

令和2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

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 *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化合物のうち 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を被験物質として遺伝毒性・発がん性包括的試験法による *in vivo* での評価を実施した。6週齢の雄性 F344 *gpt delta* ラットに 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を 0, 30 または 300 mg/kg の用量で 1日1回 13週間強制経口投与し、一般毒性ならびに肝臓を対象とした遺伝毒性・発がん性の検索を実施した。一般毒性検索の結果、3-acetyl-2,5-dimethylfuran は体重、鼻腔、肝臓及び脂質代謝に影響を与える可能性が示唆された。遺伝毒性に関しては、肝臓の *gpt assay* の結果、300 mg/kg/day 投与群における *gpt* 変異体頻度は有意な高値を示したことから、3-acetyl-2,5-dimethylfuran はラット肝臓において変異原性を示すことが明らかとなった。発がん性に関しては、300 mg/kg/day 投与群において肝前がん病変である GST-P 陽性細胞巢の数および面積の有意な増加が認められたことから、3-acetyl-2,5-dimethylfuran はラット肝発がん性を有する可能性が示された。本試験法は変異原性が疑われる化合物について *in vivo* における変異原性を検証するための有益なモデルであることが示された。

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。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。本分担研究課題では、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、昨年度までの用量設定試験をもとに、遺伝毒性・発がん性包括的試験法による評価を実施した。

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 *gpt delta* 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 *gpt delta* ラット各群 10 匹にコーン油に混じた 3-acetyl-2,5-dimethylfuran を 30 または 300 mg/kg の濃度で 1 日 1 回 13 週間強制経口投与した。対照群にはコーン油を与えた。試験期間中は体重および摂餌量を週 1 回測定し、一般状態の観察を毎日行った。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、血液学的検査および血清生化学的検査を実施した。剖検時に全身諸器官・組織を摘出し、脳、肺、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣については重量の測定を行った。前立腺、精嚢、唾液腺 (顎下腺および舌下腺)、下垂体、甲状腺 (上皮小体を含む) に関してはホルマリン固定後に重量の測定を行った。摘出した全身諸器官・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。

遺伝毒性評価では肝臓について *gpt assay* による *in vivo* 変異原性の検索を、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。検索対象臓器に関しては、3-acetyl-2,5-dimethylfuran がラット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して有していること、および用量設定試験において 3-acetyl-2,5-dimethylfuran の投与群において肝細胞増殖活性の亢進が認められたことから肝臓を検索対象とした。

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、Dunnnett 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

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。一般状態の観察において、300 mg/kg/day 投与群の全例で投与 1 週

目から鼻出血が認められたが、症状は投与3週目以降には観察されなかった。

各群の体重および摂餌量の推移を Figure 1 に示す。300 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。摂餌量は被験物質投与群において低下する傾向が認められた。

血液学的検査の結果を Table 1 に示す。30 mg/kg/day 以上の投与群の赤血球数、300 mg/kg/day 投与群のヘモグロビン濃度および好酸球比の有意な低値が認められた。また、300 mg/kg/day 投与群の血小板数、好中球比、30 mg/kg/day 投与群の平均赤血球容積および平均赤血球血色素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。30 mg/kg/day 以上の投与群において、総蛋白、トリグリセリド、総コレステロール、リン脂質、尿素窒素、クレアチニンおよびアラニンアミノトランスフェラーゼの有意な低値、A/G 比の有意な高値が認められた。また、300 mg/kg/day 投与群の総ビリルビンおよびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼは有意な低値を示した。

投与終了後の臓器重量の結果を Table 3 に示す。300 mg/kg/day 投与群の肝臓および腎臓の絶対および相対重量はいずれも有意な高値を示した。300 mg/kg/day 投与群の脳、心臓、胸腺、甲状腺および30 mg/kg/day 以上の投与群の脾臓および唾液腺の絶対重量は有意な低値を示した。一方、300 mg/kg/day 投与群の脳、肺、心臓、副腎、下垂体、精巣、精囊、前立腺の相対重量は有意な高値を示した。また、30 mg/kg/day 投与群において脾臓および唾液腺の相対重量は有意に低下した。

