

総会, 大阪

- 15) 加藤 杏子, 山村 英二, 川西 優喜, 八木 孝司, 松田 知成, 杉山 明男, 宇野 芳文, (2010) CHL/IU細胞を用いた *in vitro* 小核試験におけるDNAアダクトーム解析 (第2報), In 日本環境変異原学会(JEMS) 第39回大会, つくば.
 - 16) 安井 学, 佐々, 彰, 鴨下, 渚, 太田 敏博, 松田 知成, 能美, 健彦, 本間, 正充, (2010) DNA付加体を含む修飾DNAオリゴマーの生化学的構築法の最適化, In 日本環境変異原学会(JEMS) 第39回大会, つくば.
 - 17) 萩尾 宗一郎, 川西 優喜, 高村 岳樹, 松田 知成, 八木 孝司. (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.
 - 18) 松田 知成. (2009) 過酸化脂質によるDNA損傷, In レドックス生命科学第170委員会, p 5, 名古屋大学.
 - 19) 松田 知成. (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.
 - 20) 小山 直己, 木村 葵, 安井 学, 高見 成昭, 高橋 美和, 井上 薫, 吉田 緑, 今井 俊夫, 渋谷 淳, 鈴木 拓也, 増村 健一, 堀端 克良, 増田 修一, 木苗 直秀, 松田 知成, 能美 健彦, 本間 正充. (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.
- 2) 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.
 - 3) 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.
 - 4) 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.
 - 5) 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., Kinase, 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.
 - 6) 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

国際学会発表

- 1) Takemura, H., Sakakibara, H., Nagayoshi, H., Matsuda, T., Ohura, T., Morita, M., Matsui, A., and Shimoi, K. (2011) A methoxyflavonoid, chrysoeriol, inhibits DNA adduct formation by benzo[a]pyrene in MCF-7 breast

adducts, In 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM), p 179, Firenze, Italy.

- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Adachi, J., Kihara, K., and Matsuda, T. (2009) Oxidative modifications analysis of cysteine thiols, In 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM), p 199, Firenze, Italy.

H. 知的所有権の取得状況

特になし

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：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 変異遺伝部室長

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 Muta™Mouse 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。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 μ L と 1M 塩化マグネシウム 溶液を 320 μ L 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 Muta™ Mouse 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。

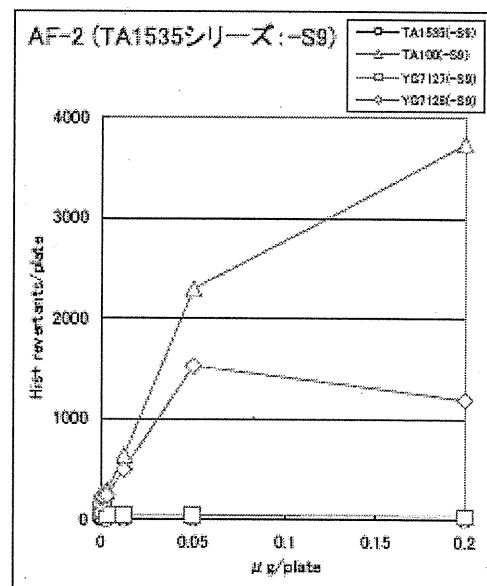


図 1 A

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)。

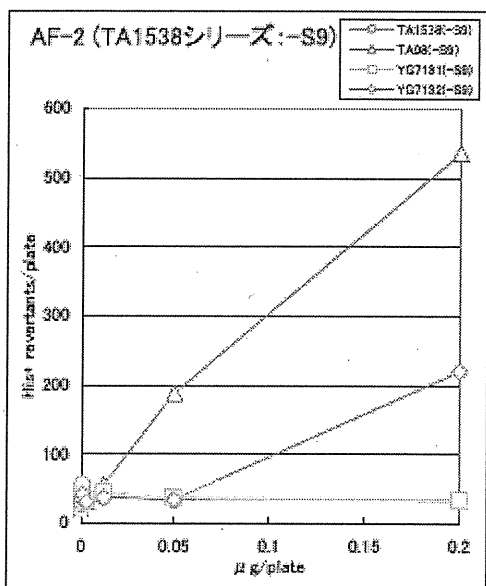


図 1 B

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。

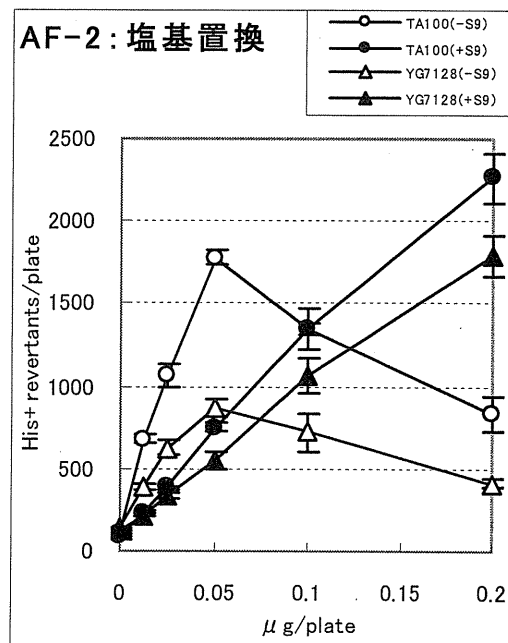


図 2 A

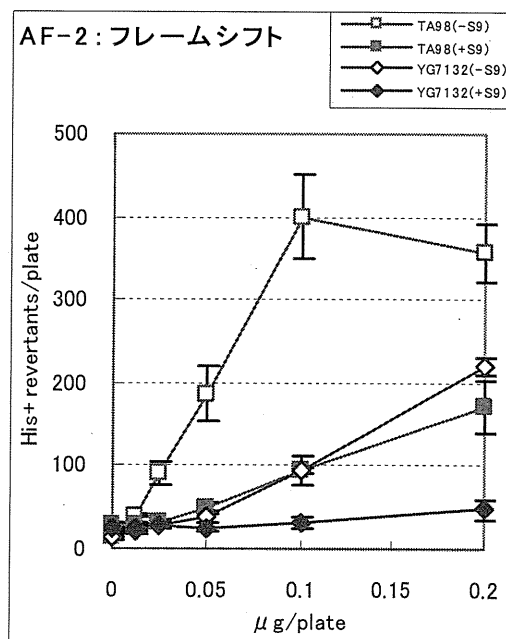


図 2 B

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。

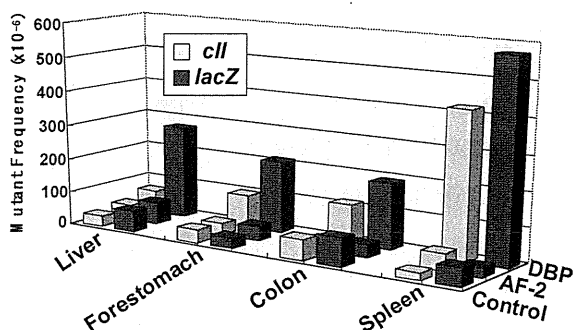


図3

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	MNRETS/1000RETS				Mean ± SD (%)
1回目投与48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48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 *in 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、有意に骨髄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、骨髄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 (ug/day)*	Carcinogenicity	
			TD50 (mg/kg/day)	HERP
Dimetylnitrosamine (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 HERP 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される。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で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、遺伝毒性があつたとしても、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

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) Yatagai, F., Sugawara, K., Enomoto, S., and Honma, M.: An approach to estimation from DSB Repair Efficiency. *J. Radiat. Res.*, 50, 407-413 (2009)
- 4) 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.* 52, 11-19 (2011)

2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) Honma, M., Keystone symposia "Genome Instability and DNA Repair (2009.3)
- 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)
- 4) 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)
- 5) Honma, M.: DNA double strand break repair and genomic stability. The 14th Academic Conference of Chinese Environmental Mutagen Society (2009.7)
- 6) Honma, M.: The new ICH guidance on genotoxicity. The 5th National Congress of Chinese Society of Toxicology (2009.8)
- 7) 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)
- 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)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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 Mutagens (2009.8)
- 12) Honma, M., Yamakage, K., Burlingson, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., Hayashi, M., Nakajima, M., Suzuki, M., Corvi, R., Uno, Y., Schechtman, L., Tice, R., and Kojima, H.: International validation study of the *in vitro*

- alkaline Comet assay. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009.8)
- 13) Hirose, A., Kamata, T., Yamazaki, T., Sato, K., Yamada, M., Ono, A., Fukumoto, T., Okamura, H., Mirokuji, Y., and Honma, M.: Validation of the (Q)SAR combination approach for mutagenicity prediction of flavour chemicals. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009.8)
- 14) Honma, M.: The new ICH guidance on genotoxicity International Conference on Environment, Occupational & Lifestyle Concern- Transdisciplinary Approach (2009.9)
- 15) 鈴木孝昌、小原有弘、小木美恵子、田邊思帆里、本間正充；8 番染色体特異的 CGH アレイ解析による各種がん細胞株での c-myc 遺伝子増幅形式の解析，第 68 回日本癌学会学術総会(200.10)
- 16) Honma M, Takashima Y, Sakuraba M, Koizumi T, Sakamoto H, and Hayashi M: DNA double strand break repair pathways and its dependence on cell cycle phases in human lymphoblastoid cells. Environmental Mutagen society 40th Annual Meeting (2009.10)
- 17) 本間正充；In vitro 遺伝毒性試験における最高用量と細胞毒性の評価，日本環境変異原学会第 38 回大会(2009.11)
- 18) 真田尚和、櫻田直美、米澤豊、入山昌美、本間正充；コルヒチン及び、ビンブラスチンのラット末梢血を用いた小核試験，日本環境変異原学会第 38 回大会(2009.11)
- 19) 小山直己、木村葵、安井学、高見成昭、高橋美和、井上薫、吉田緑、今井俊夫、渋谷淳、鈴木拓也、増村健一、堀端克良、増田修一、木苗直秀、松田知成、能美健彦、本間正充；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，日本環境変異原学会第 38 回大会(2009.11)
- 20) 安井学、小山直己、高島良生、林真、杉本憲治、本間正充；共焦点ライブセルイメージングによって明らかとなった小核のライフサイクル，日本環境変異原学会第 38 回大会(2009.11)
- 21) 鈴木孝昌、小原有弘、ラマダンアリ、菊池裕、本間正充、林真；バルカン腎症の原因物質としてのアリストロキア酸およびオクラトキシン A，日本環境変異原学会第 38 回大会(2009.11)
- 22) 谷田貝文夫、高橋昭久、本間正充、鈴木ひろみ、大森克徳、関真也、橋爪藤子、鶴飼明子、島津徹、榎本秀一、堂前直、大西武雄、石岡憲昭；国際宇宙ステーション利用実験：ヒト培養細胞の突然変異解析から宇宙環境の生物影響を解明する試み，日本環境変異原学会第 38 回大会(2009.11)
- 23) 山本歩、本間正充；Unconectable I-SceI サイトの挿入による放射線損傷様二本鎖 DNA 切断の修復機構の解析，日本放射線影響学会第 52 回大会(2009.11)
- 24) 安井学、本間正充；8-オキシグアニン 1 分子のゲノム内における突然変異誘発能の解析系の確立；低線量電離放射線の暴露モデルとして，日本放射線影響学会第 52 回大会(2009.11)
- 25) 本間正充、山影康次、Burlington, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., 林真、中嶋まどか、鈴木雅也、Corvi, R., 宇野芳文、Schechtman, L., Tice, R., 小島肇；In vitro アルカリコメットアッセイ国際バリデーション研究，第 22 回日本動物実験代替法学会総会(2009.11)
- 26) Honma, M. The new paradigm of genotoxicity testing in regulatory

science -ICH guideline and IWGT
consensus- The 1st International
Symposium on the Drug Safety Evaluation
(2009. 12)

H. 知的所有権の取得状況
なし

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：国際的な「遺伝毒性物質の閾値」に関する情報収集

分担研究者：長尾 美奈子 慶応義塾大学薬学部客員教授

研究要旨

*In vitro*において遺伝毒性発現に閾値を示さない発がん物質の発がん性については、発がん標的臓器によって閾値の有無は異なることが示されている。一方、遺伝毒性に閾値を示す物質の存在も示されていることから、遺伝毒性で閾値を示す物質は、発がん性においては標的臓器の如何を問わず閾値を示すことが想定される。すなわち遺伝毒性において閾値を示す物質を明確に把握することが重要である。Hoffmann-La Roche から発売された Viracept (HIV のプロテアーゼ阻害剤) に、遺伝毒性発がん物質 Ethyl methanesulfonate (EMS) が混入していることが判明した。EMS は種々の *in vitro* 遺伝毒性試験で閾値の存在が示されていた。*In vitro* で遺伝毒性に閾値を示さない ethyl nitrosourea (ENU) を対照に用いて、種々の臓器における *in vivo* 遺伝毒性に閾値が存在するかを検討した。Comet assay, micronucleus test, *Lac Z* 変異で検討した結果、いずれのテスト系でも、また、テストしたいずれの臓器でも閾値の存在が示された。発がんにおいても閾値の存在が強く示唆された。EMS のマウスおよびヒトにおける体内動態に検討を加え、ヒトにおける Viracept からの EMS 実質暴露量が遺伝毒性閾値以下であること示した一連の論文を紹介する。わが国の遺伝毒性発がん物質の取り扱いに参考となる事例と考える。

キーワード：EMS, 遺伝毒性閾値、ヒト暴露、リスク評価

A. 研究目的

遺伝毒性発がん物質の遺伝毒性における閾値の評価法に関する国際的な動向を調べる目的で文献検索を行なった。本年度は、DNA に直接作用するが、DNA 修復に基づく閾値の存在が示されているアルキル化剤の医薬品への混入が欧州製薬会社製

品で生じた。その混入に対するリスク評価が当該製薬会社で行われた。この評価方法は閾値のある遺伝毒性発がん物質の取り扱いに参考となる事例であるので詳細に紹介する。

2007年3～5月に Hoffmann-La Roche により、米国、カナダ、日本以外で

販売された HIV 治療薬「Viracept」に、遺伝毒性、催奇性、発がん性のあることが知られているエチルメタンサルホン酸 (EMS) が混入した。この事故はメタンサルホン酸の貯蔵タンクをエタノール洗浄した際、その除去が十分行われなかったことに起因している。この製品中の EMS 濃度は 1000 ppm に達した。HIV 患者の EMS 最大摂取量は 0.055 mg/kg day、3 ヶ月間の合計摂取量は 5.2 mg/kg と算出されている。Hoffmann-La Roche により行われたこの EMS 混入のリスク評価を以下に示す。

B. 研究方法

文献検索により情報を収集した。

(倫理面への配慮)

本研究では該当するものはない。

C. 研究結果

1. 遺伝毒性

a) *In vitro*における遺伝毒性

平成 19 年度の厚生労働省食品の安心・安全確保推進研究事業「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」に報告したとおり、ヒトリンパ芽球細胞を用いて、EMS は小核誘発、HPRT 遺伝子変異誘発において閾値が存在することが報告されている。閾値は夫々 1.35 · g/ mL および 1.25 · g/mL であった。

Hoffman-La Roche では以下の *in vivo* 実験を行い閾値の存在を確認した。

b) *In vivo*における遺伝毒性

マウスに EMS を 7 日間投与 (0, 1.25, 2.5, 5.0, 20, 80, 140, 200, 260 mg/kg/day) における骨髄小核誘発試験の結果、EMS では明らかな閾値の存在が示された。その値は 89.8 mg/kg であった。一方 ENU では閾値は認められなかった。図-1 に結果を示す。

Induction of MN by EMS or ENU

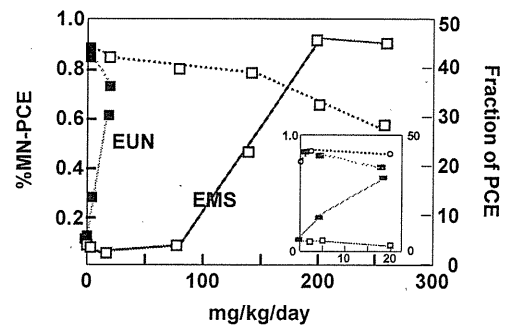


図-1 EMS および ENU による骨髄小核誘発

Muta™ マウスにおける LacZ 変異で閾値の有無を検討している。EMS (0, 1.56, 3.13, 6.25, 25, 50, 100 mg/kg day) を 28 日間投与し、31 日目に骨髄、肝臓、消化管における突然変異率を調べた。いずれの臓器でも閾値が認められ夫々 35.4, 51.3 および 24.5 mg/kg day であった。一方 ENU はいずれの臓器でも閾値は認められなかった。

2. 閾値の算出

上記 EMS の種々の遺伝毒性検出系における閾値の算出には Lutz and Lutz (2009) の Hockey Stick software (www.r-project.org よりダウンロードできる) を用いて統計的に求めている。このモデルに合う用量相関は 2 本の直線で表される。

$$y = a + b(d - td)$$

y: 遺伝毒性

a: 遺伝毒性マーカーの背景レベル

b: 直線の勾配

td の用量までは $y = a$ の勾配 (b) が 0 の直線ではじまり、用量 td 以上では勾配 b の直線に合う線形の得られるものである。EMS の MN テストの結果を Hockey Stick で表すと図-2 のようになる。

Statistic Analysis of the MN Test Data with the Hockey Stick Software

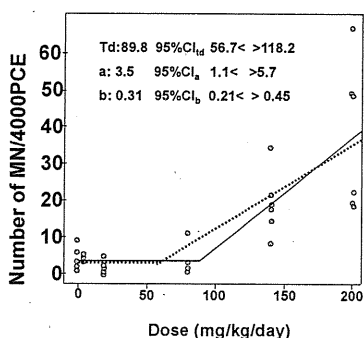


表-1 に示すのはこのモデルに従って算出した種々の遺伝毒性試験における閾値である。

表-1 EMS の種々の遺伝毒性テストにおける閾値

テスト	臓器	閾値 t d (mg/kg/day)	95% CI (mg/kg/day)
MN	骨髄	89.8	56.7 - 118.2
LacZ	骨髄	35.4	21.5 - 45.7
LacZ	肝臓	51.3	25.7 - 100.0
LacZ	消化管	24.5	13.0 - 38.5

以上の結果からマウス・遺伝毒性から見た閾値は 25 mg/kg day であることがわかった。

3. リスク評価

a) 従来の方法による、用量相関が直線であると仮定しての評価

EMS には遺伝毒性、発がん性および催奇性以外の毒性に関する報告はない。

EMS の終生投与実験の報告はないので同じアルキル化剤メチルメタンサルホン酸をマウスに飲水投与したときの肺腫瘍誘発率を用いて発がん率を推定した場合 0.0031% となる。AIDS 患者では発がん感受性は約 3 倍であるという報告に基づく補正を行うと 0.009% になる。さらにヒトに

おける AUC (下記参照) はマウスの 1.2 倍であることに基づく補正を行うと 0.11% になる。数千人の AIDS 患者が摂取したので数人が犠牲になることになる。

ラットに EMS (3-20 mM) を 0.5-3 ヶ月飲水投与したで乳がん誘発実験からの外挿では、

ヒトにおけるリスクは 0.12% となる。AUC および感受性の増加の補正を行うと % の桁数で発がんを誘発したことになる。

催奇性に関するマウスのデータの外挿からは、AUC の補正なしで 0.15% の増加が推定された。BG のヒト奇形発生率は 2.68% である。AUC の補正を行うと 1.5% となり影響はかなり大きくなる。

b) 遺伝毒性における閾値存在に基づく評価

遺伝毒性物質で閾値のある EMS とない ENU のリスク評価での重要な差異は、EMS は閾値以下の低濃度に分割投与した場合には遺伝毒性は認められないが、ENU の場合は加算されることである。従ってマウスに EMS を 28 日間投与で得られた閾値は、より長期の投与でも変わらないことが考えられる。

EMS のリスク評価を行うにあたりまず、暴露量で直接比較した。

1) Viracept 中の EMS は 1068ppm で、Viracept 摂取期間中のヒトの暴露量は最大で 0.055mg/kg day (体重 60kg) であった。マウス in vivo における遺伝毒性閾値は 25 mg/kg/day である。これらの値から安全係数を計算すると 454 になる。

2) 実験動物およびヒトにおける薬物動態を考慮した暴露評価を検討した。EMS は肝臓ミクロソームやグルタチオン転移酵素による分解は殆ど受けず、主として化学的加水分解によりエタノールとメタンサルホン酸に分解される。緩衝液、血漿、腸管液中の半減期は 37°C で 12 時間である。経口投与した EMS は 63-73% が消化管から速やかに吸収され 10 分後に最高血漿濃度に達する。

¹⁴C-EMS 投与実験より得られた in vivo における半減期は、マウスで 10-24 分、ラットおよびサル (cynomolgus) で

2.5 - 5時間であった。そこで以下の仮定を適用した。

1. AUCは可能な限り高い値とし、排泄除去 (clearance) は *in vitro* の緩衝液中での化学分解値を用いた。

2. マウスではEMSの低用量では排泄除去は増加していたが、ヒトでは低用量でも増加しないとした。

3. ヒトでの吸収は速やかで100%であると仮定した。

4. EMS体内分布の容量(distribution volume)は動物種によらず一定で0.521 L/kg とした。

ヒトでの半減期は10.7 h と算出された。

マウスにEMSを経口投与し得られた血中濃度-時間曲線を用いて測定したマウスにおける遺伝毒性閾値 (25mg/kg) の C_{maxThd} は315 μ Mであった。 C_{max} は排泄除去の影響は殆ど受けず、また、EMSの場合は動物種によって分布容量(distribution volume)が変わらないので、動物種が異なっても用量にのみ依存するとした。その結果、Viraceptを摂取したヒトのAUCは13 μ Mh, C_{max} は0.85 μ Mと算出された。

表-2 Viraceptを摂取したヒトと閾値EMSを投与したマウスにおけるEMSの体内動態の比較

マウス		ヒト	
実測半減期	10-24 min	推定半減期	10.7 h
Thd	25mg/kg/day	Max dose	0.055 mg/kg/day
C_{maxThd}	315 μ M	C_{max}	0.85 μ M
AUC_{Thd}	350 μ Mh	AUC_{max}	13 μ Mh

C_{max} からの安全係数は370と算出された。

実質暴露量 (AUC) から算出した安全係数は27であった。

D. 考察

以上に示したようにViraceptに混入していたEMSは、閾値のないLNT(Linear Non-threshold)モデルでは、マウスとヒトの代謝の違いを考慮するとかなりのリスクを伴うものであると算定される。しかし、遺伝毒性における閾値を考慮した場合は、

ヒトにおけるEMSの吸収、代謝をより安全側に仮定してのリスク評価で、安全であると算定された。これは事故による事例であるが、遺伝毒性発がん物質の取り扱いが現状のままで良いかを、再検討するには有用な事例であると考えられる。

E. 結論

化学物質の有効利用を考える上で、遺伝毒性発がん物質で閾値を有するものの情報を収集する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 引用文献

- 1) M. Kirsch-Volders, L Gonzales, P Carmichael, D Kirklan. Risk assessment of genotoxic mutagens with thresholds: A brief introduction. *Mutat Res.* 2009; 678: 72-5.
- 2) E. Gocke, L Muller. *In vivo* studies in the mouse to define a threshold for genotoxicity of EMS and ENU. *Mutat Res.* 2009; 678; 101-7.
- 3) WK Lutz, RW Lutz. Statistical model to estimate a threshold dose and its confidence limits for the analysis of sublinear dose-response relationships, exemplified for mutagenicity data. *Mutat Res.* 2009; 678: 118-2.
- 4) GE Johnson, AH Doak, AM Griffiths, EL Quick, DOF Skibinski, ZM Zair, GJ Jenkins. Non-linear dose-response of DNA-reactive genotoxins: Recommendations for data analysis. *Mutat Res.* 2009; 678; 95-100.
- 5) E Gocke, M Ballantyne, J Whitwell, L Muller. MNT and Muta™ Mouse studies to define the *in vivo* dose response relations of genotoxicity of EMS and ENU. *Toxicol Lett Toxicol Lett.* 2009; 190; 286-97..
- 6) E Gocke, L Muller, T Pfister. EMS in Viracept-Initial (traditional) assessment of risk to patients based

- on linear dose response relations.
Toxicol Lett. 2009: 190; 266-70.
- 7) L Muller, E Gocke, T Lave, T Pfister.
EMS toxicity in Viracept- A
comprehensive
Human risk assessment based on
threshold
data for genotoxicity. 2009: 190;
317-29.
- 8) T Lave, A Paehler, HP Grimm, E Gocke,
L Muller. Modelling of patient EMS
exposure: Translating
pharmacokinetics of EMS in vitro and
in animals into patients. Toxicol
Lett 2009: 190; 310-316.
- 9) T Lave, H Birnbock, A Gotschi, T Ramp,
A Pahler. *In vivo* and *in vitro*
characterization of ethyl
methansulfonate pharmacokinetics in
animals and in humans. Toxicol Lett.
2009: 190; 33030-309.

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Inami K, Nagao M, Ishikawa S,
Mochizuki M. Mutagenicity of
heterocyclic amines by chemical
models for cytochrome P450 inb the
Ames assay. Gene Environ. 2010: 32:
7-13 (2010)

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし