

Generation of 16 β -hydroxytestosterone

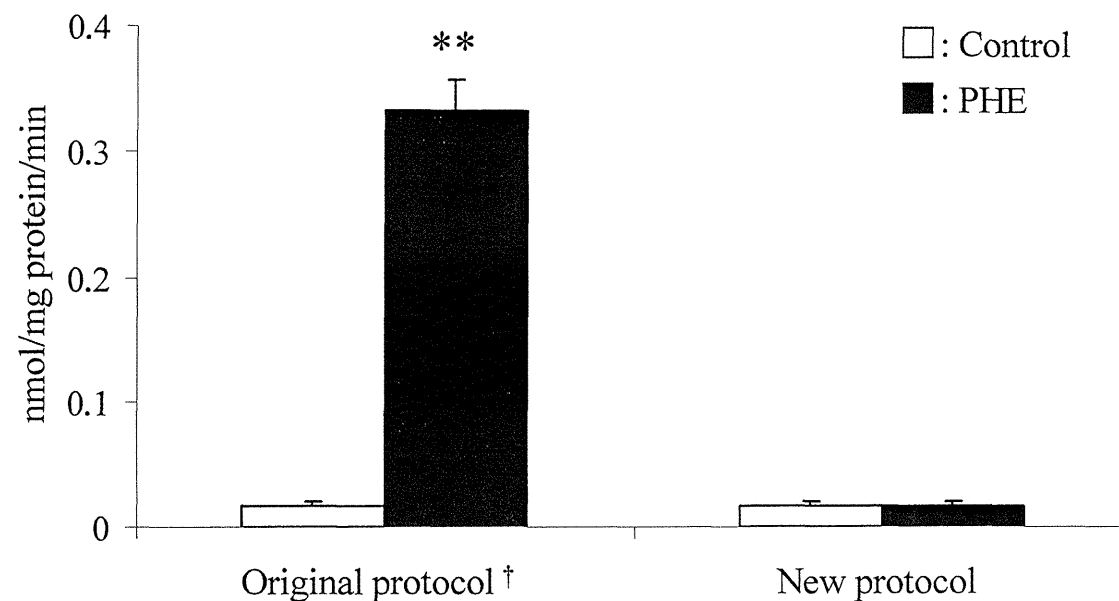


Fig. 3.

Changes of CYP2B1 activity in excised livers of rats given phenytoin (PHE) 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 $P < 0.01$.

