Conference on Environmental Mutagens (2009.8)

- 68) Honma, M.: The new ICH guidance on genotoxicity International Conference on Environment, Occupational & Lifestyle Concern- Transdisciplinary Approach (2009.9)
- 69) 鈴木孝昌、小原有弘、小木美恵子、田邊思帆里、本間正充; 8 番染色体特異的 CGH アレイ解析による各種がん細胞株での c-myc 遺伝子増幅形式の解析, 第 68 回日本癌学会学術総会 (2009.10)
- 70) Honma M, Takashima Y, Sakuraba M, Koizumi T, Sakamoto H, and Hayashi M: DNA double strand break repair pathways and its dependence on cell cycle phases in human lymphoblastoid cells. Environmental Mutagen society 40th Annual Meeting (2009.10)
- 71) 本間正充; *In vitro* 遺伝毒性試験における最高用量と細胞毒性の評価, 日本環境変異原学会第 38 回大会 (2009.11)
- 72) 真田尚和、櫻田直美、米澤豊、入山昌美、本間正充; コルヒチン及び、ビンブラスチンのラット末梢血を用いた小核試験, 日本環境変異原学会第 38 回大会 (2009.11)
- 73) 小山直己、木村葵、安井学、高見成昭、高橋美和、井上薫、吉田緑、今井俊夫、渋谷淳、鈴木拓也、増村健一、堀端克良、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 (週齢) 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 38 回大会 (2009.11)
- 74) 安井学、小山直己、高島良生、林真、杉本憲治、本間正充; 共焦点ライブセルイメージングによって明らかとなった小核のライフサイクル, 日本環境変異原学会第 38 回大会 (2009.11)
- 75) 鈴木孝昌、小原有弘、ラマダンアリ、菊池裕、本間正充、林真; バルカン腎症の原因物質としてのアリストロキア酸およびオクラトキシン A, 日本環境変異原学会第 38 回大会 (2009.11)
- 76) 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、鶴飼明子、島津徹、榎本秀一、堂前直、大西武雄、石岡憲昭; 国際宇宙ステーション利用実験: ヒト培養細胞の突然変異解析から宇宙環境の生物影響を解明する試み, 日本環境変異原学会第 38 回大会 (2009.11)
- 77) 山本歩、本間正充; Unconectable I-SceI サイトの挿入による放射線損傷様二本鎖 DNA 切断の修復機構の解析, 日本放射線影響学会第 52 回大会 (2009.11)
- 78) 安井学、本間正充; 8-オキソグアニン 1 分子のゲノム内における突然変異誘発能の解析系の確立; 低線量電離放射線の暴露モデルとして, 日本放射線影響学会第 52 回大会 (2009.11)
- 79) 本間正充、山影康次、Burlington, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., 林真、中嶋まどか、鈴木雅也、Corvi, R., 宇野芳文、Schechtman, L., Tice, R., 小島肇; *In vitro* アルカリコメットアッセイ国際バリデーション研究, 第 22 回日本動物実験代替法学会総会 (2009.11)
- 80) Honma, M., The new paradigm of genotoxicity testing in regulatory science -ICH guideline and IWGT consensus- The 1st International Symposium on the Drug Safety Evaluation (2009.12)
- 81) H. Sato, M. Matsumoto, Y. Aoki, K. Itoh, M. Yamamoto, Functional prediction analysis based on global gene expression by using *Nrf2* Knockout mouse liver exposed to TCDD. 12th Int. Congr. Toxicol. Barcelona July 2010.

