

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 28 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長

研究要旨

香料の迅速な安全性評価手法を推進するため、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の新規評価系としての可能性を検討した。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の香料の中から、使用実態および入手の可能性を総合的に判断して試験対象を選定した。まず、雄性 6 週齢の F344 系 *gpt delta* ラットに elemicin を 25、100 又は 400 mg/kg 体重の用量で 13 週間強制経口投与した結果、400 mg/kg 群で最終体重が有意に低下し、肝臓及び副腎の重量、総コレステロール、 γ -GTP 及び ALT が有意に増加した。病理組織学的に、好酸性変異肝細胞巣及びび慢性肝細胞肥大が 100 mg/kg 群から認められた。肝前がん病変マーカー GST-P 陽性細胞巣の定量解析の結果、400 mg/kg 群ではその数及び面積が有意に増加した。以上より、elemicin は肝毒性を有し（無毒性量は 25 mg/kg 体重）、肝発がん性を有する可能性が示唆された。次に、6 週齢の雄性 F344 ラットに furfuryl acetate を 20、60、180 又は 540 mg/kg の濃度で 28 日間強制経口投与した結果、540 mg/kg 投与群において投与 1 日目に全例が死亡した。一方、180 mg/kg 投与群では途中死亡例は認められず、一般状態および体重推移に変化はなかった。以上より、*gpt delta* ラットを用いた furfuryl acetate の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験を 180 mg/kg/day を最高用量として実施することとした。さらに、フラン環を有し側鎖構造の異なる 2-pentylfuran、3-(2-furyl)acrolein、2-furyl methyl ketone および ethyl 3-(2-furyl)propanoate の遺伝毒性及び発がん性を *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）を用いて評価した。本年度は、GPG モデルの標準実験プロトコールに従い、レポーター遺伝子変異解析を実施し、フラン誘導体の *in vivo* 変異原性を検討した。*gpt* アッセイの結果、陽性対照である estragole 投与群の *gpt* 変異体頻度は高値傾向を示したが、3 種のフラン誘導体投与群の *gpt* 変異体頻度は変化しなかった。Spi アッセイでも同様に、有意な変化はみられなかった。しかし、これらのアッセイにおいて、解析の信頼性に必要なコロニー数又はブランク数が得られなかった個体が存在したことから、今後追加の検討を行い確定する。

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で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 試験方法

動物は5週齢の雄性 F344 *gpt delta* ラットを日本エスエルシー株式会社（静岡）から購入し、一週間の馴化後、実験に供した。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、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2または3匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス株式会社（東京）のソフトチップを用い、週2回交換を行った。また、飲料水として水道水を試験期間中自由に摂取させた。40 匹の F344 系 *gpt delta* ラットを各群 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 の用量は平成 27 年度に実施した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、溶媒であるコーン油を投与した。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。動物は、剖検日前日より一晩絶食させ、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈から採血後、屠殺・剖検した。血液学的検査は、自動血球計数装置（Sysmex M-2000、東亜医

用電子社、東京)を用いて、白血球数(WBC)、赤血球数(RBC)、ヘモグロビン(HGB)、ヘマトクリット値(HCT)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)及び血小板数(PLT)について測定した。

血清生化学的検査は、遠心分離した血清を凍結保存し、総タンパク(TP)、アルブミン・グロブリン比(A/G)、アルブミン(Alb)、総ビリルビン(T-Bil)、トリグリセリド(TG)、総コレステロール(T-Cho)、尿素窒素(BUN)、クレアチン(CRN)、ナトリウム(Na)、塩素(Cl)、カリウム(K)、カルシウム(Ca)、無機リン(IP)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST)、アラントランスアミナーゼ(ALT)、アルカリフォスタファナーゼ(ALP)、 γ -グルタミルトランスぺプチターゼ(γ -GTP)についてSRL株式会社(東京)にて測定した。

各臓器は肉眼的に観察後摘出し、脳、肺、心臓、脾臓、肝臓、腎臓及び副腎の重量を測定した。上記臓器に加え、鼻腔を含む頭蓋骨、下垂体、眼球、ハーパー腺、脊髄、唾液腺、胃、小腸、大腸、膵臓、膀胱、皮膚、乳腺、リンパ節、胸腺、気管、食道、甲状腺、舌、大腿筋、坐骨神経を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し、ヘマトキシリンエオジン染色を施し、病理組織学的検索を行った。肝臓については、glutathione-S-transferase placental form (GST-P)免疫染色を施し、GST-P陽性肝細胞巢の定量的解析を実施した。肝臓の外側左葉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-2 Furfuryl acetateの肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験による評価

B-2-1 材料及び試薬

Furfuryl alcoholは東京化成工業株式会社(東京)から購入した。

B-2-2 試験方法

*gpt delta*ラットを用いたfurfuryl acetateの包括的試験を実施するための用量設定試験を実施した。動物は5週齢の雄性F344ラットを日本エスエルシー株式会社(静岡)から購入し、一週間の馴化後、実験に供した。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに4匹ずつ収容し、上記と同様の飼育環境にて行った。20匹の雄性F344ラット各群4匹にコーン油に混じたfurfuryl acetateを20、60、180又は540 mg/kgの濃度で1日1回28日間強制経口投与した。対照群にはコーン油を投与した。試験期間中、一般状態観察を連日実施し、体重測定を投与開始3日目までは1日1回、その後は週1回実施した。

B-3 フラン誘導体の肝短期遺伝毒性・発がん性試験(GPGモデル)による評価

B-3-1 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-3-2 試験方法

雄性6週齢のF344系*gpt delta*ラット(日本エスエルシー株式会社)90匹を対照群、各被験物質投与群及び陽性対照群の計6群(各群15匹)に配した。被験物質の投与量は予備試験結果から得られた最大耐量を用いて、コーン油に混じた2-pentylfuran(100 mg/kg体重)、3-(2-furyl)acrolein(400 mg/kg体重)、2-furyl methyl ketone(25 mg/kg体重)、ethyl 3-(2-furyl)propanoate(1000 mg/kg体重)及び陽性対照群としてestragole(150 mg/kg体重)を強制経口投与した。対照群にはコーンオイルを投与した。GPGモデル標準プロトコールに従い、被験物質を4週間反復強制経口投与し、2週間の休薬を行った。投与開始6週目にDEN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。切除した肝組織は、レ

ポーター遺伝子変異頻度解析に供するまで-80で保存した。7週目から被験物質の投与を再開し、13週目まで投与を継続した。投与期間中、飼料はCRF-1固形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、Bartlett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の多重比較検定またはTukeyの多重範囲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 Elemicin の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験による評価

試験期間中、途中死亡例は認められず、動物の一般状態にも変化は認められなかった。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有意な低値が認められた。最終体重は400 mg/kg 群で対照群に比し

て有意な低値となった。一方、臓器重量では、100 mg/kg 群から肝臓及び副腎の実重量が有意に増加し、400 mg/kg 群では胸腺及び肺の実重量の有意な減少が認められた。また、100 mg/kg 群から肝臓、腎臓及び副腎の相対重量が、400 mg/kg 群では脾臓、心臓、精巣及び脳の相対重量が有意に増加した。血液学的検査では、血液量不足により対照群、25 mg/kg 群、100 mg/kg 群及び400 mg/kg 群における解析可能な個体数はそれぞれ、7、9、9及び7例となった。PLTは25 mg/kg 群から有意な増加が、400 mg/kg 群ではMCH及びband neutrophilの有意な増加が認められた。また、100 mg/kg でHGBの有意な増加が認められたが、用量相関性は認められなかった。血清生化学的検査では、400 mg/kg 群ではT-Chol、 γ -GTP、ALT、Clの有意な上昇と、CRNの有意な低下が認められた。また、25 mg/kg 群及び100 mg/kg 群においてTG、Naの有意な上昇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。病理組織学的に、肝臓では100 mg/kg 群からび慢性の肝細胞肥大と好酸性の変異肝細胞巢が認められ、肥大の程度は用量依存的に増加した。また、変異肝細胞巢の発生頻度も用量依存的に増加した。さらに、400 mg/kg 群では10例中2例で胸腺における軽度のリンパ球減少が認められた。GST-P陽性細胞巢の免疫組織化学的検索による定量解析結果、400 mg/kg 群では肝GST-P陽性細胞巢の数ならびに面積が対照群に比して有意な高値を示した。

C-2 Furfuryl acetate の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験による評価

540 mg/kg 投与群において投与1日目に全例の死亡が認められた。一方、その他の投与群においては、試験期間中に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。20、60および180 mg/kg 投与群における体重の推移は対照群に比して顕著な変化は認められなかった。

C-3 フラン誘導体の肝短期遺伝毒性・発がん性試験 (GPG モデル) による評価

gpt 及び Spi-アッセイの結果をそれぞれ Table 1 及び 2 に示す。*gpt* アッセイの結果、陽性対照群である estragole 投与群の *gpt* 変異体頻度は対照群に比べ高値を示す傾向が認められた。一方、2-pentylfuran、3-(2-furyl)acrolein、2-furyl methyl ketone および ethyl 3-(2-furyl)propanoate 投与群における *gpt* 変異体頻度は何れも対照群に比較して顕著な変化は認められなかった。Spi-アッセイの結果、すべての投与群において、対照群間に有意な変化は認められなかった。なお、今回実施した *gpt* および Spi-アッセイにおいて、解析の信頼性を担保する上で必要なコロニー数又はプラーク数が得られなかった個体がそれぞれ 3 例ずつ認められた。従って、各群の統計学的解析に当該個体を除いて実施した。

