

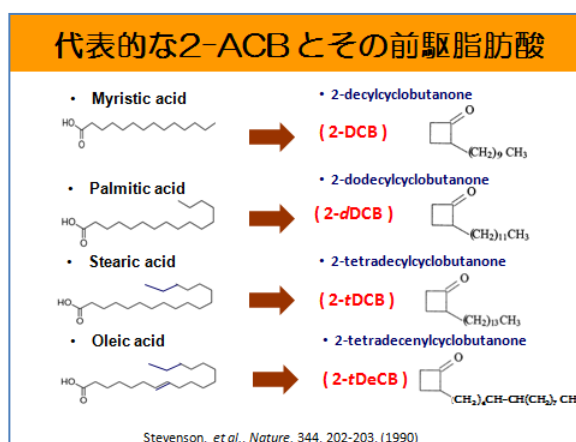
2-アルキルシクロブタノン類を指標とした照射食品の安全性解析

大阪府立大学 地域連携研究機構
放射線研究センター

古田 雅一

1. はじめに

2-アルキルシクロブタノン類 (2-ACBs) は、脂肪の放射線分解生成物として照射検知の研究の過程で食品中に同定された、脂質を構成する脂肪酸より炭素数が4つ少ないアルキル基を側鎖に持つ環状ケトンである。照射食品中では、前駆体となる脂質の脂肪酸組成に応じたアルキル側鎖を有する2-ACBs が、線量に直線的に依存して生成する。(Ndiaye 1999, Obana 2008) 食品での含有量は、パルミチン酸由来の2-dodecylcyclobutanone で、鶏肉 100g あたり 12.9 μ g 程度 (3kGy 照射を仮定) である。(Health Canada 2002)



1998年、純粋化合物の2-アルキルシクロブタノン類を高濃度用いたDNAコメットアッセイの結果、DNA鎖切断の増加が認められ、遺伝毒性の可能性があるとの実験結果が報告された。(Delincee 1999) さらに1999-2001年にドイツとフランスの合同チームのプロジェクト研究(Burnouf 2002)により、そのもの自体には発がん性はないが、発がん物質を同時に投与した場合にその発がん性を促進するプロモーション活性の可能性が見出された。(Raul 2002) この時の実験条件は、3.2 mg/kg 体重/day という、非常に高濃度の1用量のみの実験(動物数6匹)であった。これに対して、WHOおよびEU食品科学委員会(EU-SCF)は、実際の照射食品中での生成量は極めて微量であり、過去に行われた59kGy照射された冷凍鶏肉による動物(マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ビーグル犬)飼育試験で発がんなどの異常は認められなかったこと(Thayer 1987)、純粋な2-ACBsのエームス試験による変異原性は認められなかったことから、照射食品中の2-ACBsを問題視する必要はないという見解を示した(WHO 2003, European Commission 2002)。そのためその後、国際機関等が2-ACBsを動物に投与してのさらなる毒性試験を主導することはなかったが、2-ACBsの毒性に関する限られた情報が、照射食品に不安を持つ人々の懸念を大きくする状況が続いていた。

我々は、照射食品中に含まれる2-ACBsの遺伝毒性や発がんプロモーション活性の可能

性について より明確な科学的知見を得ることを目的として、食品安全委員会が助成する公募型の研究事業に応募し、2009-2011 年度の 3 年間の研究の機会を与えられた。本講演では、その成果の概要を紹介する。

2. 先行研究

我々のプロジェクト研究の開始時までに、純粋な 2-ACBs の合成品を用いて得られた毒性試験のおおまかな概要は以下のとおりである。

A. 遺伝毒性 (インビトロ試験)

試験	結果	文献
・細菌による変異原性試験 復帰突然変異 (エームス試験)	陰性	Hartwig 2007, Sommers 2004, Gadgilh 2004
(<i>E.coli</i> TRP Reverse Mutation)	陰性	Sommers 2003
・哺乳類細胞を用いた変異原性試験 (マウスリンフォーマアッセイ)	陰性	Sommers 2006a
・哺乳類細胞を用いた染色体異常試験 24 色 FISH 試験 (LT97 adenoma cell)	陽性	Knoll 2006
・小核試験 (Human TK6 Lymphoblast)	陽性	Sommers 2006b
・DNA コメットアッセイ	陽性	Knoll 2006 Marchioni 2004
	陰性	Hartwig 2007
・酸化的 DNA 障害	陽性	Hartwig 2007