- 82) 青木康展, 化学物質の体内動態など毒性発現メカニズムを考慮したリスク評価値算出の考え方. 第 51 回大気環境学会年会 大阪 September 2010.
- 83) 松本理, 青木康展, 大気中の発がん物質のリスク評価 -疫学研究データと動物実験データに基づく評価値の比較-. 日本環境変異原学会 第 39 回大会 つくば November 2010.
- 84) 青木康展, 佐藤陽美, 中島大介, 影山志保, 阪下由香利, 柳澤利枝, 後藤純雄, 松下秀鶴, 増村健一, 能美健彦 大気中の粒子状物質抽出物が *gpt delta* マウス肺中に示す変異原性; 2009 年つくば市内, 1989 年バンコク市内の試料について. 日本環境変異原学会 第 39 回大会 つくば November 2010.
- 85) 佐藤陽美, 阪下由香利, 増村健一, 古山昭子, 平野靖史郎, 能美健彦, 青木康展 ディーゼルナノ粒子長期曝露により *gpt delta* マウス肺・肝臓に誘導される突然変異. 日本環境変異原学会 第 39 回大会 つくば November 2010.
- 86) H. Sato, D. Nakajima, S. Kageyama, Y. Sakashita, R. Yanagisawa, K. Masumura, T. Nohmi and Y. Aoki, *in vivo* mutagenicity of ambient air in the lungs of *gpt delta* transgenic mice; A case studies in Tsukuba City, Japan. The 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Pataya December 2010.
- 87) 佐藤陽美、中島大介、影山志保、後藤純雄、松下秀鶴、渡辺徹志、青木康展、遺伝子発現プロファイルと分子ネットワークによる都市大気成分の毒性寄与予測手法の開発. 日本薬学会第 131 年会 静岡 March 2011
- 88) T. Tsuzuki, J. Piao, T. Isoda, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, Y. Nakatsu, Prevention of oxidative mutagenesis by DNA repair enzymes: Implication in human cancer, 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens (ACEM): Harmonize Gene & Environment, Pattaya, Thailand, 2010.12.17.
- 89) 大野みずき, 作見邦彦, 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, 日本生化学会第 82 回大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会, 神戸, 2010. 12. 8.
- 90) 中西恵美, 大野みずき, 中津可道, 續輝久, 腸管と精巣における放射線誘発 DNA 損傷とその修復機構の解析, 日本生化学会第 82 回大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会, 神戸, 2010.12.7.
- 91) 大野みずき, 中西恵美, 作見邦彦, 古市正人, 中別府雄作, 續輝久, 酸化損傷 DNA が生殖細胞ゲノムに及ぼす影響, 日本環境変異学会第 39 回大会, 茨城, 2010.11.16.
- 92) 大野みずき, 中西恵美, 中津可道, 續輝久, 低 LET 放射線による核酸の損傷とその修復機構: 腸管と精巣における解析, 日本放射線影響学会第 53 回大会, 京都, 2010.10.20.
- 93) 高橋富美, 吉原達也, 中津可道, 續輝久, 中別府雄作, 笹栗俊之, 酸化ストレス誘発小腸腫瘍に対する Differentiation-inducing factor-1 の抗腫瘍効果, 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010.9.22.
- 94) 日高真純, 高木康光, Teik-How Lim, 中津可道, 續輝久, 佐野しおり, 坂上竜資, 関口睦夫, 哺乳類細胞のゲノム安定性と細胞死, 日本遺伝学会第 82 回大会, 札幌, 2010.9.20.
- 95) T. Tsuzuki, J. Piao, T. Isoda, K.

