

平成 30 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

香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と，その標準的安全性評価法の  
確立に関する研究

分担研究課題： Acetamide の一般毒性・遺伝毒性・発がん性短期包括試験法による評価

研究分担者： 石井雄二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部  
高須伸二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部  
西川秋佳 国立医薬品食品衛生研究所 病理部  
小川久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

食品香料として用いられていた acetamide はラット肝発がん性を有する。FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）は，その機序に遺伝毒性機序の関与が否定できないという理由から添加物としての使用は不適切としたものの，種々の遺伝毒性試験は陰性であることから，その関与の有無は明らかになっていない。そこで本研究では，*gpt delta* ラットを用いた一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験を用いて，acetamide の包括的評価を実施した。F344 ラットを用いた用量設定試験では，acetamide を 1.25，2.5 及び 5.0% の濃度で 28 日間混餌投与した結果，2.5% 群において血清 AST 及び ALT が有意に上昇し，肝細胞の有糸分裂像，単細胞壊死及び好塩基性の細胞質内封入体とオーバルセルの過形成が認められた。これらの変化は 5.0% 群において減少又は消失し，一般状態の悪化に伴う摂餌量の減少によるものと考えられたため，本試験の最高用量を 2.5% に設定した。本試験では *gpt delta* ラットに acetamide を 0.625，1.25 及び 2.5% の濃度で 13 週間混餌投与した。その結果，1.25% から肝重量の低下，肝毒性パラメーターの増加が認められた。今後，全身諸臓器の病理組織学的検索を実施し，acetamide の一般毒性及び *in vivo* における変異原性の有無について評価する。

A. 研究目的

合成香料には個別指定品目に加えて，化学構造から使用が認められているいわゆる「18 類」と呼ばれる 3000 を超える品目が例示されている。しかし，その「18 類」の中の一つ 3-acetyl-2,5-dimethylthiophene は，明確な *in vivo* 遺伝毒性を示すことが明らかとなり，2013 年に欧米および我が国においても使用禁止処置がとられた。また，エストラゴール，メチルオイゲノール，サフロール及びエレミシンといったフェノールエーテル類の天然香気成分が，ラット肝発がん性を有し，その機序に直接的な DNA 損傷を介した突然変異誘発性が関与していることを我々は明らかにしてきた<sup>1-4)</sup>。このように，指定対象の香料についてもその安

全性が十分に担保されているとは言えない。国際的な食品添加物の安全性評価委員会である FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）では，香料の評価において，毒性学的懸念の閾値（TTC）と暴露マージン（MOE）を駆使し，多くの場合は実際の試験データを用いずに数多くの香料を評価している。しかしそれは，本来，遺伝毒性がないことが前提とされている。一方，我が国では，90 日間試験と遺伝毒性試験が必須とされてきた。このような違いから，EU 等におけるポジティブリスト制度導入の動きともあいまって，我が国で現在使用されている香料の安全性を可及的速やかに確認する必要がある。

そこで我々は，任意の臓器における *in vivo*

変異原性の検索が可能なレポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットを用いることで、同一個体において一般毒性、遺伝毒性及び発がん性に関する情報を短期間で得ることが出来る包括的試験法を開発し、アルコキシベンゼン化合物である香気成分サフロール、メチルオイゲノールおよびエレミシンがラット肝臓において突然変異誘発性及び発がん性を有することをこれまでに明らかにした<sup>3,4)</sup>。本研究では JECFA で登録されている食品香料または過去に登録されていた香料の中から、ヒト健康影響が懸念される物質について一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括的試験による評価を実施し、ヒトリスク評価に資するデータを提供するとともに、食品添加物の安全性評価における本試験法の有用性を確認することを目的とする。

Acetamide は過去に食品香料として用いられてきたが、ラット肝臓において強い発がん性を有する。その発生頻度の高さから、JECFA は本剤の発がん性に遺伝毒性メカニズムの関与が疑われるとし、食品添加物としての使用は不適切と判断した<sup>5)</sup>。一方、遺伝毒性試験では、コメットアッセイにおいて陽性の結果があるものの、Ames 試験及び *in vivo* 小核試験を含む多数の試験においていずれも陰性であることから、その発がん過程における遺伝毒性機序の関与の有無は明らかになっていない。また、acetamide はタバコ煙中や、牛乳、コーヒーといった食品中に含まれることから<sup>6,7)</sup>、食品を介して非意図的に暴露されており、ヒト健康への影響が懸念されるが、毒性情報は乏しく、ヒトリスク評価に資する情報の取得が喫緊の課題である。

本年度は acetamide について用量設定試験を実施し、本試験における投与量を 0.625、1.25 及び 2.5% に設定した。また、本試験として雄性 6 週齢の F344 系 *gpt delta* ラットに acetamide を 0.625、1.25 及び 2.5% の濃度で 13 週間混餌投与し、一般毒性評価を開始した。

## B. 研究方法

### B-1. 材料及び試薬

Acetamide は東京化成工業株式会社（東京）から購入した。

### B-2. 用量設定試験

雄性 6 週齢の F344 ラット 20 匹を日本エスエルシー株式会社より購入し、CRF-1 粉末基礎飼料(オリエンタル酵母工業株式会社)と水道水で飼育した。動物の飼育はバリアーシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 24±1°C、湿度 55±5%、換気回数 18 回/時(オールフレッシュ)、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯であり、この条件下で飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 5 匹ずつ収納し、床敷は三共ラボサービス社(東京)のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、飼料及び水道水は試験期間中、自由に摂取させた。ラット 20 匹を各群 5 匹に配し、対照群と低、中間及び高用量群の計 4 群を設けた。高用量群では、5.0%、中間用量、低用量群は公比 2 で除した 2.5 及び 1.25% の濃度でアセタミドを粉末飼料に混じり、4 週間自由摂取させた。試験期間中、飲水及び飼料の交換は週 1 回、一般状態観察を連日実施し、体重および摂餌量測定は週 1 回実施した。投与開始から 29 日目にイソフルラン麻酔下にて腹部大動脈より採血し、血清生化学的検査に供した。また、主要臓器(肝臓、腎臓、脾臓および肺)を採取し、重量測定後、10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定し、常法に従いパラフィン切片を作製後、ヘマトキシリンエオジン染色を施した。

### B-3. Acetamide の一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括的試験(本試験)

#### B-3-1 動物実験

動物は 5 週齢の雄性 F344 *gpt delta* ラット 40 匹を日本エスエルシー株式会社(静岡)から購入し、一週間の馴化後、実験に供し

た。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、換気回数 18 回/時(オールフレッシュ)、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯で、飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 または 3 匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス社(東京)のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、飲料水として水道水を試験期間中自由に摂取させた。40 匹の F344 系 *gpt* dela ラットを各群 10 匹に配し、対照群と低及び高用量群の計 3 群を設けた。Acetamide の投与は用量設定試験の結果に基づいて、高用量を 2.5%、中間用量、低用量群は公比 2 で除した 1.25%、0.625% とし、粉末飼料に混じり、13 週間自由摂取させた。試験期間中、飲水及び飼料の交換は週 1 回、一般状態観察を連日実施し、体重及び摂餌量測定は週 1 回実施した。剖検の 16 時間前より絶食させ、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈から採血後、屠殺・剖検した。

血液学的検査は、自動血球計数装置 (Sysmex M-2000, 東亜医用電子社, 東京) を用いて、白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン (HGB)、ヘマトクリット値 (HCT)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC) 及び血小板数 (PLT) について測定した。

血清生化学的検査は、遠心分離した血清を凍結保存し、総タンパク (TP)、アルブミン・グロブリン比 (A/G)、アルブミン (Alb)、総ビリルビン (T-Bil)、トリグリセリド (TG)、総コレステロール (T-Cho)、尿素窒素 (BUN)、クレアチン (CRN)、ナトリウム (Na)、塩素 (Cl)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、無機リン (IP)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、アラニントランスアミナーゼ (ALT)、アルカリフォスタファアーゼ (ALP)、 $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチターゼ ( $\gamma$ -GTP) について SRL 株式会社 (東

京) にて測定した。

各臓器は肉眼的に観察後摘出し、脳、肺、心臓、脾臓、肝臓、腎臓、副腎、胸腺及び精巣の重量を測定した。上記臓器に加え、鼻腔を含む頭蓋骨、下垂体、眼球、ハーダー腺、脊髄、唾液腺、胃、小腸、大腸、膵臓、膀胱、皮膚、乳腺、リンパ節、気管、食道、甲状腺、舌、大腿筋、坐骨神経を 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定し、常法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン染色を施し、病理組織学的検索を行った。なお、肝臓の外側左葉の一部は液体窒素により急速凍結して保存し、*in vivo* 変異原性試験 (*gpt* 及び *Spi* assay) に供した。

(倫理面への配慮)

投与実験は熟練者が実施し、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてイソフルラン麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。実験動物に関しては、「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」に基づき、動物実験計画書を作成し、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会による審査を受けた後、実施した。また、DNA 組換え動物の使用についても、「国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則」に従い、遺伝子組み換え実験計画書を作成し、審査を受けた。

## C. 研究結果

### C-1. 用量設定試験

試験期間中、高用量群において一般状態の悪化がみられたものの、途中死亡例は認められなかった。試験期間中の体重の推移を Figure 1A に示す。高用量群では投与 1 週目から対照群に比して体重の有意な低値が認められ、4 週目には低下した。また、中間用量群では有意な差は認められなかったものの、投与開始 1 週目から体重増加抑制が認められた。摂餌量は投与開始 3

週目まで群間の差は認められなかったものの、高用量群では4週目において中間用量群の約半量に低下した (Figure 1B)。

最終体重および主要臓器の重量を Table 1 に示す。最終体重は低用量群から低値が認められ、高用量群では有意な低値を示した。実重量において肺及び脾臓では低用量群から、肝臓及び腎臓では高用量群において有意な低値が認められ、相対重量では肝臓において低用量群から有意な低値が、肺及び腎臓では高値を示した。また、脾臓では低用量群で有意な低値が認められたものの、中間用量群以上で変化は認められなかった。血清生化学検査の結果を Table 2 に示す。1.25%以上の群においてTGの有意な低下が認められた。2.5%以上の群ではTP及びGluの有意な低値が、A/G、T-Bil、ASTの有意な高値が認められた。また、2.5%群においてAlbは有意な低値を、ALT及びALPは有意な高値を示したものの、5.0%群において回復傾向を示した。病理組織学的検索の結果を Figure 2 及び Table 3 に示す。肝臓では2.5%群から肝細胞の単細胞壊死、有糸分裂像及び核の大小不同とオーバルセルの過形成が認められた。また、肝細胞では好塩基性の細胞質内封入体が散見され、これらはフォイルゲン反応に陽性を示した (Figure 3)。また、5.0%群ではオーバルセルの過形成の程度の亢進は認められたものの、その他の変化はいずれも減少又は消失した。

#### C-2. Acetamide の一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括的試験

試験期間中、動物の一般状態に変化は見られず、途中死亡例も認められなかった。試験期間中の体重の推移を Figure 4A に示す。2.5%群では投与2週目から対照群に比して体重の有意な低値が認められた。一方、摂餌量において群間の差は認められなかった (Figure 4B)。

最終体重および臓器重量を Table 4 に示す。最終体重は2.5%群で有意な低値とな

った。実重量では0.625%群で心臓の有意な高値が、1.25%以上の群で肝臓および副腎の有意な低値が、2.5%群では脾臓の有意な低値が認められた。相対重量では0.625%で脳の有義な低値が、1.25%以上の群で肝臓および副腎の有義な低値が、2.5%群では腎臓、精巣および脳の有義な高値が認められた。

血清生化学検査の結果を Table 5 に示す。1.25%以上の群でAST、ALT、A/G比、T-Bil及びClは有意な高値が、T-Chol及びKの有義な低値が認められ、2.5%群ではTP及びGluの有義な低値が認められた。また、TG及びBUNは0.625%群において有意な低値を示したものの、用量相関性はみられなかった。

血液学的検査の結果を Table 6 に示す。0.625%以上の群でMCHの有義な高値と好塩基球の有義な低値が、1.25%以上の群でHGB及びMCVの有義な高値と白血球数、好酸球及び単球の低値又は有意な低値が認められた。2.5%群ではRBC及びReticulocyteの有義な低値がみられた。

#### D. 考察

##### D-1. 用量設定試験

Acetamideの一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験を実施するため、4週間の用量設定試験を行った結果、投与群では肝実重量及び相対重量が用量依存的に減少し、2.5%群から肝毒性パラメーターであるALT、AST及びALPの有義な上昇と、肝臓における病理組織学的変化が認められた。一方、5.0%群ではオーバルセルの過形成を除き、いずれの変化も減少又は消失した。これらは、一般状態の悪化に伴う摂餌量の減少によるものと考えられ、本用量は最大耐量を超えていると判断した。以上より、一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験における低用量、中間用量及び高用量をそれぞれ、0.625、1.25及び2.5%に設定した。

本試験では、肝重量の低値、AST及び

ALT の有意な上昇は 1.25% から認められ、これらは予備試験でも認められた肝毒性に伴う変化と考えられた。また、同群ではその他の血清生化学ならびに血液学的パラメーターの変化も認められており、これらの毒性学的意義については平成 31 年度に実施する病理組織学的解析の結果とともに考察する。また、*in vivo* における変異原性の有無を検討することで、acetamide の発がん性機序についても有用な知見が得られると考えられる。

#### E. 結論

一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験の用量設定試験から、acetamide が肝毒性を有することが明らかになった。その結果をもとに、本試験における投与量を 0.625、1.25 および 2.5% に設定し、本試験の動物実験を実施した。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究成果

##### G-1. 発表論文

なし

##### G-2. 学会発表

- 1) 石井雄二，菊池玲美花，木島綾希，高須伸二，小川久美子，梅村隆志「F344 ラットを用いたアセタミドの 28 日間反復投与による肝毒性評価」第 35 回日本毒性病理学会学術集会

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### 参考文献

- 1) Suzuki Y, Umemura T, Hibi D, Inoue T, Jin M, Ishii Y, Sakai H, Nohmi T, Yanai T, Nishikawa A, Ogawa K. Possible involvement of genotoxic mechanisms in estragole-induced hepatocarcinogenesis in

rats. Arch. Toxicol. 86, 1593-1601 (2012).

- 2) Suzuki Y, Umemura T, Ishii Y, Hibi D, Inoue T, Jin M, Ssakai H, Kodama Y, Nohmi T, Yanai T, Nishikawa A, Ogawa K. Possible involvement of sulfotransferase 1A1 in estragole-induced DNA modification and carcinogenesis in the livers of female mice. Mutat. Res. 749, 23-28 (2012).
- 3) Jin M, Kijima A, Suzuki Y, Hibi D, Inoue T, Ishii Y, Nohmi T, Nishikawa A, Ogawa K, Umemura T, Comprehensive toxicity study of safrole using a medium-term animal model with *gpt* delta rats. Toxicology, 290, 312-321.
- 4) Jin M, Kijima A, Hibi D, Ishii Y, Takasu S, Matsushita K, Kuroda K, Nohmi T, Nishikawa A, Umemura T, *In vivo* genotoxicity of methyleugenol in *gpt* delta transgenic rats following medium-term exposure. Toxicol. Sci. 131, 387-394.
- 5) JECFA : WHO Food Additives Series, Evaluation of Certain Food Additives, Report of 65th JECFA meeting , 2005
- 6) Diekmann J, Wittig A, Stabbert R, Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of acrylamide and acetamide in cigarette mainstream smoke after on-column injection. J. Chromatogr. Sci., 46, 659-663 (2008).
- 7) Vismeh R, Haddad D, Moore J, Nielson C, Bals B, Campbell T, Julian A, Teymouri F, Jones AD, Bringi V, Exposure assessment of acetamide in milk, beef, and coffee using xanthidrol derivatization and gas chromatography/Mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 66, 298-305 (2018).