

令和7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 ゲノム安全科学部
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

国内で流通する香料の遺伝毒性・変異原性のリスクを評価するための優先順位づけのスキームの確立を目指す目的で、国内での年間使用量の多い200の18類香料について、Ames/QSAR予測と国内外の遺伝毒性試験情報を収集ならびに情報のソースについて精査を実施した。加えて、使用量リストで情報が得られた全ての18類香料（全香料）についても統計ベース・ルールベースの2種類のQSARモデルでの予測を実施した。

200の18類香料において2種類のQSARでいずれかが陽性予測の香料は22存在し、うち13香料でAmes試験陽性報告例があった。ここで香料の18類香料のうちケトン類に着目すると10香料においていずれかのQSAR予測が陽性であり、この10香料のうち9香料はAmes試験陽性の報告例があった。ケトン類でQSAR陽性・Ames試験陰性は1香料であった。以上の知見から本報告書における評価スキーム案ではAmes/QSAR陽性とケトン類を優先し、2種類のQSARいずれも陰性は優先順位が低いとした。今後は、偽陰性の考察が必要である。更に、全香料の約9割において2種類のQSARいずれも陰性であり、約9割で優先順位が低くなることから、2種類のQSAR予測が陰性の香料の中での優先順位付けも必要となる。

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*手法を活用することが効率的で妥当である。例えば、(定量的)構造活性相関((Q)SAR)を用いたAmes変異原性の評価(Ames/QSAR)については、ICH M7ガイダンスや内閣府食品安全委員会が公開している「食品健康影響評価において(Q)SARを活用して変異原性を評価する場合の手引き」等で示される通り、規制目的での活用や検討が進んでいる。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）についても、2025年にOECDでGuidance on Grouping of Che

micals第3版や欧州食品安全機関（EFSA）のガイダンスが公開され、規制目的での活用するための環境の整備がすすめられている。

本研究課題では、Ames/QSARなど*in silico*手法を活用した、遺伝毒性・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している。特に、令和7年度は、国内での使用量の多い200の18類香料について、Ames/QSAR予測と国内外の遺伝毒性試験情報を収集して、香料の18類を加味して整理を行い、スキーム案を構築した。そして、国内で使用されている香料全体に対しスキーム案を適用する際の課題についても考察した。

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」より開始した。当該課題において、令和4年度は、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・整理した。

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（以下、使用量番号）に50番目までの18類香料については、構造情報を整備し、2種類のモデルによるAmes/QSAR予測と国内データベースにおける遺伝毒性試験情報収集を行い、令和6年度は使用量番号200香料までの香料に対し、4種類のモデルによるAmes/QSAR予測と国内外の情報源から遺伝毒性試験情報の収集を実施し、情報の整理を行った。

遺伝毒性試験情報の収集

遺伝毒性試験について、使用量が多い順に200番目までの18類香料の情報を収集した。

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、職場のあんぜんサイトのモデルSDS（https://anzeninfo.mhlw.go.jp/anzen_pg/GHS MSD_FND.aspx）の記載内容を調査対象とした。

国外については、US EPAのComptox（<https://comptox.epa.gov/dashboard/>）Ver.2.5.3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を含む）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。また、Comptoxの中でSourceがCOSMOSの結果については、COSMOS DB（<https://cosmostox.org/>）の記載内容も一部参照した。さらにQSAR Toolbox（<https://qsartoolbox.org/>）v4.7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。QSAR Toolboxにおいても、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。また、米国 National Toxicology Program（<https://ntp.niehs.nih.gov/>）の毒性情報も収集対象とした。

論文情報としては、Kasamatsu, et al. 2021. Genes Environ. 43, 16.のうち国立医薬品食品衛生研究所で実施したデータ、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。Ames判定のうちKasamatsu, et al.で既存情報の陽性陰性の判定が修正されているものはKasamatsu et al.での報告を反映した。

なお、国内の情報源のデータベース情報は令和6年度に収集した情報であるが、国外の情報源の内容については、令和7年度に新たに収集しなおし、整理を行った。

Ames/QSAR予測

令和7年度は、使用量の多い200の18類香料に対し下記の4種類のQSARモデル（ソフトウェア）でAmes/QSAR予測とその解析を実施した：

- ・ルールベース（3モデル）
 - Derek Nexus 6.5.0 (Nexus 2.9.0; Lhasa, Ltd. UK)：以下Derekと呼ぶ
 - Ames mutagenicity non-kinetic v.21.21 (OASIS TIMES 2.34.1; LMC Bulgaria)：以下TIMES non-kineticと呼ぶ
 - Ames Mutagenicity S9 activated kinetic v.06.06(OASIS TIMES 2.34.1)：以下TIMES kineticと呼ぶ
- ・統計ベース（1モデル）
 - GT1_BMUT 1.9.2.4 (Case Ultra 1.9.2.7; MultiCASE Inc. USA)：以下CASE Ultraと呼ぶ

DerekではEQUIVOCAL、PLAUSIBLE、PROBABLEを陽性、INACTIVEを陰性と判断した。TIMESの2つのモデルでは、*in vitro* Ames negativeを陰性、*in vitro* Ames positiveを陽性とした。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。

更に、前述の「香料化合物使用量調査結果」に記載があった全ての18類香料（全香料）に対し、上記と同じバージョンのDerekとCASE UltraによるQSAR予測を行った。

（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

使用量の多い200の18類香料の遺伝毒性試験情報

最初に昨年度報告書でも言及した、Comptoxにおける陽性のデータ数が多い状況について精査を行った。データに注目して確認した所、図1a～1cに示すように、COSMOSをソースとするデータではほぼ

陽性となる傾向が見られた。しかしながら、実際に使用量番号1のethyl maltol (CAS番号4940-11-8)をComptoxで検索すると、Comptox画面上では*in vivo*小核試験で陽性であったが、<https://cosmostox.org/>（以下、COSMOS DB）で検索をすると、*in vivo*小核試験が陰性であった。なお、使用量番号1のAmes試験結果については、Comptox、COSMOS DBでいずれの画面上でも陽性であった。次に、使用量番号7の α -limonene (CAS番号5989-27-5)をComptoxで検索すると、Comptox画面上では陽性だがCOSMOS DBで検索すると陰性であった。

（2025年4月2日現在）このように、COSMOS DBそのものの情報とComptoxに反映された情報に齟齬が生じている現状のため、以降の解析ではComptoxのデータを用いる際にはCOSMOSをソースとする情報を含めないこととした。

表1に情報収集で得られた遺伝毒性試験の概要を示す。Ames試験は133香料(66.5%)で情報が得られ、18/133つまり14%がいずれかの情報源で陽性の試験結果であった。なお、*in vitro*染色体異常試験や遺伝子突然変異試験などAmes試験以外の*in vitro*遺伝毒性試験情報は79香料(39.5%)で得られ、そのうち26/79つまり33%で何らかのデータで陽性が見られた。同様に*in vivo*試験では38香料(19%)で試験情報が得られ、そのうち7/38つまり18%で何らかの試験で陽性が見られた。

Ames試験情報に注目して18類毎に分布を整理し、後述するAmes/QSAR予測の結果と共に表2にまとめた。使用量が多かった200の18類香料で占める割合は多い順にエステル類、ケトン類、脂肪酸類、ラクトン類、脂肪族高級アルコール類、テルペン系炭化水素類と続くが、それぞれAmes試験の情報が得られている割合は49(=33/67*100)、75(=24/32*100)、71(=17/25*100)、59(=10/17*100)、80(=12/15*100)、100(=10/10*100)%であった。エステル類でAmes試験の情報少ない傾向が見られた。Ames試験陽性の結果

が得られたのは18香料であるが、そのうちケトン類が10香料であった。

Ames/QSAR 結果概要

使用量が多い 200 の 18 類香料（使用量番号 200 までの香料）のうち、使用量番号 39 の(5or6)-decanoic acid、使用量番号 191 の 6-[(5or6)-decenoyloxy]decanoic acid については構造が複数存在した。使用量番号 39 は 5-decanoic acid と 6-decanoic acid の両方、使用量番号 191 は 6-[5-decenoyloxy]decanoic acid と 6-[6-decenoyloxy]decanoic acid の両方の構造に対し QSAR を実施した。結果として、使用量番号 39、191 のそれぞれの構造において今回用いた全 4 種類の Ames/QSAR モデル(Derek、CASE Ultra、TIMES の 2 種類のモデル)の予測結果が陰性だったため、使用量番号 39 と 191 は、予測結果が陰性となる香料として分類した。なお、使用量番号 131 の butter esters は Ames/QSAR 予測を行うのに必要な構造情報を得ることができないため Ames/QSAR 予測の対象から除外した。結果として、199 香料が Ames/QSAR 予測結果で考察することが可能であった。

なお、調査可能であった 18 類香料（全香料）は 1714 香料存在したが、Ames/QSAR 予測が可能なのは 1702 香料であり 12 香料では構造情報が不定等の理由で Ames/QSAR の実施が出来なかった。1702 香料のうち、35 香料で複数の構造がみられ、予測対象となる構造そのものは 1765 であった。全香料では、使用量が多い 200 の 18 類香料の場合とは異なり、例えば使用量番号 842 2-(furfurylthio)-(3or5or6)-methylpyrazine では、3 構造が存在するが、そのうち 2 種類の構造では CASE Ultra で予測結果が inconclusive（ここでは陽性と判断）である一方、1 構造 CASE Ultra 陰性であった。この様に 1 香料において予測結果が分かれる構造が存在するため、全香料においては Ames/QSAR 予測は構造ごとに整理と解析を行った。

使用量が多い 200 の 18 類香料に対し

TIMES の 2 モデルを含む 4 種類の QSAR モデル全てで陰性の物質は 168 香料（陽性は 31 香料、1 香料は統計ベース Out of Domain とルールベース陰性）、Derek と CASE Ultra の 2 モデル両方で陰性は 176 香料（陽性は 22 香料、1 香料は統計ベース Out of Domain とルールベース陰性）であった。表 3 に示した 8 香料については Derek と CASE Ultra いずれも陰性予測で、TIMES のいずれかのモデルで陽性予測であった。

全香料では Ames/QSAR 予測が可能であった 1702 香料の 1765 構造のうち 1547 構造において、Derek と CASE Ultra いずれも陰性予測になった。

18 類香料の分布状況に注目した分類を図 2 に示した。使用量が多い 200 の 18 類香料のうち 16%をケトン類が占めるが、Derek と CASE Ultra で両方陰性並びに全 4 種類の QSAR のモデルで陰性の条件を課すと、それぞれ 13%並びに 11%となり、QSAR 陰性の割合が少ない傾向が示された。

なお、全香料ではケトン類の割合が 13%となり、Derek と CASE Ultra で両方陰性の条件下でのケトン類の割合 12%であった。全香料の中では、ケトン類では QSAR 陰性条件下で、（全香料に）占める割合が低くはならない傾向であった。

QSAR 予測結果と Ames 試験結果の整理

使用量が多い 200 の 18 類香料のうち TIMES のいずれかのモデルで陽性であるが、Derek と CASE Ultra では全て陰性に該当するのは 8 香料であった。Ames 試験結果を確認した所、表 3 で示す通り、6 香料において Ames 試験で陰性、2 香料で情報なしであった。Ames 変異原性以外のエンドポイントの試験情報では、ケトン類に含まれる 1 香料（使用量番号 16）だけ *in vitro* 遺伝毒性試験(姉妹染色分体交換試験)で陽性が見られたが、他は全試験で陰性であった。また、使用量番号 16 の香料は Ames 試験陰性の情報が得られている。一方、遺伝子突然変異試験陰性と染色体異常

試験陰性で Ames 試験情報が得られなかった 1 香料(使用量番号 112)といずれのエンドポイントでも試験結果情報が得られなかった 1 香料(使用量番号 162)については、TIMES の 2 モデルのうち従来の non-kinetic モデルでは陽性、近年導入された kinetic モデル(Computat. Toxicol. 22, 100222.)では陰性の予測であった。以上、少なくとも使用量が多い 200 の香料において、Derek と CASE Ultra の 2 種類のモデルでいずれも陰性で TIMES 陽性の条件では、Ames 試験で陽性が見落とがないと整理できた。よって、以降の議論では、Derek と CASE Ultra の 2 種類のモデル(つまり、ルールベースと統計ベース各 1 モデル)を用いた予測結果で検討を進めることとした。

図 3 に 2 種類の QSAR で陽性の予測結果となった類をグラフ化した。使用量が多い 200 の 18 類香料で占める割合が一番多いエステル類よりもケトン類の方が陽性となる香料数が多くなった。そのほかの留意点は、200 のうち 3 香料存在するイソシアネート類は両方またはいずれかの QSAR モデルで陽性となった。

図 4 には図 3 で示した「2 種類の QSAR 両方又はいずれか陽性予測(少なくとも 1 つ陽性)」で Ames 試験陽性(左)および Ames 試験陰性(右)の数と割合を示した。ケトン類は少なくとも 2 種類の QSAR のうち 1 つで陽性である 10 香料のうち 9 香料で Ames 試験陽性であった。エステル類については 2 種類の QSAR 両方で陽性の 3 香料のうち 2 香料で Ames 試験陽性となり、脂肪酸アルデヒド類について 2 種類の QSAR 両方で陽性の 2 香料いずれも Ames 試験陽性となった。イソシアネート類とフルフラール類でいずれかの QSAR で陽性となった香料については、いずれも Ames 試験陰性であった。なお、5 香料で Ames 試験陽性でいずれの QSAR 予測結果が陰性であり、それぞれエーテル類、ケトン類、脂肪酸高級アルコール類、脂肪酸高級アルデヒド類、フェノールエーテル類に分類された。

なお、2 種類の QSAR いずれも陰性の 176 香料のうち Ames 試験陰性は 110 香料、統計ベースモデル Out of Domain でルールベース陰性で Ames 試験陰性は 1 香料存在した。

D. 考察

国内での年間使用量が多い順に 200 番目までの香料のうち Ames 試験陽性の割合は 14 % であった。この割合は第 1 回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクト(Honma, et al. Mutagenesis 34, 3-16)で予測対象とした 12140 物質のうち 14.4 % が陽性であったことから、妥当な割合だと考えられる。なお Ames 試験以外の *in vitro* 遺伝毒性試験で陽性の結果となる割合が高くなった要因は、Ames 以外の *in vitro* 試験では複数の試験に対して少なくとも 1 つの試験で陽性という条件を課していたことが挙げられる。*in vivo* 遺伝毒性試験についても、もともと何らかの *in vitro* 遺伝毒性試験で陽性の結果が得られている香料を対象としていた。今回の調査では、エンドポイントの定義や試験の品質を精査せずに網羅的に調査した結果であることから、実際の評価では注意深く検討し、整理することが必要である。

図 2 に示した 18 類の割合に注目するとリスト化された全ての 18 類香料(全香料)と使用量が多い 200 の 18 類香料いずれにおいても、エステル類とケトン類を合わせた数で、半数弱の香料が網羅されていることが示された。使用量が多い 200 の 18 類香料までの調査で全香料の類をうまくサンプリングできていると解釈できる。ただし、ケトン類よりもエステル類の方が、収集可能な試験情報の量が少ない傾向であった。これは、ケトン類で Ames 試験陽性の物質が多いため、類似構造を有するケトン類も優先して試験されているためだと推察される。

一方でエーテル類、チオエーテル類の占める割合が全香料では高く、脂肪酸類、ラクトン類の占める割合は「使用量が多い 200 香料」では高くなる傾向が見られた。本年度の

遺伝毒性試験情報調査では、エーテル類やチオエーテル類の情報の割合が少なくなることから、今後の検証や実際の評価を行う段階において、既存遺伝毒性試験情報を収集する際にはエーテル類やチオエーテル類を優先すると類のバランスが取れると期待される。

