

令和1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

研究課題名：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

分担研究課題名：QSAR試験、Ames試験、哺乳類細胞を用いる遺伝子変異試験から得られる変異原性の比較

分担研究者： 安井 学 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長

研究要旨

昨年度、本班の厚生労働科学研究課題において、2つのQSARモデル（Derek Nexus (DN), Case Ultra (CU))を用いてAmes変異原性が強く疑われた10種類の食品香料について、実際のウェットなAmes試験を実施したところ、9化合物で陽性を示し、QSARによる変異原性香料物質の陽性予測率は90% (9/10)と評価された。一方、そのDNとCUモデルの予測結果が互いに異なる、或いは実際のAmes試験結果がそれらのQSAR結果と異なるものが3物質あった。そこで本研究では、これらの3物質（3-Acetyl-2,5-dimethylfuran、4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone、2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone）について、上位試験であるヒト培養細胞を用いるチミジンキナーゼ遺伝子（TK）変異試験を実施することによって、*in silico*のQSARモデルと細菌を用いるAmes試験の両結果と比較し、TK変異試験の有用性を考察することを目的とする。TK変異試験を実施した結果、3-Acetyl-2,5-dimethylfuran（DN; equivocal、CU; 陽性、Ames; 陽性）は陽性、2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone（DN; 陽性、CU; 陰性、Ames; 陰性）は陰性であり、QSAR解析やAmes試験と結果判定が一致した。一方、4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone（DN; 陽性、CU; 陰性、Ames; 陽性）は、TK変異試験では陰性と判定した。以上のことから、TK変異試験は、精度が良く信頼性の高い試験であること、そしてQSAR試験のCUモデルの結果と最も一致することが分かった。得られたデータは、QSAR予測性の向上、および専門家判断のための重要な遺伝毒性評価データとして資すると考えられる。

キーワード：ヒト細胞、チミジンキナーゼ遺伝子変異試験、Ames試験、QSAR

A. 研究目的

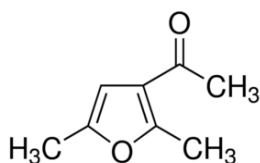
昨年度、本班の厚生労働科学研究課題において、2つのQSARモデル（Derek Nexus, Case Ultra）を用いてAmes変異原性が強く疑われた10種類の食品香料について、実際のウェットなAmes試験を実施したところ、9化合物で陽性を示し、QSARによる変異原性香料物質の陽性予

測率は90% (9/10)と評価された。この結果は香料の変異原性評価にQSAR手法が十分に利用できることを示した。

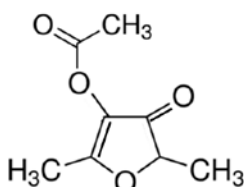
一方、そのDerek NexusとCase Ultraモデルの予測結果が互いに異なる、或いは実際のAmes試験結果がそれらのQSAR結果と異なるものが3物質あった（表1、図1）。4-Acetoxy-2, 5-

dimethyl-3(2H)-furanone と 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone は、酷似した構造を持っているが、Ames 試験結果は前者が陽性、後者が陰性である。一般的に、メトキシ基の方が変異原性増強アラートを有していると考えられるため、この結果は矛盾している。すなわち、フラン類の変異原性の予測と評価には高度の専門家判断が必要と考えられる。

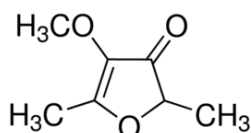
そこで本研究では、これらの3物質について、上位試験であるヒト培養細胞を用いるチミジンキナーゼ遺伝子 (*TK*) 変異試験を実施することによって、*in silico* の QSAR モデルと細菌を用いる Ames 試験の両結果と比較し、*TK* 変異試験の有用性を考察することを目的とする。それらの得られたデータは、QSAR 予測性の向上、および専門家判断のための重要な遺伝毒性評価データとして資すると考えられる。



3-Acetyl-2,5-dimethylfuran
(Cas; 10599-70-9)



4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone
(Cas; 4166-20-5)



2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone
(Cas; 4077-47-8)

図 1. 被験物質の化学構造式

B. 研究方法

1. 細胞と培養

ヒトリンパ芽球細胞 TK6 株は、10% 馬血清 (JRH Bioscience), 200 µg/mL ピルビン酸ナトリウム (和光純薬工業株), 100 U/mL ペニシリン, 100 µg/mL ストレプトマイシン (ナカライテスク株) を含む RPMI 培地 (ナカライテスク株) で培養した。培養は、37 度、5% CO₂ 濃度存在下で行った。

2. 被験物質

3-Acetyl-2,5-dimethylfuran (Cas; 10599-70-9) と 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone (Cas; 4077-47-8) は東京化成工業株式会社、4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (Cas; 4166-20-5) は富士フィルム和光純薬工業株式会社から購入した。

3. ヒト細胞 TK6 株を用いる *TK* 変異試験

TK 変異試験は、原則として OECD ガイドライン (TG490) に従って行った。用量設定試験から始め、本試験の順に実施した。処理細胞数は 10⁷ 細胞、処理時間は 4 時間、陽性対照物質は、メチルメタンサルフォネート (東京化成工業株式会社) を使用した。使用する被験物質は、非代謝活性化条件下で Ames 試験陽性になるため、本研究では代謝活性化条件下の試験は行わなかった。*TK* 変異試験の本試験の陰性対照群は 2 系列、処理群は 1 系列で実施した。形質発現期間は 3 日間とした。結果判定のための統計解析は、大森法 (Omori et al., *Mutat. Res.* 517,199-208 (2002)) を用いた。

C. 研究結果、および考察

1. *TK* 変異試験

1-1) 3-Acetyl-2,5-dimethylfuran

3-Acetyl-2,5-dimethylfuran の試験結果を図 2 に示した。1 回目の試験では、最大濃度を 2000 µg/mL として公比 3 で相対的細胞生存率 (Rel

ative Survival ; RS) を明らかにした。用量 666.7 $\mu\text{g/mL}$ のときに RS が 13.8 %であった。OEC D ガイドラインの規定通り RS = 10~20 % のときの用量を得ることができたため、引き続き TK 変異試験を実施した。その結果、用量 2000 $\mu\text{g/mL}$ では細胞毒性が強く試験続行が不可能であったが、用量 666.7 $\mu\text{g/mL}$ では TK 変異頻度が 8.3×10^{-6} であることが分かった。その値は、未処理群のそれと比較して、明らかに増加しているが、666.7 $\mu\text{g/mL}$ の用量群だけ増加しており明確な陽性と言えないため再試験を実施した。

2 回目の試験は、981.7 $\mu\text{g/mL}$ を最大濃度として公差 200 で実施したところ、581.7 $\mu\text{g/mL}$ のときに、RS が 19.1 %であった。TK 変異頻度を測定した結果、181.7、381.7、581.7 $\mu\text{g/mL}$ の用量依存的に変異頻度が増加した。統計解析をした結果、本試験は陽性であった。

表 1 に示した通り、3-Acetyl-2,5-dimethylfuran は、Ames 試験で陽性である。前年度の本間研究代表者の平成 30 年度厚労科研費報告書によると TA100 の+/-S9、WP2uvrA の-S9、TA98 の-S9 で陽性であり、TA100 の-S9 条件下の時に最大比活性値を示し 1281 revertants/mg (強い陽性) である。QSAR 試験においても明らかに陽性判定となっている。本研究で行った TK 変異試験においても明らかな陽性を示したように、既報の Ames 試験と QSAR 試験の陽性結果と一致した。3-Acetyl-2,5-dimethylfuran は、Ames 試験において比活性値 1000 revertants/mg を超える強い変異原性を有するため、3 つ全ての試験系で陽性を示したものと考えられる。

Ames 試験において塩基置換型の TA100、WP2uvrA 株、およびフレームシフト型の TA98 株を使用したときに陽性になっていることから、DNA 付加体の形成が疑われる。しかしながら、PubMed 等で 3-Acetyl-2,5-dimethylfuran の DNA 付加体に関する情報は無かった。

1 - 2) 4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone

4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone の結果を図 3 に示した。1 回目の試験では、最大濃度を 1701.6 $\mu\text{g/mL}$ として公比 3 で RS を測定した。用量 567.2 $\mu\text{g/mL}$ では RS が 62.8 %であったが、用量 1701.6 $\mu\text{g/mL}$ のときは、急に細胞毒性がすすみ、RS が 7.4 %に低下した。RS = 10~20 % 付近の至適濃度を定めるために、その用量間で再試験を実施することにした。なお、最高濃度 1701.6 $\mu\text{g/mL}$ の RS 値が 10 %以下 (7.4 %) だったため、正確な TK 変異頻度データとして採用しなかった。

2 回目の再試験のため、1701.6 $\mu\text{g/mL}$ を最大濃度として公差 200 で試験を行った。その結果、用量 1301.6、1501.6 $\mu\text{g/mL}$ の群で、RS が約 20 % であることが分かった。次に、その 1501.6 $\mu\text{g/mL}$ を最大濃度として TK 変異頻度を明らかにした。その結果、701.6 $\mu\text{g/mL}$ からの各処理群の TK 変異頻度は、未処理群のそれよりも上昇し、統計解析では陽性判定であった。しかしながら、未処理群の TK 変異頻度が 1.4×10^{-6} であり、今回の試験はこれまでの TK 変異頻度背景データの中でも非常に低かった。また、701.6~1501.6 $\mu\text{g/mL}$ の 5 用量において、 $2.7 \sim 4.7 \times 10^{-6}$ の TK 変異頻度を推移し、この幅広い用量域において用量依存的に TK 変異頻度の上昇がなかった。以上の 2 点を根拠として、本試験は陰性と判定した。

表 1 に示した通り、4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone は、Ames 試験で陽性である。前年度の本間研究代表者の平成 30 年度厚労科研費報告書によると、TA100 の+/-S9 で陽性であり、最大比活性値は 77 (TA100 の+S9) である。つまり、前述の 3-Acetyl-2,5-dimethylfuran よりも 4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone は、弱い陽性であり、さらに本研究で実施する非代謝活性化条件下 (-S9) では、さらに弱い陽性であると考えられる。QSAR 解析でも Derek Nexus で陽性であるが、Case Ultra で陰性と判定されて

いる (表 1)。本研究で行った *TK* 変異試験においても、高用量域は、未処理群の *TK* 変異頻度よりごくわずかに増加している傾向が見受けられるため、明らかに陽性ではない。前述の通り、統計解析では陽性だが、*TK* 変異頻度データを詳細にみると未処理群のそれが非常に低いことと用量依存性が無かったことから総合的判断として陰性と判定した。本物質は、*TK* 変異試験結果と Ames 試験結果が異なる結果となったが、バクテリア特異的な代謝反応等によって陽性になることが原因として考えられるが、現段階では分からない。4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone の Ames 試験陽性が比較的弱いこと、そして *TK* 変異試験もわずかであるが陽性の傾向があることから、陰性と陽性の境界にあると考えられる。*TK* 変異試験の 24 時間処理を実施すると陽性になるかもしれない。

1 - 3) 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone
2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone の結果を図 4 に示した。最大濃度を 1421.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ として公比 3 で RS を測定した。用量 17.5~1421.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の各用量では RS がおよそ 80 % を推移し、それ以上の細胞毒性は観察されなかった。したがって、*TK* 変異試験は最大濃度を 1421.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ として引き続き実施した。その結果、最大濃度 1421.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であっても、*TK* 変異頻度は、未処理群のそれよりも上昇せず、陰性と判定された。

表 1 に示した通り、2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone は、Ames 試験で陰性である。QSAR 試験においては Derek Nexus で陽性であるが、Case Ultra で陰性と判定されている (表 1)。本研究で行った *TK* 変異試験においても明らかな陰性を示したように、既報の Ames 試験と QSAR 試験 (Case Ultra) の結果と一致した。

D. 結論

本研究によって得られた 3-Acetyl-2,5-dimethyl-

ifuran、4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone、そして 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone の 3 種のフラン類について、上位試験であるヒト培養細胞を用いる *TK* 変異試験を実施し、その結果を表 2 に示した。*TK* 変異試験は、Ames 試験と QSAR 試験の陽性物質に対して陽性と判定した。また、*TK* 変異試験は、Ames 試験と QSAR 試験 (Case Ultra) の陰性物質に対して陰性と判定した。以上のことから、*TK* 変異試験は、精度が良く信頼性の高い試験であること、そして QSAR 試験の Case Ultra モデルの結果と最も一致することが分かった。得られたデータは、QSAR 予測性の向上、および専門家判断のための重要な遺伝毒性評価データとして資すると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Sassa A, Fukuda T, Ukai A, Nakamura M, Takabe M, Takamura-Enya T, Honma M, Yasui M. Comparative study of cytotoxic effects induced by environmental genotoxins using XPC- and CSB-deficient human lymphoblastoid TK6 cells. *Genes Environ.* 41 :15 (2019). doi: 10.1186/s41021-019-0130-y.

2. 学会発表

1) 安井学, 福田隆之, 鶴飼明子, 馬庭二郎, 山本春菜, 今村匡志, 藤島沙織, 大谷尚子, 成見香瑞範, 松崎香織, 岡田祐樹, 中川宗洋, 上田摩弥, 三崎健太郎, 足立淳, 小川久美子, 本間正充: Ames 陽性を示す 10 化学物質のフォローアップに関する *TK* 遺伝子変異試験の有用性の検討: MMS 共同研究の報告. アジア環境変異原学会第 6 回大会/日本環境変異原学会第 48 回大会合同大会 (2019.11.18)

2) 竹入章, 松崎香織, 田中健司, 小川久美子, 安井学, 本間正充, 三島雅之: TK6 細胞にお

ける γ H2AX 評価は Ames 試験陽性の初期フォローアップとして有用である: MMS 共同研究追加項目. アジア環境変異原学会第 6 回大会/日本環境変異原学会第 48 回大会合同大会(2019.11.20)

- 3) 山本美佳, 大谷尚子, 安井学, 小川久美子, 本間正充: Ames 試験陽性のフォローアップとしての *in vitro* Comet assay の有用性の検討: MMS 共同研究オプション試験. アジア環境変異原学会第 6 回大会/日本環境変異原学会第 48 回大会合同大会(2019.11.18)

G. 知的所有権の取得状況

なし

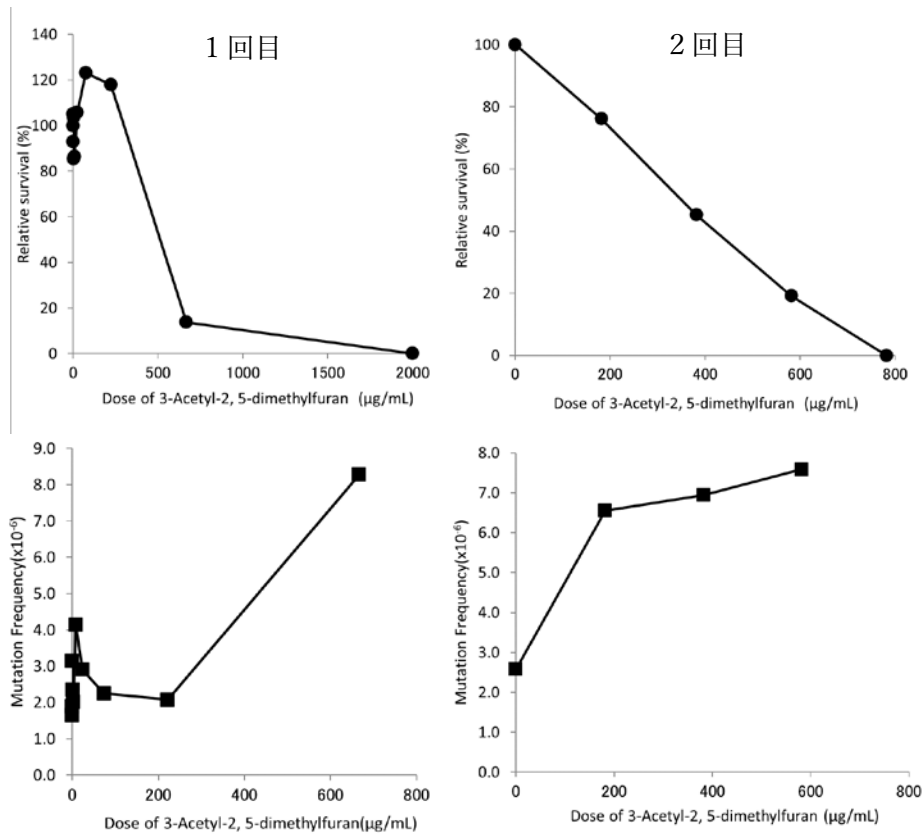


図2. 3-Acetyl-2,5-dimethylfuran の TK 変異試験結果

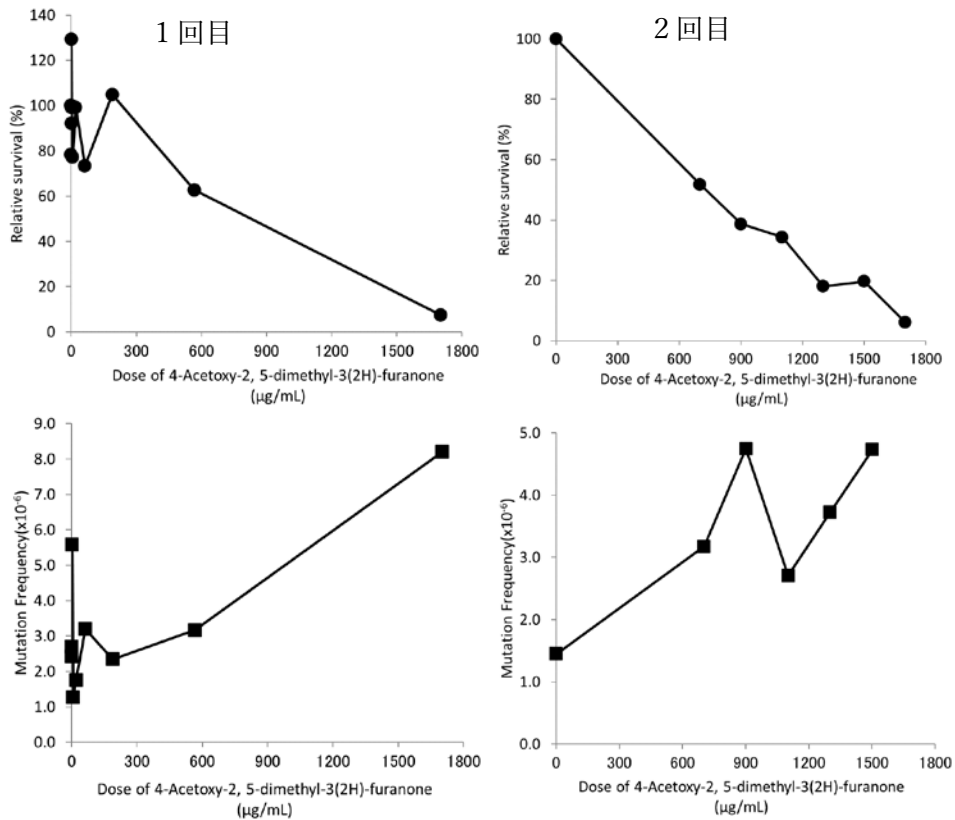


図3. 4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone の TK 変異試験結果

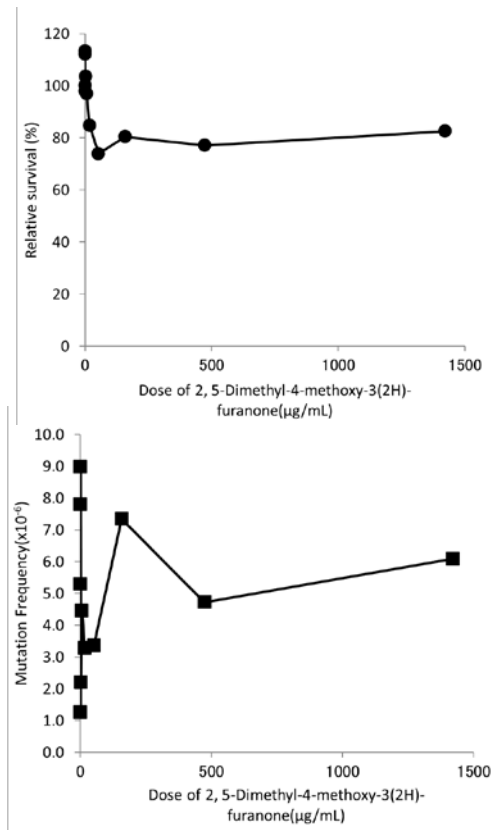


図 4. 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone の TK 変異試験結果

表1. QSAR 試験と Ames 試験の結果*

	QSAR		Ames 試験
	Derek Nexus	Case Ultra	
3-Acetyl-2,5-dimethylfuran (Cas; 10599-70-9)	Equivocal	Positive	Positive
4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (Cas; 4166-20-5)	Plausible (Positive)	Negative	Positive
2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone (Cas; 4077-47-8)	Plausible (Positive)	Negative	Negative

*前年度の本間研究代表者の平成 30 年度厚労科研費報告書から引用

表2. ヒト培養細胞を用いる TK 変異試験との比較

	QSAR*		Ames 試験*	ヒト培養細胞 を用いる TK 変異試験
	Derek Nexus	Case Ultra		
3-Acetyl-2,5-dimethylfuran (Cas; 10599-70-9)	Equivocal	Positive	Positive	Positive
4-Acetoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (Cas; 4166-20-5)	Plausible (Positive)	Negative	Positive	Negative
2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone (Cas; 4077-47-8)	Plausible (Positive)	Negative	Negative	Negative

*前年度の本間研究代表者の平成 30 年度厚労科研費報告書から引用