

平成 27 年度 指定添加物（香料）の安全性に関する試験（反復投与毒性試験）

2,3-pentandione の F344 ラットにおける 90 日間反復投与毒性試験
最終報告書

[Redacted]

担当：

[Redacted]

部長：

国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター

[Redacted]

[Redacted]

【要旨】

指定添加物における香料 18 類のうちケトン類に指定される 2,3-pentanedione (PTD)を、F344 ラットに 0、3、30 および 100 mg/kg bw で 90 日間強制経口投与し、その毒性影響を検討した。

投与期間中に死亡動物は見られず、一般状態、体重、摂餌量に被験物質投与による変化は見られなかった。投与期間終了後の血液学および血清生化学検査に被験物質投与による変化は見られなかった。被験物質投与に起因する変化として、雄の 100 mg/kg bw 群で胸腺の実重量および相対重量の低値が認められた。また、被験物質の直接接触部位である胃に、投与に起因すると考えられる諸変化が認められた。雌雄ともに 100 mg/kg bw 群で、肉眼的に前胃粘膜に白色隆起巣が散見され、組織学的には限局性扁平上皮過形成、過角化、びらん／潰瘍および炎症細胞浸潤が高頻度に認められた。従って、胃への組織傷害性の変化に基づき、本試験における PTD の無毒性量 (NOAEL) は雌雄とも 30 mg/kg bw/day と考えられた。

【緒言】

食品添加物では、安全性と有効性が評価され厚生労働大臣の指定を受けたものを「指定添加物」とし、日本国内での使用が許可されている。しかし、指定添加物のうち「類又は誘導体として指定されている 18 項目の香料」（18 類）に指定される香料については、通常の指定添加物とは異なり品目毎の安全性が確認されていない。従って、国際的な評価や欧米での許認可状況、これまでの安全性試験成績結果に加え新たな毒性試験の実施を含め、その安全性については再検討が求められている。

18 類のうちのケトン類に指定される香料の一つである 2,3-pentanedione (PTD) は、主鎖炭素数 5 の α -ジケトンであり、主鎖炭素数 4 の α -ジケトンである 2,3-butanedione (ジアセチル) の構造類似体である (1)。これらの物質はバタースッコチ様の香質を有し、バター風味の賦香剤として利用されている。また、もともと多くの食品中に微量に存在し、酒類、乳製品、肉類、発酵食品、穀類、フルーツなどから天然由来の香気成分として同定されている (2-4)。合成香料としては、両物質ともにアメリカでは米国食品医薬局 (FDA) の Generally Recognized As Safe (GRAS) 認定を受け、食品添加物の国際的評価機関である FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) の評価でも、香料としての現在の使用状況下で安全性に懸念は無いとされており、(5, 6) このような自然界での存在状況や国際的評価を反映し、日本国内でも食品香料として使用が許可されてきた。

一方で、ジアセチルについては香料としての使用に問題は無いとされるものの、ジアセチルを含むバター香料を使用するポップコーン工場やジアセチルを製造する香料工場の作業従事者間で、本来稀な疾患である閉塞性細気管支炎患者の多発が報告されている (7-11)。その後に実施された齧歯類の吸入暴露毒性試験でも、この疾患と関連するような変化が、鼻腔から終末細気管支に至る上下気道全域にかけて見られており、ラットでは鼻腔、喉頭、気管および気管支の上皮における壊死や線維素化膿性炎症、マウスでは終末細気管支における上皮傷害、気管支周囲のリンパ性炎症および線維性組織球性病変などの誘発が報告されている (12-16)。気道上皮における線維性病変は閉塞性細気管支炎発症の初期に関連すると考えられていることから、ジアセチルの吸入は閉塞性細気管支炎発症の原因となり得ると考えられている (17, 18)。従って、ジアセチルを取り扱う香料や食品工場においては労働者の健康への影響が懸念されるため、国内でも作業環境の改善や提供情報の見直しなど安全対策の実施が求められている。

PTD は、ジアセチルのヒトへの健康被害が報告されたことを機に、ジアセチルに代わる代替品として普及した化合物である (19)。PTD はジアセチル同等の賦香作用を有し、ジアセチルに比べて揮発性が低く持続性があり簡便に扱えることも広く利用される要因となっている。食品やタバコなどの嗜好品を含め国際的に幅広い使用実績があり、日本国内の調査でも [] と報告されている ([] 未公開内部データ)。しかし、PTD はジアセチルの構造類似体であり類似の生物学的作用を生じる可能性があるにも関わらず、これまでに単剤での毒性影響については十分には検討されていない。近年、ジアセチルと同様に肺への影響を検討するため、齧歯類を用い

た吸入暴露試験が実施されたが、その結果、ジアセチルと同等あるいはそれ以上の程度でげっ歯類の鼻腔と気道上皮組織に傷害を示すことが明らかとなった(16, 20, 21)。このようなPTDの吸入と肺疾患との関連性は、JECFAがPTDのADI評価を行った2004年度の評価(6)以降に報告されたことから、PTDは現在香料としての使用を許可されているものの、その毒性については国際的に注目されているところである。2011年にはNational Toxicology ProgramにおいてもPTDについての情報収集の一環として、経皮感受性の評価を目的とした動物試験等も実施されている(22)。しかし、現状としてPTDの毒性影響に関する公的な情報は乏しく、食品添加物としての安全性確保のためには、高用量暴露や投与経路による影響など多方面から評価し、知見の収集と整理を行う必要がある。

食品用香料のヒト暴露経路には、一般的に経口、吸入あるいは経皮からの吸収が考えられる。PTDにおいては、タバコへの利用もあり吸入暴露も一つの経路となるが、使用実態では菓子類、発酵食品、乳製品等、経口的に継続して摂取される食品中への添加が主であり、消費者にとって経口暴露が最も重要な暴露源と考えられる。PTDの毒性に関する報告は、前述の経緯から吸入暴露による毒性影響が近年報告されたものの、経口暴露での毒性試験の報告はこれまでにされていない。従って、今回、厚生労働省からの依頼を受け、PTDの安全性評価のための新たな情報を得ることを目的とし、経口投与によるF344ラットの90日間反復投与毒性試験を実施した。平成26年度には、本試験の実施に先立ちF344ラットを用いた28日間の用量設定のための予備試験を実施した。また、その結果を基に90日間試験の動物実験を開始し終了させた。平成27年度は、動物実験終了後の全ての検索項目の検索を終了したので、本報告書ではその結果を示し、最終報告とする。

【実験材料及び方法】

1. 動物ならびに飼育条件

5週齢のF344/DuCjラット雌雄各45匹を日本チャールス・リバー株式会社(神奈川)より購入しCRF-1粉末基礎飼料(オリエンタル酵母株式会社、東京)と蒸留水で約1週間馴化飼育した。供試動物の各群への割り当ては、馴化期間中に体重推移と一般状態で異常を認めない動物の中から体重の中央値に近い雌雄40匹を抽出し、群間の偏りを少なくする群分け方法である適正層別方式(23)を用いて、各群10匹ずつ4群に配した。雌雄の余剰5匹は検疫動物とした。動物の飼育はバリエーションシステムの動物飼育施設で行い、室内の環境条件は温度 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、換気回数18回/時間、12時間蛍光灯照明、12時間消灯の条件下で行った。動物はポリカーボネート製箱型ケージに、2または3匹ずつ収容し、床敷には三協ラボサービス株式会社(東京)のソフトチップを用い週2回交換した。また飲料水として蒸留水を自由に摂取させた。

本試験は国立医薬品食品衛生研究所「動物実験の適正な実施に関する規定」に基づき、動物実験計画書を作成し、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会による審査を受けた後、動物愛護に十分配慮し実施した。本動物実験施設はGLP適合施設ではないが、(財)ヒューマンサ

イェンス振興財団動物実験実施施設認証センターの評価を受け、厚生労働省の通知「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する指針」に適合した施設であると認定されている。また、本試験は「食品添加物の指定及び使用基準に関する指針」(24)に準拠して実施した。

2. 被験物質および投与濃度

被験物質 (2,3-pentanedione 98 FCC, lot. No. ██████████ Frutarom Ltd., Israel) は日本食品添加物協会より供与を受けた。被験物質の純度はGC法による測定で99.5%、不純物は0.5% (未同定) であり、主成分単一物質として取り扱った。

本試験におけるPTDの投与用量は、昨年度に実施したF344ラットを用いた28日間の用量設定試験の結果を基準に決定した。本試験と同一ロットのPTDを28日間反復投与毒性試験の限界用量である1000 mg/kg bwを最高用量とし(25)、以下を300、100、0 mg/kg bwの用量でF344ラットに連続28日間強制経口投与した。その結果、1000 mg/kg bwの投与で雌雄ともに死亡動物が認められ、摂餌量および体重の低値が認められた。また肝相対重量が雌雄の100 mg/kg bw群から有意に増加し、腎相対重量が雄では100、雌では300 mg/kg bw群から有意に増加した。病理学的検査では、被験物質に起因すると考えられる変化が接触部位である胃にほぼ限局して生じ、肉眼的には胃の前胃粘膜肥厚が雌雄ともに100 mg/kg bw以上の群で全例に認められ、その程度は用量相関的に増強した。病理組織学的には、前胃におけるびまん性粘膜上皮過形成、過角化および炎症細胞浸潤が雌雄ともに100 mg/kg bw以上の群で全例に認められた。びらん/潰瘍は雄で100 mg/kg bw群から、雌では300 mg/kg bw群から認められた。また、1000 mg/kg bw群では、腺胃においても雌雄ともに潰瘍、拡張および炎症が認められた。これらの諸変化は被験物質の直接的な接触による刺激性作用による影響と判断した。

従って、接触部位である胃への刺激性影響に基づき、この用量設定試験での最小毒性量 (LOAEL) は雌雄100 mg/kg bwとした。この結果を根拠に、90日間反復投与毒性試験では最高用量を雌雄ともに100 mg/kg bwに設定し、以下を約公比3で除した30および10 mg/kg bwに設定した。

3. 被験物質の安定性および投与液の調整

被験物質はコーン油 (生化学用、和光純薬工業会社、大阪) に溶解し、2、6 および20 mg/mlの濃度で調整した。投与容量は5 ml/kg 体重とし、一週間毎の体重測定時の体重に基づいて動物個体ごとに算出した。

コーン油中のPTDの安定性については、昨年度、国立医薬品食品衛生研究所、食品添加物部 (東京) の協力を得てGC法にて確認した。その結果、調整した投与液は2、20、60 および200 mg/mlの濃度で、冷蔵 (4℃) 遮光下でそれぞれ8日間安定性が保持されることが確認された (平成26年度報告書)。従って、本試験における2、6 および20 mg/mlの濃度で調整した投与液についても8日間安定であると判断し、8日に1回の頻度で調整し、調整後7日以内に使用

