

平成26年度 食品健康影響評価技術研究 成果発表会

日時：平成26年9月26日（金）
14：00～16：30

場所：食品安全委員会 中会議室
（東京都港区赤坂5-2-20
赤坂パークビル22階）

～ プログラム ～

ページ

- (1) アルセノシュガー、アルセノリピッドを含有する食品摂取による健康リスク評価
(主任研究者：圓藤 吟史)
14：05～14：50 1
- (2) ラットにおける遺伝毒性・反復投与毒性併合試験法の開発
(主任研究者：西川 秋佳)
14：50～15：35 31
- (3) 食品を介するリステリア感染症に係わる高病原性リステリア株の評価と生体側の要因を加味した食品健康影響評価に関する研究
(主任研究者：五十君 静信)
15：35～16：20 53

アルセノシュガー、アルセノリピッドを含有する食品摂取による健康リスク評価 圓藤 吟史 (えんどう ぎんじ)



大阪市立大学大学院医学研究科 産業医学分野 教授

1981年 3月 名古屋市立大学医学部卒業
1983年 4月 大阪市立大学助手 (医学部衛生学講座)
1987年 10月 大阪市立大学講師 (医学部環境衛生学講座)
1989年 3月 大阪市立大学医学博士取得
1990年 4月 大阪市立大学助教授 (医学部環境衛生学講座)
1993年 4月 大阪市立大学教授 (医学部環境衛生学講座) (現職)
2002年 4月 大阪市立大学大学院教授 (医学研究科産業医学分野) (現職)

日本産業衛生学会 (理事長)、日本産業精神保健学会 (理事)、内閣府食品安全委員会 (専門委員)、大阪労働局 (労働衛生指導医)、日本医師会産業保健委員会 (委員)、大阪府医師会産業保健医部会 (副部会長)

<研究成果概要>

アルセノシュガー (AsSugs) あるいはヒ素脂質 (AsLipid) を含有する食品を摂取することによるヒ素の健康リスクを評価するために研究を行った。

「食用海産動植物に含まれるAsSugs、AsLipidの効果的な抽出法の検討」においては、ワカメを用いた酵素処置による抽出法を検討したところ、セルラーゼとアルギン酸リアーゼによる細胞壁分解とエタノール抽出で高い回収率を得た。なお、脂溶性ヒ素化合物の抽出のためにFolch法を使用した。

「AsSugsとその中間代謝物の化学合成」においては、主な海産食品中のヒ素化合物であるAsSug328の合成を試み、9つの反応ステップからなるAsSug328と、有毒な中間代謝物であるジメチルモノチオアルシン酸 (DMMTA) の合成法を確立した。

「食品中のAsSugsの化学形態と定量分析」においては、ワカメ中のAsSugsの同定はLC/MS/MSとLC-TOF-MSを用いて行い、ワカメ、カタクチイワシ及びマグロ中のヒ素化合物の定量はHPLC-ICP-MSを用いてヒ素形態別分析を行った。

「ボランティアへのAsSugs含有食品摂取と尿中代謝物の出納」においては、5人のボランティアにワカメを摂取させ、LC-TOF-MSとHPLC-ICP-MSにより尿中ヒ素化合物の同定と定量を行った結果、ヒ素摂取量0.06mgのうち、尿に30%が排出されたことが確認された。また、尿にジメチルアルシン酸 (DMA)、オキシジメチルアルシニルエタノール (オキシDMAE)、オキシジメチルアルセノアセテート (オキシDMAA) とチオDMAEが特定された。

「動物におけるAsSugsとその中間代謝物の安全性評価」においては、gpt deltaラットを用いて、in vivo突然変異試験を実施した結果、DMA及び亜ヒ酸投与で有意な点と欠失突然変異は誘発されなかった。また、DMMTAが尿中から膀胱上皮細胞内に取り込まれることが確認された。

「培養細胞を用いたAsSugs由来の中間代謝物の試験管内の分析」においては、ヒ素代謝物質の細胞障害性試験はMYP3と1T1細胞を用いて行った。無細胞試験管内でAsSugsから有毒な代謝物質の代謝を明らかにした。代謝物質の分析はHPLC-ICP-MSとHPLC-TOF-MSを用いて行った。その結果、DMMTAは最も有毒なヒ素代謝物質で、DMMTAのLC50 (半数致死濃度) はMYP3細胞が4.6 μ M、1T1細胞が5.4 μ Mであった。DMMTAはグルタチオン (GSH) との反応によりDMMTA-SG結合体に変化し、次に硫黄原子を含んだ三価のジメチル化ヒ素と硫化水素に変化した。

「食品摂取による発がんリスクの低減法の検討」においては、遺伝子毒性テスト、動物実験による無機と有機のヒ素化合物の毒性、疫学的調査研究、国際機関による評価について情報収集を行い、知見を取りまとめた。これらの知見は、食品安全委員会における食品中のヒ素のリスク評価書作成に活用された。

アルセノシュガー、アルセノリピッド を含有する食品摂取による健康リスク評価

主任研究者	圓藤吟史	大阪市立大学大学院医学研究科産業医学
分担研究者	山中健三	日本大学薬学部環境衛生学
分担研究者	花岡研一	水産大学校水産学研究科
分担研究者	鰐淵英機	大阪市立大学大学院医学研究科都市環境病理学
分担研究者	畑 明寿	千葉科学大学危機管理学部

ヒ素及び主なヒ素化合物

- ヒ素 (arsenic, As): 半金属元素で, 食品, 水, 土壌及び大気に広く存在する
- ヒ素の分類
 1. 単体ヒ素: 灰色, 黄色, 黒色の三種の同素体
 2. 無機ヒ素化合物
 3. 有機ヒ素化合物

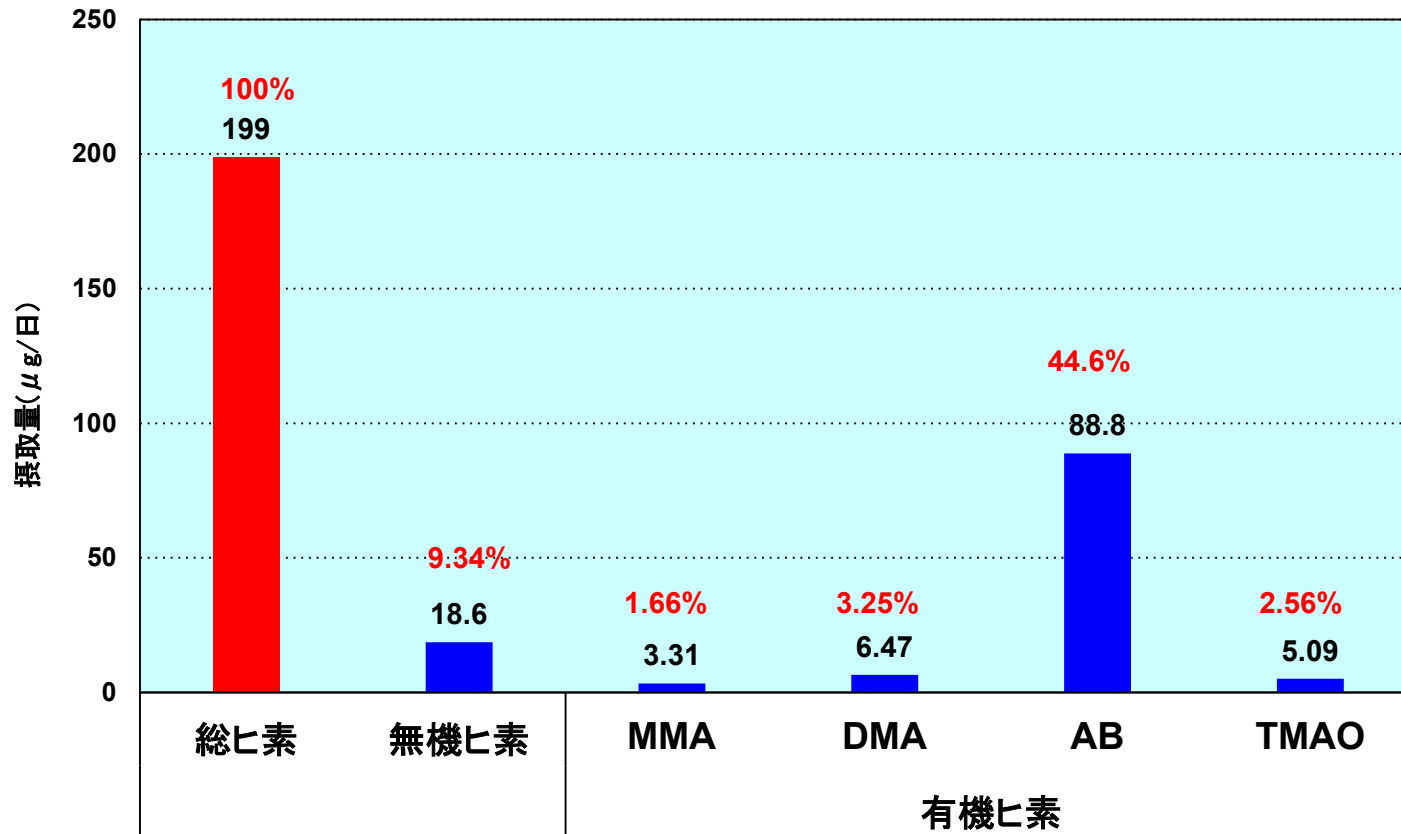
無機ヒ素化合物	
Arsenic trioxide	As_2O_3
Arsenous acid (Arsenite)	As^{III}
Arsenic pentoxide	As_2O_5
Arsenic acid (Arsenate)	As^{V}

有機ヒ素化合物	
Monomethylarsonic acid	MMA^{V}
Monomethylarsonous acid	MMA^{III}
Dimethylarsinic acid	DMA^{V}
Dimethylarsinous acid	DMA^{III}
Trimethylarsine oxide	TMAO
Dimethylmonothioarsinic acid	DMMTA
Arsine	AsH_3
Arsenobetaine	AsB
Arsenosugar	AsSug
Arsenolipid	AsLipid

ヒ素のヒトへのばく露経路

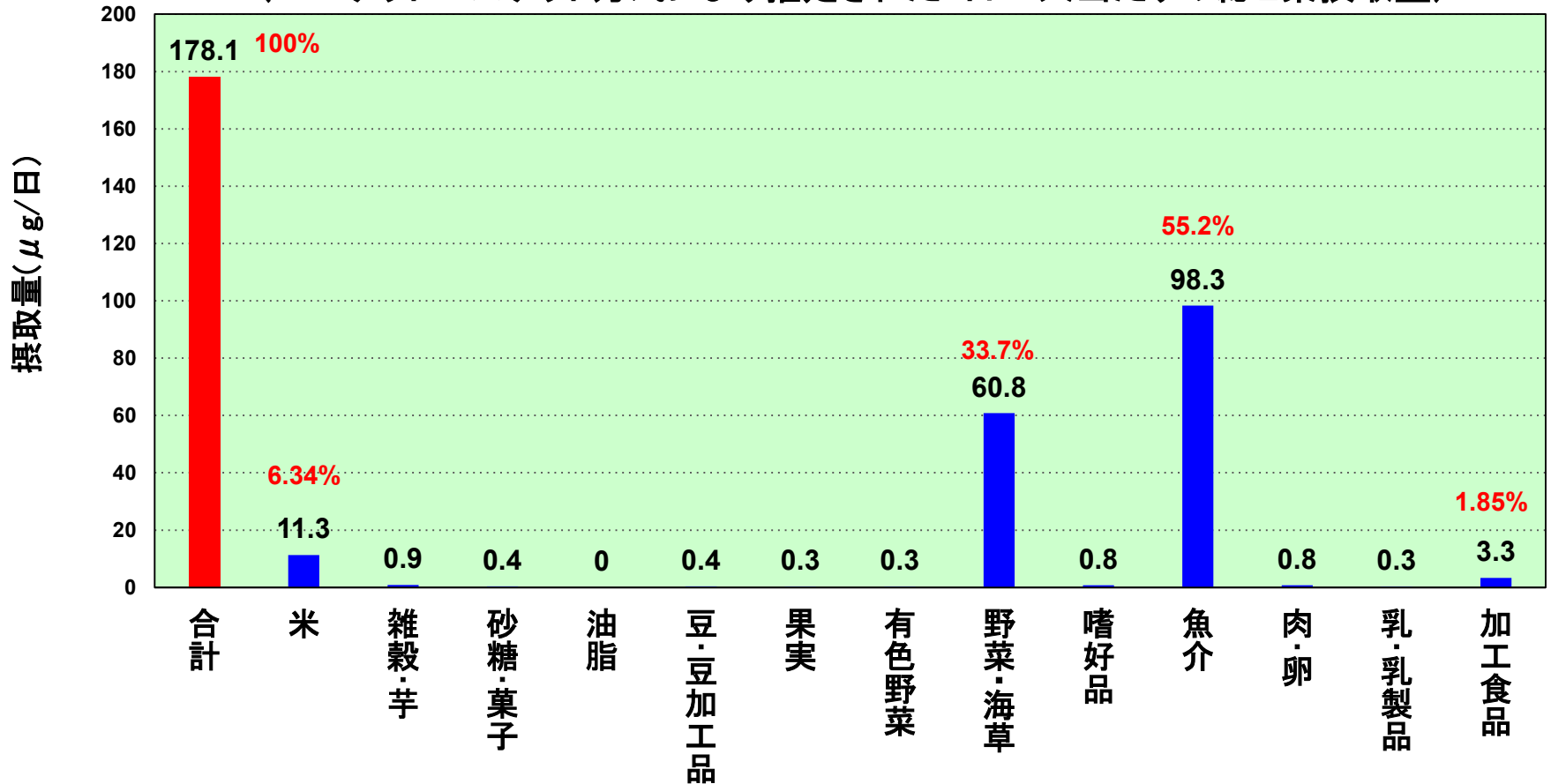
(1日・1人当たりのヒ素化合物摂取量)

- ❖ 主として飲料水及び食物を摂取することによる経口ばく露
- ❖ 呼吸による大気からの吸入ばく露:わずか



食物中のヒ素

(マーケットバスケット方式により推定された1日・1人当たりの総ヒ素摂取量)



❖ 食物中に含まれるヒ素の化学形態は食物の種類によって異なるが、ヒ素を多く含むのが魚介類及び海藻類である。

- ・ ヒジキ: 5価の無機ヒ素化合物
- ・ その他の海藻類及び魚介類:
AsBe、DMA^V、アルセノシュガーおよびアルセノリピッド

(平成 14~23年度厚生労働科学研究の結果を元に、農林水産省が計算)

ヒ素の毒性

➤ ヒ素の毒性は化学形態や化学構造の違いにより異なる.

マウスにおける経口LD₅₀

- ・ As₂O₃: 39 mg/kg
- ・ MMA^V: 916mg/kg
- ・ DMA^V: 648mg/kg
- ・ AsBe: 10g/kg

➤ 無機ヒ素化合物 > 有機ヒ素化合物、3価ヒ素 > 5価ヒ素

➤ ヒ素によるヒト健康被害のほとんどは無機ヒ素のばく露が原因

急性ヒ素中毒

急性ヒ素中毒の多くは、服毒自殺や無機ヒ素が混入した飲食物の摂取により起こる

経口:

- 数分から数時間に悪心、嘔吐、腹痛、下痢等の急性胃腸症候群が出現する
- 重篤な場合: 著明な腹痛、激しい嘔吐、水溶性下痢をきたし、脱水によるショック、筋痙攣、心筋障害、腎障害が出現し、早い場合には24時間以内に循環不全で死亡する
- 筋の委縮、運動失調、上下肢末端の知覚異常を伴う末梢神経障害や多発神経炎

経気道(アルシingasへのばく露):

急性溶血症状、吐き気、嘔吐、頭痛、腹痛、血尿、黄疸

慢性ヒ素中毒(非腫瘍性病変-1)

主にヒ素に汚染された飲料水を長期間飲用した地域の住民で報告されている

- 一般症状: 脱力感, 易疲労感, 食欲減退, 体重減少, 易刺激性
- 皮膚病変: ヒ素の長期暴露の最も鋭敏なエンドポイント接触皮膚炎
 1. ヒ素黒皮症(色素沈着)
 2. 色素脱失
 3. 手掌足底の角化症



色素沈着・脱失



角化症

慢性ヒ素中毒(非腫瘍性病変-2)

➤ 血管障害:

- 末梢血管炎症:先端紫藍症, レイノー現象
- 烏脚病:台湾風土病、ヒ素慢性曝露による重度の閉塞性動脈硬化症
- 井戸水のヒ素濃度と飲用期間に相関して虚血性心疾患、脳血管系障害がみられた

➤ 貧血

➤ 門脈性肝硬変

➤ 腎障害

➤ 経気道曝露:

- 鼻中隔:炎症、びらん、壊死→穿孔
- 慢性気管支炎



わが国の主なヒ素中毒事件

➤ 森永ヒ素ミルク中毒事件(1955年)

製造工程でヒ素が混入され、130名が死亡し12000人が被害を受けた

➤ 宮崎県土呂久地区(1972年)・島根県笹ヶ谷地区の慢性ヒ素中毒症(1974年)

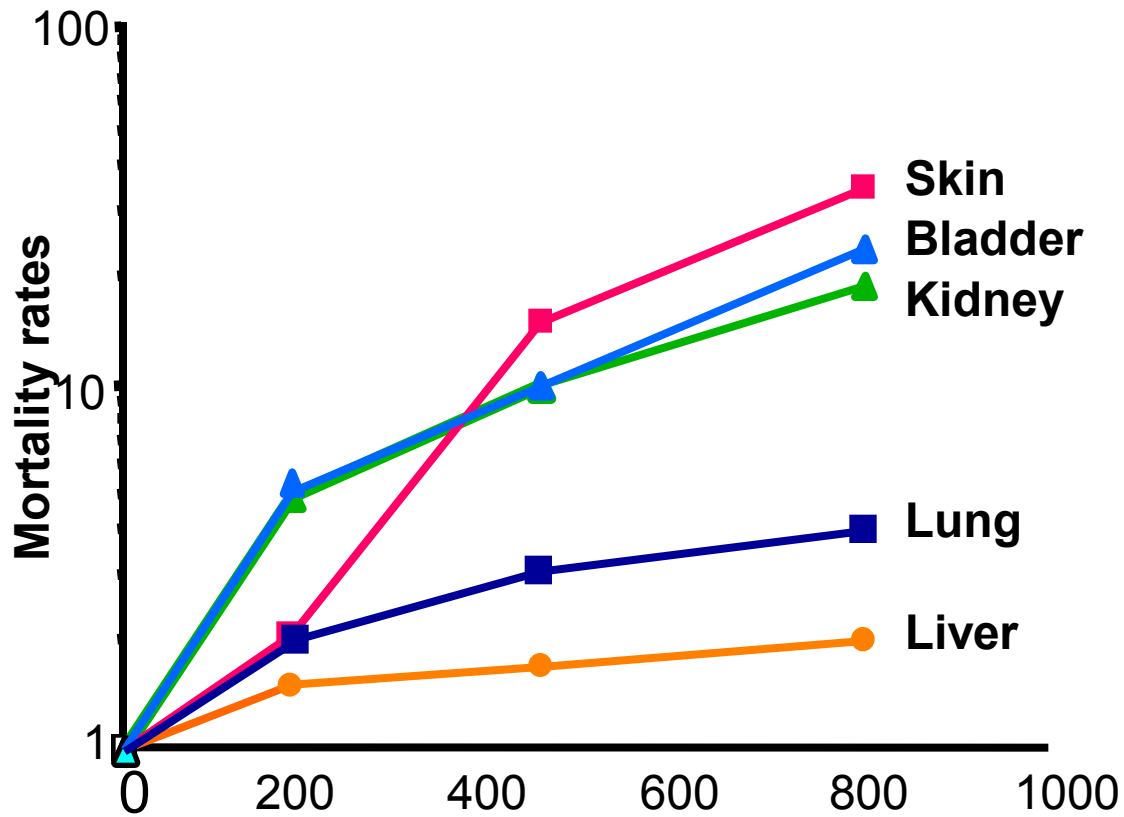
ヒ素鉱山による慢性ヒ素中毒症で、公害被害者救済法の指定を受けた

➤ 和歌山ヒ素事件(1998年)

自治会の夏祭りで亜ヒ酸がカレーに混入され、4人が死亡、63人が急性ヒ素中毒になった。

ヒ素の発がん性

皮膚がん、肺がん、膀胱がんなどの発生↑



井戸水中ヒ素濃度 (µg/liter)

癌死亡の割合, 1973-1986, 台湾烏脚病多発地域

ヒ素の発がん性

- ❖ ホーレル水で1年以上治療した患者に皮膚がん発生
- ❖ 砒素汚染井戸水の飲用による皮膚がんの多発(アルゼンチン・コルドバ地方、台湾・南西地区)
- ❖ 職業曝露
 - 銅精錬所作業者の肺がん(アメリカ)
 - 砒素含有金鉱山の労働者の肺がん(南アフリカ)
 - ブドウ栽培労働者の肝がん(ドイツ)

ヒ素の発がん性の問題

International Agency for Research on Cancer
(IARC、1987年)

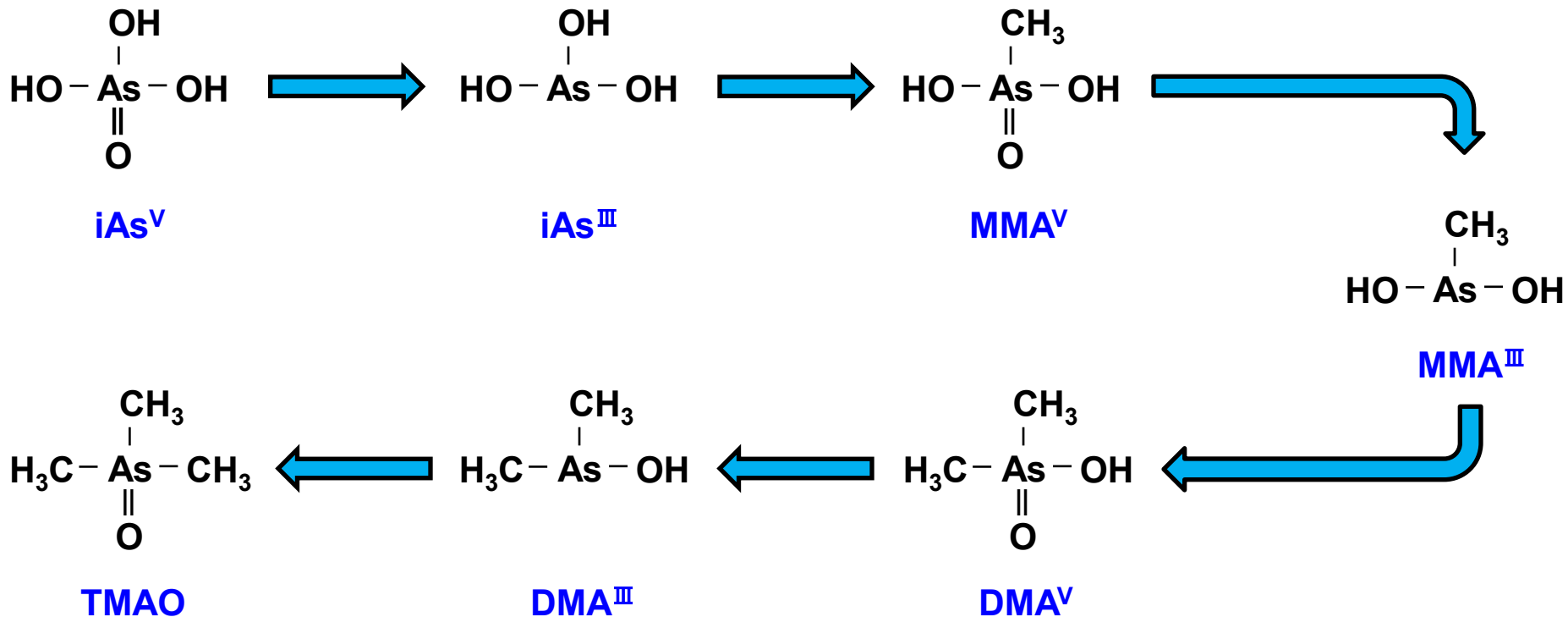
疫学的にヒ素ばく露と発がんの
因果関係は明確である



実験動物におけるヒ素の発がん性
はまだ明確ではない。

動物モデルによる発がん機序解明
が項目

無機ヒ素とヒトの皮膚がん、肺がんとの因果関係を
認める評価を下す



iAs^V: arsenate

iAs^{III}: arsenite

MMA^V: monomethylarsonic acid

MMA^{III}: monomethylarsonous acid

DMA^V: dimethylarsonic acid

DMA^{III}: dimethylarsonous acid

TMAO: trimethylarsine oxide

無機ヒ素の代謝経路

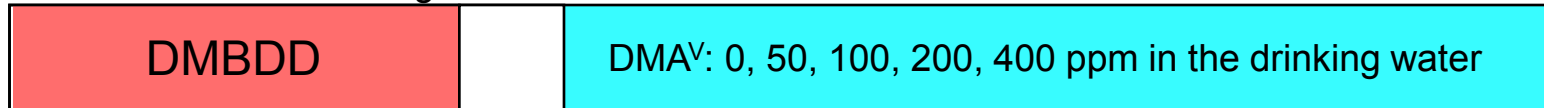
ヒ素化合物の培養細胞に対する毒性

	As ^V	As ^{III}	MMA ^V	DMA ^V	TMAO	AsBe
毒性	+++	++++	++	+	±	-
核分裂阻止	+	-	+++	++	+	-
4倍体形成	-	-	-	++	++	-
変異原性	-	-	-	-	-	-

DMA^Vの発がん修飾作用の検討 (ラット中期多臓器発がん性試験法)



Initiation with five carcinogens

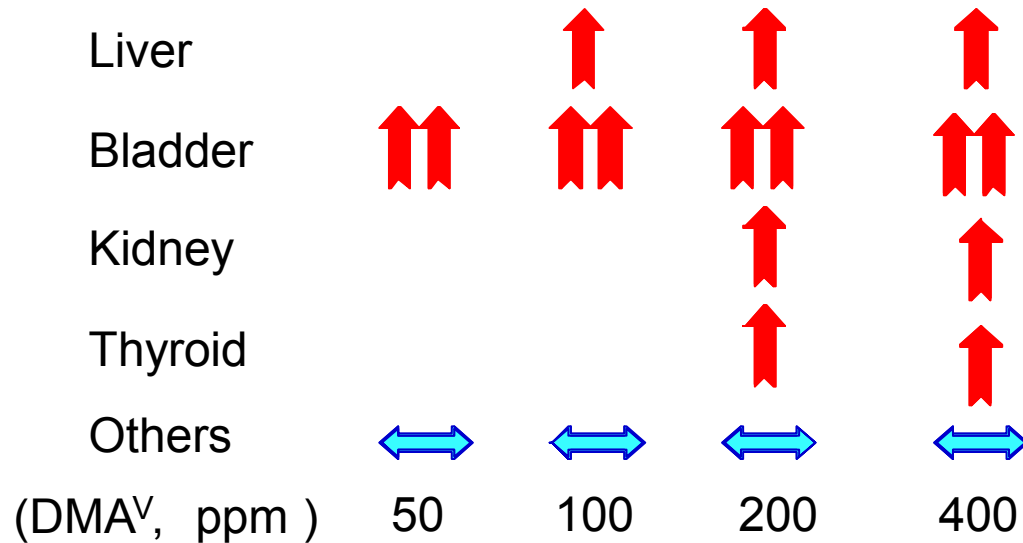


Target organs of DMBDD (DEN, MNU, BBN, DMH, DHPN)

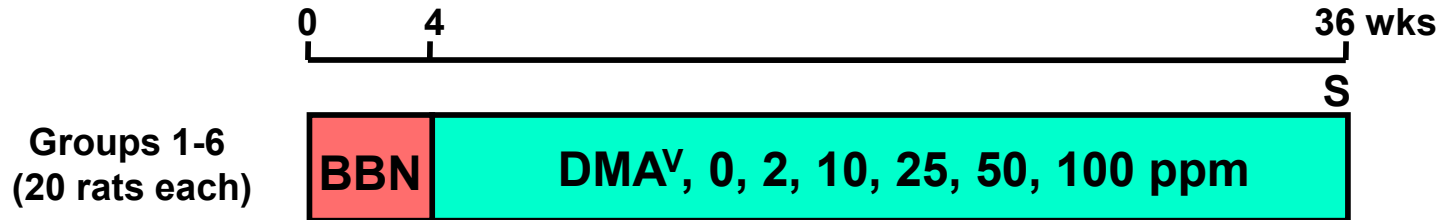
DEN: Liver, kidney; MNU: Forestomach, mammary gland, urinary bladder, thyroid

BBN: Urinary bladder; DMH: Intestinal tract; DHPN: Lung, kidney, thyroid

Enhancement of carcinogenesis by DMA^V (v.s. 0 ppm DMA^V group)



DMAの膀胱発がん修飾作用の検討 (ラット二段階膀胱発がんモデル)

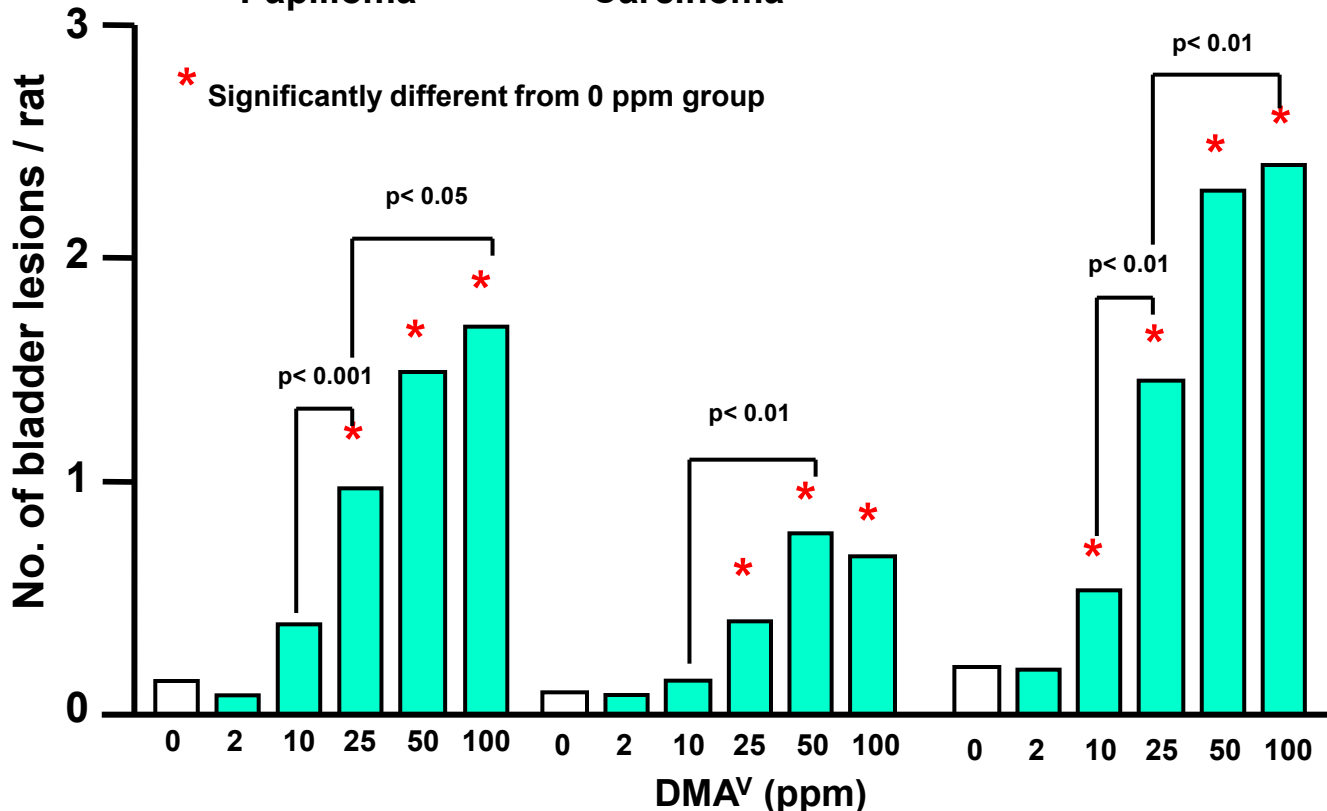


Animal: Male F344 rats, 6-week-old

Papilloma

Carcinoma

Tumor
(papilloma + carcinoma)

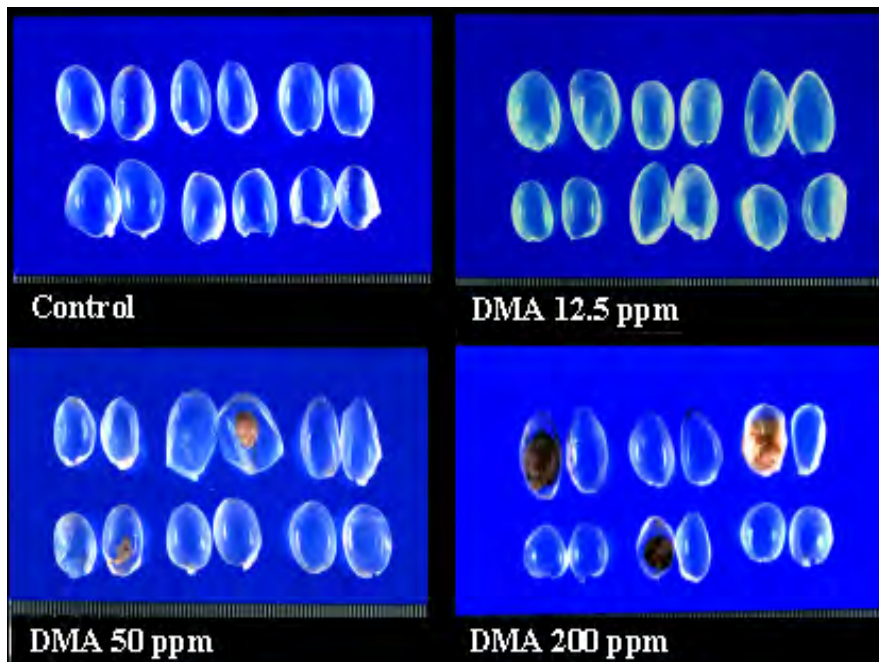


DMA^V の膀胱発がん性の証明 (2年間発がん性試験)

0 104 Wks

DMA^V (0, 12.5, 50, 200 ppm in drinking water)

Animal: 10-week-old, 144 male F344 rats



Incidence of urinary bladder tumors

DMA ^V (ppm)	Incidence(%)		
	Papilloma	Carcinoma	Total
0	0	0	0
12.5	0	0	0
50	2 (6)	6 (19)*	8 (26)*
100	2 (6)	12 (39)*	12 (39)*

*: Significantly different from 0 ppm group.

Macroscopic view of urinary bladders

ラット膀胱がんにおける各ヒ素化合物のプロモーション作用および尿中ヒ素代謝物との相関関係の検討



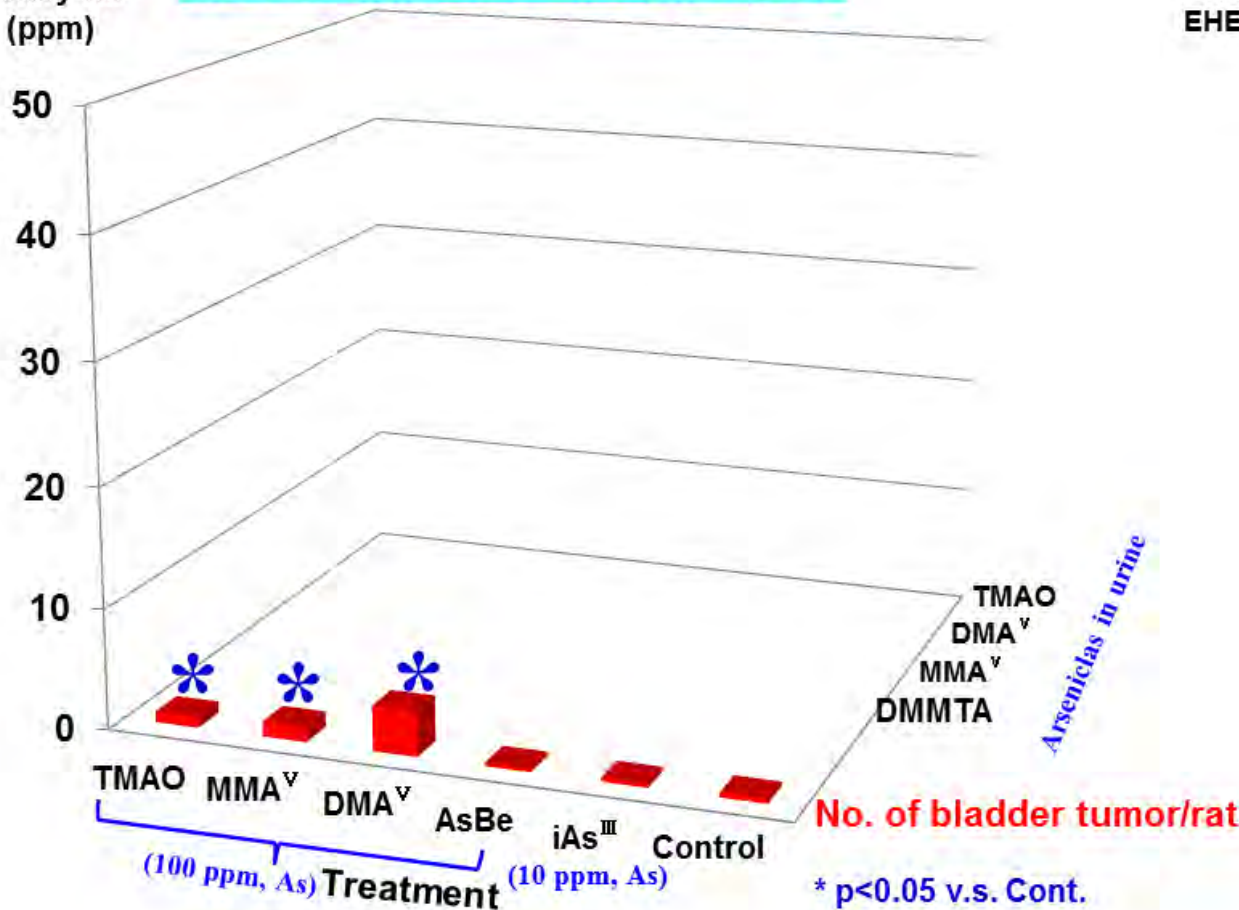
Groups 1-6
(15)



膀胱腫瘍数と尿中ヒ素代謝物濃度

Animals: F344 rat, male, 6-week-old,
BBN: N-Butyl-N (4-hydroxybutyl) nitrosamine
EHEN: N-ethyl-N-hydroxyethyl nitrosamine

Urinary As
(ppm)



ラット膀胱がんにおける各ヒ素化合物のプロモーション作用および尿中ヒ素代謝物との相関関係の検討

0 4 6 8 38 wks

Groups 1-6
(15)

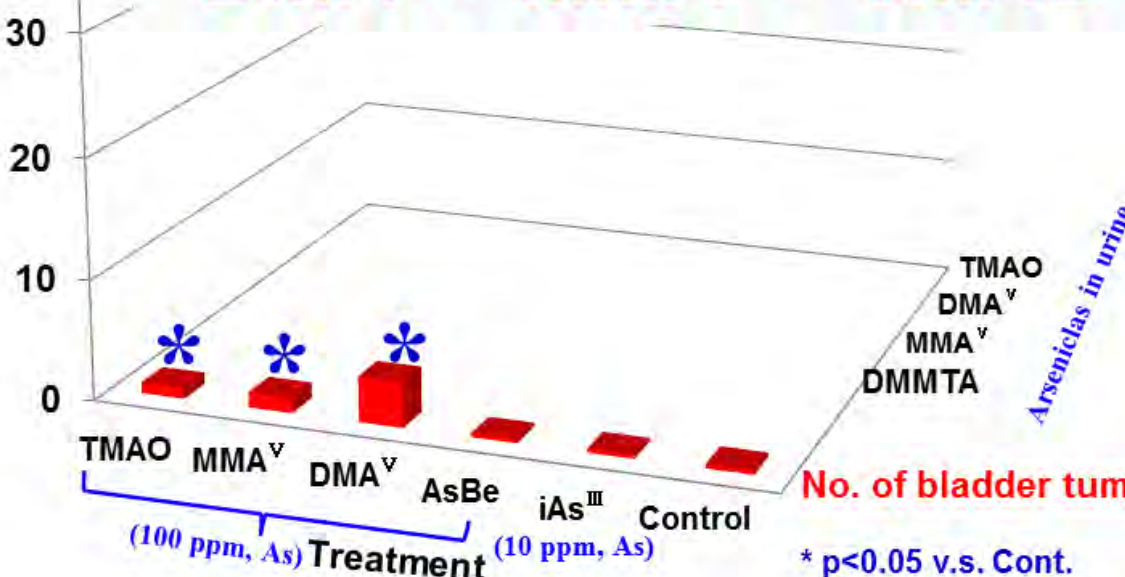


膀胱腫瘍数と尿中ヒ素代謝物濃度

Animals: F344 rat, male, 6-week-old,
BBN: N-Butyl-N (4-hydroxybutyl) nitrosamine
EHEN: N-ethyl-N-hydroxyethyl nitrosamine

Urinary As
(ppm)

DMA^V > MMA^V > TMAO



No. of bladder tumor/rat

* p<0.05 v.s. Cont.

