

201327022A

別添 1

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

食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価法に関する研究

(H24-食品-一般011)

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 本間正充

平成26(2014)年 3月

目 次

I. 総括研究報告書 (別添 3)

食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価法に関する研究	1
本間 正充	

II. 分担研究報告書 (別添 4)

リスクレベルに基づく遺伝毒性評価法の提言 -遺伝毒性発がん化学物質のリスク評価と閾値-	1 1
本間 正充	

近接させた 4 分子の DNA 付加体が引き起こす突然変異誘発能の解析	1 7
安井 学	

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	2 3
續 輝久	

微生物試験を用いた発がんリスクの定量的評価手法の構築	2 9
山田 雅巳	

トランスジェニック動物を用いた定量的遺伝毒性評価に関する研究	3 9
増村 健一	

In vivo 遺伝毒性試験の低用量リスク評価法に関する研究	6 3
鈴木 孝昌	

III.研究成果の刊行に関する一覧表 (別添 5)	7 7
---------------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別冊	7 9
-----------------	-----

I. 総括研究報告書

研究課題名：食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価法に関する研究

研究代表者： 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長

研究要旨

遺伝毒性は重要な発がんメカニズムの 1 つであり、遺伝毒性の有無と、性質（DNA 反応性、もしくは非 DNA 反応性）は、食品添加物等の化学物質の発がんリスク評価を大きく左右する。すなわち、非 DNA 反応性発がん物質であれば一般に閾値があると考えられ、ADI の設定が可能であるが、DNA 反応性発がん物質と評価された場合は、使用を禁止するか、許容リスクレベルを考慮した管理が必要となる。しかしながら、我が国においては、食品添加物に対して後者の手法は十分に開発されていない。遺伝毒性試験データを発がんリスク評価に利用するためには、試験結果の適切な量的評価が不可欠である。本研究では遺伝毒性試験データをヒト発がんリスク評価に利用するために、遺伝毒性の量的反応性を考慮した手法の開発を目指す。本年度は、第一に、遺伝毒性試験結果を定量的リスク評価に利用可能かどうかを検討するため、がん原性 BMD10 値と TG 試験 BMD10 値比較したところ、正の相関が認められた。がん原性データがない化学物質の発がんリスクの評価にも、TG 試験で得られた BMD10 からの外挿が可能かもしれない。低用量における閾値に関しては、ヒト細胞、Mutyh 遺伝子マウスを用いた研究を行った。酸化損傷である 8-oxodG の変異原性には閾値は存在しないが、効率的な修復により突然変異が抑制されることが示された。また、Mutyh 遺伝子マウスは、遺伝毒性の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た。遺伝毒性試験データの定量的評価、発がんリスク評価への利用のためにエームス試験、トランスジェニック動物突然変（TG）試験データの収集と、解析を行った。エームス試験の比活性値と、TD50 値の相関を調べたところ、高い相関性が得られた。TG 試験に関しては、128 の発がん性物質、23 の非発がん物質において、TG 試験の判定と発がん性の有無の一致率は 72.2% であり、他の *in vivo* 試験と比較して高かった。TG 試験は発がんのリスク評価に有用と判断される。低用量の遺伝毒性物質の暴露評価のために LC-MS を用いた網羅的タンパクアダクトーム解析を試みた。ラットヘモグロビンにおける新規のグリシドールアダクトとして、125 番目のシステイン残基のアダクトを検出した。これは、アルキル化剤の遺伝毒性の予測因子としての利用に期待が持たれる。

キーワード： 閾値、遺伝毒性、発がん、化学発がん物質、用量反応関係、リスク評価

分担研究者

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
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 教授
山田雅巳	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
増村健一	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
鈴木孝昌	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 室長

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 が設定されず、行政上の規制が困難となる。本研究では、遺伝毒性陽性と判定された化学物質の発がんリスクを適切に評価することを目的とし、陽性反応を定量的に評価するための手法の開発と、陽性反応における閾値の発生機序の解明を目指す。

本年度は、1 名の研究代表者と、5 名の分担研究者が以下の研究を主に行った。1) 15 種類の遺伝毒性化学物質の発がん性データ、および *in vivo* トランスジェニック動物突然変異試験 (TG) を定量的に解析し、用量相関性を比較解析し、TG データから発がんリスクを評価するための手法の開発を検討した (本間)。2) ゲノム中に DNA 損傷を 1、および 2 分子導入し、その結果を調査することによって、閾値の有無と、損傷数に依存した突然変異の発現様式を検討してきたが、本年度は、4 分子の 8-OxodG をゲノムに導入し、付加体の分子数と突然変異誘発頻度の関係性を定量的に明らかにした (安井)。3) *MutYh* 遺伝子欠損マウスでは自然発がん、臭素酸カリウム (0.2%

溶液経口投与) 誘発発がん頻度が劇的に上昇する。また、低用量 (0.05%) 臭素酸カリウムを経口投与した場合には発がん頻度の有意な上昇は認められず、*MutYh* 遺伝子が欠損した個体でも遺伝毒性に対する閾値が形成されている可能性を見出した。本年度は、この実験系を用いて遺伝毒性に対する閾値形成機構についてさらに検討するために、比較的低用量域 (0.10-0.15%) の臭素酸カリウムを経口投与して発がん実験を行うと共に、一部のマウスを用いて突然変異解析を実施した。

(續)。4) 復帰突然変異試験 (Ames 試験) と発がん性データの量的相関性を精査し、発がんリスク評価に利用するための手法の開発を目指す。量的相関性が低い化学物質に対しては、化学構造による分類、微生物に特異的なメカニズムの解析を行い、例外をフォローアップするためのストラテジーを開発する。本年度は IARC (国際がん研究機構) で発がんのクラスが Group 1 (ヒトに対する発がん性が認められる) とされている物質について、その発がん性と変異原性との相関を調査した (山田)。5) トランスジェニック齧歯類遺伝子突然変異試験 (TG 試験) のデータベースを基に定量的解析法の開発、および発がんリスク評価への利用を目的とし、引き続き既存の TG 試験のデータベースを構築し、TG 試験データと発がん性との相関を検討した (増村)。6) 遺伝毒性の定量的評価には曝露状況の適切な評価が重要である。低用量の曝露影響の評価のためには、実際の用量においても検出が可能となるようなバイオマーカーの利用が必要であり、より反応性の高いと考えられる血中タンパク質に着目し、これらに対する遺伝毒性物質の付加体の検出を試みる (鈴木)。

B. 研究方法

1) Hernandez(2011)の報告に基づきデータを収集、精査した。データを検索し、用量反応試験の選択基準と、用量反応試験の選択基準の設定、遺伝毒性 BMD₁₀ 値とがん原性 BMD₁₀ 値の比較に関する統計処理を行った(本間)。