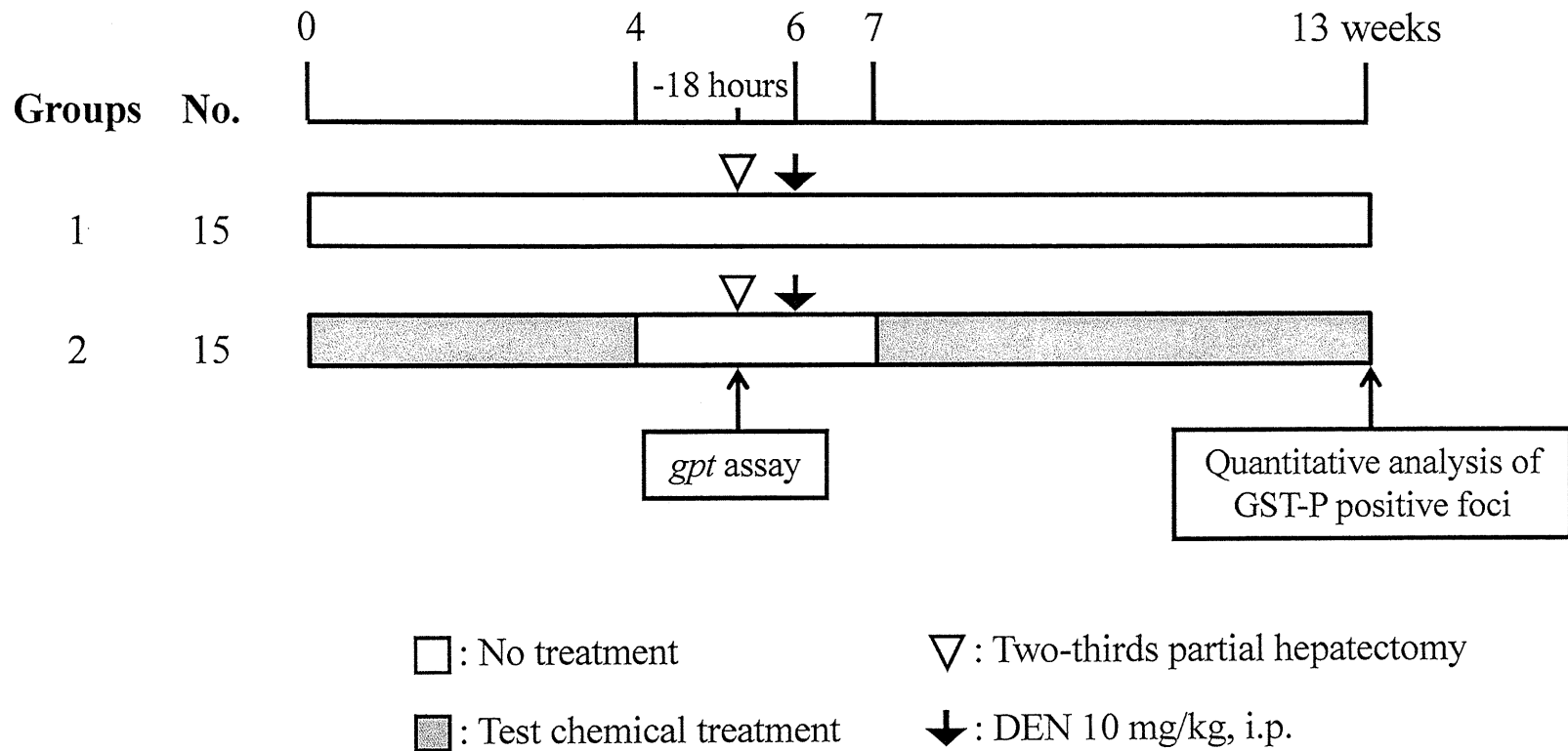


Fig. 4.

Standard protocol for the GPG model. Animals were 6-week-old male F344 *gpt* delta rats. The *gpt* assay is performed in excised liver samples as indicator of *in vivo* mutagenicity. Tumor-promoting activities are evaluated based on the enhancement of glutathione *S*-transferase placental form (GST-P) positive foci induced by diethylnitrosamine (DEN) in residual liver samples.

Table 1. Quantitative analysis of GST-P positive foci

| | No. of rats | No. of foci (No./cm ²) | Area of foci (mm ² /cm ²) |
|-----------------------------|-------------|------------------------------------|--|
| Control | 12 | 15.27 ± 3.36 ^a | 0.166 ± 0.043 |
| DADS with washout period | 12 | 12.58 ± 1.72 | 0.118 ± 0.021 |
| DADS without washout period | 9 | 2.75 ± 1.91 ^{**} | 0.025 ± 0.017 ^{**} |
| PBO | 12 | 24.94 ± 7.23 ^{**} | 0.356 ± 0.133 ^{**} |
| PHE | 12 | 38.15 ± 6.96 ^{**} | 0.515 ± 0.113 ^{**} |

^a Mean ± SD.

^{**} Significantly different from the control 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：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

研究分担者：梅村 隆志 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
研究協力者：高須 伸二 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、片側腎摘出後に腎発がんイニシエーター物質である diethylnitrosamine (DEN) を単回腹腔内投与して、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ことで、腎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短期発がん性試験法を開発することである。本年度は、適切な 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探るための条件検討試験を実施して標準プロトコルを確立した。雌性 F344 ラットに腎発がん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、その 48 時間後に DEN を 20, 40 mg/kg 体重の用量で投与し、片側腎摘出 8、12、16 週間後に残存腎組織における病理組織学的解析を実施した。その結果、DEN 40 mg/kg 群において片側腎摘出 12 週間後より、DEN 誘発の前腫瘍性病変の発生頻度が NTA 投与によって有意に上昇したことから、標準プロトコル内の DEN の投与用量は 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は 12 週間とした。さらに被験物質と DEN の相互作用を回避するため、DEN 投与の前後にそれぞれ 2 および 1 週間の休薬期間を設定することとした。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、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し、DEN 投与の 48 時間前に片側腎摘出を施して、その切除腎を用いて *gpt assay* を実施する。引き続き、DEN 投与の 1 週間後に被験物質の投与を再開して、投与再開から 12 週間後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実験期間が 19 週間の標準プロトコルを確立した。さらに種々の既知発がん物質を本試験法に適用し、動物実験を終了した。今後は *gpt assay* および病理組織学的解析を進め、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、腎発がん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短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、昨年度に引き続き、新規試験法の標準プロトコールを確立するため、腎発がんイニシエーター物質である

