

令和4年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
香料を含む食品添加物の遺伝毒性から発がんに至る毒性評価スキーム
確立に向けた基盤的研究

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

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

研究要旨

今年度の本分担研究については、香料等における定量的構造活性相関（QSAR）の活用スキームの提案に向けて、香料の中でも懸念を有する物質が多いフラン骨格物質の遺伝毒性評価を行った。また、ヒト TK6 細胞をもとにエピジェネティックな変化を定量可能なエピ遺伝毒性試験の検出能の評価を行った。さらに、酵母細胞を用いてエピジェネティック変異原検出系（FLO assay）の妥当性の確認を試みた。使用量から優先的に遺伝毒性評価することが望ましい香料を選定するための基礎データの収集も行った。詳細については以下の通りである。

定量的構造活性相関（QSAR）の活用スキームの提案に関しては、これまで Ames 試験が実施されているフラン骨格を有する香料 12 物質と香料には登録されていないが類似の香料様 6 物質に対する QSAR による解析結果に加え、令和 4 年度もカルボニル基とフラン骨格の両方を有する香料様 3 物質に対して実際に Ames 試験を実施し、QSAR 予測結果と比較した。解析には知識ベースと統計ベースの 2 種類の QSAR を使用した。令和 4 年度に Ames 試験を実施した 3 物質は、1 物質のみ両方の QSAR の予測結果と不一致だった。Ames 実試験と QSAR 予測は一致するとは限らないが、ジケトンなどカルボニル基を含有部分に注目した考察を行うことで、活用スキームで要となり得る構造的な知見が得られた。

TK6 細胞を用いたエピ遺伝毒性試験系については、TK 遺伝子をレポーター領域としてエピジェネティックな変化を検出する試験細胞株 LmTK6 を用いて、バイサルファイトシーケンスおよびクロマチン免疫沈降法によって TK 遺伝子領域のクロマチン修飾状態を同定した。また、DNA メチル化酵素阻害候補物質 5-aza-deoxycytidine、GSK-3484862、および RG108 の 3 化合物についてエピジェネティックな作用を比較定量した。

FLO assay については、Alizarin 類縁体の Emodin を用いてエピジェネティック変異原検出系 FLO assay を行い、Alizarin 同様の結果が得られた。

香料の使用量調査については、国内における香料は個別指定香料を含んだ計 18 類に分類されている。この個別指定香料を除いた 18 類香料について年間使用量に関する情報を精査し、分類ごとの使用実態を明らかにした。

A. 研究目的

香料等の食品添加物の遺伝毒性の第一段階（スクリーニング）の評価には、*in silico*も

しくは*in vitro*手法を用いることが効率的で妥当である。現状Ames試験は現在もその中心を担っている一方で、*in silico*の遺伝毒性

評価としてのAmes変異原性を予測する定量的構造活性相関(QSAR)モデルの活用が進んでいることから、香料等におけるAmes/QSARの活用スキームの提案に資する研究を行う。また、新たな遺伝毒性研究の分野としてゲノムのエピジェネティックな変化を介し発がんが促進されることも明らかにされつつあり、香料等の食品添加物によるゲノム不安定性からの発がん予測としての新たな*in vitro*試験系の構築も待たれている。そこで、*in vitro*遺伝子突然変異試験をプラットフォームとして、酵母と哺乳類細胞を活用したエピジェネティックな変化を検出定量する新規試験法の構築も検討する。令和4年度からは、上述の検討課題に加えて、我が国における香料の使用実態から、優先的に遺伝毒性評価を実施することが望ましいと考えられる香料を選定するための基盤構築も開始した。

B. 研究方法

B-1. Ames/QSARを含む香料の遺伝毒性評価

香料等におけるAmes/QSARの活用スキームの提案につなげるため、これまでの国立医薬品食品衛生研究所での変異遺伝部の結果で香料の中でも遺伝毒性(Ames変異原性)懸念を有する物質が多いフラン骨格の化学物質に着目してきた。本研究では、代表的な商業QSARモデル、知識ベースのLhasa Limited社(UK)のDEREK Nexus(ver. 6.2.1, Nexus 2.5.2)、及び統計ベースのMultiCASE社(USA)のCASE Ultra(GT1_BMUTモジュール, ver. 1.9.0.2)を用いた。Case Ultraにおいて、Inconclusive(判定がつかない)の結果の場合は、保守的に陽性という判断を行った。

令和4年度はカルボニル基とフラン骨格の両方を有する香料ではないが類似した物質に注目し、純度95%以上の被験物質の入手が可能な以下の3物質に対しAmes試験の実施し、併せてQSARによる評価結果と比較を行った。

B-2. ヒト細胞を用いたエピ遺伝毒性試験の実施

B-2-1. 細胞培養

試験に用いるヒトリンパ芽球細胞株LmTK6は、TK6細胞株をもとにCRISPR/dCas9-DNMT3A DNAメチル化システムを用いて、チミジンキナーゼ(TK)遺伝子をエピジェネティックに不活化制御した細胞株である。LmTK6は、10% FETAL BOVINE SERUM (CCB), 200 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)、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°Cの条件で培養した。

B-2-2. エピ遺伝毒性試験

被験物質として5-aza-deoxycytidine(5-aza-dC)は東京化成工業(株)、GSK-3484862とRG108はChemietekよりそれぞれ購入したものをを用いた。細胞培養液を1,500 rpm 5分間遠心分離してTFTを含む上清を取り除き、TFTを含まない培地を加えて 5×10^5 cell/mLの細胞懸濁液を調製した。被験物質は細胞懸濁液に対して100分の1量加え、37°Cで24時間培養して処理を行った。その後細胞を洗浄し、以下の条件でプレATINGを行った。平板効率測定のために8 cells/mLで96穴プレートに200 µl/wellで播種した。並行してTK復帰頻度測定のために $2 \times 10^2 \sim 4 \times 10^3$ 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。TK遺伝子におけるDNAメチル化領域はバイサルファイトシーケンスによって、またヒストン修飾マークの局在はH3K4me3抗体(ab8589, abcam)を用いたクロマチン免疫沈降法によって同定した。

B-3. 酵母細胞を用いたエピ遺伝毒性試験の実施

ヒト *DNMT* 酵母には、DNA 維持メチル化酵素 *DNMT1* と新規メチル化酵素 *DNMT3B* 遺伝子発現プラスミドを出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* YPH250 株に同時形質転換した株を使用した。また、**Emodin**と**Alizarin**はそれぞれ東京化成工業（株）と和光純薬工業（株）より購入したものを使用した。培養温度は30℃とし、SD培地（最少培地）にて培養を実施した。凝集性の確認は定常期初期の培養液で行なった。

B-4. 香料の使用量調査

我が国で食品添加物として指定された香料には、その安全性や品質が個別に評価されて指定された香料（個別指定香料と略す）を含め、図 1 に示す判断樹により類又は誘導体として指定されている 18 項目の香料（18 類香料）に分類されている。個別指定香料を含んだこの 18 類香料として 3100 種類以上がリストに掲載されているが、すでに評価済みの個別指定香料を除いたそれら 18 類香料のリスク管理上の基礎データを得るため、国内に流通している 18 類香料の使用量の傾向について調査を開始した。

今回、令和 2 年において国内で実際に使用された個別指定香料および 18 類香料の類番号 1~18 に属する約 1,800 種類の香料ごとの使用量データ（出典：令和 3 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）「食品添加物の安全性確保に資する研究」分担研究「食品添加物の摂取量推計及び香料規格に関する研究」資料 4「香料化合物使用量調査結果」）を活用し、類ごと、および 18 類香料に属する香料品目ごとの使用量の傾向について調べた。

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

C-1. Ames/QSARを含む香料の遺伝毒性評価

表1には、令和4年度に実施したAmes試験結果とQSAR予測結果を示した。全ての物質でAmes試験陰性であり、統計ベースQSARのInconclusiveを陽性と判断すると、2物質において試験結果と2つのQSAR予測結果が一致し、1物質が[D.試験結果と2つのQSAR予測結果が不一致]であった。

表2に、フラン骨格やその類似骨格を持つ21物質のAmes試験結果とQSAR予測結果を示した。令和4年度の3試験結果を含む21のAmes試験は試験報告書に戻って詳細が確認可能であり、令和3,4年度にAmes試験を実施した9物質は香料類似物質であった。

Ames試験の結果は、8物質で陽性であり、12物質で陰性、1物質でInconclusiveであった。Inconclusiveも陽性として評価すると、6物質が[A.試験結果と2つのQSAR予測結果が一致]し、[B.試験結果と知識ベースQSAR予測結果が一致]が9物質、[C.試験結果と統計ベースQSAR予測結果が一致]が1物質、[D.試験結果と2つのQSAR予測結果が不一致]が5物質であった。知識ベースの予測では21物質中15物質が一致し、統計ベースでは、21物質中7物質が一致した。

C-2. ヒト細胞を用いたエピ遺伝毒性試験の実施

C-2-1. エピ遺伝毒性評価に用いるTK遺伝子のクロマチン修飾状態の可視化

TK遺伝子上のDNAメチル化状態をバイサルファイトシーケンスによって解析した結果、TK遺伝子エキソン1上流150 bpの範囲でCpG配列の高度なメチル化が観察された。また、クロマチン免疫沈降法によって転写活性化マークであるヒストンH3K4me3について解析した結果、野生株と同程度のH3K4me3の局在が検出された（図2）。

C-2-2. DNAメチル化阻害候補物質における

エピジェネティック作用の比較定量評価

5-Aza-dC及びGSK-3484862においては、37℃ 24時間処理後に溶媒対象と比較してTK復帰頻度がそれぞれ最大で230倍、1,900倍まで上昇した。一方でRG108では、24時間処理後にTK復帰頻度の変化はみられなかった(図3)。

C-3. 酵母細胞を用いたエピ遺伝毒性試験の実施

Emodinが凝集性に及ぼす影響をDNMT yeastで検討した。その結果、Emodin(4.8 μM)の用量依存的に凝集性が促進される傾向を確認した(図4)。なお、ポジティブコントロールとしてAlizarinの凝集も確認している。

C-4. 香料の使用量調査

国内に流通している食品添加物としての指定香料は、すでに指定の際に安全性や品質が評価されている個別指定香料以外については、判断樹を基に構造によって類番号1~18に分類されている(図1)(出典:平成29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のための研究」分担研究「香料規格及び食品添加物の摂取量推計に関する研究」資料3(1)「着香の目的で使用される香料化合物類判定の判断樹」)。これら18類香料について、その流通実態調査結果に基づき、類ごとの品目数を比較したところ、エステル類(4類)が最も多く、これは次いで多いケトン類(5類)の約3倍の品目数であった(図5)。また、類ごとの国内使用量の割合においても、エステル類、次いでケトン類が多いことが分かったが(図6)、それ以下の順位にある類ごとの品目数と使用量は必ずしも対応しないことが分かった。

国内で使用されている18類香料の合計量に対する各香料(上位50品目)の使用量の割合を、色で類番号を区別して図7にまとめた。なお、品目名との対応は表3に示した。ここで、使用量の最も多い香料はエチ

ルマルトール(5類)、次いでδ-ドデカラクトン(18類)であったが、類番号に着目するとエステル類の4類が上位50品目中14品目を、次いで脂肪酸類の6類が12品目を占めていることも確認された。

D. 考察

D-1. Ames/QSARを含む香料の遺伝毒性評価

図8にこれまでに実施したフラン類のAmes試験の陽性・陰性の傾向を示す構造をまとめた。令和3年度実施したAmes試験で陽性であったDiethyl 3,4-dihydroxyfuran-2,5-dicarboxylateは、3,4-Dihydroxyfuran構造を有する(表2、図8a-P)。これまでの研究報告書にも類似の言及があるが、加水分解や互変異性により3,4-Dihydroxyfuran骨格を有する4物質(図8a-P)についてはAmes試験陽性の共通の傾向を有した。これら4物質は[B.試験結果と知識ベースQSAR予測結果が一致]した。一方、加水分解反応でOH基を有しない(加水分解や互変異性により3,4-Dihydroxyfuran骨格を有しない)ケトン類2物質では(図8a-N)、類似骨格であってもAmes試験陰性であった。これら2物質は[D.試験結果と2つのQSAR予測結果が不一致(Case UltraはいずれもInconclusive)]であった。Case UltraのInconclusiveを陽性とした保守的なQSAR評価では、QSARだけではなく専門家によるメカニズムに基づく解釈も必要であった。3,4-Dihydroxyfuran骨格の存在も重要ではあるが、互変異性体としてジケトンを生じうることもAmes陽性を示す要素のひとつと考えられる。

フランの2位にカルボニル基の存在する構造(図8c-N)で陰性の結果が多く見られるのが特徴である。ただし、ジケトン(図8c-P)が存在すると強いAmes陽性となる。また、(図8c-Nで)R₄=Hであるフルフラール(CAS 98-01-1)は、試験陰性の報告<<https://anzeninfo.mhlw.go.jp/user/anzen/kag/pdf/B/B98-01-1.pdf>>もあるが、

<<https://anzeninfo.mhlw.go.jp/anzen/gmsds/98-01-1.html>>における生殖細胞変異原性の項目には、「細菌の復帰突然変異試験で陰性の結果が多いが陽性結果もあり」と記載があるため、陰性となる構造からは除外した。

