

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
Elemicin の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験による評価
Furfuryl acetate 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
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 小川久美子
国立医薬品食品衛生研究所 病理部長

研究要旨

平成 27 年度に引き続き *gpt delta* ラットを用いた短期遺伝毒性・発がん性包括的試験による香気成分 elemicin の一般毒性、遺伝毒性及び発がん性について包括的評価を実施した。また、furfuryl acetate の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験のための用量設定試験を実施した。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 群では最終体重の有意な低値が認められ、肝臓及び副腎の実重量及び相対重量が有意に増加した。血清生化学的検査の結果、同群では総コレステロール、 γ -GTP 及び ALT の有意な上昇が認められた。病理組織学的検索の結果、肝臓では好酸性の変異肝細胞巣及びび漫性の肝細胞肥大が 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を行った結果、400 mg/kg 群ではその数及び面積の有意な増加が認められた。以上より、elemicin は肝毒性を有し、その無毒性量は 25 mg/kg 体重と考えられた。また、高用量群では GST-P 陽性細胞巣の数及び面積が有意に増加したことから、elemicin はラット肝発がん性を有することが示唆された。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。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では、180 mg/kg/day を最高用量として実施することが適切と考えられた。

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、香辛料の香気成分として知られている^{1, 2)}。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³⁾、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⁴⁾、elemicin の発がん性に関して明瞭な結論は出ていない。また、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。

Furfuryl acetate は JECFA において furfuryl alcohol とその関連物質としてグループ評価されている香料であり、これまでにグループ ADI として 0-0.5 mg/kg/day と評価されている⁵⁾。近年 JECFA では、このグループに属する 4 種の香料化合物を追加することに伴い、新たな *in vitro* および *in vivo* 遺伝毒性試験が検討された結果、furfuryl alcohol 及びその誘導体について未解決の遺伝毒性の懸念があることから、香料の安全性評価手順を用いた評価には適さず、グループ ADI を将来的に再考する必要があるとしている⁵⁾。また、Furfuryl acetate は、*S. typhimurium* TA100 を用いたエームス試験において陽性を示すことが報告されているが⁶⁾、その他の詳細な報告はほとんどない。

一方、我々は任意の臓器における *in vivo* 変異原性検索が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、遺伝毒性及び発がん性に関する情報を短時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性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^{7, 8)}。そこで本研究では、elemicin に本試験法を適用して、その一般毒性、遺伝毒性及び発がん性を包括的に評価することで、ヒトリスク評価に資するデータの提供を目的とする。また、furfuryl alcohol とその関連物質についても同様の試験を実施する。

平成 27 年度は F344 ラットを用いた elemicin の用量設定試験を実施し、本試験の投与量を 25、100 及び 400 mg/kg 体重に設定した。さらに、本試験として雄性 6 週齢の *gpt delta* ラットに上記の用量で elemicin の投与を開始した。本年度は、13 週間の投与終了後、一般毒性評価及び肝前がん病変マーカーによる発がん性評価を実施した。さらに、furfuryl acetate の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験を行うための用量設定試験を実施した。

B. 研究方法

B-1. 材料及び試薬

Elemicin は Combi-Blocks 社 (米国) から、furfuryl alcohol は東京化成工業株式会社 (東京) から購入した。

B-2. Elemicin の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験

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 ± 1°C、湿度 55 ± 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-Chol）、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ターゼ（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、ハーター腺、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-3. Furfuryl acetate の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験

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-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

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有意な低値が認められた。

最終体重および臓器重量を Table 1 に示す。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。血液学的検査の結果を Table 2 に示す。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。血清生化学的検査の結果を Table 3 に示す。400 mg/kg 群では T-Cho、 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。Elemicin 投与に起因すると考えられる病理組織学的変化を Table 4 に示す。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巣が認められ (Figure 2)、肥大の程度は用量依存的に増加した。また、変異肝細胞巣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 陽性細胞巣の免疫組織化学的検索による定量解析結果を Figure 3 に示す。400 mg/kg 群では肝 GST-P 陽性細胞巣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

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。試験期間中の体重の推移を Figure 4 に示す。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。

D. 考察

D-1. Elemicin の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験

1. 一般毒性

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-Cho、

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 $42.3\sim 88.4 \times 10^4 / \square L$ 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。

2. 発がん性

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

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。

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。

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

- 1) 時 亮、石井雄二、高須伸二、土屋卓磨、木島綾希、能美健彦、小川久美子、西川秋佳、梅村隆志「Elemicin の短期遺伝毒性・発がん性包括的試験による評価」第 33 回日本毒性病理学会総会および学術集会

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).
 - 5) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Safety evaluation of certain food additives, WHO FOOD ADDITIVES SERIES:67, 161-170 (2012)
 - 6) Glatt H, Schneider H, Murkovic M, Monien BH, Meinel W, Hydroxymethyl-substituted furans: mutagenicity in *Salmonella typhimurium* strains engineered for expression of various human and rodent sulphotransferases. Mutagenesis, 27, 41-48. (2012)
 - 7) Jin M, Kijima A, Suzuki Y, Hibi D, Inoue T, Ishii Y, Nohmi T, Nishikawa A, Ogawa K, Umemura T, Comprehensive toxicity study of safrole using a medium-term animal model with gpt delta rats. Toxicology, 290, 312-321.
 - 8) Jin M, Kijima A, Hibi D, Ishii Y, Takasu S, Matsushita K, Kuroda K, Nohmi T, Nishikawa A, Umemura T, In vivo genotoxicity of methyleugenol in gpt delta transgenic rats following medium-term exposure. Toxicol. Sci. 131, 387-394.

