

Table 3 Quantitative analysis of GST-P positive foci 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.

	No. of animals	No. of foci (No./cm <sup>2</sup> )	Area of foci (mm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> )
Control	14	2.05 ± 1.13	0.02 ± 0.01
2-Pentylfuran	14	25.88 ± 7.27*	0.71 ± 0.24
3-(2-Furyl)acrolein	11	2.66 ± 1.15	0.04 ± 0.03
2-Furyl methyl ketone	13	8.20 ± 1.88	0.15 ± 0.01
Ethyl 3-(2-furyl)propanoate	9	2.01 ± 0.89	0.08 ± 0.06
Estragole	13	88.22 ± 24.43*	6.34 ± 3.30*

\*:  $p < 0.05$  vs Control.

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・発がん性の中期的試験法の開発に関する研究

分担研究課題：Elemicin の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験による評価

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  
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

Elemicin はナツメグおよび薬用植物細辛の主成分として天然に存在するアルコキシベンゼンの一つであり、漢方薬、精油、香辛料及び香料物質として広く使用されている。アルコキシベンゼンを基本骨格とするエストラゴールはげっ歯類において肝発がん性を有することから、elemicin のヒト健康への影響が懸念されるが、毒性、遺伝毒性および発がん性に関する報告は少ない。本研究では、*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的肝細胞肥大が、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。

A. 研究目的

香料は合成香料と天然香料に大別され、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」と呼ばれる 3000 を超える品目が例示されている。しかし、この 18 類に含まれるエストラゴールは古くから齧歯類において肝発がん性が知られており、我々はこれまでにその発がん性に遺伝毒性機序が関与することを明らかにしている。また、エストラゴールの基本骨格であるアルコキシベンゼンを有するサフロール及びメチルオイゲノールについてもラット肝発がん性が確認されていることから、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）において、これらアルコキシベンゼン類の香料物質としての使用は、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。

Elemicin はナツメグ（*Myristica fragrans* houttuyn）および薬用植物細辛（*Hosokarashi*）の主成分として天然に存在するアルコキシベンゼン化合物の一つであり、漢方薬、精油、香辛料及び香料物質として広く使用されている<sup>(1, 2)</sup>。本物質は、ラット肝臓における不定期 DNA 合成（UDS）試験において陽性であるが<sup>(3)</sup>、その他の遺伝毒性試験に関する報告はない。また、ラットにおける発がん性は陰性と報告されているものの、その代謝物である 1'-水酸化体については発がん性を否定できないと結論付けられており<sup>(4)</sup>、elemicin の発がん性に関して明瞭な結論は出ていない。以上の通り、他のアルコキシベンゼン化合物がげっ歯類において肝発がん性を有することを考慮すると、elemicin のヒト健康への影響が懸念され、ヒトリスク評価に資する情報の取得が喫緊の

課題である。

一方、我々は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、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で得ることが出来る肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験法を開発してきた。本法を用いて、アルコキシベンゼン化合物であるサフロールおよびメチルオイゲノールの評価を実施した結果、何れの物質もラット肝臓において突然変異誘発及び発がん性を有することをこれまでに明らかにしている。そこで本研究では、elemicin の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験を実施して、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、ヒトリスク評価に資するデータの提供を目的としている。

## B. 研究方法

### B-1. 材料及び試薬

Elemicin は Combi-Blocks 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 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 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 ( $980 \text{ mg/kg}$  体重) を参考に、その約半分量である  $400 \text{ mg/kg}$  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  $100 \text{ mg/kg}$  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 日目にイン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-3. Elemicin の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験

雄性 6 週齢の F344 系 *gpt delta* 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  $400 \text{ mg/kg}$  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。解剖時にはインフルラン麻酔下で腹部大動脈より採血し、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 *Spi* assay) に供した。

### B-4. 統計学的解析

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、Dunnnett 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

### C-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を Figure 1 に示す。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。

最終体重および主要臓器の重量を Table 1 に示す。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を Table 2 に示す。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、肝臓において慢性の肝細胞肥大が 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 (Figure 2 及び Table 3)。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-2. Elemicin の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験

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 (Figure 3)。

## 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。

## 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 が他のアルコール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。

## 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 elimicin 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).

