

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）

食品添加物の安全性確保のための研究

平成30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 本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部長

研究要旨

食品香料化合物3,942物質について、Lhasa Limited (UK)のDEREK NexusとMultiCASE Inc. (USA) のCASE Ultraの2つのQSARを用いてAmes変異原性の予測を行ったところ58化合物で陽性と予測された。この内6化合物について実際のAmes試験を実施したところ、全てにおいて陽性を示した。また、香料に特化した新たなQSARモデル（StarDrop）の開発を行った。適正なアルゴリズムと記述子を選択し、また香料の特性（低分子量、限られた元素）を考慮したローカルQSARモデル（香料Star Drop QSARモデル）の開発に成功した。さらに、既存の香料のAmes試験データベースの見直しを行い、データベースの堅牢化を図った。新規データベースに対して新たに開発した香料Star Drop QSARモデルで予測精度を検証したところ、97%の正確性でAmes変異原性を予測できた。

協力研究者

杉山 圭一 国立医薬品食品衛生研究所
変異遺伝部

北澤 愛莉 国立医薬品食品衛生研究所
変異遺伝部

笠松 俊夫 国立医薬品食品衛生研究所
変異遺伝部

炭素、水素、酸素、窒素、硫黄を元素成分とする比較的 low molecular weight の化学物質であり、特定の官能基を有するものが多い。日本では食品香料の多くは化学構造分類に従い、18種類に分類されており、現在、全部で約3,100種類の食品香料が包括的に指定されている。また、これとは別に、バニリンなどの使用量が多い78品目が分離指定されている。一方、米国では2,200品目、欧州では2,700品目の香料が使用されているが、世界で共通に使用されている香料は1,550品目に過ぎない。香料の安全

A. 研究目的

食品に香料として用いられる化学物質は食品の香気成分として存在するもの、もしくはその類似化学物質を指す。主に、

性評価に各国の相違があることに原因の一つがあるが、早期の国際的調和が望まれる。

香料は、一般に数十から数百種類混合して用いられることが多いが、個々の香料の食品への添加量は数pptから数ppmレベルで有り、過剰摂取は考えられないことから、一般毒性の懸念は少なく、問題となる毒性は変異原性である。変異原性はがんの原因で有り、DNAに損傷を与え、突然変異を誘発し、その作用には、閾値がないと考えられている。従って、変異原性のある化学物質の摂取は、それがたとえ微量であっても、発がんリスクはゼロにはならないため厳しい管理が要求される。JECFAでは変異原性を含むいかなる毒性であっても、その曝露レベルがTTC（毒性学的懸念の閾値）以下であれば安全性に問題ないとしているが、暴露評価が適切に行われていない場合は、変異原性の有無が問題となることが多い。そのため、食品香料の安全性評価のためには適切な変異原性試験の実施が重要である。

細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames試験）は重要な変異原性試験であるが、試験の実施には約2 g程度のサンプルが必要である。一方、工業製品としての香料の生産量は極めて少なく、試験が不可能であることも多い。また、香料独特の香気（臭気）から実験室内での試験が困難である場合もある。このため、Ames変異原性をインシリコ手法であるQSARにより評価する方法が注目されている。

昨年度の本研究班では食品香料化合物データベース2015年版掲載物質4,549物

質から、混合物、構造式が記載されていない物質を除き、3,942物質を電子データ化した。この3,942物質について、Lhasa Limited (UK) の DEREK Nexus と MultiCASE Inc. (USA) の CASE Ultra を用いてAmes試験結果のQSAR予測計算を行った。このうち58化合物は両者のQSARモデルで陽性と判断され、変異原性が疑われた。本年度はこのうち試験データのない6化合物に関しては実際にAmes試験を行い、変異原性の有無を検証した。また、また、香料に特化した新たなQSARモデルの開発のため統計ベースのQSARモデルであるStar Dropに注目した。また、香料のAmes試験データベースは限られているため、その信頼性がQSARモデル構築に重要である。小野らの報告に基づく376の香料のAmes試験データベースでは、14化合物に関してはEquivocalと判定されている。このデータを再評価し、データベースの堅牢性を高めると共に、新たに開発したQSARモデルの予測性を評価した。

B. 研究方法

B.1. Ames試験対象物質

2つのQSARモデルで陽性を示した58化合物のうち、以下の6化合物を今年度のAmes試験対象物質とした。

- ① 4-methyl-2-pentenal
- ② 2,5-dimethyl-4-oxo-3(5H)-furyl acetate
- ③ furfuryl formate
- ④ methyl 6-phenylglycidate
- ⑤ 2-[(methylthio)methyl]-2-butenal
- ⑥ 6-methoxyquinoline

B.2. Ames試験

OECD試験ガイドラインTG471 に準拠し、細菌を用いる復帰突然変異試験 (Ames Test) を実施した。本試験はアミノ酸要求性のサルモネラ菌と大腸菌の株を用いて点変異を検出し、被験物質がDNAに影響を与えるか否かの判定する試験である。試験は、「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」(平成8年3月22日付、衛化第29号生活衛生局長通知) に準拠し、医薬品医療機器法施行規則第43条「申請資料の信頼性の基準」に基づいて実施した。

B.3. Star Drop QSARモデルの開発

英国オプティブリアム (日本代理店はヒューリンクス) が開発する統計ベースのQSARモデルである。ヒューリンクス社との共同研究により、Star Drop AmesQSARモデルの開発を行った。我々が保持するAmes試験データベースを活用し、適切なアルゴリズムと記述子の選択を行い、予測率の高いQSARモデルを選択した。

B.4. 香料のAmes試験データベース

小野らの報告 (Food and Chemical Toxicology, 50, 1538-1546, 2012) の香料化合物のAmes試験データの内、以下の14化合物についてはEquivocalと評価されている。

- ① allyl isothiocyanate
- ② furfuryl alcohol
- ③ furfural
- ④ butyl isothiocyanate

- ⑤ phenethyl isothiocyanate
- ⑥ 3-propylidenephthalide
- ⑦ 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone
- ⑧ Isobutanal
- ⑨ phenol
- ⑩ 2-hydroxy-1,2-diphenylethanone
- ⑪ 6-methylcoumarin
- ⑫ δ-3-carene
- ⑬ ethyl maltol
- ⑭ ethyl 2-[(5-methyl-2-propan-2-ylcyclohexanecarbonyl)amino]acetate

これら14化合物のAmes試験結果を専門家判断により見直しを行った。

(倫理面への配慮)

in silicoの研究であるので、該当しない。

C. 研究結果及び考察

C.1. Ames試験結果

Ames試験実施6化合物のQSAR予測結果と、Ames試験結果を表1に示す。QSAR予測結果では2,5-dimethyl-4-oxo-3(5H)-furyl acetateと、furfuryl formateはCase Ultraの旧バージョンのPHARM_SALMと、GT1_AT_ECOLIのモジュールで陽性とされたが、今回の新バージョン (ver. 1.7.0.5) の統合型モジュール (GT1_BMUT) ではそれぞれ陰性、inconclusiveと判定された。評価するアラート構造が変化したことによる計算結果の違いと考えるが、後述するように実際のAmes試験では陽性だったことを考えると、この改良は有効ではなかったと考える。

Ames試験結果に関しては6化合物全て

において陽性と判定された。特に、4-methyl-2-pentenalと、6-methoxyquinolineは比活性値が1000以上を示す強い陽性反応を示した。

脂肪族高級アルデヒド類の4-methyl-2-pentenalと2-[(methylthio)methyl]-2-butenalは α,β -不飽和カルボニル構造を持つ。 α,β -不飽和カルボニル化合物はDNAとの種々の相互作用を受け、異なる遺伝毒性や変異原性反応に至る可能性がある。環状付加体の形成、フレームシフト変異、鎖切断、及び交差結合などの遺伝毒性メカニズムが考えられる。直接的な相互作用に加えて、代謝的エポキシ化やラジカルの生成などその他の代謝活性化経路が可能である。 α,β -不飽和カルボニル化合物とDNA構成成分との主な相互作用は、環状1,N2-デオキシングアノシン付加体の形成である。この反応はデオキシングアノシンの環外窒素に対する初期マイケル型付加を通じて発生し、その後閉環して8-ヒドロキシプロパノ付加体が形成される。

2,5-dimethyl-4-oxo-3(5H)-furyl acetateとfurfuryl formateはエステル類に分類されるが、変異原活性は二重結合のエポキシ化が関与していることが予想される。同様に、エステル類であるmethyl β -phenylglycidateはエポキシ構造を有し変異原性が予測される。以上の変異原性は代謝活性化を必要とせず発揮される。

一方、6-methoxyquinolineは代謝活性化による3,4位が主な代謝経路と考えられている。結果として開環代謝物がDNAと共有結合することにより変異原性を発揮する。6-methoxyquinolineはキノリ

ンより変異原性が強いことが予測される。これは6位のメトキシ基が変異原性増強アラートであることを示している。

以上のことからQSARにより変異原性が予測された香料の全てが実際のAmes試験で陽性と判定され、陽性予測率は100%であった。また、その陽性結果は化学構造から説明可能であった。このことはQSARが変異原性予測に有効であり、且つその変異原性メカニズムを提示してくれることを示している。

これらの試験結果をトレーニングデータとしてQSARに組みこむことによりさらに精度の高いモデルの構築が期待できる。

C.2. 香料用Star Drop QSARモデルの開発

ヒューリンクス社との共同研究により米国オプテティブリウム社が提供するQSARモデルであるStar DropによるAmes試験予測モデルの開発を行った。安衛法データベース(ANEI)とハンセンデータベース(HANSEN)を基に、プロトタイプモデルの開発と検証を繰り返した。予測アルゴリズムとしてはGuassian Process、Decision Tree、Random Forestの3種類を検討したが、ANEI、HANSENとも、Random Forestが最も高い予測精度を示したためRandom Forestを採用した(図1)。

記述子として、HOMO-LUMOエネルギーギャップ、電荷情報(ESP Charge; 最大値)、電荷情報(ESP Charge; 最小値)、ESPダイポールモーメント等の体積電子密度に注目し、予測率向上に関連

する記述子の精査を行った。概して量子化学計算結果(MO)を記述子に採用しても大きな予測精度の向上が見られなかったため、これら記述子を含めないQSARモデル(Perfume_case10_noMO.aim)を開発した。本QSARモデルでAmes試験結果を有する香料Ames試験データベース(367化合物; Ono et al., Food and Chemical Toxicology 50, 1538–1546, 2012)のAmes試験結果を予測した(表2)。感度:68%、特異度:99.3%を示し、この精度は従来のDEREK NX、Case Ultraよりも高かった。また、香料は一般の化学物質と比較して、低分子量であり、構成元素が限られていることからケミカルスペースの解析を行った(図2)。香料のケミカルスペースは限られ、またその中でも陰性、陽性を示すスペースは同じ領域に存在することがわかったため、香料(低分子化合物に限定したローカルQSARモデルを開発した(Perfume_ABC_ANEI_noMO.aim))。さらに、低分子でも香料の大部分はハロゲンを含まないこと、また、ハロゲン化合物のなかでもS、Oと結合した分子構造を持つものはAmes変異原性の予測が困難であることから、S/Oと結合したハロゲン化合物をデータセットから削除した第2のモデル(Perfume_ABC_ANEI_mod_noMO.aim)を開発した。

C.2. 香料Ames試験データの見直しと、Star Drop QSARモデルへの反映

対象とする香料化合物化合物(14)の再評価結果を表3に示す。これらは小野らの報告ではEquivalcalと判定され、2つ

のQSARモデル(旧バージョンのDEREKとMCASE)では陰性、もしくは陽性と予測されている。新バージョンのDEREK NexusとCASE Ultraの結果は以前陰性と予測されたものが、いくつかは陽性予測に変更された。これはデータベースの蓄積により陽性のケミカルスペースが改題した結果と考えられる。報告試験データに関しては原著論文を精査し、ガイドラインの適合性、データの信頼性、科学的根拠等を考慮し、慎重にレビューを行った。その結果、4物質を陽性、6物質を陰性と判定した。残り4物質に関しては情報が十分とは言えないため判定困難とした。これら14化合物についても新たに開発した2つの香料用Star Drop QSARモデルで変異原性を予測した。その結果、全ての陽性、陰性化合物は正しく予測され、4つの判定困難物質は2つが両者で陰性、1つが両者で陽性、1つ(2-hydroxy-1,2-diphenylethanone)が陽性、判定の結果に分かれた。本物質はハロゲンを含まないことからモデル2の陰性が妥当と考えられる。

本試験結果を小野らのAmes香料データベースに反映させ、その後、全データベースに対して予測精度の検証を行った。その結果を表4に示す。両モデルとも非常に高い予測精度を示した。特に、モデル2(S/Oと結合したハロゲン化合物をデータセットから削除)では感度84.6%、特異度97.5%、正確度96.6%とほぼ完璧にAmes変異原性を予測できた。この予測結果は一つの到達点に近いとも考えられた。香料に限定したローカルモデルはあるが、香料用Star Drop QSARモデルは

特定のケミカルカテゴリーに関して強力な予測性能を発揮できることが示された。

E. 結論

食品香料化合物3,942物質について、Lhasa Limited (UK)のDEREK NexusとMultiCASE Inc. (USA) のCASE Ultraの2つのQSARを用いてAmes変異原性の予測を行ったところ58化合物で陽性と予測された。このうち6化合物について実際のAmes試験を実施したところ、全てにおいて陽性を示した。また、香料に特化した新たなQSARモデル (StarDrop) の開発を行った。適正なアルゴリズムと記述子を選択し、また香料の特性 (低分子量、限られた元素) を考慮したローカルQSARモデル (香料Star Drop QSARモデル) の開発に成功した。さらに、既存の香料のAmes試験データベースの見直しを行い、データベースの堅牢化を図った。新規データベースに対して新たに開発した香料Star Drop QSARモデルで予測精度を検証したところ、97%との正確性でAmes変異原性を予測できた。この結果は香料Star Drop QSARモデルは実用性に耐えうることを示すものである。

F. 研究発表

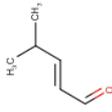
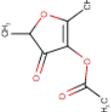
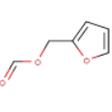
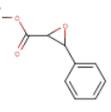
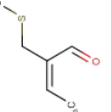
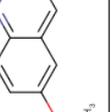
学会発表

- 1) 本間正充、Improvement of quantitative structure-activity relationship (QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity 口演、QSAR2018、ブレッド・スロベニア (2018.6)
- 2) 本間正充、Mutagens and carcinogens in Japanese food: evolution of prioritized risk 口演、第49回米国環境変異ゲノミクス学会、サンアントニオ・米国 (2018.9)
- 3) 本間正充、(QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity 口演、KNect365 Life Sciences Annual Meeting of Genotoxic Impurities、ベルリン・ドイツ (2018.10)
- 4) 本間正充、(QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity and its application to risk assessment 口演、2018 Joint International Workshop "Progress of Genotoxicity Methods and Regulatory Acceptance、広州・中国 (2018.11)

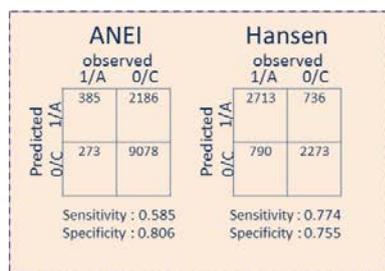
G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

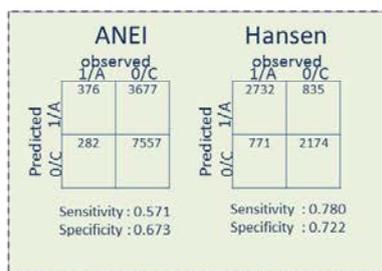
表1

chemical name	Structure	日本の種指定	SMILES	CAS#	Derek Nexus	CASE Ultra GT1_BIMUT (新規統計ベース王ジエール(統合型))	CASE Ultra GT1_BIMUT Probability (%)	エームス試験結果
4-methyl-2-pentenal		脂肪族高級アルデヒド類	<chem>CC(C)C=C(C)C=O</chem>	5362-56-1	PLAUSIBLE	Positive	70.9	TA100でS9の有無に係わらず陽性 最大比活性値:1340 (TA100、-S9) 代謝活性化が必要としない強い陽性
2,5-dimethyl-4-oxo-3-(6H)-furyl acetate		エステル類	<chem>CC1OC(C)=C(OC(C)=O)C1=O</chem>	4166-20-5	PLAUSIBLE	Negative	31.7	TA100でS9の有無に係わらず陽性 最大比活性値:77 (TA100、+S9) 代謝活性化が必要としない陽性
furfuryl formate		エステル類	<chem>O=COCc1ccoc1</chem>	13493-97-5	EQUIVOCAL	Inconclusive	40.6	TA100、TA98ではS9の有無に係わらず陽性 WP2uvr2では-S9で陽性 最大比活性値:396 (TA100、-S9) 代謝活性化を必要とせず陽性
methyl beta-phenylglycidate		エステル類	<chem>COC(=O)C1OC1c1ccccc1</chem>	37161-74-3	PLAUSIBLE	Known Positive	44.6	TA100、WP2uvr2でS9の有無に係わらず陽性 最大比活性値:84 (TA100、-S) 代謝活性化を必要とせず陽性
2-[(methylthio)methyl]-2-butenal		脂肪族高級アルデヒド類	<chem>CSCC(=C)C=O</chem>	40878-72-6	PLAUSIBLE	Positive	66.9	TA100、WP2uvr2でS9の有無に係わらず陽性 最大比活性値:225 (TA100、-S) 代謝活性化を必要とせず陽性
6-methoxyquinoline		エーテル類	<chem>COc1ccc2ncccc2c1</chem>	5263-87-6	PROBABLE	Known Positive	68.3	全ての菌株の+S9で再現性のある強い陽性 最大比活性値:51177 (TA100、-S9) 代謝活性化を要する強い陽性

Gaussian Processes



Decision Tree



Random Forests

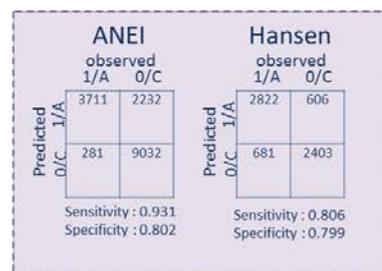


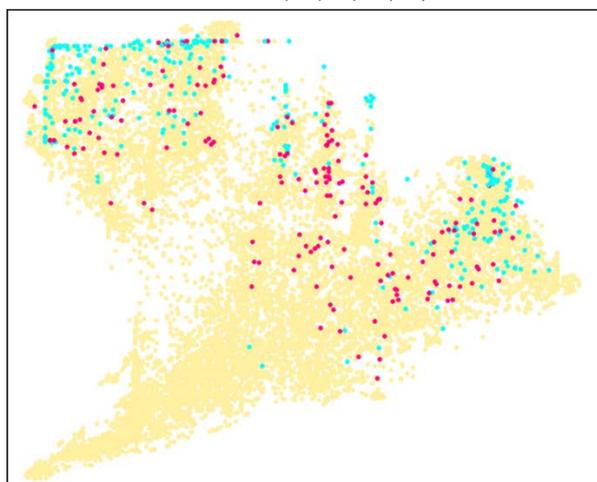
図 1

表 2

QSAR Models	Ames_Results	Positive	Negative	Total	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Concordance (%)	Applicability (%)
Star Drop Perfume_case10_noMO	positive	17	2	19	68.0	99.3	97.0	100.0
	negative	8	304	312				
	total	25	306	331				
Derek NX	positive	16	7	23	64.0	97.7	95.2	100.0
	negative	9	299	308				
	total	25	306	331				
Case Ultra GT1_A7B (Statistical base)	positive	14	6	20	60.9	97.9	95.0	91.5
	negative	9	274	283				
	total	23	280	303				
Case Ultra PHARM_SALM (Statistical base)	positive	13	5	18	54.2	98.3	95.0	96.4
	negative	11	290	301				
	total	24	295	319				

Chemical Spaceの限定

- ・分子量: <200mw
- ・元素: H, C, N, O, S, Cl



- ANEI(11922); 陽性+陰性
- Perfume+ANEI+α/A(170): 陽性
- Perfume+α/C(308): 陰性

図 2

表3

ID (小野標文 Appendix A: Equivocal)	JECA No	CAS#	品名	Structure	日本の抽出成分	小野標文 (Food and Chemical Tox. 50, 1538-1546, 2012年度)			新規QSAR解析 (注)			専門家判断 (空欄)			Star Drop 予測結果	
						Derek (小野標文)	Multicase (小野標文)	ADMEwork (小野標文)	Derek MX result	Case Ultra GTL, BMUT result	BMUT probability (%)	誤差範囲	Equivocalとみなされた誤差範囲	適合判定		最終判断結果
1	1560	57-06-7	allyl isothiocyanate	<chem>CC=NC=S</chem>	インゲン豆アシアネット類	+	+	+	PLAUSIBLE	Known Positive	67.2	positive	Kasie (2000) S9+条件下TA98, TA100で2層以上のコロニー増加	適合判定	適合判定	適合判定
2	728	98-00-0	furfuryl alcohol	<chem>OCC1=CC=CO1</chem>	芳香系アルコール類	+	-	-	INACTIVE	Known Negative	22.9	inconclusive	WHO Food Additives Series 59 (2008) 慢性毒性の報告データ (McGregor, 1991)が入手不能のため判別できません。許容濃度は年あたり200-1000 µg/mlとの推定。	適合判定	適合判定	適合判定
3	744	98-01-1	furfural	<chem>O=C1C=CC=O1</chem>	フルクトール及びその誘導体	+	-	-	EQUIVOCAL	Known Negative	31.2	inconclusive	WHO Food Additives Series 59 (2008) 4層以上に相当するin silico予測結果あり。多くの報告は慢性毒性の報告が乏しく、慢性毒性は不明。	適合判定	適合判定	適合判定
4	1561	592-82-5	butyl isothiocyanate	<chem>CCCC=C=S</chem>	インゲン豆アシアネット類	+	-	-	PLAUSIBLE	Known Positive	67.2	positive	Yamaguchi (1980) TA100, S9+にて2層以上のコロニー増加	適合判定	適合判定	適合判定
5	1563	2257-09-2	phenethyl isothiocyanate	<chem>CC1=CC=C(C=C1)C=C=S</chem>	インゲン豆アシアネット類	+	-	-	PLAUSIBLE	Known Positive	67.2	positive	Kasie (2000) TA98, S9+で2層以上のコロニー増加	適合判定	適合判定	適合判定
6	1168	17269-59-4	3-propylenephthalimide	<chem>O=C1OC(CCC)C(=O)c2ccccc12</chem>	ラクトン類	-	+	-	INACTIVE	Known Positive	22.9	inconclusive	WHO Food Additives Series 52 (2004) 慢性毒性の報告データ (Zeiger, 1988) その名の通り慢性毒性は不明。慢性毒性が報告例によるものかわからないと判断。	適合判定	適合判定	適合判定
7	1450	19322-27-1	4-hydroxy-2-methyl-3(2H)-furanone	<chem>CC1=C(O)OC(=O)O1</chem>	ケトン類	-	+	-	PROBABLE	Known Positive	36.1	positive	Hiramoto (1996) TA100, S9+にて2層以上のコロニー増加	適合判定	適合判定	適合判定
8	252	78-84-2	isobutanol	<chem>CC(C)CO</chem>	新発芽毒類	-	-	+	INACTIVE	Known Negative	31.2	inconclusive	McMahon (1979) 2層以上のコロニー増加	適合判定	適合判定	適合判定
9	690	108-95-2	phenol	<chem>Oc1ccccc1</chem>	フェノール類	-	-	-	INACTIVE	Known Negative	22.9	positive	Gocke (1981) TA98, S9+で2層以上のコロニー増加	適合判定	適合判定	適合判定
10	836	119-33-9	2-hydroxy-1,2-diphenylethane	<chem>Oc1ccc(cc1)C(O)c2ccccc2</chem>	ケトン類	-	-	-	INACTIVE	Known Negative	12.2	positive	Zeiger (1985) TA1535, S9+にて2層以上のコロニー増加	適合判定	適合判定	適合判定
11	1172	92-48-8	6-methylcoumarin	<chem>CC1=CC=C2C(=C1)OC(=O)C=C2</chem>	(日本では食品添加物として認められていない)ケトン類	-	-	-	INACTIVE	Known Negative	51.8	negative	Wild (1983) 母集団が2層以上のコロニー増加	適合判定	適合判定	適合判定
12	1342	13466-78-9	6-3-Carene	<chem>CC1=CC2C(C1)C(C)C=C2</chem>	(テルペン系天然化合物)ケトン類	-	-	-	INACTIVE	Known Negative	15.6	positive	Kurtjo (1990) 慢性毒性の報告データ (S9+)-TA100, TA102	適合判定	適合判定	適合判定
13	1481	4940-11-8	ethyl maltol	<chem>CCOC(=O)C1=CC=C(C=C1)O</chem>	ケトン類	-	-	-	EQUIVOCAL	Known Positive	65.2	inconclusive	WHO Food Additives Series 36 (2006) 慢性毒性の報告データが不足。判定できません。	適合判定	適合判定	適合判定
14	1776	68489-14-5	ethyl 2-(5-methyl-2-propenyl-1-oxoheptan-3-yl)aminoacetate	<chem>CCOC(=O)NCC1=CC=C(C=C1)C(C)C=C</chem>	エステル類	-	-	-	INACTIVE	Known Negative	6.1	inconclusive	WHO Food Additives Series 59 (2008) 慢性毒性の報告データが不足。判定できません。	適合判定	適合判定	適合判定

表 4

Model 1				Model 2			
Before Revision		After Revision		Before Revision		After Revision	
TP	20	TP	18	TP	23	TP	22
TN	312	TN	318	TN	308	TN	314
FP	4	FP	4	FP	8	FP	8
FN	13	FN	8	FN	10	FN	4
Sensitivity	60.6%	Sensitivity	69.2%	Sensitivity	69.7%	Sensitivity	84.6%
Specificity	98.7%	Specificity	98.8%	Specificity	97.5%	Specificity	97.5%
Concordance (Accuracy)	95.1%	Concordance (Accuracy)	96.6%	Concordance (Accuracy)	94.8%	Concordance (Accuracy)	96.6%