

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全性高度化推進研究事業

既存添加物における遺伝毒性評価のための
戦略構築に関する研究

平成16年度 総括研究報告書

主任研究者 林 真

平成17(2005)年4月

目 次

I. 総括研究報告書	
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……………1	
林 真 (資料)	
別添1 定例会議事録……………18	
別添2 国際コンサルテーション会議報告書(翻訳)……………35	
別添3 国際コンサルテーション会議報告書(原文)……………45	
別添4 報告に対する意見・対応案……………55	
別添6 関連シンポジウム要旨等……………58	
II. 分担研究報告	
1. DNA付加体生成に関する検討……………65	
長尾 美奈子	
2. ほ乳類培養細胞を用いる遺伝子突然変異誘発発生に関する検討……………71	
本間 正充	
3. 化学物質の遺伝毒性における生物学的閾値に関する研究……………78	
太田 敏博, 佐々木 有, 祖父尼俊雄	
4. DNAの酸化的損傷に関する検討……………83	
葛西 宏	
5. アカネ色素のラット腎臓および肝臓における不定期DNA合成試験……………86	
—高濃度単回投与における組織学的影響—	
田中 憲穂	
6. トランスジェニックラットを用いるin vivo遺伝毒性試験に関する研究……………95	
中嶋 圓	
III. 研究成果の観光に関する一覧表……………101	
IV. 研究成果の刊行物・別刷……………102	

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

総括研究報告書

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

主任研究者 林 真（国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部 部長）

赤色 2 号をはじめとするタール系食用色素，アカネ色素，既存添加物であるコウジ酸，アクリルアミド等，食品添加物を始めとする食品関連物質に関する安全に対する関心が高まっている。特に発がん性の問題は，がんが死亡原因の第一位であるように，国民の健康にとって重大な関心事であり，既存添加物の安全性に関しても，最大の懸念は発がん性である。発がん性が認められた場合，その発生機序に遺伝毒性が関与するか否かによって，安全に対する重みが大きく異なるのが現状である。すなわち，発生機序が遺伝毒性である場合には発がん性に対する閾値は存在しないものと見なされる一方，発がん機序が遺伝毒性でない場合には閾値の存在が仮定され，1 日摂取許容量が設定される。遺伝毒性試験の結果を正しく「評価する基準」および「発がん性に繋がる事象か否かを判定するための戦略」が古くから議論されているが，確立されていないのが現状である。戦略確立のため，専門家集団である日本環境変異原学会の協力を得て作業を進めた。昨年度は，この戦略が国際的に通用するよう，海外の専門家を招聘してコンサルテーション会議を昨年度末に開催したが，その報告書に対する我々の返答ならびに対応案を検討・作成した。また，戦略を考える上で重要な位置を占める閾値問題に関して検討を行うと共に，学会等で本主題に関するシンポジウムを開催し，議論を深めた。

戦略構築に必要と考えられるデータの収集を行った。本年度は，コウジ酸について DNA 付加体の形成に関して検討を加えた。また，コウジ酸ならびに食生活において接種する可能性のある癌原物質に対して，その化学物質の予想される 1 日摂取量(/kg/day)を，特定の遺伝毒性試験において，ある一定の遺伝毒性を発現する用量で除した Human Exposure Genotoxic Potency (HEGEP)を考案した。

閾値問題に関しては，DNA 修復能により，標的が暴露されているにもかかわらず遺伝子突然変異が誘発されない用量領域のあることを示す結果を得ることが出来，生物学的な閾値について検討した。

また，最近腎臓における発がん性が問題となったアカネ色素について，その発がん性の作用機序を探るため DNA の酸化的傷害，不定期 DNA 合成，gene mutation 誘発性に関する検討を行った。これらのデータを解析することにより，遺伝毒性評価のための戦略構築にとって有用な情報となることが期待できる。

分担研究者	
長尾美奈子	共立薬科大学 客員教授
葛西 宏	産業医科大学・産業生態 科学研究所 教授
佐々木 有	八戸工業高等専門学校・ 物質工学科 教授
太田 敏博	東京薬科大学・生命科学 部 助教授
田中 憲穂	(財)食品薬品安全センター 秦野研究所遺伝毒性部長
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
中嶋 圓	(財)食品農医薬品安全性 性評価センター・遺伝毒 性グループリーダー
協力研究者	
祖父尼俊雄	元国立医薬品食品衛生研 究所変異遺伝部 部長
能美 健彦	国立医薬品食品衛生研究 所変異遺伝部第二室 室 長
国立医薬品食品衛生研究所・安全情報 部 主任研究官	
宇野 芳文	三菱ウエルファーマ株式 会社研究本部
浅野 哲秀	日東電工株式会社メディ カル事業部安全性試験セ ンター

A. 研究目的

食品添加物をはじめとする食品関連物質の遺伝毒性試験結果を評価し、解釈するための統一的な戦略を構築することを目的とし、戦略構築のために不可欠なデータを新たな試験を実施することにより入手する。なお、構築された戦略を国際的なものとするため、海外の専門家を含

めて議論し、最終結果を国際誌に発表することを最終目的とする。

遺伝毒性に関する試験法は数多く開発されており、手法の技術的な面に関しては国際的なガイドライン等により標準的なものが存在する。しかし、結果の評価、解釈に関しては国際的に合意されたものはもとより、国内で検討されたものも含め、標準となる戦略は確立されていない。従って、本研究において、国内の専門家集団である日本環境変異原学会の協力を得て、戦略を構築することは非常に有意義であり、かつ重要であると考えられる。

研究班全体の活動としては、毎月定例会を開催し、会議方式で意見交換を続けた。その間、昨年度終わりに開催した国際コンサルテーション会議の報告書を翻訳すると共に、質問に対する回答、指摘に対する対応を議論し、報告書に対する返答として送り返した。その後も、海外のコンサルタントとの意見交換は継続している。