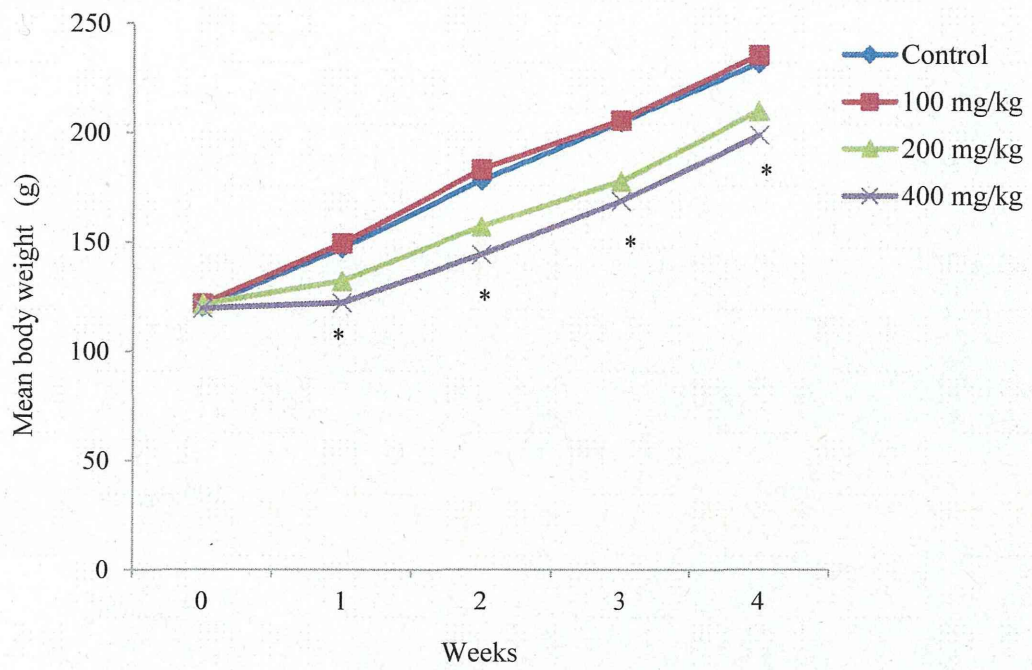
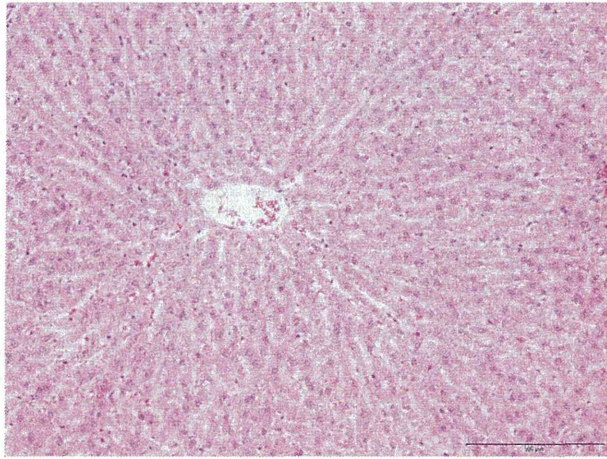
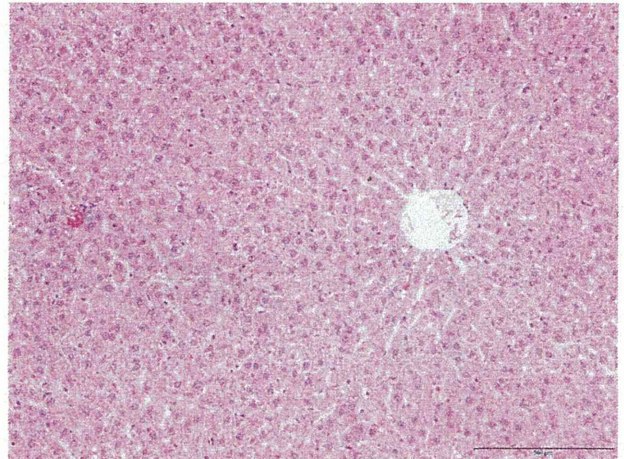


Figure 1. Mean body weight in preliminary dose finding study for 90-day oral toxicity study of elemicin. \*: Significantly different from the control group at  $p < 0.05$ .