D . 考察

D-1 Elemicin の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験による評価

F344 系 *gpt* delta ラットに elemicin を 13 週間投与した結果、100 mg/kg 投与群から肝臓の絶対及び相対重量は増加し、肝細胞肥大及び変異肝細胞巣が認められた。400 mg/kg 投与群ではこれらの変化の程度は高度となり、血清生化学検査では T-Chol、 γ -GTP、ALT の有意な上昇も認められた。以上より、elemicin は 100 mg/kg/day 以上の用量でラット肝臓に毒性影響を示すと考えられた。また、副腎では病理組織学的変化は認められなかったものの、絶対及び相対重量の用量依存的な増加が認められ、100 mg/kg 以上で有意な高値を示したことから、elemicin 投与に起因した変化である可能性が考えられた。一方、臓器重量では、肝臓及び副腎以外の臓器においても絶対又は相対重量

の変化が認められたが、それらの臓器で病理組織学的変化は認められず、何れも体重減少に伴う変化と考えられた。また、血液学的検査では、血小板数の用量依存的な増加が 25 mg/kg 投与群から認められたものの、これまで同系統の動物を用いた 3 つの包括試験における対照群の血小板数は $42.3\sim 88.4 \times 10^4 / \mu\text{L}$ であり、本試験で認められた変化はこれらの範囲内であったことから毒性学的意義は乏しいと考えた。また、400 mg/kg 群では MCH の有意な増加が認められたものの、他の赤血球検査項目に変化は認められなかった。病理組織学的検索では、400 mg/kg 投与群の胸腺においてリンパ球減少が認められたものの、その頻度は 10 例中 2 例で、その程度も軽度であったこと、他の免疫系組織において関連した変化は認められなかったことから、いずれの変化も毒性学的意義は乏しいと考えた。血清生化学的検査では 400 mg/kg 群で CRN の有意な低値が認められたものの、これまで同系統の動物を用いた 3 つの包括試験における対照群の CRN は $0.27\sim 0.37 \text{ mg/dL}$ であり、本試験で認められた変化はこれらの範囲内であったことから毒性学的意義は乏しいと考えた。また、ラット肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞の数ならびに面積は、いずれも 400 mg/kg 投与群において有意に上昇したことから、elemicin はラット肝発がん性を有する可能性が示唆された。

D-2 Furfuryl acetate の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験による評価

gpt delta ラットを用いた furfuryl acetate の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験を実施するための 28 日間の用量設定試験を実施した。その結果、540 mg/kg 投与群において投与 1 日目に全例の死亡が認められた一方、180 mg/kg 投与群では途中死亡例は認められず、一般状態および体重推移に顕著な変化は認められなかった。この結果から、furfuryl acetate の 13 週間投与における最

大耐用量を 180 mg/kg/day と判断した。今後、この結果に基づき *gpt delta* ラットを用いた furfuryl acetate の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験を実施する。

D-3 フラン誘導体の肝短期遺伝毒性・発がん性試験（GPG モデル）による評価

フラン誘導体について肝臓における *in vivo* 変異原性を明らかにするために、GPG モデル標準プロトコルに従い切除肝組織を用いたレポーター遺伝子変異頻度解析を実施した。その結果、陽性対照群である estragole 投与群の *gpt* 変異体頻度は対照群に比べて上昇する傾向が認められた一方、今回検討した 4 種のフラン誘導体は何れも対照群と比較して明らかな差は認められなかった。このことから、2-pentylfuran、3-(2-furyl)acrolein、2-furyl methyl ketone 及び ethyl 3-(2-furyl)propanoate は何れもラット肝臓において *in vivo* 変異原性を示さない可能性が示唆された。しかし、*gpt* 及び Spi-アッセイにおいて、十分なコロニー数あるいはプラーク数が得られなかった個体が認められたことから、今後追加の検討を行い、最終的なフラン誘導体の *in vivo* 変異原性を考察する。

E. 結論

肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験の結果、elemicin はラット肝臓において毒性影響をすることが明らかとなり、その無毒性量は 25 mg/kg 体重であった。また、elemicin は一部のアルコキシベンゼン類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。今後、*in vivo* 変異原性の検索により elemicin の遺伝毒性評価を実施する。また、furfuryl acetate の用量設定試験を実施し、13 週間投与における最大耐用量を 180 mg/kg/day と判断した。今後、この結果に基づき *gpt delta* ラッ

トを用いた furfuryl acetate の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験を実施する。さらに、複数のフラン誘導体について GPG モデル標準プロトコルに従った *in vivo* 変異原性の評価を行った結果、2-pentylfuran、3-(2-furyl)acrolein、2-furyl methyl ketone 及び ethyl 3-(2-furyl)propanoate は何れも対照群に比して *gpt* 及び Spi-変異体頻度に顕著な変化は認められなかった。しかし、解析の信頼性を担保する上で必要なコロニー数あるいはプラーク数が得られなかった個体例が認められたことから、今後追加の検討を行い最終的なフラン誘導体の *in vivo* 変異原性を考察する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果

G-1 発表論文

Hibi D, Yokoo Y, Suzuki Y, Ishii Y, Jin M, Kijima A, Nohmi T, Nishikawa A, Umemura T. Lack of genotoxic mechanisms in early-stage furan-induced hepatocellular tumorigenesis in *gpt delta* rats. *J Appl Toxicol.* 37 (2):142-149, 2017

G-2 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし