

Fig. 3.

The number and area of GST-P-positive foci in the livers of F344 rats fed a diet containing 20 ppm 2-AAF, 12000 ppm PBO or 6000 ppm APAP for 10 weeks. A partial hepatectomy was performed at week 4, and the rats were administered a single ip dose of 10 mg/kg diethylnitrosamine 18 hours after partial hepatectomy.

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

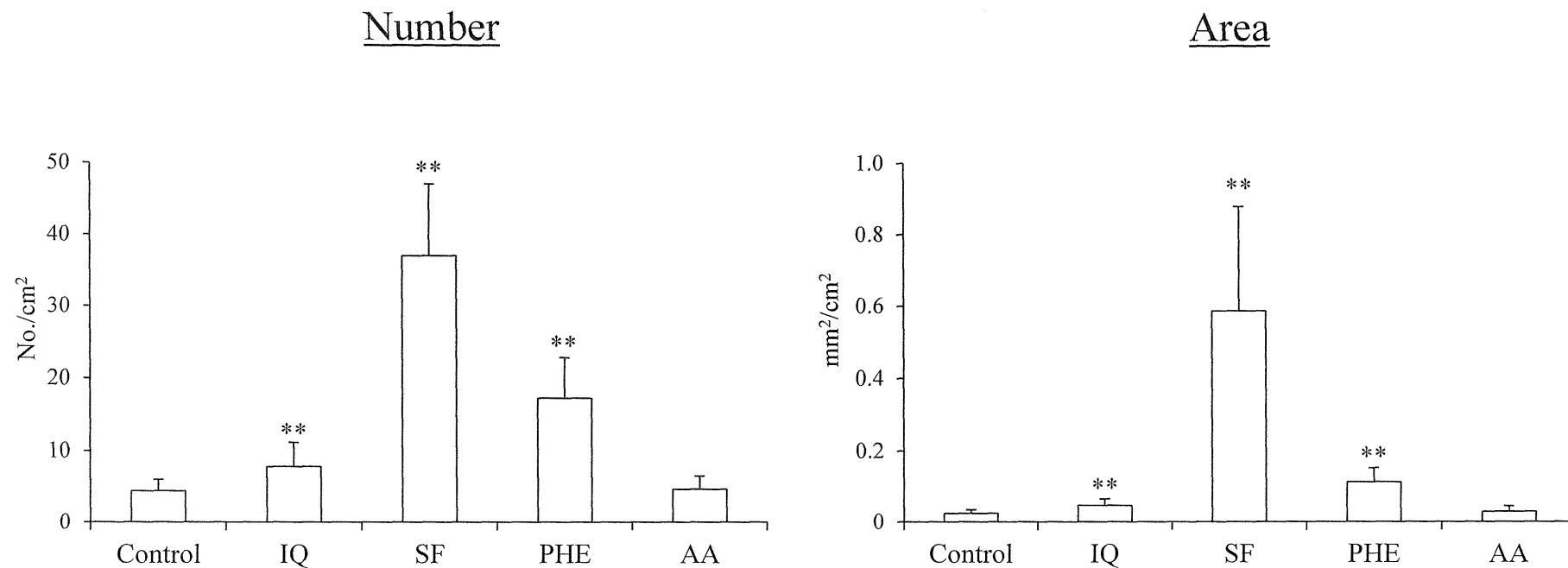


Fig. 4.

The number and area of GST-P-positive foci in the livers of F344 rats fed a diet containing 20 ppm IQ, 5000 ppm SF or 2400 ppm PHE for 10 weeks and administered 0.3 mg/kg body weight AA by gavage once a day for 10 weeks.

A partial hepatectomy was performed at week 4, and the rats were administered a single ip dose of 10 mg/kg diethylnitrosamine 18 hours after partial hepatectomy.

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

Table 1. *gpt* MFs in livers of F344 *gpt* delta rats treated with 2-AAF, PBO and APAP

Group	Animal no.	Cm ^R colonies ($\times 10^5$)	6-TG ^R and Cm ^R Colonies	MF ($\times 10^{-5}$)	Mean \pm SD
Control	101	11.75	5	0.43	0.44 \pm 0.10
	102	22.46	6	0.27	
	103	11.07	6	0.54	
	104	8.46	4	0.47	
	105	10.62	5	0.47	
2-AAF	201	8.33	12	1.44	**
	202	12.20	14	1.15	2.07 \pm 0.85
	203	7.79	15	1.93	
	204	8.15	21	2.58	
	205	8.96	29	3.24	
PBO	301	7.70	1	0.13	
	302	8.42	7	0.83	
	303	7.65	5	0.65	
	304	15.03	5	0.33	
	305	8.10	4	0.49	
APAP	401	18.77	4	0.21	0.40 \pm 0.14
	402	18.68	7	0.37	
	403	11.39	7	0.61	
	404	15.53	6	0.39	
	405	14.45	6	0.42	

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

Table 2. Mutation spectra of *gpt* mutant colonies in livers of F344 *gpt* delta rats treated with 2-AAF, PBO and APAP

	Control		2-AAF		PBO		APAP	
	Number (%)	Mutation frequency (10^{-5})	Number (%)	Mutation frequency (10^{-5})	Number (%)	Mutation frequency (10^{-5})	Number (%)	Mutation frequency (10^{-5})
Transversions								
GC-TA	6 ^a (23.1)	0.11 ± 0.08	32 (35.2)	$0.72 \pm 0.27^{**}$	5 (22.7)	0.13 ± 0.16	7 (23.3)	0.01 ± 0.09
GC-CG	1 (3.8)	0.01 ± 0.02	9 (9.9)	$0.20 \pm 0.17^*$	1 (4.5)	0.02 ± 0.05	3 (10.0)	0.03 ± 0.05
AT-TA	1 (3.8)	0.02 ± 0.04	8 (8.8)	0.17 ± 0.21	2 (9.1)	0.03 ± 0.06	3 (10.0)	0.04 ± 0.05
AT-CG	1 (3.8)	0.11 ± 0.02	3 (3.3)	0.07 ± 0.15	1 (4.5)	0.02 ± 0.06	1 (3.3)	0.02 ± 0.04
Transitions								
GC-AT	15 (57.7)	0.26 ± 0.08	19 (20.9)	0.39 ± 0.35	9 (40.9)	0.20 ± 0.14	14 (46.7)	0.19 ± 0.09
AT-GC	0	0	4 (4.4)	0.10 ± 0.11	1 (4.5)	0.02 ± 0.05	0	0
Deletion								
Single bp	1 (3.8)	0.02 ± 0.04	12 (13.2)	$0.28 \pm 0.21^*$	2 (9.1)	0.04 ± 0.06	2 (6.7)	0.03 ± 0.04
Over 2bp	0	0	1 (1.1)	0.02 ± 0.05	1 (4.5)	0.02 ± 0.05	0	0
Insertion	1 (3.8)	0.02 ± 0.04	3 (3.3)	0.07 ± 0.07	0	0	0	0
Complex	0	0	0	0	0	0	0	0

^a Number of colonies with independent mutations.

*,**Significantly different from the control group at $p < 0.05$, 0.01

Table 3. *gpt* MFs in livers of F344 *gpt* delta rats treated with IQ, SF, PHE and AA

Group	Animal no.	Cm ^R colonies ($\times 10^5$)	6-TG ^R and Cm ^R Colonies	MF ($\times 10^{-5}$)	Mean \pm SD
Control	101	15.1	3	0.20	0.38 \pm 0.19
	102	6.8	4	0.59	
	103	15.9	7	0.44	
	104	12.2	2	0.16	
	105	8.1	4	0.50	
IQ	201	8.9	18	2.03	3.35 \pm 1.22**
	202	7.2	34	4.69	
	203	6.1	18	2.94	
	204	10.4	26	2.49	
	205	4.4	20	4.58	
SF	301	10.0	8	0.80	1.18 \pm 0.74**
	302	5.0	5	1.00	
	303	5.6	14	2.49	
	304	10.1	7	0.69	
	305	5.4	5	0.92	
PHE	401	7.9	3	0.38	0.36 \pm 0.26
	402	4.5	1	0.22	
	403	11.4	1	0.09	
	404	5.9	2	0.34	
	405	7.7	6	0.78	
AA	501	8.6	13	1.50	1.18 \pm 0.41**
	502	9.8	17	1.73	
	503	12.9	12	0.93	
	504	11.3	9	0.79	
	505	9.5	9	0.95	

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

Table 4 Mutation spectra of *gpt* mutant colonies in livers of F344 *gpt* delta rats treated with IQ, SF, PHE and AA

	Control		IQ		SF		PHE		AA	
	Number (%)	Mutation frequency (10 ⁻⁵)	Number (%)	Mutation frequency (10 ⁻⁵)	Number (%)	Mutation frequency (10 ⁻⁵)	Number (%)	Mutation frequency (10 ⁻⁵)	Number (%)	Mutation frequency (10 ⁻⁵)
Transversions										
GC-TA	5 ^a (25.0)	0.11 ± 0.09	50 (43.1)	1.40 ± 0.41**	13 (33.3)	0.41 ± 0.38	4 (30.8)	0.10 ± 0.17	11 (18.3)	0.21 ± 0.09
GC-CG	1 (5.0)	0.01 ± 0.03	4 (3.5)	0.11 ± 0.25	6 (15.4)	0.17 ± 0.13	1 (7.7)	0.03 ± 0.06	1 (1.7)	0.02 ± 0.05
AT-TA	0	0	6 (5.2)	0.20 ± 0.18	3 (7.7)	0.09 ± 0.09	0	0	29 (48.3)	0.55 ± 0.30**
AT-CG	0	0	1 (0.9)	0.03 ± 0.06	2 (5.1)	0.06 ± 0.08	0	0	0	0
Transitions										
GC-AT	8 (40.0)	0.14 ± 0.11	14 (12.1)	0.40 ± 0.16*	6 (15.4)	0.17 ± 0.14	6 (46.2)	0.16 ± 0.15	7 (11.7)	0.15 ± 0.13
AT-GC	3 (15.0)	0.07 ± 0.13	0	0	4 (10.3)	0.13 ± 0.15	1 (7.7)	0.03 ± 0.08	2 (3.3)	0.04 ± 0.09
Deletion										
Single bp	3 (15.0)	0.04 ± 0.04	39 (33.6)	1.17 ± 0.58*	3 (7.7)	0.10 ± 0.17	1 (7.7)	0.03 ± 0.08	8 (13.3)	0.16 ± 0.16
Over 2bp	0	0	1 (0.9)	0.02 ± 0.04	0	0	0	0	0	0
Insertion	0	0	1 (0.9)	0.02 ± 0.05	2 (5.1)	0.06 ± 0.08	0	0	2 (3.3)	0.04 ± 0.06
Complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^a Number of colonies with independent mutations.

*, **Significantly different from the control group at $p < 0.05$, 0.01 .

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：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

研究分担者：梅村 隆志 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、食品中発がん物質、特に腎臓を発がん標的とした化学物質の遺伝毒性ならびに発がん性の早期検出系を樹立し、食の安全確保に貢献することである。そこで我々は、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片側腎摘出を実施し、その摘出腎を用いて *gpt assay* を行い、片側腎摘出後にイニシエーター物質である diethylnitrosamine (DEN) を単回腹腔内投与して、引き続き被験物質の投与を継続し、試験終了時の残存腎において前腫瘍性病変の病理組織学的解析を実施する試験系の開発を目指した。本年度は標準プロトコールの確立のため、適切な DEN の投与時期、投与用量および実験期間を探るための条件検討試験を実施した。DEN の効果的な投与時期を検索するため、雌雄 F344 ラットに片側腎摘出を行い、残存腎の細胞増殖活性を経時的に観察した。その結果、雌性ラットにおいてのみ残存腎の細胞増殖活性の亢進がみられ、48 時間後に最も高値を示した。これらの結果から、雌性ラットを用いて、片側腎摘出 48 時間後に DEN を投与する実験プロトコールを確立した。次に DEN の適正投与用量および前腫瘍性病変検出のために必要な実験期間を探るため、雌性 F344 ラットに腎プロモーター物質である trisodium nitrilotriacetic acid (NTA) を4週間投与後、片側腎摘出を実施し、その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て NTA の投与をさらに継続し、試験開始 12, 16, 20 週間後に屠殺・解剖した。今後はそれぞれの時点の残存腎における前腫瘍性病変の病理組織学的解析を行い、標準プロトコールを確立し、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。

A. 研究目的

食品添加物や食品中に非意図的に混在する汚染物質の安全性の確認は、食の安心・安全確保の点から重要な問題である。通常、

げっ歯類を用いた試験によって、その毒性・発がん性を検討するが、特に発がん性の検索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。これまでに、発がん性評価期間の短縮を目的に、また、環境発がん物質の多くが肝臓を標的としていることを考慮して、ラット肝中期発がん性試験法が開発されている。しかし、腎臓を標的とする環境発がん物質は肝臓に次いで多いにも関わらず、腎臓における有用な短・中期発がん性試験法はこれまで開発されていない。

一方、従来の遺伝毒性試験は、*in vitro*での復帰突然変異試験、染色体異常試験及び*in vivo*の小核試験が標準的な組み合わせとして実施されている。しかし、長期発がん性試験結果との齟齬がしばしば生じるなどの問題点も指摘されている。また、*in vivo*小核試験で検索する細胞・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ある。近年開発されたレポーター遺伝子導入動物は、化学物質の生体内での動態を反映し、標的臓器における遺伝毒性を検出できる系として注目されている。特にレポーター遺伝子として *gpt* ならびに *red/gam* が導入されている *gpt delta* ラットは *gpt* 遺伝子上の点突然変異に加えて、*red/gam* 上の欠失変異を効率よく検出できることを利点としている。