diethylnitrosamine (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被験物質投与期間を明らかにすることを目的とし、腎発がん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。また、既知の遺伝毒性発がん物質、非遺伝毒性発がん物質および非発がん物質を用いて、標準プロトコールの有用性を検討した。

B. 研究方法

実験①：6週齢の雌性 F344 ラット（日本 SLC）に 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 (Fig. 1)、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。

(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：前腫瘍性病変の病理組織学的解析の結果を Fig. 2 に示す。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 個体あたりの個数、片側腎摘出後 16 週時における 1 個体あたりの個数が 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 (Fig. 3)。最終体重および腎臓重量を Table 1 に示す。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。

D. 考察

本年度は、腎臓における遺伝毒性・発がん性の中期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 (Fig. 4)。

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。

E. 結論

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。

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、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)

G-2. 発表論文

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

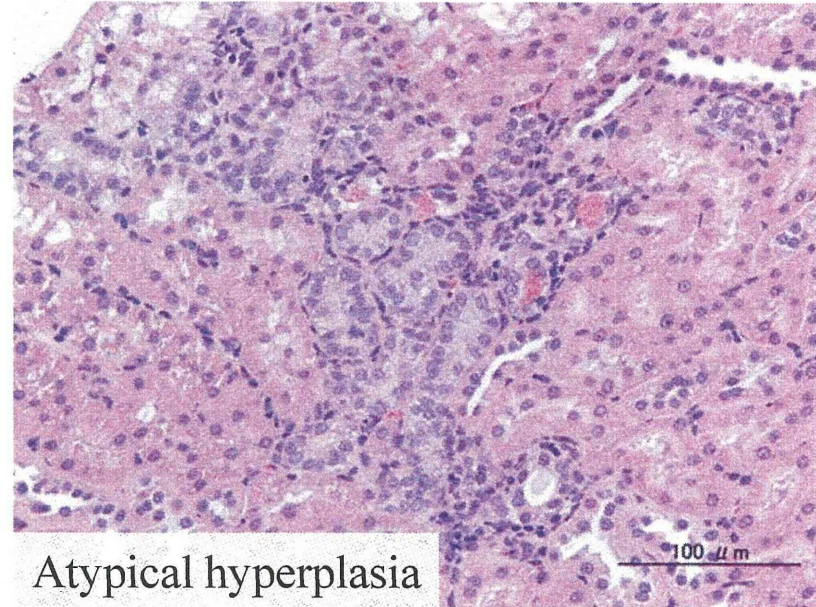
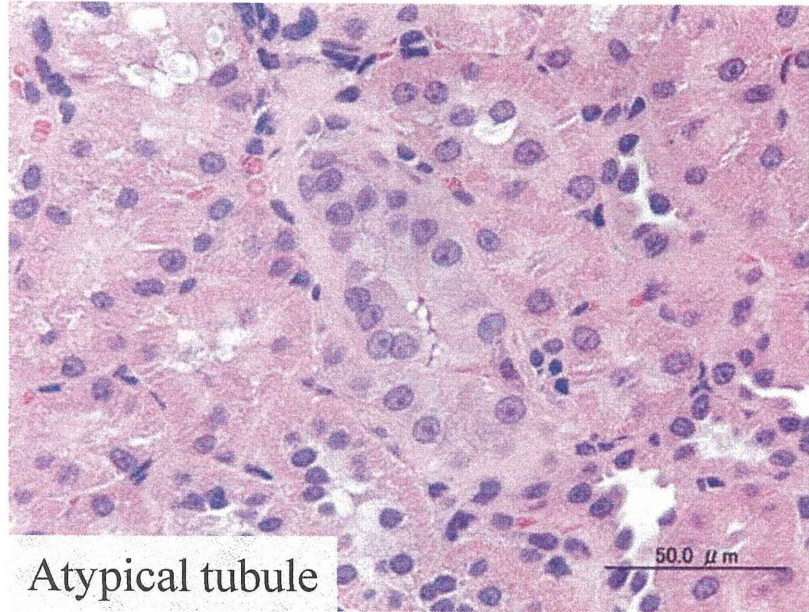


Fig. 1.
Representative microphotographs of atypical tubule and atypical hyperplasia.

