

Table 5. Histopathological findings observed in male and female B6C3F1 *gpt* delta mice given 1-MN for 13 weeks

Organs and findings	1-MN No.	Male			Female		
		Control 10	0.075% 10	0.15% 10	Control 10	0.075% 10	0.15% 10
Survival rate		100%	100%	100%	100%	100%	100%
Liver							
Vacuolization		0 <sup>a</sup> (0) <sup>b</sup>	0(0)	0(0)	0(0)	1(10)	3(30)
Focal necrosis		0(0)	0(0)	0(0)	5(50)	5(50)	7(70)
Single cell necrosis		0(0)	3(30)	5(50)**	7(70)	5(50)	5(50)
Kidney							
Inflammatory cell infiltration		1(10)	0(0)	1(10)	0(0)	0(0)	0(0)
Vacuolization		5(50)	8(80)	9(90)	0(0)	0(0)	0(0)
Pancreas							
Inflammatory cell infiltration		0(0)	0(0)	0(0)	1(10)	0(0)	0(0)
Stomach							
Squamous metaplasia		1(10)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Adrenal gland							
Subcapsular cell hyperplasia		1(10)	1(10)	3(30)	7(70)	8(80)	7(70)
Ureter							
Papillary hyperplasia		0(0)	0(0)	1(10)	0(0)	0(0)	0(0)
spinal cord cervical							
Cyst formation		0(0)	0(0)	0(0)	1(10)	0(0)	0(0)
Tongue							
Ulcer		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(10)
Lymphoreticular tissue							
Lymphoma		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(10)

<sup>a</sup>: The number of animals with histopathological lesions.

<sup>b</sup>: The incidence(%) of histopathological lesions

\*\* : Significantly different from the controls at the levels of  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively (Fisher's *t*-test)

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

Groups	Animal No.	Cm <sup>R</sup> colonies(x10 <sup>5</sup> )	6-TGR <sup>R</sup> and Cm <sup>R</sup> colonies	Mutant Frequency (x10 <sup>-5</sup> )	Mean ± S.D.	
Male	Control	1	9.8	3	0.31	0.34 ± 0.17
		2	12.3	5	0.41	
		3	15.2	9	0.59	
		4	15.1	2	0.13	
		5	4.0	1	0.25	
	0.075% 1-MN	11	11.4	5	0.26	0.33 ± 0.13
		12	2.1	1	0.47	
		13	5.3	1	0.19	
		14	23.5	5	0.30	
		15	18.2	6	0.33	
	0.15% 1-MN	21	18.0	9	0.61	0.54 ± 0.06
		23	6.1	4	0.49	
		24	24.5	17	0.57	
		25	22.4	11	0.49	
Female	Control	31	7.1	1	0.14	0.17 ± 0.10
		32	50.5	3	0.06	
		33	43.4	10	0.23	
		34	36.0	4	0.11	
		35	18.3	6	0.33	
	0.075% 1-MN	41	41.1	7	0.17	0.17 ± 0.09
		42	36.4	3	0.08	
		43	40.6	6	0.15	
		44	38.0	12	0.32	
		45	49.2	6	0.12	
	0.15% 1-MN	51	25.8	6	0.23	0.20 ± 0.14
		52	29.3	11	0.38	
		53	33.9	7	0.21	
		54	30.2	5	0.17	
		55	55.8	0	0.00	

Table 7. Spi<sup>-</sup> mutant frequencies in the liver of *gpt* delta mice given 1-MN for 13 weeks

Groups	Animal No.	Plaques within XL-1 Blue MRA (x10 <sup>5</sup> )	Plaque within WL95 (P2)	Mutant Frequency (x10 <sup>-5</sup> )	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 8. Changes in parameters for body weight, liver weight, GST-P positive foci

Groups	Animal No.	Final body weight (g)	Liver weight		GST-P	
			Absolute (g)	Relative (g/100g B. W.)	Number(No./cm <sup>2</sup> )	Area (mm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> )
Cont-1	5	231.3 ± 11.8 <sup>a</sup>	8.4 ± 0.5	3.6 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
600 mg/kg estragole	5	176.6 ± 8.1**	7.0 ± 0.5**	4.0 ± 0.1**	9.48 ± 2.67**	0.03 ± 0.02**
Cont-2	5	220.2 ± 17.1	8.7 ± 0.9	4.0 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
0.5% safrole	5	170.9 ± 4.2 <sup>##</sup>	9.6 ± 0.5	5.6 ± 0.3	0.27 ± 0.40	0.002 ± 0.004

\*\* : significantly different from the cont-1 group at the levels of  $p < 0.001$  (Student's *t*-test).

<sup>##</sup> : significantly different from the cont-2 group at the levels of  $p < 0.001$  (Student's *t*-test) <sup>a</sup> Mean ± SD.

Table 9. The level of mRNA expression of the up or down-regulated genes in common in estragole or safrole-treated groups.

