

を懸念している。このため、多くの専門家は食事に低レベルで存在する遺伝毒性／要注意構造をもつ発がん物質に関しては TTC を一桁低い 0.15 µg/人とすることを推奨している。さらに、TTC が適応できないような極めて強力な遺伝毒性発がん物質としてアフラトキシン類、アゾキシ化合物、ニトロソ化合物を挙げている。これら化合物に関しては個別の毒性データとリスク管理が必要であり、TTC を適用すべきではない。

一方、医薬品に関しては別の TTC の考え方がある。医薬品そのものに遺伝毒性があることは許されないが、そこに含まれる不純物に遺伝毒性がある場合、TTC の概念を取り入れた不純物のリスク管理が ICH でガイドライン化されつつある

(ICH-M7)。これらガイドラインでは場合によっては不純物に遺伝毒性があっても 1 日あたり 120 µg/人までの TTC が許容される。医薬品は食事と異なり、摂取（服用）期間が限られていること、また医薬品のベネフィットを考慮した 10^{-5} のリスクレベルなどが採用された段階的 TTC が提唱されている。

D. 結論

発がん率は人口あたりで発生するがん患者の数であり、動物実験による発がん性試験は担がん動物の数によって評価される。その単位は/人口、/動物数であり普遍である。一方、遺伝毒性の単位は試験系によって異なる。エームス試験は/plate、染色体異常試験は/cell、遺伝子突然変異試験は/gene によって評価される。単位が違えばその検出レベルも異なり、そこで仮に閾値が観察されたとしても、その値は試験系に依存する。また、発がん性は種差、個体差等によって変動することは当然考えられるが、遺伝毒性とは「DNA や染色体の構造的、もしくは量的変化を引き起こす性質」であり、DNA や染色体が全ての生物で共通であることを考慮すると、それは普遍でなくてはならない。もし、遺伝毒性に閾値が存在するのであれば、試験法によってそれが変動すること自体が矛盾である。従って、遺伝毒性とはそもそも閾

値を論じるような性質のものでは無いと言えるのかも知れない。遺伝毒性発がん物質に無理に閾値を設定し、ゼロリスクを求めるよりも、低レベルのリスクを、無視しうる (Negligible)、もしくは許容できる (Acceptable) リスクとして評価し、社会が受け入れることの方が現実的と考える。文明社会で生活する限り、多くの化学物質の摂取は不可避であり、そのベネフィットとリスクのバランスを考えることが重要である。また、我々人間は自然の食物からも多くの化学物質を摂取しており、それらが遺伝毒性発がん物質であることも少なくない。これら化学物質の中には一般化学物質よりも高い 10^{-4} ~ 10^{-5} というリスクレベルでないと管理できないものもある。がんの最大の原因は我々の日常の食べ物にあり、残留農薬や食品添加物にあるのではない。もちろん、これらリスクはできるだけ回避することは必要であるが、やはりここでもバランスが重要である。このバランス感覚を身につけることが成熟した社会での安心した生活に繋がるものと考え。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 誌上発表

1. Ono A, Takahashi M, Hirose A, Kamata E, Kawamura T, Yamazaki T, Sato K, Yamada M, Fukumoto T, Okamura H, Mirokuji Y, Honma M. Validation of the (Q)SAR combination approach for mutagenicity prediction of flavor chemicals. Food Chem Toxicol. 50, 1536-1546 (2012)
2. Morita T, Honma M, Morikawa K. Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. Mutat. Res. 741, 32-56 (2012)
3. Mekenyan OG, Petkov P, Kotov S, Stoeva S, Kamenska VB, Dimitrov S, Honma M,

Hayashi M, Benigni R, Donner M, Patlewicz GY. Investigating the relationship between in vitro - in vivo genotoxicity: Derivation of mechanistic QSAR models for in vivo liver genotoxicity and *in vivo* bone marrow micronucleus formation which encompass metabolism. Chem Res Toxicol. 25, 277-296 (2012)

2. 学会発表

1. O.G. Mekenyan, P. Petkov, S. Kotov, S. Stoeva, V. Kamenska, S. Dimitrov, M. Honma, M. Hayashi, R. Benigni, G. Patlewicz: Mechanistic Models for in vivo Liver Genotoxicity and in vivo Micronucleus Based on Metabolism Considerations. QSAR2012 タリン、エストニア (2012.6)
2. M. Honma : New ICH S2(R1) Guideline -Revision, Background and Highlight. 2012 International Workshop on Genetic Toxicology. 上海、中国 (2012.8)
3. M. Honma : Risk Assessment on Management of genotoxic Impurities in Pharmaceuticals International Workshop on Genetic Toxicology. 上海、中国 (2012.8)
4. M. Honma: Risk assessment and management of genotoxic impurities in pharmaceuticals. The 3rd Asian Conference on Environmental Mutagens、杭州、中国 (2012.10)
5. 本間正充: 遺伝毒性を如何に評価、解釈するか? -HESI-IVGT プロジェクト- 日本環境変異原学会第 41 回大会、静岡 (2012.11)
6. 本間正充: 医薬品中に含まれる遺伝毒性不純物の安全性評価と TTC の考え方 第 10 回食品安全フォーラム、東京 (2012.11)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

