

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

**食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価のための新戦略法
に関する研究**

平成27～29年度 総合研究報告書

研究代表者 本間正充

平成30(2018)年 5月

目 次

I. 総合研究報告書

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 1

本間 正充、安井 学、杉山 圭一、戸塚 ゆ加里、高村 岳樹、正田 卓司、
出水 庸介

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 1 2

III. 研究成果の刊行物・別冊 (省略)

研究課題名：食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価のための新戦略法に関する研究

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

遺伝毒性試験は発がん性物質のスクリーニング試験であると同時に、その遺伝毒性メカニズムが、発がん性リスク評価の上で重要な情報となる。本研究では、OECD が提唱する「有害性転帰事象（AOP）」を取り入れた遺伝毒性評価ストラテジーと、追跡型試験系を開発し、遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化を目指す。主な研究のテーマは、発がん AOP の分子初期事象である「化学物質 DNA 付加体 突然変異」のプロセスから（A）「化学物質 DNA 付加体」と、（B）「DNA 付加体 突然変異」を分離し、独立に定性、定量的に解析する試験系を構築すること。（C）発がん AOP からはずれるエピ遺伝毒性物質の検出系の開発することである。

（A）DNA 付加体に関してはヘテロサイクリックアミンである PhIP の部位特異的修飾オリゴヌクレオチドの合成は完了し、安定的に供給できるルートを確立した。また PhIP 付加体との比較のために、C8 付加体とは異なる N2 の付加体の代表であるベンゾピレンの付加体合成を着手し、ジオールエポキシドの合成までの条件を検討した。また O6 - グリコール酸付加体について検討を行った。MeIQx 付加体または IQ 付加体の合成ルート短縮を達成するためにキーとなる反応である Buchwald-Hartwig 反応におけるリガンド、塩基、溶媒等の反応条件の検討を行った。ジクロロメタンおよび 1,2-ジクロロプロパン(DCP)は、職業性胆管がんの原因物質であることが示唆されている。DCP の変異原性誘発には代謝は関与しておらず、デオキシグアノシン由来の付加体である DCP86 が同定できた。

（B）DNA 付加体 突然変異に関する研究：ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 のゲノム内に dG-C8-PhIP 付加体を導入し、その部位で起きる突然変異頻度とスペクトラムを調べた結果、164 細胞中に 6 つの細胞で dG-C8-PhIP のゲノム導入部位周辺の塩基変異（4.2%）が検出され、2 つの細胞からは大きな欠失（1.4%）が観察された（合計 5.6%）。同様の実験を XPC、ERCC6 の KO 細胞を用いて調べたが、dG-C8-PhIP 付加体の正常細胞とほぼ同じであるため、XPC、ERCC6 は dG-C8-PhIP 付加体の DNA 修復に関与していないか、あるいは TATAM 解析がバルキー付加体に適用できない可能性があることが分かった。

（C）FLO1 プロモーターを用いたエピ変異原応答性レポーターアッセイ系の構築については、凝集反応促進作用を有するアリザリンと同類縁体プルプリンが、濃度依存的に凝集性と FLO1 レポーター活性を誘導することを明らかにした。この結果は、凝集試験以上にハイスループット性並びに精度向上が期待できる本レポーターシステムをエピ遺伝毒性物質の評価系に活用できる可能性を示したもので、成果としては大きいと判断される。

研究分担者

安井 学	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
杉山圭一	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
戸塚ゆ加里	国立がん研究センター研究所 発がん・予防研究分野 ユニット長
高村岳樹	神奈川工科大学工学部 分子生物学研究室 教授
出水庸介	国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部 部長 (H29 年度)
正田卓司	国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部 室長 (H27, 28 年度)

A . 研究目的

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、食品添加物や残留農薬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。多くの化学物質の毒性は、健康リスクを評価する場合、理論的、実証的研究から、これ以下であれば健康影響が見られないレベル、すなわち閾値がある用量反応モデルが用いられてきた。これにより一日摂取許容量(Acceptable Daily Intake; ADI)を定めることができる。しかしながら、その化学物質の発がん性が問題となり、さらに遺伝毒性が認められるとやっかいである。他の毒性と異なり遺伝毒性には閾値がないとされているため、摂取量をゼロにしない限り、健康リスクもゼロのならないとの論理から ADI を設定することができない。ここに遺伝毒性発がん物質のリスク管理の問題点がある。同様の問題は、福島第一原発事故からの低レベル放射線の発がんリスクの議論においても焦点となっている。我々は日常的に、食物を通して多くの発がん物質を摂取しており、また、太陽からの紫外線、自然環境からの放射線も先史からの発がん因子である。さらに、現代社会で生活する限り、工業製品等からの微量の発がん可能性物質の暴露を避けることは

できない。現在必要なのは、食品中に含まれる化学物質の危険性とそのリスクを国民に対して合理的、且つ高い透明性をもって、説明可能な評価方法と管理方法を確立することである。このための重要な研究は、リスクをもたらずハザードのメカニズムの解明と、定量化であると考える(Hazard Characterization)。

遺伝毒性試験は発がん性物質のスクリーニング試験であると同時に、発がん性が認められた場合には、その遺伝毒性メカニズムが安全性評価の上で重要な情報となる。また、遺伝毒性発がん物質のリスク評価においても、近年では、ある一定レベル以下のリスクであれば許容されるという考えが浸透しつつあるが、この場合でも、適切な遺伝毒性メカニズムと、定量評価による透明性の高い説明が求められている。これまでの一般的な遺伝毒性試験としてはエームス試験(バクテリア; 遺伝子変異)、染色体異常試験(哺乳類; 染色体構造異常)、小核試験(げっ歯類動物; 染色体構造および数的異常)が利用されてきた。これらの組み合わせ試験は、異なる生物種、複数のエンドポイントを用いることにより、様々なタイプの遺伝毒性物質を広範に検出するためにデザインされたものである。しかしながら、この結果から発がんに関連する遺伝毒性メカニズムの情報は得ることは困難であり、また、試験結果自体も発がん性との相関性が低い。本研究では、これまでの既成概念を破り、最新の情報と分子生物学的技術に基づく評価系を構築し、遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化を目指す。

OECD では化学物質と生体(組織)の相互作用から個体での毒性発現を関連づけて説明する手法(Adverse Outcome Pathway; AOP)と、それに基づく統合的試験法と評価方法(Integrated Approaches to Testing and Assessment; IATA)を提唱し、化学物質の安全性評価の合理化と、実験動物削減を目指している。本研究では、発がん AOP の分子初期事象(Molecular Initial Event; MIE)である「化学物質 DNA 付加体 突然変異」に注目し、この MIE プロセスを追跡し、定

性、定量的に解析する試験系を構築し、メカニズムと定量性に基づいた新たな遺伝毒性 IATA を開発することを目的とする。本研究では、1. DNA 付加体検出、2. 付加体合成、3. 遺伝子ターゲットによるゲノム中への付加体の導入、が技術の核心である。特に、3 の技術に関しては、わずか 1 分子の DNA 付加体をゲノム中に導入し、その結果生じる突然変異の定性・定量的に解析することができる。1 分子の DNA 損傷は究極的な低用量モデルであり、本試験系で DNA 付加体が突然変異をもたらさなければ、その DNA 付加体(損傷)は閾値を持つか、閾値が無くとも突然変異を引き起こさないことを理論的に証明したことになる。また、本研究班では DNA 付加体形成が認められず、発がん AOP のスキームに載らない非遺伝毒性発がん物質の評価法にも取り組んでいる。これら化学物質は DNA の一次構造に変化を与えず、がんや他の疾患を引き起こすエピ遺伝毒性物質と考えられる。エピ遺伝毒性物質に反応する新たなトランスジェニック生物を作成し、エピ遺伝毒性物質の評価系の開発も行った。

本研究班は上記の目的を達成するため、6 名の分担研究者が以下の研究に取り組んだ。

1) バルキーDNA 付加体に関わるヌクレオチド除去修復遺伝子の破壊細胞の構築(安井):
これまで 1 分子の DNA 付加体をゲノム中に導入し、その運命を定性・定量的に解析できる TATAM 法の開発に成功した。この TATAM の系を用いてヘテロサイクリックアミン類(HCA)である PhIP、MeIQ、Trp-P-1 等の変異原性の解析を今後進める。HCA は、DNA と反応し、バルキーDNA 付加体を形成させ、発がんに至らせる遺伝毒性発がん物質である。バルキーDNA 付加体は、ヌクレオチド除去修復機構(NER)によって DNA から除去されることがよく知られている。NER は、大きく分けてグローバルゲノム NER と転写共役型 NER の 2 種類がある。しかし、バルキーDNA 付加体のほとんどは、そのグローバルゲノム NER が転写共役型 NER のどちらに進むかは全く不明であり、HCA の発がん作用機序を理解するうえ

で大きな障害となっている。本研究では、グローバルゲノム NER の XPC 遺伝子(XPC タンパク質)、転写共役型 NER の ERCC6 遺伝子(CSB タンパク質)が、その修復経路の必須遺伝子であることから、CRISPR/Cas9 技術を用いることによってそれらの遺伝子のノックアウト(KO)あるいはノックイン(KI)細胞を構築し、バルキーDNA 付加体の NER 機構を解明する。

2) エピ遺伝毒性物質の評価系の開発(杉山):
発がんメカニズムとして、近年エピジェネティックな変異の関与も指摘されている。エピ遺伝毒性物質のスクリーニング試験については、短期・長期に関わらず現時点では確立されていない。これまでエピ遺伝毒性の一つである DNA メチル化阻害剤検出系を構築することを目的としてヒト DNA methyltransferase(DNMT)遺伝子形質転換酵母(ヒト DNMT 酵母)を作出に成功し、DNMT 阻害剤に対する応答性を検討してきた。本年度は、DNMT 阻害剤以外の主要なエピ変異原となるヒストンに作用点を有する化学物質が凝集性に及ぼす影響を検討した。

3) DNA アダクトの定性・定量評価とアダクトのカタログ化に関する研究(戸塚):
ジクロロメタン(DCM)やジクロロエタン(DCE)等のハロゲン系炭化水素は主に工業溶剤として幅広く使用されている。また、DCM および 1,2-ジクロロプロパン(DCP)は、最近、職業性胆管がんの原因物質であることが示唆されているが、これらハロゲン系炭化水素と印刷業従事者で多発するヒト胆道がんとの関係は未だ良くわかっていない。これらハロゲン系炭化水素は代謝活性化を受け、がんの原因となる DNA 付加体を形成することが予想される。本年度はこの DNA 付加体の同定と、変異原性を解析する。

4) DNA アダクトの合成と、ターゲットベクターへの導入に関する研究(高村):
ヒトが暴露する可能性のある変異・発がん性物質は様々である。焼肉などの加熱食品中に含まれるがん原性 HCA の一つである 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]

pyridine (PhIP)は、エームス試験などバクテリアを用いる変異原性試験では、比較的低い変異原性を示すが、ラットに対し大腸がんや乳がんを誘発することが知られている。また APC 遺伝子に変異を誘発することが明らかとなっている。PhIPの突然変異誘発能を TATAM 試験系で解析し、その変異原性を明らかにする目的で、PhIP 修飾オリゴヌクレオチドの合成を試みた。

5)重要な DNA アダクトの合成に関する研究(正田、出水):

