

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* ラットを用いた肝中期遺伝毒性・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）
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）
研究分担者：高須伸二 （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* ラットを用いた肝中期遺伝毒性・発がん性試験法（GPG モデル）を用いて評価した。本年度は、昨年度までに明らかになった 2-pentylfuran ならびに 2-furyl methyl ketone の発がんプロモーション作用の機序を検討する目的で、残存肝における細胞増殖活性の検討を行った。その結果、細胞増殖活性の指標である PCNA 陽性細胞率は陽性対照である estragole 投与群では有意な高値を示したのに対し、いずれのフラン誘導体投与群においても統計学的に有意な変化は認められなかった。以上の結果から、2-pentylfuran ならびに 2-furyl methyl ketone の発がんプロモーションにおける細胞増殖活性の寄与は否定的であり、今後さらなる検討が必要であると考えた。

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した。

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¹⁾。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²⁾。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³⁾、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⁴⁾、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 *in vivo* 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⁵⁾。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。

本年度は、昨年度までに明らかになった 2-pentylfuran ならびに 2-furyl methyl ketone の発がんプロモーション作用の機序を検討する目的で、細胞増殖活性の指標である PCNA 陽性細胞率の検索を行った。

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 (Figure 1) 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 PCNA 免疫染色を行い、PCNA 陽性細胞率の検討を行った。PCNA 陽性細胞率は各群 5 例の肝臓について無作為に 5 視野 (肝細胞 3000 細胞以上) を測定し、正常肝細胞当たりの PCNA 陽性肝細胞数の割合を算出した。

(統計学的処理)

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、Dunnnett 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

PCNA 陽性細胞率の結果を Figure 2 に示す。残存肝における PCNA 陽性細胞の検索の結果、PCNA 陽性細胞率は陽性対照群である estragole 投与群では有意な高値を示したのに対し、いずれのフラン誘導体投与群においても、統計学的に有意な変化は認められなかった。

D．考察

gpt delta ラットを用いた中期遺伝毒性・発がん性包括試験の残存肝において GST-P 陽性細胞巢の数及び面積の増加が認められた 2-pentylfuran 及び 2-furyl methyl ketone について、その発がんプロモーション作用の機序を検討する目的で、残存肝における PCNA 陽性細胞率の検索を行った。その結果、肝臓の PCNA 陽性細胞率は、estragele 投与群ではこれまでの報告と同様に有意な高値を示し、本モデルの妥当性が確認されたのに対し⁵⁾、いずれのフラン誘導体においても変化は認められなかったことから、本実験条件下で認められた発がんプロモーションにおける細胞増殖活性の寄与は否定的であり、詳細な機序は明らかにならなかった。今後、さらなる検討が必要であると考えた。

E．結論

2-Pentylfuran ならびに 2-furyl methyl ketone の発がんプロモーション機序を検討したものの、細胞増殖活性の関与は認められず、細胞増殖の寄与は否定的であった。

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) National Toxicology Program (NTP), Toxicology and carcinogenesis studies of furan (CAS No. 110-00-9) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). NTP Technical Report No. 402.
- 2) Byrns MC, Vu CC, Neidigh JW, Abad JL, Jones RA, Peterson LA., Detection of DNA adducts derived from the reactive metabolite of furan, cis-2-butene-1,4-dial. Chem. Res. Toxicol. 19, 414-420.
- 3) 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, 142-149.
- 4) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Safety evaluation of certain contaminants in food. WHO Food Additive Series 63: 487-604.
- 5) Matsushita K, Kuroda K, Ishii Y, Takasu S, Kijima A, Kawaguchi H, Miyoshi N, Nohmi T, Ogawa K, Nishikawa A, Umemura T., Improvement and validation of a medium-term *gpt delta* rat model for predicting chemical carcinogenicity and underlying mode of action. Exp Toxicol Pathol. 66, 313-21.

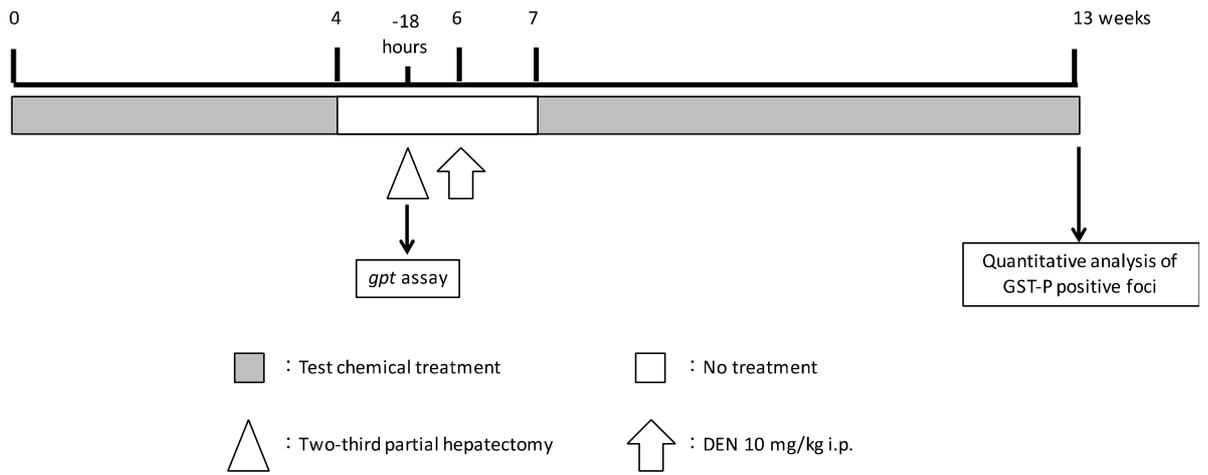


Figure 1. Standard protocol for GSG model.

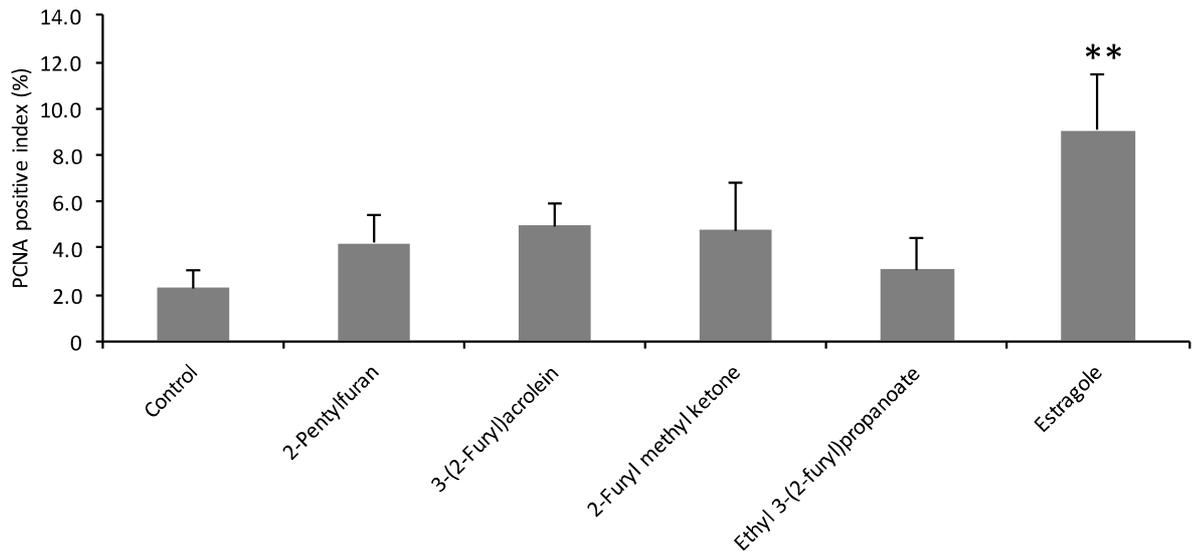


Figure 2. PCNA positive index in the liver of rats treated with 2-pentylfuran, 3-(2-furyl)acrolein, 2-furyl methyl ketone and ethyl 3-(2-furyl)propanoate. Values are means \pm s.d. (n = 5 in each group), **, p < 0.01 vs control group using Dunnett's test.