

令和2年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性評価法の
確立に関する研究

分担研究課題： Acetamide の一般毒性・遺伝毒性・発がん性短期包括試験法による評価

研究分担者： 石井雄二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
高須伸二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
西川秋佳 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
小川久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

食品香料として用いられていた acetamide はラット肝発がん性を有する。FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）は、その機序に遺伝毒性機序の関与が否定できないという理由から添加物としての使用は不適切としたものの、種々の遺伝毒性試験は陰性であることから、その関与は未だ明らかになっていない。本研究では、*gpt delta* ラットを用いた一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験を用いて、acetamide の包括的評価を実施した。本年度は acetamide を 0.625, 1.25 および 2.5% の濃度で 13 週間混餌投与した F344 系 *gpt delta* ラットの肝臓における発がん性評価と小核試験を実施した。さらに、肝臓小核試験の結果の有効性を確認するため標準プロトコールに従い F344 ラットに acetamide を 4 週間混餌投与し、肝臓および骨髄小核試験を実施した。肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の数および面積は発がん用量である 1.25% から有意に上昇した。肝臓小核試験では通常の小核に加え大型の小核を有する肝細胞が検出され、どちらも 1.25% から有意に増加した。標準プロトコールの肝臓小核試験でも同様の変化が認められたが、骨髄小核試験は陰性であった。さらに、セントロメア FISH 法により大型の小核に染色体が含まれることを確認した。以上より、acetamide は肝臓特異的に染色体異常を誘発し、その機序には肝臓における代謝活性化が寄与すると考えられた。また、本研究により GST-P 陽性細胞巢を用いた発がん性評価の有効性に加え、肝臓小核試験が *in vivo* における染色体異常の検出に有用であること、包括試験への組み込みが可能であることが確認された。

A. 研究目的

合成香料には個別指定品目に加えて、化学構造から使用が認められているいわゆる「18 類」と呼ばれる 3000 を超える品目が例示されている。しかし、その「18 類」の中の一つ 3-acetyl-2,5-dimethylthiophene は、明確な *in vivo* 遺伝毒性を示すことが明らかとなり、2013 年に欧米および我が国においても使用禁止処置がとられた。また、estragole, methyleugenol, safrole 及び elemicin といったフェノールエーテル類の天然香気成分は、ラット肝発がん性を有し、その機

序に直接的な DNA 損傷を介した突然変異誘発性が関与することを我々は明らかにしてきている¹⁻⁴⁾。このように、指定対象の香料についてもその安全性が十分に担保されているとは言えない。国際的な食品添加物の安全性評価委員会である FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）では、香料の評価において、毒性学的懸念の閾値（TTC）と暴露マージン（MOE）を駆使し、多くの場合は実際の試験データを用いずに数多くの香料を評価している。しかしそれは、本来、遺伝毒性がないことが前提とさ

れている。一方、我が国では、90日間試験と遺伝毒性試験が必須とされてきた。このような違いから、EU等におけるポジティブリスト制度導入の動きともあいまって、我が国で現在使用されている香料の安全性を可及的速やかに確認する必要がある。

そこで我々は、任意の臓器における *in vivo* 変異原性の検索が可能なレポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットを用いることで、同一個体において一般毒性、遺伝毒性及び発がん性に関する情報を短期間で得ることが出来る包括的試験法を開発し、alkoxybenzene 化合物や furan 誘導体の評価を行ってきた³⁻⁵⁾。本研究では JECFA で登録されている食品香料または過去に登録されていた香料の中から、ヒト健康影響が懸念される物質について一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験による評価を実施し、ヒトリスク評価に資するデータを提供するとともに、食品添加物の安全性評価における本試験法の有用性を確認することを目的とした。

