

Dr. Kirkland から最終版となったコンサルタント全員による Kamakura Report が事前に配布された。

Recommendation については回答したほうがよいとの意見が出され、その方向で検討することとなった（中嶋、長尾委員）。

全文翻訳してはとの意見が出され（林委員）、田中、中嶋、佐々木、宇野、森田の5委員で分担して和訳することとした。翻訳版の Review ならびに用語の統一等は林、本間委員が担当する。次回の検討会において議論したいことから連休明けには翻訳を終えるものとする。

Report の内容に評価が不適切な点があることが指摘され（長尾委員）委員会で検討すべきであるとの意見が出され、事実誤認、等に関しては早急にレスポンスすることとした。

翻訳担当者は当該部分の内容についても検討し、問題点をまとめて、議論のたたき台とする。

次回の臨時委員会でコンサルタントへの質問および意見としてまとめることとした。

遺伝毒性発がん物質を検出するための p53 マウスヘテロおよび野生型マウスを用いた試験は、肝発がんでは遺伝毒性発がん物質に対し、ヘテロマウスが野生型に比べて高感受性ではないという情報があるので、十分調査すべきである、との指摘があり（長尾）、次回の会合でがんの専門家に現在の知見を紹介してもらうこととした。

次回、がんの専門家として三森先生をお招きし、お話を伺うこととした。可能性を林委員が問い合わせることとなった。

→ 4月23日の林委員長からのメールにより、国立衛研病理部長の広瀬先生においていただくことになった。

浸透圧には Osmolality および Osmolarity があり、浸透圧計で測定できるのは osmolality であり、これは molal concentration に比例するものであること、遺伝毒性検出の際の「最高濃度 10 mM」の設定には、浸透圧は関与していないことを当委員会でも十分理解しておくべきであるとの発言があった（長尾委員）。

5. 長尾委員執筆の環境変異原研究投稿用の原稿について

表題から“遺伝毒性発がん性が示唆されているコウジ酸を例に”の副題をはずす。
その他、祖父尼、田中委員から文言についていくつか修正すべき点が指摘された。
→ 上記の各指摘を踏まえ、長尾委員が修正することとした。

6. 2004年のトキシコロジー学会シンポジウムについて

閾値に関するシンポジウムを林委員長が引き受け、祖父尼委員に本委員会の紹介

も含めて DNA 修復と閾値問題について講演予定である(講演要旨の配布有り)(林委員).

本間委員から、変異原性に関わる閾値の有無について意見が述べられた。野生型と修復欠損株の、遺伝毒性化学物質の用量に対する応答のモードの実験データからは、閾値が無いことを示すという考えが紹介された。

7. 2004 年の日本環境変異原学会・日本動物実験代替法学会合同シンポジウムにおいて、林委員が閾値問題のシンポジウムのオルガナイザーを頼まれたとの紹介があり、内容、演者とうについて意見が求められた。林委員が長めの導入講演を行い、出来るだけ若い方に実データに基づいた話をしてもらうのがよいのでは、との意見が出された。確立論に関しては京都大学の森大森氏、また、フローサイトメトリー法を用いて *in vivo* 小核試験の感度を非常に高めたときの話を米国 Litron の Dr. Dertinger をお願いしてはどうかとの意見が出た。

8. 2004 年度の計画について

Kamakura Report の recommendation に対する対応。

コウジ酸について追加実験を行う。

次のモデル化合物の策定(赤色 2 号が候補)。

発がん性に関する専門家とのジョイントシンポジウム開催の検討。

9. その他

次回(15回)は5月27日(金)を予定。

ご講演いただく予定の広瀬先生への質問も考えておくこと。

文責：中嶋 圓

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 15 回検討会議事録（改訂案）

2004 年 5 月 27 日 14:00～16:40
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，中嶋，林，本間，森田（議事録）
欠席：太田，宇野，葛西，布柴，能美，佐々木

