

し、遺伝毒性 POD とした。発がん性試験結果はカリフォルニア大学の CPDB から抽出し、TD₅₀ 値から発がんのベンチマークドーズ (CARC-BMDL₁₀) を同様に計算した。両者のベンチマークドーズは量的相関性が高く、互いに外挿可能であった。このことから、発がん性データが十分でない場合でも、TG 試験結果から発がんリスクを評価できる可能性が示唆された。

F. 参考文献

B.B. Gollapudi, I.G.E. Johnson, L.G. Hernandez, L.H. Pottenger, K.L. Dearfield, A.M. Jeffrey, E. Julien, J.H. Kim, D.P. Lovell, J.T. MacGregor, M.M. Moore, J. van Benthem, P.A. White, E. Zeiger, and V. Thybaud, *Environ Mol Mutagen.* 52, 518-28 (2011)

G. 健康危機情報

なし

H. 研究発表

誌上発表

1. Horibata K, Ukai A, Honma M., Evaluation of rats' *in vivo* genotoxicity induced by N-ethyl-N-nitrosourea in the RBC Pig-a, PIGRET, and gpt assays. *Genes and Environment*, 36:199-202 (2014)
2. Matsumoto, M., Masumori, S., Hirata-Koizumi, M., Ono, A., Honma, M., Yokoyama, K. and Hirose, A., Evaluation of *in vivo* mutagenicity of hydroquinone in MutaTMmice. *Mutat Res.*, 775, 94-98 (2014)
3. Morita, T., Miyajima, A., Hatano, A., Honma, M.: Effects of the proposed top concentration limit on an *in vitro* chromosomal aberration test to assay sensitivity or to reduce the number of false positives, *Mutation Research*, 769,

34-49 (2014)

4. Onami, S., Cho, Y., Toyoda, T., Horibata, K., Ishii, Y., Umemura, T., Honma, M., Nohmi, T., Nishikawa, A. and Ogawa, K. Absence of *in vivo* genotoxicity of 3-monochloropropane-1,2-diol and associated fatty acid esters in a 4-week comprehensive toxicity study using F344 gpt delta rats. *Mutagenesis*, 29, 295-302 (2014)

学会発表

1. 本間正充: 医薬品中に存在する遺伝毒性不純物の評価と管理, 第 350 回 CBI 学会研究講演会 2014 年 5 月 東京
2. 本間正充: 日本環境変異原学会レギュラトリーサイエンス WG 活動, 日本環境変異原学会公開シンポジウム 2014 年 5 月 東京
3. M. Honma et al.,: Demonstration of non-threshold of 8-oxoG inducing genotoxicity by targeted mutagenesis, 43rd EEMS Annual Meeting 2014 年 7 月 ランカスター・英国
4. M. Honma: Use of QSAR Tools for Hazard Identification of Genotoxic Impurities in Pharmaceuticals, 9th World Congress on Alternative and Animal Use Sciences (WC9), 2014 年 8 月 プラハ・チェコ
5. 本間正充: インシリコによる医薬品中不純物の安全性評価と、その向上に向けた国際共同研究, CBI 学会 2014 年大会プレミエーションセッション 2014 年 10 月 東京
6. M. Honma: Trend and Progress of OECD Genotoxicity Testing Guidelines, 2014 National Workshop on Non-clinical Safety Evaluation and Quality Management 2014 年 11 月 上海・中国
7. 本間正充: 遺伝毒性インテリジェントテストシステム, 日本環境変異原学会第 43 回大会 2014 年 11 月 東京

8. 本間正充：QSAR を利用した医薬品中の遺伝毒性不純物の評価と管理, 日本動物実験代替法学会第 27 回大会 2014 年 12 月 横浜
9. M. Honma et al., : Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome, 4th Asian Conference on Environmental Mutagens 2014 年 12 月 コルカタ・インド

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

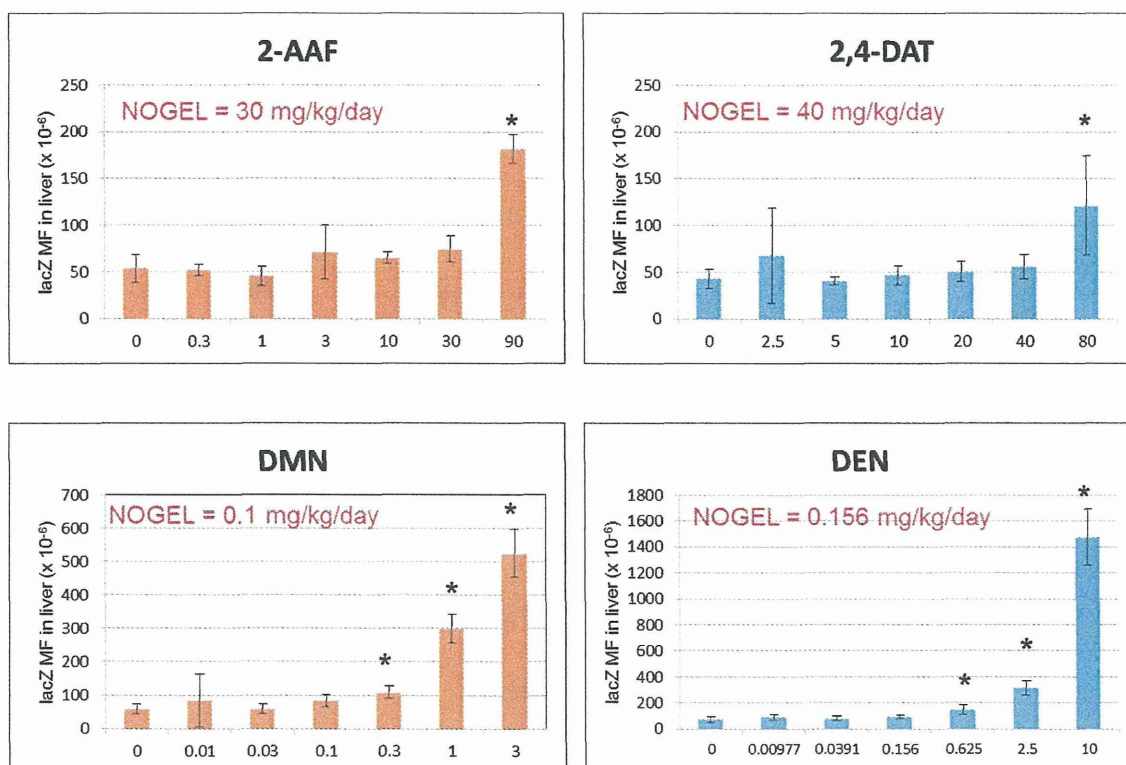


図1 4つの肝発がん物質の肝臓での突然変異の誘発 (MutaTMMouse)

