

第 42 回日本毒性学会 2015 年 7 月

5) 西野里沙子, 福山朋季, 渡部優子, 黒澤好, 上田英夫, 小坂忠司, 原田孝則: 免疫攪乱化学物質暴露が次世代の呼吸器アレルギーに及ぼす影響調査 第 42 回日本毒性学会学術年会 2015 年 6 月

6) 西野里沙子, 福山朋季, 渡部優子, 黒澤好, 上田英夫, 小坂忠司, 原田孝則: 免疫攪乱化学物質暴露が次世代の呼吸器アレルギーに及ぼす影響 第 22 回日本免疫毒性学会学術年会 2015 年 9 月

7) 関本征史, 吉成浩一, 出川雅邦: 化学物質の複合影響による細胞毒性発現: AhR 活性化を指標として (シンポジウム: 次世代研究者セミナー: 薬物の安全性評価における新たな挑戦), 第 42 回日本毒性学会学術年会 (金沢), 2015 年 7 月

8) 田野辺潤, 成瀬理紗, 田崎愛佳, 梅村隆志, 遠藤治, 出川雅邦, 吉成浩一, 関本征史: ベンズイミダゾール系化合物の AhR 活性化増強機構: CYP1A1 酵素阻害に着目した解析, 日本薬学会第 136 年会 (横浜), 2016 年 3 月

H. 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

厚生労働科学研究補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
平成 27 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

実験 1 では、細胞内微小環境の変化を引き起こす化学物質が低用量の遺伝毒性物質に及ぼす影響を明らかにするため、雌性 6 週齢の *gpt delta* マウスにフルメキン (FL) を 0.4% の濃度で粉末基礎飼料に混じ、肝発がん物質エストラゴール (ES) を 10 又は 100 mg/kg/day の濃度で強制経口により 4 週間併用投与した。その結果、高用量の ES 投与群における *gpt* 変異体頻度 (MF) の上昇が FL 併用投与により増強され、単独投与では変異を誘発しない低用量の ES 投与群においても FL 併用投与により G:C-T:A transversion 変異の増加を伴う MF の上昇が認められた。以上より、FL によって引き起こされた細胞増殖活性の加算的な増加により ES の突然変異誘発が増強されることが明らかになった。実験 2 では、昨年度までに動物実験を終了した臭素酸カリウム (KBrO<sub>3</sub>) 250 又は 500 ppm 投与群、ニトロフラントイン (NFT) 500 又は 2500 ppm 投与群及びそれぞれに対するアリザリン (Alz) 500 ppm の 13 週間併用投与群について腎皮質における酸化的 DNA 損傷と突然変異誘発性における複合影響を検討した。8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルは KBrO<sub>3</sub> 又は NFT 単独投与群で用量依存的に上昇し、Alz の併用投与により対照群及び各用量の単独投与群に比して有意に上昇した。*gpt* 及び Spi<sup>-</sup> MFs は KBrO<sub>3</sub> 単独投与群において用量依存的に上昇した。一方、Alz の併用投与は *gpt* MFs に影響を与えなかったものの、Spi<sup>-</sup> MFs の有意な上昇を引き起こした。さらに、KBrO<sub>3</sub> 投与により生じた *gpt* 及び Spi<sup>-</sup> 変異体のスペクトラム解析の結果、同群では欠失サイズの増加を伴った欠失変異頻度の増加が確認された。以上より、KBrO<sub>3</sub> 又は NFT と Alz の併用投与は酸化的 DNA 損傷を加算的に増加させ、KBrO<sub>3</sub> と Alz の併用投与では欠失サイズの増加を伴う遺伝子突然変異を誘発することが明らかになった。

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。

実験 1 では、細胞内微小環境の変化を引き起こす化学物質が低用量の遺伝毒性物質に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、平成 25 及び 26 年度においてハーブやスパイス等に含まれる香料成分であるエストラゴール (ES) と動物用医薬品のフルメキン (FL) を *gpt delta* マウスに併用投与した結果、ES 特異的 DNA 付加体の形成量に変化はないものの、細胞増殖活性は加算的

に増加することを明らかにした。これらの結果をもとに、本年度は *gpt* assay 及び Spi assay による突然変異誘発性の検索を実施し、FL 投与によって加算された細胞増殖活性が ES の突然変異誘発性に及ぼす影響を検討した。

一方、食品中に含まれる化学物質の中には、酸化的 DNA 損傷を引き起こす化学物質が多数存在することが知られている。これらの化学物質を同時に摂取した場合、酸化的 DNA 損傷は相加又は相乗的に蓄積することが懸念されるが、このような化学物質の同時ばく露による複合影響を評価した報告はこれまでにない。そこで実験 2 では、複数の酸化的 DNA 損傷誘発物質による複合影響を検討した。平成 25 年度は臭素酸カリウム ( $\text{KBrO}_3$ )、ニトロフランチン (NFT) 及びアリザリン (Alz) がいずれもラット腎臓皮質において酸化的 DNA 損傷を引き起こすものの、生じる遺伝子突然変異頻度や変異スペクトラムが異なることを明らかにした。平成 26 年度は、異なる変異スペクトラムを示した  $\text{KBrO}_3$  と NFT に対し、Alz をそれぞれ併用投与し、 $\text{KBrO}_3$  に対する Alz の併用投与により酸化的 DNA 損傷レベルが加算的に増加し、同時に欠失サイズの増加を伴った遺伝子突然変異が誘発される可能性を示した。本年度は  $\text{KBrO}_3$  と Alz の併用投与についてさらに変異スペクトラム解析を行い、遺伝子突然変異における詳細な解析を行うとともに、NFT と Alz の併用投与群についても酸化的 DNA 損傷と遺伝子突然変異における複合影響を検討した。

## 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。

動物の飼育はバリヤーシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、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 30 匹は各群 5 匹で 6 群に配した。ES 単独投与群には、ES を 10 又は 100 mg/kg/day の用量で強制経口投与（7 回/週）し、基礎飼料を摂取させた。FL 単独投与群では、ES の溶媒であるコーンオイルを強制経口投与し、FL を 0.4% の濃度で基礎飼料に混じり自由摂取させた。併用投与群では ES を 10 又は 100 mg/kg/day の用量で強制経口投与し、FL を混じた粉末飼料を自由摂取させた。対照群ではコーンオイルを強制経口投与し、基礎飼料を自由摂取させた。なお、ES 100 mg/kg と FL の併用投与群では投与開始 2 週目において明らかな体重の低下と 1 例の死亡が確認されたことから、投与開始 3 週目から ES の用量を 100 mg/kg から 70 mg/kg に変更して試験を継続した。それに伴い、ES 100 mg/kg の単独投与群も 70 mg/kg に変更した。投与期間は 4 週間とし、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た。また、体重および摂餌量の測定は週 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 付加体の測定及び *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。

*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。

Spi<sup>-</sup>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、Spi<sup>-</sup>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 Spi<sup>-</sup>プラークを検出した。また、パッケージング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 Spi<sup>-</sup>プラーク数を回

収した総プラーク数で除して Spi<sup>-</sup> MF を算出した。

(統計学的処理方法)

*gpt* MF 及び特異的変異頻度の統計学的処理は、FL 処理群及び未処理群でそれぞれ各群の分散を 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。また、FL 処理群と未処理群の比較では Tukey の多重比較を用い、有意水準は 5%未満とした。

【実験 2】腎皮質について酸化的 DNA 損傷の指標である 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルの測定を実施した。約 80 mg の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。

腎皮質のゲノム DNA を抽出し、*gpt* 及び Spi<sup>-</sup> assay に供した。*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 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。

Spi<sup>-</sup>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、Spi<sup>-</sup>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 Spi<sup>-</sup>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 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 Spi<sup>-</sup>プラーク数を回収した総プラーク数で除して Spi<sup>-</sup> MF を算出した。また、真の Spi<sup>-</sup>プラーク内のファージを採取し、再度、大腸菌 LE392 株に感染させ、その上清を Spi<sup>-</sup> lysate として保存した。Spi<sup>-</sup> lysate から QIAGEN 社製の Genra Puregene Kit を用いて DNA を抽出し、*red/gam* 遺伝子を含む約 5 kb の領域に対する PCR 増幅を行った。得られた PCR 産物についてタカラバイオ株式会社にて塩基配列解析を実施し、変異部位を同定した。

(統計学的処理方法)

8-OHdG レベル及び遺伝子突然変異頻度の統計学的処理は、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 Tukey の多重範囲検定により行った。

(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】*gpt* assay の結果を Table 1 に示す。単独投与群において、主に点突然変異頻度を示す *gpt* MF は、対照群 ( $0.49 \pm 0.25$ ) に比して ES 100/70 mg/kg ( $1.11 \pm 0.55$ ,  $p < 0.05$ ) で有意な上昇を示した。FL 投与群では、FL 単独投与群 ( $0.55 \pm 0.26$ ) に比して ES 100/70 mg/kg ( $1.11 \pm 0.55$ ,  $p < 0.05$ ) の併用投与群 ( $1.88 \pm 0.73$ ,  $p < 0.01$ ) で有意な上昇を示し、ES 100/70 mg/kg 単独投与群に比しても有意な高値を示した ( $p < 0.05$ )。

*gpt* 変異体のスペクトラム解析の結果を Table 2 に示す。ES 投与群では G:C-T:A transversion 変異頻度に変化が認められ、単独投与群では、ES 100/70 mg/kg ( $0.18 \pm 0.10$ ,  $p < 0.05$ ) で対照群 ( $0.04 \pm 0.07$ ) に比して有意な高値を示した。FL 投与群で

は、FL 単独投与群 ( $0.06 \pm 0.09$ ) に比して ES 100/70 mg/kg の併用投与群 ( $0.54 \pm 0.26$ ,  $p < 0.01$ ) で有意に上昇した。また、ES 10 mg/kg 併用投与群においても、ES 10 mg/kg 単独投与群に比して有意な高値を示した (ES 10 mg/kg;  $p < 0.05$ , ES 100/70 mg/kg;  $p < 0.01$ )。

Spi<sup>-</sup> assay の結果を Table 3 に示す。主に欠失変異頻度を示す Spi<sup>-</sup> MF は、対照群 ( $0.26 \pm 0.13$ ) 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】KBrO<sub>3</sub> 又は Alz 単独投与群及び KBrO<sub>3</sub> と Alz の併用投与群については、平成 26 年度に報告済みの各群 3 例を含めた各群 5 例の解析結果を示す。

腎皮質の DNA 中 8-OHdG レベルを Fig. 1 に示す。対照群 ( $0.37 \pm 0.03/10^5\text{dG}$ ) に比して、Alz 単独投与群 ( $0.69 \pm 0.18/10^5\text{dG}$ ) では上昇傾向が認められ、KBrO<sub>3</sub> 250 ppm 群 ( $0.86 \pm 0.15/10^5\text{dG}$ ) 及び KBrO<sub>3</sub> 500 ppm 群 ( $1.00 \pm 0.22/10^5\text{dG}$ ) において有意な上昇が認められた。一方、Alz と KBrO<sub>3</sub> 250 ppm ( $1.40 \pm 0.29/10^5\text{dG}$ ) 又は KBrO<sub>3</sub> 500 ppm ( $1.95 \pm 0.39/10^5\text{dG}$ ) の併用投与群ではいずれも対照群に比して有意な上昇が認められ ( $p < 0.01$ )、各用量の KBrO<sub>3</sub> 単独投与群に比しても有意な高値 (いずれも  $p < 0.01$ ) を示した。また、NFT 投与群については、対照群に比して、NFT 500 ppm 群 ( $0.61 \pm 0.32/10^5\text{dG}$ ) で上昇傾向が、NFT 2500 ppm 群 ( $1.08 \pm 0.32/10^5\text{dG}$ ) では有意な上昇が認められた。一方、Alz と NFT 500 ppm ( $1.30 \pm 0.44/10^5\text{dG}$ ) 又は NFT 2500 ppm ( $2.04 \pm 0.49/10^5\text{dG}$ ) の併用投与群ではいずれも対照群に比して有意な上昇が認められ ( $p < 0.01$ )、各用量の NFT 単独投与群に

比しても有意な高値 (いずれも  $p < 0.01$ ) を示した。

*gpt* assay の結果を Table 4 に示す。*gpt* MF は、KBrO<sub>3</sub> 投与群において用量依存的な上昇 (250 ppm 群:  $1.03 \pm 0.29$ 、500 ppm 群:  $1.22 \pm 0.19$ ) を認め、KBrO<sub>3</sub> 500 ppm 群では対照群 ( $0.49 \pm 0.19$ ) に比して有意な高値 ( $p < 0.05$ ) を示した。一方、Alz 併用投与群においても KBrO<sub>3</sub> の用量依存的な *gpt* MF の上昇 (250 ppm 群:  $0.69 \pm 0.56$ 、500 ppm 群:  $1.15 \pm 0.25$ ) が認められたものの、各用量の KBrO<sub>3</sub> 単独投与群と比して変化は認められなかった。

*gpt* 変異体のスペクトラム解析の結果を Table 5 に示す。KBrO<sub>3</sub> 500 ppm と Alz の併用投与群では、1 塩基欠失変異の頻度が対照群 ( $0.06 \pm 0.09$ ) に比して有意な高値 ( $0.42 \pm 0.11$ ,  $p < 0.05$ ) を示した。また、2 塩基以上の欠失変異の頻度も対照群 ( $0.03 \pm 0.07$ ) に比べ、上昇傾向 ( $0.15 \pm 0.19$ ) を示した。

Spi<sup>-</sup> assay の結果を Table 6 に示す。対照群の Spi<sup>-</sup> MF が  $0.20 \pm 0.12$  だったのに対し、KBrO<sub>3</sub> 投与群では用量依存的な増加 (250 ppm 群:  $0.30 \pm 0.16$ 、500 ppm 群:  $0.62 \pm 0.31$ ) が認められた。一方、Alz 併用投与群では、KBrO<sub>3</sub> 500 ppm と Alz の併用投与群において対照群に比して有意な高値 ( $1.02 \pm 0.40$ ,  $p < 0.01$ ) を示し、KBrO<sub>3</sub> 単独投与群と比しても顕著な増加が認められた。

KBrO<sub>3</sub> 250 ppm と Alz の併用投与群 ( $0.40 \pm 0.18$ ) では KBrO<sub>3</sub> 単独投与群に比して明らかな差は認められなかったものの、KBrO<sub>3</sub> 500 ppm と Alz の併用投与群では対照群に比して有意な高値 ( $1.02 \pm 0.40$ ,  $p < 0.01$ )

を示し、KBrO<sub>3</sub>単独投与群と比較しても顕著な増加が認められた。

Spi<sup>-</sup>変異体のスペクトラム解析の結果をTable 7に示す。対照群ではG/Cの繰り返し配列部位及びA/Tの繰り返し配列部位における欠失変異頻度がそれぞれ0.07 ± 0.07、0.05 ± 0.07だったのに対し、KBrO<sub>3</sub> 500 ppmとAlzの併用投与群では0.22 ± 0.14、0.34 ± 0.29と上昇傾向が認められた。また、2塩基から1000塩基までの欠失変異及び1000塩基上の欠失変異もそれぞれ対照群(0, 0.03 ± 0.07)に比して上昇傾向(0.05 ± 0.11, 0.18 ± 0.20)を示した。

#### D. 考察

【実験1】*gpt delta* マウスを用いてESの突然変異誘発性に対するFL併用投与の影響を検討した結果、FLの併用投与により高用量のES投与による*gpt* MFが増強されることが明らかになった。さらに、FLの併用投与は単独では変異を誘発しない低用量のESでも突然変異を引き起こすことを明らかにした。平成26年度までの結果から、FLの併用投与によりESの代謝活性化及び排泄に寄与するCyp1A2及びUgt1a1の遺伝子発現に変化が認められたものの、突然変異の原因となるES特異的DNA付加体量への影響は認められなかった。一方、FLは肝組織傷害に伴う代償性の細胞増殖を引き起こすことから、FLの併用投与はESの細胞増殖活性に加算的に作用することを明らかにした。遺伝子突然変異は主にDNA複製の際に生じたDNA損傷に対して塩基が誤挿入されることで生じることから、本研究で認められたFLによる突然変異誘発性の増強作用は、細胞

増殖によるDNA複製頻度の増加により、ES特異的DNA付加体に対する塩基の誤挿入が増加したことに起因するものと考えられた。また、高用量のES単独投与で特徴的に増加したG:C-T:A transversion変異が、FL併用投与により低用量から増加した事実は、併用投与群で生じた突然変異がES特異的DNA付加体に起因することを示唆するものと考えられた。

【実験2】昨年度に引き続き、酸化的DNA損傷を引き起こす食品中化学物質の中から、変異を誘発しないAlzと変異を誘発し異なる変異スペクトラムを示すKBrO<sub>3</sub>及びNFTを選択し、F344系*gpt delta* ラットにおけるKBrO<sub>3</sub>又はNFTとAlzの併用投与について、酸化的DNA損傷レベル及びレポーター遺伝子の突然変異頻度における複合影響を検討した。

酸化的DNA損傷の指標である8-OHdGレベルは、KBrO<sub>3</sub>、NFT及びAlz単独投与によりそれぞれの発がん標的部位或いは毒性発現部位である腎皮質において有意な上昇或いは上昇傾向が認められ、平成26年度の研究結果と一致した。一方、KBrO<sub>3</sub>又はNFTに対するAlzの併用投与は8-OHdGレベルの顕著な上昇を引き起こし、KBrO<sub>3</sub>又はNFT単独投与群に比しても有意な高値を示したことから、KBrO<sub>3</sub>又はNFTに対するAlzの併用投与により酸化的DNA損傷が加算的に蓄積することが明らかになった。

*In vivo*変異原性の検索では、平成25年度の結果と同様に、KBrO<sub>3</sub>単独投与群で*gpt*及びSpi<sup>-</sup>MFsの用量依存的な増加が認められたのに対し、Alz単独投与群でこれらの変化は認められなかった。一方、これら2剤の併用投与群では、*gpt* MFに変化はなか

ったものの、高用量の  $\text{KBrO}_3$  500 ppm と Alz の併用投与群において Spi<sup>-</sup> MF の有意な上昇が認められた。さらに、*gpt* 及び Spi<sup>-</sup>変異体のスペクトラム解析の結果、平成 26 年度にも得られていた傾向と一致して、 $\text{KBrO}_3$  500 ppm と Alz の併用投与群では 1 塩基欠失変異頻度の増加に加えて 2 塩基以上の大型の欠失変異の頻度が明らかに増加した。このことから、近接する領域に生じる多数の 1 塩基欠失変異により大型の欠失変異が誘発される可能性が考えられた。以上より、 $\text{KBrO}_3$  と Alz の併用投与による酸化的 DNA 損傷の蓄積が、欠失サイズの増加を伴った遺伝子突然変異頻度の増加を引き起こすことが示された。また、主に G:C-T:A transversion を引き起こす NFT と Alz の併用投与群においても 8-OHdG の蓄積が認められていることから、今後、*in vivo* 変異原性の検索を実施し、突然変異誘発性に及ぼす影響を明らかにする。

## E. 結論

【実験 1】細胞内微小環境を変化させる食品中化学物質は食品中の遺伝毒性発がん物質の発がんリスクを増加させる一つの要因になることが明らかになった。

【実験 2】酸化的 DNA 損傷を引き起こす食品中化学物質の同時ばく露は 8-OHdG の加算的蓄積を引き起こし、8-OHdG による欠失変異の発生に対して、欠失サイズの増加を伴う変異頻度の増加を引き起こすことが明らかになった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

## 2. 学会発表

1) 土屋卓磨、石井雄二、高須伸二、木島綾希、横尾 諭、小川久美子、梅村隆志：酸化ストレス産生物質の複合投与による酸化的 DNA 損傷並びに遺伝子突然変異への加算効果 第 42 回日本毒性学会学術年会 2015 年 6 月

2) 石井雄二、高須伸二、木島綾希、横尾 諭、土屋卓磨、小川久美子、梅村隆志：遺伝毒性肝発がん物質エストラゴールの突然変異誘発性におけるフルメキン併用投与の影響 第 44 回日本環境変異原学会 2015 年 11 月

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし。



Table 1 *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
	101	—	—	—	0.49 ± 0.25
	102	4.7	4	0.85	
	103	17.8	5	0.28	
	104	21.2	8	0.38	
	105	10.8	5	0.46	
Basal diet	201	15.2	8	0.53	0.48 ± 0.15
	202	13.3	3	0.23	
	203	11.4	6	0.52	
	204	14.3	9	0.63	
	205	12.2	6	0.49	
	301	12.5	11	0.88	1.11 ± 0.55 *
	302	7.2	10	1.38	
	303	6.7	13	1.94	
	304	11.7	9	0.77	
	305	10.4	6	0.58	
	401	16.9	5	0.30	0.55 ± 0.26
	402	7.9	5	0.63	
	403	5.4	5	0.92	
	404	4.9	6	0.61	
	405	9.6	6	0.31	
0.4% FL in diet	501	11.7	12	1.03	1.04 ± 0.19
	502	9.0	9	1.00	
	503	8.3	9	1.08	
	504	7.6	10	1.31	
	505	9.1	7	0.77	
	601	6.1	16	2.63	1.88 ± 0.73 ** #
	602	—	—	—	
	603	12.0	27	2.26	
	604	5.2	5	0.97	
	605	9.6	16	1.67	

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

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

	Basal diet + ES (mg/kg)			0.4% FL in diet + ES (mg/kg)		
	0	10	100	0	10	100
Base substitution						
Transversion						
GC-TA	0.04 ± 0.07	0.09 ± 0.06	0.18 ± 0.10 <sup>*</sup>	0.06 ± 0.09	0.33 ± 0.06 <sup>#</sup>	0.54 ± 0.26 <sup>*##</sup>
GC-CG	0	0	0.02 ± 0.04	0	0.05 ± 0.06	0.21 ± 0.25
AT-TA	0.05 ± 0.11	0.03 ± 0.05	0.08 ± 0.13	0	0.02 ± 0.05	0.18 ± 0.14
AT-CG	0	0.03 ± 0.06	0	0	0.02 ± 0.06	0
Transition						
GC-AT	0.20 ± 0.06	0.18 ± 0.14	0.43 ± 0.22	0.27 ± 0.23	0.30 ± 0.11	0.55 ± 0.40
AT-GC	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.03	0.17 ± 0.12	0.04 ± 0.09	0.12 ± 0.12	0.09 ± 0.11
Deletion						
Single bp	0.07 ± 0.08	0.09 ± 0.06	0.10 ± 0.06	0.15 ± 0.16	0.13 ± 0.09	0.07 ± 0.08
Over 2bp	0	0.02 ± 0.04	0.08 ± 0.11	0	0	0.12 ± 0.15
Insertion	0.12 ± 0.21	0.03 ± 0.05	0	0.03 ± 0.06	0.02 ± 0.05	0.04 ± 0.08
Complex	0	0	0.06 ± 0.13	0	0.04 ± 0.06	0.08 ± 0.16

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

Table 3 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
	101	—	—	—	0.26 ± 0.13
	102	6.3	1	0.16	
	103	27.7	5	0.18	
	104	32.2	8	0.25	
	105	13.5	6	0.44	
Basal diet	201	34.3	3	0.09	0.22 ± 0.10
	202	22.3	8	0.36	
	203	21.2	6	0.28	
	204	22.4	4	0.18	
	205	25.0	5	0.20	
	301	21.8	3	0.14	0.22 ± 0.13
	302	26.8	3	0.11	
	303	21.3	5	0.23	
	304	24.8	5	0.20	
	305	13.6	6	0.44	
	401	19.4	3	0.16	0.30 ± 0.12
	402	8.8	4	0.45	
	403	4.5	1	0.22	
	404	3.6	1	0.28	
	405	13.6	5	0.37	
0.4% FL in diet	501	26.4	15	0.57	0.22 ± 0.13
	502	23.4	6	0.26	
	503	17.1	3	0.18	
	504	22.1	3	0.14	
	505	20.0	7	0.35	
	601	4.1	2	0.49	0.30 ± 0.12
	602	—	—	—	
	603	13.7	1	0.07	
	604	17.6	6	0.29	
	605	8.6	2	0.44	

