

別添 1

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

( H 2 7 - 食品 - 一般 - 0 0 3 )

平成 2 9 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西川 秋佳

平成 3 0 ( 2 0 1 8 ) 年 4 月



目 次

I . 総括研究報告

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

----- 1

西川 秋佳

II . 分担研究報告

1 . 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

----- 9

西川 秋佳、小川 久美子、石井 雄二、高須 伸二

(資料) Figure 1-8  
Table 1

2 . *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 ----- 25

西川 秋佳、小川 久美子、高須伸二

(資料) Figure 1,2

III . 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 29

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）  
総括研究報告書（平成29年度）

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

研究代表者： 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 センター長）

**研究要旨：**平成 28 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り、香気成分 elemicin 及び食品香料 furfuryl acetate 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。Elemicin の遺伝毒性評価では、LC-MS/MS による網羅的 DNA 損傷解析により、elemicin 400 mg/kg 群の肝 DNA において対照群に存在しない 5 つのスポットを検出した。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。*in vivo* 変異原性の検索では、*gpt* 変異体頻度 (MFs) は 100 mg/kg 群から上昇傾向が認められ、400 mg/kg 群において有意な高値を示した。以上から、elemicin はラット肝臓において特異的 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になった。Furfuryl acetate の評価では 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。血清生化学検査及び病理組織学的検索の結果、肝毒性性を示唆する変化は認められなかった。*gpt assay* 及び Spi- assay の結果、furfuryl acetate 投与群における MFs の変化は何れの用量においても認められなかった。また、肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の定量的解析の結果、その数及び面積に統計学的に有意な変化は見られなかったことから、furfuryl acetate のラット肝臓における毒性、遺伝毒性及び発がん性はないものと考えられた。以上より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本験法は、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。

また、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。

キーワード：短・中期包括的試験法、食品香料、*gpt delta* ラット

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 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 部長

研究分担者：石井 雄二

国立医薬品食品衛生研究所 病理  
部 室長

研究分担者：高須 伸二

国立医薬品食品衛生研究所 病理  
部 主任研究官

## 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きている。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 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。

る。

一方、我々は任意の臓器における *in vivo* 変異原性の検索が可能なレポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットを用いることで、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肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験法を開発し、アルコキシベンゼン化合物である香気成分サフロールおよびメチルオイゲノールが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。そこで本研究では JECFA で登録されている食品香料の中から、ヒト健康影響が懸念される物質について短期遺伝毒性・発がん性包括的試験による評価を実施し、ヒトリスク評価に資するデータを提供するとともに、食品添加物の安全性評価における本試験法の有用性を確認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。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、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、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。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、その他の詳細な報告はほとんどない。

Elemicin については平成 28 年度までに、本試験として雄性 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、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。その結果、本剤が肝毒性を有することに加え、肝発がん性を有する可能性を明らかにした。本年度は遺伝毒性評価として肝臓における網羅的 DNA 損傷解析と *in vivo* 変異原性の検索を実施した。Furfuryl alcohol については平成 28 年度までに用量設定試験を実施し、本試験における最高用量を 180 mg/kg 体重に設定した。本年度は本試験を実施し、肝臓における毒性、遺伝毒性及び発がん性評価を行った。

また、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。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。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、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、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。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

### 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。

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。

## B-2. Elemicin の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験

### B-2-1 網羅的 DNA 損傷解析

本試験で採取し凍結保存した肝臓の外側左葉の一部を解析に供した。和光純薬社製 DNA エキストラクター WB キットを使用して抽出した DNA を 100 µg/150 µl に調整し、Acetic acid buffer 及び Nuclease P1 を加えてインキュベーション (37°C, 3 hr) した。さらに Tris buffer 及び Alkaline phosphatase を加えてインキュベーション (37°C, 3 hr) し、得られた試料から 100 µl ずつを各群 (n=5) でまとめ、450 µl をエバポレーターで乾固後、メタノールで再溶解し、メタノール層をエバポレーターで再度乾固した後、30% DMSO 溶液 150 µl で再溶解し、試料とした。

LC-MS/MS は Agilent 社製 LC 1100 シリーズ及び Quattro Ultima mass spectrometry system (Waters 社製) を用いた。カラムは関東化学社製 Mightysil RP-18GP (2.0 x 150 mm, 5 µm) を用いた。移動相は溶液 A: 蒸留水 (0.001% ギ酸添加) と溶液 B: アセトニトリル (0.001% ギ酸添加) の混液を流速 0.2 ml/min で送液した。カラムを溶液 A/B=95/5 で安定させ、グラジエント機能を用いて測定開始 30 分後に溶液 A/B=10/90 とした。MS/MS のイオン化にはエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法のポジティブイオンモードを用い、Cone voltage 及び Collision energy はそれぞれ 35 V 及び 15 eV とした。検索質量の範囲は DNA を構成するデオキシグアノシン (dG), デオキシアデノシン (dA), デオキシシチジン (dC) 及びデオキシチミジン (dT) の各分子量 (267.2, 251.2, 227.2 及び 242.2) の平均値 247.0 に被験物質の分子量を加え、その ± 50 の範囲である m/z 405 から 505 とした。

### B-2-2 *in vivo* 変異原性の検索

*in vivo* 変異原性の検索では、本試験で採取し凍結保存した肝臓の外側左葉の一部を解析に供した。*gpt* assay では回収したファージ粒子を大腸菌 YG6020 に感染させ 6-チオグアニン (6-TG) とクロラムフェニコール (Cm) を含む培地上で生育するコロニーを単離した。単離したコロニーについては、再度、6-TG と Cm を含むプレートにストリークして生育することを確認した。また、ファージ粒子の懸濁液を適宜希釈した後に YG6020 株に感染させ、Cm のみを含む培地上で生育したコロニー数を計測した。Cm プレートで生育したコロニー数に希釈倍率を掛けて回収した総ファージ数 (あるいは回収した総トランスジーン数) を求めた。6-TG と Cm に耐性となったコロニー数を総ファージ数で除して *gpt* 遺伝子変異体頻度 (MFs) を算出した。

## B-3. Furfuryl acetate の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験

### B-3-1 動物実験

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。30 匹の F344 系 *gpt* delta ラットを各群 10 匹に配し、対照群と低及び高用量群の計 3 群を設けた。Furfuryl acetate の用量は平成 28 年度に実施した用量設定試験の結果から、それぞれ 0, 60 及び 180 mg/kg 体重に設定

し、13 週間（7 日/週）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屠殺・剖検し、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈から採血後、肝臓を摘出した。血清生化学的検査は、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. Cho）、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）、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチターゼ（ $\gamma$ -GTP）について測定した。摘出した肝臓は 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、病理組織学的検索並びに glutathione-S-transferase placental form（GST-P）陽性肝細胞巢の定量的解析に供した。また、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* 変異原性試験に供した。

#### B-3-2 *in vivo* 変異原性の検索

*In vivo* 変異原性の検索には、本試験で採取し凍結保存した肝臓の外側左葉の一部を用いた *.gpt assay* の方法は「B-2-2 *in vivo* 変異原性の検索」に記す。Spi-欠失変異の検出では、ファージは P2 lysogen（大腸菌 XL-1 Blue MRA(P2)株）に感染させ、Spi-プラークの候補については、さらに他の P2 溶原菌（大腸菌 WL95 株）に感染させ、*red gam* 遺伝子機能が不活化した真の Spi-プラークを検出した。また、パッケージング反応後の懸濁液を希釈した後に P2 ファージが溶原化していない大腸菌 XL-1 Blue MRA 株に感染させて、総プラーク数を算出した。真の Spi-プラーク数を回収した総プラーク数で除して Spi- MF を算出

した。

また、各アッセイの陽性対照として、既知の遺伝毒性発がん物質である 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline（MeIQx）を 5 mg/kg 体重の用量で 4 週間投与した F344 *gpt delta* ラットの肝臓を用いた。

#### B-3-3 肝発がん性の検索

肝発がん性の検索では、肝臓パラフィン切片について、抗 GST-P 抗体を用いた免疫組織化学的染色を実施し、GST-P 陽性肝細胞巢の定量的解析を実施した。

B-4 . 2-Pentylfuran、3-(2-furyl)acrolein、2-furyl methyl ketone 及び ethyl 3-(2-furyl) propanoate の GPG モデルによる遺伝毒性及び発がん性の検索

#### B-4-1 動物実験

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。

#### B-4-1 増殖能の検討

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、Dunnett 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）

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、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

##### C-1-1. 網羅的 DNA 損傷解析

対照群及び elemicin 400 mg/kg 投与群の肝臓の DNA アダクトームマップを Figure 1 に、MRM クロマトグラムを Figure 2 に示す。m/z 496, 474 及び 434 にそれぞれ 1 つ (Peak I, II 及び V), m/z 458 に 2 つ (Peak III 及び IV), 計 5 つの DNA 付加体と考えられるスポットが検出された。これらのうち、Peak I の保持時間 (14.82 min) は Peak II と一致し、質量差が 22 であったことから、Peak I と II は同一物質の Na<sup>+</sup>付加体及び H<sup>+</sup>付加体と判断した。Peak I, II, III 及び V の MS スペクトラムを Figure 3 に示す。すべてのピークの MS スペクトラムにおいてデオキシリボースの開裂に由来するフラグメントイオン ([M+H<sup>+</sup>-116]又は[M+Na<sup>+</sup>-116])と、elemicin に由来するフラグメントイオン(m/z207)が認められた。さらに、[M+H<sup>+</sup>-116]又は[M+Na<sup>+</sup>-116]と m/z207 の差から Peak I 及び II は dG, Peak III は dA, Peak V は dC と elemicin の付加体であることが示唆された。なお、Peak IV では Peak III との分離が不十分であったことから MS スペクトラムの検出が困難であったが、同じ質量数をもつ Peak III (dA の付加体) の異性体と考えられた。

##### C-1-2. *in vivo* 変異原性の検索

肝臓における *gpt* assay の結果を Figure 4 に示す。*gpt* MFs は 25 mg/kg 投与群で変化は認められず、100 mg/kg 投与群 (2.27 ± 1.05) で上昇傾向が認められ、400 mg/kg 投与群 (5.97 ± 1.43, p<0.05) で対照群 (0.84 ± 0.44) に比して有意な上昇が認められた。

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

##### C-2-1. 動物実験及び肝毒性の検索

実験期間中の体重及び摂餌量推移を Figure 5 に、肝重量を Figure 6 に示す。

Furfuryl acetate 投与群の体重推移並びに絶対及び相対肝重量は、何れの用量においても対照群に対し顕著な変化は認められなかった。また摂餌量推移に関しても、各群間において顕著な差異は認められなかった。血清生化学検査の結果を Table 1 に示す。60 mg/kg 以上投与群において、A/G, Alb 及び ALP の有意な上昇, 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、Glu, TG 及び AST の有意な低下が認められた。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。

#### C-2-2. *in vivo* 変異原性の検索

肝臓における *gpt* assay 及び Spi assay の結果を Figure 7 に示す。*gpt* assay の結果、陽性対照の MF は  $4.46 \times 10^{-5}$  で、対照群に比して顕著な高値を示した。しかしながら、furfuryl acetate 投与群における *gpt* MFs の有意な変化は何れの用量においても認められなかった。Spi assay の結果、陽性対照の MF は  $1.45 \times 10^{-5}$  で、対照群に比して顕著な高値を示した。しかしながら、furfuryl acetate 投与群において有意な変化は認められなかった。

#### C-2-3. 肝発がん性の検索

GST-P 陽性肝細胞巢の定量的解析結果を Figure 8 に示す。180 mg/kg 投与群における GST-P 陽性細胞巢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。

C-3. 2-Pentylfuran、3-(2-furyl)acrolein、2-furyl methyl ketone 及び ethyl 3-(2-furyl) propanoate の GPG モデルによる遺伝毒性及び発がん性

#### の検索

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

##### D-1. Elemicin の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験

LC-MS/MS による網羅的 DNA 損傷解析の結果、elemicin を 13 週間投与した F344 系 *gpt* delta ラットの肝臓では elemicin と dG, dA 又は dC が共有結合した特異的 DNA 付加体が検出された。さらに、400 mg/kg 体重投与群では *gpt* MFs の有意な上昇が認められた。以上から、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ことが明らかになった。また、平成 28 年度の研究で認められた肝前がん病変の誘発にはこの突然変異誘発性が関与することが考えられた。

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

Furfuryl acetate 投与群の体重推移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、何れも軽度な変化であり、TP に変化がみられないことから、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。また、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,

□-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 の変化は何れの用量においても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。

肝臓における GST-P 陽性細胞巢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に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なかった。また、その程度はこれまでに報告した furan の遺伝毒性・発がん性包括的検索<sup>1)</sup>における GST-P 陽性細胞巢の数及び面積と比べても、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はないものと考えられた。

D-3 . 2-Pentylfuran、3-(2-furyl)acrolein、2-furyl methyl ketone 及び ethyl 3-(2-furyl) propanoate の GPG モデルによる遺伝毒性及び発がん性の検索

*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、estragole 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<sup>5)</sup>、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

肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験の結果、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。また、*gpt delta* ラットを用いた肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験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。

また、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

(該当なし)

## G . 研究発表

(論文発表)

(学会発表)

- 1) 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 回日本毒理学学会学術年会

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
(該当なし)
2. 実用新案登録  
(該当なし)
3. その他  
(該当なし)



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： 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  
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

平成 28 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り，香氣成分 elemicin 及び食品香料 furfuryl acetate 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．Elemicin の遺伝毒性評価では，LC-MS/MS による網羅的 DNA 損傷解析により，elemicin 400 mg/kg 群の肝 DNA において対照群に存在しない 5 つのスポットを検出した．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．*in vivo* 変異原性の検索では，*gpt* 変異体頻度（MFs）は 100 mg/kg 群から上昇傾向が認められ，400 mg/kg 群において有意な高値を示した．以上から，elemicin はラット肝臓において特異的 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になった．Furfuryl acetate の評価では，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．血清生化学検査及び病理組織学的検索の結果，肝毒性性を示唆する変化は認められなかった．*gpt* assay 及び Spi<sup>-</sup> assay の結果，furfuryl acetate 投与群における MFs の変化は何れの用量においても認められなかった．また，肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の定量的解析の結果，その数及び面積に統計学的に有意な変化は見られなかったことから，furfuryl acetate のラット肝臓における毒性，遺伝毒性及び発がん性はないものと考えられた．以上より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本試験法は，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きている<sup>1-4)</sup>．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 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、我々は任意の臓器における *in vivo* 変異原性の検索が可能なレポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットを用いることで、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肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験法を開発し、アルコキシベンゼン化合物である香気成分サフロールおよびメチルオイゲノールが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<sup>3, 4)</sup>。そこで本研究では JECFA で登録されている食品香料の中から、ヒト健康影響が懸念される物質について短期遺伝毒性・発がん性包括的試験による評価を実施し、ヒトリスク評価に資するデータを提供するとともに、食品添加物の安全性評価における本試験法の有用性を確認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<sup>5, 6)</sup>。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<sup>7)</sup>、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<sup>8)</sup>、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<sup>9)</sup>。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<sup>10)</sup>、その他の詳細な報告はほとんどない。