表1 4つの肝発がん物質の遺伝毒性 POD と発がん性 POD の比較

Mutagens	TG Mutagenesis		Carcinogenesis	
	NOGEL mg/kg	BMDL10 mg/kg*	TD10 mg/kg**	BMDL10 mg/kg*
2-AAF	30	2.99	3.82	0.4014
2,4-DAT	40	3.33	5.34	2.0475
DMN	0.1	0.014	0.036	0.0361
DEN	0.156	0.054	0.010(Rat)	0.0112(Rat)

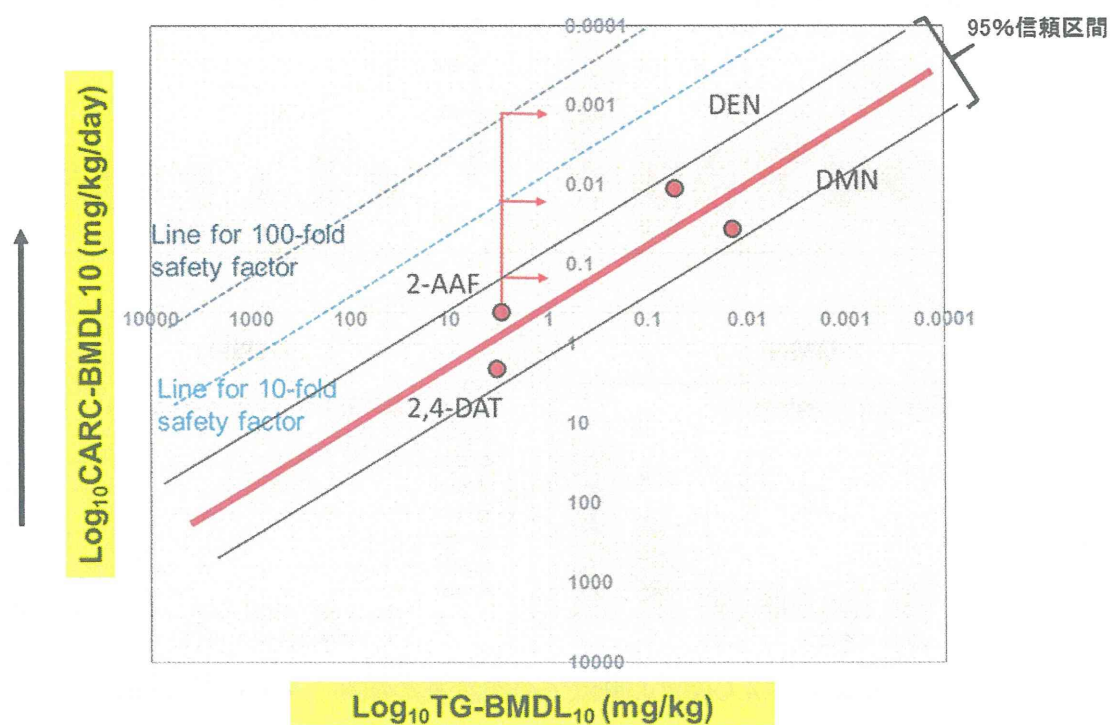


図2 遺伝毒性 TG-BMDL₁₀ と発がん性 CARC-BMDL₁₀ との相関性

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：同じDNA鎖に近接する2分子の8-オキシグアニンDNA付加体に対する
ヌクレオチド除去修復の関与

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

本研究では、ヒトリンパ芽球細胞 TSCER122 (TK6 細胞から樹立) のゲノム内に DNA 損傷の導入場所、分子数、そして化学構造がすべて既知の条件で、その損傷の DNA 修復および遺伝的影響を *in vivo* で追跡できる実験系を用いて、8-オキソ-7, 8-ジヒドロ-2'-デオキシグアニン付加体 (8-oxodG) の突然変異誘発能を調べた。その DNA 付加体は、例えば食品添加物で利用されている臭素酸カリウム等からも容易に形成する酸化的 DNA 損傷である。これまでの研究で、2分子の 8-oxodG を同じゲノム DNA 鎖内に近接して配置させると、修復効率の上昇が示唆された。この現象には、ヌクレオチド除去修復やロングパッチの塩基除去修復等が関与すると予想された。そこで本年度は、まず XPA 欠損細胞を構築し、それらがヌクレオチド除去修復によって修復されるかどうかを調べた。実験の結果、1分子の 8-oxodG 付加体に対しては、XPA 欠損細胞およびその野生型細胞で得られる突然変異誘発頻度は同程度 (約 8.3~8.5%) だった。一方、2分子を同一 DNA 鎖に近接して配置させると、突然変異誘発頻度は野生型細胞で $7.4 \pm 0.59\%$ だったが、XPA 欠損細胞を用いると $12 \pm 1.6\%$ へ有意に上昇した。つまり、同じ DNA 鎖内に近接する2分子の付加体は、通常の塩基除去修復だけでなく、ヌクレオチド除去修復機構によっても修復されていることが分かった。

キーワード: DNA 付加体、8-オキシグアニン、ヌクレオチド除去修復

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 M *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'-デオキシグアニン付加体

(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 M *et al.*, *Chem Res Toxicol* 14, 678-685 (2001))) や放射線 (例えば、電離放射線等 (Ward JF *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、2 分子の 8-oxodG を同じ DNA 鎖で近接して配置させると、修復効率の上昇が示唆された。本研究では、①まず野生型 TSCER122 細胞に同じ DNA 鎖に近接させた 2 分子の 8-oxodG を導入して調べ、1 分子および DNA 両鎖の 2 分子（前年度に実施）と比較すること、②次に、ヌクレオチド除去修復に関与する XPA 欠損細胞を構築し、同じ DNA 鎖の 8-oxodG 2 分子で起きる突然変異誘発頻度を調べる。

B. 研究方法

1. 細胞培養

ヒトリンパ芽球細胞 TSCER122 は、TK6 細胞株を由来とする細胞である (Honma, M. *et al.*, *Environ. Mol. Mutagenesis* 42, 288-298 (2003), Yasui, M. *et al.*, *DNA repair* 15, 11-20 (2014))。細胞は、10%馬血清 (JRH Bioscience)、200 µg/mL ピルビン酸ナトリウム (和光純薬工業 (株))、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン (ナカライテスク (株)) を含む RPMI 培地 (ナカライテスク (株)) で培養した (37 度、5% CO₂)。

