

研究成果報告書

研究課題名	環境化学物質の発がん性・遺伝毒性に関する検索法の確立と閾値の検討
主任研究者名	所属：名古屋市立大学 氏名：津田 洋幸（研究課題番号：0501）

分担研究課題名

癌遺伝子導入発がん高感受性ラット(Hras128)による口腔発がんプロモーション作用検出法開発（津田）
レポーター遺伝子導入動物における中期検索法の開発（西川）

化学物質の発がんリスクの評価に関する研究（鰐淵）

肺発がんにおける環境発がん物質の低用量発がん性に関する研究（今井田）

活性酸素種を産生する非遺伝毒性発がん物質の発がん機序解明に関する研究（三森）

変異原物質の低用量複合影響による強度の修飾（太田）

環境化学物質の発がん性・遺伝毒性に関する検索法の確立と閾値の検討（林）

○ 研究要旨

食品中の遺伝毒性・非遺伝毒性発がん物質の低用量域リスク評価において、*in vivo*と*in vitro*試験系において曝露状態を考慮した検索法を開発し、また発がん性と変異原性の相関を明らかにし、得られた生物学的閾値（その試験系におけるNOAEL、以下閾値とする）の妥当性について整理して、変異原性発がん物質には閾値が存在しないという考え方に一定の整理を提案することを目的とした。

1) 食品成分のうち肝での代謝により発がん性を示さない物質は、通常の経口投与では陰性の結果となる可能性がある。Hras128ラットにおいて、市販食品で発がんプロモーション作用の疑われている

1,2-diacylglycerol (DAG) と対照の通常油である Triacylglycerol (TAG) を、舌・乳腺の発がん物質 4NQO の投与期間と投与後（各10週間）に、口腔内に滴下投与した。舌腫瘍では差は無かったが、雌で乳腺腫瘍の発生は DAG で有意に増加した。乳腺における DAG の標的分子の PKC の3種類の isoform(η , λ , ν)の mRNA 発現が DAG 誘発乳腺発がんに関与している可能性が示唆された（津田）。

2) 変異原レポーター *gpt delta* 遺伝子導入ラットを用いて、水道水に低濃度で検出される発がん物質 臭素酸カリウム (KBrO_3) の *gpt delta* 遺伝子変異と発がん閾値は高用量（500ppm）で一致し、メカニズムに基づいた検索法を開発した。農薬ピペロニルブトキシド(PBO)の肝DNA中の8-OHdG量と変異スペクトラムから発がん性を予測できる可能性が示された（西川）。

3) 水道水に含まれる臭素酸カリウム (KBrO_3) の *in vivo* 変異原性と発がん性の両者とも共有する閾値（500ppm）があることを示したが、また、*gpt delta* トランスジェニックラットを用いて、水道水中に含まれる 1,4-dioxane の肝発がん性と *in vivo* 変異原性の両者に NOAEL が存在することが判明し、閾値の存在が示唆された（鰐淵）。

4) 発がん閾値の臓器差違について、遺伝毒性発がん物質の食品加熱分解産物ヘテロサイクリックアミン MeIQx の閾値を検討した結果、肺と大腸において閾値は異なることを見出し、閾値に臓器特異性のあることを示した（今井田）。

5) 農薬ピペロニルブトキシド(PBO)による酸化ストレス関連遺伝子の発現閾値及び変動感受性の高い遺伝子の検索において、*Cyp1a1*、*Abcc3*、*UDPGTR-2*が見いだされた。また、その発現レベルには閾値が存在することを見出した（三森）。

6) DNA を直接標的とする発がん物質には閾値が存在しないという考え方が一般的であるが、DNA に損傷が生成しても修復メカニズムにより突然変異の発現が見られない低用量域を生物学的な閾値とする考え方が最近提唱されている。変異原6種類について、サルモネラ菌 TA100 (DNA除去修復欠損株)と TA1975P (DNA除去修復野生株)における変異原性の検出限界用量を測定した結果、加算効果によって NOAEL が変動することを明らかにした（太田）。

7) 発がん機構における遺伝毒性の関与は、評価上重要である。しかしながら得られた遺伝毒性に関す

る情報を如何にリスクアセスメントに有効に生かすか、に関しては研究者により考え方が異なる。KBrO₃の小核試験において2000個の網状赤血球数と200,000個に増加させたフローサイトメータ(FCM)による測定において、閾値を比較したところ必ずしもn数の多い後者が正確ではないことを明らかにした(林)。

研究成果報告書

研究課題名	環境化学物質の発がん性・遺伝毒性に関する検索法の確立と閾値の検討
主任研究者名	所属：名古屋市立大学 氏名：津田 洋幸（研究課題番号：0501）

1 研究の概要

1) 口腔粘膜から直接吸収される物質は、曝露局所と運ばれた臓器において発がん性を示す。それらの物質のうち、肝における代謝によって発がん活性を失うものは、通常の経口投与による発がん試験では陰性の結果となってしまう可能性があるため、口腔内曝露試験法の開発は、食品、食品混入化学物質の発がん評価において重要である。この様な場合に発がん機序に基づく検索システムを構築し、実地への導入を図ることを目的とした。従来の主として施行されている経口投与による慢性毒性・発がん性併合試験に新しい概念と試験法を提供できることになる（津田）。

2) 発がん性評価の精緻化を目的に、発がん性と変異原性の関係を個体レベルで明らかにする。両者が一致する場合に、変異のスペクトラムを解析することにより、発がん物質の作用メカニズムを明らかにしようとするものである。遺伝毒性発がん物質と非遺伝毒性発がん物質の発がんメカニズムにおける本質的差異について、遺伝子レベルで究明し、発がん遺伝子変異についての臓器特異性発現のメカニズムについても明らかにする。生体における発がんとの関連性における一定の見解を提供することになる（西川）。

3) 食品添加物であり、また水道水では 2~5 ppb レベルで普段からヒトが摂取している臭素酸カリウム (KBrO₃) は 500ppm 混餌投与で雌雄ラットに腎細胞がんを発生させる。ラットの腎臓における KBrO₃ 投与による発がん性の閾値の有無、および各種 DNA 傷害修復酵素および抗酸化酵素の発現変化を明らかにする。同時に、1,4-dioxane (IARC 評価で Group 2B) のラット肝における *in vivo* 変異原性と発がん性に閾値が存在するか否かを明らかにすることを目的とした。腎の酸化的 DNA 損傷と近位尿細管細胞増殖活性、および DNA 変異レポーター遺伝子導入ラットで DNA 欠失変異頻度の発がん指標としての有用性の解析を検討する（鰐淵）。

4) 食品加熱分解物の中で遺伝毒性発がん物質のヘテロサイクリックアミンの 1 つである MeIQx の低用量域での発がん性を検討し、発がん閾値の有無を明らかにすることを目的とした。MeIQx はマウスに対して白血病・リンパ腫など造血器、肝、肺、大腸など複数の臓器に対する発がん性が報告されている。MeIQx をその発がん用量である 100ppm から 0.01ppm の濃度で A/J マウス経口投与し、その標的臓器での発がん性を検討する。それによって MeIQx の肺腫瘍と大腸の前癌病変 ACF の発生用量依存性を検討し、複数の発がん物質による発がん性の閾値の変動に関しての知見が得られることになれば、閾値の臓器特異性についての情報の一端が得られることになる（今井田）。

5) 殺虫剤の Piperonyl butoxide (PBO) は、マウスやラットの非遺伝毒性肝発癌物質である。F344/N slc ラットを用いた中期モデルで得られた試料で遺伝子異常を明らかにするためマイクロアレイ解析を行った。発現量が 2 倍以上に増加を示したものは酸化還元酵素活性に関連する遺伝子であることから、活性酸素種 (ROS) が、2 % PBO 群の肝臓において産生されている可能性が示唆された。低用量の PBO 投与実験では、いままでに実施した高用量実験の結果から得られた ROS 産生に関連する遺伝子について定量的発現解析を実施し、遺伝子発現の閾値・感受性の高い遺伝子の探索を行い、発がんメカニズムに基づく閾値についての知見を得ることを目的とした。また動物用抗菌剤フルメキン (FL) 及び酵素誘導剤 β-ナフトフラボン (BNF) についても、マウス (FL) 及びラット (BNF) を用いた二段階肝発がんモデルにおいて、マイクロアレイ解析・定量的遺伝子発現解析を行い、発がん機序における酸化的ストレスの関与を明らかにすることを目標とした（三森）。

6) 化学物質の安全性評価において DNA を直接標的とする発がん物質には閾値が存在しないという考え方が一般的である。しかし、DNA に付加体形成などの損傷が生成しても、DNA 修復メカニズムにより突

