

201522025A

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

遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の
確立と香料の安全性評価への応用に関する研究

(H27-食品-一般-003)

平成 27 年度総括・分担研究報告書

研究代表者 西川 秋佳

平成 28(2016)年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

- 遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の確立と香料の安全性
評価への応用に関する研究 ----- 1
西川 秋佳

II. 分担研究報告

1. *gpt delta* ラットを用いた肝短期遺伝毒性・発がん性試験法
(GPGモデル) による遺伝毒性及び発がん性の検索 ----- 7
西川 秋佳・梅村 隆志
2. Elemicin の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験による評価
西川秋佳・小川久美子 ----- 18

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 28

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）
遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の確立と香料の安全性評価への応用に関する研究
平成 27 年度総括研究報告書

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

本研究は香料の迅速かつ安全性評価手法の推進に資することを目的とし、香料を対象として、我々が開発してきた *gpt delta* ラットを用いた遺伝毒性・発がん性短中期包括的試験法により新規評価系としての可能性を検討する。本研究では、JECFA において遺伝毒性に対する懸念から評価保留となっているフルフリルアルコール類、フラン類ないしアルコキシベンゼン類から試験対象とする香料を使用実態および入手の可能性を総合的に判断して選定する。化学構造のアラートに基づいて優先順位を決め、効率的な安全性評価をめざす包括的試験法の開発は、香料を含む食品添加物、食品汚染物質、さらには広く環境化学物質の安全性確保にとって極めて有用であると考えられる。そこで、*gpt delta* ラットを用いた短期遺伝毒性・発がん性包括的試験を用いて、elemicin の一般毒性、遺伝毒性および発がん性について包括的評価を実施した。F344 ラットを用いた用量設定試験の結果、100 mg/kg 群から肝相対重量の有意な増加とび慢性の肝細胞肥大が、400 mg/kg 群では ALT の有意な上昇が認められたことから、本試験における elemicin の用量を 25、100 および 400 mg/kg に設定した。本試験では F344 系 *gpt delta* ラットに elemicin を上記の用量で強制経口投与を開始し、現在 10 週目を経過した。試験終了後、一般毒性試験における検索項目に加え、肝臓における *in vivo* 変異原性の検索及び GST-P 陽性細胞巢の定量解析を行い、elemicin の一般毒性、遺伝毒性及び肝発がん性について総合的に評価する。また、*gpt delta* ラットを用いた肝中期遺伝毒性・発がん性試験法（GPG モデル）により、様々な側鎖を有するフラン誘導体の遺伝毒性及び発がん性を評価した。2-pentylfuran、3-(2-furyl)acrolein、2-furyl methyl ketone 及び ethyl 3-(2-furyl)propanoate の用量設定試験により最大耐量を明らかにし、GPG モデルに従い各被験物質を最大耐量で投与し、残余肝組織における肝前がん病変（GST-P 陽性細胞巢）の定量解析を実施した。その結果、2-pentylfuran 及び 2-furyl methyl ketone 投与群では GST-P 陽性細胞巢の数並びに面積が増加したが、3-(2-furyl)acrolein 及び ethyl 3-(2-furyl)propanoate 投与群では増加しなかったことから、フラン誘導体の肝発がん性はフラン環に付随する側鎖によって異なっていた。今後、切除肝を用いた *in vivo* 変異原性の検索を実施し、フラン誘導体の肝発がん性への遺伝毒性機序の関与と、側鎖の違いが及ぼす影響を明らかにする。

キーワード： 遺伝毒性、発がん性、包括的試験法、香料、安全性評価

A. 研究目的

香料は合成香料と天然香料に大別され、前者は指定制度の対象であるが、後者は対象外となっている。合成香料には、個別指定品目の他に、化学構造から使用が認められているいわゆる「18類香料」と呼ばれる3000を超える品目が例示されているが、我が国で使用されている全てが網羅されているとは言えない。しかも、その「18類香料」の中の一つ3-アセチル-2,5-ジメチルチオフェンは、明確な*in vivo*遺伝毒性を示すことことから欧米および我が国において一昨年使用禁止措置がとられた。天然香料の中にも、安全性が懸念されるものが含まれており、エストラゴールによるラット肝発がん性に遺伝毒性が関与していることをこれまで我々は明らかにしている。このように、指定の対象にかかわらず、香料の安全性が十分に担保されているとはいえない現状がある。国際的な食品添加物の安全性評価委員会であるJECFAでは、TTCとMOEを駆使した独特の手法により、数多くの香料を評価しているが、遺伝毒性がないことが前提になっている。この前提は、2016年3月に食品安全委員会が策定した香料に関する食品影響評価指針でも同様である。一方、これまでの我が国の国際汎用香料の評価には、当該物質の90日間試験と遺伝毒性試験が必須となっていた。このような背景から、EU等におけるポジティブ制度導入の動きともあいまって、我が国で現在使用されている香料の安全性を可及的速やかに確認する必要がある。本研究は、香料の迅速かつ安全性評価手法の推進に資することを目的とする。

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* 動物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、香料を対象として、我々が開発してきた *gpt delta* ラットを用いた遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法により新規評価系としての可能性を検討する。本試験

法では発がん性・遺伝毒性を迅速に一つの試験で検出可能にしたことが独創的な点である。遺伝毒性の検索に部分的肝切除によって採取した臓器を活用することも本研究の特色の一つである。本研究では、JECFA において遺伝毒性に対する懸念から評価保留となっている香料を試験対象とする。

