

令和2～3年度 食品健康影響評価技術研究 研究成果報告書（終了時）

*In silico*手法の導入による食品関連化学物質の肝毒性予測の精緻化に関する事例研究
 （課題番号：JPCAFSC20212006）

付録 1-1. 食品健康影響評価書の体内動態情報のデータベース化

ID	試験	ADME	CAS No.	Chemical Name	用途	化学グループ (RAC コード)
1	+	有	74-88-4	methyl iodide	殺虫剤	ハロゲン化アルキル系
2	+	有	542-75-6	1,3-dichloropropene	殺虫剤 (殺線虫剤)	ハロゲン化アルキル系
3	+	有	40487-42-1	Pendimethalin	除草剤	ジニトロアニリン
4	+	有	68694-11-1	triflumizole	殺菌剤	イミダゾール類
5	+	有	76578-14-8	quizalofop-ethyl	除草剤	アリールオキシプロピオン酸エステル (FOPs)
6	+	有	95737-68-1	pyriproxyfen	殺虫剤	ピリプロキシフェン
7	+	有	104206-82-8	mesotrione	除草剤	トリケトン
8	+	有	111812-58-9	fenpyroximate	殺虫剤	ミトコンドリア電子伝達系複合体 I 阻害剤 (METI 剤)
9	+	有	115852-48-7	fenoxanil	殺菌剤	プロピオンアミド
10	+	有	119446-68-3	difenoconazole	殺菌剤	トリアゾール類
11	+	有	120068-37-3	fipronil	殺虫剤	フェニルピラゾール系(フィプロール系)
12	+	有	121552-61-2	cyprodinil	殺菌剤	アニリノピリミジン類
13	+	有	122453-73-0	chlorfenapyr	殺虫剤 (殺ダニ剤)	ピロール系
14	+	有	125116-23-6	metconazole	殺菌剤	トリアゾール類
15	+	有	129558-76-5	tofenpyrad	殺虫剤	ミトコンドリア電子伝達系複合体 I 阻害剤 (METI 剤) ピラゾールカルボキサミド類
16	+	有	131807-57-3	famoxadone	殺菌剤	オキサゾリジンジオン類
17	+	有	133220-30-1	indanofan	除草剤	オキシラン
18	+	有	133855-98-8	epoxiconazole	殺菌剤	トリアゾール類
19	+	有	149877-41-8	bifenazate	殺虫剤 (殺ダニ剤)	ビフェナゼート
20	+	有	173584-44-6	indoxacarb	殺虫剤	オキサジアジン系
21	+	有	181587-01-9	ethiprole	殺虫剤	フェニルピラゾール系(フィプロール系)
22	+	有	212201-70-2	ipfencarbazon	除草剤	アゾリカルボキサミド
23	+	有	926914-55-8	pyflubumide	殺虫剤 (殺ダニ剤)	カルボキサニリド系
24	+	有	121-75-5	malathion	殺虫剤	有機リン系
25	+	有	1214-39-7	benzyladenine	植物成長調整剤	-
26	+	有	1918-00-9	dicamba	除草剤	安息香酸
27	+	有	14698-29-4	oxolinic acid	殺菌剤	カルボン酸類
28	+	有	41205-21-4	sparticide; fluoroimide	殺菌剤	マレイミド
29	+	有	52888-80-9	prosofocarb	除草剤	チオカーバメート
30	+	有	53112-28-0	pyrimethanil	殺菌剤	アニリノピリミジン類
31	+	有	88678-67-5	pyributicarb	殺菌剤・除草剤	チオカーバメート類
32	+	有	101463-69-8	flufenoxuron	殺虫剤	ベンゾイル尿素系
33	+	有	126801-58-9	ethoxysulfuron	除草剤	スルホニルウレア
34	+	有	126833-17-8	fenhexamid	殺菌剤	ヒドロキシアニリド類
35	+	有	131860-33-8	azoxystrobin	殺菌剤	メトキシアクリレート類
36	+	有	136191-64-5	pyriminobac-methyl	除草剤	ピリミジニルベンゾエート
37	+	有	138261-41-3	imidacloprid	殺虫剤	ネオニコチノイド系
38	+	有	143390-89-0	kresoxim-methyl	殺菌剤	オキシイミノ酢酸類
39	+	有	148477-71-8	spirodiclofen	殺ダニ剤	テトロン酸およびテトラミン酸誘導体
40	+	有	177406-68-7	benthiavdicarb-isopropyl	殺菌剤	バリニアミドカーバメート類
41	+	有	221205-90-9	pyrimisulfan	除草剤	スルホンアニリド
42	+	有	283594-90-1	spiromesifen	殺虫剤	テトロン酸およびテトラミン酸誘導体
43	+	有	348635-87-0	amisulbrom	殺菌剤	スルファモイルトリアゾール
44	+	有	494793-67-8	penflufen	殺菌剤	ピラゾール-4-カルボキサミド類
45	+	有	560121-52-0	cyenopyrafen	殺虫剤 (殺ダニ剤)	β-ケトニトリル誘導体
46	+	有	868680-84-6	metazosulfuron	除草剤	スルホニルウレア
47	+	有	958647-10-4	flutianil	殺菌剤	シアノメチレンチアゾリジン
48	+	有	333-41-5	diazinon	殺虫剤	有機リン系
49	+	有	10380-28-6	oxine-copper; oxine cu	殺菌剤	無機化合物
50	+	有	23184-66-9	butachlor	除草剤	α-クロロアセトアミド
51	+	有	23950-58-5	propyzamide; pronamide	除草剤	ベンズアミド
52	+	有	41814-78-2	tricyclazole	殺菌剤	トリアゾロベンゾチアゾール
53	+	有	51218-45-2	metolachlor	除草剤	α-クロロアセトアミド
54	+	有	51596-11-3	milbemectin	殺虫剤	アベルメクチン系, ミルベマイシン系
55	+	有	62476-59-9	acifluorfen-sodium	除草剤	ジフェニルエーテル
56	+	有	79540-50-4	etobenzanid	除草剤	作用機構不明
57	+	有	79622-59-6	fluzinam	殺菌剤	2,6-ジニトロアニリン類
58	+	有	83121-18-0	teflubenzuron	殺虫剤	ベンゾイル尿素系
59	+	有	83164-33-4	diflufenican	除草剤	フェニルエーテル
60	+	有	85785-20-2	esprocarb	除草剤	チオカーバメート
61	+	有	102851-06-9	tau-fluvalinate	殺虫剤	ピレスロイド系, ビレトリン系
62	+	有	103055-07-8	lufenuron	殺虫剤	ベンゾイル尿素系

63	+	有	110956-75-7	pentoxazone	除草剤	N-フェニルイミド
64	+	有	125306-83-4	cafenstrole	除草剤	アゾリルカルボキサミド
65	+	有	133408-50-1	metominostrobin	殺菌剤	オキシイミノアセトアミド類
66	+	有	139920-32-4	diclocymet	殺菌剤	カルボキサミド
67	+	有	139968-49-3	metaflumizone	殺虫剤	セミカルバゾン系
68	+	有	149508-90-7	simeconazole	殺菌剤	トリアゾール類
69	+	有	158062-67-0	flonicamid	殺虫剤	フロニカミド
70	+	有	158237-07-1	fentrazamide	除草剤	アゾリルカルボキサミド
71	+	有	158353-15-2	pyraclonil	除草剤	その他
72	+	有	158474-72-7	prohydrojasmon	植物成長調整剤	-
73	+	有	161326-34-7	fenamidone	殺菌剤	イミダゾリノン類
74	+	有	162650-77-3	ethaboxam	殺菌剤	エチルアミノチアゾールカルボキサミド
75	+	有	175013-18-0	pyraclostrobin	殺菌剤	メトキシカーバメート類
76	+	有	183675-82-3	penhiopyrad	殺菌剤	ピラゾール-4-カルボキサミド類
77	+	有	187166-40-1	spinetoram	殺虫剤	スピノシン系
78	+	有	188425-85-6	boscalid	殺菌剤	ピリジンカルボキサミド類
79	+	有	219714-96-2	penoxsulam	除草剤	トリアゾロピリミジン(タイプ2)
80	+	有	224049-04-1	isotianil	殺菌剤	チアジアゾールカルボキサミド
81	+	有	239110-15-7	fluopicolide	殺菌剤	ベンズアミド類
82	+	有	365400-11-9	pyrasulfotole	除草剤	ピラゾール
83	+	有	374726-62-2	mandipropamid	殺菌剤	マンデル酸アミド類
84	+	有	376645-78-2	tebufloquin	殺菌剤	4-キノリル酢酸
85	+	有	473278-76-1	tefuryltrione	除草剤	トリケトン
86	+	有	473798-59-3	fenpyrazamine	抗菌剤	アミノピラゾリノン
87	+	有	658066-35-4	fluopyram	殺菌剤	ピリジニルエチルベンズアミド類
88	+	有	688046-61-9	pyriofenone	殺菌剤	ベンゾイルピリジン
89	+	有	799247-52-2	pyribencarb	殺菌剤	ベンジルカーバメート類
90	+	有	881685-58-1	isopyrazam	殺菌剤	ピラゾール-4-カルボキサミド類
91	+	有	907204-31-3	fluxapyroxad	殺菌剤	ピラゾール-4-カルボキサミド類
92	+	-	55-38-9	fenthion	殺虫剤	有機リン系
93	+	-	58-89-9	lindane	殺虫剤	-
94	+	-	61-31-4	alpha-naphthaleneacetic acid, sodium;1-naphthaleneacetic acid, sodium salt	植物成長調整剤	-
95	+	-	84-74-2	dibutyl phthalate (DBP)	可塑剤	-
96	+	-	85-68-7	butyl benzyl phthalate (BBP)	可塑剤	-
97	+	有	94-74-6	MCPA; agrozone; methoxone	除草剤	フェノキシカルボン酸
98	+	-	108-62-3	metalddehyde	殺虫剤	-
99	+	-	117-81-7	bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)	可塑剤	-
100	+	-	122-42-9	propham	除草剤	カーバメート
101	+	-	731-27-1	tolyfluanid	殺菌剤	スルファミド類
102	+	-	1194-65-6	dichlobenil	除草剤	ニトリル
103	+	-	1861-40-1	benfluralin	除草剤	ジニトロアニリン
104	+	有	2797-51-5	quinoclamine	除草剤	作用機構不明
105	+	-	3766-81-2	fenobucarb	殺虫剤	カーバメート系
106	+	-	7786-34-7	mevinphos	殺虫剤	有機リン系
107	+	-	13121-70-5	(azocyclostin)/cyhexatin	殺虫剤	有機スズ系殺ダニ剤
108	+	有	18409-60-3	cyflufenamid	殺菌剤	フェニルアセトアミド
109	+	有	19666-30-9	oxadiazon	除草剤	N-フェニルオキサジアゾロン
110	+	-	26087-47-8	lprobenfos; IPB	殺菌剤	ホスホロチオレート類
111	+	-	26225-79-6	ethofumesate	除草剤	ベンゾフラン
112	+	-	28249-77-6	thiobencarb	除草剤	チオカーバメート
113	+	-	34256-82-1	acetochlor	除草剤	α-クロロアセトアミド
114	+	有	39807-15-3	oxadiargyl	除草剤 (発芽前処理)	N-フェニルオキサジアゾロン
115	+	-	41083-11-8	azocyclostin	殺虫剤	有機スズ系殺ダニ剤
116	+	-	42874-03-3	oxyfluorfen	除草剤	ジフェニルエーテル
117	+	有	50512-35-1	isoprothiolane	殺菌剤	ジチオラン類
118	+	-	51707-55-2	thidiazuron	植物成長調整剤	-
119	+	有	57837-19-1	metalaxyl	殺菌剤	アシルアラニン類
120	+	有	57960-19-7	acequinocyl	殺ダニ剤	アセキノシル
121	+	-	60207-90-1	propiconazole	殺菌剤	トリアゾール類
122	+	-	66063-05-6	pencycuron	殺菌剤	フェニルウレア類
123	+	-	68515-48-0	diisononyl phthalate (DINP)	可塑剤	-
124	+	有	69327-76-0	buprofezin	殺虫剤	ブプロフェジン
125	+	有	73250-68-7	mefenacet	除草剤	α-オキサセトアミド
126	+	-	74712-19-9	bromobutide	除草剤	作用機構不明
127	+	-	76674-21-0	flutriafol	殺菌剤	トリアゾール類

128	+	有	80844-07-1	etofenprox	殺虫剤	ビレスロイド系, ビレトリン系
129	+	有	84496-56-0	clomeprop	除草剤	フェノキシカルボン酸
130	+	-	85509-19-9	flusilazole	殺菌剤	トリアゾール類
131	+	有	86598-92-7	imibenconazole	殺菌剤	トリアゾール類
132	+	有	88671-89-0	myclobutanil	殺菌剤	トリアゾール類
133	+	有	89269-64-7	ferimzone	殺菌剤	ピリミジノンヒドラゾン類
134	+	有	96489-71-3	pyridaben	殺虫剤	ミトコンドリア電子伝達系複合体I阻害剤 (METI 剤)
135	+	有	97886-45-8	dithiopyr	除草剤	ピリジン
136	+	-	98730-04-2	benoxacor	葉害軽減剤	-
137	+	-	98967-40-9	flumetsulam	除草剤	トリアゾロピリミジン(タイプ1)
138	+	有	99485-76-4	cumyluron	除草剤	作用機構不明
139	+	-	100784-20-1	halosulfuron-methyl	除草剤	スルホニルウレア
140	+	有	103361-09-7	flumioxazin	除草剤	N-フェニルイミド
141	+	-	104030-54-8	carpropamid	殺菌剤	シクロプロパンカルボキサミド
142	+	-	113136-77-9	cyclanilide	植物成長調整剤	-
143	+	-	117718-60-2	thiazopyr	除草剤	ピリジン
144	+	-	119611-00-6	fenbuconazole	殺菌剤	トリアゾール類
145	+	有	123312-89-0	pymetrozine	殺虫剤	ピリジンアゾメチン誘導体
146	+	有	123572-88-3	furametpyr	殺菌剤	ピラゾール-4-カルボキサミド類
147	+	-	126535-15-7	trifluralin-methyl	除草剤	スルホニルウレア
148	+	有	130000-40-7	thifluzamide	殺菌剤	チアゾールカルボキサミド類
149	+	有	131341-86-1	fludioxonil	殺菌剤	フェニルピロール類
150	+	有	135186-78-6	pyriftalid	除草剤	ピリミジニルベンゾエート
151	+	有	135410-20-7	acetamiprid	殺虫剤	ネオニコチノイド系
152	+	-	135590-91-9	mefenpyr-diethyl	葉害軽減剤	-
153	+	有	141112-29-0	isoxaflutole	除草剤	イソキサゾール
154	+	有	141517-21-7	trifloxystrobin	殺菌剤	オキシイミノ酢酸類
155	+	有	142459-58-3	flufenacet	除草剤	α -オキシアセトアミド
156	+	有	143807-66-3	chromafenozide	殺虫剤	ジアシル-ヒドラジン系
157	+	-	145701-21-9	diclosulam	除草剤	トリアゾロピリミジン(タイプ1)
158	+	有	153197-14-9	oxaziclofene	除草剤	作用機構不明
159	+	有	153233-91-1	etoxazole	殺虫剤	エトキサゾール
160	+	有	153719-23-4	thiamethoxam	殺虫剤	ネオニコチノイド系
161	+	有	161050-58-4	methoxyfenozide	殺虫剤	ジアシル-ヒドラジン系
162	+	有	163515-14-8	dimethenamid	除草剤	α -クロアセトアミド
163	+	有	171249-05-1	lepimectin	殺虫剤	アベルメクチン系, ミルベマイシン系
164	+	有	179101-81-6	pyridalyl	殺虫剤	ピリダリル
165	+	有	223580-51-6	tiadinil	殺菌剤	チアジアゾールカルボキサミド
166	+	有	248583-16-1	orysastrobin	殺菌剤	オキシイミノアセトアミド類
167	+	有	272451-65-7	flubendiamide	殺虫剤	ジアミド系
168	+	有	337458-27-2	pyrifluquinazon	殺虫剤	ピリジンアゾメチン誘導体
169	+	-	581809-46-3	bixafen	殺菌剤	ピラゾール-4-カルボキサミド類
170	+	有	736994-63-1	cyantraniliprole	殺虫剤	ジアミド系

付録 1-2. 食品健康影響評価書の体内動態情報のデータベース化 -入力データ項目-

吸収（血中濃度推移）	化学物質情報	CAS No., InChI, InChIKey, SMILES, Chemical Name
	評価書情報	評価品目名、評価要請文書受理日、評価結果通知日
	試験条件	投与回数（単回）、投与ルート（経口）、性別（オス）、投与量（低・高）、標識体、系統
	動態データ	T _{max} (hr), T _{1/2} (hr), AUC _{0-thr} (hr・μg/g)
吸収（吸収率）	吸収率に関する記述	
分布	化学物質情報	CAS No., InChI, InChIKey, SMILES, Chemical Name
	評価書情報	評価品目名、評価要請文書受理日、評価結果通知日
	試験条件	投与回数（単回）、投与ルート（経口）、性別（オス）、投与量（低・高）、時間(hr)、標識体、系統
	分布データ	主要臓器及び組織における残留放射能濃度（μg/g）：血液、血漿、肝臓、腎臓、脂肪、副腎等
排泄	化学物質情報	CAS No., InChI, InChIKey, SMILES, Chemical Name
	評価書情報	評価品目名、評価要請文書受理日、評価結果通知日
	試験条件	投与回数（単回）、投与ルート（経口）、性別（オス）、投与量（低・高）、時間(hr)、標識体、系統
	排泄データ	投与後の尿、糞、胆汁、呼気中の排泄率（%TAR）

付録 1-3. オトネシнтаイプピロリジジナルカロイドのヒト肝毒性評価事例

オトネシнтаイプピロリジジナルカロイドの ヒト肝毒性評価事例

目次

1. はじめに	2
2. PA 含有食品と食品からの PA 曝露	2
3. ADME	6
3.1. 吸収・分布	6
3.2. 代謝・排泄	6
4. 毒性	7
4.1. 急性毒性	7
4.2. 反復投与毒性	8
4.3. 遺伝毒性	9
4.4. 発がん性	11
4.5. 生殖発生毒性	12
5. 規制およびリスク評価	12
6. New Approach Method (NAM)を用いた PA 個別評価	13
7. まとめ	18
8. 参考文献	19

1. はじめに

ピロリジジンアルカロイド (pyrrolizidine alkaloid, PA) は、植物で合成される毒素で、草食動物に対する防御のための植物二次代謝物である (Codex Alimentarius Commission, 2011; IPCS/INCHEM, 1988; Mattocks, 1986)。全顕花植物の3%に相当する世界中の約6000種の植物にPAが含まれると推定され、PAには600種以上が知られている(Hartmann and Witte, 1995)。PAを含む植物を含有・混入した食品の報告から (EFSA, 2017a; Bodi et al., 2014; Schulz et al., 2015; Mulder et al., 2018)、それらを摂取した場合の肝毒性、遺伝毒性および発がん性が懸念されている。

本研究では日本原産種であるフキ (キク科キク属、*Petasites japonicus* Maxim.) のPAについて、他のPAのデータを参照して推定することであったが、フキのPAであるペタシテニンについての情報が極めて少なく、一方でフキは生食されることがほとんどなく、前処理や調理の過程においてPAの多くが取り除かれ、実際の摂取量はわずかである。このため、PA類全般の毒性情報を入手することにより、ペタシテニンを含めたPA類の肝毒性を相対的に評価できれば、当初の目的も達成されるものと判断した。

PAはネシンと称される塩基母核 (ネシン塩基) とネシン酸と称される炭素数5から10までの有機酸から構成される化合物で、毒性が想定される1,2-unsaturated PAはネシン塩基の構造により、レトロネシン、ヘリオトリジンおよびオトネシンの3種のタイプに分類され、ネシン酸のエステル結合によりモノエステル、ジエステルおよび環状ジエステル構造が含まれる。フキに含まれるPAはフキトキシンともいわれ、フキの葉柄 (ふき) と花穂 (ふきのとう) に含まれる1,2-unsaturated PAで、環状ジエステル構造をもつオトネシンタイプである。

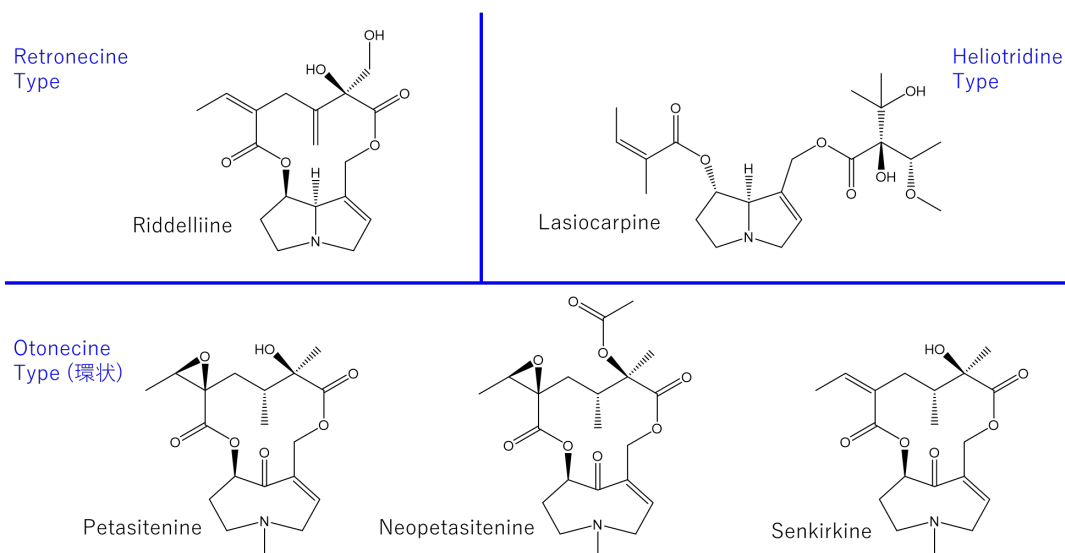


Figure 1 PAのタイプと主なPAの化学構造

2. PA含有食品と食品からのPA曝露

PA類を多く含む食品を以下に挙げた。

・緑茶、紅茶、ハーブティー (レイボスティティー、バーベナティー、ペパーミントティー、カモミールティー、ブッシュティーなど)

- ・蜂蜜（蜜を産生する花の種類により含有量が大きく異なるため、地理的、植物学的起源に依存）
- ・クミンシード、オレガノ、タラゴンなどの香辛料（含有濃度は高いが、使用量は微小）
- ・伝承薬、漢方薬（抗菌作用、抗炎症作用、抗ガン作用、抗 HIV 作用、抗潰瘍作用などを有し、古来より使用）

国産フキ中の PA 含有についての実態調査（農林水産省、2018 年）では、部位ごとの含有量とその内訳、あく抜きの影響を評価した。部位別の含有量（1 kg あたり）の平均値は、ふき（葉柄）で 9.2 mg、葉で 0.52 mg、ふきのとう（花穂）で 67 mg で、ふきは neopetasitenine、ふきのとうは petasitenine の含有比率が高く、部位あるいは生育段階により含有する PA 分子種の構成が異なることが示唆された。あく抜きにより PA 量は減少し、その含有量はふきでは 1 割に、ふきのとうでは 1/4 になった。これらの結果から、健康リスクは定量的には評価できないものの、十分にあく抜きすれば、日常的に大量に食用しない限り安全であると結論されている。

欧州食品安全機関（European Food Safety Authority, EFSA）の EFSA Scientific Report（13 July, 2016）では、植物由来の 4581 種類の食品サンプルについて 17~28 種類の PA を測定し、結果は以下のようであった。

- ・PA 平均濃度の下限は、ルイボス茶では 4.1 µg/L、ペパーミント茶では 3.5 µg/L など
- ・サプリメント（花粉サプリメント）の 1 kg あたりの PA 含有量は 235~253 µg
- ・ハーブティーの 1 kg あたりの乾燥ハーブ中の PA 含有量は、*Borago officinalis* が 31,101 µg、*Symphytum officinale* が 29,694 µg
- ・サプリメント（カプセル/錠剤）の 1 kg あたりの PA 含有量は、*Eupatorium cannabinum* が 2,410,275 µg
- ・蜂蜜では、主な PA として echimidine および lycopsamine が 8 割に検出された。
- ・お茶/ハーブティーでは、主な PA として lycopsamine, intermedine, intermedine-N-oxide, senecionine, senecionine-N-oxide, seneci(o)phylline, seneciophylline-N-oxide および retrorsine-N-oxide が 8~9 割に検出された。

これらの調査結果から、PA 曝露の主要因はお茶とハーブティーで、若年では平均 34.5~48.4 ng/kg/day および高曝露で 154~214 ng/kg/day、成人では平均 31.1~41.8 ng/kg/day および高曝露で 87.7~127.2 ng/kg/day であった。幼児の急性曝露の平均値は最大 311 ng/kg/day、高曝露（95 パーセントイル）は最大 821 ng/kg/day であった。また、蜂蜜については成人消費者で 0.1~7.4 ng/kg/day および高曝露（95 パーセントイル）では 0.4~17.6 ng/kg/day、若年消費者で 0.3~27 ng/kg/day および高曝露では 0.7~31.1 ng/kg/day であった。花粉サプリ消費者では、慢性曝露が 0.7~12 ng/kg/day、急性曝露が 2.8~44 ng/kg/day であった。ハーブ 2 g を使ったハーブティー 150 mL からは、890 ng/kg/day の PA 曝露が推定された。雄ラットに lasiocarpine を投与した際の、肝血管肉腫の発生に基づいて算出した BMDL₁₀ は 70 µg/kg/day で、2 mg/kg/day が急性/短期毒性リスクに対応すると推定された。

本報告書の勧告として、食品に関連する個々の PA 分析方法についての性能に関するクライテリアを定めること、データ収集について努め減少傾向を確認すること（特にお茶やハーブティーに関して）、植物抽出物以外のハーブ系サプリメントの PA 類についてのデータを収集すること、お茶に含まれる PA の原因となる植物（雑草）についての情報を入手し、それらの侵入を制御することが示された（EFSA, 2016）。

EFSA Statement（21 June, 2017）では、雌ラットに riddelliine を投与した際の、肝血管肉腫の発生に基づいて算出した BMDL₁₀ は 237 µg/kg/day で、これを発がんリスクの Reference Point（RP）とし、若年（乳児あるいは幼児）の蜂蜜の高消費者における健康への懸念と、お茶とハーブティーの大量消費への発がんの懸念が示された。

PA 類の慢性曝露における $BMDL_{10}$ /総摂取量、すなわち曝露マージン (Margin of Exposure, MOE) は、若年が 4,900~>10,000,000 および成人が 5,700~>1,000,000 で、高消費では若年が 1,100~>10,000,000 および成人が 1,900~>200,000 であった。お茶/ハーブティーの平均 MOE は、若年が 1,900~>200,000 および成人が 1,100~>10,000,000 で、高消費では若年が 770~43,000 および成人が 1,500~395,000 であった。蜂蜜の平均 MOE は、若年が 8,800~790,000 および成人が 32,000~>1,000,000 で、高消費では若年が 7,600~339,000 および成人が 13,500~593,000 で、いずれも高い数値になった。すべての食品において高汚染のケースでは、急性曝露は若年で 1~300 ng/kg/day および成人で 6~170 ng/kg/day になった。しかし、ヒトにおいて急性毒性の報告がある 1~3 mg/kg/day に比較すると 3 桁以上低く、急性毒性のリスクは低いものと考えられた。一方でサプリメントの摂取においては、急性あるいは短期の曝露により重篤な毒性が発現した用量と比較すると 100 倍未満で、近い曝露量になった。

本陳述書における勧告として、食品中に広く検出される PA に関する毒性データが必要で、特に個々の PA のトキシコキネティクス、代謝活性化、発がん性の情報があればリスク評価を大幅に改善できること、関連食品や飼料、ハーブ系サプリメントに含まれる PA 類の分析データを引き続き収集していくこと、リストアップした 17 種以外の PA についてモニターすべきであること、食品や飼料中の PA を評価するためおよび曝露評価の不確実性を減らすために、より高感度で選択的な分析方法を開発する必要性が示された (EFSA, 2017a,c)。

香港における食物に含まれる PA のリスク評価では、48 種類の食品の 234 サンプルについて、28 種類の 1, 2-unsaturated PA が測定された (Centre for Food Safety Food and Environmental Hygiene Department, The Government of the Hong Kong Special Administrative Region, 2017)。その結果、118 サンプル (50%) に 1 種以上の 1, 2-unsaturated PA が検出された。PA が検出されたサンプルの多くは、乾燥スパイス、蜂蜜および茶葉で、その他に小麦粉、ライムギ粉、アヒル卵、ヨーグルト、チーズ、お茶飲料などであった。乾燥スパイスの PA 平均含有量 (1 kg あたり) は最高で 300 μg で、クミンシード (1900 μg)、オレガノ (1400 μg) およびタラゴン (1100 μg) の順で高かった。蜂蜜の PA 平均含有量 (1 kg あたり) は最高で 7.5 μg で、EFSA の報告よりも低かった。茶葉の PA 平均含有量 (1 kg あたり) は最高で 0.46 μg で、ルイボスティー (1.7 μg)、バーベナティー (0.87 μg)、ペパーミントティー (0.44 μg) およびカモミールティー (0.43 μg) の順で高かったが、全般に他の報告よりは低かった。成人の食品からの PA から想定される曝露マージンはいずれも 10,000 倍を超えるため、健康リスクは低いとされた。

Dusemund らの報告において、食品からの PA の摂取 (Table 1) にもとづいて、子供と大人の個々の食品からの短期曝露 (各々 Table 2 および Table 3) を計算した結果、PA 類の曝露量は子供が 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 未満で大人が 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 未満とした (Desemund et al., 2018)。同報告からの長期曝露については、子供と大人の結果を各々 Table 4 および Table 5 に示した。その結果、子供ではハーブ茶、ペパーミント茶および紅茶からの摂取量が多く、大人ではハーブ茶と紅茶からの摂取量が多く、また個々の製品で PA 含量が異なった。PA 曝露の総量に関して、慢性毒性の RP である $BMDL_{10}$ (237 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) からの MOE を Table 6 に示した。その結果、高曝露 (95 パーセントイル) においても MOE は 2000 を超えた (Table 1~6 は Desemund et al., 2018 から引用)。

Table 1
Occurrence data for exposure estimation in µg/kg.

Food group	Source	Number of samples	Mean	Median	95 th Percentile
Honey	BfR, 2016	129	11	2.14	40
Nettel tea	BfR, 2016	27	272	158	857
Fennel tea	BfR, 2016	44	53	4.19	222
Fruit tea	BfR, 2016	14	1.81	0	7.60
Green tea	Mulder et al., 2015	26	423	25	1472
Chamomile tea	Mulder et al., 2015	35	272	124	1192
Herbal Tea	Mulder et al., 2015	20	437	178	1800
Peppermint tea	Mulder et al., 2015	30	494	193	2990
Rooibos tea	Mulder et al., 2015	22	597	242	1672
Black Tea	Mulder et al., 2015	33	571	117	3620
Tea with juice	BfR, 2016	15	0.34	0	3.14
Milk	Mulder et al., 2015	182	0.005	0	0.04
Flour	BfR, 2016	29	0.41	0	2.14
Spices	BfR, 2016	40	265	4.92	1858

Table 2
Short-term PA intake from children in µg/kg bw per day.

Food group	PA intake, short-term
Honey	0.059
Herbal tea not specified	0.720
Chamomile tea	0.771
Peppermint tea	1.026
Fennel tea	0.142
Tea with juice	0.003
Black tea, based on ice tea	1.749
Rooibos tea	0.464
Green tea	0.302
Fruit tea	0.004
Milk	0.002

Table 3
Short-term PA intake from adults in µg/kg bw per day.

	PA intake, short-term
Honey	0.036
Herbal tea not specified	0.484
Black tea	0.864
Rooibos tea	0.437
Green tea	0.350
Fruit tea	0.002
Milk	< 0.0005

Table 4
PA intake of children from single food in µg/kg bw per day (VELS study, all respondents and only consumers, P95 refers to high consumption data combined with mean contents).

	Share in the total intake in % (all respondents)	Share of consumers in %	Median only consumer	P95 only consumer
Honey	6.8	26	0.002	0.005
Herbal tea not specified	24.0	9	0.013	0.066
Chamomile tea	7.1	4	0.005	0.059
Peppermint tea	21.6	9	0.010	0.060
Fennel tea	9.4	16	0.002	0.018
Tea with juice	0.02	6	< 0.0005	< 0.0005
Ice tea (basis black tea)	18.1	4	0.018	0.083
Rooibos tea	11.0	4	0.014	0.080
Green tea	0.7	1	0.005	0.020
Fruit tea	0.6	37	< 0.0005	< 0.0005
Milk	0.7	80	< 0.0005	< 0.0005

Table 5
PA intake of adults from single food in µg/kg bw per day (NVS II, all respondents and only consumers, P95 refers to high consumption data combined with mean contents).

	Share in the total intake in % (all respondents)	Share of consumers in %	Median	P95
Honey	2.8	17	0.002	0.007
Herbal tea not specified	42.8	22	0.019	0.083
Black tea	35.0	16	0.022	0.092
Rooibos tea	8.7	4	0.026	0.093
Green tea	10.5	6	0.019	0.075
Fruit tea	0.1	10	< 0.0005	< 0.0005
Milk	0.04	55	< 0.0005	< 0.0005

Table 6
Total PA intake and MOE in children and adults (basis population: consumer of herbal tea).

	Children		Adults	
	Median	P95 ^a	Median	P95 ^a
Total Intake in µg/kg bw per day	0.019	0.079	0.026	0.108
MOE ^b	12,159	2991	8989	2197

^a 95th percentile represents high intake and refers to high consumption data combined with mean PA contents of the foods taken into consideration. Individuals, who consume only high PA contaminated foods, would have a higher exposition than indicated in Table 6.

^b Toxicological reference point BMDL₁₀: 237 µg/kg bw per day (EFSA, 2017b).

3. ADME

3.1. 吸収・分布

Riddelliine および senecionine の経口投与後の T_{max} は 30 分以内で、吸収は速やかである。放射性物質で標識した PA を経口投与した際には、主に赤血球、肝臓、腎臓、肺、血漿および乳汁に分布し、DNA やたんぱく質などの生体内高分子に結合する。

動物実験では、PA は消化管からすみやかに吸収され、代謝されたのちに主に腎臓からと少量は糞中に排泄され、反応性代謝物は組織の構成成分に結合する (NTP, 2003)。ヒトにおける生物学的利用率に関する定量的な知見はないが、*in vitro* の実験では PA の吸収は腸管からの吸収に依存し、その程度は個々の PA によって異なると考えられた (Hessel et al., 2014)。

3.2. 代謝・排泄

代謝経路を Figure 2 に示した。レトロネシンタイプおよびヘリオトリジンタイプの PA は、肝細胞のミクロソームに多く含まれるシトクロム 450 (P450) やフラビン含有ものオキシゲナーゼにより一部は N-oxide に代謝され、その一部は尿に排泄される (Edgar et al., 2015; Fu et al., 2004; Mattocks, 1986)。オトネシンタイプの PA は酸化的 N-脱メチル化によりホルムアルデヒドが外れて直接 DHP エステルを生じ、N-oxide の形成はない。いずれのタイプの PA も、P450 のうちの CYP3A および CYP2B により dihydropyrrolizin (DHP) エステルに代謝され、さらに加水分解され DHP を形成する (Prakash et al., 1999; Reed et al., 1992; Huan et al., 1998; Fu et al., 2004; Chung et al., 1995; Lin et al., 2003; Jago et al., 1970; Mattocks, 1971)。DHP は生体内高分子のタンパク質や DNA と付加体、あるいは架橋を形成するため毒性の原因となると考えられている (Fu, 2017; Chen et al., 2010)。

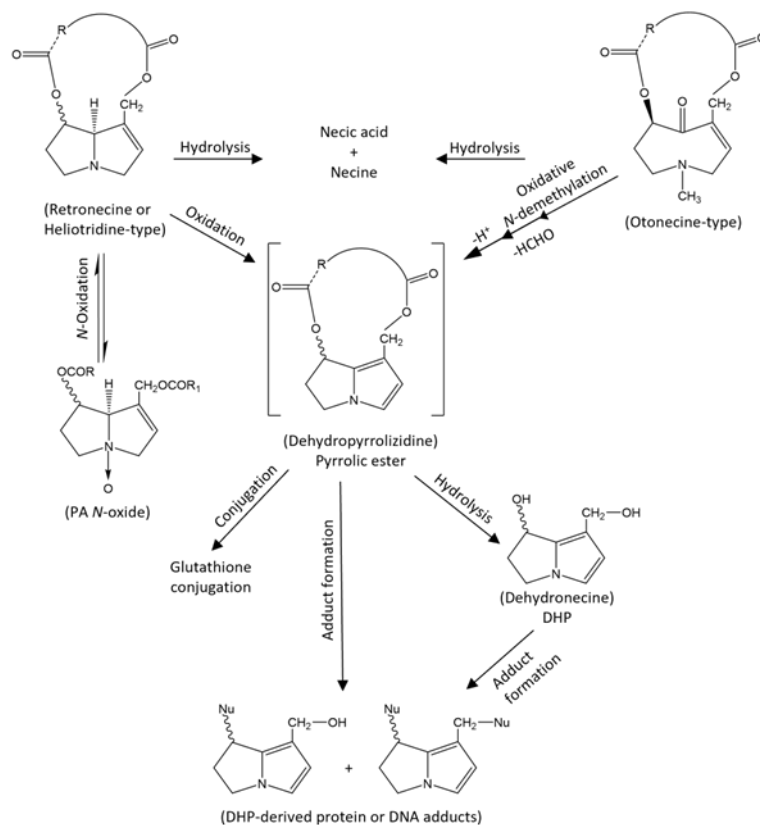


Figure 2 PA (1,2-unsaturated PA) の代謝 (Chen et al, 2010 より改変)

レトロネシンタイプおよびヘリオトリジンタイプの PA では、N-oxide が尿中にすみやかに排泄される (Edgar et al., 2015; Fu et al., 2004; Mattocks, 1986)。一方、DHP エステルの一部はグルタチオン抱合により解毒され排泄されるが、グルタチオン-S-トランスフェラーゼには多くの多型が存在し、基質特異性や種差などにより発現量が異なるため、PA による毒性に違いが生じる可能性があることが想定される (Lin et al., 1998; Ruan et al., 2014)。

PA とそのピロール類縁体は胎盤を通過し、母乳にも移行する。ラット母動物に PA を投与した胎児や新生児において、肝障害は発生したとの報告がある (IPCS/INCHEM, 1988)。

4. 毒性

4.1. 急性毒性

ラットにおける 1,2-unsaturated PA の経口投与による LD₅₀ は数十～数百 mg/kg で、腹腔内および静脈内投与による LD₅₀ は Table 7 および Table 8 のとおりである (Merz and Schrenk, 2016、Table 8 および Table 9 は同文献からの引用)。Senkirkine のラットにおける腹腔内単回投与による LD₅₀ は 220 mg/kg であった。

Table 7

LD₅₀-values of several PAs after i.p. injection in rodents.

PA congener	LD ₅₀ (mg/kg)	Time of observation (d)	Rodent, gender	Reference
Echimidine	200	not reported	rat, ♂	Culvenor et al. (1969)
Echinatine	350	not reported	rat, ♂	Culvenor et al. (1969)
Heliosupine	60	not reported	rat, ♂	Culvenor et al. (1969)
Heliotrine	296	3	rat, ♂	Bull et al. (1958)
	478	3	rat, ♀	Bull et al. (1958)
Hydroxysenkirkine	40-50	few days	rat, suckling	Schoental (1970)
	200-300		rat, weanling	
Indicine	>1000	not reported	rat, ♂	Schoental (1968)
Intermedine	1500	not reported	rat, ♂	Cheeke (1985)
Lasiocarpine	77	3	rat, ♂	Bull et al. (1958)
	79	3	rat, ♀	Bull et al. (1958)
	72	not reported	rat, ♂	Culvenor et al. (1969)
Lasiocarpine-N-oxide	547	3	rat, ♂	Bull et al. (1958)
	181	3	rat, ♀	Bull et al. (1958)
Monocrotaline	95	7	rat, ♂	Mattocks (1972b)
	180	7	rat, ♀	Mattocks (1972b)
Orosenine	630	not reported	mouse	Litvinchuk et al. (1979)
Retrorsine	153	7	rat, ♀	Mattocks (1972)
	34	7	rat, ♂	Mattocks (1971)
	5-10	few days	rat, suckling	Schoental (1970)
	30-35		rat, weanling	
Retrorsine-N-oxide (Isatidine)	250	7	rat, ♂	Mattocks (1971)
Riddelliine	105	not reported	rat	Berry et al. (1996)
	695	not reported	mouse	Berry et al. (1996)
Senecionine	85	not reported	rat, ♂	Culvenor et al. (1969)
	50	7	rat, ♂	Mattocks (1972)
	65	not reported	mouse	Litvinchuk et al. (1979)
Seneciphylline	77	3	rat, ♂	Bull et al. (1958)
	83	3	rat, ♀	Bull et al. (1958)
Senkirkine	220	not reported	rat, ♂	Hirono et al. (1979)
	40-50	few days	rat, suckling	Schoental (1970)
	200-300		rat, weanling	
Symphytine	130	not reported	rat, ♂	Hirono et al. (1979)
	300	not reported	rat, ♂	Cheeke (1985)

Table 8

LD₅₀ values for PAs after i.v. injection in rodents (Mattocks, 1986).

PA congener	LD ₅₀ (mg/kg)	Time of observation (days)	Species
Heliotrine	274	7	rat
	255	7	mouse
Lasiocarpine	88	5	rat
	85	5	mouse
	67.5	5	hamster
Retrorsine	38	7	rat
	59	7	mouse
Retrorsine-N-oxide	834	7	mouse
Riddelliine	105	7	mouse
Senecionine	64	7	mouse
	61	7	hamster
Seneciphylline	90	7	mouse

4.2. 反復投与毒性

PA による臨床における急性肝障害の兆候は、出血性壊死、肝肥大および肝機能低下で、ときに死亡に至る。臨床における急性症状として強度な腹痛と腹部腫脹を呈し、中長期的には肝線維化、肝硬変および肝不全を起こす。動物においても同様の症状がみられ、黄疸を呈すこともある。

ラットにおける反復投与毒性試験では、petasitenine を飲水で反復経口投与した際の死亡例において肝臓の出血、壊死および胆管増生がみられた。動物における慢性毒性試験では、単回投与の致死用量以下あるいは反復投与可能な用量において、巨大肝細胞、肝線維化、中心静脈および小葉下静脈の閉塞、胆管増生および結節が認められた (Edgar et al., 2015; IPCS/INCHEM, 1988; Kakar et al., 2010; Mattocks, 1986; Prakash et al., 1999)。Riddelliine をラットに週 5 日間で 105 週投与した際には、0.033 mg/kg/day で肝細胞肥大が認められ、NOAEL は 0.01 mg/kg/day と判断された (IPCS/INCHEM, 1988; NTP, 2003)。

肝毒性の機序に関して、monocrotaline は肝細胞への取り込みには OATP1 が少なくとも関係し、肝細胞に取り込まれたのちに CYP で 2 価アルキル化剤である monocrotalin pyrrole に代謝され、DNA や蛋白質に結合する。げっ歯類における急性毒性として、小葉中心性の巨大肝細胞に引き続き細胞死が起こる。この変化は、DNA への結合により細胞増殖が G2/M 期に停止したためと考えられている。一方、PA を反復投与した際にみられる肝毒性の特徴は、類洞内皮細胞の破壊に続く出血の結果として、肝細胞の

虚血によると考えられている。Monocrotaline では CYP で代謝される際に GSH の枯渇が起こり、この影響を最も受けやすいのが類洞内皮細胞である。これらの変化が、肝静脈閉塞症 (HVOD) あるいは肝類洞閉塞症 (HSOS) の病態に関連するとされている (Roth et al., 2019)。

ヒトにおいて、漢方薬やお茶などの摂取により急性肝障害が生じ、時には死亡することがある。メキシコ系米国人の 6 カ月齢の男児と 2 カ月齢の女児において、Senecio longilobus 入りの煎じハーブ茶を飲んだ後に肝障害が発生した。HVOD と診断された女児は、初期には腹水と胸水が、2 カ月後には肝類洞の線維化、6 カ月後には肝硬変がみられた。男児は吐血と、顕著な肝肥大を伴う黄疸を呈し、入院 6 日目に状態悪化により死亡した。剖検所見としては、肝臓に小葉中心性の広範な出血性壊死がみられた。ハーブ茶には、女児の場合には riddelliine を主とする PA が 0.3% と、主に retrosine と低濃度の seneciophylline および senesionine を含む PA-N-oxide が 1% 含まれていた。男児の場合には 0.5% の PA と 1% の PA-N-oxide が含まれていた。これらのハーブ茶液の分析結果と摂取日から推定すると、体重 6 kg の女児は 2 週間で 70~147 mg (12~25 mg/kg) を摂取し、推定体重 5.5 kg の男児は総量で 66 mg、4 日間で 17 mg の PA を摂取した。主成分である riddelliine および retrosine-N-oxide の摂取量としては、女児で 0.8~1.7 mg/kg/day、男児で 3 mg/kg/day と推定された (IPCS/INCHEM, 1988)。これらの症例から、ヒトにおいて急性または短期暴露後に肝毒性を発現する最低用量は 0.8~1.7 mg/kg/day と結論された (BfR, 2016, 2013a, b, 2007; EFSA, 2011)。

PA の長期投与によって肝臓のほかに肺および血管に著明な障害が生じ、腎臓、消化管、膵臓および骨髄に軽度な障害が起こる (Mattacks 1986; Fu et al. 2007)。いくつかの PA (たとえば monocrotaline や fulvine) では、げっ歯類において肺性高血圧と右心室の肥大と起こすことが報告されているが、ヒトでのこれらの症状はほとんどみられてない (Culvenor et al., 1976; Edgar et al., 2011; IPCS/INCHEM, 1988; Wiedenfeld et al., 2008)。

4.3. 遺伝毒性

レトロネシンタイプあるいはヘリオトリジンタイプの PA において、DNA 付加体形成、DNA 鎖切断、UDS 試験、Ames 試験、小核試験などにおいて陽性結果が認められ、PA は全般に遺伝毒性があると考えられている (Chen et al., 2010; Merz and Schrenk, 2016)。PA の変異原性試験および染色体損傷については Table 9 および Table 10 のとおりで、ほとんどの試験が陽性であった (Merz and Schrenk, 2016、Table 9 および Table 10 は同文献からの引用)。

Table 9

Mutagenicity of pyrrolizidine alkaloids.

PA congener	Test system	Result	Reference
<i>Bacteria</i>			
Heliotrine	<i>S. typhimurium</i> TA100 with S9	positive	Yamanaka et al. (1979)
	<i>Escherichia coli</i> WP2 and WP2 uvrA	negative	Green and Muriel (1975)
Lasiocarpine	<i>S. typhimurium</i> TA100 with S9	positive	Yamanaka et al. (1979)
Lycopsamine	<i>S. typhimurium</i> TA100 with S9	negative	Yamanaka et al. (1979)
Monocrotaline	SOS repair in <i>E. coli</i> PQ37 (SOS chromotest)	positiv with, marginal pos. without S9 mix	Kevekordes et al. (1999)
Petasitenine (Fukinotaxin)	<i>S. typhimurium</i> TA100 with S9	positive	Yamanaka et al. (1979)
Retrorsine	<i>S. typhimurium</i> TA1535 and TA1537 with S9 <i>S. typhimurium</i> TA100 with S9 SOS repair in <i>E. coli</i> PQ37 (SOS chromotest)	positive weakly positive positiv with, marginal pos. without S9 mix	Wehner et al. (1979) Rubiolo et al. (1992) Kevekordes et al. (1999)
Retrorsine- <i>N</i> -oxide (Isatidine)	<i>S. typhimurium</i> TA100 with S9 SOS repair in <i>E. coli</i> PQ37 (SOS chromotest)	negative negative with or without S9 mix	Rubiolo et al. (1992) Kevekordes et al. (1999)
Senecionine	<i>S. typhimurium</i> TA100 with S9 <i>S. typhimurium</i> TA100 with S9 SOS repair in <i>E. coli</i> PQ37 (SOS chromotest)	negative negative negative with or without S9 mix	Rubiolo et al. (1992) Yamanaka et al. (1979) Kevekordes et al. (1999)
Seneciphylline	<i>S. typhimurium</i> TA100 with S9 <i>S. typhimurium</i> TA100 with S9 <i>S. typhimurium</i> div with S9	weakly positive negative positive	Rubiolo et al. (1992) Yamanaka et al. (1979) Zeiger et al. (1988)
Senecivernine	<i>S. typhimurium</i> TA100 with S9	weakly positive	Rubiolo et al. (1992)
Senkirkine	<i>S. typhimurium</i> TA100 with S9 SOS repair in <i>E. coli</i> PQ37 (SOS chromotest)	positive negative with or without S9 mix	Yamanaka et al. (1979) Kevekordes et al. (1999)
<i>Drosophila</i>			
Echinatine	Sex-linked recessive lethal test	positive	Clark (1960)
Echimidine	Sex-linked recessive lethal test	positive	Clark (1960)
Heliotrine	Wing spot test	positive	Brink (1969); Frei et al. (1992); Sivlingham and Brink (1988). Clark (1960)
Indicine	Sex-linked recessive lethal test Wing spot test	positive positive	Frei et al. (1992)
Lasiocarpine	Sex-linked recessive lethal test	positive	Clark (1960)
Lycopsamine	Wing spot test	positive	Frei et al. (1992)
Monocrotaline	Wing spot test	positive	Frei et al. (1992)
Retrorsine	Sex-linked recessive lethal test Wing spot test	positive positive	Cook and Holt (1966) Frei et al. (1992)
Retrorsine- <i>N</i> -oxide	Sex-linked recessive lethal test	positive	Cook and Holt (1966)
Senecionine	Wing spot test Sex-linked recessive lethal test	positive positive	Frei et al. (1992) Clark (1960)
Seneciphylline	Wing spot test Sex-linked recessive lethal test	positive positive	Frei et al. (1992) Candrian et al. (1984)
Senkirkine	Wing spot test Sex-linked recessive lethal test	positive positive	Frei et al. (1992) Candrian et al. (1984)
Symphytine	Wing spot test	positive	Frei et al. (1992)
<i>Others</i>			
Monocrotaline	<i>in vitro</i> mammalian cell transformation (BHK-21/C1 13 cells)	positive	Styles et al. (1980)
Retrorsine	V79 cells, HGPRT mutation, in presence of S9 or primary hepatocytes	positive	Styles et al. (1980)
Monocrotaline		positive	Berry et al. (1996)
Riddelline		positive	Berry et al. (1996)
Senecionine		positive	Berry et al. (1996)
Seneciphylline		positive	Berry et al. (1996)
Heliotrine	V79 cells, 8-azaguanine mutation assay, with and without S9-mix	positive	Takanashi et al. (1980)
Lasiocarpine		positive	Takanashi et al. (1980)
Petasitenine		positive	Takanashi et al. (1980)
Senkirkine		positive	Takanashi et al. (1980)

Table 10

Primary DNA damage by pyrrolizidine alkaloids.

