

Toxicol. 14, 678-685(2001)) や放射線 (例えば, 電離放射線等 (Ward J.F., *Int. J. Radiat. Biol.* 66, 427-432(1994)) の低用量による暴露の影響評価に利用できるのではないかと考えている。なぜなら, 低用量域におけ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, 低用量暴露で形成した 8-oxodG 損傷 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からである。

これまでの研究によって, わずか 1 分子であっても, 8-oxodG は 10.7 % の頻度で一塩基置換 (主に G→T トランスマージョン) および欠失を誘発させることが分かった。また, その付加体部位の斜め対面にも 8-oxodG を導入し, 2 分子について調べた結果, 導入部位周辺に塩基配列の変化が高い頻度で認められ, その大部分は付加体部位の一塩基変異 (25.7 %) によるものだった。これらを比較すると, 付加体が 1 分子から 2 分子に増えることによって, 一塩基変異頻度が約 2.4 倍高くなったことから, 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分かった。

本研究の目的は, 前年度に引き続き, 4 分子の 8-oxodG をゲノムに導入し, 1 分子や 2 分子と同様の解析を行うことで, 付加体の分子数 (1 分子~4 分子) と突然変異誘発頻度の数的関係性を明らかにすることである。

B. 研究方法

1) ヒト培養細胞を用いる極低用量暴露モデルの実験系

TSCER122 細胞 ($TK^{-/-}$) は, TK6 細胞からチミジンキナーゼ遺伝子 (TK) のエキソン 5 を欠き, その欠失部位に I-SceI 認識配列 18 bp (5'ATT ACC CTG TTA TCC CTA) を 1 つ持っている。その配列は, 本来のヒトゲノムに無いため, その培養細胞に I-SceI を発現させるベクター (pCBASce) を導入すれば, I-SceI 酵素の切断により, ゲノムの 1 ヶ所だけに二本鎖切断を形成させることができる。その I-SceI 切断部位では,

DNA 修復されやすくなっているため, そこに相同配列を持ち, 且つ DNA 付加体を含むターゲティングベクターを導入すれば, 相同組み換えにより, エキソン 5 と付加体が同時にゲノム内に入る。その時, 細胞は $TK^{-/-}$ → $TK^{+/-}$ になるため, HAT セレクションによって TK 復帰細胞だけ (つまり付加体が導入された細胞だけ) を回収することができ, 後のシーケンス解析等に供することが可能である (図 1)。

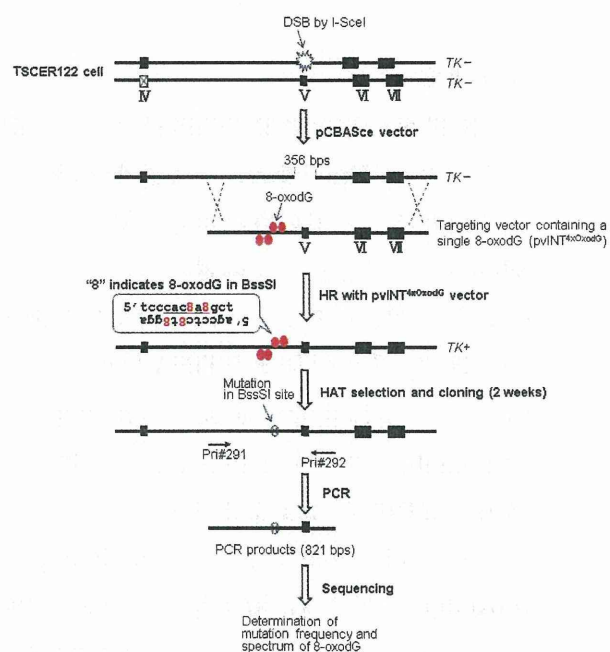


図 1. ヒト培養細胞を用いる極低用量暴露モデルの実験系の概要

2) 8-oxodG 付加体 4 分子を部位特異的に含むターゲティングベクターの構築

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 (Arakawa, T. *et al, Anal. Biochem.* 416, 211-217 (2011)) 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。

3) トランスフェクションと DNA 解析

細胞ゲノムへの導入は、Lonza 社製 Cell Line Nucleofector の手法に従っておこなった。5 x 10⁶ cells/100 μL に調整した TSCER122 細胞に、pCBASce 50μg と pvINT^{2xOxodG} ターゲティングベクター2μg を同時にトランスフェクションし、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 1~5 x 10³ cells/mL に調整し、HAT 試薬を添加後、96 穴プレートでさらに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-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。一塩基変異とは、付加体の導入部位で起きる一塩基置換、一塩基欠失 (Δ¹)、そして一塩基挿入を示す。また、TK の転写鎖 (Transcribed strand; TS)、および非転写鎖 (Non-transcribed strand; NTS) に導入された各 8-oxodG の突然変異誘発スペクトラムと頻度を計算した (表 1)。

C. 研究結果

1) 複数分子の付加体導入による TK 復帰頻度

4 分子の 8-oxodG を含む pvINT^{4xOxodG} 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結果、その TK 復帰頻度は 7~8 x 10⁻³ だった。この値は、付加体無しのコントロールベクター pvINT^{dG} を導入した時とほぼ一致する復帰頻度だった。

2) 4 分子の 8-oxodG による突然変異誘発頻度およびスペクトラム

pvINT^{4xOxodG} をトランスフェクション後、付加体が導入された 536 クローン細胞 (2 度の独立した実験の合計) についてシーケンス解析した (表 1)。そのうち、8-oxodG 導入部位および周辺 (BssSI 部位の中) に塩基配列の変化があったのは 133 クローン (24.8%) だった。そのうち 110 クローンが、付加体対面の一塩基変異 (20.1%) だったことから、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%) であり、塩基欠失や挿入など他の変異は 1% 未満であった。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。その原因は、BssSI 配列の中央に一塩基挿入された 5'-CTCZGTG (Z は G あるいは C) が、2 分子では 5.4% 検出されたが、4 分子ではほとんど無かったこと、そして、4 分子による一塩基欠失の発生頻度 (0.7%) が、2 分子の時 (7.0%) よりも 1/10 に減少したことである。