B. 研究方法

B-1) Elemicin の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験による評価

B-1-1 材料及び試薬

Elemicin は Combi-Blocks 社から購入した。

B-1-2 用量設定試験

雄性 6 週齢の F344 ラット 12 匹を日本エスエルシー株式会社より購入し、CRF-1 固型基礎飼料（オリエンタル酵母工業株式会社）と水道水で飼育した。動物の飼育はバリヤーシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数 18 回/時（オールフレッシュ）、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯であり、この条件下で飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 3 匹ずつ収納し、床敷は三共ラボサービス社（東京）のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、飼料及び水道水は試験期間中、自由に摂取させた。ラット 12 匹を各群 3 匹に配し、対照群と低、中間及び高用量群の計 4 群を設けた。高用量群の投与量は、ラット急性経口毒性試験の半数致死率 (LD_{50}) 濃度 (980 mg/kg 体重) を参考に、その約半分である 400 mg/kg 体重に設定し、中間用量、低用量群は公比 2 で除した 200 及び 100 mg/kg 体重とし、4 週間強制経口投与した。対照群には溶媒であるコーンオイルを投与した。試験期間中、飲水及び飼料の交換は週 1 回、一般状態観察を連日実施し、体重および摂餌量測定は週 1 回実施した。投与開始から 29 日目にイソフルラン麻

酔下にて腹部大動脈より採血し、血清生化学的検査に供した。また、主要臓器（肝臓、腎臓、脾臓および肺）を採取し、重量測定後、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、常法に従いパラフィン切片を作製後、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。

B-1-3 本試験

雄性6週齢のF344系 *gpt del* ラット、40匹を日本エスエルシー株式会社より購入し、各群10匹に配し、対照群と低、中間及び高用量群の計4群を設けた。Elemicinの用量は用量設定試験の結果からそれぞれ25、100及び400 mg/kg体重に設定し、13週間（7日/週）強制経口投与した。対照群には、溶媒であるコーンオイルを投与した。試験期間中、飲水及び飼料の交換は週1回、一般状態観察を連日実施し、体重および摂餌量測定は週1回実施した。解剖時にはイソフルラン麻酔下で腹大動脈より採血し、血液および血清生化学的検査を実施した。また、主要臓器について重量測定を行い、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。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* assay) に供した。

B-1-4 統計学的処理

体重、臓器重量及び血清生化学的検査の統計学的解析では、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。

B-2) *gpt del* ラットを用いた肝短期遺伝毒性・発がん性試験法 (GPGモデル) による遺伝毒性及び

発がん性の検索

B-2-1 材料及び試薬

2-Pentylfuran、3-(2-furyl)acrolein、2-furyl methyl ketone 及び ethyl 3-(2-furyl)propanoate は Sigma-Aldrich 社から購入した。

B-2-2 用量設定試験

雄性6週齢のF344ラット39匹を日本エスエルシー株式会社より購入し、CRF-1固型基礎飼料（オリエンタル酵母工業株式会社）と水道水で飼育した。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数18回/時（オールフレッシュ）、12時間蛍光灯照明/12時間消灯であり、この条件下で飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに3匹ずつ収納し、床敷は三共ラボサービス社（東京）のソフトチップを用い、週2回交換を行った。また、飼料及び水道水は試験期間中自由に摂取させた。ラット39匹を各群3匹に配し、対照群と各被験物質の低、中間及び高用量群を含めた計13群を設けた。各被験物質の投与量は過去の毒性試験情報を元に投与用量を設定し、2-pentylfuran は25、100及び400 mg/kg体重、3-(2-furyl)acrolein は100、200及び400 mg/kg体重、2-furyl methyl ketone は25、50及び100 mg/kg体重、ethyl 3-(2-furyl)propanoate は500、700及び1000 mg/kg体重で4週間強制経口投与した。対照群には溶媒であるコーンオイルを投与した。投与期間中、飼料はCRF-1固型飼料を自由に摂取させ、週1回体重及び摂餌量を測定した。解剖時には肝臓重量を測定後、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、常法に従いパラフィン切片を作製後、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して病理組織学的検査に供した。

B-2-3 本試験

雄性6週齢のF344系 *gpt del* ラット、90匹を日

本エスエルシー株式会社より購入し、各群 15 匹に配し、対照群、各被験物質及び陽性対照群の計 6 群を設けた。被験物質の投与量は予備試験の結果から得られた最大耐量とし、2-pentylfuran は 100 mg/kg 体重、3-(2-furyl)acrolein は 400 mg/kg 体重、2-furyl methyl ketone は 25 mg/kg 体重、ethyl 3-(2-furyl)propanoate は 1000 mg/kg 体重とした。陽性対照群として、estragole を 150 mg/kg 体重の用量で、対照群には溶媒であるコーンオイルを強制経口投与した。GPG モデル標準実験プロトコールに従い、被験物質を 4 週間の反復強制経口投与後、2 週間の休薬を行った。また、投与開始 6 週目に *N*-diethylnitrosamine を 10 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与し、その 18 時間前に 2/3 部分肝切除を施した。7 週目から被験物質の投与を再開し、13 週目まで反復投与を行った。投与期間中、飼料は CRF-1 固型飼料を自由に摂取させ、週 1 回体重及び摂餌量を測定した。投与開始 13 週目の最終解剖時に肝臓を採材し、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 GST-P 免疫染色を行い、GST-P 陽性細胞巢の定量解析を実施した。

B-2-4 統計学的処理

体重、摂餌量、臓器重量及び GST-P 陽性細胞巢の定量解析に関する統計学的処理は、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 の多重比較検定或いは Tukey の多重範囲検定により各群の有意差を解析した。

(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

C-1) Elemicin の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験による評価

C-1-1 用量設定試験

試験期間中、動物の一般状態に変化は認められず、途中死亡例も認められなかった。試験期間中の体重の推移について、400 mg/kg 投与群では投与 1 週目から対照群に比して体重の有意な低値が認められた。また、200 mg/kg 投与群では有意な差はなかったものの、投与開始 1 週目から体重増加抑制が認められた。最終体重は 200 mg/kg 群以上で低値となり、400 mg/kg 群では有意な低値となった。一方、肝実重量は全ての投与群において上昇傾向が認められ、相対重量は 100 mg/kg 群から有意な上昇を示した。なお、他の臓器において重量の変化は認められなかった。血清生化学的検査結果について、ALT の有意な増加は 200 mg/kg 群から認められ、用量依存的に増加した。また、400 mg/kg 群では総コレステロール値の有意な上昇が認められた。また、200 mg/kg 群では尿素窒素の有意な低値とナトリウム値の有意な高値が認められたものの、これらの変化に用量相関性は認められなかった。病理組織学的検索の結果、肝臓においてび漫性の肝細胞肥大が 100 mg/kg 群から認められ、400 mg/kg 群ではその程度が増強した。なお、他の主要臓器において投与に伴う組織学的変化は認められなかった。