PA congener	Test system	Results	Reference
DNA adducts			
Heliotrine	<i>In vitro</i> rat liver microsomes calf thymus DNA <i>In vivo</i> rat liver DNA adducts	amount of DNA adducts levels of DHP-dG and -dA adducts	Xia et al. (2008) Xia et al. (2013)
Lasiocarpine	<i>In vitro</i> ³² P-postlabel-ing/HPLC analysis with metabolic activation <i>In vivo</i> rat liver DNA adducts	DHP-derived DNA adducts were formed levels of DHP-dG and -dA adducts	Xia et al. (2006) Xia et al. (2013)
Monocrotaline	<i>In vivo</i> rat liver DNA adducts	levels of DHP-dG and -dA adducts	Xia et al. (2013)
Retrorsine (Dehydroretrorsine)	<i>In vitro</i> using synthesized Dehydroretrorsine	DHP-derived DNA adducts <i>in vitro</i>	Mattocks (1972)
Retrorsine	<i>In vivo</i> or <i>in vitro</i> with metabolic activation, ³² P-postlabeling/HPLC analysis <i>In vivo</i> rat liver DNA adducts	DHP-derived DNA adducts <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> rat liver levels of DHP-dG and -dA adducts	Wang et al. (2005) Xia et al. (2013)
Riddelliine	<i>In vivo</i> rat liver DNA adducts	levels of DHP-dG and -dA adducts	Xia et al. (2013)
Riddelliine-N-oxide	<i>In vivo</i> rat liver DNA adducts	levels of DHP-dG and -dA adducts	Xia et al. (2013)
Senecionine	<i>In vivo</i> covalent binding analysis in rat using ³ H labeling <i>In vivo</i> binding to liver DNA in BALB/c mice <i>In vitro</i> binding to calf thymus DNA	uncharacterized DNA adducts in rat liver, lung and kidney uncharacterized DNA adducts	Candrian et al. (1985) Eastman et al. (1982)
Seneciphylline	<i>In vivo</i> covalent binding analysis in rat using ³ H labeling <i>In vivo</i> binding to liver DNA in BALB/c mice <i>In vitro</i> binding to calf thymus DNA	uncharacterized DNA adducts in rat liver, lung and kidney uncharacterized DNA adducts	Candrian et al. (1985) Eastman et al. (1982)
Senkirkine	<i>In vivo</i> rat liver DNA adducts	levels of DHP-dG and -dA adducts	Xia et al. (2013)
DNA crosslinks			
Retrorsine (Dehydroretrorsine)	<i>In vitro</i> cross-linking assay of PA-exposed cells or pyrrolic PA-exposed nuclei	DNA-DNA crosslinks	Hincks et al. (1991); Reed et al. (1988)
Senecionine (Dehydroseecionine)	<i>In vitro</i> cross-linking assay of PA-exposed cells or pyrrolic PA-exposed nuclei	DNA-protein crosslinks DNA-DNA crosslinks	Coulombe et al. (1999); Hincks et al. (1991); Kim et al. (1995, 1999)
Seneciphylline (Dehydroseeciphylline)	<i>In vitro</i> cross-linking assay of PA-exposed cells or pyrrolic PA-exposed nuclei	DNA-protein crosslinks DNA-DNA crosslinks	Hincks et al. (1991); Kim et al. (1995)
DNA strand breaks			
Retrorsine	<i>In vitro</i> alkaline elution	negative	Hincks et al. (1991)
Retrorsine-N-oxide (Isatidine)	<i>In vitro</i> comet assay	positive	Uhl et al. (2000)
Senecionine	<i>In vitro</i> alkaline elution	negative	Hincks et al. (1991)
Seneciphylline	<i>In vitro</i> alkaline elution	negative	Hincks et al. (1991)
Unscheduled DNA synthesis			
Lasiocarpine	DNA repair in primary rat hepatocytes	positive	Williams et al. (1980)
Monocrotaline	DNA repair in primary rat hepatocytes DNA repair in primary rat, hamster, and mouse hepatocytes	positive each positive	Williams et al. (1980); Berry et al. (1996) Mori et al. (1985)
Petasitenine (Fukinotoxin)	DNA repair in primary rat hepatocytes	positive	Williams et al. (1980); Mori et al. (1985)
Retrorsine	in rat hepatocytes following <i>in vivo</i> treatment	positive	Griffin and Segall (1986)
Riddelliine	DNA repair in primary rat hepatocytes	positive	Berry et al. (1996)
Senecionine	in rat hepatocytes following <i>in vivo</i> treatment DNA repair in primary rat hepatocytes	positive positive	Griffin and Segall (1986) Mori et al. (1985); Berry et al. (1996)
Seneciphylline	in rat hepatocytes following <i>in vivo</i> treatment DNA repair in primary rat, hamster, and mouse hepatocytes	positive each positive	Griffin and Segall (1986) Mori et al. (1985)
Senkirkine	DNA repair in primary rat hepatocytes DNA repair in primary rat hepatocytes in primary rat and human hepatocytes DNA repair in primary rat, hamster, and mouse hepatocytes	positive positive positive each positive	Berry et al. (1996) Williams et al. (1980) Schehrer et al. (2000) Mori et al. (1985)

Petasitenine と senkirkine は、TA100 株を用いた Ames 試験と V79 細胞を用いた染色体異常試験が陽性であった。Senkirkine は、さらに V79 細胞を用いた姉妹染色分体交換、ショウジョウバエを用いた翅毛スポットおよび伴性劣性致死において陽性結果が得られている。

4.4. 発がん性

PA は動物実験において明らかな発がん作用を示し、発がんの標的は肝臓であった (IARC, 2002, 1983, 1976)。PA は、肝臓以外にも肺、腎臓、皮膚、膀胱や脳などにも発がん作用があることが報告されている (Chen et al., 2010)。ラットにおいては、riddelliine 投与による肝血管肉腫と単核細胞白血病、lasiocarpine 投与による肝血管肉腫、monocrotaline 投与による肝細胞がんと肺腺がん、senkirkine 投与による肝細胞がん、symphytine 投与による肝血管上皮肉腫、petasitenine 投与による肝血管上皮肉腫と肝細胞腺腫が報告されている (NTP, 2003; NCI, 1978; Shumaker et al., 1976; Hirano et al., 1979, 1977)。マウスにおいては、lasiocarpine 投与による肝血管肉腫と気管および肺胞の腫瘍が報告されている (NCI, 1978)。

Riddelliine, lasiocarpine および monocrotaline は、International Agency for Research on Cancer (IARC) の発がん性分類においてグループ 2B (ヒトに対して発がん性がある可能性がある) である (IARC,

2002; NTP, 2008)。ほかの PA については同分類でグループ 3 (ヒトに対する発がん性について分類できない) とされている (IARC, 2002, 1987, 1983, 1976)。いずれの PA についても、ヒトでの発がん性に関する疫学データはない。

4.5. 生殖発生毒性

ハーブ茶あるいはハーブスパイスを摂取し胎児腹水と HVOD を発症した妊婦 2 例についての報告があるが、いずれも出産はできなかった (Rasenack et al., 2003; Roulet et al., 1988; Sperl et al., 1995)。生殖発生毒性試験において、母動物体重増加にわずかに影響する用量の PA の非経口投与により、胎児の発達遅延、奇形、成長停止、未成熟、死亡および吸収が認められた (Bhattacharyya, 1965; Chan et al., 1994; Green and Christie, 1961; Kvitko and Gimmler, 1986; Nuzzo, 1987; Peterson and Jago, 1980)。Riddelliine については、受胎能、妊娠期間、受胎数、生存胎児の割合に 1 mg/kg/day の用量まで影響は認められなかった (Chen et al., 1994)。PA の生殖発生に関する情報は限定されているため、一定の結論は得られていない。

5. 規制およびリスク評価

PA に関して、各国規制当局による規制はない。2001 年に米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration, FDA) は、PA を含有するコンフリー (和名: ヒレハリソウ) について製品から除去するように諮問した。厚生労働省は 2004 年に、コンフリーを含む製品について健康被害に及ぼす影響を通知し、食用が禁止された。イギリスの医薬品・医療製品規制庁 (Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency, MHRA) は、2012 年に西洋フキ (*Petasitis hybridus*) を含む製品の市場からの自主的な撤去を要請した。

PA のリスク評価においては、累積的な毒性であることが考慮されるべきと結論されている (IPCS/INCHEM, 1988)。オーストラリアとニュージーランドの当局 (NAZFA) は、2001 年にヒトの HVOD のデータに基づいて、NOEL である 10 µg/kg/day に不確実係数 (UF) の 10 を適用した 1 µg/kg/day を、仮の一日許容摂取量 (Acceptable Daily Intake, ADI) とした (ANZFA, 2001)。その他では、lasiocarpine と riddelliine のラットでのがん原性試験の陽性結果から (NCI, 1978; NTP, 2003)、ヒトにおける慢性リスクを考慮してリスク評価を行った。すなわち、Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment (COT)、ドイツ当局 (Bundesinstitut für Risikobewertung, BfR) および EFSA は、lasiocarpine の雄ラットにおける肝血管肉腫に基づいて、慢性リスクの BMDL₁₀ (約 70 µg/kg) に MOE を適用したが、PA 総量に対しては lasiocarpine と同等の毒性ポテンシーとした (BfR, 2016, 2013a, b, 2007; COT, 2008; EFSA, 2011)。さらに、2017 年に EFSA は riddelliine のラットがん原性試験における肝血管肉腫の発現率増加に基づいた BMDL₁₀ (237 µg/kg/day) を、慢性リスク評価の RP とした (EFSA, 2017a,c)。その結果、欧州における一般的な食品摂取での PA の慢性曝露の MOE は 1,000~10, 000,000 の範囲であった。急性曝露に関しては高い汚染レベルが存在することを考慮しても、RP の 1 µg/kg/day を下回った。しかし、600 種類以上ある PA で検討されているのは 20 程度であり、その他のものについても代謝や毒性データを入手する必要があると考えられた。また、種々の食品での PA の分析データを継続的に入手する必要があるとされた。

PA の化学構造に基づく毒性の違いを、リスク評価においては考慮してこなかった。一方で、げっ歯類の急性毒性、キイロショウジョウバエによる遺伝毒性、あるいは *in vitro* 細胞毒性のデータの解析結果から、毒性ポテンシーに基づく暫定の相対効力係数がいくつかの PA について提案された (Table 11;

Merz and Schrenk, 2016)。一方、Chen らは皮下投与や腹腔内投与による試験を含むげっ歯類を用いた試験における腫瘍発生率を使用し、個々の PA の相対的効力係数を算出した (Table 12; Chen et al., 2017)。EFSA はこれらに対して、非経口投与による試験結果は食品成分のヒトでの安全性評価との関連が限定されること、あるいはデータセットが限られることから、これらのアプローチによる PA の相対効果係数は、食品中の PA のリスク評価には適さないとした。

Table 11

Provisional assignment of relative potency (REP) factors to PA congeners according to their combined genotoxic potency in *Drosophila*, cytotoxic potency *in vitro* and acute toxicity in adult rodents.

Congener	Frei et al., 1992 ^a	Field et al. LDH (μM), 2015	Field et al. MTT (μM), 2015	LD ₅₀ i.p. ^b (mg/kg)	LD ₅₀ i.v. ^c (mg/kg)	Provisional equivalent
PA s						
Heliosupine (7S, open, di) ^d	n.t.	n.t.	n.t.	60	n.t.	1.0
Lasiocarpine (7S, open, di)	n.t.	14	31	72/77/79	88/85/67.5	1.0
Monocrotaline (7R, cyclic, di)	0.90	>160	256	109/230	n.t.	1.0
Retrorsine (7R, cyclic, di)	0.08	n.t.	n.t.	153/34	38	1.0
Riddelliine (7R, cyclic, di)	n.t.	72	>208	n.t.	105	1.0
Senecionine (7R, cyclic, di)	0.39	39	96	85/50	64/61	1.0
Seneciphylline (7R, cyclic, di)	0.54	17	76	77/83	90	1.0
Senkirkine (7R, cyclic, di)	1.0	n.t.	n.t.	220	n.t.	1.0
Echinatine (7S, mono)						
Echinatine (7S, mono)	n.t.	n.t.	n.t.	350	n.t.	0.3
Heliotrine (7S, mono)						
Heliotrine (7S, mono)	0.13	45	73	296/478	274/255	0.3
Echimidine (7R, open, di)						
Echimidine (7R, open, di)	n.t.	n.t.	n.t.	200	n.t.	0.1
Symphytine (7R, open, di)						
Symphytine (7R, open, di)	0.04	n.t.	n.t.	130/300	n.t.	0.1
Indicine (7R, mono)						
Indicine (7R, mono)	< 0.01	n.t.	n.t.	> 1000	n.t.	0.01
Intermedine (7R, mono)						
Intermedine (7R, mono)	< 0.01	> 300	> 300	1500	n.t.	0.01
Lycopsamine (7-R, mono)						
Lycopsamine (7-R, mono)	< 0.01	> 300	> 300	n.t.	n.t.	0.01
N-oxides						
Isatidine (Retrorsine-N-oxide)						
Isatidine (Retrorsine-N-oxide)	n.t.	n.t.	n.t.	250	834	1.0^e
Lasiocarpine-N-oxide						
Lasiocarpine-N-oxide	n.t.	>300	>300	547/181	n.t.	1.0^e
Senecionine-N-oxide						
Senecionine-N-oxide	n.t.	>300	>300	n.t.	n.t.	1.0^e

n.t.: not tested.

Table 12

Lowest BMDL₁₀ and T10 values as derived from data on the incidence of tumours in rats exposed to lasiocarpine, riddelliine, monocrotaline, clivorine, senkirkine and symphytine. For a full overview of all data and PODs see Supplementary materials Tables S1–S4.

Compound	Species and sex	Tumour type	Malignant	BMDL ₁₀ (mg/kg bw/day)	T10 (mg/kg bw/day)	Fold difference compared to POD (BMDL ₁₀) for lasiocarpine	Relative potency compared to lasiocarpine ^a
Lasiocarpine	Male rats	Liver haemangiosarcomas	Yes	BMDL₁₀ = 0.07	T10 = 0.16	1	1.0
Riddelliine	Female rats	Liver haemangiosarcomas	Yes	BMDL₁₀ = 0.18	T10 = 0.09	3	0.39
Monocrotaline	Male rats	Pulmonary adenocarcinoma	Yes	—	T10 = 1.5	21	0.05
Clivorine	Rats (Male and Female)	Liver neoplastic nodules	No	—	T10 = 0.31	4	0.23
Senkirkine	Male rats	Liver cell adenomas	No	—	T10 = 2.4	34	0.03
Symphytine	Male rats	Hemangioendothelial sarcoma of the liver	Yes	—	T10 = 4.0	60	0.02

— Cannot be calculated.

^a Calculated using the BMDL₁₀ when available and otherwise the T10, divided by BMDL₁₀ of 0.07 mg/kg bw/day.

6. New Approach Method (NAM)を用いた PA 個別評価

現在、600 種類以上の PA が存在することが確認されている。リスク評価においては、個々の PA に対して毒性ポテンシーに基づく相対的効果係数の適用が提案されているものの、最も強い毒性が想定される PA を基準に同一の毒性を適用するのが一般的である。その背景のひとつには PA を個別に定量することの困難さにあったが、LC-MS/MS を用いることによって、個別の標品なしに各々の PA を迅速に測定する手法が確立されている (Zhou et al., 2010; Zhu et al., 2016)。実際に、多くの食品やハーブ製品において応用が試みられている (Ruan et al, 2012; Zhu et al, 2018)。本研究課題における 2 年目の取り組みとして、*in vitro* や *in silico* など動物を用いない手法である NAM を用いることによって、各 PA の毒性ポテンシーの程度に応じたリスク評価の可能性について検討した。

毒性発現において、標的臓器における毒物の濃度が重要で、そのための PA のキネティックスの研究

が生理学的動態 (pharmacological based kinetics: PBK) モデルを用いて行われている。Lasiocarpine と riddelliine について、肝細胞の細胞毒性から導かれる *in vivo* の影響を PBK モデルを用いてラットとヒトにおいて予測した結果、lasiocarpine のほうが肝クリアランスの効率が高く、その結果として同じ用量を投与した場合にも riddelliine のほうが血中濃度は高くなり、肝毒性が予測される用量は riddelliine のほうが低くなる (Chen et al., 2018; Ning et al., 2019)。ヒト細胞の細胞毒性を指標にしたベンチマークドーズ (BMD) の信頼限界の用量下限値および上限値 (BMDL₅ および BMDU₅) と PBK モデルから、lasiocarpine の BMDL₅-BMDU₅ は 7.4-23.7 mg/kg で、riddelliine の BMDL₅-BMDU₅ は 0.2-1.2 mg/kg と予測された (Ning et al., 2019)。PBK モデルによる予測を総合すると、riddelliine の肝毒性ポテンシーは lasiocarpine に比較して 4~5 倍であるとされた (Schrenk et al., 2020)。一方、国産フキに多く含まれる PA である neopetasienine とその代謝物である petasitenine について、ヒトの PBK モデルを構築し血中濃度を予測した結果、3 mg/kg の neopetasitenine を反復投与した際の投与 4 日の neopetasienine および petasitenine の平均血中濃度は 27 および 30 ng/mL と予測され、HepaRG 細胞において細胞毒性の指標である培養上清の LDH の上昇がみられた濃度 (蛋白非結合分画として 100 μM で neopetasienine と petasitenine は各々 36 および 29 ng/mL) に近似する結果になった (Yanagi et al., 2021)。前出の lasiocarpine や riddelliine (強い毒性ポテンシーを持つため PA の基準物質とされる) と比較すると、細胞の種類や毒性指標は異なるが、これらの国産フキに含まれる PA の肝毒性ポテンシーは概ね 1/2~1/40 程度と予想される。

PA の毒性発現には代謝反応が関与している。毒性の mode of action (MOA) はすべての PA に共通しており、CYP により反応性代謝産物である dehydro-pyrrolizidine (DHP) が生成され、この活性代謝物は蛋白、DNA あるいはグルタチオンとすみやかに結合する (Chen et al., 2009; Lin et al., 2000)。グルタチオンとの反応は解毒に進むものの、その反応機構が飽和した際には蛋白や DNA との結合物が急激に増加する結果、肝毒性あるいは発がんに至ると考えられている。DHP の DNA 反応物については測定が容易であるため、多くの検討がなされてきた。ラット肝細胞培養系において PA の曝露量当たりの DNA 結合物の生成量を比較した結果、lasiocarpine が最も多く、それに echimidine、riddelliine、heliotrine が続き、europine、monocrotaline、lycosamine および indicine は上記 4 種の PA に比較するとかなり少なかった (Lester et al., 2019)。DNA 結合物の生成量と肝発がんポテンシーは相関することが報告されている (Fu, 2017)。一方、蛋白結合性の指標として、ヒト肝ミクロソーム液に PA を添加して 37°C で 1 時間インキュベートした際のシステイン反応量について検討した (試験番号: GE-1966)。この検討において国産フキに多く含まれる neopetasienine、petasitenine および senkirkine のシステインとの反応性である反応性代謝物速度の増加は、petasitenine では統計学的な有意差は認められなかったが、neopetasitenine と senkirkine は陰性対照よりも統計学的に有意であった (Figure 3)。これらのフキに含まれる PA の反応性代謝物生成速度の増加は、臨床における肝毒性により市場撤退した陽性対照の nefazodone の増加量に比較すると 7%~49% で、riddelliine の増加量に比較すると 30%~214% であった (Table 13)。また、同様にヒト肝ミクロソーム液に PA (100 μM) を添加してグルタチオン結合物を測定した際には、lasiocarpine は riddelliine よりも 7.2 倍強い活性がみられたとの報告がある (Ning et al., 2019)。ラットの発がん用量 (BMDL₁₀) は lasiocarpine および riddelliine の 70 および 237 μg/kg/day で (EFSA, 2017a, 2011; NTP, 1978)、lasiocarpine は riddelliine よりも 3.4 倍強い活性がみられた。すなわち、これらの活性比の違いは 2 倍以内で、グルタチオン反応性と実際の肝発がんにおいて、肝毒性ポテンシーの相関がみられている。

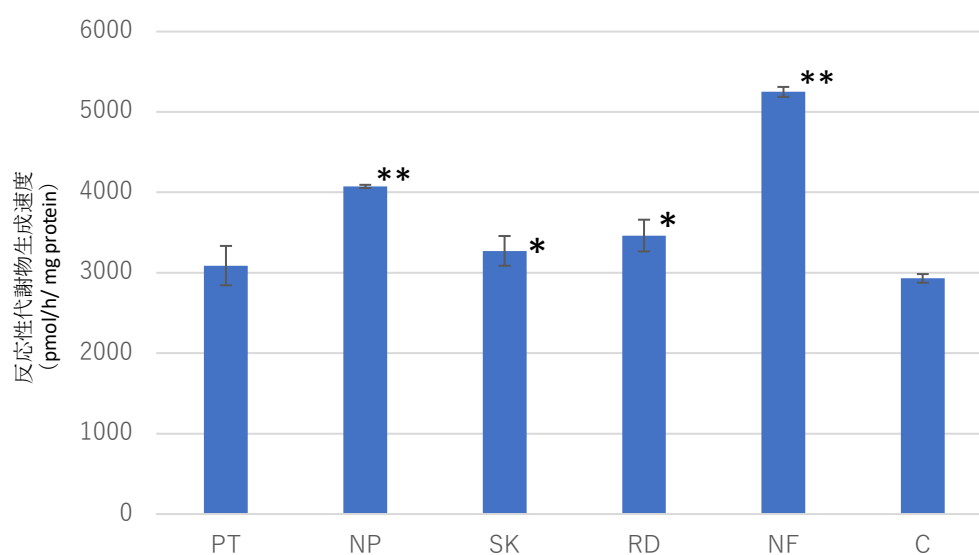


Figure 3 ヒト肝ミクロソーム液中の PA のシステインとの反応性 (試験番号: GE-1966) Petasitenine (PT)、neopetasitenine (NP)、senkirkine (SK)、riddelliine (RD)、nefazodone (NF) および陰性対照 (C) の反応性代謝物生成速度について、3 検体の平均値と標準偏差を示した。C を比較対照とした t-検定: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Table 13 ヒト肝ミクロソーム液中の PA のシステインとの反応性 (反応性代謝物生成速度) (試験番号: GE-1966)

PA	反応性代謝物生成速度 (システインとの反応性) の増加量 ^a	
	対陽性対照 ^b	対 riddelliine
Petasitenine	7%	30%
Neopetasitenine	49%	214%
Senkirkine	15%	64%
Riddelliine	23%	—

^a 反応性代謝物生成速度 (pmol/h/mg protein) について、各群 3 検体の平均値から陰性 (媒体) 対照 3 検体の平均値を差し引いた。

^b Nefazodone

各 PA の肝細胞への直接の影響について、ラット初代培養肝細胞を用いて検討が行われている (Schrenk et al., 2020)。細胞毒性の EC_{50} について比較した結果 (Table 14)、環状あるいは開環ジエステル構造を有する PA については、monocrotaline を除いて 4~25 μM の範囲で、強い毒性を示した。一方で、モノエステル構造を有する PA の EC_{50} は 100 μM を超え、弱い毒性を示した。Structure-dependent interim relative potency (iREP) (Merz and Schrenk, 2016) と概ね一致したが、echimidine と monocrotaline については明らかな不一致がみられた。これらの不一致は他の細胞系、たとえば HepaRG 細胞においても同じようにみられた (Allemang et al., 2018; Louisse et al., 2019; Waizenegger et al., 2018)。

Table 14 ラット初代培養肝細胞における PA の細胞毒性 (Schrenk et al., 2020)