戦略を構築する上で、もっとも重要な点の一つは、遺伝毒性の閾値に関する考え方であるとの認識の基、学会のシンポジウムを主催し、意見交換を行った。まず、第31回、日本トキシコロジー学会学術年回（2004年7月6～8日、大阪）において、シンポジウム1「低用量・閾値問題の新展開」と題し、シンポジウムを開催した。本研究班からは林主任研究者が

企画と座長を担当し、祖父尼協力研究者が「化学物質の遺伝毒性における生物学的な閾値」について講演を行った。シンポジウム全体としては、放射線生物学から統計学にわたる幅広い観点から低用量・閾値問題を検討した。さらに、第33回日本環境変異原学会／第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会（2004年11月30日～12月2日、長崎）においては、JEMS/JSAAE合同シンポジウム(1)として、「発がん性と遺伝毒性の閾値—リスクアセスメントにおける問題点—」を林主任研究者が企画すると共に座長を担当した。当研究班からは森田協力研究者、祖父尼協力研究者がそれぞれ「リスクアセスメントにおける遺伝毒性—海外の視点は—」および「遺伝毒性：DNA直接作用物質に閾値は存在するのか?!」と題して講演を行った。

コウジ酸は、麹菌（*Aspergillus* 属）に由来する天然成分であり、抗菌、抗酸化、抗変色作用を有する添加物として食品に用いられてきた。また、メラニン色素形成を抑制する作用があることから、化粧品や医薬部外品にも用いられてきた。

しかしながら、既存添加物の安全性確認作業の一環として実施されてきた安全性試験によって、マウス及びラットにおいて肝臓に対する発がん性が示唆されたことから、その遺伝毒性を否定できないと、また実流通がないため、食品添加物としての使用は禁止されることとなった。

このような状況の下、コウジ酸に関する遺伝毒性試験データの収集を昨年度から開始しているが、本研究では、コウジ酸は *in vivo* で一次的に DNA 傷害を起こすのか否かを明らかにするべく、DNA 付加体生成の有無を、検出感度の高い ^{32}P -ポストラベル法を用いて検討した。これまでに戸塚らにより 2%コウジ酸を含む餌を2週間投与したラットの甲状腺では、Nuclease P1 法によっては付加体が検出されないことが報告されている。Nuclease P1 はある種の DNA 付加体の 3'-末端のリン酸を除去する活性があるため、本実験では、付加体増感法のうち、比活性の高い $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP を用いる ATP deficient 法を採用した。コウジ酸によって変異原性が誘発されるサルモネラ菌およびコウジ酸により小核が誘発され、かつ腫瘍が誘発されることが報告されているマウス肝臓における付加体生成を検討した。

コウジ酸について、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、程度の評価を行った。本年度は、コウジ酸の遺伝毒性の強さの程度を、他の生活関連化学物質と比較するため、同様の遺伝毒性試験を実施し、それらの遺伝毒性の強さを比較すると共に、暴露量から考えたそれら物質の遺伝毒性の相対リスクを比較した。

閾値という概念にはいくつかの定義付けがなされているが、最近生物学的な閾値(biological threshold)という考え方が提唱されている。これは DNA を直接標的とする物質が DNA と直接作

用する場がありながら、最終的な影響（例えば突然変異）の発現に必要なとする全ての生物学的なプロセスが完遂できない（例えば DNA 修復メカニズムにより）低用量域が存在する、という考え方である。本研究では細菌を用いる復帰突然変異試験法で、野生株と DNA 修復欠損株との間での突然変異頻度を比較した。

アカネ色素 (Madder color) は、アカネ科の西洋アカネの根から抽出される色素で、性状としては赤褐色粉末で水、アルコールに溶解し、熱、光に対して非常に安定な物質である。ラットの腎臓における発がん性で問題となっている、アカネ色素の遺伝毒性に関しては *in vitro* 試験の Ames 試験で陽性、Rec-assay においても弱い陽性、*in vivo* 試験のマウス小核試験で陰性、さらにラットを用いた DNA 付加体試験において、腎臓、肝臓、消化管系で付加体が生じたとの報告がある。一方発がん性に関しては F344 系ラットを用いた 16 週間混餌投与の多臓器中期発がん性試験において、腫瘍の誘発促進は認められていないとの報告がある。しかしながら、最近 780 日間の反復投与による発がん性試験では統計学的に有意ではないものの肝臓と腎臓に腫瘍の増加が見られたとの報告がある。DNA 付加体が生じていること、複数の臓器で腫瘍の発生が増加していることから、メカニズムとして遺伝毒性に起因するかを検討するため、DNA の酸化的損傷性、不定期 DNA

合成による DNA 損傷性、およびトランスジェニックラット (Big Blue™ Rat) を用い遺伝子突然変異誘発性の有無を検索した。

B. 研究方法

日本環境変異原学会に「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」臨時委員会と協力し、本研究と合同の定例検討会議を原則として毎月開催した。定例会の課題に応じ、その分野での専門家を招聘し、戦略構築に必要な基礎知識等の蓄積に努めた。また、昨年度の終わりに開催した国際コンサルテーション会議の報告書を翻訳ならびに、海外のコンサルタントとの意見交換を行った。また、関連学会においてシンポジウムを主催し、意見交換と共に本研究で得られた情報の発信を行った。

遺伝毒性の情報収集に関する方法の概略は以下の通りである。詳細に関しては、それぞれの分担研究報告書を参照されたい。

1. 試料に供したコウジ酸：コウジ酸 Lot 番号 5312 (食品添加物用)を用いた。

DNA は①サルモネラ菌 TA100 を対数増殖期後期で集菌し、0.1M 燐酸緩衝液(pH 7.4)のけん濁液にコウジ酸 5 mg/ml を添加後フェノール法で DNA を抽出。②中嶋らが *LacZ* 突然変異検出に供した Muta™Mouse に 3%コウジ酸 (ナガセ生化学工業) を含む餌を 28 日間投与の後 3 日間の発現期間を置いた後、肝臓よ

り DNA をフェノール法により抽出したものを用いた。

ポストラベル法は、Randerath らの ATP deficient 法を用いて検討した。 $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP は 7000Ci/mmol (MP Bio Co.) を cold の ATP で希釈せず用いた。DNA をマイクロコッカルスクレアーゼおよび PDEII で消化し、3'ヌクレオチドを T4 ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、未反応の ^{32}P -ATP を apyrase で分解した後、PEI-セルロース TLC プレート上で展開した後、Kodak X-OMAT を用いてオートラジオグラフィを行った。

さらに、LC/MS/MS 法による付加体の解析に関しては、京都大学工学部 松田知成博士の協力を得て行った。

2. In Vitro チミジンキナーゼ遺伝子突然変異試験は、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子がヘテロであるヒトリンパ芽球細胞株 WTK-1 を用い、TK 遺伝子をターゲットした遺伝子突然変異試験を行った。対数増殖期にある細胞を、被験物質で 4 時間処理し、細胞毒性(Relative Survival; RS)を評価し、その 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。試験に用いた化学物質は、日常生活において食品などを通じて、摂取しているものを中心に選択した (アクリルアミド (ポテトチップス等), AF-2 (保存料, 現在使用禁止), ジメチルニトロサミン (ビール), アクリルアミドとジメチルニトロサミンに関しては代謝活性化を考慮し、

S9 存在下で試験を行った。

3. 生物学的閾値の確認をするため、モデル変異原として、*N*-Ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (ENNG), 2-Nitrofluorene (2-NF), 3-chloro-4-(dichloro-methyl)-5-hydroxy-2(5*H*)-furanone (MX), sodium azide (AZ), *p*-nitro-*o*-phenylenediamine (NPD) および 4-Nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) を用いた。AZ は滅菌水に、他の変異原は dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解させて用いた。

DNA 修復遺伝子の欠損以外については isogenic な菌株セットとし、下記のものを用いた：

(1) *Salmonella typhimurium*

TA1975: *hisG46, rfa*

TA1535: *hisG46, rfa, uvrB*

YG7104: *hisG46, rfa, uvrB, ogt*

(2) *Salmonella typhimurium*

TA1978: *hisD3052, rfa*

TA1538: *hisD3052, rfa, uvrB*

(3) *Escherichia coli*

WP2: *trpE65*

WP2*uvrA*: *trpE65, uvrA*

復帰突然変異試験は定法にしたがって、各用量に 3 枚のプレート (対照群は 4~5 枚) を用いて行った。

4. 国立医薬品食品衛生研究所から提供を受けたアカネ色素 (Lot No. : 040723, 含量 : Ruberythric acid 換算で 16.85%) 並びにデキストリンを試験に用いた。動物は 4 あるいは 6 週齢の雄 Big BlueTM Rat [F344] を Taconic 社 (Germantown, NY : 米国) より購入し、1 週間の検疫・馴化ののち、試験

に用いた。

被験物質添加飼料は基礎飼料にアカネ色素を添加し数分間混和することにより調製した。ただし、本被験物質は粉末状に保つために 30%の割合でデキストリンが添加されていることから、1%混入試料の調製時には 1.2%のデキストリンを添加した。被験物質添加飼料は週 1 回調製し、室温にて保存した。

多臓器中期発がん性試験での試験用量を参考に 5.0%と 1.0%の 2 用量設定し、28 日間の混餌投与を行った。最終投与 3 日後に各個体から腎臓、肝臓および十二指腸を摘出し、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 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene 20 mg/kg を 1 回投与した。ゲノム DNA の抽出、およびゲノム DNA のパッケージングは定法に従った。プラーク数が 400,000 に達するまで上記のパッケージング操作を繰り返した。

結果の解析は、条件付き二項検定 (Kastenbaum and Bowman の推計学的方法：有意水準上側 0.05) を用いて判定した。判定基準は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に陽性と判定するが、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。

5. DNA の酸化的損傷性を検討するため、生体内酸化ストレスマーカーである 8-OH-dG を測定した。DNA は、遺伝子突然変異試験に用いた TG ラットの腎臓を用いて行った。腎臓の一部 (それぞれ約 0.3g) を、細胞溶

解液中でホモジナイズし、細胞核を遠心分離した後、タンパク分解酵素で核膜および核タンパクを破壊し、ヨウ化ナトリウム法により DNA を抽出した。ヌクレアーゼ P_1 及びアルカリフォスファターゼによりヌクレオシドに分解し、HPLC-電気化学検出器を用いて DNA 中の 8-OH-dG を検出定量した。同時に UV 検出器で試料中の dG 量を定量し、DNA 中の 8-OH-dG 量を、 10^6 dG あたりの値として算出した。

6. アカネ色素の不定期 DNA 合成の誘導を多臓器で検討するため、Dimethylnitrosamine (DMN) を用いて処理条件の確定を行った。F-344 系雄性ラット 12 匹を 6 週齢で購入し、400 mg/kg の DMN を単回強制経口あるいは単回腹腔内投与した。各動物は屠殺 30 分前に 18.5 MBq の ^3H -thymidine を静脈内投与し、肝臓および腎臓を採取して 2%パラホルムアルデヒド・2.5%グルタルアルデヒド固定液で固定した。各組織片を電子顕微鏡用 Quetol-651 樹脂に包埋して約 1.5 μm の厚切り切片を作製して、Kodak NTB 乳剤を塗布し、2 週間露出後に Kodak デクトールで現像した。各切片をトルイジンブルー染色し、肝臓では小葉中間帯肝細胞、腎臓では近位尿細管上皮細胞および遠位尿細管上皮細胞の核内グレイン数をそれぞれ 100 細胞カウントした。

アカネ色素高濃度単回投与による影響を調べるため、F-344 系雄性ラ

ット 15 匹を 6 週齢で購入し、2000 および 1000 mg/kg のアカネ色素ならびに 400 mg/kg の DMN を単回強制経口投与した。各動物はペントバルビタールナトリウム麻酔後に放血屠殺して、腎臓および肝臓を採取した。各器官から定法に従って病理組織標本 (HE) 作製して観察するとともに、*in situ* アポトーシス検出キット (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いた TUNEL 法によるアポトーシスの検出を行った。

(倫理面への配慮)

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部で実施された研究で用いたヒトリンパ芽球細胞株 TK6 は ATCC 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。秦野研究所で実施された研究に関しては、動物愛護にかんする 3R の精神に基づき実験が実施された。実験計画は、(財)食品薬品安全センター秦野研究所動物実験倫理委員会により、当該研究計画が動物愛護に基づき倫理上適切であることを確認されたものである。また、(財)食品農医薬品安全性評価センターで実施された研究に関しては、「動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号、平成 11 年 12 月 22 日改正)」、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準 (昭和 55 年 3 月 27 日総理府告示第 6 号、平成 14 年 5 月 28 日一部改正)」および「(財)食品農医薬品安全性評価センター 動物実験に関する指針 (平成 15 年 12 月 1 日)」が順守されており、動物愛護上の配慮が十

分にされた。

C. 研究結果

これまでに行ってきた検討会の議事録を別添 1 に参考資料として添付する。また、昨年度の国際コンサルテーション会議報告書の翻訳を別添 2 に、原文を別添 3、コンサルタントへの返答、対応を別添 4 に示す。また、日本トキシコロジー学会および日本環境変異原学会/日本実験動物実験代替法学会でのシンポジウム概要を別添 5 および 6 に示す。

以下に、コウジ酸ならびにアカネ色素を用いた研究結果の概略を示す。詳細に関してはそれぞれの分担研究報告書を参照されたい。

1. コウジ酸処理したサルモネラ菌に於ける付加体の解析サルモネラ菌 TA100 を 5 mg/ml のコウジ酸と 4 時間インキュベーションした後、DNA を抽出し、DNA 付加体の生成を ATP deficient 法で解析した。3D : 90%で展開したのち、4D : 30, 60, 90%何れの条件でもスポットが観察されたが、対照サンプルにも同様なスポットが検出されたので、コウジ酸の付加体では無いと判定した。マウス肝臓 DNA の付加体生成を検討するため、3%のコウジ酸を含む餌 4 週投与したマウス肝臓の DNA におけるコウジ酸付加体を解析した。解析法はサルモネラ DNA と同じ方法を用いた。3D : 90%で展開後 4D : 60%の条件でいくつかのスポットが検出されたが、対照群のマウ

ス肝 DNA にも同様なスポットが観察された。その他の条件では、付加体と思われるスポットは観察されなかった。以上の結果より、用いた条件下では付加体は検出されなかったと結論した。

2. コウジ酸の細胞毒性、遺伝子突然変異の結果と、アクリルアミド、AF-2、ジメチルニトロサミンの結果を比較した。すべての化学物質は用量依存的に突然変異を誘発した。突然変異を2倍誘発する濃度はコウジ酸 (2.5mg/ml)、アクリルアミド (400ug/ml)、AF-2 (5ug/ml)、ジメチルニトロサミン (0.2ug/ml)と計算できた。

Human Exposure Genotoxic Potency (HEGEP)に関して、Misconceptions about the Causes of Cancer (Gold et al., The Fraser Institute, 2002)から、それぞれの化学物質の1日平均推定摂取量のデータを得た。この値を、突然変異を2倍増加させる値 (MDX2) で割ることにより HEGEP を計算した。

3. アルキル化剤 ENNG では、O⁶-methylguanine methyltransferase (MGT)を欠損した菌株 YG7104 が TA1535 よりもより低い用量で変異コロニーの誘発がみられた。ENNG では、YG7104 が 0.0001~0.03 µg/plate の用量で陰性対照の2~170倍の変異コロニーを誘発したが、TA1535 ではそれらの用量では変異コロニーの誘発はみられず、0.3 µg/plate 以上の用量から対照の2倍

以上の誘発が認められた。MXは塩基に付加体を生じる変異原であるが、WP2uvrAでは0.03~1 µg/plateで陰性対照の4~40倍の変異コロニーを誘発したが、野生株 WP2では1 µg/plate以上の用量から変異コロニーの誘発が認められた。菌体内での代謝でDNAに付加体を生じると考えられているZAにおいても、TA1535がTA1975よりもより低い用量で変異コロニーの誘発が認められた。フレームシフト変異を誘発する2-NFについて、ヌクレオチド除去修復欠損株 TA1538株では0.03 µg/plate以上の用量で変異コロニーを誘発したが、野生株 TA1978株では1 µg/plate以上の用量から変異コロニーの誘発が認められた。4-NQOによって誘発されるフレームシフト変異についても、TA1538がTA1978よりもより低い用量で変異コロニーの誘発が認められた。NPDも同様に、TA1538がTA1978よりもより低い用量で変異コロニーの誘発が認められた。

4. DNA中の8-OH-dG量は、10⁶ dGあたり次のようになった。陰性対照 1.22 ± 0.06, アカネ色素 1.0(wt%)投与群 3.74 ± 0.76, 5.0(wt%)投与群 2.14 ± 0.08。いずれも、平均値 ± 標準誤差, n=6。アカネ色素投与群の値は、陰性対照に比べ有意に高かった (t検定, p<0.05)。
5. 肝臓におけるDMNの処理条件の検討では、経口投与2および4時間後に比べ、投与6時間で核内のグレイン数が減少した。腹腔内投与では、

ややばらつきがあるものの傾向に差は認められなかった。腎臓に関しては近位尿細管上皮細胞および遠位尿細管上皮細胞ともに投与 2 時間後が 4 時間および 6 時間に比べ高値を示した。腹腔内投与では、経口投与に比べ低値を示す傾向があった。

腎臓におけるアカネ色素高濃度単回投与による影響は、2000 mg/kg 投与群の 6 および 3 時間の全例、1000 mg/kg 投与群の投与 3 時間の 1 例で、DMN 400 mg/kg 投与群の 2 例において、皮質内帯すなわち皮髄境界部の近位尿細管上皮細胞において、核の大小不同が認められた。肝臓では、2000 mg/kg 投与群の投与 3 時間後の 1 例に単細胞壊死が観察された以外、変化は認められなかった。