来年度以降は陽性の懸念が高いジケトンに注目して、さらにほかのカルボニル基を有する構造とも比較しながら、インシリコ活用スキームの提案に向けた考察を深めていく。

D-2. ヒト細胞を用いたエピ遺伝毒性試験の実施

LmTK6株のTK遺伝子座においては、遺伝子発現抑制に働くDNAメチル化と転写活性化ヒストン修飾が共存することが示唆された。つまり、TK遺伝子は完全にクロズドなヘテロクロマチン状態ではなく、DNAメチル化状態が柔軟に変化しやすい不活性型と活性型の中間の状態にあると考えられる。このようなクロマチン状態のレポーター遺伝子を利用することで、DNAメチル化の変化を双方向に検出可能であると予想される。

3つの被験物質のうち、5-aza-dC、GSK-3484862については処理濃度依存的にTK復帰頻度の上昇が観察された一方で、RG108については変化が見られなかった。5-Aza-dCおよびGSK-3484862はDNAメチル化酵素とDNAの双方に作用することで阻害効果を示すと考えられ、一方でRG108は*in vitro*で酵素単体に対して基質との結合を競合的に阻害することが報告されている。そのため、細胞内でRG108がDNAメチル化阻害効果を示すためには、より高濃度での処理が必要である可能性がある。以上の結果は、今後香料を含めた様々な物質におけるエピジェネティック変化を評価するための基盤データになり得る。

D-3. 酵母細胞を用いたエピ遺伝毒性試験の実施

本研究からAlizarinの構造類縁体であるEmodinからも酵母凝集性に対してAlizarin同様の作用が検出された。Emodinはヒストンを介したエピジェネティック作用を有する可能性が指摘されている (Evans, L. et al. *J. Nutr. Biochem.* **79**, 108339 (2020))。今後、Emodinのヒストンへの作用機序解析が必要と考えられる。

D-4. 香料の使用量調査

今回、安全性が評価された上で指定されている個別指定香料を対象外とした上で、18類香料の年間使用量に基づきその傾向について調査したところ、本邦における当該香料の使用実態の概要を把握できた。

今後は、これらの傾向を踏まえて遺伝毒性評価試験の対象となる香料を検討していく必要があると考える。

E. 結論

香料として代表的な構造のひとつフラン類に注目してこれまでの結果の整理とAmes試験を実施した。得られたAmes試験結果とQSAR予測結果は必ずしも一致するとは限らない。しかしながら、構造に注目した考察を行うことで、加水分解や互変異性により3,4-Dihydroxyfuranを有する物質と有しない物質に関して、既存のQSARの予測精度向上に資する知見が得られた。今後は情報の整理すすめ、香料類のQSAR予測能向上に資する提案を取りまとめることが必要となる。

樹立したエピ遺伝毒性試験株を用いて、DNAメチル化阻害効果を示す可能性のある化合物のエピジェネティック作用を定量評価することができた。さらにTK遺伝子座におけるDNAメチル化状態およびヒストン修飾状態を可視化したことで、今後化合物の作用機序までを解明するための分子基盤が整った。

Alizarin類縁体のEmodinを用いてFLO assayを行い、Alizarin同様の結果が得られたことから FLO assayの妥当性が高まった

別添 4

とも考えられる。

国内に流通している食品用香料の使用量を整理することで、その使用実態を確認することができた。今回得られた結果は、今後遺伝毒性評価試験の対象とする香料の選定に向けた基盤データになると考える。

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, Sassa A. Analytical technologies to revolutionize the environmental mutagenesis-and genome research-from the basics to the cutting-edge research-: the Open Symposium of the Japanese Environmental Mutagen and Genome Society (JEMS). *Genes and Environment*. 45, 9, (2023)
- 2) Liu W, Yasui M, Sassa A, You X, Wan J, Cao Y, Xi J, Zhang X, Honma M, Luan Y. FTO regulates the DNA damage response via effects on cell-cycle progression. *Mutation Research*. 887, 503608, (2023)

G-2. 学会発表

- 1) DNA二本鎖切断修復におけるNSD2の機能解析, 岩崎滉, 東條あかり, 安井学, 本間正充, 上村慶高, 孫継英, 田代聡, 佐々彰, 浦聖恵, 第40回染色体ワークショップ・第21回核ダイナミクス研究会, 2022/12/21
- 2) DNA修復欠損モデルから迫る核酸誘導性自然免疫の分子機構, 佐々彰, 日本環境変異原ゲノム学会第51回大会, 2022/11/16
- 3) DNA修復欠損による自然免疫惹起の分子メカニズムの解明, 高藤賢, 岩崎滉,

黛結衣子, 立川明日香, 中谷一真, 安井学, 本間正充, 杉山圭一, 藤木亮次, 金田篤志, 菅澤薫, 浦聖恵, 佐々彰, 日本環境変異原ゲノム学会第51回大会, 2022/11/16

- 4) クロマチン構造変化を検出可能なエピ遺伝毒性試験法の開発, 北村蒼史, 山田治人, 高藤賢, 小田切瑞基, 安井学, 本間正充, 杉山圭一, 浦聖恵, 佐々彰, 日本環境変異原ゲノム学会第51回大会, 2022/11/16
- 5) DNA中のリボヌクレオチドに起因する変異誘発機構とゲノム不安定性に関する研究, 佐々彰, 日本環境変異原ゲノム学会第51回大会, 2022/11/15
- 6) ゲノム中リボヌクレオチドの蓄積が誘発するDNA二本鎖切断の修復機構, 黛結衣子, 高藤賢, 立川明日香, 中谷一真, 安井学, 本間正充, 杉山圭一, 菅澤薫, 浦聖恵, 佐々彰, 日本環境変異原ゲノム学会第51回大会, 2022/11/15
- 7) γ H2AXの多角的解析による内因性DNA二本鎖切断の定量評価, 立川明日香, 吉本侑依, 高藤賢, 黛結衣子, 中谷一真, 中村真生, 福田隆之, 菅澤薫, 浦聖恵, 佐々彰, 日本環境変異原ゲノム学会第51回大会, 2022/11/15
- 8) ゲノム不安定性から見た食品の安全性, 杉山圭一, 第42回日本食品・機械研究会年次大会 2022年6月, 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得

該当なし

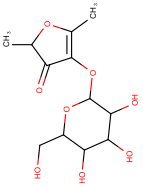
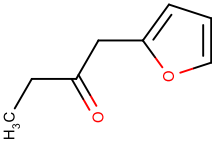
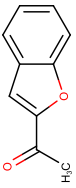
H-2. 実用新案登録

該当なし

H-3. その他

該当なし

表1 令和4年度試験化合物 QSAR 予測 Ames試験結果

CAS RN	物質名	構造	Derek Nexus	CASE ULTRA GT1_BMUT Probability (%)	Ames結果	結果詳細
121063-56-7	2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone β-D-glucopyranoside		PLAUSIBLE	Inconclusive 46.0	Negative	遺伝子突然変異誘発性を、塩基対置換型変異株の <i>Salmonella typhimurium</i> TA100及びTA1535、 <i>Escherichia coli</i> WP2 uvrA並びにフレームシフト型変異株の <i>Salmonella typhimurium</i> TA98及びTA1537を用い、37°C、20分間のプレインキュベーション法により検討した。試験は、代謝活性化非存在下及び存在下の用量設定試験及び本試験により実施し、用量設定試験及び本試験での試験結果の再現性を確認した。本被験物質は、代謝活性化の有無に関わらずいずれの菌株に対しても復帰変異コロニー数を用量反応的に増加させず、陰性対照と比較して復帰変異コロニー数の2倍以上の増加も示さなかった。被験物質処理の用量あたりの復帰変異コロニー数は、全ての用量において、背景データから算出した陰性対照の変動範囲の上限を超えなかった。また、用量設定試験及び本試験において、試験結果に再現性も得られた。陰性対照は、代謝活性化の有無に関わらず全ての菌株に対して、復帰変異コロニー数を陰性対照の2倍以上に増加させた。陰性対照及び陽性対照の平均値は、全ての試験において背景データの変動範囲内であった。また、無菌試験の結果、雑菌の混入がないことが確認された。これらの結果は、試験が適切に実施されたことを示す。試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある要因についても、何ら認められなかった。
4208-63-3	1-(Furan-2-yl)butan-2-one		INACTIVE	Negative 32.8	Negative	遺伝子突然変異誘発性を有さない（陰性）と判断した。
1646-26-0	1-(1-Benzofuran-2-yl)ethanone		INACTIVE	Known Negative 56.5	Negative	

別添 4

表 2 これまで実施された Ames 試験結果と QSAR 予測と構造的特徴

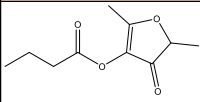
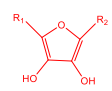
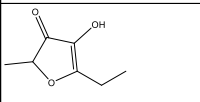
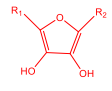
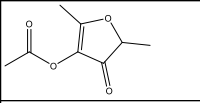
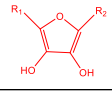
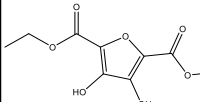
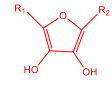
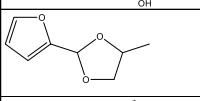
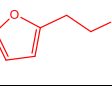
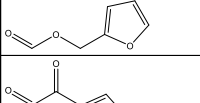
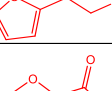
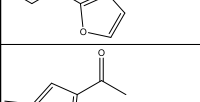
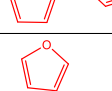
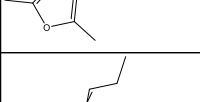
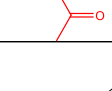
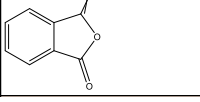
No	CAS番号	物質名	構造	Ames試験結果	Derek Nexus結果	CASE Ultra結果	出典	アラートカテゴリーR4版	モチーフ構造	概要*
2	114099-96-6	(2,5-dimethyl-4-oxofuran-3-yl) butanoate		陽性	PLAUSIBLE	Negative	[令和元年度]	a-P		B.
5	27538-09-6	5-ethyl-4-hydroxy-2-methylfuran-3-one		陽性	PLAUSIBLE	Negative	[令和2年度]	a-P		B.
7	4166-20-5	(2,5-dimethyl-4-oxofuran-3-yl) acetate		陽性	PLAUSIBLE	Negative	[参考文献 1] [平成30年度]	a-P		B.
13	6270-57-1	Diethyl 3,4-dihydroxyfuran-2,5-dicarboxylate		陽性	PLAUSIBLE	Negative	[令和3年度]	a-P		B.
9	4359-54-0	2-(furan-2-yl)-4-methyl-1,3-dioxolane		陽性	INACTIVE	Negative	[参考文献 1]	b-P		D.
3	13493-97-5	furan-2-ylmethyl formate		陽性	EQUIVOCAL	Inconclusive	[参考文献 1] [平成30年]	b-P		A.
14	17090-71-0	2-(furan-2-yl)-2-oxoacetaldehyde		強い陽性	PLAUSIBLE	Positive	[令和3年度]	c-P		A.
1	10599-70-9	1-(2,5-dimethylfuran-3-yl)ethanone		強い陽性	EQUIVOCAL	Known Positive	[H30年度]	d-P		A.
4	17369-59-4	(3Z)-3-propylidene-2-benzofuran-1-one		Inconclusive	INACTIVE	Known Positive	[参考文献 1]			C.

表 2 続き

No	CAS番号	物質名	構造	Ames試験結果	Derek Nexus結果	CASE Ultra結果	出典	アラートカテゴリーR4版	モチーフ構造	概要*
11	98-02-2	furan-2-ylmethanethiol		陰性	INACTIVE	Inconclusive	[参考文献 1]			B.
12	4466-24-4	2-butylfuran		陰性	INACTIVE	Inconclusive	[令和2年度]			B.
6	4077-47-8	4-methoxy-2,5-dimethylfuran-3-one		陰性	PLAUSIBLE	Inconclusive	[平成30年度]	a-N		D.
15	2745-26-8	2-(furan-2-yl)acetic acid		陰性	INACTIVE	Inconclusive	[令和3年度]	b-N		B.
16	62119-70-4	2-(Benzofuran-2-yl)acetic acid		陰性	INACTIVE	Inconclusive	[令和3年度]	b-N		B.
8	4208-57-5	1-(furan-2-yl)butan-1-one		陰性	EQUIVOCAL	Inconclusive	[令和2年度]	c-N		D.
10	620-02-0	5-methylfuran-2-carbaldehyde		陰性	EQUIVOCAL	Inconclusive	[参考文献 1]	c-N		D.
17	21508-19-0	5-Chloro-2-furaldehyde		陰性	INACTIVE	Inconclusive	[令和3年度]	c-N		B.
18	21921-76-6	4-Bromo-2-furaldehyde		陰性	INACTIVE	Negative	[令和3年度]	c-N		A.
19	121063-56-7	2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone β-D-glucopyranoside		陰性	PLAUSIBLE	Inconclusive	令和4年度実施	a-N		D.
20	4208-63-3	1-(Furan-2-yl)butan-2-one		陰性	INACTIVE	Negative	令和4年度実施	B-N		A.
21	1646-26-0	1-(1-Benzofuran-2-yl)ethanone		陰性	INACTIVE	Known Negative	令和4年度実施	c-N		A.

