

201426011B

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24～26年度 総合研究報告書

研究代表者 本間正充

平成27(2015)年 4月

目 次

I. 総合研究報告書

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、安井 学、續 輝久、山田 雅巳、増村 健一、鈴木 孝昌

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 \_\_\_\_\_ 29

III. 研究成果の刊行物・別冊 \_\_\_\_\_ (年度報告書に添付のため省略)

I. 総合研究報告書

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一つであり、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、閾値の存在の評価と、試験結果の適切な量的評価が不可欠である。

近年の発がん物質のリスク評価の際に遺伝毒性の「閾値」に関する議論は、その存在の有無に固執するよりも遺伝毒性試験結果を定量的に評価し、ゼロリスクの議論を回避する試みが注目されている。このため定量性が高い試験結果から、遺伝毒性を発現する最低用量を数値化し、その値と実際の暴露量を比較するリスク評価法が試みられている。このような量を Point of Departure(POD)と定義する。遺伝毒性 POD としてベンチマークドーズ (BMD<sub>10</sub>) を用い、15 種類の化合物のトランスジェニック動物突然変異 (TG) 試験の用量反応データを入手し、その BMD<sub>10</sub> 値をマウスのがん原性試験の BMD<sub>10</sub> 値と比較した。また、実際に 4 種類の代表的な遺伝毒性肝発がん物質について、TG 試験を実施し、その定量的反応性を解析した。試験結果から遺伝毒性ベンチマークドーズ (TG-BMDL<sub>10</sub>) を算出し、発がんのベンチマークドーズ (CARC-BMDL<sub>10</sub>) と比較した。TG-BMDL<sub>10</sub> は発がん性とも相関性が高く、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が示唆された。

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、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た。1 から 4 分子の 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 DNA の両鎖、あるいは同じ DNA 鎖内に近接して配置させ、それらが引き起こす突然変異誘発頻度とスペクトラムを解析した。その 8-oxodG 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。DNA 修復遺伝子の破壊細胞を用いた分子細胞遺伝学的な実験により、同じ DNA 鎖に近接する 2 分子の 8-oxodG 付加体は、DNA 両鎖に近接する 2 分子のそれらよりも効率良く修復されることが明らかとなった。よって、付加体の分子数と突然変異誘発頻度には、比例関係はなく、付加体の形成部位が突然変異誘発頻度に強い影響を与えることが明らかとなった。

*Mut*h 遺伝子欠損マウスへ臭素酸カリウムを投与する発がん実験系を確立し、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、0.05%、0.10%および0.15%臭素酸カリウムを経口投与して発がん実験および突然変異解析を行い、*Mutyh* 遺伝子産物が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ことを示唆する結果を得た。また、*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、遺伝子欠損マウスを利用した発がん・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、有用な試験系であることが示された。

芳香族アミンと一般的な発がん性物質 81 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 TD<sub>50</sub> 値の相関を調べた。芳香族アミンについては両者の相関が高いことが分かった。構造クラスを考慮に入れることで定量的評価が可能になることが示唆された。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 TD<sub>50</sub> 値の相関を調べ、従来から用いている比活性値 1,000 以上は発がん性の強さの指標として妥当であることが示唆された。最終年度に、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ところ、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むしろ、スクリーニングとして用いる従来のストラテジーでの位置づけが妥当であると考えられた。

TG 試験のデータベースを作成し、123 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、標的臓器、TG 試験判定、文献その他の情報を追加した。*In vivo* 変異原性と発がん性の相関について検討した。発がん性未知物質について TG 試験を実施する際は、肝臓を第一の解析臓器とすることが適当と考えられた。

遺伝毒性の定量的リスク評価に向けて、特に低用量でのヒトに対するリスク評価モデルの構築は重要な課題となっている。TG 試験に注目し、発がん試験における化学物質の発がん性の強さの定量的指標(TD<sub>50</sub>)を用いて、定量的な相関を試みてきたが、この考えより一般化し、投与量あたり陰性対照群におけるバックグラウンド値の何倍に増加させたかにあたる Fold increase/total dose を用いることにより、異なる試験系での比較を可能とした。一方、低用量でのリスク評価においては、新たなアプローチとして、より信頼性の高い定量値が得られる高用量での用量相関性データを詳しく取ることにより、低用量への相関を行う用量反応予測モデルを提唱した。さらに、ヒトが通常暴露される用量において、実際のヒトサンプルを用いた暴露評価を可能とし、動物モデルを併用したリスク評価法の確立をめざすため、LC-MS を用いたプロテオーム解析による「タンパク質アダクトーム解析」を提唱し、タンパク質の遺伝毒性物質による付加の検出法の確立を行った。ヒト血清アルブミン(HSA)の 34 番目のシステイン(Cys34)は高い反応性を持つことが報告されているため、モデル実験として、HSA を *in vitro* にてグリシドール等のアルキル化剤を反応させ、目的であるシステイン付加体と合わせて、リジン、ヒスチジン残基のアミノ基への付加体を検出した。さらに本検討をより一般化するため、ヒト血清サンプル中の HSA システイン残基における未知の付加体を、MS/MS スペクトルの類似性から網羅的に解析した結果、複数の付加体候補を得た。非修飾ペプチドとの精密な質量差より付加体の構造を予測した結果、システインの酸化体、ジメチルヒ素付加体に一致する付加体構造が推定された。

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。本研究は、1 名の研究代表者と、5 名の分担研究者が以下の目的で研究を行った。

#### 1) リスクレベルに基づく遺伝毒性評価法の提言 (本間)

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。*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。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<sub>10</sub>、ED<sub>50</sub> 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。齧歯類発がん性試験結果と相関性が高いとされるトランスジェニック齧歯類遺伝子突然変異試験 (TG 試験) 結果から、遺伝毒性リスク評価のための POD (Point of Departure) を導き、TG 試験結果から発がんのリスク評価を行うための手法の開発を行う。

#### 2) 極低用量の DNA 付加体数と突然変異誘発性の関係の解析 (安井)

低用量暴露における発がんや遺伝毒性の影響を正確に解析することは困難である。なぜなら、低用量域における微弱な影響シグナルは、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の場合があること等からである。つまり、我々は高用量から低用量域に外挿して毒性予測する従来の実験手法に限界があると考え、DNA 損傷 1 分子をゲノムに導入することで低用量暴露を模擬する実験系を最近確立した (Yasui, M. *et al.*, *DNA Repair* 15, 11-20 (2014))。それはヒトリンパ芽球細胞 TK6 由来の