2) 8-oxodG 付加体を含むターゲティングベクターは、荒川らの方法に従って作製した。4分子の8-oxodGは、TKのイントロン4に位置するBssSI認識配列(5'-CTCGTG/CACGAG-3';下線部が導入部位)のdG部位の両鎖に導入した(pvINT4xOxodG)。8-oxodGの代わりに正常塩基dGのコントロールターゲティングベクター(pvINTdG)も同様の方法で作製した。Lonza社製 Cell Line Nucleofector を用いて、TSCER122細胞(TK^{-/-})にターゲティングベクターをトランスフェクションし、相同組み換えにより、DNA付加体がゲノム内に入った細胞クローンを回収した。その後、各クローンのゲノムDNAを抽出し、8-oxodG部位だった周辺のシーケンスを行い、その突然変異誘発スペクトルおよび頻度を決定した(安井)。

3) 臭素酸カリウム(Sigma-Aldrich)を純水に溶解し、0.05~0.15%溶液を調製後に濾過滅菌し、マウスの飲料水とした。6~8週齢の野生型およびMutyh遺伝子欠損マウスに飲水投与方法し、発がん解析は16週間、突然変異の解析は4週間後に行った。消費量については週一回モニターした。発がん性は16週間投与後、安楽死させたマウスから腸管を摘出して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。突然変異解析は、4週間投与後、通常の飲み水に切り替えてさらに2週間飼養した後、安楽死させたマウスから摘出した腸管からDNAを抽出し、rpsL遺伝子突然変異解析法に従い、誘発突然変異の解析を行った(續)。

4) Carcinogenic Potency Database Project (CPDB)、National Toxicology Program (NTP)のデータベースから芳香族アミンに関する発がん性とAmes試験の結果のデータを抽出した。発がん性のTD50値の逆数と、Ames試験の比活性値をグラフ化し、両者の相関性を検討した(山田)。

5) TG試験が開発された90年代から2007年までのTG試験関連学術文献のデータを、OECDのDetailed Review Paper On Transgenic Rodent Mutation Assays (2009)をもとに、データベースに追加した。また、2008年~2012年に厚生労働省が委託試験等で行ったTG試験データも追加した。作成したデータベースを基に、TG試験データと発がん性との相関を検討した。陽性を陽性と評価するSensitivity、陰性を陰性と評価するSpecificity、および全体の一致率Concordanceを計算した(増村)。

6) グリシドール処理したラットのヘモグロビンサンプルのLC-MS/MSによるプロテオーム解析を行った。また、市販ヒト血清からのLC-MSデータを用い、上記のグリシドール修飾を付加したデータベース検索により、血清アルブミンのグリシドール付加体の検索を行った。グリシドール修飾ペプチドおよび非修飾ペプチドの溶出位置を、Progenesis LC-MSによる解析データ上で確認した。(鈴木)。

(倫理面への配慮)

本研究は多くは文献調査、培養細胞によるin vitro試験に基づくものであり、倫理上の問題はない。續の動物実験に関しては九州大学の動物実験委員会、研究倫理委員会の規定に準拠して行った。

C. 研究結果および考察

1) 遺伝毒性の定量的評価とリスク評価への適用(本間)

15化学物質についてTG試験データおよびがん原性データを精査し、それぞれのBMD₁₀推定値を計算した。BMD₁₀最低値に関するCI(BMDU/BMDLの比率)を計算した。この大きさは、各BMD₁₀推定値に関わる不確定度を意味する。TG試験では1.5~17で、組織がマッチした腫瘍では1.7~79.1、最低値の腫瘍は1.7~135,817であった。標的組織での腫瘍BMD₁₀に

対して、その組織の TG 試験の BMD₁₀ 最低値をプロットしたところ、中程度の相関が認められた ($\gamma=0.59$)。しかし、非腫瘍組織の TG と腫瘍 BMD₁₀ 最低値には相関が認められなかった。

遺伝毒性化合物のリスク評価は、がん原性データがないことが多い。この場合、遺伝毒性発がん物質に対するヒトの許容曝露量を評価するには、別の戦略を練る必要がある。リスク評価のためには、遺伝毒性試験の予測強度にもとづき、どの化合物をがんに関する試験にかけるべきで、どれを省略すべきか決定する際、遺伝毒性試験は有用である。本研究で行ったように、遺伝毒性とがん原性の相関をプロットすることは、そうした決定を行う上で有用である。ただし、相関プロットのばらつきと強度予測の不確実性を十分に考慮する必要がある。この場合、10~100 倍の不確実性の考慮が適切かもしれない。TG 試験から観察された BMD₁₀ を 100 で割ると、対応する腫瘍 BMD₁₀ の控えめな予測値が得られる。がん原性データがない化学物質の発がんリスクの評価にはこのような控えめな BMD₁₀ の適用が現実的かもしれない。

2) 近接させた 4 分子の DNA 付加体が引き起こす突然変異誘発能の解析 (安井)

4 分子の 8-oxodG を含む pvINT4xOxodG を I-SceI 発現ベクターと同時にトランスフェクションした。その TK 復帰頻度は $7\sim 8 \times 10^{-3}$ であり、付加体無しのコントロールベクター(pvINTdG)を導入した時とほぼ一致した。付加体が導入された 536 クローン細胞についてシーケンス解析した結果、大部分が付加体に依存した一塩基置換であることが分かった。その主な突然変異誘発スペクトラムは、G・C → T・A トランスバージョン (13%) と G・C → C・G トランスバージョン (6.0%) であった。前年度に解析した 8-oxodG 2 分子の一塩基変異頻度は 25.7% だったが、4 分子を用いた本解析では 20.1% に下がった。

近接した付加体の分子数と突然変異誘発頻度の数的関係性に関して、4 分子の 8-oxodG の突然

変異誘発頻度は 2 分子の 8-oxodG のそれよりも低下した。その理由は、一度のロングパッチ BER 修復で同時に 2 分子の付加体が修復されることが考えられる。4 分子の 8-oxodG が TK 遺伝子の NTS と TS で起こす突然変異誘発能の違いについて検討した。前年度の 2 分子の解析では、NTS の 8-oxodG は TS のそれよりも突然変異誘発頻度が 1.8 倍だった。本年度の研究でも NTS の 8-oxodG 2 分子は 14%、TS のそれらは 6.3% の頻度で一塩基変異を誘発し、NTS で起きる頻度は 2.2 倍も高かった。この結果は、TK 遺伝子の転写時に転写共役 DNA 修復機構 (TCR) によって 8-oxodG が認識され、TS 上の 8-oxodG 2 分子が、NTS 上のそれらよりも優先的に修復されたことを示唆している。これを証明するためには、TCR に関与する修復遺伝子を破壊した細胞を作製し、同様の実験で確認する必要があると考えられる。

3) 臭素酸カリウム誘発消化管発がん (續)

