

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

香料を含む食品添加物の遺伝毒性から発がんに至る  
毒性評価スキーム確立に向けた基盤的研究  
(21KA1001)

令和3年度～令和5年度 総合研究報告書

研究代表者 杉山圭一

令和6年(2024) 5月

目 次

I. 総合研究報告書（別添 3）

香料を含む食品添加物の遺伝毒性から発がんに至る毒性評価スキーム確立に向けた基盤的研究 \_\_\_\_\_ 1

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 杉山 圭一

II. 研究成果の刊行に関する一覧表（別添 4） \_\_\_\_\_ 1 6

研究課題名：香料を含む食品添加物の遺伝毒性から発がんに至る毒性評価スキーム確立に  
向けた基盤的研究研究代表者： 杉山圭一 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター  
変異遺伝部 部長

## 研究要旨

本研究では、*in silico*、*in vitro*そして*in vivo*と階層的に香料を含む食品添加物の遺伝毒性並びに発がん性を評価するスキームの開発を通じ、食の安全性確保に資する効率的且つ信頼性の高い新規な遺伝毒性・発がん性の包括的評価法の構築を目的とする。

QSAR と Ames 試験による香料の遺伝毒性評価に関する研究として、香料等における定量的構造活性相関（QSAR）の活用スキームの提案に向けて、香料の中でも懸念を有する物質が多いフラン骨格物質の遺伝毒性評価を行った。また、使用量が多い香料 50 物質に対して、Ames/QSAR 予測と遺伝毒性情報の既存情報の調査を行った。これまでに得られた知見を活かし、得られた結果を部分構造ごとに整理した。TK 遺伝子をレポーターとしてエビジェネティックな変化を高感度に評価するヒト LmTK6 細胞株を樹立し、エビ遺伝毒性試験の標準プロトコルを確立した。LmTK6 株を用いて、5-aza-deoxycytidine および GSK-3484862 の DNA 脱メチル化作用とその作用領域を同定した。さらに、12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate がエビ遺伝毒性を有することを明らかにした。Alizarin 類縁体の Emodin を用いてエビジェネティック変異原検出系 FLO assay を行い、Alizarin 同様の結果が得られた。個別指定香料を除いた 18 類香料について年間使用量に関する情報を精査し、分類ごとの使用実態を明らかにした。香料化学物質 4-メチル-2-ペンテナール（4MP）は、Ames 試験が代謝活性化の有無に関わらず明確な陽性であり、Ames/QSAR 予測でも統計・知識ベース共に陽性である。令和 3 年度に、非代謝活性化条件下の TK6 試験で 4MP が陰性であることを確認した。今年度、グルタチオン（GSH）補充した代謝活性化条件下で 4MP を TK6 遺伝子変異試験（GSH/GST-TK6 試験）に供した結果、GSH 非補充群の遺伝子変異体頻度は、未処理群のそれよりも統計的有意に増加した（陽性）が、1 mM GSH 補充群のそれはそうでは無かった（陰性）。GSH は、生体内で高濃度（1 ～ 10 mM 程度）で存在していることから、その GSH/GST-TK6 試験結果は、Ames/QSAR と Ames 実試験の陽性香料物質 4MP を、陰性と判定できることが示唆された（今後、確認試験を実施予定）。*In vivo* 遺伝毒性試験の特徴と課題に関して、遺伝毒性試験法の専門家による国際会議に参加して情報収集を行った。骨髄小核試験、肝臓小核試験、コメット試験、Pig-a 試験、TGR 試験についてフォローアップ試験としての課題を検討した。*In vivo* 遺伝毒性試験の用量反応データを用いたベンチマークドーズ（BMD）法による量的解析の検討を行った。BMD 法の国内ワークショップを実施した。*gpt delta* ラットを用いた一般毒性・遺伝毒性・発がん性短期包括試験の有用性を検討するため、本法を用いて 2-isopropyl-N-2,3-trimethylbutyramide（ITB）の評価を実施した。一般毒性評価では、ITB は既報通り肝臓および腎臓に毒性を有することに加え、神経毒性を有することを明らかにした。一方、毒性標的臓器である肝臓および腎臓における遺伝毒性評価は陰性であり、懸念された遺伝毒性は認められなかった。また、肝臓における発がん性も陰性と判断した。このように、一度の試験で複数の毒性情報を取得可能な本法は、香料の毒性評価スキームにおける *in vivo* 試験として有用であることが示された。*In vivo* 評価系としての遺伝毒性・発がん性中期包括試験の有用性を検討することを目的に、*in silico* および *in vitro* で遺伝毒性が明らかになった香料 6-methoxyquinoline（6-MQ）を対象に本法による評価を実施した。肝遺伝毒性・発がん性中期包括試験による評価の結果、6-MQ の遺伝毒性および肝発がん性は陰性と判断した。また、OECD テストガイドラインに準拠した 6-MQ の *in vivo* 変異原性試験でも、ラット肝臓に突然変異誘発性は見られず、本法における切除肝を用いた遺伝毒性評価の妥当性を支持する結果であった。これら結果は 6-MQ の安全性評価に資するとともに、遺伝毒性や発がん性を包括的に評価できる本法が階層的評価における *in vivo* 評価系として有用であることを示すものであった。

## 研究分担者

本間正充	国立医薬品食品衛生研究所 所長
安井 学	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
古濱彩子	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 主任研究官
増村健一	国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 部長
石井雄二	国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長
高須伸二	国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官
小川久美子	国立医薬品食品衛生研究所 病理部 部長
佐々 彰	国立大学法人千葉大学 大学院理学研究院生物学研究部門 准教授

### A. 研究目的

本研究では、近年開発が進む Ames 変異原性を予測する定量的構造活性相関(QSAR)モデル (Ames/QSAR)、Ames 実試験さらにはその他各種遺伝毒性試験、また発がん性短期包括試験法を階層的に組み合わせることにより、ヒト健康影響において重要なリスクファクターとされる遺伝毒性及び発がん性を効率的に評価するスキームの確立に向けた基盤研究を推進する。特に、発がん性については遺伝毒性の疑いなどから国際的にも追加の毒性情報が求められている被験物質、もしくは *in silico*、*in vitro* で遺伝毒性が疑われた物質について包括的毒性試験を実施することで、安全性評価に資するデータの提供を図る。本研究ではさらに、近年新たなリスクとしてその毒性評価方法の確立が望まれているゲノムクロマチン構造のかく乱を起因とする毒性、いわゆるエピジェネティックな毒性の検出方法の開発にも取り組む。ゲノム不安定性を惹起し発がん促進に関与することが示唆されるエピジェネティックなかく乱作用は、香料を含む食品添加物など化学物質による発がん予測の精緻化に寄与すると考えられ、

すでに申請者が構築済みの酵母凝集性を指標としたアッセイ系 (FLO assay) の活用は本研究の独自性と新規性をさらに高めるものである。最終的には、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 (Adverse Outcome Pathway ; AOP)」を取り入れた効率的かつ標準化に資する新規な遺伝毒性・発がん性包括試験法の開発を目指す。

本研究班は上記の目的を達成するため、以下の研究に取り組んだ。

1) エピジェネティックな影響を含むファーストスクリーニング系としての遺伝毒性評価スキーム確立に向けた基盤研究 (古濱、佐々、本間、杉山) :

香料等の遺伝毒性の第一段階 (スクリーニング) の評価には、*in silico* もしくは *in vitro* 手法を用いることが適切である。Ames 変異原性を予測する定量的構造活性相関(QSAR)モデルの活用が進んでいることから、Ames/QSAR の活用スキームの提案に資する研究を行う。また、新たな遺伝毒性研究の分野としてゲノムのエピジェネティックな変化を介し発がんが促進されることも明らかにされつつあり、香料等の食品添加物によるゲノム不安定性からの発がん予測としての新たな *in vitro* 試験系の構築も待たれている。そこで、*in vitro* 遺伝子突然変異試験をプラットフォームとして、酵母と哺乳類細胞を活用したエピジェネティックな変化を検出定量する新規試験法の構築も検討する。

2) 細胞を用いた *in vitro* 遺伝毒性試験による遺伝毒性評価の精緻化 (安井、本間、杉山) :

Ames/QSAR 予測は、Ames 試験結果データを基にトレーニング・開発されており、もともと Ames 試験が持つ問題点を Ames/QSAR にも引き継いでいる可能性がある。4-メチル-2-ペンテナール (4MP) は、Ames 試験が非代謝活性化条件下で強い陽性 (比活性 1340)、代謝活性化条件下でも明確に陽性 (比活性 728) であり、さらに Ames/QSAR 予測でも統計・知識ベース共に陽性である (Honma et al., *Genes and Environ.* 42:32

(2020))。我々は、それら 4MP の陽性結果をフォローアップするために、上位試験であるヒトリンパ芽球細胞 TK6 株を用いるチミジンキナーゼ遺伝子変異試験 (TK6 試験)、さらに、ラット肝 S9 に含有するグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) の解毒機序によって 4MP の陽性反応を抑制できるかを、その補因子であるグルタチオン (GSH) で補充する GSH/GST-TK6 試験で調べた。

### 3) 遺伝毒性発がんリスク評価のための *in vivo* フォローアップ試験スキーム (増村) :

遺伝毒性発がんリスク評価において、*in vitro* 遺伝毒性試験の陽性結果のフォローアップとして実施される *in vivo* 遺伝毒性試験には複数の選択肢があるが、試験デザインやエンドポイントが異なるため試験の統合に課題がある。遺伝毒性試験の専門家による国際会議に参加して情報収集を行い、各試験の特性と標的組織を考慮したフォローアップ試験の選択法を検討する。また、ゲノム解析を用いた突然変異検出法の技術的予備検討を行う。

### 4 ) 2-Isopropyl-N-2,3-trimethylbutyramide (ITB) の一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験 (石井、高須、小川) :

香料の安全性評価におけるレポーター遺伝子導入動物を用いた一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験の有用性を検討するため、食品香料である ITB について一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験による評価を実施した。

### 5) 肝又は腎遺伝毒性・発がん性中期包括試験法による香料等の評価 (高須、石井、西川、小川) :

*In vivo* 評価系としての遺伝毒性・発がん性中期包括試験 (GPG モデル) の有用性を検討することを目的に、*in silico* および *in vitro* で遺伝毒性が明らかになった香料 6-methoxyquinoline (6-MQ) を対象に、本法による遺伝毒性および肝発がん性評価を実施した。また、本法における遺伝毒性評価の妥当性を確認した。

## B. 研究方法

### 1) エピジェネティックな影響を含むファーストスクリーニング系としての遺伝毒性評価スキーム確立に向けた基盤研究 (古濱、佐々、本間、杉山) :

香料等における Ames/QSAR 活用スキームの提案につなげるため、これまでの国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部の香料の Ames 試験結果で懸念を有する物質が多いフラン骨格やその類似骨格を持つ 21 物質の Ames 試験結果と Ames/QSAR 結果の解析を行った。令和 3, 4 年度に Ames 試験を実施した 9 物質は香料類似物質であった。あわせて、2020 年 1~12 月に日本で使用された香料化合物 (個別指定のものを除く) のうち使用量の多い順番に 50 番目までの物質について、Ames/QSAR による解析並びに既存毒性情報の収集を実施した。

香料等が有するエピジェネティックな影響を定量評価するスキーム提案に向けて、遺伝毒性試験株であるヒト TK6 細胞をもとに TK 遺伝子をレポーターとしたエピ遺伝毒性試験の確立を行った。令和 3 年度は、エピジェネティックな変化を高感度に検出可能な改良型細胞株 LmTK6 を作製した。令和 4~5 年度には当該試験細胞株を用いて 5-Aza-deoxycytidine (5-azadC)、RG-108、GSK-3484862、Trichostatin A、Vorinostat、dimethyl sulfoxide (DMSO)、12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) について評価を行うと共に、バイサルファイトシーケンス解析、クロマチン免疫沈降法によって化合物の作用機序を解析した。

ヒト DNMT 酵母には、DNA 維持メチル化酵素 DNMT1 と新規メチル化酵素 DNMT3B 遺伝子発現プラスミドを同時形質転換した株を使用した。凝集性の確認は定常初期の培養液で行なった。

令和 2 年において国内で実際に使用された個別指定香料および 18 類香料の約 1,800 種類の香料ごとの使用量データ (出典: 令和 3 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) 「食品添加物の安全性確保に資する研究」分

担研究「食品添加物の摂取量推計及び香料規格に関する研究」資料4「香料化合物使用量調査結果」を活用し、類ごと、および18類香料に属する香料品目ごとの使用量の傾向について調べた。

#### 2) 細胞を用いた *in vitro* 遺伝毒性試験による遺伝毒性評価の精緻化 (安井、本間、杉山) :

TK6 試験で使用される処理液中の TK6 細胞内および細胞外の GSH 濃度を GSSG/GSH Quantification kit (同仁化学研究所)の説明書に従って測定した。TK6 試験および GSH/GST-TK6 試験は、原則として OECD ガイドライン (TG490) に従って行った。被験物質として、4MP は関東化学株式会社 (ACROS organics 製) から購入した。処理細胞数は  $10^7$  細胞、処理時間は4時間で実施した。ラット肝 S9 とコファクターは、家田貿易株式会社から購入した。GSH は富士フィルム和光純薬工業から購入した。本試験の陰性対照群は2系列、処理群は1系列で実施した。形質発現期間は3日間とした。未処理群に対する4MPの遺伝子変異誘発性に関する有意差検定は、大森法 (Omori et al., *Mutat. Res.* 517,199-208 (2002)) の Dunnett 検定を用いた。

#### 3) 遺伝毒性発がんリスク評価のための *in vivo* フォローアップ試験スキーム (増村) :

Health and Environmental Sciences Institute (HESI) の Genetic Toxicology Technical Committee (GTTC) の年次会議および International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT)に向けた *in vivo* genotoxicity test strategies WG の専門家会議に参加し、*in vivo* 遺伝毒性試験の課題について議論した。BMD法を用いた *in vivo* 遺伝毒性の量的評価手法について検討するため、日本環境変異原ゲノム学会 MMS 研究会定例会にてワークショップを実施した。ゲノム解析を用いた突然変異検出法に関して技術的検討を行った。

#### 4) ITB の一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験法による評価 (石井、高須、小川) :

4週間の用量設定試験の後、F344系 *gpt delta* ラットに ITB を 0、5、50 及び 500 mg/kg 体重/

日の用量で13週間強制経口投与し、一般毒性評価 (一般状態観察、体重、摂餌量、臓器重量、血液学的検査、血清生化学的検査及び病理組織学的検査)、遺伝毒性評価 (*gpt assay*、*Spi assay* 及び肝臓小核試験) 及び発がん性評価 (免疫組織化学染色法による GST-P 陽性細胞巢の検索) を実施した。

#### 5) 肝又は腎遺伝毒性・発がん性中期包括試験法による香料等の評価 (高須、石井、西川、小川) :

被験物質の 6-MQ に加え、陽性対照として用いた quinoline および陰性対照として用いた 8-hydroxyquinoline (8-HQ) について、GPG モデルによる遺伝毒性評価 (*gpt* および *Spi* アッセイ) ならびに肝発がん性評価 (GST-P 陽性巢の免疫組織化学染色的評価) を実施した。

また、本法で得られた遺伝毒性評価の結果について、その妥当性を確認するため、*gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性試験を実施した。用量および検索臓器設定試験では、雌雄 F344 ラットに 6-MQ を 0、50、150 または 500 mg/kg の用量で 28 日間強制経口投与し、一般毒性を評価した。本試験では、F344 系 *gpt delta* ラットに同様の用量で 28 日間強制経口投与し、投与終了3日後の肝臓について *gpt assay* および *Spi assay* を実施した。