1. 前回議事録の確認

前回議事録の確認を行い、特に問題はなく承認された。前回議事録担当の中嶋委員より、最終版を全委員にメールで配布することとした。

2. 広瀬雅雄先生講演「コウジ酸の発がん性に関する諸問題」

コウジ酸の発がん関連試験を実施されている広瀬先生（国立医薬品食品衛生研究所病理部）を招き、表記講演をしていただいた（資料 1）。コウジ酸によるマウスの甲状腺腫瘍ならびに肝腫瘍の誘発について、その発端となったがん原性試験の詳細や、一連の甲状腺腫瘍発現のメカニズム試験、肝腫瘍誘発性検討のための p53+/-マウス試験や中期発がん試験の詳細が話された。試験結果から導かれる結論としては、□甲状腺腫瘍は、ヨウ素の取込みと有機化の阻害に起因しておりイニシエーション活性は認められなかったこと、□肝発がん性に関しては、細胞毒性と細胞増殖が主要な要因と考えられるが、遺伝毒性も完全には排除できないこと、が報告された。貴重な意見を伺うことができ種々の議論がなされた。プレゼンテーションおよび議論のポイントを以下にまとめる：

- 1) Fujimoto らの試験で hepatoma と記載されているものは、カルシノーマだけではなくアデノーマも多かったとのことであるが、確認はされていない。これらを詳細に分類しても発がん性評価には意味がない。Peer-review の実施は困難であるし、やったにしてもデータの評価には影響しないであろう。また、当該施設におけるマウスの背景データはないであろう。
- 2) 甲状腺における DNA 付加体は 9 種類の溶媒系および ODS-TLC で認められなかったが、「当該実験条件下で」ということであり、本当に付加体できていないことは証明されていない。細菌をコウジ酸で処理し、付加体計測の条件設

定を行い、これを陽性対照に用いるなど、種々の工夫が必要であろう。

- 3) p53+/-マウスが遺伝毒性肝発がん物質を検出する試験系としての有効性、特性に関しては、まだ十分なバリデーションがなされていない。なお、p53+/-マウス試験の動物にはウイルス感染が認められ、以降、動物の入手は不可能となり再現性は確認できない。
- 4) マウス、ラットともにコウジ酸による肝臓への影響がみられる。
- 5) ラット肝では、コレステリン様針状結晶の沈着が認められ、コウジ酸関連物質の沈着による物理的刺激に起因する腫瘍誘発も考えられる。

3. 鎌倉コンサルテーション会議録の翻訳

本会議録の内容および翻訳（資料2）について、今後の対応を議論した。コウジ酸の *in vitro* 変異原性に関するこれまでの内外の報告は、陰性および陽性がともに複数存在し、明確ではなかった。そこで、我々はこの問題に決着をつける目的で細菌、TK6 細胞、WTK-1 細胞を用いて、突然変異、コメットおよび小核誘発性を新たに検討し、すべて陽性であることを鎌倉会議で提示した。コンサルタントの中にも *in vitro* 遺伝毒性陰性を報告している研究者がいるので、この矛盾の原因を迫及しないとストラテジー確立に到達できないので、この点を解決すべきであるという議論がなされた。そこで、まず我々が行った各試験実施の目的/背景/必要性について、試験実施者が改めて明確にまとめることとした。

肝における TSH のプロモーション作用については疑問がもたれ、引用文献 (Capen C. C., *et al*, 1991, *Endocrine System*, in *Handbook of Toxicologic Pathology*, Academic Press, pp 675-760 および Gopinath C., *et al*, 1987, *The Endocrine Glands*, in *Atlas of Experimental Toxicological Pathology*, MTP Press Limited, pp 104-121) の送付を依頼することとした。

また、翻訳担当者は、それぞれの翻訳箇所についてのコメントを中心となって提出することとした。コメントは6月8日を目処に委員全員に提示し、次回会合でコンサルタントへのレスポンスならびに翻訳版の最終化をすることとした。

4. その他

次回（16回）は6月16か17日が有力だが未定。

文責：森田 健

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16回検討会議事録

2004年6月17日 14:00～17:20
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，中嶋，林，能美，森田，本間（議事録）
欠席：太田，宇野，葛西，布柴，佐々木

1. 前回議事録の確認

前回議事録の確認を行い、特に問題はなく承認された。最終版が全委員にメールで配布された。

2. 祖父尼委員の日本トキシコロジー学会での発表

7月6日～8日に名古屋で開催される日本トキシコロジー学会のシンポジウム「低用量・閾値問題の新展開」において、祖父尼委員が「化学物質の遺伝毒性における生物学的な閾値」というタイトルで発表を行うが、発表の予行練習を兼ねてこの問題を論議した。

特定の遺伝的損傷は、低レベルであれば細胞のもつ修復システムによって完全に修復されるという前提の基に、生物学的無影響レベルと、化学物質による誘発突然変異頻度が陰性対照と同等となる用量レベルから”Spontaneous Equivalent concentration Level (SEL)”を遺伝毒性の閾値とする考え方である。

発表内容に関しては

- 修復システムだけでなく、損傷回避システムも重要である。
- まとめとして、考え方を visualize するようなスライドを追加する。

意見が出された。

また、今後このような考え方をほ乳類細胞（動物）に適用するには、DNA 修復欠損細胞(動物)の利用が重要であるとの意見が出された。

3. 鎌倉会議でのコンサルテーションへの対応

鎌倉コンサルテーション会議録の翻訳が完成したのを受けて、各担当部分に対するコメントを出すことになっているが、まだ全員からコメントが提出されていない。

最終的にはコンサルテーションメンバーへの意見であるため、英語のコメントを作成する。佐々木委員の分に関しては林委員長が行う。

また、コウジ酸に関する追加試験として

- MLA 試験による光毒性（田中委員）
- 肝臓でのアダクトの検出（長尾委員）
- 血中、肝臓中のコウジ酸の定量、アドメ（大学の先生に依頼）

を行う意見が出された。

4. 本年度の計画について

林委員長より、本年度に試験を行う化合物として“MX”が適当ではないかとの意見が出された。次回の委員会において中嶋委員がMXの発がん性、遺伝毒性についてレビューを行い、その後、検討することとなった。

5. その他

次回（17回）は未定。

文責：本間正充

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 17 回検討会議事録

2004 年 8 月 12 日 14:00～18:00

新高輪ホテル 1F 2120 会議室

参加者：田中，長尾，林，本間，森田，祖父尼，太田，浅野

欠席者：葛西，佐々木，布柴，中嶋，宇野，能美

1. 前回議事録確認

前回議事録の確認を行い、特に問題はなく承認された。

2. 鎌倉会議でのコンサルテーションへの対応

長尾委員作成原案に田中委員他の意見を組み込んだ改訂版について討議した。光遺伝毒性の部分に関連し、食品関連物質の光遺伝毒性をどう考えていくのか、すなわち、今後は試験を必要とするのか、あるいはどのような場合には試験不要なのかを含め、本委員会での検討の方針を明確にする必要があるとの意見が出された。最終結論には至らなかったが、コンサルテーションへの対応文書の当該箇所の試験実施目的の記載部分の記載に関しては、第 1 文の削除を含め改訂案を田中委員が作成することとなった。

3. 環境変異原研究への投稿論文の確認

環境変異原学会編集長より、本委員会の活動内容を臨時委員会活動報告として学会誌「環境変異原研究」へ投稿するよう依頼されている。林委員長より、本研究班の昨年度総括報告書をもとに作成した投稿原案が提示された。厚生労働省への報告ではなく、学会への報告とした記述にすべきとの意見が出され、議論の結果、総括報告書から委員会の活動意図の部分抽出し、各回の議事録を簡潔にまとめた議事要旨をつけた改訂案を森田委員が作成することとなった。その中で、以下の事項について対応することとした：

- 活動中間報告とし、年度末の第 13 回検討会までを報告対象とする。

- 各種検討の内容については、既に投稿した長尾論文を引用することで対応する。
- 戦略の定義を明確にする。加えて、検出・評価・解釈の中身も説明する。
- 第7回検討会議事録の要旨は長尾委員が作成する。
- 浸透圧 (osmolality) は測定するまでもないので、本投稿原稿に掲載する議事録からは削除する。
- 8月末に改訂案を提示し、10月初旬に投稿する。