した。投与液の保存は、1日必要量ずつ褐色ガラス瓶に分注し、使用まで冷蔵・遮光下で保存した。

4. 観察ならびに検索方法

試験期間中、一般状態の観察を連日実施し、体重、摂餌量は毎週1回測定した。動物は、剖検日前日より一晩絶食させ、翌日イソフルラン麻酔下で腹部大動脈から採血後、屠殺・剖検した。血液学的検査は、自動血球計数装置 (Sysmex K-4500、シスメックス (株)、兵庫) を用いて、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン量 (HGB)、ヘマトクリット値 (HCT)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球色素量 (MCH)、平均赤血球色素濃度 (MCHC)、血小板数 (PLT) および白血球数 (WBC) を測定した。また、白血球分画は血液細胞自動分析装置 (MICROX HE-50S, シスメックス (株)) にて、桿状核好中球 (band-form neutrophils)、分葉核好中球 (segmented neutrophils)、好酸球 (eosinophiles)、好塩基球 (basophiles)、リンパ球 (lymphocytes)、単球 (monocytes)、網状赤血球 (reticulocytes) の分類を行った。血清生化学検査は、分離した血清を凍結後、総蛋白 (TP)、アルブミン・グロブリン比 (A/G)、アルブミン (Alb)、総ビリルビン (T.Bil)、トリグリセリド (TG)、総コレステロール (T.Cho)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRN)、ナトリウム (Na)、塩素 (Cl)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、無機リン (P)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、アラニントランスアミナーゼ (ALT)、アルカリフォスタファアーゼ (ALP)、 γ -グルタミルトランスぺプチターゼ (γ -GTP) について [REDACTED] に依頼し測定した。各個体の全身を詳細に観察し、肉眼的異常を記録した後、脳、頭蓋骨、下垂体、三叉神経、眼球、唾液腺、胸腺、舌、気管、食道、甲状腺、縦隔リンパ節、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、膵臓、胃、小腸、大腸、腸間膜リンパ節、大腿筋、大腿骨、胸骨、脊髄、坐骨神経、皮膚、精巣、精巣上体、精囊、凝固腺、膀胱、前立腺、尿道球腺、卵巣、子宮、膈、膀胱を摘出した。脳、心臓、肺、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣および卵巣の重量を測定した。眼球はハーダー腺を含めてダビッドソン固定し、精巣はブアン固定した。その他の諸臓器は10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。各諸臓器は、定法に従ってパラフィン包埋した後、薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施した。

5. 統計学的処理法

体重、臓器重量、血液学的検査および血清生化学検査については、Bartlettの検定を使用して群間の正規性と等分散を解析した。データが正規分布である場合はDunnnettの検定法、不正規分布である場合はSteelの検定法を用いて多重比較検定を行った。病理組織学的変化については、発生頻度をFisherの正確確率検定法で検定した。

【結果】

1. 一般状態および死亡動物

投与期間中、雌雄とも全群で死亡例は認められなかった。また、投与期間を通じて一般状態に変化は見られなかった。

2. 摂餌量および体重

平均体重および平均摂餌量を Fig. 1 に示す。体重および摂餌量は、雌雄ともに全ての被験物質投与群において対照群と同様に推移した。

3. 血液学的検査および血清生化学検査

血液学的検査および血清生化学検査を Table.1 に示す。雌雄ともに、血液学検査および血清生化学検査に被験物質投与によると考えられる変化は見られなかった。血液学的検査では、雄の 30 mg/kg bw 群で、MCV が有意な低値を示したが明確な用量相関性のない軽微な変化であった。血清生化学検査では、雄では BUN が 30 mg/kg bw 群で、雌では Na が 100 mg/kg bw 群で、有意に減少したが明確な用量相関性の無い軽微な変化であった。雌の AST が 30mg/kg bw 以上の群で有意に減少したが軽微な変化であり減少する変化であった。また、その他の肝機能の関連項目や関連する病理組織学的所見も見られないことから、毒性学的意義の無い変化と考えられた。

4. 臓器重量

臓器重量の結果を Table. 2 に示す。雄の 100 mg/kg bw 群で、胸腺の実重量および相対重量の有意な低値が認められた。雌の副腎で相対重量の有意な低値が 30 mg/kg bw 群で認められたが、明らかな用量相関性の無い軽微な変化であり偶発的な変化と考えられた。

5. 肉眼的検査

剖検時の肉眼的観察において、雌雄 100mg/kg bw 群で、胃に被験物質投与によると考えられる変化が散見された。雄では 10/10 例に前胃粘膜に 1~3mm 大の白色の隆起巣、雌では 8/10 例に 1mm 大の白色の隆起巣が認められた。これらの変化は前胃の上部に限局的に認められた。

6. 病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を、Table. 3 に示す。雌雄ともに 100 mg/kg bw 群の前胃において、限局性扁平上皮過形成、過角化、びらん/潰瘍および炎症細胞浸潤の発生頻度が対照群に比較して有意に上昇した。このような変化は対照群、10 および 30 mg/kg bw 群では認められなかった。また、対照群および 100 mg/kg bw 群の雌雄において認められたその他の病理学的変化については、いずれもその発生頻度および程度に有意な差は認められなかった。

【考察】

PTD を F344 ラットに 0、3、30 および 100 mg/kg bw で 90 日間強制経口投与し、その毒性影響を検討した。

投与期間中に死亡動物は見られず、一般状態、体重、摂餌量にも被験物質投与による影響は見られなかった。血液学および血清生化学検査では、軽微な変化が見られる項目が幾つかあったが、明確な用量相関性が無く実験施設内の背景値内での軽微な変動であることから、いずれも生理的変動範囲内の変化と考えられた。

臓器重量では、雄の胸腺が実重量・相対重量ともに100 mg/kg bw 群で有意な低値を示した。この変化に関連する病理組織学的所見は見られず、その詳細は不明ではあるものの、100 mg/kg bw 群では対照群に対し実重量・相対重量ともに20%程度の減少を示し、それ以下の用量の投与群でも用量相関的に減少する傾向を示していることから、今回100 mg/kg bw 群で認められた胸腺重量の有意な低値は、被験物質投与の影響を否定できない変化と判断した。一方で、脾臓やリンパ節など他の免疫系器官の重量や病理組織学的所見に変化は見られず、末梢血白血球数およびその百分比におけるリンパ球比率にも変動が無いことから、この変化の免疫系機能への影響は不明であった。雌の30 mg/kg bw 群では、副腎の相対重量の減少が認められたが、明らかな用量相関性のない軽微な変化であり偶発的な変化であると考えられた。

