

発がん性評価の加速化に関する検討

遺伝子組み換え実験動物による発がん試験代替法

名古屋市立大学津田教授特任研究室 津田洋幸

発がん性評価モデル

発がん性の評価にはラットでは 108 週、マウスでは 75 週の長期試験が実施されているが、経費節減と動物愛護の立場から、試験期間の短縮と動物数を減らす目的で長期試験に代わる試験モデルの開発が要望されてきた。それには遺伝子の操作によって発がんに至る期間を短縮することが考案され、それにはがん遺伝子を導入（過剰状態にするか、肝抑制遺伝子を欠損（働かないように）する方法がある。またレポーター遺伝子を導入した遺伝子毒性（変異）評価トランスジェニック動物も作製されている。

発がん性試験では、感受性を亢進させる目的でがん遺伝子断片（DNA）を導入したトランスジェニック動物（マウス、ラット）や、目的とするがん抑制遺伝子を不活性化や欠失させたノックアウトマウスが作成された。これらには、マウスでは 1) ヒト型 c-Ha-ras 遺伝子導入モデル (rasH2)、2) がん抑制遺伝子 p53 の片側アレルを欠損させたノックアウトモデル (p53^{+/-})、3) v-Ha-ras 遺伝子導入モデル (Tg.AC) および、4) 色素性乾皮症修復遺伝子欠損モデル (XPA^{-/-})がある。ラットでは、1) ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックモデル (Hras128) および 2) SV40TAg トランスジェニックモデルがある。

遺伝毒性試験では、生体内における標的臓器の情報が得られるように、1) Big Blue マウス/ラット、2) Muta マウス、3) gptΔ (デルタ) マウス/ラット等、変異マーカー遺伝子を導入したモデルがある。

1. トランスジェニック動物とノックアウト動物

トランスジェニック動物とは、受精卵に外来遺伝子を人為的に組み込む方法で作成する。妊娠したドナーマウスまたはラットから採取した受精卵前核に目的とする DNA 断片をマイクロインジェクションし、その受精卵を偽妊娠動物（仮親）の卵管内に移植して自然分娩させると出生仔中に DNA が組み込まれた動物が 0.1～1%程度の確率で得られる。がん遺伝子が組み込まれた場合あるいはがん抑制遺伝子が欠損した場合には通常は発がん感受性の亢進がみられる。また化学物質による遺伝子変異のレポーター遺伝子を導入して *in vivo* 遺伝毒性の検出に使われている。

ノックアウト（遺伝子欠損）動物とは、ターゲティングによってES細胞の目標とする遺伝子またはそのプロモーター領域を欠損（あるいは変異）させ、その遺伝子が

機能しないように操作した動物である。がん抑制遺伝子を欠損させた場合には発がんの亢進がみられる。ES細胞が樹立されていることが前提となるので、ラットではES細胞樹立の報告¹⁴⁻¹⁶⁾はあるがまだ発がんに関与する遺伝子のノックアウトラット作製には至っていない。今後、ES細胞のみならずiPS細胞¹⁷⁻¹⁹⁾や新しい技術^{20,21)}を用いたノックアウト動物が作製されて発がん物質の中期検索法への利用が進展することが期待される。

1) トランスジェニックマウス

① rasH2 マウス

がん遺伝子のひとつであるヒトプロト型c-Ha-ras遺伝子を導入マウスで、勝木らによって作出された^{1,2)}。発がん物質の投与および自然発生において肺、皮膚および前胃腫瘍、リンパ腫、血管肉腫等が野生型より短期間に発生する（前胃腫瘍はN-methyl-N-nitrosourea 50 mg/kg 腹腔内投与の場合12週で100%；自然発生 18ヵ月以内に50%）。自然発生腫瘍は6ヶ月齢までは少ない^{3,4)}。使用するマウスの背景系統によって腫瘍の発生する臓器が若干異なる。現在ではC57BL/6J-Tg rasH2(♂) × BALB/cByJ(♀)の交配F1が使用される。発生した腫瘍では導入遺伝子に点変異が高頻度にみられるが、内在（本来持っている）ras遺伝子の変異は少ない。試験期間は通常26週投与であり、いままでの検証では、多くの遺伝毒性（変異原性）発がん物質（遺伝毒性物質）では陽性を示し、非遺伝毒性（非変異原性）発がん物質では高くない^{5,6)}。また非発がん物質はすべて陰性であり、偽陽性のない点も注目される³⁾。例えば、非遺伝毒性発がん物質（マウス2年投与で発がん）では、解熱剤で腎盂腫瘍を発生させるphenacetin、ホルモンのdiethylstilbestrolは陽性であるが、17- β -estradiol、鎮静剤のphenobarbital、免疫抑制剤のcyclosporin A、農薬のdieldrin等では陰性であった³⁾。

② Tg.AC マウス

ζ (zeta)-グロビン（ヘモグロビンのヘムタンパクを除いた部分）のプロモーター下にv-Ha-ras遺伝子（ウィルス由来のがん遺伝子）を導入したマウス。FVB/Nマウスに戻し交配されたものが米国 Taconic Farms社で維持されている⁷⁾。導入遺伝子の持続的な発現は骨髄を除いて検出されないが、皮膚創傷、紫外線照射、皮膚発がんプロモーターとして知られている12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) の皮膚塗布等によって皮膚扁平上皮腫瘍が発生し、導入遺伝子の活性化が見られる⁸⁻¹⁰⁾。その他非遺伝毒性発がん物質ではcyclosporin A、diethylstilbestrol、ethinyl estradiol、clofibrateの皮膚塗布で陽性、dimethylvinyl chloride¹¹⁾の経口投与で皮膚と前胃に腫瘍が発生する。皮膚を除く臓器における腫瘍発生では既知の結果と整合性の高い結果が得られていない¹²⁾。現状では補助的試験法として用いられる¹³⁾。

2) ノックアウトマウス

③ p53^{+/-}マウス

p53遺伝子はDNA 傷害の修復に関与するがん抑制遺伝子であるために欠損させると発がん感受性が亢進する。Exon5の欠損したp53^{+/-}C57BL6マウス²²⁾と、Exon2の欠損したp53^{+/-}CBAマウス²³⁾が中期発がん試験に用いられている。他に、p53のExon 2-6が欠損しているマウスが2系統作製されている^{24,25)}。これらのマウスは、野生型マウスに比べ、化学発がん物質に対する感受性が高い^{22,26)}。これらマウスでは共通してリンパ腫が発生するが、遺伝背景を変えると腫瘍の発生臓器が変わって、C57BL/6背景ではリンパ腫、129/SV背景では悪性奇形腫、BALB/c背景ではヒトLi-Fraumeni症候群に好発する乳がんが多くなる²⁷⁻²⁹⁾。メスC57BL/6Ntacとオスp53^{-/-}N4マウスを交配させたB6.129N5-Trp53が市販されている。背景となる自然発生腫瘍の少ない26週間が適切な試験期間である。

遺伝毒性陽性の melphalan、cyclophosphamide は陽性、非遺伝毒性物質では cyclosporin A と diethylstilbestrol では陽性、phenacetin、17-β-Estradiol は陰性であった。非遺伝毒性肝発がん物質であるペルオキシゾーム増生物質のうち、clofibrate、diethylhexylphthalate (DEHP)では肝腫瘍のわずかな増加がみられた。非がん原性物質については、いずれの化合物においても陰性であった³⁰⁾。以上から、p53^{+/-}モデルは遺伝毒性発がん物質の検出においても比較的信頼性の高いモデルとされている。

④ XPA ノックアウトマウス

ヒト色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum) は DNA 修復酵素の先天性異常によって高発がん性を示す常染色体劣性遺伝病である。紫外線暴露によって健常人の1000-2000倍の頻度で皮膚扁平上皮腫、がんが発生する^{31,32)}。遺伝子異常の差異によってA~Gの相補性群とバリエーションの8群がある。A群色素性乾皮症の原因遺伝子としてDNA除去修復遺伝子XPAが同定され³³⁾、ヌクレオチド除去修復に関与する遺伝子と考えられている。

そのDNA除去修復遺伝子を欠損させたXPAノックアウトマウス(XPA^{-/-})^{34,35)}の皮膚に紫外線(UV-B)を照射すると高頻度に皮膚扁平上皮がんが発生する。遺伝毒性発がん物質では7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)の塗布でも皮膚乳頭腫が発生する。非遺伝毒性発がん物質では、ペルオキシゾーム増生物質WY-14643は発がんするが同様物質のclofibrate、DEHPでは陰性であった。同様にphenacetinは陰性であった。またXPA^{-/-}とp53^{+/-}マウスとの交配種(XPA^{-/-}/p53^{+/-})との比較では、非遺伝毒性発がん物質の17-β-estradiolはXPA^{-/-}では陰性であるがXPA^{-/-}/p53^{+/-}では陽性を示した。非がん原性物質のmannitol、ampicillinは陰性であった。しかしながら現状では背景データがまだ少なく、実用には至っていない³⁶⁾。

3) トランスジェニックラット

ラットは、マウスよりも大型であり解析に必要な組織を採取するのに有利である。また、歴史的に化学発がん研究に多く用いられたために各臓器の前がん病変の生物学的解析がマウスより豊富に得られている。しかしながらマウスに比べてトランスジェニックラットの報告は少ない。その理由は、飼育に要する費用がマウスより高額となることが挙げられる。

⑤ ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラット (Hras128)

rasH2 マウスに導入したヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子を導入したラットであるが、種々の発がん物質に対し 10 週程度の短期間に乳腺がんが高頻度に発生する³⁷⁾。乳腺を標的とする物質のみならず、乳腺を標的としていない幾種かの発がん物質も乳腺がんを発生させることから、乳腺がんを指標として各種化学物質の発がん性を評価が可能と考えられている³⁸⁾。現状では遺伝毒性発がん物質で高い陽性結果が得られている。乳腺以外に、食道³⁹⁾、舌⁴⁰⁾、膀胱⁴¹⁾、皮膚等^{42,43)}においても高い発がん感受性が見られる。以上から、発がん性評価モデルへ応用できるが、既知の発がん物質による検証はまだ充分とは言えない。

表 Hras128 の発がん物質に対する乳腺発がん感受性

	発がん物質	+/-
Mammary carcinogen	methylnitrosourea (MNU)	+
	7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)	+
	2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)	+
	3-methyl-cholanthrene (3-MC)	+
	benzo[a]pyrene (B[a]P)	+
Non-mammary carcinogen	N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (DHPN)	+
	Anthracene	+
	Pyrene	-
	4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)	-
	2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)	+

2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)	+
azoxymethane (AOM)	+
diethylnitrosamine (DEN)	-
12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)	+
N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)	-
dimethylarsinic acid (DMA)	-

+,有意差有 ; -, 有意差無 (溶媒対照との比較)

⑥ SV40TAg トランスジェニックラット

腫瘍ウイルス SV40 の初期遺伝子からは、スプライシングパターンの異なる分子量 90kD の大型 T 抗原と 17kD の二種の小型 T 抗原が産生される。大型 T 抗原 (Large T antigen) は、がん抑制遺伝子である Rb や p53 等と結合し、小型 T 抗原は、蛋白ホスファターゼ 2A (PP2A) と相互作用してがん遺伝子として機能する。この SV40 T 抗原をラットに導入したトランスジェニックラットである。

肝臓に発現するようアルブミンプロモーターを用いた SV40 トランスジェニックラットは、4-9 ヶ月齢で 100%の頻度で肝細胞腺腫または肝細胞がんが発生する⁴⁴⁾。

さらに糖新生に関与するphosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) プロモーターを用いたSV40トランスジェニックラットは、T抗原が主に膵臓・脳に発現し、ラ氏島腫瘍が発生する⁴⁵⁾。前立腺を標的としてprobasinプロモーターを用いたSV40トランスジェニックラット (TRAMPラット) では、前立腺がんが高率に発生する⁴⁶⁾。このラットでは15週齢で100%の頻度でアンドロゲン依存性の前立腺がんを発生する。これらのラットを用いた既知の発がん物質による検証はまだ充分とは言えない。

3) 遺伝子操作動物による代替発がん試験法のまとめ

1997 年に開催された、第 4 回医薬品認可国際協調会議(International Conference on Harmonization of Technical Requirement for Registration of Pharmaceuticals for Human Use、ICH4)において、従来の 2 種類のげっ歯類 (ラットとマウス) での 104 週 (ラット) または 75 週 (マウス) の 1 種類のげっ歯類の長期発がん試験の実施に加えて、遺伝子改変動物を用いた短~中期発がん試験モデル (マウスについては 26 週間投与による中期試験)、およびイニシエーション・プロモーションモデル、さらに新生児動物モデルの中から一つの試験を実施してがん原性を評価することが認められた。また国際 NPO の環境保健科学研究所 (Health and Environmental Sciences

Institute, HESI) が主催して、1997～2001 年に、50 以上の日、米、欧の政府、大学、企業の研究施設が参画して、マウスにおいて 26 週の統一プロトコールによる評価試験が実施した。p53^{+/-}、rasH2、Tg.AC および XPA^{-/-} (ホモ型ノックアウト)、さらに新生仔マウス試験とハムスター胎仔細胞試験が加えられた。これらの結果は Toxicologic Pathology 誌特集号に rasH2 マウスと p53^{+/-} マウスが「acceptable」、Tg.AC マウスについては「limited usefulness」と報告している^{3,13,30,36})。以上の遺伝子改変モデルの長所・短所を下表にまとめる。

表 HESI の検証作業により明らかとなった問題点

モデル	問題点
rasH2	遺伝毒性発がん物質すべてが陽性ではない ホルモンに対して陽性結果が得られているが、そのメカニズムが不明
p53 ^{+/-}	遺伝毒性発がん物質すべてが陽性ではない 発がんした場合、メカニズムとして必ずしも p53 の変異・欠損が関与していない
Tg.AC	経口投与と経皮投与での結果が異なる 発がん感受性が高いといわれているが、必ずしもすべてを検出できない。発がんメカニズムが明確ではない
XPA ^{-/-}	検証試験の数が少なく、検証データ不足

HESIによる非遺伝毒性発癌物質に対する p53(+/-)マウスおよび rasH2マウスを用いた短期発がん性試験のまとめ

Chemical	P53(+/-)	rasH2
Nongenotoxic carcinogen		
Phenobarbital	Negative	Negative
Methapyrilene	Negative	Negative
Reserpine	Negative	Negative
Clofibrate	Negative	Positive
Dieldrin	Negative	Negative
Chloroform	Equivocal	Negative
Chlorpromazine	Negative	Negative
Metaproterenol	Negative	Negative
Diethylhexylphthalate/DEHP	Equivocal	Positive
Haloperidol	Negative	Negative
Sulfamethoxazole	Negative	Negative
Wy-14643	Negative	Positive
Cyclosporin A	Positive	Equivocal
Diethylstilbestrol	Positive	Positive
17β-Estradiol	Negative	Negative
Ethylene Thiourea	NA	Positive
Ethylacrylate	NA	Positive
1,1,2-Trichloroethane	NA	Negative
Nongenotoxic noncarcinogen		
Ampicillin	Negative	Negative
Sulfisoxazole	Negative	Negative
D-Mannitol	Negative	Negative

NA : Not applicable (LSHESI workshop, 2000)

2. 遺伝毒性物質の検出のための遺伝子改変動物モデル

Ames 試験等では検体は生体防御機構による代謝を経ることがない。そのために予め被検物質に肝ミクロソーム分画を加えて *in vitro* で代謝させることや一旦動物体内に入れて *in vivo* で代謝活性化を図る host mediated 方法が実施されている。こうした工夫によって代謝活性化の問題はある程度解決されたが、被検物質の遺伝毒性と発がん性の標的臓器についての情報は得られない。被検物質の生体内における遺伝子突然変異誘発性とその標的臓器の情報が得られるように、遺伝毒性の指標遺伝子を導入したトランスジェニックマウス/ラットモデルが考案されている。

① Big Blue マウス/ラット (Lambda/lacI 遺伝子導入マウス/ラット)

大腸菌の β-galactosidase の構造遺伝子 lacZ 遺伝子のリプレッサー遺伝子である lacI を導入した動物で、変異体 (lacI⁻) の検出にカラー・セレクション法を用いている⁴⁷⁾。この方法は検体組織の DNA を Lambda ファージにパッケージングし、これを E.coli に感染させた後に X-Gal プレートに播いて青色に発色した変異体プラークの数を算定する。この手法は煩雑なために、Lambda ファージのプラーク形成に関与する遺伝子の cII を用いて突然変異体をポジティブセレクションすることによって簡略化がなされている⁴⁸⁾。背景系統は、マウスは C57BL/6、B6C3F1、ラットは F344 である。

② Mutaマウス

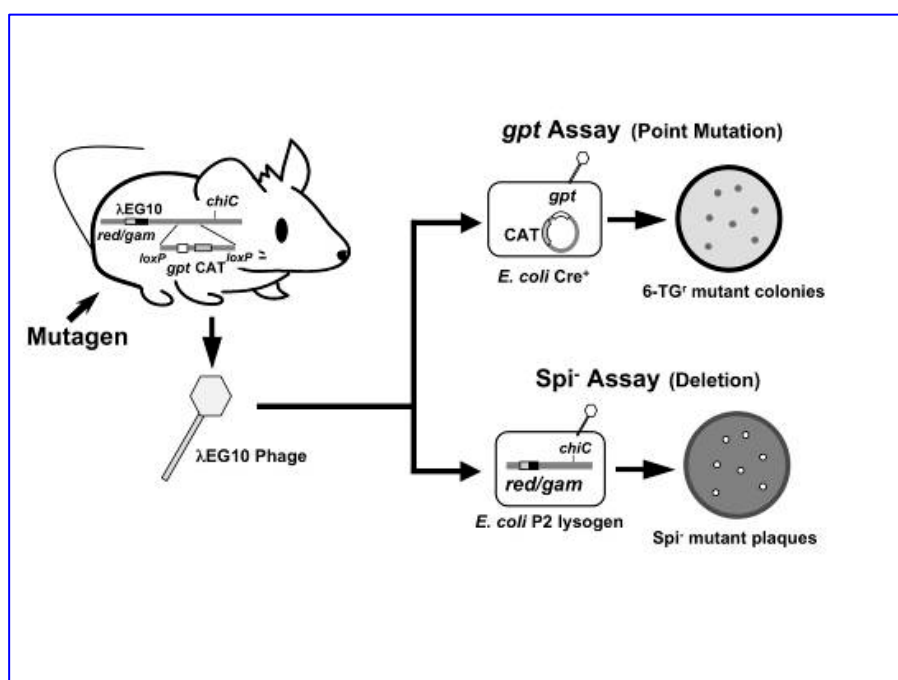
バクテリアファージの λ gt10遺伝子に、大腸菌の β -galactosidaseの構造遺伝子であるLacZ遺伝子を組み込んだ λ gt10 LacZベクターを導入したマウスである⁴⁹⁾。パッケージングしたファージ溶液を、*E. coli* C (lac^- , $galE^-$) 培養液と混合し吸着操作を行い、変異体の選択には、基質のphenyl- β -galactosidaseを含むLB培地に突然変異したlacZファージのみがプラークを形成する方法を用いる（ポジティブ・セレクション）⁵⁰⁾。全プラーク数はphenyl- β -galactosidaseを含まない培地で算出する。cIIを用いたポジティブセレクションも可能である⁵¹⁾。

③ gpt Δ （デルタ）マウス/ラット

Big Blue Mouse では、変異体(*lacI*)の検出に、カラー・セレクション法を用いているため手法が煩雑であるが、MutaMouse は変異体(*lacZ*)の検出はポジティブセレクションを用いるため手法は容易である。しかし、*lacZ* のコード領域が 3 kb もあって変異部位の同定には手間がかかり、放射線などによる欠失変異は検出しにくい。この欠点を改良するために、点突然変異検出レポーター遺伝子である大腸菌 *gpt* (guaninephosphoribosyltransferase) 遺伝子と、欠失変異検出用のレポーター遺伝子 λ ファージ *red/gam* 遺伝子を持つ λ EG10 を組み込んだトランスジェニックマウス *gpt Δ (C57BL6/J) が開発された⁵²⁾。マウスと同じ導入遺伝子 λ EG10 をもつ遺伝背景の異なる SD 系と F344 系トランスジェニックラットも開発されている^{53,54)}。*

この方法では、大腸菌 *gpt* 遺伝子をレポーターとする 6-thioguanine セレクションによって点突然変異（塩基置換変異とフレームシフト）を検出し（*Gpt* Assay）、 λ ファージの *red/gam* 遺伝子をレポーターとする *Spi*⁻セレクションでは欠失変異が検出できる（*Spi*⁻ Assay）。

図 *gpt Δ トランスジェニックマウス/ラットにおける変異体検出*



3. まとめ

遺伝子改変動物を用いた長期発がん試験に代る中・短期検索モデル、ならびに従来の *in vitro* 遺伝毒性検索法に替わる *in vivo* 遺伝毒性検索モデルについてまとめた。前者では特定の遺伝子断片 (DNA) を導入し作出したトランスジェニック動物 (マウス、ラット) や目的とする遺伝子を不活性化や欠失させたノックアウトマウスがあり、短期に発がんする形質を利用して rasH2 と p53^{+/-} マウスが実際に用いられるようになった。rasH2 マウスと同じ遺伝子をもつ Hras128 ラットは、動物を生きのまま観察出来る乳腺がんの発生を判定指標としているので便利では有るが、背景データが少ないために今後のデータの集積が課題である。遺伝毒性検出モデルは細菌等を用いる *in vitro* 試験と比べて標的臓器が特定出来るために有用性は極めて高いが、検出作業が煩雑であるために広く普及はしていない。これらの方法は、今後一層重要となると考えられるが、さらに利便性を考慮したモデルの作出が期待される。

參考論文

1. Saitoh A, Kimura M, Takahashi R, et al. Most tumors in transgenic mice with human c-Ha-ras gene contained somatically activated transgenes. *Oncogene*, 5: 1195-1200. 1990.
2. Ando K, Saitoh A, Hino O, et al. Chemically induced forestomach papillomas in transgenic mice carry mutant human c-Ha-ras transgenes. *Cancer Res*, 52: 978-982. 1992.
3. Usui T, Mutai M, Hisada S, et al. CB6F1-rasH2 mouse: overview of available data. *Toxicol Pathol*, 29 Suppl: 90-108. 2001.
4. Tamaoki N The rasH2 transgenic mouse: nature of the model and mechanistic studies on tumorigenesis. *Toxicol Pathol*, 29 Suppl: 81-89. 2001.
5. Yamamoto S, Urano K, Koizumi H, et al. Validation of transgenic mice carrying the human prototype c-Ha-ras gene as a bioassay model for rapid carcinogenicity testing. *Environ Health Perspect*, 106 Suppl 1: 57-69. 1998.
6. Yamamoto S, Urano K and Nomura T Validation of transgenic mice harboring the human prototype c-Ha-ras gene as a bioassay model for rapid carcinogenicity testing. *Toxicol Lett*, 102-103: 473-478. 1998.
7. Leder A, Kuo A, Cardiff RD, et al. v-Ha-ras transgene abrogates the initiation step in mouse skin tumorigenesis: effects of phorbol esters and retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 9178-9182. 1990.
8. Cannon RE, Spalding JW, Trempus CS, et al. Kinetics of wound-induced v-Ha-ras transgene expression and papilloma development in transgenic Tg.AC mice. *Mol Carcinog*, 20: 108-114. 1997.
9. Trempus CS, Mahler JF, Ananthaswamy HN, et al. Photocarcinogenesis and susceptibility to UV radiation in the v-Ha-ras transgenic Tg.AC mouse. *J Invest Dermatol*, 111: 445-451. 1998.
10. Hansen LA, Trempus CS, Mahler JF, et al. Association of tumor development with increased cellular proliferation and transgene overexpression, but not c-Ha-ras mutations, in v-Ha-ras transgenic Tg.AC mice. *Carcinogenesis*, 17: 1825-1833. 1996.
11. Cannon RE, Graves S, Spalding JW, et al. Oral administration of dimethylvinyl chloride increases frequency of forestomach papillomas in Tg.AC mice. *Mol Carcinog*, 29: 229-235. 2000.
12. Tennant RW, Spalding J and French JE Evaluation of transgenic mouse bioassays for identifying carcinogens and noncarcinogens. *Mutat Res*, 365:

- 119-127. 1996.
13. Eastin WC, Mennear JH, Tennant RW, et al. Tg.AC genetically altered mouse: assay working group overview of available data. *Toxicol Pathol*, 29 Suppl: 60-80. 2001.
 14. Buehr M, Meek S, Blair K, et al. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell*, 135: 1287-1298. 2008.
 15. Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, et al. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell*, 135: 1299-1310. 2008.
 16. Ueda S, Kawamata M, Teratani T, et al. Establishment of rat embryonic stem cells and making of chimera rats. *PLoS One*, 3: e2800. 2008.
 17. Takahashi K and Yamanaka S Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126: 663-676. 2006.
 18. Liao J, Cui C, Chen S, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell*, 4: 11-15. 2009.
 19. Li W, Wei W, Zhu S, et al. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell*, 4: 16-19. 2009.
 20. Zan Y, Haag JD, Chen KS, et al. Production of knockout rats using ENU mutagenesis and a yeast-based screening assay. *Nat Biotechnol*, 21: 645-651. 2003.
 21. Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, et al. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*, 325: 433. 2009.
 22. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, 356: 215-221. 1992.
 23. Tsukada T, Tomooka Y, Takai S, et al. Enhanced proliferative potential in culture of cells from p53-deficient mice. *Oncogene*, 8: 3313-3322. 1993.
 24. Purdie CA, Harrison DJ, Peter A, et al. Tumour incidence, spectrum and ploidy in mice with a large deletion in the p53 gene. *Oncogene*, 9: 603-609. 1994.
 25. Jacks T, Remington L, Williams BO, et al. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol*, 4: 1-7. 1994.
 26. Harvey M, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., et al. Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice. *Nat Genet*, 5: 225-229. 1993.

27. Harvey M, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., et al. Genetic background alters the spectrum of tumors that develop in p53-deficient mice. *FASEB J*, 7: 938-943. 1993.
28. Donehower LA, Harvey M, Vogel H, et al. Effects of genetic background on tumorigenesis in p53-deficient mice. *Mol Carcinog*, 14: 16-22. 1995.
29. Kuperwasser C, Hurlbut GD, Kittrell FS, et al. Development of spontaneous mammary tumors in BALB/c p53 heterozygous mice. A model for Li-Fraumeni syndrome. *Am J Pathol*, 157: 2151-2159. 2000.
30. Storer RD, French JE, Haseman J, et al. P53^{+/-} hemizygous knockout mouse: overview of available data. *Toxicol Pathol*, 29 Suppl: 30-50. 2001.
31. de Boer J and Hoeijmakers JH Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, 21: 453-460. 2000.
32. Berneburg M and Lehmann AR Xeroderma pigmentosum and related disorders: defects in DNA repair and transcription. *Adv Genet*, 43: 71-102. 2001.
33. Tanaka K, Miura N, Satokata I, et al. Analysis of a human DNA excision repair gene involved in group A xeroderma pigmentosum and containing a zinc-finger domain. *Nature*, 348: 73-76. 1990.
34. Nakane H, Takeuchi S, Yuba S, et al. High incidence of ultraviolet-B-or chemical-carcinogen-induced skin tumours in mice lacking the xeroderma pigmentosum group A gene. *Nature*, 377: 165-168. 1995.
35. de Vries A, van Oostrom CT, Hofhuis FM, et al. Increased susceptibility to ultraviolet-B and carcinogens of mice lacking the DNA excision repair gene XPA. *Nature*, 377: 169-173. 1995.
36. van Kreijl CF, McAnulty PA, Beems RB, et al. Xpa and Xpa/p53^{+/-} knockout mice: overview of available data. *Toxicol Pathol*, 29 Suppl: 117-127. 2001.
37. Asamoto M, Ochiya T, Toriyama-Baba H, et al. Transgenic rats carrying human c-Ha-ras proto-oncogenes are highly susceptible to N-methyl-N-nitrosourea mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21: 243-249. 2000.
38. Ohnishi T, Fukamachi K, Ohshima Y, et al. Possible application of human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats in a medium-term bioassay model for carcinogens. *Toxicol Pathol*, 35: 436-443. 2007.
39. Asamoto M, Toriyama-Baba H, Ohnishi T, et al. Transgenic rats carrying human c-Ha-ras proto-oncogene are highly susceptible to N-nitrosomethylbenzylamine induction of esophageal tumorigenesis. *Jpn J Cancer Res*, 93: 744-751. 2002.
40. Suzuki R, Kohno H, Suzui M, et al. An animal model for the rapid induction of

- tongue neoplasms in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats by 4-nitroquinoline 1-oxide: its potential use for preclinical chemoprevention studies. *Carcinogenesis*, 27: 619-630. 2006.
41. Ota T, Asamoto M, Toriyama-Baba H, et al. Transgenic rats carrying copies of the human c-Ha-ras proto-oncogene exhibit enhanced susceptibility to N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21: 1391-1396. 2000.
 42. Park CB, Fukamachi K, Takasuka N, et al. Rapid induction of skin and mammary tumors in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats by treatment with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene followed by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate. *Cancer Sci*, 95: 205-210. 2004.
 43. Tsuda H, Fukamachi K, Ohshima Y, et al. High susceptibility of human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats to carcinogenesis: a cancer-prone animal model. *Cancer Sci*, 96: 309-316. 2005.
 44. Hully JR, Su Y, Lohse JK, et al. Transgenic hepatocarcinogenesis in the rat. *Am J Pathol*, 145: 386-397. 1994.
 45. Haas MJ, Dragan YP, Hikita H, et al. Transgene expression and repression in transgenic rats bearing the phosphoenolpyruvate carboxykinase-simian virus 40 T antigen or the phosphoenolpyruvate carboxykinase-transforming growth factor-alpha constructs. *Am J Pathol*, 155: 183-192. 1999.
 46. Asamoto M, Hokaiwado N, Cho YM, et al. Prostate carcinomas developing in transgenic rats with SV40 T antigen expression under probasin promoter control are strictly androgen dependent. *Cancer Res*, 61: 4693-4700. 2001.
 47. Kohler SW, Provost GS, Fieck A, et al. Spectra of spontaneous and mutagen-induced mutations in the lacI gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 7958-7962. 1991.
 48. Jakubczak JL, Merlino G, French JE, et al. Analysis of genetic instability during mammary tumor progression using a novel selection-based assay for in vivo mutations in a bacteriophage lambda transgene target. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 9073-9078. 1996.
 49. Gossen JA, de Leeuw WJ, Tan CH, et al. Efficient rescue of integrated shuttle vectors from transgenic mice: a model for studying mutations in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86: 7971-7975. 1989.
 50. Dean SW and Myhr B Measurement of gene mutation in vivo using Muta Mouse and positive selection for lacZ- phage. *Mutagenesis*, 9: 183-185. 1994.

51. Swiger RR Just how does the cII selection system work in Muta Mouse? *Environ Mol Mutagen*, 37: 290-296. 2001.
52. Nohmi T, Kato M, Suzuki H, et al. A new transgenic mouse mutagenesis test system using Spi- and 6-thioguanine selections. *Environ Mol Mutagen*, 28: 465-470. 1996.
53. Hayashi H, Kondo H, Masumura K, et al. Novel transgenic rat for in vivo genotoxicity assays using 6-thioguanine and Spi- selection. *Environ Mol Mutagen*, 41: 253-259. 2003.
54. Toyoda-Hokaiwado N, Inoue T, Masumura K, et al. Integration of in vivo genotoxicity and short-term carcinogenicity assays using F344 gpt delta transgenic rats: in vivo mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene structural isomers. *Toxicol Sci*, 114: 71-78. 2010.