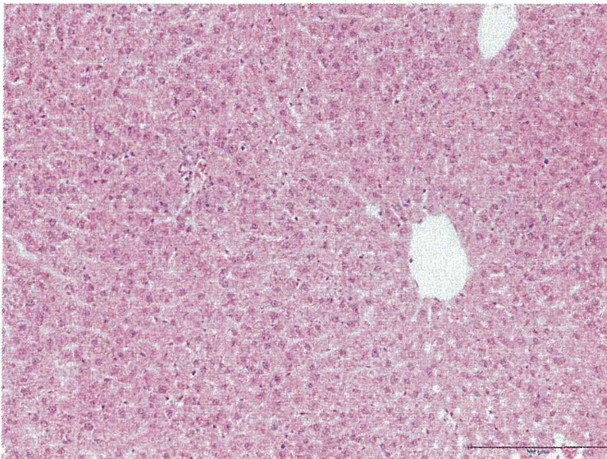




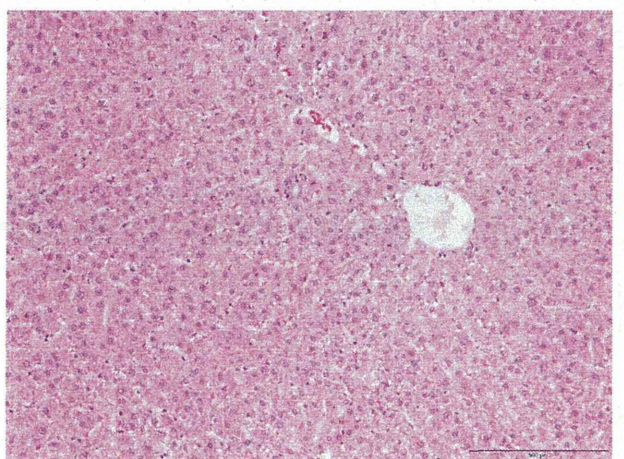
Control



100 mg/kg



200 mg/kg



400 mg/kg

Figure 2. Pathological changes in the livers of F344 rats treated with elemicin for 4 weeks.

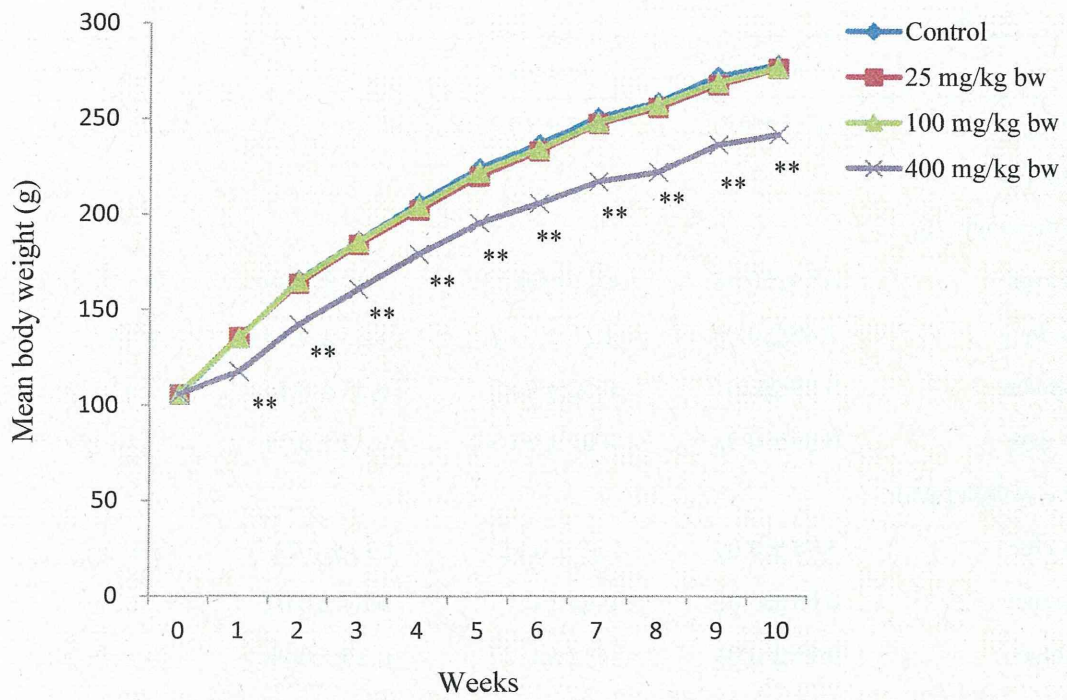


Figure 3. Mean body weight in 90-day oral toxicity study of elemicin. \*\*: Significantly different from the control group at  $p < 0.01$ .



Table 1. Mean body and organ weights in preliminary dose finding study for 90-day oral toxicity study of elemicin for 4 weeks.

	Control	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Body weight (g)	231.5±9.84	235.3±10.31	209.6±22.34	198.7±7.01*
Tissue weight (g)				
Absolute weight (g)				
Liver	8.69±0.58	10.29±0.33	9.16±1.39	9.55±0.38
Kidney	1.49±0.05	1.55±0.08	1.35±0.19	1.33±0.07
Spleen	0.49±0.01	0.52±0.03	0.57±0.16	0.43±0.01
Lung	0.85±0.03	0.87±0.03	0.72±0.24	0.76±0.03
Relative weight (g%)				
Liver	3.75±0.09	4.38±0.22**	4.35±0.22**	4.81±0.02**
Kidney	0.65±0.02	0.66±0.03	0.64±0.02	0.67±0.01
Spleen	0.21±0.01	0.22±0.00	0.27±0.08	0.22±0.01
Lung	0.37±0.01	0.37±0.01	0.34±0.10	0.38±0.01

<sup>a)</sup>: Mean±S.D

<sup>\*\*</sup>: Significantly different from the control group at p<0.05,0.01, respectively.

Table 2 Blood specimen biochemical examination of F344 rats treated with elemicin for 4 weeks.

Item	Control	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
No.of animals	3	3	3	3
TP (g/dL)	5.60±0.20	5.67±0.40	5.1±0.10	5.27±0.25
A/G	2.60±0.26	2.37±0.23	2.63±0.21	2.17±0.12
T-Bil (mg/dL)	0.02±0.01	0.02±0.02	0.02±0.01	0.01±0.01
GLU (mg/dL)	215.67±20.03	203.33±7.57	182.00±2.08	189.00±3.21
T-CHO (mg/dL)	52.67±2.08	57.00±3.46	61.00±2.08	91.00±7.21**
TG (mg/dL)	61.00±24.27	69.00±16.10	58.00±15.00	52.30±1.54
BUN (mg/dL)	12.20±1.71	12.47±0.50	8.90±1.40*	12.10±1.31
CRE (mg/dL)	0.26±0.02	0.25±0.02	0.24±0.02	0.24±0.01
Ca <sup>2+</sup> (mg/dL)	10.53±0.06	10.67±0.15	10.43±0.26	10.60±0.15
IP (mg/dL)	7.90±0.70	8.00±0.36	7.80±0.56	8.60±0.21
Na (mEQ/L)	140.00±1.00	140.67±0.58	143.00±1.15*	141.33±1.15
K (mEQ/L)	4.97±0.31	5.03±0.58	4.43±0.15	5.03±0.38
Cl (mEQ/L)	102.67±0.58	102.67±1.53	105.00±1.00	103.00±0.58
γ-GTP (IU/L)	3.00±0.00	3.00±0.00	3.00±0.00	6.00±0.58
AST (IU/L)	67.00±7.00	72.67±11.72	74.33±17.04	82.00±8.00
ALT (IU/L)	39.67±2.08	45.33±0.58	47.67±3.21*	61.30±3.79**
ALP (IU/L)	1444.67±34.79	1291.33±41.74	1284.00±145.00	1394.00±63.20
Albumin (g/dL)	4.03±0.06	3.97±0.15	3.70±0.10*	3.60±0.10**

\*\*\*: Significantly different from the control group at p<0.05,0.01, respectively.

Table 3 Hepatocyte hypertrophy grade in the livers of F344 rats treated with elemicin for 4 weeks

Group	No. of animal	Hepatocyte hypertrophy
Control	101	-
	102	-
	103	-
100 mg/kg	201	+
	202	+
	203	+
200 mg/kg	301	+
	302	+
	303	+
400 mg/kg	401	++
	402	++
	403	++

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

発表者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	該当無し						

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
	該当無し				