2. XPA 欠損細胞の構築

1) Zinc Finger Nuclease による XPA 欠損細胞の取得

XPA 遺伝子を破壊するための Zinc Finger Nuclease (ZFN) は、シグマアルドリッチから購入した。ZFN の設計およびバリデーションについてもシグマアルドリッチによって行われた。なおターゲットサイトは次の配列である；

5'CAGGCCCGGCTGGCTGCCggcccTACTCGGCGACGGCGGCT. ZFN mRNA (2 µg) を 100 µL の Nucleofector solution V (ロンザジャパン (株)) に溶解し、ヌクレオフェクター I を用いて

TSCER122 細胞 (5 x 10⁶) へトランスフェクションした。その細胞を 24 時間後に 1.6 cells/mL の濃度で 96 穴マイクロプレートで培養 (37 度、7~10 日間) した。そのクローニング後、ゲノム DNA を抽出し、プライマー

(5'-AGCTAGGTCCTCGGAGTGG-3'および 5'-GGACAGGACGCTTTGACAAG-3') を用いて PCR を実施した。シーケンス解析することにより、ZFN ターゲットサイト周辺の欠損配列を調べた。

2) ウェスタンブロッティング

対数増殖期の細胞から得られた全細胞抽出物を 10% SDS ポリアクリアミドゲルで電気泳動した。その後、タンパク質を PVDF 膜 (Immobilon-P、メルクミリポア) に移行させ、5%スキムミルクでブロッキングし、抗 XPA モノクローナル抗体 (ab2352、アブカム(株))、あるいは抗 α チューブリンモノクローナル抗体 (ab7291、アブカム(株)) と共に 18 時間反応させた。0.05% Tween20 を含む PBS で膜を洗浄後、抗マウス IgG ホースラディッシュペルオキシダーゼ (GE ヘルスケア バイオサイエンス(株)) と反応させ、化学発光によりタンパク質を検出した。イメージャーは、ImageQuant LAS4000 mini (GE ヘルスケア バイオサイエンス(株)) を使用した。

3) UV 照射

細胞をフェノールレッドを含まない RPMI 培地 (ナカライテスク (株)) で洗浄、再懸濁した。ペトリ皿 (35 mm x 100 mm) に細胞 (2.5 x 10⁶) を 5mL 培地で調整し、2.7 W/m² の UV 殺菌ランプを用いて UVC (254nm) を照射した。UV ライトの測定は、UV-light meter (Lutron) を用いた。照射後、その細胞を 1.6 cells/mL の濃度で 96 穴マイクロプレートで培養し、細胞生存度 (%) を計算した。

3. 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、その欠失部位の上流に *I-SceI* 認識配列 18 bp (5' -ATTACCTGTTATCCCTA) 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)。

4. 8-oxodG 付加体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。1 分子および 2 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) の片側鎖の dG 部位に導入した (1 分子 ; pvIT^{8oxodG}-TS、2 分子 ; pvIT^{2x8oxodG}-TS)。双方とも、導入された DNA 鎖は *TK* の転写鎖側である。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 (pvIT^{dG}) も同様の方法で作製した。

5. 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 50 μg と pvIT^{2x8oxodG} ターゲティングベクター 2 μg 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。解析する配列は、付加体を導入する制限酵素サイト 6 bp (5' -CTCGTG / CACGAG-3') とその前後の配列 3 bp の合計 12 bp の範囲とした。一塩基変異 (single point mutation) とは、付加体の導入部位で起きる一塩基置換、一塩基欠失 ($\Delta 1$)、そして一塩基挿入を示し、タンデム変異 (tandem mutation) とは、付加体導入部位と他の部位が同時に塩基変異を起こしていたことを示す。また、その他 (Others) とは付加体導入部位以外に一つあるいは複数の塩基変異があったことを示す (表 1)。

C. 研究結果

1. *XPA* 遺伝子破壊細胞の分離

ZFN mRNA のトランスフェクション後に得られたクローンから約 20 細胞をランダムに選んでジェノタイプングした結果、ほぼすべての細胞から両アリルともにターゲットサイトの配列 *XPA* が欠損していることが分かった。非常に高効率、そして部位特異的に遺伝子破壊させることが可能であることが分かった。それらのクローンについて、さらにウェスタンブロッティング解析したところ、*XPA* タンパク質の発現の有無が確認できたため、発現の無いクローンをスクリーニングした (図 2A)。

2. *XPA* 欠損細胞の UV 感受性

得られた幾つかの *XPA* 欠損細胞 *XPA*^{-/-} の候補クローンについて、UV に対する細胞生存度を調べた。図 2B で示したように、野生型 TSCER122 細胞と比較して、低用量域で UV に対して高感受性を示す *XPA* 欠損細胞 (以後、*XPA* KO と呼ぶ) を取得することができた。

3. *XPA* 欠損細胞を用いた 8-oxodG 2 分子による

突然変異誘発能頻度およびスペクトラム

pvIT^{2x8oxodG-TS} を TSCER122 および XPA KO ヘトランスフェクション後、付加体が導入されたクローン細胞（それぞれ 649、703）について、シーケンス解析した結果を表 1 に示す（4 度の独立した実験の合計）。8-oxodG 導入部位に塩基変異があったのは、33 (5.1%)、45 (6.4%) であり、どちらも G・C → T・A トランスバージョンが最も高かった。一塩基変異の誘発頻度では、TSCER122 と XPA KO に大きな差がなかったが、タンデム変異に関しては、XPA KO (3.1%) は TSCER122(1.2%) よりも約 2.5 倍多く誘発していることが分かった。また、導入部位以外の塩基で起きる変異 (Others) についても、XPA KO が TSCER122 よりも約 2 倍高かった。総じて、XPA KO によって誘発する突然変異誘発頻度 (12%) は、TSCER122 のそれ (7.4%) よりも有意に上昇していることが明らかとなった (図 3B)。

陰性対象実験として、1 分子の 8-oxodG に対しては、TSCER122 および XPA KO のどちらを用いても、それらの突然変異誘発頻度 (2 度の独立した実験結果) は、変化がなかった (図 3A、表 1)。

4. 野生型 TSCER122 を用いた 8-oxodG 1 分子および 2 分子の突然変異誘発頻度

野生型の細胞から得られる 1 分子と 2 分子の突然変異誘発頻度は、それぞれ 8.3 と 7.4% であり、付加体の分子数が 2 倍になっても変異頻度はほぼ同じと考えられた (図 3)。

D. 考 察

前年度までに、1、2、4 分子の 8-oxodG によって誘発される突然変異誘発頻度を解析 (複数分子は DNA 両鎖に配置) し、付加体の分子数と変異頻度の関係性について調べた。1 分子と 2 分子の変異頻度の間には、比例関係があったが、2 分子と 4 分子の間にはそれが無かった。その 2 分子は、各 DNA 鎖に 1 分子ずつ、つまり DNA 両鎖に 2 分子を近接 (5' -CTCGTG/CACGAG-3' ; 下線部が導入部位) させて変異頻度を解析してお

り、本報告書の 2 分子とは配置が異なる。DNA 両鎖の 2 分子による変異スペクトラムは、2 つの付加体が両鎖の近傍に導入されないと発生しないような特徴的なもので、両鎖の付加体導入部位の間に一塩基欠失と一塩基挿入が非常に高頻度で検出された (5' -CTCNGTG/CACNGAG-3' ; N が欠失あるいは挿入の部位)。その 2 分子の全変異頻度は 20% 以上にも達した。それに対し、本年度に実施した同じ DNA 鎖内の 2 分子による変異頻度は、わずか 7.4% にとどまり、それは 1 分子の頻度 (8.3%) とほぼ同じであった (図 3)。つまり、前年度で考察したとおり、同じ DNA 鎖に複数の DNA 損傷がある場合、ヌクレオチド除去修復あるいはロングパッチ除去修復等によって、効率良く除去されるため、付加体の分子数が多くなっても変異頻度の上昇が抑えられるためであると推測できる。次に、これを証明するために、ヌクレオチド除去修復に関与する XPA 欠損細胞 XPA KO を構築し、同じ DNA 鎖内の 8-oxodG 2 分子で起きる突然変異誘発頻度を調べた。その結果、XPA KO 細胞を用いたときの方が、野生型 TSCER122 細胞のときよりも有意に突然変異誘発頻度を上昇させた (図 3B)。これらのデータから、やはり同じ DNA 鎖にある複数の付加体は同時に除去修復されるため、付加体の分子数と突然変異誘発頻度には、比例関係がないことを実験的に明らかにした。

図 3A に示したように、双方の細胞から得られた 8-oxodG 1 分子の突然変異誘発頻度には差が無い。これは、酸化 DNA 損傷である 8-oxodG は、8-オキシグアニングリコシラーゼ等が関与する塩基除去修復機構によって修復されるからと考えられる (Liu M, *et al. Current Genomics* 10, 250-258 (2009))。しかしながら、8-oxodG がもう 1 分子増えただけで (計 2 分子にクラスター化)、その塩基除去修復機構だけでなく、ヌクレオチド除去修復機構が加わり、DNA 修復をより増強させていることが本研究によって明らかになった。他の研究チームにおいても、放射線のクラスター DNA 損傷の一つである AP-site が、ヌクレオチ

ド除去修復機構によって修復されるという報告がある (Torres-Ramos, CA *et al.*, *Mol Cell Biol* 20, 3522-3528 (2000))。以上のことから、バルキ一DNA 付加体に対して働くとしてきたヌクレオチド除去修復は、クラスターDNA 損傷など DNA の片側鎖に広範な損傷が形成した場合に働く機構であると考えられる。

E. 結 論

DNA 付加体の分子数と突然変異誘発頻度の関係性を調べるために、同じ DNA 鎖内に配置させた2分子の 8-oxodG が引き起こす突然変異誘発頻度を XPA 欠損細胞を用いて明らかにした。その結果、XPA 欠損細胞で起きる突然変異誘発頻度は、野生型細胞のそれよりも有意に上昇した。このことから、同じ DNA 鎖の2分子の付加体は、通常の塩基除去修復だけでなく、ヌクレオチド除去修復機構によっても修復されていることが分かった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yasui M, Kamoshita N, Nishimura T, Honma M; Mechanism of induction of binucleated cells by multiwalled carbon nanotubes as revealed by live-cell imaging analysis. *Genes and Environment*, 印刷中. (2015)

2. 学会発表

- 1) 佐々彰, 鴨下渚, 兼丸祐紀, 本間正充, 安井学; ゲノムの特定部位に配置させたクラスターDNA 損傷の数的遺伝毒性影響. 日本放射線影響学会第 57 回大会, 鹿児島市 (2014 年 10 月)
- 2) 安井学; 部位特異的にゲノム内に導入した DNA 付加体の遺伝的影響. 第 43 回日本環境変異原学会, 東京 (2014 年 11 月)

- 3) 佐々彰, 鴨下渚, 兼丸祐紀, 本間正充, 安井学; ゲノムに導入させた酸化的クラスター DNA 損傷の数的遺伝毒性影響. 第 43 回日本環境変異原学会, 東京 (2014 年 11 月)
- 4) 長野聖也, 東垣由夏, 佐々彰, 川西優喜, 安井学, 高村岳樹, 八木孝司; DNA 塩基損傷 1 分子を部位特異的にもつプラスミドの作製とヒト細胞における TLS 解析. 第 43 回日本環境変異原学会, 東京 (2014 年 11 月)
- 5) Honma M, Yasui M, Kanemaru Y, Kamoshita N, Suzuki T, Arakawa T; Tracing the fate of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome. 4th Asian Conference on Environmental Mutagens. Kolkata, India (2014 年 12 月)

H. 知的所有権の取得状況

なし

表 1. XPA 欠損および野生型細胞を用いた 1 分子および 2 分子の 8-oxodG で起きる突然変異誘発スペクトラムと頻度

Table 1. Mutation spectra induced by integration of pVI^{8oxodG} and pVI^{2x8oxodG}

Targeting vector	Cell	TK revertants analyzed	DNA adducts-integrated revertants	No mutation	Single point mutation at 8-oxoG					Tandem mutations	Others	Total mutation	ND
					T	C	A	Δ ¹	Ins.				
pVI ^{8oxodG}	TSCER122	461	422 (100%)	384 (91%)	15 (3.6%)	5 (1.2%)	1 (0.24%)	3 (0.71%)	0 (0%)	2 (0.47%)	9 (2.1%)	35 (8.3%)	3
	XPA KO	538	472 (100%)	430 (91%)	12 (2.5%)	11 (2.3%)	3 (0.64%)	1 (0.21%)	0 (0%)	0 (0%)	9 (2.5%)	39 (8.3%)	3
pVI ^{2x8oxodG}	TSCER122	713	649 (100%)	597 (92%)	19 (2.9%)	11 (1.7%)	2 (0.31%)	0 (0%)	1 (0.15%)	8 (1.2%)	7 (1.1%)	48 (7.4%)	4
	XPA KO	816	703 (100%)	614 (87%)	31 (4.4%)	6 (0.85%)	5 (0.71%)	2 (0.28%)	1 (0.14%)	22 (3.1%)	19 (2.7%)	86 (12%)	3

