

座長 太田 敏博 (東京薬科大学)

14 20-14 50 香辛料に含まれるカプサイシンは発がん物質か、発がん協調物質か、  
あるいは抗発がん物質か  
Young-Joon Surh (College of Pharmacy, Seoul National University, South  
Korea)

14 50-15 20 不純物、汚染物質と遺伝毒性 毒物学的な閾値 (TTC) の概念による制  
御  
Lutz Muller (Novartis Pharma AG, Switzerland)

15 20-15 40 (休憩)

座長 森田 健 (国立医薬品食品衛生研究所)

15 40-16 10 食品中の発癌物質に対する英国食品標準庁の施策  
Diane Benford (Food Standards Agency, UK)

16 10-16 40 食品安全行政における遺伝毒性の重要性  
中垣 俊郎 (厚生労働省 医薬食品局 食品安全部 基準審査課)

座長 祖父尼 俊雄 ((株) ノハスシーン)

16 40-17 25 総合討論

17 25-17 30 閉会の挨拶 祖父尼 俊雄 ((株) ノハスシーン)

18-30-20 30 懇親会 (銀座東武ホテル)

International Symposium  
 “Risk Assessment Strategy in Genotoxicity  
 of Food and Related Substances”  
 February 14, 2004

Program

Time	Title	Speaker
9 30 – 9 35	Opening Remarks	M Nagao (Kyoritsu College of Pharmacy)
	Chair Y Uno (Mitsubishi Pharma)	
9 35 –10 05	Strategy for safety assessment of food and related chemicals based on genotoxicity assay data	M Hayashi (NIHS, Japan)
10 05 –10 35	Report from the Kamakura Meeting	D Kirkland (Covance, UK)
10 35 –10 55	Break	
	Chair M Honma (NIHS)	
10 55 – 11 25	Limitations on interpretation of data from in vitro assays for chromosome damage Questions on significance of endoreduplication and of toxicity-related effects	S M Galloway (Merck, USA)
11 25 – 11 55	Ability of the comet assay to detect the removal of DNA bulky adducts formed in vivo in hepatocytes as compare to the unscheduled DNA synthesis test Improvement of the sensitivity with an in vitro aphidicolin incubation	V Thybaud (Aventis, France)
11 55 – 13 20	Lunch	
	Chair N Tanaka (FDSC)	
13 20 –13 50	New tools for the assessment and interpretation of genotoxicity of food and cosmetics	M J Aardema (P&G, USA)
13 50 –14 20	Toxicogenomics New Frontiers in Genetic Toxicology	D H Blakey (Health Canada, Canada)

Chair T Ohta (Tokyo University of Pharmacy and Life Science)

14 20 –14 50	Capsaicin in hot chili pepper, carcinogen, co-carcinogen or anticarcinogen?	Y-J Surh (Seoul National University, South Korea)
14 50 –15 20	Impurities, contaminants and genotoxicity and their control by the threshold of toxicological concern (TTC) concept	L Mueller (Novartis, Switzerland)
15 20 –15 40	Break	

Chair T Morita (NIHS)

15 40 –16 10	The UK food standards agency approach to carcinogens in food	D Benford (Food Standards Agency, UK)
16 10 –16 40	Importance of the assessment of genotoxicity in the food safety program	T Nakagaki (MHLW, Japan)

Chair T Sofuni (NovusGene)

16 40 –17 25	General Discussion	All
17 25 –17 30	Concluding Remarks	T Sofuni (NovusGene)

Move to GINZA TOBU HOTEL

18 30 –20 30	Banquet	
--------------	---------	--

---

# ABSTRACTS

要旨

## **Strategy for safety assessment of food and related chemicals based on genotoxicity assay data**

**Makoto Hayashi**

**Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, Japan**

In the safety evaluation of chemicals, information on genotoxicity plays an important role for prediction of carcinogenicity and also adverse heritable effects. One of the most critical features of genotoxicity is the non-existence of threshold. Based on this concept, we have adopted a strategy that genotoxic chemicals should be eliminated from our daily life especially chemicals that are avoidable and for which their benefit is not expected to exceed their health risk. Basically, even beneficial chemicals, such as pharmaceutical drugs, have been assessed by this strategy. It has been thought theoretically and practically that it is possible to estimate an acceptable daily intake (ADI) if a chemical is not genotoxic even if it has a carcinogenic potential. On the contrary, when chemical carcinogenesis is likely to involve a genotoxic mechanism, then a threshold and consequently an ADI cannot be set. This means that potential risk exists even if the level of exposure is very low. On the other hand, the existence of a threshold has been estimated for carcinogens not operating by genotoxic mechanisms, then, for such chemicals, it is thought there is virtually no carcinogenic risk for exposure below a certain level.

Theoretically, a genotoxic event occurs by the laws of probability and depending on exposure levels. This means that a genotoxic event can occur with high probability at high exposure levels and that the chance of the event exists at extremely low levels of exposure albeit with low probability. Based on actual genotoxicity assay data, the concentration of clastogens that induce chromosomal aberrations in 20% of metaphases analyzed *in vitro* varied from 0.000018 mg/mL (1,8-dinitropyrene) to 41 mg/mL (sucrose), also, some clastogens only marginally induce chromosomal aberrations and others induce aberrations in almost 100% of metaphases analyzed. In the past, the tendency has been to only consider such diverse chemicals qualitatively as "clastogens", ignoring the quantitative information on potency of clastogenic effect. This is also true for chemicals tested in microbial gene mutation assays and even in *in vivo* rodent bone marrow micronucleus assays. All organisms from low to high phylogenetic classes have DNA repair mechanisms to rescue DNA damage that is the initial event of genotoxicity. Due to these mechanisms, initial DNA lesions can be effectively repaired especially at low levels of damage. Accordingly, at least practically, a threshold of genotoxicity can be expected and a strategy for genotoxicity evaluation can be established based on this idea.

We established an ad hoc working group within the Japanese Environmental Mutagen Society to develop a strategy for safety assessment of food and related chemicals based on genotoxicity assay data, this work was supported by the Ministry of Health, Labour and Welfare. It is a three-year project which aims to prepare this strategy by the end of the project. We believe that once the strategy is established for food and related chemicals, it will be able to expand to other classes of chemicals, for example, pharmaceutical drugs, agricultural and industrial chemicals. During the present project we will discuss several key issues, e.g., the existence of threshold for genotoxicity, the applicability of quantitative data, the use of *in vitro* data, and the differences between avoidable and unavoidable chemicals.

# 食品および食品関連物質の遺伝毒性試験データに基づく安全性評価の戦略

林 真

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部(日本)

化学物質の安全性評価において遺伝毒性に関する情報は、がん原性および次世代への遺伝的影響の予測において重要な役割を果たしている。遺伝毒性において最も重要な特徴は閾値がないとされていることであろう。この考えに基づき、我々は遺伝毒性物質、とりわけ意識的にさけることの出来るものおよび有用性が危険性を大きく上回らないものを排除すべきとの立場をとってきた。基本的には、医薬品のように有用性が認められる物質についても同様の考えに基づき安全性を評価してきた。がん原性物質であっても遺伝毒性が認められない場合には閾値を仮定することが出来、一日摂取許容量(ADI)が設定可能であると考えてきた。一方、遺伝毒性メカニズムが原因であるがん原性物質に関しては閾値およびADIを設定することは出来ない、と考えてきた。このことは、暴露が非常に低くても依然としてリスクを考えなければならないことを示している。他方、遺伝毒性メカニズムが働かないがん原性物質には閾値の存在を仮定することが出来、ある一定のレベル以下では実質的にはがん原性のリスクはないものと考えられる。

理論的に遺伝毒性は遺伝物質と被験物質が衝突する確率論に基づいている。従ってそれは暴露量に関連することになる。すなわち、暴露量が高いときには高い確率で起こり、暴露量が低い時には低い確率で起こる。実際の遺伝毒性試験のデータを見ると、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験において20%の分裂細胞に染色体異常を誘発する被験物質の濃度は0.000018 mg/mL (1,8-dinitropyrene)から41 mg/mL (sucrose)と大きくばらつくことが知られている。また、弱い染色体異常誘発物質では低い頻度でしか染色体異常を誘発しないが、強いものではほぼ100%の細胞に染色体異常を誘発する。これまでは、強さに大きな差があるにもかかわらず、定量的な情報を無視した形で単に染色体異常誘発性物質として扱ってきた。これは、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験のみならず細菌を用いる復帰突然変異試験、げっ歯類を用いる小核試験結果についても同様の取り扱いがなされてきた。しかし、下等なものから高等なものまで全ての生物は、遺伝毒性の最初のステップであるDNA損傷を修復する機能を備えている。この機能により、特に低レベルの損傷は効率よく修復される。従って、少なくとも実質的には、遺伝毒性に関しても閾値の存在を期待することができ、この考えに基づく遺伝毒性評価のための戦略を構築できるものと考えられる。

我々は日本環境変異原学会の中に、「食品および関連物質の遺伝毒性に関する試験データに基づく安全性評価のための戦略」を検討する臨時作業委員会を立ち上げた。また、この研究は厚生労働省の科学研究費による補助を受けており、このプロジェクトの継続する3年の間に戦略を作り上げることを目的としている。食品および関連物質に関する戦略が構築されれば、医薬品、農薬、工業化学物質のような他の化学物質の評価にも用いることができるものと信じている。このプロジェクトでは、次のような重要な項目について議論する計画である。遺伝毒性に関する閾値の存在、定量的データの適用、in vitro データの活用法、そして日常生活でさけることのできるものとはできないものに対する考え方。

## **Report from the Kamakura Meeting**

**Dr David Kirkland**

**Scientific and Regulatory Consulting, Covance Laboratories Ltd, Harrogate, UK**

## コンサルテーションミーティングの内容の紹介

### デイビッド カーランド

コヴァンス研究所 科学・規制コンサルティング（英国）

Kirkland 博士には、2月12および13日に鎌倉で開催されたコンサルテーションミーティングの内容について紹介いただく予定である。なお、コンサルテーションミーティングは、厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）「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」および日本環境変異原学会の「食品および関連物質の遺伝毒性に関する試験データに基づく安全性評価のための戦略」を検討する臨時作業委員会が、国外の有識者（今回のシンポジスト）を集めて戦略等につきコンサルティングを受けるために開催した会合である。



## **Limitations on interpretation of data from in vitro assays for chromosome damage: Questions on significance of endoreduplication and of toxicity-related effects**

**Sheila M. Galloway**

**Merck Research Laboratories, West Point, USA**

In evaluating the safety of chemicals, the in vitro assay for chromosome aberrations is a sensitive assay used routinely in genotoxicity testing. Questions about interpretation of the data arise when aberrations are seen with compounds that are negative in other genotoxicity assays, and when the effects appear to be related to cytotoxicity. Also, while the protocols currently recommended are designed for assessing structural chromosome breakage, polyploidy and endoreduplication are often seen in in vitro assays in Chinese hamster cells and it is not known how to assess the significance of these. In our experience up to one third of compounds tested induce endoreduplication in Chinese hamster ovary (CHO) cells, mainly with no structural chromosome damage. Those tested are negative in the in vivo micronucleus assay. Typically, endoreduplication is seen when cells are sampled at 20 hours, after a 3 hour pulse treatment. Endoreduplication can result from cell cycle perturbations, e.g., [1], and is not necessarily an indicator of potential spindle disruption and aneuploidy. To see if the drug candidates had potential for induction of aneuploidy, we tested them in an in vitro assay for micronuclei in the same cells. Of 8 compounds tested, 3 (2 in the same chemical class) had equivocal or weak increases in micronuclei. Kinetochore staining is underway to determine whether these micronuclei indicate chromosome loss.

It is not known whether hamster cells are more susceptible to induction of polyploidy/endoreduplication than human cells. Published data indicate that polyploidy is a common finding in human lymphocytes in drug screening [2]. Early-passage Syrian hamster embryo cells are much more susceptible than normal human fibroblasts to induction of polyploidy and aneuploidy by spindle poisons and by the estrogenic compounds 17 $\beta$ -estradiol and diethylstilbestrol [3]. We also have shown that a chemical that induced high levels of polyploidy in CHO cells in vitro did not induce polyploidy in normal human fibroblasts. (This may be a useful follow-up assay.) This is consistent with the known low stringency of mitotic control even in normal rodent cells, compared with human cells [4]. Also, p53 function is important for preventing endoreduplication and polyploidy, and is lacking in the Chinese hamster cell lines commonly used in testing.

The in vitro micronucleus assay is gaining acceptance as an in vitro assay that would detect potential for both chromosome breakage and chromosome loss/aneuploidy. The same caution used in evaluating metaphase aberration data must be applied to interpreting in vitro micronucleus data, since toxic compounds that are not mutagens or carcinogens and do not react with DNA can induce micronuclei in vitro [5], just as they induce chromosome aberrations.

- [1] Huang et al, 1983. *Cancer Research* 43, 1361-1364
- [2] deMitchell et al, 1995. *Mutagenesis* 10, 79-83
- [3] Tsutsui et al, 1990. *Mutation Research* 240, 241-249
- [4] Kung et al, 1990. *PNAS (USA)*, 87, 9553-9557
- [5] Hill et al, 2001, *Environ Molec Mutagen* 37, suppl 132, p78

## In Vitro 染色体異常試験におけるデータ解釈の限界 核内倍加、および毒性に依存する陽性反応に対する疑問

シーラ M ギャロウェイ  
メルク研究所 ウェストポイト (米国)

化学物質の安全性評価法として、in vitro 染色体異常試験は感度の高い遺伝毒性試験の1つとして、よく利用されている。しかしながら、他の遺伝毒性試験において陰性を示した化合物が染色体異常を引き起こし、その異常の誘発が細胞毒性と関連しているような場合は、データの解釈が難しい。さらに、現在推奨されている試験プロトコルが、染色体の構造異常の検出を目的として作られているのに対して、染色体の倍数性や核内倍加等の異常はチャイニーズハムスター細胞において頻繁に観察されるものの、それらの重要性をいかに評価するかについては理解されていない。我々の経験では、CHO 細胞において核内倍加を引き起こす化合物の3分の1以上は、染色体の構造異常がほとんど観察されない。一般的に核内倍加は、細胞を3時間パルス処理した20時間後の細胞によく観察される。核内倍加は細胞周期異常の結果として起こることが知られているが [1]、それは必ずしも紡錘体障害や、異数性誘発の可能性を示唆するものではない。これら核内倍加を示す医薬品候補物質が染色体の異数性をも誘発するかを検討するため、我々はそれら物質について、同じ細胞を用いて in vitro 小核試験も実施した。試験した8化合物の内、3化合物(内2化合物は同じクラスに分類)は弱い小核の誘発を引き起こした。これら小核が染色体全体の消失によるものかどうかは、現在、キネトコア染色によって確認中である。

ハムスター由来細胞が、ヒト細胞に比べて倍数体や核内倍加を誘発しやすいかどうかについては不明である。これまで報告されたデータでは染色体の倍数性は薬剤スクリーニングの際にヒトリンパ球においても一般的に見られる現象である [2]。継代初期のシリアンハムスター胚芽細胞は、細胞分裂毒、 $17\beta$ -エストラジオールやジエチルスチルベストールなどのエストロゲン作用物質によって誘発される染色体の倍数性や異数性に対して、ヒト繊維芽細胞よりも高感受性である [3]。我々も CHO 細胞において高頻度に倍数体を誘発する化学物質が、ヒト繊維芽細胞においては誘発しないことを見いだしている(これは、フォローアップ試験が有用な例かもしれない)。このことは正常の齧歯類細胞においてもなお、細胞分裂における厳格さの程度が、ヒト細胞に比べて低いというこれまでの見解と一致するものである [4]。さらに、p53 による機能が核内倍加や倍数体の抑制に重要であり、一般的に試験に使われているチャイニーズハムスター培養細胞はこの機能を欠損している。

In vitro 小核試験は、染色体の切断などの構造異常や、消失、異数性などの数的異常の両者を検出する in vitro 試験法として容認されつつある。しかしながら、染色体異常試験と同様の注意を払うべきことを in vitro 小核試験のデータ評価においても忘れてはならない。それは、変異原性や発がん性を示さず、DNA と直接反応しない毒性化合物でも、それらが染色体異常を誘発するのと同様に、小核を誘発しうるからである。

## **Ability of the comet assay to detect the removal of DNA bulky adducts formed in vivo in hepatocytes as compared to the unscheduled DNA synthesis test: Improvement of the sensitivity with an in vitro aphidicolin incubation**

**Véronique Thybaud**

**Genetic Toxicology, France, Aventis Pharma, Paris Research Center, Drug Safety Evaluation, France**

We evaluated the ability of comet assay to detect the removal of DNA bulky adducts formed by 2-acetylaminofluorene (2-AAF) in rat liver and 5,9-dimethyl-dibenzo[c,g]carbazole (DMDBC) in mice liver 14 hours after a single in vivo administration of the compound, the hepatocytes were isolated by liver perfusion and incubated with or without aphidicolin (APC, 15  $\mu$ M), a DNA polymerase inhibitor used to accumulate incomplete repair sites. Unscheduled DNA synthesis activity observed in hepatocytes from 2-AAF- or DMDBC-treated animals was clearly decreased after 4-hour in vitro incubation with APC. 2-AAF, a rat hepatocarcinogen known to induce liver DNA adducts, was administered to rat at 5, 10 or 50 mg/kg once orally. Without APC, only a slight increase in the mean of Tail Moment (TM) median was observed whatever the 2-AAF dose level whereas a clear increase in these values were observed after 1-hour incubation with APC. When hepatocytes, isolated from rats treated at 5 or 10 mg/kg, were incubated with APC for 18-hours, the effect on TM was more pronounced than after a 1-hour incubation. DMDBC, a heterocyclic aromatic hydrocarbon known to induce liver DNA adducts and tumours in mice, was evaluated after a single skin application of 10 or 20 mg/kg. No or a limited change in the mean of TM median was noted in hepatocytes isolated from treated animals when they were incubated without APC or after 1-hour incubation with APC. However, the mean of TM median was more significantly increased after 4- and 18-hour incubations with APC. In conclusion, UDS assay demonstrated is probably more sensitive than the comet assay to detect the removal of bulky adducts. Moreover, a long in vitro incubation time (4-18 hours) of isolated hepatocytes in the presence of APC improved sensitivity of comet assay for detection of DNA damage induced in vivo by 2-AAF and DMDBC "

## In vivoにおいて肝細胞に形成される巨大DNA付加体に対するコメット試験と、不定期DNA合成試験の検出能力の比較 In vitro アフィデイコリン処理による感度の向上

ベロニカ チボー

アヴェンティスファーマ・パリ研究センター・医薬品安全評価・遺伝毒性(フランス)

我々は、コメット試験の検出力を評価するため、ラット肝臓中の 2-acetylaminofluorene (2-AAF)と、マウス肝臓中の 5,9-dimethyl-dibenzo [c,g] carbazole (DMDBC)によって形成される大きなDNA付加体の検出に、コメット試験を適用した。In vivoで化合物を単回投与14時間後に肝還流法により肝細胞を単離し、アフィデイコリン(APC, 15  $\mu$ M)存在下、もしくは非存在下で細胞を培養した。APCはDNAポリメラーゼ阻害剤の1種で、不完全なDNA複製部位を蓄積させることに用いられる。2-AAF、DMDBC処理動物の肝細胞における不定期DNA合成(UDS)活性は、APC存在下in vitroで4時間培養することにより急速に低下した。

2-AAFは肝臓にDNA付加体を形成する肝発がん物質として知られている。これをラットに経口で、5、10、または50 mg/kg単回投与した。コメット試験では、APC非存在下においては、テールモーメント(TM)の中央値はわずかに増加したが、APC存在下で1時間培養した場合は、同じ用量で明らかなTM値の増加が観察された。5もしくは10mg/kgの用量のラット肝細胞をAPC存在下で18時間培養したところ、TM値の増加は1時間培養の時よりも顕著であった。

DMDBCはヘテロ環芳香族炭化水素の一つで、マウスの肝臓にDNAアダクトを形成し、がんを誘発する。DMDBCをマウス皮膚に10、または20 mg/kgで単回塗布し、コメット試験を行った。1時間の培養ではAPCの処理にかかわらず、肝細胞での顕著なTM値の増加は認められなかったが、APC存在下4、18時間培養後では明らかなTM値の増加が観察された。

結論としては、UDS試験は大きなDNAアダクトの検出に対して、コメット試験よりおそらく感度が良いことが示された。さらに、コメット試験においてはAPC存在下での長時間の単離肝細胞の培養(4-18時間)が、2-AAF、DMDBCによって誘発されたin vivoでのDNA損傷を感度よく検出できることが示された。

## **New tools for the assessment and interpretation of genotoxicity of food and cosmetics**

**Marilyn J. Aardema**

**The Procter & Gamble Co, Miami Valley Laboratories, USA**

To date, the safety evaluation process for foods, cosmetics, and related substances relies on the use of standard genotoxicity test methods for evaluating hazard and standard approaches for interpreting the biological relevance of genotoxicity results. These approaches likely overestimate risk. In this conference, we have the opportunity to examine exciting new tools and risk assessment approaches that have the potential to improve the assessment of genotoxicity. My talk will focus on new test methods.

A recent project coordinated by the International Life Sciences Institute (ILSI) on toxicogenomics demonstrated the potential of genomics technologies to help answer questions of toxicological importance. Results from studies conducted in my laboratory provide evidence of differentially regulated genes that appear to have discriminating power for direct versus indirect genotoxins. Genomic technologies therefore may serve to provide fingerprints for classifying chemicals when their mechanism of action is unknown. As such, use of such data has the potential to improve the follow-up testing required for invitro genotoxins by reducing costly, time consuming, invivo studies.

Another technology that has promise for providing better predictions of rodent carcinogenicity for aromatic amines, found in many products, is the Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation assay. Published results from ourselves and others show that the SHE cell transformation assay has a high degree of concordance for correctly detecting both rodent carcinogens (85+) and non-carcinogens (85%+) compared to standard genotoxicity tests, like the Ames assay that have very low specificity (specificity=30%, Ashby and Tennant, Mut Res 257, 229-306, 1991).

Lastly, for dermally applied substances that are not systemically available, assays like the recently developed invivo skin micronucleus assay (Nishikawa et al, Mut Res 444, 159-166, 1999, Mut Res 513 93-102, 2002) show great promise for site-of-contact genotoxins. We have participated in a multi-lab collaborative study with Japanese investigators and results from this work demonstrate the ability of the invivo skin micronucleus assay to detect a variety of genotoxins.

## 食品及び化粧品類の遺伝毒性に関する評価と解釈についての新しい方法

マリリン J アーデマ

プロクターアンドギャンブル社 マイアミバレー研究所 (米国)

これまで、食品類、化粧品類、及びその関連物質についての安全性評価は、そのハザードを評価する為の標準試験法、および遺伝毒性試験結果の生物学的な意義を解釈する為の標準法の適用により行われてきた。これらの方法では、遺伝毒性のリスクを過大に評価する傾向がある。このシンポジウムでは、新しい興味ある試験法の紹介と遺伝毒性の評価を改善する為のリスク評価法を紹介する。ここでは、主に新しい試験方法についてお話しする。

国際生命科学研究所 (ILSI) によって主催されたトキシコゲノミクスに関する最近のプロジェクトでは、毒性学的に重要な事項の疑問を解明するゲノミクス技術の可能性についての報告がなされている。私の研究室では、直接遺伝毒性物質 (direct genotoxins) と間接遺伝毒性物質 (indirect genotoxins) を判別することのできるような調節を受けている遺伝子があるという結果を得ている。この様にゲノミクスの技術は、作用機序の分からない化学物質を分類する場合において、指紋になるような有用な情報を提供する役割を有している。この様にして得られたデータは、*in vitro* 試験の後に必要となる *in vivo* のフォローアップ試験に関して、費用や時間節減の面で有用となる。

多くの製品に含まれている芳香族アミンについて、げっ歯類動物での発がん性をより高く予測する試験系として、シリアンハムスター胎児細胞 (SHE cell) を用いるトランスフォーメーションアッセイがある。我々および他の著者によって発表された結果では、SHE cell トランスフォーメーションアッセイの結果は、標準遺伝毒性試験法、例えば、特異性がかなり低いエームス試験 (specificity=30%, Ashby and Tennant, Mut Res 257,229-306,1991) に比べ、げっ歯類の発がん物質に対しても (85%+)、また非発がん物質に対しても (85%+)、両方ともに *in vivo* での検出結果と高い一致率 (concordance) を示した。

最近、全身投与でなく経皮的に適用する物質に対して開発された *in vivo* 皮膚小核試験 (Nishikawa et al, Mut Res 444,159-166,1999, Mut Res 513, 93-102,2002) は、接触性の遺伝毒性物質に対して大変有効である。私共は日本の研究者とともに多施設共同研究に参加しているが、これから得られた結果は、各種の遺伝毒性物質を検出し得る *in vivo* 皮膚小核試験の有用性が明らかにされるであろう。

## **Toxicogenomics: New frontiers in genetic toxicology**

**David Blakey**

**Environmental Health Science, Safe Environments Programme, Health Canada, Canada**

DNA microarrays are powerful tools for the global characterization of gene expression. It is widely thought that expression profiling will revolutionize the science of toxicology, and provide new insights in genetic toxicology. Transcriptome profiling can be used to elucidate the mechanisms of action of a toxicant, identify toxicant targets and unexpected responses, discover new biomarkers of exposure and susceptibility, generate gene expression profiles that are useful predictors of disease or toxicity, and provide detailed information on tissue/cell specificity. The Mutagenesis Section at Health Canada is applying microarray technology to the validation of *in vitro* genetic toxicology models. We have established previously an epithelial cell line from Muta<sup>TM</sup>Mouse pulmonary tissue to be used in mutagenesis research. Our studies have shown similarity in gene mutation responses between the cell line *in vitro*, and lung tissue *in vivo*. The detailed biological characterization of a cell line, and its comparison to cells from the original tissue can be extremely time-consuming. While we have described this cell line extensively using biochemical and cytological methods, we are now applying DNA microarrays to compare further the gene expression patterns in the transcriptome of the cell line relative to its parent tissue. By using a global genomics approach, we were able to evaluate gene expression for the majority of the mouse genome, and rapidly characterize the attributes of the cell line compared to Muta<sup>TM</sup>Mouse whole lung. Approximately 90% of the genes active in the cell line are also active at similar levels in the lung of the Muta<sup>TM</sup>Mouse. Most of the genes that are up-regulated in the cell line are related to maintaining the cells in cell culture conditions. We are now applying toxicogenomics approaches to measure gene expression in response to challenges both *in vitro* and *in vivo*.

## トキシコゲノミクス 遺伝毒性における新機軸

### デイビッド ブラッケイ

カナダ保健省・安全性環境プログラム・環境健康科学 (カナダ)

DNA マイクロアレイは、遺伝子発現を網羅的に特定する強力なツールである。発現プロファイルは、毒性科学に革命をもたらし、遺伝毒性に新たな見識を提供するだろうと広く考えられている。トランスクリプトームのプロファイリングは、毒性物質の作用機序の解明に、毒性物質の標的および予想外の反応の同定に、暴露や感受性に関する新しいバイオマーカーの発見に、疾患あるいは毒性を予測できるような有用な遺伝子発現プロファイルの作成に、さらに組織/細胞の特異性に関する詳細な情報を提供するのに利用できる。カナダ保健省の変異原性セクションは、マイクロアレイ技術を *in vitro* 遺伝毒性モデルの評価に適用している。我々は、Muta™Mouse の肺組織から上皮細胞株を樹立し、突然変異研究に利用している。我々の研究により、*in vitro* における細胞株と *in vivo* における肺組織との間に、遺伝子の突然変異反応に類似性のあることが明らかとなった。ある細胞株の詳細な生物学的特性を掌握し、それが由来した組織からの細胞の特性と比較することは、極めて時間のかかる作業である。我々は、生化学的および細胞学的手法を用いてこの細胞株を詳細に調べてきたが、今では、さらに、細胞株とその由来組織のトランスクリプトームの遺伝子発現パターンを比較するのにDNA マイクロアレイを適用している。網羅的ゲノミクスアプローチを用いることにより、大部分のマウスゲノムの遺伝子発現が評価可能となり、Muta™Mouse 個体の肺と比較した細胞株の特性を迅速に特定できた。細胞株で活性な遺伝子の約90%は、Muta™Mouse の肺でも同様なレベルで活性である。細胞株で発現が増加していた遺伝子の大部分は、培養条件下で細胞を維持することに関連していた。我々は、現在、トキシコゲノミクスアプローチを *in vitro* および *in vivo* 両方での刺激に対する応答としての遺伝子発現の測定に適用している。



## Capsaicin in hot chili pepper, carcinogen, co-carcinogen or anti-carcinogen?

Young-Joon Surh

College of Pharmacy, Seoul National University, South Korea

Consumption of irritant spicy foods has been suspected to cause malignancies, particularly in tissues of gastrointestinal origin. Capsaicin, a principal pungent constituent of hot chili pepper (*Capsicum annuum* L., Solanaceae), has been considered to act as a co-carcinogen or a tumor promoter as well as a tumor initiator. For instance, dietary capsaicin potentiated gastric carcinogenesis induced by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine in rats. Although limited data from previous studies in experimental animals and cultured cells displayed moderate tumorigenicity of capsaicin, there is no solid evidence supporting the hypothesis that the compound is carcinogenic in humans. On the contrary, results from recent studies indicate that this pungent substance may act as an antimutagen or an anticarcinogen. According to a research conducted in Singapore, hot chili pepper and its constituent capsaicin exert protective effects against gastric mucosal injury. Interestingly, the high rate of ulcers observed among Chinese residents in Singapore, as compared to other ethnic populations in the same country, appears to be associated with their relatively low consumption of chili peppers. Our previous studies have revealed that capsaicin exerts inhibitory effects on mutagenesis and tumorigenesis induced by *N*-nitrosodimethylamine and vinyl carbamate through suppression of hepatic cytochrome P450 2E1 responsible for metabolic activation of these carcinogens. Capsaicin also induces apoptosis preferentially in cancerous or transformed cells. Thus, the genotoxicity and tumorigenicity of capsaicin is quite controversial, and need more systematic evaluation.

---

### References

- 1 Surh, Y-J and Lee, S S (1995) Capsaicin, a double-edged sword: toxicity, metabolism, and chemopreventive potential. *Life Sci*, 56: 1845-1855
- 2 Surh, Y-J and Lee, S S (1996) Capsaicin in hot chili pepper: carcinogen, co-carcinogen or anticarcinogen. *Food Chem Toxicol*, 34: 313-316
- 3 Surh, Y-J, Lee, R C-J, Park, K-K, Mayne, S T, Liem, A and Miller, J A (1995) Chemopreventive effects of capsaicin and diallyl sulfide against mutagenesis or tumorigenesis by vinyl carbamate and *N*-nitrosodimethylamine. *Carcinogenesis*, 16: 2467-2471
- 4 Surh, Y-J, Lee, E, and Lee, J-M (1998) Chemoprotective properties of some pungent ingredients present in red pepper and ginger. *Mutat Res*, 402: 259-267
- 5 Park, K-K, Chun, K-S, Yook, J-I, and Surh, Y-J (1998) Lack of tumor promoting activity of capsaicin, a principal pungent ingredient of red pepper, in mouse skin carcinogenesis. *Anticancer Res*, 18: 4201-4206
- 6 Park, K-K and Surh, Y-J (1997) Effects of capsaicin on chemically-induced two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Lett*, 114: 183-184
- 7 Han, S S, Keum, Y-S, Seo, H-J, Chun, K-S, Lee, S S, and Surh, Y-J (2001) Capsaicin suppresses phorbol ester-induced activation of NF- $\kappa$ B/rel and AP-1 transcription factors in mouse skin epidermis. *Cancer Lett*, 164: 119-126
- 8 Kang, H-J, Soh, Y, Kim, M-S, Lee, E-J, Surh, Y-J, Kim, H-R, C, Kim, S-H, and Moon, A (2003) Roles of JNK-1 and p38 in selective induction of apoptosis by capsaicin in *ras*-transformed human breast epithelial cells. *Int J Cancer*, 103: 475-482
- 9 Surh, Y-J (2002) More than spice: capsaicin in hot chili peppers makes tumor cells commit suicide. *J Natl Cancer Inst*, 94: 1263-1265
- 10 Surh, Y-J (2003) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Rev Cancer*, 3: 768-780

香辛料トウガラシ成分のカプサイシンは発がん物質か、共発がん物質か、それとも抗発がん物質か？

ヤン・ジョン ソウル

ソウル国立大学 薬学部（韓国）

刺激性のスパイス食品の摂取は、特に胃腸由来組織において腫瘍を起こす事が示唆されている。カプサイシンは香辛料トウガラシ(*Capsicum annuum* L, Solanaceae)成分の主要な刺激成分で、がんのイニシエーターであると同時にプロモーターとして、もしくは共発がん物質として作用している事が考えられている。たとえば、食餌性のカプサイシンはラットにおける MNNG による胃がんの生成を促進した。実験動物や培養細胞に限定された試験結果ではあるが、これまでの研究では、カプサイシンの弱い造腫瘍性が示されているが、ヒトに対して発がん物質であるという仮説をサポートする確固たる証拠はない。逆に、最近の研究結果は、この刺激性物質が抗変異原や抗発がん物質として作用している可能性が指摘されている。シンガポールで行われた研究によれば、香辛料トウガラシとその構成成分のカプサイシンは胃粘膜の傷害を保護する作用があるようである。興味深いことに、シンガポール在住の中国人では、同国の他の民族集団に較べ潰瘍の発生率が高いが、それは、トウガラシの消費量が比較的低いことに関連しているようにも思える。我々は以前の研究で、カプサイシンは、*N*-nitrosodimethylamine と vinyl carbamate による変異原性と造腫瘍性に対して阻害効果を示し、それはこれらの発がん物質の代謝活性化に関連した肝チトクローム P450 2E1 の抑制によることを示した。またカプサイシンは、前がん状態もしくはトランスフォームした細胞に対して選択的にアポトーシスを誘発する。このように、カプサイシンの遺伝毒性と造腫瘍性に関しては、極めて議論の多いところであり、さらに体系的な評価が必要である。

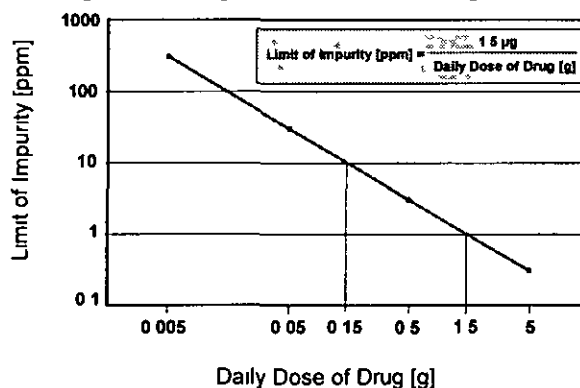
## Impurities, contaminants and genotoxicity: their control by the threshold of toxicological concern (TTC) concept

Lutz Müller

Novartis Pharma AG, Switzerland

Genotoxicity data are elementary for the safety assessment of man-made chemicals. Genotoxicity information is considered important to assess risk for hereditary effects on germ line cells and for carcinogenesis in somatic cells. It is generally accepted that most genotoxicity test results serve well for hazard identification but are not suitable for risk assessment. Risk assessment for carcinogenicity of pharmaceuticals is normally done based on extensive rodent test models that include a lifetime administration of the test compound up to the MTD. While drug substances themselves are normally not genotoxic, their synthesis involves frequently reactive (alkylating) intermediates, reactants and catalysts. Such compounds may reside in the drug substance as impurities/contaminants. While genotoxicity information may be available or can more or less easily be generated on such compounds, carcinogenicity information is usually not available. Hence, an assessment of which levels of such impurities may be acceptable for patients (and human volunteers in clinical trials) normally must be based on limited hazard assessment data. A possibility is offered by the so-called "Threshold of Toxicological Concern (TTC)" concept. The TTC concept is a principle of establishing a human exposure threshold value for chemicals below which there would be no safety concern, even if a compound will not have been subjected to any toxicological testing. The threshold was established based on the analysis of potencies of hundreds of non-genotoxic and genotoxic carcinogens from rodent long-term studies and estimates a daily human intake value for a high probability of not exceeding a  $10^{-6}$  cancer lifetime risk ("virtually safe dose"). The value of the TTC has been set and repeatedly confirmed upon further evaluations at an lifetime exposure of  $1.5 \mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ . This concept is used for regulatory purposes in food safety evaluations by the FDA ("Threshold of regulation") and the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). The concentration limits in ppm of a genotoxic impurity in drug substance derived from the TTC value can be calculated based on the expected dose to the patient. The Figure below shows impurity limits in ppm within a realistic range of daily doses of a hypothetical drug substance from 5 mg to 5 g. It is self-evident that control of specified levels requires that the limits are in a reasonable relation to analytical precision. Deviations from the TTC of  $1.5 \mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$  can be justified with duration of exposure (shorter than lifetime), patient population (pediatric versus adult use), indication (life-saving versus non life-saving). The TTC concept as originally developed for food additives, if agreed upon, can be applied in a variety of contexts, as shown here for impurities in pharmaceutical drug substances.

Figure Translation of the Threshold of Toxicological Concern of  $1.5 \mu\text{g}/\text{day}$  into acceptable ppm levels of "contamination" for daily drug substance intake between 5 mg and 5 g



## 不純物、汚染物質と遺伝毒性 毒物学的な閾値 (TTC) の概念による制御

ルッツ ミューラー

ノバルティス・ファーマ (スイス)

遺伝毒性のデータは、合成化学物質の安全評価の基本となるものである。遺伝毒性に関する情報は、生殖細胞に対する遺伝的影響および体細胞に対する発がん性の危険度を評価するのに重要であると考えられる。ほとんどの遺伝毒性試験の結果は、有害性確認の手段としては有用であるが、リスク評価の手法としてはあまり役立っていないと一般に受け取られている。

医薬品の発がん性リスク評価は通常、その物質をげっ歯類動物に最大耐量で生涯投与する試験結果に基づいて行われている。製剤原体に遺伝毒性がなくても、それらの合成過程では非常に反応性に富む (アルキル化) 中間体、反応物、および触媒が含まれている。そのような化学物質は不純物あるいは汚染物質として製剤原体に存在するかもしれない。これらの化学物質についての遺伝毒性情報は利用可能な場合もあるし、ない場合でも比較的容易な試験を実施してデータを得ることは可能である。しかし、発がん性についての情報は通常利用可能ではない。したがって、そのような不純物の量が患者 (また臨床試験のボランティア) にとって容認できるものかどうかの評価は、限られた有害性評価のデータに基づくしかない。その一つの可能性として、いわゆる「毒物学的な閾値 (TTC)」の概念が提示されている。

TTC の概念とは、仮にある化学物質について毒性試験による評価が全くなされていない場合でも、その化学物質の安全性を考慮しなくてもよいと考えられるヒトへの暴露量の閾値を確立する原理である。この閾値は、げっ歯類動物を用いた長期試験で得られた数百の発がん物質 (遺伝毒性を持つ物質と持たない物質) の強さを分析して確立されたものであり、ヒトの生涯での発がんリスクの確率が 100 万分の 1 を越えないような一日当たりの摂取量 (実質安全量) を推定した値である。TTC 値が設定され、その後も評価を繰り返し、現在は一生涯での暴露が  $15 \mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$  となっている。この概念は、FDA や FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会 (JECFA) において食品安全性評価における規制目的 (規制閾値) で用いられている。TTC 値による製剤原体中の遺伝毒性をもつ不純物の限界濃度 (ppm) は、患者への投与量に基づいて計算できる。一日当たりの投与量が 5mg から 5g までと仮定 (これは現実的な数字である) した医薬品に含まれる不純物の限界濃度は図に示した通りである。もちろんこの濃度で制御するためには分析精度が関連していることは言うまでもない。 $15 \mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$  の TTC 値の偏差は、暴露期間、患者が子供か大人か、使用目的が救命か通常の治療かによって決まってくる。

食品添加物の評価のために開発されてきた TTC の概念は、同意が得られるのであれば、医薬品の製剤原体の中に含まれる不純物に対しても適用することができると考える。