

図3 ラシカルスカヘンシャーを併用した光プラスミド切断法

● With Kojic acid (7 mM), ○ Without Kojic acid

表1 TK6細胞を用いたコウジ酸の光SCGアッセイ及びコメットアッセイ

| Irradiation group | Concentration of Kojic acid (mM) | Cell growth (%) ²⁾ | Comet assay | | | In vitro MN assay | | |
|--|----------------------------------|-------------------------------|----------------|--------------------|------------------|-------------------|---------|------------------|
| | | | Observed cells | % of positive cell | CA ³⁾ | Observed cells | MN/1000 | CA ³⁾ |
| 光照射群 (2 J/cm ²) ¹⁾ | 0 | 100 | 500 | 10.0 | | 1000 | 6 | |
| | 0.3125 | 51.1 | 500 | 13.6 | | 1000 | 6 | |
| | 0.625 | 54.7 | 500 | 12.0 | + | 1000 | 8 | + |
| | 1.25 | 39.7 | 500 | 13.4 | | 1000 | 17 | |
| | 2.5 | 15.7 | 500 | 84.8 * | | 1000 | 22 * | |
| | 5 | 7.9 | 500 | 97.0 * | | 355 | 34 * | |
| | OFLX 10 µg/mL | 5.7 | 500 | 99.4 * | | 206 | 121 * | |
| 非照射群 | 0 | 100 | 500 | 3.0 | | 1000 | 6 | |
| | 1.25 | 89.2 | 500 | 4.4 | + | 1000 | 8 | + |
| | 2.5 | 93.0 | 500 | 4.8 | | 1000 | 10 | |
| | 5 | 70.8 | 500 | 8.2 * | | 1000 | 15 | |
| | OFLX 10 µg/mL | 51.9 | 500 | 6.2 | | 1000 | 17 * | |

1) 0.67 mW/cm², 50 min

2) トリハンプルー染色して血球計算板計測。生細胞のみカウント。

3) Cochran Armitage trend test (p<0.01)

* Fisher exact probability test (p<0.01)

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

分担研究報告書

既存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

—ほ乳類培養細胞を用いた遺伝毒性誘発性に関する検討—

分担研究者 本間 正充（国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部第一室 室長）

研究要旨

発がん性が指摘されているため、安全性が問題となっている既存添加物の「コウシ酸」について、ヒト培養細胞を用いた遺伝毒性試験を実施し、コウシ酸の遺伝毒性の程度と、その特徴を明らかにした。コウシ酸は突然変異、小核とも用量依存的に誘発することから *in vitro* においては遺伝毒性を持つことが明らかとなった。しかしながら、これら誘発は 10mM 以上の高濃度で認められることから、遺伝毒性の程度は低いものと考えられた。遺伝毒性の特徴としては、DNA レベルの突然変異が主であると予想され、染色体の数的異常のような大きなゲノム変化をもたらす証拠は得られなかった。

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。特にその問題となる化学物質が発がん性を示す場合は、その評価が困難であることが多い。多くの発がん性化学物質に関しては、健康リスクを評価する場合、理論的、実証的理由から、これ以下であれば健康影響が見られないレベル、すなわち閾値のない線形の用量反応モデルが用いられてきた。しかしながら、近年、がんの発生メカニズムに関する理解から、発がん物質のなかでも、遺伝子に直接損傷を与えない非遺伝毒性発がん物質に関しては、他の毒性同様に閾値を設定することのできるかの考えが定着し、ある一定レベル以下

の非遺伝毒性発がん物質に関しては、実質的に発がんリスクはないものと考えられている。一方、遺伝毒性を持つ発がん物質に関しては、「暴露量をゼロにしない限り、健康リスクもゼロのならない」という建前上、規制するならば使用を禁止するほかはないため、発がん性を認めることができず、逆に化学物質の規制が進まないといった矛盾が生じている。

米国においても 1958 年に提出されたデラニー条項によって、動物に対して発がん性を示す農薬が残留する加工食品の販売が禁止され、その後、適用範囲が着色料、動物用薬品、飼料に拡大された。しかしながら、このゼロリスクの思想は現実的には多くの矛盾点をかかえ、1996 年「食品品質保護法」の制定とともにデラニー条項は廃止

された 現在, 米国では発がん化学物質は, 遺伝毒性の有無にかかわらず, 100 万分の 1 の生涯発がんリスクレベル以下の濃度であれば使用, 残留が認められている

このような発がん化学物質を生生涯発がんリスクレベルで評価し, 管理に用いる手法は, 我が国においても水道水や大気の新しい環境基準値の設定にも用いられている 一方, 食品中に残存する発がん化学物質の評価については未だ, 基準値の設定はなされておらず, そのための戦略も明確になっていない

これまでに戦略が構築されなかった理由の一つとして, 先ほど触れた「遺伝毒性には閾値がない」とする思想があり, ハザードがそのままリスクとして考えられてきたことがあげられる 遺伝毒性の閾値に関してもハノクグランドレベルに埋没する領域, すなわち閾値が存在する可能性があり, 安全性を十分確保した上で有益な化学物質を活用する観点から, 「遺伝毒性の閾値問題」を見直す必要があると考える このような状況の下, 遺伝毒性の専門家集団である日本環境変異原学会の協力を得て, 食品中の発がん化学物質の評価法について戦略の構築を図ることが本研究の目的である

具体的な戦略の構築のため, かつて保存料として使用経験があり, 天然由来であるため, 日常の多くの食品中に含まれている「コウシ酸」を例にとり, 文献的調査および, 実際の試験によりできるだけ多くの試験データを収集し, その材料とすることを第一歩とする 本分担研究ではコウシ酸について, ほ乳類培養細胞を用いた遺伝毒性を実施し, その遺伝毒性の有無と, 程度の評価, さらに遺伝毒性の特徴を明らかに

することを目的とする

B. 研究方法

1 ヒト細胞試験系 ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 および, WTK-1 を用いた 両細胞は同一由来細胞株であるが, WTK-1 は p53 遺伝子に突然変異を持つ p53 変異細胞である また, 両細胞ともチミンキナーゼ(TK)遺伝子がヘテロであるため, この遺伝子をターゲットした, 遺伝子突然変異試験が可能である

対数増殖期にある細胞を, コウシ酸で 4 時間処理し, 細胞毒性(Relative Survival, RS)を評価した その 48 時間後に, 小核試験による染色体異常誘発性を, 72 時間後に TK 試験による遺伝子突然変異誘発性を評価した 細胞毒性としては 72 時間での細胞の相対増殖率(Relative Suspension Growth, RSG)も検討した