表 1. 数分子の 8-oxodG が近接するときの突然変異誘発頻度とスペクトラム

Targeting vector	Experiment	No. of TK revertants analyzed	No. of 8-oxodG-integrated revertants	Strand	Point mutation							Total of mutation	Others	ND ²
					X=	G	T	C	A	Δ ¹	ins ²			
pvINT ^{2x}	1	250	209	NTS	205	0	0	0	0	0	0	0	3	0
	2	638	551	NTS	551	0	0	0	0	0	1	9	0	
	Total	888	770 (100%)		757 (98%)	0	0	0	0	0	1 (0.1%)	1 (0.1%)	12	0
pvINT ^{3x}	1	259	207	NTS	176	13	2	1	4	2		5	4	
	2	685	595	NTS	516	34	8	5	13	4		13	3	
	Total	944	803 (100%)		692 (86%)	47 (5.9%)	10 (1.2%)	6 (0.7%)	17 (2.1%)	6 (0.7%)	86 (10.7%)	18	7	
pvINT ^{2x+3x}	1	176	152	TS		4	3	1	5			9	3	
				NTS		8	7	0	10					
	2	340	276	TS		6	6	3	3		14	13	5	
				NTS		11	6	2	12					
Total	516	428 (100%)			288 (67%)	29 (6.9%)	22 (5.1%)	6 (1.4%)	30 (7%)	23 (5.4%)	110 (25.7%)	22	8	
pvINT ^{4x+3x}	1	286	236	TS		8	3	1	0		1	9	1	
				NTS		16	5	0	2					
	2	363	300	TS		13	7	2	0		0	11	2	
			NTS		29	17	2	2						
Total	649	536 (100%)			403 (75%)	68 (12%)	32 (6.0%)	5 (0.9%)	4 (0.7%)	1 (0.2%)	110 (20.1%)	20	3	

¹Significantly different from the control value. P<0.05 (Student's t-test)

²Includes G, T, and G insertions

³Not detectable

D. 考察

本実験で得られる TK 復帰頻度について、I-SceI 発現ベクターのみのトランスフェクション時は、復帰頻度が 1~5 x 10⁻⁴ の範囲にあり、ターゲティングベクター (付加体を含まない pvINT^{dG}) と同時導入すると、復帰頻度は 5~10 x 10⁻³ 程度に上昇する。同様に、1 分子 (pvINT^{OxodG}) および 2 分子 (pvINT^{2xOxodG}) の 8-oxodG を含むベクターを用いても、これと同程度の頻度を得られることが前年度の研究で確認できている。本研究においても、4 分子の 8-oxodG を含む pvINT^{4xOxodG} を I-SceI ベクターとコトランスフェクションすると、それらと同じ復帰頻度 (7~8 x 10⁻³) を得られることが確認できた。これらのデータは、ターゲティングベクター上に 8-oxodG 付加体が複数分子存在しても、ゲノムにインテグレートされる相同組換えの障害にならないことを示唆している。

表1に示した通り、8-oxodG 4分子の主な突然変異誘発スペクトラムは、1分子や2分子で得られた時と同様に G・C → T・A トランスバージョンであったが、2分子で得られた特徴的な 5'-CTCZGTG (ZはGあるいはC) 一塩基挿入、および一塩基欠失の変異スペクトラムがほとんど検出されなかった。本研究の近接させた DNA 付加体の配置は、電離放射線で発生するクラスターDNA 付加体の形成様式と類似している。そのクラスター付加体の修復機構については、主に試験管内あるいは大腸菌を用いた研究がほとんどだが、最近では哺乳類細胞を用いた研究も報告されてきている (Sage *et al.*, *Mutat. Res.* **711**, 123-133(2011))。Harrison らは、クラスター付加体が3塩基以内で近接している場合は一本鎖切断 (SSB)、3塩基以上離れている場合は二本鎖切断 (DSB) が DNA 修復初期に形成すると報告している (Harrison, L. *et al.*, *Pathophysiology* **8**, 149-159 (2002))。それに従えば、本研究で使用された 8-oxodG 2分子と4分子の配置は、3塩基以上離れることがないため DSB を介する修復が働くことは無く、両方ともおそらく SSB を介した塩基除去修復 (BER) が働くはずである。しかしながら、表1のとおり2分子と4分子の変異スペクトラムが異なっていることから、それぞれ異なる BER 機構が働いているものと予想できる。

2分子の 8-oxodG の修復では、まず、片方の DNA 鎖の 8-oxodG が 8-オキソグアニングリコシラーゼ (OGG1) によって除去され、その後、エンドヌクレアーゼがその部位で SSB を形成させる。その後、DNA ポリメラーゼ β (pol β) が正常塩基の dG を挿入する前に、斜め対面にある 8-oxodG・dC が wobble 塩基対を形成しているために、その 8-oxodG の対面に pol β が誤って一塩基挿入、および欠失を誘発したと予想できる。また、このとき pol β が DNA 複製に滞ると、DSB を形成して他の修復機構が働く可能性も考えられる。

一方、4分子の 8-oxodG では、ロングパッチ BER 機構が働いていると予想される (Nilsen *et*

al., *Carcinogenesis* **22**, 987-998(2001))。まず、片方の DNA 鎖の 8-oxodG 2分子のうち、5'側の 8-oxodG が OGG1 によって除去され、その後、エンドヌクレアーゼがその部位で SSB を形成させる。その後、pol β が正常配列を有する DNA 鎖をテンプレートとして、数塩基を DNA 合成し、もう一つの 8-oxodG を含む DNA 鎖を押し退ける。また、ロングパッチ BER では、pol β だけでなく PCNA (核内増殖抗原) が関与する正確性の高い pol δ 等も働くことが知られており、これらの機能が4分子の解析結果で一塩基挿入や欠失が検出されなかった要因かもしれない。そして、その余分鎖はフラップエンドヌクレアーゼによって取り除かれ、最後にライゲースが DNA 鎖を結合させることで4分子のうち2分子の修復が完了する。片方の DNA 鎖の付加体が修復されてから、もう一方の DNA 鎖の付加体を修復するという2段階で行われると予想される。以上のことから、2分子と4分子の 8-oxodG から誘発する突然変異スペクトラムの違いは、修復される際の BER 機構が異なることが原因だと予想できる。

近接させ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ことから、付加体数と変異頻度は比例の関係にないことが分かった (図2)。その理由は、前述のとおり、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である。つまり、もし各付加体が互いに遠隔にあり、独立して修復そして変異を誘発させていけば、付加体数と変異頻度に比例の関係が存在するかもしれないが、近接して付加体がある時 (特に同じ DNA 鎖内) は、一度の修復で複数分子が除去修復されると考えられる。よって、近接して4分子以上の付加体を導入したとしても、それらが誘発する突然変異頻度は、ある程度のところでプラトーに達すると予想できる。

次に、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させ、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。

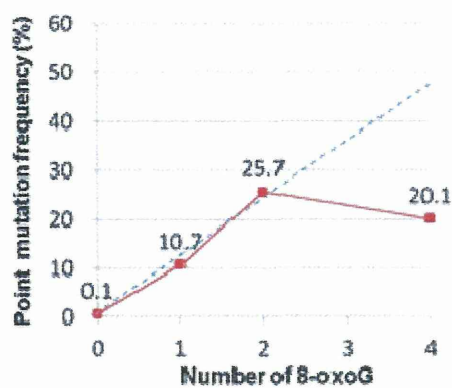


図 2. 近接させた 8-oxodG の分子数と突然変異誘発頻度の関係性

E. 結論

8-oxodG 4 分子を含むターゲティングベクターを細胞ゲノムの特定部位へ導入し、その部位および周辺をシーケンスした結果、塩基配列の変化が 24.8 % の頻度で認められ、その大部分は付加体の導入部位で起こる一塩基変異 (20.1 %) だった。この変異頻度は、2 分子を導入したときのそれよりも低かった。その原因として、同じ DNA 鎖内に 2 分子の付加体が近接しているため、一度の修復でそれらを同時に除去修復できたため (修復効率が上がった) と考えられた。以上のことから、近接させた付加体の分子数と突然変異誘発頻度は、比例の関係にならないことが明らかとなった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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)
- 2) 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)

