

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 28 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

本研究では、ミスマッチ末端からの伸長反応を行うと考えられているポリメラーゼ ζ (Pol ζ)の複製忠実度を低下させた 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 28 年度は食品中遺伝毒性物質として estragole (ES) 及び 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) を被験物質とした。雌性 8 週齢の Pol ζ KI *gpt delta* マウス及び *gpt delta* マウスに ES を 12.5, 50 及び 200 mg/kg 体重の用量で 28 日間強制経口投与し、3 日間の休薬後、肝臓を採取した。*gpt assay* の結果、肝臓における *gpt* 変異体頻度 (MFs) は両遺伝子型ともに 200 mg/kg 群で有意に上昇したが、遺伝子型間に有意な差は認められなかった。変異スペクトラム解析の結果、同群では両遺伝子型ともに G:C 塩基対における塩基置換の頻度が顕著に増加したものの、遺伝子型間に差は認められなかった。一方、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 変異の頻度が有意に増加し、Pol ζ が ES によるグアニンの損傷によって生じたミスマッチ末端からの伸長反応に寄与することが示唆された。*gpt delta* マウスを用いた用量設定試験の結果から、本試験の IQ の投与濃度を 75, 150 及び 300 ppm とした。雄性 8 週令の *gpt delta* マウスに IQ を 75, 150 及び 300 ppm の濃度で 28 日間混餌投与し、3 日間の休薬後、肝臓を採取した。*gpt assay* の結果、肝臓における *gpt* MFs は両遺伝子型とも 300 ppm 群で上昇し、G:C-T:A transversion の増加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 は IQ による DNA 損傷の乗り越え複製やミスマッチ末端からの伸長反応に寄与しないものと考えられた。以上より、Pol ζ の働きには DNA 損傷に対する構造特異性があるものと考えられた。また、本実験条件下において ES 及び IQ の「事実上の閾値」形成への Pol ζ の関与は明らかにならなかった。

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 (Pol) 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 Pol 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。本研究で注目した Pol ζ は、損傷乗り越え複製に加え、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。

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 の関与を検討した。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 の複製忠実度が低下している。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 EG10 DNA が挿入されており、*gpt* 遺伝子をレポーターとする突然変異の検出が可能であることから⁵⁾、Pol ζ の遺伝子改変の影響を *gpt* アッセイにより評価することができる。平成 27 年度は、Pol ζ の複製忠実度を低下させたヒト細胞で変異頻度の増加が認められた⁶⁾benzo[a]pyrene (BaP) の肺における突然変異誘発性に対する Pol ζ 遺伝子改変の影響を検討した。その

結果、Pol ζ KI *gpt delta* マウスでは *gpt delta* マウスに比べ *gpt* 変異体頻度 (MFs) が約 3 倍上昇し、G:C 塩基対の変異の増加に加えて特徴的なタンデム変異の増加が認められ、Pol ζ がミスマッチ末端からの伸長反応と BaP の DNA 損傷に対する損傷乗り越え複製を行っている可能性を明らかにした。これらの結果は、Pol ζ が BaP の突然変異誘発に重要な役割を担っていること、さらに遺伝毒性物質の閾値の存在を示唆するものであった。平成 28 年度は、食品中化学物質の中から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]quinoline (IQ) と estragole (ES) を被験物質として、これら食品中に含まれる遺伝毒性物質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。

B. 研究方法

B-1. 材料及び試薬

ES は東京化成工業株式会社（東京）から購入した。IQ は Toronto Research Chemicals, Inc.（カナダ）から購入した。

B-2. 動物実験操作

B-2-1. Pol ζ KI *gpt delta* マウスを用いた ES の評価

動物は雌性 6 週齢の C57BL/6 系 Pol ζ 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（静岡）より購入した。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 ± 1°C、湿度 55 ± 5%、換気回数 18 回 / 時（オールフレッシュ）、12 時間蛍光灯照明 / 12 時間消灯であり、この条件下で飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート

製箱型ケージに 5 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．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．平成 27 年度に実施した用量設定試験の結果に基づいて，低用量群，中間用量群及び高用量群には ES をそれぞれ 12.5，50 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．最終投与後，3 日間の休薬期間を設け，動物は ES の投与開始から 31 日目にイソフルラン麻酔下にて放血致死させ，肝臓を採取し，重量を測定した．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 のサンプルとして液体窒素により凍結し，-80°C で保存した．

B-2-2. IQ 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．動物の飼育条件は B-2-1 に記す．雄性 6 週齢の *gpt* delta マウス 18 匹を各群 3 匹に配し，対照群を含む計 6 群を設けた．IQ はそれぞれ 0.03，0.3，3，30 及び 300 ppm の濃度で粉餌に混じり，28 日間投与した．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．3 日間の休薬期間を設け，動物は IQ の投与開始から 31 日目にイソフルラン麻酔下にて放血致死させ，肝臓を採取し，重量を測定した．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 のサンプルとして液体窒素により凍結し，-80°C で保存した．

B-2-3. Pol ζ KI *gpt* delta マウスを用いた IQ の評価

動物は雄性 6 週齢の C57BL/6 系 Pol ζ 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．動物の飼育条件は B-2-1 に記す．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．用量設定試験の結果に基づいて，低用量群，中間用量群及び高用量群には IQ を 75，150 及び 300 ppm の濃度で粉餌に混じり 28 日間投与した．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．3 日間の休薬期間を設け，動物は IQ の投与開始から 31 日目にイソフルラン麻酔下にて放血致死させ，肝臓を採取し，重量を測定した．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 のサンプルとして液体窒素により凍結し，-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量希釈した後に 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. Pol ζ KI *gpt* delta マウスを用いた ES の評価

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。最終体重と肝重量を Table 1 に示す。*gpt* delta マウスにおいて肝臓の相対重量は 200 mg/kg 投与群において有意な高値 ($p < 0.01$) を示した。Pol ζ KI *gpt* delta マウスでは 50 mg/kg 投与群において肝臓の相対重量の有意な低値 ($p < 0.05$) が認められた。病理組織学的検索の結果、200 mg/kg 投与群では肝細胞の分裂像、卵円形細胞の過形成が認められ、炎症細胞の集簇が散見されたものの、これらの変化に遺伝子型間の差は認められなかった。

肝臓における *gpt* assay の結果を Figure 1 に示す。*gpt* delta マウスにおいて、*gpt* MFs は 50 mg/kg 群まで変化は認められず、200 mg/kg 群 (2.65 ± 0.51 , $p < 0.01$) で対照群 (0.82 ± 0.45) に比して有意に増加した。Pol ζ KI *gpt* delta マウスでは、50 mg/kg 群まで変化は認められず、200 mg/kg 群 (3.25 ± 1.01 , $p < 0.01$) で対照群 (0.54 ± 0.34) に比して有意に増加した。両遺伝子型を比較した結果、200 mg/kg 群において Pol ζ KI *gpt* delta マウスは *gpt* delta マウスに比して高値を示したものの、有意な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 2 に示す。*gpt* delta マウスの 200 mg/kg 群では G:C-T:A transversion (1.01 ± 0.34 , $p < 0.01$) 及び A:T-T:A transversion (0.23 ± 0.14 , $p < 0.05$) の頻

度が対照群 (0.20 ± 0.26 及び 0.02 ± 0.05) に比して有意に上昇し, G:C-A:T transition (0.58 ± 0.38) の頻度は対照群 (0.24 ± 0.27) に比して上昇傾向を示した。また, Pol ζ KI *gpt delta* マウスの 200 mg/kg 群では G:C-T:A transversion (1.13 ± 0.54 , $p < 0.01$), G:C-C:G transversion (0.40 ± 0.19 , $p < 0.01$) 及び complex 変異 (0.45 ± 0.22) の頻度が対照群 (0.14 ± 0.22 , 0 及び 0) に比して有意に上昇し, G:C-A:T transition (0.51 ± 0.48) 及び single base deletion (0.47 ± 0.60) の頻度が対照群 (0.17 ± 0.14 及び 0.06 ± 0.14) に比して上昇傾向を示した。両遺伝子型を比較した結果, いずれの変異についても遺伝子型間に有意な差は認められなかったものの, Pol ζ KI *gpt delta* マウスの 200 mg/kg 群では complex 変異の頻度が *gpt delta* マウスに比して上昇傾向を示した。

