

201327023A

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 25 年度総括・分担研究報告書

研究代表者 西川 秋佳

平成 26(2014)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. 肝臓を標的とする遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発 西川 秋佳 -----	10
2. 腎臓を標的とする遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発 梅村 隆志 -----	20
3. 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 小川久美子 -----	31

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	45
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷り -----	46
------------------------	----

## 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の開発を継続した。被験物質とジエチルニトロサミン（DEN）の同時投与による相互作用の可能性が懸念される従来のプロトコールに対し、その回避を目的として被験物質の休薬期間を設けた改良プロトコールを、CYP2E1の抑制剤およびCYP1A2ならびにCYP2B1の誘導剤を用いて確立した。次年度からは改良プロトコールの有用性を検証するため、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を検討した結果、腎臓がんイニシエーター物質DENの投与用量を40 mg/kg体重、前腫瘍性病変検出のための被験物質投与期間を12週間とする新規試験法の標準プロトコールを確立した。引き続き、その有用性を検討する目的で、種々の既知発がん物質を適用する動物実験を終了した。今後は、*gpt assay* および前腫瘍性病変の病理組織学的解析を行い、有用性の検証を進める予定である。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、雌雄のSD系*gpt delta* ラットに2-MFを1.2、6、30 mg/kgの用量で13週間強制経口投与し、全身の諸器官・組織の病理組織学的検索及び肝細胞の前癌病変（GST-P陽性巣）の定量解析を実施した。その結果、2-MFは雌雄の6 mg/kg以上で肝臓への毒性影響（肝細胞のアポトーシス、胆管線維症）が認められ、雌雄の30 mg/kgでGST-P陽性巣の数及び面積が増加した。

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出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・遺伝毒性を迅速に同一臓器で検出可能とする点が独創的であり、遺伝毒性の検出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出モデルは 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出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

6 週齢の雄性 F344 ラット (日本 SLC) に CYP2E1 の阻害剤である diallyl disulfide (DADS)、CYP1A2 の誘導剤である

piperonyl butoxide (PBO) あるいは CYP2B1 の誘導剤である phenylbutazone (PHE) をそれぞれ、50 mg/kg 体重の用量で週 7 回、強制経口投与、12000 あるいは 2400 ppm の濃度で混餌投与した。DADS 投与群の半数例、PBO 投与群および PHE 投与群の全例については試験開始 4 週間後に投薬を中断し、DADS 投与群の他の半数例については全試験期間を通して投薬を実施した。全ての群において試験開始 6 週間後に DEN を 10 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与した。また、DEN 投与時に残存肝組織の細胞増殖活性が最大となるように、DEN 投与 18 時間前に部分肝切除を施し、それにより得られた切除肝において DADS 投与群では CYP2E1 活性、PBO 投与群では CYP1A2 活性、PHE 投与群では CYP2B1 活性を測定した。また、昨年度に実施した従来のプロトコルのバリデーション試験における PBO 投与群および PHE 投与群の部分切除肝のサンプルを用いて、それぞれ CYP1A2 活性および CYP2B1 活性を測定した。投薬を中断した群においては試験開始 7 週間後より投薬を再開し、試験開始 13 週間後の残存肝組織において GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を行った。

### 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: 6 週齢の雌性 F344 ラット (日本 SLC) にニトリロ三酢酸三ナトリウム (NTA) を 1000 ppm の濃度で 4 週間飲水投与した後、片側腎摘出を実施した。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 の投与をさらに継続して、動物を片側腎摘出後 8, 12, 16 週

間後に屠殺・解剖し、残存腎のサンプルを用いて常法に従いパラフィン標本を作製し、病理組織学的解析を実施した。病理組織学的解析においては、atypical tubule (AT) および atypical hyperplasia (AH) を前腫瘍性病変とし、その発生頻度および1個体あたりの発生個数を算出した。

