

Table 6. Spi⁻ mutant frequencies in the liver of *gpt* delta mice given 1-MN for 13 weeks

Sex	Groups	Animal No.	Plaues within XL-1 Blue MRA (x10 ⁵)	Plaque within WL95 (P2)	Mutant Frequency (x10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
Male	Control	1	15.8	1	0.06	0.15 ± 0.06
		2	4	2	0.14	
		3	19.5	4	0.21	
		4	10.9	2	0.18	
	0.075% 1-MN	11	14.1	6	0.43	0.45 ± 0.16
		12	3.4	1	0.29	
		13	15	10	0.67	
		14	18.4	10	0.55	
		15	15.3	5	0.33	
	0.15% 1-MN	21	16.5	3	0.18	0.40 ± 0.26
		22	22.8	7	0.31	
		23	4.9	4	0.82	
		24	18	4	0.22	
		25	6.3	3	0.48	
	Female	Control	31	14.9	7	0.47
32			12.3	3	0.24	
33			10.4	1	0.09	
34			10.4	6	0.58	
0.075% 1-MN		41	13.6	1	0.07	0.37 ± 0.18
		42	20.1	9	0.45	
		43	11.8	4	0.34	
		44	17.6	9	0.51	
		45	10.9	5	0.46	
0.15% 1-MN		51	8.7	0	0.00	0.28 ± 0.23
		52	12.4	5	0.40	
		53	14.6	3	0.21	
		54	15.5	8	0.52	

Table 7. Body and liver weights and GST-P positive liver cell foci

Groups	Control	600 mg/kg estragole
	Animal No.	5
Final body weight (g)	231.3±11.8	176.6±8.1***
Liver weight		
Absolute (g)	8.4±0.5	7.0±0.5**
Relative (g/100gB.W.)	3.6±0.1	4.0±0.1**
GST-P		
Number(No./cm ²)	0.0±0.0	9.48±2.67**
Area (mm ² /cm ²)	0.0±0.0	0.03±0.02**

,* : significantly different from the control group at the levels of p<0.001 and p<0.0001, respectively (Student's -test). ^a Mean±SD.

Table 8. Up-regulated genes related to hepatocellular preneoplastic lesions induced in rats given 600 mg/kg estragole for 4 weeks.

Function	Accession	Number	Gene symbol	Estragole		
				FC	Absolute	
cytokine, chemokine	NM_053647		Cxcl2	5.4		
	NM_134455		Cx3cl1	4.6		
	NM_019233		Ccl20	4.5		
	NM_207615		Clcf1	4.1		
	NM_057151		Ccl17	3.5		
	NM_019233		Ccl2	2.8		
p38 MAPK	NM_019231		Mapk13	3.4		
Cell proliferation	NM_080782		Cdkn1a	68.2		
	NM_080581		Abcc3	26.8		
	NM_001130500		Gtse1	24.8		
	NM_053963		Mimp12	19.9		
	NM_012923		Ccng1	7.9		
	NM_053702		Ccna2	3.5		
	NM_001100821		Ccne1	3.0		
	NM_012846		Fgfl	2.7		
	NM_080400		Chek1	2.6		
	NM_171992		Ccnd1	2.2		
	Metabolism	NM_001025131		Sult2a2	104.6	
		NM_183403		Gpx2	52.0	
		NM_012540		Cyp1a1	44.1	
NM_001134844			Cyp2b1	16.5		
NM_017000			Nqo1	6.0		
NM_022407			Aldh1a1	5.6		
NM_001039665			Sult2b1	4.9		
NM_012541			Cyp1a2	2.6		
NM_001108099			Mdm2	4.6		
NM_012922			Casp3	2.0		
DNA repair	NM_012861		Mgmt	4.4		
	NM_001108204		Polh	2.6		
	NM_138516		Polk	2.5		
	NM_001008328		Parp3	2.3		
Other	NM_001013050		Pold2	2.0		
	NM_053840		Ggt1	7.2		
	NM_012577		Gstp1	6.6		

