

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 年度分担研究報告書
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
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
研究分担者 梅村 隆志
国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

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が知られている。そのため、フラン環を有するフラン誘導体に同様の肝発がん性が懸念されるが、遺伝毒性及び発がん性に関する報告はほとんどない。本研究では、何れもフラン環を有するものの側鎖構造の異なる 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。しかしながら、*gpt* アッセイおよび Spi-アッセイにおいて、解析の信頼性を担保するうえ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認められたことから、今後追加の検討を行いフラン誘導体の *in vivo* 変異原性を考察する。

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検討を実施する。

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 が生成し、DNA 付加体を形成したことから、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* ラット肝臓を用いた *in vivo* 変異原性試験においても陰性であったことから、その発がん機序は未だ不明のままである。さらに、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、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短期遺伝毒性・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、ケトン体である 2-furyl methyl ketone、エステル構造を有する ethyl 3-(2-furyl)propanoate を GPG モデルに適用し、フラン誘導体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する。

昨年度までに、GPG モデル標準実験プロトコールに従って実施した試験で得られた肝臓を用いて GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を行い、2-pentylfuran 及び 2-furyl methyl ketone は *N*-diethylnitrosamine (DEN) が誘発する GST-P 陽性細胞巢の形成を促進した一方、3-(2-furyl)acrolein 及び ethyl 3-(2-furyl)propanoate は影響を与えなかったことを明らかにした。今年度は引き続き、部分肝切除により得られた肝臓のレポーター遺伝子変異頻度解析を実施し、フラン誘導体の *in vivo* 変異原性を検討した。

B. 研究方法

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。

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 °C 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。

(統計学的処理)

レポーター遺伝子変異頻度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

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

今回、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に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

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

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