B. 遺伝毒性 (インビボ試験)

試験	結果	文献
・ラットにおける結腸細胞のコメットアッセイ	高用量のみ 陽性	Delincee 1999

C. ラット大腸 2 段階発がんモデル系における AOM 誘導発がんプロモーション試験

試験	結果	文献
・ラット 2 段階発がんモデルによる AOM 誘導 大腸発がんプロモーション試験 (3.2 mg/kg/day)	陽性 (n=6)	Raul 2002

このように、過去の試験で遺伝子突然変異原性の可能性はすべての試験で否定されてい

るものの、哺乳類培養細胞を用いたインビトロでの遺伝毒性試験により 2-ACBs には弱い DNA 損傷性が認められる傾向が報告されていた。また、ラットにアゾキシメタン (AOM) を投与することにより、あらかじめ、遺伝子変異を誘発させておいたラットに 2-tDCB および 2-tDeCB を投与した場合、すなわち大腸 2 段階発がんプロモーション試験においては、高用量での発がんプロモーションの可能性が示唆されていた。

インビボ遺伝毒性に関しては、正常な細胞は DNA 初期損傷を修復する機能を有していることから、DNA 初期損傷が必ずしも遺伝的変異として固定するとは限らない。しかし、これまでコメットアッセイによる DNA 初期損傷性以外に動物に 2-ACBs を経口投与した際の遺伝毒性は検討されていなかった。また、発がんプロモーション活性の可能性を示した試験についても、被験動物数が 1 群 6 匹と少なく、用量もヒトが照射食品を摂取する際に想定される 2-ACBs の濃度に比べてはるかに大きな量が 1 段階で設定されているのみで、複数の用量段階を設定して無作用量を決定するような実験は行われていなかった。

3. 2-ACBs の放射線照射特異性

2-ACBs は、放射線照射に特異的に生成するする化合物とされてきた。(Boyd 1991, Ndiaye 1999) それゆえ、照射検知のマーカーとして利用できると考えられ、コーデックス標準分析法に採択された EN1785 は、各国で有効に利用されてきた。しかし、2008 年末にインドの研究者から天然のナツメグおよびカシューナッツから 2-ACBs を検出したとの報告がなされた。(Variyar 2008) これまで、2-ACBs の毒性学的安全性が問題にされてきた理由は、この化合物が放射線照射食品にのみ特異的に存在する放射線特異的分解生成物であることによる。もしも、天然の非照射品に存在する化合物であれば、長年、食してきた実績がある化合物としてその毒性に注目する必要性は薄くなる。また、照射検知のマーカー化合物としての有用性についても再検討が必要となる。現在までに、この報告以外には非照射の天然物から 2-ACBs を検出した報告は無い。われわれのプロジェクト研究においても、2-ACBs が天然物に存在するか否かの再確認が求められた。そこで、起源の異なるナツメグ 5 種とカシューナッツ 2 種について、高分解能ガスクロマトグラフマスペクトルメトリーを用いた新しい高感度分析法を適用しての確認を実施したが、いずれの非照射品にも 2-ACBs の存在を確認することはできなかった。(Chen 2012a, Chen 2012b) そこで、このプロジェクト研究においては、2-ACBs は照射食品に特異的に存在するものとして、純粋な 2-ACBs の毒性評価を行うことに意義があると考えて毒性試験を進めた。

4. プロジェクト研究で取り上げた毒性試験

我々のプロジェクト研究で取り上げる試験内容は、次のような考え方で決定した。

- ・ラットを用いた **AOM 誘導大腸 2 段階発がん試験**系で、先行研究で報告されたプロモーション活性の有無を確認する。その際、被験物質の投与法は混餌とし、動物数も 1 投与

群あたりの数を 30 匹とする。また、先行研究での投与量 0.005%を中心としてその 1/5 倍量と、5 倍量の 3 段階の用量群を設ける。

- ・雌雄ラットの両方を用い全身的な毒性評価を行うため **90 日間亜急性毒性試験**を、標準的な方法で実施する。投与量は、粉食に対して 0, 0.012%, 0.006%, 0.03%の混餌とする。

これらのインビボ試験に関しては、多くの動物に大量の被験物質を投与することとなるので、全種類の 2-ACBs を用いて試験を行うことは不可能であった。そこで、先行研究の発がんプロモーション試験で用いられた 2-tDCB(2-テトラデシルシクロブタノン)を被験物質として選択した。

遺伝毒性試験としては、

- ・先行研究で不足しているインビボ試験の小核試験も含め、ガイドラインに沿った 3 種類の遺伝毒性試験；①細菌を使った変異原性試験（エームス試験）、②哺乳類培養細胞を用いた染色体異常試験、③マウスを用いた **in vivo** 小核試験の 3 つを優先的に行う。
- ・既報において陽性の疑いの持たれている **DNA コメットアッセイ**についての結果を確認するため、標準的化されたプロトコールに従いチャイニーズ・ハムスター肺由来の CHL/IU 細胞を用い、S9 mix 非存在下での 6 時間処理の条件で試験を行う。
- ・**Bhas42** 細胞を用いた形質転換試験を行い、インビトロの系で発がんプロモーション作用についての知見を得る。
- ・先行研究で発がんプロモーション活性の可能性の示された大腸組織に注目し、**in vivo** 小核試験に用いた 2-dDCB あるいは 2-tDCB 投与マウス、および、大腸がん発がんプロモーター試験に用いた 2-tDCB 投与ラットの大腸組織を摘出し、これらの細胞における **DNA の修飾（アダクト形成）**について検討を行う。

これらの遺伝毒性試験に関しては入手が容易な飽和 2-ACBs のうち、食品に多く存在するパルミチン酸 (C16) およびステアリン酸 (C18) 由来の 2-ACBs である 2-dDCB(2-ドデシルシクロブタノン)および 2-tDCB(2-テトラデシルシクロブタノン)を被験物質として選択した。

さらに、これらの毒性試験に加え、2-ACBs の DNA 損傷性に関して、その作用を詳細に解析する目的で、アポトーシスの誘導に関して、細胞レベルでの基礎的解析を実施した。

5. 試験結果の概要

試験結果の概要は以下の通りである。

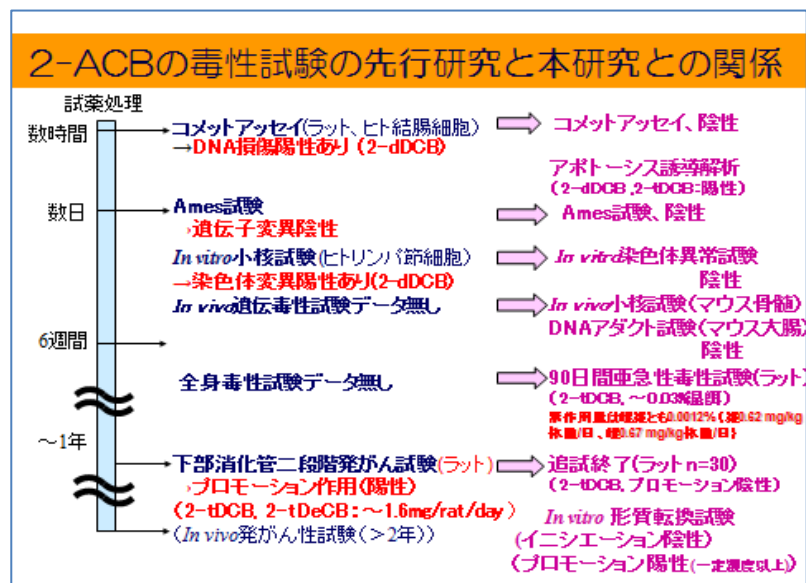
- ・2-ドデシルシクロブタノン(2-dDCB)および、2-テトラデシルシクロブタノン(2-tDCB)

を最大濃度 8 mM までの EtOH 溶液とした Ames 試験は陰性であった。

- 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(高度に損傷を受けた DNA 泳動像)の頻度が上昇したが、2-dDCB, 2-tDCB の直接的な作用による DNA 切断の増加は認められなかった。
- 2-dDCB および 2-tDCB ので処理したほ乳類培養細胞の染色体異常の出現頻度を観測したが、披験物質の濃度に依存した構造異常の増加は認められなかった。
- 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的アポトーシス活性を示していた。(Yu 2012)
- 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。
- Bhas42 細胞を用いる in vitro 形質転換試験においては 2-dDCB (0.012 mg/mL) 及び 2-tDCB (0.010 mg/mL) とともに明らかなプロモーション作用を示した。
- ラットによる 90 日間亜急性毒性試験の結果、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。
- 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。この時の 2-tDCB の最高投与量は、9.6mg/kg b.w./day であった。

以上のように、実施した遺伝毒性試験の範囲で、2-dDCB および、2-tDCB の遺伝毒性は確認されず、また、ラットにおける 2-tDCB の大腸ガンモデル実験系での発がんプロモーター活性も確認できなかった。