本研究では、*gpt delta* ラットに片側腎摘出を施し、摘出腎において *in vivo* 変異原性試験を実施し、イニシエーター処置した残存腎において前腫瘍性病変の病理組織学的解析を実施することで、腎臓における *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腎中期発がん性試験法を開発し、腎臓を標的とする食品中発がん物質を効率的に検出し、食品の安全確保に

貢献することを目的とする。本年度は、新規試験法の標準プロトコールを確立するため、イニシエーター物質である diethylnitrosamine (DEN) の効果的な投与時期を探ることを目的とし、雌雄の F344 ラットに片側腎摘出を施し、残存腎の細胞増殖活性を経時的に観察した。また、DEN の適正な投与用量および前腫瘍性病変検出のために必要な実験期間を明らかにするため、腎プロモーター物質として知られる trisodium nitrilotriacetic acid (NTA) を用いて検討を行った。

B. 研究方法

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、片側腎摘出を実施した。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。

(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: 雄性 F344 ラットの片側腎摘出後の残存腎における BrdU-LIs を Fig. 1 に示す。雄においては、残存腎の近位曲尿細管、近位直尿細管、遠位尿細管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おける BrdU-LIs を Fig. 2 に示す。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 (Fig. 3)。最終体重および腎臓重量を Table 1 に示す。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。

D. 考察

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ール確立のための、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

とともに腎重量は増加するものの、細胞増殖活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。

E. 結論

腎臓における遺伝毒性・発がん性の中期的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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果

G-1. 学会発表

なし

G-2. 発表論文

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

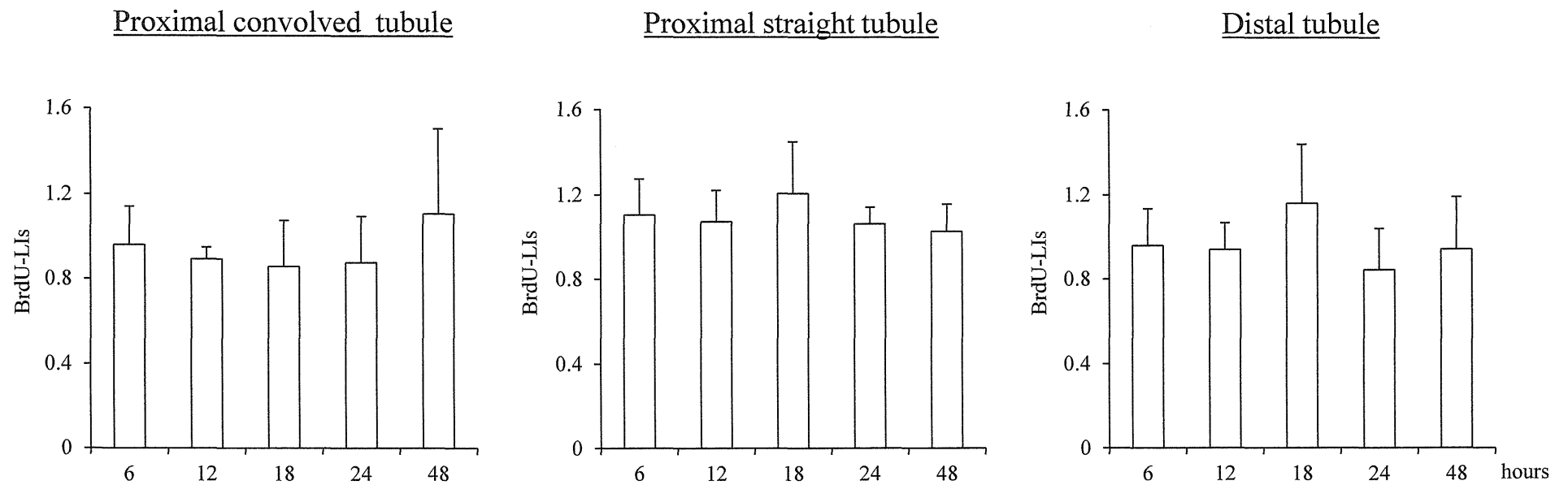


Fig. 1.

The bromodeoxyuridine labeling-indexes (BrdU-LIs) in the residual kidneys of male F344 rats after the unilateral nephrectomy.

