

成と、生体高分子のモデル化合物との付加を確認できたことから、酸化代謝を亢進する因子による複合影響としてキノン酸化体を経由する毒性が発症する可能性が考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kuroda, K., Kijima, A., Ishii, Y., Takasu, S., Jin, M., Matsushita, K., Kodama, Y., Umemura, T. Flumequine enhances the in vivo mutagenicity of MeIQx in the mouse liver. *Arch. Toxicol.* 87, 1609-1619, 2013.
- 2) Fukuyama, T., Kosaka, T., Hayashi, K., Miyashita, L., Tajima, Y., Wada, K., Nishino, R., Ueda, H., and Harada, T. Immunotoxicity in mice induced by short-term exposure to methoxy-chlor, parathion, or piperonyl butoxide. *J. Immunotoxicol.* 10:150-159, 2013.
- 3) Nishino, R., Fukuyama, T., Kosaka, T., Hayashi, K., Watanabe, Y., Kurosawa, Y., Ueda, H., and Harada, T. Effects of short-term oral combined exposure to environmental immunotoxic chemicals in mice. *J. Immunotoxicol.* 2013, in press.
- 4) Imai, K., Nakanishi, I., Ohno, A., Kurihara, M., Miyata, N., Matsumoto, K., Nakamura, A., Fukuhara, K., Synthesis and radical-scavenging activity of a dimethyl catechin analogue. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, in press

### 2. 学会発表

- 1) 妊娠ラットに対するパラチオン及びメタミドホス複合暴露影響: 元村 淳子、首藤 康文、藤江 秀彰、小松 豊、林 宏一、大塚 亮一、山口 悟、小嶋 五百合、相馬 克実、高

橋 尚史、吉田 敏則、坂 真智子、青山 博昭、原田 孝則 第 156 回 日本獣医学会学術集会 2013 年 3 月

2) 環境中化学物質の複合暴露が及ぼす獲得免疫能抑制効果の検出: 福山朋季, 西野里沙子, 小坂忠司, 林宏一, 渡部優子, 黒澤好, 上田英夫, 原田孝則 第 40 回日本毒性学会, 2013 年 6 月

3) 環境中免疫毒性化学物質の複合暴露における評価: 福山朋季, 西野里沙子, 小坂忠司, 渡部優子, 黒澤好, 林宏一, 上田英夫, 原田孝則 第 20 回日本免疫毒性学会, 2013 年 9 月

4) 村木俊文、関本征史、出川雅邦: 芳香族炭化水素受容体 (AhR) 活性化におけるヒト-マウス間での種差. 第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜)、2013 年 10 月

5) 田崎愛佳、村木俊文、長澤聖子、根本清光、関本征史、出川雅邦: 合成着色料による芳香族炭化水素受容体活性化とその種差. 第 134 回日本薬学会年会 (熊本)、2014 年 3 月

6) Fukuhara, K.: Antioxidative properties of substituted or analogues of natural molecules. *Antioxidants: New Sources & Application in Life Sciences, Japan-France Seminar at the Embassy of France in Japan (2013.7) Tokyo*

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

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）  
平成 25 年度分担研究報告書

食品中化学物質複合投与の *in vivo* 変異原性への影響

研究分担者： 梅村隆志 国立医薬品食品衛生研究所 病理部  
研究協力者： 石井雄二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

薬物動態に係る酵素群や細胞内微小環境に影響を与える化学物質が低用量の食品中遺伝毒性発がん物質に及ぼす影響を明らかにするための予備的検討として、マウス肝発がん物質エストラゴール（ES）を雌性 6 週齢の *gpt delta* マウスに 1、10 又は 100 mg/kg/day の濃度で 4 週間強制経口投与し、ES 特異的 DNA 付加体量と突然変異誘発性との関連を検討した。肝臓において特異的 DNA 付加体は全ての投与群で認められたが、*gpt* 変異体頻度（MFs）は高用量群でのみ有意に上昇した。以上より、ES には DNA 損傷を引き起こすものの、遺伝子突然変異を誘発しない濃度が存在することが明らかとなった。また、酸化的 DNA 損傷を引き起こす複数の化学物質の複合影響を検討するため、まずは単剤による酸化的 DNA 損傷の程度と突然変異誘発性の関連を検索する目的で、臭素酸カリウム（KBrO<sub>3</sub>）を 9 週間、ニトロフラントイン（NFT）あるいはアリザリン（Alz）を 13 週間、雄性 6 週齢の *gpt delta* ラットにそれぞれ 3 用量で飲水又は混餌投与した。腎皮質において KBrO<sub>3</sub> 及び NFT は中間用量群から 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルを有意に上昇させ、高用量の KBrO<sub>3</sub> は *gpt* 及び Spi<sup>-</sup> MFs を、高用量の NFT は *gpt* MFs を有意に上昇させた。変異スペクトラム解析の結果、KBrO<sub>3</sub> 投与群において single base deletion 及び AT:TA transversion 頻度の有意な増加が認められた。高用量の Alz は 8-OHdG レベルの有意な上昇を引き起こしたものの、*gpt* 及び Spi<sup>-</sup> MFs に影響を与えなかった。以上より、KBrO<sub>3</sub>、NFT 及び Alz はいずれもラット腎皮質において顕著な酸化的 DNA 損傷を引き起こすものの、それぞれ、その投与量によって遺伝子突然変異の有無や生じる変異パターンが異なることが明らかとなった。

A. 研究目的

食品中には非意図的に発がん物質が生成又は混入する。これら発がん物質と様々な化学物質が食品を介してヒトに摂取された場合、それらの複合影響が相加あるいは相乗作用として発現する可能性が考えられているが、発がん性の評価はこれまで化合物単体でのみ実施されており、このような複合影響を評価した報告は極めて少ない。我々はこれまでに、食品の加熱調理によっ