2. 学会発表

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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
- 4) 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)

H. 知的所有権の取得状況

なし

研究課題名：食品添加物等における遺伝毒性評価のための戦略構築に関する研究

分担研究課題名：食品添加物における遺伝毒性発がん物質の評価法に関する研究

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

研究要旨

食品添加物等の遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討するために、低用量臭素酸カリウムを経口投与して発がん実験を行い、*Mutyh* 遺伝子欠損マウスへ臭素酸カリウムを投与する発がん・突然変異誘発の実験系は、遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討する上で、有用な評価系であることが示された。本年度は、*Mutyh* 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する結果を得たので、「閾値」周辺の低用量臭素酸カリウムによる誘発突然変異の解析を行っている。

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

A. 研究目的

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

生命にとって必須の酸素は、エネルギー産生系で利用される際に活性酸素種の生成を伴い、遺伝情報を司る DNA、RNA 並びにそれらの前駆体を酸化する。これら内在性の酸素ストレスに加え、

環境中の放射線や遺伝毒性を示すある種の化学物質、さらには感染に伴う炎症によっても活性酸素種が生じている。活性酸素種は生体高分子を酸化し、発がんや老化を引き起こす。様々な酸化的損傷の中で、核酸のグアニン塩基の酸化体 8-オキソグアニン(8-oxoG)は遺伝情報保持及び伝達に異常を引き起こす点で最も重要である。8-oxoG はシトシンと同程度にアデニンとも対合できるので、DNA 中の 8-oxoG は突然変異の原因となる。8-oxoG による突然変異生成に対処するために生物は種々の酵素系を持っている。ヒトでは、OGG1 が DNA 中の 8-oxoG を取り除き、MUTYH が 8-oxoG に対して取り込まれたアデニンを除去する。また MTH1 はヌクレオチドプール中に生じた 8-oxo-dGTP を分解し、DNA 複製の際に 8-oxoG が DNA へ取り込まれるのを防いでいる。我々はこれらの酵素の遺伝子を欠損したマウス

を樹立し、これらのマウスでは自然発がんが上昇していることを示し、酸化 DNA 損傷が自然発がんの要因であることを明らかにしてきた。さらに *Mutyh* 遺伝子欠損マウスに酸化剤である臭素酸カリウムの 0.2% 溶液を経口投与すると、野生型マウスと比較すると突然変異および発がん頻度が劇的に上昇することを見出し、*Mutyh* 遺伝子が酸化による遺伝毒性に対する閾値形成に関与している可能性を指摘した。一方、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。

B. 研究方法

1) *Mutyh* 遺伝子欠損マウスの飼養

C57BL6/J の遺伝的背景を持つ *Mutyh* 遺伝子欠損マウスのヘテロ接合体同士との掛け合わせにより *Mutyh* 遺伝子欠損マウスと対照群の野生型マウスを得た。また、*rpsL-Tg* マウスとの交配を行い、*Mutyh* 遺伝子欠損/*rpsL-Tg* マウスと対照群の野生型/*rpsL-Tg* マウスを得た。マウスの飼養については、九州大学遺伝子組換え実験安全管理規則並びに動物実験規則に従って実施した。

2) 臭素酸カリウム溶液の投与

臭素酸カリウム (Sigma-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。投与方法としては、発がん解析には 16 週間、突然変異の解析には 4 週間自由飲水で行い、消費量については週一回モニターした。

3) 発がん実験

6~8 週齢の野生型および *Mutyh* 遺伝子欠

損マウス (雌; 6~14 匹) に臭素酸カリウムを 16 週間投与した後、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。検出した腫瘍から病理切片を作製し、病理解析を行った。

4) 突然変異解析

4 週齢の *rpsL-Tg* を持つ野生型および *Mutyh* 遺伝子欠損マウスに臭素酸カリウムを 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。

5) 統計的手法

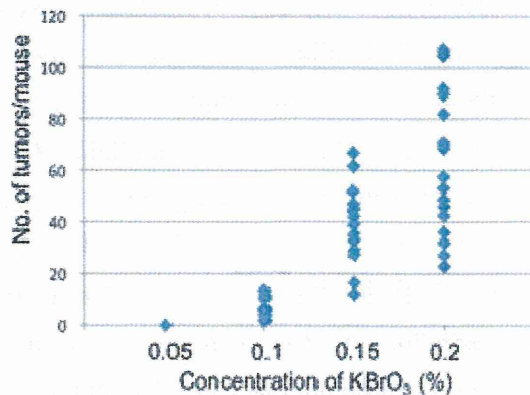
すべての測定値について平均値と標準偏差を求めた。

C. 研究結果

臭素酸カリウム誘発消化管発がん

これまでの *Mutyh* 遺伝子欠損マウスを用いた 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。一方、低用量の 0.05% 臭素酸カリウムを経口投与して発がん実験を行った結果、0.05% 臭素酸カリウムの投与では *Mutyh* 遺伝子欠損マウスの十二指腸・空腸には上皮性腫瘍を発生させなかった。

本年度は、遺伝毒性に対する閾値形成について詳細に検討するために、マウスを追加して 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 (図 1)。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。0.05% 投与群では現時点では発がんを認めていない。



第1図 *Mut*h 遺伝子欠損マウスにおける臭素酸カリウム誘発小腸腫瘍の発生頻度

臭素酸カリウム誘発突然変異

上述のように *Mut*h 遺伝子が欠損した個体でも酸化剤臭素酸カリウムによる発がん性に関して「閾値」が存在することを示唆する結果を得た。この実験系における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、現在「閾値」周辺の低用量臭素酸カリウムによる誘発突然変異の解析を行っている。0.10%投与群（野生型マウス2匹、*Mut*h 遺伝子欠損マウス2匹）を用いた突然変異解析の現時点で得られている結果では、野生型マウスに比べて *Mut*h 遺伝子欠損マウスでは全体の突然変異頻度が約1.6倍（野生型； 4.32×10^{-5} 、*Mut*h 遺伝子欠損マウス； 7.12×10^{-5} ）であり、8-oxoGに起因すると考えられるG:C→T:A型の変異が約5.8倍（野生型； 0.78×10^{-5} 、*Mut*h 遺伝子欠損マウス； 4.49×10^{-5} ）上昇していた。

D. 考察

遺伝毒性物質の作用には閾値がないとされるため、遺伝毒性に基づく発がん作用が検出された場合には、食品添加物等にはADIが設定されない。しかし、遺伝毒性発がん物質であっても「事実上の閾値」（それ以下では有意な発がん頻度の上昇が見られない用量）のあることが示唆されている（Carcinogenesis, 26, 1835-1845, 2005）。ヒトにはさまざまな生体防御機構（DNA修復、解毒代謝、

誤りのない損傷乗り越えDNA合成、アポトーシス等）が存在し、これらが遺伝毒性発がん物質の作用を抑制し「事実上の閾値」を形成する可能性が考えられる。本研究では、酸化DNA損傷に起因する突然変異を抑制する *Mut*h 遺伝子を欠損したマウスを用い、パンの製造過程でも使用される酸化ストレスを負荷することが知られている食品添加物の臭素酸カリウムを投与する実験を行い、DNA修復が遺伝毒性に関する「事実上の閾値」形成に貢献する可能性について検討するための試験系の樹立をめざしている。

*Mut*h 遺伝子欠損マウスを用いた臭素酸カリウム溶液を飲水投与する誘発消化管発がん実験の結果、0.1%～0.2%臭素酸カリウムを投与された *Mut*h 遺伝子欠損マウスでは1個体当たりの小腸発がんの発生数は投与された臭素酸カリウムの濃度に相関して増加した（図1）。一方、0.05%臭素酸カリウム投与の *Mut*h 遺伝子欠損マウスでは追加実験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 *Mut*h 遺伝子が関与していることを示している。また、*Mut*h 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} 、*Mut*h 遺伝子欠損マウスでは 4.49×10^{-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 1.89×10^{-5} 、*Mut*h 遺伝子欠損マウスでは 22.16×10^{-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 *Mut*h 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。

酸化ストレスによって自然発がんが生じることは既に複数の DNA 修復系の遺伝子欠損マウスを用いて明らかになっている。*Mut^yh* 遺伝子欠損マウスはヒトの遺伝性大腸がん (MAP: MUTYH-associated polyposis) の疾患モデルであり、消化管における自然発がんの発生頻度が野生型マウスに比して有意に上昇している。このように *Mut^yh* 遺伝子の欠損という酸化ストレス誘発発がんにも最も感受性が高いマウス個体を用いて発がん感受性や遺伝毒性に関する研究を行うことで、遺伝毒性に対する *Mut^yh* 遺伝子産物以外の多重の防御機構の寄与を明らかにすることが可能となる。すなわち、食品添加物として使用されている化学物質臭素酸カリウムの低用量に起因する酸化ストレスによる消化管発がんを、他の修復系や DNA 損傷応答系等によりどの程度まで抑制できるのかを明らかにできると考えられる。

E. 結論

Mut^yh 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、*Mut^yh* 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。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

- 1) 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 (1): 73-79, 2014

学会発表

- 1) 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.
- 2) 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, [Analyzing system for somatic and germline mutations using mutator mouse line, Mizuki Ohno, Kunihiko Sakumi, Ryotaro Fukumura, Yoichi Gondo, Yuki Iwasaki, Toshimichi Ikemura, Teruhisa Tsuzuki, Yusaku Nakabeppu], 日本環境変異原学会第 42 回大会, 岡山, 2013.11.30.
- 3) 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, [Threshold for *in vivo* mutation induced by potassium bromate in the small intestine of *gpt delta* mice, and dose-dependent changes in the mutation spectrum, Yasunobu Aoki, Michiyo Matsumoto, Michi Matsumoto, Ken-ichi Masumura, Teruhisa Tsuzuki, Takehiko Nohmi] 日本環境変異原学会第 42 回大会, 岡山, 2013.11.30.
- 4) Teruhisa Tsuzuki, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestines of *Mut^yh*-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.
- 5) Teruhisa Tsuzuki, Mizuki Ohno, Yusaku Nakabeppu, Yoshimich Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of *Mut^yh*-deficient mice: the

effect of low-level exposure to $KBrO_3$, 日本
癌学会第 72 回学術総会, 横浜, 10.6.2013.

- 6) 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.
- 7) 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, [A study of *de*
*nov*o germline mutation due to oxidative
DNA damage, Mizuki Ohno, Kunihiko
Sakumi, Ryutaro Fukumura, Yoichi Gondo,
Yuki Iwasaki, Toshimichi Ikemura,
Teruhisa Tsuzuki, Yusaku Nakabeppu] 日
本遺伝学会第 85 回大会, 東京, 2013.9.19.
- 8) 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.

G. 知的所有権の取得状況

特になし

平成 25 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：食品添加物等における遺伝毒性評価のための戦略構築に関する研究

分担研究課題名：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

分担研究者： 山田 雅巳 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長

研究要旨

国際がん研究機構（IARC）によりグループ 1 に分類された物質のうち、28 化合物について、変異原性の指標である Ames 試験の比活性値と、発がん性の指標である TD50 値の相関を調べ、構造クラスとの関係を考察した。

キーワード：Ames 試験，比活性値，発がん性，TD50 値，IARC グループ 1

A. 研究目的

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ものとして遺伝毒性が挙げられる。遺伝毒性の有無と、その性質，すなわち DNA との反応性の強さは、発がんメカニズムと密接に結び付いている。行政的には、DNA 反応性発がん物質と評価された場合は ADI が設定できず、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。我が国においては、食品添加物に対してこの手法が十分に検討されていないこと、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、試験結果の量的評価が不可欠であることを考慮し、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適切利用するために、遺伝毒性の量的反応性を考慮した手法の開発を目指す。

微生物を用いる変異原性試験（Ames 試験）では、試験に供した化学物質 mg 当たりの復帰変異コロニー数を『比活性値』として、例えばこの値が 1,000 を超えるものは非常に強いとするなど、変異原性の強さの「目安」にしている。しかしながら、これはあくまでも「目安」であり、本来

Ames 試験に正確な定量性はない。そこで、本分担研究課題では、食品添加物を含む化学物質の Ames 試験結果のデータベースを構築し、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を開発する。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。

初年度は、発がん性物質が多く含まれる構造クラスの中で芳香族アミンを選び、発がん性と Ames 試験の強さの相関を調べた。芳香族アミンは一般の化学物質に比して、Ames 試験の結果判定と発がん性の相関が高いことがわかった。

二年目は 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べた。

B. 研究方法

1) 対象化合物

IARC グループ 1 の物質（表 1）のうち、CAS

registry number (CAS#) をもち、Carcinogenic Potency Database Project (CPDB) のサイトに齧歯類を用いた発がん試験のデータとして TD50 値 (後述) が掲載されており、かつ、National Toxicology Program (NTP) のサイトに Ames 試験のデータが掲載されていたものを一覧にした (表 2)。

2) TD50 値と比活性値の定義

TD50 値：動物に物質を投与しない場合は腫瘍が誘発されないという条件で、毎日その物質を投与し続けた場合に、動物の半数に腫瘍を誘発するという被験物質の 1 日あたりの用量を、動物の体重 kg 当たりの mg 数で表したもの。単位は mg/kg body weight/day。値が小さいほど発がん性は高い。種ごとに複数の実験が実施されている場合、個々の陽性になった実験の中で最も腫瘍が起きやすかった臓器の結果に基づいて算出された TD50 値の調和平均 (それぞれの値の逆数の和の平均値の逆数をとったもの) を TD50 値としている。

