

リスクアセスメントにおける遺伝毒性

—海外の動向と視点—

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 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

Genotoxicity in risk assessment

— Global perspectives —

Takeshi Morita, Susumu Ishimitsu and Kaoru Morikawa

Division of Safety Information on Drug, Food and Chemicals, National Institute of Health Sciences
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Summary

Global new perspectives on genotoxicity, i.e., threshold and germ cell mutagenicity, are summarized. On the aspect of threshold, proposal of a flow scheme toward risk assessment and standard setting for chemical carcinogens from European Academy, guideline on the limits of genotoxic impurities in pharmaceutical from the European Medicines Agency, and the concept of thresholds of toxicological concern (TTC) are introduced. On germ cell mutagenicity, health hazard classification criteria by a system of Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS) and examples of classification by EU or Germany MAK Commission are also explained. These give major impacts to genotoxicity evaluation, risk assessment and hazard classification of chemicals.

Keywords: germ cell mutagenicity, GHS, risk assessment, threshold, TTC

緒 言

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いる。

まず、遺伝毒性メカニズムに関して、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的異常、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、実用的閾値を設定可能であることも提言されている。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(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 µg/dayに設定した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メカニズムの関与の軽重”を評価する必要性を示している。

次に生殖細胞への影響に関しては、化学物質のハザ-

* E-mail: morita-tk@nihs.go.jp

受付: 2005年4月11日 受理: 2005年4月11日

©日本環境変異原学会

本稿は第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会議、JEMS & JSAAE 合同シンポジウム1「発がん性と遺伝毒性の閾値—リスクアセスメントにおける問題点—」で発表された。

This paper was presented to the JEMS & JSAAE combination symposium 1 “Threshold of carcinogenicity and genotoxicity — issues for risk assessment —” at the 33rd JEMS annual meeting and the 18th JSAAE annual meeting, 2004.

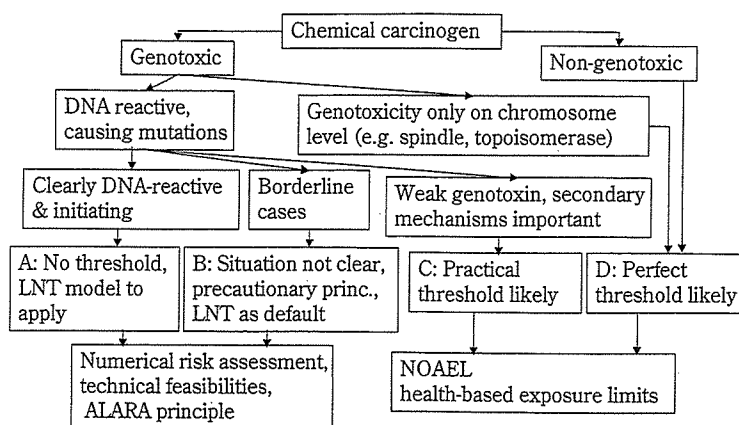


Fig. 1 Proposal of a flow scheme toward risk assessment and standard setting for chemical carcinogens (Bolt et al., 2004; Bolt and Degen, 2004; Streffer et al., 2004)

Table 1 Allocation of carcinogens to groups by European Academy

Group A	Group B	Group C	Group D
No threshold, LNT model to apply	LNT as default assumption	Practical threshold	Perfect threshold
Ionizing radiation	Acrylonitrile	Formaldehyde	TCDD and other tumor promoters
Vinyl chloride	Acrylamide	Vinyl acetate	Spindle poisons
4-Aminobiphenyl	Arsenic	Trichloroethylene	Topoisomerase II inhibitors
Diethylnitrosamine	Chromium (VI)	Phenol	Hormones
Acetaminofluorene		Reactive oxygen species inducers	Reactive oxygen species inducers
Aflatoxin B1			
NNK			

Bolt et al., 2004, modified

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。英国の変異原性諮問委員会 (UK COM) 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、それに加え米国環境保護庁 (US 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と呼ばれる欧州の新しい化学物質政策は、発がん性/変異原性/生殖毒性物質の規制を打ち出し、ドイツでは、作業環境最大許容濃度 (MAK) 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、国連が進めている化学品の分類および表示に関する世界調和システム (GHS) 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。

このような動向ならびに見解は、今後の一般化学物質、食品関連物質、医薬品等の遺伝毒性評価ならびにそれらのハザード分類に大きな影響を与えられようと考えられる。本稿では、上記に関する海外の状況を具体例をまじえて概説する。

1. 発がん性および遺伝毒性の閾値

本節では、発がん性および遺伝毒性の閾値に関し、リ

スク評価と分類に関する欧州アカデミーの提案ならびにその中で述べられている実用的閾値の例を挙げ、医薬品中の遺伝毒性不純物や食品中の化学物質に対して提案されている毒物学的閾値 (TTC) についての考え方を紹介する。

1. 欧州アカデミーの提案

欧州アカデミーが提案している発がん物質のリスク評価と標準的分類のためのフロー (Fig. 1) では、発がん物質を閾値の観点から4つに分類している (Bolt et al., 2004; Bolt and Degen, 2004; Streffer et al., 2004)。まず、遺伝毒性の有無で分け、遺伝毒性のない発がん物質は perfect threshold ということである (group D in Fig. 1)。遺伝毒性を示す発がん物質は、突然変異を誘発するようなDNA直接反応型のもの、おそらく酵素や関連タンパクへの影響に起因する染色体レベルのみの影響に区分し、後者は非遺伝毒性の場合と同様に閾値があるとしている。DNA反応型のもは、その反応が明瞭なものは閾値の存在を認めず、linear non-threshold (LNT) モデルを適用し (group A)、その反応が明らかとはいえない境界域のものについては、閾値の存在は不明確だが予防原則の立場からLNTモデルを仮定しようというものである (group B)。また、弱い遺伝毒

性しか示さず、二次的メカニズムに基づくものは実用的閾値 practical threshold があるとしている (group C). Group A, B の発がん物質は個別のリスク評価に基づいて as low as reasonably achievable (ALARA, 合理的かつ実現可能な限り低い量) の原則を適用し、技術的実行可能性や社会経済学的側面から規制を考えるのが適切とされるもの、group C, D の発がん物質は無毒性量 (NOAEL) に基づき健康影響の観点から暴露限界量を設定するのが適切としている。これらの閾値の有無に基づく発がん物質の分類例を Table 1 に示す (Bolt et al., 2004 を改変)。Group A の閾値のないものには、ジエチルニトロサミンやアフラトキシンなど代表的で強力な発がん物質が含まれ、group B の閾値の存在が不明確なものには、アクリルアミド、ヒ素や六価クロム (De Flora, 2000; Pratt and Barron, 2003) がある。Group C の実用的閾値があるとされるものには、ホルムアルデヒド、酢酸ビニル、トリクロロエチレン (Bolt, 2003; Brüning and Bolt, 2000)、フェノール (Pratt and Barron, 2003) などが、group D の閾値ありとされるものには、ダイオキシンや発がんプロモーター類、細胞分裂やトポイソメラーゼの阻害剤、ホルモン類が含まれる。活性酸素誘発物質もメカニズムに基づき group C, D に分類される (Bolt, 2003; Bolt et al., 2004; Pratt and Barron, 2003)。

2. 実用的閾値の論拠例

実用的閾値があるとされる発がん物質のホルムアルデヒドおよび酢酸ビニルについて、その論拠を示す。

ホルムアルデヒドは、2004年6月に国際がん研究機関 (International Agency for Research on Cancer, IARC) において、group 2A から group 1 のヒト発がん物質に格上げされたが、その遺伝毒性は多くの試験で陽性を示すものの、一般には in vivo で陰性である。遺伝毒性機序は、DNA-タンパク交叉結合 (DNA-protein cross-links, DPX) の形成と DNA 単鎖切断とされている。動物での発がん性については、吸入投与によりラットおよびマウスの鼻腔に腫瘍を形成することが明らかとなっており、その機序は、高用量における上皮変性、再生性の細胞増殖ならびに炎症とされている。一方でホルムアルデヒドは、ラット鼻腔粘膜 DNA との共有結合、ラット鼻腔粘膜 DPX 中への取り込みおよび鼻腔上皮細胞の細胞増殖活性にそれぞれ線形性がみられないこと、ホルムアルデヒドは内在的に生成しておりその生理的レベルとの比較の観点、さらにホルムアルデヒドは迅速に解毒されること、全身性作用ではないこと、また、遺伝毒性作用も一般に高用量で認められることから、実用的閾値があるとされている (Bolt, 2003; Bolt et al., 2004)。

酢酸ビニルは IARC では group 2B に分類されている。遺伝毒性は in vivo も含め多くの試験系で陽性 (主に染色体構造異常) を示すが、Ames test は陰性である。その遺

伝毒性機序は、ホルムアルデヒドと同様 DPX の形成と、代謝による酢酸ならびに DNA との反応性を示すアセトアルデヒドの形成とされている。発がん性は、吸入投与によりラット鼻腔腫瘍を、飲水投与によりラットおよびマウスに上部消化管腫瘍を形成し、その機序は、酢酸ならびにアセトアルデヒドへの代謝による細胞内 pH の低下と続く細胞死、細胞分裂刺激、細胞増殖とされている。ここでもアセトアルデヒドは内在的に存在していること、あるレベル以上の細胞内 pH の低下、細胞毒性、増殖、ならびにアセトアルデヒドの暴露が必要とされ、これら恒常性を損なうほどの細胞内酸性化には生体防御が働くことから、実用的閾値があるとされている (Bogdanffy and Valentine, 2003)。

3. 医薬品における遺伝毒性不純物の限量

欧州医薬品庁 (European Medical Agency, EMEA) は医薬品における遺伝毒性不純物の限量に関するガイドライン案を提示している (European Medicines Agency, 2004)。この案では、まず、遺伝毒性を示す不純物について“閾値に関連した遺伝毒性メカニズム”があるかどうかを判断する (Fig. 2)。この閾値に関連したメカニズム例については 1.5 項で述べるが、その証拠がある場合には、1日許容量 (PDE) を無影響量 (NOEL) と安全係数 (UF) から求め、安全性を評価する。メカニズムの証拠がない場合にはまず製剤学的に検討し、その不純物が除去できるかどうか、そのレベルは as low as reasonably practicable (ALARP, 合理的かつ実用的範囲で可能な限り低い量) なものかどうかを評価し、それ以上下げられないレベルであれば、その値が 1.5 $\mu\text{g}/\text{day}$ を超えるかどうかを評価する。この 1.5 $\mu\text{g}/\text{day}$ を毒物学的閾値 (thresholds of toxicological concern, TTC) としている。1.5 $\mu\text{g}/\text{day}$ を超えなければ、その不純物は無視できるリスクとされ、超える場合は、それが当該医薬品の用法用量や特性などから許容できるかどうかを判断するとしている。このガイドライン案は、TTC の概念を導入し、1.5 $\mu\text{g}/\text{day}$ という一定のラインを設けた点で画期的なものといえよう。

4. 毒物学的閾値 (TTC)

TTC とは、それ以下ではヒトの健康にリスクを与えない 1日許容摂取量のことをいい、通常、ヒト生涯の発がんリスクが 100 万分の 1 を超えない“実質安全量”を推定した値である (Kroes et al., 2000; 2004; Kroes and Koziarowski, 2002)。これは、食品汚染化学物質や食品添加物の評価のために開発され、FDA や FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会 (JECFA) などで利用されている。そのコンセプトは、毒性試験が未実施の場合でも、既存毒性データや化学構造などから、問題となっている化学物質について有害性リスクのないヒト暴露量の閾値

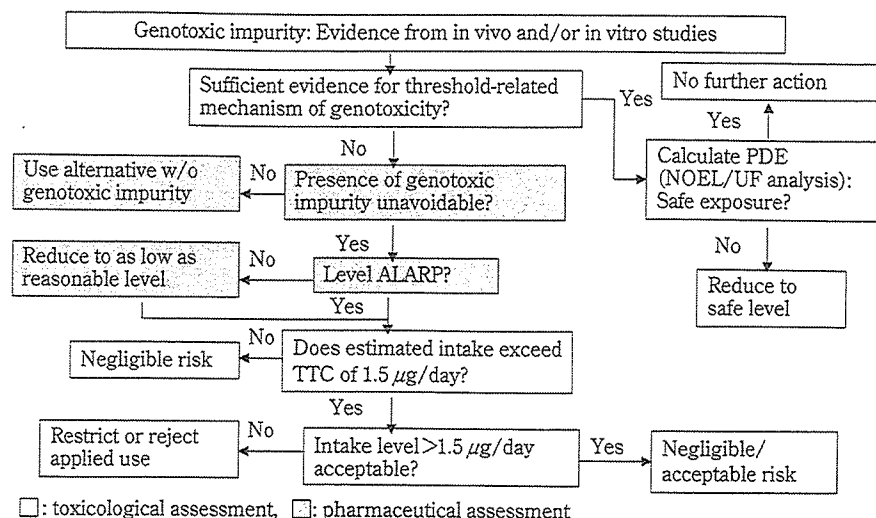


Fig. 2 Draft guideline on the limits of genotoxic impurities in pharmaceuticals (EMEA, 2004)

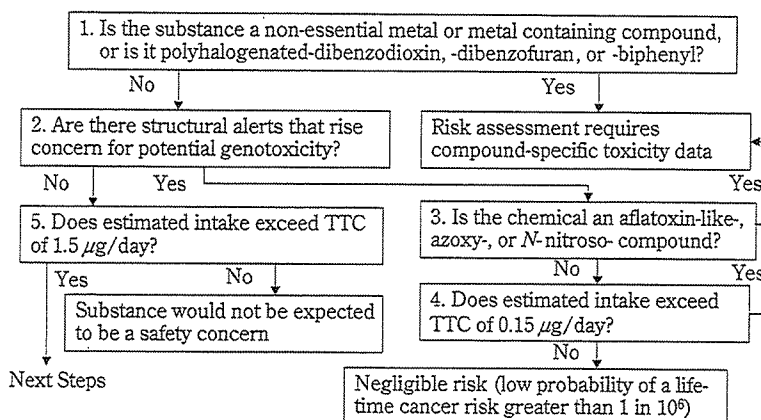


Fig. 3 Decision tree for compounds with limited toxicity data in the diet (Kroes et al., 2004)

を確立することである。数百の発がん物質および非発がん物質のデータに基づき、TTCの値は、非発がん物質や非遺伝毒性発がん物質については一人当たり1.5 µg/day、遺伝毒性発がん物質では0.15 µg/dayとされている。1.3項の医薬品の遺伝毒性不純物でのTTC値1.5 µg/dayは、遺伝毒性物質ではあるものの医薬品としてのベネフィットを考慮して10倍ゆるいTTCを設定したものである。

食品化学物質関係では、十分な毒性データがない化学物質について、Fig. 3に示すリスク評価のフローが提案されている (Kroes et al., 2004)。まず、高蓄積性や生物濃縮の観点からその構造がポリハロゲン化のダイオキシンやビフェニル類かどうかを検討する。次に遺伝毒性の構造アラートの有無を評価し、ない場合はTTCの1.5 µg/dayを超えるかどうかで安全性を評価する。遺伝毒性懸念構造がある場合には、それがアフラトキシン類似構造かアゾキシあるいはN-ニトロソ化合物かを判断し、そうである場合は個別の毒性データが必要とされ、一方、

それらに該当しない場合は、0.15 µg/dayに設定したTTCを超えるかどうかで評価する。ここで0.15 µg/dayは、ヒト体重を60 kgとして0.0025 µg/kg/dayに相当する。

5. リスク評価に関するテクニカルガイダンスドキュメント

欧州では、リスク評価に関するテクニカルガイダンスドキュメントが出され、遺伝毒性物質の用量反応関係の評価についての考え方を示している (European Commission, 2003)。遺伝毒性物質の一般原則は直線的用量反応関係だが、遺伝毒性の直接的および間接的メカニズムともに関値を示す可能性があるため、その原則が合わないことがあり、リスク評価には用量反応関係や作用メカニズムの検証が重要であるとしている。閾値あるいは非直線性を示す遺伝毒性メカニズムの例として、以下の要因を挙げている：

- 極端なpH、イオン強度および浸透圧

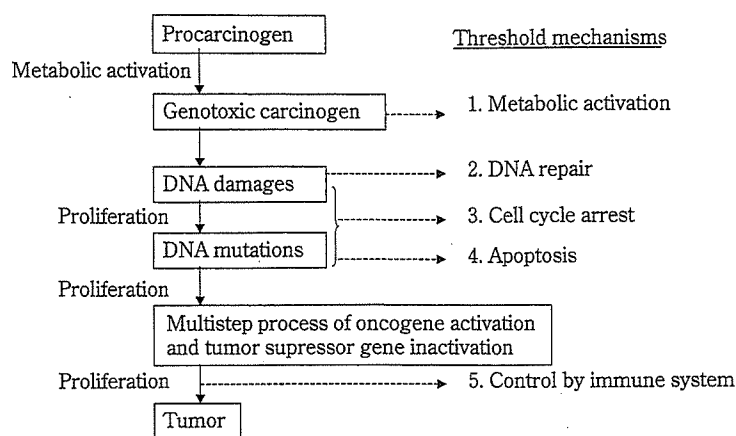


Fig. 4 Possible threshold mechanisms of genotoxic carcinogens (Hengstler et al., 2003)

- DNA合成阻害
- DNA修復系の変化
- 防御機構の過剰発現(抗酸化あるいは金属ホメオスタシス)
- 異数性を誘発する微小管重合器官との相互作用
- トポイソメラーゼ阻害
- 高細胞毒性
- 代謝の亢進
- 生理的摂動(エリスロポエシス誘導など)

また、用量反応関係における留意点として、最小影響量の把握はリスク評価に有用であること、特異な用量反応曲線は遺伝毒性メカニズムの推察に有効(急激な上昇は間接的作用あるいは代謝の変化を示唆する可能性など)であることを述べている。

6. 遺伝毒性発がん物質の閾値要因

閾値のメカニズムが明確に証明されない限り、変異原性との関連において閾値は設定できないと仮定するのは妥当であり、閾値をもたないとされる遺伝毒性発がん物質や生殖細胞変異原物質についてはリスク評価の適切な方法に関し明確な合意はない(European Commission, 2003a)。しかし、DNA直接反応型の遺伝毒性発がん物質であっても、Fig. 4に示すようにいくつかの要因において閾値の存在の可能性が示唆されている(Hengstler et al., 2003)。代謝活性化、DNA修復、細胞周期の停止、アポトーシスの誘導、免疫系の関与などである。

2. 生殖細胞変異原性

化学物質政策の中に生殖細胞変異原性が組み込まれ始め、生殖細胞変異原物質の分類についてもいくつかの提案がなされている。本節では、国際的に展開が進められているGHSを中心に、UK COMやUS EPA研究者の考え方、EUの変異原物質の分類例やドイツMAK委員会による生殖細胞変異原物質の分類例ならびに欧州の新しい

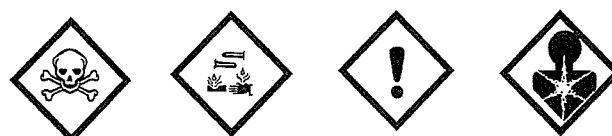


Fig. 5 Symbols for health hazard in GHS (UN, 2003)

い化学物質政策であるREACHを紹介する。

1. GHS

GHS(Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals)とは、国連が進めている化学品の分類および表示に関する世界調和システムのことであり(United Nations, 2003)。化学品を物理化学的危険性と健康および環境有害性に基づき分類し、それを表示/情報伝達するもので、医薬品や化粧品など一部を除きすべての化学品が対象とされる。GHSの対象者は、労働者(製造者など)、輸送担当者、消費者、緊急時対応者(消防、救急隊員など)である。2008年までに実施するとされているが、日本を含めAPEC加盟国は2006年为目标となっている。

GHSでは、健康有害性を次のように分類しており、発がん性や生殖毒性とならんで生殖細胞変異原性が取り上げられている：

- 急性毒性
- 皮膚腐食性/皮膚刺激性
- 眼に対する重篤な損傷性/眼刺激性
- 呼吸器感作性/皮膚感作性
- 生殖細胞変異原性
- 発がん性
- 生殖毒性
- 特定標的臓器/全身毒性(単回暴露)
- 特定標的臓器/全身毒性(反復暴露)
- 吸引力呼吸器有害性* (*2005年に追加予定)

各有害性において分類された毒性区分に応じて健康有害マーク(Fig. 5)を添付する必要がある。

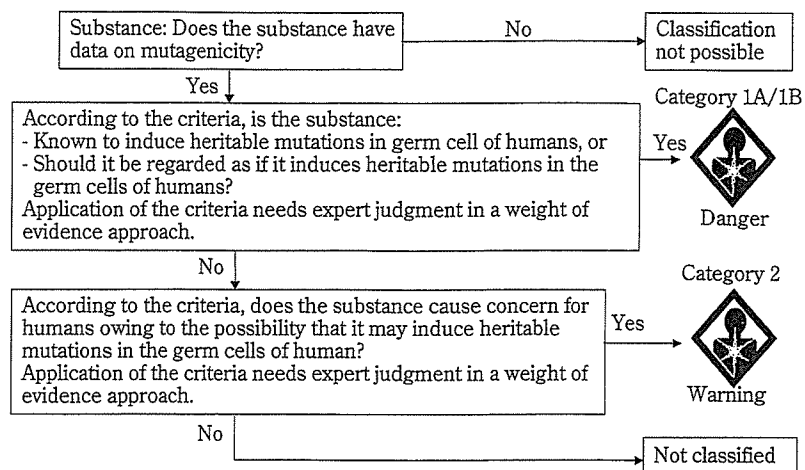


Fig. 6 Decision logic for germ cell mutagenicity in GHS (UN, 2003)

Table 2 Examples of mutagenicity/genotoxicity tests for GHS classification criteria for substances

- In vivo heritable germ cell mutagenicity tests
 - Rodent dominant lethal test
 - Mouse heritable translocation assay
 - Mouse specific locus test
- Mutagenicity/genotoxicity tests in germ cell
 - (a) Mutagenicity tests
 - Mammalian spermatogonial chromosomal aberration test
 - Spermatid micronucleus assay
 - (b) Genotoxicity tests
 - Sister chromatid exchange (SCE) analysis in spermatogonia
 - Unscheduled DNA synthesis (UDS) test in testicular cells
- In vivo somatic cell mutagenicity tests
 - Mammalian bone marrow chromosome aberration test
 - Mouse spot test
 - Mammalian erythrocyte micronucleus test
- Genotoxicity tests in somatic cells
 - Liver UDS in vivo
 - Mammalian bone marrow SCE
- In vitro mutagenicity tests
 - In vitro mammalian chromosome aberration test
 - In vitro mammalian cell gene mutation test
 - Bacterial reverse mutation test

UN, 2003

GHSでは生殖細胞変異原性を以下の論理に基づき分類している (Fig. 6)。まず、変異原性データの有無で、データがある場合には、それがヒト生殖細胞に遺伝性的変異を誘発するかどうか、あるいは誘発するとみなすべきかどうかを判断する。別途判断基準が示されているが、その適用には専門家の判断が必要とされている。ここで Yes の場合には、category 1A あるいは 1B として、健康有害マーク (シンボルあるいはピクトグラムとも呼ばれる)、注意喚起語として“危険”の文字、危険有害性情報として“遺伝的障害の可能性”と表示する必要がある。そ

こまでの影響がない場合には、ヒト生殖細胞に遺伝性的変異を誘発する可能性の有無を評価し、可能性がある場合には、category 2 として健康有害マークとともに“警告”および“遺伝的障害の疑い”と表示する。それぞれに専門家の判断が必要となっているが、GHS における化学品の分類は基本的には当該企業が実施することになっており、適切に分類されるかどうか難しい面がある。

GHS で示された分類の判断基準は次のようになっており、分類に使用する試験の例を Table 2 に示す (United Nations, 2003)。Category 1A のヒト生殖細胞に遺伝性変異を誘発するものの基準は、ヒトの疫学的調査による陽性としている。なお、現在のところ、そのような化学物質は知られていない。Category 1B のヒト生殖細胞に遺伝性変異を誘発するとみなされるものは、哺乳類の in vivo 生殖細胞遺伝性変異原性試験における陽性、これには優性致死試験、マウス転座試験や特定座位試験が該当する。あるいは、哺乳類の in vivo 体細胞変異原性試験における陽性に加え、生殖細胞に変異を誘発する可能性を示す証拠が必要とされ、また、次世代への証拠はなくてもヒトの生殖細胞に変異原性を示せば、category 1B に分類されるとしている。Category 2 は、ヒト生殖細胞に遺伝性変異を誘発する可能性があるものとされ、哺乳類の in vivo 体細胞変異原性試験の陽性、あるいは in vitro 変異原性陽性に裏付けられる in vivo 体細胞遺伝毒性陽性としている。Category 1 については、実際のカテゴリ分けを行うときにあまり問題は生じないが、category 2 については注意が必要と思われる。

なお、GHS の原文は国連欧州経済委員会の web site (http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev00/00files_e.html) で、その仮訳は厚生労働省 (<http://www.mhlw.go.jp/new-info/kobetu/roudou/ghs/index.html>)、環境省 (<http://www.env.go.jp/chemi/ghs/kariyaku.html>) あるいは経済産業省 (http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/)

Table 3 Proposed mutagenicity classification categories by US EPA researchers

Classification	Somatic cells	Germ cells
Possible human mutagen	Some evidence for genotoxic activity. May be carcinogenic through genotoxic mechanisms; possibly in humans.	Suggestive evidence of interaction with mammalian germ cells with some evidence for genotoxic activity. May be putative human germ cell mutagens if they reach target cells.
Probable human mutagen	Clear evidence for genotoxic activity in vivo mammalian test(s), usually supported by in vitro test(s). Usually animal carcinogens and may be human carcinogens.	Sufficient evidence of interaction with mammalian germ cells with clear evidence for genotoxic activity. Putative human germ cell mutagens if they reach target cells.
Human mutagen	Positive in human somatic cell mutagenicity studies as a result of human in vivo exposure. May be human carcinogens; unless the risk characterization suggest not as likely.	Positive in human in vivo germ cell mutagenicity studies. Human germ cell mutagens.