TSCER122細胞株のゲノム内に酸化 DNA 損傷の一つである 8-oxodG 1 分子を導入し、その部位周辺で起こる突然変異誘発頻度とスペクトラムを詳細に解析することができる。これまでの研究によって、わずか 1 分子であっても、8-oxodG は一塩基変異（主に G→T トランスバージョン）および欠失等で 10.7% の頻度を誘発させることが分かった。これは、極めて低い暴露用量であっても、DNA 付加体が形成すれば突然変異を誘発すること（そして発がんに至る可能性を持つ）を示しており、遺伝毒性発がん物質には閾値が無いという従来からのリスク評価法をサポートしている。しかしながら、ここで使用された実験系は、DNA 修復機能が正しく働いていないなど、本知見に関してはまだまだデータの蓄積が必要である。よって、本研究の目的は、1 分子だけでなく、2 分子および 4 分子の 8-oxodG をゲノムに導入し、同様の解析を行うことで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することである。

### 3) DNA 修復系欠損マウスを用いた *in vivo* 発がん性評価（續）

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 DNA 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。さらにマウスに酸化剤であり食品添加物としても使用されている臭素酸カリウムを経口投与し、個体での突然変異誘導・発がん感受性を検討するための系を樹立した。

本研究では、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検討するために、*Mutyh* 遺伝子欠損マウスに低用量域の臭素酸カリウムを経口投与して発がん実験を行うとともに、*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。

### 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）

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」として算出し、この値が 1,000 を超えるものは変異原性が非常に強いと判断する指標に用いている。しかしながら、これはあくまでも目安であり 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。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。二年目は IARC（国際がん研究機構）で発がんのクラスがグループ 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。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、考察した。

#### 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）

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、個体における暴露経路、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（2013年に一部改訂）。遺伝毒性は重要な発がんメカニズムの一つであり、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不可欠である。

本研究では、遺伝毒性試験データのヒト発がんリスク評価への利用を目的として、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。

#### 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）

遺伝子傷害性発がん物質には閾値はないという概念から低用量でのリスク評価には直線性に基ついた外挿による評価がなされているが、低用量における用量反応性の評価が難しいことから、実験的な根拠がないまま使われている状態である。特にヒトでのリスク評価においては低用量での暴露評価が重要となるため、より現実に近い定量的評価法として低用量での用量反応性の予測が重要な課題となっている。本研究においては、定量性という概念からよりヒトにおける暴露状況およびリスクをきちんと評価するために、実際のヒトサンプルを用いた評価系の確立をめざした。低用量の暴露影響の評価のためには、そ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、そうした観点から、従来用いられてきた DNA ではなく、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た。すでに一部の研究において、食品中の化学物質によるヘモグロビン等の付加体の形成が知られているが、これらはタンパク質上の特定の位置の特定の種類の付加体の測定に限定される。我々は、未知の付加体を含めて、さらに網羅的にタンパク質への付加体反応物を検索することを可能とする目的で、ナノ LC-MS/MS を用いた高感度なショットガンプロテオミクス解析を応用し、「タンパクアダクトーム」解析という新たなアプローチを行った。これらにより、食品等に含まれて人が摂取する化学物質の発がんリスクに対して、定量的に評価し、必要な基準値等の設定に有効な理論的根拠を提供することが可能となる。

#### B. 研究方法

##### 1) リスクレベルに基づく遺伝毒性評価法の提言（本間）

米国産業衛生専門家会議 (ACGIH)、ドイツ MAK 委員会(MAK)、ヨーロッパ環境変異原学会 (EEMS)、環境保健科学研究所 (HESI)、ICH-M7 専門家委員会での論議等を基に、遺伝毒性・変異



原性の定義、閾値の定義、閾値の存在条件、閾値に替わる評価手法等を調査した。

Hernandez (2011)の報告に基づき定量性のある *in vivo* 遺伝毒性データを収集、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<sub>10</sub> 値とがん原性 BMD<sub>10</sub> 値の比較に関する統計処理を行った。2-アセチルアミノフルオレン(2-AAF)、2,4-ジアミノトルエン(2,4-DAT)、ジメチルニトロサミン(DMN)、ジエチルニトロサミン(DEN)については、情報が不足していたため実際に TG マウス (Muta<sup>TM</sup>Mouse)を用いて肝臓における TG 試験を実施した。肝臓における突然変異の無遺伝毒性影響濃度 (NOGEL)、ベンチマーク用量 (BMDL<sub>10</sub>)を算出し、POD とした。POD の算出には米国環境保護庁の BMDS ver2.5 ソフトウェアが用いた。がん原性用量反応データについては、Carcinogenic Potency Database (CPDB)を用いた。CPDB から得られた発がん試験データから同様に POD を算出し、両者を比較した。

## 2) 極低用量の DNA 付加体数と突然変異誘発性の関係の解析 (安井)

### 2.1 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*<sup>-/-</sup>)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'-ATTACCCTGTTATCCCTA)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*<sup>-/-</sup> → *TK*<sup>+/+</sup>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(Honma, M. *et al.*, *Environ. Mol. Mutagen.* 42, 288-298 (2003), Yasui, M. *et al.*, *DNA Repair* 15, 11-20 (2014))。

### 2.2 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とゲノム導入

8-oxodG 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。

8-oxodG は、*TK* のイントロン 4 に位置する *BssSI* 認識配列 (5'-CTCGTG (非転写鎖) / CACGAG-3' (転写鎖); 下線部が導入部位) の dG 部位に導入した。8-oxodG を含むターゲティングベクターは、次の 5 通りである。また、コントロールベクターも同様の方法で作製した。1 分子;

pvIT<sup>8oxodG</sup>-TS(5'-CTCGTG / CACGAG-3')、  
pvIT<sup>8oxodG</sup>-NTS(5'-CTCGTG / CACGAG-3')、2 分子;  
pvIT<sup>2x8oxodG</sup>(5'-CTCGTG / CACGAG-3')、  
pvIT<sup>2x8oxodG</sup>-TS(5'-CTCGTG / CACGAG-3')、4 分子;  
pvIT<sup>4x8oxodG</sup>(5'-CTCGTG / CACGAG-3')、コントロール; pvIT<sup>dG</sup>