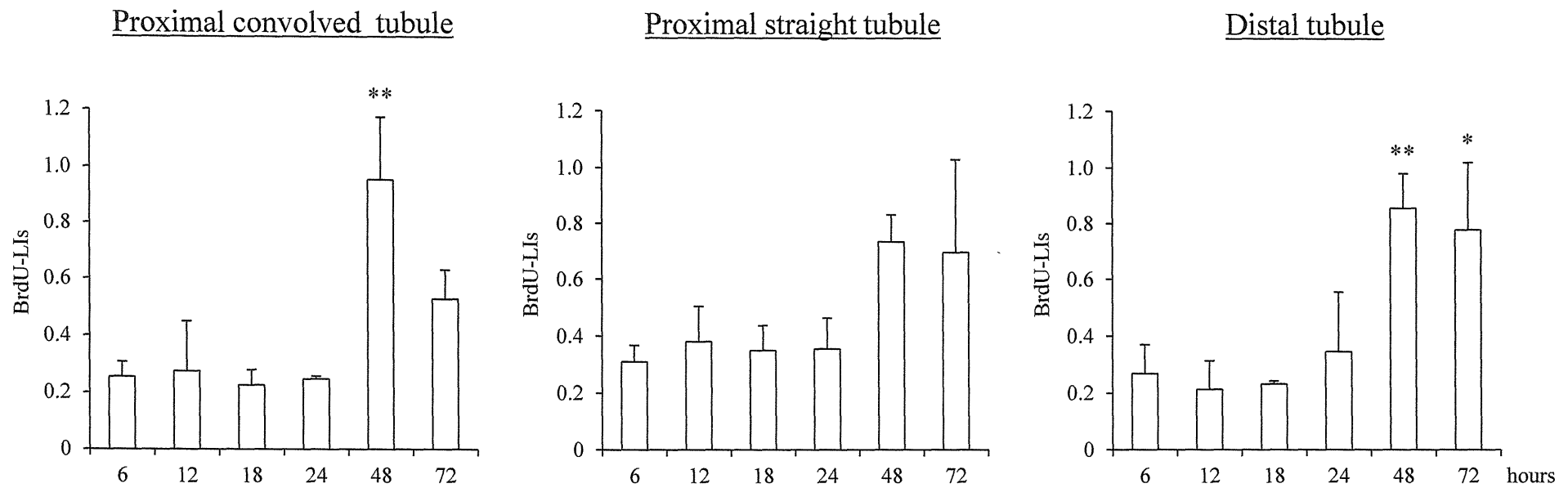


Fig. 2.

The bromodeoxyuridine labeling-indexes (BrdU-LIs) in the residual kidneys of female F344 rats after the unilateral nephrectomy.

*, **Significantly different from the 6 hours group at $p < 0.05$, 0.01 .

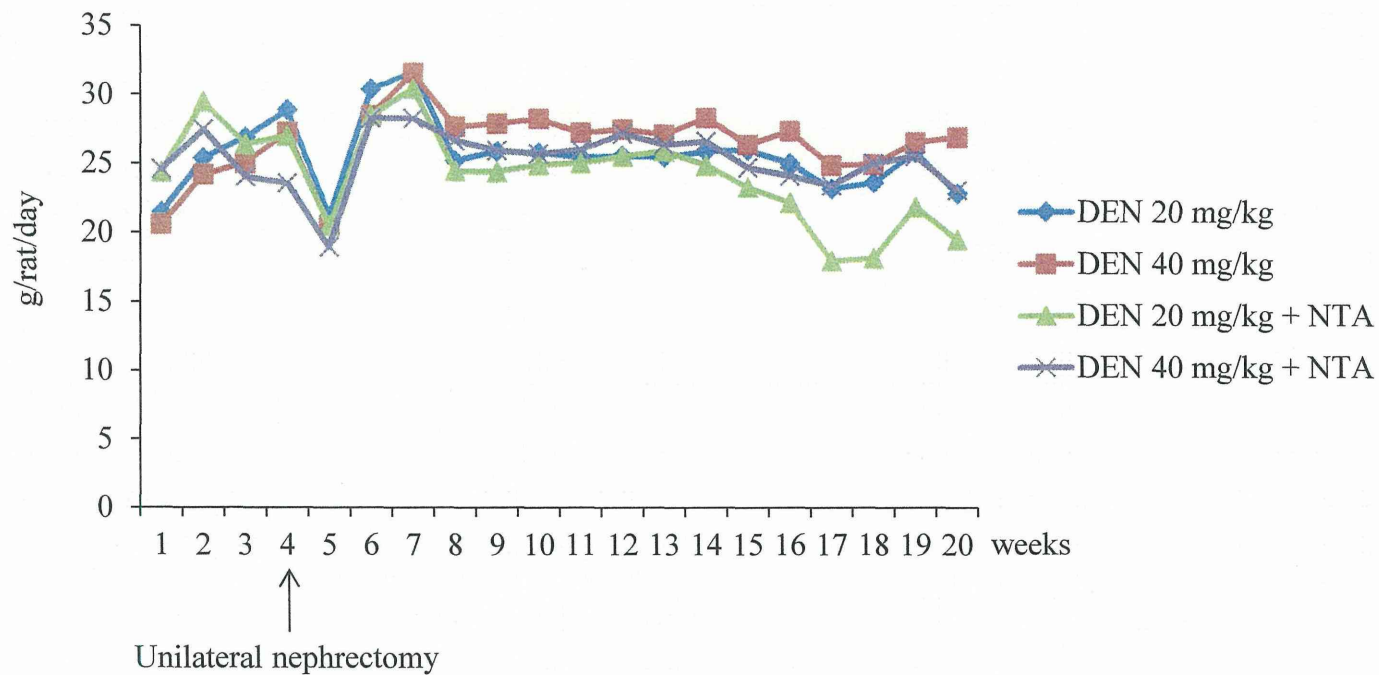


Fig. 3.

The water consumption of female F344 rats fed a water containing 1000 ppm trisodium nitrilotriacetic acid (NTA). After 4 weeks exposure, unilateral nephrectomy was performed and rats were administered diethylnitrosamine ip at a dose of 20, 40 mg/kg 48 h after unilateral nephrectomy. The rats continued to feed on a water containing NTA until they were sacrificed at 12, 16, and 20 weeks.

Table 1. Body and kidney weights of rats of following treatment with diethyl nitrosamine (DEN) and trisodium nitrilotriacetic acid (NTA)

Phase	Group	Final body weight (g)	Kidney weight	
			Absolute (g)	Relative (g%)
12 week	DEN 20 mg/kg	189.6 ± 8.5	0.75 ± 0.04	0.40 ± 0.02
	DEN 40 mg/kg	187.4 ± 5.7	0.74 ± 0.03	0.39 ± 0.01
	DEN 20 mg/kg + NTA	186.7 ± 8.0	0.77 ± 0.05	0.41 ± 0.02 **
	DEN 40 mg/kg + NTA	182.8 ± 6.4	0.76 ± 0.03	0.42 ± 0.01 ##
16 week	DEN 20 mg/kg	199.9 ± 6.8	0.78 ± 0.03	0.39 ± 0.02
	DEN 40 mg/kg	195.4 ± 6.6	0.77 ± 0.04	0.39 ± 0.01
	DEN 20 mg/kg + NTA	196.8 ± 5.3	0.81 ± 0.03	0.41 ± 0.02 *
	DEN 40 mg/kg + NTA	198.9 ± 5.2	0.80 ± 0.04	0.40 ± 0.02
20 week	DEN 20 mg/kg	206.1 ± 6.9	0.83 ± 0.05	0.40 ± 0.01
	DEN 40 mg/kg	202.5 ± 5.9	0.80 ± 0.04	0.40 ± 0.02
	DEN 20 mg/kg + NTA	209.3 ± 6.8	0.83 ± 0.04	0.40 ± 0.02
	DEN 40 mg/kg + NTA	206.9 ± 13.5	0.83 ± 0.04	0.40 ± 0.02

*,**Significantly different from the DEN 20 mg/kg group at $p < 0.05, 0.01$.

##Significantly different from the DEN 40 mg/kg group at $p < 0.01$.

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： 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

研究分担者： 小川 久美子 所属 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
研究協力者： 黒田 顕 所属 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

2-メチルフラン (2-MF) は天然に存在するフラン誘導体であり、食品中やたばこの煙に含まれる他、香料物質としても広く使用されている。2-MF の基本骨格であるフランはげっ歯類の肝臓に発がん性を有することが知られているが、構造的に類似する 2-MF の毒性・発がん性に関する報告は極めて少なく、ヒトに対する詳細な安全性評価は未だ実施されていない。そこで本研究では、これまでに我々が開発した *gpt delta* ラットを用いた短期包括的試験法を用いて、2-MF の一般毒性、遺伝毒性および発がん性について包括的に評価した。本年度は、2-MF を *gpt delta* ラットに 1.2、6、30 mg/kg で 13 週間強制経口投与し、一般毒性（体重、摂餌量、血液学検査、血清生化学検査、器官重量測定）、標的臓器である肝臓の *in vivo* 変異原性試験を実施した。雌雄の 30 mg/kg 投与群で体重増加抑制および貧血傾向が認められた。血清生化学検査では、雄の 6 mg/kg 以上および雌の 30 mg/kg 投与群で主に胆道系パラメーター（ALP、 γ -GTP あるいは T-Bil）の変動が認められ、器官重量測定では雄の 30 mg/kg および雌の 6 mg/kg 以上の投与群で肝重量の高値、雌の 30 mg/kg 投与群で腎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、*gpt* および *Spi* アッセイのいずれにおいてもレポーター遺伝子突然変異頻度に変化は認められなかった。以上より、2-MF の毒性影響は主に肝・胆道系に認められ、無毒性量は雌雄ともに 1.2 mg/kg/日であった。また、2-MF は肝臓における *in vivo* 変異原性を有していなかった。今後、全身臓器の病理組織学的検査、および肝臓の前癌病変（GST-P 陽性細胞巣）の定量解析を加え、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評価する。