#### (倫理面への配慮)

動物実験の実施に際しては、各研究施設の規定に従って動物実験倫理委員会の承認を得た後に実施した。実験においては、適切な人道的エンドポイントを見極め、動物の苦痛を軽減するよう細心の注意を払うとともに、使用する動物数を最小限に留めるなど、実験動物に対する動物愛護に関して十分配慮して行った。また、遺伝子組換え実験については、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律等、遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める法令に則り、機関承認を得た後に実施した。

## C. 研究結果

### 1) エピジェネティックな影響を含むファーストスクリーニング系としての遺伝毒性評価スキーム確立に向けた基盤研究 (古濱、佐々、本間、杉山) :

Ames 試験結果は、8 物質で陽性(Inconclusive 含む)、12 物質で陰性であった。6 物質が[試験結果と 2 つの QSAR 予測結果が一致]し、[試験結果といずれかの QSAR 予測結果が一致]が 10 物質、[試験結果と 2 つの QSAR 予測結果が不一致]が 5 物質であった。

使用量が多い 50 物質の Ames/QSAR 結果と遺伝毒性情報について酸素を含む部分構造着目して行くと、アルコール・カルボン酸かエステル、カルボニル基 (アルデヒドとジケトンを除く) を有する物質と分類した 39 物質は懸念が低く、ジケトン・アルデヒド (いずれも炭素が 6 の直鎖) ・ラズベリーケトンとして分類した 9 物質については、懸念が否定できなかった。2 物質は酸素を含む官能基の分類はできないが、QSAR 陰性また Out of Domain であり、遺伝毒性陽性の情報は得られなかった。

エピ遺伝毒性試験株として樹立した LmTK6 株は、改良前の mTK6 株に比べて TK 復帰頻度の背景値が低減された。またバイサルファイトシーケンス解析によって、LmTK6 株の TK 遺伝子座エキソン 1 上流 150 bp において CpG 配列の高度なメチル化が観察された。TK 遺伝子の DNA 脱メチル化による自然復帰頻度を基準として各化合物のエピジェネティック作用を解析した結果、5-azadC および GSK-3484862 については処理濃度依存的に TK 復帰頻度の有意な上昇が認められた。また DMSO および TPA については、24 時間処理後に TK 復帰頻度の有意な低下が観察された。以上の結果から、LmTK6 株を用いて計 4 化合物のエピジェネティック作用を同定した。

FLO assay を行なった結果、Emodin の用量依存的に酵母凝集性が促進される傾向を確認した。

流通実態調査結果に基づき、類ごとの品目数を比較したところ、エステル類が最も多かった。類ごとの国内使用量の割合においては、エステル類、

次いでケトン類が多いことが分かった。使用量の最も多い香料はエチルマルトール、次いで  $\delta$ -ドデカラクトンであった。

### 2) 細胞を用いた in vitro 遺伝毒性試験による遺伝毒性評価の精緻化 (安井、本間、杉山) :

4MP に対する TK6 試験の結果、非代謝活性化条件下で陰性 (令和 3 年度)、代謝活性化条件下で弱い陽性 (令和 4 年度) であることを確認した。4MP が、代謝活性化条件下で弱い陽性を示したため、令和 5 年度では、その弱い陽性反応が、ラット肝 S9 に含有する GST の解毒機序によって抑制されるか、GSH を補充する GSH/GST-TK6 試験を実施した。その結果、わずか 1 mM の GSH 補充にであっても、4MP の弱い陽性反応は抑制され、GSH/GST-TK6 試験では陰性と判定された。さらに、一般的に GSH は生体内で高濃度 (1 ~ 10 mM 程度) で存在することから、陰性が妥当であると考えられた (今後、確認試験を予定)。

### 3) 遺伝毒性発がんリスク評価のための in vivo フォローアップ試験スキーム (増村) :

GTTC において、コメント試験のガイダンスを作成する方針が示された。Pig-a 遺伝子突然変異試験は OECD テストガイドラインが 2022 年に公開された (TG470)。トランスジェニック動物遺伝子突然変異試験 (TGR 試験) など既存の in vivo 試験とのハーモナイズが検討された。BMD 法に関しては、遺伝毒性試験に適した critical effect size (CES) の設定が課題であることが示された。IWGT の in vivo WG において、肝小核試験の有用性と投与時週齢の影響が議論された。日本環境変異原ゲノム学会 MMS 研究会において BMD 法ワークショップを実施した。ゲノム解析を用いた突然変異検出法に関して予備検討を行った。

### 4) ITB の一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験法による評価 (石井、高須、小川) :

一般毒性評価では、病理組織学的検索において肝細胞の空胞化を 50 mg/kg 群から認めた。腎臓に病理組織学的変化は認められなかったものの、血中 Cl の低値ならびに腎重量の増加は低用量群から認められ、本試験において NOAEL は求まら

なかった。毒性標的臓器である肝臓および腎臓について *gpt* assay 及び *Spi* assay による遺伝毒性評価を行った結果、いずれも ITB 投与群において *gpt* 及び *Spi* MFs の有意な変化は認められなかった。また、*gpt* 遺伝子の変異スペクトラム解析において、ITB に投与に起因した変異パターンの変化は認められなかった。発がん性評価では、肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の数及び面積に変化は見られなかった。

#### 5) 肝又は腎遺伝毒性・発がん性中期包括試験法による香料等の評価 (高須、石井、西川、小川) :

GPG モデルにおける遺伝毒性評価では、*qunoline* 投与群において *gpt* 変異体頻度の有意な上昇が見られたのに対し、8-HQ 及び 6-MQ 群において有意な変化は見られなかった。発がん性評価では、*qunoline* 投与群において GST-P 陽性巢の数及び面積に有意な変化が見られたのに対し、8-HQ 及び 6-MQ 群において有意な変化は見られなかった。

6-MQ をラットに 28 日間反復投与した結果、病理組織学的検査において、雄 150 mg/kg 以上および雌 500 mg/kg 群で小葉中心性肝細胞肥大、雄 500 mg/kg 群で小葉中心性肝細胞空胞化、雌雄 500 mg/kg 群で前胃のびらん/潰瘍が認められた。

*gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性試験では、6-MQ 投与群において *gpt* および *Spi*-変異体頻度に有意な変化は認められなかった。

#### D. 考察

##### エピジェネティックな影響を含むファーストスクリーニング系としての遺伝毒性評価スキーム確立に向けた基盤研究 (古濱、佐々、本間、杉山) :

フラン骨格の香料等について、これまでの試験結果のうち、加水分解や互変異性により 3,4-Dihydroxyfuran 構造を有する 4 物質では、Ames 試験陽性であり 4 物質は Ames 試験結果と知識 QSAR ベースの予測が一致した。一方、加水分解や互変異性により 3,4-Dihydroxyfuran 構造を有しない 2 物質では、Ames 試験陰性であり、QSAR 結果との不整合がみられた。香料の QSAR

評価にも専門家による判断が重要であることが示唆された。

使用量の多い 50 物質のうち 48 物質が酸素を含む物質であり、大半は懸念が低い、ジケトンや特徴的な構造を有するアルデヒドなど構造が似通った 9 物質で QSAR または実試験で陽性の懸念が高かった。懸念が高い構造を基準として判断できる QSAR を併用しながら評価をすすめると効率的だと考えられる。

LmTK6 株を利用したエピ遺伝毒性試験においては、 $2\sim 3 \times 10^{-4}$  の TK 自然復帰頻度を基準として、復帰頻度の上昇および低下の双方向にエピジェネティック作用を評価できることが示唆された。5-AzadC および GSK-3484865 で認められた TK 復帰頻度の上昇は、DNA メチル化酵素 DNMTs の阻害による DNA 脱メチル化に起因すると考えられる。5-azadC は DNA に取り込まれるために遺伝毒性を有するが、GSK-3484865 は非共有結合的に酵素と DNA の結合を阻害するため直接的な遺伝毒性を持たない。以上から化合物の遺伝毒性の有無に関わらず、TK 遺伝子をレポーターとしてエピジェネティック作用の定量が可能であることが示された。

エピジェネティック作用が疑われる Alizarin の構造類縁体である Emodin からも酵母凝集性に対して Alizarin 同様の作用が検出された。今後、Emodin のエピジェネティック作用機序解析が必要と考えられる。

18 類香料の年間使用量に基づきその傾向について調査したところ、本邦における当該香料の使用実態の概要を把握できた。これら傾向を踏まえ遺伝毒性評価試験の対象となる香料を検討していく必要があると考える。

DMSO による TK 復帰頻度の低下は、DMSO が細胞内でメチル基供与に関与するによって生じた可能性がある。TPA は炎症誘発物質であることが知られており、本研究で同定されたエピジェネティック作用は炎症応答に関連した効果であると考えられる。以上の結果から本試験法は、作用機序の異なる様々な化合物において潜在的な

エピジェネティック作用のスクリーニングに有用であると考えられる。ラット肝 S9 mix を含む *in vitro* 被験物質処理中の TK6 細胞内の GSH 濃度は 0.005 mM (1000 pmol/10<sup>6</sup> cells)、細胞外は 0.002 mM であった。一方、生体内の GSH 濃度が、1 ~ 10 mM 程度であることから、*in vitro* 処理中は生体ではあり得ない低濃度、特殊な *in vitro* 条件下であり、*in vivo* と *in vitro* 間の遺伝毒性試験結果の予測精度低下の原因と考えられた。4MP の Ames 試験結果は代謝活性化の有無に関わらず陽性、一方、トランスジェニックマウス (MutaMouse) を用いる肝臓および膵胃における遺伝子突然変異誘発性は両臓器ともに陰性である (国立医薬品食品衛生研究所; 令和 4 年度指定添加物の安全性の見直しに関する調査研究 (令和 5 年 3 月))。すなわち、この *in vivo* 試験の陰性結果は、Ames 試験の陽性を否定し、本研究でフォローアップされた 4MP に対する TK6 試験で陰性 (非代謝活性化条件下; 令和 3 年度)、および GSH/GST-TK6 試験 (代謝活性化条件下; 令和 5 年度) で陰性の結果と一致した。

遺伝毒性発がんリスク評価のための *in vivo* フォローアップに関して、骨髄小核試験においては曝露量と *in vitro* 試験陽性の用量との間に明らかな相関性はないことが示唆された。肝臓小核試験では、週齢の影響および用量設定根拠となる細胞毒性指標の検討が課題に挙げられた。コメント試験では、適切な毒性指標や試験結果の解釈手法の改善が課題である。Pig-a 試験 (新規) と TGR 試験 (改定) の OECD テストガイドラインが 2022 年に公開された。BMD 法による定量解析では、適切な CES の設定が必要である。ゲノム解析を用いた突然変異検出技術は新規の変異原性試験として有望であり、変異検出時のエラー率の低減が課題である。

病理組織学的検査では肝細胞の空胞化が認められ、所見の程度は増強した。腎臓では重量の高値、BUN の高値ならびに各電解質パラメータの変動など腎毒性を示唆する変化が認められたが、

腎臓に病理組織学的検査において投与に起因する変化は認められなかった。しかしながら、血中 Cl の低値ならびに腎重量の増加は 5 mg/kg 群から認められたことから本試験において NOAEL は求まらなかった。遺伝毒性評価では、肝臓および腎臓について、主に点突然変異を検出する *gpt* assay 及び主に欠失変異を検出する *Spi* assay を実施したものの、いずれも ITB 投与による変化は認められず、ITB に *in vivo* において問題となる遺伝毒性はないと判断した。発がん性評価では、ITB の毒性標的臓器の一つである肝臓において、GST-P 陽性細胞巢の数および面積に変化が見られなかったことから、肝臓における発がん性評価は陰性と判断した。

GPG モデルにおいて、遺伝毒性肝発がん物質である quinoline 投与群では、レポーター遺伝子突然変異頻度および GST-P 陽性巢の数/面積の有意な上昇が認められたのに対し、8-HQ 投与群でこれらの変化はみられなかった。本結果は、8-HQ が Ames 試験でのみ陽性を示し、肝発がん性がないとする過去の報告を支持するものであった。これらの結果から、GPG モデルは quinoline 化合物の遺伝毒性及び発がん性を正確に評価できる系であることが確認された。

6-MQ 投与群では、*gpt* および *Spi* 突然変異頻度に有意な変化は認められず、GST-P 陽性巢の数/面積にも有意な変化は見られなかったことから、6-MQ は遺伝毒性および肝発がん性は陰性と判断した。OECD TG488 に準拠した *in vivo* 変異原性試験では、6-MQ の毒性標的である肝臓において突然変異誘発性はみられなかった。本結果は、GPG モデルにおける遺伝毒性評価の結果を支持するものであった。以上より、一度の試験で発がん性と遺伝毒性を評価可能な GPG モデルは階層的評価の *in vivo* 評価系として有用と考えられた。

## E. 結論

エピジェネティックな影響を含むファーストスクリーニング系としての遺伝毒性評価スキーム確立に向けた基盤研究 (古濱、佐々、本間、杉山) :

フラン骨格を有する香料やその類似物質や使用量の多い 50 香料に着目して、予測・実測の Ames 試験等の情報と構造の特徴を整理した。QSAR における留意事項や使用量の多い群について、遺伝毒性の懸念が低い物質の香料分類と比較的高い香料分類が可能となった。今後は調査範囲を拡大し、本研究でえられた提案の検証や類似構造による類推なども組み合わせて遺伝毒性評価の優先付けスキームの提案を目指す。

LmTK6 株を用いたエピ遺伝毒性試験によって、4 化合物における潜在的エピジェネティック作用を同定した。これらの結果から、本試験法はエピジェネティックな影響のファーストスクリーニング系として作用機序の異なる幅広い化合物に対して効果を発揮することが期待される。今後さらに化合物の評価対象を広げると共に、遺伝子発現動態・クロマチン構造を可視化するための RNA seq 解析ならびに ATAC seq 解析を併用し、スクリーニングから作用機序の同定までの統合的スキームを提案する。

Alizarin 類縁体の Emodin を用いて FLO assay を行い、Alizarin 同様の結果が得られたことから FLO assay の妥当性が高まった。また、国内に流通している食品用香料の使用量を整理することで、その使用実態を確認することができた。今回得られた結果は、今後遺伝毒性評価試験の対象とする香料の選定に向けた基盤データになると考える。

Ames/QSAR と Ames 実試験の陽性香料物質 4MP は、ヒト TK6 細胞を用いる GSH/GST-TK6 試験でフォローアップ可能であることが示唆された。今後、確認試験を実施予定である。GSH/GST-TK6 試験は、現段階で 4MP の 1 物質しか実績がないが、今後、Ames 試験陽性物質に対して、*in vivo* 試験を利用することなく、*in vitro* 試験のみでフォローアップできる潜在的な有効性を有していると考えられる。

遺伝毒性発がんリスク評価のための *in vivo* フォローアップに関して、遺伝毒性試験法の専門家による国際会議に参加して情報収集を行い、*in*

*vivo* フォローアップ試験の特徴と課題を検討した。*In vivo* 遺伝毒性試験の用量反応データを用いた量的解析の検討を行い、BMD 法に関する国内ワークショップを実施した。ゲノム解析を用いた突然変異検出法の技術的予備検討を行った。

一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験から ITB は既報通り肝臓および腎臓に毒性を有することに加え、神経毒性を有することを明らかにした。一方、毒性標的臓器である肝臓および腎臓における遺伝毒性評価は陰性であり、懸念された遺伝毒性は認められなかった。また、肝臓における発がん性もないと考えられた。このように、一度の試験で複数の毒性情報を取得可能な本法は、香料の毒性評価スキームにおける *in vivo* 試験として有用であると考えられた。また、本研究で得られた ITB の毒性情報は評価保留とされている本剤のリスク評価への利用が期待される。6-MQ について、GPG モデルによる評価を実施した結果、遺伝毒性および肝発がん性評価はいずれも陰性であった。また、OECD TG488 に準拠した 6-MQ の *in vivo* 変異原性試験の結果は、GPG モデルの切除肝を用いた遺伝毒性評価の妥当性を示すものであった。これらの結果は 6-MQ の安全性評価に資するとともに、本法が階層的評価における *in vivo* 評価系として有用であることを示すものであった。

## F. 研究発表

### 論文発表

1. 佐々彰, DNA修復の機能不全に起因する自己炎症性疾患の分子病態, *BIO Clinica*, 39(2), 81-83, (2024)
2. Takimoto N., Ishii Y., Mitsumoto T., Takasu S., Namiki M., Shibutani M., Ogawa K. Formation of hepatocyte cytoplasmic inclusions and their contribution to methylcarbamate-induced hepatocarcinogenesis in F344 rats. *Toxicol. Sci.* 198 (1), 40-49 (2024), doi:

- 10.1093/toxsci/kfad131.
3. Kuroda K., Ishii Y., Takasu S., Kijima A., Matsushita K., Masumura K., Nohmi T., Umemura T. Possible contribution of 8-hydroxydeoxyguanosine to gene mutations in the kidney DNA of gpt delta rats following potassium bromate treatment. *Mutat. Res.* 894, 503729 (2024), doi: 10.1016/j.mrgentox.2024.503729.
  4. 佐々彰, 内因性DNA損傷を起因とした自己炎症性疾患発症の分子機構. *BIO Clinica*, 38(9), 71-73, (2023)
  5. Koyama N, Sassa A. Analytical technologies to revolutionize the environmental mutagenesis-and genome research-from the basics to the cutting-edge research: the Open Symposium of the Japanese Environmental Mutagen and Genome Society (JEMS). *Genes and Environment*. 45, 9, (2023)
  6. Liu W, Yasui M, Sassa A, You X, Wan J, Cao Y, Xi J, Zhang X, Honma M, Luan Y. FTO regulates the DNA damage response via effects on cell-cycle progression. *Mutation Research*. 887, 503608, (2023)
  7. Mitsumoto T., Ishii Y., Takimoto N., Takasu S., Namiki M., Nohmi T., Umemura T., Ogawa K. Site-specific genotoxicity of rubiadin: localization and histopathological changes in the kidneys of rats. *Arch. Toxicol.* 97 (12), 3273-3283 (2023), doi: 10.1007/s00204-023-03610-4.
  8. Ishii Y., Liang Shi, Takasu S., Ogawa K., Umemura T. A 13-week comprehensive toxicity study with adductome analysis demonstrates the toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of the natural flavoring agent elemicin, *Food Chem. Toxicol.* 179, 113965 (2023), doi: 10.1016/j.fct.2023.113965.
  9. Ishii Y., Namiki M., Takasu S., Nakamura K., Takimoto N., Mitsumoto T., Ogawa K. Lack of genotoxic mechanisms in isoeugenol-induced hepatocellular tumorigenesis in male mice. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 30 (1), 9-22 (2023), doi: 10.18891/jjfc.30.1\_9.
  10. Takasu S., Ishii Y., Namiki M., Nakamura K., Mitsumoto T., Takimoto N., Nohmi T., Ogawa K. Comprehensive analysis of the general toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of 3-acetyl-2,5-dimethylfuran in male gpt delta rats. *Food Chem. Toxicol.* 172 (2023), doi: 10.1016/j.fct.2022.113544.
  11. Katayama N, Koi S, Sassa A, Kurata T, Imaichi R, Kato M., Nishiyama T. Elevated mutation rates underlie the evolution of the aquatic plant family Podostemaceae. *Communications Biology*. 5, 75.(2022).
  12. Honma M, Yamada M, Yasui M, Horibata K, Sugiyama KI, Masumura K. Genotoxicity assessment of food-flavoring chemicals used in Japan. *Toxicol. Rep.* 9:1008-1012 (2022).
  13. Kuroda K., Ishii Y., Takasu S., Matsushita K., Kijima A., Nohmi T., Umemura T. Toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of 2-methylfuran in a 90-day comprehensive toxicity study in gpt delta rats. *Food Chem. Toxicol.* 168 (2022), doi: 10.1016/j.fct.2022.113365.
  14. Ishii Y., Nakamura K., Mitsumoto T., Takimoto N., Namiki M., Takasu S., Ogawa K. Visualization of the distribution of anthraquinone components from madder roots in rat kidneys by desorption electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry imaging, *Food Chem. Toxicol.*, 161 (2022), doi: 10.1016/j.fct.2022.112851.
  15. Ogawa K., Ishii Y., Toyoda T. Role and potential of histopathological specimens in

- the toxicological evaluation of pharmaceuticals and chemicals. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 157, 139-145 (2022), doi: 10.1254/fpj.21102.
16. Jamsen JA, Sassa A, Perera L, Shock DD, Beard WA, Wilson SH. Structural Basis for Proficient Oxidized Ribonucleotide Insertion in Double Strand Break Repair. *Nature Communications*. 12, 5055 (2021).
  17. Sassa A, Fukuda T, Nakamura A, Sato R, Fujiwara S, Ukai A, Takeda S, Sugiyama KI, Honma M, Yasui M. Follow-up Genotoxicity assessment of Ames-positive/equivocal chemicals using the improved thymidine kinase gene mutation assay in DNA repair-deficient human TK6 cells. *Mutagenesis*. 36(5): 331-338 (2021).
  18. Jamsen JA, Sassa A, Shock DD, Beard WA, Wilson SH. Watching a Double Strand Break Repair Polymerase Insert a Pro-Mutagenic Oxidized Nucleotide. *Nature Communications*. 12, 2059 (2021).
  19. Kasamatsu T, Kitazawa A, Tajima S, Kaneko M, Sugiyama KI, Yamada M, Yasui M, Masumura K, Horibata K, Honma M. Development of a new quantitative structure-activity relationship model for predicting Ames mutagenicity of food flavor chemicals using StarDrop™ auto-Modeller™. *Genes and Environment*, 43, 16 (2021)
  20. Masumura K, Ando T, Ukai A, Fujiwara S, Yokose S, Xinyue Y, Suzuki T, Hayashi H, Nohmi T, Takagi H, Honma M., New homozygous gpt delta transgenic rat strain improves an efficiency of the in vivo mutagenicity assay., 43, 24 (2021)
  21. Aoki Y, Ohno M, Matsumoto M, Matsumoto M, Masumura K, Nohmi T, Tsuzuki T., Characteristic mutations induced in the small intestine of Msh2-knockout gpt delta mice., 43, 27 (2021)
  22. Honma M, Yamada M, Yasui M, Horibata K, Sugiyama KI, Masumura K., In vivo and in vitro mutagenicity of perillaldehyde and cinnamaldehyde., 43, 30 (2021)
  23. Masumura K, Ando T. Toyoda-Hokaiwado N, Ukai A. Nohmi T, Honma M., Comparison of the frequencies of ENU-induced point mutations in male germ cells and inherited germline mutations in their offspring., 43, 43 (2021)
  24. Mitsumoto, T., Ishii Y., Namiki M., Nakamura K., Takasu S., Ogawa K. A 90-day subchronic toxicity study of Myrrh in F344 rats. *Regul. Toxicol. Pharm.* 127, 105076 (2021), doi: 10.1016/j.yrtph.2021.105076.
  25. Nakamura K., Ishii Y., Takasu S., Nohmi T., Shibutani M., Ogawa K. Chromosome aberrations induced by the non-mutagenic carcinogen acetamide involve in rat hepatocarcinogenesis through micronucleus formation in hepatocytes. *Arch. Toxicol*, 95(8), 2851-2865 (2021), doi: 10.1007/s00204-021-03099-9.
  26. Matsushita K., Takasu S., Ishii Y., Toyoda T., Yamada T., Morikawa T., Ogawa K. In vivo mutagenicity and tumor-promoting activity of 1,3-dichloro-2-propanol in the liver and kidneys of gpt delta rats. *Arch. Toxicol.* 95(9), 3117-3131 (2021), doi: 10.1007/s00204-021-03120-1.
  27. Ishii Y., Takasu S., Grúz P., Masumura K., Ogawa K., Nohmi T., Umemura T. The role of DNA polymerase  $\zeta$  in benzo[a]pyrene-induced mutagenesis in the mouse lung. *Mutagenesis*, , 36(2), 155-164 (2021), doi: 10.1093/mutage/geab007.
  28. Nakamura K., Ishii Y., Takasu S., Ogawa K. A 90-day subchronic toxicity study of 5-methyl-2-phenyl-2-hexenal in F344 rats. *Food Chem. Toxicol.*, 150, 112041 (2021), doi: 10.1016/j.fct.2021.112041.

## 学会発表

1. Acetamide の肝発がんに寄与する肝細胞質内封入体の形成機序, 石井雄二, 瀧本憲史, 高須伸二, 満元達也, 相馬明玲, 小川久美子, 日本薬学会第 144 年会 2024 年 3 月, 神奈川
2. Acetamide のラット肝臓における代謝物と核の形態異常への関与, 石井雄二, 山上洋平, 田原麻衣子, 河上強志, 瀧本憲史, 笠松健吾, 相馬明玲, 高須伸二, 小川久美子, 第 40 回日本毒性病理学会 2024 年 1 月, 東京
3. 免疫組織化学染色による小核化肝細胞の検出, 笠松健吾, 石井雄二, 山上洋平, 高須伸二, 相馬明玲, 小澤俊介, 渋谷 淳, 小川久美子, 第 40 回日本毒性病理学会 2024 年 1 月, 東京
4. SD ラットを用いた decyltrimethoxysilane の 13 週間反復投与試験, 高須伸二, 石井雄二, 相馬明玲, 松本真理子, 小川久美子, 第 40 回日本毒性病理学会 2024 年 1 月, 東京
5. SARS-CoV-2 の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼにおける損傷乗り越え RNA 合成機構の解析, 赤川真崇, Grúz Petr, 菅澤薫, 浦聖恵, 佐々彰, 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会 2023 年 11 月, 福岡
6. リボヌクレアーゼ H2 の細胞内酵素活性がゲノム安定性に果たす役割の解明, 渡邊彩乃, 黛結衣子, 中谷一真, 浦聖恵, 板倉英祐, 佐々彰, 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会 2023 年 11 月, 福岡
7. epi-TK 試験を利用した発がんプロモーター TPA の新規エピジェネティック作用の同定, 山田治人, 小田切瑞基, 安井学, 本間正充, 杉山圭一, 浦聖恵, 佐々彰, 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会 2023 年 11 月, 福岡
8. ゲノム DNA に蓄積したリボヌクレオチドが誘発するゲノム不安定化の分子機構, 立川明日香, 吉本侑依, 高藤賢, 黛結衣子, 中谷一真, 中村真生, 福田隆之, 菅澤薫, 浦聖恵, 佐々彰, 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会 2023 年 11 月, 福岡
9. DNA 損傷に起因する過剰なインターフェロン応答の分子経路の同定, 寺越菜央, 高藤賢, 中谷一真, 安井学, 本間正充, 杉山圭一, 藤木亮次, 金田篤志, 菅澤薫, 浦聖恵, 佐々彰, 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会 2023 年 11 月, 福岡
10. アルコール発がんにおけるドライバーアダクトの探索と変異誘発メカニズムの解明, 本橋実奈, 別役雄毅, 高村岳樹, 小宮雅美, 佐々彰, 戸塚ゆかり, 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会 2023 年 11 月, 福岡
11. 第 II 相薬物代謝酵素を機能させた補因子補充型 *in vitro* 小核試験系の構築, 安井学, 鶴飼明子, 澁谷真也, 本間正充, 杉山圭一, 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会 2023 年 11 月, 福岡
12. アセトアミドの大型小核誘発機序に関わる代謝物の検索, 石井 雄二, 瀧本 憲史, 田原麻衣子, 河上 強志, 相馬 明玲, 高須 伸二, 小川 久美子, 第 52 回日本環境変異原ゲノム学会 2023 年 11 月, 福岡
13. gpt delta マウスにアクリルアミドが誘発する生殖系列突然変異と曝露時の精子形成ステージの影響, 増村 健一, 安東 朋子, 石井 雄二, 杉山 圭一, 第 52 回日本環境変異原ゲノム学会 2023 年 11 月, 福岡
14. 難治性炎症疾患を誘発するゲノム不安定化の分子機構, 佐々彰, 変異機構研究会第 34 回夏の学校 2023 年 9 月, 東京
15. ラットを用いた病理組織学的及び免疫組織化学的解析による抗甲状腺物質の効率的な検出, 赤根 弘敏, 豊田 武士, 石井 雄二, 高須 伸二, 小川 久美子, 第 82 回日本癌学会学術総会 2023 年 8 月, 神奈川
16. アセトアミド誘発ラット肝腫瘍におけるクロモソリプシス様染色体再構成の関与, 石井雄二, 高須 伸二, 小川 久美子, 第 82 回日本癌学会学術総会 2023 年 8 月, 神奈川
17. 遺伝毒性試験をプラットフォームとしたエピジェネティック作用評価法の開発, 佐々彰, 第 50 回日本毒性学会学術年会 2023 年 6 月, 神奈川
18. 化学物質が引き起こすエピジェネティックな修飾変化を定量評価可能な“epi-TK 試験”の確立, 山田治人, 小田切瑞基, 安井学, 本間正充, 杉山圭一, 浦聖恵, 佐々彰, 第 50 回日本毒性