生物は常に多種多様な化学物質にさらされており、それら化学物質が生体分子と結合することで、その生体分子の正常な機能は破壊される。DNA アダクトの生成機構をはじめ、その除去機構、除去後の修復機構などの詳細を明らかにすることは極めて重要である。安井らが開発した TATAM 法は、DNA 損傷と発がん性を定量的に解析できる手法である。これまで、HCA の 2-aminofluorene(9H-fluoren-2-amin)や MeIQx (3,8-dimethyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoxalin-2-amine)に注目し、Buchwald-Hartwig 反応条件に THF を溶媒として、さらに microwave を用いることにより dG 位に対して導入することが可能であることを示した。その結果、既存の合成スキームに比べて2ステップ分の短縮が可能となった。本年度は本手法の有効性を確認するため、IQ (3-methyl-3H-imidazo[4,5-f]quinolin-2-amine)の付加体合成(dG-C8-IQ)への検討を行った。そこで本研究では、TATAM 法に必要な DNA アダクトの合成は発がん性物質のスクリーニング試験であると同時に、その遺伝毒性メカニズムが、発がん性リスク評価の上で重要な情報となる。本研究では、OECD が提唱する「化学物質と生体の相互作用から個体での毒性発現までのメカニズムを関連づけて説明する手法(AOP)」を取り入れた新たな遺伝毒性評価戦略と、階層からなる追跡型試験系を開発し、遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化を目指す。主たる研究テーマは、発がんの AOP の分子初期事象である「化学物質 DNA 付加体 突然変異」のプロセスを定

性、定量的に解析する試験系の構築である。第2の研究テーマは初期の発がん AOP からはずれるとされるエピ遺伝毒性物質の検出と評価系の開発である。

B. 研究方法

A)化学物質 DNA 付加体に関する研究: ヒト GSTT1 を導入した *Salmonella typhimurium* TA100(TA100-GST)に 1,2-ジクロロプロパン(DCP)を 6000、15000ppm の濃度で気層曝露した後にゲノム DNA の抽出し、生成することが推測される DNA 付加体(N²-GSH-Pro-dG)を質量分析機器を用いて解析した。更に、DCP による変異導入メカニズム探索のため、アダクトーム解析を行った。本研究では MeIQx 付加体または IQ 付加体の無保護合成を達成するために 6 位無保護及び 2,6 位無保護の化合物を用いて Buchwald-Hartwig 反応におけるリガンド、塩基、溶媒等の反応条件の検討を行った。条件としては溶媒(THF、DMSO、DMF、toluene等)、リガンド(JohnPhos、SPhos、XPhos、DavePhos等)、塩基(t-BuOK、NaPO₄等)、触媒、反応時間、量比等を検討した。

(B)DNA 付加体 突然変異に関する研究: ヘテロサイクリックアミンや紫外線照射などで形成するバルキーDNA 付加体は、一般的にヌクレオチド除去 DNA 修復機構(NER)のグローバルゲノム修復(GG-NER)、あるいは転写共役型修復(TC-NER)のどちらか(あるいは両方)の経路で修復されると考えられている。紫外線照射で形成する cis-syn TT シクロブタン ダイマー(TT ダイマー)付加体は、GG-NER によって DNA 修復されることが分かっている。一方、ヘテロサイクリックアミンの付加体である dG-C8-PhIP は NER で修復されることが分かっているが、GG-NER か TC-NER のどちらの経路で修復されるかは分かっていない。そこで、dG-C8-PhIP 付加体の修復機構を明らかにするために、GG-NER に関与する XPC 遺伝子、TC-NER に関与する ERCC6 遺伝子をそれぞれノックアウト(KO)し

た細胞を用いて TATAM 解析を実施した。

(C) エピ遺伝毒性物質の検出と評価に関する研究：ヒト DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMT1) および 3B 発現プラスミドを出芽酵母に形質転換し得られた形質転換体(ヒト DNMT 酵母) および同ベクターコントロール株を用いて、凝集反応におよぼす発がんプロモーターの影響を新規に開発したレポーターアッセイ系も活用し検討した。

C . 研究成果

(A) 化学物質 DNA付加体に関する研究：TA100-GSTに1,2-DCPを暴露させ、ゲノムDNAに生成することが推測される1,2-DCP由来の付加体 (N2-GSH-Pro-dG) の分析を行ったが、N2-GSH-Pro-dGに相当するピークは観察されなかった。この結果は、TA100-GSTで1,2-DCPの変異原性が上昇しなかった結果を支持するものであり、1,2-DCPはGSTT1ではなく別の代謝経路にて活性化することが示唆された。一方、アダクトーム解析の結果から、グアニン及びアデニン骨格を持つ付加体を含む複数のDCP暴露に相関する付加体が検出された。先行研究の結果から、DCPはG:C塩基に変異を導入することから、おそらく、本研究で抽出されたグアニン付加体がDCPの変異導入に寄与している可能性が示唆された。ヘテロサイクリックアミンであるPhIPの部位特異的修飾オリゴヌクレオチドの合成は完了し、安定的に供給できるルートを確認した。物理化学的測定に向けてのオリゴ量は不足しているため、現在更なるアミダイト合成を行っている。またPhIP付加体との比較のために、C8付加体とは異なるN2の付加体の代表であるベンゾピレンの付加体合成を着手し、ジオールエポキサイドの合成までの条件を検討した。またO6 - グリコール酸付加体について検討を行ったが、精製が困難であったため、他の条件を検討する必要があることがわかった。MeIQx付加体またはIQ付加体の合成ルート短縮を達成するためにキーとなる反応であるBuchwald-Hartwig反応におけるリガンド、塩基

、溶媒等の反応条件の検討を行った。これまでのところ、6位無保護の場合はいずれの化合物においても十分に窒素置換したTHF, microwave照射下, 2等量のアミン, 20-30mol%のPd2(dba)3, 塩基として2等量のCs2CO3, リガンドとして1等量のXantphos を用いることで目的化合物が生成すること確認できた。その結果、MeIQx付加体の合成中間体を約60mg程度得ることができた。また、IQ付加体に関しては3'位、5'位が無保護の合成中間体を約30mg程度得ることができた。しかしながら、2位を無保護とすると、溶媒 (THF, DMSO, DMF, toluene等), リガンド (JohnPhos, SPhos, XPhos, DavePhos等), 塩基 (t-BuOK, NaPO4等), 触媒, 反応時間, 量比等を検討したが、十分な量の目的化合物が得られない、あるいは不純物を取り除くことができず、収率は低下することがわかった。Xantphosのような二座配位が可能なリガンドが有効であることが示唆された。また、いずれの反応もmicrowaveを利用することで収率は向上したことから、microwaveを用いることが有用であることが示唆された。

(B) DNA付加体 突然変異に関する研究ヒトリンパ芽球細胞株TK6のゲノム内にdG-C8-PhIP付加体を導入し、その部位で起きる突然変異頻度とスペクトラムを調べた結果、164細胞中に6つの細胞でdG-C8-PhIPのゲノム導入部位周辺の塩基変異 (4.2%) が検出され、また、2つの細胞からは大きな欠失 (1.4%) が観察された (合計5.6%)。一方、dG-C8-PhIP付加体を導入しないコントロール実験 (dG-C8-PhIP部位に正常塩基dGを導入) で得られる自然突然変異頻度は1.7%であった。つまり、ゲノム導入されたdG-C8-PhIP付加体はその自然突然変異頻度よりも約3倍高く、塩基置換や大きな欠失 (約5.6%) を誘発させることが分かった。これと同様の実験をXPC、ERCC6のKO細胞を用いて調べたが、dG-C8-PhIP付加体の突然変異頻度はそれぞれ2.4%, 0.6%であった。これらの変異頻度は自然突然変異頻度とほぼ同じであるため、XPC、ERCC6はdG-C8-PhIP付加体のDNA修復に関与していないか、あるいは

TATAM解析がバルキー付加体に適用できない可能性があることが分かった。

(C)FLO1プロモーターを用いたエピ変異原応答性レポーターアッセイ系の構築については、凝集反応促進作用を有するアリザリンと同類縁体ブルプリンが、濃度依存的に凝集性とFLO1レポーター活性を誘導することを明らかにした。この結果は、凝集試験以上にハイスループット性並びに精度向上が期待できる本レポーターシステムをエピ遺伝毒性物質の評価系に活用できる可能性を示したもので、成果としては大きいと判断される。

D. 考察

本研究では、新たな遺伝毒性発がん物質の評価法として、化学物質と生体分子の相互作用から、個体・集団レベルでの毒性発現 (AOP) までの一連の生物学的な反応を関連づけ、それに基づく統合的試験法と評価方法 (IATA) を開発し、化学物質の安全性評価の科学的合理化と、実験動物削減を目指す。化学物質による発がんの AOP の分子初期事象 (MIE) は、遺伝毒性・変異原性で有り、このプロセスは「化学物質 DNA 付加体 (損傷) 突然変異」に集約される (図 1)。

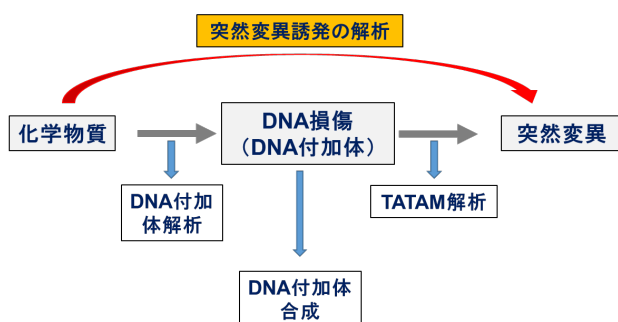


図 1

一方、この仮定された MIE が定性・定量的に正当であるかを検証する必要があると考えられる。そのためには「化学物質 突然変異を」のデータを取得、解析する必要がある (図 1)。今後、実際の in vitro 試験、もしくは文献情報により対象

とする化学物質の遺伝子突然変異誘発能に関する情報を収集する。最終的にはこれら研究結果と、化学物質構造から、in silico で化学物質の変異原性を予測するモデルを開発し、試験の迅速化、3R に貢献する。

また、この MIE を化学物質の遺伝毒性評価の新たなスキームにする (図 3)。

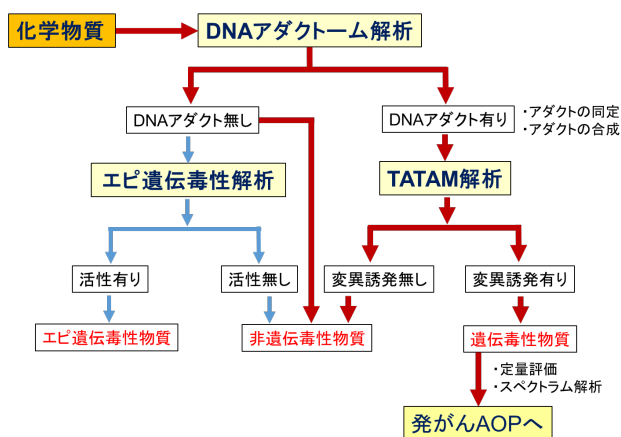


図 3

DNA 付加体解析により、特定な付加体が検出されなければ、非遺伝毒性物質とすることができる。この場合、エピ遺伝毒性の可能性が残されているので、本研究班で開発中のエピ遺伝毒性解析を行い、非遺伝毒性発がん物質の可能性を検討する。一方、DNA 付加体が検出されたからといっても、変異原性があるわけではない。修復や、損傷乗り越え DNA 合成がおきれば突然変異は起こさない。おそらく、大部分の DNA 付加体は修復されるが、その一部は修復されず、突然変異を引き起こすものと考えられる。TATAM 法はこれら性質を定性・定量的に解析できる。十分に特徴的な突然変異がみとめられた場合、本化学物質は遺伝毒性物質 (遺伝毒性変異原物質) と判断され、次の発がん AOP のスキームに載る。また、TATAM 法で明らかな突然変異誘発が認められない場合、本化学物質は遺伝毒性非変異原物質 (非遺伝毒性物質) とし、発がんの懸念は無いと判断することができる。

このような分子レベルで可視化された変異メ

カニズムの情報の蓄積が、最終的に *in silico* で化学物質の変異原性・発がん性の定量的予測を実現させるものとする。変異原性は化学物質にあるのではなく、化学物質によって引き起こされる DNA 付加体（損傷）にある。この当たり前の考え方は、遺伝毒性（変異原性）の評価の合理化にも繋がると考える。

E. 研究発表

誌上発表

1. Honma M: Evaluation of the *in vivo* genotoxicity of Allura Red AC (Food Red No. 40). *Food and Chemical Toxicology*. 84, 270-275 (2015)
2. Kanemaru Y, Suzuki T, Niimi N, Grúz P, Matsumoto K, Adachi N, Honma M, Nohmi T. Catalytic and non-catalytic roles of DNA polymerase κ in the protection of human cells against genotoxic stresses. *Environ Mol Mutagen*. 56, 650-662 (2015)
3. Keka IS, Mohiuddin, Maede Y, Rahman MM, Sakuma T, Honma M, Yamamoto T, Takeda S, Sasanuma H. Smarcal1 promotes double-strand-break repair by nonhomologous end-joining. *Nucleic Acids Res*. 43, 6359-72 (2015)
4. Sassa A, Kamoshita N, Kanemaru Y, Honma M, and Yasui M, Xeroderma Pigmentosum Group A Suppresses Mutagenesis Caused by Clustered Oxidative DNA Adducts in the Human Genome. *PLoS ONE* 10, e0142218 (2015)
5. Sugiyama K, Takamune M, Furusawa H, and Honma M, Human DNA methyltransferase gene-transformed yeasts display an inducible flocculation inhibited by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 456, 689-694 (2015)
6. Sassa A, Kanemaru Y, Kamoshita N, Honma M, Yasui M.; Mutagenic consequences of cytosine alterations site-specifically embedded in the human genome. *Genes and Environment* 38:17 (2016)
7. Sassa A, Çağlayan M, Rodriguez Y, Beard WA, Wilson SH, Nohmi T, Honma M, Yasui M; Impact of Ribonucleotide Backbone on Translesion Synthesis and Repair of 7,8-Dihydro-8-oxoguanine. *J. Biol. Chem.* 291, 24314-24323 (2016)
8. Sugiyama, K., Furusawa, H., Shimizu, M., Grúz, P. and Honma, M: Epigenetic mutagen as histone modulator can be detected by yeast flocculation. *Mutagenesis* 31, 687-693 (2016)
9. 本間正充；ゲノム上に起きた DNA 損傷の運命をターゲットミュータジェネシスにより追跡する．日本がん疫学・分子疫学研究会 News Letter 114, 11-12 (2016)
10. 本間正充；食品添加物等の遺伝毒性リスク評価法．食品衛生学雑誌 57 (1), J12-J15 (2016)
11. Suzuki T, Matsumoto K, Honma M, Nohmi T. Impact of DNA polymerase ζ mutations on genotoxic thresholds of oxidative mutagens. *Mutat Res*. 2018, 828:10-14. doi: 10.1016/j.mrgentox.2018.02.001.
12. You X, Ando T, Xi J, Cao Y, Liu W, Zhang X, Honma M, Masumura K, Luan Y. Gene mutation and micronucleus assays in *gpt delta* mice treated with 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether. *Mutagenesis*. 2018 Feb 15. doi:

- 10.1093/mutage/gey002.
13. Petkov, PI, Schultz TW, Honma M, Kirilov K, Kotov S, Mekenyan OG. Predicting in vitro genotoxicity by mouse lymphoma L5178Y thymidine kinase mutation assay (MLA): Accounting for simulated metabolic activation of chemicals. *Computational Toxicology*. 4, 45-53, 2017. Doi:10.1016/j.comtox.2017.10.002
 14. Gadaleta D, Porta N, Vrontaki E, Manganelli S, Manganaro A, Sello G, Honma M, Benfenati E. Integrating computational methods to predict mutagenicity of aromatic azo compounds. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 35, 239-257, 2017. doi: 10.1080/10590501.2017.1391521.
 15. 本間正充、食品中に含まれる化学物質のリスクアセスメントと遺伝毒性評価、FFI ジャーナル、Vol.223 No.01、8-16、2018
 16. Grúz P, Shimizu M, Sugiyama KI, Honma M. Mutagenicity of ω -3 fatty acid peroxidation products in the Ames test. *Mutat Res*. 2017 Jul;819:14-19. doi:10.1016/j.mrgentox.2017.05.004.
 17. Kanemaru Y, Suzuki T, Sassa A, Matsumoto K, Adachi N, Honma M, Numazawa S, Nohmi T. DNA polymerase kappa protects human cells against MMC-induced genotoxicity through error-free translesion DNA synthesis. *Genes Environ*. 2017 Jan 7;39:6. doi: 10.1186/s41021-016-0067-3.
 18. Sugiyama, K., Furusawa, H., Grúz, P. and Honma, M: Detection of epigenetic mutagens including anthracene-derived compounds using yeast FLO1 promoter GFP reporter gene assay, *Mutagenesis* 32, 429-435 (2017).
 19. Sugiyama, K., Furusawa, H., Grúz, P. and Honma, M: Functional role of DNA methylation at the FLO1 promoter in budding yeast, *FEMS Microbiol. Lett*. 364, doi: 10.1093/femsle/fnx221 (2017).
 20. Hashimoto, Akiko; Yamanaka, Takehiro; Takamura-Enya, Takeji, (2017) Synthesis of novel fluorescently labeled water-soluble fullerenes and their application to its cellular uptake and distribution properties *Journal of Nanoparticle Research*, 19: 402
 21. Kazue Someya, Hiroko Nakatsukasa, Minako Ito, Taisuke Kondo, Kenn-ichi Tateda, Takashi Akanuma, Ikuko Koya, Tsukasa Sanosaka, Jun Kohyama, Yu-ichi Tsukada, Takeji Takamura-Enya, Akihiko Yoshimura, (2017) Improvement of Foxp3 stability through CNS2 demethylation by TET enzyme induction and activation *International Immunology*, 29: 365-375
 22. Akiba N, Shiizaki K, Matsushima Y, Endo O, Inaba K, Totsuka Y. Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane. *Mutagenesis*, 2017, 32:455-462.

学会発表

1. 本間正充：OECD テストガイドラインの変更点 . JEMS・MMS 研究会 第 66 回定例会 (2015.6)

2. Honma M, Suzuki T : DNA Double Strand Break Repair in BLM Deficient Human Cells.
3. 本間正充:部位特異的損傷をゲノム中に導入したヒト細胞における突然変異誘発機構の研究(日本環境変異原学会学会賞受賞講演)第44回日本環境変異原学会(2015.11)46th Annual Meeting of Environmental Mutagenesis and Genomics Society (2015.9)
4. Honma M, Kanemaru Y, Kamoshita N., Suzuki T, Arakawa T, Yasui M : Tracing the fate of site-specifically introduced oxidative DNA damage in the human genome. 14th International Workshop on Radiation Damage to DNA (2016.3)
5. 本間正充;ゲノム上に起きたDNA損傷の運命をターゲットミュータジェネシスにより追跡する 平成28年度日本環境変異原学会公開シンポジウム、東京(2016.5)
6. 佐々彰, Caglayan M, Beard WA, Wilson SH, 能美健彦, 本間正充, 安井学; DNA中の酸化リボヌクレオチドがDNA複製および修復機構に及ぼす影響 日本環境変異原学会第45回大会、つくば(2016年11月)
7. Suzuki A, Bonaand A, Sassa A, Yasui M, Miyamoto A, Honma M; Theoretical Comparison of Conformational Affinity between hOOG1 DNA Repair Protein and DNA Holding Different Number of 8-OxoG. CBI学会2016年大会, 東京(2016.11)
8. 鈴木愛, Bonnaud P, 佐々彰, 安井学, 宮本明, 本間正充; 8-oxoG付加数の異なるDNAに対する修復タンパク hOGG1の高速化量子分子動力学法による親和性評価 日本環境変異原学会第45回大会、つくば(2016年11月)
9. 杉山圭一、古沢博子、清水雅富、グルーズピーター、本間正充:エピ変異原検出系としてのヒト DNMT 酵母の有用性の検討 日本環境変異原学会第45回大会, つくば(2016, 11)。
10. グルーズピーター、清水雅富、山田雅巳、杉山圭一、本間正充: Ames テスター改変株を用いた過酸化脂質誘発性 GC 塩基置換に対する Y ファミリー DNA ポリメラーゼの役割 日本環境変異原学会第45回大会つくば(2016, 11)。
11. 杉山圭一、古沢博子、清水雅富、グルーズピーター、本間正充: DNA メチル化酵素阻害剤応答性凝集酵母に対するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の影響 第89回日本生化学会大会、仙台(2016, 9)。
12. Sugiyama, K., Furusawa, H., Shimizu, M., Grúz, P. and Honma, M: Establishment of a universal detection system for epimutagen using yeast carrying human DNA methyltransferase genes, European Environmental Mutagenesis and Genomics Society Annual Meeting 2016 (コペンハーゲン・デンマーク、2016, 8)。
13. Totsuka Y, Lin Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Matsushima Y, Nakagama H: Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) 50th Anniversary Conference IARC (リヨン・フランス、2016, 6)
14. 戸塚ゆ加里、林 櫻松、加藤 護、十時 泰、柴田龍弘、松島芳隆、中釜 斉: DNA アダクトーム解析により中国食道癌の要因を探索する 第75回日本癌学会学術総会(横浜 2016年10月)
15. 戸塚ゆ加里: ゲノム解析およびDNA付加体の網羅的解析の統合による発がん要因の探索 第

- 59 回日本放射線影響学会。(広島 2016 年 10 月)
16. 前迫裕也、善家 茜、古川英作、加藤 護、椎崎一宏、中釜 斉、戸塚ゆ加里：職業性胆管がん発生に關与する 1,2-ジクロロプロパンの DNA 付加体の網羅的な解析 (アダクトーム解析) 日本環境変異原学会第 45 回大会つくば (2016, 11)
 17. 戸塚ゆ加里、善家 茜、古川 英作、加藤 護、十時 泰、柴田龍弘、中釜 斉：次世代シーケンサーと DNA アダクトーム解析の統合による発がん要因の探索 日本環境変異原学会第 45 回大会つくば (2016, 11)
 18. 高村 岳樹、村上 湖都美、小笠原 楓、益谷 美都子ポリ (ADP - リボース)加水分解産物を用いた新規な DNA 損傷活性測定法の開発 日本環境変異原学会第 45 回大会つくば (2016, 11)
 19. 森 みずき、伊藤 早紀、長谷川 一貴、佐藤 匠、高村 岳樹 エチジウムプロマイド類縁体の変異原性及び構造活性相関 日本環境変異原学会第 45 回大会つくば (2016, 11)
 20. 本間正充、Ames/QSAR International Collaborative Study、 口頭、第 7 回国際遺伝毒性試験国際ワークショップ、東京、2107/11/8
 21. 本間正充、In Silico Approaches in Genetic Toxicology -Progress and Future- 口頭、第 12 回国際環境変異原学会、韓国、2017/11/15
 22. 本間正充、AOP-based Evaluation of Chemical Mutagenicity and Development of New Endpoints and Models 口頭、第 12 回国際環境変異原学会、韓国、2017/11/14
 23. 本間正充、In Silico Approaches in Genetic Toxicology -Progress and Future- 口頭、第 17 回中国環境変異原学会年次大会、中国、2017/12/7
 24. 本間正充、QSAR の最近の進歩について、第 2 回 ICH M7 関連ワークショップ、東京、2017/5/23
 25. 戸塚ゆ加里：DNA 付加体形成と突然変異誘発 第 44 回日本毒性学会(横浜 2017 年 7 月)
 26. Totsuka Y, Lin Y, He Y, Sato H, Matsuda T, Matsushima Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Shan B, Nakagama H: Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) EEMGS (ノースカロライナ、2017 年 9 月)
 27. Totsuka Y : Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis 第 76 回日本癌学会学術総会(横浜 2017 年 9 月)
 28. 今井俊夫、落合雅子、成瀬美衣、松浦哲也、戸塚ゆ加里、筆宝義隆：マウス正常上皮の 3 次元培養系を用いる化学発がん家庭の早期変化検出系 第 76 回日本癌学会学術総会 (横浜 2017 年 9 月)
 29. 佐藤 春菜、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里：マウス正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性解析法の構築 第 46 回日本環境変異原学会 (東京、2017 年 11 月)
 30. 前迫裕也、善家 茜、アスマ エルザワハリ、古川英作、加藤 護、白石航也、河野隆志、椎崎一宏、戸塚ゆ加里：次世代シーケンサーと DNA アダクトーム解析の統合による発がん要因の探索 第 46 回日本

環境変異原学会（東京、2017年11月）

31. 秋場 望、佐藤春菜、松田知成、遠藤 治、稲葉一穂、戸塚ゆ加里：モデル生物を用いた化学物質により誘発される変異シグネチャーの解析 第46回日本環境変異原学会（東京、2017年11月）
32. 神尾翔真、斎藤春吾、渡邊昌俊、椎崎一宏、戸塚ゆ加里：生体を模倣したナノマテリアルの新規毒性評価システムの確立 第46回日本環境変異原学会（東京、2017年11月）
33. Totsuka Y : Adductomics IWGT 2017 (東京、2017年11月)
34. Totsuka Y, Lin Y, He Y, Sato H, Matsuda T, Matsushima Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Shan B, Nakagama H: Exploration of esophageal cancer etiology using DNA adductome analysis 12thICEM-5thACEM (仁川、2017年11月)
35. Totsuka Y : Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. International Conference on Environmental Health and Environmental-related Cancer Prevention 2017 (つくば、2017年12月)
36. Totsuka Y : Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. 18th All India Congress of Cytology and Genetics (コルカタ、2018年1月)
37. 中村真生、鵜飼明子、佐々彰、高部道仁、福田隆之、高村岳樹、本間正充、安井学；TK6及び変異株を用いたヌクレオチド除去修復機

構におけるゲノム全体修復と転写共役修復を区別する方法の開発．日本環境変異原学会第46回大会，東京（2017年11月）

38. Sugiyama, K., Furusawa, H., Grúz, P. and Honma, M: Detection of epigenetic mutagens by GFP reporter activity driven by yeast FLO1 promoter, Environmental Mutagenesis & Genomics Society 48th Annual Meeting (2017, 9 ローリー・米国).
39. 杉山圭一：エピジェネティック変異原試験系の開発、日本環境変異原学会第46回大会（2017・東京）（2017, 11）.
40. ナノダイヤモンド-臭化エチジウム複合体の細胞毒性評価, 森 みずき・高村 岳樹、日本化学会 第98春季年会 (2018, 船橋)
41. 蛍光フラレンの合成と評価. 01.口頭A講演. 橋本 亜紀子・山中 岳寛・高村 岳樹、日本化学会 第98春季年会 (2018, 船橋)

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
本間正充	遺伝毒性	日本毒性学会教育委員会	トキシコロジー (第3版)	朝倉書店	東京	2017	

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Honma M	Evaluation of the <i>in vivo</i> genotoxicity of Allura Red AC (Food Red No. 40).	Food and Chemical Toxicology	84	270-275	2015
Kanemaru Y, Suzuki T, Niimi N, Grúz P, Matsumoto K, Adachi N, Honma M, Nohmi T.	Catalytic and non-catalytic roles of DNA polymerase κ in the protection of human cells against genotoxic stresses.	Environ Mol Mutagen	56	650-662	2015
Keka IS, Mohiuddin, Maede Y, Rahman MM, Sakuma T, Honma M, Yamamoto T, Takeda S, Sasanuma H.	Smarcal1 promotes double-strand-break repair by nonhomologous end-joining.	Nucleic Acids Res.	43	6359-72	2015
Sassa A, Kamoshita N, Kanemaru Y, Honma M, Yasui M.	Xeroderma Pigmentosum Group A Suppresses Mutagenesis Caused by Clustered Oxidative DNA Adducts in the Human Genome.	PLOS ONE	10	E0142218	2015
Sugiyama, K., Takamune, M., Furusawa, H., Honma, M	Human DNA methyltransferase gene-transformed yeasts display an inducible flocculation inhibited by 5-aza-2'-deoxycytidine	Biochem. Biophys. Res. Commun.	456	689-694	2015