これまで 0.2% 臭素酸カリウム溶液を 16 週間連続飲水投与した誘発消化管発がん実験では、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が、低用量の 0.05% 臭素酸カリウムの投与では上皮性腫瘍を発生させなかった。本年度は、0.05~0.15% 臭素酸カリウムを経口投与して発がん実験を行った。0.10~0.20% 臭素酸カリウム溶液の用量では、Mutyh 遺伝子欠損マウスの十二指腸・空腸でそれぞれ、用量依存的に上皮性腫瘍の発生を認めた。一方、0.05% 臭素酸カリウム投与の Mutyh 遺伝子欠損マウスでは追加実験分も含めて全く腫瘍の発生が認められなかった。これらの結果は、臭素酸カリウムによる消化管発がんには閾値が存在し、その形成に Mutyh 遺伝子が関与していることを示している。また、Mutyh 遺伝子が欠損した個体においても臭素酸カリウムの発がん性に関して「閾値」が存在することを示している。

部分的な突然変異解析の結果、0.10% 投与群では G:C → T:A 型の変異頻度が野生型マウスでは 0.78×10^{-5} 、Mutyh 遺伝子欠損マウスでは $4.49 \times$

10⁻⁵であった。以前行った0.20%投与群の突然変異解析では、G:C→T:A型の変異頻度が野生型では1.89 x 10⁻⁵、Mutyh 遺伝子欠損マウスでは22.16 x 10⁻⁵であった。0.20%投与野生型マウスのG:C→T:A型の変異頻度は0.10%投与群の約2.4倍であり、0.20%投与 Mutyh 遺伝子欠損マウスでは0.10%投与群と比べて、約5倍のG:C→T:A型の変異頻度を示している。このことは、臭素酸カリウム濃度に比例する酸化DNA損傷以外の因子が突然変異体細胞（がん細胞前駆体）の出現頻度を規定している可能性を示唆している。従って、これらの因子が臭素酸カリウムによる消化管発がんの閾値形成に関与している可能性が考えられる。

4) 微生物試験を用いた発がんリスクの定量的評価手法の構築 (山田)

Ames 試験陽性の28物質について、TD50値の分布と、Ames 試験陰性の物質のTD50値の分布をグラフ化した。TD50値の逆数を用い、対数表示とした。その結果、陰性判定の物質の1/TD50は、2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)の42,553及び、Diethylstilbestrol(DES)の4.48を除けばすべて0.01以下(最小値は0.00011)と小さい値に収まった。陽性判定の物質の1/TD50は、1,3-Butadieneの0.0038を除けば0.01以上(最大値は312.5)の値に収まった。

Ames 試験の比活性値とラットのTD50値の相関も検討した。Ames 試験の比活性値が高く、発がん性が低いものは1,3-Butadieneのみであった。逆に、発がん性が高いがAmes 試験の比活性値が低いものはなかった。

発がん性が非常に高いにもかかわらず、Ames 試験で変異原性が検出されなかったのはTCDDとDESであった。TCDDは酵素誘導に働くこと、DESは代謝物のDNA付加体の安定性からそれぞれ発がんに関与するメカニズムが考察されていることから推察して、バクテリアを用いる変異原性試験では検出できないことが理解できる。

5) トランスジェニック動物を用いた定量的遺伝毒性評価に関する研究 (増村)

合計280物質のTG試験データを収集した。280件の内訳は、発がん物質128、非発がん物質23、発がん性未知物質68、複合曝露48、溶媒13物質であった。発がん性物質128物質のうち、TG試験が発がん標的組織で実施されているものは105物質であった。TG試験データがある128の発がん性物質と23の非発がん性物質を用いて、TG試験の判定と発がん性の有無との相関について検討した。発がん物質を陽性と判定するsensitivityは94/128 = 73.4%であった。非発がん物質を陰性と判定するspecificityは15/23 = 65.2%であった。全体の一致率concordanceは(94+15)/151 = 72.2%であった。

118の発がん性物質についてAmes試験結果とTG試験との相関を検討した結果、Ames試験が陽性かつTG試験が陰性のものが15物質あった。このうち6物質は発がん標的組織とTG試験実施組織が異なっていたため解釈には注意が必要である。一方、in vitro試験のみでみられた変異原性が発がん性に関与しているかどうかについては、メカニズムに関する個別の議論が必要である。また、Ames試験が陰性かつTG試験が陽性のものが15物質あった。投与期間が比較的長い試験が含まれており、酸化ストレス等を介した間接的なDNA損傷の関与など、変異誘発メカニズムに関する議論が必要である。

TG試験から遺伝毒性の定量的指標を導出するためには、多くの化学物質の試験を共通のプロトコルで行い結果を比較することが有効と考えられるが、in vivo試験ではヒトへの曝露経路や発がん標的組織を考慮した試験デザインを重視するため、共通プロトコルでの運用になじまない側面もある。また、発がん性との量的相関を調べるためには、発がん性試験と同条件の試験を行い、発がん標的組織において遺伝毒性を検索することが望ましいが、発がん性未知の物質ではそうした設定は不可能である。TG試験はコストの点から解析する組織の数が限られるため、曝露や毒性の

情報を考慮しつつ、解析組織を注意深く選択することが必要である。今後は、TG 試験における突然変異体頻度の増加率 (fold·increase) および発がん性における TD50 のような指標を参考に、実験条件の違いと用量・反応関係への影響を検討し、遺伝毒性の量的指標を用いた評価を試みる。

6) In vivo 遺伝毒性試験の低用量リスク評価法に関する研究 (鈴木)

グリシドール処理をしたラットより得られたヘモグロビンをトリプシン消化後 LC·MS にて解析し、得られた MS/MS スペクトラムを Mascot によるデータベース検索に供した。MS/MS スペクトルの内容からも、理論値と比較的きれいな一致が得られていることより、同定されたペプチドがグリシドールによる修飾を持つものであると結論付けた。しかしながら、実際のラットヘモグロビンサンプルから該当するシグナルは得られなかった。以上より、ラットヘモグロビンに関しては、これまでに報告されている N 末端の修飾は検出できなかったが、新たな修飾として 125 番目のシステインの修飾が検出できた。今後、ラットにて得られたシステイン残基の修飾に関しては、そこに的を絞った Selected Ion Monitoring (SIM) 法による同定の確認と定量を行う予定である。

今回ヒトのヘモグロビンサンプルにおいては、ラットで観察されたようなシステイン残基のグリシドール修飾は観察されなかったが、これはグリシドール処理の有無が原因とも考えられるが、システイン残基の反応性の差も影響していると考えられる。ラットヘモグロビンの 125 番目のシステイン残基に関しては、ジスルヒド結合に関与しないためフリーの状態が存在し、求電子物質等に対して高い反応性をもつことが報告されており、その反応性はグルタチオンよりも高いとも言われている。これに対し、ヒトヘモグロビンでは、フリーの状態のシステイン残基がないためラットのような反応性を示さず、その点において種差があると考えられる。よって、ラット等の実験動

