

## イソオイゲニルメチルエーテル

### 基本情報

英名： isoeugenyl methyl ether

CAS No.： 93-16-3

SEQ No.： 1665

FEMA No.： 2476

JECFA No.： 1266

別名： methyl isoeugenol

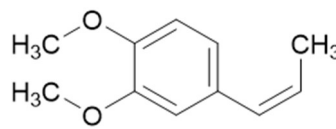
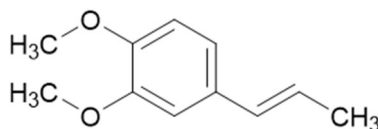
1,2-dimethoxy-4-(1-propenyl)benzene

1,2-dimethoxy-4-(1-propen-1-yl)benzene

化学式：  $C_{11}H_{14}O_2$

分子量： 178.23

構造式：



### 1. 食品添加物名

フェノールエーテル類 (13 類)

イソオイゲニルメチルエーテル

### 2. 指定年月日

昭和 23 年 7 月 13 日

### 3. 主な用途及び使用基準

#### 1) 主な用途

香料

#### 2) 使用基準

着香の目的以外に使用してはならない。

### 4. 摂取量等に関する情報

使用量 626.57 kg/年 (令和 2 年実績) <sup>1)</sup>

推定摂取量 158.95 µg/人/日 (令和 2 年実績より推定) <sup>1)</sup>

### 5. 安全性試験の概要

#### 1) 急性毒性試験

ラット 経口 LD<sub>50</sub> 1,500 mg/kg <sup>2)</sup>

ラット 経口 LD<sub>50</sub> 2,500 mg/kg<sup>2)</sup>

## 2) 反復投与毒性試験

Sprague-Dawley ラット (5 週齢、雌雄各 16 匹/群) に 30、100 及び 300 mg/kg 体重/日のイソオイゲニルメチルエーテルを 28 日間混餌投与した試験が行われている<sup>3, 4)</sup>。その結果、絶対及び相対肝重量の増加が 300 mg/kg 群の雄で、相対肝重量の増加が 300 mg/kg 群の雌で認められた。血液検査で WBC の増加が 300 mg/kg 群の雌で、血液生化学検査で ALT の増加が 300 mg/kg 群の雌で認められている。これらは被験物質投与とは関連しないと報告されている。

CrI:CD(SD)BR albino ラット (雌雄各 24 匹/群) に 6 mg/kg 体重/日のイソオイゲニルメチルエーテルを 13 週間混餌投与した試験が行われている<sup>4, 5)</sup>。投与群の雌雄で対照群に比べて甲状腺の絶対重量の低下が認められたが、毒性影響ではないと報告されている。

F344/DuCrj ラット (6 週齢、雌雄各 10 匹/群) を用いたイソオイゲニルメチルエーテルの強制経口投与 (溶媒: コーン油、0、8、40、200 mg/kg 体重/日) による 91 日間反復投与毒性試験を実施した<sup>6, 7)</sup>。

その結果、雄の 200 mg/kg 群の雄で投与 9 週目以降の体重増加抑制、TG 減少、肝細胞肥大、200 mg/kg 群の雌雄で肝臓の絶対及び相対重量増加がみられたことから、無毒性量 (NOAEL) は雌雄ともに中用量の 40 mg/kg 体重/日と考えられた。

## 3) 遺伝毒性試験

ネズミチフス菌 (TA100、TA1535、TA98、TA1537)、及び大腸菌 (WP $uvrA$ ) を用いた復帰突然変異試験を実施した。1.50、5.00、15.0、50.0、150、500、1,500 及び 5,000 µg/plate の 8 用量を設定して用量設定試験を行ったところ、代謝活性化存在下、非存在下の 500 µg/plate 以上において、全ての菌株において生育阻害が認められた。また、用いたいずれの菌株においても、代謝活性化の有無にかかわらず、陰性対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

用量設定試験の結果に基づき、以下の用量を設定して本試験を行った。

(代謝活性化非存在下)

全ての菌株 : 15.6、31.3、62.5、125、250、500 µg/plate

(代謝活性化存在下)

TA100 : 7.81、15.6、31.3、62.5、125、250、500 µg/plate

TA1535、WP2  $uvrA$ 、TA98、TA1537 : 15.6、31.3、62.5、125、250、500 µg/plate

その結果、いずれの菌株においても、代謝活性化の有無にかかわらず、陰性対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果に基づき、イソオイゲニルメチルエーテルは、用いた試験系において遺伝子突然変異誘発性を有しない（陰性）と判定した<sup>8)</sup>。

イソオイゲニルメチルエーテルの染色体異常誘発能の有無を検討するため、ほ乳類の培養細胞（CHL/IU 細胞株）を用いた染色体異常試験を実施した。初めに染色体異常試験の用量を設定するための予備試験として、最高用量を 1,800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  とし、以下公比 2 で計 8 用量を設定した細胞増殖抑制試験を実施した。その結果、短時間処理法の代謝活性化では 113  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では 225  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の用量で 50%以上の細胞増殖抑制作用が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）はそれぞれ 67、185 及び 132  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と算出された。そのため、染色体異常試験における処理用量は、短時間処理法の代謝活性化では 88.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、非代謝活性化では 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及び連続処理法では 133  $\mu\text{g}/\text{mL}$  をそれぞれ最高用量とし、以下公比 1.5 で希釈した計 5 用量を設定し、試験を実施した。

染色体異常試験の結果、短時間処理法の非代謝活性化では全ての用量で染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率（TA 値）及び倍数体の出現率は、陰性の判定基準である 5%未満を示した。一方、代謝活性化では 39.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の用量で TA 値が陽性の判定基準である 10%以上を示し、用量依存性も認められた。D20 値（観察細胞の 20%に異常がみられる濃度）は 0.042  $\text{mg}/\text{mL}$  と算出された。

以上の結果から、イソオイゲニルメチルエーテルは本試験条件下において染色体構造異常誘発能を有する（陽性）と判定した<sup>8)</sup>。

イソオイゲニルメチルエーテルの小核誘発性及び骨髄細胞増殖抑制作用を確認するため、Cr1:CD1(ICR)マウスを用いて検討した。予備試験では、1 群 3 匹の雌雄マウスに、被験物質を 250、500、1,000 及び 2,000  $\text{mg}/\text{kg}$  体重/日の用量で、1 日 1 回、24 時間間隔で 2 回経口投与した。その結果、2 回目投与翌日までに 1,000 及び 2,000  $\text{mg}/\text{kg}$  群の雌雄各 3 例が死亡した。一般状態では自発運動の減少が 1,000 及び 2,000  $\text{mg}/\text{kg}$  群の雌雄にみられ、腹臥・横臥が 1,000  $\text{mg}/\text{kg}$  群の雄及び 2,000  $\text{mg}/\text{kg}$  群の雌雄でみられた。体重では各投与群の雌雄で減少傾向がみられた。

本試験では、予備試験において死亡例がみられず最大耐量と思われる 500  $\text{mg}/\text{kg}$  体重/日を高用量とし、以下公比 2 で除して、250 及び 125  $\text{mg}/\text{kg}$  体重/日の 3 用量を設定した。これに媒体（コーン油）を投与する陰性対照群及び 1  $\text{mg}/\text{kg}$  のマイトマイシン C を単回腹腔内投与する陽性対照群を加えて計 5 群とした。1 群当たりの動物数は 5 匹とした。1 日 1 回、24 時間間隔で 2 回経口投与（陽性対照群は単回腹腔内投与）し、最終投与後約 24 時間後に骨髄塗抹標本作製して、各群 5 匹について小核の観察を行った。その結果、いずれの用量においても被験物質投与による小核出現率の有

意な増加は認められなかった。また、各被験物質投与群における全赤血球中に占める幼若赤血球の割合は、陰性対照群と比較して統計学的に有意な変化はみられなかったが、500 mg/kg 群における全赤血球中に占める幼若赤血球の割合の平均値が 50%を下回ったことから、軽度の骨髄細胞の増殖抑制作用が示唆された。

以上の結果から、本試験条件下では、イソオイゲニルメチルエーテルはマウス骨髄幼若赤血球に対する小核誘発作用を有さない（陰性）と判定した<sup>9)</sup>。

イソオイゲニルメチルエーテルの変異原性について、トランスジェニックマウス（MutaMouse）を用いて肝臓及び腺胃における遺伝子突然変異誘発性（レポーター遺伝子：lacZ）を検討した。令和 3 年度は、遺伝子突然変異解析のための臓器採取までの操作を、令和 4 年度は、遺伝子突然変異解析を実施した。被験物質は純度 99.7%、溶媒はコーン油（溶解）とし、純度換算は行わなかった。

用量設定試験の結果を基に最大耐量付近と考えられる 300 mg/kg 体重/日を最高用量とし、以下、150 及び 75.0 mg/kg 体重/日の用量で各群雄 6 匹（300 mg/kg 群については 8 匹）に 1 日 1 回、28 日間連続強制経口投与した。いずれの投与群においても一般状態及び体重推移に変化は認められなかった。最終投与後 3 日に生存動物全例から肝臓及び腺胃を摘出した。全ての投与群において、評価数 5 匹を確保することができたため、300、150、75.0 mg/kg 体重/日の 3 用量の肝臓及び腺胃について、lacZ assay により遺伝子突然変異体頻度を算出した。その結果、イソオイゲニルメチルエーテル投与群の肝臓及び腺胃のいずれにおいても陰性対照群と比較して遺伝子突然変異体頻度の統計学的に有意な増加は認められなかった。ただし、陰性対照群の 1/6 例のみ、腺胃の遺伝子突然変異体頻度が背景データの基準値から大きく超えていたことから、クローナル変異により偶発的に増加したものではないかと考えられた。