A. 研究目的

2-メチルフラン (2-MF) は天然に存在するフラン誘導体の一つであり、食品中やたばこの煙に含有されている他、香料物質としても広く使用されている。2-MF の基本骨格であるフランは、げっ歯類における肝発がん物質であると共に、ラット肝ミクロソームを用いた試験系で活性化代謝物を生成することが報告されており、生体内においてもこの活性化代謝物が生体内高分子（DNA、タンパク質等）と結合し、毒性や遺伝毒性を発揮する可能性が指摘されている。さらに、フランと構造的に類似した

2-MF についても同様の機序が想定されることから、その毒性、遺伝毒性および発がん性が懸念されている。これまでの 2-MF の遺伝毒性試験では、Ames 試験は陰性、*in vitro* 染色体異常試験は陽性、*in vivo* 染色体異常試験は陰性結果を示し、一貫した結果は得られていない。また、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）においても、2-MF を含むフラン置換体（furan-substitutes）の香料物質としての使用については、その遺伝毒性および発がん性の懸念から「評価保留」とされている。このような背景に加え、2-MF に関する毒性、

遺伝毒性および発がん性に関する *in vivo* の報告は少なく、ヒトに対する正確なリスク評価に必要な情報が不足している。

これまで我々は、任意の臓器における *in vivo* 変異原性を検索可能なレポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットあるいはマウスを用いて、同一個体において一般毒性、遺伝毒性および発がん性に関する情報を短期間（13週間）で得ることが可能な包括的試験法を開発してきた。本手法を用いて、ラット肝発がん物質として知られるサフロール、フランおよびメチルオイゲノール、またマウス肝発がん物質であるエストラゴールおよびマウス肺発がん物質である1-メチルナフタレンの一般毒性、標的臓器における *in vivo* 変異原性、ラットについては肝前癌病変（GST-P 陽性細胞巣）の定量的解析を実施し、これら被験物質の毒性影響、*in vivo* 変異原性ならびに発がん性に関して有用な情報を報告してきた。そこで今回、2-MFを *gpt delta* ラットを用いた本試験法に供し、その一般毒性、遺伝毒性および発がん性を包括的に評価した。

B. 研究方法

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。

用量設定試験 1（4日間投与）：

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。

用量設定試験 2（4週間）：

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。

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製作した。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 *Sp1* アッセイ）に供した。

統計学的解析では、Burtlet検定により分散の均一性を確認し、均一である場合はOne-way ANOVAにより、均一でない場合はKruskal-Wallis検定により群間差を解析した。群間差が認められた項目については、Dunnettの多重比較検定により各群の有意差を解析した。有意水準は $p < 0.05$ とした。

（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」を遵守して動物実験計画書を作成し、同動物実験委員会による承認を得た後に実施した。また、遺伝子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、承認を得た後に使用した。

C. 研究結果

用量設定試験 1 (4日間) :

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。

用量設定試験 2 (4週間) :

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。最終体重および器官重量を Table 1 に示す。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をそれぞれ Table 2 および 3 に示す。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。

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。体重推移を Fig. 1 に示す。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。血液学検査結果を Table 4 に示す。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。血清生化学検査結果を Table 5 に示す。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-Chol、

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。最終体重および器官重量を Table 6 に示す。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* 変異原性試験結果を Table 7 および 8 に示す。雌雄ともに *gpt* および Spi^a 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

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

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. 発表論文

- 1) 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.
- 2) 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.

