

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）
総合報告書

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： 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
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
小川久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
石井雄二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
高須伸二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

食品添加物の安全性評価における *gpt delta* ラットを用いた短期包括的試験の有用性を確認するため、FAO / WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) において登録されている食品香料の中から elemicin 及び furfuryl acetate について肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験による評価を、フラン誘導体について肝中期遺伝毒性・発がん性包括試験法 (GPG モデル) による評価を実施した。Elemicin の一般毒性評価ではラット肝臓において毒性影響が認められ、その無毒性量は 25 mg/kg 体重であった。また、遺伝毒性評価では特異的 DNA 付加体形成を起点とした突然変異誘発性を有することが明らかとなり、発がん性評価では肝発がん性を有することが示唆されたことから、elemicin はラットにおける遺伝毒性肝発がん物質であると考えられた。Furfuryl acetate の評価では、ラット肝臓における毒性学的変化は認められず、遺伝毒性及び発がん性評価においても統計学的に有意な変化は見られなかったことから、ラット肝臓において furfuryl acetate の毒性、遺伝毒性及び発がん性はないものと考えられた。フラン誘導体については 2-pentylfuran 及び 2-furyl methyl ketone にラット肝発がん性を有する可能性が示唆されたが、いずれのフラン誘導体においてもラット肝臓における突然変異誘発性は認められなかったことから、これら 2 剤はプロモーション期に作用する非遺伝毒性肝発がん物質に分類されると考えられた。しかし、肝臓の細胞増殖活性に変化は認められず、2-pentylfuran 及び 2-furyl methyl ketone の発がんプロモーション機序は明らかにならなかった。このように、化学物質の一般毒性、遺伝毒性、発がん性の包括的評価が可能な両試験法は、香料を含む食品添加物の迅速な安全性評価に有用な試験法と考えられた。

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、その「18類」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が

明らかとなり、欧米および我が国においても使用禁止処置がとられた。また、天然香料においてもエストラゴールをはじめとする複数のアルコキシベンゼン類が、ラット肝発がん性を有し、その機序に遺伝毒性が関与していることを我々は明らかにしている¹⁻⁴⁾。このように、指定対象にもかかわらず、香料の安全性は十分に担保されて

いるとは言えない。国際的な食品添加物の安全性評価委員会である FAO / WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) では、香料の評価において、毒性学的懸念の閾値 (TTC) と暴露マージン (MOE) を駆使した独特な手法により、多くの場合実際の試験データを用いずに数多くの香料を評価している。一方、我が国における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されてきた。このような背景の違いから、EU 等におけるポジティブリスト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。

一方、我々はこれまでに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期間で得ることが出来る短期遺伝毒性・発がん性包括的試験法とラット肝部分切除術又は片腎摘出術を用いた中期遺伝毒性・発がん性包括試験法 (GPG 及び GNP モデル) を開発してきた。そこで本研究では香料の安全性評価におけるこれらの試験法の有用性を確認するため、JECFA において食品香料として登録されている物質について、これら試験法による実際の評価を実施し、それらのヒトリスク評価に資するデータを提供することを目的とした。

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^{5,6)}。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⁷⁾、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⁸⁾、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⁹⁾。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。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¹⁰⁾、その他の詳細な報告はほとんどない。

フランは様々な香料物質の基本骨格であり、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¹¹⁾。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生じる *cis*-2-butene-1,4-dial が DNA 付加体を形成することから、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¹²⁾。しかしながら、本物質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* ラットを用いた *in vivo* 変異原性試験においても、肝臓における突然変異誘発は認められなかったことから¹³⁾、その発がん機序は未だ明らかになっていない。そのため、フラン環を基本骨格とする多数のフラン誘導体についても同様に発がん性が懸念されるという理由から、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¹⁴⁾、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。

このような背景から、本研究では elemicin 及び furfuryl acetate について肝短期遺伝毒

性・発がん性包括的試験法による評価を、フラン誘導体について遺伝毒性・発がん性中期包括試験法による評価を実施した。

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

雄性 6 週齢の F344 ラットを用いた用量設定試験の後、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 (7 日/週) 強制経口投与した。対照群には溶媒として用いたコーン油を投与した。試験期間中は体重の推移及び摂餌量の測定と一般状態の観察を行った。一般毒性評価では、体重及び臓器重量、血液学的検査、血清生化学検査、全身諸臓器の病理組織学的検索を実施した。遺伝毒性評価では、肝臓について LC-MS/MS による網羅的 DNA 損傷解析及び *gpt* assay による *in vivo* 変異原性の検索を実施した。発がん性評価では、肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の免疫組織化学染色法による検索を実施した。いずれの項目についても統計学的解析は 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。

B-2. Furfuryl acetate の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験

雄性 6 週齢の F344 ラットを用いた用量設定試験の後、雄性 6 週齢の F344 系 *gpt* delta ラットに、furfuryl acetate を 60 又は 180 mg/kg 体重の用量で、対照群には溶媒として用いたコーン油を 13 週間 (7 日/週) 強制経口投与した。試験期間中は体重の推移及び摂餌量の測定と一般状態の観察を行った。肝臓について一般毒性評価では、体重及び臓器重量、血清生化学検査、肝臓

の病理組織学的検索を実施した。遺伝毒性評価では、肝臓について *gpt* assay 及び Spi assay による *in vivo* 変異原性の検索を実施した。発がん性評価では、肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の免疫組織化学染色法による検索を実施した。いずれの項目についても統計学的解析は 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。

B-3. フラン誘導体の肝中期遺伝毒性・発がん性包括試験法 (GPG モデル)

フラン誘導体のうち 2-pentylfuran, 3-(2-furyl)acrolein, 2-furyl methyl ketone 及び ethyl 3-(2-furyl)propanoate を被験物質として選定し、用量設定試験の結果から最大耐量をそれぞれ 100, 400, 25 及び 1000 mg/kg 体重に設定した。雄性 6 週齢の F344 系 *gpt* delta ラットに 2-pentylfuran, 3-(2-furyl)acrolein, 2-furyl methyl ketone 及び ethyl 3-(2-furyl)propanoate を最大耐量で、陽性対照群には estragole を 150 mg/kg 体重の用量で、対照群には溶媒であるコーン油を 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 diethylnitrosamine 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。7 週目から被験物質の投与を再開し、13 週目まで反復投与を行った。切除肝を用いて *gpt* assay 及び Spi assay による *in vivo* 変異原性の検索を、残存肝を用いて肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢及び細胞増殖活性の指標として PCNA の免疫組織化学染色法による検索を行った。統計学的処理は Tukey 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)

投与実験は熟練者が実施し、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてイソフルラン麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。実験動物に関しては、「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」に基づき、動物実験計画書を作成し、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会による審査を受けた後、実施した。また、DNA 組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、遺伝子組み換え実験計画書を作成し、審査を受けた。

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

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 投与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 (Table 1)。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 (Table 2)。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 投与群から認められた (Figure 1 及び Table 3)。

LC-MS/MS による網羅的 DNA 損傷解析の結果、肝臓では elemicin 400 mg/kg 投与群において対照群に存在しない 5 つのスポットが検出された (Figure 2 及び 3)。MS スペクトラム解析の結果、それらは elemicin と dG, dA 又は dC との付加体であることが示された (Figure 4)。また、*gpt* assay の結果、*gpt* 変異体頻度 (MFs) は 100 mg/kg 投与群から上昇傾向が認められ、400 mg/kg 投与群において有意な高値を示した (Figure 5)。

肝前がん病変マーカーである GST-P 陽

性細胞巣の定量解析の結果、400 mg/kg 投与群ではその数及び面積の有意な増加が認められた (Figure 6)。

C-2. Furfuryl acetate の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験

6 週齢の雄性 F344 系 *gpt delta* ラットに furfuryl acetate を 0, 60 又は 180 mg/kg の濃度で 13 週間強制経口投与した結果、体重推移並びに絶対及び相対肝重量に顕著な変化は認められなかった (Figure 7 及び 8)。血清生化学検査の結果、60 mg/kg 以上投与群において、アルブミン・グロブリン比 (A/G)、アルブミン (Alb) 及びアルカリフォスタファアーゼ (ALP) の有意な上昇、総コレステロール (T. Cho) の有意な低下が認められた。また、180 mg/kg 投与群において、グルコース (Glu)、トリグリセリド (TG) 及びアスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST) の有意な低下が認められた (Table 4)。肝臓の病理組織学的検査の結果、ごく軽度の小肉芽腫の発生が、対照群で 3 例、60 mg/kg 投与群で 1 例、180 mg/kg 投与群で 1 例認められたが、統計学的に有意な変化は認められなかった。

gpt assay の結果、furfuryl acetate 投与群における *gpt* MFs は何れの用量においても対照群に比して有意な変化は認められなかった。また、*Spi* assay の結果、furfuryl acetate 投与群において有意な変化は認められなかった (Figure 9)。

GST-P 陽性肝細胞巣の定量的解析の結果、180 mg/kg 投与群におけるその数及び面積は対照群に比して増加する傾向が認められたものの、統計学的に有意な変化は認められなかった (Figure 10)。

C-3. フラン誘導体の遺伝毒性・発がん性中期包括試験法 (GPG モデル)

残存肝における GST-P 陽性細胞巣の定量解析の結果、2-pentylfuran と陽性対照である estragole 投与群では GST-P 陽性細胞巣の数及び面積が有意に増加し、2-furyl

methyl ketone 投与群ではそれらの増加傾向が認められたのに対し、3-(2-furyl)acrolein 及び ethyl 3-(2-furyl)propanoate 投与群で変化は認められなかった (Table 5)。また、切除肝における *in vivo* 変異原性の検索の結果、*gpt* MFs 及び *Spi*⁻ MFs の変化はいずれ投与群においても認められなかった (Table 6 及び 7)。また、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である ES 投与群で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変化は認められなかった (Figure 11)。

D. 考察

D-1. Elemicin の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験

一般毒性評価の結果、elemicin 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 体重/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、肝臓では網羅的 DNA 損傷解析で認められた elemicin 特異的 DNA 付加体の形成に加えて、*gpt* MFs の有意な上昇も認められたことから、elemicin は特異的 DNA 付加体形成を起点とした突然変異誘発性を有すると考えられた。さらに、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

Furfuryl acetate 投与群の体重及び肝重量に顕著な変化は認められなかった。血清生

化学的検査の結果、60 mg/kg 投与群から A/G 及び Alb の有意な上昇がみられたが、何れの変化も軽度な変化であり、TP に変化が見られないことから、肝臓のタンパク合成能の変化を示すものではなく、毒性学的意義は低いと考えた。T. cho は 60 mg/kg 投与群から、Glu 及び TG は 180 mg/kg 投与群において有意に低下し、ALP は 60 mg/kg 投与群から有意に上昇した。しかし、肝臓において投与に起因する病理組織学的変化は認められず、血清生化学的検査においても肝・胆道系障害を示唆する AST、ALT、 γ -GTP 及び T. Bil に変化はみられなかった。従って、これらパラメーターの毒性学的意義を明らかにするためには ALP アイソザイムの検討や骨、消化管、代謝に係る関連臓器の病理組織学的検査が必要であるものの、肝毒性を示唆する変化ではないと考えられた。

In vivo 変異原性の検索の結果、furfuryl acetate 投与群における *gpt* 及び *Spi*⁻ MFs は何れの用量においても有意な変化は認められなかったことから、furfuryl acetate のラット肝臓における遺伝毒性はないものと考えられた。

GST-P 陽性細胞巣の定量的解析の結果、180 mg/kg 投与群におけるその数及び面積は、増加傾向が認められたものの、統計学的な有意差は認められずごく僅かな変化であったことから、furfuryl acetate のラット肝臓における発がん性をないものと考えられた。

D-3. フラン誘導体の遺伝毒性・発がん性中期包括試験法 (GPG モデル)

2-Pentylfuran 及び 2-furyl methyl ketone 投与群では GST-P 陽性細胞巣の数及び面積の増加傾向又は有意な増加が認められたことから、これら 2 剤はラット肝発がん性を有することが示唆された。また、*in vivo* 変異原性の検索では、いずれのフラン誘導体においてもラット肝臓における突然変異誘発性は認められなかったことか

ら、これら 2 剤はプロモーション期に作用する非遺伝毒性肝発がん物質に分類されたと考えられた。一方、肝臓の PCNA 陽性細胞率はいずれのフラン誘導体においても変化は認められず、2-pentylfuran ならびに 2-furyl methyl ketone の発がんプロモーション機序は明らかにならなかった。

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有することが明らかとなり、その無毒性量は 25 mg/kg 体重/day 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における遺伝毒性肝発がん物質であることが示唆された。また、ラット肝臓において furfuryl acetate の毒性、遺伝毒性及び発がん性は認められなかった。

フラン誘導体の遺伝毒性・発がん性中期包括試験の結果、2-pentylfuran 及び 2-furyl methyl ketone は基本骨格であるフランと同様にラット肝臓に発がん性を有する可能性が示唆された。一方、3-(2-furyl)acrolein 及び ethyl 3-(2-furyl)propanoate は GST-P 陽性細胞巢の増加は認められなかったことから、フラン誘導体の肝発がん性の有無は側鎖によって異なることが示唆された。

このように *gpt delta* ラットを用いた短期遺伝毒性・発がん性包括的試験と中期遺伝毒性・発がん性包括試験は、化学物質の一般毒性・遺伝毒性・発がん性の迅速な評価が可能であることから、香料を含む食品添加物の迅速な安全性評価に有用な試験法と考えられた。

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

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

2) 石井雄二, 時 亮, 高須伸二, 木島綾希, 能美健彦, 小川久美子, 梅村隆志「*gpt delta* ラットを用いたエレミシンの遺伝毒性評価」第 44 回日本毒性学会学術年会

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

参考文献

- 1) Suzuki Y, Umemura T, Hibi D, Inoue T, Jin M, Ishii Y, Sakai H, Nohmi T, Yanai T, Nishikawa A, Ogawa K. Possible involvement of genotoxic mechanisms in estragole-induced hepatocarcinogenesis in rats. Arch. Toxicol. 86, 1593-1601 (2012).
- 2) Suzuki Y, Umemura T, Ishii Y, Hibi D, Inoue T, Jin M, Sakai H, Kodama Y, Nohmi T, Yanai T, Nishikawa A, Ogawa K. Possible involvement of sulfotransferase 1A1 in estragole-induced DNA modification and carcinogenesis in the livers of female mice. Mutat. Res. 749, 23-28 (2012).
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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).
- 6) 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).
 - 7) 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).
 - 8) De Vincenzi M, De Vincenzi A, Silano M, Constituents of aromatic plants: elemicin, Fitoterapia, 75, 615-18 (2004).
 - 9) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Safety evaluation of certain food additives, WHO FOOD ADDITIVES SERIES:67, 161-170 (2012)
 - 10) 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)
 - 11) 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.
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Safety evaluation of certain contaminants in food. WHO Food Additive Series 63: 487-604.