Elemicin については平成 28 年度までに、本試験として雄性 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、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。その結果、本剤が肝毒性を有することに加え、肝発がん性を有する可能性を明らかにした。本年度は遺伝毒性評価として肝臓における網羅的 DNA 損傷解析と *in vivo* 変異原性の検索を実施した。Furfuryl alcohol については平成 28 年度までに用量設定試験を実施し、本試験における最高用量を 180 mg/kg 体重に設定した。本年度は本試験を実施し、肝臓における毒性、遺伝毒性及び発がん性評価を行った。

## 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

#### B-2-1 網羅的 DNA 損傷解析

本試験で採取し凍結保存した肝臓の外側左葉の一部を解析に供した. 和光純薬社製 DNA エキストラクター WB キットを使用して抽出した DNA を 100 µg/150 µl に調整し, Acetic acid buffer 及び Nuclease P1 を加えてインキュベーション (37°C, 3 hr) した. さらに Tris buffer 及び Alkaline phosphatase を加えてインキュベーション (37°C, 3 hr) し, 得られた試料から 100 µl ずつを各群 (n=5) でまとめ, 450 µl をエバポレーターで乾固後, メタノールで再溶解し, メタノール層をエバポレーターで再度乾固した後, 30%DMSO 溶液 150 µl で再溶解し, 試料とした.

LC-MS/MS は Agilent 社製 LC 1100 シリーズ及び Quattro Ultima mass spectrometry system (Waters 社製) を用いた. カラムは関東化学社製 Mightysil RP-18GP (2.0 x 150 mm, 5 µm) を用いた. 移動相は溶液 A: 蒸留水 (0.001%ギ酸添加) と溶液 B: アセトニトリル (0.001%ギ酸添加) の混液を流速 0.2 ml/min で送液した. カラムを溶液 A/B=95/5 で安定させ, グラジエント機能を用いて測定開始 30 分後に溶液 A/B=10/90 とした. MS/MS のイオン化にはエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法のポジティブイオンモードを用い, Cone voltage 及び Collision energy はそれぞれ 35 V 及び 15 eV とした. 検索質量の範囲は DNA を構成するデオキシグアノシン (dG), デオキシアデノシン (dA), デオキシチミン

(dC) 及びデオキシチミジン (dT) の各分子量 (267.2, 251.2, 227.2 及び 242.2) の平均値 247.0 に被験物質の分子量を加え, その ±50 の範囲である m/z 405 から 505 とした.

#### B-2-2 *in vivo* 変異原性の検索

*in vivo* 変異原性の検索では, 本試験で採取し凍結保存した肝臓の外側左葉の一部を解析に供した. *gpt* assay では回収したファージ粒子を大腸菌 YG6020 に感染させ 6-チオグアニン (6-TG) とクロラムフェニコール (Cm) を含む培地上で生育するコロニーを単離した. 単離したコロニーについては, 再度, 6-TG と Cm を含むプレートにストリークして生育することを確認した. また, ファージ粒子の懸濁液を適宜希釈した後に YG6020 株に感染させ, Cm のみを含む培地上で生育したコロニー数を計測した. Cm プレートで生育したコロニー数に希釈倍率を掛けて回収した総ファージ数 (あるいは回収した総トランスジーン数) を求めた. 6-TG と Cm に耐性となったコロニー数を総ファージ数で除して *gpt* 遺伝子変異体頻度 (MFs) を算出した.

### B-3. Furfuryl acetate の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験

#### B-3-1 動物実験

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. 動物の飼育はバリヤー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。30匹のF344系 *gpt* delta ラットを各群10匹に配し、対照群と低及び高用量群の計3群を設けた。Furfuryl acetate の用量は平成28年度に実施した用量設定試験の結果から、それぞれ0、60及び180 mg/kg 体重に設定し、13週間(7日/週)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屠殺・剖検し、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈から採血後、肝臓を摘出した。血清生化学的検査は、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. Cho)、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ラーゼ(ALP)、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチターゼ( $\gamma$ -GTP)について測定した。摘出した肝臓は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、病理組織学的検索並びに glutathione-S-transferase placental form (GST-P)陽性肝細胞巢の定量的解析に供した。また、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* 変異原性試験に供した。

#### B-3-2 *in vivo* 変異原性の検索

*In vivo* 変異原性の検索には、本試験で採取し凍結保存した肝臓の外側左葉の一部を用いた *gpt* assay の方法は「B-2-2 *in vivo* 変異原性の検索」に記す。Spi-欠失変異の検出では、ファージはP2 lysogen(大腸菌 XL-1 Blue MRA(P2)株)に感染させ、Spi-プラークの候補については、さらに他のP2 溶原菌(大腸菌 WL95 株)に感染させ、*red/gam* 遺伝子機能が不活化した真の Spi-プラークを検出した。また、パッケージング反応後の懸濁液を希釈した後に P2 ファージが溶原化していない大腸菌 XL-1

Blue MRA 株に感染させて、総プラーク数を算出した。真の Spi-プラーク数を回収した総プラーク数で除して Spi- MF を算出した。

また、各アッセイの陽性対照として、既知の遺伝毒性発がん物質である 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) を 5 mg/kg 体重の用量で4週間投与した F344 *gpt* delta ラットの肝臓を用いた。

#### B-3-3 肝発がん性の検索

肝発がん性の検索では、肝臓パラフィン切片について、抗 GST-P 抗体を用いた免疫組織化学的染色を実施し、GST-P 陽性肝細胞巢の定量的解析を実施した。

(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

#### C-1-1. 網羅的 DNA 損傷解析

対照群及び elemicin 400 mg/kg 投与群の肝臓の DNA アダクトームマップを Figure 1 に、MRM クロマトグラムを Figure 2 に示す。m/z 496、474 及び 434 にそれぞれ1つ(Peak I、II 及び V)、m/z 458 に2つ(Peak III 及び IV)、計5つの



DNA 付加体と考えられるスポットが検出された。これらのうち、Peak I の保持時間 (14.82 min) は Peak II と一致し、質量差が 22 であったことから、Peak I と II は同一物質の Na<sup>+</sup>付加体及び H<sup>+</sup>付加体と判断した。Peak I, II, III 及び V の MS スペクトラムを Figure 3 に示す。すべてのピークの MS スペクトラムにおいてデオキシリボースの開裂に由来するフラグメントイオン ([M+H<sup>+</sup>-116]又は[M+Na<sup>+</sup>-116])と、elemicin に由来するフラグメントイオン (m/z207) が認められた。さらに、[M+H<sup>+</sup>-116]又は[M+Na<sup>+</sup>-116]と m/z207 の差から Peak I 及び II は dG, Peak III は dA, Peak V は dC と elemicin の付加体であることが示唆された。なお、Peak IV では Peak III との分離が不十分であったことから MS スペクトラムの検出が困難であったが、同じ質量数をもつ Peak III (dA の付加体) の異性体と考えられた。

#### C-1-2. *in vivo* 変異原性の検索

肝臓における *gpt* assay の結果を Figure 4 に示す。*gpt* MFs は 25 mg/kg 投与群で変化は認められず、100 mg/kg 投与群 (2.27 ± 1.05) で上昇傾向が認められ、400 mg/kg 投与群 (5.97 ± 1.43, p<0.05) で対照群 (0.84 ± 0.44) に比して有意な上昇が認められた。

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

#### C-2-1. 動物実験及び肝毒性の検索

実験期間中の体重及び摂餌量推移を Figure 5 に、肝重量を Figure 6 に示す。Furfuryl acetate 投与群の体重推移並びに絶対及び相対肝重量は、何れの用量においても対照群に対し顕著な変化は認められなかった。また摂餌量推移に関しても、各群間において顕著な差異は認められなかった。血清生化学検査の結果を Table 1 に示す。60 mg/kg 以上投与群において、A/G, Alb 及び ALP の有意な

上昇、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、Glu, TG 及び AST の有意な低下が認められた。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。

#### C-2-2. *in vivo* 変異原性の検索

肝臓における *gpt* assay 及び Spi assay の結果を Figure 7 に示す。*gpt* assay の結果、陽性対照の MF は 4.46 × 10<sup>-5</sup> で、対照群に比して顕著な高値を示した。しかしながら、furfuryl acetate 投与群における *gpt* MFs の有意な変化は何れの用量においても認められなかった。Spi assay の結果、陽性対照の MF は 1.45 × 10<sup>-5</sup> で、対照群に比して顕著な高値を示した。しかしながら、furfuryl acetate 投与群において有意な変化は認められなかった。

#### C-2-3. 肝発がん性の検索

GST-P 陽性肝細胞巢の定量的解析結果を Figure 8 に示す。180 mg/kg 投与群における GST-P 陽性細胞巢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。

### D. 考察

#### D-1. Elemicin の肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験

LC-MS/MS による網羅的 DNA 損傷解析の結果、elemicin を 13 週間投与した F344 系 *gpt* delta ラットの肝臓では elemicin と dG, dA 又は dC が共有結合した特異的 DNA 付加体が検出された。さらに、400 mg/kg 体重投与群では *gpt* MFs の有意な上昇が認められた。以上から、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こ

とが明らかになった。また、平成 28 年度の研究で認められた肝がん病変の誘発にはこの突然変異誘発性が関与することが考えられた。

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

Furfuryl acetate 投与群の体重推移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、何れも軽度な変化であり、TP に変化がみられないことから、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。また、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、□-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 の変化は何れの用量においても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。

肝臓における GST-P 陽性細胞巢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に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なかった。また、その程度はこれまでに報告した furan の遺伝毒性・発がん性包括的検索<sup>1)</sup>における GST-P 陽性細胞巢の数及び面積と比べても、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はないものと考えられた。

#### 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。また、*gpt* delta ラットを用いた肝短期遺伝毒性・発がん性包括的試験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。

#### 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) 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ン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) 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) 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.

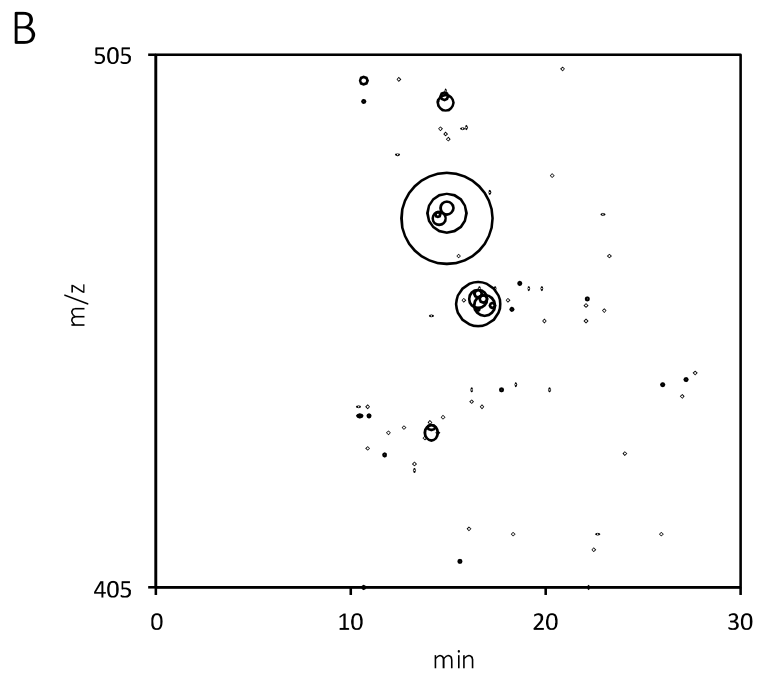
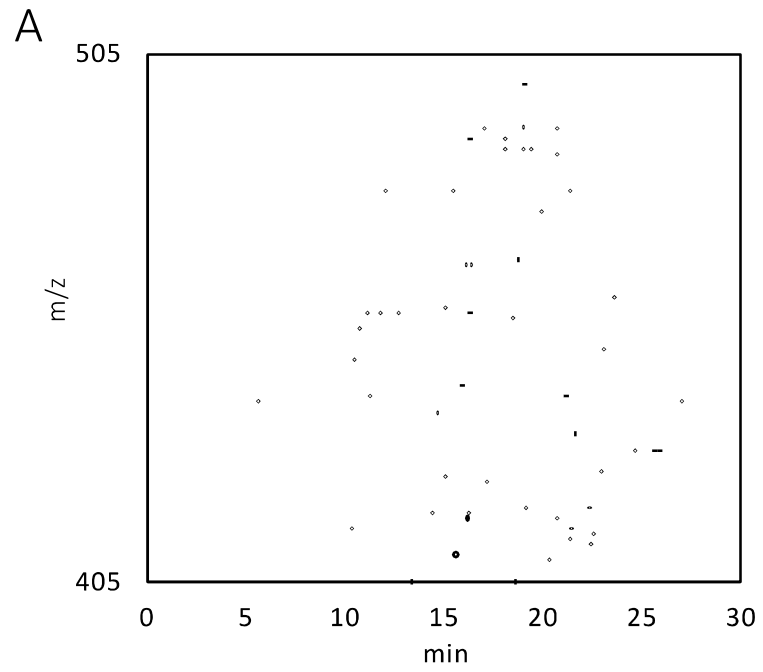


Figure 1. DNA adductome maps of liver of rats in the control group (A) and 400 mg/kg elemicin treated group (B).

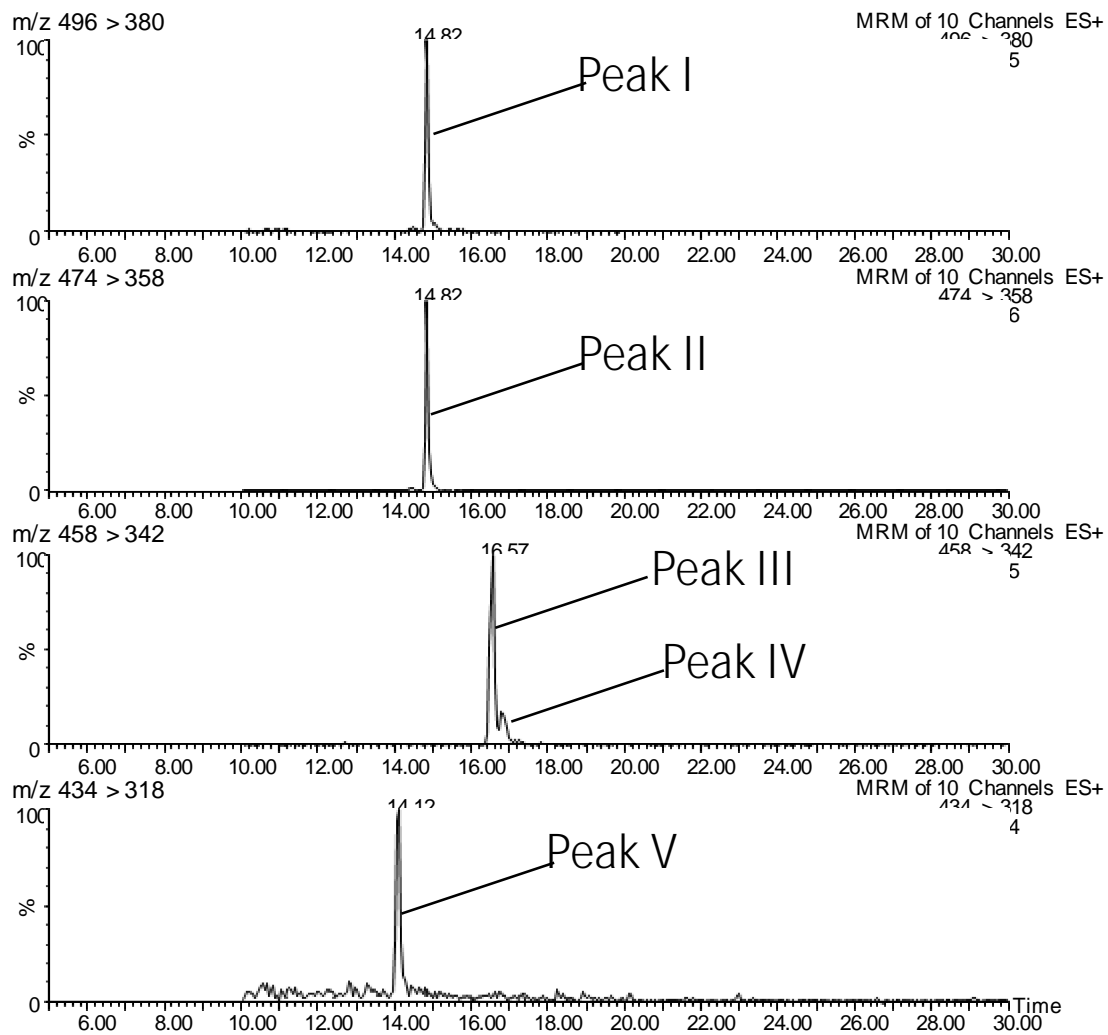


Figure 2. Representative MRM chromatograms of the elemicin-induced putative DNA adducts observed in the livers of F344 gpt delta rats treated with 400 mg/kg elemicin for 13 weeks.

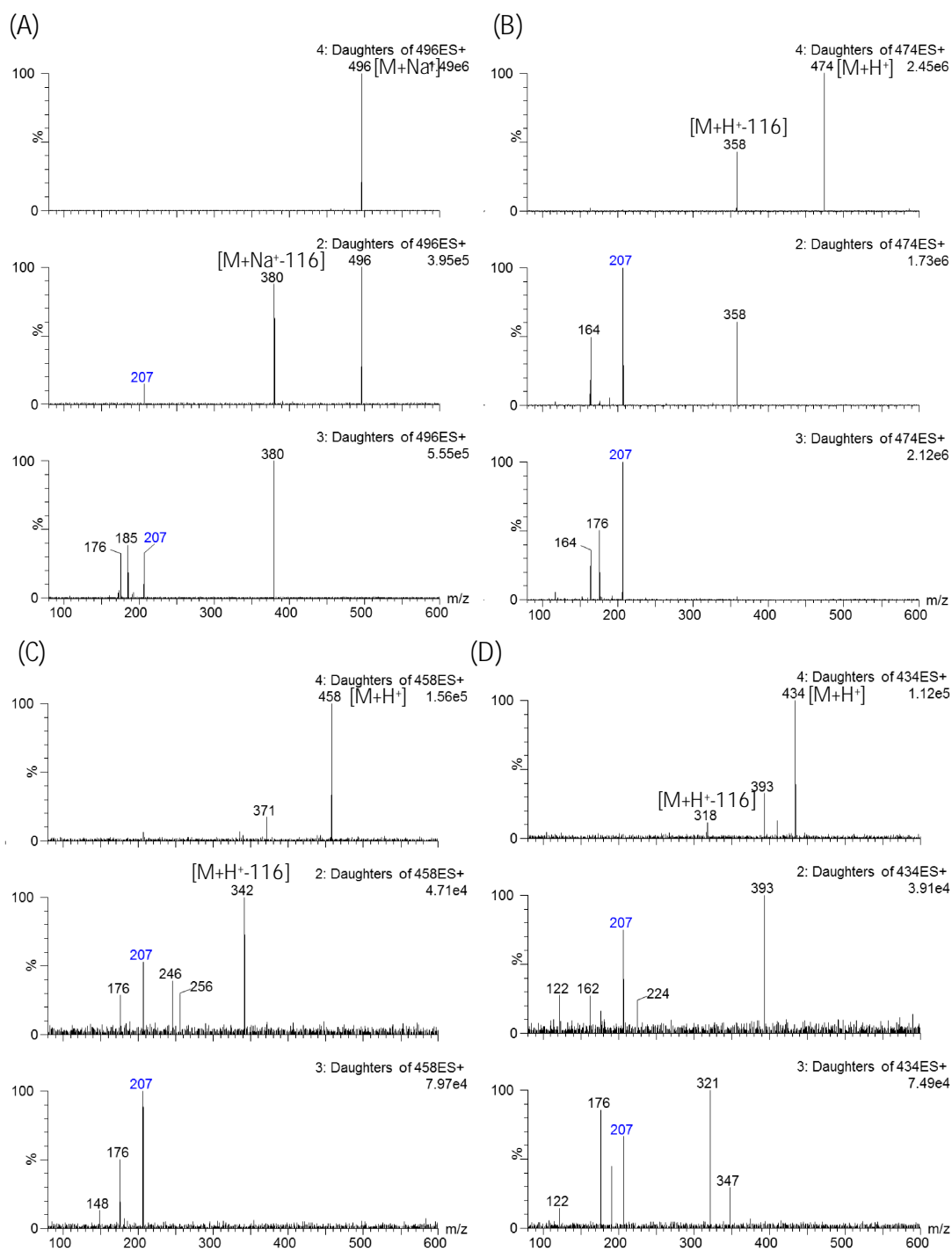


Figure 3. Product ion spectra of putative Peak I (A), Peak II (B), Peak III (C), and Peak V (D) detected in the livers of elemicin-treated gpt delta rats. The cone voltages and collision energies were set at 15 V and 5-30 eV in the positive ion mode, respectively.