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

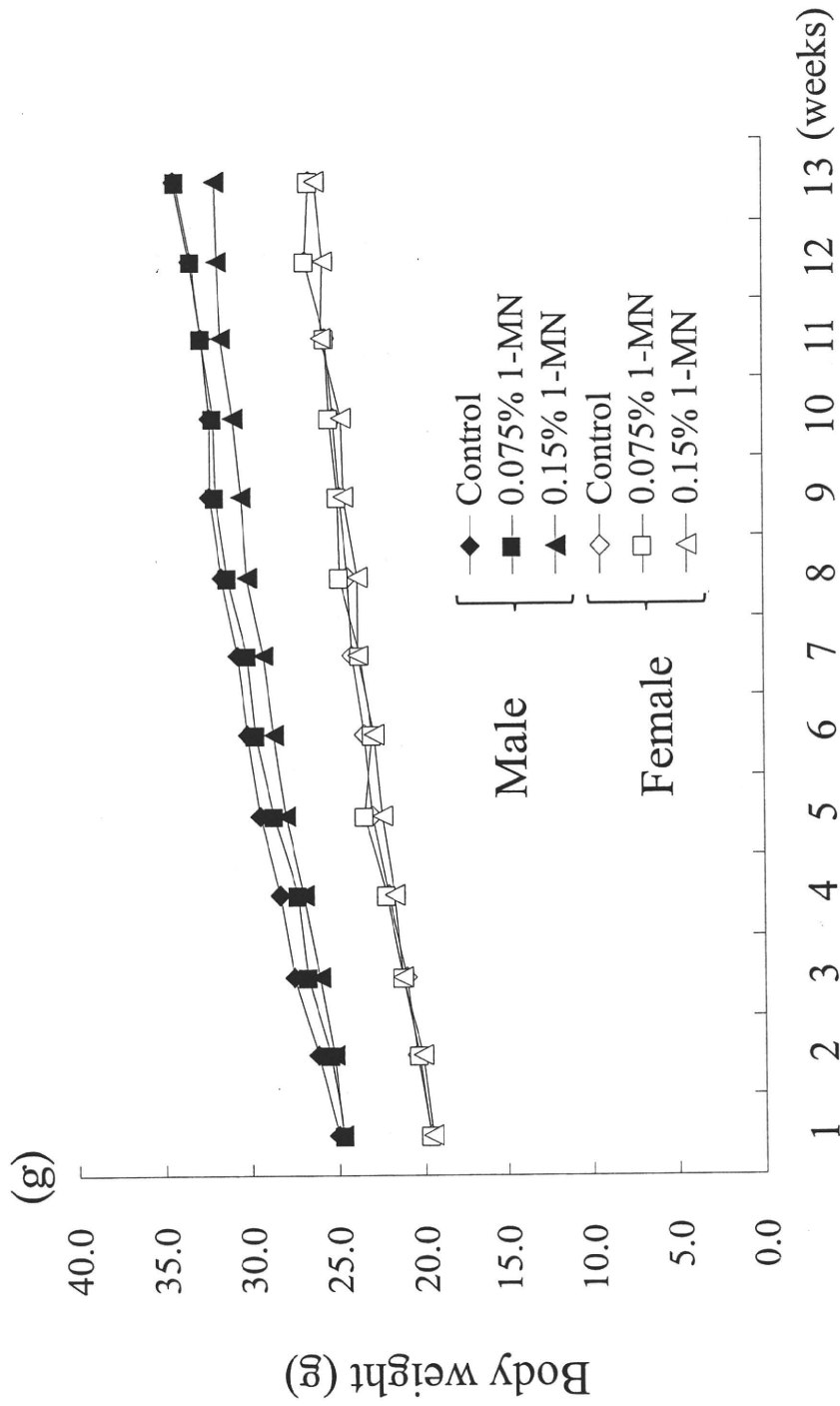


Fig. 2. Food consumption curves for male *gpt* delta mice given 1-MN for 13 weeks.

