

- 鬼頭暢子, 中村哲, 中村好志, 大石英俊, 佐々木聡, 嶋田佐和子, 土屋敏行, 宇野芳文, 鷺塚昌隆, 矢嶋聡, 山下康人, 山村英二, 八城友子: 発ガン性プロモーター検出のための Bhas 42細胞を用いた細胞形質転換試験に関する共同研究結果について, 日本動物実験代替法学会, 2005年12月, 伊勢原
- 33) 中川ゆづき, 田中憲穂, : ラット FRSK 細胞を用いた *in vitro* 小核試験法, 日本動物実験代替法学会, 2005年12月 伊勢原
- 34) 長尾美奈子, Direct Genotoxic Carcinogen の閾値をリスク評価にどう取り入れるか International Symposium-Threshold of carcinogenicity and genotoxicity, 神戸, 2006.
- 35) 田中憲穂, 板垣宏, 若栗忍, 北垣雅人, 中川ゆづき: 単回投与毒性試験代替法の開発研究および皮膚モデルを用いる遺伝毒性試験法の開発研究, 日本動物実験代替法学会, 2005年12月, 伊勢原
- 36) 梅田誠, 佐々木澄志, 田中憲穂, : 発ガン性試験の代替法: ECVAM で Prevalidation Study の現状, 日本動物実験代替法学会, 2005年12月, 伊勢原
- 37) 北垣雅人, 若栗忍, 田中憲穂, 板垣宏: 急性毒性試験代替法の検討(3): 2施設間における Collagen Gel Assay を用いた急性毒性試験予測性の評価, 日本動物実験代替法学会, 2005年12月, 伊勢原
- 38) 本間正充 ヒト型遺伝毒性試験と, ヒト発がん性の予測 日本動物代替法学会第19回大会 (2006.12)
- 39) 本間正充, 高島良生, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 坂本浩子, 林真 DNA2本鎖切断によって誘発されるヒト細胞での相同組換え反応 第28回日本分子生物学会 (2005.12)
- 40) 本間正充, 高島良生, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 坂本浩子, 林真 DNA2本鎖切断によって誘発される相同染色体組換え, および遺伝子ターゲッティング 境変異原学会第34回大会 (2005.11)
- 41) 本間正充, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 高島良生, 坂本浩子, 林真: DNA2本鎖切断によって誘発される相同染色体間組み換え, および遺伝子ターゲッティング, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 42) 木本崇文, 坂本浩子, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 高島良生, 小林恒文, 笠原義典, 林真, 本間正充: ヒトリンパ芽球細胞 TK6 を用いたフラボノイド系サプリメント化合物の *in vivo* 遺伝毒, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 43) 林真, 鎌田栄一, 広瀬明彦, 高橋美加, 森田健, 江馬真: 化学物質の安全性評価における(Q)SAR の利用, 日本動物実験代替法学会第19回大会, 2005
- 44) 林真, 鎌田栄一: 化学物質安全性評価の為のカテゴリーアプローチ, 第一回カテゴリーシンポジウム, 東京, 2005.
- 45) 林真: Ames 試験の結果を *in silico* でいかに予測出来るか, またその精度は?, MMS 研究会セミナー, 東京, 2005.
- 46) 林真: 毒性病理学に期待する- 遺伝毒性の立場から -, 第21回毒性病理学会, 浜松, 2005.
- 47) 鈴木洋, 小川いづみ, 寺島ゆかり, 島田康, 齋藤由希子, 田中仁, 林真: 幼若ラット肝細胞小核試験: 系統差の検討, 第34回日本環境変異原学会, 東

- 京, 2005.
- 48) 和田昌憲, 本郷有克, 若栗忍, 石川陽一, 梅田誠, 田中憲穂: 培地中グルコースの消費を指標とする毒性評価法の応用, 日本動物実験代替法学会, 2005年12月, 伊勢原
- 49) 欒洋, 本間正充, スレッシュユテイルパッテイー, 小木美恵子, 山口照英, 鈴木孝昌 CGH および SNP アレイを用いた染色体解析 日本環境変異原学会第34回大会 (2005.11)

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 別 添 1

日本環境変異原学会臨時委員会  
「食品および食品添加物等に関する遺伝毒性の検出・評価・解釈」  
厚生労働科学研究費  
「食品添加物等の遺伝毒性検出の戦略に関する研究」

### 第 22 回検討会議事録

2005 年 6 月 17 日(金) 21:00～24:00, 6 月 19 日(日) 9:00～11:00  
定山溪ホテル鹿の湯会議室および支笏湖観光ホテル湖水館

参加者：林，長尾，祖父尼，田中，森田，本間，中嶋，浅野，宇野（議事録）  
欠席者：能美，葛西，太田，布柴，佐々木

#### 1. 次年度研究計画（林委員長）

- ・ 今年度の研究計画が提案され，内容および各試験分担について議論した。
- ・ 今年度は最終年度となるので，ポジションペーパーを作成する。著者等どのような形にするかは今後協議したい。また，コンサルテーションミーティングの可能性についても考えたい。

#### 2. MMS 研究会第 47 回パネルディスカッションを受けて

- ・ 昨晚開催された「食の安全・安心における遺伝毒性試験のかかわりー遺伝毒性試験はどのような寄与が可能か？」と題するパネルディスカッションを受けて，遺伝毒性の役割，本委員会で今後議論すべき事項などについて討論した。
- ・ なお，パネルディスカッションに関しては，別添参照。

文責：宇野芳文

日本環境変異原学会臨時委員会  
「食品および食品添加物等に関する遺伝毒性の検出・評価・解釈」  
厚生労働科学研究費  
「食品添加物等の遺伝毒性検出の戦略に関する研究」