2 小核の FISH 解析 小核観察用に作成したスライドの一部を, 動物体近傍にのみ局在する染色体特異的配列である alpha satellite DNA をプローブ (CEP プローブ, カンビオ社製)を用いて FISH を行った プローブは Cy3 (オレンジ) でラベルされており, 動物体を持つ小核は DAPI 染色により青く染色された小核中にオレンジのシグナルをもつ 50 個の小核を持つ細胞を観察し, シグナルをもつ小核の割合を算出した

(倫理面への配慮)

本研究で用いたヒトリンパ芽球細胞株 ATTC にも登録されている使用制限のない細胞株であり, 倫理上問題はない また, 全ての実験は本研究所倫理規定に準拠して行った

C 研究結果

2 ヒト細胞に対するコウシ酸の遺伝毒性

(図1) TK6, WTK-1細胞とも、5mg/mlまで試験を行った。最高用量の3mg/ml程度から濃度依存的に細胞毒性が認められ、それに伴い、遺伝子突然変異頻度、小核誘発頻度の増加が認められた。両細胞とも、最高突然変異頻度は4mg/mlで観察され、その後5mg/mlではわずかに減少したが、これは強い細胞毒性によるものと考えられる。強い細胞毒性による遺伝毒性低下は小核試験でも見られた。突然変異頻度を2倍増加させる用量はTK6, WTK-1細胞とも約2mg/mlと計算された。

TK突然変異体には増殖の早NG (normal growth)変異体と、増殖の遅いSG(slow growth)変異体が存在する。一般的に、放射線等の強い染色体異常誘発能を持つ変異原は後者の変異体を多く誘発するが、コウシ酸に関してはSG変異体の出現比は変わらなかった。

2 FISHによる動原体をもつ小核の解析

(表1) TK6, WTK-1細胞での自然発生小核、コウシ酸誘発小核、および他の化学物質によって誘発された小核を、動原体DNAをプローブとしたFISHを行い、動原体DNAを含む小核の割合を解析した。

TK6細胞での自然小核の約50%は動原体陽性小核であった。この割合は、放射線、化学物質処理により数倍以上頻度の誘発が見られた小核でも、大きく変わらなかった。一方、WTK-1では自然小核の40%が動原体を持ち、変異原処理によりその頻度の増加傾向が見られたか、ばら

つきか大きく、はっきりした変化は認められなかった。

D 考察

コウシ酸はTK6, WTK-1の両細胞において用量依存的に遺伝子突然変異と、小核の誘発を示したことから、*in vitro*において明らかに遺伝毒性を有するTK6細胞における突然変異頻度を2倍増加させる濃度は2mg/mlと計算され、これは強変異原物質であるMNNGの2万倍、MMSの800倍に相当する。現在、食品中のモノクロタリン(コンフリーに含まれるアルカロイドの一種)、アクリルアミド(ポテトチップスなどに含まれるアミノ酸変化体)になどについても遺伝毒性や、発がん性が懸念されているが、それらの値はそれぞれ、2mg/ml, 0.8mg/mlと計算され、分子量を考慮すると、ほぼ同程度の遺伝毒性物質と考えることができる。また、遺伝毒性試験は通常5mg/mlもしくは10mMの低い方を最高濃度にする事となっているが、この場合コウシ酸の最高試験の濃度は1.4mg/ml(10mM)となるが、この濃度までの遺伝子突然変異、小核誘発率を見ると、遺伝毒性は認められないか、極めて低い。以上のことを考慮すると、コウシ酸による遺伝毒性の程度は極めて弱いものと判断される。

なお、コウシ酸は20mM(2.8mg/ml)までの高濃度においても、浸透圧の上昇や、pHの変化は認められないことから、高濃度における、遺伝毒性の出現は非特異的な影響ではないと結論づけられる。

突然変異体の特徴としては、Clastogenに見られる、SG変異体の出現比の増加が見られなかった。コウシ酸はエームス試験でも

陽性を示すことから、染色体レベルの大きな異常よりもむしろ、DNA レベルの点突然変異を主に誘発するものと予想される。このことは、TK6 と WTK-1 細胞のコウシ酸に対する細胞毒性の反応性からも支持されるものである。すなわち、染色体異常誘発性が高い化学物質に対して、p53 変異細胞である WTK-1 は一般に抵抗性を示すが、コウシ酸は両細胞に対して同程度の細胞毒性を示す。

一般に、小核には染色体の構造異常に伴い、染色体断片の一部が小核を形成するタイプと、細胞分裂の際、1本の丸ごと染色体が主核から取り残されて、小核を形成する場合があります。後者は、染色体の数の異常を引き起こす物質(Aneugen)によって誘発されやすいが、その検出は、動原体を含む小核の頻度が有用であると考えられている。

しかしながら、今回の解析では陽性対照として用いた Trichlorfon (異数性誘発物質)、carbendazim (倍数性誘発物質)においても、明確な頻度の増加は認められず、方法としての疑問が残っただけで、コウシ酸による小核の誘発か、Aneugenicity によるものかどうかは判定できなかった。今後、Aneugenicity と、動原体陽性小核出現率の関係に関しては、FISH シグナルだけでなく、小核の大きさを含めた解析や、使用細胞、方法を含めて今後その有用性をハリデーションする必要があるものと考えられる。また、多くの報告では自然小核における CEN 陽性の割合は50%程度で、動物種、*in vivo* と *in vivo*、p53 の状態によってもほぼ一定であることから、この自然小核の意味や、メカニズムを考えることも重要と考えられる。

E 結論

- ・ヒト培養細胞に対してコウシ酸は明らかに遺伝毒性を示すが、その程度は低い
- ・コウシ酸は染色体レベルの大きな欠失などよりもむしろ、DNA レベルの点突然変異を主として引き起こすものと考えられる

