

博士（栄養学）学位論文

発がん物質のDNA損傷作用に及ぼす複合影響：
タバコ，放射線，ポリフェノール

Combined Genotoxic Effects of Environmental Carcinogens and
Anticarcinogens: Tobacco, Radiation and Polyphenols

2007年

指導教員 佐久間 慶子 教授

池田 恵
IKADA, Megumi

女 子 栄 養 大 学

目次

序論	1
第 1 章 <i>gpt delta</i> トランスジェニックマウスを用いた遺伝子突然変異検出法	9
第 1 節 研究の背景	9
第 2 節 <i>gpt delta</i> トランスジェニックマウスを用いた突然変異検出法の概要	11
1-2-1 <i>gpt delta</i> トランスジェニックマウスを用いた突然変異検出法の特徴	11
1-2-2 6-TG セレクションの原理と手法	13
1-2-3 Spi ⁺ セレクションの原理と手法	14
第 2 章 <i>gpt delta</i> マウスを用いた NNK 誘発突然変異に対する低線量率放射線の影響の解析	16
第 1 節 緒言	16
第 2 節 実験材料・試薬および使用機器	18
2-2-1 使用試薬および使用機器	18
2-2-2 試薬の調製	19
第 3 節 実験方法	23
3-3-1 実験の概要	23
2-3-2 放射線照射方法	24
2-3-3 ゲノム DNA 抽出法	24
2-3-4 <i>in vitro</i> パッケージング	25

2-3-5	6-TG セレクション	25
2-3-5- i	菌液の調製	25
2-3-5- ii	プレートの作製	26
2-3-5- iii	<i>gpt</i> 変異体の検出	26
2-3-5- iv	<i>gpt</i> MF の算出	27
2-3-5- vi	<i>gpt</i> 遺伝子を含む DNA 断片の増幅	27
2-3-5- vii	<i>gpt</i> 変異部位の同定	28
2-3-6	<i>Spi</i> ⁻ セレクション	28
2-3-6- i	菌液の調製	
	(XL-1 Blue MRA, XL-1 Blue MRA (P2), WL95 (P2))	28
2-3-6- ii	培地の作製	29
2-3-6- iii	<i>Spi</i> ⁻ 変異体の検出	29
2-3-6- iv	<i>Spi</i> ⁻ 変異体の判定	30
2-3-6- v	<i>Spi</i> ⁻ MF の算出	30
2-3-6- vi	phage lysate	31
2-3-6- vi-1	菌液の調製 (LE392)	31
2-3-6- vi-2	変異部位の同定	31
2-3-6- vii	欠失領域を含む DNA 断片の増幅	31
2-3-6- viii	欠失部位の同定	36
2-3-7	MF の有意差検定法	36
第 4 節	結果	37
2-4-1	NNK 投与および低線量率放射線照射を行なったマウスの肺に おける <i>gpt</i> 突然変異頻度	37
2-4-1- i	<i>gpt</i> 突然変異頻度	37
2-4-1- ii	<i>gpt</i> 変異体の塩基配列解析	38

2-4-2 NNK 投与および低線量率放射線照射を行ったマウスの肺にお ける Spi ⁻ 欠失変異頻度	39
2-4-2- i Spi ⁻ 欠失変異頻度	39
2-4-2- ii Spi ⁻ 欠失変異体の分子解析	40
2-4-2- iii 欠失部位の配列	42
第 5 節 考察	44
第 3 章 <i>gpt delta</i> トランスジェニックマウスの肺における NNK 誘発突 然変異に対するノビレチンの化学予防効果の解析	50
第 1 節 緒言	50
第 2 節 実験材料・試薬および使用機器	53
3-2-1 使用試薬および使用機器	53
3-2-2 試薬の調製	53
第 3 節 実験方法	55
3-3-1 実験の概略	55
3-3-2 ゲノム DNA 抽出法	56
3-3-3 <i>In vitro</i> パッケージング	56
3-3-4 6-TG セレクション	56
3-3-4- i 菌液の調製	56
3-3-4- ii プレートの作製	56
3-3-4- iii <i>gpt</i> 変異体の検出	56
3-3-4- iv <i>gpt</i> MF の算出	56
3-3-5 Ames 試験(プレインキュベーション法)	57
3-3-5- i 菌株	57

3-3-5- ii	菌液の調製.....	57
3-3-5- iii	Ames 試験菌株 YG7108 株,YG5161 株を用いた 異原性試験.....	57
第 4 節	結果.....	59
3-4-1	NNK 処理とノビレチン投与によるマウス肺の	
3-4-1- i	<i>gpt</i> 突然変異頻度.....	59
3-4-2	ノビレチンによる NNK の変異抑制機構.....	63
第 5 節	考察.....	64
総括		67
本論文内容の誌上発表		69
謝辞		70
参考文献		71

略語表

本論文においては以下の略語を用いた.

B[a]P:	benzo[<i>a</i>]pyrene
Bp:	base pair(s)
Cm:	chloramphenicol
CYP:	cytochrome P450
DMSO:	dimethyl sulfoxide
DNA:	deoxyribonucleic acid
EDTA:	ethylenediaminetetraacetic acid
G-6-P:	glucose-6-phosphate
<i>gpt</i> :	guanine phosphoribosyltransferase
Gy:	gray
Kb:	kilobase pair(s)
Km:	kanamycin
<i>K-ras</i> :	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LB:	Luria-Bertani
LET:	linear energy transfer
MF:	mutation frequency
MNNG:	<i>N</i> -methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine
β-NADH:	β-nicotinamide adenine dinucleotide, reduced from
β-NADPH:	β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced from
NB:	Nutrient Broth

NNK:	4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone
NNN:	<i>N'</i> -nitrosonornicotine
PAH:	polycyclic aromatic hydrocarbon
S9:	9,000 × g supernatant fraction of homogenates
Sv:	sievert
Tris:	Tris (hydroxymethyl) aminomethane

序論

ヒトのがんが環境因子（化学物質）によって起こることを初めて報告したのは 1775 年，イギリスの外科医 Percival Pott である．彼は，煙突掃除人における陰嚢がんが多発する事を見つけ，原因として職業と関係がある化学物質の作用によることを推察した．その後，今日までがんの原因として外的要因の重要性が追求されてきており，イギリスの疫学者 Richard Doll は，がんの原因のうち 35% はライフスタイル，特に食物要因に由来し，次いで喫煙が 30% を占めていると報告している^[1]．また，米国立がん研究所の調査研究では，果物や野菜を多く摂取することががんの予防に重要であることを指摘し，これらは米国のみならずわが国のがん予防のための 12 か条にも取り入られている^[2]．このように，ヒトにおける発がんの原因の大部分は外来因子によるものであり，食品やタバコなど経口的，経気道的に摂取する化学物質の占める割合は高いといえる．この化学物質による発がん，いわゆる化学発がんは多段階の過程を経て誘発され，その課程は大きく 3 つに分けられている．すなわち，遺伝子の突然変異が誘発されるイニシエーション，腫瘍形成と腫瘍の伸展的成長の過程であるプロモーション，およびがんの悪性化の過程であるプログレッションである．このうちイニシエーション，すなわち遺伝子の突然変異を誘発する化学物質を変異原・がん原物質と呼ぶ．環境中に存在する変異原・がん原物質の多くはそれ自身では不活性な物質であり，生体内で代謝的に活性化されることが知られている^[3]．本来，酵素は生体を守るための機能すなわち，解毒的反応により深く関わるはずであるが，しばしば代謝過程で不安定な活性代謝物の生成がみられ，これらの代謝産物がタンパク質や DNA (deoxyribonucleic acid) と付加体を形

成することにより，毒性，変異原性および発がん性を発揮することが明らかになってきている^[4,5]．このように変異原・がん原物質が引き起こす DNA 損傷とそれに伴う遺伝子突然変異は発がんや遺伝的疾患の原因となるため，化学物質や放射線の生体内における突然変異誘発機構を明らかにすることは，ヒトのがん予防を考える上で重要な課題である．ヒトは多種多様な変異原に複合的に曝露されており，そのリスク評価は複雑で難しい問題である．また，変異原の作用は個体における吸収や代謝の影響，臓器特異性などと深く関連しているため，動物個体を用いた突然変異検出系が重要である．近年，発生工学的技術の進歩に伴い，突然変異検出用のレポーター遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いて生体内で起こる突然変異を個体レベルで検出する方法が実用化されてきている^[6,7]．本研究では，個体に生じる点突然変異と欠失変異を効率的に検出可能な *gpt delta* トランスジェニックマウスを用いて，タバコ特異的発がん性ニトロソアミンである NNK (4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone) と低線量率放射線によるマウス肺における突然変異誘発能およびその複合影響について検討した．また，近年発がん抑制作用が注目されている果実成分フラボノイドの一種ノビレチンを用いて，NNK 誘発突然変異に対する抑制効果の有無について検討を行った．

喫煙と肺がんの因果関係は，すでに 20 世紀の初頭から認識されており，現在では喫煙の有害性が社会常識として浸透している．また，英国など早くから積極的に禁煙対策を実施してきた欧米諸国では，近年明らかに累積肺がん罹患率が低下している．日本でも成人の喫煙率は徐々に低下しているが，禁煙の取り組みが欧米に比べ遅れたため，肺がんはなお増

加し続けている。また、全体での喫煙率は低下しているが、若い女性（20代）や未成年者では増加傾向にある^[2]。多くの疫学的研究から、ブリンクマン（Brinkman）指数（1日の喫煙本数×年数）が400~600を超えると、肺がんリスクが急激に上昇すると言われている。また、喫煙開始年齢が早いほど、タバコの煙を深く吸い込むほど、あるいはフィルターなしの高ニコチンタバコを吸うほどヒト肺がんリスクが高くなる。これにはタバコ煙中に含まれる変異原・がん原物質が関与すると言われている。

タバコ煙中には、約60種類以上のがん原物質及び発がん物質を含む4000種類を超える化合物が存在すると言われている^[8;9]。その中でも、B[a]P (benzo[a]pyrene) などの PAH (polycyclic aromatic hydrocarbon) 類および NNK などのタバコ関連 *N*-ニトロソアミン類は、喫煙による肺がんリスクに関与するという知見が数多く報告されている^[10-13]。B[a]P は、気管支滴下などその局所的な投与によってラットやハムスターの肺において扁平上皮がんを誘発する^[14;15]。一方で、ニコチンの分解産物である NNK はタバコに特異的に含まれる *N*-ニトロソアミンであり、マウス、ラット、およびハムスターなどのげっ歯類の肺にその投与経路に依存せずに末梢性の肺腺がんを誘発する^[16;17]。NNK などの環境中に存在する *N*-ニトロソアミン類はそれら自体では変異原性を示さず、生体内で最も代表的な薬物代謝酵素である CYP (cytochrome p450) により代謝的に活性化され、はじめて遺伝子変異を誘発する物質となり DNA と反応して DNA に付加体を形成する。ニトロソアミン類の代表的な活性化の最初のステップは、主として CYP により触媒されるニトロソ基に隣接する α 位の炭素原子の水酸化であると考えられている^[18-21]。このステップにより生成した α -水酸化体は科学的に不安定で、アルデヒドを放出して脱アルキル化が起こる。生じたアルキルジアゾヒドロキシド

($\text{RCH}_2\text{-N=N-OH}$) は、アルキルジアゾニウムイオン ($\text{RCH}_2\text{-N}^+\equiv\text{N}$) または窒素分子が脱離して生じたアルキルカチオン (RCH_2^+) を経由して、DNA のアルキル化を引き起こす。これにより、がん遺伝子である *K-ras* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) 遺伝子などに突然変異が誘発されると *N*-ニトロソアミン類による発がんのイニシエーションが成立すると考えられている^[22;23]。また、IARC (International Agency for Research on Cancer) の評価によると、NNK と NNN (*N'*-nitrosonornicotine) の暴露は、人に対し発がん性を持つ物質と評価している^[24;25]。

タバコや食品に由来する化学発がんに加えて、放射線もヒトの発がんを誘導する重要な変異原として知られている。放射線の生物影響は、DNA に生じる損傷が主要因と考えられている。放射線は、DNA の二本鎖切断を引き起こし、染色体異常や細胞死を招く。また、生物影響をもたらす修復不能な DNA の損傷の多くが、高 LET (linear energy transfer) 放射線により生成すると考えられている^[26;27]。放射線の事故においては、世界最大級の被害を招いた 1986 年チェルノブイリ原子力発電事故がある。当時、ウクライナ共和国チェルノブイリ原発 4 号機が火災を起こし、多量の核廃棄物が大気中に放出され、国際原子力事象評価尺度 (INES) はレベル 7 と深刻かつ重大な事件であった。この事故によって、直接の死亡者は作業員・救助隊員の数十名だけであるが、がんなどの疾病を含めると、数万から数十万にのぼるとされていた。この事故のように、放射線暴露による人体への影響はとても深刻な問題となる。放射線に対して生体で最も防護すべき標的は DNA で、放射線は DNA 鎖切断や塩基への障害を引き起こす。DNA 鎖切断は、放射線によって生じた OH ラジカルによって DNA 鎖の骨格を形成する糖・リン酸エステル結合が切断さ

れて生じる。鎖切断は一本鎖切断 (single strand break; SSB) と二本鎖切断 (double strand break; DSB) に分けられ、前者は正確に修復が可能であるが、後者は修正エラーや修正不能を起こし突然変異や細胞死に結びつく。塩基への障害は直接に、あるいは DNA の誤修復などを介して種々の突然変異をひき起こすことが知られている^[27]。これは発がんに関与し、遺伝的影響に関係する。一方で、低線量の放射線が生物の免疫力を活性化したり、生物が本来身体に備えている生化学的防御機構が活性化されるなど、近年様々な報告がされるようになってきた^[28;29]。放射線の生物学的効果で問題となるのは放射線が生体構成物質に吸収されたエネルギーの量（吸収線量）と、単位時間当りの吸収線量（線量率）であるが、同一の吸収線量であってもその生物学的影響は線量率によって大きく異なってくる。同じ種類の同じ線量の放射線でも線量率によって効果の異なることを線量率効果という。線量率効果は対象となる生物効果の指標によっても、線量率の範囲によっても、また放射線の種類によってもこととなる。高線量率より低線量率の方が効果の大きくなる場合があり、これを逆線量率効果という。一般に、線量率効果がもっとも顕著にみられるのは低 LET 放射線である X 線や γ 線による生物効果であるが、これは低線量率にすると放射線によって生じた細胞の障害が照射中に回復するためと考えられている。低線量・低線量率の一致した明確な定義はないが低線量については国連科学委員会 (United Nations Scientific Committee on Effects of Atomic Radiation : UNSCEAR)、国際放射線防護委員会 (International Commission on Radiological Protection : ICRP) が線量範囲 0 ~ 200 mGy (gray) を低線量の目安としている。低線量率については、ICRP では 100 mGy/h 以下、UNSCEAR では 3.6 mGy/h 以下としている。本研究では、低線量率放射線による生物影響について遺伝子突然変異を指標

として評価するため、*gpt delta* トランスジェニックマウスを用いて、タバコ特異的発がん性ニトロソアミンである NNK の突然変異誘発能および低線量率放射線との複合曝露による修飾効果について検討した。

また、近年がんの化学予防への応用を睨んで、 β -クリプトキサンチン^[30]、ノビレチン^[31]、オーラプテン^[32;33]、リモネン^[34]、ヘスペリジン^[35]、リモノイド^[36]、などの果実成分で発がん抑制作用の研究が行なわれている。

果実は二次代謝成分の宝庫で、ポリフェノール類、フラボノイド類、カロテノイド類、クマリン・フロクマリン類、テルペン類、リモノイド類、アクリドン類など多様な化合物を含有する。食品に由来する非栄養素機能性物質として、フラボノイド類は重要な位置を占める。フラボノイドは多数の水酸基を有することが特徴であり、カンキツ類ではこの水酸基がメトキシ基で置換されたメトキシフラボノイドとして存在する^[37]。その1種がノビレチン (5,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone) で、特にカンキツ果皮の精油中に高濃度に含まれる。このフラボノイドはカンキツ類にのみ含まれ、きわめて特異的な構造、生理活性を有するポリメトキシフラボノイドである^[38]。このフラボノイドはカンキツ類にしか含まれないこともあり、いわゆる機能性成分としてはこれまでは注目を浴びることが少なかった。しかし、ノビレチンを中心に色々な分野での研究が注目されるようになってきた。その生理活性は、抗がん作用という面ではイニシエーション^[39;40]、プロモーション^[41;42]、プログレッション^[38;43;44]のいずれの段階でも抑制作用を示し、作用機序も多面的である。その他として、抗がん剤を細胞外で能動輸送するポンプとしての役割をもつ P-glycoprotein の働きを阻害する^[45]。抗がん剤が効かなくなることの原因になるが、ノビレチンの場合「抗がん」と「抗排出」の2つの活

性を併せ持つ。またノビレチンは、マウス皮膚、ラット大腸での発がん抑制効果が認められている^[46,47]。胃がん腹膜播種モデルでの実験で、腹膜内に播種された胃がん細胞から腹膜播種結節が形成されるのをノビレチンが個数、重量ともに有意に抑制した^[38]。そのほか、血糖値上昇抑制、血圧降下作用、メラニン産生の抑制、皮膚の保湿効果、皮膚脂質の酸化防止、紫外線暴露によって生じる炎症の防止と広範囲での生理活性を有している^[78]。本研究では、ノビレチンの発がん抑制メカニズムを明らかにする目的で、タバコ特異的ニトロソアミン NNK の発がん標的臓器であるマウス肺において、ノビレチン投与によって遺伝子突然変異の誘発が抑制されるかどうか検討を行った。

第1章では、*gpt delta* トランスジェニックマウスを用いた遺伝子突然変異検出系の特徴について述べた。*gpt delta* マウスは、2つの検出法を用いることで点突然変異と欠失変異を選択的に検出することが可能である。得られた変異体から塩基配列解析によって突然変異部位を同定できるため、多様な変異原によって動物個体に誘発された遺伝子突然変異を解析するのに有効である。

第2章では、*gpt delta* トランスジェニックマウスを用いて、タバコ特異的発がん性ニトロソアミンである NNK のマウス肺における突然変異誘発能および低線量率放射線との複合曝露による修飾効果について検討した。ヒトは日常生活において様々な化学物質に暴露されていることから、本研究では化学物質と放射線という異なる変異原による複合作用に注目した。NNK は主に点突然変異を誘発するのに対して、放射線は DNA 鎖切断に起因する大きな欠失変異を誘発するため、点突然変異と欠失変異を選択的に検出可能な *gpt delta* トランスジェニックマウスを用いるこ

とで、それぞれの変異原単独の効果と複合影響による修飾効果を分子レベルで解析できることが期待された。

第3章では、マウス肺における NNK 誘発突然変異に対するノビレチンの化学予防効果の検討を行なった。がんの化学予防においては、日々の食事による予防効果が注目を浴びている。近年では特に病気を未然に防ぐということから食べて治すのではなく、食べることによって予防する予防医学がクローズアップされている。第2章で用いた化学物質 NNK に対する化学予防効果について、日本で馴染み深いミカン等に含まれるノビレチンを用い、その発がん抑制メカニズムに関して興味深い知見を得たことを報告する。

第1章 *gpt delta* トランスジェニックマウスを用いた遺伝子突然変異検出法

第1節 研究の背景

遺伝子突然変異検出の試験系には *Salmonella enterica* serovar Typhimurium を用いた Ames 試験^[48]や、哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験^[49]、マウスの末梢血の小核で調べる小核試験^[50]などがある。これらは、簡便に突然変異を検出出来る反面、動物個体における吸収、分布、代謝、排泄、また臓器特異性を反映していないという欠点がある。こうした欠点を補うため、1989 年に Gossen らによって、大腸菌の β -ガラクトシダーゼをコードする *lacZ* 遺伝子を組み込んだ λ ファージ DNA をマウスゲノム中に導入したトランスジェニックマウス (MutaTMMouse) が開発された^[6]。また、1991 年には、Kohler らによって *lac* オペロンのリプレッサーである *lacI* 遺伝子をレポーターとする λ ファージ DNA をマウス受精卵に導入した Big Blue Mouse が開発された^[7]。これらの変異原性試験用トランスジェニックマウスは生殖細胞を含む多数の臓器でレポーター遺伝子を標的ターゲットとして突然変異を検出し、塩基配列の変化を解析できるという特徴を持つ。しかし一方で、変異体の検出を呈色反応で行ったり、標的遺伝子のサイズが数 kb と大きいことは、変異体の検出や変異部位の同定に大きな労力・時間を要する。また、放射線等で誘発される欠失変異の検出には効果的でない等の欠点があった。

1996 年に Nohmi らは、大腸菌の guanine phosphoribosyltransferase をコードする遺伝子 (*gpt*) を λ ファージ DNA 上に組み込みマウスに導入した *gpt delta* トランスジェニックマウスを開発した^[51]。*gpt* (guanine

phosphoribosyltransferase) はコード領域が 456 塩基対と小さく容易に変異部位の同定を行なうことができる。また λ ファージの *red/gam* 遺伝子をレポーターする Spi 検出法により、これまで検出が難しかった欠失変異の効率的な検出を可能にしたという特徴を持っている。

第2節 *gpt* delta トランスジェニックマウスを用いた突然変異検出法の概要^[52]

1-2-1) *gpt* delta トランスジェニックマウスを用いた突然変異検出法の特徴^[53]

gpt delta トランスジェニックマウスは、C57BL/6J 系統で作出され、17番染色体上にλEG10 ファージ DNA がハプロイドあたり約 80 コピーずつ、計 160 コピー導入されている。λEG10DNA 上には、点突然変異検出用の標的遺伝子である *gpt* 遺伝子と、欠失変異検出用の標的遺伝子である λ ファージ *red/gam* 遺伝子が組み込まれている (Fig. 1)。

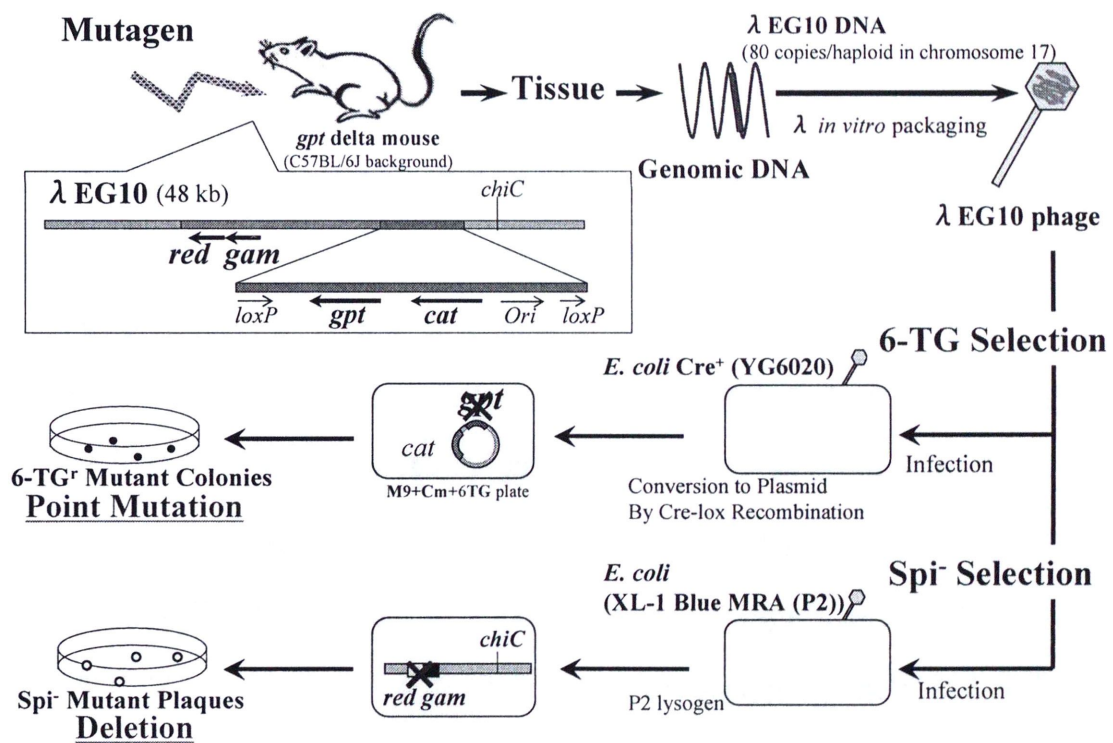


Fig. 1. Mutation assays using *gpt* delta transgenic mice.