4. 閾値問題について

本年のJEMS (長崎) の、「遺伝毒性の閾値問題に関するシンポジウム」における祖父尼委員の発表に関して、Amesの系で閾値の存在を説明するための追加データの必要性について、説明がなされた。追加試験の詳細は、太田委員および能美委員と相談することとなった。また、げっ歯類を用いる小核試験により閾値の存在を検証する研究が計画されており、研究実施者の浅野哲秀氏よりその実施計画が紹介された。試験物質 (アクリルアミドの追加/置換)、設定用量 (ポイント数とスペーシング)、陰性対照での背景データの入手などについて引続き検討することとなった。

5. アカネ色素について

アカネ色素についての遺伝毒性ならびにがん原性について、林委員長より話題提供の予定であったが、時間がなく資料の配布のみとなった。

6. その他

次回 (第18回) は、2004年9月10日午後2時から、新高輪プリンスホテル フリージアの間で開催予定。

文責：森田 健

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 18 回検討会議事録

2004 年 9 月 10 日 14:00～17:00
新高輪ホテル 1F フリージアの間

参加者：田中、長尾、林、本間、森田、祖父尼、中嶋、宇野
欠席者：葛西、佐々木、布柴、能美、太田

1. 前回議事録確認

前回議事録の確認を行い、承認された。

2. 次回の検討候補物質について

次に検討する候補物質として MX とアカネ色素が挙げられ、これらの情報提供が後述のごとくなされた。どちらの物質を今後取り上げるかは決まらなかった。また、今まで行ってきたコウジ酸の検討から得られたことをまとめるのが先ではないかとの意見も出された。

2-1. MX について

遺伝毒性およびがん原性について中嶋委員より説明がなされた。MX は Ames 試験をはじめ in vitro では陽性（直接変異原。高用量では代謝活性化条件でも Ames 試験陽性）だが、in vivo では陽性と陰性の報告がある。中嶋委員らの検討では、細胞形質転換試験でイニシエーション作用およびプロモーション作用を示し、MutaTMMouse 遺伝子突然変異試験では肝臓と小腸で陰性であった。また、飲水投与によるラット発がん性試験では、主に甲状腺と胆管に腫瘍が発生した。T₃、T₄等のホルモンの変化が見られていないことから、プロモーションによる発がんではないとの報告もある。直接変異原であるにも関わらず胃で発がんしない理由は説明されていない。MX の VSD や TDI は既に算出されており、これらを考慮したときに水道中での存在量は安全と考えられるため、日本をはじめ各国とも規制値は設定されていない。

2-2. アカネ色素について

遺伝毒性およびがん原性について林委員長より説明がなされた。アカネ色素は Ames 試験では代謝活性化の有無に関わらず陽性、げっ歯類の小核試験では陰性、in vivo の DNA 付加体形成試験では肝臓、腎臓、十二指腸、結腸で付加体が形成されたとの報告がある。ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験は未実施。また、アカネ色素は混合物で、いくつかの構成成分（lucidin-3-O-primeveroside、lucidin など）に遺伝毒性が報告されている。最近、ラットの慢性毒性・発がん性併合試験で腎尿細管腺がんの増加が認められたとの中間報告がなされ、NOAEL が求まらなかったことと遺伝毒性（特に in vitro での）が認められることから ADI の設定ができなくなった。今後、低用量域での発がん性試験を実施予定であり、TG ラット遺伝子突然変異試験についても実施を考慮中とのことであった。

3. 環境変異原研究への投稿論文の確認

森田委員が作成した改定案を検討した。特に、遺伝毒性の「検出・評価・解釈」の用語の定義について意見交換が行われた。それらの意見を反映した最終案を後日メールで提示してもらい、最終確認することになった。

4. 閾値問題について

今年の JEMS 大会の「遺伝毒性の閾値問題に関するシンポジウム」における発表に関連して、太田委員が実施した Ames 試験系での閾値の存在を説明するための追加データについて、祖父尼委員より説明がなされた。ENNG、sodium azide、MX について野生株と除去修復欠損株との間での突然変異頻度を比較した結果、変異コロニー数が上昇する濃度は、ENNG では両株に差異がみられなかったが、sodium azide、MX では明かな差異（野生株 > 除去修復欠損株）がみられた。この結果も踏まえて要旨案を作成するが、提出までに時間がないので事後承諾になるかもしれないとのことであった。

