

P-065

Spontaneous mutant frequencies in the liver and testis of young and aged *gpt* delta transgenic mice

Naohiro Osugi^{1,2,3}, Kenichi Masumura¹,
Naomi Toyoda-Hokaiwado¹, Tomo Inomata²,
Takehiko Nohmi¹

¹Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, ²School of Veterinary Medicine, Azabu University, ³Japan SLC, Inc.

Gene mutations are thought to accumulate with aging. Previous transgenic mice mutation assays revealed that point mutations such as base substitutions increase with age in an organ-specific manner. However, effects of aging on deletion mutations are not well studied. Mutation assays using *gpt* delta transgenic mice have a feature that can detect point mutations and deletions by *gpt* and *Spi*⁻ assays, respectively, in the same organ. In this study, we investigated the accumulation of point mutations and deletions with aging. At the age of 4, 26, 52, and 78 weeks, five male *gpt* delta transgenic mice were sacrificed. The mice were not treated with any mutagens. Spontaneous *gpt* mutant frequencies in liver significantly increased with age: 2.5 times in 26 weeks, 2.6 times in 52 weeks, 4.4 times in 78 weeks comparing with those in 4 weeks. However, spontaneous *gpt* mutant frequencies in testis showed no significant increases with age. We are examining spontaneous deletions by *Spi*⁻ assay in the liver and testis. Effects of aging on spontaneous mutagenesis will be discussed.

P-066

Genotoxicity of cyclophosphamide in liver and testis of *gpt* delta transgenic mouse

Masayuki Hasuko^{1,2}, Kenichi Masumura¹,
Naomi Toyoda-Hokaiwado¹, Tomo Inomata²,
Takehiko Nohmi¹

¹Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, ²School of Veterinary Medicine, Azabu University

Cyclophosphamide (CP) has been known to be clastogenic, testicular toxic and oncogenic. Mutagenicity of CP is organ-specific in transgenic (Tg) animal assays, but that in testis was not investigated well. In this study, we analyzed point mutations and deletions induced by CP in testis and liver by *gpt* and *Spi*⁻ assays. Male 6 week-old *gpt* delta Tg mice were administrated 40 mg/kg bw of CP intraperitoneally for 5 days and euthanized 14- and 50-days after the first injection. The mutations of liver and testis were subjected to *gpt* and *Spi*⁻ assays. The *gpt* mutant frequencies in testis were not increased at 14 and 50 days after the CP-treatment. The *Spi*⁻ mutant frequencies were not increased at 14 days either. However the *Spi*⁻ mutant frequencies at 50 days were significantly higher than those of the vehicle control. Sequencing analysis of the *Spi*-mutants showed that 1-bp deletions in run sequences and complex-type deletions with illegitimate recombinations were increased. Assays in liver are in progress. Mutagenicity and organ-specificity of CP will be discussed.

***gpt* delta トランスジェニックマウスを用いた加齢による自然突然変異の蓄積の検討**

大杉 直弘^{1,2,3}, 増村 健一¹, 豊田 尚美¹, 猪股 智夫²,
能美 健彦¹

¹国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部, ²麻布大学 獣医学部, ³日本エスエルシー株式会社

遺伝子突然変異は加齢とともに蓄積すると考えられており、突然変異検出用トランスジェニックマウスにおいても点突然変異頻度が加齢によって増加することが報告されている。その増加傾向には臓器特異性があることが知られているが、欠失変異に対する加齢の影響は調べられていない。本研究では、同一組織において点突然変異と欠失変異を検出可能な特長を持つ *gpt* delta マウスを変異原等で処理せずに加齢による点突然変異および欠失変異の蓄積の有無について検討した。4、26、52および78週齢の *gpt* delta マウス雄5匹から主要臓器を採材し、凍結保存した。そのうち肝臓と精巣について *gpt* アッセイを行い、点突然変異頻度を測定した。肝臓の点突然変異頻度は4週齢に対して26週齢では2.5倍、52週齢では2.6倍、78週齢では4.4倍の有意な増加が認められた。一方、精巣では加齢による変異頻度の有意な増加は認められなかった。*Spi*⁻アッセイによる欠失変異頻度の結果と合わせて加齢による影響を考察する。

***gpt* delta マウスを用いたシクロフォスファミド曝露による肝臓と精巣の遺伝子突然変異の検討**

蓮子 雅之^{1,2}, 増村 健一¹, 豊田 尚美¹, 猪股 智夫²,
能美 健彦¹

¹国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部, ²麻布大学・獣医学部

染色体の構造異常を高頻度に誘発するシクロフォスファミド (CP) は、発がん性の他、精巣毒性が知られている。トランスジェニック (Tg) 動物を用いた試験ではCPの突然変異誘発能に臓器特異性があることが知られているが、精巣における知見は十分ではない。本研究はCPの精巣における点突然変異および欠失変異誘発能を *gpt* および *Spi*⁻ アッセイで評価することを目的とした。CPを6週齢の *gpt* delta Tg マウスの雄に40 mg/kgの用量で5日間連続腹腔内投与し、試験開始から14日目と50日目に剖検を行った。肝臓と精巣について各群5匹を用いて *gpt* および *Spi*⁻ アッセイを行い、点突然変異および欠失変異の頻度を測定した。精巣において、投与後14日および50日の両群共に *gpt* 点突然変異頻度の増加は認められなかった。*Spi*⁻欠失変異は、14日群では増加していなかったが、50日群においては変異頻度の有意な増加が認められた。シーケンス解析の結果、1塩基欠失と複雑な組み換えを伴う欠失の頻度が増加していた。肝臓の結果と合わせてCPの変異誘発能と臓器特異性について考察する。