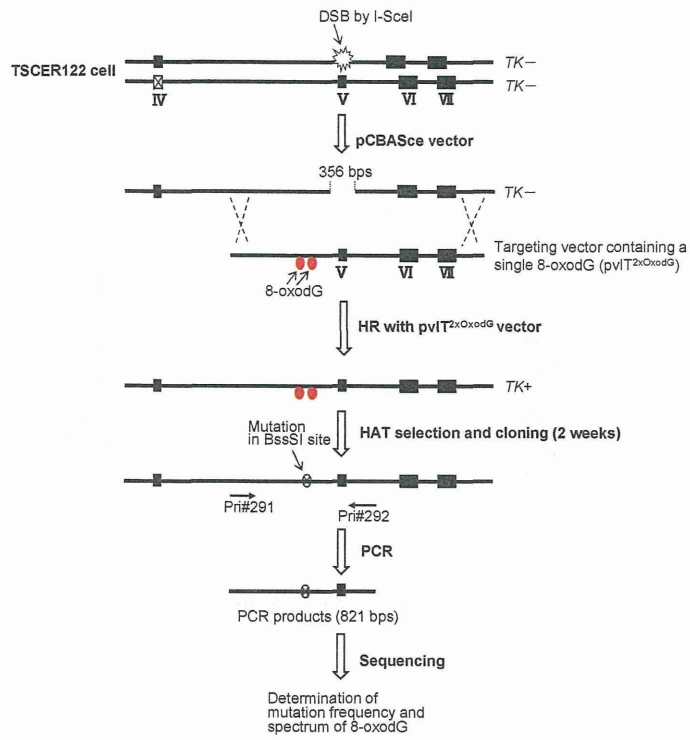


図1. ヒト培養細胞を用いる極低用量暴露モデルの実験系の概要

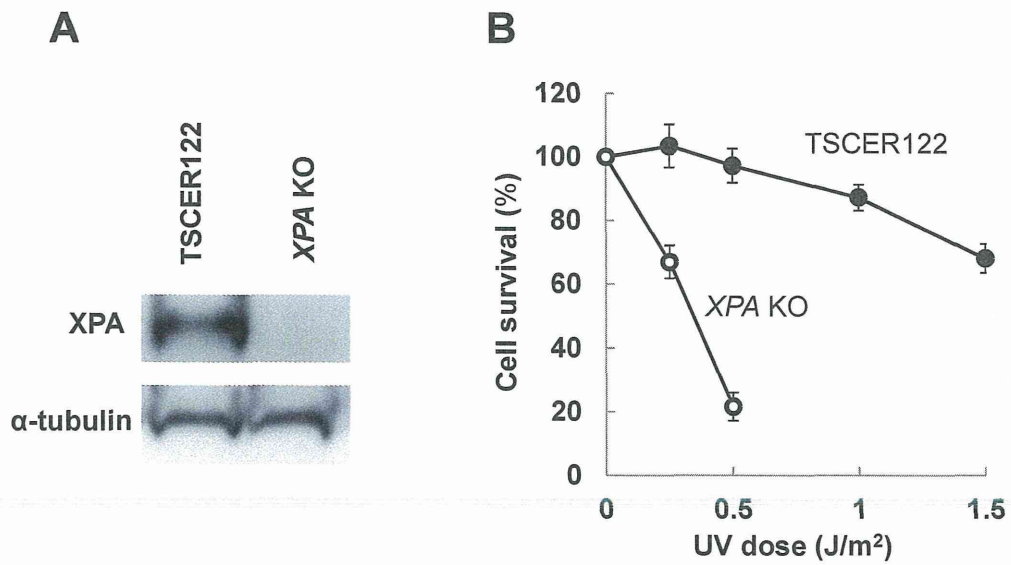


図2. XPA欠損細胞の構築

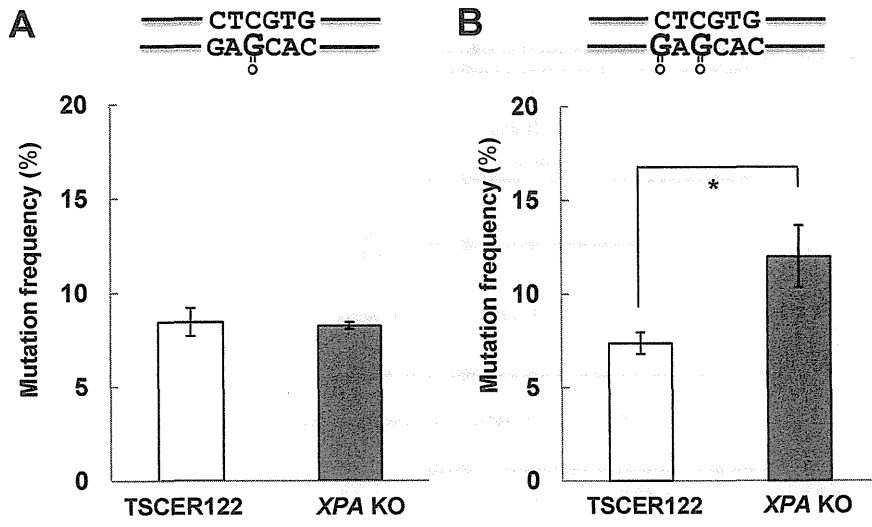


図3. 1分子および2分子の8-oxodG部位で起きる突然変異誘発頻度の比較

平成 26 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：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。昨年度に引き続き、*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。さらに「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た結果、酸化剤の突然変異誘発に関しても「閾値」が存在することを示唆する結果を得た。

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 *Mut yh* 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、*Mut yh* 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、*Mut yh* 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 (0.05-0.15%) 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、*ipsL*-トランスジェニック (Tg) マウスを用いて突然変異解析を実施した。

