

Title	食品リスク分析における総合的遺伝毒性発がん性評価の国際標準化へ向けた研究
Author(s)	小柳, 美穂子
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72185
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏 名 (小柳 美穂子)

論文題名 食品リスク分析における総合的遺伝毒性発がん性評価の国際標準化へ向けた研究

論文内容の要旨

食品分野の毒性評価学研究において、トキシコロジストは、信頼性と透明性の高い科学的根拠に基づいて食の安全を守る使命がある。私たちの健康を守るための評価対象は、新規に開発される食品添加物や、天然由来とされる既存添加物に加え、化学構造の類似性のみを基に流通している指定添加物の18類指定香料約3,000物質も含まれる。これらの安全性を確保するための科学的根拠を収集するには、利用できる資金や人材・資材・時間が限られることから、*in vitro*、*in vivo*の両観点に基づく毒性評価手法を利用した、合理的かつ論理的な戦略が必要である。とりわけ、発がん性と生殖発生毒性のスクリーニングとして位置付けられる遺伝毒性の有無は、細菌を用いる復帰突然変異試験 (Ames試験) や染色体異常試験、小核試験、コメットアッセイなどの、*in vitro*や*in vivo*の試験法を組み合わせる。

日本では、食品添加物の安全性評価における遺伝毒性試験の組み合わせは、規制上、染色体異常を指標とする、1) *in vitro*染色体異常試験、2) *in vivo*小核試験、及び、遺伝子突然変異を指標とする、3) 細菌を用いる復帰突然変異試験 (Ames試験) からなる3試験が示されている。この組み合わせでは、*in vitro*染色体異常試験における結果が陽性の場合には、その染色体異常誘発性は、同じく染色体異常を指標とする*in vivo*小核試験で検証することができる。その一方で、Ames試験陽性の場合には、遺伝子突然変異誘発性を*in vivo*で検証できないために、遺伝子突然変異誘発性ありと判断されて、1) 当該評価物質の食品添加物開発を断念するか、2) 陰性の結果を期待して長期発がん性試験にチャレンジするか、あるいは、3) *in vivo*小核試験陰性のWeight of Evidenceによって総合評価されてきた。このように、Ames試験陽性の結果は食品添加物開発に大きな影響を与えるものであることから、数億円の費用と約5年以上の歳月が必要な長期発がん性試験を実施する前に、生体内代謝系が鑑みられた*in vivo*試験法の確立が望まれていた。そのような中で、2011年に、トランスジェニック動物を供したげっ歯類遺伝子突然変異試験 (TG試験) がOECD (経済協力開発機構) の試験ガイドラインとして採択された。従って、今後の食品添加物の遺伝毒性評価において、従来の組合せの中にTG試験を加えることで、染色体異常のみならず遺伝子突然変異においても、*in vitro*、*in vivo*の両観点からの評価が確立できると期待される。しかし、OECD試験ガイドラインに準拠してGLP (優良試験所基準) で実施されたデータを基に、TG試験を組み入れた段階的な食品添加物の国際的評価が実施されておらず、その評価手順は確立されていない。そこで、本研究では、ケルセチン配糖体 *alpha*-Glycosyl Isoquercitrin (AGIQ) とAGIQ製造に使用される配糖化酵素 Cycrodextrin Glucanotransferase (CGTase) を用いた遺伝毒性試験を実施し、これらの解析を通じ、*in vitro*、*in vivo*試験の両観点からTG試験を組み入れた遺伝毒性の評価手順の提示を試みた。

従来の標準的な組み合わせとして推奨されている遺伝毒性試験をOECD試験ガイドラインに従ってGLPで実施した結果、CGTaseは、染色体異常を指標とする*in vitro* および*in vivo*試験、および遺伝子突然変異を指標とする*in vitro*試験 (Ames試験) はいずれも陰性であり、従来の標準的な組み合わせの3試験からCGTaseの遺伝毒性は陰性であると結論づけられた。その一方で、AGIQは、染色体異常を指標とする*in vitro*、*in vivo*試験はともに陰性ながら、遺伝子突然変異を指標とする*in vitro*試験 (Ames試験) は陽性であった。従って、*in vitro*で遺伝子突然変異誘発性が示唆されたAGIQについては、遺伝子突然変異を指標とする*in vivo*試験を欠く従来型の評価ではなく、生体内代謝系が鑑みられた*in vivo*試験系を用いて、遺伝子突然変異誘発性の有無を科学的に説明する新たな切り口が必要と考えた。そこで、AGIQに対してMuta™ Mouseを用いたTG試験を実施し、遺伝子突然変異を指標とするAmes試験をフォローアップするための*in vivo*試験としての有用性を検証した。その結果、AGIQ投与によるMuta™ Mouseの各対象臓器における突然変異体頻度は、いずれも陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。従って、AGIQは、*in vivo*遺伝子突然変異試験は、陰性と結論付けた。以上より、*in vitro*試験でみられたAGIQによる遺伝子突然変異誘発性は、本試験条件下において、*in vivo*試験では再現されないことが示された。

前述のように、これまでは、当該評価物質の遺伝子突然変異誘発性を*in vivo*で検証できなかったために、*in*

*in vitro*でのAmes試験陽性を基に遺伝子突然変異誘発性ありと判断され、先に1)～3)で示したように、実際の毒性のエンドポイントが相補的ではない組み合わせによって非科学的な判断が下される可能性があった。本博士論文では、*in vitro*試験（Ames試験）陽性の場合に、TG試験を用いたフォローアップにチャレンジすることによって、変異原性を*in vivo*で科学的に検証し、開発が継続できる可能性を実証した。また、染色体異常、遺伝子突然変異のそれぞれの指標において、まず*in vitro*試験を実施し、その結果に応じて、*in vivo*試験を段階的に実施するアプローチが可能であることを示した。本知見が、これから新たに開発される添加物の精度の高い遺伝毒性評価の道筋を示すとともに、現在使用されている既存添加物の遺伝毒性の懸念を払拭する道を開くことにつながると確信している。今後、国際的に合意された毒性試験ガイドラインに基づくGLP試験データが蓄積されることによって、本博士論文で提案する*in vitro*、*in vivo*の段階的アプローチが波及されることを期待する。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (小柳 美穂子)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査 副 査 副 査	教授 教授 教授
		堤 康央 中川 晋作 平田 收正
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>本博士論文では、ケルセチン配糖体AGIQおよびAGIQ製造用酵素CGTaseの遺伝毒性試験を通じ、以下のように、遺伝毒性評価における<i>in vitro</i>、<i>in vivo</i>試験の段階的総括アプローチの有用性を認めたものであり、本成果は将来的に、医薬品、化粧品、食品を含めた化学物質の安全性試験に関する世界スタンダードの提案に資することを期待させるものである。</p> <ol style="list-style-type: none"> AGIQは、<i>in vitro</i>染色体異常試験が陰性で、<i>in vitro</i>、<i>in vivo</i>小核試験も陰性であることを明らかとし、当該試験条件下では、AGIQに染色体異常誘発性は認められないことを明らかにした。 AGIQは、Ames試験において陽性であったものの、TGマウスを用いた<i>in vivo</i>遺伝子突然変異試験は陰性であることを明らかにし、当該試験条件下では、AGIQに遺伝子突然変異誘発性は認められないことを示した。 CGTaseは、<i>in vitro</i>、<i>in vivo</i>小核試験が陰性のうえ、Ames試験も陰性であることを明らかとし、当該試験条件下では、CGTaseに遺伝毒性は認められないことを示した。 <p>これまでは、遺伝子突然変異誘発性を<i>in vivo</i>で検証できなかったために、<i>in vitro</i>でのAmes試験陽性をもとに遺伝子突然変異誘発性ありと判断された場合には、1) 当該評価物質の食品添加物開発を断念するか、2) 陰性結果を期待して長期発がん性試験にチャレンジするか、3) <i>in vivo</i>小核試験陰性のWeight of Evidenceによって総合評価するといった判断がされてきた。この点、本博士論文では、Ames試験が陽性であった場合に、TG試験でフォローアップにチャレンジすることで、変異原性を<i>in vivo</i>で科学的に検証し、開発が継続できる可能性を実証したことで、これから新たに開発される添加物の精度の高い遺伝毒性評価の道筋を示すとともに、既存の添加物の遺伝毒性の懸念を払拭する道を開いたため、博士（薬学）の学位論文に値すると認めるものである。</p>		