

201234044A

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

(H24-食品-一般-012)

平成 24 年度総括・分担研究報告書

研究代表者 西川 秋佳

平成 25(2013)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. 肝臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発 西川 秋佳 -----	1 0
2. 腎臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発 梅村隆志 -----	2 4
3. 2-メチルフランの一般毒性・遺伝毒性・発がん性の 包括的評価 -----	3 2
小川久美子	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 4 6

IV. 研究成果の刊行物・別刷り ----- 4 8

I. 総括研究報告

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）

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安全性生物試験研究センター長

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

小川久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長

研究要旨

gpt delta ラットを用いた肝臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法を開発するため、条件検討試験を実施し、標準プロトコルを確立した。既知の遺伝毒性肝発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性非肝発がん物質および非発がん物質を用い、本試験法の有用性を検討した結果、何れの被験物質についても妥当な結果が得られた。次年度からは本試験法のさらなる改良に向け、研究を進める予定である。また、*gpt delta* ラットを用いた腎臓を標的とする化学物質の遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の標準プロトコル確立のため、条件検討試験を実施した。その結果、雌性ラットを用いて、片側腎摘出 48 時間後イニシエーター物質 DEN を投与する実験条件を確立した。併せて、DEN の投与用量および試験期間を検討するための動物実験を終了した。標準プロトコルの確立後、既知発がん物質を用いて本試験法の有用性を検証する予定である。さらに、2-メチルフラン (2-MF) の一般毒性、遺伝毒性および発がん性を包括的に評価するため、SD 系 *gpt delta* ラットに 2-MF を 1.2、6、30 mg/kg で 13 週間強制経口投与し、一般毒性評価および肝臓の *in vivo* 変異原性について解析した。その結果、基本骨格であるフランと同様に、2-MF は主に肝・胆道系に毒性影響を示した。肝臓の *in vivo* 変異原性は陰性であった。

A. 研究目的

ラット発がん性試験は長期間を要する。そのため、評価の迅速化を図る目的で開発されたラット肝中期発がん性試験法は予測精度が高いが(Toxicol Pathol, 2010)、検出するのは発がん性自体ではなく主に発がん促進作用である。一方、種々の遺伝毒性試験の中では *in vivo* 小核試験の成績が重視されるが、検索細胞・組織は赤血球及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

不明な点も多い。近年開発されたレポーター遺伝子導入動物による遺伝毒性検索モデルは、臓器・組織レベルでの遺伝毒性の検索を可能にし、中でも *gpt delta* は点突然変異及び欠失変異を効率よく検出できることを利点とする(Environ Mol Mutagen, 1996)。本研究は *gpt delta* ラットを用いた短期発がん性試験法を開発し、肝臓ないしは腎臓を主たる標的とする発がん性・遺伝毒性物質の検出モデルの開発を目的とする。昨年度はイニシエーター物質の投与量ならびに前

腫瘍性病変の検索に最適な投与期間を検討し、肝臓ならびに腎臓における短期発がん性試験法の標準プロトコルを確立した。今後は種々の遺伝毒性発がん物質、非遺伝毒性発がん物質、非発がん物質を用いてこれらの標準プロトコルの妥当性を検証する予定である。本試験法では発がん性・遺伝毒性を迅速に検出できるため、この点が他の研究とは異なり独創的である。遺伝毒性の検索に部分的肝切除や片側腎摘出によって採取した臓器を活用することが本研究の特色の一つである。また、肝および腎中期発がん性試験法にて評価予定である 2-MF について、ラットを用いた短期包括試験法により、その一般毒性ならびに遺伝毒性を検討する。現在、*gpt delta* ラットにおける 2-MF を 13 週間反復投与試験の動物実験を終了した。今後は包括的な安全性評価を実施して、上記、肝ならびに腎の中期発がん性試験法に適用し、本モデルの有用性について検証する。また、レポーター遺伝子導入動物による遺伝毒性検索モデルは OECD ガイドライン化されたが、一般毒性や発がん性を同時に検索する試験成績は我々の研究グループ以外からは報告されていない。

B. 研究方法

B-1 肝臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発

実験①：イニシエーター物質 DEN の適正投与用量を検討する目的で、10 週齢の雄性 F344 ラット（日本 SLC）に部分肝切除を施し、18 時間後に DEN を 10, 50, 100 mg/kg 体重の用量でそれぞれ単回腹腔内投与した。試験開始 6 週間後の残存肝のサンプルにお

いて、定法に従いパラフィン標本を作製し、抗 GST-P 抗体を用いて免疫組織化学染色を実施し、GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を行った。

実験②：被験物質のプロモーション作用検出に必要な実験期間を探る目的で、6 週齢の雄性 F344 ラットに非遺伝毒性肝発がん物質である phenobarbital (PB) を 500 ppm の濃度で 4 週間混餌投与した後、部分肝切除を施した。部分肝切除 18 時間後に実験①の結果を踏まえて DEN を 10 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与し、PB の投与をそのまま継続した。試験開始 10, 12, 14 週間後の残存肝において、GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を行った。

実験③：本試験法の有用性を検証するため、6 週齢の雄性 F344 *gpt delta* ラット（日本 SLC）に遺伝毒性肝発がん物質として 2-acetylaminofluorene (2-AAF)、非遺伝毒性肝発がん物質として piperonyl butoxide (PBO) および非発がん物質として acetaminophen (APAP) をそれぞれ 20, 12000 および 9000 ppm の濃度で 4 週間混餌投与した後、部分肝切除を施し、それにより得られた切除肝よりゲノム DNA を抽出して、*gpt assay* を実施した。部分肝切除 18 時間後に DEN を 10 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与し、さらに被験物質の投与を継続した。実験②の結果を踏まえ、試験開始 10 週間後の残存肝のサンプルにおいて、GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を行った。

実験④：本試験法の有用性をさらに検証するため、6 週齢の雄性 F344 *gpt delta* ラットに遺伝毒性肝発がん物質として 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinolone

(IQ)、safrole (SF) および非遺伝毒性肝発がん物質として phenytoin (PHE) をそれぞれ 20, 5000 および 2400 ppm の濃度で混餌投与し、遺伝毒性非肝発がん物質である aristolochic acid (AA) については、0.3 mg/kg 体重の用量で週 7 日、強制経口投与し、本試験法の標準プロトコールに従い、試験を実施した。

B-2 腎臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発

実験①： 10 週齢の雌雄 F344 ラット（日本 SLC）に片側腎摘出を施し、雄性 F344 ラットは片側腎摘出後 6, 12, 18, 24, 48 時間後に、雌性 F344 ラットは 6, 12, 18, 24, 48, 72 時間後に屠殺・解剖した。残存腎の細胞増殖活性を検索するため、それぞれの解剖の 2 時間前に bromodeoxyuridine

(BrdU) を 100 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与した。残存腎のサンプルを冷アセトンにて固定し、パラフィン標本を作製して γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT) 組織化学染色および抗 BrdU 抗体を用いた免疫組織化学染色の 2 重染色を行った。 γ -GT は刷子縁に特異的に発現しているため、その染色態度は、短い刷子縁を有する近位曲尿細管で弱陽性、長い刷子縁を有する近位直尿細管で強陽性、刷子縁を有さない遠位尿細管で陰性となることを利用して 3 種の尿細管を識別し、それぞれの部位における BrdU 陽性細胞数を 3000 個以上の細胞から算出し、BrdU labeling indexes (BrdU-LIs) とした。

実験②： 実験①の結果を踏まえ、6 週齢の雌性 F344 ラットに NTA を 1000 ppm の濃度で 4 週間飲水投与後、片側腎摘出を

施した。さらに実験①の結果を踏まえ、片側腎摘出 48 時間後に DEN を 20, 40 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与し、NTA の投与を継続した。動物を試験開始 12, 16, 20 週間後に屠殺・解剖し、残存腎のサンプルを用いて定法に従いパラフィン標本を作製し、前腫瘍性病変の病理組織学的解析を行った。

B-3 2-メチルフランの一般毒性・遺伝毒性・発がん性の包括的評価

2-MF のラットにおける有用な毒性情報がないため、4 日間および 4 週間の用量設定試験を実施した。

実験①（4 日間投与用量設定試験）： 6 週齢の雄 SD 系ラット（日本エスエルシー）各群 3 匹に 2-MF を 10, 30, 100, 200 mg/10mL/kg の用量で 4 日間強制経口投与した。最高投与量は、SD 系ラットに 2-MF を 200 mg/kg 単回腹腔内投与した結果、肝細胞壊死が惹起されたとの報告を参考に設定した。対照群には媒体であるコーンオイルのみを投与した。投与期間中、飼料は CRF-1 固形飼料を自由に摂取させ、体重推移を確認した。

実験②（4 週間投与用量設定試験）： 6 週齢の雌雄 SD 系ラットに 2-MF を 3, 10 および 30 mg/10mL/kg (n=5) の用量で 4 週間（5 日/週）強制経口投与した。投与量は、用量設定試験 1 の結果より設定した。対照群には媒体であるコーンオイルのみを投与した。投与期間中、飼料は CRF-1 固形飼料を自由に摂取させ、体重及び摂餌量測定を週 1 回実施した。解剖時にイソフルラン麻酔下で腹大動脈より採血し、血液学検査および血清生化学検査を実施した。また、

肝臓および腎臓の重量測定を実施した。

実験③ (13 週間反復投与試験) : 6 週齢の雌雄 SD 系 *gpt delta* ラット、各群 10 匹に 2-MF を 1.2、6 および 30 mg/10mL/kg の用量で 13 週間 (7 日/週) 強制経口投与した。対照群には、媒体であるコーンオイルのみを投与した。投与量は、用量設定試験 2 の結果から設定した。投与期間中、飼料は CRF-1 固形飼料を自由に摂取させ、体重及び摂餌量測定を週 1 回実施した。解剖時にイソフルラン麻酔下で腹大動脈より採血し、血液学検査および血清生化学検査を実施した。また、主要臓器については重量測定を行い、全身諸臓器についてホルマリン固定後、常法によりパラフィン切片を作製した。パラフィン切片はヘマトキシリン・エオジン染色後、病理組織学的検査に供した。また、剖検時に採材した肝臓の一部は液体窒素により急速凍結して保存し、*in vivo* 変異原性試験 (*gpt* 及び *Spi* アッセイ) に供した。

(倫理面への配慮)

本試験は「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」に基づき、動物実験計画書を作成し、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会による審査を受けた後、実施した。また、DNA 組み換え動物の使用についても、「国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則」に従い、遺伝子組換え実験計画書を作成し、審査を受けた。

C. 研究結果

C-1 肝臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発

実験① : GST-P 陽性細胞巢の定量的解析の結果、10 mg/kg 体重の用量から GST-P 陽性細胞巢の形成がみられ、数・面積ともに用量依存性に増加し、100 mg/kg 投与群で対照群と比較して何れも有意な値となった。

実験② : GST-P 陽性細胞巢の定量的解析の結果、試験開始 10 週間後より、対照群と比較して PB 投与群において GST-P 陽性細胞巢の数および面積の有意な増加がみられた。

実験③ : 切除肝における *gpt assay* の結果、2-AAF 群において対照群と比較して *gpt* 変異体頻度 (MF) の有意な上昇がみられた。変異スペクトラム解析においては、2-AAF 群において対照群と比較して GC→TA および GC→CG transversion ならびに single base pair deletion 変異の有意な上昇がみられた。残存肝における GST-P 陽性細胞巢の定量的解析の結果、GST-P 陽性細胞巢の数・面積ともに対照群と比較して 2-AAF 群および PBO 群において有意な増加が認められ、APAP 群においては有意な減少がみられた。

実験④ : 切除肝における *gpt assay* の結果、対照群と比較して IQ 群、SF 群および AA 群において *gpt* MF の有意な上昇を認めた。変異スペクトラム解析においては、対照群と比較して、IQ 群において GC→TA transversion、GC:AT transition および single base pair deletion 変異の有意な上昇がみられ、AA 群においては AT→TA transversion 変異の有意な上昇が認められた。残存肝における GST-P 陽性細胞巢の定量的解析の結果、GST-P 陽性細胞巢の数・面積ともに対照群と比較して IQ 群、SF 群および PHE

群において有意な増加を認めた。

C-2 腎臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発

実験①： 雄性 F344 ラットの片側腎摘出後の残存腎について、近位曲尿細管、近位直尿細管および遠位尿細管のいずれの部位においても BrdU-LIs に変動はみられなかった。雌性 F344 ラットの片側腎摘出後の残存腎について、近位曲尿細管においては片側腎摘出 48 時間後において 6 時間後と比較して有意な上昇を示し、遠位尿細管においては片側腎摘出 48 時間後および 72 時間後において 6 時間後と比較して有意に上昇していた。また、近位直尿細管においても、有意な変化とはならなかったものの、48 時間後の BrdU-LI が最も高かった。

実験②： 実験期間中の飲水量について、群間で明らかな差はみられなかった。何れの解剖時点においても、最終体重に群間で差はみられなかった。試験開始 12 週間後の時点では、DEN 20 mg/kg 投与/NTA 投与群において DEN 20 mg/kg 投与/NTA 非投与群と比較して有意な腎臓重量の増加がみられ、また、DEN 40 mg/kg 投与/NTA 投与群において DEN 40 mg/kg 投与/NTA 非投与群と比較して有意な腎臓重量の増加が認められた。試験開始 16 週間後の時点では、DEN 20 mg/kg 投与/NTA 投与群において DEN 20mg/kg 投与/NTA 非投与群と比較して有意な腎臓重量の増加がみられた。

C3 2-メチルフランの一般毒性・遺伝毒性・発がん性の包括的評価

実験① (4 日間投与用量設定試験)： 200 mg/kg 群の全例が投与 2 日目に死亡し、100

mg/kg 群の 2/3 例が投与 3 日目に死亡した。30 mg/kg 群で体重増加抑制傾向が認められた。以上の結果、4 週間反復投与試験における最高用量を 30 mg/kg とて設定し、以下公比 3 で除して 10、3 mg/kg を投与量として選択した。

実験② (4 週間投与用量設定試験)： 試験期間中の動物の一般状態および体重推移に変化は認められず、死亡例も認められなかった。雄の 3 mg/kg 投与群以上で肝相対重量の高値、雌雄の 10 mg/kg 投与群以上で肝相対および絶対重量の有意な高値、ならびに雌雄の 30 mg/kg 投与群で腎相対および絶対重量の有意な高値が認められた。血液学検査および血清生化学検査結果について、主な変化として雄の 30 mg/kg および雌の 10 mg/kg 以上の投与群で軽度の貧血傾向、ならびに雌雄の 30 mg/kg 投与群で肝機能パラメーターの変動が認められた。以上の結果、13 週間反復投与試験の最高用量を 30 mg/kg として設定し、以下公比 5 で除して 6、1.2 mg/kg を投与量として選択した。

実験③ (13 週間反復投与試験)： 試験期間中の動物の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。雌雄ともに投与 7 週目以降、30 mg/kg 投与群で体重増加抑制が認められた。血液学検査の結果、雌雄の 30 mg/kg 投与群で Hb、MCV、MCH の有意な低値、雄の 30 mg/kg 投与群で MCHC の有意な低値が認められ、貧血傾向が示唆された。血清生化学検査の結果、雄では、6 mg/kg 以上の投与群で ALP および IP の高値、雄の 30 mg/kg 投与群で T-Bil、 γ -GTP、Albumin、T-Cho、Na の高値および Glucose の低値が認められた。雌では、30 mg/kg 投与群で T-Bil、 γ -GTP、Albumin、

Ca の高値および TG、Glucose の低値が認められた。なお、雌の 3 および 10 mg/kg 投与群で認められた TG の低値は用量相関性に乏しく、その他の脂質系パラメーターに変動が認められなかったため、被験物質投与に起因した変化でないと考えられた。器官重量の主な変化として、雄の 30 mg/kg 投与群で肝臓の相対および絶対重量の高値、腎臓の相対重量の高値が認められた。雌では、6 mg/kg 投与群で肝臓の相対重量の高値、30 mg/kg 投与群で肝臓の絶対重量および腎臓の相対重量の高値が認められた。肝臓を用いた *in vivo* 変異原性試験の結果、雌雄ともに *gpt* および Spi アッセイのいずれにおいても、2-MF 投与に起因した変動は認められなかった。

D. 考察

D-1 肝臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発

今回の実験は、肝臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発をめざし、*gpt delta* ラットを用いた新規肝中期発がん性試験法を開発することを目的とした。試験開始から部分肝切除までの試験期間は、OECD の *gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性試験のガイドラインに準拠して 4 週間とし、部分肝切除後に効率よくイニシエーション処置を行うため、部分肝切除により残存組織の細胞増殖活性が最も上昇する 18 時間後に DEN を単回腹腔内投与することとした。実験①で、10 mg/kg 体重の用量から GST-P 陽性細胞巢の形成がみられたため、DEN の投与用量を 10 mg/kg 体重とし、さらに実験②で、試験開始 10 週間後より PB 投与群において GST-P 陽性細胞巢

の有意な増加を認めたため、試験期間を 10 週間とする新規試験法の標準プロトコールを確立した。

実験③、④では新規試験法の有用性を検証した。切除肝における *gpt assay* の結果、遺伝毒性肝発がん物質である 2-AAF、IQ、SF を投与した群において、*gpt* MF の有意な上昇がみられた。変異スペクトラム解析では、2-AAF 群において GC→TA および GC→CG transversion ならびに single base pair deletion 変異の有意な上昇がみられ、IQ 群においては GC→TA transversion、GC:AT transition および single base pair deletion 変異の有意な上昇がみられた。これらの結果は、レポーター遺伝子導入動物を用いた過去の *in vivo* 変異原性試験結果と一致していた。また、2-AAF、IQ、SF は従来の肝中期発がん性試験において、GST-P 陽性細胞巢の形成を促進することが報告されており、本実験の残存肝における GST-P 陽性細胞巢の定量的解析においても、2-AAF 群、IQ 群、SF 群において GST-P 陽性細胞巢の顕著な増加を認めた。

非遺伝毒性肝発がん物質である PBO および PHE は従来の肝中期発がん性試験において GST-P 陽性細胞巢の形成を促進するという報告がされている。今回の実験においても、PBO 群および PHE 群では *gpt* MF の上昇はみられなかったものの、GST-P 陽性細胞巢の有意な増加が認められた。非発がん物質である APAP 群においては、*gpt* MF の上昇はみられず、GST-P 陽性細胞巢の有意な減少が認められた。従来の肝中期発がん性試験において、機序は明らかにされていないものの APAP は GST-P 陽性細胞巢の形成を抑制するという報告がされて

いる。

AA は肝臓において変異原性は示すものの、発がん性は示さないことが報告されている。切除肝における *gpt* assay の結果、AA 群において *gpt* MF の有意な上昇が認められ、変異スペクトラム解析においては、AT→TA transversion 変異の有意な上昇がみられた。これらの結果は過去のレポーター遺伝子導入動物を用いた *in vivo* 変異原性試験の結果と一致していた。一方、AA 群において GST-P 陽性細胞巢の増加はみられなかった。これらの結果は、AA は肝臓において変異原性は示すものの、発がん性は示さないというこれまでの結果を反映しているものと考えられた。

以上より、本試験法は肝臓を標的とする発がん物質の迅速な検索に有用であると共に、その発がん機序に対する遺伝毒性メカニズムの関与の有無を明らかにすることが出来る試験法であることが明らかとなった。しかしながら、今回樹立した試験法においては、被験物質と DEN が同時に投与されていることから、これらの相互作用の可能性が懸念される。今後はプロトコルを改良し、被験物質と DEN の薬物相互作用の可能性を回避することのできる改良試験法の開発に向け、研究を進める予定である。

D-2 腎臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発

今回は、腎臓における遺伝毒性・発がん性の中期包括的試験法の標準プロトコル確立のための、種々の条件を検討した。まず、試験開始から片側腎摘出までの試験期間は、OECD の *gpt* delta ラットを用いた *in vivo* 変異原性試験のガイドラインに準拠し

て4週間とした。次に、片側腎摘出後に効率よくイニシエーション処置を行うため、雌雄の F344 ラットを用いて片側腎摘出後の残存腎の細胞増殖活性が最も上昇する時間を検索した。その結果、雄では片側腎摘出により残存腎の細胞増殖活性は変化しなかった。一方、雌においては検索した3種の尿細管のいずれの部位においても、片側腎摘出48時間後に細胞増殖活性が最も上昇した。これらの結果に基づき、本試験法では雌ラットを用いること、ならびに DEN の投与時間を片側腎摘出48時間後とした。片側腎摘出後の残存腎において、雌雄ラットともに腎重量は増加するものの、細胞増殖活性は雄性ラットでは変化せず雌性ラットでは上昇した。これは、片側腎摘出に対する残存腎の代償機構が雄性ラットでは肥大性であるのに対し、雌性ラットでは増殖性であると考えられている。また、雄の幼弱ラットにおいては片側腎摘出後、残存腎の細胞増殖活性が亢進することが報告されていることから、これらの代償機構の違いには性ホルモンの関与の可能性が考えられる。実験②はイニシエーター物質 DEN の適正投与用量の探索および前がん病変を検索可能な実験期間を検索することを目的として実施し、現在、動物実験を終了した。組織標本の作製終了後、前腫瘍性病変の病理組織学的解析を実施し、標準プロトコルを確立する。さらに遺伝毒性発がん物質、非遺伝毒性発がん物質、非発がん物質を用いて標準プロトコルの有用性を検証する予定である。

D-3 2-メチルフランの一般毒性・遺伝毒性・発がん性の包括的評価

2-MF の *gpt delta* ラットにおける 13 週間反復投与により、6 mg/kg 投与群以上で主に肝臓への影響が認められ、肝重量の高値に加え、ALP、 γ -GTP や T-Bil などの胆道系パラメーターの変動が特徴的であった。

2-MF は、その基本骨格であるフランと同様に、生体内で五員環が開裂することで活性化代謝物アセチルアクロレインとなり、生体内高分子と共有結合することで毒性を発揮する可能性が報告されている。我々がこれまでに実施した *gpt delta* ラットを用いたフランの短期包括的毒性試験結果においても、2 mg/kg 以上の用量で肝重量増加ならびに胆道系パラメーターの変動、また胆管増生および胆管線維症が認められている。従って、2-MF の毒性影響はそのフラン骨格に起因している可能性が考えられた。さらに、フランは GST-P 陽性細胞巢の増加を引き起こすことも報告されており、今後、肝臓の病理組織学的検査ならびに GST-P 陽性細胞巢の定量解析を行い、2-MF の肝毒性および肝発がん性について総合的な評価を実施する。また、雌雄の 30 mg/kg 投与群で認められた軽度の貧血傾向および腎重量の増加についても、フランの短期包括的毒性試験において報告されており、投与に起因した変化であると考えられた。これらの所見および血清生化学検査で認められた IP、Ca、Na の高値に対する毒性学的意義については、関連臓器の病理組織学的検査結果をもって総合的に判断する。

In vivo 変異原性試験の結果、2-MF 投与により、毒性標的である肝臓におけるレポーター遺伝子変異頻度に変動は認められなかった。本試験の最高用量は反復投与における最大耐量であることを考慮すると 2-MF

はラット肝臓において *in vivo* 変異原性を有していない可能性が強く示唆された。一方、フランについても肝臓における *in vivo* 変異原性は陰性であることから、2-MF を含むフラン置換体 (furan-substitutes) の遺伝毒性および発がん性については、2-MF の GST-P 陽性細胞巢の定量解析結果をもって総合的に考察する。

E. 結論

肝臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法として、*gpt delta* ラットを用いた、*in vivo* 変異原性と発がん性を同時に検出可能な新規肝短期発がん性試験法を開発した。今後は、被験物質と DEN の相互作用の可能性を回避することのできる改良プロトコルの確立に向け、研究を進める予定である。また、腎臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の標準プロトコル確立を目的に種々の条件検討試験を行った。その結果、雌ラットを用いること、イニシエーター処置として実施する DEN の投与を片側腎摘出後 48 時間に行うことが最適であることが明らかとなった。さらに、2-MF の一般毒性については、雌雄の 6 mg/kg 以上の投与群において胆道系障害を示唆する血清生化学マーカーの変動あるいは肝重量の増加が認められたことから、無毒性量 (NOAEL) は雌雄ともに 1.2 mg/kg/日であると考えられた。また、肝臓におけるレポーター遺伝子変異頻度は何れの投与群においても変動しなかったことから、2-MF は肝臓に対して *in vivo* 変異原性を有していないと考えられた。今後、全身臓器の病理組織学的検査ならびに肝臓の GST-P 陽性細胞巢の定量解析結果を加え、2-MF の

一般毒性、遺伝毒性および発がん性について総合的に考察する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果

G-1. 学会発表

1. 松下幸平、木島綾希、石井雄二、高須伸二、金美蘭、黒田顕、増井則夫、能美健彦、小川久美子、西川秋佳、梅村隆志：レポーター遺伝子導入ラットを用いた短期発がん物質検出モデルの開発。日本毒性学会第39回大会（仙台，2012. 07）

2. 松下幸平、石井雄二、高須伸二、黒田顕、木島綾希、能美健彦、小川久美子、梅村隆志：*gpt delta* ラットを用いた短期発がん物質検出モデルの開発。日本毒性病理学会第29回大会（つくば，2013. 01-02）

3. Kohei Matsushita, Yuji Ishii, Shinji Takasu, Ken Kuroda, Aki kijima, Takehiko Nohmi, Kumiko Ogawa, Akiyoshi Nishikawa, Takashi Umemura: A medium-term animal model using *gpt delta* rats for predicting chemical carcinogenicity and related mechanisms of action. SOT2013 (San Antonio, 2013. 03)

G-2. 発表論文

1. Kohei Matsushita, Aki Kijima, Yuji Ishii, Shinji Takasu, Meilan Jin, Ken Kuroda, Hiroaki Kawaguchi, Noriaki Miyoshi, Takehiko Nohmi, Kumiko Ogawa, Takashi Umemura: Development of a medium-term animal model using *gpt delta* rats to evaluate chemical carcinogenicity and genotoxicity. *J. Toxicol. Pathol.* 2013; 26: 19-27.

2. Jin M, Kijima A, Hibi D, Ishii Y, Takasu S, Matsushita K, Kuroda K, Nohmi T, Nishikawa A, Umemura T. (2013). *In vivo* genotoxicity of methyleugenol in *gpt delta* transgenic rats following medium-term exposure. *Toxicol Sci.* 131: 387-394.

3. Jin M, Kijima A, Suzuki Y, Hibi D, Ishii Y, Nohmi T, Nishikawa A, Ogawa K, Umemura T. (2012). *In vivo* genotoxicity of 1-methylnaphthalene from comprehensive toxicity studies with B6C3F₁ *gpt delta* mice. *J Toxicol Sci.* 37: 711-721.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

II. 分担研究報告

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

分担研究課題：肝臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発

研究分担者：西川 秋佳 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター

研究協力者：松下 幸平 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

本研究の目的は、*gpt delta* ラットに部分肝切除を施し、切除肝において *in vivo* 変異原性試験を実施し、残存肝において前がん病変である glutathione S-transferase placental form (GST-P) 陽性細胞巢の定量的解析を実施することで、肝臓における遺伝毒性および発がん性を同時に検出することのできる新しい肝中期発がん性試験法を開発することである。新規試験法の標準プロトコールを確立するため、条件検討試験を実施した。その結果に基づき、6 週齢の F344 *gpt delta* ラットに 4 週間被験物質を投与した後に部分肝切除を施し、その切除肝を用いて *gpt assay* を行い、部分肝切除 18 時間後にイニシエーター物質である diethylnitrosamine (DEN) を 10 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与して、引き続き被験物質の投与を継続し、試験開始 10 週間後の残存肝において GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を実施する標準プロトコールを確立した。標準プロトコールの有用性を検証するため、遺伝毒性肝発がん物質として 2-acetylaminofluorene、2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinolone、safrole、非遺伝毒性肝発がん物質として piperonyl butoxide、phenytoin、遺伝毒性非肝発がん物質として aristolochic acid、非発がん物質として acetaminophen を用いた。その結果、本試験法の妥当性を証明する結果が得られた。しかしながら、本プロトコールにおいては被験物質と DEN が同時に投与されていることから、それらの相互作用の可能性が懸念されるため、今後は本試験法のさらなる改良を目指し、被験物質と DEN の相互作用の可能性を回避することのできるプロトコールの確立に向け、研究を進める予定である。

A. 研究目的

食品中に意図的に添加される食品添加物や非意図的に混在する汚染物質のヒトに対する安全性確保は、各種遺伝毒性試験やげっ歯類を用いた発がん性試験結果から担保

している。しかし、ラットを主とする発がん性試験には、長期の投与期間が必要であり、剖検や病理組織検査等を含めると、最終評価までに最短でも 3~4 年を要する。そこでこれまで、発がん性評価の迅速化を図

る目的で、いくつかの短・中期検索法が開発されており、中でもラット肝中期発がん性試験法は発がん性の予測精度が高いことが知られている。しかし、その原理はイニシエーション物質の投与により生じた前がん病変の促進作用を検出するものであり、その発がん過程への遺伝毒性の関与についての情報は得られない。

一方、従来の遺伝毒性試験と比べて、近年開発されたレポーター遺伝子導入動物による遺伝毒性検索モデルは、化学物質の体内動態を考慮に入れた、標的臓器での遺伝毒性を検索できる点から注目されている。特に、*gpt delta* ラットはレポーター遺伝子 *gpt* の点突然変異に加えて、遺伝子導入ベクター上の遺伝子 *red/gam* の欠失変異を検出できることを利点としている。

本研究では、*gpt delta* ラットに部分肝切除を施し、切除肝において *in vivo* 変異原性試験を実施し、残存肝において前がん病変である glutathione S-transferase placental form (GST-P) 陽性細胞巢の定量的解析を実施することで、肝臓における *in vivo* 変異原性および発がん性を同時に検出することのできる新しい肝中期発がん性試験法を開発することを目的とした。本年度は、標準プロトコルを確立するため、切除肝後にイニシエーション処置のために投与する DEN の適正投与用量およびその後の被験物質のプロモーション効果を検出するのに必要な観察期間を探った。続いて、確立した実験プロトコルに従い、既知の遺伝毒性肝発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性非肝発がん物質および非発がん物質を用いて、本試験法の有用性を検証した。

B. 研究方法

実験①:イニシエーター物質 DEN の適正投与用量を検討する目的で、10 週齢の雄性 F344 ラット (日本 SLC) に部分肝切除を施し、18 時間後に DEN を 10, 50, 100 mg/kg 体重の用量でそれぞれ単回腹腔内投与した。試験開始 6 週間後の残存肝のサンプルにおいて、定法に従いパラフィン標本を作製し、抗 GST-P 抗体を用いて免疫組織化学染色を実施し、GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を行った。

実験②:被験物質のプロモーション作用検出に必要な実験期間を探る目的で、6 週齢の雄性 F344 ラットに非遺伝毒性肝発がん物質である phenobarbital (PB) を 500 ppm の濃度で 4 週間混餌投与した後、部分肝切除を施した。部分肝切除 18 時間後に実験①の結果を踏まえて DEN を 10 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与し、PB の投与をそのまま継続した。試験開始 10, 12, 14 週間後の残存肝において、GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を行った。

実験③:本試験法の有用性を検証するため、6 週齢の雄性 F344 *gpt delta* ラット (日本 SLC) に遺伝毒性肝発がん物質として 2-acetylaminofluorene (2-AAF)、非遺伝毒性肝発がん物質として piperonyl butoxide (PBO) および非発がん物質として acetaminophen (APAP) をそれぞれ 20, 12000 および 9000 ppm の濃度で 4 週間混餌投与した後、部分肝切除を施し、それにより得られた切除肝よりゲノム DNA を抽出して、*gpt* assay を実施した。部分肝切除 18 時間後に DEN を 10 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与し、さらに被験物質の投与を継続した。実験②の結果を踏まえ、試験開始 10 週間後

の残存肝のサンプルにおいて、GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を行った。

実験④：本試験法の有用性をさらに検証するため、6週齢の雄性 F344 *gpt delta* ラットに遺伝毒性肝発がん物質として 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinolone (IQ)、safrole (SF) および非遺伝毒性肝発がん物質として phenytoin (PHE) をそれぞれ 20, 5000 および 2400 ppm の濃度で混餌投与し、遺伝毒性非肝発がん物質である aristolochic acid (AA) については、0.3 mg/kg 体重の用量で週 7 日、強制経口投与し、本試験法の標準プロトコールに従い、試験を実施した。

(倫理面への配慮)

本試験は「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」に基づき、動物実験計画書を作成し、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会による審査を受けた後、実施した。また、DNA 組み換え動物の使用についても、「国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則」に従い、遺伝子組換え実験計画書を作成し、審査を受けた。

C. 研究結果

実験①：GST-P 陽性細胞巢の定量的解析の結果を Fig. 1 に示す。10 mg/kg 体重の用量から GST-P 陽性細胞巢の形成がみられ、数・面積ともに用量依存性に増加し、100 mg/kg 投与群で対照群と比較して何れも有意な値となった。

実験②：GST-P 陽性細胞巢の定量的解析の結果を Fig. 2 に示す。試験開始 10 週間後より、対照群と比較して PB 投与群において GST-P 陽性細胞巢の数および面積の有意な

増加がみられた。

実験③：切除肝における *gpt assay* の結果を Table 1 に示す。2-AAF 群において対照群と比較して *gpt* 変異体頻度 (MF) の有意な上昇がみられた。変異スペクトラム解析においては、2-AAF 群において対照群と比較して GC:TA および GC:CG transversion ならびに single base pair deletion 変異の有意な上昇がみられた (Table 2)。残存肝における GST-P 陽性細胞巢の定量的解析の結果を Fig. 3 に示す。GST-P 陽性細胞巢の数・面積ともに対照群と比較して 2-AAF 群および PBO 群において有意な増加が認められ、APAP 群においては有意な減少がみられた。

実験④：切除肝における *gpt assay* の結果を Table 3 に示す。対照群と比較して IQ 群、SF 群および AA 群において *gpt* MF の有意な上昇を認めた。変異スペクトラム解析においては、対照群と比較して、IQ 群において GC:TA transversion、GC:AT transition および single base pair deletion 変異の有意な上昇がみられ、AA 群においては AT:TA transversion 変異の有意な上昇が認められた (Table 4)。残存肝における GST-P 陽性細胞巢の定量的解析の結果を Fig. 4 に示す。GST-P 陽性細胞巢の数・面積ともに対照群と比較して IQ 群、SF 群および PHE 群において有意な増加を認めた。

D. 考察

今回の実験は、肝臓における遺伝毒性・発がん性の中期包括的試験法の開発をめざし、*gpt delta* ラットを用いた新規肝中期発がん性試験法を開発することを目的とした。試験開始から部分肝切除までの試験期間は、OECD の *gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変

異原性試験のガイドラインに準拠して4週間とし、部分肝切除後に効率よくイニシエーション処置を行うため、部分肝切除により残存組織の細胞増殖活性が最も上昇する18時間後にDENを単回腹腔内投与することとした。実験①で、10 mg/kg体重の用量からGST-P陽性細胞巢の形成がみられたため、DENの投与用量を10 mg/kg体重とし、さらに実験②で、試験開始10週間後よりPB投与群においてGST-P陽性細胞巢の有意な増加を認めたため、試験期間を10週間とする新規試験法の標準プロトコールを確立した。

実験③、④では新規試験法の有用性を検証した。切除肝における*gpt* assayの結果、遺伝毒性肝発がん物質である2-AAF、IQ、SFを投与した群において、*gpt* MFの有意な上昇がみられた。変異スペクトラム解析では、2-AAF群においてGC:TAおよびGC:CG transversionならびにsingle base pair deletion変異の有意な上昇がみられ、IQ群においてはGC:TA transversion、GC:AT transitionおよびsingle base pair deletion変異の有意な上昇がみられた。これらの結果は、レポーター遺伝子導入動物を用いた過去の*in vivo*変異原性試験結果と一致していた。また、2-AAF、IQ、SFは従来の肝中期発がん性試験において、GST-P陽性細胞巢の形成を促進することが報告されており、本実験の残存肝におけるGST-P陽性細胞巢の定量的解析においても、2-AAF群、IQ群、SF群においてGST-P陽性細胞巢の顕著な増加を認めた。

非遺伝毒性肝発がん物質であるPBOおよびPHEは従来の肝中期発がん性試験においてGST-P陽性細胞巢の形成を促進するとい

う報告がされている。今回の実験においても、PBO群およびPHE群では*gpt* MFの上昇はみられなかったものの、GST-P陽性細胞巢の有意な増加が認められた。

非発がん物質であるAPAP群においては、*gpt* MFの上昇はみられず、GST-P陽性細胞巢の有意な減少が認められた。従来の肝中期発がん性試験において、機序は明らかにされていないもののAPAPはGST-P陽性細胞巢の形成を抑制するという報告がされている。

AAは肝臓において変異原性は示すものの、発がん性は示さないことが報告されている。切除肝における*gpt* assayの結果、AA群において*gpt* MFの有意な上昇が認められ、変異スペクトラム解析においては、AT:TA transversion変異の有意な上昇がみられた。これらの結果は過去のレポーター遺伝子導入動物を用いた*in vivo*変異原性試験の結果と一致していた。一方、AA群においてGST-P陽性細胞巢の増加はみられなかった。これらの結果は、AAは肝臓において変異原性は示すものの、発がん性は示さないというこれまでの結果を反映しているものと考えられた。

以上より、本試験法は肝臓を標的とする発がん物質の迅速な検索に有用であると共に、その発がん機序に対する遺伝毒性メカニズムの関与の有無を明らかにすることが出来る試験法であることが明らかとなった。しかしながら、今回樹立した試験法においては、被験物質とDENが同時に投与されていることから、これらの相互作用の可能性が懸念される。今後はプロトコールを改良し、被験物質とDENの薬物相互作用の可能性を回避することのできる改良試験法の開

発に向け、研究を進める予定である。

E. 結論

肝臓における遺伝毒性・発がん性の中期的試験法として、*gpt delta* ラットを用いた、*in vivo* 変異原性と発がん性を同時に検出可能な新規肝中期発がん性試験法を開発した。今後は、被験物質と DEN の相互作用の可能性を回避することのできる改良プロトコールの確立に向け、研究を進める予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果

G-1. 学会発表

1. 松下幸平、木島綾希、石井雄二、高須伸二、金美蘭、黒田顕、増井則夫、能美健彦、小川久美子、西川秋佳、梅村隆志：レポーター遺伝子導入ラットを用いた短期発がん物質検出モデルの開発。日本毒性学会第 39 回大会（仙台，2012. 07）
2. 松下幸平、石井雄二、高須伸二、黒田顕、木島綾希、能美健彦、小川久美子、梅村隆

志：*gpt delta* ラットを用いた短期発がん物質検出モデルの開発。日本毒性病理学会第 29 回大会（つくば，2013. 01-02）

3. Kohei Matsushita, Yuji Ishii, Shinji Takasu, Ken Kuroda, Aki Kijima, Takehiko Nohmi, Kumiko Ogawa, Akiyoshi Nishikawa, Takashi Umemura: A medium-term animal model using *gpt delta* rats for predicting chemical carcinogenicity and related mechanisms of action. SOT2013 (San Antonio, 2013. 03)

G-2. 発表論文

1. Kohei Matsushita, Aki Kijima, Yuji Ishii, Shinji Takasu, Meilan Jin, Ken Kuroda, Hiroaki Kawaguchi, Noriaki Miyoshi, Takehiko Nohmi, Kumiko Ogawa, Takashi Umemura: Development of a medium-term animal model using *gpt delta* rats to evaluate chemical carcinogenicity and genotoxicity. *J. Toxicol. Pathol.* 2013; 26: 19-27.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

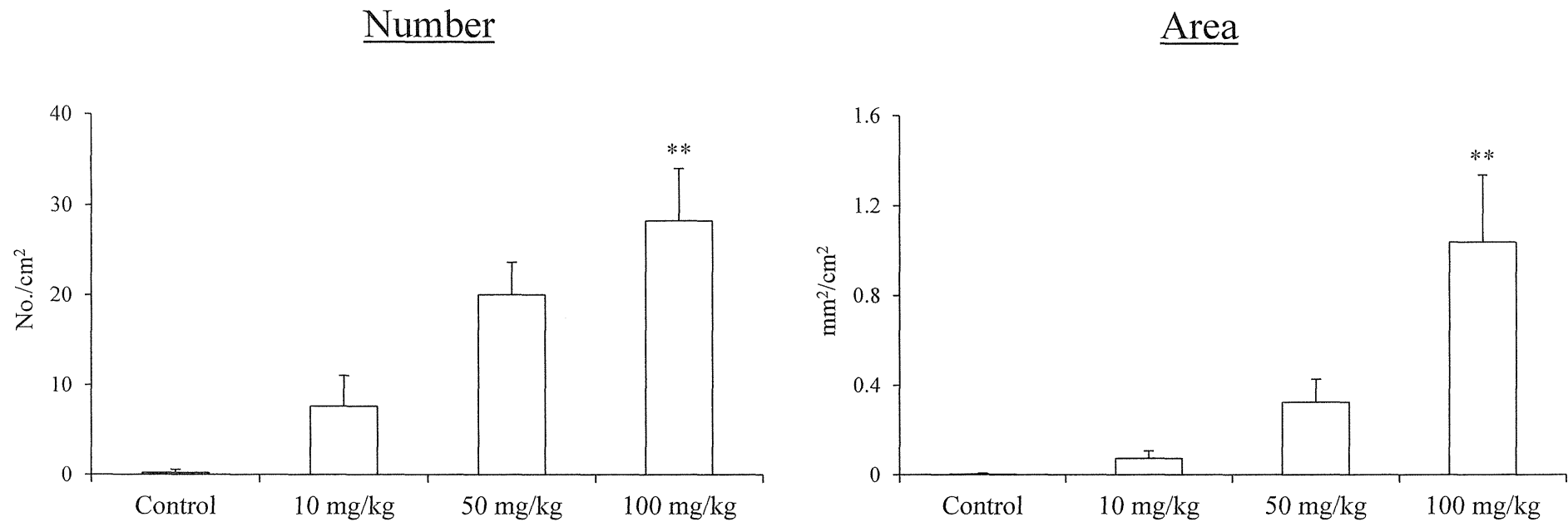


Fig. 1.

The number and area of GST-P-positive foci in the livers of F344 rats 6 weeks after single ip administration of diethylnitrosamine at doses of 0, 10, 50 and 100 mg/kg 18 hours after partial hepatectomy.

**Significantly different from the control group at $p < 0.01$.

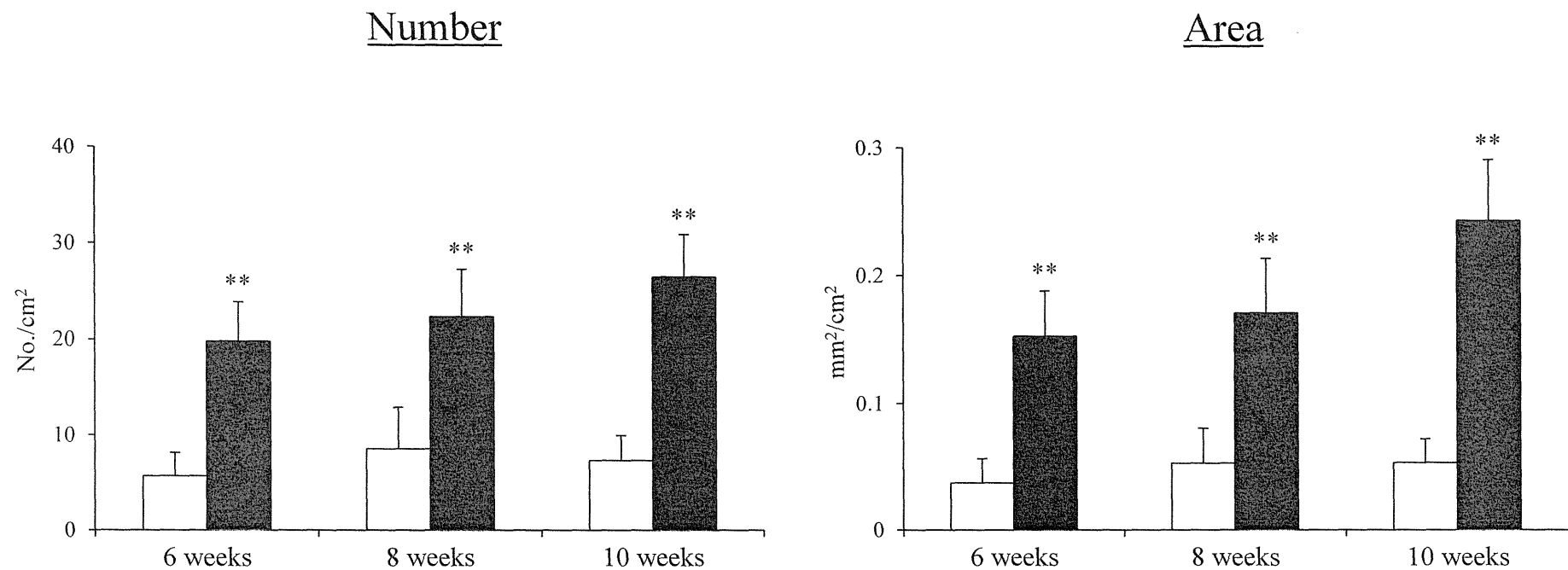


Fig. 2.

The number and area of GST-P-positive foci in the livers of F344 rats fed a diet containing 500 ppm PB.

After 4 weeks exposure, partial hepatectomy was performed and rats were administered diethylnitrosamine ip at a dose of 10 mg/kg 18 hours after partial hepatectomy. The rats continued to feed on a diet containing PB until they were sacrificed at 6, 8, and 10 weeks.

□, basal diet control; ■, PhB treatment.

**Significantly different from the control group at $p < 0.01$