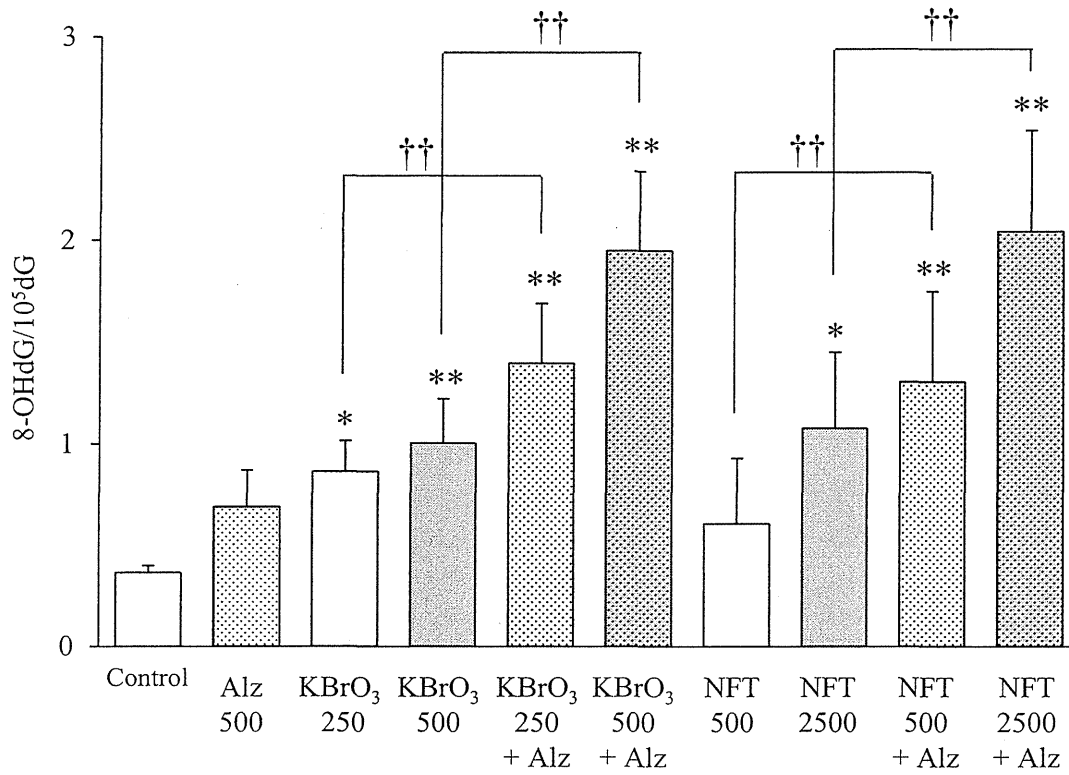


Fig. 1 8-OHdG levels in the renal cortex of *gpt* delta rats treated with KBrO<sub>3</sub> or/and Alz or NFT or/and Alz for 13 weeks. Data represent means  $\pm$  S.D. (n = 5). \*\*, \*:  $p < 0.01, 0.05$  vs Control. ††:  $p < 0.01$  vs corresponding group without combined administration of Alz 500 ppm.

Table 4 *gpt* MFs in the renal cortex of *gpt* delta rats treated with KBrO<sub>3</sub> or/and Alz for 13 weeks.

Group	Animal No.	Cm <sup>R</sup> colonies (x10 <sup>5</sup> )	6-TG <sup>R</sup> and Cm <sup>R</sup> colonies	Mutant Frequency (x10 <sup>-5</sup> )	Mean ± SD
Control	1	6.6	3	0.46	0.49 ± 0.19
	2	10.5	5	0.48	
	3	5.8	4	0.69	
	4	6.4	4	0.63	
	5	4.9	1	0.20	
Alz 500 ppm	6	5.4	4	0.74	0.53 ± 0.21
	7	5.1	3	0.58	
	8	4.5	1	0.22	
	9	9.7	4	0.41	
	10	7.3	5	0.68	
KBrO <sub>3</sub> 250 ppm	11	4.5	7	1.54	1.03 ± 0.29
	12	5.0	4	0.80	
	13	10.8	10	0.93	
	14	6.6	6	0.91	
	15	8.1	8	0.98	
KBrO <sub>3</sub> 500 ppm	16	3.0	4	1.33	1.22 ± 0.19*
	17	3.5	5	1.44	
	18	2.6	3	1.17	
	19	8.6	8	0.94	
	20	7.4	9	1.22	
KBrO <sub>3</sub> 250 ppm + Alz 500 ppm	21	6.3	1	0.16	0.69 ± 0.56
	22	7.6	2	0.26	
	23	5.1	8	1.56	
	24	8.7	7	0.81	
	25	6.0	4	0.67	
KBrO <sub>3</sub> 500 ppm + Alz 500 ppm	26	6.4	7	1.10	1.15 ± 0.25*
	27	5.9	5	0.85	
	28	4.4	5	1.15	
	29	7.2	8	1.10	
	30	7.7	12	1.55	

\*:  $p < 0.05$  vs Control

Table 5 Mutation spectra of *gpt* mutants in the renal cortex of *gpt* delta rats treated with KBrO<sub>3</sub> or/and Alz for 13 weeks.

	Control	Alz 500 ppm	KBrO <sub>3</sub> 250 ppm	KBrO <sub>3</sub> 500 ppm	KBrO <sub>3</sub> 250 ppm + Alz 500 ppm	KBrO <sub>3</sub> 500 ppm + Alz 500 ppm
Transversions						
G:C-T:A	0	0.22 ± 0.16	0.16 ± 0.18	0.12 ± 0.26	0.06 ± 0.09	0.20 ± 0.19
G:C-C:G	0.05 ± 0.08	0	0.02 ± 0.04	0.03 ± 0.06	0.05 ± 0.08	0.16 ± 0.11
A:T-T:A	0	0.10 ± 0.14	0.06 ± 0.10	0.10 ± 0.17	0	0
A:T-C:G	0.02 ± 0.04	0.04 ± 0.08	0.06 ± 0.14	0.08 ± 0.12	0.04 ± 0.09	0
Transitions						
G:C-A:T	0.19 ± 0.08	0	0.28 ± 0.13	0.22 ± 0.28	0.14 ± 0.15	0.12 ± 0.13
A:T-G:C	0.10 ± 0.10	0.03 ± 0.06	0	0.23 ± 0.16	0.02 ± 0.05	0.03 ± 0.06
Deletion						
Single bp	0.06 ± 0.09	0.09 ± 0.09	0.28 ± 0.20	0.31 ± 0.19	0.18 ± 0.24	0.42 ± 0.11*
Over 2bp	0.03 ± 0.07	0.06 ± 0.08	0.03 ± 0.07	0	0.16 ± 0.12	0.15 ± 0.19
Insertion	0	0	0.10 ± 0.09	0	0.04 ± 0.09	0.06 ± 0.08
Complex	0.03 ± 0.07	0	0.04 ± 0.06	0.14 ± 0.15	0	0.03 ± 0.06
Total	0.49 ± 0.19	0.53 ± 0.21	1.03 ± 0.29	1.22 ± 0.19*	0.69 ± 0.56	1.15 ± 0.25*

\*:  $p < 0.05$  vs Control.

Table 6 Spi- MFs in the renal cortex of *gpt* delta rats treated with KBrO<sub>3</sub> or/and Alz for 13 weeks.

Group	Animal No.	Plaques within XL-1 Blue MRA (x10 <sup>5</sup> )	Plaques within WL95 (P2)	Mutant Frequency (x10 <sup>-5</sup> )	Mean ± SD
Control	1	7.9	2	0.25	0.20 ± 0.12
	2	13.0	5	0.39	
	3	6.9	1	0.14	
	4	11.3	1	0.09	
	5	7.1	1	0.14	
Alz 500 ppm	6	5.9	4	0.68	0.36 ± 0.27
	7	8.0	1	0.12	
	8	8.2	5	0.61	
	9	13.2	2	0.15	
	10	9.2	2	0.22	
KBrO <sub>3</sub> 250 ppm	11	6.5	3	0.46	0.30 ± 0.16
	12	5.6	2	0.36	
	13	12.8	1	0.08	
	14	9.7	4	0.41	
	15	9.5	2	0.21	
KBrO <sub>3</sub> 500 ppm	16	4.4	1	0.23	0.62 ± 0.31
	17	3.4	2	0.58	
	18	3.7	4	1.08	
	19	10.7	7	0.65	
	20	8.9	5	0.56	
KBrO <sub>3</sub> 250 ppm + Alz 500 ppm	21	7.6	4	0.53	0.40 ± 0.18
	22	6.1	2	0.33	
	23	6.3	4	0.63	
	24	13.1	3	0.23	
	25	7.4	2	0.27	
KBrO <sub>3</sub> 500 ppm + Alz 500 ppm	26	3.4	4	1.17	1.02 ± 0.40**
	27	8.5	11	1.30	
	28	5.9	5	0.85	
	29	7.4	10	1.36	
	30	7.6	3	0.40	

\*\**p* < 0.01 vs Control

Table 7 Mutation spectra of Spi<sup>r</sup> mutants in the renal cortex of *gpt* delta rats treated with KBrO<sub>3</sub> or/and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> for 13 weeks.

	Control	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 500 ppm	KBrO <sub>3</sub> 250 ppm	KBrO <sub>3</sub> 500 ppm	KBrO <sub>3</sub> 250 ppm + Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 500 ppm	KBrO <sub>3</sub> 500 ppm + Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 500 ppm
1 bp deletion						
Simple G/C	0.02 ± 0.03	0.09 ± 0.08	0.03 ± 0.07	0.07 ± 0.15	0	0.02 ± 0.05
A/T	0	0.03 ± 0.08	0	0.18 ± 0.36	0.03 ± 0.06	0.08 ± 0.08
In run G/C	0.07 ± 0.07	0.09 ± 0.13	0.11 ± 0.10	0.13 ± 0.14	0.07 ± 0.11	0.22 ± 0.14
A/T	0.05 ± 0.07	0.07 ± 0.11	0.13 ± 0.13	0.11 ± 0.10	0.24 ± 0.14	0.34 ± 0.29
2 to 1 kb deletion	0	0	0.02 ± 0.03	0	0.03 ± 0.07	0.05 ± 0.11
> 1 kb deletion	0.03 ± 0.07	0	0	0.02 ± 0.04	0	0.18 ± 0.20
Complex	0	0	0.02 ± 0.05	0.12 ± 0.26	0	0.06 ± 0.13
Insertion	0.03 ± 0.06	0.03 ± 0.08	0	0	0	0.03 ± 0.06
Base substitution	0.02 ± 0.03	0.03 ± 0.08	0	0	0.03 ± 0.07	0.03 ± 0.08
Total	0.20 ± 0.12	0.36 ± 0.16	0.30 ± 0.16	0.62 ± 0.31	0.40 ± 0.18	1.02 ± 0.40**

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



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）  
分担研究報告書

食品中の複数の化学物質による健康影響に関する調査研究

分担研究課題： 食品中化学物質の発がん修飾に関する複合影響

研究分担者： 西川 秋佳 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター  
研究協力者： 高須 伸二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

疫学的研究から、がんは食生活と深く関連することが示唆されている。これまでに、動物モデルを用いた検討から、高脂肪食摂取は肝臓や大腸において発がんプロモーション作用を有することが報告されているが、その発がん促進メカニズムの詳細は未だ不明な点が多く、特に発がんイニシエーション期における役割は明らかになっていない。我々は、昨年度までにレポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットを用いてヘテロサイクリックアミンの一つである 2-amino-3-methylimidazo [4, 5-*f*] quinolone (IQ) または 2-amino-3, 8-dimethylimidazo [4, 5-*f*] quinoxaline (MeIQx) と高脂肪食の併用投与を行い、4 週間の高脂肪食摂取はこれらヘテロサイクリックアミンの *in vivo* 変異原性に影響を与えないことを明らかにした。しかしながら、より長期間に亘る高脂肪食摂取のヘテロサイクリックアミンの *in vivo* 変異原性に与える影響は不明のままである。そこで、本研究ではより長期間の高脂肪食摂取の影響を探る目的で 6 週齢の雄 C57BL 系 *gpt delta* マウスにそれぞれ実験開始後 0、8、12 または 16 週目から高脂肪食を給餌し、20 週目に実験を終了した。また、実験終了 4 週前より MeIQx を 0.9 mg/マウス/日の用量で一日一回強制経口投与した。投与終了後、肝臓のレポーター遺伝子突然変異頻度を検索した。高脂肪食を与えた群の体重は何れも高脂肪食投与開始直後から増加し、投与期間に関わらず高脂肪食を与えた群の最終体重は基礎食群に比して有意な高値を示した。高脂肪食を与えた群における絶対および相対肝重量は、高脂肪食投与期間依存的に増加する傾向が認められ、絶対肝重量は高脂肪食を 12 週間以上与えた群において、相対肝重量は高脂肪食を 20 週間与えた群において、対照群に比して有意な高値を示した。*gpt* assay の結果、MeIQx を投与した群の *gpt* 変異体頻度は、高脂肪食を与えた何れの群においても対照群に比して高値を示す傾向が認められたが、高脂肪食摂取の影響は認められなかった。また、Spi<sup>-</sup>変異体頻度に MeIQx 投与および高脂肪食の影響は認められなかった。以上の結果から、長期間の高脂肪食摂取はマウス肝臓における食品中発がん物質の遺伝毒性作用に影響を与えない可能性が示された。