病理組織学的検査の結果を Table 4 に示す。300 mg/kg/day 投与群の肝臓における軽度の小葉中心性肝細胞肥大、鼻腔における嗅上皮の変性/壊死、呼吸上皮化生および鉍質沈着が認められた。

gpt assay および *gpt* 変異体スペクトラム

解析の結果をそれぞれ Table 5 および 6 に示す。300 mg/kg/day 投与群における *gpt* 変異体頻度は対照群に比して有意な高値を示した。一方、*gpt* 変異体スペクトラム解析ではいずれの変異パターンにおいても統計学的に有意な変化は認められなかった。

肝前がん病変マーカーGST-P 陽性細胞巢の定量解析の結果を Figure 2 に示す。300 mg/kg/day 投与群における GST-P 陽性細胞巢の数および面積において有意な増加が認められた。

D. 考察

一般毒性検索の結果、300 mg/kg/day 投与群において鼻出血（投与2週目まで）、鼻腔嗅上皮の変性、呼吸上皮化生が認められた。昨年度までの用量設定試験の結果、540 mg/kg/day の用量で4週間反復投与したラットにおいても鼻腔嗅上皮の壊死が認められており、3-acetyl-2,5-dimethylfuran は高用量において鼻腔嗅上皮を毒性標的とすることが明らかとなった。

血液学的検査の結果、赤血球数、ヘモグロビン濃度および好酸球比の低値、血小板数、好中球比の高値が認められた。しかし、病理組織学的検査の結果、骨髄や脾臓などの造血器に変化は認められず、出血もみられなかったことから、毒性学的に意義の乏しい変化であると考えた。

血清生化学的検査の結果、血清中のトリグリセリド、総コレステロール、リン脂質は用量依存的に低下したことから、3-acetyl-2,5-dimethylfuran は生体の脂質代謝に影響を与える可能性が考えられた。一方、その他の項目において統計学的に有意な変化が認められたものの、変化の程度は小さく、関連する病理組織学的な変化も見られないことから、毒性学的な意義は乏しいと考えられた。

臓器重量においては肝臓および腎臓の絶対および相対重量の有意な高値が認められた。肝臓では病理組織学的に小葉中心性肝細胞肥大が認められていることから、この

変化の反映した投与に起因した変化であると考えられた。一方、腎臓については関連する病理組織学変化がないことから毒性学的意義の乏しい変化であると考えた。その他、脳、肺、心臓、副腎、下垂体、精巣、精嚢、前立腺の相対重量の増加が認められたが、これら変化は絶対重量の増加を伴っていないことから、体重の低値に起因した変化であると考えた。

遺伝毒性に関して、既知類似化合物に関する情報に加え、用量設定試験の結果から化合物の影響が見られる臓器として選別した肝臓について *gpt* assay を行った。その結果、300 mg/kg/day 投与群における *gpt* 変異体頻度は有意な高値を示したことから、3-acetyl-2,5-dimethylfuran はラット肝臓において変異原性を示すことが明らかとなった。さらに、300 mg/kg/day 投与群では GST-P 陽性細胞巢の有意な増加が認められたことから、3-acetyl-2,5-dimethylfuran は肝発がん性を有する可能性も示された。

被験物質の 3-acetyl-2,5-dimethylfuran は、先行する本間、安井らの *in silico* および *in vitro* 解析結果から変異原性が疑われた化合物の一つである。今回、*gpt delta* ラット用いた遺伝毒性・発がん性包括的試験法を用いることで本剤の *in vivo* における変異原性および発がん性を検証することができた。本試験法は変異原性が疑われる化合物について *in vivo* における変異原性を検証するための有益なモデルであることが示された。

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 *in vivo* での検討を行った。3-acetyl-2,5-dimethylfuran を 13 週間反復投与した結果、肝臓における *gpt* 変異体頻度は有意な高値を示したことから、3-acetyl-2,5-dimethylfuran はラット肝臓において変異原性を示すことが明らかとなった。さらに、GST-P 陽性細胞巢の有意な増加が認められたことから、

3-acetyl-2,5-dimethylfuran は肝発がん性を有する可能性が示された。本試験法は変異原性が疑われる化合物について *in vivo* における変異原性を検証するための有益なモデルであることが示された。