PA (structural features)	EC ₅₀ (μM, 48 h)	iREP
Lasiocarpine (open, di, 7S)	4 ± 1**	1.0
Retorsine (cyclic, di, 7R)	19 ± 2**	1.0
Senecionine (cyclic, di, 7R)	8 ± 1**	1.0
Seneciphylline (cyclic, di, 7R)	19 ± 6*	1.0
Monocrotaline (cyclic, di, 7R)	>300	1.0
Europine (mono, 7S)	>300	0.3
Heliotrine (mono, 7S)	193 ± 17**	0.3
Echimidine (open, di, 7R)	25 ± 1**	0.1
Indicine (mono, 7R)	210 ± 16	0.01
Lycopsamine (mono, 7R)	114 ± 18	0.01

*p < 0.05 and **p < 0.01 at 24 h after seeding

iREP: Structure-dependent interim Relative Potency (Merz and Schrenk, 2016)

HepaRG 細胞において、37 種類の PA について二本鎖 DNA 切断の際のヒストンリン酸化 (γH2AX) を定量化した (Louisse et al., 2019)。Benchmark Concentration (BMC)を比較した結果、ジエステル構造を有する PA の BMC は全般に低かったのに対し、モノエステル構造を有する PA の BMC は高く、モノエステル構造を有する PA のいくつかとネシン塩基のみでエステル構造を有さない PA では高濃度でもγH2AX は検出されなかった (Figure 4、Table 15)。これらの結果は、肝細胞毒性の強度と概ね一致するものであった。本研究ではオトネシンタイプの petasitenine あるいは neopetasitenine については検討されなかったが、同じネシンタイプでは senkirkinine と otosenine について検討された。Petasitenine と otosenine は立体異性体で、senkirkinine と otosenine のエステル構造はオトネシンタイプの jacobine および senecionine と同一である (Figure 5)。レトロネシンタイプの両 PA (jacobine と senecionine) の BMC は同程度に低いものの、オトネシンタイプの両 PA (senkirkinine と otosenine) の BMC は数倍以上高値であった。総合すると、オトネシンタイプの petasitenine とそのアセチル体である neopetasitenine および senkirkinine の毒性は、レトロネシンタイプの最も毒性が強い PA (lasiocarpine や riddelliine) よりかなり低いことが示唆された。

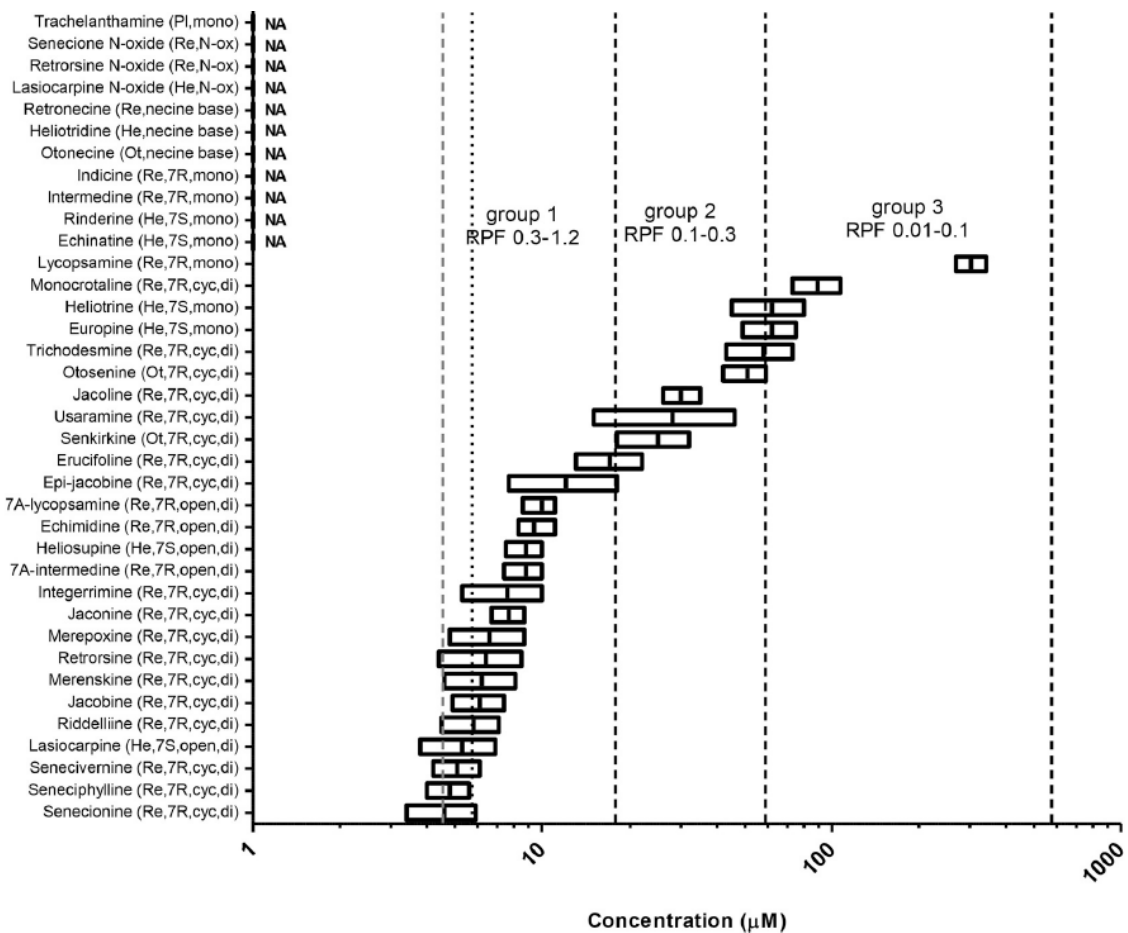


Figure 4 HepaRG 細胞における PA を処置した際の γ H2AX 発現量 (BMC₅₀ とその信頼区間)
(Louisse et al., 2019 より引用)

Table 15 HepaRG 細胞における PA を処置した際の γ H2AX 発現量 (主な PA についての結果)
(Louisse et al., 2019 より引用)

PA	BMC ₅₀ (µM)	Relative potency
Senecionine	4.6	1.24
Seneciphylline	4.8	1.20
Lasiocarpine	5.3	1.08
Riddelliine	5.8	1.00
Jacobine	6.1	0.94
Retrorsine	6.4	0.90
Jaconine	7.7	0.75
Echimidine	9.4	0.61
Senkirkine	25	0.23
Jacoline	30	0.19
Otosenine	51	0.11
Heliotrine	62	0.09
Europine	62	0.09
Monocrotaline	89	0.06
Lycopsamine	303	0.02
Indicine	NA	<0.01
Necine/PA N-oxide	NA	<0.01

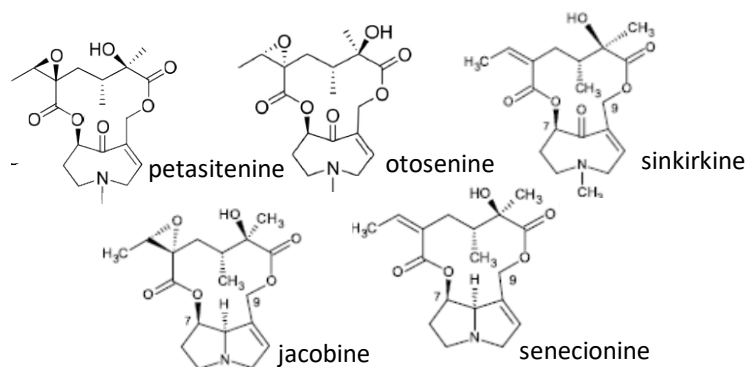


Figure 5 PA の化学構造：フキに含まれる PA (petasitenine と senkirkine) および関連構造を有する PA Neopetasitenine は petasitenine のネシン酸エステルに存在する水酸基がアセチル化されている。

フキに含まれる PA の肝毒性ポテンシーを検討した。フキには複数種の PA が含まれているが、その主なものは petasitenine、neopetasitenine および senkirkine で、この 3 種でフキに含まれる PA の約 99% に相当するとの報告がある (岡部ら、2013)。この 3 種はオトネシンタイプに分類され、PBK モデルと細胞毒性から予測した毒性量あるいは二本鎖 DNA 切断作用量は、レトロネシンタイプの PA のものよりは高いと考えられた。活性代謝物産生の指標であるシステイントラップ作用については、レトロネシンタイプの riddelliine に比較して petasitenine と senkirkine は弱いものの、neopetasitenine は強い結果が得られた。オトネシンタイプの PA の毒性が全般に低いのは、現在知られている活性代謝物を生成するには、オトネシンタイプのネシンの構造がレトロネシンタイプのものに一旦変換される必要があるためと考えられる。しかし、オトネシンタイプの PA には知られていない活性代謝物を生成する可能性があり、これについては今後検討される必要がある。また、オトネシンタイプの PA についてはレトロネシンタイプの PA に比較して *in vivo* 試験が不十分で、毒性ポテンシーについて十分に検証するためには、その必要性があると考えられる。

肝毒性のポテンシーを比較するうえで臨床の知見は重要であるが、PA による肝毒性の発症について体系的に調べることは困難である。しかし、毒性を予測できるような臨床におけるバイオマーカーがあれば、その可能性は広がる。血中での DHP と蛋白との結合物は PA の肝毒性バイオマーカーの候補になりうるもので、PA によって肝毒性が発症した症例について検討が実際に行われている (Lin et al, 2011)。中国で肝障害を発症した数百人の患者から、その血液中の PA 蛋白結合物 (DHP 蛋白) を検査した結果、PA を摂取したことが判明した患者の約 35% において陽性結果が得られた (Gao et al., 2015; Ruan et al., 2015)。今後、各々の PA の肝毒性ポテンシーについての臨床における知見が増えていくものと思われる。

以上のとおり様々な検討が行われ、NAM を多用することにより、より多くの知見を得られている。それらを用いて、リードアクロスによる量的な毒性評価が可能になるであろう。PA については、個々の PA の肝毒性のポテンシーを把握できれば、そのリスクについてより適切な評価が可能になると考える。

7. まとめ

PA 類についての調査を広範に行った結果、PA の肝毒性を含めた臓器毒性、遺伝毒性およびがん原性のポテンシャルが明らかであった。一方、PA は代謝が速く、摂取された PA の多くがすみやかに排出

され、蓄積性は認められない。また、水溶性であるために調理の過程で取り除かれることが多く、茶のように抽出物を摂取する場合を除いて含量の全部が摂取されることは多くない。これらの知見から、フキに含まれる PA の健康への影響の懸念は大きくないものと考えられた。一方で、フキ以外に含まれる PA 類については PA の種類による毒性ポテンシーの比較等を行い、総合的に判断する必要があると考えられた。

当初の調査対象はフキに多く含まれる petasitenine であったが、オトネシンタイプの PA の情報量は少ないことが判明した。しかし、いずれのタイプの PA も DHP エステルまたは DHP に変換されたのちに同様な毒性を発現するものと考えられた。この反応には CYP が関与するため、肝臓が最も PA による毒性の影響を受ける臓器である。そこで、フキに含まれる PA を含めた総合的な影響評価を行うために、PA 各々の肝毒性ポテンシーについて NAM を用いた検討を、新たな実験を含めて行った。この結果、フキに含まれる PA の肝毒性ポテンシーは、評価されてきた PA 類の肝毒性ポテンシーの範囲内であることが判明し、それらを実験するうえでの NAM の有用性が示唆された。すなわち、本事例研究によって食品に含まれる毒性物質の健康評価において、NAM とそれに基づいたリードアクロスの可能性が確認された。

8. 参考文献

- 岡部慧, 小暮紀行, 北島満里子, 高山廣光, 2013. フキ(*Petasites japonicus*) に含有されるピロリジジンアルカロイド類の検索研究, 第 5 回食品薬学シンポジウム
- 農林水産省, 2018. 国産フキ中のピロリジジンアルカロイド類の含有実態調査結果.
https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/foodpoisoning/naturaltoxin/attach/pdf/pyrrolizidine_alkaloids-5.pdf
- Allemang, A., Mahony, C., Lester, C., Pfuhrer, S., 2018. Relative potency of fifteen pyrrolizidine alkaloids to induce DNA damage as measured by micronucleus induction in HepaRG human liver cells. *Food Chem. Toxicol.* 121, 72–81.
- ANZFA (Australia New Zealand Food Authority), 2001. Pyrrolizidine Alkaloids in Food: a Toxicological Review and Risk Assessment. Technical Report Series No. 2.
- Berry, D.L., Schoofs, G.M., Schwass, D.E., Molyneux, R.J., 1996. Genotoxic activity of a series of pyrrolizidine alkaloids in primary hepatocyte-mediated V79 cell mutagenesis and DNA repair assay. *J. Nat. Toxins* 5, 7–24.
- BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung), 2007. Salatmischung mit Pyrrolizidinalkaloidhaltigem Greiskraut verunreinigt. Stellungnahme 028/2007 des BfR vom 10 January 2007.
- BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung), 2013a. Pyrrolizidine Alkaloids in Herbal Teas and Teas. BfR Opinion No. 018/2013 of 5 July 2013.
- BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung), 2013b. Analytik und Toxizität von Pyrrolizidinalkaloiden sowie eine Einschätzung des gesundheitlichen Risikos durch deren Vorkommen in Honig. Stellungnahme Nr. 038/2011 des BfR vom 11. August 2011.
- BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung), 2016. Pyrrolizidinalkaloide: Gehalte in Lebensmitteln sollen nach wie vor so weit wie möglich gesenkt werden. Stellungnahme Nr. 030/2016 des BfR vom 28. September 2016.
- Bhattacharyya, K., 1965. Foetal and neonatal responses to hepatotoxic agents. *J. Pathol. Bacteriol.* 90, 151–161.
- Bodi, D., Ronczka, S., Gottschalk, C., Behr, N., Skibba, A., Wagner, M., Lahrssen-Wiederholt, M., Preiss-Weigert, A., These, A., 2014. Determination of pyrrolizidine alkaloids in tea, herbal drugs and honey. *Food Addit. Contam. A* 31, 1886–1895.

- Brink, N.G., 1969. The mutagenic activity of the pyrrolizidine alkaloid heliotrine in *Drosophila melanogaster*. II. Chromosome rearrangements. *Mutat. Res.* 8, 139–146.
- Bull, L.B., Dick, A.T., McKenzie, J.S., 1958. The acute toxic effects of heliotrine and lasiocarpine, and their N-oxides, on the rat. *J. Pathol. Bacteriol.* 75, 17–25.
- Candrian, U., Luthy, J., Graf, U., Schlatter, C., 1984. Mutagenic activity of the pyrrolizidine alkaloids seneciphylline and senkirkine in *Drosophila* and their transfer into rat milk. *Food Chem. Toxicol.* 22, 223–225.
- Candrian, U., Luthy, J., Schlatter, C., 1985. *In vivo* covalent binding of retronecine-labelled [³H]seneciphylline and [³H]senecionine to DNA of rat liver lung and kidney. *Chem. Biol. Interact.* 54, 57–69.
- Centre for Food Safety Food and Environmental Hygiene Department, The Government of the Hong Kong Special Administrative Region, 2017. Risk Assessment Studies, Report No. 56, Chemical Hazard Evaluation, Pyrrolizidine Alkaloids in Food. https://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme_rafs/files/Pyrrolizidine_Alkaloids_in_Food_e.pdf
- Cheeke, P.R., 1985. Natural Toxicants in Feeds and Poisonous Plants. AVI Publishing Inc., Westport, Connecticut.
- Chan, P.C., Mahler, J., Bucher, J.R., Travlos, G.S., Reid, J.B., 1994. Toxicity and carcinogenicity of riddelliine following 13 weeks of treatment to rats and mice. *Toxicol.* 32, 891–908.
- Chen, L., Mulder, P.P.J., Louisse, J., Peijnenburg, A., Wesseling, S., Rietjens, I.M.C.M., 2017. Risk assessment for pyrrolizidine alkaloids detected in (herbal) teas and plant food supplements. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 86, 292–302.
- Chen, L., Ning, J., Louisse, J., Wesseling, S., Rietjens, I.M.C.M., 2018. Use of physiologically based kinetic modelling facilitated reverse dosimetry to convert *in vitro* cytotoxicity data to predicted *in vivo* liver toxicity of lasiocarpine and riddelliine in rat. *Food Chem. Toxicol.* 116, 216–226.
- Chen, T., Mei, N., Fu, P.P., 2010. Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. *J. Appl. Toxicol.* 30, 183–196.
- Chung, W.G., Miranda, C.L., Buhler, D.R., 1995. A cytochrome P4502b form is the major bioactivation enzyme for the pyrrolizidine alkaloid senecionine in guinea-pig. *Xenobiotica* 25, 929–939.
- Clark, A.M., 1960. The mutagenic activity of some pyrrolizidine alkaloids in *Drosophila*. *Z. Vererbungslehre* 91, 74–80.
- Codex Alimentarius Commission, 2011. Discussion Paper on Pyrrolizidine Alkaloids. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Committee on Contaminants in Foods. 5th Session. The Hague, The Netherlands, 21–25 March 2011. CX/CF 11/5/14.
- COT (Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment), 2008. COT Statement on Pyrrolizidine Alkaloids in Food. COT Statement 2008/06 (October 2008).
- Cook, L.M., Holt, A.C.E., 1966. Mutagenic activity in *Drosophila* of two pyrrolizidine alkaloids. *J. Genetics* 59, 273–274.
- Coulombe Jr., R.A., Drew, G.L., Stermitz, F.R., 1999. Pyrrolizidine alkaloids crosslink DNA with actin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154, 198–202.
- Culvenor, C.C., Downing, D.T., Edgar, J.A., Jago, M.V., 1969. Pyrrolizidine alkaloids as alkylating and antimetabolic agents. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 163, 837–847.
- Culvenor, C.C., Edgar, J.A., Jago, M.V., Qutteridge, A., Peterson, J.E., Smith, L.W., 1976. Hepato- and pneumotoxicity of pyrrolizidine alkaloids and derivatives in relation to molecular structure. *Chem. Biol. Interact.* 12, 299–324.
- Dusemund, B., Nowak, N., Sommerfeld, C., Lindtner, O., Schäfer, B., 2018. Risk assessment of pyrrolizidine

- alkaroids in food of plant and animal origin. *Food Chem, Toxicol.* 115, 63-72.
- Eastman, D.F., Dimenna, G.P., Segall, H.J., 1982. Covalent binding of two pyrrolizidine alkaloids, senecionine and seneciphylline to hepatic macromolecules and their distribution, excretion, and transfer into milk of lactating mice. *Drug Metabol. Dispos.* 10, 236–240.
- Edgar, J.A., Colegate, S.M., Boppre, M., Molyneux, R.J., 2011. Pyrrolizidine alkaloids in food: a spectrum of potential health consequences. *Food Addit. Contam.* 28, 308–324.
- Edgar, J.A., Molyneux, R.J., Colegate, S.M., 2015. Pyrrolizidine alkaloids: potential role in the etiology of cancers, pulmonary hypertension, congenital anomalies, and liver disease. *Chem. Res. Toxicol.* 28, 4–20.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2011. Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed. *EFSA Journal* 9 (11), 2406.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2016. Dietary exposure assessment to pyrrolizidine alkaloids in the European population. *EFSA Journal* 14 (8), 4572.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2017a. Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements. *EFSA Journal* 15, 4908.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2017b. Update: use of the benchmark dose approach in risk assessment. *EFSA Journal* 15 (1), 4658 1-41.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2017c. Risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements. *EFSA Journal* 15 (7), 4908.
- Frei, H., Luethy, J., Brauchli, J., Zweifel, U., Wuergler, F.E., Schlatter, C., 1992. Structure/activity relationships of the genotoxic potencies of sixteen pyrrolizidine alkaloids assayed for the induction of somatic mutation and recombination in wing cells of *Drosophila melanogaster*. *Chem. Biol. Interact.* 83, 1–22.
- Fu, P.P., Xia, Q., Lin, G., Chou, M.W., 2004. Pyrrolizidine alkaloids - genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. *Drug Metabol. Rev.* 36, 1–55.
- Fu, P.P., Xia, Q.S., Chou, M.W., Lin, G., 2007. Detection, hepatotoxicity, and tumorigenicity of pyrrolizidine alkaloids in Chinese herbal plants and herbal dietary supplements. *J. Food Drug Anal.* 15, 400–415.
- Fu, P.P., 2017. Pyrrolizidine alkaloids: metabolic activation pathways leading to liver tumor initiation. *Chem. Res. Toxicol.* 30, 81–93.
- Gao, H., Ruan, J.Q., Chen, J., Li, N., Ke, C.Q., Ye, Y., Lin, G., Wang, J.Y., 2015. Blood pyrrole-protein adducts as a diagnostic and prognostic index in pyrrolizidine alkaloid-hepatic sinusoidal obstruction syndrome. *Drug Des. Dev. Ther.* 9, 4861–4868.
- Green, C.R., Christie, G.S., 1961. Malformations in foetal rats induced by the pyrrolizidine alkaloid heliotrine. *Br. J. Exp. Pathol.* 42, 369–378.
- Green, M.H., Muriel, W.J., 1975. Use of repair-deficient strains of *Escherichia coli* and liver microsomes to detect and characterise DNA damage caused by pyrrolizidine alkaloids heliotrine and monocrotaline. *Mutat. Res.* 28, 331–336.
- Griffin, D.S., Segall, H.J., 1986. Genotoxicity and cytotoxicity of selected pyrrolizidine alkaloids a possible alkenal metabolite of the alkaloids, and related alkenals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 86, 227–234.
- Hessel, S., Gottschalk, C., Schumann, D., These, A., Preiss-Weigert, A., Lampen, A., 2014. Structure-activity relationship in the passage of different pyrrolizidine alkaloids through the gastrointestinal barrier: ABCB1 excretes heliotrine and echimidine. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 995–1004.

- Hincks, J.R., Kim, H.Y., Segall, H.J., Molyneux, R.J., Stermitz, F.R., Coulombe Jr., R.A., 1991. DNA cross-linking in mammalian cells by pyrrolizidine alkaloids: structure–activity relationships. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 111, 90–98.
- Hirono, I., Mori, H., Yamada, K., Hirata, Y., Haga, M., Tatematsu, H., Kanie, S., 1977. Carcinogenic activity of petasitenine, a new pyrrolizidine alkaloid isolated from petasites japonicus Maxim2. *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda)* 58, 1155–1157.
- Hirono, I., Haga, M., Fujii, M., Matsuura, S., Matsubara, N., Nakayama, M., Furuya, T., Hikichi, M., Takanashi, H., Uchida, E., Hosaka, S., Ueno, I., 1979. Induction of hepatic tumors in rats by senkirkine and symphytine. *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda)* 63, 469–472.
- Huan, J.Y., Miranda, C.L., Buhler, D.R., Cheeke, P.R., 1998. The roles of CYP3A and CYP2B isoforms in hepatic bioactivation and detoxification of the pyrrolizidine alkaloid senecionine in sheep and hamsters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 151, 229–235.
- Hartmann, T., Witte, L., 1995. Chemistry, biology and chemoecology of the pyrrolizidine alkaloids, alkaloids: chemical and biological perspectives. Elsevier, pp. 155–233.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 1976. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man. In: *Some Naturally Occurring Substances*, vol 10.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 1983. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Chem. Humans. In: *Some Food Additives, Feed Additives and Naturally Occurring Substances*, vol 31.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 1987. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Suppl. 7: Overall evaluations of carcinogenicity - An updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 2002. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. In: *Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene*, vol 82.
- IPCS/INCHEM (International Programme on Chemical Safety), 1988. Pyrrolizidine alkaloids. *Environ. Health Criter.* 80.
- Jago, M.V., Edgar, J.A., Smith, L.W., Culvenor, C.C., 1970. Metabolic conversion of heliotridine-based pyrrolizidine alkaloids to dehydroheliotridine. *Mol. Pharmacol.* 6, 402–405.
- Kakar, F., Akbarian, Z., Leslie, T., Mustafa, M.L., Watson, J., van Egmond, H.P., Omar, M.F., Mofleh, J., 2010. An outbreak of hepatic veno-occlusive disease in Western Afghanistan associated with exposure to wheat flour contaminated with pyrrolizidine alkaloids. *J. Toxicol.* 2010, 1–7.
- Kevekordes, S., Mersch-Sundermann, V., Burghaus, C., Spielberger, J., Schmeiser, H. H., Arlt, V.M., Dunkelberg, H., 1999. SOS induction of selected naturally occurring substances in *Escherichia coli* (SOS chromotest). *Mutat. Res. Gen. Toxicol. Environ. Mutagen* 445, 81–91.
- Kim, H.Y., Stermitz, F.R., Coulombe Jr., R.A., 1995. Pyrrolizidine alkaloid-induced DNA–protein cross-links. *Carcinogenesis* 16, 2691–2697.
- Kim, H.Y., Stermitz, F.R., Li, J.K., Coulombe Jr., R.A., 1999. Comparative DNA crosslinking by activated pyrrolizidine alkaloids. *Food Chem. Toxicol.* 37, 619–625.
- Kvitko, K., Gimmler, M.C., 1986. Effects of integerrimine on the implantation and intrauterine development of mice. *Rev. Bras. Genet.* 9, 439–451.
- Lester, C., Troutman, J., Obringer, C., Wehmeyer, K., Stoffolano, P., Karb, M., Xu, Y., Roe, A., Carr, G., Blackburn, K., Mahony, C., 2019. Intrinsic relative potency of a series of pyrrolizidine alkaloids characterized by rate and

- extent of metabolism. *Food Chem. Toxicol.* 131 110523. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.05.031>
- Lin, G., Cui, Y.-Y., Hawes, E.M., 1998. Microsomal formation of a pyrrolic alcohol glutathione conjugate of clivorine - firm evidence for the formation of a pyrrolic metabolite of an otonecine-type pyrrolizidine alkaloid. *Drug Metabol. Dispos.* 26, 181–184.
- Lin, G., Cui, Y.Y., Hawes, E.M., 2000. Characterization of rat liver microsomal metabolites of clivorine, an hepatotoxic otonecine-type pyrrolizidine alkaloid. *Drug Metab. Dispos.* 28, 1475–1483.
- Lin, G., Cui, Y.Y., Liu, X.Q., 2003. Gender differences in microsomal metabolic activation of hepatotoxic clivorine in rat. *Chem. Res. Toxicol.* 16, 768–774.
- Lin, G., Wang, J.Y., Li, N., Li, M., Gao, H., Ji, Y., Zhang, F., Wang, H., Zhou, Y., Ye, Y., Xu, H.X., Zheng, J., 2011. Hepatic sinusoidal obstruction syndrome associated with consumption of *Gynura segetum*. *J. Hepatol.* 54, 666–673.
- Litvinchuk, M.D., Gaiduk, R.I., Kit, V.I., 1979. Spasmolytic properties of pyrrolizidine alkaloids. *Farmakologiya i Toksikologiya (Moscow)* 42 (5), 509–511.
- Louisse, J., Rijkers, D., Stoop, G., Holleboom, W.J., Delagrange, M., Molthof, E., Mulder, P.P.J., Hoogenboom, R.L.A.P., Audebert, M., Peijnenburg, A.A.C.M., 2019. Determination of genotoxic potencies of pyrrolizidine alkaloids in HepaRG cells using the γ H2AX assay. *Food Chem. Toxicol.* 131, 110532. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.05.040>.
- Mattocks, A.R., 1971. Hepatotoxic effects due to pyrrolizidine alkaloid N-oxides. *Xenobiotica* 1, 563–565.
- Mattocks, A.R., 1972. Toxicity and metabolism of Senecio alkaloids. In: Harborne, J.B. (Ed.), *Phytochemical Ecology*. Academic Press, London/New York, pp. 179–200.
- Mattocks, A.R., 1972b. Acute hepatotoxicity and pyrrolic metabolites in rats dosed with pyrrolizidine alkaloids. *Chem. Biol. Interact.* 5, 227–242.
- Mattocks, A.R., 1986. *Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids*. Academic Press, London.
- Merz, K.-H., Schrenk, D., 2016. Interim relative potency factors for the toxicological risk assessment of pyrrolizidine alkaloids in food and herbal medicines. *Toxicol. Lett.* 263, 44–57.
- Mori, H., Sugie, S., Yoshimi, N., Asada, Y., Furuya, T., Williams, G.M., 1985. Genotoxicity of a variety of pyrrolizidine alkaloids in the hepatocyte primary culture-DNA repair test using rat mouse, and hamster hepatocytes. *Cancer Res.* 45, 3125–3129.
- Mulder, P.P.J., López, P., Castellari, M., Bodi, D., Ronczka, S., Preiss-Weigert, A., These, A., 2018. Occurrence of pyrrolizidine alkaloids in animal-and plant-derived food: results of a survey across Europe. *Food Addit. Contam. A* 35, 118–133.
- NCI (National Cancer Institute), 1978. Bioassay of Lasiocarpine for Possible Carcinogenicity. *Carcinogenesis Technical Report Series 39 (NCI-CG-TR-39; DHEW Publication No. (NIH) 78–839)*.
- Neuman, M.G., Cohen, L.B., Opris, M., Nanau, R., Jeong, H., 2015. Hepatotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. *J. Pharmaceut. Sci.* 18, 825–843.
- Ning, J., Chen, L., Wesseling, S., Louisse, J., Rietjens, I.M.C.M., 2019. Use of an *in vitro*–*in silico* testing strategy to predict inter-species and inter-ethnic human differences in liver toxicity of the pyrrolizidine alkaloids lasiocarpine and riddelliine. *Arch. Toxicol.* 93, 801–818.
- NTP (US National Toxicology Program), 1978. Bioassay of lasiocarpine for possible carcinogenicity. In: *NTP Technical Report*. vol. 39. pp. 1–66.
- NTP (US National Toxicology Program), 2003. *NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis*

- Studies of Riddelliine (CAS No. 23246-96-0) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). NTP Technical Report Series 508 (NIH Publication No. 03-4442).
- Nuzzo, N.A., Hall, A., Martin, A., Molyneux, R.J., Waller, D.P., 1987. Effect of an extract of *senecio vulgaris* and senecionine on rat fetuses. *Toxicologist* 7, 177.
- Peterson, J.E., Jago, M.V., 1980. Comparison of the toxic effects of dehydroheliotridine and heliotrine in pregnant rats and their embryos. *J. Pathol.* 131, 339–355.
- Prakash, A.S., Pereira, T.N., Reilly, P.E., Seawright, A.A., 1999. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mutat. Res.* 443, 53–67.
- Rasenack, R., Muller, C., Kleinschmidt, M., Rasenack, J., Wiedenfeld, H., 2003. Venooclusive disease in a fetus caused by pyrrolizidine alkaloids of food origin. *Fetal Diagn. Ther.* 18, 223–225.
- Reed, R.L., Ahern, K.G., Pearson, G.D., Buhler, D.R., 1988. Crosslinking of DNA by dehydroretronecine, a metabolite of pyrrolizidine alkaloids. *Carcinogenesis* 9, 1355–1361.
- Reed, R.L., Miranda, C.L., Kedzierski, B., Henderson, M.C., Buhler, D.R., 1992. Microsomal formation of a pyrrolic alcohol glutathione conjugate of the pyrrolizidine alkaloid senecionine. *Xenobiotica* 22, 1321–1327.
- Roth, R., Jaeschke, H., Luyendyk, J.P., 2019. Toxic Response of the Liver. In Casarett and Doull's *Toxicology* 9th edition (Klaassen C.D. ed.), McGraw-Hill, New York, 744-745.
- Roulet, M., Laurini, R., Rivier, L., Calame, A., 1988. Hepatic veno-occlusive disease in newborn infant of a woman drinking herbal tea. *J. Pediatr.* 112, 433–436.
- Ruan, J., Li, N., Xia, Q., Fu, P.P., Peng, S., Ye, Y., Lin, G., 2012. Characteristic ion clusters as determinants for the identification of pyrrolizidine alkaloid N-oxides in pyrrolizidine alkaloid-containing natural products using HPLC-MS analysis. *J. Mass Spectrom.* 47, 331–337.
- Ruan, J., Liao, C., Ye, Y., Lin, G., 2014. Lack of metabolic activation and predominant formation of an excreted metabolite of nontoxic platynecine-type pyrrolizidine alkaloids. *Chem. Res. Toxicol.* 27, 7–16.
- Ruan, J.Q., Gao, H., Li, N., Xue, J.Y., Chen, J., Ke, C.Q., Ye, Y., Fu, P.P.C., Zheng, J., Wang, J.Y., Lin, G., 2015. Blood pyrrole-protein adducts-A biomarker of pyrrolizidine alkaloid-induced liver injury in humans. *J. Environ. Sci. Health, Part C: Environ. Carcinog. Ecotoxicol.* 33, 404–421.
- Rubiolo, P., Pieters, L., Calomme, M., Bicchi, C., Vlietinck, A., Vanden Berghe, D., 1992. Mutagenicity of pyrrolizidine alkaloids in the *Salmonella typhimurium*/mammalian microsome system. *Mutat. Res.* 281, 143–147.
- Schehrer, L., Regan, J.D., Westendorf, J., 2000. UDS induction by an array of standard carcinogens in human and rodent hepatocytes: effect of cryopreservation. *Toxicology* 147, 177–191.
- Schoental, R., 1968. Toxicology and carcinogenic action of pyrrolizidine alkaloids. *Cancer Res.* 28, 2237–2246.
- Schoental, R., 1970. Hepatotoxic activity of retrorsine, senkirkine, and hydroxysenkirkine in newborn rats, and the role of epoxides in carcinogenesis by pyrrolizidine alkaloids and aflatoxins. *Nature* 227, 401–402.
- Schrenk, D., Gao, L., Lin, G., Mahony, C., Mulder, P.P.J., Peijnenburg, A., Pfuhler, S., Rietjens, I.M.C.M., Rutz, L., Steinhoff, B., These, A., 2020. Pyrrolizidine alkaloids in food and phytomedicine: Occurrence, exposure, toxicity, mechanisms, and risk assessment - A review. *Food Chem. Toxicol.* 136, 111107. <https://doi.10.1016/j.fct.2019.111107>.
- Schulz, M., Meins, J., Diemert, S., Zagermann-Muncke, P., Goebel, R., Schrenk, D., Schubert-Zsilavec, M., Abdel-Tawab, M., 2015. Detection of pyrrolizidine alkaloids in German licensed herbal medicinal teas. *Phytomedicine* 22, 648–656.

- Shumaker, R.C., Robertson, K.A., Hsu, I.C., Allen, J.R., 1976. Neoplastic transformation in tissues of rats exposed to monocrotaline or dehydroretronecine. *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda)* 56, 787–790.
- Sivlingham, R., Brink, N.G., 1988. Somatic mutation induced by heliotrine in *Drosophila*. *Teratog. Carcinog. Mutagen* 8, 205–213.
- Sperl, W., Stuppner, H., Gassner, I., Judmaier, W., Dietze, O., Vogel, W., 1995. Reversible hepatic veno-occlusive disease in an infant after consumption of pyrrolizidine-containing herbal tea. *Eur. J. Pediatr.* 154, 112–116.
- Styles, J., Ashby, J., Mattocks, A.R., 1980. Evaluation *in vitro* of several pyrrolizidine alkaloid carcinogens: observations on the essential pyrrolic nucleus. *Carcinogenesis* 1, 161–164.
- Takanashi, H., Umeda, M., Hirono, I., 1980. Chromosomal aberrations and mutation in cultured mammalian cells induced by pyrrolizidine alkaloids. *Mutat. Res.* 78, 67–77.
- Uhl, M., Helma, C., Knasmuller, S., 2000. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (Hep G2) cells. *Mutat. Res.* 468, 213–225.
- Waizenegger, J., Braeuning, A., Templin, M., Lampen, A., Hessel-Pras, S., 2018. Structure-dependent induction of apoptosis by hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in the human hepatoma cell line HepaRG: single versus repeated exposure. *Food Chem. Toxicol.* 114, 215–226.
- Wang, Y.-P., Fu, P.P., Chou, M.W., 2005. Metabolic activation of the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid, retrorsine, leading to DNA adduct formation *in vivo*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2, 74–79.
- Wehner, F.C., Thiel, P.G., van Rensburg, S.J., 1979. Mutagenicity of alkaloids in the Salmonella/microsome system. *Mutat. Res.* 66, 187–190.
- Williams, G., Mori, H., Hirono, I., Nagao, M., 1980. Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids in the hepatocyte primary culture/DNA-repair test. *Mutat. Res.* 79, 1–5.
- Xia, Q., Chou, M.W., Edgar, J.A., Doerge, D.R., Fu, P.P., 2006. Formation of DHP derived DNA adducts from metabolic activation of the prototype heliotridine-type pyrrolizidine alkaloid lasiocarpine. *Cancer Lett.* 231, 138–145.
- Xia, Q., Yan, J., Chou, M.W., Fu, P.P., 2008. Formation of DHP-derived DNA adducts from metabolic activation of the prototype heliotridine-type pyrrolizidine alkaloid heliotrine. *Toxicol. Lett.* 178, 77–82.
- Xia, Q., Zhao, Y., Von Tungeln, L.S., Doerge, D.R., Lin, G., Cai, L., Fu, P.P., 2013. Pyrrolizidine alkaloid-derived DNA adducts as a common biological biomarker of pyrrolizidine alkaloid-induced tumorigenicity. *Chem. Res. Toxicol.* 26, 1384–1396.
- Yamanaka, H., Nagao, M., Sugimura, T., Furuya, T., Shirai, A., Matsushima, T., 1979. Mutagenicity of pyrrolizidine alkaloids in the Salmonella/mammalianmicrosome test. *Mutat. Res.* 68, 211–216.
- Yanagi, M., Kamiya, Y., Murayama, N., Banju, K., Shimizu, M., Yamazaki, H., 2021. Metabolic profiles for the pyrrolizidine alkaloid neopetasitenine and its metabolite petasitenine in humans extrapolated from rat *in vivo* and *in vitro* data sets using a simplified physiologically based pharmacokinetic model. *J. Toxicol. Sci.* 46, 391–399.
- Zeiger, E., Anderson, B., Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K., 1988. Salmonella mutagenicity tests: IV: Results from the testing of 300 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* 11 (Suppl. 12), 1–157.

付録 1-4. クマリンのヒト肝毒性評価事例

クマリンのヒト肝毒性評価事例

目次

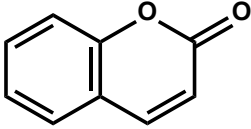
1. 物性情報	2
2. 摂取の状況	2
3. ADME	2
3.1. 経口吸収	2
3.2. 分布	2
3.3. 代謝	3
3.4. 排泄	3
4. 毒性	4
4.1. 単回投与	4
4.2. 反復投与毒性	4
4.3. 遺伝毒性	5
4.4. がん原性	6
4.5. 生殖発生毒性	6
4.6. TDI	6
4.7. ヒトにおける毒性	6
5. リスク評価	6
6. PBPK モデル	6
7. QSAR モデルでの評価	8
8. 考察および結論	11
9. 参考文献	13

1. 物性情報

名称：クマリン

化学名：2H-1-Benzopyran-2-one

化学構造式：



化学式：C₉H₆O₂

モル質量：146.14 g mol⁻¹

融点：71°C

沸点：301.71°C

水への溶解度：1.7 g/L

溶解度：エーテル、ジエチルエーテル、クロロフォルム、油、ピリジンに易溶

Log Pow：1.39

蒸気圧：1.3 hPa (106°C)

2. 摂取の状況

クマリンは桜餅や明日葉等に含まれるが、食品からの摂取は、主にシナモンを含む製品由来と考えられている。東京都健康安全センターの平成 19 年の調査（岩崎ら、2008）では、シナモンの摂取量はシナモンを振りかけたトーストで 0.4 g、コーヒーで 0.05 g、紅茶（チャイ）で 0.05 g、およびシナモンクッキーで 40 g と仮定すると、クマリンの総量として 2.45 mg が摂取されるとしている。一方、同調査ではシナモンが含まれるサプリメントが服用されると、クマリンとして 2.73 mg が摂取されるとしている。その場合には、クマリンの 1 日摂取量は 5.18 mg となる。

健康食品として市販されているメリロートエキス末は 5% のクマリンを含有し、1 日あたり 200 mg の服用を推奨しており、この場合のクマリンの摂取量は 10 mg に相当する。

一方、ノルウェーとドイツでは、食品に含まれるクマリンの摂取は 1.2 mg/kg/day で、体重 50 kg に換算すると 1 日あたり 60 mg となる（Fotland et al., 2012、Bundesinstitut für Risikobewertung, 2006）。

また、クマリンはリンパ浮腫の治療薬として日米を除く複数の国で許可され、使用されたが、複数の肝毒性の症例の発生により 1990 年代には承認が取り消され、現在治療薬として使用されている国はない。

3. ADME

3.1. 経口吸収

シナモンあるいはクマリンをカプセルあるいは食品（お茶、ライスプディング）に入れて成人に投与した際の、クマリンの吸収率は 54.7%~66.1%であった（Abraham et al., 2011）。

3.2. 分布

クマリンの 25 mg/kg をラットに経口投与した際の消化管、肝臓および腎臓の 96 時間後の残存は各々

0.055%、0.97%および0.013%であった (Lake et al., 2002)。ヒトにおいて、クマリンを経口摂取した際には組織への有意な蓄積はないと考えられている (EC, 1999、WHO, 2000)。

3.3. 代謝

クマリンの代謝は霊長類とそのほかの哺乳類で異なり、霊長類では初回通過効果が顕著にみられ、94%~98%が7-水酸化クマリンに代謝され (Ritschel et al., 1979; Ritschel et al., 1988)、尿中に排泄される (Ford et al., 2001; Shilling et al., 1969)。この7位水酸化の程度は種によりかなり異なり (Cohen, 1979; Hardt & Ritschel, 1983; Lake & Grasso, 1996; Ritschel & Hardt, 1983)、クマリンによる肝毒性の種差に関係すると考えられている (Abraham et al., 2010; Farinola & Piller, 2007; Lake, 1999)。

クマリンの7位水酸化は、CYP2A6によって行われ (Pelkonen et al., 2000)、肝臓に局在する (Ritschel et al., 1979)。健常人100人について、7位水酸化の効率を検討した結果、そのうちの4人ではそのほかに比較して効率が低いことが判明した (Rautio, 1992)。ヒトにおいてCYP2A6遺伝子の多型は7位水酸化の低下を引き起こすことが知られている (Rautio (1992))。アジア人では、この遺伝子の非野生型がおよそ20%でみられる (Oscarson et al., 1999)。

クマリンの7位水酸化以外の代謝経路は、霊長類以外の哺乳類と人において報告されている (Fernyhough et al., 1994; Vassallo et al., 2004; Hadidi et al., 1997)。その経路の中間体として、クマリン-3,4,-エポキシドと3-水酸化クマリンが想定される (Hadidi et al., 1997; Lake et al., 2002; WHO, 2000) が、それ以外の経路の可能性も考えられる。

CYP1A2とCYP2E1が3-水酸化クマリンの生成に関係すると考えられている (Born et al., 2000) が、マウスのCYP2E1を用いた *in vitro* の実験では、代謝物として *o*-hydroxyphenylacetaldehyde (*o*-HPA)が産生された (Zhuo et al., 1999)。クマリン-3,4,-エポキシドはグルタチオン抱合され、すみやかに尿中に排泄される。一方で、*o*-HPAは想定される肝毒性物質で、クマリンの肝毒性の別の要因と考えられるが、ラットでは特にその傾向が明らかであった (Felter et al., 2006)。

肝細胞を用いた *in vitro* の実験において、ヒトの肝細胞でのクマリンの7位水酸化の速度はラットに比べて約10倍速く、肝臓のミクロソームを用いた実験において、3位水酸化の最終産物である *o*-HPAAの生成速度はCYP1A2が多く含まれるヒト肝ミクロソームでは相対的に早いことが判明した (Murayama & Yamazaki, 2021)。すなわち、ヒトはラットに比べて解毒が早く、一方でヒトにおいて毒性発現には個体差がある可能性が示唆された。

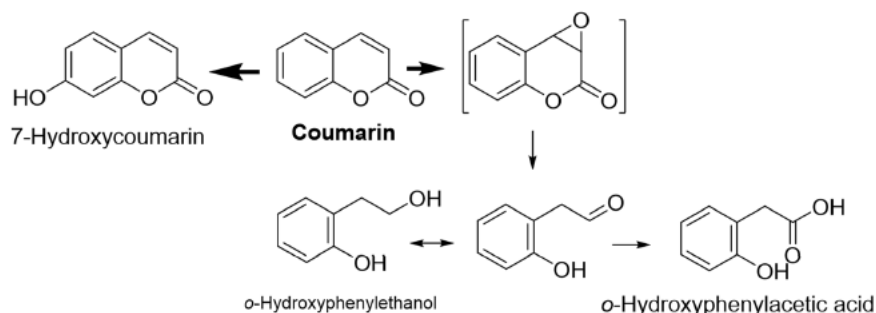


図1. クマリンの代謝 (Murayama & Yamazaki, 2021 より引用)

3.4. 排泄

ヒトおよび動物ともに、クマリン (代謝物) の排泄経路は尿で、ラットは例外的に尿への排泄量の

半分程度が糞へ排泄される (Lake, 1999)。ヒトにおいて、経口投与した際の胆汁中への排泄はほとんどない (WHO, 2000)。

ヒトにおいて、尿中排泄されたクマリンの 79%は 7-水酸化クマリンで、24 時間の排泄ではそのほかに一部には *o*-HPAA が検出された (Shilling et al., 1969)。ヒトで CYP2A6 が欠損する場合、クマリンを経口投与した際の尿では 50%が *o*-HPAA で、そのほかの代謝物は検出されなかった (Hadidi et al., 1997)。

4. 毒性

4.1. 単回投与

経口投与による LD₅₀ とする致死量は、C3H/HeJ 系マウスでは 420 mg/kg、DBA/2J 系マウスでは 780 mg/kg (Endell & Seidel, 1978) で、Wistar 系ラットでは 292~680 mg/kg の範囲にあった。ラットにおいて 125~150 mg/kg で、マウスにおいて 200 mg/kg で、クマリンの経口あるいは腹腔内投与により肝毒性が認められた (WHO, 2000) が、スナネズミでは 125~150 mg/kg の腹腔内投与では肝毒性はみられなかった (Fentem et al., 1992)。マウスにおいて、150 mg/kg を腹腔内投与した際の肺毒性が報告されている (Born et al., 1998)。

4.2. 反復投与毒性

マウス

クマリンの 0, 19, 38, 75, 150 および 300 mg/kg/day を、雌雄の B6C3F1 系マウス (各群雌雄各 10 匹) に 91 日間強制経口投与した。その結果、最高用量群の 2 匹の雄が投与 1 週に死亡し、投与過誤による死亡が雌の 2 匹に発生した (19 mg/kg/day と 75 mg/kg/day)。貧血が全投与群でみられ、肝重量が 150 mg/kg/day 以上で増加し、肝臓の小葉中心性肝細胞肥大が 300 mg/kg/day でみられた (NTP, 1993)。

クマリンの 0, 300, 1000 および 3000 ppm を含有する餌 (45, 150 および 450 mg/kg/day に相当する) を、雌雄の CD-1 系マウス (各群雌雄各 52 匹) に 100 週間 (雄) あるいは 108 週間 (雌) 与えた。その結果、中間および高用量群において投与期間前半で体重増加の減少がみられたが、腫瘍の発生頻度やタイプへの投与による影響あるいは病理組織学的な変化は認められなかった。無毒性量 (NOAEL) は 150 mg/kg/day と判断された (RIFM, 1983)。

クマリンの 0, 50, 100 および 200 mg/kg/day を、雌雄の B6C3F1 系マウス (各群雌雄各 70 匹) に 103 週間に渡って週末を除く毎日強制経口投与した。その結果、生存率に投与の影響はみられなかった。高用量群では試験全般で平均体重が対照群に比較して低く、貧血がみられた。また、病理組織学的検査において肝障害が中間用量の雄と高用量の雌雄で、肝細胞がんが低中間用量の雌で、肺胞および気管支腺がんと肺腫瘍が高用量で、前胃の乳頭腫が低用量で認められた (NTP, 1993)。

ラット

クマリンの 0, 19, 38, 75, 150 および 300 mg/kg/day を、雌雄の F344 系ラット (各群雌雄各 10 匹) に 91 日間強制経口投与した。その結果、最高用量群の雄 1 匹と雌 3 匹が投与 1 週に死亡し、さらに投与 8 週あるいは 9 週に合計 2 匹の雄が死亡した。平均体重は雄では 150 および 300 mg/kg/day で対照群の 92% および 83% で低かったが、雌では全般に高かった (19, 38, および 150 mg/kg では 107%, 106% および 107%)。小葉中心性の肝障害と腎障害が 150 および 300 mg/kg/day で増加し、赤血球への影響が 75 mg/kg/day 以上でみられた (NTP, 1993)。

クマリンの 0, 25, 50 および 100 mg/kg/day を、雌雄の F344 系ラット (各群雌雄各 60 匹) に 103 週間

に渡って週末を除く毎日強制経口投与した。その結果、50 mg/kg/day の雄では生存率がほぼゼロに近かったが、ほかの群では投与による影響はなかった。最終の体重は雌の高用量と雄の全用量で対照群に比較して低かった。肝酵素の増加が雌雄の高用量と雄の中間用量でみられ、肝臓の病理組織学的変化が中間用量と高用量の雌雄の全例に認められた。腎機能低下を示唆する臨床検査と病理組織学的変化が全投与群で認められ、前胃の潰瘍が雌の高用量と雄の全用量で認められた (NTP, 1993)。

クマリンの 0, 333, 1000, 2000, 3000 および 5000 ppm を含有する餌 (雄では 13, 42, 87, 130 および 234 mg/kg/day、雌では 16, 50, 107, 156 および 283 mg/kg/day に相当する) を、雌雄の SD 系ラットに 104~110 週間与えた。その結果、最高用量では剖検時に肝臓に腫瘍がみられた。肝重量の増加は、雄では 3000 ppm 以上で、雌では 1000 ppm 以上でみられた。病理組織学的には、肝胆管がんと肝実質の胆管線維症の頻度の増加が最高用量で認められ、肝胆管がんが雄の 3000 ppm でもみられた。NOAEL は 1000 ppm (50 mg/kg/day) と判断された (RIFM, 1984)。

クマリンの 0, 30, 75 および 150 ppm を含有する餌を、雌雄の Osbourne-Mendel ラット (各群雌雄各々 5~7 匹) に 2 年間与えた。その結果、75 ppm では肝臓の軽度な障害が病理組織学的検査で認められ、150 ppm では発育遅延、ヘモグロビン量の減少および肝胆管線維症を含む顕著な肝障害が認められた。NOAEL は 30 ppm と判断された (Hagan et al., 1967)。

ハムスター

クマリンの 0, 0.1% および 0.5% を含有する餌を、雌雄のゴールデンハムスター (各群雌雄各々 10~12 匹) に 24 カ月間与えた。その結果、投与群では 1 カ月目から 5 カ月目まで 20% の摂餌の減少がみられたが、発育の遅延はなかった。0.1% では生存率が低く、0.5% の雄では腫瘍の発生頻度が高かった。しかし、肝胆管に線維症やがん腫はみられなかった (Ueno & Hirono, 1981)。

イヌ

クマリンの 10, 25, 50 および 100 mg/kg/day をカプセルに詰め、雌雄のイヌ (各群雌雄各 1~2 匹) に週 6 日投与で最長 350 日間投与した。その結果、100 mg/kg/day では雄は投与 9 日目に切迫屠殺し、雄は投与 16 日に死亡が確認された。これらの動物では、肝臓の病理組織学的変化が顕著にみられ、脾臓は退色し、消化管の内容物が滞留および変色し、胆のうは顕著に膨張し、骨髄は減少し黄色化していた。50 mg/kg/day では削瘦と軽度から中等度の黄疸がみられ、投与 35 日から 277 日に全例死亡あるいは切迫屠殺した。肝臓の病理組織学的変化は顕著で、脾臓は肥大しヘモジデリン沈着がみられ、骨髄は退色していた。25 mg/kg/day では、1 匹の雌で削瘦と軽度の黄疸がみられた。そのほかの動物でも肝臓に病理組織学的な変化がみられ、脾臓のヘモジデリン沈着と胆のうの中等度の膨張がみられた。10 mg/kg/day では変化はなく、NOAEL と判断された (Hagan et al., 1967)。

ヒヒ

クマリンの 0, 2.5, 7.5, 22.5 および 67.5 mg/kg/day を、雄のヒヒ (各群 4~8 匹) に 24 カ月間混餌投与した。その結果、いずれの投与群でも体重への影響はなかった。高用量では肝重量が増加し、肝細胞の小胞体の肥大がみられた。NOAEL は 22.5 mg/kg/day と判断された (Evans et al., 1979)。

4.3. 遺伝毒性

クマリンについて、NTP が実施した一連の遺伝毒性試験 (NTP, 1993)、不定期 DNA 合成 (Edwards et al., 2000) および *in vivo* 小核試験 (Api, 2001) において、陰性であった。これらの結果から、クマリ

ンは肝臓や腎臓の DNA と共有結合しないと判断された (EFSA, 2004)。

4.4. がん原性

動物モデルにおいて、クマリンの 100 mg/kg/day よりも高い用量で、がん腫が検出された (Edwards et al., 2000) が、遺伝毒性試験の結果はいずれも陰性である (EC, 1999; EFSA, 2004) ことから、毒性変化に引き続いて起こった二次的な変化で、がん原性を示唆するものではないと考えられた。

4.5. 生殖発生毒性

クマリンを餌に混合して投与あるいは混合物で投与した試験が、マウス (Roll & Bar, 1967)、ラット、ウサギおよびミニブタ (Grote et al., 1977)、あるいはラット (Preuss-Ueberschar et al., 1984) において実施され、生殖発生への影響が報告されている。しかし、これらの試験の情報は十分ではなく、クマリンの生殖発生に関する知見は限定され、不十分であると判断された (WHO, 2000; NTP, 1993)。

4.6. TDI

これらの毒性試験の結果に基づいて、イヌの反復投与毒性の NOAEL (10 mg/kg/day) が最も低いことから、TDI は 0.1 mg/kg/day とされた (EFSA, 2004)。

4.7. ヒトにおける毒性

クマリンを治療薬として投与した (投与量は 25 mg 以上) 際の肝毒性については多くの報告がある (Andréjak et al., 1998; Anon., 1997; Bassett & Dahlstrom, 1995; Beinssen, 1994; Casley-Smith & Casley-Smith, 1995; Loprinzi et al., 1997; Morrison & Welsby, 1995)。肝毒性とクマリンの用量との相関性は不明であるが (EFSA, 2008)、ある研究では肝毒性の発生率は 0.37% と報告されている (Cox et al., 1989)。

2006 年に 23 歳の女性が肝炎で入院した例では、1~2 g のシナモン (クマリンとして 3.3~6.6 mg) を毎日摂取するようになってから 2 カ月後に発症した (Abraham et al., 2010)。

5. リスク評価

イヌの慢性毒性試験における NOAEL である 10 mg/kg/day に基づいて、種差と個体差を考慮した不確実係数である 100 で序し、体重 50 kg で換算すると、ADI は 5 mg と考えられる。しかし、治療薬として投与された場合は ADI を上回るものの ADI の 10 倍以下で副作用として肝障害が発生している。一方、ADI に近い量が実際に食品として摂取され、そのなかでは肝障害の報告があるが、摂取量との関係は不明である。

6. PBPK モデル

消化管、肝臓および中央コンポーネントからなる PBPK モデルについて、ラットにクマリンを 200 mg/kg の用量で経口投与した際の血中濃度にもとづいて、クマリンのヒトモデルを作成した (Miura et al., 2020)。ヒトの体重 (70 kg) と肝容積 (1.5 L) にもとづいたスケールアップを行い、入力パラメータの詳細を図 2 に示す。連立微分方程式により、中央コンポーネントにおける基質であるクマリンと 2 種類の代謝物である *o*-ヒドロキシフェニル酢酸および 7-水酸化クマリンの濃度を求めた。

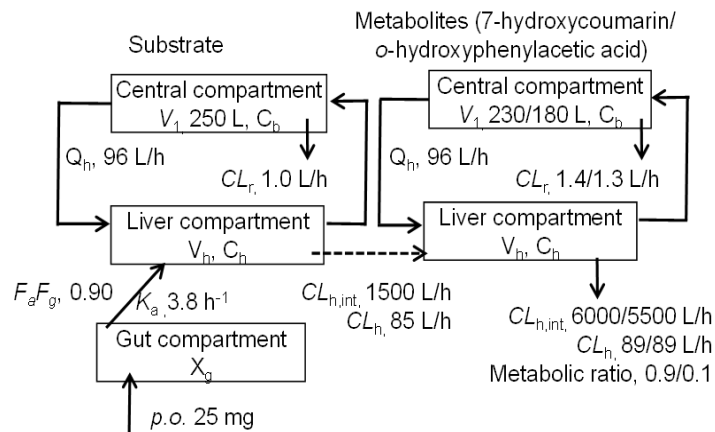


図 2. クマリン PBPK モデル

Input parameters for human coumarin PBPK model with two metabolites (7-hydroxycoumarin and o-hydroxyphenylacetic acid) were calculated previously (Miura et al, 2020). Values for fraction absorbed \times intestinal availability ($F_a F_g$), absorption rate constant (k_a), volume of the systemic circulation (V_1), hepatic intrinsic clearance ($CL_{h,int}$), hepatic clearance (CL_h), and renal clearance (CL_r) values for human PBPK models are shown, where X_g represents the amount of compound in the gut compartment, V_h represents liver volume, C_h represents hepatic substrate concentration, and C_b represents blood substrate concentration.

ヒトにクマリンを 25 mg/kg の用量で仮想投与した際の、o-ヒドロキシフェニル酢酸および 7-水酸化クマリンの血漿中濃度を推定し、その推移を図 3 (A) に示した。投与後、投与されたクマリンの大部分は 7-水酸化クマリンに代謝され、o-ヒドロキシフェニル酢酸の生成は少量であった。本モデルにおいて、クマリンの 25 mg/kg を 28 日間反復仮想投与した際の血漿中濃度推移を図 3 (B) に示した。このときのクマリンの平均および最高血漿中濃度は各々 0.41 および 2.8 ng/mL (2.7 および 19 nM) であった。なお、本モデルでの *in silico* の濃度推移は、2-コンポーネントモデルを用いて推定したクマリンのヒトにおける濃度推移 (Ritschel et al., 1977) と一致するものであった。

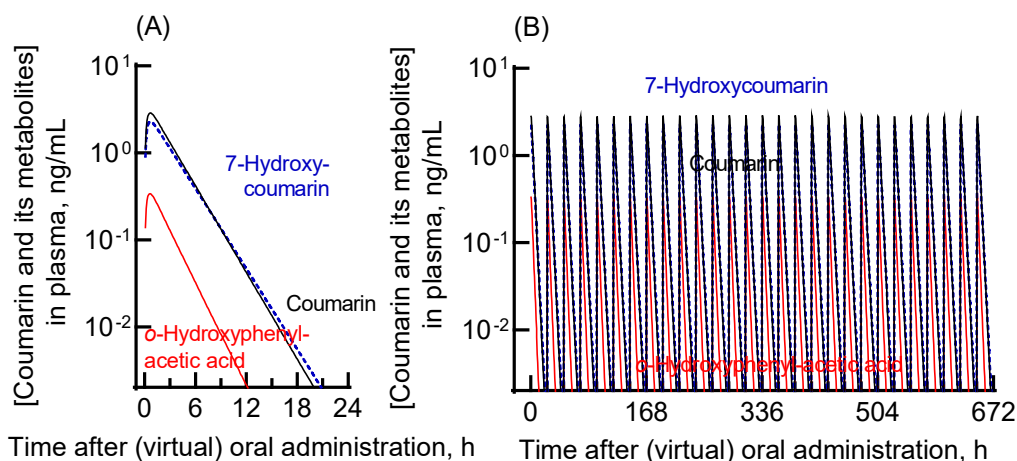


図 3. ヒト PBPK モデルにおけるクマリンとその代謝物の血漿中濃度推移

Transition of the plasma concentrations of coumarin (black), o-hydroxyphenylacetic acid (red), and 7-hydroxycoumarin (blue) after virtual administration of 25 mg of coumarin via the oral route as a single dose (A) or daily doses for 28 days (B) are shown.

7. QSAR モデルでの評価

DerekNexus (v.6.1.0) と VEGA (version 1.0.0) の肝毒性モデルでは、いずれも肝毒性に関連する構造アラートは提示されなかった。肝毒性との関連があると考えられる epoxide 中間代謝物構造についても同様であった。

FDA の薬物性肝障害 (DILI) score モデルは、数多くの薬剤における臨床での薬物誘発性肝障害 (DILI) 症例と、一日摂取量、疎水性、反応性代謝物の生成などの情報を統合した QSAR モデルである (Chen et al, 2016)。非臨床の毒性試験からは予測できなかった発症頻度が極めて低い臨床での DILI の発生により、市場からの撤退や臨床試験の中止が相次いだこと、さらに DILI は非可逆的な劇症肝炎に発展し臨床試験の安全性を確保できないことから、FDA の非臨床・臨床担当者が臨床試験プロトコルをレビューする際に、これらの肝毒性を予測することを目的に、米国 FDA National Center for Toxicological Research (NCTR) において開発された。医薬品においては多くの類似構造を持つ化合物が開発されるが、極めて類似した構造を持った化合物間での肝毒性発現の顕著な違いが経験されており、それらを識別することが可能とされている。これらには、tolcapone と entacapone のペアや、alpidem と zolpidem のペアなどが含まれる。

本モデルに食品関連物質を適用した事例はないため、クマリンがモデルの適用範囲内にあるかを先に検討した。最も重要な記述子である logP については、クマリンの logP (計算値) は 1.39 で、医薬品データセットの logP 計算値 (-4~8) の範囲内であった (図 4)。また、化学インベントリーおよびデータベース内の化学空間を記述するための方法のひとつとしてしばしば用いられている chemotype については、benzopyron 構造を含むクマリンの chemotype はいずれも DILI score モデルのデータセットに認められた (図 5、表 1)。OECD QSAR Toolbox を用いた種々の化学構造プロファイリングにおいても、同様の結果であった。以上の検討により、クマリンは本モデルの適用範囲内にあると考えられた。

クマリンを本モデルに適用すると、摂取量が 2.5 および 25 mg/person/day の場合は DILI score は 3.71 および 5.11 で、いずれも moderate risk (3~6) と判定され、摂取量を 0.25 mg/person/day とすると、DILI score は 2.31 で low risk (3 未満) と判定された (表 2)。いずれも、代謝データを参考にエポキシド体の生成から反応性代謝物の生成ありとした場合の結果である。クマリン系の薬剤は医薬品にい

くつか含まれる。そのひとつである warfarin は、抗凝固剤として広く使われ、多くの患者に長期間に渡って投与されてきたが、肝障害との関連はあまりない。一方、同様にクマリン系の薬剤である methoxsalen は、臨床試験において投与された患者の 2%~12%に肝酵素の上昇がみられたとの報告がある (LiverTox Database)。これらについて本モデルに適用した場合には、warfarin は、10 mg/day 投与で low risk (DILI score=1.95) である一方、methoxsalen は 3 mg/day で middle risk (DILI score=5.51) と判定された (表 3)。なお、methoxsalen はクマリンと同様にエポキシド体を生成することから、反応代謝物の生成ありとした。

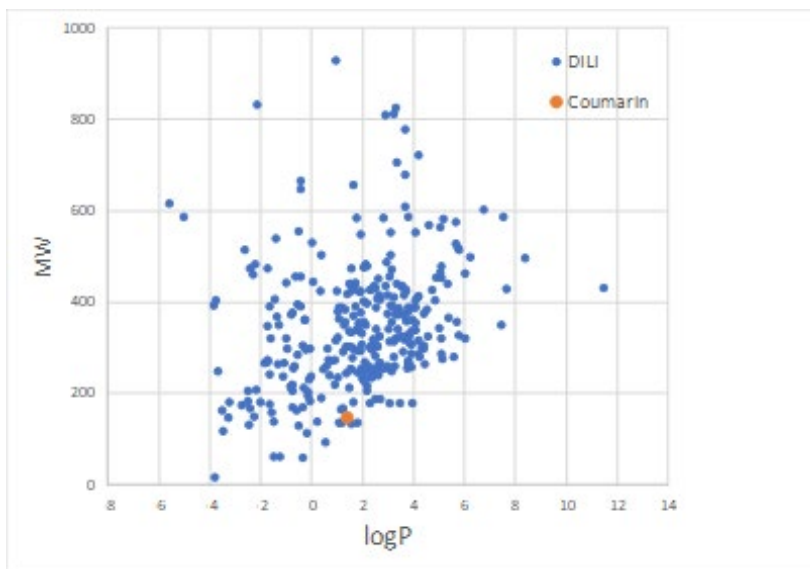


図 4. DILI score モデルの構築に使われた医薬品とクマリンの logP 推計値と分子量の分布

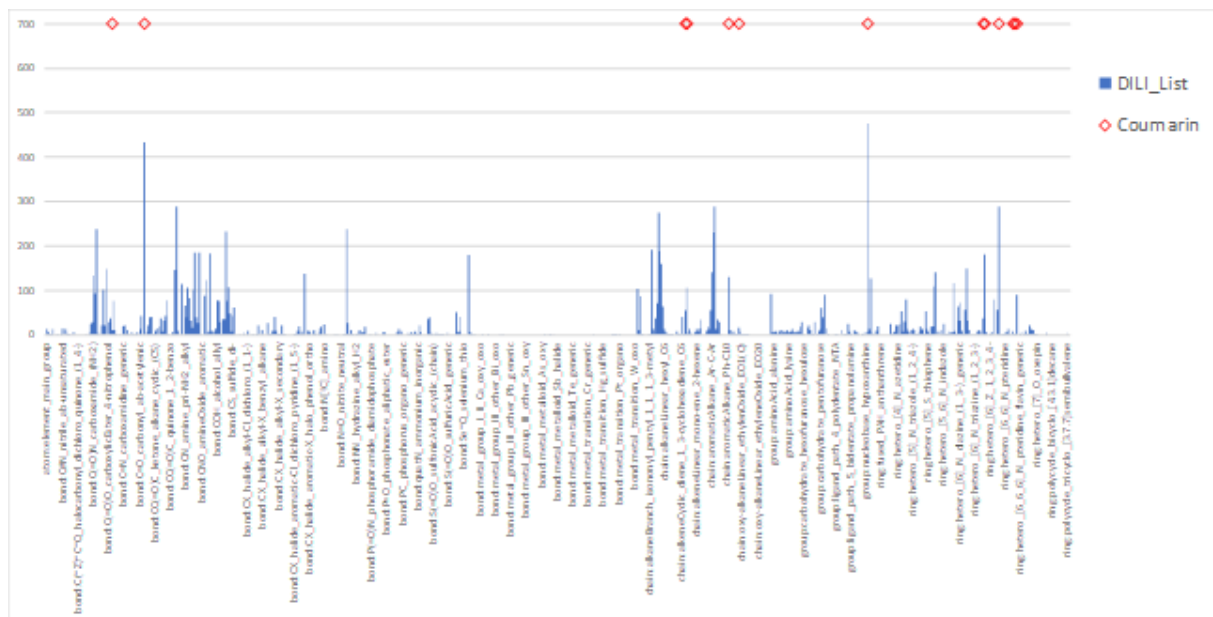


図 5. DILI score モデル構築に使われた医薬品とクマリンの Chemotype

表 1. クマリンと DILI score モデル医薬品データセットの Chemotype の比較

Chemotype	Coumarin	No. of chemotype in DILI set
bond:C(=O)O carboxylicEster alkenyl	+	10
bond:C=O carbonyl generic	+	433
chain:alkeneCyclic ethene C (connect noZ)	+	54
chain:alkeneCyclic ethene generic	+	105
chain:aromaticAlkane Ph-C1 cyclic	+	131
chain:aromaticAlkene Ph-C2 cyclic	+	16
ring:aromatic benzene	+	475
ring:hetero [6] O pyran generic	+	37
ring:hetero [6] Z 1-	+	181
ring:hetero [6] Z generic	+	289
ring:hetero [6 6] O benzopyran	+	8
ring:hetero [6 6] O benzopyrone (1 2-)	+	2
ring:hetero [6 6] Z generic	+	89

表 2. クマリンの DILI score

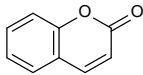
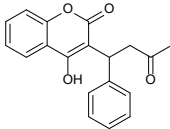
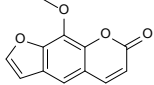
	Coumarin		
Daily Dose (mg/person/day)	25	2.5	0.25
Lipophilicity (logP)	1.39	1.39	1.39
Reactive metabolite formation*	1	1	1
DILI score calculation ^{a)}	5.11	3.71	2.31
DILI risk ^{b)}	moderate	moderate	low

*Reactive metabolite formation = 1 if Yes or 0 if No

^{a)}DILI score = $0.608 \times \log_e(\text{daily dose/mg}) + 0.227 \times \log P + 2.833^*$

^{b)}DILI score: > 6, high risk; 3-6, moderate risk; < 3, low risk

表 3. クマリンおよび関連医薬品の DILI score モデルへの適用

Chemicals	Dose (mg/day)	logP	RM formation	DILI score	DILI risk	Remarks
Coumarin 	2.5	1.39	Yes (1)	3.71	M	Daily dose as food with very occasional elevated liver enzymes.
	25			5.11	M	Daily dose as medicine for lymphedema and occasionally taken as food with occasional elevated liver enzymes.
Warfarin 	2	2.44	No (0)	0.98	L	Daily dose as medicine (anticoagulant) with rare hepatotoxicity cases.
	10			1.95	L	
Methoxsalen 	3	1.93	Yes (1)	3.92	M	Daily dose as medicine for psoriasis with occasional elevated liver enzymes (2%–12% of patients).
	40			5.51	M	

DILI score based on daily dose, lipophilicity (logP), and presence (1) or absence (0) of reactive metabolite (RM) formation was calculated following the formula: $\text{DILI score} = 0.608 \times \log_e(\text{daily dose by mg}) + 0.227 \times \log P + 2.833 \times 1/0$. DILI risk was classified according to DILI score as low (L, <3), moderate (M, 3–6), and high (H, >6).

8. 考察および結論

クマリンの食物からの摂取のほとんどはシナモンからで、一般的な日本人で1日あたり2.5 mg弱と推定される(岩崎ら、2008)。しかし、シナモンは嗜好性により摂取量は大きく異なる(欧州では1日あたり50 mgを超える国もある)。また、シナモンがサプリメントとして摂取されたり、健康食品としてメリロートエキスが摂取される場合には、それだけで1日あたり3~10 mgのクマリンが摂取されることになる。

クマリンのヒトでの毒性は、肝毒性の報告が多い。食品として摂取された場合には、摂取量の算出がほとんど困難であるが、クマリンは一時期医薬品として使用され、副作用として肝障害が報告されている。医薬品としての用量は1日あたり25 mg以上で、食品から摂取される場合よりも全般に多いが、その発生頻度は0.3%程度と推定されている。すなわち、食品からの摂取よりも全般に高い用量で、さらに一定量が投与された際の肝毒性の発生頻度においても、その程度低い。したがって、クマリンの食品摂取による肝毒性の発生頻度はさらに低いことが予想され、肝毒性の発現と摂取量の関係についての知見はない。

クマリンのADMEの特徴は、経口から摂取されるとその半分以上が消化管で吸収され、主に肝臓で代謝され尿中に排泄され、蓄積性は認められない。肝臓においてクマリンは3位と7位に代謝反応が起こるが、これらには種差および個体差が想定されている。一方で、3位の代謝によりエポキシドおよび毒性物質と考えられていた*o*-HPAが生成され、これらと肝障害には関連があると考えられた。新たな実験により、ヒトの肝細胞における7位水酸化はラットの肝細胞に比べて約10倍速く、3位代謝の最終産物である*o*-HPAAの生成速度はCYP1A2が多く含まれるヒト肝ミクロソームでは相対的に早いことが判明した(Murayama & Yamazaki, 2021)。すなわち、ヒトはラットに比べて解毒が早く、一方でヒトにおいて毒性発現の個体差の可能性が示唆された。CYP1A2は誘導されやすく喫煙等との関連があり(Zevine & Bonewitz, 1999)、一方で7位水酸化に関係するCYP2A6については遺伝多型が知られており(Firinola & Piller, 2007)、これらがクマリンの代謝の個体差に関係すると考えられる。

毒性試験では、単回投与による毒性変化は高用量が投与された際に発生したもので、クマリンが食品として摂取される際との関連はほとんどないと考えられる。反復投与毒性試験において、クマリンの蓄積によると考えられる毒性変化は認められなかった。標的臓器は肝臓であるが、障害性の変化はイヌが最も感受性が高く25 mg/kg/dayの投与でみられた(Hagan et al., 1967)。ラットやマウスでは50 mg/kg/day以上でみられているが、肝臓における障害性の変化は全般に弱く(ラットでは150 mg/kg以上で小葉中心性の肝細胞壊死がみられている)、ヒトでは最高用量の67.5 mg/kg/dayでも障害性の変化は認められなかった(Evans et al., 1979)。貧血や脾臓あるいは骨髄の変化は全身状態の悪化に伴う二次的なものと考えられる。クマリンの遺伝毒性試験はいずれも陰性であり、DNAとの反応性はないと考えられた。マウスおよびラットにおいて2年間の長期間投与による肝臓の腫瘍発生は、肝障害による細胞の再生が持続して起こった結果あるいは薬物代謝酵素誘導が関与することから、ヒトにおける腫瘍発生との関連はないと考えられた。

イヌの慢性毒性試験のNOAELである10 mg/kg/dayに基づき、種差と個体差を考慮した不確実係数(UF)である100から、体重50 kgで換算するとADIは5 mgと考えられた。しかし、治療薬として投与された場合はADIを上回り、その10倍以下で副作用として肝障害が発生している。イヌの慢性毒性でみられた肝毒性は胆汁うっ滞による二次的な障害性変化であり、ヒトでみられるものは肝細胞を直接障害した結果起こった肝毒性と考えられ、その発生機序が異なる。したがって、イヌにおける肝臓の変化に基づいてADIが設定されたものの、ヒトにおける肝毒性を直接予測するものではなさそうで

ある。また、霊長類（ヒヒ）では、肝臓に障害性の変化はみられなかった。ラットでは、91 日間の投与により致死量（300 mg/kg/day）とその半分の用量（150 mg/kg/day）の群において、さらに2年間のがん原試験では雄の最低用量（25 mg/kg/day）から肝臓に障害性の変化がみられた。したがって、いずれの動物種においても肝臓がクマリンの標的臓器であることは確かである。

本研究の一環として個別研究で行われた実験から、クマリンの解毒過程である 7-水酸化能はヒトにおいてラットよりも 10 倍以上高いことが判明し（Miura, 2020）、ヒトはクマリンの毒性の影響を受け難いと考えられる。実際、ADIやTDIの用量以上でクマリンが投与された場合にも、肝毒性が発現したという事例はほとんどない。さらに、ヒヒにおいては 67.5 mg/kg/day を2年間投与した際にも肝臓に変化は認められなかったことから、ヒトおよび霊長類においてはクマリンの毒性はラットに比較して強くないようである。一方で、この解毒反応に関係する代謝酵素は CYP2A6 で、その遺伝多型が知られている。特にアジア人では多く（Firinola & Piller, 2007）、20%において非野生型がみられるとの報告がある（Oscarson et al., 1999）。一方、クマリンの毒性発現に関係する o-ヒドロキシフェニル酢酸の生成には CYP1A2 や CYP2E1 が関与し、この代謝酵素の発現量には喫煙や飲酒などの様々な環境要因が関与することが知られている（Zevine & Bonewitz, 1999; Kessova & Cederbaum, 2005）。すなわち、クマリンの毒性発現に関して影響すると考えられる個体差や環境要因については、さらに精査する必要があると考える。

一方で、ヒトにおいて上記の個体差や環境要因によるクマリン毒性への感受性の差についての報告はない。また、薬物代謝酵素活性があるヒト肝細胞由来細胞株である HepaRG 細胞を用いた *in vitro* 毒性試験において、クマリンが影響する濃度はかなり高いことが報告されている（Baltazar et al., 2020）。この実験において、クマリンがヒト肝細胞の膜透過性、ATP 含量、グルタチオン含量あるいはミトコンドリアの大きさに影響する最小濃度は 55、135、776 あるいは 831 μM で（Baltazar et al., 2020）、ラット肝細胞を障害する濃度（ $>200 \mu\text{M}$ ）（Tanaka et al., 2017）と比較すると、その差は明らかではなかった。本研究において、クマリンの PBPK モデルを使用して、ヒトでのクマリンの血中濃度を推定した。この結果、2.5 あるいは 25 mg/day を投与した際のクマリンの最高血漿中濃度は 1.9 あるいは 19 nM で（図 3）、肝細胞に影響する濃度と比較すると明らかに低かった。したがって、個体差や環境要因がクマリンの毒性発現に及ぼす影響は、これらの結果からは説明することはできなかった。なお、PBPK モデルにおけるクマリン、o-ヒドロキシフェニル酢酸および 7-水酸化クマリンの肝/血漿比は各々 0.875、0.504 および 0.876 で（Miura et al., 2020）、これらの *in vitro* 実験における濃度は血漿中濃度や肝中濃度と比較が可能であった。

ヒトの代謝においては解毒系の 7-水酸化クマリンが主体で、すみやかに尿中排泄されるのに対し、ラットでは胆汁排泄が主であるために毒性発現が起りやすいと考えられる。ラットでは、血中濃度において毒性経路である 3,4 位エポキシ化を経由して生成される o-ヒドロキシフェニル酢酸が、未変化体の半分程度まで増加することが報告されているが（Miura et al., 2020）、ヒトでの o-ヒドロキシフェニル酢酸の濃度はわずかに増加するだけである（Miura et al., 2020）。しかしながら、ヒトにおいては CYP2A6 の多型が存在し、遺伝的要因により o-ヒドロキシフェニル酢酸の生成量が増加する可能性が想定されることから、ヒトの安全性を担保するためにラットの毒性試験結果を外挿することは、不確実性を考慮すると適切と考えられる。本研究の一環として実施した *in vitro* の実験において、個別あるいはプールしたヒト肝ミクロソームのクマリンの o-ヒドロキシフェニル酢酸の生成量を測定では 9.5~200 倍の違いがみられ、さらにプールした肝ミクロソームを用いて CYP1A2 および CYP2E1 の阻害剤を入れた場合には、130 倍の違いが各々 31 倍および 730 倍に変化した（Murayama & Yamazaki, 2021）。これらの結果からヒトにおけるクマリンの代謝能の個体差は 70 倍程度と推定された（Murayama & Yamazaki,

2021)。クマリンの肝毒性における以上のような種差やヒトの個体差を考慮しても、現在使用されている不確実係数である 100 は、総合すると安全を担保できていると思われる。一方で、喫煙などの環境要因については従来考慮されて来なかったため、それらについての検討は今後必要と考えられる。

QSAR モデルとしては、Derek Nexus (v.6.1.0) と VEGA (version 1.0.0) の肝毒性モデルを適用し、主要な標的である肝臓について化学構造からヒト肝毒性予測を行ったが、いずれのモデルも肝毒性に関連する構造アラートは提示されなかった。肝毒性との関連があると考えられる epoxide 中間代謝物構造を入力しても同様に、データセットにクマリンに類似する構造を持つ物質がなかったことが理由であると考えられる。(Q)SAR モデルの予測結果の評価にあたっては、モデルの構築に用いられたデータセットのケミカルスペースの評価が重要である。

一方、医薬品の肝毒性予測モデルである FDA DILI score モデル (Chen et al, 2016) を用いて検討した結果、クマリンのヒトでの肝毒性予測に有用であることが確認された。FDA は製造承認された薬剤およびその後市場撤退した薬剤についての安全性データを収集し、一日用量、疎水性、反応性代謝物の生成などの情報に基づいて臨床での肝障害性を予測する本 QSAR モデルを構築した。このモデルにおいては食品あるいは食品成分については考慮されていないため、予測可能性は不明であった。しかし、医薬品は天然物の化学構造を修飾することより創成されたものも多いため、適用可能性は十分あると考えられた。医薬品の肝毒性においては化学構造が類似した物質において異なる結果となる場合も多くみられるため、これらを判別できることが重要と考えられている。クマリンがこのモデルに適用可能であるかについて、モデルの構築に用いられた 354 種類の薬剤とクマリンの logP、分子量およびケモタイプ比較を行い、クマリンは 354 薬剤の範囲に入ることを確認した。クマリンを本 QSAR モデルに適用した結果、1 日用量が 2.5 mg では moderate risk と判定された。さらに、構造が類似したワルファリンは low risk で、methoxsalen は moderate risk と判定され、クマリンおよびこれらの薬剤によるヒトでの肝毒性と一致する予測結果であった (表 3)。これらは、食品あるいは食品成分の本 QSAR モデルへの適用可能性を示唆するものであった。また、本モデルにおいては反応代謝物の生成が重要なファクターであることから、代謝についての知見は食品成分の肝毒性を評価するうえで必須のものと考えられる。

以上、クマリンをモデルとした本研究において、クマリンの体内動態および毒性をはじめとするデータをレビューし、ヒトにおける曝露量と肝障害性を予測する *in silico* モデルである PBPK モデルと FDA DILI モデルを用いて、クマリンの肝毒性を評価することができた。さらに、これらの検討および同時に行った代謝についての研究からは、クマリンの肝毒性についての機序とヒトにおける個体差や個体差に影響する要因についての知見を得ることができた。すなわち、これらの新しいアプローチ手法は食品や食品成分の毒性リスクの評価に応用でき、毒性の予測と評価の精緻化に役立つと考えられる。

9. 参考文献

- 岩崎 由美子, 田端 節子, 飯田 憲司, 伊藤 弘一, 佐々木 英子, 根岸 潤, 井部 明広 (2008) . シナモン含有食品のクマリン分析法および実態調査. 東京都健康安全研究センター研究年報 第 59 号, 143-148.
- Abraham, K., Wöhrlin, F., Lindtner, O., Heinemeyer, G., Lampen, A. (2010). Toxicology and risk assessment of coumarin: Focus on human data. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54(2), 228-239. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900281>

- Abraham, K., Pfister, M., Wöhrlin, F., Lampen, A. (2011). Relative bioavailability of coumarin from cinnamon and cinnamon-containing foods compared to isolated coumarin: a four-way crossover study in human volunteers. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55(4), 644-653. <https://doi:10.1002/mnfr.201000394>
- Andréjak, M., Gersberg, M., Sgro, C., Decocq, G., Hamel, J. D., Morin, M., Gras, V. (1998). French pharmacovigilance survey evaluating the hepatic toxicity of coumarin. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 7(S1), S45-S50. [https://doi:10.1002/\(SICI\)1099-1557\(199808\)7:1+<S45::AID-PDS353>3.0.CO;2-1](https://doi:10.1002/(SICI)1099-1557(199808)7:1+<S45::AID-PDS353>3.0.CO;2-1)
- Anon. (1997). Hepatitis due to coumarin. *Prescrire International*, 6(31), 145.
- Api, A. M. (2001). Lack of effect of coumarin on the formation of micronuclei in an *in vivo* mouse micronucleus assay. *Food and Chemical Toxicology*, 39(8), 837-841. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(01\)00024-2](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(01)00024-2)
- Baltazar, M.T., Cable, S., Carmichael, P.L., Cubberley, R., Cull, T., Delagrange, M., Dent, M.P., Hatherell, S., Houghton, J., Kukic, P., Li, H., Lee, M., Malcomber, S., Middleton, A.M., Moxon, T.E., Nathanail, A.V., Nicol, B., Pendlington, R., Reynolds, G., Reynolds, J., White, A., Westmoreland, C. (2020). A next-generation risk assessment case study for coumarin in cosmetic products. *Toxicol. Sci.* 176, 236-252.
- Bassett, M. L., and Dahlstrom, J. E. (1995). Liver failure while taking coumarin. *The Medical journal of Australia*, 163(2), 106.
- Beinssen, A. P. (1994). Possible coumarin hepatotoxicity. *The Medical journal of Australia*, 161(11-12), 725.
- Born, S. L., Fix, A. S., Caudill, D., Lehman-McKeeman, L. D. (1998). Selective clara cell injury in mouse lung following acute administration of coumarin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 151(1), 45-56. <https://doi.org/10.1006/taap.1998.8442>
- Born, S. L., Caudill, D., Smith, B. J., Lehman-McKeeman, L. D. (2000). *In vitro* kinetics of coumarin 3,4-epoxidation: application to species differences in toxicity and carcinogenicity. *Toxicological Sciences*, 58(1), 23-31. <https://doi:10.1093/toxsci/58.1.23>
- Bundesinstitut für Risikobewertung. (2006). Consumers who eat a lot of cinnamon currently have an overly high exposure to coumarin. *Health Assessment*, 044(2006).
- Casley-Smith, J. R., Casley-Smith, J. R. (1995). Frequency of coumarin hepatotoxicity. *The Medical journal of Australia*, 162(7), 391.
- Chen M, Borlak J, Tong W. (2016). A model to predict severity of drug-induced liver injury in humans. *Hepatol.* 64, 931-940.
- Cohen, A. J. (1979). Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man. *Food and Cosmetics Toxicology*, 17(3), 277-289. [https://doi.org/10.1016/0015-6264\(79\)90289-X](https://doi.org/10.1016/0015-6264(79)90289-X)
- Cox, D., O'Kennedy, R., Thornes, R. D. (1989). The rarity of liver toxicity in patients treated with coumarin (1,2-benzopyrone). *Human Toxicology*, 8(6), 501-506. <https://doi:10.1177/096032718900800612>
- Edwards, A. J., Price, R. J., Renwick, A. B., Lake, B. G. (2000). Lack of effect of coumarin on unscheduled DNA synthesis in the *in vivo* rat hepatocyte DNA repair assay. *Food and Chemical Toxicology*, 38(5), 403-409. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00016-8](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00016-8)
- Endell, W., Seidel, G. (1978). Coumarin toxicity in different strains of mice. *Agents and Actions*, 8(3), 299-302. doi:10.1007/bf01966619
- European Commission. (1999). Opinion on coumarin. Brussels, Belgium Retrieved from https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scf_out40_en.pdf
- European Food Safety Authority. (2004). Opinion on a request from the commission related to Coumarin.

- European Food Safety Authority. (2008). Coumarin in flavourings and other food ingredients with flavouring properties.
- Evans, J. G., Gaunt, I. F., Lake, B. G. (1979). Two-year toxicity study on coumarin in the baboon. *Food and Cosmetics Toxicology*, 17(3), 187-193. [https://doi.org/10.1016/0015-6264\(79\)90280-3](https://doi.org/10.1016/0015-6264(79)90280-3)
- Farinola, N., Piller, N. B. (2007). CYP2A6 polymorphisms: is there a role for pharmacogenomics in preventing coumarin-induced hepatotoxicity in lymphedema patients? *Pharmacogenomics*, 8(2), 151-158. doi:10.2217/14622416.8.2.151
- Felter, S. P., Vassallo, J. D., Carlton, B. D., Daston, G. P. (2006). A safety assessment of coumarin taking into account species-specificity of toxicokinetics. *Food and Chemical Toxicology*, 44(4), 462-475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.08.019>
- Fentem, J. H., Fry, J. R., Thomas, N. W. (1992). Species differences in the hepatotoxicity of coumarin: a comparison of rat and Mongolian gerbil. *Toxicology*, 71(1), 129-136. doi:[https://doi.org/10.1016/0300-483X\(92\)90059-N](https://doi.org/10.1016/0300-483X(92)90059-N)
- Fernyhough, L., Kell, S. W., Hammond, A. H., Thomas, N. W., Fry, J. R. (1994). Comparison of *in vivo* and *in vitro* rat hepatic toxicity of coumarin and methyl analogues, and application of quantitative morphometry to toxicity *in vivo*. *Toxicology*, 88(1), 113-125. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(94\)90114-7](https://doi.org/10.1016/0300-483X(94)90114-7)
- Ford, R. A., Hawkins, D. R., Mayo, B. C., Api, A. M. (2001). The *in vivo* dermal absorption and metabolism of [4-¹⁴C]coumarin by rats and by human volunteers under simulated conditions of use in fragrances. *Food and Chemical Toxicology*, 39(2), 153-162. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00123-X](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00123-X)
- Fotland, T. Ø., Paulsen, J. E., Sanner, T., Alexander, J., Husøy, T. (2012). Risk assessment of coumarin using the bench mark dose (BMD) approach: children in Norway which regularly eat oatmeal porridge with cinnamon may exceed the TDI for coumarin with several folds. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3), 903-912. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.12.005>
- Grote, W., Schulz, L. C., Drommer, W., Uberschar, S., Shafer, E. A. (1977). Test of combination of the agents coumarin and troxerutin for embryotoxic and teratogenic side effects in Gottingen miniature pigs. *Arzneimittel-Forschung (Drug Research)*, 27(3), 613-617.
- Hadidi, H., Zahlse, K., Idle, J. R., Cholerton, S. (1997). A single amino acid substitution (Leu160His) in cytochrome P450 CYP2A6 causes switching from 7-hydroxylation to 3-hydroxylation of coumarin. *Food and Chemical Toxicology*, 35(9), 903-907. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(97\)00066-5](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(97)00066-5)
- Hagan, E. C., Hansen, W. H., Fitzhugh, O. G., Jenner, P. M., Jones, W. I., Taylor, J. M., Long, E.L., Nelson, A.A., Brouwer, J. B. (1967). Food flavourings and compounds of related structure. II. Subacute and chronic toxicity. *Food and Cosmetics Toxicology*, 5, 141-157. [https://doi.org/10.1016/S0015-6264\(67\)82961-4](https://doi.org/10.1016/S0015-6264(67)82961-4)
- Hardt, T. J., Ritschel, W. A. (1983). Dose-related pharmacokinetics of coumarin, 7-hydroxycoumarin and 7-hydroxycoumarin glucuronide upon intraperitoneal administration of coumarin and 7-hydroxycoumarin in the rat. *Arzneimittel-Forschung*, 33(10), 1442-1446.
- Kessova, I., Cederbaum, A. I. (2005). CYP2E1: biochemistry, toxicology, regulation and function in ethanol-induced liver injury. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 1, 671-685.
- Lake, B. G., Grasso, P. (1996). Comparison of the hepatotoxicity of coumarin in the rat, mouse, and Syrian hamster: a dose and time response study. *Toxicological Sciences*, 34(1), 105-117. doi:10.1093/toxsci/34.1.105
- Lake, B. G. (1999). Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 37(4), 423-453. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00010-1](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00010-1)
- Lake, B. G., Evans, J. G., Chapuis, F., Walters, D. G., Price, R. J. (2002). Studies on the disposition, metabolism

- and hepatotoxicity of coumarin in the rat and Syrian hamster. *Food and Chemical Toxicology*, 40(6), 809-823. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00036-4](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00036-4)
- LiverTox Database, updated: 03 June 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547852/>
- Loprinzi, C. L., Sloan, J., Kugler, J. (1997). Coumarin-induced hepatotoxicity. *Journal of clinical oncology*, 15(9), 3167-3168.
- Morrison, L., Welsby, P. D. (1995). Side-effects of coumarin. *Postgraduate Medical Journal*, 71(841), 701.
- National Toxicology Program. (1993). Toxicology and carcinogenesis studies of coumarin in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies).
- Oscarson, M., McLellan, R. A., Gullstén, H., Yue, Q.Y., Lang, M. A., Bernal, M.L., Sinues, B., Hirvonen, A., Raunio, H., Pelkonen, O., Ingelman-Sundberg, M. (1999). Characterisation and PCR-based detection of a CYP2A6 gene deletion found at a high frequency in a Chinese population. *FEBS Letters*, 448(1), 105-110. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00359-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00359-2)
- Pelkonen, O., Rautio, A., Raunio, H., Pasanen, M. (2000). CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase. *Toxicology*, 144(1), 139-147. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(99\)00200-0](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(99)00200-0)
- Preuss-Ueberschar, C., Ueberschar, S., Grote, W. (1984). Reproduction toxicological studies following oral administration of benzopyrone preparation in rats. *Arzneimittel-Forschung (Drug Research)*, 34(10), 1305-1313.
- Rautio, A., Kraul, H., Kojo, A., Salmela, E., Pelkonen, O. (1992). Interindividual variability of coumarin 7-hydroxylation in healthy volunteers. *Pharmacogenetics*, 2(5), 227-233.
- Research Institute for Fragrance Materials. (1983). Coumarin potential tumorigenic effects in prolonged dietary administration to mice (final report). Unpublished work from Rhône-Poulenc SA. RIFM report number 16955. Woodcliff Lake, NJ, USA.
- Research Institute for Fragrance Materials. (1984). Coumarin tumorigenic and toxic effects in prolonged dietary administration to rats following "in utero" exposure - main phase- (final phase). Unpublished report from Rhône-Poulenc SA. RIFM report number 16954. Woodcliff Lake, NJ, USA.
- Ritschel, W. A., Brady, M. E., Tan, H. S., Hoffmann, K. A., Yiu, I. M., Grummich, K. W. (1977). Pharmacokinetics of coumarin and its 7-hydroxy-metabolites upon intravenous and peroral administration of coumarin in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 12, 457-461.
- Ritschel, W. A., Brady, M. E., Tan, H. S. (1979). First-pass effect of coumarin in man. *International Journal of Clinical Pharmacology and Biopharmacy*, 17(3), 99-103.
- Ritschel, W. A., Denson, D. D., Grummich, K. W. (1988). Pharmacokinetics of coumarin and 7-hydroxycoumarin in the rhesus monkey after intravenous and peroral administration. *Arzneimittel-Forschung*, 38(11), 1619-1623.
- Ritschel, W. A., Hardt, T. J. (1983). Pharmacokinetics of coumarin, 7-hydroxycoumarin and 7-hydroxycoumarin glucuronide in the blood and brain of gerbils following intraperitoneal administration of coumarin. *Arzneimittel-Forschung*, 33(9), 1254-1258.
- Roll, R., Bar, F. (1967). Effect of coumarin on pregnant mice. *Arzneimittel-Forsch (Drug Research)*, 17(1), 97-100.
- Shilling, W. H., Crampton, R. F., Longland, R. C. (1969). Metabolism of Coumarin in Man. *Nature*, 221, 664. [doi:10.1038/221664b0](https://doi.org/10.1038/221664b0)
- Tanaka, Y., Fujii, W., Hori, H., Kitagawa, Y., Ozaki, K. (2017). Changes in coumarin kinetics and subcellular localization of CYP2E1 contribute to bile duct damage and reduce hepatocellular damage after repeated administration of coumarin in rats. *Toxicol Lett.* 280, 99-105.
- Turpeinen, M., Tolonen, A., Chesne, C., Guillouzo, A., Uusitalo, J. Pelkonen, O. (2009). Functional expression,

- inhibition and induction of CYP enzymes in HepaRG cells. *Toxicol. in Vitro*, 23, 748-763.
- Ueno, I., Hirono, I. (1981). Non-carcinogenic response to coumarin in Syrian golden hamsters. *Food and Cosmetics Toxicology*, 19, 353-355. [https://doi.org/10.1016/0015-6264\(81\)90395-3](https://doi.org/10.1016/0015-6264(81)90395-3)
- Vassallo, J. D., Hicks, S. M., Daston, G. P., Lehman-McKeeman, L. D. (2004). Metabolic detoxification determines species differences in coumarin-induced hepatotoxicity. *Toxicological Sciences*, 80(2), 249-257. <https://doi:10.1093/toxsci/kfh162>
- World Health Organization. (2000). Coumarin. In *Some industrial chemicals Vol. 77 of IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, Lyon, pp. 193-225.
- Zevin, S., Bonewitz, N. L. (1999) Drug interactions with tobacco smoking. An update. *Clin Pharmacokinet.* 36, 425-438.
- Zhuo, X., Gu, J., Zhang, Q. Y., Spink, D. C., Kaminsky, L. S., Ding, X. (1999). Biotransformation of coumarin by rodent and human cytochromes P-450: metabolic basis of tissue-selective toxicity in olfactory mucosa of rats and mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 288(2), 463-471.

付録 2-1 動物での毒性発現に関する公表文献をもつ食品成分

CAS	Name	CAS	Name
523-50-2	Isopsoralen	303-33-3	Heliotrine
3081-61-6	Theanine	520-26-3	Hesperidin
476-66-4	Ellagic acid	10597-60-1	Hydroxytyrosol
372-75-8	L-Citrulline	574-12-9	Isoflavone
96-24-2	3-Chloro-1,2-propanediol	21637-25-2	Isoquercitroside
51481-10-8	Deoxynivalenol	4618-18-2	Lactulose
74-79-3	L-Arginine	50-81-7	L-Ascorbic acid
625-08-1	beta-Hydroxyisovaleric acid	303-34-4	Lasiocarpine
501-36-0	trans-Resveratrol	56-84-8	L-Aspartic acid
6873-09-2	Epiberberine	52-90-4	L-Cysteine
2318-18-5	Senkirkine	73-32-5	l-Isoleucine
7782-77-6	Nitrous acid	56-87-1	L-Lysine
61-90-5	Leucine	63-68-3	L-Methionine
3486-66-6	Coptisine	70-26-8	L-Ornithine
38748-32-2	Triptolide	72-19-5	L-Threonine
4773-96-0	Mangiferin	502-65-8	Lycopene
130-01-8	Senecionine	7512-17-6	N-Acetyl-D-glucosamine
57-27-2	Morphine	10236-47-2	Naringin
97-54-1	Isoeugenol	7681-93-8	Natamycin
19057-60-4	Dioscin	23282-20-4	Nivalenol
486-84-0	Harman	542-40-5	Norbixin
4098-40-2	Mitragynine	244-63-3	Norharman
989-51-5	EGCG	480-78-4	Platyphylline
518-82-1	Emodin	68424-04-4	Polydextrose
932-30-9	2-(Aminomethyl)phenol	25322-68-3	Polyethylene glycol 200
104-76-7	2-Ethylhexanol	551-68-8	Psicose
30557-04-1	3-Chloro-1,2-propanediol 1-palmitate	110-60-1	Putrescine
69161-73-5	3-Chloro-1,2-propanediol dioleate	72909-34-3	Pyrroloquinoline quinone
51930-97-3	3-Chloropropane-1,2-diol dipalmitate	81-07-2	Saccharin
136-77-6	4-Hexylresorcinol	116-26-7	Safranal
59-89-2	4-Nitrosomorpholine	51-34-3	Scopolamine
106-60-5	5-Aminolevulinic acid	1338-39-2	Sorbitan Esters of Fatty Acids
134-35-0	5-Methyltetrahydrofolate	124-20-9	Spermidine
23452-05-3	Alternariol monomethyl ether	71-44-3	Spermine
87-44-5	beta-Caryophyllene	57-11-4	Stearic acid
462-94-2	Cadaverine	57817-89-7	Stevioside

13613-55-3	Carmoisine	21259-20-1	T-2 Toxin
8001-79-4	Castor oil	133-37-9	Tartaric acid
unregistered	Chocolate Brown HT	34175-08-1	Tartrazine acid
9007-27-6	Chondroitin	1948-33-0	tert-Butylhydroquinone
5392-40-5	Citral	14371-10-9	trans-Cinnamaldehyde
518-75-2	Citrinin	537-98-4	trans-Ferulic acid
27876-94-4	Crocetin	8024-37-1	Turmeric, oleoresin
2595-97-3	D-Allose	51-67-2	Tyramine
19408-84-5	Dihydrocapsaicin	303-98-0	Ubidecarenone
205687-03-2	Dihydrocapsiate	992-78-9	Ubiquinol-10
87-81-0	D-Tagatose	58872-39-2	Val-pro-pro
520-68-3	Echimidine	127-51-5	α -Isomethylionone
10030-58-7	Erythritol	58166-27-1	α -Palatinose
141-97-9	Ethyl acetoacetate	59-02-9	α -Tocopherol
48076-74-0	Ethyl lauroyl arginate	7235-40-7	β -Carotene
149-91-7	Gallic acid	9041-22-9	β -Glucan
1405-86-3	Glycyrrhizic acid	11042-64-1	γ -Oryzanol

参考文献

1. Chambers PL, Hunter CG, Stevenson DE. Short-term study of chocolate brown HT in rats. *Food Cosmet Toxicol* **1966**;4(2):151-5 doi 10.1016/s0015-6264(66)80458-3.
2. Levinskas G. Acute and chronic toxicity of pimaricin*1. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1966**;8(1):97-109 doi 10.1016/0041-008x(66)90105-0.
3. Gaunt IF, Farmer M, Grasso P, Gangolli SD. Acute (mouse and rat) and short-term (rat) toxicity studies on carmoisine. *Food Cosmet Toxicol* **1967**;5(2):179-85 doi 10.1016/s0015-6264(67)82965-1.
4. Kennedy GL, Jr., Fancher OE, Calandra JC. Subacute toxicity studies with sodium saccharin and two hydrolytic derivatives. *Toxicology* **1976**;6(2):133-8 doi 10.1016/0300-483x(76)90015-9.
5. Program NT. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of t-Butylhydroquinone (CAS No. 1948-33-0) in F344/N Rats and B6C3F(1) Mice (Feed Studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* **1977**;459:1-326.
6. Cater BR, Butterworth KR, Gaunt IF, Hooson J, Grasso P, Gangolli SD. Short-term toxicity study of sorbitan monolaurate (Span 20) in rats. *Food Cosmet Toxicol* **1978**;16(6):519-26 doi 10.1016/s0015-6264(78)80218-1.
7. Søndergaard D, Meyer O, Würtzen G. Magnesium stearate given perorally to rats. A short term study. *Toxicology* **1980**;17(1):51-5 doi 10.1016/0300-483x(80)90026-8.
8. Hayes MA, Schiefer HB. Comparative toxicity of dietary T-2 toxin in rats and mice. *J Appl Toxicol* **1982**;2(4):207-12 doi 10.1002/jat.2550020407.
9. Pollock GA, DiSabatino CE, Heimsch RC, Hilbelink DR. The subchronic toxicity and teratogenicity of alternariol monomethyl ether produced by *Alternaria solani*. *Food Chem Toxicol* **1982**;20(6):899-902 doi 10.1016/s0015-6264(82)80225-3.
10. Program NT. NTP Carcinogenesis Bioassay of L-Ascorbic Acid (Vitamin C) (CAS No. 50-81-7) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Study). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* **1983**;247:1-172.
11. Arnold D. A short-term feeding study with deoxynivalenol (vomitoxin) using rats. *Fundamental and Applied Toxicology*

1986;6(4):691-6 doi 10.1016/0272-0590(86)90182-x.

12. Program NT. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of 4-Hexylresorcinol (CAS No. 136-77-6) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). Natl Toxicol Program Tech Rep Ser **1988**;330.
13. Matsushima Y, Onodera H, Nagaoka T, Todate A, Shibutani M, Maekawa A, *et al.* [Subchronic oral toxicity study of calcium lactate in F344 rats]. Eisei Shikenjo Hokoku **1989**;107(107):78-83.
14. Aze Y, Toyoda K, Imaida K, Hayashi S, Imazawa T, Hayashi Y, *et al.* [Subchronic oral toxicity study of stevioside in F344 rats]. Eisei Shikenjo Hokoku **1991**;109(109):48-54.
15. Cook WM, Purchase R, Ford GP, Creasy DM, Brantom PG, Gangolli SD. A 28-day feeding study with ethyl acetoacetate in rats. Food Chem Toxicol **1992**;30(7):567-73 doi 10.1016/0278-6915(92)90190-v.
16. Hagiwara A, Asakawa E, Kurata Y, Sano M, Hirose M, Ito N. Dose-dependent renal tubular toxicity of harman and norharman in male F344 rats. Toxicol Pathol **1992**;20(2):197-204 doi 10.1177/019262339202000206.
17. Irwin R. NTP technical report on the toxicity studies of Castor Oil (CAS No. 8001-79-4) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Dosed Feed Studies). Toxic Rep Ser **1992**.
18. Program NT. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Turmeric Oleoresin (CAS No. 8024-37-1) (Major Component 79%-85% Curcumin, CAS No. 458-37-7) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies). Natl Toxicol Program Tech Rep Ser **1993**:1-275.
19. Weber E, Bannasch P. Dose and time dependence of the cellular phenotype in rat hepatic preneoplasia and neoplasia induced by continuous oral exposure to N-nitrosomorpholine. Carcinogenesis **1994**;15(6):1235-42 doi 10.1093/carcin/15.6.1235.
20. Bellringer ME, Smith TG, Read R, Gopinath C, Olivier P. beta-Cyclodextrin: 52-week toxicity studies in the rat and dog. Food Chem Toxicol **1995**;33(5):367-76 doi 10.1016/0278-6915(94)00149-i.
21. Hermansky SJ, Neptun DA, Loughran KA, Leung HW. Effects of polyethylene glycol 400 (PEG 400) following 13 weeks of gavage treatment in Fischer-344 rats. Food Chem Toxicol **1995**;33(2):139-49 doi 10.1016/0278-6915(94)00119-9.
22. van der Laan JW, Krajnc EI, Krajnc-Franken MA, van Loveren H. Immunotoxicological screening of morphine and methadone in an extended 28 day study in rats. Int J Immunopharmacol **1995**;17(6):535-43 doi 10.1016/0192-0561(95)00010-y.
23. Astill BD, Deckardt K, Gembardt C, Gingell R, Guest D, Hodgson JR, *et al.* Prechronic toxicity studies on 2-ethylhexanol in F334 rats and B6C3F1 mice. Fundam Appl Toxicol **1996**;29(1):31-9 doi 10.1006/faat.1996.0003.
24. Til HP, Modderman J. Four-week oral toxicity study with erythritol in rats. Regul Toxicol Pharmacol **1996**;24(2 Pt 2):S214-20 doi 10.1006/rtph.1996.0101.
25. Program NT. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Scopolamine Hydrobromide Trihydrate (CAS No. 6533-68-2) in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). Natl Toxicol Program Tech Rep Ser **1997**;445:1-277.
26. Til HP, Falke HE, Prinsen MK, Willems MI. Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. Food Chem Toxicol **1997**;35(3-4):337-48 doi 10.1016/s0278-6915(97)00121-x.
27. Til HP, Kuper CF, Falke HE. Nitrite-induced adrenal effects in rats and the consequences for the no-observed-effect level. Food Chem Toxicol **1997**;35(3-4):349-55 doi 10.1016/s0278-6915(97)00122-1.
28. Lina BA, Bar A. Subchronic oral toxicity studies with gamma-cyclodextrin in rats. Regul Toxicol Pharmacol **1998**;27(2):178-88 doi 10.1006/rtph.1998.1223.
29. Burdock GA, Flamm WG. A review of the studies of the safety of polydextrose in food. Food Chem Toxicol **1999**;37(2-3):233-64 doi 10.1016/s0278-6915(98)00113-6.
30. Carabin IG, Flamm WG. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. Regul Toxicol Pharmacol **1999**;30(3):268-82 doi 10.1006/rtph.1999.1349.

31. Kruger CL, Whittaker MH, Frankos VH, Trimmer GW. 90-Day oral toxicity study of D-tagatose in rats. *Regul Toxicol Pharmacol* **1999**;29(2 Pt 2):S1-10 doi 10.1006/rtp.1998.1262.
32. Williams KD, Maneke JD, AbdelHameed M, Hall RL, Palmer TE, Kitano M, *et al.* 52-Week oral gavage chronic toxicity study with ubiquinone in rats with a 4-week recovery. *J Agric Food Chem* **1999**;47(9):3756-63 doi 10.1021/jf981194t.
33. Baskaran V, Murthy KN, Mahadevamma, Vishwanatha S, Lokesh BR. Sub chronic toxicity studies of lactulose in rats. *Indian J Exp Biol* **2001**;39(5):441-6.
34. Niho N, Shibutani M, Tamura T, Toyoda K, Uneyama C, Takahashi N, *et al.* Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats. *Food Chem Toxicol* **2001**;39(11):1063-70 doi 10.1016/s0278-6915(01)00054-0.
35. Program NT. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of EMODIN (CAS NO. 518-82-1) Feed Studies in F344/N Rats and B6C3F1 Mice. *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* **2001**;493:1-278.
36. Yukie TADA TI, Hiroshi TAKAHASHI, Norio YANO, Katsuhiko YUZAWA, Akemichi NAGASAWA, Yoshimitsu SAKAMOTO, Nobutaka FUKUMORI, Kuniaki TAYAMA and Akio OGATA. Subchronic Toxicity Test of Ferulic Acid, Natural Food Additive, in F344 Rats. *AnnRepTokyo MetrResLabPH*, **2001**;52:272-8.
37. Jonker D, Lina BAR, Kozianowski G. 13-Week oral toxicity study with isomaltulose (Palatinose®) in rats. *Food and Chemical Toxicology* **2002**;40(10):1383-9 doi 10.1016/s0278-6915(02)00106-0.
38. Jonker D, Kuper CF, Fraile N, Estrella A, Rodriguez Otero C. Ninety-day oral toxicity study of lycopene from *Blakeslea trispora* in rats. *Regul Toxicol Pharmacol* **2003**;37(3):396-406 doi 10.1016/s0273-2300(03)00013-8.
39. Program NT. NTP toxicology and carcinogenesis studies of citral (microencapsulated) (CAS No. 5392-40-5) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* **2003**;505:1-268.
40. Hasumura M, Yasuhara K, Tamura T, Imai T, Mitsumori K, Hirose M. Evaluation of the toxicity of enzymatically decomposed rutin with 13-weeks dietary administration to Wistar rats. *Food Chem Toxicol* **2004**;42(3):439-44 doi 10.1016/j.fct.2003.10.006.
41. Lee KY, Shibutani M, Takagi H, Arimura T, Takigami S, Uneyama C, *et al.* Subchronic toxicity study of dietary N-acetylglucosamine in F344 rats. *Food Chem Toxicol* **2004**;42(4):687-95 doi 10.1016/j.fct.2003.12.005.
42. Lennon AM, Ramesh KT. The influence of crystal structure on the dynamic behavior of materials at high temperatures. *International Journal of Plasticity* **2004**;20(2):269-90 doi 10.1016/s0749-6419(03)00037-8.
43. Program NT. NTP toxicology and carcinogenesis studies of trans-cinnamaldehyde (CAS No. 14371-10-9) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* **2004**;514.
44. Ruckman SA, Rocabayera X, Borzelleca JF, Sandusky CB. Toxicological and metabolic investigations of the safety of N-alpha-lauroyl-L-arginine ethyl ester monohydrochloride (LAE). *Food Chem Toxicol* **2004**;42(2):245-59 doi 10.1016/j.fct.2003.08.022.
45. Tsubuku S, Hatayama K, Katsumata T, Nishimura N, Mawatari K, Smriga M, *et al.* Thirteen-week oral toxicity study of branched-chain amino acids in rats. *Int J Toxicol* **2004**;23(2):119-26 doi 10.1080/10915810490444424.
46. Tsubuku S, Hatayama K, Mawatari K, Smriga M, Kimura T. Thirteen-week oral toxicity study of L-arginine in rats. *Int J Toxicol* **2004**;23(2):101-5 doi 10.1080/10915810490435622.
47. Tsubuku S, Mochizuki M, Mawatari K, Smriga M, Kimura T. Thirteen-week oral toxicity study of L-lysine hydrochloride in rats. *Int J Toxicol* **2004**;23(2):113-8 doi 10.1080/10915810490444415.
48. Maeno M, Nakamura Y, Mennear JH, Bernard BK. Studies of the toxicological potential of tripeptides (L-valyl-L-prolyl-L-proline and L-isoleucyl-L-prolyl-L-proline): III. Single- and/or repeated-dose toxicity of tripeptides-containing *Lactobacillus helveticus*-fermented milk powder and casein hydrolysate in rats. *Int J Toxicol* **2005**;24 Suppl 4:13-23 doi 10.1080/10915810500259556.

49. Nabae K, Ichihara T, Hagiwara A, Hirota T, Toda Y, Tamano S, *et al.* A 90-day oral toxicity study of beta-carotene derived from *Blakeslea trispora*, a natural food colorant, in F344 rats. *Food Chem Toxicol* **2005**;43(7):1127-33 doi 10.1016/j.fct.2005.03.003.
50. Borzelleca JF, Peters D, Hall W. A 13-week dietary toxicity and toxicokinetic study with l-theanine in rats. *Food Chem Toxicol* **2006**;44(7):1158-66 doi 10.1016/j.fct.2006.03.014.
51. Isbrucker RA, Edwards JA, Wolz E, Davidovich A, Bausch J. Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 2: dermal, acute and short-term toxicity studies. *Food Chem Toxicol* **2006**;44(5):636-50 doi 10.1016/j.fct.2005.11.003.
52. Kodama T, Watanabe E, Tsubuku S, Otabe A, Mochizuki M, Masuyama T, *et al.* Studies of the toxicological potential of capsinoids: VII. A 13-week toxicity study of dihydrocapsiate in rats. *Int J Toxicol* **2008**;27 Suppl 3:79-100 doi 10.1080/10915810802513585.
53. Tada Y, Yano N, Takahashi H, Yuzawa K, Ando H, Kubo Y, *et al.* Toxic effects of l-aspartic acid at high dose levels on kidneys and salivary glands in Fischer 344 rats detected in a 90-day feeding study. *Food Chem Toxicol* **2008**;46(8):2789-95 doi 10.1016/j.fct.2008.05.013.
54. Takahashi M, Shibutani M, Sugita-Konishi Y, Aihara M, Inoue K, Woo GH, *et al.* A 90-day subchronic toxicity study of nivalenol, a trichothecene mycotoxin, in F344 rats. *Food Chem Toxicol* **2008**;46(1):125-35 doi 10.1016/j.fct.2007.07.005.
55. Tasaki M, Umemura T, Maeda M, Ishii Y, Okamura T, Inoue T, *et al.* Safety assessment of ellagic acid, a food additive, in a subchronic toxicity study using F344 rats. *Food Chem Toxicol* **2008**;46(3):1119-24 doi 10.1016/j.fct.2007.10.043.
56. Watanabe E, Kodama T, Masuyama T, Tsubuku S, Otabe A, Mochizuki M, *et al.* Studies of the toxicological potential of capsinoids: VIII. A 13-week toxicity study of commercial-grade dihydrocapsiate in rats. *Int J Toxicol* **2008**;27 Suppl 3:101-18 doi 10.1080/10915810802513619.
57. Kim YS, Baek MW, Sung JH, Ryu HY, Kim JS, Cho HS, *et al.* Acute and Sub-chronic Oral Toxicity Study of Ammonium Persulfate in Sprague-Dawley Rats. *Toxicol Res* **2009**;25(3):132-9 doi 10.5487/TR.2009.25.3.132.
58. Zhang WZ, Cui WM, Zhang X, Wang W, Jia XD, Zhang XP, *et al.* Subchronic toxicity study on soy isoflavones in rats. *Biomed Environ Sci* **2009**;22(3):259-64 doi 10.1016/S0895-3988(09)60054-4.
59. Iga Y, Nakamichi K, Shirai Y, Matsuo T. Acute and sub-chronic toxicity of D-allose in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **2010**;74(7):1476-8 doi 10.1271/bbb.100121.
60. Jonker D, Hasselwander O, Tervila-Wilo A, Tenning PP. 28-Day oral toxicity study in rats with high purity barley beta-glucan (Glucagel). *Food Chem Toxicol* **2010**;48(1):422-8 doi 10.1016/j.fct.2009.10.034.
61. Liu L, Jiang Z, Liu J, Huang X, Wang T, Liu J, *et al.* Sex differences in subacute toxicity and hepatic microsomal metabolism of triptolide in rats. *Toxicology* **2010**;271(1-2):57-63 doi 10.1016/j.tox.2010.03.004.
62. Program NT. Toxicology and carcinogenesis studies of isoeugenol (CAS No. 97-54-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* **2010**;551.
63. Himri I, Bellahcen S, Souna F, Belmekki F, Aziz M, Zoheir J, *et al.* A 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF TARTRAZINE, A SYNTHETIC FOOD DYE, IN WISTAR RATS. *Int J Pharm Pharm Sci* **2011**;3:159-69 doi 2359380591.
64. Johnson WD, Morrissey RL, Osborne AL, Kapetanovic I, Crowell JA, Muzzio M, *et al.* Subchronic oral toxicity and cardiovascular safety pharmacology studies of resveratrol, a naturally occurring polyphenol with cancer preventive activity. *Food Chem Toxicol* **2011**;49(12):3319-27 doi 10.1016/j.fct.2011.08.023.
65. Matsuo T, Ishii R, Shirai Y. The 90-day oral toxicity of d-psicose in male Wistar rats. *J Clin Biochem Nutr* **2012**;50(2):158-61 doi 10.3164/jcbrn.11-66.
66. Politano VT, Lapczynski AA, Ritacco G, Api AM. Ninety-day toxicity study of alpha-iso-methylionone in rats. *Int J Toxicol* **2012**;31(6):595-601 doi 10.1177/1091581812466116.

67. Xu T, Zhang S, Zheng L, Yin L, Xu L, Peng J. A 90-day subchronic toxicological assessment of dioscin, a natural steroid saponin, in Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol* **2012**;50(5):1279-87 doi 10.1016/j.fct.2012.02.027.
68. Aunon-Calles D, Canut L, Visioli F. Toxicological evaluation of pure hydroxytyrosol. *Food Chem Toxicol* **2013**;55:498-504 doi 10.1016/j.fct.2013.01.030.
69. Hosseinzadeh H, Sadeghi Shakib S, Khadem Sameni A, Taghiabadi E. Acute and subacute toxicity of safranal, a constituent of saffron, in mice and rats. *Iran J Pharm Res* **2013**;12(1):93-9.
70. Ishida S, Sarada M, Seki H, McGirr L, Lau A, Morishita K. Genotoxicity and subchronic oral toxicity of L-ornithine monohydrochloride. *Regul Toxicol Pharmacol* **2013**;67(3):360-71 doi 10.1016/j.yrtph.2013.08.015.
71. Li P, Wang S, Guan X, Liu B, Wang Y, Xu K, *et al.* Acute and 13 weeks subchronic toxicological evaluation of naringin in Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol* **2013**;60:1-9 doi 10.1016/j.fct.2013.07.019.
72. Sabetghadam A, Ramanathan S, Sasidharan S, Mansor SM. Subchronic exposure to mitragynine, the principal alkaloid of *Mitragyna speciosa*, in rats. *J Ethnopharmacol* **2013**;146(3):815-23 doi 10.1016/j.jep.2013.02.008.
73. Yi J, Ye X, Wang D, He K, Yang Y, Liu X, *et al.* Safety evaluation of main alkaloids from *Rhizoma Coptidis*. *J Ethnopharmacol* **2013**;145(1):303-10 doi 10.1016/j.jep.2012.10.062.
74. Aoki M, Ishida S, Fukuzumi H, Morishita K. A 13-week feeding toxicity study of L-threonine in rats with a recovery period of 5 weeks. *Fundamental Toxicological Sciences* **2014**;1(2):49-62 doi 10.2131/fts.1.49.
75. Fuller JC, Jr., Arp LH, Diehl LM, Landin KL, Baier SM, Rathmacher JA. Subchronic toxicity study of beta-hydroxy-beta-methylbutyric free acid in Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol* **2014**;67:145-53 doi 10.1016/j.fct.2014.02.025.
76. Onami S, Cho YM, Toyoda T, Mizuta Y, Yoshida M, Nishikawa A, *et al.* A 13-week repeated dose study of three 3-monochloropropane-1,2-diol fatty acid esters in F344 rats. *Arch Toxicol* **2014**;88(4):871-80 doi 10.1007/s00204-013-1190-6.
77. Chin K, Toue S, Kawamata Y, Watanabe A, Miwa T, Smriga M, *et al.* A 4-week toxicity study of methionine in male rats. *Int J Toxicol* **2015**;34(3):233-41 doi 10.1177/1091581815583678.
78. Inoue K, Morikawa T, Takahashi M, Yoshida M, Ogawa K. Obstructive nephropathy induced with DL-potassium hydrogen tartrate in F344 rats. *J Toxicol Pathol* **2015**;28(2):89-97 doi 10.1293/tox.2014-0058.
79. Liang C, Zhang X, Wang W, Song Y, Jia X. A subchronic oral toxicity study on pyrroloquinoline quinone (PQQ) disodium salt in rats. *Food Chem Toxicol* **2015**;75:146-50 doi 10.1016/j.fct.2014.11.005.
80. Yalena Prado NM, Jhoany Acosta, José A. Herrera, Yilian Luque, Ivones Hernández, Elisa Prado, Gabino Garrido, René Delgado, Idania Rodeir. Acute and 28-day subchronic toxicity studies of mangiferin, a glucosyl xanthone isolated from *Mangifera indica* L. stem bark. *J Pharm Pharmacogn Res* **2015**;3(1):13-23.
81. Dalefield RR, Gosse MA, Mueller U. A 28-day oral toxicity study of echimidine and lasiocarpine in Wistar rats. *Regul Toxicol Pharmacol* **2016**;81:146-54 doi 10.1016/j.yrtph.2016.08.006.
82. Miraglia N, Bianchi D, Trentin A, Volpi N, Soni MG. Safety assessment of non-animal chondroitin sulfate sodium: Subchronic study in rats, genotoxicity tests and human bioavailability. *Food Chem Toxicol* **2016**;93:89-101 doi 10.1016/j.fct.2016.04.013.
83. Olivier P, Verwaerde F, Hedges AR. Subchronic Toxicity of Orally Administered Beta-Cyclodextrin in Rats. *Journal of the American College of Toxicology* **2016**;10(4):407-19 doi 10.3109/10915819109078639.
84. Moon SH, Kim D, Shimizu N, Okada T, Hitoe S, Shimoda H. Ninety-day oral toxicity study of rice-derived gamma-oryzanol in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Rep* **2017**;4:9-18 doi 10.1016/j.toxrep.2016.12.001.
85. Morita M, Yamaguchi T, Morishita K, Kamimura A. A 4-week oral gavage toxicity study of L-citrulline in rats. *Fundamental Toxicological Sciences* **2017**;4(5):219-27 doi 10.2131/fts.4.219.

86. Shibui Y, Sakai R, Manabe Y, Masuyama T. Comparisons of l-cysteine and d-cysteine toxicity in 4-week repeated-dose toxicity studies of rats receiving daily oral administration. *J Toxicol Pathol* **2017**;30(3):217-29 doi 10.1293/tox.2017-0002.
87. Fuller JC, Jr., Pitchford LM, Abumrad NN, Rathmacher JA. Subchronic (90-day) repeated dose toxicity study of 2-hydroxybenzylamine acetate in rats. *Regul Toxicol Pharmacol* **2018**;99:225-32 doi 10.1016/j.yrtph.2018.09.025.
88. Deshmukh G, Venkataramaiah SB, Doreswamy CM, Umesh MC, Subbanna RB, Pradhan BK, *et al.* Safety Assessment of Ubiquinol Acetate: Subchronic Toxicity and Genotoxicity Studies. *J Toxicol* **2019**;2019:3680757 doi 10.1155/2019/3680757.
89. El-Hak HNG, EE EL, Hassan AK, Abbas OA. Study of the toxic effect and safety of vitamin E supplement in male albino rats after 30 days of repeated treatment. *Heliyon* **2019**;5(10):e02645 doi 10.1016/j.heliyon.2019.e02645.
90. Li Y, Kandhare AD, Mukherjee AA, Bodhankar SL. Acute and sub-chronic oral toxicity studies of hesperidin isolated from orange peel extract in Sprague Dawley rats. *Regul Toxicol Pharmacol* **2019**;105:77-85 doi 10.1016/j.yrtph.2019.04.001.
91. Niederberger KE, Dahms I, Broschard TH, Boehni R, Moser R. Safety evaluation of calcium L-methylfolate. *Toxicol Rep* **2019**;6:1018-30 doi 10.1016/j.toxrep.2019.09.012.
92. Zhang Y, Yuan XM, Wang YF, Jiang MM, Bi YN, Liu Y, *et al.* Isopsoralen induces different subchronic toxicities and metabolomic outcomes between male and female Wistar rats. *Regul Toxicol Pharmacol* **2019**;103:1-9 doi 10.1016/j.yrtph.2019.01.010.
93. Bastaki M, Api AM, Aubanel M, Bauter M, Cachet T, Demyttenaere JCR, *et al.* Dietary administration of beta-caryophyllene and its epoxide to Sprague-Dawley rats for 90 days. *Food Chem Toxicol* **2020**;135:110876 doi 10.1016/j.fct.2019.110876.
94. Ebmeyer J, Rasinger JD, Hengstler JG, Schaudien D, Creutzenberg O, Lampen A, *et al.* Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids induce DNA damage response in rat liver in a 28-day feeding study. *Arch Toxicol* **2020**;94(5):1739-51 doi 10.1007/s00204-020-02779-2.
95. Jagdale PR, Dev I, Ayanur A, Singh D, Arshad M, Ansari KM. Safety evaluation of Ochratoxin A and Citrinin after 28 days repeated dose oral exposure to Wistar rats. *Regul Toxicol Pharmacol* **2020**;115:104700 doi 10.1016/j.yrtph.2020.104700.
96. Tang X, Wang Y, Yang W, Zheng Y, Liu C, Qu M, *et al.* Acute and Subchronic Oral Toxicity Study of Gardenia Yellow E500 in Sprague-Dawley Rats. *Int J Environ Res Public Health* **2020**;17(2) doi 10.3390/ijerph17020531.