C-1-2 本試験

現在、投与開始後 10 週を経過した。期間中、動物の一般状態に変化は認められず、途中死亡例も認められていない。また、400 mg/kg 群では体重増加抑制が認められ、投与 1 週目から対照群に比し

て有意な低値を示した。

C-2) *gpt delta* ラットを用いた肝短期遺伝毒性・発がん性試験法 (GPG モデル) による遺伝毒性及び発がん性の検索

C-2-1 用量設定試験

2-Pentylfuran の高用量群の全例並びに 2-furyl methyl ketone の中間用量群の 1 例及び高用量群の全例において投与開始 6 日目までに死亡例が認められた。試験期間中の体重の推移について、2-Furyl methyl ketone 投与群では低用量及び中間用量の生存例において投与 1 週目に対照群に比して体重の低値が認められたものの、2 週目以降の体重増加量は対照群と同様の割合で推移した。Ethyl 3-(2-furyl)propanoate 投与群では高用量において投与 2 週目から対照群に比して低値が認められた。2-Pentylfuran 及び 3-(2-Furyl)acrolein 投与群において顕著な変化は認められなかった。試験期間中の摂餌量について、2-Furyl methyl ketone 投与群の低用量及び中間用量において投与開始 1 週目に対照群に比して摂餌量の顕著な低値が認められた。最終体重及び肝重量について、2-pentylfuran 投与群の低用量では相対重量の、中間用量では実重量と相対重量の有意な増加が認められた。3-(2-furyl)acrolein 投与群の中間用量では相対重量の、高用量では実重量と相対重量の有意な増加が認められた。さらに、Ethyl 3-(2-furyl)propanoate 投与群の低用量では相対重量の、中間用量以上では実重量と相対重量の有意な増加が認められた。病理組織学的検査の結果、2-pentylfuran、及び ethyl 3-(2-furyl)propanoate 投与群では低用量から、3-(2-furyl)acrolein 投与群では高用量において、肝細胞肥大又は肝細胞質の好酸性変化が認められた。また、2-furyl methyl ketone 投与群では低用量から肝細胞質の好酸性変化が認められた。これらの結果から、2-pentylfuran の中用量 (100 mg/kg)、3-(2-furyl)acrolein の高用量 (400 mg/kg)、2-furyl

methyl ketone の低用量 (25 mg/kg)、ethyl 3-(2-furyl)propanoate の高用量 (1000 mg/kg) を各被験物質の最大耐量と判断し、本試験の投与量とした。

C-2-2 GPG 本試験

2/3部分肝切除実施後の投与開始から7週目以降に、対照群の1例、2-pentylfuran群の1例、3-(2-furyl)acroleinの4例、2-furyl methyl ketone群の2例、ethyl 3-(2-furyl)propanoate群の6例、estragole群の2例において途中死亡が認められた。試験期間中の体重の推移は、2-pentylfuran群以外の全ての群において投与開始1週目から対照群に比して低値が認められた。摂餌量は、いずれの投与群においても投与期間を通じて明らかな変化は認められなかった。GST-P陽性細胞巢の検索の結果、対照群に比して2-pentylfuran群及びestragole群でその数及び面積の有意な増加が認められ、2-furyl methyl ketone群ではそれらの増加傾向が認められた。

D. 考察

Elemicin の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験を実施するため、4 週間の用量設定試験を行った結果、100 mg/kg 群から肝重量の増加とび慢性の肝細胞肥大が認められ、400 mg/kg 投与群では肝毒性パラメーターである ALT の有意な上昇が認められた。以上より、肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験における低、中間量及び高用量をそれぞれ 25、100 及び 400 mg/kg 体重に設定した。本試験では、体重は 400 mg/kg 群において増加抑制が認められているものの、100 mg/kg 群以下では対照群と同様に推移している。試験終了後、一般毒性試験における検索項目に加え、肝臓における *in vivo* 変異原性の検索及び GST-P 陽性細胞巢の定量解析を行い、elemicin の一般毒性、遺伝毒性及び肝発がん性を総合的に評価する。

側鎖構造の異なる複数のフラン誘導体について GPGモデルによる13週間投与を行った結果、

2-pentylfuran及び2-furyl methyl ketoneの最大耐量投与によりGST-P陽性巢の数及び面積の有意な増加或いは増加傾向が認められた。このことから、2-pentylfuran及び2-furyl methyl ketoneは基本骨格であるフランと同様にラット肝発がん性を有する可能性が示唆された。一方、3-(2-furyl)acrolein及びethyl 3-(2-furyl)propanoate投与群ではGST-P陽性細胞巢の増加が認められなかったことから、同様にフラン環を有する化学物質であっても側鎖の違いにより発がん性が異なることが明らかになった。今後、部分肝切除時に採取した肝組織を用いて*in vivo*変異原性の検索を実施し、フラン誘導体の肝発がん性並びにその発現機序への遺伝毒性機序の関与を明らかにして、側鎖の違いがそれらに及ぼす影響について考察する。

E. 結論

肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験の用量設定試験から、elemicinが他のアルコキシベンゼン類と同様に肝細胞肥大を引き起こすことが明らかになった。その結果をもとに、本試験における投与量を25、100及び400 mg/kg体重に設定し、本試験を開始した。

側鎖構造の異なる複数のフラン誘導体についてGPGモデルによる評価を行った結果、2-pentylfuran及び2-furyl methyl ketoneはラットに肝発がん性を有する可能性が示された。一方、3-(2-furyl)acrolein及びEthyl 3-(2-furyl)propanoateではGST-P陽性細胞巢の増加は認められなかったことから、フラン誘導体の肝発がん性は側鎖構造により異なることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果

G-1. 発表論文

なし

G-2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

参考文献

- (1) 橋本和則、岡田 稔、丸野政雄、細辛の原植物の成分分析, *Natural Medicines* 48, 39-48 (1994).
- (2) 前田阿紀、谷本真一、阿部 智、風間舜介、谷澤久之、野村正人、ナツメグ (*Myristica fragrans* Houttuyn) 種子中の化学成分とその生理活性について, *YAKUGAKU ZASSHI* 128, 129-33 (2008).
- (3) Hasheminejad G, Caldwell J, Genotoxicity of the alkenylbenzenes alpha- and beta-asarone, myristicin and elemicin as determined by the UDS assay in cultured rat hepatocytes, *Food Chem. Toxicol.*, 32, 223-31 (1994).
- (4) De Vincenzi M, De Vincenzi A, Silano M, Constituents of aromatic plants: elemicin, *Fitoterapia*, 75, 615-18 (2004).

Ⅱ. 分担研究報告

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）
分担研究報告書

遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の確立と
香料の安全性評価への応用に関する研究

分担研究課題： *gpt delta* ラットを用いた肝短期遺伝毒性・発がん性試験法（GPG モデル）
による遺伝毒性及び発がん性の検索

研究分担者： 西川 秋佳 所属 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
梅村 隆志 所属 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

様々な香料物質の基本骨格であるフランはラット肝発がん性を有することから、フラン誘導体には発がん性の懸念があるが、遺伝毒性及び発がん性に関する報告は少ない。そこで本研究では、*gpt delta* ラットを用いた肝中期遺伝毒性・発がん性試験法（GPG モデル）により、様々な側鎖を有するフラン誘導体の遺伝毒性及び発がん性を評価した。本年度は、被験物質として用いる 2-pentylfuran、3-(2-furyl)acrolein、2-furyl methyl ketone 及び ethyl 3-(2-furyl)propanoate の用量設定のため、これらの 4 週間反復投与試験を行い各被験物質の最大耐量を明らかにした。次に、GPG モデルに従い各被験物質を最大耐量で投与し、投与終了後の残余肝組織における肝前がん病変（GST-P 陽性細胞巢）の定量解析を実施した。その結果、2-pentylfuran 及び 2-furyl methyl ketone 投与群では GST-P 陽性細胞巢の数並びに面積が増加し、これら 2 剤の肝発がん性が疑われた。一方、3-(2-furyl)acrolein 及び ethyl 3-(2-furyl)propanoate 投与群では GST-P 陽性細胞巢の増加は認められなかったことから、フラン誘導体の肝発がん性はフラン環に付随する側鎖によって異なることが明らかになった。今後、切除肝を用いた *in vivo* 変異原性の検索を実施し、フラン誘導体の肝発がん性への遺伝毒性機序の関与と、側鎖の違いが及ぼす影響について明らかにする。

A. 研究目的

現在香料として様々な化学物質が使用されているが、それらの生体影響については不明な点が多く、安全性が十分に担保されていないものも多数含まれている。本研究では香料の迅速な安全性評価の推進に貢献することを目的として、香料として使用されているフラン誘導体の遺伝毒性及び発がん性の有無を検討する。様々な香料物質の基本骨格であるフランは、げっ歯類において肝発がん性を有することが知られている。また、ラット肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験系において、フラン環の開環により代謝物 *cis*-2-butene-1, 4-dial を生成し、

DNA 付加体を形成することから、フランの肝発がん性には遺伝毒性機序の関与が疑われている。しかしながら、フランは種々の遺伝毒性試験において陰性であることに加え、我々が実施した *gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性試験においても、肝臓における突然変異誘発は認められなかったことから、その発がん機序は未だ明らかになっていない。一方、フラン環を基本骨格とする多数のフラン誘導体はフランと同様に発がん性が懸念されるという理由から、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）において香料としての使用は「評価保留」とされているが、これらフラン誘

導体の遺伝毒性及び発がん性に関する報告はほとんどない。

我々はこれまでに、任意の臓器における *in vivo* 変異原性が検索可能なレポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットを用いて、肝臓における遺伝毒性及び発がん性を同時に評価することが可能な肝中期遺伝毒性・発がん性試験法（GPG モデル）を開発してきた。そこで本研究では、フラン誘導体のうち側鎖にアルキル基を有する 2-pentylfuran、アルデヒド基を有する 3-(2-furyl)acrolein、ケトン基を有する 2-furyl methyl ketone、エステル構造を有する ethyl 3-(2-furyl)propanoate について GPG モデルを用いて、その遺伝毒性及び発がん性を明らかにするとともに、側鎖の違いがそれらに及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

B-1. 材料及び試薬

2-Pentylfuran、3-(2-furyl)acrolein、2-furyl methyl ketone 及び ethyl 3-(2-furyl)propanoate は Sigma-Aldrich 社から購入した。

B-2. 用量設定試験

雄性 6 週齢の F344 ラット 39 匹を日本エスエルシー株式会社より購入し、CRF-1 固型基礎飼料（オリエンタル酵母工業株式会社）と水道水で飼育した。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数 18 回/時（オールフレッシュ）、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯であり、この条件下で飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 3 匹ずつ収納し、床敷は三共ラボサービス社（東京）のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、飼料及び水道水は試験期間中自由に摂取させた。ラット 39 匹を各群 3 匹に配し、対照群と各被験物質の低、中間及び高用量群を含めた計 13 群を設けた。各被験物質の投与量は過去の毒性試験情報を元に投与用量を設定し、2-pentylfuran は 25、100 及び

400 mg/kg 体重、3-(2-furyl)acrolein は 100、200 及び 400 mg/kg 体重、2-furyl methyl ketone は 25、50 及び 100 mg/kg 体重、ethyl 3-(2-furyl)propanoate は 500、700 及び 1000 mg/kg 体重で 4 週間強制経口投与した。対照群には溶媒であるコーンオイルを投与した。投与期間中、飼料は CRF-1 固型飼料を自由に摂取させ、週 1 回体重及び摂餌量を測定した。解剖時には肝臓重量を測定後、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、常法に従いパラフィン切片を作製後、ヘマトキシリンエオジン染色を施して病理組織学的検査に供した。

B-3. GPG モデルによるフラン誘導体の評価

雄性 6 週齢の F344 系 *gpt delta* ラット、90 匹を日本エスエルシー株式会社より購入し、各群 15 匹に配し、対照群、各被験物質及び陽性対照群の計 6 群を設けた。被験物質の投与量は予備試験の結果から得られた最大耐量とし、2-pentylfuran は 100 mg/kg 体重、3-(2-furyl)acrolein は 400 mg/kg 体重、2-furyl methyl ketone は 25 mg/kg 体重、ethyl 3-(2-furyl)propanoate は 1000 mg/kg 体重とした。陽性対照群として、estragole を 150 mg/kg 体重の用量で、対照群には溶媒であるコーンオイルを強制経口投与した。GPG モデル標準実験プロトコールに従い、被験物質を 4 週間の反復強制経口投与後、2 週間の休薬を行った。また、投与開始 6 週目に *N*-diethylnitrosamine を 10 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与し、その 18 時間前に 2/3 部分肝切除を施した。7 週目から被験物質の投与を再開し、13 週目まで反復投与を行った。投与期間中、飼料は CRF-1 固型飼料を自由に摂取させ、週 1 回体重及び摂餌量を測定した。投与開始 13 週目の最終解剖時に肝臓を採材し、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 GST-P 免疫染色を行い、GST-P 陽性細胞巢の定量解析を実施した。

（統計学的処理）

体重、摂餌量、臓器重量及び GST-P 陽性細胞巢の定量解析に関する統計学的処理は、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 の多重比較検定或いは Tukey の多重範囲検定により各群の有意差を解析した。

(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

C-1. 用量設定試験

2-Pentylfuran の高用量群の全例並びに 2-furyl methyl ketone の中間用量群の 1 例及び高用量群の全例において投与開始 6 日目までに死亡例が認められた。

試験期間中の体重の推移を Figure 1 に示す。2-Furyl methyl ketone 投与群では低用量及び中間用量の生存例において投与 1 週目に対照群に比して体重の低値が認められたものの、2 週目以降の体重増加量は対照群と同様の割合で推移した。Ethyl 3-(2-furyl)propanoate 投与群では高用量において投与 2 週目から対照群に比して低値が認められた。2-Pentylfuran 及び 3-(2-Furyl)acrolein 投与群において顕著な変化は認められなかった。

試験期間中の摂餌量を Figure 2 に示す。2-Furyl methyl ketone 投与群の低用量及び中間用量において投与開始 1 週目に対照群に比して摂餌量の顕著な低値が認められた。

最終体重及び肝重量を Table1 に示す。2-pentylfuran 投与群の低用量では相対重量

の、中間用量では実重量と相対重量の有意な増加が認められた。3-(2-furyl)acrolein 投与群の中間用量では相対重量の、高用量では実重量と相対重量の有意な増加が認められた。さらに、Ethyl 3-(2-furyl)propanoate 投与群の低用量では相対重量の、中間用量以上では実重量と相対重量の有意な増加が認められた。

病理組織学的検査の結果、2-pentylfuran、及び ethyl 3-(2-furyl)propanoate 投与群では低用量から、3-(2-furyl)acrolein 投与群では高用量において、肝細胞肥大又は肝細胞質の好酸性変化が認められた。また、2-furyl methyl ketone 投与群では低用量から肝細胞質の好酸性変化が認められた (Table 2)。これらの結果から、2-pentylfuran の中用量 (100 mg/kg)、3-(2-furyl)acrolein の高用量 (400 mg/kg)、2-furyl methyl ketone の低用量 (25 mg/kg)、ethyl 3-(2-furyl)propanoate の高用量 (1000 mg/kg) を各被験物質の最大耐量と判断し、本試験の投与量とした。

C-2. GPG モデルによるフラン誘導体の評価

2/3 部分肝切除実施後の投与開始から 7 週目以降に、対照群の 1 例、2-pentylfuran 群の 1 例、3-(2-furyl)acrolein の 4 例、2-furyl methyl ketone 群の 2 例、ethyl 3-(2-furyl)propanoate 群の 6 例、estragole 群の 2 例において途中死亡が認められた。試験期間中の体重の推移は、2-pentylfuran 群以外の全ての群において投与開始 1 週目から対照群に比して低値が認められた (Figure 3)。摂餌量は、いずれの投与群においても投与期間を通じて明らかな変化は認められなかった (Figure 4)。GST-P 陽性細胞巢の検索の結果、対照群に比して 2-pentylfuran 群及び estragole 群でその数及び面積の有意な増加が認められ、2-furyl methyl ketone 群ではそれらの増加傾向が認められた (Table 3)。

D. 考察

側鎖構造の異なる複数のフラン誘導体

について GPG モデルによる 13 週間投与を行った結果、2-pentylfuran 及び 2-furyl methyl ketone の最大耐量投与により GST-P 陽性巢の数及び面積の有意な増加或いは増加傾向が認められた。このことから、2-pentylfuran 及び 2-furyl methyl ketone は基本骨格であるフランと同様にラット肝発がん性を有する可能性が示唆された。一方、

3-(2-furyl)acrolein 及び ethyl

3-(2-furyl)propanoate 投与群では GST-P 陽性細胞巢の増加が認められなかったことから、同様にフラン環を有する化学物質であっても側鎖の違いにより発がん性が異なることが明らかになった。今後、部分肝切除時に採取した肝組織を用いて *in vivo* 変異原性の検索を実施し、フラン誘導体の肝発がん性並びにその発現機序への遺伝毒性機序の関与を明らかにして、側鎖の違いがそれらに及ぼす影響について考察する。

E. 結論

側鎖構造の異なる複数のフラン誘導体について GPG モデルによる評価を行った結果、2-pentylfuran 及び 2-furyl methyl ketone はラットに肝発がん性を有する可能性が示された。一方、3-(2-furyl)acrolein 及び Ethyl 3-(2-furyl)propanoate では GST-P 陽性細胞巢の増加は認められなかったことから、フラン誘導体の肝発がん性は側鎖構造により異なることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果

G-1. 発表論文

なし

G-2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

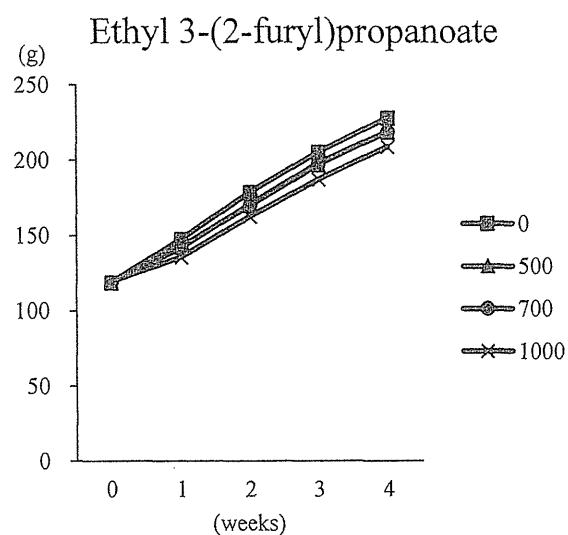
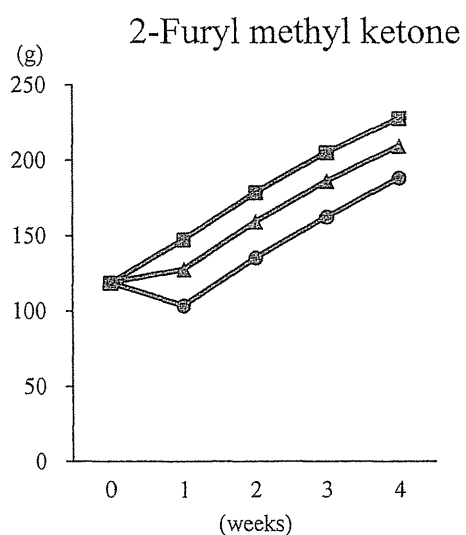
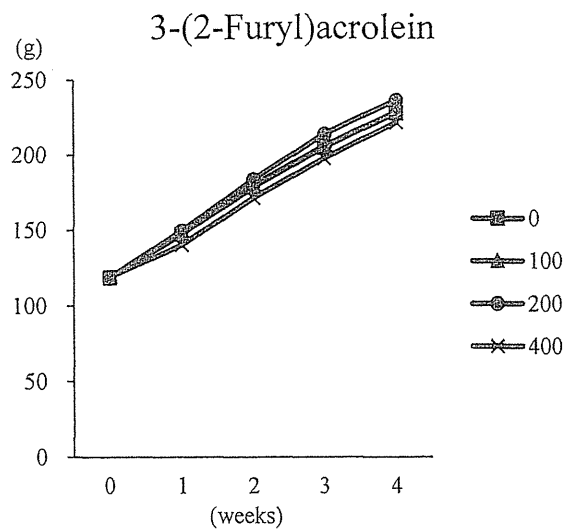
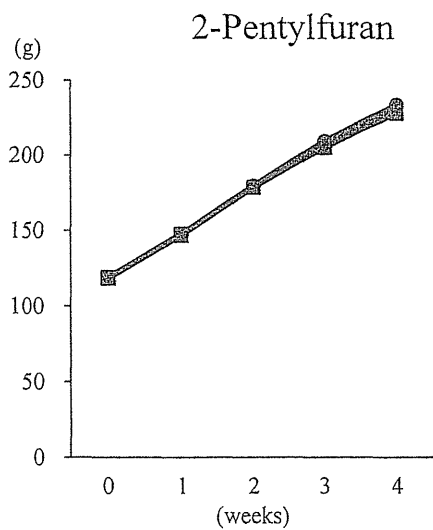


Figure 1 Body weight of F344 rats treated with 2-Pentylfuran, 3-(2-Furyl)acrolein, 2-Furyl methyl ketone and Ethyl 3-(2-furyl)propanoate for 4 weeks. (n = 3).

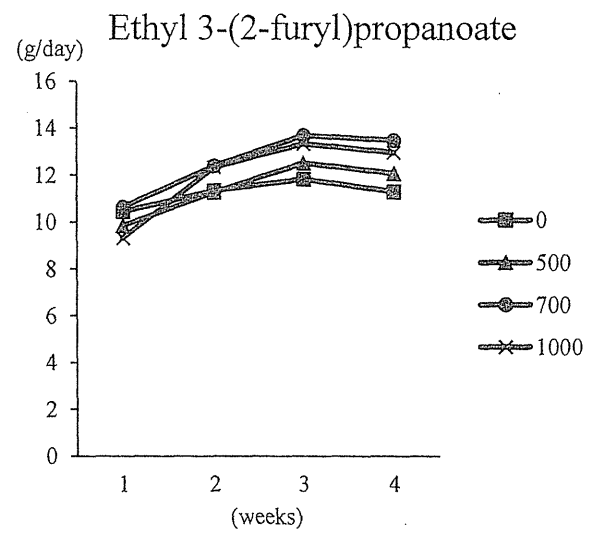
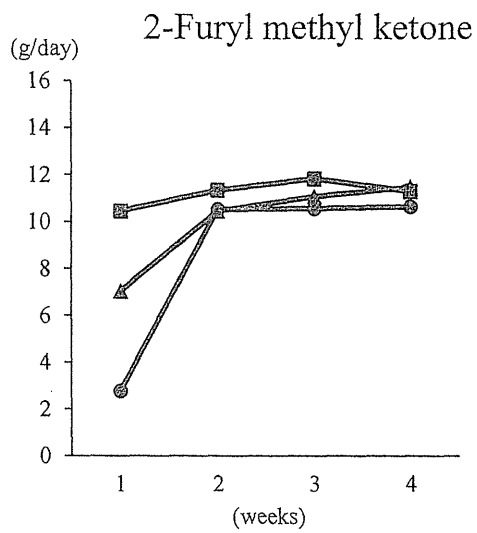
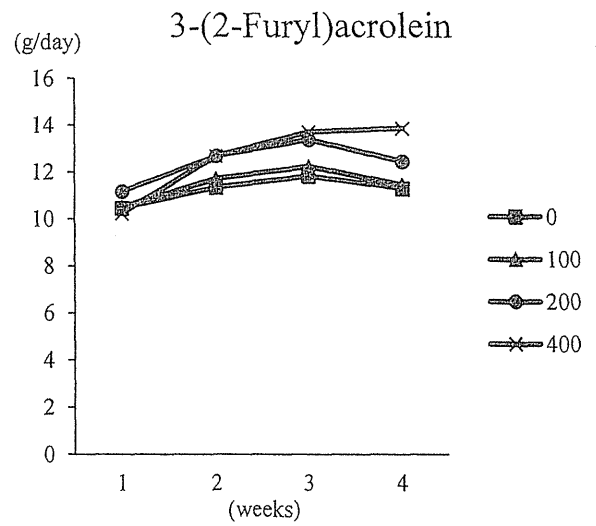
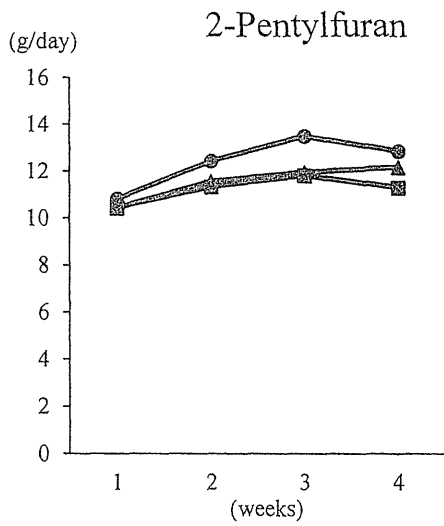


Figure 2 Food consumption of F344 rats treated with 2-Pentylfuran, 3-(2-Furyl)acrolein, 2-Furyl methyl ketone and Ethyl 3-(2-furyl)propanoate for 4 weeks. (n = 3).

Table 1 Final body weights and organ weights of F344 rats treated with 2-Pentylfuran, 3-(2-Furyl)acrolein, 2-Furyl methyl ketone and Ethyl 3-(2-furyl)propanoate for 4 weeks.

	Control	2-Pentylfuran (mg/kg)		3-(2-Furyl)acrolein (mg/kg)			2-Furyl methyl ketone (mg/kg)		Ethyl 3-(2-furyl)propanoate (mg/kg)		
		25	100	100	200	400	25	50	500	700	1000
No. of animals	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Final B. W. (g)	227.9 ± 5.3	230.2 ± 13.5	233.5 ± 2.5	228.6 ± 13.2	236.4 ± 7.5	221.4 ± 14.1	209.5 ± 2.1**	188.3 ± 2.1	218.6 ± 2.8	218.7 ± 9.5	208.7 ± 5.4*
Liver											
Absolute (g)	8.60 ± 0.23	9.38 ± 0.76	10.93 ± 0.26**	9.34 ± 0.57	10.29 ± 0.85	10.61 ± 1.10*	8.06 ± 0.27	7.39 ± 0.21	9.60 ± 0.37	10.13 ± 0.50*	11.71 ± 0.68**
Relative (%)	3.78 ± 0.07	4.07 ± 0.10**	4.68 ± 0.09**	4.09 ± 0.04	4.35 ± 0.22**	4.78 ± 0.21**	3.85 ± 0.14	3.93 ± 0.15	4.39 ± 0.15*	4.63 ± 0.08**	5.62 ± 0.37**

** , *: $p < 0.01, 0.05$ vs Control.

Table 2 Histopathological findings of F344 rats treated with 2-Pentylfuran, 3-(2-Furyl)acrolein, 2-Furyl methyl ketone and Ethyl 3-(2-furyl)propanoate for 4 weeks.

Organ	Finding	Control			2-Pentylfuran						3-(2-Furyl)acrolein						2-Furyl methyl ketone					Ethyl 3-(2-furyl)propanoate														
					25 mg/kg			100 mg/kg			100 mg/kg		200 mg/kg		400 mg/kg		25 mg/kg		50 mg/kg			500 mg/kg			700 mg/kg			1000 mg/kg								
		101	102	103	201	202	203	204	205	206	301	302	303	304	305	306	307	308	309	401	402	403	404	405	501	502	503	504	505	506	507	508	509			
Liver	Hypertrophy, hepatocellular, diffuse				±	±	±	+	+	+							±	±	±							±	±	±	±	±	±	±	±	±	+	+
	Alteration, cytoplasmic, eosinophilic				±	±	±	+	+	+							±	±	±	±	±	±	+	+				+	+	+	+	+	+	+	+	+

±: slight, +: moderate

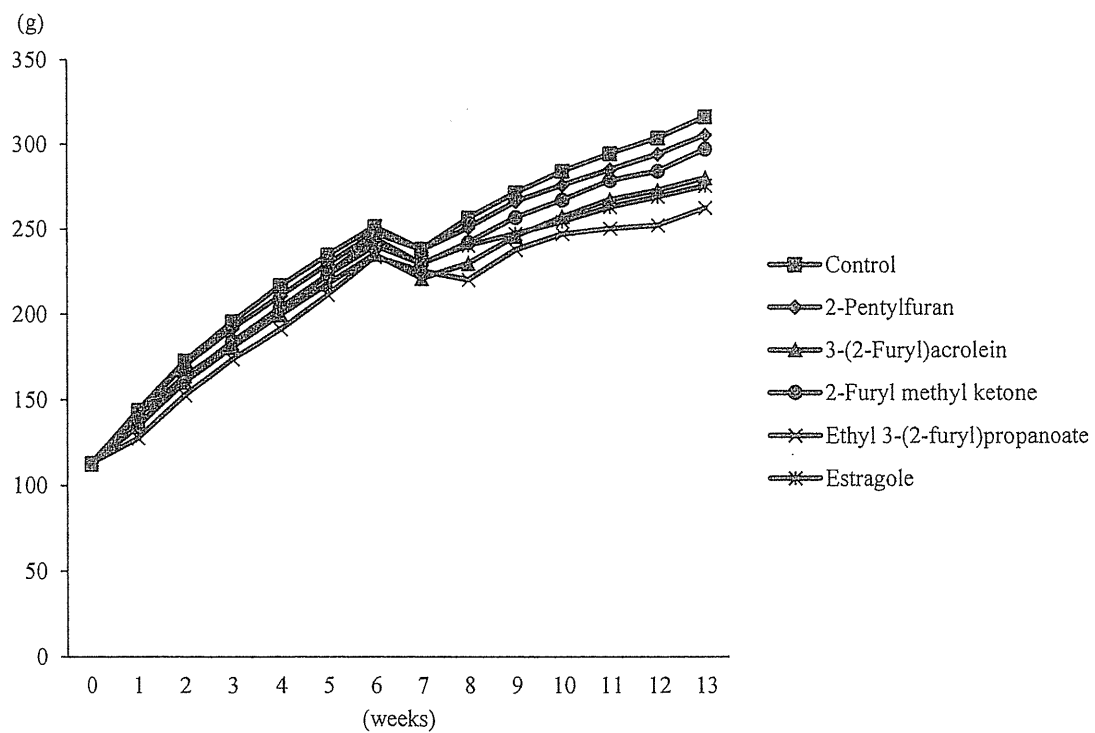


Figure 3 Body weight of *gpt* delta rats treated with 2-Pentylfuran, 3-(2-Furyl)acrolein, 2-Furyl methyl ketone and Ethyl 3-(2-furyl)propanoate for 13 weeks. (n = 15).

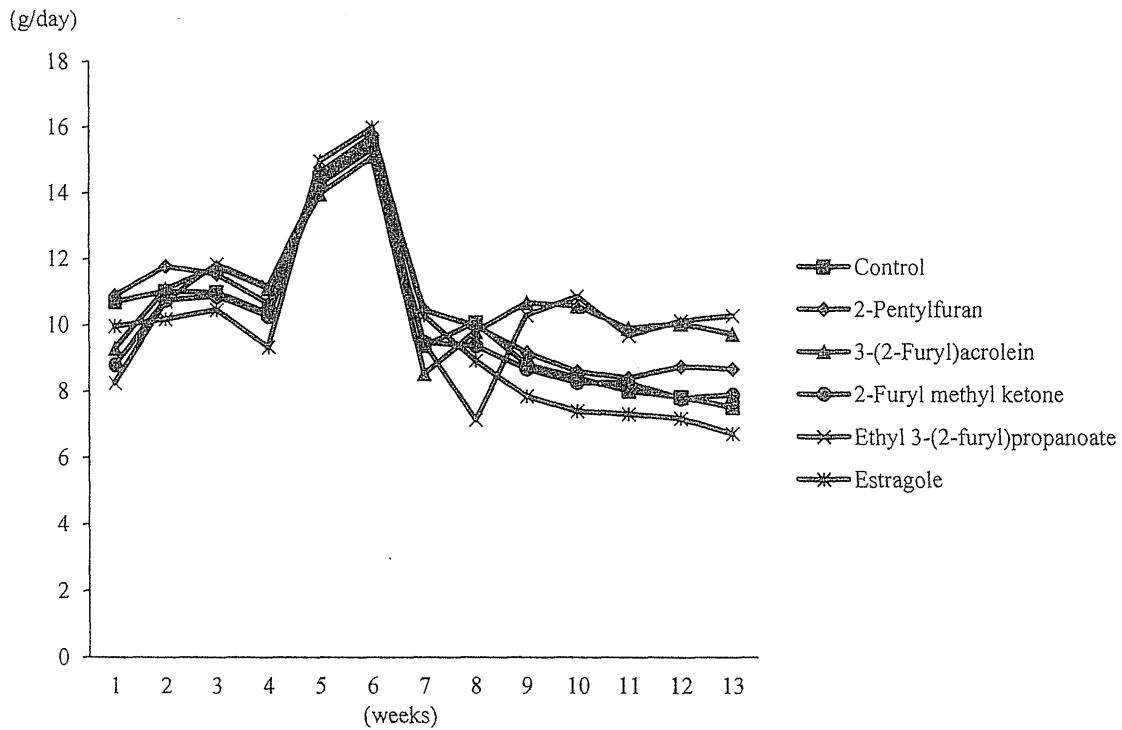


Figure 4 Food consumption of *gpt* delta rats treated with 2-Pentylfuran, 3-(2-Furyl)acrolein, 2-Furyl methyl ketone and Ethyl 3-(2-furyl)propanoate for 13 weeks. (n = 15).