て生じる遺伝毒性発がん物質である 2-amino-3,8-dimethyl-3H-imidazo [4,5-f]quinoxaline (MeIQx)と食肉中への残留が懸念されている動物用医薬品フルメキン (FL) の二剤をレポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* マウスに併用投与すると、肝臓における MeIQx の突然変異誘発性が 2 倍以上に増強されることを明らかにした。さらに、この複合影響機序を検索した結果、FL は、肝組織傷害に引き続き生じる細胞増

殖活性の亢進、MeIQx の代謝活性化に寄与する第一相酵素の誘導及び MeIQx の排泄に寄与する第二相酵素の阻害を引き起こし、これらの変化が MeIQx の DNA 損傷及び引き続き生じる突然変異を促進することが明らかになった<sup>1)</sup>。そこで本研究では、薬物動態に係る酵素群や細胞内微小環境に影響を与える化学物質が低用量の遺伝毒性発がん物質に及ぼす複合影響を明らかにすることを目的として研究を進める。本年度はその予備的検討として、遺伝毒性発がん物質であり、ハーブやスパイス等に含まれる香料のエストラゴール (ES) を種々の濃度で *gpt delta* マウスに投与し、肝臓における ES 特異的 DNA 付加体量とレポーター遺伝子における突然変異頻度との関連を検討した。

一方、食品中には酸化ストレスを引き起こす化学物質が多数存在する。事実、我々はこれまでに小麦粉処理剤として使用される食品添加物である臭素酸化カリウム

(KBrO<sub>3</sub>)、動物用医薬品として使用されており、食肉中への残留が懸念されるニトロフランチン (NFT) や、アカネ色素の構成成分の一つであるアントラキノン系色素のアリザリン (Alz) がいずれもラット腎臓で酸化的 DNA 損傷の指標である

8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルを上昇させることを明らかにしてきた。このように生じた酸化的 DNA 損傷は塩基の誤挿入や脱塩基部位の形成などにより突然変異を誘発することから、食品を介したこれら化学物質の暴露はヒトの健康への影響が懸念される。さらに、これらの化学物質を複合的に摂取した場合、酸化的 DNA 損傷は相加または相乗的に蓄積するのかわかも不明であり、酸化ストレスを引き起こす

化学物質の同時暴露による複合影響を評価した報告はない。本研究では KBrO<sub>3</sub>、NFT 及び Alz を用いて、これらの併用投与による酸化的 DNA 損傷レベルや突然変異誘発性への複合影響を検討し、酸化ストレスを生じる食品中化学物質の複合影響について評価する。本年度は予備的検討として、それぞれ単剤を *gpt delta* ラットに投与し、投与量と腎臓における酸化的 DNA 損傷レベル及びレポーター遺伝子における突然変異頻度との関連を検討した。

## B. 研究方法

＜実験 1＞動物は当研究所で系統維持している C57BL/6J *gpt delta* マウスと野生型 C3H マウス (日本チャールズ・リバー株式会社) の交配によって作出した 6 週齢の雌性 B6C3F<sub>1</sub> *gpt delta* マウスを実験に供した。動物の飼育はバリアーシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 24±1°C、湿度 55±5%、換気回数 18 回/時 (オールフレッシュ)、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯であり、この条件下で飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 又は 3 匹ずつ収納し、床敷は三共ラボサービス社 (東京) のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。*gpt delta* マウス 20 匹を各群 5 匹に配し、ES を 1、10 及び 100 mg/kg/day の用量で 4 週間強制経口投与した。対照群には被験物質の溶媒としてコーンオイルを強制経口投与した。試験期間中、飲水及び飼料の交換は週 1 回、一般状態観察を連日実施し、体重および飲水量の測定は週 1 回行った。4 週間の投与後、動物はイソフルラン麻酔下にて放血致死させ、肝臓について肉眼的に観察後摘出し、外側左葉

を 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、常法に従いパラフィン切片を作製後、ヘマトキシリンエオジン染色を施した。残りは ES 特異的 DNA 付加体の測定並びに *gpt* 及び  $\text{Spi}^-$  assay用のサンプルとして液体窒素により凍結後、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。ES 特異的 DNA 付加体の測定は、各臓器から抽出した DNA をヌクレアーゼ P1 及びアルカリフォスファターゼ処理によりデオキシヌクレオシドまで分解し、ES-3'- $\text{N}^2$ -dG、ES-3'-8-dG 及び ES-3'- $\text{N}^6$ -dA 付加体を液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) にて測定した。サンプルには  $^{15}\text{N}$  でラベル化した各付加体の安定同位体を内標準物質として一定量添加した。LC では 0.001%ギ酸/アセトニトリルを移動相とし、C18 カラム (Wakosil C18) を用いて分離した。MS/MS (Waters-Micromass 社製、Quattro Pt) はエレクトロスプレーイオン化法を用い、ポジティブイオンモードで測定を行った。各付加体の検出に用いたプリカーサイオン及びフラグメントイオンは、ES-3'- $\text{N}^2$ -dG 及び ES-3'-8-dG では  $414>298$ 、ES-3'- $\text{N}^6$ -dA では  $398>282$  とした。MRM クロマトグラムより得られたピーク面積から内標準法によって各付加体の定量値を算出した。*gpt* assay では回収したファージ粒子を大腸菌 YG6020 に感染させ 6-チオグアニン (6-TG) とクロラムフェニコール (Cm) を含む培地上で生育するコロニーを単離した。単離したコロニーについては、再度、6-TG と Cm を含むプレートにストリークして生育することを確認した。また、ファージ粒子の懸濁液を適宜希釈した後に YG6020 株に感染させ、Cm のみを含む培地上で生育したコロニー数を計測した。Cm プレートで生育したコロ

