

Table 2. Induction of mutation by Madder color in individual rats

Compound	Dose (%)	Organ	Animal ID-No.	Number of plaque forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Mean \pm S.D.
Madder color	0	Liver	1001	415,800	10	24.1	18.3 \pm 6.9
			1002	690,300	11	15.9	
			1003	587,700	6	10.2	
			1004	598,500	16	26.7	
			1005	486,900	7	14.4	
	1	Liver	1101	435,600	14	32.1	20.1 \pm 9.2
			1102	414,900	3	7.2	
			1103	497,700	8	16.1	
			1104	607,500	13	21.4	
			1105	505,800	12	23.7	
	5	Liver	1201	520,200	18	34.6	19.2 \pm 9.8
			1202	445,500	7	15.7	
			1203	478,800	8	16.7	
			1204	739,800	6	8.1	
			1205	484,200	10	20.7	
DMBA a)	20 (mg/kg)	Liver	1301	408,600	36	88.1	78.6 \pm 10.5
			1302	585,900	47	80.2	
			1303	475,200	32	67.3	

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

また、発がん性に関してはF344系ラットを用いた16週間混餌投与による多臓器中期発がん性試験ではアカネ色素の2.5並びに5.0%のいずれの用量においても発がんの促進作用は認められなかったとの報告がある⁵⁾。ACI/SegHsdラットを用いた780日間の発がん性試験においては統計学的な有意差は見られないものの肝臓および腎臓に腫瘍の増加が認められている⁶⁾。

以上の試験結果から明確な根拠は無いもののアカネ色素が遺伝毒性を示す発がん性物質の可能性も示唆された。そこで今回、標的臓器での遺伝子突然変異が検出可能なトランスジェニック動物 (Big BlueTM Rat) を用いて肝臓での遺伝子突然変異頻度を調べた。用量は発がん性試験で用いら

れた1.0および5.0%混餌投与とし28日間反復投与後3日間の休薬期間を設けた。

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⁹⁾。

E. 結論

アカネ色素は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。

引用文献

- 1) Asanoma M, Miyabe M, Skabe Y (1984): Mutagenicity of natural food additives in *Salmonella typhimurium* (II). Nagoya Eisei Kenkyuhohou, 30, 53-57.
- 2) 蜂谷紀之, 滝澤行雄, 河村太郎, 館野周之, 坂部美雄, 麻野間正晴, 野田正男, 石崎睦夫, 石橋武二, 黒田孝一 (1985): 天然添加物の急性毒性および各種変異原性の概要. トキシコロジーフォーラム, 8, 91-105.
- 3) 石館基, 滝澤行雄, 坂部美雄, 石崎睦夫, 館正知 (1986): 食品添加物の変異原性試験成績 (その7). トキシコロジーフォーラム, 9, 628-633.
- 4) Pognisky B, Westendorf J, Blomeke B, Marquardt H, Hewer A, Glover PL, Phillips DH (1991). Evaluation of DNA-binding activity of hydroxylanthraquinones occurring in *Rubia tinctorum* L. Carcinogenesis, 12, 1265-1271.
- 5) Hagiwara A, Kawabe M, Tanaka H, Kokubo Y, Sano M, Tamano S, Kadota T, Nakamura M, Imaida K (1997). Two different constituents of Madder color lack tumor promoting or carcinogenic potential in a medium-term multi-organ

carcinogenesis bioassay in rats. Jpn. J. Food Chem., 4: 99-106.

- 6) Westendorf J, Pfau W, Schute A (1998). Carcinogenicity and DNA adduct formation observed on ACI rats after long-term treatment with madder root, *L. Rubia tinctorum*. Carcinogenesis, 19, 2163-2168.
- 7) Thybaud V, Dean S, Nohmi T, de Boer J, Douglas GR, Glickman BW, Gorelick NJ, Heddle JA, Heflich RH, Lambert I, Martus HJ, Mirsalis JC, Suzuki T, Yajima N (2003): In vivo transgenic mutation assays. Mutation Res., 540(2), 141-51.
- 8) Kastenbaum, M.A., and K. O. Bowman (1970): Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutation Res., 9, 527-549.
- 9) 広瀬雅雄 (2005): アカネ色素の発がん機構に関する実験的研究. 平成16年度総括研究報告書 (印刷中)

F. 健康危険情報

「なし」

G. 研究発表

「なし」

H. 知的財産権の出願・登録状況

「なし」

研究成果の刊行に関する一覧表

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	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	環境変異原研究	26	275-283	2004
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	26	193-198	2004
Zhan, L., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Wu, D-S., Zhang, L-S., Suzuki, T., Hayashi, M., Honma, M.	Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells	Mutat. Res.	557	1-6	2004
Svoboda, P. and Kasai, H.	Simultaneous HPLC analysis of 8-hydroxy- deoxy- guanosine and 7-methylguanine in urine from humans and rodents	Anal. Biochem.	334	239-250	2004
Ohmoria, K., Sasaki, K., Asada, S, Tanaka N, Umeda, M.	An assay method for the prediction of tumor promoting potential of chemicals by the use of Bhas 42 cells	Mutat. Res	557	191-202	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

林 真^{1*} (委員長), 長尾 美奈子² (副委員長), 祖父尼 俊雄³, 森田 健¹, 能美 健彦¹, 本間 正充¹, 宇野 芳文⁴, 葛西 宏⁵, 佐々木 有⁶, 太田 敏博⁷, 田中 憲穂⁸, 中嶋 圓⁹, 布柴 達夫¹⁰

¹ 国立医薬品食品衛生研究所 〒158-8501 世田谷区上用賀1-18-1

² 共立薬科大学 〒105-8512 港区芝公園1-5-30

³ (株)ノバスジーン 〒192-8512 八王子市久保山町2-3

⁴ 三菱ウェルファーマ(株) 〒292-0818 木更津市かずさ鎌足1-1-1

⁵ 産業医科大学 〒807-8555 北九州市八幡西区医生ヶ丘1-1

⁶ 八戸工業高等専門学校 〒039-1104 青森県八戸市田面木上野平16-1

⁷ 東京薬科大学 〒192-0392 八王子市堀之内1432-1

⁸ (財)食品薬品安全センター 〒257-8523 秦野市落合729-5

⁹ (財)食品農医薬品安全性評価センター 〒437-1213 磐田郡福田町壺新田字荒浜582-2

¹⁰ 東北大学 〒980-8577 仙台市青葉区片平2-1-1

要 約

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に臨時委員会を設立し、厚生労働科学研究費補助金食品安全性確保研究事業「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」の研究班と共同し、定例の検討会議を毎月開催し、統一的な考えについて検討を続けている。本戦略を構築するためのモデルとして、コウジ酸を選択し、評価に必要と考えられる試験を実施し、その結果の評価、解釈を国際的議論のもとに標準化可能なものとするため、海外から指導的立場にある研究者をコンサルタントとして招聘し、議論、提言を受けた。本臨時委員会の活動は3年計画で進められており、現在は約1年半が経過したところである。ここでは、本委員会の設置意図を中心に活動の中間報告を行う。

1. はじめに

赤色2号をはじめとするタール系食用色素、既存添加物「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、安心が国民の関心を集めている。特に発がん性の問題はがんが死亡原因の第一位であることから、国民の健康にとって重大な問題であり、食品添加物の安全性に関しても、最大の懸念はやはり発がん性である。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が重要な問題になる。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でき、一日摂取許容量(ADI)が設定可能であると考えられてきた。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を設定することはできない、すなわち暴露が非常に低くても依然としてリスクがあるとされてきた。ところが、化学物質の遺伝毒性に関する情報は安全性評価の一環として広く用いられているが、hazard identificationを目的とする場合が主で、risk assessmentを行うための戦略が確立されていない。その理由の一つとして、この「遺伝毒性には閾値がない」とする思想が根底にあり、hazard identificationがそのままrisk assessmentとして用いられてきたことにある。遺伝毒性の試験法に関してはICH, OECD, IWGT等により国際的な調和がなされてきたが、試験結果の評価、解釈(すなわちリスク評価)に関しては国際的な基準はない。ただし、英国のDepartment of Healthの諮問会議であるCOMによるガイダンスが影響力を発揮しており、米国EPAに

* E-mail: hayashi@nihs.go.jp

受付: 2004年10月15日 受理: 2004年10月15日

日本環境変異原学会

よるポジションペーパーも同様の内容となっている。また、最近EUのCPMPからは医薬品の遺伝毒性不純物のリスク評価に関するドラフトが出されている。しかしながら、我が国ではこのような検討がなされていないのが現状である。このように、近年海外で、リスク評価に係る戦略を検討する機運が高くなってきていることを考え合わせると、我が国においても、化学物質の遺伝毒性の検出、評価、解釈に関する基本的な考えを確立することは重要なことであると考え、そこで、専門家集団である日本環境変異原学会の中に臨時委員会を設け、この問題について検討を開始することとした。本臨時委員会では、検討した戦略を日本環境変異原学会の統一見解としてまとめ、国際的なコンセンサスを得た論文として公表する予定である。まず、すべての人の生活に関係する食品関連物質を取り上げた。食品関連モデル化合物としてコウジ酸について検証を重ねてきた。食品関連物質の遺伝毒性の考え方が確立されれば、医薬品、農薬、工業化学物質等への適用は可能と考える。