F 研究発表

論文発表

- 1) Moore, M, Honma, M, Clements, J, Bolcsfoldi, G, Cifone, M, Delongchamp, R, Fellow, M, Gollapudi, B, Jenkinson, P, Kirby, P, Kirchner, S, Muster, W, Myher, B, O'Donovan, M, Oliver, J, Omori, T, Oudelhkim, M, Pant, K, Preston, R, Riach, C, San, R, Stankowski, F, Thakur, A, Wakuri, S, and Yoshimura, I. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay. International workgroup report-Plymouth, UK 2002. *Mutat Res*, 540, 127-140 (2003)
- 2) Honma, M, Izumi, M, Sakuraba, M, Tadokoro, S, Sakamoto, H, Wang, W, Yatagai, F, and Hayashi, M. Deletion, rearrangement, and gene conversion, the genetic consequences of chromosomal double-strand breaks in human cells. *Environ Mol Mutagen*, 42, 288-298 (2003)
- 3) Wang, W, Seki, M, Otsuki, M, Tada, S, Takao, N, Yamamoto, K,

- Hayashi, M, Honma, M and Enomoto, T The absence of a functional relationship between ATM and BLM, the components of BASC, in DT40 cells *Biochem Biophys Acta* (in press)
- 4) Zhan L, Sakamoto H, Sakuraba M, Wu de S, Zhang LS, Suzuki T, Hayashi M, Honma M, Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells *Mutat Res*, 557, 1-6 (2004)
- 学会発表
- 1) M Honma, T Kato, F Yatagai, M Hayashi Characterization of the genomic instability in mismatch repair deficient human lymphoblastoid cell lines The Environmental Mutagen Society 34th Annual Meeting (2003 5)
- 2) MM Moore, M Honma Measures of cytotoxicity in the mouse lymphoma assay (MLA) Implication for data comparison with in vitro cytogenetic assays 33rd Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (2003 8)
- 3) M Honma, M Izumi, M Sakuraba, S Tadokoro, H Sakamoto, W Wang, F Yatagai, M Hayashi Deletion rearrangement, and gene conversion, the genetic consequences of chromosomal double strand breaks in human cells 33rd Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (2003 8)
- 4) T Suzuki, P Rajaguru, J Kanno, H Sakamoto, M Hayashi, T Yamaguchi, and M Honma GeneChip analysis on transcriptional changes induced in human lymphoblastoid (TK6) cells by six genotoxic chemicals 33rd Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (2003 8)
- 5) 鈴木孝昌, 小原有弘, 山田勉也, 佐伯憲一, 本間正充, 山口昭英, 林 真 ニトロソアミン類がマウスに誘発する突然変異の多様性 第 62 回日本癌学会総会 (2003 9)
- 6) M Honma DNA double strand break repair and chromosome instability in mammalian cells 日本放射線学会第 46 回大会(2003 10)
- 7) 本間正充, 泉雅子, 桜庭真弓, 田所聡, 坂本浩子, 王文晟, 谷田貝文夫, 林真 Targeted Mutagenesis によるヒトゲノム中の DNA2 本鎖切断修復の解析 日本環境変異原学会第 32 回大会 (2003 11)
- 8) 坂本浩子, 本間正充, 羽倉昌志 ヒト細胞を基礎とした新しい in vitro 遺伝毒性評価系の構築 ヒト S9 の適応 (JEMS/MMS 第 2 回ヒト細胞共同研究) 日本環境変異原学会第 32 回大会 (2003 11)
- 9) パラニサミー ラシャグル, 鈴木孝昌, 坂本浩子, 菅野 純, 林 真, 本間正充 ヒトリンパ腫由来 TK6 細胞における遺伝子傷害性物質による遺伝子発現変化の解析 日本環境変異原学会第 32 回大会 (2003 11)
- 10) 本間正充 ほ乳類細胞における DNA2 本鎖切断修復と遺伝的不安定性 第 26 回日本分子生物学会(2003 12)
- G. 知的所有権の取得状況
特になし