突然変異の検出にあたっては,をマウス臓器からゲノム DNA を抽出し,
λEG10DNA を *in vitro* パッケージング法によりファージ粒子として回収
する (Fig. 2).

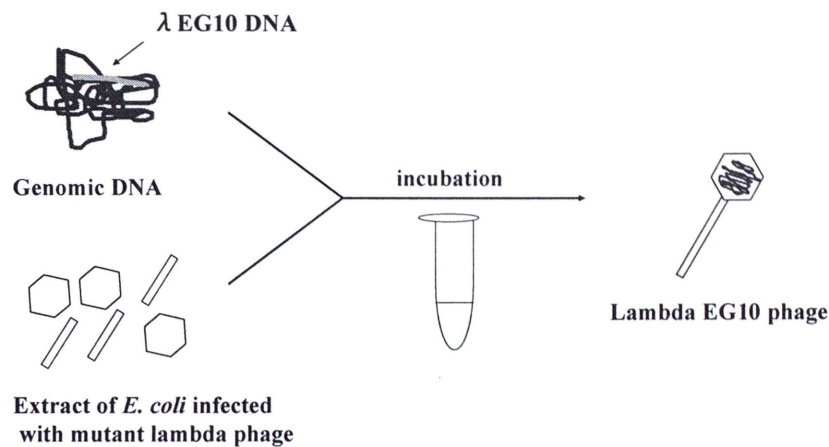


Fig. 2. *in vitro* packaging of bacteriophage lambda

回収したファージを大腸菌に感染させると, 標的遺伝子上に突然変異を
持った変異体のみが寒天培地上にコロニーやプラークを形成するため,
マウス個体に生じた突然変異を効率良く検出することができる. *gpt*
delta マウスは, 2つの検出法によってそれぞれ異なるタイプの突然変異
を選択的に検出する特徴を持つ. 第1の検出法である 6-チオグアニン
(6-thioguanine : 6-TG) セレクションは, 主に塩基置換やフレームシフト
等の点突然変異を検出する. 第2の検出法である *Spi*⁻セレクションは, 1
塩基欠失のフレームシフトを含む約 10kb (kilobase pair) 長までの欠失変
異を選択的に検出する (Fig. 1).

1-2-2) 6-TG セレクションの原理と手法

大腸菌 *gpt* 遺伝子は, purine サルベージ回路に関わる guanine phosphoribosyltransferase をコードしている. この酵素はグアニンのフォスフォリボシル化を触媒し, グアニン塩基の DNA への取り込み過程を担っている. 一方でこの酵素は 6-TG も基質とする. 6-TG は DNA に取り込まれることで毒性を示すため, 野生型の *gpt* 遺伝子を持った大腸菌は 6-TG を含む培地上で生育することが出来ない. すなわち *gpt* 遺伝子に変異を持ち不活化した大腸菌のみが 6-TG を含む寒天培地上で生育しコロニーを作る.

6-TG セレクションの手法は以下の通りである. 変異原で処理したマウスのゲノム DNA から *in vitro* パッケージング法によって回収した λ EG10 ファージを Cre 組み換え酵素を発現している大腸菌 YG6020 株に感染させると, λ EG10 上にある一組の *loxP* 配列に挟まれた領域が Cre 組み換え酵素によって切り出され, プラスミドに変換する (Fig. 3).

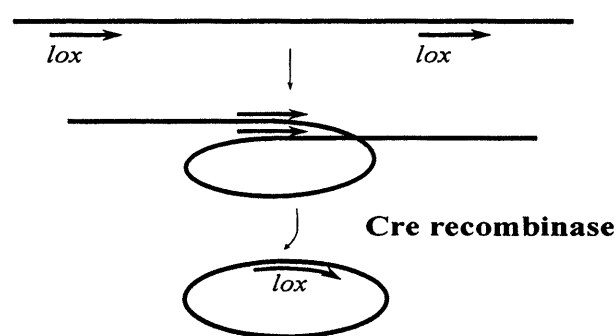


Fig. 3. Cre-lox site-specific recombination

感染後の YG6020 菌液を 6-TG とクロラムフェニコール (Cm:chloramphenicol) を含む M9 寒天培地にまいて 37°C で培養すると, プラスミド上の *gpt* 遺伝子が不活化している変異体のみが 6-TG を含む寒

天培地上でコロニーを形成する．また，Cm (chloramphenicol) のみを含む M9 寒天培地にまいて生じたコロニー数から感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換効率が求められる．したがって，変異コロニー数を形質転換コロニー数で除して突然変異体頻度を算出する．

1-2-3) Spi⁻ セレクションの原理と手法

λ ファージの *red/gam* 遺伝子は，ファージが感染した大腸菌の *recBC* 遺伝子機能を抑制し，自身の DNA が大腸菌の *exonuclease* により分解されるのを防ぐ．その結果ファージは増殖し寒天培地上にプラークを作る．しかし，P2 溶原菌では， λ ファージの進入により *recBC* 遺伝子が不活化されると P2 ファージの *Old* タンパクにより宿主大腸菌を殺すので，結果的に λ ファージの増殖は抑えられプラークを生じない．この野生型 λ ファージの P2 溶原菌に対する表現型を Spi⁺ (sensitive to P2 interference) と呼ぶ．一方，*red/gam* 両遺伝子機能が不活化している変異体ファージは P2 溶原菌に対してもプラークを形成することができる (Spi⁻)．Spi⁻ ファージの増殖には宿主大腸菌が *recA*⁺ であること，ファージ遺伝子上に *chi* 配列が存在することが必要である．Spi⁻ 表現型は *red/gam* 両遺伝子機能の不活化によりもたらされているため，Spi⁻ 変異体には主に欠失型の変異を持つと考えられる．*red/gam* 遺伝子にそれぞれ独立した点突然変異が同時に生じる確立は非常に低いと考えられるためである．Spi⁻ セレクションの手法は以下の通りである．*in vitro* パッケージングにより回収された λ EG10 ファージを大腸菌 XL-1Blue (MRA) P2 に感染させて Spi⁻ 変異体を同定する (変異プラーク数を算出)．一方，P2 が溶原化していない大腸菌 XL-1Ble (MRA) に回収した λ EG10 ファージを感染させると，

感染したファージはすべてプラークを形成する (総プラーク数を算出). 変異プラーク数を総プラーク数で除し, Spi⁻突然変異体頻度 (Spi⁻MF) を算出する. Spi⁻セレクションの特徴は, 欠失変異を持つ λ ファージをポジティブにセレクションできることである. この様に, *gpt delta* トランスジェニックマウスを用いた変異原性試験系では, 回収した同じ DNA を用いて宿主大腸菌を変えることにより異なるタイプの変異を効率よく検出することができる.

第2章 *gpt delta* マウスを用いた NNK 誘発突然変異に対する低線量率放射線の影響の解析

第1節 緒言

放射線は DNA に損傷を与え突然変異を誘発する代表的な変異原として知られている。しかし、化学物質との複合作用については多くが未解明である。ヒトは日常生活において多数の化学物質に曝露されており、ヒトに起きるがんの半数以上は食物や喫煙によって体内に取り込まれる化学物質に由来すると考えられている^[1]。従って、放射線の生物影響を考える際には、放射線のみの影響でなく、ヒトがどのような化学物質にどの程度曝露されているのかを勘案する必要がある。私たちは日常的に宇宙線や地球上の放射線同位元素の崩壊にともなって放出される放射線など絶えず環境からの放射線を浴びている。一年間に浴びる自然放射線量の世界平均は約 2.4 mSv (sievert) と言われている^[54]。その内訳は、空気中にあるラドンという放射性物質から 1.2 mSv、宇宙からやってくる宇宙放射線による被ばく量が 0.4 mSv、地面から約 0.5 mSv、食べ物から約 0.3 mSv。日本ではこの自然放射線の量は 1 人あたりの年間平均は 1.5 mSv といわれている。すなわち人が自然界および医療・職業等の理由で放射線を浴びる量は、年間世界平均 2 mGy (0.002Gy) 前後と推定されている。低線量率放射線は、発がんに対して抑制効果を示す（放射線ホルミシス）という報告もあり、そのリスク評価は複雑である。したがって、放射線と化学物質の複合作用を詳細に検討するためには動物個体を用いて分子レベル (DNA 塩基配列レベル) での解析を行うことが必要である。序論で述べたように、タバコの煙には約 4000 種類の化合物が含まれてお

り、喫煙は肺がんをはじめさまざまな疾病の誘発に関与している^[9,16]. タバコ煙中に含まれる発がん化合物の1種で、ニコチン由来タバコ特異的ニトロサミンとして知られるのが

4-(methylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)である (Fig. 4.).

NNK はチトクローム P-450 により代謝的に活性化され、DNA をアルキル化し突然変異を誘発する^[25]. これまでにマウス、ラット、ハムスターに対する発がん性が報告がされている^[16,17]. 本研究では、突然変異検出のためのレポーター遺伝子を組み込んだ *gpt delta* トランスジェニックマウスを用い、NNK 誘発突然変異に対する低線量率放射線 (γ 線) の影響を検討した. NNK によってマウス個体に誘発される塩基置換変異および欠失変異を塩基配列レベルで解析し、NNK と γ 線の複合影響を精査した. 低線量率については、ICRP (International Commission on Radiological Protection) では 100 mGy/h 以下、UNSCEAR (United Nations Scientific Committee on Effects of Atomic Radiation) では 3.6 mGy/h 以下としている. したがって、本研究では 0.5, 1.0, 1.5 mGy/h の線量を用いて実験を行なった為、「低線量率」と表記することとした.

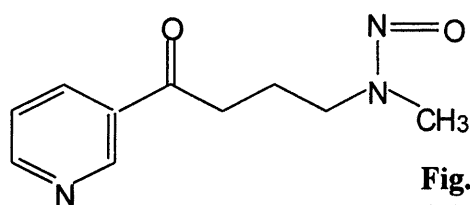


Fig. 4. Chemical structure of 4-(methylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)

第2節 実験材料・試薬および使用機器

2-2-1) 使用試薬および使用機器

マウスの固形飼料 MB-1 は船橋農場より購入した。ゲノム DNA 抽出で用いた RecoverEaseTM DNA Isolation Kit は Stratagen 社より購入した。Tris (Tris(hydroxymethyl) aminomethane, 2NA (EDTA:ethylenediaminetetraacetic acid · 2Na), NaCl, NaOH は和光純薬工業より購入した。50 mL 容遠心チューブ は CORNING 社のもの、遠心分離機は CD-100R(トミー精工) を用いた。 *in vitro* パッケージングで用いた Transpack® packaging extract は Stratagen より購入し、MgSO₄ · 7H₂O, Gelatin は和光純薬工業より購入した。6-TG セレクションで用いた培地用試薬は、BactoTM Yeast Extract, Bacto Tryptone, BactoTM Agar は Becton Dickinson より購入した。 maltose monohydrate, Na₂HPO₄ · 7H₂O, KH₂PO₄, NH₄Cl, NaCl, NaOH , CaCl₂ · 2H₂O, Thiamine Hydrochloride, L(-)-Proline, L-Leucine, L(+)-Isoleucine, Km (kanamycin), Cm, DMSO (dimethyl sulfoxide), EtOH は和光純薬より, 6-TG は東京化成より購入した。振とう培養機は G24 Enviromental Incubator Shaker (New Brunswick Scientific) を用い、OD 測定に用いた吸光光度計は UV-200S (Shimadzu) を使用した。滅菌シャーレは直径 9 cm (Eiken Kizai) を用い、全自動培地作成システム TECNOMAT (Integra Biosciences) にて培地を作成した。本培養で用いた 37℃ の高温水槽は ML-10F (Taitec), 50℃ の高温槽は THERMO ACIT-77N (Ikeda Scientific) を使用し、Vortex ミキサー は G560 (Scientific Industries) を用いた。インキュベーターは F120 (Hiyama MGF) を用いた。アガロース電気泳動では、Perfect DNATM Markers, 0.5-12kb (ローディングバッファー添付) は Novagen より, Seakem® GTG Agarose は TaKaRa より、Ethidium Bromide は和光純薬工業より購入した。ミニゲル電気泳動槽は Mupid (Adovance) を用いた。6-TG

セレクションで用いた大腸菌 YG6020 は国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部二室室長・能美健彦博士より御供与いただいた。Spi⁺ セレクションで用いた培地用試薬は、BBLTM TrypticaseTM Pepton は和光純薬工業より購入した。本培養で用いた大試験管用バイオローター は BR-3 (Renoer Science)を用いた。ガラスキャピラリー は 100 μ L Ringcaps Hirschmann® Laborgerate より購入した。大腸菌 XL-1 Blue MRA, XL-1 Blue MRA (P2), WL95 (P2), LE392 は国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部二室室長・能美健彦博士より御供与いただいた。シーケンス解析で用いた Big Dye® Terminator V1.1 Cycle Sequencing Kit は Applied Biosystems より，Exosap-IT は USB より，AutoseqTM G-50 columns は GE Healthcar より購入した。Takara Ex TaqTM，TaKaRa LA TaqTM は TaKaRa より購入した。PCR 用サーマルサイクラー は DNA Engine PTC-200 MJ Reserch, MA を用い，ABI 310 シーケンサー は Applied Biosystems Foster City CA にて塩基配列の解析を行なった。塩基配列はソフトウェア SeqScape Applied Biosystems Foster City CA により解析した。微量高速遠心機は CF15R HITACHI を使用した。本研究で用いた NNK は，Tronto Research Chemical より購入した。

2-2-2) 試薬の調製

ゲノム DNA 抽出

1M Tris-HCl : 1 L

Tris 121.1 g, 溶解後 HCl で pH を 8.0 に調整。高圧蒸気滅菌 (121°C, 20 分間)。

0.5 M EDTA : 1 L

2NA (EDTA · 2Na) 181.6 g, NaOH で pH を 8.0 に調整. 高圧蒸気滅菌 (121℃, 20 分間). EDTA は pH8 付近にならないと溶解しない.

TE buffer : 1 L

1M Tris-HCl 20 mL, 0.5M EDTA 4 mL, DW 1976 mL, 高圧蒸気滅菌 (121℃, 20 分間).

in vitro パッケージング

SM Buffer : 100 mL

NaCl 0.58 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, 1M Tris-HCl (pH7.5) 5 mL, Gelatin 0.1 g,ゼラチンが解け難いので, 温めながら溶かす. 濾過滅菌.

6-チオグアニンセレクション

LB (Luria-Bertani) broth : 100 mL

Bacto Tryptone 1.0 g, Bacto™ Yeast Extract 0.5 g, NaCl 1.0 g を混合し, 1N-NaOH にて pH7.0 に調整. 高圧蒸気滅菌 (121℃, 20 分間).

LB+0.2% (w/v) maltose broth

LB broth に 20% (w/v) maltose 溶液を 1/100 量加えて調製.

LB+10 mM MgSO₄ broth

LB broth に 10 mM MgSO₄ 溶液を 1/100 量加えて調製.

10×M9 salt : 1L

Na₂HPO₄ · 7H₂O 128 g (Na₂HPO₄ 67.81 g), KH₂PO₄ 30 g, NaCl 5 g, NH₄Cl 10 g, 高圧蒸気滅菌 (121℃, 20 分間).

20% (w/v) maltose : 100 mL

maltose 20 g (maltose monohydrate 21.05 g), 濾過滅菌.

1M MgSO₄ : 100 mL

MgSO₄ 12.0 g (MgSO₄ · 7H₂O 24.6 g), 濾過滅菌.

1M CaCl₂ : 100 mL

CaCl₂ 11.0 g (CaCl₂ · 2H₂O 14.7g), 濾過滅菌.

1% (w/v) Thiamine : 100 mL

Thiamine 1 g (Thiamine Hydrochloride 1.1 g), 濾過滅菌.

10 mg/mL Amino acid (Pro, Leu, Ile) : 100 mL

L(-)-Proline 1.0 g, L-Leucine 1.0 g, L(+)-Isoleucine 1.0g, 濾過滅菌.

25 mg/mL Km : 50 mL

Kanamycin 1.25g, -20℃で保存.

25 mg/mL Cm : 100 mL

Chloramphenicol 2.5 g, EtOH にて溶解, -20℃で保存.

25 mg/mL 6-TG :

DMSO に溶解, 当日調製.

M9 + Cm 寒天培地 : 1L

Bacto™ Agar 15 g に DW 900 ml を加え高圧蒸気滅菌 (121℃, 20 分間) 後, 60℃以下になったら以下の試薬を順に加える. 10×M9 salt 100mL, Glycerol 10 mL, 1M MgSO₄ 2 mL, 1M CaCl₂ 0.1 mL, 1% (w/v) Thiamine 0.5 mL, 10 mg/mL Amino acid (Pro, Leu, Ile) 4 mL, 25mg/mL Cm 1 mL.

M9 + Cm + 6-TG 寒天培地 : 1L

M9 + Cm 培地に当日調製した 25 mg/mL 6-TG を 1 mL 加えた.

軟寒天培地 (soft agar) : 100mL

Bacto™ Agar 0.6 g, NaCl 0.6 g, 高圧蒸気滅菌 (121℃, 20 分間). 使用当日に短い高圧蒸気滅菌 (121℃, 5 分間)によって溶解させ, 使用時まで 50℃湯浴中にて保存.

6-TG 軟寒天培地 (6-TG soft agar) : 100mL

50℃湯浴中の軟寒天培地に当日調製した 25 mg/mL 6-TG を 0.25 mL 使

用直前に加えた.

1/15 M Na-K buffer (pH 7.4) : 1 L

NaHPO₄ 7.57 g, KH₂PO₄ 1.82 g, 高圧蒸気滅菌 (121℃, 20 分間).

0.7~0.8 % アガロースゲル : 100 mL~

GTG Agarose は作成量の 0.7~0.8 %を 1×TAE Buffer にて溶解 (電子レンジ使用). 60℃くらいに冷ましてから Ethidium Bromide を 1/10000 vol. 加えた.

Spi⁻ セレクション

λ-トリプティケース寒天培地 : 1 L

BactoTM Agar 10 g, BBLTM TrypticaseTM Pepton 10 g, NaCl 5 g, 高圧蒸気滅菌 (121℃, 20 分間).

λ-トリプティケース軟寒天培地 : 100 mL

BactoTM Agar 0.6 g, BBLTM TrypticaseTM Pepton 1.0 g, NaCl 0.5 g, 高圧蒸気滅菌 (121℃, 20 分間). 使用当日に短い高圧蒸気滅菌 (121℃, 5 分間)によって溶解させ, 使用時まで 50℃湯浴中にて保存.

第3節 実験方法

3-3-1) 実験の概要

実験動物は7週齢雌の *gpt delta* トランスジェニックマウスを用い、放射線医学総合研究所の照射施設にて飼育を行った。マウスの飼育管理は、木材チップを敷いたアルミニウムケージにて飼育し、12時間の明暗サイクルで、食餌 (MB-1) と水は自由摂取させた。NNK に対する感受性は雌が高いという想定に基づき、各群8匹の雌マウスに γ 線を異なる線量率 (0 mGy/h, 0.5 mGy/h, 1.0 mGy/h, 1.5 mGy/h) で22 h/day, 2週間照射し、照射を継続しつつNNKを腹腔内投与 (2 mg/mouse $\times$ 4 day) し、さらに照射下で2週間飼育した。また、NNKの代わりに溶媒 (生理食塩水) を投与した対照群を用い、全8群で実験を行った (Fig. 5.)。総放射線量は、0.5 mGy/h 照射群で0.34 Gy, 1.0 mGy/h 照射群で0.68 Gy, 1.5 mGy/h 照射群で1.02 Gyであった。飼育終了後、マウスから臓器を採取し、液体窒素で凍結して-80℃にて保存した。各群5匹のマウスを用いて、肺における *gpt* 点突然変異体頻度および *Spi* 欠失変異体頻度を測定した。それぞれの *gpt* 変異体、*Spi* 変異体についてはPCRとDNAシーケンス解析によりDNA塩基配列上の変異部位を同定し、その変異スペクトラムを解析した。

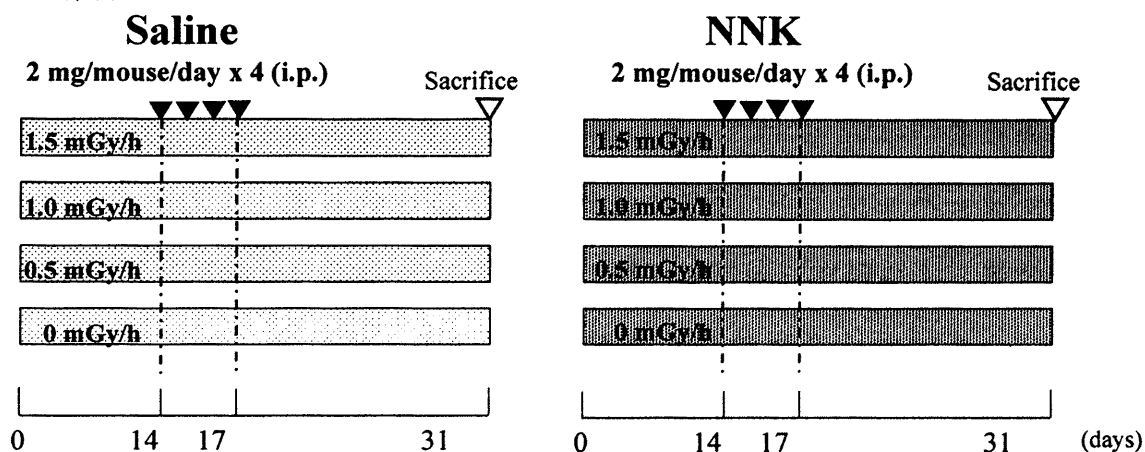


Fig. 5. An experimental design to examine the combined genotoxicity of γ -irradiation and NNK treatments in the lung of mice.

2-3-2) 放射線照射方法

放射線医学総合研究所の第一ガンマ線照射棟，第2照射室にてセシウム 137 で照射した．照射線量率は蛍光ガラス線量計を用いて測定し，非照射マウスについては，厚さ 1 m のコンクリート壁を隔て飼育した．

2-3-3) ゲノム DNA 抽出法

RecoverEase™ DNA Isolation Kit を用いてゲノム DNA 抽出を行った．10 mL 容ガラスホモジナイザーを氷上に用意し，5 mL の ice-cold lysis buffer を加えた．ドライアイスの上で砕いた氷結臓器を天秤で約 20 mg 測り，10 mL 容ガラスホモジナイザーに加えて氷上にて十分にホモジナイズした．ホモジネート液を strainer cell に通して濾過液を遠心チューブに回収した．ホモジナイザーに 3 mL の ice-cold lysis buffer を氷上にて加えて洗い込み，ホモジネート液を trainer cell に通して濾液を遠心チューブに回収して，全量 8 mL の溶液を得た．4℃で 1100×g，12 分間遠心分離し，沈殿物を流さないように注意して上清を捨てた．ペーパータオルの上に遠心チューブを逆さに置き(約 1 分)，余分な液を取り除いた後，sterile applicator を用いてチューブ内壁に残った上清を拭き取った．これに調製済みの digestion solution を 70 µl 加えた後，50℃の循環高温槽で 2~3 分温めた proteinaseK を加え，よく振った．これを 50℃の循環高温槽で 15 分おきによく振りながら 45 分 (15 分×3 回) インキュベーションした．その間に 500 mL 容ビーカーを TE buffer 500 mL で満たし、スターラーで低速に攪拌しながら、その上に透析膜に空気が入らないように注意して dialysis cup を浮かべた．インキュベーションしたゲノム DNA サンプルを wild-bore tip を用いて dialysis cup 透析膜の中心に移した．アルミ

ホイルで蓋をして室温で 18~48 時間透析を行なった。透析終了後, dialysis cup を取り外しペーパータオルで dialysis cup の裏側から余分な Buffer を吸い取った。wild-bore tip でゲノム DNA を (粘度の高い部分 50~80 μ L) を採取し 1.5 mL 容エッペンチューブに移して 4°C にて保存した。

2-3-4) *In vitro* パッケージング

Transpack® packaging extract を用いて *in vitro* パッケージング反応を行った。内溶液 10 μ L のオレンジチューブに 2-3-3 で調製した DNA 溶液を 5 μ L 加えピペッティングで十分に混和し, 37°C で 1.5 時間インキュベーションした。反応液に, ブルーチューブの内溶液を 10~13 μ L 加えピペッティングして十分に混合し, 37°C で 1.5 時間インキュベーションした。その後, オレンジチューブの全量が 300 μ L になるように SM Buffer を加え 4°C で保存した。

2-3-5) 6-TG セレクション

2-3-5- i) 菌液の調製

大腸菌 YG6020 株の冷凍保存菌株 (-80°C) から 2 mL の LB 液体培地 (0.2% (w/v) maltose, 25 μ g/mL Km を含む) に植菌し, 37°C の振とう培養機で一晩 300 ppm の速度で振とう培養し, 前培養液を作成した。翌日, LB 液体培地 (0.2% (w/v) maltose, 25 μ g/mL Km を含む) に前培養液を 1/40 量植菌し、吸光光度計で確認しながら OD₆₀₀ が 1.0 (3 時間くらいで確認) になるまで 37°C の恒温水槽で 110 rpm の速度で振とう培養した OD₆₀₀ が 1.0 に達した本培養液を 4°C で 4000×g, 10 分間遠心分離した後,

回収した菌体を 1/2 量の LB + 10 mM MgSO₄ に懸濁し，YG6020 菌液とした．菌液は氷中に保存し，当日中に使用した．

2-3-5- ii) プレーットの作製

2-2-2 試薬の調製を参照．

2-3-5- iii) *gpt* 変異体の検出

1 sample について小試験管 (12.3 mm diameter×75 mm high) 7 本を用意し YG6020 菌液を 200 μ L ずつ井上式分注ピペットを用い分注した．2-3-4 に記したパッケージング後の λ ファージ懸濁液 2 μ L を LB + 10 mM MgSO₄ で 100 倍に希釈して，小試験管 2 本に 10 μ L ずつ加えた (生菌数測定用)．残りの 5 本の小試験管に希釈していない λ ファージ懸濁液を 60 μ L ずつ加えた (セクション用)．それぞれを Vortex ミキサーで混合した後，37℃で 20 分間静置してインキュベーションした．次に振とう培養機に移し，300 rpm の速度で 37℃20 分間振とうした．生菌数測定用の小試験管 2 本に，50℃で保温しておいた軟寒天培地を 2.5 mL 加えて Vortex ミキサーで混合し，M9 + Cm プレートに重層した．一方，セクション用の小試験管 5 本に，50℃で保温しておいた 6-TG 軟寒天培地 (使用直前に当日調製した 6-TG を加える) を 2.5 mL 加えて Vortex ミキサーで混合し M9 + Cm + 6-TG プレートに重層した．6-TG 軟寒天培地が固まったらプレートを倒置して 37℃で培養した．M9 + Cm プレートは 66 時間後に Cm 耐性 (Cm^r) コロニー，M9 + Cm + 6-TG プレートは 72 時間後と 96 時間後に Cm 耐性かつ 6-TG 耐性コロニー (Cm^r, 6-TG^r) 数を数えた．次に Cm^r・6-TG^r コロニーの表現型の確認を行った．M9 + Cm + 6-TG プレートから滅菌した楊枝で Cm^r・6-TG^r コロニーを拾い，50 μ L の 1/15 M

Na-K buffer で楊枝の先を buffer 液につけ希釈した後に，未使用の M9 + Cm + 6-TG プレートと M9 + Cm プレートにストリークし，37℃で 3 日間培養した．M9 + Cm + 6-TG プレートで生育した Cm^r・6-TG^r コロニーを *gpt* 変異体として MF (mutation frequency) を算出し，さらに *gpt* 遺伝子変異部位の同定を行った．Cm^r・6-TG^r コロニーをテンプレートにするまではストリークしたプレートは 4℃にて保存し，PCR 反応の際に菌液をテンプレートとして用いた．

2-3-5-iv) *gpt* MF の算出

MF は，終濃度 25 µg/mL の Cm および 6-TG を含む M9 寒天培地において生育したコロニーの総数を，終濃度 25 µg/mL の Cm を含む M9 寒天培地において生育したコロニーの総数に希釈倍率である 3000 を乗じた値で除することにより算出した．

2-3-5-vi) *gpt* 遺伝子を含む DNA 断片の増幅

4℃で保存しておいたストリーク後の M9 + Cm + 6-TG プレートを室温に戻した．Takara Ex TaqTM，および Primer 1 (forward : 5'-TACCACTTTATCCCGCGTCAGG-3') と Primer 2 (reverse : 5'-ACAGGGTTTCGCTCAGGTTTGC-3') を加えた反応液に Cm^r・6-TG^r コロニーを滅菌した楊枝で極少量加え，反応液に加えた．PCR 用サーマルサイクラーによって，*gpt* 遺伝子のコード領域 (456 bp) を含む約 739 bp (base pair) の領域を増幅した．プライマーおよび反応液組成と使用プログラムを以下に示した．PCR 産物はアガロースゲル電気泳動によって増幅を確認した後 ExoSAP-IT 処理した．PCR 増幅産物は使用時まで-20℃で保存した．

PCR reaction mixtur	(μ L)	Program (PCR reaction)
DW	40.15	Step 1 94°C, 4 min+30 sec
10×EX Taq Buffer	5	Step 2 94°C, 30 sec.
dNTP mix (2.5 mM)	4	Step 3 58°C, 30 sec.
primer 1 (100 pmol/ μ L)	0.05	Step 4 72°C, 2 min.
primer 2 (100 pmol/ μ L)	0.05	Step 5 go to step 2, 29 time
TaKaRa ExTaq	0.25	Step 6 72°C, 5 min.
	49.5	Step 7 4°C, forever

2-3-5-vii) *gpt* 変異部位の同定

シーケンス反応産物は、Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit を用いて、PCR 用サーマルサイクラーにてサイクルシーケンシング反応を行った。PCR 産物をテンプレートとし、プライマーは *gptA2* (no label : 5'-TCTCGCGCAACCTATTTTCCC-3') を用いた。プライマーおよび反応溶液組成と使用プログラムを以下に示した。シーケンス反応産物は AutSeqTMG-50 のカラムに通してから ABI 310 シーケンサーにて塩基配列の解析を行なった。塩基配列はソフトウェア SeqScape により解析した。

Big Dye reaction (1/4 reaction mixture)	(μ L)	Program (Big Dye reaction)
DW	5	Step 1 96°C, 3 min.
Primix	1	Step 2 96°C, 10 sec.
5×Seq Buffer	1.5	Step 3 50°C, 5 sec.
Primer (1 pmol/mL)	1.5	Step 4 60°C, 4 min.
Template	1	Step 5 go to step 2, 25 time
	10	Step 6 60°C, 4 min.
		Step 7 4°C, forever

2-3-6) *Spi*⁻ セレクション

2-3-6- i) 菌液の調製 (XL-1 Blue MRA, XL-1 Blue MRA (P2), WL95 (P2))

-80°Cで保存した大腸菌 XL-1 Blue MRA, XL-1 Blue MRA (P2) および

WL95 (P2) の凍結細胞を、各 2 mL の LB 液体培地に植菌し、振とう培養機を用い、37℃で一晩 300 ppm の速度で振とう培養し、前培養液を作成した。翌日、LB 液体培地 (0.2% (w/v) maltose を含む) に前培養液を 1/100 量植菌し、吸光光度計で確認しながら OD₆₀₀ が 1.0 (3 時間で OD₆₀₀ が 0.8 くらいであることを確認) になるまで大試験管用バイオローターを用いて 37℃で培養した。4℃で 3400×g, 10 分間遠心分離して、回収した菌体を 1/2 量の LB + 10 mM MgSO₄ に懸濁し、XL-1 Blue MRA 菌液および XL-1 Blue MRA (P2) 菌液とした。菌液は氷中に保存した。大腸菌 WL95 (P2) においては、スポットテスト当日に菌液の調製を行なった。

2-3-6- ii) 培地の作製

2-2-2 試薬の調製を参照。

2-3-6- iii) Spi⁻ 変異体の検出

2 本の試験管に XL-1 Blue MRA を、井上式分注ピペットを用いて 200 μL 分注した。2-3-4 でパッケージングした後、LB 液体培地 (10mM MgSO₄ を含む) で 100 倍希釈した λファージ液を 10 μL 加えた。Vortex ミキサーで混合した後、37℃のインキュベーターで 20 分間静置してした。別の 2 本の試験管に XL-1Blue MRA (P2) 菌液を 500 μL 分注し、パッケージングした λファージ液を 150 μL 加え、Vortex ミキサーで混合した後、37℃のインキュベーターで 20 分間静置した。4 本の試験管にそれぞれ 50℃で保温していた λ-トリプティケース軟寒天培地に重層した。λ-トリプティケース軟寒天培地が固まったらプレートを倒置し、37℃で一晩培養し、プレートに形成したプラーク数を数えた。

得られた変異プラークについて、Spi⁻ 表現型の確認を行なった。4℃

でストックしておいた λ -トリプティケース寒天培地を室温に戻した。前日作成した XL-1 Blue MRA 菌液，または XL-1 Blue MRA (P2) 菌液と，WL95 (P2) 菌液を小試験管に 200 μ L ずつ分注し，50℃で保温しておいた λ -トリプティケース軟寒天培地を 2.5 mL 加えて Vortex ミキサーで混合し， λ -トリプティケース寒天培地に重層した。一方，滅菌したガラスキャピラリーで Spi^+ プラークを抜き取り，50 ~60 μ L の SM buffer を分注した 1.5 mL エッペンチューブに懸濁し，5 分以上放置して，ファージを溶出させた。予めマジックで 12~18 分割しておいた λ -トリプティケース軟寒天培地が固まったら，それぞれのプレートにファージ溶出液を各 15 μ L ずつスポットした。最後にポジティブコントロール，ネガティブコントロールを各 15 μ L スポットした。スポット液が乾燥したあと，プレートを倒置して，37℃で一晩培養した。

2-3-6-iv) Spi^+ 変異体の判定

XL-1 Blue MRA 菌液， XL-1 Blue MRA (P2) 菌液，WL95 (P2) 菌液を重層した λ -トリプティケース寒天培地の全てにプラークが確認できたものを Spi^+ 変異体とし，MF の算出および欠失部位の同定に使用した。プラークの判定後，プレートは 4℃で保存した。

2-3-6-v) Spi^+ MF の算出

MF は，WL95 (P2) 寒天培地において生育したプラークの総数を，XL-1 Blue MRA 寒天培地において再現性をもってプラークを生じたファージの数に希釈倍率である 3000 を乗じた値で除することにより算出した。

2-3-6-vi) phage lysate

2-3-6-vi-1) 菌液の調製 (LE392)

-80°Cで保存した大腸菌 LE392 の凍結細胞を、LB 液体培地 (10 mL) に植菌し、大試験管用バイオローターを用いて 37°Cで一晩培養した。翌日、培養した LE392 菌液を 4°Cで 4000×g, 10 分間遠心分離して回収した菌体を等量の LB + 10 mM MgSO₄ に懸濁し、LE392 菌液とした。

2-3-6-vi-2) 変異部位の同定

表現系を確認した Spi プラークを滅菌したガラスキャピラリーで採取し、50 µL の LE392 菌液に加えて 5 分間以上室温放置した。その後、2 mL の LB + 10 mM MgSO₄ 液の入った大試験管に菌液全量を加え、約 8 時間 37°Cでバイオローターを用いて培養した。培養後、クロロホルム 100 µL を加えて Vortex ミキサーで混合し、2 mL のエッペンドルフチューブに移して微量高速遠心機にて 4°Cで 15000 rpm, 5 分間遠心した後、4°Cにて保存した。

2-3-6-vii) 欠失領域を含む DNA 断片の増幅

まず、red/gam 遺伝子領域にまたがる欠失部位を含む領域を PCR で増幅し、シーケンシングの鋳型とした。さらに、0.5 kb きざみに位置を設定したプライマーを用いて 0.5~3.5 kb の PCR 反応を行い、バンドの有無からおよその欠失部位を絞り込んでシーケンスプライマーの位置を決定した。PCR プライマーおよびシーケンスプライマーの位置を Fig. 6 に示した。シーケンスプライマー選択法は Table 2. に示した。PCR の反応溶液組成と使用プログラム、PCR プライマーの組み合わせ例と野生型 λEG10 での増幅長は以下に示した。使用したプライマーは Table. 1

に記載した.

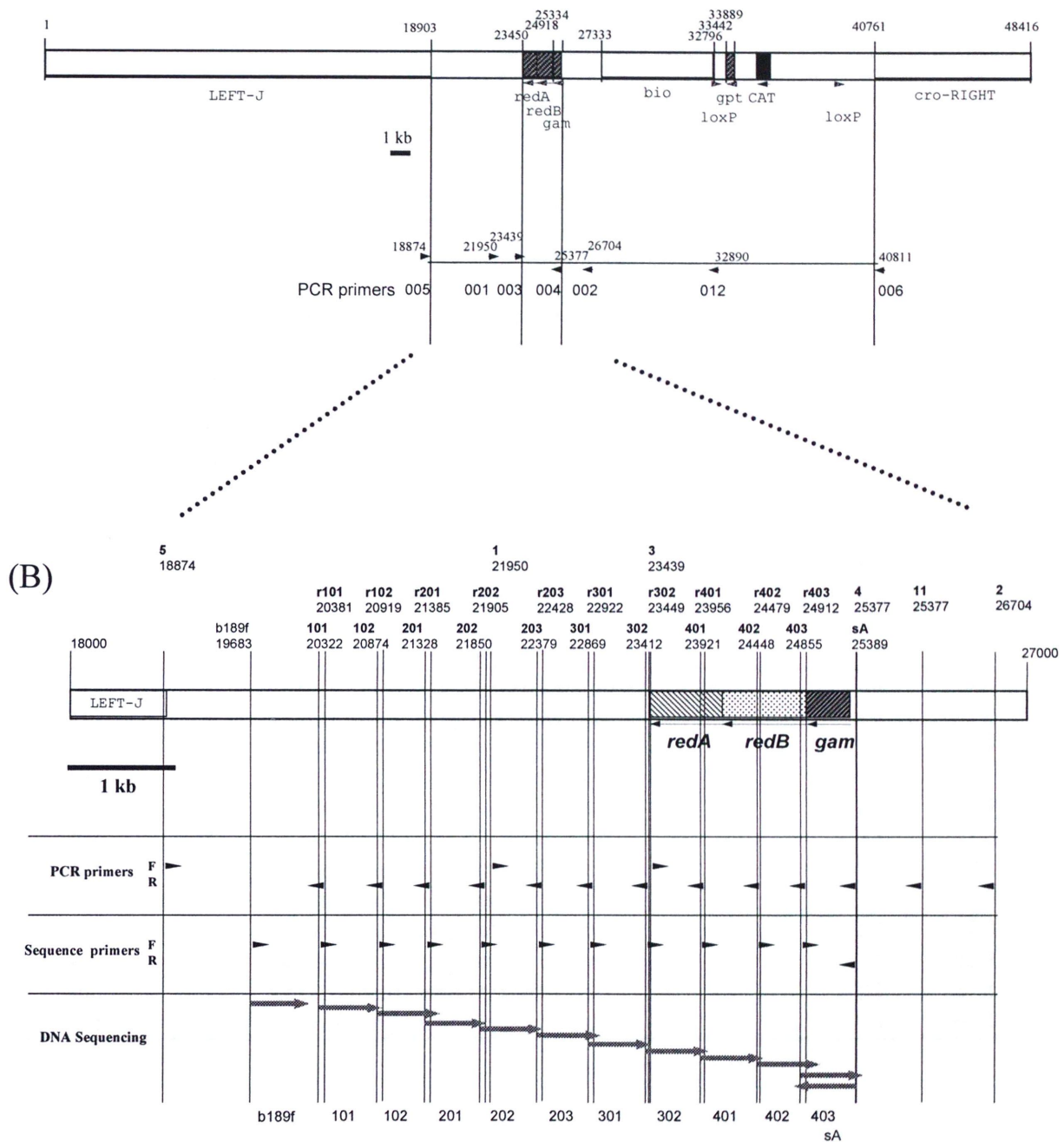


Fig. 6. PCR and Sequencing Primer of λ EG10. (A): λ EG10DNA and the position of PCR primers. (B): Partial sequence of λ EG10DNA and the position of PCR and sequencing primers. Number represent the base pairs from the terminus of left arm.

Table 1. PCR and sequencing Primers.

Lambda EG10 Primers				
name	F or R	sequence (5'-3')	oligomer	T _m (°C)
PCR primers				
001	F	ctctccttttgatgcgaatgccagc	24	59
002	R	ggagtaattatgcggaacagaatcatgc	28	58
003	F	gtgaggatgcgtcatcgccattgctccc	28	66
004	R	gaaaagatgtttcgtgaagccgtcgacgc	29	65
005	F	cgtggtctgagtgtgttacagagg	24	59
006	R	gttatgcgttggtccatacaacctcc	26	58
012	R	cggtcgagggacctaataacttcg	24	59
r101	R	gcaatggaactggctgttggtaccgggcaacg	32	67
r102	R	atattactgctacagggacccaagg	25	58
r201	R	gcacttccgagtcacaggagaatggaatggagag	34	67
r202	R	cgcgtcgtcttcacagcgatgccagagtctg	31	68
r203	R	gacgcagaccttttccatgaattgg	25	58
r301	R	ccgtagcgtactgaagaagcacccgcgaaacg	31	67
r302	R	cgcatacctcacgataatatccgggtaggcgc	31	67
r401	R	cacaccctgcttgctgaggtttgca	25	61
r402	R	cgcatacccaaacggatgttacgtcata	27	60
r403	R	atgagtactgcactcgcaacgctggctggg	30	67
Sequencing primers				
sA	r	ccactttttattggcgaatgaaaagatgtttc	30	58
b189f	f	caggaaaaccggtacagaactgc	23	62.2
101	f	ttcatttcgcataaatcaccaac	23	60.9
102	f	ccaaactctttaccgcgtccttgg	23	62.1
201	f	tcgataactctgttgaaatggctc	23	61.4
202	f	gtacggatcatcatctgacactac	23	61.3
203	f	ccagcacaatcgatggtgttacc	23	62.1
301	f	tgtgaatcccatcagcgttaccg	23	62.5
302	f	ttgcgcctaccggatattatcg	23	62.6
401	f	gccacaccggtgcaaacctcagc	23	63.3
402	f	tttatgacgtaacatccgtttgg	23	61.4
403	f	gccgacacgttcagccagcttcc	23	63.4

Table 2. Summary of the PCR to decide the sequencing primers for the analysis of deletion junction of the Spi⁻ mutants.

			Result of 1st Step PCR											
			PCR005-X product is detected. ↓					PCR001-X product is detected. (※1) ↓						
2nd Step PCR primers		PCR product (kb)	Result of 2nd Step PCR											
primer (forward)	primer (reverse)													
005	r101	1.51	×	○	○	○	○							
	r102	2.05	×	×	○	○	○							
	r201	2.51	×	×	×	○	○							
	r202	3.03	×	×	×	×	○							
001	r203	0.48						×	○	○	○	○	○	○
	r301	0.97						×	×	○	○	○	○	○
	r302	1.50						×	×	×	○	○	○	○
	r401	2.01						×	×	×	×	○	○	○
	r402	2.53						×	×	×	×	×	○	○
	r403	2.96						×	×	×	×	×	×	○
Sequence Primer →			b189f	101	102	201	→Go NEXT (※2)	202	203	301	302	401	402	403

(※1) PCR1-2の結果ほぼ全長(4.8 kb)の増幅産物が得られた場合は、Sequence Primerは sAを使用する。

(※2) 引き続き右半分の“PCR001-X product is detected.”のステップを行う。

具体的には、最初に PCR プライマー001 と 002 で PCR 反応を行い、増幅産物についてアガロースゲル電気泳動を行なった。PCR 反応には通常 TaKaRa EX TaqTM，増幅長が 5 kb 以上の場合は TaKaRa LA TaqTMを用いた。PCR 増幅産物は使用時まで-20℃で保存した。約、4.8 kb のバンドが確認できたのはプライマーsA を用いてシーケンス解析を行い、欠失部位を同定した。約 4.8 kb 以下のバンドが確認されたものについては PCR プライマー001 とリバースプライマー (r203, r301, r302, r401, r402, r403) でそれぞれ PCR を行い、増幅産物の有無でシーケンスプライマーを決定した。プライマー001 と 002 でバンドが確認できなかったものは、プライマー005 と 012 で PCR をおこなった。14 kb 以下のバンドが

確認できたものは PCR プライマー005 と 4 個のリバースプライマー (r101, r102, r201, r202) でそれぞれ PCR を行い, 増幅産物の有無でシーケンスプライマーを決定した. PCR プライマー005 と 012 で増幅産物が得られなかった場合, PCR プライマー005 と 006 で 21.9 kb の増幅を行った. 21.9 kb 以下のバンドを確認し, PCR プライマー005 とリバースプライマー (r101, r102, r201, r202) でそれぞれ PCR を行い, 増幅産物の有無でシーケンスプライマーを決定した.

PCR プライマーの組み合わせ例
(wild type λEG10での増幅長)

PCR primer 001 and 002	(4.8 kb)
PCR primer 005 and 002	(7.8 kb)
PCR primer 001 and 012	(10.9 kb)
PCR primer 005 and 012	(14.0 kb)
PCR primer 001 and 006	(18.9 kb)
PCR primer 005 and 006	(21.9 kb)

基本的には以下の 3 段階で行う.

- 1) 全サンプルについて, 最初は primer 001 and 002 (4.8 kb) の反応を行う.
- 2) 1) で増幅産物が得られない場合, 次に primer 005 and 0012 (14.0 kb) で行う.
- 3) 2) で増幅産物が得られない場合は primer 001 and 006 (19 kb) や primer 005 and 006 (21.9 kb) の反応を試す.

Reaction mixture	(μ L)
DW	15.6
10×EX Taq Buffer	2
dNTP mix (2.5 mM)	1.6
primer forward (100 pmol/ μ L)	0.2
primer reverse (100 pmol/ μ L)	0.2
template DNA	0.2
TaKaRa ExTaq or LATaq	0.2
	20.0

Program (2 STEP reaction)	
Step 1	98°C, 3 min.
Step 2	98°C, 25 sec.
Step 3	68°C, X min. (1 min/kbp)
Step 4	go to step 2, 24 times
Step 5	4°C, forever

2-3-6-viii) 欠失部位の同定

欠失領域を含む PCR の増幅産物を鋳型として、上記の方法で選択したシーケンスプライマーおよび Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Ki を用いて、PCR 用サーマルサイクラーにてサイクルシーケンシング反応を行った。プライマーおよび反応溶液組成と使用プログラムは 2-3-5-vii, Table 1. に示した。シーケンス反応産物は、AutoSeqTMG-50 のカラムに通してから ABI 310 シーケンサーを用い、塩基配列の解析を行なった。得られた塩基配列の欠失部位をソフトウェア SeqScape により同定した。

2-3-7) MF の有意差検定法

Spi⁻MF, *gpt*MF とともに、各照射群の MF を非照射群と比較し、t 検定にて有意差を検討した。P 値が 0.05 以下を統計的に有意と判定した。

第 4 節 結果

2-4-1) NNK 投与および低線量率放射線照射を行なったマウスの肺における *gpt* 突然変異頻度

2-4-1- i) *gpt* 突然変異頻度

NNK 投与および低線量率放射線照射を行ったマウスの肺における *gpt* 突然変異頻度を測定した (Table 3, Fig. 7). 各線量率の放射線照射グループにおいて, NNK 投与群および生理食塩水対照群の *gpt* MF (単位はいずれも 10^{-6} , 6 匹の平均値 $\pm$ 標準偏差) は, 14.3 ± 6.9 vs 4.2 ± 4.0 (0 mGy/h); 20.7 ± 5.1 vs 4.7 ± 3.0 (0.5 mGy/h); 15.2 ± 7.3 vs 2.0 ± 2.1 (1.0 mGy/h); 17.2 ± 7.9 vs 2.7 ± 1.4 (1.5 mGy/h)であり, NNK 投与群の *gpt* 突然変異頻度は生理食塩水対照群に対し 3~7 倍有意に上昇した. 一方, 生理食塩水対照群の *gpt* MF を各 γ 線照射グループ間で比較したところ, 照射線量率による違いは認められなかった. また低線量率放射線による複合的な効果が期待された NNK 投与群においても γ 線照射線量率の違いに *gpt*MF の有意な差は認められなかった.

さらに, 同実験に用いた *gpt delta* マウスの肝臓についても *gpt* 突然変異頻度の検出を行なった. NNK 投与群および生理食塩水対照群の肝臓における *gpt* MF (単位はいずれも 10^{-6} , 4 匹の平均値 $\pm$ 標準偏差) は 134 ± 48 vs 8.1 ± 3.8 (0 mGy/h); 105 ± 31 vs 8.7 ± 3.5 (0.5 mGy/h); 101 ± 18 vs 8.0 ± 4.2 (1.0 mGy/h); 128 ± 76 vs 6.8 ± 0.6 (1.5 mGy/h) であった. マウス肝臓において NNK 投与群の *gpt* MF は生理食塩水対照群に対して有意に増加し, また肺よりも肝臓で高い値を示した. NNK 投与と γ 線照射との複合効果については, 肺と同様に肝臓においても有意な影響は認められなかった.

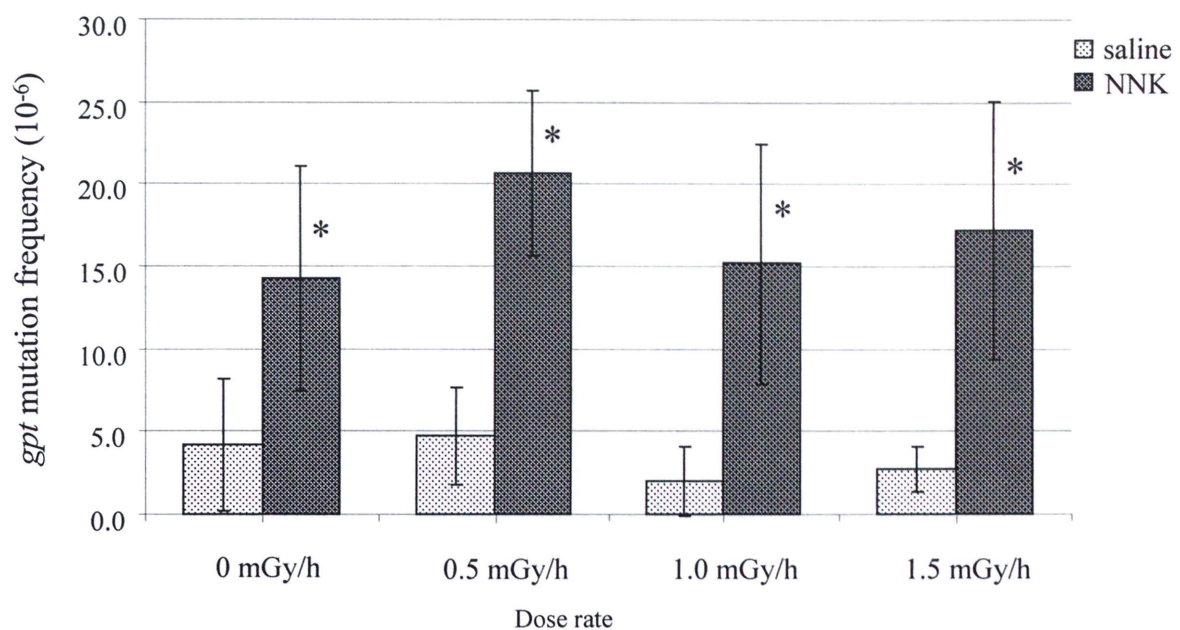


Fig. 7. *gpt* MFs in the lung of mice untreated or treated with NNK in the absence or the presence of γ -irradiation. An asterisk (*) denotes $p < 0.05$ ($n=6$) in a Student's t-test of MF of NNK-treated vs. the corresponding untreated mice. Vertical bars show the standard deviations with mice as unit of comparison.

2-4-1- ii) *gpt* 変異体の塩基配列解析

NNK 投与と γ 線照射との複合影響によって特異的な変異のタイプが認められるかどうかを検討するため、*gpt* 変異体の塩基配列の解析を行った (Table 3). NNK 処理によって G:C $\rightarrow$ A:T の transition, G:C $\rightarrow$ T:A, A:T $\rightarrow$ T:A, A:T $\rightarrow$ C:G の transversion の変異が顕著に増加し、特に A:T $\rightarrow$ T:A の変異では 20 倍以上の増加を認めた。だが γ 線照射による NNK 誘発変異に対する影響は見られなかった。NNK 処理によって *gpt* MF は有意に増加したが、 γ 線による塩基置換変異への顕著な修飾効果は、塩基配列変化の特徴においても認められなかった。

Table 3. *gpt* mutation spectra in the lung of NNK-treated and γ -irradiated *gpt* delta mice.

Treatment	Saline	0 mGy/h			0.5 mGy/h			1.0 mGy/h			1.5 mGy/h		
		No.	MF ($\times 10^{-6}$)	%	No.	MF ($\times 10^{-6}$)	%	No.	MF ($\times 10^{-6}$)	%	No.	MF ($\times 10^{-6}$)	%
Base substitution													
Transition													
	G:C $\rightarrow$ A:T	15	(6)	1.81	42.9	12	(6)	1.76	37.5	5	(2)	0.61	29.4
	A:T $\rightarrow$ G:C	2		0.24	5.7	4		0.59	12.5	1		0.12	5.9
Transversion													
	G:C $\rightarrow$ T:A	1		0.12	2.9	5	(2)	0.73	15.6	1		0.12	5.9
	G:C $\rightarrow$ C:G	1		0.12	2.9	0		0.00	0.0	0		0.00	0.0
	A:T $\rightarrow$ T:A	1		0.12	2.9	1		0.15	3.1	1		0.12	5.9
	A:T $\rightarrow$ C:G	3		0.36	8.6	1		0.15	3.1	1		0.12	5.9
Deletion													
	-1 bp	8		0.97	22.9	6		0.88	18.8	7		0.85	41.2
	>2 bp	3	3			2				5			
Insertion													
	Others	1		0.12	2.9	0		0.00	0.0	0		0.00	0.0
No. of Mutations													
		35		4.23	100.0	32		4.69	100.0	17		2.06	100.0

Treatment	NNK	0 mGy/h			0.5 mGy/h			1.0 mGy/h			1.5 mGy/h		
		No.	MF ($\times 10^{-6}$)	%	No.	MF ($\times 10^{-6}$)	%	No.	MF ($\times 10^{-6}$)	%	No.	MF ($\times 10^{-6}$)	%
Base substitution													
Transition													
	G:C $\rightarrow$ A:T	24	(2)	5.11	35.8	45	(8)	8.02	38.8	32	(5)	5.85	38.6
	A:T $\rightarrow$ G:C	0		0.00	0.0	7		1.25	6.0	6		1.10	7.2
Transversion													
	G:C $\rightarrow$ T:A	9	(2)	1.92	13.4	10	(1)	1.78	8.6	7	(1)	1.28	8.4
	G:C $\rightarrow$ C:G	0		0.00	0.0	2		0.36	1.7	0		0.00	0.0
	A:T $\rightarrow$ T:A	13		2.77	19.4	26		4.64	22.4	17		3.11	20.5
	A:T $\rightarrow$ C:G	15		3.19	22.4	12		2.14	10.3	8		1.46	9.6
Deletion													
	-1 bp	5		1.06	7.5	12		2.14	10.3	9		1.65	10.8
	>2 bp	0	5			6				4			
Insertion													
	Others	1		0.21	1.5	0		0.00	0.0	4		0.73	4.8
No. of Mutations													
		67		14.26	100.0	116		20.68	100.0	83		15.18	100.0

2-4-2) NNK 投与および低線量率放射線照射を行ったマウスの肺における Spi^- 欠失変異頻度

2-4-2- i) Spi^- 欠失変異頻度

NNK 投与および低線量率放射線照射を行ったマウスの肺における Spi^- 欠失変異頻度の測定を行なった(Fig. 8). NNK 投与群および生理食塩水対照群の肺における Spi^- MF(単位はいずれも 10^{-6} , 6 匹の平均値 $\pm$ 標準偏差)は 5.15 ± 2.34 vs 4.11 ± 0.98 (0 mGy/h); 5.47 ± 1.98 vs 5.06 ± 3.50 (0.5 mGy/h); 5.36 ± 1.56 vs 4.09 ± 0.80 (1.0 mGy/h); 5.39 ± 2.56 vs 4.65 ± 1.78 (1.5 mGy/h)であり, NNK 処理および γ 線照射による Spi^- MF の有意な増加は認められなかった.

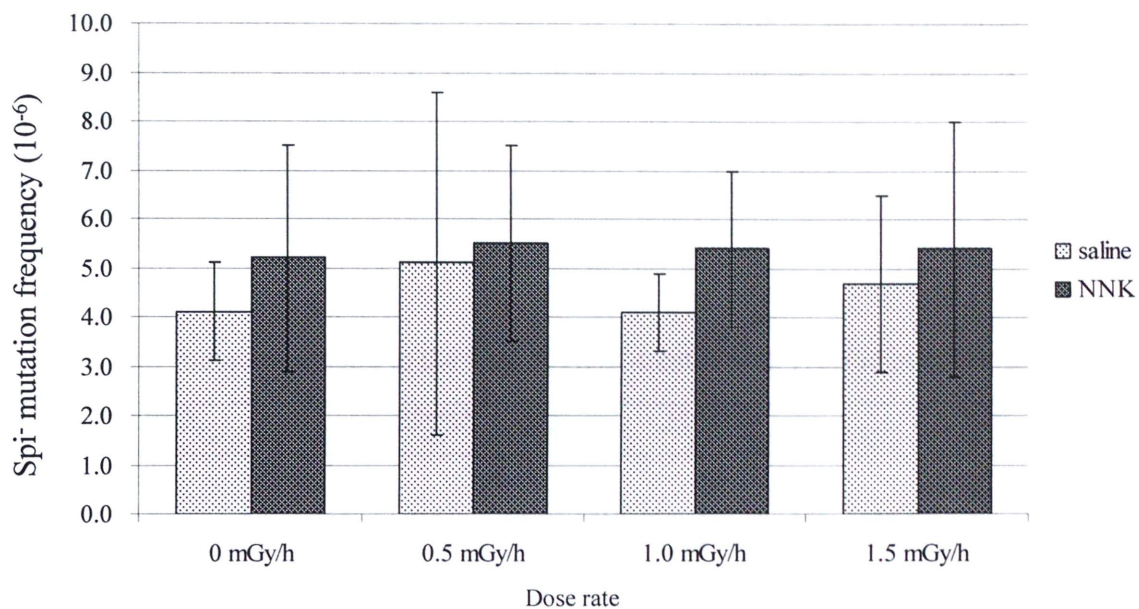


Fig. 8. Spi⁻ MFs in the lung of mice untreated or treated with NNK in the absence or the presence of γ -irradiation. Vertical bars show the standard deviations with mice as unit of comparison.

2-4-2- ii) Spi⁻欠失変異体の分子解析

NNK 処理と γ 線照射の複合効果を詳細に調べるため、得られた Spi⁻変異体から欠失変異の塩基配列解析を行った (Table 4). γ 線は二重鎖 DNA 切断を起こすことから、 γ 線照射群では大きな欠失変異体の増加が期待される。そこで 1 kb 以上の欠失に注目して NNK 投与群と対照群を比較した。その結果、生理食塩水対照群において、欠失サイズが 1kb 以上の変異体の頻度が、線量率に応じて増加していた (Fig. 9)。特に線量率 1.0 mGy/h (0.77 ± 0.49) と 1.5 mGy/h (0.82 ± 0.55) の変異頻度は非照射群の値 (0.25 ± 0.28) の約 3 倍になり、その差には統計的有意差が認められた ($P=0.04$, 単位はいずれも 10^{-6} , 5 匹の平均値 $\pm$ 標準偏差)。一方、NNK 投与群では 0.5 mGy/h (0.85 ± 0.66) と 1.0 mGy/h (0.78 ± 0.26) の変異頻度は非照射群の値 (0.29 ± 0.47) の約 3 倍になり 1.0 mGy/h 照射群では変異頻度の上昇には統計的有意差が認められたが ($P=0.04$), 1.5 mGy/h (0.35 ± 0.48) で

はその頻度は非照射群と近似した値を示した。生理食塩水対照群と NNK 投与群の変異頻度の差について t 検定を行うと、P 値はそれぞれ 0.44 (0 mGy/h) 0.32 (0.5 mGy/h), 0.48 (1.0 mGy/h), 0.09 (1.5 mGy/h)であった。

Table 4. Spi⁺ mutation spectra in the lung of NNK-treated and γ -irradiated *gpt* delta mice.

Treatment: saline	0 mGy/h			0.5 mGy/h			1.0 mGy/h			1.5 mGy/h		
	No.	MF (x 10 ⁻⁶)	%	No.	MF (x 10 ⁻⁶)	%	No.	MF (x 10 ⁻⁶)	%	No.	MF (x 10 ⁻⁶)	%
1 bp deletion												
simple												
Guanine	9	0.49	12.0	7	0.59	11.7	5	0.34	8.3	4	0.30	6.6
Adenine	4	0.22	5.33	0	0.00	0.0	2	0.14	3.3	1	0.08	1.6
in run												
Guanine	13	0.71	17.3	15	1.27	25.0	12	0.82	20.0	13	0.99	21.3
Adenine	31	1.70	41.3	19	1.60	31.7	22	1.50	36.7	25	1.91	41.0
with b.s.	0	0.00	0.0	0	0.00	0.0	0	0.00	0.0	0	0.00	0.0
> 2 bp deletion	15	0.82	20.0	17	1.43	28.3	17	1.16	28.3	13	0.99	21.3
2 bp ~ 1 kb	2	0.11	2.7	7	0.59	11.7	3	0.20	5.0	1	0.08	1.6
> 1 kb	5	0.27	6.7	7	0.59	11.7	11	0.75	18.3	10	0.76	16.4
complex	8	0.44	10.7	3	0.25	5.0	3	0.20	5.0	2	0.15	3.3
Insertion	3	0.16	4.0	2	0.17	3.3	2	0.14	2.0	5	0.38	8.2
No. of mutations	75	4.11	100.0	60	5.06	100.0	60	4.09	100.0	61	4.65	100.0

Treatment: NNK	0 mGy/h			0.5 mGy/h			1.0 mGy/h			1.5 mGy/h		
	No.	MF (x 10 ⁻⁶)	%	No.	MF (x 10 ⁻⁶)	%	No.	MF (x 10 ⁻⁶)	%	No.	MF (x 10 ⁻⁶)	%
1 bp deletion												
simple												
Guanine	5	0.61	11.9	4	0.46	8.3	4	0.50	9.3	4	0.48	8.9
Adenine	3	0.37	7.1	0	0.00	0.0	4	0.50	9.3	1	0.12	2.2
in run												
Guanine	9	1.10	21.4	19	2.17	39.6	9	1.12	20.9	14	1.68	31.1
Adenine	12	1.47	28.6	10	1.14	20.8	9	1.12	20.9	15	1.80	33.3
with b.s.	0	0.00	0.0	0	0.00	0.0	2	0.25	4.7	0	0.00	0.0
> 2 bp deletion	12	1.47	28.6	10	1.14	20.8	11	1.37	25.6	11	1.32	24.4
2 bp ~ 1 kb	6	0.74	14.3	2	0.23	4.2	3	0.37	7.0	7	0.84	15.6
> 1 kb	2	0.25	4.8	7	0.80	14.6	7	0.87	16.3	2	0.24	4.4
complex	4	0.49	9.5	1	0.11	2.1	1	0.12	2.3	2	0.24	4.4
Insertion	1	0.12	2.4	5	0.57	10.4	4	0.50	9.3	0	0.00	0.0
No. of mutations	42	5.15	100.0	48	5.47	100.0	43	5.36	100.0	45	5.39	100.0

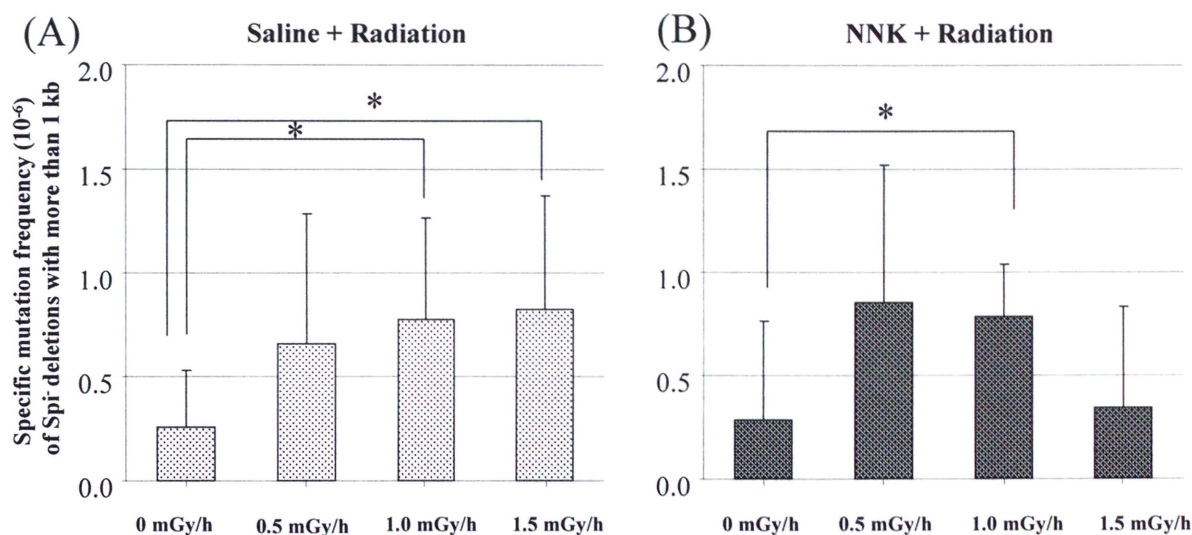


Fig. 9. Specific MF of large deletions with the size of more than 1 kb in the lung of unirradiated or γ -irradiated mice. The mice were not treated (A) or treated with NNK (B). An asterisk (*) denotes $P < 0.05$ ($n=5$) in a Student's t -test of MF of γ -irradiated versus the corresponding unirradiated mice. Vertical bars show the standard deviations with mice as the unit of comparison.

2-4-2-iii) 欠失部位の配列

放射線によって誘発されたと考えられる 1 kb 以上の欠失変異について、欠失領域と結合端の塩基配列を図に示した (Fig. 10). これら全 51 個の欠失変異体のサイズは 1035~9265 bp であり、約半分の変異体では欠失部位の両端に 1~11 bp の短い相同配列を有していた. 一方、残り半分の変異体ではこの短い相同配列が見られず、これら 2 種類のタイプの欠失変異体が認められた. また、2 つの欠失変異体に 1 若しくは 4 bp の挿入配列を認めた. 1 kb 以上の大きさをもつ 51 個の欠失変異体に特徴的な欠失部位 (ホットスポット) は認められず、NNK と放射線の複合曝露により誘導された欠失変異体および放射線のみで誘導された欠失変異体の間に違いは認められなかった.

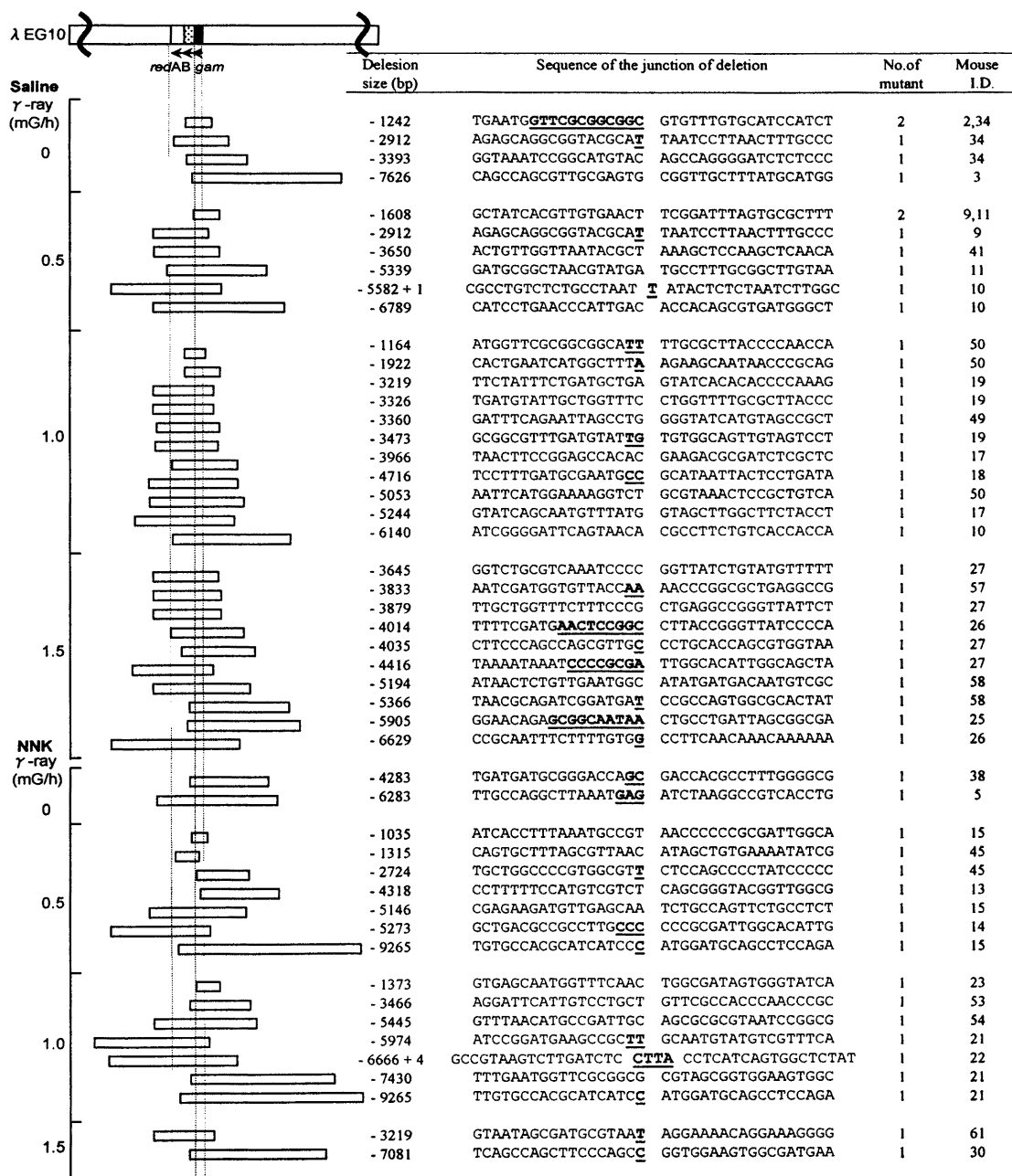


Fig. 10. Molecular nature of large deletions recovered from the lung of *gpt* delta mice untreated or treated with NNK in the absence or the presence of γ -irradiation. Horizontal bars represent the deleted regions of mutants. Most of the mutants lack the entire *gam* gene and part of the *redAB* genes, but some lack the *gam* gene and the upstream region. The *gam* and *redAB* genes make an operon and the transcription starts from the upstream of the *gam* gene. Short homologous sequences in the junctions of the mutants are underlined. Underlined sequences, i.e., T or CTTA, in the middle of two sequences are inserted sequences in the junctions.

第 5 節 考察

ヒトは内因性や外因性のさまざまな変異原に複合的に暴露されている。よって、低線量・低線量率放射線の生物学的な影響については、放射線単独の影響ではなく、化学物質との複合影響によって評価されるべきである^[26]。また、放射線やタバコの煙は代表的な遺伝毒性因子として知られているが、これらに複合的に曝露されることによるヒトに対する影響はほとんどわかっていない。例えば中国広東省の陽江地域には自然放射線が他の地域より 3-5 倍高い地域があり、自然放射線の高い地域でタバコを吸う習慣のあるヒトでは、その他の自然放射線量が普通の地域でタバコを吸うヒトに比べ、染色体異常の割合が低かったという報告がある^[55]。一方、高レベルでのラドンとプルトニウムに暴露されている鉱山労働者を対象とした疫学研究では、これらの放射線とタバコとの相互作用により肺腫瘍が誘導されたとの報告もある^[56;57]。Sakai らは^[58]、ICR マウスに 0.30 mGy/h, 0.95 mGy/h, 2.6 mGy/h 各々の線量で 35 日間 γ 線を照射した後、MC (20-methylcholanthrene) を腹腔内投与した。MC 投与後 100, 150, 200, 216 日後に腫瘍の数を調べた結果 0.95 mGy/h 照射した群で他の群より腫瘍の数が減ったと報告している。従って、化学物質による遺伝毒性や発がん性と放射線との複合作用については、詳細な分子レベルの解析に基づいて基本的なメカニズムを明らかにすることが重要である。本研究では、突然変異検出のためのレポーター遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを用い、NNK 誘発突然変異に対する低線量率放射線 (γ 線) の影響を検討した。

低線量率放射線と化学物質との複合影響について検討するため、 γ 線照射下において *gpt delta* マウスにタバコ特異的ニトロソアミン NNK を

投与した。γ線の線量率は0.5, 1.0, 1.5 mGy/hで31日間照射し、総線量は0.34, 0.68そして1.02 Gyであった。本研究で用いた照射線量率は電力中央研究所のSakaiらの論文^[58]を基に設定した。NNK投与によって*gpt* MFは有意に増加した (Fig. 7)。しかしながら、その変異頻度にはγ線照射による複合影響は認められなかった。さらに、得られた変異体のスペクトラム解析を行なった。NNKはマウスの肺にG:C→A:T, G:C→T:A, A:T→T:A, A:T→C:G変異を顕著に誘発した (Table 3)。しかしながら、NNKによる塩基置換変異の誘発は、低線量率のγ線照射によっては修飾されなかった。一方で、γ線照射は1 kb以上の大きな欠失変異をマウスの肺に誘発した。さらに1.5 mGy/hの線量率で誘発される欠失変異は、NNK処理により抑制される結果を得た (Fig. 9)。この結果から、NNK処理はγ線照射により生ずる欠失変異に対して何らかの防御機構を誘導している可能性が示唆された。これらの欠失変異体は、接合末端に短い相同配列を持つものと持たないものがあり、Fig. 11.に示す2つのタイプの特徴的な配列を有していた。これら2種類のタイプは、X線、γ線、重粒子線の高線量照射などにより生じた欠失変異体の特徴と共通しており^[59]、二本鎖DNAが切断された後、末端部分が削られ、その後、non-homologous end-joining (非相同末端結合) によって結合したことにより生じたものと考えられる^[60]。

文献によると、先に細胞に低線量放射線を照射した後、細胞に高線量の放射線を照射すると、放射線によって生じる細胞へのダメージに抑制効果を示すことから低線量放射線による適応応答が認められたとの報告がある^[61;62]。しかしながら、これらの低線量放射線による適応応答についての明確なメカニズムは未だ明らかにされていない。

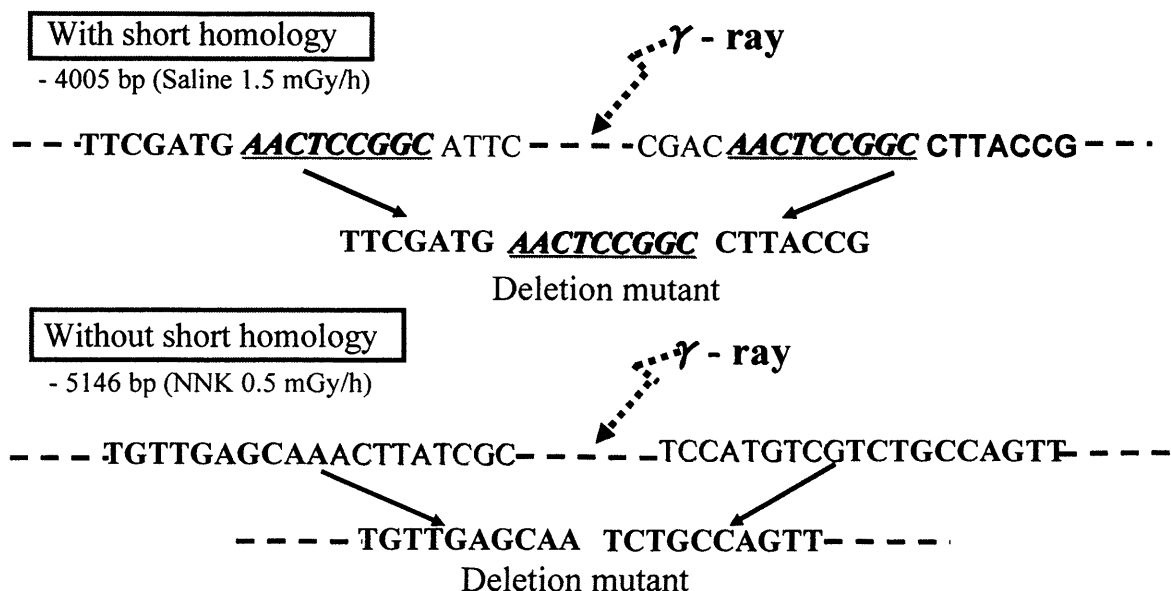


Fig. 11. Large deletions are probably formed by non-homologous end-joining (NHEJ) of double-strand breaks in DNA (DSB)

Tucker らは^[63], マウスに低線量率放射線を照射し, 小腸幹細胞の *Dlb-1* 突然変異頻度を検索した. 彼らの報告によると, マウスに 0.65, 1.85, 5.5 cGy/day を 21, 42, 63 日間 γ 線照射すると, *Dlb-1* MF は, γ 線の総放射線量に依存して増加したが, 総放射線量が最も高い (5.5cGy/day $\times$ 42 または, 63day) ところで減少した. 同線量の γ 線を急性放射線照射した場合は γ 線の線量に依存して *Dlb-1* MF は増加した. 本実験では, γ 線単独照射群において, 1kb 以上の大きな欠失変異頻度が最も高い線量率 1.5 mGy/h (線量は 1.02 Gy) の群で飽和する傾向がみられた(Fig. 9A). このことから, 若干ではあるが, 照射線量率 1.5 mGy/h の群で適応応答が検出された可能性が示唆される. 一方で, NNK と γ 線の複合曝露においては, やはり 1.5 mGy/h の群で, 1kb 以上の欠失変異の誘発が抑制される傾向が認められた. NNK 処理と線量率 1.5 mGy/h (総放射線量 1.02Gy) が組み合わさった条件下では, p53 依存的アポトーシスを引き起こし,

DNA に損傷をもつ細胞を除去したのではないかと推測される^[64]。DNA 損傷が少ないレベルにおいては、p53 依存的 DNA 修復能が促進されるが、DNA 損傷が激しいとアポトーシスが誘導される^[65]。NNK 処理と γ 線照射による DNA 損傷は、本実験で用いた最も高い放射線量がアポトーシスを誘導する引き金となるのに十分なレベルであったと考えられる。Zhou ら^[66]は、NNK と α 線との複合効果において A_L 細胞を用いて実験を行なっている。彼らは、染色体の欠失変異頻度は、NNK が低い 25 ($\mu\text{g/ml}$)濃度で最も高く、NNK が高い 100-400 (g/ml) 濃度では欠失変異に対して抑制効果を示したと報告した。また、犬を用いた *in vivo* の実験では、高濃度のタバコ煙の暴露は、ラドン照射によって起こる肺がんを減少させたとの報告もある^[67]。しかしながら、ラットを用いた実験では、NNK とラドンによる相乗効果がみられている^[68]。タバコと放射線との複合暴露による人体への影響について、明確な相互作用モデルは確立されていない^[56;57]。それ故に、今後の課題としては、タバコと放射線との相互作用についての遺伝毒性機構をより明確にすることが必要であると考えられる。

タバコ特異的ニトロサミンである NNK の代謝活性化は、主として CYP により触媒されるニトロソ基に隣接する α 位の炭素原子の水酸化によると考えられる^[69]。このステップにより生じた α -水酸化体は化学的に不安定で、アルデヒドを放出して脱アルキル化が起こる^[70]。NNK によって誘発された肺がんマウスの K-*ras* 遺伝子上に、DNA 付加体 O⁶-メチルグアニンおよびピリドキシルオキシソブチル化付加体が原因と考えられる G:C $\rightarrow$ A:T および G:C $\rightarrow$ T:A 変異がそれぞれ検出されている^[22;71]。本実験においても、NNK 処理により G:C $\rightarrow$ A:T と G:C $\rightarrow$ T:A は有意に増加した (Table3)。Tiano らは、NNK の遺伝毒性について、ヒト CYP2A6 を

発現する AS52 ハムスター細胞を用い、突然変異のレポーター遺伝子である *gpt* 遺伝子に誘発した突然変異体の解析を行なった^[72]. この細胞株は *O*⁶-メチルグアニントランスフェラーゼを欠いていることから、80%の変異体が G:C→A:T のトランジションであった. G:C→A:T トランジションのホットスポットは GGT という配列の 2 番目の G に認められた^[73]. 我々は NNK 処理により誘発された G:C→A:T の変異 155 コ中に、18 箇所 (*gpt* 遺伝子スタートコドンら、27, 64, 86, 87, 92, 107, 110, 113, 115, 116, 128, 274, 281, 409, 417, 418 番目) のホットスポットを認めた. Tiano ら^[72]の報告で、*gpt* 遺伝子のヌクレオチド 23, 116, 128, 281 番目に 4 つのホットスポットを認めている. 本研究で得られた 116, 128, 281 番目と同じ箇所にホットスポットを認めている. また、我々はそれ以外のホットスポットを認めた. GGA という配列の 2 番目の G に認められた *gpt* 遺伝子のヌクレオチド 87, 274, 402, 418 番目. GGG という配列の 2 番目の G に認められた *gpt* 遺伝子のヌクレオチド 27, 64, 92, 417 番目. GGC という配列の 2 番目の G に認められた *gpt* 遺伝子のヌクレオチド 113 番目である. このように、NNK 処理により誘発された G:C→A:T の変異は、GGX の配列で X が A,T,C,G のいずれかであり、2 番目の G に変異を生ずる特徴を有していた. 本実験において G:C→A:T と G:C→T:A の変異に加えて、NNK 処理マウスから A:T→T:A と A:T→C:G の変異頻度の増加を示した (Table 2). *lacZ* トランスジェニックマウスを用いて NNK の遺伝毒性を検索した Hashimoto ら^[74]の報告によると、A:T→T:A と A:T→C:G の変異頻度の大幅な増加を示した. それ故、NNK は、*O*⁴-メチルまたは、*O*²-メチルチミンなどにより A:T→T:A と A:T→C:G 変異をそれぞれ誘導したのかもしれない^[27]. γ 線単独照射においては、線量率 1.0 mGy/h と 1.5 mGy/h の照射群で 1kb 以上の欠失変異頻度が明らかに増加した (Fig.

3A). これら 2 照射群の総線量はそれぞれ 0.62 Gy および 1.02 Gy であり, これはトランスジェニックマウスを用いた突然変異検出法によって陽性となる下限の線量であるかもしれない. 一方, NNK 処理によってはこうした大きな欠失変異の増加は認められなかった. 従って NNK は *in vivo* において主に塩基置換変異を誘発し, 欠失変異は誘発しないことが示唆された. また, Zhou ら^[66;66]は, ヒトの染色体を組み込んだハムスター培養細胞 (A_L 細胞)を用いた実験で, NNK 処理により誘発された突然変異体の約 80%が大きな欠失変異であったと報告している. 従って, *in vitro* では NNK により塩基置換変異と欠失変異の両方が誘導される可能性があるが, *in vivo* では欠失変異を p53 依存的なメカニズムにより排除したのではないかと推測する. ちなみに上述したようなハムスター培養細胞系では p53 に変異が入っているため^[75;76], こうした *in vitro* 条件では本来 p53 によって排除されるべき欠失変異が (p53 不活化のせいに残ってしまうために) 検出されるのではないかと考察する.