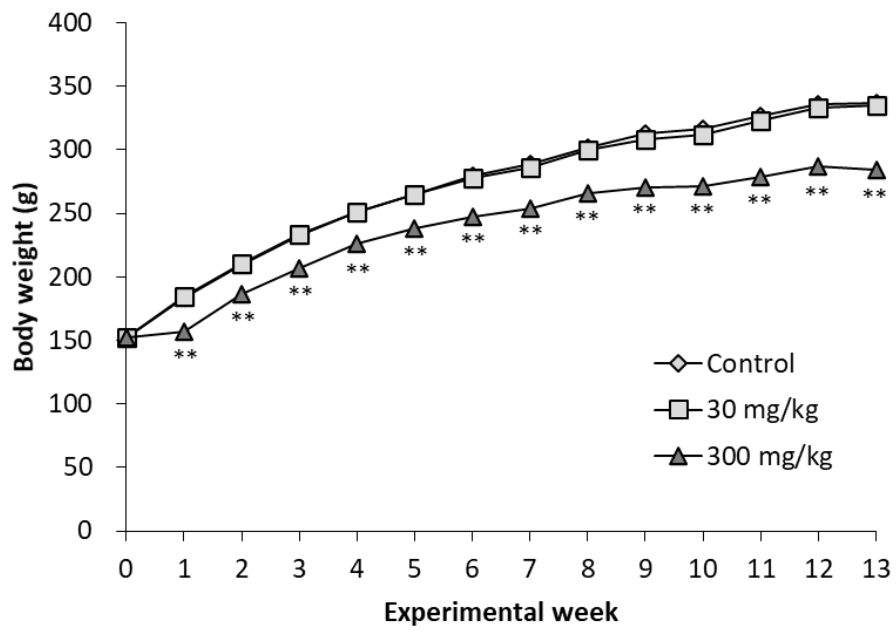
F. 健康危険情報
特になし

G. 研究成果
G-1. 発表論文
なし

G-2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

A



B

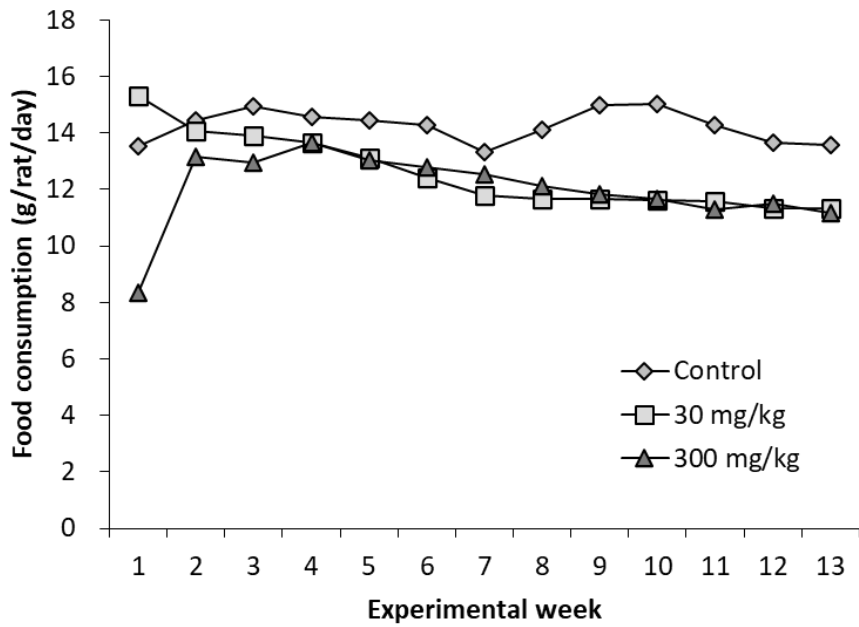


Figure 1. Body weight (A) and food consumption of F344 *gpt* delta rats treated with 3-acetyl-2,5-dimethylfuran for 13 weeks. ** $p < 0.01$ vs control.

Table 1. Hematological data for F344 *gpt* delta rats treated with 3-acetyl-2,5-dimethylfuran for 13 weeks.

