

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	アルキルシクロブタノン類を指標とした照射食品の安全性解析 (研究期間：平成21年度～平成23年度)
主任研究者名	所属：大阪府立大学地域連携研究機構放射線研究センター 氏名：古田 雅一（研究課題番号：0906）

食品の放射線照射で特異的に分解生成するとされる、2-アルキルシクロブタノン類（2-ACBs）に対し、指摘されている遺伝毒性やラットの実験的大腸発がんモデル系での発がんプロモーター活性の追試験を含む毒性試験を実施した。その際、2-ACBsの生成の放射線照射特性の再検証を行った。

2008年に1例だけ天然存在の報告のあるナツメグおよびカシューナッツを分析対象とし、HRGC-MSを用いた新規高感度分析法を適用しても、未照射試料からの2-ACBsの検出は確認されず、一方で照射試料では1.2～3.6 nmole/mmole 前駆脂肪酸/kGyの効率で2-ACBsが生成していた。よって、2-ACBsは非照射食品中では検出されず、この化合物を指標とした放射線照射食品の安全性評価研究は妥当なものと判断された。

2-ドデシルシクロブタノン（2-dDCB）および、2-テトラデシルシクロブタノン（2-tDCB）を最大濃度8 mMまでのEtOH溶液としたAmes試験は陰性で、コメットアッセイでは、2-dDCBで分析した最高濃度（0.10 mg/mL）で細胞毒性の指標であるヘッジホッグの頻度が上昇したが、両者ともにDNA切断は認められなかった。また、2-dDCBについては染色体の構造異常も陰性であった。なお、ヒトリンパ腫細胞株U937に対して2-dDCB、2-tDCB、親脂肪酸であるパルミチン酸（PA）及びステアリン酸（SA）が、活性酸素ストレスによる濃度依存적のアポトーシス活性を示していた。

Bhas42細胞を用いるin vitro形質転換試験においては2-dDCBのイニシエーション作用は陰性であったが、プロモーション作用については、2-dDCB（0.012 mg/mL）及び2-tDCB（0.010 mg/mL）ともに明らかに陽性を示した。一方、CD1(ICR)マウスを用いた経口投与による小核試験においては、2-dDCB、2-tDCB共に2,000 mg/kg/dayの経口投与で骨髓細胞に染色体異常を誘発せず、そのマウス結腸組織DNAに対するDNAアダクト形成も認められなかった。ラットによる90日間亜急性毒性試験の結果、2-tDCBの無毒性量は雌雄とも0.0012%混餌（雄：0.62 mg/kg 体重/日、雌：0.67 mg/kg 体重/日）と考えられた。ラットによる下部消化管二段階発がん試験においては先行研究の混餌濃度より高濃度条件（0.025%）においても陰性であり、その大腸粘膜DNAに対するDNAアダクト形成も認められなかった。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	アルキルシクロブタノン類を指標とした照射食品の安全性解析 （研究期間：平成21年度～平成23年度）
主任研究者名	所属：大阪府立大学地域連携研究機構放射線研究センター 氏名：古田 雅一 （研究課題番号：0906）

I 研究の全体計画

1 研究期間：平成21年度～23年度（3年間）

2 研究目的

食品に放射線を照射した場合、食品中に放射線照射による脂肪の分解生成物としてアルキルシクロブタノン類が検出されることが知られている。この物質は、放射線照射の有力な検知方法として利用の可能性がある一方、最近、照射していない食品からも微量に検出されることが明らかになるなど、動態や毒性について不明な点が多く残されている。本研究では、天然及び照射食品中の2-アルキルシクロブタノン類（2-ACBs）の量、照射線量とその生成量の関係を調べると同時に毒性試験データの再確認とプロモーション活性を含む発がん性の有無に関して明確な判断を下すに足る信頼性の高い安全性試験データを得ることを目的とする。

3 研究内容及び方法等

（1）研究内容及び方法

本研究では2-アルキルシクロブタノン類（2-ACBs）を照射食品の毒性モデルとしてとりあげ、すでに存在が報告されているナツメグ、カシューナッツなど脂質の含有量の高い香辛料中の動態を明らかにするとともに、高濃度の2-ACBsを用いた場合に指摘されているDNA損傷、染色体異常、ラットの実験的大腸発がんモデル系での発がんプロモーター活性の有無を明らかにするために *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験によりその毒性についてのプロファイルを明らかにする。実際には以下の項目で研究を実施する。

1）研究項目名 1 放射線照射による 2-ACBs の定量法と生成量の確定

① 個別課題名ア 天然食品中の 2-ACBs

天然物中での 2-ACBs の存在が報告されているナツメグ、カシューナッツを対象に、既報の分析法の追試験と改良により未照射食品中の 2-ACBs の有無を確認する。

本研究では、最初に既報（SFE-TLC 法）に従った前処理法について、標準品をスパイクしたマトリクスや大線量照射したナツメグ試料を用いて、抽出効率

や再現性、回収率を満足させる細部条件を検討する。次に、現在用いられている GC-MS の検出法よりも感度や選択性の高い二次元(マルチディメンショナル) GC 検出法等も活用して検出限界及び定量限界を定め、確立した分析条件で、天然食品中での 2-ACBs の存在が報告されているナツメグ、カシューナッツを対象に、起源の異なる試料を用いて、既報の分析法の追試験と感度や選択性の向上により未照射食品中の 2-ACBs の有無を確認する。

②個別課題名イ 照射食品中の 2-ACBs の含有量

実用的な放射食品(畜肉、水産物、穀類、香辛料)について、これまで報告されている研究論文を調査整理して、放射線照射による 2-ACBs の生成量を取りまとめる。また、放射線照射の諸条件(線質、温度、雰囲気ガス、線量率)による生成量の変動についても実験と文献調査の結果を取りまとめ、摂取量推定の基礎データを得る。

文献データベース(FSTA, BIOSIS, AGRIS, J-Dream 等)を活用して、食品中の 2-ACBs の定量結果や動態変化を報告している文献を網羅的に収集する。これらを取りまとめ、食品ごとの吸収線量あたりの脂質(脂肪酸)からの生成効率、照射条件の違いによる変動幅等に関する情報を整理する。

③個別課題名ウ 2-ACBs の安定性評価

毒性試験に用いる標準品(合成品)の試験中の安定性を確認するとともに、放射線照射によって食品中に生成する 2-ACBs の含量変化を追跡する。

購入した合成品について、純度(GC 分析ピークの単一性)及び化合物の MS スペクトル等による構造確認を行う(食品総合研究所の分析センターの協力を想定)。また、GC-MS 分析について、試験期間を通じての経時的なデータ確認を行う。遺伝毒性試験や動物試験における 2-ACBs の投与に即した化合物の溶解形態(DMSO またはアセトン溶液、オリブ油溶解後の混餌)での、2-ドデシルシクロブタノン(2-dDCB)及び 2-テトラデシルシクロブタノン(2-tDCB)の安定性を、GC-MS 分析により確認する。毒性試験に用いる標準品(合成品)の試験中の安定性を確認するとともに、放射線照射によって食品中に生成する 2-ACBs の含量変化を追跡する。

2) 研究項目名 2 *in vitro* 試験による 2-ACBs の有害性の検討

(ほ乳動物培養細胞を用いた遺伝毒性試験、発がんプロモーション試験、アポトーシス誘導及びそのシグナル伝達の解析、網羅的遺伝子発現変化の解析)

① 個別課題名エ 2-ACBs のアポトーシスに関する検討

ヒトリンパ腫細胞株である U937 細胞を用いて、アポトーシス毒性を調べる。必要に応じて、他のヒト細胞も使用する。アポトーシス検出については生化学的に DNA 断片化を定量する方法及びホスファチジルセリンの細胞膜表面への発現を、Annexin-V-FITC 及びヨウ化プロピジウムの 2 重染色した細胞についてフローサイトメトリーにより調べる。これにより、2-ACBs によるアポトーシス誘導に関する処理時間及び用量依存性を求め、アポトーシス毒性の最小用量を求める。アポトーシスが優位に誘導される条件が明らかとなった場合には、蛍光

画像解析法で調べるとともに Bax, Bcl-2, Bcl-XL, Bid 及び cytochrome c 遊離等を生化学手法や免疫染色法によって検討する。また、細胞内活性酸素生成や Ca^{2+} 濃度の変化についても調べる。上記の結果を総合して 2-ACBs によるアポトーシス誘導に関する分子機構としてシグナル伝達を明らかにする。

② 個別課題名オ 2-ACBs の遺伝子発現変化に関する検討

ヒトリンパ腫細胞株である U937 細胞を用いて、遺伝子発現の変化を調べる。必要に応じて、他のヒト細胞も使用する。2-ACBs 処理後の遺伝子発現を GeneChip を用いて網羅的に検討し、ハブ遺伝子を探索、その機能を調べる。

その後 Ingenuity Pathways Analysis データベースに基づいて構築された遺伝子ネットワークにより、2-ACBs による遺伝子発現変化及び細胞毒性発現を担うハブ遺伝子を同定する。これらの遺伝子について、さらにリアルタイム PCR を行い、2-ACBs の処理時間及び用量依存性を検討する。さらに、遺伝子ネットワークの構築を時間及び用量に依存したかたちで行うことにより、個々の遺伝子の相互作用の変動を明らかにし、分子作用機構の解明を目指す。

③ 個別課題名カ 2-ACBs の遺伝毒性評価及び *in vitro* 発がん性評価

個々の試験に対する 2-ACBs の必要量を勘案し、可能ならば dDCB について Ames test や Bhas42 細胞を用いる *in vitro* 発がん性試験、チャニーズハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験を実施し、*in vitro* における遺伝毒性及び発がん性の有無を明らかにする。

3) 研究項目 3. *in vivo* 試験による 2-ACBs の有害性の検討

(短期発がん性試験、二段階発がん性試験による発がんプロモーション確認)

① 個別課題名キ 2-dDCB のマウスを用いる小核試験

平成 21 年度から、dDCB のマウスを用いる小核試験を「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」(平成 8 年 3 月 22 日、衛化第 29 号)に準拠して行う。平成 22 年度は、小核試験に用いたマウスまたは 2-テトラデシルシクロブタンを投与したラットの大腸組織から DNA を抽出し、RI を用いるポストラベル法により、DNA に付加体が形成されているかの確認を行う。

② 個別課題名ク 2-ACBs の 90 日間亜急性毒性試験及びラットを用いた下部消化管二段階発がん試験

雄 F344 ラットを用いて 2-ACBs の 90 日間亜急性毒性試験を行い、二段階発がん試験のための投与量を決定する。また雄 F344 ラットを用いてアゾキシメタンをイニシエータとする 2-ACBs の下部消化管二段階発がん試験を行い、2-ACBs の発がん修飾作用の有無及び無作用量を明らかにする。

4 倫理面への配慮について

本研究は動物実験を行うことから、その遂行には以下の法令等を遵守する。

本研究では、動物実験材料を得る上で「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号、平成 17 年一部改正)及び「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18 年環境省告示第 88 号)を遵守するとともに、「研究機関等における動物

実験等の実施に関する基本指針」(平成 18 年文部科学省告示第 71 号)に基づいて運用されている各所属機関の指針等に従い、実験を計画し、承認を得た上で動物実験を行う。

5 当初計画からの変更点

(1) 初年度の中間評価結果を踏まえた変更点

マウスあるいはラットの大腸組織における DNA 傷害性の可能性を検討する試験を加え、不足している *in vivo* データ取得を新たに加えた。また、Ames test による変異原性試験の再検討を加えた。

(2) 2 年目の中間評価結果を踏まえた変更点

「必要な *in vivo* 試験に焦点を絞り、3 年間のまとめを確実に行うこと」という評価所見に鑑み、研究項目 2 に含まれていた *in vitro* 試験については新たな検討を停止し、研究発表に必要なデータ解析とまとめに切り替えた。これに伴い、*in vitro* 試験のみを担当していた近藤分担研究者に対する再委託は行わないこととした。

Ⅱ 平成 21 年度研究成果報告

1 当該年度の研究目標

項目 1. 「放射線照射による 2-ACBs の定量法と生成量の確定」において、すでに非照射試料における 2-ACBs の存在が報告されているナツメグを主な対象に 2-ACBs の抽出、前処理条件を確立し、GC-MS による 2-ACBs の検出感度の向上を図る。食品中の 2-ACBs の挙動に関する文献を収集・整理する。さらに標準試薬の 2-ACBs の構造確認と安定性を評価する。

項目 2. 「*in vitro* 試験による 2-ACBs の有害性の検討」及び項目 3. 「*in vivo* 試験による 2-ACBs の有害性の検討」については、既存の文献において指摘されている 2-ACBs の遺伝毒性作用、発がんのプロモーション活性の文献を調査し、当面取り組む化合物を選定する。選定された 2-ACBs の細胞に対するアポトーシス誘導について実験系を確立し、基本的なデータを得る。同時に *in vivo* における小核試験、*in vivo* 発がんプロモーション試験の実験設計を行い、試験を開始する。

2 当該年度の主な研究成果

(1) 研究項目ごとの研究成果の概要

1) 研究項目名 1 放射線照射による 2-ACBs の定量法と生成量の確定

①個別課題名ア 天然食品中の 2-ACBs (担当：等々力節子)

市販ナツメグを 50 kGy ガンマ線照射し、既報と同様に超臨界抽出 (SFE)、TLC による精製を実施することで、2-dDCB に相当すると思われる成分を GC-MS により検出することができた。また、MGDC (マルチディメンショナル GC) 法により、ナツメグ中の 2- dDCB を高い分離能で検出できることを確認した。

②個別課題名イ 照射食品中の 2-ACBs の含有量 (担当：等々力節子)

本年度までに、文献検索によりシクロブタノンの定量及び分析法に関する 61 報の文献を収集した。

③個別課題名ウ 2-ACBs の安定性評価 (担当：等々力節子)

2-dDCB 及び、2-tDCB の溶解性は、アセトン、オリブ油の溶解性は約 200 mg/ml で可溶。2-dDCB の DMSO に対する溶解性は、50 m0/ml >, tDCB はさらに難溶であった。これらの化合物の DMSO 及びアセトン中での安定性は、室温保存 4 日程度でも十分確認できた。一方、オリブ油中に溶解した 2-dDCB は、24 時間後で 92%、72 時間後で 74%まで減少した。動物飼料に混合した 2-tDCB は、ほぼ目標濃度に均一に混合され、給餌してから 72 時間後も調製時点と同程度の濃度で餌中に残存していることを確認した。

2) 研究項目名 2 *in vitro* 試験による 2-ACBs の有害性の検討

(ほ乳動物培養細胞を用いた遺伝毒性試験、発がんプロモーション試験、アポトーシス誘導及びそのシグナル伝達の解析。網羅的遺伝子発現変化の解析)

①個別課題名エ 2-ACBs のアポトーシスに関する検討 (担当：古田雅一、近藤隆)

ヒトリンパ腫細胞株 U937 を用いて、アルキルシクロブタノン類の親脂肪酸で

ある PA（パルミチン酸）及び SA（ステアリン酸）によるアポトーシスを調べたところ、濃度依存性アポトーシス誘導が確認された。さらに、2-dDCB 及び 2-tDCB は、より低濃度でアポトーシスを誘導することが判明した。一方、PA 及び SA に放射線照射（30 kGy）し、これらによるアポトーシスを調べたところ、有意なアポトーシス増加はなかった。

②個別課題名オ 2-ACBs の遺伝子発現変化に関する検討（担当：近藤隆、古田雅一）
今年度は実施しない計画となっている。

③個別課題名カ 2-ACBs の遺伝毒性評価及び *in vitro* 発がん性評価
（担当：山影康次、古田雅一）
今年度は実施しない計画となっている。

3) 研究項目 3 *in vivo* 試験による2-ACBs の有害性の検討 （短期発がん性試験、二段階発がん性試験による発がんプロモーション確認）

①個別課題名キ ドデシルシクロブタノンのマウスを用いる小核試験
（担当：山影康次）

2-dDCB の生体内における染色体異常誘発性の有無を検討するために、雄の CD1 (ICR) マウスを用いて経口投与による小核試験を実施した。

4用量（250、500、1,000及び2,000 mg/kg/day）の2-dDCB投与群を設定し、2回投与による小核試験を実施した。3用量（500、1,000及び2,000 mg/kg/day）群について分析した結果、2-dDCB投与による小核出現頻度の有意な増加は認められなかった。一方、陽性対照群（cyclophosphamide monohydrate投与群）の小核出現頻度は1%水準で有意な増加が認められ、本試験系の妥当性が確認された。なお、赤血球中に占める幼若赤血球の比率には、陰性対照群（日局オリブ油投与群）とそれ以外の群との間に有意な差は認められなかった。

②個別課題名ク 2-ACBsの90日間亜急性毒性試験及びラットを用いた下部消化管二段階発がん試験（担当：泉啓介、松本耕三）

90 日間亜急性毒性試験では 2-tDCB を 0%、0.001%、0.005%、0.01%の濃度で粉末食として雄 F344 ラットに混餌投与し、13 週で屠殺した（n=12）。全試験期間を通じて群間に体重及び摂餌量の差はみられなかった。肝臓、腎臓、脾臓の比重量、血清学的検査でも差はみられなかった。

平成 22 年 2 月から 2-tDCB の下部消化管二段階発がん試験を開始した。雄 F344 ラット（n=30）に 15 mg/kg のアゾキシメタンを 6 週齢から 3 回皮下注射し、第 3 週から第 24 週まで 2-tDCB を混餌投与する。90 日間亜急性毒性試験における最大投与濃度は 0.01%で実施したが、この濃度では毒性所見はみられなかったので二段階発がん試験では 2-tDCB の投与濃度は公比 5 で 0%、0.001%、0.005%、0.025% とすることにした。

(2) 全体の研究成果

1) 全体の研究成果の要旨

50 kGy ガンマ線照射市販ナツメグについて、超臨界抽出、TLC による精製により、既報どおり 2-dDCB の検出に成功した。GC-MS、MGDC (マルチディメンジョナル GC) 法により、より高い分離能で検出できることを確認した。

毒性試験に用いる予定の 2-dDCB 及び、2-tDCB のアセトン、オリーブ油、DMSO への溶解性、安定性及び実験動物飼料中における安定性、妥当性を確認した。

ヒトリンパ腫細胞株 U937 を用いて、2-ACBs の前駆物質、PA (パルミチン酸)、SA (ステアリン酸) による濃度依存性アポトーシス誘導を確認した。2-dDCB 及び 2-tDCB はより低濃度でアポトーシスを誘導した。ただし PA、SA の 30 kGy ガンマ線照射によるアポトーシスの増加は見られなかった。

雄の CD1 (ICR) マウスを用いて 2-dDCB の経口投与による小核試験を実施した結果、小核出現頻度の有意な増加は認められなかった。

下部消化管二段階発がん試験における 2-tDCB の投与量を決めるための 90 日間亜急性毒性試験では、0.01% の濃度までは粉末食として、雄 F344 ラットに毒性発現の兆候は現状では見られていない。

2) 研究成果の詳細

1) 研究項目名 1 放射線照射による 2-ACBs の定量法と生成量の確定

① 個別課題名ア 天然食品中の 2-ACBs (担当: 等々力節子)

市販ナツメグを 50 kGy ガンマ線照射し、既報と同様に超臨界抽出 (SFE)、TLC による精製を実施することで、2-dDCB に相当すると思われる成分を GC-MS により検出することができた (図 1、図 2)。

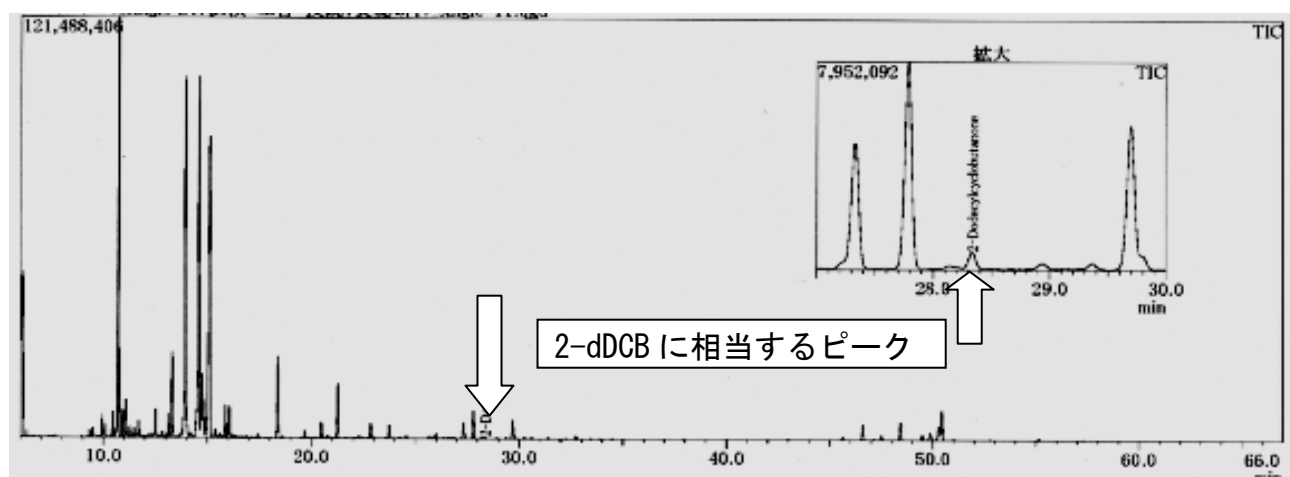


図 1. 照射ナツメグの SFE-TLC 抽出精製物の GC-MS チャート
スキャン範囲 ($m/z=50\sim300$)

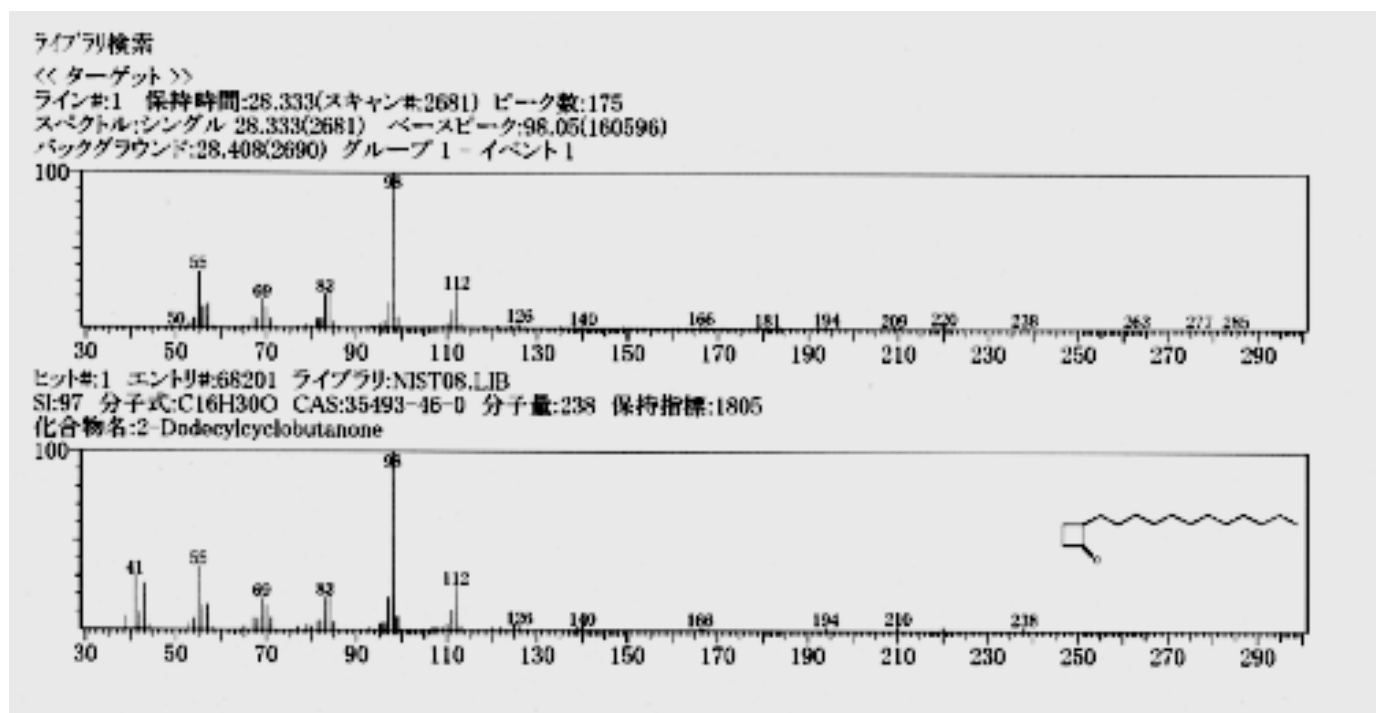


図 2. 2-dDCB 溶出時間 (RT=28.33min) のマススペクトル
 (上: 試料スペクトル、下: 標準 2-dDCB のライブラリー中のスペクトル)

さらに、2-dDCB のリテンションタイムを中心に 0.7 分間の溶出描分を 2 次元目の GC で分離し、MS で検出したクロマトグラムを図 3 に示す。

2 次元目の GC により、RT=28.33 のピークをさらに 2-dDCB と複数の微量成分に分離して検出することが可能であった。また、メインピークのマススペクトルは 2-dDCB との同定が可能であった。

なお、内部標準を用いずに絶対検量線より算出した 2-dDCB 濃度は、 $0.36 \mu\text{g/g}$ 試料であり、文献等から予想される含量より少なかった。この試料調製条件で抽出した未照射のナツメグの予備的な分析結果では、2-dDCB は検出されなかった。

②個別課題名イ 照射食品中の 2-ACBs の含有量 (担当: 等々力節子)

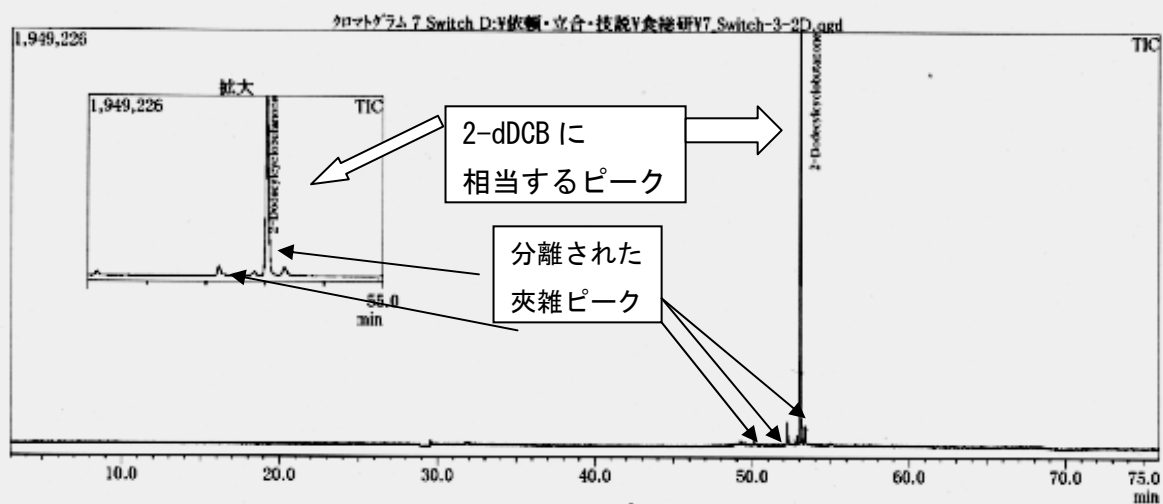
本年度までに、文献検索によりシクロブタノンの定量及び分析法に関する 61 報の文献を収集した。

③個別課題名ウ 2-ACBs の安定性評価 (担当: 等々力節子)

i) 2-dDCB の溶媒中の安定性

図 4 に示すように、2-dDCB をアセトンに溶解し放置した際のガスクロマトグラムは 4 日後も変化せず、2-dDCB に該当するピークの面積も変化しなかった。

トータルイオンクロマトグラム



マスクロマトグラム

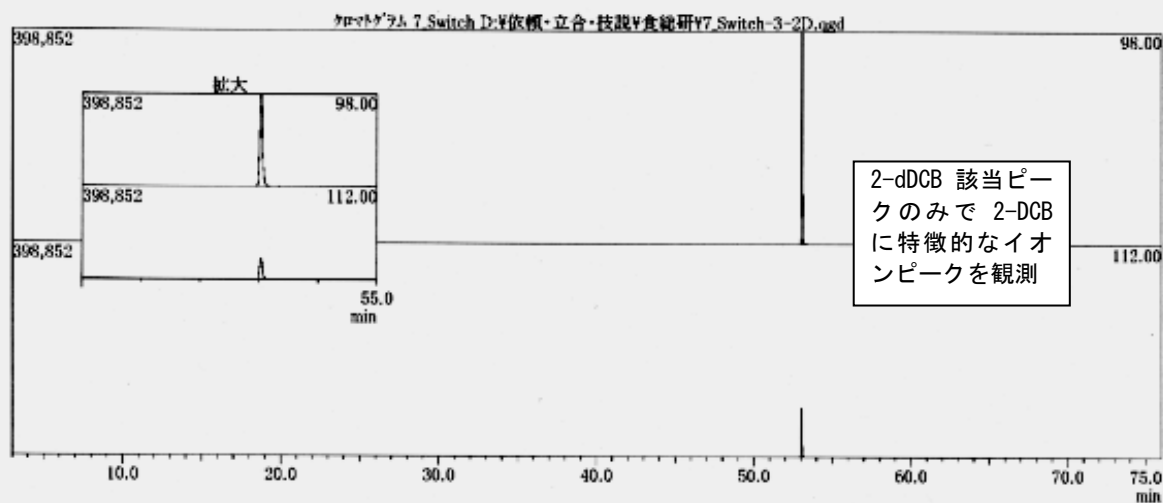
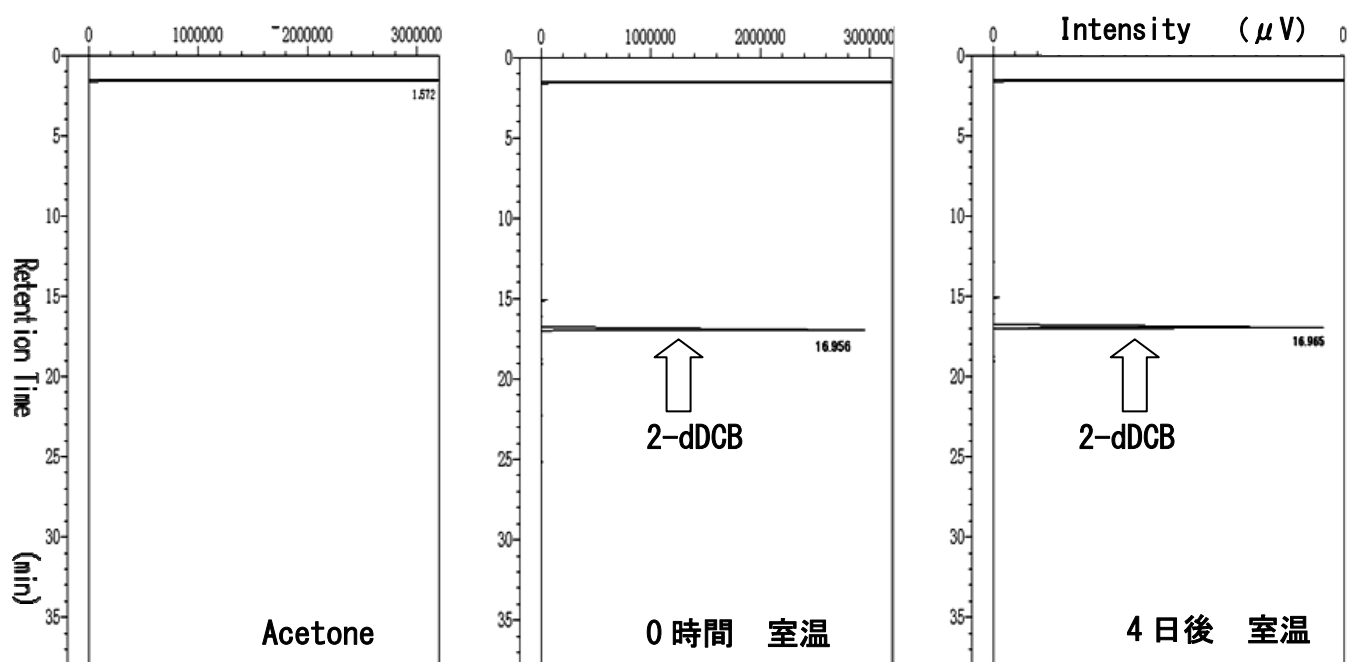


図3. 2次元目の GC-MS クロマトグラム

TIC (上段)、 MC(下段)ベースイオン ($m/z=98$) モニターイオン ($m/z=112$)



