

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、その関与は未だ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。平成 30 年度に引き続き、acetamide を 0.625、1.25 および 2.5% の濃度で 13 週間混餌投与した F344 系 *gpt delta* ラットについて、全身諸臓器の病理組織学的検索と発がん標的臓器である肝臓における遺伝毒性評価を実施した。肝臓では 1.25% から肝細胞の空胞化、核成分に由来する細胞質内封入体、核分裂像の増加、変異肝細胞巣等の変化が認められ、脾臓では 2.5% において赤芽球の減少が認められたことから、acetamide がラット肝臓および造血器系組織に毒性影響を及ぼすことが明らかになった。また、本試験における acetamide の無毒性量は 0.625%（394 mg/kg 体重/日に相当）と考えられた。遺伝毒性評価では、*gpt assay* および *Spi assay* とともに、いずれの投与群においても変異体頻度の変化は認められなかったことから、acetamide のラット肝発がん過程において突然変異誘発性の関与は乏しいと考えられた。

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シ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ている¹⁻⁴⁾。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^{3,4)}。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⁵⁾。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^{6,7)}、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。

平成 30 年度は用量設定試験の後、本試験として雄性 6 週令の *gpt delta* ラットに acetamide を 0.625、1.25 および 2.5% の濃度で 13 週間混餌投与し、血液学的検査および血清生化学検査を実施した。その結果、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、肝毒性が疑われた。本年度は、全身諸臓器の病理組織学的検査と肝臓における遺伝毒性評価を実施した。

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. Acetamide の一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括的試験

B-2-1 動物実験

動物は 5 週令の雄性 F344 系 *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。動物の飼育はバリヤー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 delta* ラットを各群 10 匹に配し、対照群と低用量、中間用量及び高用量群の計 4 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。

B-2-2. 一般毒性評価

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ナーゼ (ALP), γ -グルタミルトランスペプチターゼ (γ -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。

B-2-3. 遺伝毒性評価

Acetamide の遺伝毒性評価として, 発がん標的臓器である肝臓を用いて *gpt* assay および *Spi* assay を実施した。

gpt assay では回収したファージ粒子を

大腸菌 YG6020 に感染させ 6-チオグアニン (6-TG) とクロラムフェニコール (Cm) を含む培地上で生育するコロニーを単離した。単離したコロニーについては, 再度, 6-TG と Cm を含むプレートにストリークして生育することを確認した。また, ファージ粒子の懸濁液を適宜希釈した後 YG6020 株に感染させ, Cm のみを含む培地上で生育したコロニー数を計測した。Cm プレートで生育したコロニー数に希釈倍率を掛けて回収した総ファージ数 (あるいは回収した総トランスジーン数) を求めた。6-TG と Cm に耐性となったコロニー数を総ファージ数で除して *gpt* 遺伝子変異体頻度 (MFs) を算出した。また, 6-TG と Cm に耐性となったコロニーは Thermo Fisher Scientific 社製 3730x1 DNA Analyzer にて *gpt* 遺伝子の塩基配列解析を行い, 変異部位を同定した。

Spi assay による欠失変異の検出では, ファージは P2 lysogen (大腸菌 XL-1 Blue MRA(P2)株) に感染させ, *Spi* プラークの候補については, さらに他の P2 溶原菌 (大腸菌 WL95 株) に感染させ, *redgam* 遺伝子機能が不活化した真の *Spi* プラークを検出した。また, パッケージ反応後の懸濁液を希釈した後に P2 ファージが溶原化していない大腸菌 XL-1 Blue MRA 株に感染させて, 総プラーク数を算出した。真の *Spi* プラーク数を回収した総プラーク数で除して *Spi* MF を算出した⁸⁾。

(倫理面への配慮)

動物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. 一般毒性評価

全身諸臓器の病理組織学的検査の結果を Table 1 に示す。肝臓では、1.25%から肝細胞の空胞化、有糸分裂像の増加、単細胞壊死、好塩基性の細胞質内封入体、核の大小不同、オーバルセル過形成及び変異肝細胞巣が認められた。脾臓では、2.5%において赤芽球の減少が認められた。その他、種々の臓器で病理所見が散見されたが、いずれも統計学的に有意ではなく、自然発生性の変化と考えられた。

C-2. 遺伝毒性評価

肝臓を用いた *gpt* assay 及び *Sp1* assay の結果をそれぞれ Table 2 及び 3 に示す。いずれの投与群においても *gpt* 及び *Sp1* MFs の有意な変化は認められなかった。また、*gpt* 遺伝子の変異スペクトラム解析を行ったものの、*acetamide* に投与による変異パターンの変化は認められなかった (Table 4)。

D. 考察

D-1. 一般毒性評価

肝臓の病理組織学的検査では、1.25%から単細胞壊死、オーバルセル過形成といった肝傷害性の変化が観察され、2.5%ではそれらの程度及び頻度が増加していた。これらの変化は、昨年度報告した血清生化学検査における肝毒性パラメーターの上昇と一致していた。また、肝細胞の空胞化は血清生