- 学会学術年会2023年6月, 神奈川
19. 齧歯類に見られる acetamide の肝発がん性の種差に関する研究, 瀧本憲史, 石井雄二, 満元達也, 相馬明玲, 高須伸二, 渋谷 淳, 小川久美子, 第 50 回日本毒性学会学術年会 2023 年 6 月, 神奈川
  20. 化学発がんにおける chromothripsis の関与, 石井 雄二, 第 50 回日本毒性学会学術年会シンポジウム 2023 年 6 月, 神奈川
  21. 2-Isopropyl-N-2,3-trimethyl buthylamide の包括的毒性評価, 石井雄二, 瀧本憲史, 満元達也, 高須伸二, 並木萌香, 能美健彦, 小川久美, 日本食品化学学会 第 29 回総会・学術大会 2023 年 6 月, 富山
  22. 食品香料の安全性に関する研究, 石井雄二, 日本食品化学学会 第 29 回総会・学術大会講演 2023 年 6 月, 富山
  23. 香料類似フラン物質の Ames/QSAR 評価, 古濱彩子, 本間正充, 杉山圭一, 第 50 回日本毒性学会学術年会 2023 年 6 月, 横浜
  24. アセトアミドのラット肝発がん機序における chromoanagenesis の関与の可能性, 瀧本憲史, 石井雄二, 中村賢志, 並木萌香, 高須伸二, 満元達也, 渋谷 淳, 小川久美子, 第 39 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023 年 1 月, 東京
  25. gpt delta ラットを用いた肝中期試験法による 6-methoxyquinoline の in vivo 遺伝毒性・発がん性の評価, 高須伸二, 石井雄二, 瀧本憲史, 元達也, 相馬明玲, 能美健彦, 小川久美子, 第 39 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023 年 1 月, 東京
  26. gpt delta ラットを用いた包括的毒性試験によ 2-isopropyl-N-2,3-trimethyl buthylamide (ITB) の評価, 満元達也, 石井雄二, 瀧本憲史, 並木萌香, 高須伸二, 梅村隆志, 能美健彦, 小川久美子, 第 39 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023 年 1 月, 東京
  27. Acetamide 投与ラットの肝臓に生じる大型小核の形成機序, 石井雄二, 瀧本憲史, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 渋谷淳, 小川久美子, 第 39 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023 年 1 月, 東京
  28. DNA二本鎖切断修復におけるNSD2の機能解析, 岩崎滉, 東條あかり, 安井学, 本間正充, 上村慶高, 孫継英, 田代聡, 佐々彰, 浦聖恵, 第40回染色体ワークショップ・第21回核ダイナミクス研究会2022年12月, web
  29. DNA修復欠損モデルから迫る核酸誘導性自然免疫の分子機構, 佐々彰, 日本環境変異原ゲノム学会第51回大会2022年11月, 広島
  30. DNA修復欠損による自然免疫惹起の分子メカニズムの解明, 高藤賢, 岩崎滉, 黛結衣子, 立川明日香, 中谷一真, 安井学, 本間正充, 杉山圭一, 藤木亮次, 金田篤志, 菅澤薫, 浦聖恵, 佐々彰, 日本環境変異原ゲノム学会第51回大会2022年11月, 広島
  31. クロマチン構造変化を検出可能なエピ遺伝毒性試験法の開発, 北村蒼史, 山田治人, 高藤賢, 小田切瑞基, 安井学, 本間正充, 杉山圭一, 浦聖恵, 佐々彰, 日本環境変異原ゲノム学会第51回大会2022年11月, 広島
  32. DNA中のリボヌクレオチドに起因する変異誘発機構とゲノム不安定性に関する研究, 佐々 彰, 日本環境変異原ゲノム学会第51回大会2022年11月, 広島
  33. ゲノム中リボヌクレオチドの蓄積が誘発するDNA二本鎖切断の修復機構, 黛結衣子, 高藤賢, 立川明日香, 中谷一真, 安井学, 本間正充, 杉山圭一, 菅澤薫, 浦聖恵, 佐々彰, 日本環境変異原ゲノム学会第51回大会2022年11月, 広島
  34.  $\gamma$ H2AXの多角的解析による内因性DNA二本鎖切断の定量評価, 立川明日香, 吉本侑依, 高藤賢, 黛結衣子, 中谷一真, 中村真生, 福田隆之, 菅澤薫, 浦聖恵, 佐々彰, 日本環境変異原ゲノム学会第51回大会2022年11月, 広島
  35. 全ゲノム解析から明らかになった acetamide のラット肝腫瘍形成におけるがん遺伝子c-Mycの関与, 石井雄二, 中村賢志, 高須伸二, 瀧本憲史, 満元達也, 並木萌香, 小川久美子, 第 51 回日本環境変異原ゲノム学会 2022 年 11 月, 広島
  36. ラット肝細胞における Acetamide の大型小

- 核誘発機序に関する研究, 瀧本 憲史, 石井雄二, 満元 達也, 並木 萌香, 高須 伸二, 渋谷 淳, 小川 久美子, 第 51 回日本環境変異原ゲノム学会 2022 年 11 月, 広島
37. アカネ色素のラット腎臓における部位特異的な腫瘍形成の機序, 満元達也, 石井雄二, 瀧本憲史, 高須伸二, 並木萌香, 梅村隆志, 能美健彦, 小川久美子, 第 51 回日本環境変異原ゲノム学会 2022 年 11 月, 広島
38. フランのラット肝発がん葉特異性に着目した変異原性評価, 日比大介, 高須伸二, 石井雄二, 梅村隆志, 第 51 回日本環境変異原ゲノム学会 2022 年 11 月, 広島
39. gpt delta マウスを用いたアクリルアミドの生殖細胞変異原性と次世代個体ゲノム変異, 増村健一, 安東朋子, 石井雄二, 杉山圭一, 第 51 回日本環境変異原ゲノム学会 2022 年 11 月, 広島
40. 病理学から見た化学物質安全性評価におけるイメージング質量分析の有用性, 石井 雄二, 第 47 回日本医用マスマスベクトル学会年会 シンポジウム 2022 年 9 月, Web
41. Acetamide の肝発がん機序に関する検討: 血液及び肝臓中動態のラット系統差の比較, 石井雄二, 瀧本憲史, 河上強志, 田原麻衣子, 中村賢志, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 小川久美子, 第 49 回日本毒性学会学術集会 2022 年 6 月, 札幌
42. Acetamide が誘発するラット肝細胞における大型小核の形成機序, 瀧本憲史, 石井雄二, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 渋谷淳, 小川久美子, 第 49 回日本毒性学会学術集会 2022 年 6 月, 札幌
43. 脱離エレクトロスプレーイオン化法による質量分析イメージング組織切片上における化学物質及び代謝物の局在解析, 石井雄二, 第 38 回日本毒性病理学会 シンポジウム 2022 年 1 月, Web
44. Rubiadin の腎臓における局在と病理組織学的変化が示す部位特異的な遺伝毒性, 満元達也, 石井雄二, 瀧本憲史, 並木萌香, 高須伸二, 能美健彦, 小川久美子, 第 38 回日本毒性病理学会 ワークショップ 2022 年 1 月, Web
45. 肝発がん物質フランの葉特異的毒性発現, 相馬明玲, 日比大介, 高須伸二, 石井雄二, 梅村隆志, 第 38 回日本毒性病理学会 2022 年 1 月, Web
46. 細胞質内封入体が示す methyl carbamate の染色体異常と肝発がんへの関与, 瀧本憲史, 石井雄二, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 能美健彦, 渋谷 淳, 小川久美子, 第 38 回日本毒性病理学会 2022 年 1 月, Web
47. gpt delta ラットを用いた 3-acetyl-2,5-dimethylfuran の一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括的毒性評価, 高須伸二, 石井雄二, 並木萌香, 中村賢志, 能美健彦, 小川久美子, 第 38 回日本毒性病理学会 2022 年 1 月, Web
48. MGMT持続発現型TK6細胞を用いた遺伝毒性試験のための基礎的研究, 安井学, 佐々彰, 鶴飼明子, 足立淳, 鈴木孝昌, 本間正充, 杉山圭一, 日本環境変異原ゲノム学会第50回大会 2021年11月, 神奈川
49. DNA 修復異常がもたらす過剰な免疫応答の分子機構, 高藤 賢, 立川 明日香, 黛 結衣子, 中谷 一真, 菅澤 薫, 浦 聖恵, 佐々 彰, 日本環境変異原ゲノム学会第50回大会2021年11月, 神奈川
50. ゲノム中のリボヌクレオチドに対する誤りがちな修復機構の解明, 黛 結衣子, 高藤 賢, 中谷 一真, 菅澤 薫, 浦 聖恵, 佐々 彰, 日本環境変異原ゲノム学会第50回大会2021年11月, 神奈川
51. ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 を用いたエピ遺伝毒性試験法の確立, 小田切 瑞基, 安井 学, 本間 正充, 杉山 圭一, 浦 聖恵, 佐々 彰, 日本環境変異原ゲノム学会第 50 回大会 2021 年 11 月, 神奈川
52. Ames 試験陽性フォローアップとしての TK6 細胞  $\gamma$  H2AX 評価系の有用性検討; 構造異性体および類縁体からの検証, 田中美咲, 竹入章, 松崎香織, 田中健司, 小川久美子, 安井学, 杉山圭一, 本間正充, 三島雅之, 日本環境変異原ゲノム学会第 50 回大会 2021 年 11 月, 神奈川
53. 腎発がん物質 rubiadin のグアニン DNA 付