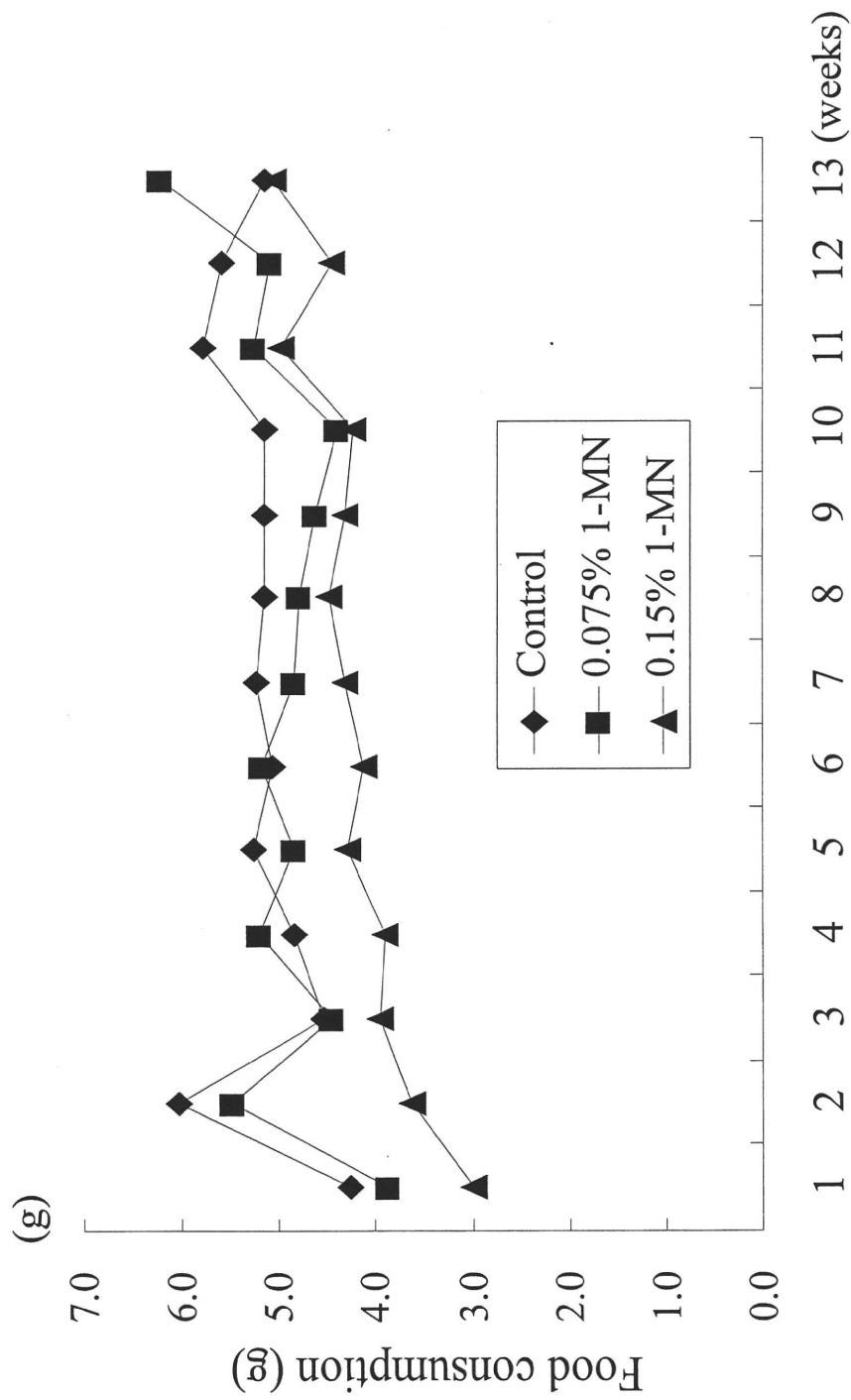


Fig. 3. Food consumption curves for female *gpt* delta mice given 1-MN for 13 weeks.

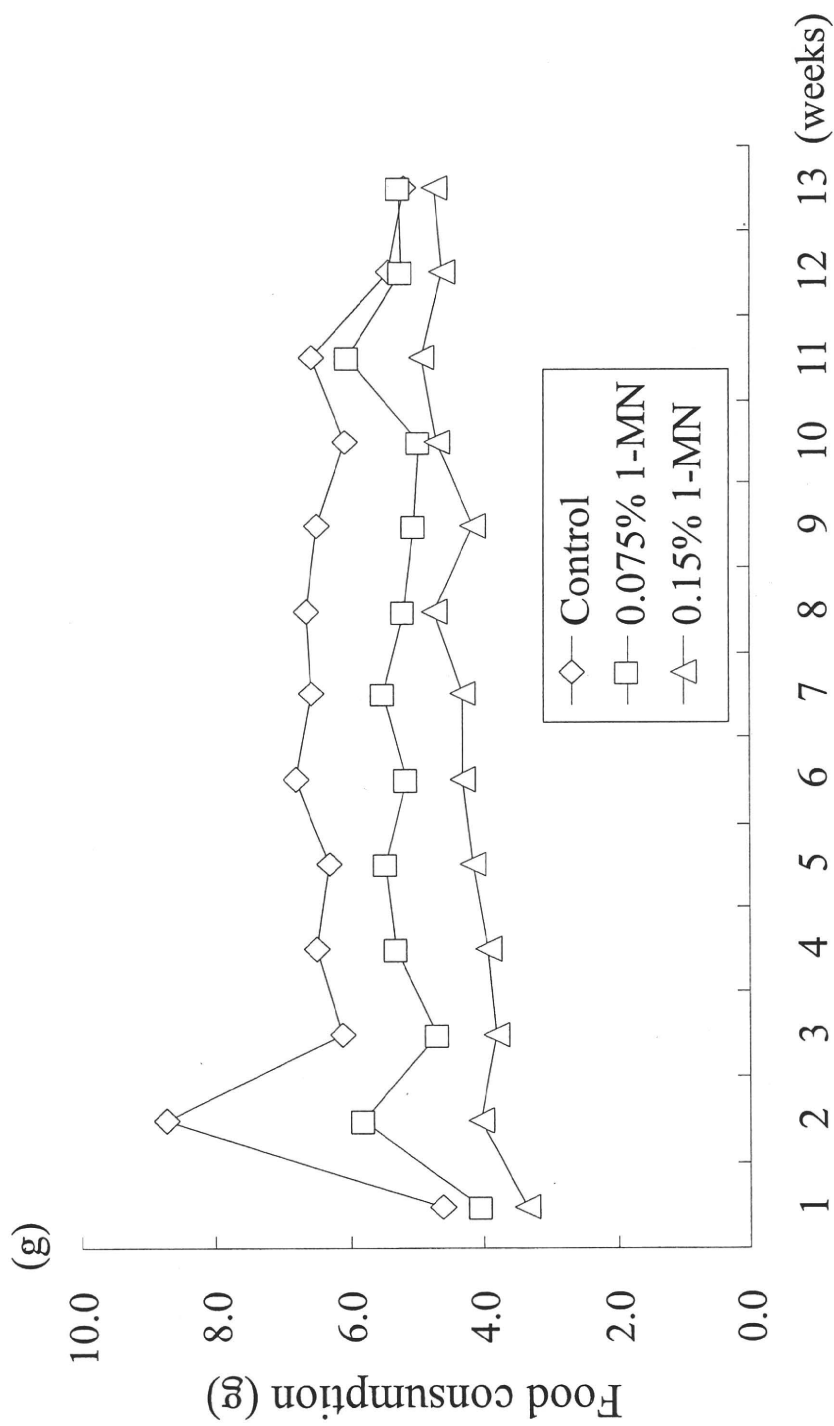
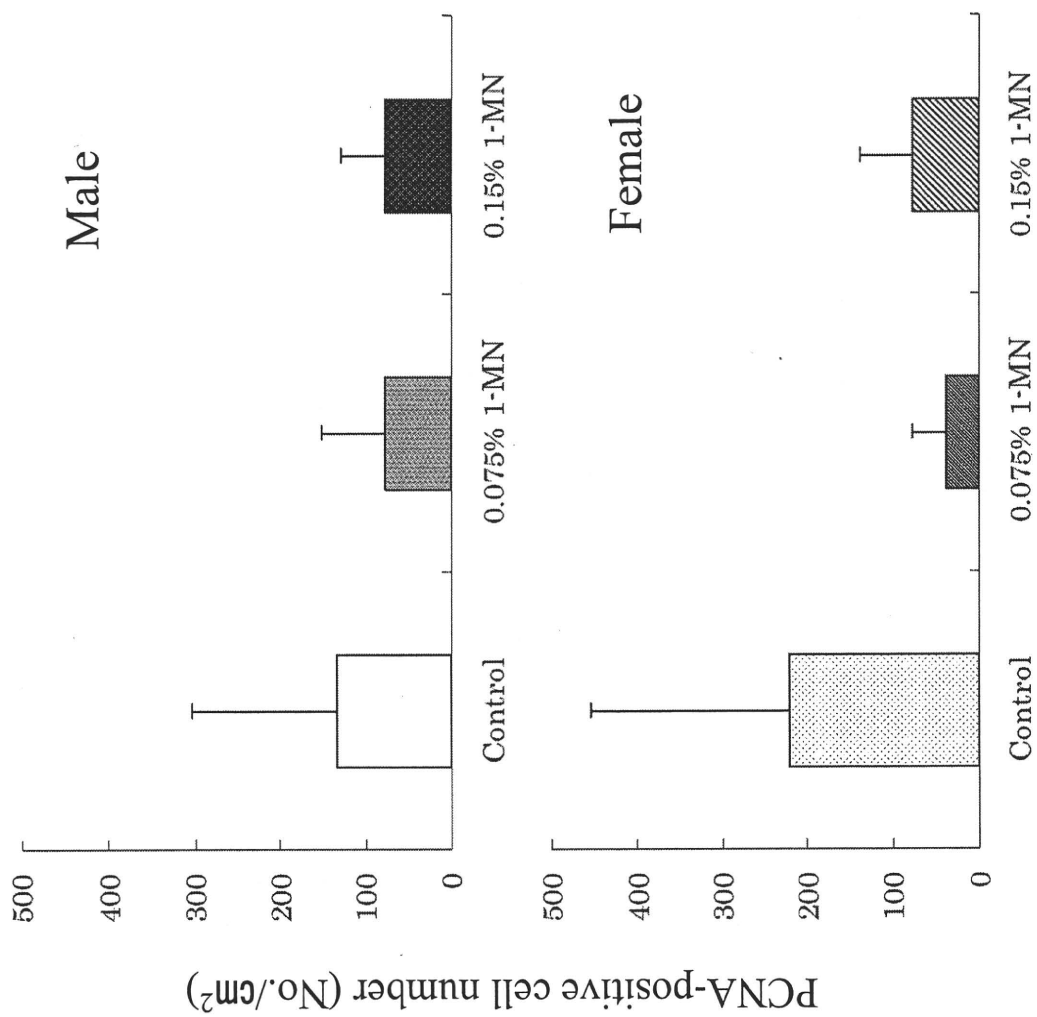


Fig.4. Immunohistochemical staining of PCNA in lungs of *gpt* delta mice given 1-MN for 13 weeks.



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：香料物質の反復投与毒性と *in vivo* 変異原性解析
furan の遺伝毒性・発がん性に関する短期包括的試験

研究分担者 梅村隆志 国立医薬品食品衛生研究所 病理部第一室長
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。前年度において、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を実施した。その結果、肝細胞腫瘍の前がん病変マーカーである GST-P 陽性肝細胞巢の増加は認められたものの、肝臓における *in vivo* 変異原性は陰性であった。しかしながら、furan 投与群において、肝内胆管癌の前がん病変である胆管線維症が肝臓尾状葉部位特異的に認められ、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考えられた。本年度では、雄の F344 系 *gpt delta* ラットに furan 0, 8 mg/kg を 4 週間あるいは 8 週間強制経口投与し、肝臓病理組織学的検索ならびに外側左葉および尾状葉におけるレポーター遺伝子解析を実施した。投与 4 週目より肝臓重量の高値が認められた。肝臓の病理組織学的検索では、4 週目から小葉中心性肝細胞肥大、被膜下炎症細胞浸潤および oval cell の増殖が各葉で認められた。また、8 週目の尾状葉においてのみ胆管線維症が認められた (1/5 例)。尾状葉におけるレポーター遺伝子解析を実施した結果、4 および 8 週目における *gpt* ならびに *Sp1* mutant frequency に有意な変化は認められなかった。葉毎の *in vivo* 変異原性評価の結果が陰性であったことから、furan 誘発肝発がん機序に遺伝毒性メカニズムは関与していないことが示唆された。

A. 研究目的

食品添加物等、化学物質のヒトに対する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。

前年度までに、食品添加物として分類される香料物質 furan-substituted 物質の基本骨格である furan を用いた短期包括的試験を実施し、本試験法の有用性を確認した。また、furan の標的臓器である肝臓における *in vivo* 変異原性評価の結果が陰性であったことから、furan の肝発がん機序に遺伝毒性メカニズムは関与していない可能性が考えられた。しかしながら、furan 投与群において、肝内胆管癌の前がん病変である胆管線維症が肝臓尾状葉特異的に認められた。この事実は、furan 誘発肝内胆管癌が肝臓尾状葉に出現するとの報告と一致している^{1,2)}。従って、furan の変異原性については、前年度の肝臓外側左葉を用いた *in vivo* 変異原性評価に加えて、肝臓葉毎の解析を含めてさらなる検討が必要であると考えられた。

本年度では、雄の F344 系 *gpt delta* ラットを用い、furan 投与後の肝臓病理組織学的検索ならびに外側左葉および尾状葉におけるレポーター遺伝子解析を実施した。

B. 研究方法

7 週齢、雄の F344 系 *gpt delta* ラットに発がん用量として報告されている 8 mg/kg をコーンオイルに溶解させ、週 5 日、4 ある

いは 8 週間、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。投与期間中は、一般状態観察を連日実施した。剖検時にイソフルラン麻酔下にて腹部大動静脈より放血致死させ、肝臓を採取後、肝臓全体および各葉毎（外側左葉、中間葉、右葉、尾状葉）の重量測定を行い、一部は病理組織検索用に 10% 中性ホルマリン溶液にて保存し、残りは *in vivo* 変異原性評価のために -80℃ にて凍結保存した。病理組織学的検索は、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。

（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。最終体重および臓器重量の結果を Table 1 に示す。4 および 8 週目において、最終体重に有意な差は認められなかった。肝臓重量においては、中間葉の絶対および相対重量、右葉および肝全体の相対重量の有意な高値が投与 4 週目から認め

られ、8週目においては、尾状葉の絶対および相対重量の有意な低値、肝臓全体、外側左葉、中間葉および右葉の絶対および相対重量の有意な高値が認められた。肝臓病理組織学的検索の結果を Table 2 に示す。4週目において、小葉辺縁性好塩基性変化(外側左葉：5/5例、中間葉：5/5例、右葉：5/5例、尾状葉：5/5例)、被膜下炎症細胞浸潤(外側左葉：5/5例、中間葉：0/5例、右葉：1/5例、尾状葉：5/5例)、肝細胞のアポトーシス(外側左葉：5/5例、中間葉：5/5例、右葉：4/5例、尾状葉：5/5例)および oval cell の増殖(外側左葉：2/5例、中間葉：2/5例、右葉：2/5例、尾状葉：1/5例)が認められた。8週目においても小葉辺縁性好塩基性変化(外側左葉：5/5例、中間葉：2/5例、右葉：3/5例、尾状葉：5/5例)、被膜下炎症細胞浸潤(外側左葉：3/5例、中間葉：0/5例、右葉：0/5例、尾状葉：4/5例)、肝細胞のアポトーシス(外側左葉：2/5例、中間葉：0/5例、右葉：3/5例、尾状葉：0/5例)および oval cell の増殖(外側左葉：5/5例、中間葉：1/5例、右葉：4/5例、尾状葉：4/5例)が認められ、尾状葉においては胆管線維症が1/5例に観察された。In vivo 変異原性評価の結果を Table 3-8 に示す。投与4週目の尾状葉における *gpt* および Spi-mutant frequency (MF) において、対照群と比較し、有意な差は認められなかった。投与8週目の尾状葉あるいは外側左葉における in vivo 変異原性評価の結果においても、尾状葉および外側左葉共に *gpt* および Spi-MF に有意な差は認められなかった。

D. 考察

本研究では、furan 誘発肝内胆管癌の発生

が葉特異的であることを考慮し、雄の F344 系 *gpt* delta ラットに 0, 8 mg/kg の furan を 4 あるいは 8 週間強制経口投与し、肝臓葉毎の病理組織学的検索、腫瘍標的葉である尾状葉および非標的葉である外側左葉における in vivo 変異原性評価を実施した。

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。4 あるいは 8 週目における最終体重に変化は認められなかった。肝臓重量においては、中間葉、右葉および肝全体の重量の有意な高値が投与4週目から認められ、8週目においては、尾状葉の重量の有意な低値、肝臓全体、外側左葉、中間葉および右葉の重量の有意な高値が認められた。病理組織学的検索の結果、投与4週目より小葉中心性肝細胞肥大、被膜下炎症細胞浸潤、肝細胞のアポトーシスおよび oval cell の増殖が各葉で認められた。8週目の尾状葉においては、これらの変化に加え、胆管線維症が1/5例に認められた。Furan 誘発肝内胆管癌の葉特異性については、尾状葉における炎症に対し増殖した oval cell の肝細胞再生・分化機構が、持続的な furan 投与による微小環境の変化により破綻し、肝内胆管癌へと進展すると考えられている³⁾。しかしながら、本実験での病理組織学的検索から、肝臓各葉における病理組織的变化に差は認められなかった。従って、furan 誘発肝内胆管癌の誘発機序は微小環境の変化が主な原因ではないと考えられた。

In vivo 変異原性評価の結果、腫瘍標的葉である尾状葉において、4 および 8 週目における *gpt* ならびに Spi-MF に有意な差は認められなかった。また、腫瘍非標的葉である 8 週目の外側左葉においても *gpt* お

よび Spi-MF に有意な差は認められなかった。尾状葉に肝内胆管癌の前がん病変である胆管線維症が認められた投与8週目における *in vivo* 変異原性評価の結果、陰性であったことから、furan による肝内胆管癌誘発機序に遺伝毒性メカニズムは関与していない可能性が示唆された。

E. 結論

前年度の furan を用いた短期包括的試験ならびに本年度の葉毎の *in vivo* 変異原性評価の結果から、ラットにおける furan 誘発肝発がん機序に遺伝毒性メカニズムは関与していないと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

日比大介, 鈴木裕太, 金 美蘭, 石井雄二, 能美健彦, 梅村隆志, 西川秋佳: Furan 肝

発がん誘発機序における遺伝毒性メカニズムの関与

第 69 回日本癌学会学術総会 (2010.9)

H. 知的財産権の出願・登録状況

【参考文献】

- 1) Elmore, L. W. and Sirica, A. E. (1993). "Intestinal-type" of adenocarcinoma preferentially induced in right/caudate liver lobes of rats treated with furan. *Cancer Res.* 53, 254-259.
- 2) Elmore, L. W. and Sirica, A. E. (1991). 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, 5752-5759.
- 3) Hickling, K. C., Hitchcock, J. M., Chipman, J. K., Hammond, T. G. and Evans, J. G. (2010). Induction and progression of cholangiofibrosis in rat liver injured by oral administration of furan. *Toxicol Pathol.* 38, 213-229.

Table 1 Final body and liver weights for F344 gpt delta rats treated with Furan

	4 weeks		8 weeks	
	0 mg/kg	8 mg/kg	0 mg/kg	8 mg/kg
Number of animals	10	10	5	5
Final body weights (g)	249 ± 10 ^{a)}	244 ± 9	302 ± 11	296 ± 6
Liver weights				
Absolute weights (g)				
Whole	10.15 ± 0.82	10.68 ± 0.65	11.36 ± 0.12	12.90 ± 0.35**
Left lobe	3.32 ± 0.31	3.42 ± 0.35	3.77 ± 0.12	4.40 ± 0.32**
Median lobe	3.75 ± 0.29	4.13 ± 0.21**	4.13 ± 0.21	4.91 ± 0.21**
Right lobe	2.18 ± 0.19	2.34 ± 0.23	2.45 ± 0.20	2.76 ± 0.12*
Caudate lobe	0.91 ± 0.18	0.78 ± 0.112	1.01 ± 0.14	0.82 ± 0.08*
Relative weights (g/100g b.w.)				
Whole	4.07 ± 0.26	4.38 ± 0.14**	3.76 ± 0.12	4.35 ± 0.06**
Left lobe	1.33 ± 0.11	1.40 ± 0.12	1.25 ± 0.03	1.48 ± 0.08**
Median lobe	1.50 ± 0.09	1.70 ± 0.06**	1.37 ± 0.06	1.66 ± 0.07**
Right lobe	0.87 ± 0.07	0.96 ± 0.07*	0.81 ± 0.08	0.93 ± 0.05*
Caudate lobe	0.36 ± 0.07	0.32 ± 0.04	0.33 ± 0.05	0.28 ± 0.03*

a): Mean ± SD ***: Significantly different from the 0 mg/kg group at $p < 0.05$ and 0.01, respectively.

Table 2 Histopathology in the livers of F344 *gpt* delta rats treated with Furan

	4 weeks		8 weeks	
	0 mg/kg	8 mg/kg	0 mg/kg	8 mg/kg
Number of animals examined	5	5	5	5
Left lobe				
Oval cell proliferation	0	2	0	5
Peripheral basophilic change	0	5	0	5
Centrilobular hepatocyte vacuolation, scattered	0	0	0	3
Hepatocyte apoptosis	0	5	0	2
Subcapsular infiltration of inflammatory cells	0	5	0	3
<hr/>				
Median lobe				
Oval cell proliferation	0	2	0	1
Peripheral basophilic change	0	5	0	2
Centrilobular hepatocyte vacuolation, scattered	0	0	0	0
Hepatocyte apoptosis	0	4	0	0
Subcapsular infiltration of inflammatory cells	0	0	0	0
<hr/>				
Right lobe				
Oval cell proliferation	0	2	0	4
Peripheral basophilic change	0	5	0	3
Centrilobular hepatocyte vacuolation, scattered	0	0	0	2
Hepatocyte apoptosis	0	5	0	3
Subcapsular infiltration of inflammatory cells	0	1	0	0
<hr/>				
Caudate lobe				
Cholangiofibrosis	0	0	0	1
Oval cell proliferation	0	1	0	4
Peripheral basophilic change	0	5	0	5
Centrilobular hepatocyte vacuolation, scattered	0	0	0	3
Hepatocyte apoptosis	0	5	0	0
Subcapsular infiltration of inflammatory cells	0	5	0	4

Table 3 *gpt* mutant frequencies in the caudate lobes of F344 *gpt* delta male rats treated with Furan for 4 weeks

	Animal No.	Cm ^R colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
0 mg/kg	1	4.14	1	0.24	0.27 ± 0.16
	2	6.48	2	0.31	
	3	5.45	2	0.37	
	4	7.20	3	0.42	
	5	4.82	0	0.00	
8 mg/kg	16	5.76	0	0.00	0.21 ± 0.20
	17	3.83	1	0.26	
	18	5.18	0	0.00	
	19	5.58	2	0.36	
	20	4.64	2	0.43	

Table 4 Spi⁻ mutant frequencies in the caudate lobes of F344 gpt delta male rats treated with Furan for 4 weeks

Animal No.	Plaques within XL-1		Plaque within WL95 (P2)	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
	Blue MRA (x 10 ⁵)	Blue MRA (x 10 ⁵)			
0 mg/kg	1	15.66	4	0.26	0.18 ± 0.16
	2	15.84	2	0.13	
	3	13.23	0	0.00	
	4	23.94	3	0.13	
	5	12.06	5	0.41	
8 mg/kg	16	10.62	1	0.09	0.18 ± 0.14
	17	12.15	2	0.16	
	18	8.10	3	0.37	
	19	13.41	0	0.00	
	20	7.56	2	0.26	

Table 5 *gpt* mutant frequencies in the left lobes of F344 *gpt* delta male rats treated with Furan for 8 weeks

