

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

化学物質の安全性評価に必要とされる遺伝毒性試験のデータは、従来「陽性」か「陰性」かの定性的な二分法で解釈され、用量-反応関係は分析されてこなかった。本研究では、*in vitro* トランスジェニック突然変異（TG）試験データの定量的な用量-反応関係を用いて、発がんリスク評価法の開発を試みた。肝臓に腫瘍を誘発することが知られている遺伝毒性発がん物質である 2-アセチルアミノフルオレン（2-AAF）、2,4-ジアミノトルエン（2,4-DAT）、ジメチルニトロサミン（DMN）、ジエチルニトロサミン（DEN）についてトランスジェニックマウス（MutaTMMouse）を用いて肝臓における遺伝子突然変異誘発性（TG試験）を実施し、用量-反応曲線の分析および出発点（POD）となる測定基準として、遺伝毒性無作用量（NOGEL）、ベンチマーク用量（BMD₁₀）を算出した。発がん性試験結果はカリフォルニア大学の発がん能力データベース（CPDB）から抽出し、TD₅₀ 値から発がんのベンチマーク用量（CARC-BMDL₁₀）を計算した。両者のベンチマークドーズは量的相関性が高く、互いに外挿可能であった。このことから、発がん性データが十分でない場合でも、TG 試験結果から発がんリスクを評価できる可能性が示唆された。

キーワード：変異原性、リスク評価、低用量、ベンチマーク用量、出発点、無遺伝毒性影響濃度、用量-反応

A . 研究目的

遺伝毒性の評価は、化学物質の安全性評価の重要な構成要素である。従来、遺伝毒性学者は、遺伝毒性の検出のために、一連の遺伝毒性試験を実施してきた。*In vitro* および *in vivo* における遺伝毒性をスクリーニングする試験には通常、(1) 細菌を用いる *in vitro* 遺伝子突然変異試験、(2) 培養哺乳類細胞を用いる *in vitro* 染色体異常試験および/または遺伝子突然変異試験、(3) げっ歯類

骨髄細胞の細胞遺伝学的 *in vivo* 試験、の3種類が挙げられる。こうした試験実施の枠組みは、強力な遺伝毒性物質、および遺伝毒性発がん物質の検出に有効であり、規制のために十分な機能を果たしていることが広く認められている。

ヒトへの暴露に伴うリスク評価の際には、危険有害性スクリーニングの解析結果として、*in vivo* 用量-反応関係を評価する必要性が、規制の上で重要であることが認識されている。しかし、遺伝毒

性は他の毒性とは対照的に、その判定は、「陽性」か「陰性」で分類する定性的方法を基準にしているためこのような定量的解析手法は十分に検討されていない。しかし、遺伝毒性においても、*in vivo* 試験では最大耐量 (MTD) まで、また *in vitro* 試験では細胞毒性および/または濃度の最大限度まで試験を行うという考え方を受け入れている。遺伝毒性試験に比較的高用量/高濃度を用いる理由は、作用の検出能を最大化するためであるが、この方法は有害性の特定には適切であるが、用量-反応曲線に必要なデータが得られない場合、このデータは、遺伝毒性無作用量 (NOGEL) の測定には使用できない。また、さらにこのデータは、現実の暴露レベルにおけるリスク予測にも使用できない。

In vivo 試験では遺伝毒性がないようにみえる化学物質についても、*in vitro* 試験系を用いた実験では、遺伝毒性陽性の知見が得られていることが多くある。このことは、*in vitro* 試験で陽性を示す暴露濃度が *in vivo* 試験で達成可能な実際の暴露レベルに比べはるかに高いこと、また代謝、薬物動態、標的細胞の分布が *in vivo* および *in vitro* 試験系間で異なることを考慮すると、驚くには当たらない。それにも関わらず、ヒトの安全性について無視できる懸念であることを示す毒性データが他に存在しても、*in vitro* 遺伝毒性試験結果が陽性であると、使用禁止および/または開発中止とされてしまうケースが多い。したがって、遺伝毒性試験法では、遺伝毒性データの評価について、より定量的な方法が重要と考える。

本研究では、齧歯類発がん性試験結果と相関性が高いとされるトランスジェニック動物遺伝毒性試験 (TG 試験) 結果から、遺伝毒性リスク評価のための POD (Point of Departure) を導き、試験結果から発がんのリスク評価を行うための手法の開発を行う。TG 試験は代表的な遺伝毒性肝発がん物質 4 種類について実施する。用量相関性を明らかにするため十分な試験用量を確保した試験を実施する。試験結果から遺伝毒性ベンチマークドーズ (TG-BMDL₁₀)、NOGEL を算出し、

遺伝毒性 POD とする。発がん性試験結果はカリフォルニア大学の CPDB から抽出し、TD₅₀ 値から発がんのベンチマークドーズ (CARC-BMDL₁₀) を計算する。両者のベンチマークドーズを比較し、発がんに対する遺伝毒性の関与を検証する。また、発がん性の程度の指標 (TD₅₀) に替わる遺伝子突然変異誘発性の程度の指標を開発し、発がん性データが十分でない場合、遺伝毒性試験結果から発がんリスクを評価する手法を提案する。

B. 研究方法

トランスジェニック突然変異 (TG) 試験

2-アセチルアミノフルオレン (2-AAF)、2,4-ジアミノトルエン (2,4-DAT)、ジメチルニトロサミン (DMN)、ジエチルニトロサミン (DEN) についてトランスジェニックマウス (Muta™ Mouse) を用いて肝臓における遺伝子突然変異誘発性 (TG 試験) を実施した。

無遺伝毒性影響濃度

NOGEL (Non-observed genotoxic effect level) とは、遺伝毒性作用の発生率の統計的に有意な上昇が、適切な無処置対照 (すなわちバックグラウンド) に対し認められなくなる、最高の被験用量と定義される。理想的には、NOGEL は、その定義に用いられる試験の統計的検出力に関係する。TG 試験データは分散分析 (ANOVA) により評価後、SPSS v16.0.1 を用い $\alpha=0.05$ として片側 Dunnett 検定を行った。本分析では、ある用量による反応が、同時無処置対照サンプルの反応と統計的に識別不能となる場合、その用量を特定した。対象エンドポイントとバックグラウンドとの有意差が認められない最高用量を NOGEL と特定した。

ベンチマーク用量

BMD による定量法は、用量-反応データの数学モデリングに基づくものであり、無毒性量 (NOAEL) による方法の改善版として提唱された。本定量法は毒性学の他の分野に広く用いられ、発がんと非がんの両エンドポイントについて

POD の値を定義してきた。BMD による定量法では、所定の生物学的関連性があると考えられる、対照を上回る程度の反応の上昇（すなわち、ベンチマーク反応（BMR））をもたらす用量（すなわち BMD）について予測する。本定量法では、標本数や用量-反応曲線の形状などの因子を考慮する用量-反応の数学モデリングを用い、測定可能なわずかな作用（すなわち BMR）および作用を生じる臨界用量（すなわち BMD）について、データ変換を必要とせず予測する。連続的なエンドポイントの場合、BMR は、適合モデルにより予測されるバックグラウンドの反応（すなわち陰性対照）との比較から得られるパーセンテージの変化（例えば 5%または 10%の変化）のことであり、一方、非連続的なエンドポイントの場合、BMR はバックグラウンドの発生率との比較から得られる発生率の特異的上昇（例えば、付加リスクまたは超過リスク）となる。BMD の片側 95% CI の下限値をベンチマーク用量信頼下限値（BMDL）と言う。このうち、BMDL₁₀とは、連続的なエンドポイントの場合、適合するバックグラウンドレベルより 10%の上昇をもたらす用量の 95%下側 CI 予測値であり、非連続的なエンドポイントの場合、10%の超過リスクの同予測値である。BMDL は、入手可能なデータ範囲を下回る用量-反応データについて外挿する場合、適切な POD とみなされることが多い。遺伝毒性に関する用量-反応データは、データセットが用量依存的な傾向を示す場合、二項対立の（非連続的な）反応と連続的な反応の双方を分析可能であることから、BMD の方法論によりモデル化できる。BMD 予測値は、予測用量に伴う作用の大きさを予測できる点で、NOGEL 値とは異なる。

BMDL₁₀ の計算には、オランダ国立公衆衛生環境研究所（RIVM）で開発された用量-反応モデリングソフトウェアパッケージ PROAST（www.proast.nl；v26.4、28.1、28.3）もしくは米国環境保護庁の BMDS ver2.5 ソフトウェアが用いられる。本研究では後者を用いた。

げっ歯類発がん試験データ

4 種類の遺伝毒性発がん物質の発がんデータは Carcinogenic Potency Database（CPDB）から得た。マウスを用いた試験の中から、信頼性が高く、且つ TD₅₀ の値が最も低い試験データを参照した。マウスでの試験データが無い場合にはラットでの試験データを用いた。

遺伝毒性 BMD₁₀ 値とがん原性 BMD₁₀ 値の比較

発がん試験、TG 試験で得られた用量反応データから、BMD₁₀ およびその信頼区間を導いた。両 BMD₁₀ のプロットし、y 方向および x 方向の偏差を乗じて合計する積和法（y 方向の偏差のみを小さくする二乗和法の逆）を用いて、（もとのスケールでは 0 で交差した）直線性の適合を検討した。適合した線から、発がん-BMD が TG-BMD に比例することが推定された。

（倫理面への配慮）

本研究で、動物を用いる実験は国立医薬品食品衛生研究所、および試験委託機関の各規定に基づき、動物実験（倫理）委員会の承認を得て実行されたものである。

C . 研究結果

肝臓に腫瘍を誘発することが知られている遺伝毒性発がん物質である 2-アセチルアミノフルオレン（2-AAF）、2, 4-ジアミノトルエン（2,4-DAT）、ジメチルニトロサミン（DMN）、d) ジエチルニトロサミン（DEN）についてトランスジェニックマウス（MutaTMMouse）を用いて肝臓における遺伝子突然変異誘発性（TG 試験）を実施した（図 1）。試験結果から、遺伝毒性無作用量（NOGEL）、遺伝毒性ベンチマークドーズ（TG-BMDL₁₀）を求めた。

a) 2-アセチルアミノフルオレン（2-AAF）

文献より得られた情報から 90.0 mg/kg/day を最高用量とし、30.0、10.0、3.00、1.00 および 0.300 mg/kg/day の計 6 用量を被験物質群として設定した。各群 6 匹に 1 日 1 回、28 日間連続強制経口投与した。90.0 mg/kg/day 群において

は投与 13 日目に死亡が 1 例認められた。最終投与後 3 日に各群 5 匹から肝臓および膀胱を摘出し、肝臓について lacZ assay による遺伝子突然変異体頻度を求めた。その結果、2-AAF の 90.0 mg/kg/day 投与群において、遺伝子突然変異体頻度に、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。以上の結果から、当該試験条件下において、2-AAF はトランスジェニックマウスに対して遺伝子突然変異誘発性を示すものと判定された。また、遺伝毒性無作用量 (NOGEL) は 30 mg/kg/day、遺伝毒性ベンチマークドーズ (TG-BMDL₁₀) は 2.99 mg/kg/day と計算された。

b) 2, 4-ジアミノトルエン (2,4-DAT)

文献より得られた情報より 80.0 mg/kg/day を最高用量とし、40.0、20.0、10.0、5.00 および 2.50 mg/kg/day の計 6 用量を被験物質群として設定した。各群 6 匹に 1 日 1 回、28 日間連続強制経口投与した。最終投与後 3 日に各群 5 匹から肝臓および大腿骨を摘出し、肝臓について lacZ assay による遺伝子突然変異体頻度を求めた。その結果、2, 4-DAT の 80.0 mg/kg/day 投与群において、遺伝子突然変異体頻度に、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。以上の結果から、当該試験条件下において、2, 4-DAT はトランスジェニックマウスに対して遺伝子突然変異誘発性を示すものと判定された。また、遺伝毒性無作用量 (NOGEL) は 40 mg/kg/day、遺伝毒性ベンチマークドーズ (TG-BMDL₁₀) は 3.33 mg/kg/day と計算された。

c) ジメチルニトロサミン (DMN)

生存率低下が認められた文献情報と、用量設定試験を基に、3.00 mg/kg/day を高用量とし、1.00、0.300、0.100、0.0300 および 0.0100 mg/kg/day の計 6 用量を設定した。各群 6 匹に 1 日 1 回、28 日間連続強制経口投与し、3 日間の遺伝子突然変異発現期間をおいた後、肝臓および肺を摘出し、肝臓について lacZ assay により遺伝子突然変異体頻度を求めた。その結果、DMN の 0.300、1.00 および 3.00 mg/kg/day 群において、用量依存的な遺伝子突然変異体頻度の増加が認められ、陰性

対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。以上の結果から、当該試験条件下において、DMN はトランスジェニックマウスの肝臓に対して遺伝子突然変異誘発性を示すもの (陽性) と判定された。遺伝毒性無作用量 (NOGEL) は 0.1 mg/kg/day、遺伝毒性ベンチマークドーズ (TG-BMDL₁₀) は 0.0138 mg/kg/day と計算された。

d) ジエチルニトロサミン (DEN)

用量設定試験を基に、最大耐量の 10.0 mg/kg/day を高用量とし、2.50、0.625、0.156、0.0391 および 0.00977 mg/kg/day の計 6 用量を設定した。各群 6 匹に 1 日 1 回、28 日間連続強制経口投与し、3 日間の遺伝子突然変異発現期間をおいた後、肝臓および肺を摘出し、肝臓について lacZ assay により遺伝子突然変異体頻度を求めた。その結果、DEN の 0.625、2.50 および 10.0 mg/kg/day 群において、用量依存的な遺伝子突然変異体頻度の増加が認められ、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。以上の結果から、当該試験条件下において、DEN はトランスジェニックマウスの肝臓に対して遺伝子突然変異誘発性を示すもの (陽性) と判定された。遺伝毒性無作用量 (NOGEL) は 0.156 mg/kg/day、遺伝毒性ベンチマークドーズ (TG-BMDL₁₀) は 0.0539 mg/kg/day と計算された。

TG 試験で得られた各肝発がん物質の TG 試験結果から NOGEL と TG-BMDL₁₀ を算出した。また、CPDB データから得られたそれら発がん性試験の結果から TD₁₀、および CARC-BMDL₁₀ を計算した。CPDB に複数の試験結果が存在した場合は、データの信頼性が高く、より保守的な値を示すデータセットを用いた。DEN に関してはマウスのデータが無かったためラットのデータを用いた。これらのリスク評価のための POD とし、比較検討した (表 1)。

今回試験した 4 つの遺伝毒性発がん物質のそれぞれの BMDL₁₀ をプロットしてグラフ化した (図 2)。発がん性と TG 変異原性は量的相関性

が高く、TG 試験の BMDL₁₀ から発がん性の BMDL₁₀ を推測できる。データにばらつきがあることを考慮し、10～100 倍の安全ファクターをとることが必要かもしれない。この手法は発がんデータが無い場合でも、TG 試験データから発がんリスク評価ができる可能性を示している。発がん性の発現が遺伝毒性に質的・量的に依存していることが明らかな場合には有効な方法と考えられるが、実現化のためにはさらなるデータの蓄積が必要と考える。

D. 考 察

In vivo 遺伝毒性とがん原性の相関を量的に調べた試験はほとんどない。ここでのアプローチはがん原性試験から予測される等価用量と *in vivo* 遺伝毒性試験から予測される等価用量の相関を可能にする BMD アプローチを採用した点に新規性がある。これまでの TG 試験の多くは、OECD 試験ガイドラインに基づき、4 用量以上の用量群を設けた TG 試験がほとんどない点がこのような解析を不可能にしてきたが、本研究では 7 用量を用いた。

遺伝毒性化合物のリスク評価は、がん原性データがないことが多い。この場合、遺伝毒性発がん物質に対するヒトの許容曝露量を評価するには、別の戦略を練る必要がある。現在、*in vivo* 遺伝毒性試験から得られた用量反応データを用いたハザード特性付けのための量的アプローチまたは半定量アプローチは存在しない。リスク評価のために、遺伝毒性試験の予測強度にもとづき、どの化合物をがんに関する試験にかけるべきで、どれを省略すべきか決定する際、遺伝毒性試験は有用である。本研究で行ったように、遺伝毒性とがん原性の相関をプロットすることは、そうした決定を行う上で有用である。ただし、相関プロットのばらつきと強度予測の不確実性を十分に考慮する必要がある。この場合、10～100 倍の不確実性の考慮が適切かもしれない。TG 試験から観察された BMDL₁₀ を 100 で割ると、対応する腫瘍 BMD₁₀ の控えめな予測値が得られる。がん原

性データがない化学物質の発がんリスクの評価にはこのような控えめな BMD₁₀ の適用が現実的かもしれない。

毒性の初期の分子的反応から、最終的な *in vivo* の病態までの発現プロセスを Adverse Outcome Pathway (AOP) としてとらえ、プロセスの重要な生物学的イベント (Critical Event) を、エンドポイントとして試験法と評価法を構築する Integrated Approach to Testing and Assessment (IATA) 手法が OECD で提唱されている。発がんのプロセスからすると遺伝毒性は初期の分子的反応 (DNA 損傷、突然変異) にあたり、これは発がんに先行しなければならない。しかしながら、これまで遺伝毒性試験と発がん性試験は独立して行われており、このような、時間的な相関性については検討されていない。同様に、今回示した用量的相関性に関しても、検討されてこなかった。理想的には、遺伝毒性試験と発がん性試験の低用量の長期試験を同一動物で同時並行して行い、遺伝毒性の発現用量と発現時期、発がん性の発現用量と発現時期を正確に解析することが必要である。現在の遺伝毒性試験は高用量短期間で試験されており、これはヒトにおける発がん物質の曝露環境と大きく乖離していることはおろか、動物を使った発がん性試験の条件とも乖離している。ヒトに対する遺伝毒性評価と発がんリスク評価の精緻化のためには、現在の遺伝毒性試験のプロトコルの見直しが必要と考える。さらには、OECD の提唱する IATA 手法に則った新たな遺伝毒性試験の開発、及び評価ストラテジーの転換も必要である。

E. 結 論

遺伝毒性試験結果は一般にハザードの同定に使用されるが、リスク評価を目的として遺伝毒性試験結果を定量的に評価する試みが注目されている。4 種類の代表的な遺伝毒性肝発がん物質について、7 用量の用量設定で TG 試験は実施し、その定量的反応性を解析した。試験結果から遺伝毒性ベンチマークドーズ (TG-BMDL₁₀) を算出

し、遺伝毒性 POD とした。発がん性試験結果はカリフォルニア大学の CPDB から抽出し、TD₅₀ 値から発がんのベンチマークドーズ (CARC-BMDL₁₀) を同様に計算した。両者のベンチマークドーズは量的相関性が高く、互いに外挿可能であった。このことから、発がん性データが十分でない場合でも、TG 試験結果から発がんリスクを評価できる可能を示唆された。

F. 参考文献

B.B. Gollapudi, G.E. Johnson, L.G. Hernandez, L.H. Pottenger, K.L. Dearfield, A.M. Jeffrey, E. Julien, J.H. Kim, D.P. Lovell, J.T. MacGregor, M.M. Moore, J. van Benthem, P.A. White, E. Zeiger, and V. Thybaud, Environ Mol Mutagen. 52, 518-28 (2011)

G. 健康危機情報

なし

H. 研究発表

誌上発表

1. Horibata K, Ukai A, Honma M., Evaluation of rats' in vivo genotoxicity induced by N-ethyl-N-nitrosourea in the RBC Pig-a, PIGRET, and gpt assays. Genes and Environment, 36:199-202 (2014)
2. Matsumoto, M., Masumori, S., Hirata-Koizumi, M., Ono, A., Honma, M., Yokoyama, K. and Hirose, A., Evaluation of in vivo mutagenicity of hydroquinone in MutaTMmice. Mutat Res., 775, 94-98 (2014)
3. Morita, T., Miyajima, A., Hatano, A., Honma, M.: Effects of the proposed top concentration limit on an *in vitro* chromosomal aberration test to assay sensitivity or to reduce the number of false positives, Mutation Research, 769,

34-49 (2014)

4. Onami, S., Cho, Y., Toyoda, T., Horibata, K., Ishii, Y., Umemura, T., Honma, M., Nohmi, T., Nishikawa, A. and Ogawa, K. Absence of in vivo genotoxicity of 3-monochloropropane-1,2-diol and associated fatty acid esters in a 4-week comprehensive toxicity study using F344 gpt delta rats. Mutagenesis, 29, 295-302 (2014)

学会発表

1. 本間正充: 医薬品中に存在する遺伝毒性不純物の評価と管理, 第 350 回 CBI 学会研究講演会 2014 年 5 月 東京
2. 本間正充: 日本環境変異原学会レギュラトリーサイエンス WG 活動, 日本環境変異原学会公開シンポジウム 2014 年 5 月 東京
3. M. Honma et al.,: Demonstration of non-threshold of 8-oxoG inducing genotoxicity by targeted mutagenesis, 43rd EEMS Annual Meeting 2014 年 7 月 ランカスター・英国
4. M. Honma: Use of QSAR Tools for Hazard Identification of Genotoxic Impurities in Pharmaceuticals, 9th World Congress on Alternative and Animal Use Sciences (WC9), 2014 年 8 月 プラハ・チェコ
5. 本間正充: インシリコによる医薬品中不純物の安全性評価と、その向上に向けた国際共同研究, CBI 学会 2014 年大会プレミエーション セッション 2014 年 10 月 東京
6. M. Honma: Trend and Progress of OECD Genotoxicity Testing Guidelines, 2014 National Workshop on Non-clinical Safety Evaluation and Quality Management 2014 年 11 月 上海・中国
7. 本間正充: 遺伝毒性インテリジェントテストシステム, 日本環境変異原学会第 43 回大会 2014 年 11 月 東京

8. 本間正充：QSAR を利用した医薬品中の遺伝毒性不純物の評価と管理 ,日本動物実験代替法学会第 27 回大会 2014 年 12 月 横浜
9. M. Honma et al., : Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome, 4th Asian Conference on Environmental Mutagens 2014 年 12 月 コルカタ・インド

H . 知的財産権の出願・登録状況

なし

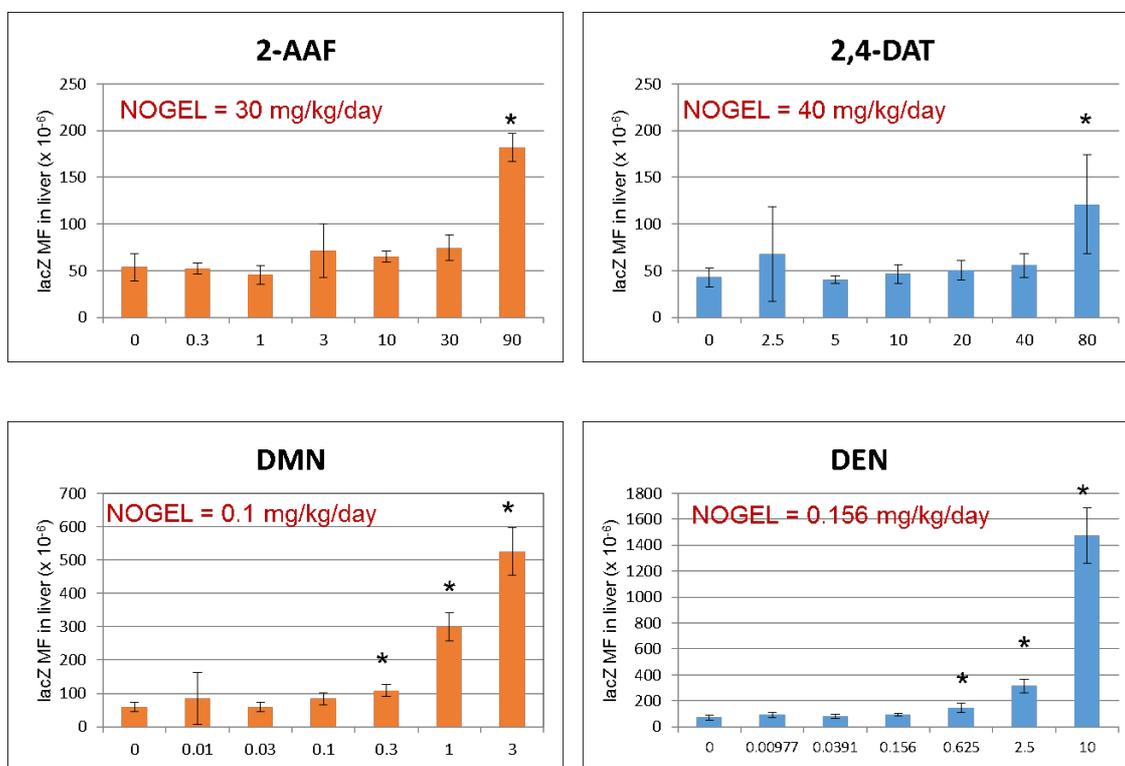


図1 4つの肝発がん物質の肝臓での突然変異の誘発 (Muta™Mouse)

表1 4つの肝発がん物質の遺伝毒性PODと発がん性PODの比較

Mutagens	TG Mutagenesis		Carcinogenesis	
	NOGEL mg/kg	BMDL10 mg/kg*	TD10 mg/kg**	BMDL10 mg/kg*
2-AAF	30	2.99	3.82	0.4014
2,4-DAT	40	3.33	5.34	2.0475
DMN	0.1	0.014	0.036	0.0361
DEN	0.156	0.054	0.010(Rat)	0.0112(Rat)

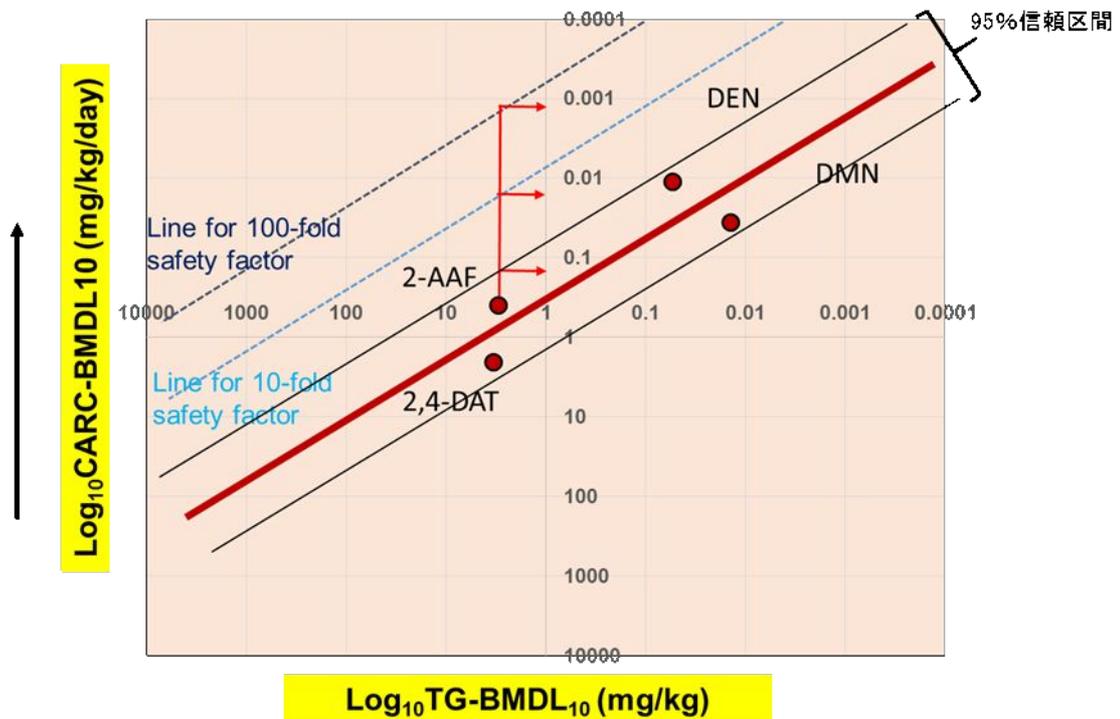


図2 遺伝毒性TG-BMDL₁₀と発がん性CARC-BMDL₁₀との相関性