

Fig. 4. Representative photographs of PCNA immunohistochemistry in the residual livers of *gpt* delta rats treated with ES and AA.

Table 1. *gpt* MFs in the excised livers of F344 *gpt* delta rats treated with ES, AA, BNF and BT.

Treatment	Animal No.	Cm ^R colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± SD
Control	101	5.00	1	0.20	0.71 ± 0.37
	102	4.10	3	0.73	
	103	3.74	4	1.07	
	104	7.88	4	0.51	
	105	4.77	5	1.05	
ES	201	4.37	11	2.52	3.04 ± 1.00**
	202	4.10	17	4.15	
	203	4.77	18	3.77	
	204	4.46	14	3.14	
	205	3.06	5	1.63	
AA	301	4.23	7	1.65	2.34 ± 0.65**
	302	3.29	6	1.83	
	303	7.70	17	2.21	
	304	4.46	14	3.14	
	305	4.55	13	2.86	
BNF	401	6.44	3	0.47	0.75 ± 0.53
	402	5.36	2	0.37	
	403	3.15	5	1.59	
	404	5.18	5	0.97	
	405	5.31	2	0.38	
BT	501	4.37	9	2.06	1.22 ± 0.65
	502	4.37	2	0.46	
	503	5.81	4	0.69	
	504	4.50	7	1.56	
	505	3.78	5	1.32	

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

Table 2. Mutation spectra of <i>gpt</i> mutant colonies in the excised livers of F344 <i>gpt</i> delta rats treated with ES, AA, BNF and BT.										
	Control		ES		AA		BNF		BT	
	Number (%)	Mutation frequency (10^{-3})	Number (%)	Mutation frequency (10^{-3})	Number (%)	Mutation frequency (10^{-3})	Number (%)	Mutation frequency (10^{-3})	Number (%)	Mutation frequency (10^{-3})
Transversions										
GC-TA	8 ^a (47.1)	0.33 ± 0.24 ^b	13 (20.0)	0.60 ± 0.33	6 (10.5)	0.23 ± 0.28	4 (23.5)	0.15 ± 0.21	9 (33.3)	0.40 ± 0.19
GC-CG	1 (5.9)	0.05 ± 0.12	5 (7.7)	0.23 ± 0.23	0	0	1 (5.9)	0.06 ± 0.14	2 (7.4)	0.09 ± 0.12
AT-TA	0	0	4 (6.2)	0.18 ± 0.19	34 (59.7)	1.39 ± 0.32**	1 (5.9)	0.04 ± 0.09	1 (3.7)	0.05 ± 0.10
AT-CG	0	0	3 (4.6)	0.16 ± 0.15*	0	0	0	0	0	0
Transitions										
GC-AT	6 (35.3)	0.26 ± 0.16	17 (26.2)	0.80 ± 0.42	7 (12.3)	0.29 ± 0.24	6 (35.3)	0.29 ± 0.39	10 (37.0)	0.46 ± 0.30
AT-GC	0	0	20 (30.8)	0.93 ± 0.39**	2 (3.5)	0.11 ± 0.15	0	0	1 (3.7)	0.03 ± 0.08
Deletion										
Single bp	2 (11.8)	0.07 ± 0.10	3 (4.6)	0.14 ± 0.22	8 (14.0)	0.32 ± 0.57	2 (11.8)	0.07 ± 0.10	4 (14.8)	0.19 ± 0.19
Over 2bp	0	0	0	0	0	0	1 (5.9)	0.04 ± 0.08	0	0
Insertion	0	0	0	0	0	0	2 (11.8)	0.10 ± 0.15	0	0
Complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
^a Number of colonies with independent mutations. ^b Mean ± SD. *, ** Significantly different from the control group at $P < 0.05$ and 0.01 , respectively.										

