

令和5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）
香料を含む食品添加物の遺伝毒性から発がんに至る毒性評価スキーム
確立に向けた基盤的研究

**分担研究課題名：エピジェネティックな影響を含むファーストスクリーニング系としての
遺伝毒性評価スキーム確立に向けた基盤研究**

研究分担者	古濱 彩子	国立医薬品食品衛生研究所	変異遺伝部
研究分担者	佐々 彰	千葉大学大学院理学研究院	生物学研究部門
研究分担者	本間 正充	国立医薬品食品衛生研究所	所長
研究分担者	杉山 圭一	国立医薬品食品衛生研究所	変異遺伝部

研究要旨

今年度の本分担研究については、香料等における定量的構造活性相関（QSAR）の活用スキームの提案に向けて、使用量が多い香料 50 物質に対して、Ames/QSAR 予測と遺伝毒性情報の既存情報の調査と整理を行った。また、ヒト TK6 細胞をもとにエピジェネティックな変化を定量可能なエピ遺伝毒性試験の検出能の評価を行った。詳細については以下の通りである。

令和 2 年に国内で実際に使用された 18 類香料のデータの資料を活用し、使用量が多い 50 物質について Ames/QSAR による解析並びに既存毒性情報の収集を実施した。毒性情報については国外の情報も収集する必要はあるが、50 物質のうち 48 物質が酸素を含む物質であり、ジケトンや炭素が 6 つの直鎖アルデヒドなど構造が似通った物質で QSAR または実試験で陽性の懸念が高かった。特にアルデヒドやジケトンなどの懸念の高い部分構造が含まれる場合には、懸念が高い構造を基準として判断できる QSAR を併用しながら評価をすすめると効率的だと考えられた。

TK6 細胞を用いたエピ遺伝毒性試験系については、TK 遺伝子をレポーター領域としてエピジェネティックな変化を検出する試験細胞株 LmTK6 を用いて、5-azadeoxycytidine および GSK-3484862 によって DNA 脱メチル化を受ける TK 遺伝子領域の塩基配列を同定した。また、12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate が持つエピジェネティック作用を新たに同定した。

A. 研究目的

香料等の食品添加物の遺伝毒性の第一段階（スクリーニング）の評価には、*in silico* もしくは *in vitro* 手法を用いることが効率的で妥当である。現状 Ames 試験は現在もその中心を担っている一方で、*in silico* の遺伝毒性評価としての Ames 変異原性を予測する定量的構造活性相関（QSAR）モデルの活用が進んでいることから、香料等における Ames/QSAR の活用スキームの提案に資する研究を行う。また、新たな遺伝毒性研究の分野としてゲノムのエピジェネティックな

変化を介し発がんが促進されることも明らかにされつつあり、香料等の食品添加物によるゲノム不安定性からの発がん予測としての新たな *in vitro* 試験系の構築も待たれている。そこで、*in vitro* 遺伝子突然変異試験をプラットフォームとして、哺乳類細胞を活用したエピジェネティックな変化を検出定量する新規試験法の構築も検討する。

B. 研究方法

B-1. Ames/QSARを含む香料の遺伝毒性評価

令和4年度から我が国における香料の使用実態から、優先的に遺伝毒性評価を実施することが望ましいと考えられる香料を選定するための基盤構築も開始し、2020年(令和2年)において国内で実際に使用された18類香料のデータ(出典:令和3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)「食品添加物の安全性確保に資する研究」分担研究「食品添加物の摂取量推計及び香料規格に関する研究」資料4「香料化合物使用量調査結果」)を活用し、類ごと、および18類香料に属する香料品目ごとの使用量の傾向について調べた。得られた2020年1~12月に日本で使用された香料化合物(個別指定のものを除く)のうち、使用量の多い順番に50番目までの物質(本研究課題令和4年度分担研究課題名:エピジェネティックな影響を含むファーストスクリーニング系としての遺伝毒性評価スキーム確立に向けた基盤研究)(以下「令和4年度分担報告書」と記載)について、本年度はAmes/QSARによる解析並びに既存毒性情報の収集を実施した。

Ames/QSARは、知識(ルール)ベースはLhasa Limited社(UK)のDEREK Nexus(ver. 6.2.1, Nexus 2.5.2)、及び統計ベースはMultiCASE社(USA)のCASE Ultra(GT1_BMUTモデル, ver. 1.9.0.2)を用いた。Lhasa Limitedでは、EQUIVOCAL、PLAUSIBLE、PROBABLEを陽性、INACTIVEを陰性と判断した。CASE Ultraでは、今回の解析においてはPositive(陽性確率Prob>60%)、Known Positive、Inconclusive(Prob:40~60%)を陽性、Negative(Prob<40%)、Known Negativeを陰性とした。

なお、対象とした50物質のうち使用量番号39番の(5 α)-decanoic acidは5-decanoic acidと6-decanoic acid、使用量番号45番のethyl 2-[(5-methyl-2-propan-2-yl)cyclohexanecarbonyl]amino]acetateは光学異性体の考慮の有無でそれぞれ2構造を有したため、それぞれの構造でQSARを実施し、合計

52構造をQSARの対象とした。

既存毒性情報については、①これまで国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部で実施されてきた香料類の遺伝毒性試験データ、②既存化学物質毒性データベース(https://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/jsp/SearchPage.jsp)の復帰突然変異(Ames)試験・ほ乳類染色体異常試験・インビボ小核試験・マウスリンフォーマTK試験・ヒトリンパ芽球TK6試験・トランスジェニックげっ歯類を用いた遺伝子突然変異(TG)試験、③職場のあんぜんサイト(<https://anzeninfo.mhlw.go.jp/user/anzen/kag/sokatutbl.htm>)のAmes試験・染色体異常試験、④職場のあんぜんサイトSDS(https://anzeninfo.mhlw.go.jp/anzen_pg/GHS_MSD_FND.aspx)の生殖細胞変異原性に記載された情報について収集を行った。

B-2. ヒト細胞を用いたエピ遺伝毒性試験の実施

B-2-1. 細胞培養

試験に用いるヒトリンパ芽球細胞株LmTK6は、TK6細胞株をもとにCRISPR/dCas9-DNMT3A DNAメチル化システムを用いて、チミジンキナーゼ(TK)遺伝子をエピジェネティックに不活化制御した細胞株である。LmTK6は、10% FETAL BOVINE SERUM (CCB)、200 μ g/mLピルビン酸ナトリウム(和光純薬工業)、100 U/mLペニシリン、100 μ g/mLストレプトマイシン(ナカライテスク)、3 μ g/ml トリフルオロチミジン(TFT)(SIGMA)を添加したRPMI-1640培地(ナカライテスク)を用いて、5% CO₂、37°Cの条件で培養した。

B-2-2. エピ遺伝毒性試験

被験物質として5-aza-deoxycytidine (5-aza-dC)は東京化成工業(株)、GSK-3484862はChemietek、12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)は富士フィルム和光純薬(株)よりそれぞれ購入したものをを用いた。細胞培養液を1,500 rpm 5

分間遠心分離してTFTを含む上清を取り除き、TFTを含まない培地を加えて 5×10^5 cell/mLの細胞懸濁液を調製した。被験物質は細胞懸濁液に対して100分の1量加え、 37°C で24時間培養して処理を行った。その後細胞を洗浄し、以下の条件でプレATINGを行った。平板効率測定のために8 cells/mLで96穴プレートに200 $\mu\text{l/well}$ で播種した。並行してTK復帰頻度測定のために $2 \times 10^2 \sim 1 \times 10^5$ cell/mLの範囲で細胞を希釈して、200 μM hypoxanthine、0.1 μM aminopterin、and 17.5 μM thymidine (HAT) 存在下で96穴プレートに200 $\mu\text{l/well}$ で播種した。21日後に、それぞれのプレートにおける生存コロニーをカウントした。TK遺伝子におけるDNAメチル化領域はバイサルファイトシーケンスによって同定した。

(倫理面への配慮)

エピ遺伝毒性試験には培養細胞株を用いるため、個人情報保護および生命倫理に関する規定には抵触しない。

C. 研究結果

C-1. Ames/QSARを含む香料の遺伝毒性評価

QSARを実施した結果は表1の通りである、Derek Nexusでは6物質が陽性、陰性は44物質(46構造)であり、CASE Ultraは5物質が陽性、陰性は44物質(46構造)、Out of Domainが1構造であった。両方のQSARでQSARで陽性なのは4物質、陰性なのは42物質(44構造)であった。使用量番号39番の(5 α -r6)-decenoic acid(表1のQSAR ID39と40)と使用量番号45番のethyl 2-[(5-methyl-2-propan-2-ylcyclohexanecarbonyl)amino]acetate(表1のQSAR ID46と47)はいずれも両方のQSARで陰性であったため、以後同一番号では同一の結果として扱う。また、表1ではQSARを行う上で構造を確認し、特徴的な構造を追記した。

毒性試験情報について、変異遺伝部で実施した遺伝毒性試験結果が得られていたのは14物質で陽性の結果を含む物質は6物質であったが、インビボ遺伝毒性試験で陽性の物質は含まれていなかった。

既存化学物質の遺伝毒性試験で情報が得られたのは6物質で陽性は使用量番号50番のraspberry ketoneはインビトロ染色体異常試験陽性であった。職場のあんぜんサイトではAmes試験のみ3物質の情報の情報がえられ、いずれも陰性であった。職場のあんぜんサイトSDSは、情報なしも含めてSDSは22物質で得られ、5物質(使用量番号8番のlactic acid、29番のhexanal、31番のdiacetyl、34番のl-carvone、40番のisobutyric acid、47番のfurfural)で何らかの試験で陽性の記載が含まれていた。陽性の記載内容は表2の通りであり、全てGHS分類「分類できない」であった。

構造ごとにQSAR結果と毒性情報の整理を行うと、アルコール・カルボン酸かエステル、カルボニル基(アルデヒドとジケトンを除く)を有する物質と表1で分類した39物質は、2つのQSARが陰性であり、かつAmes実試験で陰性の結果であった。この41物質には染色体異常試験陽性ならびにマウスリンパ腫を用いた遺伝子突然変異試験(JECFA 40(1998))で弱陽性(表2参照)のものは含まれていた。ジケトン(含アルコールの互変異性によって存在しうる物質)・アルデヒド(いずれも6炭素の直鎖)・フルフラールそしてフェノールとパラ位置にカルボニル基を有する物質(ラズベリーケトン)として表1で分類した9物質については、2つのQSARのどちらか/両方が陽性であるか、Ames実試験またはかつインビトロ染色体異常試験で陽性となる情報が得られていた。その他とした2物質(使用量番号7番d-limoneneと13番のdimethyl sulfide)は酸素を含む官能基の分類はできないが、QSAR陰性またOut of Domainであり、遺伝毒性陽性の情報は得られなかった。

C-2. ヒト細胞を用いたエピ遺伝毒性試験の実施

昨年度までに同定した5-aza-dCおよびGSK-3484862が有するエピジェネティック作用について、DNA脱メチル化の配列特異性を調べた。化合物処理後のTK復帰コロニーを単離し、バイサルファイトシーケンスによってTK遺伝子プロモーター領域上のDNAメチル化状態を解析した結果、TK遺伝子エキソン1上流150 bpにある全てのCpG配列の脱メチル化が認められた(図1)。LmTK6に対してTPAを37°C 24時間処理した結果、溶媒対照と比較してTK復帰頻度が最大で49倍低下した(図2)。

D. 考察

D-1. Ames/QSARを含む香料の遺伝毒性評価

使用量の多い50物質についてQSARと既存遺伝毒性調査を行った。毒性情報については国外の情報も収集する必要はあるが、50物質のうち48物質が酸素を含む物質であり、ジケトンや炭素が6つの直鎖アルデヒドなど構造が似通った物質でQSARまたは実試験で陽性の懸念が高かった。18類との対応関係は表3の通りであり、脂肪族高級アルコール類(7類)、芳香族アルコール類(16類)、エステル類(4類)、ラクトン類(18類)、脂肪酸類(6類)はQSARを含めた既存情報によると懸念が低い分類だと示唆された。その一方で、脂肪族高級アルデヒド類(8類)、ケトン類(5類)、そしてフルフラール及びその誘導体(15類)については遺伝毒性の懸念の高い情報が集まった分類に相当するため、優先して評価が必要ではないかと示唆される。特に昨年の調査によるとケトン類については2020年調査において18類ごとの使用量の割合がエステル類に次いで多いことを昨年度報告しており(令和4年度分担報告書図6参照)、優先して調査が必要な分類だと提案することができる。なお、ラクトン類・脂肪酸類・エステル類は懸念が低い物質の分類には含まれるが、香料化合物判断

の判断樹においてケトン類よりも優先して決定される(令和4年度分担報告書図1参照)。特にアルデヒドやジケトンなどの懸念の高い部分構造が含まれる場合には、懸念が高い構造を基準として判断できるQSARを併用しながら評価をすすめると効率的だと考えられる。

D-2. ヒト細胞を用いたエピ遺伝毒性試験の実施

DNA脱メチル化作用を有する5-aza-dCおよびGSK-3484862について、化合物で処理後のTK復帰細胞ではTKプロモーター上全てのCpG配列の脱メチル化が認められた。すなわち、エピ遺伝毒性試験で検出されるDNA脱メチル化は、レポーターであるTK遺伝子上で塩基配列の偏りなく生じると考えられる。非遺伝毒性発がん物質として知られるTPAをLmTK6に24時間処理した結果49倍もの大幅なTK復帰頻度の低下が認められた。この結果から、TPAはTK遺伝子のヘテロクロマチン化を促進することで遺伝子発現を阻害する作用を有すると考えられる。以上からLmTK6細胞を用いたエピ遺伝毒性試験は、DNA脱メチル化(遺伝子の発現復帰)作用とヘテロクロマチン化(遺伝子の発現抑制)作用の、双方向の効果を検出可能な方法であることが示唆された。

E. 結論

使用量の多い50香料に着目して、QSAR予測と実試験の遺伝毒性情報と香料化合物の構造の特徴を整理した。使用量の多い群について、遺伝毒性の懸念が低い物質の香料分類と比較的高い香料分類が整理された。今後は調査範囲を拡大し、本研究でえられた提案の検証や類似構造による類推なども組み合わせて遺伝毒性評価の優先付けスキームの提案につなげる。

本研究で確立したエピ遺伝毒性試験を用いて、DNAメチル化阻害効果を示す2化合物の塩基配列レベルでの作用領域、ならびにヘテロクロマチン化効果を示す1化合物を

別添 4

同定した。今後、遺伝子発現動態及びクロマチン構造解析の手法と組み合わせることで、化合物の潜在的エピジェネティック作用の有無からその分子機序までを統合的に捉えるスキームの確立が期待できる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

- 1) 佐々彰, DNA修復の機能不全に起因する自己炎症性疾患の分子病態, *BIO Clinica*, 39(2), 81-83, (2024)
- 2) 佐々彰, 内因性DNA損傷を起因とした自己炎症性疾患発症の分子機構. *BIO Clinica*, 38(9), 71-73, (2023)

G-2. 学会発表

- 1) 香料類似フラン物質の Ames/QSAR 評価, 古濱彩子, 本間正充, 杉山圭一, 第50回日本毒性学会学術年会, 2023/6/20 (横浜) ポスター発表
- 2) SARS-CoV-2のRNA依存性RNAポリメラーゼにおける損傷乗り越えRNA合成機構の解析, 赤川真崇, Grúz Petr, 菅澤薫, 浦聖恵, 佐々彰, 日本環境変異原ゲノム学会第52回大会, 2023/11/11
- 3) リボヌクレアーゼH2の細胞内酵素活性がゲノム安定性に果たす役割の解明, 渡邊彩乃, 黛結衣子, 中谷一真, 浦聖恵, 板倉英祐, 佐々彰, 日本環境変異原ゲノム学会第52回大会, 2023/11/11
- 4) epi-TK試験を利用した発がんプロモーターTPAの新規エピジェネティック作用の同定, 山田治人, 小田切瑞基, 安井学, 本間正充, 杉山圭一, 浦聖恵, 佐々彰, 日本環境変異原ゲノム学会第52回大会, 2023/11/12
- 5) ゲノムDNAに蓄積したリボヌクレオチドが誘発するゲノム不安定化の分子機構, 立川明日香, 吉本侑依, 高藤賢, 黛

結衣子, 中谷一真, 中村真生, 福田隆之, 菅澤薫, 浦聖恵, 佐々彰, 日本環境変異原ゲノム学会第52回大会, 2023/11/11

- 6) DNA損傷に起因する過剰なインターフェロン応答の分子経路の同定, 寺越菜央, 高藤賢, 中谷一真, 安井学, 本間正充, 杉山圭一, 藤木亮次, 金田篤志, 菅澤薫, 浦聖恵, 佐々彰, 日本環境変異原ゲノム学会第52回大会, 2023/11/11
- 7) アルコール発がんにおけるドライバーアダクトの探索と変異誘発メカニズムの解明, 本橋実奈, 別役雄毅, 高村岳樹, 小宮雅美, 佐々彰, 戸塚ゆ加里, 日本環境変異原ゲノム学会第52回大会, 2023/11/11
- 8) 難治性炎症疾患を誘発するゲノム不安定化の分子機構, 佐々彰, 変異機構研究会第34回夏の学校, 2023/9/9
- 9) 遺伝毒性試験をプラットフォームとしたエピジェネティック作用評価法の開発, 佐々彰, 第50回日本毒性学会学術年会, 2023/6/20
- 10) 化学物質が引き起こすエピジェネティックな修飾変化を定量評価可能な“epi-TK試験”の確立, 山田治人, 小田切瑞基, 安井学, 本間正充, 杉山圭一, 浦聖恵, 佐々彰, 第50回日本毒性学会学術年会, 2023/6/19
- 11) ゲノム不安定性から見た食品の安全性, 杉山圭一, 第42回日本食品・機械研究会年次大会 2022年6月, 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得

該当なし

H-2. 実用新案登録

該当なし

H-3. その他

該当なし

表 1 使用量番号 1~50 までの構造と QSAR 予測結果 (1/5)

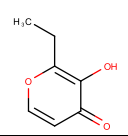
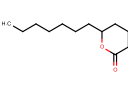
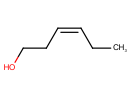
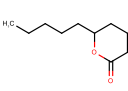
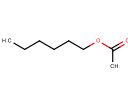
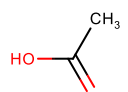
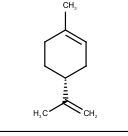
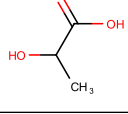
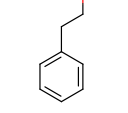
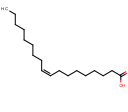
使用量 番号	18類	QSAR ID	Name	モチーフ構造	Structure	CASE Ultra GT1_BMUT 1.9.0.2 (Prob %)	Derek Nexus 6.2.1 (Nexus 2.5.2)
1	ケトン類	1	ethyl maltol	ジケトン		Known Positive (79.9)	EQUIVOCAL
2	ラクトン類	2	delta-dodecalactone	カルボン酸・エステル		Known Negative (2.5)	INACTIVE
3	脂肪族高級アルコール類	3	cis-3-hexenol	アルコール		Known Negative (9.5)	INACTIVE
4	ラクトン類	4	delta-decalactone	カルボン酸・エステル		Negative (7.7)	INACTIVE
5	エステル類	5	hexyl acetate	カルボン酸・エステル		Known Negative (21.8)	INACTIVE
6	脂肪酸類	6	acetic acid	カルボン酸・エステル		Negative (23.4)	INACTIVE
7	テルペン系炭化水素類	7	d-limonene	その他		Known Negative (9.0)	INACTIVE
8	脂肪酸類	8	lactic acid	カルボン酸・エステル		Known Negative (23.4)	INACTIVE
9	芳香族アルコール類	9	phenethyl alcohol	アルコール		Negative (38.5)	INACTIVE
10	脂肪酸類	10	oleic acid	カルボン酸・エステル		Known Negative (2.3)	INACTIVE

表 1 使用量番号 1~50 までの構造と QSAR 予測結果 (2/5)

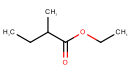
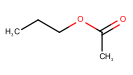

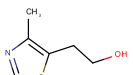
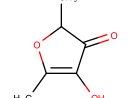
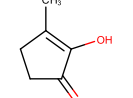
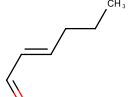
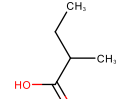
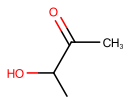
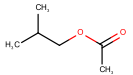
使用量番号	18類	QSAR ID	Name	モチーフ構造	Structure	CASE Ultra GT1_BMUT 1.9.0.2 (Prob %)	Derek Nexus 6.2.1 (Nexus 2.5.2)
11	エステル類	11	ethyl 2-methylbutyrate	カルボン酸・エステル		Known Negative (23.4)	INACTIVE
12	エステル類	12	propyl acetate	カルボン酸・エステル		Negative (37.8)	INACTIVE
13	チオエーテル類	13	dimethyl sulfide	その他		Out of Domain (23.4)	INACTIVE
14	芳香族アルコール類	14	2-(4-methyl-5-thiazolyl)ethanol	アルコール		Negative (38.5)	INACTIVE
15	ケトン類	15	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-	ジケトン		Negative (37.1)	PROBABLE
16	ケトン類	16	cyclotene	ジケトン		Inconclusive (41.1)	INACTIVE
17	脂肪族高級アルデヒド類	17	trans-2-hexenal	アルデヒド		Known Positive (65.9)	PLAUSIBLE
18	脂肪酸類	18	2-methylbutyric acid	カルボン酸・エステル		Known Negative (23.4)	INACTIVE
19	ケトン類	19	acetoin	カルボニル基		Known Negative (16.9)	INACTIVE
20	エステル類	20	isobutyl acetate	カルボン酸・エステル		Negative (37.8)	INACTIVE

表 1 使用量番号 1~50 までの構造と QSAR 予測結果 (3/5)

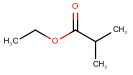
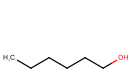
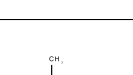
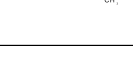

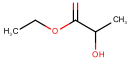
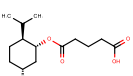
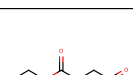
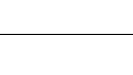
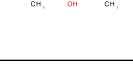
使用量番号	18類	QSAR ID	Name	モチーフ構造	Structure	CASE Ultra GT1_BMUT 1.9.0.2 (Prob %)	Derek Nexus 6.2.1 (Nexus 2.5.2)
21	エステル類	21	ethyl isobutyrate	カルボン酸・エステル		Known Negative (11.4)	INACTIVE
22	脂肪酸高級アルコール類	22	hexanol	アルコール		Known Negative (23.4)	INACTIVE
23	エステル類	23	2-methylbutyl acetate	カルボン酸・エステル		Negative (37.8)	INACTIVE
24	脂肪酸類	24	decanoic acid	カルボン酸・エステル		Known Negative (3.7)	INACTIVE
25	エステル類	25	ethyl lactate	カルボン酸・エステル		Known Negative (15.0)	INACTIVE
26	(脂肪酸類)	26	l-monomethyl glutarate	カルボン酸・エステル		Negative (1.0)	INACTIVE
27	エステル類	27	ethyl levulinate	カルボン酸・エステル		Negative (0.9)	INACTIVE
28	(ケトン類)	28	4-hydroxy-6-methyl-2-heptanone	カルボニル基		Negative (2.5)	INACTIVE
29	脂肪酸高級アルデヒド類	29	hexanal	アルデヒド		Negative (28.9)	INACTIVE
30	エステル類	30	2-(4-methyl-5-thiazolyl)ethyl acetate	カルボン酸・エステル		Negative (37.8)	INACTIVE

表 1 使用量番号 1~50 までの構造と QSAR 予測結果 (4/5)

使用量 番号	18類	QSAR ID	Name	モチーフ構造	Structure	CASE Ultra GT1_BMUT 1.9.0.2 (Prob %)	Derek Nexus 6.2.1 (Nexus 2.5.2)
31	ケトン類	31	diacetyl	ジケトン		Known Positive (23.4)	PLAUSIBLE
32	脂肪族高級アルコール類	32	alpha-terpineol	アルコール		Known Negative (4.6)	INACTIVE
33	エステル類	33	styrallyl acetate	カルボン酸・エステル		Negative (13.2)	INACTIVE
34	ケトン類	34	l-carvone	カルボニル基		Negative (31)	INACTIVE
35	脂肪酸類	35	mono-menthyl succinate	カルボン酸・エステル		Negative (0.4)	INACTIVE
36	ラクトン類	36	gamma-decalactone	カルボン酸・エステル		Negative (3.4)	INACTIVE
37	エステル類	37	methyl butyrate	カルボン酸・エステル		Negative (23.4)	INACTIVE
38	エステル類	38	l-menthyl lactate	カルボン酸・エステル		Negative (3.3)	INACTIVE
39	脂肪酸類	39	(5or6)-decenoic acid	カルボン酸・エステル		Negative (1.7)	INACTIVE
39	脂肪酸類	40	(5or6)-decenoic acid	カルボン酸・エステル		Negative (0.8)	INACTIVE
40	脂肪酸類	41	isobutyric acid	カルボン酸・エステル		Negative (11.4)	INACTIVE

表 1 使用量番号 1~50 までの構造と QSAR 予測結果 (5/5)

使用量 番号	18類	QSAR ID	Name	モチーフ構造	Structure	CASE Ultra GT1_BMUT 1.9.0.2 (Prob %)	Derek Nexus 6.2.1 (Nexus 2.5.2)
41	脂肪酸類	42	myristic acid	カルボン酸・エステル		Known Negative (5.8)	INACTIVE
42	脂肪酸類	43	palmitic acid	カルボン酸・エステル		Known Negative (5.8)	INACTIVE
43	脂肪酸類	44	lauric acid	カルボン酸・エステル		Negative (5.8)	INACTIVE
44	ラクトン類	45	delta-undecalactone	カルボン酸・エステル		Known Negative (2.0)	INACTIVE
45	エステル類	46	ethyl 2-[(5-methyl-2-propan-2-yl)cyclohexanecarbonyl]acetate	カルボン酸・エステル		Known Negative (3.9)	INACTIVE
45	エステル類	47	ethyl 2-[(5-methyl-2-propan-2-yl)cyclohexanecarbonyl]acetate	カルボン酸・エステル		Known Negative (3.9)	INACTIVE
46	エステル類	48	methyl acetate	カルボン酸・エステル		Negative (23.4)	INACTIVE
47	フルフラール及びその誘導体	49	furfural	フルフラール		Known Negative (53.1)	PLAUSIBLE
48	脂肪族高級アルコール類	50	trans-2-hexenol	アルコール		Known Negative (28.7)	INACTIVE
49	フルフラール及びその誘導体	51	5-methylfurfural	フルフラール		Inconclusive (41.5)	PLAUSIBLE
50	ケトン類	52	raspberry ketone	フェノールとパラ位置カルボニル基		Negative (13.3)	INACTIVE

別添 4

注 使用量番号:2020年1~12月に日本で使用された香料化合物(個別指定のものを除く)のうち、使用量の多い順番にナンバリングした数字。18類は令和4年度分担報告書図1に示す判断樹により類又は誘導体として指定されている18項目の香料(18類香料)の分類。QSAR ID:使用量番号順にQSARの対象となる構造にナンバリングした数字であり、混合物等の場合には1化合物に複数存在することがある。モチーフ構造:変異原性試験の陽性・陰性を特徴づける構造であり、本報告書では特に酸素を含む官能基に着目した。QSARの予測結果は赤字および黄色ハイライトは陽性、青字は陰性として判断した。

表 2 職場のあんぜんサイト SDS における生殖細胞変異原性（陽性情報が存在するもの）

使用量 番号	Name	CAS RN	モチーフ 構造	職場のあんぜん サイトのSDS	職場のあんぜんサイトSDSにおける生殖細胞変異原性
8	lactic acid	50-21-5	カルボン 酸・エス テル	https://anzeninfo.mhlw.go.jp/anzen/gmsds/50-21-5.html	☑ vivo試験のデータがなく分類できない。なお、in vitro試験として、エームス試験（NTP DB ID: A10575(1997)）で陰性、染色体異常試験で陽性（pH低値による疑陽性）（Mutat Res., 240, 195-202, (1990)）、CHO細胞の染色体異常試験で陰性（SIDS (2008)）の報告がある。GHS分類：分類できない
29	hexanal	66-25-1	アルデヒ ド	https://anzeninfo.mhlw.go.jp/anzen/gmsds/66-25-1.html	in vivo 試験のデータがなく、分類できない。なお、細菌を用いた変異原性試験で陽性、チャイニーズハムスター肺細胞（V79 細胞）を用いた変異原性試験で陽性（PATTY (5th, 2001)）の情報がある。
31	diacetyl	431-03-8	ジケトン	https://anzeninfo.mhlw.go.jp/anzen/gmsds/431-03-8.html	【分類根拠】 (1)、(2) より、in vivoのラットを用いた不定期DNA合成試験の陽性結果は腺胃粘膜炎症が生じた用量での知見であり、明確に陽性と判断できないため、分類できないとした。 【根拠データ】 (1) In vivoでは、ラットの胃における不定期DNA合成試験で陽性の報告が1件あった（PATTY (6th, 2012)）が、EU SCOEL SUM 149 (2014) によると、これは腺胃粘膜炎症が生じた用量での知見である。また、腹腔内投与によるマウス骨髄小核試験や吸入ばく露によるマウス、ラットの末梢血小核試験を含め、小核試験陰性の報告が4件あった（NTP TR593 (2018)、PATTY (6th, 2012)）。 (2) In vitroでは、細菌の復帰突然変異試験で陽性、陰性の結果、マウスリンフォーマ試験及び哺乳動物細胞の姉妹染色分体交換試験で陽性の結果であった（NTP TR593 (2018)、ACGIH (7th, 2012)、JECFA FAS42 (1999)、PATTY (6th, 2012)）。
34	l-carvone	6485-40-1	カルボニ ル基	https://anzeninfo.mhlw.go.jp/anzen/gmsds/6485-40-1.html	in vivo試験のデータがなく分類できない。なお、in vitro試験として、エームス試験で陰性、チャイニーズハムスターの卵巣細胞を用いた染色体異常試験で擬陽性の結果が報告されている（JECFA 944 (1999)）。
40	isobutyric acid	79-31-2	カルボン 酸・エス テル	https://anzeninfo.mhlw.go.jp/anzen/gmsds/79-31-2.html	in vivo変異原性試験のデータがなく、分類できない。マウスリンパ腫を用いた遺伝子突然変異試験（JECFA 40 (1998)）で弱陽性(活性化なし)及び陰性(活性化あり)、ラット肝細胞を用いた不定期DNA合成試験（JECFA 40 (1998)）で陰性、微生物を用いた復帰変異試験（IUCLID (2000)）で陰性の結果が得られている。
47	furfural	98-01-1	フルフ ラール	https://anzeninfo.mhlw.go.jp/anzen/gmsds/98-01-1.html	GHS分類: 分類できない ガイダンスの改訂により区分外が選択できなくなったため、分類できないとした。すなわち、in vivoでは、トランスジェニックマウスの肝臓を用いた遺伝子突然変異試験、マウスの骨髄細胞を用いた染色体異常試験、姉妹染色分体交換試験、ラット及びマウスの肝臓細胞を用いた不定期DNA合成試験でいずれも陰性である（EU-RAR (2008)、IARC 63 (1995)、DFGOT vol. 9 (1998)、JECFA FAS 46 (Access on September 2017)、NTP DB (Access on August 2017)）。In vitroでは、細菌の復帰突然変異試験で陰性の結果が多いが陽性結果もあり、哺乳類培養細胞のマウスリンフォーマ試験、染色体異常試験、姉妹染色分体交換試験でいずれも陽性である（EU-RAR (2008)、IARC 63 (1995)、DFGOT vol. 9 (1998)、JECFA FAS 46 (2000)、NTP DB (Access on August 2017)）。

表 3 18 類香料の分類と表 1 のモチーフ構造の関係

18類	モチーフ構造
脂肪族高級アルコール類 (7類)	アルコール
芳香族アルコール類 (16類)	
脂肪族高級アルデヒド類 (8類)	アルデヒド
エステル類 (4類)	カルボン酸・エステル
ラクトン類 (18類)	
脂肪酸類 (6類)	
ケトン類 (5類)	カルボニル基
	ジケトン
	フェノールとパラ位置カルボニル基
フルフラール及びその誘導体 (15類)	フルフラール
チオエーテル類 (10類)	その他
テルペン系炭化水素類 (12類)	その他

注：緑字で示したモチーフ構造に分類された物質群では、2つのQSARが陰性であり、かつAmes実試験で陰性の結果を有した。赤字で示したモチーフ構造に分類された物質群では、2つのQSARのどちらか/両方が陽性であるか、Ames実試験または/かつインビトロ染色体異常試験で陽性となる情報が得られていた。

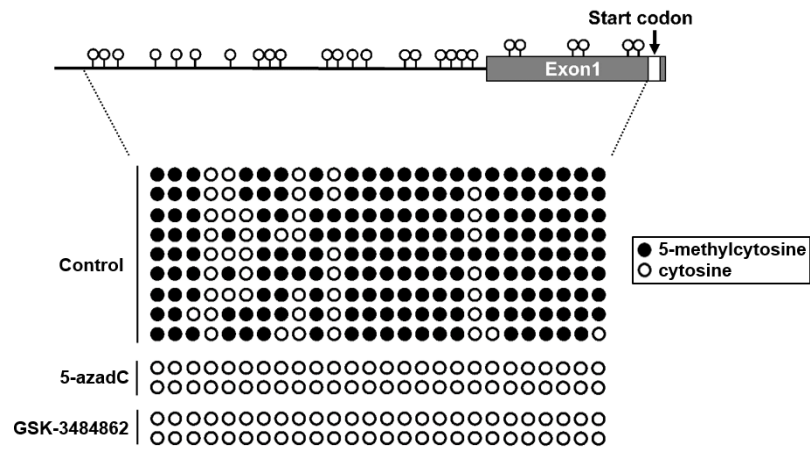


図1 TK遺伝子座においてDNA脱メチル化された領域の同定
5-azadCおよびGSK-3484862処理後の復帰コロニーにおいて、TK遺伝子のエキソン1上流150 bpの範囲全てのCpG配列で脱メチル化が観察された。

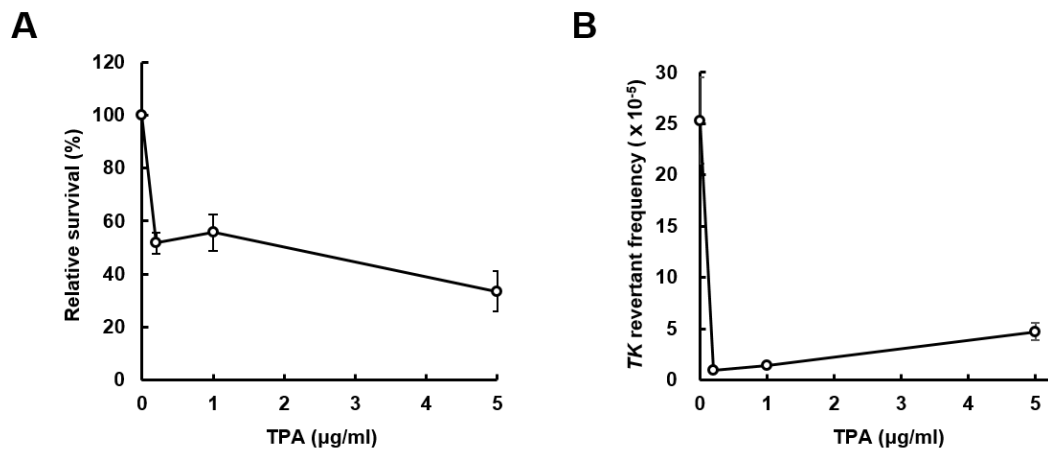


図2 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetateにおけるエピジェネティック作用の同定
12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetateをLmTK6細胞に対して24時間処理後の生存率 (A) およびTK復帰頻度 (B) を示した。値は独立した3回の試行における平均値 ± 標準誤差を示す。

令和5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）
香料を含む食品添加物の遺伝毒性から発がんに至る毒性評価スキーム
確立に向けた基盤的研究

分担研究課題名：細胞を用いた*in vitro*遺伝毒性試験による遺伝毒性評価の精緻化

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
分担研究者 本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所 所長
分担研究者 杉山 圭一 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

研究要旨

4-メチル-2-ペンテナール（4MP）は、Ames 試験が非代謝活性化条件下で強い陽性（比活性 1340）、代謝活性化条件下でも明確に陽性（比活性 728）であり、さらに Ames/QSAR 予測でも統計・知識ベース共に陽性である。一方、その 4MP に対するトランスジェニックマウス（MutaMouse）を用いる肝臓および腺胃における遺伝子突然変異誘発性は陰性（国立医薬品食品衛生研究所；令和 4 年度指定添加物の安全性の見直しに関する調査研究（令和 5 年 3 月））であり、先の Ames 試験等の陽性結果と矛盾する。我々は、ヒトリンパ芽球細胞 TK6 株を用いるチミジンキナーゼ遺伝子変異試験（TK6 試験）で 4MP を調べた結果、非代謝活性化条件下で陰性、代謝活性化条件下で弱い陽性であることを確認した。本年度は、その弱い陽性反応が、ラット肝 S9 に含有するグルタチオン S-トランスフェラーゼ（GST）の解毒機序によって抑制されるかを、その補因子であるグルタチオン（GSH）の補充型 TK6 試験（GSH/GST-TK6 試験）を実施した。その結果、GSH 非補充群の遺伝子変異体頻度は、未処理群のそれよりも統計的に有意に増加したが、1 mM GSH 補充群のそれはそうでは無かった（GSH/GST-TK6 試験では陰性）。GSH は、生体内で高濃度（1 ～ 10 mM 程度）で存在していることから、本研究で実施された GSH/GST-TK6 試験結果は、Ames/QSAR と Ames 実試験の陽性香料物質 4MP に対して、陰性と判定できるのではないかと考えられた。その判定理由は、4MP およびその代謝物が、GSH/GST の基質となり、その解毒機序によって遺伝毒性が不活化された根拠が明確だからである。GSH/GST-TK6 試験は、現段階で 4MP の 1 物質しか実績がないが、今後、Ames 試験陽性物質に対して *in vivo* 試験を利用することなく、*in vitro* 試験のみでフォローアップできる潜在的な有効性を有していると考えられた。

キーワード：TK6 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

Ames/QSAR 予測は、Ames 試験結果データを基にトレーニング・開発されており、もともと Ames 試験が持つ問題点を Ames/QSAR にも引き継いでいる可能性がある。前年度で、Ames/QSAR 予測で陽性、および Ames 実試験で明確な陽性（比活性 728；活性化条件下）を示す 4-メチル-2-ペンテナール（4MP）に焦点を絞り、上

位試験であるヒトリンパ芽球細胞 TK6 株を用いるチミジンキナーゼ遺伝子変異試験（TK6 試験）で調べた。その結果、Ames 試験で観察されたような明確な陽性ではなく、TK6 試験では微弱な陽性反応が観察された。一方、その 4MP に対するトランスジェニックマウス（MutaMouse）を用いる肝臓および腺胃における遺伝子突然変異誘発性は陰性（国立医薬品食品衛生

研究所；令和4年度指定添加物の安全性の見直しに関する調査研究（令和5年3月）であると最近報告され、先の Ames 試験等の陽性結果と矛盾している。つまり、4MP は Ames 菌株では強い陽性反応を示し、*in vivo* TG 試験（代謝が十分に働く個体動物を用いる）では陰性になる。そして、代謝機能を十分に持たない *in vitro* TK6 試験では、4MP を完全に解毒できず、結果的に弱い陽性反応を示すのではないかと昨年度に考察した。

生体において、遺伝毒性発がん性物質の解毒に重要な役割を持つ第II相代謝酵素グルタチオン S-トランスフェラーゼ（GST）の機能は、Ames 試験や哺乳類細胞を用いる *in vitro* 遺伝毒性評価でほとんど利用されていない。そこで本年度は、ラット肝 S9 中に含有する GST を機能させるために、被験物質処理液中にグルタチオン（GSH）を補充する TK6 試験（GSH/GST-TK6 試験）を構築し、代謝活性化条件下における 4MP の弱い陽性反応が、GSH/GST の解毒機序によって抑制されるかを調べた。

B. 研究方法

B-1. 細胞と培養

ヒトリンパ芽球細胞 TK6 株は、10% 馬血清（サーモフィッシャー）、200 µg/mL ビ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）で培養された。培養は、37 度、5% CO₂ 濃度存在下で行った。

B-2. GSH 定量

TK6 試験で使用される処理液中の TK6 細胞内および細胞外の GSH 濃度を GSSG/GSH Quantification kit (同仁化学研究所)の説明書に従って測定した。マイクロプレートリーダーは、Multiskan GO（サーモフィッシャー）を使用した。

B-3. GSH/GST-TK6 試験

原則として OECD ガイドライン(TG490)に従って行った。被験物質として、4MP は 関東化学株式会社（ACROS organics 製）から購入した (Fig. 1)。用量設定試験から始め、本試験を実施した。処理細胞数は 10⁷ 細胞、処理時間は 4 時間で実施した。ラット肝 S9 とコファクターは、家田貿易株式会社から購入した。GSH は富士フィルム和光純薬工業から購入した。GSH の最終濃度が、1 あるいは 4 mM になるように処理液中に補充した。代謝活性化条件下の陽性対照物質は、シクロホスファミド (CP) (東京化成工業株式会社) を使用した。GSH/GST-TK6 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。未処理群および 4MP の遺伝子変異誘発性に関する有意差検定は、大森法 (Omori et al., *Mutat. Res.* 517,199-208 (2002)) の Dunnett 検定を用いた。GSH の非補充群および補充群の間の有意差検定は実施しなかった。

C. 研究結果、および考察

C-1. TK6 細胞および S9 存在下処理液中の GSH 濃度

ラット肝 S9 mix を含む TK6 試験の被験物質処理液中の GSH 濃度を測定した結果、TK6 細胞内は 0.005 mM (1000 pmol/10⁶ cells)、細胞外は 0.002 mM であり、極めて低濃度であった (ラット肝 S9 mix 原液のそれは 0.111 mM)。生体内の GSH 濃度が、1 ~ 10 mM 程度 (Fierro S et al., *Sci Rep.* 2:901 (2012).) で存在するのに対して、通常の TK6 試験の処理液中のそれは、500 倍以上低く、GSH はほぼ存在しないことが分かった。つまり、生体ではあり得ない、この *in vitro* 特異的条件が、*in vivo* と *in vitro* 間の遺伝毒性試験結果の矛盾を形成させる原因の一つと考えられる。

C-2. GSH 非補充群 (-GSH/GST) の TK6

試験

4MP は、Ames 試験の代謝活性化条件下で比活性値 728 revertants/mg を示す明確な陽性 (Honma et al., *Genes and Environ.* 42:32 (2020)) を示すことから、代謝活性化条件下で、4MP に対して 3 回の TK6 試験を過去に実施している。それらを総合すると、4MP の 275 および 300 μM 用量群でそれぞれ Relative survival (RS) が 17.9 および 11.6 % であり、至適用量を得られることが分かっている。それらの Mutant frequency (MF) は、それぞれ 10.4×10^{-6} および 12.1×10^{-6} であり、用量依存性を有している (Supplementary Fig. 1C および D)。大森法による統計解析の結果、4MP は陽性と判定された。しかしながら、未処理群の MF 値は $3.5 \sim 5.5 \times 10^{-6}$ の範囲にあり、その最高用量 300 μM 群の MF 値は、わずか 2 倍程度の上昇であることから、専門家判断として弱い陽性であると判定した (令和 4 年度)。

本年度では、この 300 μM を最高用量とする等差 50 μM の 300、250、200、150、0 μM の用量設定について、GSH 非補充 (-GSH/GST) の TK6 試験、および GSH 補充 (+GSH/GST) する GSH/GST-TK6 試験を実施した (Fig. 2 および Fig. 3)。つまり、Fig. 2 と 3 の -GSH/GST 群は、通常の TK6 試験と同一であり、上と同じ用量の 300 μM 処理群の MF 値では、約 $30 \sim 35 \times 10^{-6}$ まで上昇し、本年度も、陽性と判定された (300 μM 用量群は、強い細胞毒性のため、MF プレートにまく細胞数が不足した理由から、MF プレート 1 枚から算出された)。これまでに実施した代謝活性化条件下の 4MP に対する TK6 試験結果は、再現性が良く、陽性であることを確認した (Fig. 2B、Fig. 3B および Supplementary Fig. 1D)。

C-3. GSH/GST-TK6 試験

まず、S9 中の GST を十分に機能させるために、最終濃度 4 mM GSH を補充する

GSH/GST-TK6 試験を実施した (Fig. 2)。その結果、RS については、-GSH/GST 群は用量依存的に細胞毒性を示したが、+GSH/GST 群のそれは、ほぼ無いと考えられた。MF 値は、-GSH/GST 群が用量依存的に増加したが、+GSH/GST 群は 10×10^{-6} を超えることが無かった (Fig. 2)。

次に、最終濃度 1 mM GSH を補充する GSH/GST-TK6 試験を実施した (Fig. 3)。RS 値については、-GSH/GST 群は用量依存的に減少したが、+GSH/GST 群は、高用量域だけわずかな細胞毒性を示した。1 mM GSH 補充群の MF 値は、4 mM 補充群のそれと類似しており、最高用量 300 μM 処理群であっても低い値 (5.6×10^{-6}) を示した (Fig. 3)。すなわち、4MP は、-GSH/GST 群では陽性だが、わずか 1 mM GSH 補充 (+GSH/GST 群) するだけで陰性 (遺伝子変異誘発性の不活化) になることが分かった。

GSH/GST-TK6 試験は、まだ 4MP しか実績がないが、今後、Ames 試験陽性物質を *in vivo* 試験なしで、*in vitro* 試験だけでフォローアップできる潜在的な有効性を有していると考えられる。さらに、本研究で構築した *in vitro* 系の最も優れた点は、GSH/GST の解毒機序が関与して、4MP が陰性となること (4MP あるいはその代謝物が、GST の基質であることを明らかにした) が明確であることである。つまり、GSH/GST の解毒機序で遺伝毒性が不活化される、あるいは不活化されない化学物質の化学構造パターンのスクリーニングが可能である。他の Ames 試験陽性物質についても、同様の実験を行い、*in vivo* 遺伝毒性結果との相関性について今後調査すべきと考えている。

4MP の Ames 試験結果は、代謝活性化条件下で比活性値 728、非代謝活性化条件下で比活性値 1340 revertants/mg (強い陽性) であり非常に明確な陽性を示めす (Honma et al., *Genes and Environ.* 42:32 (2020))。一方、4MP のトランスジェニック

クマウス (MutaMouse) を用いる肝臓および腺胃における遺伝子突然変異誘発性が調べられ、両臓器ともに陰性であることが報告された (国立医薬品食品衛生研究所; 令和4年度指定添加物の安全性の見直しに関する調査研究 (令和5年3月))。この *in vivo* 試験の陰性結果は、Ames 試験の明確な陽性を完全に否定するものであり、本研究で実施された GSH/GST-TK6 試験の陰性結果と一致した (Table 1)。

4MP は、Ames 試験において塩基対置換型の TA100 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が、PubMed 等で 4MP の DNA 付加体に関する情報は無かった。4MP と構造が類似している 2-ペンテナールの DNA 付加体形成については、論文報告があり、グアニンの 1,N2-環状付加体および 7,8-環状付加体の存在が報告されている (Eder E et al. *Chem Res Toxicol* 6: 486-494 (1993))。2-ペンテナールの Ames 試験や V79 細胞を用いた遺伝子変異試験では陽性だが、*in vivo* 骨髄小核試験では陰性の報告がある (食品安全委員会添加物専門調査会、添加物評価書 trans-2-ペンテナール(2011年10月))。その 2-ペンテナールの代謝は、カルボン酸、β酸化を受けて、最終的に二酸化炭素に分解、あるいは GSH 抱合を受け、メルカプツール酸となって排泄されることが考えられている。雄 Wistar ラットに 2-ペンテナールを単回強制経口投与したとき、投与後 24 時間尿中に排泄された主な代謝物は、3-S-(N-アセチルシステイニル)-ペンタン-1-オールであったとされている (食品安全委員会添加物専門調査会、添加物評価書 trans-2-ペンテナール(2011年10月))。以上のことから、4MP は 2-ペンテナールと酷似した化学構造を有しているため同様の代謝をうけるものと思われる。Table 1 に示した通り、4MP は MutaMouse を用いる *in vivo* TG 試験では陰性、代謝の機能を十分に持たない *in vitro* の TK6 試験では弱い陽性、S9 中の

GST を機能させた GSH/GST-TK6 試験では陰性であったことから、先の 2-ペンテナールの解毒機序とよく一致しており、本研究で使用された GSH/GST による解毒機序が、4MP の弱い陽性 (TK6 試験結果) を消失させたと考えられる。

D. 結論

本研究は、Ames/QSAR 予測で陽性、および Ames 実試験において陽性を示した 4MP に焦点を絞り、上位試験である GSH/GST-TK6 試験 (1 mM GSH 補充) を実施した。その結果、GSH 非補充群の MF 値は、未処理群のそれよりも統計的有意に上昇したが、1 mM GSH 補充群のそれはそうでは無かった (GSH/GST-TK6 試験は陰性)。GSH は、生体内で高濃度 (1 ~ 10 mM 程度) で存在していることから、本研究で実施された GSH/GST-TK6 試験結果は、Ames/QSAR と Ames 実試験の陽性香料物質 4MP を、陰性と判定できるのではないかと考えられた。その判定理由は、4MP およびその代謝物が、GSH/GST の基質となり、その解毒機序によって遺伝毒性が不活化された根拠が明確だからである。GSH/GST-TK6 試験は、現段階で 4MP の 1 物質しか実績がないが、今後、Ames 試験陽性物質に対して *in vivo* 試験を利用することなく、*in vitro* 試験のみでフォローアップできる潜在的な有効性を有していると考えられた。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。

E. 研究発表

E-1. 論文発表

なし

E-2. 学会発表

- 1) 第 II 相薬物代謝酵素を機能させた補因子補充型 *in vitro* 小核試験系の構築, 安井学, 鶴飼明子, 澁谷眞也, 本間正

別添 4

- 充, 杉山圭一, 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会, 2023 年 11 月, 福岡
- 2) epi-TK 試験を利用した発がんプロモーター TPA の新規エピジェネティック作用の同定, 山田治人, 小田切瑞基, 安井学, 本間正充, 杉山圭一, 浦聖恵, 佐々彰, 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会, 2023 年 11 月, 福岡

F. 知的所有権の取得状況

F-1. 特許取得

該当なし

F-2. 実用新案登録

該当なし

F-3. その他

該当なし

Table 1. 4-メチル-2-ペンテナールに対するGSH/GST-TK6試験結果とその他の遺伝毒性試験結果の比較

4-メチル-2-ペンテナール (Cas: 5362-56-1)	Ames/QSAR*1		Ames試験*1		MutaMouseを用いるTG試験*2		TK6試験*3	GSH/GST-TK6試験
	Derek Nexus	Case Ultra	+S9	-S9	500、250、125 mg/kg 体重/日 (28日 間連続経口投与)	肝臓	脾臓	+S9 +GSH (1 mM)
	Plausible (Positive)	Positive	陽性 (728 rev./mg)	強い陽性 (1,340 rev./mg)	陰性	陰性	弱い陽性	陰性

*1 Honma et al., Genes and Environ. 42:32 (2020). および本間研究代表者の平成30年度厚労科研究報告書から引用

*2 国立医薬品食品衛生研究所; 令和4年度指定添加物の安全性の見直しに関する調査研究 (令和5年3月)

*3 杉山研究代表者の令和3年度および令和4年度厚労科研究報告書から引用

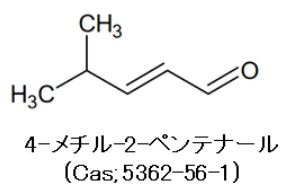


Fig.1. GSH/GST-TK6試験に供された香料物質の化学構造

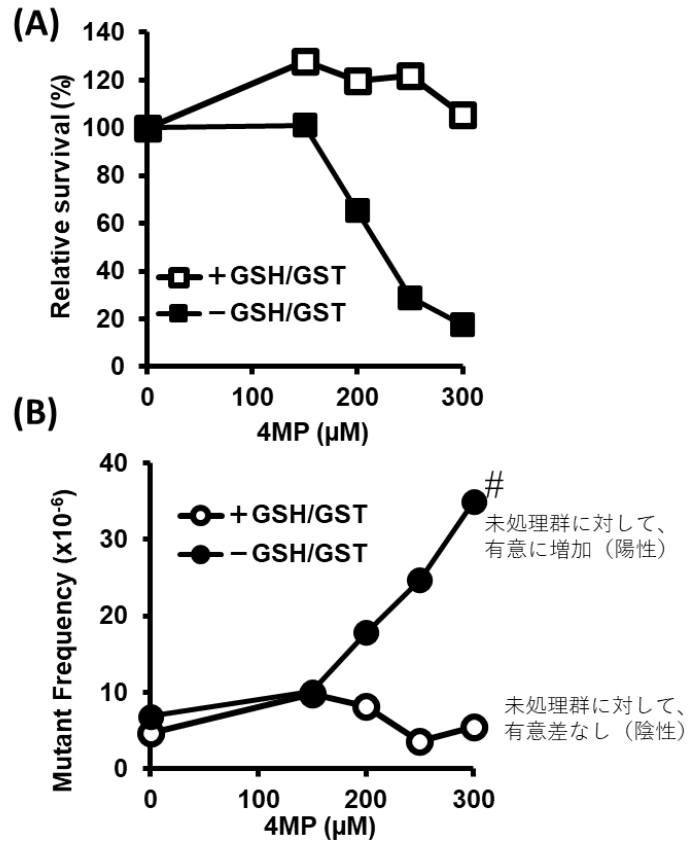


Fig. 2. S9存在下条件による4MPのGSH/GST-TK6試験結果 (4mM GSH補充)

#; 通常は96穴プレート2枚を使用してMF値の算出をするが、300μM処理群は強い細胞毒性を示したためプレート1枚からMF値を算出した

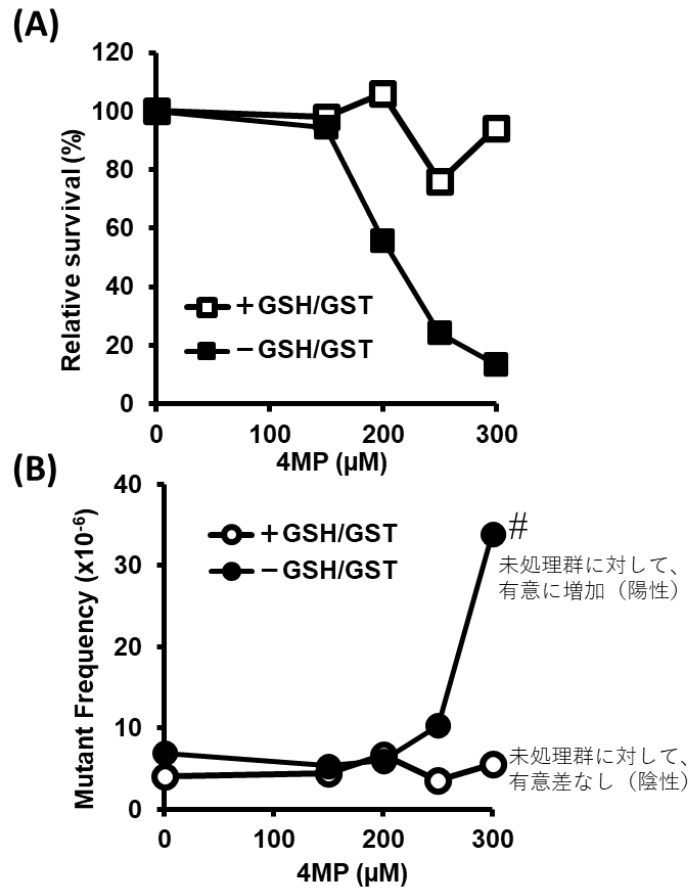
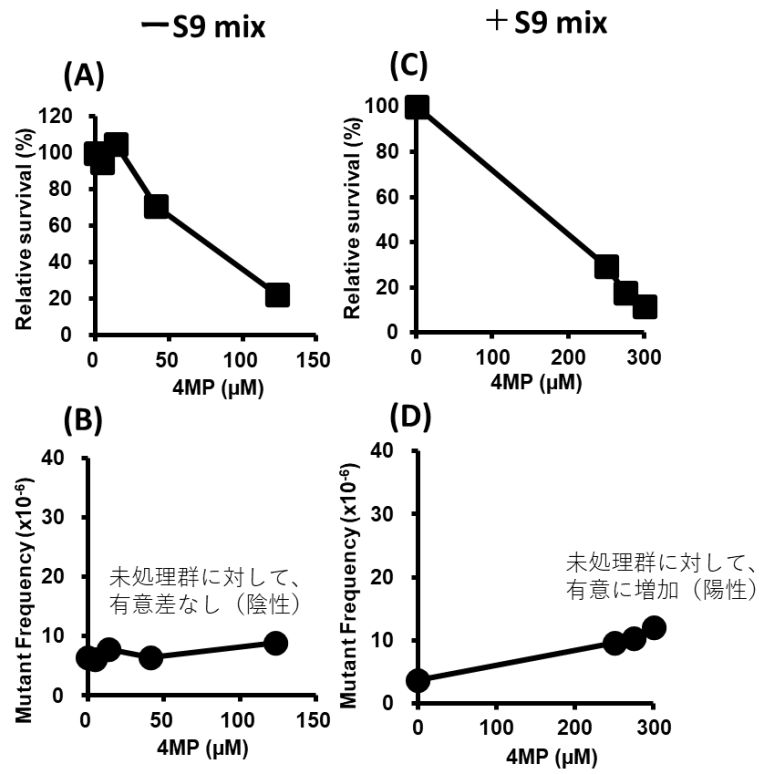


Fig. 3. S9存在下条件による4MPのGSH/GST-TK6試験結果 (1mM GSH補充)

#; 通常は96穴プレート2枚を使用してMF値の算出をするが、300μM処理群は強い細胞毒性を示したためプレート1枚からMF値を算出した



Supplementary Fig. 1.
4MPに対するTK6試験の結果 (令和3および4年度)

令和5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）
香料を含む食品添加物の遺伝毒性から発がんに至る毒性評価スキーム
確立に向けた基盤的研究

分担研究課題名: 香料の毒性評価スキームにおける一般毒性・遺伝毒性・発がん性短期包括試験の有用性評価

研究分担者名 石井 雄二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
研究分担者名 高須 伸二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
研究分担者名 小川 久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

本研究では、香料の毒性評価スキームにおける *in vivo* 試験として、我々がこれまでに開発した *gpt delta* ラットを用いた一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験の有用性を評価することを目的とし、本法を用いた 2-isopropyl-N-2,3-trimethylbutyramide (ITB; JECFA No. 1595) の包括的毒性評価を実施した。令和4年度に引き続き遺伝毒性評価として、毒性変化が認められた腎臓について *gpt assay* 及び *Spi assay* を実施した結果、いずれの投与群においても変異体頻度の有意な変化は認められなかった。また、*gpt* 変異体の変異スペクトラム解析において、ITB 投与に起因した変異パターンの変化は認められなかった。発がん性予測評価では、ITB の毒性標的臓器である肝臓について、肝前癌病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の検索を実施した結果、その数および面積において ITB 投与に起因した変化は見られなかった。以上より ITB はラット肝臓及び腎臓において毒性を示すが、遺伝毒性および発がん性は陰性と考えられた。このように、一度の試験で複数の毒性情報を取得可能な本法は、香料の毒性評価スキームにおける *in vivo* 試験として有用であると考えられた。

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 類香料」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 類香料」の中の 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、エストラゴール等のフェノールエーテル類の天然香気成分にはラット肝発がん性を示し、遺伝毒性を有するものが存在することが明らかになっている^{1, 2)}。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。

本研究事業では香料の安全性を評価する

ため、*in silico*、*in vitro* 及び *in vivo* 試験による階層的評価法の構築に取り組んでいる。*In silico* 及び *in vitro* 試験による評価は効率的で香料の安全性スクリーニングに適した手法である。一方、*in vitro* 遺伝毒性試験を代表する Ames 試験では、S9 による代謝酵素の働きによる制限による偽陰性や、バクテリア特異的代謝酵素による偽陽性が生じ、Ames/QSAR モデルはこれらの特徴を引き継いでいる可能性がある。また、前者の代謝酵素の制限は S9 により *in vivo* の代謝を模倣する *in vitro* 試験において常に問題となりうる。それ故、現段階ではこれら試験で陽性となった香料は、他の試験結果やその使用量を鑑み *in vivo* での変異原性再評価と発がん性評価を行う必要がある。また、得られた評価結果を *in silico* 試験にフィードバックすることで、それらの精緻化に資する

重要な情報となる。

我々はこれまでに、*in vivo*において任意の臓器における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* ラットを用いた包括的毒性試験法を開発し、フェノールエーテル類の天然香気成分サフロール、メチルオイゲノールおよびエレミ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明らかにしてきた^{3,4)}。本法は、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得られることから、短期間に化学物質の安全性評価に資するデータの取得が可能である。それ故、本法は本研究事業において開発を進める香料の毒性評価スキームにおける *in vivo* 試験に適した手法の一つと考える。本研究では階層的評価法における *in vivo* 試験として *gpt delta* ラットを用いた包括的毒性試験の有用性を評価するため、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本法による評価を実施する。

今回、被検物質として選定した 2-isopropyl-N,2,3-trimethylbutyramide

(ITB; Fig. 1) は、我が国では食品香料として用いられていないが、米国では食品添加物の一つとして用いられている。米国において FEMA GRAS (Flavor and Extract Manufacturers Association Generally Recognized as Safe) に指定されており、アルコール飲料、菓子等に使用されている。一方、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) では、香料の脂肪族及び芳香族アミン又はアミドに分類されており (JECFA No. 1595)、Class III (安全性の推定ができない又は毒性を示唆する反応性の化学構造を持つ香料) とされている。過去に 14 週間の反復投与毒性試験が実施されており、ラット肝臓および腎臓に毒性を有することが報告されているが、その詳細は不明である。また、遺伝毒性試験については、*in vitro* 染色体異常試験及び雄性ラット

の腎臓においてコメットアッセイ陽性の報告があるものの、ラット骨髄小核試験は陰性である。これらの結果から、2016 年に実施された JECFA における評価では腎毒性及び遺伝毒性に関する追加情報が必要とされている。従って、本研究で得られる ITB の包括的毒性データは本剤のリスク評価への利用も期待される。

令和 4 年度に引き続き、本年度は ITB の毒性標的臓器のである腎臓の遺伝毒性評価と肝臓の発がん性評価を実施した。

B. 研究方法

B-1. 遺伝毒性評価

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に 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 3730xl 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、*red/gam* 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、パッケージング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*

別添 4

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⁾。

B-2. 発がん性評価

GST-P 陽性細胞巢の免疫組織化学染色には、10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、パラフィン包埋された肝組織標本を用いて作成した切片を用いた。キシレン、無水エタノールにて脱パラフィンの後、3% H_2O_2 にて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害し、1次抗体として MBL ライフサイエンス社製抗 GST-P ラビットポリクローナル抗体を用い、室温で1時間インキュベートした。Phosphate-buffered saline にて洗浄後、2次抗体としてニチレイバイオサイエンス社製ヒストファイン シンプルステイン（ウサギ第一抗体用）にて30分間インキュベートした。発色には diaminobenzidine を用いた。

（倫理面への配慮）

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

ITB の毒性標的臓器の一つである腎臓について *gpt* assay 及び Spi assay による遺伝毒性評価を行った (Table 1 及び 2)。いずれの ITB 投与群においても *gpt* 及び Spi 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において、ITB に投与に起因した変異パターンの変化は認められなかった (Table 3)。

C-2. 遺伝毒性評価

GST-P 陽性細胞巢の数および面積において、ITB 投与による有意な変化は認められなかった (Table 4)。

D. 考察

D-1. ITB の一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括的試験

遺伝毒性評価では、ITB の毒性標的臓器の一つである腎臓について、主に点突然変異を検出する *gpt* assay 及び主に欠失変異を検出する Spi assay を実施したものの、いずれの変異頻度にも ITB 投与による変化は認められなかった。前年度の肝臓の陰性結果を含め、ITB に *in vivo* において問題となる遺伝毒性はないと判断した。

発がん性評価では、ITB の毒性標的臓器の一つである肝臓において、GST-P 陽性細胞巢の数および面積に変化が見られなかったことから、肝臓における発がん性評価は陰性と判断した。

E. 結論

一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験から ITB は既報通り肝臓および腎臓に毒性を有することに加え、神経毒性を有することを明らかにした。また、その腎毒性により 5 mg/kg 体重/日を低用量とした本試験において NOAEL は求まらなかった。一方、毒性標的臓器である肝臓および腎臓における遺伝毒性評価は陰性であり、懸念された遺伝毒性は認められなかった。また、肝臓における発がん性もないと考えられた。このように、一度の試験で複数の毒性情報を取得可能な本法は、香料の毒性評価スキームにおける *in vivo* 試験として有用であると考えられた。また、本研究で得られた ITB の毒性情報は評価保留とされている本剤のリスク評価への利用が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果

G-1. 発表論文

- 1) Takimoto N., Ishii Y., Mitsumoto T., Takasu S., Namiki M., Shibutani M., Ogawa K. Formation of hepatocyte cytoplasmic inclusions and their contribution to methylcarbamate-induced hepatocarcinogenesis in F344 rats. *Toxicol. Sci.* 2024, 198 (1), 40-49, doi: 10.1093/toxsci/kfad131.
- 2) Kuroda K., Ishii Y., Takasu S., Kijima A., Matsushita K., Masumura K., Nohmi T., Umemura T. Possible contribution of 8-hydroxydeoxyguanosine to gene mutations in the kidney DNA of gpt delta rats following potassium bromate treatment. *Mutat. Res.* 2024, 894, 503729, doi: 10.1016/j.mrgentox.2024.503729.
- 3) Mitsumoto T., Ishii Y., Takimoto N., Takasu S., Namiki M., Nohmi T., Umemura T., Ogawa K. Site-specific genotoxicity of rubiadin: localization and histopathological changes in the kidneys of rats. *Arch. Toxicol.* 2023, 97 (12), 3273-3283, doi: 10.1007/s00204-023-03610-4.
- 4) Ishii Y., Liang Shi, Takasu S., Ogawa K., Umemura T. A 13-week comprehensive toxicity study with adductome analysis demonstrates the toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of the natural flavoring agent elemicin, *Food*

Chem. Toxicol. 2023, 179, 113965, doi: 10.1016/j.fct.2023.113965.

- 5) Ishii Y., Namiki M., Takasu S., Nakamura K., Takimoto N., Mitsumoto T., Ogawa K. Lack of genotoxic mechanisms in isoeugenol-induced hepatocellular tumorigenesis in male mice. *Jpn. J. Food Chem. Safety* 2023, 30 (1), 9-22, doi: 10.18891/jjfc.30.1_9.

G-2. 学会発表

- 1) Acetamide の肝発がんに関与する肝細胞質内封入体の形成機序, 石井雄二, 瀧本憲史, 高須伸二, 満元達也, 相馬明玲, 小川久美子, 日本薬学会第 144 年会 2024 年 3 月, 神奈川
- 2) Acetamide のラット肝臓における代謝物と核の形態異常への関与, 石井雄二, 山上洋平, 田原麻衣子, 河上強志, 瀧本憲史, 笠松健吾, 相馬明玲, 高須伸二, 小川久美子, 第 40 回日本毒性病理学会 2024 年 1 月, 東京
- 3) 免疫組織化学染色による小核化肝細胞の検出, 笠松健吾, 石井雄二, 山上洋平, 高須伸二, 相馬明玲, 小澤俊介, 渋谷 淳, 小川久美子, 第 40 回日本毒性病理学会 2024 年 1 月, 東京
- 4) SD ラットを用いた decyltrimethoxysilane の 13 週間反復投与試験, 高須伸二, 石井雄二, 相馬明玲, 松本真理子, 小川久美子, 第 40 回日本毒性病理学会 2024 年 1 月, 東京
- 5) アセトアミドの大型小核誘発機序に関わる代謝物の検索, 石井 雄二, 瀧本 憲史, 田原 麻衣子, 河上 強志, 相馬 明玲, 高須 伸二, 小川 久美子, 第 52 回日本環境変異原ゲノム学会 2023 年 11 月, 福岡
- 6) gpt delta マウスにアクリルアミドが誘発する生殖系列突然変異と曝露

別添 4

時の精子形成ステージの影響, 増村健一, 安東 朋子, 石井 雄二, 杉山圭一, 第 52 回日本環境変異原ゲノム学会 2023 年 11 月, 福岡

- 7) ラットを用いた病理組織学的及び免疫組織化学的解析による抗甲状腺物質の効率的な検出, 赤根 弘敏, 豊田 武士, 石井 雄二, 高須 伸二, 小川 久美子, 第 82 回日本癌学会学術総会 2023 年 8 月, 神奈川
- 8) アセトアミド誘発ラット肝腫瘍におけるクロモソリプシス様染色体再構成の関与, 石井 雄二, 高須 伸二, 小川 久美子, 第 82 回日本癌学会学術総会 2023 年 8 月, 神奈川
- 9) 齧歯類に見られる acetamide の肝発がん性の種差に関する研究, 瀧本憲史, 石井雄二, 満元達也, 相馬明玲, 高須伸二, 渋谷 淳, 小川久美子, 第 50 回日本毒性学会学術年会 2023 年 6 月, 神奈川
- 10) 化学発がんにおける chromothripsis の関与, 石井 雄二, 第 50 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム 2023 年 6 月, 神奈川
- 11) 2-Isopropyl-N-2,3-trimethylbutylamide の包括的毒性評価, 石井雄二, 瀧本憲史, 満元達也, 高須伸二, 並木萌香, 能美健彦, 小川久美, 日本食品化学学会 第 29 回総会・学術大会 2023 年 6 月, 富山
- 12) 食品香料の安全性に関する研究, 石井雄二, 日本食品化学学会 第 29 回総会・学術大会 講演 2023 年 6 月, 富山

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得

該当なし

H-2. 実用新案登録

該当なし

H-3. その他

該当なし

I. 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.

別添 4

Table 1 The *gpt* mutant frequencies in the kidneys of F344 *gpt* delta rats administered ITB for 13 weeks

Group	Animal no.	No. of packaging	Cm ^R colonies (x10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant Frequencies (x10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
Control	101	1	12.6	15	1.04	0.88 ± 0.19 ^a
	102	1	16.5	12	1.02	
	103	1	15.3	9	0.74	
	104	1	7.2	14	0.97	
	105	1	10.5	9	0.61	
5 mg/kg	201	1	15.4	7	0.51	0.74 ± 0.28
	202	1	8.8	5	0.36	
	203	1	10.5	13	0.92	
	204	1	13.5	13	0.93	
	205	1	13.6	15	0.95	
50 mg/kg	301	1	17.6	15	0.93	0.93 ± 0.38
	302	1	15.7	19	1.30	
	303	1	16.5	10	0.66	
	304	1	17.3	7	0.44	
	305	1	16.8	18	1.30	
500 mg/kg	401	2	27.0	5	0.67	0.66 ± 0.16
	402	2	15.6	5	0.78	
	403	1	11.3	14	0.82	
	404	1	15.5	9	0.63	
	405	1	12.9	7	0.42	
Positive control	PC1	1	1.1	137	122.6	130.4 ± 20.6
	PC2	1	1.1	123	111.6	
	PC3	1	0.9	101	115.1	
	PC4	1	0.8	130	160.5	
	PC5	1	0.9	126	142.4	

^a: Values are means ± SDs

別添 4

Table 2 The Spi^r mutant frequencies in the kidneys of F344 *gpt* delta rats administered ITB for 13 weeks

Group	Animal no.	No. of packaging	Plaques within XL-1 Blue MRA (x10 ⁵)	Plaques within XL-1 Blue MRA (P2)	Mutant Frequencies (x10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
Control	101	1	19.7	2	0.10	0.31 ± 0.18 ^a
	102	1	17.8	8	0.45	
	103	1	14.0	2	0.14	
	104	1	14.2	7	0.49	
	105	1	18.5	7	0.38	
5 mg/kg	201	1	18.7	4	0.21	0.37 ± 0.22
	202	1	24.5	15	0.61	
	203	1	22.4	3	0.13	
	204	1	15.5	9	0.58	
	205	1	30.3	10	0.33	
50 mg/kg	301	1	19.4	2	0.10	0.35 ± 0.26
	302	1	27.2	8	0.29	
	303	1	20.7	16	0.77	
	304	1	19.7	4	0.20	
	305	1	19.4	7	0.36	
500 mg/kg	401	2	16.1	7	0.43	0.28 ± 0.10
	402	2	29.5	7	0.24	
	403	1	19.6	4	0.20	
	404	1	21.2	7	0.33	
	405	1	23.1	5	0.22	
Positive control	PC1	1	2.5	12	4.80	3.37 ± 1.62
	PC2	1	2.3	11	4.70	
	PC3	1	1.9	2	1.06	
	PC4	1	1.7	4	2.37	
	PC5	1	2.0	8	3.91	

^a: Values are means ± SDs

別添 4

Table 3 Mutation spectra of *gpt* mutants in the livers of F344 *gpt* delta rats administered ITB for 13 weeks

	ITB (mg/kg BW)							
	0		5		50		500	
	Number (%)	Mutation frequencies ($\times 10^{-5}$)	Number (%)	Mutation frequencies ($\times 10^{-5}$)	Number (%)	Mutation frequencies ($\times 10^{-5}$)	Number (%)	Mutation frequencies ($\times 10^{-5}$)
Base substitution								
Transversions								
G:C-T:A	16 (27.0)	0.23 \pm 0.12	21 (39.6)	0.29 \pm 0.11	26 (37.7)	0.35 \pm 0.20	16 (40.0)	0.30 \pm 0.16
G:C-C:G	11 (18.6)	0.17 \pm 0.11	5 (9.4)	0.07 \pm 0.05	11 (15.9)	0.15 \pm 0.10	9 (22.5)	0.14 \pm 0.06
A:T-T:A	3 (5.1)	0.05 \pm 0.04	0	0	1 (1.4)	0.01 \pm 0.03	1 (2.5)	0.03 \pm 0.07
A:T-C:G	0	0	1 (1.9)	0.01 \pm 0.03	1 (1.4)	0.01 \pm 0.03	2 (5.0)	0.02 \pm 0.03
Transitions								
G:C-A:T	17 (28.8)	0.25 \pm 0.11	19 (35.9)	0.27 \pm 0.12	20 (29.0)	0.27 \pm 0.14	7 (17.5)	0.09 \pm 0.10
A:T-G:C	2 (3.4)	0.03 \pm 0.04	3 (5.7)	0.04 \pm 0.06	1 (1.4)	0.01 \pm 0.03	0	0
Deletion								
Single bp	7 (11.9)	0.11 \pm 0.08	4 (7.5)	0.05 \pm 0.05	6 (8.7)	0.08 \pm 0.09	3 (7.5)	0.04 \pm 0.03
over 2bp	2 (3.4)	0.03 \pm 0.04	0	0	0	0	1 (2.5)	0.03 \pm 0.06
Insertion	1 (1.7)	0.01 \pm 0.03	0	0	3 (4.3)	0.04 \pm 0.06	1 (2.5)	0.01 \pm 0.03
Complex	0	0	0	0	0	0	0	0

別添 4

Table 4. Number and area of GST-P-positive foci in the livers of F344 *gpt* delta rats administered with ITB for 13 weeks

Item	Control	ITB (mg/kg BW)		
		5	50	500
No. of animals	10	10	10	8
No. of foci (No./cm ²)	0.04 ± 0.11	0	0	0.43 ± 0.51
Area of foci (µm ² /cm ²)	127.32 ± 402.63	0	0	2846.39 ± 3531.17

令和5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）
香料を含む食品添加物の遺伝毒性から発がんに至る毒性評価スキーム
確立に向けた基盤的研究

分担研究課題名：肝又は腎遺伝毒性・発がん性中期包括試験（GPG 又は GNP モデル）
に関する研究

研究分担者名 石井 雄二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
研究分担者名 高須 伸二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
研究分担者名 小川 久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

本研究は香料の効率的且つ信頼性の高い安全性評価を推進するために、遺伝毒性と発がん性を *in silico*、*in vitro* および *in vivo* で階層的に評価する系を確立することを目的とする。本研究課題では *in vivo* 評価系としての遺伝毒性・発がん性中期包括試験の有用性を検討することを目的に、*in silico* および *in vitro* で遺伝毒性が明らかになった香料 6-methoxyquinoline (6-MQ) を対象に本法による評価を実施した。昨年度の肝遺伝毒性・発がん性中期包括試験法（GPG モデル）による遺伝毒性評価に続き、本年度は肝発がん性評価を実施した。さらに、本法における切除肝を用いた遺伝毒性評価の妥当性を確認するため、OECD TG488 に準拠した *in vivo* 変異原性試験を実施した。肝発がん性評価では陽性対照の quinoline 投与群における GST-P 陽性巣の数及び面積は有意に上昇したが、陰性対照の 8-hydroxyquinoline (8-HQ) 投与群ならびに 6-MQ 投与群において有意な変化は見られなかったことから、6-MQ の肝発がん性評価は陰性と判断した。また、28 日間反復投与による用量及び検索臓器の設定試験の後、F344 系 *gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性試験を実施した結果、6-MQ の毒性標的である肝臓において、レポーター遺伝子突然変異頻度の変化はみられなかった。本結果は GPG モデルにおける遺伝毒性評価の妥当性を示す物であった。以上より、中期包括試験法が香料等の階層的評価における *in vivo* 評価系として有用であることが確認された。

A. 研究目的

本研究事業は香料の効率的且つ信頼性の高い安全性評価を推進するために、遺伝毒性と発がん性を *in silico*、*in vitro* および *in vivo* で階層的に評価する系を確立することを目的とする。本評価系は近年開発が進む Ames 変異原性を予測する定量的構造活性相関に始まり、Ames 実試験、さらにはその他各種遺伝毒性試験、および *in vivo* における発がん性包括試験法へと展開する評価手法の組み合わせにより構成される。本研究課題では階層的評価法のうち、*in vivo* 評価系としての包括試験法の有用性を検討することを目的とする。

我々はこれまでに、レポーター遺伝子導

入動物である *gpt delta* ラットを用いて、個体レベルで遺伝毒性や発がん性を包括的に評価できる動物モデルを開発してきた。肝遺伝毒性・発がん性中期包括試験法（GPG モデル）または腎遺伝毒性・発がん性中期包括試験法（GNP モデル）は肝臓または腎臓における遺伝毒性と発がん性を一つの試験で検出することを可能にした *in vivo* 試験モデルであり、これまでに本モデルを用いて化学物質の遺伝毒性及び発がん性を検討してきた¹⁻³⁾。

そこで、本研究では 6-Methoxyquinoline (6-MQ、JECFA No. 2157) について遺伝毒性・発がん性中期包括試験法による *in vivo* での評価を行うことで、階層的評価法

における *in vivo* 評価系の一つとして本法の有用性を検討した。6-MQ は quinoline 骨格を有する香料であり、第 76 回の JECFA 会議において香料評価手順に則った安全性評価の結果、「No safety concern」とされている⁴⁾。しかしながら、近年、*in silico* および *in vitro* 試験において、6-MQ が Ames 試験において陽性を示すことが報告された⁵⁾。それ故、本評価により 6-MQ の安全性評価と *in silico* 試験の精緻化に資するデータが得られることも期待される。

昨年度までに実施した GPG モデルによる遺伝毒性評価において、6-MQ は陰性と判断された。本年度は、GPG モデルによる肝発がん性評価を実施した。さらに、本法における遺伝毒性評価の妥当性を確認するため、OECD TG488 に準拠した *in vivo* 変異原性試験を実施した。

B. 研究方法

B-1. 被験物質および動物

6-MQ (>97.0%) は東京化成工業株式会社から購入した。コーン油は富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。5 週齢雌雄 F344 ラットおよび 5 週齢雄性 F344 *gpt delta* ラットは日本エスエルシー株式会社から購入し、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 2~3 匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス社のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、試験期間中は飲料水として水道水を自由摂取させた。

B-2. GPG モデルによる発がん性評価

本試験では陽性対照に遺伝毒性肝発がん物質 quinoline⁶⁾を、陰性対照に Ames 試験陽性ながら *in vivo* 遺伝毒性試験及び発がん性試験で陰性を示す 8-hydroxyquinoline

(8-HQ)⁷⁻¹¹⁾を用いた。

GPG モデルの標準プロトコール³⁾に従い採取した肝臓についてホルマリン固定後、常法に従いパラフィン切片を作製し、GST-P 陽性細胞巢の免疫組織化学染色を実施した。免疫組織化学染色は、1 次抗体として抗 GST-P 抗体 (MBL ライフサイエンス)、2 次抗体としてヒストファイン シンプルステイン (ニチレイバイオサイエン) 用いた。

B-3. *in vivo* 変異原性試験の用量および検索臓器設定試験

6 週齢の雌雄 F344 ラット各群 5 匹に 6-MQ を 50、150 または 500 mg/kg 体重の用量で 1 日 1 回 4 週間強制経口投与した。6-MQ の投与量は最大耐量である 500 mg/kg 体重とし、コーン油を媒体として強制経口投与した。対照群にはコーン油を投与した。試験期間中は体重および摂餌量を週 1 回測定し、一般状態の観察を毎日行った。投与終了後、剖検日前日より一晩絶食させ、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈から採血後、血液学的検査および血清生化学的検査を実施した。剖検時に全身諸器官・組織を摘出し、脳、肺、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣 (雄)、卵巣 (雌) については重量の測定を行った。前立腺、精囊、唾液腺 (顎下腺および舌下腺)、下垂体、甲状腺に関してはホルマリン固定後に重量の測定を行った。摘出した全身諸器官・組織については定法に従い病理組織学的検査を実施した。

B-4. *gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性試験

6 週齢の雄性 F344 *gpt delta* ラット各群 5 匹にコーン油に混じた 6-MQ を 50、150 または 500 mg/kg 体重の用量で 1 日 1 回 4 週間強制経口投与した。対照群にはコーン油を与えた。OECD のテストガイドライン TG488 に準拠し¹²⁾、6-MQ の最終投与より 3 日後に肝臓を摘出し、*gpt* および Spi アッセイを実施した。各アッセイの陽性対照には、diethylnitrosamine (DEN) を 40 mg/kg

の用量で 1 週間に 1 回、5 週間腹腔内投与した雄性 F344 系 *gpt delta* ラットの肝臓を用いた。

(倫理面への配慮)

本試験は「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」を遵守して動物実験計画書を作成し、同動物実験委員会による承認を得た後に実施した。遺伝子組み換え動物の使用については、「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、遺伝子組換え実験計画書を作成し、承認を得た後に使用した。

C. 研究結果

C-1. GPG モデルによる発がん性評価

GST-P 陽性巢の定量解析の結果、quinoline 投与群における GST-P 陽性巢の数及び面積は対照群に比して有意な高値を示したが、6-MQ 群及び 8-HQ 群において有意な変化は認められなかった (Fig. 1)。

C-2. *in vivo* 変異原性試験の用量および検索臓器設定試験

投与期間中、何れの群においても死亡は認められず、一般状態の変化も認められなかった。雌雄 500 mg/kg 群の投与 4 週目において、有意な体重増加抑制が認められた (Fig. 2A)。雌雄 500 mg/kg 群の摂餌量は試験期間を通じて低値を示す傾向が認められた (Fig. 2B)。

血液学的検査の結果を Table 1、2 に示す。赤血球・血小板関連項目では、赤血球数の高値が雄 500 mg/kg 群および雌 50、150 mg/kg 群で、血色素量の高値が雄 150 mg/kg 以上で、血色素量の低値が雌 50、150 mg/kg 群で、ヘマトクリット値の高値が雄 150 mg/kg 以上で、ヘマトクリット値の低値が雌 50、150 mg/kg 群で、平均赤血球容積の高値が雄 150 mg/kg 以上で、平均赤血球色素量の高値が雄 500 mg/kg 群で、平均赤血球色素量の低値が雌 500 mg/kg 群で、平均赤血球血色素濃度の低値が雄 150

mg/kg 以上および雌 500 mg/kg 群で、網赤血球数の高値が雄 500 mg/kg 群で、網赤血球数の低値が雌 50 mg/kg 群で認められた。白血球関連項目では、白血球数の高値が雄 500 mg/kg 群および雌 150 mg/kg 群で、好中球数および単球数の高値が雄 500 mg/kg 群で、好酸球数の低値が雌 50 mg/kg 群で認められた。

血清生化学的検査の結果を Table 3、4 に示す。総タンパクの高値が雌雄 500 mg/kg 群で、アルブミンおよび総コレステロールの高値が雄 150 mg/kg 以上および雌 500 mg/kg 群で、尿素窒素の低値が雌 50 mg/kg 以上で、クレアチニンの低値が雌 500 mg/kg 群で、カルシウムの高値およびリンの低値が雌 500 mg/kg 群で、ナトリウムの低値およびカリウムの高値が雄 500 mg/kg 群で、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの低値が雄 150 mg/kg 以上および雌 50 mg/kg 以上で、アラニンアミノトランスフェラーゼの高値が雌雄 500 mg/kg 群で、アルカリフォスファターゼの低値が雄 50 mg/kg 以上および雌 50、150 mg/kg 群で認められた。

投与終了後の臓器重量の結果を Table 5、6 に示す。肝臓の絶対重量が雄 150 mg/kg 以上および雌 500 mg/kg 群で、相対重量が雄 50 mg/kg 以上および雌 150 mg/kg 以上で高値を示した。脾臓の絶対重量が雌雄 500 mg/kg 群で、相対重量が雌 500 mg/kg 群で低値を示した。副腎の絶対重量が雌 500 mg/kg 群で、相対重量が雌雄 500 mg/kg 群で高値を示した。唾液腺の絶対・相対重量が雌雄 500 mg/kg 群で、絶対重量が雌 50 mg/kg 群で低値を示した。甲状腺の絶対重量が雄 50 mg/kg 以上で、相対重量が 50 および雄 150 mg/kg 群で低値を示した。その他、500 mg/kg 群の雄で肺、腎臓、精巣の相対重量の高値、心臓、胸腺の絶対重量の低値が、雌で脳の相対重量の高値および胸腺の絶対重量の低値が認められた。

病理組織学的検査の結果を Table 7、8 に示す。肝臓では雄 150 mg/kg 以上および雌

500 mg/kg 群で小葉中心性肝細胞肥大、雄 500 mg/kg 群で小葉中心性肝細胞空胞化が認められた (Fig. 3A)。胃では雌雄 500 mg/kg 群で前胃のびらん／潰瘍が認められた (Fig. 3B)。

C-3. *gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性試験

肝臓における *gpt* および *Spi* アッセイの結果を Table 9、10 に示す。6-MQ 投与群において *gpt* および *Spi* 変異体頻度の有意な変化は認められなかった。

D. 考察

GPG モデルによる発がん性評価の結果、陽性対照の quinoline 群の GST-P 陽性巣の数および面積は有意に上昇した。一方、陰性対照の 8-HQ 群の GST-P 陽性巣に有意な変化は認められなかった。本結果は、quinoline および 8-HQ の肝発がん性の有無と一致しており^{6, 11)}、GPG モデルにより quinoline 化合物の肝発がん性を検出できることを示すものであった。6-MQ 投与群における GST-P 陽性巣の数および面積に有意な変化は見られなかったことから、6-MQ の肝発がん性評価は陰性と判断した。

GPG モデルにおける遺伝毒性評価の妥当性を検証するため、OECD TG488 に準拠した *in vivo* 変異原性試験を実施した。*in vivo* 変異原性試験の用量および検索臓器設定試験では、雌雄 500 mg/kg 群において有意な体重増加抑制が認められた。赤血球・血小板関連項目では、雄で赤血球数、血色素量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、網赤血球数の高値や平均赤血球血色素濃度の低値が認められたことから、6-MQ は赤血球系パラメータに影響を与える可能性が示唆された。雌においてもこれらパラメータの有意な変化がみられたが、用量依存性を欠く変化やごく軽度の変化であったことから、偶発と考えられた。白血球関連項目では、雄の白血球数、好中球数および単球数の高値が認められた。有意な変動がみら

れた 500 mg/kg 群では病理組織学的検査で前胃のびらん／潰瘍が認められており、雄では中等度以上のびらん／潰瘍が高頻度に認められたことから、白血球関連項目の変化は前胃のびらん／潰瘍の発生に伴う炎症反応と関連していると考えられた。

血清生化学的検査では、雌雄でアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼおよびアルカリフォスファターゼは低値を示したもののアラニンアミノトランスフェラーゼは 500 mg/kg 群において高値を示した。剖検の結果、肝臓重量は用量依存的に増加しており、病理組織学的に肝細胞肥大や空胞化が認められたことから、肝臓が 6-MQ の毒性標的であることが確認された。さらに、肝臓重量の変化は雄の方が低用量から認められており、雄のみで肝細胞空胞化も生じていることから、6-MQ の肝毒性に対して雄の方が高い感受性を示した。

その他、雌雄で総タンパク、アルブミンおよび総コレステロールの高値が認められたことから、6-MQ はタンパクや脂質代謝に影響を与える可能性が考えられた。一方、その他の血清生化学的検査パラメータは、用量依存性を欠く変化やごく軽微な変化、毒性を示す変化と逆の変化であったことから、偶発と考えた。

臓器重量では、肝臓以外に唾液腺および脾臓で絶対ならびに相対重量の両方が変化した。何れも病理組織学的な所見がなかったことから、毒性学的意義の乏しい変化と考えた。その他、500 mg/kg 群の雌雄において、統計学的に有意な変化が散見されたものの、何れも絶対重量または相対重量の何れか一方の変化であり、病理組織学的な変化もみられなかったことから、最終体重の低下に伴う変化や偶発的な変化と考えられ、毒性学的意義は乏しいと判断した。

病理組織学的検査の結果、前胃のびらん／潰瘍が認められたことから、肝臓に加えて胃も 6-MQ の毒性標的であることが確認された。

gpt delta ラットを用いた *in vivo* 変異原

性試験を実施した結果、6-MQの毒性標的である肝臓において *gpt* および *Spi* 変異頻度の有意な変化はみられなかった。これらの結果は、GPGモデルにおける遺伝毒性評価と同じであり、本評価の妥当性を示すものであった。従って、一度の試験で遺伝毒性と発がん性を評価可能な GPGモデルは、香料等の階層的評価の *in vivo* 評価系として有用であると考えられた。

E. 結論

In silico および *in vitro* で遺伝毒性が明らかになった 6-MQ について、GPG モデルによる発がん性評価は陰性であった。また、OECD TG488 に準拠した *in vivo* 変異原性試験において、6-MQ のラット肝臓における突然変異誘発性は見られず、本結果は GPG モデルにおける切除肝を用いた遺伝毒性評価の妥当性を示す物であった。以上より、GPG モデルは香料等の階層的評価スキームにおける *in vivo* 評価系として有用であることを確認した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

- 1) Takimoto N., Ishii Y., Mitsumoto T., Takasu S., Namiki M., Shibutani M., Ogawa K. Formation of hepatocyte cytoplasmic inclusions and their contribution to methylcarbamate-induced hepatocarcinogenesis in F344 rats. *Toxicol. Sci.* 2024, 198 (1), 40-49, doi: 10.1093/toxsci/kfad131.
- 2) Kuroda K., Ishii Y., Takasu S., Kijima A., Matsushita K., Masumura K., Nohmi T., Umemura T. Possible contribution of 8-hydroxydeoxyguanosine to gene

mutations in the kidney DNA of *gpt* delta rats following potassium bromate treatment. *Mutat. Res.* 2024, 894, 503729, doi: 10.1016/j.mrgentox.2024.503729.

- 3) Mitsumoto T., Ishii Y., Takimoto N., Takasu S., Namiki M., Nohmi T., Umemura T., Ogawa K. Site-specific genotoxicity of rubiadin: localization and histopathological changes in the kidneys of rats. *Arch. Toxicol.* 2023, 97 (12), 3273-3283, doi: 10.1007/s00204-023-03610-4.
- 4) Ishii Y., Liang Shi, Takasu S., Ogawa K., Umemura T. A 13-week comprehensive toxicity study with adductome analysis demonstrates the toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of the natural flavoring agent elemicin, *Food Chem. Toxicol.* 2023, 179, 113965, doi: 10.1016/j.fct.2023.113965.
- 5) Ishii Y., Namiki M., Takasu S., Nakamura K., Takimoto N., Mitsumoto T., Ogawa K. Lack of genotoxic mechanisms in isoeugenol-induced hepatocellular tumorigenesis in male mice. *Jpn. J. Food Chem. Safety* 2023, 30 (1), 9-22, doi: 10.18891/jjfc.30.1_9.

G-2. 学会発表

- 1) Acetamide の肝発がんに関与する肝細胞質内封入体の形成機序, 石井雄二, 瀧本憲史, 高須伸二, 満元達也, 相馬明玲, 小川久美子, 日本薬学会第144年会 2024年3月, 神奈川
- 2) Acetamide のラット肝臓における代謝物と核の形態異常への関与, 石井雄

- 二, 山上洋平, 田原麻衣子, 河上強志, 瀧本憲史, 笠松健吾, 相馬明玲, 高須伸二, 小川久美子, 第 40 回日本毒性病理学会 2024 年 1 月, 東京
- 3) 免疫組織化学染色による小核化肝細胞の検出, 笠松建吾, 石井雄二, 山上洋平, 高須伸二, 相馬明玲, 小澤俊介, 渋谷 淳, 小川久美子, 第 40 回日本毒性病理学会 2024 年 1 月, 東京
- 4) SD ラットを用いた decyltrimethoxysilane の 13 週間反復投与試験, 高須伸二, 石井雄二, 相馬明玲, 松本真理子, 小川久美子, 第 40 回日本毒性病理学会 2024 年 1 月, 東京
- 5) アセトアミドの大型小核誘発機序に関わる代謝物の検索, 石井 雄二, 瀧本憲史, 田原 麻衣子, 河上 強志, 相馬明玲, 高須 伸二, 小川 久美子, 第 52 回日本環境変異原ゲノム学会 2023 年 11 月, 福岡
- 6) ラットを用いた病理組織学的及び免疫組織化学的解析による抗甲状腺物質の効率的な検出, 赤根 弘敏, 豊田 武士, 石井 雄二, 高須 伸二, 小川 久美子, 第 82 回日本癌学会学術総会 2023 年 8 月, 神奈川
- 7) アセトアミド誘発ラット肝腫瘍におけるクロモソリプシス様染色体再構成の関与, 石井 雄二, 高須 伸二, 小川 久美子, 第 82 回日本癌学会学術総会 2023 年 8 月, 神奈川
- 8) 齧歯類に見られる acetamide の肝発がん性の種差に関する研究, 瀧本憲史, 石井雄二, 満元達也, 相馬明玲, 高須伸二, 渋谷 淳, 小川久美子, 第 50 回日本毒性学会学術年会 2023 年 6 月, 神奈川
- 9) 2-Isopropyl-N-2,3-trimethyl butylamide の包括的毒性評価, 石井雄二, 瀧本憲史, 満元達也, 高須伸二, 並木萌香, 能美健彦, 小川久美, 日本食品化学学会 第 29 回総会・学術大会

2023 年 6 月, 富山

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得

該当なし

H-2. 実用新案登録

該当なし

H-3.その他

該当なし

I. 参考文献

1. Matsushita K, Takasu S, Ishii Y, Toyoda T, Yamada T, Morikawa T, Ogawa K. *In vivo* mutagenicity and tumor-promoting activity of 1,3-dichloro-2-propanol in the liver and kidneys of *gpt* delta rats. *Arch Toxicol.* 95(9):3117-3131. 2021.
2. Matsushita K, Ishii Y, Takasu S, Kuroda K, Kijima A, Tsuchiya T, Kawaguchi H, Miyoshi N, Nohmi T, Ogawa K, Nishikawa A, Umemura T. A medium-term *gpt* delta rat model as an *in vivo* system for analysis of renal carcinogenesis and the underlying mode of action. *Exp Toxicol Pathol.* 67(1): 31-9, 2015.
3. Matsushita K, Kuroda K, Ishii Y, Takasu S, Kijima A, Kawaguchi H, Miyoshi N, Nohmi T, Ogawa K, Nishikawa A, Umemura T. Improvement and validation of a medium-term *gpt* delta rat model for predicting chemical carcinogenicity and underlying mode of action. *Exp Toxicol Pathol.* 66(7):313-21, 2014.
4. JECFA. Evaluation of certain food additives. Seventy-sixth report of the Joint FAO/WHO expert committee on food additives. WHO Technical Report Series, No. 974, 2012.

5. Honma M, Kitazawa A, Kasamatsu T, Sugiyama KI. Screening for Ames mutagenicity of food flavor chemicals by (quantitative) structure-activity relationship. *Genes Environ.* 42(1):32, 2020.
6. International Agency for Research on Cancer. Styrene, styrene-7,8-oxide, and quinoline. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; volume 121, 2018.
7. Epler JL, Winton W, Ho T, Larimer FW, Rao TK, Hardigree AA. Comparative mutagenesis of quinolines. *Mutat Res.* 39(3-4):285-96, 1977.
8. Allavena A, Martelli A, Robbiano L, Brambilla G. Evaluation in a battery of *in vivo* assays of four *in vitro* genotoxins proved to be noncarcinogens in rodents. *Teratog Carcinog Mutagen.* 12(1):31-41, 1992.
9. McFee AF. Genotoxic potency of three quinoline compounds evaluated *in vivo* in mouse marrow cells. *Environ Mol Mutagen.* 13(4):325-31, 1989.
10. Hamoud MA, Ong T, Petersen M, Nath J. Effects of quinoline and 8-hydroxyquinoline on mouse bone marrow erythrocytes as measured by the micronucleus assay.
11. National Toxicology Program. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of 8-Hydroxyquinoline (CAS No. 148-24-3) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep. Ser.* 276:1-170, 1985.
12. OECD. Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays. OECD guideline for the testing of chemicals. Test No. 488, 2022.

別添 4

Table 1. Hematological data for male F344 rats administered 6-MQ for 4 weeks.

		Control	50 mg/kg	150 mg/kg	500 mg/kg
No. of animals		5	5	5	5
RBC	($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8.34 \pm 0.20	8.60 \pm 0.30	8.68 \pm 0.24	8.85 \pm 0.15 **
HGB	(g/dL)	14.7 \pm 0.3	15.1 \pm 0.5	15.3 \pm 0.4 *	15.7 \pm 0.2 **
HCT	(%)	43.4 \pm 1.0	45.1 \pm 1.7	46.4 \pm 1.5 **	48.6 \pm 0.6 **
MCV	(fL)	52.0 \pm 0.3	52.4 \pm 0.4	53.4 \pm 0.4 **	54.9 \pm 0.9 **
MCH	(pg)	17.6 \pm 0.1	17.5 \pm 0.1	17.7 \pm 0.1	17.8 \pm 0.1 *
MCHC	(g/dL)	33.8 \pm 0.3	33.5 \pm 0.2	33.0 \pm 0.3 **	32.4 \pm 0.2 **
RET	($\times 10^3/\mu\text{L}$)	317.1 \pm 23.2	313.9 \pm 19.6	340.6 \pm 8.7	396.4 \pm 19.3 **
PLT	($\times 10^3/\mu\text{L}$)	727 \pm 26	765 \pm 22	756 \pm 29	746 \pm 32
WBC	($\times 10^3/\mu\text{L}$)	4.71 \pm 1.03	4.99 \pm 1.23	5.25 \pm 0.72	6.39 \pm 1.05 *
Differential cell counts					
Neutrophil	($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1.00 \pm 0.24	1.14 \pm 0.19	1.25 \pm 0.18	1.61 \pm 0.22 **
Lymphocyte	($\times 10^3/\mu\text{L}$)	3.53 \pm 0.76	3.70 \pm 1.06	3.82 \pm 0.67	4.54 \pm 0.83
Monocyte	($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.12 \pm 0.04	0.11 \pm 0.03	0.13 \pm 0.02	0.19 \pm 0.06 *
Eosinophil	($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.05 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01
Basophil	($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00

RBC, red blood cell; HGB, hemoglobin; HCT, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; RET, reticulocyte; PLT, platelet; WBC, white blood cell.

Values are means \pm standard deviations.

*, **Significantly different from the control group at $p < 0.05, 0.01$, respectively.

別添 4

Table 2. Hematological data for female F344 rats administered 6-MQ for 4 weeks.

		Control	50 mg/kg	150 mg/kg	500 mg/kg
No. of animals		5	5	5	5
RBC	($\times 10^6/\mu\text{L}$)	9.22 \pm 0.08	8.83 \pm 0.20 **	8.92 \pm 0.17 *	9.25 \pm 0.21
HGB	(g/dL)	16.5 \pm 0.1	15.8 \pm 0.3 **	15.8 \pm 0.3 **	16.1 \pm 0.3
HCT	(%)	48.8 \pm 0.5	46.5 \pm 1.1 **	46.9 \pm 1.1 *	49.0 \pm 1.0
MCV	(fL)	52.9 \pm 0.4	52.6 \pm 0.2	52.6 \pm 0.3	52.9 \pm 0.7
MCH	(pg)	17.9 \pm 0.1	17.9 \pm 0.1	17.7 \pm 0.0	17.4 \pm 0.1 **
MCHC	(g/dL)	33.7 \pm 0.1	34.0 \pm 0.1	33.7 \pm 0.2	32.9 \pm 0.3 **
RET	($\times 10^3/\mu\text{L}$)	294.4 \pm 27.8	248.0 \pm 26.5 *	267.6 \pm 28.0	296.1 \pm 24.3
PLT	($\times 10^3/\mu\text{L}$)	816 \pm 73	738 \pm 100	783 \pm 75	757 \pm 94
WBC	($\times 10^3/\mu\text{L}$)	5.29 \pm 0.79	4.70 \pm 0.75	3.88 \pm 0.70 *	5.88 \pm 0.80
Differential cell counts					
Neut	($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.83 \pm 0.18	0.77 \pm 0.14	0.62 \pm 0.15	1.15 \pm 0.34
Lymp	($\times 10^3/\mu\text{L}$)	4.24 \pm 0.65	3.74 \pm 0.61	3.11 \pm 0.55	4.52 \pm 1.00
Mono	($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.15 \pm 0.01	0.12 \pm 0.03	0.11 \pm 0.02	0.15 \pm 0.05
Eo	($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.07 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01 *	0.05 \pm 0.01 *	0.06 \pm 0.01
Baso	($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.00 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.00 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01

RBC, red blood cell; HGB, hemoglobin; HCT, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; RET, reticulocyte; PLT, platelet; WBC, white blood cell.

Values are means \pm standard deviations.

*, **Significantly different from the control group at $p < 0.05, 0.01$. respectively.

別添 4

Table 3. Serum biochemistry for male F344 rats administered 6-MQ for 4 weeks.

	Control	50 mg/kg	150 mg/kg	500 mg/kg
No. of animals	5	5	5	5
TP (g/dL)	6.2 ± 0.2	6.3 ± 0.3	6.5 ± 0.1	7.1 ± 0.1 **
A/G	2.9 ± 0.2	2.9 ± 0.2	2.9 ± 0.1	2.7 ± 0.1
Alb (g/dL)	4.6 ± 0.1	4.7 ± 0.1	4.9 ± 0.1 **	5.2 ± 0.1 **
T-Bil (mg/dL)	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00
Glu (mg/dL)	125 ± 20	142 ± 22	129 ± 15	128 ± 17
TG (mg/dL)	80 ± 25	98 ± 23	65 ± 16	60 ± 5
T-cho (mg/dL)	58 ± 4	62 ± 4	83 ± 4 **	161 ± 10 **
BUN (mg/dL)	19.6 ± 2.7	17.1 ± 2.3	17.2 ± 0.5	18.9 ± 1.7
CRN (mg/dL)	0.28 ± 0.02	0.27 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.26 ± 0.01
Ca (mg/dL)	10.9 ± 0.1	10.9 ± 0.3	11.1 ± 0.3	11.2 ± 0.1
P (mg/dL)	7.3 ± 0.6	7.0 ± 0.6	7.3 ± 0.6	7.3 ± 0.4
Na (mEq/L)	141 ± 1	141 ± 1	140 ± 1	139 ± 0 **
K (mEq/L)	4.6 ± 0.2	4.6 ± 0.2	4.7 ± 0.2	5.1 ± 0.3 **
Cl (mEq/L)	104 ± 1	104 ± 1	104 ± 1	102 ± 0 *
AST (IU/L)	79 ± 9	71 ± 10	65 ± 8 *	59 ± 2 **
ALT (IU/L)	44 ± 3	44 ± 5	47 ± 4	60 ± 3 **
ALP (IU/L)	279 ± 15	256 ± 26	244 ± 17 *	226 ± 15 **

TP, total protein; A/G, albumin/globulin ratio; Alb, albumin; T-Bil, total bilirubin; Glu, glucose; TG, triglyceride; T-Cho, total cholesterol; PL, phospholipid; BUN, blood urea nitrogen; CRN, creatinine; Ca, calcium; IP, inorganic phosphorus; Na, sodium; K, potassium; Cl, chloride; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase.

Values are means ± standard deviations.

*, **Significantly different from the control group at p < 0.05, 0.01, respectively.

別添 4

Table 4. Serum biochemistry for female F344 rats administered 6-MQ for 4 weeks.

	Control	50 mg/kg	150 mg/kg	500 mg/kg
No. of animals	5	5	5	5
TP (g/dL)	6.0 ± 0.2	5.9 ± 0.2	5.9 ± 0.1	6.5 ± 0.1 **
A/G	3.2 ± 0.2	3.3 ± 0.1	3.3 ± 0.1	3.1 ± 0.3
Alb (g/dL)	4.6 ± 0.2	4.5 ± 0.2	4.5 ± 0.1	4.9 ± 0.2 *
T-Bil (mg/dL)	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.01
Glu (mg/dL)	116 ± 15	109 ± 16	115 ± 6	143 ± 24
TG (mg/dL)	50 ± 18	62 ± 5	50 ± 10	57 ± 11
T-cho (mg/dL)	85 ± 6	86 ± 2	91 ± 6	149 ± 6 **
BUN (mg/dL)	18.7 ± 1.4	15.2 ± 1.6 **	16.3 ± 1.0 *	14.9 ± 1.5 **
CRN (mg/dL)	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.28 ± 0.02	0.26 ± 0.01 **
Ca (mg/dL)	10.3 ± 0.2	10.4 ± 0.2	10.4 ± 0.2	10.9 ± 0.1 **
P (mg/dL)	6.7 ± 0.3	6.5 ± 0.1	6.6 ± 0.5	6.5 ± 0.3 **
Na (mEq/L)	139 ± 1	138 ± 1	139 ± 0	138 ± 0
K (mEq/L)	4.6 ± 0.2	4.6 ± 0.2	4.8 ± 0.2	4.8 ± 0.2
Cl (mEq/L)	104 ± 1	105 ± 0	105 ± 0	104 ± 1
AST (IU/L)	83 ± 4	72 ± 7 *	69 ± 6 **	58 ± 5 **
ALT (IU/L)	40 ± 5	34 ± 3	35 ± 3	54 ± 1 **
ALP (IU/L)	195 ± 21	163 ± 19 *	155 ± 12 **	174 ± 14

TP, total protein; A/G, albumin/globulin ratio; Alb, albumin; T-Bil, total bilirubin; Glu, glucose; TG, triglyceride; T-Cho, total cholesterol; PL, phospholipid; BUN, blood urea nitrogen; CRN, creatinine; Ca, calcium; IP, inorganic phosphorus; Na, sodium; K, potassium; Cl, chloride; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase.

Values are means ± standard deviations.

*, **Significantly different from the control group at p < 0.05, 0.01, respectively.

別添 4

Table 5. Organ weights for male F344 rats administered 6-MQ for 4 weeks.

		Control	50 mg/kg	150 mg/kg	500 mg/kg
Final body weights	(g)	234 ± 13	239 ± 6	242 ± 8	212 ± 10 **
Brain	(g)	1.83 ± 0.02	1.81 ± 0.04	1.82 ± 0.05	1.77 ± 0.02
	(g/100 g BW)	0.782 ± 0.044	0.757 ± 0.029	0.754 ± 0.044	0.835 ± 0.033
Lungs	(g)	0.837 ± 0.072	0.817 ± 0.060	0.888 ± 0.048	0.837 ± 0.059
	(g/100 g BW)	0.357 ± 0.020	0.341 ± 0.027	0.367 ± 0.014	0.394 ± 0.016 *
Heart	(g)	0.718 ± 0.045	0.696 ± 0.027	0.716 ± 0.026	0.633 ± 0.035 **
	(g/100 g BW)	0.307 ± 0.014	0.291 ± 0.010	0.296 ± 0.018	0.298 ± 0.006
Thymus	(g)	0.346 ± 0.031	0.354 ± 0.038	0.348 ± 0.029	0.271 ± 0.023 **
	(g/100 g BW)	0.148 ± 0.018	0.148 ± 0.017	0.144 ± 0.016	0.128 ± 0.011
Liver	(g)	7.24 ± 0.66	7.94 ± 0.31	8.73 ± 0.55 **	10.64 ± 0.56 **
	(g/100 g BW)	3.09 ± 0.16	3.32 ± 0.10 *	3.61 ± 0.13 **	5.01 ± 0.12 **
Kidneys	(g)	1.59 ± 0.10	1.60 ± 0.05	1.68 ± 0.07	1.53 ± 0.07
	(g/100 g BW)	0.678 ± 0.021	0.668 ± 0.019	0.695 ± 0.015	0.723 ± 0.016 **
Spleen	(g)	0.482 ± 0.028	0.478 ± 0.011	0.479 ± 0.015	0.374 ± 0.027 **
	(g/100 g BW)	0.206 ± 0.012	0.200 ± 0.006	0.198 ± 0.010	0.176 ± 0.011
Adrenals	(mg)	44.1 ± 9.8	45.5 ± 7.9	41.7 ± 3.8	53.2 ± 5.8
	(mg/100 g BW)	19.0 ± 4.8	19.0 ± 3.4	17.3 ± 1.5	25.1 ± 3.0 *
Pituitary	(mg)	10.0 ± 0.8	8.9 ± 0.4	9.9 ± 0.7	9.3 ± 1.1
	(mg/100 g BW)	4.3 ± 0.3	3.7 ± 0.1 *	4.1 ± 0.3	4.4 ± 0.4
Thyroid	(mg)	20.2 ± 2.8	15.9 ± 1.0 **	17.1 ± 1.3 *	16.7 ± 1.4 *
	(mg/100 g BW)	8.6 ± 1.2	6.6 ± 0.5 **	7.1 ± 0.4 **	7.9 ± 0.5
Testes	(g)	2.50 ± 0.16	2.60 ± 0.16	2.71 ± 0.09	2.53 ± 0.10
	(g/100 g BW)	1.07 ± 0.01	1.09 ± 0.06	1.12 ± 0.03	1.19 ± 0.06 **
Seminal vesicle	(g)	0.399 ± 0.081	0.518 ± 0.054 *	0.497 ± 0.051	0.398 ± 0.073
	(g/100 g BW)	0.169 ± 0.026	0.216 ± 0.017 *	0.206 ± 0.027	0.187 ± 0.030
Prostate	(g)	0.449 ± 0.078	0.453 ± 0.046	0.460 ± 0.041	0.359 ± 0.047
	(g/100 g BW)	0.191 ± 0.029	0.189 ± 0.020	0.190 ± 0.013	0.169 ± 0.020
Salivary gland	(g)	0.470 ± 0.022	0.456 ± 0.033	0.519 ± 0.031	0.535 ± 0.046 *
	(g/100 g BW)	0.201 ± 0.011	0.191 ± 0.011	0.214 ± 0.007	0.252 ± 0.017 **

Values are means ± standard deviations.

*, **Significantly different from the control group at p < 0.05, 0.01, respectively.

別添 4

Table 6. Organ weights for female F344 rats administered 6-MQ for 4 weeks.

		Control	50 mg/kg	150 mg/kg	500 mg/kg
Final body weights	(g)	158 ± 11	155 ± 5	153 ± 2	143 ± 4 **
Brain	(g)	1.69 ± 0.02	1.69 ± 0.02	1.69 ± 0.04	1.67 ± 0.02
	(g/100 g BW)	1.07 ± 0.07	1.09 ± 0.03	1.10 ± 0.02	1.17 ± 0.04 **
Lungs	(g)	0.668 ± 0.058	0.684 ± 0.027	0.665 ± 0.032	0.625 ± 0.032
	(g/100 g BW)	0.423 ± 0.035	0.443 ± 0.029	0.435 ± 0.019	0.438 ± 0.027
Heart	(g)	0.517 ± 0.037	0.496 ± 0.038	0.480 ± 0.014	0.465 ± 0.007 *
	(g/100 g BW)	0.326 ± 0.009	0.321 ± 0.025	0.314 ± 0.007	0.326 ± 0.009
Thymus	(g)	0.293 ± 0.030	0.285 ± 0.018	0.302 ± 0.039	0.235 ± 0.021 *
	(g/100 g BW)	0.186 ± 0.025	0.185 ± 0.015	0.198 ± 0.027	0.165 ± 0.018
Liver	(g)	4.34 ± 0.37	4.47 ± 0.10	4.60 ± 0.16	6.44 ± 0.34 **
	(g/100 g BW)	2.74 ± 0.12	2.89 ± 0.09	3.01 ± 0.09 **	4.50 ± 0.14 **
Kidneys	(g)	1.06 ± 0.06	1.02 ± 0.01	1.03 ± 0.05	1.00 ± 0.04
	(g/100 g BW)	0.669 ± 0.022	0.663 ± 0.020	0.674 ± 0.024	0.703 ± 0.028
Spleen	(g)	0.349 ± 0.020	0.332 ± 0.013	0.339 ± 0.028	0.257 ± 0.009 **
	(g/100 g BW)	0.221 ± 0.010	0.215 ± 0.012	0.222 ± 0.017	0.180 ± 0.006 **
Adrenals	(mg)	39.1 ± 3.9	41.7 ± 2.8	41.1 ± 5.3	49.2 ± 7.3 *
	(mg/100 g BW)	24.7 ± 2.1	26.9 ± 1.1	26.9 ± 3.7	34.4 ± 4.5 **
Pituitary	(mg)	11.4 ± 1.7	10.8 ± 1.9	10.5 ± 1.3	9.7 ± 2.1
	(mg/100 g BW)	7.2 ± 0.8	7.1 ± 1.2	6.8 ± 0.8	6.8 ± 1.4
Thyroid	(mg)	15.2 ± 2.5	12.1 ± 3.1	11.4 ± 2.2	14.0 ± 1.3
	(mg/100 g BW)	9.7 ± 1.8	7.8 ± 2.0	7.5 ± 1.3	9.8 ± 0.9
Ovaries	(mg)	56.9 ± 14.7	52.7 ± 8.8	48.7 ± 7.7	41.8 ± 11.9
	(mg/100 g BW)	35.6 ± 6.4	33.9 ± 4.5	31.9 ± 5.1	29.2 ± 8.0
Salivary gland	(g)	0.373 ± 0.012	0.333 ± 0.011 *	0.370 ± 0.020	0.459 ± 0.026 **
	(g/100 g BW)	0.236 ± 0.016	0.216 ± 0.007	0.242 ± 0.013	0.321 ± 0.021 **

Values are means ± standard deviations.

*, **Significantly different from the control group at p < 0.05, 0.01, respectively.

別添 4

Table 7. Histopathological findings for male F344 rats administered 6-MQ for 4 weeks.

Organs	Findings (\pm /+/++/+++)	Control	50 mg/kg	150 mg/kg	500 mg/kg
No. of animals		5	5	5	5
Liver	Hypertrophy, hepatocellular, centrilobular	0	0	3 (0/3/0/0)	5* (0/0/5/0)
	Vacuolation, hepatocyte, centrilobular	0	0	0	5* (0/5/0/0)
Kidney	Lymphoid infiltration	0	-	-	1 (1/0/0/0)
	Basophilic tubule	0	-	-	1 (1/0/0/0)
Heart	Myocardial degeneration / mononuclear cell infiltration	3 (3/0/0/0)	-	-	0
Stomach	Erosion/ulcer, forestomach	0	0	0	2 (0/0/2/0)

Grade: \pm , minimal; +, slight; ++, moderate; +++, severe.

Table 8. Histopathological findings for female F344 rats administered 6-MQ for 4 weeks.

Organs	Findings (\pm /+/++/+++)	Control	50 mg/kg	150 mg/kg	500 mg/kg
No. of animals		5	5	5	5
Liver	Hypertrophy, hepatocellular, centrilobular	0	0	0	5* (0/0/5/0)
Heart	Myocardial degeneration / mononuclear cell infiltration	1 (1/0/0/0)	-	-	0
Stomach	Erosion/ulcer, forestomach	0	0	0	3 (0/2/0/1)

Grade: \pm , minimal; +, slight; ++, moderate; +++, severe.

別添 4

Table 9. *gpt* mutant frequencies in the liver of F344 *gpt* delta rats administered 6-MQ for 4 weeks.

Treatment	Animal No.	Cm ^R colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
Control	1	3.2	12	3.76	1.82 ± 1.20
	2	4.3	5	1.16	
	3	3.6	8	2.19	
	4	3.5	4	1.15	
	5	7.2	6	0.83	
50 mg/kg	11	4.0	4	1.01	1.32 ± 0.71
	12	4.5	5	1.11	
	13	4.0	8	2.02	
	14	12.0	5	0.42	
	15	3.9	8	2.07	
150 mg/kg	21	4.1	9	2.22	1.25 ± 0.62
	22	3.6	2	0.56	
	23	3.9	5	1.28	
	24	6.3	8	1.27	
	25	3.2	3	0.94	
500 mg/kg	31	15.5	11	0.71	1.38 ± 0.66
	32	5.4	4	0.74	
	33	4.9	11	2.24	
	34	5.7	10	1.75	
	35	5.5	8	1.45	
DEN	P11	3.2	214	67.94	60.00 ± 14.05
	P12	2.6	208	79.69	
	P13	4.9	229	47.12	
	P14	7.2	338	46.94	
	P15	3.5	202	58.30	

別添 4

Table 10. Spi⁺ mutant frequencies in the liver of F344 *gpt* delta rats administered 6-MQ for 4 weeks.

Treatment	Animal No.	Plaues within XL-1 Blue MRA (x10 ⁵)	Plaque within WL95 (P2)	Mutant frequency (x10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
Control	1	6.5	5	0.77	0.36 ± 0.24
	2	7.3	2	0.27	
	3	8.6	2	0.23	
	4	5.2	1	0.19	
	5	8.8	3	0.34	
50 mg/kg	11	6.4	2	0.31	0.52 ± 0.35
	12	7.3	5	0.69	
	13	6.0	2	0.33	
	14	7.7	8	1.05	
	15	4.8	1	0.21	
150 mg/kg	21	5.9	2	0.34	0.26 ± 0.07
	22	6.6	2	0.30	
	23	7.7	2	0.26	
	24	6.3	1	0.16	
	25	9.1	2	0.22	
500 mg/kg	31	9.3	4	0.43	0.45 ± 0.29
	32	9.3	3	0.32	
	33	5.0	2	0.40	
	34	6.2	1	0.16	
	35	3.2	3	0.93	
DEN	P11	5.5	18	3.28	4.16 ± 0.56
	P12	6.0	25	4.15	
	P13	5.6	27	4.84	
	P14	6.2	27	4.35	
	P15	5.0	21	4.17	

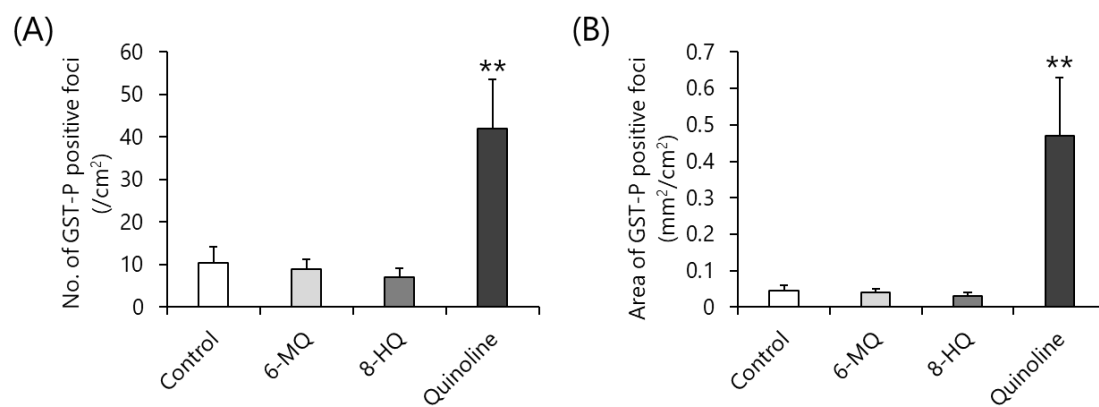


Fig. 1. Number (A) and area (B) of GST-P positive foci in the liver of F344 rats administered 6-MQ, 8-HQ or quinoline in the GPG model.

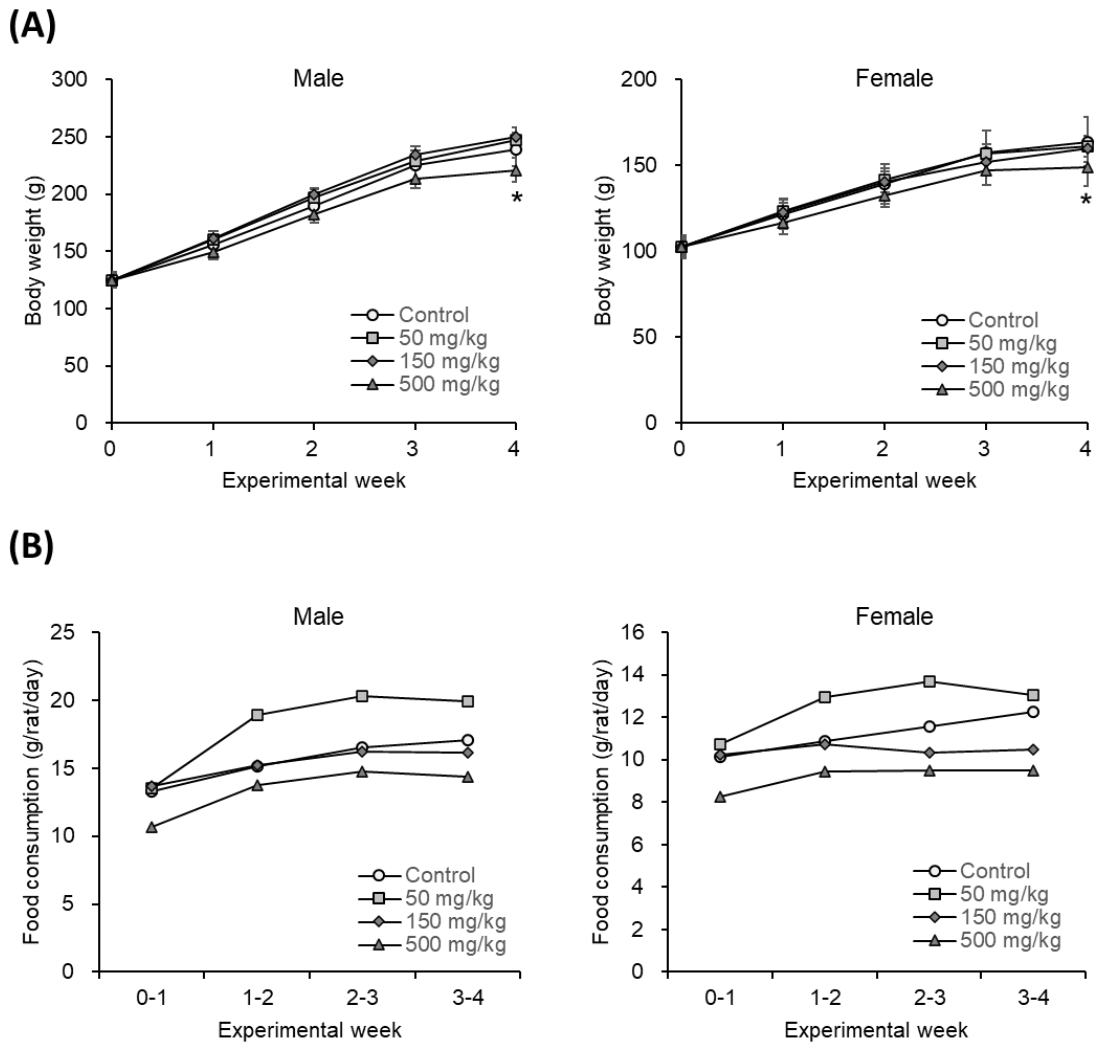


Fig. 2. Body weight (A) and food consumption (B) of F344 rats administered 6-MQ for 4 weeks.

別添 4

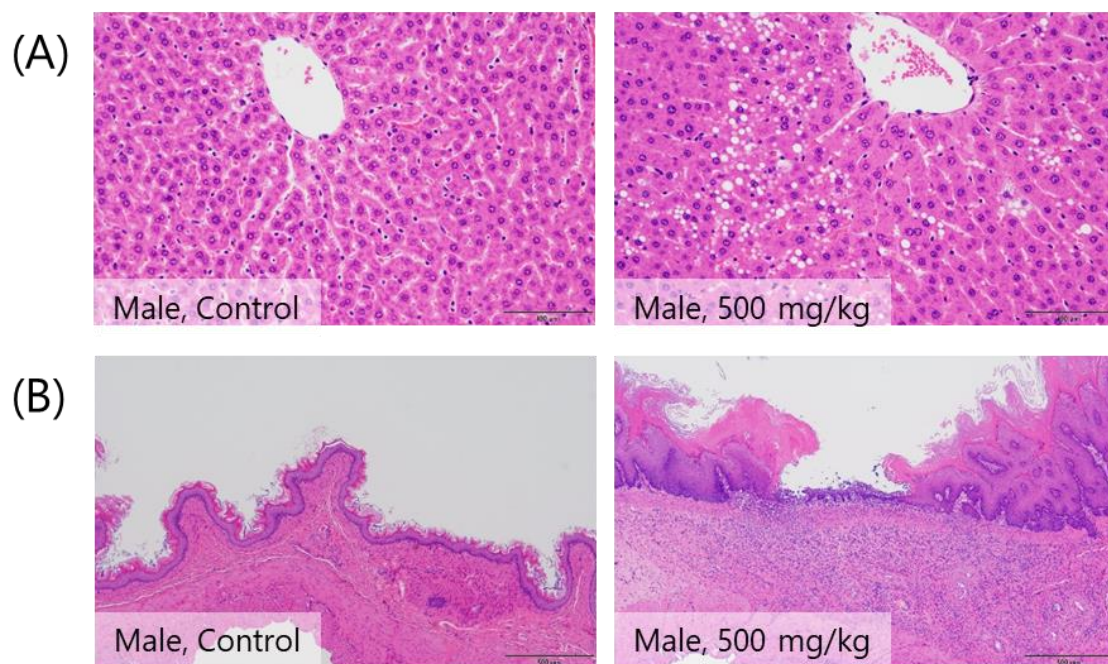


Fig 3. Representative images of histopathology in F344 rats administered 6-MQ for 4 weeks. (A), Liver. (B), Forestomach. HE staining.