物を用いる際に、ヘモグロビンは良い曝露マーカーになるといえるが、ヒトの場合にはより感度の高いタンパクマーカーが必要であることがわかった。

D. 結論

本研究では遺伝毒性試験データをヒト発がんリスク評価に利用するために、遺伝毒性の量的反応性を考慮した手法の開発を目指す。

遺伝毒性試験結果を定量的リスク評価に利用可能かどうかを検討するため、がん原性 BMD₁₀ 値と TG 試験 BMD₁₀ 値比較したところ、正の相関が認められた。がん原性データがない化学物質の発がんリスクの評価にも、TG 試験で得られた BMD₁₀ からの外挿が可能かもしれない。

8-oxodG の変異原性は分子数に依存した変異頻度を示したが、必ずしも一時関数的増加は示さなかった。このことは 8-oxodG の変異原性には閾値は存在しないが、効率的な修復により突然変異が抑制されることを示している。

Mutyh 遺伝子マウスへ臭素酸カリウムを投与する発がん実験系は、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。また、Mutyh 遺伝子産物は酸化剤の遺伝毒性に関する「事実上の閾値」形成に貢献していると示唆される。

ヒトに対して発がん性を示す 28 化合物について、Ames 試験の比活性値と、TD50 値の相関を調べたところ、高い相関性が得られた。一方、例外的なメカニズムを検出するシステムを検討する必要がある。

既存の TG 試験データが存在する 128 の発がん性物質、23 の非発がん物質、68 の発がん性未知物質についてデータベースに追加した。TG 試験の判定と発がん性の有無の一致率は 72.2% であり、他の in vivo 試験と比較して高かった。TG 試験は発がんのリスク評価に有用と判断される。

LC·MS を用いた網羅的タンパクアダクトーム解析により、ラットヘモグロビンにおける新規のグリシドールアダクトとして、125 番目のシステ

イン残基のアダクトを検出した。アルキル化剤の遺伝毒性の予測因子としての利用に期待が持たれる。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

誌上発表

1. Hayashi M, Honma M, Takahashi M, Horibe A, Tanaka J, Tsuchiya M, Morita T, Identification and Evaluation of Potentially Genotoxic Agricultural and Food-related Chemicals. *Food Safety* 1, 32-42 (2013)
2. Horibata K, Ukai A, Kimoto T, Suzuki T, Kamoshita N, Masumura K, Nohmi T, Honma M. Evaluation of in vivo genotoxicity induced by N-ethyl-N-nitrosourea, benzo[a]pyrene, and 4-nitroquinoline-1-oxide in the Pig-a and gpt assays. *Environ Mol Mutagen.* 54, 747-754 (2013)
3. Yasui M, Kanemaru Y, Kamoshita N, Suzuki T, Arakawa T, Honma M.: Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome. *DNA Repair* 15, 11-20 (2014)
4. Sassa A, Suzuki T, Kanemaru Y, Niimi N, Fujimoto H, Katafuchi A, Grúz P, Yasui M, Gupta RC, Johnson F, Ohta T, Honma M, Adachi N, Nohmi T. ; In vivo evidence that phenylalanine 171 acts as a molecular brake for translesion DNA synthesis across benzo[a]pyrene DNA adducts by human DNA polymerase κ . *DNA Repair* 15, 21-28 (2014)
5. Piao, J., Nakatsu, Y., Ohno, M., Taguchi, K. and Tsuzuki, T., Mismatch repair deficient mice show susceptibility to oxidative stress-induced intestinal carcinogenesis. *Int. J. Biol. Sci.*, 10, 73-79 (2014)
6. T. Matsuda, M. Takamune, M. Yamada, A pilot study for the mutation assay using a high-throughput DNA sequencer, *Genes & Environ.*, 35, 53-56 (2013)
7. 斎藤嘉朗, 前川京子, 齊藤公亮, 佐藤陽治, 鈴木孝昌 タンパク質・内在性代謝物バイオマーカーを利用した医薬品開発の活性化にむけて. 国立医薬品食品衛生研究所報告, 131, 20-24. 2013
8. 中村里香, 酒井信夫, 靄島由二, 福井千恵, 鈴木孝昌, 中村亮介, 蜂須賀暁子, 安達玲子, 手島玲子 ショットガンプロテオミクスによる加水分解小麦とその原料であるグルテンに含まれるタンパク質の網羅的解析. 国立医薬品食品衛生研究所報告, 131, 50-57. 2013
9. T. Suzuki Unconscious Exposure to Radiation. *Genes and Environment*, 35, 63-68. 2013

学会発表

1. 本間正充：医薬品開発における遺伝毒性予測とリスク評価 CBI 学術講演会 2013年 東京
2. 本間正充：Risk assessment and management of genotoxic impurities in pharmaceuticals (医薬品中の遺伝毒性不純物のリスク評価と管理) 第3回中国薬物毒理学会医薬品非臨床安全性評価研究フォーラム) 2013年7月 中国蘇州
3. 本間正充：遺伝毒性の予測とリスク評価 平成25年度国立医薬品食品衛生研究所シンポジウム 2013年7月
4. M. Honma: A New Strategy for Hazard and Risk Assessment of Genotoxic Impurities. 第6回遺伝毒性試験国際ワークショップ 2013年10月 ブラジル・イグアス
5. M. Honma: Risk Assessment and Management of Genotoxic impurities in Pharmaceuticals. 第11回国際環境変異原学会 2013年11月 ブラジル・イグアス
6. 安井学, 鴨下渚, 本間正充；遺伝毒性には閾値が無いことの証明 日本リスク研究学会第26回年次大会 学術講演論文集(Vol.26, Nov.15-17, 2013)
7. 安井学, 鴨下渚, 兼丸祐紀, 本間正充；DNA付加体による突然変異誘発頻度はゼロにはな

