

In this symposium, we will focus on the toxicological phenomenon at low dose levels and challenge to seek possibility to find safety dose levels of chemical, even for genotoxic carcinogens. In the general toxicology field, we estimate the no adverse effect level of the experimental animals and adjust by safe- (uncertain-) factor for extrapolation to human situation. It has been believed theoretically and also practically that genotoxicity and accordingly carcinogenicity induced by genotoxic mechanism have no threshold. Namely, we cannot find any dose levels that assure the safe dose level for genotoxicity or genotoxic carcinogenicity even at extremely low dose level. There are, however, biological mechanisms to repair DNA lesions and also carcinogenesis needs multiple steps, then, the probability a genotoxic event occurs in the body would result cancer might not be high. Therefore, it may be possible to set practical (or biological) threshold even for genotoxicity and genotoxic carcinogenicity. We will learn and discuss on probability and statistical aspects; radiation genetics aspects; general toxicological aspects; genotoxic aspects; and carcinogenic aspects on low dose effects and threshold.

化学物質の遺伝毒性における生物学的な閾値

祖父尼 俊雄

株式会社ノバスジーン

Biological threshold in genotoxic activity of chemical substances

Toshio Sofuni

NovusGene Inc.

化学物質の安全性評価において遺伝毒性試験が用いられているが、主にハザードの検出 (hazard identification) のために用いられてきたことから、遺伝毒性の有無の判断が最優先されてきた。がん原性試験で陽性の結果が得られた場合には、その発生のメカニズムに遺伝毒性が関与しているか否かが重要な点となり、遺伝毒性がある場合には閾値が存在しないとして、たとえその暴露が微量であっても安全域はないものと考えられてきた。それに対して遺伝毒性がない場合には閾値が存在するとして、安全に使用できる用量域の設定が可能となる。この考え方は遺伝毒性そのものに閾値がないとするセントラルドグマに基づいていると考えられる。

それでは、遺伝毒性化学物質に閾値がないということにどれだけの科学的根拠が提供されてきているのだろうか。上記のように遺伝毒性試験がハザードの検出に用いられてきたことから、遺伝毒性の有無を判定するためにはできるだけ高用量での試験が推奨され、また実際に行われてきた。従って、高用量域での試験データは膨大なものとなっているが、陽性結果が得られた場合においても低用量域での反応についてはほとんど注目

されてこなかった。さらに、低用量域における遺伝毒性の科学的な検討となると極めて限られたものとなっている。

最近、遺伝毒性試験結果をハザードの検出だけでなく、リスクアセスメントのためにも用いようとする動きがある。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」臨時委員会が設置され、議論が開始されている。ここでの「評価・解釈」はまさにリスクアセスメントを目指しているといえる。また、遺伝毒性に基づくリスクアセスメントの戦略を構築するため、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」の研究班が設けられ、必要な実験も行われている。これら2つのグループは合同で定例会を開催し、検討を進めている。ここでも遺伝毒性の閾値の有無はリスクアセスメント手法に大きく影響を与えることになる。

現在 DNA を直接標的とする遺伝毒性には理論的に閾値は存在しないという考え方が国際的に受け入れられているが、生物学的な閾値の存在を示唆するような実験データがある。代表的な遺伝毒性試験である Ames 試験に用いられている TA1535 株とその DNA 修復酵素欠損株の遺伝毒性化学物質に対する反応を比較すると、親株である TA1535 には自然誘発突然変異コロニー数の範囲内に埋もれてしまう用量域が見つまっている。つまり遺伝毒性化学物質がターゲットに到達しているものの、修復を主とする突然変異に至るまでの全ての生物学的プロセスを完遂できない低用量域（生物学的な閾値）が存在することを示唆している(Sofuni et al., 2000)。

上記の例を1つのモデルとして取上げ、遺伝毒性における閾値の問題についての論議を広める場を提供してみたい。

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
平成 16 年 11 月 30 日～12 月 2 日 長崎