使用量が多い200の18類香料において、試験結果が得られない香料が67香料であり、うち2種類のQSARともに陰性は61香料であった。Ames試験も2種類のQSARも陰性は110香料、Ames試験陽性でいずれか一つのQSAR予測が陽性は5香料であった。試験情報が得られている2種類のQSAR陰性の香料のうちAmes試験陰性なのは95%を超えていた。使用量が多い200の18類香料の既存Ames試験情報でQSARモデルそのものが十分にトレーニングされていると見込まれる背景もあるが、遺伝毒性試験情報が全く得られていない香料をスクリーニングするのにルールベースモデルと統計ベースモデルの2種類のQSARを用いることは妥当だと見込まれる。

Ames試験試験結果で陽性であった香料もいずれかのQSAR予測で陽性となった数もケトン類で突出して多い結果となった。もともとアルデヒドや α,β -不飽和カルボニル化合物等など懸念となる構造が含まれる類であることも要因として挙げられる。評価スキーム案を構築する際もケトン類を優先させることが妥当である。

以上の結果と考察を総括し、令和7年度の本研究課題の報告書では図5のスキーム案を提案した：最初に、本研究で用いた情報源による網羅的・簡易的な、遺伝毒性試験情報収集を実施し、陽性懸念の記載があれば優先順位1とする。次に2種類のQSARを実施し、両方陽性予測またはケトン類を優先順位2、いずれかのQSARで陽性予測を優先順位3とする。更に、両方のQSAR予測で陰性では、懸念がある構造を含むものを優先順位4、懸念がないものを優先順位5とする。

優先順位4を設けた背景として、使用量が

多い200の18類香料のうち5香料がQSAR陰性であってもAmes試験陽性であり、遺伝毒性試験情報がない場合には偽陰性となることが挙げられる。今後、偽陰性を減らす方法についても検討することが必要である。更に、使用量リストに記載がある香料の約9割において2つのQSARモデル両方で陰性予測となり、9割の香料の中での優先順位付けも必要になり、優先順位4の存在が重要である。以上、偽陰性の排除と評価の効率化の両方の観点から、図5の優先順位4と優先順位5に分けるための懸念構造の考察（または概念）が重要である。また、今回用いた特定のモデル以外の、統計ベースやルールベースモデル一般に評価スキームが拡張できるかの検証や、Ames試験以外のエンドポイントの遺伝毒性試験情報を加味する方法に関しても検討の余地がある。

E. 結論

本研究課題ではこれまで構築してきた、国内での使用量が多い200の香料に関するAmes/QSAR予測と国内外の遺伝毒性試験情報を収集ならびに情報のソースについて更なる精査を実施し、Comptoxの情報源のうちソースがCOSMOSである情報に留意する必要があること、現時点の使用量が多い200の18類香料の収集情報の範囲内では4種類ではなく2種類のQSARでの予測でAmes試験陽性情報の抜け落ちがないことを示した。使用量が多い200の18類香料の情報では、2種類のQSARいずれも陰性でAmes試験陰性が担保される傾向ではある一方、ケトン類でAmes試験陽性となる懸念が高いことが示された。以上、得られた結果を整理して、2種類のQSARにおける陽性予測が存在するか否かとケトン類に注目した現時点における評価スキーム案を提案した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

- 1) Koyama N, Furuhama A, Kruhlik NL, Shinada NK, Izawa K. Potential for Computational Genotoxicity: A Report on Symposium 3 of the 53rd Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen and Genome Society (JEMS), 2024. Genes Environ. 2026 Mar 12;48(1):8. doi: 10.1186/s41021-026-00358-y.
- 2) Sugiyama K, Furuhama A, Horibata K, Tsuda M, Izawa K, Tsuji G, Demizu Y, Matsushita K, Toyoda T, Hirabayashi Y, Saito Y, Honma M. Assessment of mutagenic potential of puberulic acid contaminated in red yeast rice (beni-koji) health food supplements. Mutagenesis. 2026 Feb 5;41(3): 110–118. doi: 10.1093/mutage/geag005.

G-2. 学会発表

- 1) 古濱彩子、亀山暁子、本間正充、杉山圭一 : *in silico*香料スクリーニング評価法検討に関する遺伝毒性データ解析、第53回構造活性相関シンポジウム 2025年9月 大阪

- 2) A. Furuham : Beyond Big Data Analysis: Learn from the 2nd AMES/QSAR International Challenge Project, the 15th Global Summit on Regulatory Science (GSRS25) Annual Conference 2025 年9月 スイス・ローザンヌ
- 3) 古濱彩子、亀山暁子、杉山圭一、本間正充 : *in silico*香料スクリーニング評価法検討に関する遺伝毒性データ解析と考察 第2回千葉大学薬学部・国立医薬品食品衛生研究所交流会 2026 年2 月 千葉

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

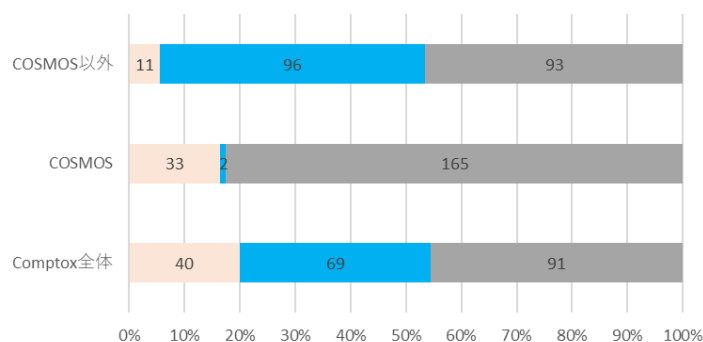
該当なし

H-3. その他

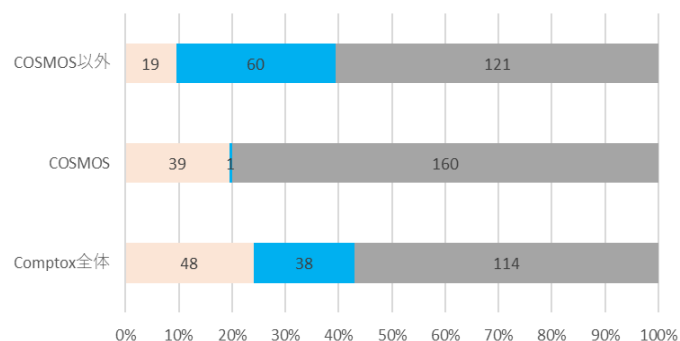
該当なし

別添 4

(a) Ames 試験



(b) Ames 試験以外の *in vitro* 試験



(c) *in vivo* 試験

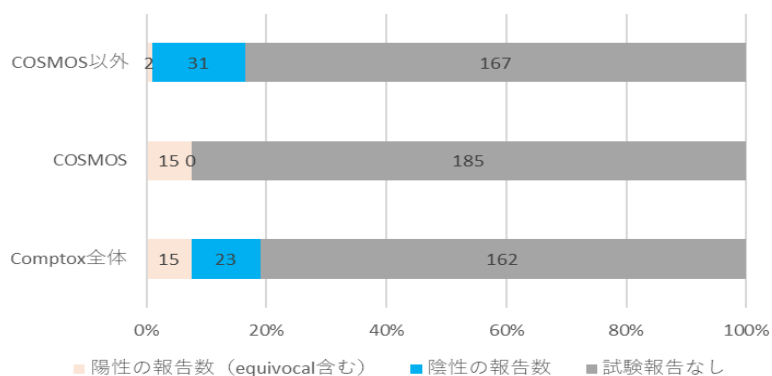


図1 国内での年間使用量が多い200の18類香料のComptoxでの遺伝毒性試験情数

- ・ 少なくとも1データ・1エンドポイントで陽性ならば陽性とカウントした。
- ・ COSMOS 以外とは Comptox でのソースが eChemPortal、Kirkland_2005_2011、NTP、SCCS、TOXNET であるデータの内訳である。
- ・ COSMOS とは Comptox で COSMOS DB (<https://cosmostox.org/>) をソースとしたデータの内訳である。
- ・ COSMOS DB とそれ以外のソースの情報を両方含む場合があるため、Comptox 全体の陽性/陰性数が COSMOS 以外と COSMOS の陽性/陰性数の和に合致しない。

別添 4

表 1 国内での年間使用量が多い 200 の 18 類香料の遺伝毒性試験情報数†

	Ames 試験	Ames 試験以外の <i>in vitro</i> 試験	<i>in vivo</i> 試験	遺伝毒性試験‡
すべての情報源で陰性	115	53	31	100
少なくとも 1 エンドポイント又は情報源で陽性 ※	18	26	7	37
情報なし	67	121	162	63

†Ames 試験情報：既存化学物質の Ames 試験情報、職場のあんぜんサイトの Ames 試験、職場のあんぜんサイトの SDS、笠松論文、小野論文、Hansen 論文、Comptox (ソースが COSMOS 以外)、QSAR Toolbox、NTP の情報源で試験情報が得られた香料数。Ames 以外 *in vitro*、*in vivo* 遺伝毒性試験情報：既存化学物質の遺伝毒性試験情報・職場のあんぜんサイトの SDS・Comptox(ソースが COSMOS 以外)、QSAR Toolbox、NTP のソースで少なくとも 1 エンドポイントの 1 試験において情報が得られた香料数。

‡Ames 試験、Ames 試験以外の *in vitro* 遺伝毒性試験情報、*in vivo* 遺伝毒性試験情報の少なくとも 1 試験で遺伝毒性試験情報が得られた香料数

※陽性の数は、1 つの香料に対し、陰性の試験数に関わらず 1 エンドポイントの 1 試験において陽性 (equivocal) の情報が得られた場合の数であり、表 3 の記載以外は Comptox の COSMOS DB のソース確認以外に行っていない。データベース上に記載がある試験の信頼性確認は行っていない。原著論文での試験結果においても、陽性 (equivocal を含む) が 1 件でもあると陽性の香料としてカウントしている。

別添 4

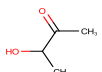
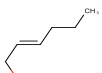
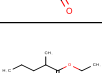
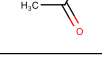
表 2 国内での年間使用量が多い 200 の 18 類香料の 2 種類（Derek と CASE Ultra）の QSAR 陰性予測・Ames 試験有・Ames 試験陽性の数[†]

		年間使用量が多い200の香料							
類番号	18香料分類	使用量が多い 200の香料の 数		2種類の QSARで陰性 予測数		Ames試験情報有の数 ※3	Ames試験情報陽性の 数※3	2種類のQSARで陰性 予測かつAmes試験情 報有の数※3	2種類のQSARで陰性 予測陰性かつAmes試 験情報陽性の数※3
1	イソシアネート類	3		0		1	0	0	0
3	エーテル類	4		4		1	1	1	1
4	エステル類	67	※0	61		33	2	31	0
5	ケトン類	32		22		24	10	14	1
6	脂肪酸類	24	※1	23	※2	17	0	16	0
7	脂肪族高級アルコール類	15		15		12	1	12	1
8	脂肪族高級類	5		3		5	3	3	1
10	チオエーテル類	4		4		2	0	2	0
11	チオール類	1		1		1	0	1	0
12	テルペン系炭化水素類	10		10		10	0	10	0
13	フェノールエーテル類	3		3		3	1	3	1
14	フェノール類	6		6		6	0	6	0
15	フルラル及びその誘導体	2		0		2	0	0	0
16	芳香族アルコール類	4		4		4	0	4	0
17	芳香族アルデヒド類	3		3		2	0	2	0
18	ラクトン類	17		17		10	0	10	0

別添 4

†Ames 試験情報は表 1 の記載を参照のこと

表 3 国内での年間使用量が多い 200 の 18 類香料のうち 2 種類の QSAR モデル (Derek と CASE Ultra) で陰性予測であり、TIMES のいずれかのモデルで陽性予測になる 8 香料とその遺伝毒性試験情報

使用 量番 号	18類	名称	CAS RN	構造	QSARモデル予測結果			Ames試験 (情報源・コメント)	in vitro Ames以外 (情報源・コメント)	in vivo (情報源・コメント)
					Derekと CASE Ultra	TIMES non- kinetic model	TIMES kinetic model			
16	ケトン類	cyclotene	80-71-7		両方陰性	陽性	陽性	陰性(小野論文、Hansen論文、Toolbox、TNPデータで陰性。)	陽性 (ComptoxでTOXNETをソースとするデータで姉妹染色分体交換試験陽性)	情報なし
19	ケトン類	acetoin	513-86-0		両方陰性	陽性	陰性	陰性 (職場のあんぜんサイトSDS、小野論文、Toolbox、TNPデータで陰性) ※	情報なし (ComptoxのCOSMOSをソースとするデータで染色体異常試験陽性であったが、信頼性に疑問があるため加味しない)	陰性 (小核試験。NTPデータで陰性)
48	脂肪族高級 アルコール 類	trans-2-hexenol	928-95-0		両方陰性	陽性	陰性	陰性 (ComptoxでeChemPortalをソースとするデータで陰性)	情報なし	情報なし
101	ケトン類	2-pentanone	107-87-9		両方陰性	陽性	陰性	陰性 (職場のあんぜんサイトSDS、Hansen論文、Toolbox、ComptoxでeChemPortalをソースとするデータ、TNPデータで陰性)	陰性 (ComptoxでeChemPortalをソースとするデータ遺伝子突然変異試験陰性)	情報なし
112	エステル類	ethyl 2-methylpentanoate	39255-32-8		両方陰性	陽性	陰性	情報なし	陰性 (ComptoxでeChemPortalをソースとするデータ遺伝子突然変異試験陰性、染色体異常試験陰性)	情報なし
120	エステル類	allyl heptanoate	142-19-8		両方陰性	陽性	陰性	陰性 (職場のあんぜんサイトSDS。ComptoxでeChemPortalをソースとするデータで陰性)	陰性 (ComptoxでeChemPortalをソースとするデータ遺伝子突然変異試験陰性、染色体異常試験陰性)	情報なし
138	ケトン類	2-butanone	78-93-3		両方陰性	陽性	陰性	陰性 (職場のあんぜんサイト、小野論文、Hansen論文、Toolbox、TNPデータで陰性) ※	陰性 (職場のあんぜんサイトSDSで遺伝子突然変異試験、染色体異常試験で陰性。ComptoxのTONETおよびeChemPortalで同試験に加え、DNA傷害及び修復試験で陰性) ※	陰性 (職場のあんぜんサイトSDSとComptoxのechemportalをソースとするデータでは小核試験陰性) ※
162	脂肪酸類	4-pentenoic acid	591-80-0		両方陰性	陽性	陰性	情報なし	情報なし	情報なし