比活性値：Ames 試験の判定が陽性になった場合に、その強さの目安として計算する。被験物質で処理したプレートの復帰変異コロニー数から、溶媒対照のプレートの復帰変異コロニー数を差し引いて、被験物質の用量 (mg) で除した値。単位は revertants/mg。値が大きいほど変異原性が高い。複数の条件で陽性になる場合は最も大きい数値を取る。

3) 発がん性と変異原性の相関

表 2 から Ames 試験が陽性のグループと、陰性のグループの TD50 値の逆数をグラフにした (図 1)。Ames 試験陽性のグループで、TD50 値の逆数と比活性値の相関をグラフにした (図 2)。逆数を用いた理由は、発がん性が高いほど数値が大きくなるようにするためである。

(倫理面への配慮)

該当しない研究である。

C. 研究結果

1) 発がん物質における TD50 値の検索と比活性値の算出

IARC の Group 1 に分類されている物質等は 114 あり (2014 年 1 月 21 日現在)、そのうち CAS# を持っているものは 57 であった (別添・表 1)。それを基に、ラットもしくはマウスで行われた発がん試験から算出された TD50 値が CPDB サイトに掲載されており、Ames 試験の判定がわかっているもの、28 物質、を抜粋した (別添・表 2)。Ames 試験の判定が陽性の物質は 21 で、陰性の物質は 7 であった。陽性の物質のうち米国 National Toxicology Program で Ames 試験が実施されているものは 14 あり、それぞれのデータから比活性値を算出した。残りの 7 物質のうち、3 物質については検索した文献内のデータから算出したが、Ethylene oxide, NNK, Tamoxifen citrate, vinyl chloride の 4 物質については Ames 試験の数値データを入手できなかった (表 2)。

2) Ames 試験の判定と TD50 値の関係

表 2 より 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 値の分布をグラフにした (図 1)。数値が大きいほど発がん性が高くなるように、縦軸はラットにおける TD50 値の逆数を用い、9 ケタの開きがあることから、対数表示にした。4-Aminobiphenyl と Azathioprine についてはラットにおける値がなかったため、マウスの値を用いた。

その結果、陰性判定の物質の $1/\text{TD50}$ は、2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) の 42,553 及び、Diethylstilbestrol の 4.48 を除けばすべて 0.01 以下 (最小値は 0.00011) と小さい値に集まった。陽性判定の物質の $1/\text{TD50}$ は、1,3-Butadiene の 0.0038 を除けば 0.01 以上 (最大値は 312.5) の値に集まった。

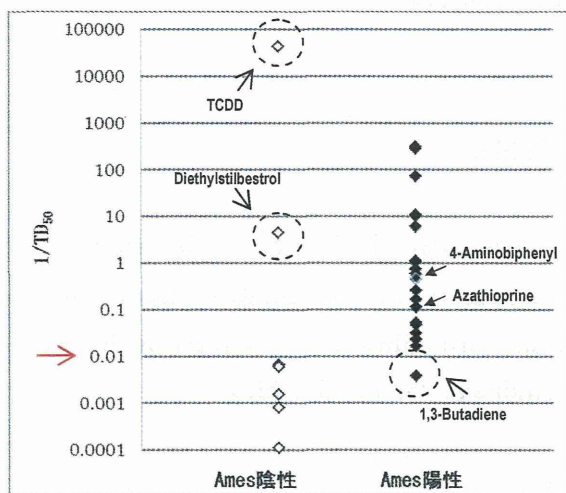


図1 Ames 試験の判定と TD50 値の関係
◇陰性判定の物質，◆陽性判定の物質

3) 比活性値と TD50 値の相関

次に、Ames 試験の比活性値とラットの TD50 値の相関をグラフにした。Ames 試験の比活性値が高いのに比べて、発がん性が低い、グラフで右下にプロットされるものは 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、グラフの左上にプロットされるものはなかった。

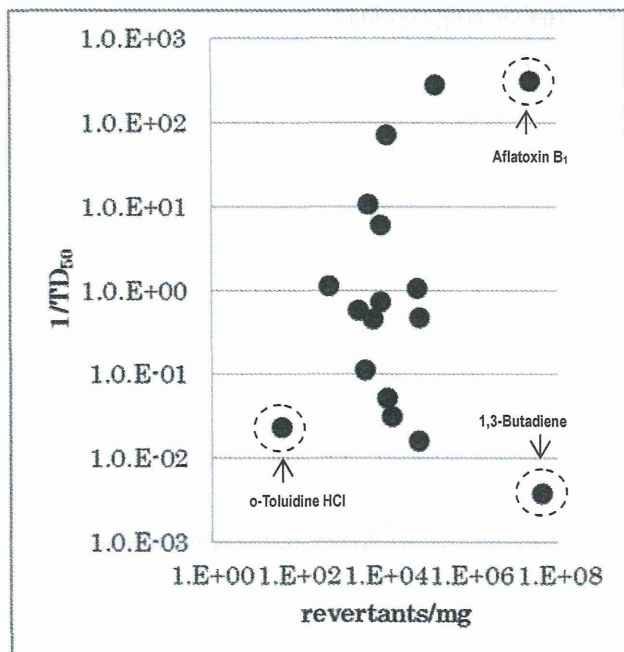


図2 Ames 試験における陽性判定の物質の、比活性値と発がん試験結果から算出した TD50 値の逆数の相関

発がん性も変異原性も高いと考えられる Aflatoxin B1 と、このグループの中では比較的どちらも低い o-Toluidine HCl を除けば、残りの 14 物質の比活性値は mg あたり 103 から 105 の間の数値であった。

D. 考察

昨年度は、一般的な化学物質と芳香族アミンについて、TD50 値比活性値について相関を調べたところ、芳香族アミンは一般的な化学物質に比べて相関が高いという結果を得た。今年度はヒトに対する発がん性があるとされている物質に絞って、同様に相関を調べたところ、Ames 試験陽性と陰性の境目が、TD50 値の逆数が 0.01 付近であるという結果を得た。Ames 試験が陰性の物質の場合、発がん性があっても TD50 値が 100 mg/kg/day 以上である場合がほとんどであるということである。

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 Diethylstilbestrol であった。TCDD は酵素誘導に働くことから (J.B.C., 288, 21514, 2013), Diethylstilbestrol は代謝物の DNA 付加体の安定性から (J.B.C., 264, 16847, 1989), それぞれ文献において発がんに関与するメカニズムとして考察されており、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。

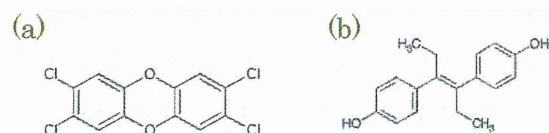


図3 TCDD(a)と Diethylstilbestrol(b)の構造式

図2で Ames 試験陽性の物質について、比活性値と TD50 値の逆数をプロットした。プロットの位置と物質の構造の関係を見るために、プロットを次のように分類した (図4)。

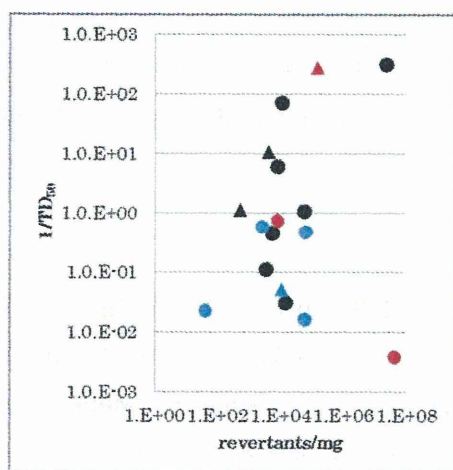


図4 構造別プロット

赤色は常温で気体の 1,3-Butadiene, BCME, Formaldehyde, 水色はニトロアレーン (Aristolochic acid, Azathioprine) と芳香族アミン (4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline), 2-Naphthylamine, 4-Aminobiphenyl, Benzidine, o-Toluidine HCl) である. TCDD のように塩素を含む物質 (Melphalan, Chlorambucil, Bis(chloromethyl)ether (BCME), 4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline)) を▲で示した. 図4を見る限り, いずれのグループの物質も, TD50 値は上から下まで分布しており, 特徴は見いだせなかったが, その中で芳香族アミンは比較的弱い発がん性を示す傾向にあった.

E. 結論

IARC によりグループ 1 に分類された物質のうち, 28 化合物について, 変異原性の指標である Ames 試験の比活性値と, 発がん性の指標である TD50 値の相関を調べた. 従来どおり, mg 当たりの復帰変異コロニー数が 1,000 を超えるものを変異原性が強いとする位置づけに大きな問題はないことが確認できた. しかしその一方で, 例外的なメカニズムにより, 相関が崩れるものもあることから, そのようなものを検出するシステムを検討する必要があると考える.

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

- 1) 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)

学会発表

- 1) 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)
- 2) 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)

H. 知的所有権の取得状況

特になし

表1 IARCにおいてGroup 1（ヒトに対する発がん性がある）とされた物質一覧#（1）

Agent	CAS#
1 Acetaldehyde associated with consumption of alcoholic beverages	75-07-0
2 Acid mists, strong inorganic	-
3 Aflatoxins	1402-68-2
4 Alcoholic beverages	-
5 Aluminium production	-
6 4-Aminobiphenyl	92-67-1 1
7 Areca nut	-
8 Aristolochic acid (NB: Overall evaluation upgraded to Group 1 based on mechanistic and other relevant data)	313-67-7
9 Aristolochic acid, plants containing	313-67-7
10 Arsenic and inorganic arsenic compounds	7440-38-2 1332-21-4 13768-00-8
11 Asbestos (all forms, including actinolite, amosite, anthophyllite, chrysotile, crocidolite, tremolite) (NB: Mineral substances (e.g. talc or vermiculite) that contain asbestos should also be regarded as carcinogenic to humans.)	12172-73-5 17068-78-9 12001-29-5 12001-28-4 14567-73-8
12 Auramine production	-
13 Azathioprine	446-86-6
14 Benzene	71-43-2
15 Benzidine	92-87-5
16 Benzidine, dyes metabolized to (NB: Overall evaluation upgraded to Group 1 based on mechanistic and other relevant data)	-
17 Benzo[a]pyrene (NB: Overall evaluation upgraded to Group 1 based on mechanistic and other relevant data)	50-32-8
18 Beryllium and beryllium compounds	7440-41-7
19 Betel quid with tobacco	-
20 Betel quid without tobacco	-
21 Bis(chloromethyl)ether; chloromethyl methyl ether (technical-grade)	542-88-1 107-30-2
22 Busulfan	55-98-1
23 1,3-Butadiene	106-99-0
24 Cadmium and cadmium compounds	7440-43-9
25 Chlorambucil	305-03-3
26 Chloroaphazine	494-03-1
27 Chromium (VI) compounds	18540-29-9
28 Clonorchis sinensis (infection with)	-
29 Coal, indoor emissions from household combustion of	-
30 Coal gasification	-
31 Coal-tar distillation	8007-45-2
32 Coal-tar pitch	65996-93-2
33 Coke production	-
34 Cyclophosphamide	50-18-0 6055-19-2
35 Cyclosporine	59865-13-3 79217-60-0
36 Diethylstilbestrol	56-53-1
37 Engine exhaust, diesel	-
38 Epstein-Barr virus	-
39 Erionite	66733-21-9
40 Estrogen therapy, postmenopausal	-

参照サイト : <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>

表 1 (続き) IARC において Group 1 (ヒトに対する発がん性がある) とされた物質一覧 (2)

Agent	CAS#
41 Estrogen-progestogen menopausal therapy (combined)	-
42 Estrogen-progestogen oral contraceptives (combined) (NB: There is also convincing evidence in humans that these agents confer a protective effect against cancer in the endometrium and ovary)	-
43 Ethanol in alcoholic beverages	64-17-5
44 Ethylene oxide (NB: Overall evaluation upgraded to Group 1 based on mechanistic and other relevant data)	75-21-8
45 Etoposide (NB: Overall evaluation upgraded to Group 1 based on mechanistic and other relevant data)	33419-42-0
46 Etoposide in combination with cisplatin and bleomycin	33419-42-0 15663-27-1 11056-06-7
47 Fission products, including strontium-90	-
48 Formaldehyde	50-00-0
49 Haematite mining (underground)	-
50 Helicobacter pylori (infection with)	-
51 Hepatitis B virus (chronic infection with)	-
52 Hepatitis C virus (chronic infection with)	-
53 Human immunodeficiency virus type 1 (infection with)	-
54 Human papillomavirus types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 (NB: The HPV types that have been classified as carcinogenic to humans can differ by an order of magnitude in risk for cervical cancer)	-
55 Human T-cell lymphotropic virus 1	-
56 Ionizing radiation (all types)	-
57 Iron and steel founding (occupational exposure during)	-
58 Isopropyl alcohol manufacture using strong acids	-
59 Kaposi sarcoma herpesvirus	-
60 Leather dust	-
61 Magenta production	-
62 Melphalan	148-82-3
63 Methoxsalen (8-methoxypsoralen) plus ultraviolet A radiation	298-81-7
64 4,4'-Methylenbis(2-chloroaniline) (MOCA) (NB: Overall evaluation upgraded to Group 1 based on mechanistic and other relevant data)	101-14-4
65 Mineral oils, untreated or mildly treated	-
66 MOPP and other combined chemotherapy including alkylating agents	-
67 2-Naphthylamine	91-59-8
68 Neutron radiation (NB: Overall evaluation upgraded to Group 1 with supporting evidence from other relevant data)	-
69 Nickel compounds	-
70 N'-Nitrosornicotine (NNN) and 4-(NNitrosomethylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) (NB: Overall evaluation upgraded to Group 1 based on mechanistic and other relevant data)	16543-55-8 64091-91-4
71 Opisthorchis viverrini (infection with)	-
72 Outdoor air pollution	-
73 Outdoor air pollution, particulate matter in	-
74 Painter (occupational exposure as a)	-
75 Particulate matter in outdoor air pollution (see Outdoor air pollution, particulate matter)	-
76 3,4,5,3',4'-Pentachlorobiphenyl (PCB-126) (see Polychlorinated biphenyls, dioxin-like, with a TEF according to WHO)	57465-28-8
77 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran (NB: Overall evaluation upgraded to Group 1 based on mechanistic and other relevant data)	57117-31-4
78 Phenacetin (NB: Overall evaluation upgraded to Group 1 with supporting evidence from other relevant data)	62-44-2
79 Phenacetin, analgesic mixtures containing	-
80 Phosphorus-32, as phosphate	14596-37-3

表 1 (続き) IARC において Group 1 (ヒトに対する発がん性がある) とされた物質一覧 (3)

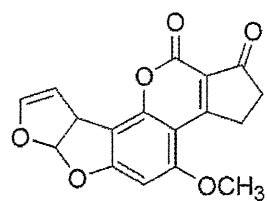
Agent	CAS#
81 Plutonium	7440-07-5
82 Polychlorinated biphenyls	1336-36-3
83 Polychlorinated biphenyls, dioxin-like, with a Toxicity Equivalency Factor (TEF) according to WHO (PCBs 77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169, 189)(NB: Overall evaluation upgraded to Group 1 with strong supporting evidence)	-
84 Radioiodines, including iodine-131	-
85 Radionuclides, alpha-particle-emitting, internally deposited (NB: Specific radionuclides for which there is sufficient evidence in humans are also listed)	-
86 Radionuclides, beta-particle-emitting, internally deposited (NB: Specific radionuclides for which there is sufficient evidence in humans are also listed)	-
87 Radium-224 and its decay products	13233-32-4
88 Radium-226 and its decay products	13982-63-3
89 Radium-228 and its decay products	15262-20-1
90 Radon-222 and its decay products	10043-92-2
91 Rubber manufacturing industry	-
92 Salted fish, Chinese-style	-
93 Schistosoma haematobium (infection with)	-
94 Semustine [1-(2-Chloroethyl)-3-(4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea, Methyl-]	13909-09-6
95 Shale oils	68308-34-9
96 Silica dust, crystalline, in the form of quartz or cristobalite	14808-60-7
97 Solar radiation	-
98 Soot (as found in occupational exposure of chimney sweeps)	-
99 Sulfur mustard	505-60-2
100 Tamoxifen (NB: There is also conclusive evidence that tamoxifen reduces the risk of contralateral breast cancer in breast cancer patients)	10540-29-1
101 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-para-dioxin	1746-01-6
102 Thiotepea	52-24-4
103 Thorium-232 and its decay products	7440-29-1
104 Tobacco, smokeless	-
105 Tobacco smoke, second-hand	-
106 Tobacco smoking	-
107 ortho-Toluidine	95-53-4
108 Treosulfan	299-75-2
109 Trichloroethylene	79-01-6
110 Ultraviolet radiation (wavelengths 100-400 nm, encompassing UVA, UVB, and UVC)	-
111 Ultraviolet-emitting tanning devices	-
112 Vinyl chloride	75-01-4
113 Wood dust	-
114 X- and Gamma-Radiation	-

表 2 Ames 試験における比活性値と発がん試験における TD₅₀ 値の対照表

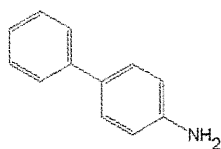
	Chemical	CAS #	TD ₅₀ (mg/kg/day)		Ames試験判定	比活性値 (rev./mg)	陽性になる条件
1	Acetaldehyde	75-07-0	153	/	-	/	/
2	AflatoxinB ₁	1162-65-8	0.0032	-	+	2.3.E+07	(TA100, +S9)
3	4-Aminobiphenyl	92-67-1	/	2.1	+	6.5.E+04	(TA100, +S9)
4	Aristolochic acid, sodium salt	10190-99-5	0.0141	/	+	1.1.E+04	/
5	Azathioprine	446-86-6	-	8.92	+	3.6.E+03	(TA100, ±S9)
6	Benzene	71-43-2	169	77.5	-	/	/
7	Benzidine	92-87-5	1.73	19.9	+	2.6.E+03	(TA98, ±S9)
8	Benzo[a]pyrene	50-32-8	0.96	3.47	+	5.7.E+04	(TA98, +S9)
9	Bis(chloromethyl)ether	542-88-1	0.00357	0.182	+	1.5.E+05	(WP2uvrA/pKM101, ±S9)
10	1,3-Butadiene	106-99-0	261	13.9	+	4.2.E+07	(TA1535, ±S9)
11	Chlorambucil	305-03-3	0.896	0.133	+	5.2.E+02	(TA100/TA1535, +S9)
12	Cyclophosphamide	50-18-0	2.21	5.96	+	5.4.E+03	(TA100/TA1535, +S9)
13	Diethylstilbestrol	56-53-1	0.223	0.0391	-	/	/
14	Ethanol	64-17-5	9110	-	-	/	/
15	Ethylene oxide	75-21-8	21.3	63.7	+	/	/
16	Formaldehyde	50-00-0	1.35	43.9	+	8.1.E+03	(TA100/TA104, ±S9)
17	Melphalan	148-82-3	0.0938	0.15	+	4.2.E+03	(TA100, ±S9)
18	Methoxsalen	298-81-7	32.4	-	+	1.5.E+04	(TA102/TA104, -S9)
19	4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline)	101-14-4	19.3	/	+	1.1.E+04	(TA100/TA98, +S9)
20	2-Naphthylamine	91-59-8	61.6	39.4	+	6.0.E+04	(TA100/TA98, +S9)
21	4-(N-Nitrosomethylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone) (NNK)	64091-91-4	0.0999	/	+	/	/
22	Phenacetin	62-44-2	1250	2140	-	/	/
23	Tamoxifen citrate	54965-24-1	3.96	4.39	+	/	/
24	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-pa-dioxin	1746-01-6	0.0000235	0.000156	-	/	/
25	Thio-tepa	52-24-4	0.164	0.223	+	8.1.E+03	(TA100, ±S9)
26	o-Toluidine-HCl	636-21-5	43.6	840	+	4.2.E+01	(TA100, +S9_hamster)
27	Trichloroethylene	79-01-6	668	1580	-	/	/
28	Vinyl chloride	75-01-4	6.11	21.8	+	/	/

※TD₅₀ の欄の-は発がん試験を実施したが、がんが発生しなかったことを示す。同欄の斜線は発がん試験が実施されなかったことを示す。

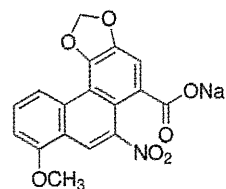
※比活性値は NTP のサイト (http://tools.niehs.nih.gov/ntp_tox/index.cfm) に掲載されているデータ表の数値から算出した。ただし、Aristolochic acid, Bis(chloromethyl)ether, Cyclophosphamide については検索により見つけた文献の表のデータから算出した。この欄の斜線は Ames 試験結果が陰性、もしくは比活性値が算出できなかったことを示す。



