

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全性高度化推進研究事業

既存添加物等における遺伝毒性評価のための
戦略構築に関する研究

平成17年度 総括研究報告書

主任研究者 林 真

平成 18(2006)年 4 月

目 次

I.	総括研究報告書	
	既存添加物等における遺伝毒性評価のための戦略構築に関する研究	1
	林 真	
	(資料)	
	別添1 定例会議事録	21
	別添2 国際シンポジウム「環境因子, 特に遺伝毒性発がん物質の閾値: 安全と安心の接点を目指して」	26
II.	分担研究報告	
	1. 小核誘発性の低用量域での現実的(生物学的)な閾値に関する研究	36
	林 真	
	2. 天然物配糖体の変異原性の検出法の確立	45
	長尾 美奈子	
	3. DNA の酸化的損傷に関する検討	52
	葛西 宏	
	4. タール系食用色素の in vivo 遺伝毒性評価における投与形態の影響に 関する検討	56
	佐々木 有	
	5. 化学物質の遺伝毒性における生物学的閾値に関する研究	63
	太田 敏博	
	6. アカネ色素のラット腎臓および肝臓における不定期 DNA 合成試験	67
	田中 憲徳	
	7. ほ乳類培養細胞を用いる遺伝子突然変異誘発生に関する検討	75
	本間 正充	
	8. TG ラットを用いる in vivo 遺伝毒性試験に関する研究	82
	中嶋 圓	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	90
IV.	研究成果の刊行物・別刷	93

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
総括研究報告書

既存添加物等における遺伝毒性評価のための
戦略構築に関する研究

主任研究者 林 真（国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部 部長）

赤色2号をはじめとするタール系食用色素、アカネ色素、既存添加物であるコウジ酸、アクリルアミド等、食品添加物を始めとする食品関連物質に関する安全に対する関心が高まっている。特に発がん性の問題は、がんが死亡原因の第一位であるように、国民の健康にとって重大な関心事であり、既存添加物の安全性に関しても、最大の懸念は発がん性である。発がん性が認められた場合、その発生機序に遺伝毒性が関与するか否かによって、安全に対する重みが大きく異なるのが現状である。すなわち、発がんの発生機序が遺伝毒性である場合には閾値は存在しないものと見なされる一方、発がん機序が遺伝毒性でない場合には閾値の存在が仮定され、1日摂取許容量が設定される。遺伝毒性試験の結果を正しく「評価する基準」および「発がん性に繋がる事象か否か」を判定するための戦略が古くから議論されているが、確立されていないのが現状である。

閾値の問題を論ずる場合に、試験法の検出力が重要な要素となる。そこで、小核誘発性の統計学検出力が、観察細胞数を増加させることにより上昇することを、フローサイトメトリーを用い、解析細胞数を2,000個、20,000個、200,000個、1,000,000個の解析結果を基に考察した。また、実際のモデル化合物として colchicine (COL), mitomycin C (MMC) 及び1-β-D-arabinofuranosyl-cytosine (Ara-C) のフローサイトメトリーを用いた小核試験を実施し、低用量域での小核誘発頻度差が個体間のばらつきの範囲に入り、個体を「単位」として考えた場合、低用量域では誘発の差がない、すなわち閾値が存在することを明らかにした。

細菌を用いる復帰突然変異試験法で、食品関連の変異原であるヘテロサイクリックアミン類について、ヌクレオチド除去修復欠損 (uvrB) 変異株の TA98株とその野生株である TA1978P 株を用いて、フレームシフト突然変異の誘発用量を比較した。Trp-P-1, Trp-P-2, MeIQ について調べた結果、いずれの場合も DNA 修復欠損株で明らかに変異コロニーを誘発する用量、つまり DNA 損傷（付加体形成）により突然変異が生じる用量においても、正常な DNA 修復能をもつ株では変異コロニーの誘発が認められておらず、生物学的な閾値が存在することを示唆していた。

不飽和脂肪酸の過酸化反応によって生成する新規変異原物質4-oxo-2-hexenal (4-OHE) を加熱調理食品中から初めて検出した。食品1グラムあたり数十マイ

クログラムの4-OHEを含む場合もあり、ヒト発がんへの関与が注目される。

投与形態の違いが及ぼす *in vivo* コメットアッセイの結果への影響を検討した。赤色2号、赤色102号はいずれも1回の強制経口投与では結腸等で陽性であった。しかし、混水投与では1日の投与では陽性であったものの投与期間の延長（最大6日間）とともに陰性となる傾向にあった。一方、肝癌原性の DAB の場合、1回の強制経口投与では癌原性標的臓器の肝ではなく、消化管粘膜で陽性であった。混餌投与では1日の投与では全臓器で陰性、投与期間の延長（最大6日間）とともに肝で陽性となる傾向が、消化管粘膜では投与期間の延長と共に陰性となる傾向がみられた。このことから1週間程度の自由摂取による遺伝毒性のデータのほうが、1回の強制投与よりも癌原性試験の結果と乖離しない傾向にあると考えられる。

細菌を用いる復帰突然変異試験法で、食品関連の変異原であるヘテロサイクリックアミン類について、ヌクレオチド除去修復欠損 (*uvrB*) 変異株の TA98株とその野生株である TA1978P 株を用いて、フレームシフト突然変異の誘発用量を比較した。

Trp-P-1, Trp-P-2, MeIQ について調べた結果、いずれの場合も DNA 修復欠損株で明らかに変異コロニーを誘発する用量、つまり DNA 損傷（付加体形成）により突然変異が生じうる用量においても、正常な DNA 修復能をもつ株では変異コロニーの誘発が認められておらず、生物学的な閾値が存在することを示唆していた。

アカネ色素投与群では、投与3時間後の肝細胞および近位尿細管上皮細胞で UDS 誘発細胞の有意な増加が認められた。遠位尿細管では、有意な差はなかったものの、溶媒対照群より3倍強の出現があった。一方、投与6および24時間後では、肝細胞、近位尿細管上皮細胞および遠位尿細管上皮細胞ともに有意な差は認められず、経時的に減少した。以上のことから、アカネ色素投与により肝臓および腎臓組織において DNA に直接傷害を生じていることが示唆された。

既存添加物であるアカネ色素の遺伝毒性リスクの評価、比較のため、ヒト培養細胞 TK6を用いて、遺伝子突然変異誘発性、小核誘発性を検討した。アカネ色素は4.0 mg/ml までの用量で、突然変異、小核誘発とも陽性を示した。突然変異を2倍増加させる濃度 (DMFD) 2.88mg/ml であった。日本人が一日に摂取しうる可能性あるアカネ色素の量はその生産量から最大0.1mg/day と推定されており、これら計算されるの Human Exposure Genotoxic Potency (HEGEP)は、0.034であった。また、渋谷らの発がん性試験結果から計算される Human Exposure Rodent Potency (HERP)は0.00012であった。これらの値は、日常生活で暴露しうるピーナッツ類からのアフラトキシンや、焼けこげ食品

中の IQ のそれら値より、10分の1以下である。従って、日常生活において、これまでのようなアカネ色素の摂取がヒトの遺伝毒性、発がんリスクを特に増加させることはないと考えられる。

トランスジェニック (TG) ラット (Big Blue™Rat) を用いて標的臓器での遺伝子突然変異誘発性を検索した。混餌法による28日間の反復投与後に導入遺伝子 (シャトルベクター上の cII 遺伝子) の突然変異を解析した。アカネ色素投与による遺伝子突然変異頻度は、肝臓で陰性、腎臓では陽性との結果が得られており、これらについては既に報告されている。今回は、アカネ色素に直接暴露されている消化管のうち、小腸 (十二指腸) について同様の解析を実施した。その結果、アカネ色素による十二指腸での遺伝子突然変異頻度は媒体対照に比較し統計学的に有意な上昇は認められなかった。

分担研究者

長尾美奈子	共立薬科大学 客員教授
葛西 宏	産業医科大学・産業生態 科学研究所 教授
佐々木 有	八戸工業高等専門学校・ 物質工学科 教授
太田 敏博	東京薬科大学・生命科学 部 助教授
田中 憲徳	(財)食品薬品安全センター 秦野研究所遺伝毒性部長
本間 正充	国立医薬品食品衛生研究 所変異遺伝部第一室長
中嶋 圓	(財)食品農医薬品安全性 性評価センター・遺伝毒 性グループリーダー
協力研究者	
祖父尼俊雄	元国立医薬品食品衛生研 究所変異遺伝部 部長
能美 健彦	国立医薬品食品衛生研究 所変異遺伝部第二室長
森田 健	国立医薬品食品衛生研究 所安全情報部主任研究官
宇野 芳文	三菱ウエルファーマ株式会 社研究本部
浅野 哲秀	日東電工株式会社メディカ ル事業部安全性試験センタ ー

A. 研究目的

食品添加物をはじめとする食品関連物質の遺伝毒性試験結果を評価し、解釈するための統一的な戦略を構築することを目的とし、戦略構築のために不可欠なデータを新たな試験を実施することにより入手する。なお、構築された戦略を国際的なものとするため、海外の専門家を含めて議論し、最終結果を国際誌に発表することを最終目的とする。

遺伝毒性に関する試験法は数多く開発されており、手法の技術的な面に関しては国際的なガイドライン等により標準的なものが存在する。しかし、結果の評価、解釈に関しては国際的に合意されたものはもとより、国内で検討されたものも含め、標準となる戦略は確立されていない。従って、本研究において、国内の専門家集団である日本環境変異原学会の協力を得て、戦略を構築することは非常に有意義であり、かつ重

要であると考えられる。

戦略を構築する上で、もっとも重要な点の一つは、遺伝毒性の閾値に関する考え方であるとの認識の基、本プロジェクトの締めくくりの一環として、国際シンポジウム「環境因子、特に遺伝毒性発がん物質の閾値：安全と安心の接点を目指して」を2006年3月に神戸で開催した。これまでは、遺伝毒性発がん物質には閾値を仮定することは不可能であり、ADIの設定はできないとの考えが一般であり、議論すらあまりなされないのが現状である。しかし、今回のシンポジウムでは、遺伝毒性分野の研究者とがん研究の研究者が一堂に会し、閾値の問題を議論することができた。結論を得るには至らなかったが、議論を開始したことは重要であると考えた。

本年度は、昨年度に引き続き、会合を持ちこれまでに得られたデータを元に食品関連物質の安全性評価における遺伝毒性の考え方について議論した。また、これらの議論の中から新たに提出された疑問点を解決するため、実験を行い検証することを試みた。

最近の国際的な了解事項として、直接DNAに作用しない物質には閾値が存在すると考えられるようになってきた。今回、観察細胞数を増やした場合に統計学的な検出力がどのように推移するかを小核を持つ網赤血球のモデルとしてマラリア原虫感染マウス赤血球を用い、フローサイトメトリーにより1,000,000個まで解析し、その理論値と実測値の相関性を検討する。さらに作

用機作の異なる染色体切断物質 colchicine (COL), mitomycin C (MMC) 及び1-β-D-arabinofuranosyl- cytosine (Ara-C)について、フローサイトメトリーを用いた小核試験を実施し、検出感度を上げ、低用量域における小核誘発性について、現実的な閾値が統計学的に証明可能かどうかを検討した。

既存添加物の多くは植物由来であり、その結果、有効成分あるいは共存する成分が配糖体として存在することが考えられる。配糖体の多くは、ヒトの口中バクテリア¹⁾、ヒトやラットの小腸粘膜に存在するラクターゼ・フロリジンヒドロラーゼ²⁾や腸内細菌によりアグリコンとなり生体内に吸収され遺伝毒性をはじめ、種々の生理活性を示す。しかし、*in vitro*における遺伝毒性検出のために現在用いられている方法では、glycosidase 処理が義務付けられていない為、アグリコンにたとえ遺伝毒性が有っても、それが検出されないことが起こりうる。そこで、*in vitro* 遺伝毒性系に glycosidase 処理する過程を組み入れる方法の検討した。

不飽和度の高い脂質は過酸化を起こしやすく、過酸化脂質の多い食品の多量摂取は有害である。この脂質過酸化にする起因するDNA 損傷も広い意味での酸化的損傷と見ることができる。我々は最近、食品中に含まれる多価不飽和脂肪酸の酸化に伴って生じる新規変異原物質4-oxo-2-hexenal (4-OHE)を見出した。4-OHE をマウスに経口投与すると、消化管の組織を中心に DNA 付加体を生じる。4-OHE の摂取がヒトの健康に与える影響は大きいと考えられ、食品中の4-OHE 含量を調べた。

コメットアッセイに限らず *in vivo* 遺伝毒性試験は最大耐量に近い高用量で単回の強制投与で行われるのが一般的である。しかし、長期発癌試験では混餌または混水で長期の暴露が行われる。発癌性陰性を示したタール系食用色素の長期発癌試験は混餌または混水投与によって行われたものであり、遺伝毒性陽性を示したコメットアッセイは強制経口投与によるものである。そこで、投与形態の相違が結果の大きな乖離の一因となったか否かの検証を目的として、混水投与によるコメットアッセイによってタール系食用色素の遺伝毒性を改めて検討した。

閾値という概念にはいくつかの定義付けがなされているが、最近生物学的な閾値 (biological threshold) という考え方が提唱されている。これは DNA を直接標的とする物質が DNA と直接作用する場がありながら、最終的な影響 (例えば突然変異) の発現に必要とする全ての生物学的なプロセスが完遂できない (例えば DNA 修復メカニズムにより) 低用量域が存在する、という考え方である。

昨年度の本研究ではアルキル化剤など直接変異原について、野生株と DNA 修復欠損株との間での突然変異頻度を比較した。今年度は代謝活性化を必要とする間接変異原について、ヘテロサイクリックアミン類を用いて調べた。

化学物質等により損傷を受けた組織 DNA は、その後の修復過程において、一部は不定期 DNA 合成 (unscheduled DNA synthesis:UDS) により修復されることから、オートラジオグラフィ (ARG) により、

DNA 除去修復過程の指標である UDS を定量化して調べることが可能である。本実験では、アカネ色素投与によるラットの肝臓および腎臓における DNA 傷害の有無を確認するため、*in vivo* UDS 試験を実施した。

遺伝毒性のリスク評価 (比較) の手段として Human Exposure Genotoxic Potency (HEGEP) を提唱した。これは、発がん性評価のための Human Exposure Rodent Potency (HERP) を応用したものであり、多くに遺伝毒性物質の生活中でのリスクを相対的に知ることができる。本年度は、既存添加物としてこれまで我が国で長年使われてきた「アカネ色素」について試験を行い、その遺伝毒性の強さを比較すると共に、暴露量から考えたそれら物質の遺伝毒性の相対リスクを比較した。

アカネ色素の遺伝毒性に関しては *in vitro* 試験の Ames 試験で陽性、Rec-assay においても弱い陽性、*in vivo* 試験のマウス小核試験で陰性、さらにラットを用いた DNA 付加体試験において、腎臓、肝臓、消化管系で付加体が生じたとの報告がある。一方発がん性に関しては F344 系ラットを用いた 16 週間混餌投与の多臓器中期発がん性試験において、腫瘍の誘発促進は認められていないとの報告がある。しかしながら、最近 780 日間の反復投与による発がん性試験では統計学的に有意ではないものの肝臓と腎臓に腫瘍の増加が見られたとの報告がある。DNA 付加体が生じていること、複数の臓器で腫瘍の発生が増加していることから、メカニズムとして遺伝毒性に起因す

るかを検討するため、トランスジェニックラット (Big Blue™ Rat) を用い遺伝子突然変異誘発性の有無を検索した。

B. 研究方法

1) フローサイトメトリーを用いた解析方法：フローサイトメトリーによる解析は Litron Laboratories (NY, USA) の Mouse MicroFlow™ PLUS Kits を用いた。Mouse MicroFlow™ PLUS Kits のコントロール用リファレンス (biological standard) として kit に含まれているマラリア原虫感染マウス赤血球 (Mal) を、小核をもつ網赤血球のモデルとして用いた。正常マウス血液を用いて Mal を 1:1, 1:3, 1:7, 1:15, 1:31, 及び 1:63 に希釈し、フローサイトメトリーを用いて 1,000,000 個 (1M) まで解析を実施した。低用量域での小核の誘発性：被験物質として mitomycin C (MMC：協和発酵工業), 1-β-D-arabinofuranosylcytosine (Ara-C：メルク社) および colchicine (COL：シグマ社) を用いた。使用動物は日本チャールズリバー社から 5 週令の雄 CD-1 マウスを購入し、10 日間の馴化期間の後 7 週令で試験に用いた。1 群 5 匹のマウスを用い、Ara-C は 6.0 mg/Kg, MMC は 0.3 mg/Kg, Col は 0.8 mg/Kg を最高投与量に設定し、以下公比 $\sqrt{10}$ で段階希釈した。陰性対照群として Ara-C 及び Col には溶媒として用いた生理食塩水 (大塚製薬) を、MMC には注射用蒸留水 (大塚製薬) を用いた。投与経路は腹腔内投与とし、アクリジンオレンジ超生体染色法によるマニュアル観察により網赤血球 2000 個を観察し、小核を持つ網赤血球の頻度を求めた。さらに、フローサイトメ

トリー (FACS Calibur flow cytometer, BD Biosciences) を用いて解析した。

2) Hesperidinase は 0.45 mL の 10 mM クエン酸—20 mM 燐酸 2 ナトリウム (pH 4.0) に溶解し用いた。試験化合物を 50 μL の DMSO に溶解し、0.45 mL の Hesperidinase 溶液を加え、40°C で 2 時間インキュベートした後、20 μL の 30 mM NaOH で中和し、0.43 mL の DMSO を加えて変異原テストのサンプルとした。サルモネラ菌 TA100 および TA98 を用いて、preincubation 法により変異原性を検討した。

3) 食品 1 g を密栓できるガラス容器中で、2 ml の酢酸エチルエステルと混合し、4°C で 16 時間抽出した。抽出液を酢酸エチルエステルで 5 倍希釈した後、GC-MS により 4-OHE を定量した。

4) 赤色 2 号、赤色 102 号はいずれも水に溶かして用量 2000 mg/kg で 1 群 4 匹のマウスに 1 回強制経口投与した。DAB はオリーブオイルに溶解して用量 100 mg/kg で 1 群 4 匹のマウスに 1 回強制経口投与した。いずれの場合も投与容量は 10 mL/kg とした。投与の 3, 24 時間後に各個体から腺胃、結腸、肝、腎、膀胱、肺、脳、骨髄の 8 臓器を摘出し、コメットアッセイに供した。混水投与による実験では、赤色 2 号、赤色 102 号はいずれも 3—5% の 104 週間混餌投与で発癌性試験を元に用量を決定した。1, 2, 4, 6 日間の投与の後、各個体から腺胃、結腸、肝、腎、膀胱、肺、脳、骨髄の 8 臓器を摘出し、コメットアッセイに供した。

5) 変異原の Trp-P-1, Trp-P-2, MeIQ, およびは代謝活性化系 S9mix 調製のための S9 分画とコファクター混合液は和光純薬工業より購入し、変異原は dimethyl sulfoxide

(DMSO) に溶解させて用いた。試験菌株は DNA 修復遺伝子 (uvrB) の欠損以外については isogenic である *Salmonella typhimurium* TA1978P (pKM101): hisD3052, rfa, TA98 (pKM101): hisD3052, rfa, uvrB を用いた。復帰突然変異試験は通常の手法を用いて行い、各用量に2枚のプレート (対照群は6枚) を用い、2~3回の実験の平均値を求めた。

6) アカネ色素2000 mg/kg 単回経口投与し、投与3~24時間後に屠殺剖検した。屠殺30分前に18.5 MBq の3H-thymidine ([methyl-3H]-thymidine, PerkinElmer, Inc., specific activity: 2841 GBq/mmol, concentration 37.0 MBq/mL) を尾静脈内投与し、ペントバルビタール全身麻酔下で肝臓および腎臓を採取して、約1.5 μm の厚切り切片を作製し、マイクロオートラジオグラフィー標本を作製した。肝臓では小葉中間帯肝細胞、腎臓では近位尿細管上皮細胞および遠位尿細管上皮細胞の核内グレインをそれぞれ1切片あたり100細胞、動物あたり300細胞カウントし、UDS 誘発細胞 (バックグラウンドグレイン + 2SD 以上の核グレインを有する細胞) を計数した。

7) 被験物質としてアカネ色素を用いた。色素成分は、主成分として Ruberythric acid, Lucidin-3-O-primerveroside, および Alzarin をそれぞれ、34.4%, 53.0%, 12.7%を含む。色素含量は Ruberythric acid 換算で16.1%である。本品は生理食塩水に溶解後、速やかに試験に供した。In Vitro 遺伝毒性試験はヒトリンパ芽球細胞株 TK6を用い、試験検体で4時間処理後に細胞毒性(Relative Survival; RS)を、48時間後に小核試験、72時間後にチミジンキナーゼ(TK)遺伝子をタ

ーゲットした遺伝子突然変異試験を定法に従って行った。

8) アカネ色素 (Lot No. : 040723, 含量: Ruberythric acid 換算で16.85%) 並びにデキストリンを用い、トランスジェニック動物を用いて生体内での遺伝子突然変異誘発性を検討した。使用動物は4あるいは6週齢の雄 Big Blue™ Rat [F344] を Taconic 社 (Germantown, NY : 米国) より購入し、1週間の検疫・馴化ののち、5あるいは7週齢のラットを試験に用いた。被験物質添加飼料の調製は基礎飼料にアカネ色素を添加し数分間混和することにより調製した。投与方法および投与期間に関しては、多臓器中期発がん性試験での用量を参考にして決定した。アカネ色素1.0および5.0%の2用量について1群6匹のトランスジェニックラットを用い28日間の混餌投与を行った。最終投与3日後に各個体から腎臓、肝臓および十二指腸を摘出し、速やかに液体窒素で凍結した後、解析に用いた。各試験群の *cH* 遺伝子の突然変異頻度は条件付き二項検定 (Kastenbaum and Bowman の推計学的方法⁸⁾ : 有意水準上側 0.05)を用いて有意差を判定した。

(倫理面の配慮) : 本研究では実験動物としてラットを用いているが、動物の飼育および取り扱い等動物を使用するに際しては、「動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和48年10月1日法律第105号, 平成11年12月22日改正)」、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準 (昭和55年3月27日総理府告示第6号, 平成14年5月28日一部改正)」を順守しており、動物愛護上の配慮が十分にされている。また、本研究では、微生物、培

養細胞を用いた試験研究が多く、また、ヒト組織を利用した試験研究は行っていないので倫理上問題となることはない。

C. 研究結果

これまでに行ってきた検討会の議事録を別添1に参考資料として添付する。また、2006年3月に神戸で開催した国際シンポジウムの要旨を別添2に示す。

以下に、コウジ酸、アカネ色素等を用いた研究結果の概略を示す。詳細に関してはそれぞれの分担研究報告書を参照されたい。

1) フローサイトメトリーの検出力に関しては、観察細胞数2000個では理論値と実測値にはバラツキが多く相関性はやや低いが ($r^2=0.793$) , 20K ($r^2=0.942$) , 200K ($r^2=0.995$) , 1M ($r^2=0.998$)と観察細胞数の増加とともにバラツキは減少し、1Mでの相関係数は理論値と計算値がほぼ一致するほど改善された。次に、低用量域での小核の誘発性については、マニュアル観察での2K個の網赤血球の観察結果ならびにフローサイトメトリーでの2K, 20K, 200K, 1M個を解析した。その結果 MMC, Ara-C 及び COL の3つの化合物の最高投与量での P 値は0.01以下であった。マニュアル観察とフローサイトメトリーの解析結果とは同じような曲線を描き、また解析細胞数が増加につれマウス間のバラツキが減少することが示された。

2) Rutin および Isoquercitrin はいずれも Hesperidinase 処理によりはじめて変異原性が検出され、Hesperidinase の濃度依存的に活性は増加した。しかし、Rutin の場合、

10mg/mL では飽和に近い状態にあることが示された。

3) 加熱調理した魚（イワシ、サンマ、サバ、サケ）から多量の4-OHE が検出された。また、油炒めした野菜からも比較的多量の4-OHE が検出された。これに対して、調理した牛、豚、鶏肉からは4-OHE は検出されなかった。サンマ1匹を焼いたときに発生する煙を集めて分析したところ、31 μg の4-OHE が検出された。4-OHE に関しては、魚、野菜の加熱調理品から若干検出されたが、その量は4-OHE に比べて少量であった。

赤色2号と赤色102号において24時間の混水投与と強制一回経口投与の結果を比較した。強制経口投与では2000 mg/kg の一回投与3時間後に腺胃、結腸等で Migration の有意な増大がみられた。マウスの飲水の概日パターンを考慮すると、混水投与の場合の屠殺は摂水量の多い時間帯の3〜6時間後と推定された。すなわち、混水投与における食用色素の摂取から標本作製までの時間間隔は強制経口投与における投与と標本作製の時間間隔ほぼ同等と考えられる。混水投与では一日当たりの最大摂取用量が3125 mg/kg と強制経口投与の最高用量2000 mg/kg よりも高いにも関わらず、Migration の値は混水投与のほうが強制経口投与よりも低い傾向にあった。

DAB を560 ppm で混餌投与したときの摂取用量は114.4 mg/kg/day であり、強制経口投与の用量である100 mg/kg とほぼ同程度であった。なお、DAB を混餌投与したときも6日間の投与期間において体重の減少はみられなかった。DAB の強制投与では、一回投与後に腺胃、結腸、肝等で Migration の有意な増

大がみられた。DAB の混餌投与では、投与1日目に膀胱で Migration の増大がみられた。しかしながら、癌原性標的臓器である肝では投与1日目では Migration の有意な増大は見られず、投与期間の延長とともに Migration が増大する傾向がみられた。

4) Trp-P-1の TA98株および TA1978P 株に対する変異原性は、変異原性が認められない最大用量に両株で100倍の差があった。

Trp-P-2に関しては Trp-P-1と同様に、変異原性が認められない最大用量に両株で100倍の差があった。また、MeIQ の変異原性に関しては、変異原性が認められない最大用量に両株で50倍の差があった。

5) アカネ色素投与群では、投与3時間後の肝細胞および近位尿細管上皮細胞で UDS 誘発細胞の有意な増加が認められた (5% および1%水準)。遠位尿細管では、有意な差はなかったものの、溶媒対照群より3倍強の出現があった。一方、投与6および24時間後では、肝細胞、近位尿細管上皮細胞および遠位尿細管上皮細胞ともに有意な差は認められず、経時的に減少した。

6) アカネ色素の十二指腸における *cII* 遺伝子の突然変異頻度は、陰性対照群と比較していずれの投与群とも統計学的に有意な増加は認められなかった。

D. 健康危険情報

本研究は遺伝毒性の評価と解釈に関する戦略を構築しようとするもので、健康危険情報を報告しなければいけないようなデータはなかった。

E. 考察

化学物質の安全性評価において遺伝毒性に関する情報は、がん原性および次世代への遺伝的影響の予測において重要な役割を果たしている。遺伝毒性において最も重要な特徴は閾値がないとされていることであろう。この考えに基づき、我々は遺伝毒性物質、とりわけ意識的にさけることの出来るものおよび有用性が危険性を大きく上回らないものを排除すべきとの立場をとってきた。基本的には、医薬品のように有用性が認められる物質についても同様の考えに基づき安全性を評価してきた。がん原性物質であっても遺伝毒性が認められない場合には閾値を仮定することが出来、一日摂取許容量 (ADI) が設定可能であると考えてきた。一方、遺伝毒性メカニズムが原因であるがん原性物質に関しては閾値および ADI を設定することは出来ない、すなわち暴露が非常に低くても依然としてリスクを考えなければならないと考えてきた。

1) フローサイトメトリーによる検出力については、Mal を用いた段階希釈モデルで解析した結果、理論値と実測値が解析細胞を増やすことにより、相関性が飛躍的に上昇し、1M の解析細胞数では理論値と実測値がほぼ同一直線上にプロットされることがわかった。このことは、観察細胞数を多くすることにより、真の値により近づくことを意味していると考えられた。また、マニュアル観察による小核を持つ網赤血球の頻度がフローサイトメトリーによる解析結果より高めに観察されることが示された。これはマニュアルでは、顕微鏡下で網赤血球を Type I, II および III に分類される集

団を観察対象としているのに対し、フローサイトメトリーでは未成熟赤血球に発現する CD71陽性細胞を解析対象にするためによる差であると考えられた。フローサイトメトリーによる解析では2 K 細胞ではバラツキも大きく、むしろ20K 以上の細胞の解析が適当と考えられた。200K あるいは1M の解析において、細胞を「単位」として考えた場合には、ごく僅かな差でも統計学的には差があると結論できると考えられた。

しかしながら、1M もの細胞を解析した場合は、個体ごとのその値の分布は正規分布と仮定できた。すなわち個体を「単位」として考えた場合には、低用量域の小核の誘発頻度は個体ごとのバラツキの範囲に入ることが確認できた。DNA クロスリンク剤である MMC 及び DNA の代謝拮抗剤である Ara-C は低用量域での小核誘発性は個体間のバラツキの範囲であり、誘発性は認められなかった。一方、細胞分裂の際の紡錘体阻害作用を持つ COL は DNA に直接作用しないので、「閾値」があるとされていたが、本研究においても COL は低用量域では小核誘発性は認められず、「閾値」が存在することを再確認できた。すなわち DNA に直接作用する化学物質でも、低用量域において小核誘発性が個体間のバラツキの範囲に入ることが明らかになり、現実的（生物学的）な「閾値」と見なすことが可能であると考えられた。

2) 配糖体である Rutin および Isoquercitrin の変異原性は、Hesperidinase 処理によりはじめて検出され、Hesperidinase 処理は配糖体をアグリコンに変換するのに有用であることが確認された。さらに、平成16年まで既存添加物名簿に記

載されていたアカネ色素についても、Hesperidinase 処理により顕著な遺伝毒性の増加が確認された。アカネ色素の場合、アグリコンであるルシジンも含まれており、それに遺伝毒性があるため、Hesperidinase 処理を行わなくてもある程度の遺伝毒性が検出されたと考えられる。植物由来のサンプルではアグリコンあるいは配糖体で存在する割合はいろいろ異なることが考えられ、またその割合は抽出等精製濃縮過程で変化することが考えられる。実験過程もサンプルを Hesperidinase で前処理するのみであり、極めて簡単な手法であり、哺乳類細胞を用いたテスト系への応用もできる。従って、植物由来サンプルについては、Hesperidinase 処理による遺伝毒性の検出を追加するべきであると考えられる。

3) 本研究で初めて、4-OHE が食品中に含まれることを示した。4-OHE は、 ω -3 不飽和脂肪酸のモデル過酸化反応によって見出され、*Salmonella thphimurium* に対する変異原性や DNA に対する付加体生成が認められている。さらに、動物実験においてマウス消化管組織に DNA 付加体を形成することも分かっており、今回、ヒトが日常口にする食品中に検出されたことから、ヒト発がんへの関与が懸念される。4-OHE は ω -3 不飽和脂肪酸の酸化によって生成すると考えられ、事実 ω -3 不飽和脂肪酸を多く含む魚、野菜の加熱調理食品から多く検出された。その量は、加熱調理食品の代表的変異・発がん物質とされているヘテロサイクリックアミン類の1000倍近い。また、これまで脂質過酸化に伴って生成するアルデヒドとして、4-hydroxy-2-nonenal や 4-OHE が広く研究されてきた。しかし、

これらは ω -6不飽和脂肪酸から生成すると考えられ、食品中には少量しか存在しなかった。近年、 ω -3不飽和脂肪酸は、その抗酸化作用等から摂取が推奨されているが、一方では非常に酸化されやすい脂質でもある。今後4-OHE について、発がん性を含めヒトの健康への影響を慎重に調査する必要があると考える。

4) Azo 色素の遺伝毒性には腸内細菌による代謝が重要な役割を示すと考えられた。混水投与による投与期間の延長に伴う遺伝毒性の減弱は、このような代謝が投与期間の延長により変化する可能性を示すものとも考えられる。我々が食用色素に暴露される場合は、長期の混水・混餌投与の形態に類似するものである。このことから、今回の本研究の結果は急性的な投与での遺伝毒性陽性の結果をヒトに直接外挿して議論することができないことを示すものとも言える。Azo 色素の遺伝毒性に重要な役割を果たすと考えられる腸内細菌代謝には種によって大きな相違があると考えられた。そのため、マウスでみられたことがヒトで必ずみられるとは限らない。癌原性試験が陰性であっても、急性的な投与で遺伝毒性がみられることも事実であり、これらの食用色素の安全性評価にはヒトにおける代謝等の検討も必要であると考えられる。

5) 代表的な突然変異検出系である細菌を用いる復帰突然変異試験について、TA1975, TA1535 (uvrB) YG7104 (uvrB, ogt) を用い、アルキル化剤の突然変異誘発性を比較した。また、非アルキル化剤で塩基置換変異を誘発する変異原については、ヌクレオチド除去修復欠損株の TA1535 (uvrB) および WP2uvrA (uvrA) とそれらの野生株

である TA1975および WP2株を用いて、突然変異誘発性を比較した。一方、フレームシフト変異についてはTA1538 (uvrB) 株とその野生株である TA1978株で比較した。いずれの場合にも DNA 修復欠損株で明らかに変異コロニーを誘発する用量、つまり DNA の障害により突然変異が生じうる用量においても、正常な DNA 修復能をもつ株では変異コロニーの誘発が認められておらず、生物学的な閾値が存在することを示唆している。今後、このような考え方が細菌のみならず、他の生物種に拡大できる可能性について検討する必要があると考えられる。

6) 昨年度の本研究において、アカネ色素単回投与により、腎近位尿管上皮細胞の核の大小不同および肝臓では肝細胞のアポトーシスがいずれも投与後2~3時間の早期に認められた。一方、今回の実験では投与後6時間で UDS 誘発細胞の減少、投与24時間後には溶媒対照群と同程度となったことから、断片化された DNA 速やかに修復され、その後修復できない細胞はアポトーシスとして淘汰されるものと考えられた。アカネ色素のラットにおける発がんには、酸化ストレスが要因の1つとして関与していることが示されていることから、尿管上皮細胞あるいは肝細胞の DNA の断片化が引き起こされた後の組織内環境も重要な要因であると考えられる。

7) アカネ色素は主として、ハム・ソーセージ等の畜肉加工品、菓子類に使用される着色料である。日本では食品添加物としてその使用が認められていたが、米国および EU では認められていない。国内生産量は平成15年までで3~5トンであるとされて

いる。Amesらは、齧歯類発がん性試験で得られた、動物の半数にがんを引き起こす化学物質の濃度（TD50）で、その物質の1日推定摂取量を割った値を Human Exposure Rodent Carcinogenic Potency (HERP)として、発がんリスクを評価している。この値により、生活関連化学物質の相対的な発がんの危険性を推測できるほか、絶対値としての数字は、1が動物実験と同程度の暴露で半数にがんを引き起こす濃度と同等であるため、数値からその発がんの程度を推測することができる。アカネ色素の HARP に関しては以下のように計算できる。1日摂取量としては平成14年度の生産量5トンと、日本の人口12,700万人、365日、平均体重50kg から0.002mg/kg/day である。これは実際の摂取量よりはかなり多めの予想である。これより $HERP=(0.002/1661) \times 100=0.00012$ である。同様に遺伝毒性の相対リスクとして我々の提唱する Exposure Genotoxic Potency (HEGEP)を計算した。TK 突然変異を2倍増加させる濃度（DMFD）は2880ug/ml であり、1日平均摂取量を100ug/day とすると、 $HEGEP=100/2880=0.034$ となる。これらの値を他の食品から摂取する可能性のある発がん、遺伝毒性物質と比較すると、現在問題となっているポテトチップ等からのアクリルアミド、ピーナッツ等からのアフラトキシン、焼けこげ食品の IQ よりも1桁以上低い値である。従って、アカネ色素が遺伝毒性発がん物質であったとしても、日常生活において、これまでのようなアカネ色素の摂取がヒトの遺伝毒性、発がんリスクを特に増加させることはないと考えられる。現時点では、発がん物質が遺伝毒性を持つ

ことが明らかとなった場合、遺伝毒性物質には閾値がないという考えから、「暴露量をゼロにしない限り、健康リスクもゼロのならない」という理由で、使用を一切認めないという方策がとられてきた。遺伝毒性物質の閾値の有無に関しては議論のあるところであるが、その有無にこだわらず、発がん性、遺伝毒性を定量的にとらえ、他の化学物質のリスクと比較し、ランキング化することの方がリスク評価としては現実的であると考えられる。

8) アカネ色素が遺伝毒性を示す発がん性物質の可能性も示唆された。そこで今回、標的臓器での遺伝子突然変異が検出可能なトランスジェニック動物（Big Blue™ Rat）を用いて肝臓での遺伝子突然変異頻度を調べた。用量は発がん性試験で用いられた1.0および5.0%混餌投与とし28日間反復投与後3日間の休薬期間を設けた。

9) アカネ色素に直接暴露されると考えられる消化管のうち、今回は十二指腸について解析を実施した。高用量の5%群では、突然変異頻度が対照群に比較して僅かに上昇していたが、統計学的な有意差は認められなかったことから、最終的には陰性反応と判断した。小腸は発がんの標的臓器ではないことから、本結果は発がん性試験を補足しているものと考えられた。

F. 結論

食品関連物質の遺伝毒性の評価、解釈をするための戦略を構築するため、日本環境変異原学会の臨時作業委員会と共同し、研究班の統一的な考え方について検討を続けた。また、議論の途上で必要とされる実験

を行い、戦略構築のための基礎資料とした。目下、これらの新しく得たデータならびに議論の結果を論文として作成中である。

また、本年度に行った研究の結果から、次のような結論を導き出すことができた。

げっ歯類を用いる小核試験において、観察細胞数を増加させることにより、統計学的な検出力を高め、より真の値に近づくことが可能であることが確認できた。しかし、同時に観察細胞の母数が大きくなることにより個体ごとの小核誘発頻度の差は明確になるが、低用量域での小核誘発は個体間のバラツキの範囲に入り、低用量投与群間の小核誘発性に有意な差はないことが認められた。DNA と直接作用のない COL および、DNA に直接作用する MMC 及び Ara-C においても現実的な閾値が存在すると考えることのできる事実を確認できた。

植物由来のサンプルではアグリコンあるいは配糖体で存在する割合はいろいろ異なることが考えられ、またその割合は抽出等精製濃縮過程で変化することが考えられる。Hesperidinase で前処理が、配糖体をアグリコンに変換するのに有用であることが確認された。極めて簡単な手法であり、哺乳類細胞を用いたテスト系への応用も可能であり、植物由来サンプルについては、Hesperidinase 処理による遺伝毒性の検出を追加するべきであると考えられる。

脂質過酸化によって生成する新規変異原物質を加熱食品中に見出した。発がん性との関連が示唆され、さらに詳細な検討が必要である。

投与形態は *in vivo* 遺伝毒性試験の結果にはが重大な影響を及ぼすこと、1週間程度の自由摂取による遺伝毒性のデータのほう

が1回の強制投与よりも癌原性試験の結果と乖離しない傾向にあることが示唆された。

DNA を直接標的とする変異原物質について細菌を用いる復帰突然変異試験で、DNA 修復能の有無による突然変異誘発の違いを調べた。DNA 修復欠損株で明らかに変異コロニーを誘発する用量においても DNA 修復能をもつ野生株では変異コロニーの誘発が認められておらず、生物学的な閾値が存在すると考えられる。

アカネ色素投与により、肝臓および腎臓組織において DNA に直接傷害を生じていることが示唆された。

アカネ色素はヒト培養細胞 TK6において、遺伝子突然変異、小核試験で陽性反応を示した。突然変異を2倍増加させる濃度(DMFD)は2.88mg/ml であり、HEGEP は、0.034であった。この値は、日常生活において、アカネ色素の摂取がヒトの遺伝毒性、発がんリスクを特に増加させることはないことを示すものと考えられる。遺伝毒性のリスクを絶対的数値化によって評価することは困難であるが、他の化学物質との相対リスクを評価することは可能であり、日常的に避けられない発がん物質とのリスクの比較は、新たな発がん危険因子を許容できるか、否かを判断する上で、わかりやすい指標になるものと考えられる。

アカネ色素は十二指腸に対して遺伝子突然変異を誘発しないものと判断した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Agneta Rosengre, Linda Faxius, Noriho

- Tanaka, Mika Watanabe, Lars Magnus Bjursten, Comparison of implantation and cytotoxicity testing for initial toxic biomaterials, *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 75A Issue 1, 115-122 (2005)
- 2) Asada, S., K. Sasaki, N. Tanaka, K. Takeda, M. Hayashi and M. Umeda (2005) Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/c 3T3 cells (Bhas 42 cells), *Mutat. Res.*, 588, 7-21.
 - 3) Asada, S., Kiyoshi Sasaki, Norihiro Tanaka, Ken Takeda, Makoto Hayashi and Makoto Umeda, Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/c 3T3 Cells (Bhas 42 Cells), *Mutation Res.*, 588: 7-21 (2005)
 - 4) Asano, N., D. Torous, C. Tometsko, S. Dertinger, T. Morita and M. Hayashi (2006) Practical threshold for micronucleated reticulocyte induction observed for low doses of mitomycin C, Ara-C and colchicine, *Mutagenesis*, 21, 15-20.
 - 5) Fukuda H, Katahira M, Tanaka E, Enokizono Y, Tsuchiya N, Higuchi K, Nagao M, Nakagama H.. Unfolding of higher DNA structures formed by the d(CGG) triplet repeat by UPI protein. *Genes Cells*. 2005; 10: 953-62.
 - 6) H. Kasai, M. Maekawa, K. Kawai, K. Hachisuka, Y. Takahashi, H. Nakamura, R. Sawa, S. Matsui and T. Matsuda: 4-Oxo-2-hexenal, a mutagen formed by ω -3 fat peroxidation, causes DNA adduct formation in mouse organs. *Industrial Health*, 43, 699-701, 2005
 - 7) Hayashi, M. (2005) げっ歯類を用いる小核試験の基礎研究ならびにその行政面への応用, *Environ. Mutagen Res.*, 27, 13-20.
 - 8) Hayashi, M., E. Kamata, A. Hirose, M. Takahashi, T. Morita and M. Ema (2005) In silico assessment of chemical mutagenesis in comparison with results of Salmonella microsome assay on 909 chemicals, *Mutat. Res.*, 588, 129-135.
 - 9) Honma, M. Generation of loss of heterozygosity and its dependency on p53 status in human lymphoblastoid cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45, 162-176 (2005)
 - 10) Ishikawa S, Sasaki YF, Kawaguchi S, Michizuki M, Nagao M. Characterization of genotoxicity of kojic acid by mutagenicity in Salmonella and micronuclei induction in rodent liver. *Genes and Environ*. 2006, 28: 31-7.
 - 11) Kawai, K., K. Matsuno and H. Kasai: Detection of 4-oxo-2-hexenal, a novel mutagenic product of lipid peroxidation, in human diet and cooking vapor. *Mutation Research*, 603(2), 186-192, 2006
 - 12) Kitamura K, Nagao M, Hayatsu H, Morita M. Effect of chlorophyllin-chitosan on excretion of dioxins in a healthy man. *Environ Sci Technol*. 2005; 39 :1084-91.
 - 13) Kiyomi Ohmori, Makoto Umeda, Norihiro Tanaka, Hiroki Takagi, Isao Yoshimura, Kiyoshi Sasaki, Shin Asada, Ayako Sakai,

- Harumi Araki, Masumi Asakura, Hiroshi Baba, Youichi Fushiwaki, Shuichi Hamada, Nobuyui Kitou, Tetsuo Nakamura, Yoshiyuki Nakamura, Hidetoshi Oishi, Satoshi Sasaki, Sawako Ahimada, Toshiyuki Tsuchiya, Yoshifumi Uno, Masataka Washizuka, Satoshi Yajima, Yasuhito Yamamoto, Eiji Yamaura and Tomoko Yatsushiro: An inter-laboratory collaborative study by the Non-Genotoxic Carcinogen Study Group in Japan, on a cell transformation assay for tumour promoters using Bhas 42 cells, *ATLA* 33, 619-639 (2005)
- 14) Koyama, N., H. Sakamoto, M. Sakuraba, T. Koizumi, Y. Takashima, M. Hayashi, H. Matsufuji, K. Yamagata, M. Shuichi, N. Kinae and M. Honma (2006) Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells, *Mutat. Res.* 603, 151-158.
- 15) Kurihara, R., F. Shiraishi, N. Tanaka, S. Hashimoto, Presence and estrogenicity of anthracene derivatives in coastals Japanese waters, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 1984- 1993 (2005)
- 16) Maekawa, M., K. Kawai, Y. Takahashi, H. Nakamura, T. Watanabe, R. Sawa, K. Hachisuka, and H. Kasai: Identification of 4-Oxo-2-hexenal and Other Direct Mutagens Formed in Model Lipid Peroxidation Reactions as dGuo Adducts. *Chemical Research in Toxicology*, 19, 130-138, 2006
- 17) Matura-Eisaki, K., Sakamoto, H., Sofuni, T., Hayashi, M. and Honma, M. In vitro genotoxicity of inorganic arsenics and their genotoxic risk through food intake. *Environ. Mutat. Res.*, 27, 153-160 (2005)
- 18) Nakajima, M., S. Shimada, M. Nagai, F. Mizuhashi, C. Sugiyama, S. Masuda, M. Hayashi and N. Kinae (2005) 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone [MX] shows initiating and promoting activities in a two-stage BALB/c 3T3 cell transformation assay, *Mutagenesis*, 20, 375-379.
- 19) Ochiai M, Sugimura T, Nagao M. Modification of the 32P-postlabeling method to detect a single adduct species as a single spot. *Methods Mol Biol.* 2005, 291:13-19.
- 20) Sofuni, T., T. Nohmi, T. Ohta and M. Hayashi (2005) Genotoxicity : Is a threshold concept applicable to evaluate the mutagenic activity of DNA-targeting substances !? *Environ. Mutagen Res.*, 27, 61-73.
- 21) Suzuki, H., N. Ikeda, K. Kobayashi, Y. Terashima, Y. Shimada, T. Suzuki, T. Hagiwara, S. Hatakeyama, K. Nagaoka, J. Yoshida, Y. Saito, J. Tanaka and M. Hayashi (2005) Evaluation of liver and peripheral blood micronucleus assays with 9 chemicals using young rats: A study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS)—Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS), *Mutat. Res.*, 583, 133-145.
- 22) Torous, D., N. Asano, C. Tometsko, S. Sugunan, S. Dertinger, T. Morita and M.

- Hayashi (2006) Performance of flow cytometric analysis for the micronucleus assay—a reconstruction model using serial dilutions of malaria infected cells with normal mouse peripheral blood, *Mutagenesis*, 21, 11-13.
- 23) Watanabe-Akanuma, M. and T. Ohta, Inhibitory effects of NADH/NADPH in S9mix on photo-mutagenicity of thiabendazole following UVA-irradiation in *E. coli*. *Environ. Mutagen Res.*, 27, 7-12 (2005)
- 24) Watanabe-Akanuma, M., T. Ohta, and Y. F. Sasaki, A novel genotoxic aspect of thiabendazole as a photomutagen in bacteria and cultured human cells. *Toxicol. Lett.*, 158, 213-219 (2005)
- 25) 祖父尼俊雄, 能美健彦, 太田敏博, 林真, 遺伝毒性: DNA 直接作用物質に閾値は存在するののか, 環境変異原研究, 27, 61-73 (2005)
2. 学会発表
- 1) Asano, N., Dorothea Torous, Carol R. Tometsko, Stephen D. Dertinger, Takeshi Morita, and Makoto Hayashi: Low dose effects in the MNRetS induction by acridine orange supravital staining and flow cytometric methods, The 9th International Conference on Environmental Mutagens, San Francisco, 2005.
- 2) Dorothea Torous, Norihide Asano, Makoto Hayashi, Stephen Dertinger, Takeshi Morita, Carol Tomesko, and Siva Sugunan: Performance and power of flow cytometric micronucleus scoring, The 9th International Conference on Environmental Mutagens, San Francisco, 2005.
- 3) Hakura A., Oka H., Takasaki W., Sasaki YF., Suzuki S, Satoh T., and Honma M., Establishment of humanized in vitro genotoxicity test system: combined system using human cell lines and human S9. The 9th International Conference on Environmental Mutagens, San Francisco, 2005.
- 4) Hayashi, M.: Strategy for evaluation and interpretation of genotoxicity for food and related chemicals, The Int Conf Environ & Genet Damage, The 12th Congress of the CEMS (Chongqing, People's republic of China) , 中国重慶, 2005.
- 5) Honma M., Genotoxic risk assessment for synthetic and natural chemicals in foods. The 2nd international Conference on the Modernization of Traditional Chinese Medicine. (2005.9)
- 6) Honma M., Takashima Y., Sakuraba M., Koizumi T., Sakamoto H. and Hayashi M., Interallelic homologous recombination and target intergration induced by DNA double strand breaks. The 22nd Radiation Biology Center International Symposium. (2005.9)
- 7) Kawai, K., M. Maekawa, K. Hachisuka, M. Matsui, T. Matsuda and H. Kasai: 4-Oxo-2-Hexenal In Cooked Foods And DNA Adduct Formation In Mouse Organs After Oral Administration, 9th ICEM (San Francisco, U.S.A.) 2005
- 8) Koyama N., Sakamoto H., Sakuraba M., Koizumu T., Takashima Y., Hayashi M., Matsufuji H., Yamagata K., Masuda S.,

- Kinae N. and Honma M., Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. The 9th International Conference on Environmental Mutagens, San Francisco, 2005.
- 9) M. Maekawa, K. Kawai, K. Hachisuka, Y. Takahashi, H. Nakamura, R. Sawa and H. Kasai: Identification Of 4-Oxo-2-Hexenal As A dG Adduct In A Model Lipid Peroxidation Reaction And Its Mutagenicity To TA 100 And 104. 9th ICEM (San Francisco, U.S.A.) 2005.
- 10) Matsufuji, H., Inoue M., Chino M., Honma M., Hayashi M., and Yamagata K., Genotoxicity of quercetin in the presence of oxygen species and human liver S9 in human lymphoblastoid TK6 and WTK-1 cells. The 9th International Conference on Environmental Mutagens, San Francisco, 2005.
- 11) Neuwirth EAH, Honma M. and Grosovsky AJ., High frequencies of crossing-over associated with long tract gene conversion in human cells. The 9th International Conference on Environmental Mutagens, San Francisco, 2005.
- 12) Omori, K., M. Umeda, N. Tanaka, H. Takagi, I. Yoshimura, K. Sasaki, A. Sakai, H. Araki, M. Asakura, H. Baba, Y. Fushiwaki, S. Hamada, N. Kitou, T. Nakamura, Y. Nakamura, H. Oishi, S. Sasaki, S. Shimada, T. Tsuchiya, Y. Uno, M. Washizuka, S. Yajima, Y. Yamamoto, E. Yamamura and T. Yatsushiro: Inter-laboratory collaborative study of cell transformation assay for tumour promoters using Bhas 42 cells by non-genotoxic carcinogen study group in Japan, 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August, Berlin (Germany) 2005.
- 13) Takashima Y., Sakuraba M., Koizumi T., Sakamoto H. and Honma M., DNA double strand break repair and cells cycle in human lymphoblastoid cell line. The 9th International Conference on Environmental Mutagens, San Francisco, 2005.
- 14) Tanaka, N.: Current activities of alternative research in Japan, 1st International Forum on Laboratory Animal Science and Technology, Beijing (China), November 2005
- 15) Tanaka, N.: The Activity of JSAAE - past, present and future, 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August, Berlin (Germany) 2005
- 16) Umeda, M., Noriho Tanaka, Shin Asada, Kiyoshi Sasaki and Kumiko Hayashi: Detection of non-genotoxic carcinogens using ras-transfected Bhas 42 cells, 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August, Berlin (Germany) 2005
- 17) Wakuri, S., Y. Matsumoto, M. Hayashi and N. Tanaka: Application of in vitro alternative methods to ecotoxicology, 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August, Berlin (Germany) 2005
- 18) Yoshimura, I., T. Omori, Y. Ohno, M. Hoya, M. Mori, T. Doi, Y. Fujita, H. Itagaki, R. Kawabata, H. Kojima, S. Hasegawa, Y. Okamoto, N. Tanaka, K. Tanigawa and S. Wakuri: Validation study on the battery

- system for prediction of phototoxicity in Japan: The overview of the results, 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August, Berlin (Germany) 2005.
- 19) 河井一明, 前川宗之, 松井三郎, 松田知成, 高橋良和, 中村光, 澤竜一, 葛西宏 : 4-Oxo-2-hexenal as a novel lipid peroxide product: mutagenicity, DNA adduct formation and presence in human diet 日本環境変異原学会第34回大会(東京)平成17年11月
- 20) 河井一明, 前川宗之, 松田知成, 松井三郎, 葛西宏 : 過酸化脂質由来変異原によるマウス臓器 DNA 付加体の形成 第64回日本癌学会学術総会(札幌)平成17年9月
- 21) 広瀬明彦, 鎌田栄一, 高橋美加, 森田健, 江馬 眞, 林 真 : In silico 評価系を用いる化学物質遺伝毒性検出の戦略, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 22) 高島良生, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 坂本浩子, 林真, 本間正充 ヒト細胞における制限酵素によって切断された DNA二本鎖切断修復の細胞周期依存性 第28回日本分子生物学会(2005.12)
- 23) 高島良生, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 坂本浩子, 林 真, 本間正充 : ヒト細胞における DNA 二本鎖切断修復の細胞周期依存性, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 24) 山影康次, 高橋俊孝, 浅田晋, 田中憲穂 : In vitro 光染色体異常試験における各種照射条件とその影響, 日本動物実験代替法学会, 2005年12月, 伊勢原
- 25) 若栗忍, 大野泰雄, 田中憲穂 : 細胞毒性による in vivo 全身毒性の予測について-代謝活性化の導入および処理条件の検討-, 日本動物実験代替法学会, 2005年12月, 伊勢原
- 26) 松藤 寛, 井上真由美, 千野 誠, 本間正充, 林 真, 山形一雄 : ヒトリンパ芽球細胞 TK6を用いた抗酸化フラボノイド及びその酸化生成物の遺伝毒性, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 27) 森田 健, 祖父尼俊雄, 林 真, 田中憲穂, 中嶋 圓, 中西良文, 樋口政純, 石光 進, 小嶋 靖, 佐々木史歩, 森川馨 : GHS における生殖細胞変異原性物質の分類, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 28) 真田尚和, 坂本浩子, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 高島良生, 林 真, 本間正充 : P53に依存したスピンドルポイズンの in vitro 遺伝毒性, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 29) 浅田晋, 佐々木澄志, 田中憲穂, 梅田誠 : Bhas 42細胞を用いるイニシエーター/プロモーターの検出, 日本動物実験代替法学会, 2005年12月, 伊勢原
- 30) 浅野哲秀, D. Torous, S. Dertinger, C. Tometsko, 森田 健, 林 真 : AO およびフローサイトメトリーを用いた低用量域での小核誘発について, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 31) 前川宗之, 河井一明, 葛西宏 : 過酸化脂質モデル反応により生成する変異原・dG 付加体の構造 第64回日本癌学会学術総会(札幌)平成17年9月
- 32) 大森清美, 梅田誠, 田中憲穂, 高木弘毅, 吉村功, 佐々木澄志, 浅田晋, 酒井綾子, 浅倉真澄, 馬場博, 伏脇裕一, 浜田修一,