然変異の発現が見られない低用量域を生物学的閾値 (Biological threshold) とする考え方が近年提唱されている。これを検証するために、塩基対置換を誘発する直接変異原を用いて、DNA 修復欠損株と野生株との間での突然変異頻度を比較することで、生物学的な閾値の変動を明らかにする事を目的とする。変異原性検索にはヌクレオチド除去修復欠損株であるサルモネラ菌 TA100 株、野生型の TA1975/pKM101 (TA1975P) 株を用いる。次に 6 種類の変異原物質を生物学的な閾値以下の用量で混合して検体として変異原性の強度の推移について調べる (太田)。

7) 加熱食品に生成し、その発がん性が問題視されているアクリルアミドについて検討する。アクリルアミドは小核の誘発性に関しては陰性と陽性の両方の結果が報告されており、ICH ガイドラインに従って試験を実施する。今回は特に低用量域での小核誘発性を通常の蛍光顕微鏡下で観察し、さらにフローサイトメータを用いて 1 個体あたりの観察細胞数を最大 100 万細胞まで計数することによって、データの精緻化を図ることを目的とした。さらに $KBrO_3$ についても低用量域における遺伝毒性を検討し、DNA に直接作用する遺伝毒性物質に対する生物学的な閾値の存在についても、遺伝毒性物質の低用量問題、閾値問題について考察を加える (林)。

2 研究の成果

(1) 研究の成果と概要

In vivo 実験系

1) 細胞機能の発現や細胞増殖に関与するプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化物質である

1,2-diacylglycerol (DAG) は発がんプロモーターとして作用する事が知られている。DAG は食用油として市販されているが、慢性経口毒性試験においては発がん性は認められていない。舌 (雄) と乳腺 (雌) 発がん高感受性ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラット (Hras128) を用いて、DAG に直接曝露される舌、および口腔から吸収された場合の遠隔臓器の乳腺における発がん増強・プロモーション作用を検討した。舌 (雄) と乳腺 (雌) を標的とする発がん物質 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) 10ppm を飲水に加えて投与中投与後 (雄)、投与後のみ (雌) に、市販品 DAG (1,3-DAG 70%, 1,2-DAG 30%) と対照の脂肪酸組成率の同じ TAG (大豆油) を口腔内に滴下投与し (各 0.5ml、1 週 2 回又は 1 回)、雄では 20 週で終了して舌の腫瘍発生の増強作用、雌では 15 週で終了して乳腺腫瘍発生の促進作用を検討した。さらに、乳腺では protein kinase C (PKC) の発現の状態についてサテライト実験にて検討した。ラット PKC isoform は計 11 種類存在するので、全ての isoform に対して primer を設定し、増幅される fragment の塩基配列を確認後、RT-PCR アッセイにて乳腺腫瘍サンプルのスクリーニングを行った。

その結果、雄では舌上皮の乳頭腫と舌がんの発生率と個数/ラットにおいて DAG 投与と TAG 対照群において差違は無かった。雌では乳腺の腺がんの個数/ラットは、DAG 週 2 回投与群 1.33 ± 1.12 であり TAG 対照群 0.44 ± 1.01 より有意 ($P < 0.05$) の増加、乳腺がんの重量 (g/ラット) では DAG 週 2 回投与群 2.71 ± 3.71 、週 1 回投与群 3.45 ± 4.15 であり、いずれも TAG 対照群 0.75 ± 2.21 より有意 ($P < 0.05$) の増加が見られ、DAG の乳腺発がんプロモーション作用が示された。PKC の解析において、Hras128 の正常乳腺組織における PKC isoform の発現レベルは、0.5ml DAG と 0.5ml TAG を週 2 回口腔内に滴下して、実験第 4 週にて乳腺組織を摘出し解析した結果、DAG 処理群で 3 種類の isoform (eta, lambda, nu) の mRNA 発現が DAG により特異的に誘発され、乳腺発がんの促進に関与している可能性が示唆された。以上の結果は、Hras128 において、DAG は曝露部位の舌においては発がんを増強させなかったが、吸収された DAG が遠隔の乳腺において PKC の発現を増加させて発がんが促進された可能性が示された (津田)。

2) 変異原物質レポーター *gpt delta* 遺伝子導入ラットを用いて、農薬等の既知の遺伝毒性および非遺伝毒性発がん物質を 13 週間投与し、前癌病変を指標として発がん性を検索するとともに、レポーター遺伝子上の突然変異を臓器別に検討し、変異と前癌病変発生の相関を臓器レベルで解析した。また、上記試験で得られた臓器・組織を用いて、種々の酸化的ストレスのマーカーについて、発がん性評価に応用可能かどうか検討した。

腎発がん物質の $KBrO_3$ を被検物質として実験を行った。雌雄の F344 系 *gpt delta* ラットに $KBrO_3$ を発がん用量の 500 ppm の濃度で 9 週間飲水投与し、投与 1 週間前より抗酸化物質の α -tocopherol (TP)、sodium ascorbic acid (SAA)、mercaptoethane sulfonate (MESA) を各 1% の濃度に混じた粉末基礎飼料を 10 週ま

で自由摂取させた。KBrO₃を投与せず基礎飼料のみを与えた群、および無処置群も設けた。腎の8-OHdGレベルはSAA投与群で雌雄ともにKBrO₃のみの陽性対照群に比べて有意の低値を示した。BrdU標識率は、雄ではいずれの抗酸化物質でも影響なく、雌のSAAおよびMESA投与群で有意に減少した。また、雌雄で*gpt*遺伝子の点突然変異頻度の増加が認められたが、いずれの抗酸化物質も変異頻度に影響を与えなかった。以上より、KBrO₃が誘導する細胞増殖活性ならびに*in vivo*変異原性と酸化的ストレスの関連性は明確とはならなかった。

さらに、雄6週齢のF344系*gpt delta*ラット各群5匹に、2% PBOを、0.1%フェノバルビタール(PB、発がん用量以下))をそれぞれ4、13週間混餌投与し、肝DNA中の8-OHdG量、*gpt*遺伝子突然変異頻度ならびに変異スペクトラムを解析した。その結果、肝重量は何れの投与群においても有意に増加した。8-OHdG量は、PBOの4週間投与群で対照群と比して有意に上昇し、13週間投与群ではさらに顕著な増加が観察された。一方、PB投与群では実験期間を通じて変化は認められなかった。13週間投与群の各群3例について*in vivo* mutation assayを実施したところ、PBO投与群2例の変異頻度が対照群に比して約3~5倍の高値を示した。そのスペクトラム解析の結果、主にAT:TAのトランスバージョン変異の増加が認められた。一方、PB投与群の変異頻度に変化は認められなかった。2% PBOを、0.1%フェノバルビタール(PB)の発がん強度を反映した変異、すなわち閾値を示唆する結果が得られた(西川)。

3) ラットの腎臓における水道水微量汚染物質KBrO₃による各種DNA傷害修復酵素および抗酸化酵素の発現量と酸化的DNA傷害との相関を検討し、*gpt delta*トランスジェニックラットを用いて、KBrO₃と同様に高用量で肝発がん物質1,4-dioxaneの肝*in vivo*変異原性と発がん性を検討した。実験1ではWistarラットに腎発がん物質N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine(EHEN)を0.05%、2週間飲水投与し、その後KBrO₃を0, 0.02, 0.2, 2, 8, 30, 125, 250 ppmの用量で2週間飲水投与し、腎における各種DNA傷害修復酵素および抗酸化酵素の発現を検討した。実験2ではF344ラットに食品から微量に検出される

1,4-dioxaneを0, 2, 20, 200, 2000, 5000 ppmの用量で16週間飲水投与し、肝前がん病変の指標であるGST-P陽性細胞巢の発生を検索して、閾値の有無を検索した。実験3では*gpt delta*ラットに1,4-dioxaneを0, 200, 1000, 5000 ppmの用量で16週間飲水投与し、肝における*gpt*遺伝子の変異頻度とGST-P陽性細胞巢の発生についての閾値の有無を検索した。

その結果、KBrO₃投与ラット腎におけるOgg1、MTH、MYHなどのDNA傷害修復酵素遺伝子およびGPX2、GSTなどの抗酸化酵素遺伝子のmRNA発現量は各群間に有意な差はみられなかったことから、本実験の条件下では、KBrO₃の短期投与は上記の遺伝子のmRNA発現量に影響を及ぼさないことが判明した(実験1)。

さらに、1,4-dioxaneのF344ラット肝における発がん性を検討した結果、GST-P陽性細胞巢の発生は0 ppmに比較して2000 ppmから有意に増加したが、200 ppm以下では差は認められなかった。細胞増殖能は5000 ppm群でのみ有意に増加した(実験2)。1,4-dioxaneの*gpt delta*ラット肝における発がん性と変異原性を検討した結果、肝臓における*gpt*遺伝子の変異頻度は0 ppmに比較して5000 ppmでは有意増加し、1000 ppmでは増加傾向がみられたが、200 ppmでは差は認められなかった。GST-P陽性細胞巢の発生と細胞増殖能は5000 ppmでのみ有意に増加した(実験3)。以上より、1,4-dioxaneの肝発がん性と*in vivo*変異原性両者ともにNOAELが存在することが判明し、閾値の存在が示唆された(鰐淵)。

4) 加熱調理によって発生する発がん性ヘテロサイクリックアミンMeIQxをその発がん用量である100ppmから、公比10として10, 1, 0.1, 0.01ppmの低濃度でA/J雌マウスに経口投与し、肺と大腸における発がん閾値の有無の検討を行った。さらにタバコ煙中の発がん物質であるNNKを腹腔内投与後に低濃度のMeIQxを投与し、その発がん性の閾値がNNKの投与の無い時と変動するかどうかを検討した。その結果、雌A/Jマウス、120匹を6群に分け、1から5群にはMeIQxを100, 10, 1, 0.1, 0.01ppmの濃度で基礎飼料に混じて経口投与し、6群は基礎食のみの対照群とした。実験期間は32週間とし、MeIQxの発がん標的臓器である造血器、肝、肺、大腸を中心に、それぞれの臓器での腫瘍性病変を検討した。その結果、発生した肺腫瘍の発生頻度ならびにマウス1匹あたりの発生個数はMeIQx100ppmまでは、対照群と有意差は認められず、600ppmで発生頻度、個数ともに有意に増加することが明らかになり、MeIQxの肺発がんの閾値は100~600ppmの間に存在することが明らかになった。一方、大腸のACFをみるとその発生頻度ならびに個数は用量依存性に増加し、100ppm投与群で統計学的に有意となり、肺と大腸では

MeIQx の発がん性に関して異なる反応を示した（今井田）。

5) 農薬ピペロニルブトキシド(PBO)の高・中用量投与において選出した酸化ストレス関連遺伝子の発現閾値及び感受性の高い遺伝子の検索を行うため、さらに低用量(0.015、0.0313、0.0625%)における定量的発現解析を実施した。また動物用抗菌剤フルメキン(FL)及び酵素誘導剤β-ナフトフラボン(BNF)については、二段階発がんモデルを用い、肝発がん機序における酸化ストレスの関与を解析した。その結果、PBOのラット肝発がん機序には酸化ストレスが関与することが示唆された。0.125、0.25、0.5および0% PBO投与群に対して遺伝子発現解析より選出した9遺伝子に関してReal time RT-PCR解析を行った結果、全投与群でCyp1a1、UDPGTR-2、GPX-2、Abcc3の遺伝子発現が有意な発現上昇を示した。一方、肝前がん病変マーカーであるGST-P免疫染色では、有意な陽性細胞数と面積の増加は0.25% PBO投与群以上であった。

さらに、PBOによる酸化ストレス関連遺伝子の発現閾値及び感受性の高い遺伝子の解析では、選出した酸化ストレス関連遺伝子(*Akr7a3*、*Nqo1*、*UDPGTR-2*、*Gpx2*、*GR*、*Slc7a5*、*Abcc3*)のmRNA発現変動を確認した結果、最も感受性の高い遺伝子は*Cyp1a1*、*Abcc3*、*UDPGTR-2*であり、その閾値は0.0313%であることが確認できた。動物用抗菌剤フルメキン(FL)及び酵素誘導剤β-ナフトフラボン(BNF)については、マウス(FL)及びラット(BNF)を用いた二段階肝発がんモデルにおいて、前がん病変マーカー(GGT及びGST-P)の増加並びに細胞増殖活性(PCNA)の亢進が認められ、マイクロアレイ解析・定量的遺伝子発現解析の結果から、酸化ストレス関連遺伝子発現の増加が認められた。さらに、肝ミクロソームにおけるROS産生量の亢進が観察され、FL及びBNFの肝発がん過程における酸化ストレスの関与が示唆された(三森)。