実験②：6週齢の雌性 F344 系 *gpt delta* ラット（日本 SLC）に遺伝毒性発がん物質として aristolochic acid (AA)、非発がん物質として *d*-limonene (DL) をそれぞれ 0.3 mg/kg 体重および 600 mg/kg 体重の用量で週7回、強制経口投与し、非遺伝毒性発がん物質として potassium dibasic phosphate (PDP) および phenylbutazone (PB) をそれぞれ 50000 ppm および 2400 ppm の濃度で混餌投与した。それぞれの被験物質を4週間投与した後、投薬を中断して試験開始6週間後に実験①の結果を踏まえ、DEN を 40 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与した。DEN 投与時に残存腎組織の細胞増殖活性が最大となるように、DEN 投与の48時間前に片側腎摘出を実施し、それにより得られた摘出腎よりゲノム DNA を抽出して、*gpt assay* を実施した。DEN 投与1週間後に被験物質の投与を再開し、さらに実験①の結果を踏まえて投与再開12週間後に動物を屠殺・解剖し、残存腎のサンプルを用いて常法に従いパラフィン標本を作製し、実験①と同様に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（ロット番号：CDL2169）は和光純薬工業株式会社より購入した。2-MF はオリ

ーブオイルに溶解した。投与液は週1回調製し、使用直前まで冷蔵保存した。

6週齢の雌雄 SD 系 *gpt delta* ラット（日本エスエルシー）の各群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、媒体であるオリーブオイルのみを投与した。投与量は、昨年度の本研究班で実施した用量設定試験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。肝臓の一部を *in vivo* 変異原性試験用に採材し、液体窒素で急速凍結し保存した。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。前癌病変（GST-P 陽性細胞巢）の定量解析に際しては、ポリクローナル抗 GST-P 抗体（1:1000 希釈、株式会社医学生物学研究所）を用いてパラフィン切片を免疫組織化学的に染色し、画像解析装置（IPAP、住化テクノサービス）を用いて定量した。なお、5つ以上の染色された肝細胞を有するものを陽性細胞巢として評価した。

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)

以上の試験は「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

### 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

休薬期間を設けずに DADS を投与した群においては、部分切除肝における CYP2E1 活性が対照群と比較して有意な減少を示したものの、休薬期間を設定した群においては明らかな変化はみられなかった。休薬期間を設定していない従来のプロトコールにおいては、PBO および PHE の投与によりそれぞれ CYP1A2 および CYP2B1 活性の有意な上昇を認めたが、休薬期間を設定した改良プロトコールにおいては、CYP1A2 および CYP2B1 活性はともに対照群と比較して差は認められなかった。休薬期間を設定せずに DADS を投与した群においては、GST-P 陽性細胞巢の数・面積ともに対照群と比較して有意な減少を認めたが、休薬期間を設定した群においては、差はみられなかった。PBO および PHE 投与群においては、GST-P 陽性細胞巢の数・面積ともに対照群と比較して有意な増加を示した。

### 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： DEN 投与により全ての時点において前腫瘍性病変の発生がみられ、DEN 20 mg/kg 投与群よりも DEN 40 mg/kg 投与群において発生頻度および1個体あたりの個数ともに高い値を示す傾向がみられた。また、いずれの用量および時点においても、NTA 投与により前腫瘍性病変の形成が促進される傾向がみられ、DEN 40 mg 投与後、NTA を投与した群において、片側腎摘出後12週時における発生頻度および1個体当たりの個数、片側腎摘出後16週時における1個体当たりの個数が DEN 単独群に比して有意な高値を示した。

実験②： 被験物質の投与期間中、DL 投与群において対照群と比較して摂餌量の減少傾向がみられたが、他の群では明らかな差はみられなかった。PDP 投与群および PBZ 投与群において、対照群と比較して最終体重の有意な減少が認められた。また、PDP 投与群および PBZ 投与群においては、対照群と比較して腎臓の絶対および相対重量の有意な増加がみられ、DL 投与群においては相対重量の有意な増加がみられた。

### 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

13 週間反復投与試験において、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。血液学検査では、雌雄の30 mg/kg で Hb、MCV、MCH あるいは MCHC の有意な低値が認められた。血清生化学検査結果では、肝臓関連パラメーターとして、雄の6 mg/kg 以上で ALP の高値、

雌雄の 30 mg/kg 投与群で T-Bil、 $\gamma$ -GTP、T-Cho の高値あるいは Glucose の低値が認められた。その他、雄の 6 mg/kg 以上および雌の 30 mg/kg で IP の低値、雌雄の 30 mg/kg で Na あるいは Ca の高値が認められた。雌雄の 30 mg/kg 投与群で最終体重の有意な低値が認められた。雌の 6 mg/kg 以上で肝臓の相対重量の高値、雌雄の 30 mg/kg で肝臓の相対および絶対重量の有意な高値が認められた。また、雌雄の 30 mg/kg で腎臓の相対重量の高値が認められた。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。病理組織学的に、2-MF 投与による影響が認められた臓器は肝臓であった。肝細胞への影響としては、雄の 30 mg/kg および雌の 6 mg/kg 以上で肝細胞のアポトーシス、雌雄の 30 mg/kg で変異肝細胞巣が認められた。胆管系への影響としては、雌雄の 6 mg/kg 以上で胆管増生、30 mg/kg で胆管線維症、雄の 30 mg/kg で卵円形細胞の増殖が認められた。また、雌雄の 6 mg/kg 以上で被膜下の細胞浸潤、マクロファージの食食像 (褐色色素を伴う) が認められた。その他、2-MF 投与群において、腎臓の硝子円柱/硬質沈着/再生尿細管、心臓の局所炎症、甲状腺の嚢嚢遺残が認められたが、いずれも対照群にも認められる変化あるいは自然発生病変として報告のある変化であり、2-MF 投与に起因した変化ではないと判断した。

雌雄の 30 mg/kg で比較的大型の GST-P 陽性細胞巣が認められ、定量解析の結果、陽性細胞巣の数および面積ともに有意な高値となった。

#### 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、*gpt delta* ラットを用いた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目的とし、被験物質と DEN が同時に投与され、それらの相互作用の可能性が考えられる従来のプロトコールに対して、その回避を目的とした改良プロトコールの確立を目指した。化学物質投与に起因する薬物代謝酵素誘導は適応反応であり、通常は可逆性の反応であるとされているため、休薬期間を設定することは被験物質と DEN の薬物相互作用を回避することに対して有用であると考えられた。また、遺伝毒性発がん物質投与により誘発される遺伝子変異は不可逆的な現象であり、実際に 2 週間の休薬後に被験物質の変異原性を検出している報告もあることから、休薬期間がその後の *in vivo* 変異原性試験の結果に与える影響はないものと考えられた。

DADS は DEN の代謝活性化に寄与するとされる CYP2E1 の抑制剤であり、本研究結果においても、休薬期間を設けずに DADS を投与した群においては、対照群と比較して CYP2E1 活性の有意な減少がみられた。さらに、休薬期間を設けずに DADS を投与した群において、DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巣の数・面積は DEN の単独投与群に比して有意な減少がみられた。一方で、休薬期間を設定した群において CYP2E1 活性は対照群と同等の値を示したことから、4 週間の DADS 投与により抑制された CYP2E1 活性は、2 週間の休薬によりほぼ回復することが示された。この結果に一致して、GST-P 陽性細胞の定量的解析におい



ても、休薬期間を設定して DADS を投与した群においては、GST-P 陽性細胞の数・面積ともに DEN の単独投与群と同程度の値を示した。この結果は、従来のラット肝中期発がん性試験法による解析で DADS は GST-P 陽性細胞巢の形成に影響を及ぼさないという結果とも一致していた。

PBO および PHE はそれぞれ DEN の代謝活性化に寄与する CYP1A2 および CYP2B1 誘導能を有する肝プロモーター物質である。休薬期間を設定していない従来のプロトコールにおいては、PBO および PHE 投与によりそれぞれ CYP1A2 および CYP2B1 活性の顕著な上昇が認められたものの、休薬期間を設定したプロトコールにおいては、それぞれの代謝酵素活性は対照群と同程度の値を示した。従って、4 週間の PBO および PHE 投与により誘導された CYP1A2 および CYP2B1 活性は、2 週間の休薬後にはほぼ回復することが示された。一方、ラットにおいて単回腹腔内投与された DEN は、1 週間で体内よりほぼ全てが消失することが報告されているため、DEN が被験物質の薬物動態に与える影響を消失させることを目的として、DEN 投与後に 1 週間の休薬期間を設定することとした。DEN 投与の 1 週間後に PBO および PHE 投与を再開させるプロトコールにおいて、GST-P 陽性細胞巢の数・面積の有意な増加が認められたことから、DEN 投与後に 1 週間の休薬期間を設けても、これらの腫瘍促進効果は十分に検出できるということが示された。これまでの実験結果より確立した改良プロトコールの詳細を以下に示す。6 週齢、雄性 *gpt delta* ラットに被験物質を 4 週間投与後、2 週間の休薬を行い、DEN を 10 mg/kg 体重の用

量で単回腹腔内投与する。DEN 投与 18 時間前に部分肝切除を施し、その切除肝を用いて *gpt assay* を実施する。DEN 投与の 1 週間後に被験物質の投与を再開し、試験開始 13 週間後の残存肝組織において GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を実施する。