ニー数に希釈倍率を掛けて回収した総ファージ数 (あるいは回収した総トランスジーン数) を求めた。6-TG と Cm に耐性となったコロニー数を総ファージ数で除して *gpt* 遺伝子変異体頻度 (MF) を算出した。また、6-TG と Cm に耐性となったコロニーはタカラバイオ株式会社にて *gpt* 遺伝子の塩基配列解析を実施し、変異部位を同定した。 $\text{Spi}^-$  欠失変異の検出では、ファージは P2 lysogen (大腸菌 XL-1 Blue MRA(P2)株) に感染させ、 $\text{Spi}^-$  プラークの候補については、さらに他の P2 溶原菌 (大腸菌 WL95 株) に感染させ、*red/gam* 遺伝子機能が不活化した真の  $\text{Spi}^-$  プラークを検出した。また、パッケージ反応後の懸濁液を希釈した後に P2 ファージが溶原化していない大腸菌 XL-1 Blue MRA 株に感染させて、総プラーク数を算出した。真の  $\text{Spi}^-$  プラーク数を回収した総プラーク数で除して  $\text{Spi}^-$  MF を算出した。(統計学的処理方法)

体重、腎重量、遺伝子突然変異頻度及び変異スペクトラムの統計学的処理は、各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、不等分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合は Dunnett の多重比較検定により行った。<実験 2> 6 週齢の雄性 F344 *gpt* delta ラット (日本 SLC 株式会社) 20 匹を各群 5 匹に配し、 $\text{KBrO}_3$  を 0、125、250 及び 500 ppm の濃度で 9 週間飲水投与した (実験 2-1)。また、6 週齢の雄性 F344 *gpt* delta ラット 35 匹を各群 5 匹に配し、NFT を 100、500 及び 2500 ppm の濃度で、Alz を 20、100 及び 500 ppm の濃度で 13 週間混餌投与した (実験 2-2)。腎臓について肉眼的に観察後摘出し、

右腎を 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、常法に従いパラフィン切片を作製後、ヘマトキシリンエオジン染色を施した。KBrO<sub>3</sub> 及び NFT の発がん標的部位ならびに Alz の毒性発現部位が腎皮質であることから、左腎は長軸にカットした後、眼科用反剪ばさみを用いて弓状動静脈に沿ってハサミを入れて皮質と髓質を分けて採取し、8-OHdG の測定並びに *gpt* 及び Spi<sup>-</sup> assay 用のサンプルとして液体窒素により凍結後、-80°C で保存した。8-OHdG レベルの測定は、腎皮質と髓質でそれぞれ実施した。約 80 mg の腎組織から和光純薬社製 DNA Extractor<sup>®</sup> WB Kit を用いてヨウ化ナトリウム法により DNA を抽出した。得られた DNA は和光純薬社製 8-OHdG Assay Preparation Reagent Set を使用し、nuclease P1 及び alkaline phosphatase による酵素処理によってデオキシヌクレオシドまで分解した。8-OHdG 量は液体クロマトグラフィー/電気化学検出器 (HPLC/ECD) システム (ESA, Coulochem<sup>®</sup> II) を用いて定量的解析を実施した。*gpt* 及び Spi<sup>-</sup> assay では、腎皮質のゲノム DNA を抽出し、実験に供した。各 assay は実験 1 と同様に実施した。

#### (統計学的処理方法)

腎皮質と髓質における 8-OHdG レベルの統計学的処理は Student t 検定により、その他のデータは実験 1 と同様な統計処理を行った。

#### (倫理面への配慮)

投与実験は混餌投与、飲水投与ならびに熟練者による強制経口投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物は

すべてイソフルラン麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。実験動物に関しては、「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」に基づき、動物実験計画書を作成し、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会による審査を受けた後、実施した。また、DNA 組換え動物の使用についても、「国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則」に従い、遺伝子組み換え実験計画書を作成し、審査を受けた。

#### C. 研究結果

<実験 1> 試験期間中の一般状態及び体重の推移に、投与に起因する変化は何れの群においても認められなかった。最終体重及び肝重量を Table 1 に示す。肝臓の実重量及び相対重量においても投与に起因する変化は何れの群においても認められなかった。肝臓における ES 特異的 DNA 付加体量を Fig. 2 に示す。ES-3'-8-dG、ES-3'-N<sup>2</sup>-dG 及び ES-3'-N<sup>6</sup>-dA は肝臓において低用量群から検出され、投与量依存的に増加した。その生成量は ES-3'-N<sup>6</sup>-dA が最も多く、続いて ES-3'-N<sup>2</sup>-dG、ES-3'-8-dG の順であった。*gpt* assay の結果を Table 2 に示す。点突然変異頻度を示す *gpt* MF は、対照群 (0.61 ± 0.39) に比して高用量群 (1.27 ± 0.15, p<0.01) で有意な上昇が認められた。*gpt* 変異体のスペクトラム解析の結果を Table 3 に示す。対照群に比して、高用量群で A:T-G:C transition (p<0.01) と G:C-T:A transversion (p<0.05) の頻度の有意な増加が認められた。Spi<sup>-</sup> assay の結果を Table 4 に示す。欠失変異頻度を示す Spi<sup>-</sup> MF は、対照群 (0.69 ± 0.20) に比していずれの投与群においても有意な

増加は認められなかった。

〈実験 2-1〉高用量群において投与開始4週目から体重増加抑制が認められ、有意な低値 ( $p<0.05$ ) となった。同群では3週目以降摂餌量の低値が認められたものの、その程度はわずかであったことから、体重増加抑制は  $KBrO_3$  の毒性影響である可能性が考えられた。最終体重及び腎重量を Table 5 に示す。高用量群では対照群に比して腎臓の相対重量の有意な高値 ( $p<0.01$ ) が認められ、実重量も高値を示したことから、腎重量の増加は  $KBrO_3$  の投与に起因した変化であると考えられた。腎皮質及び髓質の DNA 中 8-OHdG レベルを Fig. 2 に示す。皮質では対照群 ( $0.46 \pm 0.07/10^5dG$ ) に比して中間用量群 ( $0.94 \pm 0.08/10^5dG$ ,  $p<0.01$ ) 及び高用量群 ( $1.16 \pm 0.12/10^5dG$ ,  $p<0.01$ ) で有意な高値が認められた。一方、髓質では対照群 ( $0.33 \pm 0.16/10^5dG$ ) に比して高用量群でのみ有意な高値 ( $0.58 \pm 0.05/10^5dG$ ,  $p<0.05$ ) が認められたが、そのレベルは皮質に比して有意に低かった ( $p<0.01$ )。gpt assay の結果を Table 6 に示す。gpt MF は、対照群 ( $0.17 \pm 0.09$ ) に比して高用量群 ( $0.45 \pm 0.21$ ,  $p<0.05$ ) で有意な高値を示した。gpt 変異体のスペクトラム解析の結果、高用量群では、対照群に比して single base deletion ( $p<0.01$ ) と A:T-T:A transversion ( $p<0.01$ ) 頻度の有意な増加が認められた (Table 7)。Spi assay の結果を Table 8 に示す。Spi MF は、対照群 ( $0.15 \pm 0.12$ ) に比して高用量群で有意な高値を示した ( $0.34 \pm 0.07$ ,  $p<0.05$ )。Spi 変異体のスペクトラム解析の結果、高用量群では、G/C 及び A/T の繰り返し配列部位における single base deletion 頻度の増加傾向と insertion ( $p<0.05$ ) 頻度の有意な増加が認め

られた (Table 9)。

〈実験 2-2〉NFT 投与群では高用量群において投与開始1週目から体重増加抑制が認められ、有意な低値 ( $p<0.01$ ) となった。試験期間中の摂餌量は、対照群、Alz 投与群及び高用量群を除く NFT 投与群において、一日当たり 15~23 g/body の範囲で推移したのに対し、NFT 高用量群では 10 g/body 前後で推移したことから、高用量群で認められた体重増加抑制は摂餌忌避に起因するものと考えられた。また、Alz 投与群では投与開始12週目において低用量群のラット1例の途中死亡例がみられたが、剖検の結果、明らかな死因は認められず、その後、死亡動物は認められなかったことから偶発的なものと考えられた。最終体重及び肝重量を Table 5 に示す。NFT 投与群では対照群に比して、肝臓 ( $p<0.01$ ) 及び腎臓 ( $p<0.05$ ) の実重量の有意な低値と、腎臓相対重量の有意な高値 ( $p<0.01$ ) が認められたが、いずれも体重の低値に起因する変化と考えられた。Alz 高用量群では対照群に比して肝臓の相対重量の有意な高値 ( $p<0.01$ ) が認められ、同群では腎臓の相対重量も有意な高値 ( $p<0.01$ ) を示したことから、腎重量の増加は Alz の投与に起因する変化であると考えられた。腎皮質及び髓質の DNA 中 8-OHdG レベルを Fig. 3 に示す。NFT 投与群の皮質では、対照群 ( $0.32 \pm 0.09/10^5dG$ ) に比して中間用量群 ( $1.07 \pm 0.30/10^5dG$ ,  $p<0.01$ ) 及び高用量群 ( $1.90 \pm 0.30/10^5dG$ ,  $p<0.01$ ) において有意な高値を示した。一方、髓質では、高用量群においてのみ有意な上昇 ( $1.09 \pm 0.30/10^5dG$ ,  $p<0.01$ ) が認められたが、髓質の 8-OHdG レベルは皮質に比して有意に低かった ( $p<0.01$ )。Alz 投与群では、皮質、

髄質ともに高用量でのみ有意な高値（皮質： $0.95 \pm 0.26/10^5\text{dG}$ ,  $p<0.01$ , 髄質： $0.75 \pm 0.19/10^5\text{dG}$ ,  $p<0.01$ ）が認められ、髄質に比して皮質の 8-OHdG レベルは高値を示す傾向が認められた。*gpt* assay の結果を Table 11 及び 12 に示す。NFT 投与群では、*gpt* MF は対照群（ $1.04 \pm 0.62$ ）に比して高用量群において有意な高値を示した（ $2.13 \pm 0.46$ ,  $p<0.05$ ）。Alz 投与群では、*gpt* MF は対照群（ $0.65 \pm 0.15$ ）に比して有意な変化は認められなかった。*Spi* assay の結果を Table 13 及び 14 に示す。Alz 又は NFT 投与群の皮質において、*Spi* MF は、対照群（Alz:  $0.55 \pm 0.18$ , NFT:  $1.77 \pm 0.19$ ）に比していずれの投与群においても有意な変化は認められなかった。

#### D. 考察

B6C3F<sub>1</sub> *gpt* delta マウスを用いて ES 特異的付加体形成量とレポーター遺伝子の突然変異頻度との関連を検討した結果、3 種の ES 特異的 DNA 付加体はいずれも低用量群から検出され用量依存的に増加したのに対し、*gpt* MFs の有意な上昇は高用量群でのみ認められた。さらに、同群では ES 投与によって生じる特徴的な A:T-G:C transition 変異頻度の有意な増加が認められたが、低用量及び中間用量群で同変異頻度に変化は認められなかったことから、ES には直接的な DNA 損傷を引き起こすものの突然変異を誘発しない用量が存在することが示唆された。我々はこれまでに、ラット肝臓における ES の突然変異誘発機序に、特異的 DNA 付加体の形成に加えて、細胞増殖活性の亢進が寄与することを明らかにしている。今後、マウス肝臓における細胞増殖活性の検索を実施して、高用量における特異的 DNA 付加体

から遺伝子突然変異への進展過程の詳細について検討していく。一方、前述のように、食肉中への残留が懸念されている動物用医薬品 FL は肝障害に続く代償性細胞増殖亢進作用さらには薬物動態に係る酵素誘導作用を有することから、特異的付加体の形成は認められるものの、突然変異を誘発しない低用量の ES と FL の併用投与を実施して、突然変異を誘発しない低用量の食品中遺伝毒性発がん物質と、その代謝過程や細胞内微小環境に影響与える食品中化学物質との複合影響を明らかにする予定である。