なお、本臨時委員会の活動は、厚生労働科学研究費補助金食品安全性確保研究事業「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」の研究班と合同で進めているものである。本臨時委員会の活動は現在も継続中であり、ここでは、活動中間報告としてその活動目的を述べ、初期約1年間の検討会(第1回～第13回)の議事要旨を本臨時委員会の活動報告として提示する。

2. 遺伝毒性の戦略

本臨時委員会が描く「遺伝毒性の評価・解釈のための戦略」とは、遺伝毒性のリスク評価における定量的評価の導入である。遺伝毒性を有する発がん物質は閾値ならびにADIが設定されず、食品添加物等においては使用禁止の措置がとられる。例えば、食品添加物では、動物に対し低用量で高頻度でがんを誘発する物と、高用量でも低頻度にしかがんを誘発しない物では、そのリスクの違いは考慮されていいにも関わらず、最終的に同じ扱いがなされる。すなわち、ゼロリスクの考えである。しかし、リスクとは確率であり、0.01%のリスクも50%のリスクも、それが0%ではないということのみで同等のリスクととらえることは、リスク評価においても、続くリスクマネジメントにおいても、もはや現実的ではないと考える。本臨時委員会は、遺伝毒性のリスク評価に定量的評価を導入し、より現実的な遺伝毒性のリスク評価法を構築したいと考えている。この考えは、発がんとの関連だけでなく、次世代への遺伝的影響の評価においても同様である。定量的評価には、動物の発がんにおける遺伝毒性の関与(メカニズム)、ヒトにおける当該メカニズムの発現、閾値の設定、ヒトの暴露量などの検討が不可欠である。また、アフラトキシンは、遺伝毒性発がん物質

であるにもかかわらず、避けることのできない汚染物質ということでTDI(耐容一日摂取量)が設定されている。この例からも理解されるように、遺伝毒性発がん物質であってもなんらかの「実務的閾値」を設定することは可能と思われる。そのための、理論的構築やデータベースによる検証(例えば、各種遺伝毒性試験における反応の強さとヒトにおける発がん性の有無の相関など)が必要となろう。

なお、遺伝毒性の「検出・評価・解釈」という用語は、「リスク評価」と同義に用いている。「検出」ではどのような試験の組合せが遺伝毒性に係るハザードの確認に有効なのか、「評価」では各種試験の重み付けやin vivo遺伝毒性試験の有用性や限界、またその用量や反応の程度はどうか、「解釈」ではどのような遺伝毒性のメカニズムによりハザードが生じているのか、そのハザードはヒトにおいても影響(発がん性、生殖細胞突然変異など)を与えるのか、閾値は設定できるのか、既知物質と比較しての影響はどうか、ということの意味している。

3. コウジ酸の検討結果

化学物質の遺伝毒性の検出、評価、解釈(すなわちリスク評価)に関する基本的な考えを確立するためのモデル化合物として、最初にコウジ酸を選択した。コウジ酸は、麹菌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、その遺伝毒性も検出されたことから、食品添加物としての使用は禁止されることとなった化合物である。

コウジ酸の遺伝毒性試験ならびに発がん性試験については、これまでにいくつかの既発表および未発表のデータがある。さらに、本臨時委員会においても厚生労働科学研究費研究班とともに、追加検討を行った。それら一連の試験の結果については、すでに長尾委員による報告があるので参照されたい(環境変異原研究, 26, 193-198, 2004)。結論として、コウジ酸は多くのin vitro遺伝毒性試験およびいくつかのin vivo遺伝毒性試験において陽性を示したことから、遺伝毒性物質であることは明らかであるが、試験用量を考慮するとその程度は弱いものと考えられる。一方、肝臓においてはわずかな8-OH-dG量の増加が見られたが、突然変異の増加は観察されず、初期1年間の検討で得られたデータからは、肝臓で示唆されている腫瘍誘発性を遺伝毒性によって合理的に説明することはできていない。

4. 検討会議事要旨

以下は、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」および厚生労働科学研究費研究班：「食品添加物等の遺伝毒性検出の戦略に関する研究」による合同検討会の議事要旨である。

4.1. 第1回検討会(2003年1月27日)

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

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

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

今後の計画として、8名の委員をコアとし、会合を重ねて問題点の抽出、整理、議論、とりまとめを行う。それぞれの会合においてさらに専門家の必要な場合には個別に招聘することとし、議論の質と正確さを高める配慮

をする。具体的には、文献、ドキュメントの収集とそれらの整理、解析を行う。手始めとして、前述のCOMガイダンス、USEPAのポジションペーパー、EUCPMPのドラフト、食品添加物として議論された赤色2号およびコウジ酸の遺伝毒性に関する文書等を用いる。

本臨時委員会の特色としては、具体的なデータを基に議論を進めることを基本とし、具体的な議論の積み重ねの上に概念的な考察を加える。特に、閾値の問題に関しては十分な議論の上に、学会としての統一見解を示したい。その過程において、個々の試験法の限界ならびに結果の解釈についても議論を深める。検討内容に関しては随時日本環境変異原学会のHP上に公開し、学会員が自由に発言できる体制を考える。また、本年11月に開催される日本環境変異原学会第32回大会において検討結果(少なくとも中間的なまとめ)を発表する。さらに、この議論を国際的に認知されるよう、海外の専門家にコンサルテーションを年度内に開催するとともに、速やかに論文として公表することを目指す。

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

- 食品添加物だけでなく食品そのものも対象とするのか？：その方向で考えている。
- 遺伝毒性の閾値をどう取り扱うか？：行政サイドからの要望もあり、practicalな閾値の設定が可能かどうかを議論したい。そのためには遺伝毒性のメカニズム解析が必要だろう。
- 遺伝毒性の総合的評価法を議論するのか、個々の化学物質の評価を議論するのか？：最終的には前者を考えたい。
- 基本的なstrategyはCOMガイダンスで大筋良いと思えるので、COMの問題点は何か、データが足りないなら何が足りないのかを明らかにできれば良いのではないか？：遺伝毒性の問題の有無を我々のstrategyできちんと評価することが主目的。COMが良いという結論ならばそれでも良い。その評価法を用いて、例えばコウジ酸(遺伝毒性、発がん性の陽性・陰性データが種々あり、現状では評価が困難)をきちんと評価できれば良い。
- Genotoxic non-carcinogenをどう考えるかも一つの方法論ではないか？：遺伝毒性をもつこと自体の危険性をアピールできれば、遺伝毒性試験の実施意義もアピールできる。

- 本委員会の最終結論をどのようにまとめるのか、そのイメージは(例えば、危険度につき何らかの call を発信する等)? : 化学物質の単なる classification ではなく、risk 評価まで踏み込みたい(できるか否かは別として)。
- 知りたいことは、何を具体的にどうすればものが言えるのかという点。また、COM 等では in vivo の結果を重視しているが、in vitro 陽性の結果が何を意味するのかも検討すべき。
- Epigenetic なものをどう扱うか? : 本委員会の趣意とは異なるように思えるので、必要があれば考慮する。
- 各遺伝毒性試験の既知データを解析するにあたり、定量的概念(どの用量から陽性になっているか、1 μ g オーダーか 1000 μ g オーダーかでは意味が違うのではないか)も考慮してはどうか。
- 代謝の種差も考慮すべき。ヒトに対する遺伝毒性の有無を最終的には評価すべきではないか。
- まずは、COM の各 stage の試験法の整理(発がん性等との一致率の評価等: 分担者を決め、review paper を中心に調査)から始めてはどうか? : 定量的評価も考慮するなら、膨大な作業量になるため困難か。分担は決めず、各人が可能な範囲で調査してみる。Discrepancy のあるものを中心に調査する手もある。
- 総論からまとめていくのは大変な作業になりそうなので、各論から始めてはどうか? まずはコウジ酸の評価を行う。評価のために何が足りないかを議論すれば、自ずと COM に何が足りないかや遺伝毒性総合評価の strategy が見えてくるのではないか? : この方向性で検討を開始することになった。コウジ酸に関する資料を配付し、各委員ごとにその risk を考察して、次回の委員会で討論することになった。

4.2. 第2回検討会(2003年3月18日)

林委員長より、厚生労働科学研究費申請に関する説明があった。概要としては、戦略に関する理論を構築するために必要なデータを得るための実験も行うこととする。運営に関しては、研究班と JEMS 臨時委員会は協力して事業を推進するものであり、今後は合同の会合を持つこととする。

国際ワークショップに関しては、本年度中に開催する必要がある。3日程度の会合を計画し、最初の2日間はクローズドな会議とし、3日目に公開のワークショップかシンポジウムを開催する。クローズドな会議では、その時点までにまとめた我々の考えについてコンサルテーションを受ける。公開ワークショップでは、我々の考え、コンサルテーションのまとめ、ならびに海外からの参加者にそれぞれの立場から講演をしてもらう。

4.3. 第3回検討会(2003年5月26日)

長尾委員より、本委員会の課題につき説明があった。遺伝毒性評価のための strategy として UK COM のガイダンスを参考にしたとき、そこに含まれる3つの課題(1. in vivo 遺伝毒性の検出法と評価基準の確立、2. 発がん性に繋がる事象か否かの判定、特に aneugenicity を含めるべきかどうか、3. 遺伝毒性発がん性物質と遺伝毒性物質の閾値)を中心に議論したいとのことであった。Heritable な影響、特に遺伝毒性非発がん性物質の germ cell への影響についても議論すべきとの意見が出され、第4の課題として加えることになった。委員会の具体的な取り組み方法に関して討議し、まずは各ガイダンス(COM, ICH, CPMP, EPA, Health Canada など)の比較表を森田委員が中心となって作成し、相違点を明らかにしつつ問題点の議論を行うことになった。議論の中で試験系に関する疑問点が出てきた場合、その試験系に精通している委員または専門家によるレビューをその都度行うことになった。

研究班におけるコウジ酸とタール系色素の研究内容につき確認が行われた。コウジ酸に関しては食添用、部外品用、試薬を代表する3種のロットを選び、まずは in vitro Comet assay (佐々木委員)と TA98, TA100 を用いる細菌を用いる復帰突然変異試験(ブラックライトの同時照射実験を含む: 太田委員)を行う。その結果を見て他の試験系でも3種ロットでの評価が必要かを考える。³²P ポストラベル法による DNA 付加体形成試験(長尾委員)を実施する前に各ロットの不純物分析とその遺伝毒性確認を行い、その後に DNA 付加体形成試験を行うかどうかを考える。光遺伝毒性(プラスミド DNA 鎖切断試験, Ames 試験, 染色体異常試験, Comet assay 等: 田中委員)は先ずプラスミド DNA 鎖切断試験を行い、その後に他の試験系の必要性を考える。新たに、コウジ酸とタール系色素に関して遺伝毒性との構造活性相関を調べることにする(林委員)。

4.4. 第4回検討会(2003年6月30日)

コウジ酸の試験進捗状況について、担当者から途中経過について説明がなされた。TA100, WP2uvrA/pKM101, +/-S9 mix において陽性となり、ロット間で大きな差はなかった(太田委員)。TA100, -S9 mix で3ロットとも同様に陽性、分析も開始した(長尾委員)。Comet 試験, WTK1, -S9 mix, 4, 8 h 処理した結果全て陽性で、ロット間に大きな差は認められなかった(佐々木委員)。

森田委員からリスクアセスメントの基礎的事項の概説の後、ICH-Q3C, CPMP の genotoxic impurities に関する position paper, Dearfield らによる US EPA の position paper, UKDH の COM ガイダンス, Health Canada の工業化学物質に関する文書の詳しい紹介があった。さらに、それらの間の比較表が提示され、説明がなされた。

今回の検討会は、コウジ酸の既存データに基づく評価を分担して行うこととした。分担は、in vitro non mammalian(能美委員)、in vitro mammalian(祖父尼委員)、in vivo 試験(中嶋委員、林委員)、Comet(佐々木委員)、carcinogenicity(宇野委員)とした。

4.5. 第5回検討会(2003年7月22日)

コウジ酸の既存データに基づく評価のまとめが報告され、多くの議論がなされた。

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

遺伝子突然変異試験、染色体異常試験、SCEおよび小核試験のデータが報告された。染色体損傷性について1000 µg/mL以上の濃度で陽性となるケースが認められたが、コウジ酸の分子量が142であることから、10 mM(1420 µg/mL)を上回る濃度での陽性結果の生物学的妥当性に疑問が呈された。1000 µg/mL以上の濃度での細胞毒性、pHのデータの必要性が指摘され、pHについて中嶋委員が確認することとなった。そのデータに基づき、必要に応じ、田中委員が染色体異常試験(細胞毒性評価を含む)を実施することとなった。追加情報として、佐々木委員により、WTK-1細胞を用いた染色体異常試験の結果(約10 mM以上で陽性)が紹介された。会議後、長尾委員より、CHL細胞において72時間処理で見られる小核がaneuploidyによるものかどうかを検討してはどうかとの提案がなされた。また、祖父尼委員より、WTK-1細胞での染色体異常誘発性に関連し、TK6細胞での検討(トリパンプルー法による細胞数計測も含む)の必要性が提案された。佐々木委員により、これら試験の実施の可否について検討中。

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

2) Comet assay(佐々木委員)

In vitro Cometでは、2500 µg/mL以上の濃度で、用いた2種類の細胞で陽性となったこと、in vivo Cometでは、マウスを用いた2つの機関の結果の相違(機関Aは陰性、機関Bは胃と肝で陽性)、ならびにマウスとラットの陽性臓器の相違(マウス：胃と肝、ラット：胃と肝に加え肺と骨髄)が報告された。前者の相違の要因としてマウスの系統差、被験物質の相違、検体調製の微妙な相違などが考えられるが、実際のところ何に起因するかを確認する必要性が指摘された。A社のサンプルを分析にかけることが提案され、実施することとなった(長尾委員)。なお、機関Bにおけるin vivo Cometの陽性反応は弱いものであったが、BaPのような多環芳香族炭化水素が示

すComet像と類似していた。ただし、in vivo Cometでは、BaPのような多環芳香族炭化水素は弱い陽性しか示さない。

3) In vivo mammalian test systems(中嶋委員)

優性致死(陰性)、マウス(陰性)&ラット(陽性)骨髄/末梢血小核試験、マウス(陽性)&ラット(陰性)肝臓小核試験、ラット肝UDS試験(陰性)、マウスTG試験(陰性；肝臓)およびDNA付加体試験(ラット甲状腺、陰性)の結果が報告された。総合すると、コウジ酸のin vivo 遺伝毒性(小核誘発性として)はマウス肝およびラット骨髄にみられ、動物種および標的臓器に相違が認められることから、実際の曝露評価や代謝の検討が必要かもしれない。また、いずれの陽性反応も致死用量付近(1000 mg/kg以上)であることも重要なポイントとなる可能性がある。マウスTG試験では1600 mg/kgを28日間投与されているが、なぜ、そのような高用量の投与が可能であったのかに疑問が呈された。

4) Carcinogenicity(宇野委員)

コウジ酸による甲状腺腫瘍および肝腫瘍を検討した試験(マウスがん原性試験、p53-KO & 野生型マウス反復投与試験、ラット肝二段階発がん試験、ラット伊東モデル試験、甲状腺腫瘍検討試験)から、マウスおよびラットの甲状腺腫瘍はプロモーション作用によること、肝腫瘍については、プロモーション作用に加え、イニシエーション作用も否定できないことが報告された。甲状腺については、DNA付加体や8-OH-dGの検討がなされ陰性結果を示したが、肝臓の当該データがなく、その必要性が指摘された。8-OH-dGについては葛西委員による検討結果が待たれる。また、宇野委員からショウジョウバエ試験、RDS試験等の実施を計画していることが紹介された。会議後、7月中旬に開催されたトキシコロジー学会で、コウジ酸による肝RDSの陽性結果が報告された(2%混餌投与で投与開始約3日目と2週間目の解析で陽性、4週間後では陰性)ことから、宇野委員によるRDSの検索は、混餌と強制経口での比較を加えてみる予定とのこと。

5) In vitro non mammalian(太田委員)

Ames試験データについて報告され、公表文献のいくつかはデータの信頼性に疑問のあることが述べられ、最終的な評価材料としないことが提案され、了解された。さらに、太田委員によって検討されたTA100、TA98、TA102およびWP2 *uvrA*/pKM101を用いたAmes試験のデータが紹介された(コウジ酸のいずれのロットも代謝活性化の有無にかかわらず陽性)。さらに、UVA照射の影響は受けなかったこと、変異のタイプに他の化合物ではあまりみられないA・T→C・G、G・C→C・Gがみられたことが報告された。会議後、能美委員より、コウジ酸の化学構造からどのようなDNA損傷作用が考えられるのか、化学の立場から検討することの必要性が、また、

長尾委員より、topoisomerase阻害活性の有無を検討することの必要性も提案された。

4.6. 第6回検討会(2003年8月20日)

コウジ酸の遺伝毒性について新しいデータが紹介された。光切断(田中委員)について、コウジ酸を用いた光プラスミド切断性試験と、それに対するラジカルスカベンジャーの影響に関する試験が実施された。コウジ酸は光照射によるDNA切断を誘発し、これにはスーパーオキシドおよび過酸化水素の発生が関与していることが示唆された。TK6/WTK-1細胞によるTK-遺伝子突然変異試験(本間委員)について、TK6、WTK-1細胞とも用量依存的に突然変異を誘発することが示された。細胞毒性の結果と両細胞の反応性から、コウジ酸は主として、点突然変異を誘発すること、細胞周期停止作用があることが指摘された。

特別講演として、大阪市立大学福島昭治先生より「Genotoxic carcinogenの閾値に関する研究」について講演が行われた。

4.7. 第7回検討会(2003年9月22日)

コウジ酸溶液pHに関して中嶋委員より紹介された。前回のデータよりさらに高濃度での検討が提案され、それに回答するものである。DMSO、生理食塩液ともに最高用量で6.9および6.7と軽度な低下が観察されたが、染色体異常誘発性が認められる低pHは6程度であるので、pHの変化が染色体異常誘発性の原因とは考えがたいことが確認された。

E. coli WP2 *uvrA*/pKM101 および *E. coli* WP2/pKM101 を用いた結果が太田委員より報告された。S9 mixの存在に関わらず用量依存的に復帰変異コロニーが増加したが、WP2 *uvrA*/pKM101でより強い誘発が観察され、酸化的傷害のみでなく、bulky adductを形成している可能性が示唆された。

BMD(Bench-mark dose)およびVSD(Virtual Safe Dose)算出法が宇野委員によって紹介された。コウジ酸の雌マウスにおける甲状腺がんのデータを用いてBMDの計算のデモが行われ、数学モデル(Gamma, Multistage, Logistic, Provit, Quantal-linear, Quantal-quadratic, Weibull model)の違いによりBMDの値に多少違いが出るが、その差は小さいことが示された。また、遺伝毒性試験、例えばin vivo小核試験データへの適用に関しても議論がなされ、陰性対照の値を10%上昇させる用量を指標にしてはどうかとの提案もなされた。今後、本委員会の提案の一つとして検討する必要がある。

William G. Thilly: Have environmental mutagens caused oncomutations in people? Nature Genetics, 34, 255-259(2003)が本間委員より紹介された。ポイントは、人にがんを引き起こす突然変異のほとんどは内的要因に

よるものであり、環境変異原が突然変異を誘発することにより人のがんを引き起こすという証拠は特別の場合を除きほとんどない(紫外線照射、がんの化学療法や、放射線療法)。環境要因は突然変異を誘発するというよりもむしろ、突然変異を持つ細胞を選択すると考えた方が、人での環境発がんの事実をうまく説明できるように思われる。以上の発表に関して多くの議論がなされ、本委員会のポジションペーパーを作り上げる場合にも参考になるが、遺伝毒性に関する考え方を単純化しすぎることなく、いろいろな角度から考察を加える必要があるとされた。

日本環境変異原学会発表の要旨について長尾委員から説明があり、ヒトに対するコウジ酸の暴露量を、天然に存在する可能性のある「みそ、醤油」から試算してみるなどの説明があった。

長尾委員から、これまでに得られた新しいデータのまとめおよび今後の検討の方向性に関する以下の提案がなされた。コウジ酸の変異原性についての整理では、コウジ酸のHPLC分離により、コウジ酸の分画が±S9で変異原性を示した。コウジ酸以外の分画に変異原性があるか否か現在検討中である。大腸菌変異スペクトル解析により、G→Aが35%、その他は9~15%、AT塩基対の変異が37%と高いのが特徴である。In vitro ヒトリンパ芽球様細胞でTK変異、MN、Cometの誘発がみられ、MNについてはaneuploidyであるか否か検討する必要があると思われる。TK変異については塩基置換、LOH、aneuploidyによる可能性があるが、このメカニズムについては特に検討せず、トランスジェニックラットの結果を待つ方針である。In vitro 染色体異常について、ヒト細胞TK6およびWTK-1細胞を用いて検討する(佐々木委員)。In vivo genotoxicityの検出法のrecommendationを作る場合に重要となる問題として以下の事項があげられた:

- In vitro におけるMNはin vivo情報のために重要か。In vivoと動物種を統一する必要は無いか。
- ヒトの細胞を使うことは良いが、MNについてはWTK-1、TK6細胞の結果は陽性であり、Human keratinocyte および Hep G2の結果と異なる。後二者の再現性を検討した上で、理由を検討する必要があると思われる。
- コウジ酸はdirect mutagenであるが、S9の存在下でも活性は低下しないので下記に関する問題は無いが、S9で不活性化されるものは、胃に対する作用を調べる必要がある。変異原性試験において胃で使えるシステムとしてCometのvalidationが重要である。

以上の提案について議論がなされた。In vitroでの小核誘発性に関し、数的異常によるものか否かを、本間委員がFISHで検討することとした。また、トランスジェ

ニックのデータが非常に重要であることが確認され、中嶋委員が担当することとなった。雌 MutaMouse を用い、3 および 1.5% の混餌で 4 週間の投与とし、肝臓における変異を調べる。他の臓器も凍結保存しておき、必要に応じて解析する。また、DNA シークエンスの解析が必要な場合には衛研が協力することとした。その他、雌雄を用いるべき、BMD が求められるように多くの用量段階について検討すべき、Comet、肝小核等を組みあわせて行っは、等の意見が出されたが、さらに検討することとした。

4.8. 第8回検討会(2003年10月22日)

コウジ酸のSVK14およびHepG2を用いたin vitro小核試験の結果に関する祖父尼委員のレビューが紹介された。

コウジ酸のラット肝RDS試験およびショウジョウバエ試験の中間結果が宇野委員より報告された。RDS試験は強制経口投与と混餌投与で行い、投与3日後に両条件とも最高用量でRDSが誘発された。肝の重量変化および病理組織変化はなかった。体重当たり投与量は混餌投与の方で多かったが、体重増加量は強制経口投与で強く抑制された。甲状腺重量は強制経口投与より混餌投与で著しく増加した。ショウジョウバエのDNA修復および翅毛スポット試験は陰性であった。

コウジ酸のMutaMouseを用いた遺伝子突然試験の計画概要が中嶋委員によって紹介され、内容が協議された。投与用量は1、2および3%とすること、摘出器官に甲状腺を加えることになった。

Kerry L. Dearfield et al.: Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutation Res.*, 521, 121-135(2002)のJETOCによる日本語の解説記事が森田委員より紹介された。

4.9. 第9回検討会(2003年11月20日)

コウジ酸の遺伝毒性について、長尾委員より新しいデータが紹介された。3ロットのコウジ酸の各HPLC分画について復帰突然変異誘発能を検討したところ、ロット間に相違は認められず、またNMR分析により活性物質はコウジ酸であることが確認された。このことから、既報告の相反するin vitro試験結果は、各ロットに含有されている可能性のある不純物によるものではないことが明らかとなった。

日本環境変異原学会発表スライドの改訂版が長尾委員より提示された。スライドは若干の変更がかけられた後、最終版とされる予定である。今後、リスク評価に関し必要とされるであろう議論内容について、以下の項目が上げられた：

- 閾値以下のものであれば、いくら加えても問題はないのか？

- 化学物質の使用をやめた場合のリスクは？
- 何に使うかによって許容できるレベルは異なるのでは？
- 発癌性のリスクには閾値があっても、遺伝毒性のリスクとしてはどうか？

4.10. 第10回検討会(2003年12月25日)

中嶋委員から、コウジ酸のTG試験(1, 2, 3%混餌)の進捗状況について説明がなされた。12月19日に解剖が終わり、必要な組織(肝臓、胃、結腸、骨髄、甲状腺)を凍結した。肝臓の一部をDNAの酸化障害(8-OH-dG)を検討するため葛西委員に送付した。マクロでは全処理群で甲状腺の肥大、および最高用量群で子宮の肥大(5倍程度)が観察された。また、最高投与群において軽度な体重増加抑制が認められたが、その他特記すべき事項はない。また、最終日には末梢血のAO超生体染色による小核試験のための標本作製したので、順次解析予定である。さらに、肝臓の一部を用いてComet試験を実施するための準備を進めている。

森田委員から、Commission of the European CommunitiesのRegulation of the European Parliament and of the Council, concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restrictions of Chemicals (REACH)に関する紹介がなされた。一般化学物質が対象で、CMR effects (carcinogenicity, mutagenicity and toxicity for reproduction)を中心に考慮し、危険物を規制しようとするものである。生産量により要求される試験項目が変わる点、陰性の場合in vitroの試験がなくても受け入れ可能なin vivo試験結果があれば、それでの評価も行う点等が新しい点であろう。

4.11. 第11回検討会(2004年1月16日)

葛西委員からコウジ酸を投与したTGマウス肝における8-OH-dGの測定結果の説明があった。以前の実験では、2%コウジ酸を2週間投与したラットの甲状腺で明らかな減少がみられたが、MutaMouseの肝では3%混餌投与群で有意に増加した。葛西委員の発表について質疑がなされた。主なものとしては、コウジ酸は抗酸化物質なのに今回8-OH-dGが上がった理由に関し、アスコルビン酸でも高用量だと上がることが判っており、コウジ酸の構造から考えて、ラジカルができてきている可能性が指摘された。その他、ラットでは甲状腺での8-OH-dGの低下がマウスでも再現可能かとの疑問が提示されたが、マウスの甲状腺は非常に小さく、技術的に困難であることが指摘された。また、データのばらつきに関する質問等が出された。また、反応の強さ、再現性に関する質疑、応答があった。

MutaMouseを用いる試験の進捗状況について中嶋委員から報告がなされた。現時点で、DNA抽出まで終了

しており、これから解析にかかる。また、同じ動物での Comet assay (28日投与の3日後の測定)と末梢血MNは陰性であった。

4.12. 第12回拡大検討会(クローズド会議：2004年2月12～13日、国際シンポジウム：2004年2月14日)

本検討会は、海外コンサルタント(M.J. Aardema, D. Benford, D.H. Blakey, S.M. Galloway, D. Kirkland, Y.J. Surh, V. Thybaud, D. Tweats, L. Müller)を招き、拡大検討会として2回に分けて開催した。

1) クローズド会議

第12回拡大検討会議を海外の識者を招いてのコンサルテーション会議として開催するにあたり、本検討会の背景および目的が林委員長より説明された。最終目標は、3年間(2003年4月～2006年3月)の研究期間の最後まで残り2年で、食品関連物質の遺伝毒性に関するリスク評価の戦略を構築し、提言をまとめることにある。

長尾委員より、食品添加物としてのコウジ酸の遺伝毒性リスク評価について説明がなされた。すなわち、日本における食品添加物の規制の歴史、今回のコウジ酸規制の理由、薬事食品審議委員会で検討されたコウジ酸の発癌性ならびに遺伝毒性データの要約、それらを基にしたHERP法やBMD法による発癌リスクの計算結果などが報告され、極めて弱い反応しか示さない化合物の評価をどう扱うかについて問題提起を行った。

宇野委員より、コウジ酸の遺伝毒性に関する新規データについて説明がなされた。本検討会がこの1年間で実施した下記11種の試験/検討の結果を、データをふまえて報告した。

- 培養液のpH：影響なし
- Ames試験における不純物の影響：コウジ酸に起因
- Ames試験(再確認など)：陽性
- 光プラスミド試験：陽性
- TK6/WTK-1細胞による突然変異および小核試験：陽性
- TK6/WTK-1細胞による Comet試験：陽性
- TK6細胞による光遺伝毒性試験：陽性
- ショウジョウバエ翅毛スポット試験：陰性
- 雌 MutaMouseによる肝臓遺伝子変異：陰性
- 雌 MutaMouseによる肝臓の8-OH-dG形成：陽性
- ラット肝臓 RDS試験：陽性

海外コンサルタントを中心として、コウジ酸の発癌性および遺伝毒性データが検証された。一連の議論は「コウジ酸はヒトにも該当する遺伝毒性発癌物質かどうか？」という点に集約された。その結果、結論を導くには現時点ではデータ間のギャップが多く、そのギャップを埋める必要があるとされた。相反する結果が得られた

場合には、一般的にはなんらかのクライテリアでその重み付けをすることがあり、その中ではGLP試験か非GLP試験なのか、発表された論文の掲載誌は何か、試験のデザインは適切か、著者の評判はどうなのか、といった点も考慮されることがあるとされた。コウジ酸については、肝発癌性が遺伝毒性メカニズムに起因するものか否かを評価するには、いくつかの不明点、疑問点あるいは問題点すなわちギャップが存在することが指摘された。例えば、発癌性データに関しては、肝腫瘍の質(良性か悪性か)や用いたコウジ酸の質(かび毒の含有率など)が明らかでないこと、ノックアウトマウスを用いた検討では群あたりの匹数が少ないことなど、また遺伝毒性データに関しては、肝臓小核ではマウス陽性/ラット陰性、骨髄/末梢血小核ではラット陽性/マウス陰性のように明確に一致していない点のあること、Comet試験ではtail momentの測定が必要とされたことなどである。これらの事項を解決するには、スライド標本の再評価やADMEデータ収集を含む追加確認試験の実施などが必要と提言された。

2) 国際シンポジウム

第12回拡大検討会議「その2」を、「食品関連物質等のリスクアセスメント戦略」と題した国際シンポジウムとして開催するにあたり、まず、その趣旨が長尾委員より説明された。以下、海外シンポジスト7名および国内シンポジスト2名による発表ならびに総合討論が行われた。その演題の中で、クローズド会議をふまえ、海外コンサルタントの提言が報告された。本シンポジウムの開催により、遺伝毒性を中心とした食品関連化学物質の安全性に関心のある多くの参加者に、遺伝毒性発癌物質であっても閾値を設定できる可能性のあることが認識されたものと思われる。今後は、どのようなケースに閾値の設定が可能なのか、また、その設定はどのように行うのが適切で人々に受け入れられるものなのかを明らかにする必要がある。

4.13. 第13回検討会(2004年3月15日)

2004年2月の鎌倉、東京会議について、今回の会議の成果については、Dr. Tweatsより提出される報告書の内容が重要であり、報告書を検討した上で今後の方向性を検討する。会議ではコウジ酸の発がん性、特に肝臓に対する発がん性に疑問が集中した。コウジ酸に遺伝毒性であったとしても甲状腺がんとの直接作用の関係はないであろう。また、肝がんを引き起こすとしても、それが遺伝毒性によるものがはっきりしない。従って、肝臓に対する遺伝毒性の有無を明らかに必要があるのではないかと。肝臓での小核試験を実施する際の問題点(ラット or マウス、加齢による影響、肝部分切除の影響)が話し合われた。

次年度コウジ酸に関する試験としては以下の試験を追

加試験として行うことが提案された：肝小核，肝臓でのDNAアダクトの検出，光毒性を考慮したMLA，ラット肝UDS，TK試験．試験データの信頼性を向上させるため，GLPでの試験，もしくは試験プロトコール等の精査の必要性である．今年度でコウジ酸に関する試験を終了させ，試験結果については来年度中に論文にまとめることを目指す．

次回のモデル化合物としてはアマランス，もしくは他のアゾ化合物を候補とする．化合物が決まり次第，手分けしてこれまでの試験データをレビューする．具体的な進め方に関しては，Dr. Tweatsの報告書を精査した上で，

もう一度話し合う．

5. おわりに

「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」に関する臨時委員会の目指しているところを軸に，活動中間報告をまとめた．コウジ酸1つを取り上げても，そのリスク評価は容易なものではなく，検討すべき事項は山積している．検討を重ね，残りの1年半で，JEMSの会員からも理解の得られる遺伝毒性の「検出・評価・解釈」についての戦略を構築したい．

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—

長尾美奈子^{1*}, 日本環境変異原学会臨時委員会²

¹ 共立薬科大学 〒105-8512 東京都港区芝公園1-5-30

Present situation and perspective of risk assessment: From the view point of food additives

Minako Nagao^{1*} and The Ad hoc Committee of JEMS²

¹Kyoritsu University of Pharmacy, 1-5-30, Shibakoen, Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan

²Japanese Environmental Mutagen Society

Summary

Kojic acid (KA), belonging to existing food additives for which compositions or usages are not clarified, had been used for prevention of enzymatic browning. In 1995, the food sanitation law was largely revised to harmonize with JECFA, OECD and FDA. Under the new law, reevaluation of existing food additives was required. In 1998, it was found that KA induced tumors in the thyroid and liver of mice. KA also showed genotoxicities; gene mutations in *S. typhimurium*, chromosome aberrations in CHO-K1 and CHL/IU cells in vitro, and micronuclei in the liver of mice and hematopoietic cells in rats. Although it has not been clarified whether liver or thyroid tumors were induced by genotoxic effects of KA or not, use of KA as a food additive was banned in 2003, based on the fact that KA was not used in any country at that time. The ad hoc committee which was set-up for a three-year task from 2003-2005 considered that KA was an appropriate model compound to re-evaluate the strategies presently used to detect genotoxicity in vitro and in vivo, and to re-evaluate the regulatory rules (use of genotoxic carcinogens as food additives should be totally avoided; genotoxic non-carcinogens in rodents can be used as food additives). First of all, we confirmed the genotoxicity of KA; we demonstrated that genotoxicity in *S. typhimurium* was due to KA itself, but not due to contaminants, KA induced TK mutations, micronuclei and DNA damage (Comet) in human lymphoblastoid cells, TK6 and WTK-1. These results support the finding that KA is genotoxic in vivo, although it is not clear yet whether KA induces tumors by its genotoxicity or not. Speculating that liver tumors induced by KA were due to its genotoxicity, human risks to KA to which humans are exposed by taking fermented food products was calculated to be 2×10^{-7} by the linearized multistage model.

Keywords: kojic acid, genotoxicity, tumorigenicity, risk, regulatory rule

* E-mail: mnagao@m8.dion.ne.jp

受付: 2004年7月1日 受理: 2004年8月2日

日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第32回大会シンポジウム3「リスクアセスメントの現状と展望：レギュラトリーサイエンスへの係わり」で発表された。

This paper was presented to the symposium 3 "Perspectives of risk assessment for genotoxicity" at the 32nd JEMS annual meeting, 2003.

背 景

食品添加物については、遺伝毒性の検出は規制の点から極めて重要である。遺伝毒性は単純、明確なマーカーのように思われるが、これをリスク評価に使用すると多くの問題がある。林 真 日本環境変異原学会前会長（2002～2003年）の提案で、「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」を検討することを目的とし、環境変異原学会の中に臨時委員会が設けられた。この臨時委員会は委員長・林 真、副委員長・長尾美奈子、委員・宇野芳文、太田敏博、祖父尼俊雄、布柴達男、能美健彦、本間正充、森田 健氏からなる。実験的裏づけに基づいて問題点を整理したいという考えから、林 真を班長とする厚生労働科学研究補助金（食品安全確保研究事業）「既存添加物の遺伝毒性検出の戦略に関する研究」の班員、田中憲穂、太田敏博、中嶋 圓、葛西 宏、長尾美奈子、佐々木 有、本間正充と合同で、毎月1回会合を持っている。研究班としては、最近使用禁止になった既存添加物・コウジ酸を取り上げて、遺伝毒性検出に関わる補充実験を行っている。この臨時委員会―厚生労働省研究班合同会議での、遺伝毒性検出および評価に関する取り組みについて、また、現在得られている結果に基づくリスクアセスメントについて報告する。

食品添加物の規制

わが国の食品添加物の規制は、厚生労働省（旧厚生省）の管轄になってから50年以上が経過する。現在使用が許可されている食品添加物は指定添加物、既存添加物、天然香料、その他に分類される。平成13年1月現在でそれぞれ338、489、612および72品目ある。コウジ酸は既存添加物、いわゆる天然添加物に属し、1995年の法改正の時点で既に使われていたものであり、成分規格・使用基準が設定されていなかった。しかし現在の法律では、新規食品添加物は、化学合成品か天然由来かを問わず、全て規格・基準の設定が要求されており、また、既存添加物についても規格・基準の設定が順次行なわれている。そのような過程で、コウジ酸が遺伝毒性発がん物質である可能性が示され、2002年12月に薬事・食品衛生審議会毒性・食品添加物合同部会、食品安全委員会に於いてその可能性が認められ、また、2002年には流通実態がなかったこともあり、パブリックコメントを求め、WTO通報した後、2003年10月に添加物として使用しないよう告示された（厚生労働省、2003）。

ここでわが国の食品添加物の規制について簡単に紹介する。国際的な食品添加物規制に関わる機関としては、FAO（Food and Agriculture Organization）とWHOが合同で設立したコーデックス国際食品規格委員会（CAC）があるが、日本もコーデックス加盟国である。コーデッ

クス食品添加物・汚染物質規格部会に科学的裏づけを提供しているのがJECFA（Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会）である。

わが国の食品添加物の毒性に関する試験として要求されているものは、① 28日反復投与毒性試験、② 90日反復投与毒性試験、③ 1年間反復投与毒性試験、④ 繁殖試験、⑤ 催奇性試験、⑥ 発がん性試験、⑦ 1年間反復投与毒性・発がん性併合試験、⑧ 抗原性試験、⑨ 変異原性試験、⑩ 一般薬理試験である（厚生労働省行政情報）。

変異原性試験としてはⅠ. 微生物を用いる復帰変異試験、Ⅱ. 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、Ⅲ. げっ歯類を用いる小核試験を実施し、これらの試験結果を補足する必要がある場合には、哺乳類培養細胞、ショウジョウバエ、げっ歯類を用いる遺伝子突然変異試験、げっ歯類の骨髓細胞、生殖細胞を用いる染色体異常試験、げっ歯類を用いる優性致死試験、微生物を用いるDNA修復試験、哺乳類細胞を用いるUDS試験、哺乳類細胞を用いるSCE試験を追加実施する、となっている（厚生労働省行政情報）。

遺伝毒性の評価には*in vivo*のデータが採用されるが、それを裏づける*in vitro*のデータが重要である。つまり、*in vivo*ではじめて陽性になる遺伝毒性物質は、*in vivo*ではじめて代謝活性化が起こることを示す必要がある。また、微生物を用いる変異原性試験で陽性ということは、その物質または代謝物がDNAと反応する確率が極めて高い点で、重要な意味をもっている。

毒性試験の結果の評価については、わが国でもJECFAでも、発がん性を有し、*in vivo*で遺伝毒性が示された物質は、食品添加物としての使用は認められていない。遺伝毒性発がん物質を使用禁止している理由を説明しているJECFAの文章をそのまま下に引用する（Food Standards Agency, UK, 2002）。

All studied neoplasms contain mutations of one type or another; there is a single copy of DNA in every cell, therefore, it is reasoned, there can be no threshold of damage below which DNA damage has no consequence, hence, there can be no safe exposure level to a carcinogen that is genotoxic.

JECFAでは、エピジェネティックな変化が発がんに関与すること、遺伝毒性があっても実験動物で発がん性を示さない物質が多々あること、遺伝毒性を示す発がん物質が非遺伝毒性のメカニズムでがんを誘発する場合があることを述べているが、これらを如何に取り扱うべきかについては、言及していない（Food Standards Agency, UK, 2002）。われわれは、げっ歯類の*in vivo*で

遺伝毒性を示すが、げっ歯類で発がん性を示さない物質がどの位あるのかは重要な問題であると考えている。

in vivo 遺伝毒性の試験には、骨髄における造血系細胞を標的としたものが一般的に評価に用いられているが、化合物によっては骨髄に分布し難いものがある。例えば MeIQ-DNA 付加体レベルは、骨髄では肝臓の 1/70 であり (Nagao et al., 2001)、N-NO-dipropylamine は肝小核では陽性であるが骨髄小核では陰性である (Noguchi et al., 1994)。また、直接変異原で、肝臓で不活性化されるものは、口腔や胃で遺伝毒性を示していないかについては調べられていない。

以上のように、コウジ酸の評価をしながら、現在行なわれている評価法の問題点を考え、一歩ずつ問題解決に向けて本委員会は活動している。

コウジ酸

コウジ酸は麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の産生する化合物で抗菌作用およびメラニン合成阻害作用を有する。チ

Table 1 Carcinogenicity of kojic acid¹⁾

	Kojic Acid %	Tumor incidence (%)	
		Thyroid tumor	Liver tumor
Male	0	2	48
	1.5	65 ^{**2)}	69
	3	87 ^{**}	47
Female	0	2	0
	1.5	8	4
	3	80 ^{**}	10 [*]

¹⁾Fujimoto et al., 1998. Kojic acid was administered to B6C3F1 mice in diet for 20 months. Effective numbers of animals were between 48-53.

²⁾* and **; significantly different from the control value at P < 0.05 and P < 0.01, respectively

ロシナーゼの阻害作用によるものである。食品添加物 (蟹やエビの黒変を防ぐための製造用剤) および医薬部外品 (化粧品) として使用されていた。冷凍保存法の普及により、現在では、食品添加物としては使われていない。1998年にマウスにおいて、甲状腺腫瘍および肝腫瘍誘発作用が検出された。発がん性を、Fujimoto ら (1998) の論文に基づいて纏めたものを Table 1 に示す。甲状腺腫瘍に関してはコウジ酸のプロモーション作用によること、マウスおよびラットで示唆されている (Fig. 1) (Fujimoto et al., 1998; 1999; Tamura et al., 2001)。

一方、コウジ酸に in vivo で遺伝毒性が検出され、特にマウス肝で小核が誘発されたこともあり、遺伝毒性発がん物質の可能性が示唆された。さらに、p53^{+/+}ヘテロマウスを用いた発がん実験で、コウジ酸の肝発がん性が遺伝毒性によることを否定できなかった (Takizawa et al., 2003)。

また、薬事・食品衛生審議会に提出された遺伝毒性の成績を Table 2 および Table 3 に纏めた。

コウジ酸の遺伝毒性は、サルモネラ菌突然変異、哺乳動物培養細胞染色体異常で陽性、ラット (幼若) 骨髄および末梢血における小核、マウス肝 (成熟、再生肝) における小核で陽性であったが、マウス骨髄 (成熟) およびラット肝 (幼若) 小核試験は陰性であった。そして、このラットとマウスにおける遺伝毒性発現の差を説明できる状態にはなかったが、2002年の時点ではコウジ酸

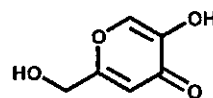


Fig. 1 Kojic acid

Table 2 Genotoxicity of kojic acid in bacteria and mammalian cells in vitro¹⁾

Marker for DNA damage	Cell	S9	No. of experiments	Result
Bacteria				
SOS repair	<i>E. coli</i>	with and without	1	Negative
Rec assay	<i>B. subtilis</i>	without	1	Positive
Gene mutation	<i>S. typhimurium</i>	with and without	6	Positive 5; Negative 1 (5 mg/mL) ²⁾
Mammalian cells				
<i>Hprt</i> mutation	V79	with and without	1	Negative (3 mg/mL)
<i>Hprt</i> mutation	L5178Y	with and without	1	Negative (1.4 mg/mL)
SCE	CHO-K1	with and without	1	Positive
Chromosome aberration	CHO-K1	with and without	1	Positive
Chromosome aberration	CHL/IU	with and without	2	Positive and Negative (5 mg/mL)
Chromosome aberration	V79	with and without	1	Positive due to toxicity
Micronucleus	HepC2	with and without	1	Negative (8 mg/mL)
Micronucleus	CHL/IU	with and without	1	Inconclusive (2 mg/mL)

¹⁾December 2002. Consultation meeting for drugs and foods, MHILW

²⁾The maximum concentration used

Table 3 Genotoxicities of kojic acid in vivo¹⁾

Tissue, cell	Marker for DNA damage	Lowest effective dose (g/kg×times)	Maximum dose (g/kg×times)	Number of experiments	Result
Mice					
Bone marrow (adult)	Micronuclei		1×2	3	Negative
Hepatocytes (adult, PH)	Micronuclei	1×1		1	Positive
Hepatocytes (adult)	Comet	1×1	1×1	2	Positive and negative
Liver (adult)	Lac Z		1.6×28	1	Negative
Thyroid (adult)	Comet		0.75×1	1	Negative
Rats					
Bone marrow (young)	Micronuclei	2×2		1	Positive
Peripheral blood (young)	Micronuclei	2×2		2	Positive
Hepatocytes (young)	Micronuclei		2×1	2	Negative
Hepatocytes (adult)	Comet	1×1		1	Positive
Hepatocytes (adult)	UDS		1.5×1	1	Negative

¹⁾ December 2002. Consultation meeting for drug and foods, MHLW

Table 4 Genotoxicity of kojic acid in human lymphoblastoid cells *

Marker	Cells	Result	Effective concentrations of kojic acid (mg/mL)
Mutation (TK)	TK6	Positive	1~4
	WTK-1	Positive	2~4
DNA damage (Comet)	TK6	Positive	2.5~5
	WTK-1	Positive	2.5~5
Micronuclei	TK6	Positive	2~3
	WTK-1	Positive	1~2

* Genotoxicities were examined without S9 mix.

が食品添加物としては使用されていないこともあり、使用禁止の措置がとられたわけである。

コウジ酸の遺伝毒性の再評価

以上の結果を踏まえて、本委員会で遺伝毒性検出法の問題点を討議し、試験物質のロットの違いによる可能性に配慮すると共に、さらにデータの補充を行なうことからはじめた。

1. サルモネラ菌、大腸菌における復帰突然変異

3種の異なるロットのコウジ酸、食品添加物用 (5312)、医薬部外品用 (2Y181)、および試薬 (052K2516) を用いた。サルモネラ菌 TA100, TA98, TA102、大腸菌 WP2uvrA/pKM101 に対し、いずれのロットもほぼ同程度の変異原性を示した。S9 mix 存在下では活性はやや低い傾向にあった。比活性は TA100、-S9 mix で、~100 変異コロニー/mg であった。さらにコウジ酸を HPLC で分離し、+S9 mix および -S9 mix で検出される変異原性がコウジ酸自身によることを明らかにした。

2. ヒト培養細胞における遺伝毒性

哺乳類の細胞としては、近い将来にヒトの細胞を使う

ことが望まれる。また、コウジ酸の培養細胞における変異原性は *Hprt* を標的とした解析が行なわれていたが、いずれも陰性であったことから、TK を標的とした解析を行なった。用いた細胞は、ヒトリンパ芽球様細胞 TK-6 (*TK*^{+/+}) および WTK-1 (*TK*^{+/+}*p53*^{mut/-}) である。TK 変異、小核、DNA 傷害 (コメット) いずれも陽性であった。突然変異頻度を自然突然変異頻度の2倍に増加させる濃度は両細胞とも 2 mg/mL であった。

食品添加物の指針には、遺伝毒性の試験に用いられる試験物質の濃度は最高 10 mM と定められているが (その理由は DNA と直接反応しない、いわゆる閾値のある遺伝毒性物質を拾う確率が高いためである、Scott et al., 1991)、サルモネラ菌に対する変異原性から、ヒトリンパ芽球様細胞における染色体異常は遺伝毒性により誘発されたと考えられる。

3. In vivo 遺伝毒性

Table 4 に示すようにコウジ酸は *LacZ* トランスジェニックマウスで陰性との報告がある (Nohynek et al., 2004)。しかし、肝発がん性が観察されたのは雌マウスであること、また、強制経口投与であることから、雌マウスに混餌投与することにより確認実験を行なってい

Table 5 Risk evaluation of kojic acid naturally present in fermented foods

Human exposure	
0.6 μg/kg/day	
HERP index	
Based on male mice thyroid tumor	$TD_{50} = 1.4 \times 10^3$ mg/kg/day
Based on female mice liver tumor	$TD_{50} = 1.4 \times 10^4$ mg/kg/day
HERP index = 4.2×10^{-7}	(thyroid)
HERP index = 4.2×10^{-8}	(liver)
Linearized multistage model for genotoxic carcinogen	
Mouse BMD_{10}	= 29,600 ppm
Mouse LED_{10}	= 18,600 ppm
Mouse kojic acid intake at LED_{10}	= 2.4×10^6 μg/day
Human tumor risk	$0.6 / 2.4 \times 10^{-7} \times (50 / 0.025)^{0.75} = 1.67 \times 10^{-7}$

る。また薬事・食品衛生審議会に提出された遺伝毒性の成績のうちマウスおよびラットの、それぞれ肝および骨髄における小核試験は、当委員会委員の実験結果であり、実験の詳細についての議論が可能であった。用いた動物の週齢、部分肝切除の適用などの点を統一した上で、なおラットとマウス間で遺伝毒性の発現に差がある場合は代謝の差に由来するのかを追求する方針である。

食品中のコウジ酸のリスク評価

薬事・食品衛生審議会では、醗酵食品中におけるコウジ酸の濃度を調べた結果、味噌41検体、醤油32検体、酒29検体のうち、味噌2検体から各々0.5 ppmおよび1 ppm濃度で、醤油1検体から1 ppm濃度で検出されたと報告されている。国民栄養調査に基づき、1日摂取量を味噌3g、醤油27 mLとし、味噌および醤油には1 ppmのコウジ酸が含まれているとすると、コウジ酸の摂取量は0.6 μg/kg/dayと見積もられる。

ヒトのコウジ酸に対する暴露量を0.6 μg/kg/dayとして、コウジ酸による発がんリスクの算出を試みた。一般に最もよく用いられている、HERP index (Human exposure to rodent potency index) および、米国EPAが遺伝毒性発がん物質のリスク評価に用いている線形多段階モデル (Linearized multistage model) 法に基づいて算出した。結果をTable 5に示す。

HERPは、発がん物質が遺伝毒性であるか否かを問わず、動物発がんにおいて用量相関が直線であり、動物の単位体重当たりの暴露量に基づくデータを、そのままヒトに適用する方法である (Gold et al., 1991)。B6C3F1マウス雄甲状腺腫瘍およびB6C3F1マウス雌肝腫瘍誘発率に基づくHERPはそれぞれVSD (virtually safety dose; 10^{-6} の発がん率) の1/10~1/100であった。なお、Tamuraら (2001) は甲状腺腫瘍に関してはコウジ酸のNOAEL (no-observed-adverse effect for thyroid tumor-promoting effect) を0.03% (15.5 mg/kg/day) としている。一般にはNOAELに安全係数100を用いて

1日許容摂取量が算出される。其の値は155 μg/kg/dayとなり、食品からのヒト暴露量はその1/260となる。

線形多段階モデルでは BMD_{10} および LED_{10} を用いる (関沢ら, 2001)。ベンチマーク量 (BMD, Benchmark Dose) は観察された領域内での用量-反応曲線の下限値を決定する一つの代替法であり、発がん実験では用いる動物の匹数からいって、10%の発がん率の増加 (BMD_{10}) は検出できる下限値である。発がん実験のデータよりMultistage model (Armitage and Doll, 1961) に従って BMD_{10} を求め、低用量側95%信頼限界の値 LED_{10} (Lower 95% confidence limit for the dose giving the animals an increased tumor incidence of 10%) を求める。それより低濃度側における用量相関は、0点を通る直線を示すとしてリスクを評価する方法である。この方法では、薬物代謝は体表面積に比例する、すなわち体重の0.75乗 ($W^{0.75}$) に比例するとしている。この評価法に従っても肝発がんリスクはVSD値より低い 1.65×10^{-7} であった。

終わりに

コウジ酸が遺伝毒性発がん物質であるか否かまだ結論は出していない。コウジ酸は、医薬部外品として化粧品に用いられている。現在は、「新しくはコウジ酸入りの化粧品は作らない」という暫定措置が取られている状態であり、マウス肝発がんが遺伝毒性により誘発されるのか、ラットに発がん性を示すのか、光との相互作用はどうか等が検討されている。

たとえコウジ酸が遺伝毒性発がん物質であるとしても、遺伝毒性も発がん性も極めて弱い。コウジ酸自身のリスクは極めて低いといって過言では無いであろう。しかし、ヒトのがんは多数の遺伝子変異の結果であり、その全ての過程が一つの因子によって起こるのは、職業がんの場合位であろう。多くのヒトのがんは、いろいろな因子により惹き起こされた遺伝子変異の結果と考えられるので、そういうもののリスクを如何ように評価すべきな

のか実はよく判らないのである。科学的によく判らない時には、安全性を重視し、代替品を含めて総合的に、社会的良識を加味して判断していくことになる。

いずれにしても、in vivoにおける遺伝毒性の検出、つまり調べたいと思う臓器での遺伝毒性を測定できるようにすることが急務であろう。

参考文献

- Armitage, P. and R. Doll (1961) Stochastic models for carcinogenesis, In: L.M. LeCam and J. Neyma (EDS), Proceedings of the Fourth Berkely symposium on Mathematical Statics and Probability, Berkeley, Univ. Calif. Press, pp. 19-38.
- Food Standard Agency, UK (2002) Joint FAO/WHO project to update the principles and methods for the risk assessment of chemicals in food Workshop I: Introduction, toxicological tests & evaluation, human data, margins of safety, 9-13, December, 2002.
- Fujimoto, N., H. Watanabe, T. Nakatani and G. Roy and A. Ito (1998) Induction of thyroid tumors in (C57BL/6N × C3H/H) F1 mice by oral administration of Kojic acid Fd. Chem. Toxicol., 36, 697-703.
- Fujimoto, N., H. Onodera, K. Mitsumori, S. Maruyama and A. Ito (1999) Changes in thyroid function during development of thyroid hyperplasia induced by kojic acid in F344 rats, Carcinogenesis, 20, 1567-1571.
- Gold, L.S., T.H. Slone, N.B. Manley, G.B. Garfinkel, E.S. Hudes, L. Rohrbach and B.N. Ames (1991) the carcinogenic potency database: Analysis of 4000 chronic animal cancer experiments published in the general literature and by the U.S. National Cancer Institute/National Toxicology Program, Environ. Health Perspectives, 96, 11-15.
- 厚生労働省 (2003) 厚生労働省 告示第351号 (平成15年10月16日)。
- 厚生労働省行政情報 食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針。
- 厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品添加物・毒性合同部会資料, 2002年12月19日。
- Nagao, M., M. Ochiai, E. Okochi, T. Ushijima and T. Sugimura (2001) *LacI* transgenic animal study: relationships among DNA-adduct levels, mutant frequencies and cancer incidences, Mutat. Res., 477, 119-124.
- Noguchi, T., M. Asakura, T. Sugiyama, T. Matsushima (1994) N-Nitroso-di-n-propylamine induces micronuclei in partially hepatectomized rat liver but not in mouse bone marrow cells, MMS Com., 2, 79-82.
- Nohynek, G.J., D. Kirkland, D. Marzin, H. Toutain, C. Leclerc-Ribaud, H. Jinnai (2004) An assessment of the genotoxicity and human health risk of topical use of kojic acid [5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one], Food Chem. Toxicol., 42, 93-105.
- Scott, D., S.M. Galloway, R.R. Marshall, M. Ishidate, D. Brusick, J. Ashby and B.C. Myhr (1991) Genotoxicity under extreme culture conditions: a report from ICPEMC task group 9, Mutat. Res., 257, 147-204.
- 関沢 純, 花井壮輔, 毛利哲夫共訳 (2001) 化学物質の健康リスク評価 [International Programme on Chemical Safety (1999), Environmental health criteria 210. Principles for the assessment of risks to human health from exposure to chemicals] 丸善株式会社, pp. 1-119.
- Takizawa, T., K. Mitsumori, T. Tamura, M. Nasu, M. Ueda, T. Imai and M. Hirose (2003) Hepatocellular tumor induction in heterozygous p-53 deficient CBA mice by a 26-week dietary administration of Kojic acid, Toxicol. Sci., 73, 287-293.
- Tamura, T., K. Mitsumori, H. Oodera, N. Fujimoto, K. Yasuhara, K. Takegawa, H. Takagai and M. Hirose (2001) Dose-threshold for thyroid tumor-promoting effects of orally administered kojic acid in rats after initiation with N-bis (2-hydroxypropyl) nitrosamine, J. Toxicol. Sci., 26, 85-94.



Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells

Li Zhan^{a,b}, Hiroko Sakamoto^a, Mayumi Sakuraba^a, De-Sheng Wu^b, Li-Shi Zhang^b, Takayoshi Suzuki^a, Makoto Hayashi^a, Masamitsu Honma^{a,*}

^a Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

^b West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Received 6 June 2003; received in revised form 22 September 2003; accepted 22 September 2003

Abstract

Toxic cyanobacteria (blue-green algae) water blooms have become a serious problem in several industrialized areas of the world. Microcystin-LR (MCLR) is a cyclic heptapeptidic toxin produced by the cyanobacteria. In the present study, we used human lymphoblastoid cell line TK6 to investigate the in vitro genotoxicity of MCLR. In a standard 4 h treatment, MCLR did not induce a significant cytotoxic response at <80 µg/ml. In a prolonged 24 h treatment, in contrast, it induced cytotoxic as well as mutagenic responses concentration-dependently starting at 20 µg/ml. At the maximum concentration (80 µg/ml), the micronucleus frequency and the mutation frequency at the heterozygous thymidine kinase (*TK*) locus were approximately five-times the control values. Molecular analysis of the *TK* mutants revealed that MCLR specifically induced loss of heterozygosity at the *TK* locus, but not point mutations or other small structural changes. These results indicate that MCLR had a clastogenic effect. We discuss the mechanisms of MCLR genotoxicity and the possibility of its being a hepatocarcinogen.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Cyanobacteria; Microcystin-LR; Micronucleus test; TK-gene mutation

1. Introduction

Water pollution by cyanobacteria (blue-green algae) causes serious environmental and public health problems in several areas of the world [1–3]. Some genera, such as *Microcystis*, *Oscillatoria*, and *Anabaena* produce microcystines, cyclic heptapeptides, with potent hepatotoxic activity. Fifty different cyanobacterial microcystines have been discovered. They have caused the death of fish, birds, wild animals, and livestock

[1,4] and sometimes have had adverse health effects on humans through contaminated residential water supplies [5,6].

Microcystin-LR (MCLR) is the most toxic microcystine. Only 1–2 µg MCLR given intraperitoneally is lethal to mice, with most accumulating in the liver [7,8]. While MCLR hepatotoxicity has been well documented in vitro and in vivo [9–12], few reports describe its genotoxicity. MCLR is not genotoxic in the Ames test, although cyanobacterial extracts are, both with and without metabolic activation [13]. In a human cancer cell line, on the other hand, MCLR induces point mutations, and it produces DNA fragmentation and degradation in mouse liver in vivo [14,15].

* Corresponding author. Tel.: +81-3-3700-1141x434;

fax: +81-3-3700-2348.

E-mail address: honma@nihs.go.jp (M. Honma).

To evaluate the *in vitro* genotoxicity of MCLR, we used the *in vitro* micronucleus (MN) assay and the thymidine kinase (*TK*) gene mutation assay on treated human lymphoblastoid TK6 cells [16,17]. The *TK* gene mutation assay is capable of detecting a wide range of genetic damage, including gene mutations, large scale chromosomal changes, recombination, and aneuploidy. Most of the changes occur in human tumors and are presumably relevant to carcinogenesis. Use of a human cell line makes this genotoxicity evaluation appropriate for human hazard evaluation. Molecular analysis of the *TK*-mutants may help us understand the genotoxic mechanism of MCLR [18,19].

2. Materials and methods

2.1. Cells culture and chemical treatment

The TK6 human lymphoblastoid cell line has been described previously [18]. Cells were grown in RPMI1640 medium (Gibco-BRL, Life technology Inc., Grand Island, NY) supplemented with 10% heat-inactivated horse serum (JRH Biosciences, Lenexa, KS), 200 $\mu\text{g/ml}$ sodium pyruvate, 100 unit/ml penicillin, and 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin. The cultures were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere with 100% humidity and maintained at densities ranging from 10⁵ to 10⁶ cells/ml.

MCLR (Cas.# 101043-37-2) was purchased from Wako Pure Chemical Co. (Tokyo, Japan) and dissolved in phosphate-buffered saline just before use. Prior to their exposure, the cells were cultured in CHAT (10 μM deoxycytidine, 200 μM hypoxanthine, 0.1 μM aminopterin, 17.5 μM thymidine) medium for 2 days to reduce the background mutant fraction. Cultures of 20 ml at 5.0 \times 10⁵ cells/ml and of 50 ml at 2.0 \times 10⁵ cells/ml were treated at 37 °C with serial dilution of MCLR for 4 h and 24 h, respectively. They were then washed once, re-suspended in fresh medium, and cultured in new flasks for the MN assay and *TK* gene mutation assay, or diluted to be plated for survival estimates.

2.2. MN assay

Forty-eight hours after exposure, the MN assay samples were prepared as previously reported [20].

Briefly, approximately 10⁶ cells suspended in hypotonic KCl solution were incubated for 10 min at room temperature, fixed twice with ice-cold fixative (glacial acetic acid: methanol, 1:3), and then re-suspended in methanol containing 1% acetic acid. A drop of the suspension was placed on a clean glass slide and air-dried. The cells were stained with 40 $\mu\text{g/ml}$ acridine orange solution and immediately observed with the aid of an Olympus model BX50 fluorescence microscope equipped with a U-MWBV band pass filter. At least 1000 intact interphase cells for each treatment were examined, and the cells containing MN were scored.

2.3. *TK* gene mutation assay

The TK6 cell cultures were maintained for 3 days after exposure to permit expression of the *TK* deficient phenotype. To isolate the *TK* deficient mutants, we seeded cells into 96-well microwell plates at 40,000 cells/well in the presence of 3.0 $\mu\text{g/ml}$ trifluorothymidine (TFT). Cells from each culture were also plated at 1.6 cells/well in the absence of TFT for the determination of plating efficiency (PE). All plates were incubated for 14 days at 37 °C in a 5% CO₂, humidified incubator, and then scored for colony formation. Plates containing TFT were then re-fed with TFT, incubated for an additional 14 days, and scored for the appearance of slow-growing *TK* mutants. Mutation frequencies were calculated according to the Poisson distribution [21].

2.4. LOH analysis of *TK* mutants

Genomic DNA was extracted from *TK* mutant cells and used as a template for PCR. The PCR-based LOH analysis at human *TK* gene was described previously [19]. Two sets of primers were used to amplify the parts of exons 4 and 7 of the *TK* gene containing frameshift mutations. Another primer set for amplifying parts of the β -globin was also prepared. Quantitative-multiple PCR was subjected to co-amplification of the three regions and qualify and quantify the PCR products. They were analyzed with an ABI310 genetic analyzer (PE Biosystems, Chiba, Japan), and classified them into non-LOH, hemizygous LOH, or homozygous LOH mutants.