Regulation	Function	Accession number	Gene Symbol	Estragole	Safrole
				FC Absolute	
Up					
	DNA repair	NM_012861	Mgnt	4.4	3.6
	Cell proliferation	NM_053963	Mmp12	19.9	7.7
		NM_012923	Ceng1	7.9	2.4
	apoptosis	NM_001108099	Mdm2	4.6	2.6
	Other	XM_574584	Adam8	350.0	10.7
		NM_001106536	Mybl2	68.5	10.1
		NM_001012022	Cldn4	9.2	3.3
		NM_133304	Heph	2.6	3.0
		NM_001127524	Aadacl1	2.8	3.0
		NM_001014217	Nhej1	19.7	2.9
		NM_019179	Tyms	9.8	2.2
		NM_012946	Sparcl1	2.8	2.1
		NM_001106707	Nlrc4	2.6	2.0
		NM_138536	Ttl	2.3	2.0
Down					
	Tumor suppressor	NM_021774	Fhit	-65.4	-55.6
		BC168961	Tfdp2	-3.7	-2.0
	Oxidation/metabolism	NM_001014167	Rnls	-3.4	-3.5
		NM_001025762	Smyd3	-7.3	-2.2
	Other	NM_138835	Syt12	-4.6	-6.0
		NM_001108803	Mogat1	-5.6	-4.2
		NM_001100685	Clyb1	-10.9	-3.6
		NM_001009695	Wnt7b	-4.1	-3.4
		XM_574162	Alpk2	-4.3	-3.0
		NM_133614	Slc25a21	-6.1	-2.5
		NM_022184	Cask	-3.0	-2.1
		XM_231528	Cadps2	-11.8	-2.1

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

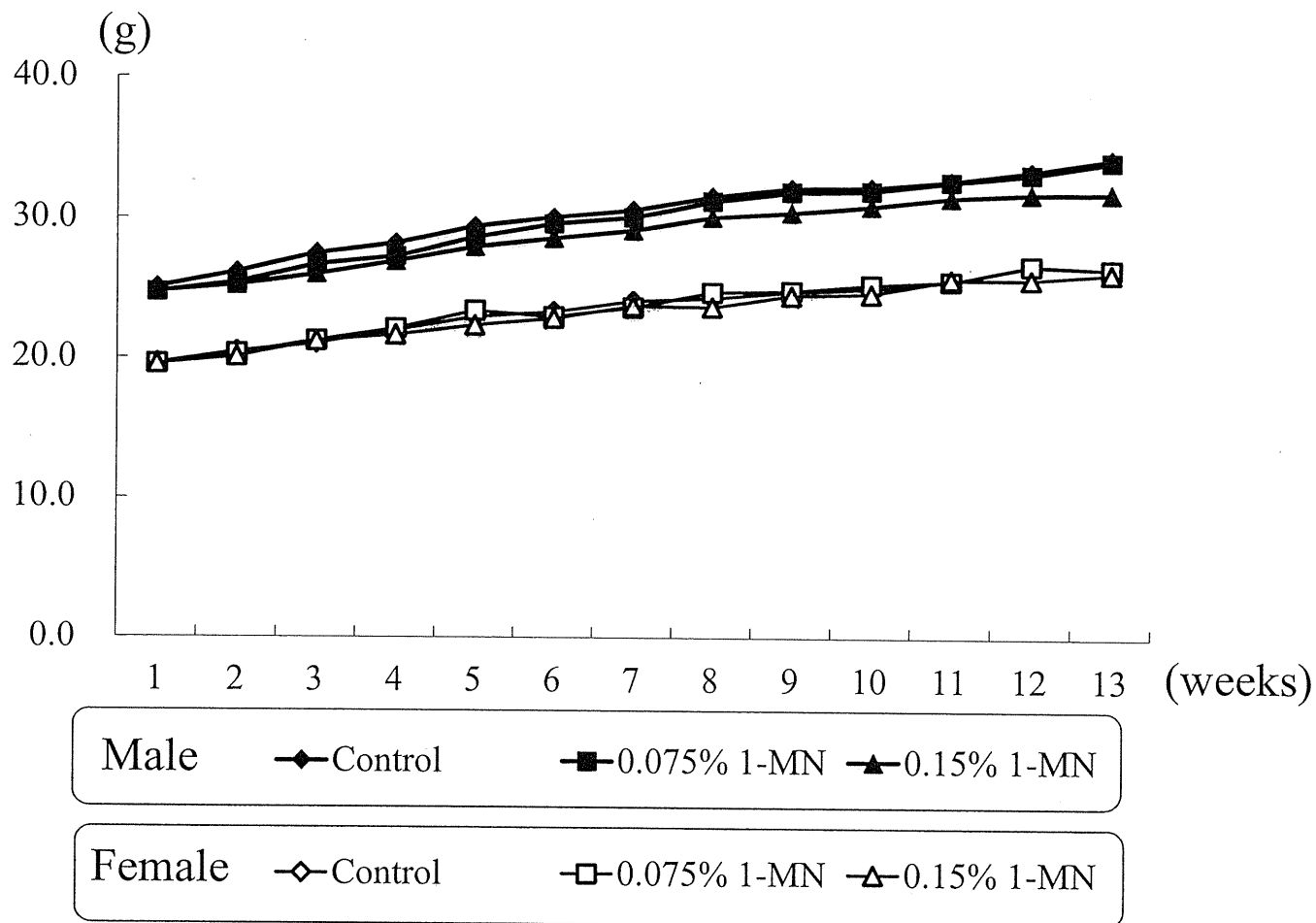


Fig. 2. Food consumption curves for male and female *gpt* delta mice given 1-MN for 13 weeks.

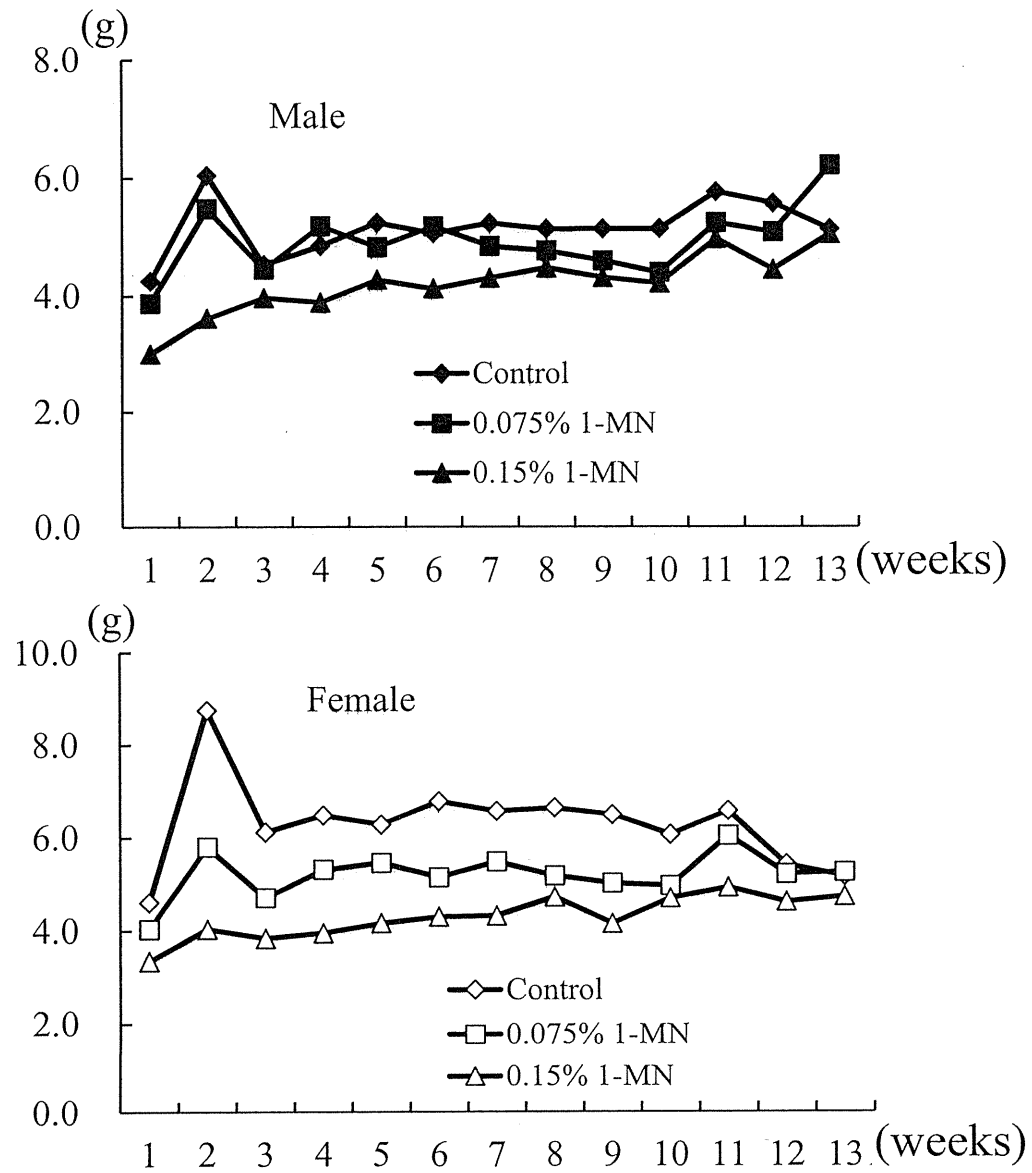


Fig.3. Immunohistochemical staining of PCNA in lung of *gpt* delta mice given 1-MN for 13 weeks.

