

201426012B

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 24～26 年度総合研究報告書

研究代表者 西川 秋佳

平成 25(2013)年 4 月

目 次

I. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	21
--------------------------	----

I. 総合研究報告

「糖尿病の予防と治療」をテーマとして、糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。本報告は、糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。本報告は、糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。

糖尿病は、世界的な健康問題であり、その有病率は年々増加している。糖尿病の予防と治療は、公衆衛生上の重要な課題である。本報告では、糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。本報告は、糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。

糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。本報告は、糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。本報告は、糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。本報告は、糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。

糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。本報告は、糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。本報告は、糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。

糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。本報告は、糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。本報告は、糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。

糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。本報告は、糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。本報告は、糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。

糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。本報告は、糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。本報告は、糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。

糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。本報告は、糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。本報告は、糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。

糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。本報告は、糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。本報告は、糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。

糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。本報告は、糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。本報告は、糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。

糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。本報告は、糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。本報告は、糖尿病の予防と治療に関する最新の研究成果を報告する。

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

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

研究要旨

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できる新しい肝短期発がん性試験法を開発した。被験物質と *diethylnitrosamine* (DEN) の同時投与による相互作用の可能性を回避する目的として被験物質の休薬期間を設けた改良プロトコルを確立した。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プロトコ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。遺伝毒性肝発がん物質 *estragole* (ES)、遺伝毒性非肝発がん物質 *aristolochic acid* (AA)、非遺伝毒性肝発がん物質 β -*naphthoflavone* (BNF) および *barbital* (BT) を用いて検証した結果、切除肝における *gpt assay* では、ES 群および AA 群において *gpt* 変異体頻度 (MF) の有意な上昇がみられ、残存肝における GST-P 陽性細胞巢の定量的解析では、ES 群、BNF 群および BT 群において GST-P 陽性細胞巢の有意な増加がみられた。また、ES 群および AA 群における残存肝の細胞増殖活性を検索した結果、ES 群でのみ細胞増殖活性の亢進がみられた。以上より、本試験法は肝臓における *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同時に検索することで、より詳細な発がん機序の究明も可能となることが示された。

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、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できる新しい短期発がん性試験法を開発した。遺伝毒性腎発がん物質 *aristolochic acid* (AA)、非遺伝毒性腎発がん物質 *potassium dibasic phosphate* (PDP) および *phenylbutazone* (PBZ)、雄ラット特有腎発がん物質 *d-limonene* (DL) を用い、本試験法の

有用性について検証した。AA 群では、摘出腎の *gpt* assay において *gpt* 変異体頻度 (MF) が有意に上昇し、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* MF は上昇しなかったが、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。DL 群では、*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する。

gpt delta ラットを用いた中期包括的試験法を用いて、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について包括的に評価した結果、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にした毒性を示し、また GST-P 陽性細胞巢の数および面積が有意に増加し、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、いずれもフランと同様であり、フラン骨格に起因するものと考えられた。次に、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 4 週間強制経口投与した結果、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、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。

キーワード： 遺伝毒性、発がん性、短期包括的試験法、*gpt delta* ラット、フラン

研究分担者及び研究協力者の氏名・所属機関名及び所属機関における職名

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

研究協力者

高須 信二 国立医薬品食品衛生研究所
病理部主任研究官

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短期発がん性試験法は予測精度が高いが、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。本研究は *gpt delta* ラットを用いた中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。これまでに、イニシエーター物質と被験物質の相互作用の回避を目的とした肝短

期発がん試験法の改良プロトコールを樹立し、既知発がん物質を用いてその妥当性を検証した。また、非遺伝毒性腎発がん物質を用いて腎短期発がん性試験法の妥当性を検証した。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、香料物質 2-メチルフラン (2-MF) および基本骨格フランについて、*gpt delta* ラットを用いた短期包括試験法により、その一般毒性、遺伝毒性ならびに発がん性を検討した。これまでに、2-MF の標的臓器である肝臓の *in vivo* 変異原性は陰性であるものの、前癌病変 (GST-P 陽性細胞巢) が増加することを報告し、2-MF は肝発がん性を有する可能性を明らかにした。本年度は、*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、フラン骨格化合物の標的臓器における遺伝毒性をより詳細に検討した。

B. 研究方法

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)

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。

実験⑤： 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。

実験⑥： 6週齢の雄性 F344 系 *gpt delta* ラット（日本 SLC）に遺伝毒性肝発がん物質として estragole (ES)、遺伝毒性非肝発がん物質として aristolochic acid (AA) をそれぞれ 150 mg/kg 体重および 0.3 mg/kg 体重の用量で週 7 日、強制経口投与し、非遺伝毒性肝発がん物質として β -naphthoflavone (BNF) および barbitol (BT) をそれぞれ 5000 および 2500 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、2 週間の休薬後に diethylnitrosamine (DEN) を 10 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与した。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 投与の 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 13 週間後に動物を屠殺・解剖した。解剖時、残存肝組織の一部を 10% 中性緩衝ホルマリン液に浸漬固定し、残りの組織を遺伝子解析用に液体窒素で急速凍結し保存した。ホルマリン固定した残存肝組織を用いて常法に従いパラフィン標本を作製し、全例について抗 GST-P 抗体を用いた免疫組織化学染色を施して GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を行った。また ES 群および AA 群については、残存肝における肝細胞の細胞増殖活性を評価する目的で、パラフィン標本において抗 PCNA 抗体を用いた免疫組織化学染色を実施して PCNA 陽性細胞率を算出し、さらに凍結サンプルより total RNA を抽出し、リアルタイム PCR により細胞周期関連遺伝子である *Cyclin A2*, *Cyclin B1*,

Cyclin E1 および *E2f1* の mRNA 発現量を測定した。リアルタイム PCR の内在性コントロールには、*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* を用いた。

腎臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発（梅村）

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（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③： 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、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。

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 (小川)

2-メチルフラン (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。

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： 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。

実験④： 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 70µm 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）

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

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)

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。

実験⑤： 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。

実験⑥： ES 群および 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では、対照群と比較して ES 群において A:T-C:G transversion および A:T-G:C transition 変異頻度の有意な上昇がみられ、AA 群においては A:T-T:A transversion の有意な上昇が認められた。ES 群における GST-P 陽性細胞巢の数および面積、BNF 群および BT 群における GST-P 陽性細胞巢の数が対照群と比して有意な高値を

示した。また、BNF 群および BT 群における GST-P 陽性細胞巢の面積は、有意差は認められなかったものの、対照群と比較して明らかな増加を示した。PCNA 免疫染色の結果、ES 群では対照群と比して PCNA 陽性細胞率の有意な増加が認められた一方で、AA 群においては対照群と比較して差はみられなかった。リアルタイム PCR の結果、検索したいずれの遺伝子においても、ES 群において対照群と比して有意な mRNA 発現量の増加を認めた一方で、AA 群においては対照群と比較して差はみられなかった。

腎臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発 (梅村)

実験①： 雄性 F344 ラットの片側腎摘出後の残存腎について、近位尿管細管、近位直尿管細管および遠位尿管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、近位尿管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、遠位尿管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、近位直尿管細管においても、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 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た。実験③： 切除腎における *gpt* assay の結果、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。病理組織学的解析により算出した前腫瘍性病変について、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については、近位尿管細管上皮における石灰沈着が PDP 群においてみられた。DL 群では近位尿管細管において $\alpha_2\text{-globulin}$ 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。

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 (小川)

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。

実験④： 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。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。肝臓の病理組織学的検査の結果、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。肝臓における GST-P 陽性細胞巢の定量解析の結果、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。肝臓におけるレポーター遺伝子変異原性試験の結果、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。肝細胞を用いた *in vivo* 小核試験の結果、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

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)

本実験は、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。DEN 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、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。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ことから、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、研究を進めた。

次いで、その回避を目的とした改良プロトコ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。

その改良プロトコールを用いた新規試験
法の有用性について検証した。その結果、
切除肝における *gpt assay* では ES 群およ
び AA 群において *gpt MF* の有意な上昇が
みられ、残存肝における GST-P 陽性細胞
巢の定量的解析では ES 群、BNF 群および
BT 群において GST-P 陽性細胞巢の有意な
増加を認めた。これらの結果は、それぞ
れの発がん物質の Mode of Action を反映し
ているものと考えられた。また、AA は非発
がん標的臓器である肝臓において *in vivo*
変異原性を示したことに着目し、切除肝に
おいて同様に *in vivo* 変異原性を示した肝
発がん性を有する ES 群の結果と比較し
た。変異スペクトラム解析において、ES
群では A:T-C:G transversion および A:T-
G:C transition 変異頻度の有意な上昇がみ
られ、これらの結果は ES 投与によってラ
ット肝臓に形成される DNA 付加体の内、
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。一方、AA 投与によりラット肝臓
において形成される AA 特異的 DNA 付加
体は、主に deoxyadenosine 付加体である
ことが知られており、本研究においても
AA 群では A:T-T:A transversion 変異頻度の
有意な上昇がみられた。また、AA は発がん
標的臓器である腎臓においても、AA 特
異的 deoxyadenosine 付加体を形成し、同
様の遺伝子突然変異を誘発するという報告

がある。従って、ES あるいは AA を投与
されたラットの肝臓と AA を投与されたラ
ットの腎臓における遺伝毒性発現機序に大
きな差異はないものと考えられた。そこ
で、過去に実施された網羅的遺伝子発現解
析の結果から、AA を投与されたラットに
おいて、腎臓で発現上昇のみられた細胞周
期関連遺伝子の数が肝臓と比較して多かつ
たという事実を踏まえ、細胞周期関連因子
をより詳細に両群間で比較した。ES 群お
よび AA 群の残存肝において *Cyclin A2*,
Cyclin B1, *Cyclin E1* およびその転写因子
である *E2f1* の mRNA 発現量を測定した結
果、何れの遺伝子においても、ES 群では
有意な上昇を示したが、AA 群では変化が
みられなかった。また、肝細胞の PCNA
陽性細胞率も ES 群においてのみ有意な上
昇を示した。以上より、肝臓において AA
は ES と同様に変異原性を示すものの、細
胞増殖活性を亢進させないことが明らかと
なった。遺伝子突然変異の生じた細胞が腫
瘍細胞に形質転換するためには、細胞分裂
による変異の固定が必須であると考えられ
ている。本実験でも示された通り、AA 単
独投与により肝臓における GST-P 陽性細
胞巢の増加は観察されないことが知られて
いるが、AA を投与後、肝プロモーター物
質を処置することにより、GST-P 陽性細
胞巢の形成が促進されたという報告もあ
る。以上より、AA が肝臓において細胞増
殖亢進作用を有していないことが AA の肝
臓における非発がん性の一因である可能性
が示された。本試験法においては化学物質
の *in vivo* 変異原性およびプロモーション
活性の評価に加え、切除肝組織あるいは残
存肝組織を用いて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考えられた。さらに本試験法においては、遺伝毒性は示すものの発がん性は示さない、いわゆる潜在性発がん物質の検出にも有用であることが示された。

腎臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発（梅村）

最初に、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。

次に、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ルを確立し、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。肝臓における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法において、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が示されたことから、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。

次いで、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について、これ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。

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（小川）

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。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。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。*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した。

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。

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。