ラット膀胱がんにおける各ヒ素化合物のプロモーション作用および尿中ヒ素代謝物との相関関係の検討



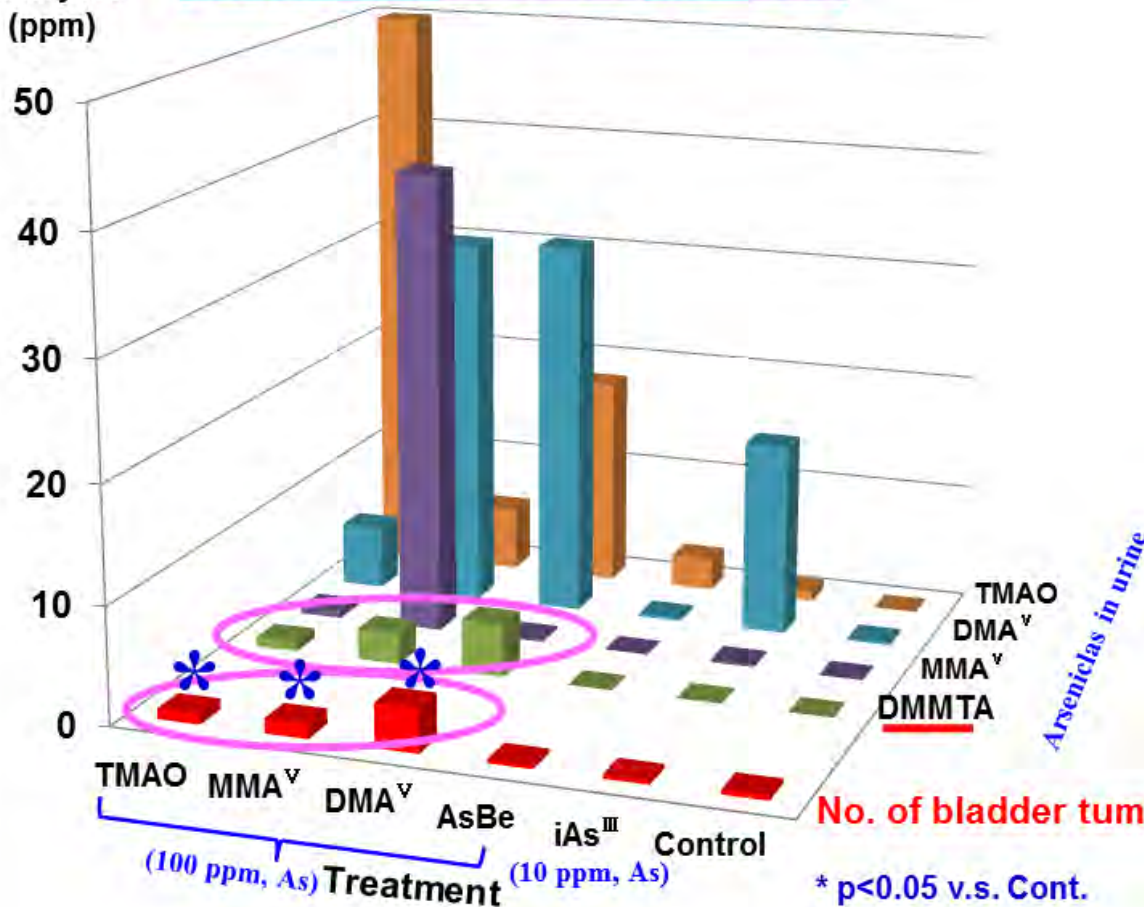
Groups 1-6
(15)



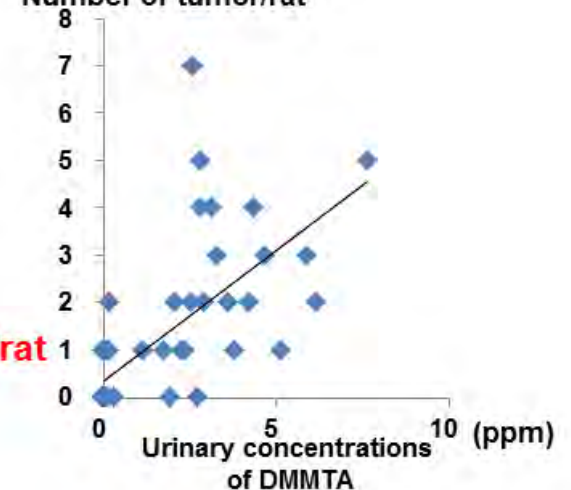
膀胱腫瘍数と尿中ヒ素代謝物濃度

Animals: F344 rat, male, 6-week-old,
BBN: N-Butyl-N (4-hydroxybutyl) nitrosamine
EHEN: N-ethyl-N-hydroxyethyl nitrosamine

Urinary As
(ppm)



Number of tumor/rat



ラット膀胱がんにおける各ヒ素化合物のプロモーション作用および尿中ヒ素代謝物との相関関係の検討

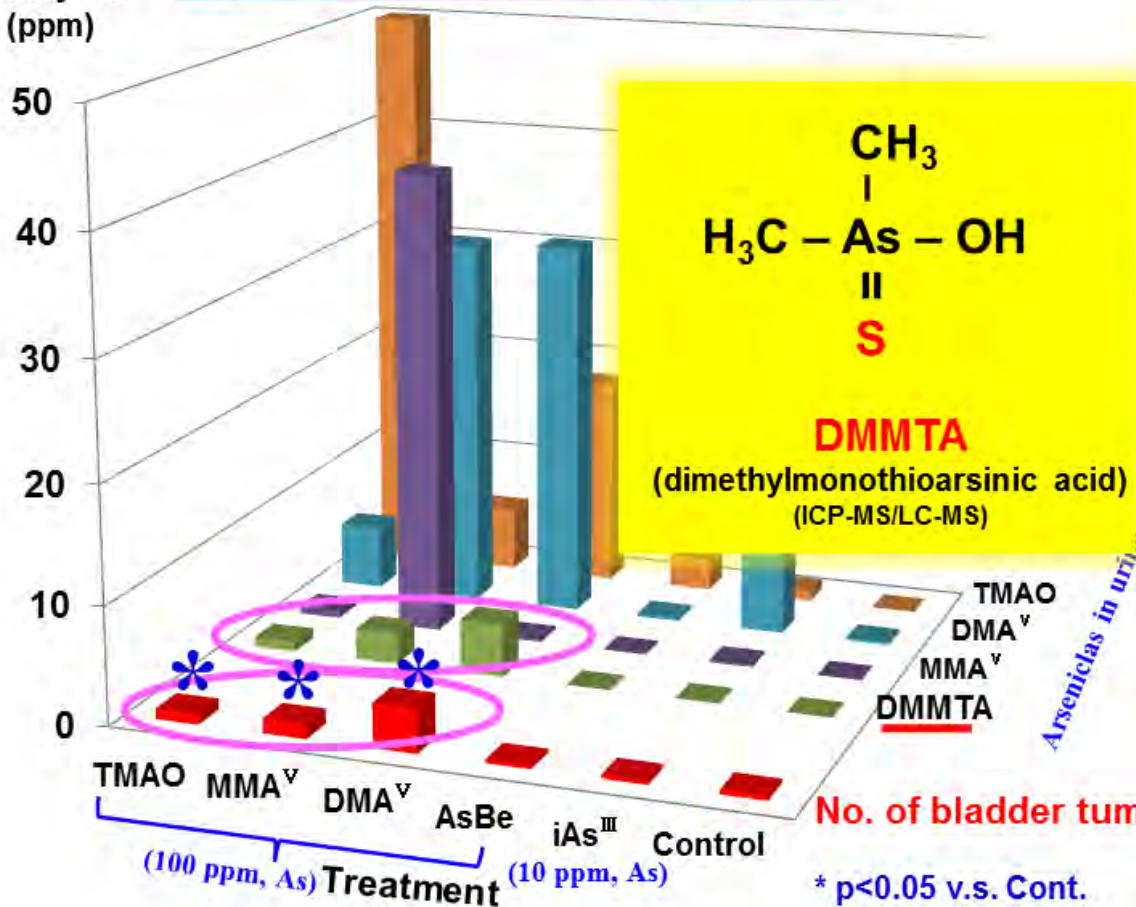


Groups 1-6
(15)

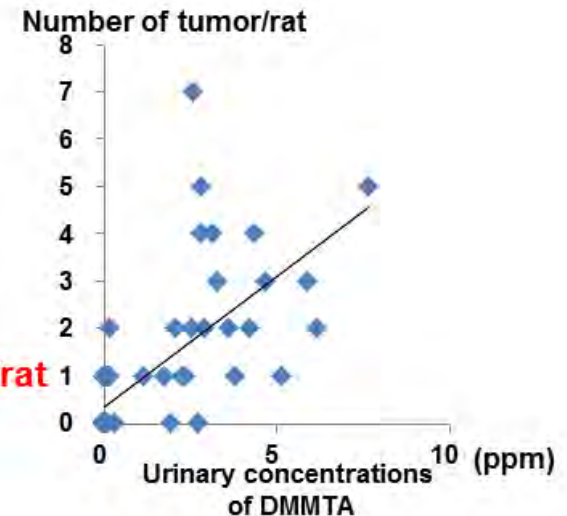


膀胱腫瘍数と尿中ヒ素代謝物濃度

Urinary As
(ppm)



Animals: F344 rat, male, 6-week-old,
BBN: N-Butyl-N (4-hydroxybutyl) nitrosamine
EHEN: N-ethyl-N-hydroxyethyl nitrosamine



ラット膀胱がんにおける各ヒ素化合物のプロモーション作用および尿中ヒ素代謝物との相関関係の検討

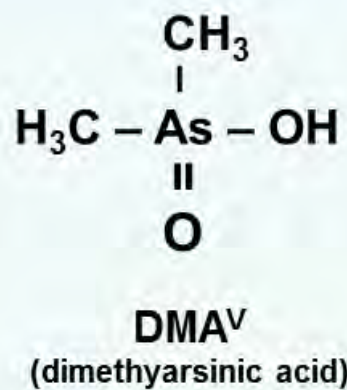
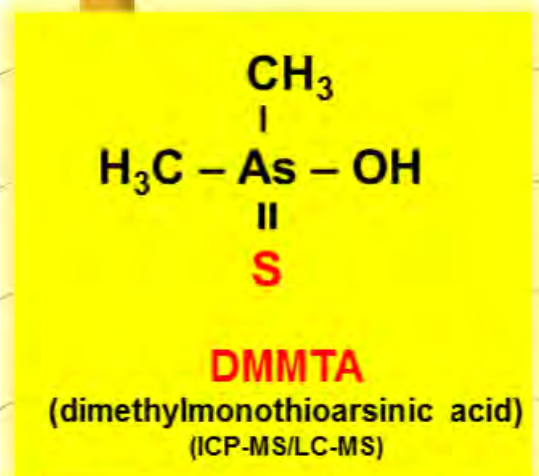
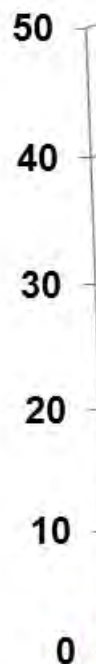


Groups 1-6
(15)



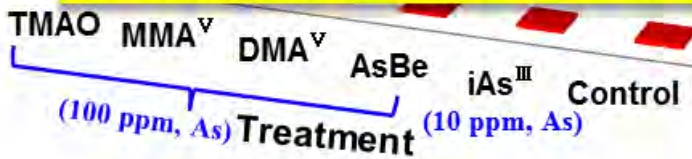
膀胱腫瘍数と尿中ヒ素代謝物濃度

Urinary As
(ppm)

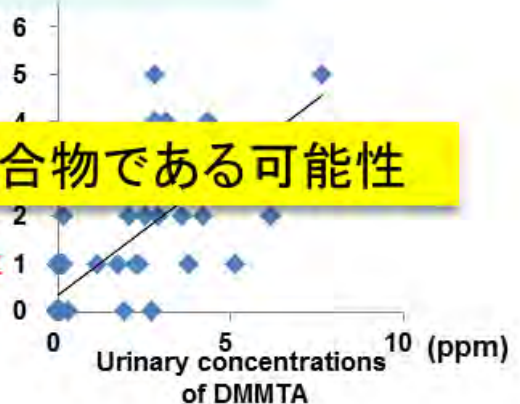


Animals: F344 rat, male, 6-week-old,
BBN: N-Butyl-N (4-hydroxybutyl) nitrosamine
EHEN: N-ethyl-N-hydroxyethyl nitrosamine

DMMTA:膀胱発がんに関連する共通のヒ素化合物である可能性

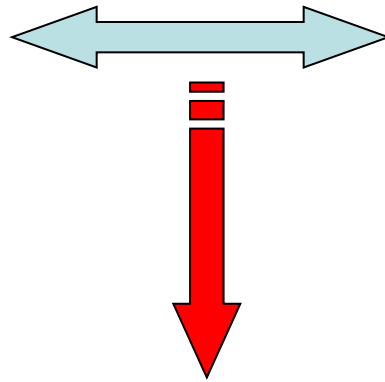


No. of bladder tumor/rat
* p<0.05 v.s. Cont.



ヒ素の発がん性の評価 (IARC, 2004年)

疫学的にヒ素ばく露と発がんの因果関係は明確



実験動物におけるDMA^Vの発がん性は明確

無機ヒ素とヒトの皮膚がん、肺がん、**膀胱がん**との因果関係を認める評価を下す。

日本人が日常的に摂取する食用海産動植物に含有される**アルセノシュガー**および**アルセノリピッド**などの有機ヒ素化合物に対する安全性評価は十分でない

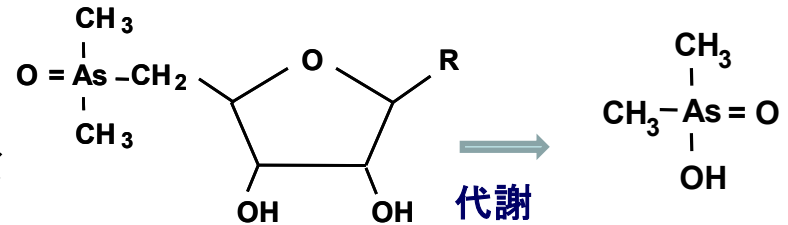
アルセノシュガー(AsSugs)

❖ アルセノシュガーは、褐藻類>紅藻類>緑藻類の高濃度順に多く含まれる

❖ これまでAsSugsそのものについては毒性が低いと報告されてきた

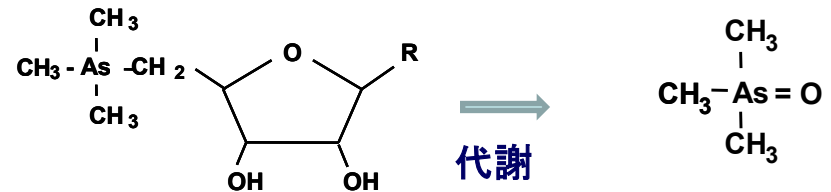
❖ しかし、AsSugsの代謝の過程での作用については明らかでない

❖ AsSugsの大部分は市販の標準がなく、実際の環境試料から抽出、精製、同定作業を行って標準物質を持たないと確実な分析ができない状況にある



ジメチル態12種

ジメチルアルシン酸 (DMA^V)

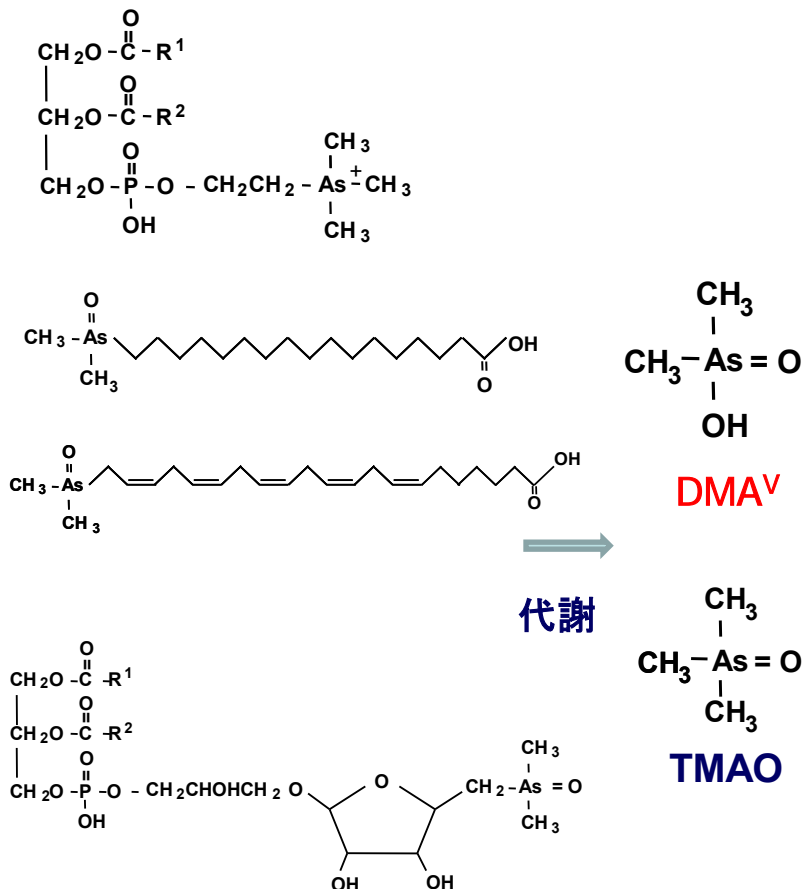


トリメチル態4種

トリメチルアルシンオキシド (TMAO)

アルセノリピッド (AsLipids)

- ❖ AsLipidsは、脂溶性ヒ素化合物の代表的な存在で、海産動植物に普遍的に存在すると予想される
- ❖ 数種類の存在が認められているものの、そのほかは構造解析に至っていない
- ❖ DMA^V、TMAOの生成が予想される
- ❖ しかしながら、これら代謝過程が未解明であり、その安全性についても未だほとんど解明されていない
- ❖ 市販の標準がなく、実際の環境試料から抽出、精製、同定作業を行って標準物質を持たないと確実な分析ができない状況にある

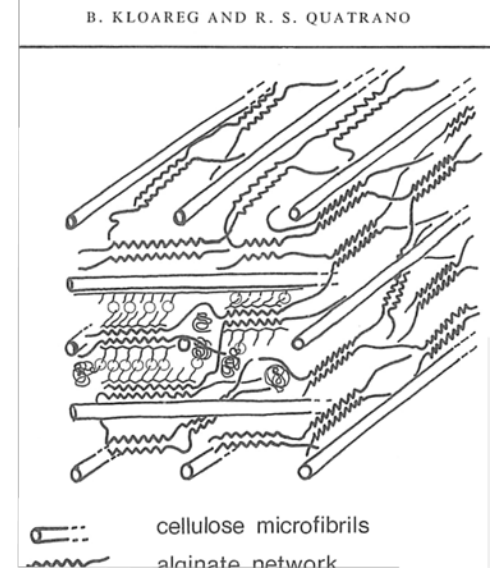


リン脂質型、炭化水素型あるいは脂肪酸型のAsLipids

研究項目

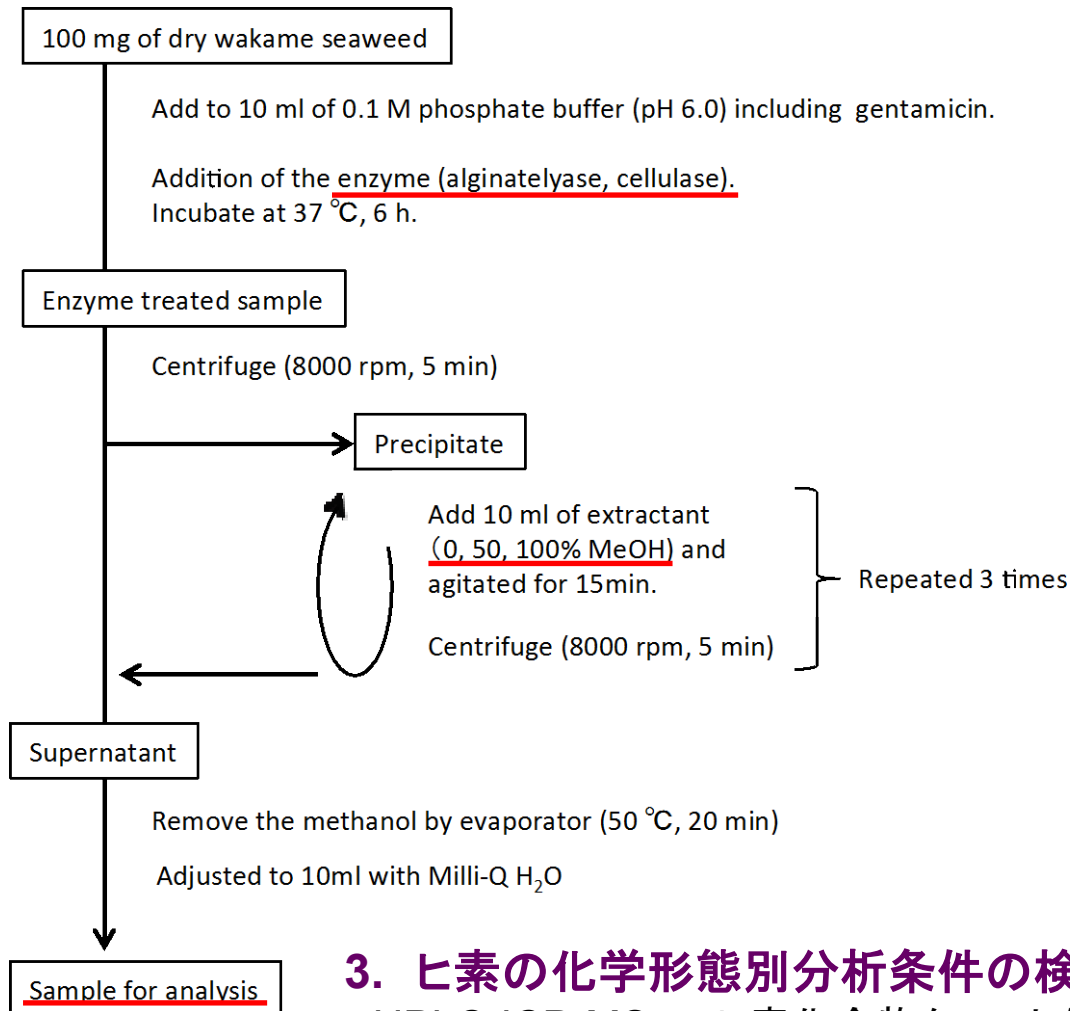
1. 食用海産動植物に含まれるAsSugsおよびAsLipidsの抽出法の検討
2. 食用海産動物に含まれるヒ素化合物の検討
3. AsSugsおよびAsLipidsの標準品の化学合成
4. ボランティアによるAsSugs含有食品摂取と尿中ヒ素代謝物との出納
5. 研究項目5: AsSugsおよびAsLipidsの動物を用いた安全性評価
6. 腸内細菌や培養細胞を用いた代謝と毒性試験
7. 食品摂取によるヒ素の発がんを含めた毒性発現のリスク低減法の検討

- AsSugsは多様な化学形態をとり、海藻に豊富に含まれている。
- 食用海藻に含まれるAsSugsの定量は十分には行われていない。日常的に摂取されているワカメもその1つであり、今回の研究の被験食品とした。
- 先行研究におけるワカメからのヒ素抽出率は5~49%と低い。
- 海藻に含まれるAsSugsの同定と定量を行うためには、①AsSugsの化学形態を壊さない化学的に温和な抽出条件であること、②分析装置の定量感度を満たす十分な濃度が得られることが必要である。
- ヒ素抽出率を高めるため、細胞壁の構造に注目した。
- 褐藻類の細胞壁はセルロース骨格の隙間に粘性多糖類であるアルギン酸が充填され、強固に細胞を保護している。
- この構造がヒ素抽出を妨げている可能性がある。
- 温和な条件で細胞壁を分解するため、アルギン酸とセルラーゼ酵素を用いた検討を行った。



褐藻類 細胞壁構造の仮説モデル
Kloareg et al.(1986)

ワカメからのヒ素抽出条件の検討



1. 酵素処理条件の検討

条件	Alginate lyase	Cellulase
①	-	-
②	-	+
③	+	-
④	+	+

2. 抽出溶媒の検討

0, 50, 100% メタノール

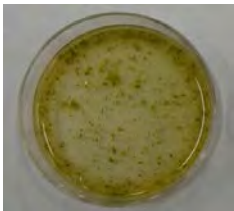
3. ヒ素の化学形態別分析条件の検討

HPLC-ICP-MS ⇒ ヒ素化合物クロマトグラムの取得、ヒ素化合物の定量

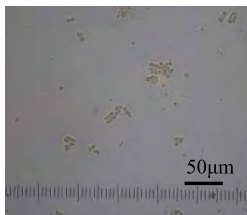
HPLC-TOF-MS ⇒ 未同定ヒ素の同定

各ヒ素化合物を分離でき、ICP-MS、TOF-MSの両方に導入可能なHPLC条件を確立する必要がある

1. 酵素処理条件の検討



A(+), C(-)



A(+), C(+)

両方の酵素処理を行ったサンプル(A(+), C(+))では細胞壁が分解され、細胞の大半が浮遊した状態で観察された。

2. 抽出溶媒の検討

抽出溶媒メタノール濃度による総ヒ素抽出率の変化

MeOH concentration	Percentage of acid digestion (%), Mean ± SD	
	A(-) C(-)	A(+), C(+)
0%	22.5 ± 1.1	48.3 ± 0.5
50%	21.8 ± 0.9	58.7 ± 4.1
100%	28.1 ± 0.2	88.8 ± 8.4

抽出率は粉碎ワカメの湿式灰化サンプルの分析値(25.50 mg/kg dry)を100%として計算

酵素処理による総ヒ素溶出率の変化

Enzyme treatment	Eluted arsenic (mg/kg dry)		Percentage of acid digestion (%)
	Mean	SD	
A(-) C(-)	4.4	0.93	17.1
A(-) C(+)	5.8	0.14	22.5
A(+), C(-)	8.0	0.18	31.1
A(+), C(+)	11.6	0.56	45.0

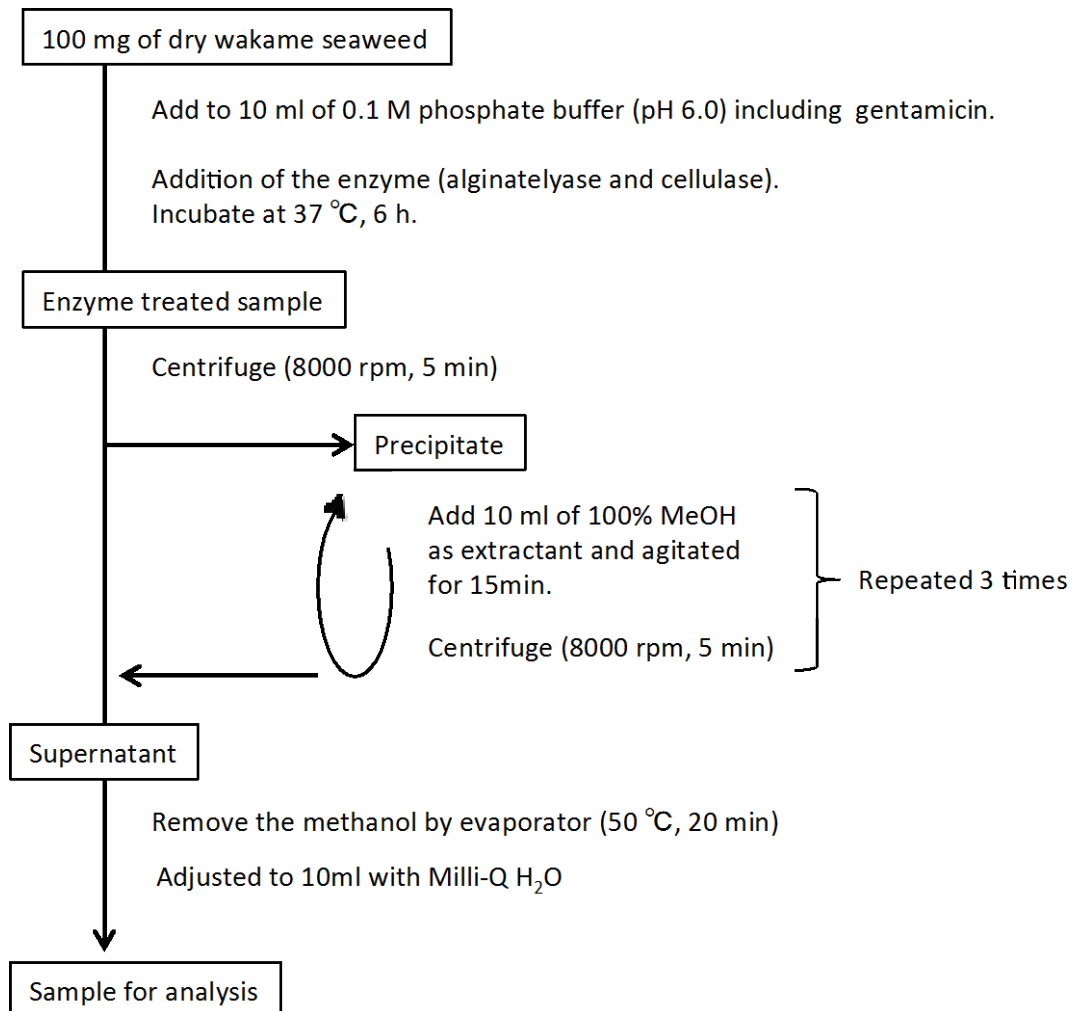
酵素処理溶液中の総ヒ素量
 溶出率は粉碎ワカメの湿式灰化サンプルの分析値(25.50 mg/kg dry)を100%として計算

総ヒ素抽出率が最も高くなった条件

- ・ 酵素処理: アルギン酸リアーゼ & セルラーゼ処理
- ・ 抽出溶媒: 100%メタノール

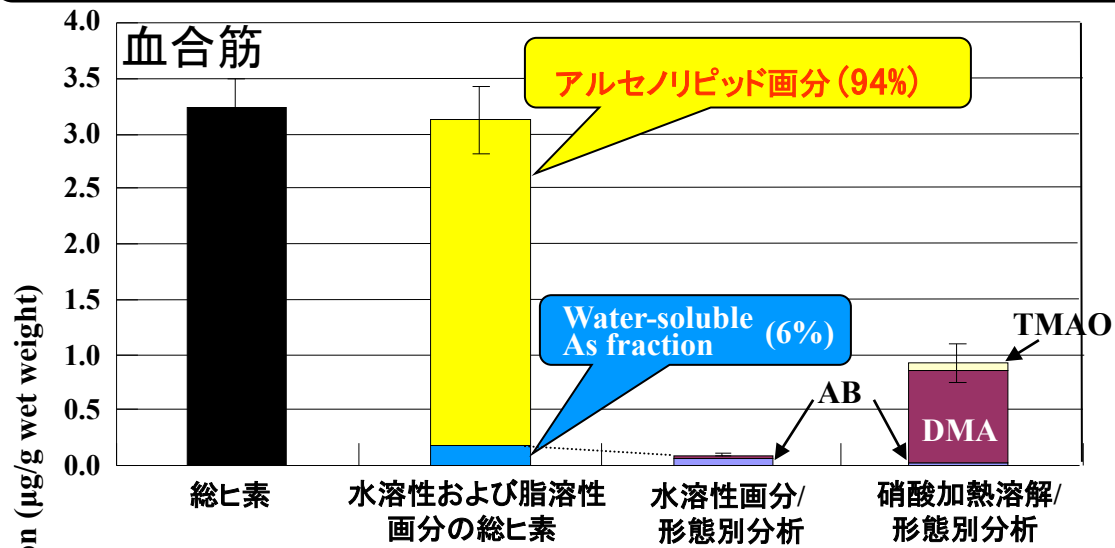
A(+), C(+), 100% MeOH抽出サンプルを化学形態別分析に使用する

ワカメなどの褐藻類における最適ヒ素抽出条件



研究項目1-2: 食用海産動植物に含まれるAsSugs、AsLipidsの抽出法の検討

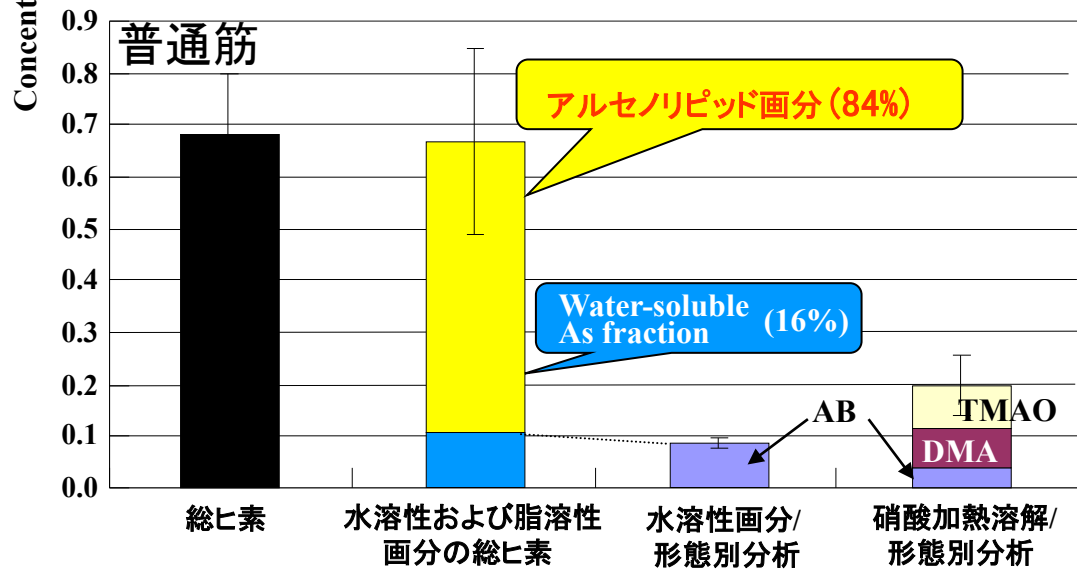
サンマ筋肉に存在するヒ素化合物は主に脂溶性である



サンマ(9月漁獲)の血合筋および普通筋における総ヒ素濃度は、それぞれ3.23±0.26 μg/g (湿重量)および0.68±0.11 μg/g(湿重量)であり、血合筋で5倍程度高かった。

この総ヒ素のうち、血合筋においては約94%、普通筋においては約84%が脂溶性ヒ素化合物画分に検出された。

硝酸加熱溶解/形態別分析の結果、ABの他にDMAおよびTMAOが主要なヒ素化合物として検出された。



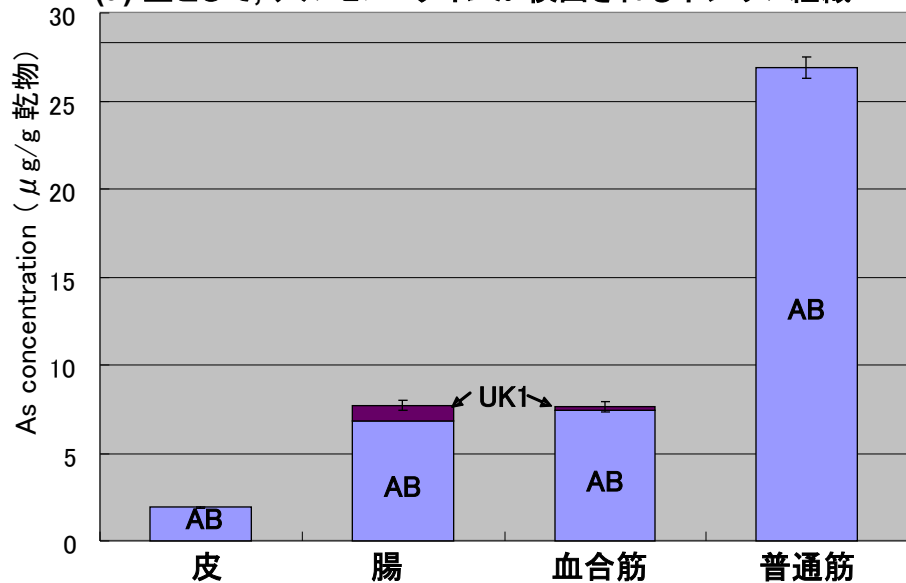
サンマの筋肉に存在するヒ素は、主にDMA含有AsLipidsあるいはTMAO含有AsLipidsとして存在している。

サンマ血合筋および普通筋に存在するヒ素、あるいはそれらの水溶性画分に存在するヒ素の形態別分析 (n=3).

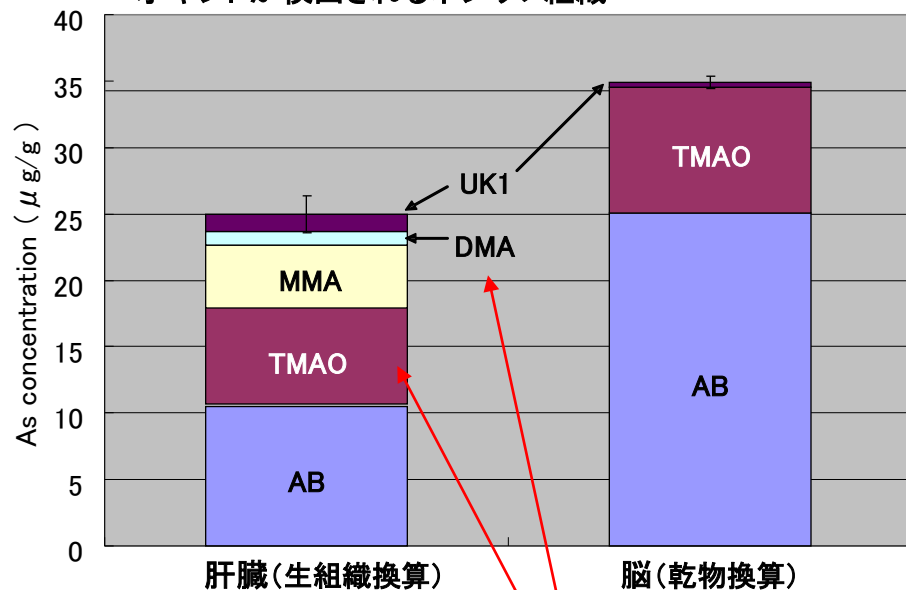
(筋肉における形態別分析法, 硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS法; 水溶性画分の抽出法, Folchの方法)

研究項目2: 食用海産動物に含まれるヒ素化合物の検討

(a) 主として、アルセノベタインが検出されるホシザメ組織



(c) アルセノベタインの他, 比較的少量のトリメチルアルシノキシドが検出されるホシザメ組織

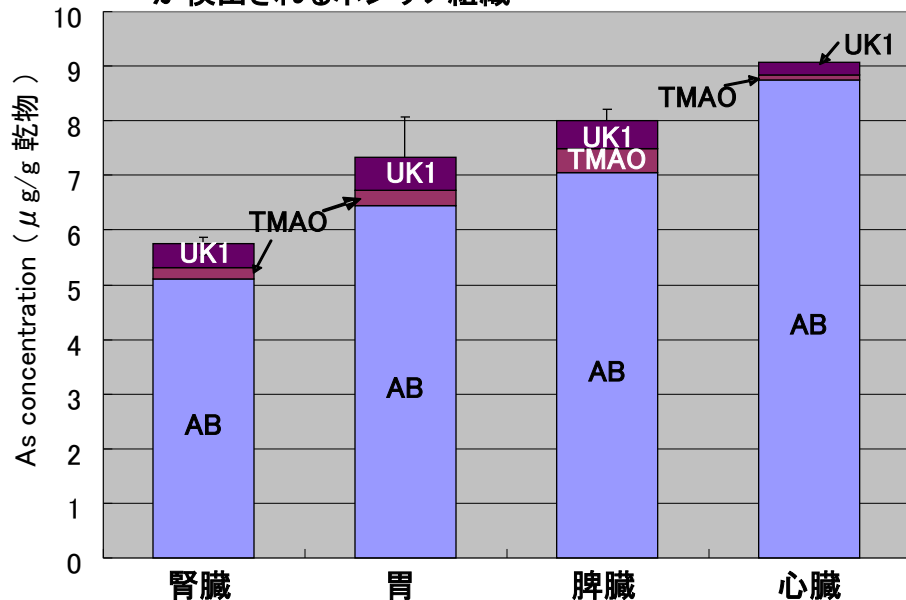


肝臓の場合, 普通筋と同様, 水溶性画分からは, 実質的にアルセノベタインのみが検出される。したがって, DMAやTMAOは, 硝酸加熱溶解処理により, DMAA含有AsLipidsやTMAO含有AsLipids から誘導されたと示唆された。

肝臓や脳に存在する高濃度のTMAO含有AsLipidsには, 安全学的あるいは比較生化学的な興味と共に, 機能学的な興味も持たれた。

ホシザメにおける10種の組織に存在するヒ素化合物(n=3)
(形態別分析法: 硝酸加熱溶解-HPLC-ICP-MS法)

(b) アルセノベタインの他, 少量のトリメチルアルシノキシドが検出されるホシザメ組織



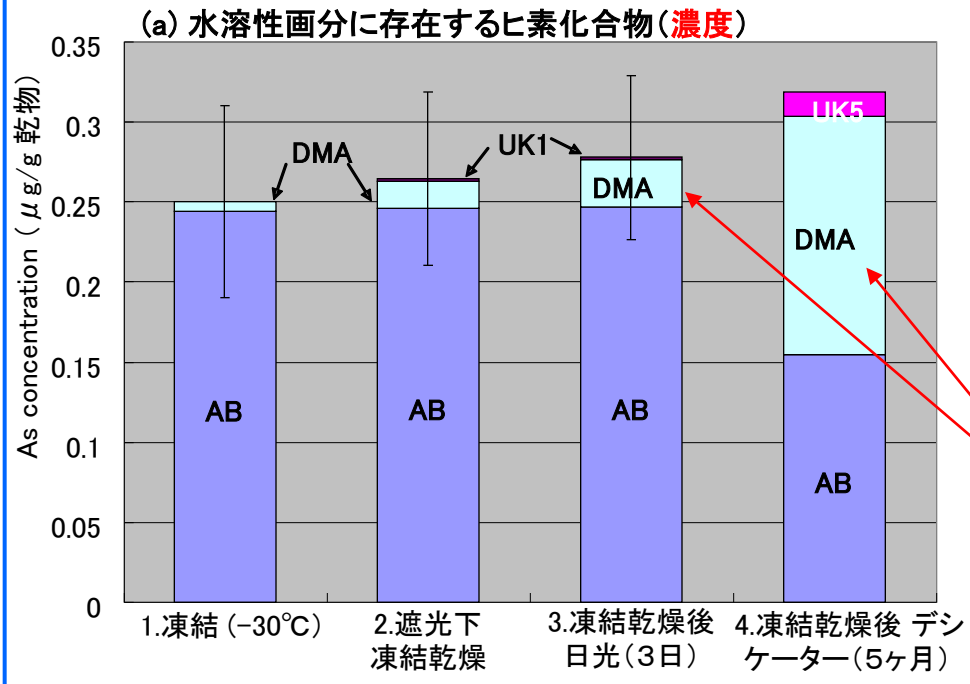
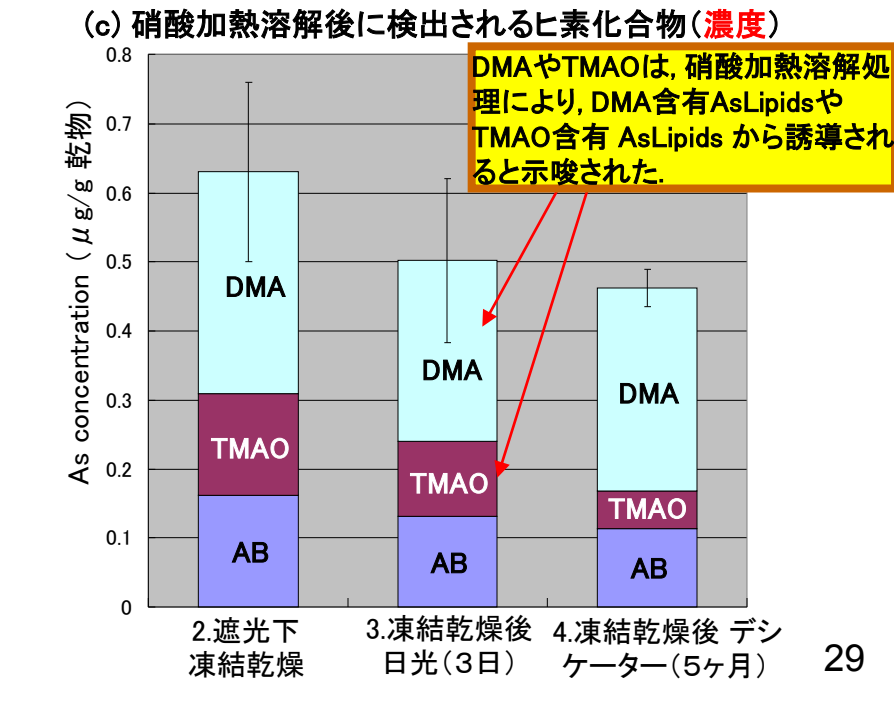
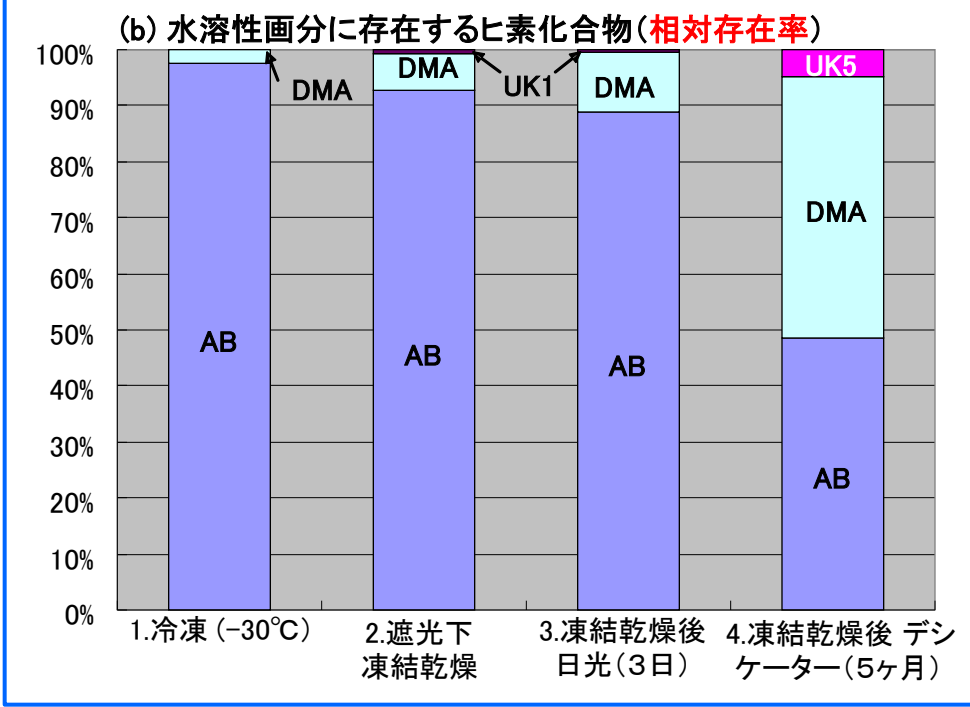


図2. マイワシ普通筋に存在するヒ素化合物の濃度と組成に及ぼす, 1. 凍結貯蔵, 2. 遮光下の凍結乾燥, 3. 凍結乾燥後の日光曝露(3日間), および 4. 凍結乾燥後のガラス製デシケーター中での保存(5ヶ月間、実験台上)の影響 (n=3).
(形態別分析法, HPLC-ICP-MS法; 水溶性画分の抽出法, Folchの方法)

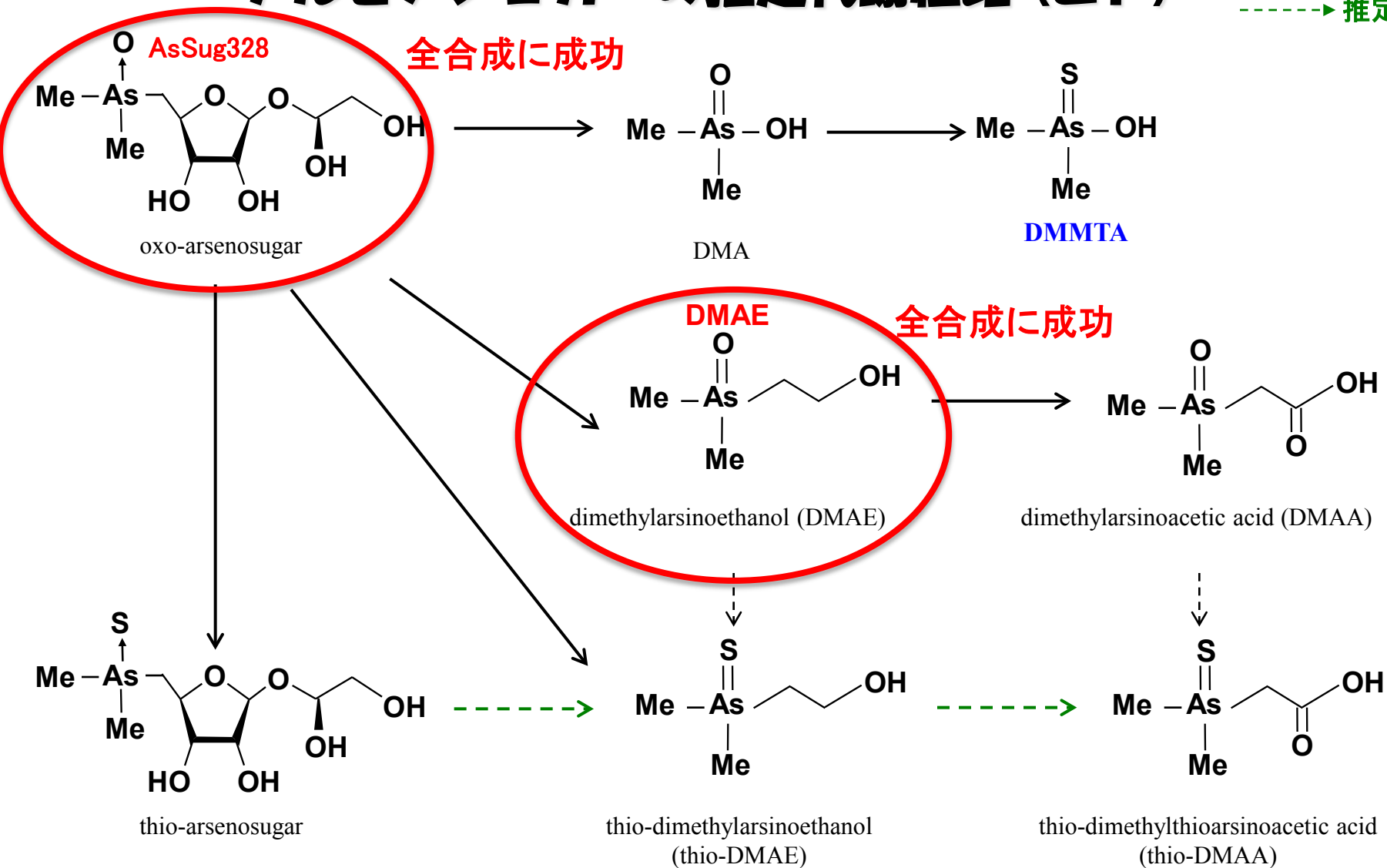
魚肉の貯蔵中に, 日光や自己消化により,
 1. DMAはAsLipidsから誘導される
 2. DMAはアルセノベタインから誘導された可能性も否定できなかった.



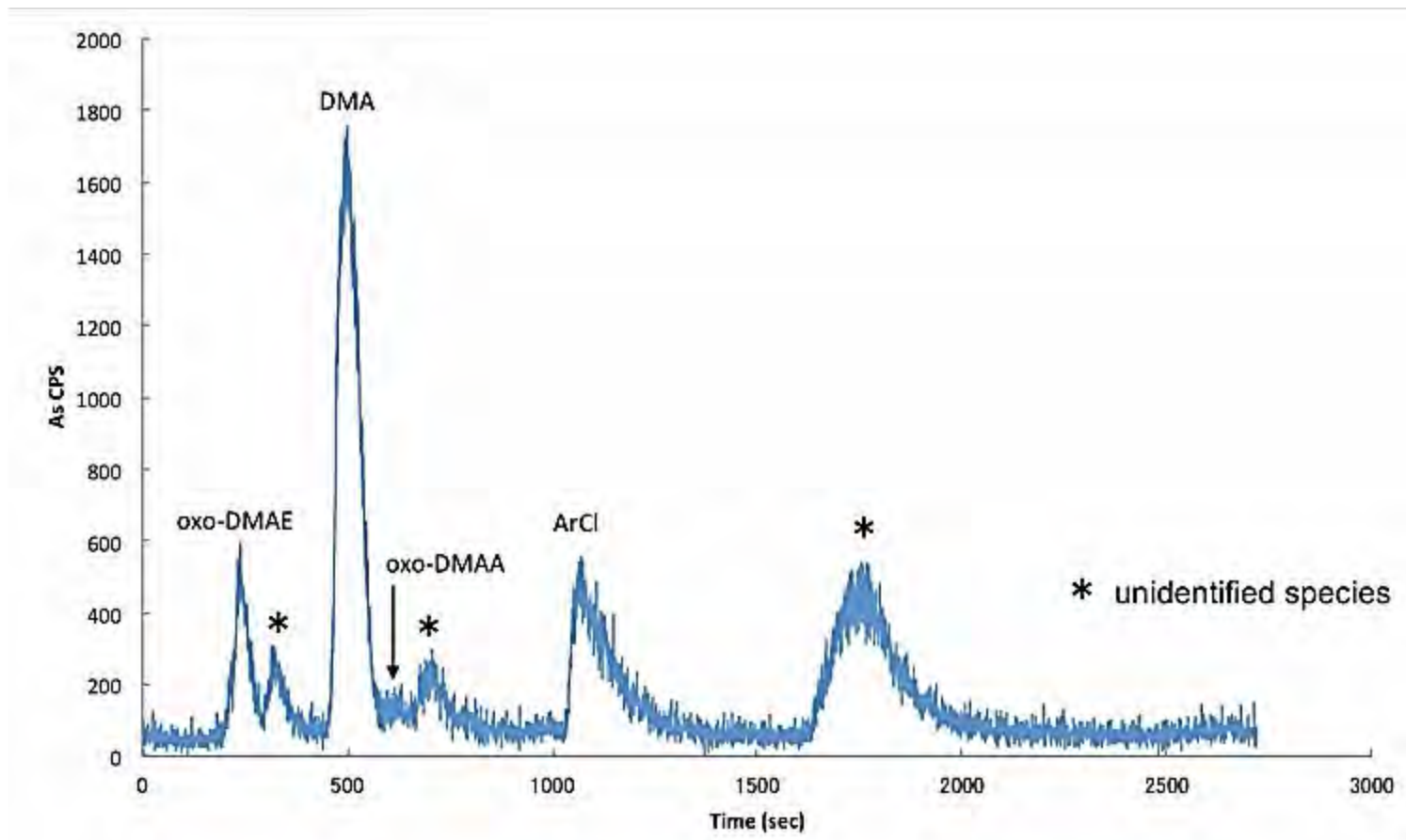
アルセノシュガーの推定代謝経路 (ヒト)

—→ 確定経路

- - - - -→ 推定経路



摂取24h後



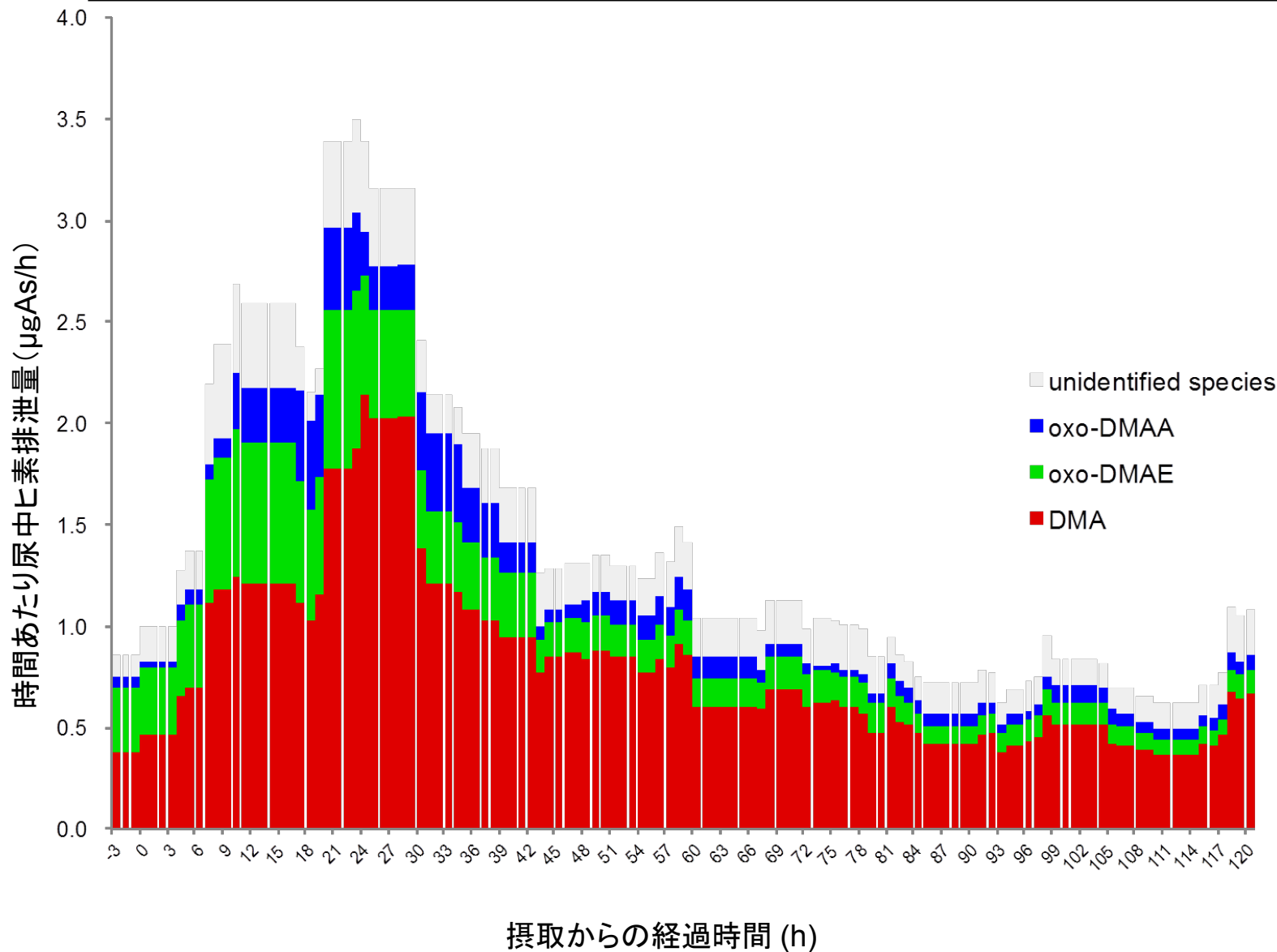
HPLC-ICP-MS分析、陰イオン交換カラムPRP-X100使用

oxo-DMAE: oxo-dimethylarsenoethanol

oxo-DMAA: oxo-dimethylarsenoacetate

これらはHPLC-TOF-MS分析で質量数を確認

ワカメ摂取者 時間あたり尿中ヒ素排泄量(5名の平均値)



背景

- ❖ AsSugsおよびAsLipidsの代謝過程でDMA^Vが生成される。
- ❖ DMA^Vはラット膀胱に膀胱発がん性を有する。
- ❖ DMA^Vの代謝物であるジメチルモノチオアルシン酸(DMMTA)がDMA^Vの膀胱発がん性に関与することが示唆された。

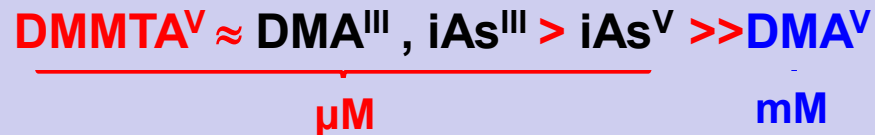
課題

- ① DMMTAの*in vitro*遺伝毒性、膀胱上皮細胞に及ぼす影響の検討、および産生経路の解明
- ② DMA^VおよびiAs^{III}の膀胱粘膜における*in vivo*変異原性の検討
- ③ DMA^VおよびiAs^{III}投与F344ラット膀胱粘膜におけるヒ素トランスポートの発現の検討

① DMMTAの*in vitro*遺伝毒性、膀胱上皮細胞に及ぼす影響の検討、および産生経路の解明

in vitro

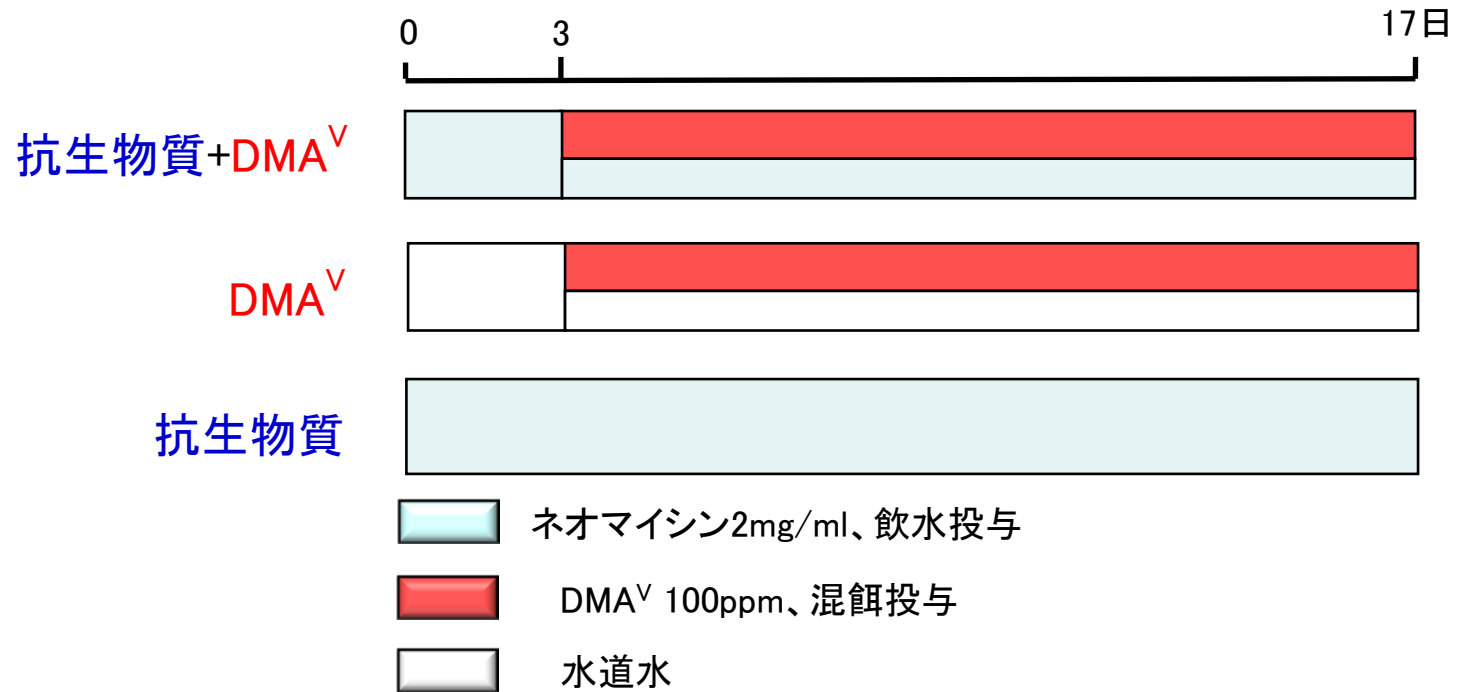
ヒトおよびラットの培養膀胱上皮細胞における: DMMTA^VのLD50



- DMMTA^VのLC₅₀は、iAs^V、iAs^{III}、DMA^{III}と同程度で、発がん性のあるDMA^Vに比べてはるかに**強い細胞毒性**を示した。
- DMMTA^Vは細胞非存在下では安定していたが、細胞存在下ではDMA^Vへの変換がみられた。
- DMMTA^Vは**染色体異常試験**で**陽性**（構造異常および数的異常）を示した。Ames試験では陰性である。

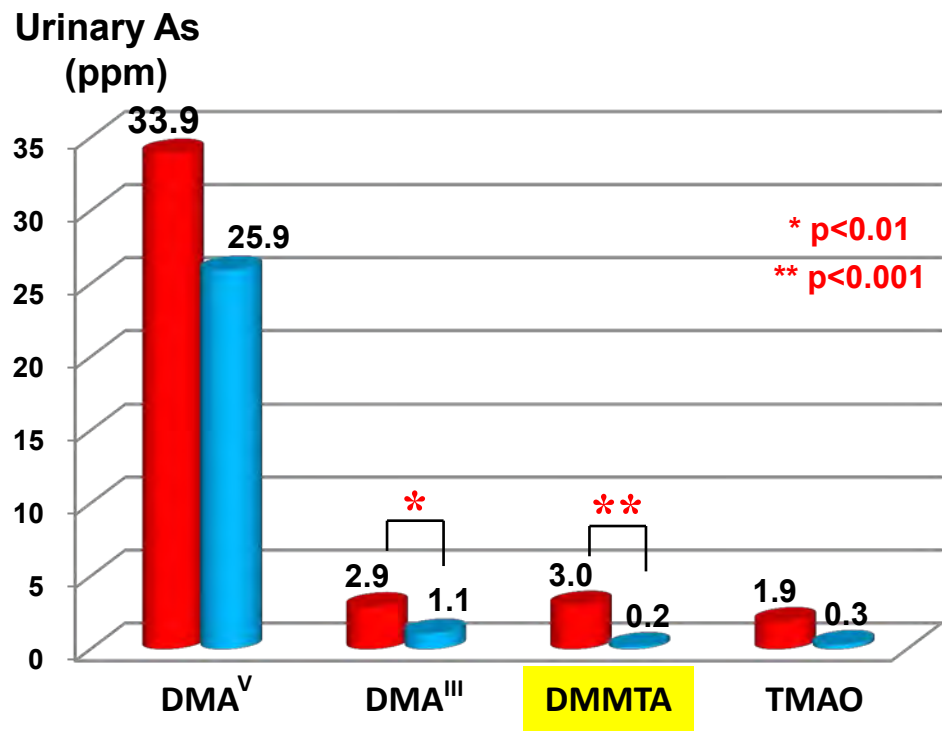
in vivo

DMMTAの産生経路の検討

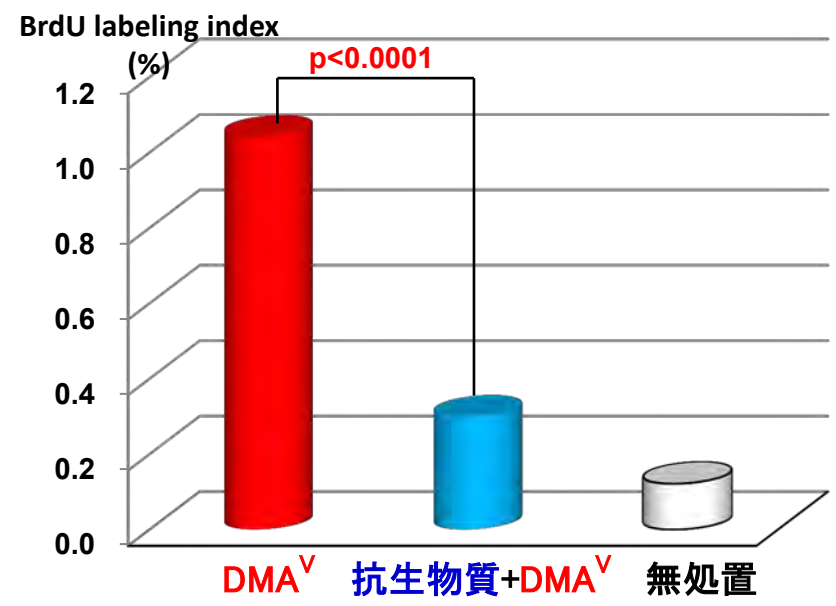


- 動物:6週齢、雌性F344、 30 匹(各群10匹ずつ)
- 基礎飼料:AIN-93 粉末
- 測定項目:
 - 尿中ヒ素濃度
 - 膀胱粘膜上皮細胞増殖能(BrdU標識率)

研究項目5: AsSugsおよびAsLipidsの動物を用いた安全性評価

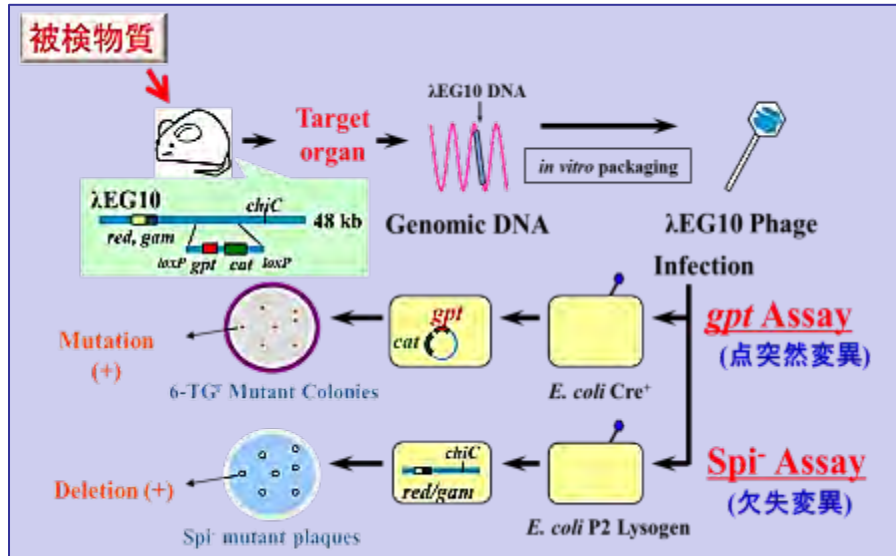


尿中ヒ素化合物濃度



膀胱上皮細胞増殖能

② DMA^VおよびiAs^{III}の膀胱粘膜における*in vivo*変異原性の検討



従来DNA抽出法
膀胱粘膜などの微小组織の解析が困難

改良DNA抽出法
膀胱粘膜などの微小组織の解析が可能

0 13週

対照群

被検物質投与群

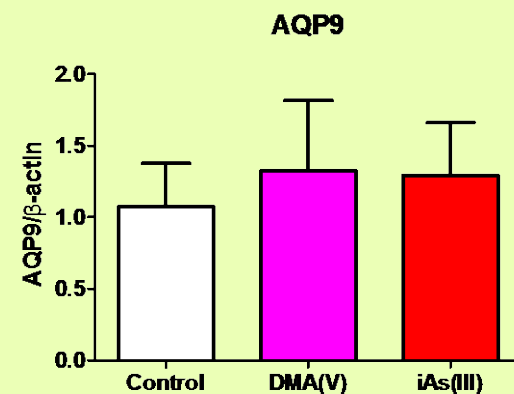
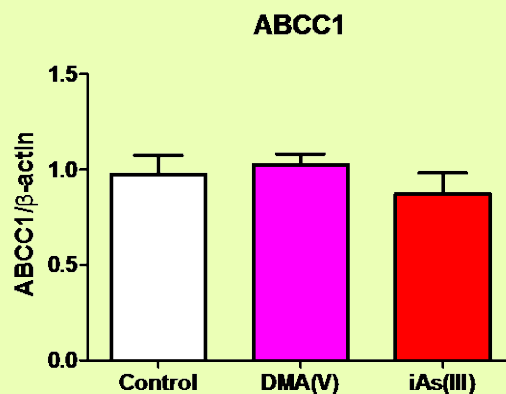
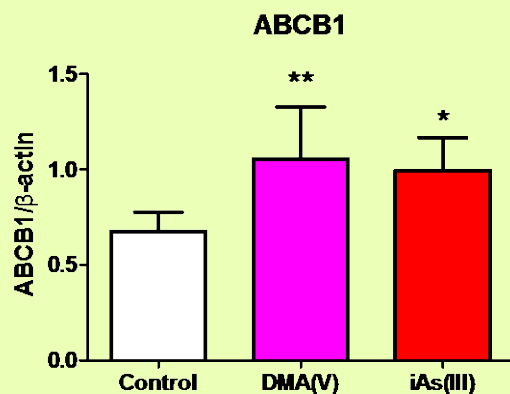
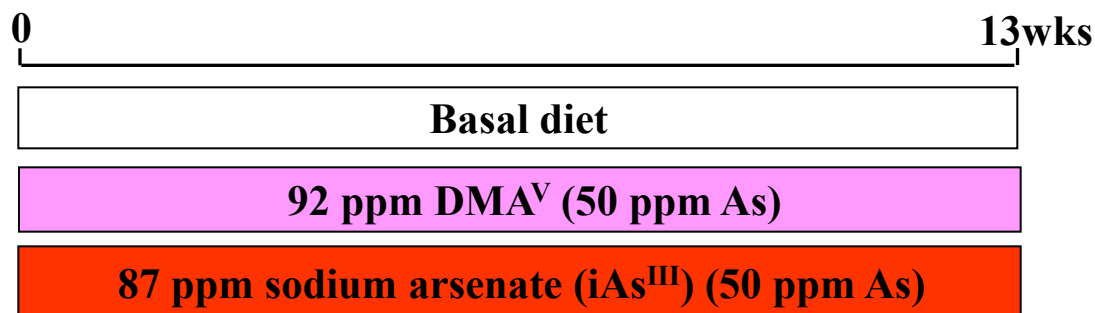
動物: F344 *gpt* deltaラット

*in vivo*変異原性および発がん性を臓器特異的にかつ包括的に評価できる

被検物質	膀胱粘膜における変異原性
N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (変異原性膀胱発がん物質)	陽性
Sodium ascorbate (非変異原性膀胱発がん促進物質)	陰性
iAs ^{III}	陰性
DMA ^V	陰性

本試験法は食品中ヒ素化合物のリスク評価に有用である

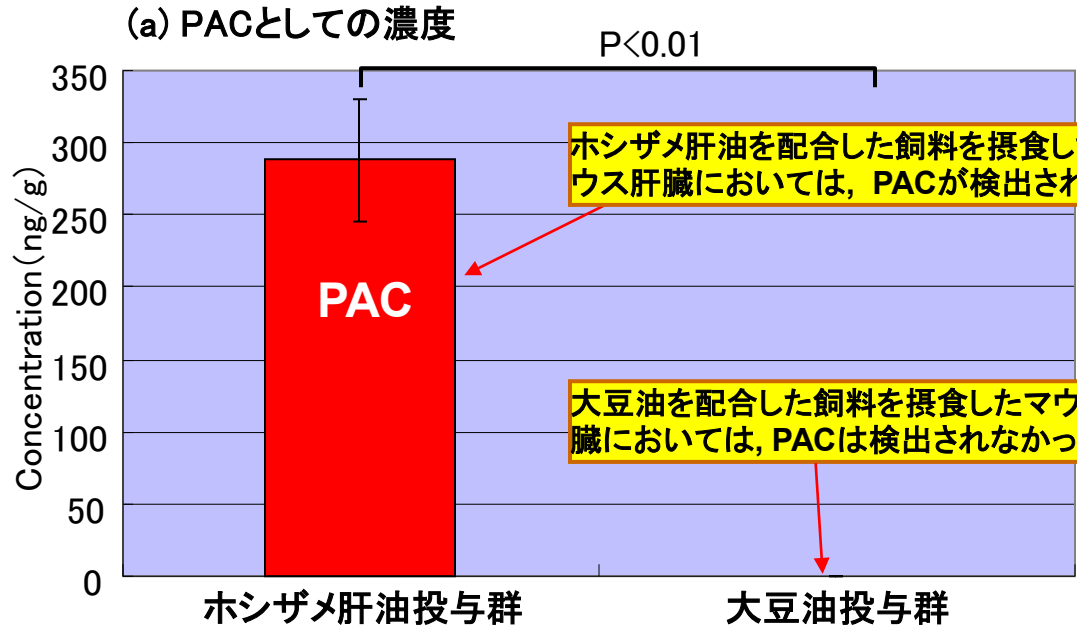
③ DMA^VおよびiAs^{III}投与F344ラット膀胱粘膜におけるヒ素トランスポーターの発現の検討



*p<0.05 vs. control
** p<0.01 vs. control

1. ラット膀胱粘膜において、DMA^VおよびiAs^{III}の代謝にABCB1が関与する可能性が示唆された。
2. この結果がラット膀胱粘膜におけるヒ素発がんメカニズムの解明に寄与できるものと考えられる。

研究項目5: AsSugsおよびAsLipidsの動物を用いた安全性評価

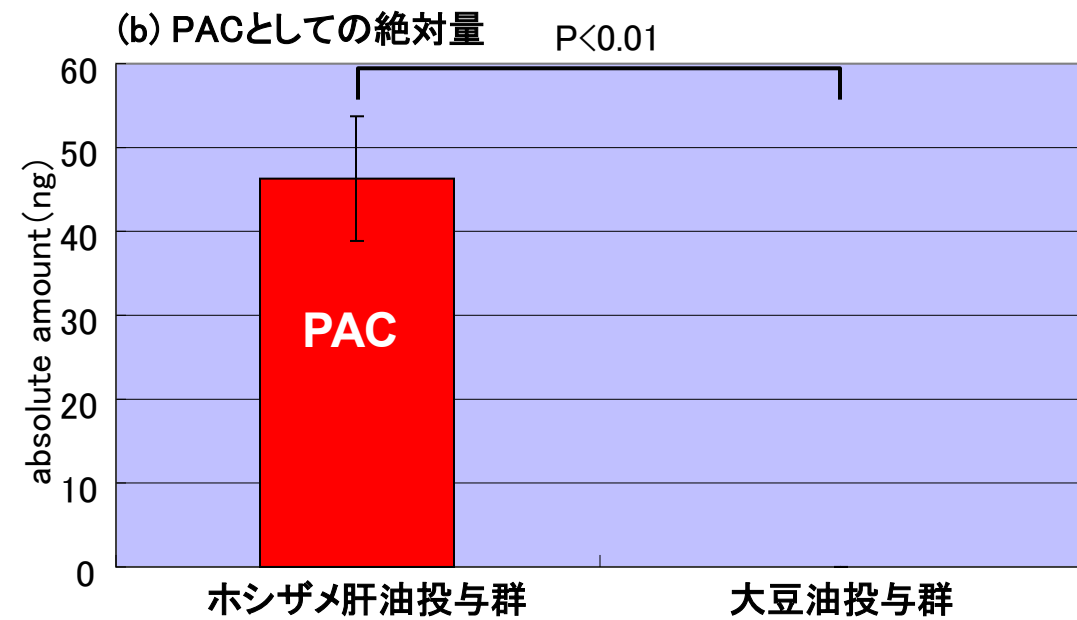


ホシザメ肝油を配合した飼料を摂食したマウス肝臓においては, PACが検出された.

大豆油を配合した飼料を摂食したマウス肝臓においては, PACは検出されなかった.

ホシザメ肝油中のホスファチジルアルセノコリン(PAC)はマウスの肝臓に移行する

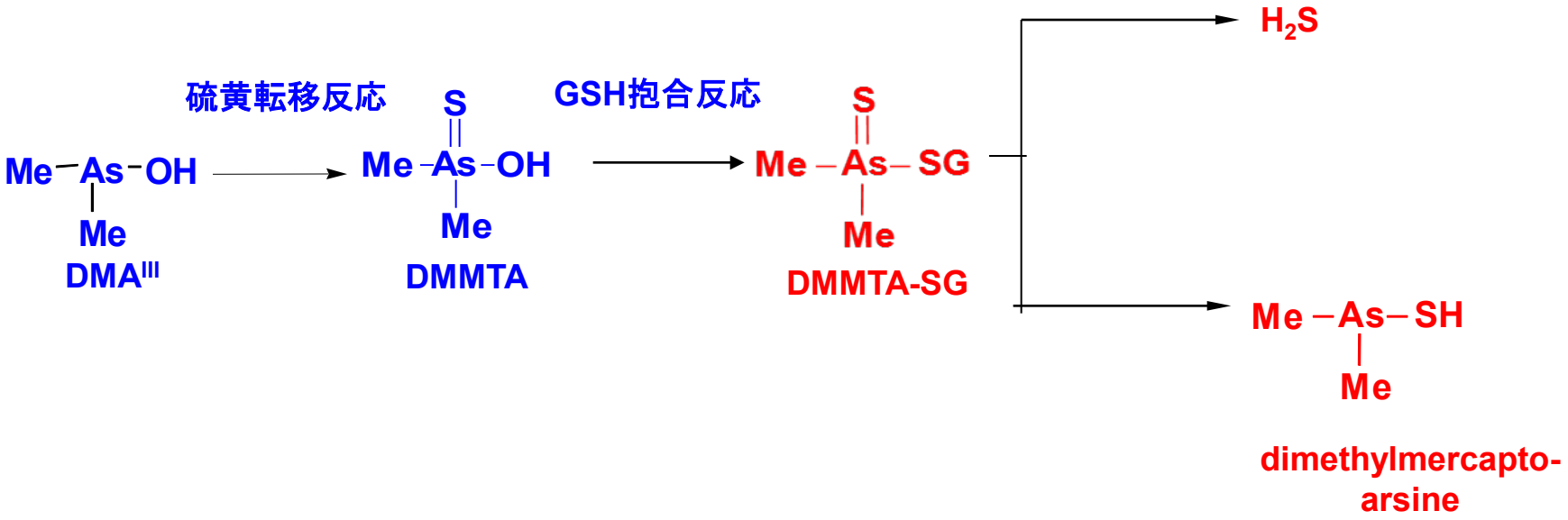
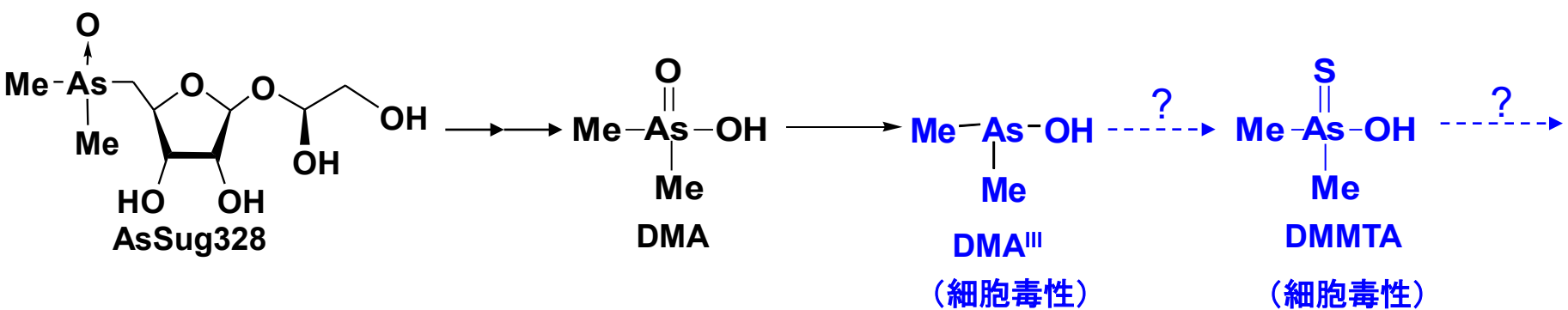
今回用いた分析法は, 他組織でのPACの動態を検討する上でも, 有効な方法になると予想される



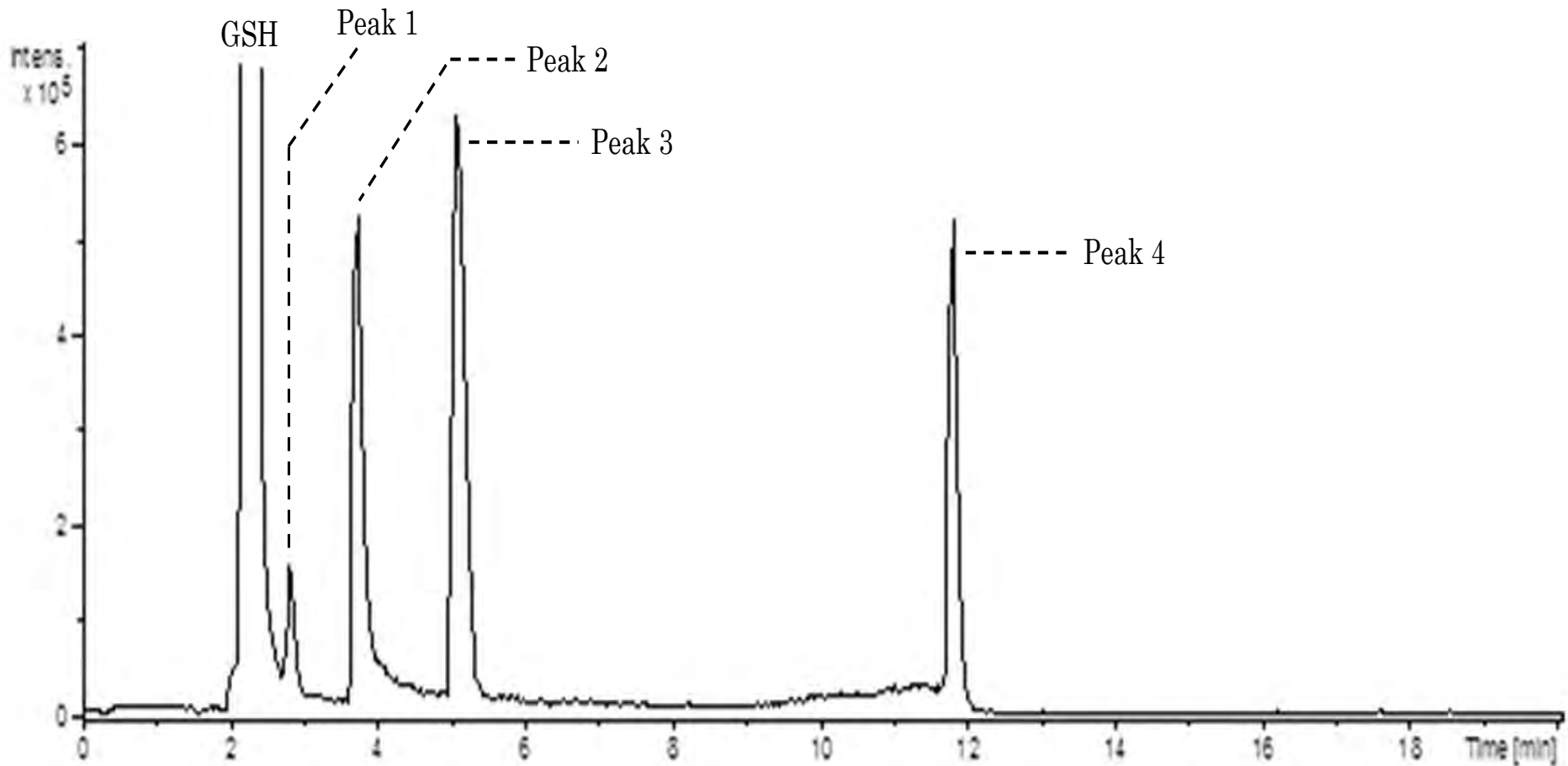
ホシザメ肝油配合 (4%) 飼料を摂食させたマウスの肝臓に存在する, (a) ホスファチジルアルセノコリン(PAC)濃度, および (b) 絶対量 (n=3). (14日間連続摂食の例)

PACの検出法: Dawson の方法によるアルカリ不安定画分を HPLC-ICP-MS分析し, PACから誘導されるグリセリルホスホリルアルセノコリンを定量.

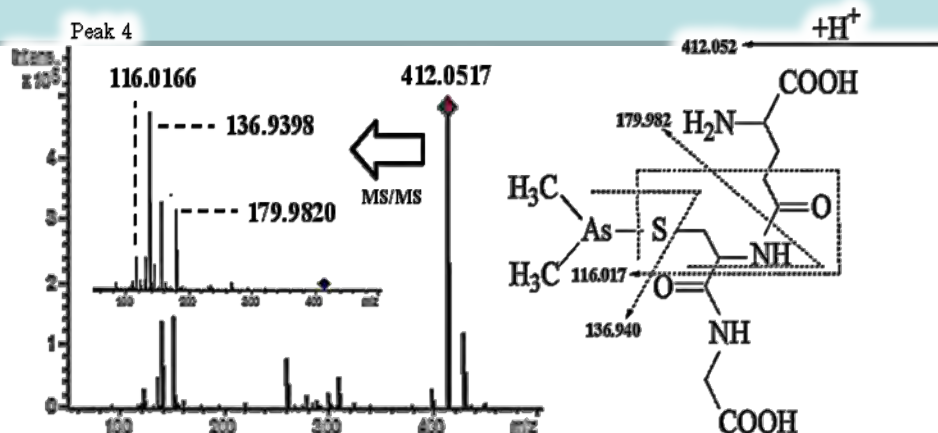
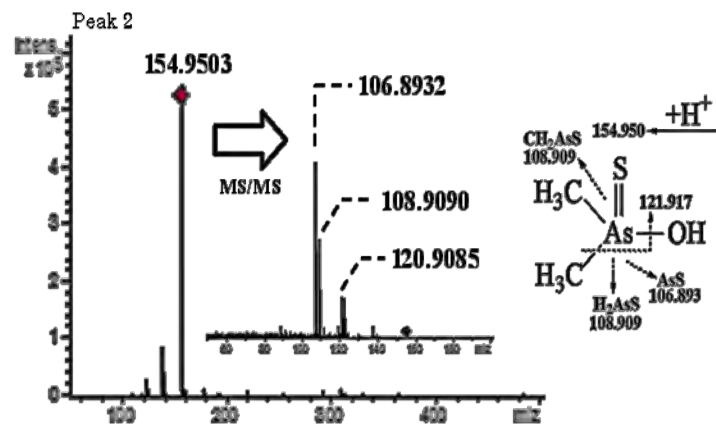
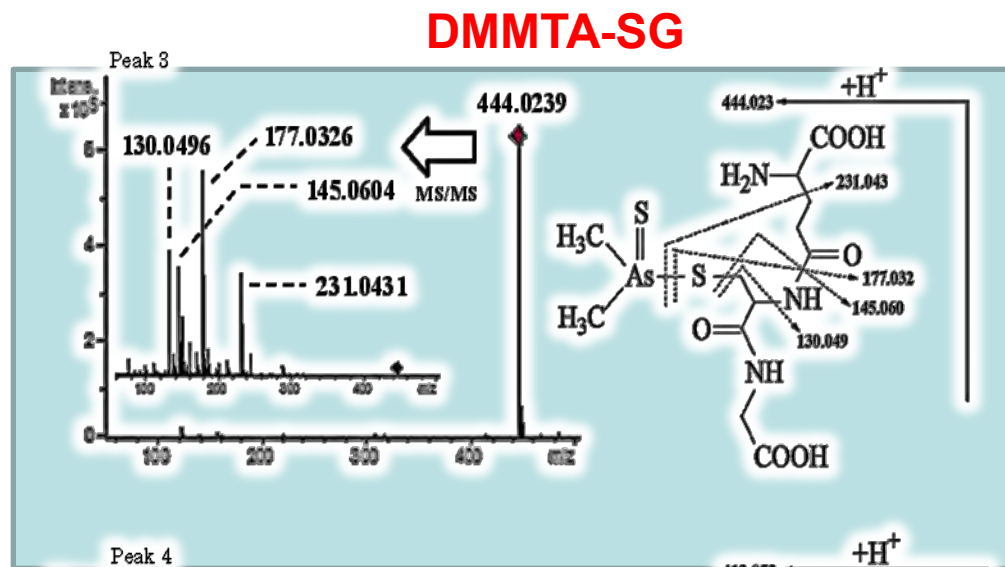
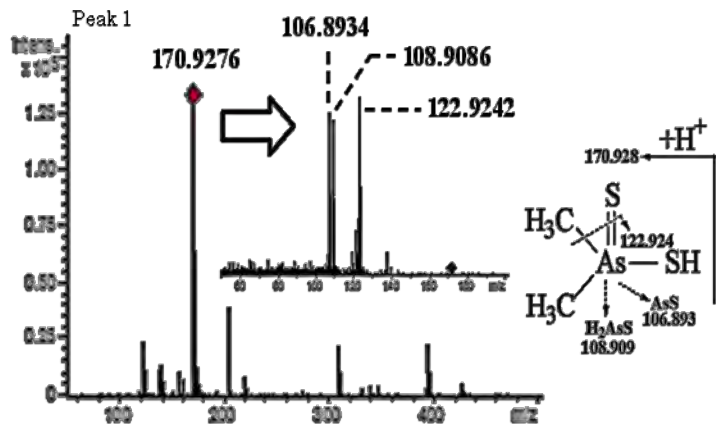
アルセノシュガーから腸内生成するジメチルモノチオアルシン酸 (DMMTA)の生成経路とその毒性の可能性



DMMTAおよびGSHの *in vitro* 反応生成物の HPLCクロマトグラム



DMMTAの生体チオールとの代謝 -HPLC-TOFMSによる検討-



食品安全委員会では、食品中のヒ素について自ら評価を行い、2013年12月に食品健康影響評価の結果を厚生労働大臣ならびに農林水産大臣に通知した。評価書作成に当たって、圓藤吟史、鰐淵英機は汚染物質専門調査会専門委員として、花岡研一、山中健三は専門参考人として参画した。

成果

食品安全委員会: 化学物質・汚染物質評価書 食品中のヒ素. 2013.12

食品安全委員会セミナー「ヒ素に関する最新知見について」

コーディネーター 佐藤 洋 食品安全委員会委員長代理

講演1 食品中の有機ヒ素に関する最新の知見

オーストリア グラーツ大学: Dr. Kevin Francesconi 教授

講演2 海産物におけるヒ素に関する知見について

水産大学校水産学研究科: 花岡 研一教授

講演3 食品中の無機ヒ素の健康影響について

～食品中のヒ素に係る食品健康影響評価(案)～

化学物質・汚染物質専門調査会: 圓藤 吟史専門委員

本研究で得られた成果

- ✓ AsSugsおよびAsLipidsの抽出法の確立
- ✓ AsSug328およびその代謝物の全合成に成功
- ✓ アルセノシュガーおよびアルセノリピッド代謝過程でDMA^Vが生成される
- ✓ ワカメ摂取後の主な尿中ヒ素代謝物にはDMA^Vである
- ✓ DMA^Vは生体内で一部、腸内細菌によりDMMTAに代謝され、尿中に存在する
- ✓ 膀胱上皮細胞に対してDMMTAは、膀胱発がん物質であるDMA^Vに比べてはるかに強い細胞毒性を有する
- ✓ *in vitro*において、DMMTAは染色体異常試験で陽性である

DMMTAはDMA^V誘発ラット膀胱発がんにおける究極発がん物質のひとつである可能性が示唆された

DMMTAに対するリスク評価が食品中有機ヒ素化合物の健康影響評価に必要かつ不可欠

食品中ヒ素の代謝物DMMTAの発がん性に関する研究 (H26-27年度)

目的:

DMMTAおよび関連有機ヒ素化合物の体内動態、遺伝毒性および発がん性の有無を明らかにする

研究課題


1. DMMTAのF344 *gpt* deltaラット膀胱粘膜における変異原性および発がん性の検討
2. iAs^{III}およびDMA^V投与C57BL/6マウスにおけるDMMTA産生の検討
3. iAs^{III}およびDMA^VのINK4a/ARF 欠損マウスにおける発がん性の検討
4. DMMTAならびに関連ヒ素化合物の高純度化学合成
5. 腸内細菌や培養細胞を用いた代謝・毒性試験

課題1 DMMTAのF344 *gpt delta*ラット膀胱粘膜における変異原性および発がん性の検討

DMMTAの経尿道的膀胱内投与方法を用いた検討

□ 予備試験

F344ラットにDMMTAの経尿道的膀胱内直接注入(投与時間:30分/回)

- 
1. 膀胱粘膜の病理学的評価
 2. DMMTAの膀胱内の代謝動態の解析
(尿中および膀胱粘膜内のヒ素代謝産物の測定)

DMMTAの投与量および投与回数などの設定

□ 本試験



F344 *gpt delta*ラットに、DMMTAの経尿道的膀胱内直接注入

□ 膀胱における検討項目:

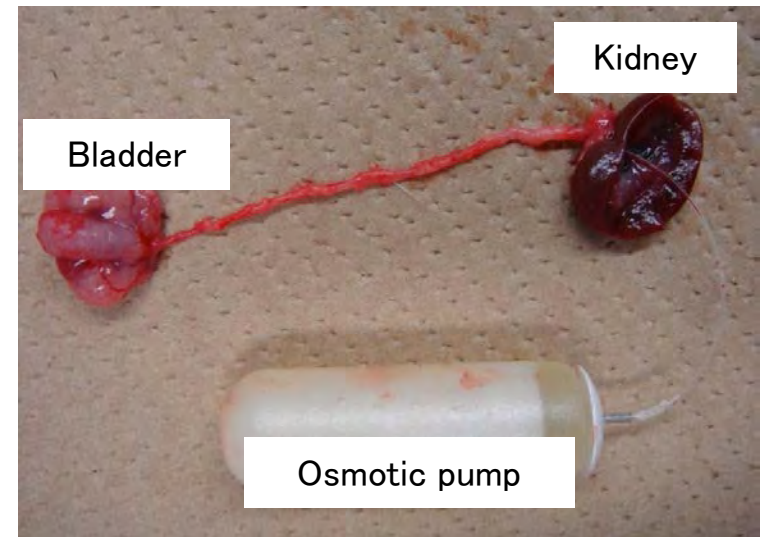
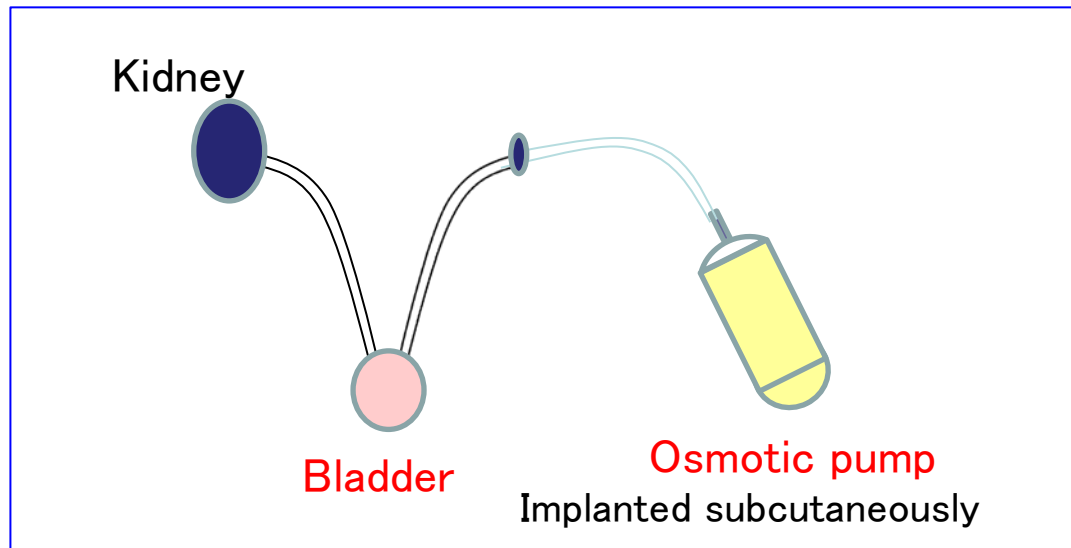
1. 尿中・膀胱粘膜内のヒ素代謝産物の経時的測定
2. DMMTAの膀胱粘膜における*in vivo*変異原性の検討(*gpt* assay、*Spi⁻* assay)
3. 病理学的解析



DMMTAの体内動態、遺伝毒性および発がん性の有無を明らかにする

課題1 DMMTAのF344 *gpt delta*ラット膀胱粘膜における変異原性および発がん性の検討

DMMTAの経尿管的長期間膀胱内投与法を用いた検討 (投与時間:2週間/回)



浸透圧ポンプ :ALZET[®] Osmotic mini-pump: 2ML2 (5.0 μ L/h, 2 weeks)

- 予備試験 (F344ラット)
DMMTAの投与量と投与回数の設定
- 本試験 (F344 *gpt delta*ラット)
DMMTAの体内動態、遺伝毒性および発がん性の有無を明らかにする

課題2 iAs^{III} および DMA^V 投与C57BL/6マウスにおけるDMMTA産生の検討

❖ 背景

- ・ マウスは経胎盤ばく露以外の経路でヒ素発がん到低感受性
- ・ ヒ素投与マウスの尿中ヒ素代謝物に関する知見は少ない

❖ 目的

マウスのヒ素発がん低感受性とDMMTAとの関連性を検討する

❖ 方法

C57BL/6マウスに iAs^{III} および DMA^V を飲水投与し、尿中および糞中における投与に由来するDMMTAを測定する

課題3 iAs^{III}およびDMA^VのINK4a/ARF欠損マウスにおける発がん性の検討(鰐渕)

❖ 背景

- ・ マウスは経胎盤ばく露以外の経路でヒ素発がん到低感受性
- ・ ヒト材料および培養細胞を用いた研究でヒ素発がん性にp16^{INK4a}、p14^{ARF}などのがん抑制遺伝子の不活性化が関与していると示唆されているが、動物モデルではまだ証明されていない
- ・ INK4a/ARF欠損マウスはp16^{INK4a}/p14^{ARF} のダブル欠損マウス

❖ 目的

1. iAs^{III}およびDMA^VのINK4a/ARF 欠損マウスにおける発がん性を明らかにする
2. マウスにおけるヒ素発がん性の証明を試みる

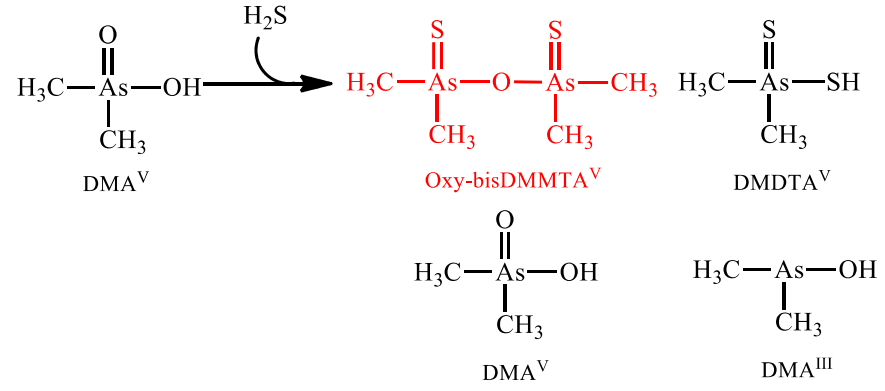
❖ 方法

1. INK4a/Arf -/-および+/-欠損マウスを用いて、iAs^{III}およびDMA^Vの飲水投与による発がん性試験を行う
2. 発がん性が認められた臓器における発がんメカニズムの解析を行う。

課題4 DMMTAならびに関連ヒ素化合物の高純度化学合成

①DMMTA合成

文献: MW Fricke et al. Chem Res Toxicol 2005,18(12):1821-9.

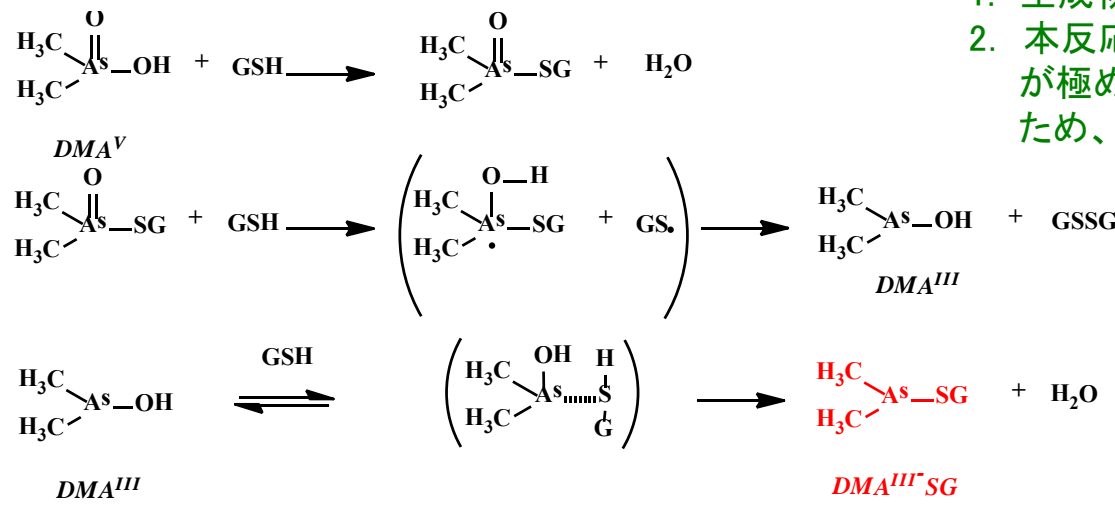


問題点

1. 高濃度硫化水素を使用、生成物も含めて毒性が強いので大量合成に不適
2. 本反応では不純物が多い
3. クロロホルムで抽出、ヘキサン/メタノール再結晶するため、無水DMMTA^V(oxy-bisDMMTA^V)が得られるが収率が悪く、結晶多形を示し、溶解性や物理化学的安定性が異なる可能性がある

②DMA^{III}-SG合成

文献: WR Cullen et al. J Inorg Biochem 1984, 21:179-194.



問題点

1. 生成物は毒性が強いので大量合成に不適
2. 本反応では不純物が多い。また、目的生成物の極性が極めて高く、かつpH7以上で容易に加水分解するため、高純度品が得られない

両化合物ともに分離精製法も含めて高い回収率に特化した合成法の開発を目指すとともに、活性中間代謝物が代謝実験から推定された場合、その合成も鋭意行う。

課題5 腸内細菌や培養細胞を用いた代謝・毒性試験

1. 無細胞系での検討から発展的な検討の必要が生じた場合、ヒト肝細胞由来でCYPなどの薬物代謝酵素活性が高いヒト肝培養細胞株Hepa-RGまたはヒトiPS細胞から樹立した肝細胞を用いてより詳細な代謝経路の推定を行う

ReproHepato: ヒトiPS細胞由来肝細胞(凍結)

ヒト初代肝細胞に近い細胞機能を実現したヒトiPS細胞由来肝細胞を、世界で初めて商用供給いたします

リプロセルは、世界で初めてヒトiPS細胞由来肝細胞を製品化致しました。ReproHepatoはヒト初代培養肝細胞に近い細胞機能を持った正常分化細胞であり、同時に安定した大量供給を実現する製品です。この度発売したCYP3A4誘導試験に適した製品(Type 1)に続き、他のCYP(Cytochrome P450)アイソザイム試験にも最適化された製品を順次開発・発売いたします。

- ヒトiPS細胞由来のCYP陽性肝細胞です
- ヒト初代肝細胞に近いCYP(3A4/1A2/2C9/2C19)活性/誘導活性を示します
- 安定供給可能でロット差が小さい肝細胞です
- 機能を保持したまま長期間の培養が可能です
- CYP受託アッセイサービスも承ります
- CYP2D6酵素活性の高い製品も開発中



ReproHepatoは分化した肝細胞の製品です。製品に添付の培地で6日間培養した後、CYPアッセイにご使用になれます。

※: 凍結細胞は、お受け取り後-80℃に保管して下さい。細胞を液体窒素で保管すると生存率が低下する場合があります。

株式会社リプロセルホームページより

肝の薬剤代謝酵素による影響評価向けに、ヒトiPS細胞から分化させた肝細胞が市販されている

- 1) 培養肝細胞を使用し、AsSugsあるいはAsLipidsの中間代謝物と考えられているDMA^V、DMA^{III}、DMMTAに対する肝薬物代謝酵素群の影響(ヒ素化学形態の変化ならびにCYPなど薬物代謝酵素発現量の変化など)をみる。
- 2) ヒ素化学形態の変化はHPLC-ICP-MS、HPLC-TOFMS等を用いて分析する

2. ヒト培養肝細胞を用い、合成したDMMTA、DMA^{III}等のヒ素化合物について、Hepa-RG株を用いた細胞毒性試験を実施する。さらに結果次第では、マウスリンフォーマT/Kアッセイ(MLA)、コメットアッセイ等の遺伝毒性試験を行う予定である

期待される成果

DMMTAおよび関連有機ヒ素化合物の
体内動態の解明、遺伝毒性および発がん性の有無の確認



有機ヒ素の安全性評価

ヒ素発がんのメカニズムの解明



食品に由来する有機ヒ素の健康影響評価に大いに貢献

ラットにおける遺伝毒性・反復投与毒性併合試験法の開発

西川 秋佳 (にしかわ あきよし)

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長



1978年 3月 岐阜大学医学部卒業
1982年 3月 岐阜大学大学院医学研究科単位修得（病理学専攻）
1982年 4月 高山赤十字病院副部長（中央検査部）
1983年 10月 岐阜大学医学部助手（第一病理学教室）
1985年 4月 岐阜県立健康管理院医長（検査部）
1987年 4月 県立岐阜病院医長（病理診断部）
1989年 10月 米国ネイラー・ダナ研究所化学発癌研究部客員研究員
国立衛生試験所病理部室長、国立医薬品食品衛生研究所病理部長を経て、
2010年より現職。薬事・食品衛生審議会（臨時委員）、内閣府食品安全
委員会（専門委員）、中央環境審議会（臨時委員）、日本毒性学会（理
事）、日本癌学会（評議員）、日本病理学会（評議員）、日本毒性病理学
会（評議員）、日本がん予防学会（評議員）

＜研究成果概要＞

*gpt delta*ラットを用いた遺伝毒性・反復投与毒性併合試験法を開発した。試験法の標準化のため、投与期間や系統差を検証し、13週間反復投与による一般毒性検索系としての妥当性を検討した。また、遺伝子改変に伴うゲノムの欠失等の影響を明らかにするため、 λ EG10の挿入部位を決定した。さらに、加齢に伴う突然変異の蓄積及びクローナル変異体の影響の有無について検討した。

F344系及びSD系*gpt delta*ラットにdiethylnitrosamine (DEN) を2~8週間飲水投与した結果、いずれの時点でも最高用量群（10 ppm）で対照群と比較して有意な*gpt*遺伝子突然変異頻度及びSpi-欠失変異体頻度の上昇が認められた。一方、di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) 混餌投与群では全ての投与群、全期間で、*gpt*及びSpi-突然変異頻度は対照群と比較して有意差はなかった。また、*gpt delta*ラットはF344系、SD系ともに野生型ラットとほぼ同程度の一般毒性を示した。

F344系*gpt delta*ラットにDEN を13週間飲水投与した結果、一般状態、血清生化学、臓器重量、病理組織等の一般毒性に野生型ラットとの差異はなく、肝前がん病変であるGST-P陽性細胞は投与群において対照群に比較し有意な高値を示したが、その程度は野生型ラットと同程度であった。DENを5週間腹腔内投与後、phenobarbital (PB)を8週間混餌投与した結果、K-ras遺伝子の変異パターンは*gpt*アッセイの変異スペクトラム解析で明らかとなった*gpt*遺伝子上の遺伝子変異と一致するものであったことから、*gpt*遺伝子上の遺伝子変異が、がん遺伝子上の遺伝子変異と相関する可能性が示唆された。

遺伝子導入によってラットゲノム配列は71,789塩基分が欠失し、欠失領域中には1遺伝子が存在した。104週齢の肝臓では19週齢と比較して点突然変異頻度が約3倍有意に高く、肝臓において自然突然変異が加齢に伴い蓄積することが示された。点突然変異に関するシークエンス解析の結果、主な自然突然変異のタイプはCpG部位におけるG:C to A:T変異であった。また、老齢個体において、生体の機能低下によって内因性変異原の増加や修復能の低下が生じ、酸化的DNA損傷等を介してG:C to T:A変異や欠失変異が増加する可能性が示唆された。3系統の*gpt delta*ラット（SD、F344及びWistar Hannover）について肝臓の突然変異頻度を測定した結果、系統差はみられなかった。

以上の成績から、レポーター遺伝子導入動物*gpt delta*ラットにおける臓器レベルでの検索は、遺伝毒性の標的臓器における直接的な関与の証明となる点で優れており、一般の反復投与毒性に加えて遺伝毒性・発がん性をより精緻かつ短期に予測できる可能性が期待できる。

ラットにおける遺伝毒性・反復投与 毒性併合試験法の開発

研究代表者

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

研究分担者

増村健一

梅村隆志

小川久美子

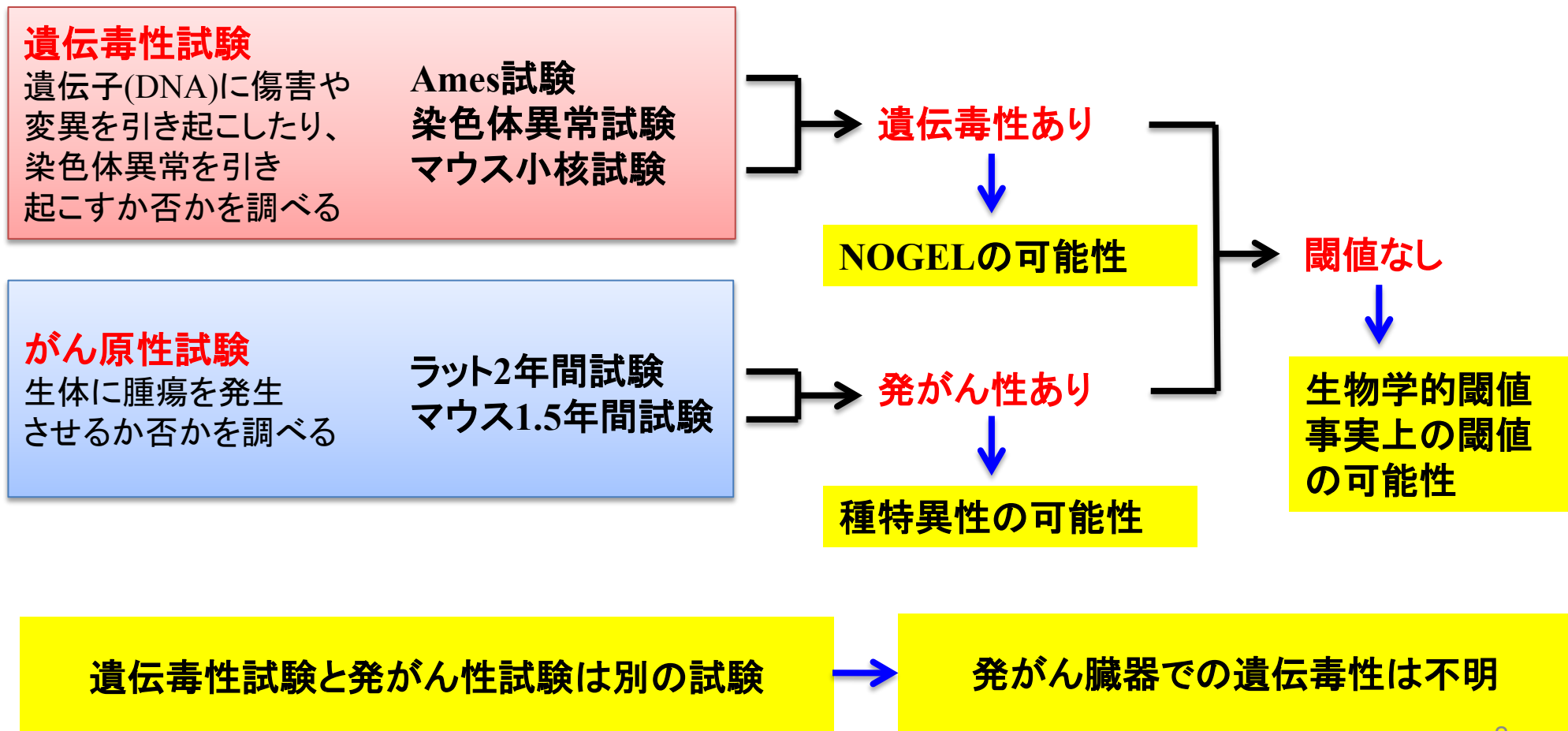
国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部

国立医薬品食品衛生研究所病理部

国立医薬品食品衛生研究所病理部

遺伝毒性発がん物質

食品中に存在する化学物質によるヒト健康影響において、**発がん性**は最も懸念すべきハザードの一つである。特にその作用機序に**遺伝毒性**が関与する場合には、閾値がないとの前提でリスク評価がなされることから、遺伝毒性の有無を判定することはリスク評価上極めて重要である。

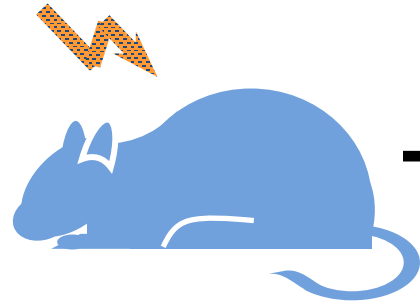


トランスジェニックげっ歯類遺伝子突然変異試験

	動物種	レポーター 遺伝子	回収方法	選別方法
Muta TM	マウス	<i>lacZ</i>	λ <i>in vitro</i> パッケージング	color positive
Big Blue ^R	マウス ラット	<i>lacI</i>	λ <i>in vitro</i> パッケージング	color
<i>lacZ</i> plasmid	マウス	<i>lacZ</i>	リゲーション & エレクトロポ レーション	positive
<i>gpt delta</i>	マウス ラット	<i>gpt</i> & <i>red/gam</i>	λ <i>in vitro</i> パッケージング	positive
Lambda <i>cII</i>	マウス ラット	<i>cII</i>	λ <i>in vitro</i> パッケージング	positive
その他		<i>supF</i> <i>rpsL</i>		

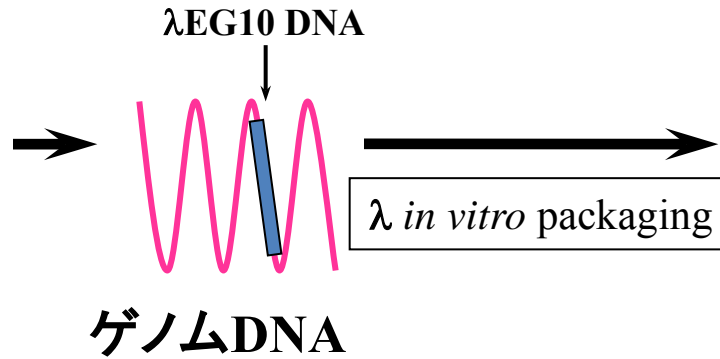
gpt delta トランスジェニックラットを用いた遺伝子突然変異解析

化学物質



gpt delta rat

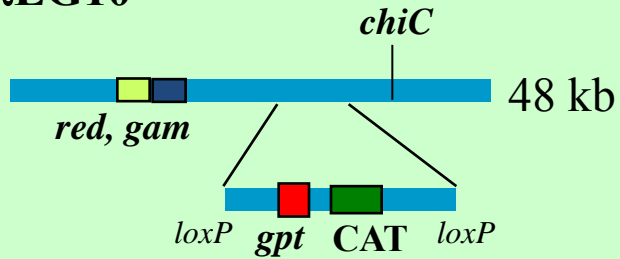
組織



ゲノムDNA

λ EG10 phage

λ EG10



導入遺伝子 λ EG10

gpt Assay
(点突然変異)

Spi⁻ Assay
(欠失変異)

研究目的

レポーター遺伝子導入動物である*gpt delta*ラットを用いて反復投与毒性試験を実施し、遺伝毒性と一般毒性の検索に加え、前がん病変の検出を行うことにより、遺伝毒性発がん物質をより精緻に、より短期的に予測できる動物モデルを開発する。

研究項目

遺伝毒性・反復投与毒性併合試験法の開発

遺伝毒性試験や反復投与毒性試験にレポーター遺伝子導入動物を用いるうえでの適切な試験方法や妥当性の検討

*gpt delta*ラットの特徴とレポーター遺伝子を用いて*in vivo* 遺伝毒性を評価することの有用性の検討

レポーター遺伝子導入動物を用いて**遺伝毒性**を評価するための投与期間や、系統差を検討する。

レポーター遺伝子導入動物を用いた**反復投与毒性試験**が可能かどうかを検討する。

導入遺伝子やレポーター遺伝子導入動物に関する基礎的な情報を検討する。

レポーター遺伝子を用いて*in vivo* 遺伝毒性を評価することの有用性の検討する。

遺伝毒性の包括的試験法の標準化

一般毒性検索系としての妥当性

レポーター遺伝子および導入動物の特徴

gpt delta ラットにおける遺伝子変異と誘発病変内遺伝子変異の比較

*gpt delta*ラットを用いた遺伝毒性・反復投与毒性の包括的試験の標準化

*gpt delta*ラットを用いた*in vivo*遺伝毒性評価が発がんへの遺伝毒性の関与を検討するうえでの有用性

*gpt delta*ラットを用いた遺伝毒性・反復投与毒性併合試験法の確立・有用性の検証

1. *gpt delta*ラット反復投与毒性試験を用いた遺伝毒性の包括的試験法の標準化

*gpt delta*ラットを用いた包括的試験法の標準化を目的に、被験物質の投与期間やラット系統差の検討を行う。

2. *gpt delta*ラットの一般毒性検索系としての妥当性の検討

*gpt delta*ラットを用いて反復投与毒性を検索することの妥当性を明らかにするために、*gpt delta*ラットおよびその野生型ラットの差異を検討する。

3. *gpt delta*ラットの詳細なレポーター遺伝子変異の解析

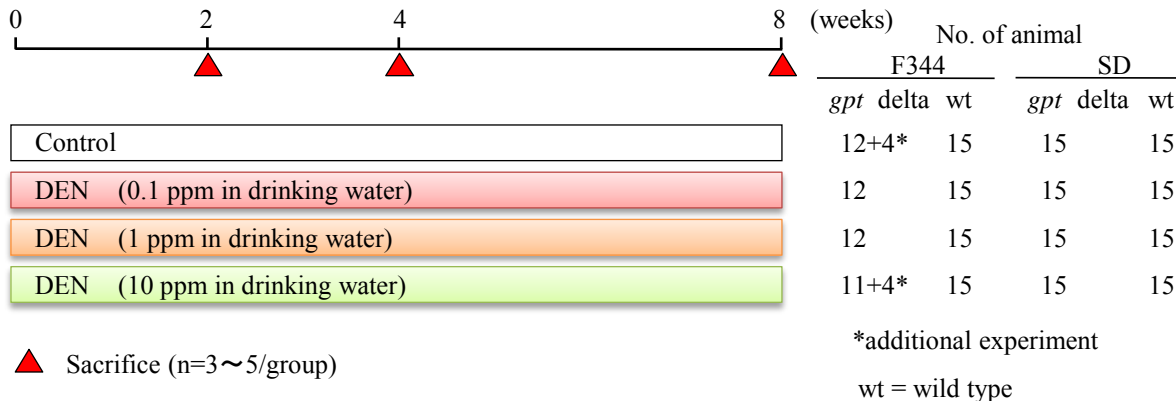
ゲノム中のレポーター遺伝子挿入部位の解析や加齢による自然突然変異頻度の変化や系統間の差異を検討する。

4. *gpt delta*ラットにおける遺伝子変異と誘発病変内遺伝子変異の比較

*gpt*遺伝子上の遺伝子変異とがん遺伝子上の遺伝子変異との相関性を検討する。

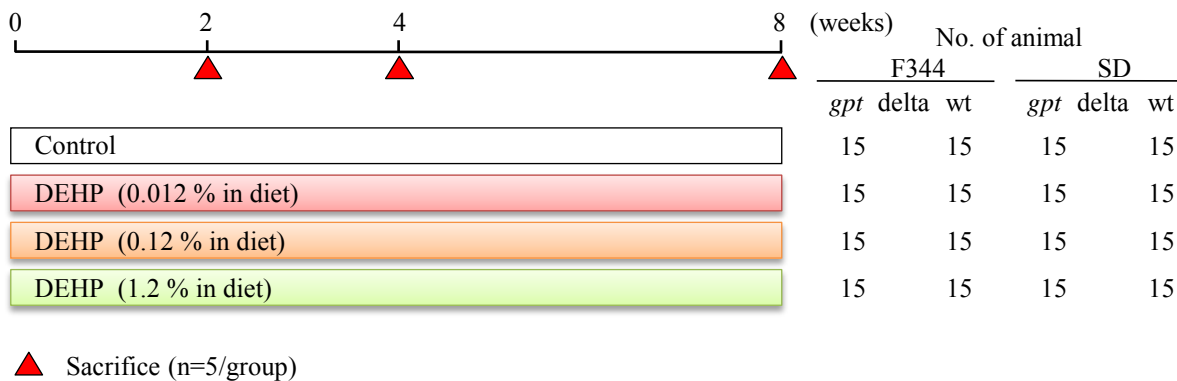
1. *gpt* deltaラット反復投与毒性試験を用いた遺伝毒性の包括的試験法の標準化

Diethylnitrosamine (DEN): 遺伝毒性肝発がん物質



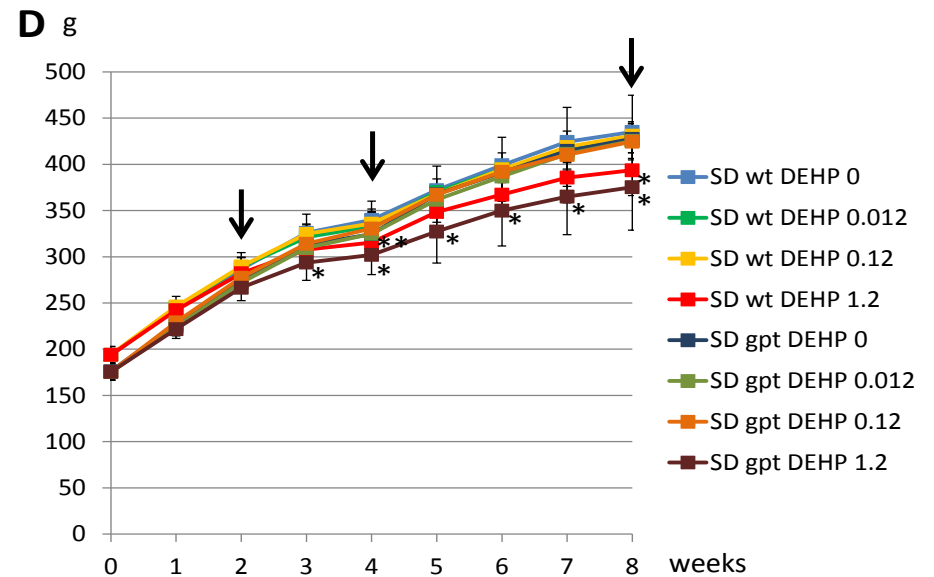
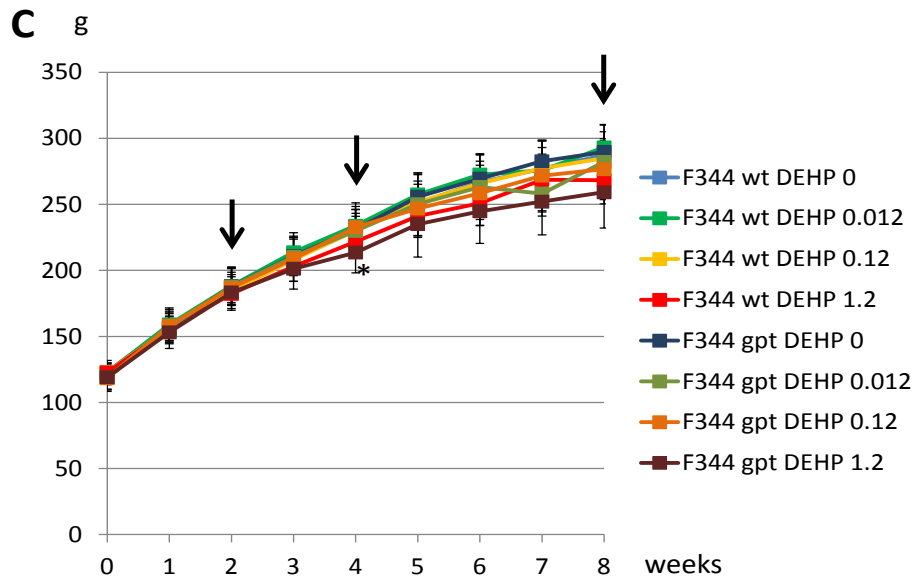
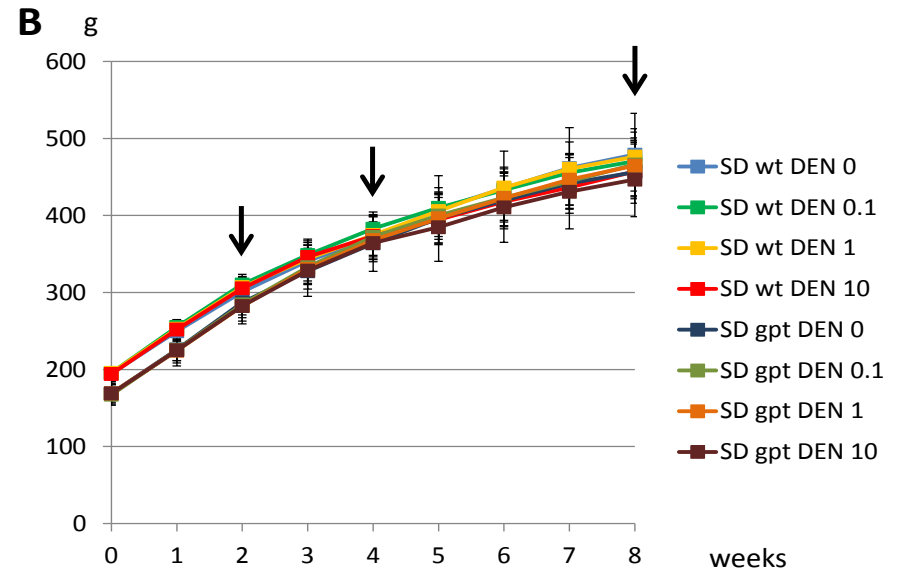
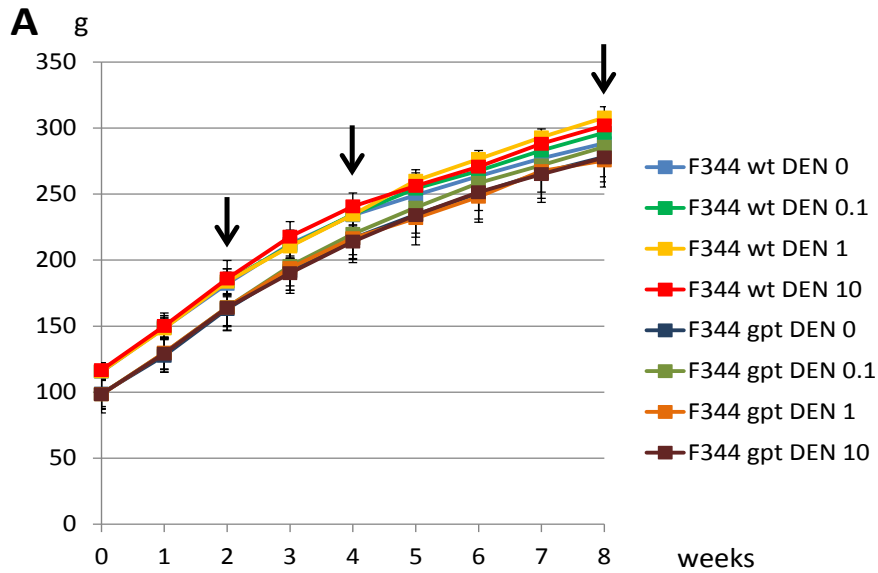
Examination : Histopathology, Serum Biochemistry, IHC of GST-P in liver, *gpt*/*Spi* assay

Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): 非遺伝毒性肝発がん物質



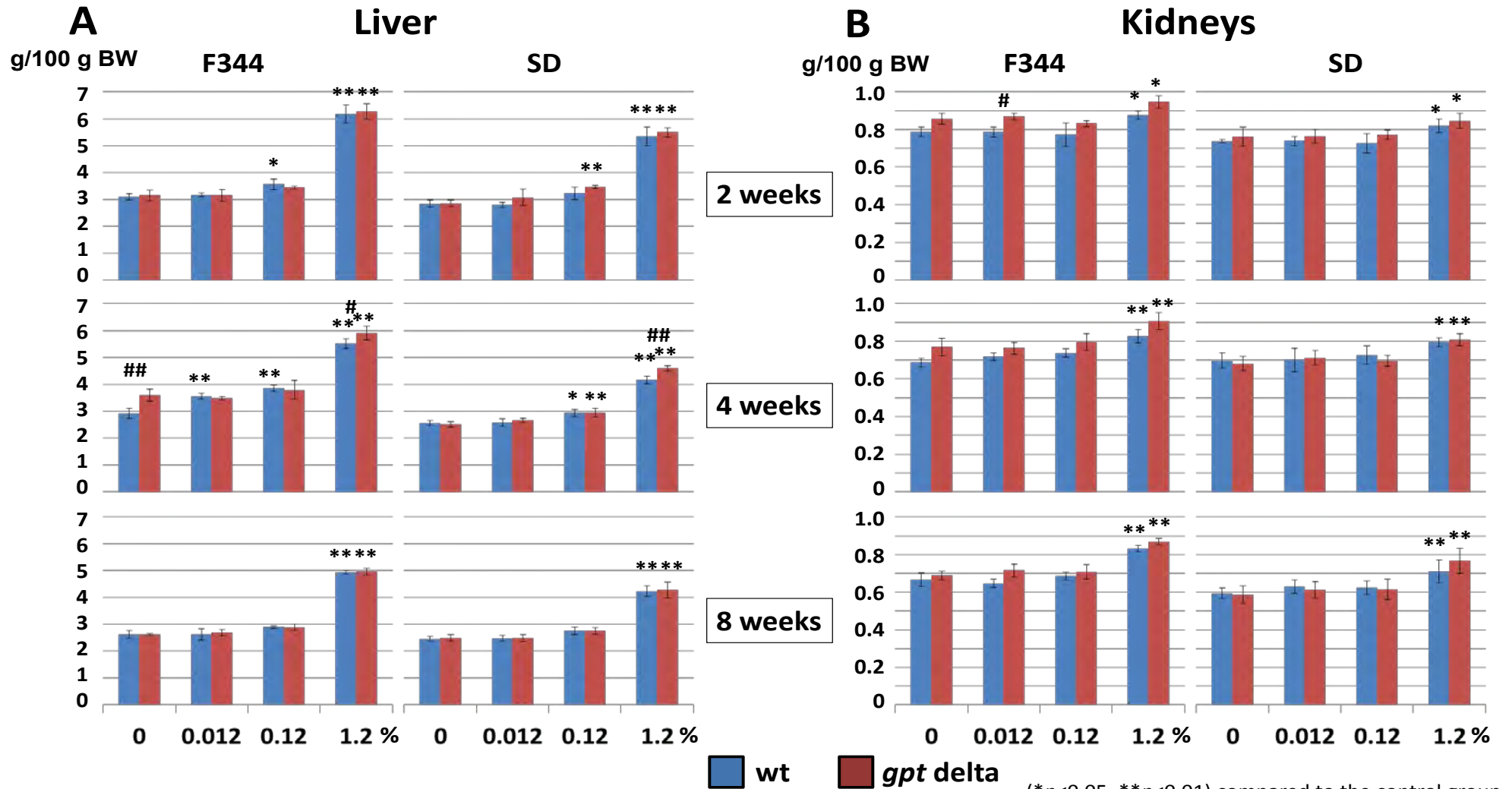
Examination : Histopathology, Serum Biochemistry, *gpt*/*Spi* assay

DEN投与ラットおよびDEHP投与ラットの体重



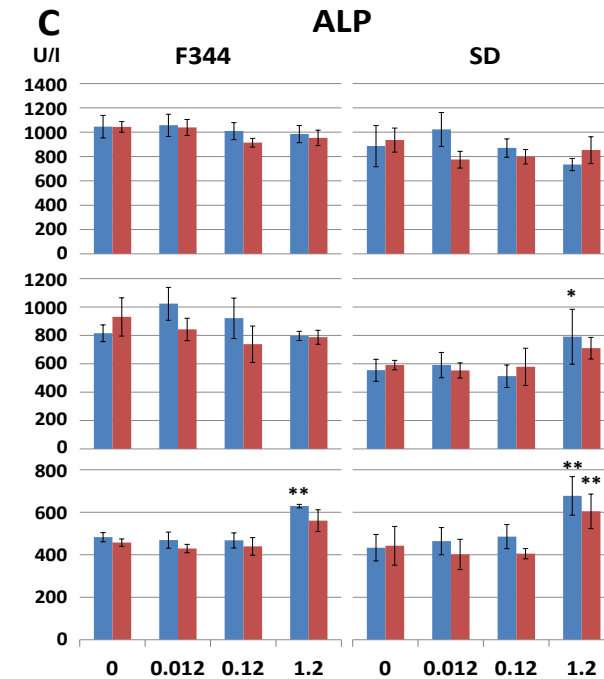
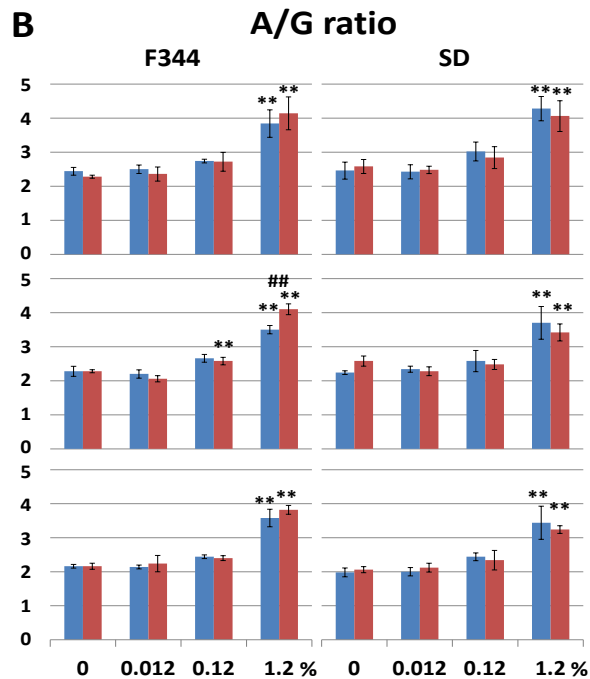
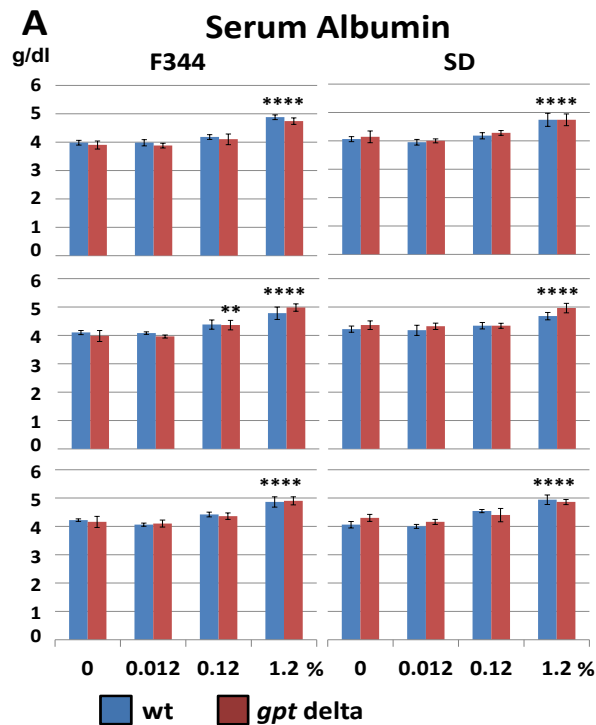
(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) compared to the control group

DEHP投与ラットの相対肝・腎重量



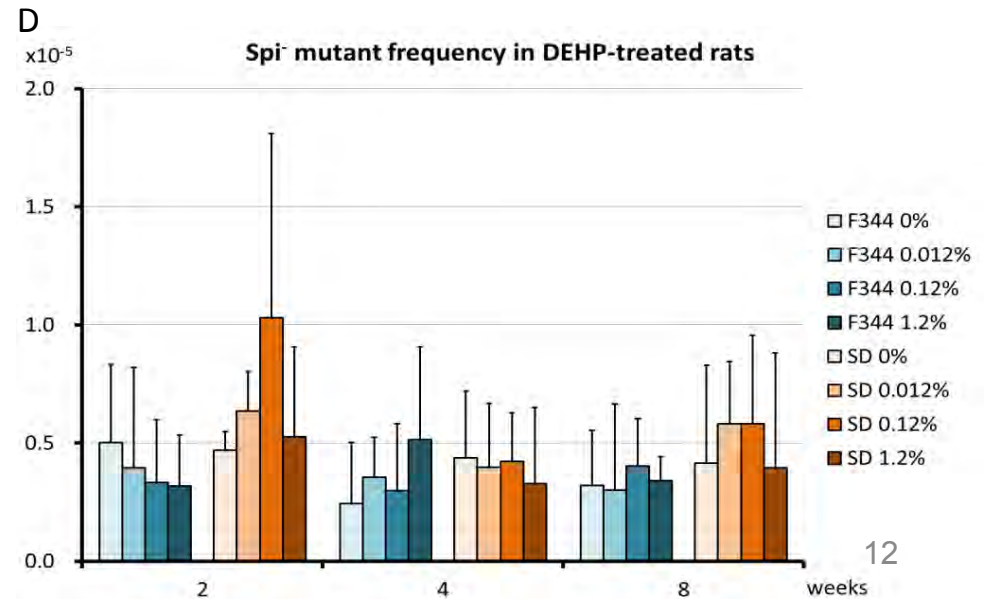
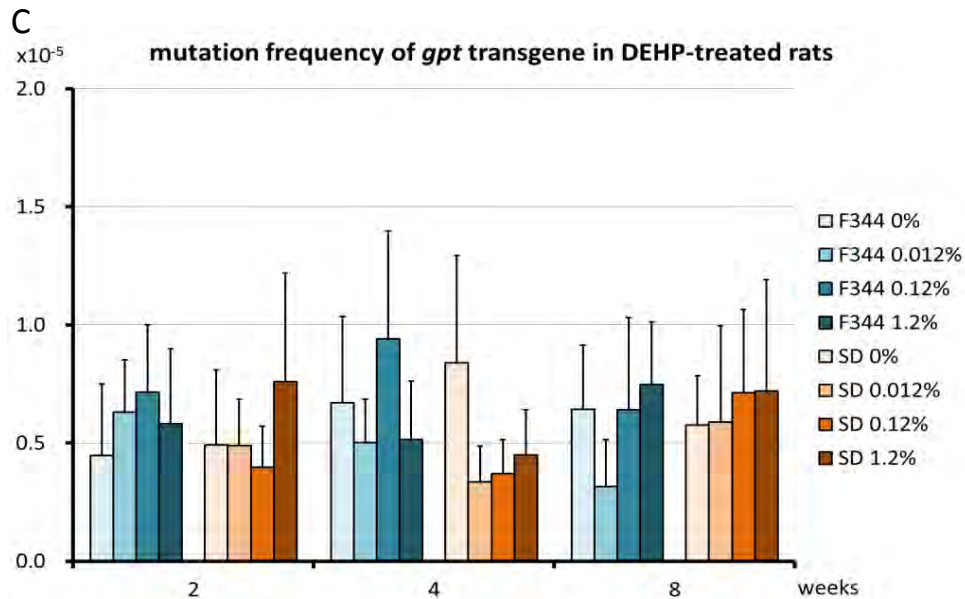
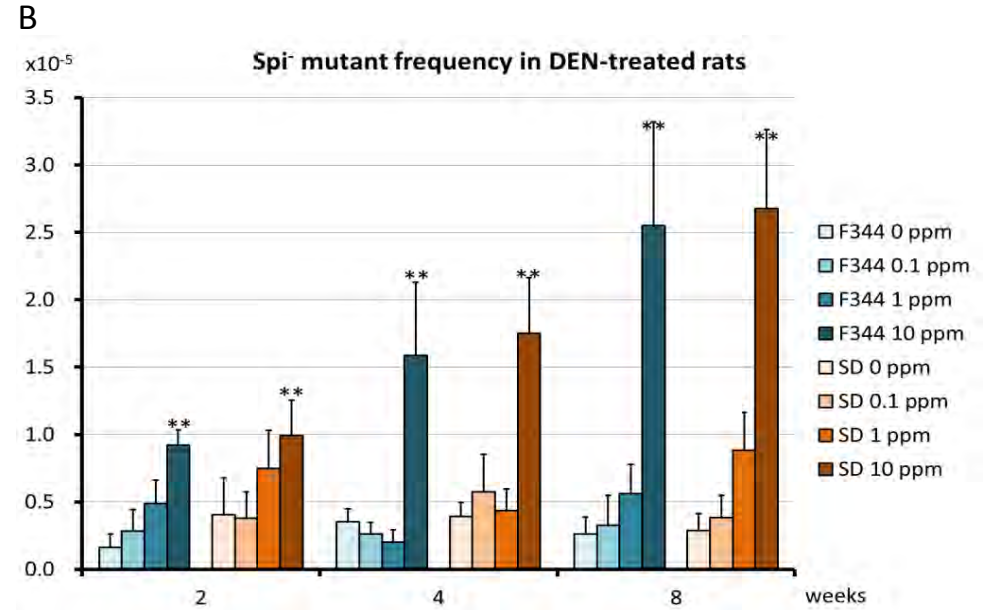
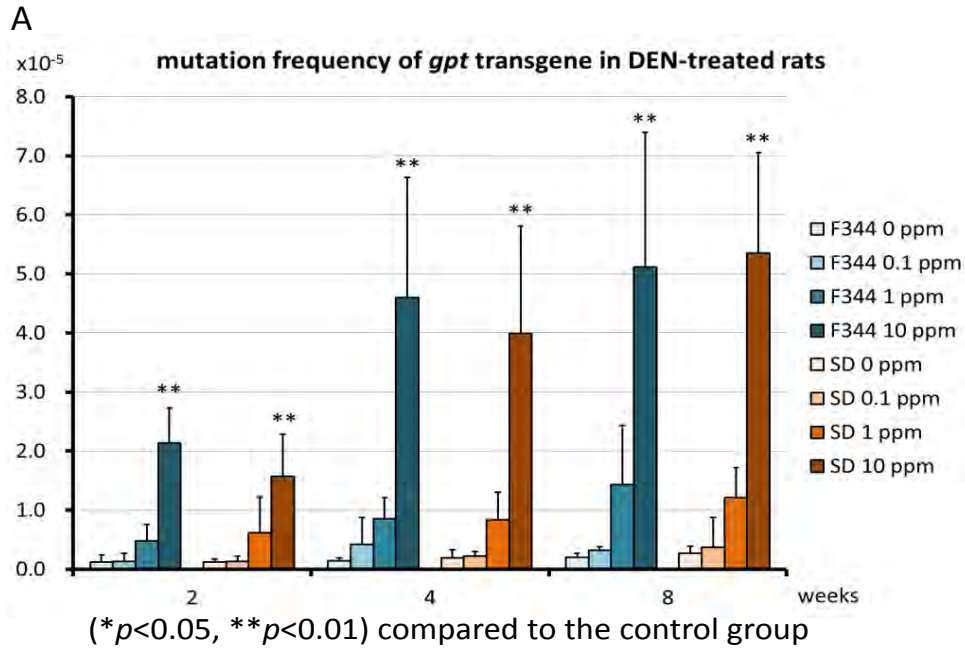
(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) compared to the control group
 (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$) between wt and gpt delta rats

DEHP投与ラットの血清アルブミン、A/G比、ALP



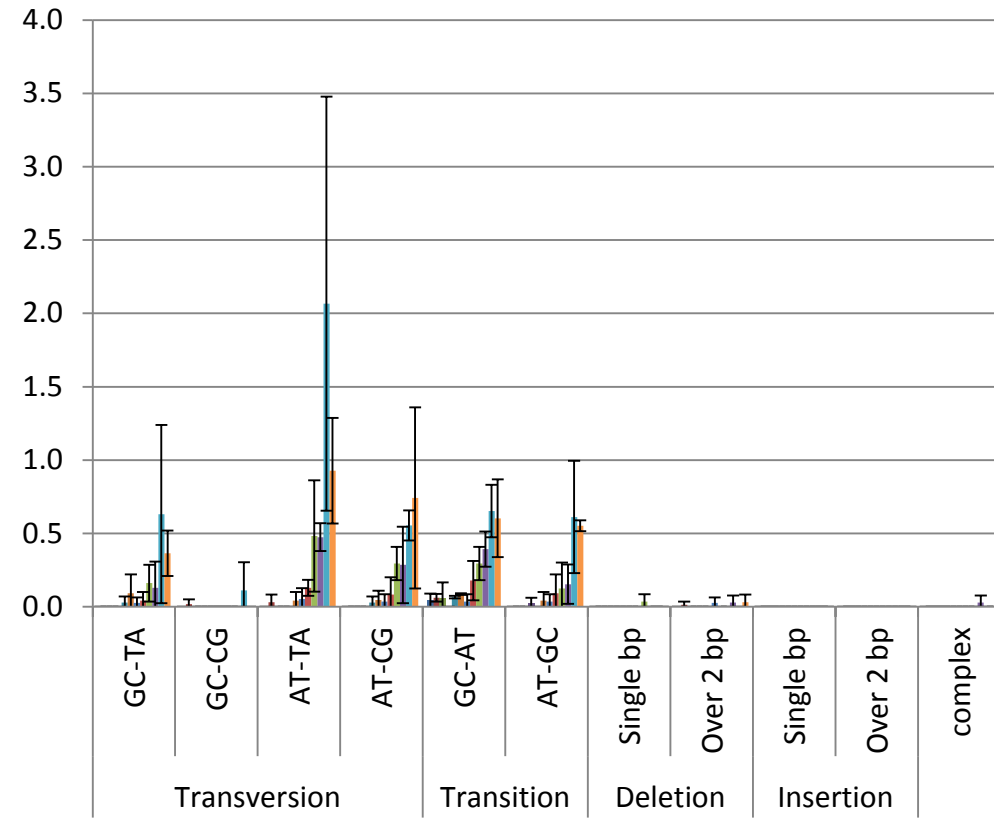
(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) compared to the control group
 (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$) between wt and *gpt delta* rats

gpt deltaラット肝臓における突然変異頻度



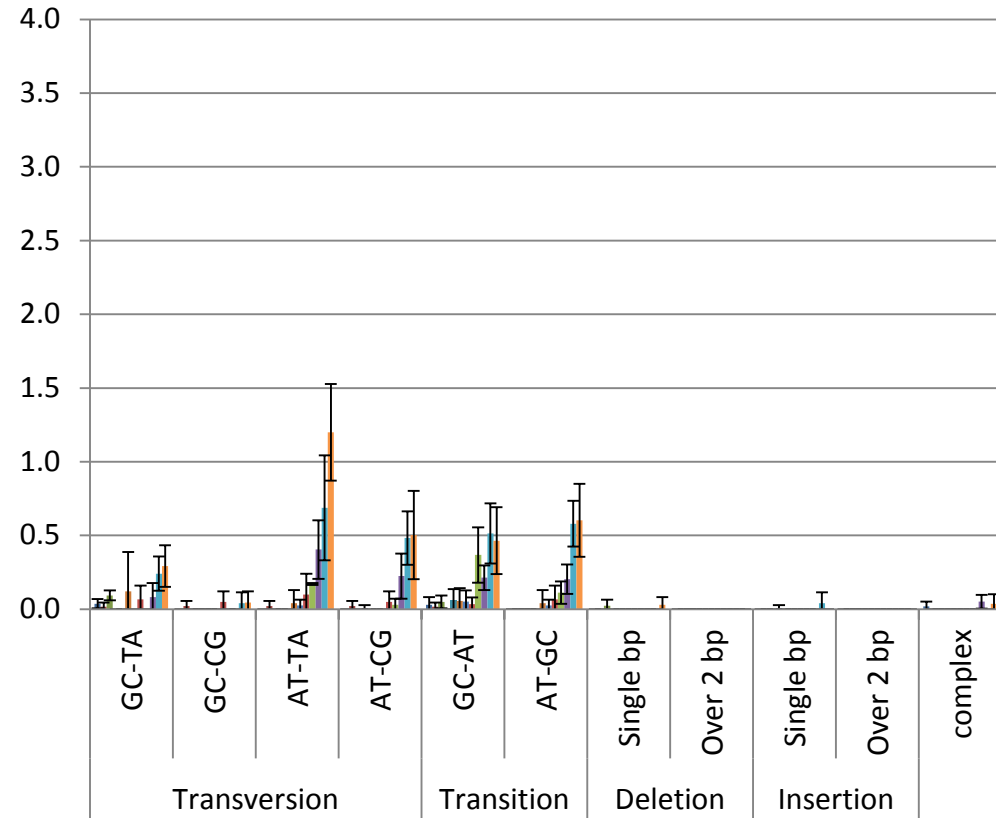
gpt 遺伝子突然変異スペクトラム

F344



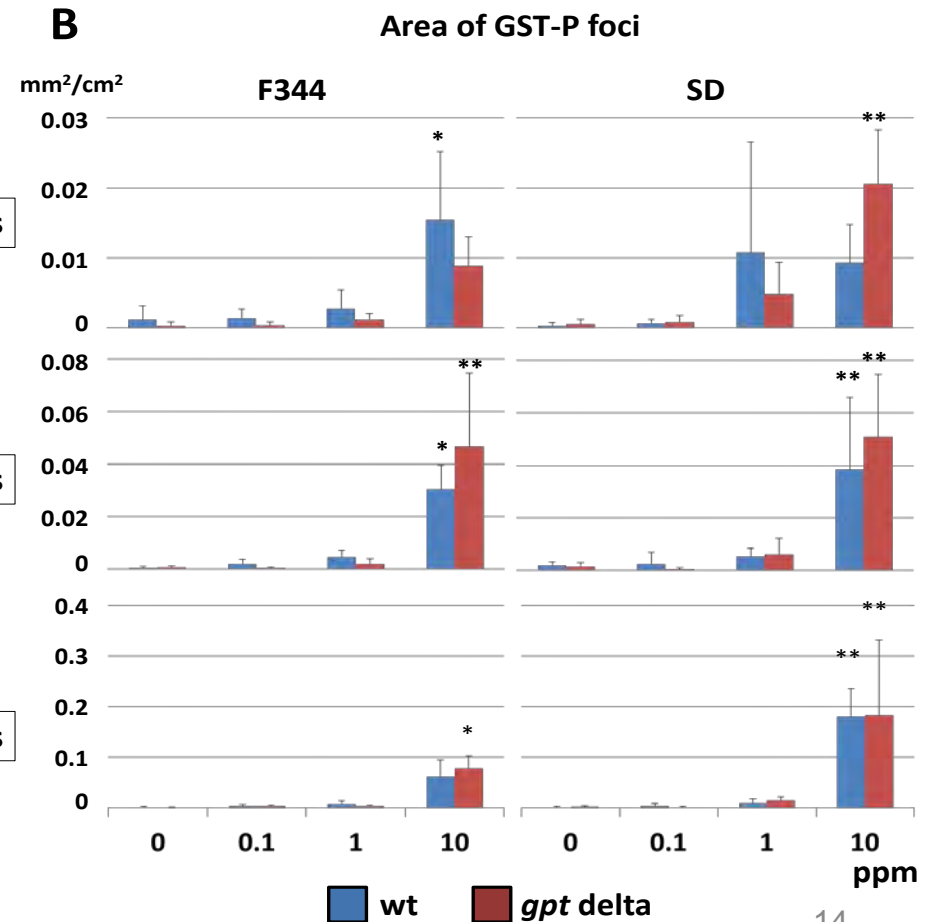
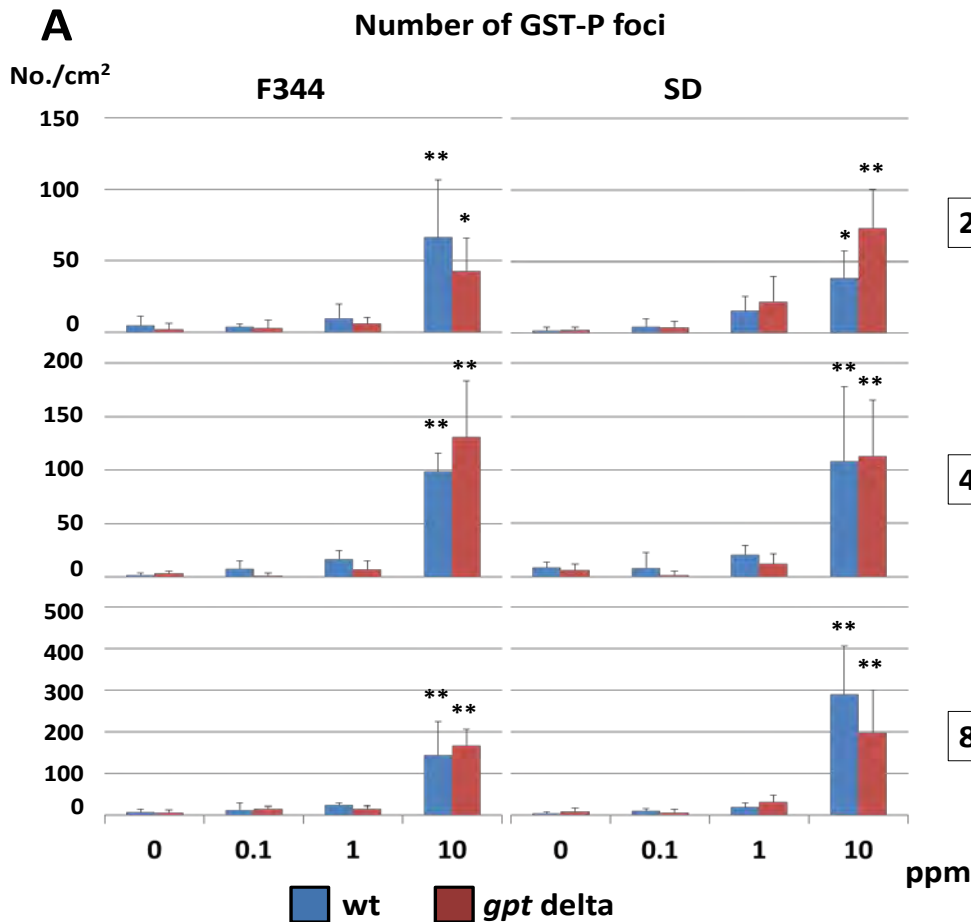
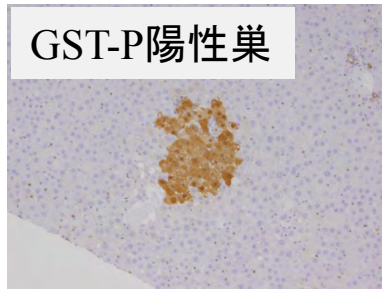
- F344 0 ppm 2 weeks ■ F344 0 ppm 4 weeks ■ F344 0 ppm 8 weeks
- F344 0.1 ppm 2 weeks ■ F344 0.1 ppm 4 weeks ■ F344 0.1 ppm 8 weeks
- F344 1 ppm 2 weeks ■ F344 1 ppm 4 weeks ■ F344 1ppm 8 weeks
- F344 10 ppm 2 weeks ■ F344 10 ppm 4 weeks ■ F344 10 ppm 8 weeks

SD



- SD 0 ppm 2 weeks ■ SD 0 ppm 4 weeks ■ SD 0 ppm 8 weeks
- SD 0.1 ppm 2 weeks ■ SD 0.1 ppm 4 weeks ■ SD 0.1 ppm 8 weeks
- SD 1 ppm 2 weeks ■ SD 1 ppm 4 weeks ■ SD 1ppm 8 weeks
- SD 10 ppm 2 weeks ■ SD 10 ppm 4 weeks ■ SD 10 ppm 8 weeks

DEN投与ラット肝臓におけるGST-P陽性巣数および面積



(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) compared to the control group

1. *gpt* deltaラット反復投与毒性試験を用いた遺伝毒性の包括的試験法の標準化

- 遺伝毒性肝発がん物質であるDENをF344系*gpt* deltaラットおよびSD系*gpt* deltaラットに2、4または8週間投与した結果、両系統のラットで何れの投与期間においても*gpt*およびSpi-変異体頻度は用量依存的に増加し、高用量群において有意な上昇が認められた。一方、非遺伝毒性肝発がん物質であるDEHPを投与した結果、何れの系統および投与期間においても*gpt*およびSpi-変異体頻度の有意な上昇は認められなかった。
- DEN投与群において認められた*gpt*変異体頻度の上昇は、投与期間が長いほど高値を示したが、その程度は何れの投与期間においてもF344系*gpt* deltaラットおよびSD系*gpt* deltaラット間でほぼ同程度であった。
- DEN投与群で認められたGST-P陽性巣の数および面積はF344系*gpt* deltaラットおよびSD系*gpt* deltaラットともに、何れの投与期間においても高用量群において有意な上昇が認められた。さらに、その程度は投与期間が長いほど高値を示したが、*gpt* deltaラットとその野生型間において有意な差異は認められなかった。

gpt deltaラットを用いて反復投与試験を行った結果、遺伝毒性および発がん性は投与期間に関わらず検出でき、その程度は投与期間が長いほど顕著であったことから、*gpt* deltaラットは遺伝毒性を短期間で検出できる有用な手段であり、*gpt* deltaラットを遺伝毒性・反復投与毒性併合試験法に用いることは可能であると考えられた。

1. *gpt delta*ラット反復投与毒性試験を用いた遺伝毒性の包括的試験法の標準化

*gpt delta*ラットを用いた包括的試験法の標準化を目的に、被験物質の投与期間やラット系統差の検討を行う。

2. *gpt delta* ラットの一般毒性検索系としての妥当性の検討

gpt delta ラットを用いて反復投与毒性を検索することの妥当性を明らかにするために、*gpt delta*ラットおよびその野生型ラットの反復投与毒性の差異を検討する。

3. *gpt delta*ラットの詳細なレポーター遺伝子変異の解析

ゲノム中のレポーター遺伝子挿入部位の解析や加齢による自然突然変異頻度の変化や系統間の差異を検討する。

4. *gpt delta* ラットにおける遺伝子変異と誘発病変内遺伝子変異の比較

*gpt*遺伝子上の遺伝子変異とがん遺伝子上の遺伝子変異との相関性を検討する。

2. *gpt delta* ラットの一般毒性検索系としての妥当性の検討

*gpt delta*ラットとその背景系統F344ラットにDENを反復投与し、一般毒性ならびに肝発がん性について遺伝子型間で比較した。

STRAIN: F344 *gpt delta* rat and F344 rat

SEX: Male

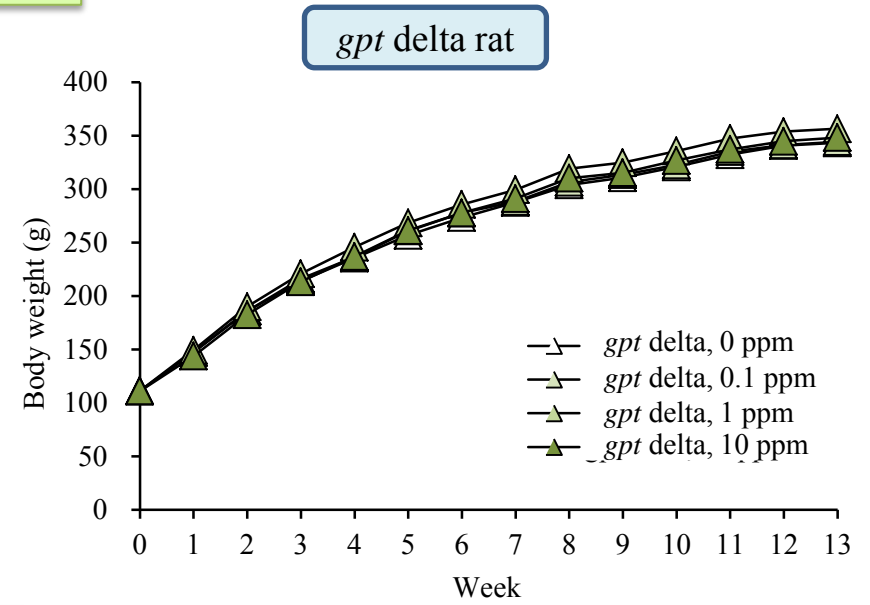
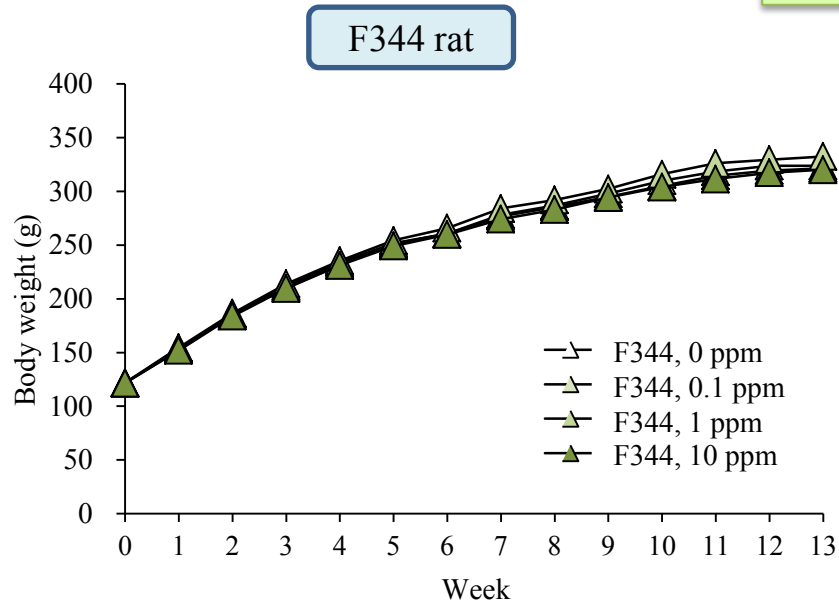
AGE OF START: 6-week-old

			(weeks)
F344	<i>gpt delta</i>	0	13
10	10	0 ppm DEN (ultrapure water)	
10	10	0.1 ppm DEN in drinking water	
10	10	1 ppm DEN in drinking water	
10	10	10 ppm DEN in drinking water	

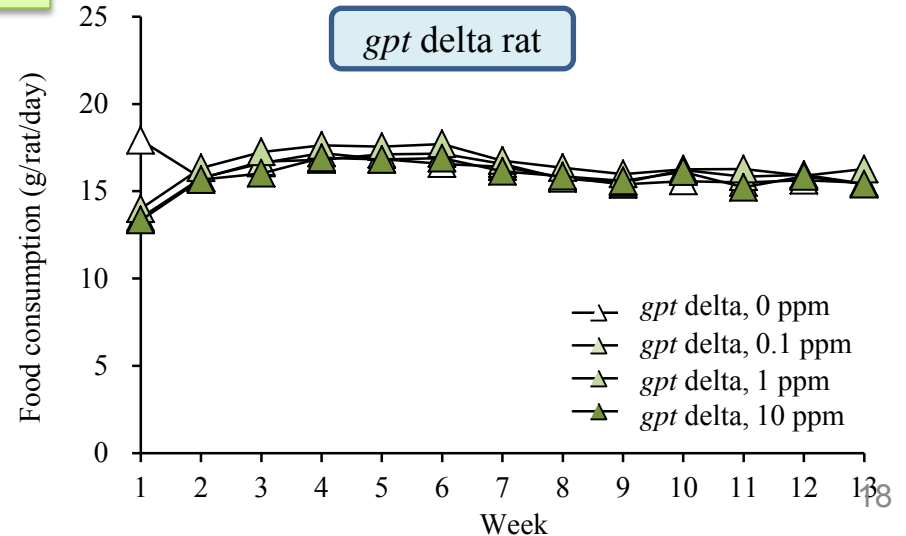
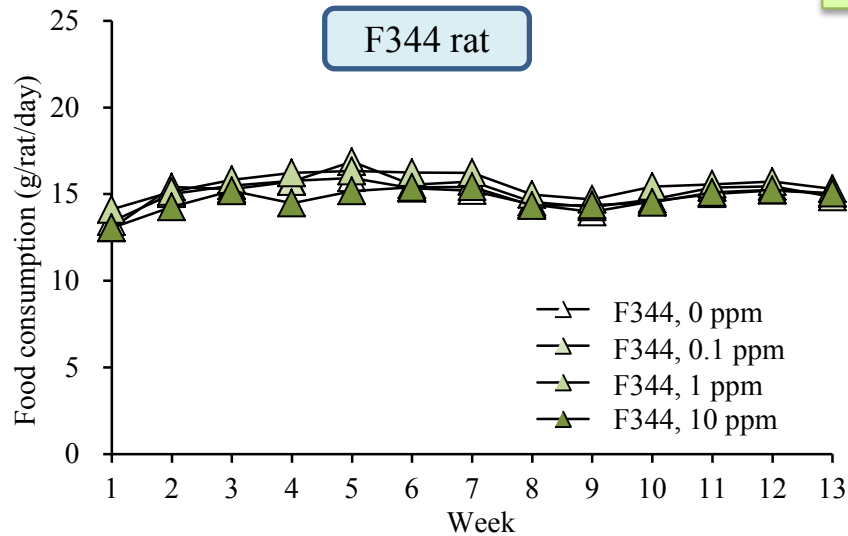
Examination: in-life parameters, hematology, serum biochemistry, organ weight histopathology (liver), quantitative analysis of GST-P positive foci

体重増加曲線と摂餌量

体重増加曲線



摂餌量



臟器重量

	F344				<i>gpt delta</i>			
	0 ppm	0.1 ppm	1 ppm	10 ppm	0 ppm	0.1 ppm	1 ppm	10 ppm
Final body weights (g)	317 ± 18	314 ± 19	324 ± 20	313 ± 18	334 ± 15	335 ± 28	347 ± 15	339 ± 11
Organ weights								
Absolute weights (g)								
Brain	1.92 ± 0.07	1.95 ± 0.05	1.93 ± 0.03	1.93 ± 0.04	1.96 ± 0.06	1.94 ± 0.06	1.95 ± 0.03	1.93 ± 0.05
Thymus	0.25 ± 0.04	0.27 ± 0.05	0.27 ± 0.04	0.27 ± 0.05	0.26 ± 0.04	0.27 ± 0.05	0.25 ± 0.03	0.24 ± 0.03
Lungs	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.05	1.02 ± 0.03	1.02 ± 0.04	1.03 ± 0.07	1.03 ± 0.08	1.04 ± 0.05	1.03 ± 0.07
Heart	0.86 ± 0.05	0.87 ± 0.05	0.89 ± 0.07	0.90 ± 0.08	0.88 ± 0.05	0.90 ± 0.07	0.90 ± 0.08	0.88 ± 0.05
Spleen	0.66 ± 0.02	0.66 ± 0.04	0.67 ± 0.02	0.69 ± 0.04	0.66 ± 0.03	0.67 ± 0.04	0.68 ± 0.04	0.69 ± 0.03
Liver	7.79 ± 0.65	7.72 ± 0.55	7.87 ± 0.45	8.02 ± 0.58	8.58 ± 0.65	8.33 ± 0.76	8.72 ± 0.54	8.67 ± 0.42
Adrenals	0.044 ± 0.005	0.043 ± 0.005	0.044 ± 0.002	0.040 ± 0.003	0.044 ± 0.005	0.044 ± 0.003	0.046 ± 0.003	0.043 ± 0.004
Kidneys	1.87 ± 0.12	1.91 ± 0.13	1.90 ± 0.06	1.88 ± 0.13	1.92 ± 0.12	2.05 ± 0.14	2.03 ± 0.12	1.95 ± 0.07
Testes	3.04 ± 0.20	3.02 ± 0.16	3.03 ± 0.24	3.09 ± 0.19	2.98 ± 0.17	3.08 ± 0.21	3.09 ± 0.14	3.03 ± 0.12
Relative weights (g/100g b.w.)								
Brain	0.61 ± 0.02	0.62 ± 0.03	0.60 ± 0.04	0.62 ± 0.03	0.59 ± 0.03	0.58 ± 0.04	0.56 ± 0.02	0.57 ± 0.02
Thymus	0.079 ± 0.012	0.086 ± 0.015	0.084 ± 0.009	0.087 ± 0.018	0.078 ± 0.012	0.080 ± 0.012	0.072 ± 0.009	0.071 ± 0.011
Lungs	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.02
Heart	0.27 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.26 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.26 ± 0.02	0.26 ± 0.02
Spleen	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01
Liver	2.45 ± 0.09	2.46 ± 0.09	2.43 ± 0.07	2.56 ± 0.09	2.56 ± 0.09	2.49 ± 0.10	2.51 ± 0.09	2.56 ± 0.08
Adrenals	0.014 ± 0.0010	0.014 ± 0.0015	0.014 ± 0.0009	0.013 ± 0.0010	0.013 ± 0.0014	0.013 ± 0.0012	0.013 ± 0.0012	0.013 ± 0.0012
Kidneys	0.59 ± 0.02	0.61 ± 0.03	0.59 ± 0.04	0.60 ± 0.02	0.58 ± 0.03	0.61 ± 0.02**	0.58 ± 0.02	0.58 ± 0.02
Testes	0.96 ± 0.04	0.96 ± 0.04	0.94 ± 0.11	0.99 ± 0.06	0.89 ± 0.05	0.92 ± 0.03	0.89 ± 0.04	0.90 ± 0.05

** $p < 0.01$ vs. 0 ppm

血液学的検査および血清生化学的検査

血液学的検査

	F344				gpt delta			
	0 ppm	0.1 ppm	1 ppm	10 ppm	0 ppm	0.1 ppm	1 ppm	10 ppm
WBC (x10 ² /μL)	40.5 ± 14.0	48.6 ± 15.6	41.5 ± 7.0	41.1 ± 10.1	38.4 ± 12.0	37.0 ± 8.5	33.1 ± 6.1	29.1 ± 3.2
RBC (x10 ³ /μL)	869.6 ± 45.0	944.1 ± 42.9 **	920.2 ± 37.7 *	941.4 ± 37.8 **	889.4 ± 53.4	910.4 ± 51.1	875.7 ± 26.1	916.4 ± 33.2
HGB (g/dL)	15.1 ± 0.9	15.8 ± 0.6 *	15.5 ± 0.4	15.7 ± 0.6	15.0 ± 1.0	15.3 ± 0.7	14.8 ± 0.2	14.8 ± 0.4
HCT (%)	47.6 ± 2.4	51.4 ± 2.4 **	50.1 ± 1.8 *	50.9 ± 2.0 **	47.7 ± 2.5	48.8 ± 2.6	46.8 ± 1.5	48.3 ± 2.0
MCV (fL)	54.7 ± 0.5	54.5 ± 0.2	54.4 ± 0.4	54.1 ± 0.4 **	53.7 ± 0.5	53.6 ± 0.4	53.5 ± 0.4	53.3 ± 0.3
MCH (pg)	17.4 ± 0.3	16.8 ± 0.5 **	16.8 ± 0.4 **	16.6 ± 0.2 **	16.9 ± 0.2	16.8 ± 0.5	16.9 ± 0.3	16.4 ± 0.3 **
MCHC (g/dL)	31.7 ± 0.5	30.8 ± 0.9	30.9 ± 0.7 *	30.8 ± 0.4 **	31.5 ± 0.5	31.4 ± 0.9	31.6 ± 0.6	30.7 ± 0.6
PLT (x10 ⁴ /μL)	62.2 ± 5.2	64.6 ± 7.2	64.5 ± 2.2	69.6 ± 9.5	66.9 ± 7.6	67.2 ± 5.4	66.5 ± 3.4	74.2 ± 3.9 *

*, **: $p < 0.05, 0.01$ vs. 0 ppm

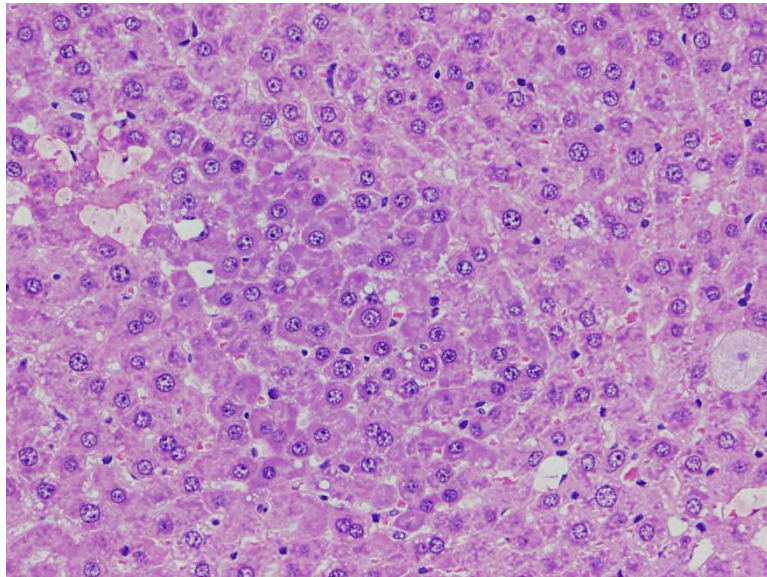
血清生化学的検査

	F344				gpt delta			
	0 ppm	0.1 ppm	1 ppm	10 ppm	0 ppm	0.1 ppm	1 ppm	10 ppm
TP (g/dL)	6.1 ± 0.2	5.9 ± 0.1	6.0 ± 0.2	6.1 ± 0.3	6.1 ± 0.2	6.0 ± 0.2	6.1 ± 0.2	6.0 ± 0.2
A/G	2.0 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.2 ± 0.1 *	2.1 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.9 ± 0.1 *	2.2 ± 0.1
ALB (g/dL)	4.1 ± 0.1	4.0 ± 0.1	4.0 ± 0.2	4.2 ± 0.2	4.1 ± 0.1	4.0 ± 0.2	4.0 ± 0.1	4.1 ± 0.1
T-Bil (mg/dL)	0.039 ± 0.007	0.034 ± 0.008	0.040 ± 0.007	0.043 ± 0.008	0.037 ± 0.005	0.043 ± 0.005 *	0.037 ± 0.005	0.040 ± 0.005
T-Chol (mg/dL)	64 ± 3	64 ± 6	66 ± 7	65 ± 6	63 ± 4	67 ± 5	63 ± 4	59 ± 7
Glu (mg/dL)	166 ± 36	170 ± 22	180 ± 24	169 ± 29	189 ± 44	201 ± 36	180 ± 21	168 ± 25
TG (mg/dL)	110 ± 25	104 ± 19	110 ± 27	100 ± 14	151 ± 41	120 ± 40	136 ± 34	93 ± 22 **
PL (mg/dL)	111 ± 7	108 ± 7	107 ± 10	108 ± 8	115 ± 9	113 ± 12	112 ± 9	103 ± 10 *
BUN (mg/dL)	17.8 ± 0.7	16.5 ± 0.6	16.2 ± 1.3 *	17.0 ± 1.7	20.7 ± 1.5	18.5 ± 0.9	17.6 ± 1.4 **	17.0 ± 1.5 **
CRN (mg/dL)	0.28 ± 0.01	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.28 ± 0.04	0.30 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.02
Ca (mg/dL)	10.0 ± 0.3	9.7 ± 0.2	9.9 ± 0.2	10.1 ± 0.3	9.8 ± 0.3	9.9 ± 0.3	10.0 ± 0.2	10.1 ± 0.2
P (mg/dL)	5.6 ± 0.1	5.5 ± 0.2	5.5 ± 0.4	5.9 ± 0.5	5.8 ± 0.4	5.8 ± 0.3	5.8 ± 0.4	5.7 ± 0.2
Na (mEq/dL)	145 ± 1	143 ± 1 **	144 ± 1 *	143 ± 1 **	143 ± 1	143 ± 1	142 ± 1	143 ± 1
K (mEq/dL)	4.2 ± 0.1	4.2 ± 0.2	4.2 ± 0.2	4.3 ± 0.4	4.4 ± 0.1	4.4 ± 0.2	4.5 ± 0.2	4.4 ± 0.2
Cl (mEq/dL)	105 ± 1	104 ± 1	105 ± 1	104 ± 1	103 ± 1	103 ± 1	103 ± 1	104 ± 1
AST (IU/L)	83 ± 8	78 ± 9	75 ± 10	77 ± 11	82 ± 14	74 ± 5	80 ± 9	80 ± 12
ALT (IU/L)	47 ± 6	45 ± 6	43 ± 6	45 ± 7	53 ± 9	49 ± 5	48 ± 4	48 ± 6
ALP (IU/L)	384 ± 25	366 ± 22	339 ± 29 **	338 ± 26 **	421 ± 31	379 ± 30	353 ± 19 **	350 ± 28 **
γ-GTP (IU/L)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND 20

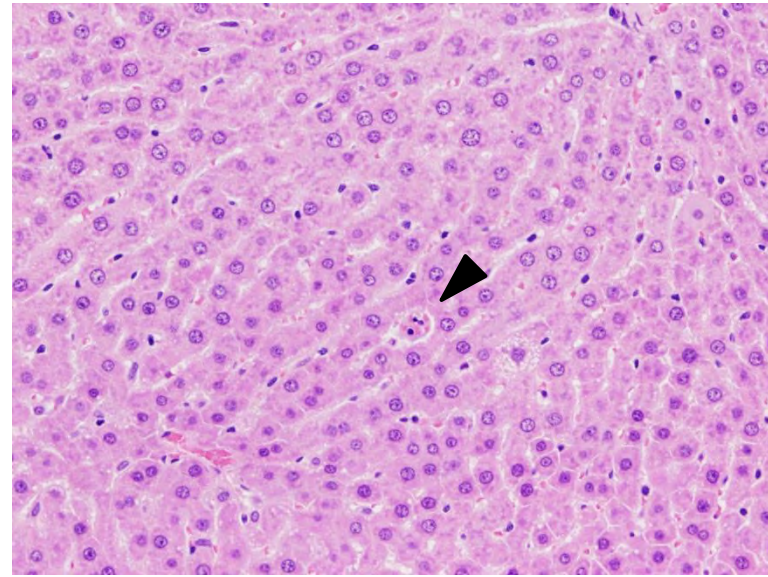
ND, Not detected. *, **: $p < 0.05, 0.01$ vs. 0 ppm

肝臓の病理組織学的検査

Organs	Findings	F344				<i>gpt</i> delta			
		0 ppm	0.1 ppm	1 ppm	10 ppm	0 ppm	0.1 ppm	1 ppm	10 ppm
No. of animal		10	10	10	10	10	10	10	10
Liver	Single cell necrosis	0	2	3	7	0	3	4	5
	Hepatocyte, necrosis, focal	0	0	1	0	0	0	1	1
	Focus of cellular alteration, basophilic, diffuse	0	0	0	7	0	0	0	8

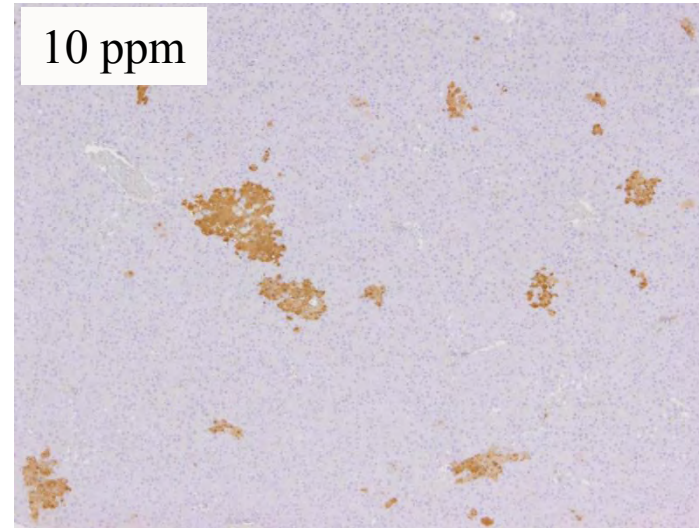
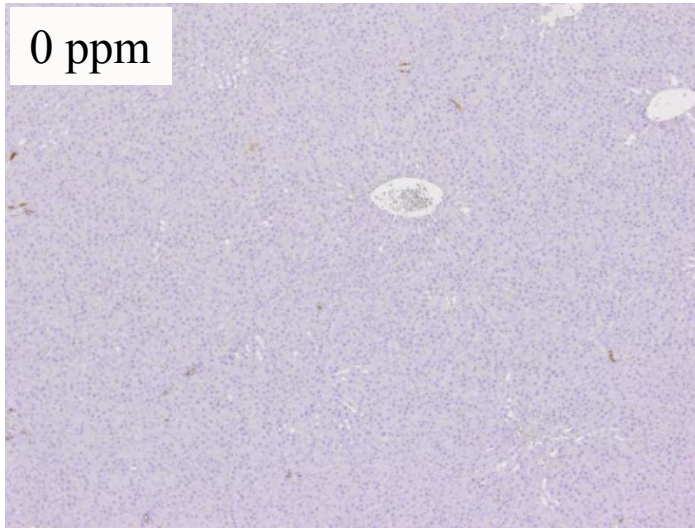


Focus of cellular alteration

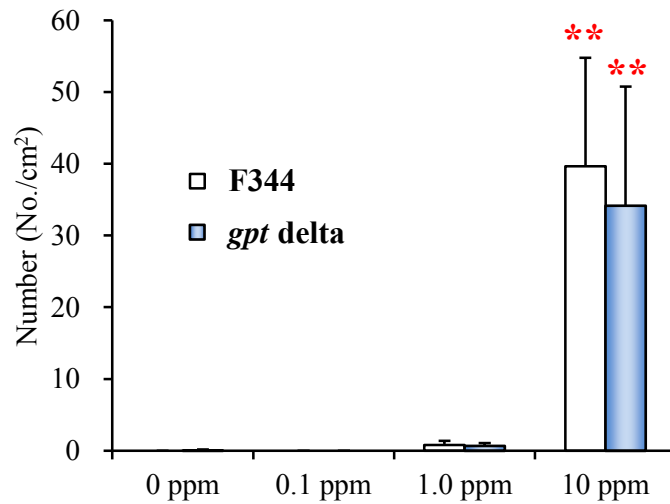


Single cell necrosis

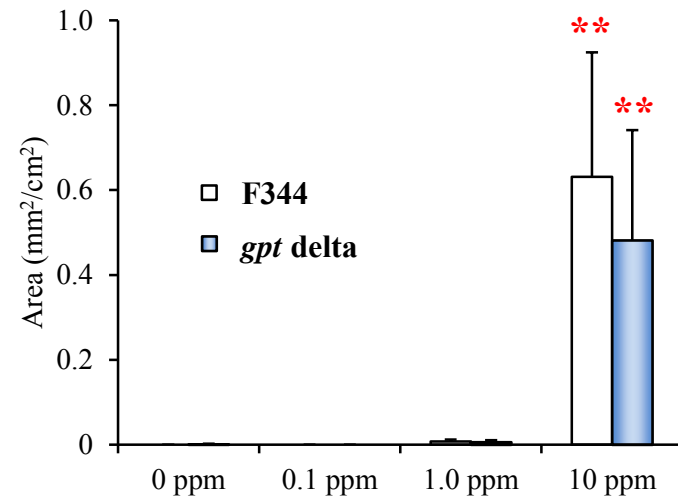
肝臓のGST-P陽性細胞巢定量的解析



Number



Area



2. *gpt delta* ラットの一般毒性検索系としての妥当性の検討

- *gpt delta*および野生型ラットにDENを13週間投与した結果、何れのラットにも投与に起因する体重・摂餌量の変化はなく、血液学的検査、血清生化学的検査ならびに臓器重量測定に毒性学的意義のある変化は認められなかった。
- 病理組織学的検査の結果、肝細胞の単細胞壊死、巣状壊死および好塩基性変異肝細胞巢の発生が認められたが、その発生頻度において両遺伝子型間に有意な差は認められなかった。また、GST-P陽性細胞巢の定量的解析の結果、両遺伝子型ともに投与群において、その数および面積ともに有意な高値を示し、その程度も遺伝子型間で同程度であったことから、DENの肝発がん性に対する感受性に両遺伝子型間に差異はないと考えられた。
- DENの一般毒性ならびに発がん性に関して、F344系*gpt delta*ラットおよびF344系ラット間で特異的な差異は認められなかったことから、一般毒性検索を目的とした反復投与試験にF344系*gpt delta*ラットを用いることは妥当であると考えられた。

F344系*gpt delta*ラットおよびF344系ラットにDENを13週間反復投与した結果、DENの一般毒性および発がん性に対する遺伝子型間の特異的な差異はないと考えられた。

1. ***gpt delta*ラット反復投与毒性試験を用いた遺伝毒性の包括的試験法の標準化**

*gpt delta*ラットを用いた包括的試験法の標準化を目的に、被験物質の投与期間やラット系統差の検討を行う。

2. ***gpt delta*ラットの一般毒性検索系としての妥当性の検討**

*gpt delta*ラットを用いて反復投与毒性を検索することの妥当性を明らかにするために、*gpt delta*ラットおよびその野生型ラットの反復投与毒性の差異を検討する。

3. ***gpt delta*ラットの詳細なレポーター遺伝子変異の解析**

ゲノム中のレポーター遺伝子挿入部位の解析や加齢による自然突然変異頻度の変化や系統間の差異を検討する。

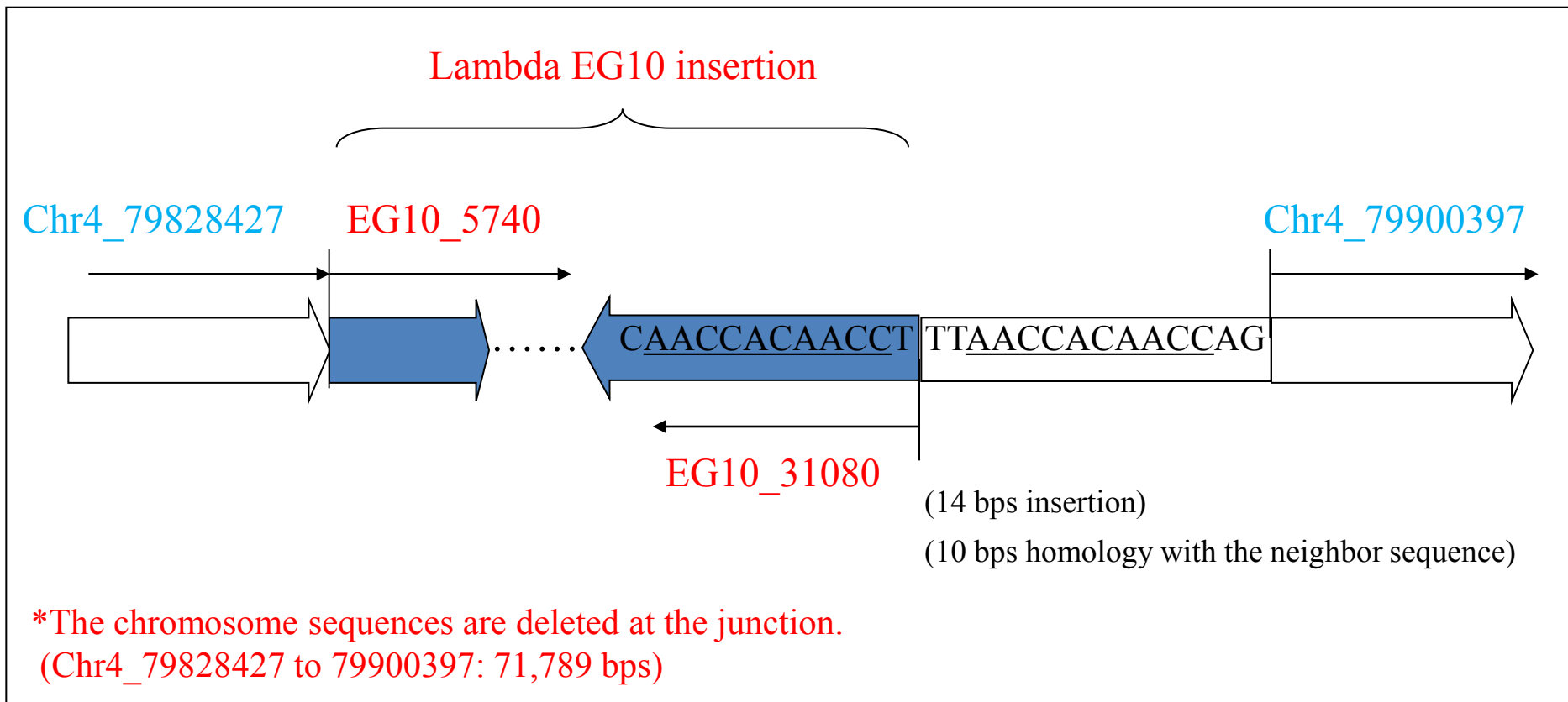
4. ***gpt delta*ラットにおける遺伝子変異と誘発病変内遺伝子変異の比較**

*gpt*遺伝子上の遺伝子変異とがん遺伝子上の遺伝子変異との相関性を検討する。

ゲノム中のトランスジーン挿入部位の解析

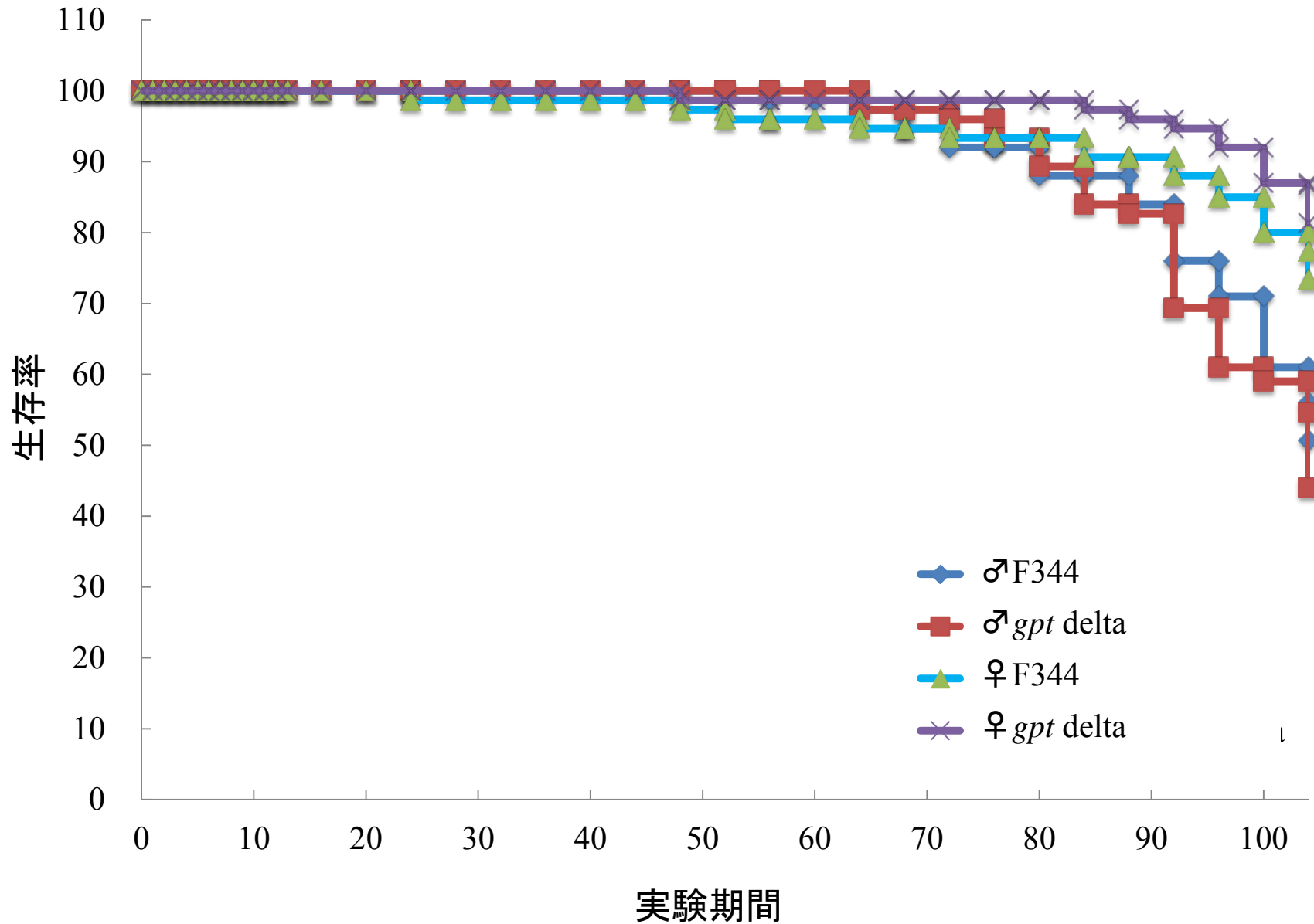
次世代シーケンサーを用いて、導入遺伝子 λ EG10の挿入位置の配列を決定した。

Lambda EG10 transgenes are integrated in chromosome 4 of *gpt* delta rat (F344 background).



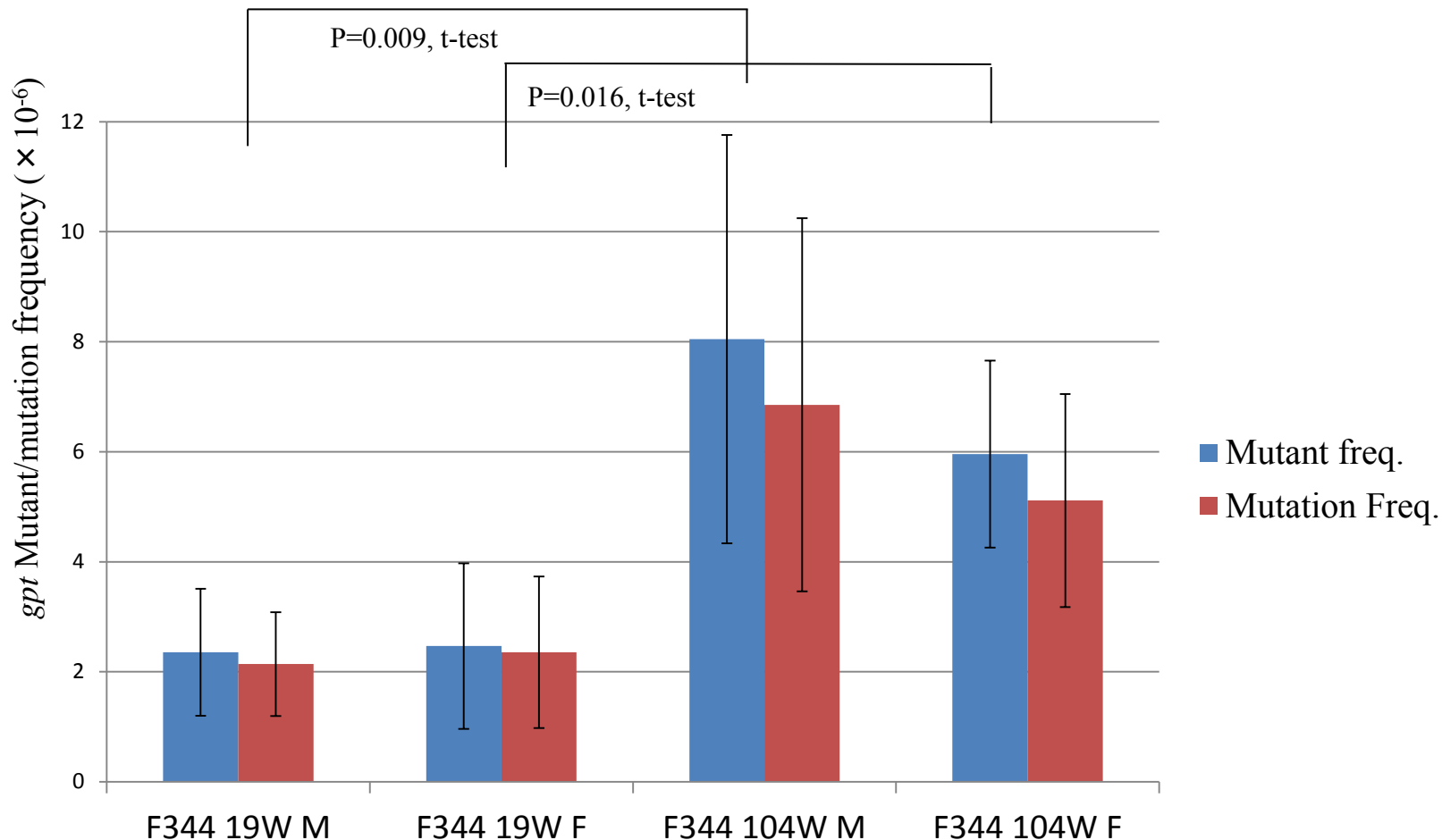
挿入部位におけるゲノム欠失(72 kb、1遺伝子含む)および導入遺伝子の断片化が確認された。

F344 *gpt* delta ラット2年間飼育実験の生存率



自然突然変異の蓄積の検討

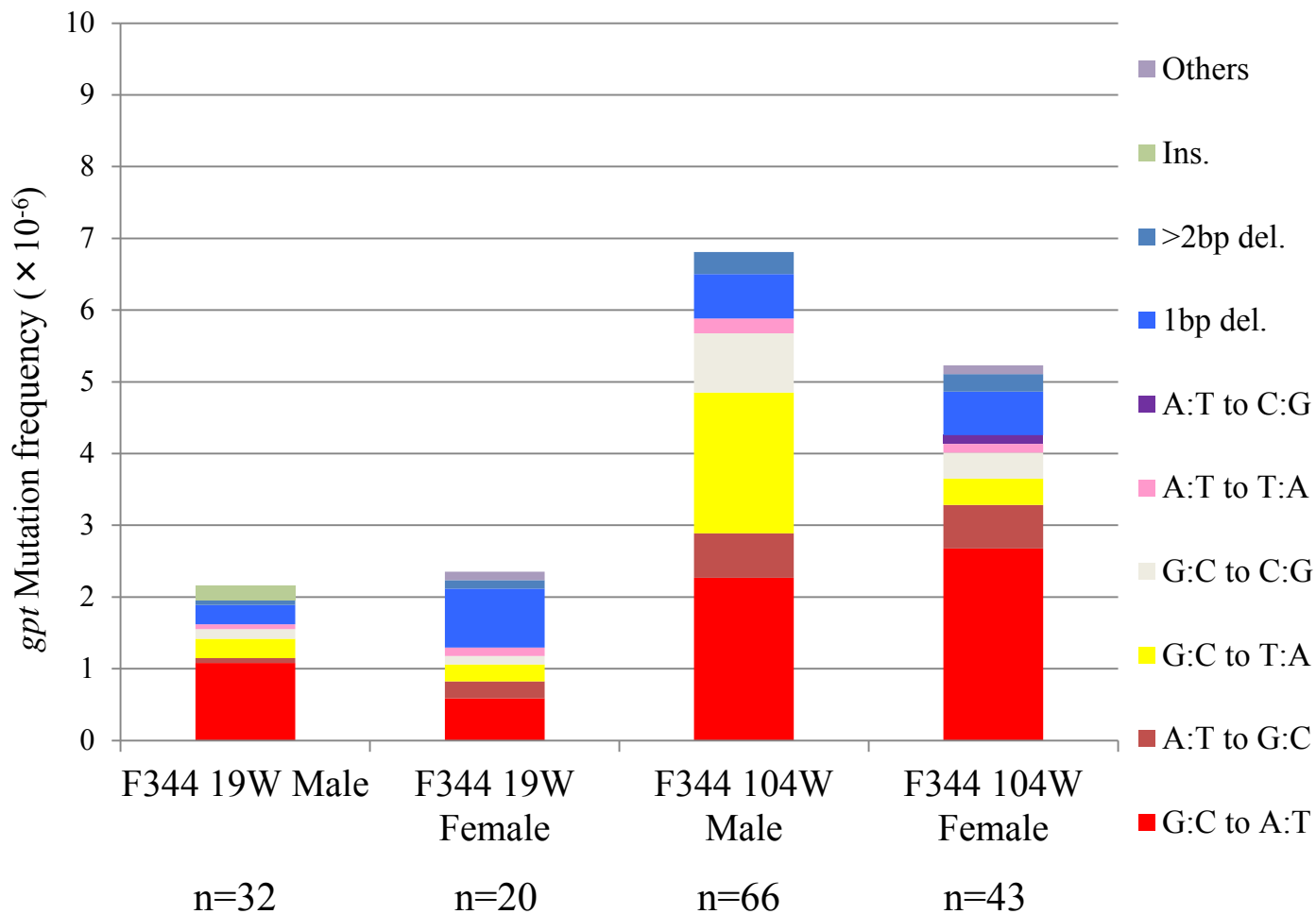
Point mutations in liver of F344 *gpt* delta rats



F344 *gpt* deltaラット肝臓の*gpt*点突然変異頻度は、19週齢と比較して104週齢では約3倍に増加した。

自然突然変異の蓄積の検討

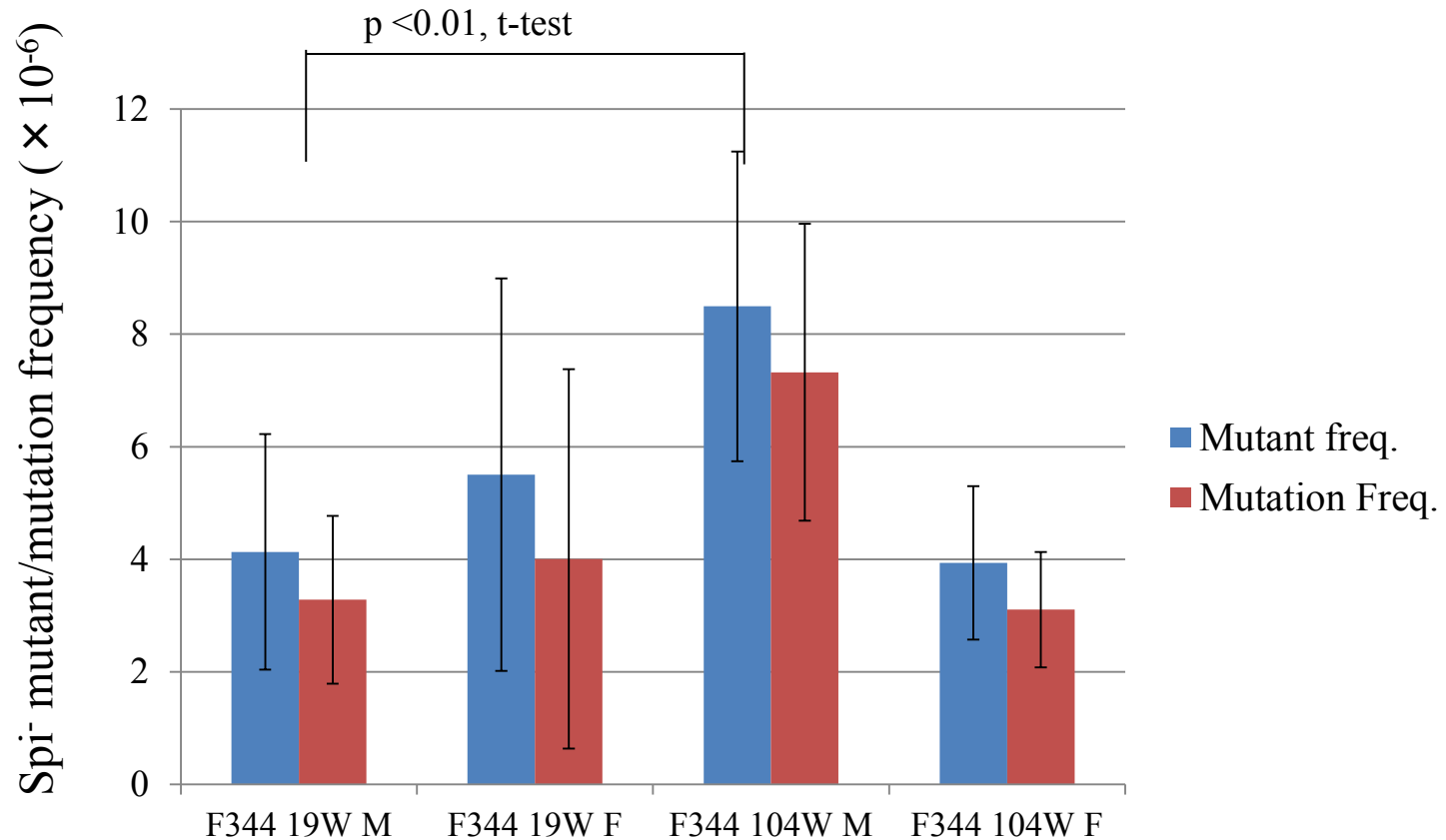
gpt Mutation spectra in liver of F344 *gpt* delta rats



点突然変異の主要なタイプはG:C to A:T, G:C to T:A, 1塩基欠失等であり、加齢によって増加した。104週齢の雄ではG:C to T:A変異の顕著な増加がみられた。

自然突然変異の蓄積の検討

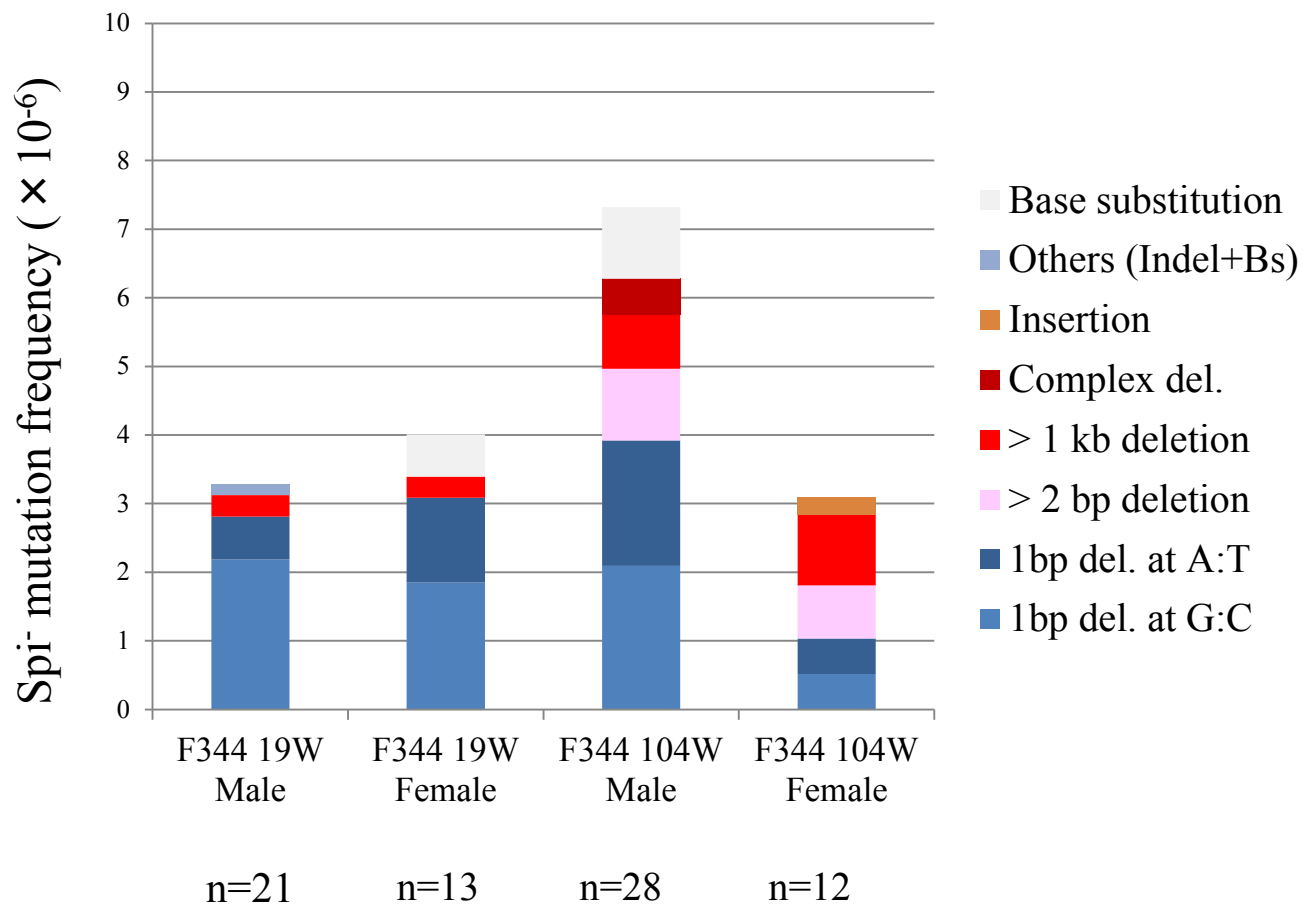
Deletions in liver of F344 *gpt* delta rats



F344 *gpt* deltaラット肝臓のSpi-欠失変異頻度は、19週齢と比較して104週齢の雄で2倍に増加した。

自然突然変異の蓄積の検討

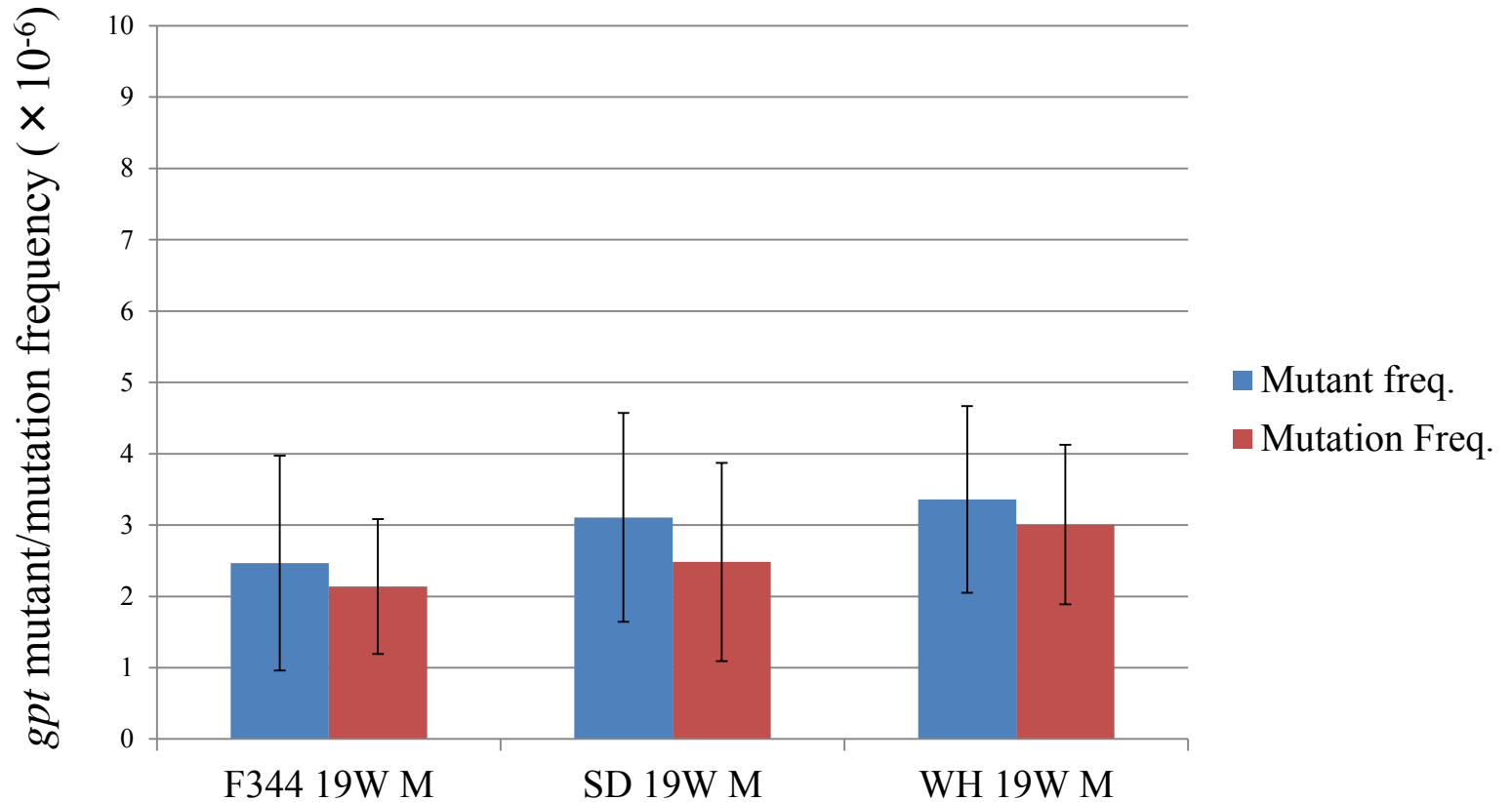
Spi^r mutation spectra in liver of F344 *gpt* delta rats



104週齢の雌雄ラット肝臓では2 bps～数kbの欠失変異が増加した。

系統差の検討

gpt Mutant/mutation frequencies in liver of male *gpt* delta rats (F344, SD and WistarHannover)

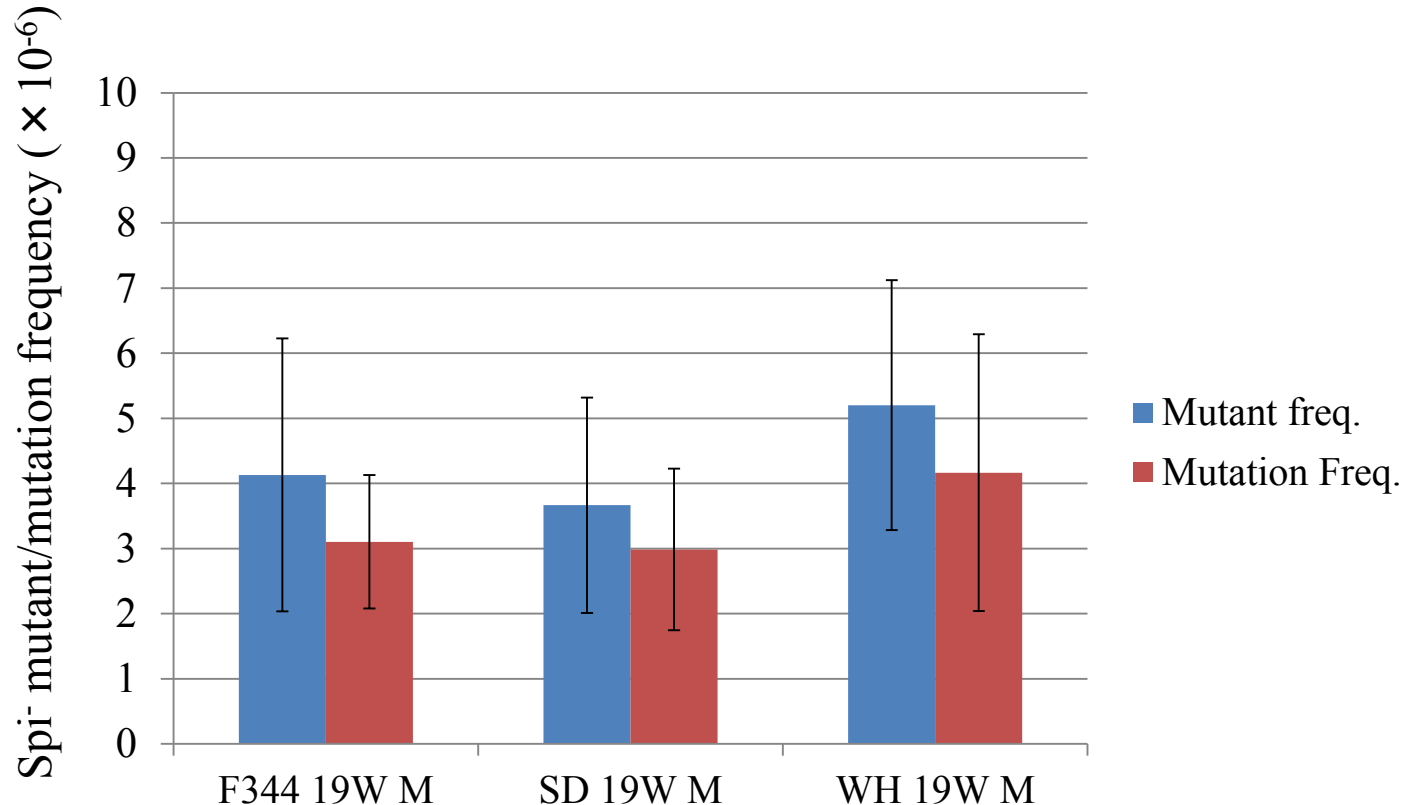


19週齢F344, SD, WistarHannover雄ラットの肝臓における*gpt*点突然変異頻度に系統差はみられなかった。

系統差の検討

Spi⁻ mutant/mutation frequencies in liver of male *gpt* delta rats

(F344, SD and WistarHannover)



19週齢のF344, SD, WistarHannover雄ラットの肝臓におけるSpi⁻欠失変異頻度に系統差はみられなかった。

3. *gpt delta*ラットの詳細なレポーター遺伝子変異の解析

- *gpt delta*ラットゲノムのトランスジーンλEG10の挿入部位を決定した。挿入部位には72 kbのゲノム欠失が認められた。導入遺伝子のコピー数は約10コピーと推定された。
- F344 *gpt delta*ラットの肝臓の点突然変異頻度は19週齢と比較して104週齢では2~3倍に増加し、104週齢の雄ではG:C to T:A変異が顕著に増加した。また、104週齢の雌雄で2 bps~数kbの欠失変異が増加した。
- 104週齢においても、検出された自然突然変異の多くは独立した*de novo*変異であり、クローン性の変異体の影響は限定的であった。
- 3系統の*gpt delta*ラット(SD, F344, Wistar Hannover)における自然突然変異頻度に明らかな系統差は認められなかった。

1. *gpt delta*ラット反復投与毒性試験を用いた遺伝毒性の包括的試験法の標準化

*gpt delta*ラットを用いた包括的試験法の標準化を目的に、被験物質の投与期間やラット系統差の検討を行う。

2. *gpt delta*ラットの一般毒性検索系としての妥当性の検討

*gpt delta*ラットを用いて反復投与毒性を検索することの妥当性を明らかにするために、*gpt delta*ラットおよびその野生型ラットの差異を検討する。

3. *gpt delta*ラットの詳細なレポーター遺伝子変異の解析

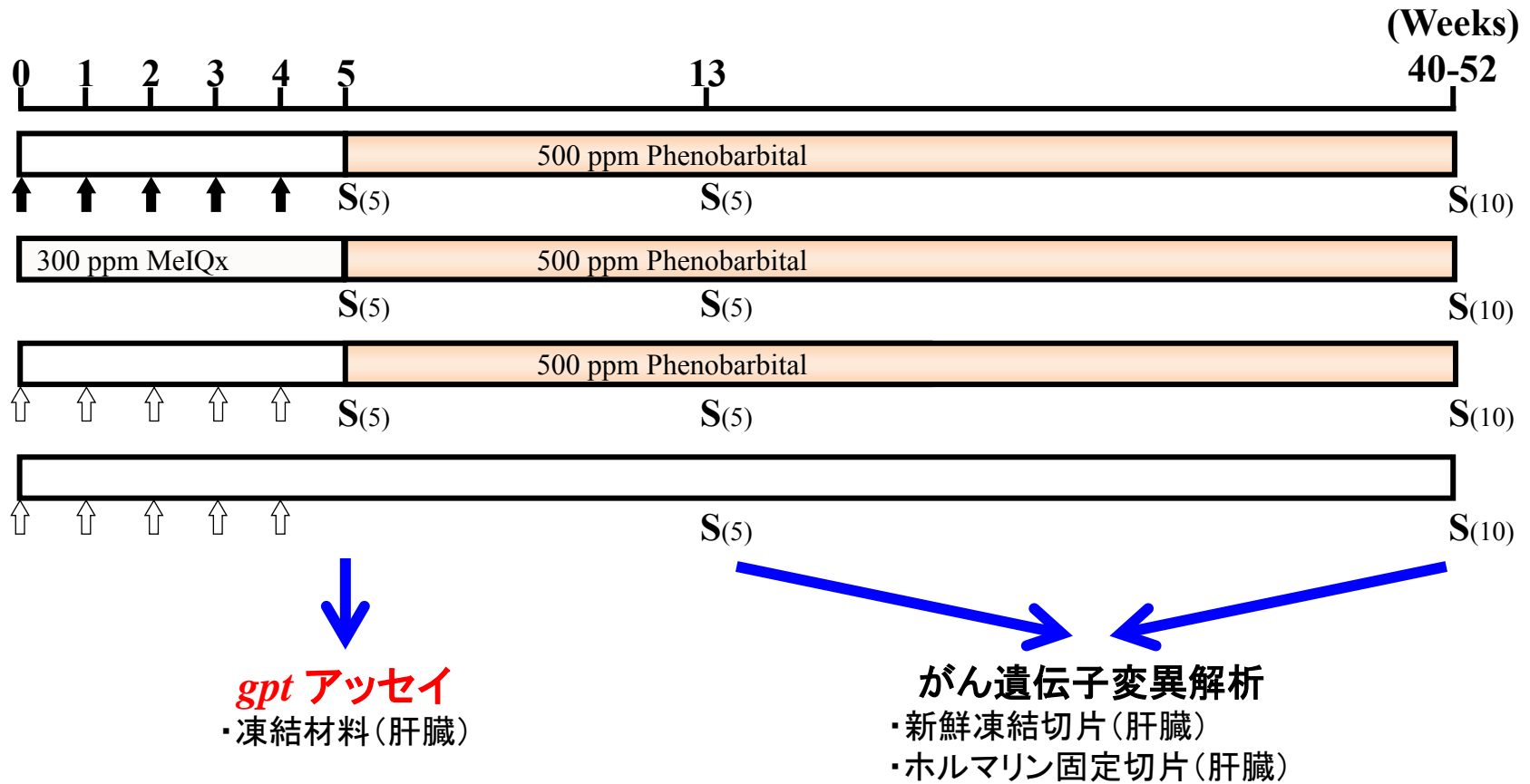
ゲノム中のレポーター遺伝子挿入部位の解析や加齢による自然突然変異頻度の変化や系統間の差異を検討する。

4. *gpt delta*ラットにおける遺伝子変異と誘発病変内遺伝子変異の比較

*gpt*遺伝子上の遺伝子変異とがん遺伝子上の遺伝子変異との相関性を検討する。

4. *gpt* delta ラットにおける遺伝子変異と誘発病変内遺伝子変異の比較

遺伝毒性肝発がん物質の投与により誘発される*gpt*遺伝子上の遺伝子変異と、前がん病変あるいは腫瘍組織内におけるがん遺伝子の遺伝子変異パターンを比較検討した。



↑ : Diethylnitrosamine (DEN) (40 mg/kg, i.p) (遺伝毒性肝発がん物質) ↑ : Saline S : Sacrifice
□ : 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx) (遺伝毒性肝発がん物質)

gpt assayおよびgpt変異体スペクトラム解析

gpt assay

Treatment	Animal No.	Cm ^R colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
	11	2.66	30	11.30	
	12	1.97	26	13.19	
DEN	13	2.17	41	18.90	17.89±6.20**
	14	2.10	57	27.18	
	15	2.22	42	18.89	
	21	2.62	30	11.45	
	22	2.91	19	6.54	
MeIQx	23	1.75	29	16.61	9.73±4.35**
	24	2.80	18	6.43	
	25	3.02	23	7.63	
	31	13.23	6	0.45	
	32	10.26	5	0.49	
Saline	33	12.56	2	0.16	0.26±0.21
	34	14.81	3	0.20	
	35	9.90	0	0.00	

** : p < 0.01 vs. saline group

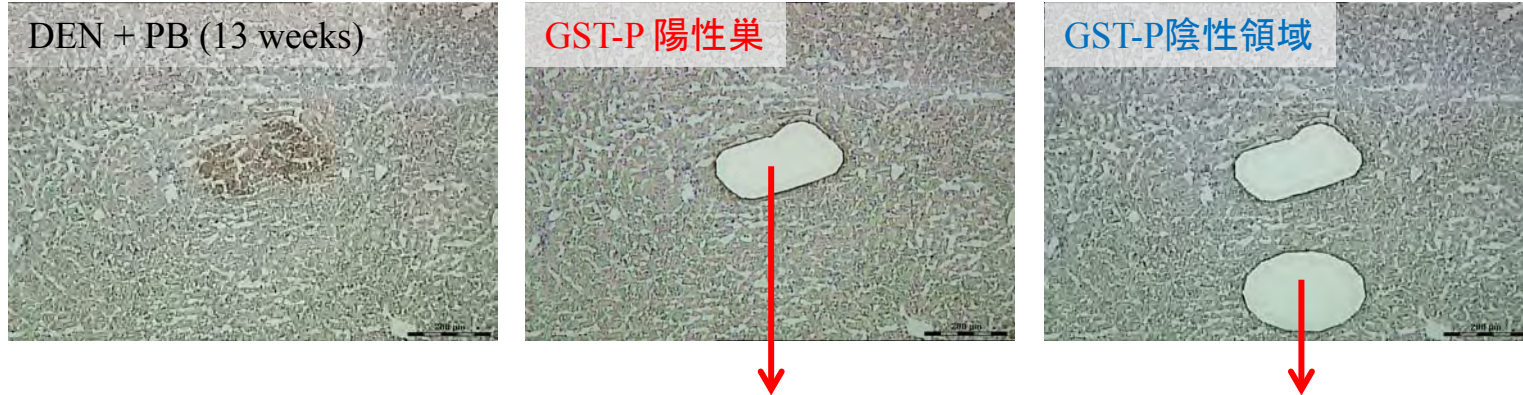
gpt変異体スペクトラム解析

	DEN		MeIQx		Saline	
	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)
Base substitution						
Transversions						
G:C-T:A	19 (9.7)	1.73±0.63	57 (47.9)	4.67±2.19**	4 (25.0)	0.08±0.17
G:C-C:G	2 (1.0)	0.17±0.24	3 (2.5)	0.26±0.25	1 (6.3)	0.02±0.03
A:T-T:A	70 (35.7)	6.33±2.15**	4 (3.4)	0.30±0.50	1 (6.3)	0.02±0.04
A:T-C:G	24 (12.2)	2.26±1.41*	1 (0.8)	0.07±0.15	0	-
Transitions						
G:C-A:T	40 (20.4)	3.70±1.37**	6 (5.0)	0.42±0.29	7 (43.8)	0.10±0.13
A:T-G:C	36 (18.4)	3.24±1.56**	2 (1.7)	0.18±0.26	1 (6.3)	0.02±0.04
Deletions						
Single bp	1 (0.5)	0.09±0.21	35 (29.4)	2.98±1.94**	1 (6.3)	0.02±0.03
Over 2 bp	0	-	4 (3.4)	0.33±0.33	1 (6.3)	0.01±0.03
Insertions	0	-	0	-	0	-
Complexes	4 (2.0)	0.37±0.40	7 (5.9)	0.53±0.49	0	-
Total	196	17.89±6.20	119	9.73±4.35	16	0.26±0.21

*, ** p < 0.05, 0.01 vs. saline group

マイクロダイセクション法を用いたがん遺伝子変異解析

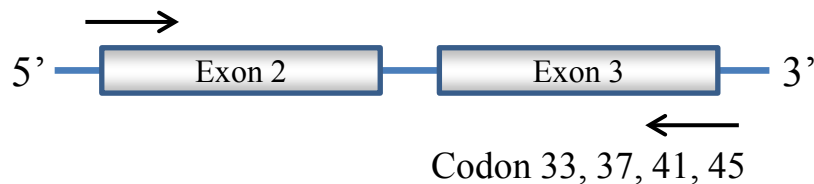
1. レーザーマイクロダイセクション法による組織の回収およびDNA抽出



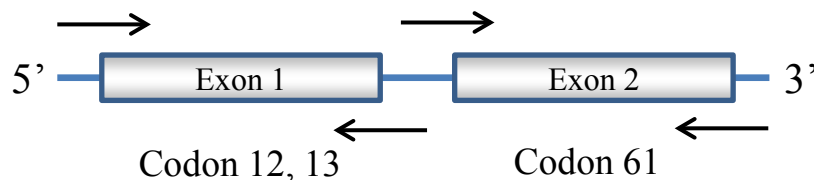
レーザーマイクロダイセクション法にてGST-P陽性細胞巣またはGST-P陰性領域を採取し、DNAを抽出

2. PCR法による遺伝子増幅

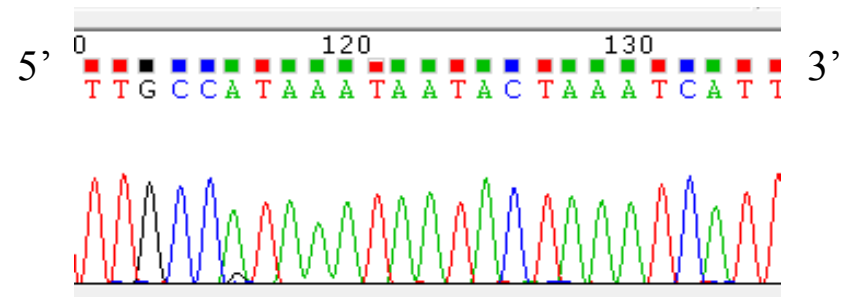
β-catenin



K-ras



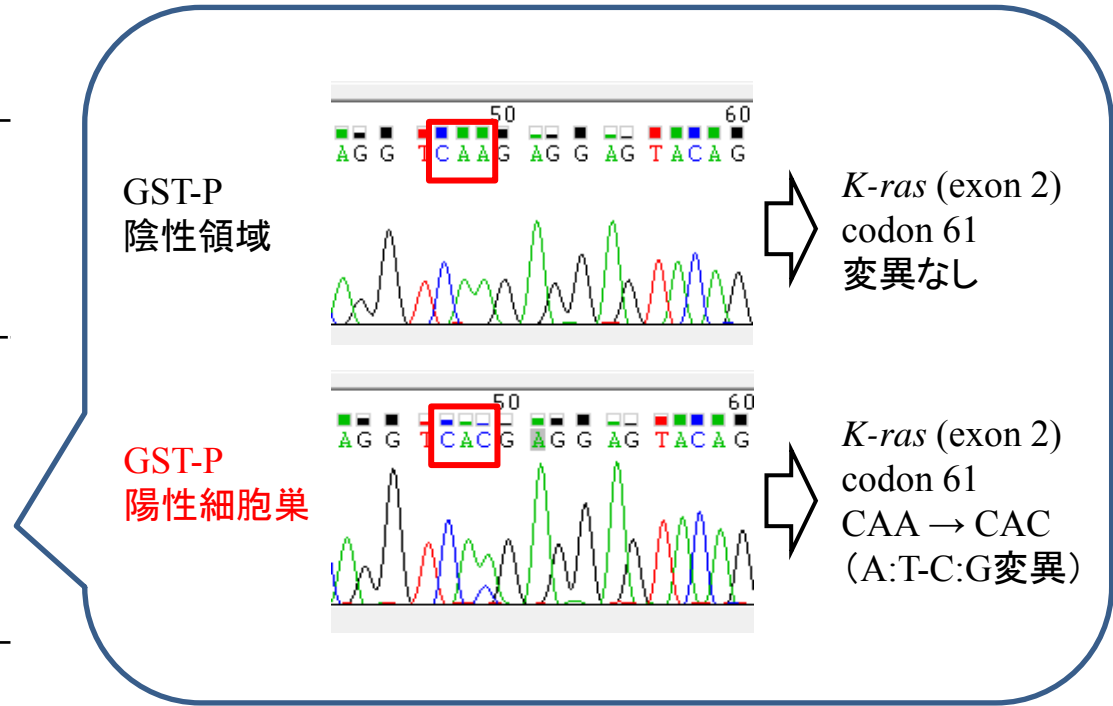
3. Direct sequence法による遺伝子配列解析



がん遺伝子変異解析

DEN + PB群の*K-ras* (exon 2) 遺伝子変異頻度

	No. of animals	No. of foci	Mutation frequency (%)
GST-P negative lesion	2	20	0 / 20 (0)
GST-P positive foci	2	20	1 / 20 (5)



DEN + PB群のGST-P陽性細胞巢において*K-ras* (exon2) codon 61変異が1例で認められ、その変異パターンは、A:T-C:G変異であった。一方、GST-P陰性領域においては、*K-ras* (exon 2)に遺伝子変異は認められなかった。

4. *gpt* delta ラットにおける遺伝子変異と誘発病変内遺伝子変異の比較

- *gpt* deltaラットにDENを週1回、5週間腹腔内投与またはMeIQxを5週間混餌投与したラット肝臓における*gpt* アッセイの結果、DENおよびMeIQx投与群における*gpt*遺伝子変異体頻度(MF)は対照群に比較して有意な高値を示した。
- *gpt*変異体スペクトラム解析の結果、DEN投与群では、A:T-T:A、A:T-C:G transversionおよびG:C-A:T、A:T-G:C transition 変異頻度が対照群に比較して有意に上昇した。また、MeIQx投与群ではG:C-T:A transversionおよび一塩基欠失変異が対照群に比較して有意な高頻度で認められた。
- DEN+PB群において認められたGST-P陽性細胞巢のがん遺伝子変異解析を行ったところ、*K-ras* (exon 2) codon 61に変異が1例認められ、その変異パターンはA:T-C:G変異であった。この変異パターンは、DEN投与により高頻度に認められる*gpt*遺伝子上の変異パターンの1つであったことから、*gpt*遺伝子上の遺伝子変異とがん遺伝子上の遺伝子変異の変異パターンは相関する可能性が示唆された。
- しかし、MeIQx+PB群において認められたGST-P陽性細胞巢は、DEN+PB群で認められたGST-P陽性細胞巢に比較して数、面積ともに小さく、DNA抽出やPCRを実施するための充分量のサンプルをマイクロダイセクション法により採取することが困難であった。さらに、*K-ras*遺伝子 (exon 1)および β -*catenin*遺伝子(exon 3)を標的とした遺伝子変異検索のためのDNA抽出法やPCR条件の最適化が困難であったことから、複数の発がん物質での検討や他のいくつかのがん遺伝子での解析ができなかった。今後、サンプル採取の時期、DNA抽出法やPCR条件の最適化のさらなる検討が必要であると考えられた。

DEN+PB群のGST-P陽性細胞巢において認められた*K-ras*遺伝子の変異パターンは、*gpt* アッセイの変異スペクトラム解析で明らかとなった*gpt*遺伝子上の遺伝子変異と一致するものであったことから、*gpt*遺伝子上の遺伝子変異ががん遺伝子上の遺伝子変異と相関する可能性が示唆された。

まとめ

遺伝毒性・反復投与毒性併合試験法の開発

遺伝毒性試験や反復投与毒性試験にレポーター遺伝子導入動物を用いるうえでの適切な試験方法や妥当性の検討

*gpt delta*ラットの特徴とレポーター遺伝子を用いて*in vivo* 遺伝毒性を評価することの有用性の検討

- ・投与期間に関わらず、遺伝毒性発がん物質の遺伝毒性、発がん性が評価可能
- ・投与期間に関わらず、非遺伝毒性発がん物質ではレポーター遺伝子変異体頻度の増加は認められない
- ・投与期間が長いほど影響が顕著
- ・遺伝毒性、発がん性の程度に系統間の特異な差は認められない

- ・F344系*gpt delta*ラットおよびF344系ラットにDENを13週間反復投与した結果、DENの一般毒性および発がん性に対する遺伝子型間の特異的な差異はない

- ・トランスジーンの挿入部位を同定、コピー数を推定
- ・加齢によって自然突然変異は増加し、G:C to T:A変異や2 bps~数kbの欠失変異が増加
- ・加齢で見られる自然突然変異の多くは*de novo*変異で、クローン性の変異体の影響は限定的
- ・自然突然変異頻度に明らかな系統差は認められない

- ・GST-P陽性巢内の*K-ras*遺伝子の変異パターンは*gpt*アッセイの変異スペクトラム解析で明らかとなった*gpt*遺伝子上の遺伝子変異と一致するものであった

*gpt delta*ラットを用いて、13週間遺伝毒性試験を行うことは可能であると考えられる。

*gpt delta*ラットを用いて、13週間反復投与毒性試験にて一般毒性を評価することは妥当であると考えられる。

*gpt delta*ラットの導入遺伝子の基礎的な情報を提供し、加齢による影響を明らかにした。

gpt 遺伝子上の遺伝子変異が、がん遺伝子上の遺伝子変異と相関する可能性が示唆された。

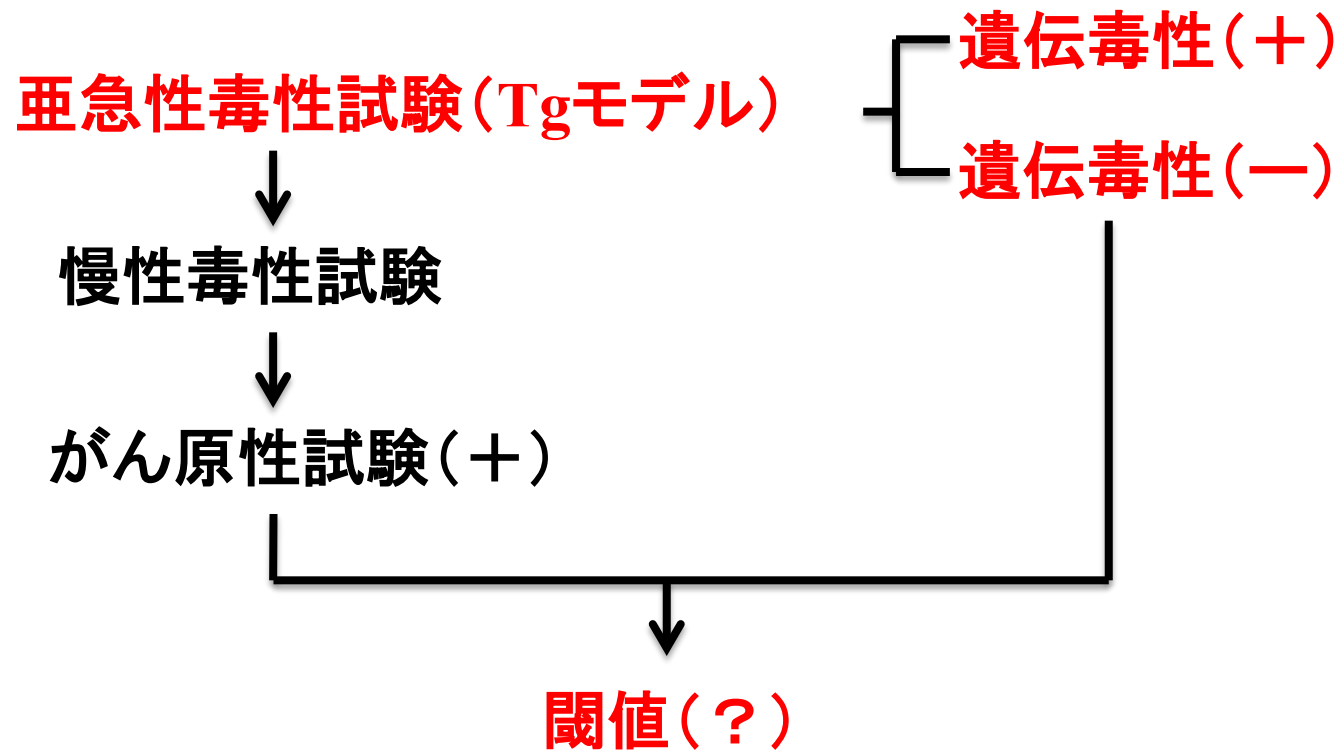
*gpt delta*ラットを用いて反復投与毒性試験を行い、一般毒性、遺伝毒性、発がん性を評価する包括的試験を標準化

*gpt delta*ラットを用いた*in vivo* 遺伝毒性の評価と発がんへの関与を検討するうえでの基礎的知見・有用性を検証

*gpt delta*ラットを用いた遺伝毒性・反復投与毒性併合試験法の確立

レポーター遺伝子導入動物*gpt delta*ラットにおける臓器レベルでの検索は、遺伝毒性の標的臓器における直接的な関与の証明となる点で優れており、一般の反復投与毒性に加えて遺伝毒性・発がん性をより精緻かつ短期に予測できる可能性が期待できる。

遺伝毒性・反復投与毒性併合試験



食品を紹介するリステリア感染症に係わる高病原性リステリア株の 評価と生体側の要因を加味した食品健康影響評価に関する研究

五十君 静信 (いぎみ しずのぶ)

国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部長



1984年 東京大学農学部畜産学科卒業
1989年 東京大学大学院博士課程修了農学博士（獣医学）
1989年 国立予防衛生研究所（現国立感染症研究所）・食品衛生部研究員
1996年 米国メリーランド大学医学部・ワクチン開発センターへ留学
1996年 国立予防衛生研究所・食品衛生部主任研究官
2001年 国立感染症研究所・食品衛生微生物部食品微生物室長
2002年 国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部第一室長
2013年 国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部長（現職）
岐阜大学大学院連合獣医学研究科連携教授、麻布大学客員教授、
東京農業大学客員教授

<研究成果概要>

リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*; LM) は環境に広く分布し、食品からしばしば分離される。喫食前の加熱処理をしない調理済食品においては、国内の市販食品から平均約2%程度のLMが分離される。日本人は生食が多く調理済食品の種類も多いため、欧米先進国に比べ食品を通じLMに曝される機会が多いと思われる。食品を通じ本菌に曝される機会が多いが、重篤なリステリア感染症を発症する患者は極端に少ない。重篤なリステリア感染症の発症は生体側の免疫との関わりがあり、宿主側の要因が強く働いているためであると理解されている。2004年のFAO/WHOの専門家会議によるLMのリスク評価では、LMの菌株毎の病原性の違いについては未だ科学的に十分解明されておらず、血清型や特定の菌群に関し病原性の違いの有無を言える段階ではないとして、LMを一律同様な扱いとしてリスク評価を行っている。一方、ヒト臨床から分離される血清型は特定の血清型に偏っており、国内のヒト臨床分離株の65%以上は血清型4bであり、食品や環境由来株の血清型の分離頻度の傾向とは明らかに異なっている。

本研究ではLMの侵入メカニズムが、継代細胞やヒトの腸管に類似している感染モデル動物としてスナネズミを用いて、LM菌株の病原性を評価し高病原性株の存在を明らかにした。血清型4bは高病原性であり、ほぼいずれの株も高病原性と考えて良いと思われた。血清型1/2aと1/2bの検討ではこれらの血清型の一部に高病原性が認められた。一方、食品や環境からしばしば分離されるその他の血清型には、ほとんど病原性が無いと思われた。LMの病原性は一律に考えることは出来ず、血清型4bと血清型1/2a、1/2bの一部の高病原性の菌株をどのようにコントロールするかが重要である。

また、スナネズミを用いた実験により、あらかじめ少量のLMに曝された場合、その後大量のLMに曝されても感染が軽度ですむことが証明された。すなわち、通常の商品摂取時のような低菌数のLMへの暴露があれば、その後の高病原性のLMの高菌数の暴露に対して、明らかに発症を抑える経口ワクチン効果があることが示された。スナネズミを用いたLMの経口ワクチン効果はヒトにおいても同様に起こっている可能性は高く、このような観点からLMの制御を考えていく必要があることが示された。

平成23～25年度食品健康影響評価技術研究 研究課題番号:1101

「食品を介するリステリア感染症に係わる高病原性リステリア株の評価と生体側の要因を加味した食品健康影響評価に関する研究」

研究分担

- 研究代表者:五十君静信 (H23-25)
高病原性株と生体側の要因を加味した食品健康影響評価
- 研究分担者:岡田由美子 (H23-25)
血清型4bのリステリアの遺伝子レベルの解析と病原性評価
- 研究分担者:朝倉宏 (H23-25)
血清型4b以外のリステリアにおける主要病原性遺伝子の発現制御分布と病原性評価系に関する検討
- 研究分担者:仲真晶子 → 田中廣行(H23)→天野富美夫(H24,25)
食品・環境由来株の検討 →細胞を用いた株の評価

リステリア モノサイトゲネス

- 自然界に広く分布する
- 低温増殖性がある
- 耐塩耐酸性が強い
- 低い菌数ではあるが**広く食品を汚染している**
生肉で数10%程度
その他の食品で、数%の汚染が報告されている
- 海外では、食品による**集団発症事例**が報告されている

リステリア感染症の重要性

- 重症化したリステリア感染症は、髄膜炎や敗血症を発症し、全身性、神経系の症状を呈する
- 発症した場合、致死率は約20%と高い
- 感染経路は、ほぼ食品と考えられている
- 発症までの期間が長いため、原因食品や感染経路の特定が困難である
- 市販食品には、リステリアの汚染が広く認められる
- リステリア症の患者数は100万人あたり1人ないしは数人と、それほど多くない

リステリア感染症は、どんな病気

初期症状

38～39℃の発熱、頭痛、悪寒、嘔吐など、
インフルエンザ様症状を示す **感染後24時間程度**

重症化、全身性、神経系まで感染

髄膜炎・敗血症 **20～30日(3ヶ月)程度**

妊婦が感染すると軽いインフルエンザ様症状

胎児は、影響が強く、早産や死産の原因となる
新生児の髄膜炎・敗血症

腹痛、下痢などの急性胃腸炎症状は通常みられない

国内におけるリステリア症発生状況 (1996年～2002年)

全国の100床以上の病院を対象に行われたアンケート結果より

項目	患者数
1996年以降の発症報告総数	95人
単年度当たりの発症数	13例



年間推定発症数(病床数から推定)	83例
リステリア症発症率	0.65人/100万人

- 2007年7月に開始した厚生労働省院内感染対策サーベイランス(JANIS)事業では、327の参加医療機関のデータに基づく集計(2007年7月～2008年6月)において、リステリア・モノサイトゲネス(LM)及びリステリア属菌は、58名から分離されたと報告されている

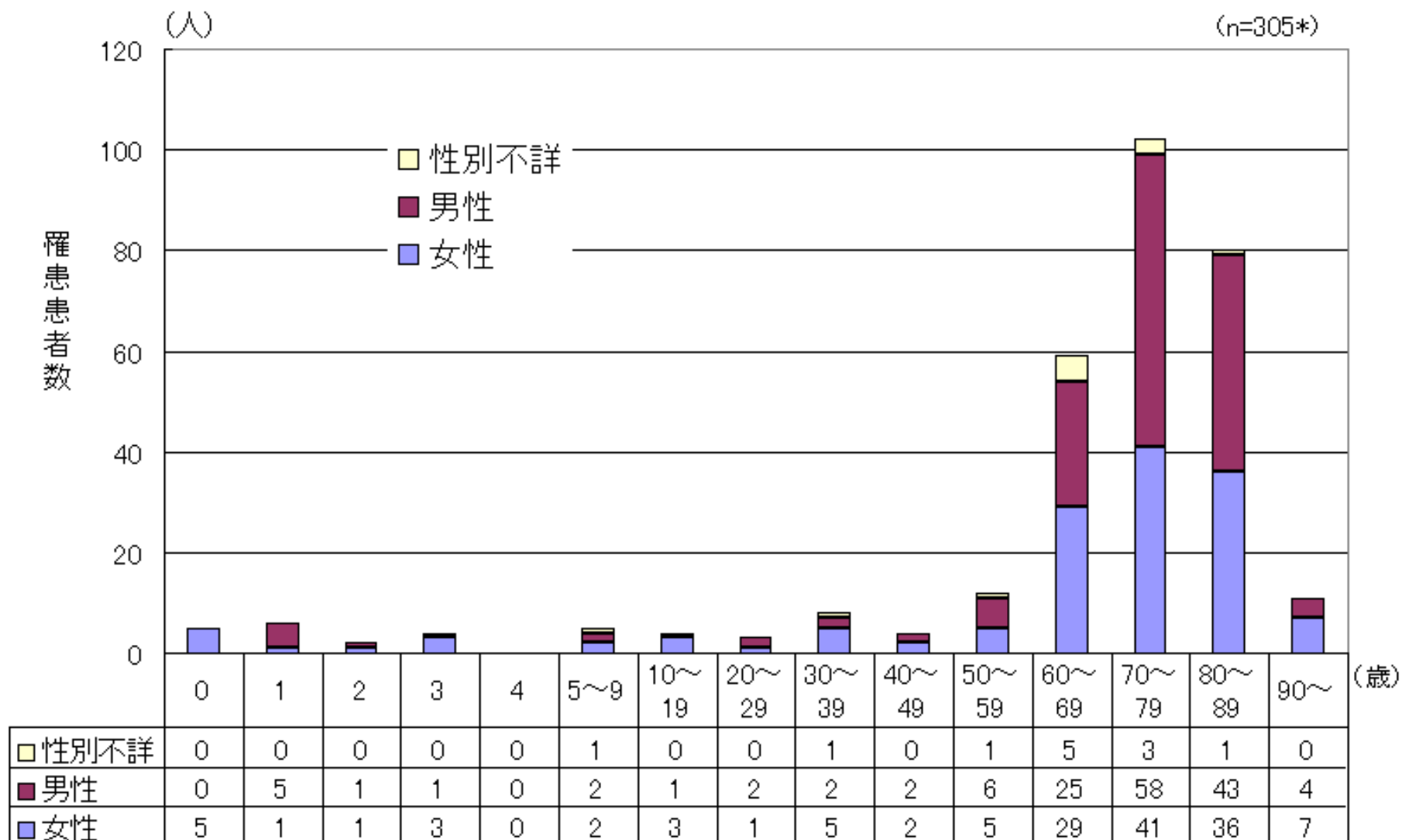
表 1. 推定リステリア症罹患率と JANIS 検査部門集計対象医療機関の年次推移

	2008 年	2009 年	2010 年	2011 年
推定罹患率 (/100 万人・年)	1.06	1.38	1.58	1.57
推定リステリア症患者数(人)	135.2	176.0	202.1	200.9
JANIS リステリア患者数(人)	49	65	84	109
集計対象医療機関数	426	480	483	579



Infectious Agents Surveillance Report

図1. 年齢群、性別リステリア症罹患患者数 2008～2011年



*年齢不詳であった2例は集計から削除

患者由来リステリアの血清型 (1958～2001年)

単位：人

血清型	1	1/2a	1/2b	1/2c	3	4a	4b	4c	4d	UT	合計
男性	13	21	119	8	1	0	267	0	2	9	440
女性	12	24	90	3	4	1	209	1	0	9	353
不明	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	3
合計 (%)	25 (3.1)	46 (5.8)	210 (26.4)	11 (1.4)	5 (0.6)	1 (0.1)	477 (59.9)	1 (0.1)	2 (0.3)	18 (2.3)	796 (100)

リステリア症患者の血清型は、4b(59.9%) > 1/2b(26.4%) > 1/2a(5.8%)の順に多い

食品安全委員会のリスク評価資料から

本研究の目指すもの

- ヒトは食品を通じリステリア・モノサイトゲネスに曝される機会は多いと思われるが、重篤なリステリア感染症を発症する患者は2000年頃の推定で0.65人/100万人と極端に少ない。最新のJANISによる2011年の推計では、1.57/100万人である
- 菌株の病原性の差異については、はっきりしていない
- 血清型間、菌株間の病原性の差はあるのか→**ありそうだ！**
- あるとすると、どのような方法で振り分けられるか→**鑑別法**

LMの細胞や動物を用いた病原性評価系の確立

- 食品・環境での高病原株の分布はどのようになり、重篤なLM感染症の発症をどのように考えたら良いのか

病原性発現に係わる生体側の要因に関する知見とワクチン効果

細胞や動物評価系を用いてLMの発症に至る過程を考察

これらの知見から、LM菌株の病原性の違いを
加味した食品健康影響評価が可能か試みる

研究班の構成と分担

1. **高病原性株と生体側の要因を加味した食品健康影響評価 (五十君)**
 - 1) 病原性評価法の開発
 - 2) 生体側の免疫効果の評価検討
 - 3) 高病原性株や免疫効果を加味した食品健康影響評価

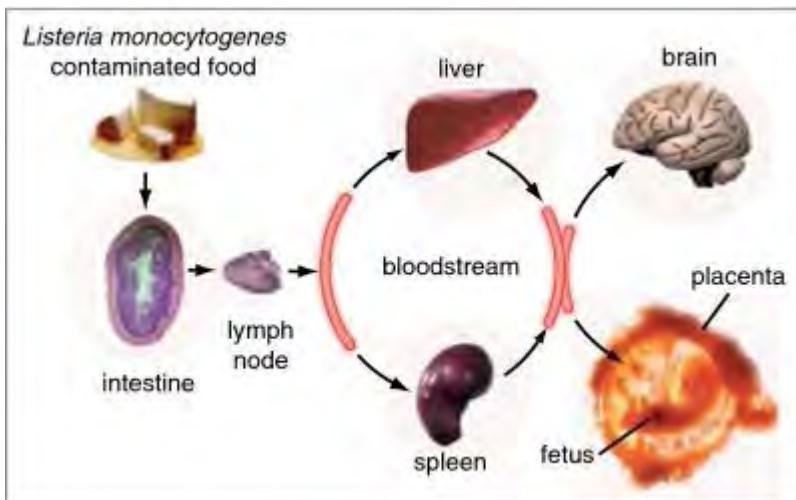
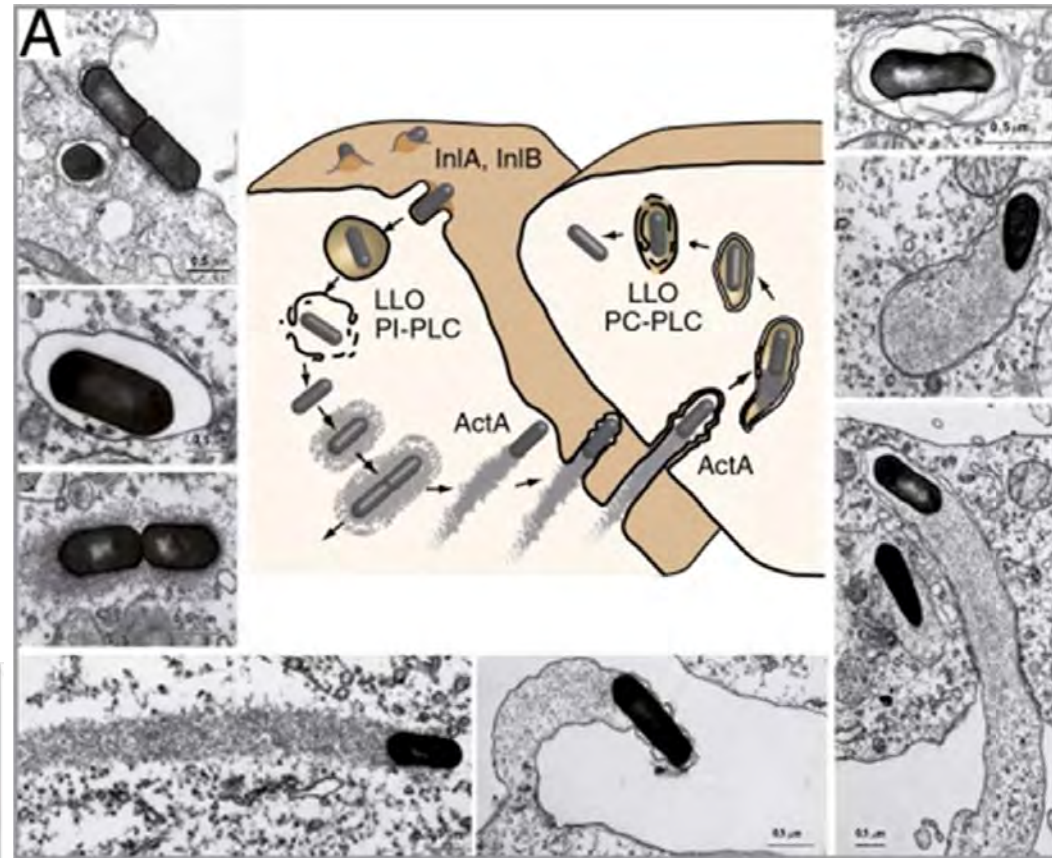
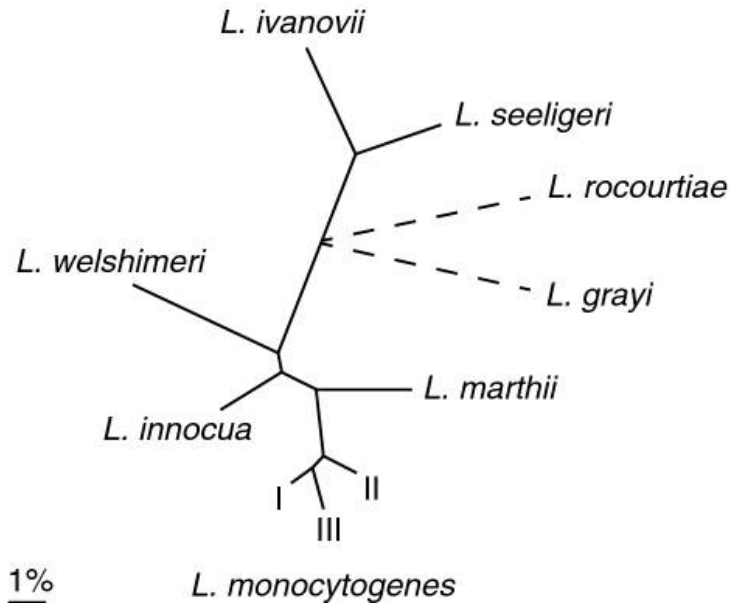
2. **血清型4bのリステリアの遺伝子レベルの解析と病原性評価 (岡田)**
 - 4) LM血清型4b菌株群の病原性評価法の確立
 - 5) LM血清型4b菌株群における高病原性株の同定と感染リスク評価
 - 6) LM血清型4b菌株群における高病原性株識別マーカーの同定

3. **血清型4b以外のリステリアにおける主要病原性遺伝子の発現制御分布と病原性評価系に関する検討 (朝倉)**
 - 7) 血清型4b以外の高病原性株の評価
 - 8) 菌株の病原性の評価手法に関する検討

4. **食品・環境由来株の病原性に関する検討 (田中、天野)**
 - 9) 食品・環境由来株の収集と性状検査
 - 10) 高病原性LMマーカーの分布調査

LM感染症概要

Cossart P. PNAS 2011



LMの病原性に関わる主な遺伝子
prf A, *plc A*, *hly*, *act A*, *mpl*,
plc B, *inl A*, *iap*, *clp C*, *opuCA*

血清型4b株の病原性評価法の確立 及び病原性評価

- スナネズミMGW雌3か月齢(自家繁殖)
- 経口投与4日目に肝臓、脾臓の摘出
→臓器内菌数の計測
- 免疫不全モデルとして、経口投与前日に
免疫抑制剤(シクロスポリンA)を腹腔内投与
- 1菌株につき5頭のスナネズミを使用
- 各菌株に1頭、脳を摘出して病理組織学的解析

- 食品由来株及び患者由来株 各6株について病原性評価を
実施

血清型4bに関するまとめ及び結論

- 健常動物において有意に低い菌数を示した株でも、免疫不全動物では大幅な菌数の増加がみられた。
- 脳の病理組織学的解析を行った40個体のうち、脳炎又は髄膜炎が見られた個体は10個体であった。
- そのうち9頭はシクロスポリンAによる免疫不全状態の個体であった。一方、脳炎及び髄膜炎の有無と、肝臓及び脾臓の菌数には相関はみられなかった。



血清型4bの病原性評価に関しては、健常動物に加え、免疫不全動物での評価を行う必要があると思われ、この検討により供試菌株のほとんどに病原性が確認された。

小 括

生体通過による酸抵抗性・病原性変動に関する検討

- 2001年集団感染疑い事例由来株(血清型1/2b)のうち、生体通過により酸抵抗性の減弱を認める菌株を見出した。
- タンパク変動及び比較ゲノム解析等を通じ、上記形質変化は*rsbW*遺伝子変異に基づくSigB依存性機能喪失に因ることを明らかにした。

血清型1/2b株間でのゲノム多様性と病原性との関連性に関する検討

- 国内分離株の血清型1/2b株は4b株に比べ、ゲノム多様性に富んでいた。
- 1/2b株はカイコ致死毒性にも菌株間多様性を示した。
- 1/2b株においては、LLO等のタンパク分泌活性の弱い株は、カイコ致死毒性も弱い傾向を示し、病原性マーカーとしての有用性が示唆された。
- 4b株は高いカイコ致死毒性を示す一方、1/2c株は致死毒性を示さなかった。

LM感染に伴うRAW264.7細胞のNF- κ B関連遺伝子群応答性に関する研究

- LLO欠損は、LMのM ϕ 侵入性やTNF- α 誘導活性を低下させた。
- LM感染に伴う同細胞での*cc15* (RANTES)遺伝子発現がLLO発現の有無と関連を示し、LLO依存性の細胞毒性を評価するマーカーとしての有用性が示唆された。

ヒトKB細胞を用いた、リステリアの病原性の評価系の開発

【研究目的】

ヒトに対する病原性の評価系を確立するため、ヒト扁平上皮がん細胞であるKB細胞を用いた実験系を検討した。

【研究の背景】

- ①リステリア菌のヒトへの経口感染における組織・細胞内への侵入系を考える上で、上皮組織に対する細菌の親和性・付着(接着)性、ならびに侵入性を考慮する必要がある。
- ②マウスやスナネズミを用いた従来の動物実験系において行われた、致死毒性を含めたさまざまな病原性の検討結果は、臨床における病原性・毒性の程度と、必ずしも一致しない場合があった。
- ③その原因の一つとして、動物とヒトにおける口腔から上部消化管の構造の違いが考えられる。

【研究の方法】

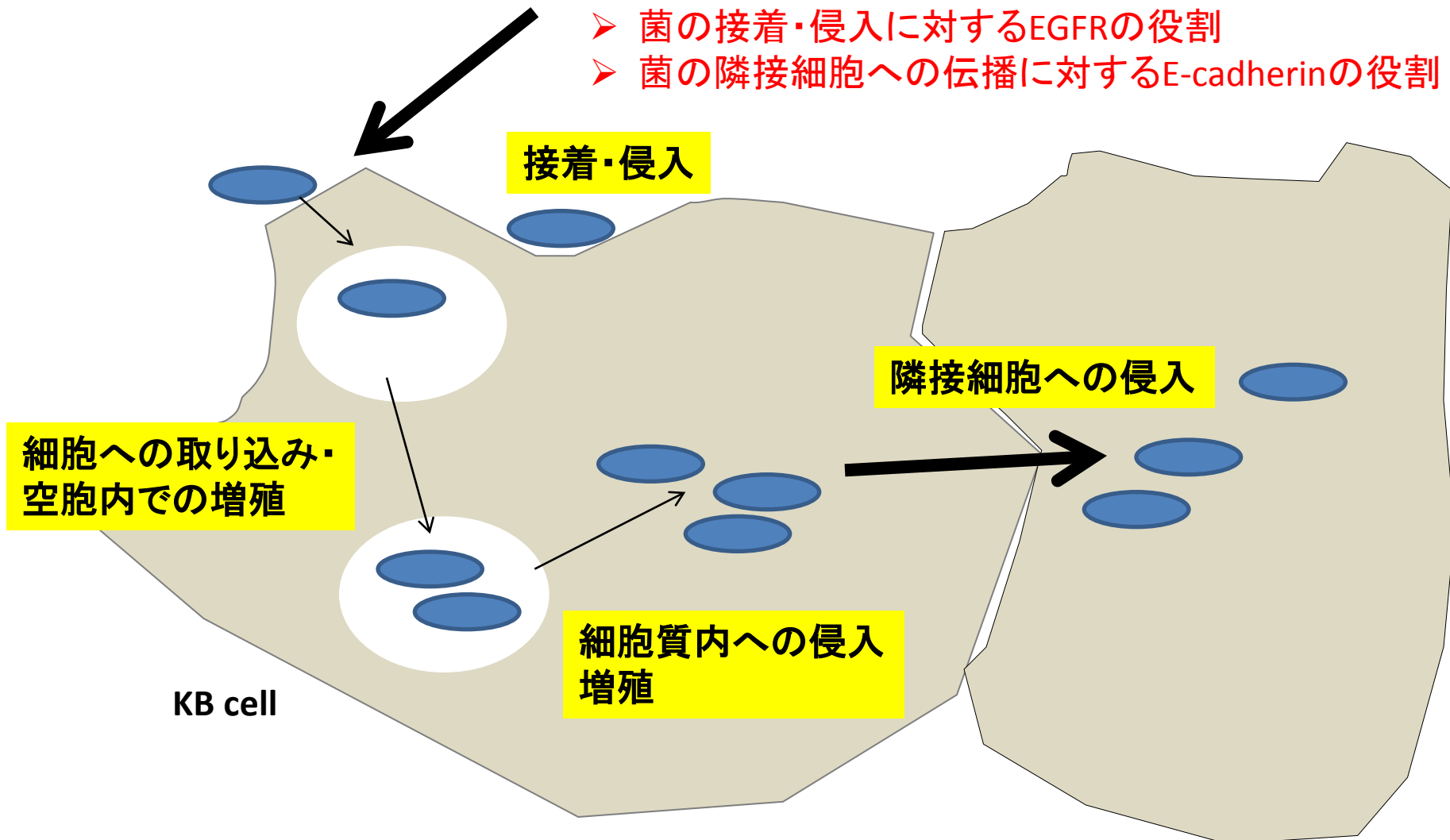
KB細胞、及びKB細胞由来のEGF応答性変異株を用いて、細胞表面のEGFRの数・分布だけでなく、E-cadherinの量ならびに細胞間のtight junctionの発達に大きな差がある細胞を用いて、リステリア感染に対する感受性、感染細胞内における菌の増殖、細胞間での菌の伝播の違いについて検討する

【モデル図】

Listeria monocytogenes (LM)

宿主要因:

- 菌の接着・侵入に対するEGFRの役割
- 菌の隣接細胞への伝播に対するE-cadherinの役割

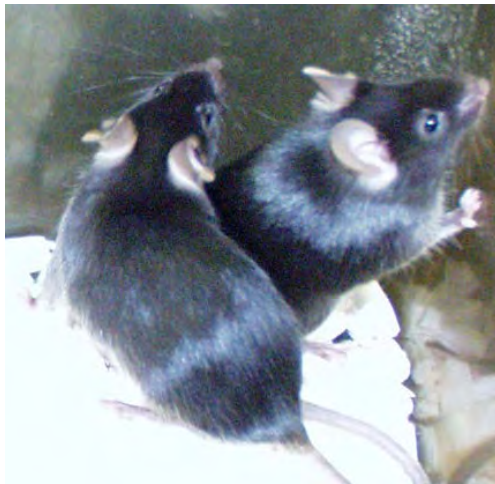
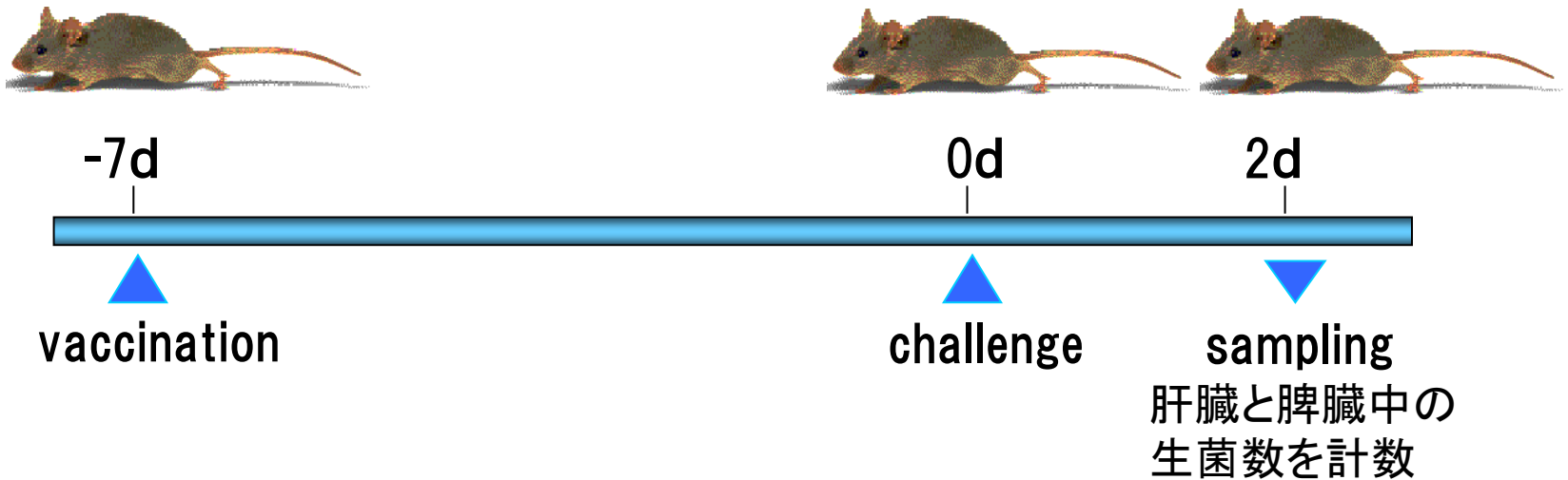


ヒトKB細胞評価系のまとめ

病原性の異なるリステリア菌株の感染ならびに病原性の評価において、リステリア側の*inlA*遺伝子発現と宿主細胞側EGFR, E-cadherinが関与している可能性が示唆された。

ヒト扁平上皮細胞株KB-3-1およびEGFRの低下したF-22変異株を用いた実験系がその評価系として有用であることが示唆された。

C57BL/6マウスにおける免疫効果の観察



予め、少数のLMを投与した群



コントロール群

腹腔内に 10^7 CFUのY7株を投与(ほぼ100%致死菌数)し、2日後のマウスの状態
脾臓中の菌数は、予め少数を投与することにより、コントロールに比べ 10^3 個低下していた

研究班の構成と分担成果

1. 高病原性株と生体側の要因を加味した食品健康影響評価

- 1) 病原性評価法の開発: スナネズミ、継代細胞、カイコなど
- 2) 生体側の免疫効果の評価検討: マウス、スナネズミにより、確認
- 3) 高病原性株や免疫効果を加味した食品健康影響評価: 一部が関与

2. 血清型4bのリステリアの遺伝子レベルの解析と病原性評価

- 4) 4b菌株群の病原性評価法の確立: スナネズミの経口モデル
- 5) 4b菌株群における高病原性株の同定と感染リスク評価: 宿主の免疫状態
- 6) 4b菌株群における高病原性株識別マーカーの同定: 候補遺伝子選定

3. 血清型4b以外のリステリアにおける主要病原性遺伝子の発現制御分布と病原性評価系に関する検討

- 7) 血清型4b以外の高病原性株の評価: 比較ゲノム、カイコ、タンパク分泌
- 8) 菌株の病原性の評価手法に関する検討: RAW264.7細胞、cc15

4. 食品・環境由来株の病原性に関する検討

- 9) 食品・環境由来株の収集と性状検査: 検討済み
- 10) 高病原性LMマーカーの分布調査: マーカーの検討

研究の総括

1. 細胞、スナネズミなどの動物による病原性評価法を確立し、これらの評価法を用いて、LM分離株の病原性評価を行った。
2. 血清型4bの臨床株と食品由来株について病原性の評価を行い、菌株の病原性以上に宿主の免疫状況が感染病態に強く関与することが示された。
3. 血清型1/2a、1/2bの複数の病原遺伝子に関する保有・転写活性状況を検討し、血清型1/2b菌株については、遺伝的に多様であり、その病原性は一律ではないことを示した。
4. 遺伝子レベルでの解析結果と、実験動物における病原性を考察し、高病原性のマーカーとなる遺伝子情報を検討し、血清型や特定の遺伝子産物をマーカーとして高病原性株の特定が可能であることを示した。
5. 免疫効果について、スナネズミ(経口投与)により評価し、低菌数暴露が後の高菌数暴露に於いて発症抑制効果があることを示した。