TUNEL 法によるアポトーシスを検討した結果、2000 mg/kg 投与群の投与 3 時間後の 2 例に軽度の増加が、DMN 400 mg/kg 投与群に軽度から中等度の増加が認められた。

6. 各群の肝臓における *cH* 遺伝子の突然変は、陰性対照群においては総ブランク数 2,779,200 の内、変異ブランクが 50 出現し、その突然変異頻度は 18.0×10^{-6} であった。一方、アカネ色素処理群での突然変異頻度陰性対照群と比較していずれの投与群とも統計学的に有意な増加は認められなかった。陽性対照群の突然変異頻度は 78.2×10^{-6} に増加しており、媒体対照群に比べて統計学的に有意 ($p < 0.01$) な増加が認められた。

D. 健康危険情報

本研究は遺伝毒性の評価と解釈に関する戦略を構築しようとするもので、健康危険情報を報告しなければいけないようなデータはない。

E. 考察

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、すなわち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と考えてきた。

昨年度末に開催した国際コンサルテーション会議の参加者から、報告書として、我々の本プロジェクトに対しての意見、提言が寄せられた。報告書の要旨を以下に示す：

「我々コンサルタントは本ワークショ

ップを、日本のある種の食品中に発酵生産物として自然状態でも含まれ、また、過去において甲殻類の褐変防止を目的に食品添加物として用いられていたコウジ酸をモデル化合物とし、それに関する多くの実験データの評価を行うことから始めた。このテストケースに関する作業を通じて、食品および食品関連物質で提起されるリスク評価に関しての戦略を立てるための一助とした。コウジ酸は *in vitro* および *in vivo* における多種類の遺伝毒性試験がなされ、異なった結果が得られており結論づけることは難しいが、遺伝毒性を疑わせるような証拠があり、また現在食品添加物としての使用実績がない事などから、日本における食品添加物としての使用が禁止された。高濃度のコウジ酸を含む飼料を与えられたマウスは甲状腺および肝臓に腫瘍を生じる。遺伝毒性試験でコウジ酸が陽性になる事を考慮すると、腫瘍形成のイニシエーションに遺伝毒性が関与している事が懸念された」。

また、主な提言は：

- i) DNA 付加体形成を含む *in vivo*, *in vitro* の遺伝毒性メカニズムについて検討すること。
- ii) *In vivo* の結果を解釈する一助とするため、ADME とトキシコキネティックに関するパラメータ類、特に種間差の説明、代謝の役割、そして、コウジ酸とその代謝物類の標的組織の暴露証明について検討すること。
- iii) 骨髄小核試験とコメット試験の *in vivo* での陽性結果は、コウジ酸が遺伝毒性物質として決定付けられるキ

ーポイントであるが、我々は、ここで用いられた試験プロトコールの幾つかは矛盾した結果を導き、解釈に困難をもたらした可能性がある事を述べた。ラット小核試験では成熟動物を用いて再試験を実施すべきであり、コメット試験では単離核でなく単離細胞を用い、また、テール長よりもテールモーメントを測定する事を推奨する。

- iv) 我々は p53 マウスの試験は用いた動物数が少ない事や感染を示唆する炎症細胞の大量の壊死/浸潤が見られたことにより、試験自体に問題があると考え、現時点で受け入れ可能なプロトコールを用いて新しい試験を実施することを推奨する。
 - v) 新しく行われる全ての試験は、マイコトキシンの汚染のない、純度の高い検体を用いて実施するべきである。
 - vi) コウジ酸によるマウスの甲状腺腫瘍誘発が、非遺伝毒性的な事象としておそらく説明可能であると考えることが出来ると共に、肝腫瘍の誘発に関しても同様な説明が可能であろうと考える。観察された肝腫瘍が悪性癌腫を含むかどうか不明確である。悪性腫瘍が実際に誘発されたかどうかを確定するために、生データ、病理専門家の報告などについて再検討（スライドの再観察を含む）することを推奨する。
 - vii) 理想的には生涯投与によるラットを用いる発がん性試験がなされるべきであろう。
- 等、多くの提言、推奨がなされた。さら

に、「閾値と“強さ”を考慮することは、避けることのできない遺伝毒性物質の規制に意味がある。ある試験は他の試験よりもより重みがある。最終的なリスク評価を可能にするには、*in vitro* で陽性結果を示した化合物のフォローアップ *in vivo* 試験を注意深く選択することが重要である。」と、結ばれている。

定例の例会でこれらの提言が検討され、実施可能なものに関しては、実際の実験も含め、今後検討していくとした。また、報告書に対する返答書を長尾委員を中心に作成し、海外のコンサルタントに返送した。その後も意見交換が続いている。

最終目標である、論文の作成に向けて、定例会で閾値問題を含めて議論を進めている。将来的に作成する position paper は general なものとし、以下のような項目またはキーワードを含む：目的、用語の定義、avoidable vs unavoidable、試験の質の評価、試験の組み合わせ、試験結果の評価、weight of evidence、volume vs quality (データの量 vs 質)、*in vitro* vs *in vivo*、animal vs human、threshold、risk assessment。これらの項目またはキーワードにつき、現状認識および将来展望について意見交換を行った。特に、規制の根拠となる試験データの質を如何に保証するかについて活発に討論され、以下のような意見が出された：規制の根拠となるデータの質はガイドラインと GLP で保証されるべき；質が保証できないデータは参考扱いとしてはどうか；データの質を確認するため、実験データの peer

review を学会レベルでできないか；機関によって矛盾するデータが得られた場合は、第三者機関(GLP 施設)に被験物質を blind で評価させて決着してはどうか；質の悪い多数のデータよりも質の良い少数のデータの方が規制の根拠としては有用、等の意見を基に議論がなされている。Position paper を仕上げていくのに際して、具体例であるコウジ酸についての再評価を行った。今まで得られたデータにつき宇野委員より説明がり、コウジ酸は高濃度・高用量域ではあるが、*in vitro* では陽性、*in vivo* では臓器によって陽性（マウス肝小核、ラット骨髄小核）または陰性（マウス骨髄小核、マウス肝遺伝子突然変異、ラット肝小核）と結論された。この事例を参考にして戦略に関する討論を行い、以下のような意見が出された（多くは遺伝毒性に閾値があると仮定した場合の意見）：コウジ酸のヒトおよび動物の暴露量（TK、臓器中濃度）が分からない現状では安全域の議論ができないではないか（データを採るべき）；コウジ酸はこれだけ多くのデータがあるから議論できるが、実際の食品添加物で特に既存のものは殆どデータがなく、これらをどう評価するかが問題；これらの安全性を無影響量との安全域で考えることはできないか；遺伝毒性のあるものは通常の種差 10 倍×個体差 10 倍に更なる安全係数を掛けて ADI を算出することはできないか；データが十分にそろっていない場合は大きな安全係数を掛けておき、陰性データが出てくる都度安全係数を

減らしていくことはできないか
(注)；これらのことを裏付ける理論構築ができないか、既存の化合物を用いてケーススタディをしてはどうか；*in vitro* 試験の上限濃度をヒトの暴露量を考慮してもっと低くすることはできないか（例えば安全性薬理の *in vitro* 試験では経験的に 100 μ M を上限として実施：それ以上は非生理的な条件と言われている）。

(注：具体例としては、従来行われている一般毒性試験で得られた NOEL の 1/100 (種差×個人差) に、さらに 1/100 (遺伝毒性(10)×発がん性(10)) を掛けた値を求める。遺伝毒性試験および発がん性試験のデータがない場合にはこの数値を用いる。もしそれぞれの試験結果が提出され、いずれも明らかな陽性の結果であれば、いずれもそのまま 10 の数値を残し、いずれも問題のない陰性結果の場合には、それぞれを 1 とする。さらに、それぞれの陽性結果の内容、例えば高用量のみでの陽性やマージナルな陽性等を考慮して、係数を 5 ~2 に低減させる。)

閾値問題に関しては、生物学的閾値、実用的閾値、と言う考え方を導入し、考察を進めている。本年度も、祖父尼協力研究者を中心に議論を展開し、日本トキシコロジー学会および日本環境変異原学会/日本動物実験代替法学会合同学術大会のシンポジウムで講演を行った。議論の要旨は『遺伝毒性には閾値が存在しないという考え方がこれまで一般的に受け

入れられてきたが、近年 DNA を直接標的としない物質、例えば細胞分裂阻害剤や DNA 合成阻害剤など、DNA 以外の酵素や蛋白などへの影響によってもたらされる遺伝毒性には閾値が存在するとの考え方が国際的にも急速に受け入れられてきている。一方、DNA を直接標的とする物質には閾値が存在しないという考え方は依然として広く浸透しており、化学物質の安全性評価においてもこの考え方が支配的な状態にあるといえる。

閾値という概念にはいくつかの定義付けがなされているが、生物学的な閾値 (biological threshold) という考え方が提唱されている。これは DNA を直接標的とする物質が DNA と直接作用する場がありながら、最終的な影響（例えば突然変異）の発現に必要とする全ての生物学的なプロセスが完遂できない（例えば修復メカニズムにより）低用量域が存在する、という考え方である。実際にそのような生物学的な閾値の存在を示唆するデータが示され始めている。』

コウジ酸ならびにアカネ色素に関する遺伝毒性試験に関する考察の詳細は、各分担研究報告書を参照されたい。概要を以下に示す。

1. 32 P-ポストラベル法は、極めて感度の高い DNA 付加体検出法である。これまでに、戸塚らは、コウジ酸を投与したラットの甲状腺における DNA 付加体を Nuclease P1 法により解析し、DNA 付加体が検出されなかったことを報告している。本研究では、手法としては煩雑であるが、より適用範囲の広い ATP deficient 法を用いた。また、

TLC お展開条件も 9 通りを用いた。サルモネラ菌 DNA およびマウス肝 DNA 何れの場合も、スポットは検出されたが、コウジ酸処理群に特異的なスポットは検出されなかった。すなわち用いた実験条件下では、コウジ酸の DNA 付加体は検出されなかった。以上の結果からは、コウジ酸がマウス肝臓で DNA 付加体を形成しているか否かについて結論を得ることが出来なかった。さらに、種々の異なった ^{32}P -ポストラベル法を種々の条件下で検討するのも一つのアプローチであるが、本研究では、マウス肝 DNA を酵素分解し、得られたヌクレオシドを LC/MS/MS で網羅的に分析することを試みた。コウジ酸処理群で特異的に検出される分子イオンの存在の有無を検討した。予備実験の結果、複数のイオンピークが検出された。これらのピークがコウジ酸処理群に特異的であるか否かを、複数の処理群および対照群のマウス肝臓の DNA を用いて現在検討中である。

2. コウジ酸の HERP と HEGEP はアクリルアミド、AF-2、ジメチルニトロサミンと比較してもかなり低いことから、日常的にみそや醤油から摂取しうるコウジ酸の遺伝毒性リスクは、ポテトチップス等からのアクリルアミド、ビール等からのジメチルニトロサミンよりずっと低いものと考えられる。AF-2 は昭和 50 年に禁止された保存料で、遺伝毒性が強く、発がん性が疑われたことから使用が禁止になった化学物質である。HERP はアクリルアミド、ジメチルニトロサミンより低いが、

HEGEP はそれらの 10 倍程度あり、遺伝毒性が過度に評価された。齧歯類動物による発がん性試験は、必ずしも人への発がん性を反映するものではないため、このように HERP と HEGEP の両者の比較により、人に対するより慎重なリスク評価が可能になるものと考えられる。

3. DNA 修復欠損株で明らかに変異コロニーを誘発する用量、つまり DNA の障害により突然変異が生じうる用量においても、正常な DNA 修復能をもつ株では変異コロニーの誘発が認められておらず、生物学的な閾値が存在することを示唆している。今後、このような考え方が細菌のみならず、他の生物種に拡大できる可能性について検討する必要があると考えられる。