<実験 2>食品中の化学物質の中には酸化ストレスを発生し、結果として酸化的 DNA 損傷を引き起こすものがあることが知られている。ヒトは食品の摂取を介してこれら化学物質に複合的に暴露される可能性が考えられるが、酸化的 DNA 損傷への相加・相乗作用も含め、酸化ストレスに対する複合影響の詳細はいまだ不明な点が多い。そこで本年度は、予備的検討として、F344 系 *gpt* delta ラットに酸化的 DNA 損傷を引き起こすことが知られている KBrO<sub>3</sub>、NFT 及び Alz を投与して、酸化的 DNA 損傷レベルと突然変異誘発性の関連を検討した。KBrO<sub>3</sub> 及び NFT はそれぞれの発がん標的部位である腎皮質において中間用量群から 8-OHdG レベルの有意な上昇を引き起こし、その値は髄質での値に比して有意な高値を示した。さらに、高用量群では *gpt* MF の有意な高値が認められたことから、腎皮質を標的とするこれら二剤の発がん性に酸化的 DNA 損傷を介した遺伝子突然変異が寄与することが示唆された。一方、中間用量群では *gpt* MF の変化が認められなかったことから、KBrO<sub>3</sub> 及び NFT には酸化的 DNA 損傷を引

き起こすものの、突然変異を誘発しない用量が存在することが示された。また、高用量の  $\text{KBrO}_3$  で生じる *gpt* 及び  $\text{Spi}^-$  変異体の変異スペクトラム解析の結果、single base deletion の増加が認められたのに対し、NFT 投与群において欠失変異頻度を示す  $\text{Spi}^-$  MF の変化は認められなかったことから、これら二剤によって生じる変異スペクトラムは異なる可能性が考えられた。今後、NFT 投与群で認められた *gpt* 変異体の変異スペクトラム解析を実施し、 $\text{KBrO}_3$  と NFT が引き起こす変異スペクトラムの違いを明らかにする。一方、Alz の高用量群では、皮質及び髄質の 8-OHdG レベルの有意な高値が認められたが、皮質の *gpt* 及び  $\text{Spi}^-$  MFs に有意な変化は認められなかったことから、Alz は酸化的 DNA 損傷を引き起こすものの、その損傷は突然変異の誘発に至らない可能性が考えられた。以上より、本研究において選定した三剤はいずれもラット腎皮質において重度な酸化的 DNA 損傷を引き起こすものの、投与した剤及びその投与量によって、突然変異誘発性の有無や生じる変異スペクトラムは異なる可能性が示された。今後、 $\text{KBrO}_3$  と NFT にそれぞれ Alz を併用投与し、酸化的 DNA 損傷の蓄積と、それによる突然変異誘発性への影響を検討する予定である。

#### E. 結論

本実験条件下において、低用量の ES は特異的 DNA 付加体を形成するものの、遺伝子突然変異を誘発しないことが示された。

$\text{KBrO}_3$ 、NFT 及び Alz はいずれもラット腎皮質において重度な酸化的 DNA 損傷を引き起こすものの、遺伝子突然変異の有無や

生じる変異スペクトラムは異なることが明らかとなった。また、 $\text{KBrO}_3$  及び NFT には、酸化的 DNA 損傷を引き起こすものの、突然変異を誘発しない用量が存在することが示された。これらの結果を踏まえ、遺伝子突然変異を誘発しない低用量の食品中遺伝毒性発がん物質とその薬物動態に係る酵素群や細胞内微小環境に影響与える食品中化学物質の複合影響を明らかにするとともに、酸化ストレスを生じる食品中化学物質の複合影響の詳細について検討する。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Kuroda, K., Kijima, A., Ishii, Y., Takasu, S., Jin, M., Matsushita, K., Kodama, Y., Umemura, T. Flumequine enhances the in vivo mutagenicity of MeIQx in the mouse liver. Arch. Toxicol. 87, 1609-1619, 2013.

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし。



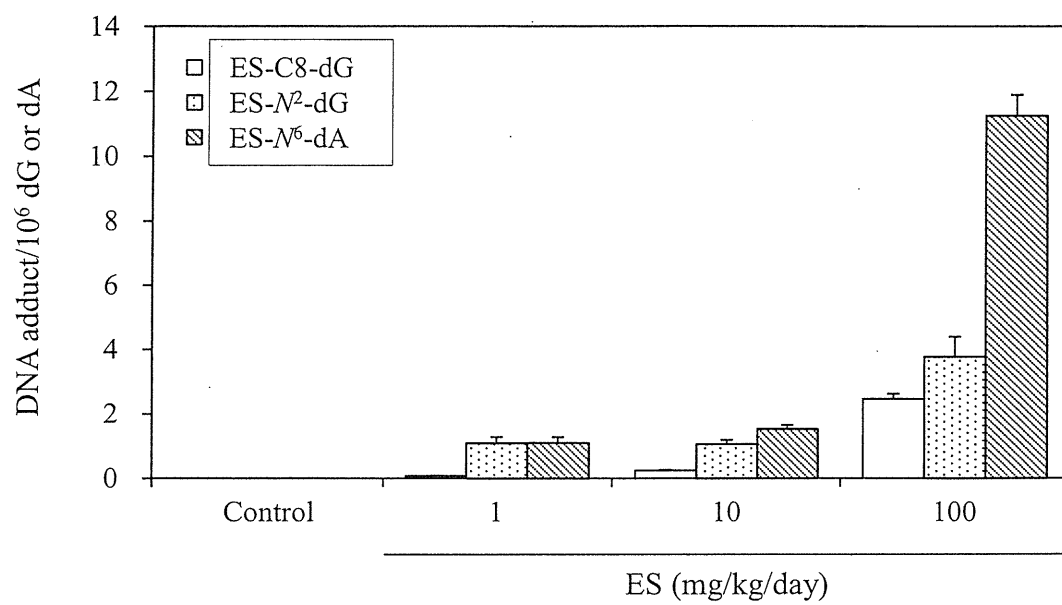


Fig. 1. ES-specific DNA adduct levels in the livers of *gpt* delta mice treated with ES for 4 weeks.

