

2004-00013A

別添1

厚生労働科学研究研究費補助金

厚生労働科学特別研究事業

アカネ色素の発がん機構に関する実験的研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 広瀬 雅雄

平成17（2005）年 4月

目 次

I. 総括研究報告書	
アカネ色素の発がん機構に関する実験的研究	1
広瀬雅雄	
II. 分担研究報告書	
1. アカネ色素のラット腎尿細管における毒性、 細胞増殖と酸化性ストレスに関する実験的研究	8
広瀬雅雄	
(資料) 図 1-7、表 1-3	
2. トランスジェニックラットを用いたアカネ色素の 発がん標的臓器における遺伝毒性に関する研究	12
林 真	
(資料) 表 1-4	
3. ラット中期多臓器発がん試験法を用いたアカネ色素の評価	18
今井田 克己	
(資料) 図 1、表 1-2	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	21
IV. 研究成果の刊行物・別刷	22

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別）
 総括研究報告書（平成16年度）
 アカネ色素の発がん機構に関する実験的研究（H16-特別-018）

分担研究者 広瀬雅雄 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長

研究要旨：本研究では、既存添加物であるアカネ色素による発がんメカニズムを追求する目的で、遺伝子に対する直接傷害性と酸化ストレスの関与について検討した。また、以前行われた二種類のアカネ色素製品のラット中期多臓器発がん性試験において、最高5%の混餌用量で16週間投与してもいずれの臓器にも発がん促進作用ないし発がん性を認めていない。そこで、腎臓および肝臓におけるアカネ色素の発がんプロモーション作用を検索するために、同モデルを用いて投与期間を更に延長して、20週まで経過した時点での検討を行った。腎臓発がん性に対する酸化ストレスの関与についての検討では、雄性F344ラットにアカネ色素を0, 0.1, 1.0, 5.0%の用量で混餌投与し、投与後3日, 1週, 4週, 13週目に腎臓を採取し、病理組織学的検索、proliferating cell nuclear antigen (PCNA)とnitrotyrosineの免疫組織化学的検索を実施した。その結果、アカネ色素による腎腫瘍好発部位である髄質外帯の近位尿細管上皮に、細胞壊死・脱落を伴わない二峰性の細胞増殖を認め（1週目までと13週目）、そのピークの間（4週目）これらの尿細管上皮細胞に散在性の核の大小不同が出現し始めた。病理形態学的には、投与1週目までに皮質に存在する近位尿細管上皮の硝子滴変性の発生が増強されたものの、4週目以降では自然発生性の硝子滴変性と好酸性小体の発生は逆に抑制された。また、投与1週目より皮質近位尿細管上皮細胞の空胞変性や好塩基性変化が出現し、4週目では前述の核の大小不同が散見され、13週目では皮質における巣状の尿細管再生像が見出された。更に、投与初期からnitrotyrosine陽性の近位尿細管上皮細胞が増加したことから、細胞増殖を含む一連の変化に、一酸化窒素ラジカルとスーパーオキシドとの反応による酸化ストレスの関与が示唆された。また、一連の変化は、1.0%以上の反応であったため、現時点の解析でアカネ色素の腎臓影響のNOAELは0.1%となった。現在、腎髄質外帯でのマイクロアレイによる細胞増殖や酸化ストレスの反応主成分の解析やその他の酸化ストレスの最終産物の解析、NOの関与の有無について検討を加えている。アカネ色素による遺伝子傷害性に関する検討として、レポーター遺伝子を導入した突然変異検出系であるトランスジェニックラット（Big Blue™ Rat）を用いて、1.0, 5.0%の混餌によるアカネ色素の28日間反復投与を行い、腎臓に対する遺伝子突然変異誘発性の検討を行った。導入遺伝子（シャトルベクター上のcII遺伝子）の突然変異を解析した結果、アカネ色素は1.0, 5.0%群の何れにおいても、遺伝子突然変異頻度は媒体対照に比較し統計学的に有意な上昇が認められた。別の班研究で、本研究で用いた腎臓における8-ヒドロキシグアノシン（8-OHdG）を測定した結果、1.0及び5.0%群で増加を認めたことから、本研究で確認された腎臓での遺伝子突然変異頻度の増加傾向と符合しており、腎臓発がんのメカニズムとして生体内酸化ストレスの亢進によるDNA酸化障害、ひいては遺伝子突然変異の誘発というイニシエーション作用の可能性が示唆された。ラット中期多臓器発がん性試験モデルを用いたアカネ色素による肝・腎の発がんプロモーション作用に関する検討では、F344雄ラット100匹を用い、N-nitrosodiethylamine (100 mg/kg), N-methyl-N-nitrosourea (20 mg/kg), N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (0.1%飲料水)を投与してDMDモデルを作製した。DMD処置をした動物を4群に分け、5.0%, 2.5%, 0%(デキストリン対照), 0% (基礎飼料対照)のアカネ色素を混餌投与した。現在、DMD処置を終了し、アカネ色素の投与を開始して8週を経過しており、実験は順調に経過している。

分担研究者

広瀬雅雄
 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長

林 真
 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部長

今井田 克己
 香川大学医学部 腫瘍病理学 教授

A. 研究目的

アカネ色素 (Madder color) は、アカネ科セイヨウアカネ (*Rubia tinctorum* LINNE) の根から抽出される天然のアントラキノン系色素であり、その本成分は Alizarin, Ruberythric acid と Lucidin-3-O-primeveroside である。この色素は、本邦においてハム・ソーセージ等の畜肉加工品や菓子類の着色料として使用されてきている。この色素の毒性に関しては、SD 系ラットにおける 14 日間反復経口投与試験の LD50 値が雌雄とも 5,000 mg/kg 以上であり、B6C3F1 系マウスに 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3% の割合で 90 日間混餌投与した結果、雌雄ともに毒性学的影響は認められないと報告されている。一方、変異原性に関しては細菌を用いた復帰変異試験では代謝活性化の有無に関わらず陽性、細菌を用いた DNA 修復試験 (Rec assay) では代謝活性化なしで弱陽性、ddY マウスを用いた小核試験では陰性、ラット肝細胞及びマウス肝細胞を用いた DNA adduct 試験で陽性であった。発がん性に関しては、diethylnitrosamine, *N*-methylnitrosurea 及び *N*-bis (2-hydroxypropyl)nitrosamine を処置した雄の F344 系ラットに 2 種類のアカネ色素製品をそれぞれ 5 及び 2.5% の用量で 16 週間混餌投与した多臓器中期発がん性試験において、いずれの臓器においても発がん促進作用が認められていないとの報告があるが、最近、ACI/SegHsd ラットを用いた 780 日間反復投与による発がん性試験において有意差はないものの肝臓と腎臓に腫瘍の増加が見られたとの報告がなされた。

厚生労働省の委託事業として行われている既存添加物の安全性再評価研究のうち、国立医薬品食品衛生研究所病理部においてアカネ色素のラットを用いた発がん性試験を実施しているが、投与動物の腎臓について病理組織学的な評価を行ったところ、この色素は高頻度に尿管腺腫・腺がんを誘発することが判明し、平成 15 年度の間報告書にその結果を報告した。これを受けて平成 16 年 7 月 2 日に、食品安全委員会専門委員会においてアカネ色素に係わる食品健康影響が評価された。そして、この色素あるいはその構成成分である Lucidin が各種の遺伝毒性試験において陽性を示していることから、今回報告された発がん性のメカニズムとして遺伝子の直接傷害性の可能性が示唆されたため、一日許容摂取量 (ADI) を設定できないと結論され、アカネ色素は既存添加物名簿から削除され、同色素及びそれを使用した食品の製造、販売、輸入等が

禁止された。食品安全委員会の報告書においては、アカネ色素のリスク評価において、「今後とも情報収集が必要である。」及び「発がんメカニズムの一端を遺伝毒性が担う可能性は高いものと考えられるが、現時点では、それを証明する証拠が十分であるとは言えない。」と明記されており、今後とも、発がん性に関する情報収集や研究を迅速に推進していく必要がある。上述の発がん性試験におけるその後の検索で、腎臓のみならず雌雄の肝臓に対する発がん標的性も確認されている。

以上、アカネ色素は複数の臓器に発癌性を示し DNA 付加体も形成することから、その発がん性メカニズムとして遺伝子の直接傷害性の可能性が示唆されているものの、ヒトに対する安全性を評価するために必要な試験結果は極めて乏しい。この色素はキノン系色素であるため、その発がんにキノンラジカルの生成による酸化ストレスの関与が考えられ、酸化ストレスは酸化 DNA 損傷を引き起こし、その中で特に 8-ヒドロキシグアノシン (8-OHdG) は DNA 複製の際に G:C から T:A の塩基置換変異を起こすことから、発がんへの関与が注目されている。また、前述の多臓器中期発癌性試験では、プロモーションの期間が不十分であったため、腎臓及び肝臓に対する発がんプロモーション作用が検出されなかった可能性が指摘される。本研究では、このような経緯を踏まえて、アカネ色素による発がん性について、①腎臓での酸化ストレスによる細胞傷害性の関与の有無とそのタイミングについての経時的な解析、②トランスジェニックラットを用いた遺伝毒性に関する解析、及び、③ラット中期多臓器発がん性試験法による発がん標的性に関する評価研究を行った。

