

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

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、遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法による *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、今年度は遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法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 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、540 mg/kg/day 投与群では、投与 1 週目から全例で鼻出血が認められ、病理組織学的検査の結果、鼻腔嗅上皮の壊死が認められたことから、3-acetyl-2,5-dimethylfuran は、高用量では鼻腔粘膜を毒性標的とする可能性が示唆された。以上の結果を総合的に検討した結果、540 mg/kg/day では顕著な体重増加抑制が認められたことから、投与を継続できないと判断し、本試験の最高用量を 300 mg/kg/day に設定した。今後、遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の本試験を開始する予定である。

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、食品香料の効率的か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。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、遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法による *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、遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法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 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、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. 試験計画

6 週齢の雄性 F344 ラット各群 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。投与量は、昨年度に実施した 7 日間反復投与試験の結果に基づき設定した。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、遠心分離した血清を凍結保存した。血清生化学的検査は、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)、グルコース (Glu)、トリグリセリド (TG)、総コレステロール (T-Cho)、リン脂質 (PL) 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 (P)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、アラニ

ントランスアミナーゼ (ALT)、アルカリフォスタファアーゼ (ALP)、 γ -グルタミルトランスペプチターゼ (γ -GT) についてオリエンタル酵母工業株式会社（東京）にて測定した。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

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 週日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 1 及び 2 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べ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。

血清生化学的検査の結果を Table 2 に示す。60 mg/kg/day 以上の投与群において、A/G の有意な上昇、Glu, TG, BUN 及び CRN の有意な低下が認められた。また、60 及び

180 mg/kg/day 投与群における T. Cho の有意な増加, 60 及び 540 mg/kg/day 投与群におけるナトリウムの有意な増加, 60 mg/kg/day 投与群における AST の有意な低下, 180 mg/kg/day 投与群における ALT の有意な増加が認められた。

病理組織学的検査の結果を Table 3 に示す。540 mg/kg/day 投与群の全例において, 鼻腔嗅上皮の壊死及び腎臓近位尿細管における hyaline droplet の減少が認められた。

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, 遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法による *in vivo* での遺伝毒性・発がん性を検討することを目的に, 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, 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, 投与終了時では対照群に比して約 30% 減少した。このことから, 540 mg/kg/day では投与を継続できないと判断し, 本試験の最高用量を 300 mg/kg/day に設定した。今後, 遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の本試験を開始する予定である。

また, 540 mg/kg/day 投与群では, 投与 1 週目から全例で鼻出血及び紅涙が認められた。この症状は, 投与 3 週目以降には観察されなかったものの, 病理組織学的検査で鼻腔嗅上皮の壊死が認められたことから, 3-acetyl-2,5-dimethylfuran は, 高用量では鼻腔粘膜を毒性標的とする可能性が示唆された。

一方, 投与終了後の臓器重量を測定した結果, 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が, 投与に関連した病理組織学的変

化は認められなかった。血清生化学的検査の結果, 複数の検査項目で統計学的に有意な変化が認められたものの, 鼻腔粘膜以外の臓器・器官において毒性影響を示す病理組織学的変化がみられなかったことから, より長期間の投与による 3-acetyl-2,5-dimethylfuran の毒性影響を検討する必要があると考えられた。

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, 遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法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 では顕著な体重増加抑制が認められたことから投与を継続できないと判断し, 本試験の最高用量を 300 mg/kg/day に設定した。

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

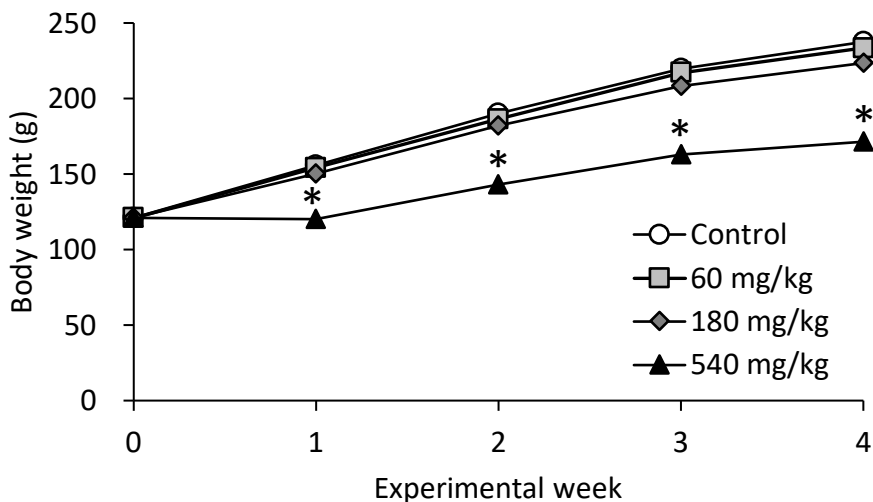


Figure 1. Body weights of male F344 rats treated with 3-acetyl-2,5-dimethylfuran for 4 weeks.

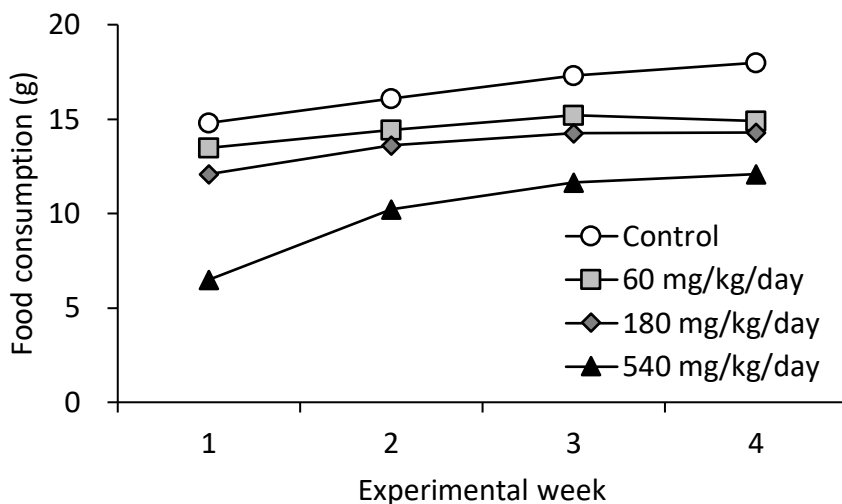


Figure 2. Food consumption of male F344 rats treated with 3-acetyl-2,5-dimethylfuran for 4 weeks.

Table 1. Final body weight and organ weight data for male F344 rats treated with 3-acetyl-2,5-dimethylfuran for 4 weeks.

	Control	60 mg/kg/day	180 mg/kg/day	540 mg/kg/day
Final body weights (g)	237.7 ± 12.8	233.4 ± 13.1	223.6 ± 8.5	171.6 ± 5.2 *
Organ weights				
Absolute weights (g)				
Lungs	0.82 ± 0.05	0.82 ± 0.04	0.81 ± 0.04	0.68 ± 0.02 *
Liver	7.30 ± 0.63	7.29 ± 0.58	7.67 ± 0.52	6.55 ± 0.35
Kidneys	1.48 ± 0.12	1.48 ± 0.13	1.56 ± 0.16	1.46 ± 0.08
Spleen	0.47 ± 0.02	0.45 ± 0.03	0.45 ± 0.02	0.38 ± 0.01 *
Relative weights (g/100g b.w.)				
Lungs	0.34 ± 0.02	0.35 ± 0.01	0.36 ± 0.01	0.39 ± 0.01 *
Liver	3.07 ± 0.13	3.12 ± 0.08	3.43 ± 0.11 *	3.82 ± 0.09 *
Kidneys	0.62 ± 0.02	0.64 ± 0.03	0.70 ± 0.06	0.85 ± 0.03 *
Spleen	0.20 ± 0.00	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.22 ± 0.01 *

*: Values are significantly different from control at $p < 0.05$.

Table 2. Serum biochemistry for male F344 rats treated with 3-acetyl-2,5-dimethylfuran for 4 weeks.

	Control	60 mg/kg/day	180 mg/kg/day	540 mg/kg/day
TP (g/dL)	6.1±0.1	6.1±0.1	6.0±0.2	5.8±0.3
A/G	2.6±0.1	2.9±0.1 *	3.1±0.2 **	3.4±0.2 **
Alb (g/dL)	4.4±0.1	4.5±0.1	4.5±0.1	4.5±0.2
T. Bil (mg/dL)	0.010±0.010	0.024±0.011	0.020±0.000	0.030±0.017
Glu (mg/dL)	173±5	152±5 **	142±11 **	126±4 **
TG (mg/dL)	114±21	78±18 **	46±10 **	18±4 **
T. Cho (mg/dL)	59±2	70±2 **	67±3 **	55±5
PL (mg/dL)	109±6	119±7	111±7	91±8 *
BUN (mg/dL)	21.6±1.8	19.1±0.8 *	17.3±1.0 **	16.5±1.3 **
CRN (mg/dL)	0.28±0.02	0.24±0.02 **	0.24±0.02 **	0.20±0.01 **
Ca (mg/dL)	10.1±0.2	10.2±0.2	10.2±0.2	10.1±0.3
P (mg/dL)	6.8±0.8	6.7±0.8	7.4±0.6	8.4±0.1 *
Na (mEq/dL)	142.2±0.8	143.6±0.5 **	143.2±0.4	144.0±0.7 **
K (mEq/dL)	4.2±0.2	4.3±0.2	4.3±0.2	4.3±0.2
Cl (mEq/dL)	101.2±1.1	102.2±0.4	101.6±1.1	102.2±1.3
AST (IU/L)	76±6	67±5 *	70±3	71±4
ALT (IU/L)	43±2	48±5	50±2 *	38±4
ALP (IU/L)	886±31	904±42	898±83	799±78
γ-GT (IU/L)	<3	<3	<3	<3

*, **: Values are significantly different from control at $p < 0.05$ and 0.01 , respectively.

TP, total protein; A/G, albumin/globulin ratio; Alb, albumin; T. Bil, total bilirubin; Glu, glucose; TG, triglyceride; T. Cho, total cholesterol; PL, phospholipid; BUN, blood urea nitrogen; CRN, creatinine; Ca, calcium; P, inorganic phosphorus; Na, sodium; K, potassium; Cl, chloride; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; γ-GT, γ-glutamyl aminotransferase.

Table 3. Histopathological findings in male F344 rats treated with 3-acetyl-2,5-dimethylfuran for 4 weeks.

	Control	60 mg/kg/day	180 mg/kg/day	540 mg/kg/day
No. of animals	5	5	5	5
Liver				
Microgranuloma, minimal	0	0	1	0
Cyst	0	0	0	1
Kidney				
Hyaline droplet, proximal, minimal	5	5	5	0
Nasal cavity				
Necrosis, olfactory epithelium, slight	0	0	0	5