

陰性対照群においては総プラーク数 3,670,200 の内、変異プラークが 156 出現し、その突然変異頻度は 42.5×10^{-6} 、各個体の平均値では 44.0×10^{-6} であった。

コウジ酸処理群での突然変異頻度は、1.0%群で 42.8×10^{-6} (変異体数/総コロニー数: 118/2,755,800)、2.0%群で 43.8×10^{-6} (同: 155/3,542,400)、3.0%群で 39.2×10^{-6} (同: 165/4,207,500) であり、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。各個体の平均値は 1.0、

2.0 および 3.0%群それぞれ 42.8、45.5 ならびに 36.4×10^{-6} であった。

一方、陽性対照群の突然変異頻度は 290.4×10^{-6} (同: 563/1,938,600) と顕著な増加を示し、媒体対照群に比べて統計学的に有意 ($p < 0.05$) な増加が認められた。各個体の平均値は 288.0×10^{-6} であった。

アカネ色素ににおける *cII* 遺伝子の突然変異頻度についてその総括を Table 3 に、個体別値を Table 4 に示した。

Table 3. Mutant frequency of *cII* gene in transgenic rats after Madder color treatment

Compound	Dose (%)	Organ	Number of animals	Number of plaques	Number of mutants	Mutant Frequency ($\times 10^{-6}$)	p-value
Madder color	0	Kidney	5	4040100	102	25.2	-
	1.0		5	2946600	113	38.3*	0.0014
	5.0		5	3036600	115	37.9*	0.0018
	0	Liver	5	2779200	50	18.0	-
	1.0		5	2461500	50	20.3	0.3056
	5.0		5	2668500	49	18.4	0.4993
	0	Small intestine	5	1916100	18	9.4	-
	1.0		5	1876500	23	12.3	0.2448
	5.0		5	1823400	28	15.4	0.0672
DMBA ^{a)}	20 (mg/kg)	Liver	5	1469700	115	78.2*	0.0000

* : $p \leq 0.05$, significant difference from control (Kastenbaum and Bowman method, upper-tailed)

a): Positive control (7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene). A single dose samples were prepared at 14-days after the dose.

ークが 18 出現し、その突然変異頻度は 9.4×10^{-6} 、各個体から求めた突然変異頻度の平均値では 10.0×10^{-6} であった。

アカネ色素処理群での突然変異頻度は 1.0%群で 12.3×10^{-6} (同: 23/1,876,500)、5.0%群で 15.4×10^{-6} (同: 28/1,823,400) であり、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。各個体から求めた突然変異頻度の平均値は 1.0 および 5.0%群でそれぞれ 14.0 ならびに 15.7×10^{-6} であった。

一方、陽性対照群の肝臓における突然変異頻度は、 78.2×10^{-6} (同:

115/1,469,700) 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。各個体の平均値は 78.6×10^{-6} であった。

十二指腸を解析した結果、陰性対照群においては総プラーク数 1,916,100 の内、変異プラークが 18 出現し、その突然変異頻度は 9.4×10^{-6} 、各個体から求めた突然変異頻度の平均値では 10.0×10^{-6} であった。

アカネ色素処理群での突然変異頻度は 1.0%群で 12.3×10^{-6} (変異プラーク数/総プラーク数: 23/1,876,500)、5.0%群で

Table 4 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	
	1.0	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	
	5.0	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	
Madder color	0	Small intestine	1001	506,700	3	5.9	10.0 \pm 4.7
			1002	168,300	1	5.9	
			1003	665,100	7	10.5	
			1004	171,900	3	17.5	
			1005	404,100	4	9.9	
	1.0	Small intestine	1101	498,600	5	10.0	14.0 \pm 5.6
			1102	666,900	6	9.0	
			1103	252,000	4	15.9	
			1104	219,600	5	22.8	
			1105	239,400	3	12.5	
	5.0	Small intestine	1201	488,700	10	20.5	15.7 \pm 5.5
			1202	405,000	8	19.8	
			1203	410,400	4	9.8	
			1204	105,300	2	19.0	
			1205	414,000	4	9.7	
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

15.4 $\times 10^{-6}$ (同 : 28/1,823,400) であり、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。各個体から求めた突然変異頻度の平均値は 1.0 および 5.0%群でそれぞれ 14.0 ならびに 15.7 $\times 10^{-6}$ であった。

D. 考 察

コウジ酸は、サルモネラ菌を用いた復帰突然変異試験 (Ames 試験) で陽性結果が得られており⁴⁾、さらに、ヒトリンパ球由来の細胞株 WTK1 細胞および TK6 細胞を用いた遺伝子突然変異、小核試験およびコメット試験でいずれも陽性

反応が確認されている⁴⁾。長期試験においては、混餌投与において雌の肝臓に腫瘍を誘発することが確認されている。

今回、コウジ酸について、発がん性試験で用いられた 3.0%を高用量とし、以下 2.0 および 1.0%の 3 用量まで試験したが、被験物質投与群における肝臓での遺伝子突然変異頻度の有意な増加は認められなかった。

したがって、コウジ酸の遺伝子突然変異誘発性は、陰性と判断した。

アカネ色素については 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^{5, 6)}、*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⁷⁾、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⁸⁾。

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⁹⁾。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¹⁰⁾。

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 Blue™ Rat) を用いて肝臓および十二指腸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。

肝臓では 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。また、アカネ色素に直接暴露されると考えられる消化管のうち、今回は十二指腸については、高用量の 5%群で、突然変異頻度が対照群に比較して僅かに上昇していたが ($p=0.067$, Table 3 参照)、統計学的な有意差は認められなかったことから、最終的には陰性反応と判断した。小腸は発がんの標的臓器ではないことから、本結果は発がん性試験を補足しているものと考えられたが、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¹¹⁾ (Table 5 参照)。

また、乳がん、卵巣がん等、多臓器に発がん性を示す陽性対照群である DMBA 処理群では、肝臓において十分な陽性反応 ($p<0.0000$) が得られていることから、

当該試験は適正に実施されたものと判断した。

E. 結論

コウジ酸は、*in vivo*において遺伝毒性を示す可能性は低いものと推察された。アカネ色素は発がん標的臓器の肝臓では陰性結果を示したが、腎臓では明確な陽性反応がみられた。発がん非標的臓器の十二指腸では陰性結果が得られた。

引用文献

- 1) Fujimoto N, Watanabe H, Nakatani T, Roy G, Ito A. (1998): Induction of thyroid tumours in (C57BL/6N x C3H/N)F1 mice by oral administration of kojic acid. *Food Chem Toxicol.*, 36(8), 697-703.
- 2) 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.
- 3) Kastenbaum, M.A., and K. O. Bowman (1970): Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Res.*, 9, 527-549.
- 4) 林真 (2004) : 既存添加物の遺伝毒性検出の戦略に関する研究. 平成 16 年度総括研究報告書
- 5) Asanoma M, Miyabe M, Skabe Y (1984): Mutagenicity of natural food additives in *Salmonella typhimurium*. *Nagoya Eisei Kenkyuhohou*, 30, 53-57.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Pognisky B, Westendorf J, Blomeke B, Marquardt H, Hewer A, Glover PL, Phillips DH (1991). Evaluation of DNA-binding activeity of hydroxylanthraquinones occurring in *Rubia tinctorum* L. *Carcinogenesis*, 12, 1265-1271.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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

F. 健康危険情報

「なし」

H. 研究発表

「なし」

I. 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
Müller, L., D. Blakey, K.L. Dearfield, S. Galloway, P. Guzzie, M. Hayashi, P. Kasper, D. Kirkland, J.T. MacGregor, J.M. Parry, L. Schechtman, A. Smith, N. Tanaka, D. Tweats, and H. Yamasaki	Strategy for genotoxicity testing and stratification of genotoxicity test results—report on initial activities of the IWGT Expert Group	Mutation Research	540	177-181	2003
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
Svoboda, P. and Kasai, H.	Simultaneous HPLC analysis of 8-hydroxydeoxy- guanosine and 7-methylguanine in urine from humans and rodents	Anal. Biochem.	334	239-250	2004
田中憲穂	照射食品の遺伝的安全性試験	食品照射	39	13-27	2004
Asada, S., Sasaki, K., Tanaka, N., Takeda, K., Hayashi, M., Umeda, M.	Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay , using v-Ha-ras-transfected BALB/c 3T3 Cells (Bhas 42 Cells)	Mutation Research	588	7-21	2005

Asano, N., D. Torous, C. Tometsko, S. Dertinger, T. Morita and M. Hayashi	Practical threshold for micronucleated reticulocyte induction observed for low doses of mitomycin C, Ara-C and colchicine	Mutagenesis	21	15-20	2006
Kasai, H., M. Maekawa, K. Kawai, K. Hachisuka, Y. Takahashi, H. Nakamura, R. Sawa, S. Matsui, T., Matsuda	4-Oxo-2-hexenal, a mutagen formed by ω -3 fat peroxidation, causes DNA adduct formation in mouse organs	Industrial Health	43	699-701	2005
IshikawaS, Sasaki YF, Kawaguchi S, Michizuki M, Nagao M	Characterization of genotoxicity of kojic acid by mutagenicity in Salmonella and micronuclei induction in rodent liver	Genes and Environ	28	31-7	2006
Kawai, K., K. Matsuno, H. Kasai	Detection of 4-oxo-2-hexenal, a novel mutagenic product of lipid peroxidation, in human diet and cooking vapor	Mutation Research	603	186-192	2006
Koyama, N., H. Sakamoto, M. Sakuraba, T. Koizumi, Y. Takashima, M. Hayashi, H. Matsufuji, K. Yamagata, M. Shuichi, N. Kinai M. Honma	Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells	Mutation Research	603	151-158	2006
Maekawa, M., K. Kawai, Y. Takahashi, H. Nakamura, T. Watanabe, R. Sawa, K. Hachisuka, H. Kasai	Identification of 4-Oxo-2-hexenal and Other Direct Mutagens Formed in Model Lipid Peroxidation Reactions as dGuo Adducts	Chemical Research in Toxicology	19	130-138	2006
Matsura-Eisaki, K., Sakamoto, H., Sofuni, T., Hayashi, M. Honma, M	In vitro genotoxicity of inorganic arsenics and their genotoxic risk through food intake	Environ. Mutat. Res.	27	153-160	2005

Nakajima, M., S. Shimada, M. Nagai, F. Mizuhashi, C. Sugiyama, S. Masuda, M. Hayashi N. Kinae	3-Chloro-4- (dichloromethyl)-5- hydroxy-2(5H)- furanone [MX] shows initiating and promoting activities in a two-stage BALB/c 3T3 cell transformation assay	Mutagenesis	20	375-379	2005
Suzuki, H., N. Ikeda, K. Kobayashi, Y. Terashima, Y. Shimada, T. Suzuki, T. Hagiwara, S. Hatakeyama, K. Nagaoka, J. Yoshida, Y. Saito, J. Tanaka , M. Hayashi	Evaluation of liver and peripheral blood micronucleus assays with 9 chemicals using young rats: A study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS)— Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS)	Mutation Research	583	133-145	2005
Torous, D., N. Asano, C. Tometsko, S. Sugunan, S. Dertinger, T. Morita, M. Hayashi	Performance of flow cytometric analysis for the micronucleus assay— a reconstruction model using serial dilutions of malaria infected cells with normal mouse peripheral blood	Mutagenesis	21	11-13	2006
Watanabe-Akanuma, M., T. Ohta,	Inhibitory effects of NADH/NADPH in S9mix on photo- mutagenicity of thiabenzazole following UVA-irradi- ation in E. coli	Environ. Mutagen Res.	27	7-12	2005
Watanabe-Akanuma, M., T. Ohta, Y. F. Sasaki	A novel genotoxic aspect of thiabendazole as a photomutagen in bacteria and cultured human cells	Toxicol. Lett.	158	213-219	2005
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	環境変異原研究	27	13-20	2005
林 真, 田中憲穂	既存添加物 43 品目の 遺伝毒性試験	食衛誌	46	177-184	2005

祖父尼俊雄, 能美健彦, 太田敏博, 林真	遺伝毒性: DNA 直接作用物質に閾値は存在するのか	環境変異原研究	27	61-73	2005
-----------------------	----------------------------	---------	----	-------	------



Strategy for genotoxicity testing and stratification of genotoxicity test results—report on initial activities of the IWGT Expert Group

Lutz Müller^{a,*}, David Blakey^b, Kerry L. Dearfield^c, Sheila Galloway^d,
Peggy Guzzie^e, Makoto Hayashi^f, Peter Kasper^g, David Kirkland^h,
James T. MacGregorⁱ, James M. Parry^j, Leonard Schechtmanⁱ, Andrew Smith^k,
Noriho Tanaka^l, David Tweats^m, Hiroshi Yamasakiⁿ

^a Novartis Pharma AG, CH-4002 Basel, Switzerland

^b Safe Environments Programme, Health Canada, Ottawa, Canada

^c U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development (8103R), Washington, DC 20460, USA

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

^e Pfizer, Inc. Global Research and Development, Amboise Laboratories, France

^f Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

^g Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Bonn, Germany

^h Covance Laboratories Limited, Otley Road, Harrogate, UK

ⁱ National Center for Toxicological Research, U.S. Food and Drug Administration, Rockville, MD 20857, USA

^j Centre for Molecular Genetics and Toxicology University of Wales Swansea, Swansea, UK

^k Health and Safety Executive, Magdalen House, Stanley Precinct, Bootle, Merseyside, UK

^l Hatano Research Institute (HRI), Food and Drug Safety Center (FDSC), Kanagawa, Japan

^m GlaxoSmithKline, Ware, Hertfordshire, UK

ⁿ Department of Bioscience, School of Science and Technology, Kwansai Gakuin University, Sanda, Japan

Keyword: Genotoxicity

During the past two decades, a number of national and international efforts have developed or refined the test methods and guidance on their strategic use to assess the potential genotoxicity of chemicals, including pharmaceuticals, pesticides, and industrial chemicals (selected papers and guidelines: [1–4]). Among the guidance documents agreed upon and used multi-nationally are the Organisation of Economic Cooperation and Development (OECD) protocol guidelines on individual tests and the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for

Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) test and strategy guidelines for pharmaceuticals [5–7]. In addition, recently, a Globally Harmonised System (GHS) for health hazard classification has been developed under the OECD auspices and is due to be formally ratified under the United Nations in December 2002 as part of a wider model scheme for hazard communication [8]. In the European Union (EU), there are various Directives and associated Annexes and Guidances that cover the regulatory requirements for mutagenicity testing and classification of dangerous substances [9–12] and the recently re-drafted Technical Guidance Document on Risk Assessment of New Substances, Existing Substances and Biocides [13]. Also recently, the United Kingdom Commit-

* Corresponding author. Tel.: +41-62-324-1797;

fax: +41-61-323-1893.

E-mail address: Lutz.Mueller@pharma.novartis.com (L. Müller).

tee on Mutagens (UKCOM) issued a strategic paper that incorporates many recent developments in test approaches and gives more weight than before on the analysis of numerical chromosomal aberrations [14].

To assist the continuous development of these national and international guidances, two major international conferences on genotoxicity test procedures under the International Workshop on Genotoxicity Tests (IWGT) initiative were held in Melbourne, Australia 1993 [15] and in Washington DC, United States 1999 [16]. These workshops invited recognised experts in genetic toxicity to work toward consensus approaches in genotoxicity testing and assessment. While an international consensus on test methods was the goal of these conferences, it was recognised that differences in legislation between countries often limit a harmonisation in their strategic use. In order to address the differences in national approaches, an expert group within the IWGT initiative was convened in Plymouth, England, in June 2002 to develop a process to provide guidance on a common strategy for genotoxicity testing and risk assessment. The authors of this summary paper comprise this IWGT strategy group, which includes experts from government, industry and academia. Many of these individuals have actively contributed to the development of the above

mentioned strategies and guidances for genotoxicity testing (e.g. [17–21]).

The IWGT strategy group members noted that there is still a lack of common understanding of several issues that are considered important for the development of a consensus general strategy for genotoxicity testing and the interpretation of test results for risk assessment. While one initial goal of the group was to develop a possible classification scheme for genotoxicity, similar to the International Agency on Research on Cancer (IARC) classification of evidence for human carcinogenicity, it became evident during the discussions that the initial emphasis should be to formulate a common genotoxicity testing and assessment strategy. Therefore, the strategy group focused exclusively on these aspects during the Plymouth meeting.

The group agreed upon a number of principles, such as the need for an elementary data set that addresses the three major genetic endpoints, namely mutagenicity, chromosome breakage (clastogenicity), and aneuploidy. Table 1 summarises the consensus statements concerning genotoxicity testing and assessment. The strategy group understands that these consensus statements are basic elements that are to be considered independent from the area of use of test articles or human exposure/dose scenarios. Although the group consensus is that a minimum data set should always be

Table 1

Consensus statements as derived from discussions in the IWGT Strategy and Classification Working Group

Consensus 1: For hazard evaluation, data are needed from an elementary data set providing information on (1) gene mutations, (2) structural chromosome aberrations, and (3) numerical chromosome aberrations^a

The tests conducted to evaluate effects on these endpoints need to be properly conducted, i.e. according to existing guidelines, IWGT recommendations or best scientific practice

Structure–activity analysis is a useful supplementary tool for assessment but is not essential^b

Investigations into biotransformation pathways (e.g. oxidative pathways and evidence for the formation of glutathione adducts), can provide useful initial information but are not essential for interpretation of results that have been obtained with the standard rat liver microsomal S9 mix^c

Consensus 2: The three elementary genetic endpoints cannot currently be adequately covered with a single test system

Consensus 3: Useful information on the potential aneuploidy of a test chemical can be obtained by recording the incidence of polyploidy and/or mitotic index in the *in vitro* cytogenetic test. A higher level of confidence in the detection of aneuploidy can be obtained by studying the induction of micronuclei and/or non-disjunction (*in vitro* or *in vivo*)

Consensus 4: In some instances, *in vivo* studies are mandated or are part of the testing program (e.g. for pharmaceuticals). If in such cases an aneuploidy endpoint (e.g. as detected with the *in vitro* micronucleus test or the assessment of polyploidy and mitotic index in the *in vitro* cytogenetic assay) has not been studied *in vitro*, it should be studied *in vivo*

^a It is recognised that at this time, existing regulations/guidelines/guidances/regulatory practices allow preliminary assessments on the basis of a data set that may not include all of the components of the elementary data set.

^b Most structure–activity methods mainly address potential direct DNA reactivity.

^c A preliminary characterisation of the metabolism of the test compound in the *in vitro* genotoxicity test systems is useful.

available, it is acknowledged that in practice there are cases with such a low exposure potential that judgments on the basis of more limited data may be justified.

Starting from these consensus statements, the various regulatory strategies, their scientific assumptions and their potential shortcomings were discussed. In view of the limited time available at this first meeting, it was recognised that a consensus on most major issues could not be achieved. It was therefore unanimously decided to identify major open questions and needs that would be addressed subsequently by independent working groups. These working groups would be formed after the meeting to work toward a consensus on the issues identified below.

(1) *Agents mutagenic in vivo but non-mutagenic in vitro.* Several current guidance approaches, in particular for the testing of pharmaceuticals, stipulate that an in vivo test should normally be part of an initial test battery for genotoxicity. This approach was implemented because of examples of agents that are mutagenic in vivo but not reliably detected as mutagenic in standard in vitro tests. These examples include procarbazine, urethane, benzene and hydroquinone as referred to in the ICH S2B guidance [7,15]. However, for most of such compounds, positive results are available from in vitro tests when the tests are adapted to the specific characteristics of the test compound. Nevertheless, the attendees felt that there were additional relevant unpublished examples, which need to come to the attention of the scientific community, if possible. The group felt that the occurrence of agents that are uniquely mutagenic in vivo was relatively rare, but that a survey should be made of unpublished evidence to provide substantive data on this point. It was suggested that a questionnaire should be drafted and an effort made to identify further examples of such agents. This questionnaire should address the following questions:

- Are there (further) examples of uniquely in vivo positives that would justify the use of an in vivo test in the initial battery of tests?
- Are there convincing examples of differences between in vitro and in vivo metabolism that would account for such a data set?

- Are there examples of inappropriately low exposure to relevant metabolites in vitro?

(2) *Rationale for in vivo testing of agents that are negative after thorough in vitro testing.* In certain cases, there may be reasons to conduct in vivo testing even after in vitro tests have been conducted to the best standards and scientific knowledge and have failed to identify mutagenic activity. The following three questions are designed to identify follow-up scenarios if data from standard in vitro tests are negative, but other information, such as studies on metabolism, indicate that in vivo tests would be helpful.

- Which endpoints/tissues should be studied in vivo to confirm/investigate negative results in vitro?
- What strategy is appropriate if structure–activity data suggest that the conventional in vitro assays may yield irrelevant results?
- What evidence indicates a need to conduct follow-up tests in vivo (e.g. are there examples for in vivo metabolism known to generate potentially active intermediates, which are not produced by the in vitro metabolising system)?

(3) *Follow-up testing of tumourigenic agents not positive in the “standard” genotoxicity test battery.* It is acknowledged that a carcinogenicity test in rodents can yield evidence for a tumourigenic response of a compound that is negative in a genotoxicity test battery in vitro and in vivo. The ICH guidance S2B [7] stipulates that such compounds shall be investigated further in supplemental genotoxicity tests, if rodent tumourigenicity is not clearly based on a non-genotoxic mechanism. Cases for which there is no clear information about the mechanism of tumourigenesis occur often in rodent life-time bioassays. Hence, examples of compounds that induce tumours at specific sites in rodent carcinogenicity studies, but which are clearly negative in vitro and in vivo in the elemental data set, and which have been subsequently tested in additional genotoxicity tests could be important for evolving a more appropriate genotoxicity testing strategy. A subgroup will examine such cases, the scientific rationales that were applied, and the types of tests that were conducted. It is understood that these examples will most likely be available in

the pharmaceutical area and will have to include the recently developed mouse transgenic carcinogenicity assays, in particular those with an activated human ras gene and an inactivated p53 tumor suppressor gene allele.

- (4) *Metabolic considerations.* Genotoxicity testing relies heavily on rodent metabolism systems for in vitro tests (normally aroclor- or phenobarbital-plus 5,6-benzoflavone-induced rat liver S9) and rodents are usually used for in vivo investigations. Also, carcinogenicity testing is usually performed with rodents (rats and/or mice). However, there are examples of major human metabolites that are not presented under the conditions in vitro or in rodents in vivo. Under these circumstances, additional testing may be indicated. The following questions are related to this issue.
- When is a change in an exogenous metabolic system in vitro indicated?
 - Which animal species in vivo should be selected?
 - When shall the human metabolite be isolated or synthesised and tested separately?
- (5) *Dose-response considerations.* Recently, evidence for (i) non-linear dose-response relationships, (ii) responses only at high or cytotoxic doses, and (iii) mechanisms of genotoxicity that may involve a threshold have been important topics of discussion in the field of genetic toxicology. These aspects have not been treated with consistency in the regulatory evaluation of genotoxicity. In this context, the following questions have been raised during the group discussions as relevant for a more consistent approach towards the interpretation of genotoxicity test results:
- When do positive results in bacterial or in vitro mammalian cell mutation tests indicate (or not indicate) a human hazard?
 - When can a negative mammalian cell gene mutation test, e.g. a mouse lymphoma tk assay, overrule a positive bacterial assay result?
 - Are there examples of positives resulting from bacterial-specific metabolism/mechanisms, which may be not relevant for the mammalian organism and what are the appropriate measures to show this?
 - How can positive results from in vitro micronucleus assays be interpreted?

1. Is the test agent an aneugen and does this imply the existence of a threshold?
 2. Is the test agent a clastogen and how can sufficient evidence for a non-linear dose-response or non-relevance be provided?
 - Can reliable criteria be developed to identify when positive genotoxicity results are either not relevant, follow a non-linear dose-effect relationship or demonstrate a threshold, in particular for chromosomal aberration or mouse lymphoma tk tests in vitro and for genotoxicity assays in vivo?
- (6) *Risk assessment versus hazard identification.* There is considerable debate over how to conduct risk assessment based on genotoxicity test results. Traditionally, risk assessment considers in vivo dose-response data, information on the mechanism of action, and information on human exposure. Since genotoxicity testing employs several in vitro approaches, there is a need to assess how in vitro data can contribute to a risk assessment. A fundamental question is whether or how reliably information on a genotoxic potency can be derived from in vitro test data and how this information can be used quantitatively in risk evaluation?
- These six general areas of discussion were considered to be the most critical for the strategic use of test systems and interpretation of genotoxicity test results. Ultimately, the goal of addressing the issues outlined above is to develop consistent strategies for genotoxicity testing and follow-up that allow an assessment of potential for human risk. For each of the above tasks, potential work group leaders have been identified and a procedure of regular meetings or conferences has been developed.

References

- [1] J. Ashby, The prospects for a simplified and internationally harmonized approach to the detection of possible human carcinogens and mutagens, *Mutagenesis* 1 (1986) 3–16.
- [2] U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), Guidelines for mutagenicity risk assessment, *Federal Register* 51 (1986) 34006–34012.
- [3] K.L. Dearfield, A.E. Auletta, M.C. Cimino, M.M. Moore, Considerations in the U.S. Environmental Protection Agency's testing approach for mutagenicity, *Mutat. Res.* 258 (1991) 259–283.

- [4] EU: Anon. Testing of Medicinal Products for their Mutagenic Potential. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, vol. 3B, 1998, pp. 45–50.
- [5] OECD: Ninth Addendum to the OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris, 1998.
- [6] ICH S2A: Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals, <http://www.ifpma.org/ich1.html>.
- [7] ICH S2B, A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals, <http://www.ifpma.org/ich1.html>.
- [8] OECD: Globally Harmonised System for Hazard Classification and Communication (GHS) ENV/JM/MONO (2001) 6, <http://www.unece.org/trans/main/dgdb/dgsubc4/c4inf3.html>.
- [9] EU: Anon. Directive 67/548/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances, Off. J. Eur. Comm. 196 (1967) 1–98.
- [10] EU: Anon. Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market, Off. J. Eur. Comm. L 230 (1991) 1–32.
- [11] EU: Anon. Directive of the European Parliament and of the Council No 98/8/EC of 16 February 1998 on the placing of biocidal products on the market, Off. J. Eur. Comm. L 123 (1998) 1–63.
- [12] EU: Anon. Technical Guidance Document (TGD) in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Notified Substances, Commission Regulation (EC) No. 1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances and Directive 98/8/EC concerning the placing of biocidal products on the market (test strategy, Part I, Chapter 2, p. 3.10), update final version June 2002.
- [13] COM, Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment, Guidance on a strategy for testing of chemicals for mutagenicity, Department of Health, UK, 2000, <http://www.doh.gov.uk/com.htm>.
- [14] Mutat. Res. 312 (1994) whole issue.
- [15] Environ. Mol. Mutagen. 35 (2000) whole issue.
- [16] D.J. Tweats, Follow-up of in vitro positive results, in: P.F. D'Arcy, D.W.G. Harron (Eds.), Proceedings of the Second International Conference on Harmonisation (ICH), Greystone Books Ltd., Antrim, Northern Ireland, 1994, pp. 240–244.
- [17] L. Müller, The significance of positive results in genotoxicity testing, in: P.F. D'Arcy, D.W.G. Harron (Eds.), Proceedings of the Fourth International Conference on Harmonisation, Brussels, 1997, Greystone Books Ltd., Antrim, Northern Ireland, 1998, pp. 253–259.
- [18] L. Müller, Y. Kikuchi, G. Probst, L. Schechtman, T. Sofuni, D. Tweats, ICH-harmonised guidances on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evaluation, reasoning and impact, Mutat. Res. 436 (1999) 195–225.
- [19] S.M. Galloway, Cytotoxicity and chromosome aberrations in vitro: experience in industry and the case of an upper limit on toxicity in the aberration assay, Environ. Mol. Mutagen. 35 (2000) 191–201.
- [20] J.T. MacGregor, D. Casciano, L. Müller, Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks, Mutat. Res. 455 (2000) 3–21.
- [21] K.L. Dearfield, M.C. Cimino, N.E. McCarroll, I. Mauer, L.R. Valcovic, Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy, Mutat. Res. 521 (2002) 121–135.

「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 磐田郡福田町塩新田字荒浜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否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られる。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係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)が必要となる。

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なのか、「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なのか、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 μg オーダーか 1000 μg 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。
- 先ずは、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? 先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、先ずは各ガイダンス(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、先ずは 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時間処理でみられる小核が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つの臓器の結果の相違(臓器Aは陰性、臓器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、臓器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サイ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の存否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発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」から試算してみるとの説明があった。

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