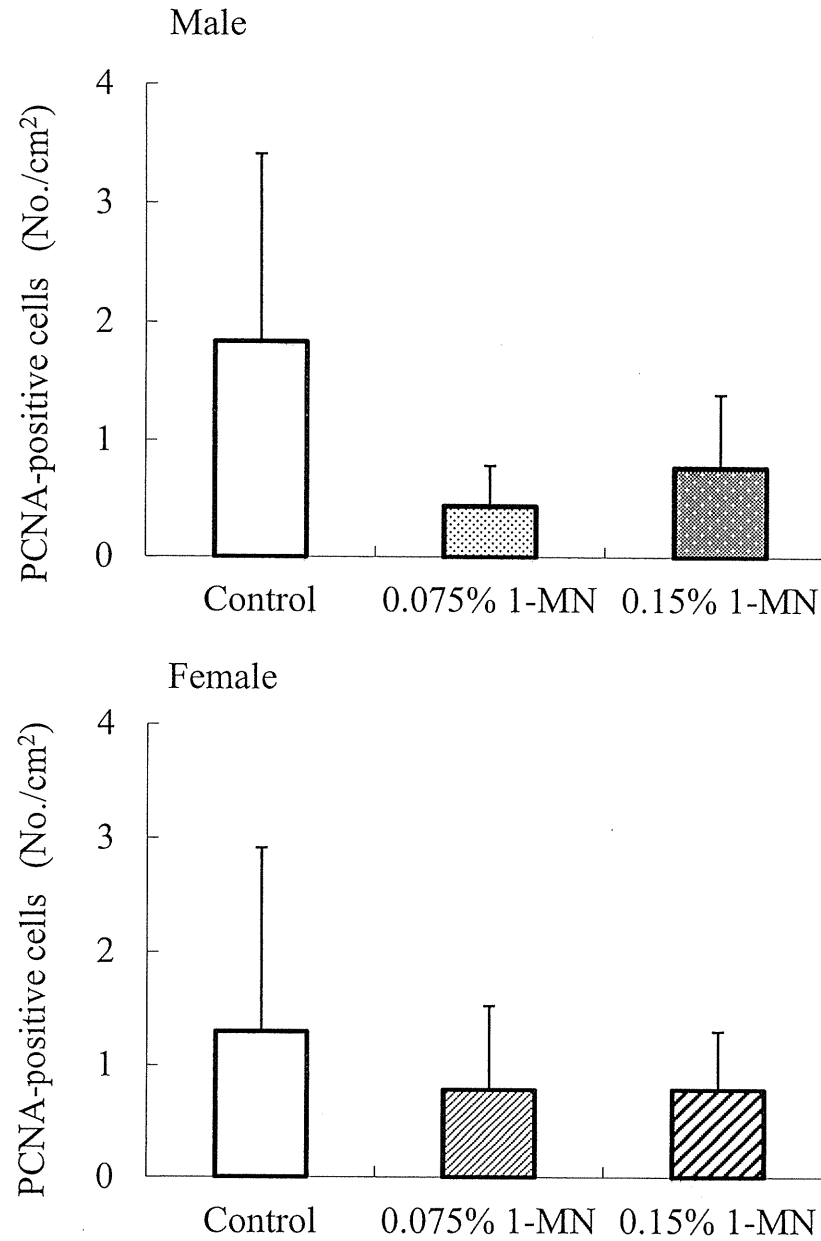




Fig.4. Venn diagram of up or down-regulated genes in the liver of F344 rat given 600mg/kg estragole or 0.5% safrole for 4weeks.

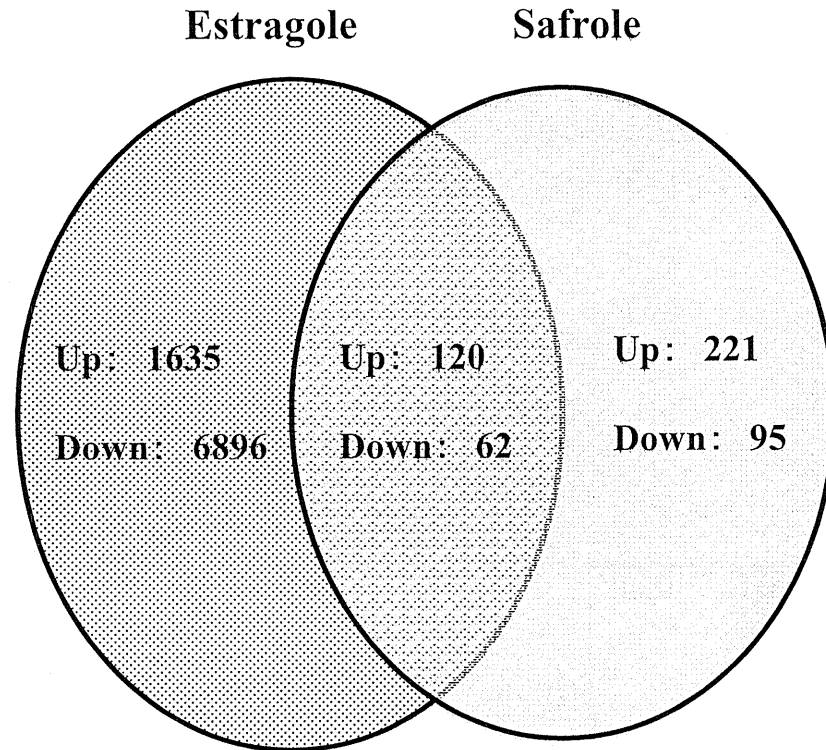
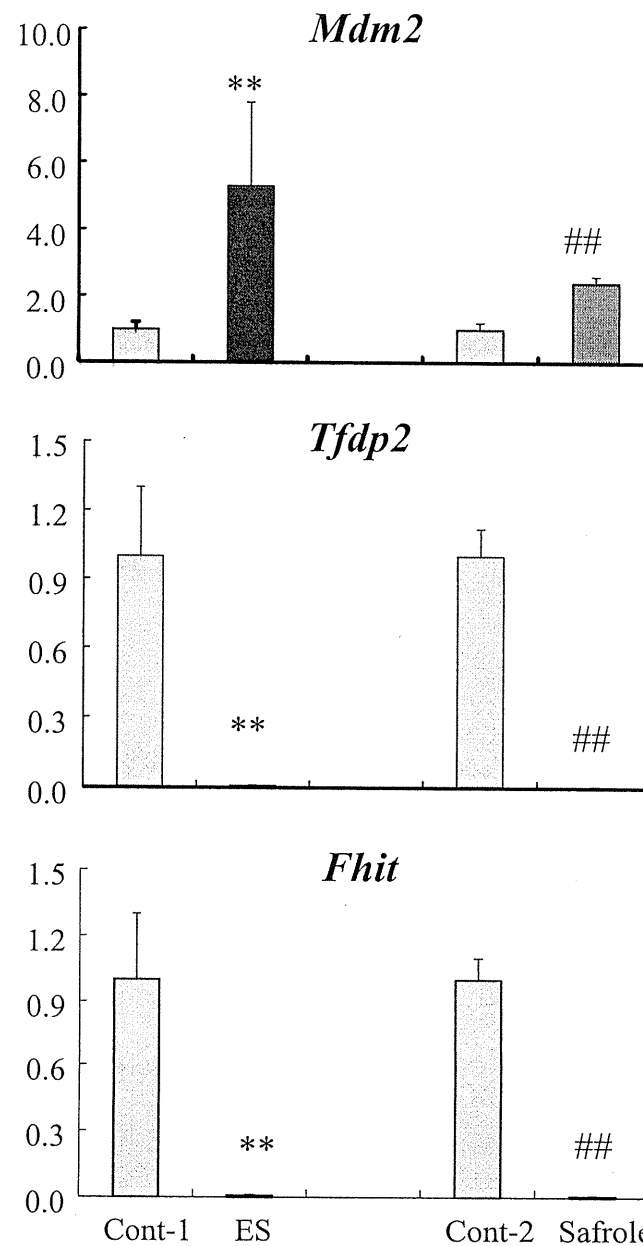
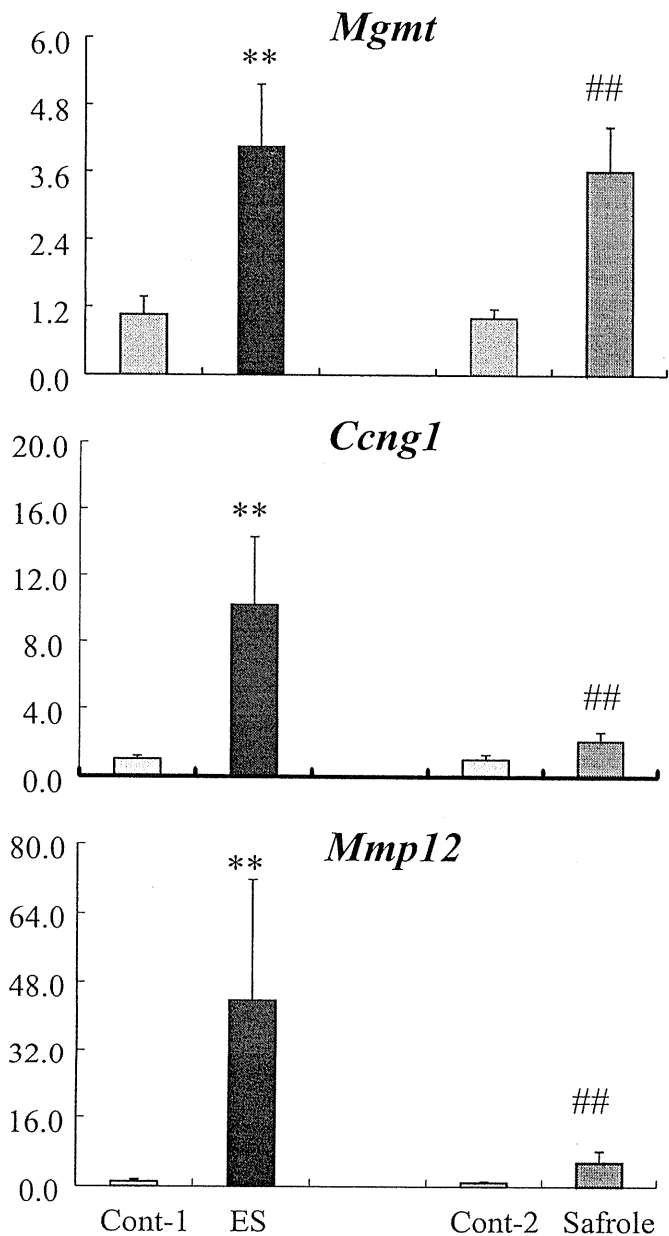


Fig.5. The level of mRNA expression of the up or down-regulated genes in common in safrole or estragole-treated groups.



\*\* : p<0.01 vs Cont-1 (Student's *t*-test)

## : p<0.01 vs Cont-2 (Student's *t*-test)

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) 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

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 日比 大介 国立医薬品食品衛生研究所 病理部研究生

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* ラットあるいはマウス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 について、ラットを用いた本試験法及び詳細な *in vivo* 変異原性解析により、furan の肝発がん機序に遺伝毒性メカニズムが関与していない可能性が示唆された。一方で、furan はラットのみならずマウスにおいても肝発がんを誘発することが知られている。本年度では、雌雄の B6C3F<sub>1</sub> 系 *gpt delta* マウスに furan 0、2、15 mg/kg を 4 週間あるいは 13 週間強制経口投与し、肝臓病理組織学的検索に加え、肝臓におけるレポーター遺伝子変異解析（変異原性評価）及び DNA 損傷の指標であるコメットアッセイ（DNA 損傷の評価）、さらに、骨髄における小核試験（染色体異常誘発性の評価）の 3 種の *in vivo* 遺伝毒性試験を同一個体で実施した。投与 4 週目より 15 mg/kg において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限局性の肝細胞壊死が認められた。肝臓の *in vivo* 変異原性評価の結果、4 及び 13 週目における *gpt* ならびに Spi<sup>-</sup> mutant frequency (MF) に有意な差は認められなかった。また、肝臓のコメットアッセイにおいても tail moment、tail length 及び tail intensity のいずれの項目においても著差は認められなかった。骨髄を用いた小核試験の結果、投与 4 週目の雄で小核出現頻度の有意な増加が認められたものの、13 週目では変化は認められなかった。以上より、マウスにおける 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* では小核試験が標準的な組み合わせとして実施される

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* ラットあるいはマウスを用い、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 について、ラット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 はラットのみならずマウスにおいても肝発がんを誘発することが知られている<sup>1)</sup>。

本年度は、furan のマウスにおける肝発がん機序解明を目的とし、*gpt delta* マウスを用い、肝臓における病理組織学的検索に加え、肝臓におけるレポーター遺伝子変異解析（変異原性評価）及びコメットアッセイ（DNA 損傷の評価）、さらに、骨髄における小核試験（染色体異常誘発性の評価）の3種の *in vivo* 遺伝毒性試験を同一個体で実施した。

## B. 研究方法

6週齢の雄の B6C3F<sub>1</sub> 系 *gpt-delta* マウスに発がん用量として報告されている 15 mg/kg あるいは非発がん用量である 2 mg/kg をコーンオイルに溶解させ、4 あるいは 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。投与期間中は、一般状態観察を連日実施した。剖検時にエーテル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、肝臓重量測定を行い、一部は細胞洗浄用緩衝液に懸濁させ、電気泳動を行い、コメットアッセイを実施し、他の一部を病理組織検索用にホルマリン固定後、定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。残りの肝臓からはゲノム DNA を採取し、*in vivo* 変異原性評価を実施した。また、大腿骨骨髄から骨髄細胞を採取し、*in vivo* 小核試験を実施した。

### （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 および 2 に示す。13 週目の 15 mg/kg の雄において、最終体重に有意な低値が認められた。肝臓重量においては、15 mg/kg において絶対あるいは相対重量の有意な高値が 4 週目から認められた。肝臓病理組織学的検索の結果を Table 3 及び 4 に示す。4 週目において、小葉中心性肝細胞肥大 (2 mg/kg : 雄 2/5 例 ; 15 mg/kg : 雄 5/5 例、雌 : 1/5 例)、被膜下炎症細胞浸潤 (15 mg/kg : 雄 1/5 例、雌 3/5 例) が認められた。13 週目では、小葉中心性肝細胞肥大 (2 mg/kg : 雄 1/5 例)、被膜下炎症細胞浸潤 (2 mg/kg : 雄 4/5 例、雌 5/5 例 ; 15 mg/kg : 雄 5/5 例、雌 5/5 例)、限局性の肝細胞壊死 (15 mg/kg : 雄 1/5 例) が認められた。In vivo 変異原性評価の結果を Table 5~12 に示す。投与 4 及び 13 週目の雌雄の肝臓における *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。In vivo コメットアッセイの結果を Table 13 に示す。投与 13 週目の肝臓におけるコメットアッセイの結果、雌雄共に対照群と比較し、tail moment、tail length 及び tail intensity のいずれの項目においても著差は認められなかった。In vivo 小核試験の結果を Figure 1~3 に示す。雌においては、著差は認められなかった。投与 4 週目の雄の 2 mg/kg 以上では小核出現頻度の有意な増加が認められたが、投与 13 週目では対照群と比較し、有意な差は認められなかった。

#### D. 考察

本研究では、furan のマウスにおける肝発がん機序解明を目的とし、雌雄の *gpt* delta

マウス各群 10 例にコーンオイルに溶解させた furan 0、2 及び 15 mg/kg を 4 週間あるいは 13 週間強制経口投与し、肝臓における病理組織学的検索に加え、肝臓におけるレポーター遺伝子変異解析 (in vivo 変異原性評価) 及びコメットアッセイ (DNA 損傷傷の評価)、さらに、骨髄における小核試験 (染色体異常誘発性の評価) の 3 種の in vivo 遺伝毒性試験を同一個体で実施した。

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。最終体重においては、投与 13 週目の 15 mg/kg において有意な低値が認められた。肝臓重量においては、15 mg/kg において絶対あるいは相対重量の有意な高値が 4 週目から認められた。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及び被膜下炎症細胞浸潤が認められ、投与 13 週目では 15 mg/kg の雄において肝細胞壊死も認められた。

肝臓の in vivo 変異原性評価の結果、4 及び 13 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、肝臓のコメットアッセイにおいても tail moment、tail length 及び tail intensity のいずれの項目においても著差は認められなかった。骨髄を用いた小核試験の結果、投与 4 週目の雄で小核出現頻度の有意な増加が認められたものの、13 週目では変化は認められなかった。これらの結果から、furan は弱いながらも染色体異常誘発性を有する可能性が考えられたが、標的臓器における DNA 損傷性及び遺伝子突然変異誘発性が認められないことから、furan のマウスにおける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。

## E. 結論

初年度の furan を用いた短期包括的試験、前年度の肝臓葉毎の *in vivo* 変異原性評価及び本年度のマウスを用いた *in vivo* 遺伝毒性包括試験の結果から、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強く示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 学会発表