合同シンポジウム

発がん性と遺伝毒性の閾値

ーリスクアセスメントにおける問題点ー

林 真

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部

Some Concerns in Risk Assessment – Threshold in Carcinogenicity and Genotoxicity

Makoto Hayashi

Division of Genetics and Mutagenesis, NIHS

合同シンポジウム 1「発がん性と遺伝毒性の閾値ーリスクアセスメントにおける問題点」のオルガナイザーとして、以下のような考えの基に本シンポジウムを企画した。

遺伝毒性発がん物質に閾値はない、従って、発がん性が認められ、かつ遺伝毒性がある場合には ADI（1 日許容摂取量）を設定することは出来ない。これまではこのような考えでリスクアセスメント、リスクマネージメント、さらにリスクコミュニケーションが行われてきた（現に行われている）。発がん性がある、遺伝毒性のある化学物質は天然にも存在し、食品の調理過程でも生成する。さらに、我々の体内にもそのような物質は存在する。天然物と人工的に合成されたもの、避けることの出来るものと避けることの出来ないもの、等についてこの閾値問題をどのように整理すべきなのか。ハザードとリスクの意味を正確に理解する必要がある。リスクアセスメントとは言い古された言葉のように考える人も多いと思うが、我々の分野においては今原点に立ち返り、もう一度考えなければならない非常にホットな今日的な課題であることは確かである。

本シンポジウムにおいては、まず森田会員に石光進、森川馨先生と共著で「リスクアセスメントにおける遺伝毒性：海外の視点は」と題し、情報処理の立場から海外の現状を総括していただく。

吉村功先生には統計家として、遺伝毒性分野の研究者は試験の陰性、陽性を気にしすぎているのではないかと、この考えの基に「統計家からの疑問：遺伝毒性のインビトロ試験のデータから定量的結論を導こうとするのは邪道なのか」と題し、in vitro 試験結果の定量的評価に関する問題提起と提言をお願いする。

祖父尼会員には「遺伝毒性：DNA 直接作用物質に閾値は存在するか?!」と題し、細菌を用いる復帰突然変異試験等における、生物学的閾値の問題を論じていただく。福島会員には「遺伝毒性発がん物質の閾値問題：微量でも本当に危険なのか」と題し、遺伝毒性発がん物質における閾値問題を紹介していただく。

そして最後に、林裕造先生には「リスクアセスメントとは何か：もう一度原点に戻って」と題して、リスクアセスメントについて教育講演的に解説をお願いすると共に、遺伝毒性の研究者、および代替法の研究者への要望、提言をお願いする。

日本環境変異原学会、日本動物実験代替法学会は共にリスクアセスメントならびにリスクコミュニケーションにはそれなりの立場と責任を持たねばならない学会であり、このシンポジウムを機会に議論が盛り上がることを節に期待する。

リスクアセスメントにおける遺伝毒性－海外の視点は

森田 健, 石光 進, 森川 馨

国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部

Genotoxicity in risk assessment – Global Perspective

Takeshi Morita, Susumu Ishimitsu, and Kaoru Morikawa

Division of Safety Information on Drug, Food and Chemicals, NIHS

化学物質のリスクアセスメントにおける遺伝毒性では、国際的には「遺伝毒性のメカニズム」および「生殖細胞への影響」の視点が重要視されるようになってきており、また、後者は今後の化学物質のハザード分類にも大きな影響を与えるものと考えられる。

① 発がんにおける遺伝毒性メカニズムの関与：化学物質の発がん性が遺伝毒性に起因するものか否かの検証は、当該物質の許容量設定（すなわち閾値の有無）に際し極めて重要な事項である。「遺伝毒性発がん物質には閾値がない」というのが従来からの定説であったが、欧州では最近では染色体数異常、酸化ストレス、DNA 合成阻害などのメカニズムによる間接的遺伝毒性発がん物質には閾値の考えが導入されつつある。さらに、直接的（DNA 反応型）遺伝毒性発がん物質であっても、遺伝毒性の強さや発がんにおける二次的作用メカニズムの関与を考慮した場合、実際的な閾値を設定可能であることも提言されている。ホルムアルデヒドや酢酸ビニルなどがそれに該当する。また欧州医薬品庁では、医薬品に係る遺伝毒性不純物に対し、食品汚染物質と同様に ALARP (as low as reasonably practicable, 合理的かつ実用的な範囲で可能な限り低い量) 原則を適用し、 $1.5 \mu\text{g/day}$ に設定した TTC (Threshold of Toxicological Concern, 毒物学的閾値) に基づきリスクの許容の可否について判断することを提案している。これらのことは、発がん性試験および遺伝毒性試験が共に陽性の物質を単純に遺伝毒性発がん物質とみなすのではなく、「発がん部位における遺伝毒性の関与の軽重」を評価する必要性を示している。

② 生殖細胞への影響とハザード分類：化学物質のハザード分類において、発がん性物質と同様に遺伝毒性物質が扱われてきている。それは、遺伝毒性の独自性を意味する。英国の COM (Committee on Mutagenicity, 変異原性諮問委員会) は、生殖細胞への影響