Acetamide は過去に食品香料として用いられてきたが、ラット肝臓において強い発がん性を有する。その発生頻度の高さから、JECFA は本剤の発がん性に遺伝毒性メカニズムの関与が疑われるとし、食品添加物としての使用は不適切と判断した⁶⁾。一方、遺伝毒性試験では、コメットアッセイにおいて陽性の結果があるものの、Ames 試験及び *in vivo* 小核試験を含む多数の試験においていずれも陰性であることから、その発がん過程における遺伝毒性機序の関与の有無は明らかになっていない。また、acetamide はタバコ煙中や、牛乳、コーヒーといった食品中に含まれることから^{7,8)}、食品を介して非意図的に暴露されており、ヒト健康への影響が懸念されるが、毒性情報は乏しく、ヒトリスク評価に資する情報の取得が喫緊の課題である。

昨年度までに、雄性 6 週令の *gpt delta* ラットに acetamide を 0.625、1.25 および 2.5% の濃度で 13 週間混餌投与し、一般毒性評価

及び遺伝毒性評価を実施した。その結果、一般毒性評価では acetamide が 1.25% から肝臓及び造血器系組織に毒性影響を示し、無毒性量は 0.625% (394 mg/kg 体重/日に相当) であることを明らかにした。遺伝毒性評価では acetamide が発がん標的臓器においても変異原性を示さないことを明らかにした。本年度は発がん性評価としてラット肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の検索と、新たに遺伝毒性評価として染色体異常を検出する肝臓小核試験を実施した。さらに、包括試験の 13 週間投与における小核試験で得られたデータの有効性を確認する目的で、標準プロトコールである 4 週間投与における acetamide の肝臓および骨髄小核試験を実施し、結果を比較した。

B. 研究方法

B-1. 材料及び試薬

Acetamide は東京化成工業株式会社（東京）から購入した。

B-2. Acetamide の一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験

B-2-1 動物実験

動物は 5 週令の雄性 F344 系 *gpt delta* ラット 40 匹を日本エスエルシー株式会社（静岡）から購入し、一週間の馴化後、実験に供した。動物の飼育はバリヤーシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数 18 回/時（オールフレッシュ）、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯で、飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 または 3 匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス社（東京）のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、飲料水として水道水を試験期間中自由に摂取させた。40 匹の F344 系 *gpt delta* ラットを各群 10 匹に配し、対照群と低用量、中間用量及び高用量群の計 4 群を設けた。Acetamide の投与は用量設定試験の結果に基づいて、高用量

を 2.5%、中間用量、低用量群は公比 2 で除した 1.25%、0.625%とし、粉末飼料に混じり、13 週間自由摂取させた。試験期間中、飲水及び飼料の交換は週 1 回、一般状態観察を連日実施し、体重及び摂餌量測定は週 1 回実施した。剖検の 16 時間前より絶食させ、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈から採血後、屠殺・剖検した。

B-2-2. 発がん性評価

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

B-2-3. 遺伝毒性評価（肝臓小核試験）

肝臓小核試験には 10%中性緩衝ホルマリン液で固定した肝組織を用いた⁹⁾。2~3 mm 大にカットした肝組織 10 個を 12N 水酸化カリウム溶液に入れ、室温で 16 時間インキュベーションし、洗浄後、水でホモジナイズした。遠心分離後、10%中性緩衝ホルマリンで洗浄し、固定した。細胞懸濁液を SYBR Gold で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。2000 個の肝細胞（HEPs）をカウントし、そのうち小核を有する肝細胞（MNHEPs）の割合を算出した。主核の直径の 1/4 以下の物を通常の小核（MN）、1/2 ~ 1/4 の物を大型の小核（LMN）としてカウントした。

B-3. Acetamide の *in vivo* 染色体異常試験

B-3-1 動物実験

動物は 5 週齢の雄性 F344 ラット 30 匹を日本エスエルシー株式会社（静岡）から購入し、一週間の馴化後、実験に供した。動物の飼育はバリ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 $24 \pm 1^\circ C$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数 18 回/時（オールフレッシュ）、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯で、飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 または 3 匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス社（東京）のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、飲料水として水道水を試験期間中自由に摂取させた。30 匹の F344 ラットを各群 5 匹に配し、対照群と 0.625% 群、1.25% 群及び 2.5% 群、陽性対照として mitomycin C 及び colchicine 投与群の計 6 群を設けた。Acetamide は粉末飼料に混じり、4 週間自由摂取させた。Mitomycin C 及び colchicine は 0.25 及び 0.6 mg/kg/day の用量で 2 週間腹腔内投与した。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。