- らない. 日本環境変異原学会第 42 回大会, 岡山市 (2013 年 11 月)
8. 安井学; DNA 付加体を部位特異的に含む DNA オリゴマーの生化学的構築とその突然変異誘発機構の解析. 日本環境変異原学会第 42 回大会研究奨励賞 AA-2
 9. 安井学, 鴨下渚, 本間正充; DNA 付加体 1 分子による遺伝子変異誘発性. 日本放射線影響学会第 56 回大会 青森市 (2013 年 10 月)
 10. 大野みずき, 中津可道, 中別府雄作, 續 輝久, 酸化 DNA 損傷と消化管がん, 日本分子生物学会第 34 回年会, 神戸, 2013.12.5.
 11. 大野みずき, 作見邦彦, 福村龍太郎, 権藤洋一, 岩崎裕貴, 池村淑道, 續 輝久, 中別府雄作, ミューテーターマウス家系を用いた生殖細胞突然変異の解析システム, 日本環境変異原学会第 42 回大会, 岡山, 2013.11.30.
 12. 青木康展, 松本みちよ, 松本 理, 増村健一, 續 輝久, 能美健彦, 臭素酸カリウムが *gpt delta* マウス小腸で誘導する突然変異の閾値と変異スペクトルの用量依存性変化, 日本環境変異原学会第 42 回大会, 岡山, 2013.11.30.
 13. Teruhisa Tsuzuki, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestines of *Mutyh* deficient mice: the effect of low-level exposure to KBrO₃, 11th International Conference on Environmental Mutagens, Bourbon Cataratas Convention & Spa Resort – Foz do Iguassu, Brazil, 2013.11.6.
 14. Teruhisa Tsuzuki, Mizuki Ohno, Yusaku Nakabeppu, Yoshimich Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of *Mutyh* deficient mice: the effect of low-level exposure to KBrO₃, 日本癌学会第 72 回学術総会, 横浜, 10.6.2013.
 15. Charatda Punvittayagul, Yoshimichi Nakatsu, Rawiwan Wongpoomchai, Mizuki Ohno, Teruhisa Tsuzuki, *In vitro* study for mutagenicity of purple rice hull extract using fibroblasts derived from *rpsL*-transgenic mouse, 日本癌学会第 72 回学術総会, 横浜, 10.5.2013.
 16. 大野みずき, 作見邦彦, 福村龍太郎, 権藤洋一, 岩崎裕貴, 池村淑道, 續 輝久, 中別府雄作, 酸化 DNA 損傷に起因する *de novo* germline mutation の解析, 日本遺伝学会第 85 回大会, 東京, 2013.9.19.
 17. Teruhisa Tsuzuki, AARR Award (Medicine) Lecture, Prevention of Oxidative Tumorigenesis by DNA Repair Enzymes: Implication in Human Cancer, The 3rd Asian Congress of Radiation Research (ACRR 2013), Beijing International Convention Center, Beijing, China, 2013.5.13.
 18. 山田雅巳, 高宗万希子, 松田知成, 次世代 DNA シーケンサーを用いた、表現型によらない変異原性試験の開発, 日本環境変異原学会第 42 回大会, 岡山(2013.11)
 19. M. Yamada, M. Takamune, Y. Matsuda, T. Matsuda, A pilot study for the new mutation assay using a high-throughput DNA sequencer, 11th International Conference on Environmental Mutagens, Brazil (2013.11)
 20. K. Masumura, N. Toyoda-Hokaiwado, N. Osugi, Y. Ishii, T. Umemura, H. Takagi, A. Nishikawa, T. Nohmi, M. Honma, Spontaneous point mutations and deletions increased with aging in *gpt delta* transgenic mice and rats, 11th International Conference on Environmental Mutagens, Brazil (2013.11)
 21. K. Masumura, Aging and accumulation of gene mutations: Identification of spontaneous mutations in the tissues of *gpt delta* transgenic mice, National Cancer Forum 2013, Thailand (2013.8)
 22. 増村健一, 第 6 回 IWGT 報告および共同研究進捗報告: 生殖細胞に影響を及ぼす変異原の同定, MMS 研究会第 63 回定例会, 岡山 (2013.11)
 23. Suresh T., Oshizawa T., Maekawa K., Saito Y.,

Sato Y., Suzuki T. Improvement of Rat Urinary Proteomics by a Differential Precipitation of Proteins. Human Proteome Organization 12th World Congress (2013.9) (横浜)

24. Suzuki T., Suresh T., Oshizawa T., Maekawa K., Saito Y., Sato Y. Basic factors that influence the rat urinary proteome. 第13回国際毒性学会 (ソウル)

25. 鈴木孝昌、Suresh Thirupathi、本間正充、鈴木和博、佐藤陽治 次世代 DNA シークエンサーの染色体異常解析への応用 日本環境変異原学会第42回大会 (2013. 11) (岡山)

26. スレッシュ ティルパッティ、斎藤嘉朗、本間正充、佐藤陽治、鈴木孝昌 ヘモグロビンAダクトーム; 環境変異原に対する暴露マーカーとしての新しいアプローチ 日本環境変異原学会第42回大会 (2013. 11) (岡山)

27. 降旗千恵、櫻井幹也、渡辺貴志、鈴木孝昌 Toxicogenomics/JEMS・MMS V: クリセン投与48時間後までのマウス肝臓における遺伝子発現変化 日本環境変異原学会第42回大会 (2013. 11) (岡山)

28. Suzuki T., Suresh T., Yamada M., Honma M., Suzuki K., Sato Y. Use of the next generation sequencers for the evaluation of genomic integrity of cellular therapy products. 11th International Conference on Environmental Mutagens (2013.11) (Foz do Iguaçu)

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

II. 分担研究報告書

研究課題名：食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価法に関する研究

分担研究課題名：リスクレベルに基づく遺伝毒性評価法の提言
-遺伝毒性発がん化学物質のリスク評価と閾値-

分担研究者： 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長

研究要旨

遺伝毒性試験結果は一般にハザードの同定に使用されるが、リスク評価を目的として遺伝毒性試験結果を定量的に評価する試みが注目されている。突然変異や染色体異常等の遺伝毒性が、発がん性と強く相関するのであれば、発がん性の強さを評価するために、これら遺伝毒性試験結果の定量的検定法が有用であるかもしれない。In vivo 遺伝毒性試験の用量反応データを検索し、詳細な文献調査を行った。用量反応モデリングプログラム PROAST を用いて、ベンチマークドーズ (BMD) を計算した。ここでは in vivo 遺伝毒性試験としてトランスジェニックげっ歯類突然変異試験 (TG) のみを扱った。15 種類の化合物から TG 試験の用量反応データを入手し、その BMD₁₀ 値をマウスのがん原性試験の BMD₁₀ 値と比較した。残念ながら報告されている TG 試験の多くは推奨されたプロトコルを用いておらず、適正な用量反応性を評価することは困難であった。しかしながら、最適とは言えない試験であっても、TG 試験の BMD₁₀ 最低値と、同じ組織での発がん性の BMD₁₀ 値とを比較したところ正の相関が認められた。遺伝毒性試験を、ハザードの同定から、リスク評価にシフトさせるためには、用量反応評価に耐えうる試験デザインの変更が必要である。

キーワード：in vivo 遺伝毒性試験、発がん性、ベンチマークドーズ、定量解析、トランスジェニックげっ歯類突然変異試験

A. 研究目的

遺伝毒性試験は、遺伝毒性の有無を定性的に評価する、いわゆるハザードの同定に用いられている。この目的のために、一連の in vitro および in vivo 遺伝毒性試験の実施に関する国際的ガイドラインが制定されている。特に世界保健機関 (WHO)、International Program on Chemical Safety (IPCS)、日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH)、および REACH などがガイドライン

を規定、採用している。

In vitro 遺伝毒性試験はハザードの同定のために種々の遺伝的損傷を幅広く検出するために設計されているが、陽性結果が必ずしもヒトの健康リスクを示すものではない。そのため、陽性結果が出た化合物は、毒物動態学および毒物動力学などの要因を考慮しながら、さらに in vivo 試験を行うのが一般的である。In vivo 試験の選択は、in vitro 試験で検出された遺伝毒性による損傷の種