In vitro 実験系

DNA修復欠損株とその野生株の一对の細菌株を用いた遺伝毒性試験で、既知変異原物質の低用量域における遺伝毒性の複合影響を検討する。DNAを直接標的とする変異原によってDNAに付加体形成などの損傷が生成しても、DNA修復メカニズムにより突然変異の発現が見られない低用量域が存在するか否かについて詳細に検討する。さらに、複数の変異原による低用量域での加算効果の有無について検討した。

その結果、食品に含まれる変異原として知られているヘテロサイクリックアミン類を用いて、野生株とDNA修復欠損株との間での突然変異頻度を比較することで、上記の生物学的な閾値について検証することを第一の目的とした。さらに、個々の変異原にこのような生物学的な閾値を設定した場合でも、多数の変異原の複合効果によって変異原性が現れる可能性を検証することを第二の目的とした。

6種類の既知の発がん性ヘテロサイクリックアミン類(Trp-P-1、Trp-P-2、Glu-P-1、Glu-P-2、IQ、MeIQ)について、DNA除去修復欠損株のサルモネラ菌TA98、および野生株のTA1978/pKM101(TA1978P)に対する変異原性の検出限界用量を調べ、生物学的な閾値以下と考えられる用量を求めた。次に6種類のヘテロサイクリックアミン類を生物学的閾値以下の用量で混合して、TA1978P株に対して変異原性が現れるか否かを調べた結果、変異原性が検出された。したがってヘテロサイクリックアミン類によるDNA損傷の加算効果によってDNA修復が完全に行われず、変異原性が検出されたと解釈された。このことは仮に個々の変異原にBiological thresholdを設定したとしても、変異原の複合作用についても十分に考慮しないと実際の意味がないことが明らかとなった(太田)。

ヘテロサイクリックアミン以外の変異原6種類について、サルモネラ菌TA100(DNA除去修復欠損株)、およびTA1975P(DNA除去修復野生株)に対する変異原性の検出限界用量を調べて、生物学的な閾値以下と考えられる用量を求めた。次に6種類の変異原を生物学的閾値以下の用量で混合して、TA1975P株に対して変異原性が現れるか否かを調べた結果、対照に比べ統計学的有意差をもって変異原性が検出された。これはDNA除去修復が完全に行われず、変異原性が検出されたと解釈された。前年度にヘテロサイクリックアミン類によるDNA損傷の加算効果について報告したが、類似化合物ではなくても変異原によるDNA損傷には加算性があることが判った。変異原の生物学的な閾値の設定に際しては、複合作用まで考慮しないと実際の意味がないことを明らかにした(太田)。

7) 通常の方法で小核誘発性が観察される用量より低い用量域における小核誘発性を検討した。モデル化学物質として、食パン製造にのみ認められている食品添加物である臭素酸カリウムを用い、低用量域

における小核誘発性を従来の顕微鏡観察による方法とフローサイトメータを用いる方法で比較検討し、低用量域での細胞遺伝学的影響の評価を行った。

その結果、食品中特に加熱食品に生成し、その発がん性が問題視されているアクリルアミドについて検討した。アクリルアミドは小核の誘発性に関しては陰性と陽性の両方の結果が報告されており、ICH ガイドラインに従って試験を実施した。今回は特に低用量域での小核誘発性を通常の蛍光顕微鏡下で観察し、さらにフローサイトメータを用いて1個体あたりの観察細胞数を最大100万細胞まで計数する。まず用量設定のための予備試験を実施した。250 mg/kg および 200 mg/kg の用量で経口投与した場合、マウスは全例死亡した。以上の予備試験結果を考慮し、本試験は最高用量を 100 mg/kg に設定し以下公比 $\sqrt{10}$ で希釈し、7用量を設定した。末梢血を用いたアクリジンオレンジによる超生体染色法で1個体2000個の網状赤血球を観察した。100 mg/kg 投与群では明らかな誘発が観察され、アクリルアミドは染色体に傷をつけるハザード物質であることが明らかになった。一方、3.16 mg/kg 以下の用量では小核の明らかな誘発は観察されなかった。しかしながら、低用量域での誘発の挙動を考えた場合、閾値問題は個体差を考慮した考察が必要であることが示唆される結果であった。小核試験はICH ガイドラインに従った。臭素酸カリウムの投与用量は、予備試験の結果から、最高用量を 100mg/kg とし以下公比2で段階希釈し、溶媒対照群を含む7群を設定し、7週齢の雄性CD-1マウスに経口投与した。投与48時間後採血し、末梢血を用いるアクリジンオレンジ超生体染色法により各マウス2000個の網状赤血球を蛍光顕微鏡下で観察した。同時に各マウスから約100 μ L採血し、フローサイトメータ(FCM)による測定を実施した。顕微鏡観察では、最高用量で明らかな小核誘発が観察され、低用量域では小核の誘発は観察されなかった。FCMでは、観察細胞数を増やすことで、低用量域においても小核を持つ幼若赤血球が有意に増加したが、200,000個以上を観察することで、小核の出現分布は正規分布に近似するようになり、小核誘発をマウス個体単位として考えた時、低用量域での誘発頻度はマウスの個体間バラツキの範囲内であり、有意な小核の増加は観察されなかった。これらの考察を基に、DNA損傷性遺伝毒性物質に関する閾値問題に関する議論を深める事が出来た(林)。

以上をまとめると、*in vivo*では、通常の混餌発がん試験では肝での代謝を受けて発がん性が看過される可能性がある口腔等の発がん物質の検出法、*gpt delta*トランスジェニックラットを用いた農薬の発がん物質の短期検出法を開発し、食品や飲料水に検出される1,4-dioxane (IARC評価でGroup 2B)の*gpt delta*トランスジェニックラットにおける*in vivo*変異原性と肝前癌病変の発生においてそれぞれ生物学的閾値の存在すること、加熱食品に含まれるMeIQxの発がん性の生物学的閾値の肺と大腸における臓器差、PBOのマイクロアレイ解析による遺伝子発現において閾値の存在すること、等を明らかにした。*in vitro*ではサルモネラ菌TA100(DNA除去修復欠損株)、およびのTA1975P(DNA除去修復野生株)に対する変異原性の検出限界用量に多種変異原物質の加算効果があつてNOAELに変動が生じること、KBrO₃の小核試験において2000個の網状赤血球カウントと200,000個に増加させてフローサイトメータ(FCM)による測定の結果、閾値について比較したところ必ずしも後者が正確ではないことを明らかにした。

(2) 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト

Tsuda, H., Iigo, M., Takasuka, N., Ueda, S., Ohshima Y., Fukamachi, K., Shirai, T., Hirano, S., Matsuda, E., and Wakabayashi, K. Possible enhancing activity of diacylglycerol on 4-nitroquinoline 1-oxide induced carcinogenesis of the tongue in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats. Food and Chemical Toxicology 45: 1013-1019, 2007.

Umamura, T., Kuroiwa, Y., Tasaki, M., Okamura, T., Ishii, Y., Kodama, Y., Nohmi, T., Mitsumori, K., Nishikawa, A., Hirose, M.: Detection of oxidative DNA damage, cell proliferation and *in vivo* mutagenicity induced by dicyclanil, a nongenotoxic carcinogen, using *gpt delta* mice. Mutat. Res., 63:46-54, 2007.

Yamaguchi T, Wei M, Hagihara N, Omori M, Wanibuchi H, Fukushima S. Lack of mutagenic and toxic effects of low dose potassium bromate on kidneys in the Big Blue rat. Mutat Res 2008;652:1-11.

Kang JS, Wanibuchi H, Morimura K, Gonzalez FJ, Fukushima S. Role of CYP2E1 in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in vivo. Cancer Res 2007;67:11141-6.

Matsuda Y, Imaida K, et al. Post-initiation chemopreventive effects of dietary bovine lactoferrin on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis in female A/J mice. Cancer Letters, 246:41-46, 2007.

Yokohira M, Imaida K, et al. Bioassay by intratracheal instillation for detection of lung toxicity due to fine particles in F344 male rats. *Exp Toxicol Pathol.* 58: 211-221, 2007.

Matsuda Y, Imaida K, et al. Overexpression of CYP2A6 in Human Colorectal Tumors. *Cancer Sci.*, 98: 1582-1585, 2007.

Muguruma, M., Mitsumori, K. Et al., Possible involvement of oxidative stress in piperonyl butoxide induced hepatocarcinogenesis in rats. *Toxicology.* 236: 61-75 (2007).

Kenmochi, Y., Mitsumori, K. et al., Reactive Oxygen Species are Possible Involved in the Mechanism of Flumequine-induced Hepatocarcinogenesis in Mice. *J. Toxicol. Pathol.* 20, 55-64 (2007).

Dewa, Y., Mitsumori, K. et al., β -Naphthoflavone enhances oxidative stress responses and the induction of preneoplastic lesions in a diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis model in partially hepatectomized rats. *Toxicology.* 244, 179-189 (2008).

Ohta, T., Additive mutagenic effects of DNA damages induced by multiple mutagens at virtually non-mutagenic dose level of each. *Genes Environ.*, 29, 141-145 (2007)

Watanabe-Akanuma, M., Y, Inaba, and T. Ohta, Mutagenicity of UV-irradiated maltol in *Salmonella typhimurium*. *Mutagenesis*, 22, 43-47 (2007)

(3) 特許及び特許出願の数と概要
特になし

(4) その他 (各種賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等)
特になし

3 今後の問題点等

口腔では食品や食品成分が肝で代謝される前に直接曝露されるために、代謝されない状態で発がん性があっても肝における代謝によって発がん活性を失うものがある。そのような物質は、通常の混餌発がん試験では看過されている可能性がある。そのような物質について、口腔内粘膜と口腔から吸収されて直接全身曝露を来して発がん性・発がんプロモーション作用を示す可能性のある物質の低用量域での発がん性検索システムを構築することを目的として、PKCの活性化物質 DAG について、口腔内にヒトの曝露量に近い量で直接滴下投与した実験において曝露部位から離れた乳腺にプロモーション作用が見出された。さらに DAG の標的である PKC の誘導が乳腺に見られたことは機序の解明につながると考えられる。使用した動物は、乳腺発がん高感受性形質であるために観察されたのか、ある条件下でヒトに外挿出来得るかについては今後の追究が必要である (津田)。

これまで非遺伝毒性発がん物質に分類されながらも高い腫瘍発生率を有する PBO は *gpt delta* ラットを用いた本研究結果から、その *in vivo* 変異原性が明らかとなり、発がん性評価の精密化に本アッセイが有用であることが示唆された。しかし、当該ラットは *gpt* 遺伝子コピー数がハプロイド当たり 8 個と少なく、個体間のばらつきにより統計学的評価が困難な点があり、今後改良すべき課題である (西川)。KBrO₃ による各種 DNA 傷害修復酵素の発現量と酸化的 DNA 傷害との相関を検討し、*gpt delta* トランスジェニックラットを用いて、KBrO₃ と同様に高用量で肝発がん物質 1,4-dioxane の肝 *in vivo* 変異原性と発がん性を検討した研究では、KBrO₃ は 125 ppm から酸化的 DNA 傷害を引き起こしたにもかかわらず (昨年度の結果)、Ogg1, MTH, MYH などの代表的な DNA 傷害修復酵素遺伝子の mRNA 発現量には変化はなかったことから、今後これらの遺伝子の蛋白質レベルの発現量および活性、さらに KBrO₃ 長期投与における発現変化を検討する必要があると考えられる (鰐淵)。

雌 A/J マウスに MeIQx を 100、10、1、0.1、0.01ppm で基礎飼料に混じて経口投与し、発がん標的臓器である造血器、肝、肺、大腸を中心に、それぞれの臓器での腫瘍性病変を検討した結果、MeIQx の肺発がんの閾値は 100~600ppm の間に存在するが、大腸の ACF では 100ppm 投与群で統計学的に有意となり、肺と大腸では NOAEL 値は異なることを明らかにしたことは、発がん物質の臓器特異性を考慮する上で重要な知見となる (今井田)。

酸化的ストレスマーカーとして 8-OHdG の測定を行っているが、この酸化的 DNA 損傷が点突然変異として固定されるか否かについて更なる検討が必要である (三森)。

類似の作用機構を持つヘテロサイクリックアミン類を 6 種類混合した場合、および異なる作用機構で DNA と反応する変異原 6 種類を組み合わせた場合の複合効果について調べた結果、加算効果があること

が明らかになった。しかし、相乗効果は確認されなかったため、安全性評価においては食品中に存在する可能性のある変異原の種類数の推定数を考慮することで複合作用については対処できると考えられた（太田）。

臭素酸カリウムは、食パンの製造にかかる食品添加物であり、一般の食品への展開は禁止されている。この臭素酸カリウムは250ppm濃度での飲水投与でラット腎に腫瘍を誘発することが報告されているが、250ppmの濃度と小核の誘発との関連において、生物学的な閾値の問題を考察する必要があると思われる（林）。