0時間(溶解直後)				4日後(室温保存後)			
ピーク番号	保持時間	面積	面積(%)	ピーク番号	保持時間	面積	面積(%)
1	3.632	4149	0.0208	1	6.944	1555	0.0076
2	6.944	1526	0.0077	2	12.266	1032	0.0059
3	12.857	11659	0.0585	3	12.864	12158	0.0591
4	12.927	3127	0.0157	4	12.933	3280	0.0159
5	15.075	90069	0.4518	5	15.081	93683	0.4552
6	15.233	1266	0.0063	6	15.240	1262	0.0061
7	15.640	2704	0.0136	7	15.646	2807	0.0136
8	16.110	17277	0.0867	8	16.117	18046	0.0877
9	16.595	6474	0.0325	9	16.600	6754	0.0328
10 *	16.956	19722413	98.9203	10 *	16.965	20360965	98.939
* 2-DCB 該当ピーク							

図4. アセトンに溶解した 2-dDCB のガスクロマトグラムとピーク面積
(2-dDCB 濃度: 207.50 mg/ml)

表1に 200 mg/ml の 2-dDCB を局方オリブ油に溶解し、室温遮光保存し、1 部を経時的に抜き取って GC で、濃度測定をした結果を示す。

表1. オリブ油に溶解した 2-dDCB の濃度変化

保存期間	濃度 *	(SD)	%
	(μ g/ml)		
0h	147.2	2.1	100.0
24h	135.1	1.0	91.8
48h	131.6	6.7	89.4
72h	109.0	4.1	74.0
* 原液希釈後測定時の濃度 (n=3)			

2-dDCB の濃度は経時的に減少したが、24 時間後に初期濃度の 90%以上が残存して

いた。48 時間以降、GC 分析によるクロマトグラムに、2-dDCB より遅い保持時間に新規ピークを確認した（図 5）。このピークは、72 時間後にはさらにピーク面積が増加した。

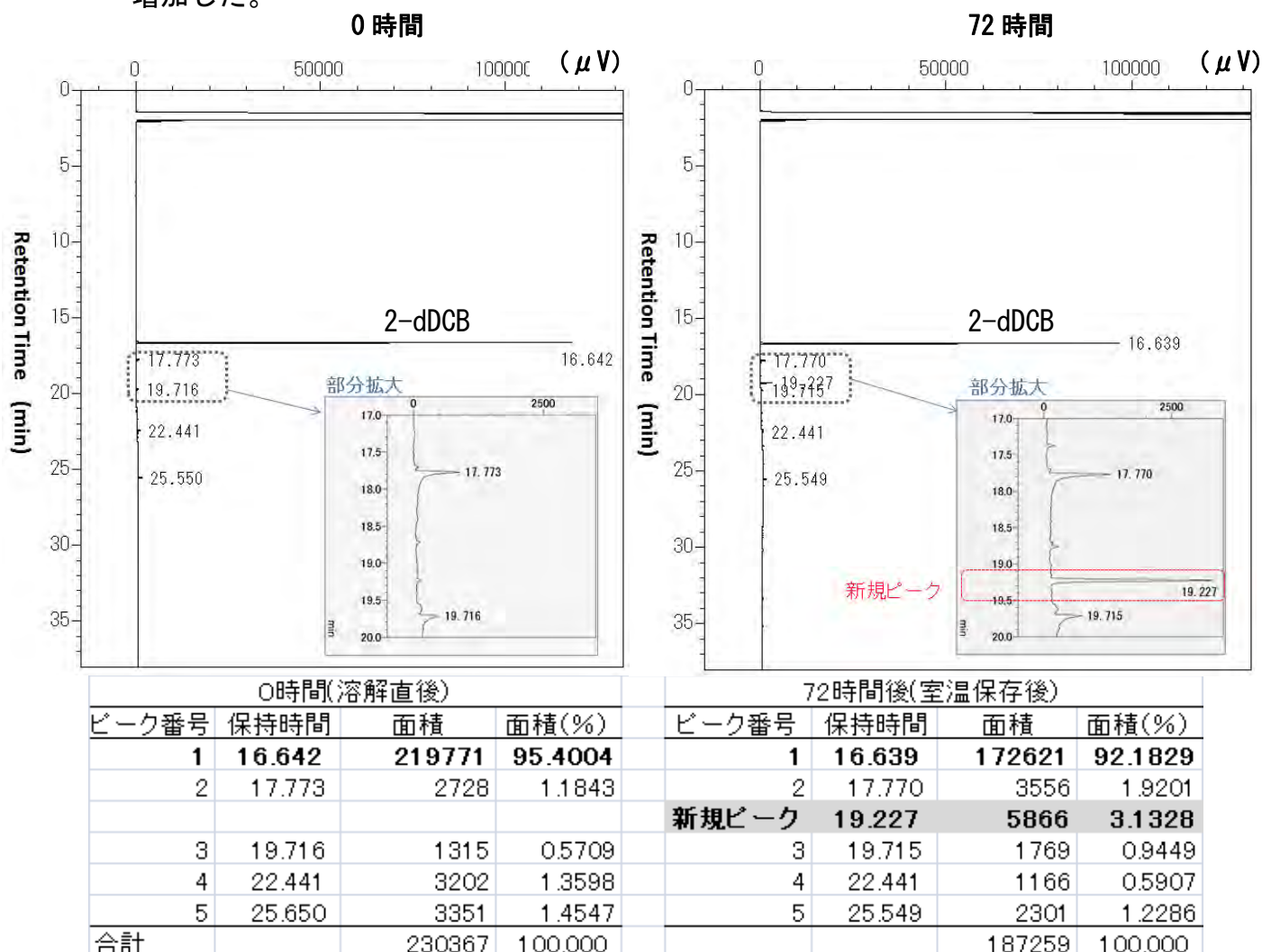


図 5. オリーブ油に溶解した 2-dDCB の希釈後のクロマトグラムとピーク面積
200 mg/ml 濃度に溶解後遮光保存。1300 倍に希釈して GC で分析。

ii) 2-動物試料中の 2-tDCB 含量と安定性

2-tDCB の濃度が、0.01%、0.001%の濃度になるように、粉末飼料の調製直後（1.5kg/1 回調製分）の異なる部位から 2 か所、各約 3g 分のサンプリングを行い、飼料に含まれる 2-tDCB の濃度を測定した。さらに、給餌後 3 日経た残余飼料について、容器あたり 1 か所、3 容器分の飼料をサンプリングし、その濃度を測定した。

結果を表 2 に示す。動物飼料に混合した 2-tDCB は、ほぼ目標濃度に均一に混合され、給餌してから 72 時間後も調製時点と同程度の濃度で餌中に残存していると判断した。

また、中間濃度の 0.005%の飼料については、調製時のみ濃度測定を行ったところ、56.6 μ g/g とほぼ想定される含量であった。

表 2. 0.01%飼料 及び 0.001%飼料中の 2-tDCB の含量
0.01%試料 (理論値 100 μ g/g)

試料 ID	調製直後		給餌後(72h)		
	#3	#15	#10	#11	#12
各試料の濃度 (μ g/g 飼料) ^a	114.4	105.8	127.2	141.6	130.0
調製直後、給餌後の総平均	110.1		132.9		

0.001%試料 (理論値 10 μ g/g)

試料 ID	調製直後		給餌後(72h)		
	#1	#13	#4	#5	#6
各試料の濃度 (μ g/g 飼料) ^a	10.2	9.69	9.37	9.42	10.58
調製直後、給餌後の総平均	9.94		9.79		

a. 2 回の分析の平均値

2) 研究項目名 2 *in vitro* 試験による 2-ACBs の有害性の検討

①個別課題名エ 2-ACBs のアポトーシスに関する検討 (担当: 古田雅一、近藤隆)

ヒトリンパ腫細胞株 U937 を用いて、アルキルシクロブタノン類の親脂肪酸である PA (パルミチン酸) 及び SA (ステアリン酸) によるアポトーシスについて DNA 断片化を指標に調べたところ、濃度依存性アポトーシス誘導が確認された (図 6)。

アポトーシス毒性を示す濃度は PA が低く、24 時間処理では、100 μ M で増加傾向を示すのに対して、SA では 300 μ M でも、その傾向は認められなかった。

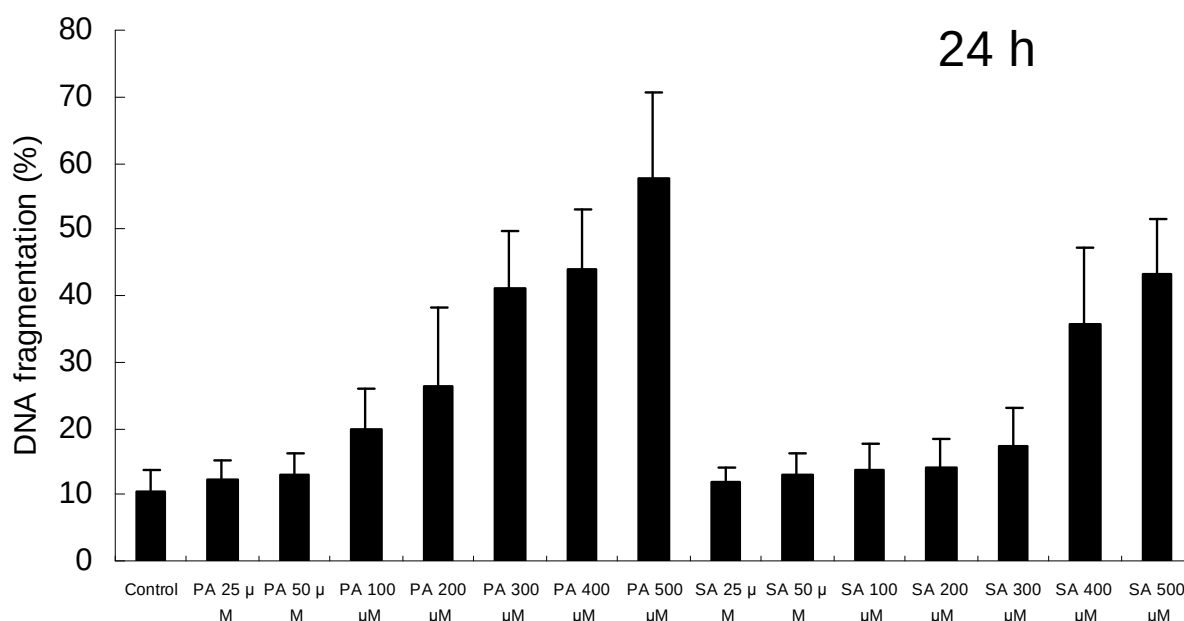


図 6. PA (パルミチン酸) 及び SA (ステアリン酸) 24 時間処理による DNA 断片化を指標にしたアポトーシス

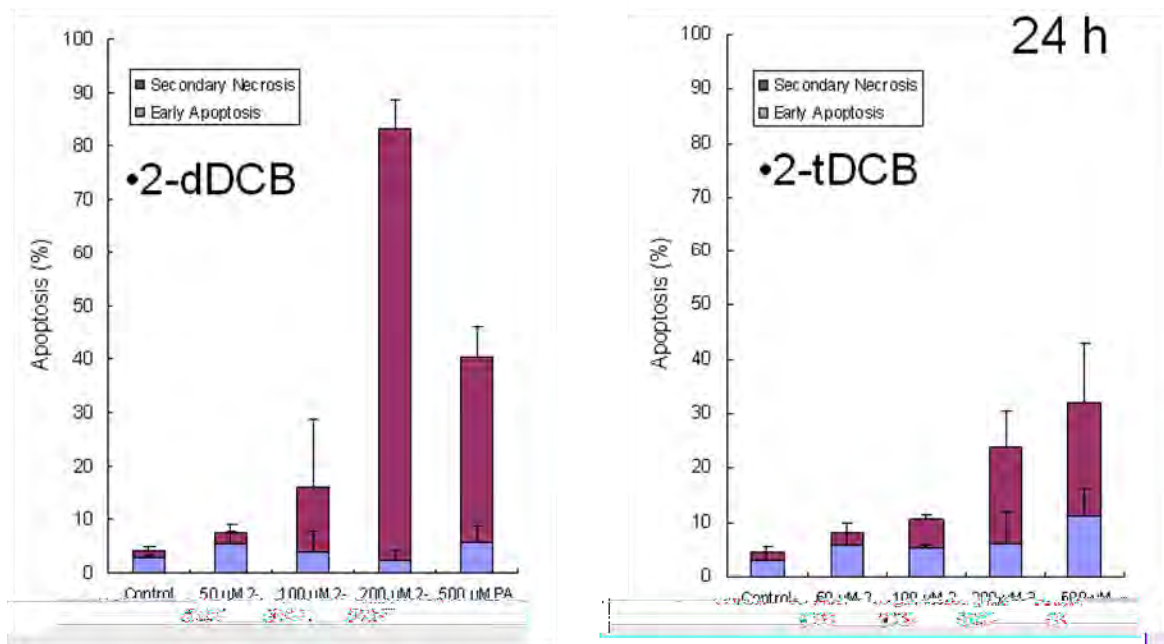
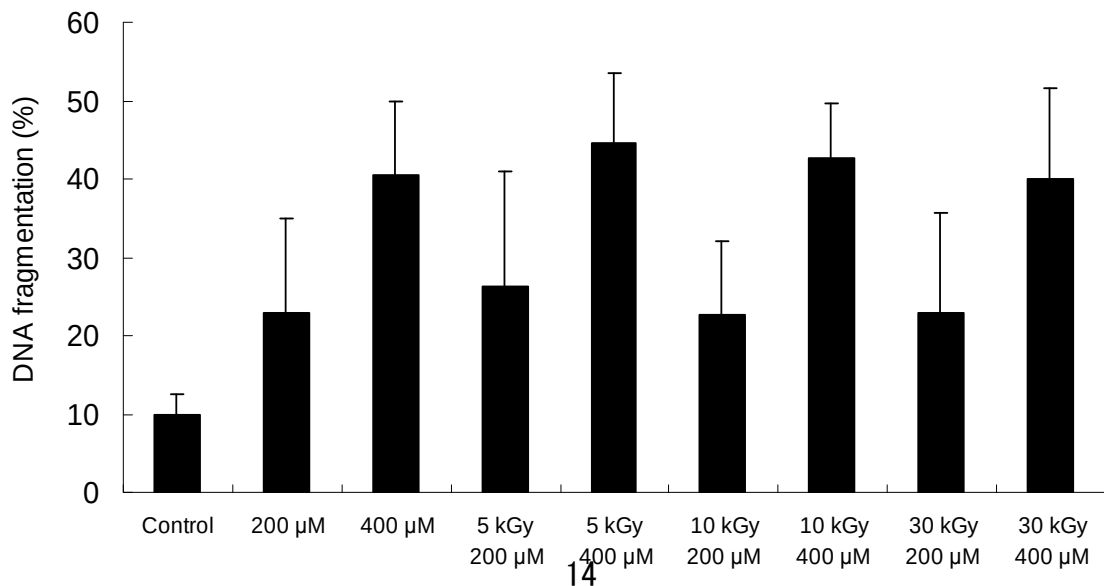


図7. Annexin V-FITC と PI 二重染色後のフローサイトメトリーで調べた 2-dDCB (2-dodecylcyclobutanone) 及び 2-tDCB (2-tetradecylcyclobutanone) によるアポトーシス

次に、両者の濃度を 500 μM として、細胞膜上へのホスファチジルセリンの発現を Annexin V-FITC と PI 二重染色後のフローサイトメトリーで調べる手法を用いて検討したところ、同様に PA が SA に比べて高い値を示した。特徴的なのは、Annexin V-FITC(+), PI(-) の細胞の割合は少なく、多くは V-FITC(+), PI(+) の細胞であり、細胞膜損傷を伴う後期アポトーシスを示した。

同様の条件でミトコンドリア関連アポトーシスの指標であるスーパーオキシド産生とミトコンドリア膜電位の低下について、フローサイトメトリーにより細胞の割合を調べた。その結果、同様に PA が SA に比べて効果が高く、その割合も高かった。本結果は脂肪酸誘発アポトーシスにミトコンドリア経路が関与することを示唆する。



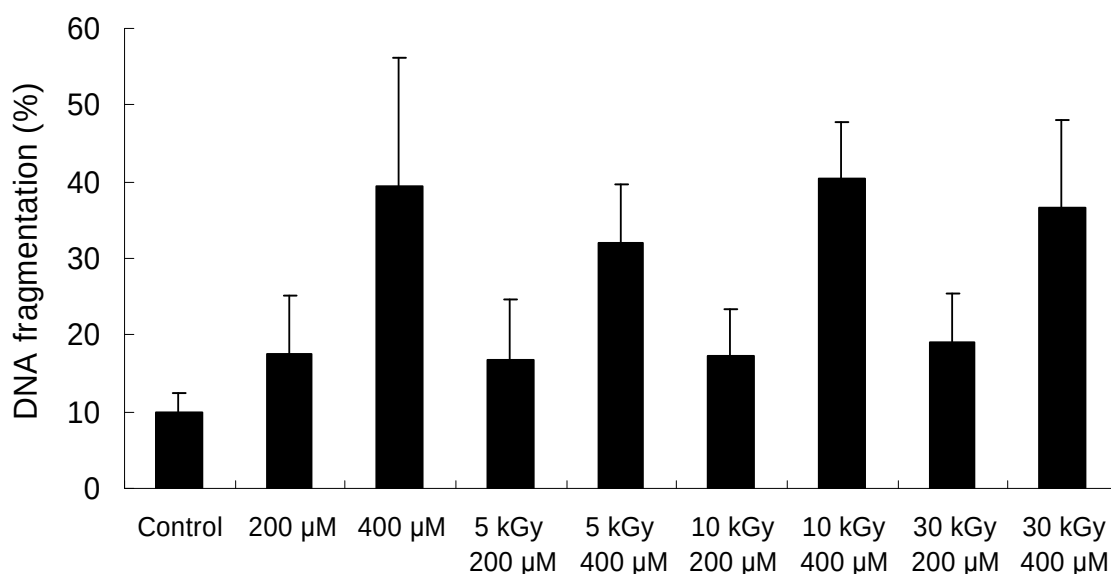


図 8. DNA 断片化を指標に調べた放射線照射 PA 及び SA の 24 時間処理によるアポトーシス

(a; 上図で PA によるアポトーシス、b; 下図で SA によるアポトーシス)

ヒトリンパ腫細胞株 U937 を用いて、アルキルシクロブタノン類である 2-dDCB (2-dodecylcyclobutanone) 及び 2-tDCB (2-tetradecylcyclobutanone) によるアポトーシスを Annexin V-FITC と PI 二重染色後のフローサイトメトリーで調べた。本法では生化学的 DNA 断片化の測定よりも少ない試料（細胞数及び試薬）ですむため、効率的である。その結果濃度依存性アポトーシス誘導が確認された（図 7）。

アポトーシス毒性を示す濃度は PA や SA に比べて低く、24 時間処理では、50 μM で増加を示した。2-dDCB と 2-tDCB の比較では、前者が 200 μM で顕著な増加を示し、80%以上に達したのに対して、後者では 500 μM でも、30%程度であった。また、

脂肪酸誘発アポトーシスの結果と同様に、Annexin V-FITC(+), PI(-)の細胞の割合は少なく、多くは V-FITC(+), PI(+)の細胞であり、細胞膜損傷を伴う後期アポトーシスであった。

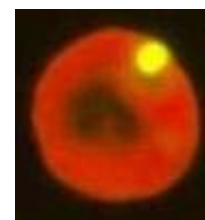
PA 及び SA に放射線照射した場合、親脂肪酸に比べてアポトーシスが増加する可能性について検討した。PA 及び SA に 30 kGy まで放射線を照射し、これらによるアポトーシス誘発量を調べた。その結果、30 kGy まで放射線を照射しても PA 及び SA 単独によるアポトーシス誘発率を上回る結果は認められなかった（図 8 a, b）。

3) 研究項目 3 *in vivo* 試験による 2-ACBs の有害性の検討

①個別課題名キ ドデシルシクロブタノンのマウスを用いる小核試験

(担当：山影康次)

2-dDCB のマウスを用いる小核試験を「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」(平成 8 年 3 月 22 日、衛化第 29 号)に準拠して行い、2-dDCB の *in vivo*における染色体異常誘発作用を調べた。すなわち、2-dDCB を日局オリブ油に溶解して用時に投与液を調製し、9 週齢の雄の CD1(ICR)マウスに 24 時間おきに 2 回経口投与(10 mL/kg/日)した。2 回目投与の 24 時間後に両側の大腿骨を摘出して骨髓塗抹標本を作製し、アクリジンオレンジで黄色に染色される小核を有する幼若赤血球(右写真)の数を分析した。1 匹あたり 2,000 個の幼若赤血球を分析し、1 群 5 匹の合計 10,000 個の幼若赤血球における小核の出現頻度を求めた。また、骨髓細胞の増殖抑制の指標として、1 匹あたり 1,000 個の赤血球(幼若赤血球及び成熟赤血球)を観察した。



医薬品や化学物質の *in vivo*における遺伝毒性試験評価法として国際的に認められているげっ歯類の骨髓細胞を用いる小核試験を実施した。その結果、2-dDCB 投与による死亡や一般状態の変化は観察されず、小核誘発頻度については、日局オリブ油投与群(陰性対照群)との間に統計学的有意差は認められず、いずれも陰性対照群の背景値の範囲内であり、2-dDCB は骨髓細胞に染色体異常誘発作用を示さない(陰性)ことを確認した(下表)。

表 3 2-DCB(2-Dodecylcyclobutanone)を経口投与した雄CD1(ICR)マウスの骨髓細胞を用いた小核試験結果

群	用量 (mg/kg/day)	投与 回数	動物数	多染性赤血球数		MNPCEs ^a ± S.D. (%)	ERYs ^b ± S.D. (%)
				観察細胞	小核保有細胞		
陰性対照 (局方オリブ油)	0	2	5	10000	10	0.10 ± 0.10	55.8 ± 5.3
2-DCB	500	2	5	10000	18	0.18 ± 0.10	53.9 ± 6.4
	1000	2	5	10000	12	0.12 ± 0.09	53.9 ± 4.9
	2000	2	5	10000	17	0.17 ± 0.08	50.8 ± 5.5
陽性対照 (CP)	50	1	5	10000	252*	2.52 ± 0.38	52.1 ± 10.6

a, 小核を有する幼若赤血球の%

b, 赤血球中における幼若赤血球の%

CP, Cyclophosphamide monohydrate (単回経口投与)

*, 陰性対照群との間に有意差あり(1%水準)。

②個別課題名ク 2-ACBsの90日間亜急性毒性試験及びラットを用いた下部消化管二段階発がん試験(担当: 泉啓介、松本耕三)

90 日間亜急性毒性試験では 2-tDCB を 0%、0.001%、0.005%、0.01%の濃度で粉末食として雄 F344 ラットに混餌投与し、13 週で屠殺した(n=12)。全試験期間を通じて群間に体重及び摂餌量の差はみられなかった(図 9、図 10)。肝臓、腎臓、脾臓の比重量、血清学的検査でも差はみられなかった(表 4、表 5)。組織学的検査は実施中である。90 日間亜急性毒性試験における 2-tDCB の最大投与濃度はヒ

トが照射食品から摂取する可能性がある濃度の約 600 倍であるが、明らかな毒性はみられなかった。

平成 22 年 2 月から 2-tDCB の下部消化管二段階発がん試験を開始した。雄 F344 ラット (n=30) に 15 mg/kg のアゾキシメタンを 6 週齢から 3 回皮下注射し、第 3 週から第 24 週まで 2-tDCB を混餌投与する。90 日間亜急性毒性試験における最大投与濃度は 0.01% で実施したが、この濃度では毒性所見はみられなかったので二段階発がん試験では 2-tDCB の投与濃度は公比 5 で 0%、0.001%、0.005%、0.025% とすることにした。

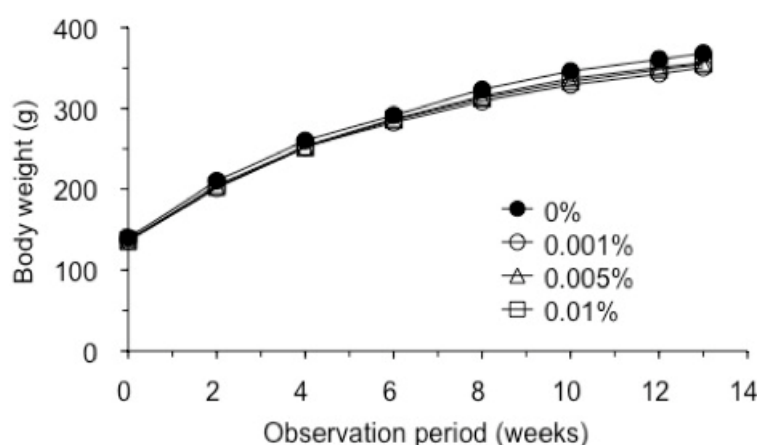


図 9. 90 日間亜急性毒性試験の体重曲線

6 週齢雄 F344 ラット (n=12) に 0, 0.001, 0.005, 0.01% tDCB 食を投与した。

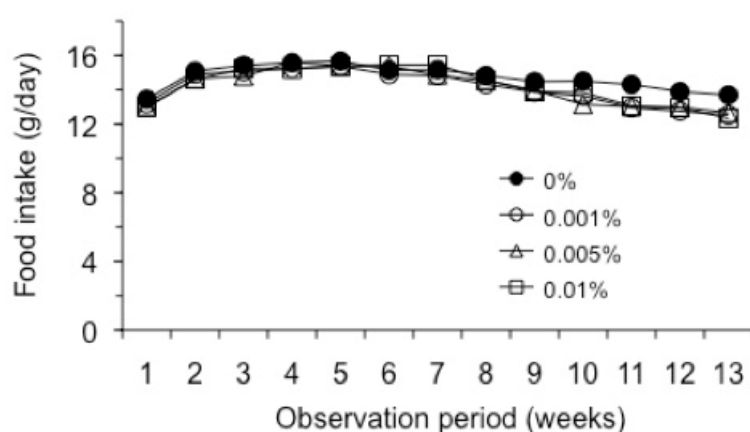


図 10. 90 日間亜急性毒性試験における各群の摂餌量

表 4. 肝臓、腎臓、脾臓の比体重 (90 日間亜急性毒性試験)

投与濃度	肝臓	腎臓 (両側)	脾臓
0%	0.032	0.0070	0.0022
0.001%	0.031	0.0067	0.0021
0.005%	0.032	0.0067	0.0022
0.01%	0.031	0.0067	0.0022

表 5. 血清学的検査所見 (90 日間亜急性毒性試験)

投与濃度	総ビリルビン (mg/dl)	尿素窒素 (mg/dl)	クレアチニン (mg/dl)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)
0%	0.04	23.8	0.27	86	64
0.001%	0.04	22.8	0.26	86	66
0.005%	0.04	21.6	0.26	82	64
0.01%	0.04	21.0	0.27	84	65

3) 考察及び結論

研究項目名 1「放射線照射による 2-ACBs の定量法と生成量の確定」においては照射ナツメグをマトリックスとした、シクロブタノンの検出において、既報を模倣した抽出精製条件が利用可能なことが確認された。ただし、マトリックスからの抽出効率や、添加回収率を確認するために適当な内部標準を利用した定量法とはなっていないため、これらを確認した条件下での天然物中の存在の有無を確定する必要がある。次年度は、サロゲートの入手が可能であれば、これを内部標準とした定量法を検討して、結論を得たい。

また、MGDC (マルチディメンショナル GC) 法は、複雑なマトリックス中の 2-dDCB 成分の検出に有効に活用できることが明らかになったので、次年度以降も必要に応じて取り入れ、本項目の最終目標である天然のナツメグ、カシューナッツにおいて 2-dDCB が検出されたとする既報の追試に役立てたい。

また以下の研究項目で予定されている遺伝毒性試験や発がん試験を適切に行うためには試験に供する試料中に含まれる 2-ACBs 標品の安定性が大きな問題となる。今年度はこの点に関しても溶解性試験と安定性試験を行い、*in vitro* 試験の被験液の溶媒はアセトンとした。また、*in vivo* 小核試験の 2-dDCB オリブ油溶液は、調製後 24 時間以内に使用することとした。オリブ油中での分解の詳細については、食品中の 2-ACBs の存在動態にも関連するので、可能であればさらに検討したい。さらに次年度に行う予定のラットを用いた二段階発がん試験に使用する粉

末飼料中の 2-tDCB 標品の均質性や安定性について情報が得られることは本試験の妥当性を担保する意味で重要な成果であると考えられる。

研究項目名 2 「*in vitro* 試験による 2-ACBs の有害性の検討」については既報の文献調査により、2-dDCB は遺伝子に対して酸化損傷を与え、また 2-dDCB の前駆体である PA (パルミチン酸) が 2-dDCB と同様にヒト TK6 細胞に小核を誘導することが知られている。本研究における今年度の検討から、PA (パルミチン酸) 及び SA (ステアリン酸) による濃度依存性アポトーシス誘導が確認された。2-dDCB 及び 2-tDCB については、親脂肪酸よりも低濃度でアポトーシスを誘導することが判明した。一方、PA 及び SA に放射線を照射した場合、アポトーシス増加はみられなかった。今後は異なる細胞種を用いた検討、2-dDCB によるアポトーシスの分子機構の解明を行う予定であり、GeneChip 及び Ingenuity Pathway Analysis Tool Software を用いて網羅的遺伝子発現変化及び遺伝子間相互作用の検討及び変化のあった遺伝子についてのリアルタイム PCR によるその発現変化の確認が必要となる。

2-dDCB を用いた小核試験においては、マウスでは 2,000 mg/kg というかなり高用量を経口投与しても骨髄細胞に染色体異常誘発作用を示さなかった。2-dDCB については、培養細胞を用いた *in vitro* 試験系で遺伝毒性作用を示唆する結果も得られているが、試験法ガイドラインに従った *in vitro* 遺伝毒性試験を実施し、遺伝毒性作用の有無を総合的に評価する必要がある。また、十分量の 2-dDCB が得られるのであれば、エンドポイントあるいは異なる臓器における *in vivo* 遺伝毒性試験結果の取得も重要であると考えられる。

今年度の結果を総合すると、2-dDCB の発がん性の標的臓器と考えられる大腸における影響についてはさらなる検討が必要であるが、試験法ガイドラインに従って実施した小核試験の結果からは 2-dDCB が *in vivo* で遺伝毒性作用を示す可能性は低いものと考えられる。

研究項目名 3 (*In vivo* 試験による 2-ACBs の有害性の検討) については 90 日間亜急性毒性試験を予定通り行うことができた。この経過から、0.01% 2-tDCB 含有粉末食の投与では雄 F344 ラットには特に毒性を示唆する兆候は見られていないため、予定している下部消化管二段階発がん試験においてより確実な結果を得るためにはより高濃度の 0.025% で実施することにした。

- 3 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト
なし
- 4 本研究を基にした学会発表の実績
なし
- 5 特許及び特許出願の数と概要
なし

6 その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）の実績

なし

7 今後の問題点等

研究項目名 1（放射線照射による 2-ACBs の定量法と生成量の確定）の大きな目的は、既報と比較して、天然物中のナツメグ、カシューナッツの 2-ACBs の存在確認をすることであるが、これにあたり、最終的な結論を得るためには試料の起源についての検討を要する。

研究項目名 2（*in vitro* 試験による 2-ACBs の有害性の検討）において気になることは 2-ACBs の生体内での発がんの種類として大腸発がんが疑われていることから、標的臓器である大腸における遺伝毒性作用の検討も考慮する必要がある。

研究項目名 3（*In vivo* 試験による 2-ACBs の有害性の検討）においては、上述したように、90 日間亜急性毒性試験の経過から予測に反して 2-tDCB の毒性が被験動物には現れていないため、下部消化管二段階発がん試験においてより確実な結果を得るためにはさらに多くの試薬を要することが懸念される。

Ⅲ 平成 22 年度研究成果報告

1 当該年度の研究目標

研究項目名 1「放射線照射による 2-ACBs の定量法と生成量の確定」においてはナツメグを主な対象に 2-ACBs の定量条件を確立し、天然物中の存在を確認する。また食品中の 2-ACBs の挙動に関する文献を収集整理する。さらに発がんプロモーター活性の有無を調べる二段階発がん試験の妥当性の基礎となる飼料中のシクロブタノンの安定性を確認する。

研究項目名 2「*in vitro* 試験による 2-ACBs の有害性の検討」においては、平成 21 年度の結果に基づき、U937 細胞を用いて、2-dDCB によるアポトーシス誘導に関する分子機構を解明する。さらに他のヒト正常及びがん細胞を用いて処理時間及び用量応答関係を求め、アポトーシス毒性の最小用量を求め、比較する。これらの結果より、アポトーシスを誘導する濃度及びしない濃度を設定して、2-dDCB 処理細胞において、遺伝子発現変化を網羅的検討して、これに特異的に反応する遺伝子を同定する。

2-dDCB 及びパルミチン酸について、Bhas42 細胞を用いる *in vitro* 発がん性試験を行い、2-dDCB のイニシエーション活性及びプロモーション活性を調べる。また、*in vivo* におけるイニシエーション（遺伝毒性作用）を DNA 付加体生成の有無の検討により調べる。