出典：[参考文献 1] T. Kasamatsu, A. Kitazawa, S. Tajima, M. Kaneko, K. Sugiyama, M. Yamada, M. Yasui, K. Masumura, K. Horibata, M. Honma, Development of a new quantitative structure–activity relationship model for predicting Ames mutagenicity of food flavor chemicals using StarDrop™ auto-Modeller™, *Genes and Environment*, 43 (2021) 16. [平成30年度]、[令和元年度]、[令和2年度]厚生労働科学研究費補助金H30-食品-一般-003分担報告書。[令和3年度]厚生労働科学研究費補助金21KA1001分担報告書。

* Aは「試験結果と2つのQSAR予測結果が一致」、Bは「試験結果と知識ベースQSAR予測結果が一致」、Cは「試験結果と統計ベースQSAR予測結果が一致」、Dは「試験結果と2つのQSAR予測結果が不一致」。

表 3 各番号と品目名の対応表

使用量番号※	SEQ No.	FEMA No.	品目名
1	850	3487	ethyl maltol
2	692	2401	delta-dodecalactone
3	1125	2563	cis-3-hexenol
4	489	2361	delta-decalactone
5	1195	2565	hexyl acetate
6	39	2006	acetic acid
7	1465	2633	d-limonene
8	1456	2611	lactic acid
9	2103	2858	phenethyl alcohol
10	2065	2815	oleic acid
11	766	2443	ethyl 2-methylbutyrate
12	2213	2925	propyl acetate
13	625	2746	dimethyl sulfide
14	2305	3204	2-(4-methyl-5-thiazolyl)ethanol
15	959	3174	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone
16	475	2700	cyclotene
17	1111	2560	trans-2-hexenal
18	1822	2695	2-methylbutyric acid
19	40	2008	acetoin
20	1334	2175	isobutyl acetate
21	839	2428	ethyl isobutyrate
22	1102	2567	hexanol
23	1808	3644	2-methylbutyl acetate
24	495	2364	decanoic acid
25	843	2440	ethyl lactate
26	(2676)	4006	l-monomenthyl glutarate
27	845	2442	ethyl levulinate
28		4784	4-hydroxy-6-methyl-2-heptanone
29	1087	2557	hexanal
30	2306	3205	2-(4-methyl-5-thiazolyl)ethyl acetate
31	533	2370	diacetyl
32	2321	3045	alpha-terpineol
33	2298	2684	styralyl acetate
34	345	2249	l-carvone
35	1901	3810	mono-menthyl succinate
36	490	2360	gamma-decalactone
37	1636	2693	methyl butyrate
38	1528	3748	l-menthyl lactate
39	174	3742	(5or6)-decenoic acid
40	1377	2222	isobutyric acid
41	1907	2764	myristic acid
42	2073	2832	palmitic acid
43	1457	2614	lauric acid
44	2451	3294	delta-undecalactone
45	3096	4309	ethyl 2-[(5-methyl-2-propan-2-ylcyclohexanecarbonyl)amino]acetate
46	1624	2676	methyl acetate
47	961	2489	furfural
48	1127	2562	trans-2-hexenol
49	1834	2702	5-methylfurfural
50	2268	2588	raspberry ketone

※ 2020年1～12月に日本で使用された香料化合物（個別指定のものを除く）のうち、使用量の多い順番にナンバリングした数字。

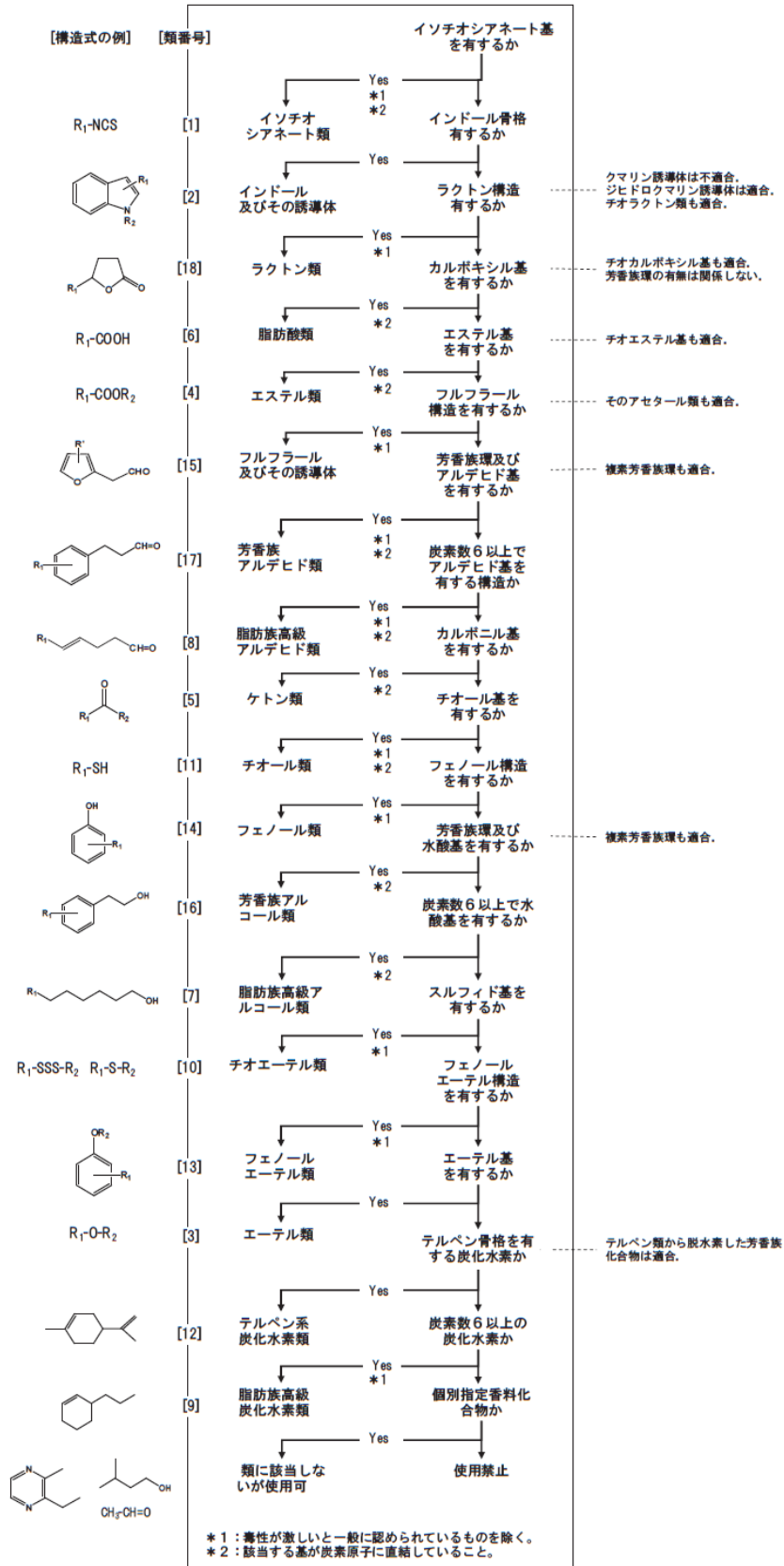


図1 着香の目的で使用される香料化合物類判定の判断樹

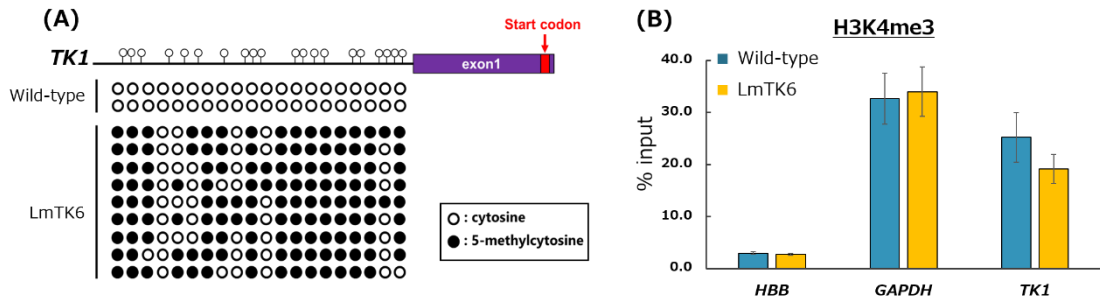


図2 TK遺伝子座のDNAメチル化領域とヒストン修飾の同定
 (A) TK遺伝子のエクソン1上流150 bpの範囲にCpG配列のメチル化が観察された。
 (B) TK遺伝子における転写活性化マークH3K4me3は、LmTK6株と野生株の間で同程度の局在が観察された。転写活性のある遺伝子としてGAPDH、不活性な遺伝子としてHBBを比較解析した。

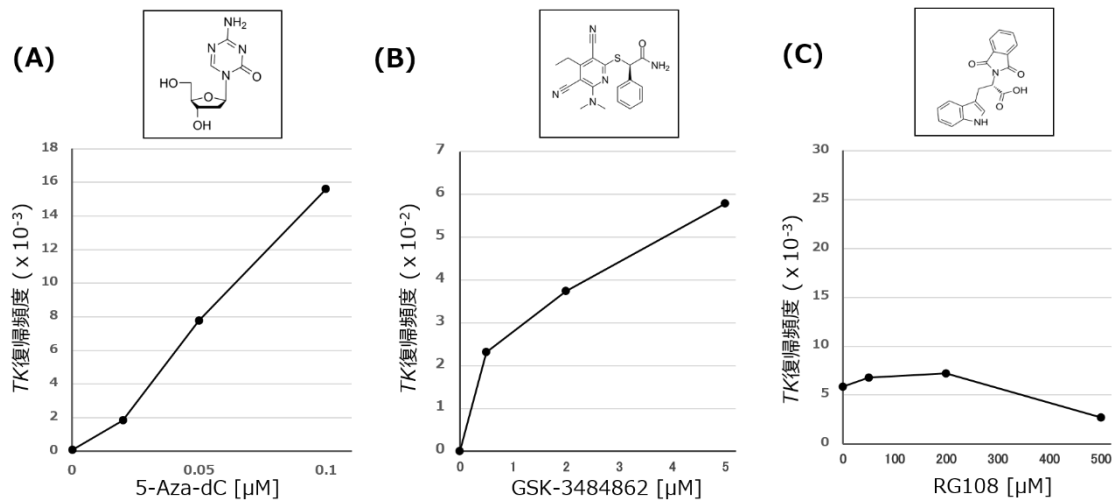


図3 DNAメチル化阻害候補物質におけるエピジェネティック作用の比較
 (A) 5-Aza-deoxycytidine、(B) GSK-3484862、
 および (C) RG108処理後のTK復帰頻度の変化。

DNMT yeast

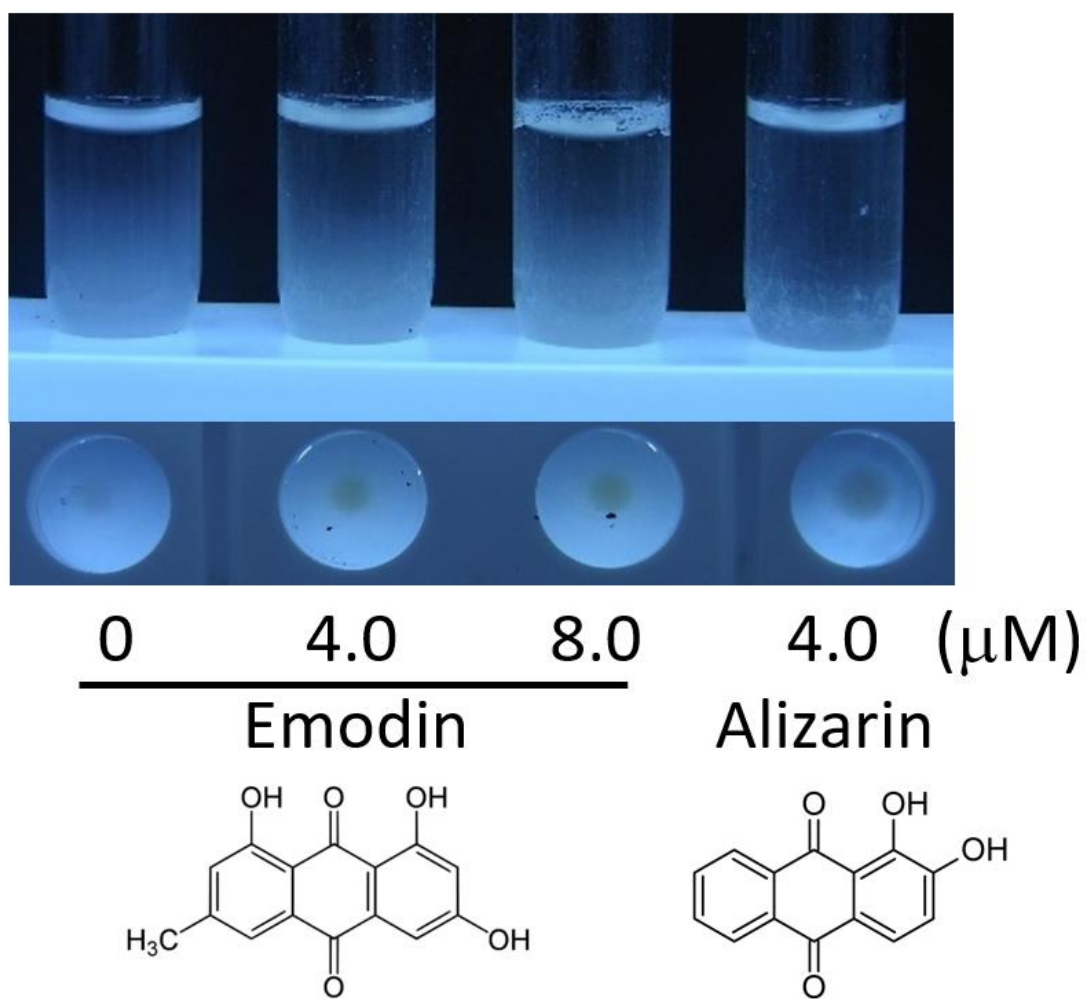


図 4 Emodin による凝集性の抑制傾向

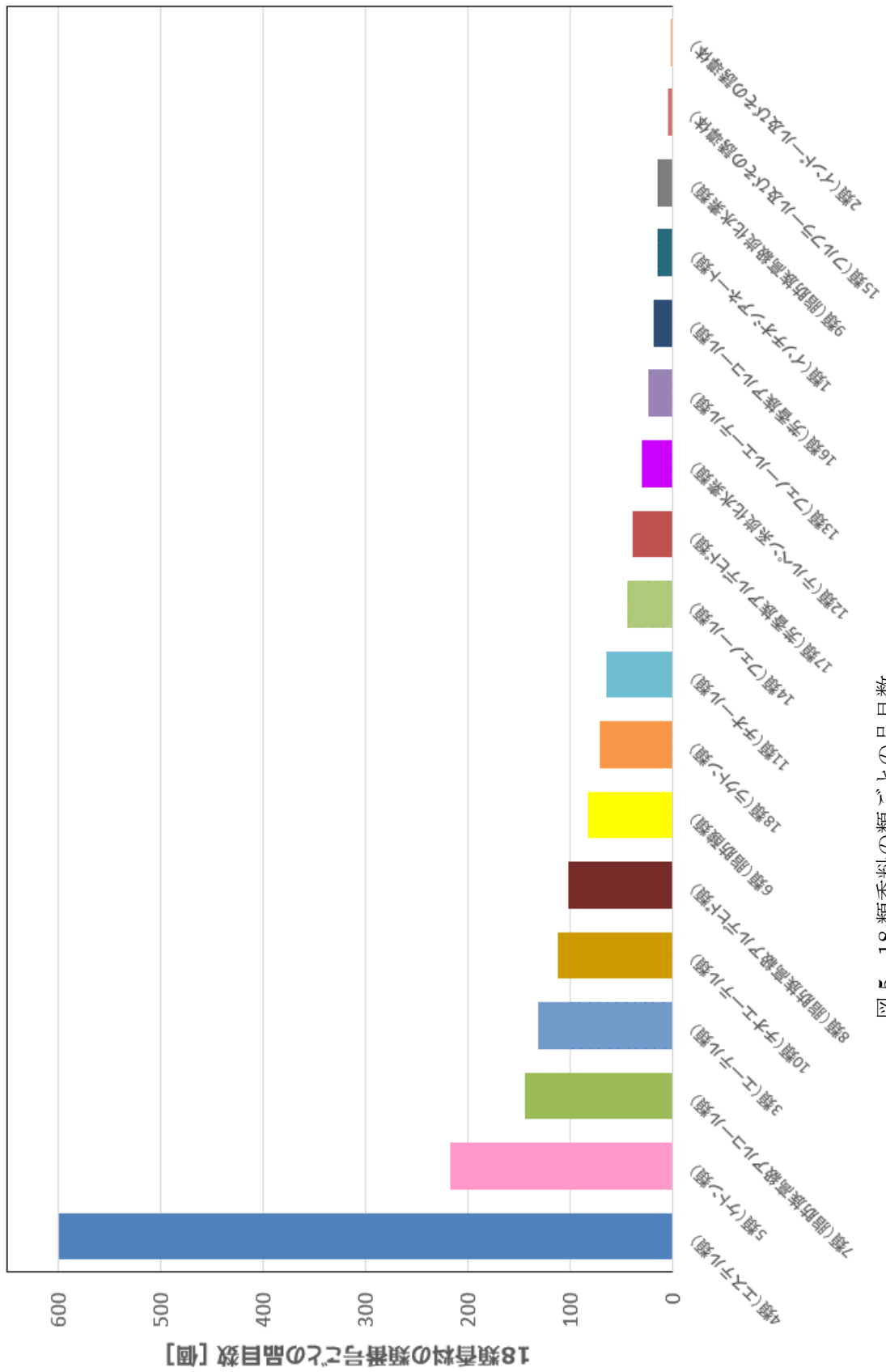


図 5 18 類香料の類ごとの品目数

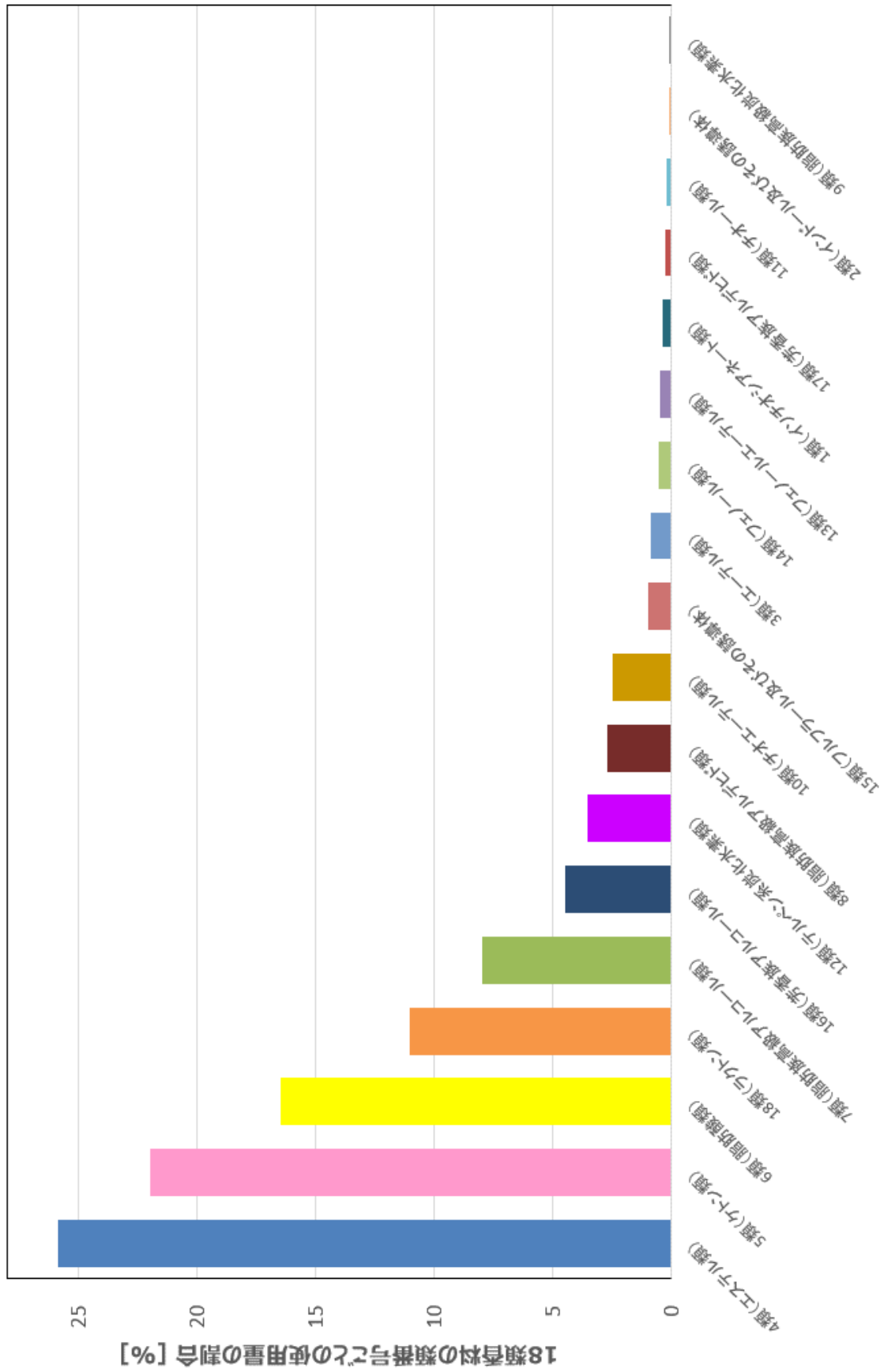


図 6 18 類香料の類ごとごの使用量の割合

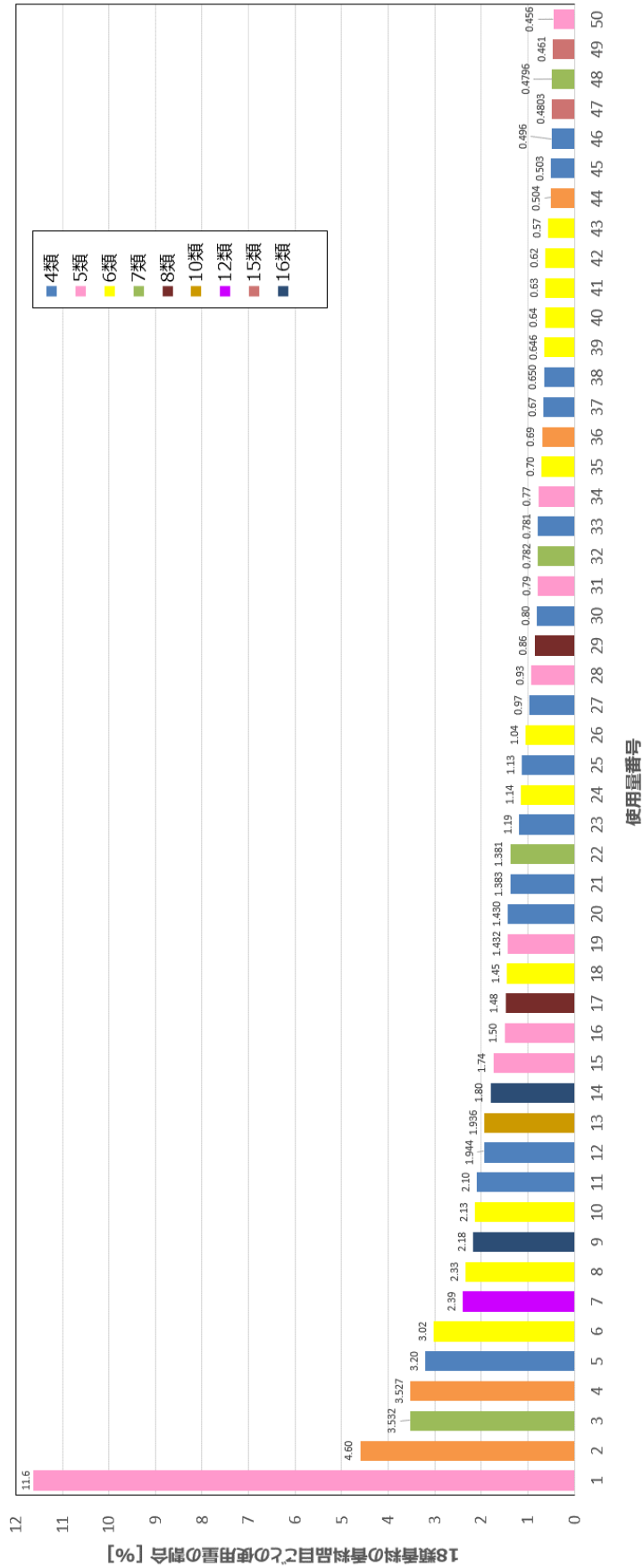


図 7 18 類香料の香料品目ごとの使用量の割合（上位 50 品目）

別添 4

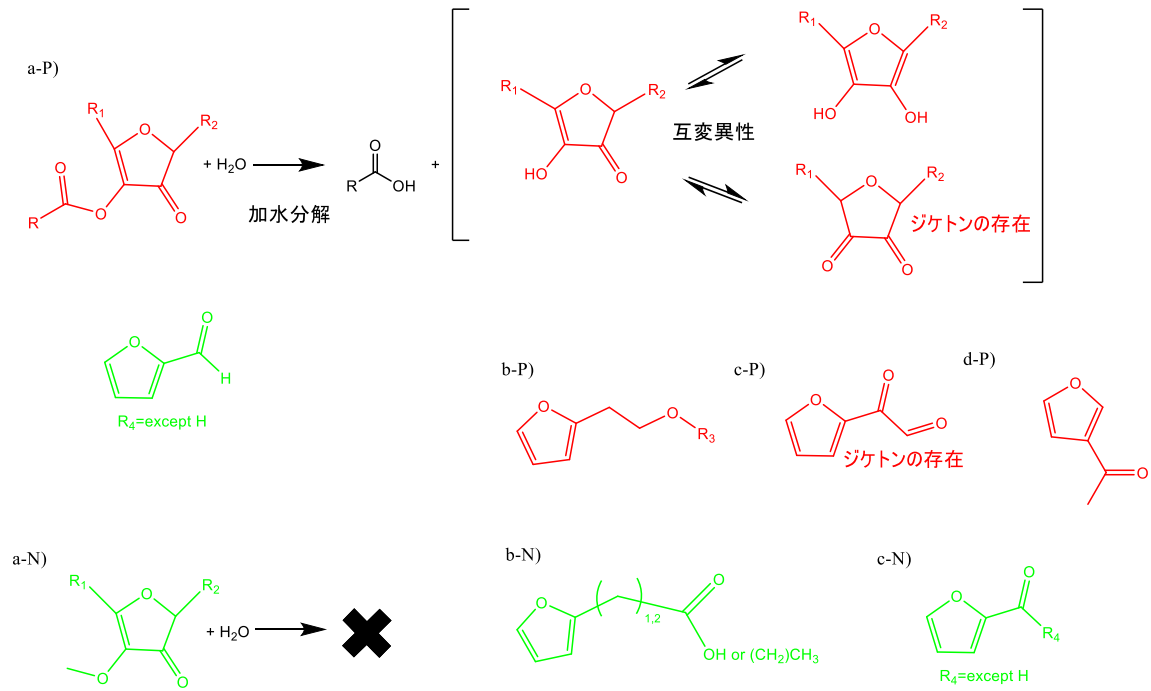


図8 フラン類においてAmes試験陽性（赤色）・陰性（緑色）となる構造の考察
 加水分解や互変異性により3,4-Dihydroxyfuranを有する骨格(a-P)の4物質では、Ames試験陽性であった。一方、加水分解反応でヒドロキシル基を有しない骨格の(a-N) 2物質では、Ames試験陰性であった。ジケトンが存在する物質(c-P)ではAmes試験陽性であった。