		Control	30 mg/kg	300 mg/kg
Number of animals		10	10	10
RBC	(10 ⁶ /mL)	9.25 ± 0.12 ^a	8.99 ± 0.22 *	8.96 ± 0.24 **
HGB	(g/dL)	15.5 ± 0.2	15.3 ± 0.4	15.1 ± 0.4 *
HCT	(%)	45.6 ± 0.6	45.3 ± 1.2	44.6 ± 1.5
MCV	(fL)	49.3 ± 0.6	50.4 ± 0.4 **	49.8 ± 0.5
MCH	(pg)	16.7 ± 0.1	17.0 ± 0.2 **	16.8 ± 0.2
MCHC	(g/dL)	33.9 ± 0.2	33.7 ± 0.3	33.7 ± 0.2
PLT	(10 ³ /mL)	647.7 ± 63.4	665.6 ± 36.2	735.1 ± 57.2 **
WBC	(10 ³ /mL)	4.13 ± 0.67	4.02 ± 0.85	3.46 ± 0.96
Differential cell counts				
Neutrophils	(%)	22.7 ± 7.4	27.6 ± 8.0	30.9 ± 6.8 *
Eosinophils	(%)	1.2 ± 0.4	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.2 **
Basophils	(%)	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2
Lymphocytes	(%)	69.7 ± 7.2	68.9 ± 8.0	66.1 ± 6.6
Monocytes	(%)	2.4 ± 0.6	2.2 ± 0.4	2.0 ± 0.4

^a Data represent means ± SD.

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

Table 2. Serum biochemistry data for F344 *gpt* delta rats treated with 3-acetyl-2,5-dimethylfuran for 13 weeks.

		Control	30 mg/kg	300 mg/kg
TP	(g/dL)	6.6 ± 0.2 ^a	6.3 ± 0.2 **	6.3 ± 0.2 **
A/G		2.2 ± 0.1	2.3 ± 0.1 *	2.6 ± 0.2 **
Alb	(g/dL)	4.5 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.6 ± 0.1
T-Bil	(mg/dL)	0.046 ± 0.008	0.041 ± 0.007	0.035 ± 0.008 *
Glu	(mg/dL)	168 ± 26	157 ± 19	164 ± 28
TG	(mg/dL)	128 ± 28	73 ± 24 **	33 ± 5 **
T-Cho	(mg/dL)	71 ± 5	63 ± 7 **	61 ± 3 **
PL	(mg/dL)	125 ± 9	108 ± 12 **	102 ± 4 **
BUN	(mg/dL)	16.1 ± 1.1	13.2 ± 1.4 **	12.1 ± 0.6 **
CRN	(mg/dL)	0.32 ± 0.01	0.30 ± 0.01 **	0.23 ± 0.02 **
Ca	(mg/dL)	10.5 ± 0.2	10.5 ± 0.2	10.4 ± 0.2
P	(mg/dL)	5.7 ± 0.2	5.5 ± 0.5	5.9 ± 0.3
Na	(mEq/dL)	143.7 ± 1.1	143.5 ± 0.8	143.7 ± 1.6
K	(mEq/dL)	4.2 ± 0.3	4.2 ± 0.2	4.3 ± 0.2
Cl	(mEq/dL)	103.1 ± 1.0	102.8 ± 1.0	102.8 ± 1.1
AST	(IU/L)	84 ± 31	67 ± 8	57 ± 7 **
ALT	(IU/L)	59 ± 20	45 ± 6 *	36 ± 3 **
ALP	(IU/L)	461 ± 39	466 ± 50	425 ± 32
γ-GTP	(IU/L)	<3	<3	<3

^a Data represent means ± SD.

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

Table 3. Organ weight data for F344 gpt delta rats treated with 3-acetyl-2,5-dimethylfuran for 13 weeks.

	Control	30 mg/kg	300 mg/kg
Number of animals	10	10	10
Final body weights (g)	329 ± 16 ^a	328 ± 14	278 ± 11 **
Organ weights (absolute) (g)			
Brain	1.97 ± 0.04	1.94 ± 0.04	1.82 ± 0.04 **
Lungs	0.98 ± 0.06	1.02 ± 0.07	0.92 ± 0.06
Heart	0.87 ± 0.03	0.88 ± 0.05	0.80 ± 0.05 **
Thymus	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.15 ± 0.03 **
Liver	8.51 ± 0.60	8.50 ± 0.64	9.40 ± 0.49 **
Kidneys	1.94 ± 0.11	2.00 ± 0.11	2.13 ± 0.09 **
Spleen	0.63 ± 0.02	0.60 ± 0.04 *	0.53 ± 0.01 **
Adrenals	0.044 ± 0.007	0.042 ± 0.004	0.044 ± 0.006
Pituitary	0.0104 ± 0.0009	0.0101 ± 0.0008	0.0109 ± 0.0009
Thyroid	0.0211 ± 0.0029	0.0212 ± 0.0031	0.0181 ± 0.0016 *
Testes	2.91 ± 0.05	2.87 ± 0.11	2.88 ± 0.11
Seminal vesicle	1.21 ± 0.18	1.16 ± 0.15	1.31 ± 0.09
Prostate	0.93 ± 0.15	0.86 ± 0.10	0.92 ± 0.15
Salivary gland	0.62 ± 0.06	0.55 ± 0.03 **	0.48 ± 0.04 **
Organ weights (relative) (g/100g b.w.)			
Brain	0.60 ± 0.03	0.59 ± 0.02	0.65 ± 0.02 *
Lungs	0.30 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.33 ± 0.02 **
Heart	0.27 ± 0.01	0.27 ± 0.02	0.29 ± 0.02 *
Thymus	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Liver	2.59 ± 0.08	2.59 ± 0.10	3.38 ± 0.10 **
Kidneys	0.59 ± 0.01	0.61 ± 0.02	0.77 ± 0.02 **
Spleen	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.01 *	0.19 ± 0.01
Adrenals	0.013 ± 0.002	0.013 ± 0.001	0.016 ± 0.002 *
Pituitary	0.0032 ± 0.0002	0.0031 ± 0.0002	0.0039 ± 0.0003 **
Thyroid	0.0064 ± 0.0008	0.0064 ± 0.0009	0.0065 ± 0.0006
Testes	0.89 ± 0.04	0.88 ± 0.03	1.04 ± 0.06 **
Seminal vesicle	0.37 ± 0.04	0.35 ± 0.05	0.47 ± 0.03 **
Prostate	0.28 ± 0.04	0.26 ± 0.03	0.33 ± 0.06 *
Salivary gland	0.188 ± 0.017	0.166 ± 0.010 **	0.173 ± 0.017

^a Data represent means ± SD.

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

Table 4. Histopathological findings of F344 gpt delta rats treated with 3-acetyl-2,5-dimethylfuran for 13 weeks.

	Control	30 mg/kg	300 mg/kg
Number of animals	10	10	10
Liver			
Hypertrophy, hepatocellular, centrilobular, slight	0	0	5 *
Kidney			
Lymphoid infiltration, minimal	1	0	0
Heart			
Myocardial degeneration / mononuclear cell infiltration, minimal	1	-	0
Pituitary			
Cyst, pars distalis	1	-	0
Nasal cavity			
Degeneration/necrosis, olfactory epithelium, slight	0	0	6 *
Respiratory metaplasia	0	0	10 *
Mineralization	0	0	4 *

*, Significantly different from the control at $p < 0.05$ (Fisher's exact test)

Table 5. *gpt* mutant frequencies in the liver of F344 *gpt* delta rats treated with 3-acetyl-2,5-dimethylfuran for 13 weeks.

	Animal No.	Cm ^R clones (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
Control	2	4.5	4	0.90	0.78 ± 0.28 ^a
	3	12.0	10	0.84	
	5	5.7	4	0.70	
	8	3.7	4	1.09	
	9	5.7	2	0.35	
30 mg/kg	13	3.2	2	0.63	0.49 ± 0.31
	14	3.9	1	0.26	
	15	3.7	1	0.27	
	18	10.3	10	0.97	
	20	3.3	1	0.30	
300 mg/kg	21	1.9	5	2.58	1.95 ± 1.15 *
	22	8.1	3	0.37	
	23	2.5	7	2.78	
	27	2.4	7	2.94	
	30	2.8	3	1.08	

^a Data represent means ± SD.

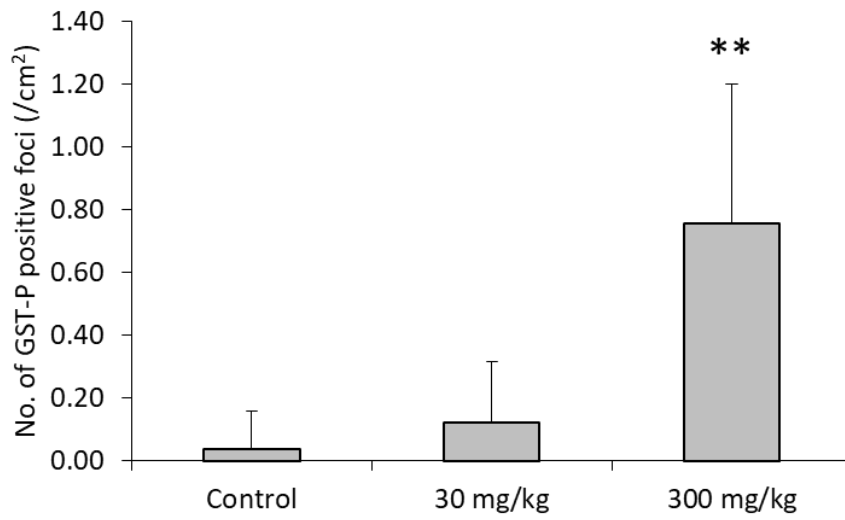
*: Values are significantly different from control at $p < 0.05$.

Table 6. Mutation spectra of *gpt* mutants in the liver of F344 *gpt* delta rats treated with 3-acetyl-2,5-dimethylfuran for 13 weeks.

	Control		30 mg/kg		300 mg/kg	
	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)	No. (%)	MF (x10 ⁻⁵)
Base substitution						
Transversion						
G:C-T:A	1 (4.2)	0.02 ± 0.04 ^a	3 (20.0)	0.13 ± 0.15	2 (8.0)	0.16 ± 0.22
G:C-C:G	1 (4.2)	0.02 ± 0.04	2 (13.3)	0.08 ± 0.13	3 (12.0)	0.27 ± 0.25
A:T-T:A	1 (4.2)	0.04 ± 0.10	0 (0.0)	0	2 (8.0)	0.16 ± 0.22
A:T-C:G	0 (0.0)	0	1 (6.7)	0.06 ± 0.14	1 (4.0)	0.07 ± 0.16
Transition						
G:C-A:T	16 (66.7)	0.47 ± 0.14	4 (26.7)	0.08 ± 0.17	10 (40.0)	0.77 ± 0.80
A:T-G:C	2 (8.3)	0.10 ± 0.14	2 (13.3)	0.07 ± 0.12	4 (16.0)	0.27 ± 0.34
Deletion						
Single bp	1 (4.2)	0.04 ± 0.08	0 (0.0)	0	1 (4.0)	0.08 ± 0.19
Over 2 bp	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0	2 (8.0)	0.16 ± 0.35
Insertion	1 (4.2)	0.05 ± 0.12	3 (20.0)	0.06 ± 0.13	0 (0.0)	0
Complex	1 (4.2)	0.04 ± 0.08	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0
Total	24	0.78 ± 0.28	15	0.49 ± 0.31	25	1.95 ± 1.15

^a Data represent means ± SD.

A



B

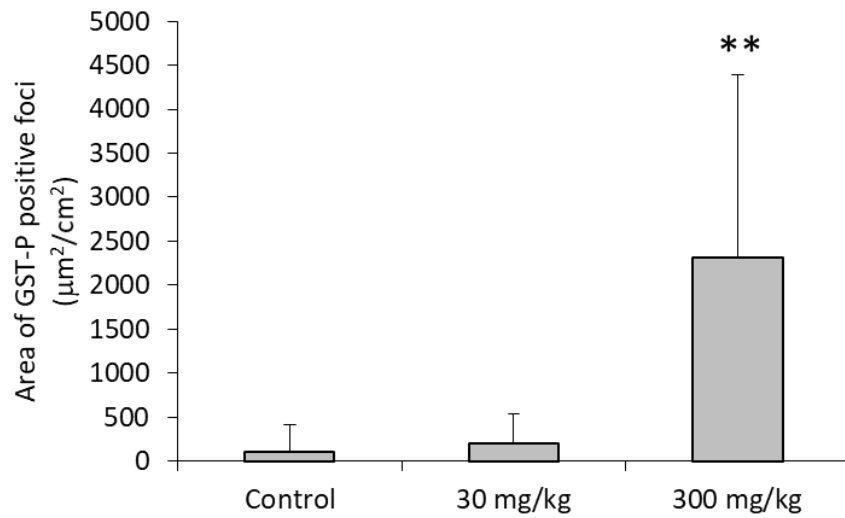


Figure 2. Number (A) and area (B) of GST-P positive foci in the liver of F344 *gpt* delta rats treated with 3-acetyl-2,5-dimethylfuran for 13 weeks. Data represent means \pm SD. ** p <0.01 vs control.