

平成 21 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：食品添加物等における遺伝毒性発がん物質の評価法に関する研究

分担研究課題名：遺伝毒性発がん物質評価のための新規TGマウス作製用ベクターの構築

分担研究者： 山田 雅巳 国立医薬品食品衛生研究所 室長

研究要旨

個体レベルで遺伝毒性発がん物質を評価するためのトランスジェニック (TG) マウス、ラットの系は、発がん試験が併用できることもあり有用である。新規 TG マウス作製に当たり、化学物質が突然変異を起こす要因のひとつである DNA ポリメラーゼの働きについて、考察した。

キーワード；Ames 試験、突然変異、DNA ポリメラーゼ

A. 研究目的

国内外で起こるさまざまな事件を通じて、食品の安全性が国民に注目されるようになった。合法的に食品に添加されている化学物質のほかに、調理の過程で変異原物質が生じるという事象も注目され、安全性の評価について従来どおりの手法を再検討するべきときが来ている。

化学物質が DNA と反応して付加体を作り、それがもとで DNA の複製が誤った形で行われると突然変異が生じる。ヒトを含む生物では、さまざまな生体防御機構により化学物質が突然変異を起こさないようにしている。まず、解毒代謝は、化学物質が DNA と反応する前に働いて、反応性を低くする。解毒されなかった化学物質が DNA と反応して付加体ができたとしても、複製の鋳型になる前に修復系がそれを取り除けば突然変異には至らない。さらに、取り除かれなかった付加体が複製の鋳型になった場合でも、特別な DNA ポリメラーゼがエラーフリーに損傷を乗り越えれば、やはり、突然変異は

起こらない（エラーフリーのトランスリジョン DNA 合成）。しかしながら、DNA ポリメラーゼは損傷を乗り越える際に、むしろ突然変異を積極的に起こす場合もあることがわかっている。

今年度は代謝や修復系に比較して、変異原性との関係について論じられる機会の少ない、損傷乗り越え型の DNA ポリメラーゼの働きについて検討した。

B. 研究方法

1) 使用した化学物質

2-nitrofluorene、2-NF (CAS No. 607-57-8)、glyoxal、Gx (同 83513-30-8)、ketoxal、Kx (同 27762-78-3)、methylglyoxal、MGx (同 78-98-8)。

2) 使用した菌株

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Typhimurium TA1535 を親株とした、その改変株 YG3001、YG3206 に加えて、それら 3 株に pKM101 が導入された TA100、YG3008、

YG3216 を使用した (表 1)。いずれの株も *rfa* の膜変異を持ち, *uvrB* と *bio* を含む領域を欠失している。YG3001 と YG3008 は 8-oxo グアニン DNA グリコシラーゼを欠損し, YG3206 と YG3216 はエンドヌクレアーゼ III および VIII を欠損している。

表 1 使用菌株一覧

菌株名	<i>mutM</i>	<i>nth</i>	<i>nei</i>	pKM101
TA1535	+	+	+	-
YG3001	Δ	+	+	-
YG3206	+	Δ	Δ	-
TA100	+	+	+	+
YG3008	Δ	+	+	+
YG3216	+	Δ	Δ	+

3) Ames 試験

ニュートリエントブロス培地 (5 mL) に凍結保存菌株を接種し, 試験菌株の一夜培養液とした。被験物質は, ケミカルを滅菌蒸留水 (ただし 2-NF については DMSO) により段階希釈して調製した。用量はグラフ中に示す。最小培地は 950 mL 当たり 5 g の NaCl を溶解し, 15 g の寒天を加えてオートクレーブ滅菌後, 20 倍濃度の Medium E 溶液を 50 mL と 40% グルコース溶液を 5 mL 加えてよく攪拌し, プラスチックシャーレに 30 mL ずつ入れて固化したものを用いた。

軟寒天は, 蒸留水 150 mL に Bacto Agar と NaCl をそれぞれ 0.9 g ずつ加えてオートクレーブ滅菌し, 使用直前に 0.5mM ヒスチジン-ビオチン溶液を 15mL 加えた。

Ames 試験は以下の条件で行った。各濃度の被験物質溶液 0.1 mL, 試験菌株の一夜培養液 0.1 mL, Na-K りん酸緩衝液 0.5 mL を試験管内で混合し, 37°C の湯浴で 20 分間

緩やかに振とう後, 2 mL の軟寒天を加えて最小培地にまき広げた。プレートは逆さにし, 37°C のインキュベーターで 48 時間培養後, 復帰変異コロニー数を計測した。

(倫理面への配慮)

本研究はバクテリアを用いた実験なので配慮の対象ではない。

C. 研究結果

1. 2-nitrofluorene, glyoxal, kethoxal

2-NF, Gx, Kx の 3 物質については, pKM101 を持たない TA1535, YG3001, YG3206 の 3 株において突然変異を誘発しなかった (図 1)。一方, pKM101 を持つ 3 株に対しては, 溶媒対照の数倍から 50 倍もの復帰変異株数を示した。

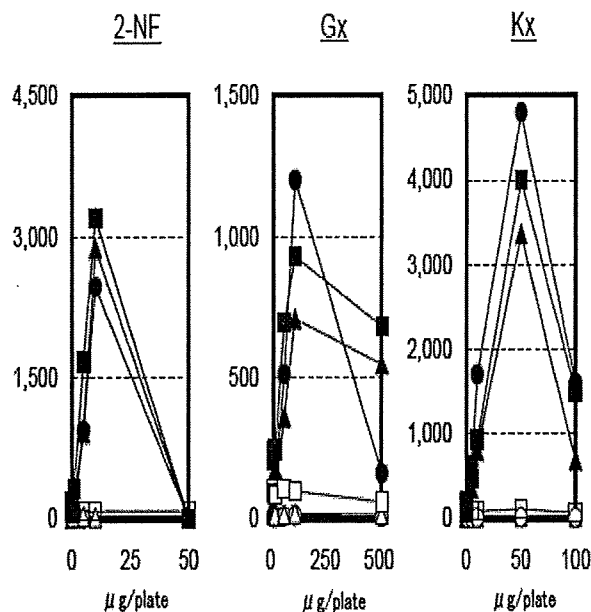


図 1 2-NF, Gx, Kx の復帰変異株数 (縦軸)。

横軸はプレート辺りの化学物質の用量。

○, TA1535; △, YG3001; □, YG3206; ●, TA100; ▲, YG3008; ■, YG3216。

2. methylglyoxal

Mx についても pKM101 を持たない TA1535, YG3001, YG3206 の 3 株においては突然変異を誘発しなかったが, pKM101 を持つ 3 株に

ついては、DNA 修復系に依存した復帰変異株数を示した (図 2)。すなわち、pKM101 をもつ 3 株に対しては、いずれも溶媒対照の数倍以上の復帰変異株数を示したが、修復系をもつ TA100 株では溶媒対照の 75 倍であったのに対して、修復系を欠損した YG3001 と YG3206 に対しては溶媒対照の 10 倍前後であった。

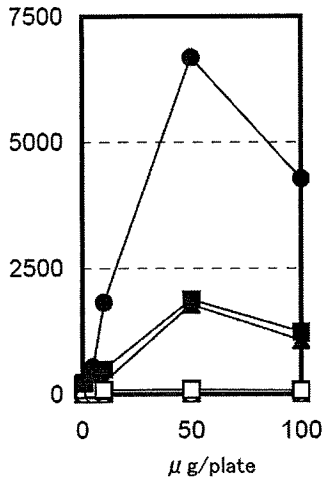


図 2 MGx の復帰変異株数 (縦軸)。横軸はプレート辺りの化学物質の用量。
○, TA1535 ; △, YG3001 ; □, YG3206 ; ●, TA100 ; ▲, YG3008 ; ■, YG3216。

D. 考 察

今回用いたケミカル 4 物質、2-NF、Gx、Kx、MGx については、その変異誘発性は、pKM101 に依存していた。pKM101 は損傷乗り越え型の DNA ポリメラーゼである DNA polI R1 をコードすることが知られる。pKM101 の存在に依存して変異原性が示される物質は過去にも報告がある。Ames 試験の陽性対照物質である benzo[a]pyrene (CAS No. 50-32-8) や AF-2 (CAS No. 3688-53-7) などが代表的である。これらは特異的な DNA 付加体も同定され、それを DNA polI R1 が乗り越える際に突然変異が生じていると考えられている。

そのほかに quercetin (CAS No. 117-39-5)、norwogonin (5, 7, 8-trihydroxy flavone,

CAS No. 4443-09-8) などフラボンの誘導体も、同様に pKM101 に依存した変異原性を示すという報告がある (Env. Mol. Mutagen. 11-315, 1988)。これらの物質はプレート当たり、1-10 μg の用量で 600 以上の復帰変異株数を TA100 で示す。pKM101 を持たない、TA1535 株でもわずかに復帰変異株数の増加が見られるが、用量が高いにもかかわらず溶媒対照のころうじて 2 倍程度の数であり、pKM101 に依存した変異原性であることは明白だとしている。

そのほかに、似た構造をとる

4-acetoxy-s-acetoxy-methyl-acetophenone,

1-[4'-hydroxy-3'-hydroxy-methylphenyl]-2-[benzyl-*t*-butylamino] ethanone hydrochloride,

1-[4'-hydroxy-3'-hydroxy-methylphenyl]-2-[benzyl-*t*-butylamino] ethanol の 3 化合物についても、TA100 では用量相関性を持って復帰変異株数の増加が見られたのに対して、TA1535 では復帰変異株数の増加が見られなかったという報告がある

(Mutagenesis, 4-371, 1989)。これらの化合物については、染色体異常

(sister-chromatid exchange, SCE) を誘発する性質が見られたことから、pKM101 に依存した変異原性が、真核生物で生じる遺伝毒性の相関を示唆する可能性も考えられるとしている。

TA100 も TA1535 も、かさ高い DNA 付加体を除去する修復系を欠損しているため、これらの化合物による DNA 付加体が残っている条件は同じだが、DNA polI R1 の有無により、突然変異の誘発には歴然とした違いが見られる。このことは、化学物質が変異原性を示すに当たり、DNA ポリメラーゼの性質が突然変異の程度だけでなく、種類も変えることを意味する。DNA polI R1 は必ずし

も、mammal の DNA ポリメラーゼに性質が近いわけではないので、mammal の細胞の中で生じる突然変異について予測することは、mammal の損傷乗り越え型の DNA ポリメラーゼを Ames 試験菌株に導入することで可能になるかもしれない。

MGx については、グリコシラーゼ欠損株で、復帰変異株数が半分以下になる結果が得られた。このことは、通常は考えにくいですが、修復系が働くことで MGx の変異原性が増強されるという解釈が導かれる。YG3008 と YG3216 で欠損しているグリコシラーゼはいずれも酸化損傷塩基を除去する性質を持つ。①MGx は酸化損傷塩基がある場合と無い場合で DNA との反応性が異なり、生じる付加体が違う、②酸化損傷塩基がある場合にできる付加体は polR1 がエラーフリーに乗り越え、無い場合にできる付加体は polR1 が誤って複製するという考えは、得られた結果と矛盾しない。但し、今後、付加体を同定するなど、実証するための実験が必要である。

E. 結論

本研究結果は、DNA ポリメラーゼの性質が化学物質の遺伝毒性の性質を左右することを示唆している。評価に当たっても、DNA ポリメラーゼの性質を十分に調べ、その遺

伝毒性に及ぼす影響を考慮することが必要である。

F. 健康危機情報

省略

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamada, M., Matui, K., Katafuchi, A., Takamune, M., Nohmi, T., Development of tester strains deficient in Nth/Nei DNA glycosylases to selectively detect the mutagenicity of oxidized DNA pyrimidines, *Genes and Environ.*, 31, 69-79 (2009)

2. 学会発表

ピーターグルーズ、山田雅巳、高宗万希子、能美健彦、ヒト DNA ポリメラーゼ η をコードする大腸菌 *umuDC* 欠損株における紫外線による誘発突然変異の検出、日本環境変異原学会第 38 回大会 (2009.11)

H. 知的所有権の取得状況

- | | | |
|----|--------|----|
| 1. | 特許取得 | 無し |
| 2. | 実用新案登録 | 無し |
| 3. | その他 | 無し |

研究課題名：食品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

分担研究課題名：食品中変異原のDNA損傷の測定と、修復メカニズムの解明

分担研究者： 松田知成 京都大学工学研究科 准教授

研究要旨

食品中物質によるDNA損傷がどのように修復されるのかをタンパク質レベルで解析するために、DNA損傷に結合するタンパク質をSILACという技術を用いて網羅的に解析する方法の確立を試みた。今年度はDNA損傷の代わりにやりやすいGTミスマッチを用いて系が動くかどうか検討した。その結果、MSH6やMSH2など、ミスマッチ修復特異的なタンパク質を同定することができ、実験系がうまく働いていることが明らかとなった。この方法はミスマッチの代わりに様々なDNA損傷を用いれば、それぞれのDNA損傷に対する修復メカニズムの解明に威力を発揮すると考えられる。

キーワード：SILAC、DNA修復蛋白質、プロテオーム解析

A. 研究目的

食品中物質によるDNA損傷がどのように修復されるのかをタンパク質レベルで解析するために、DNA損傷に結合するタンパク質の網羅的解析法について検討した。今年度はまず系の確立を目指し、DNA損傷の代わりにGTミスマッチを用いて検討した。

B. 研究方法

1. 細胞のSILACラベリング

SILACとは、stable isotope labeling of amino acid in cell cultureの略である。アルギニンとリジンを安定同位体に置換した培地中でA549細胞を5回以上系代培養し、細胞中のタンパク質のすべてのアルギニンとリジンを安定同位体に置き換えた。等量のラベルした細胞とラベルしていない細胞からそれぞれ核抽出物を調整した。

2. ミスマッチDNAの調整

P53遺伝子でもっとも高頻度に変異が確認

されているArg248Trp(IARC TP53 databaseより)を含む60merのoligo DNA、およびその相補配列、および、一箇所だけGTミスマッチが含まれるよう設計した、合計3本のoligo DNAを合成した。一方の鎖をデスチオビオチン化した後、アニーリングさせ、完全に相補的な60merの2本鎖DNA（以下コントロールDNA）および一箇所だけGTミスマッチを含む60merの2本鎖DNA（以下ミスマッチDNA）を調整した。

3. DNAとDynabeadsの結合

アビジンコーティングしたDynabeadsとデスチオビオチン化したDNAを以下のプロトコルで結合した。コントロールDNAとミスマッチDNAにつきそれぞれ調整した。

二本鎖 DNA 100 pmol
 Dynabeads 100 μ g in 10 μ l (65-90 pmol
 biotin binding capacity)
 DNAB buffer 200 μ l
 ↓ Mix 10min R.T.
 上澄みを捨てる
 Wash DNAB buffer 100 μ l vortex
 上澄みを捨てる
 Wash 2 回繰り返す

DNAB buffer 組成

50mM Tris pH8.0
 150 mM NaCl
 10% glycerol
 5 mM MgCl₂
 0.2% NP40
 0.5 mM DTT

4. DNA-protein binding

上記のように調整した DNA に核抽出物を以下のプロトコールで反応させた。SILAC ラベルした核抽出物は mismatch DNA と反応させ、SILAC ラベルしていない核抽出物は control DNA と反応させた。

DNAB buffer 480 μ l
 DNA-Dynabeads
 Nuclear extract 50 μ g
 ↓ Mix 60min 4°C
 Wash DNAB buffer 200 μ l
 ↓ Mix 10min 4°C
 上澄みを捨てる
 Wash 4 回繰り返す