4. アカネ色素の投与によって腎臓 DNA 中の 8-OH-dG 量が陰性対照に比べて有意に増えていることから、アカネ色素の 28 日間経口摂取により、生体内酸化ストレスが亢進し、腎臓 DNA に酸化的傷害が起こったと考えられる。アカネ色素がラットの腎臓に対して発がん性を示すことが報告され、その腎臓発がんにはアカネ色素の腎傷害性やイニシエーション作用も関与している可能性が示唆されているが、今回の結果を合わせて考えると、腎臓での酸化ストレス亢進が、その一要因となっている可能性がある。アカネ色素 1% 含有餌の方が 5% 含有餌よりも 8-OH-dG 増加量が多かったが、これは 1% 餌の方が生体内酸素濃度との比率からフリーラジカルを生じ易かったためと考

えられる。臓器 DNA 中 8-OH-dG のみならずラット、マウス尿中 8-OH-dG および塩基 8-OH-Gua の測定が可能となっており、今後食品添加物による酸化 DNA 損傷の誘発、あるいは抗酸化物質によるその抑制を調べる上で有用と考えられる。

5. アカネ色素のラット腎臓における発がんメカニズム探索の一環として、ラット肝臓と腎臓の *in vivo* UDS 試験の最適条件設定の試験を実施した。(陽性対照の Dimethylnitrosamine(DMN)を用いて UDS 試験を実施したところ、DMN は経口投与では投与 2 時間で腎臓での UDS が最も高く、4-6 時間で取り込みは減少した。また、アカネ色素の高濃度単回投与による肝臓、腎臓での組織学的な毒性発現を調べたところ、1000mg/kg および 2000mg/kg 単回経口投与により、投与後 3-6 時間で腎臓の近位尿細管上皮細胞において、核の大小不同が観察された。一方、肝臓では 2000mg/kg 投与 3 時間後の 1 例において、単細胞壊死が観察され、アポトーシスの誘導が認められた。以上の結果より、腎臓がアカネ色素の標的臓器になっている事が強く示唆された。

6. アカネ色素について細菌を用いた復帰突然変異試験 (Ames 試験) および枯草菌を用いた DNA 修復試験 (Rec assay) で陰性あるいは陽性等、合い異なる結果が報告されているが、*in vitro* の遺伝毒性試験として総合的には陽性と判断されている。*In vivo* 試験の場合、マウス小核試験で陰性であったが、ラットを用いた DNA 付加体試験におい

て、腎臓、肝臓、消化管系で付加体が生じたとの報告がある。アカネ色素投与群では 1.0 および 5.0%群のいずれにおいても遺伝子突然変異頻度の統計学的に有意な増加は認められなかった。本被験物質のアカネ色素は混餌投与において腎臓並びに肝臓に腫瘍を誘発することが確認されているが、本結果から肝臓での発がんは遺伝毒性に起因しているとのデータは得られなかった。一方、厚生労働科学研究費補助金 (厚生労働科学特別研究事業) のトランスジェニックラットを用いたアカネ色素の発がん標的臓器における遺伝毒性に関する研究 (主任研究者: 広瀬雅雄 (国立医薬品食品衛生研究所)) において、本研究で使用したラットの腎臓について同様の遺伝子突然変異の解析を実施した。腎臓については遺伝子突然変異の統計学的に有意な増加が認められ、発がんとの関連が示唆されている。

F. 結論

食品関連物質の遺伝毒性の評価、解釈をするための戦略を構築するため、日本環境変異原学会の臨時作業委員会と共同し、定例の班会議を原則として毎月開催し、研究班の統一的な考え方について検討を続けた。また、昨年度末の国際コンサルテーション会議の報告書を検討し、海外の指導的立場にある研究者と議論を行っている。閾値論に関しては、生物学的閾値に関する考えを取り込み、現実面での閾値について検討中である。

コウジ酸はサルモネラ菌に対し変異原性を、マウスに対し強制経口投与により肝小核を誘発したが、マウス肝に対し発がんイニシエーション活性は検出されていない。DNA 付加体の生成を、³²P-ポストラベル法—其中で感度が高く、適用範囲の広い ATP deficient 法を用いて検討したが、用いた実験条件下では DNA 付加体は検出されなかった。LC/MS/MS でさらに検討している。

ヒト培養細胞に対してコウジ酸が突然変異を 2 倍増加させる濃度は 2.5mg/ml であり、他の生活化学物質に比較して、その遺伝毒性の程度は低い。

1 日平均摂取量をを考慮した、遺伝毒性のリスク Human Exposure Genotoxic Potency (HEGEP)も他の物質に比べて遙かに低く、日常生活におけるコウジ酸の遺伝毒性リスクはほとんど無視できるものと考えられる。遺伝毒性のリスクを絶対的数値化によって評価することは困難であるが、他の化学物質との相対リスクを評価することは可能である。日常的に避けられない発がん物質とのリスクの比較は、新たな発がん危険因子を許容できるか、否かを判断する上で、わかりやすい指標になるものと考えられる。

DNA を直接標的とする変異原物質について細菌を用いる復帰突然変異試験で、DNA 修復能の有無による突然変異誘発の違いを調べた。DNA 修復欠損株で明らかに変異コロニーを誘発する用量においても DNA 修復能をもつ野生株では変異コロニーの誘発が認められおらず、生物学的な閾値が存在する

と考えられる。

アカネ色素を含む餌 28 日間投与によりラット腎臓 DNA に酸化的傷害がみられた。発がん性との関連が示唆され、さらに詳細な検討が必要である。

アカネ色素の高濃度単回投与による肝臓、腎臓での組織学的な毒性発現を調べたところ、1000mg/kg および 2000mg/kg 単回経口投与により、投与後 3~6 時間で腎臓の近位尿細管上皮細胞において、核の大小不同が観察された。一方、肝臓では 2000mg/kg 投与 3 時間後の 1 例において、単細胞壊死が観察され、アポトーシスの誘導が認められた。