Dearfield et al., 2002

Table 4 EU criteria for classification of chemicals as mutagenic

Category	Classification	Criteria
Category 1	Substances known to be mutagenic to man.	Positive evidence from human mutation epidemiology studies will be needed. Examples of such substances are not known to date.
Category 2	Substances which should be regarded as if they are mutagenic to man.	Positive results from assays showing (a) mutagenic effects, or (b) other cellular interactions relevant to mutagenicity, in germ cells of mammals in vivo, or (c) mutagenic effects in somatic cells of mammals in vivo in combination with clear evidence that the substance or a relevant metabolite reaches the germ cell.
Category 3	Substances which cause concern for man owing to possible mutagenic effects.	There is evidence from appropriate mutagenicity studies, but this is insufficient to place the substance in category 2. Assays showing (a) mutagenic effects or (b) other cellular interaction relevant to mutagenicity, in somatic cells in mammals in vivo. The latter would be supported by positive results from in vitro mutagenicity assays.

EC, 2001; Pratt and Barron, 2003

kokusai/GHS/index_GHS.htm)の各web siteで閲覧できる。

2. UK COMの考え方

英国の変異原性諮問委員会(Committee on Mutagenicity, COM)は、変異原性試験ストラテジーを発表した(Committee on Mutagenicity, 2000)。その中のstage 3として、哺乳類の精原細胞あるいは精子細胞を用いた染色体異常試験(構造異常および数的異常)、優性致死試験やその他の生殖細胞での変異原性あるいはDNA損傷を検討する試験が提案され、さらに場合によってはマウス転座試験やマウス特定座位試験により経世代的影響のリスクを評価することが述べられている。生殖細胞を用いた試験の必要性は、変異原性を次世代へ継続されるリスクとして取り扱うことの重要性ならびにその独自性をあらためて認識させるものである。

3. US EPA研究者の考え方

US EPAのDearfield et al.(2002)は、UK COMのスト

ラテジーを受け、変異原物質を possible human mutagen, probable human mutagen および human mutagen に分け、それぞれ体細胞だけでなく生殖細胞への影響も考慮して分類することを提案している(Table 3)。

4. EUの分類

EUでは以前から化学物質の分類政策をとっており、変異原性、発がん性および生殖毒性についてそれぞれ3つのcategoryに分類している(European Communities, 2001; Pratt and Barron, 2003)。変異原性については、in vivo 哺乳類の生殖細胞における変異原性や当該関連物質の生殖細胞への移行性を考慮したクライテリアがとられている(Table 4)。変異原物質のEU分類例をTable 5に示すが、特徴的なのは、変異原物質と分類された化学物質のほとんどが発がん物質とも分類されている中で、異数体を誘発するとされるベノミルは発がん物質に分類されていないことである。

Table 5 Examples of mutagen in EU classification

Substances	Mutagenic category	Carcinogenic category	Reproductive toxic category
Acrylamide	2	2	3
Benzo[<i>a</i>]pyrène	2	2	2
1,3-Butadiene	2	1	-
Benzene	2	1	-
Benomyl	2	-	2
Cadmium chloride	2	2	2
Chromium (VI) trioxide	2	1	3
Hexamethylphosphoramide	2	2	-
2-Nitrotoluene	2	2	3
<i>n</i> -Butyl glycidyl ether	3	3	-
4-Chloro- <i>o</i> -toluidine	3	2	-
Dinitrotoluene	3	2	3
Trichloroethylene	3	2	-

Table 6 Categories for classification of germ cell mutagens by MAK commission

Category	Classification
Category 1	Substances shown to increase the mutant frequency in the progeny of exposed humans
Category 2	Substances shown to increase the mutant frequency in the progeny of exposed mammals
Category 3A	Substances shown to induce genetic damage in germ cells of humans or animals, or which produce mutagenic effects in somatic cells of mammals in vivo and shown to reach the germ cells in an active form
Category 3B	Substances suspected of germ cell mutagens because of their genotoxic effects in mammalian somatic cells in vivo; in exceptional cases, substances without in vivo data but with clearly mutagenic in vitro and structurally related to known in vivo mutagens
Category 4	Not applicable (Category 4 carcinogenic substances are those with non-genotoxic mechanisms of action. By definition, germ cell mutagens are genotoxic.)
Category 5	Substances considered the potency is considered so low, their contribution to genetic risk for man is expected not to be significant

DFG, 2003

5. ドイツ MAK 委員会の分類

ドイツの作業環境最大許容濃度 (Maximale Arbeitsplatz-Konzentration, MAK) 委員会は、“生殖細胞変異原物質は、生殖細胞に遺伝性の遺伝子突然変異や経世代的な染色体の構造ならびに数的異常をもたらす。次世代における生殖細胞の変異の結果、病気の兆候を伴わない遺伝的に同定される表現系の変化、受精率の低下、胎児期あるいは周産期の死亡、先天異常ならびに種々の程度健康障害を伴う遺伝性疾患が生ずる。”と述べている (DFG, 2003)。そして、生殖細胞変異原物質を発がん物質の分類と対応させ5つのカテゴリーに分類し (Table 6)、2003年時点で26物質を生殖細胞変異原物質としている (Table 7)。ベンゾピレンとジエポキシブタンを除き、MAK分類においても、生殖細胞変異原物質のほとんどが発がん物質に分類されている。

6. REACH

欧州では REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restrictions of Chemicals) システムと呼ばれる新しい化学物質管理政策が始まろうとしている (European Commission, 2003b)。本システムでは、最終

的には年間1トン以上生産あるいは輸入されるすべての化学物質が登録 (registration) 対象となり、書類審査と当該物質評価により評価 (evaluation) される。そして健康や環境に対し強い懸念のあるすべての化学物質が認可 (authorisation) 対象となり、必要に応じ使用禁止などの規制 (restrictions) がかけられる。認可対象物質例として、EU分類で category 1, 2 に区分される発がん性/変異原性/生殖毒性物質 (carcinogens, mutagens and reproductive toxins, CMRs)、残留性/生体蓄積性/毒性物質 (persistent, bio-accumulative and toxic substances, PBTs) および高残留性/高生体蓄積性物質 (very persistent, very bio-accumulative substances, vPvB) が挙げられている。

結 語

発がん性および遺伝毒性の閾値については、間接的遺伝毒性発がん物質については、閾値の設定が可能であるというのが、ほぼ国際的同意を得ている。一方、直接的遺伝毒性発がん物質には、まだまだ同意は得られておらず、また閾値の明確な証拠も得られていない。規制の分野では、遺伝毒性発がん物質についても TTC による閾値の概念を導入することが図られつつあり、そのために

Table 7 Germ cell mutagens defined by MAK Commission

Substances	Germ cell mutagens category	Carcinogens category
Acrylamide	2	2
Benzo[<i>a</i>]pyrene	2	—
1,3-Butadiene	2	1
<i>n</i> -Butyl glycidyl ether	2	3B
1,2-dibromo-3-chloropropane	2	2
Diepoxybutane	2	—
Ethylene oxide	2	2
Ethyleneimine	2	2
<i>N</i> -Methyl-bis(2-chloroethyl)amine	2	1
Olaquinox	2	3B
Trimethyl phosphate	2	3B
Arsenic and inorganic arsenic compounds	3A	1
Benzene	3A	1
4-Chloro- <i>o</i> -toluidine	3A	1
Cobalt and cobalt compounds	3A	2
1,4-Dichloro-2-butene	3A	2
Hydroquinone	3A	2
1,4-Dichlorobenzene	3B	2
Epichlorohydrin	3B	2
Naphthalene	3B	2
2-Nitrotoluene	3B	2
Ochratoxine A	3B	2
Quinone	3B	3B
Trichloroethylene	3B	1
Ethanol	5	5
Formaldehyde	5	4

DFG, 2003

は発がん部位におけるメカニズムの検討がより一層重要となってきた。


生殖細胞への遺伝的影響に注目が集まっており、生殖細胞変異原性が化学物質の分類項目の1つに加えられてきている。化学物質の適切な分類のためには、具体的な分類方法の提示が必要と考えられる。

遺伝毒性/変異原性は、ともすれば発がん性のプレスクリーニングとして扱われてきた。しかしながら、最近の閾値ならびに生殖細胞変異原性に関する動向は、遺伝毒性のリスクアセスメント、すなわち定量的評価ならびに化学物質の的確なハザード分類を実施するうえで、新たな遺伝毒性の意義付けを与えるものである。

参考文献

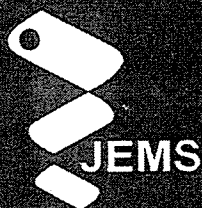
- Bogdanffy, M.S. and R. Valentine (2003) Differentiating between local cytotoxicity, mitogenesis, and genotoxicity in carcinogen risk assessments: the case of vinyl acetate, *Toxicol. Lett.*, 140-141, 83-98.
- Bolt, H.M. (2003) Genotoxicity—threshold or not? Introduction of cases of industrial chemicals, *Toxicol. Lett.*, 140-141, 43-51.
- Bolt, H.M. and G.H. Degen (2004) Human carcinogenic risk evaluation, Part II: Contributions of the EUROTOX specialty section for carcinogenesis, *Toxicol. Sci.*, 81, 3-6.
- Bolt, H.M., H. Foth, J.G. Hengstler and G.H. Degen (2004) Carcinogenicity categorization of chemicals, New aspects to be considered in a European perspective, *Toxicol. Lett.*, 151, 29-41.
- Brüning, T. and H.M. Bolt (2000) Renal toxicity and carcinogenicity of trichloroethylene: Key results, mechanisms, and controversies, *Crit. Rev. Toxicol.*, 30, 253-285.
- Committee on mutagenicity of chemicals in food, consumer products and the environment (COM) (2000) Guidance on a strategy for testing of chemicals for mutagenicity, Department of Health, UK.
- Dearfield, K.L., M.C. Cimino, N.E. McCarroll, I. Mauer and L.R. Valcovic (2002) Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy, *Mutat. Res.*, 26, 121-135.
- De Flora, S. (2000) Threshold mechanisms and site specificity in chromium(VI) carcinogenesis, *Carcinogenesis*, 21, 533-541.
- Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (2003) List of MAK and BAT values, Commission for the investigation of health hazards of chemical compounds in the work area, Report No. 39, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- European Commission (2003a) Technical guidance document on risk assessment, Part I.
- European Commission (2003b) Proposal for a Regulation of the European parliament and of the council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency and amending Directive 1999/45/EC and Regulation (EC), COM(2003) 644 final, Brussels.
- European Communities (2001) Commission directive 2001/59/EC of 6 August 2001, *Official J. of Europe Commun.* L225.
- European Medicines Agency (2004) Guideline on the limits of genotoxic impurities, Committee for medical products for human use

- (CHMP), CPMP/SWP/5199/02, London.
- Hengstler, J.G., M.S. Bogdanffy, H.M. Bolt and F. Oesch (2003) Challenging dogma: Threshold for genotoxic carcinogens? The case of vinyl acetate, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 43, 485-520.
- Kroes, R., C. Galli, I. Munro, B. Schilter, L.-A. Tran, R. Walker and G. Würtzen (2000) Threshold of toxicological concern for chemical substances present in the diet: A practical tool for assessing the need for toxicity testing, *Food Chem. Toxicol.*, 38, 255-312.
- Kroes, R. and G. Kozianowski (2002) Threshold of toxicological concern (TTC) in food safety assessment, *Toxicol. Lett.*, 127, 43-46.
- Kroes, R., A.G. Renwick, M. Cheeseman, J. Kleiner, I. Mangelsdorf, A. Piersma, B. Schilter, J. Schlatter, F. van Schothorst, J.G. Vos and G. Würtzen (2004) Structure-based thresholds of toxicological concern (TTC): guidance for application to substances present at low levels in the diet, *Food Chem. Toxicol.*, 42, 65-83.
- Pratt, I.S. and T. Barron (2003) Regulatory recognition of indirect genotoxicity mechanisms in the European Union, *Toxicol. Lett.*, 140-141, 53-62.
- Streffer, C., H. Bolt, D. Føllesdal, P. Hall, J.G. Hengstler, P. Jakob, D. Oughton, K. Prieß, E. Rehbinder and E. Swanton (2004) Low dose exposures in the environment, *Dose-effect relations and risk evaluation*, Springer-Verlag, Berlin.
- United Nations (2003) Globally harmonized system of classification and labeling of chemicals (GHS), United Nations, New York and Geneva.



日本環境変異原学会 (JEMS)

第34回大会 (東京)
プログラム・要旨集



NOV. 2005

P-97

Computerized prediction system of mutagenicity of organic compounds by application of classification decision tree

K Sawatari¹, T Matsushima² (National Institute of Industrial Health¹), Japan Bioassay Research Center²)
sawatari@niih.go.jp

Keywords: Computerized prediction of mutagenicity; Structure-Activity relationships (SAR); Decision tree

A computerized prediction system of mutagenicity of organic compounds is being developed. Training data set consists of ca. nine thousand mutagenicity test results reported to Ministry of Health, Labour and Welfare according to Industrial Safety and Health Law. Topological parameters and LogP values were calculated from chemical structure formulas using ADAPT (Jurs PC, et. al.) and CLogP4.0 (BioByte Corp), respectively. CART5.0 (Salford Systems) was applied to organization of classification decision trees, evaluation function being Shannon's Information Entropy Function. Five types of compounds were extracted from the whole compound set, i.e. aromatic nitro compounds, aromatic amino compounds, primary alkyl halides, epoxides and hydrazine derivatives. Another compounds set was assembled combining the five types of compounds listed above. Classification decision trees were organized from those six sets, and cross-validation tests were carried out. Strongly mutagenic compounds of each type were correctly predicted as strongly mutagenic on the reliabilities of 93.8%, 85.3%, 90.0%, 88.9%, 100% and 81.4%, respectively. Because strongly mutagenic compounds can be carcinogenic on high probability, this high prediction accuracy has very important meanings in the view of protection of human health. A study employing all of the mutagenicity test results will be presented in November.

分類決定木によるコンピュータを用いた有機化合物の変異原性の予測システム
猿渡雄彦¹、松島泰次郎² (産業医学総合研究所¹、日本バイオアッセイ研究センター²)

P-98

Classification of germ cell mutagens for GHS

T. Morita¹, T. Sofuni², M. Hayashi¹, N. Tanaka³, M. Nakajima⁴, Y. Nakanishi⁵, M. Higuchi⁶, S. Ishimitsu¹,
Y. Kojima¹, S. Sasaki¹, K. Morikawa¹ (NIHS¹), CIEA², FDSC³, Bio-safety Res. Ctr.⁴, NIIH⁵, MHLW⁶)
morita-tk@nihs.go.jp

Keywords: GHS; Hazard classification; Germ cell mutagens

APEC members are encouraged in Fourteenth APEC Ministerial Meeting to work towards implementing the Globally Harmonized System (GHS) on hazard classification and labeling of chemicals and safety data sheets by 2006. The Japanese government plans to conduct GHS classification on about 1500 chemicals that are regulated by Industrial Safety and Health Law, Poisonous and Deleterious Substances Control Law or Pollutant Release and Transfer Register (PRTR). The GHS includes (a) harmonized criteria for classifying substances and mixtures according to their health, environmental and physical hazards, and (b) harmonized hazard communication elements, including requirement for labeling and safety data sheets. Health hazards in GHS include germ cell mutagenicity. The GHS document (UN, 2003) states hazard categories and decision logic for Germ Cell Mutagens (GCM), however, it is inconvenient practically for classification of chemicals. Therefore, we prepared the guidance for GCM classification. The guidance introduces the concept of heritable mutagenicity, and presents criteria of GCM, mutagenicity/genotoxicity test data to be used, and a flow chart for classification. Practical approach and examples of GCM classification will be presented and its usefulness will be discussed.

GHSにおける生殖細胞変異原性物質の分類

森田健¹、祖父尼俊雄²、林真¹、田中憲穂³、中嶋圓⁴、中西良文⁵、樋口政純⁶、石光進¹、小嶋靖¹、佐々木史歩¹、森川馨¹
(国衛研¹、実中研²、食薬セ³、安評セ⁴、産医研⁵、厚労省⁶)



Read me ==>

目次	会頭講演・特別講演・受賞講演	シンポジウム	一般学術発表 (口頭・ポスター)
	▶ 会頭講演 ▶ 特別講演 ▶ 受賞講演	▶ シンポジウム一覧	▶ セッション検索 ▶ 全文検索 (Webからはこちら)

一般学術発表 (口頭・ポスター)

- ▶ [発表される方へ](#)
- ▶ [シンポジウム \(一般・スポンサード・大学院生\)](#)
- ▶ [一般シンポジウム](#)
- ▶ [講演される方へ](#)
- ▶ [スポンサードシンポジウム](#)
- ▶ [講演される方へ](#)
- ▶ [大学院生シンポジウム](#)
- ▶ [講演される方へ](#)
- ▶ [特別講演など](#)
- ▶ [講演される方へ](#)
- ▶ [参加申込](#)
- ▶ [参加される方へ](#)
- ▶ [126年会 行事](#)
- ▶ [懇親会](#)
- ▶ [総会等行事](#)
- ▶ [薬学市民講演会](#)
- ▶ [その他](#)
- ▶ [薬剤師研修認定の受講シール](#)
- ▶ [糖尿病療養指導士の認定更新単位](#)
- ▶ [特許証明願](#)
- ▶ [託児所](#)

プログラム関連

- ▶ [プログラム集正誤表](#)
- ▶ [日程一覧](#)
- ▶ [全日程一覧](#)
- ▶ [一般口頭発表日程一覧](#)
- ▶ [一般ポスター発表日程一覧](#)
- ▶ [特別講演・受賞講演・シンポジウム日程表 \(PDF\)](#)
- ▶ [特別講演一覧](#)
- ▶ [受賞講演一覧](#)
- ▶ [シンポジウム一覧](#)
- ▶ [ランチョンセミナー一覧](#)
- ▶ [出展一覧 \(日本薬科機器協会主催\)](#)
- ▶ [会場・交通案内](#)
- ▶ [会場案内](#)
- ▶ [会場へのアクセス](#)
- ▶ [無料シャトルバス](#)
- ▶ [クローク](#)
- ▶ [組織委員会より](#)
- ▶ [謝辞](#)
- ▶ [委員会](#)
- ▶ [広告](#)

P29[S]am-424

室内空気中の揮発性有機化合物の GHS 分類

○石光 進, 森田 健, 森川 馨 (国立衛研)

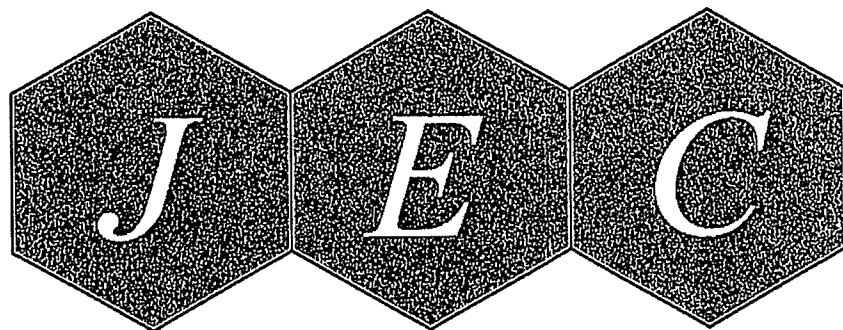
【目的】厚生労働省は 13 の化学物質について室内空気濃度の指針値を定めている。しかし、現実にはその数倍以上の化学物質が検出される場合がある。一方、検出される揮発性有機化合物 (VOC) については、統一された基準に基づく有害性の評価はされていない。今回、GHS (The Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals) 分類に基づいて VOC の有害性評価を行った。

【方法】GHS 分類は、国内外のデータベース及び文献調査により有害性データを収集・評価した後、国連から出版公開されている GHS 文書と GHS 関連省庁等で作成されている分類マニュアル及び技術上の指針に基づき実施した。

【結果・考察】平成 16 年度に日本の室内空気中で測定され最も高濃度に検出された VOC はアセトンで、以下トルエン、リモネン、ノナンの順であった。健康有害性については GHS に基づいて呼吸器/皮膚感作性、生殖細胞変異原性等 10 項目について検討した。急性毒性の強いものとしてデカン、ドデカン、トリデカン等があげられた。評価した VOC の大部分はヒトに対して皮膚及び眼刺激性を示した。単回及び反復暴露の特定標的臓器毒性では肝臓及び中枢神経系への影響を示す物質が多く認められた。発がん性はエチルベンゼン等、生殖毒性はトルエン等でヒトに対する毒性が疑われる結果が示された。また、誤嚥により化学性肺炎を引き起こす物質としてノナン、デカン、オクタン、1,2,4-トリメチルベンゼン、エチルベンゼン等が認められ、VOC はヒトへの吸引性呼吸器有害性が多く認められるのが特徴であった。今回評価・分類した VOC の健康有害性は、国連が進めている GHS 分類に基づく健康有害性情報として提供することができるとともに、今後我が国における VOC への実施すべき施策に貢献できるものと考えられる。

第15回 環境化学討論会

講演要旨集



期日：2006年6月20日(火)～22日(木)

会場：仙台国際センター(仙台市)

協賛：(財)宮城県公害衛生検査センター

(財)青葉工学会

後援：宮城県、仙台市

15th Symposium on Environmental Chemistry
Programs and Abstracts

日本環境化学会

ラットを用いたトルエンの投与濃度・経路による血液中濃度推移の研究

○武 信、大西 誠、長野 嘉介、山本 静護、松島 泰次郎

(中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター)

【目的】塗料溶剤等として使用され、環境中への排出量が多いトルエン(PRTR 制度：平成 16 年度 1 位)の体内動態を把握することを目的として、ラットに腹腔内投与、強制経口投与及び吸入暴露（投与用量及び暴露濃度：4 段階）を行い、各投与経路における血液中トルエンの濃度推移を比較した。

【方法】動物は CrI:CD(SD)IGS ラット(10 週齢)雄を使用した。設定した投与用量及び暴露濃度を下記の表に示した。

	投与経路	投与用量及び暴露濃度
①	腹腔内投与	25、50、100、200mg/kg・BW
②	強制経口投与	25、50、100、200mg/kg・BW
③	吸入暴露	25、50、100、200ppm (v/v)

①腹腔内投与及び②強制経口投与：トルエンをコーン油に溶解し単回投与した。③吸入暴露：トルエンを所定の濃度に調整した空気に 360 分間、全身暴露した。ラットの血液中トルエンを測定するための血液採取は尾静脈から行った。採血時間は①腹腔内投与及び②強制経口投与：投与後 30、60、180、360、390、420、540 分、③吸入暴露：暴露開始 30、60、180、360 分及び暴露終了後 30、60、180 分とした。それぞれの採血した試料はヘッドスペース-GC/MS でトルエン濃度を測定した(n=3)。

【結果・考察】各投与用量及び暴露濃度における血液中トルエン濃度の経時的変化を図 1、薬物血中濃度-時間曲線下面積 (AUC)を表 1 に示した。

1. 血液中トルエン濃度の経時的変化 (図 1) と AUC (表 1)

①腹腔内投与：各投与用量とも投与後、時間経過に伴って血液中濃度は増加する傾向を示し、投与後 180 分で最大濃度(Cmax)に達し、以後、血液中濃度は減衰し、投与後 540 分まで認められた。また、25 mg/kg・BW の AUC 値を 1 として比較すると、50 mg/kg・BW : 2.3 倍、100 mg/kg・BW : 5.1 倍、200 mg/kg・BW : 9.3 倍であり、ほぼ投与用量の増加(公比 2)に対応した AUC 値の増加が認められた。

②強制経口投与：各投与用量とも投与後、時間経過に伴って血液中濃度は増加する傾向を示し、25mg/kg・BW では投与後 60 分で Cmax、50、100、200mg/kg・BW では投与後 180 分で Cmax に達し、以後、血液中濃度は減衰し、50、100、200mg/kg・BW では投与後 540 分まで認められたが、25mg/kg・BW では投与後 360 分以降、検出されなかった。また、25 mg/kg・BW の AUC 値を 1 として比較すると、50 mg/kg・BW : 1.6 倍、100 mg/kg・BW : 4.9 倍、200mg/kg・BW : 12.4 倍であり、ほぼ投与用量の増加(公比 2)に対応した AUC 値の増加が認められた。

③吸入暴露：暴露中 360 分の間、25、50ppm ではほぼ一定の血液中濃度であったが、100、200ppm で暴露時間の経過に伴って血液中濃度が増加した。暴露終了後は各暴露濃度とも血液中濃度は減衰し、50、100、200ppm では暴露終了後 180 分まで認められたが、25ppm では暴露終了後 180 分で検出されなかった。50ppm 以下の暴露濃度では暴露中、ほぼ一定の血液中濃度であることから、この暴露濃度以下であると吸収と排泄の関係が一定に保たれるが、100ppm 以上の暴露濃度

Dose- and route-dependent alteration of blood toluene concentration in rats.

Makoto TAKE, Makoto OHNISHI, Kasuke NAGANO, Seigo YAMAMOTO and Taijiro MATSUSHIMA:
Japan Bioassay Research Center, 2445 Hirasawa, Hadano, Kanagawa 257-0015, Tel 0463-82-3911,
Fax 0463-82-3860, E-mail m-take@jisha.or.jp

では吸収と排泄の関係が一定に保たれなくなり、暴露時間の経過に伴って血液中濃度が増加したと考えられた。また、25ppm の AUC 値を 1 として比較すると、50ppm : 3.2 倍、100ppm : 15.2 倍、200ppm : 28.1 倍であり、特に 100、200ppm は暴露濃度の増加(公比 2)以上の AUC 値の増加が認められた。

2. 投与経路における AUC の比較

腹腔内投与と強制経口投与の AUC で比べると同じ投与用量において、強制経口投与に比べ腹腔内投与で 2.7~5.2 倍高かった。このことから、トルエンは強制経口投与に比べ腹腔内投与において、体内への吸収率が高いと考えられた。腹腔内投与を基に吸入暴露の AUC を比べると吸入暴露 25、50ppm の AUC は腹腔内投与 25mg/kg・BW 以下の濃度であり、吸入暴露 100、200ppm の AUC は腹腔内投与 50~100mg/kg・BW の濃度範囲に相当した。

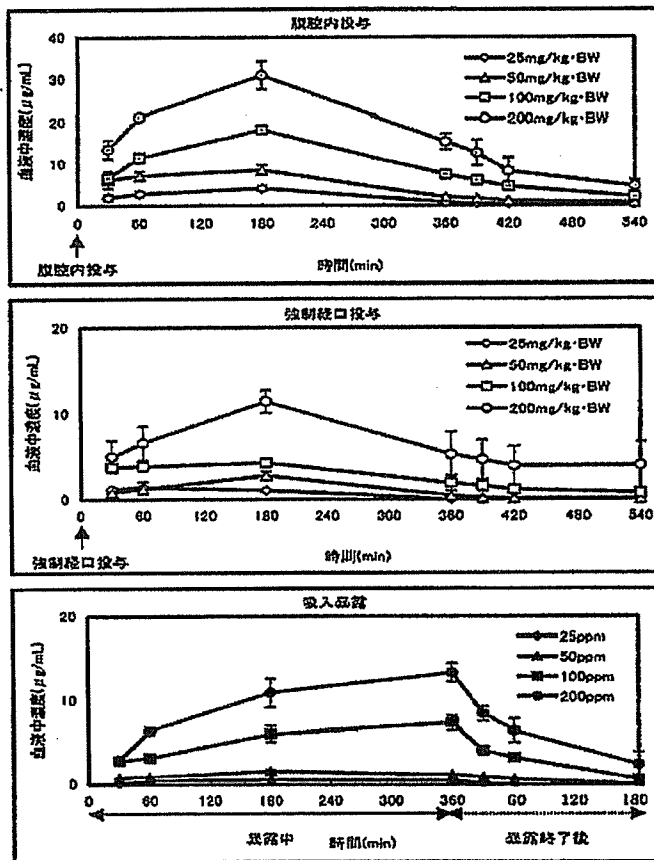


図 1. 血液中トルエン濃度の経時的変化

【まとめ】

各投与経路における投与用量・暴露濃度の血液中トルエンの濃度推移が明らかになった。また、各投与経路の AUC を比較することにより、投与経路による吸収の違い、体内濃度の比較が可能になった。これらのことは、環境中への排出量が多いトルエンが人体に与える影響を把握するための基礎データとして、重要な知見であると考えられた。

本研究は厚生労働科学研究費補助金(家庭用品中化学物質のリスク評価に関する総合研究事業)により実施した。

表 1. AUC

腹腔内投与	AUC	比率 ^a
25mg/kg・BW	1022 ^b	1
50mg/kg・BW	2360	2.3
100mg/kg・BW	5202	5.1
200mg/kg・BW	9491	9.3

強制経口投与

	AUC	比率
25mg/kg・BW	288	1
50mg/kg・BW	457	1.6
100mg/kg・BW	1399	4.9
200mg/kg・BW	3561	12.4

吸入暴露

	AUC	比率
25ppm	159	1
50ppm	505	3.2
100ppm	2419	15.2
200ppm	4474	28.1

^a: 各投与用量及び暴露濃度の最低濃度の AUC を 1 とした時の比率

^b: μg・min/mL

アセトアルデヒド吸入曝露は *Aldh2* ノックアウトマウスにおいて網状赤血球小核頻度を増加させる

樺田尚樹, 一瀬豊日, 小山倫浩, 小川真規, 山口哲右, 木長 健, 村上朋絵, 奈良井理恵, 北川恭子, 川本俊弘

- 1 産業医科大学産業保健学部保健情報科学,
- 2 産業医科大学医学部衛生学,
- 3 浜松医科大学学生化学第 1 講座

【背景・目的】日本人の約半数にはアセトアルデヒド脱水素酵素 (ALDH2) 活性の欠損のために、飲酒後、フラッシュと呼ばれる顔面紅潮や、心悸亢進、吐き気、頭痛等の気分不良を訴える人がいる。一方、少量適度の飲酒は各種生活習慣病の予防効果もあるといわれるが、過度の飲酒により食道がんや頭頸部がんのリスクを高めることが知られている。ALDH2 酵素不活性者においては、ALDH2 正常者と同量の飲酒をするとアセトアルデヒド濃度が高く維持されるために、発がんリスクが高まると予想されるが、その発がんリスク評価はほとんどなされていなかった。わずかに、最近、疫学調査によって ALDH2 酵素不活性者の発がんリスクが同酵素活性正常者よりも高くなる可能性や重複がんが増加するなどの報告がされはじめたところである。人種的に日本人を含む東洋人に多い ALDH2 活性欠損者の飲酒による発がんリスクの評価は、飲酒量が増加する今日において発がん予防の観点からも非常に重要な課題である。一方、動物実験においても ALDH2 不活性型モデルとなるモデル動物はこれまで存在しなかったため、日本人に多い *ALDH2* 遺伝子型変異に伴う発がんリスク評価は動物実験も困難であった。本研究では、我々が ALDH2 活性欠損者の動物モデルとして開発した *Aldh2* ノックアウトマウスを用いて、アセトアルデヒド吸入曝露時の変異原性を評価比較することを目的とする。

【方法】*Aldh2* ノックアウトマウスおよび野生型マウスを用い、アセトアルデヒドを 500ppm で 2 週間吸入曝露を行った。

網状赤血球における小核発現頻度の解析：FITC ラベル抗 CD71 抗体を用いて網状赤血球を識別し、PI 色素で DNA を有する小核を染色することでフローサイトメーターを用いて網状赤血球中小核頻度を検出・定量化した。

脾臓 T リンパ球における *T cell receptor (TCR)* 遺伝子の突然変異頻度の解析：フローサイトメーターを用い、FITC ラベル抗 CD3 抗体と PE ラベル抗 CD4 抗体を用いて T リンパ球を 2 重染色することにより、*TCR* 遺伝子に突然変異を来たした結果、CD3⁺CD4⁺ という異常な表現型をもつ T リンパ球頻度を解析した。

【結果・結論】

体重増加：アセトアルデヒド吸入曝露により *Aldh2* ノックアウトマウスにおいては体重の減少が観察された。

変異原性試験：1) 網状赤血球および赤血球中小核頻度；未処理コントロール群において、野生型マウスに比し *Aldh2* ノックアウトマウスにおいては有意に小核頻度が高値を示した。さらにアセトアルデヒド吸入曝露により野生型マウスにおいては小核頻度の増加は認められなかったが、*Aldh2* ノックアウトマウスにおいては有意な増加が観察された。

2) TCR 突然変異頻度；小核頻度同様に未処理コントロール群において、野生型マウスに比し *Aldh2* ノックアウトマウスにおいては有意に TCR 突然変異頻度が高値を示した。しかしアセトアルデヒド曝露の影響は認めなかった。

Aldh2 ノックアウトマウスにおいては野生型マウスに比べ尿中 8-OHdG レベルが増加していることを以前に報告しているが、さらに小核頻度および TCR 突然変異頻度においても野生型マウスに比べ高値を示していた。これらのことはノックアウトマウスにおいては内因性の酸化ストレスの増加が示唆される。さらにアセトアルデヒド曝露によりノックアウトマウスにおいてのみ小核頻度の増加が認められたが、このとき血中のアセトアルデヒド濃度も高値であることを認めており代謝の遅延により毒性が増加することが確認された。なお、TCR 突然変異頻度においては曝露の影響が認められなかったが、このアッセイ系においては約 2 週間の発現期間を要することより曝露の影響を認めなかったと考えられる。

影響マーカーと産業保健

櫻田 尚樹 (産業医大・産業保健学部)

1. はじめに

産業界においては、毎日非常に多数の新規化学物質が導入されている。現在 Chemical Abstracts データベースに登録されている化学物質は 2500 万種以上あり、さらに日々 3000 種以上新規登録されている。

これらの中には、変異原性・発がん性を有するものも多数ある。ここでは、変異原性試験を中心とした影響マーカーについて報告する。すなわち特定遺伝子座における突然変異頻度解析、*in vivo* における小核試験、突然変異解析用レポーター遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを用いた試験法などが近年開発されているが、これらを用いた動物実験データを中心に、遺伝子修復や代謝酵素遺伝子多型による感受性の相違などを紹介する。

2. 低線量・低線量率放射線誘発突然変異と p53 依存性アポトーシス

【方法】 *p53*(+/+)、*p53*(+/-) および *p53*(-/-) 成獣マウスを使用し、高線量率群 (HDR) として 1.02 Gy/min、および低線量率群 (LDR) として HDR の約 1/850 の線量率である 1.2 mGy/min で γ 線照射した。

1) *TCR* 突然変異頻度解析：脾臓 T リンパ球の *TCR* 突然変異頻度を FITC-抗 CD3、PE-抗 CD4 抗体による 2 重染色し、CD3⁺、CD4⁺ 表現型を示す *TCR* 遺伝子突然変異頻度をフローサイトメーター (FACS) にて観察した。

2) アポトーシス頻度の比較：HDR 照射 4 時間後に屠殺し胸腺および脾臓組織中のアポトーシス頻度を観察した。

【結果】 1) *TCR* 突然変異頻度解析：いずれの系統のマウスでも HDR 照射では、照射線量に対して直線-2 次曲線モデルにフィットする突然変異頻度の増加を認めた。一方、LDR 照射では *p53*(-/-) マウスにおいて直線モデルにフィットする増加を認めたが、*p53*(+/+)、*p53*(+/-) マウスにおいては 3 Gy 照射においても自然突然変異頻度と全く相違を認めず突然変異の増加を認めなかった。

2) アポトーシス頻度の比較：*p53*(+/+) マウスにおいては高頻度にアポトーシスが観察されたが、*p53*(-/-) マウスにおいては 2 Gy 照射してもアポトーシス頻度の増加は認

めなかった。

【まとめ】 以上の結果は、放射線により誘発された DNA 損傷は、*p53*(-/-) マウスにおいても DNA 修復により LDR では HDR に比較して半分程度の突然変異誘発まで低減される。一方、高いアポトーシス活性を有する *p53*(+/+) マウスにおいては DNA 修復と協調してアポトーシスを介した修復機構により完全な修復がなされ LDR では誘発突然変異頻度がゼロになると考えられた。

3. *Aldh2* ノックアウトマウスにおけるアセトアルデヒド曝露による小核誘発

【目的】 アルデヒド脱水素酵素 (ALDH) 2 活性欠損モデルとして開発した *Aldh2*(-/-) における、アセトアルデヒド曝露による発がんリスク評価を小核試験にて実施した。

【方法】 *Aldh2*(-/-) および野生型マウスそれぞれにアセトアルデヒド曝露を行った。2 週間曝露直後に、末梢血を採取し、網状赤血球中の小核頻度を FACS を用いた方法により測定した。

【結果】 網状赤血球中小核頻度は *Aldh2*(-/-) マウスではコントロール群に比べ有意に上昇した。一方野生型マウスにおいては有意な変化は認めなかった。

【考察】 *Aldh2* 遺伝子ノックアウトによりアセトアルデヒド曝露に対する変異原性の感受性が高まることが示唆された。

4. まとめ

近年各種ノックアウトマウス、トランスジェニックマウスが開発されているが、これらを用いることで化学物質の変異原性の有無を評価するだけでなく、変異のメカニズム解析、修復との関連、あるいは代謝酵素遺伝子に関連したノックアウトマウスを用いることで感受性の相違などを幅広く容易に観察できるようになった。これらを使用し、*in vitro* 実験結果による変異原性スクリーニングと長期間を要する発がん実験をつなぐ実験データが蓄積されることが、産業保健分野で日々新規に導入される化学物質の安全性評価において非常に重要であると考えられる。

低濃度アセトアルデヒド経気道曝露による生体影響評価

榎田尚樹¹⁾、○河野亮¹⁾、吉田安宏²⁾、安藤正典³⁾、嵐谷奎一¹⁾

¹⁾ 産業医科大学・産業保健学部、²⁾ 産業医科大学・医学部・免疫学、³⁾ 武蔵野大学・薬学部・薬学研究所・環境科学研究室

【はじめに】近年我々の生活環境中の化学物質の種類増加は著しい。さらにオフィスや住宅の建材の変化・気密性の増加なども加わり、種々の症状を訴える人が増加し、シックビルディング症候群あるいは化学物質過敏症（以下 MCS）という概念が提唱され、その対応が緊急に迫られている。ホルムアルデヒドの MCS への関与などの指摘より代替物質としてのアセトアルデヒドの使用が増加傾向にある。そこで本研究ではアセトアルデヒドについて低濃度経気道曝露実験系を確立し、その生態影響を評価することを試みた。

【研究方法】

(1) 実験動物および曝露濃度：C57BL/6N 雄性マウス、10 週齢を使用。曝露条件は、2~3 日に一度維持管理のために数時間の中断をおく以外は一日 24 時間、4 週間の連続曝露とし、濃度は 0ppm、25ppm、125ppm の 3 段階で行った。ガスの発生には、ガス拡散管法を用いた動的ガス発生法によった。

(2) バイオロジカルモニタリング：生体内曝露指標としてアセトアルデヒド-ヘモグロビン付加体を測定することを試みた。すなわちヘパリン加採血赤血球を蒸留水を加え溶血し、Cyclohexan-1,3-dione を含む反応試薬と反応させ誘導体を形成し、HPLC で分離・定量した。

(3) 変異原性試験：脾臓 T リンパ球を採取し、フローサイトメーター (FACS) を用いて *T cell receptor* (TCR) 遺伝子の突然変異頻度を解析した。

(4) 免疫学的検索：①脾細胞数、FACS を用いた細胞分画の比較、②リンパ球マイトジェン LPS, ConA で刺激培養した際の細胞増殖試験を実施した。その他 (5) 病理学的検索を実施した。

【研究結果】

1. 曝露濃度および体重変化：25ppm 曝露では目的濃度に対して±20%の範囲で安定して濃度を維持できた。125ppm の場合は、曝露開始時に濃度上昇に伴い1~2時間設定濃度より高い300ppm程度になる時間があるが、その後は設定濃度に復し、安定した曝露が行えた。各群の体重を計測観察した結果、125ppm 群では若干体重増加の抑制が認められたが、曝露終了時の体重は、有意な差異は認めなかった。

2. バイオロジカルモニタリング：生体内曝露指標としてのアセトアルデヒド-ヘモグロビン付加体の測定を行ったが、コントロール、25ppm、125ppm とほぼ同じ濃度レベル (6 μmol/gHb) で差が認められなかった。

3. 変異原性試験：25ppm、125ppm 曝露群いずれもコントロールに比べ有意な突然変異増加を認めなかった。

4. 免疫学的検索：①脾細胞数・細胞分画：各群マウスの個体あたりの脾細胞数は、相違は認めなかった。脾細胞中の細胞分画を FACS にて解析した結果、免疫担当細胞のうち CD3 陽性の T リンパ球は 125ppm 曝露群で若干ながら有意に増加を認めた。一方、B リンパ球は逆に曝露により減少した。T リンパ球分画の中では、CD4 および CD8 陽性 T リンパ球いずれにおいても CD4⁻、CD25⁻ naïve T リンパ球が 125ppm 曝露により増加していた。一方、CD44⁺、CD25⁺ activated T リンパ球は CD4 陽性 T リンパ球では曝露により減少傾向が認められたが、CD8 陽性 T リンパ球では変化無かった。また CD44⁺、CD25⁻ memory T リンパ球は、125ppm 曝露群で CD4 および CD8 陽性 T リンパ球いずれにおいても有意な減少が認められた。②細胞増殖：マイトジェン刺激したときの細胞増殖を Stimulation index で比較した。LPS 刺激では、アセトアルデヒド曝露群においてもコントロール群と差異は認めなかったが、Con A 刺激に際しては、アセトアルデヒドの曝露濃度依存的に細胞増殖の増大が観察された。

5. 病理学的検索：頭部鼻腔組織に関して、一般に鼻腔上方は一部を嗅上皮、下方を扁平上皮、呼吸上皮で覆われている。125ppm 曝露群においてもこれら組織において上皮のびらん、出血、変性像などの明らかな変化は認められなかった。

【まとめ】

アセトアルデヒドの人への健康影響評価として、比較的低い曝露濃度による経気道曝露実験系を確立しマウス経気道曝露実験を実施した。その結果、病理学的に明白な変化は観察されなかった。またアセトアルデヒド-ヘモグロビン付加体や変異原性試験においても陽性結果は認めなかった。一方、免疫学的パラメータにおいては、特に T リンパ球系の増殖刺激を受けている可能性が示唆された。

【謝辞】本研究は厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）および産業保健実践研究の補助を受けて実施された。