を検討する試験ストラテジーを提案し、それに加え米国 EPA の研究者は、化学物質の遺伝毒性分類カテゴリーも提示している。REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restrictions of Chemicals) と呼ばれる欧州の新しい化学物質政策は、CMR (Carcinogen, Mutagen and Reproductive toxin, がん原性/変異原性/生殖毒性物質) の規制を打ち出し、ドイツでは、MAK (Maximale Arbeitsplatz-Konzentration, 作業環境最大許容濃度) 委員会が、26 物質を生殖細胞変異原物質に分類している。さらに、国連が進めている GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals, 化学品の分類および表示に関する世界調和システム) では、発がん性と同様に生殖細胞変異原性についても分類・表示の規定がなされている。我が国でも GHS の導入に伴い、化学物質の生殖細胞変異原性の評価も必要となると考えられる。

このような動向は、一般化学物質、食品関連物質、医薬品等の遺伝毒性評価に大きなインパクトを与えると考えられる。本シンポジウムでは、上記に関する海外の状況を具体例をまじえて紹介し、閾値の問題を考える参考としたい。

遺伝毒性：DNA 直接作用物質に閾値は存在するのか？！

祖父尼 俊雄

元国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部

Genotoxicity: Is a threshold concept acceptable to mutagenic activity of DNA-targeting substances?!

Former affiliation: Division of Genetics and Mutagenesis, NIHS

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、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¹⁾。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²⁾が、改めてこの問題について検討した結果を報告する

代表的な突然変異検出系である細菌を用いる復帰突然変異試験について、TA1535 ま

たはTA100, およびこれらのO⁶-methyl guanine methyltransferase (MGT)を欠損した菌株, YG7108 または YG7113 を用い3), その突然変異誘発性を比較した. DNA を直接標的とする物質としてアルキル化剤を取上げ, その比較として非アルキル化剤を含めた 20 種の既知変異原物質について検討した. 復帰突然変異試験は, 通常のプレインキュベーション法を用い, 必要に応じてラットまたはハムスター肝 S9 mix による代謝活性化を行った.

アルキル化剤では, MGT 欠損株である YG7108/YG7113 が TA1535/TA100 よりもより低い用量で変異コロニーの誘発がみられた. MNNG では, YG7108 が 0.001~0.25 µg/plate の用量で陰性対照の 4~100 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, 0.5 µg/plate 以上の用量から誘発が認められた. その他のアルキル化剤, 例えば ENNG, MNU, ENU, MMS, EMS, DMN, DEN などでは, 化合物により程度の差はあるものの, 同様の差異が認められた. 一方, 非アルキル化剤である 4-NQO, AF-2, 2-NF, MX では, YG7108/YG7113 と TA1535/TA100 とにおいて明らかな差異は認められなかった.

MGT による修復が直接関与しない非アルキル化剤についてさらに検討するため, ヌクレオチド除去修復欠損株, TA1535 (Δ uvrB)および WP2uvrA (Δ uvrA)とそれらの野生株である TA1975 および WP2 を用いて, 突然変異誘発性を比較した. ENNG では TA1535 と TA1975 との間の変異コロニーの誘発に差異はみられなかった. 一方, MX では WP2uvrA が 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, 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. また, 付加体を生じるといわれている NaN₃ 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.

上記の結果は, 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. このような考え方は細菌のみならず, 他の生物種に拡大できる可能性が考えられ, DNA を直接標的とする変異原物質についての閾値の議論に話題を提供する.

文献

- 1) Kirsch-Volders, M. et al., *Mutat. Res.*, 464:3-11, 2000.
- 2) Sofuni, T. et al., *Mutat. Res.*, 464:97-104, 2000.
- 3) Yamada, M. et al., *Mutat. Res.*, 381:15-24, 1999.