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 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中期発がん性試験法を開発することである。本年度は、遺伝毒性腎発がん物質として aristolochic acid (AA)、非遺伝毒性腎発がん物質として potassium dibasic phosphate (PDP) および phenylbutazone (PBZ)、雄ラット特有腎発がん物質として *d*-limonene (DL) を用い、昨年度までの研究により樹立した標準プロトコールによる新規試験法の有用性について検証した。AA 群では、摘出腎における *gpt assay* において *gpt* 変異体頻度 (MF) の有意な上昇がみられ、残存腎における病理組織学的解析においては前腫瘍性病変の有意な増加が認められた。PDP 群および PBZ 群では、*gpt assay* において *gpt* MF の上昇はみられなかったが、残存腎においては前腫瘍性病変の有意な増加が認められた。また PDP 群では、残存腎においてその腎発がん機序に関与するとされる近位尿細管における石灰沈着が認められた。DL 群では、*gpt assay* において *gpt* MF の上昇はみられず、残存腎においても前腫瘍性病変の増加はみられなかった。以上の結果は、標準プロトコールにて実施した新規試験法の有用性を支持しているものと考えられた。

本試験法では腎臓における *in vivo* 変異原性および発がんプロモーション活性を同時に検出することができ、さらに他の発がんに関連する種々のパラメータの検索を組み合わせることで、より詳細な発がん機序の考察も可能となることが考えられた。また $\alpha_2\mu$ -globulin 腎症を介した発がん機序はヒトへの外挿性はないため、雌ラットを用いる本試験法ではこの偽陽性結果を回避できることも示された。

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、*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、既知の遺伝毒性腎発がん物質、非遺伝毒性腎発がん物質および雄ラット特有腎発がん物質を用い、昨年度までの研究によ

り樹立した標準プロトコールによる新規試験法の有用性について検証した。

B. 研究方法

6週齢の雌性 F344 系 *gpt delta* ラット（日本 SLC）に遺伝毒性腎発がん物質として aristolochic acid (AA)、雄ラット特有腎発がん物質として *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、非遺伝毒性腎発がん物質として potassium dibasic phosphate (PDP) および phenylbutazone (PBZ) 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 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、試験開始 19 週間後に動物を屠殺・解剖して、残存腎を採取した。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) を尿細管前腫瘍性病変とし (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。

(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

切除腎における *gpt* assay の結果を Table 1 に示す。AA 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、AA 群において対照群と比較して A:T:T:A transversion 変異頻度の有意な上昇がみられた (Table 2)。病理組織学的解析により算出した前腫瘍性病変の発生頻度および 1 個体あたりの発生個数を Fig. 2 に示す。AA 群および PDP 群における発生頻度および 1 個体あたりの発生個数、PBZ 群における 1 個体あたりの発生個数が対照群に比して有意な高値を示した。PDP 群および DL 群の残存腎組織の代表的な組織像を Fig. 3 に示す。近位尿細管上皮における石灰沈着が PDP 群においてみられた。DL 群では近位尿細管において α_{2u} -globulin の蓄積を示唆する好酸性硝子滴の沈着は認められなかった。

D. 考察

本年度は、腎臓における遺伝毒性・発がん性の中期包括的試験法の開発のため、種々の既知発がん物質を用いて、昨年度までの研究により樹立した標準プロトコルを用いた新規試験法の有用性を検証した。

遺伝毒性腎発がん物質である AA は、ラット腎臓において deoxyadenosine 付加体を主とする AA 特異的 DNA 付加体を形成するという報告がある。摘出腎における *gpt* assay の結果、AA 群において *gpt* MF の有意

な上昇がみられ、変異スペクトラム解析においては A:T:T:A transversion 変異頻度の有意な上昇がみられた。これらの結果は、AA 特異的 deoxyadenosine 付加体が遺伝子突然変異に寄与している可能性を示していると考えられた。*gpt* delta ラットは化学物質の *in vivo* 変異原性の評価のみでなく、塩基修飾と遺伝子変異との関連性を検索することについても有用であることがこれまでに示されている。従って、本試験法においても摘出腎や残存腎を用いて化学物質特異的 DNA 付加体の形成を測定することによって、遺伝毒性機序をより詳細に検索することも可能であると考えられた。また、残存腎における病理組織学的解析では、AA 群において前腫瘍性病変の有意な増加が認められ、この結果は AA の腎プロモーション作用を反映しているものと考えられた。

