

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保推進研究事業）

食品添加物の安全性確保のための研究

平成 28 年度分担研究報告書

食品香料についての遺伝毒性評価予測システムの研究

研究分担者 山田雅巳 国立医薬品食品衛生研究所室長

研究要旨 香料について、構造活性相関（SAR）の陽性予測のフォローアップの Ames 試験を 5 化合物について追加した結果、2-methyltetrahydrofuran-3-one のみが TA100 と TA98 において代謝活性化無の条件で弱い陽性という結果を得た。

A. 研究目的

食品添加物の安全性確保の一環として、わが国独自の香料規格の向上が重要と考え、本研究では、適切な安全性評価の整備を目指す。安全性評価において最初のステップである遺伝毒性評価に焦点を絞り、構造活性相関手法に基づく遺伝毒性予測システムの研究について効率的かつ有効なアプローチを検討する。

欧米を中心として流通している食品香料のポジティブリスト化は、JECFA による安全性評価を軸として進行しており、国内における規格も、国際ハーモナイゼーションをふまえた規格向上を検討することが望まれている。我が国では嗜好の違いから独自に使用されている食品香料が多く、それらについては JECFA による安全性評価がなされていないことから、日本で評価を実施する必要がある。しかし、1000 を超える数の香料の安全性評価を、期間、費用の面から効率化するため、構造活性相関手法（SAR）の導入により遺伝毒性評価を実施することを検討してきた。

香料に特異的な警告構造を検索することで、構造活性相関のモデルを香料に特化した形に改良し、遺伝毒性評価のスクリーニングに用いることを目指す。これまで、SARモデルの

陰性予測が簡易Ames試験と一致しなかった 12 化合物に着目し、一般化合物として市販されている 10 化合物について、標準的な Ames 試験では陰性であることを確認した。本研究課題では、さらに香料の Ames 試験データを蓄積するため、SAR 予測結果が陽性の中の 5 物質について標準的な Ames 試験を実施した。

B. 研究方法

【Ames 試験の概略】ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) 及び大腸菌 (*Escherichia coli*) を用いて、S9mix 存在下及び非存在下、プレインキュベーション法により実施した。初めに、5000 µg/plate を最高用量に用量設定試験を行い、生育阻害が認められた場合は、その用量を最高用量として本試験を実施した。陰性対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加が認められた場合を陽性と判定した。

【被験物質】被験物質の CAS No. と構造式を表 1 に示す。被験物質、6-amyl-2-pyrone (CAS No. : 27593-23-3), 2-pentylfuran (CAS No. : 3777-69-3), 2-methyltetrahydrofuran-3-one (CAS No. : 3188-00-9), linalool oxide (CAS No. : 60047-17-8), 2-isopropenyl-5-

methyl-5-vinyltetrahydrofuran (CAS No. : 13679-86-2)は、いずれも東京化成工業(株)製。2-methyltetrahydrofuran-3-oneは注射用水(株)大塚製薬工場)に、その他の4化合物はdimethylsulfoxide (DMSO ; 和光純薬工業(株))に溶解して用いた。

陽性対照物質は、S9mix存在下、TA1535とWP2uvrAについては2-aminoanthracene (2AA; 和光純薬工業(株))を、TA100, TA98, TA1537についてはbenzo[a]pyrene (B[a]P ; 和光純薬工業(株))を用いた。S9mix非存在下ではTA100, TA98, WP2uvrAについては2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2 ; 和光純薬工業(株))を、TA1535についてはsodium azide (NaN₃ ; 和光純薬工業(株))を、TA1537については2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine · 2HCl (ICR-191 ; Polysciences, Inc.)を用いた。NaN₃は注射用水に、その他はDMSOに溶解し、所定の濃度に調製したものを-20°C以下で冷凍保存し、用時解凍して用いた。

【検定菌】「OECD 化学物質試験法ガイドライン 471」を参考にし、その中で推奨されている菌株のうち、スクリーニングにおいて汎用されるネズミチフス菌 4 菌株、TA100, TA1535, TA98, TA1537 及び、大腸菌 WP2uvrA を試験に用いた。

【試験操作】Amesらの標準法を参考にして、プレインキュベーション法により、用量設定試験と本試験を各1回実施した。試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させるS9 mix非存在下、及びラットのもつ薬物代謝酵素によって産生される被験物質の代謝物の遺伝子突然変異誘発性を試験するS9 mix存在下で行った。

滅菌した小試験管中、被験物質調製液0.1 mLと、S9 mix非存在下では0.1 M ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL, S9 mix存在下ではS9 mix 0.5 mL, さらに試験菌液0.1 mLを混合し、37°Cで20分間プレインキュベーションしたのち、2.0 mLのトップアガーを加えて混和し、最小グルコース寒天平板培地上に流して固めた。また、被験物質調製液のかわりに溶媒0.1 mLまたは陽性対照物質溶液を加えて、それぞれ陰性対照及び陽性対照とした。

培養は37°Cで48時間行い、出現した変異コロニー数を、コロニーアナライザー (CA-11, システムサイエンス(株), 面積補正值: 1.21) により計測した。被験物質に由来する沈殿及び着色の有無は、目視により観察した。また、生育阻害の有無については、実体顕微鏡下で判断した。平板は被験物質処理群、陰性対照群及び陽性対照群について、用量設定試験、本試験ともに用量ごとに2枚のプレートを用い、変異コロニー数について平板2枚の平均値を求めた。

【試験用量】用量設定試験においては、1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 313, 1250, 5000 µg/plate の 7 用量を設定した。2-methyltetrahydrofuran-3-one 以外は生育阻害が見られたので、本試験では生育阻害が認められた最低用量を最高用量に設定し公比2の6用量で実施した、2-methyltetrahydrofuran-3-one は 5000 µg/plate を最高用量とし、公比2の5用量で実施した(表2)。

(倫理面への配慮)

in silico と in vitro の研究であるので、該当しない。

C. 研究結果

6-amyl-2-pyrone, 2-pentylfuran, linalool oxide, 2-isopropenyl-5-methyl-5-vinyltetrahydrofuran については、用いたいずれの検定菌においても、S9 mix の有無にかかわらず、陰性対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。一方、2-methyltetrahydrofuran-3-one は、TA100 と TA98 において S9 mix 非存在下で陰性対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加が認められた。比活性値は TA100 において 45 rev/mg であり遺伝子突然変異誘発能は弱いものと考えられた (表 3)。

すべての試験において、用いた最高用量の被験物質調製液及び S9 mix への雑菌の混入は認められなかった。被験物質に由来する沈殿は、S9 mix 非存在下及び存在下ともに、いずれの用量においても認められなかった。いずれの検定菌においても陽性対照物質の遺伝子突然変異誘発性が検出され、陽性対照値及び陰性対照値は、ともに背景データの変動範囲内 (平均値 \pm 3 \times 標準偏差) であった。したがって、当該試験系の妥当性が確認されたと考える。

D. 考察

本研究課題では、これまでに126の香料についての、SARモデルによるAmes試験の判定予測と簡易Ames試験 (FAT) 結果を得ている (表3(a))。表3(b)の補正1は3種類のSARモデルにおいていずれも「陽性のカテゴリーではないもの」と判断された72のうち、FATの結果が陽性になった香料12種類から10物質を選んで実施したAmes試験 (2菌株) が陰性だったことを反映させたものである (表3(b)) [平成27年度分担研究報告書「食品添加

物の規格試験法の向上及び摂取量推定等に関する研究」山田雅巳]。今回、SAR予測陰性の物質同様、この表の中でSAR予測が陽性だった物質 (12物質と42物質の合計54物質) についてもAmes試験を実施する必要があると考えた。

この54物質の中でFATの結果を無視して、Ames試験のデータがなく、同一メーカーの市販品が入手できる20物質について、類縁化合物等の参考文献を調査し、結果の予測が難しいと考えられた (データがない) 5物質、6-amyl-2-pyrone, 2-pentylfuran, 2-methyltetrahydrofuran-3-one, linalool oxide, 2-isopropenyl-5-methyl-5-vinyl tetrahydrofuran, を選んで、標準の5菌株を用いたAmes試験を実施した。その結果、5物質中1物質が陽性の結果となったので表3の(b)で補正2を加えた。この香料を陽性と予測したSARモデルはMultiCASEのみだった。

一般的に、Ames試験が陽性になる化合物は全体の約10%であることを考えると、5物質中1物質が陽性というのは、通常より陽性の割合が高かったことになり、SAR予測陽性の香料を優先してAmes試験を実施してよくことが望ましいことが示唆されたと考える。さらに、物質数を増やしてAmes試験を実施し検証する必要があるだろう。

E. 結論

SARモデルにより陽性と予測された54物質のうち、5物質についてAmes試験実施のフォローをした。「SARモデルにはアラートの違いがあるため、複数のSARモデルによるAmes試験の陰性予測は正しいと考えてよく、安全性評価をする際には、優先順位を下げてよい。」という考え方に問題はない。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 被験物質の CAS No.と構造式

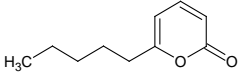
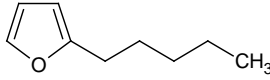
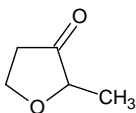
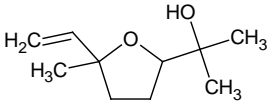
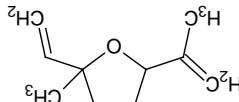
名 称	CAS No.	構造式
2,4-Decadien-5-olide	27593-23-3	
2-Pentylfuran	3777-69-3	
2-Methyltetrahydrofuran-3-one	3188-00-9	
Linalool oxide (furanoid)	60047-17-8	
2-Ethenyl-5-isopropenyl-2-methyl tetrahydrofuran	13679-86-2	

表 2 本試験に用いた溶媒及び被験物質用量

名 称	溶媒	-S9mix ¹⁾	+S9mix ¹⁾
2,4-Decadien-5-olide	DMSO	TA1535, TA1537 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313 TA98, TA100, WP2 <i>uvrA</i> 39.1, 78.1, 156, 313, 625, 1250	すべての菌株 39.1, 78.1, 156, 313, 625, 1250
2-Pentylfuran	DMSO 脱水処理	すべての菌株 0.61, 1.22, 2.44, 4.88, 9.8, 19.5	すべての菌株 2.44, 4.88, 9.8, 19.5, 39.1, 78.1
2-Methyltetrahydrofuran- 3-one	注射用水	すべての菌株 313, 625, 1250, 2500, 5000	すべての菌株 313, 625, 1250, 2500, 5000
Linalool oxide (furanoid)	DMSO	TA98, TA100, TA1535, TA1537 156, 313, 625, 1250, 2500, 5000 WP2 <i>uvrA</i> 313, 625, 1250, 2500, 5000	TA98, TA100, TA1535, TA1537 156, 313, 625, 1250, 2500, 5000 WP2 <i>uvrA</i> 313, 625, 1250, 2500, 5000
2-Ethenyl-5-isopropenyl-2- methyltetrahydrofuran	DMSO	すべての菌株 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313	TA1535, TA1537 0.15, 0.31, 0.61, 1.22, 2.44, 4.88 TA98, TA100 0.61, 1.22, 2.44, 4.88, 9.8, 19.5 WP2 <i>uvrA</i> 2.44, 4.88, 9.8, 19.5, 39.1, 78.1

1) 単位は µg/plate.

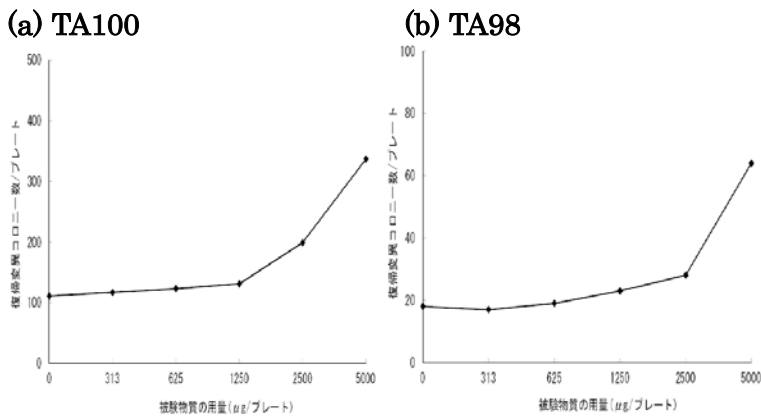


図 1 2-Methyltetrahydrofuran-3-one の S9mix 非存在下での TA100(a)及び TA98(b)における復帰変異コロニー数

表 3 SAR モデルによる Ames 試験の判定予測と実施した試験結果の相関 (126 物質について)

(a) FAT のみ実施していた時の相関

		SAR 予測	
		陽性	陰性
FAT 結果	陽性	1 2	1 2
	陰性	4 2	6 0

(b) Ames 試験実施結果により補正した相関

		SAR 予測	
		陽性 (補正 2)	陰性 (補正 1)
Ames/FAT 結果	陽性	1 1	2
	陰性	4 3	7 0

補正 1 : SAR 予測陰性/FAT 結果陽性の 10 物質について Ames 試験を実施した結果, すべて陰性であったため, SAR 予測陰性/FAT 陽性から 10 物質を除き (12→2), SAR 予測陰性/FAT 陰性に 10 物質を加える (60→70) 補正を行った.

補正 2 : SAR 予測陽性/FAT 結果陽性の 2 物質と SAR 予測陽性/FAT 結果陰性の 3 物質について, Ames 試験を実施した結果, SAR 予測陽性/FAT 結果陽性の 2 物質のうち 1 物質が陰性であったことから, SAR 予測陽性/実施試験結果陽性から 1 物質を除き (12→11), SAR 予測陽性/実施試験結果陰性に 1 物質を加える (42→43) 補正を行った.