類（遺伝子変異または染色体異常）によって異なる。一般に化合物が *in vitro* で染色体異常を誘発することが確認された場合、通常 *in vivo* 小核試験（MN）が実施される。その化合物が *in vitro* で遺伝子変異を誘発するとの兆候があれば、標的組織でトランスジェニックげっ歯類突然変異試験（TG）またはコメット試験（COM）が実施される。

遺伝毒性試験はがん原性のスクリーニング試験という位置づけであるため、生涯にわたるがんバイオアッセイを実施してもよいが、がん原性試験は時間がかかり、高コストであり、また動物愛護の観点から世界的には実験動物数を減らす取り組みが行われていることから、遺伝毒性試験の重要性は依然として高い。がん原性試験では量的パラメータ（ $BMDL_{10}$ 、 ED_{50} 等）を算出し、発がん性の強さを評価することができる。最近、遺伝毒性試験においても、その結果を定量的に評価する試みが注目されている。遺伝毒性の強さが、発がん性の強さに相関していることが確認できれば、定量的遺伝毒性試験結果を発がんリスク評価に用いることができるかもしれない。このアプローチは最終的に、動物の利用をより効果的にするひとつの方法として、現行の法的枠組みを変更することになるかもしれない。

本研究では *in vivo* 遺伝毒性試験から示された遺伝毒性の強さが、がん原性試験から示された発がん性の強さと相関するかという疑問に取り組む。その目的を達するため、文献の遺伝毒性試験、およびがん原性試験結果のレビューを実施した。最終的には、がん原性、*in vivo* 遺伝毒性のベンチマークドーズ（BMD）を予測するアプローチを用いて、両者の相関性の評価を試みる。

B. 研究方法

Hernandez(2011)の報告に基づきデータを収集、精査した。データを検索し、用量反応試験の選択基準と、用量反応試験の選択基準の設定、遺伝毒性 BMD_{10} 値とがん原性 BMD_{10} 値の比較に関する統計処理を行った。

データ検索

In vivo 遺伝毒性試験としては TG 試験のみに注目し、文献を検索した。MN 試験、COM 試験は、発現が一過性で有り、がん原性のような長期曝露による蓄積効果が認められないため、対象となしなかった。がん原性用量反応データについては、Carcinogenic Potency Database (CPD) を用いた。

用量反応解析

用量反応試験の選択には複数の基準を設けた。用量を 2 種類以上（対照のほかに）設けた試験のみを対象とした。

用量反応解析および等価用量予測には BMD アプローチを適用した。最小毒性量（LOAEL）などのアプローチは、効果量が明らかでないが、BMD は効果量が明確に定義されており、信頼区間を確立できる信頼予測が可能である。さらに、BMD アプローチは完全なデータセットを利用しており、LOAEL のように試験条件に大きく依存しない。

統計的観点から、非連続データ（腫瘍発現率など）では、 ED_{50} が等価用量として最適な選択である。しかし、種々のがん原性試験は最高用量ですら 50%未満の反応であることから、われわれはベンチマーク反応（BMR）として 10%余分のリスクを選択した。TG 試験で評価した連続データについても、等価用量を定義する効果量を 10%と設定した（ BMD_{10} ）。

用量反応のモデリングは、オランダの National Institute for Public Health and the Environment（RIVM）が開発したソフト PROAST を用いて行った。

発がん性（非連続）データでは、European Food Safety Association が推奨するモデルの標準リストが適合した。モデルを適合させる際、有限の傾きをゼロにした。許容可能な適合が得られたモデルから、適合度にしたがって、最低値の $BMDL$ （ BMD の信頼区間下限値）および最大値の $BMDU$ （ BMD の信頼区間上限）を選択した。こうした 2 つの値は BMD_{10} の不確実な範囲を表し

ている。がん原性試験に関して、2種類の BMD₁₀ を検討した。一方は「組織がマッチした腫瘍 BMD₁₀」で、これは遺伝毒性 BMD₁₀ のもとになった組織（同じものがなければ、類似組織）の発現率データにもとづいている。もう一方は「腫瘍 BMD₁₀ の最低値」すなわち腫瘍で用量依存性の増加を示す全組織のうち最低の BMD₁₀ である。反応を示す全組織が、組織がマッチした腫瘍 BMD₁₀ および腫瘍の BMD₁₀ の最低値の導出に使用した。

遺伝毒性（連続）データについては、指数モデルおよび Hill モデルを用いた。尤度比検定をもとにモデルを選定し、パラメータの数が増えると、適合性が統計的に有意に改善するかを評価した。対数尤度比の差が臨界値を超える場合、パラメータの多いモデルを許容した（P=0.05、補足情報、表 VI）。「完全な」モデルのため対数尤度比の値も示した。完全なモデルとは（残差分散とともに）単に各用量での観察結果を幾何平均したセットである。対数尤度比検定を用いて、適合度検定として選択したモデルと完全なモデルとを比較した。採用した遺伝毒性検定の簡単な説明

トランスジェニックげっ歯類突然変異試験

本研究では遺伝毒性試験として TG 試験のみを扱った。TG 動物にはその動物のあらゆる組織の細胞ゲノムに突然変異検出用ベクターが組み込まれている。代表的な TG 動物としては MutaTMMouse、Big BlurTMマウス、*gpt delta* トランスジェニック C57BL/6J マウスがある。

遺伝毒性 BMD₁₀ 値とがん原性 BMD₁₀ 値の比較

発がん試験、TG 試験で得られた用量反応データから、BMD₁₀ およびその信頼区間を導いた。両 BMD₁₀ のプロットし、y 方向および x 方向の偏差を乗じて合計する積和法（y 方向の偏差のみを小さくする二乗和法の逆）を用いて、（もとのスケールでは 0 で交差した）直線性の適合を検討した。適合した線から、発がん-BMD が TG-BMD に比例することが推定された。各遺伝毒性試験で評価したエンドポイントが 10% (BMR) 変化しても、それが必ずしも 10%の発がんリスクを予測するものではないため、比例定数が必要である。

（倫理面への配慮）

本研究は文献調査に基づくものであり、倫理上の問題は無い。

C. 研究結果

選択したデータから TG 試験データおよびがん原性データがいずれも入手可能であった化学物質について、TG 試験で得られた BMD₁₀ 推定値とがん原性試験で得られた BMD₁₀ 推定値を表 1 に示す。TG 試験について、解析可能な試験は 15 試験あった。がん原性試験は TG 試験と同じ組織における腫瘍発現率から導いた BMD₁₀ と、その化学物質に対する全試験および全組織のうち最低値の BMD₁₀ を示した。

BMD₁₀ 最低値に関する CI (BMDU/BMDL の比率) の大きさは、各 BMD₁₀ 推定値に関わる不確定度の大きさを表す (表 II)。TG 試験では 1.5 ~17 で、組織がマッチした腫瘍では 1.7~79.1、最低値の腫瘍は 1.7~135,817 であった。

TG 試験についても、TG およびがん原性試験の用量反応データが確認できる化合物が 15 あった。図 1 に、信頼区間の上限値および下限値とともに、組織がマッチした腫瘍 BMD₁₀ に対する TG による BMD₁₀ 最低値をプロットした。ここでも TG 試験から得た BMD₁₀ 値とそれぞれ組織がマッチした腫瘍データに中程度の相関が認められた ($\gamma=0.59$)。しかし、TG と腫瘍 BMD₁₀ 最低値には相関が認められなかった (データ非掲載)。

D. 考察

In vivo 遺伝毒性とがん原性の相関を量的に調べた試験はほとんどない。ここでのアプローチはがん原性試験から予測される等価用量と in vivo 遺伝毒性試験から予測される等価用量の相関を可能にする BMD アプローチを採用した点で新しい。残念なことに、OECD 試験ガイドラインに基づき、3 種類以上の用量群を設けた TG 試験がほとんどない点が本解析の限界であった。また、曝露経路もがん原性試験と TG 試験では異なり、そ

の比較も困難であった。TG 試験とがん原性試験の曝露経路が異なっていたのは、15 化合物中 6 化合物であった。こうした限界にもかかわらず、そのような化合物でも TG 遺伝毒性とがん原性に正の相関が認められた。一般に、組織がマッチした腫瘍 BMD₁₀ は腫瘍 BMD₁₀ 最低値より良好な相関がみられた。これは信頼区間が広いことから分かるように、腫瘍 BMD₁₀ 最低値から不確実性の大きさからも理解できるが、がんのリスク評価全体からみると、これはむしろ悩ましい。というのも、最も感度の高いエンドポイントが起程点 (PoD) の根拠になるのが当然であるが、ここでの結果では、この PoD は不確実性が高いことを示している。

遺伝毒性試験やがん原性試験において、高用量群をいくつか設けようとする現行の慣習は、ハザード特定のため、すなわちこの化学物質には遺伝毒性/発がん性があるかどうか、効果を検出する高い統計的検定力を実現するためである。同数の動物を用いるのであれば、多くの用量群を設けた試験デザインは、グループサイズが小さくなるため、明らかに統計的検定力が小さい。しかし、用量群を多く（そしてグループサイズを小さく）した試験デザインにおいて、用量相関性を評価することはリスク評価にとって重要である。リスク評価に向けた PoD を確立する用量反応解析のためには、用量群の数は多いが、サイズの小さい試験デザインが適しているかもしれない。

遺伝毒性化合物のリスク評価は、がん原性データがないことが多い。この場合、遺伝毒性発がん物質に対するヒトの許容曝露量を評価するには、別の戦略を練る必要がある。現在、*in vivo* 遺伝毒性試験から得られた用量反応データを用いたハザード特性付けのための量的アプローチまたは半定量アプローチは存在しない。リスク評価のために、遺伝毒性試験の予測強度にもとづき、どの化合物をがんに関する試験にかけるべきで、どれを省略すべきか決定する際、遺伝毒性試験は有用である。本研究で行ったように、遺伝毒性とがん原性の相関をプロットすることは、そうした決定

を行う上で有用である。ただし、相関プロットのばらつきと強度予測の不確実性を十分に考慮する必要がある。この場合、10~100 倍の不確実性の考慮が適切かもしれない。TG 試験から観察された BMDL₁₀ を 100 で割ると、対応する腫瘍 BMD₁₀ の控えめな予測値が得られる。がん原性データがない化学物質の発がんリスクの評価にはこのような控えめな BMD₁₀ の適用が現実的かもしれない。

E. 結論

遺伝毒性試験結果は一般にハザードの同定に使用されるが、リスク評価を目的として遺伝毒性試験結果を定量的に評価する試みが注目されている。がん原性試験、*in vivo* 遺伝毒性試験の用量反応データを検索し、詳細な文献調査を行った。用量反応モデリングプログラム PROAST を用いて、ベンチマークドーズ (BMD) を計算した。ここでは *in vivo* 遺伝毒性試験としてトランスジェニックげっ歯類突然変異試験 (TG) のみを扱った。15 種類の化合物から TG 試験の用量反応データを入手し、その BMD₁₀ 値をマウスのがん原性試験の BMD₁₀ 値と比較した。残念ながら報告されている TG 試験の多くは推奨されたプロトコルを用いておらず、適正な用量反応性を評価することは困難であった。しかしながら、最適とは言えない試験であっても、TG 試験の BMD₁₀ 最低値と、同じ組織での発がん性の BMD₁₀ 値とを比較したところ正の相関が認められた。遺伝毒性試験を、ハザードの同定から、リスク評価にシフトさせるためには、用量反応評価に耐えうる試験デザインの変更が必要である。また、がん原性データがない化学物質の発がんリスクの評価には、TG 試験で得られた BMD₁₀ からの外挿が可能かもしれない。

E. 参考文献

Hernández LG, Slob W, van Steeg H, van Benthem J. Can carcinogenic potency be predicted from *in vivo* genotoxicity data?: a

meta-analysis of historical data. Environ Mol Mutagen. 52, 518-28 (2011)

2013年11月 ブラジル・イグアス

F. 健康危機情報

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

G. 研究発表

誌上発表

1. Hayashi M, Honma M, Takahashi M, Horibe A, Tanaka J, Tsuchiya M, Morita T, Identification and Evaluation of Potentially Genotoxic Agricultural and Food-related Chemicals. Food Safety 1, 32-42 (2013)
2. Horibata K, Ukai A, Kimoto T, Suzuki T, Kamoshita N, Masumura K, Nohmi T, Honma M. Evaluation of in vivo genotoxicity induced by N-ethyl-N-nitrosourea, benzo[a]pyrene, and 4-nitroquinoline-1-oxide in the Pig-a and gpt assays. Environ Mol Mutagen. 54, 747-754 (2013)

学会発表

1. 本間正充：医薬品開発における遺伝毒性予測とリスク評価 CBI 学術講演会 2013年 東京
2. 本間正充：Risk assessment and management of genotoxic impurities in pharmaceuticals (医薬品中の遺伝毒性不純物のリスク評価と管理) 第3回中国薬物毒理学会医薬品非臨床安全性評価研究フォーラム) 2013年7月 中国蘇州
3. 本間正充：遺伝毒性の予測とリスク評価 平成25年度国立医薬品食品衛生研究所シンポジウム 2013年7月
4. M. Honma: A New Strategy for Hazard and Risk Assessment of Genotoxic Impurities. 第6回遺伝毒性試験国際ワークショップ 2013年10月 ブラジル・イグアス
5. M. Honma: Risk Assessment and Management of Genotoxic impurities in Pharmaceuticals. 第11回国際環境変異原学会

表1 解析結果: TG 試験 vs がん原性試験 (標的組織)

