

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法  
の開発に関する研究  
(H21-食品-一般-010)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西川 秋佳

平成22(2010)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発に関する研究 --- 1

西川秋佳

II. 分担研究報告

1. 反復投与毒性試験の病理組織学的解析ならびに網羅的遺伝子解析 ----- 7

西川秋佳

2. 反復投与毒性試験材料による*in vivo*変異原性解析 ----- 20

梅村隆志

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 36

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

総括研究報告書

食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発に関する研究

研究代表者	西川 秋佳	国立医薬品食品衛生研究所	病理部部長
研究分担者	梅村 隆志	国立医薬品食品衛生研究所	病理部室長
研究協力者	石井 雄二	国立医薬品食品衛生研究所	病理部研究員

研究要旨

香料物質は微量での使用特性から、JECFA では TTC の概念に基づいて、構造クラス分類から類推されるヒト暴露許容値等による安全性評価が実施されている。我が国では少なくとも 90 日間反復投与試験と遺伝毒性試験が求められている。膨大な数の香料物質の安全性データを迅速かつ効率的に収集することは急務であるが、その化学構造中に発がん性を疑う置換基を有する香料も含まれている。本研究では、レポーター遺伝子を導入した *gpt delta* ラットまたはマウスを用いて、前がん病変の解析を含む反復投与毒性試験データおよび遺伝毒性データを短期的に同時に得ることができる短期包括的試験法の開発を目指す。被験物質としては JECFA で発がん性等の懸念のために評価保留となっている香料の furan-substituted 物質、alkoxy-substituted allylbenzenes、1-methylnaphthalene などを対象とする。2009 年度は、げっ歯類に肝発がん性を有するが、遺伝毒性は明確になっていない furan-substituted 物質の基本骨格である furan を *gpt delta* ラットに 13 週間反復投与した結果、胆管線維症などの顕著な肝組織変化が誘発され、コントロール群に比較して肝重量や骨髄小核出現頻度が有意に増加し、*gpt delta* 変異頻度は用量依存性の増加傾向を示した。また、alkoxy-substituted allylbenzenes の 1 つで、ラット肝発がん性を示す estragole を *gpt delta* ラットに 4 週間反復投与した結果、肝変異増殖巣が誘発され、肝重量が有意に増加した。さらに、マウス肺発がん性を示すとされる 1-methylnaphthalene を *gpt delta* マウスに 13 週間投与した結果、肺に顕著な組織変化はみられず、細胞増殖活性の亢進もみられなかった。一般反復投与毒性と遺伝毒性に関するその他の項目については解析中であり、必要に応じて DNA マイクロアレイによる遺伝子の網羅的解析も実施する。本試験系において、遺伝毒性または明らかな前がん病変が検出されれば、長期間の発がん性試験を実施するまでもなく使用禁止等の処置がとれるものと予想される。

A. 研究目的

食品添加物として分類される香料物質は、その使用量がごく微量であるという特性から JECFA においては threshold of

toxicological concern (TTC) の概念に基づいて、当該物質の試験データがなくても構造クラス分類から類推されるヒト暴露値との安全マージン等による安全性評価が実施さ

れている。我が国では少なくとも 90 日間反復投与試験と遺伝毒性試験が求められているが、発がん性試験は対象外である。しかしながら、香料の中にはその化学構造中に発がん性が知られている置換基を有する物質もあり、その発がん性が危惧されているものもある。また、何種類もの香料を組み合わせる種の香りを再現するという使用特性から、膨大な数の香料物質の安全性データが迅速かつ効率的に収集されることが望まれる。

本研究では、これらの問題解決に大きく寄与することが期待できる *gpt delta* ラットおよびマウスを用いた前がん病変の解析を含む反復投与毒性試験データ、遺伝毒性データを短期的に同時に得ることができる短期包括的試験法の開発を目指す。*gpt delta* ラットおよびマウスは、臓器・組織レベルで一般毒性と遺伝毒性（点突然変異および欠失変異）を同時に検索可能なレポーター遺伝子を導入した遺伝毒性検索モデル動物である。被験物質としては JECFA で発がん性等の懸念のために評価保留となっている香料の furan-substituted 物質、alkoxy-substituted allylbenzenes、1-methylnaphthalene などを対象とした。本試験系において、遺伝毒性または明らかな前がん病変が検出されれば、長期間の発がん性試験を実施するまでもなく使用禁止等の処置がとれるものと予想され、国民の多くが危惧している食の安全に対する厚生労働行政の責務遂行に大いに役立つものと期待できる。

## B. 研究方法

実験 1 : furan の短期包括的試験では、

furan の投与量は、発がん用量として報告されている 8 mg/kg を最高用量に設定し、発がん用量であり、これまでの 13 週間亜慢性毒性試験で毒性影響が認められた最低用量である 4 mg/kg を下回る 2 mg/kg を低用量に設定した。furan はコーンオイルに溶解させ、13 週間、週 5 日で、7 週齢の雌雄 F344 *gpt delta* ラット各群 10 匹に強制経口投与した。対照群には媒体であるコーンオイルを同期間強制経口投与した。期間中、餌の交換は週 1 回、一般状態観察を連日実施した。また、体重および摂餌量の測定は週 1 回行った。投与最終日に全動物を一晩絶食させ、翌日の剖検時にエーテル麻酔下にて採血を行い、血液学的検査および血清生化学的検査を実施した。主要臓器の重量測定を行い、他の器官・組織と共にホルマリン固定後、常法によりパラフィン切片を作製し、病理組織学的検索を実施した。*In vivo* 変異原性の評価として、肝臓におけるレポーター遺伝子 *gpt* の変異頻度 (*gpt* MF) および骨髄における小核試験を実施した。さらに、肝臓における前癌病変である GST-P 陽性肝細胞巢の量的解析を実施した。

実験 2 : estragole の短期包括的試験では、4 週齢の雄 F344 ラット 20 匹を 4 群に分けて二つの群には 600 mg/kgbw の estragole を 4 週間強制経口または混餌投与した。また、一つの対照群には媒体であるコーン油を 4 週間強制経口し (Control-1)、もう一つの対照群には基礎飼料のみ 4 週間経口投与した (Control-2)。実験終了後には、全ての動物をエーテル麻酔下で放血致死させ、標的臓器である肝臓を採取し、それぞれの重量を測定した。マイクロアレイ用のサンプルは液体窒素により凍結し、測定ま