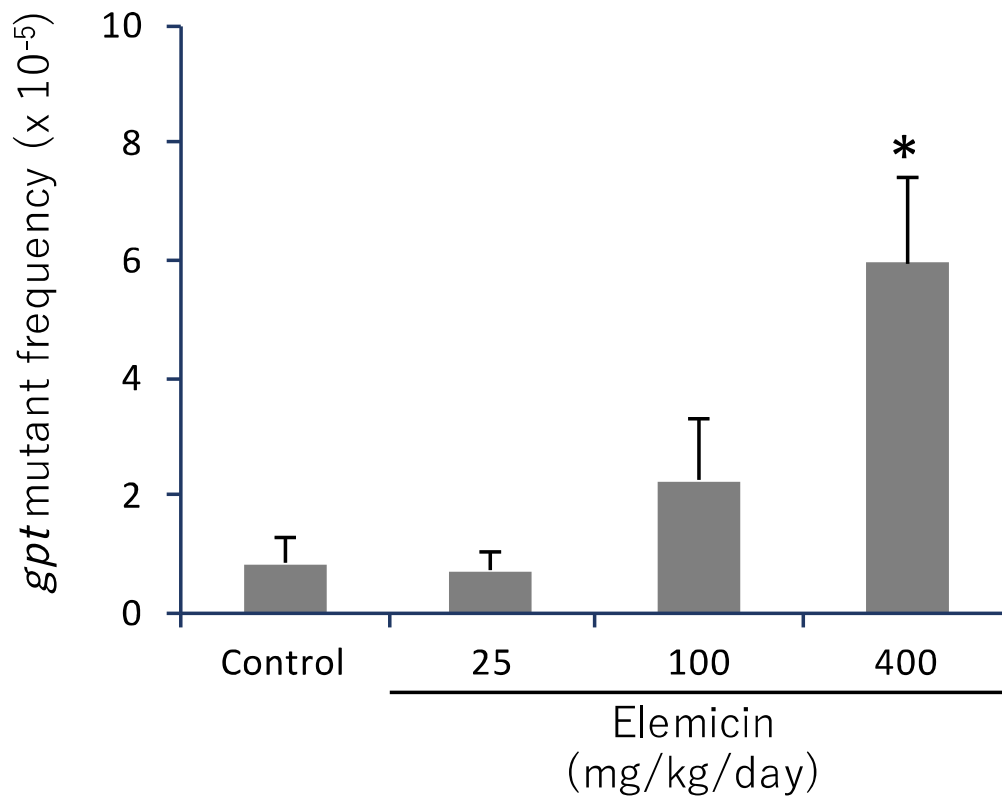


Figure 4. *gpt* MFs in the livers of F344 *gpt* delta rats treated with elemicin at a dose of 25, 100 and 400 mg/kg by gavage for 13 weeks. Values are means  $\pm$  s.d. (n = 5 in each group), \*, p < 0.05 vs control group using Dunnett's test.

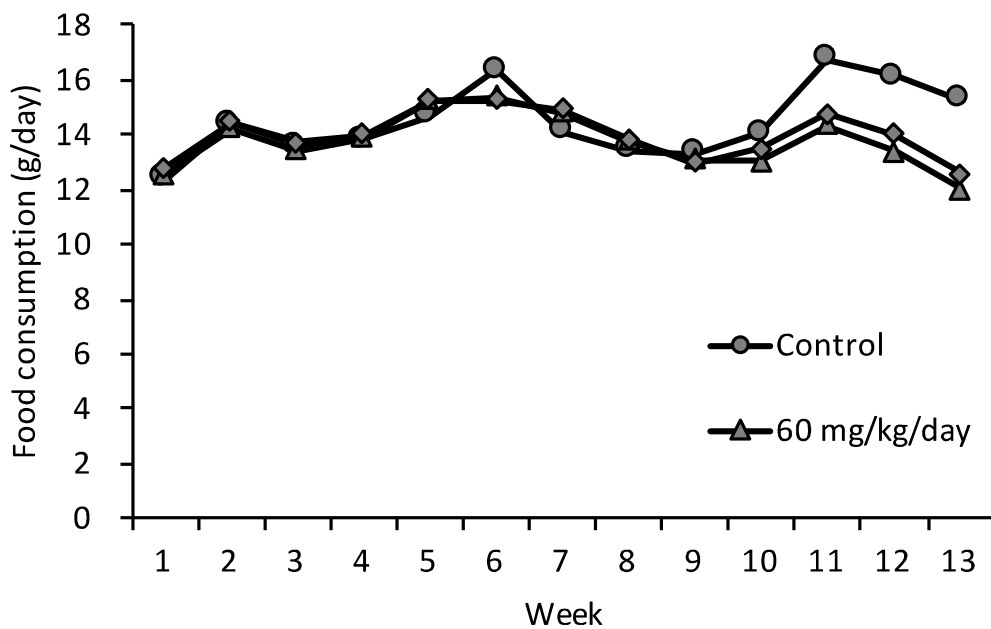
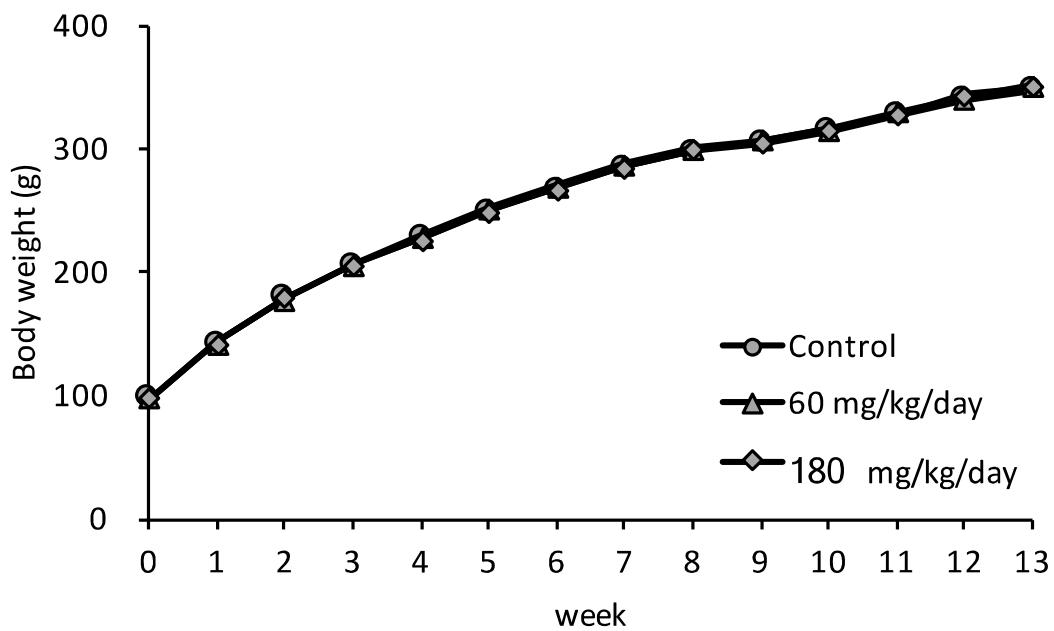


Figure 5. Body weight (A) and food consumption (B) of F344 *gpt* delta rats treated with furfuryl acetate at a dose of 60 and 180 mg/kg by gavage for 13 weeks.



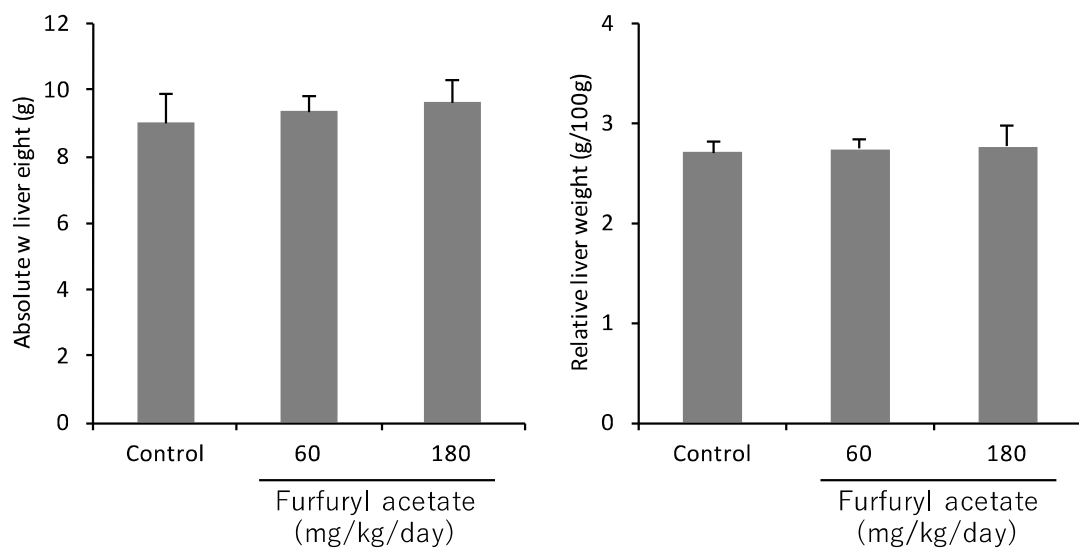


Figure 6. Liver weights of F344 *gpt* delta rats treated with furfuryl acetate at a dose of 60 and 180 mg/kg by gavage for 13 weeks. Values are means  $\pm$  s.d.