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 10<sup>6</sup> cells/100 μL に調整した TSCER122 細胞に、pCBASce 50 μg と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 cm<sup>2</sup> の培養フラスコで 3 日間培養(37°C、5 % CO<sub>2</sub>)した。次に、その細胞を 1~5 x 10<sup>3</sup> cells/mL に調整し、HAT 試薬を添加後、96 穴プレートでさらに 2 週間培養し、*TK* 復帰細胞を回収した。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。

### 2.3 XPA 欠損細胞 (*XPA* KO) の構築

*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。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 10<sup>6</sup>) 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、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。

### 3) DNA 修復系欠損マウスを用いた *in vivo* 発がん性評価 (續)

#### 3.1 *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。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。

#### 3.2 臭素酸カリウム(KBrO<sub>3</sub>)溶液の投与

臭素酸カリウム(Sigma)を純水に溶解し、0.05、0.10%および 0.15%溶液を調製後濾過滅菌し、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 週間の自由飲水で行い、消費量については週一回モニターした。

#### 3.3 発がん実験

マウスを安楽死させた後、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。検出した腫瘍から病理切片を作製し、病理解析を行った。

#### 3.4 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。

#### 3.5 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。

### 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)

初年度は、芳香族アミンの発がん性と Ames 試験の結果の相関を調べるため、CPDB のサイトに齧歯類を用いた発がん試験のデータが掲載されており、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芳香族アミンを一覧にした。二年目は、IARC グループ 1 の物質 114 のうち (2014 年 1 月 21 日現在)、CAS registry number (CAS#) をもち (57 物質)、CPDB のサイトにラットもしくはマウスを用いた発がん試験のデータとして TD<sub>50</sub> 値が掲載されており、かつ NTP のサイトに Ames 試験のデータが掲載されていたもの (28 物質) を一覧にした。最終年度は、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 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、TG 試験の結果 (陽性、陰性の別) を一覧表にした。

### 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)

過去の総説、原著論文および試験報告書から TG 試験結果のデータベースを作成した。OECD の Detailed Review Paper On Transgenic Rodent Mutation Assays (2009) をもとに、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データベースに追加した。本総説は、個別の試験の投与方法、用量、突然変異体頻度等が記載されていることから、定性的分析に加えて定量的分析にも有用と考えられる。TG 試験データが存在する物質について、発がん性物質および非発がん性物質を検索してデータベースに追加した。項目は、物質名称、CAS 番号、構造式、発がん標的組織、TG 試験判定結果 (陽性または陰性) とした。また、コメントとして TG 試験実施組織の情報を追加した。当該物質に対して他の遺伝毒性試験 (Ames 試験等) の情報がある場合は追加した。また、2008 年以降に厚生労働省が委託試験等で行った TG 試験デー

タを追加した。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。さらに、肝臓における TG 試験結果と発がん性の相関を調べた。

## 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)

低用量での定量的評価モデルの確立に当たっては、実験的アプローチに限界があるため、既存の変異原性試験データを活用した理論的なアプローチを採用した。発がん性試験と変異原性試験の定量的相関に関する検討においては、すでに報告している Muta<sup>TM</sup>Mouse および BigBlue<sup>®</sup>トランスジェニックマウスを用いた変異原性試験データと、発がん性の強度の指標としての TD<sub>50</sub> との相関図を基にして、新たなトランスジェニックマウスモデルである *gpt delta* マウスにおけるデータの適応性に関して検討するとともに、*in vivo* 変異原性試験としての一般的応用を目指して、小核試験データへの適応を試みた。ヒト血清サンプルの LC-MS/MS によるプロテオーム解析に関しては、以下の方法に従った。

### 6.1 タンパク質の溶解

ヒト血清 2  $\mu$ l に 2 倍量のアセトンを追加してタンパク質を沈殿させた。遠心分離により上澄を除き、沈殿を洗浄後、15  $\mu$ l のタンパク溶解液 Rapigest (Waters) 0.1% に溶解させた。

### 6.2 還元アルキル化

タンパクの溶解後、トリプシンによる消化を促進するために、以下の条件にてタンパク質 S-S 結合の還元とアルキル化の処理を行なった。タンパク溶液 30  $\mu$ l に、30  $\mu$ l の 10 mM DDT を加え、60°C、30 分間反応させて還元後、室温に戻した後、60  $\mu$ l の 30 mM ヨードアセトアミド溶液を加え、遮光して室温にて 30 分間反応させた。

### 6.3 トリプシン消化

還元アルキル化したサンプル溶液にそのままトリプシン溶液 (Trypsin Gold, Promega) を 4.6

$\mu$ l (0.25  $\mu$ g/ $\mu$ l) 加え、37°C で一晩消化した。消化液を、ZipTip C18-P10 (Millipore) にて精製後、LC-MS 解析に用いた。

### 6.4 システイン 34 含有ペプチドフラグメント付加体の網羅的解析

同定されたペプチドのうち、システイン 34 を含むペプチド (ALVLI<sup>34</sup>AFAQYLQQCPFEDHVK) に着目し、このペプチドが溶出されたリテンションタイム付近前後 10 分間に検出された未同定ペプチドの中から、このペプチドフラグメントと類似した MS/MS スペクトルを示すペプチドピークを目視により検索した。

(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。本間、續の動物実験に関してはそれぞれ、国立衛研、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

### 1) リスクレベルに基づく遺伝毒性評価法の提言 (本間)

文献情報から 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 BMD<sub>10</sub> 推定値とがん原性試験で得られた BMD<sub>10</sub> 推定値をまとめた。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 BMD<sub>10</sub> 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 BMD<sub>10</sub> を示した。

BMD<sub>10</sub> 最低値に関する CI (BMDU/BMDL の比率) の大きさは、各 BMD<sub>10</sub> 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 BMD<sub>10</sub> に対する TG による BMD<sub>10</sub> 最低値をプロットした。ここでも TG 試験から得た BMD<sub>10</sub> 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 ( $r=0.59$ )。しかし、TG と腫瘍 BMD<sub>10</sub> 最低値には相関が認められなかった。

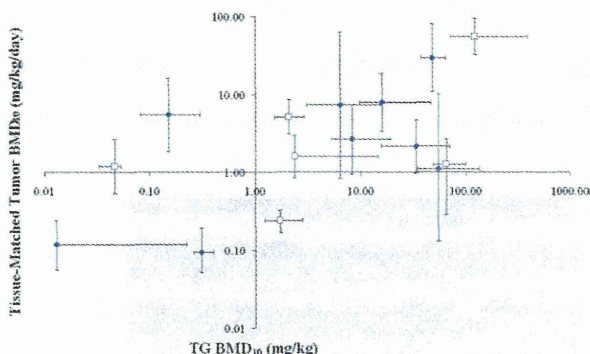


図1 TG 試験-BMD と発がん (TG 標的組織)-BMD の相関性 ( $r=0.59$ )

肝臓に腫瘍を誘発することが知られている遺伝毒性発がん物質である 2-アセチルアミノフルオレン(2-AAF)、2, 4-ジアミノトルエン(2,4-DAT)、ジメチルニトロサミン(DMN)、d) ジエチルニトロサミン(DEN)についてトランスジェニックマウス (Muta<sup>TM</sup>Mouse) を用いて肝臓における TG 試験を実施した (図 2)。TG 試験で得られた各肝発がん物質の TG 試験結果から NOGEL と TG-BMDL<sub>10</sub> を算出した。また、CPDB データから得られたそれら発がん性試験の結果から TD<sub>10</sub>、および CARC-BMDL<sub>10</sub> を計算した。CPDB に複数の試験結果が存在した場合は、データの信頼性が高く、より保守的な値を示すデータセットを用いた。

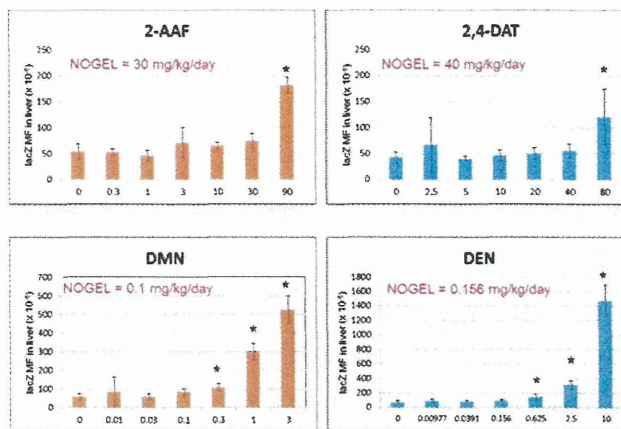


図2 4つの肝発がん物質の肝臓での突然変異の誘発 (MutaMouse)

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	BMDL <sub>10</sub> mg/kg*	TD <sub>10</sub> mg/kg**	BMDL <sub>10</sub> 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)

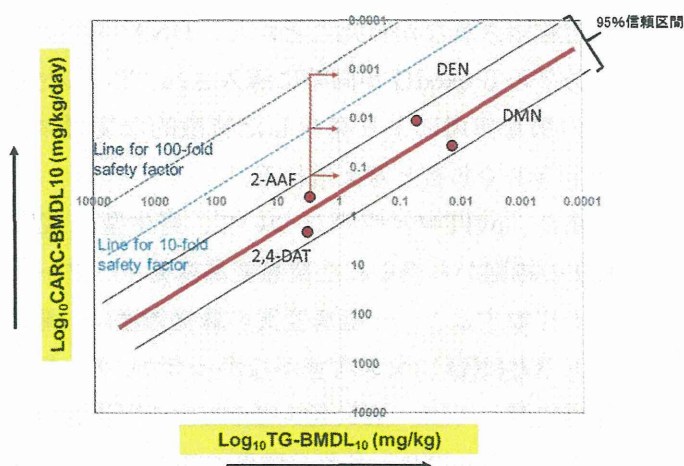


図3 遺伝毒性 TG-BMDL<sub>10</sub> と発がん性 CARC-BMDL<sub>10</sub> との相関性

DEN に関してはマウスのデータが無かったためラットのデータを用いた。これらのリスク評価のための POD とし、比較検討した (表 1)。



今回試験した 4 つの遺伝毒性発がん物質のそれぞれの BMDL<sub>10</sub> をプロットしてグラフ化した (図 3)。

## 2) 極低用量の DNA 付加体数と突然変異誘発性の関係の解析 (安井)

TSCER122 を用いて、部位特異的にゲノム導入された複数分子の 8-oxodG が誘発する突然変異誘発頻度 (次の括弧内は *XPA* KO を用いたとき) を調べたところ、pvIT<sup>8oxodG-TS</sup>; 8.3~11%(8.3%)、pvIT<sup>8oxodG-NTS</sup>; 11% (未実施)、pvIT<sup>2x8oxodG</sup>; 26% (未実施)、pvIT<sup>2x8oxodG-TS</sup>; 7.4%(12%)、pvIT<sup>4x8oxodG</sup>; 20~25%(39%)の突然変異誘発頻度が得られた。

野生型細胞を用いて pvIT<sup>2x8oxodG</sup>(5'-CTCGTG / CACGAG-3')をゲノム導入したとき、特徴的な突然変異誘発スペクトラムが得られた。その主なスペクトラムは、斜め対面に位置する 2 分子の 8-oxodG の間に、G あるいは C が一塩基挿入された 5'-CTCZGTG (Z は G あるいは C) が 5.2%、および一塩基欠失 7%が高頻度で観察された。1 分子の pvIT<sup>8oxodG-TS</sup> や pvIT<sup>8oxodG-NTS</sup> をゲノム導入したときには、この特徴的なスペクトルはほとんど検出されなかったことから、DNA の両鎖に 2 分子の 8-oxodG が同時に導入され、互いの付加体の相互作用により発生した特徴的な変異スペクトラムであると考えられる。

また、pvIT<sup>2x8oxodG-TS</sup> について、野生型と *XPA* KO の細胞から得られた突然変異誘発スペクトラムを比較すると、一塩基変異の誘発頻度は、野生型と *XPA* KO に大きな差がなかったが、タンDEM 変異に関しては、*XPA* KO (3.1%)は TSCER122 (1.2%)よりも約 2.5 倍多く誘発することが分かった。また、導入部位以外の塩基で起きる変異についても、*XPA* KO(2.7%)が TSCER122(1.1%)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。