B. 研究方法

1) *Mut yh* 遺伝子欠損マウスの飼養

C57BL6/J の遺伝的背景を持つ *Mut yh* 遺伝子欠損マウスのヘテロ接合体同士の掛け合わせにより *Mut yh* 遺伝子欠損マウスと対照群の野生型マウスを得た。また、*ipsL*-Tg マウスとの交配を行い、*Mut yh* 遺伝子欠損/*ipsL*-Tg マウスと対照群の野生型/*ipsL*-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 週齢の野生型および *Mut yh* 遺伝子欠損マウス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 4% パラフォルムアルデヒドを用いて固定した。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。

4) 突然変異解析

4 週齢の *ipsL*-Tg を持つ野生型および *Mut yh* 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、*ipsL* 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

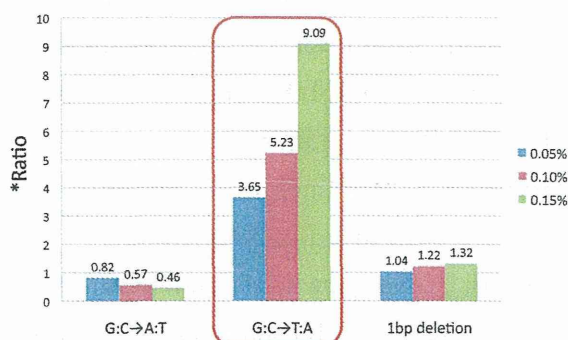
1) 臭素酸カリウム誘発消化管発がん

これまでの *Mut yh* 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、*Mut yh* 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 *Mut yh* 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。

昨年度に引き続き、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、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。これまでと同様に、0.10~0.20% 臭素酸カリウム溶液の用量では、*Mut yh* 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、0.05% 投与群では発がんは認められなかった。

2) 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、「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た。0.10%および0.15%投与群を用いた突然変異解析の結果では、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それぞれ約 1.5 倍および 1.8 倍上昇していた。一方、0.05%投与群の *Mut*h 遺伝子欠損マウスの突然変異は、野生型マウスの突然変異頻度とほぼ同程度 (0.94 倍) であった。8-oxoG に起因すると考えられる G:C→T:A 型の変異頻度を *Mut*h 遺伝子欠損マウスと野生型マウスで比較すると、0.10%投与群では約 5.2 倍、0.15%投与群では約 9.1 倍上昇していたが、0.05%投与群では非投与群における比率 (約 3.3 倍) と同程度の約 3.7 倍しか上昇していなかった (図 1)。



* 野生型マウス突然変異頻度に対する *Mut*h 遺伝子欠損マウス突然変異頻度の比

図 1 野生型および *Mut*h 遺伝子欠損マウスの小腸における KBrO_3 誘発突然変異のスペクトル別の比

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た。

*Mut*h 遺伝子欠損マウスを用いた臭素酸カリウム溶液投与によ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 遺伝子欠損マウス群では 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が、0.05%臭素酸カリウム投与群の *Mut*h 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 *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。

臭素酸カリウムによる誘発突然変異解析の結果、*Mut*h 遺伝子欠損マウスでは酸化 DNA 損傷に起因する G:C→T:A 型の変異頻度が野生型マウスと比較して、非投与群では 3.3 倍、0.05%では 3.7 倍、0.10%では 5.2 倍、0.15%では 9.1 倍、0.20%では 11.8 倍上昇する。この G:C→T:A 型変異の誘発頻度の上昇は、臭素酸カリウムによる小腸発がん頻度の上昇と良く一致していることから、臭素酸カリウムによる消化管発がんにみられる閾値の形成には、酸化 DNA 損傷に起因する突然変異の発生を効率良く抑制する *Mut*h 遺伝子がコードするアデニン DNA グリコシラーゼの機能が関与していることを示唆している。

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 修復系の遺伝子改変マウスを用いて明らかになっている。*MutYh* 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 *MutYh* 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 *MutYh* 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 損傷応答系等で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。今回の低用量 (0.05%) 臭素酸カリウム投与群における発がん性および突然変異誘発に関する研究成果は、このことを強く示唆している。

E. 結論

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。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

[学術雑誌]

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) [査読有]

2. Takahashi-Yanaga, F., Yoshihara, T., Jingushi, K., Igawa, K., Tomooka, K., Watanabe, Y., Morimoto, S., Nakatsu, Y., Tsuzuki, T., Nakabeppu, Y. and Sasaguri, T., DIF-1 inhibits tumor growth *in vivo* reducing phosphorylation of GSK-3 β and expressions of cyclin D1 and TCF7L2 in cancer model mice, Biochem. Pharmacol., 89, 340-348 (2014) [査読有]
3. Ohno, M., Sakumi, K., Fukumura, R., Furuichi, M., Iwasaki, Y., Hokama, M., Ikemura, T., Tsuzuki, T., Gondo, Y. and Nakabeppu, Y., 8-Oxoguanine causes spontaneous *de novo* germline mutations in mice, Scientific Reports, 4:4689 DOI: 10.1038/srep04689 (2014) [査読有]
4. Isoda, T., Nakatsu, Y., Yamauchi, K., Piao, J., Yao, T., Honda, H., Nakabeppu, Y., Tsuzuki, T., Abnormality in Wnt signaling is causatively associated with oxidative stress-induced intestinal tumorigenesis in MUTYH-null mice, Int. J. Biol. Sci., 10 (8), 940-947 (2014) [査読有]
5. Kyuragi, R., Matsumoto, T., Harada, Y., Saito, S., Onimaru, M., Nakatsu, Y., Tsuzuki, T., Nomura, M., Yonemitsu, Y., Maehara, Y., BubR1 insufficiency inhibits neointimal hyperplasia through impaired vascular smooth muscle cell proliferation in mice, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 35, 341-347 (2015) [査読有]
6. Kanao, R., Yokoi, M., Ohkumo, T., Sakurai, Y., Dotsu, K., Kura, S., Nakatsu, Y., Tsuzuki, T., Masutani, C., Hanaoka, F., UV-induced mutations in epidermal cells of mice defective in DNA polymerase β and/or γ DNA Repair, in press (2015) [査読有]