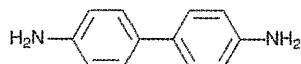
AflatoxinB₁



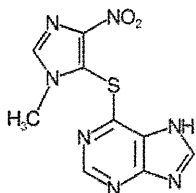
4-Aminobiphenyl



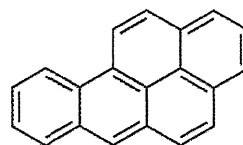
Aristrolochic acid, sodium salt



Benzidine



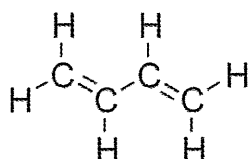
Azathioprine



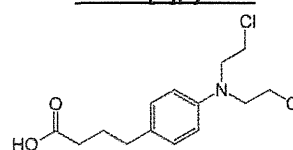
Benzo[a]pyrene



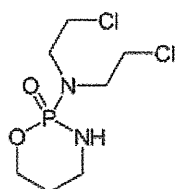
Bis(chloromethyl)ether



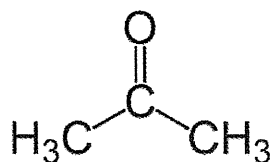
1,3-Butadiene



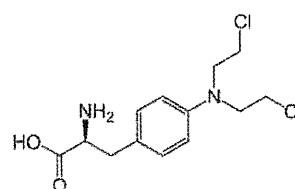
Chlorambucil



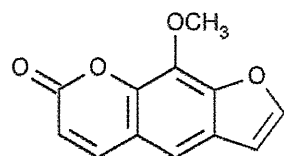
Cyclophosphamide



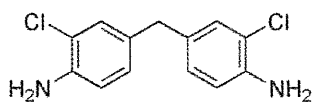
Formaldehyde



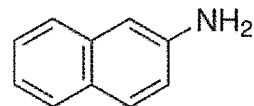
Melphalan



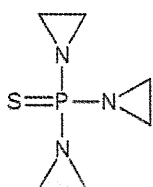
Methoxsalen



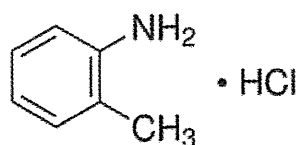
4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline)



2-Naphthylamine



Thio-tepa



o-Toluidine-HCl

図5 図2に記載した17物質の名称と構造式

平成 25 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：食品添加物等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：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

分担研究者： 増村健一 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長

研究要旨

トランスジェニック齧歯類遺伝子突然変異試験 (TG 試験) の報告がある発がん性物質 128 件、非発がん物質 23 件、発がん性未知物質 68 件の情報をデータベースに追加した。In vivo 変異原性と発がん性の相関について検討した。

キーワード：トランスジェニック齧歯類遺伝子突然変異試験、発がん性

A. 研究目的

トランスジェニック齧歯類遺伝子突然変異試験 (TG 試験) は、突然変異検出用のレポーター遺伝子をゲノム中に導入した遺伝子組換えマウスやラットを使用する in vivo 突然変異試験である。任意の臓器・組織において突然変異を検出可能であるため、個体における曝露経路、発がん標的臓器、代謝等を考慮した評価に有用である。TG 試験は International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT)における試験法の評価とガイドライン化の検討を経て、2011 年に OECD ガイドライン (TG488 : Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays) が公開された。

遺伝毒性は重要な発がんメカニズムの 1 つであり、食品添加物等の化学物質の発がんリスク評価においては、非遺伝毒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、遺伝毒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。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

な量的評価が必要である。

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、TG 試験のデータベースを作成し、遺伝毒性の量的反応性を考慮したリスク評価手法の開発を目指す。昨年度は、既存の TG 試験のデータベースを作成した。25 年度は、前年に引き続いてデータベースの充実化をはかり、TG 試験データと発がん性との相関を検討した。

B. 研究方法

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。TG 試験データが存在する物質については、発がん性の有無を検索してデータベースに追加した。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。

(倫理面への配慮)

本研究は遺伝毒性データベース作成に関するものであり、倫理上の問題はない。

C. 研究結果

昨年度は発がん性の有無が明らかになっている 140 物質をデータベースに追加した。今年度は、発がん性未知の物質等を追加し、計 280 件となった。この中には OECD Detailed Review Paper に記載の 238 の被験物質データが含まれる。また、厚生労働省が委託試験等で行った食品関連物質および一般化学物質の情報が 20 件含まれる (表 1)。データベースには、紫外線など化学物質以外の変異原についても記載した。Ames 試験等の情報がある場合は記載した。

<表 1>

厚生労働省委託試験等による TG 試験 : 20 物質	
2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid	121-03-9
1-Bromo-3-chloropropane	109-70-6
2-Vinylpyridine	100-69-6
N-phenylmaleimide	941-69-5
Thiourea dioxide	4189-44-0
Allura Red AC	25956-17-6
Rumput roman extract	223747-93-1
Piperonal	120-57-0
Cinnamaldehyde	14371-10-9
Ferrous lactate trihydrate	6047-24-1
Propyl gallate	121-79-9
Sodium nitrite	7632-00-0
D-Isoascorbic acid	89-65-6
L-Cysteine	7048-04-6
Maltol (3-Hydroxy-2-methyl-4-pyrone)	118-71-8
New Coccine (Acid Red 18)	2611-82-7
Phloxine B (Acid Red 92)	18472-87-2
Rose bengal (Acid Red 94)	632-69-9
Sesame seed oil unsaponification matter	
Kidachi aloe extract	

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。このうち、複合曝露は 2 種類以上の化学物質に曝露した試験であり、遺伝毒性の修飾効果の解明などを目的とした個別研究であることから、単独の化学物質の遺伝毒性評価に用いることは適当でないと考え、データには含めなかった。また、蒸留水やコーン油など、溶媒対照として使用された 13 物質についても今回のデータには含めなかった。従って、本データベースに含まれるのは 219 件 (発がん物質 128、非発がん物質 23、発がん性未知物質 68) となった (appendix 1)。

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。さらに、TG 試験が発がん標的組織以外で実施されているものが 19 物質、発がん標的組織の情報が不明なものが 4 物質あった。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 (appendix 2, 3)。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。発がん性物質 128 のうち、TG 試験データのある発がん標的臓器全てで TG 陰性のものが 26 物質あった。非発がん性物質 23 のうち、TG 試験陽性のものは 7 物質あった。

さらに、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 (appendix 2, 3)。発がん性物質 128 のうち、Ames 試験が陽性かつ TG 試験が陰性のものが 15 物質あった。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。

D. 考察

TG 試験データベースの作成および利用の際には、既存の TG 試験の特徴とデータの偏りを考慮する必要がある。280 の試験データのうち、発がん性物質が 128、非発がん性物質は 23 であり、