5. プロテオーム解析

上記の反応を終えた control DNA および mismatch DNA を混ぜ合わせ、結合しているタンパク質を SDS-PAGE で分離した。ゲルをいくつかの領域に切り分け、ゲル内トリプシン消化を行った。消化物は脱塩した後、ナノ HPLC-Q-TOF/MS を用いてプロテオーム解析を行った。

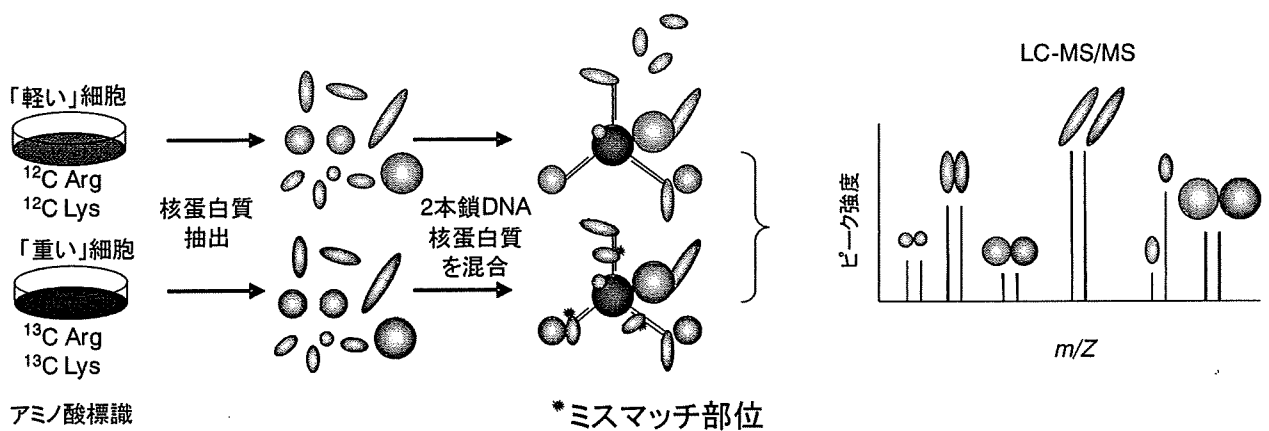


図1 SILACによるミスマッチDNA結合タンパク質同定の戦略

C. 研究結果

コントロール DNA またはミスマッチ DNA に結合したタンパク質は 77 種類同定された。図 2 に SILAC ラベルしたタンパク (Heavy; H) とラベルしていないタンパク (Light; L) のシグナル比をプロットした。ミスマッチ DNA は SILAC ラベルしたタンパクと反応させたので、H/L 比が高いものほど特異的にミスマッチと結合している可能性が高い。

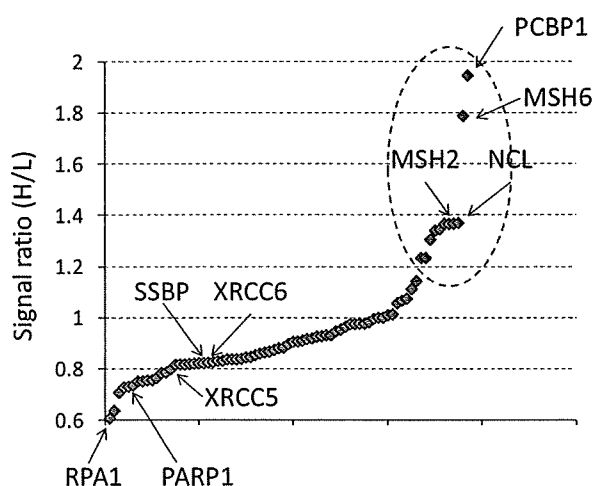


図 2 同定されたタンパク質の H/L 比

図 2 において、高い H/L 比を示したタンパク質の中には、ミスマッチ修復タンパク質である MSH6 や MSH2 が検出された。そのほかにも機能がよくわからない PCBP1

(Poly(rC)-binding protein 1) や NCL といったタンパク質が同定された。図 2 で H/L 比が 0.7–1.1 のものは非特異的に DNA に結合するタンパク質であると考えられる。この領域では XRCC や PARP1、SSBP (single strand binding protein) などが同定された。H/L 比が 0.7 以下のものはもしかしたらミスマッチ結合タンパク質に押し外れて外れてしまうタンパク質かもしれない。この中には RPA1 (Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit) が含まれていた。

D. 考察

各種 DNA 損傷に特異的な修復タンパク質の同定を行う実験系を確立するため、手始めにミスマッチ DNA を用いて実験系の確認をした。この結果、MSH6 や MSH2 など、ミスマッチ修復特異的なタンパク質を同定することができ、実験系がうまく働いていることが明らかとなった。今後はミスマッチの代わりに様々な DNA 損傷を入れて、特異的に結合するタンパク質を同定し、修復メカニズムの解明を試みる。

E. 結論

SILAC を用いて DNA 損傷に特異的な修復タンパク質の同定を行う実験系を確立するための予備実験を行い、良好な結果を得た。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

- 論文発表
 - Oyama, T., Nagayoshi, H., Matsuda, T., Oka, M., Isse, T., Yu, H. S., Phuong, P. T. T., Tanaka, M., Kagawa, N., Kaneko, K., Kawamoto, T. (2010) N2-ethylidene-2'-deoxyguanosine DNA adducts in organs of Aldh2 knockout mice treated with acetaldehyde inhalation. *Frontiers in Bioscience*, In press
 - Kawai, K., Chou, P. H., Matsuda, T., Inoue, M., Aaltonen, K., Savela, K., Takahashi, Y., Nakamura, H., Kimura, T., Watanabe, T., Sawa, R., Dobashi, K., Li, Y. S., and Kasai, H. (2010) DNA Modifications by the omega-3

- Lipid Peroxidation-Derived Mutagen 4-Oxo-2-hexenal in Vitro and Their Analysis in Mouse and Human DNA. *Chem Res Toxicol*. In press
- 3) 松田, 永吉, 梶村, 周. (2009) 液体クロマトグラフィータンデム質量分析法を用いた DNA 損傷研究法. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 57, 301-304.
 - 4) 松田, 足立, 周. (2009) アダクトミクス-DNA およびタンパク質付加体の網羅的解析. *実験医学増刊*, 27, 2481-2488.
2. 学会発表
- 1) Muto, S., Kato, K., Yamamura, E., Kawanishi, M., Yagi, T., Matsuda, T., Sugiyama, A., and Uno, Y. (2009) Significance of DNA adductome analysis in in vitro micronucleus test, In *10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM)* p 120, Firenze, Italy.
 - 2) Matsuda, T., Nagayoshi, H., Oka, M., Yukawa, Y., Hori, K., Kawamoto, T., Muto, M., and Oyama, T. (2009) ALDH2 genotype is critical for DNA adducts formation in mice treated with alcohol and acetaldehyde, In *10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM)* p 200, Firenze, Italy.
 - 3) Matsuda, S., Matsui, S., and Matsuda, T. (2009) Approach to toxicity evaluation of C60 fullerene using several in vitro methods, In *10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM)* p 213, Firenze, Italy.
 - 4) Koyama, N., Kimura, A., Yasui, M., Takami, S., Takahashi, M., Inoue, K., Yoshida, M., Imai, T., Shibutani, M., Suzuki, T., Yamamoto, A., Kumita, W., Matsumura, K., Horibata, K., Masuda, S., Kinae, N., Matsuda, T., Nohmi, T., and Honma, M. (2009) Child-adult differences in evaluation of in vivo genotoxicity of acrylamide, In *10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM)* p 212, Firenze, Italy.
 - 5) Kawanishi, M., Nishida, H., Ishii, H., Kanno, T., Takamura, T., Matsuda, T., and Yagi, T. (2009) Formation, DNA repair, and TLS of 3-nitrobenzanthrone-derived DNA adducts, In *10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM)* p 179, Firenze, Italy.
 - 6) Ihara, M., Yasui, M., Matsui, S., Shibutani, S., and Matsuda, T. (2009) Frequent incorporation of formaldehyde derived N2-methyl-2'-deoxyguanosine triphosphate into DNA during DNA synthesis catalyzed by bacterial and mammalian DNA polymerase, In *10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM)* p 213, Firenze, Italy.
 - 7) Chou, P.-H., Kageyama, S., Matsuda, S., Kanemoto, K., Sasada, Y., Oka, M., Shinmura, K., Mori, H., Kawai, K., Kasai, H., Sugimura, H., and Matsuda, T. (2009) Detection of lipid peroxidation-induced DNA adducts caused by 4-oxo-2-nonenal and 4-oxo-2-hexenal in human autopsy

tissues, In *10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM)* p 157, Firenze, Italy.

- 8) Adachi, J., Kihara, K., and Matsuda, T. (2009) Oxidative modificomics analysis of cysteine thiols, In *10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM)* p 199, Firenze, Italy.
- 9) 萩尾ら (2009) 大気汚染物質 3-ニトロベンズアントロンによる DNA 付加体の生成および修復の効率, In *日本環境変異原学会第 38 回大会*, 静岡.
- 10) 松田 (2009) LC/MS/MS を用いた DNA 付加体の網羅的解析に関する研究, In *日本環境変異原学会第 38 回大会*, 静岡.
- 11) 小山ら (2009) ライフステージ (週齢) を考慮したアクリルアミドの多臓器遺伝毒性評価, In *日本環境変異原学会第 38 回大会*, 静岡.

H. 知的所有権の取得状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金・食品の安心・安全性確保推進研究事業
食品中の遺伝毒性を有する有害物質のリスク管理に資する総合研究
研究課題名：食品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
平成 21 年度分担研究報告書

分担研究課題名：哺乳類細胞を用いた遺伝毒性閾値の研究

分担研究者： 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部第一室
協力研究者： 山田雅巳 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部第二室
鈴木孝昌 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部第三室

研究要旨

ニトロフラン系化学物質である AF-2 は我が国でかつて豆腐や魚肉ソーセージ、麺類の保存剤料として使われてきたが、変異原性と、げっ歯類での発がん性が報告され 1974 年に使用禁止になった。しかしながら、その変異原性のメカニズムや程度は十分に解析されておらず、また、リスク評価も十分ではない。AF-2 はエームス試験において pKM101 が存在する TA100、TA98 では強い変異原性を示したが、親株の TA1535、TA1538 では全く変異原性を示さなかった。また、TA100、TA98 のバクテリア特有のニトロ還元酵素を欠損する YG7128、YG7132 ではその変異原性が半減した。これらのことから、AF-2 の強い変異原性の一部はバクテリア特異的な反応として説明される。しかし AF-2 は、ヒト細胞に対しても強い変異原性を示すことから、ニトロ還元の一部はヒトにも共通するものと考えられる。In vivo 遺伝毒性試験として MutaTMMouse に AF-2 を 120mg/kg/week で 4 週間強制経口投与し、末梢血小核試験、肝臓、前胃、脾臓、大腸でのトランスジェニック遺伝子突然変異試験を行ったが、全てにおいて陰性であった。従って、AF-2 の in vivo での遺伝毒性は否定された。AF-2 はその発がん性から使用が禁止されたが、マウスにおける TD50 値(50%の動物にがんを引き起こす量)は 550mg/kg/day と計算された。また、当時の AF-2 の一日平均摂取量は約 5.7ug/day と推定され、HERP(Human Exposure/Rodent Potency)は 0.00002 と計算される。この数字は、現在我々が日常の食品中から摂取している可能性のあるアクリルアミドや、ジメチルニトロサミンの 500 分の 1 である。AF-2 の人に対する発がん性、および遺伝毒性リスクは当時の予測よりは極めて低いものと考えられる。

キーワード；AF-2 (Furylfuramide)、遺伝毒性、突然変異、発がんリスク

A. 研究目的

食品の安全性に対して、多くの国民が関心を寄せている今日、食品添加物等の食品中に含まれる微量の化学物質の安全性が問題となっている。特にその問題となる化学物質が発がん性を示す場合は、その評価が困難であることが多い。多くの発がん性化学物質に関しては、健康リスクを評価する場合、理論的、実証的理由から、これ以下であれば健康影響が見られないレベル、すなわち閾値のない線形の用量反応モデルが用いられてきた。しかしながら、近年、がんの発生メカニズムに関する理解から、発がん物質のなかでも、遺伝子に直接損傷を与えない非遺伝毒性発がん物質に関しては、他の毒性同様に閾値を設定することができるとの考えが定着し、ある一定レベル以下の非遺伝毒性発がん物質に関しては、実質的に発がんリスクはないものと考えられている。従って遺伝毒性試験による遺伝毒性の有無は発がん物質のリスク管理の方向性を決定する上で重要である。一方、遺伝毒性試験は感度が高く、ヒトの発がん性とは無関係と考えられるような陽性反応を示すことが多い。このような場合、その陽性反応の程度や意味 (Weight of Evidence; WOE)、遺伝毒性メカニズム (Mode of Action; MOA) の検討が重要である。特に後者の情報によっては遺伝毒性物質であっても、閾値を設定できる場合がある。

閾値を設定により低レベルの化学物質をゼロリスクとする方法とは別に、閾値の有無にかかわらず、その摂取や暴露レベルが十分に低いのであれば、ある程度のリスクは社会的に許容できる、との考えもある。日常生活において我々は、多くの発がん物質を食事、飲料水、大気中から摂取しており、特定の低レベル化学物質のみに注目し、その発がん性や、遺伝毒性のみを論じるこ

とはいささかバランスに欠けると言える。この場合にもその考えが適用できるかどうかは、WOE、MOA での評価が重要である。いずれにせよ、今後、食品に含まれる低レベルの食品添加物、残留農薬の遺伝毒性、発がん性の評価には、1) ハザードの同定、2) 暴露レベルの評価、3) メカニズム情報、によるリスク評価が必要である。また、過去に評価された物質についても、現在の最新毒性試験情報と、社会的コンセンサスに基づき再評価すべきと考える。

ニトロフラン系化学物質である

2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)-acrylamide (フリルフラマイド; AF-2) は我が国でかつて豆腐や魚肉ソーセージ、麺類の殺菌剤として使われてきたが、強い変異原性と、げっ歯類での発がん性が報告され使用禁止になった。しかしながら、その遺伝毒性のメカニズムや、程度は十分に解析されておらず、また、リスク評価も十分ではない。

AF-2はエームス試験において、TA100株、TA98株等の陽性対照物質として用いられている。その高い変異原性はバクテリア特有のものである可能性が残されている。1-ニトロピレンは強変異原物質であり、エームス試験ではng単位の微量でも非常に高い変異原性を示す。しかしながらヒトに対するリスクは低いことが知られ、高い変異原性はバクテリア特有のクラシカルニトロ還元酵素による代謝に起因することが報告されている。しかし、サルモネラ株には、この他に複数のニトロ還元酵素が存在し、ニトロ化合物であっても、それぞれが異なったニトロ還元酵素によって代謝されることが知られている。本研究では、AF-2もニトロ化合物であるため、バクテリアに特有なクラシカルニトロ還元酵素がその変異原性発現にどの程度関与しているかを調べた。

トランスジェニックマウスを用いた変異

原試験法は、各臓器において被験物質が突然変異誘発性を持つかどうか調べることができ、発がんの臓器特異性の予測にも役立つことが期待されている。AF-2 の *in vivo* での遺伝毒性試験の報告は少なく、また全てが 20 年以上前に行われた試験であり、その信頼性も乏しい。最新の試験法であるトランスジェニック遺伝子突然変異試験を用いて AF-2 の発がん臓器と考えられる胃を含む 4 臓器での突然変異誘発性、末梢血での小核誘発性を検討した。

B. 研究方法

1. エームス試験

1.1. 使用した化学物質

2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)-acrylamide, AF-2 (CAS No. 3688-53-7)

1.2. 使用した菌株

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Typhimurium TA1535、TA100、YG7127、YG7128、TA1538、TA98、YG7131、YG7132 株 (表 1)。TA100、YG7127、YG7128 は TA1535 を親株とし、いずれも塩基置換変異を検出する。TA98、YG7131、YG7132 は TA1538 を親株とする、フレームシフト変異を検出する株である。YG7127、YG7128、YG7131、YG7132 は、それぞれ TA1535、TA100、TA1538、TA98 において、クラシカルニトロ還元酵素をコードする *nfsB* 遺伝子の特異的に欠損した株である。TA100、YG7128、TA98、YG7132 株は、損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼの一つである Pol R1 をコードする pKM101 プラスミドを保持する。残り 4 株は pKM101 を保持しない株である。

		塩基置換型変異 検出		フレームシフト型 変異検出	
pKM101		-	+	-	+
ニトロ 還元 酵素	+	TA1535	TA100	TA1538	TA98
	Δ	YG7127	YG7128	YG7131	YG7132

表 1 使用菌株一覧

1.2.3. 試験方法

ニュートリエントブロス培地 (5 mL) に凍結保存菌株を接種し、試験菌株の一夜培養液とした。被験物質は、AF-2 を溶媒 DMSO により段階希釈して調製した。濃度はグラフに示す。最小培地は 950 mL 当たり 5 g の NaCl を溶解し、15 g の寒天を加えてオートクレーブ滅菌後、20 倍濃度の MediumE 溶液を 50 mL と 40% グルコース溶液を 5 mL 加えたてよく攪拌し、プラスチックシャーレに 30 mL ずつ入れて固化したものをを用いた。軟寒天は、蒸留水 150 mL に Bacto Agar と NaCl をそれぞれ 0.9 g ずつ加えてオートクレーブ滅菌し、使用直前に 0.5mM ヒスチジン-ピオチン溶液を 15mL 加えた。S9mix はグルコース 6-りん酸 (G-6-P) を 68 mg、NADPH を 145 mg、NADH を 122 mg、22 mL の 0.2M ナトリウムりん酸緩衝液 (pH7.4) に溶かし、1M 塩化カリウム 溶液を 1320 μL と 1M 塩化マグネシウム 溶液を 320 μL 加えて、蒸留水で 36 mL にメスアップし、フィルター滅菌ろ過した後、キッコーマン社製の S9 分画を 4mL 加えて混合したものをを用いた。

エームス試験は以下の条件で行った。各濃度の AF-2 溶液 0.1 mL、試験菌株の一夜培養液 0.1 mL、りん酸緩衝液 0.5 mL を試験管内で混合し、37°C の湯浴で 20 分間緩やかに振とう後、2 mL の軟寒天を加えて最小培地 (プレート) にまき広げた。代謝活性化を行う条件の場合は、りん酸緩衝液の代

わりに S9mix を使用した。プレート を 37°C のインキュベーターで 48 時間培養後、復帰変異コロニー数を計測した。AF-2 自身が陽性対照物質なので、他に陽性対照物質は使用しなかった。

2. トランスジェニック遺伝子突然変異試験、小核試験

2.1. 動物、薬物投与

8-9 週令の MutaTMMouse 雄 (Covance Research Product) に対し、AF2 (120 mg/kg)、もしくは陽性対照として DBP:ジベンゾピレン (6 mg/kg) を投与した。いずれの薬物についても、LD50 の 1/4 量を一週間おきに 4 回強制経口投与した (DBP は腹腔内投与)。溶媒としてオリーブオイルを用い、一群あたり 4-5 匹のマウスに対し 10ml/kg で投与した。陰性対照群は溶媒のみの投与を行った。

2.2. 小核試験

初回および 2 回目の薬物投与 48 時間後に尾部血管より 5ul の末梢血を採取し、アクリジンオレンジ超生体染色法により小核を有する幼若赤血球を観察し、その出現頻度を比較した。

2.3. 遺伝子変異

最終投与後 7 日目にマウスを頸椎脱臼法により屠殺し肝臓、前胃、大腸、脾臓を回収し、凍結保存した。これら組織のホモジネートより、フェノール/クロロホルム法により DNA を抽出し、in vitro packaging 法により導入遺伝子をラムダファージへと回収した。lacZ 遺伝子の場合にはこれを E.coli C galE-株へ感染させ、cII 遺伝子の場合には、E.coli G1225(hfl-)株に感染させることにより変異体を選択し、変異頻度を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究で特に倫理上問題になる実験はな

い。また、動物実験を含む全ての実験は本研究所倫理規定に準拠して行った。

C. 研究結果

1. エームス試験

1.1. AF-2 の変異原性についての確認実験

AF-2 のバクテリアにおける変異原性は pKM101 に依存することがわかっている。このことを、塩基置換変異の誘発 (図 1 A) とフレームシフト変異の誘発 (図 1 B) について確認した。この際に、ニトロ還元酵素の有無が影響するかどうかも予備的に調べた。いずれも代謝活性化されない条件 (-S9mix) で行った。

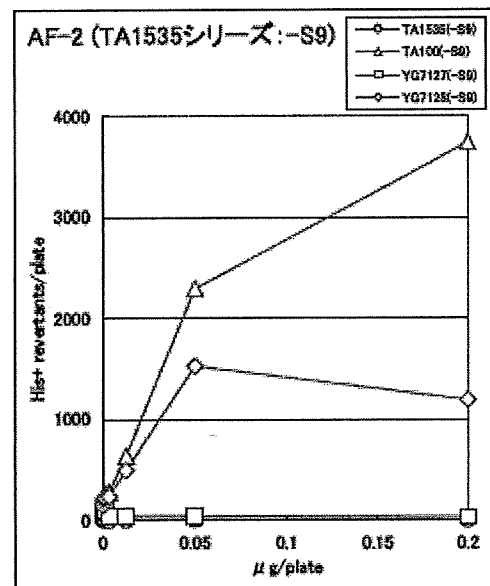


図 1 A

図 1 A に示すように、ニトロ還元酵素の有無に係わらず、pKM101 を持たない株、TA1535 と YG7127 では復帰変異株数の増加が見られなかった。pKM101 を持つ株では、ニトロ還元酵素を欠損する YG7128 株 (△) が TA100 株 (◇) のおよそ半分の復帰変異株数になった。フレームシフト変異を検出する TA1538 株のシリーズでも同様の傾向を示した (図 1 B)。

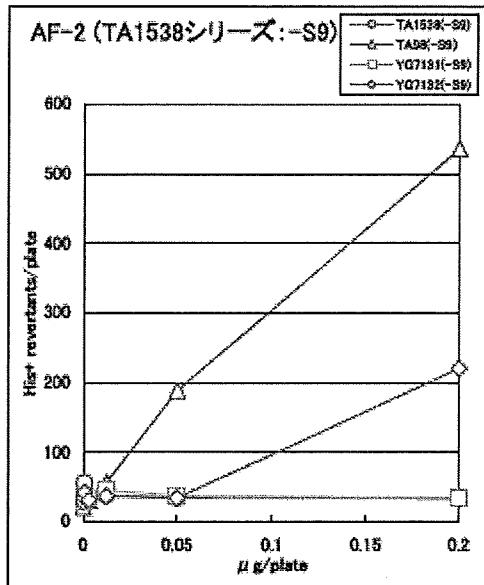


図 1 B

1.2. AF-2 の変異原性に対するニトロ還元酵素の影響

1 の予備試験により、AF-2 が変異原性を示すためには pKM101 の存在が必須であることが確認できたので、以下の実験では TA100 とそのニトロ還元酵素欠損株 YG7128、および、TA98 とそのニトロ還元酵素欠損株 YG7132 の 4 株を用いた。代謝活性化の影響も調べるため、S9mix 存在下、非存在下の両方の条件で試験を実施した。

図 2 A には塩基置換変異誘発の結果を示した。まず、S9mix の有無に係わらず、ニトロ還元酵素を欠損することで有意に塩基置換誘発性が減弱した。また、減弱する度合いは S9mix が無い方が大きかった。代謝活性化の影響については、いずれの株においても、0.05 μg/plate 以下の低用量では S9mix 添加により復帰変異株数が減り、逆に 0.2 μg/plate の高濃度では S9mix 添加条件でより高い復帰変異株数を示した。

図 2 B にはフレームシフト変異誘発の結果を示す。塩基置換変異誘発と同様に、ニトロ還元酵素の欠損株 (YG7131) では、ニトロ還元酵素を保持する株 (TA98) よりも、

2 分の 1 から 3 分の 1 の復帰変異株数を示し、その減少の割合は S9mix 非存在下で大きかった。またニトロ還元酵素の有無に係わらず、代謝活性化により変異原性が低くなった。

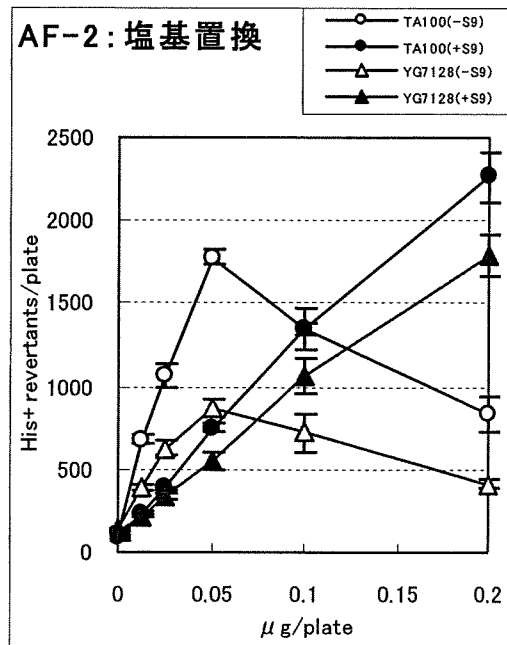


図 2 A

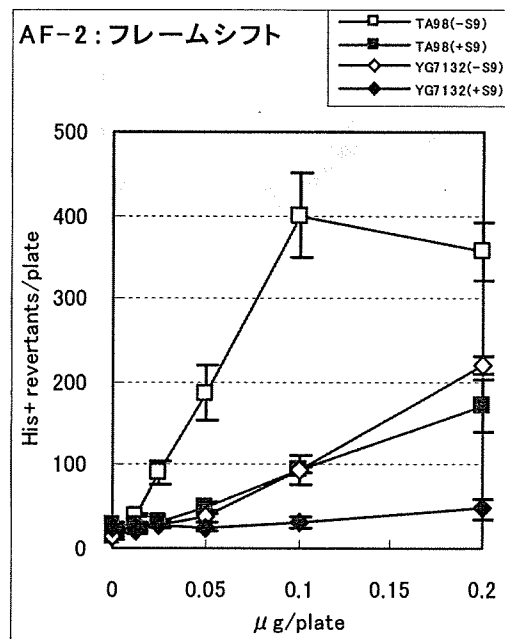


図 2 B

2. トランスジェニック遺伝子突然変異試験、小核試験

AF2 は Ames 試験では非常に強い活性を示すため、トランスジェニックマウスを用いた試験においても、陽性となることが予測されたが、調べたいずれの臓器においても変異の誘発は認められなかった (図3)。また、小核誘発性に関しても陰性の結果を得た (表2)。

一方、陽性対照である DBP のトランスジェニックマウスを用いた解析では、すべての臓器において変異頻度の上昇が見られ、このうち特に脾臓での活性が強かった (図3)。また、小核誘発性に関しては、2回目投与後により強い小核誘発性が見られるという興味深い結果が得られた (表2)。これは、酵素誘導による影響が関与すると考えられる。

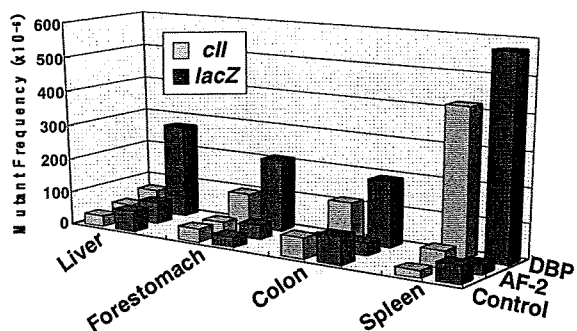


図3

以上より、AF2 はマウス個体に対する変異原性は弱いことがわかり、発がんのカニズムに関して従来考えられていた遺伝障害の関与は低いことが示唆された。

Treatment	Dose	MF/FETs/1000FETs				Mean ± SD (%)
1 回目投与 4 8 時間後						
Olive Oil	10 mL/kg	0	3	1	2	0.15 ± 0.11
DBP	6 mg/kg	11	2	3	11	0.68 ± 0.43
AF-2	120 mg/kg	1	3	2	5	0.28 ± 0.15
2 回目投与 4 8 時間後						
Olive oil	10 mL/kg	1	3	0	3	0.18 ± 0.13
DBP	6 mg/kg	8	68	53	52	4.53 ± 2.24
AF-2	120 mg/kg	0	1	2	1	0.10 ± 0.07

表2

D. 考察

AF-2 は昭和 40 年代に我が国で食品保存の用途で使用が許可された食品添加物である。その後、AF-2 指定以前に許可されてきた食品添加物についての見直しがあり、食用タール系色素類やチクロ等の甘味料が指定削除になった影響で、食品添加物についてもその安全性に懸念がもたれるようになった。昭和 40 年代後半になって、エームス試験が開発され、AF-2 の変異原性が報告され、また染色体異常試験、小核試験等でも AF-2 の陽性反応が相次いで報告された。さらに、発がん性についても陽性との報告があり、国立衛生試験所でのマウスによる発がん試験で発がん性が確認されたことから昭和 49 年に食品添加物の指定は解除された。この事件を契機に変異原性 (遺伝毒性) 試験の重要性が認識され、安全性試験の一つとして、食品添加物だけでなく、医薬品や、農薬の安全性試験ガイドラインに取り入れられることになった。しかしながら、当時の遺伝毒性試験はまだ、十分にバリデーションされておらず、データの信頼性に関しても疑問が残る。また、最終的に使用禁止としたリスク評価法についても現在の方法と異なる。現在の遺伝毒性試験法、リスク評価法をもって AF-2 の安全性の再評価を行った。

AF-2 の遺伝毒性に関しては多くの報告がある。エームス試験では当初、TA1535、

TA1536、TA1537、TA1538 では陰性であった。これらエームス試験用サルモネラ菌株は *umu* 活性を消失しており SOS 反応が関与する DNA 損傷に対しては変異原性を示さないことが知られていた。その後 MaCann (1975)らによって開発された pKM101 プラスミドをもつ TA100、TA98 では強い陽性反応を示したことから AF-2 は強い変異原性をもつとの報告がされた。pKM101 には染色体上の *umuDC* 遺伝子に相当する *mucAB* 遺伝子が存在しており、SOS 反応を介して、エラー発生型の乗り越え修復が働き、突然変異を誘発する。

今回、我々はエームス試験での陽性結果について、その妥当性を検証した。エームス試験における強い陽性反応の原因として pKM101 によって誘発されるエラー発生型の DNA 修復機構と、バクテリア特異的なニトロ還元酵素による AF-2 の還元作用が予想された。

AF-2 は pKM101 が存在する TA100、TA98 では強い変異原性を示したが、親株の TA1535、TA1538 では全く変異原性を示さなかった。これまでの報告と同様に、AF-2 の変異原性の発現にはエラー発生型の DNA 修復機構が必須であることが示された。pKM101 が介在する TA100 と TA98 での変異原性陽性結果をヒトでの遺伝毒性リスクを考慮する上でどのように扱うべきかは論議されるべきであろう。Little(1988)は幾つかの芳香族化合物で TA100 の陽性結果とチャイニーズハムスター V79 細胞での SCE の陽性結果の相関性から、TA100 の結果をほ乳類での変異原性の予測に外挿できると論じているが、TA98 と、SCE には相関性がなく、バクテリアでのエラー発生型修復がほ乳類でも起こりうるか、または突然変異誘発への関与の程度に関しては疑問が残る。また、Goodman(1977)はニトロフラ

ン化合物の多くは TA100、TA98 で強いエームス陽性を示すが、ラット小核試験においては、AF-2 のみが弱い陽性反応を示しただけで後はすべて陰性であったことを報告している。

ニトロ還元酵素に関しては、塩基置換変異誘発性およびフレームシフト変異共に、ニトロ還元酵素の欠損により復帰変異株数が減弱したが、変異原性が無くなることは無かった。このことから、AF-2 には *nfsB* にコードされたクラシカルニトロ還元酵素依存的に示される変異原性と、クラシカルニトロ還元酵素非依存的に示される変異原性の 2 種類があることがわかった。また、減少の割合が S9mix 非存在下で大きかったことから、S9mix により代謝されない部分がニトロ還元酵素による代謝を受けて、変異原性を示していることが予想される。

代謝活性化の影響については、フレームシフト変異誘発に関しては、ニトロ還元酵素の有無に係わらず、S9mix 存在下で 2 分の 1 から 3 分の 1 の復帰変異株数が見られ、S9mix により変異原性が部分的に消失していると考えられる。興味深いことに、塩基置換変異については、AF-2 の濃度により、代謝活性化の影響が異なっていた。ニトロ還元酵素の有無に係わらず、S9mix 非存在下では、0.05 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を超える用量では復帰変異株数の減少が見られたのに対して、S9mix 存在下では用量依存的に復帰変異株数が増加した。従って、低用量では S9mix 添加により復帰変異株数が減り、逆に 0.2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の高濃度では S9mix 添加条件でより高い復帰変異株数を示すという結果になっている。これらのことから、AF-2 には少なくとも S9mix に依存的に示される変異原性と、S9mix に非依存的に示される変異原性と、S9mix 依存的に消失する変異原性の 3 種類があるといえる。

Murty(1980)らはエームス株 TA100、TA98、および酵母を用いて AF-2 の遺伝子突然変異試験を行ったところ、S9mix 非存在下で顕著に誘発された突然変異は S9mix で 10 分間処理しただけで完全になくなったと報告している。

Suter (2002)らはヘテロサイクリックニトロ化合物である AMP397 が S9mix 非存在下での TA98、TA100 でのみで強い陽性反応を示し、S9mix 存在下、およびニトロ還元酵素欠損株では陰性であることを報告した。また、この物質について、ほ乳類培養細胞を用いた小核試験、マウスリンフォーマ試験、in vivo での小核試験、トランスジェニックマウス遺伝子突原変異試験、コメット試験、DNA 結合試験で全て陰性であり、AMP397 はニトロ還元酵素によるバクテリア特異的な変異原物質であることを証明した。

一方、AF-2 に関してはその変異原性はクラシカルニトロ還元酵素欠損株で半分程度にしか減少しなかったことから、他のニトロ還元酵素によるメカニズムあるいはニトロ還元以外のメカニズムが考えられる。

Thornton-Manning (1991)らは 1-ニトロピレン(1-NP)の CHO 細胞への変異原性の発現メカニズムが嫌氣的条件下と、好氣的条件下では異なることを報告している。嫌氣的条件下ではニトロ還元酵素が働き、好氣的条件下では芳香環の酸化が起きる。事実、1-NP の 6 位の水酸化体は 1-NP 自身より強い変異原性を示すことが知られている

(El-Bayoumy, Hecht, 1993)。AF-2 では芳香環の酸化により変異原性を生ずるという報告はないが、AF-2 の代謝も還元と、酸化の別々のメカニズムで起こりその代謝物が変異原性を示し、特に後者の反応は S9mix によって影響を受けるものと予想される。

他に vitro の試験ではヒトリンパ球細胞で

の染色体異常、チャイニーズハムスター細胞、酵母細胞での遺伝子突然変異、遺伝子変換の誘発などが報告されている。我々はこれまでヒトリンパ球培養細胞株 TK6 を用いて、コメット試験 (DNA 損傷試験)、小核試験、遺伝子突然変異試験を行ったが、すべて陽性であった。遺伝子突然変異試験において、突然変異頻度は S9mix 非存在下で 10 倍程度の増加を示した (20ug/ml、4 時間処理) が、S9mix 非存在下では 4 倍程度であった。コメット試験、小核試験でも同様に S9mix による遺伝毒性反応の低減化が見られた。従って、バクテリアでの系と同様、AF-2 は S9mix 存在下で、その遺伝毒性作用が減じられるものの、依然有意な誘発性をもつ。これらの結果から AF-2 は in vitro で明らかな遺伝毒性を有するものと結論づけられる。

In vivo における AF-2 遺伝毒性に関しては報告が少ない。Goodman (1977)らはラットに 240mg/kg の AF-2 の腹腔内投与すると、有意に骨髓小核が誘発されたと報告しているが、その程度は $0.49 \pm 0.32\%$ と極めて低い。また、Sugiyama(1975)らはラットに 30-240mg/kg の AF-2 を経口し、骨髓細胞の染色体異常誘発性を観察した。用量依存的に染色体異常の誘発が観察されたが、240mg/kg の最高用量でも染色体異常頻度は 8.88% であり、こちらも反応性は弱かった。従って、AF-2 の遺伝毒性は in vitro では明らかであるが、in vivo については未だ結論づけられていないものと考えられる。

今回、我々はトランスジェニックマウスを用いて、肝臓、前胃、大腸、脾臓での突然変異誘発性を解析したが、調べたいずれの臓器においても変異の誘発は認められなかった。特に、前胃は AF-2 の発がん標的臓器であり、ここでの陰性結果は胃での発がんの原因は遺伝毒性によるものではないこ

とを示唆している。また、小核誘発性に関しても陰性の結果を得た。Goodman、Sugiyama らの報告等は異なるが、その反応性の程度と、データの信憑性を考慮すると、in vivo での AF-2 の遺伝毒性は陰性と判断できる。

AF-2 の発がん性に関しては当初、ラット、マウスでの慢性毒性試験（0.2%までの混餌投与、24ヶ月）では観察されなかったが（Miyaji, 1971）、その後、ラットでの乳がん（Takayama & Kuwabara, 1977）、マウス前胃のがん（Sano, 1977、Yokoro, 1976）の報告があった。国立衛研試験所の Ochiai ら（1982）はマウスに 0.05、0.15、0.45% の AF-2 を混餌投与による 18ヶ月の発がん試験を行ったところ 0.15%、0.45% 群で、前胃における扁平上皮がん、または平滑筋肉腫（44%、55%）のがんの増加を認めたことを報告した。この発がん性の程度と、当時、AF-2 を摂取した日本人の発がんリスクを考察する。

Ochiai らの報告を基に計算される TD50 値（半分の動物にがんを発生させる量）は 0.33% の AF-2 の混餌量であり、マウスの一日の食事量から計算すると、550mg/kg/day と計算される。一方、1973 年当時の AF-2 の日本での生産量は 3500kg/年であり、仮にすべての AF-2 が食品に利用されたと仮定する。AF-2 の分解から推定される食品中への残存量は約 5% であり（Tajima 1979）、当時の日本人人口（一億五百万人）、365 日、補正係数(0.8)を考慮すると、平均一日摂取量は 5.7ug/day (0.08ug/kg/day) と計算される。TD50 値が 550mg/kg/day であることを考慮すると、その暴露マージン (MOE) は 680 万倍である。現在、我々が日常生活で摂取している発がん性物質の多くは MOE が 10 万～100 万であれば特にリスクの懸念はないと考えられていることから、AF-2 の

発がんリスクは極めて低い。

表 3 はアクリルアミドの一日平均摂取量、TD50、IARC 評価を示す。アクリルアミドは全てにおいて、ヒトに対してがんの引き起こす可能性が示唆されているが、現在、そのリスクは暴露マージン 1000 程度で管理されている。一方、そのリスクがアクリルアミドよりずっと少ない AF-2 に関しては、使用禁止の措置がとられた。

	一日平均摂取量	TD50	IARC	
Acrylamide	40ug (スウェーデン)	8.9mg/kg/day(ラット)	2A	許容
AF-2	5.7ug (当時の日本)	550mg/kg/day(マウス)*	2B	全面禁止

*Ochiai et al., 衛生試験所報告 100, 80-84 (1982)
0.05, 0.15, 0.45% で 18ヶ月混餌投与、それぞれ 12.1、44.4、58.8% に前胃部にがん

表 3

また、エームスらが発がんのリスク評価への利用を推奨している Human Exposure Rodent Carcinogenic Potency (HERP) を計算して、他の発がん可能性物質とのそのリスクの程度を比較した（表 4）。HERP 値は日常での摂取量と、実験動物での TD50 値から計算される。

Human Exposure Rodent Carcinogenic Potency (HERP)

Compounds (Major origin)	IARC	Average daily intake (µg/day)*	Carcinogenicity	
			TD50 (mg/kg/day)	HERP
Dimethylnitrosamine (Beer, bacon etc.)	2A	0.646	0.0959 (rats)	0.01
Acrylamide (Potato chips, etc.)	2A	40	8.89 (rats)	0.01
Saccharin (Artificial sweetener)	3	7000	2140 (rats)	0.005
Aflatoxin B1 (Peanut, etc.)	1	0.018	0.0032 (rats)	0.008
TCDD (Environmental pollutant)	1	0.0000054	0.0000235 (rats)	0.0003
AF-2 (Preservative, -1975)	2B	5.7	550 (mice)	0.00002
IQ (Burnt foods)	2A	0.0064	0.921 (rats)	0.00001
As (III) (Hijiki, cooked)	1	1.6	-	-

* 70kg on average /person

表 4

AF-2 の HERP 値は 0.00002 であり、これはアクリルアミドだけでなく、日常食品中

から摂取する可能性のあるジメチルニトロサミン、サッカリン、アフラトキシン等よりかなり低い。従って、当時使用されていた AF-2 が引き起こす発がんリスクは、他の食品中の発がん可能性物質と比較しても、特段問題になるものではないと考えられる。尚、AF-1 の HRP 値は昨年の報告書では 0.0004 としたが、今回の値は信頼性の高い Ochiai 等、Tazima の報告を基に計算したものである。

現在の食品添加物の安全性評価体系では発がん性と、遺伝毒性は評価の上で重要である。AF-2 は発がん性が明らかであることから、遺伝毒性の有無によって、ADI（一日摂取許容量）の設定が可能かどうかが決定的である。AF-2 の遺伝毒性は *in vitro* では明らかであるが、*vivo* では認められず、遺伝毒性の存在の有無については専門家によるさらなる論議や、追加実験が必要かも知れない。しかしながら、仮に遺伝毒性がなく、ADI が設定された場合、そのレベルは 5.7ug/day (0.08ug/kg/day) を遙かに上回るものと予想される (ADI の設定には発がん性以外のデータも必要)。

一方、食品香料など一部の添加物に関しては、発がん性や遺伝毒性の有無にかかわらず、一定レベル以下であれば発がん性があってもそのリスクは許容できる (毒性学的の閾値; Threshold for Toxicological Concern; TTC) との考えもある (Kros, 2004)。現在 TTC は 1.5ug/day という値が推奨されている。当時の AF-2 摂取量は 5.7ug/day と推定されており、この TTC 同程度である。従って、遺伝毒性、発がん性があっても当時の使用レベルでは、発がんリスクを上げるとは考えられない。

E. 結論

かつて防腐剤として使用されてきた

AF-2 は *in vitro* 試験においては遺伝毒性を示すが、*in vivo* においては遺伝毒性の証拠は得られなかった。ヒトに対する発がんリスクに關与する遺伝毒性の有無に関してはさらなる検討が必要かも知れない。AF-2 はげっ歯類において発がん性もつ。遺伝毒性がない場合、ADI を設定可能であるが、仮に設定できた場合の ADI レベルは、当時の 1 日摂取量 (5.7ug/day) を大きく上回ることが予想され、安全性には問題ない。また、遺伝毒性があったとしても、その発がんリスクは TTC に近い許容レベルであり、他の食品中に含まれる遺伝毒性発がん物質のリスクと比較しても、ほとんど無視できるリスクレベルと考えられる。いずれにせよ、当時の AF-2 の使用がヒトの発がんリスクを上げる可能性はほとんどない。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Takashima Y, Sakuraba M, Koizumi T, Sakamoto H, Hayashi M, Honma M.: Dependence of DNA double strand break repair pathways on cell cycle phase in human lymphoblastoid cells. *Environ Mol Mutagen.* 50, 815-822 (2009)

Wang J, Sawyer JR, Chen L, Chen T, Honma M., Mei N, Moore MM.: The mouse lymphoma assay detects recombination, deletion, and aneuploidy. *Toxicol Sci.* 109, 96-105 (2009)

Yatagai, F., Sugawara, K., Enomoto, S., and Honma, M.: An approach to estimation from DSB Repair Efficiency. *J. Radiat. Res.*, 50, 407-413 (2009)

Koyama, N., Yasui, M., Oda, Y., Suzuki, S., Satoh, T., Suzuki, T., Matsuda, T., Masuda, S., Kinae, N., Honma, M.: Genotoxicity of acrylamide in vitro: Acrylamide is not metabolically activated in standard in vitro systems. *Environ Mol Mutagen.* (in press)

2. 学会発表

Honma, M., Kumita, W., and Sakuraba, M.: Demonstration of ionizing irradiation inducing genomic instability via breakage–fusion-bridge cycle in human cells by CGH-microarray. Keystone symposia “Genome Instability and DNA Repair (2009.3)

Honma, M., Koyama, N., Kimura, A., Yasui, M., Takami, S., Takahashi, M., Imai, T., Yamamoto, Y., Kumita, W., Masumura, K., Masuda, S., Kinae, N., Matsuda, T., and Nohmi, T.: Child-adult differences in evaluation of in vivo genotoxicity of acrylamide. 48th Annual Meeting for Society of Toxicology (2009.3)

Kimura, A., Sakamoto, H., Saigo, K., Sukamoto, T., and Honma, M.: Establishment of simple in vitro Comet Assay Protocol. 48th Annual Meeting for Society of Toxicology (2009.3)

Honma, M.: DNA double strand break repair and genomic stability. The 14th Academic Conference of Chinese Environmental Mutagen Society (2009. 7)

Honma, M.: The new ICH guidance on genotoxicity. The 5th National Congress of Chinese Society of Toxicology.

(2009.8)

Uno, Y., Kojima, H., Honma, M., Tice, R., Corvi, R., Schechtman, and Hayashi, M.: In vivo Comet assay: update on going international validation coordinated by JaCVAM. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009.8)

Yamamoto, A., sakamoto, Y., Matsumura, K., Honma, M., and Nohmi, T.: Combined genotoxic effects of a methylating agent and radiation on human cells. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009.8)

Yasui, M., Koyama, N., Koizumi, T., Sakuraba, M., Takashima, Y., Hayashi, M., Sugimoto, K., and Honma, M.: Life cycle of micronucleus analyzed by confocal live cell imaging. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009.8)

Koyama, N., Kimura, A., Yasui, M., Takami, S., Takahashi, M., Inoue, K., Yoshida, M., Imai, T., Shibutani, M., Suzuki, T., Yamamoto, A., Kumita, W., Masumura, K., Horibata, K., Masuda, S., Kinae, N., Nohmi, T., and Honma, M.: Child-adult difference in evaluation of in vitro genotoxicity of acrylamide. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009.8)

Suzuki, T., Kohara, A., Ramadan, A., Kikuchi, Y., Honma, M., and Hayashi, M.: Comparative study of in vitro genotoxicity of ochratoxin A and aristolochic acid as a causative for Balkan endemic nephropathy. 10th International Conference on Environmental