#### 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

本年度は、腎臓における遺伝毒性・発がん性の中期包括的試験法の開発のため、条件検討試験を実施して新規試験法の標準プロトコールを確立した。さらにその有用性を検証するため種々の既知発がん物質を用いて実験を行った。

腎臓においては、肝臓における glutathione S-transferase placenta form のように前腫瘍性病変に特異的に発現する酵素はこれまで見出されていない。しかし、大きさは正常な尿細管と同程度であるが異型細胞により構成される AT や単層あるいは多層化した異型細胞からなる尿細管が複数集合して形成される AH は腎尿細管の前がん病変と考えられているため、本試験法における発がんプロモーション活性の指標として、これらの前腫瘍性病変を解析した。また、DEN をラットに投与すると、これらの前腫瘍性病変が誘発されることが多くの報告により示されていることから、本試験法における発がんイニシエーター物質として DEN を選択した。

DEN の投与用量および前腫瘍性病変検出のために必要な被験物質投与期間を決定するために、腎発がんプロモーター物質である NTA を用いて検討した。その結果、片側腎摘出 48 時間後に DEN 40 mg/kg 体重を

単独投与した群に比して、NTA を併用投与した群において、片側腎摘出 12 週間後より、前腫瘍性病変の形成が有意に促進されていたことから、イニシエーション処置後の残存腎において、NTA が発がんプロモーション作用を発揮するためには 12 週間の投与期間が必要であることが明らかとなった。よって、DEN の投与用量を 40 mg/kg 体重に、前腫瘍性病変検出のための被験物質投与期間を 12 週間に決定した。一方、DEN と被験物質を同時に投与することによって、それらの薬物相互作用の可能性が懸念されることから、それらの回避を目的に被験物質の休薬期間を設定することとした。我々は本年度の食品の安全確保推進研究事業における、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の分担研究課題のうち「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」において、DEN 投与の前後にそれぞれ 2 および 1 週間の被験物質の休薬期間を設けることにより、それらの相互作用を十分に回避できることを示した。よって、本試験法においても同様に被験物質を 4 週間投与した後、2 週間の休薬後に DEN を投与し、さらに 1 週間の休薬後に被験物質投与を再開して、実験①の結果に基づき、被験物質投与を投与再開から 12 週間実施することとした。以上より、6 週齢の雌性 F344 系 *gpt delta* ラットに被験物質を 4 週間投与した後、2 週間の休薬後に DEN を 40 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与する。DEN 投与 48 時間前に片側腎摘出を施し、その切除腎を用いて *gpt assay* を実施する。DEN 投与の 1 週間後に被験物質の投与を再開し、投与再開 12 週間後の残存腎組織において

前腫瘍性病変の病理組織学的解析を実施する、実験期間が 19 週間の標準プロトコルを確立した。

実験②は本試験法の有用性を検証することを目的として実施し、現在、動物実験を終了した。今後、片側腎摘出により得られた切除腎において *gpt assay* を実施し、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、雌雄の 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、 $\gamma$ -GTP や T-Bil などの胆道系パラメーターの変動を伴っていた。病理組織学検索の結果、肝臓において肝細胞への影響（肝細胞のアポトーシス）ならびに胆管系への影響（胆管増生や胆管線維症）、被膜下の細胞浸潤、マクロファージの貪食像が認められた。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、胆管増生および胆管線維症が認められた。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。

その他の一般毒性変化として、雄の 6 mg/kg 以上および雌の 30 mg/kg で認められ

た IP の高値、雌雄の 30 mg/kg 投与群で認められた軽度の貧血傾向、腎臓の相対重量の高値、Na あるいは Ca の高値については、関連する器官（造血系、骨、腎臓）に病理組織学的変化が認められなかったことから、毒性学的意義の小さい変化と考えられた。

肝臓の前癌病変の定量解析の結果、雌雄の 30 mg/kg で GST-P 陽性細胞巢の顕著な増加が認められたことから、2-MF の肝発がん性が示唆された。また、同用量で胆管線維症が高頻度に認められており、2-MF は胆管がんを誘発する可能性も示された。これら変化についても、フランの短期包括的毒性試験で認められたものであり、2-MF の肝発がん性もフラン骨格に起因した変化である可能性が考えられた。また、フランと同様に 2-MF についても、肝臓を用いた *in vivo* 変異原性試験では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ことから、フラン骨格化合物の肝発がん過程における遺伝毒性メカニズムの関与は明らかにならなかった。