PDP および PBZ はともに非遺伝毒性メカニズムによりラット腎臓において発がん性を示すことが知られている。本研究では、PDP 群および PBZ 群において *gpt* MF の上昇は認められなかったものの、尿細管前腫瘍性病変が有意に増加していたことから、本試験法は非遺伝毒性腎発がんプロモーター物質の検出にも有用であることが示された。また、PDP 投与群においては近位尿細管における石灰沈着が認められた。PDP は石灰沈着による尿細管の障害および再生を誘発し、細胞増殖亢進作用を発揮することが知られている。よって本試験法においては、前腫瘍性病変の解析に加えてさらに詳細な病理解析を実施することで、発がん機序に関するさらなる情報を得ることも可能となることが示された。

DL は近位尿細管における α_{2u} -globulin の

蓄積を介し、雄ラット特異的に腎発がん性を示すことが知られている。本研究においては、DL群では *gpt* MFの上昇はみられず、前腫瘍性病変の増加も認められなかった。また残存腎においては、近位尿細管上皮において α_{2u} -globulinの沈着を示唆する好酸性硝子滴の沈着は認められなかった。

α_{2u} -globulin腎症を介した発がん機序はヒトへの外挿性はないため、雌ラットを用いる本試験法ではこの偽陽性結果を回避できることが示された。

以上の結果は、標準プロトコールを用いた本試験法の有用性を支持するものと考えられた。また、本試験法においては化学物質の腎臓における *in vivo* 変異原性および発がんプロモーション活性の評価に加え、発がんに関連する種々のパラメータを追加検索することにより、より詳細な発がん機序の解析も可能となることが示された。

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試験法の開発を目指し、種々の既知発がん物質を標準プロトコールによる新試験法に適用して検証した結果、その有用性が証明された。さらに、本試験法においては *in vivo* 変異原性および発がんプロモーション活性の評価に加え、発がんに関連する種々のパラメータを追加検索することにより、より詳細な発がん機序の考察が可能となることが考えられた。また α_{2u} -globulin腎症を介した発がん機序はヒトへの外挿性はないため、雌ラットを用いる本試験法ではこの偽陽性結果を回避できる

ことも示された。

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、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

1. Kohei Matsushita, Yuji Ishii, Shinji Takasu, Ken Kuroda, Aki Kijima, Takuma Tsuchiya, Hiroaki Kawaguchi, Noriaki Miyoshi, Takehiko Nohmi, Kumiko Ogawa, Akiyoshi Nishikawa, Takashi Umemura: A medium-term *gpt delta* rat model as an *in vivo* system for analysis of renal carcinogenesis and the underlying mode of action. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2015; 67; 31-39.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

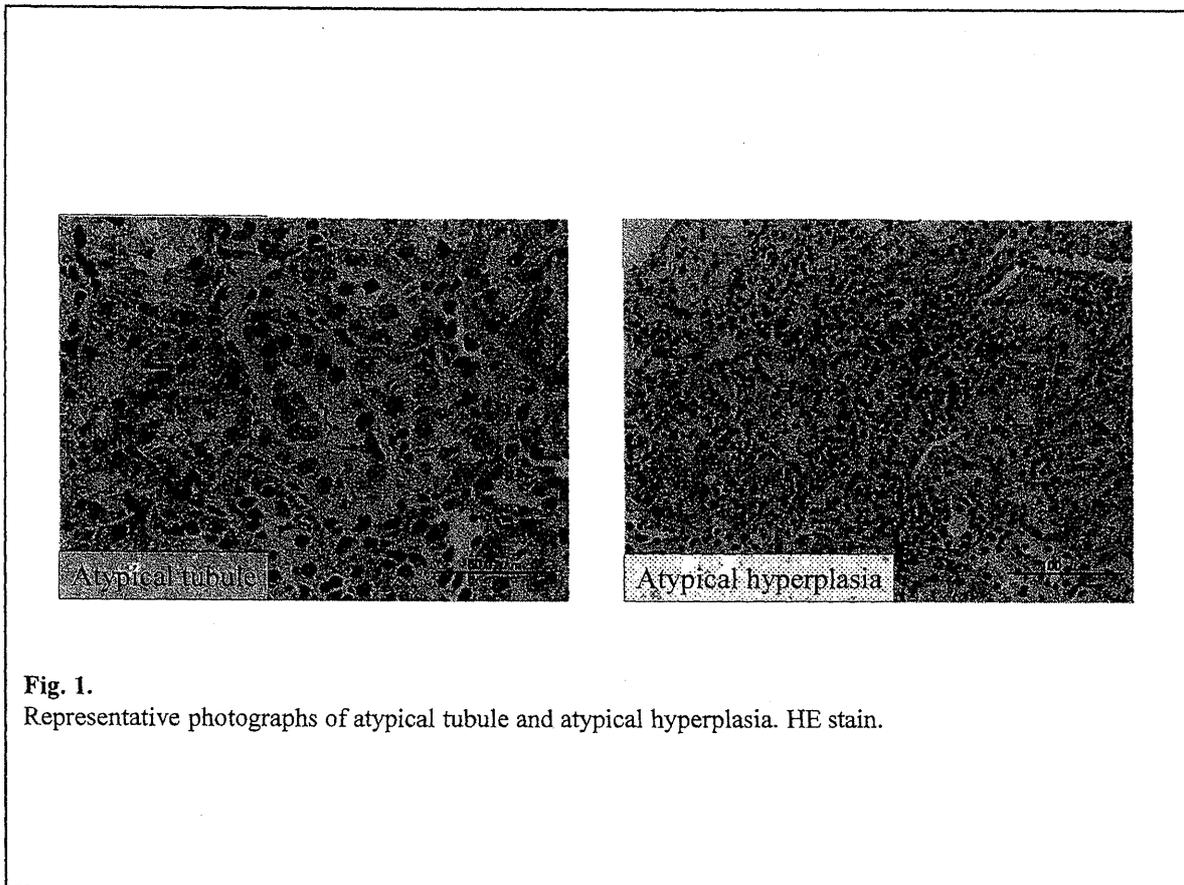
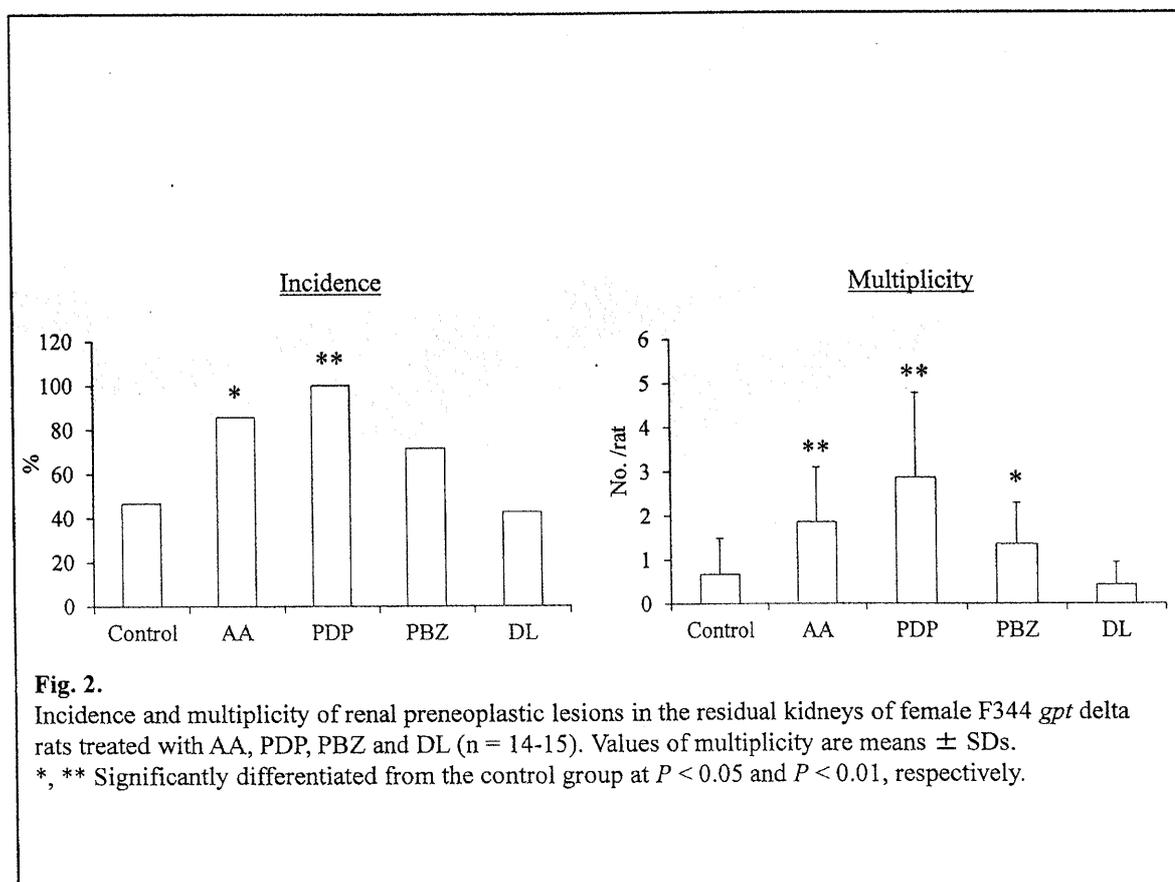


Fig. 1.
Representative photographs of atypical tubule and atypical hyperplasia. HE stain.



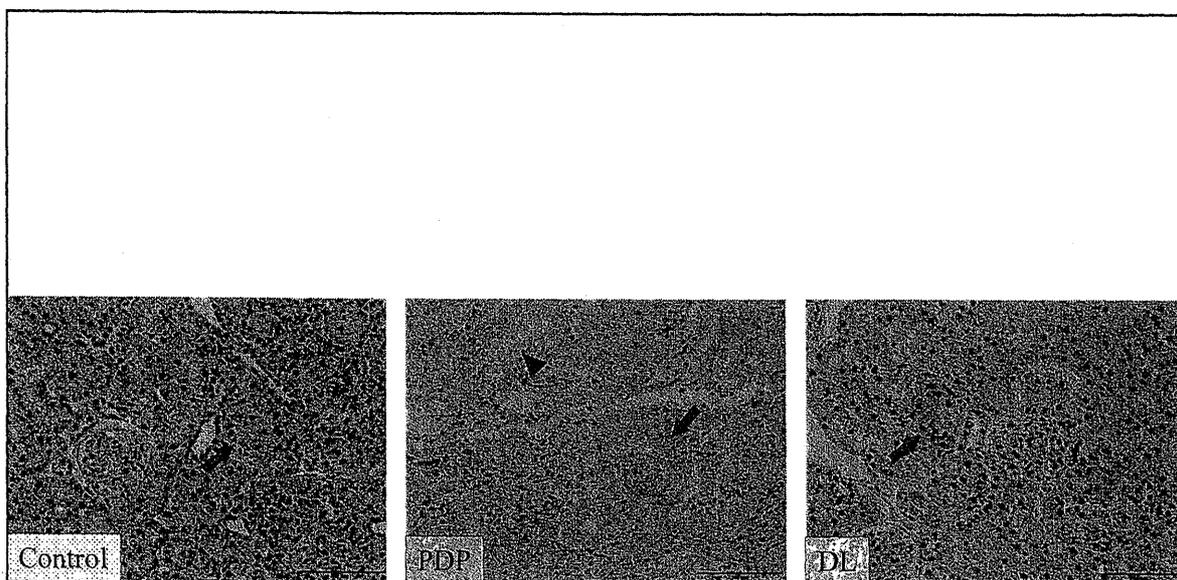


Fig. 3.

Representative photographs of the residual kidneys of female F344 *gpt* delta rats treated with PDP and DL. Calcium depositions were observed in the proximal tubules of rats treated with PDP (arrow head). There were no hyaline droplets indicating accumulation of $\alpha_2\mu$ -globulin in the proximal tubular epithelium in DL-treated rats. Arrows represent preneoplastic lesions in renal tubules. HE stain.

Table 1. *gpt* MFs in excised kidneys of F344 *gpt* delta rats treated with AA, PDP, PBZ and DL

Treatment	Animal No.	Cm ^R colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± SD
Control	101	3.69	2	0.54	0.43 ± 0.22
	102	10.04	3	0.30	
	103	8.91	2	0.22	
	104	9.50	3	0.32	
	105	7.92	6	0.76	
AA	201	3.74	4	1.07	1.20 ± 0.42 **
	202	6.89	5	0.73	
	203	5.54	10	1.81	
	204	6.21	6	0.97	
	205	6.35	9	1.42	
PDP	301	5.90	1	0.17	0.57 ± 0.32
	302	4.77	5	1.05	
	303	7.47	4	0.54	
	304	6.39	4	0.63	
	305	6.21	3	0.48	
PBZ	401	5.49	3	0.55	0.48 ± 0.32
	402	5.36	1	0.19	
	403	7.43	2	0.27	
	404	7.79	7	0.90	
	405	3.56	0 ^a	-	
DL	501	5.13	4	0.78	0.47 ± 0.29
	502	4.41	1	0.23	
	503	6.93	5	0.72	
	504	7.16	1	0.14	
	505	6.21	3	0.48	

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

^aNo mutant colonies were detected on the plate, with this data being excluded from the calculation of MF.

Table 2. Mutation spectra of *gpt* mutant colonies in excised kidneys of F344 *gpt* delta rats treated with AA, PDP, PBZ and DL

	Control		AA		PDP		PBZ		DL	
	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	1 (6.3) ^a	0.02 ± 0.05 ^b	3 (8.8)	0.11 ± 0.12	5 (24.9)	0.17 ± 0.14	2 (11.8)	0.06 ± 0.10	3 (21.4)	0.11 ± 0.17
GC-CG	2 (12.5)	0.05 ± 0.11	1 (2.9)	0.03 ± 0.07	2 (11.8)	0.08 ± 0.18	0	0	0	0
AT-TA	0	0	12 (35.3)	0.43 ± 0.39*	0	0	1 (5.9)	0.02 ± 0.04	0	0
AT-CG	0	0	2 (5.9)	0.06 ± 0.14	0	0	0	0	2 (14.3)	0.07 ± 0.10
Transitions										
GC-AT	11 (68.8)	0.31 ± 0.17	8 (23.5)	0.28 ± 0.08	6 (35.3)	0.18 ± 0.15	10 (58.8)	0.28 ± 0.13	5 (35.7)	0.17 ± 0.11
AT-GC	1 (6.3)	0.03 ± 0.06	4 (11.8)	0.13 ± 0.14	1 (5.9)	0.04 ± 0.08	1 (5.9)	0.02 ± 0.04	1 (7.1)	0.03 ± 0.07
Deletion										
Single bp	1 (6.3)	0.02 ± 0.05	3 (8.8)	0.10 ± 0.14	3 (17.6)	0.09 ± 0.09	3 (17.6)	0.10 ± 0.10	3 (21.4)	0.09 ± 0.14
Over 2bp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Insertion	0	0	1 (2.9)	0.05 ± 0.12	0	0	0	0	0	0
Complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^a Number of colonies with independent mutations.

^b Mean ± SD.

* Significantly different from the control group at $P < 0.05$.