令和4年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
香料を含む食品添加物の遺伝毒性から発がんに至る毒性評価スキーム
確立に向けた基盤的研究

分担研究課題名：Ames/QSARおよびAmes実試験で明確に陽性を示す
4-メチル-2-ペンテナールに対するヒト培養細胞の弱い
遺伝子変異誘発性

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

研究要旨

本研究は、Ames/QSAR 予測で陽性、かつ Ames 実試験において明確に陽性（代謝活性化条件下）を示した 4-メチル-2-ペンテナール（MP）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）を実施した。MP 処理群の遺伝子変異体頻度は、未処理群のそれよりも統計的有意に上昇するが、わずか2 倍程度であり、専門家判断として弱い陽性と判定した。

MP の Ames 試験結果は、非代謝活性化条件下で強い陽性（比活性 1340）、代謝活性化条件下でも明確に陽性（比活性 728）であり、強い変異原性をイメージさせる。一方、TK6 試験を用いると全く異なった結果であり、MP は、非代謝活性化条件下で陰性、代謝活性化条件下で弱い陽性であった。最近、MP 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は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 試験結果より TK6 試験結果と類似していると考えられる。代謝が十分に働く個体動物を用いる *in vivo* 試験では MP は陰性になるが、代謝機能を十分に持たない *in vitro* TK6 試験では、MP を完全に解毒できず、結果的に弱い陽性反応を示したものと予想できる。このような *in vitro* 特異的なメカニズムで陽性となっているのであれば、今後、DNA 付加体形成の考察、並びに代謝機能の補完実験等によって作用機序を明らかにすることが非常に重要であると考えられる。

キーワード：TK6 細胞、チミジンキナーゼ遺伝子変異試験、Ames 試験、QSAR

A. 研究目的

Ames/QSAR 予測は、Ames 試験結果データを基にトレーニング・開発されており、もともと Ames 試験が持つ問題点を Ames/QSAR にも引き継いでいる可能性がある。前年度で、非代謝活性化条件下の MP は、Ames 実試験で強い陽性（比活性 1340 revertants/mg）を示す（Honma et al., Genes and Environ. 42:32 (2020)）にも関わらず、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 試験と略す）では陰性だったことから、その強い陽性は、細菌特異的な代謝反応が原因ではないかと予想された。本年度は、Ames/QSAR 予測で陽性、および Ames 実試験で明確に陽性（比活性 728；活性化条件下）を示す MP に焦点を絞り、上位試験である TK6 試験で調べた。

B. 研究方法

B-1. 細胞と培養

ヒトリンパ芽球細胞 TK6 株は、10% 馬血清 (JRH Bioscience), 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. TK6 試験

TK6 試験は、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、MP は関東化学株式会社 (ACROS organics 製) から購入した (図 1)。用量設定試験から始め、本試験の順に実施した。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。代謝活性化条件下の陽性対照物質は、シクロホスファミド (東京化成工業株式会社) を使用した。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。結果判定のための統計解析は、大森法 (Omori et al., *Mutat. Res.* 517,199-208 (2002)) を用いた。

C. 研究結果、および考察

C-1. TK6 試験

C-1-1. TK6 試験の用量設定試験

MP は、Ames 試験の代謝活性化条件下で比活性値 728 revertants/mg を示す明確な陽性 (Honma et al., *Genes and Environ.* 42:32 (2020)) を示すことから、TK6 試験も代謝活性化条件下で試験した。用量設定試験 (試験 1 回目) では、最高用量を 10 mM として公比 3 で相対的細胞生存率 (Relative Survival; RS) を明らかにした。図 2 に示した通り、123.5 と 370.4 µM 用量群の間で急に細胞毒性が現れ、RS がそれぞれ 109、および 7.3% だった。OECD ガイドラインの規定通り RS = 10~20% のときの至適用量を得ることができなかった (図 2)。参考値として、遺伝子変異体頻度の結果も図 2 に示した。

C-1-2. TK6 試験の本試験 (試験 2 回目)

用量設定試験の結果から、TK6 試験の本試験について、450 µM を最高用量として等差 100 µM で 6 用量を実施した (図 3)。その結果、最高用量群の RS が 1.1%、350 µM 用量群は 14.1% であり、至適用量を得ることができた (図 3)。引き続き、遺伝子変異体頻度 (Mutant Frequency; MF) を測定するために、トリフルオロチミジンの存在下でその細胞をプレーティングした。しかし、350 と 450 µM 用量群は細胞毒性が強く、プレーティングするための細胞数が不足したため試験続行不可能であった (図 3)。250 µM 以下の低用量群については、遺伝子変異試験を継続できた。その結果、未処理群のチミジンキナーゼ遺伝子突然変異体頻度が 4.7×10^{-6} に対して、250 µM 用量群のそれは 9.9×10^{-6} であり、約 2 倍上昇した (図 3)。大森法による統計解析を実施するための用量数が足りないこと、また、250 µM では至適用量 (RS = 72%) に達しておらず用量不足であることから、3 回目の TK6 試験を実施した。

C-1-3. TK6 試験の本試験 (試験 3 回目)

確認試験としての本試験は、375 µM を最高用量として等差 25 µM で 6 用量を実施した。その結果、275 および 300 µM 用量群でそれぞれ RS が 17.9 および 11.6% であり、至適用量を得ることができた (図 4)。それらの MF 値は、それぞれ 10.4×10^{-6} および 12.1×10^{-6} であり、用量依存性を確認できた (図 4)。大森法による統計処理の結果、MP は陽性と判定された。しかしながら、当ラボにおける未処理群の MF 値は $3.5 \sim 5.5 \times 10^{-6}$ の範囲にあり、その 300 µM 用量群の MF 値は、わずか 2 倍程度の上昇であることから、専門家判断として弱い陽性であると判定した。

表 1 のとおり、MP 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、本研究は、その結果とは全く異なっており、MP は、前年度では非代謝活性化条件下で陰性、本年度では代謝活性化条件下で弱い陽性であった。さらに、最近、MP 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 TK6 試験結果の方が、その *in vivo* 試験結果と一致していると考えられる (表 1)。つまり、MP は、哺乳類を用いる遺伝毒性試験であれば明確な陽性を示すような物質では無いことが本研究によって明らかとなった。やはり哺乳類では起きない細菌特異的な反応が関与し、Ames 試験では強い陽性を示してしまうことが容易に推測できる。

MP は、Ames 試験において塩基対置換型の TA100 株を使用したときに陽性になっていることから、DNA 付加体の形成が疑われるが、PubMed 等で MP の DNA 付加体に関する情報は無かった。構造が類似している 2-ペンテナールについては、その DNA 付加体形成について *in vitro* 実験系を使用した論文があり、グアニンの 1,N2-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))。また、不飽和脂肪酸の過酸化によるフリーラジカルの作用で酸化 DNA 損傷の形成の可能性もある。

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、あるいはグルタチオン抱合を受け、メルカプトツール酸となって排泄されることが考えられている (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、前述のとおり、代謝が十分に働く MutaMouse を用いる *in vivo* 試験では MP は陰性になるが、

代謝の機能を持たない *in vitro* TK6 試験では、十分に MP を解毒できず、結果的に弱い陽性反応を示したものと予想できる。このような *in vitro* 特異的な反応は、例えば MP を処理する際に、グルタチオンを S9mix とともに混合することで、遺伝子変異体頻度を減少させることができれば、総合判定として陰性と考えられることができる。*in vitro* 特異的なメカニズムで陽性となっているのであれば、今後、DNA 付加体形成の考察、並びに代謝機能の補完実験等によって作用機序を明らかにすることは非常に重要であると考えられる。

D. 結論

本研究は、Ames/QSAR 予測で陽性、および Ames 実試験において陽性 (活性化条件下) を示した MP に焦点を絞り、上位試験である TK6 試験を実施した。その結果、MP 処理群の遺伝子変異体頻度は、未処理群のそれよりも統計的に有意に上昇するが、わずか 2 倍程度であり、専門家判断として弱い陽性と判定した。*in vitro* 特異的なメカニズムで弱い陽性となっているのであれば、代謝機能を補完させる *in vitro* 実験等によって作用機序を明らかにすることが非常に重要であると考えられた。得られたデータは、QSAR 予測性の向上、および専門家判断のための重要な遺伝毒性評価データとして資すると考えられる。

E. 研究発表

E-1. 論文発表

- 1) Honma M, Yamada M, Yasui M, Horibata K, Sugiyama KI, Masumura K. Genotoxicity assessment of food-flavoring chemicals used in Japan. *Toxicol. Rep.* 9:1008-1012 (2022).

E-2. 学会発表

- 1) 北村蒼史、山田治人、高藤賢、小田切瑞基、安井学、本間正充、杉山圭一、浦聖恵、佐々彰; クロマチン構造変化を検出可能なエピ遺伝毒性試験法の開発. 日本

別添 4

環境変異原ゲノム学会第 51 回大会
(2022.11.16)

- 2) 黛結衣子、高藤賢、立川明日香、中谷一真、安井学、本間正充、杉山圭一、菅澤薫、浦聖恵、佐々彰;ゲノム中リボヌクレオチドの蓄積が誘発する DNA 二本鎖切断の修復機構.日本環境変異原ゲノム学会第 51 回大会 (2022.11.15)

F. 知的所有権の取得状況

F-1. 特許取得

該当なし

F-2. 実用新案登録

該当なし

F-3.その他

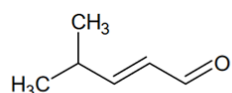
該当なし

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

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

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

*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)



4-メチル-2-ペンテナール
(Cas; 5362-56-1)

図1. TK6試験に供された香料物質の構造

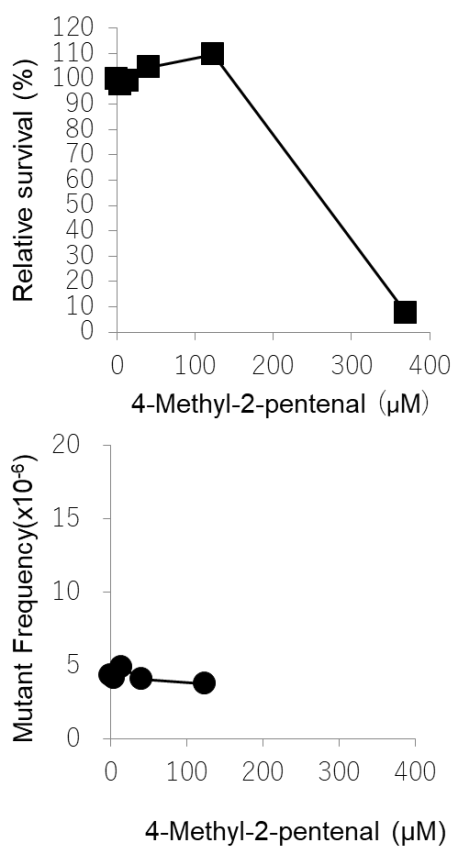


図2. 4-メチル-2-ペンテナールの用量設定試験およびTK6試験(試験1回目)

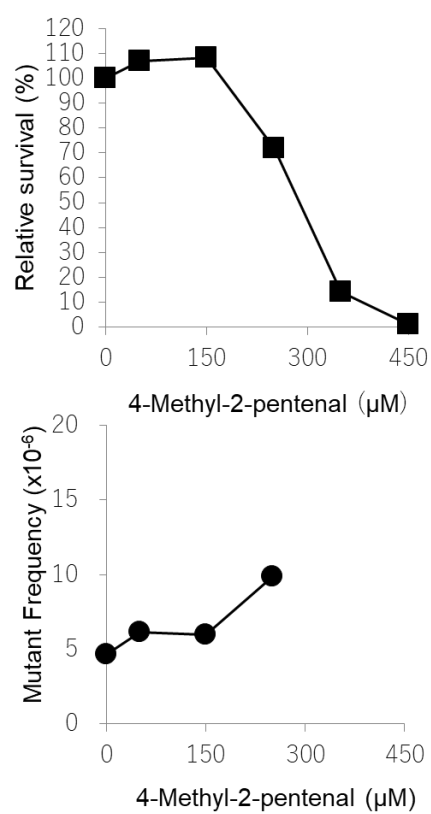


図3. 4-メチル-2-ペンテナールのTK6試験(試験2回目)

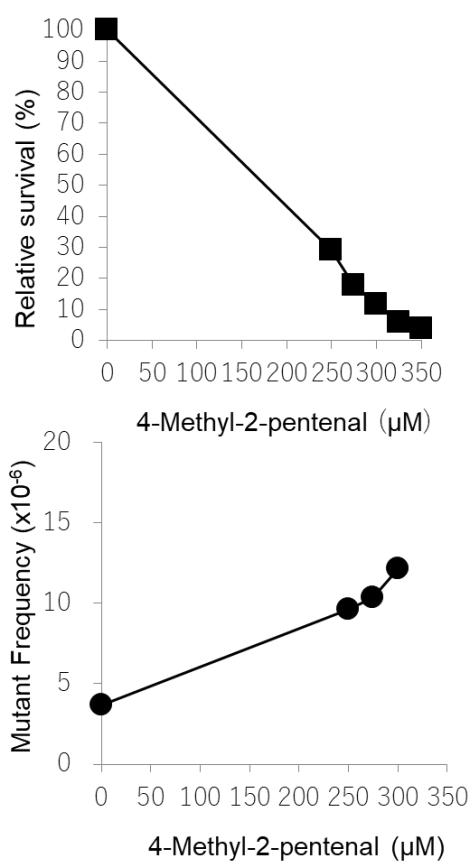


図4. 4-メチル-2-ペンテナールのTK6試験(試験3回目)

令和4年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
香料を含む食品添加物の遺伝毒性から発がんに至る毒性評価スキーム
確立に向けた基盤的研究

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

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

研究要旨

本研究では、香料の毒性評価スキームにおける *in vivo* 試験として、我々がこれまでに開発した *gpt delta* ラットを用いた一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験の有用性を評価することを目的とし、本法を用いた 2-isopropyl-N-2,3-trimethylbutyramide (ITB; JECFA No. 1595) の包括的評価を実施した。令和3年度に引き続き一般毒性評価を実施した結果、病理組織学的検索では、肝細胞の空胞化を 50 mg/kg 群から認めた。腎臓に病理組織学的変化は認められなかったものの、血中 Cl の低値ならびに腎重量の増加は低用量群から認められ、本試験において NOAEL は求まらなかった。遺伝毒性評価では、ITB の毒性標的臓器の一つである肝臓について *gpt assay* 及び *Spi* assay を実施した結果、いずれの投与群においても変異体頻度の有意な変化は認められなかった。また、*gpt* 変異体の変異スペクトラム解析において、ITB 投与に起因した変異パターンの変化は認められなかった。以上より肝臓の遺伝毒性評価は陰性と判断した。今後、腎臓の遺伝毒性評価及び肝発がん性評価について実施する。

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、明確な *in vivo* 遺伝毒性を示すことが明らかとなり、2013 年に欧米および我が国においても使用禁止処置がとられた。また、エストラゴール等のフェノールエーテル類の天然香気成分にはラット肝発がん性を示し、遺伝毒性を有するものが存在することが明らかになっている^{1, 2)}。このように、指定対象の香料についてもその安全性が十分に担保されているとは言えない。

本研究事業では香料の安全性を評価するため、*in silico*、*in vitro* 及び *in vivo* 試験に

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

我々はこれまでに、*in vivo*において任意の臓器における変異原性の検索が可能なレポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットを用いた包括的毒性試験法を開発し、フェノールエーテル類の天然香气成分サフロール、メチルオイゲノールおよびエレミンがラット肝臓において突然変異誘発性及び発がん性を有することを明らかにしてきた^{3,4)}。本法は、同一個体において一般毒性、遺伝毒性及び発がん性に関する情報を得られることから、短期間に化学物質の安全性評価に資するデータの取得が可能である。それ故、本法は本研究事業において開発を進める香料の毒性評価スキームにおける *in vivo* 試験に適した手法の一つと考える。本研究では階層的評価法における *in vivo* 試験として *gpt delta* ラットを用いた包括的毒性試験の有用性を評価するため、JECFA で登録されている食品香料または過去に登録されていた香料の中からヒト健康影響が懸念される物質について本法による評価を実施する。

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

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

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

令和 3 年度に引き続き、本年度は一般毒性評価と ITB の毒性標的臓器の一つである肝臓の遺伝毒性評価を実施した。

B. 研究方法

B-1. 遺伝毒性評価

gpt assay では回収したファージ粒子を大腸菌 YG6020 に感染させ 6-チオグアニン (6-TG) とクロラムフェニコール (Cm) を含む培地上で生育するコロニーを単離した。単離したコロニーについては、再度、6-TG と Cm を含むプレートにストリークして生育することを確認した。また、ファージ粒子の懸濁液を適宜希釈した後に YG6020 株に感染させ、Cm のみを含む培地上で生育したコロニー数を計測した。Cm プレートで生育したコロニー数に希釈倍率を掛けて回収した総ファージ数 (あるいは回収した総トランスジーン数) を求めた。6-TG と Cm に耐性となったコロニー数を総ファージ数で除して *gpt* 遺伝子変異体頻度 (MFs) を算出した。また、6-TG と Cm に耐性となったコロニーは Thermo Fisher Scientific 社製 3730xl DNA Analyzer にて *gpt* 遺伝子の塩基配列解析を行い、変異部位を同定した。*Spi assay* による欠失変異の検出では、ファージは P2 lysogen (大腸菌 XL-1 Blue MRA(P2)株) に感染させ、*Spi* プラークの候補については、さらに他の P2 溶原菌 (大腸菌 WL95 株) に感染させ、*red/gam* 遺伝子機能が不活化した真の *Spi* プラークを検出した。また、パッケージング反応後の懸濁液を希釈した後に P2 ファージが溶原化していない大腸菌 XL-1 Blue MRA 株に感染させて、総プラーク数を算出した。真の *Spi* プラーク数を回収した総プラーク数で除し

て Spi MF を算出した⁸⁾。

(倫理面への配慮)

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、DNA 組換え動物の使用についても、「国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則」に従い、遺伝子組み換え実験計画書を作成し、審査を受けた。

C. 研究結果

C-1. 一般毒性評価

前年度に引き続き、ITB を 5, 50 又は 500 mg/kg 体重/日の用量で 13 週間強制経口投与した雄性 *gpt delta* ラットについて、全身諸臓器の病理組織学的検索を行った。肝臓では肝細胞の空胞化が 50 mg/kg 群から認められた (Fig. 2 及び Table 1)。一方、その他の臓器において ITB の投与に起因した変化は認められなかった。

C-2. 遺伝毒性評価

ITB の毒性標的臓器の一つである肝臓について *gpt assay* 及び Spi assay による遺伝毒性評価を行った (Table 2 及び 3)。いずれの ITB 投与群においても *gpt* 及び Spi MFs の有意な変化は認められなかった。また、*gpt* 遺伝子の変異スペクトラム解析において、ITB に投与に起因した変異パターンの変化は認められなかった (Table 4)。

D. 考察

D-1. ITB の一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括的試験

病理組織学的検査では令和 3 年度に報告した 4 週間の用量設定試験と同様に、肝細

胞の空胞化が認められ、所見の程度は増強した。腎臓では重量の高値、BUN の高値ならびに各電解質パラメータの変動など腎毒性を示唆する変化が認められたが、腎臓に病理組織学的検査において投与に起因する変化は認められなかった。しかしながら、血中 Cl の低値ならびに腎重量の増加は 5 mg/kg 群から認められたことから本試験において NOAEL は求まらなかった。

遺伝毒性評価では、ITB の毒性標的臓器の一つである肝臓について、主に点突然変異を検出する *gpt assay* 及び主に欠失変異を検出する Spi assay を実施したものの、いずれの変異頻度にも ITB 投与による変化は認められなかった。以上より、肝臓における遺伝毒性評価は陰性と判断した。

E. 結論

一般毒性・遺伝毒性・発がん性包括試験から ITB は神経毒性ならびに肝及び腎毒性を有することを明らかにした。また、その腎毒性により 5 mg/kg 体重/日を低用量とした本試験において NOAEL は求まらなかった。毒性標的臓器の一つである肝臓における遺伝毒性評価は陰性であった。今後、もう一つの毒性標的である腎臓における遺伝毒性評価と、肝発がん性予測評価を実施し、本試験法の有用性について取り纏める。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果

G-1. 発表論文

- 1) 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-acetyl-2,5-dimethylfuran in male *gpt delta* rats. Food Chem. Toxicol. 2023, 172, doi: 10.1016/j.fct.2022.113544.

- 2) Kuroda K., Ishii Y., Takasu S., Matsushita K., Kijima A., Nohmi T., Umemura T. Toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of 2-methylfuran in a 90-day comprehensive toxicity study in gpt delta rats. *Food Chem. Toxicol.* 2022, 168, doi: 10.1016/j.fct.2022.113365.
 - 3) Ishii Y., Nakamura K., Mitsumoto T., Takimoto N., Namiki M., Takasu S., Ogawa K. Visualization of the distribution of anthraquinone components from madder roots in rat kidneys by desorption electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry imaging, *Food Chem. Toxicol.* 2022, 161, doi: 10.1016/j.fct.2022.112851.
 - 4) Ogawa K., Ishii Y., Toyoda T. Role and potential of histopathological specimens in the toxicological evaluation of pharmaceuticals and chemicals. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 2022, 157, 139-145, doi: 10.1254/fpj.21102.
- G-2. 学会発表
- 1) アセトアミドのラット肝発がん機序における chromoanagenesis の関与の可能性, 瀧本憲史, 石井雄二, 中村賢志, 並木萌香, 高須伸二, 満元達也, 渋谷淳, 小川久美子, 第 39 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023 年 1 月, 東京
 - 2) gpt delta ラットを用いた肝中期試験法による 6-methoxyquinoline の in vivo 遺伝毒性・発がん性の評価, 高須伸二, 石井雄二, 瀧本憲史, 元達也, 相馬明玲, 能美健彦, 小川久美子, 第 39 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023 年 1 月, 東京
 - 3) gpt delta ラットを用いた包括的毒性試験によ 2-isopropyl-N-2,3-trimethylbutylamide (ITB) の評価, 満元達也, 石井雄二, 瀧本憲史, 並木萌香, 高須伸二, 梅村隆志, 能美健彦, 小川久美子, 第 39 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023 年 1 月, 東京
 - 4) Acetamide 投与ラットの肝臓に生じる大型小核の形成機序, 石井雄二, 瀧本憲史, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 渋谷淳, 小川久美子, 第 39 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023 年 1 月, 東京
 - 5) 全ゲノム解析から明らかになった acetamide のラット肝腫瘍形成におけるがん遺伝子 c-Myc の関与, 石井雄二, 中村賢志, 高須伸二, 瀧本憲史, 満元達也, 並木萌香, 小川久美子, 第 51 回日本環境変異原ゲノム学会 2022 年 11 月, 広島
 - 6) ラット肝細胞における Acetamide の大型小核誘発機序に関する研究, 瀧本憲史, 石井雄二, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 渋谷淳, 小川久美子, 第 51 回日本環境変異原ゲノム学会 2022 年 11 月, 広島
 - 7) アカネ色素のラット腎臓における部位特異的な腫瘍形成の機序, 満元達也, 石井雄二, 瀧本憲史, 高須伸二, 並木萌香, 梅村隆志, 能美健彦, 小川久美子, 第 51 回日本環境変異原ゲノム学会 2022 年 11 月, 広島
 - 8) フランのラット肝発がん葉特異性に着目した変異原性評価, 日比大介, 高須伸二, 石井雄二, 梅村隆志, 第 51 回日本環境変異原ゲノム学会 2022 年 11 月, 広島
 - 9) gpt delta マウスを用いたアクリルアミドの生殖器細胞変異原性と次世代個体ゲノム変異, 増村健一, 安東朋子, 石井雄二, 杉山圭一, 第 51 回日本環境変異原ゲノム学会 2022 年 11 月, 広島
 - 10) 病理学から見た化学物質安全性評価におけるイメージング質量分析の有用性, 石井雄二, 第 47 回日本医用マススペ

別添 4

クトル学会年会 シンポジウム 2022
年 9 月, Web

- 11) Acetamide の肝発がん機序に関する検討：血液及び肝臓中動態のラット系統差の比較, 石井雄二, 瀧本憲史, 河上強志, 田原麻衣子, 中村賢志, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 小川久美子, 第 49 回日本毒性学会学術集会 2022 年 6 月, 札幌
- 12) Acetamide が誘発するラット肝細胞における大型小核の形成機序, 瀧本憲史, 石井雄二, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 渋谷淳, 小川久美子, 第 49 回日本毒性学会学術集会 2022 年 6 月, 札幌

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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得

該当なし

H-2. 実用新案登録

該当なし

H-3. その他

該当なし

I. 参考文献

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

Table 1 Histopathological findings of F344 *gpt* delta rats administered ITB for 13 weeks

Dose (mg/kg)		0	5	50	500
Number of animals		10	10	10	8
Liver					
	vacuolation, hepatocyte, periportal moderate (2+)	0	0	0	2
	mild (+)	0	0	4	6
	minimal (±)	0	0	6	0
	vacuolation, hepatocyte, centrilobular, minimal	1	1	0	0
	cellular infiltration, mononuclear, subcapsular, minimal	1	0	0	0
	tension lipidosis	1	0	0	0
Kidney					
	basophilic tubule, minimal	1	-	-	1
Heart					
	cellular infiltration, mononuclear, minimal	3	-	-	1
Lung					
	hyperplasia, bronchiolo-alveolar, mild	1	-	-	0
	mineralization, artery, pulmonary, minimal	3	-	-	3
Testis					
	necrosis, tubular, unilateral, marked	0	-	-	1
	atrophy, tubular, unilateral, mild	0	-	-	1
Epididymis					
	inflammation, unilateral, moderate	0	-	-	1
	atrophy, ductal, unilateral, moderate	0	-	-	1
Bone marrow (femur)					
	increased, granulocyte, mild	0	-	-	1
Gland, Harderian					
	cellular infiltration, mononuclear, mild	0	-	-	1

Table 2 The *gpt* mutant frequencies in the livers of F344 *gpt* delta rats administered ITB for 13 weeks

Group	Animal no.	No. of packaging	Cm ^R colonies (x10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	MFs (x10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
0 mg/kg BW	101	1	14.4	15	1.04	0.88 ± 0.19
	102	1	11.7	12	1.02	
	103	1	12.2	9	0.74	
	104	1	14.4	14	0.96	
	105	1	14.9	9	0.61	
5 mg/kg BW	201	1	15.3	7	0.51	0.74 ± 0.28
	202	1	15.5	5	0.36	
	203	1	15.7	13	0.92	
	204	1	15.5	13	0.93	
	205	1	17.5	15	0.95	
50 mg/kg BW	301	1	18.0	15	0.93	0.93 ± 0.38
	302	1	16.3	19	1.30	
	303	1	16.8	10	0.66	
	304	1	17.8	7	0.44	
	305	1	15.4	18	1.30	
500 mg/kg BW	401	2	8.3	5	0.67	0.66 ± 0.16
	402	2	7.2	5	0.78	
	403	1	18.9	14	0.82	
	404	1	15.9	9	0.63	
	405	1	18.5	7	0.42	
Positive control ^a	PC1	1	5.1	91	120.1	100.2 ± 36.7**
	PC2	1	7.9	66	55.7	
	PC3	1	6.2	79	85.0	
	PC4	1	5.6	74	88.9	
	PC5	1	3.3	75	151.5	

Table 3 The Spi^r mutant frequencies in the livers of F344 *gpt* delta rats administered ITB for 13 weeks

Group	Animal no.	No. of packaging	Plaques within XL-1 Blue MRA (x10 ⁵)	Plaques within XL-1 Blue MRA (P2)	MFs (x10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
0 mg/kg BW	101	1	18.8	12	0.64	0.31 ± 0.21
	102	1	18.8	7	0.37	
	103	1	15.8	4	0.25	
	104	1	17.1	2	0.12	
	105	1	16.6	3	0.18	
5 mg/kg BW	201	1	21.0	5	0.24	0.19 ± 0.08
	202	1	15.3	2	0.13	
	203	1	18.9	2	0.11	
	204	1	22.6	7	0.31	
	205	1	22.4	4	0.18	
50 mg/kg BW	301	1	18.4	4	0.22	0.24 ± 0.12
	302	1	18.9	6	0.32	
	303	1	15.3	4	0.26	
	304	1	19.4	7	0.36	
	305	1	24.9	1	0.04	
500 mg/kg BW	401	2	12.3	1	0.08	0.34 ± 0.22
	402	2	11.8	2	0.17	
	403	1	22.4	8	0.36	
	404	1	11.3	7	0.62	
	405	1	13.3	6	0.45	
Positive control ^a	PC1	1	1.6	11	6.98	3.25 ± 2.48
	PC2	1	1.7	7	4.15	
	PC3	1	1.7	5	3.00	
	PC4	1	1.3	1	0.77	
	PC5	1	1.5	2	1.35	

別添 4

Table 4 Mutation spectra of *gpt* mutants in the livers of F344 *gpt* delta rats administered ITB for 13 weeks

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

別添 4

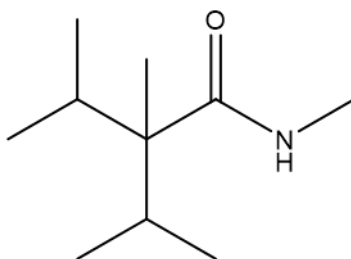


Figure 1. Chemical structure of 2-isopropyl-*N*-2,3-trimethylbutyramide (ITB)

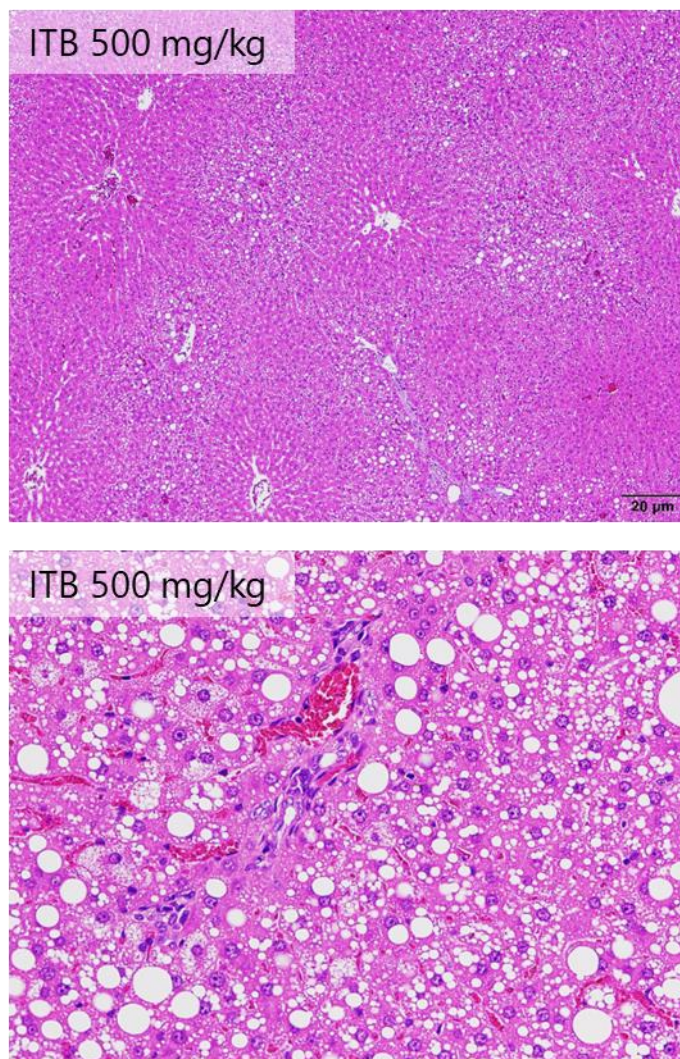


Figure 2. Histopathological changes in the livers of F344 *gpt* delta rats treated with ITB at a dose of 500 mg/kg bw/day for 13 weeks.

令和4年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
香料を含む食品添加物の遺伝毒性から発がんに至る毒性評価スキーム
確立に向けた基盤的研究

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

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

研究要旨

本研究は香料の効率的且つ信頼性の高い安全性評価を推進するために、遺伝毒性と発がん性を *in silico*, *in vitro* および *in vivo* で階層的に評価する系を確立することを目的とする。本研究課題では *in vivo* 評価系としての遺伝毒性・発がん性中期包括試験の有用性を検討することを目的に、*in silico* および *in vitro* で遺伝毒性が明らかになった香料 6-methoxyquinoline (6-MQ) を対象に本法による評価を実施した。昨年度の用量設定試験の結果、6-MQ の毒性標的が肝臓であったことから、本年度は肝臓を評価対象とする肝遺伝毒性・発がん性中期包括試験（GPG モデル）を実施し、レポーター遺伝子突然変異解析を行った。その結果、6-MQ 投与群のレポーター遺伝子突然変異頻度に有意な変化は認められなかった。なお、遺伝毒性肝発がん物質 quinoline を投与した陽性対照群ではレポーター遺伝子突然変異頻度の有意な上昇が認められ、Ames 試験陽性ながら *in vivo* 遺伝毒性試験及び発がん性試験で陰性を示す 8-hydroxyquinoline を投与した陰性対照群では有意な変化はみられなかった。今後、本モデルにおける発がん性評価を実施し、最終的な 6-MQ の遺伝毒性および発がん性評価をし、GPG モデルの *in vivo* 評価系としての有用性を考察する。

A. 研究目的

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

我々はこれまでに、レポーター遺伝子導入動物である *gpt* delta ラットを用いて、個

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

そこで、本研究では 6-Methoxyquinoline (6-MQ, JECFA No. 2157) について遺伝毒性・発がん性中期包括試験法による *in vivo* での評価を行うことで、階層的評価法における *in vivo* 評価系の一つとして本法の有用性を検討した。6-MQ は quinoline 骨

格を有する香料であり、第 76 回の JECFA 会議において香料評価手順に則った安全性評価がなされ、「No safety concern」と結論されている⁴⁾。しかしながら、近年、*in silico* および *in vitro* 試験の結果、6-MQ が Ames 試験において陽性を示すことが報告されている⁵⁾。それ故、本評価により 6-MQ の安全性評価と *in silico* 試験の精緻化に資するデータが得られることも期待される。

昨年度実施した予備試験の結果から、6-MQ の毒性標的が肝臓であること、最大耐量は 500 mg/kg 体重/日であることを明らかにした。そこで本年度は、6-MQ の評価に GPG モデルを適用することとし、*in vivo* における遺伝毒性、発がん性の評価を実施した。

B. 研究方法

B-1. 被験物質および動物

本試験では陽性対照に遺伝毒性肝発がん物質 quinoline⁶⁾を、陰性対照に Ames 試験陽性ながら *in vivo* 遺伝毒性試験及び発がん性試験で陰性を示す 8-hydroxyquinoline (8-HQ)⁷⁻¹¹⁾を用いた。

6-MQ (>97.0%)、quinoline (>97.0%)、8-HQ (>99.0%)、および diethylnitrosamine (DEN) (>99.0%) は東京化成工業株式会社から購入した。コーン油は富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。動物は 5 週齢の雄性 F344 *gpt* delta ラットを日本エスエルシー株式会社から購入し、一週間の馴化後、実験に供した。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 24±1°C、湿度 55±5%、換気回数 18 回/時 (オールフレッシュ)、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯で、飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2~3 匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス社のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、試験期間中は飲料水として水道水を自由摂取させた。

B-2. 肝遺伝毒性・発がん性中期包括試験法 (GPG モデル)

GPG モデルの実験プロトコールを Fig. 1 に示す。雄性 6 週齢の F344 系 *gpt* delta ラット 60 匹を 6-MQ 投与群、8-HQ 投与群、quinoline 投与群および対照群の計 4 群 (各群 15 匹) に配した。6-MQ の投与量は用量設定試験の結果から得られた最大耐量である 500 mg/kg 体重/日とし、コーン油を媒体として強制経口投与した。Quinoline および 8-HQ は過去の報告を参考に^{11, 12)}、quinoline は発がん用量の 0.1%で、8-HQ は最大耐量の 0.6%の濃度で基礎飼料 (CRF-1) に混じて投与した。対照群にはコーン油を投与した。GPG モデルの標準プロトコールに従い³⁾、被験物質を 4 週間反復経口投与し、2 週間の休薬を行った。投与開始 6 週目に DEN を 10 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与し、その 18 時間前に 2/3 部分肝切除を施した。切除した肝組織は-80°Cで保存し、*gpt* および Spi⁺アッセイに供した。7 週目から被験物質の投与を再開し、13 週目まで投与を継続した。なお、投与再開時に 6-MQ 群で一般状態の悪化や消瘦がみられたことから、投与再開 4 日目より投与量を 500 mg/kg 体重/日から 250 mg/kg 体重/日に変更した。再開 6 週後の最終解剖時に肝臓を採材し、ホルマリン固定後、常法に従いパラフィン切片を作製した。

(倫理面への配慮)

本試験は「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」を遵守して動物実験計画書を作成し、同動物実験委員会による承認を得た後に実施した。遺伝子組み換え動物の使用については、「国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則」に従い、遺伝子組換え実験計画書を作成し、承認を得た後に使用した。

C. 研究結果

gpt アッセイの結果を Table 1 及び 2 に示す。Quinoline 投与群の *gpt* 変異体頻度は

対照群に比べ有意な高値を示し、変異スペクトラム解析の結果、G:C-C:G トランスバージョンの増加を特徴とする塩基置換型の点突然変異頻度が有意に増加した。一方、6-MQ および 8-HQ 投与群における *gpt* 変異体頻度および変異スペクトラムに有意な変化は認められなかった。

Spi アッセイの結果を Table 3 に示す。Quinoline 投与群の Spi 変異体頻度は対照群に比べ有意な高値を示した一方、6-MQ および 8-HQ 投与群では有意な変化は認められなかった。

D. 考察

Quinoline 投与群では、肝臓の *gpt* 及び Spi 変異体頻度は有意に上昇し、*gpt* 変異体のスペクトラム解析の結果、G:C-C:G トランスバージョンの増加が明らかになった。これらの結果は、レポーター遺伝子導入マウスを用いた過去の報告と一致したことから¹³⁾、GPG モデルにより quinoline 化合物の *in vivo* における変異原性の検出が可能であることを確認した。

8-HQ 投与群において肝臓の *gpt* 及び Spi 変異体頻度の有意な変化は認められなかった。これらの結果は、8-HQ が Ames 試験で陽性を示すものの、*in vivo* において問題となる遺伝毒性は示さないというこれまでの報告を支持するもので、GPG モデルが quinoline 化合物の *in vivo* における遺伝毒性の有無を正確に評価できることを示唆するものと考えられた。

6-MQ 投与群では、肝臓の *gpt* 及び Spi 変異体頻度に変化は見られなかったことから、6-MQ は 8-HQ と同様に Ames 試験において陽性を示すものの、*in vivo* において遺伝毒性を示さないことが示唆された。引き続き、発がん性評価を完遂し、quinoline 化合物の *in vivo* における遺伝毒性と肝臓がん性の関係を明らかにし、本モデルの *in vivo* 評価系としての有用性を考察する。

E. 結論

In silico 及び *in vitro* 試験において遺伝毒性陽性と判断された 6-MQ について GPG モデルによる *in vivo* における遺伝毒性・発がん性評価を実施した結果、6-MQ は変異原性試験で陰性を示し、*in vivo* において遺伝毒性を示さないことが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