Ames test など微生物を用いる変異原性試験において陰性であることの既報について再確認する。

研究項目名 3「*In vivo* 試験による 2-ACBs の有害性の検討」においては平成 21 年度の研究を継続し、2-tDCB の 90 日間亜急性毒性試験における組織学的検査を行う。発がんプロモーション活性の有無を当該投与量の範囲で明らかにする。また、下部消化管二段階発がん試験における発がん促進活性の有無を当該投与量の範囲（0.001% - 0.025%）で明らかにする。

小核試験に用いたマウスまたは 2-tDCB を投与したラットの大腸組織から DNA を抽出し、RI を用いるポストラベル法により、DNA に付加体が形成されているかの確認を行う。

2 当該年度の主な研究成果

（1）研究項目ごとの研究成果

1）研究項目名 1 放射線照射による 2-ACBs の定量法と生成量の確定

個別課題名ア 天然食品中の 2-ACBs（担当：等々力節子）

2-ACBs 測定のための条件検討を行い、通常の GC-MS によるナツメグ中の 2-dDCB 及び 2-tDCB、カシューナッツ中の 2-dDCB、2-tDCB 及び 2-tDeCB の定量法を確立した。一方で、この系で未照射のナツメグ（5 ロット）及びカシューナッツ（2 ロット）を分析しても、これらの 2-ACBs は検出されなかった。さらに、高分解能 GC-MS により、ナツメグに添加した 0.016 $\mu\text{g/g}$ の 2-DCB、0.032 $\mu\text{g/g}$ の 2-dDCB 及び、カシューナッツに添加した、0.004 $\mu\text{g/g}$ の 2-dDCB、0.008 $\mu\text{g/g}$ の 2-tDCB、0.04 $\mu\text{g/g}$ の 2-tDeCB の検出に成功したが、このとき、同時に分析した未照射（無添加）試料では、いずれの 2-ACBs も検出されなかった。以上から、天然（未照射）のナツメグ及び、カシューナッツにおける 2-ACBs の存在は、確認できないと結論した。

個別課題名イ 照射食品中の 2-ACB の含有量 (担当:等々力節子)

22 年度中に、照射食品中の 2-ACBs の定量に関し、新たに 3 報の論文を収集した。
さらに本研究の中でも、照射ナツメグとカシューナッツの定量を進めている。
(詳細は省略する)

個別課題名ウ 2-ACBs 類の安定性評価 (担当:等々力節子)

2-tDCB を投与したラット脂肪組織中における、同化合物の検出方法の予備検討
を行い、検出の可能性を見いだした。

2) 研究項目名 2 *in vitro* 試験による 2-ACBs の有害性の検討

個別課題名エ 2-ACBs のアポトーシスに関する検討遺伝子発現変化を指標とした
安全性評価とそれらの分子機構の解明 (担当:古田雅一、近藤隆)

個別課題名オ 2-ACBs の遺伝子発現変化に関する検討 (担当:古田雅一、近藤隆)

昨年度までに、ヒトリンパ腫細胞株 U937 を用いて、アルキルシクロブタノン類の
親脂肪酸である PA (パルミチン酸) 及び SA (ステアリン酸) による濃度依存性ア
ポトーシス誘導が確認され、さらに、2-dDCB 及び 2-tDCB はより低濃度でアポトー
シスを誘導することが判明した。一方、PA 及び SA に放射線照射 (30 kGy) したが、
有意なアポトーシス増加はないことが確認された。さらに、アポトーシスの分子機
構を探る目的で、アポトーシス関連分子、ミトコンドリア膜電位、細胞膜への Fas
の発現、細胞内活性酸素の生成、同カルシウムイオン濃度について調べた。その結
果、2-dDCB 及び 2-tDCB は細胞内活性酸素生成及び Fas の発現を増加させ、それ
により、アポトーシス-ミトコンドリア経路を活性化し、アポトーシスを誘導するこ
とが判明した。加えて、細胞内活カルシウムイオンの増加もその一因となることが示
唆された。

個別課題名カ 2-ACBs の遺伝毒性評価及び *in vitro* 発がん性評価

(担当:古田雅一、山影康次)

In vitro 形質転換試験を実施する前に、2-dDCB、パルミチン酸及びステアリン酸
の本試験条件下における細胞毒性作用を調べた。その結果をもとに、イニシエー
ション試験では、10~50%相対細胞増殖率を示すと考えられる濃度を 2 濃度以上、50
~80%の相対細胞増殖率を示すと考えられる濃度を 2 濃度以上及び 80%以上の相対細
胞増殖率を示すと考えられる濃度を 1 濃度以上設定し、プロモーション試験では、
80%以上の相対細胞増殖率を示すと考えられる濃度を 2 濃度以上、50~80%の相対細
胞増殖率を示す濃度を 2 濃度以上、50%以下の相対細胞増殖率を示すと考えられる濃
度を 1 濃度以上設定し、形質転換試験を継続中である。また 2-dDCB、2-tDCB 最大
濃度 8 mM までのエタノール溶液に対して TA100、TA98 株を用いた Ames 試験は全て
陰性であった。

3) 研究項目名 3 *In vivo* 試験による 2-ACBs の有害性の検討

個別課題名キ ドデシルシクロブタノンのマウスを用いる小核試験

(担当:山影康次)

*In vivo*における 2-ABC 類の DNA 損傷性を調べるために、2-dDCB の骨髓細胞を用いる小核試験に使用したマウスの大腸組織、及び、2-tDCB の中期二段階発がん性試験に使用したラットの大腸の正常組織から DNA を抽出し、ポストラベル法によるアダクト試験を実施した。試験法の概略図を図 1 1 に示した。

今回は、感度が高いとされているヌクレアーゼPI法及びブタノール抽出法により2-dDCBまたは2-tDCBが発がんの標的臓器である大腸組織においてDNA付加体形成の有無を調べた。現在、ヌクレアーゼPI法の結果では、2-dDCB及び2-tDCBによるDNA付加体生成は認められなかった。

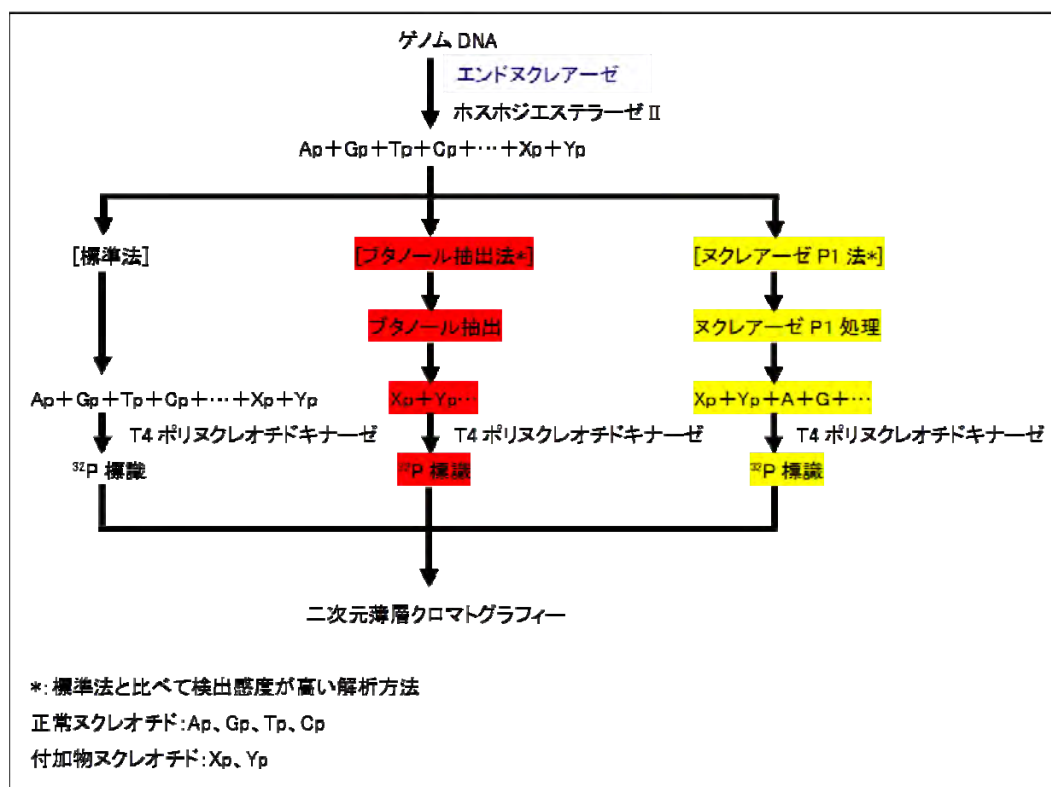


図 1 1 ポストラベル法によるDNAアダクト解析の流れ

個別課題名ク 2-ACBs の 90 日間亜急性毒性試験及びラットを用いた下部消化管二段階発がん試験（担当：泉啓介）

雄 F344 ラットを用いて 2-テトラデシルシクロブタノンの下部消化管の二段階発がん試験を行った。実験は、雄 F344 ラット (n=30) に 15 mg/kg のアゾキシメタンを 6 週齢から 3 回皮下注射し、第 3 週から第 28 週まで 2-テトラデシルシクロブタノン (0%, 0.001%, 0.005%, 0.025%) を混餌投与した。下部消化管腫瘍の発生頻度、腫瘍の個数に群間差はなく、今回の実験条件では 2-テトラデシルシクロブタノンは発がん促進作用を示さないことが明らかになった。

(2) 全体の研究成果

1) 全体の研究成果の要旨

通常の GC-MS、高分解能 GC-MS 測定によりナツメグ、カシューナッツ中の 2-ACBs

の定量法を確立したが、未照射（無添加）試料では、2-ACBs は確認できなかった。また 2-tDCB を投与したラット脂肪組織中において同化合物の検出の可能性を見いだした。2-dDCB 及び 2-tDCB は細胞内活性酸素生成及び Fas の発現を増加させ、それにより、アポトーシス-ミトコンドリア経路を活性化し、アポトーシスを誘導することが判明し、細胞内活 Ca イオンの増加もその一因となることが示唆された。2-dDCB、2-tDCB 最大濃度 8 mM までのエタノール溶液に対して TA100, TA98 株を用いた Ames 試験は全て陰性であり、Bhas 42 細胞を用いる 2-dDCB 及びその起源物質であるパルミチン酸、2-tDCB ステアリン酸に対する *In vitro* 形質転換試験は現在継続中である。2-dDCB の骨髓細胞を用いる小核試験に使用したマウスの大腸組織、及び、2-tDCB の中期二段階発がん性試験に使用したラットの大腸の正常組織から DNA を抽出し、ヌクレアーゼ PI 法によるアダクト試験を実施したが、2-dDCB 及び 2-tDCB による DNA 付加体生成は認められなかった。雄 F344 ラットを用いて 2-tDCB の下部消化管の二段階発がん試験を行ったが、0.025%以下の 2-tDCB の混餌投与では 2-tDCB は発がん促進作用を示さないことが明らかになった。

2) 研究成果

研究項目名 1 放射線照射による 2-ACBs の定量法と生成量の確定

i) ナツメグ中の 2-ACBs

抽出条件の検討

SFE 抽出において高濃度の 2-ACBs を含有するナツメグ(50 kGy 照射品)から 2-DCB, 2-dDCB を完全に抽出する CO₂ の圧力と流量を検討し、CO₂ 80℃、150atm、120ml と決定した。

Q-MS によるナツメグの分析方法の評価（添加回収試験）

SFE 抽出物の精製を、上記に記載したシリカゲル及び SulfoxideSPE カラムによるものに変更した。添加試料で、該当するリテンションタイム付近に、照射食品の検知法である EN1785 及び厚生労働省の通知法（食安発第 0330 平成 22 年 3 月 30 日）の判定基準を満たす定量イオン ($m/z=98$) 及び確認イオン ($m/z=112$) の明確なピークが観測された。従って、この方法で 0.125 $\mu\text{g/g}$ 以上のナツメグ中の 2-DCB 及び 2dDCB の検出が可能と評価した。

照射ナツメグからの 2-ACBs の検出

5 及び 10 kGy 照射試料で、2-dDCB, 2-DCB を検出した。その濃度は、10 kGy 試料で、2-dDCB; 0.41 $\pm$ 0.04 $\mu\text{g/g}$ 2-DCB; 2.51 $\pm$ 0.25 $\mu\text{g/g}$ (ロット Ng1) で 5 kGy に比べて線量依存的な増加が認められた。

QMS による未照射ナツメグ中の 2ACBs (2-DCB, 2-dDCB) の存在確認

未照射ナツメグ 5 ロットを通常の GC-MS で分析したとき、2-dDCB の保持時間の近傍に、 $m/z=98$ 及び 112 の微少なピーク（標準試料と比較しても十分小さい）ピークが観測されたが、これらの R. T. は標準試料とは微妙にずれており、また、112/98 の面積比も 2-dDCB のそれを反映していないことから、全てのロットで 2-dDCB は不検出と判断した。同様に 2-DCB についても R. T. ピーク面積比の両方の同定条件を満たすピークはどのロットにおいても観測されず、2-DCB についても、この QMS によ

る検出条件では不検出と判断した。

HRGC-MS によるナツメグ未照射試料の確認

上記の結果をさらに確認するため、HRGC-MS による分析を行った。未照射試料(5ロット)に $0.016 \mu\text{g/g}$ FW (検出濃度= $0.006 \mu\text{g/ml}$) の 2-DCB お及び 2-dDCB を添加した低濃度添加試料、または、 $0.032 \mu\text{g/g}$ FW (検出濃度= $0.012 \mu\text{g/ml}$) 添加した高濃度添加試料を作成し、それぞれの化合物のベースイオンの精密質量数 $m/z=98.073$, 確認イオンの $m/z=112.088$ 及び、 95.086 を検出した。図 1 2 にナツメグ 1 ロット (Ng1 スリランカ産) についてのクロマトグラム例を示す。

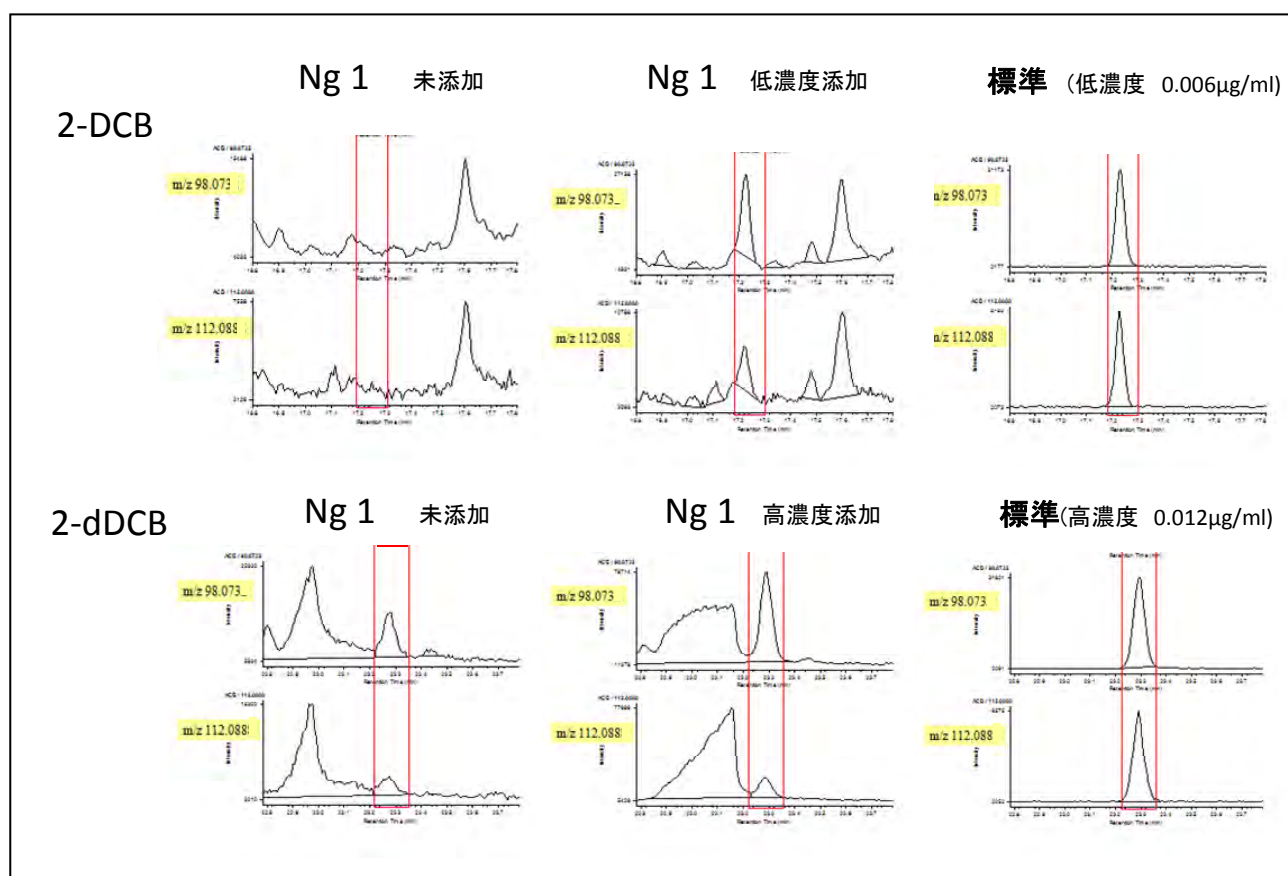


図 1 2 ナツメグ試料 (Ng1) の HR-GCMS によるクロマトグラム例 (上 ; 2-DCB 下 2-dDCB)
図中赤線囲み部分は、それぞれの化合物の該当 R. T. を示す

HRGC-MS を用い精密質量数をモニターしたことで選択性が上がり、2-DCB の該当 R. T. 付近では、 $m/z=98.073$, $m/z=112.088$ とともに $\text{SN} \geq 3$ のピークは検出されなかった。一方、低濃度 ($0.016 \mu\text{g/g}$ FW, 検出濃度= $0.006 \mu\text{g/ml}$) 添加試料では、2-DCB の該当 R. T. にそれぞれのイオンのピークが観測された。これは、他の 4 ロットの試料についても同様であった。2-dDCB の R. T. 付近には、Ng2 を除き、未照射試料でも $m/z=98.073$, $m/z=112.088$ で、それぞれ、 $\text{SN} \geq 3$ のピークが観測された。そこで、

m/z=112.088 の m/z=98.073 に対するピーク面積比(%)を求め、標準試料と比較し、その差が+/-20%以内となることを条件に 2-dDCB の同定を行った。表 6 に 2-DCB についてのピークの確認結果も含め、未照射試料、添加試料、標準試料についてのピークの同定結果をまとめた。

表 6 ナツメグ試料(5 ロット)の HRGC-MS 測定における検出ピークの確認

a. 標準試料

試料	モニターイオン m/z	2-DCB					2-dDCB				
		R.T.(min)	面積	面積比(%)	S/N	標準との差*	R.T.(min)	面積	面積比(%)	S/N	標準との差*
STD 低濃度 (0.006 μ g/ml)	98.073	17.24	1246	100	184	16	23.28	843	100	112	-5
	112.088	17.25	241	19	91		23.29	177	21	51	
STD 高濃度 (0.012 μ g/ml)	98.073	17.24	2204	100	342	-8	23.29	1569	100	151	-4
	112.088	17.24	421	19	187		23.29	332	21	126	

*0.1 μ g/ml の標準試料の 3 回測定結果の平均値 (2-DCB 20.7%, 2-dDCB 22.%との比較)

b 2-DCB

試料(ロット)	未照射試料			添加試料			
	面積比(%)	比較*	検出の有無	添加濃度 **	面積比(%)	比較*	検出の有無
Ng1(スリランカ)	-	-	×	0.016 μ g/g	18	-13	○
Ng2(インドネシアS)	-	-	×	0.016 μ g/g	17	-15	○
Ng3(インドネシアA)	-	-	×	0.016 μ g/g	18	-15	○
Ng4(インドネシアB)	-	-	×	0.016 μ g/g	17	-20	○
Ng5(インド)	-	-	×	0.016 μ g/g	19	-9	○

- 両モニターイオンとも SN>3 のピークを確認できない場合

* 0.1 μ g/ml の標準試料の 3 回測定結果の平均値 (2-DCB 20.7%)との比較

** その試料ロットに対し、ピーク検出可能であった低い方の添加濃度の結果を記載

c 2-dDCB

試料(ロット)	未照射試料			添加試料			
	面積比(%)	比較*	検出の有無	添加濃度 **	面積比(%)	比較*	検出の有無
Ng1(スリランカ)	31	39	×	0.032 μ g/g	25	13	○
Ng2(インドネシアS)	-	-	×	0.016 μ g/g	26	19	○
Ng3(インドネシアA)	29	33	×	0.016 μ g/g	26	19	○
Ng4(インドネシアB)	51	130	×	0.032 μ g/g	25	13	○
Ng5(インド)	35	59	×	0.032 μ g/g	21	-4	○

- 両モニターイオンとも SN>3 のピークを確認できない場合

* 0.1 μ g/ml の標準試料の 3 回測定結果の平均値 (2-dDCB 22.5%)との比較

** その試料ロットに対し、ピーク検出可能であった低い方の添加濃度の結果を記載

今回の試験に用いた 5 ロット全てにおいて、0.016 μ g/gFW の 2-DCB 及び 0.032 μ g/gFW の 2-dDCB を添加しても検出可能であった。一方で、同時に分析した未照射試料では、これらの 2-ACBs は検出することができなかった。

ii) カシューナッツ中の 2-ACBs

QMS による分析法の確認(添加回収試験)

カシューナッツ試料についても、ナツメグと同様の抽出条件と、Sulfoxide SPE カラムでの精製を行い、既報と同様の 2-dDCB, 2-tDCB, 2-テトラデセニルシクロブタノン(2-tDeCB cis 体)の検出を行った。それぞれの化合物の添加回収実験の結果、試験に用いた濃度で、QMS によるピーク検出及び回収率の再現性を確認した。

照射試料からの 2-ACBs の検出

1 kGy 照射試料から 2-dDCB, 2-tDCB, 2-tDeCB の検出を確認した。その濃度は概算値 (n=1 の分析) で、2-dDCB; 0.11 $\mu\text{g/g}$, 2-tDCB; 0.10 $\mu\text{g/g}$, 2-tDeCB; 0.62 $\mu\text{g/g}$ であった。また、未照射試料では 2-ACBs のピークは認められなかった。

未照射カシューナッツ中の 2ACBs (2-d DCB, 2-tDCB, 2-t DeCB) の存在確認

2 つのロットの未照射試料を上記で確認した方法で分析した。その結果、2-dDCB では、該当 R. T. 付近にピークが認められるが、R. T. が微妙にずれること加えて、 $m/z=98$ 及び 112 のピーク面積比が標準試料とは全く異なっており同定条件を満たしておらず、不検出と判断された。また、2-tDCB 及び 2-tDeCB の R. T. 付近では、十分な大きさのピークが観測されなかった。

HRGC-MS によるカシューナッツ未照射試料の確認

カシューナッツについても、HRGC-MS による分析を行った。未照射試料 (2 ロット) に 0.004 $\mu\text{g/g}$ FW (検出濃度=0.006 $\mu\text{g/ml}$) の 2-tDCB 及び 2-dDCB, 0.017 $\mu\text{g/g}$ FW (検出濃度=0.025 $\mu\text{g/ml}$) の 2-tDeCB を添加した低濃度添加試料、または、0.008 $\mu\text{g/g}$ FW (検出濃度=0.012 $\mu\text{g/ml}$) の 2-tDCB 及び 2-dDCB, 0.034 $\mu\text{g/g}$ FW (検出濃度=0.05 $\mu\text{g/ml}$) の 2-tDeCB を添加した高濃度添加試料を作成した。それぞれの検体から分析試料を調製し、化合物のベースイオンの精密質量数 $m/z=98.073$, 確認イオン $m/z=112.088$ 及び、95.086 をモニターした。

図 13 にカシューナッツ 1 ロット (Cn2) についてのクロマトグラムの例を示す。また、表 7 に、未照射カシューナッツ 2 ロット及び各ロットの添加試料のピーク確認結果をまとめた。 $m/z=112.088$ のピーク面積の $m/z=98.073$ ピーク面積に対する比率を標準試料と比較し、その差が $\pm 20\%$ 以内にあるものを該当 2-ACBs と同定できると判断した。

それぞれのカシューナッツ検体について、2-dDCB ; 0.004 $\mu\text{g/g}$ FW, 2-tDCB ; 0.008 $\mu\text{g/g}$ FW, 2-tDeCB; 0.034 $\mu\text{g/g}$ FW で添加された 2-ACBs の検出を確認した。一方、未照射試料ではいずれの化合物でも該当 R. T. に $\text{SN} \geq 3$ を満たす十分な大きさのピークを確認することはできず、この分析条件においてもカシューナッツ中の 2-ACBs は不検出と結論された。

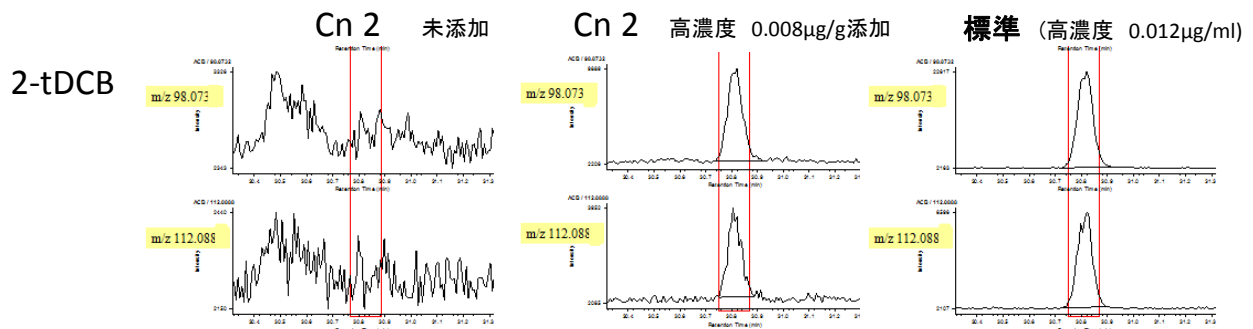
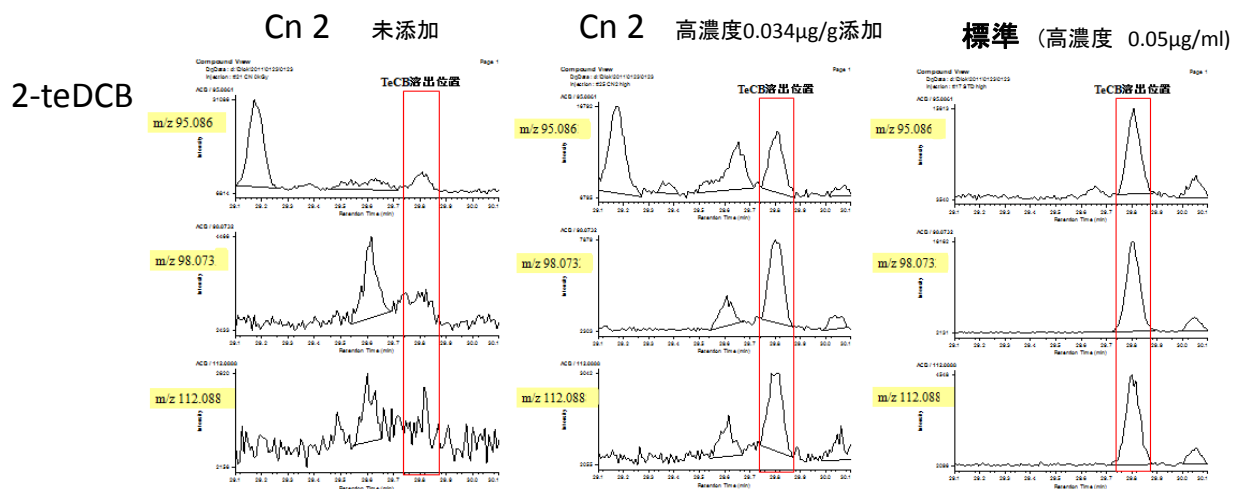
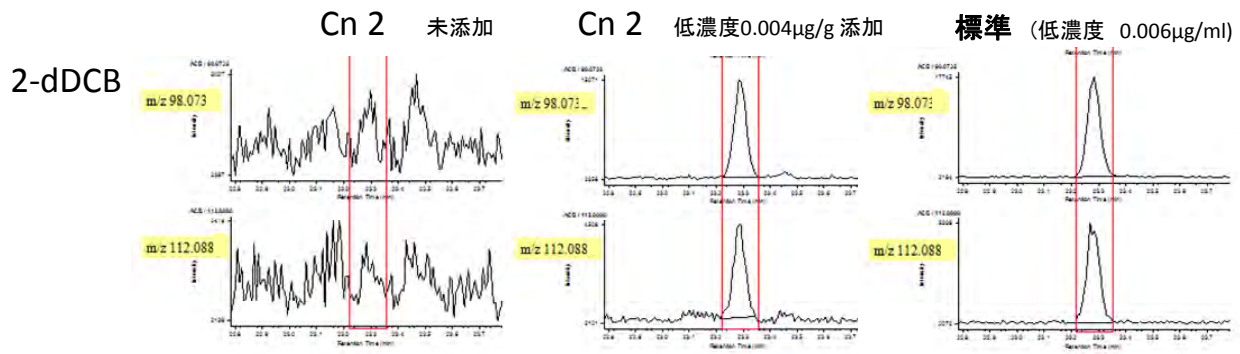


図 1 3 カシューナッツ試料(Cn2)のHR-GCMSによるクロマトグラム例
 図中赤線囲み部分は、それぞれの化合物の該当 R. T. を示す

表7 カシューナッツ試料（2ロット）のHRGC-MS測定による検出ピークの確認

a. 標準試料

試料	モニターイオン m/z	2-dDCB					2-tDCB				
		R.T.(min)	面積	面積比(%)	S/N	標準との差*	R.T.(min)	面積	面積比(%)	S/N	標準との差*
STD低濃度 (0.006 μ g/ml)	98.073	23.28	843	100	112	-5	30.81	713	100	70	1
	112.088	23.29	177	21	51		30.81	162	23	32	
STD高濃度 (0.012 μ g/ml)	98.073	23.29	1569	100	151	-4	30.82	1421	100	157	-9
	112.088	23.29	332	21	126		30.81	290	20	78	

試料	モニターイオン m/z	2-tDeCB				
		R.T.(min)	面積	面積比(%)	S/N	標準との差*
STD低濃度 (0.025 μ g/ml)	95.086	29.80	386	81	10	0
	98.073	29.80	478	100	22	
	112.088	29.80	85	18	15	
STD高濃度 (0.05 μ g/ml)	95.086	29.81	674	77	15	0
	98.073	29.81	872	100	80	
	112.088	29.80	156	18	44	

*0.1 μ g/ml の標準試料の3回測定結果の平均値（2-dDCB：22.5% 2-tDCB：17.9% 2-tDeCB：22.5%）との比較

b. 2-dDCB

試料(ロット)	未照射試料			添加試料			
	面積比(%)	比較*	検出の有無	添加濃度 **	面積比(%)	比較*	検出の有無
Cn1(インド)	-	-	×	0.004 μ g/g	20	-10	○
Cn2(インド2)	-	-	×	0.004 μ g/g	18	-17	○

c. 2-tDeCB

試料(ロット)	未照射試料			添加試料			
	面積比(%)	比較*	検出の有無	添加濃度 **	面積比(%)	比較*	検出の有無
Cn1(インド)	-	-	×	0.034 μ g/g	18	0	○
Cn2(インド2)	-	-	×	0.034 μ g/g	17	-3	○

d. 2-tDCB

試料(ロット)	未照射試料			添加試料			
	面積比(%)	比較*	検出の有無	添加濃度 **	面積比(%)	比較*	検出の有無
Cn1(インド)	-	-	×	0.008 μ g/g	20	-9	○
Cn2(インド2)	-	-	×	0.008 μ g/g	20	-11	○

- 両モニターイオンとも $SN \geq 3$ のピークを確認できない場合

* 0.1 μ g/ml の標準試料の3回測定結果の平均値（2-dDCB：22.5% 2-tDCB：17.9% 2-tDeCB：22.5%）との比較

** その試料ロットに対し、ピーク検出可能であった低い方の添加濃度の結果を記載

ラット脂肪組織中の2-tDCB 検出の予備試験

図14に、0.01 μ g/g の2-tDCBを混餌で90日間投与えしたラット脂肪組織を、EN1785に記載された、ソックスレー抽出、フロリジルカラム精製後にGC-MSで検出したクロマトグラム結果を示す。（使用カラムが異なるので、R.Tは(1)項の結果とは一致しない）参考値(n=1)となるが、含量は、2.6 μ g/g 脂肪(2.4 μ g/g 組織重量)程度であった。一方で、コントロール試料で飼育した検体では、2-tDCBは不検出であった。

