

Table 2. Histopathological changes in the kidney of male F344 rats treated with madder color for up to 13 weeks.

Histopathological change	Control (n=) 6	Group		
		0.1% 6	1.0% 6	5.0% 6
Day 3				
Tubular regeneration, focal ($\pm/+/++$)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	1 (1/0/0)
Hyaline droplet degeneration, cortical proximal tubules ($\pm/+/++$)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	5 (1/3/1)*.**	4 (1/2/1)**.#
Week 1				
Vacuolar degeneration, cortical proximal tubules ($\pm/+/++$)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	6 (0/0/6)**.**
Basophilic tubular change with distinct nucleolus, cortical proximal tubules ($\pm/+/++$)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	6 (0/0/6)**.**
Hyaline droplet degeneration, cortical proximal tubules ($\pm/+/++$)	6 (0/6/0)	6 (0/5/1)	6 (0/0/6)**	6 (2/4/0)
Week 4				
Vacuolar degeneration, cortical proximal tubules ($\pm/+/++$)	2 (2/0/0)	1 (1/0/0)	2 (2/0/0)	6 (3/3/0)*
Hyaline droplet degeneration, proximal tubules ($\pm/+/++$)	6 (0/0/6)	6 (0/0/6)	6 (1/5/0)**	5 (5/0/0)**
Eosinophilic body, cortical proximal tubules ($\pm/+/++$)	6 (0/0/6)	6 (0/2/4)	6 (5/1/0)**	1 (1/0/0)*.**
Basophilic tubular change, cortical proximal tubules ($\pm/+/++$)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	0 (0/0/0)	6 (0/6/0)**.**
Anisokaryosis, proximal tubules, outer medulla ($\pm/+/++$)	0 (0/0/0)	2 (2/0/0)	3 (3/0/0)	6 (3/3/0)**.**
Week 13				
Vacuolar degeneration, cortical proximal tubules ($\pm/+/++$)	4 (3/1/0)	6 (3/3/0)	6 (3/2/1)	6 (0/3/3)**
Hyaline droplet degeneration, cortical proximal tubules ($\pm/+/++$)	6 (1/5/0)	6 (1/4/1)	5 (0/3/2)**	0 (0/0/0)**.**
Eosinophilic body, cortical proximal tubules ($\pm/+/++$)	6 (0/0/6)	6 (0/3/3)	0 (0/0/0)**.**	0 (0/0/0)**.**
Tubular regeneration, focal ($\pm/+/++$)	0 (0/0/0)	1 (1/0/0)	1 (1/0/0)	6 (0/1/5)**.**
Anisokaryosis, proximal tubules, outer medulla ($\pm/+/++$)	0 (0/0/0)	2 (2/0/0)	3 (3/0/0)	6 (5/1/0)**.**

*, **: Significantly different from the untreated controls at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Fisher's exact probability test or Chi-square test).

*, **: Significantly different from the untreated controls at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Mann-Whitney's U-test).

Table 3. Distribution of nitrotyrosine-positive proximal tubules in the kidneys of male F344 rats treated with madder color for up to 4 weeks.

		Group			
		Control	0.1%	1.0%	5.0%
		(n=) 6	6	6	6
Day 3	Incidence	6	5	6'	6''
	Grade ±	0	1	0	0
	+	5	4	1	0
	++	1	0	5	1
	+++	0	0	0	5
Week 1	Incidence	6	6	6	6''
	Grade ±	1	1	0	0
	+	5	5	3	0
	++	0	0	3	1
	+++	0	0	0	5
Week 4	Incidence	5	6	6''	6''
	Grade ±	0	2	0	0
	+	4	4	0	0
	++	1	0	4	0
	+++	0	0	2	6

'': Significantly different from the untreated controls at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Mann-Whitney's U-test).

±, +, ++, +++: Degree of the distribution of immunoreactive tubules.

±: Up to 20% positive tubules within the area of cortico-medullary junction.

+: Up to 50% of positive tubules within the area of cortico-medullary junction.

++: 50 to 70% of positive tubules in both cortical and medullary areas.

+++ : Up to 100% of positive tubules in both cortical and medullary areas.

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

分担研究者 林 真 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部長
協力研究者 中嶋 圓 (財) 食品農医薬品安全性評価センター 第三試験室長
菊池 正憲 (財) 食品農医薬品安全性評価センター 遺伝毒性グループ
島田 昌也 (財) 食品農医薬品安全性評価センター 遺伝毒性グループ

要旨

本研究は、天然の着色料であるアカネ色素のラット腎臓に対する生体内遺伝毒性の有無を検索することを目的とした。多臓器中期発がん性試験においてアカネ色素は陰性との報告があるが、最近の研究結果からラットの腎臓並びに肝臓においては腫瘍を誘発すると考えられている。そこでトランスジェニックラット (Big Blue™ Rat) を用いて標的臓器での遺伝子突然変異誘発性を検索した。混餌法による 28 日間の反復投与後に導入遺伝子 (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、アカネ色素による腎臓での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。

A. 目的

アカネ色素 (Madder color) は、アカネ科の西洋アカネの根から抽出される色素で、性状としては赤褐色粉末で水、アルコールに溶解し、熱、光に対して非常に安定な物質である。アカネ色素の遺伝毒性に関しては *in vitro* 試験の Ames 試験で陽性¹⁾、Rec-assay においても弱い陽性²⁾、*in vivo* 試験のマウス小核試験で陰性³⁾、さらにラットを用いた DNA 付加体試験において、腎臓、肝臓、消化管系で付加体が生じたとの報告がある⁴⁾。一方発がん性に関しては F344 系ラットを用いた 16 週間混餌投与の多臓器中期発がん性試験において、腫瘍の誘発促進は認められていないとの報告がある⁵⁾。しかしながら、最近 780 日間の反復投与による発がん性試験では統計学的に有意で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ある

6)。DNA 付加体が生じていること、複数の臓器で腫瘍の発生が増加していることから、メカニズムとして遺伝毒性に起因するかを検討するため、トランスジェニックラット (Big Blue™ Rat) を用い遺伝子突然変異誘発性の有無を検索した。

B. 方法

1. 被験物質

国立医薬品食品衛生研究所から提供を受けたアカネ色素 (Lot No. : 040723, 含量: Ruberythric acid 換算で 16.85%) 並びにデキストリンを試験に用いた。提供されたアカネ色素並びにデキストリンは使用時まで室温で保管した。

2. 使用動物

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・馴化のうち, 5あるいは7週齢のラットを試験に用いた。

3. 飼育条件

動物は温度 $24.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 20\%$, 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)で飼育した。

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。

4. 被験物質添加飼料の調製

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。ただし, 本被験物質は粉末状に保つたために30%の割合でデキストリンが添加されていることから, 1%混入飼料の調製時には1.2%のデキストリンを添加した。被験物質添加飼料は週1回調製し, 室温にて保存した。

5. 投与方法および投与期間

多臓器中期発がん性試験での用量は5.0および2.5%であること, さらには本被験物質が食品添加物であることを考慮した結果, 5.0%を高用量とし, 以下1.0%の計2用量を被験物質投与群として設定した。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⁷⁾。したがって, アカネ色素1.0および5.0%の2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°C 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回投与した。投与後14日に各器官を摘出した。

6. ゲノムDNAの抽出

ダウンス型ホモジナイザーに腎臓の凍結組織片(20~30 mg)および組織破碎用緩衝液を加えホモジナイズした。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静かに重層し, 1900 xGで10分間遠心した。RNase含有ダウンス緩衝液およびProteinase K溶液を加えて静かに混和転倒し, 3時間程度 50°C で保温し消化させた。等量のフェノール/クロロホルム混液(容量比1:1)を加え10分間ローターを用いて回転混和した後, 1100 xGで10分間遠心した。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)を加え同様にローターを用いて回転混和した後, 1100 xGで10分間遠心した。上層の水層にエタノールを徐々に加えることによりゲノムDNAを析出させた。析出したゲノムDNAに適量のTE緩衝液を加え, 一晚室温に放置し溶解させた。

7. 試験菌株の準備

バッ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 μ L ずつ添加したのち、大腸菌 hf1⁻株 (G1225) 懸濁液 50 μ L を接種した。30°C、120 回/分の振盪条件で一晩培養し、前培養液とした。新しいバッ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 接種した後、同様に 4 時間培養を続けた。培養終了後、菌懸濁液を 10 分間遠心分離 (1000 r/min) した。上清を捨て、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°C で保管した。

8. ゲノム DNA のパッケージング

6. で調製したゲノム DNA 溶液は Transpack (Stratagene) を用いて *in vitro* パッケージング反応を行った。

あらかじめ準備しておいた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 μ L 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。

9. 統計方法

各試験群の *cII* 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⁸⁾: 有意水準上側 0.05) を用いて有意差を判定した。

10. 判定基準

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。

(倫理面の配慮): 本研究では実験動物としてラットを用いているが、動物の飼育および取り扱い等動物を使用するに際しては、「動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号, 平成 11 年 12 月 22 日改正)」、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準 (昭和 55 年 3 月 27 日総理府告示第 6 号, 平成 14 年 5 月 28 日一部改正)」および「(財)食品農医薬品安全性評価センター 動物実験に関する指針 (平成 15 年 12 月 1 日)」を順守しており、動物愛護上の配慮が十分になされている。また、ヒト組織利用の倫理上問題となることはない。

C. 結果

各群の腎臓における *cII* 遺伝子の突然変異頻度について Table 1 および 2 に示す。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。

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。

投与期間中の体重については Table 3 に示す。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 (Table 4)。

D. 考 察

アカネ色素について細菌を用いた復帰突然変異試験 (Ames 試験) および枯草菌を用いた DNA 修復試験 (Rec assay) で陰性あるいは陽性等, 相異なる結果が報告されているが^{1,2)}, *in vitro* の遺伝毒性試験として総合的には陽性と判断されている。 *In vivo* 試験の場合, マウス小核試験で陰性であったが³⁾, ラットを用いた DNA 付加体試験において, 腎臓, 肝臓, 消化管系で付加体が生じたとの報告がある⁴⁾。また, 発がん性に関しては

F344 系ラットを用いた 16 週間混餌投与による多臓器中期発がん性試験ではアカネ色素の 2.5 並びに 5.0%のいずれの用量においても発がんの促進作用は認められなかったとの報告がある⁵⁾。ACI/SegHsd ラットを用いた 780 日間の発がん性試験においては統計学的な有意差は見られないものの肝臓および腎臓に腫瘍の増加が認められている⁶⁾。最近の研究では F344/DuCrj 系ラットを用いた 104 週間の混餌投与試験において腎臓の尿管に腺がんの発生が認められたとの報告もある⁷⁾。

以上の試験結果から明確な根拠は無いもののアカネ色素が遺伝毒性を示す発がん性物質の可能性も示唆された。そこで今回, 標的臓器での遺伝子突然変異が検出可能なトランスジェニック動物 (Big Blue™ Rat) を用いて腎臓での遺伝子突然変異頻度を調べた。用量は発がん性試験で用いられた 1.0 および 5.0%混餌投与とし 28 日間反復投与後 3 日間の休薬期間を設けた。

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学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¹⁰⁾。さらに、*cH*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的DNA損傷の指標である8-ヒドロキシグアノシン(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学的に有意(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酸化的障害、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。

E. 結論

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した。

F. 引用文献

- 1) Asanoma M, Miyabe M, Skabe Y (1984): Mutagenicity of natural food additives in *Salmonella typhimurium* (II). Nagoya Eisei Kenkyuhohou, 30, 53-57.
- 2) 蜂谷紀之, 滝澤行雄, 河村太郎, 館野周之, 坂部美雄, 麻野間正晴, 野田正男, 石崎睦夫, 石橋武二, 黒田孝一 (1985): 天然添加物の急性毒性および各種変異原性の概要. トキシコロジーフォーラム, 8, 91-105.
- 3) 石館基, 滝澤行雄, 坂部美雄, 石崎睦夫, 館正知 (1986): 食品添加物の変異原性試験成績 (その7). トキシコロジーフォーラム, 9, 628-633.
- 4) Pognisky B, Westendorf J, Blomeke B, Marquardt H, Hewer A, Glover PL, Phillips DH (1991). Evaluation of DNA-binding activity of hydroxyl- anthraquinones occurring in *Rubia tinctorum* L. Carcinogenesis, 12, 1265- 1271.
- 5) Hagiwara A, Kawabe M, Tanaka H, Kokubo Y, Sano M, Tamano S, Kadota T, Nakamura M, Imaida K (1997). Two different constituents of Madder color lack tumor promoting or carcinogenic potential in a medium-term multi-organ carcinogenesis bioassay in rats. Jpn. J. Food Chem., 4: 99-106.
- 6) Westendorf J, Pfau W, Schute A (1998). Carcinogenicity and DNA adduct formation observed on ACI rats after long-term treatment with madder root, *L. Rubia tinctorum*. Carcinogenesis, 19, 2163-2168.
- 7) Thybaud V, Dean S, Nohmi T, de Boer J, Douglas GR, Glickman BW, Gorelick NJ, Heddle JA, Heflich RH, Lambert I, Martus HJ, Mirsalis JC, Suzuki T, Yajima N (2003): In vivo transgenic mutation assays. Mutation Res., 540(2), 141-51.
- 8) Kastenbaum, M.A., and K. O. Bowman (1970): Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutation Res., 9, 527-549.
- 9) アカネ色素の慢性毒性・発がん性併合試験 (中間報告) (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病理部, 平成年 16 月 6 日 18) .
- 10) 林真 (2005): 既存添加物の遺伝毒性検出の戦略に関する研究. 平成 16 年度総括研究報告書 (印刷中).

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Table 1. Mutant frequency (MF) of *cII* gene in transgenic rats after Madder color treatment

Compound	Dose (%)	Organ	Number of animals	Number of plaque forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	P-value
Madder color	0	Kidney	6	4,040,100	102	25.2	-
	1	Kidney	6	2,946,600	113	38.3 *	0.0014
	5	Kidney	6	3,036,600	115	37.9 *	0.0018
DMBA a)	20 (mg/kg)	Kidney	3	1,506,600	42	27.9	0.3234
Madder color	0	Liver	5	2,779,200	50	18.0	-
DMBA a)	20 (mg/kg)	Liver	3	1,469,700	115	78.2 *	0.0000

* : $p \leq 0.05$, significant difference from control (Kastenbaum and Bowman method, upper-tailed)

a) : Positive control (7,12-Dimethylbenz [a] anthracene); a single dose

Samples were prepared at 14-day after the dose.

Table 2. Induction of mutation by Madder color in individual rats

Compound	Dose (%)	Organ	Animal ID-No.	Number of plaque forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Mean \pm S.D.
Madder color	0	Kidney	1001	711,900	12	16.9	24.6 \pm 10.0
			1002	832,500	34	40.8	
			1004	604,800	10	16.5	
			1005	790,200	15	19.0	
			1006	465,300	10	21.5	
			1101	425,700	27	63.4	
	1	Kidney	1102	627,300	20	31.9	39.5 \pm 17.7
			1103	432,000	17	39.4	
			1104	468,000	27	57.7	
			1105	504,000	10	19.8	
DMBA a)	20 (mg/kg)	Kidney	1201	578,700	25	43.2	37.7 \pm 17.5
			1202	537,300	11	20.5	
			1203	493,200	33	66.9	
			1204	503,100	21	41.7	
			1205	474,300	16	33.7	
			1206	450,000	9	20.0	
Madder color	0	Liver	1301	567,000	15	26.5	27.7 \pm 10.7
			1302	452,700	8	17.7	
			1303	486,900	19	39.0	
DMBA a)	20 (mg/kg)	Liver	1001	415,800	10	24.1	18.3 \pm 6.9
			1002	690,300	11	15.9	
			1003	587,700	6	10.2	
			1004	598,500	16	26.7	
			1005	486,900	7	14.4	
			1301	408,600	36	88.1	
Madder color	0	Liver	1302	585,900	47	80.2	78.6 \pm 10.5
			1303	475,200	32	67.3	

a): Positive control (7,12-Dimethylbenz [a] anthracene); a single dose
 Samples were prepared at 14-day after the dose.

Table 3. Body weight in the gene mutation assay with Madder color

Compound	Dose (%)	Animal ID-No.	Body weight of each period (g)							Gain a) (g)	
			Received	Allocated	1 week	2 weeks	Dosing	3 weeks	4 weeks		Sacrificed
Madder color	0	1001	115	175	220	249	-	269	286	285	110
		1002	140	192	223	242	-	254	262	262	70
		1003	104	160	200	221	-	235	253	255	95
		1004	52	106	144	173	-	194	208	212	106
		1005	52	102	137	170	-	196	210	212	110
		1006	52	103	147	183	-	209	229	234	131
		Mean ± S.D.	86 ± 39	140 ± 41	179 ± 40	206 ± 35	-	226 ± 31	241 ± 31	243 ± 29	104 ± 20
1	1	1101	136	190	221	241	-	257	269	265	75
		1102	117	173	209	234	-	257	271	271	98
		1103	116	176	217	236	-	254	268	267	91
		1104	56	110	148	184	-	209	230	234	124
		1105	46	95	126	150	-	169	178	183	88
		1106	47	99	135	163	-	193	214	214	115
		Mean ± S.D.	86 ± 41	141 ± 44	176 ± 44	201 ± 41	-	223 ± 38	238 ± 38	239 ± 35	99 ± 18
5	5	1201	125	187	201	214	-	228	234	239	52
		1202	140	196	205	218	-	230	241	246	50
		1203	119	171	190	205	-	219	231	237	66
		1204	52	106	132	161	-	188	204	212	106
		1205	49	100	124	154	-	179	193	198	98
		1206	47	96	121	143	-	160	169	171	75
		Mean ± S.D.	89 ± 44	143 ± 47	162 ± 40	183 ± 33	-	201 ± 29	212 ± 28	217 ± 29	75 ± 23
DMBA b)	20 (mg/kg)	1301	116	172	206	220	225	226	225	220	48
		1302	46	98	134	167	180	188	190	193	95
		1303	45	91	128	161	172	180	185	188	97
		1304	51	105	148	178	189	198	197	204	99
		Mean ± S.D.	64 ± 35	117 ± 37	154 ± 36	182 ± 27	192 ± 23	198 ± 20	199 ± 18	201 ± 14	85 ± 25

a): Gain = Sacrificed - Allocated

b): Positive control (7,12-Dimethylbenz [a] anthracene); a single dose

Table 4. Food consumption in the gene mutation assay with Madder color

Compound	Dose (%)	Animal ID-No.	Food consumption of each period (g)				Total (g) (1→4)		
			1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks			
Madder color	0	1001	123	121	122	118	484		
		1002	112	105	105	100	422		
		1003	108	105	99	102	414		
		1004	94	97	92	94	377		
		1005	96	101	101	102	400		
		1006	98	106	106	104	414		
		Mean ± S.D.	105 ± 11	106 ± 8	104 ± 10	103 ± 8	419 ± 36		
		1		1101	109	105	109	107	430
				1102	111	107	111	107	436
				1103	111	109	108	104	432
1104	99			104	103	102	408		
1105	89			86	84	83	342		
1106	88			94	98	100	380		
Mean ± S.D.	101 ± 11			101 ± 9	102 ± 10	101 ± 9	405 ± 37		
5				1201	91	88	90	85	354
				1202	79	84	90	91	344
				1203	91	90	91	86	358
		1204	78	86	91	96	351		
		1205	77	83	96	96	352		
		1206	82	81	81	80	324		
		Mean ± S.D.	83 ± 6	85 ± 3	90 ± 5	89 ± 6	347 ± 12		
		DMBA a)	20 (mg/kg)	1301	114	103	92	70	379
				1302	97	95	89	73	354
				1303	91	99	90	76	356
1304	107			105	96	71	379		
Mean ± S.D.	102 ± 10			101 ± 4	92 ± 3	73 ± 3	367 ± 14		

a): Positive control (7,12-Dimethylbenz [a] anthracene); a single dose

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
分担 研究報告書

ラット多臓器中期発がん性試験法を用いたアカネ色素の発がん修飾作用の検討

分担研究者 今井田 克己 香川大学医学部 腫瘍病理学

研究要旨：天然のアカネ色素(madder color)の発がん性の機序を解明する目的で、ラット多臓器中期発がん性試験法を用いて検討を行っている。現在実験開始8週を経過し、DMD処置を終了し、アカネ色素を5, 2.5, 0%の濃度で混餌投与を行っており、実験は順調に経過している。

A. 研究目的

天然のアカネ色素(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の色素で、菓子やデザート、農産加工品、乳飲料などの着色料で、わが国では平成7年、既存添加物として名簿に記載されており、天然添加物として使用されていた。

アカネ色素の毒性に関しては14日間反復経口投与試験や90日間反復投与試験などが行われ、毒性学の影響は報告されていない。また、発がん性に関しては、diethylnitrosamine (DEN), N-methylnitrosourea (MNU), N-bis(2-hydropropyl) nitrosamine (DHPN) を処置(DMD処置)後にアカネ色素を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も発がん促進作用は認められていない。しかし、最近アカネ色素の慢性毒性/発がん性併用試験において腎における発がん性が雌雄ともに報告された。そこで、本研究ではアカネ色素の腎に対する発がん性の機序を解明する目的で、多臓器中期発がん性試験を応用して腎発がんメカニズムの解析を解析し、さらに多臓器中期発がん性試験で認められなかった腎に対する影響を詳細な検討を行っている。

B. 研究方法

<動物並びに飼育条件>

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。動物の飼育は香川大学動物実験施設の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±2℃、湿度60±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匹ずつ飼育し、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。

<被験物質並びに投与量>

アカネ色素(TN-A760, Lot No. 040723)はその色素濃度を色価として214、Ruberthric acid換算で16.85%のものを用いた。アカネ色素をオリエンタルCRF-1飼料中に5.0, 2.5, 0%の濃度で混じた。なお、このアカネ色素にはDextrinがアカネ色素5.0%に対して1.5%の割合で含まれるため、Dextrinの濃度が一定になるように、アカネ色素：Dextrinの濃度は、5.0%:0%, 2.5%:0.75%, 0%:1.5%として、さらに何も添加しない基礎食の対照群群も設け、対照群とした。

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Dextrinをそれぞれ0%, 0.75%, 1.5%含有している。第4群にはDextrin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、エーテル麻酔下に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。

C. 研究結果

現在8週を経過している。表1に実験開始第1週、第4週、第8週時の体重の平均値を、そして体重の増加曲線を図1に示す。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相関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。

表2に各群の第4週および第8週の摂水量と第8週の摂餌量を示す。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

アカネ色素の毒性に関してはSDラットの14日間反復経口投与試験、B6C3F1マウスの90日間経口投与試験などが行われているがいずれも雌雄とも毒性学的影響は認められない、と報告されている。変異原性に関してはAmes試験で代謝活性化の有無にかかわらず陽性、Rec assayで弱陽性、小核試験で陰性、DNA adduct形成試験で陰性、と報告されている。一方、発がん性に関してはDMD処理をしたラット多臓器中期発がん性試験でいずれの臓器にも発がんの促進作用はないと報告されている。しかし、ACI/SegHsdラットの780日間反復投与試験で統計学的な優位差はないものの肝臓、腎臓の腫瘍の発生が見られた、と報告されている。さらに、F344ラットを用いた慢性毒性/発がん性併合試験で、雌雄とも腎に腎細胞がんの発生が認められた。そこで、今回はその腎に対する発がん性の機序を解明するとともにDMD処理による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も含めて試験を行っており、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

天然のアカネ色素の発がん性の機序を解明する目的で、ラット多臓器中期発がん性試験法を用いて検討を行っている。実験は現在、実験開始後8週を経過し、アカネ色素を5, 2.5, 0%の濃度で混餌投与を行っており、実験は順調に経過している。この研究により、慢性毒性/発がん性併合試験で認められたアカネ色素の腎臓に対する発がん性の発生機序を解明することにより、最終的には天然の食品添加物に対する国民の安心、安全を科学的に評価する際の重要な情報が提供できるものと期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

2. 実用新案登録 なし

H. 知的所有権の取得状況

3. その他 なし

1. 特許取得 なし

表1 アカネ色素による多臓器中期発がん性試験の各群の体重推移

Group	Treatment	No.	1W	4W	8W
1	DMD-5.0%Madder color	20	108.8±4.7	163.4±8.3	193.8±8.1
2	DMD-2.5%Madder color	20	108.5±4.3	165.9±5.6	205.5±7.9
3	DMD	20	109.5±6.1	166.8±8.6	223.4±10.9
4	DMD-Basal diet	23	110.4±5.5	178.9±6.3	224.0±5.9
5	Control-Basal diet	20	109.1±4.9	214.7±9.0	226.5±10.4

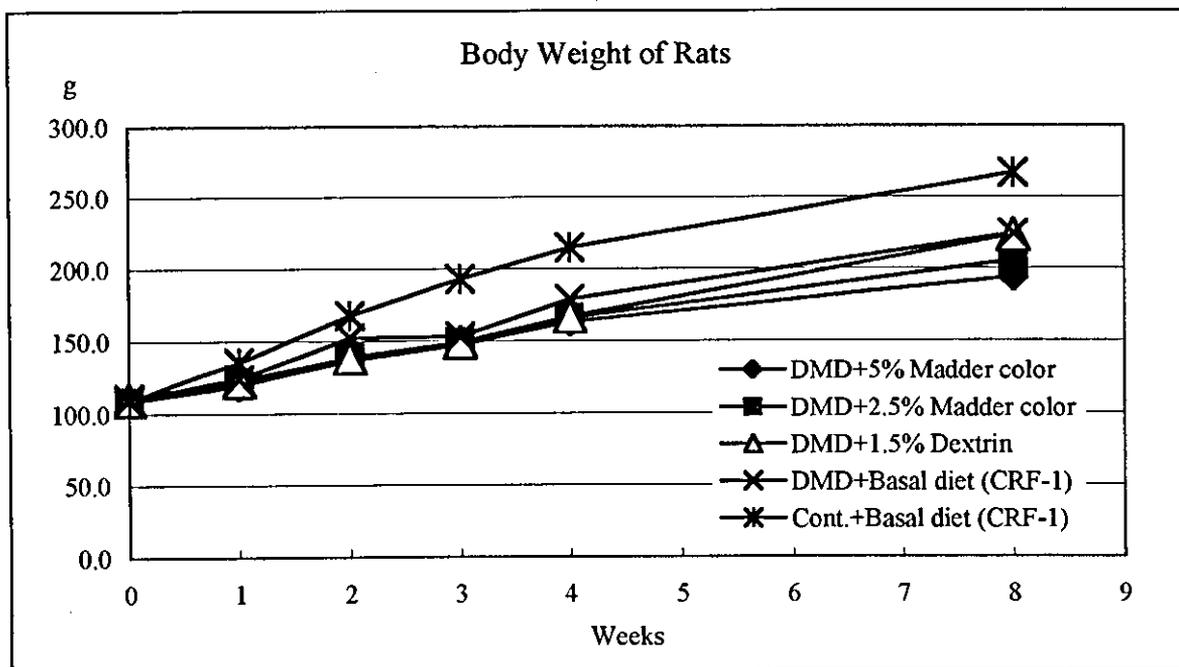
DMD: N-nitrosodiethylamine (DEN), N-methyl-N-nitrosourea (MNU), N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DNPN)

表2 各群の飲料水と摂餌量

Group	treatment	Water drinking (ml/rat/day)		Food Consumption (g/rat/day)
		3w	4w	8w
1	DMD+5% Madder color	15.9± 1.6	15.9± 2.6	17.4± 0.7 ^a
2	DMD+2.5% Madder color	15.7± 1.1	15.7± 0.7	17.7± 0.7 ^a
3	DMD+1.5% Dextrin	16.8± 0.8	16.8± 1.6	20.1± 1.7
4	DMD+Basal diet (CRF-1)	23.1± 15.5	23.1± 0.8	21.0± 0.9
5	Cont.+Basal diet (CRF-1)	19.2± 0.8	19.2± 2.4	22.8± 0.5

^a P<0.05 vs. group 4

図1 体重増加曲線



別添5

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当無し							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
該当無し					

研究成果の刊行物・別刷

該当無し

LIHIT LAB.

M-285