対照群及び 200 mg/kg 群で認められた complex 変異の詳細を Table 2 に示す。同様の変異は *gpt delta* マウスの 200 mg/kg 群では計 4 例認められたのに対し, Pol ζ KI *gpt delta* マウスでは計 11 例認められ, そのほとんどは連続した 2 塩基または 1 塩基をまたいだ 2 塩基の変異であった。また, 認められたこれら complex 変異計 15 例のうち 14 例は 3' 末端側がグアニンであった。同様の変異は両遺伝子型とも対照群では認められなかった。

C-2. IQ 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。最終体重と肝重量を Table 3 に示す。最終体重, 肝臓の実重量及び相対重

量は 300 ppm 投与群において低値を示した。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 3 に示す。*gpt* MFs は 300 ppm 投与群 (1.38 ± 1.34) において対照群 (0.36 ± 0.19) に比して顕著に上昇した。一方, 30 ppm 以下の群で変化は認められなかった。

C-3. Pol ζ KI *gpt delta* マウスを用いた IQ の評価

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。最終体重と肝重量を Table 4 に示す。*gpt delta* マウスの 300 ppm 群では最終体重の低値が認められ, Pol ζ KI *gpt delta* マウスでは有意な低値 ($p < 0.01$) を示した。同群では Pol ζ KI *gpt delta* マウスにおいて肝実重量及び相対重量の低値が, *gpt delta* マウスにおいて有意な低値 ($p < 0.01$) が認められたが, 遺伝子型間に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。

肝臓における *gpt assay* の結果を Figure 4 に示す。*gpt delta* マウスにおいて, *gpt* MFs は 300 ppm 群 (2.00 ± 0.67) で対照群 (0.79 ± 0.75) に比して上昇傾向が認められた。Pol ζ KI *gpt delta* マウスでも同様に, 300 ppm 群 (2.19 ± 1.11) で, 対照群 (1.20 ± 0.50) に比して上昇傾向が認められた。遺伝子型を比較した結果, すべての用量において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 5 に示す。*gpt delta* マウス及び Pol ζ KI *gpt delta* マウスともに 300 ppm

群では G:C-T:A transversion 及び complex 変異の頻度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。

D. 考察

D-1. ES の突然変異誘発性における Pol ζ の寄与

平成 27 年度に実施した ES の用量設定試験では、200 mg/kg 群の肝臓において *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を、それぞれ 12.5、50 及び 200 mg/kg に設定した。

本試験の結果、肝臓における *gpt* MFs は *gpt delta* マウス、Pol ζ KI *gpt delta* マウスともに 200 mg/kg 群で有意に上昇したものの、遺伝子型間に有意な差は認められなかった。変異スペクトラム解析の結果、両遺伝子型ともに 200 mg/kg 群で G:C 塩基対における塩基置換の頻度が増加したが、遺伝子型間に差は認められなかった。一方、Pol ζ KI *gpt delta* マウス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 を活性化した酵母 (L989F Pol ζ) 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⁷⁾。また、平成 27 年度に陽性対照として用いた BaP においても同様の変異の増加が観察されている。今回認められた変異のほとんどは 3' 末端側がグアニ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 mismatches 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。また、ES はグアニンだけでなくア

デニンの DNA 付加体を形成する⁸⁾。しかしながら、本研究においてアデニンの損傷が寄与したと考えられる A:T 塩基対の変異や、complex 変異の増加は認められなかったことから、Pol ζ は主にグアニンの損傷に対して生じた mismatches 末端からの伸長反応を行うものと考えられた。また、Pol ζ 遺伝子改変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 200 mg/kg 群でも検出された事実は、通常のマウスにおいても ES の突然変異誘発に Pol ζ が寄与することを支持する結果と考えられた。一方、ES 50 mg/kg 群では、両遺伝子型とも *gpt* MFs の変化は認められず、遺伝子型間に差は認められなかったことから、本実験条件下において Pol ζ の ES の「事実上の閾値」形成への関与は明らかにならなかった。

D-2. IQ の突然変異誘発性における Pol ζ の寄与

用量設定試験では、IQ 300 ppm 群の肝臓において *gpt* MFs の上昇が認められたのに対し、30 ppm 以下の群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を、それぞれ 75、150 及び 300 ppm に設定した。

本試験の結果、肝臓における *gpt* MFs は両遺伝子型とも 300 ppm 群で上昇傾向が認められたものの、すべての用量において遺伝子型間の差は認められなかった。また、変異スペクトラムにおいて complex 変異の増加も認められなかったことから、本実験条件下において Pol ζ は IQ の DNA 損傷に対する損傷乗り越え複製と mismatches 末端からの伸長反応の両方に寄与しない可能性が

示唆された。

E. 結論

Pol ζ は、ESにより生じたグアニン塩基の損傷に対して生じたミスマッチ末端からの伸長反応を行うのに対し、IQのDNA損傷に対する複製反応には寄与しない可能性が示唆され、その働きにはDNA損傷に対する構造特異性があるものと考えられた。また、本実験条件下においてES及びIQの「事実上の閾値」形成へのPol ζ の関与は明らかにならなかった。

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

- 1) 石井雄二、高須伸二、木島綾希、能美健彦、小川久美子、梅村隆志「Benzo[a]pyreneによるマウス肺の突然変異誘発過程におけるDNA Polymerase ζ の役割」第45回日本環境変異原学会

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) Suzuki, T., Grúz, P., Honma, M., Adachi, N., Nohmi, T. The role of DNA polymerase ζ in translesion synthesis across bulky DNA adducts and cross-links in human cells. *Mutat. Res.* 791-792, 35-41, 2016.
- 7) 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.
- 8) Ishii, Y., Suzuki, Y., Hibi, D., Jin, M., Fukuhara, K., Umemura, T., Nishikawa, A. Detection and quantification of specific DNA adducts by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the livers of rats given estragole at the carcinogenic dose. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 532-541, 2011.

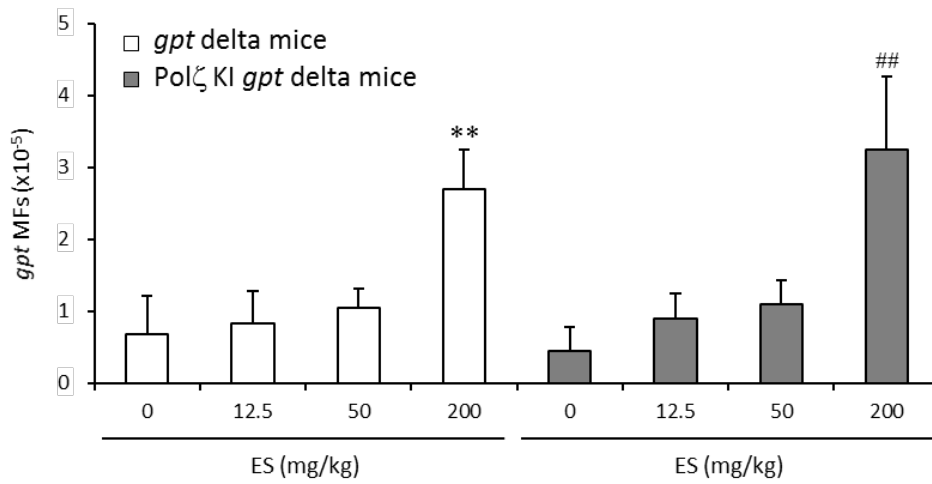


Figure 1. *gpt* MFs in the livers of female Pol ζ KI *gpt* delta mice and *gpt* delta mice treated with ES at a dose of 12.5, 50 and 200 mg/kg by gavage for 4 weeks. Values are means \pm s.d. (n = 5 in each group), **, p < 0.01 vs control group of *gpt* delta mice using Dunnett 's test. ##, p < 0.01 vs control group of Pol ζ KI *gpt* delta mice using Dunnett 's test.

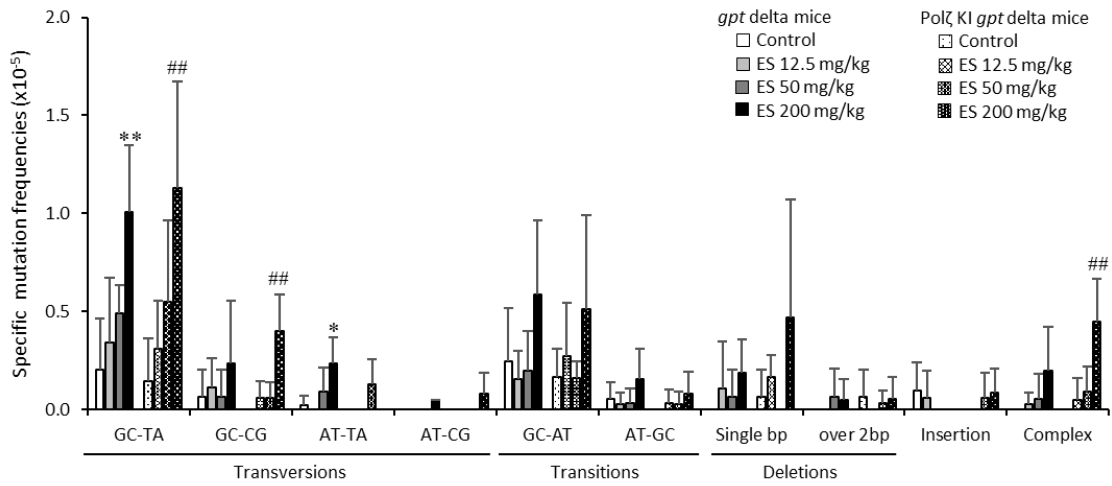


Figure 2. Specific mutation frequencies in the livers of female Polζ KI *gpt* delta mice and *gpt* delta mice treated with ES at a dose of 12.5, 50 and 200 mg/kg by gavage for 4 weeks. Values are means ± s.d. (n = 5 in each group) *, **, p < 0.05, 0.01 vs control group of *gpt* delta mice using Dunnett ' s test. ##, p < 0.01 vs control group of Polζ KI *gpt* delta mice using Dunnett ' s test.

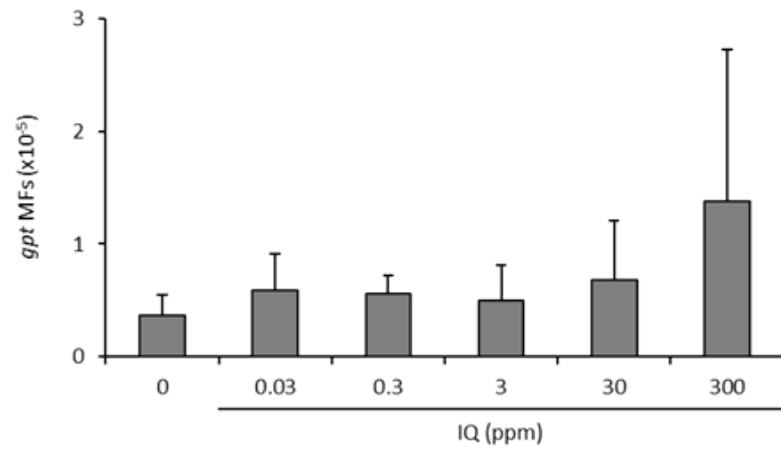


Figure 3. *gpt* MFs in the livers of male *gpt* delta mice treated with IQ 0.03, 0.3, 3, 30 and 300 ppm in diet for 4 weeks. Values are means \pm s.d. (n = 3 in each group)

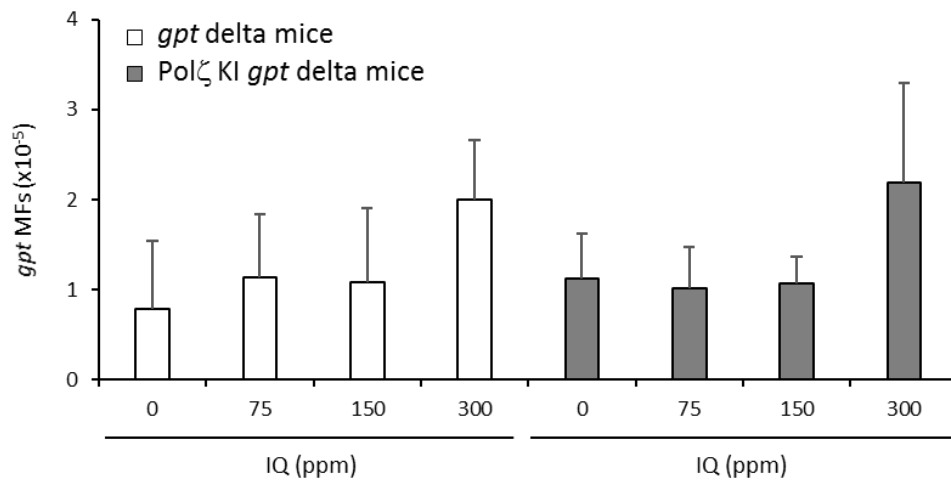


Figure 4. *gpt* MFs in the livers of male Polζ KI *gpt* delta mice and *gpt* delta mice treated with IQ 75, 150 and 300 ppm in diet for 4 weeks. Values are means ± s.d. (n = 5 in each group)

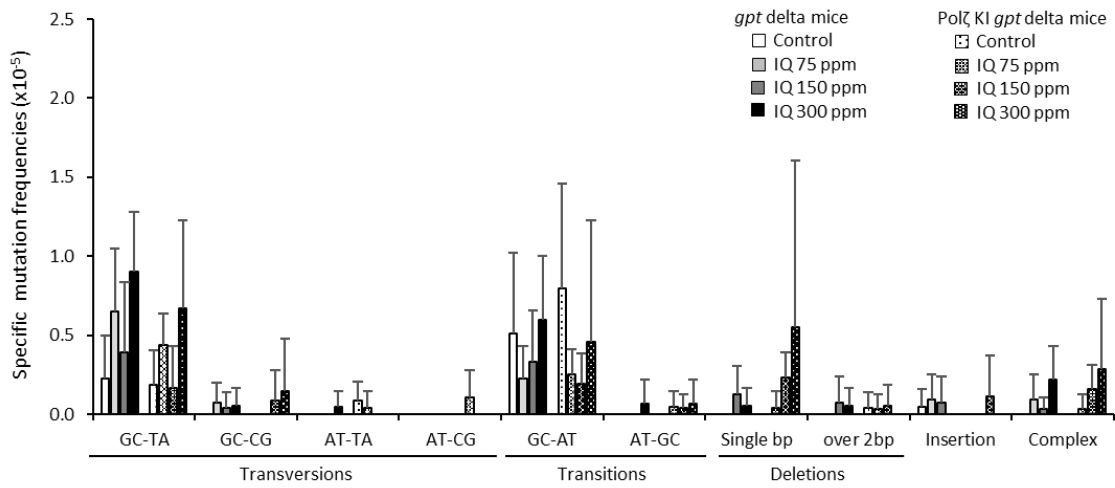


Figure 5. Specific mutation frequencies in the lungs of male *Polζ KI gpt delta* mice and *gpt delta* mice treated with IQ 75, 150 and 300 ppm in diet for 4 weeks. Values are means \pm s.d. (n = 5 in each group)

Table 1 Final body and liver weights

Item	gpt delta mice					Polζ KI gpt delta mice				
	0	12.5	50	200	200	0	12.5	50	200	200
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	20.8 ± 1.2	20.2 ± 0.9	20.3 ± 1.2	19.9 ± 1.2	20.8 ± 1.1	20.7 ± 0.6	20.2 ± 1.5	20.0 ± 0.8		
Absolute (g)										
Liver	0.84 ± 0.09	0.85 ± 0.05	0.86 ± 0.07	0.93 ± 0.08	0.88 ± 0.08	0.79 ± 0.08	0.75 ± 0.08	0.85 ± 0.05		
Relative (g%)										
Liver	4.02 ± 0.41	4.19 ± 0.15	4.24 ± 0.19	4.66 ± 0.35 ^{**}	4.22 ± 0.21	3.83 ± 0.37	3.73 ± 0.20 [*]	4.26 ± 0.19		

Table 2 Tandem mutations detected in the livers of female Pol ζ KI *gpt* delta mice and *gpt* delta mice treated with vehicle and ES 200 mg/kg by gavage for 4 weeks

Geno type	Group	Animal No.	Position	Wild type	Mutation
<i>gpt</i> delta mice	Control	-	-	-	-
	ES 200 mg/kg	402	112	TGGC	TTTC
		403	25	CTGG	CGTT
		404	149	CTGG	CCTG
		404	273	TGGA	TTTA
Pol ζ KI <i>gpt</i> delta mice	Control	-	-	-	-
	ES 200 mg/kg	801	24	CCTGG	C_TAG
		801	76	TT	TAACAT
		801	235	GCGG	GATG
		802	110	CGT	CTTT
		802	114	GCGG	GACTG
		802	207	CGA	CCTTA
		803	413	CCGT	CATT
		804	115	CGGT	CATT
		804	288	TGC	TTCC
		804	413	CCGT	CGTT
		805	115	CGGT	CTTT

Table 3 Final body and liver weights

Item	IQ (ppm)					
	0	0.03	0.3	3	30	300
No. of animals	3	3	3	3	3	3
Body weight (g)	28.6 ± 0.6	29.2 ± 2.0	30.8 ± 2.1	30.8 ± 2.1	27.2 ± 4.0	25.9 ± 0.9
Absolute (g)						
Liver	1.43 ± 0.03	1.34 ± 0.23	1.40 ± 0.17	1.50 ± 0.06	1.32 ± 0.25	1.21 ± 0.21
Relative (g%)						
Lung	5.00 ± 0.06	4.63 ± 1.09	4.56 ± 0.71	4.87 ± 0.13	5.02 ± 1.65	4.67 ± 0.98

Table 4 Final body and liver weights

Item	gpt delta mice					Polζ KI gpt delta mice				
	0	75	150	300	300	0	75	150	300	300
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	28.1 ± 1.9	28.4 ± 1.2	27.7 ± 1.1	26.1 ± 2.0	27.6 ± 2.0	26.3 ± 0.8	26.7 ± 1.6	26.3 ± 0.9#		
Absolute (g)										
Liver	1.34 ± 0.06	1.32 ± 0.08	1.28 ± 0.04	1.16 ± 0.07**	1.27 ± 0.15	1.27 ± 0.15	1.24 ± 0.09	1.19 ± 0.05		
Relative (g%)										
Liver	4.78 ± 0.17	4.64 ± 0.14	4.61 ± 0.12	4.45 ± 0.14**	4.63 ± 0.80	4.82 ± 0.55	4.68 ± 0.58	4.50 ± 0.15		