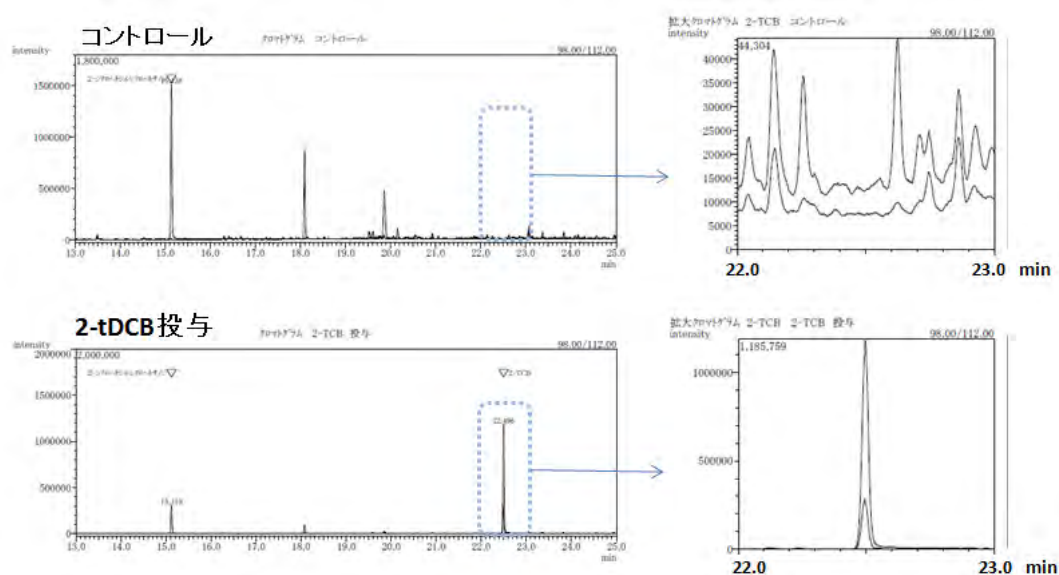


図 1 4 2-tDCB 投与ラット (0.01 μ g/g 混餌) 脂肪組織の GC-MS クロマトグラム(左)と 2-tDCB R.T. 付近の拡大クロマトグラム(右)

研究項目名 2 *in vitro* 試験による 2-ACBs の有害性の検討

個別課題名エ 2-ACBs のアポトーシスに関する検討遺伝子発現変化を指標とした安全性評価とそれらの分子機構の解明

個別課題名オ 2-ACBs の遺伝子発現変化に関する検討

ヒトリンパ腫細胞株 U937 を用いて、アルキルシクロブタノン類である 2-dDCB (2-dodecylcyclobutanone) 及び 2-tDCB (2-tetradecylcyclobutanone) によるミトコンドリア膜電位の変化を調べたところ、濃度依存性に膜電位低下細胞の増加が確認された (図 1 5)。

さらに、アポトーシスに関連するカスパーズ-8 及びカスパーズ-3 の活性化を処理 6 時間後で調べたところ、濃度依存性の増加が確認され、汎用カスパーズ阻害剤 Z-VAD を添加した場合にはアポトーシス抑制が認められた (図 1 6)。

細胞内活性酸素生成を、スーパーオキシドに選択性の高い HE 及びパーオキシドの生成を示す DCF で評価したところ、両者とも濃度依存性の増加が確認された。これに、抗酸化剤 NAC を添加した場合には約 50% のアポトーシス抑制が認められた (図 1 7)。

加えて、アポトーシスを誘導する細胞膜表面上の Fas 発現細胞の割合をフローサイトメトリーで調べた場合には、濃度依存性の増加が確認された (図 1 8)。

アポトーシスに関係する Bcl-2 ファミリーとして、Bax, Bcl-2, Bid, t-Bid (切断型 Bid) 及びシトクロム c の遊離を調べた。Bax の変化は認められず、Bcl-2 の低下もごく僅かであったが、t-Bid の発現は顕著であった (図 1 9)。

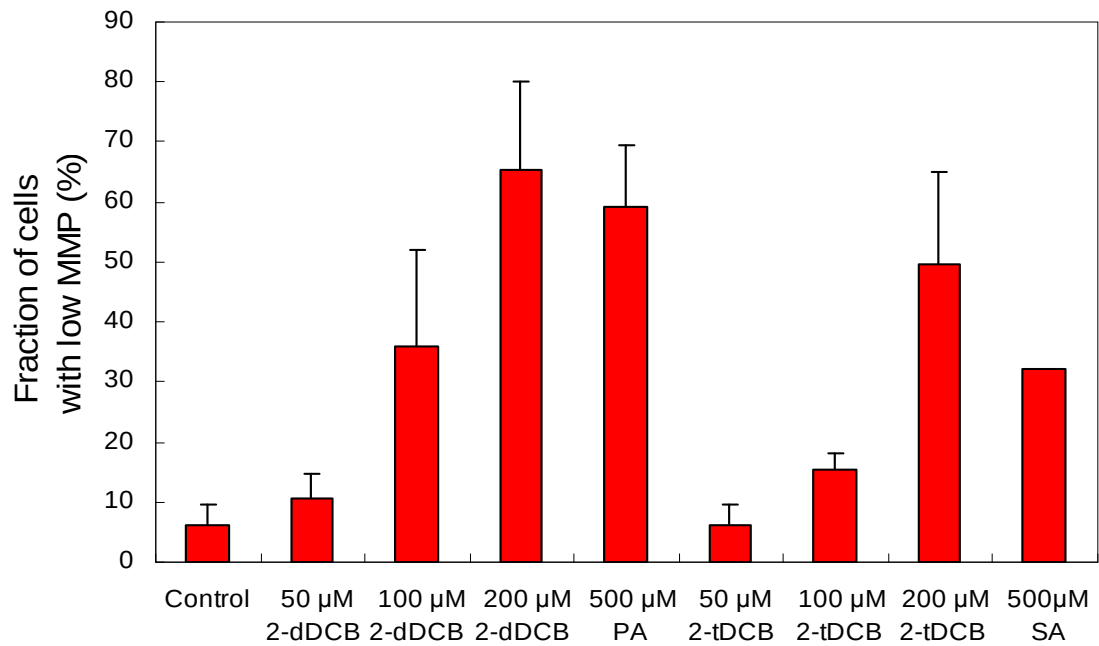


図 1 5 2-dDCB 及び 2-tDCB によるアポトーシス関連ミトコンドリア膜電位の変化。膜電位の測定には、蛍光指示薬として TMRM を使用した。アルキルシクロブタノン類の親脂肪酸である PA（パルミチン酸）及び SA（ステアリン酸）も比較対照に用いた。

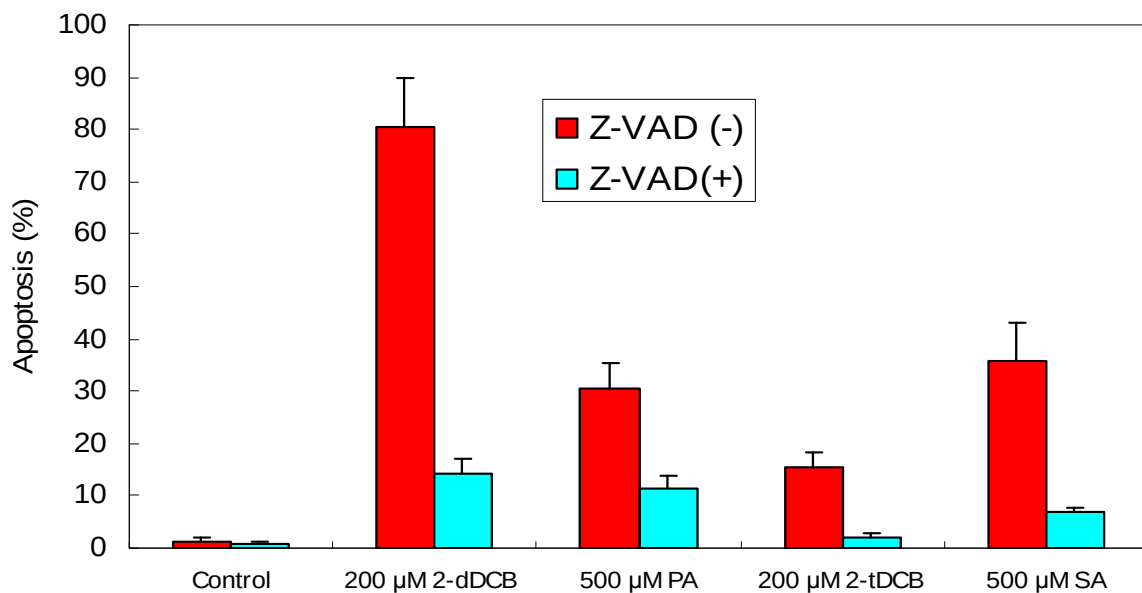


図 1 6 Annexin V-FITC と PI 二重染色後のフローサイトメトリーで調べた 2-dDCB 及び 2-tDCB によるアポトーシスに対する汎用カスプーシス阻害剤 Z-VAD の影響。

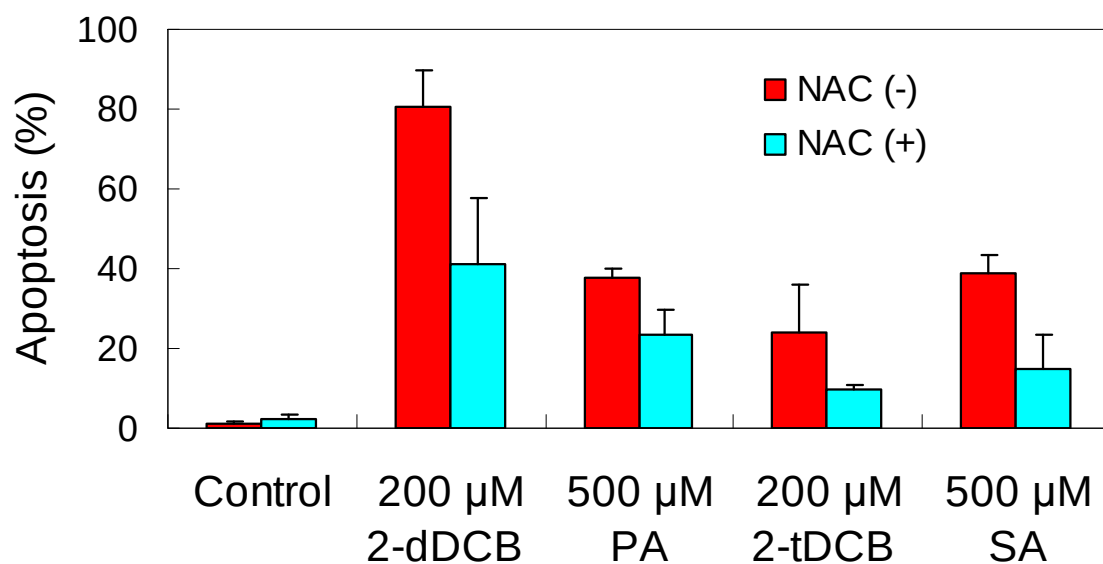


図 1 7 Annexin V-FITC と PI 二重染色後のフローサイトメトリーで調べた 2-dDCB 及び 2-tDCB によるアポトーシスに対する抗酸化剤 NAC (10 mM) の影響。

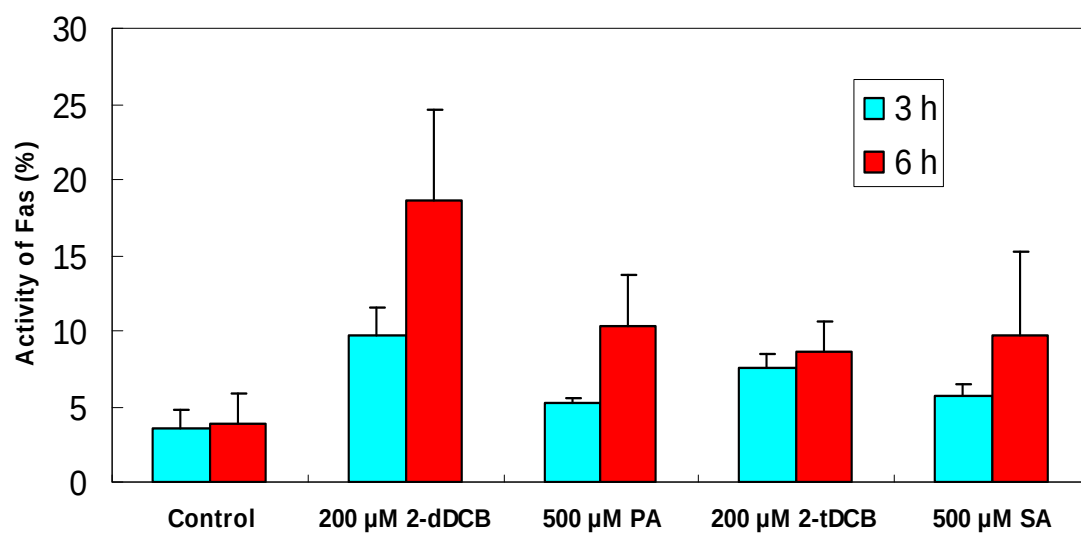


図 1 8 フローサイトメトリーで調べた Fas 発現が陽性細胞の割合。

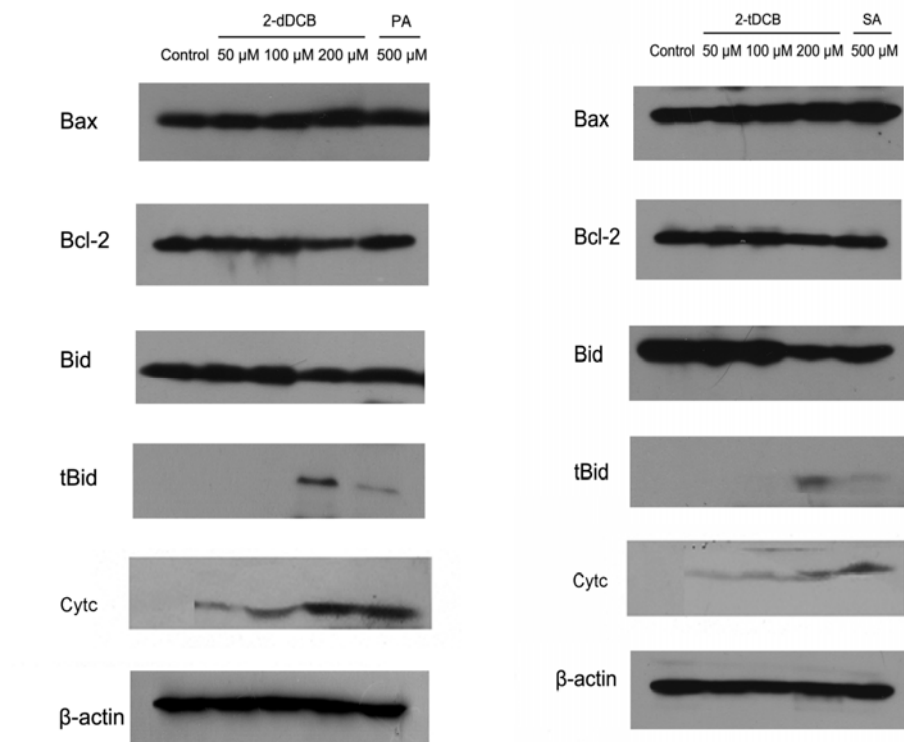


図 19 ウェスタンブロットによる Bax, Bcl-2, Bid, t-Bid (切断型 Bid) ノ発現及びシトクロム c の遊離の変化。

Fura-2 を用いて細胞内カルシウムイオン濃度変化を蛍光画像解析法にて、経時的に調べたところ、カルシウムイオン濃度の増加が認められた。特に 2-dDCB 処理細胞では、その傾向が明瞭であった。

個別課題名力 2-ACBs の遺伝毒性評価及び *in vitro* 発がん性評価

2-dDCB 及びその起源物質であるパルミチン酸、2-tDCB ステアリン酸の *in vitro* 形質転換試験の処理濃度を決定するために、イニシエーション試験及びプロモーション試験における細胞毒性試験を実施した。2-dDCB (分子量: 238.4) については、2.4 mg/mL (10 mM) を最高濃度とし、計 12 濃度を設定して 3 日間処理した結果、イニシエーション試験及びプロモーション試験ともに 0.024 mg/mL (0.1 mM) で急激に相対細胞増殖率が低下した (表 8、表 9)。

表 8 Bhas 42細胞における2-dodecylcyclobutanone3日間処理の細胞毒性作用(イニシエーション試験)

物質名	濃度 (mg/mL)	OD (%) / ウェル ^a						相対細胞 増殖率 (%)
		1	2	3	平均	±	S.D.	
Acetone (溶媒対照)	0.5 vol%	100	97	101	99.3	± 2.1		100.0
2-Dodecylcyclobutanone	0.00048	98	96	99	97.7	± 1.5		98.3
	0.0012	102	102	103	102.3	± 0.6		103.0
	0.0024 ^b	94	98	96	96.0	± 2.0		96.6
	0.0048 ^b	100	102	103	101.7	± 1.5		102.3
	0.012 ^b	83	72	76	77.0	± 5.6		77.5
	0.024 ^b	11	9	13	11.0	± 2.0		11.1
	0.048 ^b	14	16	16	15.3	± 1.2		15.4
	0.12 ^b	17	18	18	13.5	± 8.3		13.6
	0.24 ^b	12	14	15	13.7	± 1.5		13.8
	0.48 ^b	14	15	13	14.0	± 1.0		14.1
	1.2 ^c	5	4	11	6.7	± 3.8		6.7
	2.4 ^c	13	13	11	12.3	± 1.2		12.4

a: 溶媒対照群中の1ウェルの吸光度と比較した相対パーセント。

b: 培養液添加時に白濁したが、すぐに消失した。また、処理終了時に顕微鏡下で観察したところ、油滴状の浮遊物が見られた。

c: 培養液添加時に油膜状に浮遊した。また、処理終了時に培養液表面に細かい油膜が見られた。

表 9 Bhas 42細胞における2-dodecylcyclobutanone3日間処理の細胞毒性作用(プロモーション試験)

物質名	濃度 (mg/mL)	OD (%) / ウェル ^a						相対細胞 増殖率 (%)
		1	2	3	平均	±	S.D.	
Acetone (溶媒対照)	0.5 vol%	100	95	100	98.3	± 2.9		100.0
2-Dodecylcyclobutanone	0.00048	103	100	100	101.0	± 1.7		102.7
	0.0012	100	101	98	99.7	± 1.5		101.4
	0.0024 ^b	97	98	100	98.3	± 1.5		100.0
	0.0048 ^b	107	110	108	108.3	± 1.5		110.2
	0.012 ^b	98	100	100	99.3	± 1.2		101.0
	0.024 ^b	6	5	2	4.3	± 2.1		4.4
	0.048 ^b	0	0	0	0.0	± 0.0		0.0
	0.12 ^b	5	4	0	2.5	± 2.4		2.5
	0.24 ^b	0	0	0	0.0	± 0.0		0.0
	0.48 ^b	3	2	0	1.7	± 1.5		1.7
	1.2 ^c	0	0	0	0.0	± 0.0		0.0
	2.4 ^c	4	2	0	2.0	± 2.0		2.0

a: 溶媒対照群中の1ウェルの吸光度と比較した相対パーセント。

b: 培養液添加時に白濁したが、すぐに消失した。また、処理終了時に顕微鏡下で観察したところ、油滴状の浮遊物が見られた。

c: 培養液添加時に油膜状に浮遊した。また、処理終了時に培養液表面に細かい油膜が見られた。

2-dDCB の起源物質であるパルミチン酸（分子量：256.4）の場合には、溶媒であるアセトンに対する溶解性の検討結果をもとに、0.13 mg/mL (0.5 mM) を最高濃度とし、計 12 濃度を設定して用量設定試験を行った。その結果、0.51 mg/mL (約 0.2 mM) で急激に相対細胞増殖率が低下した（表 10、表 11）。

表 1 0 Bhas 42細胞におけるpalmitic acid3日間処理の細胞毒性作用(イニシエーション試験)

物質名	濃度 (mg/mL)	OD (%) / ウェル ^a						相対細胞 増殖率 (%)
		1	2	3	平均	±	S.D.	
Acetone (溶媒対照)	0.5 vol%	100	93	92	95.0	± 4.4		100.0
Palmitic acid	0.000026	98	97	98	97.7	± 0.6		102.8
	0.000051	102	101	102	101.7	± 0.6		107.0
	0.00013	97	98	100	98.3	± 1.5		103.5
	0.00026	104	105	106	105.0	± 1.0		110.5
	0.00051	98	94	97	96.3	± 2.1		101.4
	0.0013	99	102	101	100.7	± 1.5		106.0
	0.0026	101	98	98	99.0	± 1.7		104.2
	0.0051	103	104	102	103.0	± 1.0		108.4
	0.013 ^b	98	98	99	98.3	± 0.6		103.5
	0.026 ^b	21	99	99	73.0	± 45.0		76.8
	0.051 ^c	7	8	8	7.7	± 0.6		8.1
	0.13 ^c	11	14	14	13.0	± 1.7		13.7

a: 溶媒対照群中の1ウェルの吸光度と比較した相対パーセント。

b: 培養液添加時に白濁したが、すぐに消失した。また、処理終了時に顕微鏡下で観察したところ、油滴状の浮遊物が見られた。

c: 培養液添加時に白濁し、処理終了時に顕微鏡下で観察したところ、油滴状の浮遊物が見られた。

表 1 1 Bhas 42細胞におけるpalmitic acid3日間処理の細胞毒性作用(プロモーション試験)

物質名	濃度 (mg/mL)	OD (%) / ウェル ^a						相対細胞 増殖率 (%)
		1	2	3	平均	±	S.D.	
Acetone (溶媒対照)	0.5 vol%	100	97	101	99.3	± 2.1		100.0
Palmitic acid	0.000026	100	95	97	97.3	± 2.5		98.0
	0.000051	101	98	95	98.0	± 3.0		98.7
	0.00013	91	89	88	89.3	± 1.5		89.9
	0.00026	101	99	93	97.7	± 4.2		98.3
	0.00051	103	102	101	102.0	± 1.0		102.7
	0.0013	96	96	99	97.0	± 1.7		97.7
	0.0026	102	99	102	101.0	± 1.7		101.7
	0.0051	106	104	104	104.7	± 1.2		105.4
	0.013 ^b	95	97	92	94.7	± 2.5		95.3
	0.026 ^b	74	77	80	77.0	± 3.0		77.5
	0.051 ^c	7	14	9	10.0	± 3.6		10.1
	0.13 ^c	4	8	6	6.0	± 2.0		6.0

a: 溶媒対照群中の1ウェルの吸光度と比較した相対パーセント。

b: 培養液添加時に白濁したが、すぐに消失した。また、処理終了時に顕微鏡下で観察したところ、油滴状の浮遊物が見られた。

c: 培養液添加時に白濁し、処理終了時に顕微鏡下で観察したところ、油滴状の浮遊物が見られた。

2-tDCB の起源物質であるステアリン酸（分子量：284.5）の場合には、溶媒であるアセトンに対する溶解性の検討結果をもとに、0.14 mg/mL（約 0.5 mM）を最高濃度とし、計 12 濃度を設定して用量設定試験を行った。その結果、この濃度範囲では相対細胞増殖率は約 50%までの低下であった（表 1 2、表 1 3）。

表 1 2 Bhas 42細胞におけるstearic acid3日間処理の細胞毒性作用(イニシエーション試験)

物質名	濃度 (mg/mL)	OD (%) / ウェル ^a						相対細胞 増殖率 (%)
		1	2	3	平均	±	S.D.	
Acetone (溶媒対照)	0.5 vol%	100	93	92	95.0	± 4.4		100.0
Stearic acid	0.000029	107	107	106	106.7	± 0.6		112.3
	0.000057	108	108	109	108.3	± 0.6		114.0
	0.00014	108	106	108	107.3	± 1.2		113.0
	0.00029	112	110	108	110.0	± 2.0		115.8
	0.00057	109	107	106	107.3	± 1.5		113.0
	0.0014	106	106	107	106.3	± 0.6		111.9
	0.0029	111	106	104	107.0	± 3.6		112.6
	0.0057	110	108	108	108.7	± 1.2		114.4
	0.014 ^b	43	100	102	81.7	± 33.5		86.0
	0.029 ^b	36	93	40	56.3	± 31.8		59.3
	0.057 ^c	43	99	51	64.3	± 30.3		67.7
	0.14 ^c	45	52	53	50.0	± 4.4		52.6

a: 溶媒対照群中の1ウェルの吸光度と比較した相対パーセント。

b: 培養液添加時に白濁したが、すぐに消失した。また、処理終了時に顕微鏡下で観察したところ、油滴状の浮遊物が見られた。

c: 培養液添加時に白濁し、処理終了時に顕微鏡下で観察したところ、油滴状の浮遊物が見られた。

表 1 3 Bhas 42細胞におけるstearic acid3日間処理の細胞毒性作用(プロモーション試験)

物質名	濃度 (mg/mL)	OD (%) / ウェル ^a						相対細胞 増殖率 (%)
		1	2	3	平均	±	S.D.	
Acetone (溶媒対照)	0.5 vol%	100	97	101	99.3	± 2.1		100.0
Stearic acid	0.000029	97	99	93	96.3	± 3.1		97.0
	0.000057	95	99	99	97.7	± 2.3		98.3
	0.00014	98	96	96	96.7	± 1.2		97.3
	0.00029	96	99	98	97.7	± 1.5		98.3
	0.00057	96	99	96	97.0	± 1.7		97.7
	0.0014	96	97	99	97.3	± 1.5		98.0
	0.0029	97	98	97	97.3	± 0.6		98.0
	0.0057	100	101	98	99.7	± 1.5		100.3
	0.014 ^b	97	99	97	97.7	± 1.2		98.3
	0.029 ^b	99	100	100	99.7	± 0.6		100.3
	0.057 ^c	53	54	51	52.7	± 1.5		53.0
	0.14 ^c	45	47	48	46.7	± 1.5		47.0

a: 溶媒対照群中の1ウェルの吸光度と比較した相対パーセント。

b: 培養液添加時に白濁したが、すぐに消失した。また、処理終了時に顕微鏡下で観察したところ、油滴状の浮遊物が見られた。

c: 培養液添加時に白濁し、処理終了時に顕微鏡下で観察したところ、油滴状の浮遊物が見られた。

現在、これらの用量設定試験結果をもとに、形質転換試験を継続中である。

個別研究課題名キ ドデシルシクロブタノンのマウスを用いる小核試験

2-dDCB を投与したマウス及び 2-tDCB を投与したラットから摘出した大腸組織及び陽性対照として用いた培養細胞は、採取後、速やかに液体窒素中で凍結したのち、ゲノム DNA の抽出に使用するまで凍結（設定温度：-80℃）保存した。

試料	群(用量)	試料番号
遠位大腸粘膜*1	陰性対照群:2-tDCB(0%)	TA122m、TA123m、TA124m
	被験物質処理群:2-tDCB(0.025%)	TA422m、TA423m、TA425m
マウス結腸*2	陰性対照群:日局オリブ油(10 mL/kg/day)	1~5
	被験物質処理群:2-tDCB(2,000 mg/kg/day)	21~25
培養細胞*3	陰性対照群:ジメチルスルホキシド(DMSO、1 vol%)	DMSO
	陽性対照群:4-ニトロキノリン 1-オキシド (4NQO、4.8 μ g/mL)	PC

*1 : Azoxymethane 投与 (15 mg/kg $\times$ 3 回、1 回/週、6-8 週齢) 後、2-tDCB を 25 週間 (9-34 週齢) 混餌投与した F344 系ラット (雄、34 週齢) から得た。

*2 : 処理物質を強制経口投与 (1 回/日 $\times$ 連続 2 日、9 週齢) された ICR 系マウス (雄、9 週齢) から、最終投与後 24 時間に得た。

*3 : 処理 (37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、1 時間) 直後のチャイニーズハムスタ由来の CHL/IU 細胞を回収して得た。

採取した組織からフェノール抽出法を用いてゲノム DNA を抽出し、RNase A 及び RNase T1 で処理してゲノム DNA 溶液 (2 μ g/ μ L) を調製し、使用時まで冷蔵で保存した。そのゲノム DNA (10 μ g) を micrococcal endonuclease (2400 U/mL) 及び spleen phosphodiesterase II (24 U/mL) によりヌクレオシド 3' -リン酸に分解した。ヌクレアーゼ P1 処理ののち、0.25 mCi の [γ -³²P] ATP (7,000 Ci/mmol、GE Healthcare) を T4 ポリヌクレオチドキナーゼにより ³²P ポストラベルを行った。

精製水で前処理したポリエチレンイミン (PEI) シートを用いて以下の手順で二次元 TLC を行った。

(展開溶媒)

D1 : 2.3 mol/L Sodium phosphate (pH 6.0)

D2 : 4.5 mol/L Lithium formate/ 7 mol/L urea (pH 3.5)

D3 : 1.1 mol/L Lithium chloride/ 0.5 mol/L Tris-HCl/ 7 mol/L urea (pH 8.0)

D4 : 2.3 mol/L Sodium phosphate (pH 6.0)

(展開方法)

(1) 展開方向上部にろ紙を付け、原点に ³²P ポストラベル反応液を滴下したのち、D1 方向へ展開した (図 A)。

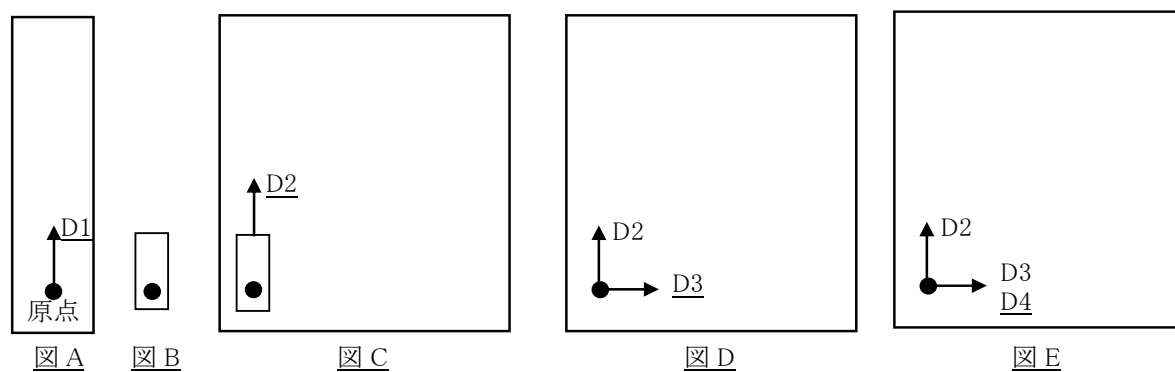
(2) PEI シートを洗浄及び自然乾燥したのち、原点付近からシート片 (横 : 1 cm、縦 : 1.5 cm) を切り取った (図 B)。

(3) 新しい PEI シート (10 $\times$ 10 cm) の原点 (表面) とシート片の原点 (表面) を重ねたのち、D2 方向へ展開した (図 C)。

(4) シート片を取り去り、PEI シートを洗浄及び自然乾燥したのち、D3 方向へ展開した (図 D)。

(5) PEI シートを洗浄及び自然乾燥したのち、展開方向上部にろ紙を付け、D4 方向へ展開した (図 E)。

(6) PEI シートを洗淨及び自然乾燥した。



PEI シートを X 線フィルムに露光（設定温度： -80°C ）させたのち、X 線フィルムを現像した。

全ての試料について、X 線フィルム上の展開領域内におけるスポットの有無を目視により観察した結果、2-dDBC を投与したマウス結腸及び 2-tDBC を投与した遠位大腸粘膜において、陰性対照群及び 2-dDBC/2-tDBC 投与群のいずれの個体においても、スポットは認められなかった（図 20、図 21）。

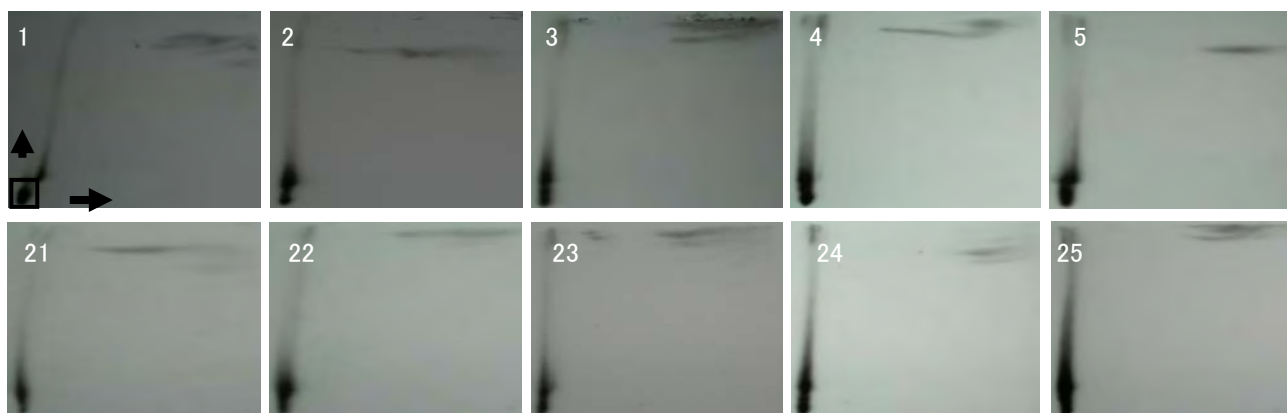


図 20 2-dDCB を投与したマウス結腸のゲノム DNA における二次元 TLC 像

1～5：オリブ油（溶媒）投与群、21～25：2-dDCB 投与群（2,000 mg/kg/day）、
“↑”及び“→”：各展開方向、“□”：D2 展開時に重ねたシート片（D1 展開後に切り取ったもの）のイメージを示す（代表として試料番号：1 のみ記載）。

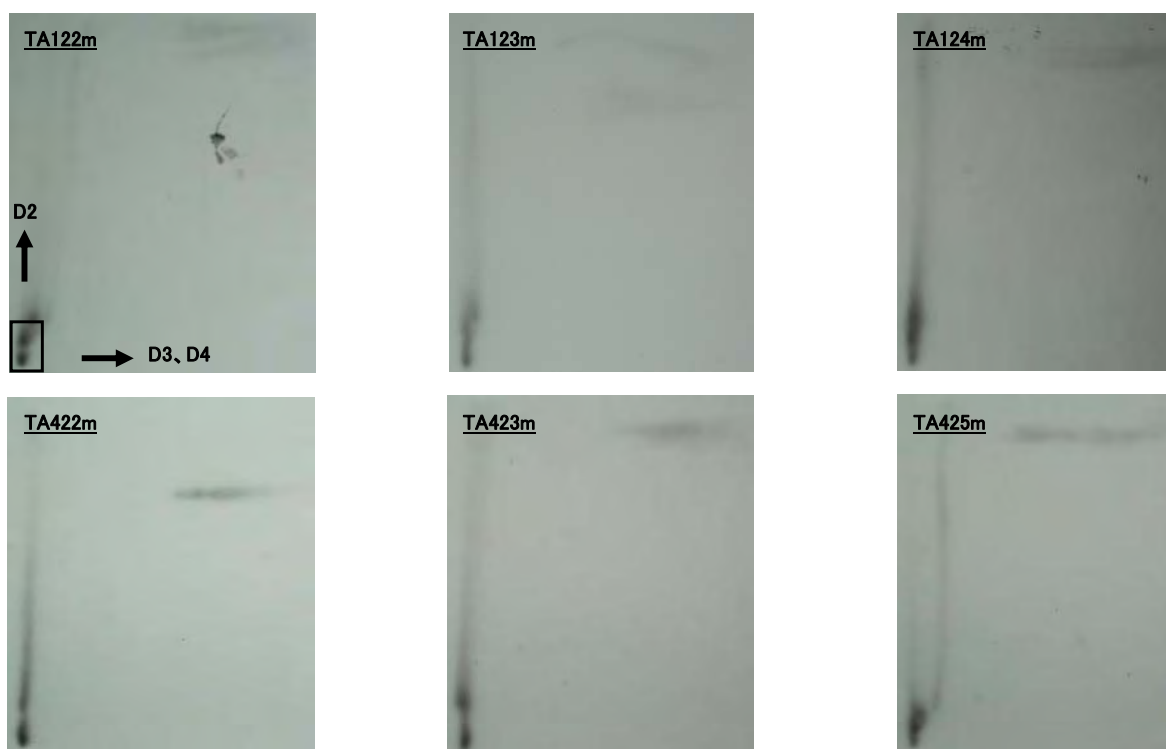


図 2 1 2-tDCB を投与したラットの遠位大腸粘膜のゲノム DNA における二次元 TLC 像

TA122m～TA124m：陰性対照、TA422m～TA424m：2-tDCB 投与群（0.0025%、30 週）

“↑” 及び “→”：各展開方向、“□”：D2 展開時に重ねたシート片（D1 展開後に切り取ったもの）のイメージを示す（代表として試料番号：TA122m のみ記載）。

一方、4-NQO 処理した CHL/IU 細胞においては、陰性対照群では認められない特異的スポットが認められた（図 2 2）。



図 2 2 4-NQO 処理した CHL/IU 細胞のゲノム DNA における二次元 TLC 像

DMSO：陰性対照、4-NQO：陽性対照（4.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）、黄色矢印：DNA アダクト

“↑” 及び “→”：各展開方向、“□”：D2 展開時に重ねたシート片（D1 展開後に切り取ったもの）のイメージを示す（代表として DMSO のみ記載）。

以上の結果より、2-dDCB 及び 2-tDCB は標的臓器である大腸組織から抽出したゲノム DNA において DNA アダクトが検出されなかった。

個別研究課題名 ク ラットを用いた 2-ACBs の下部消化管二段階発がん試験

雄 F344 ラットを用いて 2-tDCB の下部消化管二段階発がん試験を実施した。雄 F344 ラット (n=30) に 15 mg/kg のアゾキシメタンを 6 週齢から 3 回皮下注射し、第 3 週から第 28 週まで 2-tDCB を混餌投与した (図 2 3)。28 週で全動物を屠殺し、臓器重量の測定及び病理学的検索を行った。体重曲線及び摂餌量の群間差はなかった (図 2 4)。肝臓、腎臓、脾臓の相対重量の群間差はなかった (表 1 4)。アゾキシメタンの主な標的臓器は小腸と大腸であった。いずれの腫瘍も組織学的には腺癌であり、各群でその発生頻度の有意な差はみられなかった (表 1 5)。各群の一匹当たりの小腸腫瘍の平均個数は 0-0.2 個、大腸腫瘍の平均個数は約 0.5 個であり、群間の有意差はなかった (図 2 5)。

Animal: 6-week-old male F344 rats (n=30)
2-tDCB: 0, 0.001, 0.005 and 0.025%

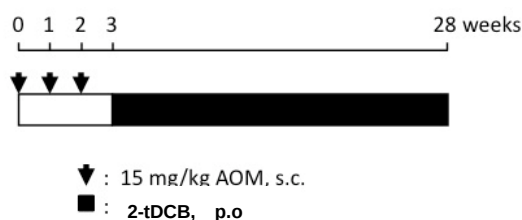


図 2 3 実験デザイン

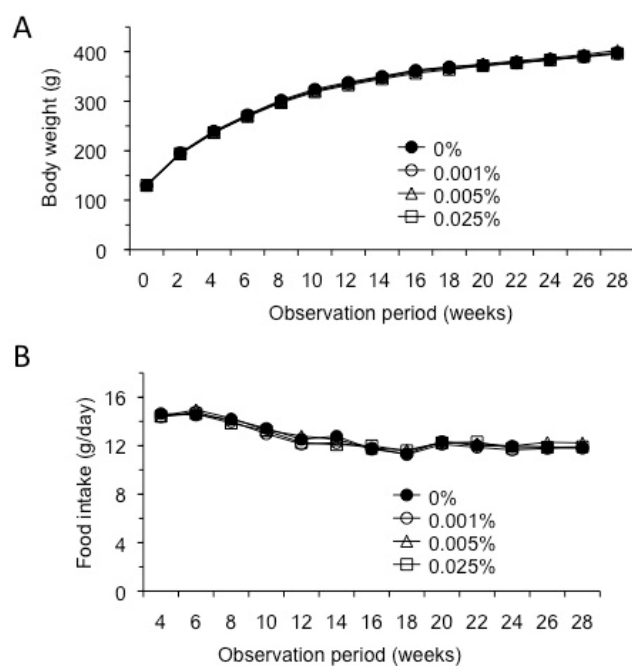


図 2 4 体重曲線及び摂餌量

表 1 4 相対臓器重量

Relative organ weights in the AOM-induced carcinogenesis

Dose of 2-tDCB (%)	Organ weight/body weight		
	Liver	Kidneys	Spleen
0	0.0272±0.0017	0.0057±0.0004	0.0021±0.0002
0.001	0.0274±0.0016	0.0057±0.0002	0.0020±0.0001
0.005	0.0269±0.0013	0.0056±0.0006	0.0020±0.0002
0.025	0.0270±0.0018	0.0057±0.0002	0.0020±0.0002

表 1 5 腫瘍の発生頻度

Incidences of tumors in AOM-induced carcinogenesis

Dose of 2-tDCB (%)	No. of rats	Tumors		
		Zymbal gland	Small intestine	Cecum/ colon
0	29 ^a	1 (3%)	5 (17%)	10 (34%)
0.001	29 ^b	0	3 (10%)	13 (45%)
0.005	30	0	0	12 (40%)
0.025	30	0	5 (17%)	11 (37%)

^aOne rat died of unknown cause at week 20.

^bOne rat died of unknown cause at week 10.

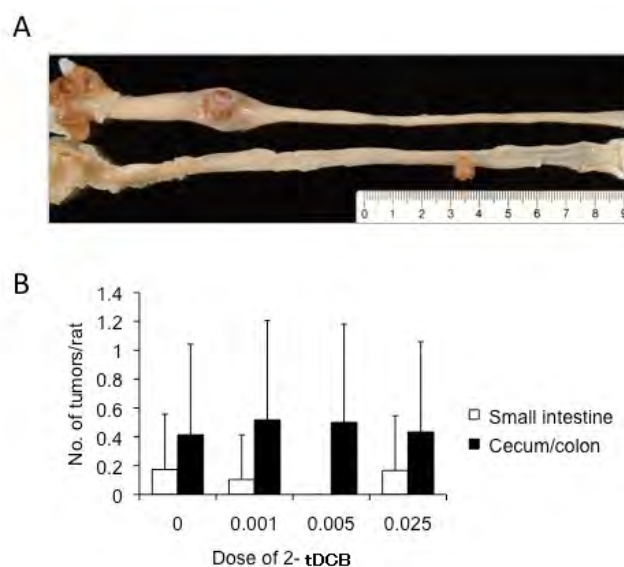


図 2 5 下部消化管腫瘍（0.025%群）と小腸及び大腸腫瘍の平均個数

3) 考察及び結論

本研究では、ナツメグとカシューナッツについてSFE抽出とSPE精製による2-ACBsの定量法を検討し、その精度と再現性を確認した。その上で、未照射試料の分析を行ったが、いずれの試料でも、未照射品に2-ACBsが存在する証拠を得ることはできなかった。さらにHRGC-MSを用い、4重極質量分析計(QMS)よりも1/4~1/10程度低い添加試料中の2-ACBsの検出が可能な条件で分析を行っても、未照射試料の2-ACBsを検出することはできなかった。

天然のナツメグ中にシクロブタノンの存在を報告した Variyer らの論文、(J. Agric. Food. Chem 56, pp11817-11823(2008))では、その濃度を2-DCB; 2.67 μ g/g, 2-dDCB; 0.58 μ g/gとしており、今回の未照射品の分析結果とは大きく異なっている。そればかりではなく、彼らの報告の未照射品の値は、本研究での10 kGy照射品の定

量値に近い値となっている。

カシューナッツでも既報は、未照射品 2-dDCB; 2.70 $\mu\text{g/g}$, 2-tDCB; 1.0 $\mu\text{g/g}$, 2-tDeCB; 0.52 $\mu\text{g/g}$, 1 kGy 照射試料で 2-dDCB; 6.12 $\mu\text{g/g}$, 2-tDCB; 2.06 $\mu\text{g/g}$, 2-tDeCB; 0.8 $\mu\text{g/g}$ とされており、我々が得ている照射試料の予備的な結果の値とは大きく異なっている。カシューナッツの脂肪酸組成は、パルミチン酸(10%)、ステアリン酸(10%)、オレイン酸(60%) (食品成分データベース)であり、我々の 1 kGy 試料の 2-ACBs 分析結果は、この前駆体の脂肪酸組成比を反映しているが、既報の結果では、パルミチン酸由来の 2-dDCB の生成量が多い。これらの不一致の理由については不明である。本研究課題全体としては、2-ACBs は放射線照射食品に特異的な分解生成物であると考えて、食品中での存在量と化合物の毒性試験の結果に基づくリスク評価を実施できると判断する。

2-ACBs が細胞に及ぼすアポトーシスの分子機構を探る目的で、ヒトリンパ腫細胞株 U937 を用いてアポトーシス関連分子、ミトコンドリア膜電位、細胞膜への Fas の発現、細胞内活性酸素の生成、同カルシウムイオン濃度について調べた。その結果、2-dDCB 及び 2-tDCB は細胞内活性酸素生成及び Fas の発現を増加させ、それにより、アポトーシス-ミトコンドリア経路を活性化し、アポトーシスを誘導することが判明した。加えて、細胞内活カルシウムイオンの増加もその一因となることが示唆される。今後は異なる細胞種を用いた検討、アポトーシスについて GeneChip を用いて網羅的遺伝子発現変化の解析により、さらに詳細な作用機序が明らかになる可能性がある。

2-dDCB の Bhas 42 細胞に対する毒性に関しては、培養細胞を用いた他の試験結果と同様に、0.1 mM 付近の濃度で細胞毒性作用を示すことが示された。また、その起源物質であるパルミチン酸については、2-dDCB と同様の濃度依存性を示すが、その細胞毒性作用は 2-dDCB よりも約 2 倍弱い (細胞毒性作用が弱い) ことが示唆された。さらに、2-tDCB の起源物質であるステアリン酸については、2-dDCB やパルミチン酸よりも細胞毒性作用は弱く、今回の試験条件では約 50%の相対細胞増殖率を示す濃度よりも高い濃度での形質転換試験は困難であると考えられた。また 2-dDCB 及び 2-tDCB の Ames 試験の結果は陰性であり、微生物に対する変異原性は示さないことが強く示唆された。これはヨーロッパにおける先行研究の結果を再現するものであった。

Raul, F らの研究より高濃度 (5 倍) の 2-tDCB を用い、一群の動物数も 5 倍に増やして下部消化管二段階発がん試験を行ったが、2-tDCB は発がん促進作用を示さなかった。また、2-tDCB を 30 週投与したラットの大腸粘膜のゲノム DNA においても 2-tDCB による DNA アダクト形成は認められなかった。なお、ヒトの 2-ACBs の一日摂取量は最大 10 マイクログラム/体重とされているので今回の最高投与濃度はその 860 倍に当たる。

2-dDCB は先行研究において *in vitro* で DNA 損傷を示唆する結果が得られていることから、前年度の 2-dDCB の骨髓細胞を用いる小核試験に使用したマウスの結腸組織の DNA における DNA アダクト形成の有無を調べたが、DNA アダクト形成は認められなかった。この結果は、2-dDCB を投与した骨髓において小核誘発が認められなかったことと一致する結果であった。

以上のことから、放射線照射によって生成される 2-dDCB 及び 2-tDCB は発がんの標

的臓器として懸念されている大腸組織においても DNA 損傷を引き起こさないと考えられ、さらに 2-tDCB の発がんのプロモーション活性の可能性もきわめて低いと考えられる。

- 3 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト（論文は添付すること）
なし
- 4 本研究を基にした学会発表の実績
第 69 回日本癌学会 平成 22 年 9 月
第 27 回日本毒性病理学会 平成 23 年 1 月
- 5 特許及び特許出願の数と概要
なし
- 6 その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）の実績
なし
- 7 今後の問題点等
なし

IV 平成 23 年度研究成果報告

- 1 当該年度研究計画
 - (1) 当該年度の目標
 - 1) 食品中の 2-ACBs の挙動に関する文献と昨年度までに得られたデータ比較検討し、取りまとめを行う。
 - 2) *in vivo* 試験に付随する、飼料や動物臓器中での 2-ACBs の存在状態を確認する。
 - 3) 平成 22 年度までの試験結果により、アポトーシスの分子機構がある程度明らかとなったので、細胞種を増やして、2-dDCB によるアポトーシス誘導に関する普遍的分子機構を解明するとともに、他のヒト正常及びがん細胞を用いて処理時間及び用量応答関係を求め、アポトーシス毒性の最小用量を求め、比較する。
 - 4) アポトーシス毒性の結果より、アポトーシスを誘導する濃度及びしない濃度を設定して、2-dDCB 処理細胞において、遺伝子発現変化を網羅的検討して、これに特異的に反応する遺伝子を同定する。
 - 5) 本研究ではこれまで、*in vivo* 遺伝毒性試験として 2-dDCB のマウスの骨髄細胞を用いる小核試験をガイドラインに準拠して実施し、陰性の結果を得た。また、発がんのプロモーション作用が疑われている大腸組織を用い 2-tDCB の DNA 付加体形成試験を実施し、陰性の結果を得た。そこで当該年度は、不足している試験データを取得する。さらに、2-dDCB 及び 2-tDCB の起源物質であるパルミチン酸 (PA) 及びステアリン酸 (SA) についての遺伝毒性データも取得する。コメットアッセイについては、

比較的多くの報告があるが、この方法は、DNA の初期損傷を検出する系であり、この結果が必ずしも遺伝的変異に結びつく訳ではないことや、コメットアッセイの試験法ガイドラインが無く、現在、international validation study が進行中であることから、信頼性のある方法を用いてコメットアッセイの結果を確認する必要がある。また、これら 4 物質のうち、未取得の物質について Bhas42 細胞を用いる形質転換試験を行い、*in vitro*における発がん性データを取得する。これら 4 物質の遺伝毒性試験データ及び *in vitro*発がん性試験データを比較検討し、放射線照射によって生成されと考えられる 2-ACBs のリスクを考察する。

- 6) 雌雄 F344 ラットを用いて前年度の濃度よりも高濃度の条件で 2-テトラデシルシクロブタノンの 90 日間亜急性毒性試験（より高濃度暴露による再試験）を行い、血液検査、尿検査、血清検査、組織学的検査を行う。

(2) 研究内容及び方法

研究項目名 1 放射線照射による 2-ACBs の定量法と生成量の確定

- 1) 個別課題名ア 天然食品中の 2-ACBs (担当:等々力節子)
22 年度で研究がすでに終了しているため行わない。
- 2) 個別課題名イ 照射食品中の 2-ACBs の含有量 (担当:等々力節子)
(研究内容)

食品中の 2-ACBs の照射による生成効率に関し、昨年度の研究対象としたナツメグ、及びカシューナッツについてのデータを得る。さらに、照射食品中の 2-アルキルシクロブタノン生成量に関する文献情報のとりまとめを行い暴露量推定の基礎とする。

(方法)

照射ナツメグ、カシューナッツ試料中の 2-ACBs の定量

上記Ⅲ 平成 22 年度に用いた、Ng 1(ナツメグ、スリランカ)及び、Cn 2(カシューナッツ、インド)について、5、10 kGy の照射を行い、Ⅲ項と同条件で、SFE 抽出、SPE カラムによる精製、GC-MS、Q-MS による定量を行った。脂肪酸量の測定は、非照射のナツメグ及びカシューナッツをクロロフォルム/メタノールで抽出後、5% 塩酸性メタノール溶液にてメタノリシスを行い、DB225 カラム (J&W 製、内径 0.25 mm x 長さ 30m 膜厚 0.25 μm) を用いて、脂肪酸メチルエステルを検出した。トリデカン酸を内部標準に用いた。また、ナツメグについては、照射後 8~10 度の保存を 30 週間実施し濃度変化を追跡した。

照射食品中の 2-アルキルシクロブタノン生成量の文献情報とりまとめ

文献検索により、照射食品中の 2-アルキルシクロブタノン生成量に関する文献情報を収集し、2-ACBs の生成効率と保存安定性について取りまとめを行った。

- 3) 個別課題ウ 2-ACB 類の安定性評価 (担当:等々力節子)
(研究内容)

遺伝毒性試験の被験溶液やインビトロ試験、亜急性毒性試験で動物に投与した試料中の 2-dDCB 及び 2-tDCB の分析を行う。実験動物組織中への移行について、脂肪組織中の濃度について検討する。

(方法)

毒性試験試料中の安定性確認：

毒性試験に用いる飼料や被験液中の 2-ACBs の GC 及び GC-MS により、試験前後の濃度、純度を確認する。

亜急性毒性試験における動物組織試料中の 2-tDCB 濃度：

本年度実施した、「個別課題名ク 2-ACBs の 90 日間亜急性毒性試験及びラットを用いた下部消化管二段階発がん試験」における亜急性毒性試験(90 日)での 2-tDCB 投与ラット(0, 0.0012, 0.006 及び 0.03%投与の 4 群)の脂肪組織を供試試料とした。試料は屠殺ののち、液体窒素で急速凍結し、-80℃の冷凍庫で保管した。動物試料約 1 g をソックスレー抽出により脂肪を抽出し、この脂質 100 mg~500 mgをさらに SFE で抽出(150atm, 80℃で CO₂ 0-120mL の溶出画分を補習し、これを SI 固相抽出カラムにて精製し行い GC-MS で検出、定量した。GC-MS の分析検出条件は以下の通り。

カラム: J&W SCIENTIFIC 122-5562 DB-5MS 60m×0.250mm 0.25µm

GC 装置: GC: GC-2101, MS: QP2010+ Shimadzu

GC 条件

注入口	250℃	(カラムオーブンプログラム)
インターフェース	280℃	55℃ (2min)
入口圧 (kPa)	119.5	20℃/min → 175℃
カラム流量 (ml/min)	1.00	2℃/min → 250℃
注入モード	SPLITLESS	10℃/min → 270℃ (20min)
全流量 (ml/min)	28.4	(検出器) 島津 QP2010+
線速度 (cm/秒)	25.7	MS 温度: 200℃
サンプリング時間	1.0 min	インターフェース: 280℃
注入サンプル量	1µl	モード: EI (70eV) SIM 測定

研究項目名 2 *in vitro* 試験による 2-ACBs の有害性の検討

- 4) 個別課題名エ 2-ACBs のアポトーシスに関する検討。遺伝子発現変化を指標とした安全性評価とそれらの分子機構の解明(担当: 古田雅一、近藤隆)
- 5) 個別課題名オ 2-ACBs の遺伝子発現変化に関する検討(担当: 古田雅一、近藤隆)
22 年度までの研究成果をまとめ、研究発表に必要な検討を行う。実際には Fura-2 を用いて細胞内カルシウムイオン濃度変化を蛍光画像解析法にて、経時的に調べる。
- 6) 個別課題名カ 2-ACBs の遺伝毒性評価及び *in vitro* 発がん性評価
(担当: 古田雅一、山影康次)

カ-1 培養細胞を用いる染色体異常試験

2-dDCB 及び 2-tDCB の染色体異常誘発作用を調べた。チャイニーズ・ハムスター肺由来の CHL/IU 細胞を用い、公的な試験法ガイドラインに準拠し、図 26 に示すように S9 mix 非存在下での 6 時間処理(短時間処理、処理後正常培養液で 18 時間培養)と代謝活性化による作用を調べるための S9 mix 存在下での 6 時間処理(短時間

処理、処理後正常培養液で 18 時間培養) ならびに S9 mix 非存在下での連続処理 (24 時間) による染色体異常試験を実施した。2-dDCB 及び 2-tDCB をアセトンに溶解し、1 vol% 添加して処理を行った。処理終了の 2 時間前にコルセミドを添加し、常法に従って染色体標本作製した。



図26 CHL/IU 細胞を用いる染色体異常試験スケジュール

作製したスライド標本をギムザ液で染色し、コード化した状態で顕微鏡下で分裂中期細胞における染色体の構造異常の種類と数を分析した。また、倍数性細胞の出現数も計数した。

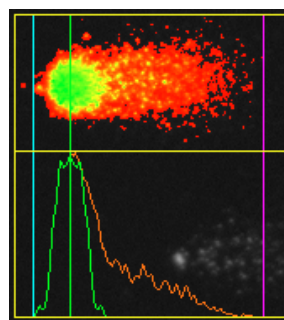
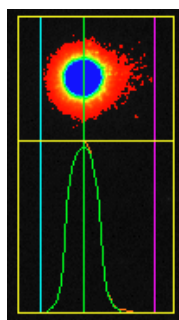
カ-2 培養細胞を用いるコメットアッセイ

染色体異常試験の S9 mix 非存在下での 6 時間処理については、染色体異常試験と同時に同じ条件で 2-dDCB 及び 2-tDCB で処理した CHL/IU 細胞を用いて、コメットアッセイにより DNA 切断性を調べた。

処理終了後の細胞浮遊液を 0.5 w/v% 低融点アガロース液と混合し、コード番号を記したアガーコートスライドグラスに滴下し、カバーガラスをかけ、氷上に放置して固化させた。カバーガラスを除去したスライド標本を細胞溶解液中で一晩静置した。精製水でリンス後、電気泳動槽のゲルトレー上に標本をランダムに並べ、アルカリ電気泳動液を注ぎ 20 分間アンワインドした。その後、約 0.7 V/cm で 20 分間通電して電気泳動を行った。染色体異常試験の観察対象となった濃度群について、作製した標本を SYBR Gold で染色し、蛍光顕微鏡下で細胞毒性の指標であるヘッジホッグ (図 27、ヘッド部位が小さいためにコメット分析ソフトで正常にヘッド部分が認識されない細胞) の数を記録した。次に、コメット分析ソフト (Comet assay IV、バージョン番号: 4.11、Perspective Instruments) を用いて %DNA in tail を測定した。



a) ヘッジホッグ



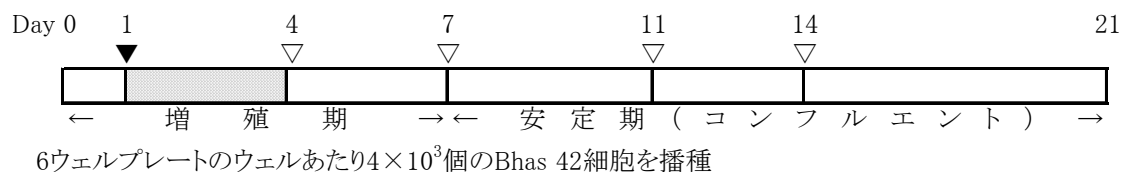
b) 正常(左)及び陽性(右)の画像解析イメージ

図27 アルカリ電気泳動した細胞の解析例

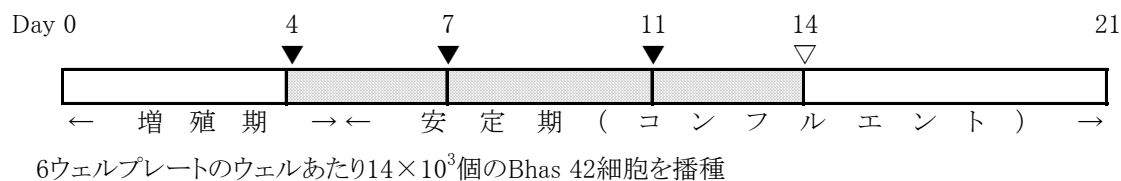
カ-3 培養細胞を用いる形質転換試験

培養細胞を用いる形質転換試験（二段階発がん性試験）として古くから利用されている BALB/c 3T3 細胞は、正常の培養状態では接触阻止能（細胞密度が飽和すると細胞増殖が停止する作用）を有するマウス全胚由来の株細胞である。この細胞に ras 遺伝子を導入して作製した Bhas 42 細胞は、BALB/c 3T3 細胞よりも短期間で発がん物質の検出が可能で、試験の目的によりイニシエーション試験とプロモーション試験に区別される。試験法の概要を図3に示した。

[イニシエーション試験]



[プロモーション試験]



▼:処理液(被験物質を含む培養液)と交換

▽:培養液と交換

図28 Bhas42 細胞を用いる形質転換試験スケジュール

イニシエーション試験では、Bhas 42 細胞を 6 ウェルプレートの 1 ウェルあたり 4×10^3 個播種 (6 ウェル/群) し、播種翌日に被験物質を含む処理液と交換 (1 ウェルあたり 2 mL) し、3 日間処理した。播種 4 日、7 日、11 日、14 日後に新鮮な培養液と交換 (1 ウェルあたり 2 mL) し、播種 21 日後に細胞をメタノール固定したのち、ギムザ染色した。

プロモーション試験では、細胞をウェルあたり 14×10^3 個播種 (6 ウェル/群) し、播種 4 日、7 日、11 日後に被験物質を含む処理液と交換 (1 ウェルあたり 2 mL) し、

10 日間処理を行い、播種 14 日後に新鮮な培養液と交換して、播種 21 日後に細胞をメタノール固定したのち、ギムザ染色した。

形質転換試験と同時に細胞増殖試験用として 3 ウェルを用い、同様の方法でイニシエーション及びプロモーションの処理を行い、播種 7 日後にホルマリン固定し、0.1 w/v% クリスタルバイオレット液で染色し、水洗・風乾後、相対細胞増殖率（陰性対照群を 100% とした時の増殖率）を算出した。

形質転換試験用のウェルについては、50 個以上の細胞からなる形質転換巣で、紡錘形をなして周囲の細胞とは異なる細胞形態を示し（spindle-shaped）、細胞質が塩基性（濃い紫色）に強く染まり（basophilic）、ランダムな配列で互いに交差し（criss-cross）、積み重なりあった細胞の増殖（piling-up）を示す形質転換巣を陽性形質転換巣として計数した。

平成 23 年度は、2-dDCB とその起源物質であるパルミチン酸のイニシエーション試験及びプロモーション試験を実施し、2-tDCB とその起源物質であるステアリン酸についてはプロモーション試験を実施した。

研究項目名 3 *In vivo* 試験による 2-ACBs の有害性の検討

7) 個別課題名 キ ドデシルシクロブタノンのマウスを用いる小核試験

（担当：山影康次）

2-tDCB を投与したマウスから骨髓細胞を採取し、小核試験を行う。また、小核試験に用いたマウスまたは 2-tDCB を投与したラットの大腸組織から DNA を抽出し、³²P ポストラベル法により、DNA 付加体形成の有無の確認を行う。

キ-1 マウス骨髓細胞を用いる小核試験

2-tDCB のマウスを用いる小核試験を「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」（平成 8 年 3 月 22 日、衛化第 29 号）に準拠して行い、2-tDCB の *in vivo* における染色体異常誘発作用を調べた。すなわち、2-tDCB を日局オリブ油に溶解して用時に投与液を調製し、9 週齢の雄の CD1 (ICR) マウスに 24 時間おきに 2 回経口投与（10 mL/kg/日）した。2 回目投与の 24 時間後に両側の大腿骨を摘出して骨髓塗抹標本作製し、アクリジンオレンジで黄色に染色される小核を有する幼若赤血球の数を分析した。1 匹あたり 2,000 個の幼若赤血球を分析し、1 群 5 匹の合計 10,000 個の幼若赤血球における小核の出現頻度を求めた。また、骨髓細胞の増殖抑制の指標として、1 匹あたり 1,000 個の赤血球（幼若赤血球及び成熟赤血球）を観察した。

キ-2 マウス及びラット大腸組織における DNA 付加体（アダクト）生成試験

2-tDCB の発がん性の標的臓器であることが示唆されている大腸組織における DNA 付加体生成の有無をポストラベル法（ヌクレアーゼ PI 法）により確認した。試験法の概略図を図 29 に示した。

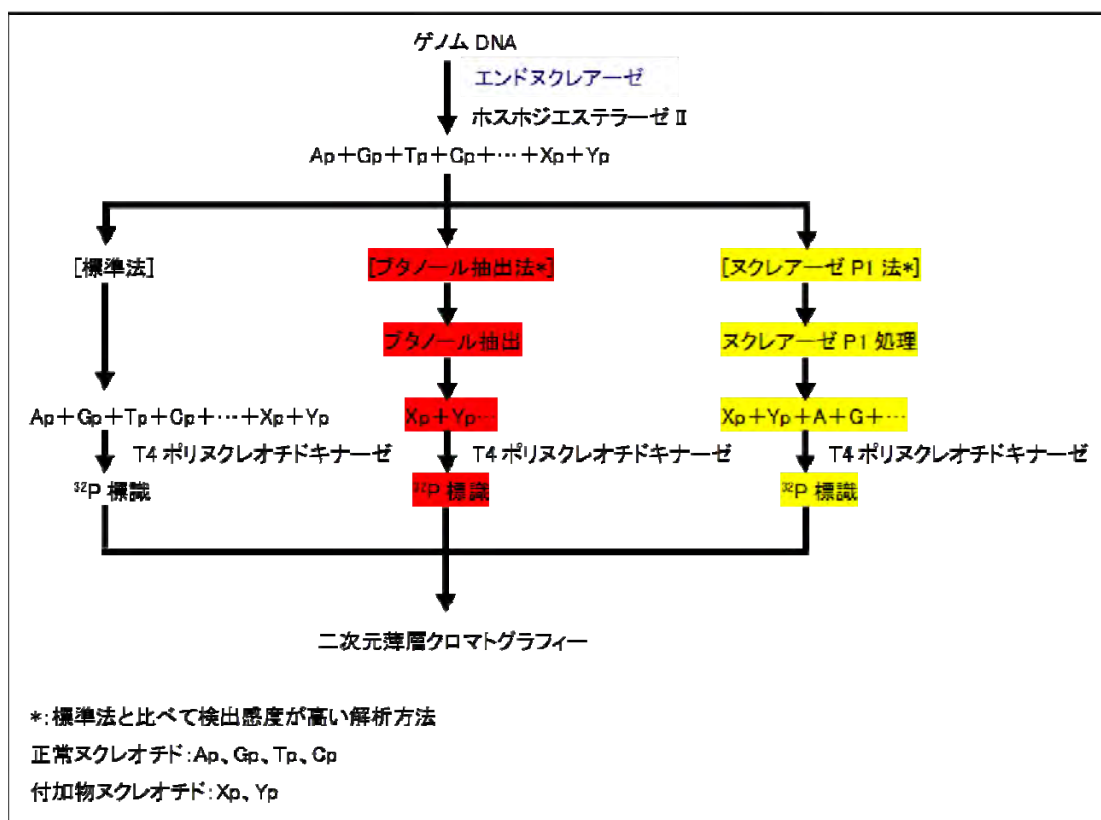


図 2 9 ポストラベル法による DNA アドクト解析の流れ

2-tDCB を投与したラット及びマウスから抽出した大腸組織、陽性対照として用いた培養細胞（下表参照）をゲノム DNA 抽出に使用するまで凍結（設定温度：－80℃）保存した。

試料	群(用量)	試料番号
大腸粘膜 ^{*1}	陰性対照群(雄): 2-tDCB (0%)	TS2-107、TS2-108、TS2-109
	被験物質処理群(雄): 2-tDCB (0.03%)	TS2-407、TS2-408、TS2-409
大腸粘膜 ^{*1}	陰性対照群(雌): 2-tDCB (0%)	TS2-143、TS2-144、TS2-145
	被験物質処理群(雌): 2-tDCB (0.03%)	TS2-443、TS2-444、TS2-445
マウス結腸 ^{*2}	陰性対照群: 日局オリブ油 (10 mL/kg/day)	1～5
	被験物質処理群: 2-tDCB (2,000 mg/kg/day)	21～25
培養細胞 ^{*3}	陰性対照群: ジメチルスルホキシド (DMSO、1 vol%)	DMSO
	陽性対照群: 4-ニトロキノリン 1-オキシド (4NQO、4.8 μg/mL)	PC

*1: 2-tDCB を 90 日間混餌投与した F344 系ラットから得た。

*2: 処理物質を強制経口投与（1 回/日×連続 2 日、9 週齢）された ICR 系マウス（雄、9 週齢）から、最終投与後 24 時間に得た。

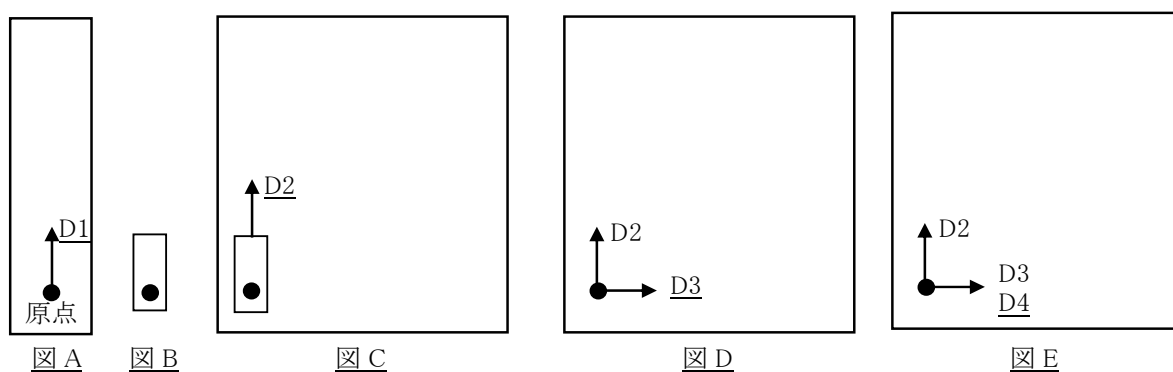
*3: 処理（37℃、5% CO₂、1 時間）直後の CHL/IU 細胞を回収して得た。

採取した組織からフェノール抽出法を用いてゲノム DNA を抽出し、RNase A 及び RNase T1 で処理してゲノム DNA 溶液 ($2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) を調製し、そのゲノム DNA を micrococcal endonuclease 及び spleen phosphodiesterase II によりヌクレオシド 3'ーリン酸に分解した。ヌクレアーゼ P1 処理ののち、 $[\gamma-^{32}\text{P}]$ ATP を T4 ポリヌクレオチドキナーゼにより ^{32}P ポストラベルを行った。

精製水で前処理したポリエチレンイミン (PEI) シートを用いて以下の手順で二次元 TLC を行った。

(展開方法)

- (1) 展開方向上部にろ紙を付け、原点に ^{32}P ポストラベル反応液を滴下したのち、D1 方向へ展開した (図 A)。
- (2) PEI シートを洗淨及び自然乾燥したのち、原点付近からシート片 (横 : 1 cm、縦 : 1.5 cm) を切り取った (図 B)。
- (3) 新しい PEI シート (10×10 cm) の原点 (表面) とシート片の原点 (表面) を重ねたのち、D2 方向へ展開した (図 C)。
- (4) シート片を取り去り、PEI シートを洗淨及び自然乾燥したのち、D3 方向へ展開した (図 D)。
- (5) PEI シートを洗淨及び自然乾燥したのち、展開方向上部にろ紙を付け、D4 方向へ展開した (図 E)。
- (6) PEI シートを洗淨及び自然乾燥した。



PEI シートを X 線フィルムに露光・現像し、全ての試料について、X 線フィルム上の展開領域内におけるスポットの有無を目視により観察した

8) 個別課題名ク 2-ACBsの90日間亜急性毒性試験及びラットを用いた下部消化管二段階発がん試験 (担当: 泉啓介)

2-テトラデシルシクロブタノンの 90 日間経口毒性試験 (より高濃度暴露による再試験):

6 週齢の雌雄 F344 ラットに 0%, 0.0012%, 0.006%, 0.03% (各群 12 匹) の 2-テトラデシルシクロブタノンを 90 日間混餌投与し、血液検査、尿検査、血清検査、組織学的検査によりその毒性を明らかにする。

2 当該年度の主な研究成果

研究項目名 1 放射線照射による 2-ACBs の定量法と生成量の確定

(1) 個別課題名ア 天然食品中の 2-ACBs (担当:等々力節子)

22 年度で研究がすでに終了しているため行わない。

(2) 個別課題名イ 照射食品中の 2-ACBs の含有量 (担当:等々力節子)

1) 当該年度の研究成果の要旨

ナツメグ及びカシューナッツのガンマ線照射による、2-ACBs の生成効率を検討したところ、「1.2~3.6 nmole/mmole 脂肪酸/kGy」であった。2012 年末までに、(照射)食品中の 2-ACBs の定量に関連する論文を約 70 報収集した。非照射食品中に 2-ACBs が存在することを報告した 1 件の論文を除き、2-ACBs の検出は放射線照射試料においてのみ報告されていた。2-ACBs の生成効率は、カカオ豆などの例外を除き、脂肪酸や食品の種類によらず、線量 1 kGy あたり 1~3 nmol/mmol 脂肪酸となるものが多かった。また、室温保存に於いては、照射後貯蔵中に 2-ACBs が分解し、濃度減少する例が多数報告されていた。

2) 研究成果

照射ナツメグ、カシューナッツ試料中の 2-ACBs の定量

表 16 に実験に供試したナツメグ及びカシューナッツの脂肪酸組成(重量%)と主な脂肪酸の試料湿重量(FW)当たりの含量(モル数)を示す。ナツメグはミリチン酸がその大半(約 85%)を占め、その次に多いのがパルミチン酸である。またカシューナッツは、オレイン酸がメインの構成脂肪酸となっている。

表 16 ナツメグ及びカシューナッツの脂肪酸組成と含量

脂肪酸	ナツメグ		カシューナッツ	
	組成 (重量%)	含量 (μ mole/g FW)	組成 (重量%)	含量 (μ mole/g FW)
C12:0 (カプリン酸)	2.0	25.9		
C12:1 (ドデセン酸)				
C14:0 (ミリスチン酸)	84.8	958.0		
C16:0 (パルミチン酸)	4.4	44.8	8.8	153
C16:1 (パルミトレイン酸)			0.3	5.3
C18:0 (ステアリン酸)	0.3	2.8	7.2	113
C18:1 (オレイン酸)	4.2	38.5	66.2	1048
C18:2 (リノール酸)	0.5	4.9	17.1	273
未同定	3.8		0.4	

5 kGy 及び 10 kGy 照射を行ったナツメグ及びカシューナッツに生成した 2-dDCB, 2-tDCB (ナツメグ)、2-dDCB, 2-tDeCB, 2-tDCB の濃度と線量の関係の直線回帰を行い、その傾きから、この実験の照射条件における 1 kGy あたりの各 2-ACBs の生成量を求め、さらに前駆体脂肪酸あたりの生成効率を求めた。ナツメグ、カシュー

ーナッツとも、前駆体となる脂肪酸に対して 1 kGy の照射では、 10^{-6} オーダーの 2-ACBs が生成していた(表 1 7)。

表 1 7 ガンマ線照射 1 kGy で生成の生成効率(照射温度 15°C, 照射後 24 時間)

	濃度		生成効率
	($\mu\text{g/g FW}\cdot\text{kGy}$)	(nmoleg/g FW/kGy)	(nmole/mmmole FA/kGy)
ナツメグ			
2-DCB	0.268	1.28	1.3
2-dDCB	0.041	0.17	3.8
カシューナッツ			
2-dDCB	0.043	0.18	1.2
2-tDeCB	0.438	1.66	1.6
2-tDCB	0.041	0.15	1.4

表 1 8 にスリランカ産のナツメグを 5 及び 10 kGy で照射し、1 日後～30 週間保存した際の、2-dDCB 及び 2-tDCB の濃度変化を示す。2-dDCB も 2-tDCB とともに、5 週間までの貯蔵では、濃度の変化はいずれの線量とも認められなかった。(p>0.05)。しかしながら、5 週間を過ぎると有意な減少が認められ、2-dDCB 及び 2-tDCB は 30 週間の貯蔵で、照射直後の約 65%～75%に減少した。

表 1 8 照射ナツメグ中の 2-ACBs 含量の変化(保存温度 10°C)

		(μg/g FW sample)		
2-ACBs	保存期間 (Weeks)	線量 (kGy) ¹		
		0	5	10
2-dDCB	0*	ND ²	1.52 ± 0.18 ^a	2.52 ± 0.25 ^a
	1	ND	1.30 ± 0.16 ^a	2.57 ± 0.16 ^a
	5	ND	1.51 ± 0.30 ^a	2.05 ± 0.19 ^b
	15	ND	1.16 ± 0.21 ^b	1.96 ± 0.12 ^b
	30	ND	0.99 ± 0.20 ^b	1.64 ± 0.13 ^c
2-tDCB	0	ND	0.21 ± 0.02 ^a	0.41 ± 0.04 ^a
	1	ND	0.19 ± 0.01 ^a	0.42 ± 0.02 ^a
	5	ND	0.20 ± 0.03 ^a	0.31 ± 0.02 ^b
	15	ND	0.18 ± 0.00 ^b	0.29 ± 0.05 ^b
	30	ND	0.17 ± 0.01 ^b	0.27 ± 0.03 ^b

* 照射後 1 日¹ 4 併行分析の平均値 (標準偏差).² N.D. 不検出

^{a-c} 2-dDCB and 2-tDCB について同一記号は Welch's *t*-test (*p* > 0.05)で優位差なし

照射食品中の 2-ACBs 生成効率と安定性についての文献調査

i) 収集文献の範囲：1990 年から 2012 年 3 月までで、約 70 報の論文を収集検討した。その結果、以下のことが見いだされた。

- ・非照射の食品から 2-ACBs の検出を報告した論文は 1 報しか存在しなかった。
- ・食品の種類を問わず、ほとんどの場合において、同一の照射条件下で生成する 2-ACBs の濃度は、線量と直線的な相関が認められた。
- ・生成する 2-ACBs の種類は、その食品中の脂質の構成脂肪酸組成に依存していた。

ii) 代表的な食品中の先駆脂肪酸あたり、1 kGy あたりの 2-ACBs 生成効率

既報文献の情報から、前駆体脂肪酸量に対する放射線照射 1 kGy あたりの 2-ACBs の生成量に関する情報を取りまとめた(表 19)。この目的は、各脂肪酸 1 分子あたりに、照射で生成する 2-ACBs の分子数の大まかな範囲（オーダー）を知ることである。したがって、文献に前駆体脂肪酸重量（またはモル数）あたりの生成 2-ACBs の重量（あるいはモル数）が実験結果に基いていて報告されている場合は値を記し、また、脂質重量や脂肪酸含量について完全な情報がなく、シクロブタノン濃度（脂質重量当たり）と脂肪酸組成のみが報告されている場合には、脂質総量のうちの総脂肪酸量を 90%（種子類）あるいは、95%（ゴマ種子）と想定し、脂肪 1 g あたりの脂肪酸量を推定し、生成効率の計算を行った。

表 19 2-ACBs の生成効率（文献情報まとめ）

(nmole/m mole 脂肪酸/kGy)

食品	2-ACBs							備考	ref
	2-HCB	2-OCB	2-DCB	2-dDCB	2-tDCB	2-dDeCB	2-tDeCB		
粉乳	—	—	1.31	1.65	2.79	1.34	1.16		
ヘーゼルナッツ	—	—	—	2.44	2.74	—	1.8		
鶏肉	—	—	—	1.88	2.32	1.41	1.65		
牛ヒレ	—	—	0.7	1.33	1.67	1.09	1.59		
フォアグラ	—	—	—	1.39	1.93	—	1.08		
カカオ豆	—	—	—	6.14	12.21	—	0.71		
ハンバーガー	—	—	0.43	1.87	4.18	0.48	1.17	6-8°C 好気条件	1.Marchioni 2002
スモークサーモン	—	—	0.63	0.76	1.11	0.48	0.56		
カエル脚	—	—	—	1.05	1.23	—	0.2		
家禽肉のクネル	—	—	0.34	0.71	1.42	0.31	0.52		
サケ	—	—	1.03	1.3	1.2	1.31	1.21		
アボガド	—	—	—	1.7	—	—	1.0		
卵料理	—	—	—	1.2	1.8	0.6	0.7		
チーズ	1.4	1.3	1.5	1.4	1.1	—	—		2.Ndiaye

イワシ	-	-	1.3	1.1	1.0	-	-	1999
マス	-	-	1.5	1.3	1.2	-	-	8 °C
牛肉	-	-	-	1.0	1.0	-	-	好気条件
マンゴ(種子)	-	-	-	1.1	1.0	-	-	
トリグリセリド	1.3	1.4	1.4	1.6	1.1	-	-	
鶏肉	-	-	-	1.3	1.6	-	-	
鶏肉	-	-	-	1.2	1.1	-	-	+20°C(好気)
鶏肉	-	-	-	0.9	0.8	-	-	-20°C(好気)
鶏肉	-	-	-	0.6	0.6	-	-	-80°C(好気)
鶏肉	-	-	-	0.9	0.9	-	-	+20°C(真空)
鶏肉	-	-	-	0.8	0.8	-	-	-20°C(真空)
鶏肉	-	-	-	0.5	0.5	-	-	-80°C(真空)
鶏肉フリーズドライ	-	-	-	0.6	0.7	-	-	+20°C(好気)
牛肉パテ	-	-	-	0.5	-	-	-	凍結(電子線) 3.Gadgil
牛肉パテ	-	-	-	0.3	-	-	-	凍結(γ線) 2002
牛肉(挽肉)	-	-	-	0.6	1.7	-	-	
牛肉(大腸)	-	-	-	0.9	3.2	-	-	
牛肉(もも肉)	-	-	-	0.6	1.6	-	-	
牛肉(レバー)	-	-	-	2.4	7.1	-	-	-19°C 4.Obana
豚肉(挽肉)	-	-	-	0.3	1.5	-	-	(好気) 2005
豚肉(もも肉)	-	-	-	0.8	3.1	-	-	
鶏肉(もも肉)	-	-	-	1.4	2.3	-	-	
サケ	-	-	-	0.9	0.9	-	-	
牛肉(パテ)	-	-	-	2.8	3.1	-	-	室温(20°C)
牛肉(パテ)	-	-	-	1.1	2.2	-	-	チルド(0°C) 5.Obana
牛肉(パテ)	-	-	-	0.6	1.7	-	-	凍結(-78°C) 2007
サラミ	-	-	-	0.1	0.3	-	0.7	
コッパ	-	-	-	0.4	0.5	-	0.9	嫌気(5°C)
パンチェッタ	-	-	-	0.5	0.7	-	2.9	6..ZANARDI
サラミ	-	-	-	0.7	1.1	-	2.8	2007
コッパ	-	-	-	0.7	1.2	-	3.3	嫌気(5°C)
パンチェッタ	-	-	-	1.0	1.3	-	4.4	60 日 保存
ブラックメロン(種子)	-	-	-	2.2	1.5	-	-	室温
レッドメロン(種子)	-	-	-	4.6	4.2	-	-	好気条件 7.Shin
かぼちゃ(種子)	-	-	-	0.9	0.6	-	-	脂肪酸90% 2006
ヒマワリ(種子)	-	-	-	3.7	3.2	-	-	仮定で計算
ゴマ	-	-	-	2.6	3.0	-	0.7	4kGy脂肪酸 8.Lee
								95%として計算 2008

1. Marchioni, E et al. Determination of 2-alkylcyclobutanones in irradiated Food.In “Etude toxicologique

transfrontalière destinée à évaluer le risque encouru lors de la consommation d'aliments gras ionizes. (2002).“ p.46.

2. Ndiaye, B.*et.al.*: 2-alkylcyclobutanones as markers for irradiated foodstuffs. II. The CEN (European Committee for Standardization) method: field of application and limit of utilization. Radiat. Phys. Chem.. 55(4), 437-445(1999).

3. Gadgil, P. *et al.* 2-alkylcyclobutanones as irradiation dose indicators in irradiated ground beef patties. J. Agric. Food Chem.. 50(20), 5746-5750(2002).

4. Obana, H. *et.al.*: Analysis of 2-alkylcyclobutanones with accelerated solvent extraction to detect irradiated meat and fish. J. Agric. Food Chem.. 53(17), 6603-6608(2005).

5. Obana, H.*etal.*, Detection of irradiated meat, fish and their products by measuring 2-alkylcyclobutanones levels after frozen storage. Journal of the Food Hygienic Society of Japan 2007, 48 (6), 203-206.

6. Zanardi, *et.al.*, Evaluation of 2-alkylcyclobutanones in irradiated cured pork products during vacuum-packed storage. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2007, 55 (10), 4264-4270.

7. Sin, D. W. M.; Wong, YiuChung; Yao, WaiYin. Analysis of γ irradiated melon pumpkin and sunflower seeds by electron paramagnetic resonance spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry. J. Agric. Food Chem.. 54(19), 7159-7166(2006).

8. Lee, J.E. *et al* Characteristic hydrocarbons and 2-alkylcyclobutanones for detecting gamma -irradiated sesame seeds after steaming, roasting, and oil extraction. J. Agric. Food Chem.. 56(21), 10391-10395(2008).

iii) 照射食品中に生成した 2-ACBs の保存安定性

既報文献の情報から、照射食品中に生成した 2-ACBs の貯蔵安定性に関する情報を取りまとめた(表 20)。

表 20 照射食品中に生成した 2-ACBs の貯蔵安定性(文献調査のまとめ)

マトリックス	照射条件			貯蔵条件			結果	
	線源	線量 (kGy)	温度 (°C)	温度 (°C)	雰囲気	期間	減少率%	文献
動物性食品								
エビ	60-Co	2.5-10	凍結	-20	好気	60 日	減少無し	¹ Chen 2011
鶏肉	60-Co	2.5	-	4	嫌気	21 日	減少無し	² Stevenson1993
鶏肉	10 MeV 電子線	0.9-3.1	6-8	4	好気	1 ヶ月	dDCB 52%; tDCB 48%	³ Ndiaye 1999
カマンベール	10 MeV 電子線	0.9-3.1	6-8	4	好気	1 ヶ月	HCB 78%; OCB 65%; DCB 58%; dDCB 53%; tDCB 45%	³ Ndiaye 1999
イワシ	10 MeV 電子線	0.9-3.1	6-8	4	好気	1 ヶ月	DCB 30%; dDCB 26%; tDCB 22%	³ Ndiaye 1999
カマンベール	60-Co	0.52-5.41	4	10	好気	26 日	3 kGy まで減少無、 4,5 kGy は 20%	⁴ Stewart 2000
鶏肉	2.2MeV 電子線	10	6-8.	25	好気	21 日	dDeCB 57%, dDCB 53%; tDeCB 41%; tDCB 53%	⁵ Horvatovich 2005

鶏肉	2.2MeV 電子線	10	6-8	4	好気	28 日	dDeCB 65%, dDCB 46%; tDeCB 31%; tDCB 38%	⁵ Horvatovich 2005
モンガラカワハギ	60-Co	3-10	室温	4	好気	6 ヶ月	減少無し	⁶ Kwon 2007
牛肉	60-Co	4.8-5.1	凍結	-20	好気	1 年	dDCB 30%; tDCB 減少無	⁷ Obana 2007
豚肉	60-Co	4.7-4.5	凍結	-20	好気	1 年	減少無し	⁷ Obana 2007
鶏肉	60-Co	4.2	凍結	-20	好気	1 年	dDCB 30%; tDCB 減少無	⁷ Obana 2007
サケ	60-Co	4.4	凍結	-20	好気	1 年	dDCB 30%; tDCB 減少無	⁷ Obana 2007
サラミ	60-Co	2, 5, 8	5±1	-20	嫌気	60 日	増加 (8 kGy、dDCB、tDCB, tDeCB 約 4 倍)	⁸ Zanardi 2007
コッパ	60-Co	2, 5, 8	5±1	-20	嫌気	60 日	同上 約 2~4 倍	⁸ Zanardi 2007
パンチエッタ	60-Co	2, 5, 8	5±1	-20	嫌気	60 日	同上 2 倍程度	⁸ Zanardi 2007
唐揚げ (180度調理)	60-Co	3	凍結 (鶏肉)	-20	好気	6 ヶ月 1 年	dDCB 24%; tDCB 20% dDCB 46%; tDCB 32%	⁷ Obana 2007
ホットケーキ	60-Co	4-5	室温 (卵)	-20	好気	7 ヶ月 1 年	dDCB 17%; tDCB 32% dDCB 23%; tDCB 53%	⁷ Obana 2007
牛肉	60-Co	2-8	-20	-20	好気	1 年	dDCB 48-57%; tDCB 51-60%	⁹ Tewfik2008

表 20 続き

植物性食品								
ナツメグ	60-Co	5,10	15	8-10	好気	30 週	DCB 36%, dDCB 35%	¹¹ Chen 2012
マンゴ (種子)	60-Co	0.1-3.1	6-8	20	好気	1 ヶ月	dDCB 38%; tDCB 21%	³ Ndiaye 1999
マンゴ (種子)	60-Co	0.05-2.21	室温	10	好気	14 日	減少なし	⁴ Stewart 2000
パパイア (種子)	60-Co	0.06-2.62	室温	10	好気	21 日	1 kGy dDCB は 21 日以後 N.D. 2 kGy tDCB は 21 日以降 80%	⁴ Stewart 2000
Black melon	137-Cs	1-10	室温	20	好気	120 日	dDCB 85-93%; tDCB 90-97%	¹⁰ Shin 2006
Red melon	137-Cs	1-10	室温	20	好気	120 日	同上	¹⁰ Shin 2006
カボチャ (種子)	137-Cs	1-10	室温	20	好気	120 日	同上	¹⁰ Shin 2006
ヒマワリ (種子)	137-Cs	1-10	室温	20	好気	120 日	同上	¹⁰ Shin 2006
実験動物飼料	60-Co	5.3	室温	室温	好気	12ヶ月	dDCB 3ヶ月 50% 6ヶ月 81%; tDCB 3ヶ月 50%	⁷ Obana2007
実験動物飼料	60-Co	5.3	室温	-20	好気	12ヶ月	dDCB 6ヶ月 50%12ヶ月 80%; tDCB 6ヶ月 50%	⁷ Obana2007

* 2-DCB : 2-デシルシクロブタノン 2-dDCB : 2-ドデシルシクロブタノン, 2-dDeCB : 2-ドデセニルシクロブタノン, 2-tDCB : 2-テトラデシルシクロブタノン, 2-tDeCB : 2-テトラデセニルシクロブタノン

1. Chen, S. S.; Morita, Y.; Saito, K.; Kameya, H.; Nakajima, M.; Todoriki, S., Identification of Irradiated Prawn (*Penaeus monodon*) Using Thermoluminescence and 2-Alkylcyclobutanone Analyses. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2011, 59 (1), 78-84.

2. Stevenson, M. H.; Crone, A. V. J.; Hamilton, J. T. G.; McMurray, C. H., THE USE OF

2-DODECYLCYCLOBUTANONE FOR THE IDENTIFICATION OF IRRADIATED CHICKEN MEAT AND EGGS. Radiation Physics and Chemistry 1993, 42 (1-3), 363-366.

3. Ndiaye, B.; Jamet, G.; Miesch, M.; Hasselmann, C.; Marchioni, E., 2-Alkylcyclobutanones as markers for irradiated foodstuffs II. The CEN (European Committee for Standardization) method: field of application and limit of utilization. Radiation Physics and Chemistry 1999, 55 (4), 437-445.

4. Stewart, E. M.; Moore, S.; Graham, W. D.; McRoberts, W. C.; Hamilton, J. T. G., 2-Alkylcyclobutanones as markers for the detection of irradiated mango, papaya, Camembert cheese and salmon meat. Journal of the Science of Food and Agriculture 2000, 80 (1), 121-130.

5. Horvatovich, P.; Miesch, M.; Hasselmann, C.; Delincee, H.; Marchioni, E., Determination of monounsaturated alkyl side chain 2-alkylcyclobutanones in irradiated foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2005, 53 (15), 5836-5841.

6. Kwon, J. H.; Kausar, T.; Noh, J.; Kim, D. H.; Byun, M. W.; Kim, K. S., The identification of irradiated seasoned filefish (*Thamnaconus modestus*) by different analytical methods. Radiation Physics and Chemistry 2007, 76 (11-12), 1833-1836.

7. Obana, H.; Furuta, M.; Tanaka, Y., Detection of irradiated meat, fish and their products by measuring 2-alkylcyclobutanones levels after frozen storage. Journal of the Food Hygienic Society of Japan 2007, 48 (6), 203-206.

8. Zanardi, E.; Battaglia, A.; Ghidini, S.; Conter, M.; Badiani, A.; Ianieri, A., Evaluation of 2-alkylcyclobutanones in irradiated cured pork products during vacuum-packed storage. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2007, 55 (10), 4264-4270.

9. Tewfik, I.; Tewfik, S., Would it Still be Possible to Identify Irradiated Lipid-containing Foods Towards the End of their Shelf-life? Food Science and Technology International 2008, 14 (6), 519-524.

10. Sin, D. W. M.; Wong, Y. C.; Yao, W. Y., Analysis of gamma-irradiated melon, pumpkin, and sunflower seeds by electron paramagnetic resonance spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2006, 54 (19), 7159-7166.

11. Chen, S., Tsutsumi, T., Takatsuki, S., Matsuda, R., Kameya H., Nakajima, M., Furuta, M., Todoriki, S. Identification of 2-alkylcyclobutanones in nutmeg (*Myristica fragrans*). Food Chemistry 2012, doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.176

3) 考察及び結論

香辛料であるナツメグ及びナッツ類であるカシューナッツ のガンマ線照射により生成する 2-ACBs は元の脂質の脂肪酸組成比を反映していた。脂肪酸分子あたりの 1 kGy ガンマ線照射で生ずる 2-ACBs 量 (生成効率) は、ナツメグの 2-dDCB を除き、1.2-1.6 nmole/ mmole/kGy であり、既報の他の食品における生成効率と同レベルの生成効率であった。

既報の照射食品中の 2-ACBs の生成効率は、照射温度や雰囲気の影響を受けるが、前駆体である脂肪酸 1 mmole、1 kGy あたり、0.3 nmole~12.2 nmole の範囲に分布していた。多くの場合、1~4 nmole/mmole/kGy の範囲の効率での生成が多く、カカオ豆で例外的に高い生成効率が報告されていた。また、いったん照射により生成した 2-ACBs は好氣的貯蔵条件では減少することが報告されていた。

照射食品の処理線量は、その目的により大きく変わるが、動物性食品（畜肉、魚介類）で 3 kGy 程度、青果物の植物検疫処理で～1 kGy まで、香辛料、乾燥野菜で～10 kGy 程度が実用線量として想定される。平成 17 年及び 18 年の国民健康・栄養調査では、日本人全年齢の総脂肪酸摂取量は、約 43 g/日である。ここで、脂肪酸 1 mmole, 1 kGy あたりの 2-ACBs 生成効率を 3 nmole とし、2-ACBs と対応する前駆体脂肪酸の分子量は、脂肪酸のほうがやや大きい（2-ACBs+18）が、これを重量で 1:1 の対応とし、摂取している脂肪酸すべてが 3 kGy で照射されていると仮定すると、43 g の脂肪酸から生成する 2-ACBs の重量は、 $43 \times 3 \times 3 \times 10^{-6}(\text{g})=0.39 \text{ mg/day}$ となる。これは、体重 50 kg の成人を考えると、 $7.8 \mu\text{g/kg/day}$ に相当する。したがって、人が摂取する食品のほとんどすべてが殺菌線量（3kGy）で照射されても、2-ACBs の食餌由来の摂取量は $10 \mu\text{g/kg/day}$ には満たないと推察される。実際には、食品照射が導入されるとしても、摂取している脂質（脂肪酸）のごく一部が照射されるに過ぎない。

（３）個別課題ウ 2-ACB 類の安定性評価（担当：等々力節子）

１）当該年度の研究成果の要旨

亜急性毒性試験に用いたラットの脂肪組織中の 2-tDCB 濃度を測定し、経口投与した被験物質の体内移行を確認した。2-tDCB 非投与のコントロール動物の組織では、2-tDCB は検出されず、一方、投与動物の脂肪組織では、2-tDCB の投与濃度に応じた脂肪組織への 2-tDCB の蓄積が確認された。

２）研究成果

コントロールのラット脂肪に、 $0.5 \mu\text{g/g}$ 脂肪の割合で 2-tDCB を添加し、上記方法で述べた試料精製法の妥当性を検証するための添加回収試験を行った。その結果、2-tDCB の回収率は 75.7% でほぼ妥当であった。表 2 1 に 2-tDCB 投与ラットの 2-tDCB 含量を組織脂肪重量当たりの濃度として示した。雄雌とも投与量に応じて、脂肪組織への 2-tDCB の移行、蓄積が確認された。

表 2 1 2-tDCB 投与ラット脂肪組織中の 2-tDCB 濃度

(オス)				(メス)			
2-tDCB 含量 (% in Diet)	2-tDCB 濃度 ($\mu\text{g/g}$)			2-tDCB 含量 (% in Diet)	2-tDCB 濃度 (mg/g)		
0	ND			0	ND		
0.0012	0.124	$\pm$	0.016	0.03	3.97	$\pm$	0.33
0.006	0.577	$\pm$	0.079	3 匹の平均値 (標準偏差)			
0.03	9.12	$\pm$	1.52				
6 匹の平均値 (標準偏差)							

３）考察及び結論

これまでに、2-ACBs を経口投与した動物(ラット)の体内動態を研究した実験の報告は、Horvatovich (2002) らと Priyadarshine (2006) の 2 研究グループである。前者は、1%アルコールに溶解した 0.005% 2-tDCB 及び 2-teDCB を飲料水として与え、1 日平均 1 mgの投与で 4 か月飼育している。この時 2-tDCB の脂肪組織内濃度は、 $0.31 \mu\text{g/gfat}$ 、ラット体内の脂肪量を 30 g とすると、2-tDCB の体内総量は、 $9 \mu\text{g}$ 程度、この量は総摂取量の 10^{-5} オーダーであるとしている。一方の Priyadarshine のグループでは、1 日 5 mgの 2-dDCB を 5 日間投与して、脂肪組織に移行、残存したものは 0.33%未満であったとしている。

研究項目名 2 *in vitro* 試験による 2-ACBs の有害性の検討

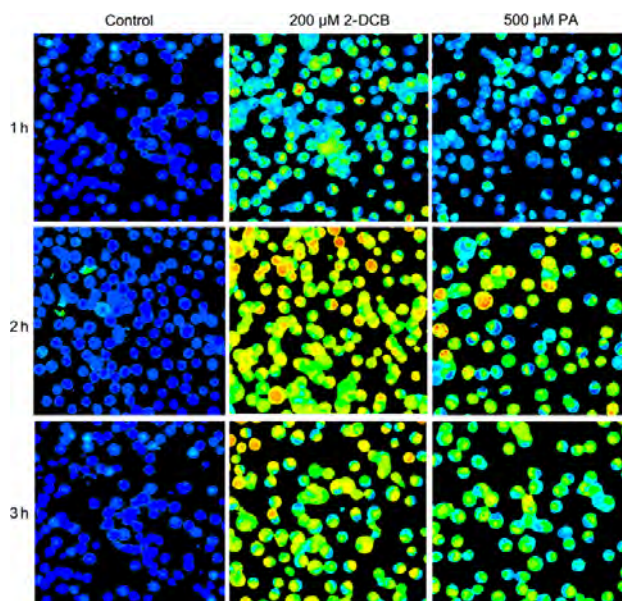
(4) 個別課題名エ 2-ACBs のアポトーシスに関する検討遺伝子発現変化を指標とした安全性評価とそれらの分子機構の解明 (担当: 古田雅一、近藤隆)

(5) 個別課題名オ 2-ACBs の遺伝子発現変化に関する検討 (担当: 古田雅一、近藤隆)

1) 当該年度の研究成果の要旨

Fura-2 を用いて細胞内カルシウムイオン濃度変化を蛍光画像解析法にて、経時的に調べたところ、カルシウムイオン濃度の増加が認められ、画像として表示した。

下記図参照。



2) 研究成果

アポトーシスの結果について、公表するための論文作成に集約した

3) 考察及び結論

今までのデータを総括し、2-dDCB 及び PA に関するアポトーシス機構を明らかにし、これを Apoptosis に公表した。分子機構のスキームについては、平成 22 年度分について示した。これらの、遺伝子網羅的遺伝子発現解析の検討は今後の課題である。

(6) 個別課題名カ 2-ACBs の遺伝毒性評価及び *in vitro* 発がん性評価

1) 当該年度の研究成果の要旨

2-dDCB は、染色体異常も DNA 切断も誘発しなかった。しかしながら、コメットアッセイでは、分析した最高濃度 (0.10 mg/mL) で細胞毒性の指標であるヘッジホッグの頻度が上昇した。

形質転換試験においても、イニシエーション作用は認められず、染色体異常試験及びコメットアッセイの結果と一致した。一方、プロモーション試験では明らかに形質転換巣が増加し、2-dDCB はこの試験条件下ではプロモーション作用を示すことが示された。2-dDCB の起源物質である PA についても形質転換試験を実施したが、イニシエーション作用及びプロモーション作用とも認められなかった。

2-tDCB については DNA 切断の誘発は認められなかった。また、形質転換試験においては、プロモーション試験で明らかに形質転換巣が増加し、2-tDCB はこの試験条件下ではプロモーション作用を示すことが示された。2-tDCB の起源物質である SA についても形質転換試験を実施したがプロモーション作用は認められなかった。

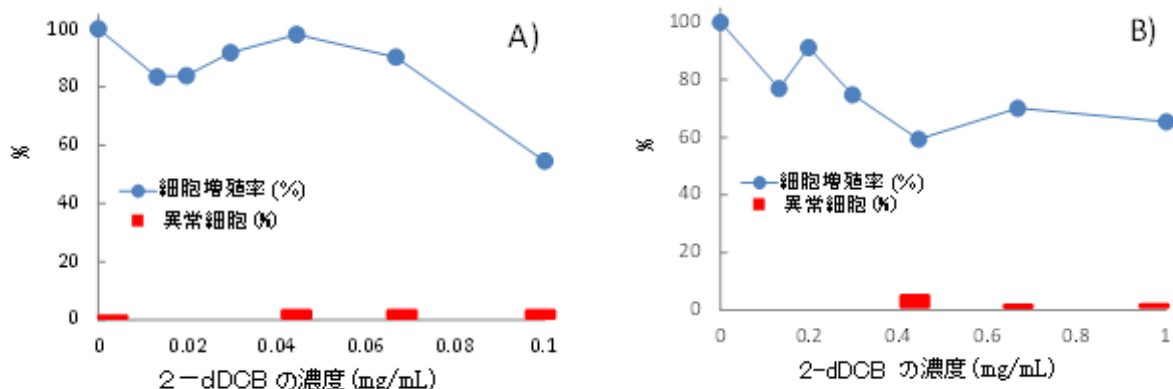
2) 研究成果

2)-1 培養細胞を用いる染色体異常試験

2-dDCB については、以下の濃度群を設定して染色体異常試験を実施した。

- ・ S9 mix 非存在下の短時間処理 : 0.013、0.020、0.030、0.044、0.066、0.10 mg/mL
- ・ S9 mix 存在下の短時間処理 : 0.13、0.20、0.30、0.44、0.66、1.0 mg/mL
- ・ 24 時間連続処理 : 0.013、0.020、0.030、0.044、0.066、0.10 mg/mL

染色体分析に先立ち、分裂指数の分析を実施した結果、分析可能な最高濃度は、S9 mix 非存在下の短時間処理では 0.10 mg/mL、S9 mix 存在下の短時間処理では 1.0 mg/mL、24 時間連続処理では 0.066 mg/mL となった。したがって、それらの濃度群を含む 2 ないし 3 濃度群について染色体分析を行った。その結果、2-dDCB で処理したいずれの処理群においても染色体異常の有意な増加は認められなかった (図 30)。



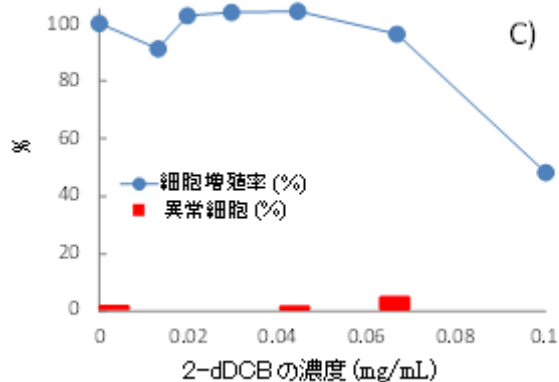


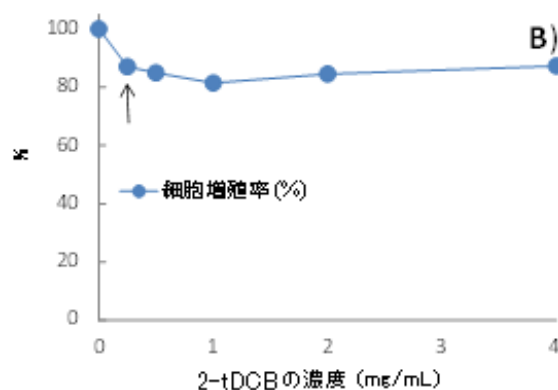
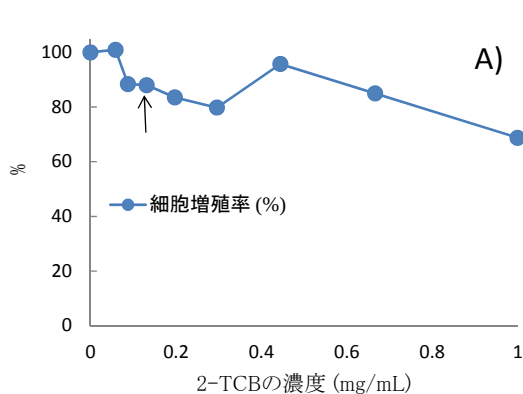
図 30 2-dDCB の染色体異常試験結果

A: S9 mix 非存在下の短時間処理、B: S9 mix 存在下の短時間処理、
C: 24 時間連続処理

2-tDCB については、以下の濃度群を設定して染色体異常試験を実施した。

- ・ S9 mix 非存在下の短時間処理 : 0.059、0.088、0.13、0.20、0.30、0.44、0.66、1.0 mg/mL
- ・ S9 mix 存在下の短時間処理 : 0.25、0.50、1.0、2.0、4.0 mg/mL
- ・ 24 時間連続処理 : 0.059、0.088、0.13、0.20、0.30、0.44、0.66、1.0 mg/mL

なお、2-tDCB を試験系に添加すると、0.13 mg/mL 以上の濃度で沈殿が認められた (図 31)。染色体分析に先立ち、分裂指数の分析を実施した結果、分析可能な最高濃度は、S9 mix 非存在下の短時間処理では 1.0 mg/mL、S9 mix 存在下の短時間処理では 4.0 mg/mL、24 時間連続処理では 0.44 mg/mL となった。したがって、それらの濃度を含む 3 濃度群について染色体分析を実施中である。



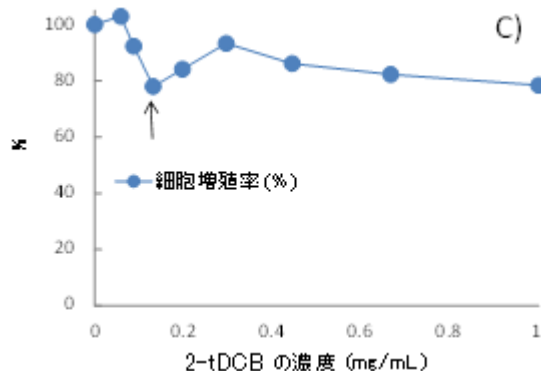


図 3 1 2-tDCB の染色体異常試験における増殖抑制作用

A: S9 mix 非存在下の短時間処理、B: S9 mix 存在下の短時間処理、
C: 24 時間連続処理、↑: 培養液中に 2-tDCB の沈殿が認められた濃度

2-dDCB については、染色体異常の誘発が認められなかったことから、その起源物質である PA の染色体異常試験は実施しなかった。また、2-tDCB については染色体分析が終了していないが、陽性の結果が得られた場合にはその起源物質である SA の染色体異常試験を実施する予定である。

2)-2 培養細胞を用いるコメットアッセイ

染色体異常試験と同時にコメットアッセイを実施した。染色体分析を実施した濃度群について、DNA 切断性を画像解析ソフトにより分析した結果、2-dDCB 及び 2-tDCB とともに DNA 切断性の指標である %DNA in tail の増加は認められなかった(図 32)。また、細胞毒性の指標として分析したヘッジホッグ (図 32) の出現頻度については、2-dDCB の最高濃度 (0.10 mg/mL) ではその頻度が上昇したが、それ以外では、ヘッジホッグの頻度の増加は認められなかった (図 32)。

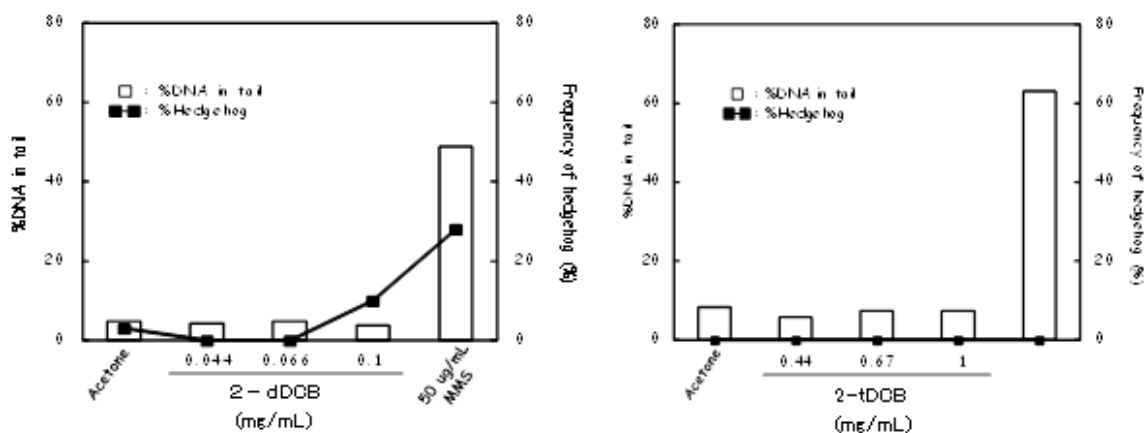


図 3 2 2-dDCB 及び 2-tDCB のコメットアッセイ結果

2)-3 培養細胞を用いる形質転換試験

Bhas42 細胞を用いる形質転換試験は、*in vitro* の二段階発がん性試験であり、遺伝毒性作用（イニシエーション作用）による発がん性と非遺伝毒性作用（プロモーション作用）による発がん性を検出することが可能であることから、2-dDCB のイニシエーション作用とプロモーション作用を検討した。また、その起源物質であるパルミチン酸（PA）についても同様にその作用を検討した。

2-dDCB 及び PA のイニシエーション試験では以下の濃度を設定し、対数増殖期に 3 日間処理した。

2-dDCB : 0.003、0.006、0.012、0.013、0.014、0.015、0.016、0.018、0.020 mg/mL

PA : 0.005、0.010、0.020、0.025、0.030、0.035、0.040、0.050、0.10 mg/mL

また、2-dDCB 及び PA のプロモーション試験では以下の濃度を設定し、増殖がほぼ停止した時期に 10 日間処理した。

2-dDCB : 0.003、0.006、0.012、0.013、0.014、0.015、0.016、0.018、0.020 mg/mL

PA : 0.0025、0.0030、0.0050、0.0075、0.010、0.020、0.025、0.030、0.035、0.050、0.10 mg/mL

その結果、2-dDCB 及び PA とともにイニシエーション作用を示さなかったが、陽性対照として用いた 3-methylcholanthrene（MCA）で処理した場合には明らかに形質転換巢の増加が認められた（図 33）。

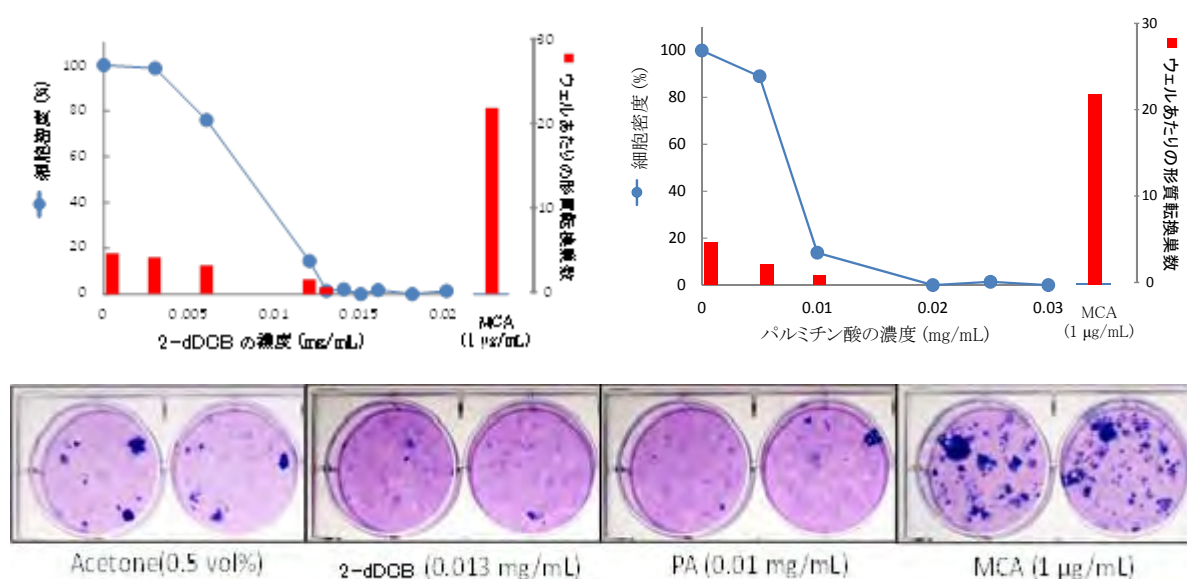


図 33 2-dDCB 及び PA のイニシエーション作用

一方、プロモーション作用については、2-dDCB は陽性対照物質である 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate（TPA）と同程度の形質転換巢を誘発し、起源物質である PA ではその誘発は認められなかった（図 34）。なお、2-dDCB のプロモーション作用については、2 回の実験で陽性の結果となることを確認した。

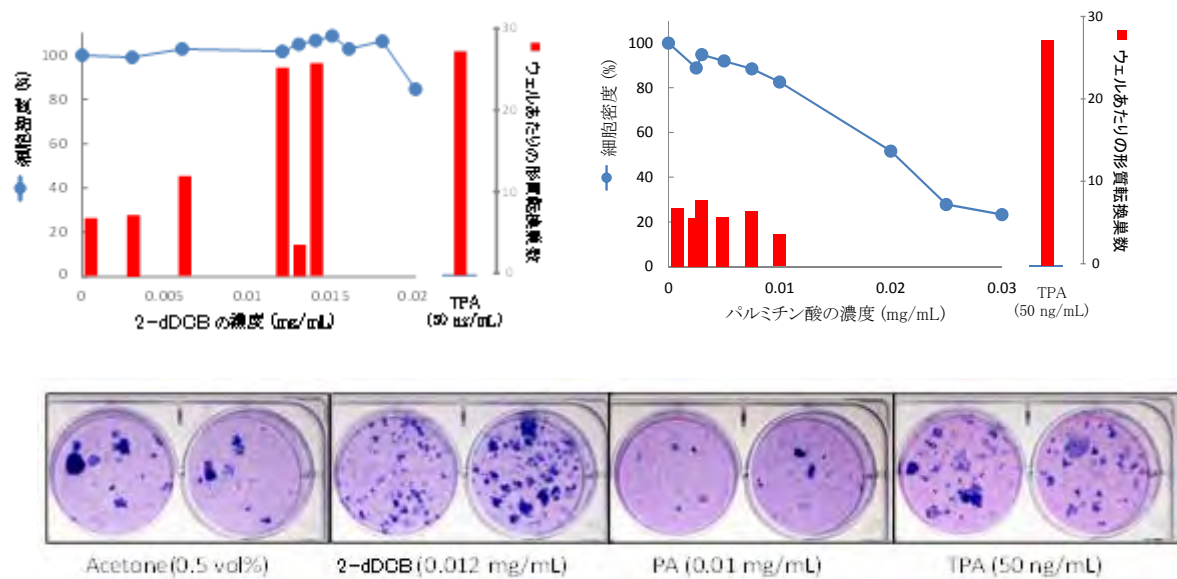


図 3 4 2-dDCB 及び PA のプロモーション作用

2-tDCB 及びその起源物質である SA のプロモーション試験については以下の濃度を設定して実施した。

2-tDCB : 0.000020、0.000039、0.000078、0.00016、0.00031、0.00063、0.0013、0.0025、0.0050、0.010、0.020 mg/mL (公比 2)

SA : 0.000098、0.00020、0.00039、0.00078、0.0016、0.0031、0.0063、0.013、0.025、0.050、0.10 mg/mL (公比 2)

その結果、2-tDCB についても 2-dDCB と同様に、陽性対照物質である TPA と同程度の形質転換巣を誘発し、起源物質である SA は形質転換巣を誘発しなかった (図 35)。

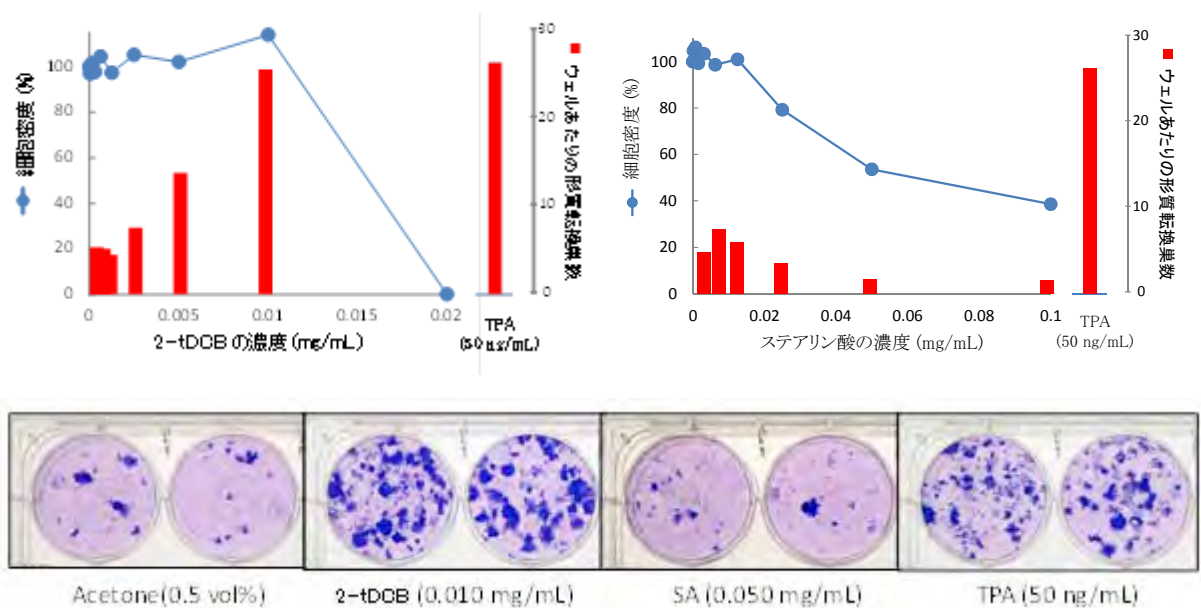


図 3 5 2-tDCB 及び SA のプロモーション作用

3) 考察及び結論

医薬品や食品の遺伝毒性作用を評価する場合のバッテリーとして、遺伝子レベルの変異を検出する細菌を用いる復帰突然変異試験、染色体レベルの変異を検出する培養細胞を用いる染色体異常試験及びほ乳類動物を用いる小核試験が一般的に行われている。

これまでに、2-dDCB 及び 2-tDCB の遺伝子レベルの変異誘発作用については、復帰突然変異試験により陰性の結果が得られており、我々のプロジェクトにおいても陽性の結果は得られていない。また、培養細胞を用いる試験について、公的試験法ガイドラインに従った試験結果は報告されていないが、ヒトの培養細胞を用いる小核試験で 2-dDCB が小核を誘発すると報告されているほか、コメットアッセイによる *in vitro* 及び *in vivo* での陽性結果が報告されている。今回これらの試験結果を確認するために、公的試験法ガイドラインに従って染色体異常試験を実施したが、2-dDCB については陰性の結果が得られた。同時に実施したコメットアッセイにおいても陰性の結果が得られていることから、2-dDCB には遺伝毒性作用は無いと考えられる。

2-tDCB についてはガイドラインで求められている増殖抑制作用が得られていないが、培養液中に沈殿が生じることにより現在得られているよりも強い増殖抑制作用を得ることは困難である。現在染色体分析結果が得られていないが、同時に実施したコメットアッセイの結果が陰性であることや他の試験結果においても陽性の結果は得られていないことから、2-tDCB の染色体異常誘発性も陰性の可能性が高いと考えられる。

また、Bhas42 細胞を用いる形質転換試験は、*in vitro* の二段階発がん性試験であり、遺伝毒性作用（イニシエーション作用）による発がん性と非遺伝毒性作用（プロモーション作用）による発がん性を検出することが可能であることから、2-dDCB のイニシエーション作用を調べたところ陰性の結果が得られ、染色体異常試験及びコメットアッセイの結果と一致した。一方、遺伝毒性試験では検出できないプロモーション作用については、2-dDCB 及び 2-tDCB とともに明らかに陽性の結果が得られた。2-dDCB については、その起源物質である PA が 2-dDCB と同様に *in vitro* で小核を誘発することが報告されている。そこで、2-dDCB 及び 2-tDCB の起源物質である PA や SA の形質転換試験を実施したが、PA についてはイニシエーション作用及びプロモーション作用とも認められず、SA については少なくともプロモーション作用は認められなかった。

以上のことから、2-dDCB 及び 2-tDCB は遺伝毒性誘発能を有さないことが示唆されるが、発がんにおけるプロモーション作用を有し、その作用は起源物質である PA または SA に放射線照射することにより形成されると考えられる閉環構造が関与していることが示唆された。

研究項目名 3 *In vivo* 試験による 2-ACBs の有害性の検討

(7) 個別課題名 キ ドデシルシクロブタノンのマウスを用いる小核試験

(担当：山影康次)

1) 当該年度の研究成果の要旨

In vitro における遺伝毒性作用に加え、*in vivo* の遺伝毒性作用として、マウスの骨髄細胞における小核試験により 2-tDCB の染色体異常誘発作用を調べた。その結果、昨年実施した 2-dDCB と同様に 2,000 mg/kg の用量においても陰性の結果が得られた。また、発がん性の標的臓器と考えられる大腸組織における DNA 傷害性を調べるために、小核試験に用いたマウスの大腸組織、及びラットの反復毒性試験で得られた大腸組織から DNA を抽出し、2-tDCB 投与による DNA 付加体の生成の有無を調べた。その結果、マウス大腸組織においては、昨年の 2-dDCB と同様に DNA 付加体の生成は認められなかった。また、2-tDCB を反復経口投与したラット大腸組織においても DNA 付加体の生成は認められなかった。

2) 研究成果

2)-1 マウス骨髄細胞を用いる小核試験

最高用量が 2,000 mg/kg となるように 2-tDCB を 2 日間強制経口投与したマウスの骨髄塗抹標本を用いて、幼若赤血球における小核の有無を分析した結果、2-tDCB 投与による小核出現頻度の有意な増加は認められなかった（表 22）。

表 22 2-tDCB (2-Tetradecylcyclobutanone) を経口投与した雄 CD1(ICR) マウスの骨髄細胞を用いた小核試験結果

群	用量 (mg/kg/day)	投与 回数	動物数	多染性赤血球数		MNPCES ^a ± S.D. (%)	ERYs ^b ± S.D. (%)
				網赤細胞	小核保有細胞		
陰性対照 (局方オリーブ油)	0 (10 mL/kg/day)	2	5	10000	9	0.09 ± 0.05	58.3 ± 4.6
2-tDCB	500	2	5	10000	12	0.12 ± 0.06	57.6 ± 9.5
	1000	2	5	10000	7	0.07 ± 0.08	63.3 ± 3.1
	2000	2	5	10000	6	0.06 ± 0.07	58.6 ± 7.2
陽性対照 (CP)	50	1	5	10000	236*	2.36 ± 0.80	51.6 ± 11.6

a. 小核を有する幼若赤血球の%

b. 赤血球中における幼若赤血球の%

CP, Cyclophosphamide monohydrate (単回経口投与)

*, 陰性対照群との間に有意差あり (1%水準)。

2)-2 マウス及びラット大腸組織における DNA 付加体（アダクト）生成試験

2-ACBs の発がん性の標的臓器と考えられる大腸組織から DNA を抽出し、DNA に生成された付加体（アダクト）生成の有無をポストラベル法、すなわち二次元で展開した PEI シートを X 線フィルムに露光・現像し、DNA 付加体生成により正常塩基とことなる移動を示したスポットの有無を目視により観察した。その結果、2-tDCB を投与したラット遠位大腸粘膜及びマウス結腸において、陰性対照群及び 2-tDCB 投与群のいずれの個体においても、スポットは認められなかったが、4-NQO 処理した CHL/IU 細胞においては陰性対照群では認められない特異的スポットが認められた（図 37）。

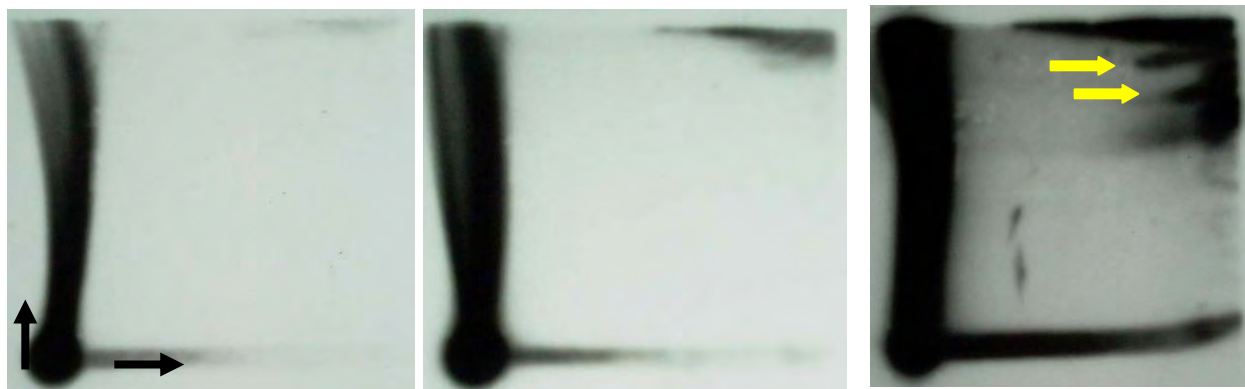


図 3 7 大腸組織のゲノム DNA における二次元 TLC 像

TS2-107 : 2-tDCB 投与したラット遠位大腸粘膜 (0.03% 90 日間反復経口投与群)
 21 : 2-tDCB 投与したマウス結腸 (2,000 mg/kg/day、2 回経口投与群)
 PC : 陽性対照 (4.8 μ g/mL 4NQO, CHL/IU 細胞)
 “ $\uparrow$ ” / “ $\rightarrow$ ” : 各展開方向を示す (代表として TS2-408 のみ記載)。
 黄色矢印 : DNA アダクト

3) 考察及び結論

2-dDCB は *in vitro* 及び *in vivo* で DNA 損傷を示すことが報告されていることから、それらの結果を確認するために、我々は *in vitro* に加え *in vivo* における DNA 損傷作用及び染色体異常誘発作用を調べた。

In vitro の遺伝毒性試験については、上述したように現在のところ 2-dDCB 及び 2-tDCB とともに遺伝毒性作用を示す結果は得られていない。また、*in vivo* の遺伝毒性作用についても、これまでの結果より、2-dDCB はマウスの結腸組織及び骨髄においてそれぞれ DNA 付加体及び小核 (染色体異常) を誘発しないことを示した。今回、我々は 2-tDCB についても、マウス骨髄に小核を誘発しないことも示した。また、発がんの標的臓器と考えられる大腸組織についても、昨年と同様にラットの大腸粘膜及びマウス結腸組織のゲノム DNA に DNA アダクトを形成しないことを示した。

以上のことから、放射線照射によって生成される 2-dDCB 及び 2-tDCB は *in vitro* 試験系のみならず、生体内においても DNA 損傷及び染色体異常を引き起こさないと考えられる。

(8) 個別課題名ク 2-ACBs の 90 日間亜急性毒性試験及びラットを用いた下部消化管二段階発がん試験 (担当：泉啓介)

1) 当該年度の研究成果の要旨

ラットを用いた 90 日間経口毒性試験において、雄では 0.006% で血清総蛋白量増加、0.03% で血清アルブミン増加、血漿グルコース減少が見られ、雌では 0.006% で血漿グルコース減少が見られた。雌雄とも何れの群においても摂餌量変化、体重増加抑制、各臓器の組織学的変化は観察されなかった。以上の結果から 2-tDCB の無毒性量

は雌雄とも 0.0012%（雄では 0.62 mg/kg 体重/日、雌では 0.67 mg/kg 体重/日）と考えられた。

2) 研究成果

表 23 に示すように雌雄とも白血球数は用量依存性の増加傾向が見られた。表 23 に示すように雄では 0.006%で血清総蛋白量増加、0.03%で血清アルブミン増加が見られた。表 24 に示すように雌雄とも臓器重量の変化はなかった。図 38 に示すように雌雄とも体重変化、摂餌量変化はなかった。図 39A に示すように雄では 0.03%で、雌では 0.006%で血漿グルコース減少が見られた。図 39B に示すように雌雄とも何れの群においても各臓器の組織学的変化は観察されなかった。図 40 に示すように雄では用量依存性の蓄積が見られた。雌では 0.03%群のみ測定したが、雄の蓄積量の 44.5%であった。

表 2 3 Hematological data of male and female rats given 2-dTCB for 13 weeks (n=6)

2-tDCB (%)	0	0.0012	0.006	0.03
<i>Male</i>				
RBC (x10 ⁴ /ml)	956±68 [†]	996±25	969±49	978±43
Hb (g/dl)	16.4±1.2	16.9±0.4	16.5±0.8	17.0±0.6
Ht (%)	51.0±3.6	53.2±1.6	50.8±3.0	52.0±2.2
MCV (fl)	53±1	54±1	53±1	53±1
MCH (pg)	17.1±0.3	17.0±0.4	17.1±0.3	17.4±0.4
MCHC (g/dl)	32.1±0.4	31.8±0.7	32.6±0.6	32.7±0.7
WBC (x10 ² /ml)	53±3	53±8	54±5	57±8
Neutrophil (%)	17±6	21±7	19±5	21±5
Monocyte (%)	5±3	5±4	7±4	5±2
Lymphocyte (%)	78±5	73±5	74±3	74±6
Plt (x10 ⁴ /ml)	72.3±6.0	75.7±3.3	71.4±3.2	78±4.7
Ret (%)	2.1±0.2	2.2±0.2	2.2±0.2	2.3±0.3
<i>Female</i>				
RBC (x10 ⁴ /ml)	855±82	828±57	837±80	858±59
Hb (g/dl)	16.7±0.1	16.6±0.6	16.6±0.4	16.7±0.2
Ht (%)	38.7±15.5	36.1±14.5	37.0±16.6	37.9±15.7
MCV (fl)	58±1	58±1	58±2	58±1
MCH (pg)	19.4±1.4	19.6±1.4	20.0±1.7	19.5±1.2
MCHC (g/dl)	31.7±0.2	31.9±0.3	31.9±0.4	32.1±0.6
WBC (x10 ² /ml)	31±4	40±6	42±10	44±9
Neutrophil (%)	20±7	18±5	14±4	16±3
Monocyte (%)	4±1	4±1	4±2	4±2

Lymphocyte (%)	76±8	78±5	82±3	80±5
Plt (x10 ⁴ /ml)	80.3±8.6	73.5±7.7	75.7±7.9	68.2±7.9
Ret (%)	2.4±0.3	2.3±0.2	2.3±0.1	2.4±0.3

†Mean±SD.

表 2 4 . Serum biochemical data of male and female rats given 2-tDCB for 13 weeks (n=8 to 9)

2-tDCB (%)	0	0.0012	0.006	0.03
<i>Male</i>				
TP (g/dl)	7.1±0.3 [†]	7.2±0.2	7.4±0.3 [‡]	7.5±0.3 [§]
Alb (g/dl)	4.6±0.1	4.6±0.1	4.7±0.1	4.8±0.2 [§]
A/G	1.8±0.1	1.8±0.1	1.8±0.1	1.8±0.1
T-Bil (mg/dl)	0.02±0.01	0.02±0.02	0.02±0.01	0.02±0.01
TG (mg/dl)	95±27	81±12	95±11	99±21
T-Chol (mg/dl)	63±6	64±4	67±4	64±6
BUN (mg/dl)	21.4±3.4	20.3±1.9	19.6±2.6	20.2±3.4
Cre (mg/dl)	0.34±0.01	0.33±0.02	0.34±0.02	0.34±0.02
UA (mg/dl)	1.8±0.3	1.5±0.4	2.3±1.0	2.2±0.6
Na (mEq/l)	148±2	147±2	149±1	148±1
Cl (mEq/l)	99±1	99±2	101±2	99±1
K (mEq/l)	5.7±0.4	5.9±0.3	5.6±0.4	5.8±0.5
Ca (mg/dl)	11.9±0.3	11.8±0.3	12.2±0.5	12.2±0.4
AST (IU/l)	80±8	87±15	76±5	77±11
ALT (IU/l)	68±11	68±9	66±8	67±19
ALP (IU/l)	436±59	435±46	436±20	424±37
<i>Female</i>				
TP (g/dl)	7.2±0.5	7.2±0.2	7.1±0.2	7.1±0.2
Alb (g/dl)	4.8±0.3	4.8±0.1	4.7±0.2	4.9±0.2
A/G	2.1±0.2	2.0±0.1	2.0±0.2	2.1±0.1
T-Bil (mg/dl)	0.04±0.02	0.04±0.01	0.04±0.02	0.02±0.02
TG (mg/dl)	58±24	55±11	60±17	62±17
T-Chol (mg/dl)	98±10	98±9	101±12	90±10
BUN (mg/dl)	21.9±2.9	22.7±3.8	22.1±2.0	21.7±3.1
Cre (mg/dl)	0.33±0.04	0.35±0.03	0.34±0.03	0.33±0.02
UA (mg/dl)	1.3±0.1	1.3±0.2	1.5±0.3	1.5±0.2
Na (mEq/l)	146±2	147±2	146±2	146±2
Cl (mEq/l)	100±2	101±2	101±2	101±2

K (mEq/l)	6.0±0.6	6.3±0.3	6.3±0.5	6.3±0.5
Ca (mg/dl)	11.5±0.3	11.7±0.3	11.5±0.3	11.4±0.4
AST (IU/l)	82±6	84±6	80±7	89±8
ALT (IU/l)	55±8	53±6	49±4	59±11
ALP (IU/l)	341±40	333±51	332±33	317±45

[†]Mean±SD.

^{‡,§}Significantly different from control at [‡]*P*<0.05 and [§]*P*<0.01, Dunnett's test.

表 2 5 . Absolute and relative organ weights of male and female rats given 2-tDCB for 13 weeks (n=12)

2-tDCB (%)	0	0.0012	0.006	0.03
<i>Male</i>				
<i>Absolute organ weight(g)</i>				
Brain	2.01±0.03 [†]	1.98±0.06	1.99±0.04	1.99±0.08
Thymus	0.26±0.03	0.26±0.02	0.26±0.03	0.26±0.01
Heart	1.07±0.05	1.03±0.05	1.04±0.06	1.08±0.07
Liver	8.59±0.87	8.71±0.58	8.38±0.36	8.57±0.67
Spleen	0.72±0.05	0.73±0.04	0.70±0.04	0.70±0.03
Kidneys	2.29±0.20	2.16±0.10	2.18±0.09	2.17±0.13
Adrenals	0.079±0.006	0.071±0.016	0.076±0.016	0.071±0.013
Testes	3.15±0.13	3.20±0.11	3.13±0.12	3.17±0.11
<i>Relative organ weight (%)</i>				
Brain	0.59±0.04	0.59±0.04	0.60±0.03	0.58±0.03
Thymus	0.08±0.01	0.08±0.01	0.08±0.01	0.08±0.01
Heart	0.31±0.02	0.30±0.01	0.32±0.01	0.32±0.01
Liver	2.52±0.06	2.57±0.13	2.54±0.05	2.54±0.14
Spleen	0.21±0.01	0.22±0.01	0.21±0.01	0.21±0.01
Kidneys	0.67±0.04	0.64±0.03	0.66±0.03	0.64±0.02
Adrenals	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.01	0.02±0.00
Testes	0.93±0.04	0.94±0.03	0.95±0.04	0.94±0.04
<i>Female</i>				
<i>Absolute organ weight(g)</i>				
Brain	1.80±0.06	1.81±0.04	1.83±0.04	1.82±0.04
Thymus	0.18±0.02	0.19±0.04	0.19±0.02	0.19±0.02
Heart	0.63±0.02	0.64±0.03	0.64±0.03	0.64±0.03

Liver	4.24±0.15	4.41±0.29	4.32±0.29	4.30±0.33
Spleen	0.43±0.02	0.45±0.02	0.44±0.03	0.45±0.04
Kidneys	1.19±0.06	1.17±0.09	1.16±0.02	1.17±0.06
Adrenals	0.066±0.012	0.068±0.010	0.063±0.009	0.066±0.009
Ovaries	0.12±0.02	0.12±0.02	0.11±0.01	0.12±0.01

Relative organ weight (%)

Brain	1.02±0.05	1.02±0.04	1.03±0.04	1.03±0.05
Thymus	0.10±0.01	0.10±0.02	0.10±0.01	0.11±0.01
Heart	0.36±0.01	0.36±0.01	0.36±0.02	0.36±0.02
Liver	2.42±0.05	2.47±0.10	2.42±0.10	2.45±0.14
Spleen	0.24±0.02	0.25±0.01	0.25±0.01	0.25±0.01
Kidneys	0.68±0.03	0.66±0.04	0.65±0.03	0.66±0.03
Adrenals	0.04±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.04±0.00
Ovaries	0.07±0.01	0.07±0.01	0.06±0.01	0.07±0.01

†Mean±SD.

図 3 8 90日経口毒性試験における体重曲線および摂餌量

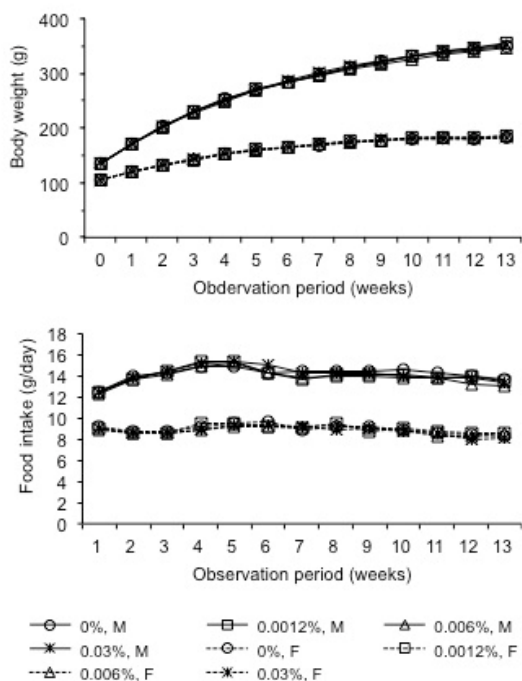


図 3 9 90日経口毒性試験における空腹時血糖及び組織像(肝臓、脾臓) * : $P < 0.05$

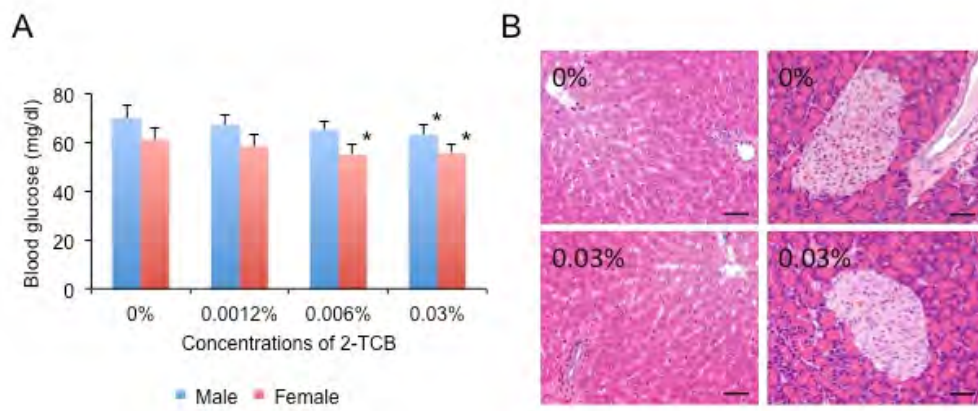
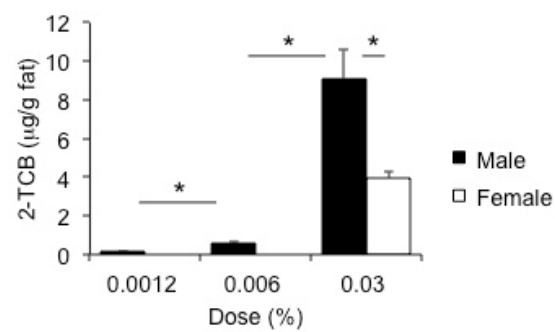


図 4 0 90日経口毒性試験の後腹膜脂肪組織における2-テトラシクロブタンン蓄積量 * : $P < 0.001$



3) 考察及び結論

ラットを用いた 90 日経口毒性試験における 2-テトラデシルシクロブタノンの無毒性量は雌雄とも 0.0012% (雄では 0.62 mg/kg 体重/日、雌では 0.67 mg/kg 体重/日) と考えられた。

3 3年間の主な研究成果

研究項目名 1 放射線照射による 2-ACBs の定量法と生成量の確定

(1) 個別課題ア 天然食品中の 2-ACBs. (担当:等々力節子)

1) 3年間の研究成果の要旨

2-ACBs の天然存在の報告されているナツメグ (5 ロット) 及びカシューナッツ (2 ロット) について、2-ACBs が検出できるか否かの検討を行った。試料前処理法を検討し、HRGC-MS により、ナツメグに添加した 0.016 $\mu\text{g/g}$ の 2-DCB, 0.032 $\mu\text{g/g}$ の 2-dDCB 及び、カシューナッツに添加した、0.004 $\mu\text{g/g}$ の 2-dDCB, 0.008 $\mu\text{g/g}$ の 2-tDCB, 0.034 $\mu\text{g/g}$ の 2-tDeCB の検出に成功したが、同時に分析した未照射 (無添加) 試料では、いずれの 2-ACBs も検出されなかった。以上から、天然 (未照射) のナツメグ及び、カシューナッツにおける 2-ACBs の存在は、確認できないと結論した。

2) 考察及び結論

天然 (非照射品) のナツメグ、カシューナッツ中での 2-ACBs の存在は、本試験で入手可能な検体では、確認することはできなかった。2008 年末の当該論文以外に、非照射の天然物中に 2-ACBs が存在すると報告した論文は報告されておらず、2-ACBs は食品照射に用いられるガンマ線などの放射線照射により食品中に特異的に生成する化合物であると判断した。

(2) 個別課題イ 放射線照射食品中の 2-ACBs の含有量 (担当:等々力節子)

1) 3年間の研究成果の要旨

ナツメグ及びカシューナッツのガンマ線照射による、2-ACBs の生成効率を検討したところ、「1.2~3.6 nmole/mole 脂肪酸/kGy」であった。2012 年末までに、(照射) 食品中の 2-ACBs の定量に関連する論文を約 70 報収集した。非照射食品中に 2-ACBs が存在することを報告した 1 件の論文を除き、2-ACBs の検出は放射線照射試料においてのみ報告されていた。2-ACBs の生成効率は、カカオ豆などの例外を除き、脂肪酸や食品の種類によらず、線量 1 kGy あたり 1~3 nmole/mole 脂肪酸となるものが多かった。また、室温保存に於いては、照射後貯蔵中に 2-ACBs が分解し、濃度減少する例が多数報告されていた。

2) 考察及び結論

食品中の 2-ACBs の照射による生成量は、前駆脂肪酸量に対して 1 kGy で、 10^{-7} ~ 10^{-5} のオーダーであり、その生成効率は、高いとは言えない。

(3) 個別課題ウ 2-ACB 類の安定性評価 (担当: 等々力節子)

1) 3 年間の研究成果の要旨

2-dDCB 及び、2-tDCB の溶解性は、アセトン、オリブ油の溶解性は約 200 mg/ml で可溶。2-dDCB の DMSO に対する溶解性は、50 mg/ml >, tDCB はさらに難溶であった。これらの化合物の DMSO 及びアセトン中での安定性は、室温保存 4 日程度でも十分確認できた。一方、オリブ油中に溶解した 2-dDCB は、24 時間後で 92%, 72 時間後で 74% まで減少した。動物飼料に混合した 2-tDCB は、ほぼ目標濃度に均一に混合され、給餌してから 72 時間後も調製時点と同程度の濃度で餌中に残存していることを確認した。また、粉食に混餌して経口投与した 2-tDCB は、その投与濃度に応じて、ラットの脂肪組織中に移行蓄積しており、用いた試験系で腸管を介した吸収が行われたことが、証明された。

2) 考察及び結論

溶解性試験と安定性の結果より、*in vitro* 試験の被験液の溶媒はアセトンとした。また、*in vivo* 小核試験の 2-dDCB オリブ油溶液は、調製後 24 時間以内に使用することとした。オリブ油中での分解の詳細については、食品中の 2-ACBs の存在動態にも関連するので、可能であればさらに検討したい。また、ラットの体内移行については、消化管から吸収されたのち、複雑な移行経路をたどる可能性があるため、今後さらに検討を要する。

研究項目名 2 *in vitro* 試験による 2-ACBs の有害性の検討

(4) 個別課題名エ 2-ACBs のアポトーシスに関する検討遺伝子発現変化を指標とした安全性評価とそれらの分子機構の解明 (担当: 古田雅一、近藤隆)

(5) 個別課題名オ 2-ACBs の遺伝子発現変化に関する検討 (担当: 古田雅一、近藤隆)

1) 3 年間の研究成果の要旨

ヒトリンパ腫細胞株 U937 を用いて、アルキルシクロブタノン類の親脂肪酸である PA (パルミチン酸) 及び SA (ステアリン酸) によるアポトーシスを調べたところ、濃度依存性アポトーシス誘導が確認された。さらに、2-dDCB 及び 2-tDCB はより低濃度でアポトーシスを誘導することが判明した。一方、PA 及び SA に放射線照射 (30 kGy) し、これらによるアポトーシスを調べたところ、有意なアポトーシス増加はなかった。さらに、アポトーシスの分子機構を探る目的で、アポトーシス関連分子、ミトコンドリア膜電位、細胞膜への Fas の発現、細胞内活性酸素の生成、同カルシウムイオン濃度について調べた。その結果、2-dDCB 及び 2-tDCB は細胞内活性酸素生成及び Fas の発現を増加させ、それにより、アポトーシス-ミトコンドリア経路を活性化し、アポトーシスを誘導することが判明した。加えて、Fura-2 を用いて細胞内カルシウムイオン濃度変化を蛍光画像解析法にて、経時的に調べたところ、カルシウムイオン濃度の増加が認められた。

2) 考察及び結論

本研究における今年度の検討から、PA（パルミチン酸）及びSA（ステアリン酸）による濃度依存性アポトーシス誘導が確認された。2-dDCB 及び 2-tDCB については、親脂肪酸よりも低濃度でアポトーシスを誘導することが判明した。一方、PA 及び SA に放射線を照射した場合、アポトーシス増加はみられなかった。

2-ACBs が細胞に及ぼすアポトーシスの分子機構を探る目的で、ヒトリンパ腫細胞株 U937 を用いてアポトーシス関連分子、ミトコンドリア膜電位、細胞膜への Fas の発現、細胞内活性酸素の生成、同カルシウムイオン濃度について調べた。その結果、2-dDCB 及び 2-tDCB は細胞内活性酸素生成及び Fas の発現を増加させ、それにより、アポトーシス-ミトコンドリア経路を活性化し、アポトーシスを誘導することが判明した。加えて、細胞内活カルシウムイオンの増加もその一因となることが示唆される。これらのデータを総括し、2-dDCB 及び PA に関するアポトーシス機構を明らかにし、これを *Apoptosis* に公表した。今後は異なる細胞種を用いた検討、アポトーシスについて GeneChip 及び Ingenuity Pathway Analysis Tool Software を用いて網羅的遺伝子発現変化及び遺伝子間相互作用の検討、及び変化のあった遺伝子についてのリアルタイム PCR によるその発現変化の確認により、より詳細な作用機序が明らかになる可能性がある。

（6）個別課題名力 2-ACBs の遺伝毒性評価及び *in vitro* 発がん性評価

（担当：古田雅一、山影康次）

1）3 年間の研究成果の要旨

2-dDCB、2-tDCB 最大濃度 8 mM までのエタノール溶液に対して TA100, TA98 株を用いた Ames 試験は全て陰性であった。2-dDCB は、染色体異常も DNA 切断も誘発しなかった。しかしながら、コメットアッセイでは、分析した最高濃度（0.10 mg/mL）で細胞毒性の指標であるヘッジホッグの頻度が上昇した。2-tDCB についても DNA 切断の誘発は認められなかった。

Bhas42 細胞を用いる *In vitro* 形質転換試験を実施する前に、2-dDCB、パルミチン酸及びステアリン酸の本試験条件下における Bhas42 細胞に対する毒性作用を調べた。その結果をもとに、イニシエーション試験では、10～50%相対細胞増殖率を示すと考えられる濃度を 2 濃度以上、50～80%の相対細胞増殖率を示すと考えられる濃度を 2 濃度以上及び 80%以上の相対細胞増殖率を示すと考えられる濃度を 1 濃度以上設定し、プロモーション試験では、80%以上の相対細胞増殖率を示すと考えられる濃度を 2 濃度以上、50～80%の相対細胞増殖率を示す濃度を 2 濃度以上、50%以下の相対細胞増殖率を示すと考えられる濃度を 1 濃度以上設定し、それぞれの試験を行った。

その結果、形質転換試験においても、イニシエーション作用は認められず、染色体異常試験及びコメットアッセイの結果と一致した。しかし同じ培養細胞を用いたプロモーション試験では明らかに形質転換巣が増加し、2-dDCB、2-tDCB はこの試験条件下ではプロモーション作用を示すことが示された。2-dDCB の起源物質であるパルミチン酸、2-tDCB の起源物質であるステアリン酸はプロモーション作用を示さなかった。

2) 考察及び結論

医薬品や食品の遺伝毒性作用を評価する場合のバッテリーとして、遺伝子レベルの変異を検出する細菌を用いる復帰突然変異試験、染色体レベルの変異を検出する培養細胞を用いる染色体異常試験及びほ乳類動物を用いる小核試験が一般的に行われている。

これまでに、2-dDCB 及び 2-tDCB の遺伝子レベルの変異誘発作用については、復帰突然変異試験により陰性の結果が得られており、我々のプロジェクトにおいても陽性の結果は得られていない。また、培養細胞を用いる試験について、公的試験法ガイドラインに従った試験結果は報告されていないが、ヒトの培養細胞を用いる小核試験で 2-dDCB が小核を誘発すると報告されているほか、コメットアッセイによる *in vitro* 及び *in vivo* での陽性結果が報告されている。今回これらの試験結果を確認するために、公的試験法ガイドラインに従って染色体異常試験を実施したが、2-dDCB については陰性の結果が得られた。同時に実施したコメットアッセイにおいても陰性の結果が得られていることから、2-dDCB には遺伝毒性作用は無いと考えられる。

2-tDCB についてはガイドラインで求められている増殖抑制作用が得られていないが、培養液中に沈殿が生じることにより現在得られているよりも強い増殖抑制作用を得ることは困難である。現在染色体分析結果が得られていないが、同時に実施したコメットアッセイの結果が陰性であることや他の試験結果においても陽性の結果は得られていないことから、2-tDCB の染色体異常誘発性も陰性の可能性が高いと考えられる。

また、Bhas42 細胞を用いる形質転換試験は、*in vitro* の二段階発がん性試験であり、遺伝毒性作用（イニシエーション作用）による発がん性と非遺伝毒性作用（プロモーション作用）による発がん性を検出することが可能であることから、2-dDCB のイニシエーション作用を調べたところ陰性の結果が得られ、染色体異常試験及びコメットアッセイの結果と一致した。一方、遺伝毒性試験では検出できないプロモーション作用については、2-dDCB 及び 2-tDCB とともに明らかに陽性の結果が得られた。2-dDCB については、その起源物質である PA が 2-dDCB と同様に *in vitro* で小核を誘発することが報告されている。そこで、2-dDCB 及び 2-tDCB の起源物質である PA や SA の形質転換試験を実施したが、PA についてはイニシエーション作用及びプロモーション作用とも認められず、SA については少なくともプロモーション作用は認められなかった。

以上のことから、2-dDCB 及び 2-tDCB は遺伝毒性誘発能を有さないことが示唆されるが、発がんにおけるプロモーション作用を有し、その作用は起源物質である PA または SA に放射線照射することにより形成されると考えられる閉環構造が関与していることが示唆された。

研究項目 3 *In vivo* 試験による 2-ACBs の有害性の検討

(7) 個別課題名キ ドデシルシクロブタノンのマウスを用いる小核試験

(担当：山影康次)

1) 3 年間の研究成果の要旨

2-dDCB の生体内における染色体異常誘発性の有無を検討するために、雄の CD1 (ICR) マウスを用いて経口投与による小核試験を実施した。

4用量 (250、500、1,000 及び 2,000 mg/kg/day) の 2-dDCB 投与群を設定し、2 回投与による小核試験を実施した。3 用量 (500、1,000 及び 2,000 mg/kg/day) 群について分析した結果、2-dDCB 投与による小核出現頻度の有意な増加は認められなかった。一方、陽性対照群 (cyclophosphamide monohydrate 投与群) の小核出現頻度は 1% 水準で有意な増加が認められ、本試験系の妥当性が確認された。なお、赤血球中に占める幼若赤血球の比率には、陰性対照群 (日局オリブ油投与群) とそれ以外の群との間に有意な差は認められなかった。2-tDCB に関しても 2-dDCB と同様に 2,000 mg/kg の用量においても陰性の結果が得られた。

In vivo における 2-ACBs の DNA 損傷性を調べるために、2-dDCB の骨髓細胞を用いる小核試験に使用したマウスの大腸組織、及び、2-tDCB の中期二段階発がん性試験に使用したラットの大腸の正常組織から DNA を抽出し、ポストラベル法によるアダクト試験を実施した。今回は、感度が高いとされているヌクレアーゼ PI 法及びブタノール抽出法により 2-dDCB または 2-tDCB が発がんの標的臓器である大腸組織において DNA 付加体形成の有無を調べた。その結果、2-dDCB 及び 2-tDCB による DNA 付加体生成は認められなかった。また、2-tDCB を反復経口投与したラット大腸組織においても DNA 付加体の生成は認められなかった。

2) 考察及び結論

2-dDCB を用いた小核試験においては、マウスでは 2,000 mg/kg というかなり高用量を経口投与しても骨髓細胞に染色体異常誘発作用を示さなかった。この試験に使用したマウスの結腸組織の DNA における DNA アダクト形成の有無を調べたが、DNA アダクト形成は認められなかった。この結果は、2-dDCB を投与した骨髓において小核誘発が認められなかったことと一致する結果であった。また 2-tDCB についても、マウス骨髓に小核を誘発せず、大腸組織についてもゲノム DNA に DNA アダクトを形成しないことを示した。

以上のことから、放射線照射によって生成される 2-dDCB 及び 2-tDCB は *in vitro* 試験系のみならず、生体内においても DNA 損傷及び染色体異常を引き起こさないと考えられる。

(9) 個別課題名ク 2-ACBs の 90 日間亜急性毒性試験及びラットを用いた下部消化管二段階発がん試験 (担当: 泉啓介、松本耕三)

1) 3 年間の研究成果の要旨

90 日間亜急性毒性試験では 2-tDCB を 0%, 0.001%, 0.005%, 0.01% の濃度で粉末食として雄 F344 ラットに混餌投与し、13 週で屠殺した (n=12)。全試験期間を通じて群間に体重及び摂餌量の差はみられなかった。肝臓、腎臓、脾臓の比重量、血清学的検査でも差はみられなかった。さらに濃度を 0.03% まで高めて再試験を行ったところ、雄では 0.006% で血清総蛋白量増加、0.03% で血清アルブミン増加、血漿グル

コース減少が見られ、雌では0.006%で血漿グルコース減少が見られた。雌雄とも何れの群においても摂餌量変化、体重増加抑制、各臓器の組織学的変化は観察されなかった。以上の結果から 2-テトラデシルシクロブタノンの無毒性量は雌雄とも0.0012%（雄では0.62 mg/kg 体重/日、雌では0.67 mg/kg 体重/日）と考えられた。

下部消化管二段階発がん試験は、雄 F344 ラット（n=30）に 15 mg/kg のアゾキシメタンを 6 週齢から 3 回皮下注射し、第 3 週から第 28 週まで 2-テトラデシルシクロブタノン（0%, 0.001%, 0.005%, 0.025%）を混餌投与した。下部消化管腫瘍の発生頻度、腫瘍の個数に群間差はなく、今回の実験条件では 2-テトラデシルシクロブタノンは発がん促進作用を示さないことが明らかになった。さらに Raul, F らの研究より高濃度（5 倍）の 2-tDCB を用い、一群の動物数も 5 倍に増やして下部消化管二段階発がん試験を行ったが、2-tDCB は発がん促進作用を示さなかった。

2) 考察及び結論

研究期間内に行った 2 回の 90 日間亜急性毒性試験の結果、ラットを用いた 90 日経口毒性試験における 2-テトラデシルシクロブタノンの無毒性量は雌雄とも0.0012%（雄では0.62 mg/kg 体重/日、雌では0.67 mg/kg 体重/日）と考えられた。

下部消化管二段階発がん試験においては先行研究において用いられた混餌濃度より高濃度の条件（0.025%）においても陰性であり、少なくとも 2-tDCB については安全性に問題ないものと考えられる。

4 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト（3 年分）

- 1) Chen, S., Tsutsumi, T., Takatsuki, S., Matsuda, R., Kameya H., Nakajima, M., Furuta, M., Todoriki, S. Identification of 2-alkylcyclobutanones in nutmeg (*Myristica fragrans*). Food Chemistry (2012), doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.176
- 2) Chen, S., Tsutsumi, T., Takatsuki, S., Matsuda, R., Kameya H., Saito, K., Furuta, M., Todoriki, S., Identification of 2-Alkylcyclobutanones in cashew nut (*Anacardium occidentale*), 食品照射 47 巻 pp19-28 (2012)
- 3) Yu D-Y, Zhao Q-L, Furuta M, Todoriki S, Izumi K, Yamakage K, Matsumoto K, Nomura T, Kondo T: Molecular mechanisms of apoptosis induction by 2-dodecylcyclobutane, a radiolytic product of palmitic acid, in human lymphoma U937 cells. Apoptosis Volume 17, Issue 6 (2012), Page 636-645. 別添資料
- 4) Yamakage, et al., Genotoxicity and in vitro carcinogenicity of 2-alkylcyclobutanones derived from irradiated foods (論文作成中)
- 5) Sato, M., Izumi, K., et al. A 90-day oral toxicity test and azoxymethane-induced carcinogenesis of 2-tetradecylcyclobutanone, a radiolytic product of stearic acid, in F344 rats. (論文作成中)

5 本研究を基にした学会発表の実績（3 年分）

- 1) 陳蘇蘇, 亀谷宏美, 齊藤希巳江, 等々力節子, 照射ナツメグにおける 2-アルキルシクロブタノンの測定, 第 46 回 日本食品照射研究協議会 教育講演/討論会 講演要旨 p22-23 (2010. 12. 3)
- 2) Todoriki, S., Kameya, H., Ukai, M., Current States on Detection Methods of Irradiated Food in Japan. KAERI International Symposium on Food Irradiation 100, 241-244, (2011. 05. 17)
- 3) Furuta, M., Izumi, K., Yamakage, K., Todoriki, S., Kondo, T., Matsumoto, K., Safety analysis of 2-alkylcyclobutanone derived from irradiated foods as a unique radiolytic product International Meeting on Radiation Processing (IMRP Montreal 2011), Hilton Montreal Bonaventure, Canada, June 13-16, 2011, Final Programme and Book of Abstract, pp. 86.
- 4) 泉 啓介、上原久典、放射線照射によって生成する 2-テトラデシルシクロブタノンの安全性、第 27 回日本毒性病理学会 平成 23 年 1 月 27、28 日 大阪、抄録集 84 頁
- 5) Chie Takasu, Tetsuyuki Takahashi and Keisuke Izumi Evaluation and oral toxicity and intestinal two-stage carcinogenesis of 2-tetradecylcyclobutanone in rats. 第 71 回日本癌学会学術総会 平成 24 年 9 月 19-21 日 札幌 抄録集 194 頁
- 6) 山影康次 他、第 41 回日本環境変異原学会 平成 24 年 11 月 (発表予定)
- 7) 古田雅一, 2-アルキルシクロブタノン類を指標とした照射食品の安全性試験、第 48 回 日本食品照射研究協議会大会 教育講演会 (2012. 11. 30) (発表予定)

6 特許及び特許出願の数と概要

該当なし

7 その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）の実績

該当なし

8 今後の問題点等

なお、2-ACBs が、放射線照射特異的分解生成物であるか否かは、この化合物を指標とした照射食品の検知法の妥当性の観点でも重要な意味を持っており、2012 年 3 月末に実施されたヨーロッパ標準委員会 TC275WG8（照射食品検知法 EN 規格の改訂についての作業部会）会合にも印刷中の論文の情報を提供した。同部会は、天然存在の確認についてさらに情報を集めることを決定している。なお、本研究において天然存在の報告を行ったインドの研究者に、分析試料の提供を依頼したが提供を受けることはできなかった。

食品照射のリスク評価の一部として、照射食品中に存在する 2-ACBs の毒性発現について検討する場合、照射食品中からの 2-ACBs の暴露量評価が必須である。食品照射の実施は基本的には限定的であり、すべての食品が照射されることはありえない。また、照射の目的により設定される照射条件（特に線量と照射温度）については幅があり、対

象食品と線量を限定しないと、現実的には暴露量評価は不可能である。ただし、国民栄養調査の実績を基礎に、1日に摂取脂肪酸のすべてが3 kGy程度(畜肉製品の冷蔵殺菌の線量)で照射されているとの仮定を設けても、1日あたりの2-ACBsの摂取総量の推定値は10 $\mu\text{g/kg/day}$ に満たない。したがって、本研究の中で実施している動物試験の用量設定は、実際の照射食品から予想される2-ACBsの摂取量に比べて十分なマージンを持っていると判断される。

本研究においては3年間という研究期間と研究予算の制約上すべての放射線照射食品中に生じる2-ACBsのうち代表的な2-dDCBと2-tDCBにおいてさえも十分な試験を行うことができなかった。例えば*in vitro*の遺伝毒性試験においては2-tDCBの染色体分析を完了させることが必要である。また、2-dDCBについては、コメットアッセイで陽性の結果が報告されているが、我々の結果では細胞毒性と考えられるヘッジホッグは観察されたものの、コメットアッセイ結果は陰性である。この不一致の可能性として、apoptosisの結果、すなわちヘッジホッグの結果を陽性と判定している可能性が高いことから、我々の試験系におけるアポトーシスの誘発について検討する必要がある。さらにラットを用いた2-tDCBに対する90日間亜急性毒性試験において有意な血液データの変化が見られたので、より長期の毒性試験を行う必要がある。また2-dDCBについての毒性試験、発がん試験を行う必要がある。また今回2-dDCBと2-tDCBを投与したマウス、ラットの標的臓器とされる大腸組織において遺伝毒性が見られず、また2段階発がんプロモーション試験に供したラットの脂肪組織に2-tDCBが存在していることから腸管を介した2-tDCBの吸収の証拠を得た。これらのことから2-tDCB腸管に対して遺伝毒性は示さない可能性が示唆されたが、これについても他の2-ACBsも含めて体内での薬物代謝経路についてのより多くの知見を基にさらに詳しく検証する必要がある。さらに2-ACBsの生殖/発生毒性についても今後考慮すべきであろう。