Ishino K, Kato T, Kato M, Shibata T, Watanabe M, Wakabayashi K, Nakagama H, Totsuka Y.	Comprehensive DNA adduct analysis reveals pulmonary inflammatory response contributes to genotoxic action of magnetite nanoparticles.	Int J Mol Sci.	16(2):	3474-92.	2015
Komiya M, Fujii G, Miyamoto S, Takahashi M, Ishigamori R, Onuma W, Ishino K, Totsuka Y, Fujimoto K, Mutoh M.	Suppressive effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on intestinal tumorigenesis in obese KK-Ay and Apc mutant Min mice.	Cancer Sci.	106(11)	1499-505	2015
Misaki K, Takamura-Enya T, Ogawa H, Takamori K, Yanagida M	Tumour-promoting activity of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxygenated or nitrated derivatives	Mutagenesis	31(2)	205-213	2016
Takamura-Enya T, Tokutake M	Novel speciation analysis of copper in river water: observation of soluble anionic copper-ligand complexes	Limnology	17	117-125	2016
Sassa A, Kanemaru Y, Kamoshita N, Honma M, Yasui M	Mutagenic consequences of cytosine alterations site-specifically embedded in the human genome.	Genes and Environment	38	17	2016
Sassa A, Çağlayan M, Rodriguez Y, Beard W, Wilson SH, Nohmi T, Honma M, Yasui M	Impact of Ribonucleotide Backbone on Translesion Synthesis and Repair of 7,8-Dihydro-8-oxoguanine.	J. Biol. Chem.	291	24314-24323	2016
Sugiyama, K., Furusawa, H., Shimizu, M., Gerúz, P. and Honma, M	Epigenetic mutagen as histone modulator can be detected by yeast flocculation.	Mutagenesis	31	687-693	2016
本間正充	ゲノム上に起きたDNA損傷の運命をターゲットミュータジェネシスにより追跡する	日本がん疫学・分子疫学研究会 News Letter	114	11-12	2016
本間正充	食品添加物等の遺伝毒性リスク評価法	食品衛生学雑誌	57(1)	J12-J15	2016

Petkov, PI, Sc hultz TW, Hon ma M, Kirilov K, Kotov S, Mekenyan OG.	Predicting in vitro genoto xicity by mouse lymphom a L5178Y thymidine kina se mutation assay (MLA): Accounting for simulated metabolic activation of c hemicals.	Computational Toxicology	4	45-53	2017
Gadaleta D, Porta N, Vrontaki E, Manganelli S, Manganaro A, Sello G, Honma M, Benfenati E.	Integrating computational methods to predict mutagenicity of aromatic azo compounds.	J Environ Sci Health C En viron Carcino g Ecotoxicol R ev.	35	239-257	2017
本間正充	食品中に含まれる化学物質 のリスクアセスメントと遺 伝毒性評価	FFIジャーナル	223	8-16	2018
Grúz P, Shimi zu M, Sugiya ma KI, Honma M.	Mutagenicity of ω -3 fatty acid peroxidation product s in the Ames test.	Mutat Res.	819	14-19	2017
Kanemaru Y, Suzuki T, Sassa A, Matsumoto K, Adachi N, Honma M, Numazawa S, Nohmi T.	DNA polymerase kappa protects human cells against MMC-induced genotoxicity through error-free translesion DNA synthesis.	Genes Enviro n.	39	6	2017
Sugiyama, K., Furusawa, H., Grúz, P., Honma, M	Detection of epigenetic mutagens including anthracene-derived compounds using yeast <i>FLO1</i> promoter GFP reporter gene assay	Mutagenesis	32	429-435	2017
Toyoda T, Tots uka Y, Matsus hita K, Morika wa T, Miyoshi N, Wakabayam shi K, Ogawa K.	γ -H2AX formation in the urinary bladder of rats tr eated with two norharm ag in derivatives obtained fro m o-toluidine and aniline.	Journal of Ap plied Toxicolo gy	16		2017
Akiba N, Shiiz aki K, Matsus hima Y, Endo O, Inaba K, T otsuka Y.	Influence of GSH S-transf er er er erase on the mutagenicity induced by dichlorometh ane and 1,2-dichloropropa ne.	Mutagenesis	32	455-462	2017

Kato T, Toyooka T, Ibuki Y, Masuda S, Watanabe M, Totsuka Y.	Effect of Physicochemical Character Differences on the Genotoxic Potency of Kaolin.	Genes Environ	39	12	2017
Someya K, Nakatsukasa H, Ito M, Kondo T, Tateda KI, Akanuma T, Koya I, Sanosaka T, Kohyama J, Tsukada M.	Improvement of Foxp3 stability through CNS2 demethylation by TET enzyme induction and activation. Int. Immunol	Int. Immunol.	29	365-375	2017
Hashimoto, A., Yamanaka, T., Takamura-Enya, T.	Synthesis of novel fluorescently labeled water-soluble fullerenes and their application to its cellular uptake and distribution properties	J Nanopart Res	19:	402	2017
Suzuki T, Matsumoto K, Honma M, Nohmi T	Impact of DNA polymerase ζ mutations on genotoxic thresholds of oxidative mutagens.	Mutat Res.	828	10-14	2018
You X, Ando T, Xi J, Cao Y, Liu W, Zhang X, Honma M, Masumura K, Luan Y.	Gene mutation and micro nucleus assays in gpt delta mice treated with 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether.	Mutagenesis	33	153-160	2018
Fukai, E, Satoh, H, Watanabe, M, Nakae, D, Totsuka, Y.	Establishment of an in vivo simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes.	Cancer Sci.	109	1024-1031.	2018