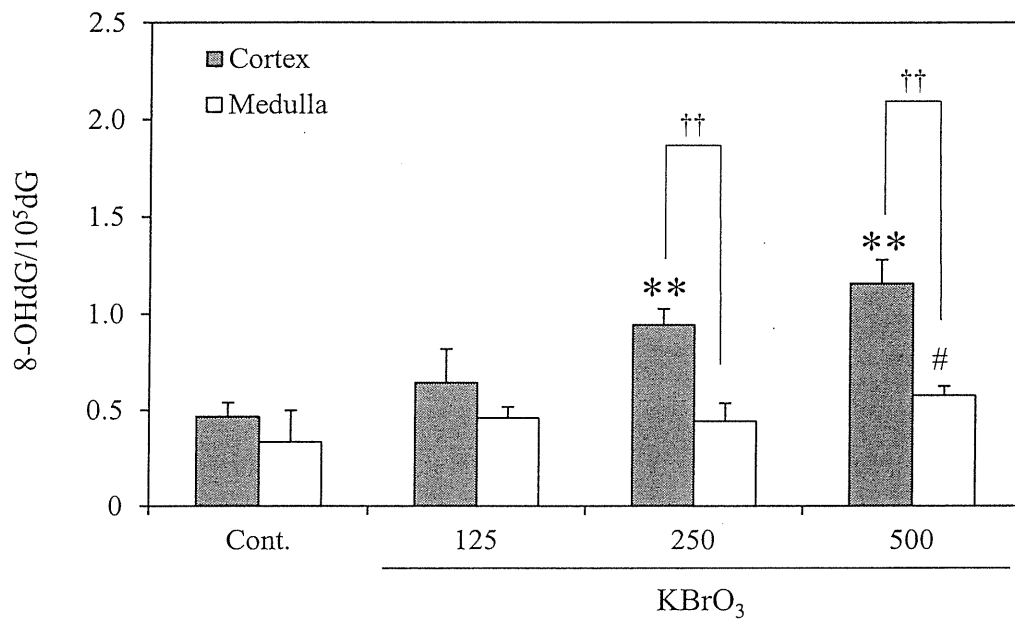


Fig. 2. 8-OHdG levels in the renal cortex (filled bars) and medulla (open bars) of *gpt* delta rats treated with KBrO<sub>3</sub> for 9 weeks. Data represent means  $\pm$  S.D. (n = 5). \*\*:  $p < 0.01$  vs. Control group (cortex). #:  $p < 0.05$  vs. Control group (medulla). ††:  $p < 0.01$  vs. medulla.