で-80°Cで保存した。

実験3： 1-methylnaphthaleneの短期包括的試験では、6週齢のB6C3F<sub>1</sub>系 *gpt delta* マウス雌雄各30匹ずつを実験に供した。動物は約1週間の馴化飼育後、雌雄とも各群10匹ずつ3群に分けて、コーン油に溶解した1-MNを0.075%または0.15%の濃度で13週間混餌投与した。対照群には媒体であるコーン油を餌に混ぜて13週間投与した。実験終了後、動物をエーテル麻酔下で腹腔内静脈より採血し、血液学および血清生化学的検査を行った。解剖時、脳、心臓、肺、腎臓、副腎、胸腺、脾臓、肝臓及び精巢の重量を測定し、全身臓器について病理組織学的検査を行った。発がん標的臓器である肺においては、細胞増殖活性の指標であるPCNA免疫染色を行い、一部を *gpt assay* 用に採取し、液体窒素により凍結し、測定まで-80°Cで保存した。

(倫理面への配慮)

実験動物は、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験ガイドラインに準拠し、実験動物委員会の承認に基づき実施した。特に、動物愛護の精神に則って動物飼育を行い、動物処置には倫理基準に充分配慮し、実験終了時、安楽死においても深麻酔下、苦痛に配慮した。また、申請者ならびに研究協力者の健康保持のため、本研究で被験物質として使用する化合物、各実験で使用する薬品は、安全キャビネット等で厳重に注意して取り扱った。

### C. 研究結果

実験1： 試験期間中の動物の一般状態については特記すべき変化は認められず、死亡例も認められなかった。体重推移では、

雄の8 mg/kgにおいて増加抑制が認められた。雌においては投与群と対照群との間に変化は認められなかった。摂餌量では、雌雄ともに対照群と比較し、変化は認められなかった。最終体重および臓器重量では、雄の8 mg/kgにおいて最終体重の有意な低値が認められ、心臓の実重量の有意な低値、脾臓、肝臓および腎臓の相対重量の有意な高値が認められた。雌においては、8 mg/kgで肝臓の実重量および相対重量、脾臓の相対重量の有意な高値が認められた。血液学的検査では、雄の2 mg/kg以上でMCVおよびMCHの高値、8 mg/kgでPLTの高値が認められた。雄の2 mg/kgにおいてWBCの高値、雌の2 mg/kgにおいてMCHCの低値が認められたものの、用量依存性に乏しい変化であった。白血球分画においては雌雄ともに投与群で変化は認められなかった。血清生化学的検査では、雄の2 mg/kg以上でALPの高値、8 mg/kgでA/G比、T-Bil、BUNおよびCRNの有意な高値、GluおよびTGの有意な低値が認められた。雌においては、2 mg/kg以上でTP、ALB、A/G比およびT-Bilの有意な高値、PLの有意な低値、8 mg/kgにおいてCaの有意な高値、ALTの有意な低値が認められた。肝臓における病理組織学的検査では、雄の2 mg/kgで胆管線維症、胆管増生および卵円形細胞の増生が認められ、また8 mg/kgにおいてはそれらの変化に加え、肝細胞のアポトーシス、空胞変性およびクッパー細胞の色素沈着も高頻度に認められた。雌においては、2 mg/kg以上で卵円形細胞の増生およびクッパー細胞の色素沈着が認められ、8 mg/kgにおいては胆管線維症、胆管増生および肝細胞のアポトーシスも高頻度に認められた。

その他の組織における病理組織学的検索は現在検査中である。小核試験の結果、雄の 8 mg/kg において、対照群と比較し、小核出現頻度の 2~3 倍程度の有意な増加が認められた。一方、雌において変化は認められなかった。また、骨髄細胞抑制は投与群の雌雄共に認められなかった。肝臓における *gpt* reporter gene assay の結果、雄の肝臓における *gpt* MF は、8 mg/kg において有意な高値が認められた。一方、雌においては、2 mg/kg 投与群において *gpt* MF の有意な高値が認められた。肝臓における GST-P 陽性肝細胞巢の定量解析の結果、雌雄共に 8 mg/kg において、GST-P 陽性肝細胞巢の面積および数の有意な増加が認められた。

実験 2 : 試験期間中の動物の一般状態については特記すべき変化は認められなかった。対照群と比べて雄の 1-MN 群は第 2 週以降で体重増加抑制が認められた。雌雄の摂餌量において、実験期間中に雄の 0.15% 群と雌の全投与群で摂餌量の低値が認められた。臓器重量においては、雄の 0.075% 以上群で心臓と脾臓の絶対重量と脾臓の相対重量、また、0.15% 投与群の心臓の相対重量が対照群に比べて有意に減少した。雌では、0.15% 投与群の心臓と肝臓の絶対重量が対照群に比べて有意に減少した。血液学的検査においては投与群と対照群の間に有意な差は認められなかった。雄の 0.15% または 0.075% 以上投与群でリン脂質、BUN (blood urea nitrogen)、CRN (creatinine)、Ca (calcium) が対照群に比べて有意に減少し、0.15% 投与群の AST (aspartate aminotransferase) と ALT (alanine aminotransferase) は対照群に比べて有意に増加した。雌では、0.15% 投与群

においてリン脂質、総コレステロール、Cl (chloride) が対照群に比べて有意に増加または減少した。標的臓器である肺の病理組織学的検査では、投与に起因した変化は認められなかった。また、肺における PCNA 免疫染色の結果、単位面積あたりの PCNA 陽性細胞数に対照群と投与群の間に有意な差はなかった。

実験 3 : 試験期間中の動物の一般状態については特記すべき変化は認められなかった。体重は、estragole または PBO 投与群でそれぞれの対照群に比べ有意な減少が認められた。さらに、estragole または PBO 投与群の肝臓の相対または絶対重量はそれぞれの対照群に比べ有意に増加した。病理組織学的検査においては、estragole 投与群に肝細胞変異増殖巣、PBO 投与群に小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。

