

平成 30 年度 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

香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、
その標準的安全性評価法の確立に関する研究

分担研究課題：肝又は腎遺伝毒性・発がん性中期包括試験法による香料等の評価

研究分担者： 高須 伸二 所属 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
石井 雄二 所属 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
西川 秋佳 所属 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
小川久美子 所属 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

肝又は腎遺伝毒性・発がん性中期包括試験法（GPG 又は GNP モデル）は、*gpt delta* ラットを用いることにより、肝又は腎における発がん性・遺伝毒性を迅速に一つの試験で検出できる試験系である。本研究では、食品香料化学物質の安全性を *in silico* , *in vitro* , *in vivo* で階層的に評価する評価系を構築することを目的に、*in silico* 解析結果から遺伝毒性が疑われる化合物を対象として、GPG 又は GNP モデルによる *in vivo* での遺伝毒性・発がん性を検討する。本分担研究課題では、遺伝毒性が疑われる化合物としてリストアップされた候補化合物のうち、フラン環を基本骨格とする 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を被験物質とし、今年度は GPG 又は GNP モデルによる評価を実施するための用量設定試験を実施した。6 週齢の雄性 F344 ラットに 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を 125, 250, 500 又は 1000 mg/kg/day の濃度で 1 日 1 回 7 日間強制経口投与した。その結果、1000 mg/kg/day 投与群の体重は投与期間中の何れの時点においても開始時より低値を示したことから、当該用量ではより長期の反復投与試験は実施できないと判断し、28 日間の反復投与試験は 500 mg/kg/day 程度を最高用量とした。続いて、6 週齢の雄性 F344 各に 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を 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。その結果、540 mg/kg/day 投与群では投与 1 週目から投与終了時まで有意な体重増加抑制がみられ、肝臓、腎臓、肺及び脾臓の相対重量は統計学的に有意な高値を示した。また、肝臓の相対重量は 180 mg/kg/day 投与群においても有意な高値を示した。今後、血清生化学的検査及び病理組織学的検査を実施し、本試験の実施用量を設定する予定である。

A. 研究目的

現在、食品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も多く、全ての香料の安全性が十分に担保されているとは言えない現状がある。本研究では香料化学物質の安全性を *in silico* , *in vitro* , *in vivo* で階層的に評価する評価系を構築し、食品香料の効率的且つ信頼性の高い安全性評価の推進に資する

ことを目的とする。このうち、本分担研究課題では *in silico* , *in vitro* 試験において遺伝毒性が疑われる香料について *in vivo* 試験系を用いて評価を行うことで、提唱する階層型試験系の開発に寄与することを目指す。

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、個体レベルで遺伝毒性や発がん性を包括的に評価できるモデルを開発してきた。肝遺伝毒性・発がん性中期包括試験法（GPG モデル）又は腎遺伝毒性・発がん性中期包括試

験法 (GNP モデル) は, *gpt delta* ラットを用いて, 肝又は腎発がん性・遺伝毒性を一つの試験で迅速に検出することを可能にした試験系であり, これまでに本モデルを用いて香料などの化学物質の遺伝毒性・発がん性を検討してきた。

本研究では, 本間, 安井らの *in silico* 解析結果から遺伝毒性が疑われる化合物としてリストアップされた 10 候補化合物のうち, げっ歯類において肝発がん性を示すことが知られるフラン環を基本骨格とする香気成分である 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を被験物質として, GPG 又は GNP モデルによる *in vivo* での遺伝毒性・発がん性を明らかにすることを目的とする。今年度は, GPG 又は GNP モデルによる評価を実施するための用量設定試験を実施した。

B. 研究方法

B-1. 試薬及び動物

3-Acetyl-2,5-dimethylfuran は東京化成工業株式会社から購入した。コーン油は富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。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 , 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社のソフトチップを用い, 週 2 回交換を行った。また, 試験期間中は飲料水として水道水を自由摂取させた。

B-2. 用量設定試験 (1) : 3-acetyl-2,5-dimethylfuran の 7 日間反復投与 毒性試験

6 週齢の雄性 F344 ラット各群 3 匹にコーン油に混じた 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を

125, 250, 500 又は 1000 mg/kg/day の濃度で 1 日 1 回 7 日間強制経口投与した。対照群にはコーン油を投与した。試験期間中は一般状態観察及び体重測定を 1 日 1 回実施した。投与終了後, イソフルラン麻酔下にて肝臓を摘出し, 重量測定を行った。

B-3. 用量設定試験 (2) : 3-acetyl-2,5-dimethylfuran の 28 日間反復投与 毒性試験

6 週齢の雄性 F344 各群 5 匹にコーン油に混じた 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を 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。投与終了後, 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, 血清生化学的検査を実施した。剖検時に肝臓, 腎臓, 脾臓, 肺, 消化管および鼻腔を摘出し, 肝臓, 腎臓, 脾臓及び肺に関しては, 重量の測定を行った。さらに, 摘出した臓器・組織については定法に従い病理組織学的検査を実施した。

(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。

C. 研究結果

C-1. 用量設定試験 (1) : 3-acetyl-2,5-dimethylfuran の 7 日間反復投与 毒性試験

投与期間中, 何れの群においても死亡動物は認められなかった。一般状態観察において, 投与 2 日後から 1000 mg/kg/day 投与群の全例において鼻出血並びに紅涙が認められ, 同様の症状は投与 3 日後の 500 mg/kg/day 投与群の全例においても観察された。一方, 125 及び 250 mg/kg/day 投与群並びに対照群では一般状態の変化も認められなかった。各群の体重推移を Figure 1 に示す。

3-Acetyl-2,5-dimethylfuran 投与群において、用量依存的な体重の低値が認められた。投与終了後の肝重量の結果を Figure 2 に示す。投与終了後の絶対肝重量は、用量依存的に低値を示す傾向が認められたものの、相対肝重量に顕著な変化は認められなかった。

C-2. 用量設定試験 (2) : 3-acetyl-2,5-dimethylfuran の 28 日間反復投与毒性試験

投与期間中、何れの群においても死亡動物は認められなかった。一般状態観察において、投与 1 週目から 540 mg/kg/day 投与群の全例で鼻出血及び紅涙が認められたが、症状は投与 3 週目以降には観察されなかった。一方、60 及び 180 mg/kg/day 投与群並びに対照群の一般状態に変化は認められなかった。

各群の体重推移と摂餌量を Figure 3 及び 4 に示す。540 mg/kg/day 投与群において、投与 1 週目から投与終了時まで統計学的に有意な体重増加抑制が認められた。また、540 mg/kg/day 投与群の摂餌量は対照群に比して低い傾向が認められた。

投与終了後の臓器重量の結果を Table 1 に示す。臓器重量を測定した結果、540 mg/kg/day 投与群において肺及び脾臓の絶対重量の低値が認められた。また、180 mg/kg/day 以上の投与群の相対肝重量及び 540 mg/kg/day 投与群の肺、腎及び脾臓相対重量は有意な高値を示した。

D. 考察

in silico 解析結果から遺伝毒性が疑われた 3-acetyl-2,5-dimethylfuran について、GPG 又は GNP モデルを用いて肝又は腎における遺伝毒性・発がん性を評価することを目的に、今年度は本試験を実施するための用量設定試験を実施した。

強制経口投与での標準的な投与量の上限である 1000 mg/kg/day を最高用量として、F344 ラットに 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を 7

日間反復投与した結果、1000 mg/kg/day 投与群で投与 2 日目から鼻出血及び紅涙が認められ、体重は投与期間中の何れの時点においても投与開始時より低値を示した。一方、500 mg/kg/day 投与群では、1000 mg/kg/day 投与群と同様に鼻出血及び紅涙が観察され、投与翌日から体重減少が認められたものの、投与 4 日目からは体重は増加し、投与 7 日後では投与開始時と同程度であった。このことから、1000 mg/kg/day では長期間の投与を継続することが困難であると判断し、500 mg/kg/day 程度を最高用量として 28 日間の反復投与試験を実施した。

540 mg/kg/day を最高用量に、180 又は 60 mg/kg/day の用量で 28 日間反復投与した結果、540 mg/kg/day 投与群では投与 1 週目から投与終了時まで有意な体重増加抑制が認められた。540 mg/kg/day 投与群では肝臓、腎臓、肺及び脾臓の相対重量は高値を示した。また、肝臓の相対重量は 180 mg/kg/day 投与群においても有意な高値を示した。これらの相対重量の変化は、体重増加抑制に関連する可能性が考えられたが、肝臓、腎臓の絶対重量は 180 mg/kg/day 投与群でわずかながら増加傾向を示したことから、投与に起因した変化である可能性も否定できないと考えた。今後、血清生化学的検査及び病理組織学的検査を実施することで、3-acetyl-2,5-dimethylfuran の毒性影響と毒性標的臓器を明らかにし、本試験の実施用量を設定する予定である。

E. 結論

in silico 解析結果から遺伝毒性が疑われた 3-acetyl-2,5-dimethylfuran について、GPG 又は GNP モデルを用いて肝又は腎における遺伝毒性・発がん性を評価することを目的に、今年度は本試験を実施するための用量設定試験を実施した。540 mg/kg/day を最高用量に 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を 28 日間反復投与した結果、540 mg/kg/day 投与群では肝臓、腎臓、肺及び脾臓の相対重量は高

値を示した。また、肝臓の相対重量は 180 mg/kg/day 投与群においても有意な高値を示した。今後、血清生化学的検査及び病理組織学的検査を実施し、本試験の実施用量を設定する予定である。

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