A. 研究目的

疫学的研究から、がんは食生活と深く関連することが示唆されている。なかでも脂肪の過剰摂取は発がんのリスクファクターであることが示唆されており、動物モデルを用いた研究からも高脂肪食摂取は齧歯類

の発がんを促進させることが報告されている。本研究では、このような疫学的研究や動物実験の知見に着目し、実際の日常生活のなかで起こり得る栄養素の過剰摂取状態を想定した食品中発がん物質の生体影響を評価することを目的としている。

これまでに、動物モデルを用いた検討から、高脂肪食摂取は肝臓や大腸において発がんプロモーション作用を有することが報告されているが、その発がん促進メカニズムの詳細は未だ不明な点が多く、特に発がんイニシエーション期における役割は明らかになっていない。我々は、昨年度までにレポーター遺伝子導入動物である F344 系 *gpt delta* ラットを用いてヘテロサイクリックアミンの一つである

2-amino-3-methylimidazo [4, 5-*f*] quinolone (IQ) または

2-amino-3, 8-dimethylimidazo [4, 5-*f*] quinoxaline (MeIQx) と高脂肪食の 4 週間の併用投与を行い、肝臓および大腸における IQ または MeIQx の *in vivo* 変異原性に対する高脂肪食摂取の影響を検討してきた。その結果、4 週間の高脂肪食摂取はこれらヘテロサイクリックアミンの *in vivo* 変異原性に影響を与えないことが明らかとなった。しかしながら、当該研究では体重や肝重量は高値を示し、血清中グルコースやトリグリセリド濃度も高値を示す傾向が認められ、肝細胞の脂肪変性も認められたことから、ラット生体に一定の高脂肪食摂取の影響が生じていたと考えられた。しかし、その程度はいずれも軽度であり、より長期間にわたり高脂肪食を摂取させ、生体に対して顕著な高脂肪食摂取の影響が生じる条件下で検討する必要があると考えられた。

そこで本研究では、C57BL 系 *gpt delta* マウスに高脂肪食を長期間与えるとともに、MeIQx を併用投与して、MeIQx の肝臓における *in vivo* 変異原性に与える高脂肪食摂取の影響を検討した。

## B. 研究方法

6 週齢雄 C57BL 系 *gpt delta* マウス (各群 5 匹) にそれぞれ実験開始後 0, 8, 12 または 16 週目から高脂肪食 (粗脂肪量 32%) を給餌し、20 週目に実験を終了した。また、実験終了 4 週前よりコーン油に懸濁した MeIQx を 0.9 mg/マウス/日の用量で一日一

回強制経口投与した。MeIQx 非投与群には基礎食 (粗脂肪量 5.4%) または高脂肪食を給餌した。投与終了後、肝臓を摘出し、肝臓のレポーター遺伝子突然変異頻度 (各群 3 匹) を検討した。

## (倫理面への配慮)

本試験は「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 組み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、遺伝子組換え実験計画書を作成し、審査を受けた。

## C. 研究結果

実験期間中の体重推移を Fig. 1 に、各群の最終体重を Fig. 2 に示す。高脂肪食を投与した群の体重は、いずれの群も高脂肪食の投与開始直後から増加し、高脂肪食を 8 週以上投与した群における最終体重は基礎食群に比して有意な高値を示した。

実験終了時の絶対肝重量を Fig. 3 に、相対肝重量を Fig. 4 に示す。高脂肪食を投与した群の絶対および相対肝重量は、基礎食群に比して高脂肪食投与期間依存的に増加する傾向が認められ、高脂肪食を 20 週間与えた群における絶対肝重量は基礎食群に比して有意な高値を示した。

*gpt* assay および Spi<sup>-</sup> assay の結果をそれぞれ Table 1 および 2 に示す。*gpt* assay の結果、MeIQx を投与した群における *gpt* 変異体頻度 (MF) は、何れの高脂肪食投与群で対照群に比して高値を示す傾向が認められた。しかしながら、高脂肪食と MeIQx を投与した群の *gpt* MF は、何れの高脂肪食投与群においても、MeIQx 単独群に対し顕著な変化は認められなかった。また、Spi<sup>-</sup> 変異体頻度には MeIQx 投与および高脂肪食の影響は認められなかった。

#### D. 考察

今回、長期間にわたる高脂肪食摂取がヘテロサイクリックアミンの *in vivo* 変異原性に与える影響を明らかにする目的で、C57BL系 *gpt delta* マウスに粗脂肪含量 32% の高脂肪食を最長 20 週間与えた結果、体重は高脂肪食の投与開始時から増加し、高脂肪食を 8 週以上投与した群における最終体重は基礎食群に比して有意に上昇した。さらに、肝重量も高脂肪食投与期間依存的に増加する傾向が認められ、高脂肪食を 20 週間与えた群における絶対肝重量は基礎食群に比して有意な高値を示した。

昨年度までの研究で、F344系 *gpt delta* ラットに高脂肪食を 4 週間自由摂取させたところ、最終体重は基礎食群に対して約 6%、絶対および相対肝重量はそれぞれ約 15% および 9% の増加であったのに対し、今回 C57BL系 *gpt delta* マウスに同一の高脂肪食を 20 週間与えた結果、最終体重は約 32% 増加し、絶対および相対肝重量はそれぞれ約 113% および 60% 増加したことから、今回の実験条件下では、長期間の高脂肪食によって、生体に対しより顕著な影響が認められたものと考えられた。

このような実験条件下において、肝臓を用いた *gpt assay* を行った結果、MeIQx 投与群における *gpt MF* は、高脂肪食摂取の有無ならびに高脂肪食摂取期間に関わらず基礎食群に比して高値を示す傾向が認められた。しかし、高脂肪食と MeIQx を投与した群の *gpt MF* は、何れの高脂肪食投与期間においても MeIQx 単独群に対して顕著な変化は認められなかった。

MeIQx はタンパク質やアミノ酸を多く含む食品の加熱等により生成されるヘテロサイクリックアミンの 1 種であり、ラットやマウス肝臓において変異原性や発がん性を示すことが知られている遺伝毒性肝発がん物質である。本実験条件下においても、MeIQx 投与群における *gpt MF* は基礎食群に比して高値を示す傾向が認められたことか

ら、MeIQx のマウス肝臓における *in vivo* 変異原性が再確認されたものと考えた。しかしながら、高脂肪食摂取は MeIQx の *gpt MF* に明らかな影響を与えなかったことから、長期間の高脂肪食の摂取は肝臓における食品中発がん物質の遺伝毒性作用に影響を与えない可能性が示された。

#### E. 結論

長期間の高脂肪食の摂取は肝臓における食品中発がん物質の遺伝毒性作用に影響を与えない可能性が示された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

##### 2. 学会発表

1) Shinji Takasu, Yuji Ishii, Aki Kijima, Yuh Yokoo, Takuma Tsuchiya, Takehiko Nohmi, Akiyoshi Nishikawa, Takashi Umemura : The effects of a high-fat diet on *in vivo* mutagenicity induced by heterocyclic amines in the colon of *gpt delta* rats. 51st Congress of the European societies of toxicology, 2015 年 9 月

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

##### 2. 実用新案登録

##### 3. その他

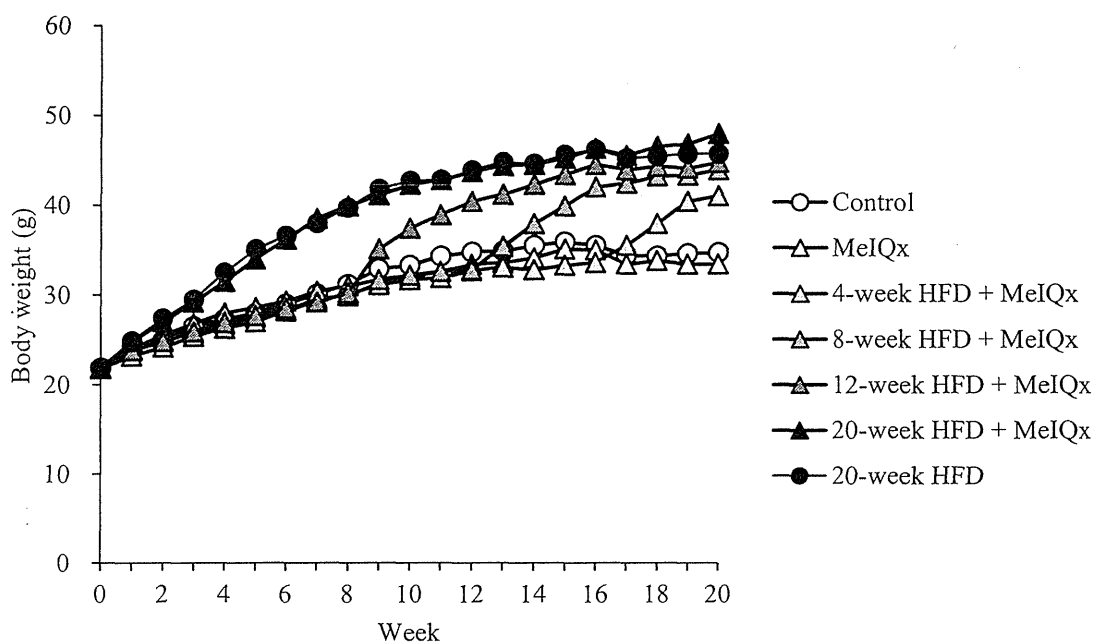


Fig. 1. 高脂肪食およびMeIQx投与 *gpt delta* マウスにおける体重増加曲線

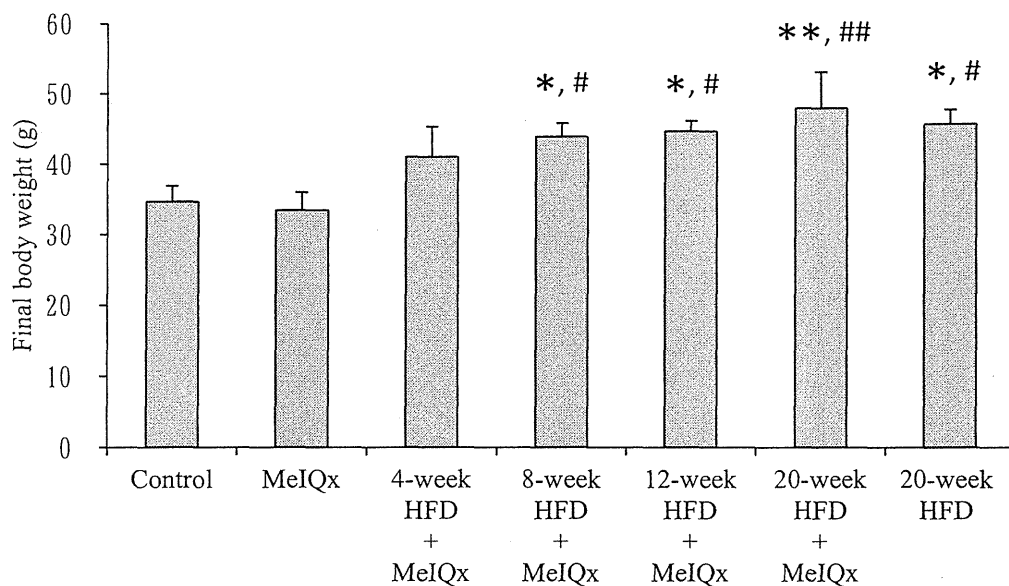


Fig. 2. 高脂肪食およびMeIQx投与 *gpt delta* マウスにおける最終体重  
 \*\*, \*\*  $p < 0.05, 0.01$  v.s control group, #, ##  $p < 0.05, 0.01$  v.s MeIQx group