B. 研究方法

使用したアカネ色素は、実験間で統一し、色価が 214 (10%E)、Ruberythric acid 換算で 16.85%、色素成分の比率が Ruberythric acid; 46.5%: Lucidin-3-O-primeveroside; 20.0%: Alizarin; 7.3% (HPLC 分析) のものを用いた。尚、被験物質は分状を保つために、賦形剤としてデキストリンが 30% の割合で添加されているため、以下に述べる混餌投与の際には、各群で飼料中のその含量が同じになるように、デキストリンを添加した。

①腎尿細管における毒性，細胞増殖，酸化性ストレスに関する研究（広瀬）

動物は5週齢の雄性F344ラットを日本チャールズ・リバーから購入し，一週間の馴化後，4群（24匹/群）に分け，発がん性試験において明らかに腎発がん性が認められた濃度を最高用量として，アカネ色素を0, 0.1, 1.0, 5.0%の用量で混餌投与した（デキストリン添加量はそれぞれ，1.5, 1.47, 1.2, 0%）。アカネ色素の投与後3日，1週，4週，13週目に経時的に各群6匹について腎臓を採取し，動物実験を終了した。採取した腎臓について，現在までに，病理組織学的検索を実施し，出現した病変についてはその強さを求め，群当たりの発生頻度も求めた。免疫組織化学的検索として，細胞増殖の指標である proliferating cell nuclear antigen (PCNA)及び一酸化窒素による蛋白質修飾の指標である nitrotyrosine について，それぞれマウス・モノクローナル抗体(Dako, clone PC10, x100)，イムノアフィニティー精製したウサギ IgG 抗体 (Upstate, x2000)を用いて，ABC法にて実施した。尚，nitrotyrosine については投与4週目まで検討し，13週目に関しては今後実施する予定である。

②トランスジェニックラットを用いた遺伝毒性に関する研究（林）

動物は，4あるいは6週齢の雄 Big Blue™ Rat [F344]を Taconic 社 (Germantown, NY : 米国)より購入し，1週間の検疫・馴化の後，試験に用いた。動物は温度 24.5±2.5℃，湿度 55±20%，照明 12時間 (7:00点灯，19:00消灯)，換気回数 1時間あたり 8回に設定したラット飼育室（組替え DNA 実験指針；昭和 54年 8月 27日 内閣総理大臣決定，平成 3年 9月 24日 改訂による物理的封じ込めに係わる施設）で，Micro-Isolator™ System (Lab Products Inc.) ラックを使用し，飼育ケージに動物を 1匹ずつ収容して飼育した。粉末飼料（基礎飼料，放射線滅菌改良 NIH 公開ラット，マウス飼料：オリエンタル酵母工業株式会社）を自由摂取させた。また，水道水を自動給水ノズルより自由摂取させた。

被験物質添加飼料は基礎飼料にアカネ色素を添加し数分間混和することにより調製した。また，各飼料におけるデキストリン濃度も同一になるよう調整した。被験物質添加飼料は週 1回調製し，室温にて保存した。

投与方法および投与期間に関しては，腎発がん用量である 5.0%を高用量とし，以下 1.0%の計 2用量を設定した。また，トランスジェニック動

物を用いる遺伝子突然変異試験での投与期間に関しては Thybaud 等が 28日間の反復投与を推奨しているため，各用量について 1群 6匹のトランスジェニックラットを用い 28日間の混餌投与を行った。最終投与 3日後に各個体から腎臓，肝臓および十二指腸を摘出し，速やかに液体窒素で凍結した後，-80℃で保存した。陽性対照群にはオリブ油に溶解した 7, 12-ジメチルベンズ [a] アントラセン (DMBA) 20 mg/kg を 1回投与し，14日後に各器官を摘出した。

ゲノム DNA の抽出として，ダウンス型ホモジナイザーに腎臓の凍結組織片 (20~30 mg) に組織破碎用緩衝液を加えてホモジナイズした後，あらかじめ 0.5 mol/L ショ糖溶液を入れて氷冷しておいた遠心管に上記の組織破碎液を重ねし，遠心した。RNase 含有ダウンス緩衝液および proteinase K 溶液を加えて消化させた。等量のフェノール/クロロホルム混液 (容量比 1:1) を加えて混和後，遠心し，上層の水層を回収し，本操作を 2回繰り返した。回収した水相と等量のクロロホルム/イソアミルアルコール混液 (容量比 24:1) を加えて混和後，遠心し，上層の水層にエタノールを加えてゲノム DNA を析出させた。析出したゲノム DNA に TE 緩衝液を加え，一晚室温に放置し溶解させた。

試験菌株の調製として，バツフル付三角フラスコに 30 mL の LB 培養液，マルトース水溶液 (200 mg/mL) ならびに 1 mol/L 硫酸マグネシウム水溶液をそれぞれ 300 μL ずつ添加したのち，大腸菌 hfl⁻株 (G1225) 懸濁液 50 μL を接種した。30℃，120 回/分の振盪条件で一晩培養し，前培養液とした。別のバツフル付三角フラスコに新鮮な LB 培養液 100 mL およびマルトース水溶液ならびに 1 mol/L 硫酸マグネシウム水溶液をそれぞれ 1 mL を添加し，次いで先の前培養液を 1 mL 殖菌した後，同様に 4時間培養を続けた。培養終了後，菌懸濁液を遠心分離し，ペレットについて 10 mmol/L の硫酸マグネシウムを含む LB 培養液を用いて再懸濁した後，試験に使用するまで 4℃で保管した。

調製したゲノム DNA 溶液の *in vitro* パッケージング反応は，Transpack (Stratagene) を用いて行った。次いで，大腸菌懸濁液を総プラーク算出用 (タイター用) ならびに突然変異算出用 (セレクション用) に分取した。パッケージング溶液の全量をセレクション用チューブに加えた後，室温に 30分間放置してファージを大腸菌に感染させた。本溶液を 30 μL とり 10 mmol/L の硫酸

マグネシウムを含むLB培養液で10倍希釈した。本溶液 30 μ L をタイター用チューブに加え攪拌した後、LB 寒天培地に全量を重層した。セレクション用チューブについても同様にLB 寒天培地に重層した。セレクション用プレートは 24.5°C、タイター用プレートは 37°C でそれぞれ 48 時間培養した後、出現したプラーク数を計数した。プラーク数が 400,000 に達するまで上記のパッケージング操作を繰り返した。

各試験群の *cH* 遺伝子の突然変異頻度は条件付き二項検定 (Kastenbaum and Bowman の推計学的方法：有意水準上側 0.05) を用いて有意差を判定した。被験物質投与群において統計学的な有意差が認められた場合、陽性と判定した。ただし、最終的な判定は試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行った。

③ラット中期多臓器発がん性試験法による発がん標的性評価 (今井田)

動物は、5 週齢の F344/DuCrj 雄ラットを用い、一週間の馴化期間の後 6 週齢より実験を開始した。動物の飼育はバリアーシステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度 24 \pm 2°C、湿度 60 \pm 10%、12 時間蛍光灯照明、12 時間消灯の条件下で行っている。動物は全て網ケージに 5 匹づつ飼育し、飲料水として、DHPN の投与時期以外は水道水を自由に摂取させた。また、DHPN の水溶液も自由に摂取させた。

アカネ色素は基礎飼料 (CRF-1, オリエンタル酵母) 中に 5.0, 2.5, 0% の濃度で混じた。尚、アカネ色素：デキストリンの濃度は、5.0%:0%, 2.5%:0.75%, 0%:1.5% として、更に何も添加しない基礎食の対照群も設け、対照群とした。

実験は、F344 ラット 100 匹を 5 群に分け、1 から 4 群には複数の臓器にイニシエーションを行う目的で、DEN(100mg/kg b.w.) を単回腹腔内投与し、さらに MNU(20mg/kg b.w.) を第 1 および第 2 週にかけて計 4 回腹腔内投与し、DHPN(0.1% 飲料水) を第 3 週から第 4 週にかけて 2 週間飲水投与した (DMD 処置)。第 5 群には DMD 処置の溶媒対照群として 3 種の発癌物質の溶媒のみを投与した。実験開始 4 週目より第 1 から 3 群にはアカネ色素を 5.0%, 2.5%, 0% の濃度で経口投与を開始した。なお、前述のようにこれらの飼料にはデキストリンをそれぞれ 0%, 0.75%, 1.5% 含有している。第 4 群にはデキストリンを含有しない基礎飼料 (CRF-1) を、同様に第 5 群には基礎飼料のみを投与している。実験終了時、エーテル麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、肺、

心、肝、脾臓、胸腺、両側腎、両側副腎、脳など主要臓器の臓器重量を計測後、中性緩衝ホルマリンで固定し、定法に従い組織標本を作製し、病理組織学的に詳細に検討し、各臓器の前がん病変を含む各種病変を検出する。なお、肝に関しては胎盤型 Glutathione S-transferase placental form (GST-P) による免疫染色を行い、肝の前がん病変である GST-P 陽性巣の肝切片当たりの発生個数、面積を画像処理装置 (IPAP Win, Sumika Techno-service Co.) を用いて計測し、各群の値を比較検討する予定である。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌による経口投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育、管理に当たっては、大学、研究所のそれぞれの利用規程に従った。

C. 研究結果

①腎尿細管における毒性、細胞増殖、酸化性ストレスに関する研究 (広瀬)

体重は 5.0% 投与群で投与 3 日目より減少を示し、13 週目まで続いた。摂餌量は、5.0% 群において 3 日目、1, 3, 4 週目で低下し、4 週目では 1.0% 群も若干低値を示したが、5 週目以降は群間での明らかな差は認められなかった。

剖検時の体重は 5.0% 投与群で投与 1 週目より減少を示し、13 週目まで続いた。4 週目では 1.0% でも低値を示したが、この群では 13 週目では回復した。腎臓重量は各時期で絶対重量に群間での明らかな差はなかった。比重量に関しては、3 日目に 1.0% 群でごく軽度の増加を示したが、5.0% 群では明らかな変化を示さなかった。1 週目では、1.0% 以上で用量依存的に増加を示した。しかし、4 週及び 13 週では 5.0% のみで有意な増加を示した。

病理組織学的に、投与 3 日目で 1.0% 以上に皮質近位尿細管上皮の硝子滴変性が出現した。1 週目では 5.0% で、2-3 個の明瞭な核小体を有し細胞質が好塩基性変化や空胞変性を示す近位尿細管上皮が、皮質に巣状に出現し、これらの一部に apoptosis や核分裂像が認められた。皮質の近位尿細管上皮の硝子滴変性は、対照群を含む全群に認められたが、1.0% でその強度の増強が認められた。4 週目では皮質近位尿細管上皮の空胞変性の増強が 5.0% で認められたが、この変化は、

後述する細胞質が好塩基性変化を示す上皮以外の近位尿細管上皮にも認められた。また、対照群で出現した皮質近位尿細管上皮の硝子滴変性や好酸性小体が1.0%以上でその強度が減少し、5.0%では極軽度に推移するか、あるいは殆ど認められなくなった。この時期でも5.0%で尿細管上皮の細胞質の好塩基性変化は巣状に出現したが、これらの細胞にapoptosisや核分裂像は認められなかった。また、この時期から髓質外帯の近位尿細管上皮の核の大小不同を示す例が0.1%群から認められ、5.0%から有意に出現した。13週目では、皮質近位尿細管上皮の空胞変性は対照群でも認められたが、5.0%でその強度は有意に増加した。また、4週目と同様に、この時期でも硝子滴変性の減少が5.0%で、好酸性小体の減少が1.0%以上で認められた。また、5.0%でネフロン単位の再生尿細管が巣状に出現し、髓質外帯の近位尿細管上皮の核の大小不同を示す例が0.1%群から認められ、5.0%で有意に出現した。

PCNA免疫染色の結果、髓質外帯の近位尿細管上皮における陽性細胞が多く認められ、実験開始の時期から翌週(生後6-7週目)にかけて、これらの尿細管においてPCNA陽性細胞率(PI)は無処置対照と比較的高く推移していたが、その後経時的に減少していった。アカネ色素投与によって、PCNA-PIは3日目、1週目で用量依存的に増加し、1.0%以上でその増加は有意であった。ところが、投与4週目においては、いずれの濃度においてもPCNA-PIの変動を認めなかった。一方、13週目では、有意差はないものの0.1%以上でPCNA-PIは増加傾向を示し、5.0%で明らかに増加した。

Nitrotyrosineの免疫染色の結果、無処置対照ではどの時点でも、近位尿細管上皮の細胞質がネフロン単位で巣状に陽性を示した。アカネ色素投与によって、3日目の時点より1.0%以上で陽性を示す近位尿細管上皮の領域が拡大を示し、5.0%では皮質の殆どの近位上皮が陽性を示した。また、0.1%では無処置対照と同程度であった。この染色性は1週目、4週目でも同様であったが、1週目では1.0%でその程度に有意差は認められなかった。

②トランスジェニックラットを用いた遺伝毒性に関する研究(林)

媒体対照群においては総プラーク数3,574,800の内、変異プラークが92出現し、その突然変異頻度は 25.7×10^{-6} 、各個体の平均値では 25.3×10^{-6} であった。それに対し、アカネ色素投与群での

突然変異頻度は1.0%群で 41.1×10^{-6} (変異体数/総コロニー数:101/2,457,000)、5.0%群で 41.0×10^{-6} (同:106/2,586,600)であり、媒体対照群と比較していずれの投与群とも統計学的に有意な増加が認められた($p < 0.01$)。各個体の平均値は1.0および5.0%でそれぞれ42.4ならびに 41.2×10^{-6} であった。一方、肝臓に対する陽性対照であるDMBA群の腎臓での突然変異頻度は 27.9×10^{-6} (同:42/1,506,600)であったが、標的臓器の肝臓では 78.2×10^{-6} (同:115/1,469,700)に増加しており、媒体対照群に比べて統計学的に有意($p < 0.01$)な増加が認められた。各個体の平均値は腎臓で 27.7×10^{-6} 、肝臓で 78.6×10^{-6} であった。

投与期間中の体重の推移として、高用量の5.0%群では対照群と比べ投与1週以降継続的に低値を示し、器官摘出時では10%以上の減少を示した。また、投与1~4週の体重増加量も低値を示した。摂餌量についても体重増加抑制の認められた5.0%群では投与1週以降4週まで低値を示した。

③ラット中期多臓器発がん性試験法による発がん標的性評価(今井田)

現在8週を経過しているが、DMD処理を行わない第5群に比べて、DMD処理を行った他の群の体重増加は抑制されている。アカネ色素の投与を開始した4週からの体重は8週の時点で第1群から第3群でアカネ色素の投与用量に関連した体重増加の抑制を認めている。それぞれの平均体重は第1群から第3群でそれぞれ193.8, 205.5, 223.4gであった。なお、第3群と4群間でDextrinの投与の有無による体重の差は見られておらず、それぞれの平均体重は223.4と224.0gであった。

摂水量と摂餌量の推移は、DMD処理後5.0%および2.5%のアカネ色素を投与している第1群と第2群はDMD処理のみの第4群に比べて、8週の時点での摂餌量は統計学的に有意に減少していた。

D. 考察

①腎尿細管における毒性、細胞増殖、酸化性ストレスに関する研究(広瀬)

今回の研究により、アカネ色素は投与初期(3日目)には1.0%以上で近位尿細管上皮の硝子滴変性をもたらしたが、4週以降では逆に自然発生性の硝子滴変性をこの用量から抑制し、好酸性小体の発生も1.0%以上で抑制した。これらの二相性の変化の原因及び投与初期に誘発された硝

子滴と自然発生性の硝子滴との相同性の有無は不明である。自然発生性の好酸性小体は雄のラットの肝臓で生成される $\alpha 2u$ グロブリンであると言われており、この物質はまず硝子滴として蓄積し、ライソゾーム内での部分分解により好酸性小体となる。その上皮内への高度の蓄積により、尿細管の壊死・再生が繰り返され、いわゆる $\alpha 2u$ グロブリン腎症が誘発される。現在までに多くの化学物質が雄ラットに対して好酸性小体を誘発することが知られており、これによる腎臓がんの報告もある。現在解析中のアカネ色素によるがん原性試験の結果では、雌に比べ、雄で腎臓がんが明らかに強く誘発されている。しかし、今回明らかになった結果として、4週以上の投与で自然発生性の好酸性小体の発生がアカネ色素により抑制されていること、及びこの病変の発生部位がアカネ色素による腎腫瘍の好発部位である髄質外帯ではなく皮質であることから、アカネ色素による発がん過程に $\alpha 2u$ グロブリン腎症の関与はないものと判断された。以前実施した90日間反復投与試験においても、投与90日目(13週目)で好酸性小体の発生が用量依存的に抑制されている。

また、髄質外帯の近位尿細管におけるPCNAの染色性の経時的検索により、明らかな尿細管壊死・脱落を伴わずに投与初期に1.0%以上で細胞増殖を誘発し、13週目にも5.0%濃度で再度細胞増殖活性を亢進するという二峰性の変化を示すことが明らかとなった。この細胞増殖のシグナルに関してはマイクロアレイ解析によりこれから検討を加えるが、一旦生じた細胞増殖亢進が抑制されたことは、この二つの増殖ピークの間、後述するDNA傷害性が蓄積され、 G_1 -S-G₂ arrestの生じている可能性が示唆された。以前実施した90日間反復投与試験においても、投与90日目(13週目)でPCNA-PIが用量依存的に増加している。

Nitrotyrosineの免疫染色により、近位尿細管上皮における陽性所見が、1.0%以上で3日目から増加したことから、今回初めてアカネ色素によって誘発された細胞増殖を含む一連の変化に、一酸化窒素ラジカルとスーパーオキシドとの反応による酸化ストレスの関与が示唆された。一方、投与4週目から、アカネ色素による腎臓がんの好発部位である髄質外帯の近位尿細管上皮に、明らかな尿細管壊死・脱落を伴わずに核の大小不同を認めているが(5.0%で有意)、この核変化は何らかの核機能の障害を示唆し、発がん

と関連した細胞分裂異常と捉える報告もある。また、13週目に至ると、最高用量でこの部位での細胞増殖能が再度亢進し、アカネ色素によって誘発される酸化ストレスがDNA傷害性と共に細胞増殖シグナルも亢進させている可能性が示唆され、その発がんメカニズム解明の一端が開かれたと考えられる。