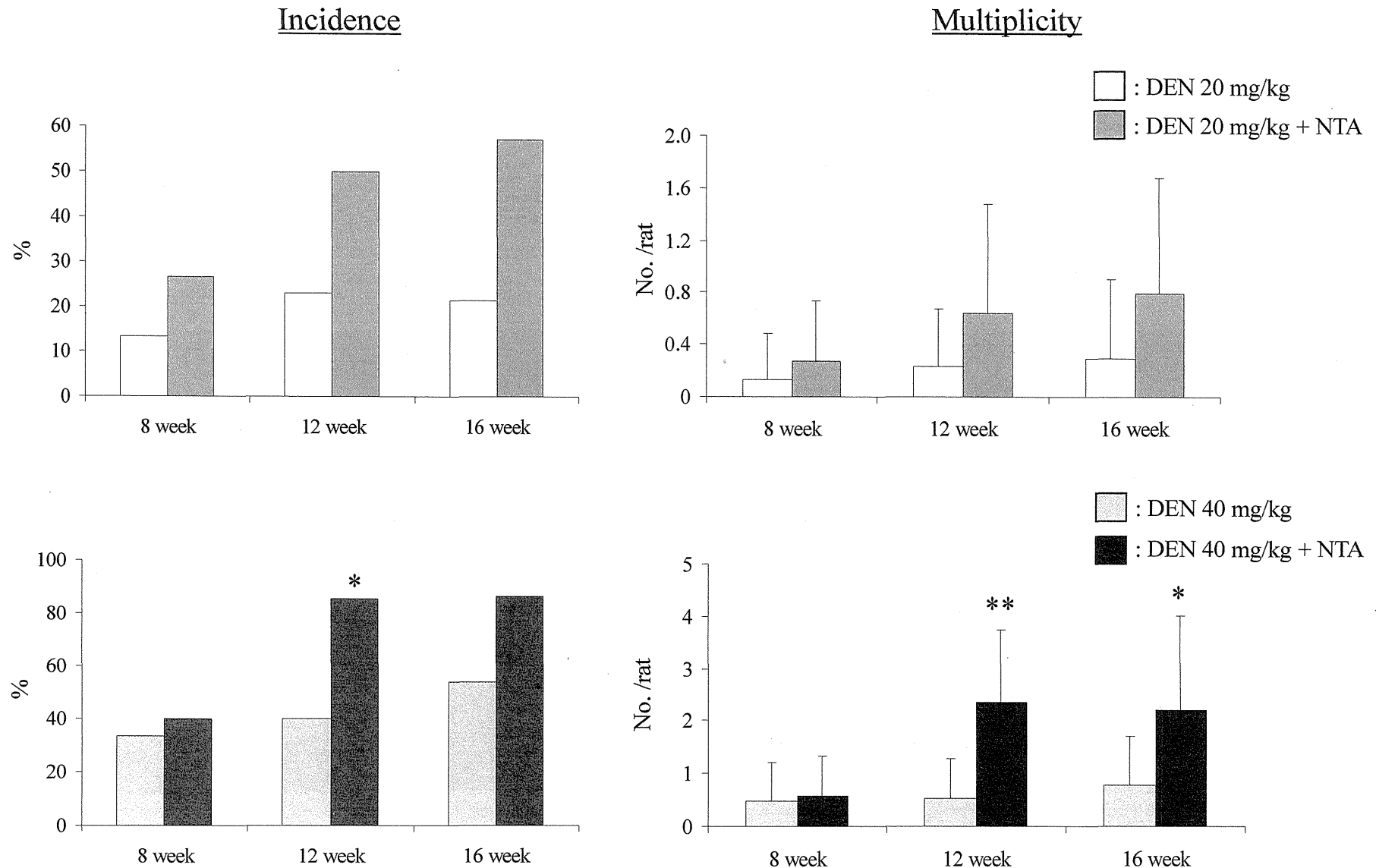


Fig. 2.

Incidence and multiplicity of preneoplastic lesions in the residual kidney tissue of female F344 rats treated with diethylnitrosamine (DEN) and trisodium nitrilotriacetic acid (NTA). The values are mean \pm SD. The horizontal axes represent the treatment period after unilateral nephrectomy. *,**Significantly different from the DEN 40 mg/kg group at $p < 0.05, 0.01$.

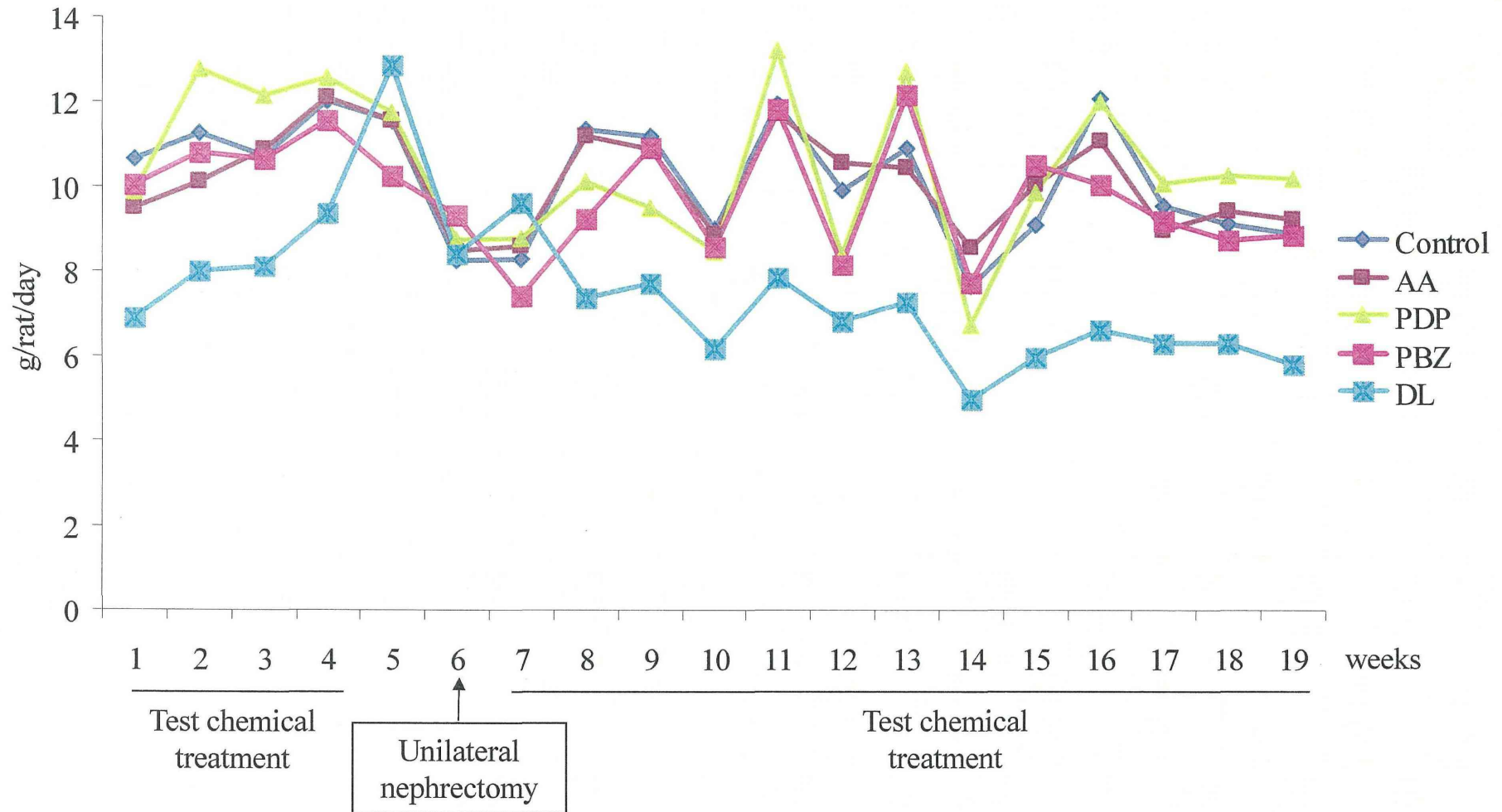


Fig. 3.

Food consumption of female F344 *gpt* delta rats treated with aristolochic acid (AA), potassium dibasic phosphate (PDP), phenylbutazone (PB), *d*-limonene (DL).

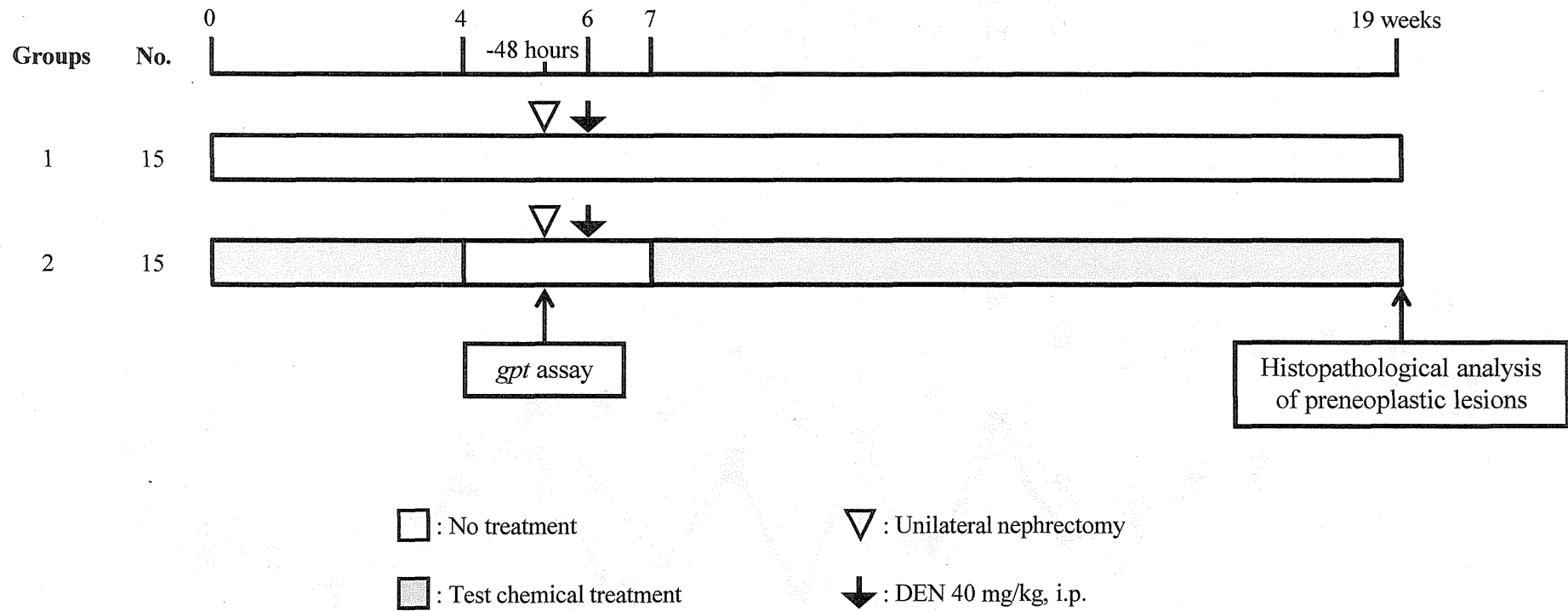


Fig. 4.

Standard protocol for the GNP (*gpt*, nephrectomy and preneoplastic lesion) model. Animals were 6-week-old female F344 *gpt* delta rats. The *gpt* assay is performed in excised kidney samples as indicator of *in vivo* mutagenicity. Tumor-promoting activities are evaluated based on the enhancement of formation of preneoplastic lesions induced by diethylnitrosamine (DEN) in residual kidney samples.

Table 1.

Body and kidney weights of rats treated with aristolochic acid (AA), potassium dibasic phosphate (PDP), phenylbutazone (PB), *d*-limonene (DL).

| Group | No. of rats | Final body weight (g) | Kidney weight | |
|---------|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | | Absolute (g) | Relative (g%) |
| Control | 15 | 198.3 ± 13.1 ^a | 0.80 ± 0.06 | 0.40 ± 0.02 |
| AA | 14 | 192.7 ± 8.4 | 0.79 ± 0.03 | 0.41 ± 0.01 |
| PDP | 14 | 187.6 ± 7.6 [*] | 1.17 ± 0.07 ^{**} | 0.61 ± 0.03 ^{**} |
| PBZ | 14 | 190.8 ± 9.9 [*] | 0.88 ± 0.05 ^{**} | 0.47 ± 0.02 ^{**} |
| DL | 14 | 198.3 ± 9.7 | 0.83 ± 0.05 | 0.42 ± 0.02 [*] |

^a Mean ± SD

^{*}, ^{**} 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・発がん性の中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 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
研究協力者： 曹 永晩 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
研究協力者： 赤木 純一 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発がん物質であるが、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* ラットを用いた中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。昨年度は、2-MF を *gpt delta* ラットに 1.2、6、30 mg/kg の用量で 13 週間強制経口投与し、一般毒性評価、標的臓器である肝臓の *in vivo* 変異原性試験を実施した。その結果、雄の 6 mg/kg 以上および雌の 30 mg/kg で肝臓への影響（ALP、 γ -GTP あるいは T-Bil の増加、肝臓重量の高値）が認められた。一方、肝臓における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。本年度は、全身諸器官・組織の病理組織学的検索及び肝細胞の前癌病変

（glutathione-S-transferase placental form（GST-P）陽性細胞巢）の定量解析を実施した。その結果、雌雄の 6 mg/kg 以上の肝臓において、肝細胞のアポトーシス、胆管線維症、胆管増生ならびに被膜下の炎症細胞浸潤が認められた。また、雌雄の 30 mg/kg で GST-P 陽性細胞巢の数および面積の有意な増加が認められた。以上より、雌雄 6 mg/kg 以上の投与群で、肝・胆道系障害を示唆する病理組織学的変化および血清生化学マーカーが変動したことから、本試験における 2-MF の無毒性量は雌雄共に 1.2 mg/kg であった。また、肝臓の GST-P 陽性細胞巢の増加が認められたことから、2-MF は肝発がん性を有する可能性が示された。本試験で認められた 2-MF の肝毒性ならびに肝発がん性は、いずれもフランの毒性試験で認められた変化と同様であり、フラン骨格に起因するものと考えられた。今後は、*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検討し、フラン骨格を有する類似化学物質の安全性を総合的に評価する予定である。

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

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*での報告は少なく、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陽性細胞巢)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。

昨年度の本研究班では、2-MFを*gpt delta*ラットに13週間強制経口投与し、一般状態、体重及び摂餌量推移、剖検、器官重量、血液学検査、血清生化学検査、肝臓を用いた*in vivo*変異原性試験を実施した。その結果、2-MFはその基本骨格フランと同様に肝臓を標的とした毒性を有していること、肝臓における*in vivo*変異原性は陰性であることが明らかとなった。本年度は、全身臓器の病理組織学的検索に加えて、肝臓の前癌病変(GST-P陽性細胞巢)の定量解析を実施し、2-MFの毒性、遺伝毒性および発がん性について包括的に評価した。

B. 研究方法

被験物質

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。

13週間反復投与試験

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30mg/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 陽性細胞巣）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巣として評価した。

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）

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

一般毒性変化および *in vivo* 変異原性試験

（昨年度結果の概略）

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。体重推移および摂餌量推移を 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 1 に示す。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を Table 2 に示す。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、 γ -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。最終体重および器官重量測定結果を Table 3 に示す。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。肝臓を用いた *in vivo* 変異原性試験結果を Fig. 2 に示す。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。

全身臓器の病理組織学的検索

全身臓器の病理組織学的検索結果を Table 4 示す。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、マクロファージの貪食像（褐色色素を伴う）が認められた。肝臓で認められた主要な所見の組織像を Fig. 3 に示した。

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、甲状腺の鰓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。

GST-P 陽性細胞巢の定量解析

GST-P 陽性細胞巢の定量解析結果を Fig. 4 に示した。雌雄の 30 mg/kg で比較的大型の陽性細胞巢が認められ、定量解析の結果、陽性細胞巢の数および面積ともに有意な高値となった。

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、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、 γ -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

的として、*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

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

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).

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

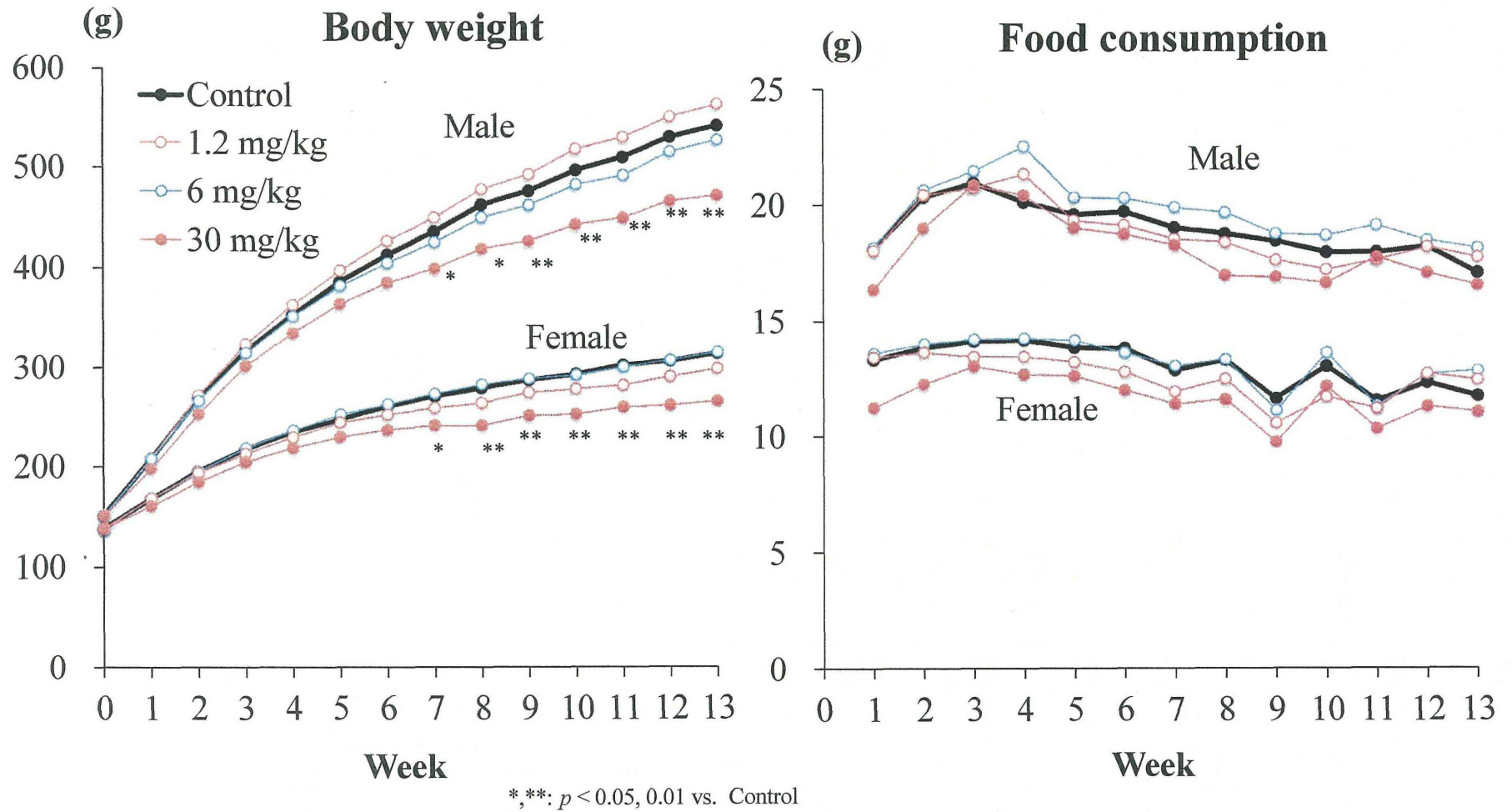


Fig 2. Mutant frequencies (MFs) of SD *gpt* delta rats treated with 2-MF for 13 weeks

88