今後は、フラン骨格化合物の *in vivo* 遺伝毒性についてより詳細に評価することを目指すとして、*gpt delta* ラット肝細胞を用いた *in vivo* 小核試験とレポーター遺伝子突然変異試験を組み合わせ、フランの標的臓器における遺伝毒性をより詳細に解析する予定である。

## E. 結論

肝臓における遺伝毒性・発がん性の短・中期包括的試験法として、*gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性および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の開発を目指し、被験物質と DEN の相互

作用を回避することのできる改良プロトコールを確立した。今後は本試験法の有用性を検証するため、種々の発がん物質を用いて研究を進める予定である。

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のため、条件検討試験を実施し、標準プロトコールを確立した。また、本試験法に種々の既知発がん物質を適用する動物実験を終了した。今後は *gpt assay* および前腫瘍性病変の病理組織学的解析を実施し、本試験法の有用性を示すため研究を進める予定である。

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肝・胆道系障害を示唆する病理組織学的変化、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、肝臓における前癌病変の増加が認められたことから、肝発がん性が示唆された。

## 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、黒田颯、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、黒田颯、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)

4. 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 : レポーター遺伝子導入ラットを用いた短期腎発がん物質検出モデルの開発. 日本毒性学会第 40 回大会 (幕張, 2013. 06)

5. 黒田 顕、石井雄二、高須伸二、木島綾希、松下幸平、能美健彦、小川久美子、梅村隆志. 2-メチルフランの *gpt delta* ラットを用いた一般毒性・遺伝毒性・発がん性の包括的評価. 日本環境変異原学会第 42 回大会 (岡山、2013.11).

## 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 B6C3F<sub>1</sub> *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

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：肝臓を標的とする遺伝毒性・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 *gluthathione S-transferase placental form* (GST-P) 陽性肝細胞巣を定量的解析することで、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短期発がん性試験法を開発することである。本年度は被験物質と *diethylnitrosamine* (DEN) が同時に投与され、それらの相互作用の可能性が懸念される従来のプロトコールに対し、その回避を目的として被験物質の休薬期間を設けた改良プロトコールの確立を目指した。DEN の代謝活性化に寄与するとされる CYP2E1 の抑制剤および CYP1A2 ならびに CYP2B1 の誘導剤を用いて、それらの CYP 活性に与える影響が 2 週間の休薬期間により消失することを確認した。さらに DEN が被験物質の薬物動態へ与える影響を回避するため、DEN 投与 1 週間後に被験物質の投与を再開することとし、そのプロトコールにおいても被験物質の腫瘍促進効果を十分に検出できることを確認した。以上の結果より、6 週齢の雄性 F344 *gpt delta* ラットに被験物質を 4 週間投与し、2 週間の休薬後に DEN を 10 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与し、DEN 投与の 18 時間前に部分肝切除を施して、その切除肝を用いて *gpt assay* を実施する。そして、DEN 投与の 1 週間後に被験物質の投与を再開して、試験開始 13 週間後の残存肝において GST-P 陽性細胞巣の定量的解析を実施する改良プロトコールを確立した。今後は改良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、非遺伝毒性肝発がん物質および遺伝毒性非肝発がん物質を用いて、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 *gluthathione S-transferase placental form* (GST-P) 陽性肝細胞巢を定量的解析することで、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する。本年度は、被験物質とイニシエーション物質である *diethylnitrosamine* (DEN) が同時に投与される従来のプロトコールに対して、それらの相互作用の可能性の回避を目的として DEN 投与の前後にそれぞれ 2 および 1 週間の被験物質の休薬期間を設けた改良プロトコールの確立を目指した。休薬期間を設定したプロトコールにおいて、DEN 投与時に被験物質による薬物代謝酵素活性への影響が消失していることを確認し、また、腫瘍

促進作用を効率よく検出できるということを明らかにするため、DEN の代謝活性化に寄与する CYP2E1 の阻害剤、CYP1A2 ならびに CYP2B1 の誘導剤を用いて検討した。

