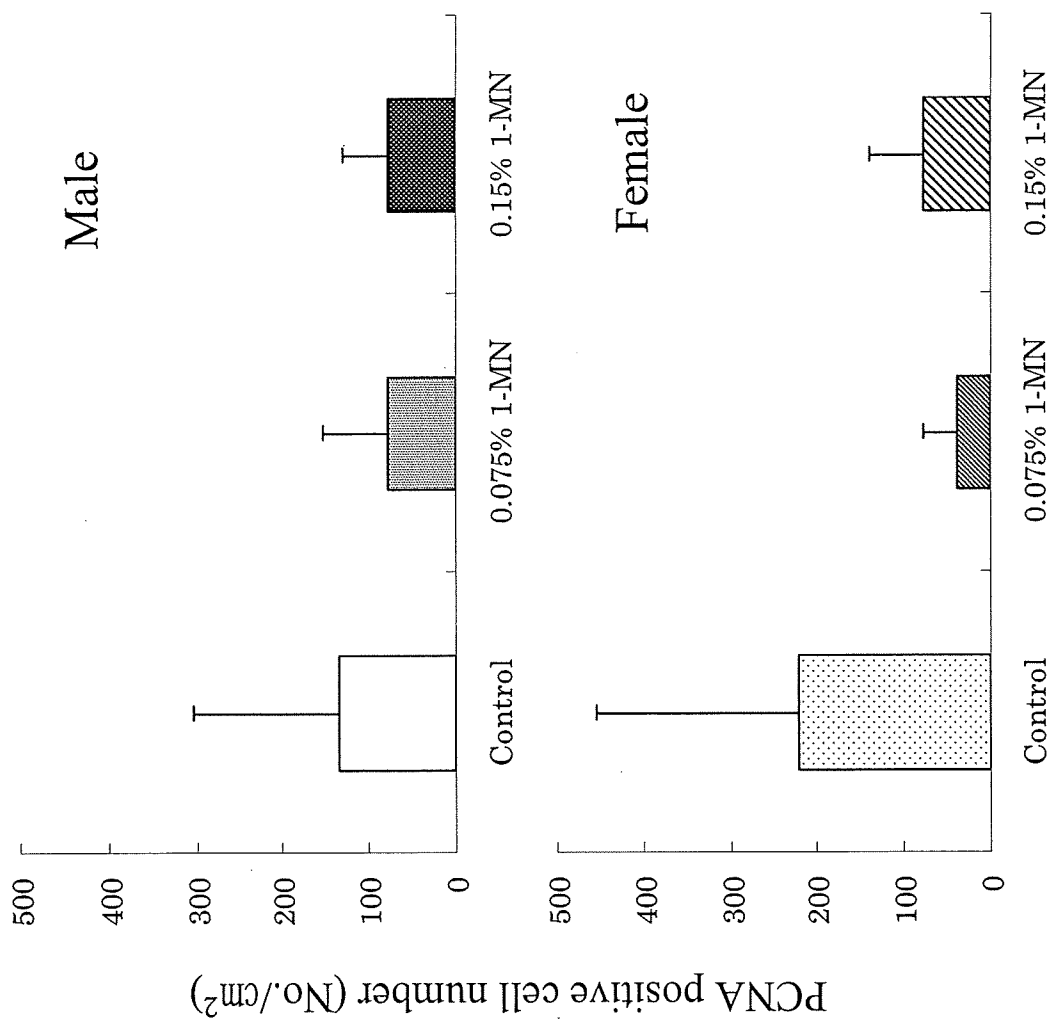


Fig.4. Immunohistochemical staining of PCNA in lung of *gpt* delta mice given 1-MN for 13 weeks.



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

分担課題：反復投与毒性試験材料による *in vivo* 変異原性解析

研究分担者	梅村 隆志	国立医薬品食品衛生研究所	病理部長
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している。今回、評価対象被験物質としてげっ歯類の肝臓に発がん性を有しているものの、その発がん機序が不明であり、一般毒性の情報も乏しい Furan を選択し、短期包括的毒性試験によりその毒性プロファイルを明らかにすると共に、種々の *in vivo* 変異原性試験によりその発がん機序の解明を目指した。雌雄 7 週齢の F344 *gpt delta* ラット各群 10 匹に Furan を 0、2、8 mg/kg の用量で 13 週間強制経口投与（週 5 回）した。剖検時、エーテル麻酔下で採血し、血液学的検査、血清生化学的検査を行い、主要臓器の重量測定および病理組織学的検索を実施した。*In vivo* 変異原性の評価は肝臓の *gpt reporter gene assay* および骨髄を用いた小核試験により、発がん性の評価は肝臓での前癌病変である GST-P 陽性肝細胞巢の定量解析により行った。雄の 8 mg/kg において体重増加抑制が、雌雄の 8 mg/kg において脾臓および肝臓重量の増加が認められた。血清生化学検査では、2 mg/kg 以上において、雄で ALP、雌で T-Bil の増大が認められ、8 mg/kg の雄においては T-Bil の高値も認められた。病理組織学的検索では、投与群の肝臓において胆管線維症、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。*In vivo* 小核試験においては、雄の 8 mg/kg で小核出現頻度の有意な増加が認められ、*gpt* 遺伝子突然変異頻度においては雄で用量に依存した増加傾向が認められた。発がん性評価では、雌雄の 8 mg/kg で GST-P 陽性肝細胞巢の数および面積の増加が認められた。これらの結果から、Furan の NOAEL は 2 mg/kg 未満であり、Furan の肝発がん機序には遺伝毒性のメカニズムの関与が示唆された。同一個体において比較的短期間で、一般毒性、*in vivo* 変異原性、そして発がん性まで評価可能であることが示された本試験法は、食品添加物等のヒトへの安全性向上に大きく貢献できると考えられた。

