

令和6年度 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
香料を含む食品添加物の遺伝毒性評価スキームの構築に関する基盤研究

分担研究課題名： *in silico*手法を用いた香料スクリーニング評価法の提案

研究分担者 古濱 彩子 国立医薬品食品衛生研究所 ゲノム安全科学部
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 ゲノム安全科学部

研究要旨

本研究課題では、変異原性のリスクを予測・評価するためのスキームの確立を目指す目的で、国内での使用量の多い200香料について、QSAR 予測結果と国内外の遺伝毒性情報を収集・整理を実施した。

4種類のQSARモデル全てで陰性であるのは8割であった。遺伝毒性試験情報については、132香料で何等かの遺伝毒性試験結果の情報を得ることができた。42香料でAmes試験陽性(equivocalを含む)の懸念が見られたが、全ての情報ソースで陽性のAmes試験結果が確認できたのは16香料であり、陰性・陽性が混在している香料も存在した。Ames変異原性QSAR予測結果との比較や、陽性陰性の混在状況を加味すると信頼性の担保に課題がある。特に、今回はUS EPAのCompToxの情報を安全サイドの基準で収集したため、判定基準の精査と、試験情報の収集と確認・精査が必要である。その一方、今回用いた4モデルの予測が全て陰性で、Ames試験情報が全ての情報源で陽性になった物質(偽陽性物質)とその類似の構造を有する物質については、情報の精査を行うことで、今後優先して評価が必要であると提言でき、その類似構造の提案がスクリーニング方法の原案につながる。

A. 研究目的

香料等の食品添加物の遺伝毒性スクリーニング評価には、*in silico*手法を用いることが効率的で妥当である。例えば、Ames変異原性については、定量的構造活性相関(QSAR)を用いた評価はICH M7ガイダンス等で示される通り、規制目的での活用が進んでいる。リードアクロス手法(類似の化学物質群の毒性に関する情報から、毒性情報の乏しい化学物質の毒性を推定する方法のひとつ。https://www.fsc.go.jp/yougoshu/kensaku_hyouka.html#item360より引用)も規制目的での活用がすすめられている。本研究課題では、QSARは、実試験を必要とせず遺伝毒性を予測しうる点で画期的な技術である

が、更にリードアクロス手法の活用を検討する。*in silico*評価を順次行なって、変異原性のリスクを予測・評価するためのスキームの確立を目指す。

令和6年度は、既存のデータや基本情報を整理するため、使用量の多い200香料について、QSAR予測結果と国内外の遺伝毒性情報を収集・整理し、課題点を明らかにすることを目的として研究を進めた。

B. 研究方法

これまでの研究の経緯

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

構築と情報収集は、令和4年度から厚生労働科学研究費補助金「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」の分担課題「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」より開始していた。当該課題では、令和4年度には、2020年（令和2年）1～12月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て整理されていた。令和5年度は、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番目までの物質については、構造情報を整備し、QSAR予測と国内のデータベースにおける毒性情報の収集を行い、考察をおこなっていた。QSAR予測は、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。既存毒性情報については、国内のデータベースに限定して収集を行っていた。

QSAR評価

令和6年度においては、年間使用量の多い50香料から200香料に整備をする対象を広げた。また、QSAR予測結果もルールベースのQSARはDerek Nexusに加えてブルガリアOASIS TIMES 2.33.1の2つのモデルAmes mutagenicity v.20.20（non-kinetic model）並びにAmes Mutagenicity S9 activated kinetic v.05.05（kinetic model）の結果を整理する対象とした。kinetic model（速度論的モデル）と non-kinetic model（非速度論的モデル、従来のTIMESのモデ

ル）の概要と評価結果は、厚生労働科学研究費補助金「インシリコ予測技術の高度化・実用化に基づく化学物質のヒト健康リスクの評価ストラテジーの開発」の分担課題「代謝予測モデルの改良によるMoAに基づいた*in vivo*遺伝毒性予測性の向上に関する研究」の令和2年度研究報告書に記載されている。TIMESでは、*in vitro* Ames negativeを陰性、*in vitro* Ames positiveを陽性とし、Domain判定も一部加味した。統計ベースQSARのCASE Ultraの結果と合わせて4種類のQSAR予測結果を整理することとした。なお、Derek NexusとCASE UltraのQSARのバージョンは、最新版のもので再計算をおこなっておりDEREK Nexusは、Nexus 2.6.0（Derek KB 2023 1.0）Derek Nexus 6.3.0、CASE Ultraは、CASE Ultra 1.9.0.4 GT1_BMUT1.9.0.2.13760.500を用いた。Derek Nexus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>50%）、Known Positive、Inconclusive（Prob:40～50%）を陽性、Negative（Prob<40%）、Known Negativeを陰性とした。なお、モデルのバージョンが令和5年度から更新されたことにより、Inconclusiveの閾値が変更されていた。

遺伝毒性試験の収集

遺伝毒性情報については、国内情報源として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、職場のあんぜんサイト（<https://anzeninfo.mhlw.go.jp/user/anzen/kag/sokatutbl.htm>）のAmes試験・染色体異常試験を調査対象とした。国外については、US EPAのCompTox <<https://comptox.epa.gov/dashboard/>> Ver.2.4.1で収集したAmes試験情報、Ames試験以外の

*in vitro*遺伝毒性試験情報、*iv vivo*遺伝毒性試験情報を調査した。CompToxでは、データベース上に少なくとも1つの陽性(equivocal)の報告があれば陽性、すべて陰性の報告のものを陰性とした。更に書誌情報Ono et al. 2012. Food Chem. Toxic. 50, 1538-1546.とHansen et al. 2009. J. Chem. Inf. Model. 49, 2077-2081.の香料のAmes試験データも収集対象とした。

(倫理面の配慮)

本研究では動物を用いた実験は実施しない。

C. 研究結果

200 香料のデータの整理

年間使用量の多い 200 番目までの香料のうち、39 番目 (以下使用量番号 39 番と呼ぶ、以下同様) (5or6)-decenoic acid、使用量番号 191 番 6-[(5or6)-decenoyloxy]decanoic acid については、使用量番号 39 番は 5-decenoic acid と 6-decenoic acid の両方、使用量番号 191 番は 6-[5-decenoyloxy]decanoic acid と 6-[6-decenoyloxy]decanoic acid の両方の構造を QSAR の対象とした。一方、使用量番号 131 番の butter esters は QSAR の対象とする構造を得ることができないため QSAR の対象から除外した。本報告書では、200 香料のうち 199 香料の 201 構造を評価対象とした。なお、令和 5 年度の報告書では、使用量番号 45 番の ethyl 2-[(5-methyl-2-propan-2-ylcyclohexanecarbonyl)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 を実施したが、光学異性体の有無で結果が変わらないことから、光学異性体ありを入力とした QSAR 予測結果を用いた。

QSAR 予測

Derek Nexus では、184 物質 (92%) が陰性、17 物質 (8%) が陽性の予測だった。陰性は全て、No misclassified or unclassified features のコメントを有し、信頼度の高い陰性予測であるといえた。CASE Ultra で

は、181 物質 (90%) が陰性、19 物質 (9.5%) が陽性、1 物質 (0.5%) が Out of Domain の予測であった。TIMES v.05.05 (kinetic model)では、ドメインを考慮しない場合は、178 物質 (88.6%) が陰性、23 物質 (11.4%) が陽性であった。ドメインを考慮した場合の結果は図 1 の通りであり、85%の物質がドメイン内での予測が可能であった。

TIMES v.20.20 (non-kinetic model)では、ドメインを考慮しない場合は、180 物質 (89.6%) が陰性、21 物質 (10.4%) が陽性であった。ドメインを考慮した場合の結果は図 2 の通りであり、85%の物質がドメイン内での予測が可能であった。

4 モデルの予測結果をまとめた概要を表 1 に示す。8 割の構造 (香料) において 4 種類の QSAR モデル全てで陰性であり、Derek Nexus と CASE Ultra が両方陰性は 88% になった。

なお、2 つの構造を加味した、使用量番号 39 と使用量番号 190 の香料の QSAR 予測結果は、4 種類のモデル全てで陰性であった。以降の遺伝毒性試験情報を加味した議論では、使用量番号 39 と使用量番号 190 の香料は 4 種類のモデルで陰性の区分で扱うこととした。この定義の場合、200 香料のうち、4 種類のモデル全てで陰性 (「QSAR 陽性なし」) は 159 香料、少なくとも 1 つの QSAR で陽性あり又は統計ベースでの Out of Domain は 40 香料 (「QSAR 陽性あり」) と規定された。Butter ester が QSAR 対象外のため、「QSAR 陽性あり」と「QSAR 陽性なし」の和は 199 だった。

遺伝毒性試験収集

200 香料中、三分の二に相当する 132 香料で何等かの遺伝毒性試験結果の情報を得ることができた。得られた情報の内訳については表 2 の通りであった。21%の 42 香料において、Ames 試験陽性(equivocalを含む)の懸念が見られたが、情報源によって陰性・陽性が混在しており、脚注にも記載したようにすべてのソースで陽性のみの Ames 試験結果と確認できたのは約 4 割の 16 香料

であり、陰性・陽性が混在している香料も存在した。

「QSAR 陽性あり」の概要は図 3 の通りであり、「Ames 試験陽性 (equivocal を含む)」は、15 香料存在するが、少なくとも 1 件でも Ames 試験陽性の報告が含まれているものをカウントした。全ての試験報告で陽性であったのは 7 香料であり、全て小野らの論文で陽性 (equivocal を含む) の報告があった物質に該当する。更にこの 7 香料のうち 6 香料は 4 種類すべての QSAR 予測で陽性であった。同様に、「QSAR 陽性なし」の概要は図 4 の通りであり、「Ames 試験陽性 (equivocal を含む)」は、27 香料存在するが、少なくとも 1 件でも Ames 試験陽性の報告が含まれているものをカウントした。全ての試験報告で陽性であったのは 9 香料であり、8 香料が CompTox の収集結果でのみ陽性と定義された。

D. 考察

香料のスクリーニング評価は使用量の多く、遺伝毒性などの有害性の懸念が高い物質から実施していくことが妥当である。使用量の多い 200 香料について、QSAR で評価した所、9 割弱の香料の構造において、2 つの相補的な統計ベース・ルールベースの QSAR モデルで陰性予測であり、8 割の香料の構造が 4 種類の QSAR モデルで陰性となった。一方で、国内外の遺伝毒性情報源から実試験データを収集したところ、三分の二の香料で情報が得られた。しかしながら、Ames/QSAR 予測結果との比較や、陽性陰性の混在状況を加味すると信頼性の担保に課題がある。特に、今回は CompTox の情報を安全サイドの基準で収集したが、判定基準の精査と、試験情報の収集と確認・精査が必要であると考えられる。課題はあるものの、今回用いた 4 モデルの予測が全て陰性で、Ames 試験情報が全ての情報源で陽性になった物質 (偽陽性物質) とその類似の構造を有する物質は、情報精査を行うことで、今後優先して評価

が必要であると提言でき、スクリーニング方法の原案につながる。

E. 結論

200 香料について Ames/QSAR 評価と既存毒性情報収集を行った。前年度までよりも広範囲の調査により、QSAR 陰性で既存情報が Ames 試験陽性の香料に対しては留意が必要であり、今後優先して評価する際の判断基準につながる知見が得られた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

該当なし

G-2. 学会発表

1. 古濱彩子、本間正充、杉山圭一: 「効率的な香料の遺伝毒性評価スキーム構築のための *in silico* 手法の活用に関する研究」 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2023 年 7 月 5 日福岡) ポスター発表
2. Furuhama A, Kameyama A, Honma M, Sugiyama K: 「*In silico* mutagenicity assessments of furan compounds related to flavor」 The SOT 64th Annual Meeting and ToxExpo (2025 年 3 月 17 日米国オランダ) ポスター発表

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

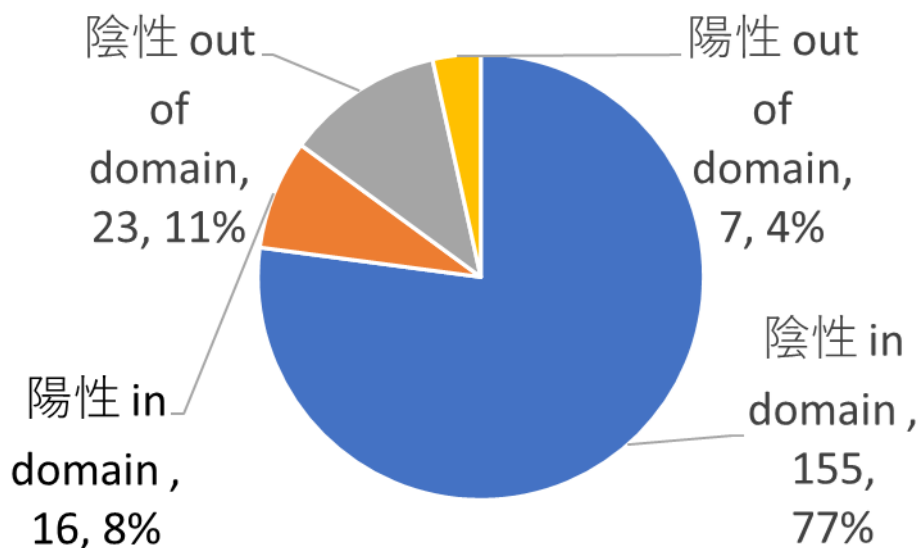


図 1. TIMES v.05.05 (kinetic model)での予測結果の概要

TIMES では陽性と陰性の判断と共にトータルドメインが予測結果とともに提示される。本文に示した通り、QSAR 不能の 1 物質並びに 1 物質に 2 構造が存在する 2 物質を加味し、199 香料の 201 構造を評価対象とした。

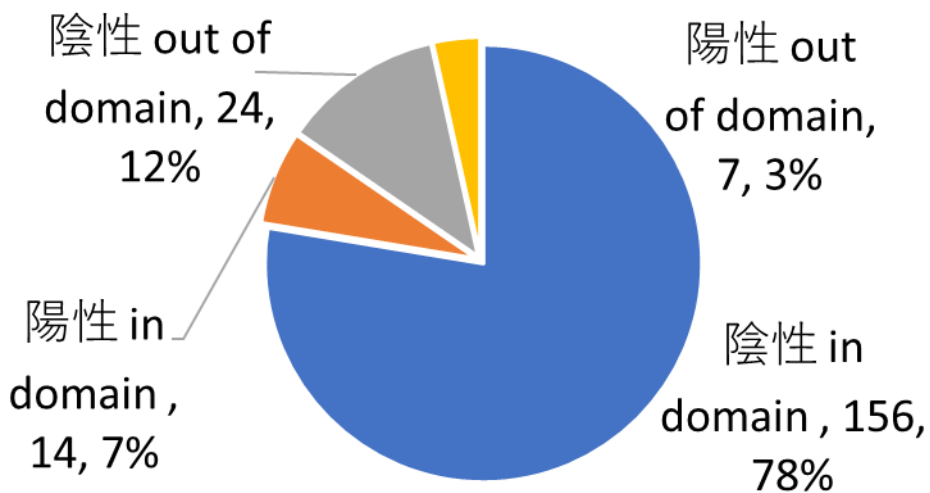


図 2. TIMES v.20.20 (no-kinetic model)での予測結果の概要

図 1 における注釈を参照のこと

表 1. 4 種類の QSAR モデルによる使用量番号 200 までの香料の予測結果の概要

別添 4

概要	化学構造数 [割合 (%)] ^{†2}
4モデル共に陰性 ^{†1}	161 [80.1]
TIMES v.05.05のみ陽性 ^{†1}	9 [4.5]
TIMES v.20.20のみ陽性 ^{†1}	4 [2]
TIMES 2モデルのみ陽性 ^{†1}	2 [1]
全てのモデルで陽性	8 [4]
統計ベースのみ陽性	5 [2.5]
統計ベースのみ陰性	3 [1.5]
Derek Nexusのみ陽性	2 [1]
DerekとTIMES v.05.05のみ陰性	2 [1]
TIMES v.05.05のみ陰性	2 [1]
TIMES v.20.20のみ陰性	1 [0.5]
統計ベースOut of Domain・他は陰性	1 [0.5]
TIMES 2モデルのみ陰性	1 [0.5]

^{†1} Derek Nexus と CASE Ultra の両方で陰性の物質、176 [87.6%] が該当した。

^{†2} 200 香料(使用量番号 200 までの香料)のうち、1 香料(Buter ester)が QSAR に必要な構造が得られず、評価対象外とし、2 香料については 2 種類の構造が対象となった。200-1 (対象外) + 2 (2 香料の構造追加) = 201 構造が QSAR 評価対象となる。

表 2. 遺伝毒性試験収集結果の概要 (使用量番号 200 までの 200 香料を対象) *

収集結果	香料数 [割合(%)]
Ames試験陽性 (equivocalを含む)	42 [21]
Ames試験陰性だが、他の <i>in vitro</i> 遺伝毒性試験で陽性	17 [8.5]
Ames試験陰性だが、他の <i>in vitro</i> 遺伝毒性試験と <i>in vivo</i> 遺伝毒性試験で陽性	5 [2.5]
Ames試験陰性だが。他の <i>in vitro</i> 遺伝毒性試験陽性ではあるが <i>in vivo</i> 遺伝毒性試験陰性	1 [0.5]
Ames試験情報なし、 <i>in vitro</i> 遺伝毒性試験陽性	3 [1.5]
陰性情報のみ	64 [32]
遺伝毒性情報なし	68 [34]

* 「Ames 試験陽性 (equivocal を含む) 」は、少なくとも 1 件でも Ames 試験陽性の報告が含まれているものをカウント。全ての Ames 試験報告で陽性の報告であったのは 16 香料。

QSAR陽性ありの40香料の内訳

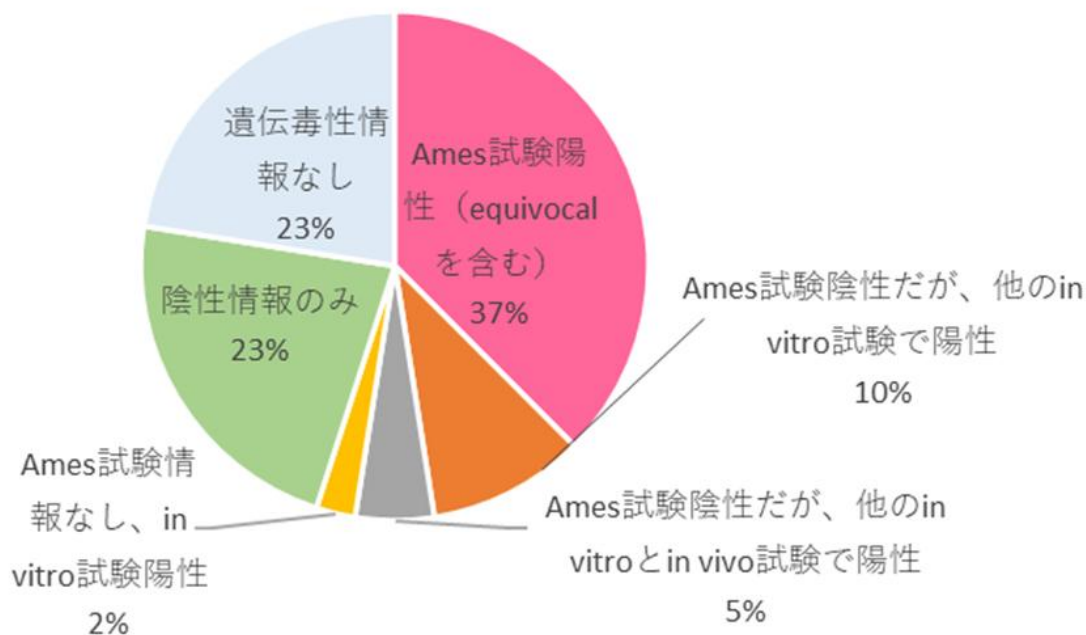
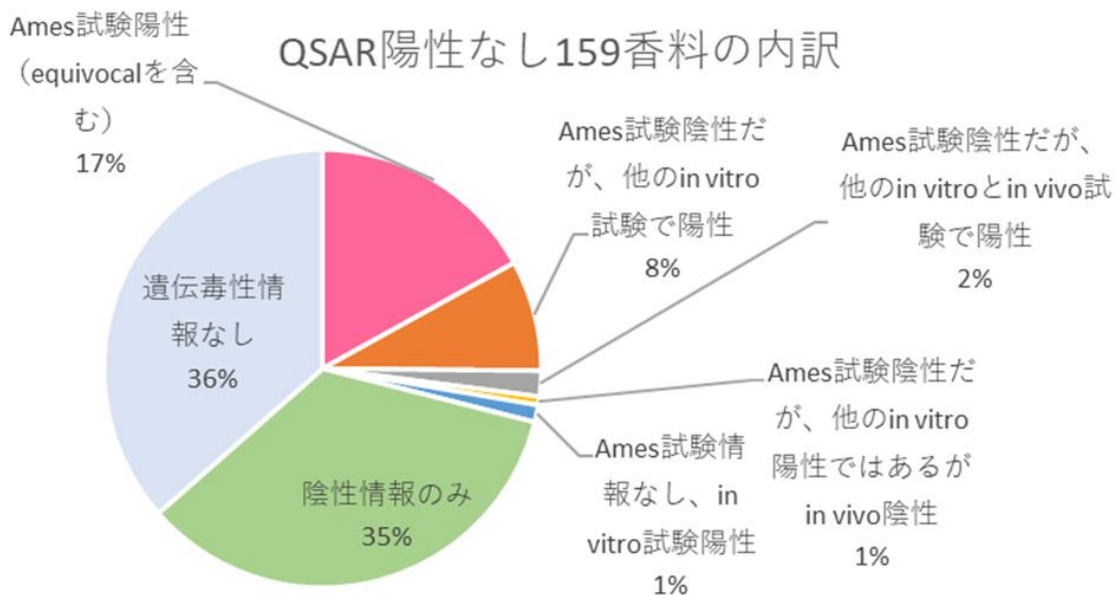


図 3. 「QSAR 陽性あり」の毒性試験情報

今回評価対象とした 4 種類の Ames 変異原性予測 QSAR で 1 つ以上陽性または、統計ベースで Out of Domain の評価になった 40 香料を対象とした。「Ames 試験陽性 (equivocal を含む)」は、15 香料存在するが、少なくとも 1 件でも Ames 試験陽性の報告が含まれているものをカウント。全ての試験報告で陽性であったのは 7 香料。



別添 4

図 4. 「QSAR 陽性なし」の毒性試験情報

今回評価対象とした 4 種類の Ames 変異原性予測 QSAR で全てのモデルの予測結果が陰性と定義された 159 香料を対象とした。

「Ames 試験陽性 (equivocal を含む)」は、27 香料存在するが、少なくとも 1 件でも Ames 試験陽性の報告が含まれているものをカウント。全ての試験報告で陽性であったのは 9 香料。

令和 6 年度 食品衛生基準科学研究費（食品安全科学研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：香料を含む食品添加物の遺伝毒性評価スキームの構築に関する基盤研究

分担研究課題名：グルタチオン補充による第Ⅱ相薬物代謝を評価に入れた*in vitro*遺伝
毒性試験の構築

研究分担者： 安井 学 国立医薬品食品衛生研究所 ゲノム安全科学部 室長

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 ゲノム安全科学部 部長

研究要旨

グルタチオン（GSH）は、生体の細胞中に高濃度（1～10 mM）で存在し、遺伝毒性物質の解毒機序に深く関与している。しかし、GSH による解毒機序は遺伝毒性物質毎にスクリーニングされておらず、遺伝毒性評価に考慮されていない。ヒトリンパ芽球細胞 TK6 株を用いる *in vitro* チミジンキナーゼ遺伝子突然変異試験（TK6 試験）における、ラット肝 S9mix を含む被験物質処理液中の GSH 濃度を測定したところ 2 μ M（TK6 細胞内は 5 μ M（1000 pmol/10⁶ cells））であった。本 *in vitro* 試験条件は生体内ではあり得ない低い GSH 濃度であり、この変則的な条件が *in vivo* と *in vitro* 間の遺伝毒性試験結果の予測精度低下の原因の一つと考えられた。前研究班において、Ames 試験陽性だが *in vivo* 遺伝子変異試験陰性の 4-メチル-2-ペンテナール（4MP）に対して GSH 補充型 TK6 試験（GSH-TK6 試験）を実施した結果、4MP は TK6 試験で弱い陽性だったが、1 mM 補充した GSH-TK6 試験では陰性となった。

本研究では、GSH と同じチオール基を有するジチオトレイトール（DTT）を添加した TK6 試験を実施し、4MP の解毒機序を考察した。また、GSH-TK6 試験のコントロール物質としてシクロホスファミドの基礎データを取得した。その結果、シクロホスファミドは GSH-TK6 試験の対照物質として利用可能であること、そして、DDT 非添加群の 4MP による変異体頻度は明確に上昇したが、添加群のそれはそうではなかった（陰性判定）。つまり、グルタチオン S-トランスフェラーゼは、GSH 自体の求核性よりも高いチオラートイオン（GS⁻）を生成するため、その関与が濃厚であるが、DTT の抗酸化作用だけでも 4MP の遺伝毒性を抑制できることが明らかとなった。以上のように、*in vitro* 遺伝毒性試験で GSH 解毒機序を理解することは、遺伝毒性評価の精緻化やフォローアップに有用であることが示唆された。

キーワード：TK6 細胞、チミジンキナーゼ遺伝子突然変異試験、グルタチオン

A. 研究目的

Ames 試験陽性の結果は、医薬品等の開発に

別添 4

大きな影響を与え、適切なフォローアップが必要となるが、*in vivo* トランスジェニック動物を用いる試験 (TG 試験) は負担が大きいと考えられる。少なくともその陽性反応がバクテリア特異的反応である場合、ヒトへの外挿性が低いことを証明し、無駄な *in vivo* 試験を避けることができる可能性がある。一方、Ames 試験と発がん性の特異性 (Specificity; Ames 試験陰性で発がん性陰性) は 80% 程度で有り (Kirkland *et al.*, *Mutat Res* 584, 1-256 (2005))、これは Ames 試験陽性で発がん性陰性であるものは比較的少ないことを示している。それでも、バクテリア特異的な陽性反応が存在し、ヒトの発がんとは無関係なものは除外すべきである。典型的なバクテリア特異的な陽性反応の例としては、AMP397 で報告されるようなバクテリア特異的ニトロリダクターゼ反応がある (Suter *et al.*, *Mutat Res* 518, 181-194 (2002))。この酵素が Ames 試験の変異原性に強く関与する場合、他の遺伝毒性試験では陰性を示すことが多く、発がん性のリスクは低い。また、Ames 試験は復帰型の突然変異検出系であるため、特定の DNA 配列以外に変化させるような塩基変異や大きな欠失を検出することができない問題がある。

本間らは、Ames/QSAR 予測で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 Ames 試験を行ったところ、9 化合物で陽性を示し、Ames/QSAR による変異原性香料物質の陽性予測率は 90 % (9/10) であることを報告した (Honma *et al.*, *Genes and Environ.* 42:32 (2020))。この結果は、香料の変異原性評価に QSAR 予測が十分に利用できることを示した。一方、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。

前研究班 (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 21KA1001) において、

Ames/QSAR 予測で陽性、および Ames 実試験で陽性 (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 試験では非代謝活性化条件下では陰性、代謝活性化条件下において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膵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している。つまり、4MP は Ames 菌株では強い陽性反応を示すが、代謝が十分に働く個体動物を用いる *in vivo* TG 試験では陰性になったと推測できる。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したのではないかと予想した。そこで前研究班では、ラット肝 S9 中に含有するグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) を機能させるためにグルタチオン (GSH) を補充する TK6 試験 (GSH-TK6 試験) を構築することから始め、4MP を試験した。その結果、代謝活性化条件下における 4MP の弱い陽性反応は、GSH 補充によって突然変異体頻度が抑制され、統計的に有意に陰性になることが分かった。

本研究では、TK6 試験で使用される被験物質処理液中、および TK6 細胞内の GST 活性を測定すること、GSH-TK6 試験のコントロール物質 (シクロホスファミド) の基礎データを得ること、並びに、GSH 補充による GST の抱合作用と GSH 自体の抗酸化作用のどちらが寄与率が高いのか、GSH と類似構造を持つジチオトレイトル (DTT) を試験に用いて考察した。

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（サーモフィッシャー）、200 µg/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 µg/mL ストレプトマイシン（ナカライテスク㈱）を含む RPMI 培地（ナカライテスク㈱）で培養された。培養は、37 度、5% CO₂ 濃度存在下で行った。

2. GST 活性の測定

TK6 試験で使用する被験物質処理液中、TK6 細胞内の GST 活性を SensoLyte GST activity assay (AnaSpec, Inc.) 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、TECAN INFINITE F PLEX（テカンジャパン株式会社）を使用した。

3. *In vitro* 小核試験

原則として OECD ガイドライン TG487 に従って実施した。被験物質の処理時間は 3 時間、回復時間は約 22 時間として小核標本作製した。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 および DTT は富士フィルム和光純薬工業から購入した。本研究では、4MP によって誘発される小核形成（DNA 損傷性）に対して、GSH がその DNA 損傷性を 50% 程度抑制できる補充量を求め、それと同等の DTT 添加量を探索した。

4. 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 および DTT は富士フィルム和光純薬工業から購入した。GSH、および DTT の最終濃度は、それぞれ 1 mM、および 400 µM になるように処理液中に添加した。代謝活性化条件下のコントロール物質は、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-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 の変異体頻度 (Mutant frequency; MF) の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 (有意水準 $p < 0.05$) を用いた。

C. 研究結果、および考察

1. TK6 細胞および S9 存在下処理液中の GST 活性

ラット肝 S9 mix を含む TK6 試験の被験物質処理液中の GST 活性を測定した結果、検出限界以下であった。また、TK6 細胞 (10⁷ cells) のペレットを取得して測定した結果も検出限界以下であった。次に、100 µM GSH を添加して GST 活性を測定すると、被験物質処理液中および TK6 細胞内はそれぞれ 35.6 mU/µg proteins、および 2.79 mU/10⁷ cells であった。すなわち、GSH を補充しない TK6 試験の実験条件では、GST 活性が機能していないことが明らかとなった。このような生体内ではあり得ない、*in vitro* 特異的条件があることから、*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た。

2. コントロール物質 CP の MF データ取得

CP は、GSH が関与する解毒作用で代謝されることが知られており、本研究の GSH-TK6 試験でも、GSH 補充群において CP の MF が抑制されると考えられる。CP をコントロール物質として利用可能か検討するために、5 µg/mL CP

別添 4

に対して 4 mM GSH を補充する TK6 試験を行い、背景データを取得した (n=4)。その結果、相対細胞生存率 (Relative survival; RS) の平均値は、GSH 非補充群が $63.3 \pm 15.7\%$ 、GSH 補充群が $88.4 \pm 31.0\%$ だった。少しデータがばらつくことがあったが、各実験の RS 値は GSH 補充群の方が常に高く、細胞毒性を抑制していることが観察できた。また、MF の平均値は、GSH 非補充群が $20.6 \pm 5.6 \times 10^{-6}$ 、GSH 補充群が $8.6 \pm 2.5 \times 10^{-6}$ だった。各実験の MF は GSH 非補充群よりも、補充群の方が常に半分以上抑制されており、CP が GSH 補充によって解毒されていることが確認できた。よって、CP は GSH-TK6 試験のコントロール物質として利用可能であることが分かった。

3. DTT 添加量の設定

4MP が、TK6 細胞に対して約 60% (RPD) 程度の毒性を示す用量が 150 μM であり、この用量を固定して、GSH 補充量と DTT 添加量をそれぞれ変化させた小核試験を実施した (Fig. 2)。その結果、Fig. 2(A)のとおり、GSH 非補充の小核形成は 1000 細胞中 22 個であるが、1 mM GSH 補充することで 11 個に減少させた (50%程度の抑制)。これと同じ抑制効果を持つ DTT 添加量を調べると、Fig. 2(B)に示した通り、400 μM (1000 細胞中 23 個から、400 μM DTT 添加時に 12 個に抑制) であることが分かった。よって、DTT 添加させる TK6 試験では、DTT 濃度を 400 μM で実施することにした。なお、Fig. 2(B)下図のとおり、DTT 自体は、1 mM 以上で細胞毒性を示すことが分かった (GSH は 8 mM であっても細胞毒性を示さないことを確認済みである)。

4. GSH 補充の TK6 試験

前研究班 (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 21KA1001) で、4MP を

用いて、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) の TK6 試験、および GSH 補充 (+GSH) する GSH-TK6 試験を実施した (Supplementary Fig. 1)。−GSH 群は、通常の TK6 試験と同一であり、用量の 300 μM 処理群の MF 値は、約 30×10^{-6} まで上昇し、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ている。一方、1 mM GSH 補充群の MF は、最高用量 300 μM 処理であっても低い値 (5.6×10^{-6}) を示した (Supplementary Fig. 1)。すなわち、4MP は、−GSH 群では陽性だが、わずか 1 mM GSH 補充 (+GSH 群) するだけで陰性 (突然変異体誘発性の不活化) になることが分かった。

5. DTT 添加の TK6 試験

1 mM GSH が小核形成を抑制できる作用と同等と考えられる DTT の添加量は、Fig. 2(B)に示した通り 400 μM であることから、400 μM DTT を添加する条件下で 4MP に対する TK6 試験を行った。その結果、DTT 非添加群 (−DTT) の RS 値は 300 μM 4MP の用量で 20%程度の細胞毒性を示したが、DTT 添加群 (+DTT) のそれは 60%程度に抑制された (Fig. 3(A))。また、それぞれの MF 値を比較すると、−DTT は 25×10^{-6} に上昇し、未処理群のそれよりも統計的有意差が認められた (陽性判定)。一方、+DTT の MF 値は、未処理群のそれと比較し、ほぼ同じレベルであり、統計処理の結果、陰性判定となった (Fig. 3(B))。再現性を確認するために、同じ実験条件で確認試験を実施した結果、同様の試験結果が得られた (Fig. 4)。

これらの結果から、DTT の抗酸化作用によっ

別添 4

て 4MP の遺伝毒性が不活化されたことから、GSH においても同様の機序で 4MP の遺伝毒性が不活化されたと予想される。Fig. 5 に示したとおり、4MP は α, β -不飽和アルデヒドであり、カルボニル基 (C=O) と共役した二重結合を持っている。GSH のチオール基が、4MP の β -炭素に付加するマイケル付加反応が主要な反応経路として予想され、3-(グルタチオン-S-イル)-4-メチルペンタナールの生成物が得られることで、4MP の弱い遺伝毒性が不活化されたと考えられる。

DTT は、GST の補因子として利用され無いため、GST 活性は無い条件下であるが、それでも DTT は 4MP の遺伝毒性を不活化させた。このことから、4MP の弱い陽性反応は、GST が関与しなくても GSH 自体の抗酸化作用で抑制できたと推論できる。しかし、様々なタンパク質が混在する S9mix 中で、GSH は 4MP の β -炭素に付加して抗酸化作用を効率的に発揮できるだろうか。Armstrong らによると、GSH の抗酸化作用は生理的条件下での効率は限定的であり、GST は GSH のチオール基を脱プロトン化し、求核性の高いチオラートイオン (GS^-) を生成することで、よりマイケル付加反応を非常に効率良く進めることができると報告している (Armstrong RN. *Chem Res Toxicol.* 10:2-18 (1997).)。つまり、GSH 補充による GST の抱合作用と GSH 自体の抗酸化作用のどちらが寄与しているかは、おそらく両方が機能しており (Zheng R et al, *Toxicol Appl Pharmacol.* 279, 43-52 (2014))、その寄与率は GST による抱合作用のほうが大きいと考えられる (Hubatsch et al, *Biochem J.* 330 (Pt 1), 175-179 (1998))。

6. フォローアップ試験としての GSH-TK6 試験の有用性

GST は電子吸引力をもつ薬物を補因子 GSH と反応させ GSH 抱合体を形成する。一般に抱

合反応は極性基を持つ薬物や酸化、加水分解により生成した極性代謝物が受けるが、GST は脂溶性ニトロ化合物、ハロゲン化アルキルやアリール、 α, β -不飽和カルボニル化合物、エポキシドのような非極性化合物も直接抱合できる (宮本徹, *J. Agric. Sci. Tokyo Univ. Agric.* 57, 247-260 (2013))。GSH-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。本系の最も優れた点は、単にヒト TK6 細胞を用いる突然変異試験で陰性になっただけでなく、その作用機序として、GSH が関与して 4MP が陰性となったこと (4MP は GST の基質となった) が明確であることである。予備実験の結果、他の物質を GSH-TK6 試験で調べると、遺伝毒性を抑制できない事例があり、基質特異性が低いと言われる GST でも、基質にならずに遺伝毒性を示す化学物質が存在することが分かっている。つまり、GSH-TK6 試験によってスクリーニングする重要性があると考えられる。

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-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、

別添 4

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と考えられている。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が、おそらく本研究のように、GSH 欠乏が起きない程度の微量の 4MP 用量であれば GSH-TK6 試験で検出し、陰性と判定できるのかもしれない。GSH 欠乏を誘発するような投与量では、本 GSH-TK6 試験の有用性は限定的であると言える。よって、GST-TK6 試験は、GSH 欠乏が起きない低濃度曝露条件下で使用される化学物質 (香料化学物質等) のフォローアップ試験に有効と考えられる。

D. 結 論

本研究は、TK6 試験で使用される被験物質処理液中、および TK6 細胞内の GST 活性を測定し、GSH を補充しない TK6 試験の実験条件では、GST 活性が無いことが明らかにした。

また、GSH-TK6 試験のコントロール物質として、シクロホスファミドが利用可能であることを明らかにした。並びに、GSH と同じチオール基を有する DTT を添加した TK6 試験を実施し、GSH が関与する 4MP の解毒機序とともに遺伝毒性が陰性となることを考察した。以上、*in vitro* 系で GSH 解毒機序を理解することは、遺伝毒性評価の精緻化やフォローアップに有用であることが示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada H, Odagiri M, Yamakita K, Chiba A, Ukai A, Yasui M, Honma M, Sugiyama KI, Ura K, Sassa A. Dual-directional epi-genotoxicity assay for assessing chemically induced epigenetic effects utilizing the housekeeping TK gene. *Sci Rep.* 2025 Mar 5;15(1):7780. doi: 10.1038/s41598-025-92121-6.

2. 学会発表

- 1) 安井学、鵜飼明子、本間正充、杉山圭一 TK6 細胞を用いたグルタチオン補充型 *in vitro* 遺伝子突然変異試験によるフォローアップの試み. 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会、岡山市(2024.12.7)
- 2) 山田治人、山北啓吾、小田切瑞基、安井学、本間正充、杉山圭一、浦聖恵、佐々彰 化学物質に起因するエピジェネティック作用の双方向評価レポーター試験法の確立 第 47 回 日本分子生物学会年会、福岡市 (2024.11.29)

F. 知的所有権の取得状況

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 膵臓	+S9	-S9	+S9 +GSH (1 mM)	
	Plausible (Positive)	Positive	陽性 (728 rev./mg)	強い陽性 (1,340 rev./mg)		陰性	弱い陽性	陰性	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年度厚労科研費報告書から引用

*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年度厚労科研費報告書から引用

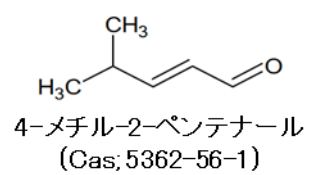


Fig.1. TK6試験に供された香料物質の化学構造

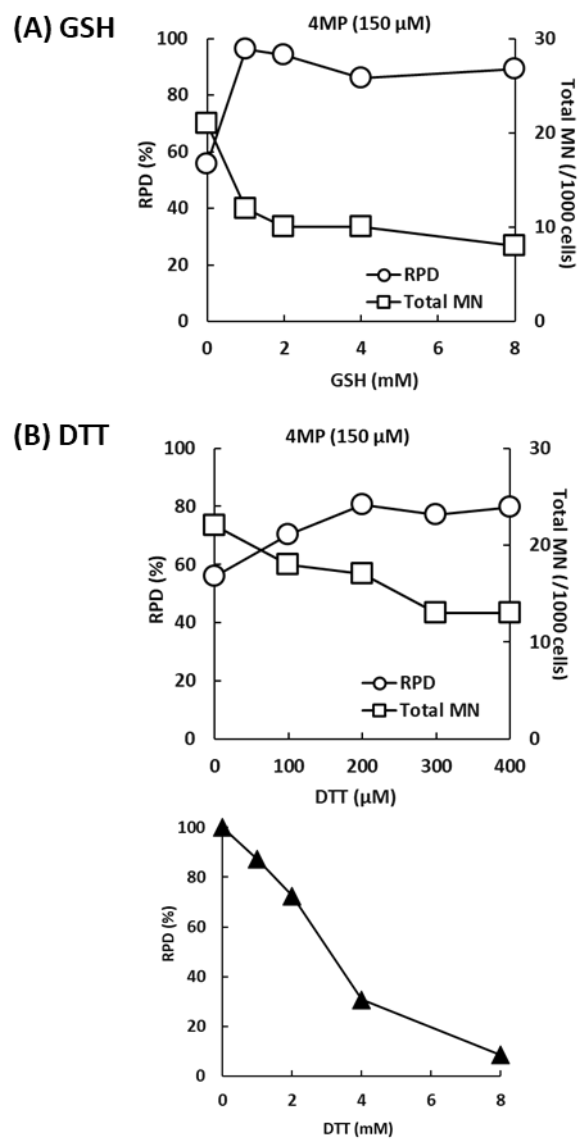


Fig. 2. 4MP (150 μ M)に対するGSH補充、あるいはDTT添加による小核形成能の抑制効果、およびDTT自体の細胞毒性

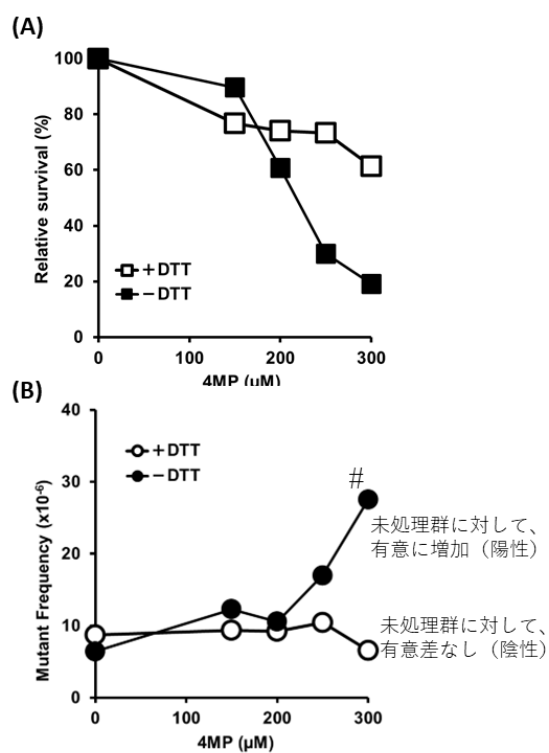


Fig. 3. S9存在下条件による4MPのTK6試験結果(400μM DTT添加)
 #, 通常は96穴プレート2枚を使用してMF値の算出をするが、300 μM処理群は強い細胞毒性を示したためプレート1枚からMF値を算出した

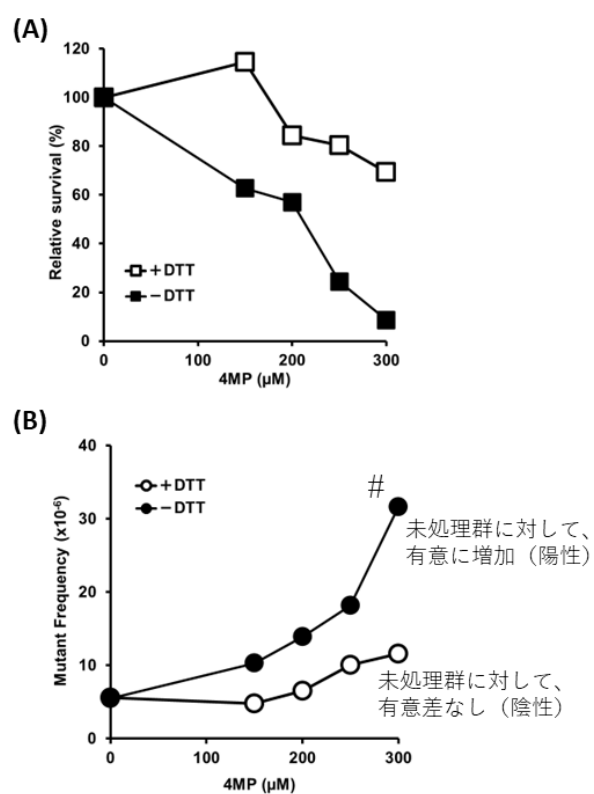


Fig. 4. 確認試験 S9存在下条件による4MPのTK6試験結果(400μM DTT添加)
 #: 通常は96穴プレート2枚を使用してMF値の算出をするが、300 μM処理群は強い細胞毒性を示したためプレート1枚からMF値を算出した

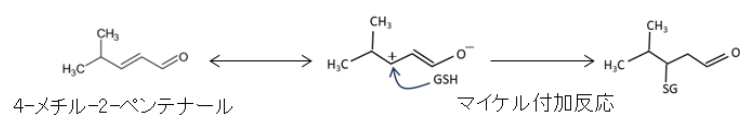


Fig. 5. 予想される4MPの解毒機序

令和6年度 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
香料を含む食品添加物の遺伝毒性評価スキームの構築に関する基盤研究

分担研究課題名：香料を含む食品添加物の遺伝毒性評価スキームの構築に関する基盤研究

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

研究要旨

化学物質のばく露から発がんに至る機序には、DNA メチル化やヒストン修飾に影響を及ぼすエピジェネティックな作用（エピ遺伝毒性）を含む、多階層的な分子変化が関与する。そこで本研究では、哺乳類細胞を用いて開発したエピ遺伝毒性試験法（エピ TK 試験）の有用性を検証し、同定されたエピ遺伝毒性物質の作用機序を解析するためのスキームの確立を目的とした。

令和 6 年度の本分担研究では、被験物質として新たに isoeugenol、methyleugenol、trichloroethylene の 3 化合物を選定し、エピ TK 試験により評価を行った。また、エピ TK 試験の評価でこれまでにエピ遺伝毒性が陽性となった 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) について、クロマチン免疫沈降法およびウエスタンブロッティングによって、TPA 処理細胞におけるヒストンアセチル化修飾への影響を解析した。詳細については以下の通りである。

被験物質として用いた上記 3 化合物は、エピジェネティックな作用が疑われる、あるいはエピ遺伝毒性に関する知見が不十分な化合物である。それぞれについて、S9 mix による代謝活性化の有無の条件でエピ TK 試験を実施し、エピジェネティックな作用を評価した。その結果、3 化合物いずれにおいても、S9 mix の添加の有無にかかわらず TK 復帰頻度に有意な変化は認められなかった。なお、S9 mix を添加した各群では、S9 mix 非添加群と比較して TK 復帰頻度が低下する傾向がみられた。このことは、S9 mix による代謝が細胞内のエピジェネティックな動態に僅かながら影響を与えた可能性を示唆している。これらの知見は、今後のエピ遺伝毒性評価における基礎データとして有用と考えられる。

エピ遺伝毒性陽性物質の TPA については、mTK6 細胞に 24 時間処理後、3 日間の回復培養を経た後に H3K27Ac 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法を実施した。その結果、TPA 処理群では、TK 遺伝子座における H3K27Ac レベルが溶媒対照群と比較して有意に低下していた。この結果から、TPA のエピ遺伝毒性は、ヒストン修飾に影響を与える機序を介していることが示唆された。

I. 研究目的

香料等の食品添加物について、遺伝毒性に加えエピジェネティックな作用が発がんに寄与する可能性が示唆されており、今後の安全性評価において新たな観点からの解析が求められている。特に、DNAメチル化

やヒストン修飾など、ゲノム構造や遺伝子発現に影響を及ぼす変化が、発がんの初期過程に関与することが明らかとなりつつある。そこで本研究では、香料等の食品添加物が有するエピジェネティックな変化を、哺乳類細胞を用いた新規*in vitro*試験法（エピ

TK試験)により評価する。また、エピジェネティックな陽性応答を示した化合物については、クロマチン免疫沈降法などを用いた機序解明も併せて行い、試験法の実用性と信頼性を高めるとともに、エピジェネティックな作用に基づく発がん予測スキームの確立を目指す。

J. 研究方法

B-1. ヒト細胞株を用いたエピ遺伝毒性試験の実施

B-1-1. 細胞培養

解析に用いるヒトリンパ芽球細胞株mTK6は、TK6株にCRISPR/dCas9-DNMT3A DNAメチル化システムを一過的に導入して、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。mTK6は、10% FETAL BOVINE SERUM (CCB), 200 $\mu\text{g/mL}$ ビルビン酸ナトリウム (ナカライテスク)、100 U/mL ペニシリン、100 $\mu\text{g/mL}$ ストレプトマイシン (ナカライテスク)、3 $\mu\text{g/mL}$ 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-1-2. エピ遺伝毒性試験

被験物質としてisoeugenol、methyleugenolは東京化成工業 (株)、trichloroethylene、12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) は富士フイルム和光純薬 (株) よりそれぞれ購入したものを用いた。代謝活性化のためのS9 mixは家田貿易 (株) から購入した。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、S9 mix添加または非添加の条件で37°C、24時間培養して処理を行った。その後細胞を洗浄し、以下の条件でプレーティングを行った。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遺伝子座および細胞内でのヒストン修飾H3K27Acレベルの定量は、H3K27Ac抗体 (Active Motif) を用いたクロマチン免疫沈降法およびウエスタンブロッティングによって同定した。

(倫理面への配慮)

エピTK試験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。

K. 研究結果

エピ TK 試験の結果について、S9 mix 非添加条件 (S9-、図 1 左) では、各化合物処理後の TK 復帰頻度は 50 μM isoeugenol: 0.92×10^{-3} 、100 μM methyleugenol: 1.3×10^{-3} 、400 μM trichloroethylene: 1.0×10^{-3} となり、溶媒対照 DMSO: 1.3×10^{-3} と比較して差はみられなかった。また、S9 mix 添加条件 (S9+、図 1 右) では、各化合物処理後の TK 復帰頻度は 50 μM isoeugenol: 0.69×10^{-3} 、100 μM methyleugenol: 0.56×10^{-3} 、400 μM trichloroethylene: 0.34×10^{-3} となり、溶媒対照 DMSO: 0.58×10^{-3} と比較して顕著な差はみられなかった。一方で、S9 mix 非添加条件で実験を実施した場合と比べて、S9 mix 添加条件ではいずれも TK 復帰頻度が低下する傾向がみられた。

TPA は、エピ TK 試験において 24 時間曝露後に TK 復帰頻度の大幅な低下を示す化合物である。具体的なエピ遺伝毒性の機序についてヒストンアセチル化への作用を想定し、クロマチン免疫沈降およびウエスタンブロッティングによってTPA処理後の細胞におけるH3K27Acレベルを定量した。

H3K27Ac 抗体を用いたクロマチン免疫沈降の結果、TPA 処理後の細胞では溶媒対照 (EtOH) と比べて、TK 遺伝子座における H3K27Ac レベルの有意な低下が観察された (図 2A)。同様に別のハウスキーピング遺伝子である GAPDH 遺伝子座においても H3K27Ac レベルの低下がみとめられた。さらに細胞抽出液を用いたウェスタンブロッティングによる H3K27Ac レベルの定量においても、TPA 処理細胞では溶媒対照 (EtOH) と比べて H3K27Ac レベルの有意な低下が観察された (図 2B)。

L. 考察

本研究では、3つの化合物isoeugenol、methyleugenol、trichloroethyleneについて、エピTK試験を用いて評価を行った。その結果、いずれの化合物も、S9 mixの有無にかかわらずTK復帰頻度に有意な変化は観察されず、エピジェネティックな作用は認められなかった。一方で、S9 mixの添加によりTK復帰頻度が一貫して低下する傾向が見られたことから、代謝活性化に伴う軽微なエピジェネティック変化の可能性があり、今後の検討課題と考えられる。

TPA処理群では、クロマチン免疫沈降およびウェスタンブロッティングの両手法において、ヒストン修飾 (H3K27Ac) の有意な低下が確認された。この結果は、TPAが細胞内においてグローバルなヒストンアセチル化の抑制を介してエピジェネティックな変化を誘導し、TK遺伝子座においても発現調節に影響を与えたことを示唆している。

M. 結論

isoeugenol、methyleugenol、trichloroethyleneは、いずれもエピTK試験において明確なエピジェネティック変化を示さなかった。一方で、代謝活性化が細胞内のエピジェネティックな環境変化を引き起こす可能性は今後の検討課題といえる。TPAのエピジェネティック作用については、H3K27Acの低下を通じた作用機序が明確となり、エ

ピTK試験がエピジェネティックな遺伝毒性の検出に有用であることが実証された。今後は本試験法を基盤とし、さらに幅広い化学物質に対する評価および異なるエンドポイントを通じた機序解析の適用が期待される。

N. 健康危険情報

該当なし

O. 研究発表

G-1. 論文発表

- 1) Yamada H, Odagiri M, Yamakita K, Chiba A, Ukai A, Yasui M, Honma M, Sugiyama KI, Ura K, Sassa A. Dual-directional epi-genotoxicity assay for assessing chemically induced epigenetic effects utilizing the housekeeping TK gene, *Sci. Rep.*, 15, 7780, 2025
- 2) Nakano T, Akamatsu K, Kohzaki M, Tsuda M, Hirayama R, Sassa A, Yasui M, Shoulkamy MI, Hiromoto T, Tamada T, Ide H, Shikazono N. Deciphering repair pathways of clustered DNA damage in human TK6 cells: insights from atomic force microscopy direct visualization. *Nucleic Acids Res.*, 53, gkae1077, 2025
- 3) Iwasaki K, Tojo A, Kobayashi H, Shimizu K, Kamimura Y, Horikoshi Y, Fukuto A, Sun J, Yasui M, Honma M, Okabe A, Fujiki R, Nakajima NI, Kaneda A, Tashiro S, Sassa A, Ura K. Dose-dependent effects of histone methyltransferase NSD2 on site-specific double-strand break repair. *Genes Cells*, 29, 951-965, 2024

G-2. 学会発表

- 1) Uncovering distinct DNA damage responses associated with RNase H2

- deficiency and its pathogenic mutation in human TK6 cells. Nakatani K., Terakoshi N., Yamakita K., Tachikawa A., Tanaka H., Watanabe A., Takafuji K., Mayuzumi Y., Yoshimoto Y., Fukuda T., Sugawara K., Ura K., Sassa A. Gutenberg Workshop RNase H 2024. 2024 年 9 月, Rhein, Germany
- 2) *In vitro* RNA Synthesis Past Oxidative Base Damage by SARS-CoV-2 RNA-Dependent RNA Polymerase. Akagawa M., Grúz P., Sugawara K., Ura K., Sassa A. 55th Annual Meeting of The Environmental Mutagenesis and Genomics Society. 9/2024 年 9 月, CA, USA
 - 3) RNA のイノシン修飾がゲノム恒常性維持に果たす役割の解明, 吉田 昭音, 北村 蒼史, Yu-Hsien HWANG-FU, Zachary JOHNSON, 浦 聖恵, 佐々 彰, 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 2024 年 12 月, 岡山
 - 4) O6-メチルグアニン DNA メチルトランスフェラーゼが炎症応答制御に果たす役割の解明, 古西 乃々香, 北村 蒼史, 鶴飼 明子, 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 53 回大会, 2024 年 12 月, 岡山
 - 5) DNA 損傷応答と RNA 修飾の新規クロストークの同定, Sujin SONG, 吉田 昭音, 北村 蒼史, 立川 明日香, Yu-Hsien HWANG-FU, Zachary JOHNSON, 浦 聖恵, 佐々 彰, 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 2024 年 12 月, 岡山
 - 6) ATAC-seq によるクロマチン構造変化を指標とした高次ゲノム不安定性評価, 山北 啓吾, 安井 学, 本間 正充, 杉山 圭一, 藤木 亮次, 金田 篤志, 浦 聖恵, 佐々 彰, 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 2024 年 12 月, 岡山
 - 7) 酸化的 RNA 損傷を鋳型とした SARS-CoV-2 由来 RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの RNA 合成機構の解明, 赤川 真崇, Grúz Petr, 菅澤 薫, 浦 聖恵, 佐々 彰, 第 47 回日本分子生物学会年会, 2024 年 11 月, 福岡
 - 8) 化学物質に起因するエピジェネティック作用の双方向評価レポーター試験法の確立, 山田 治人, 山北 啓吾, 小田 切 瑞基, 安井 学, 本間 正充, 杉山 圭一, 浦 聖恵, 佐々 彰, 第 47 回日本分子生物学会年会, 2024 年 11 月, 福岡
 - 9) 造血幹細胞から B 細胞への分化・増殖に果たすヒストンメチル化酵素 NSD2 の機能, 八木 栄飛, 磯野 太一, 岩崎 滉, 河合 智子, 秦 健一郎, 佐々 彰, 浦 聖恵, 第 47 回日本分子生物学会年会, 2024 年 11 月, 福岡
 - 10) クロマチン構造に応じたヒストンメチル化酵素 NSD2 の活性ダイナミクス, 磯部 博登, 小池 望実, 佐々 彰, 菊地 正樹, 梅原 崇史, 堀越 直樹, 胡桃坂 仁志, 浦 聖恵, 第 47 回日本分子生物学会年会, 2024 年 11 月, 福岡
 - 11) DNA 鎖切断に起因するインターフェロン応答における核酸センサーcGAS, IFI16 の役割, 寺越 菜央, 山北 啓吾, 安井 学, 本間 正充, 杉山 圭一, 菅澤 薫, 浦 聖恵, 佐々 彰, 第 31 回日本免疫毒性学会学術年会, 2024 年 9 月, 兵庫
 - 12) DNA 修復の機能不全による DNA 鎖切断を伴わない自然免疫応答メカニズムの解明, 田中 陽菜, 山北 啓吾, 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, 第 31 回日本免疫毒性学会学術年会, 2024 年 9 月, 兵庫
- P. 知的財産権の出願・登録状況**
H-1. 特許取得
 該当なし

別添 4

H-2. 実用新案登録
該当なし

H-3.その他
該当なし

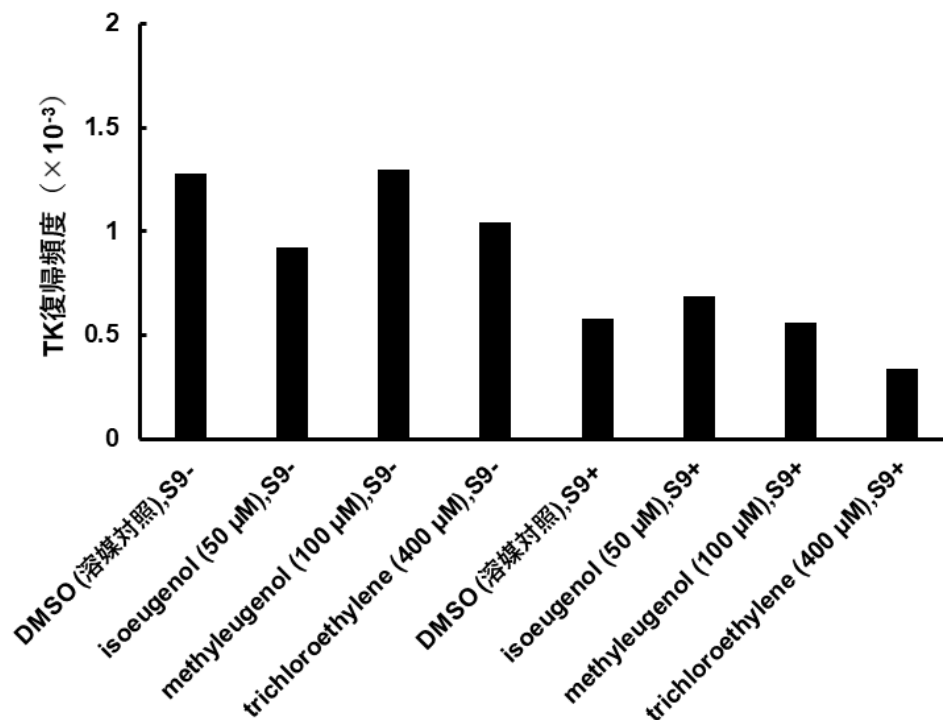


図1 エピTK試験を用いたisoeugenol, methyleugenol, trichloroethyleneにおけるエピジェネティック作用の評価

S9 mixの非添加 (S9-) および添加 (S9+) 条件下で、DMSOを溶媒対照として、mTK6株に50 μ M isoeugenol、100 μ M methyleugenol、または400 μ M trichloroethyleneを24時間処理した。

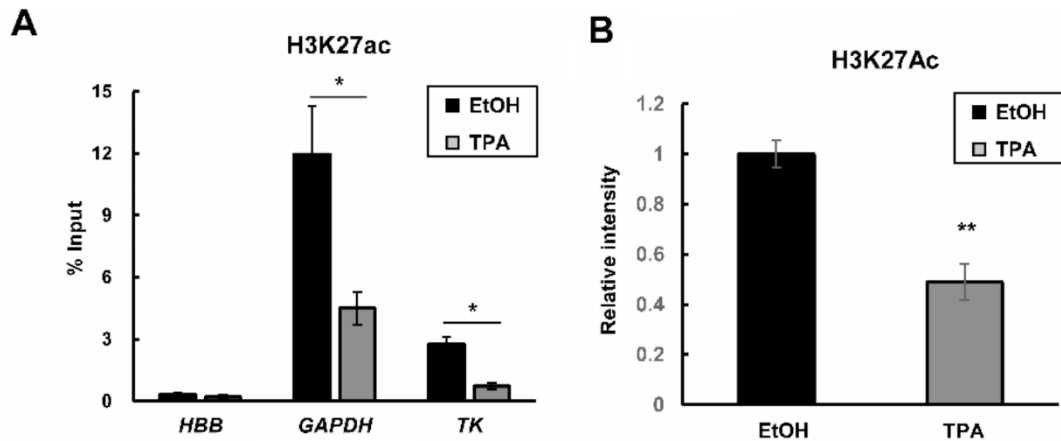


図2 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate曝露が細胞内のヒストンH3K27Ac修飾に与える影響

(A) TPA処理に応答したH3K27Acレベルの変化：H3K27Acレベルは、クロマチン免疫沈降法/qPCR解析により測定した。比較のため、HBBおよびGAPDH遺伝子を解析対象に含めた。データは3回の独立した試行の平均値 ± 標準誤差として示している。*は、評価されたサンプル間で統計的に有意な差が認められたことを示す ($P < 0.05$, Student t検定)。

(B) 細胞内H3K27Acレベルの測定：ウェスタンブロッティング解析によってTPA処理後の細胞内H3K27Acシグナルレベルを定量した。データは3回の独立した試行の平均値 ± 標準誤差として示している。*は、評価されたサンプル間で統計的に有意な差が認められたことを示す ($P < 0.01$, Student t検定)。

令和6年度 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
香料を含む食品添加物の遺伝毒性評価スキームの構築に関する基盤研究

分担研究課題名：包括的毒性試験による *in silico* 評価系の精緻化

研究分担者 石井 雄二 所属 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

本研究では、香料の遺伝毒性評価スキームにおける *in silico* 及び *in vitro* 試験の精緻化を目的とし、Ames/QSAR 及び Ames 試験で陽性となった香料 4-methoxycinnamaldehyde (MCA) について、*gpt delta* ラットを用いた一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括的毒性試験を実施した。雌雄 F344 ラットを用いた用量設定試験では、MCA を 0, 50, 150 及び 500 mg/kg/日の用量で 28 日間強制経口投与した。その結果、雄では 150 mg/kg 群から腎近位尿細管の硝子滴変性の増加が、500 mg/kg 群で体重増加抑制、肝重量増加及び血清 Cl の有意な高値が見られた。雌では 500 mg/kg 群で肝臓、副腎及び腎臓重量の増加が見られたが、毒性を示唆する血清パラメーターの変動及び病理組織学的変化は見られなかった。以上から、包括的毒性試験は雄性 *gpt delta* ラットを用い、高用量は 500 mg/kg 体重/日、中間用量、低用量は公比約 3 で除した 150 及び 50 mg/kg/日とした。また、遺伝毒性評価の対象臓器は肝臓及び腎臓に設定した。本試験では雄性 *gpt delta* ラットに MCA を 0, 50, 150 及び 500 mg/kg/日の用量で 13 週間強制経口投与した。その結果、500 mg/kg 群で有意な体重増加抑制と臓器重量の変化が認められた。今後、全身諸臓器の病理組織学的検索を実施し、これらの毒性学的意義について考察する。

Q. 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」の中の一つ 3-acetyl-2,5-dimethylthiophene は、*in vivo* においても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。

令和 3 年度厚生労働科学研究「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 (21KA1001)」では、*in silico*, *in vitro* 及び *in vivo* 試験からなる香料の毒性評価スキームにおける *in vivo* 試験の一つとして、我々は *gpt delta* ラットを用いた遺伝毒性・発がん性中期包括試験を提案し、その有用性を確認した。本法を用いて Ames/QSAR 及び Ames 試験で陽性となった香料を評価した結果、3-acetyl-2,5-dimethylfuran は、ラット肝臓において変異原性を示し、肝発がん性を有する可能性が示された³⁾。一方、6-methoxyquinoline はラット肝臓における変異原性及び発がん性は陰性となり、*in silico* 及び *in vitro* 試験とは相反する結果を示した。Ames 試験では S9 による代謝酵素の制限による偽陰性や、バクテリア特異的代謝による偽陽性が生じる

ことが知られており、Ames/QSAR モデルはこれらの特徴を引き継いでいる。それ故、*in silico* 及び *in vitro* 試験による香料を含む食品添加物の遺伝毒性評価を実現するには、これらの評価結果の精緻化が必要である。そこで本研究では、これまでに Ames/QSAR 及び Ames 試験で陽性となった香料について、*gpt delta* ラットを用いた一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験による評価を実施し、遺伝毒性結果の真偽を明らかにし、結果に相違があった場合にはその原因と同様の骨格を有する香料の遺伝毒性を考察し、*in silico* 評価へフィードバックする。

評価対象とした 4-methoxycinnamaldehyde (MCA; Fig. 1) は、我が国では 17 類（芳香族アルデヒド類）に分類される食品香料で、2020 年の国内使用量は 0.76 kg と報告されている⁴⁾。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 (FEMA No. 3567)、飲料、菓子等に使用されている。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 (JECFA No. 687)、Class II (香料として現在の摂取量で使用される限り、安全性に懸念はない) とされている。一方、本間らが実施した Ames QSAR (Derek Nexus 及び CASE Ultra) では陽性を示し、その後実施された Ames 試験 (TA100 株、+S9) において陽性と判定されている⁴⁾。本年度は MCA について F344 ラットを用いた用量設定試験を実施し、本試験における投与量を設定した。さらに、本試験として雄性 6 週齢の F344 系 *gpt delta* ラットに MCA を 13 週間強制経口投与し、一般毒性評価を開始した。

R. 研究方法

B-1. 材料及び試薬

MCA (CAS No. 24680-50-0, >97.0%)

は東京化成工業株式会社 (東京) から購入した。

B-2. 用量設定試験

動物は 6 週齢の雌雄 F344 ラット各 20 匹を日本エスエルシー株式会社より購入し、CR F-1 粉末基礎飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社) と調製水で飼育した。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 時間消灯であり、この条件下で飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 または 3 匹ずつ収納し、床敷は三共ラボサービス社 (東京) のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、飼料及び調製水は試験期間中、自由に摂取させた。ラット 20 匹を各群 5 匹に配し、対照群と低、中間及び高用量群の計 4 群を設けた。高用量群では、500 mg/kg 体重、中間用量および低用量群では公比約 3 で除した 150 および 50 mg/kg 体重の用量でコーン油に溶解した MCA を 28 日間強制経口投与した。対照群にはコーン油を投与した。試験期間中、飲水及び飼料の交換は週 1 回、一般状態観察を連日実施し、体重および摂餌量測定は週 1 回実施した。投与開始から 29 日目にイソフルラン麻酔下にて腹部大動脈より採血し、血液学検査および血清生化学的検査に供した。また、脳、胸腺、心臓、脾臓、肝臓、副腎及び腎臓を採取し、重量測定後、10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定し、常法に従いパラフィン切片を作製後、ヘマトキシリンエオジン染色を施した。

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 (CRE) , ナトリウム (Na) , 塩素 (Cl) , カリウム (K) , カルシウム (Ca) , 無機リン (IP) , アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST) , アラニントランスアミナーゼ (ALT) , アルカリフォスタファアーゼ (ALP) , γ -グルタミルトランスペプチターゼ (γ -GTP) について、オリエンタル酵母株式会社 (東京) にて測定した。

B-3. MCAの一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括的試験 (本試験)

5週齢の雄性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、透明なポリカーボネート製箱型ケージに2または3匹ずつ収容した。飼育条件はB-2に同じ。ラットは各群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。用量設定試験の結果に基づいて、高用量を500 mg/kg体重/日、中間用量および低用量群は公比約3で除した150および50 mg/kg体重/日とし、13週間強制経口投与した。対照群にはコーン油を投与した。試験期間中、飲水及び飼料の交換は週1回、一般状態観察を連日実施し、体重及び摂餌量測定は週1回実施した。剖検の16時間前より絶食させ、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈から採血後、屠殺・剖検した。

血液学的検査及び血清生化学検査はB-2に同じ。

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と左腎の一部は、*in vivo*変異原性試験 (*gpt* assay及び*Spi*-assay) に供するため液体窒素により急速凍結して-80°Cで保存した。

(倫理面への配慮)

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

S. 研究結果

C-1. 用量設定試験

試験期間中の一般状態観察において、投与による影響は認められなかった。体重と摂餌量の推移を Figure 2 に示す。500 mg/kg 群の雄で投与 2 週目以降、体重増加抑制が見られたが、摂餌量に変化は見られなかった。

最終体重および主要臓器の重量を Table 1 に示す。最終体重において、雄の 500 mg/kg 群では統計学的有意差はないものの、対照群に比べ約 10%の低値を示した。500 mg/kg 群の雄では肝実重量の高値及び相対重量の有意な高値がみられ、雌では肝臓、副腎及び腎臓の実重量及び相対重量の有意な高値が見られた。その他の臓器で見られた重量の変化は体重の変化によるものと考えられた。血液学的検査の結果を Table 2 に示す。500 mg/kg 群の雄では MCV の有意な低値、MCHC の有意な高値が、雌では、MCH 及び MCHC の有意な高値、Eosi の有意な低値が見られたが、いずれも軽微な

変化であった。血清生化学検査の結果を Table 3 に示す。500 mg/kg 群の雄では Cl の有意な高値が見られた。その他、投与群において TP, ALB, T-CHO, ALP, GLU, AST 及び ALT の有意な変化が見られたが、これらは軽微、用量相関性を伴わない又は毒性を示唆する変化とは逆の変化であった。主要臓器の病理組織学的検索の結果を Table 4 に示す。150 mg/kg 以上の群の雄では、腎臓の近位尿細管に硝子滴変性の増加が認められ (Fig. 3), 硝子滴は抗 $\alpha 2u$ -グロブリン抗体に陽性を呈した (Fig. 4)。その他の臓器において投与に起因する変化は認められなかった。

C-2. MCA の一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括的試験 (本試験)

試験期間中、500 mg/kg 群では誤投与によると考えられる死亡例が 1 例認められたが、その他の動物において一般状態の変化は見られず、途中死亡例は認められなかった。試験期間中の体重の推移を Figure 5A に示す。500 mg/kg 群では投与 3 週目から対照群に比して体重の有意な低値が認められ、試験終了まで有意な体重増加抑制がみられた。摂餌量は投与 5 週目から 500 mg/kg 群で高値を示した (Figure 5B)。

最終体重および臓器重量を Table 5 に示す。最終体重は 500 mg/kg 群で有意な低値を示した。実重量では 150 mg/kg 群から胸腺、脾臓及び下垂体、500 mg/kg 群では脳、肺、及び精巣の有意な低値が認められた。相対重量では 150 mg/kg 群から胸腺の有意な低値と腎臓の有意な高値が、500 mg 群では、精囊及び前立腺の有意な低値が、脳、心臓、肝臓、肺、精巣、副腎、下垂体、甲状腺及び唾液腺の有意な高値が認められた。

血液学的検査の結果を Table 6 に示す。50 mg/kg 群から MCV の有意な低値が、150 mg/kg 群から MCHC の有意な高値、Eosi の有意な低値が、500 mg/kg では Ht 及び MCH の有意な低値がみられた。

血清生化学検査の結果を Table 7 に示す。

150 mg/kg 群から A/G の有意な高値と CRE の有意な低値が、500 mg/kg 群では Cl の有意な高値と TP, K 及び Ca の有意な低値が認められた。

T. 考察

D-1. 用量設定試験

MCAの一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験を実施するため、4週間の用量設定試験を行った結果、500 mg/kg群の雄では、約10%の体重増加抑制が認められた。雌雄ともに肝重量の増加が認められたものの、いずれも肝毒性パラメーターの変化は認められず、病理組織学的変化は見られなかった。500 mg/kg群の雌では腎重量の増加が認められたものの、病理組織学的変化は見られなかった。一方、病理組織学的検索では150 mg/kg以上の雄で近位尿細管に硝子滴変性の増加が確認され、500 mg/kg群の雄では電解質の変動が見られた。免疫組織化学染色の結果、硝子滴は $\alpha 2u$ -グロブリンであったことから、これらは雄ラット特有の変化であることが確認された。その他の臓器において投与による変化は見られなかったことから、一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験は雄ラットのみで実施し、高用量は500 mg/kg体重/日に設定した。中間用量及び低用量は、公比約3で除した150及び50 mg/kg体重/日に設定した。また、遺伝毒性評価の対象臓器は雄において重量又は病理組織学的変化が見られた肝臓及び腎臓とした。

D-2. MCAの一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括的試験

本試験では、500 mg/kg群において誤投与による死亡が1例みられたものの、その他の動物の一般状態に変化はなく、死亡例は認められなかった。臓器重量の変化は150 mg/kg群から認められたが、その多くは体重の低値に伴う変化と考えられた。血清生化学検査では、電解質の変動が認められたが、これらの毒性学的意義については令和7年

度に実施する病理組織学的解析の結果とともに考察する。

U. 結論

一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験の用量設定試験から、MCAに顕著な毒性は観察されなかった。500 mg/kg群の雄では体重増加抑制が見られたことから、13週間反復投与が可能な最大量は500 mg/kg体重/日と判断した。また、肝重量の増加及びα2u-グロブリン腎症が認められたことから、遺伝毒性評価の対象増加を肝臓及び腎臓に設定した。これらの結果をもとに、本試験における投与量を50、150及び500 mg/kg体重/日に設定し、一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験の動物実験を実施した。

V. 健康危険情報

W. 研究発表

G-1. 論文発表

該当なし

G-2. 学会発表

- 1) Investigations of the mechanism underlying acetamide-induced hepatocarcinogenesis in rat. Ishii Y., Nakamura K., Yamagami Y., Takasu S., Nohmi T., Toyoda T., Shibutani M., Ogawa K., SOT2025 (2025 年 3 月, 米国)
- 2) gpt delta ラットを用いた 6-methoxyquinoline の *in vivo* 変異原性の評価, 高須伸二, 石井雄二, 相馬明玲, 笠松建吾, 山上洋平, 豊田武士, 小川久美子, 第 53 回日本環境変異原ゲノム学会 (2024 年 12 月, 岡山)

X. 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

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) Takasu S, Ishii Y, Namiki M, Nakamura K, Mitsumoto T, Takimoto N, Nohmi T, Ogawa K, Comprehensive analysis of the general toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of 3-acethyl-2,5-dimethylfuran in male gpt delta rats. Food Chem. Toxicol. 172, 113544 (2023).
- 4) Honma M, Yamada M, Yasui M, Horibata K, Sugiyama K, Masumura K, Genotoxicity assessment of food-flavoring chemicals used in Japan. Toxicol. Rep. 9, 1008-1012 (2022).

別添 4

Table 1 Body and organ weights data for F344 rats treated with MCA for 4 weeks

Item / Dose		0 mg/kg	50 mg/kg	150 mg/kg	500 mg/kg
No. of animals		5	5	5	5
Males					
Body weight	(g)	241.7 ± 17.1 ^a	232.5 ± 21.5	234.3 ± 17.1	221.0 ± 12.2
Brain	(g)	1.81 ± 0.04	1.78 ± 0.04	1.77 ± 0.04	1.72 ± 0.04**
	(g/100gBW)	0.75 ± 0.04	0.77 ± 0.07	0.76 ± 0.04	0.78 ± 0.04
Thymus	(g)	0.27 ± 0.03	0.26 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.20 ± 0.02**
	(g/100gBW)	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01
Heart	(g)	0.70 ± 0.05	0.68 ± 0.04	0.68 ± 0.06	0.68 ± 0.04
	(g/100gBW)	0.29 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.29 ± 0.02	0.31 ± 0.02
Spleen	(g)	0.38 ± 0.05	0.38 ± 0.02	0.40 ± 0.08	0.32 ± 0.03
	(g/100gBW)	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.03	0.15 ± 0.01
Liver	(g)	7.06 ± 0.50	6.59 ± 0.60	6.75 ± 0.45	7.29 ± 0.58
	(g/100gBW)	2.92 ± 0.05	2.83 ± 0.07	2.89 ± 0.11	3.40 ± 0.23 [§]
Adrenals	(g)	0.030 ± 0.007	0.036 ± 0.002	0.030 ± 0.007	0.035 ± 0.004
	(g/100gBW)	0.012 ± 0.003	0.016 ± 0.001	0.013 ± 0.003	0.017 ± 0.001**
Kidneys	(g)	1.46 ± 0.16	1.38 ± 0.11	1.44 ± 0.08	1.44 ± 0.12
	(g/100gBW)	0.60 ± 0.04	0.60 ± 0.02	0.62 ± 0.02	0.68 ± 0.04**
Testes	(g)	2.53 ± 0.18	2.48 ± 0.14	2.09 ± 0.84	2.49 ± 0.09
	(g/100gBW)	1.05 ± 0.05	1.07 ± 0.07	0.88 ± 0.34	1.15 ± 0.06
Females					
Body weight	(g)	156.8 ± 5.9	151.6 ± 5.3	154.8 ± 6.8	161.9 ± 6.6
Brain	(g)	1.67 ± 0.03	1.67 ± 0.04	1.66 ± 0.04	1.64 ± 0.05
	(g/100gBW)	1.06 ± 0.03	1.10 ± 0.05	1.08 ± 0.04	1.03 ± 0.03
Thymus	(g)	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.21 ± 0.02
	(g/100gBW)	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.13 ± 0.01
Heart	(g)	0.53 ± 0.03	0.49 ± 0.015*	0.51 ± 0.02	0.58 ± 0.02*
	(g/100gBW)	0.34 ± 0.02	0.33 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.36 ± 0.01
Spleen	(g)	0.28 ± 0.01	0.27 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.02
	(g/100gBW)	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.01
Liver	(g)	4.15 ± 0.25	4.20 ± 0.15	4.42 ± 0.25	5.58 ± 0.41**
	(g/100gBW)	2.65 ± 0.10	2.77 ± 0.07	2.85 ± 0.10	3.48 ± 0.24**
Adrenals	(g)	0.036 ± 0.002	0.035 ± 0.005	0.038 ± 0.006	0.046 ± 0.002*
	(g/100gBW)	0.023 ± 0.001	0.023 ± 0.003	0.024 ± 0.004	0.029 ± 0.001 [§]
Kidneys	(g)	0.99 ± 0.08	0.99 ± 0.06	1.03 ± 0.05	1.13 ± 0.03**
	(g/100gBW)	0.63 ± 0.03	0.65 ± 0.03	0.67 ± 0.02	0.71 ± 0.03**
Ovaries	(g)	0.048 ± 0.004	0.048 ± 0.013	0.056 ± 0.002 [§]	0.062 ± 0.007 [§]
	(g/100gBW)	0.030 ± 0.002	0.032 ± 0.008	0.036 ± 0.001 [§]	0.039 ± 0.004 [§]

^a: Mean ± SD

*, **: Significantly different from control group at p<0.05, 0.01. (Dunnett's test.)

[§]: Significantly different from control group at p<0.05. (Steel's test.)

Table 2 Hematology data for male and female F344 rats administered MCA for 4 weeks

Item / Group	0 mg/kg	50 mg/kg	150 mg/kg	500 mg/kg
No. of animals	5	5	5	5
Males				
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	5.4 ± 1.4	5.3 ± 0.8	5.1 ± 0.9	4.4 ± 0.8
RBC ($10^4/\mu\text{L}$)	8.6 ± 0.2^a	8.6 ± 0.1	8.9 ± 0.2	8.8 ± 0.3
HGB (g/dL)	14.9 ± 0.2	14.9 ± 0.3	15.3 ± 0.3	15.2 ± 0.4
HCT (%)	44.4 ± 1.0	44.5 ± 0.8	45.7 ± 0.8	44.5 ± 1.4
MCV (fL)	51.8 ± 0.4	51.7 ± 0.2	51.6 ± 0.4	$50.6 \pm 0.5^{**}$
MCH (pg)	17.4 ± 0.2	17.3 ± 0.1	17.3 ± 0.3	17.2 ± 0.1
MCHC (g/dL)	33.6 ± 0.4	33.4 ± 0.1	33.6 ± 0.4	$34.0 \pm 0.2^*$
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	586.6 ± 81.5	608.8 ± 81.8	621.6 ± 60.3	581.2 ± 54.6
RET ($\times 10^3/\text{mL}$)	333.9 ± 44.6	369.5 ± 39.1	324.8 ± 23.2	348.4 ± 19.8
Differential leukocyte counts				
Neut (%)	1.07 ± 0.14	1.10 ± 0.06	1.11 ± 0.25	1.18 ± 0.23
Lymp (%)	4.13 ± 1.22	4.08 ± 0.82	3.88 ± 0.67	3.09 ± 0.63
Mono (%)	0.12 ± 0.03	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.01
Eosi (%)	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.07 ± 0.13
Baso (%)	0.004 ± 0.005	0.010 ± 0.000	0.006 ± 0.005	0.002 ± 0.004
Females				
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	5.2 ± 1.6	4.5 ± 0.9	3.6 ± 0.7	4.0 ± 0.7
RBC ($10^4/\mu\text{L}$)	8.9 ± 0.1	8.9 ± 0.2	8.6 ± 0.2	8.7 ± 0.2
HGB (g/dL)	15.4 ± 0.2	15.4 ± 0.3	14.9 ± 0.3	15.2 ± 0.2
HCT (%)	45.8 ± 0.6	45.7 ± 1.0	$44.2 \pm 0.9^*$	44.6 ± 0.6
MCV (fL)	51.6 ± 0.1	51.2 ± 0.2	51.2 ± 0.3	51.3 ± 0.3
MCH (pg)	17.3 ± 0.0	17.2 ± 0.2	17.3 ± 0.1	$17.5 \pm 0.1^*$
MCHC (g/dL)	33.5 ± 0.1	33.6 ± 0.3	33.8 ± 0.2	$34.1 \pm 0.2^{**}$
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	643.4 ± 48.6	611.8 ± 24.1	634.8 ± 29.3	616.2 ± 18.7
RET ($\times 10^3/\text{mL}$)	307.8 ± 34.7	$254.9 \pm 29.0^*$	264.5 ± 20.3	315.3 ± 30.2
Differential leukocyte counts				
Neut (%)	0.97 ± 0.43	0.91 ± 0.27	0.73 ± 0.08	0.93 ± 0.27
Lymp (%)	4.03 ± 1.24	3.47 ± 0.73	2.74 ± 0.71	2.91 ± 0.42
Mono (%)	0.13 ± 0.06	0.10 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.02
Eosi (%)	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	$0.02 \pm 0.01^*$
Baso (%)	0.010 ± 0.007	0.008 ± 0.004	0.006 ± 0.005	0.006 ± 0.005

^a: Mean $\pm$ SD*, **: Significantly different from control group at $p < 0.05$, $p < 0.01$. (Dunnett's test.)

Abbreviations; 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; Neut, neutrophil; Eosi, eosinophil; Baso, basophil; Lymp, lymphocyte; Mono, monocyte.

Table 3 Serum biochemistry for male and female F344 rats administered MCA for 4 weeks

Item / Group	0 mg/kg	50 mg/kg	150 mg/kg	500 mg/kg
No. of animals	5	5	5	5
Males				
TP (g/dL)	5.6 ± 0.1 ^a	5.6 ± 0.1	5.9 ± 0.1*	5.9 ± 0.1**
A/G	3.8 ± 0.1	3.8 ± 0.2	3.7 ± 0.2	4.0 ± 0.3
ALB (g/dL)	4.4 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.6 ± 0.1*	4.7 ± 0.1**
T-BIL (mg/dL)	0.036 ± 0.009	0.032 ± 0.004	0.030 ± 0.007	0.028 ± 0.004
GLU (mg/dL)	147.2 ± 12.9	147.0 ± 15.7	110.8 ± 19.0**	137.4 ± 17.9
TG (mg/dL)	71.4 ± 15.7	63.0 ± 6.0	55.2 ± 17.4	50.4 ± 16.8
T-CHO (mg/dL)	50.8 ± 2.8	44.6 ± 2.5*	44.0 ± 3.8**	45.0 ± 3.2*
BUN (mg/dL)	12.2 ± 1.2	10.9 ± 1.1	11.7 ± 0.5	10.8 ± 1.2
CRE(mg/dL)	0.28 ± 0.00	0.30 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.02
Na (mEq/L)	140.8 ± 0.4	140.8 ± 0.8	141.2 ± 1.1	141.4 ± 0.9
Cl (mEq/L)	100.0 ± 1.0	100.8 ± 0.8	101.4 ± 1.1	102.4 ± 0.5**
K (mEq/L)	4.7 ± 0.2	4.6 ± 0.2	4.9 ± 0.3	4.5 ± 0.2
Ca (mg/dL)	10.8 ± 0.1	10.6 ± 0.3	10.7 ± 0.2	10.6 ± 0.1
IP (mg/dL)	7.2 ± 0.5	6.8 ± 0.6	6.7 ± 0.9	7.1 ± 0.6
AST (IU/L)	79.8 ± 9.2	78.4 ± 13.3	91.8 ± 7.1	80.8 ± 5.0
ALT (IU/L)	63.6 ± 2.7	61.0 ± 8.7	67.0 ± 9.3	60.0 ± 10.7
ALP (IU/L)	424.0 ± 90.4	356.8 ± 14.6	337.6 ± 36.7	292.2 ± 18.9 [§]
γ-GTP (IU/L)	3>	3>	3>	3>
Females				
TP (g/dL)	5.5 ± 0.1	5.5 ± 0.1	5.5 ± 0.1	5.8 ± 0.1**
A/G	3.8 ± 0.4	4.3 ± 0.5	4.0 ± 0.3	3.8 ± 0.0
ALB (g/dL)	4.3 ± 0.2	4.5 ± 0.1	4.4 ± 0.0	4.6 ± 0.1
T-BIL (mg/dL)	0.042 ± 0.004	0.040 ± 0.007	0.036 ± 0.005	0.038 ± 0.004
GLU (mg/dL)	104.0 ± 10.2	110.6 ± 15.8	126.4 ± 16.0	142.2 ± 14.2**
TG (mg/dL)	61.2 ± 13.8	44.8 ± 15.9	41.6 ± 11.6	46.0 ± 15.7
T-CHO (mg/dL)	51.4 ± 5.6	47.0 ± 3.7	49.0 ± 3.2	60.4 ± 7.4*
BUN (mg/dL)	9.9 ± 1.4	9.9 ± 1.1	9.1 ± 1.0	10.4 ± 1.0
CRE(mg/dL)	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.01
Na (mEq/L)	139.8 ± 0.8	139.8 ± 0.8	140.4 ± 0.9	138.8 ± 0.8
Cl (mEq/L)	101.6 ± 1.3	102.8 ± 1.9	103.0 ± 2.3	102.2 ± 1.3
K (mEq/L)	4.7 ± 0.2	4.6 ± 0.2	4.3 ± 0.00*	4.5 ± 0.2
Ca (mg/dL)	10.3 ± 0.2	10.2 ± 0.2	10.2 ± 0.1	10.4 ± 0.1
IP (mg/dL)	5.8 ± 0.7	5.7 ± 0.7	5.6 ± 1.0	6.8 ± 0.5
AST (IU/L)	94.2 ± 4.1	89.8 ± 13.0	84.2 ± 10.7	78.0 ± 5.8*
ALT (IU/L)	60.8 ± 3.9	51.4 ± 8.2	54.0 ± 8.0	49.0 ± 3.1*
ALP (IU/L)	234.2 ± 37.5	220.6 ± 8.6	219.6 ± 22.0	228.2 ± 8.4
γ-GTP (IU/L)	3>	3>	3>	3>

*: Mean ± SD

*,**: Significantly different from control group at p<0.05, p<0.01. (Dunnett's test.)

§: Significantly different from control group at p<0.05. (Steel's test.)

Abbreviations; TP, total protein; A/G, albumin/globulin ratio; ALB, albumin; T-BIL, total bilirubin; GLU, glucose; TG, triglyceride; T-CHO, total cholesterol; BUN, blood urea nitrogen; CRE, creatinine; Na, sodium; Cl, chloride; K, potassium; Ca, calcium; IP, inorganic phosphate; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; γ-GTP, gamma glutamyl transpeptidase.

Table 4 Histopathological findings in F344 rat treated with MCA for 4 weeks

Findings ($\pm$, +, ++, +++)	0 mg/kg	50 mg/kg	150 mg/kg	500 mg/kg
No. of animals	5	5	5	5
Males				
Kidney				
hyaline droplet degeneration, focal, renal tubule	2(1/1/0/0)	1(1/0/0/0)	2(0/2/0/0)	2(1/1/0/0)
Females				
Kidney				
hyaline droplet degeneration, focal, renal tubule	0	0	0	0

Table 5 Body and organ weights data for male *gpt* delta rats treated with MCA for 13 weeks

Item / Dose		0 mg/kg		50 mg/kg		150 mg/kg		500 mg/kg	
No. of animals		10		10		10		9	
Body weight	(g)	281	$\pm$ 25 ^a	296	$\pm$ 40	262	$\pm$ 23	214	$\pm$ 27**
Brain	(g)	1.81	$\pm$ 0.04	1.81	$\pm$ 0.04	1.78	$\pm$ 0.05	1.70	$\pm$ 0.05**
	(g/100 g BW)	0.65	$\pm$ 0.05	0.62	$\pm$ 0.08	0.68	$\pm$ 0.05	0.80	$\pm$ 0.10**
Thymus	(g)	0.11	$\pm$ 0.02	0.09	$\pm$ 0.03	0.07	$\pm$ 0.02**	0.06	$\pm$ 0.02**
	(g/100 g BW)	0.04	$\pm$ 0.01	0.03	$\pm$ 0.01	0.03	$\pm$ 0.01*	0.03	$\pm$ 0.01*
Heart	(g)	0.77	$\pm$ 0.06	0.80	$\pm$ 0.06	0.75	$\pm$ 0.05	0.71	$\pm$ 0.07
	(g/100 g BW)	0.28	$\pm$ 0.01	0.27	$\pm$ 0.02	0.29	$\pm$ 0.02	0.33	$\pm$ 0.04 ^{##}
Spleen	(g)	0.37	$\pm$ 0.02	0.36	$\pm$ 0.03	0.32	$\pm$ 0.03*	0.26	$\pm$ 0.05**
	(g/100 g BW)	0.13	$\pm$ 0.01	0.12	$\pm$ 0.01	0.12	$\pm$ 0.01	0.12	$\pm$ 0.01**
Liver	(g)	6.80	$\pm$ 0.56	7.08	$\pm$ 0.98	6.28	$\pm$ 0.55	6.06	$\pm$ 0.79
	(g/100 g BW)	2.42	$\pm$ 0.08	2.40	$\pm$ 0.08	2.40	$\pm$ 0.10	2.83	$\pm$ 0.11**
Kidneys	(g)	1.37	$\pm$ 0.13	1.40	$\pm$ 0.13	1.37	$\pm$ 0.13	1.28	$\pm$ 0.15
	(g/100 g BW)	0.49	$\pm$ 0.02	0.48	$\pm$ 0.03	0.52	$\pm$ 0.02**	0.60	$\pm$ 0.03**
Lungs	(g)	0.89	$\pm$ 0.06	0.87	$\pm$ 0.07	0.87	$\pm$ 0.06	0.75	$\pm$ 0.07**
	(g/100 g BW)	0.32	$\pm$ 0.02	0.30	$\pm$ 0.02	0.33	$\pm$ 0.02	0.36	$\pm$ 0.04*
Testes	(g)	2.56	$\pm$ 0.16	2.57	$\pm$ 0.15	2.49	$\pm$ 0.13	2.13	$\pm$ 0.22**
	(g/100 g BW)	0.91	$\pm$ 0.06	0.88	$\pm$ 0.09	0.96	$\pm$ 0.06	1.00	$\pm$ 0.05*
Adrenals	(mg)	45.3	$\pm$ 6.1	46.5	$\pm$ 6.0	47.4	$\pm$ 3.6	45.9	$\pm$ 4.4
	(mg/100 g BW)	16.2	$\pm$ 2.3	16.2	$\pm$ 4.0	18.2	$\pm$ 1.9	21.8	$\pm$ 3.5**
Pituitary gland	(mg)	8.94	$\pm$ 0.56	8.30	$\pm$ 0.98	8.13	$\pm$ 0.58*	8.24	$\pm$ 0.70
	(mg/100 g BW)	3.19	$\pm$ 0.18	2.83	$\pm$ 0.36*	3.11	$\pm$ 0.20	3.87	$\pm$ 0.34**
Thyroid	(mg)	12.8	$\pm$ 1.9	11.6	$\pm$ 1.7	11.8	$\pm$ 1.2	11.5	$\pm$ 1.5
	(mg/100 g BW)	4.56	$\pm$ 0.50	3.92	$\pm$ 0.51	4.51	$\pm$ 0.51	5.41	$\pm$ 0.81*
Salivary glands	(g)	0.42	$\pm$ 0.03	0.41	$\pm$ 0.04	0.40	$\pm$ 0.03	0.36	$\pm$ 0.04**
	(g/100 g BW)	0.15	$\pm$ 0.01	0.14	$\pm$ 0.01	0.15	$\pm$ 0.02	0.17	$\pm$ 0.02*
Seminal vesicles	(g)	0.43	$\pm$ 0.09	0.39	$\pm$ 0.12	0.32	$\pm$ 0.12	0.16	$\pm$ 0.09**
	(g/100 g BW)	0.15	$\pm$ 0.03	0.13	$\pm$ 0.04	0.12	$\pm$ 0.04	0.07	$\pm$ 0.03**
Prostate	(g)	0.43	$\pm$ 0.08	0.38	$\pm$ 0.10	0.36	$\pm$ 0.06	0.23	$\pm$ 0.09**
	(g/100 g BW)	0.15	$\pm$ 0.03	0.13	$\pm$ 0.03	0.14	$\pm$ 0.02	0.10	$\pm$ 0.02**

^a: Mean $\pm$ SD*, **: Significantly different from control group at $p < 0.05, 0.01$. (Dunnett's test.)

Table 6 Hematological data for male F344 *gpt* delta rats administered MCA for 13 weeks

Item / Group	0 mg/kg	50 mg/kg	150 mg/kg	500 mg/kg
No. of animals	10	10	10	9
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	2.8 ± 0.9	2.8 ± 0.7	2.9 ± 0.4	2.7 ± 0.6
RBC ($10^4/\mu\text{L}$)	8.8 ± 0.2^a	$9.2 \pm 0.2^{\#}$	$9.1 \pm 0.2^{\#}$	8.5 ± 0.7
HGB (g/dL)	14.4 ± 0.4	$14.9 \pm 0.4^{\#}$	14.7 ± 0.4	13.5 ± 1.7
HCT (%)	43.9 ± 1.2	44.9 ± 1.3	43.8 ± 1.0	$39.5 \pm 4.3^{\#}$
MCV (fL)	49.7 ± 0.7	$48.8 \pm 0.4^{\#}$	$48.1 \pm 0.5^{\#}$	$46.3 \pm 1.7^{\#}$
MCH (pg)	16.3 ± 0.2	16.2 ± 0.1	16.1 ± 0.2	$15.8 \pm 0.8^{\#}$
MCHC (g/dL)	32.8 ± 0.5	33.2 ± 0.3	$33.6 \pm 0.2^{\#}$	$34.1 \pm 0.8^{\#}$
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	468 ± 144	465 ± 42	467 ± 71	554 ± 172
RET ($\times 10^3/\text{mL}$)	389 ± 79	$307 \pm 48^{\#}$	$313 \pm 24^{\#}$	440 ± 245
Differential leukocyte counts				
Neut (%)	0.91 ± 0.25	0.88 ± 0.14	1.08 ± 0.23	1.07 ± 0.10
Lymph (%)	1.77 ± 0.68	1.83 ± 0.58	1.73 ± 0.35	1.51 ± 0.51
Mono (%)	0.09 ± 0.03	0.09 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.09 ± 0.03
Eosi (%)	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.00	$0.01 \pm 0.01^{**}$	$0.00 \pm 0.00^{**}$
Baso (%)	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00

: Mean $\pm$ SD, **: Significantly different from control group at $p < 0.05$, $p < 0.01$. (Dunnett's test.)

Abbreviations: 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; Neut, neutrophil; Eosi, eosinophil; Baso, basophil; Lymph, lymphocyte; Mono, monocyte.

Table 7 Serum biochemistry for male F344 *gpt* delta rats administered MCA for 13 weeks

Item / Group	0 mg/kg	50 mg/kg	150 mg/kg	500 mg/kg
No. of animals	10	10	10	9
TP (g/dL)	5.2 ± 0.2^a	5.3 ± 0.3	5.2 ± 0.2	$4.9 \pm 0.2^*$
A/G	4.8 ± 0.6	4.9 ± 0.5	$5.8 \pm 0.5^{**}$	$6.0 \pm 0.6^{**}$
ALB (g/dL)	4.3 ± 0.2	4.4 ± 0.2	4.4 ± 0.1	4.2 ± 0.2
T-BIL (mg/dL)	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.01	$0.08 \pm 0.02^*$
GLU (mg/dL)	146 ± 22	146 ± 12	138 ± 19	131 ± 31
TG (mg/dL)	66.2 ± 18.2	93.5 ± 34.3	76.5 ± 27.7	93.1 ± 18.9
T-CHO (mg/dL)	41.5 ± 4.3	38.4 ± 2.3	38.9 ± 4.6	45.9 ± 7.1
BUN (mg/dL)	6.5 ± 1.7	5.5 ± 0.5	5.5 ± 0.6	6.9 ± 1.4
CRE (mg/dL)	0.38 ± 0.02	0.36 ± 0.02	$0.35 \pm 0.01^{**}$	$0.33 \pm 0.01^{**}$
Na (mEq/L)	141.7 ± 1.1	142.0 ± 0.9	142.3 ± 0.7	142.0 ± 0.9
Cl (mEq/L)	103.2 ± 0.6	102.9 ± 0.9	103.9 ± 0.7	$104.9 \pm 0.9^{**}$
K (mEq/L)	4.48 ± 0.13	4.35 ± 0.18	4.36 ± 0.16	$4.29 \pm 0.18^*$
Ca (mg/dL)	9.9 ± 0.2	10.0 ± 0.2	9.9 ± 0.1	$9.6 \pm 0.2^{**}$
IP (mg/dL)	5.0 ± 0.5	4.9 ± 0.5	4.7 ± 0.5	5.4 ± 0.5
AST (IU/L)	90.7 ± 11.6	85.1 ± 7.7	82.8 ± 8.7	81.9 ± 10.2
ALT (IU/L)	56.1 ± 13.8	54.2 ± 8.0	59.8 ± 12.0	66.0 ± 13.9
ALP (IU/L)	230 ± 34	232 ± 38	264 ± 35	226 ± 42
γ -GTP (IU/L)	3>	3>	3>	3>

: Mean $\pm$ SD, **: Significantly different from control group at $p < 0.05$, $p < 0.01$. (Dunnett's test.)*: Significantly different from control group at $p < 0.05$. (Steel's test.)Abbreviations: TP, total protein; A/G, albumin/globulin ratio; ALB, albumin; T-BIL, total bilirubin; GLU, glucose; TG, triglyceride; T-CHO, total cholesterol; BUN, blood urea nitrogen; CRE, creatinine; Na, sodium; Cl, chloride; K, potassium; Ca, calcium; IP, inorganic phosphate; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; γ -GTP, gamma glutamyl transpeptidase.

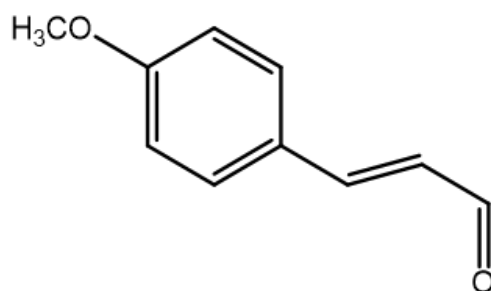


Figure 1. Chemical structure of 4-methoxycinnamaldehyde (MCA)

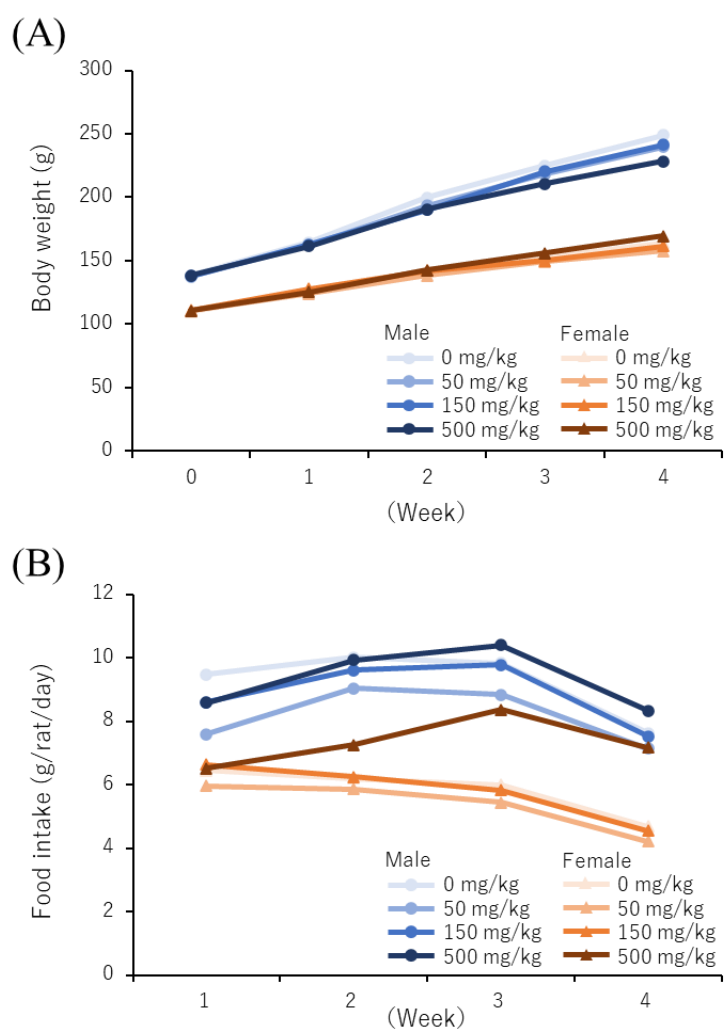


Figure 2. Mean body weight (A) and food consumption (B) for F344 rats treated with MCA for 4 weeks.

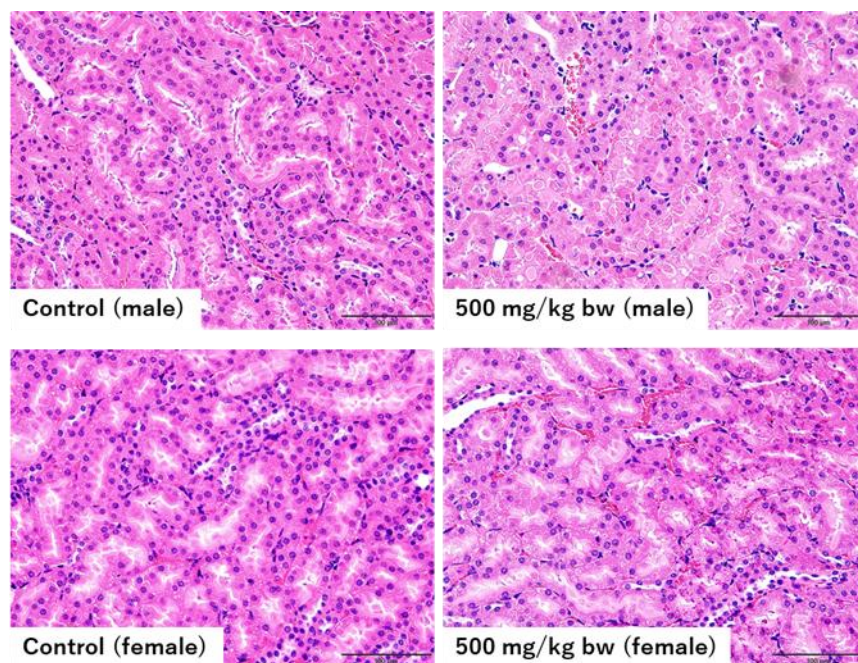


Figure 3 Representative histopathological findings for the kidneys of rat. Hyaline droplet degeneration in the renal tubule were observed in the kidneys of rats treated with 500 mg/kg MCA.

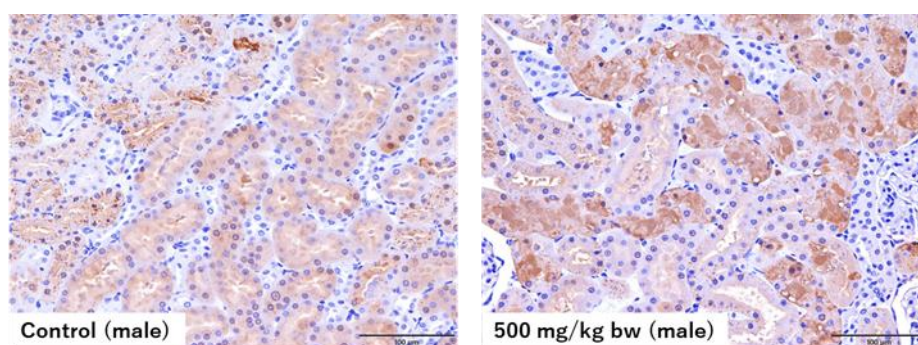


Figure 4 Representative immunohistochemical findings for α 2u-globulin. In the rats of 500 mg/kg group, hyaline droplet in the renal tubule were positive for α 2u-globulin.

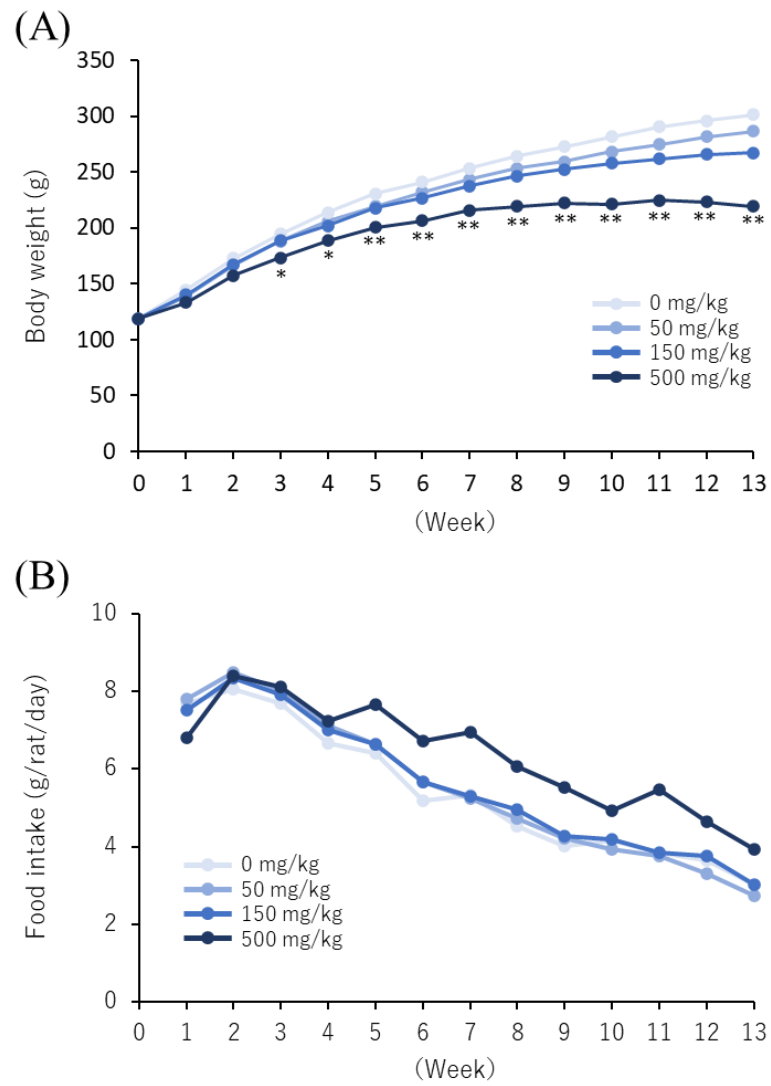


Figure 5 Representative immunohistochemical findings for $\alpha 2$ u-globulin. In the rats of 500 mg/kg group, hyaline droplet in the renal tubule were positive for $\alpha 2$ u-globulin.

令和6年度 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
香料を含む食品添加物の遺伝毒性評価スキームの構築に関する基盤研究

分担研究課題名：DNAメチル化異常を介したゲノム不安定性誘発作用のスクリーニング系の開発

研究分担者 鈴木孝昌

研究要旨

DNA メチル化等のエピジェネティックな変化の解析は、化学物質等のゲノム影響を評価するにあたり重要である。従来メチル化の解析には **Bisulfite** 法など煩雑な操作が必要であったが、我々は、ナノポアシーケンサーを用いて直接メチル化塩基を検出することによる簡便迅速な解析手法の開発を行った。これにより、比較的簡便な手法でDNA のメチル化状態を調べることができれば、DNA メチル化異常を介したゲノム不安定性誘発作用のスクリーニング系として普及できることが期待される。

本手法では、比較的安価で簡便に DNA のシーケンス解析が可能であり、かつ 5-methyl cytosine (5mC) や 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) の検出が可能なナノポア型のポータブルシーケンサーである MinION を使い、まずゲノム上のグローバルなメチル化レベルの検討を行った。実験では、HCT116 細胞由来のメチル化/非メチル化標準DNA (EpiScope®/TaKaRa) を用いて希釈系列を作成し、ナノポアシーケンサー (MinION) を用いて通常のシーケンス解析を行った。得られた raw data である FAST5 ファイルを Guppy ソフトウェアにて解析し、5 mC を含めたシーケンスコールを行い、ゲノムワイドにグローバルなメチル化頻度 (GMF) を算出するワークフローを本所における共通機器として知用可能なナノポアサーバー上に構築した。

メチル化標準品を用いてシーケンス解析を行った結果、メチル化 DNA の添加割合に従って GMF は直線的に上昇し、定量的な解析が可能であることが示された。また、メチル化を低下させることが知られている 5azaC を陽性対照物質として細胞に処理し、ゲノム DNA のグローバルメチル化を解析した結果、メチル化の減少傾向が認められた。今後は、さらに他の化学物質処理による GMF の変化の検討を行うとともに、部位特異的なメチル化変化の解析へと応用したい。

研究目的

近年、がんや神経変性疾患などをはじめとする様々な疾患や老化においてDNAのメチル化の異常が起きていることが報告されている。DNAメチル化異常は、細胞内のエピジェネティックな制御機構の破綻を示す指標となり得る。特に、DNA修復機構の低下やクロマチン構造の変化を伴うメチル化異常は、染色体の異常や遺伝子変異を誘発へとつながる可能性がある。こうした背景から、DNAメチル化異常の検出系開発

は、ゲノムの不安定性のスクリーニングと化学物質の安全性評価の両面で極めて重要な意義を持つ。

DNAメチル化の解析にはこれまで様々な手法が用いられてきたが、何れも操作が複雑で会ったり、高額な機器を必要としたりして、一般に普及しうる簡便な手法の開発が望まれていた。最も代表的な手法としては、メチル化シトシンの変換試薬である Bisulfite を用いたバイサルファイトシーケンス法が知られているが、サンプル

調製及びシークエンスデータ解析の複雑さから簡便な手法とは言い難かった。

しかし、第三世代の一分子シークエンサーとされるナノポア型のシークエンサーの登場により、煩雑な前処理なく直接 DNA メチルを検出できる可能性が出てきた。ナノポア型シークエンサーは、DNA 分子がナノポアを通過する際の電流値変化を読み取り、塩基配列へと変換するが、5mC や 5hmC などの修飾塩基に関しても、それらの電流値変化を学習させることにより、直接読み取ることが可能となる。そこで、このナノポア型のシークエンサーを用いて、簡便な DNA メチル化の解析系を構築することにした。

これまで遺伝毒性の分野においては、主に突然変異や染色体異常を指標に安全性の評価を行ってきたが、DNA メチル即ちエピジェネティックな異常を誘発するという観点からは、被験物質の安全性の評価は行われていなかった。しかし、発がん性物質の評価において、遺伝子突然変異のみならず、エピジェネティックな変化を指標として組み込むことで、より包括的なリスク評価が可能となる。DNA メチル化異常を解析することで、化学物質が長期的に細胞の機能異常を誘発するか否かを評価できるため、香料を含む食品添加物の安全性評価においても有用な指標となるだろう。こうしたエピジェネティック異常の検出系の利用により、将来的には疾患リスクの予測や予防医学の発展にもつながり事が期待できる。こうした観点から、簡便迅速なメチル化異常の検出系の開発を行うことが本研究の目的である。

なお、エピジェネティックな変化としては、DNA 上のメチル化の変化だけでなく、ヒストンのアセチル化等のタンパク質修飾も解析

対象として含まれるが、本研究においては手法開発の容易さから、DNA 上のメチル化にフォーカスを絞り、短期にスクリーニング法の開発を達成することを目的とした。

研究方法

1. メチル化/非メチル化標準 DNA

- EpiScope® methylated HCT116 gDNA (TaKaRa)
 - EpiScope® unmethylated HCT116 DK0* gDNA (TaKaRa)
- *DK0: DNMT1 & DNMT3B double knock out

2. 薬剤処理

- ヒト培養細胞 (hTERT RPE1) にメチル化阻害剤である 5-azacytidine (5azaC) を 24 時間処理した。

3. ライブラリー調製

- 細胞より抽出したゲノム DNA (400ng) を用い、Rapid Barcoding kit (SQK-RBK004/ONT) によりバーコード化したライブラリーを調整した。

4. シークエンシング

- MinION フローセル (FLO-MIN 106D/ONT) にて、48 時間シークエンスランを行い、MInKNOW ソフトウェアにより Fast5、及び FASTQ ファイルを生成した

5. データ解析

- 所内のナノポアサーバー PC (Intel Xeon Gold 28corex2) 上に、ナノポアシークエンサーの Raw data である Fast5 ファイルよりメチル化情報を持った modBAM ファイルを生成し、グローバルな DNA メチル化レベルを測定でき

るシステムを構築した。(GeneBay 社に委託)

研究結果

ナノポアシーケンサーから得られたシーケンス解析データより DNA メチル化レベルを解析するためのワークフローを図 1 に示す。ナノポアシーケンサーより得られる Raw data である Fast5 ファイルは、DNA がナノポアを通過する際の電流値変化データであり、これをインプットファイルとして DNA メチル化レベルを測定するデータ解析ワークフローを、所の共有ナノポアサーバー上に構築した。

データ解析ワークフローは、まずインプットデータである Fast5 ファイルをナノポア社の提供する Guppy ソフトウェア（将来的には Dorado ソフトウェアに更新）を用いて、メチル化情報を含んだ modBam ファイルに変換し、これを Modkit ソフトウェアによ

りグローバルメチル化レベルの情報に変換する。なお、将来的には、この modBam ファイルをマッピングすることにより、部位特異的なメチル化レベルの解析へと発展させる予定である。

構築したメチル化解析ワークフローを用いて DNA メチル化レベルを定量的に解析可能かを検証する目的で、完全メチル化及び非メチル化された HCT116 gDNA 標準品（EpiScope®/TaKaRa）を用いて希釈系列を作成し、測定を行った。

その結果、図 2 に示すように、DNA メチル化レベルに用量相関性のある測定結果が得られた。測定は 2 回行ったが、非常に再現性の高いデータが得られた。このことから、本手法は DNA メチル化レベルを定量的に測定可能であることが確認できた。

図 1 Workflow of the epigenetic analysis system by the nanopore sequencer

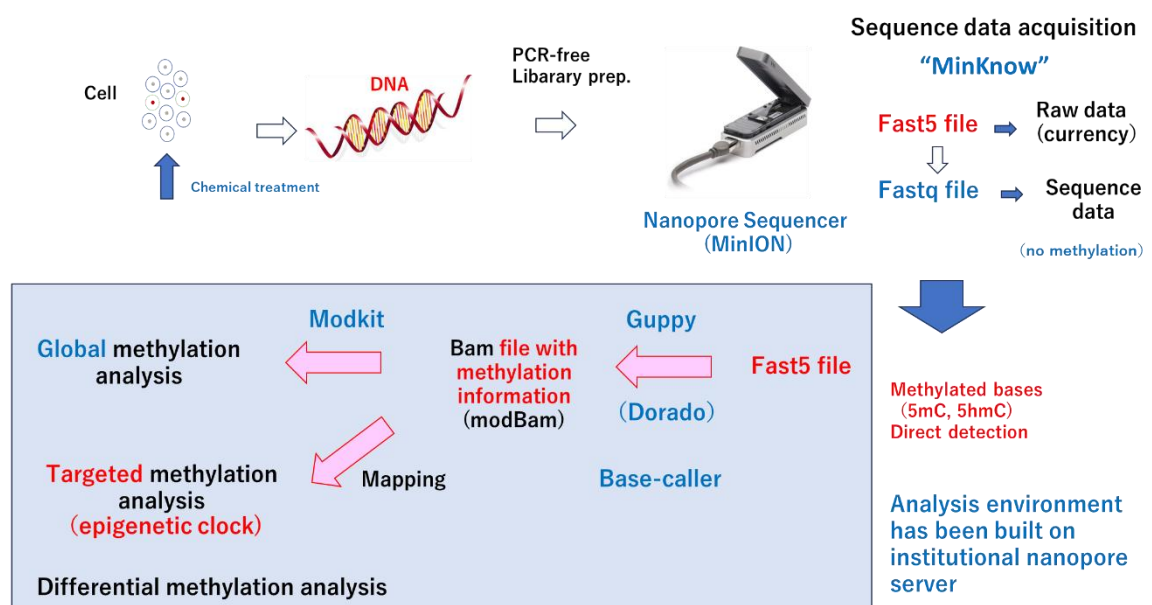
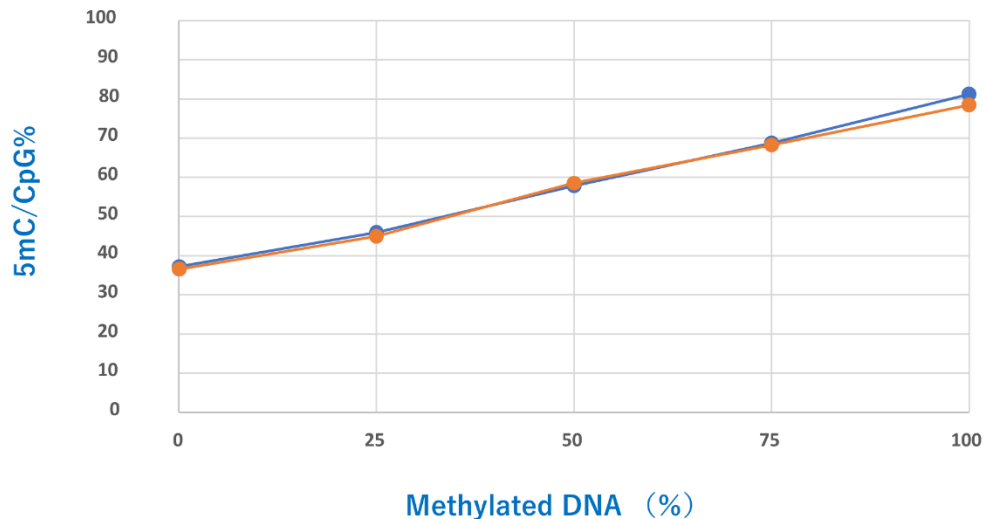


図2 Measurements of the dilution samples of the standards



次に、薬剤処理により DNA メチル化が変化するかを細胞を用いて検証した。被験物質としては、DNA に取り込まれることにより DNA メチル化のレベルを落とすことが知られている 5-aza cytidine(5azaC)を用いた。ヒト培養細胞 (hTERT RPE1) にメチル化阻害剤である 5-azacytidine (5azaC)を 24 時間処理した後、細胞よりゲノム DNA を抽出し、Rapid Barcoding kit を用いてナノポアシーケンサー用のライブラリー調製を行った (PCR free)。作製したライブラリーを MinION でシーケンス解析し、得られた Fast5 ファイルから、グローバル DNA メチル化を解析した結果を表 1 に示す。この際、解析システムの構築が間に合わなかったため、一部手計算にて処理を行った。Guppy ベースコーダーでは、CpG サイトのメチル化のみを対象としているため、DNA メチル化量の解析は、CpG サイト当たりの 5mC の C に対する割合として算出される。

いずれのサンプルにおいても、20 満 - 70 万塩基対程度の塩基数について解析を行い、解析対象となった CpG サイトの数は 3000 - 8000 程度となった。初回の実験においてコントロールでの 5mC の割合は約 42%であり、5azC 処理によりその頻度は低下したが、用量相関性は見られなかった。コントロールと最高用量のみを再試験した結果、同様にメチル化割合の低下がみられたが、初回の実験よりやや高めの値が得られた。

考察

標準希釈系列サンプルを用いた測定から、本試験系において DNA メチル化の割合を再現性高く定量的に測定可能なことがわかった。ただし、メチル化割合の絶対値に関しては、理論値 (0 - 100%) とは異なるため、Bisulfite 法など既存の手法を用いて検証を行う予定である。

一方で、細胞にメチル化阻害剤を処理した実験からは、5azaC 処理によるメチル化割

合の減少が見られたが、用量依存性が認められなかったことと、変化がそれほど大きくなかったことから、今後さらに他の陽性物質を用いた検証を行う予定である。

今回の検討においては、MinION という比較的安価で入手しやすいシーケンサーを用いて、Barcoding kit により多検体を一度に混合してシーケンス解析することにより、簡便、迅速に DNA メチル化の解析が可能であることが確認できた。得られた数値の信頼性に関しては今後更なる検証が必要であるが、簡便な解析法として普及できる可能性は確認できた。今回はグローバルなメチル化の解析にとどまったが、この目的であればシーケンスデータ量をそれほど必要としないため、一回のランで 10 サンプル程度を同時に解析しても十分なデータ量が得られることがわかった。今後は、さらにデータ量を増やし、最終的に得られた modBam ファイルをマッピングすることにより部位特異的にメチル化状態を調べることも可能となる。近年加齢の指標となる Clock

遺伝子のメチル化など、特定遺伝子（プロモーター部位）のメチル化が細胞機能の調節に関わる重要な指標となりうることが知られてきており、遺伝子ごとの部位特異的メチル化を調べることにより、より詳細な細胞機能への影響としてのゲノム毒性を評価できる可能性がある。来年度は、このような方向へも研究は発展させていきたい。

結論

ナノポア型シーケンサーMinION を用いて、簡便迅速にゲノム DNA のメチル化を解析する系を構築した。メチル化標準サンプルを用いた検討から、メチル化の度合いに相関した再現性の高い定量結果が得られた。また、メチル化を低下させることが知られている 5azaC 処理によるゲノムのグローバルメチル化の減少が検出できたことから、化学物質によるゲノム DNA メチル化の変化を簡便にスクリーニングできる可能性が示唆された。

表1 5azaC処理によるメチル化の変化

Barcode	Treatment conc(μ M)	Total reads	Total base	Total C	Total CpG	CpG %	Total 5mC	5mC/CpG*	5mC/C% *	
1	5azaC	0	143	472334	95790	5861	1.91	3166	41.86	3.27
2	5azaC	1	178	437189	95769	7108	2.44	2512	27.90	2.68
3	5azaC	10	72	208471	43662	2965	2.54	982	28.34	2.63
4	5azaC	100	104	292409	63131	4630	2.26	1963	32.70	2.97
再試験										
1-1	5azaC	0	189	709225	147549	8176	1.38	5014	57.31	3.27
1-2	5azaC	0	166	457088	121157	6262	1.34	3611	53.66	3.05
4-1	5azaC	100	175	563675	119936	6751	1.23	3467	50.05	2.83
4-2	5azaC	100	126	373224	78676	4688	1.31	2591	49.94	3.00
* average of each read										

* average of each read

5azaC処理により5mC含量は下がる傾向

健康危険情報

特になし

研究発表

論文発表

1. Furihata C., Suzuki T. Four functional genotoxic marker genes (Bax, Btg2, Ccng1, and Cdkn1a) discriminate genotoxic hepatocarcinogens from non-genotoxic hepatocarcinogens and non-genotoxic non-hepatocarcinogens in rat public toxicogenomics data, Open TG-GATEs. Genes Environ. 2024; 46: 28.
2. Hosoi S, Hirose T, Matsumura S, Otsubo Y, Saito K, Miyazawa M, Suzuki T, Masumura K, Sugiyama KI Effect of sequencing platforms on the sensitivity of chemical mutation detection using Hawk-Seq™. Genes Environ. 2024;46:20.
3. Corton JC, Auerbach SS, Koyama N., Mezencev R., Yauk CL., Suzuki T. Review and meta-analysis of gene expression biomarkers predictive of chemical-induced genotoxicity *in vivo*. Environ. Mol. Mutagen. 2025: doi: 10.1002/em.22646.
4. Froetschl R., Corton JC., Li H., Aubrecht J., Scott S. Auerbach SS., Caiment F., Doktorova TY., Fujita Y., Jennen D., Koyama N., Meier MJ., Mezencev R., Recio L., Suzuki T., Yauk CL. Consensus findings of an IWGT Workshop on using

Transcriptomic Biomarkers to Predict Genotoxicity. Environ. Mol. Mutagen. 2025: doi: 10.1002/em.22645

5. 築茂由則, 吉田徳幸, 大岡伸通, 内田恵理子, 鈴木孝昌, 米満研三, 上間匡, 本間正充, 合田幸広, 井上貴雄: 共通ウイルスゲノム RNA を用いた COVID-19 診断用核酸増幅検査薬の一斉性能評価試験. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2024;55:295-310.
6. Ikeuchi S, Hirose S, Shimada K, Koyama A, Ishida S, Katayama N, Suzuki T, Tokairin A, Tsukamoto M, Tsue Y, Yamaguchi K, Osako H, Hiwatashi S, Chiba Y, Akiyama H, Hayashidani H, Hara-Kudo Y. Isolation of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli from the Surfaces of Beef Carcasses in Slaughterhouses in Japan. J Food Prot. 2024: 87:100263.

学会発表

1. 鈴木孝昌 様々な EC-NGS 法の特徴 日本環境変異原ゲノム学会第 84 回 MMS 研究会, 東京都 (2024. 6)
2. 鈴木孝昌 Error-corrected next generation sequencing (ecNGS)の現状 第 51 回日本毒性学会学術年会 福岡市 (2024.7)
3. 鈴木孝昌, 尤馨悦, 伊澤和輝, 津田雅貴, 本間正充, 欒洋, 杉山圭一. PECC-Seq 法の開発から学ぶエラー修正 NGS(ecNGS)法の残存エラーの要因 第 83 回日本癌学会学術総会, 福岡市 (2024.9)

別添 4

- | | |
|---|---|
| <p>4. 鈴木孝昌, 西川可穂子. 河川水のメタゲノム解析による細菌叢と薬剤耐性遺伝子の探索 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 岡山市 (2024.12)</p> <p>5. 鈴木孝昌, 杉山圭一. ナノポアシーケンサーを用いた簡便迅速な DNA メチル化解析手法の開発 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 岡山市 (2024.12)</p> <p>6. 降旗千恵, 鈴木孝昌. <i>In vivo</i> トキシコゲノミクス試験に有用な 4 つの遺伝毒性マーカー遺伝子 (Bax, Btg2, Ccng1, Cdkn1a) 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 岡山市 (2024.12)</p> <p>7. 東航平, 鈴木孝昌, 青木康展, 山田雅巳. 魚類腸内細菌叢解析を用いた水</p> | <p>環境中の界面活性剤のモニタリングに関する研究 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 岡山市 (2024.12)</p> <p>8. “Error-corrected next-generation sequencing (NGS)” as an ultimate tool for genetic toxicology 第 47 回インド環境変異原学会年会 アンナマライ/インド (2025.1)</p> <p>知的財産権の出願・登録状況
なし</p> <p>特許取得
なし</p> <p>実用新案登録
なし</p> |
|---|---|