第 23 回拡大検討会議事録

2005 年 11 月 21 日(月) 14:00～17:00

新高輪プリンスホテル 2120 室

参加者：林，祖父尼，森田，中嶋，太田，佐々木，宇野（議事録）

欠席者：長尾，田中，本間，浅野，能美，葛西，布柴，

1. 平成 17 年度研究の進捗状況と最終報告書の作成について（林委員長）

研究成果見込み概要の提出締め切りが 12 月 15 日なので，今年度の成果と 3 年間の総括(今年度は最終年度のため)を提出願いたい(田中班員からは入手済)。

2. コウジ酸に関する最新情報について（林委員長）

医薬部外品(化粧品など)としての使用禁止が解除された(11 月 2 日)。ヒトの経皮吸収性が極めて低いことが判明し，これが解除の主たる理由。遺伝毒性に関しては，3%塗布におけるマウス皮膚小核試験での陰性結果もあって，健康被害に繋がる重大な影響はないと判断。

3. 国際シンポジウム「環境因子，特に遺伝毒性癌原物質の閾値：安全と安心の接点を目指して」について（林委員長）

2006 年 3 月 15-16 日に神戸国際会議場で開催。本検討会からは林委員長，長尾副委員長，祖父尼委員の 3 名が講演予定。海外からも演者(遺伝毒性分野では J. Parry, V. Thybout, D. Kirkland)を招く。このときに本検討会(班会議)も兼ねる予定。MMS, BMS 研究会に後援を打診することにした。

4. 食品健康影響評価技術研究委託研究「化学物質の発がんリスクの評価に関する研究領域」について（林委員長）

津田先生が班長で今年からスタート。班員として，本検討会のメンバーからは林委員長，太田班員が参画。第一回班会議が 2005 年 11 月 14 日に開催。そのときに林委員長が報告した内容につき紹介がなされた(添付ファイル参照)。

#### 5. Position paper について（林委員長）

今年度は最終年度となるので、とにかくポジションペーパーを作成する必要がある。著者等どのような形にするかは今後協議したい（とりあえず関係者全員の共著とするが、強制はしない）。なお、林委員長が早急にドラフティングし、全員で強化、添削する。森田委員に、国際的な状況に関するまとめのドラフティングをお願いする。目標は年度末までに投稿すること。

#### 6. 今後の予定

この研究班は3月末までで、3月15、16日に神戸での国際シンポジウムにあわせて最終の班会議を行う。同様の課題で継続の可能性もあるが、主任研究者は交代する予定（能美委員）。

文責：宇野芳文

日本環境変異原学会臨時委員会  
「食品および食品添加物等に関する遺伝毒性の検出・評価・解釈」  
厚生労働科学研究費  
「食品添加物等の遺伝毒性検出の戦略に関する研究」

第 24 回拡大検討会議事録

2006年3月14日（火）17:00～19:00 および16日（木）12:30～13:30  
神戸国際会議場国際会議室 301 控室

参加者：林，長尾，田中，中嶋，能美，本間，佐々木，祖父尼，宇野，浅野，  
森田（議事録）

欠席者：太田，布柴，葛西

1. 国際シンポジウム「環境因子，特に遺伝毒性癌原物質の閾値：安全と安心の接点を  
目指して」について

林委員長より，明日からこの神戸国際会議場で開催される表記国際シンポジウムについて，厚生労働科学研究費「食品添加物等の遺伝毒性検出の戦略に関する研究」の締めくくりとしての位置づけにもあることが説明された．このシンポジウムの目的は，「発がん物質の中で，特に遺伝毒性発がん物質には閾値はないという概念が一般的で，ADIやTDIを設定することはできないという考えのもと，リスクアセスメント，リスクマネージメント，さらにリスクコミュニケーションが行われてきている．遺伝毒性発がん物質は天然に存在し，大気や飲料水中にも存在する．食品の調理過程においても生成されるし，我々の体内においても生成される．場合によっては，医薬品として摂取することもある．そこで，遺伝毒性発がん物質の閾値問題に一定の結論を出し，天然物と人工的に合成された発がん物質，回避できるものと回避できないもの等について整理し，ハザードとリスクの意味を正確に理解する必要がある．」にあり，本検討班の目的にも合致している．加えて，本シンポジウムには本検討班からも，祖父尼委員が「DNA直接作用変異原の閾値」，林委員長が「遺伝毒性の閾値を考える」，長尾副委員長が「閾値概念をリスク評価にどう取り入れるか」，さらに，一昨年 of 鎌倉会議に招聘した海外コンサルタントでもある Dr. Kirkland が”Investigation into potential thresholds of genotoxic activity”ならびに”Is it possible to obtain convincing evidence of threshold mechanisms of genotoxicity in vitro?”，Dr. Thybaud が”Relevance and follow-up of positive results in the in vitro genotoxicity tests: importance of threshold mechanisms”と題する講演を行う．その他，発がん性に関する閾値の世界的研究者も多く参加されているので，積極的な議論をお願いしたい．

## 2. Position paper について

林委員長より、現在 position paper はまとめの最終段階にはいりつつあることが説明された。最終化について議論され、本シンポジウムの内容も必要に応じ組入れること、モデル化合物としてのデータ提示はコウジ酸にしぼるのが適当、既公表を避ける観点から position paper 案は総括報告書に入れないほうがよい、などの意見がだされた。Position paper 案を回覧し、再度つめることとした。

## 3. 平成 17 年度研究の最終報告書の作成について

林委員長より、平成 17 年度研究の最終報告書の作成について 3 月末までにまとめる必要があり、分担研究者は適宜報告書を作成/送付するよう要請がなされた。

## 4. その他

今後の予定について、本検討課題が継続される場合には、本研究班はそのまま維持する予定であるが、主任研究者は能美委員に交代することが了承された。

文責：森田 健

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:安全と安心の接点を目指して」  
2006年3月15-16日  
神戸国際会議場

プログラム

【3月15日】

10:00 会長挨拶(開会の辞)

林 真(国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部)

10:10-12:10 シンポジウム1 (国際会議室301)

座長: 小西陽一(国際毒性病理学会連合)

S1-1 遺伝毒性発がん物質の閾値とその要因

西川秋佳(国立医薬品食品衛生研究所病理部)

S1-2 発がん物質の閾値の存在

福島昭治(大阪市立大学大学院医学研究科都市環境病理学)

S1-3 ラット肝における化学発がん性の閾値

アラン ジェフリー(ニューヨーク医科大学, アメリカ)

13:40-15:40 シンポジウム2 (国際会議室301)

座長: 長尾美奈子(共立薬科大学)

S2-1 DNA直接作用変異原の閾値

祖父尼俊雄(元国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部)

S2-2 遺伝毒性の閾値を考える

林 真(国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部)

S2-3 遺伝毒性に閾値は存在するか

ジム パリー(ウェールズスワンシー大学, イギリス)

16:00-18:00 シンポジウム3 (国際会議室301)

座長: 北川知行(癌研究会癌研究所)

S3-1 食品安全委員会の役割と機能

寺田雅昭(内閣府 食品安全委員会)

S3-2 -食品の安全・安心-消費者意識の変化と専門家への期待

神田敏子(全国消費者団体連絡会)



- S3-3 食品中の化学物質に関するリスクマネジメントについて  
伏見 環(厚生労働省医薬食品局基準審査課)

【3月16日】

9:00-10:20 シンポジウム4 (国際会議室301)

座長: 白井智之(名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学)

- S4-1 放射線とエチルニトロソウレアの複合影響の線量依存性  
-閾値, 相乗効果とその分子学的機構解明-  
島田義也(放射線医学総合研究所 低線量生体影響プロジェクト)

- S4-2 がん因子の作用の多様性と閾値の問題  
北川知行(癌研究会癌研究所)

10:40-12:00 シンポジウム5 (国際会議室301)

座長: 祖父尼俊雄(元国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部)

- S5-1 白血球 DNA 付加体による発がん物質暴露評価  
市場正良(佐賀大学医学部社会医学講座)

- S5-2 発がん性およびDNA付加体の用量-反応曲線  
ウィリアム ワデル(ルイヴィル大学, アメリカ)

13:30-15:30 シンポジウム6 (国際会議室301)

座長: 林 真(国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部)

- S6-1 In vitro において遺伝毒性に閾値があることを示す説得力のある  
証拠の入手は可能か?  
デービッド カークランド(株式会社コバンス研究所, イギリス)

- S6-2 In vitro 遺伝毒性試験における陽性結果の妥当性とそのフォローアップ:  
閾値メカニズムの重要性  
ベロニク チボー(アヴェンティスファーマ, フランス)

- S6-3 閾値概念をリスク評価にどう取り入れるか  
長尾美奈子(共立薬科大学)

15:30 会長挨拶(閉会の辞)

福島昭治(大阪市立大学大学院医学研究科都市環境病理学)

シンポジウム2と6の抄録を掲載

## DNA 直接作用変異原の閾値

祖父尼 俊雄

元国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

DNA を直接標的とする変異原の安全性評価において「生物学的な(あるいは真の)閾値 (biological (or real) threshold)」という考え方が適用できるかどうかは重要な課題である。この考え方は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(例えば修復メカニズムにより)低用量域が存在する、というものである。この問題について細菌を用いる復帰突然変異試験を用いて、DNA 修復欠損株と野生株における突然変異誘発性を比較することにより検討を行った。使用菌株は *S. typhimurium* の *O*<sup>6</sup>-methylguanine methyltransferase 欠損株 ( $\Delta og_{ST}$ ,  $\Delta ada_{ST}$ ), ヌクレオチド除去修復欠損株 ( $\Delta uvrB$ ), 8-hydroxyguanine (8-OH-G) DNA glycosylase 欠損株 ( $\Delta mutM_{ST}$ ), 並びに *E. coli* のヌクレオチド除去修復欠損株 ( $\Delta uvrA$ ) で、20 種類の変異原について検討した。

MNNG, ENNG, EMS, ENU, DMN, DEN のようなアルキル化剤においては、YG7108 ( $\Delta og_{ST}$ ,  $\Delta ada_{ST}$ ) および YG7113 (pKM101 を有する YG7108) がその野生株である TA1535 および TA100 (pKM101 を有する TA1535) に比べてそれぞれより強い変異原活性を示した。MNNG では、YG7108 は 0.00025~0.25  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の用量域において陰性対照の 2~100 倍の変異コロニー数を誘発したが、TA1535 は同じ用量域で陰性対照と同等の値を示し、0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$  よりようやく変異コロニー数の増加傾向がみられ、突然変異を誘発する最低用量には 2,000 倍程の違いがみられた。一方、4-NQO, AF-2, 2-NF, MX のような非アルキル化剤においては YG7113 と TA100 との間に明らかな差異はみられなかった。4-NQO, 2-NF および MX について TA1535 ( $\Delta uvrB$ ), TA1538 ( $\Delta uvrB$ ), WP2 *uvrA* ( $\Delta uvrA$ ) とそれらの野生株 TA1995, TA1998, WP2 とで比較すると、突然変異誘発最低用量に明らかな差異 (30~60 倍程度) がみられた。4-NQO について YG3002 ( $\Delta mutM_{ST}$ ) とその野生株 TA1975 とで比較すると 10 倍程度の違いがみられたが、過酸化水素等の酸化的損傷変異原では違いがあるものの 10 倍以下であった。

本研究により、修復欠損株において明らかに突然変異が誘発される用量においても、正常な DNA 修復系をもつ野生株では突然変異の誘発が認められていないことが判明した。この結果は DNA を直接標的とする変異原においても突然変異の誘発がみられない「生物学的な閾値」が存在することを示唆している。

### Biological threshold in DNA-targeting mutagens

Toshio Sofuni

Formerly Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences,

1-18-1 Kamiyoga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan

The concept of a “biological (or real) threshold” is attracting interest as an evaluation criterion for the mutagenic activity of DNA-targeting mutagens. This concept is defined here as “a concentration of a chemical which does not produce any damage through its inability to perform the necessary biochemical reactions, even though present at the target in finite amount”. To clarify whether this criterion is indeed applicable to DNA-targeting mutagens, we re-evaluated the mutagenic responses of 20 test compounds using DNA repair-deficient bacterial strains, such as *S. typhimurium* strains lacking the *O*<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase genes (*ada*<sub>ST</sub> and *ogt*<sub>ST</sub>), the nucleotide excision repair gene (*uvrB*) or the 8-hydroxyguanine DNA glycosylase gene (*mutM*<sub>ST</sub>), and *E. coli* strains lacking the nucleotide excision repair gene

(*uvrA*).

All the alkylating agents, such as MNNG, ENNG, EMS, ENU, DMN and DEN, exhibited more sensible mutagenic responses in strains YG7108 ( $\Delta da_{ST}$ ,  $\Delta og_{ST}$ ) and YG7113 (YG7108 containing pKM101) than in the parental strains TA1535 and TA100 (TA1535 containing pKM101), respectively. Upon applying MNNG, YG7108 showed about 2–100 fold increase in the number of revertants above the spontaneous level over the range of 0.00025–0.25  $\mu\text{g}/\text{plate}$ , whereas TA1535 did not show any significant increase in the number of revertants over the same dose range, though an increasing tendency of the number of revertants was observed at 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$  or above. This indicates an approximate 2,000-fold difference at the mutagenic concentration level between the wild-type and the repair-deficient strains. On the other hand, non-alkylating agents, such as 4-NQO, AF-2, 2-NF and MX, did not show any differences in the dose-response relationships between YG7113 and TA100. When non-alkylating agents, such as 4-NQO, 2-NF and MX, were applied to TA1535 ( $\Delta uvrB$ ), TA1538 ( $\Delta uvrB$ ) and WP2*uvrA* ( $\Delta uvrA$ ), clearly different mutagenic responses, i.e. about 30- to 60-fold, were observed between the repair-deficient and the parental strains (TA1995, TA1998 and WP2, respectively). 4-NQO showed different mutagenic responses between YG3002 ( $\Delta mut_{MST}$ ) and TA1975 (about 10-fold), though the application of other oxidative agents such as hydrogen peroxide resulted in less than 10-fold differences.

The present results indicate that the wild-type strains having normal repair capacity show no gene mutation induction at the concentrations at which gene mutations are clearly induced in the repair-deficient strains through DNA damage. Thus, the present results suggest the existence of a “biological threshold” below which no mutagenic response is induced by DNA-targeting mutagens.

## 遺伝毒性の閾値を考える

林 真

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部  
〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

先進諸国においては数万から十萬種類の化学物質が我々の身の回りに存在すると言われて  
いる。それらの安全性を評価する一環として、遺伝毒性、変異原性の評価が行われている。変  
異原性の評価が導入された当初においては、変異原性があるもの、すなわちがん原物質との  
図式があった。その後データの蓄積に伴い、短絡的な考えは無くなってきたが、「遺伝毒性に  
閾値はない」との考えから、遺伝毒性を有するがん原物質に閾値を仮定することはできないの  
で、摂取許容量の設定はできない、との考えが一般的に支持されている。最近では、国際的  
な了解事項として、DNA に直接作用するものには閾値は存在しないが、DNA に直接作用し  
ないような遺伝毒性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。

化学物質の安全性評価においては、理論的・科学的な評価が重要であることは勿論であるが、  
現実的な考えも取り入れる必要があると考える。ある量での暴露が明らかであるにもかかわらず、  
変異原性が認められない用量を現実的な閾値と考えると、DNA 直接傷害性物質にも現  
実的な閾値が存在することを示す情報が蓄積されつつあるが、十分な検出感度を持つ試験が  
なされたかが問われる。試験の感度は統計学的には指標を解析する細胞数に依存することが  
知られている(数多く解析すれば感度が上がる)。染色体異常誘発性の指標となる小核誘発  
の作用機序の異なる3種類の化学物質(マイトマイシン C, Ara-C, コルヒチン)を用いて、通常  
の観察細胞数である動物あたり 2000 細胞のところを、機械を用いて 100 万細胞まで解析し、

小核試験の感度がどのように変化するかを調べた。その結果、2000 細胞程度の観察では無視できる程度であった動物間差が明らかになったが、処理群単位でみた場合には観察細胞数を増加させても検出感度の上昇につながらないことが判明した。これら3種類のモデル化合物の用量反応関係と閾値について考察する。

### Threshold of genotoxicity—Power of the assay—

Makoto Hayashi

Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences,  
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

In the developed countries, people may have contact with up to a hundred thousand chemicals in their daily life. During the course of safety assessment of environmental chemicals, genotoxicity is now routinely evaluated. When genotoxicity assays were introduced, people tended to consider that genotoxicity equated to carcinogenicity. After accumulating information about genotoxicity mechanisms, there is no more such tendency at the present time. It is believed that there is no threshold for genotoxic chemicals, as derived from the hypothesis based on radiation biology. Accordingly, the idea that acceptable daily intake (ADI) cannot be set for genotoxic carcinogens is supported. Recently, however, it is the international trend to believe the idea that there is a threshold for non DNA direct-acting chemicals but not for DNA direct-acting ones.

It is, of course, important to make risk assessment based on theoretical consideration and best science; it is also important to assess practical assay thresholds. If we consider that a practical threshold exists when no genotoxic effect can be seen at a certain exposure to a chemical, such data are accumulating even for DNA direct-acting chemicals. Another important question raised is the power of the assay to show no genotoxic effect. It is well known statistically that larger sample size gives higher power, i.e., higher sensitivity can be obtained when more cells are analyzed. We examined the sensitivity of the rodent peripheral blood micronucleus assay using 3 model chemicals (mitomycin C, Ara-C, and colchicine) with different modes of action in induction of micronuclei. It is known that there is no practical difference among animals when 1000 cells were analyzed manually per animal. We analyzed up to one million cells per animal by flow cytometry in comparison to 2000 manual analyses as would be routine practice. Based on the million-cell analysis, a difference among animals became apparent that was not evident from the 2000-cell manual analyses. The result showed that the sensitivity of the micronucleus assay could be improved when cells but not animals were considered as the statistical evaluation units. The practical threshold for DNA direct-acting chemicals and the power of the assay system are discussed.

### 遺伝毒性に閾値は存在するか

J.M. パリー, E.M. パリー, E. クイック, G. ジョンソン (D. カーランドが講演)  
ウエルズ スワンシー大学医学部, UK

がんを生成するいかなる機序においても、最終的に細胞は、増殖コントロールのような細胞内現象や異常な血管新生のような組織内現象に関連した遺伝子に変化をきたす。これらの遺伝的変化は、化学物質や放射線のような環境因子への暴露により生ずる様々な機序によることが明らかになりつつある。がん原物質の管理と規制を考える上で最も重要な課題は、その暴

露量以下では発がん過程でみられる現象が起こらない暴露量(すなわち, 無作用量/閾値)を見いだすことができるか否かである. これまで, 英国の発がん性検討委員会(COC)では, 非遺伝毒性がん原物質についてのみ閾値の存在を認めることを提唱してきた. また, 変異原性検討委員会(COM)では, 異数性を誘発する化学物質について閾値の存在の可能性を評価する用量反応データを求めることを推奨してきた.

我々は, 異数性の活性についての閾値仮説を検証する研究を続けてきた. その一環として, 種々の作用機序を持つ幅広い化学物質に関する詳細な用量反応関係の解析も行ってきた. プラスチックの原料であるビスフェノール A の場合, 紡錘体の 2 極性構造の変化と関連する異数性誘発に関して閾値のあることを示した.

DNA 直接作用性の変異原性に関する閾値存在の可能性を探るため, モデル化合物としてメチル化剤であるメチルメタンサルフォネート(MMS)とメチルニトロソ尿素(MNU)について研究を進めてきた. これまでに, ほ乳類培養細胞を用いて遺伝子突然変異と染色体異常誘発性について詳細な用量反応データをとった. これらの研究により, グアニンの *N*-7 位に付加体を形成する MMS については閾値を伴う用量反応関係が示されたが, 主に *O*-6 位に付加体を形成する MNU については測定可能な最低用量においても閾値の存在を示す用量反応関係は認められなかった. 我々のデータは, DNA 直接作用性の化学物質に無作用量を設定できるか否かは DNA のどの部分が修飾されるかによることを示している.

## Investigations into potential thresholds of genotoxic activity

J M Parry<sup>1</sup>, E M Parry<sup>1</sup>, E Quick<sup>1</sup> and G Johnson<sup>1</sup>

(Paper presented by D Kirkland<sup>2</sup>)

<sup>1</sup>Centre for Molecular Genetic and Toxicology,

School of Medicine, University of Wales Swansea, Swansea, SA2 8PP, UK

<sup>2</sup>Covance Laboratories Ltd, Otley Road, Harrogate, HG3 1PY, UK

Irrespective of the mechanisms which result in tumour formation, the end results are cells with changes in genes related to cellular events such as control of proliferation and tissue events such as abnormal angiogenesis. It has become increasingly clear that these genetic changes may be derived from a variety of mechanisms including those produced by exposure to environmental agents including chemicals and radiations. A key question which arises when considering the control and regulation of carcinogens is whether we can identify exposure levels below which no changes are induced that may lead to events in the cancer process i.e. the setting of No Observable Effect Levels (NOEL) and /or thresholds of activity. Thus far, in the UK the Advisory Committee on Carcinogenicity has advocated the acceptance of the concept of thresholds of activity only for non-genotoxic carcinogens and the Committee on Mutagenicity has recommended the need for data which evaluates the potential for dose response thresholds for chemicals with aneugenic activity.

We have been undertaking studies to evaluate the hypothesis of thresholds of aneugenic activity. These included detailed analyses of the dose response relationships of a range of chemicals with diverse mechanisms of action. In the case of the plastics component bisphenol A we have demonstrated a thresholded response for the induction of aneuploidy which correlates with the modification of the bipolar structure of the mitotic spindle.

To investigate the potential for the existence of thresholds of activity of DNA reactive chemicals we have undertaken the analysis of the mutagenic activity of the model methylating agents methyl methane sulphonate (MMS) and methyl nitrosourea (MNU). We have generated detailed dose response data for the induction of both gene and chromosomal mutations in cultured mammalian cells. These studies have demonstrated that MMS, which generates *N*-7 guanine

adducts, produces thresholded dose response relationships whereas MNU, which produces a substantial frequency of O-6 adducts, produces dose response relationships without evidence of thresholds of activity even at the lowest measurable treatment concentrations. Our data demonstrates that the ability to generate NOEL values for DNA reactive compounds depends upon factors such as the sites they modify within the DNA helix.

**In vitro** において遺伝毒性に閾値があることを示す説得力のある証拠の入手は可能か？

デー ビッド カークランド  
コヴァンス研究所, UK

最近我々は、ほ乳類細胞を用いる遺伝毒性試験系の特異性(非がん原物質に対して陰性結果を与える能力)が非常に低いことを報告した(Kirkland *et al*, *Mutat. Res.* 584, 2005, 1-256). *In vitro* における“偽陽性”結果の多くは、閾値があるとするメカニズムに起因していると考えられることができる。これらの多くは DNA 傷害をもたらすことが報告されており、便宜的に次のように分類される:

- 極端な, または非生理的な状況下によるもの
- 代謝の違い, または過剰な代謝によるもの
- DNA を標的としない作用によるもの

それぞれの場合について, そのメカニズムを支持すると考えられる実験事実を元に考察する。しかしながら, 間接的に DNA に作用する, または DNA を標的としないメカニズムによることを支持する確固たる証拠はまれであり, 通常は, DNA に直接作用するような閾値がないとするメカニズムも含まれているのでは, との疑問を呈する程度のものである。非DNA傷害性または閾値の存在を支持する証拠が集まりつつあるものの, 少なくとも閾値以下の濃度域においては DNA に直接作用するメカニズムが働いていないことを証明する必要がある。

### **Is It Possible To Obtain Convincing Evidence of Threshold Mechanisms of Genotoxicity *In Vitro*?**

Dr David Kirkland  
Covance Laboratories Limited, Otley Road, Harrogate, HG3 1PY, United Kingdom

#### **ABSTRACT**

The specificity (i.e. ability to give negative results with non-carcinogens) of mammalian cell genotoxicity tests is particularly poor, as revealed from our recent analysis (Kirkland *et al*, *Mutat. Res.* 584, 2005, 1-256). In a number of cases, the “false positive” result *in vitro* may be due to a mechanism with a threshold. Many threshold mechanisms have been described that could result in DNA damage, and these may be conveniently grouped as:

- Extreme or non-physiological conditions
- Metabolic differences or overload
- Action on non-DNA targets.

Examples from each category will be discussed together with the types of experimental evidence that may be obtained to support such a mechanism. However, evidence to support an indirect or non-DNA mechanism is rarely absolute, and it is usually possible to question

whether a second, non-threshold (or direct DNA mediated) mechanism could be involved. Whilst evidence in support of a non-DNA or threshold mechanism may be being gathered it may also be necessary to demonstrate absence of a DNA-mediated mechanism, at least at concentrations below the threshold.

### **In vitro 遺伝毒性試験における陽性結果の意味するところとそのフォローアップ: 閾値メカニズムの重要性**

ベロニク チボー

サノフィ アヴェンティス, フランス

遺伝毒性を評価するための標準的な試験の組み合わせは遺伝子突然変異と染色体異常誘発性を検出する *in vitro* 試験によって構成されており, *in vivo* 試験が加わり完結する場合があります. *In vitro* 試験, 特に染色体異常誘発性を調べる試験においては陽性を示す率が非常に高く, *in vivo* における遺伝毒性やがん原性と関連しないものがたびたび認められる. 最近では, DNA 合成阻害剤や紡錘体阻害剤のように DNA と直接作用しないような遺伝毒性物質の存在が受け入れられるようになってきた. このような作用機序については, その用量以下では遺伝毒性活性が発現しないような閾値用量の存在が広く受け入れられるようになってきた. しかしながら, この陽性結果が人にとっての危険性が無いか, または, 低いものであると結論する前に, 作用機序に関する情報や DNA と直接反応しないことを示すための追加試験が通常要求される. 大学, 企業, 規制当局の専門家を含む先駆的な活動(たとえば, 遺伝毒性試験に関する国際ワークショップ(IWGT), 国際生命科学研究所(ILSI))が進行中であり, 確認のためにどのような追加試験を実施する必要があるかを推薦するために *in vitro* 陽性結果の妥当性を評価中であり, 最新の情報を提供する. DNA 直接作用性化学物質にも閾値が存在するかもしれない, とする考えもあるが, まだ広く受け入れられるには至っていない. *In vitro* での陽性結果が *in vivo* で確認できない場合に, *in vitro* で影響が認められた用量にまで達し得ないので, *in vivo* ではその傷害が発現しない, との議論がしばしばなされる. そのような議論は必然的に閾値の存在を暗に認めていることになる. がん原性ほど複雑ではないが, *in vivo* における変異原性も多段階, すなわち吸収, 代謝活性化, 解毒, 標的組織における DNA との反応, DNA 修復作用の飽和, 細胞増殖, アポトシスの欠如, 等を経て発現する. ハザードの同定からリスク評価への移行に伴い, それぞれの化学物質が標的臓器で安定した突然変異を起こすことを示すためにはどのステップが必須であり, どこに限界があるかを示すために, 非線形(閾値)の可能性について調べるのが賢明であろう. 将来において, とりわけごく低容量への外挿, リスク評価において, 遺伝毒性データの解釈に変化が生じる可能性がある.

### **Relevance and follow-up of positive results in the *in vitro* genotoxicity tests: importance of threshold mechanisms**

Véronique Thybaud

sanofi aventis, Vitry sur Seine, France

The standard genetic toxicology batteries of tests generally consist of *in vitro* tests able to detect gene mutations and chromosome damage, completed or not by *in vivo* tests. The *in vitro* tests, and especially the chromosome damage ones, show a high frequency of positive results that are not corroborated by genotoxic or tumorigenic findings in rodent studies. It is now well accepted that some compounds induce genotoxicity via non-DNA reactive mechanisms, such as DNA synthesis inhibition, disruption of mitotic spindle, etc. For those mechanisms, is it more and

more accepted that threshold doses exist below which no genotoxic effect occur. Nevertheless, further testing is generally requested to provide on one hand information on mode of action, and on the other hand to demonstrate the absence of direct DNA interaction, before concluding the initial positive results are of no or low safety concern for human. Several on-going initiatives involving scientists from academia, industry and regulatory authorities (e.g. International Workshop on Genotoxicity Testing, International Life Sciences Institute) evaluate the relevance of *in vitro* positive results, in an attempt to provide recommendations for the selection of follow-up tests. Information on the on-going discussions will be given. The idea that threshold mechanisms might also exist for DNA-reactive compounds is today not well accepted. When an *in vitro* positive result is not confirmed *in vivo*, it is sometimes stated that the positive concentrations at which the effect is observed *in vitro* cannot be reached *in vivo*, and therefore no damage can be induced *in vivo*. Such a statement indirectly implies threshold mechanisms. Like carcinogenesis, though less complex, mutagenesis *in vivo* results from multiple steps, e.g. absorption, metabolic activation and detoxification, interaction with the DNA in the target tissue, DNA repair saturation, cell proliferation or apoptosis deficiency. To move from hazard identification to risk assessment, it might be advisable to examine the possibility of non-linear (or threshold) response of each component and define which steps are essential and/or limiting for the appearance of stable mutations in the target organ. There might be some change in the future in the way genotoxicity data are managed, in particular in the extrapolation to very low doses and risk assessment.

## 閾値概念をリスク評価にどう取り入れるか

長尾美奈子  
共立薬科大学

現在わが国においては、遺伝毒性メカニズムが関与する発がん物質は、食品に意図的に加えることは禁止されている。しかし、発がんの過程を分子レベルで考えることが可能になり、また、分析技術も進歩してきたので、遺伝毒性発がん物質の生体へ及ぼす影響を再評価してみる。発がんは複数の遺伝子変異の蓄積の結果生じると考えることが出来る。そこで発がん物質の遺伝子変異誘発能をマーカーに、其の作用様式に閾値があるか否かを検討した。閾値を議論するには、其の定義、および論点を明確にする必要がある。其の為に、敢えて他の研究者が報告しているデータについて検討を加えた。

「閾値」は、**Real threshold** (真の閾値)であるか、**Alleged threshold** (擬似閾値)かの正確な認識が必須である。後者はテスト系の感受性が不十分で、化合物によって誘発されたものを自然に誘発されたものから区別出来ないために閾値のように見える濃度をいう。No effect level もこれに相当する。真の閾値は、その濃度以下では測定している効果が起らない濃度をさす。其の実験系に適応した濃度範囲で用量-反応相関関係を求めて、それを低濃度へ外挿することにより求めることが出来る。この際算術座標軸を用いる。

MNNG および UV はバクテリアやヒトの細胞の *in vitro* 突然変異検出系では閾値があることが知られている<sup>1-3)</sup>。しかし、PhIP は *in vivo* マウス末梢血小核誘発系で閾値を示さない<sup>4)</sup>。MeIQx は *in vivo* マウス肝、および大腸におけるgpt変異検出系<sup>5)</sup>で閾値を示さないように思われるが、確答を得るにはデータの補充が必要である。また、MeIQx は、ラット肝 *LacI* 変異検出系<sup>6)</sup>で閾値を示すとおもわれるが、確答を得るにはデータの補充が必要である。

ヒトの場合、複合汚染を考慮する必要がある。遺伝毒性発がん物質の安全性を考える場合、遺伝毒性をマーカーにするのが適切であると考え。閾値以下の濃度の多数の物質に暴露さ



れた時の用量—反応に関する情報が必要である。

【参考文献】

- 1) Day RS, Ziolkowski CHJ, Scudiero DA, Meyer SA Lubiniecki AS, Giraidi AJ, Galloway SM, Byuum GD Nature 288, 724-27, 1980.
- 2) Maher VM, xxx Mutat Res, 62 311-xx , 1979.
- 3) Sofuni T, Nohmi T, Ohta T, Hayashi M Environ Mutagen Res 27, 61-73, 2005.
- 4) Durling LJK, Abrmsson-Zetterberg L. Mutat Res, 580, 103-10, 2005
- 5) Musumura KI, Horiguchi M, Nishikawa A, Umemura T, Kanki K, Kanke Y, Nohmi T. Mutat Res 541 91-102, 2003.
- 6) Hoshi M, Morimura K, Wanibushi H, Wei M, Okochi E, Ushijima T, Takaoka K, Fukushima S, Toxicol Sci. 81, 273-9, 2004.

**Do we have enough data to demonstrate the presence of thresholds in mutagenicity induced by genotoxic carcinogens?**

Minako Nagao

Kyoritsu University of Pharmacy, Japan

In Japan, use of direct genotoxic carcinogens for food additive, animal drugs or agricultural chemicals is legally prohibited. However, molecular events occurring after DNA damage have become more clearly understood than before. Thus, it is an appropriate time to reevaluate effects of low dose genotoxic carcinogens on the living systems.

The presence or absence of threshold is a key point in evaluating the risk of chemicals. Real threshold is a dose below which the measured effect does not occur, and it can be obtained by extrapolation to lower doses of the dose-effect relationship which can be clearly obtained at doses where the effect is not disturbed by background levels of the living systems.

It is well known that UV and MNNG have thresholds in induction of mutations in bacteria or human fibroblasts *in vitro*<sup>1-3)</sup>. However, it has been reported that there was no threshold in induction of micronuclei by PhIP in peripheral blood of mice<sup>4)</sup>. It can be estimated that there are no thresholds in induction of *gpt* mutations by MeIQx in the liver or colon of mice according to the data by Masumura et al.<sup>5)</sup>, although the number of data points is too small to be confident. On the other hand, there seems to be a threshold in induction of *lacI* mutations by MeIQx in the liver of rats according to Hoshi et al<sup>6)</sup>, although again the data points are too small to be confident.

To incorporate threshold concept to evaluate hazards of chemicals, evaluation of the hazard derived from exposure to multiple numbers of chemicals at doses below their thresholds are needed to be clarified.

- 7) Day RS, Ziolkowski CHJ, Scudiero DA, Meyer SA Lubiniecki AS, Giraidi AJ, Galloway SM, Byuum GD Nature 288, 724-27, 1980.
- 8) Maher VM, xxx Mutat Res, 62 311-xx , 1979.
- 9) Sofuni T, Nohmi T, Ohta T, Hayashi M Environ Mutagen Res 27, 61-73, 2005.
- 10) Durling LJK, Abrmsson-Zetterberg L. Mutat Res, 580, 103-10, 2005
- 11) Musumura KI, Horiguchi M, Nishikawa A, Umemura T, Kanki K, Kanke Y, Nohmi T. Mutat Res 541 91-102, 2003.
- 12) Hoshi M, Morimura K, Wanibushi H, Wei M, Okochi E, Ushijima T, Takaoka K, Fukushima S, Toxicol Sci. 81, 273-9, 2004.

## 小核誘発物質の低用量域での現実的(生物学的)な閾値に関する研究

主任研究者： 林 真 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部長

協力研究者： 浅野 哲秀 日東電工株式会社安全性試験センター

森田 健 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部

化学物質の安全性評価においては、科学的な評価が重要であると共に現実的な思考も重要である。DNA 直接傷害性遺伝毒性物質には閾値がないと一般的には受け入れられている。DNA 直接傷害性物質にも現実的な閾値の存在を証明する試みは多くの研究者がチャレンジしている。しかしながら、現実的で且つ十分な検出感度を持つ試験法は、一般化されていない。小核試験は遺伝毒性物質、特に染色体の切断作用の検出には有効な試験である。小核誘発性の統計学検出力を上げるためには、動物個体数或いは観察細胞数を増やす必要があるが、現実的な対応は困難な状況であった。今回、多数の細胞を短時間に扱うことのできる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 個と増やした結果、統計学的な検出力は増し、わずかな差も検出することが可能であった。さらに、colchicine (COL), mitomycin C (MMC) 及び 1-β-D-arabinofuranosylcytosine(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た。2,000 個、20,000 個、200,000 個、1,000,000 個の解析細胞数を用いて実施した結果、DNA に直接作用しない COL では、改めて閾値の存在を明確にした。MMC 及び Ara-C では、解析細胞数 (200,000 個以上) を増やすことで、統計学的には近似的に正規分布と見なすことができ、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が明らかになった。

### A. 研究目的

化学物質の安全性評価において閾値をどのように考えるかが大きな命題である。

特に、変異原性のある発がん性化学物質の健康への影響を評価する上で、閾値をどのように設定できるかが最大の関心事

になってきた。一般的には遺伝毒性には閾値がないと言われている。しかし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-arabinofuranosylcytosine (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、検出感度を上げた場合に、(解析細胞：2,000 個～1,000,000 個/固体) 低用量域における小核誘発性について、解析し、現実的な閾値が統計学的に証明可能かどうかを検討する。

## B. 研究方法

### I. 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。すなわち -80°C のメタノール中で固定されたマウス赤血球を抗 CD71-FITC 及び抗 CD61-PE により二重染色した後、Mouse MicroFlow PLUS Kits の手順に従って赤血球を調製した。調製した赤血球はフローサイトメトリー (FACSCalibur flow cytometer, BD Biosciences) を用いて解析した (解析プログラム：version 031230)。

### II. フローサイトメトリーの検出力

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 (マラリア原虫の DNA 量が小核の DNA 量と近似している)。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 に希釈した。それぞれの段階希釈サンプルはフローサイトメトリー (FACSCalibur flow cytometer, BD Biosciences) を用いて解析を実施した。実験 I ではそれぞれ 2,000 個 (2K), 20,000 個 (20K), 200,000 個 (200K) について解析し、さらに実験 II ではそれぞれ 2,000 個 (2K), 20,000 個 (20K), 200,000 個 (200K) 1,000,000 個 (1M) について解析し、マラリア原虫に感染した赤血球の頻度を計測した。フローサイトメトリーによって測定された実測値と希釈前 Mal の実測値と希釈率から計算された理論値を比較した。

### III. 低用量域での小核の誘発性

被験物質： 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：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。

飼育条件：飼育はポリカーボネート製のマウス用ケージを用い、温度 21 ± 1°C、湿度 55 ± 10% 明暗サイクル 12 時間の環

境で飼育した。給餌は一般飼育用飼料 CE-2（日本クレア）を、給水は給水瓶により市水道水を自由に摂取させた。

用量及び群構成：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）を用いた。MMCには注射用蒸留水（大塚製薬）を用いた。

投与経路：腹腔内投与  
小核試験

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：被験物質をそれぞれマウスに腹腔内投与後、48時間目に尾静脈から血液5 $\mu$ L採血し、アクリジンオレンジ塗布スライドグラスへ載せ、カバーグラスで伸展した。観察は落射蛍光顕微鏡（B励起）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。

フローサイトメトリーを用いた小核試験：フローサイトメトリー用の血液は尾静脈採血が終了後、各マウスから抗凝固処理したガラスキャピラリーを用いて各マウスの眼窩静脈そうから100 $\mu$ L採血し、ヘパリン溶液350 $\mu$ L含有のマイクロチューブへ移した。そして-80 $^{\circ}$ Cのメタノールで固定し、フローサイトメトリーで解析するまで超低温フリーザー(-80 $^{\circ}$ C以下)で保管した。フローサイトメトリーによる解析は、抗CD71-FITC及び抗CD61-PEを用いて二重染色した後さらにMouse MicroFlow PLUS Kitsの手順書に従って赤血球を調製し、フローサイトメ

トリー(FACSCalibur flow cytometer, BD Biosciences)を用いて解析した（解析プログラム：version 031230）。

統計学的解析：多重性を考慮し、Fisher's exact test 並びに t-test を用い、溶媒対照群と各投与群を比較した。

（倫理面の配慮）

本研究では実験動物としてマウスを用いているが、動物の飼育及び取り扱い等動物を使用するに際しては、「動物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）」を遵守し、動物愛護に関する3Rの精神に基づき実施した。

## C. 研究結果

### 1. フローサイトメトリーの検出力

図1に示したように、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。

### 2. 低用量域での小核の誘発性

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個を解析結果を表1に示した。図2にはMMC、Ara-C及びCOLの3つの化合物の用量関係曲線