- Sakumi, Y. Nakabeppu, Y. Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice, Workshop: Biological effects of low-level exposure to ionizing radiation, health risks and clinical consequences, Richland, WA, USA, 2010. 5. 5.
- 96) T. Nohmi, Transgenic *in vivo* genotoxicity assays: current status of *gpt* delta transgenic mice and rats, The 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Pattaya, Thailand (December 15-18, 2010)
- 97) Y. Totsuka, T. Kato, S. Matsuda, D. Nakae, Y. Tada, T. Nohmi, M. Kawanishi, T. Yagi, T. Ichinose, T. Sugimura and K. Wakabayashi, Genotoxicity induced by nanoparticles, The 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Pattaya, Thailand (December 15-18, 2010)
- 98) M. Yamada, M. Takamune, A. Katafuchi and T. Nohmi, Novel Salmonella strains for Ames test that can detect pyrimidine damage in DNA, The 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Pattaya, Thailand (December 15-18, 2010)
- 99) K. Masumura, N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Muramatsu, M. Takamune, M. Yamada, T. Tanaka and T. Nohmi, Chemopreventive effects of silymarin on mutagenesis and carcinogenesis in *gpt* delta transgenic rats, The 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Pattaya, Thailand (December 15-18, 2010)
- 100) A. Sassa, N. Niimi, H. Fujimoto, A. Katafuchi, P. Gruz, M. Yasui, R. C. Gupta, F. Johnson, T. Ohta and T. Nohmi, Phenylalanine 171 as a molecular brake for dCMP incorporation opposite benzo[a]pyrene-guanine adducts by human DNA polymerase kappa, The 7th 3R symposium, Toyama, Japan, October 26-30, 2010.
- 101) N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Muramatsu, K. Masumura, M. Takamune, M. Yamada, T. Ohta and T. Nohmi, Chemopreventive effects of silymarin, a plant constituent, against the carcinogenicity of dimethylhydrazine plus dextran sodium sulfate in the colon of *gpt* delta transgenic rats, The 10th International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis (ICMAA), Guarujá, Brazil, September 26-29, 2010.
- 102) T. Nohmi, *gpt* delta transgenic mouse and rat for *in vivo* genotoxicity assays, The 2nd Westlake Conference- Translational Medicine, Hangzhou, Zhejiang, China, June 24-26, 2010.
- 103) 安井 学, 佐々 彰, 鴨下 渚, 太田 敏博, 松田 知成, 能美 健彦, 本間 正充; DNA 付加体を含む修飾 DNA オリゴマーの生化学的構築法の最適化. 日本環境変異原学会第 39 回大会 (2010. 11)
- 104) 佐々 彰, 太田 敏博, 能美 健彦, 本間 正充, 安井 学; 臭素化 DNA 付加体の誤塩基対形成機構. 日本環境変異原学会第 39 回大会 (2010. 11)
- 105) A. Sassa, N. Kamoshita, T. Ohta,

- T. Nohmi, M. Honma, and M. Yasui; A rapid system for the biochemical preparation of oligodeoxynucleotides containing a single DNA adduct. The 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (2010. 11)
- 106) 本間正充, 安井 学, 堀端克良, 鈴木哲矢, 谷田貝文夫; DNA 二本鎖切断修復に対する低線量放射線等の環境ストレスの影響. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (2010. 12)
- 107) A. Sassa, T. Ohta, T. Nohmi, M. Honma, and M. Yasui; Miscoding events during DNA synthesis past brominated DNA adducts. The 2nd Asian Conference of Environmental Mutagen (2010. 12)
- 108) M. Yasui, A. Sassa, T. Ohta, T. Nohmi, and M. Honma; Miscoding properties of brominated DNA adducts catalyzed by human DNA polymerases. UKEMS / Dutch EMS-sponsored Workshop on Biomarker of Exposure and Oxidative DNA Damage (2011. 3)
- 109) M. Yamada, K. Matsui, M. Takamune, A. Katafuchi, T. Nohmi, Sensitive detection of oxidative damages using BER-deficient Ames tester strains, European Environmental Mutagen Society 2010, (2010.9)
- 110) 須井 哉, 川上久美子, 桜井徳子, 奥富弘子, 太田 亮, 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6, 日本環境変異原学会第39回大会 (2010. 11)
- 111) 本山茂記, 竹入章, 和田直子, 寺社下浩一, 三島雅之, 新見直子, ピーター・グルーズ, 増村健一, 山田雅巳, 能美健彦, DNA polymerase κ 遺伝子ノックイン *gpt delta* マウスにおいて mitomycin C によって骨髄に誘発された変異の解析, 日本環境変異原学会第39回大会 (2010. 11)
- 112) 山田雅巳, 高宗万希子, 能美健彦, 香辛料成分カプサイシンによる変異原性修飾効果について, 日本環境変異原学会第 39 回大会 (2010. 11)
- 113) 堀 貴美子, 武藤 学, 松田 知成, 湯河 良之, アセトアルデヒド由来 DNA アダクトの安定性に関する検討, 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪
- 114) 湯河 良之, 堀 貴美子, 江副 康正, 宮本 心一, 武藤 学, 松田 知成, 千葉 勉, Aldh2 欠損および p53 欠損とアセトアルデヒド由来 DNA アダクト形成との関連性の検討, 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪 (2010, 9)
- 115) 小山 倫浩, 田中 政幸, 永吉 春奈, 松田 知成, 川本 俊弘, アセトアルデヒド吸入曝露によるアルデヒド脱水素酵素 2 ノックアウトマウス臓器の N2-ethylidene-dG による DNA 付加体, 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪 (2010, 9)
- 116) 石野 孔祐, 加藤 竜也, 増田 修一, 松田 知成, 杉村 隆, 若林 敬二, 戸塚 ゆ加里, ナノマテリアルにより誘発される DNA 付加体の解析, 日本環境変異原学会 (JEMS) 第 39 回大会, つくば, (2010, 11)
- 117) 松田 知成, 質量分析器, 次世代 DNA シーケンサーの変異原研究への応用可能性, 日本環境変異原学会 (JEMS) 第 39 回大会, つくば (2010, 11)
- 118) 松田 俊, 足立 淳, 井原 賢, 井倉 正枝, 井倉 毅, 松田 知成, 芳香族炭化水素受容体 (AhR) 複合体のプロテオーム解析, 日本環境変異原学会 (JEMS) 第 39 回大会, つくば (2010, 11)

- 119) 加藤 杏子, 山村 英二, 川西 優喜, 八木 孝司, 松田 知成, 杉山 明男, 宇野 芳文, CHL/IU 細胞を用いた *in vitro* 小核試験における DNA アダクトーム解析 (第 2 報), 日本環境変異原学会 (JEMS) 第 39 回大会, つくば (2010, 11)
- 120) 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 ASSOCIATION OF THEORETICAL AND COMPUTATIONAL CHEMISTS WATOC 2011 Santiago de Compostela, Spain July 2011
- 121) 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.
- 122) 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)
- 123) 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.
- 124) 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)
- 125) 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)
- 126) 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..
- 127) 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 回大会, 東京 (2011. 11)
- 128) 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 回大会, 神戸 (2011. 11)
- 129) 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 回大会, 京都 (2011. 9)
- 130) 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.
- 131) 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.

- 132) 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.
- 133) 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.
- 134) 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)
- 135) 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)
- 136) 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)
- 137) 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テ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)
- 138) 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)
- 139) 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)
- 140) 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)
- 141) 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)
- 142) 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)
- 143) 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)
- 144) 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)
- 145) 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)
- 146) 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)
- 147) 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)
- 148) 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)
- 149) 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)
- 150) 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)
- 151) 鈴木裕太, 木島綾希, 日比大介, 金美蘭, 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)
- 152) 金美蘭, 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)
- 153) 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)
- 154) M. Yasui, A. Sassa, N. Kamoshita, T. Matsuda, T. Ohta, T. Nohmi and M. Honma; 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)
- 155) M. Yasui, N. Kamoshita, and M. Honma; Tracking a single DNA adduct in targeted mutagenesis. 第 34 回日本分子生物学会 (2011. 12)

- 156) 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与する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)
- 157) 堀妃佐子、下吉里実、藤居亙、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)
- 158) 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)
- 159) 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)
- 160) 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)
- 161) 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)
- 162) 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)
- 163) 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)
- 164) 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21-23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。