## 3) DNA 修復系欠損マウスを用いた *in vivo* 発がん性評価 (續)

### 3.1 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 (図 4)。臭素酸カリウムを投与した野生型マウス雌 9 匹および *Mutyh* 遺伝子欠損マウス雌 8 匹に生じた 1 個体当たりの平均腫瘍数はそれぞれ 1.0±0.7、51.0±28.4 であった。

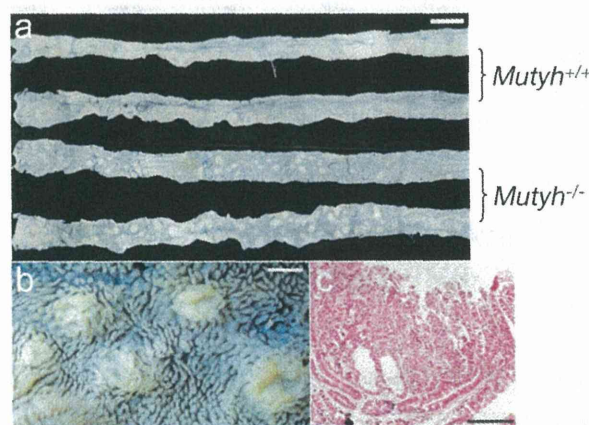


図 4 臭素酸カリウム誘発小腸腫瘍

今回、遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討するための実験として、従来から用いてきた用量である 0.2%に加えてより低用量の 0.05%、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った。0.2%臭素酸カリウムを投与した *Mutyh* 遺伝子欠損マウス 4 匹に生じた 1 個体当たりの平均腫瘍数は 60.8±35.0 で、前回行った大規模な投与実験の結果 (51.0±28.4) と同程度の腫瘍発生頻度であった。一方、0.10%臭素酸カリウムを投与された *Mutyh* 遺伝子欠損マウス 12 匹の小腸には、1 個体当たり平均 8.8±4.7 の腫瘍が、0.15%臭素酸カリウムを投与された *Mutyh* 遺伝子欠損マウス 22 匹の小腸には、1 個体当たり平均 41.6±12.7 の腫瘍が発生していたが、0.05%臭素酸カリウムを投与された *Mutyh* 遺伝子欠損マウス 9 匹の小腸には全く腫瘍の発生を認めなかった (表 2、図 5)。

表2 *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

No of <i>Mut</i> h mice	KBrO <sub>3</sub> (%)	No of tumor/mouse (mean±SD)
9	0.05	0
12	0.10	8.8±4.7
22	0.15	41.6±12.7
4	0.20	60.8±35.0

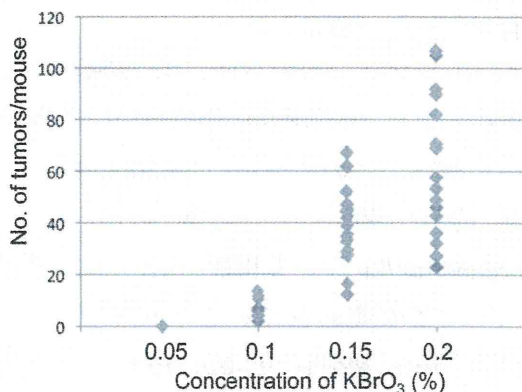


図5 *Mut*h 遺伝子欠損マウスにおける臭素酸カリウム誘発小腸腫瘍の発生頻度

### 3.2 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。比較的多く検出される G:C→A:T 型変異や1塩基欠失の発生頻度には顕著な変化は無かったが、8-oxoG に起因すると考えられる G:C→T:A 型の突然変異頻度を *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(図6)。一方、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。

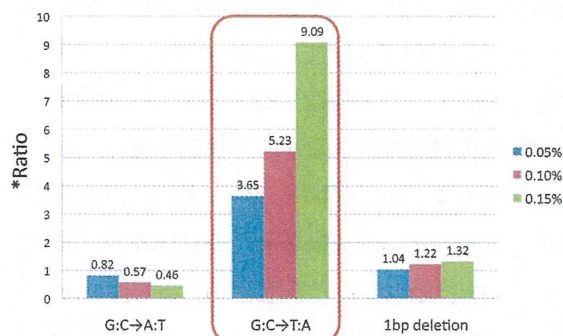


図6 野生型および *Mut*h 遺伝子欠損マウスの小腸における KBrO<sub>3</sub> 誘発突然変異のスペクトル別の比

### 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)

初年度に検討した芳香族アミンの比活性値に1,000を超えるものはなくいずれも500未満であった。二年目に、IARCのグループ1に分類される28物質についてAmes試験の結果と発がん試験の結果を比較したところ、Ames試験の陰性と陽性の境目は、発がん試験のTD<sub>50</sub>値100 mg/kg/day付近であることがわかった。指定添加物436品目のうち293品目について、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た。

### 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)

収録したデータ件数は計273件となった。内訳は、発がん物質123件、非発がん物質23件、発がん性未知物質65件、複合暴露49件、溶媒13



件であった。このうち、複合暴露および溶媒対照については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 211 件（発がん物質 123 件、非発がん物質 23 件、発がん性未知物質 65 件）となった。

発がん性物質 123 件のうち、TG 試験が発がん標的組織で実施されているものは 102 件、発がん標的組織以外で実施されているものは 21 件あった。TG 試験データがある 123 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。陽性を陽性と評価する sensitivity は  $91/123 = 74.0\%$  であった。陰性を陰性と評価する specificity は  $15/23 = 65.2\%$  であった。全体の一致率 concordance は  $(91+15)/146 = 72.6\%$  であった。発がん性物質 123 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 25 件あった。非発がん性物質 23 のうち、TG 試験陽性のものは 8 件あった。

また、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。発がん性物質 123 件のうち、Ames 試験が陽性かつ TG 試験が陰性のものが 13 件あった。また、Ames 試験が陰性かつ TG 試験が陽性のものが 15 件あった。

さらに、肝臓における TG 試験結果と発がん性の相関を調べた。発がん性物質 123 件のうち、肝臓の TG 試験データがあるものが 92 件あり、このうち肝臓 TG 陽性が 62 件、肝臓 TG 陰性が 30 件であった。肝臓 TG 陰性 30 件のうち 9 件は肝臓以外の組織で TG 陽性結果が得られていた。非発がん性物質 23 件のうち肝臓の TG 試験データがあるものが 15 件あり、このうち TG 陽性が 4 件、TG 陰性が 11 件であった。このことから、発がん物質が肝臓で TG 陽性となる sensitivity は  $62/92 = 67.4\%$ 、非発がん物質が肝臓で TG 陰性となる specificity は  $11/15 = 73.3\%$ 、全体の一致率 concordance は  $(62+11)/107 = 68.2\%$  と算出された。