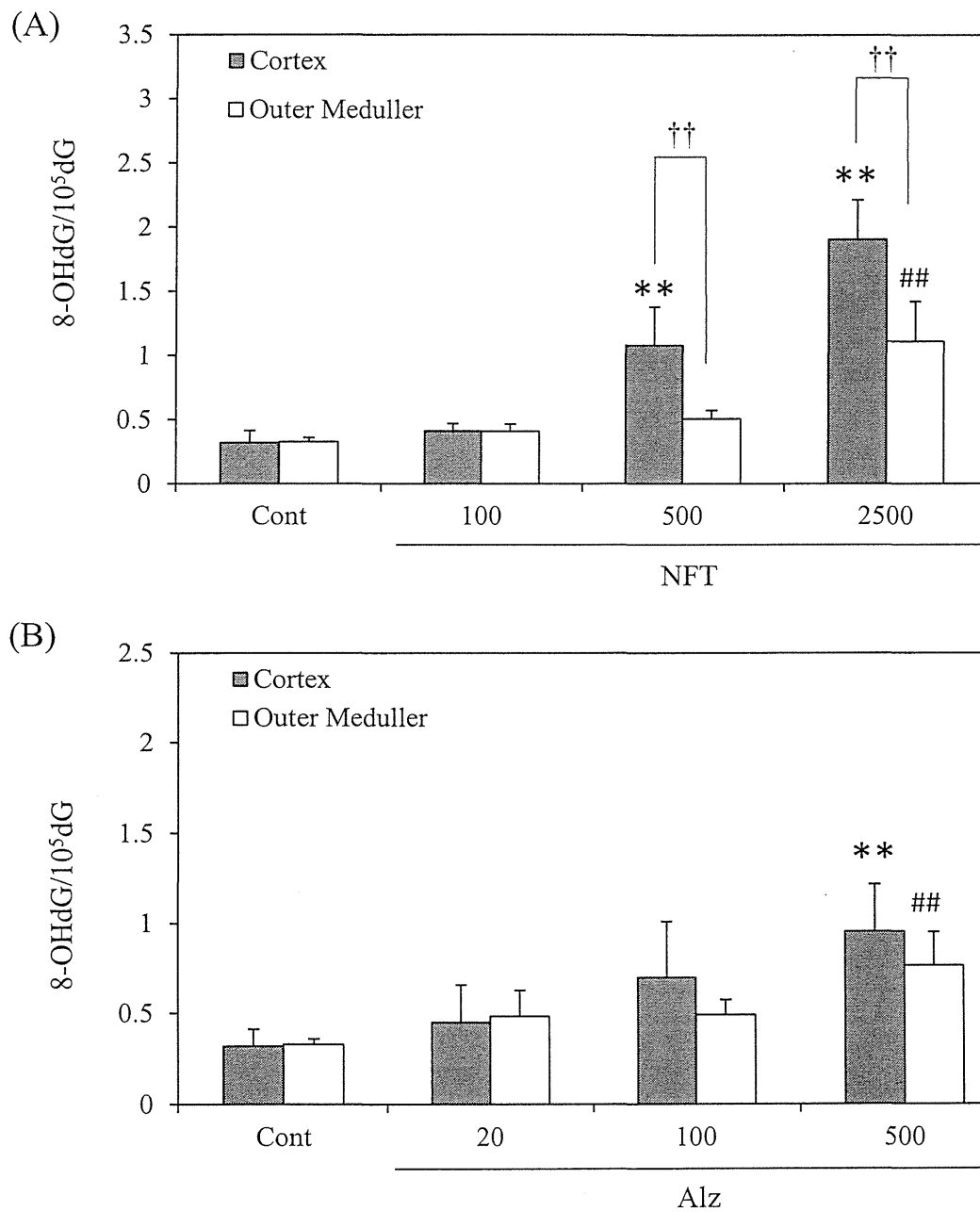


Fig. 3. 8-OHdG levels in the renal cortex and medulla of *gpt* delta rats treated with NFT (A) or Alz (B) for 13 weeks. Data represent means  $\pm$  S.D. (n = 5 or 4). \*\*:  $p < 0.01$  vs. Control group (cortex). #:  $p < 0.01$  vs. Control group (medulla). ††:  $p < 0.01$  vs. medulla.

Table 1 Final body and liver weight

Item	Control	ES (mg/kg/day)		
		1	10	100
No. of animals	5	5	5	5
Body weight (g)	20.3 ± 0.9	20.1 ± 0.8	20.4 ± 0.6	20.5 ± 0.7
Absolute (g)				
Liver	0.89 ± 0.05	0.88 ± 0.07	0.90 ± 0.04	0.85 ± 0.05
Relative (g%)				
Liver	4.36 ± 0.11	4.38 ± 0.20	4.38 ± 0.11	4.16 ± 0.15

Table 2 *gpt* MFs in the livers of *gpt* delta mice treated with ES for 4 weeks.

Treatment	Animal No.	Cm <sup>R</sup> colonies (x 10 <sup>5</sup> )	6-TG <sup>R</sup> and Cm <sup>R</sup> colonies	Mutant frequency (x 10 <sup>-5</sup> )	Mean ± SD
Control	1	17.2	5	0.29	0.61 ± 0.39
	2	18.2	11	0.61	
	3	16.3	10	0.61	
	4	20.1	6	0.30	
	5	8.8	11	1.25	
ES 1 mg/kg/day	6	15.7	13	0.83	0.85 ± 0.30
	7	17.0	12	0.71	
	8	6.5	8	1.23	
	9	4.4	2	0.46	
	10	8.7	9	1.04	
ES 10 mg/kg/day	11	18.8	10	0.53	0.73 ± 0.21
	12	14.9	11	0.74	
	13	12.9	8	0.62	
	14	4.5	3	0.67	
	15	14.9	16	1.08	
ES 100 mg/kg/day	16	11.9	13	1.26	1.27 ± 0.15 **
	17	8.6	13	1.51	
	18	12.5	18	1.44	
	19	11.7	14	1.20	
	20	14.9	14	0.94	

\*\* :  $p < 0.01$  vs. Control group

Table 3 Mutation spectra of *gpt* mutants in the livers of *gpt* delta mice treated with ES for 4 weeks.

	Control	ES (mg/kg/day)		
		1	10	100
Base substitution				
Transversion				
GC-TA	0.10 ± 0.06	0.12 ± 0.13	0.23 ± 0.18	0.34 ± 0.07 *
GC-CG	0.01 ± 0.03	0.01 ± 0.03	0.01 ± 0.02	0.02 ± 0.04
AT-TA	0.08 ± 0.09	0.10 ± 0.12	0.01 ± 0.03	0.07 ± 0.07
AT-CG	0	0.04 ± 0.05	0.04 ± 0.10	0
Transition				
GC-AT	0.23 ± 0.23	0.35 ± 0.23	0.25 ± 0.14	0.54 ± 0.16
AT-GC	0.03 ± 0.05	0.04 ± 0.07	0.03 ± 0.04	0.17 ± 0.07**
Deletion				
Single bp	0.10 ± 0.03	0.15 ± 0.10	0.11 ± 0.14	0.11 ± 0.09
Over 2bp	0	0.01 ± 0.03	0.02 ± 0.03	0
Insertion	0.06 ± 0.10	0.02 ± 0.03	0.01 ± 0.03	0.04 ± 0.05
Complex	0	0	0	0

\*, \*\*:  $p < 0.05, 0.01$  vs. Control group.

Table 4 Spi<sup>r</sup> MFs in the livers *gpt* delta mice treated with ES for 4 weeks.

Treatment	Animal No.	Plaques within XL-1 Blue MRA (x 10 <sup>5</sup> )	Plaques within WL95 (P2)	Mutant frequency (x 10 <sup>-5</sup> )	Mean ± SD
Control	1	33.7	26	0.77	0.69 ± 0.20
	2	24.6	18	0.73	
	3	30.6	22	0.72	
	4	28.8	10	0.35	
	5	14.0	12	0.85	
ES 1 mg/kg/day	6	23.3	6	0.26	0.47 ± 0.27
	7	34.3	19	0.55	
	8	16.3	4	0.25	
	9	4.9	2	0.41	
	10	17.8	16	0.90	
ES 10 mg/kg/day	11	23.3	15	0.65	0.56 ± 0.32
	12	21.7	13	0.60	
	13	20.6	17	0.82	
	14	4.0	0	0	
	15	23.5	17	0.72	
ES 100 mg/kg/day	16	15.8	18	1.14	0.85 ± 0.31
	17	12.5	9	0.72	
	18	12.7	5	0.39	
	19	15.8	14	0.88	
	20	11.6	13	1.12	

Table 5 Final body and liver weight

Item	Control	KBrO <sub>3</sub> (ppm)		
		125	250	500
No. of animals	5	5	5	5
Body weight (g)	306.9 ± 14.1	293.1 ± 12.9	290.4 ± 18.3	253.8 ± 33.2**
Absolute (g)				
Kidney	1.83 ± 0.12	1.78 ± 0.14	1.80 ± 0.11	2.04 ± 0.23
Relative (g%)				
Kidney	0.60 ± 0.02	0.61 ± 0.05	0.62 ± 0.01	0.81 ± 0.03*

\*, \*\*:  $p < 0.05, 0.01$  vs. Control group



Table 6 *gpt* MFs in the renal cortex of *gpt* delta rats treated with KBrO<sub>3</sub> for 9 weeks.