まず、Nrf2(-/-)マウスにおける突然変異の性質を調べるために、Nrf2(-/-)-、Nrf2(+/-)-、Nrf2(+/-)-*gpt delta*マウスの肝臓で発生した自然発生突然変異のスペクトルを解析した。その結果Nrf2(-/-)では、Nrf2(+/-)に比べてG:C→T:A transversionと1塩基欠失の発生率が増加していた。活性酸素種により生成される付加体である8-oxodGがNrf2(-/-)での自然突然変異頻度の上昇に関与していることが示唆された。

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

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-KO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-KO *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、Nrf2欠損で誘導される突然変異の性質を、Nrf2(-/-)マウスの肝臓について調べ、さらに、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-KO *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-KO *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。

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) 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λEG10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、酸化的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 など酸化的 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*(-/-) 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) 同上)。

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。

2) Nrf2-KO *gpt delta* マウスの作出

Nrf2(+/-) *gpt*(+/+) 遺伝型マウス雌雄2ペアを交配してその後代のNrf2(+/-) *gpt*(+/+) 遺伝型マウスを作出し、8ペアの交配を行った。その結果、図1、2の実験で用いることとなる♂Nrf2(+/+) 7匹、Nrf2(+/-) 12匹、Nrf2(-/-) 4匹、♀Nrf2(+/+) 6匹、Nrf2(+/-) 5匹、Nrf2(-/-) 3匹の *gpt delta* マウスを得た。

また、♂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、雄マウスを突然変異体頻度解析の実験に用いた。

3) 臭素酸カリウムの投与

小腸に癌が発症する標準投与量である2g/1の用量で、♂Nrf2(+/+) 4匹、Nrf2(-/-) 2匹の *gpt delta* マウスに臭素酸カリウムを飲水投与した。また、対照群として♂Nrf2(+/+) 3匹、Nrf2(-/-) 2匹の *gpt delta* マウスにイオン交換水を投与した。その結果、図1および2に示すように、Nrf2(+/+)は投与による死亡は認められなかったが、Nrf2(-/-)は2匹とも投与期間中に体重が減少し、生存できなかった。

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/1の用量で、対照として1群3匹のNrf2(+/+)マウスに2 g/1の用量で投与した。その結果、2 g/1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/1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。

4) 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/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。

5) 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。

6) *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 2)

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 (2 g/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増加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理的变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

- 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.
- 3) Furuhashi A., Toida T., Nishikawa M., Aoki Y., Yoshioka Y., Shiraishi F. (2010) Development of an ecotoxicity QSAR model for the KAsinhou Tool for Ecotoxicity (KATE) system, March 2009 version. SAR QSAR Environ. Res., 21, 403-413
 - 4) Kawahara J., Tanaka C., Tanaka C., Aoki Y., Yonemoto J. (2010) Estimation of the respiratory ventilation rate of preschool children in daily life. J. Air Waste Manag. Assoc. in press.
 - 5) Furuhashi A., Hasunuma K., Aoki Y., Yoshioka Y., Shiraishi H. (2011) Application of chemical reaction mechanistic domains to an ecotoxicity QSAR model, the KAsinhou Tool for Ecotoxicity (KATE). SAR QSAR Environ. Res., 22, 505-523
 - 6) 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.
 - 7) 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
- 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

- 7) Sato H., Matsumoto M., Aoki Y., Itoh K., Yamamoto M. Functional prediction analysis based on global gene expression by using Nrf2 Knockout mouse liver exposed to TCDD. 12th Int. Congr. Toxicol. Barcelona July 2010.
 - 8) 青木康展 化学物質の体内動態など毒性発現メカニズムを考慮したリスク評価値算出の考え方. 第 51 回大気環境学会年会 大阪 September 2010.
 - 9) 松本理, 青木康展 大気中の発がん物質のリスク評価 -疫学研究データと動物実験データに基づく評価値の比較-. 日本環境変異原学会 第 39 回大会 つくば November 2010.
 - 10) 青木康展, 佐藤陽美, 中島大介, 影山志保, 阪下由香利, 柳澤利枝, 後藤純雄, 松下秀鶴, 増村健一, 能美健彦 大気中の粒子状物質抽出物が gpt delta マウス肺中に示す変異原性; 2009 年つくば市内, 1989 年バンコク市内の試料について. 日本環境変異原学会 第 39 回大会 つくば November 2010.
 - 11) 佐藤陽美, 阪下由香利, 増村健一, 古山昭子, 平野靖史郎, 能美健彦, 青木康展 ディーゼルナノ粒子長期曝露により gpt delta マウス肺・肝臓に誘導される突然変異. 日本環境変異原学会 第 39 回大会 つくば November 2010.
 - 12) Sato H., Nakajima D., Kageyama S., Sakashita Y., Yanagisawa R., Masumura K., Nohmi T., Aoki Y In vivo mutagenicity of ambient air in the lungs of gpt delta transgenic mice; A case studies in Tsukuba City, Japan. The 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Pataya December 2010.
 - 13) 佐藤陽美、中島大介、影山志保、後藤純雄、松下秀鶴、渡辺徹志、青木康展 遺伝子発現プロファイルと分子ネットワークによる都市大気成分の毒性寄与予測手法の開発. 日本薬学会第 131 年会 静岡 March 2011
 - 14) 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
 - 15) 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.
 - 16) 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.
 - 17) 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

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						
	0	0	1	3	1	4
Other						
	0	0	0	0	0	0
Total	10	100	30	100	23	100

表2 臭素酸カリウムを投与した Nrf2-0K マウス小腸上皮組織の突然変異体発生頻度

	# animal	# mutants	titer	MF (xE-05)
(-/-) 0 g/L	1	2	297000	0.673
	2	6	1022550	0.587
	3	3	393000	0.763
	ave			0.674
	Std			0.088
(-/-) 0.6g/L	4	7	369000	1.897
	5	8	1278000	0.626
	6	6	330000	1.818
	ave			1.447
	Std			0.712
	t-test (-/-)0			0.136
(+/+) 0 g/L	7	2	548100	0.365
	8	1	225600	0.443
	9	3	390000	0.769
	ave			0.526
	Std			0.214
	t-test (-/-)0			0.329
(+/+) 0.6g/L	10	9	498000	1.807
	11	3	666000	0.450
	12	9	756900	1.189
	ave			1.149
	Std			0.679
	t-test (-/-)0			0.297
	t-test (+/+)0			0.204
	t-test (-/-)0.6			0.627

図 1

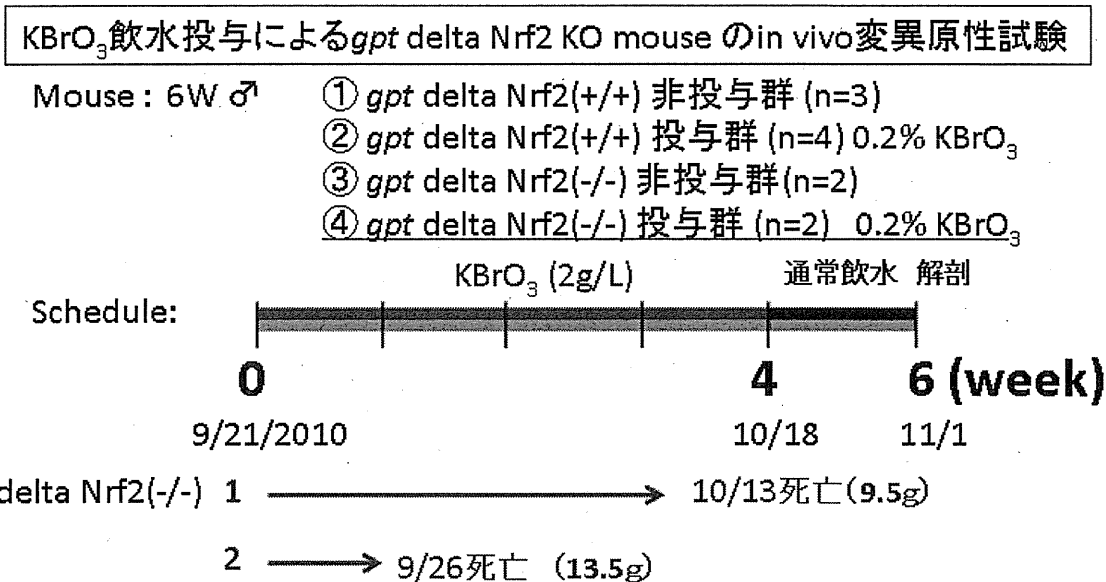
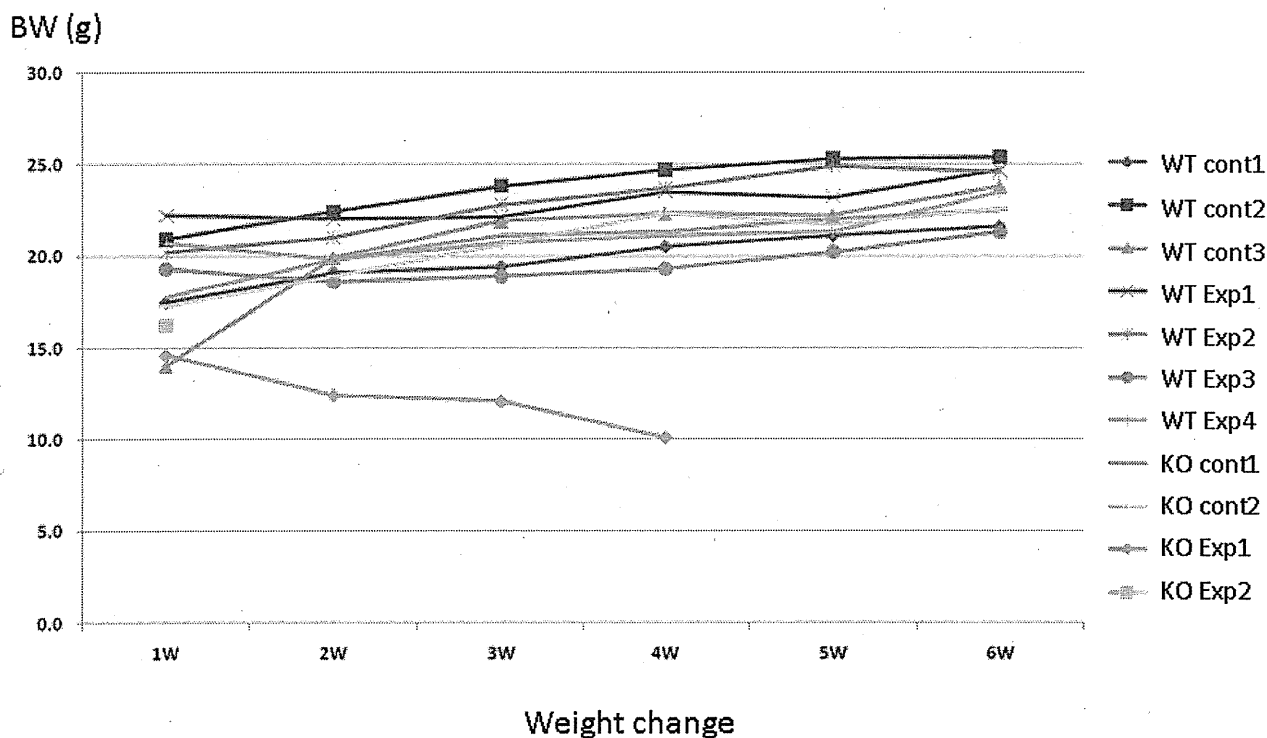


図 2 臭素酸カリウム投与動物の体重変化



KO Exp1: 4w 10/13 死亡 (9.5 g)、 KO Exp 2: 1w 9/26 死亡 (13.5 g)