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）
平成 26 年度 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。昨年度までの研究により、2-MF は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細胞浸潤などの肝臓を標的とした毒性を示し、また、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、肝発がん性が示唆された。しかし、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ず、発がん過程への遺伝毒性メカニズムの関与は明らかにならなかった。2-MF の肝毒性ならびに肝発がん性を示唆する変化は、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。そこで本年度は、フラン骨格化合物の標的臓器における遺伝毒性をより詳細に解析することを目的として、基本骨格であるフランを *gpt delta* ラットに 2、4、8 mg/kg で 4 週間強制経口投与し、肝臓の病理組織学的検索、GST-P 陽性細胞巢の定量解析、肝臓のレポーター遺伝子変異原性試験ならびに肝細胞を用いた *in vivo* 小核試験を実施した。その結果、4 週間投与では GST-P 陽性細胞巢の数および面積の増加は認められなかったが、4 mg/kg 以上で肝細胞のアポトーシスや胆管線維症などの肝臓への影響が認められ、フラン骨格に起因する肝臓への影響の発現が認められた。一方、肝臓のレポーター遺伝子変異頻度に変化はなく、また肝細胞を用いた小核試験も陰性であった。以上の結果、フラン骨格化合物による肝発がん過程への遺伝毒性メカニズムの関与の可能性は低いと考えられた。

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* 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。

昨年までの本研究班では、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、全身臓器の病理組織学的解析、肝臓を用いた *in vivo* 変異原性試験及び前癌病変（GST-P 陽性細胞巢）の定量解析を実施した。その結果、2-MFは肝臓への影響（肝重量増加、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。また、GST-P 陽性細胞巢の数および面積の増加が認められ、肝発がん性が示唆されたが、肝臓における *in vivo* 変異原性は陰性であったことから、発がん過程への遺伝毒性メカニズムの関与は明らかにならなかった。2-MF投与により認められた肝毒性ならびに肝発がん性は、我々が過去に実施した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変化と考えられた。

化学物質による遺伝毒性は遺伝子突然変異と染色体異常に分けられるが、*in vivo* において肝臓の染色体異常を評価する試験系として、肝細胞を用いた小核試験が報告されている。特に、*gpt delta* ラットにおけるレポーター遺伝子突然変異試験と標的臓器における *in vivo* 小核試験とを組み合わせることにより、標的臓器における異なるエンドポイントでの遺伝毒性の同時評価が可能となる。フランおよび2-MFはいずれも *in vitro* 染色体異常試験において陽性結果が得られているが、発がん標的臓器における染色体異常については検討されていない。そこで本年度は、フラン骨格化合物の標的臓器（肝臓）における遺伝毒性を詳細に評価する目的で、基本骨格であるフランを用いて、肝臓におけるレポーター遺伝子変異原性試験と肝細胞を用いた小核試験を組み合わせ評価した。

B. 研究方法

被験物質

2-MF（ロット番号：CDL2169）、フラン（ロット番号：WEP0576）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、フランはコーンオイルに溶解した。

N-Nitrosodiethylamine (DEN、ロット番号：D0516)は東京化成工業株式会社より購入した。DENは精製水に溶解した。

投与液は週1回調製し、使用直前まで冷蔵保存した。

フランのラット4週間反復投与試験

6週齢の雄SD系 *gpt delta* ラット(日本エスエルシー)の各群5匹にフランを2、4、8 mg/5mL/kgの用量で4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、陽性対照群には、DENを12.5 mg/5 mL/kgの用量で投与した。投与期間中、飼料はCRF-1固形飼料を自由に摂取させた。解剖時にイソフルラン麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させ、肝臓を採取して肝細胞を用いた *in vivo* 小核試験、レポーター遺伝子変異原性試験(*gpt* 及び *Spi*アッセイ)、病理組織学的検索ならびにGST-P陽性細胞巢の定量解析に供した。

肝細胞を用いた *in vivo* 小核試験

肝臓は外側左葉を剃刀で薄切し、氷冷したHank' balanced salt solution (HBSS)に採取した。さらに100 U/mL コラゲナーゼ(ヤクルト薬品工業株式会社)含有HBSSにて37°C、50 rpmで1時間振とうしながらインキュベーションした後、ピペッティングにより細胞を単離した。細胞浮遊液は70 μmのセルロースアセテート膜フィルターでろ過した後、10%緩衝ホルマリンと混和し固定した。肝細胞の染色はアクリジンオレンジ(AO)及びDAPI混液により実施した。観察に際しては、UV励起の蛍光顕微鏡下で1個体あたり肝細胞2000個以上をカウントし、そのうち小核を有する肝細胞の割合を

算出した。統計解析法はKaetenbaumとBowmanの統計解析表を用い、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

1) 一般状態、体重および器官重量

4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。最終体重及び器官重量をTable 4に示す。8 mg/kgで最終体重の低値、4 mg/kg以上で肝臓相対重量の高値が認められた。

2) 肝臓の病理組織学的検査

肝臓の病理組織学的検査の結果をTable 4に示す。4 mg/kg以上で肝細胞のアポトーシス、被膜化の細胞浸潤、卵円形細胞の増殖が認められ、8 mg/kgでは胆管線維症が認められた。

3) 肝臓におけるGST-P陽性細胞巢の定量解析

肝臓におけるGST-P陽性細胞巢の定量解析結果をFig. 3に示す。いずれの用量においても、GST-P陽性細胞巢の数および面積にフラン投与に起因した変動は認められな

かった。

4) 肝臓におけるレポーター遺伝子変異原性試験

肝臓におけるレポーター遺伝子変異原性試験結果を Table 5 および Table 6 に示す。いずれの用量においても、*gpt* および Spi アッセイにおいて、フラン投与に起因した変動は認められなかった。なお、陽性対照群ではいずれのアッセイにおいても有意な変異頻度の増加が認められた。

5) 肝細胞を用いた *in vivo* 小核試験

肝細胞を用いた小核試験の結果を Table 7 に示す。いずれの用量においても、小核を有する肝細胞率に変化は認められなかった。なお、陽性対照群では小核を有する肝細胞率の有意な増加が認められた。

D. 考察

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。さらに、フランの 8 mg/kg 投与により、肝臓の GST-P 陽性細胞巢の数および面積の増加が認められた。従って、今回認められた 2-MF の肝毒性および肝発がん性（肝細胞がんおよび胆管がん）を示唆する変化は、フラン骨格に起因してい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。

フランの *gpt delta* ラットにおける肝臓を用いたレポーター遺伝子変異原性試験および肝細胞を用いた *in vivo* 小核試験の投与期間は、OECD ガイドラインあるいは文献にて報告されている 4 週間とした。フランを 4 週間反復投与した結果、8 mg/kg で最終体重の低値、4 mg/kg 以上で肝重量の増加が認められた。肝臓における GST-P 陽性細胞巢の数及び面積に変化は認められなかったものの、肝臓の病理組織学的検索において肝細胞への影響（肝細胞のアポトーシス）および胆管系への影響（胆管線維症）、被膜下の細胞浸潤が認められたことから、4 週間投与においてもフラン骨格に起因した肝臓への影響は発揮されていると考えられた。肝臓の *in vivo* 変異原性試験の結果、*gpt* 及び Spi アッセイにおけるいずれのレポーター遺伝子についても変異頻度に変化は認められなかった。さらに、肝細胞を用いた小核試験においても、フラン投与に起因した変化は認められなかった。従って、フラン骨格化合物の肝発がん過程において、主として遺伝毒性メカニズムが関与している可能性は低いと考えられた。なお、フランはラットにおいて、肝細胞がんに加えて胆管がんを誘発することが特徴的である。今回検討した肝臓におけるレポーター遺伝子変異原性試験および肝細胞を用いた *in vivo* 小核試験は、いずれも肝細胞の遺伝毒性の有無を反映した結果と考えられることから、胆管がんの発生過程における遺伝毒性メカニズムの関与の詳細については明らかとなら

なかった。

E. 結論

2-MF は、基本骨格であるフランと同様に肝毒性を示し、肝発がん性を示唆する変化が認められたが、肝臓のレポーター遺伝子変異原性試験は陰性であった。また、フランの肝臓におけるレポーター遺伝子変異原性は陰性であり、また肝細胞を用いた *in vivo* 小核試験も陰性であった。従って、フラン骨格化合物によるラット肝発がん過程において、遺伝毒性メカニズムが関与している可能性は低いと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果

未発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Fig. 1 Number and area of GST-P-positive foci for SD *gpt* delta rats treated with 2-MF for 13 weeks