Compound (n)	In vivo genotoxicity				Tissue TG	Tissue-matched tumors						
	TG BMD ₁₀	TG BMDL ₁₀	TG BMDU ₁₀	Ratio BMDU/ BMDL		Tumor BMD ₁₀	Tumor BMDL ₁₀	Tumor BMDU ₁₀	Ratio BMDU/ BMDL	n	Tumor tissue	Route
CBC (3)	0.01	0.01	0.22	17.0	BM	0.12	0.06	0.24	4.3	8	Lymphosarcoma	ip
TDBP (4)	122.64	72.71	393.54	5.4	Kidney	55.02	32.10	94.30	2.9	12	Kidney mixed tumors	food
BD (1)	6.38	3.07	15.90	5.2	BM	7.26	0.83	63.60	76.8	10	Mixed tumors	inh
NDA (5)	0.31	0.26	0.40	1.5	Liver	0.09	0.05	0.19	3.9	8	Liver malignant	po
CPA (5)	8.31	5.33	18.93	3.6	Spleen	2.63	0.94	7.36	7.8	8	Leukemia	ip
EO (1)	15.97	9.66	46.41	4.8	Spleen	7.84	3.32	18.50	5.6	15	Mixed tumors	inh
EC (2)	65.60	49.18	98.54	2.0	Lung	1.25	0.58	2.67	4.6	7	Lung alveolar-bronchiolar adenoma	water
2-AAF (2)	33.63	15.75	69.95	4.4	Liver	2.14	0.99	4.62	4.7	59	Liver carcinoma	food
DMH (4)	1.72	1.24	2.83	2.3	SI	0.24	0.17	0.33	1.9	10	Liver angiosarcoma	water
BEN (3)	55.00	34.55	135.36	3.9	Spleen	1.09	0.12	9.65	79.1	16	Mixed tumors	po
BaP (3)	2.08	1.52	2.90	1.9	Spleen	5.11	3.07	8.52	2.8	7	Esophagus mixed	food
MNU (1)	0.05	0.03	0.05	1.6	SI	1.19	0.54	2.63	4.9	2	Spleen hemangio- endothelial sarcoma	water
AZA (2)	2.38	2.37	14.79	6.2	Liver	1.58	0.84	2.97	3.5	1	Uterus hemangioendothelioma	food
PhIP (6)	0.15	0.08	0.30	3.8	Colon	5.46	1.84	16.20	8.8	3	Mixed tumors	food
DCA (1)	48.02	38.16	64.79	1.7	Liver	29.48	11.00	79.00	7.2	13	Liver hepatocellular carcinoma	water

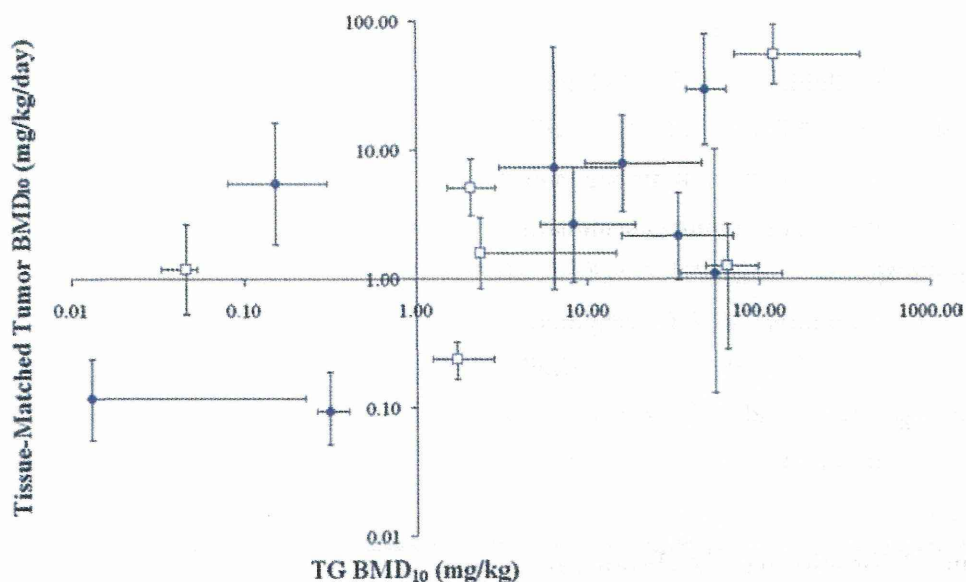


図1 TG 試験-BMD と発がん (TG 標的組織) -BMD の相関性 (r=0.59)

研究課題名：食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価法に関する研究

分担研究課題名：近接させた 4 分子の DNA 付加体が引き起こす突然変異誘発能の解析

分担研究者： 安井 学 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

研究要旨

低濃度の化学物質や低線量放射線の暴露による微弱な遺伝毒性の影響シグナルは、細胞毒性など他の要因による影響に埋没し区別できないこと、そして測定系の検出限界以下であること等の理由から、暴露で形成した DNA 付加体 1 分子だけの遺伝的影響を調べることはこれまで困難だった。しかし、我々はヒトリンパ芽球細胞 TSCER122 (TK6 細胞から樹立) のゲノム内に付加体の導入場所、分子数、そして化学構造がすべて既知の条件で、その付加体の DNA 修復および遺伝的影響を *in vivo* で追跡できる実験系を構築した。これまでの研究で、8-オキソ-7,8-ジヒドロ-2'-デオキシグアノシン付加体 (8-oxodG) を 1 分子から 2 分子に増加させたとき、そのゲノム導入部位で誘発する一塩基変異頻度が 2.4 倍上昇したことから、付加体の分子数と突然変異誘発頻度は、ほぼ比例の関係であることが示唆された。本年度は、これを確認するために、4 分子の 8-oxodG をゲノムに導入し、その部位で起こる突然変異誘発頻度とスペクトラムを明らかにすることを目的とした。実験の結果、8-oxodG 2 分子と 4 分子で得られた突然変異誘発スペクトラムが異なること、そして、4 分子の一塩基変異頻度 (20.1 %) は、2 分子のそれ (25.7 %) よりも低いことが分かった。その原因として、4 分子では同じ DNA 鎖内に 2 分子の付加体が近接しており、一度の修復でそれら 2 分子を同時に除去修復された (修復効率が上がった) ためだと推測された。よって、付加体の分子数と突然変異誘発頻度は、比例の関係に無いことが明らかとなった。

キーワード: DNA 付加体, 8-オキソグアニン, 閾値, 遺伝毒性発がん物質

A. 研究目的

最近、我々はヒトリンパ芽球細胞 TSCER122 (TK6 細胞から樹立) のゲノム内に DNA 付加体の導入場所、分子数、そして化学構造がすべて既知の条件で、その付加体の DNA 修復および遺伝的影響を *in vivo* で追跡できる実験系を構築した

(Yasui et al., *DNA repair* 15, 11-20 (2014))。その系に酸化的 DNA 損傷である 8-オキソ-7,8-ジヒドロ-2'-デオキシグアノシン付加体 (8-oxodG) を 1 分子だけ導入して調べれば、DNA に酸化損傷を形成させる化学物質 (例えば、食品添加物の臭素酸カリウム等 (Murata et al., *Chem. Res.*