以上、アカネ色素投与により腎臓に認められた変化は、1.0%以上の反応であったため、現時点の解析でアカネ色素の腎臓影響のNOAELは0.1%となった。現在、免疫染色によるinducible NO synthaseの局在、ELISA法による8-OHdG、acroleinの定量や、レーザーマイクロダイセクション法を利用して、慢性毒性試験、発がん性試験で異型尿細管や腺腫・腺がんが高頻度に認められた腎髄質外帯部をメタカーン固定パラフィン切片から採取し、部位特異的なマイクロアレイ法による発現遺伝子の網羅的解析を、Affymetrix Rat RAE230A Arrayを用いて継続中である。また、アカネ色素の構成成分についても最長13週間投与し、腎毒性の程度を比較するとともに、発がん性への関与の有無について明確にする。

②トランスジェニックラットを用いた遺伝毒性に関する研究(林)

アカネ色素投与群では1.0および5.0%群のいずれにおいても遺伝子突然変異頻度の統計的に有意な増加が認められた。本被験物質のアカネ色素は混餌投与において腎臓並びに肝臓に腫瘍を誘発することが確認されているが、本結果から腎臓での遺伝子突然変異が発がんに寄与している可能性があるものと推察された。

一方、厚生労働科学研究費補助金(食品の安全性高度化推進研究事業)の既存添加物等における遺伝毒性の評価のための戦略構築に関する研究(主任研究者:林真(国立医薬品食品衛生研究所))において、本研究で使用したラットの肝臓について同様の遺伝子突然変異の解析を実施した。肝臓については遺伝子突然変異の明確な増加は認められず、陰性結果が得られている。さらに、*c H*遺伝子の突然変異解析に用いなかったもう一方の腎臓について分担研究者の葛西が酸化DNA傷害の指標である8-OHdGを測定した。その結果、DNA中の8-OHdG量は10⁶dGあたり媒体対照群で1.22、アカネ色素1.0%混餌投与群で3.74、同5.0%群で2.14であり、いずれの投与群とも統計的に有意(p<0.05)な増加を示していた。このことは、本研究で確認された腎臓での遺伝子突然変異頻度の増加傾向と符合しており、腎臓がんのメカニズ

ムとして生体内酸化ストレスの亢進による DNA 酸化障害、ひいては遺伝子突然変異の誘発というイニシエーション作用の可能性が示唆されたものと考えられた。

③ラット中期多臓器発がん性試験法による発がん標的性評価 (今井田)

本研究では、DMD 処理による以前の多臓器中期発がん性試験で腎に対する発がん促進作用が確認できなかった点の解析を含めて、肝・腎、あるいはその他の臓器・組織に対する発がん標的性を明らかにするために実験を遂行中であり、試験終了時にはこれらの疑問点が解明されるものと期待される。

E. 結論

ラットを用いた、腎尿細管における毒性、細胞増殖、酸化性ストレスに関する研究では、アカネ色素による腎腫瘍好発部位での近位尿細管上皮に、細胞壊死・脱落を伴わずに二峰性の細胞増殖を認め(1 週目までと 13 週目)、そのピークの間(4 週目)に核の大小不同が出現し始めた。また、投与初期から nitrotyrosine 陽性の近位尿細管上皮細胞が増加したことから、細胞増殖を含む一連の変化に、一酸化窒素ラジカルとスーパーオキシドとの反応による酸化ストレスの関与が示唆された。また、一連の変化は、1.0%以上の反応であったため、現時点の解析でアカネ色素の腎臓影響の NOAEL は 0.1%となった。トランスジェニックラットを用いた遺伝毒性に関する研究では、アカネ色素は弱いながらもラット腎臓に対して遺伝子突然変異を誘発するものと判断された。ラット中期多臓器発がん性試験法による発がん標的性評価に関しては、実験は現在、実験開始後 8 週を経過し、動物実験は順調に経過している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究業績

論文『英文』

なし

学会発表

井上 薫, 渋谷 淳, 高木広憲, 榊富直哉, 豊田和弘, 李 京烈, 広瀬雅雄: アカネ色素のラ

ットを用いた慢性毒性試験において認められた腎毒性について, 第 138 回日本獣医学会学術集会, 札幌, 第 138 回日本獣医学会学術集会講演要旨集: B-55, p. 60, 9 月, 2004

Hirose, M., Inoue, K., Shibutani, M.: Toxicity and Carcinogenicity of Madder Color in F344 Rats. The 3rd International Symposium on Korea National Toxicology Program. Seoul, 2004,10,12.

井上 薫, 渋谷 淳, 高木広憲, 榊富直哉, 豊田和弘, 李 京烈, 広瀬雅雄: アカネ色素のラット腎および肝に対する発がん性について, 第 21 回日本毒性病理学会, 浜松, 第 21 回日本毒性病理学会講演要旨集: p94 (P-86), 1 月, 2005

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別）

分担研究報告書（平成16年度）

アカネ色素の発がん機構に関する実験的研究（H16-特別-018）

アカネ色素のラット腎尿細管における毒性、細胞増殖と酸化性ストレスに関する実験的研究

分担研究者 広瀬雅雄 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長

協力研究者 渋谷 淳 国立医薬品食品衛生研究所 病理部第二室長

協力研究者 井上 薫 国立医薬品食品衛生研究所 病理部研究員

研究要旨：既存添加物であるアカネ色素による腎発がん性に対する酸化的ストレスの関与について検討を行った。雄性 F344 ラットにアカネ色素を 0, 0.1, 1.0, 5.0% の用量で混餌投与し、投与後 3 日, 1 週, 4 週, 13 週目に腎臓を採取し、病理組織学的検索, 免疫組織化学的検索 (PCNA, nitrotyrosine) を実施した。その結果, 近位尿細管上皮の硝子滴変性が 3 日目の 1.0% 以上の投与群で認められ, 1 週目では対照群を含む全ての動物に認められたが, 1.0% でその強度が増加した。4 週目では, 硝子滴変性に加えて好酸性小体が対照群で認められたが, その発生頻度や程度はアカネ色素投与により逆に用量依存的に低下を示し, 13 週目では 5.0% で完全に抑制された。また, 1 週目に核小体が明瞭化し, 細胞質の空胞変性や好塩基性変化を伴う近位尿細管が 5.0% 群に認められたが, 4 週目にはその程度は軽減し, 13 週目には限局的な再生尿細管が高頻度に認められた。更に, 4 週目以降において, アカネ色素投与により, 髓質外帯の近位尿細管で核の大小不同を示す上皮細胞が認められ, 5.0% でその病変の頻度及び強度は有意であった。この部位での PCNA 陽性細胞率を求めた結果, 3 日目及び 1 週目において, 1.0% 以上でラベリングが増加し, 4 週目では何れの群でも明らかな増加を示さなかったものの, 13 週目で 5.0% 投与により再度増加を示した。nitrotyrosine は 4 週までの検索で, 3 日目より 1.0% 以上で用量依存的に陽性像を示す近位尿細管の領域が拡大を示した。以上の結果から, アカネ色素は尿細管壊死・脱落を伴わずに細胞増殖を誘発することが分かった。また, nitrotyrosine の染色性が増加したことから, アカネ色素による発がん過程の初期には一酸化窒素ラジカルとスーパーオキシドとの反応による酸化的ストレスの関与が示唆された。また, 硝子滴変性や好酸性小体が経時的及び用量依存的に減少したことにより, アカネ色素による発がん過程に $\alpha 2u$ グロブリン腎症の関与は否定された。上記の変化は, 1.0% 以上の反応であったため, 現時点の解析でアカネ色素の腎臓影響の NOAEL は 0.1% となった。現在, 腎皮質でのマイクロアレイによるメカニズムの反応主成分の解析やその他の酸化的ストレスの最終産物の解析, NO の関与の有無について検討を加えている。

A. 研究目的

アカネ色素 (Madder color) は, アカネ科セイヨウアカネ (*Rubia tinctorum* LINNE) の根から抽出される天然のアントラキノン系色素であり, その本成分は alizarin, ruberythric acid と lucidin-3-O-primeveroside である。この色素は, 本邦においてハム・ソーセージ等の畜肉加工品や菓子類の着色料として使用されてきている。厚生労働省の委託事業として行われている既存添加物の安全性再評価研究のうち, 国立医薬品食品衛生研究所病理部においてアカネ色素のラットを用いた発がん性試験を実施しているが, 投与動物の腎臓について病理組織学的な評価を行ったところ, この色素は高頻度に尿細管腺腫・腺がんを誘発することが判明し, 平成 15 年度の中間報告書にその結果を報告した。これを受けて平成 16 年 7 月 2 日に, 食品安全委員会専門委員会においてアカネ色素に係わる食品健康影響が評価された。そして, この色素あるいはその構成成分

である lucidin が各種の遺伝毒性試験において陽性を示していることから, 今回報告された発がん性のメカニズムとして遺伝子の直接傷害性の可能性が示唆されたため, 一日許容摂取量 (ADI) を設定できないと結論され, アカネ色素は既存添加物名簿から削除され, 同色素及びそれを使用した食品の製造, 販売, 輸入等が禁止された。また, 上記の発がん性試験において, 肝臓に対する発がん性も見出されている。

一方で, アカネ色素による発がん性メカニズムとして遺伝子の直接傷害性の可能性が示唆されているものの, ヒトに対する安全性を評価するために必要な試験結果は極めて乏しい。この色素はキノン系色素であるため, その発がん性にキノンラジカルの生成による酸化的ストレスの関与が考えられ, 酸化的ストレスは酸化的 DNA 損傷を引き起こし, その中で特に 8-ヒドロキシングアノシン(8-OHdG)は DNA 複製の際に G:C

から T:A の塩基置換変異を起こすことから、発がんへの関与が注目されている。本研究では、このような経緯を踏まえて、アカネ色素による発がん性について、腎臓での酸化ストレスによる細胞傷害性の関与の有無とそのタイミングについて経時的な解析を行った。

B. 研究方法

アカネ色素は、色価が 214 (10%E), ruberythric acid 換算で 16.85%, 色素成分の比率が ruberythric acid; 46.5%: lucidin-3-O-primeveroside; 20.0%: alizalin; 7.3% (HPLC 分析) のものを用いた。

動物は 5 週齢の雄性 F344 ラットを日本チャールズ・リバーから購入し、一週間の馴化後、4 群 (24 匹/群) に分け、アカネ色素を 0, 0.1, 1.0, 5.0% の用量で混餌投与した。アカネ色素には、賦形剤としてデキストリンが混入してあるため、その飼料中の濃度が投与群間で一致するように添加し、アカネ色素の投与後 3 日, 1 週, 4 週, 13 週目に経時的に各群 6 匹について腎臓を採取し、動物実験を終了した (Fig. 1)。採取した腎臓について、現在までに、病理組織学的検索を実施し、出現した病変についてはその強さを求め、群当たりの発生頻度も求めた。免疫組織化学的検索として、細胞増殖の指標である proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 及び一酸化窒素による蛋白質修飾の指標である nitrotyrosine について、それぞれマウス・モノクローナル抗体 (Dako, clone PC10, x100), イムノアフィニティー精製したウサギ IgG 抗体 (Upstate, x2000) を用いて、ABC 法にて実施した。尚、nitrotyrosine については投与 4 週目まで検討し、13 週目に関しては今後実施する予定である。

(倫理面への配慮)

投与実験は飲水による経口投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育、管理に当たっては、研究所の利用規程に従った。

C. 研究結果

体重は 5.0% 投与群で投与 3 日目より減少を示し、13 週目まで続いた (Fig. 2)。摂餌量は、5.0% 群において 3 日目, 1, 3, 4 週目で低下し、4 週目では 1.0% 群も若干低値を示したが、5 週目以

降は群間での明らかな差は認められなかった (Fig. 3)。

剖検時の体重は 5.0% 投与群で投与 1 週目より減少を示し、13 週目まで続いた。4 週目では 1.0% でも低値を示したが、この群では 13 週目では回復した (Table 1)。腎臓重量は各時期で絶対重量に群間での明らかな差はなかった (Table 1)。比重量に関しては、3 日目に 1.0% 群でごく軽度の増加を示したが、5.0% では明らかな変化を示さなかった。1 週目では、1.0% 以上で用量依存的に増加を示した。しかし、4 週及び 13 週では 5.0% のみで有意な増加を示した。

病理組織学的に、投与 3 日目で 1.0% 以上に皮質近位尿細管上皮の硝子滴変性が出現した (Table 2; Fig. 4)。1 週目では 5.0% で、2-3 個の明瞭な核小体を有し細胞質が好塩基性変化や空胞変性を示す近位尿細管上皮が、皮質に巣状に出現し、これらの一部に apoptosis や核分裂像が認められた (Table 2; Fig. 4)。皮質の近位尿細管上皮の硝子滴変性は、対照群を含む全群に認められたが、1.0% でその強度の増強が認められた。4 週目では皮質近位尿細管上皮の空胞変性の増強が 5.0% で認められたが、この変化は、後述する細胞質が好塩基性変化を示す上皮以外の近位尿細管上皮にも認められた (Table 2; Fig. 5)。また、対照群で出現した皮質近位尿細管上皮の硝子滴変性や好酸性小体が 1.0% 以上でその強度が減少し、5.0% では極軽度に推移するか、あるいは殆ど認められなくなった。この時期でも 5.0% で尿細管上皮の細胞質の好塩基性変化は巣状に出現したが、これらの細胞に apoptosis や核分裂像は認められなかった。また、この時期から髓質外帯の近位尿細管上皮の核の大小不同を示す例が 0.1% 群から認められ、5.0% から有意に出現した。13 週目では、皮質近位尿細管上皮の空胞変性は対照群でも認められたが、5.0% でその強度は有意に増加した。また、4 週目と同様に、この時期でも硝子滴変性の減少が 5.0% で、好酸性小体の減少が 1.0% 以上で認められた (Table 2; Fig. 5)。また、5.0% でネフロン単位の再生尿細管が巣状に出現し、髓質外帯の近位尿細管上皮の核の大小不同を示す例が 0.1% 群から認められ、5.0% で有意に出現した。

PCNA 免疫染色の結果、髓質外帯の近位尿細管上皮における陽性細胞が多く認められ、実験開始の時期から翌週 (生後 6-7 週目) にかけて、これらの尿細管において PCNA 陽性細胞率 (PI) は無処置対照で比較的高く推移していたが、その後

経時的に減少していった (Fig. 6)。アカネ色素投与によって、PCNA-PI は 3 日目、1 週目で用量依存的に増加し、1.0%以上でその増加は有意であった。ところが、投与 4 週目においては、いずれの濃度においても PCNA-PI の変動を認めなかった。一方、13 週目では、有意差はないものの 0.1%以上で PCNA-PI は増加傾向を示し、5.0%で明らかに増加した。

Nitrotyrosine の免疫染色の結果、無処置対照ではどの時点でも、近位尿細管上皮の細胞質がネフロン単位で巣状に陽性を示した。アカネ色素投与によって、3 日目の時点より 1.0%以上で陽性を示す近位尿細管上皮の領域が拡大を示し、5.0%では皮質の殆どの近位上皮が陽性を示した (Fig. 7; Table 3)。また、0.1%では無処置対照と同程度であった。この染色性は 1 週目、4 週目でも同様であったが、1 週目では 1.0%でその程度に有意差は認められなかった (Table 3)。

D. 考察

今回の研究により、アカネ色素は投与初期 (3 日目) には 1.0%以上で近位尿細管上皮の硝子滴変性をもたらしたが、4 週以降では逆に自然発生性の硝子滴変性をこの用量から抑制し、好酸性小体の発生も 1.0%以上で抑制した。これらの二相性の変化の原因及び投与初期に誘発された硝子滴と自然発生性の硝子滴との相同性の有無は不明である。自然発生性の好酸性小体は雄のラットの肝臓で生成される $\alpha 2u$ グロブリンであると言われており、この物質はまず硝子滴として蓄積し、ライソゾーム内での部分分解により好酸性小体となる。その上皮内への高度の蓄積により、尿細管の壊死・再生が繰り返され、いわゆる $\alpha 2u$ グロブリン腎症が誘発される。現在までに多くの化学物質が雄ラットに対して好酸性小体を誘発することが知られており、これによる腎臓がんの報告もある。現在解析中のアカネ色素によるがん原性試験の結果では、雌に比べ、雄で腎臓がんが明らかに強く誘発されている。しかし、今回明らかになった結果として、4 週以上の投与で自然発生性の好酸性小体の発生がアカネ色素により抑制されていること、及びこの病変の発生部位がアカネ色素による腎腫瘍の好発部位である髄質外帯ではなく皮質であることから、アカネ色素による発がん過程に $\alpha 2u$ グロブリン腎症の関与はないものと判断された。以前実施した 90 日間反復投与試験においても、投

与 90 日目 (13 週目) で好酸性小体の発生が用量依存的に抑制されている。

また、髄質外帯の近位尿細管における PCNA の染色性の経時的検索により、明らかな尿細管壊死・脱落を伴わずに投与初期に 1.0%以上で細胞増殖を誘発し、13 週目にも 5.0%濃度で再度細胞増殖活性を亢進するという二峰性の変化を示すことが明らかとなった。この細胞増殖のシグナルに関してはマイクロアレイ解析によりこれから検討を加えるが、一旦生じた細胞増殖亢進が抑制されたことは、この二つの増殖ピークの間、後述する DNA 傷害性が蓄積され、 G_1 -S- G_2 arrest の生じている可能性が示唆された。以前実施した 90 日間反復投与試験においても、投与 90 日目 (13 週目) で PCNA-PI が用量依存的に増加している。

Nitrotyrosine の免疫染色により、近位尿細管上皮における陽性所見が、1.0%以上で 3 日目から増加したことから、今回初めてアカネ色素によって誘発された細胞増殖を含む一連の変化に、一酸化窒素ラジカルとスーパーオキシドとの反応による酸化的ストレスの関与が示唆された。一方、投与 4 週目から、アカネ色素による腎臓がんの好発部位である髄質外帯の近位尿細管上皮に、明らかな尿細管壊死・脱落を伴わずに核の大小不同を認めているが (5.0%で有意)、この核変化は何らかの核機能の障害を示唆し、発がんに関連した細胞分裂異常と捉える報告もある。また、13 週目に至ると、最高用量でこの部位での細胞増殖能が再度亢進し、アカネ色素によって誘発される酸化的ストレスが DNA 傷害性と共に細胞増殖シグナルも亢進させている可能性が示唆され、その発がんメカニズム解明の一端が開かれたと考えられる。

以上、アカネ色素投与により腎臓に認められた変化は、1.0%以上の反応であったため、現時点の解析でアカネ色素の腎臓影響の NOAEL は 0.1%となった。現在、免疫染色による inducible NO synthase の局在、ELISA 法による 8-OHdG, acrolein の定量や、レーザーマイクロダイセクション法を利用して、慢性毒性試験、発がん性試験で異型尿細管や腺腫・腺がんが高頻度に認められた腎髄質外帯部をメタカーン固定パラフィン切片から採取し、部位特異的なマイクロアレイ法による発現遺伝子の網羅的解析を、Affymetrix Rat RAE230A Array を用いて継続中である。また、アカネ色素の構成成分についても最長 13 週間投与し、腎毒性の程度を比較するとともに、発が

ん性への関与の有無について明確にする。

1. 特許所得
なし

E. 結論

雄性ラットに対してアカネ色素の発がん用量を含む3用量を設定して、最高13週間混餌投与した結果、アカネ色素による腎腫瘍好発部位での近位尿細管上皮に、明らかな細胞壊死・脱落を伴わずに二峰性の細胞増殖を認め、そのピークの間核の大小不同が出現し始めた。また、投与初期から nitrotyrosine 陽性の近位尿細管上皮細胞が増加したことから、細胞増殖を含む一連の変化に、一酸化窒素ラジカルとスーパーオキシドとの反応による酸化ストレスの関与が示唆された。また、一連の変化は、1.0%以上の反応であったため、現時点の解析でアカネ色素の腎臓影響のNOAELは0.1%となった。

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

F. 健康危険情報

なし

G. 研究業績

論文『英文』

なし

学会発表

井上 薫, 渋谷 淳, 高木広憲, 榎富直哉, 豊田和弘, 李 京烈, 広瀬雅雄: アカネ色素のラットを用いた慢性毒性試験において認められた腎毒性について, 第138回日本獣医学会学術集会, 札幌, 第138回日本獣医学会学術集会講演要旨集: B-55, p. 60, 9月, 2004

Hirose, M., Inoue, K., Shibutani, M.: Toxicity and Carcinogenicity of Madder Color in F344 Rats. The 3rd International Symposium on Korea National Toxicology Program. Seoul, 2004, 10, 12.

井上 薫, 渋谷 淳, 高木広憲, 榎富直哉, 豊田和弘, 李 京烈, 広瀬雅雄: アカネ色素のラット腎および肝に対する発がん性について, 第21回日本毒性病理学会, 浜松, 第21回日本毒性病理学会講演要旨集: p94 (P-86), 1月, 2005

H. 知的所有権の取得状況

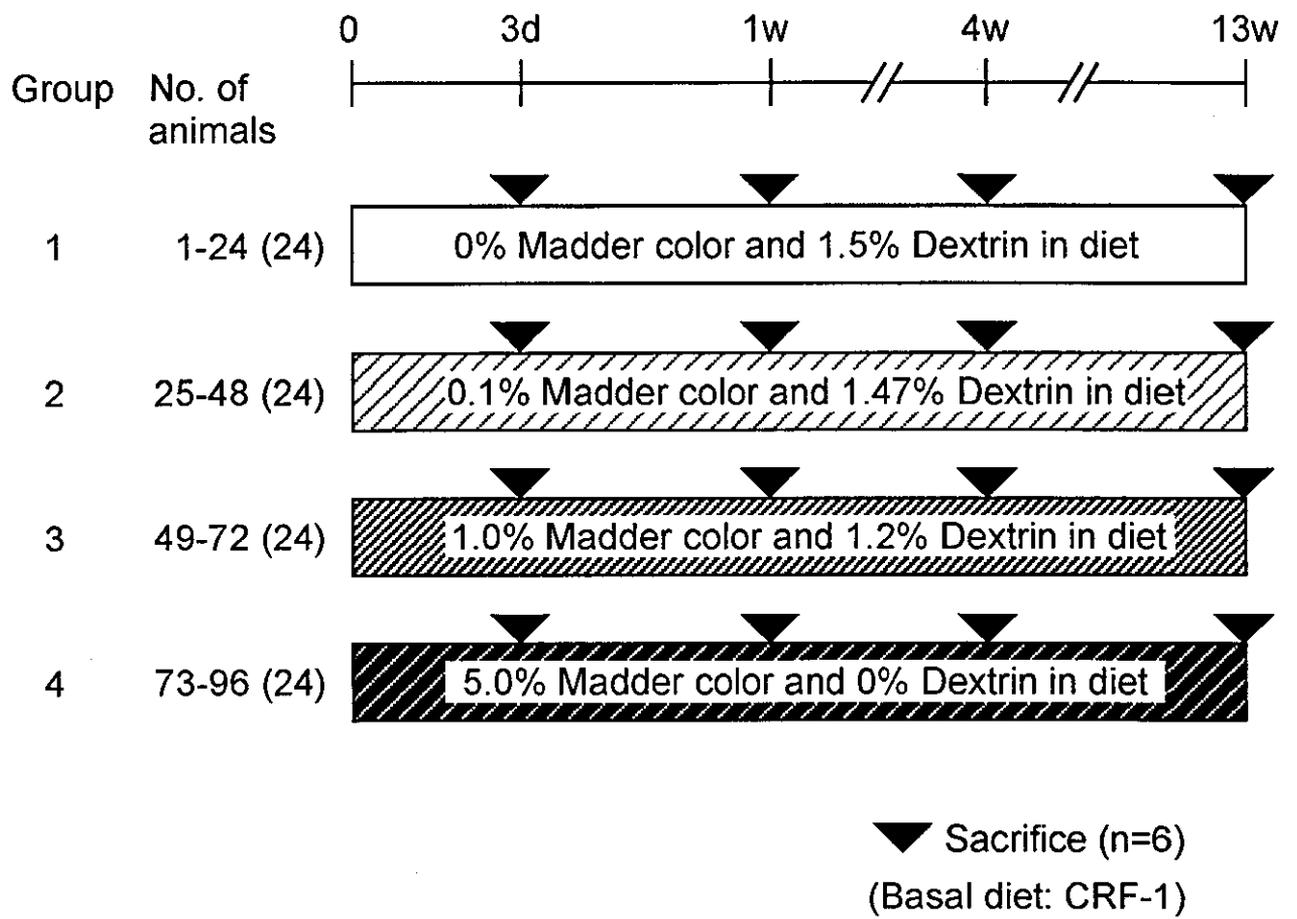


Fig. 1. Experimental design

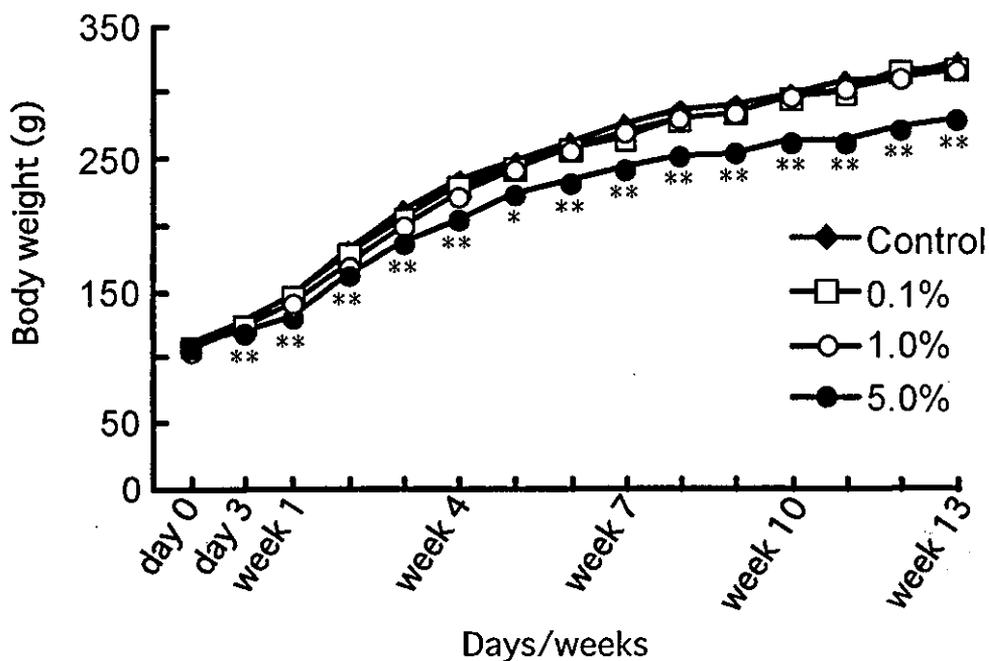


Fig. 2. Growth curves of male F344 rats treated with madder color for up to 13 weeks. *, **: $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively vs. untreated controls.

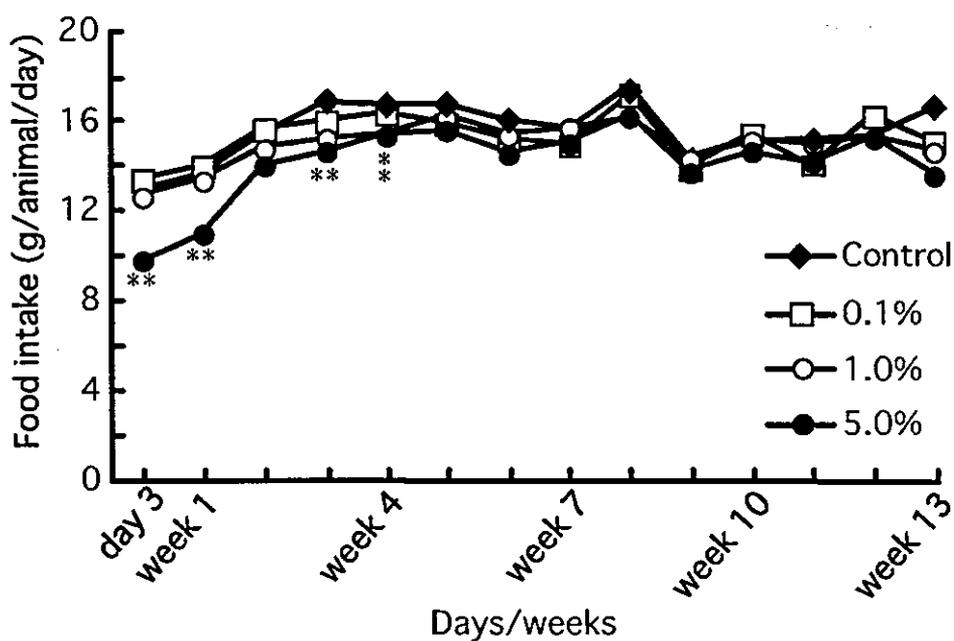


Fig. 3. Food intakes of male F344 rats treated with madder color for up to 13 weeks. *, **: $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively vs. untreated controls.

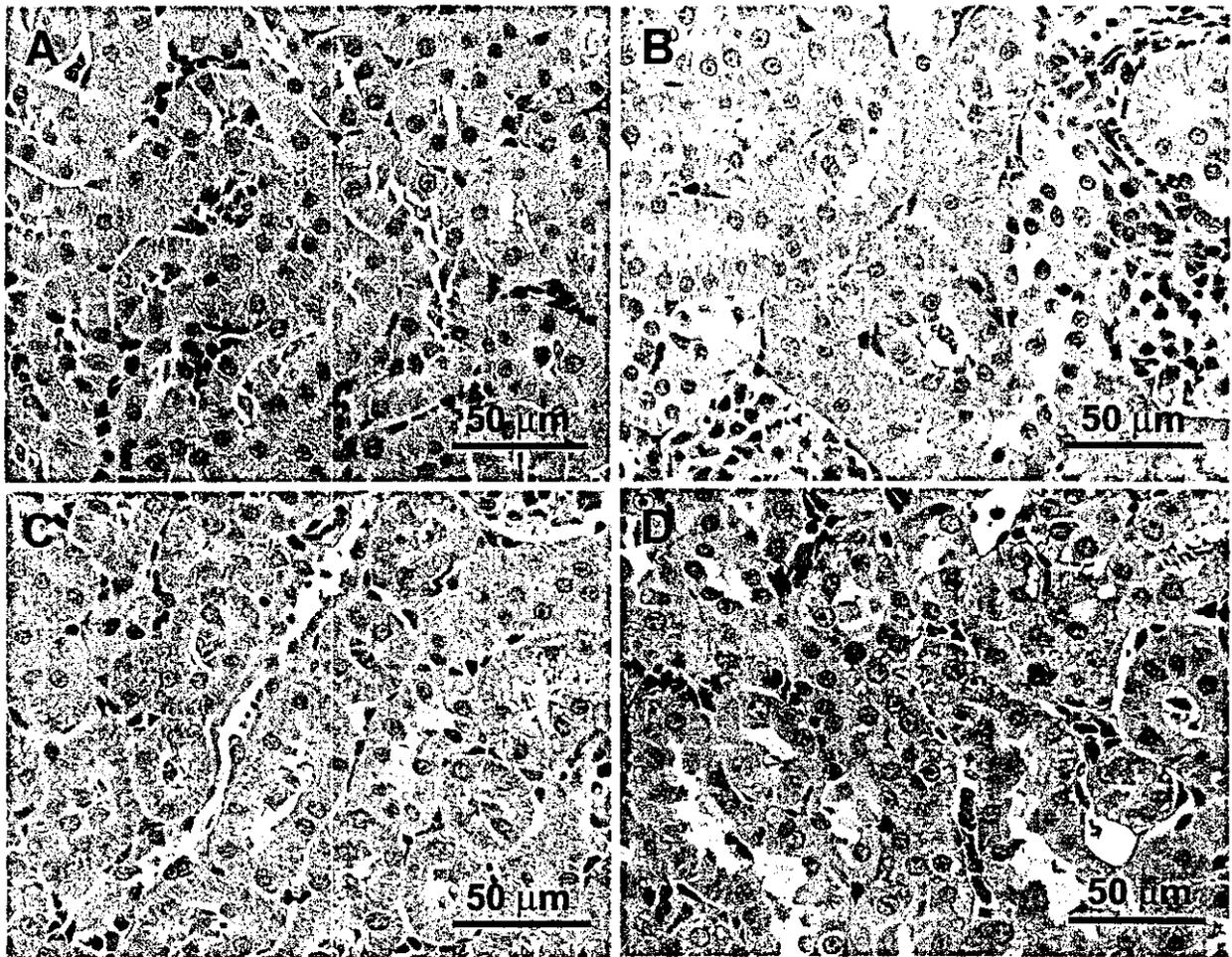


Fig. 4.

Histopathological changes in the proximal renal tubular epithelia of male F344 rats treated with madder color for 3 days or 1 week. *Panel A.* Cortical proximal tubules in a control animal at day 3 of experiment. *Panel B.* Hyaline droplet degeneration in cortical proximal tubules of a rat treated with 1% madder color for 3 days. *Panel C.* Hyaline droplet degeneration in cortical proximal tubules of a control animal at week 1. *Panel D.* Basophilic tubules with moderate vacuolar degeneration in a rat treated with 5% madder color for 1 week. Note mitotic figures as well as apoptotic cells in the tubular epithelia.

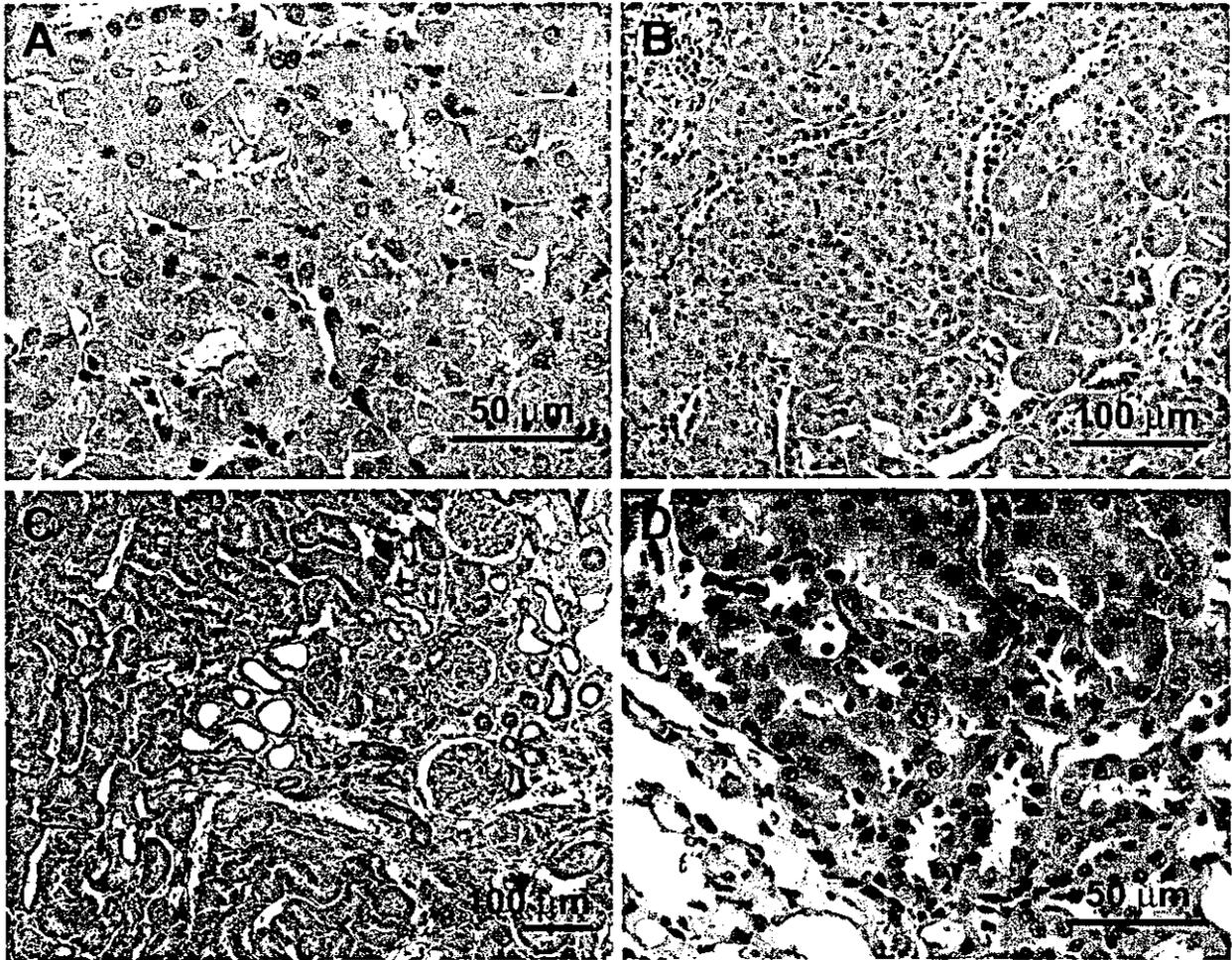


Fig. 5.

Histopathological changes in the proximal renal tubular epithelia of male F344 rats treated with madder color for 4 or 13 weeks. Panel A. Renal cortical proximal tubules of a control animal. Note eosinophilic bodies as well as hyaline droplets in the cytoplasm of tubular epithelia. Panel B. Lack of eosinophilic bodies in the cortical proximal tubules in a rat treated with 5% madder color. Note a focus of basophilic tubules with slight cytoplasmic vacuolar degeneration. Panel C. A focus of tubular regeneration in a rat treated with 5% madder color for 13 weeks. Panel D. Anisokaryotic nuclear changes in the proximal tubular epithelia located within outer medulla in a rat shown in the Panel C.

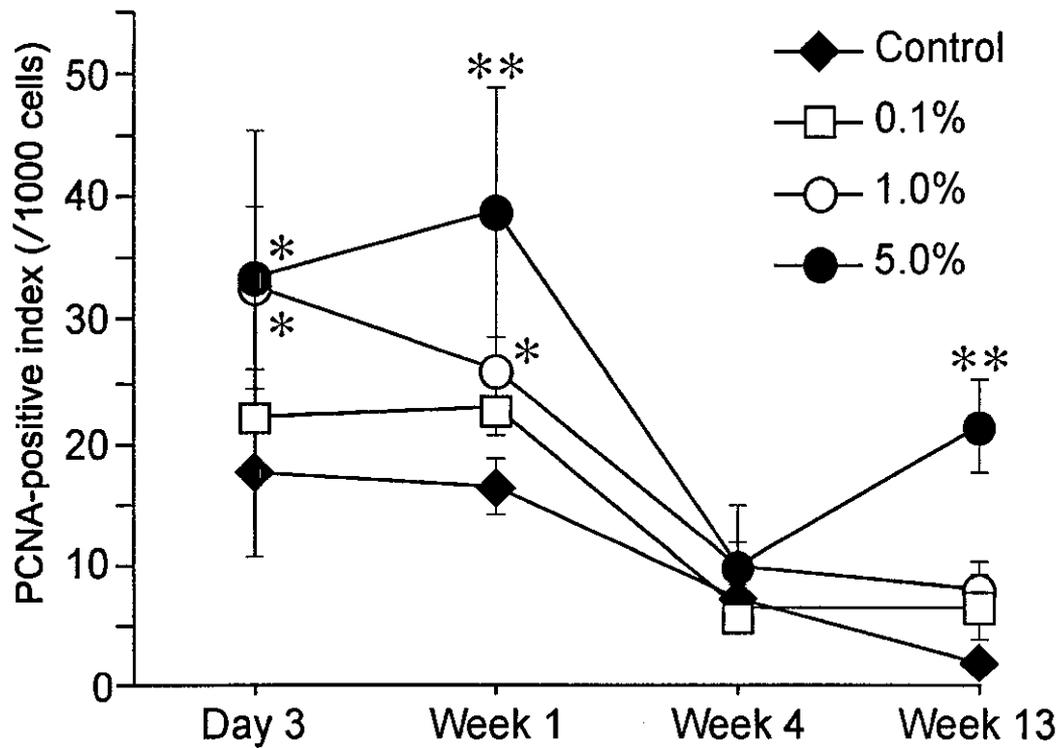


Fig. 6. Time course of PCNA-positive index in the proximal tubular epithelia within the outer medulla of the kidneys of male F344 rats treated with madder color for up to 13 weeks. PCNA-positive cells in the regenerating tubular epithelia were excluded from counting. *, **: $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively vs. untreated controls.

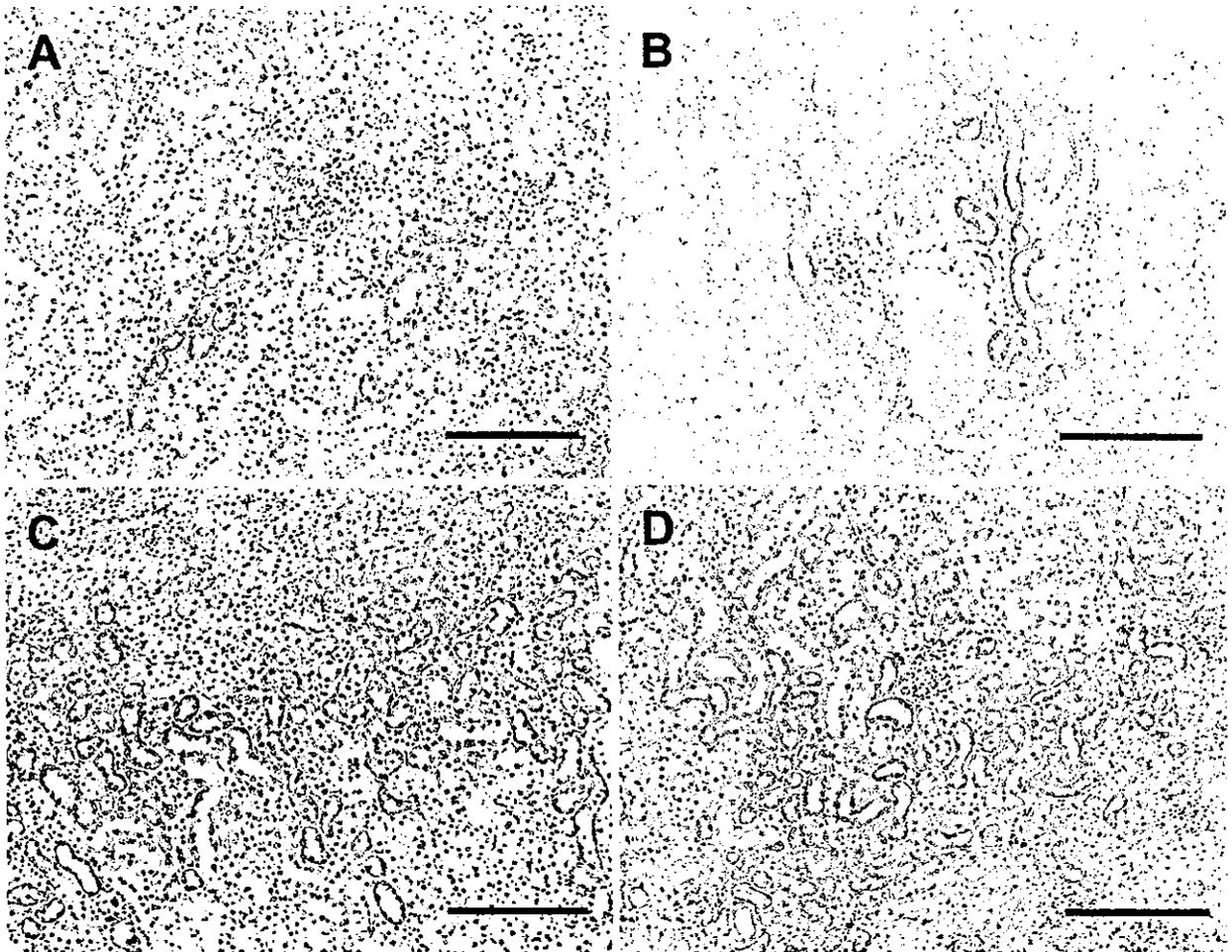


Fig. 7.

Nitrotyrosine immunoreactivity in the proximal renal tubular epithelia of male F344 rats treated with madder color for 3 days. Panel A. A control animal.

Panel B-D. Animals treated with madder color at 0.1, 1.0, or 5.0%, respectively.

Bar=200 μ m.

Table 1. Final body, absolute and relative organs weights of male F344 rats treated with madder color for up to 13 weeks.

	Group			
	Control	0.1%	1.0%	5.0%
(n=)	6	6	6	6
Day 3				
Body weight (g)	123.3 ± 4.6 ^a	123.2 ± 5.9	121.9 ± 6.0	116.0 ± 4.6
Kidneys				
absolute (g)	1.07 ± 0.03	1.11 ± 0.07	1.11 ± 0.05	1.03 ± 0.04
relative (g/100 g b.w.)	0.87 ± 0.03	0.90 ± 0.03	0.91 ± 0.01*	0.89 ± 0.02
Week 1				
Body weight (g)	144.3 ± 5.8	147.5 ± 6.7	143.7 ± 6.7	128.1 ± 4.0**
Kidneys				
absolute (g)	1.21 ± 0.04	1.25 ± 0.07	1.28 ± 0.04	1.19 ± 0.04
relative (g/100 g b.w.)	0.84 ± 0.01	0.85 ± 0.03	0.89 ± 0.03**	0.93 ± 0.02**
Week 4				
Body weight (g)	234.6 ± 9.8	229.2 ± 10.3	216.0 ± 16.0*	197.0 ± 12.1**
Kidneys				
absolute (g)	1.68 ± 0.14	1.69 ± 0.13	1.62 ± 0.16	1.57 ± 0.15
relative (g/100 g b.w.)	0.72 ± 0.06	0.73 ± 0.03	0.75 ± 0.03	0.80 ± 0.04**
Week 13				
Body weight (g)	312.8 ± 11.3	315.2 ± 22.3	314.2 ± 16.3	278.9 ± 15.2**
Kidneys				
absolute (g)	2.00 ± 0.16	1.91 ± 0.13	2.07 ± 0.14	2.01 ± 0.16
relative (g/100 g b.w.)	0.64 ± 0.05	0.61 ± 0.03	0.66 ± 0.04	0.72 ± 0.02**

^a: Mean±SD

*, **: Significantly different from the control at p<0.05 and p<0.01, respectively (Dunnett's test).