病理学的検査では、剖検時の肉眼的観察で、被験物質の直接的接触部位である胃に被験物質投与に関連すると考えられる変化が見られた。雌雄ともに最高用量である100 mg/kg bw 群で、前胃粘膜上部に1~3 mm程度の白色隆起巣が、雄では10/10例、雌では7/10例に散見された。病理組織学的検査では100 mg/kg bw 群の前胃に、限局性扁平上皮過形成、過角化、びらん/潰瘍および炎症細胞浸潤が高頻度に認められた (Fig.2)。本病変は対照群では認められなかったことから (Fig.2-A) 投与に起因する変化であると考えられた。本試験でみられた限局性扁平上皮過形成や過角化はびらん/潰瘍を中心に認められており (Fig.2-C)、びらん/潰瘍を伴わない部位では過形成性病変が認められなかったことから (Fig.2-B)、びらん/潰瘍の発生に関連する変化であると考えられた。げっ歯類の前胃における扁平上皮過形成は刺激性物質の胃内投与に対する反応性の変化としても認められるが、この際に認められる扁平上皮過形成は多くの場合、びまん性に起きることが知られている。本試験で認められた過形成は限局的であり、びらん/潰瘍に伴って認められたことから、刺激性の変化ではなく組織傷害性に起因する変化であると考えられ、PTDは前胃において組織傷害性を示す可能性が示唆された。一方で、前年度に報告した28日間の用量設定試験では、びまん性の扁平上皮過形成が認められたことから、PTDは刺激性に加え組織傷害性の変化を引き起こすと考えられた。また、胃以外の臓器で認められた病理組織学的変化は、いずれもその発生頻度や程度は低く、対照群と比較して有意差は認められなかったことから、投与に関連する変化ではないと考えられた。また、28日間の用量設定試験において腎臓ヘンレ係蹄の尿細管上皮に観察された核濃縮、脱落および壊死等の変化は、本試験の対照群にも認められ、さらに同部位は低酸素性の変化を受けやすい部位として知られていることから、投与に起因する変化ではなくアーティファクトによるものと考えられた。

【結論】

PTDをF344ラットに0、3、30および100 mg/kg bwで90日間強制経口投与し、その毒性影

響を検討した。投与期間中に死亡動物は見られず、一般状態、体重、摂餌量に被験物質投与による変化は見られなかった。投与期間終了後の血液学および血清生化学検査に被験物質投与による変化は見られなかった。被験物質投与に起因する変化として、雄の 100 mg/kg bw 群で胸腺の実重量および相対重量の低値が認められた。また、被験物質の直接接触部位である胃に、投与に起因すると考えられる諸変化が認められた。雌雄ともに 100 mg/kg bw 群で、肉眼的に前胃粘膜に白色隆起巣が散見され、組織学的には限局性扁平上皮過形成、過角化、びらん/潰瘍および炎症細胞浸潤が高頻度に認められた。

従って、胃への組織傷害性の変化に基づき、本試験の無毒性量 (NOEL) は雌雄とも 30 mg/kg bw/day と考えられた。

【参考文献】

1. 厚生労働省、最終改正・平成 27 年 7 月 29 日厚生労働省令第 126 号、「食品衛生法施行規定」(昭和 23 年 7 月 13 日厚生省令第 23 号)、別表 1、<http://law.e-gov.go.jp/htmldata/S23/S23F03601000023.html> (2015 年 10 月 20 日アクセス)。
2. Escamilla-Hurtado, M.L., Tomasini-Campocosio, A., Valdés-Martínez, S., Soriano-Santos, J. 1996. Diacetyl formation by lactic bacteria. *Rev. Latinoam Microbiol.* 38, 129-137.
3. Majcher, M.A., Klensporf-Pawlik, D., Dziadas, M., Jeleń, H.H. 2013. Identification of aroma active compounds of cereal coffee brew and its roasted ingredients. *J. Agric. Food Chem.* 61, 2648-2654.
4. Rincon-Delgadillo, M.I., Lopez-Hernandez, A., Wijaya, I., Rankin, S.A. 2012. Diacetyl levels and volatile profiles of commercial starter distillates and selected dairy foods. *J. Dairy Sci.* 95, 1128-1139.
5. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 1999. Safety evaluation of certain food additives. WHO Food Additives Series, No. 42.
6. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 2004. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Food Additives Series No. 52.
7. Kreiss, K., Gomaa, A., Kullman, G., Fedan, K., Simoes, E.J., Enright, P.L. 2002. Clinical bronchiolitis obliterans in workers at a microwave-popcorn plant. *N. Engl. J. Med.* 347, 330-338.
8. Lockey, J.E., Hilbert, T.J., Levin, L.P., Ryan, P.H., White, K.L., Borton, E.K., Rice, C.H., McKay, R.T., LeMasters, G.K. 2009. Airway obstruction related to diacetyl exposure at microwave popcorn production facilities. *Eur. Respir J.* 34, 63-71.
9. Schachter, E.N. 2002. Popcorn worker's lung. *N. Engl. J.* 347, 360-361.
10. van Rooy, F.G., Rooyackers, J.M., Prokop, M., Houba, R., Smit, L.A., Heederik, D.J. 2007. Bronchiolitis obliterans syndrome in chemical workers producing diacetyl for food flavorings. *Am. J. Respir Crit. Care Med.* 176, 498-504.

11. van Rooy, F.G., Smit, L.A., Houba, R., Zaat, V.A., Rooyackers, J.M., Heederik, D.J. 2009. A cross-sectional study of lung function and respiratory symptoms among chemical workers producing diacetyl for food flavourings. *Occup. Environ Med.* 66, 105-110.
12. Hubbs, A.F., Battelli, L.A., Goldsmith, W.T., Porter, D.W., Frazer, D., Friend, S., Schwegler-Berry, D., Mercer, R.R., Reynolds, J.S., Grote, A., Castranova, V., Kullman, G., Fedan, J.S., Dowdy, J., Jones, W.G. 2002. Necrosis of nasal and airway epithelium in rats inhaling vapors of artificial butter flavoring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 185, 128-135.
13. Hubbs, A.F., Goldsmith, W.T., Kashon, M.L., Frazer, D., Mercer, R.R., Battelli, L.A., Kullman, G.J., Schwegler-Berry, D., Friend, S., Castranova, V. 2008. Respiratory toxicologic pathology of inhaled diacetyl in sprague-dawley rats. *Toxicol. Pathol.* 36, 330-344.
14. Morgan, D.L., Flake, G.P., Kirby, P.J., Palmer, S.M. 2008. Respiratory toxicity of diacetyl in C57BL/6 mice. *Toxicol. Sci.* 103, 169-180.
15. Morris, J.B., Hubbs, A.F. 2009. Inhalation dosimetry of diacetyl and butyric acid, two components of butter flavoring vapors. *Toxicol. Sci.* 108, 173-183.
16. Zaccone, E.J., Thompson, J.A., Ponnath, D.S., Cumpston, A.M., Goldsmith, W.T., Jackson, M.C., Kashon, M.L., Frazer, D.G., Hubbs, A.F., Shimko, M.J., Fedan, J.S. 2013. Popcorn flavoring effects on reactivity of rat airways in vivo and in vitro. *J. Toxicol. Environ Health A.* 76, 669-689.
17. Cordier, J.F. 2007. Challenges in pulmonary fibrosis. 2: Bronchiolocentric fibrosis. *Thorax.* 62, 638-649.
18. Epler, G.R. 2007. Constrictive bronchiolitis obliterans: the fibrotic airway disorder. *Expert Rev. Respir Med.* 1, 139-147.
19. Day, G., LeBouf, R., Grote, A., Pendergrass, S., Cummings, K., Kreiss, K., Kullman, G. 2011. Identification and measurement of diacetyl substitutes in dry bakery mix production. *J. Toxicol. Environ Health A.* 8, 93-103.
20. Hubbs, A.F., Cumpston, A.M., Goldsmith, W.T., Battelli, L.A., Kashon, M.L., Jackson, M.C., Frazer, D.G., Fedan, J.S., Goravanahally, M.P., Castranova, V., Kreiss, K., Willard, P.A., Friend, S., Schwegler-Berry, D., Fluharty, K.L., Sriram, K. 2012. Respiratory and olfactory cytotoxicity of inhaled 2,3-pentanedione in Sprague-Dawley rats. *Am. J. Pathol.* 181, 829-844.
21. Morgan, D.L., Jokinen, M.P., Price, H.C., Gwinn, W.M., Palmer, S.M., Flake, G.P. 2012. Bronchial and bronchiolar fibrosis in rats exposed to 2,3-pentanedione vapors: implications for bronchiolitis obliterans in humans. *Toxicol. Pathol.* 40, 448-465.
22. National Toxicology Program. 2011 (Web page last updated on Friday June 27, 2014). NTP Report on the Assessment of Contact Hypersensitivity to 2,3-Pentanedione in Female BALB/c Mice (CASRN: 600-14-6), NTP Report Number I08010. <http://ntp.niehs.nih.gov/testing/types/imm/abstract/i08010/index.html> (2015年10月20日アクセス)。

23. 阿部正信、1986、長期毒性試験に用いるラット・マウスの体重変化の解析による群分けの適正層別方式の確立、薬理と治療 14 ; 7285-7302。
24. 厚生労働省、平成 8 年 3 月 22 日衛化第 29 号、「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」(別添)、<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syokuten/960322/betu.html> (2015 年 10 月 20 日アクセス)。
25. 国立医薬品食品衛生研究所、最終更新 2015 年 4 月 14 日、「OECD テストガイドライン」(反 復 投 与 毒 性 試 験 TG407 、 1995.7.27 採 択) 、
<http://www.nihs.go.jp/hse/chem-info/oecdindex.html> (2015 年 10 月 20 日アクセス)。

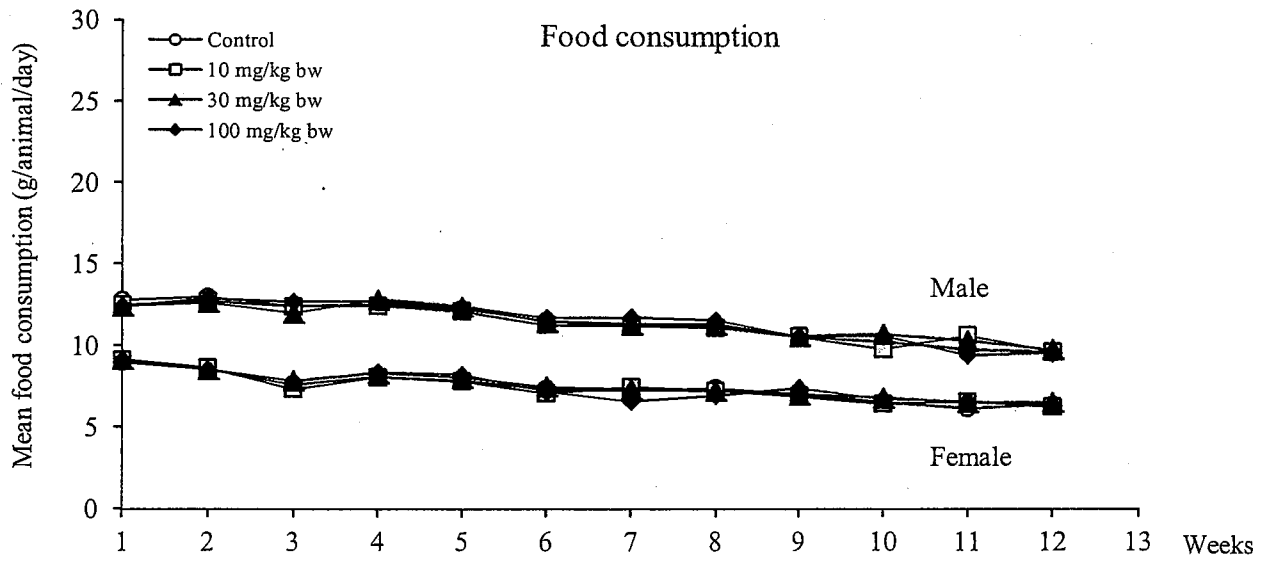
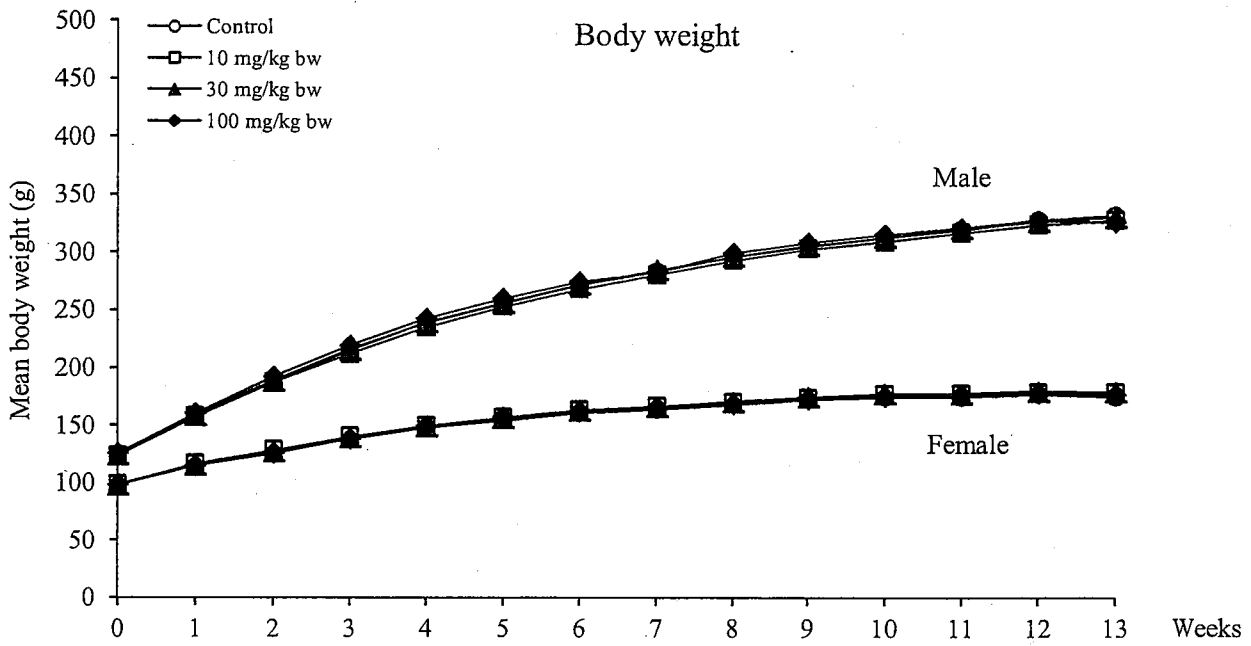


Fig. 1
 Body weight and food consumption for F344 rats treated with 2,3-pentanedione for 90 days.

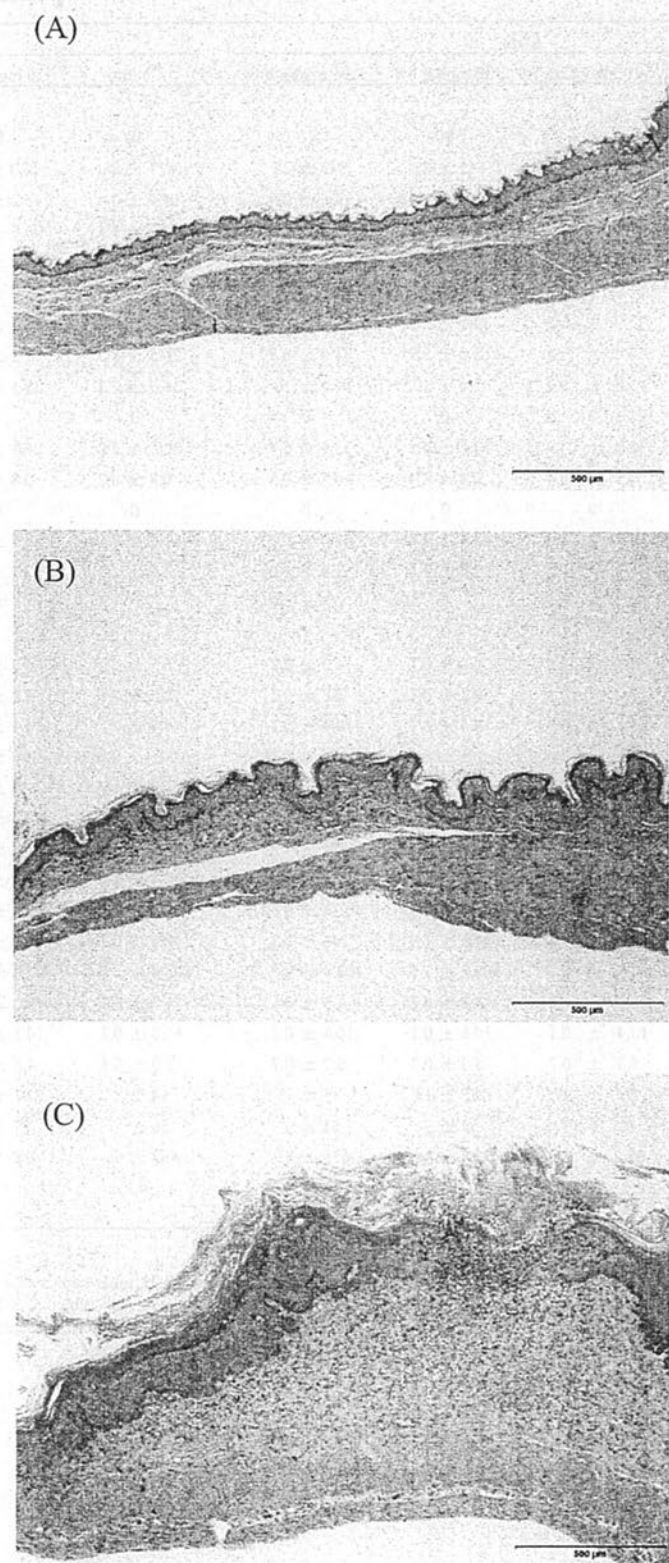


Fig. 2
Focal lesions of the forestomach in the male rats that treated with 2,3-pentanedione at 100 mg/kg bw for 90 days. (A) Normal forestomach mucosa in the control group. (B) Normal forestomach mucosa in the 100 mg/kg bw group. (C) Focal lesions of the forestomach, including inflammation, hyperplasia, hyperkeratosis, erosion/ulcer, and inflammation in the 100 mg/kg bw group.

Table 1. Hematological and biochemical data for F344 rats treated with 2,3-pentanedione for 90 days.

Sex Item / Dose	Male				Female			
	Control	10 mg/kg bw	30 mg/kg bw	100 mg/kg bw	Control	10 mg/kg bw	30 mg/kg bw	100 mg/kg bw
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10	10
RBC (10 ⁴ /μL)	843 ± 47 ^a	854 ± 39	847 ± 31	843 ± 25	827 ± 28	820 ± 29	816 ± 51	817 ± 46
Hb (g/dL)	14.5 ± 0.8	14.7 ± 0.6	14.6 ± 0.4	14.6 ± 0.4	15.4 ± 0.4	15.2 ± 0.4	15.0 ± 0.8	15.1 ± 0.7
Ht (%)	45.7 ± 2.4	46.1 ± 2.0	45.5 ± 1.5	45.5 ± 1.3	46.6 ± 1.4	46.0 ± 1.6	45.7 ± 2.9	45.9 ± 2.6
MCV (fL)	54.2 ± 0.3	54.0 ± 0.4	53.8 ± 0.3 ^{**}	53.9 ± 0.3	56.3 ± 0.5	56.1 ± 0.3	56.0 ± 0.2	56.2 ± 0.2
MCH (pg)	17.2 ± 0.4	17.2 ± 0.3	17.2 ± 0.3	17.3 ± 0.2	18.6 ± 0.5	18.6 ± 0.5	18.4 ± 0.5	18.5 ± 0.5
MCHC (g/dL)	31.8 ± 0.5	31.9 ± 0.5	32.1 ± 0.5	32.0 ± 0.4	33.1 ± 0.7	33.1 ± 0.8	32.8 ± 0.9	32.9 ± 0.9
Plt (10 ⁴ /μL)	62.6 ± 10.1	67.7 ± 5.3	68.0 ± 8.7	71.0 ± 6.7	76.5 ± 8.5	77.2 ± 4.3	74.0 ± 9.9	77.9 ± 6.3
WBC (10 ² /μL)	45.3 ± 6.1	43.6 ± 8.4	42.4 ± 10.9	54.0 ± 10.3	36.6 ± 7.3	38.5 ± 6.3	34.2 ± 6.4	38.3 ± 8.5
Band (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
Seg (%)	32.8 ± 7.0	32.0 ± 4.9	33.2 ± 4.2	33.9 ± 5.7	30.2 ± 7.0	26.2 ± 7.0	26.1 ± 8.9	28.4 ± 7.5
Eosi (%)	0.6 ± 0.6	0.3 ± 0.4	0.4 ± 0.4	0.7 ± 0.5	0.8 ± 0.7	0.8 ± 0.9	0.9 ± 0.8	0.7 ± 0.4
baso (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
Lymp (%)	64.2 ± 7.6	66.1 ± 5.4	64.4 ± 4.4	63.6 ± 5.9	67.0 ± 7.1	70.8 ± 8.6	73.3 ± 10.6	69.8 ± 7.9
Mono (%)	2.4 ± 1.0	1.6 ± 1.1	2.0 ± 1.4	1.9 ± 1.0	2.0 ± 1.3	2.2 ± 1.1	1.4 ± 0.9	1.2 ± 0.7
Ebl	0	0.1 ± 0.3	0	0.1 ± 0.3	0	0	0.1 ± 0.3	0
TP	6.4 ± 0.1	6.4 ± 0.1	6.4 ± 0.1	6.3 ± 0.2	6.1 ± 0.2	6.3 ± 0.2	6.2 ± 0.1	6.3 ± 0.1
A/G	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.2	2.5 ± 0.2	2.5 ± 0.1	2.5 ± 0.1	2.5 ± 0.1
Alb	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.5 ± 0.1
T-Bil	0.051 ± 0.011	0.051 ± 0.009	0.053 ± 0.008	0.050 ± 0.007	0.045 ± 0.012	0.050 ± 0.013	0.056 ± 0.020	0.052 ± 0.008
Glu	154 ± 9	154 ± 10	156 ± 11	153 ± 11	129 ± 16	134 ± 9	132 ± 7	135 ± 11
TG	58 ± 17	60 ± 16	70 ± 14	71 ± 15	39 ± 7	42 ± 6	45 ± 31	53 ± 20
T-Cho	62.1 ± 4.4	63.4 ± 5.1	62.7 ± 2.2	62.4 ± 4.3	73.8 ± 3.9	77.6 ± 7.5	75.0 ± 7.7	75.7 ± 6.2
BUN	23.6 ± 2.5	22.1 ± 2.2	20.8 ± 1.9 ^{**}	22.1 ± 1.9	20.4 ± 2.6	20.4 ± 3.1	19.5 ± 2.6	18.9 ± 3.0
Cr	0.37 ± 0.04	0.35 ± 0.03	0.34 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.34 ± 0.03	0.34 ± 0.04	0.34 ± 0.04	0.32 ± 0.03
Na	142.9 ± 0.6	142.8 ± 0.4	142.3 ± 1.9	143 ± 0.5	142.5 ± 0.7	142.1 ± 0.7	142.2 ± 0.8	141.5 ± 0.8 [*]
Cl	102.6 ± 0.8	102.3 ± 0.7	101.7 ± 1.5	102.4 ± 0.5	102.8 ± 2.9	103.8 ± 0.6	104.1 ± 0.6	103.0 ± 0.8
K	4.3 ± 0.2	4.3 ± 0.2	4.3 ± 0.2	4.3 ± 0.1	4.0 ± 0.1	4.0 ± 0.2	4.1 ± 0.1	4.1 ± 0.1
Ca	10.4 ± 0.2	10.4 ± 0.1	10.5 ± 0.1	10.4 ± 0.2	10.0 ± 0.2	10.1 ± 0.2	10.1 ± 0.2	10.0 ± 0.1
IP	5.6 ± 0.6	5.5 ± 0.7	5.6 ± 0.7	5.7 ± 0.7	5.0 ± 0.8	4.5 ± 0.5	4.6 ± 0.6	4.5 ± 0.5
AST	86 ± 16	92 ± 17	87 ± 18	85 ± 15	84 ± 7	81 ± 7	77 ± 6 [*]	73 ± 5 ^{**}
ALT	58 ± 7	62 ± 7	57 ± 7	53 ± 6	56 ± 12	57 ± 9	53 ± 6	48 ± 9
ALP	719 ± 81	684 ± 57	665 ± 46	651 ± 82	462 ± 56	428 ± 53	419 ± 61	409 ± 41
γ-GTP	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3

^a Mean ± SD

Abbreviations; RBC, red blood cell; Hb, hemoglobin; Ht, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; Plt, platelet; WBC, white blood cell; TP, total protein; A/G, albumin/globulin ratio; Alb, albumin; T-Bil, total bilirubin; Glu, glucose; TG, triglyceride; T-Cho, total cholesterol; BUN, blood urea nitrogen; Cr, creatinine; Na, sodium; Cl, chloride; K, potassium; Ca, calcium; IP, inorganic phosphate; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; γ-GTP, gamma glutamyl transpeptidase.

^{**} Significantly different from control group at p<0.05, 0.01. (Dunnett's test.)

Table 2. Final body and organ weights for F344 rats treated with 2,3-pentanedione for 90 days.

Sex	Male				Female			
	Control	10 mg/kg bw	30 mg/kg bw	100 mg/kg bw	Control	10 mg/kg bw	30 mg/kg bw	100 mg/kg bw
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10	10
Body weight (g)	327 ± 13 ^a	323 ± 14	325 ± 11	325 ± 12	173 ± 6	176 ± 8	176 ± 7	174 ± 9
Absolute (g)								
Brain	1.98 ± 0.05	1.99 ± 0.02	1.99 ± 0.05	1.98 ± 0.02	1.811 ± 0.017	1.81 ± 0.03	1.80 ± 0.04	1.81 ± 0.03
Thymus	0.233 ± 0.051	0.204 ± 0.039	0.190 ± 0.041	0.179 ± 0.014 **	0.154 ± 0.017	0.158 ± 0.012	0.153 ± 0.009	0.161 ± 0.036
Lungs	1.05 ± 0.11	1.06 ± 0.08	1.05 ± 0.08	1.11 ± 0.11	0.81 ± 0.19	0.78 ± 0.06	0.79 ± 0.08	0.75 ± 0.08
Heart	0.92 ± 0.04	0.92 ± 0.06	0.91 ± 0.04	0.91 ± 0.03	0.55 ± 0.02	0.56 ± 0.03	0.56 ± 0.03	0.56 ± 0.03
Spleen	0.56 ± 0.01	0.56 ± 0.03	0.57 ± 0.03	0.56 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.35 ± 0.02
Liver	7.90 ± 0.36	7.73 ± 0.47	7.90 ± 0.24	7.94 ± 0.45	3.71 ± 0.18	3.80 ± 0.26	3.72 ± 0.22	3.88 ± 0.21
Adrenals	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.01
Kidneys	1.80 ± 0.09	1.85 ± 0.08	1.81 ± 0.07	1.83 ± 0.11	1.04 ± 0.03	1.08 ± 0.05	1.08 ± 0.06	1.07 ± 0.06
Testes	3.157 ± 0.152	3.182 ± 0.116	3.101 ± 0.244	3.137 ± 0.112	0.048 ± 0.005	0.046 ± 0.010	0.048 ± 0.008	0.051 ± 0.006
Relative (g%)								
Brain	0.61 ± 0.02	0.62 ± 0.03	0.61 ± 0.03	0.61 ± 0.02	1.05 ± 0.04	1.03 ± 0.04	1.03 ± 0.05	1.04 ± 0.04
Thymus	0.071 ± 0.015	0.061 ± 0.011	0.059 ± 0.015	0.055 ± 0.004 **	0.089 ± 0.010	0.091 ± 0.009	0.086 ± 0.005	0.083 ± 0.033
Lungs	0.32 ± 0.03	0.33 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.34 ± 0.04	0.47 ± 0.12	0.44 ± 0.03	0.45 ± 0.04	0.43 ± 0.05
Heart	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.02
Spleen	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.00	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.20 ± 0.01
Liver	2.42 ± 0.07	2.39 ± 0.10	2.43 ± 0.06	2.44 ± 0.07	2.14 ± 0.06	2.16 ± 0.09	2.11 ± 0.06	2.23 ± 0.11
Adrenals	0.012 ± 0.001	0.012 ± 0.001	0.012 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.026 ± 0.003	0.025 ± 0.003	0.023 ± 0.002 *	0.026 ± 0.004
Kidneys	0.55 ± 0.03	0.57 ± 0.02	0.56 ± 0.02	0.56 ± 0.02	0.60 ± 0.01	0.61 ± 0.02	0.61 ± 0.01	0.62 ± 0.02
Testes/Ovaris	0.966 ± 0.055	0.986 ± 0.059	0.953 ± 0.070	0.966 ± 0.043	0.028 ± 0.002	0.026 ± 0.006	0.027 ± 0.004	0.029 ± 0.004

^a Mean±SD

^{a,**} Significantly different from control group at p<0.05, 0.01. (Dunnett's test.)

Table 3. Histopathological findings for F344 rats treated with 2,3-pentanedione for 90 days.

Sex Item / Dose	Male				Female			
	Control	10 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	Control	10 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10	10
Stomach								
Forestomach								
Hyperplasia, squamous cell, focal	0	0	0	10 **	0	0	0	8 **
Hyperkeratosis, focal	0	0	0	10 **	0	0	0	8 **
Erosion/ulcer, focal	0	0	0	7 **	0	0	0	5 *
Inflammation, (slight/moderate)	0	0	0	8 (1/7) **	0	0	0	7 (2/5) **
Heart								
Inflammatory cell infiltration, minimal	4	-	-	4	1	-	-	0
Kidney								
Cyst, tubule	0	-	-	0	1	-	-	0
Mineralization, minimal	0	-	-	0	0	-	-	1
Prostate								
Inflammatory cell infiltration, minimal	3	-	-	5	-	-	-	-
Pituitary								
Cyst, anterior lobe	0	-	-	1	0	-	-	0
Pancreas								
Atrophy, acinar cell, minimal	0	-	-	0	0	-	-	1
Harderian gland								
Inflammation, minimal	0	-	-	0	0	-	-	2

** Significantly different from control group at p<0.05, 0.01. (Fisher's exact test)