

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

研究代表者： 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長

研究要旨

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、閾値の存在の評価と、試験結果の適切な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。

4 種類の代表的な遺伝毒性肝発がん物質について、トランスジェニック動物遺伝子突然変異 (TG) 試験を実施し、その定量的反応性を解析した。試験結果から遺伝毒性ベンチマークドーズ (TG-BMDL₁₀) を算出し、発がんのベンチマークドーズ (CARC-BMDL₁₀) と比較したところ、発がん性データが十分でない場合でも、TG 試験結果から発がんリスクを評価できる可能性が示唆された。DNA 酸化損傷である 8-oxodG は 1 分子では塩基除去修復が働くが、複数クラスタリングしている場合はヌクレオチド除去修復が関与することが XPA 欠損細胞を用いた研究で明らかになった。低用量における閾値に関しては、低用量臭素酸カリウムを経口投与して、発がん実験を行った。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。さらに臭素酸カリウムの突然変異誘発に関しても「閾値」が存在することを示唆された。

食品添加物のうち指定添加物に関して実施された遺伝毒性試験データ、細菌を用いる復帰突然変異試験・哺乳類細胞を用いる染色体異常試験・齧歯類を用いる小核試験データベースを作成した。また、全ての化学物質に対する TG 試験データベースを作成し、TG 試験結果と発がん性の相関について検討した。TG 試験は発がんのリスク評価に有用と判断された。低用量の遺伝毒性物質の暴露評価のために LC-MS を用いた網羅的タンパクアダクトーム解析を試みた。ヒト血清サンプル中のヒトアルブミン (HAS) システイン残基における未知の付加体を、MS/MS スペクトルの類似性から網羅的に解析した。ラットヘモグロビンにおける新規のグリシドールアダクトとして、125 番目のシステイン残基のアダクトを検出した。これは、アルキル化剤の遺伝毒性の予測因子としての利用に期待が持たれる。

キーワード：閾値、遺伝毒性、発がん、化学発がん物質、用量反応関係、リスク評価

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 主任研究官
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 教授
山田雅巳	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
増村健一	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
鈴木孝昌	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部 室長

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 が設定されず、行政上の規制が困難となる。本研究では、遺伝毒性陽性と判定された化学物質の発がんリスクを適切に評価することを目的とし、陽性反応を定量的に評価するための手法の開発と、陽性反応における閾値の発生機序の解明を目指す。

本年度は、1名の研究代表者と、5名の分担研究者が以下の研究を行った。1)齧歯類発がん性試験結果と相関性が高いとされるトランスジェニック動物遺伝子突然変異試験 (TG 試験)の結果から、遺伝毒性リスク評価のための POD (Point of Departure) を導き、TG 試験結果から発がんのリスク評価を行うための手法の開発を行う(本間)。2)本研究で開発した TATAM (Tracing DNA Adduct Targeted Mutagenesis)を用いて、野生型および XPA 欠損細胞の同じ DNA 鎖に近接させた 2分子の 8-oxodG を導入して調べ、1分子および DNA 両鎖の 2分子 (前年度に実施)と比較した (安井)。3) *Mut^yh* 遺伝子欠損マウスでは自然発がん、臭素酸カリウム (0.2%溶液経口投与)誘発発がん頻度が劇的に上昇することが示されて

いる。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 (0.05-0.15%) の臭素酸カリウムを経口投与して発がん実験を行うと共に、*rpsL*-トランスジェニック (Tg) マウスを用いて突然変異解析を実施した (續)。4) 細菌を用いる復帰突然変異試験 (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の開発を目指す。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。本年度は IARC (国際がん研究機構) で発がんのクラスが Group 1 (ヒトに対する発がん性が認められる) とされている物質について、その発がん性と変異原性との相関を調査した。本最終年度は、食品添加物の *in vitro*、*in vivo* 遺伝毒性試験既存データを合わせて一覧表にした (山田)。5) TG 試験のデータベースを基に定量的解析法の開発、および発がんリスク評価への利用を目的とし、前年に引き続きデータベースの充実化をはかり、TG 試験データと発がん性との相関を検討した。また、作成したデータベースを用いて肝臓における TG 試験結果の発がん予測性について検討を行った (増村)。6) 遺伝毒性の定量的評価には暴露状況の適切な評価が重要である。低用量の暴露影響の評価のためには、実際の用量においても検出が可能となるようなバイオマーカーの利用が必要である。各種変異原に対する鋭敏な暴露マーカーとして、血中タンパクに対する各種アダクトの解析が行われている。このアプローチを一般化する目的で、近年進歩の著しい LC-MS によるプロテオーム解析技術を利用した網羅的解析によるアダクトームによるアプローチを行った (鈴木)。