- 加体に対する DNA Polymerase への選択的作用, 満元達也, 石井雄二, 滝本憲史, 並木萌香, 高須伸二, 能美健彦, 小川久美子, 第 50 回日本環境変異原ゲノム学会 2021 年 11 月, Web
54. CHL/IU 細胞と RL-34 細胞を用いたラット肝発がん物質 acetamide の *in vitro* 小核試験, 並木萌香, 石井雄二, 中村賢志, 瀧本憲史, 満元達也, 高須伸二, 小川久美子, 第 50 回日本環境変異原ゲノム学会 2021 年 11 月, Web
55. F344 ラットにおける acetamide 誘発肝腫瘍の全ゲノム解析, 石井雄二, 中村賢志, 瀧本憲史, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 渋谷淳, 小川久美子, 第 50 回日本環境変異原ゲノム学会 2021 年 11 月, Web
56. *gpt delta* ラットを用いた中期遺伝毒性・発がん性試験法による 1,3-dichloro-2-propanol の発がん機序の解明, 松下幸平, 高須伸二, 石井雄二, 豊田武士, 山田貴宣, 森川朋美, 小川久美子, 第 50 回日本環境変異原ゲノム学会 2021 年 11 月, Web
57. 遺伝毒性における BMD 法の利用について, 増村健一, 日本環境変異原ゲノム学会・MMS 研究会第 79 回定例会 2021 年 11 月, 神奈川
58. 生殖細胞突然変異と次世代ゲノムへの影響, 増村健一, 日本環境変異原ゲノム学会第 50 回大会 2021 年 11 月, 神奈川
59. ミスマッチ修復欠損条件下で *gpt delta* マウス小腸に誘発される特徴的突然変異, 青木康展, 大野みずき, 松本みちよ, 松本理, 増村健一, 能美健彦, 續輝久, 日本環境変異原ゲノム学会第 50 回大会 2021 年 11 月, 神奈川
60. レポーター遺伝子導入マウスと NGS を用いた生殖細胞突然変異の解析, 増村健一, 日本遺伝学会第 93 回大会 2021 年 9 月, 東京
61. Mutagenic response of newly developed *gpt delta* transgenic rat strain with homozygous transgene, Masumura K, Ando T, Ukai A, Fujiwara S, Yokose S, Takagi H, Nohmi T, Sugiyama K, Honma M, 52nd annual meeting of Environmental Mutagenesis and Genomics Society 2021 年 9 月
62. 食品用器具・容器包装のポジティブリスト収載物質「4,4'-オキシビス (ベンゼンスルホノヒドラジド)」の遺伝毒性評価, 磯貴子, 村田康允, 重田善之, 広瀬望, 堀端克良, 増村健一, 杉山圭一, 松本真理子, 広瀬明彦, 第 48 回日本毒性学会学術年会 2021 年 7 月, web
63. *gpt delta* ラットを用いた 1,3-dichloro-2-propanol の肝発がん機序の検索, 高須伸二, 石井雄二, 中村賢志, 並木萌香, 能美健彦, 小川久美子, 第 48 回日本毒性学会学術集会 2021 年 7 月, Web
64. 脱離エレクトロスプレーイオン化-質量分析イメージング (DESI-MSI) による腎発がん物質アカネ色素構成成分のラット腎臓における分布解析, 石井雄二, 中村賢志, 並木萌香, 高須伸二, 小川久美子, 第 48 回日本毒性学会学術集会 2021 年 7 月, Web
65. Acetamide のラット肝発がん性における系統差に基づいた肝発がん機序に関する検討, 中村賢志, 石井雄二, 河上強志, 田原麻衣子, 高須伸二, 並木萌香, 渋谷淳, 小川久美子, 第 48 回日本毒性学会学術集会 2021 年 7 月, Web
66. 質量分析イメージングを用いたアントラキノン系色素成分のラット腎臓における分布解析, 石井雄二, 中村賢志, 並木萌香, 高須伸二, 小川久美子, 第 27 回日本食品化学学会 2021 年 6 月, Web
67. *gpt delta* ラットを用いた 1,3-dichloro-2-propanol の *in vivo* 変異原性の評価, 高須伸二, 石井雄二, 中村賢志, 並木萌香, 能美健彦, 小川久美子, 第 27 回日本食品化学学会総会・学術大会講演要旨集 2021 年 6 月, Web
68. ラットを用いたミルラの 90 日間反復経口投

与毒性試験，並木萌香，石井雄二，高須伸二，  
小川久美子，第 27 回日本食品化学学会総  
会・学術大会講演要旨集 2021 年 6 月，Web

69. HESI GTTC annual meeting 報告，増村健  
一，日本環境変異原ゲノム学会・MMS 研究  
会第 78 回定例会 2021 年 6 月，web

70. 遺伝毒性試験研究における EC-NGS の可能  
性，増村健一，日本環境変異原ゲノム学会・  
MMS 研究会第 78 回定例会 2021 年 6 月，  
web

#### G. 知的財産権の取得状況

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
なし							

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
Kasamatsu T, Kitazawa A, Tajima S, Kaneko M, Sugiyama KI, Yamada M, Yasui M, Masumura K, Horibata K, Honma M.	Development of a new quantitative structure-activity relationship model for predicting Ames mutagenicity of food flavor chemicals using StarDrop™ auto-Modeller™.	Genes and Environment	43	16	2021
Masumura K, Ando T, Ukai A, Fujiwara S, Yokose S, Xinyue Y, Suzuki T, Hayashi H, Nohmi T, Takagi H, Honma M.	New homozygous gpt delta transgenic rat strain improves an efficiency of the in vivo mutagenicity assay.	Genes and Environment	43	25	2021
Aoki Y, Ohno M, Matsumoto M, Matsumoto M, Masumura K, Nohmi T, Tsuzuki T.	Characteristic mutations induced in the small intestine of Msh2-knockout gpt delta mice.	Genes and Environment	43	27	2021
Honma M, Yamada M, Yasui M, Horibata K, Sugiyama KI, Masumura K.	In vivo and in vitro mutagenicity of perillaldehyde and cinnamaldehyde.	Genes and Environment	43	30	2021
Masumura K, Ando T, Toyoda-Hokaiwado N, Ukai A, Nohmi T, Honma M.	Comparison of the frequencies of ENU-induced point mutations in male germ cells and inherited germline mutations in their offspring.	Genes and Environment	43	43	2021
Sassa A, Fukuda T, Nakamura A, Sato R, Fujiwara S, Ukai A, Takada S, Sugiyama KI, Honma M, Yasui M.	Follow-up Genotoxicity assessment of Ames-positive/equivocal chemicals using the improved thymidine kinase gene mutation assay in DNA repair-deficient human TK6 cells.	Mutagenesis	36	331-338	2021
Honma M, Yamada M, Yasui M, Horibata K, Sugiyama KI, Masumura K.	Genotoxicity assessment of food-flavoring chemicals used in Japan.	Toxicol. Rep.	9	1008-1012	2022

佐々彰	DNA修復の機能不全に起因する自己炎症性疾患の分子病態	BIO Clinica	39(2)	81-83	2024
Takimoto N., Ishii Y., Mitsumoto T., Takasu S., Namiki M., Shibutani M., Ogawa K.	Formation of hepatocyte cytoplasmic inclusions and their contribution to methylcarbamate-induced hepatocarcinogenesis in F344 rats.	Toxicol. Sci.	198 (1)	40-49	2024
Kuroda K., Ishii Y., Takasu S., Kijima A., Matsushita K., Masumura T., Nohmi T., Umemura T.	Possible contribution of 8-hydroxydeoxyguanosine to gene mutations in the kidney DNA of gpt delta rats following potassium bromate treatment.	Mutat. Res.	894	503729	2024
Mitsumoto T., Ishii Y., Takimoto N., Takasu S., Namiki M., Nohmi T., Umemura T., Ogawa K.	Site-specific genotoxicity of rubinadin: localization and histopathological changes in the kidneys of rats.	Arch. Toxicol.	97 (12)	3273-3283	2023
Ishii Y., Liang Shi, Takasu S., Ogawa K., Umemura T.	A 13-week comprehensive toxicity study with adductome analysis demonstrates the toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of the natural flavoring agent elemicin	Food Chem. Toxicol.	179	113965	2023
Ishii Y., Namiki M., Takasu S., Nakamura K., Takimoto N., Mitsumoto T., Ogawa K.	Lack of genotoxic mechanisms in isoeugenol-induced hepatocellular tumorigenesis in male mice.	Jpn. J. Food Chem. Safety	30 (1)	9-22	2023
佐々彰	内因性DNA損傷を起因とした自己炎症性疾患発症の分子機構	BIO Clinica	38(9)	71-73	2023