B-3-2. 遺伝毒性評価（骨髄及び肝臓小核試験）

剖検時に採取した左大腿骨の両端を切断後、非働化ウシ胎児血清（FBS）で洗い出し、骨髄細胞を採取した。採取した細胞は遠心分離し、細胞濃度を調整した後、細胞懸濁液を用いてスライドガラス状に塗抹し、風乾後メタノール固定した。観察時にはアクリジン・オレンジで染色し蛍光顕微鏡で観察した。4000 個の多染性赤血球をカウントし、そのうち MN を有する多染性赤血球の割合を算出した。

肝臓小核試験については B-2-3 を参照。

B-3-3. セントロメア FISHによる小核における染色体の検出

ラットのサテライト DNA 配列のプロローブを用いてラット染色体のセントロメアの染色を行った¹⁰⁾。プライマーには 5'-TCCCCGCTTGGAACGAAGAGA-3' 及び 5'-TTCTATATCCCGAACAGTCC-3' を用いた。肝細胞懸濁液をスライドガラスに塗抹後メタノール固定し、-20°C で保存した。プロテアーゼ処理後、2xSSC/70%ホルムアミドで変性させ、エタノールで脱水した。digoxigenin 標識した DNA プロローブを含むハイブリダイゼーションバッファーを滴下し、80°C で 10 分間加熱した後、37°C で 16 時間インキュベートした。洗浄後、抗 digoxigenin マウスモノクローナル抗体を室温で 2 時間処理し、Red-X 標識抗 mouse 抗体で 10 分間処理した後、VECTASHIELD 社製 mounting medium with DAPI で封入し、蛍光顕微鏡で観察した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

C-1. Acetamide の一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験

C-1-1. 発がん性評価

GST-P 陽性細胞巢の一部は病理組織学的検索において認められた変異肝細胞巢と一致して発現し、その数及び面積は発がん用量である 1.25% から有意に増加した (Fig.1)。

C-1-2. 遺伝毒性評価 (肝臓小核試験)

MNHEPs 及び LMNHEPs は 1.25% から有意に上昇した。なお、LMNHEPs の頻度は MNHEPs よりも高値を示した (Fig.2)。

C-2. Acetamide の *in vivo* 染色体異常試験

骨髄小核試験では陽性対照である mitomycin C 及び colchicine を投与したラットにおいて、小核を有する多染性赤血球の増加が認められたのに対し、acetamide 投与群において変化は認められなかった (Fig.3)。肝臓小核試験では陽性対照である mitomycin C を投与したラットにおいて MNHEPs が、colchicine を投与したラットにおいて LMNHEPs の増加が認められ、acetamide 投与群では 1.25% から MNHEPs 及び LMNHEPs の有意な増加が認められた (Fig.4)。なお、4 週投与における MNHEPs 及び LMNHEPs の割合は、13 週投与に比して高値を示した。

FISH 法による解析の結果、acetamide 及び colchicine に誘発された LMNs において染色体の存在が確認された (Fig.5)。

D. 考察

肝臓の GST-P 陽性細胞巢の数及び面積の有意な増加は 1.25% から認められ、acetamide の肝発がん性と一致した。このことから、本法が包括的毒性試験における発がん性評価に有効であることを確認した。また、GST-P 陽性細胞巢が検出される条件下においても、*in vivo* 変異原性試験が陰性だった事実は、acetamide の肝発がん性に突然変異誘発性が寄与しないことを支持するものと考えられた。