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）
分担研究報告書

DNA 付加体生成に関する検討

分担研究者 長尾 美奈子（共立薬科大学 客員教授）

コウジ酸はサルモネラ菌やヒトリンパ芽球培養細胞に突然変異を示すことが明らかにされた。さらにマウス肝、およびラット骨髄、末梢血で小核の誘発が認められている。コウジ酸はマウスの甲状腺および肝臓に腫瘍を誘発するが、マウス肝2段階発がんテスト系ではイニシエーション活性は認められない。マウス肝においてコウジ酸が肝臓で直接的な遺伝毒性物質として作用しているか否かを明らかにするために、検出感度の高いポストラベル法により DNA 付加体生成の有無を検討した。付加体増感法を用いたが検出されなかった。さらに、付加体の分子量をモニターする LC/MS/MS 法を用いて現在検討している。

A. 研究目的

既存添加物として登録されているコウジ酸に、マウスにおいて甲状腺および肝臓における腫瘍誘発活性があることが1998年に報告された¹⁾。その後コウジ酸の *in vivo* 投与により、マウス肝における小核の誘発が²⁾、さらにラット骨髄および抹消血における小核誘発活性が示され³⁾、コウジ酸が遺伝毒性発がん物質である可能性が示された。マウスおよびラットに誘発される甲状腺腫瘍は、コウジ酸のサイロイドホルモン生成阻害作用の結果、補足的に起こる細胞増殖促進によることが示唆されている。一方、肝臓に関しては、マウスでは小核が誘発されるが、マウス肝2段階発がん実験では、コウジ酸はイニシエーション活性を示さないこ

とが報告された。コウジ酸は発がん標的臓器で DNA 傷害を誘発するが、発がんのメカニズムは DNA 傷害作用以外の作用機構によることが示唆されている。これまでに、トランスジェニックマウスを用いた解析ではコウジ酸は肝臓では突然変異を誘発しないことが明らかになっている。コウジ酸の *in vivo* における小核誘発が、コウジ酸の一次的な DNA 傷害作用に因るのでは無い可能性も考えられる。このようなタイプの発がん物質の安全性を、正しく効率よく評価するために必要なテスト系を確立することは極めて重要である。

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'-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 ^{32}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。

さらに、DNA 付加体の推定分子量をモニターし検出 LC/MS/MS 法を用いて検討する。

B. 研究方法

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。
2. DNA の調整：□サルモネラ菌 TA100 を対数増殖期後期で集菌し、0.1M 磷酸緩衝液(pH 7.4)のけん濁液にコウジ酸 5 mg/ml を添加し、37°C, 4hr インキュベートした。サルモネラ菌からフェノール法で DNA を抽出した。□中嶋らが LacZ 突然変異検出に供したマウス {[CD2-LacZ80/HazfBR (BALB/C x DBA/2)], 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てから、試験に供した}の肝臓より、DNA をフェノール法により抽出した。

3. ポストラベル法：Randerath らの変法付加体増感法のうち、ATP deficient 法を用いて検討した。□ ^{32}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ヌクレアーゼおよび 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。
4. TLC の展開：1D, 2.3 M 磷酸ナトリウム (pH6.0); 3D, 4.5 M 蟻酸リチウム-8.5 M 尿素 (pH3.5) : 4D, 1M 塩化リチウム-0.5 M トリス塩酸-8.5 M 尿素 (pH3.5) : 5D, 1.7 M 磷酸ナトリウム (pH 6.0) を適宜希釈して用いた。1D はいずれの場合も overnight で展開し、付加体は原点に残るものとして原点に残存する物質を切り出し、新しい PEI セルロースシートにトランスファーした。さらに D3 および D4 で二次元クロマトグラフィーを行なった。3D の 30%, 60%, 90%溶液を、4D の 30%, 60%, 90%溶液を組み合わせて、9 通りの条件で解析した。
5. オートラジオグラフィー：X 線フィルム (Kodak X-OMAT) に TLC プレートに暴露し作成した。
6. LC/MS/MS 法による付加体の解析：京都大学工学部 松田知成博士の協力により、ポストラベル解析に用いたマウス肝臓の DNA の一部を用いて付加体塩基を LC/MS/MS の MRM モードで $m/z=270\sim 500$ の範囲を、網