なし

### 2. 発表論文

なし

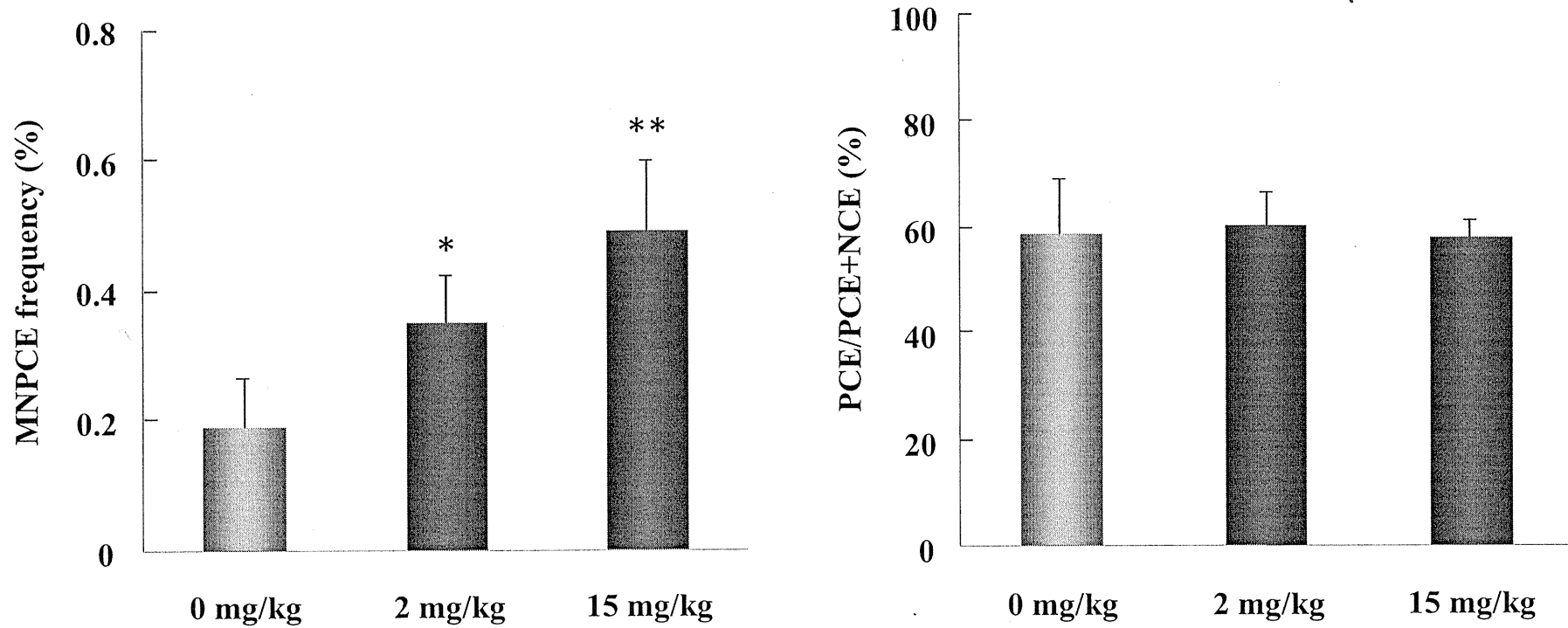
## G. 知的財産権の出願・登録状況

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)

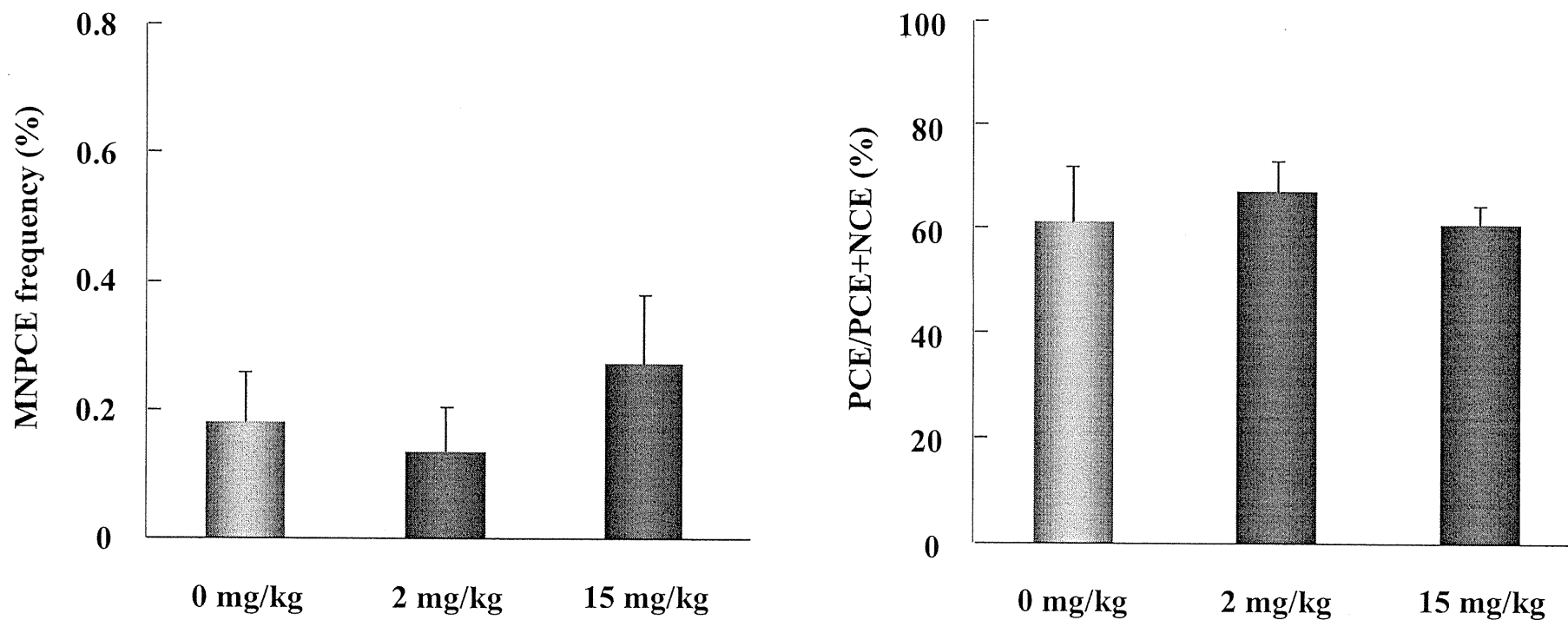
Figure 1 Micronucleus test with bone marrow in B6C3F1 *gpt* delta male mice treated with Furan for 4 weeks



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

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

Figure 2 Micronucleus test with bone marrow in B6C3F1 *gpt* delta female mice treated with Furan for 4 weeks