G-1. 学会発表

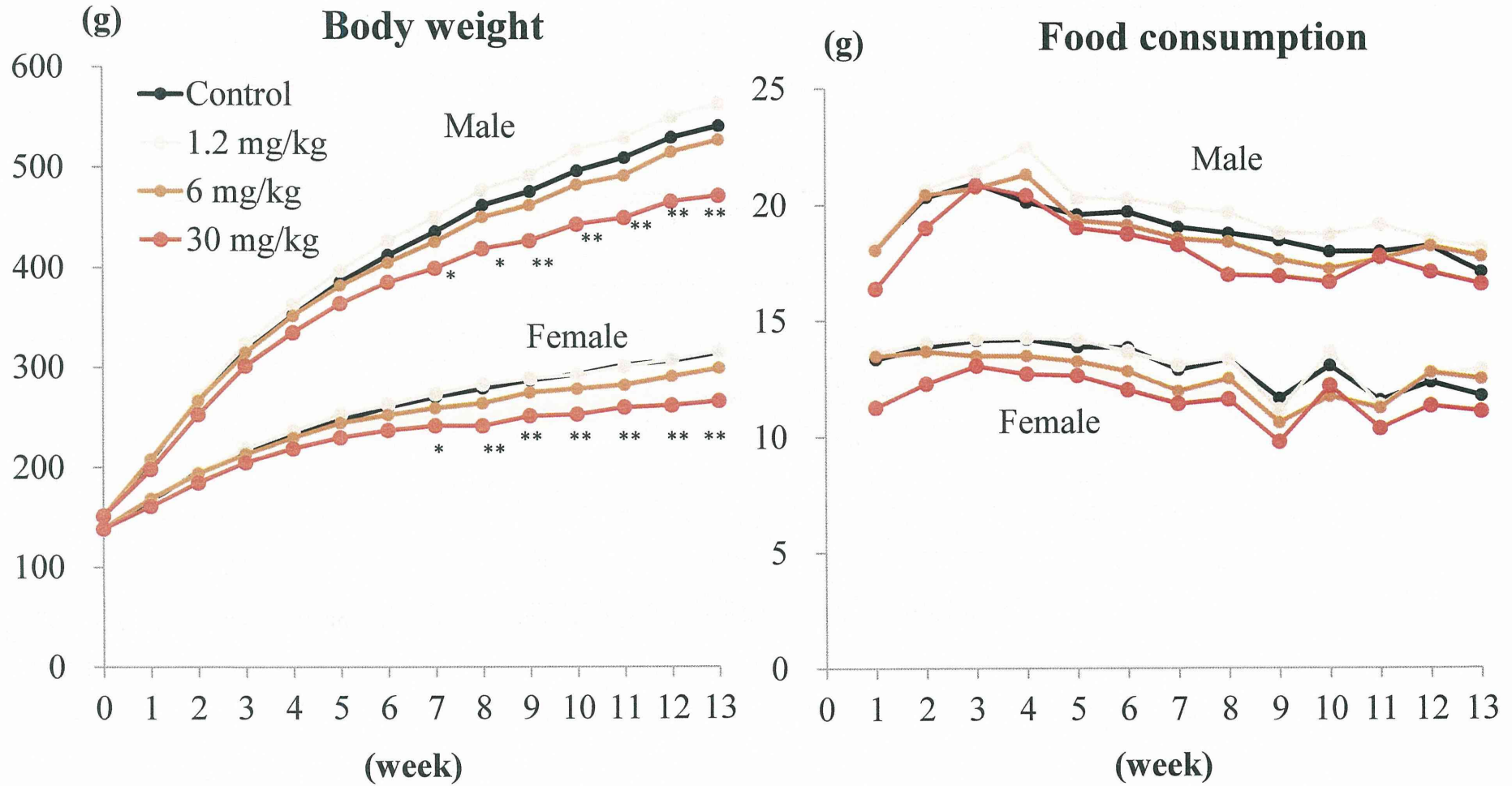
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Fig. 1
Changes of body weight and food consumption for SD gpt delta rats
treated with 2-MF for 13 weeks

36



*, **: Significantly different from the control group at $p < 0.05$ and 0.01 , respectively.

Table 1**Final body, liver and kidney weights of SD rats treated with 2-MF for 4 weeks**

	Group	Final body weight	Liver		Kidney	
			Absolute (g)	Relative (g%)	Absolute (g)	Relative (g%)
Male	Control	314.2 ± 22.0	8.47 ± 0.64	2.70 ± 0.06	1.94 ± 0.13	0.62 ± 0.02
	3 mg/kg	313.5 ± 27.1	9.09 ± 1.10	2.89 ± 0.12*	2.00 ± 0.19	0.64 ± 0.01
	10 mg/kg	311.0 ± 9.1	10.35 ± 0.50**	3.33 ± 0.09**	2.01 ± 0.08	0.65 ± 0.03
	30 mg/kg	304.1 ± 7.0	12.57 ± 0.50**	4.13 ± 0.10**	1.98 ± 0.16	0.65 ± 0.06
Female	Control	198.8 ± 10.1	5.44 ± 0.68	2.73 ± 0.25	1.31 ± 0.12	0.66 ± 0.03
	3 mg/kg	200.6 ± 4.5	5.81 ± 0.19	2.90 ± 0.12	1.35 ± 0.11	0.67 ± 0.04
	10 mg/kg	201.1 ± 12.2	6.81 ± 0.73**	3.38 ± 0.26**	1.35 ± 0.05	0.67 ± 0.03
	30 mg/kg	193.4 ± 10.9	8.65 ± 0.65**	4.47 ± 0.27**	1.47 ± 0.10*	0.76 ± 0.05**

*,**: Significantly different from the control group at $p < 0.05$ and 0.01 , respectively.