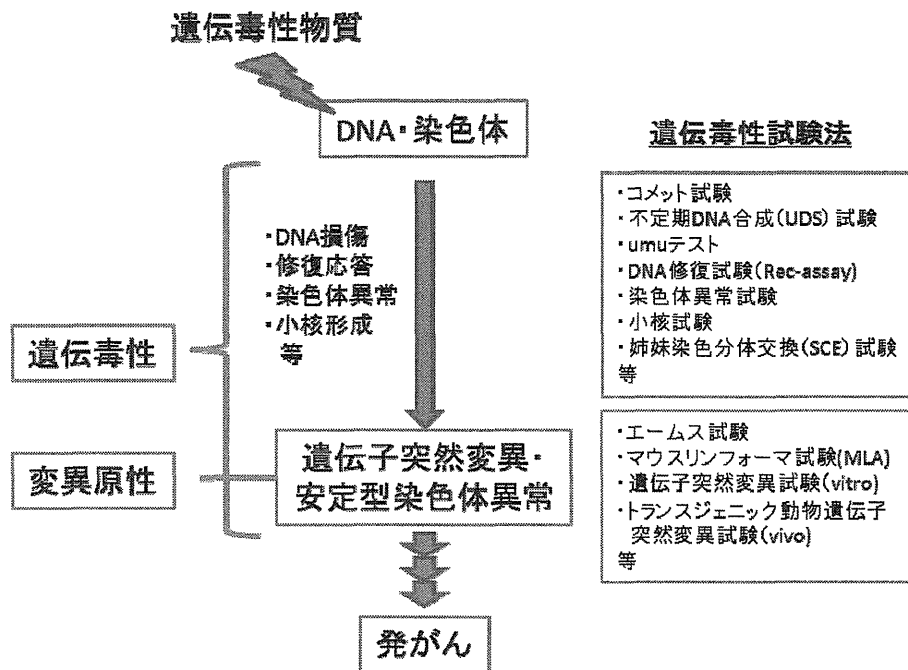


図1 遺伝毒性とその試験法

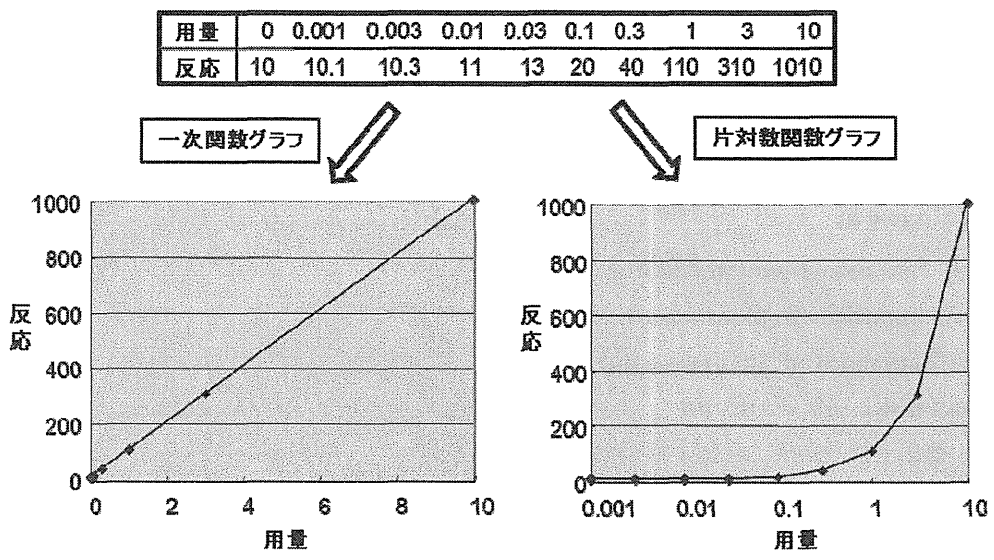


図2 閾値無し用量相関モデルのグラフ表示

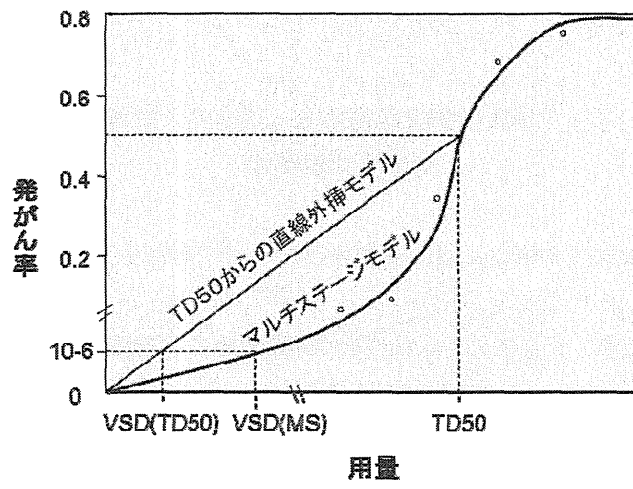


図3 Virtually Safety Dose の算出法

平成 24 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価法に関する研究

分担研究課題名：2分子のDNA付加体が引き起こす突然変異誘発能の解析

分担研究者： 安井 学 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

研究要旨

低用量暴露の発がん・遺伝毒性の影響を正確に解析することは困難である。なぜなら、低用量域における微弱な影響シグナルは、他の要因による影響に埋没し区別できないこと、そして測定系の検出限界以下の場合があること等からである。つまり、我々は低濃度で用量依存的に暴露させる従来の実験手法に限界があると考え、DNA 損傷 1 分子をゲノムに導入することで低用量暴露を模擬する実験系を最近確立した。これまでの研究により、わずか 1 分子であっても、酸化 DNA 損傷の一つである 8-オキソ-7,8-ジヒドロ-2'-デオキシグアノシン付加体 (8-OxodG) は 10.7%の頻度で一塩基変異を誘発することが分かった。しかしながら、この実験系は、DNA 修復機能が正しく働いていないなど、本知見に関してはまだまだデータの蓄積が必要である。よって、本研究の目的は、1 分子だけでなく、2 分子の 8-OxodG をゲノムに導入し、同様の解析を行うことで付加体の分子数と突然変異誘発頻度の関係性を定量的に明らかにすることである。実験の結果、2 分子の 8-OxodG は一塩基変異を 25.7%の頻度で誘発した。同条件で実験した 8-OxodG 1 分子の結果 (10.7%) と比較すると、1 分子から 2 分子に増やすことによって、約 2.4 倍高くなったことから、付加体の分子数と突然変異誘発頻度は、ほぼ比例の関係であることが分かった。

キーワード：DNA 付加体、8-オキソグアニン、閾値、遺伝毒性発がん物質

A. 研究目的

低用量暴露における発がんや遺伝毒性の影響を正確に解析することは困難である。なぜなら、低用量域における微弱な影響シグナルは、他の要因による影響に埋没し区別できないこと、そして測定系の検出限界以下の場合があること等からである。つまり、我々は低濃度で用量依存的に暴露させる従来の実験手法に限界があると考え、DNA 損傷 1 分子をゲノムに導入することで低用量暴露を模擬する実験系を最近確立した。それは

ヒトリンパ芽球細胞 TK6 由来の TSCER122 細胞株のゲノム内に酸化 DNA 損傷の一つである 8-オキソ-7,8-ジヒドロ-2'-デオキシグアノシン付加体 (8-OxodG) 1 分子を導入し、その部位周辺で起こる突然変異誘発頻度とスペクトラムを詳細に解析することができる。これまでの研究によって、わずか 1 分子であっても、8-OxodG は一塩基置換 (主に G→T トランスポージョン) および欠失を 10.7%の頻度で誘発することが分かった。これは、極めて低い暴露用量であっても、DNA 付

加体が形成すれば突然変異を誘発すること（そして発がんに至る可能性を持つ）を示しており、遺伝毒性発がん物質には閾値が無いという従来からのリスク評価法をサポートしている。しかしながら、ここで使用された実験系は、DNA 修復機能が正しく働いていないなど、本知見に関してはまだまだデータの蓄積が必要である。

よって、本研究の目的は、1 分子だけでなく、2 分子および4 分子の 8-OxodG をゲノムに導入し、同様の解析を行うことで付加体の分子数と突然変異誘発頻度の関係性を定量的に明らかにすることである。本報告書では、2 分子の 8-OxodG が誘発する突然変異誘発頻度とスペクトラムを解析した。

B. 研究方法

1) ヒト培養細胞を用いる極低用量暴露モデルの実験系

TSCER122 細胞 ($TK^{-/-}$) は、TK6 細胞からチミジンキナーゼ遺伝子 (TK) のエクソン 5 を欠き、その欠失部位に I-SceI 認識配列 18 bp (5'ATT ACC CTG TTA TCC CTA) を 1 つ持っている。その配列は、本来のヒトゲノムに無いため、その培養細胞に I-SceI を発現させるベクター (pCBASce) を導入すれば、I-SceI 酵素の切断により、ゲノムの 1 ヶ所だけに二本鎖切断を形成させることができる。その I-SceI 切断部位では、DNA 修復されやすくなっているため、そこに相同配列を持ち、且つ DNA 付加体を含むターゲティングベクターを導入すれば、相同組み換えにより、エクソン 5 と DNA 付加体が同時にゲノム内に入る。その時、細胞は $TK^{-/-}$ → $TK^{+/-}$ になるため、HAT セレクションによって TK 復帰細胞だけ（つまり DNA 付加体が導入された細胞だけ）を回収することができ、後のシーケンス解析等に供することが可能である（図 1）。

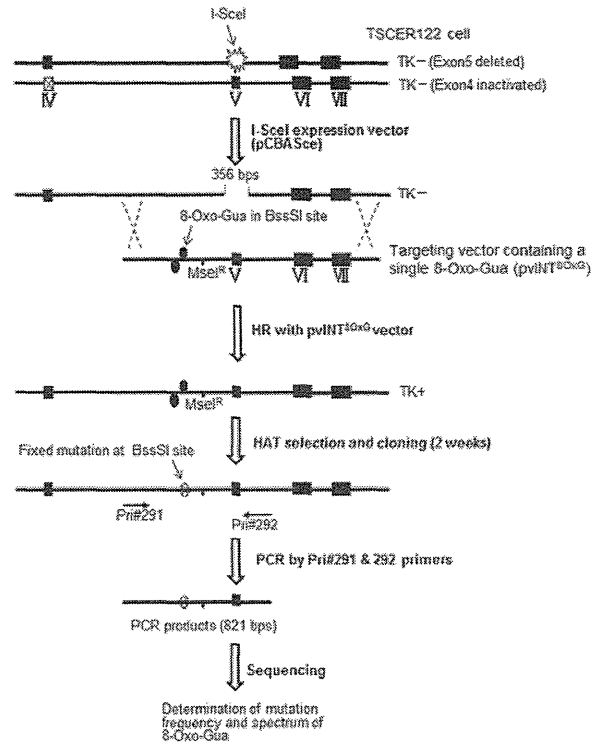


図 1. ヒト培養細胞を用いる極低用量暴露モデルの実験系の概要

2) 8-OxodG 2 分子を部位特異的に含むターゲティングベクターの構築

8-OxodG 付加体を含むターゲティングベクターは、荒川らの方法 (Arakawa, T. *et al*, *Anal. Biochem.* 416, 211-217 (2011)) に従って作製した。2 分子の 8-OxodG は、 TK のイントロン 4 に位置する BssSI 認識配列 (5'-CTCGTG/CACGAG-3'; 下線部が導入部位) の中央 dG 部位の両鎖に導入した (pvINT^{2xOxodG})。8-OxodG の代わりに正常塩基 dG のコントロールターゲティングベクター (pvINT^{dG}) も同様の方法で作製した。

3) ゲノム導入と解析

細胞ゲノムへの導入は、Lonza 社製 Cell Line Nucleofector の手法に従っておこなった。5 x 10⁶ cells/100 μL に調整した TSCER122 細胞に、pCBASce 50 μg と pvINT^{2xOxodG} ターゲティングベクター 2 μg を同時にトランスフェクションし、75 cm² の培養フラスコで 3 日間培養 (37°C, 5%

CO₂) した。次に、その細胞を 1~5 x 10³ cells/mL に調整し、HAT 試薬を添加後、96 穴プレートでさらに 2 週間培養することによって、復帰細胞のクローン (TK⁺/-) を回収した。その後、各クローンのゲノム DNA を抽出し、8-OxodG 部位だった周辺のシーケンスを行い、その突然変異誘発スペクトルおよび頻度を決定した。また、TK の転写鎖 (Transcribed strand; TS)、および非転写鎖 (Non-transcribed strand; NTS) に導入された各 8-OxodG の突然変異誘発スペクトラムと頻度を計算した (表 1)。

C. 研究結果

1) 複数分子の付加体導入による TK 復帰頻度の影響

2 分子の 8-OxodG を含む pvINT^{2xOxodG} を I-SceI 発現ベクターと同時にトランスフェクションした結果、その TK 復帰頻度は 5~8 x 10⁻³ だった。この値は、付加体無し (pvINT^{dG})、および 1 分子の 8-OxodG ベクター (pvINT^{OxodG}) を導入した時とほぼ一致する復帰頻度であった。

2) 8-OxodG 2 分子の突然変異誘発頻度およびスペクトラム

pvINT^{2xOxodG} をトランスフェクション後、付加体が導入された 428 クローン細胞 (2 度の独立した実験の合計) についてシーケンス解析した (表 1)。そのうち、8-OxodG 導入部位に変異があったのは 110 (25.7%)、その周辺配列に変異があったのは 22 クローン (5.1%) 見つかった。よって、ほとんどが付加体部位に依存した一塩基変異 (塩基置換、欠失および挿入) であることが分かった。その主な突然変異誘発スペクトラムは、G・C → T・A トランスバージョン (6.8%) と一塩基欠失 (7%) であり、G・C → C・G トランスバージョン (5.1%) や一塩基挿入 (5.4%) も比較的高い頻度で検出された。その一塩基欠失と挿入は、1 分子のときよりもそれぞれ 4.9%、4.7% も増加した (表 1)。また、G・C → C・G トランスバージョンも 3.9% 上昇した。一方、8-OxodG の代表的

な変異スペクトラムである G・C → T・A トランスバージョンは、1 分子から 2 分子に増加させても、わずか 0.9% しか上昇せず 6.8% にとどまった。つまり、2 分子の 8-OxodG が 1 分子の時よりも突然変異誘発頻度を上昇させた原因は、G・C → T・A トランスバージョンではなく、一塩基欠失・挿入および G・C → C・G トランスバージョンによる増加であることが分かった。

以上のように、2 分子の 8-OxodG によって誘発する一塩基変異のトータル (25.7%) は、1 分子のそれ (10.7%) よりも、約 2.4 倍高く、現段階では、付加体の分子数と突然変異誘発頻度は、ほぼ比例の関係であると言える。次年度では、4 分子の 8-OxodG について同様の解析をすすめ、一塩基変異頻度のトータルを決定する。

表 1. 1 分子および 2 分子の 8-OxodG が誘発する突然変異誘発頻度とスペクトラムの比較

Targeting vector	Experiment	No. of TK revertants analyzed	No. of 8-OxodG-integrated revertants	Strand	No. of targeted mutations (C/G or 8-OxodG → X)								Total of point mutation		
					Point mutation								Others ¹	NTF ²	
					X = G	T	C	A	G ³	ins ⁴	del ⁵	sub ⁶			
pvINT ^{dG}	1	250	208	NTS	208	0	0	0	0	0	0	9	0	9	0
	2	638	561	NTS	551	0	0	0	0	0	1	8	0	9	0
	Total	888	770 (100%)		757 (89%)	0	0	0	0	1 (0.1%)	1 (0.1%)	12	0	13	0
pvINT ^{OxodG}	1	259	207	NTS	176	13	2	1	4	2	2	5	4	9	4
	2	685	596	NTS	516	34	8	5	13	4	13	3	13	3	
	Total	944	803 (100%)		692 (86%)	47 (5.9%)	10 (1.2%)	6 (0.7%)	17 (2.1%)	6 (0.7%)	16 (2.0%)	18	7	25	7
pvINT ^{2xOxodG}	1	176	152	TS	4	3	1	5	8	9	9	3	3	12	3
	2	340	276	TS	8	7	6	10	10	14	13	5	5	18	5
	Total	516	428 (100%)		285 (67%)	23 (5.6%)	22 (5.2%)	6 (1.4%)	30 (7.0%)	23 (5.4%)	110 (25.7%)	22	8	30	8

¹Significantly different from the control value; P<0.05 (Student's t-test)
²Includes C, T, and G insertions.
³Not countable.

D. 考察

本実験で得られる TK 復帰頻度について、I-SceI 発現ベクターのみの形質転換では、1~5 x 10⁻⁴ の範囲にあり、ターゲティングベクター (付加体を含まない pvINT^{dG}) と同時導入すると、その頻度は 5~10 x 10⁻³ 程度に上昇する。同様に、1 分子の 8-OxodG を含む pvINT^{OxodG} ベクターを用いても、これと同程度の頻度を得られることが確認できており、さらに本研究でも、2 分子の 8-OxodG を含む pvINT^{2xOxodG} も同程度の頻度 (8 x 10⁻³) が確認された。これらのデータは、ターゲティングベクター上に 8-OxodG 付加体が 1 つあるいは 2 つあっても、ゲノム導入時の相同組み替えに障害にならないことを示唆している。

表 1 に示した通り、8-OxodG 2 分子の主な突然

変異誘発スペクトラムは、1分子の時と同様に $G \cdot C \rightarrow T \cdot A$ トランスポージョンであったが、予想に反して2分子に増加したことによる頻度の上昇はわずか0.9%であった。そこには、1分子では誘発しないが、2分子で生ずる特徴的な変異スペクトルがあり、*BssSI* 配列の真ん中にGあるいはCが一塩基挿入された5'-CTCZGTG (ZはGあるいはC) が5.2%の高頻度で観察されたことである。Harrisonらは、2つの付加体が近接している場合は一本鎖切断、3塩基以上離れている場合は二本鎖切断がDNA修復初期に形成すると報告している (Harrison, L. *et al*, *Pathophysiology* 8, 149-159 (2002))。それに従えば、近接する2つの8-OxodG部位の片方で一本鎖切断が形成し、付加体を切除後に正常塩基dGがdCの対面に挿入される。しかし、その部位の斜め対面にもう一つの8-OxodG:dC塩基対があるため、おそらく修復酵素やDNAポリメラーゼが相互作用し、いわゆるwobbleペアになることにより、余分なdCあるいはdGを塩基対形成させ、結果的に一塩基挿入になったと予想できる。このwobbleペアによる影響は、一塩基欠失および $G \cdot C \rightarrow C \cdot G$ トランスポージョンの頻度上昇にも関与している可能性がある。以上のことから、2つの近接した付加体は、塩基置換よりも塩基挿入や欠失の塩基変異を促進させることが分かった。

次に、2分子の8-OxodGが*TK*のNTSとTSで起こす突然変異誘発能の違いについて検討した。我々は、すでにNTSとTS各鎖に1分子ずつ8-OxodGを導入し、突然変異誘発能をそれぞれ解析しており、その結果はどちらのDNA鎖でもほぼ同じ一塩基変異頻度(約10%)とスペクトラムを誘発することを確認している。しかし、2分子同時にゲノム導入すると、NTSの8-OxodGは13.9%の頻度で一塩基変異を起こしたが、TSの8-OxodGはそれよりも約半分低い頻度(7.6%)であり、DNA鎖ごとに頻度が異なった(スペクトルは類似した)。この結果は、TSの付加体は転写共役DNA修復などによる修復機構が、NTSのそれよりも良く働いていることを示唆している。

つまり、付加体が2分子になるとDNA構造のサイズが変化し、修復機構によってTSの8-OxodGが優先的に修復されているのではないかと予想できる。この点に関しても、引き続き、4分子の8-OxodGを解析することで、TSとNTSで起こす突然変異誘発能の相違性について調べる予定である。

E. 結論

8-OxodG 2分子を含むターゲティングベクターを細胞ゲノムの特定部位へ導入し、その部位および周辺をシーケンスした結果、32.2%の頻度で塩基配列の変化が認められ、その大部分は付加体導入部位の一塩基変異(25.7%)だった。同条件で実験した8-OxodG 1分子の結果(10.7%)と比較すると、1分子から2分子に増やすことによって、約2.4倍高くなったことから、付加体の分子数と突然変異誘発頻度は、ほぼ比例の関係であると考えられる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sassa A, Kamoshita N, Matsuda T, Ishii Y, Kuraoka I, Nohmi T, Ohta T, Honma M, Yasui M.; Miscoding properties of 8-chloro-2'-deoxyguanosine, a hypochlorous acid-induced DNA adduct, catalysed by human DNA polymerases. *Mutagenesis* 28,81-88 (2013)

2. 学会発表

- 1) 兼丸祐紀, 嶋下渚, 佐々彰, 本間正充, 安井学: ゲノムの特定部位に導入させたプロモ化DNA付加体の突然変異誘発能の解析. 日本環境変異原学会第41回大会, 静岡 (2012.11)
- 2) M. Yasui, Y. Kanemaru, N. Kamoshita, A. Sassa, M. Honma, Mutation analysis of

site-specific brominated DNA adducts
located in the genome of human
lymphoblastoid cells. Mammalian DNA
Repair in Gordon Research Conferences,
Ventura, USA (2013.2)

H. 知的所有権の取得状況

特になし

平成 24 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：食品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

分担研究課題名：食品添加物における遺伝毒性発がん物質の評価法に関する研究

分担研究者： 續 輝久 九州大学大学院医学研究院基礎医学部門
生体制御学講座 基礎放射線医学（分子遺伝学）分野 教授

研究要旨

食品添加物等の遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討するために、低用量臭素酸カリウムを経口投与して発がん実験を行い、*Mutyh* 遺伝子欠損マウスへ臭素酸カリウムを投与する発がん・突然変異誘発の実験系は、遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討する上で、有用な評価系であることが示された。また、*Mutyh* 遺伝子が欠損した個体でも酸化剤の発がん性に関して「閾値」が存在することを示唆する結果を得た。

キーワード：臭素酸カリウム、*Mutyh* 遺伝子、*rpsL* トランスジェニックマウス

A. 研究目的

遺伝毒性物質の作用には一般に閾値がないとされており、どのように微量であってもヒトに対してリスクを示すと考えられている。このため遺伝毒性を示す発がん物質には ADI（Acceptable Daily Intake）が設定されず、食品添加物等に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は、行政上重要な問題になっている。だが、ヒトにはさまざまな生体防御機能（DNA 修復、解毒代謝、損傷乗り越え DNA 合成、アポトーシスなど）が備わっており、ある限度（閾値）以下の作用は、事実上無毒化される可能性が考えられる。

生命にとって必須の酸素は、エネルギー産生系で利用される際に活性酸素種の生成を伴い、遺伝情報を司る DNA、RNA 並びにそれらの前駆体を酸化する。これら内在性の酸素ストレスに加え、

環境中の放射線や遺伝毒性を示すある種の化学物質、さらには感染に伴う炎症によっても活性酸素種が生じている。活性酸素種は生体高分子を酸化し、発がんや老化を引き起こす。様々な酸化的損傷の中で、核酸のグアニン塩基の酸化体 8-オキソグアニン（8-oxoG）は遺伝情報保持及び伝達に異常を引き起こす点で最も重要である。8-oxoG はシトシンと同程度にアデニンとも対合できるので、DNA 中の 8-oxoG は突然変異の原因となる。8-oxoG による突然変異生成に対処するために生物は種々の酵素系を持っている。ヒトでは、OGG1 が DNA 中の 8-oxoG を取り除き、MUTYH が 8-oxoG に対して取り込まれたアデニンを除去する。また MTH1 はヌクレオチドプール中に生じた 8-oxo-dGTP を分解し、DNA 複製の際に 8-oxoG が DNA へ取り込まれるのを防いでいる。我々はこれらの酵素の遺伝子を欠損したマウス

を樹立し、これらのマウスでは自然発がんが上昇していることを示し、酸化 DNA 損傷が自然発がんの要因であることを明らかにしてきた。さらに *Mutyh* 遺伝子欠損マウスに酸化剤である臭素酸カリウムの 0.2% 溶液を経口投与すると、野生型マウスと比較すると突然変異および発がん頻度が劇的に上昇することを見出し、*Mutyh* 遺伝子が酸化による遺伝毒性に対する閾値形成に関与している可能性を指摘した。一方、低用量 (0.05%) 臭素酸カリウムを経口投与した場合には発がん頻度の有意な上昇は認められず、*Mutyh* 遺伝子が欠損した個体でも遺伝毒性に対する閾値が形成されていることを見出した。

本年度は、この実験系を用いて遺伝毒性に対する閾値形成機構についてさらに検討するために、比較的低用量域 (0.10-0.15%) の臭素酸カリウムを経口投与して発がん実験を行った。

B. 研究方法

1) *Mutyh* 遺伝子欠損マウスの飼養

C57BL6/J の遺伝的背景を持つ *Mutyh* 遺伝子欠損マウスのヘテロ接合体同士の掛け合わせにより *Mutyh* 遺伝子欠損マウスと対照群の野生型マウスを得た。マウスの飼養については、九州大学遺伝子組換え実験安全管理規則並びに動物実験規則に従って実施した。

2) 臭素酸カリウム溶液の投与

臭素酸カリウム (Sigma-Aldrich) を純水に溶解し、0.10% および 0.15% 溶液を調製後に濾過滅菌し、マウスの飲料水とした。投与方法としては、発がん解析には 16 週間の自由飲水で行い、消費量については週一回モニターした。

3) 発がん実験

6~8 週齢の野生型および *Mutyh* 遺伝子欠損マウス (雌; 6~14 匹) に臭素酸カリウムを 16 週間投与した後、安楽死させたマウスから腸管を摘

出して 10%ホルマリンを用いて固定した。その後、固定液を 70%エタノールに置換えて、腸粘膜を実体顕微鏡下で観察し、腫瘍の形成を確認した。検出した腫瘍から病理切片を作製し、病理解析を行った。

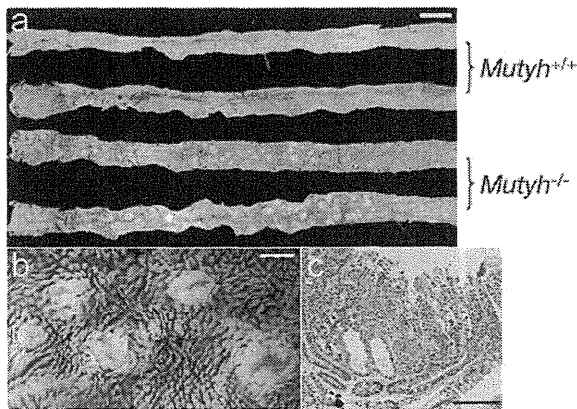
4) 統計的手法

すべての測定値について平均値と標準偏差を求めた。

C. 研究結果

これまでの *Mutyh* 遺伝子欠損マウスを用いた 0.2% 臭素酸カリウム溶液を 16 週間連続飲水投与した誘発消化管発がん実験では、*Mutyh* 遺伝子欠損マウスの十二指腸・空腸で多数の上皮性腫瘍の発生を認めた (第 1 図)。一方、低用量の 0.05% 臭素酸カリウムを経口投与して発がん実験を行った結果、0.05% 臭素酸カリウムの投与は *Mutyh* 遺伝子欠損マウスの十二指腸・空腸には上皮性腫瘍を発生させないことが明らかになった。

本年度は、遺伝毒性に対する閾値形成について詳細に検討するために、比較的低用量の臭素酸カリウムを経口投与して発がん実験を行った。前年度までに進行中であった 0.10% 臭素酸カリウム経口投与発がん実験をマウスを追加して行った。また、新たに 0.15% 臭素酸カリウムを経口投与して発がん実験を行った。0.10% および 0.15% 臭素酸カリウム溶液を 16 週間連続飲水投与した誘発消化管発がん実験では、*Mutyh* 遺伝子欠損マウスの十二指腸・空腸でそれぞれ、 10.67 ± 3.57 (9 匹) および 43.93 ± 13.42 (14 匹) の上皮性腫瘍の発生を認めた。対照群の野生型マウスではそれぞれ、 0.17 ± 0.41 (6 匹) および 1.00 ± 0.94 (10 匹) の上皮性腫瘍の発生を認めた。これらの結果をこれまでの結果と併せて表 1 に示す。



第 1 図 臭素酸カリウム誘発小腸腫瘍
(代表的な病理像)

表 1 *Mutyh* 欠損マウスにおける臭素酸カリウム誘発小腸腫瘍の発生頻度

No of <i>Mutyh</i> mice	KBrO ₃ (%)	No of tumor/mouse (mean±SD)
9	0.05	0
9	0.10	10.67±3.57
14	0.15	43.93±13.42
4	0.20	60.8±35.0

D. 考 察

遺伝毒性物質の作用には閾値がないとされるため、遺伝毒性に基づく発がん作用が検出された場合には、食品添加物等には ADI が設定されない。しかし、遺伝毒性発がん物質であっても「事実上の閾値」（それ以下では有意な発がん頻度の上昇が見られない用量）のあることが示唆されている (Carcinogenesis, 26, 1835-1845, 2005)。ヒトにはさまざまな生体防御機構 (DNA 修復、解毒代謝、誤りのない損傷乗り越え DNA 合成、アポトーシス等) が存在し、これらが遺伝毒性発がん物質の作用を抑制し「事実上の閾値」を形成する可能性が考えられる。本研究では、酸化 DNA 損傷に起因する突然変異を抑制する *Mutyh* 遺伝子を欠損したマウスを用い、パンの製造過程でも使用される酸化ストレスを負荷することが知られている食

品添加物の臭素酸カリウムを投与する実験を行い、DNA 修復が遺伝毒性に関する「事実上の閾値」形成に貢献する可能性について検討するための試験系の樹立をめざしている。

Mutyh 遺伝子欠損マウスを用いた臭素酸カリウム溶液を飲水投与する誘発消化管発がん実験の結果、0.1%~0.2%臭素酸カリウムを投与された *Mutyh* 遺伝子欠損マウスでは 1 個体当たりの小腸発がんの発生数は投与された臭素酸カリウムの濃度に相関して増加した。0.1%臭素酸カリウムを投与された *Mutyh* 遺伝子欠損マウスの平均腫瘍発生頻度は 1 個体当たり約 10 個で、0.2%臭素酸カリウム投与群と比較すると、約 6 分の 1 に減少していたが、野生型と比較して顕著な腫瘍発生頻度の上昇が認められた。一方、0.05%臭素酸カリウムを投与された *Mutyh* 遺伝子欠損マウスでは全く腫瘍の発生が認められなかった。これらの結果は、臭素酸カリウムによる消化管発がんには閾値が存在し、その形成に *Mutyh* 遺伝子が関与していることを示唆する。また、*Mutyh* 遺伝子が欠損した個体でも臭素酸カリウムの発がん性に関して「閾値」が存在することを示している。

酸化ストレスによって自然発がんが生じることとは既に複数の DNA 修復系の遺伝子改変マウスを用いて明らかになっている。*Mutyh* 遺伝子欠損マウスはヒトの遺伝性大腸がん (MAP: MUTYH-associated polyposis) の疾患モデルであり、消化管における自然発がんの発生頻度が野生型マウスに比して有意に上昇している。このように *Mutyh* 欠損という酸化ストレス誘発発がんにも最も感受性が高いマウス個体を用いて発がん感受性や遺伝毒性に関する研究を行うことで、遺伝毒性に対する *Mutyh* 遺伝子産物以外の多重の防御機構の寄与を明らかにすることが可能となる。すなわち、食品添加物として使用されている化学物質臭素酸カリウムの低用量に起因する酸

化ストレスによる消化管発がんを、他の修復系や DNA 損傷応答系等によりどの程度まで抑制できるのかを明らかにできると考えられる。

E. 結論

Mutyh 遺伝子マウスへ臭素酸カリウムを投与する発がん実験系は、遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討する上で有用な試験系であると考えられる。また、*Mutyh* 遺伝子産物は酸化剤の遺伝毒性に関する「事実上の閾値」形成に貢献していると示唆される。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 誌上発表

- 1) Lim, T-H, Fujikane, R, Sano, S, Sakagami, R, Nakatsu, Y, Tsuzuki, T, Sekiguchi, M, Hidaka, M. Activation of AMP-activated protein kinase by MAPO1 and FLCN induces apoptosis triggered by alkylated base mismatch in DNA. *DNA Repair*, 11, 259-266 (2012)

2. 学会発表

- 1) 續 輝久, 朴 晶淑, 磯田拓郎, 中津可道, 酸化ストレス誘発発がんの抑制に関与する分子機構の解明 - *Msh2* 遺伝子欠損マウスにおける消化管発がんの解析を中心として、日本生化学会第 85 回大会、福岡 (2012. 12)
- 2) 日高真純, 佐野しおり, 藤兼亮輔, 林 徳豪, 坂上竜資, 中津可道, 續 輝久, 関口睦夫, 発がんを抑制するアポトーシスの誘導機構、ワークショップ：ゲノムの安定性と発がん・老化の抑制、日本分子生物学会第 33 回年会、

福岡 (2012. 12)

- 3) 大野みずき, 作見邦彦, 福村龍太郎, 榎藤洋一, 田口健一, 續 輝久, 中別府雄作, 酸化損傷塩基の修復機構を欠損するマウス家系の解析、ワークショップ：ゲノムの安定性と発がん・老化の抑制、日本分子生物学会第 33 回年会、福岡 (2012. 12)
- 4) 大野みずき, 作見邦彦, 福村龍太郎, 榎藤洋一, 續 輝久, 中別府雄作, 酸化損傷塩基の修復は生殖細胞ゲノム変異を抑制し同系交配によるマウスの表現型の安定性に寄与する、日本環境変異原学会第 41 回大会、静岡、(2012. 11)
- 5) 續 輝久, 遺伝子欠損マウスでの低用量化学物質投与による酸化ストレス誘発の消化管発がん、日本放射線影響学会ワークショップ、磐梯熱海 (2012. 10)
- 6) M. Ohno, K. Sakumi, T. Tsuzuki, Y. Nakabeppu, Influence of 8-oxoguanine on mitotic and meiotic chromosome, The 10th International Symposium on Chromosomal Aberrations (ISCA-10)、アマルフィ、イタリア (2012. 10)
- 7) 大野みずき, 作見邦彦, 福村龍太郎, 榎藤洋一, 續 輝久, 中別府雄作, 8-オキシグアニンの修復機構を欠損するマウスは、生殖細胞ゲノム中の突然変異頻度の上昇と遺伝性の変異形質を呈する、日本遺伝学会第 84 回大会、福岡 (2012. 9)
- 8) 續 輝久, *Mutyh* 遺伝子欠損マウスでの低用量化学物質による酸化ストレス誘発の消化管発がん、特別シンポジウム：放射線規制値の科学的根拠、日本放射線影響学会第 55 回大会、仙台 (2012. 9)
- 9) T. Tsuzuki, J.-S. Piao, N. Matsumoto, Y. Nakatsu, The roles of mismatch repair

system and *p53* in the suppression of oxidative stress-induced intestinal tumor-formation in mice., 4th US-Japan DNA Repair Meeting, The National Conference Center, Leesburg, VA, USA, (2012. 4)

G. 知的所有権の取得状況

特になし

平成 24 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価法に関する研究

分担研究課題名：微生物試験を用いた発がんリスクの定量的評価手法の構築

分担研究者： 山田雅巳 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長

研究要旨

芳香族アミンと一般的な発がん性物質 81 化合物について、変異原性の指標である Ames 試験の比活性値と、発がん性の指標である TD₅₀ 値の相関を調べた。芳香族アミンについては両者の相関が高いことが分かった。構造クラスを考慮に入れることで定量的評価が可能になることが示唆された

A. 研究目的

食品添加物等の化学物質の発がんリスク評価を大きく左右するものとして遺伝毒性が挙げられる。遺伝毒性の有無と、その性質、すなわち DNA との反応性の強さは、発がんメカニズムと密接に結び付いている。行政的には、DNA 反応性発がん物質と評価された場合は ADI が設定できず、使用を禁止するか、許容リスクレベルを考慮した管理が必要となる。我が国においては、食品添加物に対してこの手法が十分に検討されていない。遺伝毒性試験データを発がんリスク評価に利用するためには、試験結果の量的評価が不可欠である。本研究では遺伝毒性試験データをヒト発がんリスク評価に適切利用するために、遺伝毒性の量的反応性を考慮した手法の開発を目指す。微生物を用いる変異原性試験 (Ames 試験) では、試験に供した化学物質 μg 当たりの復帰変異コロニー数を『比活性値』として、例えばこの値が 1,000 を超えるものは非常に強いとするなど、変異原性の強さの「目安」にしている。しかしながら、これはあくまでも「目安」であり、本来 Ames 試験に正確な定量性はない。そこで、本分担研究課題では、食品添加物を含む化学物質の Ames 試

験結果のデータベースを構築し、Ames 試験と発がん性データの量的相関性を精査し、発がんリスク評価に利用するための手法を開発する。量的相関性が低い化学物質に対しては、化学構造による分類、微生物に特異的なメカニズムの解析を行い、例外をフォローアップするためのストラテジーを開発する。

初年度は、発がん性物質が多く含まれる構造クラスの中で芳香族アミンを選び、発がん性と Ames 試験の強さの相関を調べた。

B. 研究方法

芳香族アミンの発がん性と Ames 試験の結果の相関を調べるため、Carcinogenic Potency Database Project (CPDB) のサイトに齧歯類を用いた発がん試験のデータが掲載されており、かつ、National Toxicology Program (NTP) のサイトに Ames 試験のデータが掲載されていた芳香族アミンを一覧にした (表 1)。

CPDB のサイトでは、TD₅₀ 値を発がん性の程度を示すものとして採用している。TD₅₀ 値の定義は、その動物にその物質を投与しない場合は腫瘍が誘発されないという条件で、毎日投与し続けた

場合に、動物の半数に腫瘍を誘発するという被験物質の1日あたりの用量を、動物の体重 kg 当たりの mg 数で表したものである(単位: mg/kg body weight/day)。種ごとに複数の実験が実施されている場合、個々の陽性になった実験の中で最も腫瘍が起きやすかった臓器の結果に基づいて算出された TD₅₀ 値の調和平均(それぞれの値の逆数の和を計算し、その逆数をとったもの)を TD₅₀ 値としている。

比較のため、発がん物質 40 個について同様に TD₅₀ 値と Ames 試験の比活性値を一覧にし(表 2)、両者の相関を、表 1 の値とともにグラフ化し、重ね合わせた(図 1)。

(倫理面への配慮)

本研究は文献調査に基づくものであり、倫理上の問題はない。

C. 研究結果

図 1 より芳香族アミン(■)は一般の化学物質(◇)と比較して、Ames 試験と TD₅₀ 値の相関がよいことがわかった。その中で、次の 6 化合物(図 1 の Y 軸上の■)は CPDB では発がん性が認められていないとされているもので、かつ Ames 試験も陰性であった。

- Aniline
- Anthranilic acid
- 2-Naphthylamino-1-sulfonic acid
- 4-Chloro-*o*-toluidine·HCl
- 5-Chloro-*o*-toluidine
- *m*-Toluidine·HCl

さらに、次の 9 化合物(図 1 の X 軸上の■)は比活性値が報告されているものの Ames 試験の総合的な判定は陰性で、かつ非発がん性物質とされているものだった。() 内は比活性値。

- *m*-Phenylenediamine (13)
- 2,6-Diaminotoluene·2HCl (5)
- 2-Chloro-*p*-phenylenediamine sulfate (2)
- *p*-Anisidine (2), *p*-Phenylenediamine (1)
- 2,4-Dimethoxyaniline·HCl (1)

- *p*-Phenylenediamine·2HCl (0.31)
- 3-Chloro-*p*-toluidine (0.30)
- 2,5-Diaminotoluene sulfate (0.29)

今回検討した芳香族アミンの比活性値に 1,000 を超えるものはなくいずれも 500 未満であった。その中で 100 を超えたものは次の 5 化合物だった。

() 内は比活性値。

- 4,4'-Thiodianiline (438)
- 4,4'-Oxydianiline (153)
- 3'-Dichlorobenzidine·HCl (130)
- 4-Aminodiphenyl (111)
- 4,4'-Methylenedianiline·2HCl (107)

これらの TD₅₀ 値は 2 から 32 で、一般の化学物質では Cyclophosphamide (2.2)、MeIQ (12)、Ethylene oxide (21)、AF-2 (29) などが同等の TD₅₀ 値を示すものであった。

一般の化学物質の中で比活性値と発がん性の相関が低いと考えられるものを丸で囲んだ(図 1)。

次の 5 化合物は強い発がん性を示すとされる AflatoxinB₁ (比活性値=28,000) よりも高い比活性値を示したが、TD₅₀ 値は AflatoxinB₁

(TD₅₀=0.003) のおよそ 300-10,000 倍高かった。

() 内に TD₅₀ 値を示す。

- MeIQ (12)
- IQ (0.81)
- MeIQx (1.67)
- Streptozotocin (0.96)
- AF-2 (29)

一方、次の 3 化合物の TD₅₀ 値は () 内に示すように 1 未満であったが、Ames 試験は陰性で変異原性は検出されなかった。

- *N*-Nitrosodiethylamine (0.027)
- OchratoxinA (0.10)
- Diethylstilbestrol (0.22)

D. 考 察

芳香族アミンについては、CPDB で発がん性が認められていないとされているものは Ames 試験が陰性であった。非発がん性物質で比活性値が求

められていたものでは、非活性値はいずれも低い値であり判定は陰性となっていた。したがって、Ames 試験で変異原性が検出されなかった芳香族アミンについては、げっ歯類について発がん性は認められない可能性が高いと考えてよいことになる。次に、今回検討した芳香族アミンの比活性値は、行政の判定で変異原性が非常に強いとされる 1,000 を超えるものはなかったが、その中で比較的高い値を示した上位 5 化合物の TD₅₀ 値は IARC (国際がん研究機関) の発がん性分類が 1 の、Cyclophosphamide、Ethylene oxide などと同等であった。したがって、芳香族アミンについて Ames 試験で高い比活性値を示すものについて、げっ歯類に対する発がん性は高いと考えてよいだろう。

一方、一般的な発がん物質については、IARC の発がん性分類が 1 の AflatoxinB₁ よりも 1.5-10 倍高い比活性値を示した MeIQ、MeIQx、Streptozotocin、AF-2 は、IARC の発がん性分類がいずれも 2B であり、変異原性試験の結果と発がん性は相関しているとは言い難かった。これらの化学物質の構造式を図 2 に示した。特に構造上類似性があるわけではない。このうち、Streptozotocin と AF-2 は Ames 試験において代謝活性化がない条件で突然変異を誘発する直接変異原である。生体内に存在する代謝酵素はバクテリアよりも多いため、それらにより一部不活化される可能性は、Ames 試験の比活性値に比して発がん性が低くなる理由の一つと考えることができる。一方、MeIQ および MeIQx の変異原性には代謝活性化、中でも N-水酸化が必要である。N-水酸化に働く酵素の活性および誘導の程度は種差が著しいことが報告されており (Cancer Res., 41, 4518, 1981)、Ames 試験で用いた S9 や発がん試験に用いた動物の種類による活性の違いなどが比活性値と発がん性のずれに関与した

可能性が考えられた。

一方、IARC の発がん性分類がそれぞれ 1、2A、2B とされる化合物、Diethylstilbestrol、N-Nitrosodiethylamine、OchratoxinA が、Ames 試験では変異原性が検出されていない。これらはいずれも芳香族アミンではなく、分子量に幅があり、また構造上目立った共通点は見られなかった (図 3)。いずれも代謝活性化を受けて DNA と反応するもので、OchratoxinA はラット肝の S9 では代謝活性化されないことも報告されているが (Mutat. Res., 261, 209, 1991)、その標的臓器は腎臓であり、トランスジェニックラットの腎臓で突然変異が誘発されているという報告がある (Toxicol. Sci., 122, 406-414, 2011)。これは、腎臓で局所的に代謝活性化を受けて代謝物が DNA と反応すると考えれば、Ames 試験と発がん性試験の大きな差を説明できる。Diethylstilbestrol は代謝物 Diethylstilbestrol 4', 4'-quinone が DNA と結合すると報告されている。この DNA 付加体はそれ自身が安定でないことに加えて、効率よく修復されるため非常に増殖が速い細胞に限って発がんに結び付くのではないかと考察されている (J.B.C., 264, 16847, 1989)。いくつかの例が示唆するように、Ames 試験と発がん性試験の結果、程度の差は代謝の差に起因すると考えてよいだろう。

E. 結 論

芳香族アミンを含む発がん性物質 81 化合物について、変異原性の指標である Ames 試験の比活性値と、発がん性の指標である TD₅₀ 値の相関を調べた。構造上の共通点を考慮せずに集めた発がん性物質には、Ames 試験と発がん性が相関しない物質が複数見られたのに対して、芳香族アミンは両者の値の相関が高いことが分かった。相関しなかった理由は主に代謝の違いによるものであ

った。定量的な評価手法には、構造クラス及び代謝の機構を考慮に入れることが重要と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 誌上発表

1. Yamada M, Shimizu M, Katafuchi A, Grúz P, Fujii S, Usui Y, Fuchs RP, Nohmi T, Erroneous nature of DNA polymerase III in *Escherichia coli* is responsible for the high spontaneous mutations in a *mutT* background, *Mol Microbiology*, 86, 1364–1375 (2012)
2. Nohmi T, Yamada M, Masumura K, *In vivo* approaches to identify mutations and in vitro research to reveal underlying mechanisms of genotoxic thresholds, *Genes and Environment*, 34, 146-152 (2012)