学会発表

1. 2014年12月10日 Teruhisa Tsuzuki, Mizuki Ohno, Noriko Takano, Kenichi Taguchi, Yusaku Nakabeppu, Yasunobu Aoki, Takehiko Nohmi, Yoshimichi Nakatsu [Oxidative stress-induced intestinal tumors in *MutYh*-deficient mice treated with low doses of potassium bromate] 4th Asian Conference on Environmental Mutagen, Kolkata, India [12月10日~12日] 招待講演 (旅費等は新学術領域研究の方から支出)
2. 2014年12月5日、*MutYh* 遺伝子欠損マウスにおける酸化ストレス誘発突然変異の解析、鷹野典子、大野みずき、稲葉洋平、志村勉、樺田尚樹、中別府雄作、中津可道、續輝久 [Oxidative DNA damage-induced mutagenesis in *MutYh*-deficient mice, Noriko Takano, Mizuki Ohno, Yohei Inaba, Tsutomu Shimura, Naoki Kunugida, Yusaku Nakabeppu, Yoshimichi Nakatsu, Teruhisa Tsuzuki] 日本環境変異原学会第43回大会、東京 [12月4日~5日]
3. 2014年12月5日、*MutYh* 遺伝子欠損マウスを用いた酸化ストレス誘発消化管がんの解析、大野みずき、鷹野典子、佐々木史子、田口健一、中別府雄作、青木康展、能美健彦、中津可道、續輝久 [Oxidative stress-induced intestinal tumors in *MutYh* deficient mice, Mizuki Ohno, Noriko Takano, Fumiko Sasaki, Kenichi Taguchi, Yusaku Nakabeppu, Yasunobu Aoki, Takehiko Nohmi, Yoshimichi Nakatsu, Teruhisa Tsuzuki] 日本環境変異原学会第43回大会、東京 [12月4日~5日]
4. 2014年11月26日、非標的部位におけるミスマッチの配列変換 (遺伝子修復) への影響、西垣奈津希、池田彰弘、湯川誠也、守田由子、中津可道、續輝久、原島秀吉、紙谷浩之、日本分子生物学会第37回年会、横浜 [11月25日~27日]
5. 2014年11月25日、*MutYh* 遺伝子欠損マウスにおける酸化ストレス誘発突然変異の解析、鷹野典子、大野みずき、稲葉洋平、志村勉、樺田尚樹、中別府雄作、中津可道、續輝久、日本分子生物学会第37回年会、横浜 [11月25日~27日]
6. 2014年11月25日、8-oxoguanine に起因する *de novo* germline mutation の解析、作見邦彦、大野みずき、福村龍太郎、権藤洋一、岩崎裕貴、池村淑道、續輝久、中別府作、日本分子生物学会第37回年会、ワークショップ：生命の起源・進化・本質、横浜 [11月25日~27日]
7. 2014年10月29日、Oxidative stress-induced intestinal tumors in *MutYh*-deficient mice treated with low doses of potassium bromate、Teruhisa Tsuzuki, Mizuki Ohno, Noriko Takano¹, Kenichi Taguchi, Yusaku Nakabeppu, Yasunobu Aoki, Takehiko Nohmi, Yoshimichi Nakatsu, 5th US-Japan DNA Repair Meeting, Grand XIV Naruto, Tokushima [10月28日~31日] 招待講演
8. 2014年10月2日、酸化ストレス誘発突然変異と消化管がん解析、大野みずき、鷹野典子、佐々木史子、橋詰拓弥、李賛、田口健一、中別府雄作、中津可道、續輝久、日本放射線影響学会第57回大会、鹿児島 [10月1日~3日]
9. 2014年10月2日、ミスマッチ修復欠損マウスにおける酸化ストレス誘発突然変異の解析、橋詰拓弥、中津可道、大野みずき、佐々木史子、鷹野典子、續輝久、日本放射線影響学会第57回大会、鹿児島 [10月1日~3日]
10. 2014年10月1日、DNA修復欠損マウスを用いた発がん研究：低用量化学物質投与研究から見えること、續輝久、シンポジウム：低線量・低線量率放射線による発がんを考える、

日本放射線影響学会第57回大会, 鹿児島[10月1日~3日]

11. 2014年9月27日、Oxidative stress-induced mutagenesis and tumorigenesis in the small intestine of *Mutyh*-deficient mice treated with low doses of potassium bromate, Mizuki Ohno, Noriko Takano, Yoshimichi Nakatsu, Yusaku Nakabeppu, Teruhisa Tsuzuki [低用量臭素酸カリウムの飲水投与により *Mutyh* 遺伝子欠損マウスの消化管で誘発された突然変異並びに発がんの解析、大野みずき、鷹野典子、中津可道、中別府雄作、續輝久]、日本癌学会第73回学術総会、横浜 [9月25日~27日]
12. 2014年9月27日、Microsatellite instability is induced by DNA replication stress in association with massive induction of mutations, Yuko Atsumi, Kotoe Katayama, Teppei Shimamura, Yoshimichi Nakats5, Mitsuko Masutani, Satoru Miyano, Hitoshi Nakagama, Teruhisa Tsuzuki, Ken-ichi Yoshioka [マイクロサテライト不安定性は変異導入を伴ってDNA複製ストレス下で誘導される、熱海悠子、片山琴絵、島村徹平、中津可道、益谷美都子、宮野悟、中釜斉、續輝久、吉岡研一]、日本癌学会第73回学術総会、横浜 [9月25日~27日]
13. 2014年9月26日、DIF-1 inhibits tumor growth in vivo reducing phosphorylation of GSK-3b and expressions of cyclin D1 and TCF7L2, Fumi Takahashi, Yoshimichi Nakatsu, Teruhisa Tsuzuki, Yusaku Nakabeppu, Toshiyuki Sasaguri [DIF-1はGSK-3βのリン酸化抑制とcyclin D1およびTCF7L2の発現低下により抗腫瘍効果を発揮する、高橋富美、中津可道、續輝久、中別府雄作、笹栗俊之]、日本癌学会第73回学術総会、横浜 [9月25日~27日]
14. 2014年9月17日、DNA酸化損傷修復欠損マウスの継代実験で捉えられた遺伝現象、作

見邦彦, 大野みずき, 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, 日本遺伝学会第86回大会、長浜市 [9月17~19日]

15. 2014年9月17日、*Mutyh* 欠損マウスにおける酸化ストレス誘発発がんおよび突然変異の解析、鷹野典子, 大野みずき, 中別府雄作, 中津可道, 續輝久、日本遺伝学会第86回大会、長浜市 [9月17~19日]

G. 知的所有権の取得状況

特になし

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 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

研究分担者 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

食品添加物のうち指定添加物に関して実施された、遺伝毒性試験データ、細菌を用いる復帰突然変異試験・哺乳類細胞を用いる染色体異常試験・齧歯類を用いる小核試験他を一覧表にまとめた。

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）には、本来正確な定量性は無いが、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、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。昨年度、IARCがヒトに発がん性があるとしている物質等のうち28個について発がん性の強さの指標TD₅₀値とAmes試験の比活性値を調べたところ、比活性値が1,000を超えることが