- A. 研究目的  
安全性は一般毒性試験、遺伝毒性試験、発がん性試験、生殖発生毒性試験など様々な食品添加物等、化学物質のヒトに対する

毒性試験の結果を総合的に捉えた上で担保されている。発がん性試験はこれら毒性試験の中で最も多くの動物数と長期間の投与を必要とし、剖検や病理組織学的検査などを含めると、最短でも3~4年を要する。遺伝毒性試験では、*in vitro* 試験である Ames 試験や染色体異常試験、*in vivo* では小核試験が実施されるが、*in vivo* 小核試験では検索する細胞・組織が赤血球および骨髄に限定されるため、発がん標的臓器における遺伝毒性をどの程度正確に反映しているか不明な点がある。これらに加え、近年、動物愛護の観点から実験動物数削減の声が高まっていることも踏まえ、本研究は、臓器・組織レベルでの点突然変異ならびに欠失変異を検索可能な *gpt delta* ラットを用い、前癌病変を含む反復投与試験データ、遺伝毒性データを比較的短期間で同一個体において得ることができる短期包括的試験法の開発を目指している。

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。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、発がん性が危惧されているものもある。その代表例に Furan-substituted 物質が挙げられる。Furan-substituted 物質の基本骨格である Furan はげっ歯類において肝臓での発がん性が確認されており、近年、レトルト食品や缶詰製品などの加熱食品中にその存在が

認められていることから、ヒトへの健康被害が危惧されている。しかしながら、Furan の遺伝毒性は明確になっていないため、その発がん機序は不明である。さらに、一般毒性試験のデータも乏しく、ラットにおける NOAEL は未だ求まっていない。

そこで今回、*gpt delta* ラットを用いた短期包括的毒性試験を実施し、Furan の一般毒性、変異原性、発がん性を含めた総合的な毒性評価を行い、さらに本試験で得られたデータと過去に報告されているデータと比較し、本試験法の有用性を検討した。

## B. 研究方法

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<sup>1)</sup>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。

(倫理面への配慮)

動物実験は、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、動物の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

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。体重推移を Fig. 1 に示す。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。摂餌量を Fig. 2 に示す。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の結果を Table 1 に示す。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。血液学的検査結果を Table 2 に示す。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。血清生化学的検査結果を Table 3 に示す。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結果を Table 4 に示す。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。小核試験の結果を Table 5 に示す。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 の結果を Table 6 および 7 に示す。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結果を Fig. 3 および 4 に示す。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。

#### D. 考察

本研究では、*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<sup>1)</sup>。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<sup>1)</sup>、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<sup>1)</sup>が、陽性を示した報告もある<sup>2,3)</sup>。*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<sup>4)</sup>。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<sup>1)</sup>。今回、ラットに反復投与することで、雄の骨髓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<sup>5,6)</sup>、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る。

#### E. 結論

Furan の一般毒性について、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。

本試験の結果から、同一個体において比較的短期間で、一般毒性、*in vivo* 変異原性、そして発がん性まで評価可能であることを確認できた。短期包括的毒性試験法は食品添加物の安全性データを迅速かつ効率的に収集でき、ヒトの食に対する安全を担保する上で大きく貢献できる試験法であると考えられた。

#### 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

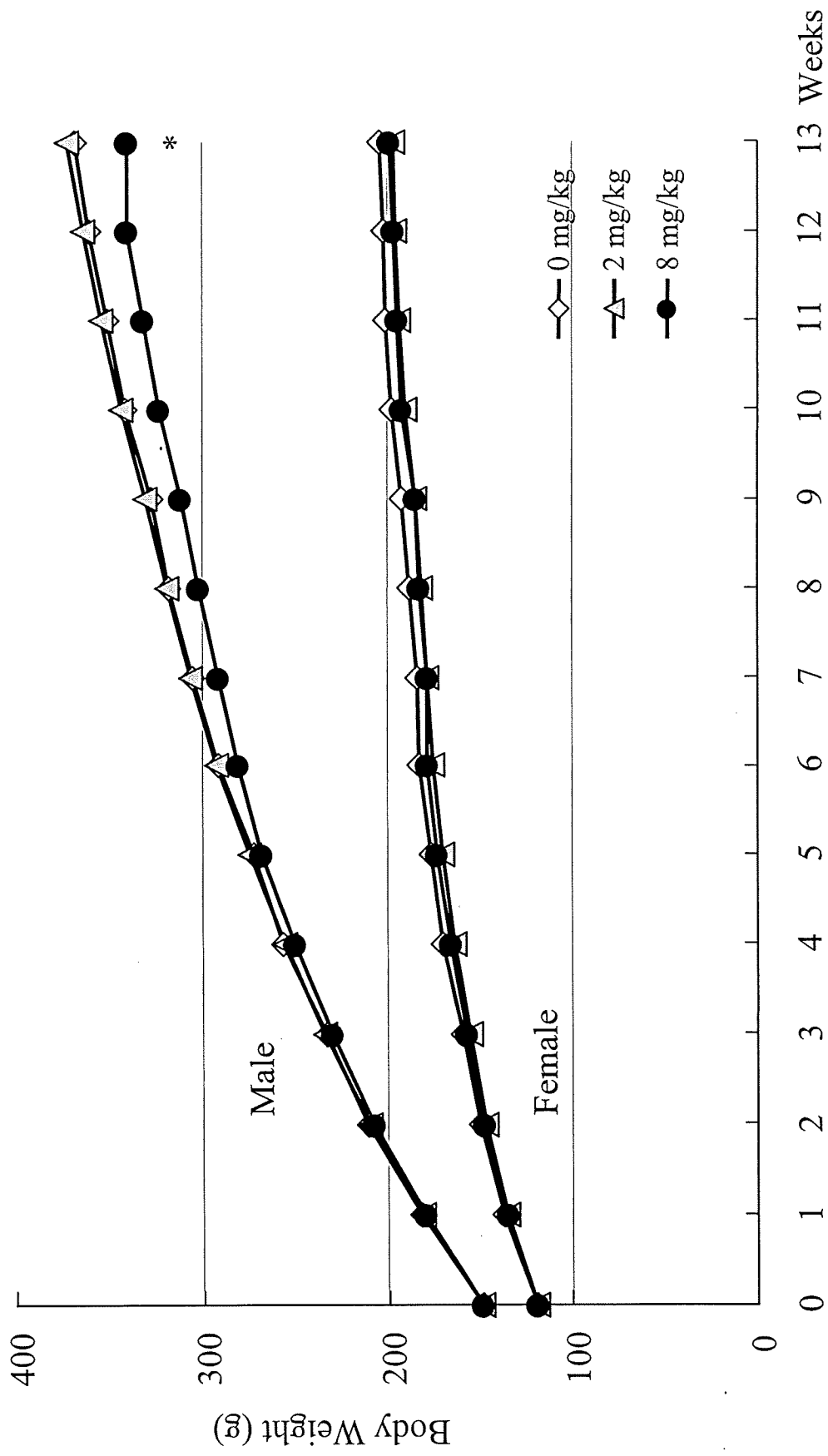
なし

#### 【参考文献】

- 1) National Toxicology Program: Toxicology and Carcinogenesis Studies of Furan (CAS No. 110-00-9) in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies), Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser., 402, 1-286 (1993)
- 2) Lee H., Bian S.S., Chen Y.L.: Genotoxicity of 1,3-dithiane and 1,4-dithiane in the CHO/SCE assay and the Salmonella/microsomal test., *Mutat. Res.*, 321(4), 213-8 (1994)
- 3) Peterson L.A., Naruko K.C., Predecki D.P.: A reactive metabolite of furan, cis-2-butene-1,4-dial, is mutagenic in the Ames assay., *Chem. Res. Toxicol.*, 13(7), 531-534 (2000)
- 4) Durling L.J., Svensson K., Abramsson-Zetterberg L.: Furan is not genotoxic in the micronucleus assay in vivo or in vitro., *Toxicol. Lett.*, 169(1), 43-50 (2007)
- 5) Elmore L.W., Sirica A.E.: Phenotypic characterization of metaplastic intestinal glands and ductular hepatocytes in cholangiofibrotic lesions rapidly induced in the caudate liver lobe of rats treated with furan. *Cancer Res.*, 51(20), 5752-5759 (1991)
- 6) Elmore L.W., Sirica A.E.: "Intestinal-type" of adenocarcinoma preferentially induced in right/caudate liver lobes of rats treated with furan. *Cancer Res.*, 53(2), 254-259 (1993)

- 1) National Toxicology Program: Toxicology and Carcinogenesis Studies of Furan (CAS No. 110-00-9) in F344

Fig.1. Growth curves for F344 *gpt* delta rats treated with Furan for 13 weeks



\*: Significantly different from the 0 mg/kg group at  $p < 0.05$ .

Fig.2. Daily food intakes for F344 *gpt* delta rats treated with Furan for 13 weeks

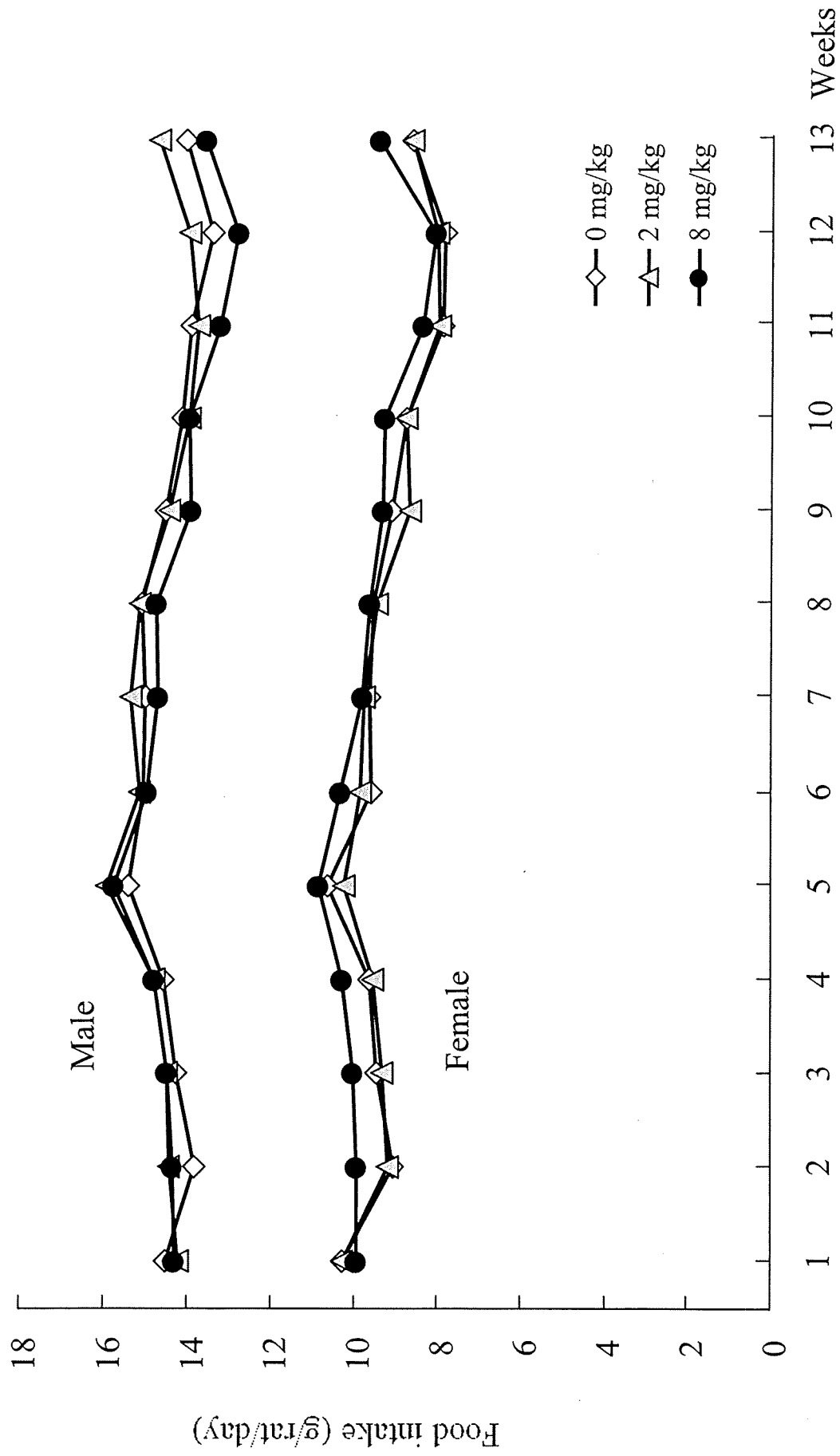
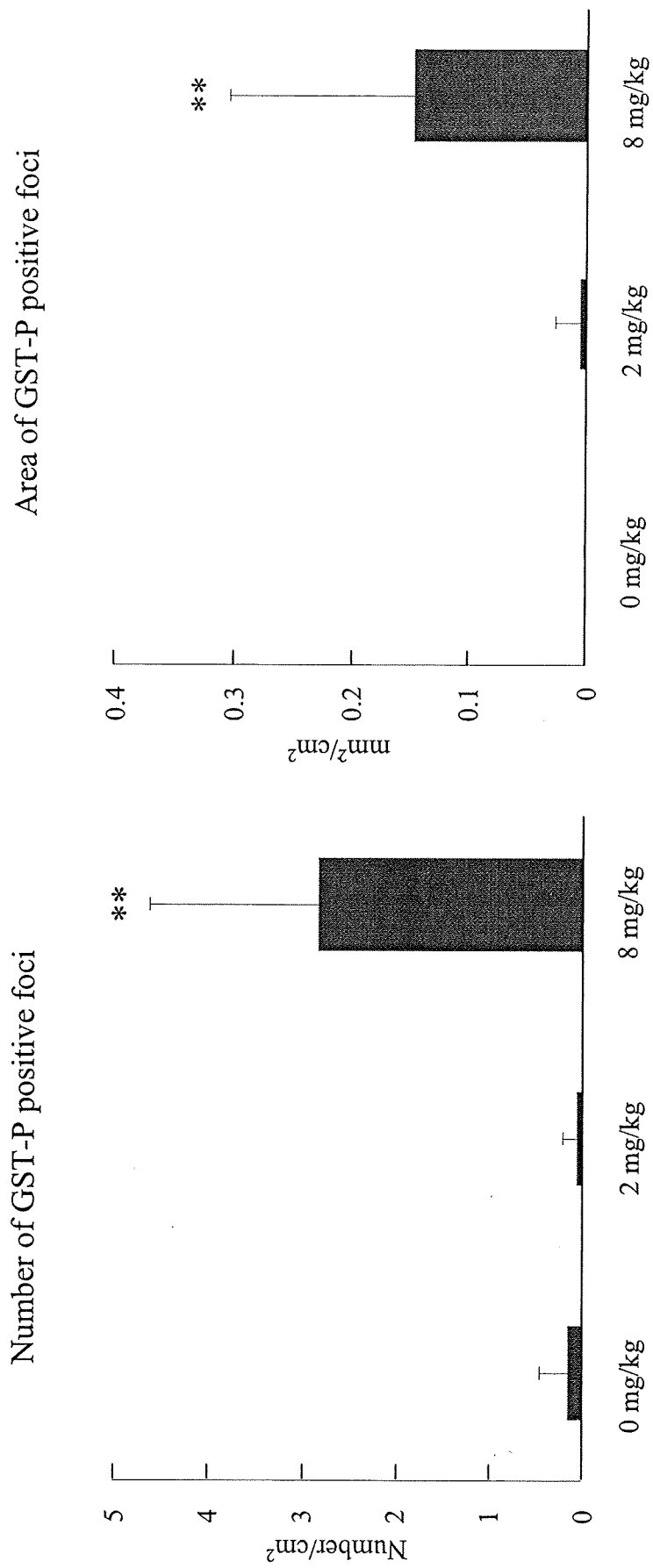


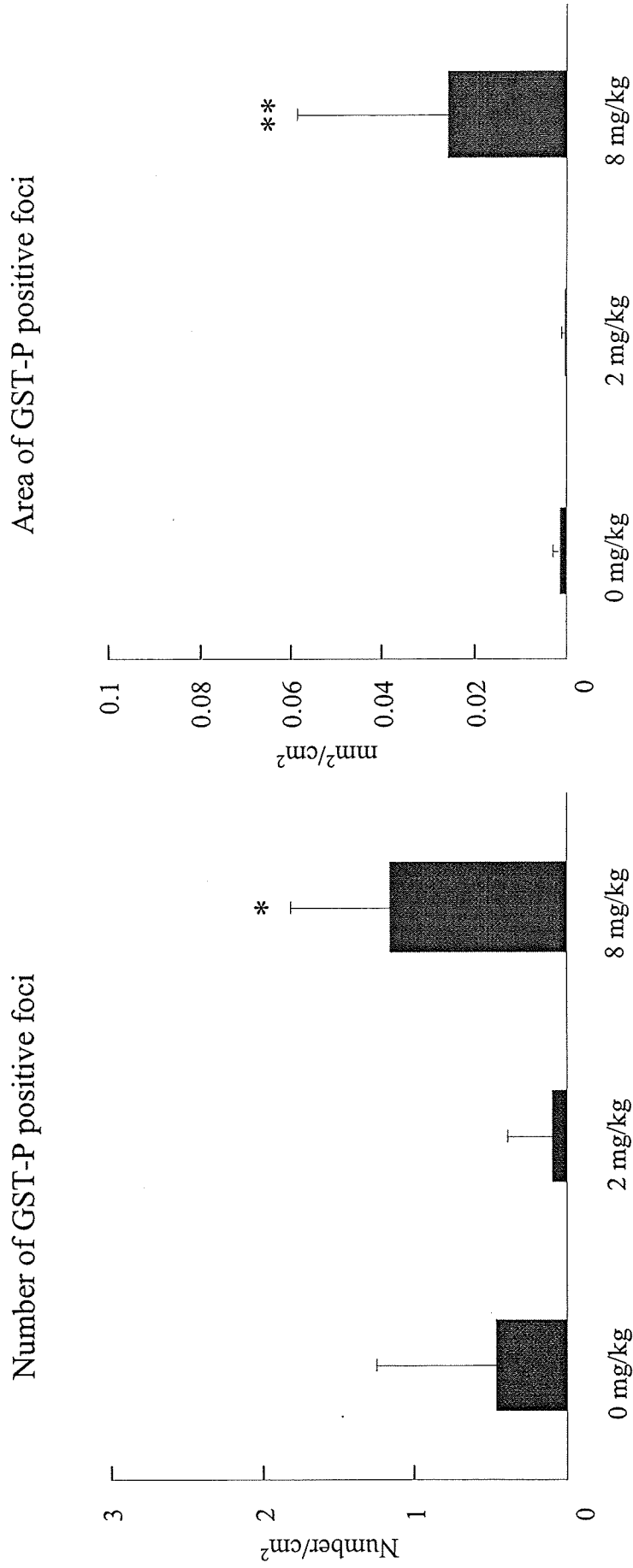


Fig.3. Quantitative analysis of GST-P positive foci in the livers of F344 *gpt* delta male rats treated with Furan for 13 weeks



\*\* : Significantly different from the 0 mg/kg group at  $p < 0.01$ .

Fig.4. Quantitative analysis of GST-P positive foci in the livers of F344 *gpt* delta female rats treated with Furan for 13 weeks



\*,\*\* : Significantly different from the 0 mg/kg group at  $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

Table 1 Final body and organ weights for F344 *gpt* delta rats treated with Furan for 13 weeks

	Male			Female		
	0 mg/kg	2 mg/kg	8 mg/kg	0 mg/kg	2 mg/kg	8 mg/kg
Final body weights (g)	357 ± 21 <sup>a)</sup>	361 ± 21	328 ± 27*	195 ± 10	189 ± 5	187 ± 7
Organ weights						
Absolute weights (g)						
Brain	1.92 ± 0.06	1.94 ± 0.06	1.88 ± 0.03	1.78 ± 0.04	1.77 ± 0.04	1.75 ± 0.03
Thymus	0.21 ± 0.02	0.20 ± 0.01	1.90 ± 0.03	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.17 ± 0.01
Lungs	1.05 ± 0.06	1.12 ± 0.10	1.03 ± 0.08	0.77 ± 0.06	0.79 ± 0.03	0.76 ± 0.05
Heart	0.90 ± 0.05	0.91 ± 0.04	0.84 ± 0.05**	0.58 ± 0.03	0.57 ± 0.04	0.54 ± 0.03
Spleen	0.65 ± 0.03	0.66 ± 0.04	0.67 ± 0.04	0.43 ± 0.04	0.41 ± 0.02	0.46 ± 0.03
Liver	9.46 ± 0.71	9.75 ± 0.86	10.37 ± 1.00	4.75 ± 0.39	4.69 ± 0.23	5.81 ± 0.28**
Adrenals	0.045 ± 0.005	0.048 ± 0.004	0.050 ± 0.011	0.052 ± 0.003	0.051 ± 0.009	0.051 ± 0.007
Kidneys	2.01 ± 0.14	2.09 ± 0.18	1.98 ± 0.14	1.24 ± 0.17	1.14 ± 0.07	1.23 ± 0.08
Testes	2.98 ± 0.14	3.04 ± 0.09	2.92 ± 0.12			
Relative weights (g/100g b.w.)						
Brain	0.54 ± 0.03	0.54 ± 0.02	0.58 ± 0.05	0.92 ± 0.04	0.94 ± 0.03	0.94 ± 0.04
Thymus	0.059 ± 0.005	0.057 ± 0.004	0.057 ± 0.008	0.091 ± 0.006	0.093 ± 0.006	0.089 ± 0.009
Lungs	0.30 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.40 ± 0.03	0.42 ± 0.02	0.41 ± 0.03
Heart	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.26 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.01	0.29 ± 0.01
Spleen	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.21 ± 0.01**	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.24 ± 0.02**
Liver	2.65 ± 0.06	2.70 ± 0.11	3.16 ± 0.12**	2.44 ± 0.16	2.50 ± 0.11	3.11 ± 0.13**
Adrenals	0.013 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.015 ± 0.004	0.027 ± 0.002	0.026 ± 0.003	0.027 ± 0.004
Kidneys	0.56 ± 0.03	0.58 ± 0.04	0.605 ± 0.03*	0.64 ± 0.10	0.61 ± 0.03	0.66 ± 0.05
Testes	0.84 ± 0.03	0.85 ± 0.05	0.90 ± 0.07			

a): Mean ± SD

\*\*\*: Significantly different from the 0 mg/kg group at  $p < 0.05$  and 0.01, respectively.

Table 2 Hematology for F344 *gpt* delta rats treated with Furan for 13 weeks

	Male				Female			
	0 mg/kg	2 mg/kg	8 mg/kg	8 mg/kg	0 mg/kg	2 mg/kg	2 mg/kg	8 mg/kg
RBC ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	1003 $\pm$ 43 <sup>a)</sup>	1003 $\pm$ 56	937 $\pm$ 114	881 $\pm$ 54	883 $\pm$ 36	847 $\pm$ 75		
Hb (g/dL)	15.6 $\pm$ 0.6	16.1 $\pm$ 0.7	15.4 $\pm$ 1.8	15.2 $\pm$ 0.9	15.0 $\pm$ 0.6	14.7 $\pm$ 1.3		
Ht (%)	52.9 $\pm$ 2.2	54.0 $\pm$ 3.1	51.2 $\pm$ 5.7	49.3 $\pm$ 2.9	49.8 $\pm$ 2.0	47.5 $\pm$ 4.0		
MCV (fL)	52.7 $\pm$ 0.4	53.8 $\pm$ 0.4*	54.7 $\pm$ 0.3**	56.0 $\pm$ 0.4	56.4 $\pm$ 0.3	56.1 $\pm$ 0.5		
MCH (pg)	15.5 $\pm$ 0.5	16.1 $\pm$ 0.3**	16.4 $\pm$ 0.3*	17.2 $\pm$ 0.3	16.9 $\pm$ 0.3	17.3 $\pm$ 0.3		
MCHC (g/dL)	29.4 $\pm$ 0.9	29.9 $\pm$ 0.5	30.0 $\pm$ 0.5	30.8 $\pm$ 0.6	30.0 $\pm$ 0.7*	30.9 $\pm$ 0.4		
PLT ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	74.6 $\pm$ 8.6	78.2 $\pm$ 4.0	87.2 $\pm$ 6.6**	86.0 $\pm$ 11.2	76.8 $\pm$ 4.5	83.5 $\pm$ 9.9		
WBC ( $\times 10^2/\mu\text{L}$ )	46.6 $\pm$ 4.9	58.4 $\pm$ 10.1**	54.6 $\pm$ 9.9	40.4 $\pm$ 9.8	39.5 $\pm$ 9.8	35.4 $\pm$ 10.5		
Differential cell counts (%)								
Band	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0		
Seg	37.1 $\pm$ 6.2	39.9 $\pm$ 8.6	35.6 $\pm$ 9.0	28.5 $\pm$ 7.8	28.6 $\pm$ 7.8	27.7 $\pm$ 4.7		
Eosino	1.4 $\pm$ 0.7	1.2 $\pm$ 0.8	1.0 $\pm$ 0.6	1.6 $\pm$ 1.3	0.8 $\pm$ 0.6	1.0 $\pm$ 1.1		
Baso	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0		
Lymph	61.0 $\pm$ 6.0	58.6 $\pm$ 8.7	63.3 $\pm$ 9.0	69.4 $\pm$ 7.6	70.2 $\pm$ 8.3	70.8 $\pm$ 4.5		
Mono	0.5 $\pm$ 0.6	0.3 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.5	0.4 $\pm$ 0.5	0.4 $\pm$ 0.4		
EbI	1.6 $\pm$ 1.5	2.4 $\pm$ 1.7	1.6 $\pm$ 1.5	4.0 $\pm$ 2.6	2.1 $\pm$ 1.5	2.0 $\pm$ 1.6		

<sup>a)</sup>: Mean  $\pm$  SD

\*,\*\*: Significantly different from the 0 mg/kg group at  $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

Table 3 Serum biochemistry for F344 *gpt* delta rats treated with Furan for 13 weeks

	Male			Female		
	0 mg/kg	2 mg/kg	8 mg/kg	0 mg/kg	2 mg/kg	8 mg/kg
TG (g/dL)	7.1±0.1 <sup>a)</sup>	7.1±0.3	7.0±0.2	6.7±0.2	7.0±0.2*	7.1±0.3**
A/G	2.2±0.1	2.3±0.1	2.5±0.2**	2.4±0.2	2.8±0.2**	3.0±0.2**
ALB (g/dL)	4.9±0.1	4.9±0.1	5.0±0.2	4.7±0.2	5.1±0.1**	5.3±0.2**
T-Bil (mg/dL)	0.05±0.01	0.05±0.01	0.06±0.01**	0.05±0.01	0.07±0.01**	0.07±0.01**
T-Cho (mg/dL)	72±6	71±7	71±16	104±16	93±6	91±8
Glu (mg/dL)	161±17	148±18	129±13**	111±9	113±17	105±11
TG (mg/dL)	106±30	103±52	64±23*	31±9	21±4*	28±11
PL (mg/dL)	117±8	116±17	113±21	177±20	162±10*	158±10**
BUN (mg/dL)	17.5±1.4	18.4±2.4	26.4±21.6*	16.5±1.9	15.9±1.6	15.7±1.7
CRN (mg/dL)	0.31±0.02	0.30±0.02	0.38±0.37*	0.29±0.05	0.29±0.03	0.27±0.05
Ca (mg/dL)	11.0±0.2	11.3±0.4	11.0±0.3	10.5±0.2	10.7±0.2	11.1±0.3**
P (mg/dL)	6.1±0.7	6.7±0.6	6.7±0.7	6.5±0.7	6.2±0.5	6.5±0.7
Na (mEq/dL)	145±1	146±1	146±1	145±1	146±1	145±1
K (mEq/dL)	4.4±0.2	4.3±0.4	4.2±0.2	4.3±0.4	4.0±0.3	4.1±0.4
Cl (mEq/dL)	104±1	103±1	105±1	107±1	106±1	105±2
AST (IU/L)	98±20	91±15	110±23	83±6	83±11	86±8
ALT (IU/L)	57±12	50±5	51±9	42±4	38±5	36±4*
ALP (IU/L)	537±49	626±73**	630±64**	461±73	438±59	442±61
γ-GTP (IU/L)	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0

a): Mean ± SD

\*\*\*: Significantly different from the 0 mg/kg group at  $p < 0.05$  and 0.01, respectively.

Table 4 Histopathology in the livers of F344 *gpt* delta rats treated with Furan for 13 weeks

	Males			Females		
	0 mg/kg	2 mg/kg	8 mg/kg	0 mg/kg	2 mg/kg	8 mg/kg
Number of animals examined	10	10	10	10	10	10
Liver						
Bile ducts						
Cholangiofibrosis	0	6	7	0	0	4
Bile duct proliferation	1	4	9	2	2	10
Oval cell proliferation	0	5	10	0	5	10
Hepatocytes						
Apoptosis	0	0	5	0	0	6
Vacuolation	0	1	5	0	0	0
Kupffer cells						
Pigmentation	0	0	5	0	10	10

Table 5 Micronucleus test with bone marrow in F344 *gpt* delta rats treated with Furan for 13 weeks

	Male			Female		
	No. of animals examined	MNPCE (%)	PCE/PCE + NCE (%)	No. of animals examined	MNPCE (%)	PCE/PCE + NCE (%)
0 mg/kg	5	0.13±0.07 <sup>a)</sup>	22.8±6.8	5	0.14±0.09	26.3±6.1
2 mg/kg	5	0.18±0.07	23.5±7.4	5	0.14±0.02	28.1±7.2
8 mg/kg	5	0.32±0.07*	20.8±3.3	5	0.17±0.08	39.0±3.1**

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocytes, PCE : Polychromatic erythrocytes, NCE : Normochromatic erythrocytes

a): Mean ± S.D.

\*:\*\*: Significantly different from the 0 mg/kg group at  $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

Table 6 *gpt* mutant frequencies in the livers of F344 *gpt* delta male rats treated with Furan for 13 weeks

	Animal No.	Cm <sup>R</sup> colonies (x 10 <sup>5</sup> )	6-TG <sup>R</sup> and Cm <sup>R</sup> colonies	Mutant Frequency (x 10 <sup>-5</sup> )	Mean ± S.D.
0 mg/kg	1	7.16	0	0.00	
	2	5.85	1	0.17	
	3	4.95	1	0.20	
	4	9.05	1	0.11	
	5	7.38	1	0.14	0.12 ± 0.08
2 mg/kg	11	8.46	1	0.12	
	12	6.57	0	0.00	
	13	15.57	1	0.06	
	14	10.44	4	0.38	
	15	9.54	2	0.21	0.16 ± 0.15
8 mg/kg	21	10.44	4	0.38	
	22	7.07	1	0.14	
	23	6.21	3	0.48	
	24	7.25	2	0.28	
	25	7.83	4	0.51	0.36 ± 0.15*

\*: Significantly different from the 0 mg/kg group at  $p < 0.05$ .



Table 7 *gpt* mutant frequencies in the livers of F344 *gpt* delta female rats treated with Furan for 13 weeks

	Animal No.	Cm <sup>R</sup> colonies (x 10 <sup>5</sup> )	6-TG <sup>R</sup> and Cm <sup>R</sup> colonies	Mutant Frequency (x 10 <sup>-5</sup> )	Mean ± S.D.
0 mg/kg	31	2.30	1	0.44	
	32	3.15	2	0.63	
	33	3.60	2	0.56	
	34	6.17	0	N.D. <sup>a)</sup>	
	35	3.60	0	N.D.	0.54 ± 0.10
2 mg/kg	41	3.65	4	1.10	
	42	3.33	3	0.90	
	43	1.35	2	1.48	
	44	2.97	3	1.01	
	45	2.48	0	N.D.	1.12 ± 0.25*
8 mg/kg	51	2.57	0	N.D.	
	52	6.89	3	0.44	
	53	3.83	3	0.78	
	54	3.15	0	N.D.	
	55	6.35	3	0.47	0.56 ± 0.19

<sup>a)</sup>: No mutant colonies were detected on the plate, those data being excluded for the calculation of mutant frequency.

\*: Significantly different from the 0 mg/kg group at  $p < 0.05$

別紙4

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	該当なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
	該当なし				