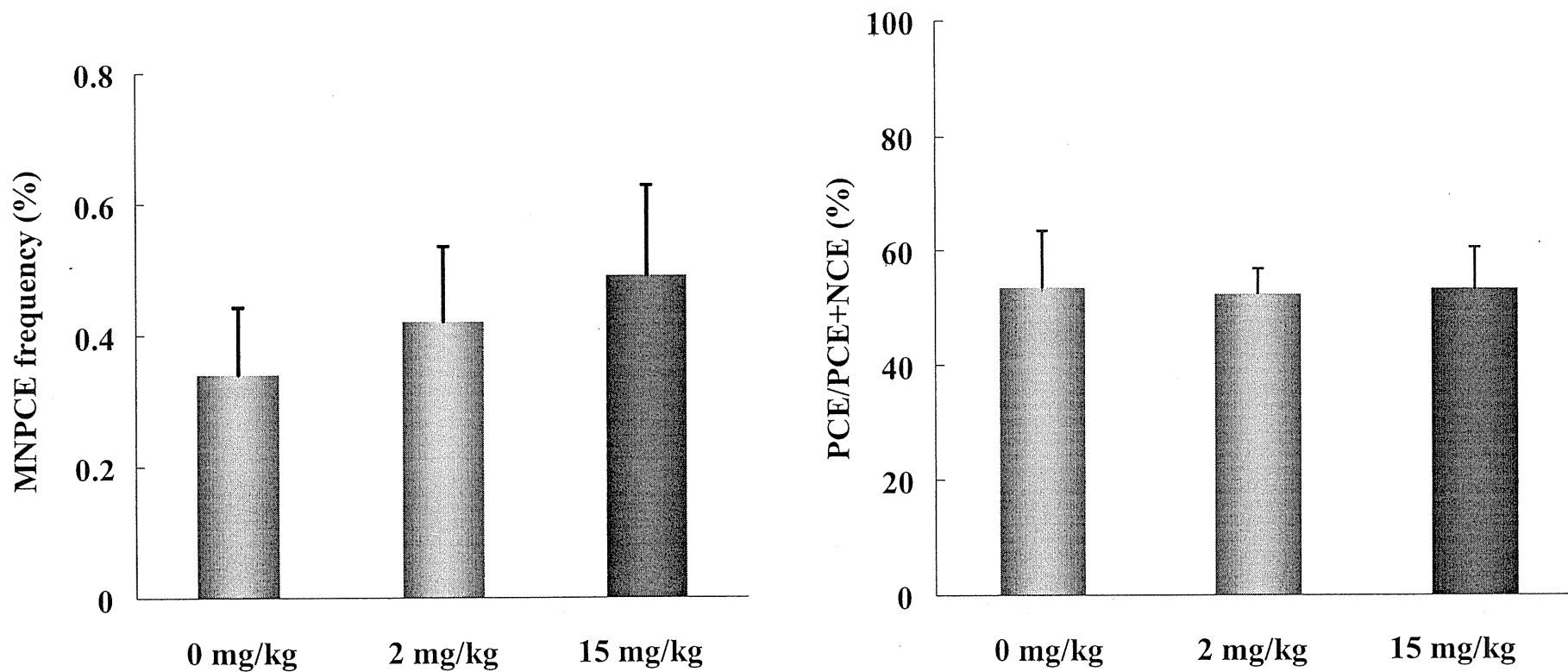


MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocytes, PCE : Polychromatic erythrocytes, NCE : Normochromatic erythrocytes



Figure 3 Micronucleus test with bone marrow in B6C3F1 *gpt* delta male mice treated with Furan for 13 weeks

35



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

**Table 1 Final body and liver weights for B6C3F1 *gpt* delta mice treated with Furan for 4 weeks**

	Male			Female		
	0 mg/kg	2 mg/kg	15 mg/kg	0 mg/kg	2 mg/kg	15 mg/kg
<b>Final body weight (g)</b>	28.2 ± 1.4 <sup>a)</sup>	28.9 ± 0.7	29.7 ± 1.9	21.8 ± 1.0	22.2 ± 1.3	22.5 ± 0.9
<b>Organ weight</b>						
<b>Absolute weight (g)</b>						
Liver	1.28 ± 0.06	1.32 ± 0.04	1.56 ± 0.01**	1.06 ± 0.07	1.04 ± 0.10	1.15 ± 0.07*
<b>Relative weight (g/10g b.w.)</b>						
Liver	0.45 ± 0.02	0.46 ± 0.02	0.53 ± 0.02**	0.46 ± 0.15	0.47 ± 0.02	0.51 ± 0.01**

<sup>a)</sup>: Mean ± S.D.

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

**Table 2 Final body and liver weights for B6C3F1 *gpt* delta mice treated with Furan for 13 weeks**

	Male			Female		
	0 mg/kg	2 mg/kg	15 mg/kg	0 mg/kg	2 mg/kg	15 mg/kg
<b>Final body weight (g)</b>	35.7 ± 1.3 <sup>a)</sup>	34.4 ± 1.7	33.1 ± 1.0*	25.2 ± 2.0	24.3 ± 0.9	24.8 ± 0.5
<b>Organ weight</b>						
<b>Absolute weight (g)</b>						
Liver	1.59 ± 0.03	1.64 ± 0.10	1.73 ± 0.15	1.12 ± 0.15	1.09 ± 0.05	1.31 ± 0.04
<b>Relative weight (g/10g b.w.)</b>						
Liver	0.45 ± 0.03	0.48 ± 0.03	0.52 ± 0.04**	0.44 ± 0.03	0.45 ± 0.02	0.53 ± 0.02**

<sup>a)</sup>: Mean ± S.D.

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

**Table 3 Histopathology in the livers of B6C3F1 *gpt* delta mice treated with Furan for 4 weeks**

	Male			Female		
	0 mg/kg	2 mg/kg	15 mg/kg	0 mg/kg	2 mg/kg	15 mg/kg
<b>Number of animals examined</b>	5	5	5	5	5	5
<b>Liver</b>						
<b>Centrilobular hepatocyte hypertrophy</b>	0	2	5	0	0	1
<b>Subcapsular infiltration of inflammatory cells</b>	0	0	1	0	0	3