5. 鎌倉会議でのコンサルテーションへの対応

田中委員の改定案が説明され、それらを反映した最終案を後日メールで提示してもらい、最終確認することになった。

6. その他

次回（第 19 回）は、2004 年 10 月 15 日午後 2 時から、新高輪プリンスホテル カトレアの間で開催予定。

文責：宇野芳文

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19回検討会議事録

2004年10月15日(金) 14:00～17:20

新高輪ホテル1F 2125室

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

1. 前回議事録の確認

前回議事録の確認を行い、特に問題はなく承認された。

2. 環境変異原研究への投稿論文の確認

投稿予定の原稿をメールで確認し、最終化することとなった。

3. 閾値問題について

本年のJEMS/JSAAE大会の「遺伝毒性の閾値問題に関するシンポジウム」における発表に関連して、森田委員と、祖父尼委員より発表内容について説明がなされた。森田委員は「リスクアセスメントにおける遺伝毒性—海外の視点は」というタイトルで発表予定であり、主にヨーロッパにおける発がん物質、遺伝毒性物質（生殖細胞への影響も含む）のclassificationやlabelingについて話す予定である。祖父尼委員は、Ames試験のデータを利用し「遺伝毒性：DNA直接作用物質に閾値は存在するのか?!」というタイトルで発表を行う。

4. 本年度の計画について

本年度の試験については以、以下の試験が進行中であることが林委員長より説明があった。

- アカネ色素：BigBlueラットを用いた遺伝子突然変異試験（中嶋）、ラット多臓器でのUDS（田中）
- コウジ酸：アダクトの検出（長尾）、ポジションペーパーの作成（林）
- 閾値問題：エームス試験（祖父尼、太田）

5. その他

林委員長より情報として、「食のシンポジウム」、「動物愛護のシンポジウム」の開催に関して紹介があった。

次回（20回）は未定。11月は学会のため開催はしない。

文責：本間正充

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 20 回検討会議事録（案）

2005 年 1 月 7 日(金) 17:00～23:30（含：休憩時間）、8 日(土) 9:00～11:00
大月ホテル 11F 1105 室

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

1. 食品添加物等の遺伝毒性検出の戦略に関する研究の中間評価ヒアリング
(1 月 26 日開催)について

中間評価ヒアリングでは、研究の目的とゴール、過去 2 年間の業績、将来展望について、当日は林委員長不在のため本間委員が代行して報告する。特に閾値問題を中心に話をしたい。報告時間は 6 分間程度なので、コウジ酸のデータは GAP(Genetic Activity Profile)形式のグラフにまとめる。

2. Position paper について

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考えている：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 質の意)、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。

今後 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あった。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。)

文責: 宇野芳文

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 21 回検討会議事録（案）

2005 年 3 月 1 日(火) 14:00～17:30

新高輪ホテル 1F 2137 室

参加者：林，長尾，祖父尼，田中，中嶋，葛西，森田，浅野，宇野（議事録）

欠席：能美，本間，太田，布柴，佐々木

1. 平成 16 年度報告書と次年度計画（林委員長）

- 本年度研究報告書の提出の締め切りは 4 月 10 日で、とりまとめは林委員長が行う。
- 各試験分担者からの分担報告書は一部提出済み。未提出の試験分担者は 3 月 20 日頃までに提出して欲しい。予算は順調に執行されている。
- 食品添加物等の遺伝毒性検出の戦略に関する研究の中間評価ヒアリングが 1 月 26 日に行われ、次年度も研究の継続が認められる予定。
- 次年度は最終年度となるので、ポジションペーパーを作成する。著者等どのような形にするかは今後相談したい。また、コンサルテーションミーティングの可能性についても考えたいを予定している。
- 4 月 20 日頃に Kirkland 博士が来日し、MMS 主催で研究会を予定。また、9 月には ICEM, IWGT が開催されるので、これらの機会を有効に生かすことを考えたいこの際に少しコンサルテーションしてもらおうことを考えている。

2. 本年度の分担試験の結果報告

- 葛西委員より、アカネ色素を 1 および 5%濃度で 28 日間混餌投与した TG ラットの腎臓における 8-OH-dG の測定結果が報告された。8-OH-dG は両濃度群で対照群に比べて有意に上昇し、5%よりも 1%の方で高値であった。また、技術改良により 8-OH-G も尿や血液サンプルで測定できるようになったことが報告された。Base excision repair が起こったか否かの指標として有用と思われるので、今後活用したいとのことであった。
- 中嶋委員より、上述の TG ラットの腎臓における C₈遺伝子の突然変異頻度の測定結果が報告された。遺伝子突然変異頻度は、両濃度群で対照群に比べて有

意かつ同程度に上昇した。今後、DNA シーケンスと臓器から DNA を抽出するところから始める再実験を考えている。

- 田中委員より、アカネ色素のラット肝臓および腎臓における UDS 試験を行うに際して実施した予備検討の結果が報告された。DMN を 400 mg/kg で経口または腹腔内に単回投与し、2、4、6 時間後に UDS を測定した。その結果、肝細胞および腎尿細管上皮細胞で UDS が誘発された。今後、アカネ色素を 2000、1000、500 mg/kg で経口投与し、3 時間後に UDS を測定する予定。
- 長尾副委員長より、³²P-ポストラベル法(アダクト増感法)によるコウジ酸の DNA アダクトの解析結果が報告された。サルモネラ菌にコウジ酸を 5 mg で 4 時間 pre-incubation して解析した結果、DNA アダクトは検出されなかった。また、コウジ酸を 3%濃度で 28 日間混餌投与した TG マウスの肝臓を解析した結果、DNA アダクトは検出されなかった。現在、京大の松田先生に LC/MS/MS による解析をお願いしている。

3. マウス小核試験における観察細胞数の小核誘発率に及ぼす影響について

浅野氏より、フローサイトメトリーによる末梢血マウス小核試験において、観察細胞数が小核誘発率に及ぼす影響を検討した結果が報告された。Ara-C、コルヒチン、MMC をマウスに投与(最高用量は僅かに小核を誘発する用量で、以下公比 $\sqrt{10}$ で数用量設定)し、末梢血における小核誘発率を測定した。マニュアルでは 2000 細胞/動物を、フローサイトメトリーでは 2000、20000、200000、1000000 細胞/動物を観察した。その結果、20000 細胞/動物以上の観察で得られた結果はほぼ一致していた。検出感度を上げるために閾値にメガスタディを行う必要はないことが示唆された。

文責：宇野芳文

別 添 2

食品および食品関連物質の遺伝毒性のリスク評価に関する 鎌倉コンサルテーション会議報告

Marilyn J. Aardema¹, Diane Benford², David H. Blakey³, Sheila M. Galloway⁴,
David Kirkland⁵ (Chairman), Lutz Müller⁶, Young-Joon Surh⁷, Veronique Thybaud⁸,
David Tweats⁹ (Rapporteur),

¹The Procter & Gamble Company, PO Box 538707, Cincinnati, OH USA

²Food Standards Agency, Room 508C, Aviation House, 125 Kingsway, London, WC2B 6NH, United
Kingdom

³Safe Environments Programme, Health Canada, Rm 210, EHC, PL 08012A, Tunney's Pasture,
Ottawa, Ontario, K1A 0L2, CANADA

⁴Merck Research Laboratories, W 45-204, West Point, PA 19486, USA

⁵Covance Consulting Services, Covance Laboratories Ltd., Otley Road, Harrogate, North Yorkshire
HG3 1PY, United Kingdom

⁶Novartis Pharma AG, MUT-2881.2.28, CH-4002 Basel, Switzerland

⁷College of Pharmacy, Seoul National University, Shinlim-dong, Kwanak-ku, Seoul 151-742, South
Korea

⁸Aventis Pharma, Centre de Recherche de Paris, 13 quai Jules Guesde, Vitry sur Seine, 94403
FRANCE

⁹Genetic Toxicology Consultant, United Kingdom

2004年2月12, 13日

鎌倉パークホテル

248-0021 神奈川県鎌倉市坂ノ下 33-6

要 約

我々コンサルタント（訳者注：本報告書の著者達）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。

我々は、多くの遺伝毒性データがあるにもかかわらず、データ間で大きなギャップがある事を痛感し、コウジ酸は遺伝毒性発がん物質であるという確固たる結論にいたらなかった。結論として以下の項目を検討することを推奨する：

- 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。

我々は、もし DNA 付加体が標的組織で検出できず、かつ、新しい p53 マウスの試験が陰性（すなわち、遺伝子改変動物と正常動物間で差がみられないなど）であった場合は、この発がん性が遺伝毒性とリンクするものではないとの見解をもった。

コウジ酸データのレビューで得た教訓は次の通りである：被験物質は質的に問題ないことが確認されている事（食品・食品関連変異原物質として当然必要なこと）；標準化されていないプロトコールは、バリデーションが十分に行われていないことから結果の解釈を困難にする；調査、検査することが重要であるが、引き続きそれに関わるメカニズムの理解が重要である；ADME の研究は *in vitro/in vivo* 差や種差などを理解するために重要である；腫瘍の研究では病理学的説明に明快性が要求される；そして、選択した試験で有用な情報が得られない限り、または重要な問題解決の手がかりを得られないかぎり、大量の試験データがあっても、必ずしも解釈を明確にできない。

さらに、我々は、閾値のある、すなわち、ヒトに対して心配のない暴露量を決定することができる遺伝毒性物質（特に間接的に作用するもの）について、遺伝毒性の“強さ”がリスクアセスメントに対し、どの程度の影響力があるかについて検討した。

目 的

食品ならびに食品関連物質における遺伝毒性のリスクを評価するためのストラテジー構築の一助として、厚生労働省／日本環境変異原学会臨時委員会はコンサルテーション会議の開催を要請した。コンサルタントはストラテジー構築に必要な試験および必要なデータベースは何かを見極めるよう要望された。

実例として発酵産物であるコウジ酸のデータを基に、我々コンサルタントは以下の項目について検討することが求められた：

- i) 有用な情報を提供しているのはどの試験なのか？
- ii) 有用な情報を提供していないのはどの試験なのか？

- iii) 量的（たとえば強さ）な評価を下すことのできる試験はあるのか？
あるならばどの試験か？
- iv) コウジ酸の遺伝毒性の理解を深めるために必要なメカニズム試験はあるか？あるならばどのような試験か？

コウジ酸

提供された試験データに関するコメントを以下に示した。

遺伝毒性試験

微生物を用いる試験：Ames 試験では代謝活性化系 S9 の有無に関わらず再現性良く陽性結果が得られている。陽性結果がコウジ酸自体に起因しており、混在物あるいは代謝物によるのではないという知見が示された。変異スペクトラムの結果は、塩基対トランスバアージョン型の変異が誘発されたことを示している。得られた陽性結果はアミノ酸／タンパクの持込による栄養効果により誘発された可能性が指摘されたが、栄養効果の影響がない *Rec* アッセイにおいても陽性となっていることに注目すべきであろう、との見解に至った。

光プラスミド弛緩試験：UVA 照射により陽性結果が得られている。本結果は当該実験条件下でスーパーオキシドラジカルおよび過酸化水素が生成されたことを示唆するものである。我々はこの試験が十分バリデートされているのか否かの確信が持てなかった。さらに、この仮説は TA102 での変異が UV により増強されていないことから支持されてはいないと考えられた。

In vitro ほ乳類細胞を用いる試験：多数の試験結果が報告されている。V79 細胞を用いた *hprt* 変異および L5178Y 細胞での *tk* (訳者注：*hprt*) 変異は陰性であったが、TK6 ならびに WTK-1 での *tk* 遺伝子突然変異は陽性であった。高濃度(≥1000 μg/ml)で実施された染色体異常試験の多くは陽性となり、同一の細胞および試験方法を用いたにもかかわらず陰性となっているものもあった。染色体異常の増加は浸透圧に起因するものではないが、強い細胞毒性によるものであろうと考えられた。この点を評価するにはデータが不十分であると考えられる。CHO 細胞を用いた FPG-コメント試験の結果からは染色体損傷は酸化的損傷によるものではないと考えられる。*In vitro* 小核試験の場合、ヒトケラチノ細胞では陰性、CHL 細胞では相異なる結果があり結論できない(72時間処理では陽性であるが6時間処理では陰性)、TK6 ならびに WTK-1 細胞では陽性、強い細胞毒性発現濃度では HepG2 細胞でも陽性となっている。