喫煙と放射線の複合効果を調査する目的で, 低線量率放射線を照射しているマウスに NNK を処理し誘発された変異体を詳細に解析した. 低線量率 γ 線照射は, 肺における 1kb 以上の欠失変異頻度を有意に上昇させた. 一方, NNK 処理群では線量効果曲線は釣鐘型となり, 1.5 mGy/h 照射群における 1kb 以上の大きさの欠失変異頻度は非照射群と近似した値を示し, NNK 処理が欠失変異の誘発を抑制する可能性を示した. NNK 処理に生ずるアルキル化損傷塩基を認識するミスマッチ修復蛋白質やアポトーシスに関与する p53 が抑制機構に関与する可能性が考えられた.

第3章 *gpt delta* トランスジェニックマウスの肺における NNK 誘発突然変異に対するノビレチンの化学予防効果の解析

第1節 緒言

ミカンをはじめとするカンキツ類にはビタミン、ミネラルさらには食物繊維が豊富に含まれており、すぐれた補助食品である。近年、カンキツ類にはがん抑制効果をはじめとする多様な健康増進効果を有する物質が豊富に含有されていることが明らかにされている。今回注目したポリメトキシフラボノイドの一種であるノビレチン (Fig. 12) は、カンキツ類に特徴的な成分でありタンカン、ポンカン特にシークワーサーの果皮に豊富に含まれ、抗がん性、抗ウィルス性、抗腫瘍性、抗炎症性などの生物活性を示すことが報告されている^[31;77-80]。喫煙由来の肺がんに対するノビレチンの化学予防効果を評価するため、タバコ特異的ニトロソアミンである NNK の遺伝毒性に対するノビレチンの抑制効果について *gpt delta* トランスジェニックマウスを用いて検討した。

NNK はマウス、ラットおよびハムスターに共通して末梢性の肺線がんを誘発する唯一のタバコ関連 *N*-ニトロソアミンである。NNK はチトクローム P-450 (CYP) により代謝的に活性化され DNA をアルキル化し突然変異を誘発する。CYP には多くのサブタイプが存在し、マウス CYP2A4 および CYP2A5, ラット CYP2A3 およびハムスター CYP2A16 はいずれも肺において発現していることが報告されている。このことから、肺に発現しているこれらの CYP2A が NNK を効率よく代謝活性化して NNK による肺がんの誘発に関与していると考えられる。そこで、ノビレチンによる NNK の変異抑制機構、特に CYP に対する影響を明らかにするため、細菌を用いた復帰突然変異試験を行なった。

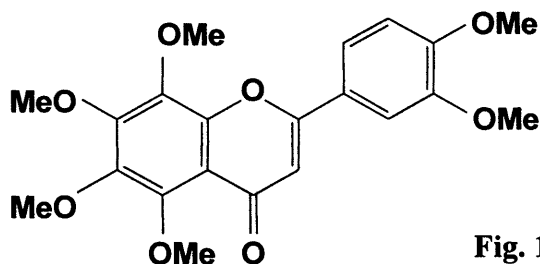


Fig. 12. Chemical structure of nobiletin

復帰突然変異試験（Ames 試験）は，サルモネラ属菌の一種であるネズミチフス菌 LT-2 株由来のヒスチジン要求性変異株に変異原物質を作用させ，ヒスチジン非要求性に戻る His⁺復帰変異（reverse mutation）を検出する試験で，米国の Bruce N. Ames 博士によって開発された^[48]．ネズミチフス菌において，ヒスチジンはグルコースから 8 種類の酵素による 10 段階の反応を経て合成される．試験菌株は，それぞれ異なる *his* 遺伝子欠損を持ち，特定のタイプの復帰変異に対して感受性を示す．この他に試験菌株には 3 つの工夫が加えられ，変異原に対する感受性が高められている．第 1 は，細胞壁のリポ多糖の一部が欠如している *rfa* 変異で，これにより化学物質の膜透過性が増大し，多環芳香族炭化水素のように膜を透過しにくい疎水性の物質の変異原性も検出できるように工夫されている．第 2 は *uvrB* 変異で，DNA の除去修復能を欠失させている点である．このため DNA 上の損傷は除去されず，何らかの DNA ポリメラーゼにより乗り越えて複製される過程で突然変異として固定される確立が高くなっている．また環境化学物質の中には，それ自身は DNA との反応性が低く，哺乳類の体内において代謝され，初めて DNA と結合するものが多い．バクテリアはこの代謝機能を持たないため変異原性を検出できない．そこで第 3 の工夫として，哺乳動物（ラット）のもつ薬物代謝酵素によって産生される被験物質の代謝物の変異原性を試験する

S9 mix [S9 (ラット肝ホモジネートの 9,000×g 上清) + 補酵素] 添加条件を合わせて行う。これにより、DNA と直接は反応性を示さない発がん物質を代謝的に活性化することができるようになり、さまざまな環境因子の変異を検出できるようになっている。

第 2 節 実験材料・試薬および使用機器

3-2-1) 使用試薬および使用機器

前章までに記載した使用試薬および使用機器については記載を省略した。マウスの粉末飼料 CRF-1 は、オリエンタル酵母より購入した。ノビレチン (>99.9% 純度) は金沢医科大学の田中卓二教授より御供与いただいた。Ames 試験で用いた β -NADH (β -nicotinamide adenine dinucleotide, reduced from), β -NADPH (β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced from), G-6-P (glucose-6-phosphate) はオリエンタル酵母より、フェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボン誘導ラット肝ホモジネート 9000 $\times$ g 上清 (S9) はキッコーマンより購入した。B[a]P, MNNG (*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine), 8-methoxypsoralen は Sigma-Aldrich より購入した。YG7108 株と YG5161 株は国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部二室室長・能美健彦博士より御供与いただいた。Glycerol, NaNH_4 , HPO_4 , Citric Acid Monohydrate, L-Histidine Monohydrochloride, (+)-Biotin は和光純薬工業より購入した。

3-2-2) 試薬の調製

前章までに記載した試薬の調製については記載を省略した。

Ames 試験 (ブレインキュベーション法)

20 $\times$ Medium E : 1L

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 g, Citric Acid Monohydrate 40 g, K_2HPO_4 200 g, $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$ 70 g, 高圧蒸気滅菌 (121 $^\circ\text{C}$, 20 分間).

40% glucose : 200 mL

Glucose 80 g, 高圧蒸気滅菌 (121 $^\circ\text{C}$, 20 分間).

0.5 mM His-Bio 溶液 : 300 mL

L-Histidine Monohydrochloride, Monohydrate 26.2 mg, Biotin 30.5 mg
(1N-NaOH 0.3 ml で溶かす), 高圧蒸気滅菌 (121℃, 20 分間).

Nutrient Broth : 100 mL

Nutrient Broth 0.8 g, NaCl 0.5 g, 高圧蒸気滅菌 (121℃, 20 分間).

0.2 M PO₄ buffer (pH7.4)

NaHPO₄·H₂O 7.8 g/250mL ①, Na₂HPO₄ 28.4 g/1000mL ②, ①と②を 1:4
の割合で混合し高圧蒸気滅菌 (121℃, 20 分間).

S9 (9,000×g supernatant fraction of homogenates) mix : 10 mL

G-6-P 17.0 mg, NADPH 36.2 mg, NADH 30.5 mg, 0.2 M PO₄ buffer 5.0 mL,
1 M KCl 330 μL, 1 M MgCl₂ 80 μL, Fill Up (D.W.) 9.0 mL, 濾過滅菌後,
Homogenate 1.0 mL を加えた.

Vogel-Bonner 最少寒天培地 : 1L

Bacto™ Agar 15 g, NaC 5 g, 高圧蒸気滅菌 (121℃, 20 分間)後,
20×Medium E 50 mL, 40% グルコース 5 mL を加えた.

軟寒天培地 : 100 mL

Bacto™ Agar 0.6 g, NaC 0.6 g, 高圧蒸気滅菌 (121℃, 20 分間)後, 0.5
mM His-Bio 溶液を 10 ml 加えた.

第3節 実験方法

3-3-1) 実験の概要

実験動物は *gpt delta* トランスジェニックマウスを用いた。飼育管理は、プラスチックケージにて飼育し、室温 23±2℃、12 時間の明暗サイクルで食餌 (CRF-1) と水は自由摂取させた。*gpt delta* マウス(雌 4 匹、雄 5 匹)にノビレチンを 100 ppm あるいは 500ppm, 7 日間混餌投与した後, NNK (2 mg/mouse/day, i.p.) を 4 日間投与し, ノビレチンの投与を継続して 38 日目に屠殺して肺における変異頻度を測定した(Fig. 13)。飼育終了後, マウスから臓器を採取し, 液体窒素で凍結して-80℃にて保存した。各群 5 匹のマウスを用いて, 肺における *gpt* 突然変異体頻度を測定した。細菌を用いる突然変異試験は YG7108 株と YG5161 株を用い, NNK, B[a]P, MNNG に対するノビレチンの変異抑制作用を検討した。

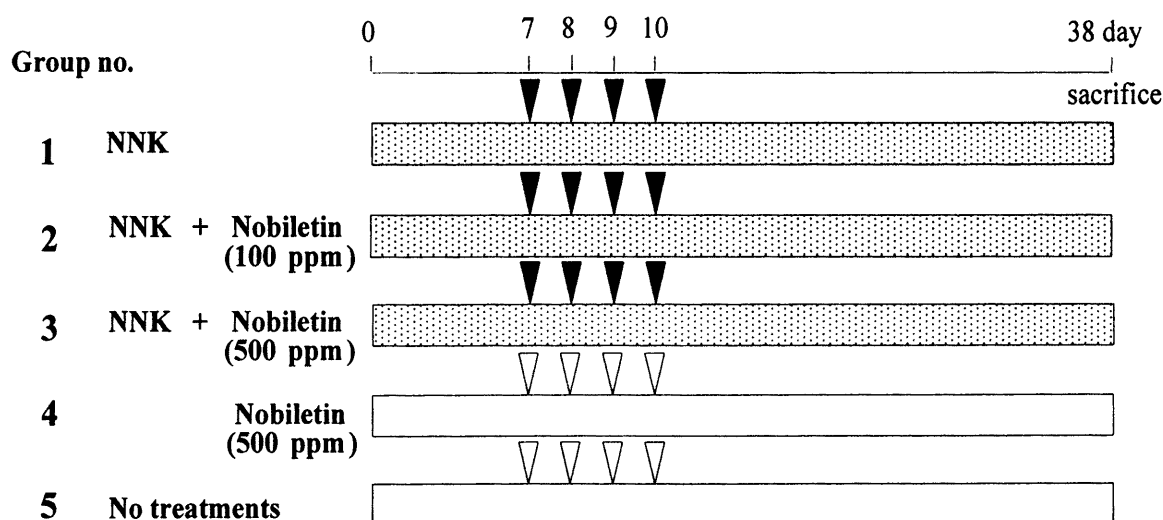


Fig. 13. An experimental design to examine chemopreventive effects of nobiletin against genotoxicity of NNK in the lung of *gpt delta* mice.

3-3-2) ゲノム DNA 抽出法

ゲノム DNA 抽出法は第 2 章 3 節 2-3-3 に準じた。

3-3-3) *in vitro* パッケージング

in vitro パッケージングは第 2 章 3 節 2-3-4 に準じた。

3-3-4) 6-TG セレクション

6-TG セレクションは第 2 章 3 節 2-3-5 に準じた。

3-3-4- i) 菌液の調製

菌液の調製は第 2 章 3 節 2-3-5- i に準じた。

3-3-4- ii) プレーットの作製

プレーットの作製は第 2 章 3 節 2-3-5- ii に準じた。

3-3-4- iii) *gpt* 変異体の検出

gpt 変異体の検出は第 2 章 3 節 2-3-5- iii に準じた。

3-3-4- iv) *gpt* MF の算出

gpt MF の算出は第 2 章 3 節 2-3-5- iv に準じた。

3-3-5) Ames 試験(プレインキュベーション法)

3-3-5- i) 菌株

使用した菌株は Table.5 に示した.

Table 5. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains and plasmids

Strain	Description	Source
Strain		
TA1535	<i>hisG46, gal, Δ (chl, uvrB, bio), rfa</i>	Maron and Ames ^[48]
TA1538	<i>hisD3052, gal, Δ (chl, uvrB, bio), rfa</i>	Maron and Ames ^[48]
YG7108	As TA1535 but Δada_{ST} and Δogt_{ST} , Km ^r and Cm ^r	Yamada et al. ^[81;82]
YG5161	As TA1538 but harbors plasmid pYG768	Matsui et al. ^[83]
Plasmids		
pYG768	Derivative of pWSK29 with the <i>E. coli dinB</i> gene	Kim et al. ^[84]

Km^r, resistant to Kanamycin; Cm^r, resistant to chloramphenicol.

3-3-5- ii) 菌液の調製

-80 °Cで凍結保存しておいた YG7108 株, YG5161 株を, 薬剤を加えた NB 3 ml に 30 μ l (1/100 vol.)植菌し, 37 °Cで 16 時間大試験管用バイオローターにて回転培養し、培養液を作製した。

3-3-5- iii) Ames 試験菌株 YG7108 株, YG5161 株を用いた変異原性試験

ノビレチンまたは 8-methoxysoralen を DMSO (または H₂O または EtOH) に溶かし小試験管に 50 μ L 入れる. そこに S9mix 50 mL を加え vortex ミキサーで混ぜ, 5 分間氷上にて冷却した. DMSO に溶かした NNK,

B[a]P または MNNG を 50 μ L を加え混ぜた後, overnight culture を 0.1 mL 加え vortex ミキサーで混合し 37℃の湯浴で 20 分間, 40~50 rpm の速度で振とう培養した. 50℃に温めた Soft agar 2 mL を駒込ピペットで加え vortex ミキサーでよく攪拌し, Vogel-Bonner 最少寒天培地に重層し, 37℃, 48 時間培養した. 培養後, His⁺復帰変異コロニーを数えた. 代謝活性化なしに遺伝毒性を示す MNNG の変異原性試験においては, S9mix の代わりに 1/15 M Na-K buffer (pH 7.4)を用いた.

第4節 結果

3-4-1 NNK 処理とノビレチン投与によるマウス肺の *gpt* 突然変異頻度

3-4-1-i *gpt* 突然変異頻度

NNK 誘発突然変異に対するノビレチンの化学予防効果を検索するため、*gpt* delta マウスの肺を用いて *gpt* 突然変異頻度の測定を行なった (Table 6-7, Fig.10-11,). まず、雌マウス肺の *gpt* MF (単位はいずれも 10^{-6} , 4 匹の平均値 $\pm$ 標準偏差) は、NNK 単独投与群 (Group 1) で 58.1 ± 16.7 , NNK+ノビレチン 100 ppm 処理群 (Group 2) で 38.6 ± 6.6 , NNK+ノビレチン 500 ppm 処理群 (Group 3) で 39.3 ± 10.4 , ノビレチン 500 ppm 処理群 (Group 4) で 4.5 ± 1.9 , 無処理群 (Group 5) で 3.0 ± 1.3 であった. 一方、雄マウス肺の *gpt* MF (単位はいずれも 10^{-6} , 5 匹の平均値 $\pm$ 標準偏差) は、NNK 単独処理群 (Group 1) で 26.5 ± 11.8 , NNK+ノビレチン 100 ppm 処理群 (Group 2) で 19.9 ± 6.1 , NNK+ノビレチン 500 ppm 処理群 (Group 3) で 14.4 ± 5.4 , ノビレチン 500 ppm 処理群 (Group 4) で 3.5 ± 1.0 , 無処理群 (Group 5) で 3.1 ± 2.0 であった. NNK 投与によりマウス肺の *gpt* 突然変異頻度は雌で 19 倍、雄で 9 倍に増加し、雌が雄よりも 2 倍高い感受性を示した. NNK を投与した雌マウス肺の変異頻度はノビレチン 100 ppm 処理群で有意 ($P=0.04$) に低下し、500 ppm でも同程度に低下した (Fig. 14). 雄での変異頻度は雌の約半分であったがノビレチン 500 ppm 処理群で有意 ($P=0.04$) に減少した.

female

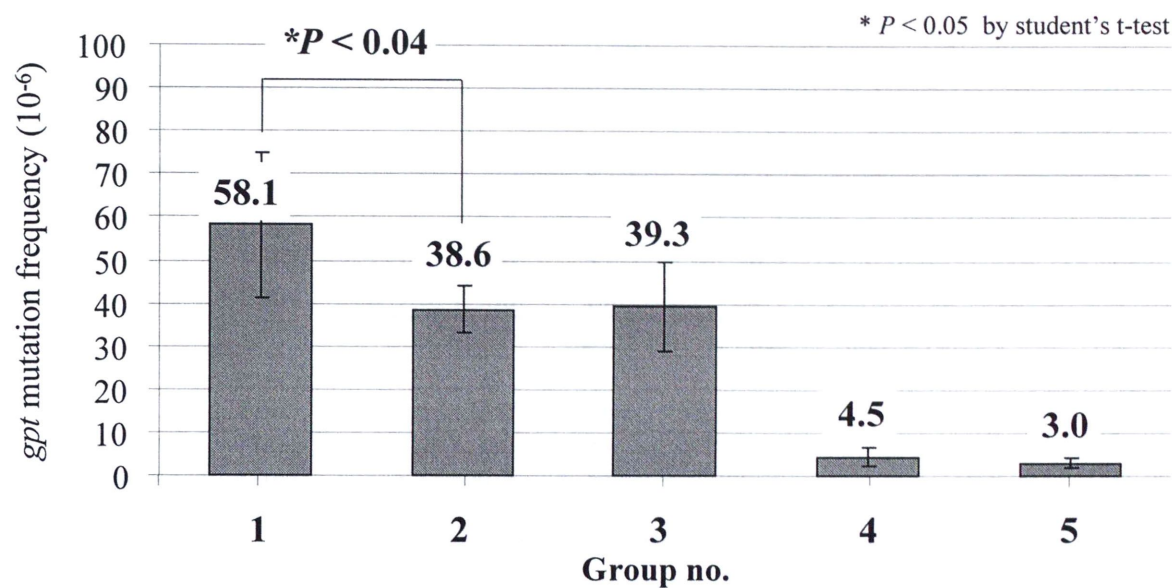


Fig. 14. Suppressive effects of nobiletin against genotoxicity of NNK in the lung of female *gpt* delta mice

male

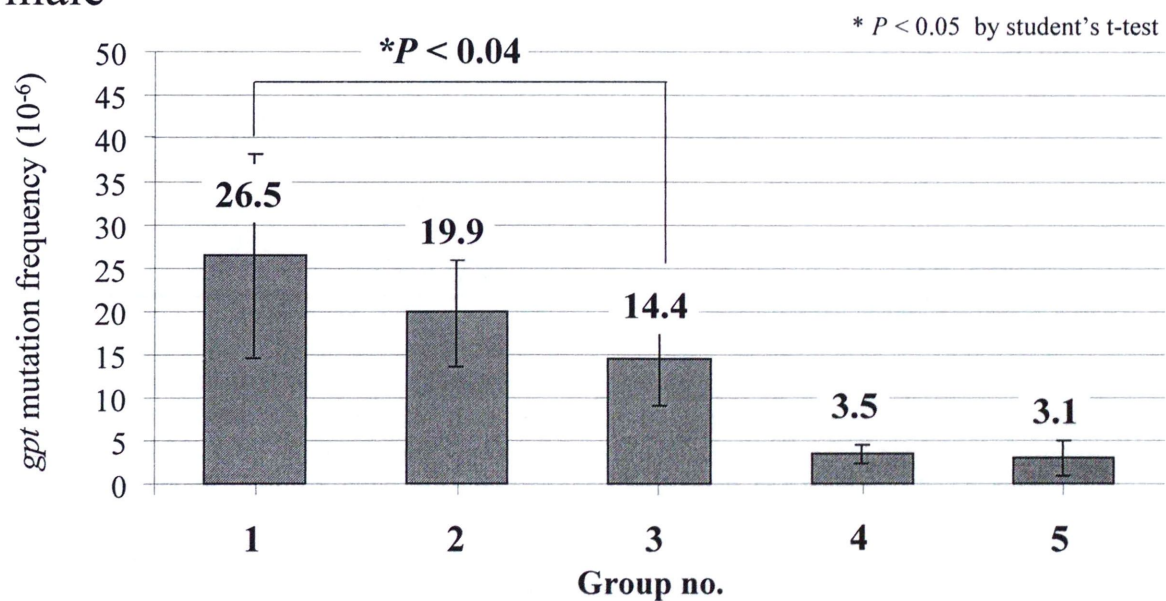


Fig. 15. Suppressive effects of nobiletin against genotoxicity of NNK in the lung of male *gpt* delta mice

Table 6. Suppressive effects of nobiletin against genotoxicity of NNK in the lung of female *gpt* delta mice

Group number*	Animal I.D.	Total colonies	No. of mutants	<i>gpt</i> MF ($\times 10^{-6}$)	Average $\pm$ S.D. [†]	<i>P</i> -value [‡]
1 NNK alone	F001	898,500	68	75.7	58.1 $\pm$ 16.7	
	F002	1,017,000	57	56.1		
	F003	1,464,000	53	36.2		
	F004	1,054,500	68	64.5		
		4,434,000	246	55.5		
2 NNK + Nobiletin (100 ppm)	F005	1,134,000	36	31.8	38.6 $\pm$ 6.6	0.036 [§]
	F006	1,353,000	48	35.5		
	F007	1,152,000	54	46.9		
	F008	916,500	37	40.4		
		4,555,500	175	38.4		
3 NNK + Nobiletin (500 ppm)	F009	1,369,500	33	24.1	39.3 $\pm$ 10.4	0.052
	F010	798,000	36	45.1		
	F011	1,606,500	66	41.1		
	F012	1,027,500	48	46.7		
		4,801,500	183	38.1		
4 Nobiletin (500 ppm) alone	F013	1,059,000	3	2.8	4.5 $\pm$ 1.9	<0.001
	F014	1,377,000	4	2.9		
	F015	1,092,000	6	5.5		
	F016	900,000	6	6.7		
		4,428,000	19	4.3		
5 No treatments treatments	F018	2,856,000	6	2.1	3.0 $\pm$ 1.3	<0.001
	F019	1,560,000	4	2.6		
	F020	1,809,000	9	5.0		
	F021	2,013,000	5	2.5		
		8,238,000	24	2.9		

* Group 1, mice treated with NNK (2 mg/mouse/day $\times$ 4 days) alone; Group 2, mice treated with NNK plus nobiletin at a dose of 100 ppm in diet; Group 3, mice treated with NNK plus nobiletin at a dose of 500 ppm in diet; Group 4, mice fed nobiletin at a dose of 500 ppm in diet without NNK treatments; Group 5, mice without treatments with NNK or nobiletin. The Group No. corresponds with group No. in Fig. 9.

[†] Average $\pm$ standard deviation of *gpt* MF of four mice.

[‡] Differences between *gpt* MF of each group and that of Group 1 were tested for statistical significance using a Student's *t*-test.

[§] Statistically significant ($P < 0.05$) against Group 1. The values in Groups 4 and 5 are also statistically significant. But the mice in Groups 4 and 5 are not treated with NNK so that the values are not marked with §.

Table 7. Suppressive effects of nobiletin against genotoxicity of NNK in the lung of male *gpt* delta mice

Group number*	Animal I.D.	Total colonies	No. of mutants	<i>gpt</i> MF ($\times 10^{-6}$)	Average $\pm$ S.D. [†]	<i>P</i> -value [‡]
1 NNK alone	M001	960,000	21	21.9	26.5 $\pm$ 11.8	
	M002	987,000	32	32.4		
	M003	1,320,000	57	43.2		
	M004	876,000	20	22.8		
	M005	1,892,000	23	12.2		
		6,035,000	153	25.4		
2 NNK + Nobiletin (100 ppm)	M007	1,156,000	16	13.8	19.9 $\pm$ 6.1	0.147
	M008	991,000	19	19.2		
	M009	828,000	20	24.2		
	M010	828,000	23	27.8		
	M011	840,000	12	14.3		
		4,643,000	90	19.4		
3 NNK + Nobiletin (500 ppm)	M013	700,000	16	22.9	14.4 $\pm$ 5.4	0.035
	M014	1,404,000	11	7.8		
	M015	1,052,000	14	13.3		
	M016	760,000	10	13.2		
	M017	1,000,000	15	15.0		
		4,916,000	66	13.4		
4 Nobiletin (500 ppm) alone	M019	1,028,000	4	3.9	3.5 $\pm$ 1.0	0.003
	M020 [§]	388,000	4	10.3		
	M021	1,640,000	6	3.7		
	M022	708,000	3	4.2		
	M023	972,000	2	2.1		
		4,348,000	15	3.5		
5 No treatments	M024 [§]	705,000	14	19.9	3.1 $\pm$ 2.0	0.003
	M025	1,410,000	8	5.7		
	M026	1,410,000	5	3.6		
	M027	1,928,000	3	1.6		
	M028	2,032,000	3	1.5		
		6,780,000	19	2.8		

* Group 1, mice treated with NNK (2 mg/mouse/day x 4 days) alone; Group 2, mice treated with NNK plus nobiletin at a dose of 100 ppm in diet; Group 3, mice treated with NNK plus nobiletin at a dose of 500 ppm in diet; Group 4, mice fed nobiletin at a dose of 500 ppm in without NNK treatments; Group 5, mice without treatments with NNK or nobiletin. The Group No. corresponds to Group No. in Fig. 9.

[†] Average $\pm$ standard deviation of *gpt* MF of four or five mice.

[‡] Differences between *gpt* MF of each group and that of Group 1 were tested for statistical significance using a Student's *t*-test.

[§] Two unusually high *gpt* MF of M020 and M024 were excluded for the calculation of average by the Smirnov-Grubb's outlier test.

^{||} Statistically significant ($P < 0.05$) against Group 1. The values in Groups 4 and 5 are also statistically significant. But the mice in Groups 4 and 5 are not treated with NNK so that the values are not marked with ||.

3-4-2) ノビレチンによる NNK の変異抑制機構

ノビレチンによる NNK の変異抑制機構を明らかにするため、NNK の YG7108 株に対する変異原性をノビレチンが抑制するか検討を行なった (Fig. 16.). NNK の変異原性に対するノビレチンの抑制効果(A), NNK の変異原性に対する 8-methoxypsoralen の抑制効果(B), B[a]P の変異原性に対するノビレチンの影響(C), MNNG の変異原性に対するノビレチンの影響(D)をそれぞれ検討した. NNK はラット肝 S9mix の存在下, アルキル化剤に高感受性を示す YG7108 株に対して変異原性を示したが, ノビレチン(2.5 or 5.0 $\mu\text{g}/\text{plate}$)を共存させるとその変異原性は約 50%減少した (Fig. 16A.). ノビレチンの代わりに, CYP2A の阻害剤である 8-methoxypsoralen(0.25 or 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$)を加えた場合も, NNK の変異原性は約 50%減少した (Fig. 16B.). 一方, ノビレチンは B[a]P や MNNG による変異原性に対しては顕著な抑制効果を示さなかった(Fig. 16C, D.).

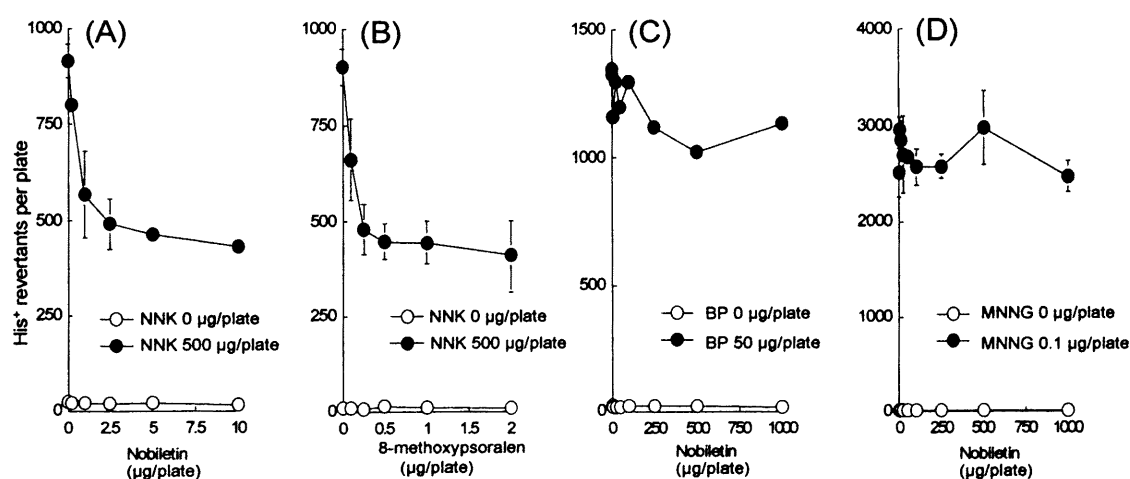


Fig. 16. Suppressive effects of nobiletin against genotoxicity of NNK in the presence of S9 mix in *S. typhimurium* YG7108. Closed circles represent the numbers of His⁺ revertants/plate induced by the following compounds: NNK (500 mg/plate) in the presence of S9 mix along with the increasing doses of nobiletin (A), NNK (500 mg/plate) in the presence of S9 mix along with the increasing doses of 8-methoxypsoralen (B); BP (50 mg/plate) in the presence of S9 mix along with the increasing doses of nobiletin (C); MNNG (0.1 mg/plate) in the absence of S9 mix along with the increasing doses of nobiletin. Open circles represent the numbers of His⁺ revertants/plate when the non-genotoxicity of nobiletin (A, C and D) and 8-methoxypsoralen (B) were confirmed. Strains used are *S. typhimurium* YG7108 (A, B and D) and *S. typhimurium* YG5161 (C). Averages and standard deviations are presented in A, B and D where three plates were used for the assays. Averages are presented in C where two plates were used for the assay.

第 5 節 考察

第 3 章では、喫煙由来の肺がんに対するノビレチンの化学予防効果を評価するため、タバコ特異的なニトロサミンである NNK の遺伝毒性に対するノビレチンの抑制効果について *gpt delta* トランスジェニックマウスを用いて検討した。NNK 処理により肺における *gpt* 突然変異頻度は有意に増大した (Table 6-7.)。これらは、雌で 19 倍、雄で 9 倍の変異頻度の上昇を示した。このことから、雌の方が雄に比べて NNK に対する感受性が高いことが示唆された。これは、NNK を代謝活性化する酵素が性差によって異なることに起因する可能性がある^[85]。雌のマウスが雄のマウスよりも NNK に対して高い感受性を示したことから、人間に関しても NNK がもたらす遺伝毒性により高い感受性を示すのは男性より女性の方かもしれない^[86]。また、ノビレチンはマウス皮膚、ラット大腸で発がん抑制効果が認められ^[46;47]、ラット肝では GST-P 陽性巣の発現をエンドポイントとして発がん抑制作用が検討された^[87]。Diethylnitrosamine による外因性モデルの実験では発がん抑制が認められる一方で、コリン欠乏食による内因性モデルの実験では発がんの促進がみられるなど、相反する結果が報告されている^[87]。

第 2 章より、*gpt delta* マウスの肺における NNK 誘発変異タイプは G:C→A:T, G:C→T:A, A:T→T:A, A:T→C:G であった。NNK 処理により DNA のアルキル化を引き起こし、*K-ras* 遺伝子に G:C→A:T の変異を誘発することが報告されている^[22]。G:C→A:T 変異は *K-ras* がん遺伝子を活性化することから、ノビレチン処理によって *gpt* MF の減少が見られたことは、肺腫瘍の減少との関連を示唆している。すなわちノビレチンがマウスにおける NNK 誘発肺がんに対して化学予防効果を持つことが示唆された。

ノビレチンは他にも転移抑制^[43;44]，炎症そしてプロモーション抑制^[41;42;88-91]が報告されている．それ故に，イニシエーション，プロモーション，プログレッションのいずれの段階でもタバコによる肺発がん抑制作用を示す可能性がある．しかしながら，特定の化合物は，NNK による腫瘍を減少することが出来ても，必ずしもタバコの煙による肺腫瘍を減少させるとは限らない^[92]．それ故，今後の研究課題としては，タバコの煙によって誘導される肺腫瘍に対して，ノビレチンの予防効果を評価する必要があると考える．

次に，ノビレチンによる NNK の変異抑制機構を明らかにするためノビレチンが P450 による NNK の代謝活性化に影響しているかどうかを YG7108 株を用いて検討した．興味深いことに，ノビレチンは NNK の遺伝毒性に対して抑制効果を示したが，B[a]P および代謝活性化なしに遺伝毒性を示す MNNG に対する遺伝毒性阻害効果はごく弱いかあるいは阻害効果が認められなかった．MNNG は DNA に O⁶-メチルグアニン付加体を形成し G:C→A:T 変異を誘発主に誘導する^[93]ことから，ノビレチンは O⁶-メチルグアニンに対する修復活性を高めたり，誤りのない損傷乗り越え DNA 合成を促進しているのではなく，むしろ NNK の代謝活性化に関わる CYP(P-450) 酵素活性を阻害することによって NNK の遺伝毒性を抑制しているのではないかと推察される^[94-96]．

実際，CYP2A の特異的阻害剤である 8-methoxyporalen は，S9 存在下においてノビレチンと同様に NNK の遺伝毒性を抑制した^[97]．一方，B[a]P の遺伝毒性は CYP1A1 を経て活性化されることがわかっている^[98]が，B[a]P に対するノビレチンの阻害効果は弱かった(Fig.16C)．このことから，ノビレチンの阻害作用は CYP2A を含むある特定の CYP 酵素によるものと考えられる．しかしながら，ノビレチンと 8-methoxyporalen

は共に NNK の遺伝毒性に対する阻害効力は 50% 程度であった。従って、残りの 50% は CYP2A とは別の CYP 酵素が関与していると思われる。本実験で B[a]P の遺伝毒性作用にノビレチンは効果的ではなかったが、Conney らは^[99]、ノビレチンによって突然変異誘発物質である aflatoxin B1 の代謝や B[a]P の水酸化について、ヒト肝臓ミクロソームの代謝活性化が促進されたと報告した。ノビレチンはまた、ヒト肝臓ミクロソームによる acetaminophen^[100] と、ラット肝臓ミクロソームによる zoxazolamine^[101] の酸化代謝を促進した。これらの報告から、ノビレチンが CYP 酵素活性を調節する作用を持つ可能性が示唆される。

NNK 投与により肺における *gpt* 突然変異頻度は有意に増大し、雌は雄よりも 2 倍以上高い感受性を示した。食餌中のノビレチンは NNK による変異誘発を 25-45% 抑制し、雌では 100ppm、雄では 500ppm 投与群で有意に抑制した。以上の結果は、ノビレチンが喫煙に基づく肺がんの抑制に有効である可能性を示唆する。またノビレチンは CYP2A の阻害剤である 8-methoxypsoralen と同様に NNK の *in vitro* における変異原性を抑制した。

本第 3 章の研究において、ノビレチンは NNK の代謝活性化に関わる CYP の活性を修飾することによりその変異原性を抑制している可能性が強く示唆された。

総括

本研究では、大腸菌のグアニンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子 (*gpt*) を λ ファージ DNA 上に組み込みマウスに導入した *gpt delta* トランスジェニックマウスを用いて、環境中の変異原（化学物質および放射線）のマウス組織における突然変異誘発能とその複合影響について検討を行なった。*gpt* はコード領域が 456 塩基対と小さく容易に変異部位の同定を行なうことができ、また λ ファージの *red/gam* 遺伝子をレポーターすることにより、これまでの検出が難しかった欠失変異の効率的な検出を可能にした。

第2章では1章で述べた *gpt delta* トランスジェニックマウスを用いて、喫煙と放射線の複合影響を調べる目的で、低線量率放射線を照射しているマウスにタバコ特異的ニトロサミンである NNK を投与し、誘発された塩基置換変異および欠失変異を詳細に解析した。低線量放射線による生物影響については多く研究されていない。また低線量放射線による適応応答・ホルミシス効果といった報告もありその評価は複雑といえる。本研究で用いた線量は、低線量率放射線ではあるが、総放射線量を考慮すると最高線量で 1Gy を越すため必ずしも低線量とは言えない。本研究では、0.5, 1.0, 1.5 mGy/h という低線量率放射線が NNK の遺伝毒性にどう作用するのか検索した結果、むしろ NNK 処理によって放射線誘発欠失変異の誘発が抑制される可能性を示唆した。NNK 処理によって生じたアルキル化損傷塩基を認識するミスマッチ修復蛋白質やアポトーシスに関与する p53 が抑制機構に関与する可能性が考えられた。喫煙と放射線の複合遺伝毒性効果については、さらに詳細に検討する必要があるのではないかと考えられる。

がんは遺伝子の変異に基づく疾病と考えられており、環境因子の遺伝毒性作用に対抗する生体防御機構の解明ならびに食品などに含まれる抗変異・抗発がん物質の検索は、がん予防戦略を策定する上で重要な知見となる。第3章では、タバコ特異的なニトロサミン NNK の遺伝毒性作用に対するノビレチンの抑制作用について個体レベルで検討した。前述したように、タバコ関連 *N*-ニトロソアミン類は、生体内において CYP によって代謝的に活性化されて初めて変異原性を示す。*gpt delta* トランスジェニックマウスを用いて NNK 誘発突然変異を検索した結果、NNK 投与により肺における *gpt* 突然変異頻度は有意に増大し、雌は雄よりも2倍以上高い感受性を示したことがわかった。NNK の代謝活性化酵素の作用に性差があることを示唆する結果を得た。また雌雄ともに、ノビレチン処理によって NNK 誘発突然変異を抑えたことから、ノビレチンは NNK の肺がん誘発に関しても抑制作用を示す可能性を認めた。さらにノビレチンによる NNK の変異抑制機構を明らかにするため、Ames 試験菌株 YG7108 (アルキル化剤高感受性株) を用いて復帰突然変異試験を行った結果、ノビレチンは CYP2A の阻害剤である 8-methoxypsoralen と同程度に NNK の *in vitro* における変異原性を抑制した。これらノビレチンの効果は NNK の代謝に関わる特定の CYP の活性を修飾することによりその変異原性を抑制している可能性が示唆された。第3章により認められた知見はとても興味深く、今後の予防医学を推奨する上で大きな役割を担う研究成果であるといえる。また、ノビレチン以外の植物成分にどのような遺伝毒性、発がん抑制効果があるかが今後の重要な課題となる。

本論文内容の誌上発表

- 1) M. Ikeda, K. Masumura, K. Matsui, H. Kohno, K. Sakuma, T. Tanaka and T. Nohmi: Chemopreventive effects of nobiletin against genotoxicity induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in the lung of *gpt* delta transgenic mice. *Genes and Environment*, 28, 84-91 (2006)
- 2) Megumi Ikeda, Ken-ichi Masumura, Yasuteru Sakamoto, Bing Wang, Mitsuru Neno, Keiko Sakuma, Isamu Hayata, Takehiko Nohmi: Combined genotoxic effects of radiation and tobacco-specific nitrosamine on the lung of *gpt* delta transgenic mice. *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 626 (2007) 15-25.

謝辞

本研究を行なうにあたり，御懇切な御指導と御鞭撻を賜りました女子栄養大学教授・佐久間慶子博士，同講師・福島亜紀子博士に心より感謝致します。

また本研究を遂行する上で，研究の進行等について，終始変わらぬ御指導と御助言を賜りました国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部第二室室長・能美健彦博士に深く感謝致します。

さらに本研究を行なうにあたり，学術面，技術面において多大な御指導と御助言を賜りました国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部・増村健一博士に厚く感謝致します。

また，多くの有益な御助言・御討論をいただきました放射線医学総合研究所の早田勇博士，根井充博士，王冰博士ならびに金沢医科大学教授・田中卓二博士，同講師・甲野裕之博士に心より御礼申し上げます。

また，本研究においてお力添えを頂いた国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部第二室の松井恵子さん，坂元康晃さんに心より感謝いたします。

さらに，本研究を進める上で多くの御助言，ご指導を賜りました国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部の皆様に心より感謝いたします。

最後に，これまで私を温かく見守ってくれた家族・友人に心より感謝します。

参考文献

- [1] R.Doll, R.Peto. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today, J.Natl.Cancer Inst., 66, (1981) 1191-1308.
- [2] 国立がんセンター <http://www.ncc.go.jp/jp/>
がん情報サービス→がんを予防する (がんを防ぐための 12 カ条 1978 年策定).
- [3] C.Heidelberger. Chemical carcinogenesis, Annu.Rev.Biochem., 44, (1975) 79-121.
- [4] A.H.Conney. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture, Cancer Res., 42, (1982) 4875-4917.
- [5] F.P.Guengerich. Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy, Cancer Res., 48, (1988) 2946-2954.
- [6] S.W.Kohler, G.S.Provost, A.Fieck, P.L.Kretz, W.O.Bullock, J.A.Sorge, D.L.Putman, J.M.Short. Spectra of spontaneous and mutagen-induced mutations in the lacI gene in transgenic mice, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 88, (1991) 7958-7962.
- [7] J.Vijg. New methods for the detection of genetic variation, Ann.Ist.Super.Sanita, 27, (1991) 123-126.

- [8] D.Hoffmann, I.Hoffmann. The changing cigarette, 1950-1995, *J.Toxicol.Environ.Health*, 50, (1997) 307-364.
- [9] S.S.Hecht. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer, *Nat.Rev.Cancer*, 3, (2003) 733-744.
- [10] S.S.Hecht. Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention, *Lancet Oncol.*, 3, (2002) 461-469.
- [11] S.S.Hecht. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer, *J.Natl.Cancer Inst.*, 91, (1999) 1194-1210.
- [12] D.Hoffmann, I.Hoffmann, K.El Bayoumy. The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder, *Chem.Res.Toxicol.*, 14, (2001) 767-790.
- [13] P.G.Shields. Molecular epidemiology of smoking and lung cancer, *Oncogene*, 21, (2002) 6870-6876.
- [14] R.P.Deutsch-Wenzel, H.Brune, G.Grimmer. Experimental studies on the carcinogenicity of five nitrogen containing polycyclic aromatic compounds directly injected into rat lungs, *Cancer Lett.*, 20, (1983) 97-101.
- [15] A.P.Wolterbeek, E.J.Schoevers, A.A.Rutten, V.J.Feron. A critical appraisal of intratracheal instillation of benzo[a]pyrene to Syrian golden hamsters as a model in respiratory tract carcinogenesis, *Cancer Lett.*, 89, (1995) 107-116.

- [16] S.S.Hecht. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines, *Chem.Res.Toxicol.*, 11, (1998) 559-603.
- [17] S.S.Hecht, C.B.Chen, N.Hirota, R.M.Ornaf, T.C.Tso, D.Hoffmann. Tobacco-specific nitrosamines: formation from nicotine in vitro and during tobacco curing and carcinogenicity in strain A mice, *J.Natl.Cancer Inst.*, 60, (1978) 819-824.
- [18] H.Bartsch, R.Montesano. Relevance of nitrosamines to human cancer, *Carcinogenesis*, 5, (1984) 1381-1393.
- [19] J.S.Yoo, F.P.Guengerich, C.S.Yang. Metabolism of N-nitrosodialkylamines by human liver microsomes, *Cancer Res.*, 48, (1988) 1499-1504.
- [20] C.J.Patten, H.Ishizaki, T.Aoyama, M.Lee, S.M.Ning, W.Huang, F.J.Gonzalez, C.S.Yang. Catalytic properties of the human cytochrome P450 2E1 produced by cDNA expression in mammalian cells, *Arch.Biochem.Biophys.*, 299, (1992) 163-171.
- [21] Q.Huang, S.Wang, S.C.Chen, D.M.Babcook, S.S.Park, H.V.Gelboin, S.S.Mirvish. Hydroxylation and dealkylation of methyl-n-butyl nitrosamine and role of certain cytochrome P-450 isozymes in these reactions, *Cancer Lett.*, 69, (1993) 107-116.
- [22] Z.A.Ronai, S.Gradia, L.A.Peterson, S.S.Hecht. G to A transitions and G to T transversions in codon 12 of the Ki-ras oncogene isolated from

- mouse lung tumors induced by
4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and related
DNA methylating and pyridyloxobutylating agents, *Carcinogenesis*, 14,
(1993) 2419-2422.
- [23] W.H.Westra, I.O.Baas, R.H.Hruban, F.B.Askin, K.Wilson,
G.J.Offerhaus, R.J.Slebos. K-ras oncogene activation in atypical
alveolar hyperplasias of the human lung, *Cancer Res.*, 56, (1996)
2224-2228.
- [24] Tobacco smoke involuntary smoking, IARC Monogr Eval. Carcinog.
Risk Chem. Hum., vol. 83, International Agency for Research on
Cancer, Lyon, France, 2002. 2006.
- [25] International Agency for Research on Cancer Press Release, vol. 154,
International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2004.
2006.
- [26] United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic
Radiation, Sources, Effects and Risks of Ionising Radiation, 1988
Report to the General Assembly with Annexes, United Nations Press,
New York, 1989. 2006.
- [27] E.C. Friedberg, G.C. Walker, W. Siede, R.D. Wood, R.A. Schultz, T.
Ellenberger, DNA Repair and Mutagenesis, 2nd ed., ASM Press,
Washington, DC, 2006, pp. 1-1118. 2006.

- [28] M.Yonezawa, A.Takeda, J.Misonoh. Acquired radioresistance after low dose X-irradiation in mice, *J.Radiat.Res.(Tokyo)*, 31, (1990) 256-262.
- [29] M.Mifune, T.Sobue, H.Arimoto, Y.Komoto, S.Kondo, H.Tanooka. Cancer mortality survey in a spa area (Misasa, Japan) with a high radon background, *Jpn.J.Cancer Res.*, 83, (1992) 1-5.
- [30] T.Tanaka, H.Kohno, M.Murakami, R.Shimada, S.Kagami, T.Sumida, Y.Azuma, H.Ogawa. Suppression of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats by mandarin juices rich in beta-cryptoxanthin and hesperidin, *Int.J.Cancer*, 88, (2000) 146-150.
- [31] M.Calomme, L.Pieters, A.Vlietinck, D.Vanden Berghe. Inhibition of bacterial mutagenesis by Citrus flavonoids, *Planta Med.*, 62, (1996) 222-226.
- [32] T.Tanaka, K.Kawabata, M.Kakumoto, A.Hara, A.Murakami, W.Kuki, Y.Takahashi, H.Yonei, M.Maeda, T.Ota, S.Odashima, T.Yamane, K.Koshimizu, H.Ohigashi. Citrus auraptene exerts dose-dependent chemopreventive activity in rat large bowel tumorigenesis: the inhibition correlates with suppression of cell proliferation and lipid peroxidation and with induction of phase II drug-metabolizing enzymes, *Cancer Res.*, 58, (1998) 2550-2556.
- [33] A.Murakami, W.Kuki, Y.Takahashi, H.Yonei, Y.Nakamura, Y.Ohto, H.Ohigashi, K.Koshimizu. Auraptene, a citrus coumarin, inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion in ICR

mouse skin, possibly through suppression of superoxide generation in leukocytes, *Jpn.J.Cancer Res.*, 88, (1997) 443-452.

- [34] P.L.Crowell, M.N.Gould. Chemoprevention and therapy of cancer by d-limonene, *Crit Rev.Oncog.*, 5, (1994) 1-22.
- [35] T.Tanaka, H.Makita, K.Kawabata, H.Mori, M.Kakumoto, K.Satoh, A.Hara, T.Sumida, T.Tanaka, H.Ogawa. Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin, *Carcinogenesis*, 18, (1997) 957-965.
- [36] T.Tanaka, M.Maeda, H.Kohno, M.Murakami, S.Kagami, M.Miyake, K.Wada. Inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats by the citrus limonoids obacunone and limonin, *Carcinogenesis*, 22, (2001) 193-198.
- [37] A.M.M.W.W.W.Jie Chen. Two New Polymethoxylated Flavones, a Class of Compounds with Potential Anticancer Activity, Isolated from Cold Pressed Dancy Tangerine Peel Oil Solids, *J.Agric.Food Chem.*, (1997).
- [38] A.Minagawa, Y.Otani, T.Kubota, N.Wada, T.Furukawa, K.Kumai, K.Kameyama, Y.Okada, M.Fujii, M.Yano, T.Sato, A.Ito, M.Kitajima. The citrus flavonoid, nobiletin, inhibits peritoneal dissemination of human gastric carcinoma in SCID mice, *Jpn.J.Cancer Res.*, 92, (2001) 1322-1328.

- [39] R.Visockiene, A.Inciura, E.Juozaityte. [Update on treatment of bladder cancer], *Medicina (Kaunas.)*, 40, (2004) 1239-1248.
- [40] R.Suzuki, H.Kohno, A.Murakami, K.Koshimizu, H.Ohigashi, M.Yano, H.Tokuda, H.Nishino, T.Tanaka. Citrus nobiletin inhibits azoxymethane-induced large bowel carcinogenesis in rats, *Biofactors*, 22, (2004) 111-114.
- [41] A.Murakami, Y.Nakamura, K.Torikai, T.Tanaka, T.Koshiba, K.Koshimizu, S.Kuwahara, Y.Takahashi, K.Ogawa, M.Yano, H.Tokuda, H.Nishino, Y.Mimaki, Y.Sashida, S.Kitanaka, H.Ohigashi. Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor promotion in mice, *Cancer Res.*, 60, (2000) 5059-5066.
- [42] H.Kohno, M.Taima, T.Sumida, Y.Azuma, H.Ogawa, T.Tanaka. Inhibitory effect of mandarin juice rich in beta-cryptoxanthin and hesperidin on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced pulmonary tumorigenesis in mice, *Cancer Lett.*, 174, (2001) 141-150.
- [43] Y.Miyata, T.Sato, M.Yano, A.Ito. Activation of protein kinase C betaII/epsilon-c-Jun NH2-terminal kinase pathway and inhibition of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in antitumor invasive activity induced by the polymethoxy flavonoid, nobiletin, *Mol.Cancer Ther.*, 3, (2004) 839-847.
- [44] K.Kawabata, A.Murakami, H.Ohigashi. Nobiletin, a citrus flavonoid,

- down-regulates matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) expression in HT-29 human colorectal cancer cells, *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, 69, (2005) 307-314.
- [45] H.Takanaga, A.Ohnishi, S.Yamada, H.Matsuo, S.Morimoto, Y.Shoyama, H.Ohtani, Y.Sawada. Polymethoxylated flavones in orange juice are inhibitors of P-glycoprotein but not cytochrome P450 3A4, *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 293, (2000) 230-236.
- [46] A.Murakami, Y.Nakamura, K.Torikai, T.Tanaka, T.Koshiba, K.Koshimizu, S.Kuwahara, Y.Takahashi, K.Ogawa, M.Yano, H.Tokuda, H.Nishino, Y.Mimaki, Y.Sashida, S.Kitanaka, H.Ohigashi. Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor promotion in mice, *Cancer Res.*, 60, (2000) 5059-5066.
- [47] H.Kohno, S.Yoshitani, Y.Tsukio, A.Murakami, K.Koshimizu, M.Yano, H.Tokuda, H.Nishino, H.Ohigashi, T.Tanaka. Dietary administration of citrus nobiletin inhibits azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats, *Life Sci.*, 69, (2001) 901-913.
- [48] D.M.Maron, B.N.Ames. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat.Res.*, 113, (1983) 173-215.
- [49] A.Matsuoka, N.Yamazaki, T.Suzuki, M.Hayashi, T.Sofuni. Evaluation of the micronucleus test using a Chinese hamster cell line as an alternative to the conventional in vitro chromosomal aberration test, *Mutat.Res.*, 272, (1992) 223-236.

- [50] 林真, 小核試験, サンエンティスト社 (1991)
- [51] T.Nohmi, M.Katoh, H.Suzuki, M.Matsui, M.Yamada, M.Watanabe, M.Suzuki, N.Horiya, O.Ueda, T.Shibuya, H.Ikeda, T.Sofuni. A new transgenic mouse mutagenesis test system using Spi- and 6-thioguanine selections, *Environ.Mol.Mutagen.*, 28, (1996) 465-470.
- [52] T.Nohmi, T.Suzuki, K.Masumura. Recent advances in the protocols of transgenic mouse mutation assays, *Mutat.Res.*, 455, (2000) 191-215.
- [53] T.Nohmi, K.I.Masumura. Gpt delta transgenic mouse: A novel approach for molecular dissection of deletion mutations in vivo, *Adv.Biophys.*, 38, (2004) 97-121.
- [54] 放射線総合医学研究所 <http://www.nirs.go.jp/>
- [55] W.Zhang, C.Wang, D.Chen, M.Minamihisamatsu, H.Morishima, Y.Yuan, L.Wei, T.Sugahara, I.Hayata. Effect of smoking on chromosomes compared with that of radiation in the residents of a high-background radiation area in China, *J.Radiat.Res.(Tokyo)*, 45, (2004) 441-446.
- [56] V.E.Archer. Enhancement of lung cancer by cigarette smoking in uranium and other miners, *Carcinog.Compr.Surv.*, 8, (1985) 23-37.
- [57] Z.B.Tokarskaya, B.R.Scott, G.V.Zhuntova, N.D.Okladnikova, Z.D.Belyaeva, V.F.Khokhryakov, H.Schollnberger, E.K.Vasilenko. Interaction of radiation and smoking in lung cancer induction among

- workers at the Mayak nuclear enterprise, *Health Phys.*, 83, (2002) 833-846.
- [58] Kazuo Sakai, Yuko Hoshi, Takaharu Nomura, Takeshi Oda, Toshiyasu Iwasaki, Kazuko Fujita, Takeshi Yamada, Hiroshi Tanooka.
Suppression of carcinogenic processes in mice by chronic low dose rate gamma-irradiation, *Int.J.Low radiation*, 1, (2003) 142-146.
- [59] K.Masumura, K.Kuniya, T.Kurobe, M.Fukuoka, F.Yatagai, T.Nohmi.
Heavy-ion-induced mutations in the gpt delta transgenic mouse: comparison of mutation spectra induced by heavy-ion, X-ray, and gamma-ray radiation, *Environ.Mol.Mutagen.*, 40, (2002) 207-215.
- [60] T.Nohmi, K.Masumura. Molecular nature of intrachromosomal deletions and base substitutions induced by environmental mutagens, *Environ.Mol.Mutagen.*, 45, (2005) 150-161.
- [61] M.S.Sasaki, Y.Ejima, A.Tachibana, T.Yamada, K.Ishizaki, T.Shimizu, T.Nomura. DNA damage response pathway in radioadaptive response, *Mutat.Res.*, 504, (2002) 101-118.
- [62] S.Wolff. Failla Memorial Lecture. Is radiation all bad? The search for adaptation, *Radiat.Res.*, 131, (1992) 117-123.
- [63] J.D.Tucker, K.J.Sorensen, C.S.Chu, D.O.Nelson, M.J.Ramsey, C.Urlando, J.A.Heddle. The accumulation of chromosome aberrations and Dlb-1 mutations in mice with highly fractionated exposure to gamma radiation, *Mutat.Res.*, 400, (1998) 321-335.

- [64] C.E.Canman, M.B.Kastan. Role of p53 in apoptosis, *Adv.Pharmacol.*, 41, (1997) 429-460.
- [65] H.Offer, N.Erez, I.Zurer, X.Tang, M.Milyavsky, N.Goldfinger, V.Rotter. The onset of p53-dependent DNA repair or apoptosis is determined by the level of accumulated damaged DNA, *Carcinogenesis*, 23, (2002) 1025-1032.
- [66] H.Zhou, L.X.Zhu, K.Li, T.K.Hei. Radon, tobacco-specific nitrosamine and mutagenesis in mammalian cells, *Mutat.Res.*, 430, (1999) 145-153.
- [67] F.T.Cross, R.F.Palmer, R.E.Filipy, G.E.Dagle, B.O.Stuart. Carcinogenic effects of radon daughters, uranium ore dust and cigarette smoke in beagle dogs, *Health Phys.*, 42, (1982) 33-52.
- [68] F.T.Cross. Radioactivity in cigarette smoke issue, *Health Phys.*, 46, (1984) 205-208.
- [69] S.S.Hecht, D.Hoffmann. Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke, *Carcinogenesis*, 9, (1988) 875-884.
- [70] Y.Lao, P.W.Villalta, S.J.Sturla, M.Wang, S.S.Hecht. Quantitation of pyridyloxobutyl DNA adducts of tobacco-specific nitrosamines in rat tissue DNA by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry, *Chem Res.Toxicol.*, 19, (2006) 674-682.

- [71] R.Guza, M.Rajesh, Q.Fang, A.E.Pegg, N.Tretyakova. Kinetics of O(6)-methyl-2'-deoxyguanosine repair by O(6)-alkylguanine DNA alkyltransferase within K-ras gene-derived DNA sequences, *Chem Res.Toxicol.*, 19, (2006) 531-538.
- [72] H.F.Tiano, R.L.Wang, M.Hosokawa, C.Crespi, K.R.Tindall, R.Langenbach. Human CYP2A6 activation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK): mutational specificity in the gpt gene of AS52 cells, *Carcinogenesis*, 15, (1994) 2859-2866.
- [73] L.A.Peterson, S.S.Hecht. O6-methylguanine is a critical determinant of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone tumorigenesis in A/J mouse lung, *Cancer Res.*, 51, (1991) 5557-5564.
- [74] K.Hashimoto, K.Ohsawa, M.Kimura. Mutations induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in the lacZ and cII genes of Muta Mouse, *Mutat.Res.*, 560, (2004) 119-131.
- [75] W.Chaung, L.J.Mi, R.J.Boorstein. The p53 status of Chinese hamster V79 cells frequently used for studies on DNA damage and DNA repair, *Nucleic Acids Res.*, 25, (1997) 992-994.
- [76] H.Lee, J.M.Larner, J.L.Hamlin. Cloning and characterization of Chinese hamster p53 cDNA, *Gene*, 184, (1997) 177-183.
- [77] A.G.Schwartz, W.R.Rate. Inhibition of aflatoxin B1-induced cytotoxicity and binding to DNA in cultured rat liver cells by naturally

occurring flavones, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 2, (1979) 1021-1028.

- [78] C.Kandaswami, E.Perkins, D.S.Soloniuk, G.Drzewiecki, Middleton E Jr.
Antiproliferative effects of citrus flavonoids on a human squamous cell carcinoma in vitro, *Cancer Lett.*, 56, (1991) 147-152.
- [79] H.Takase, K.Yamamoto, H.Hirano, Y.Saito, A.Yamashita.
Pharmacological profile of gastric mucosal protection by marmin and nobiletin from a traditional herbal medicine, *Aurantii fructus immaturus*, *Jpn.J.Pharmacol.*, 66, (1994) 139-147.
- [80] N.K.Mak, Y.L.Wong-Leung, S.C.Chan, J.Wen, K.N.Leung, M.C.Fung.
Isolation of anti-leukemia compounds from *Citrus reticulata*, *Life Sci.*, 58, (1996) 1269-1276.
- [81] M.Yamada, K.Matsui, T.Sofuni, T.Nohmi. New tester strains of *Salmonella typhimurium* lacking O6-methylguanine DNA methyltransferases and highly sensitive to mutagenic alkylating agents, *Mutat.Res.*, 381, (1997) 15-24.
- [82] M.Yamada, B.Sedgwick, T.Sofuni, T.Nohmi. Construction and characterization of mutants of *Salmonella typhimurium* deficient in DNA repair of O6-methylguanine, *J.Bacteriol.*, 177, (1995) 1511-1519.
- [83] K.Matsui, M.Yamada, M.Imai, K.Yamamoto, T.Nohmi. Specificity of replicative and SOS-inducible DNA polymerases in frameshift mutagenesis: mutability of *Salmonella typhimurium* strains overexpressing SOS-inducible DNA polymerases to 30 chemical

mutagens, DNA Repair (Amst), 5, (2006) 465-478.

- [84] S.R.Kim, G.Maenhaut-Michel, M.Yamada, Y.Yamamoto, K.Matsui, T.Sofuni, T.Nohmi, H.Ohmori. Multiple pathways for SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: an overexpression of *dinB/dinP* results in strongly enhancing mutagenesis in the absence of any exogenous treatment to damage DNA, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 94, (1997) 13792-13797.
- [85] J.Schulze, W.Schlager, R.Wunsch, E.Richter. Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) by hamster, mouse and rat intestine: relevance of species differences, *Carcinogenesis*, 17, (1996) 1093-1099.
- [86] C.E.Hill, A.A.Affatato, K.J.Wolfe, M.S.Lopez, C.K.Hallberg, D.Canistro, S.Z.Abdel-Rahman. Gender differences in genetic damage induced by the tobacco-specific nitrosamine NNK and the influence of the Thr241Met polymorphism in the XRCC3 gene, *Environ.Mol.Mutagen.*, 46, (2005) 22-29.
- [87] 中江大, *Food Style*, 21, (2000) 51-61.
- [88] N.Lin, T.Sato, Y.Takayama, Y.Mimaki, Y.Sashida, M.Yano, A.Ito. Novel anti-inflammatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages, *Biochem.Pharmacol.*, 65, (2003) 2065-2071.
- [89] A.Murakami, Y.Nakamura, Y.Ohto, M.Yano, T.Koshiba, K.Koshimizu,

- H.Tokuda, H.Nishino, H.Ohigashi. Suppressive effects of citrus fruits on free radical generation and nobiletin, an anti-inflammatory polymethoxyflavonoid, *Biofactors*, 12, (2000) 187-192.
- [90] H.Ohnishi, M.Asamoto, K.Tujimura, N.Hokaiwado, S.Takahashi, K.Ogawa, M.Kuribayashi, T.Ogiso, H.Okuyama, T.Shirai. Inhibition of cell proliferation by nobiletin, a dietary phytochemical, associated with apoptosis and characteristic gene expression, but lack of effect on early rat hepatocarcinogenesis in vivo, *Cancer Sci.*, 95, (2004) 936-942.
- [91] T.Sato, L.Koike, Y.Miyata, M.Hirata, Y.Mimaki, Y.Sashida, M.Yano, A.Ito. Inhibition of activator protein-1 binding activity and phosphatidylinositol 3-kinase pathway by nobiletin, a polymethoxy flavonoid, results in augmentation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 production and suppression of production of matrix metalloproteinases-1 and -9 in human fibrosarcoma HT-1080 cells, *Cancer Res.*, 62, (2002) 1025-1029.
- [92] H.Witschi. Successful and not so successful chemoprevention of tobacco smoke-induced lung tumors, *Exp.Lung Res.*, 26, (2000) 743-755.
- [93] E.L.Loechler, C.L.Green, J.M.Essigmann. In vivo mutagenesis by O6-methylguanine built into a unique site in a viral genome, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 81, (1984) 6271-6275.
- [94] K.Fujita, T.Kamataki. Predicting the mutagenicity of tobacco-related N-nitrosamines in humans using 11 strains of *Salmonella typhimurium*

YG7108, each coexpressing a form of human cytochrome P450 along with NADPH-cytochrome P450 reductase, *Environ.Mol.Mutagen.*, 38, (2001) 339-346.

- [95] R.Thapliyal, G.B.Maru. Inhibition of cytochrome P450 isozymes by curcumins in vitro and in vivo, *Food Chem.Toxicol.*, 39, (2001) 541-547.
- [96] C.S.Yang, S.K.Chhabra, J.Y.Hong, T.J.Smith. Mechanisms of inhibition of chemical toxicity and carcinogenesis by diallyl sulfide (DAS) and related compounds from garlic, *J.Nutr.*, 131, (2001) 1041S-1045S.
- [97] M.Miyazaki, H.Yamazaki, H.Takeuchi, K.Saoo, M.Yokohira, K.Masumura, T.Nohmi, Y.Funae, K.Imaida, T.Kamataki. Mechanisms of chemopreventive effects of 8-methoxypsoralen against 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced mouse lung adenomas, *Carcinogenesis*, 26, (2005) 1947-1955.
- [98] Y.Yamazaki, K.Fujita, K.Nakayama, A.Suzuki, K.Nakamura, H.Yamazaki, T.Kamataki. Establishment of ten strains of genetically engineered *Salmonella typhimurium* TA1538 each co-expressing a form of human cytochrome P450 with NADPH-cytochrome P450 reductase sensitive to various promutagens, *Mutat.Res.*, 562, (2004) 151-162.
- [99] A.H.Conney, M.K.Buening, E.J.Pantuck, C.B.Pantuck, J.G.Fortner, K.E.Anderson, A.Kappas. Regulation of human drug metabolism by dietary factors, *Ciba Found.Symp.*, 76, (1980) 147-167.

- [100] Y.Li, E.Wang, C.J.Patten, L.Chen, C.S.Yang. Effects of flavonoids on cytochrome P450-dependent acetaminophen metabolism in rats and human liver microsomes, *Drug Metab Dispos.*, 22, (1994) 566-571.
- [101] J.M.Lasker, M.T.Huang, A.H.Conney. In vitro and in vivo activation of oxidative drug metabolism by flavonoids, *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 229, (1984) 162-170.