#### D. 考察

実験 1 では、*gpt* delta ラットを用いた短期包括的毒性試験法における Furan の一般毒性、標的臓器における *in vivo* 変異原性ならびに前癌病変の検索による発がん性を同一固体で評価した。試験期間中、一般状態に変化は認められず、死亡例も認められなかった。雄の 8 mg/kg において体重増加抑制が認められた。摂餌量に関しては、雌雄共に投与群に変化は認められなかった。肝臓重量の高値が 8 mg/kg の雌雄に認められ、血清生化学的検査では、胆管系障害を示唆する T-Bil および ALP の有意な高値が認められた。肝臓の病理組織学的検索においては、投与群で胆管線維症、胆管増生、卵円形細胞の増生、クッパー細胞の色素沈着、肝細胞のアポトーシスおよび空胞変性が認

められた。これら胆管系障害、肝細胞障害といった肝臓を標的とした毒性変化は何れも過去に報告されている変化と同様のものであった。また、雌雄の 8 mg/kg において、肝臓における前癌病変である GST-P 陽性肝細胞巢の数および面積の有意な増加が認められた。Furan はラットにおいて肝細胞癌および肝胆管癌を誘発することが知られており、本試験で認められた Furan 投与群における GST-P 陽性肝細胞巢の有意な増加および病理組織学的検索での胆管線維症は、肝細胞癌および肝胆管癌への進展を示唆するものと考えられた。その他投与群で認められた変化に対する毒性学的意義については、今後、肝臓以外の病理組織学的検索の結果をもって評価する。

*In vivo* 変異原性評価の結果、雄の肝臓における *gpt* MF の用量依存的な増加傾向が認められ、雌においては 2 mg/kg で *gpt* MF の有意な増加が認められた。さらに小核試験においては雄の 8 mg/kg で陽性を示した。過去に実施されている Furan の Ames 試験では、その多くが陰性の結果を示しているが、陽性を示した報告もある。*In vivo* 小核試験においてはマウスを用いた単回投与の条件では陰性であることが報告されている。その他、種々の遺伝毒性試験においても一貫した結果は得られていない。今回、ラットに反復投与することで、雄の骨髄細胞での小核陽性結果を得た。また、reporter gene mutation assay では雄において用量相関性を持った上昇が認められ、高用量では有意な上昇を示した。雌においては用量相関性がないものの低用量で有意な上昇を示した。本試験結果は Furan が遺伝毒性発がん物質である可能性を示唆するものと考えられた

が、病変が肝臓の葉特異的に出現することが報告されており、Furan の変異原性については葉別の解析を含めてさらなる検討が必要であると思われた。

実験 2 では、1-MN の肺発がん機序を明らかにすることを目的に、*gpt delta* マウスにおける *gpt delta* マウスによる 90 日間の反復投与毒性試験を実施した。今回は、解析が終了した実験期間中の体重推移、臓器重量、肺における PCNA 免疫染色の結果について報告する。実験終了時のマウスの最終体重は 1-MN の投与により低値傾向が見られ、実験期間中に投与群の摂餌量も低値を示していた。1-MN については、これまでの実験においても同様の体重増加抑制や摂餌量の低値が認められていることから、これらの変化は今までの報告と一致しており、1-MN の投与の影響によるものであると考えられた。

雄の心臓と脾臓重量では、絶対および相対ともに 0.15% 投与群で対照群に比べ有意な減少が認められた。また、雌の 0.15% 投与群の心臓と肝臓の絶対重量が対照群に比べて有意に減少した。これらの変化は長期発がん性試験での報告と一致しており、何れも 1-MN が何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。しかし、血液学的または血清生化学的検査に関連する変化が認められておらず、病理組織学的検査が終了してないことから、これらの結果を踏まえて再評価をする必要があると考えられた。

血清生化学的検査において、雄の 0.15% 投与群でリン脂質、BUN、CRN、Ca、AST、ALT が、雌の 0.15% 投与群においてリン脂質、総コレステロール、Cl が対照群に比べて有意に増加または減少した。しかし、臓

器重量においてこれらに関連する顕著な変化が認められておらず、病理組織学的検査が終了してないことから、1-MNの影響について再検討する必要があると考えられる。

肺のPCNA陽性細胞数において、雌雄ともに対照群と投与群の間に有意な変化は見られなかった。さらに、重量および病理組織学的検査においても対照群と投与群の間に顕著な変化が見られなかった。長期発がん性試験において、肺は標的臓器であり、気管支/肺腺腫の増加が見られることから、今後肺組織を用いた *gpt* ならびに *redlgam* 変異頻度の解析を行い、1-MNの *in vivo* 変異原性を明らかにし、その発がん機序解明を目指す予定である。

実験3では、*estragole* またはPBO投与群で体重の有意な減少、肝重量の有意な増加が認められた。さらに、*estragole* またはPBO投与群の肝臓において変異増殖巣または肝細胞肥大が認められた。今後は、肝臓におけるマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、肝臓に酸化的DNA損傷を引き起こすこと、また明らかな *in vivo* 変異原性は示さないことが明らかとなっているPBOと比較しながら *estragole* の肝発がん過程早期に関わる遺伝子群を検索し、その肝発がん機序解明を目指す予定である。

#### E. 結論

Furanの *gpt delta* ラットにおける一般毒性について、肝臓以外の病理組織学的検査を実施中であるが、2 mg/kgの雌雄において、胆管系障害を示唆する病理組織変化および血清生化学マーカーが変動したことから、FuranのNOAELは、雌雄共に2 mg/kg

未満であることがわかった。また、Furanの肝発がん機序には遺伝毒性メカニズムの関与の可能性が考えられた。一方、*gpt delta* マウスにおいて1-MNの投与による顕著な変化は見られていないが、引き続き全身臓器の病理組織検査を行い、その影響について検討するとともに肺における *gpt* ならびに *redlgam* 変異頻度の解析を行い、1-MNの *in vivo* 変異原性ならびにその発がん機序を明らかにする予定である。また、肝臓におけるマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、*estragole* の肝発がん過程早期に関わる遺伝子群を検索し、その肝発がん機序を明らかにする予定である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### G-1. 論文発表

なし

##### G-2. 学会発表

日比 大介, 木島 綾希, 鈴木 裕太, 金 美蘭, 石井 雄二, 増井 則夫, 能美 健彦, 梅村 隆志, 西川 秋佳: *gpt delta* ラットを用いた新しい短期包括試験法によるフランの毒性評価. 第26回日本毒性病理学会, 金沢, 第26回日本毒性病理学会講演要旨集: p54 (O-11), 2月, 2010

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

分担研究報告書

食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発に関する研究

分担研究課題：反復投与毒性試験の病理組織学的解析ならびに網羅的遺伝子解析

研究分担者	西川 秋佳	国立医薬品食品衛生研究所	病理部部長
研究協力者	石井 雄二	国立医薬品食品衛生研究所	病理部研究員

研究要旨

本研究は、一般毒性、変異原性および発がん性評価を同一動物で実施する *gpt delta* ラットを用いた短期包括試験法の開発を目的とする。有機材料の不完全燃焼で発生する多環芳香族炭水化物の一つの成分である 1-Methylnaphthalene (1-MN) はマウス肺発がん性が報告されており、さらに体内に蓄積されアデノシンと結合することが知られているが、その遺伝毒性については明らかではない。近年開発されたレポーター遺伝子導入動物 *gpt delta* マウスは点突然変異に加えて、欠失変異を効率よく検出することが確認されていることから、本研究では、1-MN の発がん機序を解明するため、*gpt delta* マウスを用いた 90 日間反復投与毒性試験を行った。その結果、雄の 1-MN 投与群で心臓と肺の絶対および相対重量が対照群に比べて有意に減少した。雌では、0.15% 1-MN 投与群の心臓と肝臓の絶対重量が対照群に比べて有意に減少した。血液学的検査では、投与群と対照群の間に有意な変化はなかった。血清生化学的検索では、雄の 0.15% 投与群でリン脂質、BUN、CRN、Ca、AST、ALT が対照群に比べて有意に増加または減少した。雌では、0.15% 投与群においてリン脂質、総コレステロール、Cl が対照群に比べて有意に増加または減少した。肺の病理組織学的検査では、投与群に顕著な変化は見られなかった。PCNA 免疫染色による肺胞上皮細胞 PCNA 陽性率の解析においても、投与群と対照群の間には有意な差は認められなかった。今後、肺における *gpt* ならびに *redlgam* 変異頻度の解析を行い、1-MN の *in vivo* 変異原性を明らかにし、その発がん機序解明を目指す予定である。また、香料として使用され、ラットでの肝発がん性が知られている estragole を F344 系ラットに 4 週間投与して、網羅的遺伝子解析を実施、構造類似化合物（ピペロニルブトキサイド：PBO）と比較し、その発がん過程早期に関わる遺伝子群を解析した。その結果、estragole または PBO 投与群でそれぞれの対照群に比べ体重の有意な減少と肝臓の絶対及び相対重量の有意な増加が認められた。肝臓の病理組織学的検査では、estragole 投与群で変異増殖巣、PBO 投与群で肝細胞肥大が認められた。今後マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析を行い、estragole の肝発がん過程早期に関わる遺伝子群を把握し、その肝発がん機序解明を目指す予定である。

## A. 研究目的

第 69 回国連食糧農業機関・世界保健機関合同食品添加物専門家委員会 Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)において、その発がん機序が不明である理由により引き続き評価保留となった香料の 1-Methylnaphthalene (1-MN) は B6C3F1 系マウスにおける肺発がん性が報告されている。さらに、有機材料の不完全燃焼で発生する多環芳香族炭水化物の一つの成分であることから 1-MN は体内に蓄積し、アデノシンと結合することが報告されている。しかし、その遺伝毒性については明らかではない。一方、近年開発されたレポーター遺伝子を導入した *gpt delta* マウスを用いた *in vivo* 変異原性試験は、点突然変異に加えて、欠失変異を効率よく検出でき、環境変異原性物質の検出に有力な試験法として期待されている。

このような背景から、本研究では、1-MN の発がん機序解明を目的として、*gpt delta* マウスを用いた 90 日間反復投与毒性試験を行った(実験 1)。さらに、同じく香料として使用され、ラットにおいて肝発がん性が認められている estragole の発がん機序を明らかにするために F344 ラットを用いて網羅的遺伝子解析を実施、構造類似化合物と比較した(実験 2)。構造類似化合物としては estragole の methoxy 側鎖が propyl 基であり、また、methylenedioxy 環を有するげっ歯類肝発がん物 piperonyl butoxide (PBO) を選択した。

## B. 研究方法

実験 1 : 6 週齢の B6C3F1 系 *gpt delta* マウス雌雄各 30 匹ずつを実験に供した。動物は

約 1 週間の馴化飼育後、雌雄とも各群 10 匹ずつ 3 群に分けて、コーン油に溶解した 1-MN を 0.075% または 0.15% の濃度で 13 週間混餌投与した。対照群には媒体であるコーン油を餌に混ぜて 13 週間投与した。実験終了後、動物をエーテル麻酔下で腹腔内静脈より採血し、血液学および血清生化学的検査を行った。解剖時、脳、心臓、肺、腎臓、副腎、胸腺、脳、脾臓、肝臓及び精巢の重量を測定し、全身臓器について病理組織学的検査を行った。発がん標的臓器である肺においては、細胞増殖活性の指標である PCNA 免疫染色を行い、一部を *gpt assay* 用に採取し、液体窒素により凍結し、測定まで -80°C で保存した。

実験 2 : 4 週齢の雄 F344 ラット 20 匹を 4 群に分けて二つの群には 600 mg/kgbw estragole または 2% PBO を 4 週間強制経口または混餌投与した。また、一つの対照群には媒体であるコーン油を 4 週間強制経口し (Control-1)、もう一つの対照群には基礎飼料のみ 4 週間経口投与した (Control-2)。実験終了後には、全ての動物をエーテル麻酔下で放血致死させ、標的臓器である肝臓を採取し、それぞれの重量を測定した。マイクロアレイ用のサンプルは液体窒素により凍結し、測定まで -80°C で保存した。

(倫理面への配慮)

実験動物は、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験ガイドラインに準拠し、実験動物委員会の承認に基づき実施した。特に、動物愛護の精神に則って動物飼育を行い、動物処置には倫理基準に充分配慮し、実験終了時、安楽死においても深麻酔下、苦痛に配慮した。また、申請者ならびに研究協力者の健康保持のため、本研究で被験物質

として使用する化合物、各実験で使用する薬品は、安全キャビネット等で厳重に注意して取り扱った。

### C. 研究結果

実験 1：試験期間中の動物の一般状態については特記すべき変化は認められなかった。対照群と比べて雄の 1-MN 群は第 2 週以降で体重増加抑制が認められた (Fig. 1)。雌雄の摂餌量を Fig. 2 と Fig.3 に示す。実験期間中に雄の 0.15% 群と雌の全投与群で摂餌量の低値が認められた。臓器重量においては、雄の 0.075% 以上群で心臓と脾臓の絶対重量と脾臓の相対重量、また、0.15% 投与群の心臓の相対重量が対照群に比べて有意に減少した (Table 1)。雌では、0.15% 投与群の心臓と肝臓の絶対重量が対照群に比べて有意に減少した (Table 2)。血液学的検査においては投与群と対照群の間に有意な差は認められなかった (Table 3)。雄の 0.15% または 0.075% 以上投与群でリン脂質、BUN (blood urea nitrogen)、CRN (creatinine)、Ca (calcium) が対照群に比べて有意に減少し、0.15% 投与群の AST (aspartate aminotransferase) と ALT (alanine aminotransferase) は対照群に比べて有意に増加した。雌では、0.15% 投与群においてリン脂質、総コレステロール、Cl (chloride) が対照群に比べて有意に増加または減少した (Table 4)。標的臓器である肺の病理組織学的検査では、投与に起因した変化は認められなかった。また、肺における PCNA 免疫染色の結果、単位面積あたりの肺胞上皮細胞 PCNA 陽性細胞数に対照群と投与群の間に有意な差はなかった (Fig. 4)。

実験 2：試験期間中の動物の一般状態につ

いては特記すべき変化は認められなかった。体重は、estragole または PBO 投与群でそれぞれの対照群に比べ有意な減少が認められた (Table 5)。さらに、estragole または PBO 投与群の肝臓の相対または絶対重量はそれぞれの対照群に比べ有意に増加した (Table 5)。病理組織学的検査においては、estragole 投与群に肝細胞変異増殖巣、PBO 投与群に小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。

### D. 考察

実験 1 では、1-MN の肺発がん機序を明らかにすることを目的に、*gpt delta* マウスにおける *gpt delta* マウスによる 90 日間の反復投与毒性試験を実施した。今回は、解析が終了した実験期間中の体重推移、臓器重量、肺における PCNA 免疫染色の結果について報告する。

実験終了時のマウスの最終体重は 1-MN の投与により低値傾向が見られ、実験期間中に投与群の摂餌量も低値を示していた。1-MN については、これまでの実験においても同様の体重増加抑制や摂餌量の低値が認められていることから、これらの変化は今までの報告と一致しており、1-MN の投与の影響によるものと考えられた。

雄の心臓と脾臓重量では、絶対および相対ともに 0.15% 投与群で対照群に比べ有意な減少が認められた。また、雌の 0.15% 投与群の心臓と肝臓の絶対重量が対照群に比べて有意に減少した。これらの変化は長期発がん性試験での報告と一致しており、何れも 1-MN が何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。しかし、血液学的または血清生化学的検査に関連する変化が認

められておらず、病理組織学的検査が終了してないことから、これらの結果を踏まえて再評価をする必要があると考えられた。

血清生化学的検査において、雄の 0.15% 投与群でリン脂質、BUN、CRN、Ca、AST、ALT が、雌の 0.15% 投与群においてリン脂質、総コレステロール、Cl が対照群に比べて有意に増加または減少した。しかし、臓器重量においてこれらに関連する顕著な変化が認められておらず、病理組織学的検査が終了してないことから、1-MN の影響について再検討する必要があると考えられる。

肺の PCNA 陽性細胞数において、雌雄ともに対照群と投与群の間に有意な変化は見られなかった。さらに、重量および病理組織学的検査においても対照群と投与群の間に顕著な変化が見られなかった。長期発がん性試験において、肺は標的臓器であり、気管支/肺腺腫の増加が見られることから、今後肺組織を用いた *gpt* ならびに *redlgam* 変異頻度の解析を行い、1-MN の *in vivo* 変異原性を明らかにし、その発がん機序解明を目指す予定である。

実験 2 では、estragole または PBO 投与群で体重の有意な減少、肝重量の有意な増加が認められた。さらに、estragole または PBO 投与群の肝臓において変異増殖巣または肝細胞肥大が認められた。今後は、肝臓におけるマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、肝臓に酸化的 DNA 損傷を引き起こすこと、また明らかな *in vivo* 変異原性は示さないことが明らかとなっている PBO と比較しながら estragole の肝発がん過程早期に関わる遺伝子群を検索し、その肝発がん機序解明を目指す予定である。

#### E. 結論

*gpt delta* マウスにおいて 1-MN の投与による顕著な変化は見られていないが、引き続き全身臓器の病理組織検査を行い、その影響について検討するとともに肺における *gpt* ならびに *redlgam* 変異頻度の解析を行い、1-MN の *in vivo* 変異原性ならびにその発がん機序を明らかにする予定である。また、肝臓におけるマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、estragole の肝発がん過程早期に関わる遺伝子群を検索し、その肝発がん機序を明らかにする予定である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### 【参考文献】

- 1) Murata Y., Denda A., Maruyama H., Konishi Y., Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies of 1-Methylnaphthalene in B6C3F1 mice, *Fundam and Appl Toxicol.*, 21 (1), 44-51 (1993)
- 2) Harvy R.G., and Halonen M., Interaction between carcinogenic hydrocarbons and nucleosides. *Cancer Res.*, 28, 2183-2186(1968)

Table 1. Final body and organ weights for male *gpt* delta mice given 1-MN for 13 weeks

Group	Control		0.075% 1-MN		0.15% 1-MN	
	No. of animals examined	10	10	10	10	10
Body weight		33.1±1.8 <sup>a</sup>	33.1±3.7		30.7±2.0	
Absolute(g)						
Liver		1.35±0.10	1.32±0.18		1.21±0.11	
Lung		0.18±0.03	0.17±0.02		0.17±0.02	
Kidney		0.46±0.08	0.45±0.03		0.45±0.04	
Brain		0.49±0.01	0.48±0.01		0.48±0.01	
Spleen		0.09±0.01	0.07±0.02*		0.06±0.01**	
Thymus		0.03±0.01	0.03±0.01		0.03±0.01	
Heart		0.97±0.06	0.81±0.24*		0.72±0.03**	
Adrenal		0.01±0.00	0.01±0.00		0.01±0.00	
Gonad		0.21±0.03	0.22±0.03		0.21±0.03	
Relative(g/100g B.W.)						
Liver		4.09±0.27	3.99±0.19		3.93±0.23	
Lung		0.55±0.07	0.52±0.07		0.51±0.17	
Kidney		1.38±0.24	1.38±0.11		1.47±0.12	
Brain		1.47±0.10	1.47±0.15		1.57±0.12	
Spleen		0.27±0.04	0.21±0.04*		0.21±0.05*	
Thymus		0.09±0.02	0.08±0.04		0.08±0.01	
Heart		2.94±0.21	2.48±0.77		2.35±0.19**	
Adrenal		0.02±0.00	0.02±0.01		0.02±0.01	
Gonad		0.63±0.08	0.67±0.08		0.67±0.07	

\*,\*\* : Significantly different from the controls at the levels of p<0.05 and p<0.01, respectively (Dunnnett's test)

<sup>a</sup> Mean±SD.

Table 2. Final body and organ weights for female *gpt* delta mice given 1-MN for 13 weeks

No. of animals examined	Group		0.1% Safrole		0.5% Safrole	
	Control	10	10	10	10	10
Body	25.6±1.4 <sup>a</sup>		25.5±2.6		24.8±1.3	
Absolute(g)						
Liver	1.08±0.06		1.04±0.06		1.00±0.07*	
Lung	0.17±0.02		0.17±0.02		0.17±0.02	
Kidney	0.34±0.02		0.33±0.02		0.33±0.02	
Brain	0.52±0.01		0.50±0.02		0.51±0.01	
Spleen	0.08±0.01		0.08±0.01		0.07±0.01	
Thymus	0.04±0.01		0.04±0.01		0.08±0.10**	
Heart	0.13±0.01		0.12±0.01		0.12±0.01	
Adrenal	0.01±0.00		0.01±0.00		0.01±0.00	
Relative(g/100g B.W.)						
Liver	4.28±0.43		4.12±0.29		4.05±0.27	
Lung	0.66±0.08		0.67±0.12		0.68±0.09	
Kidney	1.33±0.13		1.29±0.11		1.32±0.10	
Brain	2.03±0.11		1.99±0.16		2.04±0.10	
Spleen	0.32±0.03		0.30±0.04		0.30±0.04	
Thymus	0.14±0.02		0.15±0.02		0.35±0.44	
Heart	0.51±0.02		0.49±0.04		0.47±0.04	
Adrenal	0.03±0.01		0.03±0.01		0.04±0.01	

\*, \*\*: Significantly different from the controls at the levels of  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively (Dunnnett's test)

<sup>a</sup> Mean±SD.

Table 3. Hematological data for male and female *gpt* delta mice given 1-MN for 13 weeks

Item	Dose of 1-MN (% in diet)			
	0		0.075	
No. of animals examined	10	10	10	10
<b>Males</b>				
WBC(x10 <sup>2</sup> /μℓ)	24.2±15.0 <sup>a</sup>	22.0±9.0	15.0±7.0	
RBS(x10 <sup>4</sup> /μℓ)	963±40	959±64	965±63	
Hb(g/dL)	13.9±0.6	14.0±1.0	14.1±0.8	
Ht(%)	50.6±2.0	50.5±3.2	50.5±3.2	
MCV(fL)	53.0±0.0	52.6±0.5	52.0±0.0	
MCH(pg)	14.4±0.2	14.7±0.3	14.6±0.4	
MCHC(g/dL)	27.5±0.4	27.8±0.4	27.9±0.7	
Plt(x10 <sup>4</sup> /μℓ)	138.0±8.0	134.0±14.0	137.0±17.0	
<b>Females</b>				
WBC(x10 <sup>2</sup> /μℓ)	16.0±8.0	17.0±11.0	17.0±8.0	
RBS(x10 <sup>4</sup> /μℓ)	998±45	991±67	977±53	
Hb(g/dL)	14.8±0.6	14.7±0.9	14.4±0.8	
Ht(%)	53.0±2.4	52.9±3.5	51.6±2.9	
MCV(fL)	53.1±0.4	53.4±0.5	52.9±0.5	
MCH(pg)	14.8±0.1	14.9±0.3	14.8±0.4	
MCHC(g/dL)	27.8±0.1	27.8±0.5	28.0±0.5	
Plt(x10 <sup>4</sup> /μℓ)	115.0±7.0	112.0±9.0	113.0±8.0	

Abbreviations: WBC, white blood cell; RBC, red blood cell; Hb, hemoglobin; Ht, hematocrit; MCV, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; Plt, platelet.

<sup>a</sup> Mean±SD.

Table 4. Serum biochemistry for male and female *gpt* delta mice given 1-MN for 13 weeks

Item	Dose of 1-MN (% in diet)			
	0	9	0.075	0.15
Males				
No. of animals examined	9	9	8	10
TP (g/dl)	5.3±0.3 <sup>a</sup>	5.3±0.2	5.3±0.2	5.2±0.2
Alb (g/dl)	3.1±0.2	3.1±0.2	3.1±0.2	3.1±0.2
T-Bil (mg/dl)	0.05±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01	0.06±0.01
TG (mg/dl)	99.0±41.8	99.0±41.8	73.8±21.6	68.1±24.7
Phospholipid (mg/dl)	232.3±22.8	232.3±22.8	218.9±15.2	207.4±5.6*
TC (mg/dl)	119.6±12.5	119.6±12.5	121.3±8.1	113.9±5.8
BUN (mg/dl)	31.1±3.8	31.1±3.8	28.6±2.0	26.6±3.7*
CRN (mg/dl)	0.11±0.01	0.11±0.01	0.10±0.01	0.09±0.01**
Na (mEq/l)	152.2±1.9	152.2±1.9	151.0±1.4	152.3±1.5
Cl (mEq/l)	115.4±1.4	115.4±1.4	115.4±1.3	116.9±3.0
K (mEq/l)	5.3±0.7	5.3±0.7	5.4±1.4	5.0±0.3
Ca (mg/dl)	9.2±0.3	9.2±0.3	8.9±0.2*	8.9±0.3*
IP (mg/dl)	8.1±1.0	8.1±1.0	7.5±1.1	8.1±0.6
AST (IU/l)	37.1±2.8	37.1±2.8	37.3±3.2	50.6±15.6*
ALT (IU/l)	20.3±2.1	20.3±2.1	20.9±4.5	30.1±10.4*
ALP (IU/l)	199.6±19.2	199.6±19.2	209.1±26.1	220.5±21.0
No. of animals examined	10	10	10	9
Females				
TP (g/dl)	5.3±0.1	5.3±0.1	5.2±0.1	5.2±0.1
Alb (g/dl)	3.4±0.1	3.4±0.1	3.4±0.1	3.4±0.1
T-Bil (mg/dl)	0.05±0.01	0.05±0.01	0.06±0.02	0.07±0.01
TG (mg/dl)	38.1±26.6	38.1±26.6	29.9±23.0	22.9±17.3
Phospholipid (mg/dl)	189.2±8.1	189.2±8.1	181.0±7.9	172.3±16.6*
TC (mg/dl)	104.6±4.8	104.6±4.8	98.6±7.1	97.1±7.1*
BUN (mg/dl)	20.9±4.1	20.9±4.1	24.4±10.4	25.3±5.4
CRN (mg/dl)	0.09±0.01	0.09±0.01	0.11±0.02	0.09±0.02
Na (mEq/l)	150.2±1.2	150.2±1.2	150.9±0.9	151.6±2.2
Cl (mEq/l)	115.6±1.5	115.6±1.5	115.9±1.4	117.6±2.1*
K (mEq/l)	5.4±0.4	5.4±0.4	5.4±0.7	5.2±0.2
Ca (mg/dl)	8.9±0.2	8.9±0.2	9.0±0.3	8.7±0.2
IP (mg/dl)	7.5±1.0	7.5±1.0	7.7±1.3	7.2±0.6
AST (IU/l)	39.6±2.4	39.6±2.4	38.6±3.4	40.3±4.1
ALT (IU/l)	18.0±2.1	18.0±2.1	16.7±1.2	18.4±2.5
ALP (IU/l)	344.9±48.1	344.9±48.1	361.3±54.7	343.6±29.6

Abbreviations: TP, total protein; Alb, albumin; T-Bil, total bilirubin; TG, triglyceride; TC, Total cholesterol; BUN, blood urea nitrogen; CRN, creatinine; Na, sodium; Cl, chloride; K, potassium; Ca, calcium; IP, inorganic phosphate; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase  
<sup>a</sup>,\*\* : Significantly different from the controls at the levels of p<0.05 and p<0.01, respectively (Dunnett's test)  
<sup>a</sup> Mean±SD



Table 5. Final body and liver weights for male F344 rat given 600 mg/kg estragole or 2% PBO for 4 weeks

Groups	Animal No.	Final body weight(g)	Liver weight	
			Absolute(g)	Relative(g/100gB.W.)
Control-1	5	231.3±11.8 <sup>a</sup>	8.4±0.5	3.6±0.1
600 mg/kg Estragole	5	176.6±8.1 <sup>***</sup>	7.0±0.5 <sup>**</sup>	4.0±0.1 <sup>**</sup>
Control-2	5	220.2±17.1	8.7±0.9	4.0±0.2
2% PBO	5	167.4±18.5 <sup>##</sup>	12.1±1.2 <sup>##</sup>	7.2±0.2 <sup>###</sup>

<sup>\*\*\*</sup>, <sup>\*\*</sup>: significantly different from the control-1 group at the levels of p<0.001 and p<0.0001, respectively (Student's *t*-test). <sup>##</sup>,<sup>###</sup>: significantly different from the control-2 group at the levels of p<0.001 and p<0.0001, respectively (Student's *t*-test) <sup>a</sup> Mean±SD.

Fig. 1. Growth curves for male and female *gpt* delta mice given 1-MN for 13 weeks.

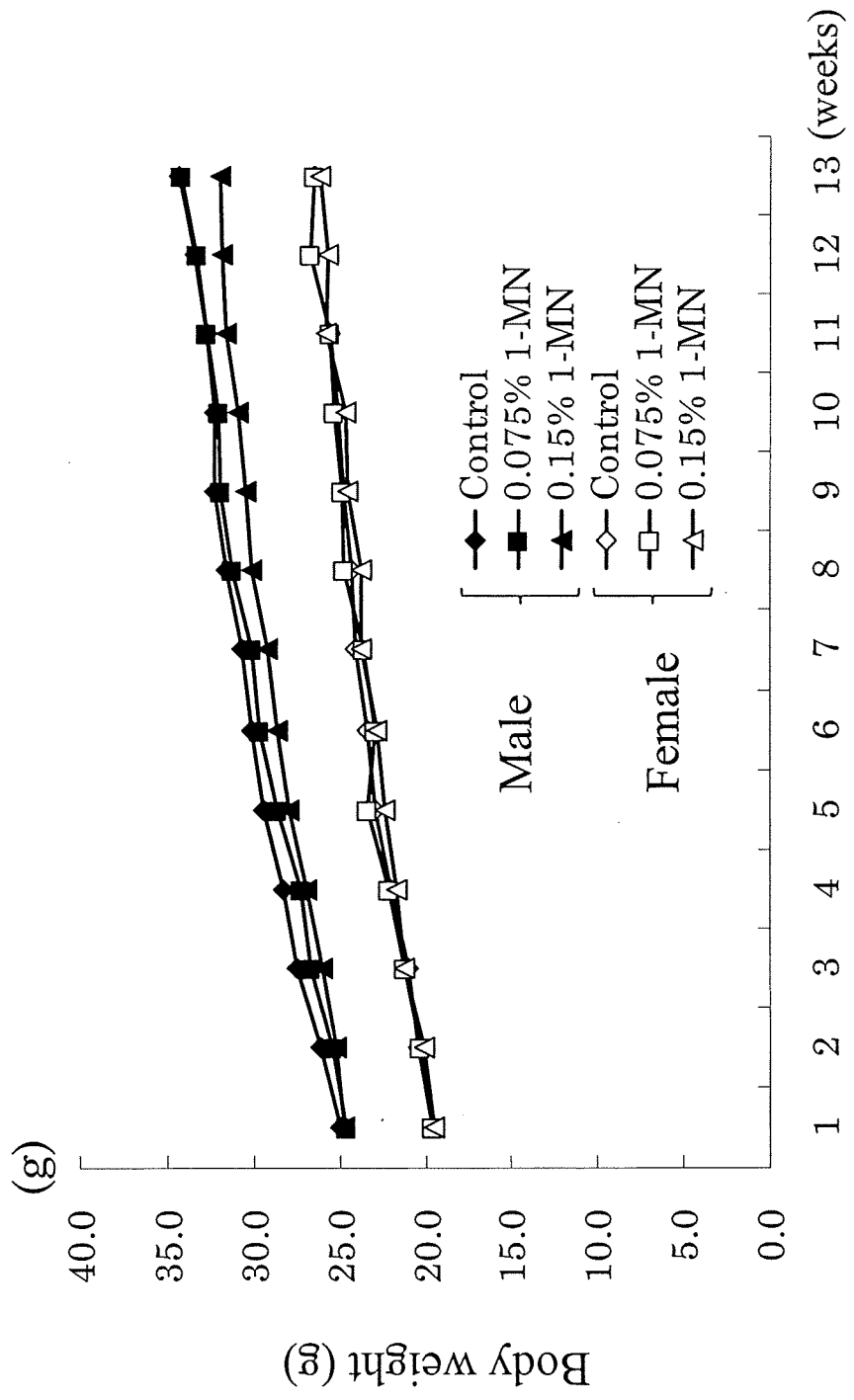


Fig. 2. Food consumption curves for male *gpt* delta mice given 1-MN for 13 weeks.

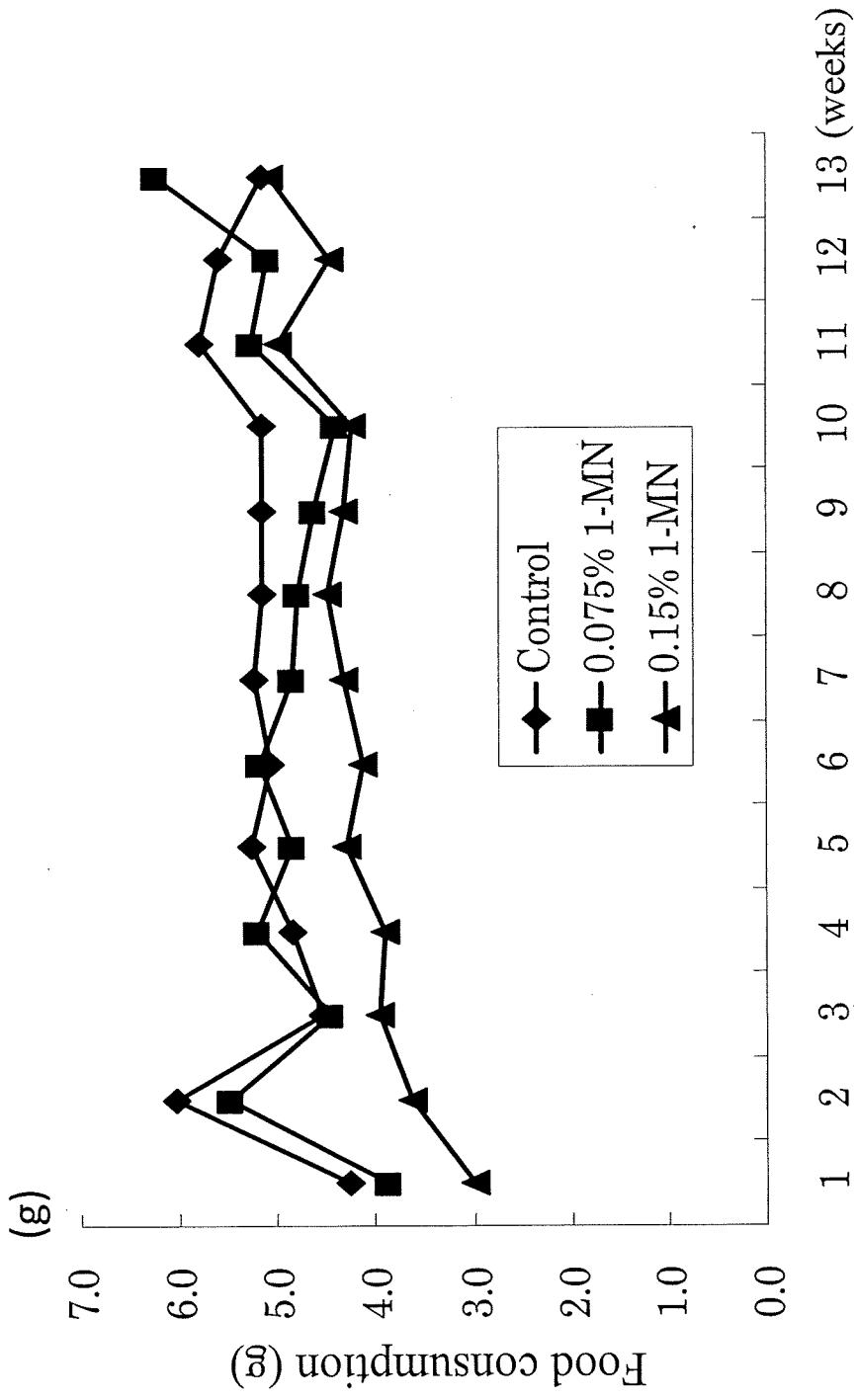


Fig. 3. Food consumption curves for female *gpt* delta mice given 1-MN for 13 weeks.