陽性対照の N-エチル-N-ニトロソウレア（ENU）投与群（投与量 100 mg/kg 体重/日、腹腔内投与、1 日 1 回 2 日間）では、肝臓及び腺胃ともに陰性対照群と比較して統計学的に有意な遺伝子突然変異体頻度の増加が認められたことから、当該試験は適切に実施されたと判断した。以上の結果から、当該試験条件下において、イソオイゲニルメチルエーテルはトランスジェニックマウスの肝臓及び腺胃に対して遺伝子突然変異誘発性を示さないもの（陰性）と判定された<sup>10)</sup>。

染色体異常試験は陽性であったもののフォローアップとなる *in vivo* 小核試験は陰性であり、遺伝子突然変異試験である Ames 試験とトランスジェニックマウスを用いた遺伝子突然変異試験（TG 試験）も陰性であったことから、総合判定は陰性と判断する。

#### 遺伝毒性試験のまとめ

|                     |    |
|---------------------|----|
| Ames 試験             | 陰性 |
| 染色体異常試験             | 陽性 |
| <i>in vivo</i> 小核試験 | 陰性 |
| TG 試験               | 陰性 |
| 総合判定                | 陰性 |

#### 4) JECFA の評価

JECFA では、イソオイゲニルメチルエーテルは構造クラス III と判断されている。ヨーロッパ及びアメリカ合衆国における 1 人あたり推定摂取量はそれぞれ 128 µg/人/日及び 129 µg/人/日であり、このクラスの許容量である 90 µg/人/日を上回っているが、90 日間反復投与毒性試験における無影響量 (NOEL) である 6 mg/kg 体重/日<sup>4,5)</sup> に対し十分な安全域が確保されており、香料としての使用において安全上の懸念はないと判断されている<sup>4)</sup>。

#### 6. 検討結果

イソオイゲニルメチルエーテルは染色体異常試験で陽性を示しており、フォローアップ試験として実施された *in vivo* 小核試験及び TG 試験の結果は陰性であったことから、遺伝毒性の総合判定は陰性と判断された。また、本邦での推定摂取量 158.95 µg/人/日は、90 日間反復投与毒性試験における NOAEL 40 mg/kg 体重/日に対し、十分な安全域 (約  $1 \times 10^4$ ) を有している。以上より、香料としての現状の使用においてヒトの健康影響に対する懸念はないと結論された。

#### 7. 参考資料

1. 榊村聡：香料化合物及び天然香料物質の使用量調査研究 (日本香料工業会)：令和 4 年度厚生労働科学研究費補助金 (食品の安全確保推進研究事業)「食品添加物の試験法の検討及び摂取量に基づく安全性確保に向けた研究」分担研究「食品添加物生産量調査・香料使用量及び SPET 法による調査に基づく摂取量推計に関する研究」、2023
2. Opdyke D L J: Monographs on Fragrance Raw Materials 1st Edition: A Collection of Monographs Originally Appearing in Food and Cosmetics Toxicology. Elsevier (Amsterdam) ISBN: 9781483147970. 1979
3. Purchase R, Ford G P, Creasy D M, Brantom P G, Gangolli S D: A 28-day feeding study with methyl isoeugenol in rats. Food Chem. Toxicol. 30, 475–481. 1992
4. JECFA: Safety evaluation of certain food additives and contaminants (Sixty-first report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives). WHO Food Additives Series 52, 2004
5. Osborne B E: A 91-day single dose level dietary study of eugenyl methyl ether

and isoeugenyl methyl ether in the albino rat. Private communication to the Flavor and Extract Manufacturers Association. Submitted to WHO by the Flavor and Extract Manufacturers Association of the United States, Washington, DC, USA. 1981

6. 赤木純一、水田保子、曹 永暉、小川久美子：指定添加物（香料）の安全性に関する試験（イソオイゲニルメチルエーテルの F344 ラットにおける 90 日間反復投与毒性試験）、2017
7. Akagi J, Cho Y M, Mizuta Y, Tatebe C, Sato K, Ogawa K: Subchronic toxicity evaluation of isoeugenyl methyl ether in F344/DuCrj rats by 13-week oral administration. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 102, 34-39. 2019
8. 本間正充：平成 26 年度 指定添加物等の安全性に関する試験報告書、2015 年 3 月 30 日
9. 本間正充：平成 27 年度 指定添加物等の安全性に関する試験報告書、2016 年 3 月 3 日
10. 杉山圭一：令和 4 年度 指定添加物・既存添加物の安全性に関する試験報告書、2023 年 3 月