## 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）

### 6.1 低用量リスク評価に対する理論的アプローチ

低用量におけるリスク評価の新たなアプローチとして、高から中用量域での用量反応の詳細な解析から、外挿により低用量域での反応性を予測するモデルを提唱した。十分な用量反応の得られる領域において、適切に用量間隔を設けて詳細な用量反応曲線（直線）を描くことにより、低用量での反応性を、実験を行わずに予測できる。

### 6.2 *in vivo* 遺伝毒性試験の発がん性との定量的相関関係モデルの一般化

我々はこれまでに、発がん性と TG 試験の定量的相関モデルにて、両者が良い相関関係にあることを示してきた。このモデルの一般化にあたり、変異原性の強さの尺度として、fold-increase/mg/kg という指標を用い、同一物質においてデータが得られているアリストロキア酸を用いて Muta<sup>TM</sup>Mouse と *gpt delta* マウスでのデータの比較を行った結果、変異頻度の値は両者においてかなり差があったものの、fold-increase を用いて現した活性値はほぼ同じ位置にプロットされた。次に、小核試験のデータがあるものに関して、その活性の強さを、単回投与量あたりの fold-increase 値として、TD<sub>50</sub> 値との相関をプロットしたところ、陽性結果が得られている化合物に関しては、TD<sub>50</sub> 値との間に良い相関関係が見られた。

### 6.3 ラットおよびヒトヘモグロビンサンプル中のグリシドールアダクトの検出

まず、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/MSs ペクトラムを MSCOT によるデータベース検索に供した。グリシドール修飾ヘモグロビンとして同定されたのは、125 番目のシステイン残基を含むペプチドフラグメント(EFTPCAQAQAFQK)のみであり、エンドマン分解法で検出できていた N 末端のバリニアダクトは検出されなかった。一方で、ヒトヘモグロビンサンプル（グリシドール処理なし）に関し

ても同様な解析を行ったが、検出できなかった。

#### 6.4 血清中のアルブミン付加体の解析

前立腺がん患者由来血清より得られたタンパク質をトリプシン消化後に、LC-MS によりショットガンプロテオミクス解析し、スペクトルの類似性を手がかりに、Cys34 アダクトの候補を同定した。その結果、既知の修飾として cysteic acid (cysteine oxidation)、dimethylarsino、carbamidomethyl DDT が得られた他、複数の未知付加体候補が得られた。

### D. 考察

#### 1) リスクレベルに基づく遺伝毒性評価法の提言 (本間)

遺伝毒性結果は「陽性」もしくは「陰性」として判定され、遺伝毒性ハザードの有無を評価するのが一般的である。HESI の遺伝毒性試験プロジェクト(GTTC)・定量的評価グループは、従来の「ハザードの同定」を目的とした遺伝毒性評価を「リスク評価」に転換すべく、試験結果の定量的評価法を試みている。これまでの毒性試験と同様、もしくはその代替パラメータを開発し、ヒト発がんリスクへの適用を目指す。ここでは他の毒性と同様に遺伝毒性試験から得られた用量-反応評価の結果から、ヒトでの通常の摂取量領域における健康影響評価基準値等を設定する際の毒性反応曲線の基準となる出発点の値として POD を求める。遺伝毒性の場合 POD としては、No-observed Genotoxic Effect Level (NOGEL)、Benchmark dose (BMD)がある。

**NOGEL** : 適切な陰性対照群と比較して統計学的に遺伝毒性反応を示さない最高用量と定義する。理想的には、NOGEL を求めるための統計的手法を特定すること、データセットと検出力が明らかであることであるが、現実には困難である。NOGEL 値を決定するための標準アプローチとしては以下の手法が推奨される。データは SPSS のバージョン 16.0.1 を使用し、 $\alpha=0.05$  での片側 Dunnett 検定に従い分散分析(ANOVA)により評価する。この解析により陰性対照と統計学的に差

がある用量と差がない用量を区別できる。これから統計学的に差が無い用量の最高用量を NOGEL と定義する。次の用量は LOGEL である。データは必要に応じて Log または平方根に変換することができる。

**BMD**: BMD アプローチは用量反応性データの数学的モデルに基づき、NOAEL アプローチの改良型として提案させている。このアプローチは、がんおよび非がん性病変の両者に POD を決定する手法として毒物学の他の分野の中で広く利用されている。BMD アプローチは、陰性対照に対して何らかの生物学的反応が現れる用量(BMD)を推定する。このアプローチはサンプル数や反応曲線などを考慮に入れた因子を取り入れた数学的用量反応モデルを採用している。また、わずかな反応性(BMR)、重要な反应用量(BMD)をデータの変換を行わず推定することができる。BMR は連続したエンドポイントの場合は、適合モデルで推定された陰性対照に対する%の変化 (3%、10%) として表される。BMD の信頼上限曲線における用量の 95%信頼下限値が BMDL である。BMDL<sub>10</sub> は連続性エンドポイントの陰性対照に比べて 10%増加する 95%信頼下限値である。この方法では少ない動物数の試験でも統計学的信頼性に関する補正ができ、より安全側からの推定ができる (信頼下限値を用いているので、データの質および統計学的考え方が含まれる)。つまり、同じ用量反応曲線を描く場合でも、動物数が少ない場合や、データのバラツキが大きい場合には信頼限界の幅が広くなり、BMDL はより低い値となって、より安全側に推定されることとなる。遺伝毒性の用量相関データは線形および二次反応として解析されているため、BMD 手法でモデル化できる。BMDL<sub>10</sub> 値は用量反応モデリング・パッケージ・ソフト PROAST で計算できる。これは、オランダの国立公衆衛生・環境保護研究所(RIVM)で開発された。このプログラムはアメリカ EPA の BMDS ソフトウェアと類似している。本研究では文献情報で得られた 15 の TG 試験に関しては PROST を、実際に TG 試験を行った 4 試験に関

しては BMDS を用いた。

文献情報で TG 試験とがん原性試験の暴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 BMD<sub>10</sub> は腫瘍 BMD<sub>10</sub> 最低値より良好な相関がみられた (図 1)。これは信頼区間が広いことから分かるように、腫瘍 BMD<sub>10</sub> 最低値から不確実性の大きさから理解できるが、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。

試験した 4 つの遺伝毒性発がん物質のそれぞれの BMDL<sub>10</sub> をプロットしてグラフ化した (図 3)。発がん性と TG 変異原性は量的相関性が高く、TG 試験の BMDL<sub>10</sub> から発がん性の BMDL<sub>10</sub> を推測できる。データにばらつきがあることを考慮し、10~100 倍の安全ファクターをとることが必要かもしれない。この手法は発がんデータが無い場合でも、TG 試験データから発がんリスク評価ができる可能性を示している。発がん性の発現が遺伝毒性に質的・量的に依存していることが明らかでない場合には有効な方法と考えられるが、実現化のためにはさらなるデータの蓄積が必要と考える。

毒性の初期の分子的反応から、最終的な *in vivo* の病態までの発現プロセスを Adverse Outcome Pathway (AOP) としてとらえ、プロセスの重要な生物学的イベント (Critical Event) を、エンドポイントとして試験法と評価法を構築する Integrated Approach to Testing and Assessment (IATA) 手法が OECD で提唱されている。発がんのプロセスからすると遺伝毒性は初期の分子的反応 (DNA 損傷、突然変異) にあたり、これは発がんに先行しなければならない。しかしながら、これまで遺伝毒性試験と発がん性試験は独立して行われており、このような、時間的な相関性については検討されていない。同様に、今回示した用量的相関性に関しても、検討されてこなかった。理想的には、遺伝毒性試験と発がん性試験の低用量の長期試験を同一動物で同時並

行して行い、遺伝毒性の発現用量と発現時期、発がん性の発現用量と発現時期を正確に解析することが必要である。現在の遺伝毒性試験は高用量短期間で試験されており、これはヒトにおける発がん物質の暴露環境と大きく乖離していることはおろか、動物を使った発がん性試験の条件とも乖離している。ヒトに対する遺伝毒性評価と発がんリスク評価の精緻化のためには、現在の遺伝毒性試験のプロトコールの見直しが必要と考える。さらには、OECD の提唱する IATA 手法に則った新たな遺伝毒性試験の開発、及び評価ストラテジーの転換も必要である。

## 2) 極低用量の DNA 付加体数と突然変異誘発性の関係の解析 (安井)

本研究では、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 pvIT<sup>8oxodG</sup>-TS (8.3~10%) と DNA 両鎖の 2 分子 pvIT<sup>2x8oxodG</sup> (26%) の変異頻度の間には、比例関係があったが、4 分子 pvIT<sup>4x8oxodG</sup> (20~25%) に増やすと比例関係がなかった。一方、DNA 両鎖ではなく、同じ DNA 鎖内に 2 分子を導入した pvIT<sup>2x8oxodG</sup>-TS を用いると、その変異頻度はわずか 7.4%にとどまり、1 分子と 2 分子の間にも比例の関係がないと分かった。この現象について推測すると、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、効率良く一度に複数の付加体が除去されるため、付加体の分子数が増えても変異頻度の上昇が抑えられるためであると考えた。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 (12%) を用いた時の方が、野生型の細胞 (7.4%) の時よりも有意に突然変異誘発頻度を上昇させた。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。

本研究で得られたデータを基にすると、1分子の 8-oxodG 付加体は約 10%の変異頻度の強さを持っている。もし、その付加体部位から遠方にもう 1分子が形成すると、それぞれが独立して修復や塩基変異を発生させるため、2分子の合計で約 20%の変異頻度を示す(比例の関係)はずである。しかし、それら 2分子が近接して形成すると、その比例関係はどうなるか、という疑問を明らかにすることも本研究の目的の一つであった。なぜなら、2分子以上の付加体同士が近接し群集化する DNA 損傷(クラスターDNA 損傷)が、電離放射線の照射、および酸化ストレス等の重篤化により容易にゲノム DNA で発生するからである。本研究では、部位特異的な DNA 付加体のゲノム導入法の確立、および XPA 欠損細胞を用いる細胞遺伝学的な解析によって、その疑問を実験的に明らかにした。

### 3) DNA 修復系欠損マウスを用いた *in vivo* 発がん性評価(續)

臭素酸カリウムは、パンの製造過程で使用される酸化作用を有する食品添加物であるが、ラットにおいては腎がんを誘発し、IARC はグループ 2B の発がん性物質に指定している。

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、福島昭治博士(現、日本バイオアッセイ研究センター所長)らの系統的な研究により、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 *Mutyh* 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した。

本研究で行った発がん実験の結果では、臭素酸カリウム 0.2%投与された *Mutyh* 遺伝子欠損マウスで、小腸での発がん頻度は 1 個体当たり  $60.8 \pm 35.0$  と野生型の個体当たり約 1 個に比べて顕著な上昇を認めた。0.15%臭素酸カリウムを投与された *Mutyh* 遺伝子欠損マウス平均腫瘍発生頻度は 1 個体当たり  $41.6 \pm 12.7$  で、0.2%の臭素酸カリウム投与群の約 68%に減少していた。また、0.1%の臭素酸カリウムを投与された *Mutyh* 遺伝子欠損マウスの平均腫瘍発生頻度は 1 個体当たり  $8.8 \pm 4.7$  で、0.2%の臭素酸カリウム投与群と比較すると、約 7 分の 1 近くに減少していたものの、多数の腫瘍発生を認めた。これらの結果は、*Mutyh* が酸化剤臭素酸カリウムによってもたらされる遺伝毒性に関する「事実上の閾値」形成に寄与している可能性を示唆している。また、さらに低用量の 0.05%の臭素酸カリウム投与群では全く腫瘍の発生が認められなかったことから、*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している。すなわち、*Mutyh* 以外の因子も酸化剤の発がん性に関して「閾値」形成に関わっている可能性を示唆している。

臭素酸カリウムによる誘発突然変異解析の結果、*Mutyh* 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(図 7)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 *Mutyh* 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。