※Comptox の COSMOS をソースとするデータでは記載されたエンドポイントで陽性があったが、信頼性に疑問があるため加味しない。

別添 4

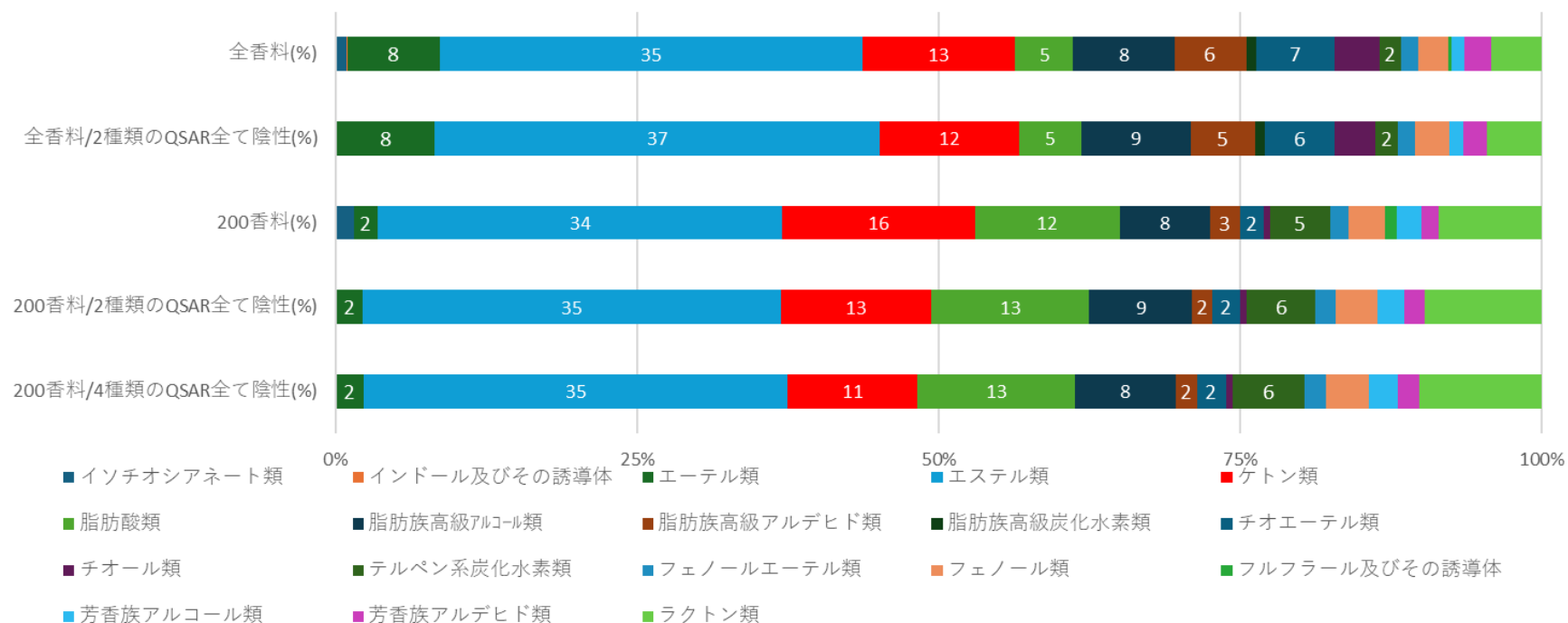


図2 情報が得られた18類香料（全香料）と国内での年間使用量が多い200の18類香料（200香料）のQSAR陰性に注目した整理[†]

1 番目：全香料 1714 の18類類の分布。

2 番目：全香料 1714 のうち QSAR 可能な 1704 香料の 1765 構造において 2 種類の QSAR(Derek と CASE Ultra)でいずれも陰性予測となった 1547 構造の18類香料の分布。

3 番目：使用量が多い 200 香料の18類香料の分布。

4 番目：使用量が多い 200 香料のうち 2 種類の QSAR(Derek, CASE Ultra) でいずれも陰性予測であった 176 の18類香料の分布。

5 番目：使用量が多い 200 香料のうち 4 種類の QSAR(Derek, CASE Ultra, TIMES の 2 モデル)すべてで陰性予測であった 168 の18類香料の分布。

[†]Ames 試験情報源は表 1 の記載を参照のこと

別添 4

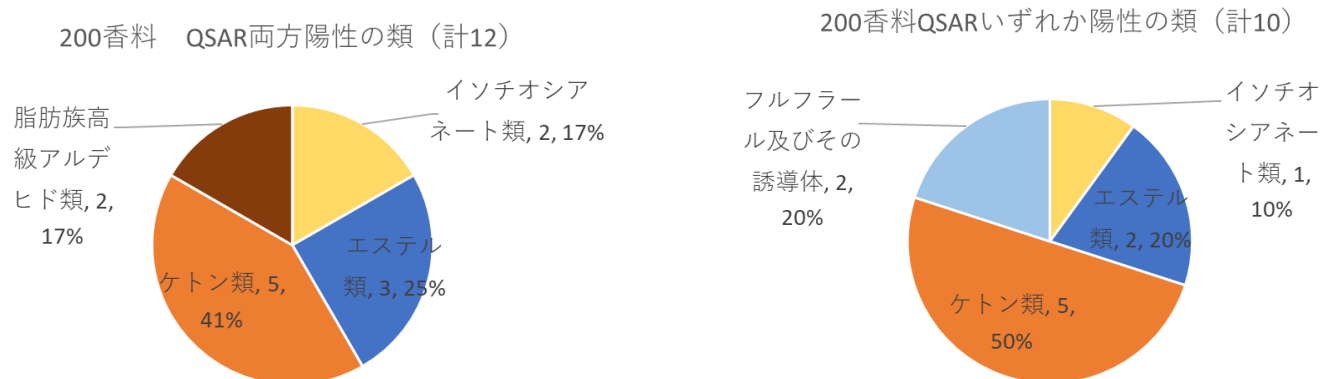


図 3 国内での年間使用量が多い 200 の 18 類香料 (200 香料) で 2 種類の QSAR 両方(左)およびいずれか(右)陽性予測の類毎の数と割合[†]
[†]Ames 試験情報源は表 1 の記載を参照のこと

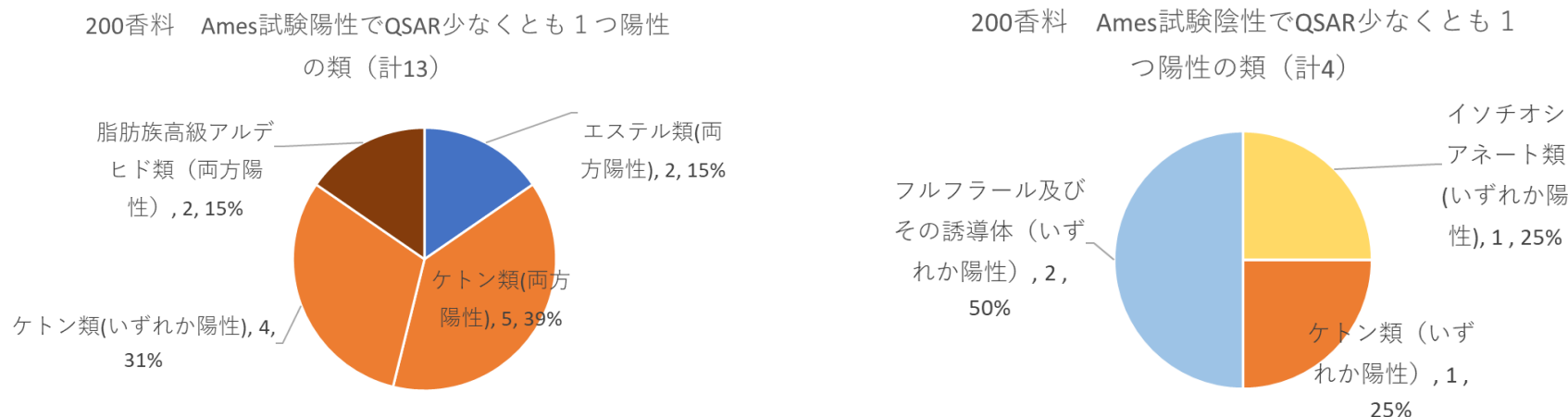


図 4 国内での年間使用量が多い 200 の 18 類香料 (200 香料) で「2 種類の QSAR 両方又はいずれか陽性予測 (少なくとも 1 つ陽性)」で Ames 試験陽性 (左) および Ames 試験陰性 (右) の数と割合。[†]
[†]Ames 試験情報源は表 1 の記載を参照のこと

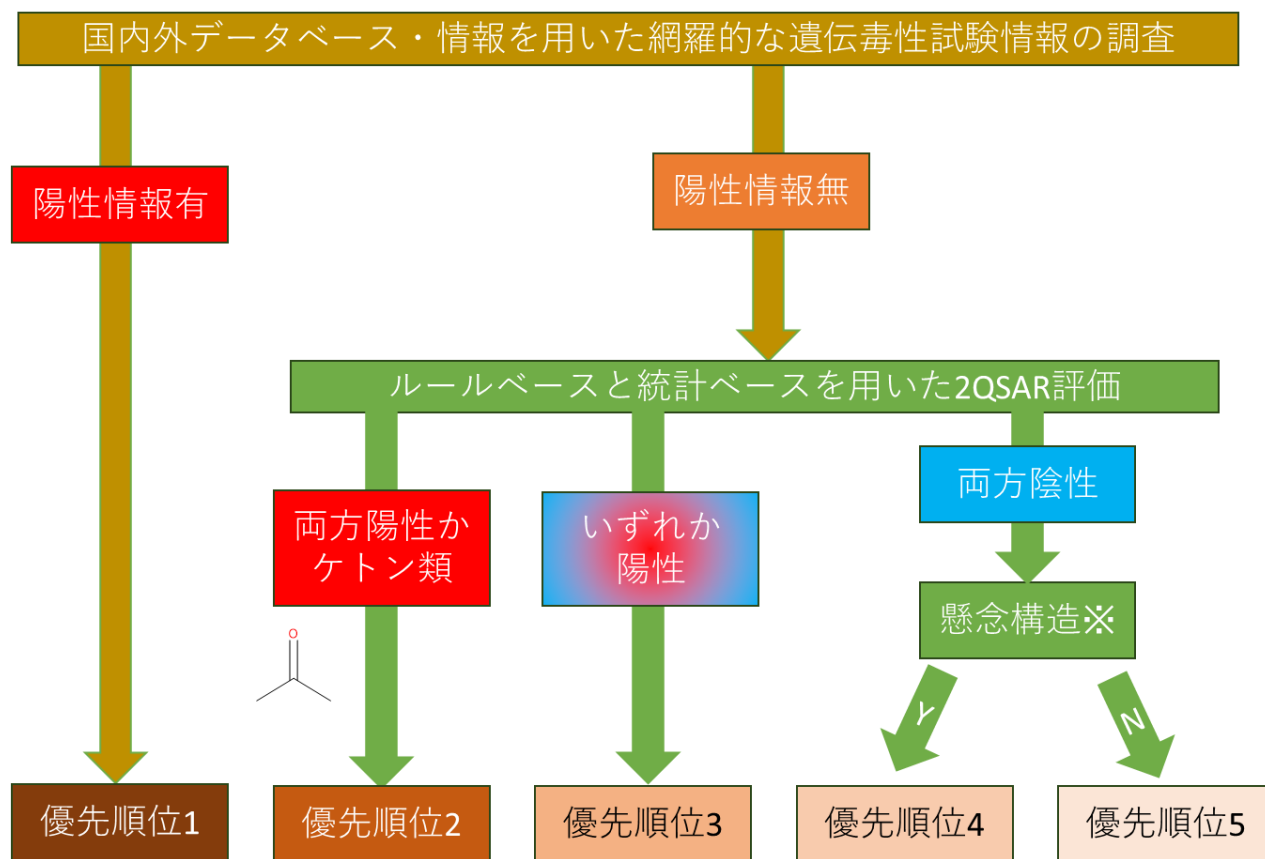


図 5 令和 7 年度 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）

「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 「*in silico* 手法を用いた香料スクリーニング評価法の提案」における遺伝毒性評価を行う優先順位のスキーム案

令和7年度 食品衛生基準科学研究費（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：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

研究分担者： 本間 正充 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： 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

Ames 試験の陽性結果は医薬品や食品添加物等の開発に多大な影響を及ぼすが、そのフォローアップとして実施される in vivo トランスジェニック動物試験（TG 試験）は、コストや動物愛護の観点から負担が大きい。Ames 試験陽性反応がバクテリア特異的な機序やヒトへの外挿性が低い代謝経路に起因する場合、これを in vitro で証明できれば不必要な in vivo 試験を回避できる可能性がある。また、近年活用が進む Ames/QSAR 予測も、Ames 試験特有の問題を継承している可能性がある。本研究では、in vitro と in vivo の遺伝毒性結果が矛盾する香料物質、4-メトキシシンナムアルデヒド（MCA）および6-メトキシキノリン（MQ）に着目した。両物質は Ames 試験および QSAR 予測で陽性、標準的なチミジンキナーゼ遺伝子突然変異試験（TK6 試験）でも代謝活性化条件下で弱陽性を示す一方、in vivo 試験（MCA が小核試験陰性、MQ が gpt delta 試験陰性）では陰性である。それらの結果が矛盾する原因として、in vitro 試験系におけるグルタチオン（GSH）/グルタチオン S-トランスフェラーゼ（GST）による解毒能の不足を仮定し、検証を行った。ラット肝 S9 中に含まれる GST を機能させるため、1 mM GSH を補充した TK6 試験（GSH-TK6 試験）を実施した。その結果、TK6 試験で観察された MCA および MQ による変異体頻度の上昇は、GSH-TK6 試験では有意に抑制され、陰性の判定となった。GSH 補充の有無によって遺伝毒性が不活化されたことは、MCA および MQ の in vivo 試験の陰性結果と一致しており、GSH/GST 代謝解毒が両剤の様々な生体内代謝の中で中心的な役割を果たしていると考えられた。生体内の GSH が比較的高濃度（1～10 mM）に存在していることから、in vitro 試験においても GSH を補充しフォローアップすることで、in vivo 試験との相関性を高められる科学的根拠（作用機序）になりうることを示唆された。

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の反応

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

別添 4

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な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。

10 種類の食品香料のうち、4-メトキシシナマルデヒド (MCA) は、Ames/QSAR 予測で陽性、Ames 実試験で弱い陽性 (代謝活性化条件下)、そして標準的なチミジンキナーゼ遺伝子突然変異試験 (TK6 試験) では代謝活性化条件下で弱い陽性を示す (Fig. 1、Table 1)。また、6-メトキシキノリン (MQ) は、Ames/QSAR 予測で陽性、Ames 実試験で強い陽性 (代謝活性化条件下)、そして TK6 試験では代謝活性化条件下で弱い陽性を示す (Fig. 1、Table 2)。

一方、MCA の *in vivo* 小核試験 (Thakkar Y, *et al.* *Mutagenesis* 37, 89-111 (2022))、および MQ のトランスジェニック動物 (gpt delta ラット) を用いる

肝臓および腺胃における遺伝子突然変異誘発試験 (国立医薬品食品衛生研究所 病理部 (Takasu *et al.* Unpublished data)) について、両剤はともに陰性である。つまり、MCA および MQ は Ames 菌株では陽性を示すが、代謝が十分に働く動物個体を用いる *in vivo* 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細胞を用いる *in vitro* TK6 試験では、MCA および MQ 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された (Table 1, 2)。

そこで本研究では、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) で、MCA および MQ の遺伝毒性を調べた。その結果、GSH を用いない通常の TK6 試験における MCA および MQ の弱い陽性反応は、GSH 補充によって、それぞれの突然変異体頻度が抑制されることが分かった。GSH 補充するかしないかだけの違いによって遺伝毒性が陽性から陰性になった。つまり、GSH/GST が MCA および MQ の遺伝毒性を不活化した証拠となるだけでなく、生体内の GSH が比較的高濃度 (1~10 mM) に存在していることから *in vitro* 試験でもフォローアップできる科学的根拠になりうると考えられた。

B. 研究方法

B-1. 細胞と培養

ヒトリンバ芽球細胞 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. *in vitro* 小核試験

原則として OECD ガイドライン TG487 に従っ

別添 4

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を作製した。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は富士フィルム和光純薬工業から購入した。本研究では、MCAおよびMQの処理によって示される相対的細胞集団倍加数(Relative Population Doubling: RPD)が50%程度となる用量を求め、その用量におけるGSH非補充、およびGSH補充量を1、2、4、8mMと変化させて、各小核形成細胞数を測定した。有意差検定はフィッシャーの直接確率検定(有意水準 $p < 0.05$)を用いた。

B-3. GSH-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MCAおよびMQは、関東化学株式会社から購入した(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 10^7 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の最終濃度は、1mM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、MCAおよびMQ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。

(倫理面への配慮)

TK6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。

C. 研究結果、および考察

C-1. MCAのGSH-TK6試験

MCAは、Ames試験の代謝活性化条件下で陽性(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通常のTK6試験をすでに実施している。その結果、MCAの600 μ M用量群でMF値は、 14.6×10^{-6} であり、未処理群のそれが 4.5×10^{-6} であるため、有意差検定により陽性の判定であった。MF値が 10×10^{-6} をわずかに超える程度であるため、専門家判断として弱い陽性であると判定した(令和3年度 厚生労働科学研究費補助金)。

本年度では、この600 μ Mを最高用量とする等差100 μ Mの500、400 μ M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(Fig. 2)。Fig. 2の-GSH群は、通常のTK6試験と同一であり、上と同じ用量の600 μ M処理群のMF値では、約 20×10^{-6} 程度まで上昇し、令和3年度と同様に陽性と判定された。一方、+GSH群の500、600 μ M用量であっても、それぞれMF値は 10×10^{-6} 未満であり、未処理群のMF値とほぼ同程度であり、有意差検定を実施したところ陰性の判定であった(Fig. 2)。

引き続き、同じ実験を繰り返す確認試験を実施したところ、Fig. 3に示した通り、-GSH群は1回目と同じ陽性の結果が得られたが、+GSH群では500、600 μ M用量で、それぞれMF値は5.3、 10×10^{-6} であり、有意差検定の結果、陽性判定であった。我々は、その弱い陽性反応の原因は、1mMのGSH補充では抑制できなかったと推測した。

そこで、MCAのin vitro小核試験(DNA損傷性試験)を実施した。MCAに対して小核試験の用量設定試験を行い、細胞処理から24時間後に細胞毒性(PRD値)が50%となる用量が370 μ Mであることから、その用量を採用して、GSH濃度(0、1、2、4、8mM)を変化させて小核形成細胞を計測した(Supplementary Fig.1(A))。GSH非補充では36%程度の細胞毒性であったが、GSH濃度が高く

別添 4

なるとともに緩和され、80%程度まで回復した。また、それらの小核形成細胞数（1000 個あたり）は、GSH 非補充では 30 細胞程度であったが、GSH 濃度が高くなるとともに 10 細胞程度まで顕著に減少した。小核試験と GSH-TK6 試験とでは、細胞毒性指標やエンドポイントが異なるため直接比較することはできないが、GSH 補充量を高くすると遺伝毒性も抑制される。つまり、GSH 補充量が 1 mM 条件の GSH-TK6 試験では、MCA による変異体頻度を十分に抑制できず、より高濃度の GSH 補充ではそれを抑制できることが考察できる。4 mM GSH 条件での追加検討が必要であるが、現時点の結果は GSH/GST 関与を強く示唆しており、専門家判断として MCA の GSH-TK6 試験の確認試験結果は陰性と判定した。

参考データとして、GSH 濃度を高くしても小核細胞数が減少しない例として、アリストロキア酸 I (AA-I) の結果を Supplementary Fig.1(C)に示した。74.1 μ g AA-I は、細胞処理から 24 時間後に細胞毒性が約 50 %になる用量である。GSH 濃度を 0、1、2、4、8 mM のように変化させても、AA-I に対する細胞毒性は緩和されず、8 mM GSH であっても約 50%付近であった。また同様に、GSH 濃度を高くしても AA-I によって誘発する小核細胞数（DNA 損傷性）も変化しなかった（Supplementary Fig.1(C)）。つまり、AA-I は、GSH と反応あるいは、GSH/GST による抱合反応を受けないことが分かる。このことから、先述のとおり、MCA は GSH 補充の有無によって、細胞毒性が緩和し、DNA 損傷性（小核細胞数）も抑制されたことから、より高濃度の GSH 補充をした GSH-TK6 試験を実施すれば、陰性となることが容易に推測できるため専門家判断として陰性と判定した。

Table 1 に示した通り、MCA の Ames 試験結果は、代謝活性化条件下で弱い陽性だが、再現性のある明確な陽性を示し、Ames/QSAR でも統計ベースと知識ベースともに陽性判定である。一方、マウスあるいはラットを用いた *in vivo* 小核試験

では陰性である（Table 1）。動物個体を用いる *in vivo* 小核試験の陰性結果は、Ames 試験の陽性を否定しており、それぞれの試験は、エンドポイントが染色体異常誘発性と突然変異誘発性であり、検出しているものが異なるものの、動物個体は正常な GST 活性を有しており、それがすべてではないと思われるが、MCA の解毒に GSH/GST が間違いなく関与していると考えられる。つまり、実験動物を用いない本研究において、GSH を補充しただけの GSH-TK6 試験で陰性の結果が得られたことから、MCA が陽性から陰性へ総合判定が変わったことは、GSH/GST の働きによるものであると根拠を示すことができる。GSH-TK6 試験は、陰性陽性の判定だけでなく、GSH/GST 機能の関与も同時に根拠づけできる有用な実験系であることが確認できた（Table 1）。

Fig. 6(A)に示したとおり、MCA は α, β -不飽和炭素を有しており、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、MCA の β -炭素に付加するマイケル付加反応することによって、MCA の遺伝毒性が不活化されたと考えられる。Armstrong らによると、GSH 自体の抗酸化作用は生理的条件下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)）。

シンナムアルデヒドの DNA 付加体を PubMed で検索したところ、 α, β -不飽和アルデヒドが DNA と反応すると、主に 2'-deoxyguanosine とマイケル付加反応を起こし、Exocyclic 1,N²-propano-2'-deoxyguanosine 付加体を形成することが報告されている（Kiwamoto et al, *Toxicology in Vitro* 31, 114-125 (2016)）。本作用機序は、昨年度に報告した 4-メチル-2-ペンタナール（4MP）（ α, β -不飽和炭素を有する）が、1 mM GSH の有無によって GSH-

別添 4

TK6 試験で陽性から陰性になったことと一致している。すなわち、MCA も 4MP も共通して、Ames 実試験や Ames/QSAR 予測で陽性、in vivo 遺伝毒性試験では陰性を示す物質であり、バクテリア特異的な反応であると推測できる。Ames 試験は、 α 、 β -不飽和炭素を有する化学物質に対して偽陽性を示す傾向があると考えられることができる。

さらに MCA は、芳香環（ベンゼン環）を有しており、S9 に含まれる CYP によってエポキシ体が生じ、DNA 付加体を形成する可能性がある。GSH/GST は、そのエポキシ体も抱合反応することで DNA との反応を防ぐことができるため、その作用機序においても、GSH 非補充よりも、補充された GSH-TK6 試験では遺伝毒性が陰性となっていると考えられる。すなわち、先述の 4MP の GSH 付加サイトは 1 ヶ所存在するが、MCA のそれは、4MP よりも 2 倍以上の GSH 分子と反応する可能性があるため、遺伝毒性を不活化するために必要な GSH 分子数が必要となる。これまで実験してきた考察として、今回、MCA の確認試験で陽性となってしまった原因は、MCA はマイケル付加とベンゼン環のエポキシ体を抑制するために、1 mM GSH だけでは不足だったということが言えるかもしれない。1 ヶ所しか GSH 付加サイトがない 4MP に関しては、過去に数回 GSH-TK6 試験を実施したが、毎回、1 mM GSH 補充で安定に陰性判定できたからである。この考察は、化学物質毎に同じモル比で定量的な実験をしてみないと分からないが、1 mM GSH あたりに被験物質を何 mol まで遺伝毒性を不活化できるか係数を測定することが可能かもしれない。

C-2. MQ の GSH-TK6 試験

MQ は、Ames 試験の代謝活性化条件下で比活性値 51,177 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 TK6 試験をすでに実施している。その結果、3.3 mM 用量群で

MF 値は、 11.5×10^{-6} 、未処理群のそれが 2.6×10^{-6} であるため、有意差検定で陽性判定となっている。MF 値が 10×10^{-6} をわずかに超える程度だったため、専門家判断として弱い陽性であると判定した（令和 3 年度 厚生労働科学研究費補助金）。

本年度では、3.8 mM を最高用量とする等差 0.5 mM の 3.3、2.8 mM 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（Fig. 4）。-GSH 群は、上と同じ用量の 3.3 mM 処理群の MF 値では、約 15×10^{-6} まで上昇し、令和 3 年度と同様に陽性と判定された。一方、+GSH 群の 3.3、3.8 mM 用量は、それぞれの MF 値が 7.6、 2.8×10^{-6} であり、未処理群の MF 値とほぼ同程度であった（Fig. 4）。有意差検定を実施したところ陰性の判定であった。

引き続き、同じ実験を繰り返す確認試験を実施したところ、Fig. 5 に示した通り、-GSH 群については同じ陽性の結果が得られたが、+GSH 群では 3.3、3.8 mM 用量で、それぞれ MF 値は 10.7、 9.5×10^{-6} であり、有意差検定の結果、陽性判定であった。我々は、その陽性反応の原因は、1 mM の GSH 補充では抑制できなかったと推測した。そこで、MQ の in vitro 小核試験（DNA 損傷性）を実施した。MQ に対して用量設定試験を行い、細胞処理から 24 時間後に細胞毒性（PRD 値）が 50% となる用量が 2 mM であったことから、その用量を採用し、GSH 濃度（0、1、2、4、8 mM）を変化させて小核形成細胞を計測した（Supplementary Fig.1(B)）。GSH 濃度が高くなるとともに、細胞毒性は 50 % から 80 % に緩和し、小核形成細胞数は約半分に減少した。小核試験と GSH-TK6 試験とでは、細胞毒性指標やエンドポイントが異なるため直接比較することはできないが、GSH 補充量を高くすると遺伝毒性も抑制される。つまり、GSH 補充量が 1 mM 条件の GSH-TK6 試験では、MQ による変異体頻度を十分に抑制できず、より高濃度の GSH 補充ではそれを抑制できることが考察で

別添 4

きる。4 mM GSH 条件での追加検討が必要であるが、現時点の結果は GSH/GST 関与を強く示唆しており、専門家判断として MQ の GSH-TK6 試験の確認試験結果は陰性と判定した。

Table 2 に示した通り、MQ の Ames 試験結果は、代謝活性化条件下で強い陽性、Ames/QSAR でも統計ベースと知識ベースともに陽性判定である。一方、gpt delta ラットを用いた in vivo TG 試験では陰性である (Table 2)。動物個体を用いる in vivo TG 試験の陰性結果は、Ames 試験の陽性を否定しており、総合判定として陰性と考えることができる。先述のとおり、動物個体は正常な GST 活性を有しており、その解毒機能がすべてではないと思われるが、MQ の解毒に GSH/GST が間違いなく関与していると考えられる。つまり、実験動物を用いない本研究において、GSH を補充しただけの GSH-TK6 試験で陰性の結果が得られたこと、および in vivo TG 試験結果が陰性であることから、MQ が陽性から陰性へ総合判定が変わったことは、GSH/GST の働きによるものであると根拠を示すことができる。GSH-TK6 試験は、陰性陽性の判定だけでなく、GSH/GST 機能の関与も同時に根拠づけできる有用な実験系であることが確認できた (Table 2)。

MQ は、Fig. 6(B) に示したとおり、ラット肝 S9 中の CYP1A2 などのシトクロム P450 により、ベンゼン環やピリジン環の各部分でエポキシ化され、2,3 位、3,4 位、5,6 位、7,8 位のエポキシ体が生成すると考えられている。既報によると、特に 2,3 位のエポキシ体が遺伝毒性に関わると考えられている (Suzuki T. et al., J Health Sci 53, 325-328 (2007), Takahashi K. et al., Chem Pharm Bull 36, 4630-3 (1988))。これらのエポキシドは極めて反応性が高く、GSH 非補充の条件下では、細胞内の DNA (主にグアニン残基) と結合して DNA 付加体を形成すると考えられる。一方、GSH 補充の条件下では、S9 に含まれる GST が機能し、反応性の高いエポキシド中間体に GSH を抱合させ、水溶性

の高い無毒な抱合体へと変換する。この反応は、エポキシドが DNA に攻撃する前に不活化するため、DNA への反応性および変異原性が抑制されることが考えられる。類似構造物質の 6-メチルキノリンの遺伝毒性情報によると、6 位にメチル基があっても 5,6 位にエポキシ化された代謝物 6-メチルキノリン-5,6-エポキシドが検出されている (添加物評価書 6-メチルキノリン、2009 年 4 月、食品安全委員会添加物専門調査会)。しかしながら、5,6 位エポキシ体は代謝物として比較的多く生成するとされるが、2,3 位エポキシ体よりも遺伝毒性に関与していないという報告がある (Suzuki T. et al., J Health Sci 53, 325-328 (2007), Takahashi K. et al., Chem Pharm Bull 36(11):4630-3 (1988))。また、MQ は 6-メチルキノリンよりも物理的に大きいメトキシ基であり、6 位炭素と自由回転できることなどから、メトキシ基の立体障害によって 5,6 位のエポキシ体は、生成しにくいのではないかと考えられる。

D. 結 論

本研究では、Ames 試験および Ames/QSAR 予測で陽性を示しながら、in vivo 遺伝毒性試験では陰性を示す MCA および MQ を対象に、GSH を補充した GSH-TK6 試験を実施した。その結果、両物質の遺伝毒性は GSH 補充により抑制される傾向が認められた。GSH 補充の有無によって遺伝毒性が不活化されたことは、MCA および MQ の in vivo 試験の陰性結果と一致しており、GSH/GST 代謝解毒が両剤の様々な生体内代謝の中で中心的な役割を果たしていると考えられた。生体内の GSH が比較的高濃度 (1~10 mM) に存在していることから、in vitro 試験においても GSH を補完しフォローアップすることで、in vivo 試験との相関性を高められる科学的根拠 (作用機序) になりうることを示唆された。

E. 研究発表

別添 4

E-1. 論文発表

- 1) Kuroki, S., Yamada, H., Odagiri, M., Sugiyama, K., Yasui, M. and Sassa, A. (2026). Quantifying Epigenetic Changes Induced by Chemical Exposure Using the epi-TK Assay. Bio-protocol 16(9): e5671. DOI: 10.21769/BioProtoc.5671

E-2. 学会発表

- 1) 安井学、鵜飼明子、本間正充、杉山圭一; Ames 試験で強い陽性を示す香料物質 6-メトキシキノリンのグルタチオン補充型 TK6 試験によるフォローアップ. 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会、静岡市 (2025.11.23)
- 2) 古西 乃々香, 北村 蒼史, 鵜飼 明子, 安井学, 本間 正充, 杉山 圭一, 浦 聖恵, 佐々彰; O6-メチルグアニン DNA メチルトランスフェラーゼの新規生理学的機能の解明. 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会、静岡市 (2025.11.22)
- 3) 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; ATAC-seq を用いたクロマチン構造を基準とした高次ゲノム不安定性質評価法の確立. 本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会、静岡市 (2025.11.22)

F. 知的所有権の取得状況

なし

Table 1. 4-メトキシジシナンナムアルデヒドに対するGSH-TK6試験結果とその他の遺伝毒性試験結果の比較

4-メトキシジシナンナムアルデヒド (Cas: 1963-36-6)	Ames/QSAR ^{*1}		Ames試験 ^{*1}		in vivo 小核試験 ^{*2}		TK6試験 ^{*3}		GSH-TK6試験	
	Derek Nexus	Case Ultra	+ S9	- S9	マウスあるいはラット 経口強制投与2〜4 回		+ S9	- S9	+ S9	+ GSH (1 mM)
	Plausible (Positive)	Positive	弱い陽性 (再現性有り, TA100, 1.6倍)	陰性	陰性		弱い陽性	未	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 Thakkar Y, et al. Mutagenesis. 4:37(2):89-111 (2022)

*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

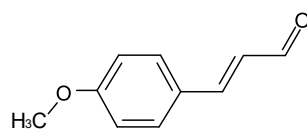
Table 2. 6-メトキシキノリンに対するGSH-TK6試験結果とその他の遺伝毒性試験結果の比較

6-メトキシキノリン (Cas: 5263-87-6)	Ames/QSAR ^{*1}		Ames試験 ^{*1}		gpt deltaフラットを用いた 遺伝子突然変異試験 ^{*2}		TK6試験 ^{*3}		GSH-TK6試験	
	Derek Nexus	Case Ultra	+ S9	- S9	500, 150, 50 mg/kg 体重/日 (28日間連続 強制経口投与) 肝臓 腺胃		+ S9	- S9	+ S9	+ GSH (1 mM)
	Probable (Positive)	Known Positive	強い陽性 (51,177 rev./mg)	陰性	陰性		弱い陽性	陰性	陰性	

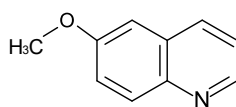
*1 Honma et al., Genes and Environ. 42:32 (2020), および本間研究代表者の平成30年度厚労科研費報告書から引用

*2 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 (Takasu et al. Unpublished data)

*3 杉山研究代表者の令和3年度厚労科研費報告書から引用



4-メトキシシンナムアルデヒド (MCA)
(Cas; 24680-50-0)



6-メトキシキノリン (MQ)
(Cas; 5263-87-6)

Fig.1. TK6 試験に供された香料物質の化学構造

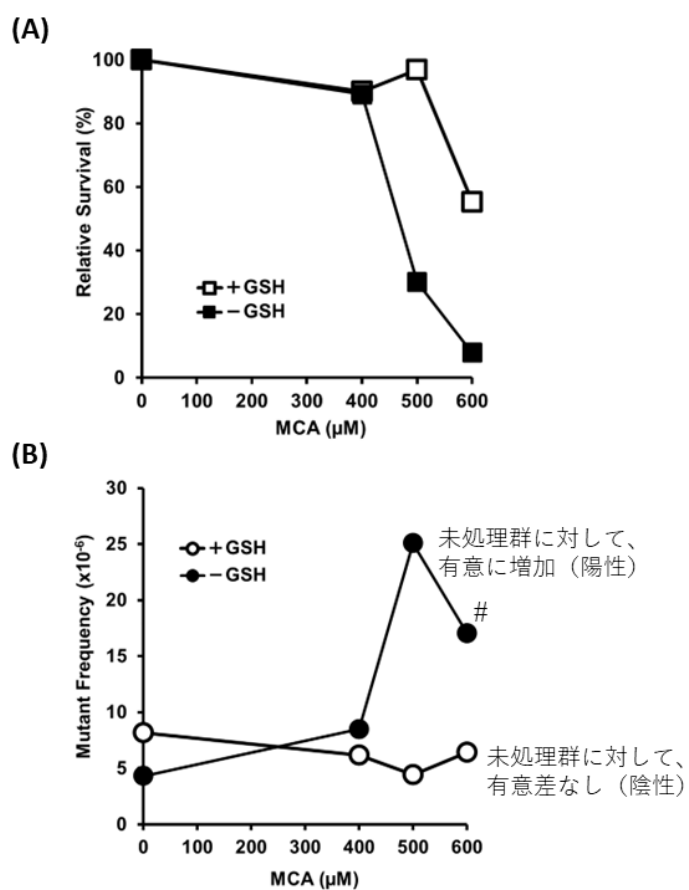


Fig. 2. S9存在下条件によるMCAのGSH-TK6試験結果

#; 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、-GSHの600 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

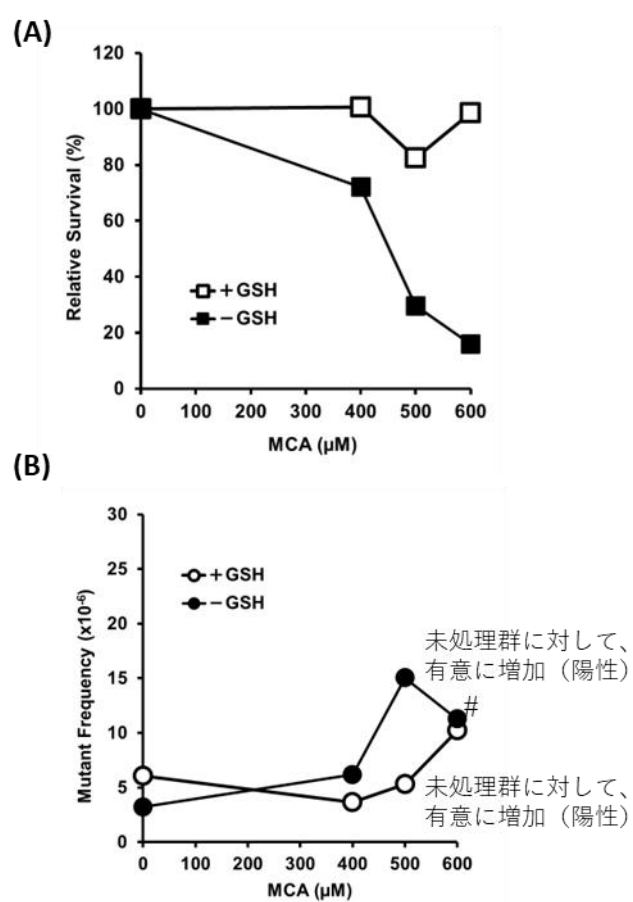


Fig. 3. 確認試験 S9存在下条件によるMCAのGSH-TK6試験結果

#; 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、-GSHの600 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

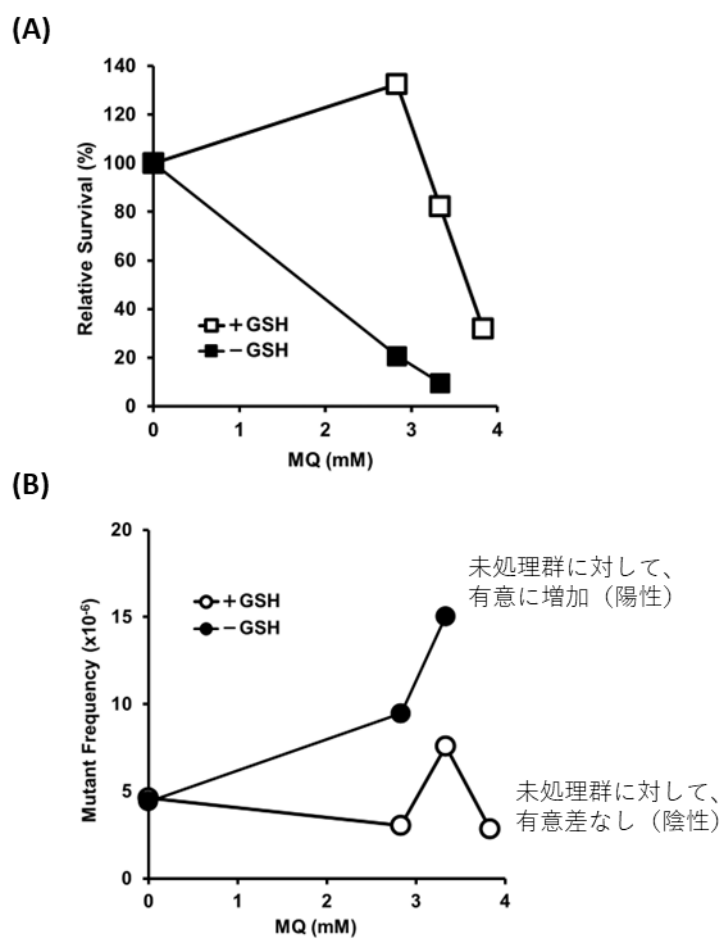


Fig. 4. S9存在下条件によるMQのGSH-TK6試験結果

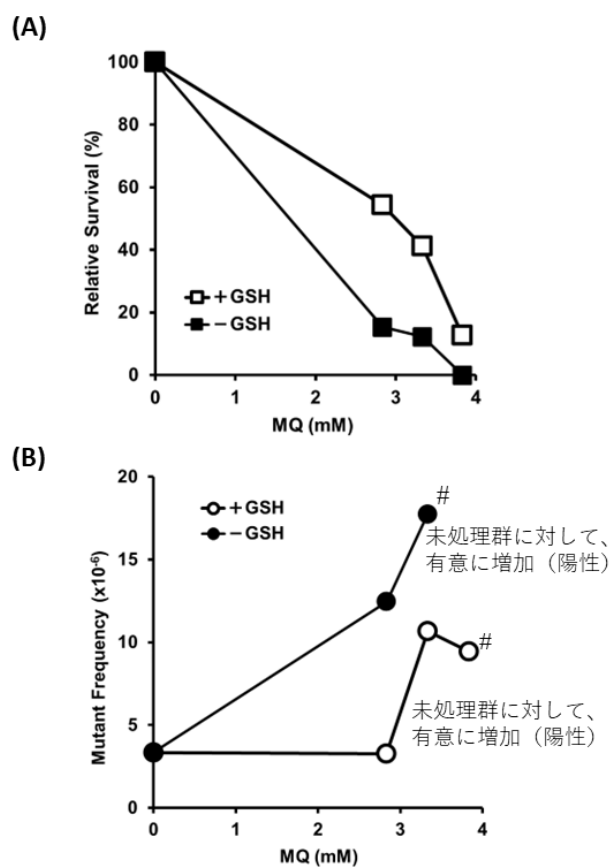


Fig. 5. 確認試験 S9存在下条件によるMQのGSH-TK6試験結果

#; 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、-GSHの3.3mM処理群、+GSHの3.8mM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

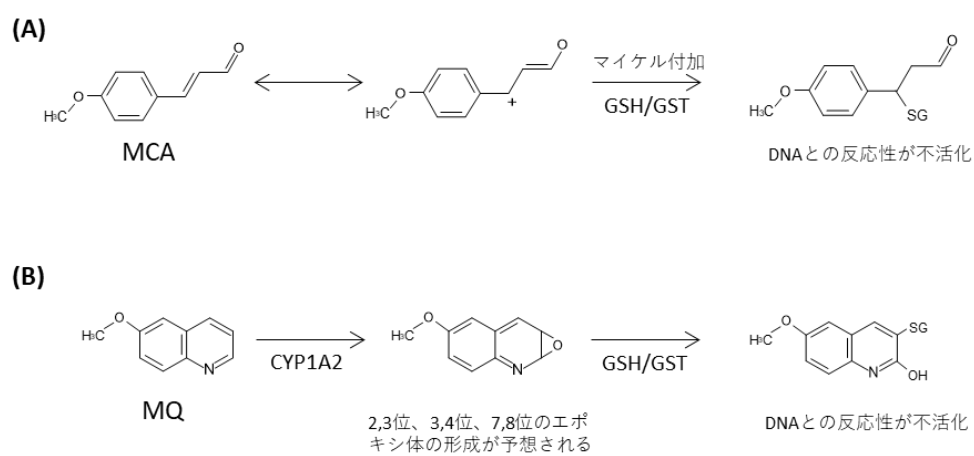
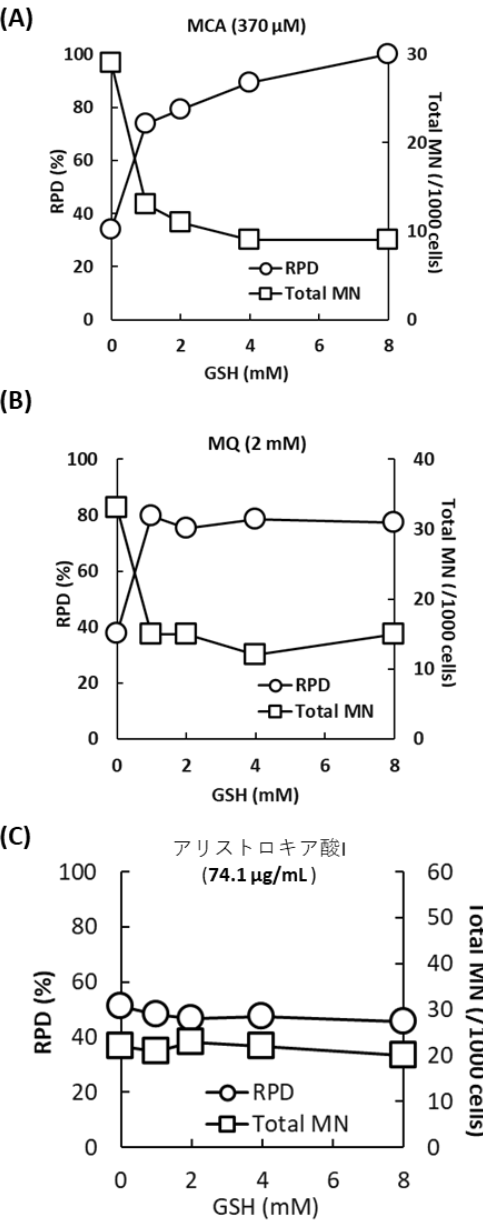


Fig. 6. GSH/GSTが関与するMCAおよびMQの予想される主な解毒機序



Supplementary Fig. 1.
GSH補充量に対する小核形成頻度と細胞毒性の関係

令和7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 vitro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と検証

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

化学物質ばく露から発がんに至る過程には、DNA メチル化やヒストン修飾の変化を含むエピジェネティックな作用（エピ遺伝毒性）を介した多階層的な分子変化が関与する。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）を基盤として、ATAC-seq によるクロマチンアクセシビリティ解析を評価指標として統合することで、エピジェネティックな作用を分子変化から細胞表現型まで一貫して捉える統合的評価スキームの確立を目的とした。

令和 7 年度の本分担研究では、被験物質として新たに styrene および hydroquinone を選定し、エピ TK 試験により評価を行った。また、これまでの成果でエピ TK 試験によりエピ遺伝毒性が陽性と明らかになっている 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) について、ATAC-seq 解析によるクロマチン構造動態を評価するとともに、RNA-seq による遺伝子発現変動との対応関係を網羅的に解析し、エピジェネティックな作用に伴う分子変化から細胞応答に至るまでの変化を統合的に評価した。詳細については以下の通りである。

styrene および hydroquinone は、エピ遺伝毒性に関する知見が不十分な化合物である。これらについて、S9 mix による代謝活性化の有無の条件下でエピ 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、いずれの化合物においても、S9 mix 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。これらの結果は、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であると考えられる。

エピ遺伝毒性陽性物質として同定された 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) をもとに、クロマチン構造動態に基づく新たな評価指標を探索するために、mTK6 細胞に TPA を処理後に回復培養を経て ATAC-seq 解析を実施した。その結果、TNFSF4やFCRL5遺伝子座を代表とする炎症応答遺伝子群でのクロマチンアクセシビリティの恒常的な変化が認められた。RNA-seq 解析による遺伝子発現動態と統合することで、炎症応答に関連する遺伝子発現変動との対応関係が確認され、エピジェネティックな作用がクロマチン構造変化として捕捉できることが示された。以上より、エピ TK 試験にクロマチンアクセシビリティ解析を組み込むことで、エピ遺伝毒性を多層的に評価可能な評価スキームを確立した。

A. 研究目的

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

化やヒストン修飾に代表されるエピジェネティック変化は、クロマチン構造や遺伝子発現制御を介して発がんのイニシエーション、プロモーション過程の双方に関与することが明らかになりつつある。

本研究では、これまでに確立した哺乳類

細胞を用いたin vitroエピジェネティック評価系（エピTK試験）を基盤として、今年度はATAC-seqによるクロマチンアクセシビリティ解析を新たに統合し、エピTK試験で検出される表現型変化とゲノムワイドなクロマチン構造動態との関連を多層的に解析する。これにより、エピ遺伝毒性評価法の実用性および信頼性を向上させるとともに、クロマチン構造変化を指標としたエピジェネティック作用の試験基盤を構築し、発がん予測に資する評価スキームの確立を目指す。

B. 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 µg/mLピ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 µg/mLストレプトマイシン（ナカライテスク）、3 µg/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℃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styreneは東京化成工業（株）、hydroquinone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5×10⁵ cell/mLの細胞懸濁液を調製した。被験物質または溶媒対照（DMSO）を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℃、4時間培養して処

理を行った。その後細胞を洗浄し、24時間の回復培養をおこなったのちに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 µl/wellで播種した。並行してTK復帰頻度測定のために2×10² ~ 1×10⁵ 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 µl/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。

B-2. ATAC-seqによるクロマチンアクセシビリティの評価

12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) は富士フィルム和光純薬（株）より購入したものを用いた。TPAまたは溶媒対照（エタノール）を細胞懸濁液に対して100分の1量加えて37℃、24時間培養して処理を行った。その後、細胞を洗浄し、3日間の回復培養を行った。溶媒対照としてエタノール処理群を設け、各群の細胞から核を抽出した後、Tn5トランスポザーゼを添加してaccessible chromatin領域の断片化およびアダプター付加を行い、ライブラリを調製した。得られたライブラリについて次世代シーケンサーを用いて配列解析を行い、TPA処理群と溶媒対照群との比較によりクロマチンアクセシビリティの変動を評価した。

B-3. RNA-seqによる遺伝子発現変動の網羅的解析

ATAC seqと同様の条件で細胞をTPAで処理したのちに、NucleoSpin RNA Plus kit（タカラバイオ）を用いてtotal RNAを抽出した。抽出したRNAは、マクロジェン株式会社に委託してRNA-seq解析を実施した。得られたシーケンスデータを用いて、各処理群間における遺伝子発現変動を網羅的に評価した。

(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。

C. 研究結果

Styrene (200 μ M) および hydroquinone (5 μ M) についてエピ TK 試験を実施したところ、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの条件においても TK 復帰頻度に顕著な変化は認められなかった。S9 存在下では各処理群において DMSO 溶媒対照と比較してわずかな低下傾向が観察されたものの、その変動は限定的であった (図 1)。これらの結果から、両化合物は本試験条件下において明確なエピジェネティック作用を示さない、あるいは影響が小さいことが示唆された。なお、本研究で確立された実験手順をもとに、エピ TK 試験の標準化プロトコルを整備し、Bio-protocol 誌に出版した。

非遺伝毒性発がん物質のモデルである TPA (0.2 μ g/mL) について、処理後 3 日目の細胞を用いて ATAC-seq 解析を行った。その結果、溶媒対照と比較して、3,756 箇所 でクロマチンのアクセシビリティ上昇 (open)、794 箇所 で低下 (closed) が認められた (図 2)。特に open 領域の増加が顕著であり、TPA 処理により広範なクロマチン開放が誘導されることが示された。Open および closed 領域に対して Gene Ontology 解析を行ったところ、いずれにおいても炎症応答および免疫関連プロセスに関与する遺伝子群が有意に認められた (図 2)。さらに、RNA-seq による遺伝子発現解析と統合した結果、対応する転写産物の発現上昇と良好な相関を示した。すなわち、TPA により誘導されるクロマチン構造変化が、実際の遺伝子発現変動と機能的に連動していることが示唆された。

恒常的にアクセシビリティの上昇が認められた領域の中から、エピジェネティック指標として有望な候補領域を抽出した。その結果、炎症関連遺伝子である *TNFSF4* プ

ロモーター領域におけるアクセシビリティの増加、および *FCRL5* 遺伝子座におけるアクセシビリティの減少を同定した (図 3)。これらの領域は、エピジェネティック作用を反映する特徴的な変化として再現性が高く、評価指標として利用可能であると考えられた。

D. 考察

styreneおよびhydroquinoneは、S9の有無にかかわらずエピTK試験で顕著な変化を示さず、本条件下ではエピジェネティック影響は限定的と考えられた。一方で、S9存在下での軽微な低下傾向は、代謝に伴う細胞応答の変化を反映している可能性がある。本年度におけるBio-protocol誌への標準プロトコルの出版によって、本試験系の再現性および汎用性が担保され、エピ遺伝毒性評価における基盤技術としての確立が進んだと言える。

TPA処理では、ATAC-seqによりクロマチン開放領域が同定され、炎症応答関連遺伝子に偏った変化として検出された。さらに、RNA-seqとの統合解析により、クロマチン開放と遺伝子発現上昇の対応が確認され、クロマチン構造変化が機能的な転写制御と連動していることが示された。*TNFSF4*や*FCRL5*遺伝子座におけるプロモーター領域など再現性の高いクロマチン動態は、エピジェネティック作用に起因するリスクマーカーになり得ることが示唆された。これらの結果から、ATAC-seqを統合することで、エピTK試験の解釈と感度の向上が期待できる。

E. 結論

エピTK試験とATAC-seqを統合した評価系により、食品添加物のエピジェネティック作用を多層的に捉えることが可能となった。styreneおよびhydroquinoneは顕著な影響を示さなかった一方、TPAはクロマチン開放と炎症関連遺伝子の発現誘導を伴う特徴的な応答を示した。これらの変化は指

標化可能であり、エピジェネティック作用に基づく発がんリスク評価の高度化に資する基盤となることが示された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

- 1) Kuroki S, Yamada H, Odagiri M, Sugiyama KI, Yasui M, Sassa A. Quantifying epigenetic changes induced by chemical exposure using the epi-TK assay. *Bio-protocol*, 2026, 16, e5671.
- 2) Wada NA, Takeiri A, Motoyama S, Matsuzaki K, Tanaka K, Matsuo S, Fujii-Takeiri E, Tateishi H, Matsumoto K, Niimi N, Sassa A, Grúz P, Masumura K, Mishima M, Jishage KI, Sugiyama KI, Nohmi T. Mitomycin C-induced DNA double-strand breaks are enhanced by catalytical inactivation of DNA polymerase κ in mice. *Genes and Environment*, 2025, 47, 22.
- 3) Yoshida A, Song Y, Takaine H, Song S, Konishi N, Hwang-Fu, YH, Johnson Z, Ura K, and Sassa A. Epitranscriptome-wide profiling identifies RNA editing events regulated by ADAR1 that are associated with DNA repair mechanisms in human TK6 cells. *Frontiers in Genetics*, 2025, 16, 1663827.
- 4) Betsuyaku Y, Motohashi M, Sassa A, Takamura T, and Totsuka Y. Analysis of novel DNA adducts derived from acetaldehyde. *Biomolecules*, 2025, 15, 878.
- 5) Akagawa M, Sugasawa K, Ura K, and Sassa A. Impact of an oxidative RNA

lesion on in vitro replication catalyzed by SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry*. 2025, 301, 108512.

G-2. 学会発表

- 1) RNA 編集を介したゲノム維持ネットワーク制御の分子基盤, 吉田昭音, Song Sujin, Song Yuqian, Hwang-Fu Yu-Hsien, Johnson Zachary, 浦聖恵, 佐々彰, 第 43 回染色体ワークショップ・第 24 回核ダイナミクス研究会, 2026 年 2 月, 仙台
- 2) ヒストンメチル化酵素 NSD2 による新規 DNA 損傷修復機構, 晝間裕翔, 岩崎滉, 原田佳歩, 佐々彰, 浦聖恵, 第 48 回日本分子生物学会年会, 2025 年 12 月, 横浜
- 3) NSD2 のヒストンメチル化酵素活性に RNA が及ぼす影響 - 再構成クロマチンアレーを用いた解析, 市村智明, 磯部博登, 佐々彰, 堀越直樹, 胡桃坂仁志, 菊地正樹, 梅原崇史, 浦聖恵, 第 48 回日本分子生物学会年会, 2025 年 12 月, 横浜
- 4) 酸化的 RNA 損傷を鋳型とした RNA ウイルス由来 RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ複合体の RNA 合成機構の解明, 赤川真崇, 浦聖恵, 佐々彰, 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会, 2025 年 11 月, 静岡
- 5) DNA 修復酵素 RNaseH2 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, 寺越菜央, 山北啓吾, 菅澤薫, 浦聖恵, 佐々彰, 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回

別添 4

大会, 11/2025 年 11 月, 静岡

- 6) O6-メチルグアニン DNA メチルトランスフェラーゼの新規生理学的機能の解明, 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 54 回大会, 2025 年 11 月, 静岡
- 7) DNA 損傷応答とイノシン RNA 修飾の相互作用の解明, Sujin SONG, 吉田昭音, 山北啓吾, 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 54 回大会, 2025 年 11 月, 静岡
- 8) ATAC-seq を用いたクロマチン構造を基準とした高次ゲノム不安定性質評価法の確立, 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 54 回大会, 2025 年 11 月, 静岡
- 9) 化学物質ストレスによる R-loop 蓄積とゲノム不安定の関連性の検討, 高稲蛸, 吉田昭音, 菅澤薫, 浦聖恵, 佐々彰, 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会, 2025 年 11 月, 静岡
- 10) Comprehensive Analysis of DNA Repair Mechanisms Regulated by Inosine RNA Modification. Yoshida Y, Song Y, Takaine H, Hwang-Fu YH, Johnson Z, Ura K, Sassa A. 56th Annual Meeting of The Environmental Mutagenesis and Genomics Society. 2025 年 9 月, NY, USA

H-2. 実用新案登録

該当なし

H-3. その他

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得

該当なし

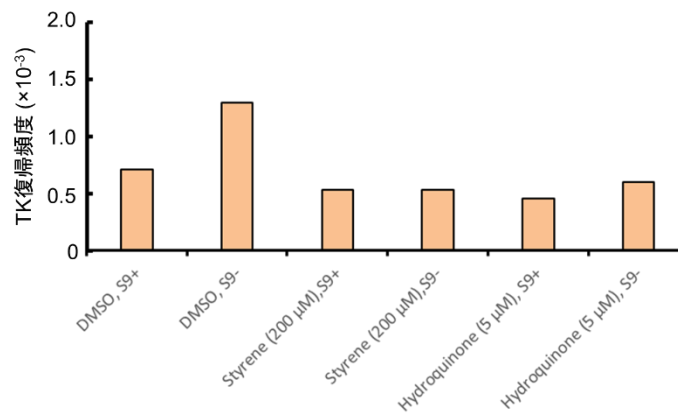


図1 エピTK試験を用いたstyrene, hydroquinoneにおけるエピジェネティック作用の評価
S9 mixの非添加 (S9-) および添加 (S9+) 条件下で、DMSOを溶媒対照として、mTK6株に200 μM styreneまたは5 μM hydroquinoneを4時間処理した。

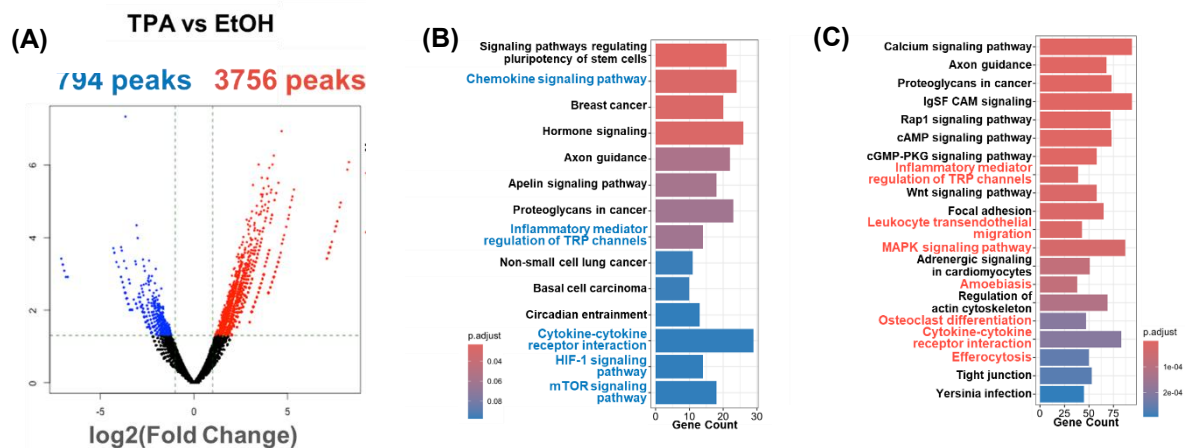


図2 TPA処理によるクロマチンアクセシビリティ変動および関連経路解析

TPA処理群とエタノール (EtOH) 対照群との比較により得られたATAC-seq解析結果を示す。(A) TPA処理により、3756箇所クロマチンアクセシビリティの増加 (赤)、794箇所減少 (青) が認められた。(B) および (C) は、それぞれアクセシビリティが減少および増加した領域に対応する遺伝子の経路解析結果を示す。

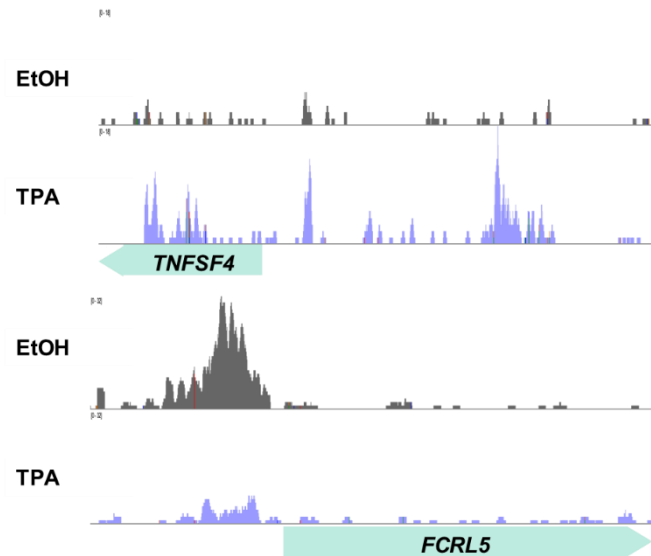


図3 エピジェネティック作用の指標となる炎症応答遺伝子座でのクロマチン構造変化
TPA処理群とエタノール（EtOH）対照群におけるゲノムブラウザ上のATAC-seqシグナルを示す。TPA処理により、*TNFSF4*遺伝子座ではクロマチンアクセシビリティの顕著な増加、*FCRL5*遺伝子座ではアクセシビリティの低下が観察された。

令和7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・発がん性包括的試験による評価を実施した。一般毒性評価では、令和6年度に実施した器官重量測定、血液学的検査及び血清生化学検査に引き続き全身諸臓器の病理組織学的検索を実施した。その結果、高用量群では肝グリコーゲンの減少と赤脾色素沈着の軽度な増加が見られたものの、いずれも毒性学的意義は乏しいと考えられた。一方、高用量群では有意な体重増加抑制が認められ、本試験条件下における MCA の無毒性量 (NOAEL) は 150 mg/kg 体重/日と考えられた。発がん性評価では、ラット肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の免疫組織化学染色法による検索を実施した。その結果、対照群を含むいずれの群においても陽性細胞巢の出現は認められなかったことから、MCA にラット肝発がん性はないと考えられた。

A. 研究目的

合成香料には個別指定品目に加えて、化学構造から使用が認められているいわゆる「18 類香料」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 A

mes/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⁾。

本年度は令和 6 年度に実施した F344 系 *gpt delta* ラットを用いた MCA の包括試験について、一般毒性評価と発がん性評価を実施した。

B. 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. 一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験による MCA の一般毒性評価

動物は 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より購入し、CRF-1 粉末基礎飼料 (オリエンタル

酵母工業株式会社) と調製水で飼育した。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 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ターゼ (ALP)、 γ -グルタミルトランスぺプチターゼ (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。

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。

B-3. 一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験によるMCAの発がん性評価

ラット肝前がん病変マーカーである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。リン酸緩衝液にて洗浄後、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)

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。

C. 研究結果

C-1. MCAの一般毒性評価

令和 6 年度に実施した血液学的検査 (Table 1)、血清生化学検査 (Table 2)、肉眼的病理学検査、器官重量測定 (Table 3) に引き続き、全身諸臓器の病理組織学的検査を実施した (Table 4)。500 mg/kg 群では肝グリコーゲンの減少がみられたが、体重の低値に伴う二次的変化と考えられた。また、同群では赤脾髄色素沈着の軽度な増加が散見されたが、血液学的検査において関連した変化は認められず、軽度な変化であったことから毒性学的意義は低いと考えられた。

C-2. MCAの発がん性評価

ラット肝前がん病変マーカーであるGST-P陽性細胞巢について免疫組織化学染色法による検索を実施した結果、対象群およびいずれの投与群においてもGST-P陽性細胞巢と判定される5細胞以上からなる陽性細胞巢の発現は認められなかった (Figure 2)。

D. 考察

D-1. MCAの一般毒性評価

試験期間中、500 mg/kg 群では投与3週目から対照群に比して有意な体重増加抑制がみられ、最終体重においても有意な低値を示した。一方、同群では、血液学的検査、血清生化学検査、器官重量においてパラメータの変動が散見されたものの、それらに関連する臓器に病理組織学的変化を伴わないことから、毒性学的意義は乏しいと考えられた。

D-2. MCAの発がん性評価

発がん性予測評価では、ラット肝前がん

病変マーカーであるGST-P陽性細胞巢の検索を行ったものの、対照群およびいずれの投与群においても陽性細胞巢の発現は認められなかったことから、MCAのラット肝発がん性は陰性と考えられた。

E. 結論

一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験において、MCAの一般毒性評価を行った結果、高用量群では顕著な体重増加抑制が見られた。以上の結果より、本試験条件下におけるMCAのラット90日間反復投与による無毒性量（NOAEL）は150 mg/kg体重/日と判断した。また、発がん評価の結果、ラット肝臓におけるMCAの発がん性は陰性と考えられた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

G-1. 論文発表

該当なし

G-2. 学会発表

該当なし

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

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, Sakai 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).

Table 1 Hematological data for male *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 2 Serum biochemistry for male *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.

Table 3 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 ± 25 ^a		296 ± 40		262 ± 23		214 ± 27 ^{**}	
Brain	(g)	1.81 ± 0.04		1.81 ± 0.04		1.78 ± 0.05		1.70 ± 0.05 ^{**}	
	(g/100 g BW)	0.65 ± 0.05		0.62 ± 0.08		0.68 ± 0.05		0.80 ± 0.10 ^{**}	
Thymus	(g)	0.11 ± 0.02		0.09 ± 0.03		0.07 ± 0.02 ^{**}		0.06 ± 0.02 ^{**}	
	(g/100 g BW)	0.04 ± 0.01		0.03 ± 0.01		0.03 ± 0.01 [*]		0.03 ± 0.01 [*]	
Heart	(g)	0.77 ± 0.06		0.80 ± 0.06		0.75 ± 0.05		0.71 ± 0.07	
	(g/100 g BW)	0.28 ± 0.01		0.27 ± 0.02		0.29 ± 0.02		0.33 ± 0.04 ^{##}	
Spleen	(g)	0.37 ± 0.02		0.36 ± 0.03		0.32 ± 0.03 [*]		0.26 ± 0.05 ^{**}	
	(g/100 g BW)	0.13 ± 0.01		0.12 ± 0.01		0.12 ± 0.01		0.12 ± 0.01 ^{**}	
Liver	(g)	6.80 ± 0.56		7.08 ± 0.98		6.28 ± 0.55		6.06 ± 0.79	
	(g/100 g BW)	2.42 ± 0.08		2.40 ± 0.08		2.40 ± 0.10		2.83 ± 0.11 ^{**}	
Kidneys	(g)	1.37 ± 0.13		1.40 ± 0.13		1.37 ± 0.13		1.28 ± 0.15	
	(g/100 g BW)	0.49 ± 0.02		0.48 ± 0.03		0.52 ± 0.02 ^{**}		0.60 ± 0.03 ^{**}	
Lungs	(g)	0.89 ± 0.06		0.87 ± 0.07		0.87 ± 0.06		0.75 ± 0.07 ^{**}	
	(g/100 g BW)	0.32 ± 0.02		0.30 ± 0.02		0.33 ± 0.02		0.36 ± 0.04 [*]	
Testes	(g)	2.56 ± 0.16		2.57 ± 0.15		2.49 ± 0.13		2.13 ± 0.22 ^{**}	
	(g/100 g BW)	0.91 ± 0.06		0.88 ± 0.09		0.96 ± 0.06		1.00 ± 0.05 [*]	
Adrenals	(mg)	45.3 ± 6.1		46.5 ± 6.0		47.4 ± 3.6		45.9 ± 4.4	
	(mg/100 g BW)	16.2 ± 2.3		16.2 ± 4.0		18.2 ± 1.9		21.8 ± 3.5 ^{**}	
Pituitary gland	(mg)	8.94 ± 0.56		8.30 ± 0.98		8.13 ± 0.58 [*]		8.24 ± 0.70	
	(mg/100 g BW)	3.19 ± 0.18		2.83 ± 0.36 [*]		3.11 ± 0.20		3.87 ± 0.34 ^{**}	
Thyroid	(mg)	12.8 ± 1.9		11.6 ± 1.7		11.8 ± 1.2		11.5 ± 1.5	
	(mg/100 g BW)	4.56 ± 0.50		3.92 ± 0.51		4.51 ± 0.51		5.41 ± 0.81 [*]	
Salivary glands	(g)	0.42 ± 0.03		0.41 ± 0.04		0.40 ± 0.03		0.36 ± 0.04 ^{**}	
	(g/100 g BW)	0.15 ± 0.01		0.14 ± 0.01		0.15 ± 0.02		0.17 ± 0.02 [*]	
Seminal vesicles	(g)	0.43 ± 0.09		0.39 ± 0.12		0.32 ± 0.12		0.16 ± 0.09 ^{**}	
	(g/100 g BW)	0.15 ± 0.03		0.13 ± 0.04		0.12 ± 0.04		0.07 ± 0.03 ^{**}	
Prostate	(g)	0.43 ± 0.08		0.38 ± 0.10		0.36 ± 0.06		0.23 ± 0.09 ^{**}	
	(g/100 g BW)	0.15 ± 0.03		0.13 ± 0.03		0.14 ± 0.02		0.10 ± 0.02 ^{**}	

* : Mean ± SD

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

Table 4 Histopathological findings in male *gpt* delta rats treated with MCA for 13 weeks

Organs	Findings (±/+/++/+++)	Control	50 mg/kg	150 mg/kg	500 mg/kg
No. of animals		10	9	10	9
Liver	Vacuolation, hepatocellular, periportal	3 (0/3/0/0)	-	-	0
	Decreased glycogen	0	0	0	8 (0/3/5/0)
Kidney	Basophilic tubule, proximal	1 (1/0/0/0)	-	-	0
Spleen	Pigmentation, macrophage, red pulp	0	0	0	7 (7/0/0/0)
Heart	Myocardial degeneration/mononuclear cell infiltration	1 (1/0/0/0)	-	-	1 (1/0/0/0)
Stomach	Erosion, forestomach	6 (5/1/0/0)	-	-	6 (6/0/0/0)
	Granuloma, forestomach, lamina propria	1 (1/0/0/0)	-	-	1 (1/0/0/0)
	Erosion, glandular stomach	1 (1/0/0/0)	-	-	1 (1/0/0/0)
Pituitary	Cyst, pars distalis (P)	1	-	-	0
Thyroid	Remnant of ultimobranchial body (P)	0	-	-	1
Harderian gland	Inflammation	1 (1/0/0/0)	-	-	0
Nasal cavity	Mineralization, respiratory epithelium	4 (4/0/0/0)	-	-	2 (2/0/0/0)

Grade: ±, minimal; +, slight; ++, moderate; +++, severe.

別添 4

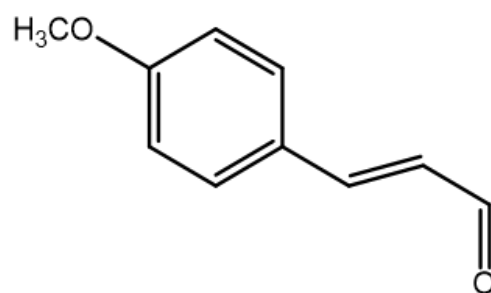


Figure 1. Chemical structure of 4-methoxycinnamaldehyde (MCA)

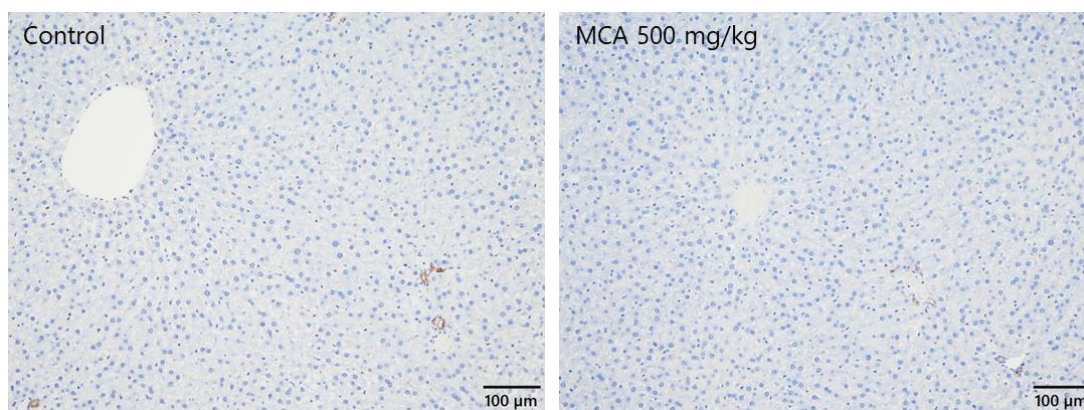


Figure 2. Representative photomicrographs of GST-P immunohistochemical staining.

令和7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 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： 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

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、昨年度にゲノム上のグローバルなメチル化レベルを簡便に測定する系を開発した。今年度は、この手法を用いて、TK6 細胞に DNA メチル転移酵素 DNMT1 阻害剤である GSK-3484862 を処理した際のゲノムのグローバルメチル化レベルの変化を検討した。その結果、用量依存的にグローバルメチル化レベルの減少が観察できた。また、同一サンプルに対して、Illumina 社 Miniseq シーケンサーを用いた Bisulfite sequencing 法により、メチル化レベルを検証した。さらに、ナノポアシーケンスデータをリファレンスゲノムにマッピングすることにより、LINE-1 等の部位特異的なメチル化レベルを解析可能な手法を開発した。その結果、LINE-1 のメチル化レベルは、グローバルメチル化と同様に、用量依存的な現象が認められた。今後はさらに、遺伝子（部位）特異的なメチル化レベルの解析を可能とするとともに、実際の化学物質処理によるメチル化レベルの変化の検討に応用する予定である。

A. 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、未修飾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。

B. 研究方法

1. 使用した細胞

- ヒト Lymphoblastoid cell line TK6

2. 薬剤処理

- 対数増殖期の Tk6 細胞株に以下の濃度の GSK-3484862 を 24 時間処理した。
0.13, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 μ M

3. ライブラリー調製

- 細胞より抽出したゲノム DNA (50ng) 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 modBam ファイルを生成した
(ア)データ解析
- 所内のナノポアサーバー PC (Intel Xeon Gold 28corex2) 上に構築したメチル化解析ワークフローに、ナノポアシークエンサーより得られた modBam ファイルを投げ、Modkit ソフトウェアによりグローバルな 5mC 及び 5hmC のレベルを算出した。

5. Bisulfite sequencing

EpiTect Bisulfite Kits (Qiagen) を用いて、マニュアルに従って DNA サンプルの Bisulfite 処理を行い、非修飾シトシン塩基のウラシル塩基への変換

を行ったのち、Illumina MiniSeq シークエンサーにてシークエンス解析を行った。

6. LINE-1 配列メチル化の解析

modBam ファイルを minmap2 ソフトウェアを用いてヒトリファレンスゲノム (hg38) に対してマッピングした。この際、`-y` option をつけることにより、modBam ファイルの修飾塩基の情報を保持した。LINE-1 配列に対する BED ファイル UCSC Table Browser より取得し modkit software に読み込ませることにより、Line-1 配列特異的なメチル化レベルを算出した。

C. 研究結果

ナノポアシークエンサーの解析ソフト MinKnow のバージョンアップにより、シークエンサーより直接 modBam ファイルが得られるようになったため、昨年度開発したメチル化解析ワークフローに修飾を加え、FAST5 ファイルを介さずにグローバルメチル化の解析を可能とする系を確立した (図 1) データ解析ワークフローは、MinION シークエンサーから得られる modBam ファイルを直接 Modkit ソフトウェアにて解析することにより、グローバルメチル化レベルの情報を得た。

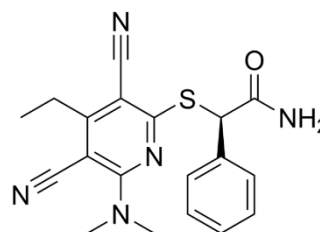
この系を用いて、DNMT1 阻害剤である GSK-3484862 処理した TK6 細胞のメチル化レベルの変化を検討した結果、図 2 に示すように用量相関性を持ったメチル化レベルの減少が認められた。図において縦軸は、CpG

サイトにおける 5mC と 5hmC を合わせたトータルメチル化レベル (比) として表している。

未処理細胞におけるメチル化のレベルは約 5 割であるのに対して、GSK-3484862 処理した細胞においては用量相関的にメチル化レベルの減少が認められ、最高用量 2 μ M 処理においては、約半分程度までメチル化レベルが低下した。この変化は、昨年度検討した 5azC 処理よりも大きく、GSK-3484862 はメチル化解析における陽性コントロール物質として適当であることがわかった。この変化を 5mC と 5hmC に分けて見たのが図 3 であるが、どちらも同じような減少傾向を示したものの、メチル化量としては 5mC の方が圧倒的に多く、5hmC の量は 1/10 以下であった。このことからメチル化量の変化としては、5mC の影響が大きいと考えられる。

さらに DNA メチル化量の測定を、Bisulfite 法を用いて検討を行った。Bisulfite 処理した DNA サンプルと、未処理サンプルのシークエンスを比較し、Bisulfite 処理により C から T へ変化した部位が非メチル化 C、C のままの部位がメチル化 C (5mC, 5hmC 両方を含む) として DNA のトータルメチル化量の変化を算出した。この場合、CpG サイトのメチル化に限定して

GSK-3484862



GSK-3484862 is a non-covalent inhibitor for [DNA methyltransferase \(Dnmt1\)](#). GSK-3484862 induces DNA hypomethylation to against [cancer](#). GSK-3484862 mediates dramatic demethylation in murine embryonic stem cells with minimal non-specific toxicity.

解析することが難しいため、トータルのCに対するメチル化Cの割合として算出したが、その影響もあり得られた変化量はMinIONシーケンサーから得られる変化量よりも小さく、検出感度としては後者が優れていることがわかった。

次に、部位特異的なメチル化の変化を調べる目的で、LINE-1 配列のメチル化に限定した解析を行った。LINE-1 配列はそのメチル化の変化が環境要因の影響を受けやすいことが知られるとともに、各種癌細胞においてそのメチル化レベルの変化が報告されている。LINE-1 はレトロトランスポゾン由来の配列としてゲノム上に多数存在することが知られているが、エピジェネティックなコントロールを受けており、メチル化の変化により活性化され、ゲノム不安定性を誘発することが知られている。よって、LINE-1 配列のメチル化レベルの検討は、ゲノム不安定性の評価につながることを期待される。

LINE-1 配列のメチル化解析にあたっては、UCSC ゲノムブラウザーサイトにより提供されている LINE-1 配列の BBED ファイルを使用し、Modkit ソフトウェアにてこの部位のメチル化に限定してグローバルメチル化レベルを算出した。この系を用いて、DNMT1 阻害剤である GSK-3484862 処理した TK6 細胞のメチル化レベルの変化を検討した結果、ゲノム全体のメチル化レベルの変化とほぼ同じ結果が得られた。

GSK-3484862 処理により、グローバルメチル化が約半分程度に減少したことから、本試験系がメチル化レベルの変化を鋭敏にとらえることができることを示すことができた。従来の Bisulfite 法と比較しても、より簡便迅速な解析が可能であり、感度も高いことから、今後メチル化レベルの解析法として非常に有望であることが示された。

CpG サイトのメチル化量は、未処理の状態で約 5 割であったが、これは一般的に報告されている値である 7-8 割と比較するとやや低い値である。今後検証が必要であるが、別途本手法をマウス臓器に応用した検討からは報告と同程度の値が得られており、TK6 細胞に特有の性質である可能性もある。

LINE-1 配列のメチル化に関しては、ゲノムワイドなメチル化と同様の傾向を示したが、化合物によっては特異的な変化が出る可能性も残されている。BED ファイルを用いて比較的簡単に解析が可能であることから、今後両者を合わせて検討したい。

一方、遺伝子特異的なプロモーター部位のメチル化の変化が、各種外的刺激に対する特異的な反応として起こることが知られており、原理的にはマッピング後に遺伝子ごとのメチル化レベルの変化を求めることは可能であるが、信頼性のあるデータを得るためにはシーケンスのカバレッジを増やす必要があり、一気に大量のシーケンスデータが必要になる。よって当面は、少量のデータで解析可能な、グローバルなメチル化の変化と、LINE-1 領域の変化に着目し、香料を含めた各種化学物質処理の影響を検討していきたい。

D. 考察

図 1 Nanoporeシーケンサーを用いたメチル化解析

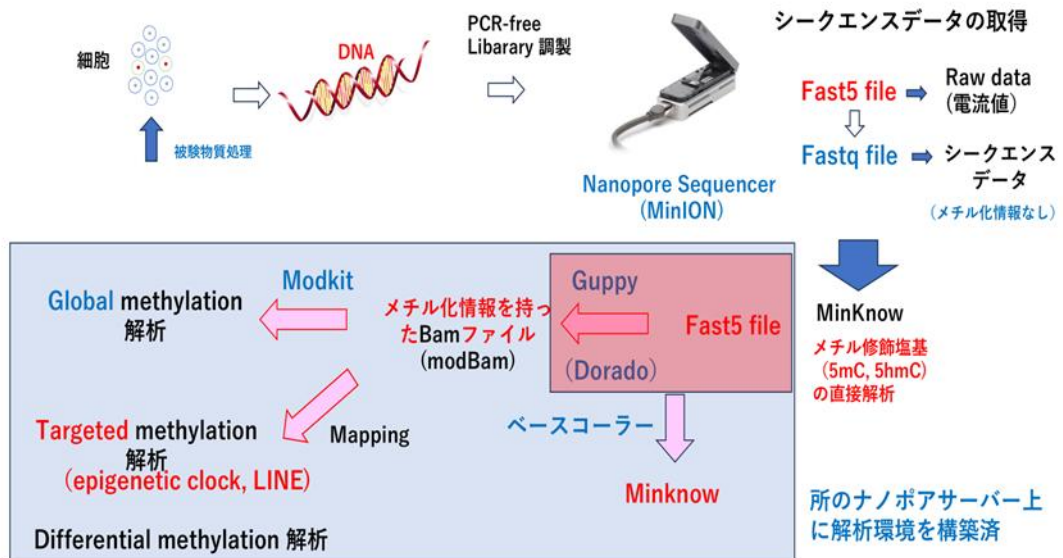
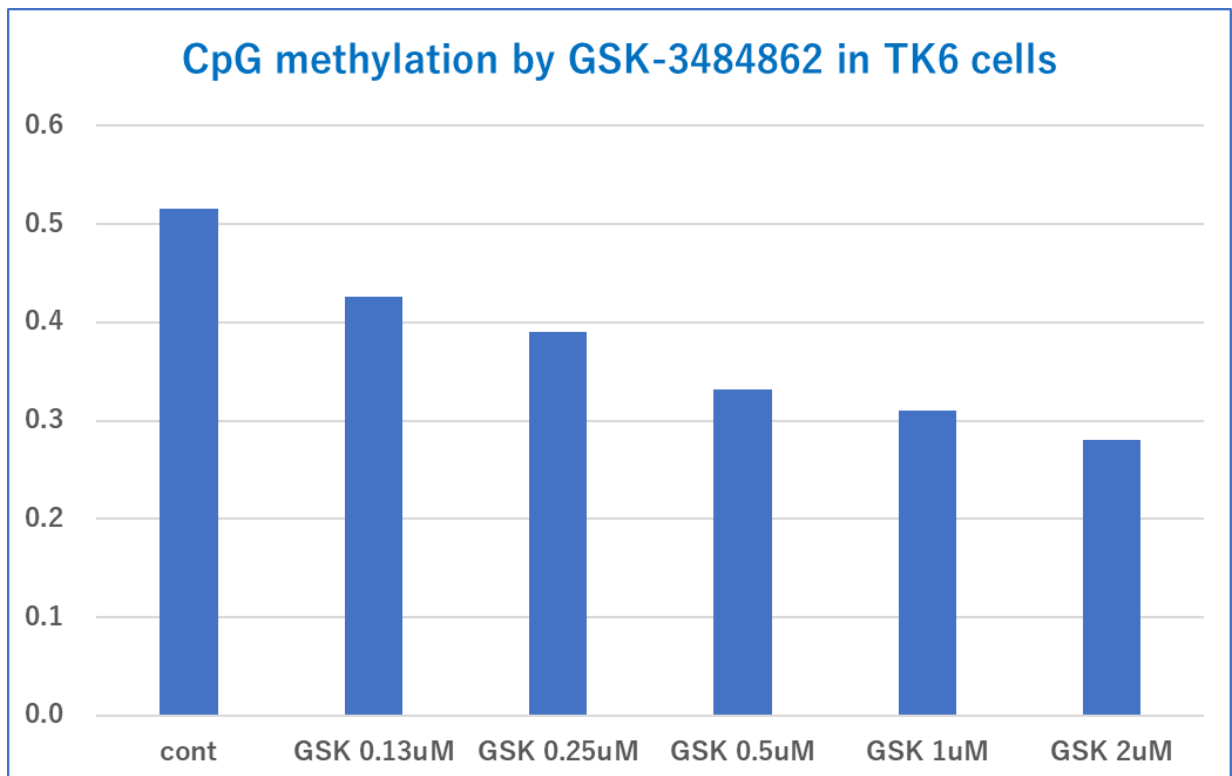


図 2 GSK-3484862 処理 TK6 細胞のグローバルメチル化レベルの変化



別添 4

図 2 GSK-3484862 処理 TK6 細胞の 5mC 及び 5hmC レベルの変化

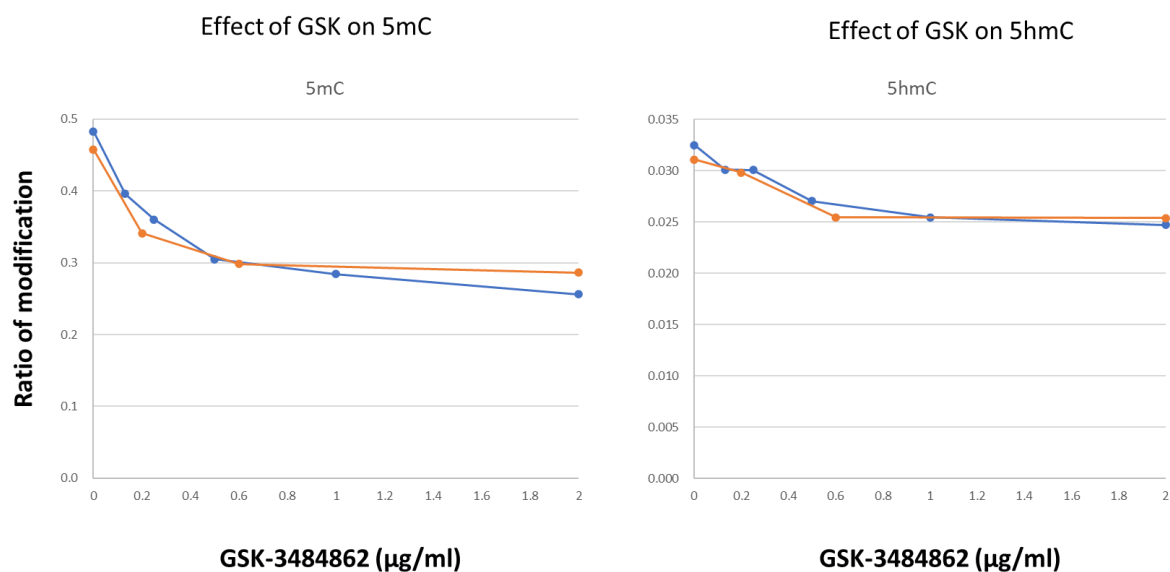
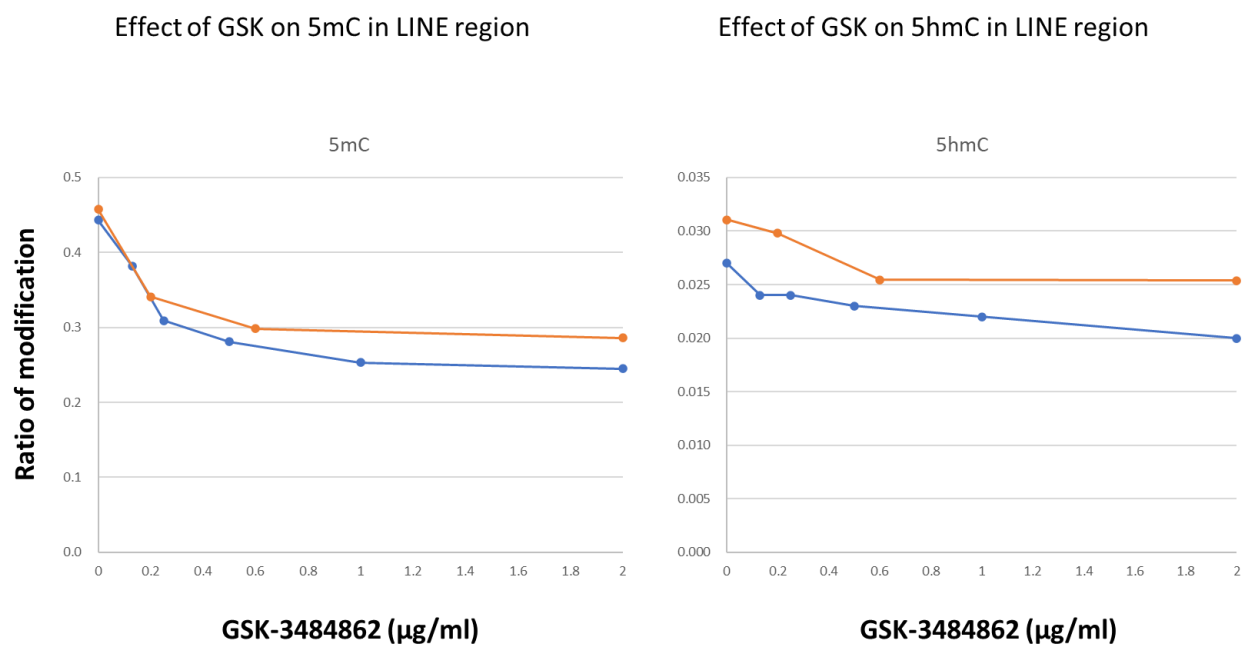


図 3 GSK-3484862 処理 TK6 細胞の LINE-1 領域における 5mC 及び 5hmC レベルの変化



E. 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確立し、DNA メチル転移酵素 DNMT1 阻害剤である GSK-3484862 処理によるメチル化レベルの用量依存的な減少を測定できた。また、得られた modBam ファイルをマッピングすることにより、部位特異的なメチル化解析が可能となり、LINE-1 配列に着目したメチル化レベルの検討が可能となった。これらの結果から、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ことが示されたことから、今後本試験法を用いて香料を含めた各種化学物質によるエピジェネティックな影響を評価したい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

- 1) Yauk CL, Lynch AM, Dobrovolsky VN, Schuler M, Smith-Roe SL, Fitzgerald D, Higgins J, Honarvar N, Le Curieux F, Matsumura S, Minocherhomji S, Recio L, Salk JJ, Sugiyama KI, Suzuki T, Wills JW, Marchetti F. Application of error-corrected sequencing technologies for in vivo regulatory mutagenicity assessment. Regul Toxicol Pharmacol. 2026, 164:105985.
- 2) Honda H, Suzuki T, Kitajima M, Kondo NI, Miyata K, Utsumi S, Yamada M. The new era shaped by environmental genome monitoring - symposium of the Japanese environmental mutagen and g

enome society (JEMS), 2024. Genes Environ. 2025, 47: 6.

- 3) Matsumura S, Hosoi S, Hirose T, Otsubo Y, Saito K, Miyazawa M, Kawade A, Hakura A, Kakiuchi D, Asakura S, Koyama N, Okada Y, Chikura S, Kimoto T, Masumura K, Suzuki T, Sugiyama KI. Whole genome mutagenicity evaluation using Hawk-Seq™ demonstrates high inter-laboratory reproducibility and concordance with the transgenic rodent gene mutation assay. Genes Environ. 2025, 47: 13.

G-2. 学会発表

- 1) 降旗千恵, 杉山圭一, 鈴木孝昌. 遺伝毒性肝発がん物質の予測に有用な 4 マーカー遺伝子 (Bax, Btg2, Ccng1, and Cdkn1a) 第 84 回日本癌学会学術総会, 金沢市 (2025. 9)
- 2) Sugiyama, K., Grúz, P., Sato, K. and Honma, M.: Effects of anthraquinone derivatives on expression of yeast *FLO1* gene under epigenetic regulation and *Oct3/4* gene in ES cells, the Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EMGS) 2025 Annual Meeting. Poster, September 8, 2025. Rochester, NY, USA.
- 3) 鈴木 孝昌, 三島 雅之, 笠原 杏奈, 最上 由香里, 高橋 華奈子, 佐藤 薫, 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, 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会, 静岡市 (2025. 11)
- 4) 鈴木 孝昌, 三島 雅之, 佐藤 薫, 杉山 圭一, 動物細胞を用いた DNA メチル

別添 4

化検出法の検討，日本農芸化学会
2026 年度大会，京都市（2026. 3）

- 5) 最上 由香里，高橋 華奈子，鈴木 孝
昌，伊澤 和輝，三島 雅之，柳井 修
一，堀端 克良，小泉 修一，杉山 圭
一，佐藤 薫，神経細胞、ミクログリア
における細胞老化にともなうゲノム変
化と表現系の解析，日本薬理学会第 99
回年会，仙台市（2026. 3）

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