これらの結果と先行研究により行われた試験との関係を図にまとめて示す。



文献：

- Boyd, D. R. et al. (1991) Synthesis, characterization, and potential use of 2-dodecylcyclobutanone as a marker for irradiated chicken. *J. Agric. Food Chem.* 39(4), 789-792.
- Burnouf D. et al. (2002) Etude toxicologique transfrontalière destinée à évaluer le risque encouru lors de la consommation d'aliments gras ionisés - Toxikologische Untersuchung zur Risikoberwertung beim Verzehr von bestrahlten fetthaltigen Lebensmitteln - Eine französisch-deutsche Studie im Grenzraum Oberrhein, Rapport final d'étude Interreg II, project No 3171.
- Chen, S. et al. (2012a) Identification of 2- Alkylcyclobutanones in Nutmeg (*Myristica fragrans*). *Food Chemistry*. 134(1), 359-364.
- Chen, S. et al. (2012b) カシューナッツ中の 2-アルキルシクロブタノン類の同定. *食品照射*. 47 (1), 19-28.
- Delincee, H. et al. (1999) Genotoxizität von 2-Dodecyl-cyclobutanon,. In '5 Deutsche Tagung Lebensmittelbestrahlung' (Knörr M. et al. eds.), Karlsruhe, 11-12 November(1998), Berichte der Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe, BFE-R--99-01, 262-269. (public citizen 英訳)
- European Commission DG SANCO (2002) Statement of the Scientific Committee on Food on a Report on 2-alkylcyclobutanone.
http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out135_en.pdf
- Gadgil, P. et al. (2004) Mutagenicity and Acute Toxicity Evaluation of 2-Dodecylcyclobutanone. *J. Food Sci.* 69(9), 713-715.
- Hartwig, A. et al. (2007) Toxicological potential of 2-alkylcyclobutanones – specific radiolytic products in irradiated fat-containing food – in bacteria and human cell lines. *Food and Chemical Toxicology*. 45, 2581-2591.
- Health Canada 2002 Evaluation of the Significance of 2-Dodecylcyclobutanone and other Alkylcyclobutanones.
http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/fpi-ipa/e_cyclobutanone.html
- Knoll, N. et al. (2006) 2-Dodecylcyclobutanone, a radiolytic product of palmitic acid, acts genotoxic in primary human colon cells and in cells from preneoplastic lesions. *Mutat. Res.* 594, 10-19.
- Marchioni, E. et al. (2004) Toxicological study on 2-alkylcyclobutanones—results of a collaborative study. *Radiat. Phys. Chem.* 71 (1-2), 147-150.
- Ndiaye, B. et al. (1999) 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*. 55, 437-445.

- Raul, F. et al. (2002) Food-borne radiolytic compounds (2-alkylcyclobutanones) may promote experimental colon carcinogenesis. *Nutr. Cancer.* 44 (2), 88-191.
- Sommers, C. H. (2003) 2-Dodecylcyclobutanone does not induce mutations in the *Escherichia coli* tryptophan reverse mutation assay. *J. Agr. Food Chem.* 51, 6367-6370.
- Sommers, C. H. et al. (2004) 2-Dodecylcyclobutanone does not induce mutations in the *Salmonella* mutagenicity test or intrachromosomal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Food Prot.* 67, 1293-1298.
- Sommers, C. H., (2006a) Recent Advances in Food Irradiation: Mutagenicity Testing of 2-Dodecylcyclobutanone in *Advances in Microbial Food Safety*, ACS Symposium Series American Chemical Society ed Vijay K. Juneja, John P. Cherry, Michael H. Tunick, Volume 931 Chapter 8, 109-120.
- Sommers, C. H., (2006b) Induction of Micronuclei in Human TK6 Lymphoblasts by 2-Dodecylcyclobutanone, a Unique Radiolytic Product of Palmitic Acid. *J. Food Sci.* 70, 254-256.
- Thayer, D. W. et al. (1987) Toxicology Studies of Irradiation-Sterilized Chicken. *J. Food. Prot.* 50(4), 278-288.
- Variyar, Prasad, S. et al. (2008) Natural existence of 2-alkylcyclobutanones. *J. Agric. Food Chem.* 56(24), 11817-11823.
- WHO (2003) : WHO Statement on 2-Dodecylcyclobutanone and Related Compounds. March 2003.
- Yu, D-Y. et al. (2012) Molecular mechanisms of apoptosis induction by 2-dodecylcyclobutane, a radiolytic product of palmitic acid, in human lymphoma U937 cells. *Apoptosis.* 17(6), 636-645.
- 尾花裕孝. (2008) 2-アルキルシクロブタノン分析と照射食品の検知. *食品照射.* 43(1,2), 37-45.