

201522048A

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

食品中遺伝毒性物質の「事実上の閾値」形成における

DNAポリメラーゼ γ （ゼータ）の関与

(H27-食品-若手-020)

平成27年度 総括研究報告書

研究代表者 石井 雄二

平成28（2016）年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
食品中遺伝毒性物質の「事実上の閾値」形成における DNAポリメラーゼ γ （ゼータ）の関与 石井雄二	----- 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 16

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 年度総括研究報告書

食品中遺伝毒性物質の「事実上の閾値」形成における DNA ポリメラーゼ ζ
(ゼータ) の関与

研究代表者 石井雄二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官

研究要旨

遺伝毒性発がん物質は DNA を損傷することから「閾値」は存在しない。しかしながら、生体には様々な防御機構が存在することから遺伝毒性物質においても「事実上の閾値」が形成されると考えられている。本研究では、DNA 損傷の乗り越え複製とミスマッチ末端からの伸長反応を行うポリメラーゼ ζ (Pol ζ) を活性化した Pol ζ KI *gpt delta* マウスを用いて、食品中化学物質の突然変異誘発性及び「事実上の閾値」形成における Pol ζ の関与を検討した。平成 27 年度は陽性対照として benzo[a]pyrene (BaP) を被験物質とした。雄性 7 週齢の Pol ζ KI *gpt delta* マウス及び *gpt delta* マウスに BaP を 10, 40 及び 160 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与し、投与後 31 日目に肺を採取した。*gpt* assay の結果、肺における *gpt* MFs は両遺伝子型ともに 160 mg/kg 群で有意に上昇し、Pol ζ KI *gpt delta* マウスでは *gpt delta* マウスに比して 3 倍以上の有意な高値を示すことを明らかにした。また、変異スペクトラム解析の結果、同群では G:C 塩基対における塩基置換と欠失変異の顕著な増加が認められ、いずれも *gpt delta* マウスに比して高値または有意な高値を示した。さらに、Pol ζ KI *gpt delta* マウスでは連続した 2 塩基または 1 塩基をまたいだ 2 塩基の特徴的な complex 変異が高頻度に認められた。以上より、Pol ζ は BaP によるグアニンの損傷に対する損傷乗り越え複製とミスマッチ末端からの伸長反応に寄与することが明らかになった。一方、両遺伝子型とも 40 mg/kg 群で *gpt* MFs の変化は認められず、80 mg/kg 群では上昇傾向が認められたものの遺伝子型間に差は認められなかった。以上より、本実験条件下において Pol ζ は BaP の「事実上の閾値」形成に寄与しない可能性が示唆された。また、平成 28 年度に実施するエストラゴール (ES) の評価に先立ち、その用量設定試験を実施した結果、本試験で使用する低用量、中間用量及び高用量をそれぞれ 12.5, 50 及び 200 mg/kg 体重に設定した。

A. 研究目的

遺伝毒性発がん物質は DNA を損傷することから「閾値」は存在しない。しかしながら、生体にはこれらに対する防御機構が存在しており、暴露量が極めて低い場合には「事実上の閾値」が形成されると考えられている¹⁾。食品中には調理過程で非意図的に生成又は混入する遺伝毒性物質が存在す

ることから、このような遺伝毒性物質の低用量暴露時のヒトリスクを考える上で、「事実上の閾値」の生物学的意義を理解することは重要である。

ポリメラーゼは 1 本鎖の核酸を鋳型として相補的な塩基配列をもつ DNA 鎖を合成する酵素である。鋳型 DNA に損傷が生じた場合、複製型 DNA ポリメラーゼは損傷を乗り

越えられずに複製が停止するが、Y-family ポリメラーゼは損傷塩基に対し塩基を挿入し損傷を乗り越えることが可能である。しかし、その忠実度の低さから損傷塩基の対にはしばしば誤った塩基が挿入され、ミスマッチ末端が形成される。さらに、この形成されたミスマッチ末端からの伸長反応が停止すると細胞死（アポトーシス）が誘導されるが、伸長反応が進み複製が完了すると変異が固定される。今回注目した Pol ζ は、損傷乗り越え複製に加え、Y-family ポリメラーゼにより形成されたミスマッチ末端からの伸長反応を行うことが報告されている²⁾。それ故、Pol ζ はミスマッチ末端が形成された細胞の細胞死か変異誘発かを決定づけるポリメラーゼと考えられ、「事実上の閾値」形成への関与も疑われる。実際、Pol ζ の触媒サブユニットである Rev3 遺伝子を欠損した酵母やアンチセンス RNA を導入したヒト細胞では、UV 照射による突然変異誘発性が低下することが知られている³⁾。また、マウスでは Rev3 遺伝子の欠損は胎生致死となるが、B cell 特異的に Rev3 遺伝子を欠損したマウスでは自然発生性の突然変異が減少すること、B cell 特異的に Pol ζ の 2610 番目のロイシンをフェニルアラニンに置換することで活性を増大したノックインマウスではそれらの変異が増加することが報告されている⁴⁾。しかしながら、化学物質が誘発する突然変異への *in vivo* における Pol ζ の関与は知られていない。

本研究では、能美らが樹立した Pol ζ KI *gpt delta* マウスを用いて食品中化学物質の突然変異誘発性及び「事実上の閾値」形成における Pol ζ の関与を明らかにする。Pol ζ KI *gpt delta* マウスは、Pol ζ の 2610

番目のロイシンをメチオニンに置換することで Pol ζ の活性が増大している。また、このマウスの 17 番染色体にはそれぞれ約 80 コピーの λ EG10DNA が挿入されており、*gpt* 遺伝子をレポーターとする主に点突然変異の検出と *red/gam* 遺伝子をレポーターとする大型の欠失変異の検出が可能であることから⁵⁾、Pol ζ 活性化の影響を *gpt* 及び Spi-アッセイで評価することができる。平成 27 年度は、Pol ζ KI *gpt delta* マウスと同様の方法で Pol ζ を活性化したヒト細胞で変異頻度の増加が認められた benzo[a]pyrene (BaP) を用いて (unpublished data)、Pol ζ KI *gpt delta* マウス及び *gpt delta* マウスにそれぞれ低用量、中間用量及び高用量で投与後、肺における *in vivo* 変異原性を検索し、遺伝子型間を比較することで BaP の突然変異誘発性と「事実上の閾値」形成への Pol ζ の寄与を検討した。また、平成 28 年度に実施する香料エストラゴール (ES) の評価に先立ち、その用量設定試験を実施した。

B. 研究方法

B-1. 材料及び試薬

BaP は和光純薬工業株式会社から購入した。ES は東京化成工業株式会社から購入した。

B-2. 動物実験操作

B-2-1. BaP の用量設定試験

動物は当研究所で系統維持している C57BL/6J *gpt delta* マウスを実験に供した。動物の飼育はバリエーション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

ユ), 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. 雄性 6 週齢の *gpt delta* マウス 18 匹を各群 3 匹に配し, 対照群を含む 6 群を設けた. 対象群には溶媒である tricapriline を, その他の 5 群には BaP をそれぞれ 0.02, 0.2, 2, 20 及び 200 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与した. 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た. 体重は開始から試験終了までは毎週 1 回測定した. 動物は投与後 31 日目にイソフルラン麻酔下にて放血致死させ, 肺及び肝臓を採取し, 重量を測定した. 肺の右葉及び肝臓の外側左葉を 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定し, 残りは *gpt* assay および DNA 付加体測定サンプルとして液体窒素により凍結し, 測定まで -80°C で保存した.

B-2-2. Pol と KI *gpt delta* マウスを用いた BaP の評価

動物は雄性 7 週齢の C57BL/6 系 Pol と KI *gpt delta* マウス及び *gpt delta* マウス各 20 匹を日本エスエルシー株式会社より購入した. 飼育条件は B-2-1 に記載する. 各遺伝子型マウス 20 匹を各群 5 匹に配し, 対照群と低用量群, 中間用量群及び高用量群の計 4 群を設けた. 対象群には溶媒である tricapriline を, 低用量群, 中間用量群, 高用量群には BaP をそれぞれ 40, 80, 160 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与した. 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た. 体重は開始から試験終了までは毎週 1 回測定した. 動

物は投与後 31 日目にイソフルラン麻酔下にて放血致死させ, 肺及び肝臓を採取し, 重量を測定した. 肺の右葉及び肝臓の外側左葉を 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定し, 残りは *gpt* assay および DNA 付加体測定サンプルとして液体窒素により凍結し, 測定まで -80°C で保存した.

B-2-3. ES の用量設定試験

動物は当研究所で系統維持している C57BL/6J *gpt delta* マウスを実験に供した. 雌性 6 週齢の *gpt delta* マウス 18 匹を各群 3 匹に配し, 対照群を含む 6 群を設けた. 対象群には溶媒であるコーンオイルを, その他の 5 群には ES をそれぞれ 0.02, 0.2, 2, 20 及び 200 mg/kg 体重の用量で 28 日間強制経口投与した. 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た. 体重は開始から試験終了までは毎週 1 回測定した. 動物は最終投与日から 3 日後にイソフルラン麻酔下にて放血致死させ, 肝臓及び腎臓を採取し, 重量を測定した. 肝臓の外側左葉及び片腎の半分を 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定し, 残りは *gpt* assay および DNA 付加体測定サンプルとして液体窒素により凍結し, 測定まで -80°C で保存した.

B-3 *in vivo* 変異原性の検索

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 (MFs) を算出した。また、6-TG と Cm に耐性となったコロニーは Thermo Fisher Scientific 社製 3730xl DNA Analyzer にて *gpt* 遺伝子の塩基配列解析を行い、変異部位を同定した。

(統計学的処理方法)

体重、臓器重量、*gpt* MFs 及び各変異の特異的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 Dunnett の多重比較検定により行った。また、遺伝子型間の比較には Tukey の多重比較を用い、有意水準は 5%未満とした。

(倫理面への配慮)

投与実験は熟練者が実施し、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

C-1. BaP の用量設定試験

試験期間中、一般状態観察及び体重の推移において投与に起因する変化は認められなかった。最終体重と肺及び肝重量を Table1 に示す。肺の実重量及び相対重量は 200 mg/kg 投与群において高値を示したものの有意な差は認められなかった。また、いずれの群においても投与に伴う組織学的変化は認められなかった。

gpt assay の結果を Figure 1 に示す。*gpt* 変異体頻度 (MFs) は 200 mg/kg 群 (20.64 ± 8.75 , $p < 0.01$) において対照群 (0.69 ± 0.29) に比して顕著に上昇した。一方、20 mg/kg 群以下で変化は認められなかった。

C-2. Pol ζ KI *gpt* delta マウスを用いた BaP の評価

投与開始 1 週目において、Pol ζ KI *gpt* delta マウスの 80 及び 160 mg/kg 群において各 1 例死亡が認められた。その他の動物では、一般状態観察及び体重の推移において両遺伝子型とも投与に起因する変化は認められなかった。最終体重と肺及び肝重量を Table2 に示す。投与に伴う肺及び肝重量の変化はいずれの遺伝子型においても認められなかった。

肺における *gpt* assay の結果を Figure 2 に示す。*gpt* delta マウスにおいて、*gpt* MFs は 40 mg/kg 群で変化は認められず、80 mg/kg 群 (1.92 ± 0.84) で上昇傾向が認められ、160 mg/kg 群 (3.73 ± 1.59 , $p < 0.05$) で対照群 (0.59 ± 0.22) に比して有意な上昇が認められた。Pol ζ KI *gpt* delta マウ

スでは、40 mg/kg 群で変化は認められず、80 mg/kg 群 (2.26 ± 1.05) で上昇傾向が認められ、160 mg/kg 群 (11.70 ± 6.58 , $p < 0.05$) で対照群 (1.05 ± 0.82) に比して有意に増加した。両遺伝子型を比較した結果、160 mg/kg 群において Pol ζ KI *gpt delta* マウスは *gpt delta* マウスに比して3倍以上の有意な高値 ($p < 0.05$) を示した。一方、上昇傾向が認められた80 mg/kg 及びその他の群で遺伝子型間における差は認められなかった。

gpt 変異体の変異スペクトラム解析の結果を Figure 3 に示す。*gpt delta* マウスの80 mg/kg 群では G:C-T:A transversion (0.72 ± 0.55) の頻度が対照群 (0.17 ± 0.20) に比して上昇傾向を示した。160 mg/kg 群では、G:C-C:G transversion (0.79 ± 0.30 , $p < 0.05$) の頻度が対照群 (0.03 ± 0.06) に比して有意に上昇し、G:C-T:A transversion (0.93 ± 0.63)、G:C-A:T transition (0.57 ± 0.18)、single base deletion (0.26 ± 0.30) 及び complex 変異 (0.32 ± 0.22) の頻度は対照群 (0.17 ± 0.20 , 0.14 ± 0.21 , 0.05 ± 0.07 及び 0) に比して上昇傾向を示した。また、Pol ζ KI *gpt delta* マウスの80 mg/kg 群では G:C-T:A transversion (0.67 ± 0.84) の頻度が対照群 (0.31 ± 0.42) に比して上昇傾向を示した。160 mg/kg 群では、G:C-T:A transversion (4.57 ± 3.76 , $p < 0.05$)、G:C-C:G transversion (0.72 ± 0.57 , $p < 0.05$)、G:C-A:T transition (1.39 ± 0.90 , $p < 0.01$)、single base deletion (1.46 ± 0.94 , $p < 0.05$) 及び complex 変異 (2.28 ± 2.02 , $p < 0.05$) の頻度が対照群 (0.31 ± 0.42 , 0.12 ± 0.18 , 0.32 ± 0.32 , 0.08 ± 0.11 及び 0.08

± 0.11) に比して有意に上昇した。両遺伝子型を比較した結果、Pol ζ KI *gpt delta* マウスの160 mg/kg 群では *gpt delta* マウスに比して single base deletion 及び complex 変異の頻度が有意な高値 ($p < 0.05$) を示し、G:C-T:A transversion 及び G:C-A:T transition の頻度は明らかな高値を示した。一方、*gpt* MFs の上昇傾向が認められた80 mg/kg 群を含め、その他の群では遺伝子型間に差はみとめられなかった。

対照群及び160 mg/kg 群で認められた complex 変異の詳細を Table 3 に示す。*gpt delta* マウスの160 mg/kg 群では計3例だったのに対し、Pol ζ KI *gpt delta* マウスでは計26例認められ、そのほとんどは連続した2塩基 (61.5%) または1塩基をまたいだ2塩基の変異 (26.9%) であった。また、Pol ζ KI *gpt delta* マウスで認められたこれら complex 変異26例のうち20例は3'末端側がグアニンで、残りは5'末端側がシトシンであった。同様の変異は Pol ζ KI *gpt delta* マウスの対照群においても3例認められたのに対し、*gpt delta* マウスの対照群では認められなかった。

C-3. ES の用量設定試験

試験期間中、一般状態観察及び体重の推移において投与に起因する変化は認められなかった。最終体重と肝及び腎重量を Table 4 に示す。いずれの用量においても投与による変化は認められなかった。病理組織学的検索の結果、200 mg/kg 群では肝細胞の有糸分裂像と辺縁部において肝細胞の腫大、単細胞壊死及び卵円形細胞の過形成が認められた。20 mg/kg 群以下では投与に伴う組織学的変化は認められなかった。

gpt assay の結果を Figure 4 に示す。 *gpt* MFs は 200 mg/kg 群 (2.58 ± 1.10 , $p < 0.01$) で対照群 (0.39 ± 0.30) に比して有意に上昇した。一方、20 mg/kg 群以下で変化は認められなかった。

D. 考察

D-1. BaP の突然変異誘発性における Pol ζ の寄与

食品中遺伝毒性物質の突然変異誘発性及び「事実上の閾値」形成への Pol ζ の関与を明らかにするため、低用量、中間用量及び高用量の各用量における Pol ζ 活性化の影響を検討することとした。これらの用量を設定するための予備試験では、BaP 200 mg/kg 群の肺において *gpt* MFs の顕著な上昇が認められたのに対し、20 mg/kg 群以下で変化は認められなかった。これらの結果から、本試験で使用する低用量、中間用量及び高用量は、それぞれ 40、80 及び 160 mg/kg に設定した。

本試験では、Pol ζ KI *gpt* delta マウスの 80 及び 160 mg/kg 群において各 1 例ずつ途中死亡が認められたものの、同群におけるその他のマウスで体重の変化及び一般状態の悪化は認められなかったことから、偶発的に生じたものと考えられた。

肺における *gpt* assay の結果、Pol ζ KI *gpt* delta マウスの 160 mg/kg 群では *gpt* MFs の顕著な上昇が認められ、*gpt* delta マウスに比べ約 3 倍の上昇が認められた。変異スペクトラム解析の結果、Pol ζ KI *gpt* delta マウスの 160 mg/kg 群では G:C 塩基対における塩基置換と欠失変異の頻度の増加が確認された。従って、同群における *gpt* MFs の増加は、BaP によるグアニン塩基の損

傷に対して活性化した Pol ζ が損傷乗り越え複製とミスマッチ末端からの伸長反応を行ったことで生じたものと考えられた。また、同群では特徴的に連続した 2 塩基又は 1 塩基を挟んだ 2 塩基の complex 変異が増加した。同様の変異は Pol ζ を活性化(L989F Pol ζ) した酵母でも自然発生及び UV 照射によって増加することが確認されている⁶⁾。さらに、今回認められた変異はいずれも 3' 末端及又は 5' 末端側がそれぞれグアニン又はシトシンであったことから、これらはグアニン塩基の損傷によって形成されたミスマッチ末端から伸長反応を行う際に Pol ζ が誤った塩基を挿入したことで生じたものと考えられた。

以上の結果から、Pol ζ は BaP によって形成されたグアニンの損傷に対して損傷乗り越え複製とミスマッチ末端からの伸長反応を行うことが明かになった。また、Pol ζ 活性化で特徴的に認められた complex 変異が少ないながらも *gpt* delta マウスの 160 mg/kg 群でも検出された事実は、通常のマウスにおいても BaP の突然変異誘発に Pol ζ が重要な役割を担っていることを支持する結果と考えられた。一方、BaP 80 mg/kg 群では、両遺伝子型とも G:C-T:A transversion 変異の増加を伴う *gpt* MFs の上昇傾向が認められたものの、遺伝子型間に差は認められなかったことから、Pol ζ が BaP の「事実の閾値」形成に寄与しない可能性が示唆された。今後、BaP の DNA 付加体量の測定及び Pol ζ の触媒サブユニット及び非触媒サブユニットである Rev3 及び Rev7 の遺伝子発現解析を行い、それらの結果を含めて考察する。

D-2. ES の突然変異誘発性における Pol ζ の寄与

本試験における用量を設定するための予備試験を実施した結果、200 mg/kg 体重では肺において *gpt* MFs の顕著な上昇と組織学的変化が認められたのに対し、20 mg/kg 体重ではこれらの変化が認められなかったことから、本試験で使用する低用量、中間用量及び高用量は、それぞれ 12.5、50 及び 200 mg/kg に設定した。平成 28 年度は Pol ζ KI *gpt* delta マウス及び *gpt* delta マウスに ES を上記の用量で投与し、ES の突然変異誘発性及び「事実上の閾値」形成における Pol ζ の寄与を明らかにする。

E. 結論

Pol ζ が BaP により生じたグアニン塩基の損傷に対する乗り越え複製とミスマッチ末端からの伸長反応を行うことが明かとなり、BaP の突然変異誘発に重要なポリメラーゼであることが示された。一方、Pol ζ は本実験条件下において BaP の「事実上の閾値」形成へ寄与しない可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし。

(参考文献)

- 1) Nohmi, T., Possible mechanisms of practical thresholds for genotoxicity. *Genes Environ.* 30, 108-113, 2008.
- 2) Stone, JE., Kumar, D., Binz, SK., Inase, A., Iwai, S., Chabes, A., Burgers, PM., Kunkel, TA. Lesion bypass by *S. cerevisiae* Pol ζ alone. *DNA Repair* 10, 826-834, 2011.
- 3) Diaz, M., Watson, NB., Turkington, G., Verkoczy, LK., Klinman, NR., McGregor, WG. Decreased frequency and highly aberrant spectrum of ultraviolet-induced mutations in the *hprt* gene of mouse fibroblasts expressing antisense RNA to DNA polymerase zeta. *Mol. Cancer Res.* 1, 836-847, 2003.
- 4) Ddaly, J., Bebenek, K., Wwatt, DL., Richter, K., Jiang, C., Zhao, ML., Ray, M., McGregor, WG., Kunkel, TA., Diaz, M. Altered Ig hypermutation pattern and frequency in complementary mouse models of DNA polymerase ζ activity. *J. Immunol.* 188, 5528-5537, 2012.
- 5) Nohmi, T., Suzuki, T., Masumura, K. Recent advances in the protocols of transgenic mouse mutation assay. *Mutat. Res.* 455, 191-215, 2000.
- 6) Sakamoto, AN., Stone, JE., Kissling, GE., McCulloch, SD., Pavlov, YI., Kunkel, TA. Mutator alleles of yeast DNA polymerase zeta. *DNA repair.* 6, 1829-1838, 2007.

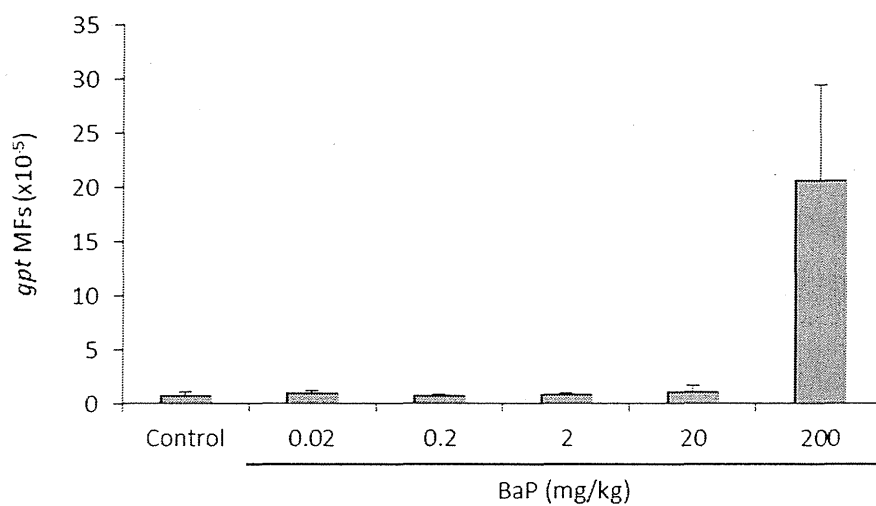


Figure 1. *gpt* MFs in the lungs of male *gpt* delta mice treated with BaP at a dose of 0.02, 0.2, 2, 20 and 200 mg/kg by single i.p. injection.

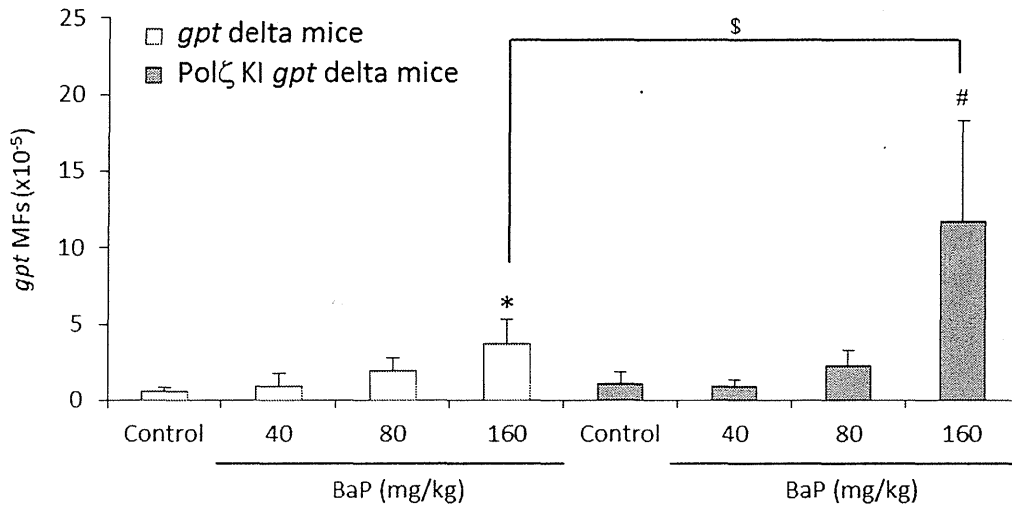


Figure 2. *gpt* MFs in the lungs of male Pol ζ KI *gpt* delta mice and *gpt* delta mice treated with BaP at a dose of 40, 80 and 160 mg/kg by single i.p. injection. Values are means \pm s.d. (n = 4 or 5 in each group), * p < 0.05 vs control group of *gpt* delta mice using Dunnett's test. # p < 0.05 vs control group of Pol ζ KI *gpt* delta mice using Dunnett's test. \$ p < 0.05 vs *gpt* delta mice using Tukey's test

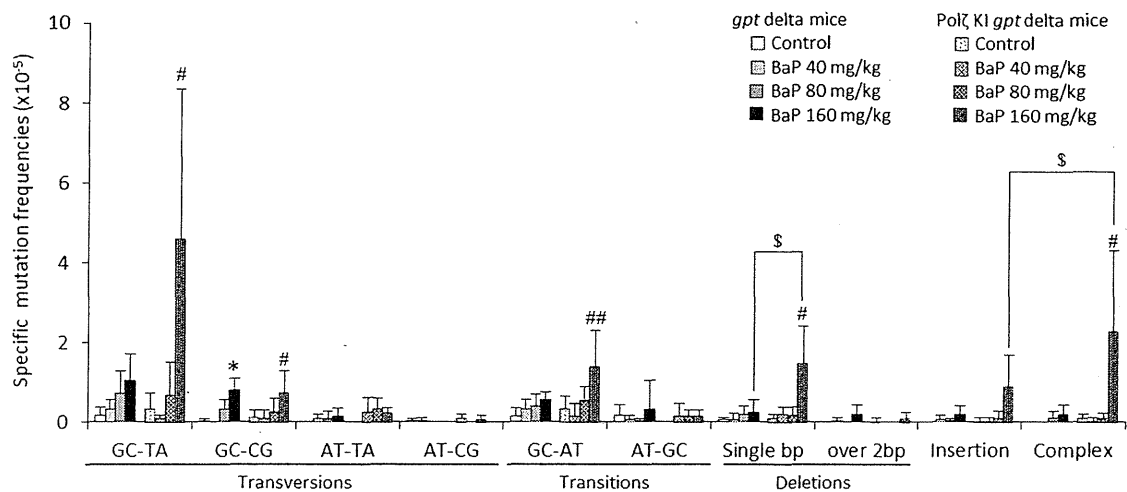


Figure 3. Specific mutation frequencies in the lungs of male Pol ζ KI *gpt* delta mice and *gpt* delta mice treated with BaP at a dose of 160 mg/kg by single i.p. injection. * $p < 0.05$ vs control group of *gpt* delta mice using Dunnett's test. #, ## $p < 0.05, 0.01$ vs control group of Pol ζ KI *gpt* delta mice using Dunnett's test. \$ $p < 0.05$ vs *gpt* delta mice using Tukey's test.

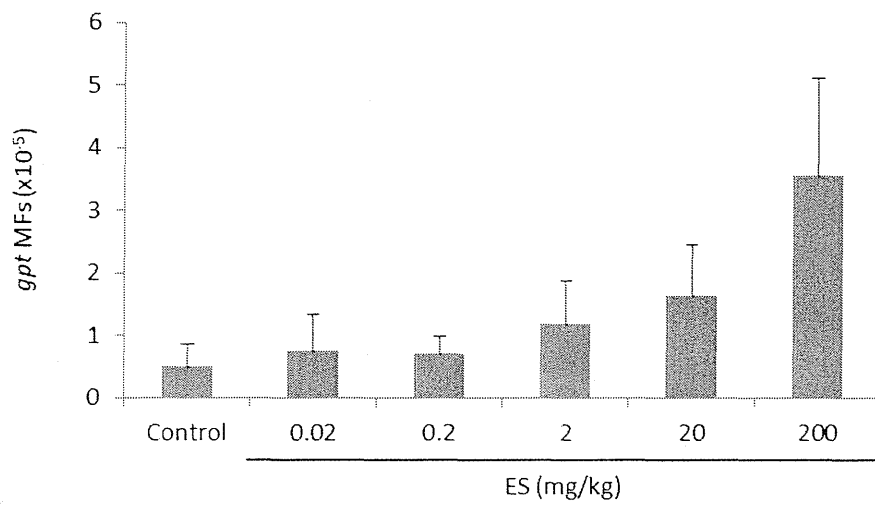


Figure 4. *gpt* MFs in the lungs of female *gpt* delta mice treated with ES at a dose of 0.02, 0.2, 2, 20 and 200 mg/kg by gavage for 4 weeks.

Table 1 Final body, lung and liver weights

Item	BaP (mg/kg)					
	0	0.02	0.2	2	20	200
No. of animals	3	3	3	3	3	3
Body weight (g)	26.7 ± 0.5	28.1 ± 2.2	26.9 ± 0.5	27.3 ± 2.6	26.6 ± 1.6	25.7 ± 0.6
Absolute (g)						
Lung	0.137 ± 0.009	0.140 ± 0.006	0.140 ± 0.004	0.138 ± 0.011	0.147 ± 0.004	0.151 ± 0.015
Liver	1.37 ± 0.10	1.37 ± 0.19	1.41 ± 0.04	1.34 ± 0.20	1.32 ± 0.09	1.21 ± 0.05
Relative (g%)						
Lung	0.52 ± 0.04	0.50 ± 0.04	0.52 ± 0.01	0.51 ± 0.02	0.56 ± 0.02	0.59 ± 0.06
Liver	5.15 ± 0.32	4.85 ± 0.38	5.25 ± 0.11	4.88 ± 0.31	4.97 ± 0.60	4.72 ± 0.23

Table 2 Final body and liver weights

Item	<i>gpt</i> delta mice				Pol ζ KI <i>gpt</i> delta mice			
	BaP (mg/kg)							
	0	0.02	0.2	2	0	0.02	0.2	2
No. of animals	5	5	5	5	5	5	4	4
Body weight (g)	26.1 \pm 0.5	26.4 \pm 2.3	26.3 \pm 1.8	25.9 \pm 1.3	27.1 \pm 1.5	25.5 \pm 0.8	25.7 \pm 1.6	25.1 \pm 1.5
Absolute (g)								
Lung	0.14 \pm 0.01	0.14 \pm 0.01	0.14 \pm 0.01	0.13 \pm 0.01	0.14 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01	0.14 \pm 0.02	0.14 \pm 0.02
Liver	1.16 \pm 0.13	1.30 \pm 0.16	1.28 \pm 0.15	1.20 \pm 0.08	1.19 \pm 0.15	1.31 \pm 0.08	1.31 \pm 0.15	1.17 \pm 0.10
Relative (g%)								
Lung	0.52 \pm 0.04	0.52 \pm 0.03	0.52 \pm 0.02	0.50 \pm 0.02	0.51 \pm 0.04	0.57 \pm 0.03	0.55 \pm 0.05	0.55 \pm 0.06
Liver	4.45 \pm 0.45	4.92 \pm 0.40	4.86 \pm 0.32	4.65 \pm 0.11	4.42 \pm 0.71	5.15 \pm 0.36	5.09 \pm 0.30	4.64 \pm 0.24

Table 3 Tandem and triplet base substitutions detected in the lung of male Pol ζ KI *gpt* delta mice and *gpt* delta mice treated with vehicle and BaP 160 mg/kg by single i.p. injection

Geno type	Group	Animal No.	Position	wildtype	mutation	
<i>gpt</i> delta mice	Control	-	-	-	-	
	BaP 160 mg/kg	401	125	CCGGG	CGGTG	
		403	416	TGGGA	TAGAA	
Pol ζ <i>gpt</i> delta mice	Control	404	207	GCGA	GTTA	
		502	277	TACC	T_GC	
		503	25	CTGGG	CCGAG	
	BaP 160 mg/kg	801	25	CTGGG	CCGAG	
			103	CGTA	CAAA	
			114	GCGG	GATG	
			207	GCGA	GATA	
			279	GCGG	GAAG	
			320	GCGCA	GAGAA	
			412	GCCGT	G_CTT	
			498	44	CATGC	C_TAC
			503	56	CTCGC	CCTTC
			503	320	GCGCA	GACAA
			503	401	TGGA	TCTA
			503	56	CTCGC	CACTC
			503	101	GCCGT	G_CTT
			503	114	GCGG	GATG
503	189	ACGA	AATA			
503	207	GCGA	GGTA			
503	269	CTGG	CCAG			
503	398	ACCTG	AACAG			
503	456	GCTA	GTAA			
804	804	24	CCTG	CTAG		
		125	CCGG	CGTG		
805	805	114	GCGG	GATG		
		124	CCGGG	C_ATG		
		226	ACGC	A_TC		
		278	CCGG	C_TG		
		412	CCGT	C_TT		

Table 4 Final body, liver and kidney weights

Item	ES (mg/kg/day)					
	0	0.02	0.2	2	20	200
No. of animals	3	3	3	3	3	3
Body weight (g)	20.1 ± 1.3	20.3 ± 1.1	20.9 ± 1.1	20.6 ± 0.9	20.8 ± 0.2	19.9 ± 0.8
Absolute (g)						
Liver	0.92 ± 0.10	0.91 ± 0.08	1.01 ± 0.10	0.96 ± 0.07	0.93 ± 0.06	0.85 ± 0.11
Kidney	0.21 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.25 ± 0.04
Relative (g%)						
Liver	4.55 ± 0.23	4.48 ± 0.18	4.83 ± 0.24	4.63 ± 0.14	4.45 ± 0.26	4.26 ± 0.61
Kidney	1.07 ± 0.03	1.13 ± 0.04	1.09 ± 0.01	1.10 ± 0.03	1.10 ± 0.02	1.23 ± 0.17

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	該当なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
	該当なし				

LIMIT LAB.
M-285