## B. 研究方法

6 週齢の雄性 F344 ラット (日本 SLC) に CYP2E1 の阻害剤である *diallyl disulfide* (DADS)、CYP1A2 の誘導剤である *piperonyl butoxide* (PBO) あるいは CYP2B1 の誘導剤である *phenylbutazone* (PHE) をそれぞれ、50 mg/kg 体重の用量で週 7 回、強制経口投与、12000 あるいは 2400 ppm の濃度で混餌投与した。DADS 投与群の半数例、PBO 投与群および PHE 投与群の全例については試験開始 4 週間後に投薬を中断し、DADS 投与群の他の半数例については全試験期間を通して投薬を実施した。全ての群において試験開始 6 週間後に DEN を 10 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与した。また、DEN 投与時に残存肝組織の細胞増殖活性が最大となるように、DEN 投与 18 時間前に部分肝切除を施し、それにより得られた切除肝において DADS 投与群では CYP2E1 活性、PBO 投与群では CYP1A2 活性、PHE 投与群では CYP2B1 活性を測定した。また、昨年度に実施した従来のプロトコールのバリデーション試験における PBO 投与群および PHE 投与群の部分切除肝のサンプルを用いて、それぞれ CYP1A2 活性および CYP2B1 活性を測定した。投薬を中断した群においては試験開始 7 週間後より投薬を再開し、試験開始 13 週間後の残存肝組織において GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を行った。

(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。

### C. 研究結果

CYP2E1 活性測定の結果を Fig. 1 に示す。休薬期間を設けずに DADS を投与した群においては、部分切除肝における CYP2E1 活性が対照群と比較して有意な減少を示したものの、休薬期間を設定した群においては明らかな変化はみられなかった。CYP1A2 活性および CYP2B1 活性測定の結果をそれぞれ Fig. 2 および 3 に示す。休薬期間を設定していない従来のプロトコールにおいては、PBO および PHE の投与によりそれぞれ CYP1A2 および CYP2B1 活性の有意な上昇を認めたが、休薬期間を設定した改良プロトコールにおいては、CYP1A2 および CYP2B1 活性はともに対照群と比較して差は認められなかった。GST-P 陽性細胞巢の定量的解析の結果を Table 1 に示す。休薬期間を設定せずに DADS を投与した群においては、GST-P 陽性細胞巢の数・面積ともに対照群と比較して有意な減少を認めたが、休薬期間を設定した群においては、差はみられなかった。PBO および PHE 投与群においては、GST-P 陽性細胞巢の数・面積ともに対照群と比較して有意な増加を示した。

### D. 考察

今回の実験は、*gpt delta* ラットを用いた肝臓における遺伝毒性・発がん性の中期的包括的試験法の開発を目的とし、被験物質と DEN が同時に投与され、それらの相互作用

の可能性が考えられる従来のプロトコールに対して、その回避を目的とした改良プロトコールの確立を目指した。化学物質投与に起因する薬物代謝酵素誘導は適応反応であり、通常は可逆性の反応であるとされているため、休薬期間を設定することは被験物質と DEN の薬物相互作用を回避することに対して有用であると考えられた。また、遺伝毒性発がん物質投与により誘発される遺伝子変異は不可逆的な現象であり、実際に 2 週間の休薬後に被験物質の変異原性を検出している報告もあることから、休薬期間がその後の *in vivo* 変異原性試験の結果に与える影響はないものと考えられた。

DADS は DEN の代謝活性化に寄与するとされる CYP2E1 の抑制剤であり、本研究結果においても、休薬期間を設けずに DADS を投与した群においては、対照群と比較して CYP2E1 活性の有意な減少がみられた。さらに、休薬期間を設けずに DADS を投与した群において、DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢の数・面積は DEN の単独投与群に比して有意な減少がみられた。一方で、休薬期間を設定した群において CYP2E1 活性は対照群と同等の値を示したことから、4 週間の DADS 投与により抑制された CYP2E1 活性は、2 週間の休薬によりほぼ回復することが示された。この結果に一致して、GST-P 陽性細胞の定量的解析においても、休薬期間を設定して DADS を投与した群においては、GST-P 陽性細胞の数・面積とも DEN の単独投与群と同程度の値を示した。この結果は、従来のラット肝中期発がん性試験法による解析で DADS は GST-P 陽性細胞巢の形成に影響を及ぼさないという結果とも一致していた。



PBO および PHE はそれぞれ DEN の代謝活性化に寄与する CYP1A2 および CYP2B1 誘導能を有する肝プロモーター物質である。休薬期間を設定していない従来のプロトコールにおいては、PBO および PHE 投与によりそれぞれ CYP1A2 および CYP2B1 活性の顕著な上昇が認められたものの、休薬期間を設定したプロトコールにおいては、それぞれの代謝酵素活性は対照群と同程度の値を示した。従って、4 週間の PBO および PHE 投与により誘導された CYP1A2 および CYP2B1 活性は、2 週間の休薬後にはほぼ回復することが示された。一方、ラットにおいて単回腹腔内投与された DEN は、1 週間で体内よりほぼ全てが消失することが報告されているため、DEN が被験物質の薬物動態に与える影響を消失させることを目的として、DEN 投与後に 1 週間の休薬期間を設定することとした。DEN 投与の 1 週間後に PBO および PHE 投与を再開させるプロトコールにおいて、GST-P 陽性細胞巢の数・面積の有意な増加が認められたことから、DEN 投与後に 1 週間の休薬期間を設けても、これらの腫瘍促進効果は十分に検出できるということが示された。これまでの実験結果より確立した改良プロトコールの詳細を Fig. 4 に示す。6 週齢、雄性 *gpt delta* ラットに被験物質を 4 週間投与後、2 週間の休薬を行い、DEN を 10 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与する。DEN 投与 18 時間前に部分肝切除を施し、その切除肝を用いて *gpt assay* を実施する。DEN 投与の 1 週間後に被験物質の投与を再開し、試験開始 13 週間後の残存肝組織において GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を実施する。

以上より、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として、被験物質と DEN の相互作用を回避することのできる改良プロトコールを確立した。今後は遺伝毒性肝発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質および遺伝毒性非肝発がん物質を用いて本試験法の有用性を検証するため、研究を進める予定である。

## E. 結論

肝臓における遺伝毒性・発がん性の短・中期包括的試験法として、*gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性および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の開発を目指し、被験物質と DEN の相互作用を回避することのできる改良プロトコールを確立した。今後は本試験法の有用性を検証するため、種々の発がん物質を用いて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、黒田颯、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. Kohei Matsushita, Yuji Ishii, Shinji Takasu, Ken Kuroda, Aki kijima, Takehiko Nohmi, Kumiko Ogawa, Akiyoshi Nishikawa, Takashi Umemura: A medium-term animal

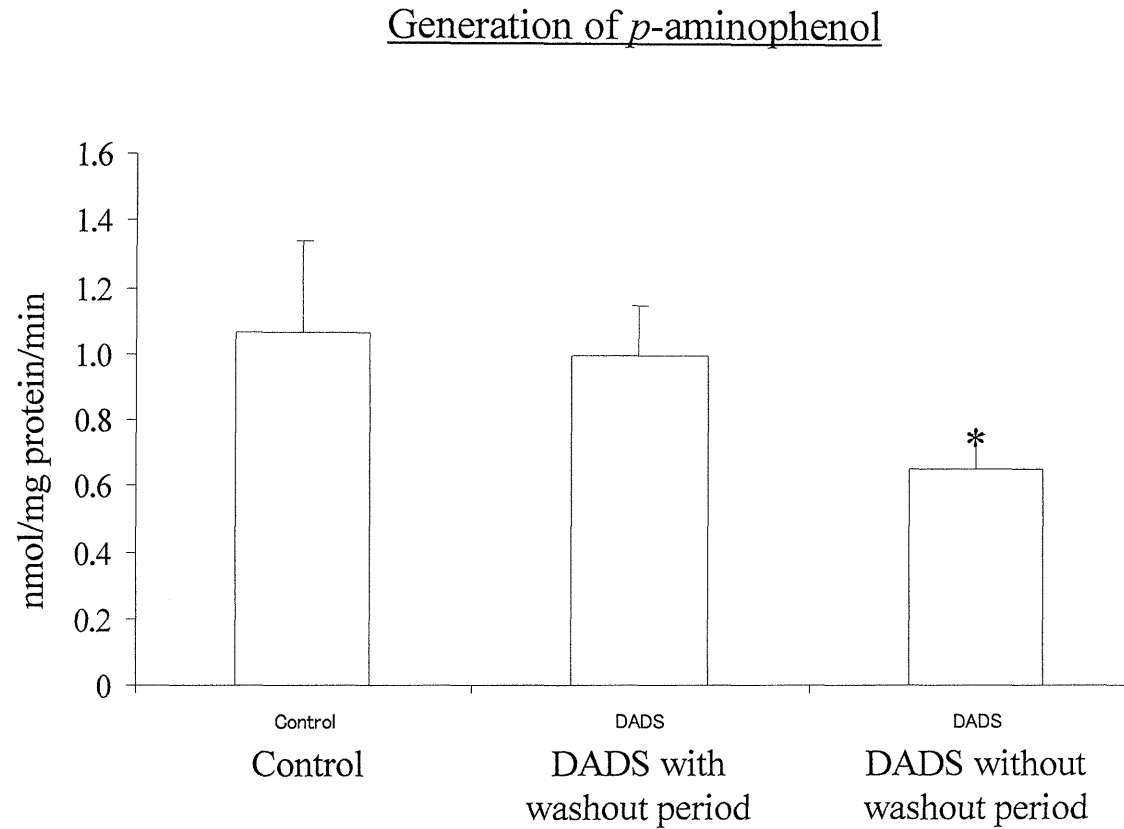
model using *gpt* delta rats for predicting chemical carcinogenicity and related mechanisms of action. SOT2013 (San Antonio, 2013. 03)

G-2. 発表論文

なし

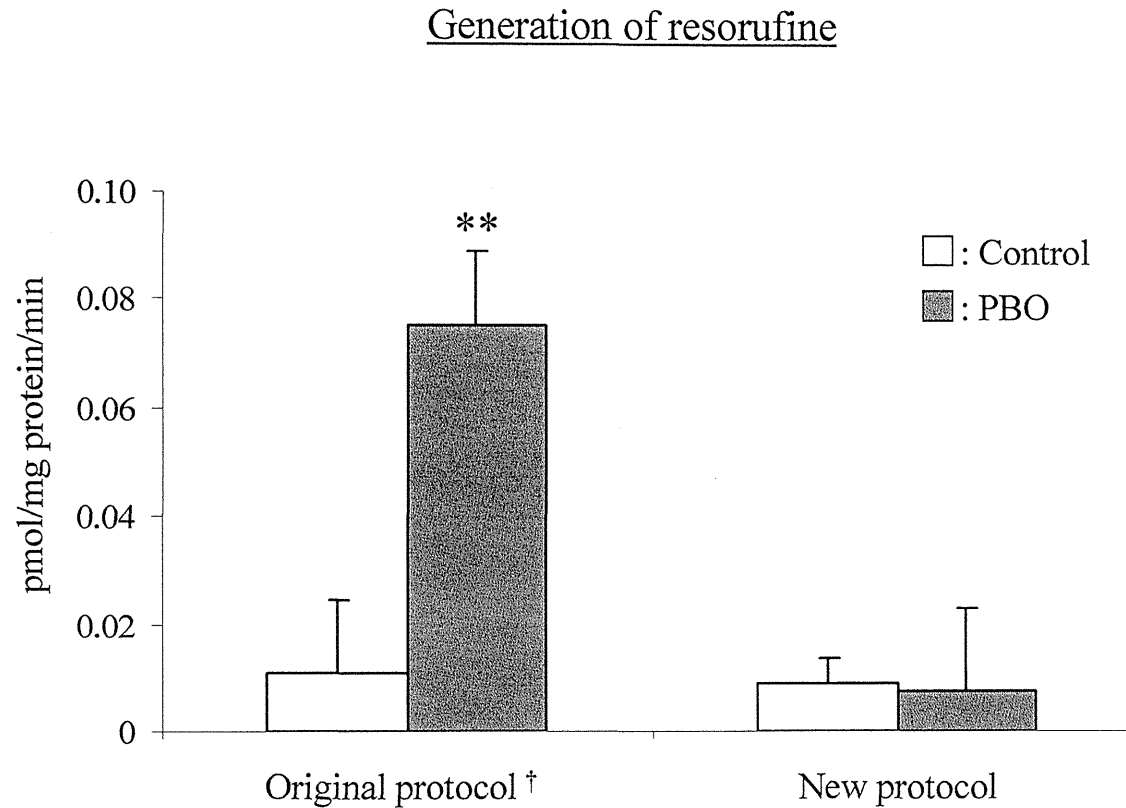
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



**Fig. 1.**

Changes of CYP2E1 activity in excised livers of rats given diallyl disulfide (DADS) with or without washout periods. The values are means  $\pm$  SD of data for 5 rats. \*Significantly different from the control group at  $P < 0.05$ .



**Fig. 2.**

Changes of CYP1A2 activity in excised livers of rats given piperonyl butoxide (PBO) in original and new protocol. The values are means  $\pm$  SD of data for 5 rats. †Samples were obtained from a previous validation study of original protocol. \*\*Significantly different from the control group at  $P < 0.01$ .