アカネ色素を 28 日間混餌投与した結果、ラット肝臓に対して遺伝子突然変異を誘発しないものと判断した。ただし、腎臓に関しては遺伝子突然変異誘発の結果が得られている。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Homa, M., M. Izumi, Y. Sakurada, S. Tadokoro, H. Sakamoto, W. Wang, F. Yatgai, and M. Hayashi (2003) Deletion, rearrangement, and gene conversion; genetic consequences of chromosomal double-strand breaks in human cells, *Environ. Mol. Mutagen.*, 42, 288-298.
- 2) Itoh, T., T. Kuwahara, T. Suzuki, M. Hayashi, and Y. Ohnishi (2003) Regional mutagenicity of heterocyclic amines in the intestine: mutation analysis of the *cII* gene in lambda/*lacZ* transgenic mice,

- Mutat. Res., 539, 99-108.
- 3) Yamada, K., T. Suzuki, A. Kohara, M. Hayashi, T. Mizutani, and K. Sacki (2004) In vivo mutagenicity of benzo[*f*]quinoline, benzo[*h*]quinoline, and 1,7-phenanthroline using the *lacZ* transgenic mice, Mutat. Res., 559, 83-95.
 - 4) Zang, Li, H. Sakamoto, M. Sakuraba, D-S Wu, L-S Zhang, T. Suzuki, M. Hayashi, M. Honma (2004) Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells, Mutat. Res., 557, 1-6.
 - 5) Suzuki, H., T. Shirotori, and M. Hayashi (2004) A liver micronucleus assay using young rats exposed to diethylnitrosamine: methodological establishment and evaluation, Cytogenet. Genome. Res., 104, 299-303.
 - 6) 林真, 長尾美奈子, 祖父尼俊雄, 森田健, 能美健彦, 本間正充, 宇野芳文, 葛西宏, 佐々木有, 太田敏博, 田中憲穂, 中嶋圓, 布柴達夫 (2004) 食品および食品添加物に関する遺伝毒性の検出・評価・解釈に関する臨時委員会の活動中間報告, Environ. Mutagen Res., 26, 275-283.
2. 学会発表
- 1) M. Hayashi: Newly development of in vivo micronucleus assay. ASIATOX III, Chiang Mai, 2004.
 - 2) M. Hayashi: Strategy for safety assessment of food and related chemicals based on genotoxicity assay data. International Symposium on Risk Assessment Strategy in Genotoxicity of Food and Related Substances, Tokyo, 2004.
 - 3) M. Hayashi: Regulatory perspective on data gaps in Japan, HESI Workshop on DNA Adducts: Biological Consequences and Application to Risk Assessment, Washington DC, 2004.
 - 4) 林 真: げっ歯類を用いる小核試験の基礎研究ならびにその行政面への応用, 第 33 回日本環境変異原学会, 長崎, 2004.
 - 5) 鈴木孝昌, パラニサミー・ラジャグル, 小原有弘, 本間正充, 林真, 高木篤也, 菅野純, 山口照英 GeneChip による遺伝子発現解析を用いてアリストロキア酸による遺伝子傷害の臓器特異性を予測可能か 第 63 回日本癌学会総会 (2004.9)
 - 6) 小山直己, 坂本浩子, 桜庭真弓, 小泉朋子, 桜庭真弓, 高島良生, 林真, 松藤寛, 山形一雄, 本間正充 ヒトリンパ球芽細胞株 TK6 を用いたアクリルアミドの in vitro 遺伝毒性誘発機構の解析 日本環境変異原学会第 33 回大会 (2004.11)
 - 7) 欒 洋, パラニサミー・ラジャグル, 本間正充, 林 真, 鈴木孝昌 ヒト細胞における遺伝毒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 33 回大会 (2004.11)
 - 8) 本間正充, 桜庭真弓, 小泉朋子, 高島良生, 坂本浩子, 林 真 ヒトゲノム中に生じた DNA2 本鎖切

- | | |
|--|--|
| 断の運命 第 47 回日本放射線影響学会 (2004.11) | human cells. Environmental Mutagen Society 35 th Annual Meeting (2004.10) |
| 9) 高島良生, 桜庭真弓, 小泉朋子, 坂本浩子, 林 真, 本間正充 ヒト細胞における DNA2 本鎖切断修復の細胞周期依存性 第 47 回日本放射線影響学会 (2004.11) | H. 知的所有権の取得状況 |
| 10) 桜庭真弓, 本間正充, 小泉朋子, 高島良生, 坂本浩子, 林 真 ヒトゲノム中に生じた DNA2 本鎖切断の運命 第 27 回日本分子生物学会 (2004.12) | 1. 特許取得
なし |
| 11) Honma, M., Sakuraba, M., Koizumi, T., and Hayashi, M. The fate of chromosomal double strand break in | 2. 実用新案登録
なし |
| | 3. その他
なし |

別 添 1

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 14 回検討会議事録

2004 年 4 月 22 日 14:00～17:00
インダストリアルホール 1F 中会議室

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

1. 第 13 回検討会議事録について
議事録（案）を承認し，最終化した。
2. 平成 15 年度の報告書について
若干のバグはあるものの総括報告書を製本化した。国会図書館にも所蔵されるものであるので，公開されたものとして扱って良いものとする。
3. コウジ酸に関する新しいデータの紹介
佐々木委員から成熟マウスおよび成熟ラットの再生肝での小核試験結果の報告がなされた。マウスは最高用量（1 g/kg）で陽性の反応を再現したが，ラットでは陰性の結果であった。
また，末梢血を用いた小核試験では成熟ラットでは最高用量(1g/kg)，48 時間後に統計学的に有意な小核の誘発が認められたが，成熟マウスでは陰性であることが確認された。
以上の結果から次の 2 点が浮き彫りになった。
 - a. 三森先生の実験結果では，コウジ酸はマウス肝二段階発がんイニシエーション活性を示さなかったとのことであるが，どのように評価するのかが，重要な問題点である。
 - b. Toxicokinetics を検討する必要性が決定的になった。
4. Kamakura Report について