高い発がんリスクの指標になっていることが示唆された。

最終年度は、食品添加物の遺伝毒性試験既存データを*in vitro*、*in vivo*合わせて一覧表にした。

B. 研究方法

平成25年8月6日現在の指定添加物について、これまで実施された細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames試験）、哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、齧歯類を用いる小核試験、及び、一部実施されているコメット試験、トランスジェニック動物遺伝子突然変異試験（TG試験）の結果（陽性、陰性の別）を一覧表にした。出典は以下のとおり。

- ・ 石館基、吉川邦衛、祖父尼俊雄、食品添加物の変異原性試験成績（その1-9）、変異原と毒性、第12集及び 4、5、トキシコロジーフォーラム 6-10
- ・ Hayashi et al. Food Chem Toxicol、 26、 485-500 (1988)
- ・ 藤田博 他、*Salmonella typhimurium* TA97、TA102、を用いた食品添加物の変異原性試験（第1-10報）東京都立衛生研究所年報
- ・ 厚生労働省実施のGLPに則した変異原性試験

（倫理面への配慮）

該当しない研究である。

C. 研究結果

1) 概要

食品添加物のうち、指定添加物436品目（一部混合物等を含む）について実施されていた遺伝毒性試験結果を表1にまとめた。293品目については、Ames試験と染色体異常試験が実施され、91品目について*in vivo*の小核試験が実施されていた。3つの試験がいずれも実施されているのは、55品目だった。12品目については肝臓と消化器（胃もしくは大腸）を対象にTG試験が実施されていた。結果はいずれも陰性となっている。

2) 陽性データについて

着色料のうち4品目についてはコメット試験でDNA損傷性を調べており、赤色104号と赤色105号は陽性の結果であったが、TG試験の結果は陰性だった。Ames試験陽性は16品目、染色体異常試験陽性は43品目、*in vivo*小核試験陽性は6品目で、3試験が共に陽性なのは4品目にとどまった。

3) 陰性データについて

Ames試験と染色体異常試験が実施されている293品目のうち、両試験が陰性だったものは233品目（約80%）だった。その中で13品目については小核試験が実施されているがいずれも陰性だった。

D. 考察

従来の手法で実施された食品添加物の安全性評価のうち遺伝毒性に関するものをまとめた。従来の手法とは、まず*in vitro*の二試験をスクリーニングとして実施し、陽性になったものの結果を精査して、*in vivo*の小核試験を実施するというものである。さらに、約10年前から*in vivo*の遺伝子突然変異を調べる系としてTG試験が導入され、最終的に遺伝毒性の有無を決定する手法になっている。現時点では12品目について実施され、陽性の結果になった品目はまだ無い。マルトールのようにAmes試験、染色体異常試験、*in vivo*小核試験が陽性になったものでも、TG試験が陰性であれば、生体にとって問題となる遺伝毒性は否

定される戦略である。

微生物を用いる遺伝毒性試験、すなわちAmes試験を用いて発がんの定量性を論じる場合、対象になるのはAmes試験陽性の場合である。既存のデータよりAmes試験が実施されている316品目のうち陽性だったのは15品目、約5%である。一方、昨年度、IARCのGroup1のカテゴリーの化学物質について調べた結果、Ames試験の比活性値がある17物質のうち、1,000を超えるものが15物質と、大半を占めていた。以上をまとめると次の3点になる。

1. Ames試験、染色体異常試験、小核試験がいずれも陽性であった場合でも、TG試験が陰性であれば、少なくとも食品添加物の場合生体にとって問題となる遺伝毒性は否定されている。
2. Ames試験が陽性になる食品添加物は、既存データより5%程度と推察される。
3. Ames試験の比活性値が1000を超える場合、発がん性を持つ可能性が高いと考えられる。

つまり、Ames試験で陽性になる食品添加物の数は限られ、最終的にはTG試験で確認することからAmes試験に細かい定量性を求める必要はなく、従来どおり比活性値を目安に次の評価ステップに進むことが妥当であると考えられる。

TG試験による遺伝毒性から発がん性を定量的に予測する手法についての詳細は、他の分担研究報告書を参照されたい。

E. 結論

指定添加物436品目についての遺伝毒性試験データをまとめた。微生物を用いる遺伝毒性試験には、定量性を求めるよりもスクリーニングとして用いる従来の戦略での位置づけが妥当であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takeiri A, Wada NA, Motoyama S, Matsuzaki K, Tateishi H, Matsumoto K, Niimi N, Sassa A, Grúz P, Masumura K, Yamada M, Mishima M, Jishage K, Nohmi T: *In vivo* evidence that DNA polymerase kappa is responsible for error-free bypass across DNA cross-links induced by mitomycin C. *DNA Repair*, 24, 113-21, 2014.

2. 学会発表

- 1) 堀妃佐子, 田中康浩, 堤絵梨, 百南綾華, 増村健一, 山田雅巳, 藤居瓦, 北川義徳: DMHを用いた F344 系統 *gpt delta* ラット突然変異試験と小核試験 (末梢血、骨髄、肝臓、大腸) の統合法の検討. 日本環境変異原学会第 43 回大会 (2014.12、東京) .
- 2) 山田雅巳, 堀端克良, 鵜飼明子, 木本崇文, 千蔵さつき, 伊東悟, 武藤重治, 宇野芳文, 真田尚和, 高島理恵, 志賀野美幸, 高沢博修, 濱田修一, 山本美佳, 堀妃佐子, 堤絵梨, 和田邦生, 前田晃央, 小坂瑞樹, 木村葵, 菊月隆太, 荻原庸介, 京谷恭弘, 足立秀樹, 上松

泰明, 吉田唯真, 成見香瑞範, 福田隆之, 鈴木裕太, 後藤玄, 森田健, 本間正充:

Pig-a/PIGRET アッセイに関する短期試験への有用性: MMS 共同研究報告. 日本環境変異原学会第 43 回大会 (2014.12、東京) .

- 3) 須井哉, 川上久美子, 根岸沙記, 増渕恵美, 園原啓太, 山田雅巳: ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験法の検討 9. 日本環境変異原学会第 43 回大会 (2014.12、東京) .
- 4) Yamada M, Takamune M, Matsuda T.: Novel mutation assay with non-selective protocol using a next-generation DNA sequencer. 4th Asian Conference for Environmental Mutagen Society (2014.12、Kolkata, India).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし