

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 15～17 年度 総合研究報告書

主任研究者 林 真

平成 18(2006)年 4 月

# 目 次

I.	総合研究報告書 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
III.	研究成果の刊行に関する一覧表…………… 84
IV.	研究成果の刊行物・別刷…………… 88

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 変異遺伝部長

食品の安全性に対して、多くの国民が関心を寄せている今日、食品添加物等の食品中に含まれる微量の化学物質の安全性が問題となっている。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、発生機序が遺伝毒性である場合には発がん性に対する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。戦略確立のため、専門家集団である日本環境変異原学会の協力を得て作業を進めた。この戦略が国際的に通用するよう、海外の専門家を招聘してコンサルテーション会議、国際シンポジウムを開催し、議論を深めた。戦略構築に必要と考えられるデータの収集を行った。具体的な食品添加物として、コウジ酸、アカネ色素について詳細に調査研究を行うと共に、戦略構築上必要と考えられる場合には実際の試験、研究を行い欠損データの補完を行った。閾値問題に関しては、DNA 修復能により、標的が暴露されているにもかかわらず遺伝子突然変異が誘発されない用量領域のあることを示す結果を得ることが出来、生物学的な閾値について検討した。また、遺伝毒性の評価に関する考え方を広く議論するため、学会等でのシンポジウムを始め、最終年度には国際シンポジウム「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めざして」を開催した。実際に行った実験に関しては以下の通りである。

閾値問題等を考えるに当たって、遺伝毒性を検出するための試験系の検出感度の問題は重要であると考えられる。統計学の面から、試験の規模、すなわち観察細胞数、しよ動物個体数を増加させることにより、検出力を高まることが知られている。げっ菌類を用いる小核試験についてフローサイトメータを用いることにより、観察細胞数を大幅に増大させて、検出力について検討した結果、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。しかし、同時に動物個体間の差が明確となり、小核試験自体の検出感度が高めることは出来なかった。

既存添加物の多くは植物由来であり、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。生体では配糖体はアグリコンに加水分解されて吸収されるので、*in vitro* 遺伝毒性試験系には、配糖体をアグリコンに変換する操作を組み入れることにより、遺伝毒性はより正確に測定できることが期待される。Hesperidinase を用いて、glycosidase 処理の方法および有効性について検討した結果、哺乳細胞を用いた *in vitro* 試験にも応用可能であり、既存添加物遺伝毒性評価への取り入れを検討する必要があると思われる。

コウジ酸を投与したマウスの肝 DNA 及びアカネ色素を投与したラットの腎臓 DNA を分離し、酸化的 DNA 損傷の一種 8-ヒドロキシデオキシグアノシンを測定したところ、いずれにおいても投与量に依存した増加が見られた。

コウジ酸は 1 回強制経口投与によってマウスの胃と肝、肺、骨髄でコメットアッセイ陽性を、マウス再生肝小核試験で陽性を、ラット末梢血小核試験で陽性を示した。コウジ酸は混餌投与によって雌ラットの肝に腫瘍を誘発することが報告されているが、コメットアッセイで検出された肝における DNA 損傷の染色体異常等への固定を示唆する明確な証拠は得られなかった。コウジ酸の *in vivo* 遺伝毒性の結果は錯綜した状態にあることなどを勘案すると、コウジ酸の雌ラットの肝で報告された腫瘍の誘発を *in vivo* 遺伝毒性と結びつける根拠は薄弱であると考えられる。

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、変異原性が認められる最低用量には 20~3000 倍の開きがあった。この結果は変異原性においても、生物学的な閾値が存在することを示唆した。

コウジ酸に関しては、*in vitro* の光遺伝毒性評価系である光プラスミド切断試験、培養細胞を用いた光 *in vitro* 小核試験およびコメットアッセイを実施し、また、アカネ色素に関しては、腎臓での発がんの可能性が示唆されていることから、ラットを用いる *in vivo* UDS 試験を実施した。その結果、コウジ酸は太陽類似光線下でプラスミド切断を誘発し、培養細胞においても小核とコメットの誘発を増強することが示されたことから、コウジ酸は光遺伝毒性作用を有するものと結論した。一方、アカネ色素を投与したラットでは、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が、投与 6 時間および 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 UDS の有意な誘発は認められなかった。

生活関連化学物質の遺伝毒性のリスク評価のために有用な指標として、Human Exposure Genotoxic Potency (HEGEP) を考案した。その化学物質の予想される 1 日摂取量(/kg/day)を、特定の遺伝毒性試験において、ある一定の遺伝毒性を発現する用量で除したものである。ここでの数値は遺伝毒性試験系によって異なり、絶

対値は生物学的に意味のあるものではないが、それぞれの化学物質の相対的遺伝毒性リスクを評価することには役立つ。TK 遺伝子突然変異試験において、突然変異を 2 倍増加させる濃度によって HEGEP を算出したところ、コウジ酸は 0.00008, 0.034 であった。これは、同じく食生活において摂取する可能性のある発がん物質であるアクリルアミド (0.4), ジメチルニトロサミン (9.2), アフラトキシン (2.4) に比較しても十分に低い値であり、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。

コウジ酸およびアカネ色素のいずれとも混餌法による 28 日間の反復投与後に、TG マウスでは導入遺伝子の *lacZ* 遺伝子、TG ラットではシャトルベクター上の *cII* 遺伝子の突然変異を解析した。

その結果、コウジ酸による肝臓での遺伝子突然変異頻度の媒体対照に比較し明確な上昇は認められなかった。また、アカネ色素投与による遺伝子突然変異頻度は、肝臓および十二指腸では陰性であったが、腎臓では媒体対照に比較し統計学的に有意な上昇は認められ、陽性結果が得られた。

#### 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 憲穂	(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。

研究班全体の活動としては、毎月定例会を開催し、会議方式で意見交換を続けた。その間、年度の終わりに開催した国際コンサルテーション会議の報告書を翻訳すると共に、質問に対する回答、指摘に対する対応を議論し、報告書に対する返答として送り返した。その後も、海外のコンサルタントとの意見交換は継続している。

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、学会のシンポジウムを主催し、意見交換を行った。まず、第31回、日本トキシコロジー学会学術年回（2004年7月6～8日、大阪）において、シンポジウム1「低用量・閾値問題の新展開」と題し、シンポジウムを開催した。本研究班からは林主任研究者が企画と座長を担当し、祖父尼協力研究者が「化学物質の遺伝毒性における生物学的な閾値」について講演を行った。シンポジウム全体としては、放射線生物学から統計学にわたる幅広い観点から低用

量・閾値問題を検討した。さらに、第33回日本環境変異原学会／第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会（2004年11月30日～12月2日、長崎）においては、JEMS/JSAAE合同シンポジウム(1)として、「発がん性と遺伝毒性の閾値—リスクアセスメントにおける問題点—」を林主任研究者が企画すると共に座長を担当した。当研究班からは森田協力研究者、祖父尼協力研究者がそれぞれ「リスクアセスメントにおける遺伝毒性—海外の視点は—」および「遺伝毒性：DNA直接作用物質に閾値は存在するのか?!」と題して講演を行った。また、最終年度には（2006年3月15日～16日 神戸）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めざして」を林主任研究者が企画し、発表を行った。また、このシンポジウムに長尾分担研究者、祖父尼協力研究者も本研究事業で得られた成果を発表した。

閾値問題を考える上で、重要な要素の一つとして、試験系の検出力の問題が考えられる。そこで、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した。さらに作用機作の異なる小核誘発モデル物質として 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、観察細胞数を増やした場合に、（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した。

コウジ酸は、麹菌（*Aspergillus* 属）に由来する天然成分であり、抗菌、抗酸化、抗変色作用を有する添加物として食品に用いられてきた。また、メラニン色素形成を抑制する作用があることから、化粧品や医薬部外品にも用いられてきた。

しかしながら、既存添加物の安全性確認作業の一環として実施されてきた安全性試験によって、マウス及びラットにおいて肝臓に対する発がん性が示唆されたことから、その遺伝毒性を否定できないと、また実流通がないため、食品添加物としての使用は禁止されることとなった。

このような状況の下、コウジ酸に関する遺伝毒性試験データの収集を行った。コウジ酸の遺伝毒性発がん標的臓器の可能性が示されたマウス肝臓に関おいて、小核が誘発されるがマウス肝2段階発がん実験では、コウジ酸はイニシエーション活性を示さないことが報告された。コウジ酸は発がん標的臓器でDNA傷害を誘発するが、発がんのメカニズムはDNA傷害作用以外の作用機構によることが示唆されている。コウジ酸が直接 *in vivo* でDNA傷害を起こすのか否かを明らかにするべく、DNA付加体生成の有無を、検出感度の高い<sup>32</sup>P-ポストラベル法を用いて検討した。また、酸化的DNA損傷の1種である8-ヒドロキシデ

オキシグアノシンを測定した。

コウジ酸の細菌での変異原性を詳細に検討することを目的として以下の実験を実施した。（1）サルモネラ菌 TA100 および TA98 株に対するコウジ酸の変異原性を3種類のサンプルについて比較し、不純物の関与について考察する（2）活性酸素を生成する変異原に感受性を示すサルモネラ菌 TA102 株と大腸菌 WP2*uvrA*/pKM101 株を用いてコウジ酸の変異原性を調べ、活性酸素の関与について考察する（3）コウジ酸の光活性化の可能性について調べるため、UVA照射による変異原性の増強の有無を試験する（4）コウジ酸によって誘発される塩基対置換変異のスペクトルを調べ、誘発変異の特徴を見いだす。

ほ乳類培養細胞を用いたコウジ酸の遺伝毒性の評価には、小核試験、TK 遺伝子突然変異試験を実施し、その遺伝毒性の有無と、程度の評価を行った。コウジ酸はUV-B領域 (> 320 nm) に吸収を示し皮膚に塗布される可能性があることから、（光）遺伝毒性作用の有無とその作用機序の解明を目的として *in vitro* 実験系であるプラスミド切断試験も実施した。また、コウジ酸の遺伝毒性の強さの程度を、他の生活関連化学物質と比較するため、同様の遺伝毒性試験を実施し、それら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。

*In vivo* での遺伝毒性の評価として、コウジ酸投与マウスの肝臓における comet 試験、再生肝での小核試験を行った。また、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。

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、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。本研究では細菌を用いる復帰突然変異試験法で、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。

アカネ色素 (Madder color) は、アカネ科の西洋アカネの根から抽出される色素で、性状としては赤褐色粉末で水、アルコールに溶解し、熱、光に対して非常に安定な物質である。ラットの腎臓における発がん性で問題となっている、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。

アカネ色素に関してもほ乳類培養細胞を用いた小核試験、TK 遺伝子突然変異試験を実施し、遺伝毒性の強さを比較した。また *in vivo* 試験でも DNA の酸化的損傷性、不定期 DNA 合成による DNA 損傷性、および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

日本環境変異原学会に「食品および食品添加物に関する遺伝毒性の検出・評価・解釈」臨時委員会と協力し、本研究と合同の定例検討会議を原則として毎月開催した。定例会の課題に応じ、その分野での専門家を招聘し、戦略構築に必要な基礎知識等の蓄積に努めた。また、昨年度の終わりに開催した国際コンサルテーション会議の報告書を翻訳ならびに、海外のコンサルタントとの意見交換を行った。また、関連学会においてシンポジウムを主催し、意見交換と共に本研究で得られた情報の発信を行った。

遺伝毒性の情報収集に関する方法の概略に関しては、それぞれの分担研究報告書を参照されたい。ここでは、試験法の検出力に関する項目に関して述べる。

フローサイトメトリーの検出力を検討するため、Mouse MicroFlow™ PLUS Kits のリファレンス (biological standard) として用いら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, 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) まで解析した。



次に、低用量域での小核の誘発性を検討するため、小核誘発の作用機序が異なる mitomycin C , 1-b-D-arabinofuranosyl-cytosine および colchicine を用いた。1群 5 匹の CD-1 マウスに Ara-C は 6.0 mg/Kg , MMC は 0.3 mg/Kg , Col は 0.8 mg/Kg を最高投与量として腹腔内投与し、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とフローサイトメトリーを用いた解析を行った。

その他の試験に用いたモデル化合物であるコウジ酸は Lot 番号 052K2516 (シグマ), 2Y181 (化粧品用), 5312 (食品添加物用)を用いた。アカネ色素は国立医薬品食品衛生研究所より供与を受けた。本品は西洋アカネ粉末から 50%エタノールで抽出、濾過、濃縮し、デキストリン添加度、スプレードライ、混合、粉碎の過程を経て調整された、褐色の粉末である。

#### (倫理面への配慮)

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部で実施された研究で用いたヒトリンパ芽球細胞株 TK6 は ATCC にも登録されている使用制限のない細胞株であり、倫理上問題はない。秦野研究所で実施された研究に関しては、動物愛護にかんする 3R の精神に基づき実験が実施された。実験計画は、(財)食品薬品安全センター秦野研究所動物実験倫理委員会により、当該研究計画が動物愛護に基づき倫理上適切であることを確認されたものである。また、(財)食品農医薬品安全性評価センターで実施された研究に関しては、「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)」および「(財)食品農医薬品安全性評価センター 動物実験に関する指針(平成 15 年 12 月 1 日)」が順守されており、動物愛護上の配慮が十分にされた。

#### C. 研究結果

小核試験の検出力およびモデル化合物の低用量域での小核誘発性。

フローサイトメトリーの検出力に関しては、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。また、検出力をあげた状況下に検討した低用量域での小核の誘発性に関しては、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 以下であったり、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示し、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。

コウジ酸ならびにアカネ色素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。

#### <コウジ酸>

1) コウジ酸は TA100 に対し S9 mix の有無に関わらず変異原性を示し、Lot による比活性の差は認められなかった。HPLC による分離により変異原性は 270 nm 吸収の主ピーク分画のみに認められ、HPLC 分離前

後で突然変異比活性に差が無かった。NMR により主ピーク分画の物質はコウジ酸であることを確認した。以上の結果より、コウジ酸標品中のサルモネラ菌に対する変異原性はコウジ酸自身によるものであり、変異原性を持つ夾雑物は含まないことが明らかになった。

- 2) サルモネラ菌 TA100 をコウジ酸処理した後抽出した DNA には付加体は検出されなかった。また、3%のコウジ酸を含む餌を4週投与したマウス肝臓の DNA におけるコウジ酸付加体を解析した結果、付加体と思われるスポットは観察されなかった。以上の結果より、用いた条件下では付加体は検出されなかったと結論した。
- 3) コウジ酸投与マウス肝臓 DNA 中の 8-OH-dG 量を測定したところ、コウジ酸 3.0(wt%)投与群の値は、陰性対照に比べ有意に高かった。
- 4) コウジ酸の1回強制経口投与すると、コメット試験でマウスの胃と肝で Migration の有意な増大がみられた。ラットでは胃、肝、肺、骨髄で Migration の有意な増大がみられたが、その程度は胃を除いて弱いものであった。肝のコメットアッセイではテールが極めて短いコメット像が高頻度で見られるという特徴がみられた。Migration の有意な増大がみられた臓器では病理学的な壊死の兆候はみられなかったことから、Migration の有意な増大は細胞死に起因するものとは考えられなかった。

一方、小核試験ではコウジ酸の1回強制経口投与によってマウスの再生肝で小核を有する細胞の頻度の有意な増大がみられた。

- 5) コウジ酸処理したサルモネラ菌に於ける付加体の解析サルモネラ菌 TA100 を 5 mg/ml のコウジ酸と4時間インキュベーションした後、DNA を抽出し、DNA 付加体の生成を ATP deficient 法で解析した。3D : 90%で展開したのち、4D : 30, 60, 90%何れの条件でもスポットが観察されたが、対照サンプルにも同様なスポットが検出されたので、コウジ酸の付加体では無いと判定した。マウス肝臓 DNA の付加体生成を検討するため、3%のコウジ酸を含む餌4週投与したマウス肝臓の DNA におけるコウジ酸付加体を解析した。解析法はサルモネラ DNA と同じ方法を用いた。3D : 90%で展開後4D : 60%の条件でいくつかのスポットが検出されたが、対照群のマウス肝 DNA にも同様なスポットが観察された。その他の条件では、付加体と思われるスポットは観察されなかった。以上の結果より、用いた条件下では付加体は検出されなかったと結論した。
- 6) コウジ酸の細胞毒性、遺伝子突然変異の結果と、アクリルアミド、AF-2、ジメチルニトロサミンの結果を比較した。すべての化学物質は用量依存的に突然変異を誘発した。突然変異を2倍誘発する濃度はコウジ酸 (2.5mg/ml)、アクリルアミド

(400ug/ml), AF-2 (5ug/ml), ジメチルニトロサミン (0.2ug/ml)と計算できた。

Human Exposure Genotoxic Potency (HEGEP) に関して, Misconceptions about the Causes of Cancer (Gold et al., The Fraser Institute, 2002)から, それぞれの化学物質の 1 日平均推定摂取量のデータを得た。この値を, 突然変異を 2 倍増加させる値 (MDX2) で割ることにより HEGEP を計算した。

- 7) アルキル化剤 ENNG では, O<sup>6</sup>-methylguanine methyltransferase (MGMT)を欠損した菌株 YG7104 が TA1535 よりもより低い用量で変異コロニーの誘発がみられた。ENNG では, YG7104 が 0.0001 ~ 0.03 µg/plate の用量で陰性対照の 2~170 倍の変異コロニーを誘発したが, TA1535 ではそれらの用量では変異コロニーの誘発はみられず, 0.3 µg/plate 以上の用量から対照の 2 倍以上の誘発が認められた。MX は塩基に付加体を生じる変異原であるが, WP2uvrA では 0.03~1 µg/plate で陰性対照の 4~40 倍の変異コロニーを誘発したが, 野生株 WP2 では 1 µg/plate 以上の用量から変異コロニーの誘発が認められた。菌体内での代謝で DNA に付加体を生じると考えられている ZA においても, TA1535 が TA1975 よりもより低い用量で変異コロニーの誘発が認められた。フレームシフト変異を誘発する 2-NF について, ヌクレオチド除去修復欠

損株 TA1538 株では 0.03 µg/plate 以上の用量で変異コロニーを誘発したが, 野生株 TA1978 株では 1 µg/plate 以上の用量から変異コロニーの誘発が認められた。4-NQO によって誘発されるフレームシフト変異についても, TA1538 が TA1978 よりもより低い用量で変異コロニーの誘発が認められた。NPD も同様に, TA1538 が TA1978 よりもより低い用量で変異コロニーの誘発が認められた。

- 8) DNA 中の 8-OH-dG 量は, 10<sup>6</sup> dG あたり次のようになった。陰性対照 1.22 ±0.06, アカネ色素 1.0(wt%) 投与群 3.74±0.76, 5.0(wt%) 投与群 2.14±0.08。いずれも, 平均値±標準誤差, n=6。アカネ色素投与群の値は, 陰性対照に比べ有意に高かった (t 検定, p<0.05)。
- 9) 肝臓における DMN の処理条件の検討では, 経口投与 2 および 4 時間後に比べ, 投与 6 時間で核内のグレイン数が減少した。腹腔内投与では, ややばらつきがあるものの傾向に差は認められなかった。腎臓に関しては近位尿細管上皮細胞および遠位尿細管上皮細胞ともに投与 2 時間後が 4 時間および 6 時間に比べ高値を示した。腹腔内投与では, 経口投与に比べ低値を示す傾向があった。腎臓におけるアカネ色素高濃度単回投与による影響は, 2000 mg/kg 投与群の 6 および 3 時間の全例, 1000 mg/kg 投与群の投与 3 時間の 1 例で, DMN 400 mg/kg 投与群の 2 例におい

て、皮質内帯すなわち皮髄境界部の近位尿細管上皮細胞において、核の大小不同が認められた。肝臓では、2000 mg/kg 投与群の投与3時間後の1例に単細胞壊死が観察された以外、変化は認められなかった。

TUNEL 法によるアポトーシスを検討した結果、2000 mg/kg 投与群の投与3時間後の2例に軽度の増加が、DMN 400 mg/kg 投与群に軽度から中等度の増加が認められた。

- 10) 各群の肝臓における *cH* 遺伝子の突然変は、陰性対照群においては総プラーク数 2,779,200 の内、変異プラークが 50 出現し、その突然変異頻度は  $18.0 \times 10^{-6}$  であった。一方、アカネ色素処理群での突然変異頻度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。陽性対照群の突然変異頻度は  $78.2 \times 10^{-6}$  に増加しており、媒体対照群に比べて統計学的に有意 ( $p < 0.01$ ) な増加が認められた。

#### 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い。

#### 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。

昨年度末に開催した国際コンサルテーション会議の参加者から、報告書として、我々の本プロジェクトに対しての意見、提言が寄せられた。報告書の要旨を以下に示す：

「我々コンサルタントは本ワークショップを、日本のある種の食品中に発酵生産物として自然状態でも含まれ、また、過去において甲殻類の褐変防止を目的に食品添加物として用いられていたコウジ酸をモデル化合物とし、それに関する多くの実験データの評価を行うことから始めた。このテストケースに関する作業を通じて、食品および食品関連物質で提起されるリスク評価に関しての戦略を立てるための一助とした。コウジ酸は *in vitro* および *in vivo* における多種類の遺伝毒性試験がなされ、異なった結果が得られており結論づけることは難しいが、

遺伝毒性を疑わせるような証拠があり、また現在食品添加物としての使用実績がない事などから、日本における食品添加物としての使用が禁止された。高濃度のコウジ酸を含む飼料を与えられたマウスは甲状腺および肝臓に腫瘍を生じる。遺伝毒性試験でコウジ酸が陽性になる事を考慮すると、腫瘍形成のイニシエーションに遺伝毒性が関与している事が懸念された」。

また、主な提言は：

- i) DNA 付加体形成を含む *in vivo*, *in vitro* の遺伝毒性メカニズムについて検討すること。
- ii) *In vivo* の結果を解釈する一助とするため、ADME とトキシコキネティクスに関するパラメータ類、特に種間差の説明、代謝の役割、そして、コウジ酸とその代謝物類の標的組織の暴露証明について検討すること。
- iii) 骨髄小核試験とコメット試験の *in vivo* での陽性結果は、コウジ酸が遺伝毒性物質として決定付けられるキープポイントであるが、我々は、ここで用いられた試験プロトコールの幾つかは矛盾した結果を導き、解釈に困難をもたらした可能性がある事を述べた。ラット小核試験では成熟動物を用いて再試験を実施すべきであり、コメット試験では単離核でなく単離細胞を用い、また、テール長よりもテールモーメントを測定する事を推奨する。
- iv) 我々は p53 マウスの試験は用いた動物数が少ない事や感染を示唆する炎症細胞の大量の壊死/浸潤が見られ

たことにより、試験自体に問題があると考え、現時点で受け入れ可能なプロトコールを用いて新しい試験を実施することを推奨する。

- v) 新しく行われる全ての試験は、マイコトキシンの汚染のない、純度の高い検体を用いて実施するべきである。
- vi) コウジ酸によるマウスの甲状腺腫瘍誘発が、非遺伝毒性的な事象としておそらく説明可能であると考えることが出来ると共に、肝腫瘍の誘発に関しても同様な説明が可能であろうと考える。観察された肝腫瘍が悪性癌腫を含むかどうか不明確である。悪性腫瘍が実際に誘発されたかどうかを確定するために、生データ、病理専門家の報告などについて再検討（スライドの再観察を含む）することを推奨する。
- vii) 理想的には生涯投与によるラットを用いる発がん性試験がなされるべきであろう。

等、多くの提言、推奨がなされた。さらに、「閾値と“強さ”を考慮することは、避けることのできない遺伝毒性物質の規制に意味がある。ある試験は他の試験よりもより重みがある。最終的なリスク評価を可能にするには、*in vitro* で陽性結果を示した化合物のフォローアップ *in vivo* 試験を注意深く選択することが重要である。」と、結ばれている。

定例の例会でこれらの提言が検討され、実施可能なものに関しては、実際の実験も含め、今後検討していくとした。また、報告書に対する返答書を長尾委員を中心に作成し、海外のコンサルタントに

返送した。その後も意見交換が続いている。

最終目標である、論文の作成に向けて、定例会で閾値問題を含めて議論を進めている。将来的に作成する position paper は general なものとし、以下のような項目またはキーワードを含む：目的、用語の定義、avoidable vs unavoidable, 試験の質の評価、試験の組み合わせ、試験結果の評価、weight of evidence, volume vs quality (データの量 vs 質), in vitro vs in vivo, animal vs human, threshold, risk assessment. これらの項目またはキーワードにつき、現状認識および将来展望について意見交換を行った。特に、規制の根拠となる試験データの質を如何に保証するかについて活発に討論され、以下のような意見が出された：規制の根拠となるデータの質はガイドラインと GLP で保証されるべき；質が保証できないデータは参考扱いとしてはどうか；データの質を確認するため、実験データの peer review を学会レベルでできないか；機関によって矛盾するデータが得られた場合は、第三者機関(GLP 施設)に被験物質を blind で評価させて決着してはどうか；質の悪い多数のデータよりも質の良い少数のデータの方が規制の根拠としては有用、等の意見を基に議論がなされている。Position paper を仕上げていくのに際して、具体例であるコウジ酸についての再評価を行った。今まで得られたデータにつき宇野委員より説明がり、コウジ酸は高濃度・高用量域ではあるが、in vitro では陽性、in vivo では臓器によって陽性(マウス肝小核、ラット骨髄小核)また

は陰性(マウス骨髄小核、マウス肝遺伝子突然変異、ラット肝小核)と結論された。この事例を参考にして戦略に関する討論を行い、以下のような意見が出された(多くは遺伝毒性に閾値があると仮定した場合の意見)：コウジ酸のヒトおよび動物の暴露量(TK, 臓器中濃度)が分からない現状では安全域の議論ができないではないか(データを採るべき)；コウジ酸はこれだけ多くのデータがあるから議論できるが、実際の食品添加物で特に既存のものは殆どデータがなく、これらをどう評価するかが問題；これらの安全性を無影響量との安全域で考えることはできないか；遺伝毒性のあるものは通常の種差 10 倍×個体差 10 倍に更なる安全係数を掛けて ADI を算出することはできないか；データが十分にそろっていない場合は大きな安全係数を掛けておき、陰性データが出てくる都度安全係数を減らしていくことはできないか(注)；これらのことを裏付ける理論構築ができないか、既存の化合物を用いてケーススタディをしてはどうか；in vitro 試験の上限濃度をヒトの暴露量を考慮してもっと低くすることはできないか(例えば安全性薬理の in vitro 試験では経験的に 100 μM を上限として実施；それ以上は非生理的な条件と言われている)。

(注：具体例としては、従来行われている一般毒性試験で得られた NOEL の 1/100 (種差×個人差)に、さらに 1/100 (遺伝毒性(10)×発がん性(10)) を掛けた値を求める。遺伝毒性試験および発がん性試験のデータがない場合にはこの数値を用いる。もしそれぞれの試験結果が提

出され、いずれも明らかな陽性の結果であれば、いずれもそのまま10の数値を残し、いずれも問題のない陰性結果の場合には、それぞれを1とする。さらに、それぞれの陽性結果の内容、例えば高用量のみでの陽性やマージナルな陽性等を考慮して、係数を5~2に低減させる。)

閾値問題に関しては、生物学的閾値、実用的閾値、と言う考え方を導入し、考察を進めている。本年度も、祖父尼協力研究者を中心に議論を展開し、日本トキシコロジー学会および日本環境変異原学会/日本動物実験代替法学会合同学術大会のシンポジウムで講演を行った。議論の要旨は『遺伝毒性には閾値が存在しないという考え方がこれまで一般的に受け入れられてきたが、近年DNAを直接標的としない物質、例えば細胞分裂阻害剤やDNA合成阻害剤など、DNA以外の酵素や蛋白などへの影響によってもたらされる遺伝毒性には閾値が存在するとの考え方が国際的にも急速に受け入れられてきている。一方、DNAを直接標的とする物質には閾値が存在しないという考え方は依然として広く浸透しており、化学物質の安全性評価においてもこの考え方が支配的な状態にあるといえる。

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、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)の発現に必要な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、という考え方である。実際にそのような生物学的な閾値の存在を示唆するデータが示され始めている。』

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れることがわかった。このことは、観察と実測値がほぼ同一直線上にプロットさ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。モデル化合物を用いて行った小核誘発性の検討では、サイトメトリーによる解析では2K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。200,000あるいは1,000,000細胞の解析において、細胞を「統計学的な評価単位」として考えた場合には、ごく僅かな差でもFisher's exact testでは有意になってしまうが、個体を単位として考えた場合には、個体差が明瞭になってしまい、試験系としての件出力は上昇しないことが判明した。また、DNA直接作用性のMMCおよびAra-Cにおいても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は期待どおり「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。

コウジ酸ならびにアカネ色素に関する遺伝毒性試験に関する考察の詳細は、各分担研究報告書を参照されたい。概要を以下に示す。

1.  $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法は、極めて感度の高い DNA 付加体検出法である。これまでに、戸塚らは、コウジ酸を投与したラットの甲状腺における DNA 付加体を Nuclease P1 法により解析し、DNA 付加体が検出されなかったことを報告している。本研究では、手法としては煩雑であるが、より適用範囲の広い ATP deficient 法を用いた。また、TLC お展開条件も 9 通りを用いた。サルモネラ菌 DNA およびマウス肝 DNA 何れの場合も、スポットは検出されたが、コウジ酸処理群に特異的なスポットは検出されなかった。すなわち用いた実験条件下では、コウジ酸の DNA 付加体は検出されなかった。以上の結果からは、コウジ酸がマウス肝臓で DNA 付加体を形成しているか否かについて結論を得ることが出来なかった。さらに、種々の異なった  $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法を種々の条件下で検討するのも一つのアプローチであるが、本研究では、マウス肝 DNA を酵素分解し、得られたヌクレオシドを LC/MS/MS で網羅的に分析することを試みた。コウジ酸処理群で特異的に検出される分子イオンの存在の有無を検討した。予備実験の結果、複数のイオンピークが検出された。これらのピークがコウジ酸処理群に特異的であるか否かを、複数の処理群および対照群のマウス肝臓の

DNA を用いて現在検討中である。

2. コウジ酸の HERP と HEGEP はアクリルアミド、AF-2、ジメチルニトロサミンと比較してもかなり低いことから、日常的にみそや醤油から摂取しうるコウジ酸の遺伝毒性リスクは、ポテトチップス等からのアクリルアミド、ビール等からのジメチルニトロサミンよりずっと低いものと考えられる。AF-2 は昭和 50 年に禁止された保存料で、遺伝毒性が強く、発がん性が疑われたことから使用が禁止になった化学物質である。HERP はアクリルアミド、ジメチルニトロサミンより低いが、HEGEP はそれらの 10 倍程度あり、遺伝毒性が過度に評価された。齧歯類動物による発がん性試験は、必ずしも人への発がん性を反映するものではないため、このように HERP と HEGEP の両者の比較により、人に対するより慎重なリスク評価が可能になるものと考えられる。

3. 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。

4. アカネ色素の投与によって腎臓 DNA 中の 8-OH-dG 量が陰性対照に比べて有意に増えていることから、アカネ色素の 28 日間経口摂取により、生



体内酸化ストレスが亢進し、腎臓 DNA に酸化的傷害が起こったと考えられる。アカネ色素がラットの腎臓に対して発がん性を示すことが報告され、その腎臓がんにはアカネ色素の腎傷害性やイニシエーション作用も関与している可能性が示唆されているが、今回の結果を合わせて考えると、腎臓での酸化ストレス亢進が、その一要因となっている可能性がある。アカネ色素 1% 含有餌の方が 5% 含有餌よりも 8-OH-dG 増加量が多かったが、これは 1% 餌の方が生体内酸素濃度との比率からフリーラジカルを生じ易かったためと考えられる。臓器 DNA 中 8-OH-dG のみならずラット、マウス尿中 8-OH-dG および塩基 8-OH-Gua の測定が可能となっており、今後食品添加物による酸化的 DNA 損傷の誘発、あるいは抗酸化物質によるその抑制を調べる上で有用と考えられる。

5. アカネ色素のラット腎臓における発がんメカニズム探索の一環として、ラット肝臓と腎臓の *in vivo* UDS 試験の最適条件設定の試験を実施した。(陽性対照の Dimethylnitrosamine(DMN)を用いて UDS 試験を実施したところ、DMN は経口投与では投与 2 時間で腎臓での UDS が最も高く、4-6 時間取り込みは減少した。また、アカネ色素の高濃度単回投与による肝臓、腎臓での組織学的な毒性発現を調べたところ、1000mg/kg および 2000mg/kg 単回経口投与により、投与後 3-6 時間で腎臓の近位尿細管上皮細胞において、核の大小不同が観察された。一方、肝

臓では 2000mg/kg 投与 3 時間後の 1 例において、単細胞壊死が観察され、アポトーシスの誘導が認められた。以上の結果より、腎臓がアカネ色素の標的臓器になっている事が強く示唆された。

6. アカネ色素について細菌を用いた復帰突然変異試験 (Ames 試験) および枯草菌を用いた DNA 修復試験 (Rec assay) で陰性あるいは陽性等、合い異なる結果が報告されているが、*in vitro* の遺伝毒性試験として総合的には陽性と判断されている。*In vivo* 試験の場合、マウス小核試験で陰性であったが、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。アカネ色素投与群では 1.0 および 5.0% 群のいずれにおいても遺伝子突然変異頻度の統計学的に有意な増加は認められなかった。本被験物質のアカネ色素は混餌投与において腎臓並びに肝臓に腫瘍を誘発することが確認されているが、本結果から肝臓での発がんは遺伝毒性に起因しているとのデータは得られなかった。一方、厚生労働科学研究費補助金 (厚生労働科学特別研究事業) のトランスジェニックラットを用いたアカネ色素の発がん標的臓器における遺伝毒性に関する研究 (主任研究者: 広瀬雅雄 (国立医薬品食品衛生研究所)) において、本研究で使用したラットの腎臓について同様の遺伝子突然変異の解析を実施した。腎臓については遺伝子突然変異の統計学的に有意な増加が認められ、発がんとの関連が示唆されている。

## 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、定例の班会議を原則として毎月開催し、研究班の統一的な考え方について検討を続けた。また、昨年度末の国際コンサルテーション会議の報告書を検討し、海外の指導的立場にある研究者と議論を行っている。閾値論に関しては、生物学的閾値に関する考えを取り込み、現実面での閾値について検討中である。

観察細胞数を増加する事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、低用量域での小核誘発は個体間の差は明確になるが、個体を単位として考えた場合対照群におけるデータのばらつきが明確になるが、検出力の上昇は確認できなかった。DNA と直接作用のない COL に閾値があることを再確認すると共に、DNA に直接作用する MMC 及び Ara-C においても現実的な閾値（或いは生物学的な閾値）が存在すると考えることのできる事実を確認できた。

コウジ酸はサルモネラ菌に対し変異原性を、マウスに対し強制経口投与により肝小核を誘発したが、マウス肝に対し発がんイニシエーション活性は検出されていない。DNA 付加体の生成を、<sup>32</sup>P-ポストラベル法—其中で感度が高く、適用範囲の広い ATP deficient 法を用いて検討したが、用いた実験条件下では DNA 付加体は検出されなかった。LC/MS/MS でさらに検討している。

ヒト培養細胞に対してコウジ酸が突然

変異を2倍増加させる濃度は2.5mg/mlであり、他の生活化学物質に比較して、その遺伝毒性の程度は低い。

1 日平均摂取量を考慮した、遺伝毒性のリスク Human Exposure Genotoxic Potency (HEGEP)も他の物質に比べて遙かに低く、日常生活におけるコウジ酸の遺伝毒性リスクはほとんど無視できるものと考えられる。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る。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。

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。

アカネ色素を含む餌 28 日間投与によりラット腎臓 DNA に酸化的傷害がみられた。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。

アカネ色素の高濃度単回投与による肝臓、腎臓での組織学的な毒性発現を調べたところ、1000mg/kg および 2000mg/kg 単回経口投与により、投与後 3~6 時間で腎臓の近位尿細管上皮細胞において、核の大小不同が観察された。一方、肝臓では 2000mg/kg 投与 3 時間後の 1 例において、単細胞壊死が観察され、アポトー

シスの誘導が認められた。

アカネ色素を 28 日間混餌投与した結果、ラット肝臓に対して遺伝子突然変異を誘発しないものと判断した。ただし、腎臓に関しては遺伝子突然変異誘発の結果が得られている。

## G. 研究発表

各分担研究者研究発表に関してはそれぞれの報告を参照

### 1. 論文発表

- 1) Saotome, K., and M. Hayashi: Application of a sea urchin micronucleus assay to monitoring aquatic pollution: influence of sample osmolality, *Mutagenesis*, 18, 73-76 (2003).
- 2) Hamada, S., K. Nakajima, T. Serikawa and M. Hayashi: The effect of aging on the results of the rat micronucleus assay, *Mutagenesis*, 18, 273-275 (2003).
- 3) Hamada, S., K. Nakajima, C. Namiki, T. Serikawa, and M. Hayashi: Sex differences in the chemical induction of micronuclei in the rat, *Environ. Mutagen. Res.*, 25, 33-37 (2003).
- 4) Kirkland, D.J., M. Hayashi, J.T. MacGregor, L. Müller, L.M. Schechtman, and T. Sofuni: Summary of major conclusions—the 3rd International Workshop on Genotoxicity Testing—*Mutat. Res.*, 540, 123-125(2003).
- 5) Müller, L., D. Blakey, K.L. Dearfield, S. Galloway, P. Guzzie, M. Hayashi, P. Kasper, D. Kirkland, J.T. MacGregor, J.M. Parry, L. Schechtman, A. Smith, N. Tanaka, D. Tweats, and H. Yamasaki: Strategy for genotoxicity testing and stratification of genotoxicity test results—report on initial activities of the IWGT Expert Group, *Mutat. Res.*, 540, 177-181 (2003).
- 6) Homa, M., M. Izumi, Y. Sakurada, S. Tadokoro, H. Sakamoto, W. Wang, F. Yatgai, and M. Hayashi: Deletion, rearrangement, and gene conversion; genetic consequences of chromosomal double-strand breaks in human cells, *Environ. Mol. Mutagen.*, 42, 288-298 (2003).
- 7) Itoh, T., T. Kuwahara, T. Suzuki, M. Hayashi, and Y. Ohnishi: Regional mutagenicity of heterocyclic amines in the intestine: mutation analysis of the *cII* gene in *lambda/lacZ* transgenic mice, *Mutat. Res.*, 539, 99-108 (2003).
- 8) Yamada, K., T. Suzuki, A. Kohara, M. Hayashi, T. Mizutani, and K. Saeki: In vivo mutagenicity of benzo[*f*]quinoline, benzo[*h*]quinoline, and 1,7-phenanthroline using the *lacZ* transgenic mice, *Mutat. Res.*, 559, 83-95 (2004).
- 9) Zang, Li, H. Sakamoto, M. Sakuraba, D-S Wu, L-S Zhang, T. Suzuki, M. Hayashi, M. Honma: Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells, *Mutat. Res.*, 557, 1-6 (2004).
- 10) Suzuki, H., T. Shirotori, and M. Hayashi: A liver micronucleus assay using young rats exposed to diethylnitrosamine: methodological establishment and

- evaluation, *Cytogenet. Genome. Res.*, 104, 299-303 (2004).
- 11) 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: 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 (2005).
- 12) 林 真: 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 (2005).
- 13) Sofuni, T., T. Nohmi, T. Ohta and M. Hayashi: Genotoxicity: Is a threshold concept applicable to evaluate the mutagenic activity of DNA-targeting substances!?, *Environ. Mutagen Res.*, 27, 61-73 (in Japanese) (2005)
- 14) Nakajima, M., S. Shimada, M. Nagai, F. Mizuhashi, C. Sugiyama, S. Masuda, M. Hayashi and N. Kinae: 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 (2005).
- 15) Asada, S., K. Sasaki, N. Tanaka, K. Takeda, M. Hayashi and M. 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), *Mutat. Res.*, 588, 7-21 (2005).
- 16) M. Hayashi, E. Kamata, A. Hirose, M. Takahashi, T. Morita and M. Ema: In silico assessment of chemical mutagenesis in comparison with results of Salmonella microsome assay on 909 chemicals, *Mutat. Res.*, 588, 129-135 (2005).
- 17) Torous, D., N. Asano, C. Tometsko, S. Sugunan, S. Dertinger, T. Morita and M. Hayashi: 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 (2006).
- 18) Asano, N., D. Torous, C. Tometsko, S. Dertinger, T. Morita and M. Hayashi: Practical threshold for micronucleated reticulocyte induction observed for low doses of mitomycin C, Ara-C and colchicine, *Mutagenesis*, 21, 15-20 (2006).
- 19) Koyama, N., H. Sakamoto, M. Sakuraba, T. Koizumi, Y. Takashima, M. Hayashi, H. Matsufuji, K. Yamagata, M. Shuichi, N. Kinae and M. Honma: Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells, *Mutat. Res.* 603, 151-158 (2006).