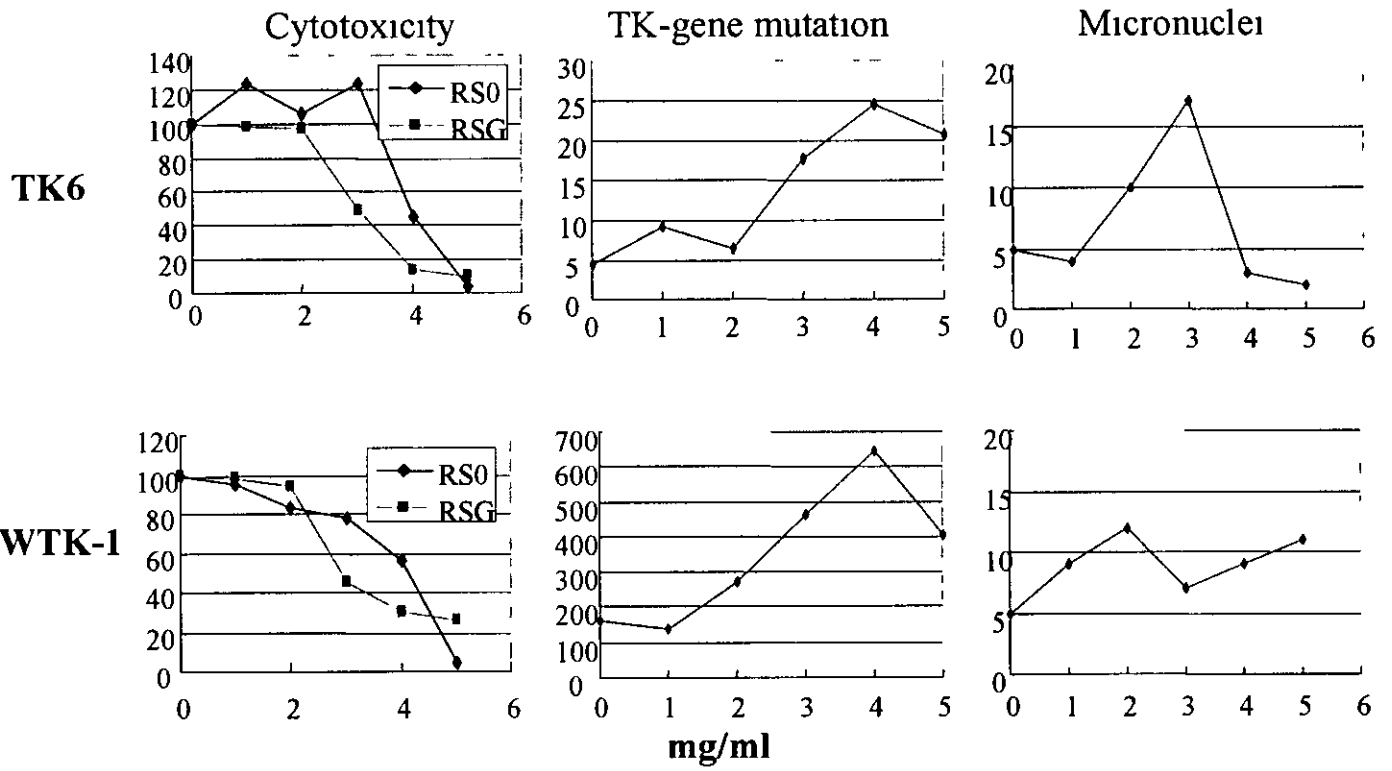


図1 TK6, WTK-1細胞を用いたコウシ酸に対する遺伝毒性試験

| MN frequencies and % of centromere positive MN | | | |
|--|-------------------------|------------|-------------|
| Cell | Treatment | MN (/1000) | % CEN+ MN |
| TK6 | Spont | 102 ± 4.8 | 48.5 ± 5.3 |
| | Kojic acid (5 mg/ml) | 40 | 52.3 |
| | Acrylamide (1 mg/ml) | 27 | 39.5 |
| | γ-ray (1 Gy) | 142 | 55.3 |
| | Trichlorfon (15 ug/ml) | - | - |
| | Carbendazim (0.3 ug/ml) | - | - |
| WTK-1 | Spont | 81 ± 4.0 | 39.1 ± 11.0 |
| | Kojic acid (5 mg/ml) | 29 | 46.2 |
| | Acrylamide (1 mg/ml) | 16 | 64.3 |
| | γ-ray (1 Gy) | - | - |
| | Trichlorfon (15 ug/ml) | 75.5 | 52 |
| | Carbendazim (0.3 ug/ml) | 47 | 56 |

表1 小核誘発頻度と動原体をもつ小核の存在比

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

分担研究報告書

既存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

—In vivo 遺伝毒性試験の検討—

分担研究者 中嶋 圓 ((財) 食品農医薬品安全性評価センター・遺伝毒性グループ
グループリーダー)

協力研究者 菊池 正憲 ((財)食品農医薬品安全性評価センター・遺伝毒性グループ)

研究要旨

本研究は、既存天然添加物であるコウシ酸のマウス肝臓に対する遺伝子突然変異の有無を検索することを目的とした 発がん性試験においてコウシ酸は雌の肝臓に腫瘍を誘発すると考えられており、トランスジェニックマウス (MutaTM Mouse) を用いて標的臓器の肝臓での遺伝子突然変異誘発性を検索した 混餌法による 28 日間の反復投与後に導入遺伝子の突然変異を解析したが、コウシ酸による肝臓での遺伝子突然変異頻度の上昇は認められなかった

A 研究目的

コウシ酸 (CAS No. 501-30-4) は、黄褐色の粉末で僅かに特異な臭いを有する。水、エタノール、アセトンには溶けやすく、エーテル、酢酸エチル、クロロホルム、ヒリシンには溶けにくい。味噌、しょう油等の製造に用いられる麹菌 (*Aspergillus* 属等) を培養して得られる抗菌作用を持った物質である。カニやエビなど甲殻類の異変防止、抗菌作用等の用途で、甲殻類、生麺、餃子の皮、加工用原料野菜等に添加物として使われていた実績がある。

本試験は、コウシ酸のマウス肝臓における遺伝子突然変異誘発性の有無を検索することを目的とした。

B 研究方法

- 1 被験物質 ナガセ生化学工業株式会社から提供を受けたコウシ酸 (含量 98%以上、残りは糖質および無機塩類) を試験に用いた。提供されたコウシ酸は使用時まで室温で保管した。
- 2 使用動物 4~5 週齢の雌の MutaTM Mouse [CD₂-LacZ80/HazfBR (BALB/C × DBA/2)] を Covance Research Products Inc (Denver, PA 米国) より購入し、1 週間の検疫・馴化ののち、5~6 週齢のマウスを試験に用いた。
- 3 飼育条件 動物は温度 24.5±2.5℃、湿度 55±20%、照明 12 時間 (7:00 点灯, 19:00 消灯)、換気回数 1 時間あたり 18 回に設定したマウス飼育室 (組替え DNA 実験指針, 昭和 54 年 8 月 27 日内閣総理大臣決定, 平成 3 年 9 月 24 日改訂による物理的

封し込めに係わる施設)で飼育した

Micro-Isolator™ System (Lab Products Inc) ランクを使用し、飼育ケースに動物を1匹ずつ収容した。粉末飼料 (CRF-1 オリエンタル酵母工業株式会社) を自由摂取させた。また、水道水を自動給水ノズルより自由摂取させた。

4 被験物質添加飼料の調製 被験物質添加飼料は基礎飼料 (CRF-1) にコウシ酸を添加し数分間混和することにより調製した。被験物質添加飼料は週1回調製し、室温にて保存した。

5 投与方法および投与期間 コウシ酸は3%の88週間混餌投与で雌に肝腫瘍を誘発することか報告されている¹⁾。また、投与期間に関してはThybaud等が28日間の反復投与を推奨している²⁾。したがって、コウシ酸1, 2および3%の3用量について1群5匹のマトランスシュエニノクスを用い28日間の混餌投与を行った。最終投与3日後に各個体から肝臓を摘出し、速やかに液体窒素で凍結した後、-80°Cで保存した。

陽性対照群にはオリブ油に溶解した7, 12-シメチルヘンス [a] アントラセン (DMBA) 20 mg/kg を1回投与した。投与後14日に肝臓を摘出した。

6 ゲノム DNA の抽出 ダウンス型ホモシナイザーに凍結組織片 (20~30 mg) をおよび組織破砕用緩衝液を加えホモシナイズした。あらかじめ0.5 mol/L ショ糖溶液を入れて水令しておいた遠心管に上記の組織破砕液を静かに重層し、1900 × G で10分間遠心した。RNase 含有ダウンス緩衝液および Proteinase K 溶液を加えて静かに混和転倒し、5時間程度50°Cで保温

し消化させた。等量のフェノール/クロロホルム混液 (容量比 1:1) を加え10分間ローテーターを用いて回転混和した後、1100 × G で10分間遠心した。上層の水層を回収し、本操作を2回繰り返した。回収した水相と等量のクロロホルム/イソアミルアルコール混液 (容量比 24:1) を加え同様にローテーターを用いて回転混和した後、1100 × G で10分間遠心した。上層の水層にエタノールを徐々に加えることによりゲノム DNA を析出させた。析出したゲノム DNA に適量の TE 緩衝液を加え、一晚室温に放置し溶解させた。

7 ゲノム DNA のパノケーニング およそ500 μg/mL の濃度に調製したゲノム DNA 溶液を Transpack (Stratagene) を用いて *in vitro* パノケーニング反応を行った。あらかじめ準備しておいた大腸菌懸濁液を総プラーク算出用 (タイター用) ならびに突然変異算出用 (セレクション用) に分取した。パノケーニング溶液の全量をセレクション用チューブに加えた後、室温に30分間放置してファーンを大腸菌に感染させた。本溶液を30 μL とり10 mmol/L の硫酸マグネシウムを含む LB 培養液で10倍希釈した。本溶液30 μL をタイター用チューブに加え攪拌した後、LB 寒天培地に全量を重層した。セレクション用チューブには、P-gal 溶液を最終濃度で3 mg/mL 加え、同様に LB 寒天培地に重層した。各プレートを37°Cで16時間培養した後、出現したプラーク数を計数した。プラーク数が400,000に達するまで上記のパノケーニング操作を繰り返した。

8 統計方法 各試験群の突然変異頻度は条

件付き二項検定 (Kastenbaum and Bowman の推計学的方法³⁾ 有意水準上側 0.05) を用いて有意差を判定した

- 9 判定基準 被験物質処理群において統計学的な有意差が認められた場合、陽性と判定した。ただし、最終的な判定は試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行った

C 研究結果

陰性対照群においては総プラーク数 3, 670, 200 の内、変異プラークが 156 出現し、その突然変異頻度は 42.5×10^{-6} 、各個体の平均値では 44.0×10^{-6} であった

コウシ酸処理群での突然変異頻度は 1.0% 群で 42.8×10^{-6} (変異体数/総コロニー数 118/2, 755, 800)、2.0% 群で 43.8×10^{-6} (同 155/3, 542, 400)、3.0% 群で 39.2×10^{-6} (同 165/4, 207, 500) であり、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。各個体の平均値は 1.0, 2.0 および 3.0% それぞれ 42.8, 45.5 ならびに 36.4×10^{-6} であった

一方、陽性対照群の突然変異頻度は 290.4×10^{-6} (同 563/1, 938, 600) と顕著な増加を示し、媒体対照群に比べて統計学的に有意 ($p < 0.05$) な増加が認められた。各個体の平均値は 288.0×10^{-6} であった

D 考察

コウシ酸について、発がん試験で用いられた 3% を高用量とし以下 2.0 および 1.0% の 3 用量 mg/kg まで試験したが、被験物質投与群における遺伝子突然変異頻度の有意な増加は認められなかった。一方、陽性対照群については、陰性対照群に比べて統計学的に有意

な ($p < 0.05$) 増加が認められたことから、本試験が適切な条件下でなされたと判断された。以上のことより、コウシ酸のトランスジェニックマウスに対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した

本被験物質のコウシ酸は混餌投与において雌の肝臓に腫瘍を誘発することが確認されているか、本結果から肝臓での遺伝子突然変異頻度の増加はみられなかった。したがって、コウシ酸が *in vivo* において遺伝毒性を示す可能性は低いものと推察された

E. 引用文献

- 1) Fujimoto N, Watanabe H, Nakatani T, Roy G, Ito A (1998) Induction of thyroid tumours in (C57BL/6N x C3H/N)F1 mice by oral administration of kojic acid Food Chem Toxicol, 36(8), 697-703
- 2) Thybaud V, Dean S, Nohmi T, de Boer J, Douglas GR, Ghickman BW, Gorelick NJ, Heddle JA, Heflich RH, Lambert I, Martus HJ, Mirsalis JC, Suzuki T, Yajima N (2003) *In vivo* transgenic mutation assays Mutation Res, 540(2), 141-51
- 3) Kastenbaum, M A, and K O Bowman (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies Mutation Res, 9, 527-549

F 研究発表

特になし

G. 知的所有権の取得状況

特になし

表 1 コウノ酸混餌投与によるメスマウスの肝臓における *lacZ* 遺伝子突然変異頻度解析結果
(投与期間 28 日 回復期間 3 日)

| Compound | Dose (%) | Animal ID-No | Number of plaque forming units | Number of mutants | Mutant frequency ($\times 10^{-6}$) | Mean \pm SD |
|------------|--------------|------------------|--------------------------------|-------------------|---------------------------------------|------------------|
| Kojic acid | 0 | 1001 | 472 500 | 24 | 50.8 | 44.0 \pm 10.2 |
| | | 1002 | 871 200 | 46 | 52.8 | |
| | | 1003 | 556 200 | 28 | 50.3 | |
| | | 1004 | 779 400 | 27 | 34.6 | |
| | | 1005 | 990 900 | 31 | 31.3 | |
| | | <i>Total</i> | <i>3,670,200</i> | <i>156</i> | <i>42.5</i> | |
| | 1 | 1101 | 468 000 | 23 | 49.1 | 42.8 \pm 11.1 |
| | | 1102 | 411 300 | 14 | 34.0 | |
| | | 1103 | 765 000 | 39 | 51.0 | |
| | | 1104 | 461 700 | 24 | 52.0 | |
| | | 1105 | 649 800 | 18 | 27.7 | |
| | | <i>Total</i> | <i>2,755,800</i> | <i>118</i> | <i>42.8</i> | |
| | 2 | 1201 | 987 300 | 40 | 40.5 | 45.5 \pm 7.8 |
| | | 1202 | 458 100 | 19 | 41.5 | |
| | | 1203 | 427 500 | 19 | 44.4 | |
| 1204 | | 1 264 500 | 53 | 41.9 | | |
| 1205 | | 405 000 | 24 | 59.3 | | |
| | <i>Total</i> | <i>3,542,400</i> | <i>155</i> | <i>43.8</i> | | |
| 3 | 1301 | 414 900 | 9 | 21.7 | 36.4 \pm 9.0 | |
| | 1302 | 1 442 700 | 65 | 45.1 | | |
| | 1303 | 849 600 | 32 | 37.7 | | |
| | 1304 | 620 100 | 22 | 35.5 | | |
| | 1305 | 880 200 | 37 | 42.0 | | |
| | <i>Total</i> | <i>4,207,500</i> | <i>165</i> | <i>39.2</i> | | |
| DMBA a) | 20 (mg/kg) | 1401 | 662 400 | 137 | 206.8 | 288.0 \pm 73.3 |
| | | 1402 | 798 300 | 279 | 349.5 | |
| | | 1403 | 477 900 | 147 | 307.6 | |
| | | <i>Total</i> | <i>1,938,600</i> | <i>563</i> | <i>290.4</i> *(KB) | |

* Significant difference from control (p < 0.05)

(KB) Kastenbaum and Bowman method

a) Positive control (7,12-Dimethylbenz [a] anthracene) a single dose
Samples (DMBA) were prepared at 14-day after the dose

日本環境変異原学会

「食品および食品添加物に関する遺伝毒性の検出・評価・解釈」臨時委員会 第1回会合 議事録

日時 2003年1月27日 午後3時～午後6時

場所 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部長室

出席者 林（委員長）、長尾（副委員長）、宇野、森田、本間、祖父尼、太田、能美（欠席）

議事

最初に林委員長より、以下の説明があった

1 本委員会の概要

化学物質の遺伝毒性に関する情報は安全性評価の一環として広く用いられているが、**hazard identification** を目的とする場合が主で、**risk assessment** を行うためのストラテジーが確立されていない。その理由の一つとして、「遺伝毒性には閾値かない」とする思想が根底にあり、**hazard identification** がそのまま **risk assessment** として用いられてきたことにある。近年海外で、このストラテジーを検討する機運が高くなってきていることも考え合わせると、この時期に専門家集団である日本環境変異原学会の中に臨時委員会を設け、化学物質の遺伝毒性の検出、評価、解釈に関する基本的な考えを確立することは重要なことであると考え。先ず、全ての人の生活に関係する食品関連の遺伝毒性について検討する。最も安全性が要求される食品関連物質についての考え方が確立されれば、医薬品、農薬、工業化学物質等への適用は大きな問題にはならないと考える。

2 本委員会の目的

我々の生活環境中に存在する化学物質の遺伝毒性の検出、評価、解釈に関するストラテジーを日本環境変異原学会の統一見解としてまとめ、学会に報告するとともに論文として公表する。さらに、国際的なコンセンサスを得るため、海外の専門家にコンサルテーションをお願いする。なお、本臨時委員会としては、食品および食品添加物に焦点を絞り、それらの安全性に関する考え方をまとめることを、本臨時委員会の目的とする。

3 本委員会を取り巻く現状

遺伝毒性の試験法に関しては ICH, OECD, IWGT 等により国際的な調和がなされてきたか、試験結果の評価、解釈に関しては国単位で検討が開始されている。特に、英国の Department of Health の諮問会議である COM によるガイダンスが影響力を発揮しており、米国 EPA によるポジションペーパーも同様の内容となっている。また、最近 EU の CPMP から医薬品の不純物に関するドラフトが出され、コメントが求められている。しかし、我が国ではこのような検討がなされていないのが現状である。

4 今後の計画

8名の委員をコアとし、会合を重ねて問題点の抽出、整理、議論、とりまとめを行う。それぞれの会合においてさらに専門家の必要な場合には個別に招聘することとし、議論の質と正確さを高める配慮をする。具体的には、文献、トキュメントの収集とそれらの整理、解析を行う。手始めとして、前述の COM ガイダンス、USEPA のポジションペーパー、EUCPMP のドラフト、食品添加物として議論された赤色2号およびコウシ酸の遺伝毒性に関する文書等を用いる。

本臨時委員会の特色としては、具体的なデータを基に議論を進めることを基本とし、具体的な議論の積み重ねの上に概念的な考察を加える。特に、閾値の問題に関しては十分な議論の上に、学会としての統一見解を示したい。その過程において、個々の試験法の限界ならびに結果の解釈についても議論を深める。検討内容に関しては随時日本環境変異原学会の HP 上に公開し、学会員が自由に発言できる体制を考える。また、本年11月に開催される日本環境変異原学会第32回大会において検討結果（少なくとも中間的なとり

まとめ) を発表する。さらに、この議論を国際的に認知されるよう、海外の専門家にコンサルテーション年度内に開催するとともに、速やかに論文として公表することを目指す

なお、林委員長は他の臨時委員会も兼任していることから、実質的な委員長は長尾副委員長にお願いする旨の説明があった

長尾副委員長より、具体的取り進め方につき提案があった。COM ガイドラインの項目ごとに討議し、他の資料ともつき合わせて矛盾点、補足すべき点等を議論する。遺伝毒性試験ごとの結果と発がん性、次世代毒性との一致性をクリアにして考えていきたい。その後、赤色 2 号等の現実のデータを当てはめてみることで、本委員会の特徴付けをしたい。この提案を受けて、以下のような質疑応答、意見交換がなされた

- 1 食品添加物だけでなく食品そのものも対象とするのか? → その方向で考えている
- 2 遺伝毒性の閾値をどう取り扱うか? → 行政サイトからの要望もあり、practical な閾値の設定が可能かどうかを議論したい → そのためには遺伝毒性のメカニズム解析が必要だろう
- 3 遺伝毒性の総合的評価法を議論するのか、個々の化学物質の評価を議論するのか? → 最終的には前者を考えたい
- 4 基本的な strategy は COM ガイダンスで大筋良いと思えるので、COM の問題点は何か、データが足りないなら何が足りないのかを明らかにできれば良いのではないか → 遺伝毒性の問題の有無を我々の strategy できちんと評価することが主目的。COM が良いという結論ならばそれでも良い。その評価法を用いて、例えばコウシ酸（遺伝毒性、発がん性の陽性・陰性データが種々あり、現状では評価が困難）をきちんと評価できれば良い
- 5 Genotoxic non-carcinogen をどう考えるかも一つの方法論ではないか。遺伝毒性をもつこと自体の危険性をアピールできれば、遺伝毒性試験の実施意義もアピールできる
- 6 本委員会の最終結論をどのようにまとめるのか、イメーンを聞きたい（例えば、危険度につき何らかの call を発信する等） → 化学物質の単なる classification ではなく、risk 評価まで踏み込みたい（できるか否かは別として）
- 7 知りたいことは、何を具体的にどうすればものか言えるのかという点。また、COM 等では in vivo の結果を重視しているが、in vitro 陽性の結果が何を意味するのかも検討すべき
- 8 Epigenetic なものをどう扱うか? → 本委員会の趣意とは異なるように思えるので、必要があれば考慮する
- 9 各遺伝毒性試験の既知データを解析するにあたり、定量的概念（どの用量から陽性になっているか。1 µg オーダーか 1000µg オーダーかでは意味が違うのではないか）も考慮してはどうか
- 10 代謝の種差も考慮すべき。ヒトに対する遺伝毒性の有無を最終的には評価すべきではないか
- 11 先ずは、COM の stage□ の試験法の整理（発がん性等との一致率の評価等。分担者を決め、review paper を中心に調査）から始めてはどうか? → 定量的評価も考慮するなら、膨大な作業量になるため困難か? → 分担は決めず、各人が可能な範囲で調査してみる

Discrepancy のあるものを中心に調査する手もある

- 12 総論からまとめていくのは大変な作業になりそうなので、各論から始めてはどうか？
まずはコウシ酸の評価を行う 評価のために何が足りないかを議論すれば、自ずと COM
に何が足りないかや遺伝毒性総合評価の strategy が見えてくるのではないか →この方向
性で検討を開始することになった コウシ酸に関する資料を配付し、各委員ごとにその risk
を考察して、次回の委員会で討論することになった

文責 林 真

日本環境変異原学会

「食品および食品添加物に関する遺伝毒性の検出・評価・解釈」臨時委員会 第2回会合 議事録

日時 2003年3月18日 午後5時～午後10時

場所 国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部長室他

出席者 林(委員長), 長尾(副委員長), 宇野(欠席), 森田, 本間, 祖父尼, 太田, 能美(欠席)

議事

- 1 最初に林委員長より, 厚生労働科学研究費申請に関する説明があった 概要としては, ストラテジーに関する理論を構築するために必要なデータを得るための実験も行うこととする なお, 国際ワークショップ(暫定呼称)は本年度中に開催する なお, 研究班は単年度ではなく3年間の計画書を作り, 申請することとした
- 2 本委員会と研究班の関係 本委員会の運営のために必要な予算措置を講ずるものであるが, 実際に実験も行う必要があり, 研究班の分担研究者としては本臨時委員会の委員にこだわらず学会員から選抜する 運営に関しては, 研究班と JEMS 臨時委員会は協力して事業を推進するものであり, 今後は合同の会合を持つこととする
- 3 申請書の作成-1 申請書を作成するに当たり, 具体的にどのような試験研究をするかについて話し合った その結果, コウシ酸に関しては食添用, 部外品用, 試薬を代表する3種のロットを選び, *in vitro* Comet assay (佐々木) および TA98, TA100 を用いる細菌復帰突然変異試験(フラノクライトの同時照射実験を含む 太田)を実施する 加えて, マウスリンフォーマTK試験(本間), 32P ポストラヘル法によるDNA付加体形成試験(長尾), 8-OH-dG (*in vitro* および *in vivo*)形成試験(葛西/大江他 林か交渉), 光遺伝毒性(プラスミド試験, 細菌復帰突然変異試験, 染色体異常試験, Comet assay 等 田中)も検討する さらに, タール系色素の *in vivo* Comet assay およびトランスジェニック動物試験(中嶋)を実施するために, 予算を計上することとした
- 4 申請書の作成-2 申請書の作成を早急に行う 予算の積算は林委員長が担当し, 申請文書の添削, 試験計画部分の変更等を長尾副委員長が担当する 3月28日を目標に作業を行い, その過程で本省医薬局食品保健部基準課とも連絡を取り, 先方の意向も確認する 最終的なまとめと送付は本間委員が担当する
- 5 今後はできる限り定期的に会合を持ち, がん研究者等を招いて話を聞く機会を作る等, 活動を始める 次回は, 臨時委員会, 研究班の合同会議とし, 4月中の開催を目指す 研究班が立ち上かることを想定して具体的な試験計画, 臨時委員会としての年次計画等を明確にする
- 6 国際ワークショップに関しては, 別途予算が考えられており, 本年度中に開催する必要がある 3日程度の会合を計画し, 最初の2日間はクローズドな会議とし, 3日目に公開のワークショップかシンポジウムを開催する クローズドな会議では, その時点までにまとめた我々の考えについてコンサルテーションを受ける 公開ワークショップでは, 我々の考え, コンサルテーションのまとめ, ならびに海外からの参加者にそれぞれの立場から講演をしてもらう 開催日は, 2004年2月12(木), 13(金), 14(土)を第一候補とする 海外からの招待者候補として以下の名前が挙がった

D Kirkland, M Aardema, D Tweats, D Blakey, J MacGregor, D Cassiano, I-D Adler, M Sorsa, Y-J Surh 以上の他, AAEMS からの参加も考え, 一緒に勉強することを考えても良いのではないかと、この意見が出された 以上を原案として、今後人選も含め具体化することとした

文責
林 真

日本環境変異原学会

「食品および食品添加物に関する遺伝毒性の検出・評価・解釈」臨時委員会 第3回会合 議事録

日時 2003年5月26日 午後3時～午後6時

場所 インダストリアル・ホール

出席者 林(委員長), 長尾(副委員長), 宇野, 森田, 本間, 祖父尼, 太田(欠席), 能美, 佐々木, 中嶋, 田中, 葛西(欠席)

議事

- 1 長尾副委員長より, 本委員会と平成15年度厚生労働科学研究費補助金(食品安全確保研究事業)班会議を当面合同で開催する旨の説明があった
- 2 長尾副委員長より, 本委員会の課題につき説明があった 遺伝毒性評価のための strategy として COM (UK) のガイダンスを参考にしたとき, そこに含まれる3つの課題 (1 in vivo 遺伝毒性の検出法と評価基準の確立, 2 発がん性に繋がる事象か否かの判定, 特に aneugenicity を含めるべきかどうか, 3 遺伝毒性発がん性物質と遺伝毒性物質の閾値) を中心に議論したいとのことであった Heritable な影響, 特に遺伝毒性非発がん性物質の germ cell への影響についても議論すべきとの意見が出され, 第4の課題として加えることになった 委員会の具体的な取り進め方法に関して討議し, 先ずは各ガイダンス (COM, ICH, CPMP, EPA, Health Canada など) の比較表を森田委員が中心となって作成し, 相違点を明らかにしつつ問題点の議論を行うことになった 議論の中で試験系に関する疑問点が出てきた場合, その試験系に精通している委員または専門家によるレビューをその都度行うことになった
- 3 研究班におけるコウシ酸とタール系色素の研究内容につき確認が行われた コウシ酸に関しては食添用, 部外品用, 試薬を代表する3種のロットを選び, 先ずは in vitro Comet assay (佐々木) と TA98, TA100 を用いる細菌を用いる復帰突然変異試験 (ブラノクライトの同時照射実験を含む 太田) を行う その結果を見て他の試験系でも3種ロットでの評価が必要かを考える 32P ポストラヘル法による DNA 付加体形成試験 (長尾) を実施する前に各ロットの不純物分析とその遺伝毒性確認を行い, その後に DNA 付加体形成試験を行うかどうかを考える 光遺伝毒性 (プラスミド DNA 鎖切断試験, エイムス試験, 染色体異常試験, コメントアノセイ等 田中) は先ずプラスミド DNA 鎖切断試験を行い, その後に他の試験系の必要性を考える 新たに, コウシ酸とタール系色素に関して遺伝毒性との構造活性相関を調べることにする (林)
- 4 来年2月に開催する国際コンサルテーション会議への招待者の人選, 招聘状の文案について議論かなされた 招聘状は早く出す必要があるか, 予算等を考慮した最終的な人選に関しては林委員長に一任することとした
- 5 次回会合は6月30日(月)13時に開催予定

以上
文責 宇野 芳文
May 29, 2003

日本環境変異原学会臨時委員会
「食品および食品添加物等に関する遺伝毒性の検出・評価・解釈」
厚生労働科学研究費
「食品添加物等の遺伝毒性検出の戦略に関する研究」

第4回検討会

2003年6月30日 13:00~17:30
国立医薬品食品衛生研究所安全生成物試験研究センター会議室

参加者 長尾, 祖父尼, 田中, 能美, 宇野, 中嶋, 森田, 布柴, 佐々木, 林
欠席 太田, 葛西

- 1 厚生労働科学研究費補助金申請状況について、ヒアリングも終わり、近々内示が出る予定である。ただし、補助金額はかなり減らされる予定 (林)
- 2 International Consultation Meeting の準備状況については、メールのやりとりで状況把握はできていると思われるが、現時点で10名の候補者全員から参加するとの返事が届いている。実際の開催に当たっては、委員の皆様のご協力をお願いしたい (林)
- 3 コウシ酸の試験進捗状況について、担当者から途中経過について説明がなされた。太田 TA100, WP2uvrA/pKM101, +/-S9mix において陽性となり、ロット間で大きな差はなかった。長尾 TA100, -S9mix で3ロットとも同様に陽性、分析も開始した。佐々木 コメント試験, WTK1, -S9mix, 4, 8 h 処理した結果全て陽性で、ロット間に大きな差は認められなかった。
- 4 森田委員からリスクアセスメントの基礎的事項の概説の後、ICH-Q3c, CPMP の genotoxic impurities に関する position paper, Dearfield らによる USEPA の position paper, UKDH の COM ガイダンス, Health Canada の工業化学物質に関する文書の詳しい紹介があった。さらに、それらの間の比較表が提示され、その説明もなされた。
- 5 次回の検討会は7月22日午後1時半から (インダストリアルホールにて)、コウシ酸の既存データに基づく評価を分担して行うこととした。
分担は
In vitro non mammalian 能美
In vitro mammalian 祖父尼
In vivo 中嶋, 林
Comet 佐々木
Carcinogenicity 宇野

今後の検討会に関しても議論がなされ、8月または9月の定例会に福島先生をお招きし、genotoxic carcinogen の閾値についてじっくり話をうかがうこととした。

文責
林 真

日本環境変異原学会臨時委員会
「食品および食品添加物等に関する遺伝毒性の検出・評価・解釈」
厚生労働科学研究費
「食品添加物等の遺伝毒性検出の戦略に関する研究」

第5回検討会

2003年7月22日 13:30~17:00
インダストリアルホール 中会議室

参加者 長尾, 祖父尼, 田中, 太田, 宇野, 中嶋, 佐々木, 林, 森田 (議事録)
欠席 能美, 葛西, 本間, 布柴

- 1 前回 (第4回検討会) 議事録の確認を行い, コメント等があれば林委員長まで連絡することとした
- 2 コウシ酸の既存データに基づく評価のまとめが報告され, 多くの議論がなされた

1) In vitro mammalian test systems (祖父尼委員)

遺伝子突然変異試験, 染色体異常試験, SCE および小核試験のデータが報告された。染色体損傷性について 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で陽性となるケースが認められたが, コウシ酸の分子量が 142 であることから, 10mM (1420 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を上回る濃度での陽性結果の生物学的妥当性に疑問が呈された。1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度での細胞毒性, 浸透圧, pH のデータの必要性が指摘され, 浸透圧および pH について中嶋委員が確認することとなった。そのデータに基づき, 必要に応じ, 田中委員が染色体異常試験 (細胞毒性評価を含む) を実施することとなった。追加情報として, 佐々木委員により, WTK-1 細胞を用いた染色体異常試験の結果 (約 10mM 以上で陽性) が紹介された。

なお, 未投稿データの Covance Lab と RCC/CCR のデータの詳細を, 林委員長から祖父尼委員に連絡することとなった。

[会議後備考]

長尾委員より, CHL 細胞において 72 時間処理でみられる小核が aneuploidy によるものかどうかを検討してはどうかとの提案がなされた。また, 祖父尼委員より, WTK-1 細胞での染色体異常誘発性に関連し, TK6 細胞での検討 (トリパンプルー法による細胞数計測も含む) の必要性が提案された。佐々木委員により, これら試験の実施の可否について検討中。

本間委員より, TK6 と WTK-1 細胞を用いたコウシ酸の tk 座位遺伝子突然変異試験の結果速報が提示され, 両細胞で濃度依存的な突然変異頻度増加がみられた。これを受け能美委員より, トランスジェニックラットを使って長期発がん試験と遺伝子突然変異試験を並行して行い, 発がん標的臓器 (甲状腺と肝臓) での突然変異誘発性を調べることの必要性が提案された。

2) Comet assay (佐々木委員)

In vitro Comet では, 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で, 用いた 2 種類の細胞で陽性となったこと, in vivo Comet では, マウスを用いた 2 つの臓器の結果の相違 (臓器 A は陰性, 臓器 B は胃と肝で陽性), ならびにマウスとラットの陽性臓器の相違 (マウス 胃と肝, ラット 胃と肝に加え肺と骨髄) が報告された。前者の相違の要因としてマウスの系統差, 被験物質の相違, 検体調製の微妙な相違などが考えられるか, 実際のところ何に起因するかを確認す