化学検査における TG の減少に関連した変化と考えられた。核成分に由来する細胞質内封入体も 1.25%から認められ、同群では有糸分裂像の増加および核の大小不同が高頻度に認められたことから、当該封入体は有糸分裂異常に関連した変化と考えられた。変異肝細胞巣については、令和 2 年度に実施する発がん性評価と合わせて考察する。

脾臓の病理組織学的検査では、2.5%で赤芽球の減少が認められた。当該変化は、血液学的検査における赤血球系パラメーターの変動に関連した変化と考えられた。

なお、0.625%では、血清生化学検査における TG の低値、及び血液学的検査における MCH の高値と好塩基球の低値が認められたが、いずれも軽微な変化であり、関連するパラメーターの変動や病理組織変化を伴っていなかったことから、毒性学的意義は乏しいと判断した。

D-2. 遺伝毒性評価

発がん標的臓器である肝臓における変異原性評価では、発がん用量である 2.5%においても *gpt* 及び *Sp1* MFs の変化は認められなかったことから、*acetamide* のラット肝発がんにおける突然変異誘発性の関与は乏しいと考えられた。一方、病理組織学的検査において肝臓で認められた細胞質内封入体は核成分に由来しており、小核とも類似していたことから、今後、同組織を用いた肝臓小核試験を実施し、肝臓における染色体異常の有無と肝発がん性との関連について検討する。

E. 結論

一般毒性試験において、*acetamide* は 1.25%から肝臓及び造血器系組織に毒性影響を示すことが明らかとなり、本試験における無毒性量は 0.625% (394 mg/kg 体重/日に相当) と考えられた。

また、発がん標的臓器である肝臓における遺伝毒性評価の結果、*acetamide* は *in vivo* においても変異原性を示さないことが明ら

かとなった。

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) 中村賢志, 木島綾希, 高須伸二, 能美健彦, 石井雄二, 小川久美子「レポーター遺伝子導入動物を用いた包括的毒性試験法による acetamide の評価」第5回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2019年9月)
- 2) 中村賢志, 石井雄二, 木島綾希, 高須伸二, 能美健彦, 渋谷 淳, 小川久美子「*gpt delta* ラットを用いた acetamide のラット肝発がんメカニズムに関する検討」第36回日本毒性病理学会学術集会 (2020年2月)

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).
- 8) Nohmi T, Suzuki T, Masumura K. Recent advances in the protocols of transgenic mouse mutation assay. Mutat. Res. 455, 191-215 (2000).

Table 1 Histopathological findings in F344 *gpt* delta rats given diet containing acetamide for 13 weeks.

Organs	Findings (\pm / $+$ / $++$ / $+++$)	Acetamide (%)			
		0	0.625	1.25	2.5
	No. of animals	10	10	10	10
Liver	Vacuolation, hepatocyte	0	0	10 (8/2/0/0)	10 (0/4/6/0)
	Single cell necrosis	0	0	8 (7/1/0/0)	10 (4/6/0/0)
	Oval cell hyperplasia	0	0	6 (6/0/0/0)	10 (3/7/0/0)
	Increased mitoses, hepatocyte	0	0	9 (6/3/0/0)	10 (1/9/0/0)
	Karyomegaly, hepatocyte	0	0	9 (5/4/0/0)	10 (0/10/0/0)
	Cytoplasmic inclusion, hepatocyte	0	0	10 (2/8/0/0)	10 (0/10/0/0)
	Foci of cellular alteration	0	0	3 (2/1/0/0)	10 (0/1/9/0)
	Necrosis, focal	0	0	0	1 (1/0/0/0)
Spleen	Decrease, erythroblast	0	0	0	7 (5/2/0/0)
Kidneys	Hyaline droplet	9 (9/0/0/0)	-	-	0
	Basophilic tubule	9 (9/0/0/0)	-	-	2 (2/0/0/0)
Harderian glands	Mononuclear cell infiltration	0	-	-	1 (1/0/0/0)
Heart	Degeneration/necrosis, cardiomyocyte	3 (3/0/0/0)	-	-	3 (2/1/0/0)
	Mononuclear cell infiltration	5 (4/1/0/0)	-	-	4 (4/0/0/0)
Lungs	Alveolar macrophage aggregation	1 (1/0/0/0)	-	-	1 (1/0/0/0)
	Osseous metaplasia	2 (2/0/0/0)	-	-	0
	Mineralization, pulmonary artery	2 (2/0/0/0)	-	-	1 (1/0/0/0)
Adrenals	Accessory adrenal gland	0	-	-	2
Epididymides	Mononuclear cell infiltration	1 (1/0/0/0)	-	-	1 (1/0/0/0)
Prostate	Atrophy, acinus	1 (1/0/0/0)	-	-	0
	Neutrophil infiltration	0	-	-	2 (2/0/0/0)
Salivary glands	Degeneration, acinar cell	0	-	-	1 (1/0/0/0)
Nasal cavity	Mineralization, epithelium	1 (1/0/0/0)	-	-	1 (1/0/0/0)
	Neutrophil infiltration, submucosa	0	-	-	1 (1/0/0/0)
Mediastinal lymph node	Deposit, brown pigment, sinus	1 (1/0/0/0)	-	-	1 (1/0/0/0)

Grade of change: \pm , minimal; +, slight; ++, moderate; +++, marked.

-: Not examined.

*, **: Significantly different from the 0% group at $p < 0.05$ and 0.01 , respectively (Fisher's t-test).

Table 2 *gpt* MFs in the liver of F344 *gpt* delta rats given diet containing acetamide for 13 weeks.

Dose	Animal No.	Cm ^R colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± SD
0%	101	7.43	2 ^a	0.27	0.57 ± 0.53
	102	4.05	6	1.48	
	103	3.51	2	0.57	
	104	3.06	1	0.33	
	105	5.22	1	0.19	
0.625%	201	3.60	2	0.56	0.66 ± 0.42
	202	3.83	1	0.26	
	203	6.66	3	0.45	
	204	3.65	5	1.37	
	205	7.74	5	0.65	
1.25%	301	3.65	2	0.55	1.16 ± 0.64
	302	5.31	5	0.94	
	303	4.01	7	1.75	
	304	5.18	10	1.93	
	305	3.06	2	0.65	
2.5%	401	3.06	2	0.65	1.26 ± 0.70
	402	5.00	5	1.00	
	403	5.40	4	0.74	
	404	3.15	5	1.59	
	405	3.02	7	2.32	

^a: Number of colonies with independent mutations.

Table 3 Mutation spectra of *gpt* mutants in the liver of F344 *gpt* delta rats given diet containing acetamide for 13 weeks.

Dose	0%		0.625%		1.25%		2.5%	
	No. (%)	Specific mutation frequency (x 10 ⁻⁵)	No. (%)	Specific mutation frequency (x 10 ⁻⁵)	No. (%)	Specific mutation frequency (x 10 ⁻⁵)	No. (%)	Specific mutation frequency (x 10 ⁻⁵)
Base substitutions								
Transversions								
GC-TA	3 ^a (25.0)	0.13 ± 0.21	3 (18.8)	0.11 ± 0.12	4 (15.4)	0.18 ± 0.18	6 (26.1)	0.31 ± 0.08
GC-CG	0	0	0	0	2 (7.7)	0.09 ± 0.12	1 (4.3)	0.04 ± 0.08
AT-TA	0	0	0	0	0	0	2 (8.7)	0.13 ± 0.30
AT-CG	1 (8.3)	0.03 ± 0.06	0	0	0	0	0	0
Transitions								
GC-AT	5 (41.7)	0.26 ± 0.36	8 (50.0)	0.35 ± 0.43	10 (38.5)	0.49 ± 0.37	10 (43.5)	0.55 ± 0.14
AT-GC	0	0	1 (6.3)	0.03 ± 0.06	1 (3.8)	0.05 ± 0.11	1 (4.3)	0.04 ± 0.09
Deletion								
Single bp	2 (16.7)	0.10 ± 0.15	1 (6.3)	0.06 ± 0.12	6 (23.1)	0.23 ± 0.11	2 (8.7)	0.13 ± 0.18
over 2bp	1 (8.3)	0.05 ± 0.11	1 (6.3)	0.03 ± 0.07	1 (3.8)	0.05 ± 0.11	0	0
Insertion	0	0	2 (12.5)	0.08 ± 0.12	2 (7.7)	0.08 ± 0.17	1 (4.3)	0.06 ± 0.14
Complex	0	0	0	0	0	0	0	0

^a: Number of colonies with independent mutations.

Table 4 Spi⁺ MFs in the liver of F344 *gpt* delta rats given diet containing acetamide for 13 weeks.

Dose	Animal No.	Plaques within XL-1 Blue MRA (x 10 ⁵)	Plaque WL95 (P2)	withinMutant frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± SD
0%	101	3.24	1	0.31	0.33 ± 0.13
	102	4.05	2	0.49	
	103	4.50	0	0.00 ^a	
	104	5.31	1	0.19	
	105	3.15	1	0.32	
0.625%	201	5.40	0	0.00 ^a	0.80 ± 0.36
	202	6.66	6	0.90	
	203	6.39	7	1.10	
	204	5.04	2	0.40	
	205	5.40	0	0.00 ^a	
1.25%	301	5.94	1	0.17	0.43 ± 0.27
	302	3.87	3	0.78	
	303	3.69	1	0.27	
	304	4.59	3	0.65	
	305	7.29	2	0.27	
2.5%	401	5.40	4	0.74	0.73 ± 0.43
	402	6.39	2	0.31	
	403	3.78	2	0.53	
	404	3.06	0	0.00 ^a	
	405	7.56	10	1.32	

^a: No mutant colonies were detected on the plate and this data was excluded from the calculation of mutant frequency.