

201234043A

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価法に関する研究

(H24-食品-一般011)

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 本間正充

平成25（2013）年 3月

目 次

I. 総括研究報告書（別添 3）

食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価法に関する研究_____	1
本間 正充	

II. 分担研究報告書（別添 4）

リスクレベルに基づく遺伝毒性評価法の提言 -遺伝毒性発がん化学物質のリスク評価と閾値-_____	1 1
本間 正充	

2分子の DNA 付加体が引き起こす突然変異誘発能の解析_____	2 2
安井 学	

食品添加物における遺伝毒性発がん物質の評価法に関する研究_____	2 7
續 輝久	

微生物試験を用いた発がんリスクの定量的評価手法の構築_____	3 2
山田 雅巳	

トランスジェニック動物を用いた定量的遺伝毒性評価に関する研究_____	4 0
増村 健一	

In vivo 遺伝毒性試験の低用量リスク評価法に関する研究_____	5 7
鈴木 孝昌	

III.研究成果の刊行に関する一覧表（別添 5）_____	6 5
-------------------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別冊_____	6 7
----------------------	-----

I. 総括研究報告書

平成 24 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
総括研究報告書

研究課題名：食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価法に関する研究

研究代表者： 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長

研究要旨

遺伝毒性は重要な発がんメカニズムの 1 つであり、遺伝毒性の有無と、性質（DNA 反応性、もしくは非 DNA 反応性）は、食品添加物等の化学物質の発がんリスク評価を大きく左右する。すなわち、非 DNA 反応性発がん物質であれば一般に閾値があると考えられ、ADI の設定が可能であるが、DNA 反応性発がん物質と評価された場合は、使用を禁止するか、許容リスクレベルを考慮した管理が必要となる。しかしながら、我が国においては、食品添加物に対して後者の手法は十分に開発されていない。遺伝毒性試験データを発がんリスク評価に利用するためには、試験結果の適切な量的評価が不可欠である。本研究では遺伝毒性試験データをヒト発がんリスク評価に利用するために、遺伝毒性の量的反応性を考慮した手法の開発を目指す。本年度は、第一に発がんリスク評価の際の「遺伝毒性」「閾値」「定量的評価」に関するこれまでの国際的議論をまとめた。閾値の有無にかかわらず遺伝毒性を定量化し、リスク評価に適応することが今後の主流になるものと考えられる。閾値の存在に関しては、酸化的 DNA 損傷の一つである 8-OxodG の突然変異誘発には閾値は存在せず、数に比例した突然変異に誘発が確認された。一方、*Mutyh* 遺伝子欠損マウスの実験から、臭素酸カリウムの発がん性に関して「閾値」が存在することを示唆する結果を得た。化学構造と遺伝毒性に関する調査では、変異原性を示す芳香族アミンと発がん性の強さは相関性が高いことが分り、構造クラスを考慮に入れることで定量的評価が可能になることが示唆された。トランスジェニック 齧歯類遺伝子突然変異試験（TG 試験）の報告がある 118 の発がん性物質、22 の非発がん物質についてデータベースに作成した。In vivo 変異原性と発がん性の相関について検討した。TG 試験の定量的解析は、投与量あたり陰性対照群におけるバックグラウンド値の何倍に増加させたかにあたる Fold-Increase/total dose を用いることにより、発がんとの相関を適切に比較することが可能となった。

キーワード：閾値、遺伝毒性、発がん、化学発がん物質、用量反応関係、リスク評価

分担研究者

安井 学	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 主任研究官
續 輝久	九州大学大学院医学研究院基礎医学 部門生体制御学講座 教授
山田雅巳	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
増村健一	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
鈴木孝昌	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 室長

A. 研究目的

遺伝毒性物質の作用には一般に閾値がないとされており、どのように微量であってもヒトに対してリスクを示すと考えられている。このため遺伝毒性を示す発がん物質には ADI が設定されず、行政上の規制が困難となる。本研究では、遺伝毒性陽性と判定された化学物質の発がんリスクを適切に評価することを目的とし、陽性反応を定量的に評価するための手法の開発と、陽性反応における閾値の発生機序の解明を目指す。

本年度では、これまでの発がん物質のリスク評価の際に用いられてきた「遺伝毒性」と「閾値」に関するこれまでの議論をまとめた(本間)。DNA 損傷 1 分子をゲノムに導入することで低用量暴露を模擬する実験系を最近確立し、閾値が無いことを証明した。本年度は、1 分子だけでなく、2 分子の 8-OxodG をゲノムに導入し、付加体の分子数と突然変異誘発頻度の関係性を定量的に明らかにした(安井)。Mutyh 遺伝子欠損マウスを樹立した。このマウスでは自然発がん、臭素酸カリウム (0.2%溶液経口投与) 誘発発がん頻度が劇的に上昇することを見出した。本年度は、遺伝毒性、発がん性に対する閾値形成機構について検討するために、比較的低用量域 (0.10-0.15%) の臭素酸カリウムを経口投与して発がん実験を行

った(續)。復帰突然変異試験 (Ames 試験) 結果の定量化を目指す。本年度は、発がん性物質が多く含まれる構造クラスの中で芳香族アミンを選び、発がん性と Ames 試験の強さの相関を調査した(山田)。トランスジェニック齧歯類遺伝子突然変異試験 (TG 試験) のデータベースを基に定量的解析法の開発、および発がんリスク評価への利用を目的とし、既存の TG 試験のデータベースを構築し、TG 試験データと発がん性との相関を検討した(増村)。また、TG 試験の定量的解析に有用な指標の開発を行った(鈴木)。

B. 研究方法

1) 米国産業衛生専門家会議 (ACGIH)、ドイツ MAK 委員会 (MAK)、ヨーロッパ環境変異原学会 (EEMS)、環境保健科学研究所 (HESI)、ICH-M7 専門家委員会での論議等を基に、遺伝毒性・変異原性の定義、閾値の定義、閾値の存在条件、閾値に替わる評価手法等を調査した(本間)。

2) 荒川らの方法により 8-OxodG 2 分子を部位特異的に含むターゲティングベクターを構築した。TSCER122 細胞 (TK^{-/-}) にターゲティングベクター (pvINT2xOxodG) をトランスフェクションし、相同組み換えにより、DNA 付加体がゲノム内に入った細胞クローンを回収した。各クローンのゲノム DNA を抽出し、8-OxodG 部位だった周辺のシーケンスを行い、その突然変異誘発スペクトルおよび頻度を決定した(安井)。

3) 6~8 週齢の野生型および Mutyh 遺伝子欠損マウス (雌; 6~14 匹) に臭素酸カリウム (0.10-0.15%) を 16 週間経口投与した後、安楽死させたマウスから腸管を摘出して 10%ホルマリンを用いて固定した。その後、固定液を 70%エタノールに置換えて、腸粘膜を実体顕微鏡下で観察し、腫瘍の形成を確認した。検出した腫瘍から病理切片を作製し、病理解析を行った(續)。

4) Carcinogenic Potency Database Project

(CPDB)、National Toxicology Program (NTP) のデータベースから芳香族アミンに関する発がん性と Ames 試験の結果のデータを抽出した。発がん性の TD50 値の逆数と、Ames 試験の比活性値をグラフ化し、両者の相関性を検討した (山田)。

5) OECD の Detailed Review Paper On Transgenic Rodent Mutation Assays (2009) の総説から TG 試験データを抽出した。項目として、物質名称、CAS 番号、構造式、発がん標的組織、TG 試験判定結果 (陽性または陰性)、および定量的試験結果をデータベース化した。作成したデータベースを基に、TG 試験データと発がん性との相関を検討した (増村)。

6) 発がん性試験と変異原性試験の定量的相関に関する検討においては、すでに報告されている MutaMouse および BigBlue トランスジェニックマウスを用いた変異原性試験データと、発がん性の強度の指標としての TD50 との相関図を基にして、新たなトランスジェニックマウスモデルである gptΔ マウスにおけるデータの適応性に関して検討するとともに、in vivo 変異原性試験としての一般的応用を目指して、小核試験データへの適応を試みた (鈴木)。

(倫理面への配慮)

本研究は多くは文献調査、培養細胞による in vitro 試験に基づくものであり、倫理上の問題はない。續の動物実験に関しては九州大学の動物実験委員会、研究倫理委員会の規定に準拠して行った。

C. 研究結果および考察

1) 遺伝毒性の定量的評価とリスク評価への適用 (本間)

遺伝毒性結果は「陽性」もしくは「陰性」として判定され、遺伝毒性ハザードの有無を評価するのが一般的である。環境保健科学研究所 (HESI) の遺伝毒性試験プロジェクト (GTTC)・定量的評価グループは、従来の「ハザードの同定」を目的

とした遺伝毒性評価を「リスク評価」に転換すべく、試験結果の定量的評価法を試みている。これまでの毒性試験と同様、もしくはその代替パラメータを開発し、ヒト発がんリスクへの適用を目指している。ここでは他の毒性と同様に遺伝毒性試験から得られた用量-反応評価の結果から、ヒトでの通常の摂取量領域における健康影響評価基準値等を設定する際の毒性反応曲線の基準となる出発点の値として POD (point of departure) を求める。遺伝毒性の場合 POD としては、No-observed Genotoxic Effect Level (NOGEL)、Threshold effect level (Td)、Benchmark dose (BMD)がある。このような定量的評価法は将来遺伝毒性発がん物質のリスク評価に大きく貢献できると考えられる。定量的評価から閾値の有無にかかわらず適切なリスク評価を行うことが理想である。しかしながら、現時点では閾値の有無が未だ重要な争点である。閾値を設定し、ゼロリスクを追求するのに対して、「発がん可能性がある化学物質が十分に低濃度であれば、その発がん可能性は極めて小さくなり、その程度が社会的に許容できるリスクレベルであれば実質的に安全と見なし得る」とのリスク管理の方法もある。この量を実質安全性量 (Virtually Safety Dose: VSD) という。発がん性データが無い場合、VSD はこれまでの発がんデータから「毒性学的懸念の閾値 (Threshold of Toxicological Concern: TTC)」を設定することができる。TTC は遺伝毒性がない場合は 1.5ug/日であるが、遺伝毒性物質であり高い発がんリスクが懸念される場合は 0.15ug/日とすることが推奨されている。

2) 2分子の DNA 付加体が引き起こす突然変異誘発能 (安井)

8-OxodG 2分子を部位特異的に含むターゲティングベクター (pvINT2xOxodG) をトランスフェクション後、付加体が導入された 428 クローン細胞について解析した結果、8-OxodG 導入部位に変異があったのは 110 (25.7%)、その周辺配列に変異があったのは 22 クローン (5.1%) 見つ

かった。よって、ほとんどが付加体部位に依存した一塩基変異（塩基置換、欠失および挿入）であることが分かった。2分子の8-OxodGによって誘発する一塩基変異のトータル（25.7%）は、1分子のそれ（10.7%）よりも、約2.4倍高く、付加体の分子数と突然変異誘発頻度は、ほぼ比例関係であると言える。

8-OxodG2分子の主な突然変異誘発スペクトラムは、1分子の時と同様にG・C→T・Aトランスバージョンであった。1分子では誘発しないが、2分子で生ずる特徴的な変異スペクトルとしてBssSI配列の真ん中にGあるいはCが一塩基挿入された5'-CTCZGTG（ZはGあるいはC）が5.2%の高頻度で観察された。近接する2つの8-OxodG部位の片方で一本鎖切断が形成し、付加体を切除後に正常塩基dGがdCの対面に挿入される。しかし、その部位の斜め対面にもう一つの8-OxodG:dC塩基対があるため、おそらく修復酵素やDNAポリメラーゼが相互作用し、いわゆるwobbleペアになることにより、余分なdCあるいはdGを塩基対形成させ、結果的に一塩基挿入になったと予想できる。このwobbleペアによる影響は、一塩基欠失およびG・C→C・Gトランスバージョンの頻度上昇にも関与している可能性がある。以上のことから、2つの近接した付加体は、塩基置換よりも塩基挿入や欠失の塩基変異を促進させることが分かった。引き続き、4分子の8-OxodGを解析することで、TSとNTSで起こす突然変異誘発能の相違性について調べる予定である。

3) 臭素酸カリウム誘発消化管発がん (續)

0.10%および0.15%臭素酸カリウム溶液を16週間連続飲水投与した誘発消化管発がん実験では、*Mutyh* 遺伝子欠損マウスの十二指腸・空腸でそれぞれ、10.67±3.57 (9匹)および43.93±13.42 (14匹)の上皮性腫瘍の発生を認めた。対照群の野生型マウスではそれぞれ、0.17±0.41 (6匹)および1.00±0.94 (10匹)の上皮性腫瘍の発生を認めた。

食品添加物の臭素酸カリウムは酸化ストレスを負荷することが知られている。*Mutyh* 遺伝子欠損マウスはヒトの遺伝性大腸がん (MAP: MUTYH-associated polyposis) の疾患モデルであり、消化管における自然発がんの発生頻度が野生型マウスに比して有意に上昇している。このように *Mutyh* 欠損という酸化ストレス誘発発がんにも感受性が高いマウス個体を用いて発がん感受性や遺伝毒性に関する研究を行うことで、遺伝毒性に対する *Mutyh* 遺伝子産物以外の多重の防御機構の寄与を明らかにすることが可能となる。

4) 芳香族アミンのエームス変異原性と発がん性の相関(山田)

芳香族アミンは一般の他の化学構造からなる物質と比較して、Ames試験での強さとTD50値の相関がよいことがわかった。

CPDBで発がん性が認められていない芳香族アミンはAmes試験が陰性であった。非発がん性物質で比活性値が求められていたものでは、非活性値はいずれも低い値であり判定は陰性となっていた。したがって、Ames試験で変異原性が検出されなかった芳香族アミンについては、げっ歯類について発がん性は認められない可能性が高いと考えてよい。一方、比較的比活性値が高い上位5化合物のTD50値はIARC（国際がん研究機関）の発がん性分類が1の、Cyclophosphamide、Ethylene oxideなどと同等であった。したがって、芳香族アミンについてAmes試験で高い比活性値を示すものについて、げっ歯類に対する発がん性は高いと考えてよい。芳香族アミン以外で高い比活性値を示したMeIQ、MeIQx、Streptozotocin、AF-2は、IARCの発がん性分類がいずれも2Bであり、変異原性試験の結果と発がん性は相関しているとは言い難かった。このうち、StreptozotocinとAF-2はAmes試験において代謝活性化がない条件下で突然変異を誘発する直接変異原である。生体内に存在する代謝酵素はバクテリアよりも多いため、それらにより一部不活化される可能性は、

Ames 試験の比活性値に比して発がん性が低くなる理由の一つと考えることができる。一方、MeIQ および MeIQx の変異原性には代謝活性化、中でも N-水酸化が必要である。N-水酸化に働く酵素の活性および誘導の程度は種差が著しいことが報告されており、Ames 試験で用いた S9 や発がん試験に用いた動物の種類による活性の違いなどが比活性値と発がん性のずれに関与した可能性が考えられた。

5) TG 試験のデータベース化と、TG 試験と発がんデータの比較 (増村)

文献情報より、TG 試験データが報告されている 238 物質のうち、発がん性の有無が明らかになっているものは 140 物質であった。うち発がん性物質が 118、非発がん性物質が 22 であった。計 140 物質についてエクセルのデータベースに物質名称、CAS 番号、構造式、発がん標的組織、TG 試験判定結果 (陽性または陰性) の情報を追加した。発がん性物質 118 物質のうち、TG 試験が発がん標的組織で実施されているものは 101 物質であった。さらに、TG 試験が発がん標的組織以外で実施されているものが 15 物質、発がん標的組織の情報が不明なものが 2 物質あった。TG 試験データがある 118 の発がん性物質と 22 の非発がん性物質を用いて、TG 試験の判定と発がん性の有無との相関について検討した。Sensitivity は $84/118 = 71.2\%$ であった。Specificity は $15/22 = 68.2\%$ であった。全体の一致率 Concordance は $(84+15)/140 = 70.7\%$ であった。これまでの Kirkland らの報告では Sensitivity は $17/30 = 56.7\%$ であった。Specificity は $9/13 = 69\%$ である。

TG 試験から遺伝毒性の定量的指標を導出するためには多くの課題がある。まず、突然変異体頻度に影響する要素が多いことが挙げられる。投与経路 (暴露量、部位の影響)、用量 (毒性影響)、投与期間および発現時間 (DNA 修復能や組織のターンオーバーの影響)、解析対象組織 (組織特異性の影響)、種差、性差、週齢など、in vivo 試

験特有の条件が存在し、試験結果に影響する。発がん性との量的相関を調べるためには、発がん性試験と同条件の試験を行い、発がん標的組織において遺伝毒性を検索することがより望ましいが、そのような試験は限られる。また、発がん性未知の物質ではそうした設定は不可能である。従って、いくつかの主要な組織に限った試験にならざるを得ない。TG 試験実施の際は、曝露や毒性の情報を考慮しつつ、解析組織を注意深く選択することが必要である。今後の課題としては、既存の TG 試験データは高用量、短期間投与で行われたものが多いため、これらのデータを定量的評価に活用できるか検討することが重要である。TG 試験における突然変異体頻度の増加率 (fold-increase) および発がん性における TD50 のような指標を参考に、同一物質であっても実験条件の差が用量-反応関係にどう影響するかを検討し、遺伝毒性の量的指標を用いた評価を試みる。

6) In vivo 遺伝毒性試験の発がん性との定量的相関関係モデルの一般化 (鈴木)

発がん性の強さの指標として、毎日動物に投与して半分の個体に癌が発生する用量である TD50 値を用いた。一方、トランスジェニックマウス試験での活性の強さは、総投与量 (mg/kg) あたりの変異頻度の上昇率 (fold-increase) で表し、両者をグラフ上にプロットしたところ、非常に良い相関性が得られた。この結果から、トランスジェニックマウスを用いた試験は、定量的な発がん性の予測のために有用であることが示された。この相関には旧来から使用されていた、MutaMouse および BigBlue マウスに関するデータを用いた。この指標の有効性を gpt Δ トランスジェニックマウスモデルで検証するためアリストロキア酸を用いてデータの比較を行ったところ、ほぼ同じ位置にプロットされた。また、小核試験に関しても、TD50 値との間に良い相関関係が見られた。

Fold-increase/mg/kg の値を定量的評価の指標として発がん性との相関を調べることにより、in vivo 遺伝毒性試験全体に適応可能であることが

わかった。個々の試験法と発がん性の相関関係については、今後より詳しい解析を行う必要があるが、今回小核試験に関して一部の化合物にて比較を行ったところ、陽性結果の得られている化合物に関しては、発がん性との間に比較的良い相関関係があることが明らかとなった。

低用量での用量反応性およびリスク評価法に関しては、実際に低用量域での実験的なアプローチの限界から、むしろ高用量での用量相関をきちんと評価し、その外挿による低用量領域での反応性の予測を行う手法を提案する。これには、用量反応の連続性（直線性ではない）が前提となるが、現実的にはこのようなアプローチを取らざるを得ない。

D. 結論

本研究では遺伝毒性試験データをヒト発がんリスク評価に利用するために、遺伝毒性の量的反応性を考慮した手法の開発を目指す。本年度は、第一に発がんリスク評価の際の「遺伝毒性」「閾値」「定量的評価」に関するこれまでの国際的議論をまとめた。閾値の有無にかかわらず遺伝毒性を定量化し、リスク評価に適用することが今後の主流になるものと考えられる。閾値の存在に関しては、酸化DNA損傷の一つである8-OxodGの突然変異誘発には閾値は存在せず、数に比例した突然変異に誘発が確認された。一方、Mutyh遺伝子欠損マウスの実験から、臭素酸カリウムの発がん性に関して「閾値」が存在することを示唆する結果を得た。化学構造と遺伝毒性に関する調査では、変異原性を示す芳香族アミンと発がん性の強さは相関性が高いことが分り、構造クラスを考慮に入れることで定量的評価が可能になることが示唆された。TG試験の報告がある118の発がん性物質、22の非発がん物質についてデータベースに作成した。発がん性との相関はSensitivity:71.2%、Specificity:68.2%である。小核試験のSensitivity:46%、Specificity:54%であることを考えると(NIHSデータ)、TG試験は発がんリスク評価に適している。In vivo変異原性と発がん性の

定量的相関について検討した。TG試験の定量的解析は、投与量あたり陰性対照群におけるバックグラウンド値の何倍に増加させたかにあたるFold-Increase /total doseをパラメータとして用いることにより、発がんとの定量的相関性を適切に比較することが可能となる。

今後の遺伝毒性リスク評価の方向性としては、
①試験データから Mode of Action (MOA)による閾値の決定
②試験データの重み付け (Weight of Evidence; WOE)
③In vivo試験データ (TG試験)の定量化
④化学構造による重み付け
⑤遺伝毒性試験データから発がん性への外挿を目指す。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

誌上発表

1. Ono A, Takahashi M, Hirose A, Kamata E, Kawamura T, Yamazaki T, Sato K, Yamada M, Fukumoto T, Okamura H, Mirokuji Y, Honma M. Validation of the (Q)SAR combination approach for mutagenicity prediction of flavor chemicals. Food Chem Toxicol. 50, 1536-1546 (2012)
2. Morita T, Honma M, Morikawa K. Effect of reducing the top concentration used in the in vitro chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. Mutat. Res. 741, 32-56 (2012)
3. Mekenyan OG, Petkov P, Kotov S, Stoeva S, Kamenska VB, Dimitrov S, Honma M, Hayashi M, Benigni R, Donner M, Patlewicz GY. Investigating the relationship between in vitro · in vivo genotoxicity: Derivation of mechanistic QSAR models for in vivo liver

- genotoxicity and in vivo bone marrow micronucleus formation which encompass metabolism. *Chem Res Toxicol.* 25, 277-296 (2012)
4. Sassa A, Kamoshita N, Matsuda T, Ishii Y, Kuraoka I, Nohmi T, Ohta T, Honma M, Yasui M.; Miscoding properties of 8-chloro-2'-deoxyguanosine, a hypochlorous acid-induced DNA adduct, catalysed by human DNA polymerases. *Mutagenesis* 28,81-88 (2013)
 5. Lim, T.-H., Fujikane, R., Sano, S., Sakagami, R., Nakatsu, Y., Tsuzuki, T., Sekiguchi, M., and Hidaka, M. Activation of AMP-activated protein kinase by MAPO1 and FLCN induces apoptosis triggered by alkylated base mismatch in DNA. *DNA Repair*, 11: 259-266, 2012
 6. M. Yamada, M. Shimizu, A. Katafuchi, P. Grúz, S. Fujii, Y. Usui, R.P. Fuchs, T. Nohmi, Erroneous nature of DNA polymerase III in *Escherichia coli* is responsible for the high spontaneous mutations in a mutT background, *Mol Microbiology*, 86, 1364–1375 (2012)
 7. T. Nohmi, M. Honma, M. Yamada, K. Masumura, M. Yasui, K. Horibata, S. Fukushima, 2nd International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds. *Genes and Environment*, 34, 141-145 (2012)
 8. T. Nohmi, M. Yamada, K. Masumura, In vivo approaches to identify mutations and in vitro research to reveal underlying mechanisms of genotoxic thresholds, *Genes and Environment*, 34, 146-152 (2012)
 9. Wu Y, Qi X, Gong L, Xing G, Chen M, Miao L, Yao J, Suzuki T, Furihata C, Luan Y, Ren J, Identification of BC005512 as a DNA damage responsive murine endogenous retrovirus of GLN family involved in cell growth regulation. *PLoS One.* 7, e35010. 2012
 10. Watanabe T, Suzuki T, Natsume M, Nakajima M, Narumi K, Hamada S, Sakuma T, Koeda A, Oshida K, Miyamoto Y, Maeda A, Hirayama M, Sanada H, Honda H, Ohyama W, Okada E, Fujiishi Y, Sutou S, Tadakuma A, Ishikawa Y, Kido M, Minamiguchi R, Hanahara I, Furihata C. Discrimination of genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens by statistical analysis based on gene expression profiling in the mouse liver as determined by quantitative real-time PCR. *Mutat Res.*, 747, 164-175. 2012
 11. Suenaga K, Takasawa H, Watanabe T, Wako Y, Suzuki T, Hamada S, Furihata C. Differential gene expression profiling between genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens in young rat liver determined by quantitative real-time PCR and principal component analysis *Mutat Res.*, 751, 73-83. 2013i
- 学会発表
1. Mekenyan, P. Petkov1, S. Kotov, S. Stoeva1, V. Kamenska1, S. Dimitrov, M. Honma, M. Hayashi, R. Benigni, G. Patlewicz: Mechanistic Models for in vivo Liver Genotoxicity and in vivo Micronucleus Based on Metabolism Considerations. *QSAR2012 (2012.6)* タリン、エストニア
 2. M. Honma : New ICH S2(R1) Guideline -Revision, Background and Highlight. 2012 International Workshop on Genetic Toxicology. 上海、中国
 3. M. Honma : Risk Assessment on Management of genotoxic Impurities in Pharmaceuticals (2012.8) International Workshop on Genetic Toxicology. 上海、中国
 4. M. Honma: Risk assessment and management of genotoxic impurities in

- pharmaceuticals. The 3rd Asian Conference on Environmental Mutagens (2012.10) 杭州、中国
5. 本間正充: 遺伝毒性を如何に評価, 解釈するか? -HESI-IVGT プロジェクト- 日本環境変異原学会第 41 回大会(2012.11)静岡県静岡市
 6. 本間正充: 医薬品に含まれる遺伝毒性不純物の安全性評価と TTC の考え方 第 10 回食品安全フォーラム(2012.11) 東京
 7. 兼丸祐紀, 鴨下渚, 佐々彰, 本間正充, 安井学: ゲノムの特定部位に導入させたプロモ化 DNA 付加体の突然変異誘発能の解析. 日本環境変異原学会第 4 1 回大会, 静岡市 (2012.11)
 8. Manabu Yasui, Yuki Kanemaru, Nagisa Kamoshita, Akira Sassa, and Masamitsu Honma: Mutation analysis of site-specific brominated DNA adducts located in the genome of human lymphoblastoid cells. Mammalian DNA Repair in Gordon Research Conferences, Ventura (CA), USA (2013.2)
 9. 續 輝久, 朴 晶淑, 磯田拓郎, 中津可道: 酸化ストレス誘発発がんの抑制に関与する分子機構の解明- Msh2 遺伝子欠損マウスにおける消化管発がんの解析を中心として. 日本生化学会第 85 回大会, 福岡, 2012. 12.15.
 10. 日高真純, 佐野しおり, 藤兼亮輔, 林 徳豪, 坂上竜資, 中津可道, 續 輝久, 関口睦夫: 発がんを抑制するアポトーシスの誘導機構. ワークショップ: ゲノムの安定性と発がん・老化の抑. 日本分子生物学会第 33 回年会, 福岡, 2012. 12.11.
 11. 大野みずき, 作見邦彦, 福村龍太郎, 榎藤洋一, 田口健一, 續 輝久, 中別府雄作: 酸化損傷塩基の修復機構を欠損するマウス家系の解析. 日本分子生物学会第 33 回年会, 福岡, 2012. 12.11.
 12. 大野みずき, 作見邦彦, 福村龍太郎, 榎藤洋一, 續 輝久, 中別府雄作: 酸化損傷塩基の修復は生殖細胞ゲノム変異を抑制し同系交配によるマウスの表現型の安定性に寄与する. 日本環境変異原学会第 41 回大会, 静岡, 2012. 11.29.
 13. 續 輝久: 遺伝子欠損マウスでの低用量化学物質投与による酸化ストレス誘発の消化管発がん. 日本放射線影響学会ワークショップ, 磐梯熱海, 2012. 10.31.
 14. Mizuki Ohno, Kunihiko Sakumi, Teruhisa Tsuzuki, Yusaku Nakabeppu, Influence of 8-oxoguanine on mitotic and meiotic chromosome, The 10th International Symposium on Chromosomal Aberrations (ISCA-10), Amalfi, Italy, 2012. 10.20.
 15. 大野みずき, 作見邦彦, 福村龍太郎, 榎藤洋一, 續 輝久, 中別府雄作: 8-オキソグアニンの修復機構を欠損するマウスは、生殖細胞ゲノム中の突然変異頻度の上昇と遺伝性の変異形質を呈する. 日本遺伝学会第 84 回大会, 福岡, 2012. 9.25.
 16. 續 輝久: Mutyh 遺伝子欠損マウスでの低用量化学物質による酸化ストレス誘発の消化管発がん, 特別シンポジウム: 放射線規制値の科学的根拠. 日本放射線影響学会第 55 回大会, 仙台, 2012. 9.7.
 17. Teruhisa Tsuzuki, Jing Shu Piao, Noritaka Matsumoto, Yoshimichi Nakatsu, The roles of mismatch repair system and p53 in the suppression of oxidative stress-induced intestinal tumor-formation in mice., 4th US-Japan DNA Repair Meeting, The National Conference Center, Leesburg, VA, USA, 2012. 4.12.
 18. 山田雅巳, 高宗万希子, 増村健一, 能美健彦, 大腸菌 mutM/mutY 二重変異株のゲノムに蓄積した突然変異の 3 か月間の推移の次世代シーケンサーによる解析, 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡(2012.12)
 19. 須井哉, 川上久美子, 根岸沙記, 山田雅巳, ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験法の検討 8. 日本環境変異原学会第 41 回大会, 静岡 (2012.11)
 20. 山田雅巳, 高宗万希子, 松田知成, 次世代 DNA シーケンサーを用いた変異原性試験の開発 -変異スペクトラムの特徴-, 日本環境変異原学会第

41 回大会, 静岡(2012.11)

21. 松田知成, 松田陽子, 高宗万希子, 山田雅巳,
次世代 DNA シーケンサーを用いた変異原性試験の開発ーパイロット試験ー, 日本環境変異原学会第 41 回大会, 静岡(2012.11)
22. M. Yamada, K. Masumura, M. Takamune, T. Nohmi, Analysis of mutations accumulated in the genome of E.coli mutator strains using a next-generation DNA sequencer, The 3rd Asian Conference on Environmental Mutagens, China (2012.10)
23. M. Yamada, K. Masumura, T. Nohmi, Mutation accumulation in the whole genome of E. coli mutator strains, UKEMS 35th annual meeting, UK (2012.7)
24. 鈴木孝昌: 我々は既に被曝していた (放射線リスクに関する HP の紹介) 平成 24 年度 環境変異原学会公開シンポジウム (2012.5) 東京
25. 鈴木孝昌: Omics approach for the biomarker of genotoxicity by aristolochic acid. 韓国毒性学会、公衆衛生学会合同国際シンポジウム (2012.6) ソウル
26. 鈴木孝昌、田邊思帆里、山口鉄生、鈴木和博: MYBPC2 はヒト骨格筋筋芽細胞の筋分化マーカーとなる 第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.6) 横浜
27. 鈴木孝昌、小原有弘、松本真理子、広瀬明彦、林 真、本間正充: ジメチルアニリン異性体のマウスでの変異原性 日本環境変異原学会 第 41 回大会 (2012.11) 静岡

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

II. 分担研究報告書

平成 24 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価法に関する研究

分担研究課題名：リスクレベルに基づく遺伝毒性評価法の提言
-遺伝毒性発がん化学物質のリスク評価と閾値-

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 部長

研究要旨

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。ここではこれまでの発がん物質のリスク評価の際に用いられてきた「遺伝毒性」と「閾値」に関するこれまでの議論をまとめた。

キーワード：閾値、遺伝毒性、化学発がん物質、用量反応関係、リスク評価

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、残留農薬や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。多くの化学物質の毒性は、健康リスクを評価する場合、理論的、実証的研究から、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」がある用量反応モデルが用いられてきた。これにより一日摂取許容量（Acceptable Daily Intake; ADI）を定めることができる。しかしながら、その化学物質の発がん性が問題となり、

さらに遺伝毒性が認められるとやっかいである。他の毒性と異なり遺伝毒性には閾値がないとされているため、摂取量をゼロにしない限り、健康リスクもゼロのならないとの論理から ADI を設定することができない。ここに遺伝毒性発がん物質のリスク管理の問題点がある。本研究では、これまでの発がん物質のリスク評価の際に用いられてきた「遺伝毒性」と「閾値」に関するこれまでの議論をまとめた。

B. 研究方法

米国産業衛生専門家会議 (ACGIH)、ドイツ MAK 委員会 (MAK)、ヨーロッパ環境変異原学会 (EEMS)、環境保健科学研究所 (HESI)、ICH-M7 専門家委員会での論議等を基に、遺伝毒性・変異原性の定義、閾値の定義、閾値の存在条件、閾値に替わる評価手法等を調査した。

(倫理面への配慮)

本研究は文献調査に基づくものであり、倫理上の問題はない。

C. 研究結果および考察

a) 遺伝毒性とは？

遺伝毒性 (Genotoxicity) は遺伝子の本体である DNA や染色体に対する毒性である。その定義は曖昧かつ広義であるが、一般には「DNA や染色体の構造的、もしくは量的変化を引き起こす性質」を言う。別の言葉として変異原性

(Mutagenicity) があるが、こちらは遺伝毒性に比べて狭義であり、主として DNA や染色体に対する損傷の結果として生じる突然変異等の誘発能を示す。変異原性が最終的な遺伝的影響を示すものであり、それ以外の遺伝毒性は DNA や染色体が何らかの影響を受けたことによる一過性の変化であることが多い。遺伝毒性は他の毒性と異なりそれ自体の毒性の実態をつかむことができない。肝毒性、神経毒性、発がん性などは症状や病変として我々の体で認識できるが、遺伝毒性自体の症状や病変はない。遺伝毒性はその結果として、がんや遺伝性疾患を引き起こす。従って遺伝毒性とはそれら疾患を引き起こすポテンシャルの一つであり、その有無は遺伝毒性試験によって認識される。図 1 に一般的な遺伝毒性試験を示す。遺伝子 DNA はバクテリアからほ乳類まで共通する生命の設計図であり、様々な動物種を用いた試験法が開発されている。また、そのエンドポイントは DNA の損傷、染色体の構造的、もしくは数的変化、遺伝子突然変異等、多岐にわたる。この中で代表的な試験法としてはエームス試験、染色

体異常試験、小核試験 (in vivo) が挙げられる。これら試験は医薬品を初めとする多くの化学物質の安全性を評価する上で必須の試験として義務づけられている。遺伝毒性試験は一般的に、遺伝毒性ハザードの有無を検出する定性的試験法であり、その結果は「陽性」もしくは「陰性」として判定される。しかしながら、毒性には本来、量的相関性があることが常識であり、遺伝毒性のような一義的に陽性、陰性を決定することの方が特殊と言える。従って、遺伝毒性の閾値問題はこの結果の定性的評価法に端を発すると言える。

b) 遺伝毒性発がん物質、非遺伝毒性発がん物質

遺伝毒性試験の目的の一つは化学物質等の発がん可能性を調査するためのスクリーニングである。しかし、遺伝毒性試験で陽性となったからと言っても必ずしも発がん性があるとは限らない。遺伝毒性試験結果とげっ歯類発がん性試験結果の相関性は、試験系によっても異なるが 60~80%程度である。スクリーニングとしての目的上、できるだけ多くの発がん可能性を検出することが求められるため、感度の高い試験法が開発・利用されてきたが、それでも一部の発がん性物質に関しては陰性を示す。これらが非遺伝毒性発がん物質である。がんは遺伝子の病気であり、必ず遺伝的な変化を伴うと考えられるが、これらの物質は自然に生じたがん原細胞の増殖の亢進などを通じてがんの形成を助けるものと考えられる。ホルモン作用をもつ化学物質の一部などがこれに相当する。

遺伝毒性物質にはベンツピレン、アフラトキシン B₁、N-ニトロソ化合物、アルキル化剤などの強力な発がん物質が含まれる。これら化学物質は DNA に直接作用し、切断、架橋、付加体の形成、脱塩基、酸化損傷、アルキル化等を引き起こし、その結果、高い確率で突然変異を引き起こす。一方、遺伝毒性試験で陽性であっても直接 DNA に作用しないものもある。チュブリンの重合阻害剤であるコルヒチンは細胞分裂装置に影響を与え、

染色体異常を引き起こす。また、DNA 修復阻害、アポトーシス抑制、細胞周期停止などを引き起こす化学物質も遺伝毒性試験で陽性を示すことがある。これら、化学物質のターゲットは DNA ではなくタンパク質であり、非 DNA 損傷性遺伝毒性物質と定義することができる。In vitro 遺伝毒性試験は陽性反応を示しやすく、その毒性メカニズムが不明であることもある。強い細胞毒性、高浸透圧、沈澱の生成、非生理的 pH などは非特異的な影響により陽性反応を示すこともあるので注意を要する。通常、一つの遺伝毒性試験の結果から遺伝毒性の有無を判定することは困難であり、複数の試験結果から試験条件や反応の程度などを考慮して判定することが多い。遺伝毒性試験で陰性を示すもの、また陽性を示しても非 DNA 損傷性であるものを総称して非遺伝毒性物質と呼ぶこともある。

c) 閾値とは何か？

「閾値」という用語は、様々に定義されており、多くの場合、曖昧に使用されている。閾値には、本来、定義付けと実証が必要であるが、最近では、閾値は限界値の意味として広範に使用されている。米国産業衛生専門家会議 (ACGIH) は職場での有害化学物質の限界値を確立する上で、実際的アプローチから閾値を定義している。その概念を閾値限界値 (threshold limit value、TLV) と称している。TLV は化学物質の大気中濃度の許容値として用いられ、ほぼすべての労働者が有害な健康影響を受けずに職業人生の毎日に曝露される条件である。この定義には、特定の化学物質に対する生物学的反応レベルには大きなばらつきがあるであろうことが内包される。ACGIH の議長であるマストロマテオ博士 (1981) 「発がん物質の無作用量の問題、すなわち閾値の概念は盛んに議論されているテーマであり、いずれも DNA 修復系及び免疫学的防御系を有する動物及びヒトにおいてそのような閾値があると考える」と発がん物質の閾値を示唆した。ここでの閾値は無作用量 (NEL) の意味であり、TLV とは意味が異なる。

発がん物質の作用機序において閾値の存在を仮定すると、閾値は実験的に作用の認められない量 (NOEL) を見つけ、安全曝露量を導き出すために使用することを意味する。しかしながらこのような閾値 (NEL) は細胞又は分子レベルには無い。細胞レベル、分子レベルでの閾値は TLV で評価されるが、検出限界値との区別ができない。TLV はある化学物質が特定の遺伝毒性を示す時の、その毒性が起らない最大曝露量であるが、それは評価パラメータの 1 つであり、その解釈及び適用性は限定される。

EEMS のキルシュボルダー博士ら (2000) は、閾値を説明する言葉を提案した。①絶対閾値、②真の又は生物学的閾値、③見かけの閾値、④統計的閾値。絶対閾値は「それ以下では細胞がこの物質の存在に気付かない、すなわち、化学物質は存在するが細胞内標的と相互作用を起こさない化学物質の濃度」と定義されている。EU 報告書 (2000) の補遺では、閾値は次のとおり定義されている。「それ以下では一定の作用がみられない、又はその発生が期待されない物質の用量又は曝露濃度。それ以下では恒常性変化が有害作用を逆行可能な摂取量及び用量、それ以下では恒常性変化が代償不可能である摂取量及び用量、それ以下では刺激認知可能でなくなる摂取量」。この広い解釈は、生理学的平衡を許容範囲内で妨害又は変換され得るエンドポイントとして考慮している。非遺伝毒性発がん物質評価において、これら定義は重要である。2003 年のドイツ臨時リスク委員会の最終報告書の用語解説における「閾値」は「用量反応曲線で背景ノイズに達する前に認められる、ゼロ作用から測定可能な作用に変化する際に発生する場合、特に意義のある段階の値」とされている (2003)。この定義はリスク評価における背景負荷の役割を強調し、作用の変化には顕著な段階が必要であることを強調しているが、生理学的作用の平衡の許容可能な変化を上回ることの役割を説明するものではない。多くの定義は、「閾値」が NEL に相当する限界値との理解で使用されている。

d) 遺伝毒性物質に閾値はあるのか？

遺伝毒性物質が DNA と反応し遺伝子突然変異をもたらす。突然変異は確率論的 (Stochastic) 事象であり 0 になることはない。また、たった一つの遺伝子突然変異でも、その変異が、がん遺伝子、がん抑制遺伝子などの細胞のがん化に重要な遺伝子に生じた場合、1 つのがん原細胞が生じ、それだけで発がんに至ることがある。従って、この発がんの確率も 0 にはならず、理論的に遺伝毒性発がん物質に閾値を設定することはできない。一方、タンパク質に作用する非遺伝毒性発がん物質に関してはどうかであろうか？1 つの細胞中には遺伝子は多くても 2 コピーしか存在しないのに対して、タンパク質分子は数多く存在する。高濃度の化学物質が多くのタンパク質と作用すれば発がんに至る影響が表れるかもしれないが、少数であれば影響はないことは容易に想像できる。このようなことから非遺伝毒性発がん物質に関しては理論的に閾値が設定できる。また、いくつかの実験により非遺伝毒性発がん物質の閾値の存在は証明されており、多くの専門家はこの問題に関して異論はない。問題は遺伝毒性発がん物質の閾値である。

遺伝毒性発がん物質の発がん性、遺伝毒性、DNA 付加体の形成に閾値が存在するかどうかの検討が多くの研究者によって動物実験等によってなされている。低用量において、標的組織中の DNA 付加体濃度が腫瘍発生率と線形形で相関することを示すことができれば、このエンドポイントで閾値の存在を排除することができる。一方、非線形型の用量反応性を示せば閾値の存在が示唆される。代謝の不活化又は DNA 修復の飽和を考慮したトキシコキネティクスが非線形型の用量反応性をもたらすことを予測させる。この結果として用量反応関係は「ホッケースティック」の形となるべきである。この仮説は実験的に検討可能であるが、重要な問題は、異なる細胞内標的との反応の割合は低用量で変化するか、ということである。低用量では核 DNA と反応する重要な代

謝物の割合は、核外 RNA 又は重要ではない蛋白質と反応する割合よりも小さくなるべきである。

実験としては、高度に放射性標識した発がん性遺伝毒性物質を動物に投与し、核内 DNA、RNA、蛋白、及び細胞外蛋白としてヘモグロビンへの共有結合を測定する。アフラトキシン B1 やベンツピレン、または芳香族アミンであるトランス-4-ジメチルアミノスチルベンを動物に投与した場合、測定可能な高分子付加体が生成される最低用量は最低発がん性用量をはるかに下回った。また、低用量から高用量まで多くに標的臓器での DNA : RNA : 蛋白結合比は変化しなかった。これは明らかに、広い用量範囲において、反応性代謝物の代謝活性化及びバイオアベイラビリティが変化しなかったことを示している。つまり、トキシコキネティクスも一次反応プロセスに従っている。DNA 付加体の形成は化学反応であり、DNA と反応する化学物質が存在する限り形成を否定できないため閾値がないとするのが一般的であろう。

通常の遺伝毒性試験で、遺伝毒性の閾値の存在を証明するには、動物に投与する遺伝毒性物質の用量を段階的に下げて、無作用量が存在するかどうかを、様々な遺伝毒性のエンドポイントで検出する方法が取られている。遺伝子突然変異試験の場合、無作用量とは自然誘発突然変異レベルを示す。このような実験は千~十万倍の用量域で行うため、用量を対数換算して表示することがしばしば見られる。図 2 は $y = ax + b$ の用量相関性を示す反応の 2 つのグラフを示す。これは閾値無しモデルであるが、対数表示だと閾値があるように見える。これは錯覚であり、このような図から閾値を論じるべきではない。同様に、低用量域ではその増加量が極わずかで有意差がないため閾値と見なすとする論理もあるが、これも正しくない。それは試験の検出力が乏しく、自然突然変異の変動が大きいため統計的に有意にならないだけである。先に述べたように遺伝毒性は遺伝毒性試験によって認識される。全ての試験には検出限界があり、用量を段階的に下げて、無作用量が存在す

るかどうかを見るという戦略は、閾値よりもむしろ、検出感度を見るに過ぎない。そもそも（閾値の）存在を、非検出をもって証明することが、論理的に無理があるように思われる。

一方、極低用量域では高用量域からの一義的外挿では説明できない生物学的反応が効率的に働くため閾値を設定できるとの説もある。ここでの生物学的反応とは DNA 修復、代謝反応、スカベンジャーなどの防御機構が考えられる。このような生体防御機構は遺伝毒性の発生確率の低減化には寄与するが、閾値を作る根拠にはならない。DNA 付加体の除去には塩基除去修復機構が働き、これは一般にエラー非発生型の修復機構であるが、 10^{-6} 以下の発生頻度でエラーが起き、突然変異を引き起こす。同様に、化学物質の無毒化に働く薬物代謝や、スカベンジャーも 100%の効率で働くという保証はない。先に述べた様に付加体形成に閾値が無いことは、トキシコキネティクスも一次反応プロセスであることを示す。

このような科学的・理論的解釈では閾値を設定できないが、現実的には極低用量の遺伝毒性反応は、自然に起きる反応と区別をすることが困難であり、閾値と見なしてもいいのではないかという考え方もある。一般に遺伝子突然変異試験の自然突然変異頻度は 10^{-6} 程度であり、一定のばらつきをもつ。この原因として、酸化ストレス、老化等の内的要因や、環境中に極微量存在する試験物質以外の化学物質や放射線、紫外線などの影響が考えられる。これにより、自然に起きる遺伝毒性反応内に収まるようなレベルを「現実的閾値

(practical もしくは pragmatic threshold)」とするものである。しかし、これは閾値とは別の問題である。現実的閾値の考えはある種の妥協であり、専門家の中でもこの考えは合意に至っていない。従って、発がん物質が、遺伝毒性試験陽性、特にそれが発がん標的組織であれば、その発がん性に閾値を設定することはできず、ADIのような安全量を設定することはできない。

e) 遺伝毒性の定量的評価

先にも述べたが、遺伝毒性結果は「陽性」もしくは「陰性」として判定され、遺伝毒性ハザードの有無を評価するのが一般的である。環境保健科学研究所 (HESI) の遺伝毒性試験プロジェクト (GTTC)・定量的評価グループは、従来の「ハザードの同定」を目的とした遺伝毒性評価を「リスク評価」に転換すべく、試験結果の定量的評価法を試みている。これまでの毒性試験と同様、もしくはその代替パラメータを開発し、ヒト発がんリスクへの適用を目指す。ここでは他の毒性と同様に遺伝毒性試験から得られた用量-反応評価の結果から、ヒトでの通常の摂取量領域における健康影響評価基準値等を設定する際の毒性反応曲線の基準となる出発点の値として POD (point of departure) を求める。遺伝毒性の場合 POD としては、No-observed Genotoxic Effect Level (NOGEL)、Threshold effect level (Td)、Benchmark dose (BMD) がある。

NOGEL : 適切な陰性対照群と比較して統計的に遺伝毒性反応を示さない最高用量と定義する。理想的には、NOGEL を求めるための統計的手法を特定すること、データセットと検出力が明らかであることであるが、現実には困難である。NOGEL 値を決定するための標準アプローチとしては以下の手法が推奨される。データは SPSS のバージョン 16.0.1 の使用し、 $\alpha=0.05$ での片側 Dunnett 検定に従い分散分析 (ANOVA) により評価する。この解析により陰性対照と統計的に差がある用量と差がない用量を区別できる。これから統計的に差が無い用量の最高用量を NOGEL と定義する。次の用量は LOGEL である。データは必要に応じて Log または平方根に変換することができる。

Td: 閾値を意味するが定義は異なる。ここでは「閾値効果レベル」(Td) とし、これはそれ以下では反応が陰性対照と区別することができず、かつ、それ以上では陰性対照と比べて反応を認めることができる統計的に決定できる用量である。Td 値は、用量反応性の数学的モデルによって導かれ、異なる用量で実験の応答データの統計分析に適

用された規準に基づく。2相性のホッケースティックモデル、およびブロークンスティックモデルが特別にデザインされている。線型モデルが統計的に否定された場合はTd算出のためにより複雑なモデルが必要かもしれない。実際のTd値は「ホッケースティック」パッケージを使用して計算する。具体的に言うと、以下の4つのステップからなる結合型評価によって導かれる。

- (1) 陰性対照群との比較
- (2) 線形用量反応性の否定(全用量範囲)
- (3) NOGEL 以下が勾配0の用量反応性であること
- (4) 信頼限界を含む閾値を計算するためにルッツ/ルッツによって開発された閾値ソフトウェアの適用。

具体的な4段階の統計的処理によるデータ分析は以下の通りである。まず、log-logとliner-logのデータの扱いの問題を回避するため、データはすべて変換せずに解析する。段階1は、SPSSのバージョン16.0.1による片側ANOVA検定を行う。もしそれが著しい違いを示さなければ、対照群を一つにまとめる。段階2は、決定係数(R²(SPSSのバージョン16.0.1))を使用して、線形・二次のモデルを比較検定する。この場合、f分布はマイクロソフト・エクセルを用い、P値を計算する。段階3は、未変換あるいは対数変換データ(SPSSのバージョン16.0.1)上で片側のDunnett検定を行い、NOGELとLOGELを決定する。線形・二次のモデルはNOGELと比較する。NOGELまではフラット、もしくはゼロ増加の場合は2相性もしくはホッケースティック解析に適切と判断する。段階4は、ルッツ/ルッツによって推奨されたRパッケージ・ソフト(バージョン12.2)を使用して、ホッケースティックモデルと線形モデルを比較する。

BMD: BMDアプローチは用量反応性データの数学的モデルに基づき、NOAELアプローチの改良型として提案させている。このアプローチは、がんおよび非がん性病変の両者にPODを決定する手法として毒物学の他の分野の中で広く利用さ

れている。

BMDアプローチは、陰性対照に対して何らかの生物学的反応が現れる用量(BMD)を推定する。このアプローチはサンプル数や反応曲線などを考慮に入れた因子を取り入れた数学的用量反応モデルを採用している。また、わずかな反応性(BMR)、重要な反应用量(BMD)をデータの変換を行わず推定することができる。BMRは連続したエンドポイントの場合は、適合モデルで推定された陰性対照に対する%の変化(3%、10%)として表される。BMDの信頼上限曲線における用量の95%信頼下限値がBMDLである。BMDL10は連続性エンドポイントの陰性対照に比べて10%増加する95%信頼下限値である。この方法では少ない動物数の試験でも統計学的信頼性に関する補正ができ、より安全側からの推定ができる(信頼下限値を用いているので、データの質および統計学的考え方が含まれる)。つまり、同じ用量反応曲線を描く場合でも、動物数が少ない場合や、データのバラツキが大きい場合には信頼限界の幅が広くなり、BMDLはより低い値となって、より安全側に推定されることとなる。遺伝毒性の用量相関データは線形および二次反応として解析されているため、BMD手法でモデル化できる。

BMDL10値は用量反応モデリング・パッケージ・ソフトPROASTで計算できる。これは、オランダの国立公衆衛生・環境保護研究所(RIVM)で開発された。このプログラムはアメリカEPAのBMDSソフトウェアと類似している。また2つのパッケージ・ソフトのアルゴリズムも共通している。

f) 遺伝毒性発がん物質のリスク管理

先に述べた遺伝毒性の定量的評価法は将来遺伝毒性発がん物質のリスク評価に大きく貢献できると考えられる。閾値の有無にかかわらず適切なリスク評価を行うことが理想である。しかしながら、現時点では閾値の有無が未だ重要な争点である。それでは、現在、遺伝毒性発がん物質に閾値が設定できなければそのリスク管理はできな

いのであろうか？米国においては1958年に「発がん性の可能性がある化学物質はいかなる低用量でも安全とみなすことはできない」という、いわゆるデラニー条項により、動物に対して発がん性を示す農薬が残留する加工食品の販売が禁止され、その後、適用範囲が着色料、動物用薬品、飼料に拡大された。しかしながら、このゼロリスク思想は現実的には多くの矛盾点があった。主な矛盾点としては、①分析技術の進歩により、微量な化学物質も検出可能となり、検出限界である安全レベルがどんどん低くなってしまふこと。②発がん性の有無だけが強調されているため、他の毒性が低くて、安全性の高い化合物ができて、わずかの発がん性のため代替できないこと。③人工化学物質のみを対象としているため、天然由来の発がん物質は無視されていること。④動物実験の発がん性試験は、必ずしも人に対する発がん性と一致しないこと、などが挙げられる。これらのことから、1996年「食品品質保護法」の制定とともにデラニー条項は廃止された。

閾値を設定し、ゼロリスクを追求するのに対して、「発がん可能性がある化学物質が十分に低濃度であれば、その発がん可能性は極めて小さくなり、その程度が社会的に許容できるリスクレベルであれば実質的に安全と見なし得る」とのリスク管理の方法もある。この量を実質安全量 (Virtual Safety Dose: VSD) といい、そのリスクレベルを「無視しうる (Negligible)」、もしくは「許容できる (Acceptable)」リスクとする。ここでの許容できるリスクとしてのがんの生涯リスクレベルは一般的に百万分の1 (10^{-6}) が採用されている。 10^{-6} の生涯リスクとは日本の人口 (10^8) と、平均寿命 (80) から計算すると ($10^8 \times 1/80 \times 10^{-6} = 1.25$) 1年間に1.25人のがんによる死者が増えることを意味する。がんは今や先進諸国では死亡原因の1位であり、我が国においても年間約35万人が、がんで死亡していることを考慮すると1.25人の増加は社会的に許容できると言えよう。VSDは一般に齧歯類を用いた発がん試験で得られた半数がん誘発用量 (TD50) からマルチステ

ージモデル、もしくは直線外挿により得られる (図3)。このような発がん化学物質を生涯発がんリスクレベルで評価し、管理に用いる手法は、現在、水道水や大気中に含まれる汚染物質の新しい環境基準値の設定に用いられている。

Cheesemanらは約500種類の発がん化学物質に関する動物実験でのTD50からVSDを算出し、その算定暴露分布の結果から、ほとんどの発がん化学物質については $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ (0.5ppb)以下の食事中濃度で百万分の1のがん生涯リスクよりも低くなることを示した。一人の1日食事量を3kg (固形食品1.5kg、飲料1.5kg)とし、その化学物質が全食事にむらなく入っていると仮定すると、1日暴露量は $1.5 \mu\text{g}/\text{人}$ と計算できる。つまり、大部分の化学物質については一日の摂取量が $1.5 \mu\text{g}/\text{人}$ 以下であれば、たとえそれが発がん物質であっても実質的な健康危害はほとんどないだろうとすることができる。このような包括的な閾値を「毒性学的懸念の閾値 (Threshold of Toxicological Concern: TTC)」という。TTCは化学構造を考慮すればその毒性がわかっていないものも含め多くの化学物質に適用できる。我が国では食品衛生法に基づき残留農薬のポジティブリスト制が導入されたが、ここでは残留基準値が設定されていない農薬に関しては一律基準値として 0.01ppm が設定された。この値もTTC ($1.5 \mu\text{g}/\text{人}$)に基づくものであり、個々の農畜産物の一日摂取量はお米を除いて150gを超えることがないという国民栄養調査から計算されている ($1.5/150 = 0.01$)。TTCはすでに米国FDAがプラスチック容器から溶出する化学物質 (間接添加物)のリスク管理に用いており、またJECFA

(FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会)は食品に添加する香料物質に適用している。

しかしながら、TTCレベルはその発がんが疑われ、さらに遺伝毒性があった場合にはより慎重な取り扱いが必要となる。Kroesらは600以上の発がん化学物質を比較して、TTCを $1.5 \mu\text{g}/\text{人}$ とした場合、遺伝毒性、もしくは要注意構造をもつ遺伝毒性物質の幾つかについて高い発がんリスク