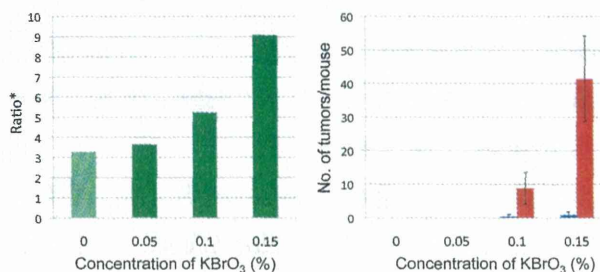


図7 野生型および *Mutyh* 遺伝子欠損マウスの  $\text{KBrO}_3$  誘発消化管がんと小腸における G:C→T:A 変異頻度の割合

最近の研究で、MUTYH は DNA 修復以外に酸化 DNA 損傷に起因する細胞死誘導に関与することが示されている (Oka et al., EMBO J, 2008)。突然変異の蓄積を防ぐ DNA 修復は発がん抑制に大きく寄与する。一方、DNA 損傷に起因する細胞死誘導能も個体における突然変異体 (前がん細胞) の出現を防ぐ役割を果たすことから、この DNA 損傷細胞の排除の分子機構も発がん抑制に大きく関わっていると考えることができる。

以上、*Mutyh* 遺伝子産物の DNA 修復機能と細胞死誘導機能が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可能性が考えられ、今後、腫瘍発生が認められなかった低用量域の臭素酸カリウムを投与された *Mutyh* 遺伝子欠損マウスの小腸上皮における突然変異や細胞死をもっと詳細に解析することで、「閾値」形成におけるそれぞれの細胞機能の貢献度を明らかにすることができる。また、本研究では、*Mutyh* 以外の因子が酸化剤の遺伝毒性に関する「閾値」形成に関与していることが示唆されたが、これらの他の因子 (群) の解明のためには、想定される因子 (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) の遺伝子との二重欠損マウスを用いた突然変異・発がん解析が有効であると思われる。

#### 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)

初年度は、一般的な化学物質と芳香族アミンについて、 $\text{TD}_{50}$  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。二年目は、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、Ames 試験の比活性値と発がん試験御  $\text{TD}_{50}$  値の相関を調べたところ、Ames 試験が陰性の物質の場合、発がん性があっても  $\text{TD}_{50}$  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がわかった。最終年度は、指定添加物の遺伝毒性試験結果を精査した結果、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た。

#### 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)

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 試験のデータの偏りを考慮する必要がある。現在のデータは発がん性物質に偏っており、TG 試験結果と発がん性の相関性を検討するためには非発がん物質の情報を増やすことが重要である。TG 試験のほとんどはマウスを用いて行われており、ラットを用いた TG 試験データの充実が必要である。

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結果、sensitivity は 74.0%、specificity は 65.2%、concordance は 72.6%であった。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 25 あった。このカテゴリには、直接的な DNA 反応性を示さない、いわゆる非遺伝毒性発がん物質が分類されると考えられる。発がん標的組織での変異原性の有無はリスク評価において重要である。

発がん性物質のうち、Ames 試験が陽性かつ TG 試験が陰性のものが 13 件あった。このうち発がん標的組織と TG 試験実施組織が異なっている場

合は、発がん標的組織で TG 試験が実施されれば陽性となる可能性もある。一方、*in vitro* 試験でみられた変異原性が発がん標的組織で確認できないことは、*in vivo* 特有の代謝や解毒等の関与を示唆している。

TG 試験においては、投与経路、用量、投与期間および発現時間、解析対象組織、種差、性差、週齢など、*in vivo* 試験特有の条件が存在し、試験結果に影響する。TG 試験実施の際は、暴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。中でも肝臓は、遺伝毒性発がん物質を陽性、非遺伝毒性発がん物質を陰性と判定する率が高いと考えられた。

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ールで行い結果を比較することが有効と考えられる。具体的な指標としては NOGEL や BMDL が挙げられる。BMDL は発がん性や一般毒性指標でも用いられており、変異原性と発がん性を同じ指標で比較できる利点がある。一方で発がん性試験と変異原性試験は使用する動物種や投与期間、用量などが異なる点には注意が必要である。実験条件の違いと用量・反応関係への影響を検討することが必要と考える。

#### 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)

fold-increase/mg/kg の値を定量的評価の指標として発がん性との相関を調べることにより、*in vivo* 遺伝毒性試験全体に適応可能であることがわかった。小核試験に関して比較を行ったところ、陽性結果の得られている化合物に関しては、発がん性との間に比較的良い相関関係があることが明らかとなった。一方で、陰性結果を示した化合物は標的臓器でのデータを使う必要性があると考えられる。

低用量での用量反応性およびリスク評価法に関しては、高用量での用量相関をきちんと評価し、その外挿による低用量領域での反応性の予測を行う手法を提案した。これには、用量反応の連続

性 (直線性ではない) が前提となるが、現実的にはこのようなアプローチを取らざるを得ない。

これまで一般的に遺伝子傷害性物質による生体分子の修飾としては、DNA 付加体の検出が行われてきたが、DNA への到達性、修復を考えると必ずしも感度の高いマーカーとはいえず、ヒトが通常暴露されうる低用量レベルでのアダクトの検出は難しいことが予想される。一方で、血中に存在するタンパク質は、外部からの化学物質の暴露に直接さらされ、また DNA の場合のような効率的な修復システムが存在しないため、暴露マーカーとしての感度は高いと予想される。

今回例として用いたグリシドール修飾に関しては、すでにヘモグロビンを用いて、その N 末端のバリン残基への修飾が、エドマン分解と GC-MS を組み合わせた方法により解析されていたが、ショットガンプロテオミクスを用いたアプローチの可能性に関して検討を行った。その結果、すでに報告されているヘモグロビンの N 末端のバリンのアダクトに関しては検出できず、エドマン分解法に比べて感度は落ちることが明らかとなった。

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。

ヒトの変異源物質に対する暴露マーカーとして、血中アルブミンのシステイン 34 残基への付加体に注目し、LC-MS を用いたショットガンプロテオミクスの手法により、これらを網羅的に検出することを試みたが、MS/MS スペクトルの類似性を手掛かりとして、いくつかの付加体候補ピークが検出された。最も注目されるのは、有機ヒ素化合物である dimethylarsinous (AsIII) acid 由来の付加体であり、ヒトは低濃度のヒ素に暴露されている事実から、その付加体が検出できたのであれば、その意義は大きい。

#### E. 結論