2. 学会発表

1. 山田雅巳、高宗万希子、増村健一、能美健彦、大腸菌 *mutM/mutY* 二重変異株のゲノムに蓄積した突然変異の3か月間の推移の次世代シーケンサーによる解析、第35回日本分子生物学会年会、福岡(2012.12)
2. 須井哉、川上久美子、根岸沙記、山田雅巳、ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験法の検討 8. 日本環境変異原学会第41回大会、静岡 (2012.11)
3. 山田雅巳、高宗万希子、松田知成、次世代 DNA シーケンサーを用いた変異原性試験の開発 – 変異スペクトラムの特徴 –、日本環境変異原学会第41回大会、静岡 (2012.11)
4. 松田知成、松田陽子、高宗万希子、山田雅巳、次世代 DNA シーケンサーを用いた変異原性試験の開発 – パイロット試験 –、日本環境変異原学会第41回大会、静岡 (2012.11)

5. M. Yamada, K. Masumura, M. Takamune, T. Nohmi, Analysis of mutations accumulated in the genome of *E. coli* mutator strains using a next-generation DNA sequencer, The 3rd Asian Conference on Environmental Mutagens, 杭州、中国 (2012.10)
6. M. Yamada, K. Masumura, T. Nohmi, Mutation accumulation in the whole genome of *E. coli* mutator strains, UKEMS 35th annual meeting, UK (2012.7)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 芳香族アミンの比活性値と TD₅₀ 値の対照表

	Aromatic amines	Ames test (revertants/ μ g)	TD ₅₀ (mg/kg/day)* ¹	CAS No.
1	4,4'-Thiodianiline	438	4	139-65-1
2	4,4'-Oxydianiline	153	10	101-80-4
3	3,3'-Dichlorobenzidine·2HCl	130	12	612-83-9
4	4-Aminodiphenyl	111 ^{*2}	2	92-67-1
5	4,4'-Methylenedianiline·2HCl	107	32	13552-44-8
6	3,3'-Dichlorobenzidine	75 ^{*2}	28	91-94-1
7	2-Naphthylamine	60	39	91-59-8
8	2,4-Diaminoanisole sulfate	59	183	39156-41-7
9	2,4-Diaminophenol·2HCl	45	143	137-09-7
10	Benzidine·2HCl	43	20	531-85-1
11	2,4,5-Trimethylaniline	36	6	137-17-7
12	Benzidine	24	2	92-87-5
13	3,3'-Dimethoxybenzidine	24 ^{*2}	1	119-90-4
14	<i>m</i> -Phenylenediamine	13	<u>309</u>	108-45-2
15	4,4'-Methylene- <i>bis</i> (2-chloroaniline)	11	52	101-14-4
16	2,4-Xylidine	8	10	95-68-1
17	1-Naphthylamine	5	67	134-32-7
18	2,6-Diaminotoluene·2HCl	5	<u>65</u>	15481-70-6
19	3,3'-Dimethylbenzidine·2HCl	4	1	612-82-8
20	<i>o</i> -Anisidine	3 ^{*2}	23	134-29-2
21	2-Chloro- <i>p</i> -phenylenediamine	2	<u>602</u>	61702-44-1
22	<i>p</i> -Anisidine	2 ^{*2}	<u>880</u>	104-94-9
23	<i>o</i> -Phenylenediamine	2	148	95-54-5
24	1,5-Naphthalenediamine	2	161	2243-62-1
25	<i>p</i> -Cresidine	1	54	120-71-8
26	<i>p</i> -Phenylenediamine	1	<u>200</u>	106-50-3
27	2,4-Diaminotoluene	1	2	95-80-7
28	2,4-Dimethoxyaniline·HCl	1	<u>593</u>	54150-69-5
29	2,5-Xylidine	1	117	95-78-3
30	<i>p</i> -Phenylenediamine·2HCl	0.31	<u>245</u>	624-18-0
31	3-Chloro- <i>p</i> -toluidine	0.30	<u>506</u>	95-74-9
32	2,5-Diaminotoluene sulfate	0.29	<u>290</u>	6369-59-1
33	2,4,6-Trichloroaniline	0.20	259	634-93-5
34	<i>m</i> -Cresidine	0.14	473	102-50-1
35	<i>p</i> -Toluidine·HCl	0.10	83	540-23-8
36	<i>p</i> -Chloroaniline	0.09	<u>76</u>	106-47-8
37	<i>o</i> -Toluidine·HCl	0.04	44	636-21-5
38	2-Naphthylamino,1-sulfonic acid	-	<u>1,395</u>	81-16-3
39	4-Chloro- <i>o</i> -toluidine·HCl	-	26	3165-93-3
40	5-Chloro- <i>o</i> -toluidine	-	194	95-79-4
41	Aniline	-	300	62-53-3
42	Anthranilic acid	-	<u>3,428</u>	118-92-3
43	<i>m</i> -Toluidine·HCl	-	<u>1,436</u>	638-03-9

*¹ CPDB より引用。網掛けはマウスのデータ，それ以外はラットのデータである。
下線はこの 5 倍用量でも発がんは見られなかったという数値で TD₅₀ 値ではない。

*² NTP のデータがなく，文献値を採用。

表 2 発がん物質の比活性値と TD₅₀ 値の対照表

	Chemical names	Ames test	TD ₅₀	CAS No.
1	MeIQ	681000	12	77094-11-2
2	IQ	433000	0.81	76180-96-6
3	MitomycinC	209100	0.001	50-07-7
4	MeIQx	145000	1.67	77500-04-0
5	Streptozotocin	104000	0.96	18883-66-4
6	AF-2	69800	29	3688-53-7
7	AflatoxinB ₁	28000	0.003	1162-65-8
8	PhIP	1800	1.91	105650-23-5
9	N-Nitroso-N-methylurea	780	0.093	684-93-5
10	N-OH-AAF	583	0.001	53-95-2
11	Benzo[<i>a</i>]pyrene	472	0.96	50-32-8
12	A-alpha-C	300	50	26148-68-5
13	7,12-Dimethylbenz[<i>a</i>]anthracene	77	0.080	57-97-6
14	<i>o</i> -Aminoazotoluene	21	4.0	97-56-3
15	2-Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine	17	614	5307-14-2
16	2-Acetylaminofluorene	7.18	1.2	53-96-3
17	Tris (2,3-dibromopropyl)phosphate	4.86	3.8	126-72-7
18	Ethylene oxide	3.16	21	75-21-8
19	4-chloro- <i>o</i> -phenylenediamine	2.73	214	95-83-0
20	Dibenzo[<i>a,f</i>]pyrene	2.50	0.070	-
21	Cyclophosphamide	2.00	2.2	50-18-0
22	N-Nitrosodimethylamine	1.20	0.096	62-75-9
23	Phenacetin	1.17	1,250	62-44-2
24	Melphalan	1.00	0.094	148-82-3
25	Phenobarbital	0.83	86	50-06-6
26	<i>o</i> -Anisidine	0.54	30	90-04-0
27	2,4-Diaminotoluene	0.53	4.4	95-80-7
28	Styrene oxide	0.30	55	96-09-3
29	Urethane	-	41	51-79-6
30	Diethylstilbestrol	-	0.22	56-53-1
31	<i>α</i> -Limonene	-	204	5989-27-5
32	Tamoxifen	-	3.71	10540-29-1
33	OchratoxinA	-	0.10	303-47-9
34	N-Nitrosodiethylamine	-	0.027	55-18-5
35	Oxazepam	-	36	604-75-1
36	Benzene	-	169	71-43-2
37	1,2-Epoxybutane	-	220	106-88-7
38	1,3-Butadiene	-	261	106-99-0
39	Chloroform	-	262	67-66-3
40	Acetaminophen	-	495	103-90-2