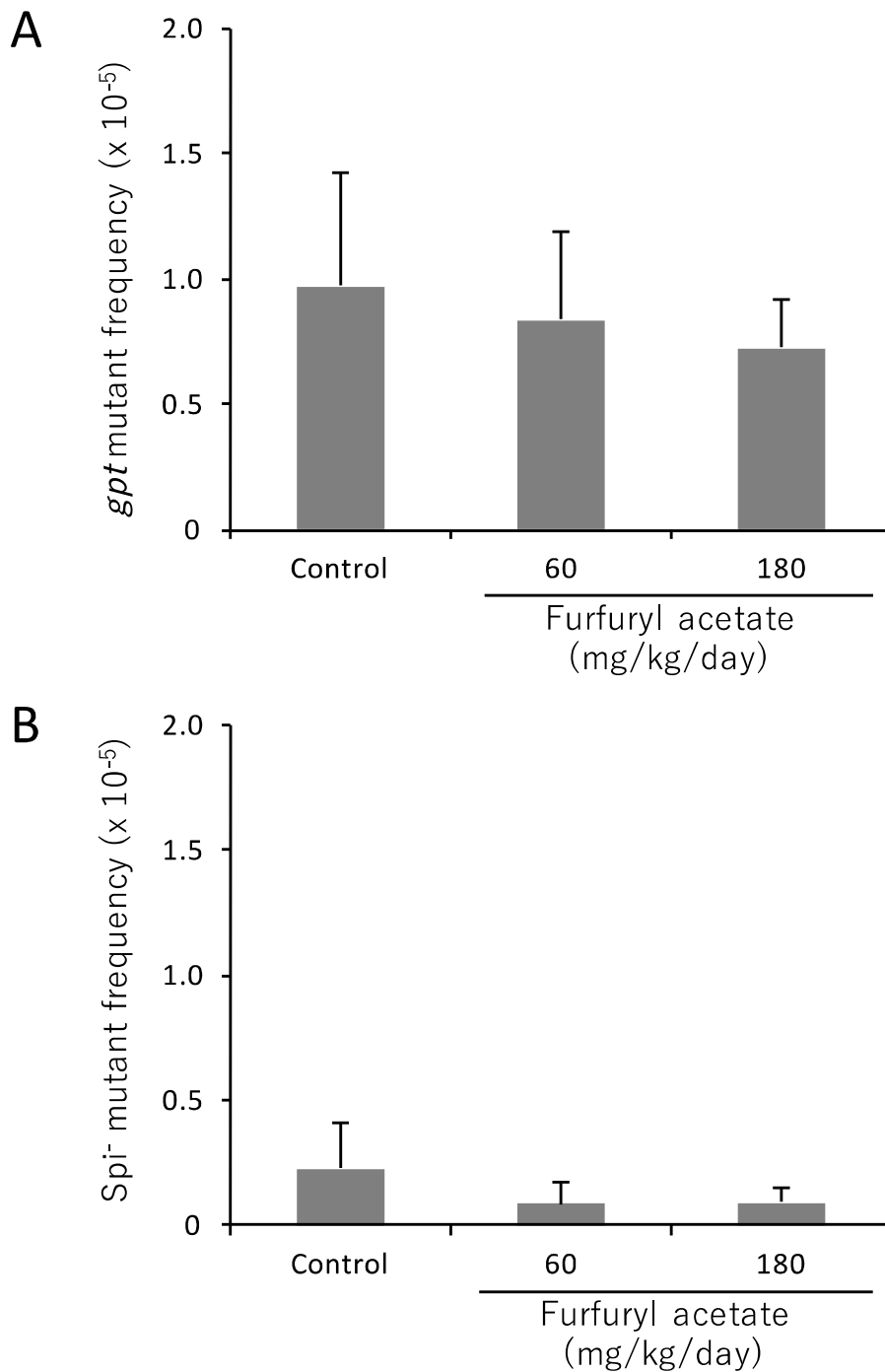


Figure 7. *gpt* (A) and *Spi*<sup>-</sup> (B) MFs in the livers of F344 *gpt* delta rats treated with furfuryl acetate at a dose of 60 and 180 mg/kg by gavage for 13 weeks. (n = 5 in each group). Values are means  $\pm$  s.d.

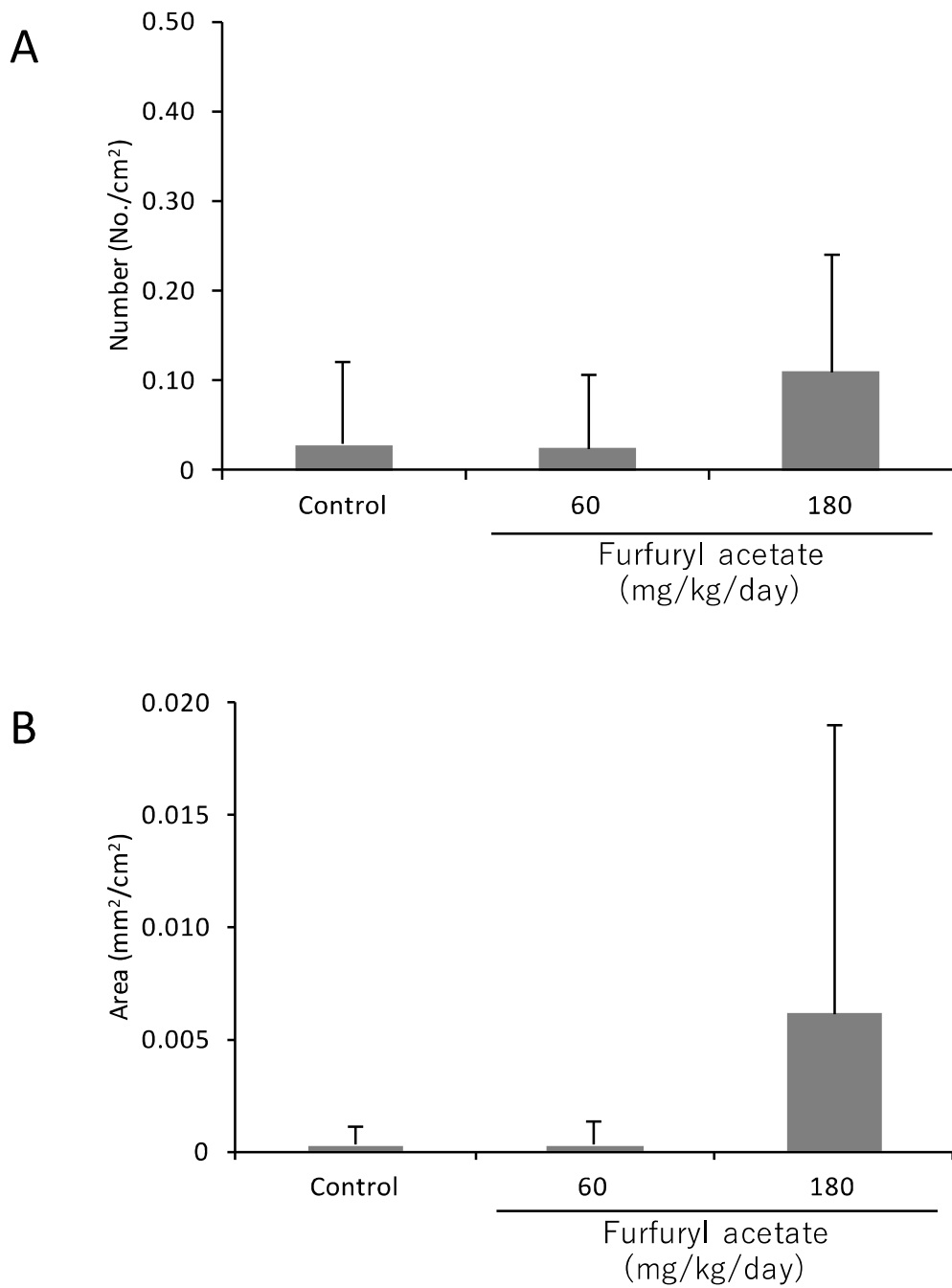


Figure 8. Number (A) and area (B) of GST-P positive foci in the livers of F344 *gpt* delta rats treated with furfuryl acetate at a dose of 60 and 180 mg/kg by gavage for 13 weeks. Values are means  $\pm$  s.d.

Table 1. Serum biochemical data for F344 gpt delta rats treated with furfuryl acetate for 13 weeks.

Item / group	Control	60 mg/kg	180 mg/kg
TP (g/dL)	6.4 ± 0.2	6.4 ± 0.1	6.4 ± 0.2
A/G	2.0 ± 0.1	2.2 ± 0.1 **	2.4 ± 0.1 **
Alb (g/dL)	4.3 ± 0.1	4.4 ± 0.1 *	4.5 ± 0.1 **
T. Bil (mg/dL)	0.052 ± 0.006	0.087 ± 0.024	0.083 ± 0.026
Glu (mg/dL)	158 ± 14	153 ± 10	143 ± 11 *
TG (mg/dL)	132 ± 29	116 ± 33	88 ± 18 **
T. cho (mg/dL)	76 ± 5	66 ± 3 **	64 ± 7 **
AST (IU/L)	83 ± 6	77 ± 5	72 ± 7 **
ALT (IU/L)	41 ± 5	41 ± 3	40 ± 5
ALP (IU/L)	445 ± 36	795 ± 90 **	766 ± 92 **
γ-GTP (IU/L)	<3	<3	<3

\*, \*\*  $p < 0.05$  and  $0.01$  vs control.

TP, total protein; A/G, albumin/globulin ratio; Alb, albumin; T. Bil, total bilirubin; GLU, glucose; TG, triglyceride; T. Cho, total cholesterol; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; γ-GT, γ-glutamyl aminotransferase.

別添 5

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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>、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<sup>4)</sup>、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<sup>5)</sup>。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<sup>5)</sup>、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.

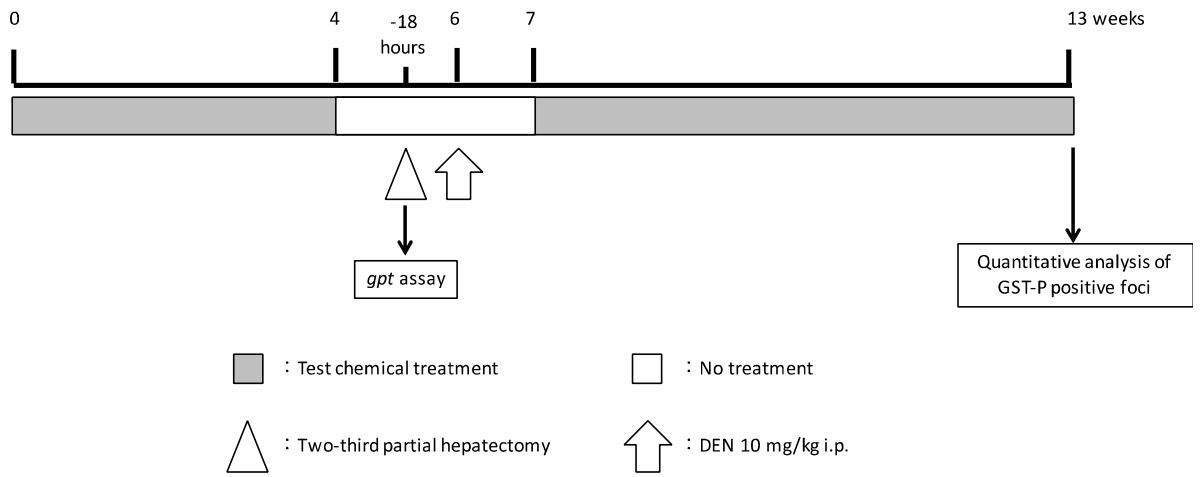


Figure 1. Standard protocol for GSG model.

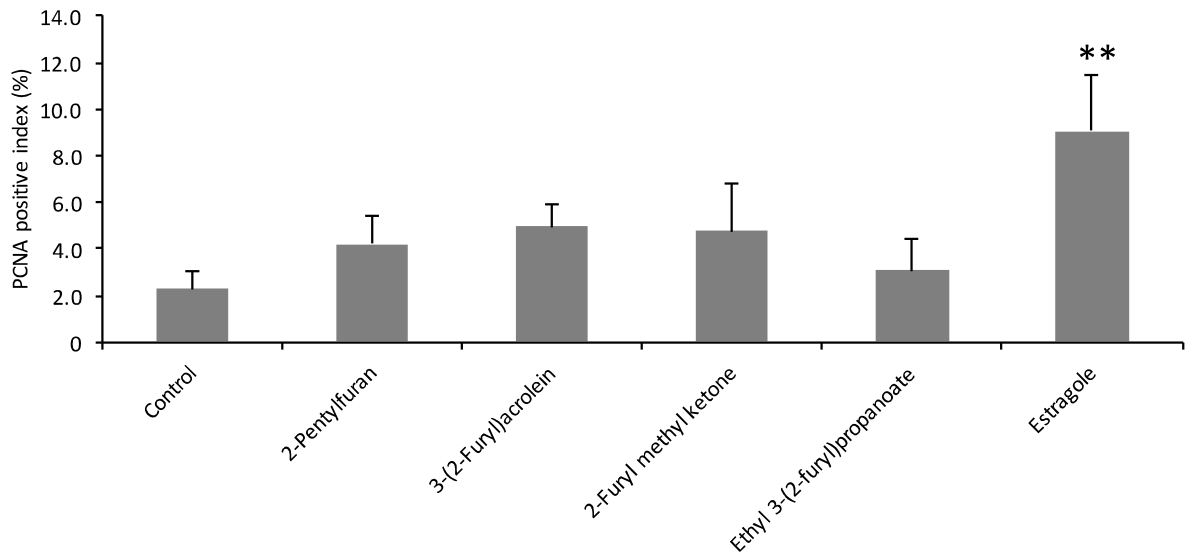


Figure 2. PCNA positive index in the liver of rats treated with 2-pentylfuran, 3-(2-furyl)acrolein, 2-furyl methyl ketone and ethyl 3-(2-furyl)propanoate. Values are means  $\pm$  s.d. (n = 5 in each group), \*\*, p < 0.01 vs control group using Dunnett's test.



別添 6

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当なし					