肝臓小核試験で認められた LMNHEPs は、前年度実施した病理組織学的検索にお

いて肝臓で高頻度に認められた細胞質内封入体と同一と考えられた。FISH 分析の結果、acetamide により誘発された LMNs には、異数性誘発物質である colchicine によって誘発された LMNs と同様に染色体が含まれることが確認され、acetamide は異数性誘発物質であることが示唆された。肝臓小核試験の結果、MNHEPs 及び LMNHEPs はいずれも発がん用量である 1.25% から有意に増加し、同様の結果は標準プロトコール（4 週間投与）で実施した肝臓小核試験においても認められたことから、染色体異常が acetamide の肝発がん性に寄与することが示唆された。一方、骨髄小核試験は陰性であったことから、acetamide は肝臓に選択的に染色体異常を誘発し、その機序には肝臓における代謝活性化が寄与すると考えられた。一方、肝臓小核試験の標準プロトコールとして推奨されている 4 週間投与に比べ、13 週間投与では MNHEPs 及び LMNHEPs の割合がわずかに減少したものの、本法が 13 週間投与した肝臓でも染色体異常誘発性を評価できる十分な検出感度を有することを確認した。

E. 結論

Acetamide が肝臓特異的に小核を形成する異数性誘発物質であることを明らかにし、その染色体異常が肝発がん性に寄与することが示唆された。一方、*gpt delta* ラットを用いた包括的毒性試験における発がん性評価では、GST-P 陽性細胞巢の検索が有効であることを確認した。さらに、肝臓小核試験は *in vivo* における染色体異常誘発性を検出する有用な手法であり、包括試験への組み込みも可能であることを確認した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果

G-1. 発表論文

Nakamura K, Ishii Y, Takasu S, Nohmi T, Shibutani M, Ogawa K. Lack of *in vivo* mutagenicity of acetamide in a 13-week comprehensive toxicity study using F344 *gpt delta* rats. *Toxicol. Sci.* 177, 431-440 (2020).

G-2. 学会発表

- 1) 中村賢志, 石井雄二, 木島綾希, 高須伸二, 能美健彦, 渋谷 淳, 小川久美子「Acetamide のラット肝発がん過程における染色体異常及び DNA 損傷の関与」第 47 回日本毒性学会学術年会(2020 年 6 月)
- 2) 中村賢志, 石井雄二, 木島綾希, 高須伸二, 能美健彦, 渋谷 淳, 小川久美子「染色体異常により誘発される小核形成を介した acetamide の肝発がん機序の検討」日本環境変異原学会第 49 回大会(2020 年 11 月)
- 3) 中村賢志, 石井雄二, 高須伸二, 能美健彦, 渋谷 淳, 小川久美子「染色体異常を起点とする acetamide の肝発がん機序の検討」第 37 回日本毒性病理学会学術集会(2021 年 2 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

参考文献

- 1) Suzuki Y, Umemura T, Hibi D, Inoue T, Jin M, Ishii Y, Sakai H, Nohmi T, Yanai T, Nishikawa A, Ogawa K. Possible involvement of genotoxic mechanisms in estragole-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Arch. Toxicol.* 86, 1593-1601 (2012).
- 2) Suzuki Y, Umemura T, Ishii Y, Hibi D, Inoue T, Jin M, Ssakai H, Kodama Y, Nohmi T, Yanai T, Nishikawa A, Ogawa, K. Possible involvement of sulfotransferase 1A1 in estragole-induced DNA modification and carcinogenesis in the livers of female mice. *Mutat. Res.* 749, 23-28 (2012).
- 3) Jin M, Kijima A, Suzuki Y, Hibi D, Inoue

- T, Ishii Y, Nohmi T, Nishikawa A, Ogawa K, Umemura T, Comprehensive toxicity study of safrole using a medium-term animal model with *gpt* delta rats. *Toxicology*, 290, 312-321.
- 4) Jin M, Kijima A, Hibi D, Ishii Y, Takasu S, Matsushita K, Kuroda K, Nohmi T, Nishikawa A, Umemura T, *In vivo* genotoxicity of methyleugenol in *gpt* delta transgenic rats following medium-term exposure. *Toxicol. Sci.* 131, 387-394.
 - 5) Hibi D, Yokoo Y, Suzuki Y, Ishii Y, Jin M, Kijima A, Nohmi T, Nishikawa A, Umemura T, Lack of genotoxic mechanisms in early-stage furan-induced hepatocellular tumorigenesis in *gpt* delta rats. *J. Appl. Toxicol.*, 37, 142-149 (2017).
 - 6) JECFA : WHO Food Additives Series, Evaluation of Certain Food Additives, Report of 65th JECFA meeting, 2005
 - 7) Diekmann J, Wittig A, Stabbert R, Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of acrylamide and acetamide in cigarette mainstream smoke after on-column injection. *J. Chromatogr. Sci.*, 46, 659-663 (2008).
 - 8) Vismeh R, Haddad D, Moore J, Nielson C, Bals B, Campbell T, Julian A, Teymouri F, Jones AD, Bringi V, Exposure assessment of acetamide in milk, beef, and coffee using xanthidrol derivatization and gas chromatography/Mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 66, 298-305 (2018).
 - 9) Hamada S, Shigano M, Kawakami S, Ueda M, Sui H, Yamada K, Haio S, Momonami A, Maeda A, Terashima Y, Ohyama W, Morita T, Hayashi M, Evaluation of the novel liver micronucleus assay using formalin-fixed tissues. 41, 13 (2019).
 - 10) Takeiri A, Motoyama S, Matsuzaki K, Harada A, Taketo J, Katoh C, Tanaka K, Mishima M, New DNA probes to detect aneuploidy in rat bone marrow micronucleated cells by a pan-centromeric FISH analysis. *Mutat. Res.* 755, 73-80 (2013).

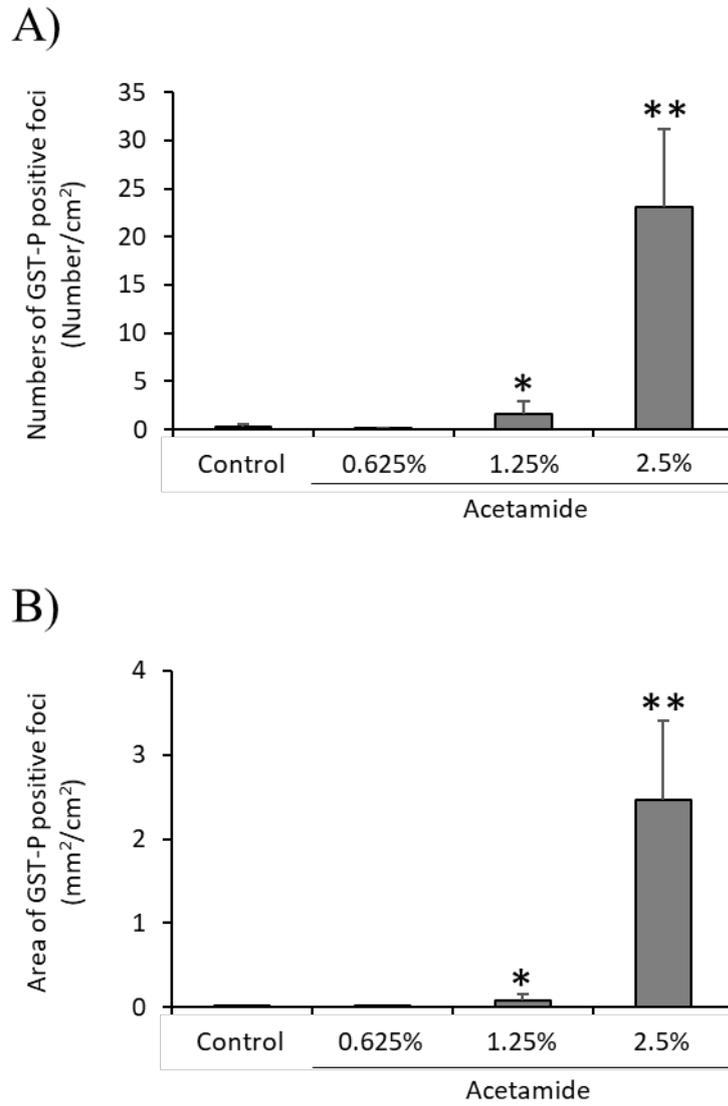


Figure 1. Number (A) and area (B) of GST-P-positive foci in the livers of F344 *gpt* delta rats given a diet containing acetamide for 13 weeks. Data represent the means \pm SDs. *, **: Significantly different from the control group at $p < 0.05$ and 0.01 , respectively.

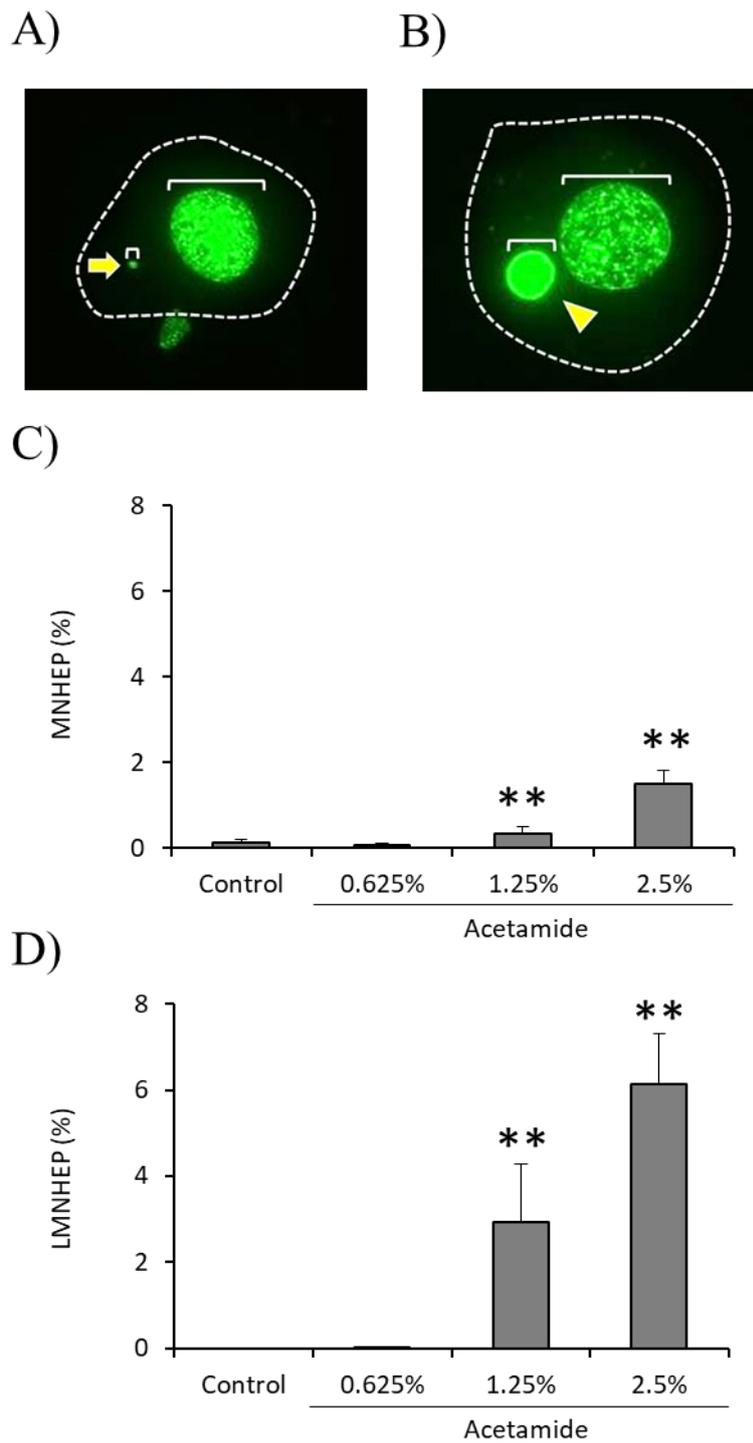


Figure 2. *in vivo* micronucleus assay in the livers of F344 *gpt* delta rats given a diet containing acetamide for 13 weeks. Representative photos of micronucleated hepatocytes (MNHEPs) (A) and large micronucleated hepatocytes (LMNHEPs) (B) in *in vivo* liver micronucleus assay (yellow arrow; micronucleus). Dashed line indicates cell border. (B) The quantification of ratio MNHEP/HEP (C) and LMNHEP/HEP (D). **: Significantly different from the respective control groups at $p < 0.01$, respectively.

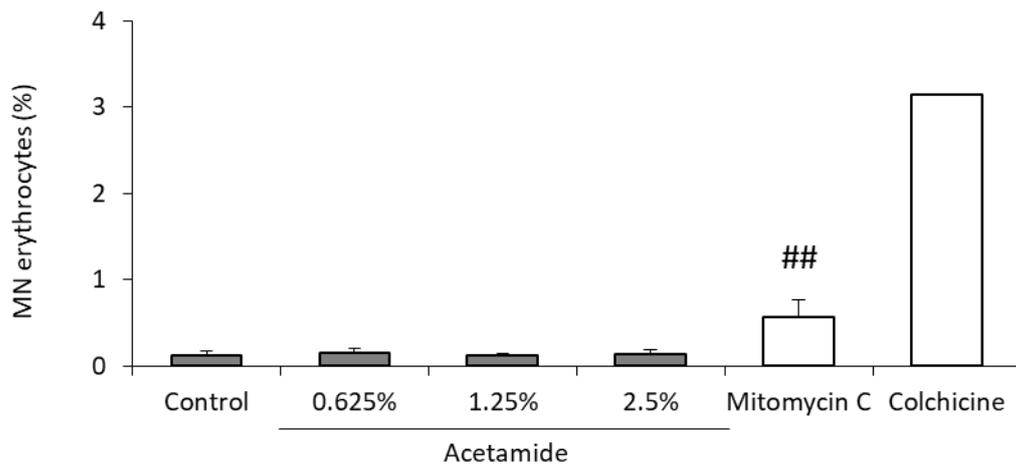


Figure 3. *in vivo* micronucleus assay in the erythroblasts of F344 *gpt* delta rats given a diet containing acetamide for 4 weeks. The quantification of ratio micronucleated erythroblast/erythroblast. ##: Significantly different from the respective control groups at $p < 0.01$, respectively.

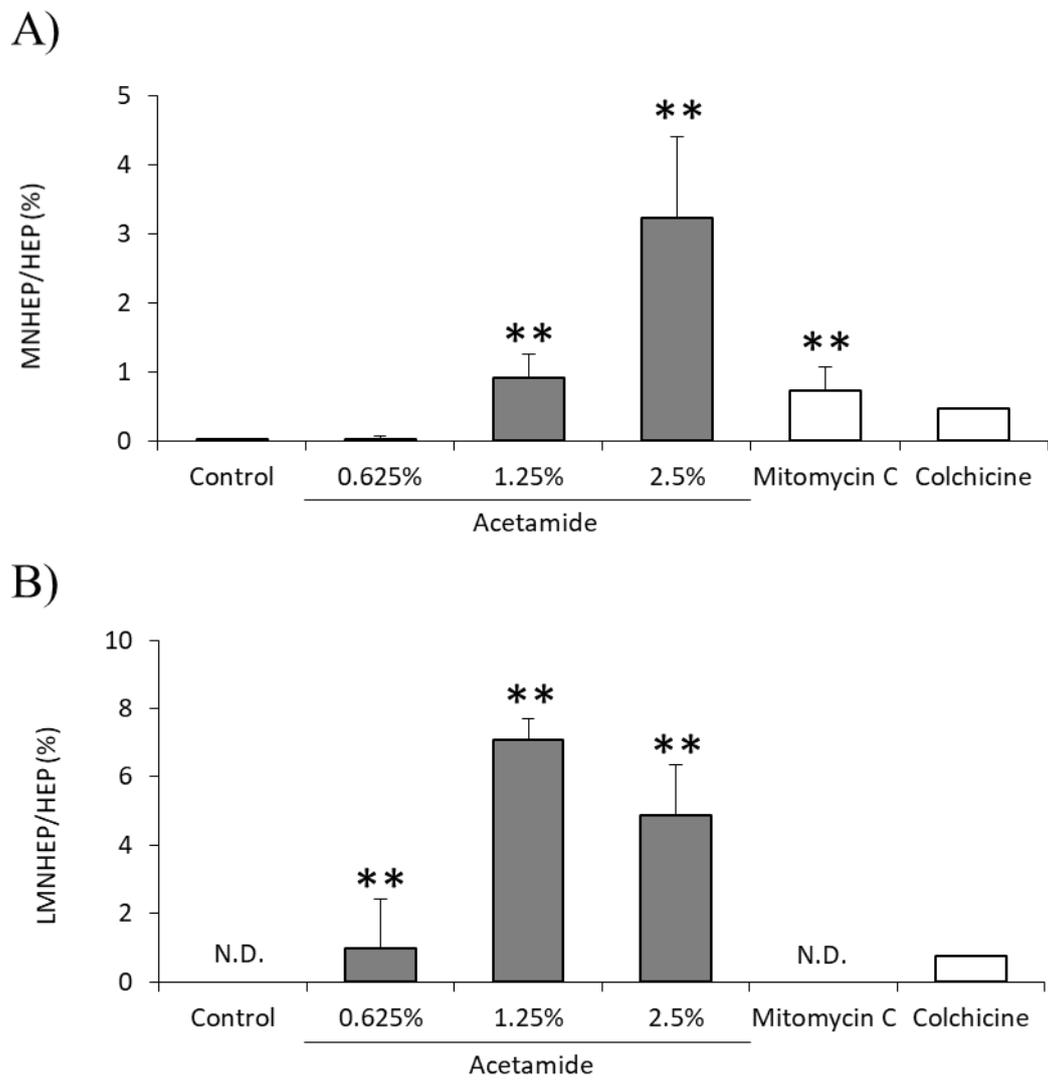


Figure 4. *in vivo* micronucleus assay in the livers of F344 *gpt* delta rats given a diet containing acetamide for 4 weeks. (A) The quantification of ratio MNHEP/HEP (C) and LMNHEP/HEP (B). **: Significantly different from the respective control groups at $p < 0.01$, respectively.

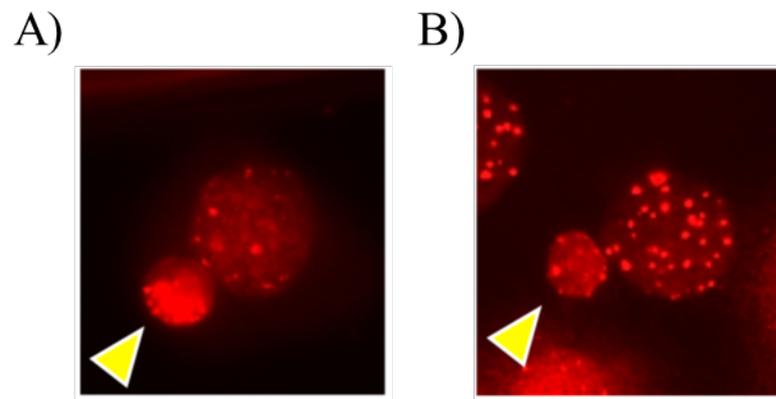


Figure 5. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis with a centromere probe. Representative photos of LMNHEPs induced by acetamide (A) and colchicine (B).