

Table 4. Body and organ weights of F1 offspring at postnatal week 11.

		Acrylamide in the drinking water (ppm)			
		0	50	100	200
<i>Males</i>					
No. of animals		6	6	6	4
Body weight	(g)	473.5 ± 16.7 ^a	441.8 ± 28.2	342.4 ± 60.6*	299.6 ± 18.4**
Brain	(g)	2.12 ± 0.06	2.12 ± 0.09	1.98 ± 0.11**	1.86 ± 0.07**
	(g%)	0.45 ± 0.00	0.48 ± 0.04	0.58 ± 0.08**	0.62 ± 0.05**
Liver	(g)	17.59 ± 1.48	16.61 ± 1.05	11.62 ± 3.87*	10.65 ± 1.41*
	(g%)	3.71 ± 0.20	3.76 ± 0.12	3.34 ± 0.56	3.55 ± 0.26
Spleen	(g)	0.81 ± 0.05	0.79 ± 0.15	0.60 ± 0.07*	0.54 ± 0.03*
	(g%)	0.17 ± 0.01	0.18 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.18 ± 0.01
Kidneys	(g)	3.24 ± 0.17	3.13 ± 0.14	2.50 ± 0.49	2.16 ± 0.21*
	(g%)	0.68 ± 0.03	0.71 ± 0.03	0.73 ± 0.08	0.72 ± 0.06
Testes	(g)	3.62 ± 0.27	3.19 ± 0.21	2.91 ± 0.45**	2.78 ± 0.22**
	(g%)	0.76 ± 0.06	0.73 ± 0.07	0.86 ± 0.14	0.93 ± 0.07*
Epididymides	(g)	1.08 ± 0.06	0.93 ± 0.05**	0.90 ± 0.11**	0.81 ± 0.05**
	(g%)	0.23 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.27 ± 0.03	0.27 ± 0.00
<i>Females</i>					
No. of animals		6	6	6	3
Body weight	(g)	268.3 ± 44.5	261.7 ± 17.1	240.5 ± 18.8	191.8 ± 10.7**
Brain	(g)	1.92 ± 0.06	1.98 ± 0.07	1.85 ± 0.05	1.71 ± 0.11**
	(g%)	0.73 ± 0.12	0.76 ± 0.03	0.77 ± 0.04	0.89 ± 0.07
Liver	(g)	9.34 ± 1.80	9.13 ± 0.67	8.39 ± 1.02	6.83 ± 0.35*
	(g%)	3.47 ± 0.21	3.50 ± 0.25	3.48 ± 0.18	3.56 ± 0.07
Spleen	(g)	0.51 ± 0.09	0.51 ± 0.10	0.55 ± 0.05	0.41 ± 0.02
	(g%)	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.03	0.23 ± 0.03*	0.21 ± 0.02
Kidneys	(g)	2.00 ± 0.34	1.88 ± 0.10	1.73 ± 0.18	1.55 ± 0.12*
	(g%)	0.75 ± 0.06	0.72 ± 0.02	0.72 ± 0.03	0.81 ± 0.04

^a: mean ± SD

*, **: p<0.05, p<0.01 vs. 0 ppm group

Table 5. Data for histopathological grading of the lesions developed in the peripheral nerves of dams.

Organ	Findings	Acrylamide in the drinking water (ppm)			
		0	50	100	200
No. of animals		3	3	3	3 ^b
Trigeminal nerve	Central chromatolysis of ganglion cells (+/++) ^a	0	3 (3/0)	3 (0/3)	3 (0/3)

^a: Grade of change: +; mild, ++; moderate

^b: One dam was killed due to inability of delivery.

Table 6. Data for morphometry of the lesions developed in the nervous systems of dams.

		Acrylamide in the drinking water (ppm)			
		0	50	100	200
No. of animals		3	3	3	2
Sciatic nerve (distal portion)					
Density	(/100 μm^2)	1.89 \pm 0.31 ^a	2.10 \pm 0.11	1.96 \pm 0.07	1.59
Degenerated axons	(%)	1.04 \pm 1.56	0.94 \pm 0.20	2.43 \pm 0.50*	5.78
Myelinated axons, <3 μm in diameter	(%)	7.82 \pm 1.57	10.45 \pm 2.80	13.02 \pm 1.59*	14.55
Cerebellar cortex, molecular layer					
SYP-immunoreactive aberrant dots	(/mm cortex)	0.44 \pm 0.11	0.75 \pm 0.27	3.18 \pm 0.45**	4.57

^a: mean \pm SD

*, **: p<0.05, p<0.01 vs. 0 ppm group

Abbreviation: SYP, synaptophysin

Table 7. Data for histopathological analysis of F1 offspring at weaning.

Organ	Findings	Males				Females			
		Acrylamide in the drinking water (ppm)				Acrylamide in the drinking water (ppm)			
		0	50	100	200	0	50	100	200
No. of animals		6	6	6	4	6	6	6	4
Cerebellum	Persisted external granule layer (+/+/+/+) ^a	6 (6/0/0)	6 (4/2/0)	6 (2/4/0)	4 (0/2/2) ^{††}	6 (5/1/0)	6 (5/1/0)	6 (1/4/1)	4 (0/2/2) [†]
	Apoptosis of granular cells (±/+/+)	6 (6/0/0)	6 (6/0/0)	6 (4/2/0)	4 (1/0/3)	6 (6/0/0)	6 (6/0/0)	6 (4/2/0)	4 (1/2/1)
Trigeminal N.	Central chromatolysis of ganglion cells	0	0	0	0	0	0	0	0
	Extramedullary hematopoiesis	0	1	0	0	0	0	0	0
Liver	Extramedullary hematopoiesis (±/+/+)	6 (0/0/6)	6 (0/2/4)	6 (1/5/0) ^{††}	2 (2/0/0) ^{††}	6 (0/3/3)	6 (0/1/5)	5 (1/3/1)	4 (4/0/0) ^{††}
	Loss of glycogen in cytoplasm, hepatocyte	0	0	0	3	0	0	0	2
	Brown pigment deposition, Kupffer cell	0	0	0	3	0	0	0	1
	Microgranuloma development	0	0	0	0	1	0	0	0
Spleen	Extramedullary hematopoiesis (±/+/+/+)	6 (0/0/0/6)	6 (0/0/2/4)	6 (0/3/3/0) ^{††}	4 (4/0/0/0) ^{††}	6 (0/0/5/1)	6 (0/0/6/0)	6 (1/3/2/0)	4 (3/1/0/0) ^{††}
	Hemosiderin deposition	0	0	0	1	0	0	0	0
Kidneys	Renal cyst	0	2	2	0	1	3	4	0
	Hyaline cast	1	0	0	0	0	0	0	0
	Focal interstitial inflammation	0	0	0	0	1	0	0	0
Testes	Retardation of spermatogenesis (+/+/+/+)	0	0	6 ^{**} (4/2/0) ^{††}	4 ^{**} (0/2/2) ^{††}	-	-	-	-
Epididymides	Focal hyaline droplet degeneration	0	1	0	0	-	-	-	-

^a: Grade of change: ±: slight; +; mild, ++; moderate, +++: severe

-: not available

^{**}: p<0.01 vs. 0 ppm group (Fisher's exact test)

[†], ^{††}: p<0.05, p<0.01 vs. 0 ppm group (Mann-Whitney's U-test)

Table 8. Data for histopathological analysis of F1 offspring at postnatal week 11.

Organ	Findings	Males				Females			
		Acrylamide in the drinking water (ppm)				Acrylamide in the drinking water (ppm)			
		0	50	100	200	0	50	100	200
No. of animals		6	6	6	4	6	6	6	3
Liver	Microgranuloma development	4	5	5	4	6	5	5	3
	Focal fatty degeneration, hepatocyte	0	0	0	1	0	0	0	0
Kidneys	Renal cyst	2	0	0	1	0	1	0	1
	Tubular hyperplasia (clear cell type)	1	0	0	0	0	0	0	0
	Regenerative tubules	3	6	3	3	2	3	2	1
	Hyaline cast	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mineralization, cortico-medullary junction	0	0	0	0	0	1	2	0
Skeletal muscle	Focal necrosis	1	2	0	0	1	0	0	1
Testes	Focal atrophy of seminiferous tubules	0	0	2	1	-	-	-	-
Epididymides	Cell debris in the epididymal duct	0	0	0	1	-	-	-	-

-: not available

Table 9. Data for morphometry of the lesions developed in the nervous systems of F1 offspring at weaning.

		Acrylamide in the drinking water (ppm)			
		0	50	100	200
<i>Males</i>					
No. of animals		6	6	6	4
Sciatic nerve (distal portion)					
Density	(/100 μm^2)	4.08 \pm 0.34 ^a	4.40 \pm 0.22	4.47 \pm 0.64	5.42 \pm 0.37**
Degenerated axons	(%)	0.85 \pm 0.17	0.67 \pm 0.17	0.76 \pm 0.20	0.72 \pm 0.18
Myelinated axons, <3 μm in diameter	(%)	18.62 \pm 2.32	19.11 \pm 2.50	22.04 \pm 5.08	25.51 \pm 1.87*
Cerebellar cortex, molecular layer					
SYP-immunoreactive aberrant dots	(/mm cortex)	0.29 \pm 0.09	0.26 \pm 0.11	0.32 \pm 0.16	0.44 \pm 0.09
<i>Females</i>					
No. of animals		6	6	6	4
Sciatic nerve (distal portion)					
Density	(/100 μm^2)	4.26 \pm 0.21	4.14 \pm 0.48	4.73 \pm 0.70	5.28 \pm 1.27
Degenerated axons	(%)	0.82 \pm 0.33	0.71 \pm 0.18	0.81 \pm 0.31	0.86 \pm 0.38
Myelinated axons, <3 μm in diameter	(%)	20.93 \pm 1.64	20.1 \pm 2.55	22.37 \pm 2.48	23.92 \pm 8.21
Cerebellar cortex, molecular layer					
SYP-immunoreactive aberrant dots	(/mm cortex)	0.55 \pm 0.17	0.46 \pm 0.17	0.55 \pm 0.27	0.64 \pm 0.33

^a: mean \pm SD

*, **: p<0.05, p<0.01 vs. 0 ppm group

Abbreviation: SYP, synaptophysin

Table 10. Data for morphometry of the lesions developed in the nervous systems of F1 offspring at postnatal week 11.

		Acrylamide in the drinking water (ppm)			
		0	50	100	200
<i>Males</i>					
No. of animals		6	6	6	4
Sciatic nerve (distal portion)					
Density	(/100 μm^2)	1.87 \pm 0.19 ^a	1.94 \pm 0.19	1.83 \pm 0.39	1.89 \pm 0.16
Degenerated axons	(%)	1.06 \pm 0.45	1.01 \pm 0.55	0.93 \pm 0.23	1.04 \pm 0.19
Myelinated axons, <3 μm in diameter	(%)	9.50 \pm 2.19	11.82 \pm 1.75	11.38 \pm 3.68	12.88 \pm 1.03
Cerebellar cortex, molecular layer					
SYP-immunoreactive aberrant dots	(/mm cortex)	0.58 \pm 0.17	0.63 \pm 0.28	0.53 \pm 0.20	0.51 \pm 0.12
<i>Females</i>					
No. of animals		6	6	6	3
Sciatic nerve (distal portion)					
Density	(/100 μm^2)	2.22 \pm 0.14	2.01 \pm 0.27	2.08 \pm 0.09	1.99 \pm 0.11
Degenerated axons	(%)	1.11 \pm 0.84	0.89 \pm 0.40	1.08 \pm 0.71	1.30 \pm 0.23
Myelinated axons, <3 μm in diameter	(%)	11.47 \pm 0.76	10.99 \pm 2.01	11.41 \pm 1.90	12.03 \pm 2.39
Cerebellar cortex, molecular layer					
SYP-immunoreactive aberrant dots	(/mm cortex)	0.74 \pm 0.27	0.59 \pm 0.36	0.61 \pm 0.29	0.67 \pm 0.38

^a: mean \pm SD

Abbreviation: SYP, synaptophysin

ライフステージによるアクリルアミドの発がん感受性に関する研究

分担研究者 今井 俊夫 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

研究要旨

本研究では、アクリルアミド (AA) の発がん感受性あるいは標的性に対する、乳幼児期と成熟期暴露の違いについて実験的に明らかにし、AA の高摂取群とされる小児を含むヒトに対するリスク管理に資する情報を得ることを目的とする。18 年度は、乳幼児期投与によるラット多臓器中期発がん性試験法の実施に先立ち、その用量設定のため、AA の乳幼児～思春期飲水投与による予備実験を 10、20、40 ppm 濃度で実施した。その結果、いずれの用量でも、一般状態、体重、摂餌量及び飲水量に明らかな影響がみられなかったことより、AA の乳幼児～思春期投与において 40 ppm は耐量であると判断された。また、病理組織学的には、40 ppm 群の雄で精巣毒性、雌では成熟期投与では報告のない心臓毒性を示唆する所見が得られ、今後の詳細な検討を要する。現在、AA の 20、40、80 ppm の乳幼児期飲水投与による多臓器中期発がん性試験を開始し、継続している。

A. 研究目的

アクリルアミド (AA) は、実験的に神経毒性、精巣毒性、遺伝毒性及び発がん性を示すことが知られ、中でも遺伝毒性を伴う発がん性のヒトへのリスクが懸念されている。現在、米国を中心に AA あるいはその代謝物で生体内活性の高いグリシドアミド (GA) の発がん性試験及び発達期神経毒性試験により低用量長期間投与による毒性評価を目的とした研究が行われており、それらの結果が明らかにされた際に再度リスク評価をすべきであるとされている。一方、現時点における AA の実験的毒性研究の課題として、これまでの研究では職業的暴露に対するリスク評価が主な目的であったことから、動物モデルとして主に成熟ラットなどを用いた研究結果を中心に報告さ

れ、胎生・乳幼児期あるいは春機発動期におけるデータの極めて少ないことが挙げられる。胎生・幼若期の動物は化学物質の代謝様式や臓器組織の発育速度、成熟度のみならず、臓器への血流量や血液-脳関門の機能など生理的な違いにより化学物質に対する毒性反応も成熟動物と異なる可能性がある。AA の高摂取者が小児であり、また AA は母親から胎児へ胎盤移行する可能性も示されていることから、当該期投与による毒性の比較評価を早急に実施することが重要である。

本研究では、AA の発がん感受性及び標的性に対する乳幼児期と成熟期暴露の違いについて実験的に明らかにする。特に用量反応性を考慮した検索を行うことにより、AA の高摂取群とされる小児を含むヒトに対するリスク管理に資する情報を得ることが可能となる。

B. 研究方法

(1) 乳幼児～思春期投与による予備実験

妊娠 F344 ラット 12 匹を日本チャールズリバーより購入し、各群 3 匹の 4 群に分けた。出生後の児動物は、雌雄各群 12 例に揃えたが、雌雄の出生児数が均等でなかった群については、動物数を雌雄合わせて 24 匹とした。各群の母動物には、出産直後より 3 週後の離乳まで、AA を 0 (対照)、10、20 及び 40 ppm 濃度で飲料水に混じて自由摂取させた。離乳後は、母動物はエーテル麻酔下で屠殺した。離乳後の各群の児動物には母動物と同様の方法で AA を 9 週間投与した。最高投与量の 40 ppm は、ラットの長期試験における発がん用量である (Johnson KA et al., 1986; Friedman MA et al., 1994)。実験期間中は、一般状態を毎日観察し、体重、摂餌量、飲水量は週 1 回測定した。12 週間の投与期間終了後は、全動物をエーテル深麻酔下で大動脈より放血屠殺して剖検を行った。脳、甲状腺 (含上皮小体)、胸腺、肺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓及び精巣については摘出後、重量を測定した。これらの臓器に加え、鼻腔、気管、大動脈、下垂体、唾液腺、舌、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、脾臓、膀胱、精巣上体、前立腺、精嚢、卵巣、子宮、膣、乳腺、皮膚、リンパ節、胸骨、大腿骨 (含骨髓)、坐骨神経、三叉神経、脊髄、眼球、ハーダー腺、大腿筋及び肉眼的異常部位についても摘出し、10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定、常法に従ってパラフィン包埋切片、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、対照群及び 40 ppm 群について病理組織学的検索を行った。組織学的に AA 投与に起因することが疑われた臓器については 10 及び 20 ppm 群についても観察した。

(2) 乳幼児期投与によるラット多臓器中期発

がん性試験

妊娠 F344 ラット 36 匹を日本チャールズリバーより購入し、各群 6 匹の 1~6 群に分けた。出生後の児動物は、各群雌雄各 12 例に揃えたが、6 群中 1 群の母動物 1 匹については、出産児数が 1 匹で児動物の発育も不良であったことから除外した。1~4 群の母動物には、出産直後より 3 週後の離乳まで、AA を各 0 (対照)、20、40 及び 80 ppm 濃度で飲料水に混じて自由摂取させている。5、6 群については実験途中より抗甲状腺剤処置を行うサテライト群として AA を各 0 (対照) 及び 40 ppm 濃度で投与している。AA の投与量は、乳幼児～思春期投与の予備実験で一般状態、体重、摂餌量及び飲水量に明らかな影響のみられなかった 20 及び 40 ppm に加え、より高い用量として 80 ppm を設定した。現在、生後 5 週が経過し、実験を継続している。離乳後は、母動物はエーテル麻酔下で屠殺し、離乳後の各群の児動物には AA を母動物と同様の方法で 3 週間の予定で投与している。AA 投与終了 1 週後に発癌物質処置として肝臓、腎臓、肺、甲状腺、乳腺など多臓器に発がん標的性を示す *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) を 1~6 群の雌雄の児動物に 50 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与する。実験期間中、体重及び摂餌量を週 1 回測定している。また生後 10 週目より週 1 回、触診により乳腺腫瘍の発生状況を観察してノギスにてその大きさ (たて×よこ×高さ) を測定する。実験期間終了後は、エーテル深麻酔下にて動物を放血屠殺し、剖検においては剥皮後、皮下結節/腫瘍を詳細に観察して大きさを測定する。更に肝臓、腎臓、肺、脾臓、胸腺、リンパ節、甲状腺、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、脳、乳腺、膀胱、及び肉眼的異常部位を摘出し、病理組織学的検索を行う。なお、触診及び剖検時に測定した腫瘍 (腫瘍) の大きさより、次の式により体積を計算する。

体積=(たて)×(よこ)×(高さ)× $\pi/6$

統計方法：体重、臓器重量及び乳腺腫瘍の発生数、体積については Bertlett 検定の後、ANOVA あるいは Kruskal Wallis 検定を行い、群間差が認められた場合は Dunnett の多重比較で判定する。乳腺腫瘍及び他臓器の病理組織所見の発生頻度については Fisher の直接確率検定法を用いる。

(倫理面への配慮)

使用する動物は最小限に留めた。投与実験は飲水による経口投与が主体であり、また動物は全てエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、その他の実験手技についても動物の愛護に十分配慮して行っている。動物の飼育、管理に当っては、「国立医薬品食品衛生研究所実験動物に関する指針」に従っている。

C. 研究結果

(1) 乳幼児～思春期投与による予備実験

実験期間を通して、いずれの群においても AA 投与に起因すると考えられる死亡及び一般状態の異常は認められなかった。体重については、雄では群間の明らかな差はみられなかったが、雌の 20 及び 40 ppm 群において生後 3～9 週目に僅かながら、統計学的に有意な ($p < 0.05$, 0.01) 低値を示した (図 1)。摂餌量及び飲水量に AA 投与による明らかな影響は認められず (図 2、3)、飲水量より算出した AA の 10、20 及び 40 ppm 群における AA 摂取量は、雄では各 1.0、2.1 及び 4.4 mg/kg 体重/日、雌では各 1.2、2.5 及び 4.9 mg/kg 体重/日であった。剖検時の臓器重量については、雄では AA 投与による影響はみられなかったが、雌の 40 ppm 群において、対照群と比し有意な甲状腺 ($p < 0.01$) 及び脾臓 ($p < 0.05$) 相対重量の増加が認められた (表 1)。病理組織学的には、精巣、精巣上体及び心臓において AA 投与による、あるいは AA

投与によることが疑われる変化が認められた (表 2)。即ち、精巣では両側性の精細管萎縮の発生頻度が、対照群と比し 40 ppm 群で有意に ($p < 0.01$) 増加し、関連する変化として精巣上体では、精巣上体管内にみられる剥離精上皮の発生頻度が 40 ppm 群で有意に ($p < 0.05$) 増加した (写真 1)。心臓では、心筋炎が雌雄の対照群の各 2/7 例及び 2/17 例の乳頭筋あるいは左心室壁などに散発性にみられたが、いずれも軽度な変化であった。一方、40 ppm 群においては雌雄各 4/12 例にみられた対照群と同等の軽度な心筋炎に加え、雄の 5/12 例には右心室壁心底側、心外膜下の中等度の心筋炎が認められた (写真 2)。雌において腎臓の石灰沈着が対照群の 15/17 例に比し、40 ppm 群では 6/12 例とその発生頻度が有意に ($p < 0.05$) 減少した。その他の臓器組織における病理組織学的変化に関しては、AA 投与による明らかな影響は認められなかった。

(2) 乳幼児期投与によるラット多臓器中期発がん性試験

現在のところ、児動物は生後 5 週間を経過したが、いずれの群においても AA 投与に起因すると考えられる死亡は認められていない。体重については、生後 2 週目より、雌雄の全ての AA 投与群において用量反応性のある有意な ($p < 0.05$, 0.01) 体重の低値がみられ (表 3)、摂餌量及び飲水量も減少傾向を示している。

D. 考察

AA の乳幼児期投与によるラット多臓器中期発がん性試験の実施に先立ち、乳幼児～思春期における AA の飲水投与による予備実験を 10、20、40 ppm 濃度で実施し、一般状態の観察、体重、摂餌量、飲水量及び臓器重量の測定、全身の諸臓器組織の病理組織学的検索を行った。その結果、雌雄のいずれの群においても AA 投与に起因すると考えられる死亡、一般状態の異

常はみられなかった。また、雌雄の摂餌量、飲水量及び雄の体重に明らかな変化は認められなかったが、雌の 20 及び 40 ppm 群において生後 3~9 週目に僅かな体重増加抑制がみられた。しかし、投与期間終了時には、雌のいずれの群にも体重への影響は殆ど認められなかったことから、AA の乳幼児~思春期投与において 40 ppm は耐量であると判断された。

臓器重量に関しては、雌の 40 ppm 群において、甲状腺及び脾臓の重量増加がみられたが、いずれにおいても AA 投与に関連する病理組織学的な異常は認められず、原因は明らかではなかった。病理組織学的所見に関しては、雄の 40ppm 群において精巣の精細管萎縮及び精巣上体における剥離精上皮の発生頻度が、対照群と比して有意に増加した。AA のラットにおける精巣毒性に関しては、7-8 週齢の SD ラットに対する 5 日間投与では 5 mg/kg 体重/日の用量で病理組織学的変化の発現することが報告されている (Yang H et al., 2005)。今回の実験における雄の 40ppm 群の実投与量の算出値が 4.4 mg/kg 体重/日であることから、乳幼児期の AA 投与による精巣毒性に対する感受性は思春期投与とほぼ同等であると推測されたが、ラットの系統あるいは投与期間などを合わせた実験での比較が必要である。心臓については、雌の 40ppm 群において、右心室壁心底側、心外膜下の巣状心筋炎が 5/12 例に認められた。F344 ラットにおける自然発生病変として、心尖、乳頭筋あるいは左心室などに散発性にみられる心筋炎は広く知られており、本実験においても雌雄の対照群の少数例に認められた。しかし、雌の 40 ppm 群にみられた病変については、右心室心底側と部位的に特徴があり、その程度も対照群に比して強かったことから、その程度も対照群に比して強かったことから、AA 投与の影響であることが否定できない。今後、当該変化が AA の乳幼児期投与に特異的であるのか、

成熟期投与でも誘発されるのか、あるいはその感受性を含め、更に詳細な検討を加える必要がある。雌において腎臓の石灰沈着が対照群の 15/17 例に比し、40 ppm 群では 6/12 例とその発生頻度が有意に ($p < 0.05$) 減少したが、その毒性学的意義は明らかではなかった。

乳幼児期投与によるラット多臓器中期発がん性試験については、生後 5 週が経過した段階であり、今後の経過観察を要するが、生後 2 週目より、雌雄の全ての AA 投与群において用量反応性のある有意な体重の低値及び摂餌量、飲水量の減少傾向がみられている。乳幼児~思春期の 12 週間投与による予備実験では、特に雄の 40ppm 群においては体重、摂餌量、飲水量のいずれにも影響はみられなかったことから、本中期発がん性試験で AA の影響が比較的強く現れている。その原因として、各群の動物数が多く、ばらつきの比較的小さいことが考えられるが、詳細については不明である。

E. 結論

AA の乳幼児期投与によるラット多臓器中期発がん性試験法の実施に先立ち、その用量設定のため、乳幼児~思春期における AA の飲水投与による予備実験を 10、20、40 ppm 濃度で実施した。その結果、いずれの用量においても一般状態、体重、摂餌量及び飲水量に明らかな影響がみられなかったことより、AA の乳幼児~思春期投与において 40 ppm は耐量であると判断された。また、病理組織学的には、40 ppm 群の雄で精巣毒性、雌では成熟期投与では報告のない心臓毒性を示唆する所見が得られ、今後の詳細な検討を要する。現在、AA の 20、40、80 ppm の乳幼児期飲水投与による多臓器中期発がん性試験を開始し、継続している。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Ota, Y., Hasumura, M., Okamura, M., Takahashi, A., Ueda, M., Onodera, H., Imai, T., Mitsumori, K., Hirose, M.: Chronic toxicity and carcinogenicity of dietary administered ammonium sulfate in F344 rats. *Food Chem. Toxicol.*, 44, 17-27 (2006)
- (2) Takizawa, T., Imai, T., Ueda, M., Onodera, H., Hirose, M.: Comparison of enhancing effects of different goitrogen treatments in combination with β -estradiol-3-benzoate for establishing a rat two-stage thyroid carcinogenesis model to detect modifying effects of estrogenic compounds. *Cancer Sci.*, 97, 25-31 (2006)
- (3) Onose, J., Imai, T., Hasumura, M., Cho, Y.M., Hirose, M.: A new medium-term rat colon bioassay applying neoplastic lesions as endpoints for detection of carcinogenesis modifiers-validation with known modifiers. *Cancer Lett.*, 232, 272-8 (2006)
- (4) Imai, T., Onose, J., Hasumura, M., Takizawa, T., Hirose, M.: Indomethacin induces small intestinal damage and inhibits amitrole-associated thyroid carcinogenesis in rats initiated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Toxicol. Lett.*, 164, 71-80 (2006)
- (5) Cho, Y.M., Onodera, H., Ueda, M., Imai, T., Hirose, M.: A 13-week subchronic toxicity study of dietary administered morin in F344 rats. *Food Chem. Toxicol.*, 44, 891-897 (2006)
- (6) Cho, Y.M., Imai, T., Hasumura, M., Hirose, M.: Lack of enhancement of susceptibility to mammary and thyroid carcinogene-

sis in rats exposed to DMBA and DHPN following prepubertal iodine deficiency. *Cancer Sci.*, 97, 1031-1036 (2006)

(7) Imai, T., Hasumura, M., Cho, Y.M., Onose, J., Hirose, M.: Depression of T cell-mediated immunity reduces sulfadimethoxine-induced capsular inflammation and inhibits associated development of invasive thyroid follicular cell carcinomas in rats. *Cancer Sci.*, 98, 294-298 (2007)

(8) Hasumura, M., Ueda, M., Onose, J., Imai, T., Hirose, M.: Lack of a significant effect of arctiin on development of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Nutr. Cancer* (In press)

2. 学会発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

該当なし。

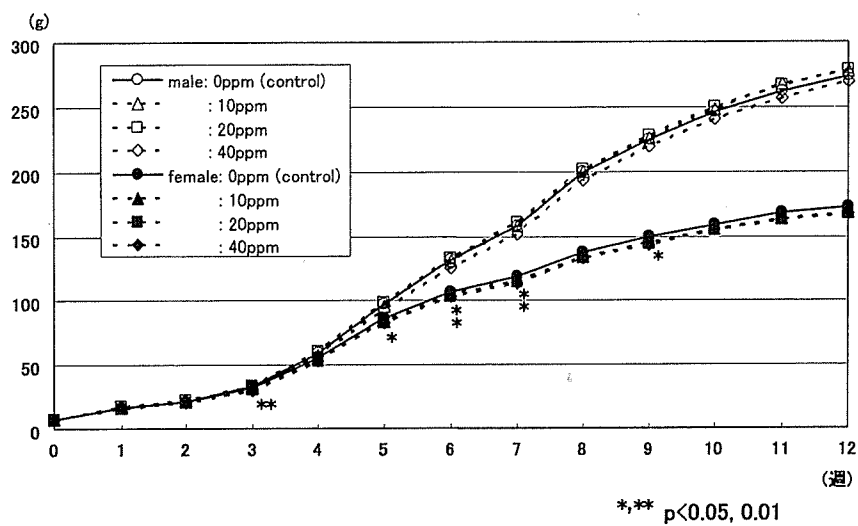


図1 アクリルアミドを乳幼児期に12週間飲水投与したラットの体重曲線

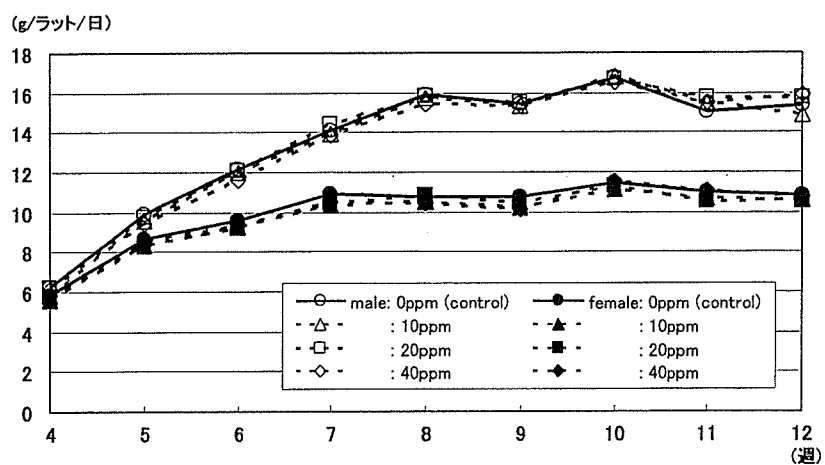


図2 アクリルアミドを乳幼児期に12週間飲水投与したラットの摂餌量の推移

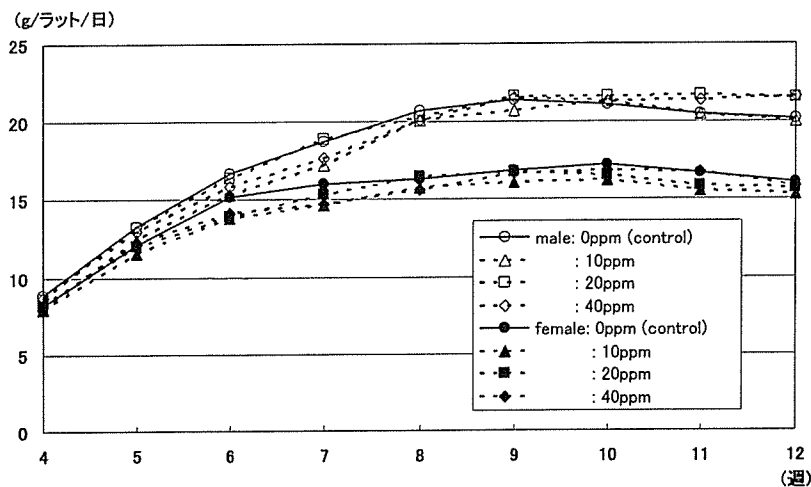


図3 アクリルアミドを乳幼児期に12週間飲水投与したラットの飲水量の推移

表1 アクリルアミドを乳幼児期に12週間飲水投与したラットの相対臓器重量

	用量 (ppm)	0 (対照)	10	20	40
雄	動物数	7	12	13	12
体重 (g)		274±10	276±12	279±11	268±14
脳 (g/100g b.w.)		0.70±0.03	0.70±0.03	0.69±0.02	0.71±0.03
甲状腺 (mg/100g b.w.)		6±1	±	±	5±1
胸腺 (g/100g b.w.)		0.10±0.01	0.10±0.01	0.10±0.01	0.10±0.01
肺 (g/100g b.w.)		0.35±0.02	0.35±0.03	0.36±0.02	0.35±0.02
心臓 (g/100g b.w.)		0.29±0.01	0.30±0.02	0.30±0.01	0.30±0.01
脾臓 (g/100g b.w.)		0.22±0.01	0.25±0.11	0.22±0.00	0.23±0.01
肝臓 (g/100g b.w.)		3.77±0.16	3.75±0.28	3.78±0.28	3.82±0.21
副腎 (mg/100g b.w.)		12±2	12±2	12±1	11±1
腎臓 (g/100g b.w.)		0.65±0.02	0.67±0.03	0.67±0.03	0.68±0.03
精巣 (g/100g b.w.)		1.06±0.04	1.03±0.06	1.06±0.03	1.06±0.05
雌	動物数	17	12	11	12
体重 (g)		171±8	169±6	165±5	166±7
脳 (g/100g b.w.)		1.05±0.05	1.04±0.04	1.08±0.02	1.04±0.04
甲状腺 (mg/100g b.w.)		7±1	±	±	9±1 **
胸腺 (g/100g b.w.)		0.13±0.01	0.13±0.01	0.13±0.01	0.13±0.01
肺 (g/100g b.w.)		0.43±0.02	0.42±0.03	0.44±0.02	0.43±0.03
心臓 (g/100g b.w.)		0.33±0.02	0.32±0.01	0.32±0.01	0.32±0.01
脾臓 (g/100g b.w.)		0.24±0.01	0.24±0.01	0.25±0.01	0.25±0.01 *
肝臓 (g/100g b.w.)		2.96±0.15	3.07±0.19	3.10±0.09	3.00±0.14
副腎 (mg/100g b.w.)		24±4	22±4	25±3	21±3 * p<0.05
腎臓 (g/100g b.w.)		0.68±0.03	0.67±0.04	0.67±0.03	0.67±0.03 ** p<0.01

表2 アクリルアミドを乳幼児期に12週間飲水投与したラットの主要臓器における病理組織所見

		用量(ppm)	0(対照)	10	20	40
雄	動物数		7	12	13	12
精巣						
	精細管萎縮, 両側 +		0	1	0	8 **
精巣上体						
	剥離精上皮, 両側 +		0	-	-	7 *
心臓						
	心筋炎 +		2	-	-	4]**
	++		0	-	-	5]**
雌	動物数		17	12	11	12
心臓						
	心筋炎 +		2	-	-	4
腎臓						
	石灰沈着 +		15	-	-	6 *

+ 軽度; ++ 中等度 **, ** p<0.05, 0.01

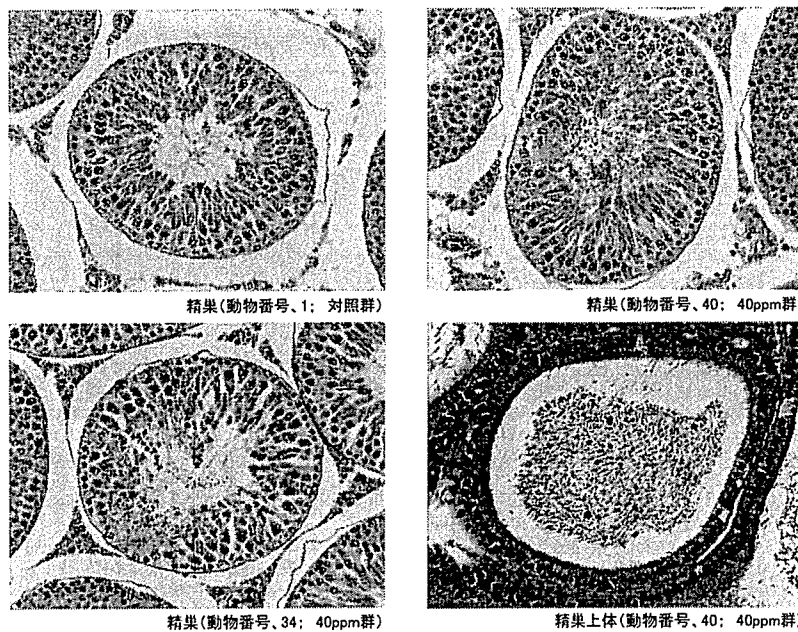
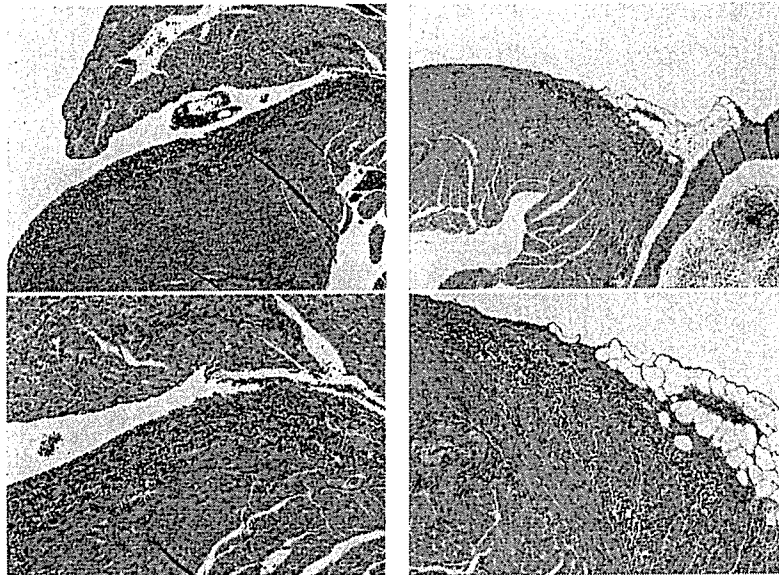


写真1 アクリルアミドを乳幼児期に12週間飲水投与したラット精巣、精巣上体の病理組織像



上段、弱拡大; 下段、強拡大(動物番号、37; 40ppm群)

上段、弱拡大; 下段、強拡大(動物番号、38; 40ppm群)

写真2 アクリルアミドを乳幼児期に12週間飲水投与したラット心臓の病理組織像

表3 アクリルアミドの乳幼児期飲水投与によるラット多臓器中期発がん性試験おける体重推移

群	(ppm)	N	生後(週)						
			0	1	2	3	4	5	
雄	1	0	24	7.1	15.3	20.9	28.8	48.3	81.7
	2	20	24	6.7	14.2	19.2	27.7	46.5	79.3
	3	40	24	7.0	14.1	18.6	26.6**	45.6*	78.2
	4	80	24	6.9	13.0	17.0	23.0**	39.8**	69.6**
	5	0	24	6.9	14.6	19.5	29.4	49.6	84.5
	6	40	20	6.9	13.7	18.0	26.8**	45.0*	76.9*
雌	1	0	24	6.7	14.6	19.5	28.9	47.0	74.3
	2	20	24	6.4	13.2	17.9	26.3*	42.7**	69.5**
	3	40	24	6.8	13.4	17.6	26.0**	43.6**	70.5**
	4	80	24	6.7	12.5	16.4	22.4**	37.9**	62.9**
	5	0	24	6.7	14.6	19.7	29.5	48.3	76.0
	6	40	20	6.7	13.6	17.8	26.9	44.0	70.4

*,** p<0.05, 0.01

厚生労働科学研究費補助金・食品の安心・安全性確保推進研究事業
食品中の遺伝毒性を有する有害物質のリスク管理に資する総合研究

分担研究報告書

生体内代謝機構を考慮したアクリルアミドの遺伝毒性抑制物質の探索

分担研究者： 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部第一室 室長

研究要旨

食品の安全性において、ポテトチップス等に含まれる発がん性物質であるアクリルアミド(AA)が問題となっている。これまでの我々の研究では、AAの細胞毒性、遺伝毒性はそれほど強くはないが、その代謝物であるグリシダミド(GA)が、点突然変異を主とする遺伝子突然変異を強く誘発することを明らかにした。AAは一般的に生体内で薬物代謝酵素CYP2E1によってエポキシ体であるGAに変換されると言われている。CYP2E1を高発現するトランスジェニック細胞であるh2E1v2細胞、および5種類の薬物代謝酵素を発現するMCL-5細胞(CYP1A2、CYP2A3、CYP3A4、CYP2E1、mEpoxide hydrolase)を用いて細胞毒性と共に、小核試験、TK突然変異試験を行った。h2E2v2細胞は親細胞のAHH-1に比べCYP2E1のタンパク量、酵素活性とも3倍以上高く、CYP2E1に代謝されるdimethylnitrosamine(DMN)に強い感受性を示したのに対して、AAに対しては同程度の反応性しか示さなかった。一方、MCL-5はAAに対して高い感受性を示した。このことは、AAの代謝にはCYP2E1以外の代謝酵素が関与してことを示すものである。AAの毒性抑制を考えるには、まずその代謝様式を明らかにする必要がある。

A. 研究目的

食品の高温調理により自然発生することが報告されているアクリルアミド(AA)が、人の健康にどれだけの影響を与えるかが問題となっている。

AAはヒトでの発がん性の証拠は不十分であるものの、ラット、マウスにおいて発がん性が認められることからグループ2Aにランクされている。遺伝毒性に関しては細菌を用いた遺伝子突然変異試験(エームス

試験)ではすべて陰性を示し、真核生物を用いたほとんどの試験系ではin vitro、in vivo試験とも陽性結果が得られている。我々のこれまでの研究では、AAの代謝物であるグリシダミド(GA)が、ほ乳類細胞において、強い遺伝素突然変異誘発性を示すことが明らかになり、AAの生体摂取は遺伝毒性、発がんリスクを増加させることが示された。このようなことから、日常生活に置いて、できるだけAAの摂取量を減らすこと、また、AAが生体内で速やかに解毒させ

ることが、そのリスクを低減させることに重要であることが示唆された。

本研究ではこのような状況の下、AAによる遺伝毒性誘発機構を解明し、その対抗する有効な抑制手段を見るけることを目的とする。これまでの研究では、AAによる遺伝毒性の誘発機構の解明のため、1) ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 を用いて、細胞毒性試験、遺伝子突然変異試験、小核試験、コメット試験を行い、*in vitro*での遺伝毒性誘発性を明らかにし、また、2) ラットおよびヒト S9 を試験系に加え、薬物代謝による遺伝毒性への影響を検討した。さらに、3) AAによって誘発された突然変異体のクローニングし、遺伝子解析の結果から突然変異誘発のメカニズムの解析を行った。このような研究から明らかになったことは以下の点である

- 1) AA の *in vitro* での細胞毒性、遺伝毒性はそれほど強くないが、その代謝物である GA は強い毒性を示す。
- 2) GA は全ての遺伝毒性試験で陽性を示した。突然変異体の解析から、GA は主として DNA に直接損傷を与え、点突然変異を誘発するものと考えられた。
- 3) *In vitro* で S9 を加えた系では、AA の毒性が増強されないことから、AA の代謝は従来の S9 存在下の系では働かない。この中で、とくに 3) の AA の毒性発現様式、特に薬物代謝様式を明らかにすることは、その毒性を軽減する方法を考える上で重要である。

本年度は、AA が GA に代謝される *in vitro* 試験系を確立するため、薬物代謝酵素を発現するトランスジェニック細胞を用いて、その毒性発現様式機構の解明を目的とした。

B. 研究方法

1) 試験化合物

アクリルアミド (AA) (M.W. 71, シグマ)、グリシダミド (GA) (M.W. 87, LKT Laboratory) は、滅菌蒸留水で調整した。

2) トランスジェニック細胞

ヒトリンパ芽球細胞株 AHH-1 と、それを基礎としたトランスジェニック細胞、h2E1V2 と、MCL-5 を用いた。h2E1V2 は CYP2E1 を、MCL-5 は 5 つの代謝酵素 (CYP1A2, CYP2A3, CYP3A4, CYP2E1, mEpoxide hydrolase) を高発現する。これら細胞は、BD Bioscience の Dr. Crespi から供与された。h2E1V2 細胞のコントロールとして、親細胞である AHH-1 細胞を、MCL-5 細胞のコントロールとしては TK6 細胞を用いた。

4) CYP2E1 タンパクおよび、酵素活性の測定

CYP2E1 のタンパク量は抗体 (Anti-Rat CYP2E1, 第一化学薬品) を用いたウェスタンブロット法により行った。検出には ECL (Bio-Rad) による化学発光を用いた。

Chlorzoxazone (CXZ) は CYP2E1 基質となり、CYP2E1 によって 6 位が水酸化され、6-OH CXZ となる。反応液における 6-OH CXZ を HPLC 法により定量して CYP2E1 活性を求めた。また、内部標準として 7-OH coumarin を添加した。

4) 被験物質処理

増殖期の細胞を振とうにより単一細胞にして細胞数を計数し、細胞濃度を調整しフラスコに播種し、用時調製した化合物溶液を 1% 添加し、24 時間連続処理した。処理終了後、細胞懸濁液の一部を用いて、コールターカウンタで細胞数を測定し、細胞毒

性作用の指標となる相対生存率(RS)測定のために細胞をプレーティングした(後述)。残りの細胞懸濁液については、後述の各実験に用いた。各群1つの細胞懸濁液を用いて処理を行い、必要に応じてその細胞懸濁液の一部を採取して、それぞれの実験に用いた。

5) 小核試験

被験物質で処理した細胞を正常培地で48時間培養し小核の標本を作製した。培養細胞液を遠心して上澄を捨て、0.075 M KCl水溶液を加えて室温で低張処理を行い、固定液(メタノール:氷酢酸=3:1, v/v)を静かに加えた。遠心(1000~1500 rpm, 約5分)による固定液の更新を2回繰り返したのち、細胞を少量の固定液に浮遊させ、その懸濁液を伸展器上であらかじめ約30℃に暖めてあるスライドグラスに滴下し、小核標本を作製した。観察直前に20 µg/mLのアクリジンオレンジ溶液をスライドグラス上に滴下して染色し、B励起による蛍光顕微鏡下で1000~2000細胞あたりの小核を有する細胞の数を計数した。

6) TK 遺伝子突然変異試験

処理終了直後と発現時間(3日間)終了時に細胞懸濁液の一部を用いて、コロニー形成率(それぞれPE0およびPE3)を算出した。また、処理終了直後から発現時間終了までの間毎日細胞数を計測し、各濃度における相対増殖率(RSG)を算出した。処理終了3日(発現時間終了)後に96wellプレートに細胞を3 µg/mLトリフルオロチミジン(TFT)下ではん種し、14日目に突然変異コロニー(TFT耐性コロニー)の数を計数し、突然変異率を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用したヒト細胞は米国 American Type Culture Collection (ATCC)に登録済みの株化細胞で、国際的に広く普及している細胞であり、倫理上問題はない。また、全ての実験は本研究所倫理規定に準拠して行った。

C. 研究結果

1) CYP2E1 タンパク、および酵素活性の発現

各細胞におけるCYP2E1タンパク量をウェスタンブロット法により測定した(図1)。対照細胞であるAHH-1に対して、トランスジェニック細胞h2E1v2では5倍以上のタンパク量が確認できた。MCL-5においても2倍以上のタンパク量が確認できた。

CYP2E1の基質であるCXZを用いたCYP2E1の酵素活性量を表1に示した。対照細胞であるAHH-1に対して、トランスジェニック細胞h2E1v2の酵素活性は、3.5倍であった。また、対照細胞であるTK6に対して、トランスジェニック細胞MCL-5の酵素活性は、0.7倍であった。

2) h2E1v2 と AHH-1 の比較

トランスジェニック細胞であるh2E1v2細胞と、対照細胞であるAHH-1細胞を用いてAAを0.7~5.6 mMの濃度で曝露したところ、AHH-1細胞とh2E1v2細胞に対して、同程度の細胞毒性を示した。また、小核誘発頻度、遺伝子突然変異頻度にも差は認められなかった(図2)。同様にGAでも両細胞に顕著な差は認められなかった。

3) MCL-5 と TK6 の比較

MCL-5とTK6細胞を同様にAAで0.7~5.6

mM の濃度で曝露した。MCL-5 は TK6 に比べて細胞毒性、小核誘発性に対してわずかに感受性を示し、また TK 突然変異に対して強い反応性を示した (図 3)。GA に対しては大きな差は認められなかった。

4) Dimethylnitrosamine (DMN) に対する h2E1v2 と AHH-1 の比較

トランスジェニック細胞である h2E1v2 の CYP2E1 活性が実際に薬物代謝を促進していることを証明するため、CYP2E1 に代謝される代表的な化学物質である DMN を用いて両細胞を試験し、比較した。H2E1v2 は AHH-1 に比べて極めて強い細胞毒性、小核誘発性、遺伝子突然変異誘発性を示した。従って、この細胞での CYP2E1 活性は機能していることが示された。

D. 考 察

これまでの我々の研究で、AA と GA の遺伝毒性について比較したところ、AA はほとんど *in vitro* では毒性を示さなかったのに対して、GA の遺伝毒性は強く、主として点突然変異を主体とする DNA 損傷作用を持つことを報告した。このことから、AA の毒性の本体はその代謝物である GA であると結論した。

AA は CYP2E1 により、エポキシ環をもつ GA に変換され、強い遺伝毒性物質に変わったことが予想される。トランスジェニック BigBlue マウスを用いた AA と GA の突然変異の結果では、それぞれ 10、50ppm の飲水で 50 日間投与し、4 週間後に肝臓での突然変異は、両化合物とも有意に上昇し、むしろ AA でその誘発率は高意図の報告がある。また、突然変異スペクトルを比較したところ、AA も GA も GC>TA のトランスバージョン

を主体とする点突然変異であることが示された。また、CYP2E1-null のマウスを用いて、AA に対する遺伝毒性をコメット試験、小核試験をしたところ正常マウスに比べて反応性が低いとの報告もある。*In vitro* では CYP2E1 を高発現する V79 細胞を用いて、AA の遺伝毒性を、SCE を指標として評価したところ高い反応性が観察されている。このような事実は AA は CYP2E1 で代謝を受け GA に変換され、毒性を発現するという説を支持するものである。

しかしながら、我々のこれまでの実験では AA は S9 存在下でも毒性の増強作用は観察されず、*in vitro* での代謝を再現することはできなかった。CYP2E1 で代謝される他の薬物は代謝活性化を受け、毒性を発現することから、AA の代謝様式の解明には S9 の系は不適切であること、もしくは AA は CYP2E1 以外の薬物代謝酵素により代謝される可能性が示唆された。

今回、CYP2E1 を高発現するトランスジェニック細胞 (h2E1v2、MCL-5) を用いて、AA および GA の遺伝毒性 (小核誘発能、TK 遺伝子突然変異誘発頻度) 試験を実施した。また、細胞分画を行い、HPLC 法により酵素の定量、ウェスタンブロット法により CYP2E1 タンパク量を測定し、遺伝毒性との相関を検討した。CYP2E1 を発現する h2E1v2 細胞は、その対照細胞である AHH-1 細胞に比べて AA による細胞毒性、遺伝毒性に差は見られなかった。しかしながら、CYP2E1 によって代謝活性化される DMN を暴露したところ、h2E1v2 細胞は、細胞毒性、小核誘発、遺伝子突然変異にいずれも AHH-1 よりも強い反応性を示した。さらに、h2E1v2 は対照細胞に比べ、CYP2E1 タンパク量の増加、酵素活

性の上昇が確認された。これらの結果は、h2E1v2 細胞は間違いなく CYP2E1 高発現細胞であるのも係わらず、AA に対しては反応しないことを示す。この理由としては、a) AA は従来考えられてきた CYP2E1 以外の代謝酵素により代謝される。b) AA の代謝活性化には CYP2E1 だけでなく他の酵素も関与する。ことが考えられる。

MCL-5 は CYP2E1 だけでなく、CYP1A2、CYP2A3、CYP3A4、mEpoxide hydrolase を高発現するトランスジェニック細胞である。この細胞は、対照細胞である TK6 細胞と比べて、AA に対する細胞毒性、遺伝毒性に対して高感受性を示した。このことから、AA の代謝経路は、CYP2E1 以外にも酵素が存在している可能性が考えられた。今後、他の酵素 (CYP1A2、CYP2A3、CYP3A4、mEpoxide hydrolase 等) を責任酵素として考え研究する必要がある。AA の代謝経路の解明が、新しい解毒方法の確立に重要と考えられる。

E. 結論

AA は *in vitro* で、CYP2E1 を高発現するトランスジェニック細胞でも代謝活性化による毒性の増強が観察されなかったことから、AA は CYP2E1 以外の経路によって代謝されるか、もしくは GA への代謝には、それに加えた他の経路の必要性が考えられた。複数の薬物代謝酵素を発現する MCL-5 細胞では毒性の増強が観察されたことはその仮説を支持するものである。AA の毒性軽減法の確立のためにはこの代謝系路の解明と、それを利用した *in vitro* 試験系の構築が重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Koyama, N., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Koizumi, 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. *Mutat. Res.*, 603, 151-158 (2006)

Oka, H., Ikeda, K., Yoshimura, H., Ohuchida, A., Honma, M. Relationship between p53 status and 5-fluorouracil sensitivity in 3 cell lines. *Mutat. Res.*, 606, 52-60 (2006)

Umebayashi, Y. Honma, M., Abe, T., Ryuto, H. Suzuki, H., Shimazu, T., Ishioka, N., Iwaki, M., Yatagai, F. Mutation induction after low-dose carbon-ion beam irradiation of frozen human cultured cells. *Biological Sci. in Space*, 19, 237-241 (2006)

Burlinson, B., Tice, RR., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, SY., Collins, AR., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, TS., Nakajima, M., Sasaki, YF., Thybaud, V., Uno, Y., Vasquez, M., and Hartmann, A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the *in vivo* Comet assay workgroup *Mutat. Res.*, 627, 31-35 (2007)

Moore, MM., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, J., Burlinson, B., Cifone, M., Clark, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, J., Muster, W., Pant, K., Kidd, DA., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, Jr. LF., Thakur, AK., and Van Goethem, F. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity

Testing, San Francisco, 2005, recommendations for 24-h treatment. *Mutat. Res.*, 627, 36-40 (2007)

Ku, WW., Bigger, A., Brambilla, G., Glatt, H., Gocke, E., Guzzie, PJ., Hakura, A., Honma, M., Martus, H-J., Obach, RS., and Roberts, R. Strategy for genotoxicity testing—Metabolic considerations *Mutat. Res.*, 627, 59-77 (2007)

Wang, J., Chen, T., Honma, M., Chen, L., Moore, M. 3'-Azido-3'-deoxythymidine induces deletions in L5178Y mouse lymphoma cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, in press (2007)

2. 学会発表

本間正充 *In vitro* コメット試験は遺伝毒性のエビデンスになりうるか? 日本環境変異原学会 MMS 研究会第 49 回定例会 (2006.5)

Honma M., Sakuraba M., Koizumi T., Takashima Y., Sakamoto H. and Hayashi M., Error-prone and error-free nonhomologous end-joining for repairing DNA double strand breaks in human cells. 36th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (2006.7)

Honma M., Yamakage K. *In vitro* Comet assay—A possible candidate as a member of the standard test battery. JaCVAM/MMS Joint Seminar -Pros & Cons of Comet Assay- (2006.8)

本間正充、高島良生、安井学、谷田貝文夫、鈴木雅雄、林 真 低放射線による相同組換え修飾効果 日本放射線影響学会第 46 回大会 (2006.9)

谷田貝文夫、梅林志浩、本間正充、阿部知子、鈴木ひろみ、島津徹、石岡憲昭、岩本正哉 ISS 利用実験計画:宇宙環境の突然変異に及ぼす影響の推定 日本放射線影響学会第 46 回大会 (2006.9)

高島良生、櫻庭真弓、小泉朋子、坂本浩子、安井学、林 真、本間正充 ヒト細胞に誘導された DNA 二重鎖切断修復とその細胞周期依存性 日本放射線影響学会第 46 回大会 (2006.9)

Kohara A., Ozawa Y., Ohtani A., Shioda S., Takeuchi K., Morita K., Hirano T., Honma M., Suzuki T., Masui T., Mizusawa H. High resolution genomic analysis of immortal human cells and tumor cells using array-based comparative genomic hybridization. Environmental Mutagen Society 37th Annual Meeting (2006.9)

Luan Y., Honma M., Suresh T., Kogi M., Yamaguchi T., Suzuki T. CGH and SNP array are powerful tools for chromosome analysis. Environmental Mutagen Society 37th Annual Meeting (2006.9)

Matsufuji H., Chino M., Hayashi M., Honma M., Yamagata K. Genotoxicity of quercetin in the presence of reactive oxygen species using human lymphoblastoid TK6 cells. Environmental Mutagen Society 37th Annual Meeting (2006.9)

本間正充、鈴木雅雄、谷田貝文夫 染色体切断に対する放射線影響の検討 日本宇宙生物学会第 20 回大会(2006.9)

梅林志浩、菅澤薫、本間正充、島津徹、鈴

木ひろみ、石岡憲昭、岩本正哉、谷田貝文夫 放射セン適応応答による突然変異の抑制 ISS 利用実験計画：宇宙環境の突然変異に及ぼす影響の推定 日本宇宙生物科学会第 20 回大会(2006.9)

Honma M., Sakuraba M., Koizumi T., Takashima Y., Sakamoto H. and Hayashi M., Requirement of p53 for maintenance of chromosome integrity against DNA double strand breaks. DNA Repair 2006 (2006.9)

本間正充 DNA2 本鎖切断修復によるゲノム安定化機構 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)

斉藤美香、高島良生、坂本浩子、林 真、松藤寛、山形一雄、本間正充 簡便な in vitro コメット試験法の確立とその評価 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)

小山直己、加藤竜也、本間正充、林 真、増田修一、木苗直秀 ヒトリンパ芽球トランスジェニック細胞を用いたアクリルアミドおよびグリシダミドの遺伝毒性試験 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)

谷田貝文夫、梅林志浩、鈴木雅雄、岩木正哉 染色体特定部位 DSB の修復：低線量／低線量率ガンマ線照射による影響 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)

高島良生、小泉朋子、櫻庭真弓、林 真、本間正充 ライブセルイメーjingによる小核の運命の追跡 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)

松藤寛、千野誠、本間正充、林 真、山形一雄 ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 を用いた亜硝酸ナトリウムと抗酸化剤の複合遺伝毒性 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)

Honma M. DNA double strand break inducing chromosome instability and its genetic consequences. International Conference on Biomarkers in Health and Environmental Management & XXXII Annual Meeting Environmental Mutagen Society of India (2007.1)

Honma M. DNA double strand breaks inducing chromosome instability in p53-deficient human cells. Key Stone Symposia –Genome Instability and Repair (2007.1)

G. 知的所有権の取得状況

なし