	Animal No.	Cm ^R colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
0 mg/kg	11	7.20	2	0.28	
	12	3.65	2	0.55	
	13	5.27	3	0.57	
	14	2.52	1	0.40	
	15	4.95	2	0.40	0.44 ± 0.12
8 mg/kg	26	4.23	1	0.24	
	27	6.71	2	0.30	
	28	4.05	0	0.00	
	29	6.30	0	0.00	
	30	7.11	0	0.00	0.11 ± 0.15

Table 6 Spi^r mutant frequencies in the left lobes of F344 gpt delta male rats treated with Furan for 8 weeks

Animal No.	Plaues within XL-1		Plaque within WL95 (P2)	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
	Blue MRA (x 10 ⁵)	Blue MRA (x 10 ⁵)			
11	14.13	4	0.28		
12	10.62	12	1.13		
13	10.71	2	0.19		
14	7.38	0	0.00		
15	5.04	0	0.00		0.32 ± 0.47

26	11.25	3	0.27		
27	10.44	2	0.19		
28	9.27	1	0.11		
29	9.90	1	0.10		
30	10.80	1	0.09		0.15 ± 0.08

Table 7 *gpt* mutant frequencies in the caudate lobes of F344 *gpt* delta male rats treated with Furan for 8 weeks

	Animal No.	Cm ^R colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
0 mg/kg	11	9.27	3	0.32	0.24 ± 0.10
	12	4.82	1	0.21	
	13	11.25	4	0.36	
	14	8.24	1	0.12	
	15	5.85	1	0.17	
8 mg/kg	26	5.27	1	0.19	0.30 ± 0.21
	27	3.78	2	0.53	
	28	5.04	0	0.00	
	29	4.28	2	0.47	
	30	10.04	3	0.29	

Table 8 Spi^r mutant frequencies in the caudate lobes of F344 gpt delta male rats treated with Furan for 8 weeks

Animal No.	Plaques within XL-1 Blue MRA (x 10 ⁵)	Plaque within WL95 (P2)	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
11	12.06	0	0.00	
12	7.11	15	2.11	
13	20.61	3	0.15	
14	11.79	6	0.51	
15	7.02	4	0.57	0.67 ± 0.84

26	10.44	4	0.38	
27	13.23	1	0.08	
28	9.63	3	0.31	
29	8.82	1	0.11	
30	15.57	1	0.06	0.19 ± 0.15

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：香料物質の反復投与毒性と病理組織学的解析
methyleugenol の遺伝毒性・発がん性に関する短期包括的試験

研究分担者 小川久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部部长
研究協力者 石井 雄二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

天然調味料や香料の一つであり、ミカンコミバエの誘引薬として使用されている methyleugenol (MEUG) はげっ歯類における肝発がん性が報告されているが、これまでの遺伝毒性試験では一定の結果は得られておらず、その発がん機序についての詳細は明らかではない。一方、近年開発されたレポーター遺伝子導入動物 *gpt delta* ラット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。本研究では、MN の一般毒性、*in vivo* 変異原性ならびに発がん性を包括的に検索する目的で、*gpt delta* ラットを用いた 90 日間反復投与毒性試験を行った。その結果、雄の 100 mg/kg 投与群の肝臓と腎臓の絶対及び相対重量と雌の 100 mg/kg 投与群の肝臓、腎臓、脳相対重量が有意に増加した。さらに、雄の 30 mg/kg 以上の投与群で心臓の絶対重量と 100 mg/kg 投与群で精巣の相対重量、雌の 30 mg/kg 以上の投与群で心臓の絶対および相対重量が対照群に比べ有意な増加が認められた。血液学的検査においては、雌の 30 mg/kg または 100 mg/kg 投与群で WBC と Plt 数が対照群に比べて有意に増加した。血清生化学的検査では、30 mg/kg 以上の投与群で雄の A/G 比、phospholipid が有意な減少、CRN、Cl、IP、AST、ALT が有意な増加、雌の Alb、T-Bil、CRN が有意な減少、Cl、IP が有意な増加を示した。さらに、肝臓における GST-P 免疫染色の結果、雌雄ともに 100mg/kg の投与群で GST-P 陽性肝細胞巢の数、面積ともに対照群に比べ有意に増加した。今後、肝臓における *gpt* ならびに *red/gam* 変異頻度の解析を行い、MEUG の *in vivo* 変異原性を明らかにし、包括的評価を実施する。

A. 研究目的

天然調味料や香料であり、ミカンコミバエの誘引薬として広く使用されている methyleugenol (MEUG) はげっ歯類において肝発がん性が報告されている。しかし、これまでの遺伝毒性試験で陽性または陰性との結

果が混在し、その発がん機序の詳細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* ラットを用いた *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