B . 研究方法

1) 2-アセチルアミノフルオレン (2-AAF)、2, 4-ジアミノトルエン (2,4-DAT)、ジメチルニトロサミン (DMN)、ジエチルニトロサミン (DEN) についてトランスジェニックマウス (MutaTM

Mouse) を用いて肝臓における TG 試験を実施した。肝臓における突然変異の無遺伝毒性影響濃度 (NOGEL)、ベンチマーク用量 (BMDL₁₀) を算出し、POD とした。CPDB から得られた発がん試験データから同様に POD を算出し、両者を比較した (本間)。

2) XPA 遺伝子を破壊するための Zinc Finger Nuclease (ZFN) は、シグマアルドリッチから購入した。ZFN の設計およびバリデーションについてもシグマアルドリッチによって行われた。シーケンス解析することにより、ZFN ターゲットサイト周辺の欠損配列を調べた。8-oxodG 付加体を含むターゲティングベクターは、荒川らの方法に従って作製した。4 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 dG 部位の両鎖に導入した (pvINT4xOxodG)。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 (pvINTdG) も同様の方法で作製した。Lonza 社製 Cell Line Nucleofector を用いて、TSCER122 細胞 (TK^{-/-}) にターゲティングベクターをトランスフェクションし、相同組み換えにより、DNA 付加体がゲノム内に入った細胞クローンを回収した。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 (安井)。

3) C57BL6/J の遺伝的背景を持つ *Mut*yh 遺伝子欠損マウスのヘテロ接合体同士の間掛け合わせにより *Mut*yh 遺伝子欠損マウスと対照群の野生型マウスを得た。臭素酸カリウムを純水に溶解し、0.05~0.15% 溶液を調製後に濾過滅菌し、マウスの飲料水とした。6~8 週齢の野生型および *Mut*yh 遺伝子欠損マウスに飲水投与方法し、発がん解析は 16 週間、突然変異の解析は 4 週間後に行った。消費量については週一回モニターした。発がん性は 16 週間投与後、安楽死させたマウスから腸管を摘出して 4% パラフォルムアルデヒドを

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。突然変異解析は、4 週間投与後、通常の飲み水に切り替えてさらに 2 週間飼育した後、安楽死させたマウスから摘出した腸管から DNA を抽出し、*rpsL* 遺伝子突然変異解析法に従い、誘発突然変異の解析を行った (續)。

4) 平成 25 年 8 月 6 日現在の指定添加物について、これまで実施された細菌を用いる復帰突然変異試験 (Ames 試験) 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、齧歯類を用いる小核試験、及び、一部実施されているコメント試験、TG 試験の結果 (陽性、陰性の別) を一覧表にした (山田)。

5) TG 試験データが存在する物質については、TG 試験の解析臓器の情報、さらに発がん性の情報をデータベースに追加した。作成したデータベースを基に、TG 試験データと発がん性との相関を検討した。陽性を陽性と評価する Sensitivity、陰性を陰性と評価する Specificity、および全体の一致率 Concordance を計算した。さらに、肝臓における TG 試験結果と発がん性の相関を調べた (増村)。

6) ヒト血清サンプルとして、Promedix 社より入手した白人男性の前立腺癌患者由来の血清検体を用いた。Progenesis LC-MS によって同定されたペプチドのうち、システイン 34 を含むペプチド (ALVLIAFAQYLQQ CPFEDHVK) に着目し、このペプチドが溶出されたリテンションタイム付近前後 10 分間に検出された未同定ペプチドの中から、このペプチドフラグメントと類似した MS/MS スペクトルを示すペプチドピークを目視により検索した (鈴木)。

(倫理面への配慮)

本研究は多くは文献調査、培養細胞による *in vitro* 試験に基づくものであり、倫理上の問題はない。本間、續の動物実験に関してはそれぞれ、国立衛

研、九州大学の動物実験委員会、研究倫理委員会の規定に準拠して行った。

C . 研究結果および考察

1) 遺伝毒性の定量的評価とリスク評価への適用 (本間)

TG 試験で得られた各肝発がん物質の TG 試験結果から NOGEL と TG-BMDL₁₀ を算出した。また、CPDB データから得られたそれら発がん性試験の結果から TD₁₀、および CARC-BMDL₁₀ を計算した。CPDB に複数の試験結果が存在した場合は、データの信頼性が高く、より保守的な値を示すデータセットを用いた。DEN に関してはマウスのデータが無かったためラットのデータを用いた。これらのリスク評価のための POD とし、比較検討した。今回試験した 4 つの遺伝毒性発がん物質のそれぞれの BMDL₁₀ をプロットしてグラフ化した結果、発がん性と TG 変異原性は量的相関性が高く、TG 試験の BMDL₁₀ から発がん性の BMDL₁₀ を推測できる。データにばらつきがあることを考慮し、10~100 倍の安全ファクターをとることが必要かもしれない。この手法は発がんデータが無い場合でも、TG 試験データから発がんリスク評価ができる可能性を示している。発がん性の発現が遺伝毒性に質的・量的に依存していることが明らかな場合には有効な方法と考えられるが、実現化のためにはさらなるデータの蓄積が必要と考える。遺伝毒性化合物のリスク評価は、がん原性データがないことが多い。この場合、遺伝毒性発がん物質に対するヒトの許容暴露量を評価するには、別の戦略を練る必要がある。現在、*in vivo* 遺伝毒性試験から得られた用量反応データを用いたハザード特性付けのための量的アプローチまたは半定量アプローチは存在しない。リスク評価のために、遺伝毒性試験の予測強度にもとづき、どの化合物をがんに関する試験にかけるべきで、どれを省略すべきか決定する際、遺伝毒性試験は有用である。本研究で行ったように、遺伝毒性とがん原性の相関をプロットすることは、そうした決定を行う上で有用である。ただし、相

関プロットのばらつきと強度予測の不確実性を十分に考慮する必要がある。この場合、10~100 倍の不確実性の考慮が適切かもしれない。TG 試験から観察された BMDL₁₀ を 100 で割ると、対応する腫瘍 BMD₁₀ の控えめな予測値が得られる。がん原性データがない化学物質の発がんリスクの評価にはこのような控えめな BMD₁₀ の適用が現実的かもしれない。

2) 近接させた 4 分子の DNA 付加体が引き起こす突然変異誘発能の解析 (安井)

前年度までに 1, 2, 4 分子の 8-oxodG によって誘発される突然変異誘発頻度を解析 (複数分子は DNA 両鎖に配置) し、付加体の分子数と変異頻度の関係性について調べた。1 分子と 2 分子の変異頻度の間には、比例関係があったが、2 分子と 4 分子の間にはそれが無かった。その 2 分子は、各 DNA 鎖に 1 分子ずつ、つまり DNA 両鎖に 2 分子を近接 (5'-CTCGTG / CACGAG-3'; 下線部が導入部位) させて変異頻度を解析しており、本報告書の 2 分子とは配置が異なる。DNA 両鎖の 2 分子による変異スペクトラムは、2 つの付加体が両鎖の近傍に導入されないと発生しないような特徴的なもので、両鎖の付加体導入部位の間に一塩基欠失と一塩基挿入が非常に高頻度で検出された (5'-CTCNGTG / CACNGAG-3'; N が欠失あるいは挿入の部位)。その 2 分子の全変異頻度は 20% 以上にも達した。それに対し、本年度に実施した同じ DNA 鎖内の 2 分子による変異頻度は、わずか 7.4% にとどまり、それは 1 分子の頻度 (8.3%) とほぼ同じであった。つまり、前年度で考察したとおり、同じ DNA 鎖に複数の DNA 損傷がある場合、ヌクレオチド除去修復あるいはロングパッチ除去修復等によって効率良く除去されるため、付加体の分子数が増えても変異頻度の上昇が抑えられるためであると推測できる。これを証明するために、ヌクレオチド除去修復に関与する XPA 欠損細胞 XPA KO を構築し、同じ DNA 鎖内の 8-oxodG 2 分子で起きる突然変異誘発頻度を調べた。その結果、XPA KO 細胞を用い

たときの方が、野生型 TSCER122 細胞のときよりも有意に突然変異誘発頻度を上昇させた。これらのデータから、やはり同じ DNA 鎖にある複数の付加体は同時に除去修復されるため、付加体の分子数と突然変異誘発頻度には、比例関係がないことを実験的に明らかとなった。バルキーDNA付加体に対して働くと考えられてきたヌクレオチド除去修復は、クラスターDNA損傷などDNAの片側鎖に広範な損傷が形成した場合に働く機構であると考えられる。

3) 臭素酸カリウム誘発消化管発がん(續)

これまで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、*Mut*h 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と、低用量の0.05%臭素酸カリウムの投与では上皮性腫瘍を発生させなかった。本年度は、マウスを追加して0.05~0.15%臭素酸カリウムを経口投与して発がん実験を行った。これまでと同様に、0.10~0.20%臭素酸カリウム溶液の用量では、*Mut*h 遺伝子欠損マウスの十二指腸・空腸でそれぞれ、用量依存的に上皮性腫瘍の発生を認め、0.05%投与群では発がんは認められなかった。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、「閾値」周辺の低用量臭素酸カリウムによる誘発突然変異の解析を行った。0.10%および0.15%投与群を用いた突然変異解析の結果では、野生型マウスに比べて *Mut*h 遺伝子欠損マウスでは全体の突然変異頻度がそれぞれ約1.5倍および1.8倍上昇していた。一方、0.05%投与群の *Mut*h 遺伝子欠損マウスの突然変異は、野生型マウスの突然変異頻度とほぼ同程度(0.94倍)であった。8-oxoGに起因すると考えられるG:C→T:A型の変異頻度を *Mut*h 遺伝子欠損マウスと野生型マウスで比較すると、0.10%投与群では約5.2倍、0.15%投与群では約9.1倍上昇していたが、0.05%投与群では非投与群における比率(約3.3倍)と同程度の約3.7倍しか上昇していなかった。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 *Mut*h 遺伝子が関与していることを示している。また、*Mut*h 遺伝子が欠損した個体において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。

4) 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(山田)

食品添加物のうち、指定添加物436品目(一部混合物等を含む)について実施されていた遺伝毒性試験結果をまとめた。293品目については、Ames試験と染色体異常試験が実施され、91品目について *in vivo* の小核試験が実施されていた。3つの試験がいずれも実施されているのは、55品目だった。12品目については肝臓と消化器(胃もしくは大腸)を対象にTG試験が実施されていた。結果はいずれも陰性となっている。Ames試験で陽性になる食品添加物の数は限られ、最終的にはTG試験で確認することからAmes試験に細かい定量性を求める必要はなく、従来どおり比活性値を目安に次の評価ステップに進むことが妥当であると考えられる。

5) トランスジェニック動物を用いた定量的遺伝毒性評価に関する研究(増村)

昨年度までに計280件をデータベースに追加した。今年度は、その内容を精査し各物質について個々の解析臓器のTG試験結果の情報をコメント欄に追加した。また、重複データを削除、統合するとともに、一部の物質の判定ならびに発がん性カテゴリの修正・変更を行った。その結果、データ件数は計273件となった。内訳は、発がん物質123、非発がん物質23、発がん性未知物質65、複合暴露49、溶媒13物質であった。TG試験データがある123の発がん性物質と23の非発がん性物質を用いて、TG試験の判定と発がん性の有無との相関について検討した。陽性を陽性と評価するSensitivityは91/123=74.0%であった。陰性を陰性と評価するSpecificityは15/23=65.2%であった。全体の一致率Concordanceは(91+15)/146=72.6%であった。さらに、肝臓に

おける TG 試験結果と発がん性の相関を調べた。発がん性物質 123 のうち、肝臓の TG 試験データがあるものが 92 あり、このうち 肝臓 TG 陽性が 62、肝臓 TG 陰性が 30 であった。肝臓 TG 陰性 30 のうち 9 物質は肝臓以外の組織で TG 陽性結果が得られていた。非発がん性物質 23 のうち肝臓の TG 試験データがあるものが 15 あり、このうち TG 陽性が 4、TG 陰性が 11 であった。このことから、発がん物質が肝臓で TG 陽性となる Sensitivity は $62/92 = 67.4\%$ 、非発がん物質が肝臓で TG 陰性となる Specificity は $11/15 = 73.3\%$ と算出された。データベースの偏りに留意する必要があるが、TG 試験の Sensitivity と Specificity は比較的高いと考えられた。また、発がん標的において TG 陰性の発がん物質に関しては、mode of action の観点からいわゆる非遺伝毒性発がん物質とされるものが含まれており、その場合 TG 陰性は妥当な結果と考えられる。この点をふまえると、遺伝毒性発がん物質に限れば TG 試験の Sensitivity はさらに高いと予想される。一方で、TG 試験は投与の方法、期間および用量が発がん試験と異なり、一般的には発がん試験より短期間のため総投与量が低いことには注意する必要がある。

6) In vivo 遺伝毒性試験の低用量リスク評価法に関する研究(鈴木)

前立腺がん患者由来血清より得られたタンパク質をトリプシン消化後に、LC-MS によりショットガンプロテオミクス解析 ProgenesisLC-MS にて解析を行った。同時に得られた MS/MS スペクトルデータを利用して MASCOT によるデータベース検索によるタンパク同定を行った結果、ヒト血清アルブミン (HAS) の各種フラグメントが検出されたが、このうち C34 を含むフラグメントは、ALVLIIFAQYLQQCPFEDHVK からなる 21 アミノ酸残基の比較的長いペプチドとして同定された。このスペクトルの類似性を手がかりに、C34 含有ペプチドと溶出時間が近いペプチドの中で、MS/MS スペクトルの類似したペプチドを、

未修飾体の主要なピークを手掛かりとして検索し、アダクトの候補として同定した。この中で最も注目されるのは、有機ヒ素化合物である dimethylarsinous (AsIII) acid 由来の付加体であり、ヒトは低濃度のヒ素に暴露されている事実から、その付加体が検出できたとすれば、その意義は大きい。今回の検討により、いくつかの付加体の候補が得られたが、ジメチルヒ素を除き、既知の何らかの変異原物質による付加体は検出されなかった。これまでの報告では、ヒトヘモグロビンを用いて、アクリルアミドやグリシドールといった食品中の変異原物質による付加体が検出されているため、HSA のシステインに対するこれらの付加体が検出されることも期待されたが、残念ながら今回は検出できなかった。検出感度がそれほど高くないためであるとも考えられるが、これまでの検討から、これら化合物はシステイン以外にも、リジンやアルギニンなどの塩基性アミノ酸のアミノ基に対しても反応性を示すことがわかってきており、今後はシステイン残基に限定せず、他のアミノ酸へのアダクトも含めてより網羅的に解析を行う予定である。

D. 結論

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。4 種類の代表的な遺伝毒性肝発がん物質について、TG 試験は実施し、その定量的反応性を解析した。試験結果から遺伝毒性ベンチマークドーズ (TG-BMDL₁₀) を算出し、発がんのベンチマークドーズ (CARC-BMDL₁₀) と比較したところ、発がん性データが十分でない場合でも、TG 試験結果から発がんリスクを評価できる可能性が示唆された。DNA 酸化損傷である 8-oxodG は 1 分子では塩基除去修復が働くが、複数クラスタリングしている場合はヌクレオチド除去修復が関与することが XPA 欠損細胞を用いた研究で明らかになった。低用量における閾値に関しては、低用量臭素酸カリウムを経口投与して、発がん実験を行っ

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。さらに臭素酸カリウムの突然変異誘発に関しても「閾値」が存在することを示唆された。食品添加物のうち指定添加物に関して実施された遺伝毒性試験データ、細菌を用いる復帰突然変異試験・哺乳類細胞を用いる染色体異常試験・齧歯類を用いる小核試験データベースを作成した。また、全ての化学物質に対する TG 試験データベースを作成し、TG 試験結果と発がん性の相関について検討した。TG 試験は発がんのリスク評価に有用と判断された。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

誌上発表

- Horibata K, Ukai A, Honma M, Evaluation of rats' *in vivo* genotoxicity induced by *N*-ethyl-*N*-nitrosourea in the RBC *Pig-a*, *PIGRET*, and *gpt* assays. *Genes and Environment*, 36, 199-202 (2014)
- Matsumoto, M, Masumori, S, Hirata-Koizumi, M, Ono, A, Honma, M, Yokoyama, K, Hirose, A, Evaluation of *in vivo* mutagenicity of hydroquinone in *Muta*TMMice, *Mutat Res*, 775-776, 94-98 (2014)
- Morita, T, Miyajima, A, Hatano, A, Honma, M, Effects of the proposed top concentration limit on an *in vitro* chromosomal aberration test to assay sensitivity or to reduce the number of false positives, *Mutat Res*, 769, 34-49 (2014)
- Onami, S, Cho, Y, Toyoda, T, Horibata, K, Ishii, Y, Umemura, T, Honma, M, Nohmi, T, Nishikawa, A, Ogawa, K, Absence of *in vivo* genotoxicity of 3-monochloropropane-1,2-diol and associated fatty acid esters in a 4-week comprehensive toxicity study using F344 *gpt* delta rats, *Mutagenesis*, 29, 295-302 (2014)
- Matsumoto, M, Masumori, S, Hirata-Koizumi, M, Ono, A, Honma, M, Yokoyama, K, Hirose, A, Evaluation of *in vivo* mutagenicity of hydroquinone in *Muta*TMMice, *Mutat Res*, 775-776, 94-98 (2014)
- Piao, J, Nakatsu, Y, Ohno, M, Taguchi, K, Tsuzuki, T, Mismatch repair deficient mice show susceptibility to oxidative stress-induced intestinal carcinogenesis, *Int J Biol Sci*, 10, 73-79 (2014)
- Takahashi-Yanaga, F, Yoshihara, T, Jingushi, K, Igawa, K, Tomooka, K, Watanabe, Y, Morimoto, S, Nakatsu, Y, Tsuzuki, T, Nakabeppu, Y, Sasaguri, T, DIF-1 inhibits tumor growth *in vivo* reducing phosphorylation of GSK-3 β and expressions of cyclin D1 and TCF7L2 in cancer model mice, *Biochem Pharmacol*, 89, 340-348 (2014)
- Ohno, M, Sakumi, K, Fukumura, R, Furuichi, M, Iwasaki, Y, Hokama, M, Ikemura, T, Tsuzuki, T, Gondo, Y, Nakabeppu, Y, 8-Oxoguanine causes spontaneous *de novo* germline mutations in mice, *Scientific Reports*, 4, 4689 DOI: 10.1038/srep04689 (2014)
- Isoda, T, Nakatsu, Y, Yamauchi, K, Piao, J, Yao, T, Honda, H, Nakabeppu, Y, Tsuzuki, T, Abnormality in Wnt signaling is

causatively associated with oxidative stress-induced intestinal tumorigenesis in MUTYH-null mice, *Int J Biol Sci*, 10, 940-947 (2014)

10. Kyuragi, R, Matsumoto, T, Harada, Y, Saito, S, Onimaru, M, Nakatsu, Y, Tsuzuki, T, Nomura, M, Yonemitsu, Y, Maehara, Y, BubR1 insufficiency inhibits neointimal hyperplasia through impaired vascular smooth muscle cell proliferation in mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35, 341-347 (2015)
11. Takeiri A, Wada NA, Motoyama S, Matsuzaki K, Tateishi H, Matsumoto K, Niimi N, Sassa A, Grúz P, Masumura K, Yamada M, Mishima M, Jishage K, Nohmi T, *In vivo* evidence that DNA polymerase kappa is responsible for error-free bypass across DNA cross-links induced by mitomycin C, *DNA Repair*, 24, 113-21 (2014)
12. Kawamura Y, Hayashi H, Masumura K, Numazawa S, Nohmi T, Genotoxicity of phenacetin in the kidney and liver of Sprague-Dawley *gpt* delta transgenic rats in 26-week and 52-week repeated-dose studies, *Toxicology*, 324, 10-17 (2014)
13. 鈴木孝昌 コンパニオン診断薬の現状と課題 「最先端バイオマーカーを用いた診断薬/診断装置開発と薬事対応」 p271-275 (技術情報協会) (2015)

学会発表

1. 本間正充 医薬品中に存在する遺伝毒性不純物の評価と管理, 第 350 回 CBI 学会研究講演会, 東京 (2014.5)
2. 本間正充, 日本環境変異原学会レギュラトリ

ーサイエンス WG 活動, 日本環境変異原学会公開シンポジウム, 東京 (2014.5)

3. Honma M et al., Demonstration of non-threshold of 8-oxoG inducing genotoxicity by targeted mutagenesis, 43rd EEMS Annual Meeting, UK (2014.7)
4. Honma M, Use of QSAR Tools for Hazard Identification of Genotoxic Impurities in Pharmaceuticals, 9th World Congress on Alternative and Animal Use Sciences (WC9), Czech (2014.8)
5. 本間正充: インシリコによる医薬品中不純物の安全性評価と, その向上に向けた国際共同研究, CBI 学会 2014 年大会プレミティンクセッション, 東京 (2014.10)
6. Honma M, Trend and Progress of OECD Genotoxicity Testing Guidelines, 2014 National Workshop on Non-clinical Safety Evaluation and Quality Management, China (2014.11)
7. 本間正充, 遺伝毒性インテリジェントテストシステム, 日本環境変異原学会第 43 回大会, 東京 (2014.11)
8. 本間正充, QSAR を利用した医薬品中の遺伝毒性不純物の評価と管理, 日本動物実験代替法学会第 27 回大会, 横浜 (2014.12)
9. Honma M et al., Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome, 4th Asian Conference on Environmental Mutagens, India (2014.12)
10. 佐々彰, 鴨下渚, 兼丸祐紀, 本間正充, 安井学; ゲノムの特定部位に配置させたクラスター-DNA 損傷の数的遺伝毒性影響. 日本放射線影響学会第 57 回大会, 鹿児島 (2014.10)
11. 安井学, 部位特異的にゲノム内に導入した DNA 付加体の遺伝的影響, 日本環境変異原

- 学会第 43 回大会，東京 (2014.11)
12. 佐々彰，鴨下渚，兼丸祐紀，本間正充，安井学；ゲノムに導入させた酸化的クラスター DNA 損傷の数的遺伝毒性影響，日本環境変異原学会第 43 回大会，東京 (2014.11)
 13. 長野聖也，東垣由夏，佐々彰，川西優喜，安井学，高村岳樹，八木孝司；DNA 塩基損傷 1 分子を部位特異的にもつプラスミドの作製とヒト細胞における TLS 解析，日本環境変異原学会第 43 回大会，東京 (2014.11)
 14. Tsuzuki T, Ohno M, Takano N, Taguchi K, Nakabeppu Y, Aoki Y, Nohmi T, Nakatsu Y, Oxidative stress-induced intestinal tumors in *Mut yh*-deficient mice treated with low doses of potassium bromate, 4th Asian Conference on Environmental Mutagens, India (2014.12)
 15. 鷹野典子，大野みずき，稲葉洋平，志村勉，櫻田尚樹，中別府雄作，中津可道，續輝久 *Mut yh* 遺伝子欠損マウスにおける酸化ストレス誘発突然変異の解析，日本環境変異原学会第 43 回大会，東京 (2014.11)
 16. 大野みずき，鷹野典子，佐々木史子，田口健一，中別府雄作，青木康展，能美健彦，中津可道，續輝久，*Mut yh* 遺伝子欠損マウスを用いた酸化ストレス誘発消化管がんの解析，日本環境変異原学会第 43 回大会，東京 (2014.11)
 17. 西垣奈津希，池田彰弘，湯川誠也，守田由子，中津可道，續輝久，原島秀吉，紙谷浩之，非標的部位におけるミスマッチの配列変換（遺伝子修復）への影響，日本分子生物学会第 37 回年会，横浜 (2014.11)
 18. 鷹野典子，大野みずき，稲葉洋平，志村勉，櫻田尚樹，中別府雄作，中津可道，續輝久，*Mut yh* 遺伝子欠損マウスにおける酸化ストレス誘発突然変異の解析，日本分子生物学会第 37 回年会，横浜 (2014.11)
 19. 作見邦彦，大野みずき，福村龍太郎，榎藤洋一，岩崎裕貴，池村淑道，續輝久，中別府作，8-oxoguanine に起因する *de novo* germline mutation の解析，日本分子生物学会第 37 回年会，ワークショップ：生命の起源・進化・本質，横浜 (2014.11)
 20. Tsuzuki T, Ohno M, Takano N, Taguchi K, Nakabeppu Y, Aoki Y, Nohmi T, Nakatsu Y, Oxidative stress-induced intestinal tumors in *Mut yh*-deficient mice treated with low doses of potassium bromate, 5th US-Japan DNA Repair Meeting, Grand XIV, Tokushima (2014.10)
 21. 大野みずき，鷹野典子，佐々木史子，橋詰拓弥，李賛，田口健一，中別府雄作，中津可道，續輝久，酸化ストレス誘発突然変異と消化管がん解析，日本放射線影響学会第 57 回大会，鹿児島 (2014.10)
 22. 橋詰拓弥，中津可道，大野みずき，佐々木史子，鷹野典子，續輝久，ミスマッチ修復欠損マウスにおける酸化ストレス誘発突然変異の解析，日本放射線影響学会第 57 回大会，鹿児島 (2014.10)
 23. 續輝久，シンポジウム：低線量・低線量率放射線による発がんを考える，DNA 修復欠損マウスを用いた発がん研究：低用量化学物質投与研究から見えること，日本放射線影響学会第 57 回大会，鹿児島 (2014.10)
 24. Ohno M, Takano N, Nakatsu Y, Nakabeppu Y, Tsuzuki T, Oxidative stress-induced mutagenesis and tumorigenesis in the small intestine of *Mut yh*-deficient mice treated with low doses of potassium bromate, 日本癌学会第 73 回学術総会，横浜 (2014.9)

25. Atsumi Y, Katayama K, Shimamura T, Nakatsu Y, Masutani M, Miyano S, Nakagama H, Tsuzuki T, Yoshioka K, Microsatellite instability is induced by DNA replication stress in association with massive induction of mutations, 日本癌学会第73回学術総会, 横浜 (2014.9)
26. Takahashi F, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Nakabeppu Y, Sasaguri T, DIF-1 inhibits tumor growth *in vivo* reducing phosphorylation of GSK-3 β and expressions of cyclin D1 and TCF7L2, 日本癌学会第 73 回学術総会, 横浜 (2014.9)
27. 作見邦彦, 大野みずき, 福村龍太郎, 権藤洋一, 岩崎裕貴, 池村淑道, 續輝久, 中別府雄作, DNA 酸化損傷修復欠損マウスの継代実験で捉えられた遺伝現象, 日本遺伝学会第 86 回大会, 長浜 (2014.9)
28. 鷹野典子, 大野みずき, 中別府雄作, 中津可道, 續輝久, Mutyh 欠損マウスにおける酸化ストレス誘発がんおよび突然変異の解析, 日本遺伝学会第 86 回大会, 長浜 (2014.9)
29. 堀妃佐子, 田中康浩, 堤絵梨, 百南綾華, 増村健一, 山田雅巳, 藤居互, 北川義徳: DMH を用いた F344 系統 *gpt delta* ラット突然変異試験と小核試験 (末梢血, 骨髄, 肝臓, 大腸) の統合法の検討. 日本環境変異原学会第 43 回大会 (2014.12, 東京).
30. 山田雅巳, 堀端克良, 鶴飼明子, 木本崇文, 千藏さつき, 伊東悟, 武藤重治, 宇野芳文, 真田尚和, 高島理恵, 志賀野美幸, 高沢博修, 濱田修一, 山本美佳, 堀妃佐子, 堤絵梨, 和田邦生, 前田晃央, 小坂瑞樹, 木村葵, 菊月隆太, 荻原庸介, 京谷恭弘, 足立秀樹, 上松泰明, 吉田唯真, 成見香瑞範, 福田隆之, 鈴木裕太, 後藤玄, 森田健, 本間正充: *Pig-a*/PIGRET アッセイに関する短期試験への有用性: MMS 共同研究報告. 日本環境変異原学会第 43 回大会 (2014.12, 東京).
31. 須井哉, 川上久美子, 根岸沙記, 増淵恵美, 園原啓太, 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 9. 日本環境変異原学会第 43 回大会 (2014.12, 東京).
32. Yamada M, Takamune M, Matsuda T, Novel mutation assay with non-selective protocol using a next-generation DNA sequencer, 4th Asian Conference on Environmental Mutagens, India (2014.12)
33. Masumura K, Toyoda-Hokaiwado N, Ishii Y, Umemura T, Honma M, Nishikawa A, Nohmi T, Point mutations and deletions induced by aging in liver of *gpt delta* transgenic rats, 4th Asian Conference on Environmental Mutagens, India (2014.12)
34. 増村健一, 豊田尚美, 石井雄二, 梅村隆志, 能美健彦, 西川秋佳, 本間正充, *gpt delta* ラットの加齢により誘発される点突然変異および欠失変異の解析, 第 37 回日本癌学会学術総会, 横浜 (2014.9)
35. 増村健一, 大杉直弘, 豊田尚美, 能美健彦, 本間正充, *gpt delta* マウスを用いた加齢に伴い蓄積する遺伝子突然変異の解析, 日本進化学会第 16 回大会, 大阪 (2014.8)
36. 増村健一, トランスジェニック動物を用いた遺伝子突然変異試験の動向, MMS 研究会第 64 回定例会, 静岡 (2014.6)
37. Suresh T, Maekawa K, Saito Y, Sato Y, Suzuki T, Individual variations in the human urinary proteome in relation to rat, The 3rd International Conference on Personalized Medicine, Czech (2014.6)
38. スレッシュ ティルパッティ, 斎藤嘉朗, 本間正充, 佐藤陽治, 鈴木孝昌, 変異原暴露モニタリング手法としてのタンパクアダクトミクス, 日本環境変異原学会第 43 回大会,

東京 (2014.12)

39. Suzuki T, Suresh T, Protein adductome analysis for the human exposure monitoring to mutagens, The 4th Asian Conference on Environmental Mutagens, India, (2014.12)
40. 鈴木孝昌, 医薬品開発においてヒト内在性物質を測定する際の定量分析法に関する留意点(案)の概要:規制の重要性と今後の課題, 第6回 JBF シンポジウム, 東京 (2015.2)

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