Treatment	Animal No.	Cm <sup>R</sup> colonies (x 10 <sup>5</sup> )	6-TG <sup>R</sup> and Cm <sup>R</sup> colonies	Mutant frequency (x 10 <sup>-5</sup> )	Mean ± SD
Control	1	15.8	7	0.44	0.17 ± 0.09
	2	17.8	4	0.23	
	3	17.0	5	0.29	
	4	14.7	5	0.34	
	5	22.8	4	0.18	
KBrO <sub>3</sub> 125 ppm	6	19.1	4	0.21	0.23 ± 0.11
	7	9.4	1	0.11	
	8	13.9	6	0.43	
	9	12.3	4	0.32	
	10	14.2	3	0.21	
KBrO <sub>3</sub> 250 ppm	11	15.8	7	0.44	0.32 ± 0.23
	12	15.2	5	0.33	
	13	10.2	6	0.59	
	14	21.4	19	0.89	
	15	20.7	7	0.34	
KBrO <sub>3</sub> 500 ppm	16	9.1	5	0.55	0.45 ± 0.21 *
	17	11.0	8	0.73	
	18	13.0	10	0.77	
	19	11.1	6	0.54	
	20	8.8	6	0.68	

\*:  $p < 0.05$  vs. Control group

Table 7 Mutation spectra of *gpt* mutants in the renal cortex of *gpt* delta rats treated with KBrO<sub>3</sub> for 9 weeks.

	Control	KBrO <sub>3</sub> (ppm)		
		125	250	500
Base substitution				
Transversion				
GC-TA	0.06 ± 0.04	0.08 ± 0.05	0.07 ± 0.13	0.05 ± 0.07
GC-CG	0	0	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.04
AT-TA	0	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.04	0.08 ± 0.05 *
AT-CG	0.01 ± 0.03	0	0	0.02 ± 0.03
Transition				
GC-AT	0.09 ± 0.08	0.04 ± 0.06	0.04 ± 0.04	0.09 ± 0.11
AT-GC	0	0.02 ± 0.04	0.02 ± 0.04	0.04 ± 0.08
Deletion				
Single bp	0	0.06 ± 0.06	0.09 ± 0.03	0.11 ± 0.07 *
Over 2bp	0	0	0.01 ± 0.02	0.04 ± 0.05
Insertion	0	0	0.02 ± 0.03	0.02 ± 0.05
Complex	0	0	0	0

\*:  $p < 0.05$  vs. Control group

Table 8 Spi- MFs in the renal cortex of *gpt* delta rats treated with KBrO<sub>3</sub> for 9 weeks.

Treatment	Animal No.	Plaques within XL-1 Blue MRA (x 10 <sup>5</sup> )	Plaques within WL95 (P2)	Mutant frequency (x 10 <sup>-5</sup> )	Mean ± SD
Control	1	21.4	2	0.09	0.15 ± 0.12
	2	21.8	2	0.09	
	3	17.6	6	0.34	
	4	17.6	1	0.06	
	5	32.5	6	0.18	
KBrO <sub>3</sub> 125 ppm	6	27.2	6	0.22	0.15 ± 0.11
	7	30.9	8	0.26	
	8	20	2	0.10	
	9	22.1	3	0.14	
	10	30.4	1	0.03	
KBrO <sub>3</sub> 250 ppm	11	25.1	6	0.24	0.26 ± 0.19
	12	24.8	1	0.04	
	13	13.6	4	0.29	
	14	23.4	5	0.21	
	15	12.2	6	0.49	
KBrO <sub>3</sub> 500 ppm	16	12.8	3	0.23	0.34 ± 0.07 *
	17	18.5	8	0.43	
	18	14.3	5	0.35	
	19	14.1	5	0.35	
	20	13.0	4	0.34	

\*:  $p < 0.05$  vs. Control group

Table 9 Mutation spectra of Spi<sup>-</sup> mutants in the renal cortex of *gpt* delta rats treated with KBrO<sub>3</sub> for 9 weeks.

	Control	KBrO <sub>3</sub> (ppm)		
		125	250	500
1 bp deletion				
Simple				
G/C	0.02 ± 0.03	0.01 ± 0.02	0.06 ± 0.05	0.04 ± 0.04
A/T	0.02 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.07	0
In run				
G/C	0.01 ± 0.02	0.02 ± 0.03	0.02 ± 0.04	0.04 ± 0.04
A/T	0.04 ± 0.05	0.05 ± 0.05	0.10 ± 0.11	0.12 ± 0.10
2 to 1 kb deletion	0	0.01 ± 0.01	0	0.02 ± 0.05
> 1 kb deletion	0.03 ± 0.08	0.06 ± 0.07	0.06 ± 0.06	0.03 ± 0.04
Complex	0	0.01 ± 0.02	0	0
Insertion	0	0	0.01 ± 0.02	0.04 ± 0.07*
Base substitution	0.02 ± 0.03	0.01 ± 0.02	0.02 ± 0.03	0.03 ± 0.04

\*:  $p < 0.05$ , 0.01 vs. Control group.