羅的に解析した。DNA はマイクロコックカルヌクレアーゼおよび PDEII で消化し、アルカリホスファターゼで脱リン酸化し得たヌクレオシドを分析に供した。

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。結果を図-1 に示す。

C. 研究結果

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、

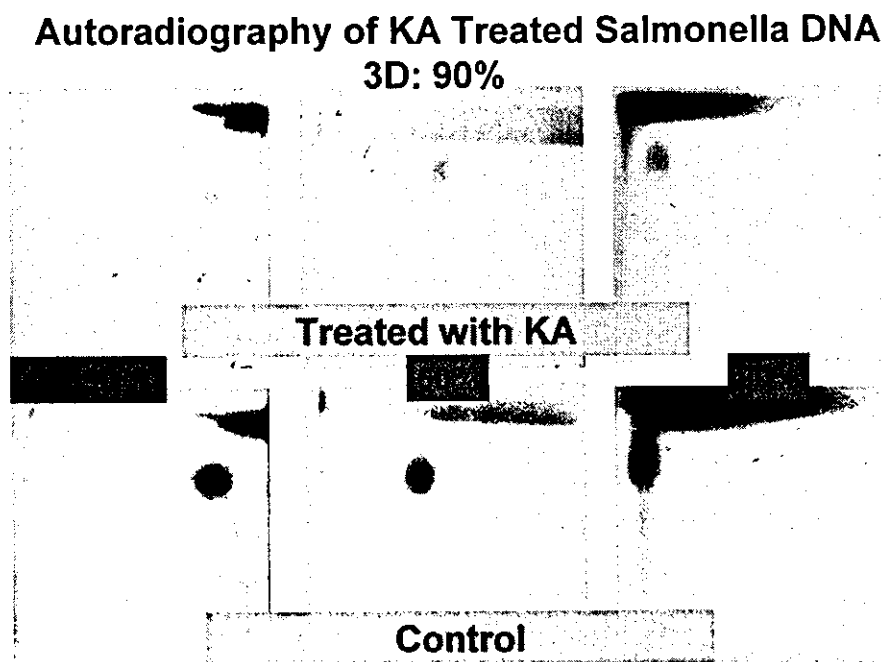


図-1 コウジ酸とインキュベートしたサルモネラ菌における DNA 付加体解析の TLC パターン

2. マウス肝臓 DNA の付加体解析

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% の条件で図-2 に示すような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。

Autoradiogram of Liver DNA of Mouse Treated with KA

3D, 90%: 4D, 60%

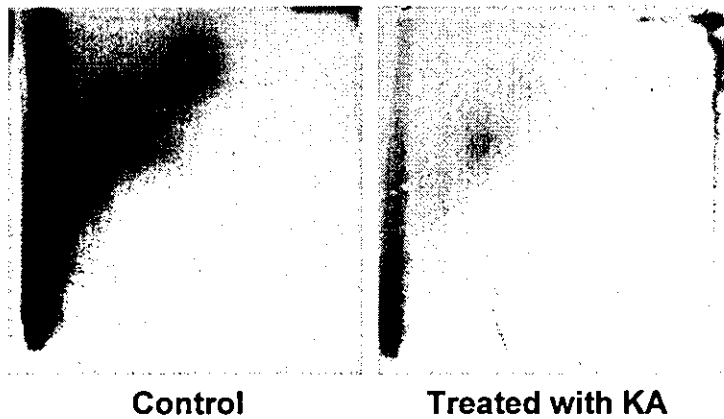


図-2 マウス肝臓 DNA の付加体解析の TLC パターン

3. LC/MS/MS による付加体の解析

コウジ酸投与したマウス肝 DNA に分子量 349, 368, 427, 428, 464, 469, および 499 にイオンピークが認められた。複数のサンプルを用いて、これらがコウジ酸由来であるか否かを確認している。

D. 考 察

本試験に用いたサルモネラ菌はコウジ酸 5 mg/ml で 4 時間処理したもので、付加体生成に長時間のインキュベーションを必要としない限り十分条件であると推定される。また、マウス肝で小核が誘発された条件は、2 g/kg の用量で胃内投与を 24 時間間隔で 2 回行なったもので

ある。本実験に用いたものは、発がん実験で癌腫瘍誘発が認められた 3% の混餌投与を 28 日間行った後 3 日の休薬期間を置いたものである。一般に長期間投与後の DNA 付加体レベルは、比較的安定で、1 週間位は其のレベルは変化しないことが知られている。また、マウスの 1 日当たりのコウジ酸摂取量は、本実験条件の方が、約 2 倍多い。

³²P-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 ³²P-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。

E. 結 論

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。

謝 辞

本研究は(財)食品薬品安全センター 秦野研究所・遺伝毒性部 に於いて行なわれた。研究の機会を与えていただきました遺伝毒性部・部長・田中憲徳博士に深謝します。

参考文献

- 1) Fujimoto N., Watanabe H., Nakatani T, Roy G, and Ito A. Induction of thyroid tumors in (c57BL/6N x C3H/N) F1 mice by oral administration of Kojic acid. Food Chem Toxicol 36, 697-703, 1998.
- 2) 佐々木有 コウジ酸の in vivo コメントアッセイおよび再生肝小核試験, 厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会毒性・添加物合同部会資料 別添 10-1
- 3) 林 真 コウジ酸の幼若ラットを用いる小核試験, 厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会毒性・添加物合同部会資料 別添 9

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ochiai M, Sugimura T, Nagao M., Modification of the ³²P-postlabeling method to detect a single adduct species as a single spot, Methods Mol Biol. 2005, 291:13-19.
- 2) Tsuchiya N, Fukuda H, Nakashima K, Nagao M, Sugimura T, Nakagama H., LRP130, a single-stranded DNA/RNA-

- binding protein, localizes at the outer nuclear and endoplasmic reticulum membrane, and interacts with mRNA in vivo, *Biochem Biophys Res Commun.* 2004, 317: 736-743.
- 3) Sugimura T, Wakabayashi K, Nakagama H, Nagao M., Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish, *Cancer Sci.* 2004, 95: 290-299 (Review).
- 4) Fujiwara K, Ochiai M, Ohta T, Ohki M, Aburatani H, Nagao M, Sugimura T, Nakagama H., Global gene expression analysis of rat colon cancers induced by a food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl- 6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, *Carcinogenesis.* 2004: 1495-505.
- 5) 長尾美奈子, 日本環境変異原学会臨時委員会, リスクアセスメントの現状と展望—食品添加物の立場から—, *環境変異原研究* 2004, 26: 193-198.
- 6) Kitamura K, Nagao M, Hayatsu H, Morita M., Effect of chlorophyllin-chitosan on excretion of dioxin in a healthy man, *Enviro. Sci. Technol.*, 2005, 39, 1084-1091.
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

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）
分担研究報告書

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

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長

生活関連化学物質の遺伝毒性のリスク評価のために有用な指標として、Human Exposure Genotoxic Potency (HEGEP)を考案した。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ものである。ここでの数値は遺伝毒性試験系によって異なり、絶対値は生物学的に意味のあるものではないが、それぞれの化学物質の相対的遺伝毒性リスクを評価することには役立つ。WTK-1を用いたTK遺伝子突然変異試験において、突然変異を2倍増加させる濃度によってHEGEPを算出したところ、コウジ酸は0.008であった。これは、同じく食生活において摂取する可能性のある発がん物質であるアクリルアミド(5)、ジメチルニトロサミン(8)、アフラトキシン(10.3)に比較しても十分に低い。同様の結果は、発がん性を指標としたHuman Exposure Rodent Carcinogenic Potency (HERP)からも指示されており、我々の生活中で摂取するコウジ酸の遺伝毒性リスクは、他の化学物質に比べて極めて低いものと考えられた。

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ができるという考えが定着し、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ていた。

主な矛盾点としては：

- 分析技術の進歩により、微量な化学物質も検出可能となり、検出限界である安全レベルがどんどん低くなってしまふこと。
- 発がん性の有無だけが強調されているため、他の毒性の低くて、安全性の高い化合物ができて、わずかの発がん性のため代替できないこと。
- 人工化学物質のみを対象としているため、天然由来の発がん物質は無視されていること。
- 動物実験の発がん性試験は、必ずしも人に対する発がん性と一致しないこと。

である。これらのことから、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、ハザードがそのままリスクとして考えられ、その程度の評価にあまり注意が払われなかったことがあげられる。さらに、その化学物質の実際の暴露量を考慮したリスク評価は全く行われていない。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遺伝毒性評価法について戦略の構築を図ることが行われた。

具体的な戦略の構築のため、昨年度は、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「コウジ酸」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、遺伝毒性のリスク評価のための材料とした。本分担研究ではコウジ酸について、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程度を、他の生活関連化学物質と比較するため、同様に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。

B. 研究方法

- 1) In Vitro チミジンキナーゼ遺伝子突然変異試験

ヒトリンパ芽球細胞株 WTK-1 を用いた。チミジンキナーゼ(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、試験検体で4時間処理し、細胞毒性(Relative Survival; RS)を評価した。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。

2) 試験化合物

日常生活において食品などを通じて、摂取している化学物質を選択した。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) について, TK 遺伝子突然変異試験を行った。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。

(倫理面への配慮)

本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。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

1) TK 遺伝子突然変異試験

昨年行った, コウジ酸の細胞毒性, 遺伝子突然変異の結果と, 今回行ったアクリルアミド, AF-2, ジメチルニトロサミンの結果を図1に示した。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。

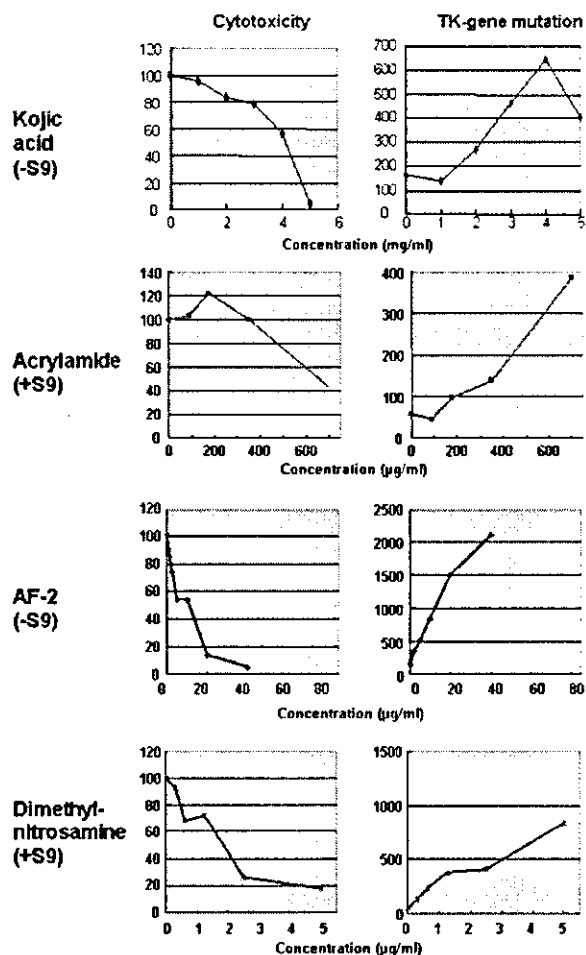


図1 TK 遺伝子突然変異試験結果

2) Human Exposure Genotoxic Potency (HEGEP)

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 Human Exposure Genotoxic Potency (HEGEP)を計算した(表

1). 表では Ames らが提唱する Human Exposure Rodent Carcinogenic Potency (HERP)を比較のため記載した。TD50 mg/kg は、発がん試験において、動物の半数にがんを引き起こす濃度である。コウ

ジ酸の HERP 値は Nagao らの発表を引用した。また、他の文献データより、アフラトキシン B1, ベンゼン, ダイオキシンのデータも記載した。

表 1 Human Exposure Rodent Carcinogenic Potency (HERP) vs. Human Exposure Genotoxic Potency (HEGEP)

化合物	I A R C	由来	1日 摂取量 (/kg/day)	HERP (%) (TD50 mg/kg)	HEGEP (%) (MDX2)
コウジ酸	2 B	食品(みそ等)	0.2 ug	0.0000005 (19500)	0.008 (2.5 mg/ml)
アクリアミド*	2 A	食品(ポテトチップス等)	40 ug	0.01 (8.89)	10 (400 ug/ml)
AF-2 (フルフラミド*)	2 B	保存料	4.8 ug	0.0002 (29)	96 (5 ug/ml)
ジメチルニトロソ	2 A	食品(ビール等)	16 ng	0.01 (0.0959)	8 (0.2 ug/ml)
アフラトキシン B1	1	食品(ピーナッツ等)	64 ng	0.03 (0.003)	10.3 (6.24 ng/ml)
ベンゼン	1	室内空気	155 ug	0.004 (53)	- (negative)
ダイオキシン	1	大気, 食品	5.4 pg	0.0003 (0.0000235)	- (no data)

D. 考察

試験を行った化合物は、コウジ酸と同様、食品等を通じて、我々が日常的に摂取しているものである。特定の化学物質のリスクを比較する場合、絶対値と表すより、他の化学物質との比較することにより、相対的リスクを把握することができる。Ames らは、げっ歯類発がん性試験で得られた、動物の半数にがんを引き起こす化学物質の濃度 (TD50) で、その物質の 1 日推定摂取量を割った値を Human Exposure Rodent Carcinogenic Potency (HERP)として、発がんリスクを評価している。この値により、生活関連化学物質の相対的な発がんの危険性を推測できる

ほか、絶対値としての数字は、1 が動物実験と同程度の暴露で半数にがんを引き起こす濃度と同等であるため、数値からその発がんの程度を推測することができることが特徴である。

これまで遺伝毒性試験においては、試験結果を単に陽性、陰性と判定するのみの hazard identification が中心であった。しかしながら、発がん物質が遺伝毒性を持つことが明らかとなった場合、遺伝毒性物質には閾値がないという考えから、「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」という理由で、規制が進まないという事態が生じている。従って、遺伝毒性物質に対する閾値の考え方

や、何らかの量的な評価の導入が検討されている。しかしながら、現実的にはその評価法および、リスク評価への適用については困難であるとの認識が強い。その理由の一つとして、試験方法の多様性と、定量的評価法の問題点がある。発がん性試験は、基本的には、ラット、マウスの試験しかなく、その試験プロトコルが確立されているが、遺伝毒性試験では *in vitro*, *in vivo* に数多くの試験系があり、どれを評価に使うかが問題である。また、エームス試験や、染色体異常試験を取ってみても、菌株、細胞、プロトコルが異なるため簡単に試験を比較することもできない。

試験系が単一で、プロトコルも統一されている試験であれば、各試験結果を定量的に評価できる可能性がある。In *vitro* 試験では、MLA などの遺伝子突然変異試験がこれに相当する。また、遺伝子突然変異は、濃度依存的な定量性にも優れているため、暴露量を基にした評価法にも適する。本共同研究では、昨年よりヒトリンパ芽球細胞である WTK-1 を用いて、コウジ酸の TK 遺伝子突然変異誘発性を評価した。本試験系は MLA と同様、試験系、およびプロトコルが単一であるため、各試験系を定量的に評価することが可能である。本試験系により突然変異を 2 倍増加させる濃度 (MDX2) を測定し、その相対的遺伝毒性の強さを比較することができた。また、HERP と同様、MDX2 をその物質の 1 日推定摂取量を割った値を Human Exposure Genotoxic Potency (HEGEP) とし、遺伝毒性のリスクの指標とした。HEGEP の値は、HERP と

異なりその絶対値は試験系において異なるため意味を持たない (WTK-1 細胞での TK 遺伝子突然変異試験であれば HEGEP(WTK-1/TK) と書くべきかもしれない) が、他の化合物との相対的リスクを知る上では有用と考えられる。

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。げっ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。

E. 結 論

- ・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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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)
- 2) Zhan, L., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Wu, D., Zhang, L., Suzuki, T., Hayashi, M. and Honma, M. Genotoxicity of microcystine-LR in human lymphoblastoid cells. *Mutat. Res.*, 557, 1-6 (2004)
- 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* 168, 137-144 (2004)
- 4) Yatagai F, Morimoto S, Kato T, Honma M. Further characterization of loss of heterozygosity enhanced by p53

abrogation in human lymphoblastoid TK6 cells: disappearance of endpoint hotspots. *Mutat. Res.*, 560, 133-145 (2004)

2. 学会発表

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)

- | | |
|---|---|
| <p>6) 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)</p> <p>7) Honma, M., Sakuraba, M., Koizumi, T., and Hayashi, M. The fate of chromosomal double strand break in human cells. Environmental Mutagen Society 35th Annual Meeting (2004.10)</p> <p>8) Honma, M., Hakura, A., Oka, A., Takasaki, W., Sasaki, YF., Suzuki, S., and Sato, T. Establishment of humanized in vitro genotoxicity system. Society of Toxicology 44th Annual</p> | <p>Meeting (2005.3)</p> <p>G. 知的所有権の取得状況</p> <p>1. 特許取得
なし</p> <p>2. 実用新案登録
なし</p> <p>3. その他
なし</p> |
|---|---|

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）

分担研究報告書

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

分担研究者 太田 敏博 東京薬科大学・生命科学部・助教授

佐々木 有 国立八戸工業高等専門学校・教授

研究協力者 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

細菌を用いる復帰突然変異試験法で、TA1975, TA1535 (*uvrB*) YG7104 (*uvrB, ogt*) を用い、アルキル化剤 ENNG の突然変異誘発性を比較した。また、塩基置換変異を誘発する変異原 MX, AZ については、ヌクレオチド除去修復欠損株の TA1535 (*uvrB*) および WP2*uvrA* (*uvrA*) とそれらの野生株である TA1975 および WP2 株を用いて、突然変異誘発性を比較した。一方、フレームシフトを誘発する変異原の 2-NF, 4-NQO, NPD については TA1538 (*uvrB*) 株とその野生株である TA1978 株で比較した。いずれの場合にも 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た。

A. 研究目的

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、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）の発現に必要とす