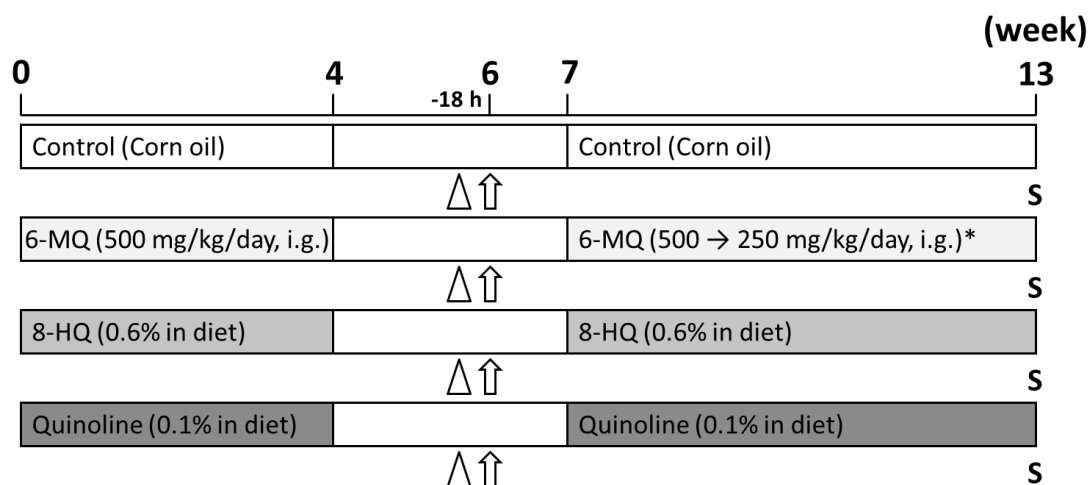
- 1) Takasu S., Ishii Y., Namiki M., Nakamura K., Mitsumoto T., Takimoto N., Nohmi T., Ogawa K. Comprehensive analysis of the general toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of 3-acetyl-2,5-dimethylfuran in male *gpt* delta rats. *Food Chem. Toxicol.* 2023, 172, doi: 10.1016/j.fct.2022.113544.
- 2) Kuroda K., Ishii Y., Takasu S., Matsushita K., Kijima A., Nohmi T., Umemura T. Toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of 2-methylfuran in a 90-day comprehensive toxicity study in *gpt* delta rats. *Food Chem. Toxicol.* 2022, 168, doi: 10.1016/j.fct.2022.113365.
- 3) Ishii Y., Nakamura K., Mitsumoto T., Takimoto N., Namiki M., Takasu S., Ogawa K. Visualization of the distribution of anthraquinone components from madder roots in rat kidneys by desorption electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry imaging. *Food Chem. Toxicol.* 2022, 161, doi: 10.1016/j.fct.2022.112851.

G-2. 学会発表

- 1) アセトアミドのラット肝臓がん機序に

- における chromoanagenesis の関与の可能性, 瀧本憲史, 石井雄二, 中村賢志, 並木萌香, 高須伸二, 満元達也, 渋谷淳, 小川久美子, 第 39 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023 年 1 月, 東京
- 2) *gpt delta* ラットを用いた肝中期試験法による 6-methoxyquinoline の *in vivo* 遺伝毒性・発がん性の評価, 高須伸二, 石井雄二, 瀧本憲史, 元達也, 相馬明玲, 能美健彦, 小川久美子, 第 39 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023 年 1 月, 東京
 - 3) *gpt delta* ラットを用いた包括的毒性試験によ 2-isopropyl-N-2,3-trimethylbutylamide (ITB) の評価, 満元達也, 石井雄二, 瀧本憲史, 並木萌香, 高須伸二, 梅村隆志, 能美健彦, 小川久美子, 第 39 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023 年 1 月, 東京
 - 4) Acetamide 投与ラットの肝臓に生じる大型小核の形成機序, 石井雄二, 瀧本憲史, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 渋谷淳, 小川久美子, 第 39 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023 年 1 月, 東京
 - 5) 全ゲノム解析から明らかになった acetamide のラット肝腫瘍形成におけるがん遺伝子 *c-Myc* の関与, 石井雄二, 中村賢志, 高須伸二, 瀧本憲史, 満元達也, 並木萌香, 小川久美子, 第 51 回日本環境変異原ゲノム学会 2022 年 11 月, 広島
 - 6) ラット肝細胞における Acetamide の大型小核誘発機序に関する研究, 瀧本憲史, 石井雄二, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 渋谷淳, 小川久美子, 第 51 回日本環境変異原ゲノム学会 2022 年 11 月, 広島
 - 7) アカネ色素のラット腎臓における部位特異的な腫瘍形成の機序, 満元達也, 石井雄二, 瀧本憲史, 高須伸二, 並木萌香, 梅村隆志, 能美健彦, 小川久美子, 第 51 回日本環境変異原ゲノム学会 2022 年 11 月, 広島
 - 8) フランのラット肝発がん葉特異性に着目した変異原性評価, 日比大介, 高須伸二, 石井雄二, 梅村隆志, 第 51 回日本環境変異原ゲノム学会 2022 年 11 月, 広島
 - 9) Acetamide の肝発がん機序に関する検討: 血液及び肝臓中動態のラット系統差の比較, 石井雄二, 瀧本憲史, 河上強志, 田原麻衣子, 中村賢志, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 小川久美子, 第 49 回日本毒性学会学術集会 2022 年 6 月, 札幌
 - 10) Acetamide が誘発するラット肝細胞における大型小核の形成機序, 瀧本憲史, 石井雄二, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 渋谷淳, 小川久美子, 第 49 回日本毒性学会学術集会 2022 年 6 月, 札幌
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
- H-1. 特許取得**
該当なし
- H-2. 実用新案登録**
該当なし
- H-3. その他**
該当なし
- I. 参考文献**
1. Matsushita K, Takasu S, Ishii Y, Toyoda T, Yamada T, Morikawa T, Ogawa K. *In vivo* mutagenicity and tumor-promoting activity of 1,3-dichloro-2-propanol in the liver and kidneys of *gpt delta* rats. Arch Toxicol. 95(9):3117-3131. 2021.
 2. Matsushita K, Ishii Y, Takasu S, Kuroda K, Kijima A, Tsuchiya T, Kawaguchi H, Miyoshi N, Nohmi T, Ogawa K, Nishikawa A, Umemura T.

- A medium-term *gpt* delta rat model as an *in vivo* system for analysis of renal carcinogenesis and the underlying mode of action. *Exp Toxicol Pathol.* 67(1): 31-9, 2015.
3. Matsushita K, Kuroda K, Ishii Y, Takasu S, Kijima A, Kawaguchi H, Miyoshi N, Nohmi T, Ogawa K, Nishikawa A, Umemura T. Improvement and validation of a medium-term *gpt* delta rat model for predicting chemical carcinogenicity and underlying mode of action. *Exp Toxicol Pathol.* 66(7):313-21, 2014.
 4. JECFA. Evaluation of certain food additives. Seventy-sixth report of the Joint FAO/WHO expert committee on food additives. WHO Technical Report Series, No. 974, 2012.
 5. Honma M, Kitazawa A, Kasamatsu T, Sugiyama KI. Screening for Ames mutagenicity of food flavor chemicals by (quantitative) structure-activity relationship. *Genes Environ.* 42(1):32, 2020.
 6. International Agency for Research on Cancer. Styrene, styrene-7,8-oxide, and quinoline. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; volume 121, 2018.
 7. Epler JL, Winton W, Ho T, Larimer FW, Rao TK, Hardigree AA. Comparative mutagenesis of quinolines. *Mutat Res.* 39(3-4):285-96, 1977.
 8. Allavena A, Martelli A, Robbiano L, Brambilla G. Evaluation in a battery of *in vivo* assays of four *in vitro* genotoxins proved to be noncarcinogens in rodents. *Teratog Carcinog Mutagen.* 12(1):31-41, 1992.
 9. McFee AF. Genotoxic potency of three quinoline compounds evaluated *in vivo* in mouse marrow cells. *Environ Mol Mutagen.* 13(4):325-31, 1989.
 10. Hamoud MA, Ong T, Petersen M, Nath J. Effects of quinoline and 8-hydroxyquinoline on mouse bone marrow erythrocytes as measured by the micronucleus assay.
 11. National Toxicology Program. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of 8-Hydroxyquinoline (CAS No. 148-24-3) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep. Ser.* 276:1-170, 1985.
 12. Hirao K, Shinohara Y, Tsuda H, Fukushima S, Takahashi M. Carcinogenic activity of quinoline on rat liver. *Cancer Res.* 36(2 Pt 1):329, 1976.
 13. Suzuki T, Wang X, Miyata Y, Saeki K, Kohara A, Kawazoe Y, Hayashi M, Sofuni T. Hepatocarcinogen quinoline induces G:C to C:G transversions in the *cII* gene in the liver of lambda/lacZ transgenic mice (MutaTM Mouse). *Mutat Res.* 456(1-2):73-81, 2000.



Δ ; 2/3 Partial hepatectomy ↑ ; 10 mg/kg diethylnitrosamine, i.p. S ; Sacrifice

Fig. 1. Protocol for the medium-term *gpt* delta rat model (GPG model) for 6-MQ, 8-HQ and quinoline.
 *The dose was decreased to 250 mg/kg on experimental 7 day 4 because of aggravated general condition and severe body weight loss.

別添 4

Table 1. *gpt* mutant frequencies in the liver of male F344 rats given 6-MQ, 8-HQ or quinoline in the GPG model.

Treatment	Animal No.	Cm ^R clones (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
Control	101	6.0	0	0.00	0.49 ± 0.42
	102	9.9	4	0.40	
	103	6.9	3	0.44	
	109	6.7	3	0.45	
	110	5.1	6	1.17	
6-MQ	201	10.5	5	0.47	0.81 ± 0.42
	203	8.1	4	0.49	
	204	8.8	5	0.57	
	211	7.1	8	1.13	
	212	7.2	10	1.39	
8-HQ	301	8.9	8	0.90	0.83 ± 0.50
	302	14.2	7	0.49	
	303	7.1	3	0.42	
	308	6.0	4	0.67	
	309	6.0	10	1.66	
Quinoline	401	4.8	63	13.08	12.14 ± 0.92**
	402	4.7	56	11.85	
	404	7.2	89	12.44	
	408	4.9	52	10.70	
	409	5.3	67	12.62	
DEN	P11	8.6	416	48.15	60.04 ± 12.81
	P12	6.3	313	49.68	
	P13	6.3	407	65.07	
	P14	5.0	397	79.48	
	P15	6.9	398	57.81	

** $p < 0.01$ compared with the control group.

DEN: Positive control (diethylnitrosamine, 40 mg/kg, i.p., once weekly for 5 weeks)

別添 4

Table 2. Mutation spectra of *gpt* mutant colonies in the liver of male F344 rats given 6-MQ, 8-HQ or quinoline in the GPG model.

	Control		6-MQ		8-HQ		Quinoline	
	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)
Base substitution								
Transversion								
G:C-T:A	2(12.5)	0.06±0.09	10(31.3)	0.26±0.27	8(25.0)	0.25±0.42	52(15.9)	1.93±0.39**
G:C-C:G	0(0.0)	0.00±0.00	6(18.8)	0.15±0.17	2(6.3)	0.05±0.07	185(56.6)	6.95±0.52**
A:T-T:A	1(6.3)	0.04±0.09	0(0.0)	0.00±0.00	0(0.0)	0.00±0.00	16(4.9)	0.61±0.15**
A:T-C:G	0(0.0)	0.00±0.00	0(0.0)	0.00±0.00	2(6.3)	0.04±0.05	9(2.8)	0.30±0.27**
Transition								
G:C-A:T	4(25.0)	0.13±0.16	7(21.9)	0.18±0.16	11(34.4)	0.28±0.14	37(11.3)	1.35±0.39**
A:T-G:C	1(6.3)	0.03±0.07	2(6.3)	0.05±0.07	2(6.3)	0.06±0.08	18(5.5)	0.66±0.31**
Deletion								
Single bp	5(31.3)	0.15±0.11	6(18.8)	0.15±0.11	5(15.6)	0.10±0.10	1(0.3)	0.03±0.06
Over 2 bp	1(6.3)	0.02±0.05	0(0.0)	0.00±0.00	0(0.0)	0.00±0.00	2(0.6)	0.08±0.11
Insertion	0(0.0)	0.00±0.00	0(0.0)	0.00±0.00	1(3.1)	0.03±0.06	4(1.2)	0.11±0.25
Complex	2(12.5)	0.07±0.09	1(3.1)	0.03±0.06	1(3.1)	0.03±0.07	3(0.9)	0.12±0.17

** $p < 0.01$ compared with the control group.

別添 4

Table 3. Spi^r mutant frequencies in the liver of male F344 rats given 6-MQ, 8-HQ or quinoline in the GPG model.

Treatment	Animal No.	Plaues within XL-1 Blue MRA (x10 ⁵)	Plaque within WL95 (P2)	Mutant frequency (x10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
Control	101	6.7	1	0.15	0.35 ± 0.35
	102	9.0	3	0.33	
	103	8.6	0	0.00	
	109	8.1	3	0.37	
	110	6.6	6	0.91	
6-MQ	201	11.8	2	0.17	0.40 ± 0.24
	203	6.6	5	0.76	
	204	9.5	2	0.21	
	211	8.3	3	0.36	
	212	5.9	3	0.51	
8-HQ	301	9.7	2	0.21	0.29 ± 0.18
	302	7.4	1	0.14	
	303	7.2	1	0.14	
	308	5.4	3	0.56	
	309	7.7	3	0.39	
Quinoline	401	9.5	14	1.48	1.30 ± 0.38**
	402	6.3	8	1.27	
	404	4.5	7	1.56	
	408	3.1	2	0.65	
	409	5.9	9	1.52	
DEN	P11	10.8	26	2.41	1.94 ± 0.91
	P12	4.9	5	1.03	
	P13	6.6	7	1.07	
	P14	5.0	10	2.02	
	P15	4.4	14	3.17	

** $p < 0.01$ compared with the control group.

DEN: Positive control (diethylnitrosamine, 40 mg/kg, i.p., once weekly for 5 weeks)