

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

既存添加物の慢性毒性及び発がん性に関する研究

平成 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 西川秋佳

平成 19 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	1
既存添加物の慢性毒性及び発がん性に関する研究	
II. 分担研究報告書	
1. オゾケライトの慢性毒性・発がん性に関する研究	10
西川秋佳	
2. アカネ色素の発がん性に関する成分に関する研究	29
渋谷 淳	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	43
IV. 研究成果の刊行物・別刷	44

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心安全確保推進研究事業）

総括研究報告書（平成18年度）

既存添加物の慢性毒性及び発がん性に関する研究

主任研究者 西川秋佳 国立医薬品食品衛生研究所 病理部第一室長

研究要旨： オゾケライトはワックスシュールの鉍脈に含まれるロウを精製したもので、成分は C₂₉～C₅₃ の炭化水素であり、既存添加物として主にチューインガムのガムベースとして使用されているが、その安全性データは限られており、遺伝毒性は陰性であるが、強制経口投与によるラット 90 日間反復投与毒性試験で肝臓等の諸臓器に肉芽腫の形成がみられたことから、今回、さらに長期投与の影響を検索する目的で慢性毒性試験及び発がん性試験を実施することとした。混餌投与での用量を決定するための 3 週間予備試験を 2 度にわたり実施した結果、オゾケライトは 0.25% 以上の混餌投与で雌雄のラットに肝障害を引き起こす可能性が示唆されたことから、本試験での投与濃度は 0.2% を最高濃度とし、慢性毒性試験を 0.05%、0.1%、0.2%、発がん性試験を 0.1%、0.2% の各用量に設定した。現在、順調に経過している。一方、既存添加物として使用されていたアカネ色素の腎発がんに関与する成分の同定を目的として色素成分やその代謝産物をラットに短期間投与した際の腎変化を検討した結果、アカネ色素投与早期に認められた腎皮質の変化（腎皮質近位尿細管上皮細胞の微小空胞変性、好塩基性変性）は alizarin と lucidin-3-O-primeveroside によって誘発され、それらの発現には酸化的ストレスの関与が示唆された。また、アカネ色素投与でみられた腎髄質外帯の尿細管変化（核の大小不同、細胞増殖活性亢進）は rubiadin に起因したものと考えられ、rubiadin が遺伝毒性試験陽性であることを考え合わせると、アカネ色素による腎発がんは rubiadin による直接的 DNA 損傷の関与が示唆された。

分担研究者

渋谷 淳 国立医薬品食品衛生研究所 病理部第二室長

A. 研究目的

オゾケライトはワックスシュールの鉍脈に含まれるロウを精製したもので、成分は C₂₉～C₅₃ の炭化水素である。既存添加物としては主にチューインガムのガムベースとして使用されている他、口紅、リップクリーム等の化粧品の油性成分の固化剤としても使用されている。しかし、その安全性データは限られており、遺伝毒性は陰性であるが、最近報告されたラット 90 日間強

制経口投与毒性試験で肝臓等の諸臓器に肉芽腫の形成がみられている。そこで今回、さらに長期投与の影響を検索する目的で実施する慢性毒性および発がん性試験の用量設定のための予備試験を行なった。

一方、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

成分は主に alizarin、ruberthric 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いた。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、腎臓について病理組織学的評価を行ったところ、この色素は高頻度に腎細胞腺腫・がんや肝細胞腺腫・がんを誘発することが判明し、平成 15 年度の間接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、食品安全委員会添加物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、この色素及びその構成成分である lucidin-3-O-primeveroside (LP) 及びその代謝産物である 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へ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。アカネ色素による発がん性メカニズムには上述したように遺伝子の直接傷害性の可能性が示唆されたものの、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。一方で、この色素はアントラキノン系色素であるため、その発がんに関与するキノンラジカルの生成による酸化ストレスの関与も考えられた。そこで近年実施した厚生労働特別研究 (H16-特別-018) において、アカネ色素による腎発がん性について、酸化ストレスによる細胞傷害性の関与の有無を経時的に解析し、さらに lucidin をラットに投与した際に現れる腎変化をアカ

ネ色素投与の発がん過程早期に認められる変化と比較した。その結果、アカネ色素による腎発がん過程早期から酸化 DNA 損傷 (8-OHdG) の上昇と酸化ストレス関連遺伝子の発現変動が見出されたものの、lucidin 投与ではアカネ色素と同様の病理組織学的所見、細胞増殖活性の増加、8-OHdG レベルの増加などを認めず、アカネ色素による酸化ストレスの発生に lucidin の関与は低いものと推察された。そこで本研究では、アカネ色素の lucidin 以外の構成成分である alizarin (Alz)、lucidin-3-O-primeveroside (LP) や、lucidin と同様に LP の代謝産物であり、各種遺伝毒性試験で陽性との報告がある rubiadin (Rub) をラットに 1 週間投与し、アカネ色素による腎発がん過程早期に見られた変化と比較し、発がんに関与する色素成分またはその代謝産物の同定を試みた。

B. 研究方法

<オゾケライトの慢性毒性・発がん性に関する研究>

予備試験 1 として、4 週齢の F344/DuCrj ラット雌雄各 25 匹を日本チャールス・リバー(株)より購入し、約 1 週間の馴化飼育の後、雌雄とも各群 5 匹ずつ 5 群に配した。動物の飼育はバリヤーステムの動物室にて行い、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 5 匹ずつ収容し、床敷は三協ラボサービス(株)のソフトチップを用い、週 2 回交換した。また、飲料水として水道水を自由に摂取させた。被験物質は株式会社加藤洋行から供与を受けたオゾケライト 075 (Lot No. 06-0619) を使用した。強制経

口投与による 90 日間反復投与毒性試験では、全投与群で雌雄ともに血液生化学的及び病理組織学的検査において肝障害が認められたと報告されていることから、その中用量である 100 mg/kg 体重をもとに、体重および摂餌量から概算した 0.2% を最高用量とし、以下の用量は公比 2 で除して、0.1%、0.05%、0.025% に設定した。オゾケライトは CRF-1 粉末飼料（オリエンタル酵母株式会社）にオリーブ油を溶剤とし飼料に添加し、3 週間自由に摂取させ、対照群にはオリーブ油のみを添加した粉末飼料を同様に摂取させた。投与期間中、一般状態の観察を連日実施し、体重および摂餌量は毎週 1 回測定した。エーテル麻酔下で腹部大動脈から採血後、剖検した。血清生化学的検査は、分離した血清を凍結後、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)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、アラントランスアミナーゼ (ALT)、アルカリフォスファターゼ (ALP) および γ -グルタミルトランスアミナーゼ

(γ -GTP) について SRL 社（東京）に依頼し測定した。諸臓器は肉眼的に観察後摘出し、肺、脾臓、肝臓および腎臓の重量を測定した。統計学的処理は、血清生化学的検査値、体重および臓器の相対重量については、各群の分散比を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置分散分析を行い、不等分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合の多重比較は Bonferroni/Dunn の方法で対照群と被験物質投与群との間で有意差検定を行った。

引き続き、予備試験 2 として、4 週齢の F344/DuCrj ラット雌雄各 20 匹を日本チャールス・リバー(株)より購入し、約 1 週間の馴化飼育の後、雌雄とも各群 5 匹ずつ 4 群に配した。動物の飼育は予備試験 1 と同様に行なった。被験物質

は株式会社加藤洋行から供与を受けたオゾケライト 075 (Lot No. 06-0619) を使用した。予備試験 1 の最高用量群で明らかな肝毒性が認められなかったことから、0.25% を低用量として、公比 2 で乗じて以上の用量を 0.5%、1% に設定した。各飼料は Table 2-1 に示した配合で調製し、予備試験 1 と同様に 3 週間投与した。動物の観察、検索方法ならびに統計学的処理は、予備試験 1 と同様に行なった。

2 つの予備試験の結果から、慢性毒性・発がん性試験での投与濃度は 0.2% を最高濃度とし、慢性毒性試験を 0%、0.05%、0.1%、0.2%、発がん性試験を 0%、0.1%、0.2% の各用量に設定した。動物は慢性毒性試験および発がん性試験において、4 週齢の F344/DuCrj ラット雌雄各 10 匹および雌雄各 50 匹を用いた。試験は「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」に準拠して実施中である。

<アカネ色素の発がん性に関する成分に関する研究>

Alz は市販品 (Sigma-Aldrich、純度 97%) を購入し使用した。LP は、セイヨウアカネの根粉砕品からエタノール抽出したものの凍結乾燥品を用いた。即ちセイヨウアカネ (*Rubia tinctorum* L.) の根粉砕品 300 kg から 50% エタノールで色素成分を抽出し、合成吸着樹脂処理した吸着成分を 30% エタノールで脱着、回収、濃縮した。その後、濃縮液をメタノールに溶解させ、濾過して得た濾液のアルコールを除去後、シリカゲルに吸着させた。吸着物を酢酸エチル：メタノール：水=80：20：5 で溶出させ、溶出液を一晩静置後、結晶化して回収した。回収した結晶をさらにエタノールに再溶解後濾過し、濾液を濃縮させ、凍結乾燥したもの

をLPとして用いた。HPLCのクロマトグラムからLPの純度は90.5% (R.T. 31.4 min)と求められたが、不純物の存在を示唆するピークの一つはruberythric acid (R.T. 29.3 min)、もう一つはunknown (R.T. 60.9 min)であり、後者はLPの精製にメタノールを使用していたため、ruberythric acidのOH基がメチル化したものを検出した可能性が示唆された。また、Rubは既存の報告(Blomeke B., *et al. Mutat. Res.* 1992. 265: 263-272)をもとに合成したもの(純度99.9%)を使用した。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、無処置群(6匹)の他に各物質について3用量(6匹/群)を設定し、AlzとLPについてはアカネ色素の発がん性試験での腎発がん用量(5.0%)での各色素の成分含量(Alz 1.58%, LP 6.60%)を算出し、それを中間用量とした用量(Alz: 0.0016, 0.008, 0.04%, LP: 0.06, 0.3, 1.5%)を、Rubについては参考となるデータがなかったため、LPと同じ用量(0.06, 0.3, 1.5%)で1週間混餌投与した。投与1週目に腎臓を採取し、動物実験を終了した。動物実験は、各物質の入手時期が異なったため、AlzおよびLPとRubに対してそれぞれ対照群を設定して別々に実施した。採取した腎臓について、乳頭部を含む両腎の短軸断のスライスをホルマリン固定し、常法に従い厚さ3 μm のパラフィン切片を作製し、HE染色後、病理組織学的検索に用いた。出現した病変については群当たりの発生頻度やその強さを求めた。また、アカネ色素投与で腫瘍好発部位であった髄質外帯PTCの増殖活性を検索するため、ホルマリン固定パラフィン切片を用いてproliferating cell nuclear antigen (PCNA)の免疫染色

を実施した。このとき、一次抗体はマウス・モノクローナル抗体(Dako, clone PC10, x100)を用い、4°C一晩反応させ、二次抗体以降のステップはVECTASTAIN®Elite ABC KIT (Vector Laboratories)を用いたABC法にて実施し、3,3'-diaminobenzidineで可視化、ヘマトキシリンで核染した。PCNA陽性細胞数は、各動物の片腎の髄質外帯について、光学顕微鏡を用いて200倍で観察し、1視野に認められた近位尿細管上皮細胞1000個中の陽性細胞数を求め、5視野の平均値を算出し、さらに対照群との相対比を求めた。また、腎組織内の8-OHdGレベルを測定するため、ホルマリン固定したスライス以外の腎組織から皮質-髄質外帯を採取し、新鮮凍結した。凍結腎組織は、実験直前に凍結したまま200 mg 測り取り、直ちに市販のDNA抽出キット(DNA Extractor WB Kit; 和光純薬)を用いて核DNAを抽出した。抽出した核DNAをヌクレアーゼPIとアルカリフォスファターゼで消化しデオキシヌクレオチドにした後、electrochemical detection system (Coulchem II)を用いてHPLC-ECD法で測定し、各群の8-OHdGレベルと対照群との相対比を求めた。

(倫理面への配慮)

投与実験は主に混餌による経口投与であり、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

＜オゾケライトの慢性毒性・発がん性に関する研究＞

予備試験1において、投与期間中の死亡動物は認められず、いずれの動物においても一般状態の異常は認められなかった。最終体重は、雄では0.025%群が有意に減少し、0.05%群で有意に増加したが、投与濃度との相関性は無く、被験物質投与に起因する変化ではないと考えられた。雌では、投与期間を通じて被験物質投与群と対照群の間に体重の有意差は認められず、同様な推移を示した。一匹当りの平均摂餌量は、雄では各群約13g、雌では約10gであり、雌雄ともに各群における摂餌量にほとんど差は見られなかった。被験物質の3週間の総摂取量は、雄の0.025%投与群で0.06g、0.05%投与群で0.15g、0.1%投与群で0.27g、0.2%群で0.56g、雌ではそれぞれ0.05g、0.1g、0.21g、0.41gであり、投与予定量の被験物質を供試動物が摂取したことが確認できた。体重あたりの被験物質摂取量に大きな雌雄差はみられなかった。血清生化学的に、雄ではTGが0.05%群で有意に増加したが、0.2%群では有意に減少した。T.Choは0.05%以上の投与群において有意に増加した。ASTは、0.1%群で有意に減少したが、0.2%群では有意に増加した。ALTは、0.1%以上の投与群で有意に増加した。ALPは0.1%投与群で有意に増加したが、0.2%投与群では減少した。一方、雌ではT.Choが0.2%投与群で有意に増加した。ASTは0.025%投与群と0.1%投与群で有意に増加したが、0.2%投与群では有意な増加はなく、投与量に相関した変化ではなかった。ALPは、0.2%投与群で有意に減少した。諸臓器の相対重量については、対照群と比較して、雌の0.05%投与群で肝臓の相対重量の有意な増加が認められたが、その他の臓器では、雌雄ともに各群間に有意な差を認めなかった。

予備試験2において、投与期間中の死亡動物は認められず、いずれの動物においても一般状態の異

常は認められなかった。試験期間中の各群の体重は同様に推移し、雌雄ともにいずれの投与群も対照群との間に有意差は認められなかった。一匹当りの平均摂餌量は、雄で各群約12g、雌では約9gであり、雌雄ともに各群における摂餌量に明らかな差は見られなかった。オゾケライトの3週間の総摂取量は、雄の0.25%投与群で0.61g、0.5%投与群で、1.31g、1%投与群で2.6g、雌ではそれぞれ0.48g、0.97g、2.01gであり、投与予定量の被験物質を供試動物が摂取したことが確認できた。体重あたりの被験物質摂取量に雌雄差はみられなかった。血清生化学的に、対照群と比較し、雄ではT.Bilが1%投与群で有意に増加し、TGは全ての投与群で有意に減少した。T.Choは0.5%、1%投与群で有意に増加した。ASTおよびALTは0.5%以上の投与群で有意に増加した。一方、雌ではT.Bilが全ての投与群で有意に増加し、TGは全ての投与群で有意に減少した。T.Choは1%投与群で有意に増加した。ASTおよびALTは0.5%以上の投与群で有意に増加した。ALPは0.25%投与群、1%投与群で有意に減少した。諸臓器の相対重量については、雄の腎臓相対重量は0.25%、1%投与群で有意に減少した。雌では、0.25%、0.5%投与群で脾臓相対重量が有意に増加し、0.5%投与群で肝臓相対重量が有意に増加した。しかし、何れも用量相関性がなく投与に起因する変化ではないと考えられた。

慢性毒性及び発がん性試験の本試験は、現在、開始から3週目を経過したが、両試験において、雌雄とも体重および摂餌量で、被験物質投与群と対照群との間に有意差は無く、同様な推移を示している。

＜アカネ色素の発がん性に関する成分に関する研究＞

最終体重はRub投与群において、0.06%から用

量の増加に伴い、対照群に比し減少した。また、腎重量は 0.04% Alz 投与群で相対重量が増加し、Rub 投与群では 0.3%以上群で用量の増加に伴う絶対重量の減少と 1.5%群で相対重量の増加が認められた。LP はいずれの用量でも体重、腎重量に変動を及ぼさなかった。Alz, LP はいずれの用量でも摂餌量に大きな変動を認めず、被験物質の一日摂取量は混餌用量の公比 5 をほぼ反映して増加を示したが、Rub は 0.3%以上の群で顕著な摂餌量の減少に伴う検体摂取量の減少を示した。病理組織学的に、Alz 及び LP 投与では皮質 PTC に変化が認められ、微小空胞変性は、Alz 投与では 0.0016%以上群で、LP 投与では 0.3%以上群で用量相関性に Grade が増加した。硝子滴変性は対照群を含む全ての動物に認められたが、その Grade は Alz 0.008%群と LP 0.3%以上の LP 群で対照群に比し増加していた。また、アカネ色素投与 1 週目で認められたものと同様の近位尿細管の好塩基性変性が Alz, LP とも最高用量群（それぞれ 0.04%、1.5%）で各々 6 例中 6 例、2 例に認められた。Rub 投与では、アカネ色素による腎発がんの好発部位である髓質外帯の PTC に核の大小不同と細胞質腫大を伴う好塩基性変性が 0.06%以上の全動物に認められ、用量の増加に伴いそれらの Grade が増加した。これらの変化は、Rub の高用量で髓放線に沿って皮質にも拡大していた。また、1.5%群では、PTC にアポトーシスが散見された。その他、髓質外帯 PTC の微小空胞変性が対照群を含む全群に認められたが、病変の発生頻度、Grade とも 0.06%、0.3%群で対照群に比し増加していた。また、皮質 PTC の硝子滴変性が対照群と 0.06%群に認められたが、0.3%以上群では認められなかった。

次に、髓質外帯の PTC1000 個あたりの PCNA 陽性細胞数を検索した結果、0.04% Alz 群では対照群との間に差は認めず、LP 投与群では 0.3%群で対照群に比し、1.5%群では有意に増加（1.9 倍）した。Rub 投与群では、0.06%群で対照群に比し有意な増加（3 倍）を示したが、0.3%以上の群では細胞毒性のため差は認められなかった。腎組織（皮質＋髓質外帯）における 8-OHdG レベルを測定した結果、0.04% Alz 群及び 1.5% LP 群で増加を示し、対照群との相対比は 0.04% Alz、1.5% LP 群で各々 3 倍、2.6 倍であった。Rub 投与群では、0.06%群、1.5%群とも対照群との差は認められなかった。

D. 考察

<オゾケライトの慢性毒性・発がん性に関する研究>

予備試験 1 の血清生化学的検査の結果、最高用量である 0.2%群において、肝障害を示唆する AST および ALT の有意な増加が雄において認められたが、その変化は軽微であり、雌では明らかな変化はみられなかった。そこで、雌雄共に明らかな毒性の出現する投与濃度を求める目的で、さらに高濃度のオゾケライトを投与する予備試験 2 を実施した。その結果、血清生化学的検査において、AST および ALT の増加が雌雄ともに 0.5%以上に、総ビリルビンの増加が雄の 1%、雌の 0.25%以上に、トリグリセライドの減少が雌雄の全投与群で認められ、これらの変化は 90 日間反復投与試験でも観察されていたことから、オゾケライトは 0.25%以上の混餌投与で雌雄のラットに肝障害を引き起こす可能性が示唆された。以上の結果から、慢性毒性・発癌性試験での投与濃度は 0.2%を最高用量とし、慢性毒性試験を

0%、0.05%、0.1%、0.2%、発がん性試験を 0%、0.1%、0.2%の各用量に設定して開始し、現在、開始から3週目を経過したが、両試験において、雌雄とも体重および摂餌量で、被験物質投与群と対照群との間に有意差は無く、同様な推移を示している。

<アカネ色素の発がん性に関する成分に関する研究>

アカネ色素の成分やその代謝産物のラット腎臓に対する影響（病理変化，細胞増殖性，酸化的 DNA 損傷）を検索し、アカネ色素の腎発がん性に関する成分の検討を行った。各物質を1週間投与したとき、ラットの最終体重は Alz, LP 投与群では変化が認められず、Rub 投与群では低用量群から用量依存的な低値が見られ、これは後述する Rub の腎毒性による全身状態の悪化とそれに伴う摂餌量の減少によるものと考えられた。この群では病理組織学的に PTC の腫大と核の大小不同を伴う好塩基性変化が髄質外帯に認められ、その程度は用量依存的に増加し、特に最高用量群（1.5%）では上皮細胞の腫大や核の大小不同が高度で、アポトーシス像も散見された。今回の病理組織学的検索において、Alz 及び LP 投与では腎皮質の PTC に好塩基性変性や微小空胞変性がみられた。また、両物質の最高用量投与により、腎組織内の 8-OHdG レベルが明らかに増加した。これらの皮質 PTC でみられた病理所見は、アカネ色素投与1週目で認められたものと同様の変化であり、また、腎組織内の 8-OHdG レベルの増加はアカネ色素投与でも認められた。これらの結果から、アカネ色素投与による腎皮質の病理変化は、Alz と LP に起因し、それに対する酸化的

ストレスの関与が示唆された。Rub では、一週間の投与で PTC の核の大小不同が認められた。同部位の核の大小不同は、アカネ色素を投与した際には4週目から認められ、本色素の90日試験、慢性毒性・発がん性試験においても認められた変化で、その発生頻度は用量に相関して増していた。核の大小不同は、遺伝毒性の有無に関わらず、オクラトキシン A やクロロホルムなどの腎発がん物質の投与により尿細管上皮に認められ、腫瘍発生に関する可能性のある変化であると考えられている。本病変は、Alz や LP 投与では認められず、Rub 用量の増加に伴い程度が増していたことから、アカネ色素でみられた同様の本病変は主に Rub によることが示唆された。Rub は LP より強い遺伝毒性を示し、本研究において腎臓に対して酸化的 DNA 損傷性は認められなかったことから、Rub 及びアカネ色素で認められた尿細管上皮の核の大小不同は直接的 DNA 損傷による可能性が示唆される。また、Rub (0.06%)による同部位での PCNA 陽性尿細管上皮細胞の増加はアカネ色素投与でも認められ、同部位での細胞増殖活性の亢進を示唆し、腎腫瘍の発生は Rub に起因することが考えられた。0.3%以上の Rub 投与で細胞増殖の亢進が認められなかったのは、変性変化を主体とする細胞毒性が強く出現したためと考えられ、最高用量ではむしろアポトーシスの増加を認めた。Rub は、*in vitro* の Ames 試験、不定期 DNA 合成試験、DNA 付加体試験で陽性結果を示し、このうち不定期 DNA 合成試験では lucidin より強い陽性、Ames 試験では他の色素成分の10分の1量でより強い陽性を示すことが報告されている。また、今回の検索で、1週間の Rub

投与では酸化 DNA 損傷を誘発しないことが明らかになった。以上のことから、髄質外帯で認められた Rub による変化は、酸化ストレスは関与せず直接的 DNA 損傷によるものと考えられた。今回の検索で、LP は腎皮質尿細管に微小空胞変性や好塩基性変性を引き起こし、髄質外帯では用量の増加に伴って細胞増殖を亢進させることが明らかになった。また、LP 投与により、腎組織内の 8-OHdG レベルが増加を示した。LP の遺伝毒性に関しては、Ames 試験、不定期 DNA 合成試験で陽性との報告がある。LP は前述した様に、Alz に比し弱いながらも腎皮質の変化の発現に関与し、それが酸化ストレスに起因することが考えられる。一方で、LP は生体内で Rub に代謝されるため、直接的 DNA 損傷性との関連は不明であるが、生成された Rub により髄質外帯の上皮細胞増殖亢進を招いた可能性がある。

E. 結論

オゾケライトの慢性毒性・発がん性に関する研究では、予備試験の結果、オゾケライトは 0.25% 以上の混餌投与で雌雄のラットに肝障害を引き起こす可能性が示唆されたことから、本試験での投与濃度は 0.2% を最高濃度とし、慢性毒性試験では 0.05%、0.1%、0.2%、発がん性試験では 0.1%、0.2% の各用量に設定した。慢性毒性試験は雌雄ともに各群 10 匹、発がん性試験は雌雄ともに各群 50 匹で試験を開始し、継続中である。

アカネ色素の発がん性に関与する成分に関する研究では、アカネ色素投与早期に腎皮質の PTC に認められた好塩基性変性や微小空胞変性は、アカネ色素成分である Alz と LP に誘発され、その変化の発現には酸化ストレスが関与すること

が示唆された。また、腎髄質外帯の PTC に認められた核の大小不同、細胞増殖亢進は LP の代謝産物である Rub による直接的 DNA 損傷が主に関与し、腎腫瘍の発生に寄与することが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究業績

論文『英文』

Kaoru Inoue, Makoto Shibutani, Naoya Masutomi, Kazuhiro Toyoda, Hironori Takagi, Chikako Uneyama, Masao Hirose. A 13-week subchronic toxicity study of madder color in F344 rats. Food Chem. Toxicol. (submitted)

学会発表

井上 薫, 渋谷 淳, 禹 桂炯, 禹 麻美, 五十嵐勝秀, 黒岩敬子, 富士本仁, 広瀬雅雄: アカネ色素によるラット腎発がん過程における酸化ストレスの関与について, 第 22 回日本毒性病理学会, 鹿児島, 第 22 回日本毒性病理学会講演要旨集: p83 (P-58), 1 月, 2006

井上 薫, 渋谷 淳, 禹 桂炯, 禹 麻美, 五十嵐勝秀, 富士本仁, 広瀬雅雄: 食品添加物として使用されていたアカネ色素のラット腎発がん機序: 特に酸化ストレスの関与について, 第 141 回日本獣医学会学術集会, つくば, 第 141 回日本獣医学会学術集会講演要旨集: BP-092, p. 200, 3 月,

2006

井上 薫，渋谷 淳，梅村隆志，高橋美和，禹 麻美，富士本仁，禹 桂炯，広瀬雅雄：食品添加物として使用されていたアカネ色素のラット腎発がんへの酸化的ストレスの関与に関する検討，第21回発癌病理研究会，徳島，第21回発癌病理研究会プログラム：p21，8月，2006

井上 薫，渋谷 淳，高橋美和，禹 麻美，富士本仁，禹 桂炯，梅村隆志，広瀬雅雄：アカネ色素によるラット腎発がんに対する酸化的DNA損傷とその成分の関与についての検討，第23回日本毒性病理学会，東京，第23回日本毒性病理学会講演要旨集：p44 (O-6)，1月，2007

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（食品の安心安全確保推進研究事業）

分担研究報告書（平成18年度）

既存添加物の慢性毒性及び発がん性に関する研究

分担課題： オゾケライトの慢性毒性・発がん性に関する研究

分担研究者 西川秋佳 国立医薬品食品衛生研究所 病理部第一室長

協力研究者 梅村隆志 国立医薬品食品衛生研究所 病理部主任研究官

研究要旨： オゾケライトはワックスシュールの鉱脈に含まれるロウを精製したもので、成分は C₂₉～C₅₃ の炭化水素である。既存添加物としては主にチューインガムのガムベースとして使用されている。他、口紅、リップクリーム等の化粧品の油性成分の固化剤としても使用されている。しかし、その安全性データは限られており、遺伝毒性は陰性であるが、最近報告されたラット 90 日間反復投与毒性試験で肝臓等の諸臓器に肉芽腫の形成がみられたことから、今回、さらに長期投与の影響を検索する目的で慢性毒性試験及び発がん性試験を実施することとした。上述の 90 日間反復投与毒性試験が強制経口投与で実施されていたことから、混餌投与での用量を決定するための 3 週間予備試験を 2 度にわたり実施した。その結果、血清生化学的検査において、AST 及び ALT の増加が雌雄ともに 0.5% 以上、総ビリルビンの増加が雄の最高用量 1%、雌の 0.25% 以上、トリグリセライドの減少が雌雄の 0.25% 以上の投与群で認められ、これらの変化は 90 日間反復投与試験でも観察されていたことから、オゾケライトは 0.25% 以上の混餌投与で雌雄のラットに肝障害を引き起こす可能性が示唆された。以上の結果から、本試験での投与濃度は 0.2% を最高濃度とし、慢性毒性試験を 0.05%、0.1%、0.2%、発がん性試験を 0.1%、0.2% の各用量に設定した。慢性毒性試験は雌雄ともに各群 10 匹、発がん性試験は雌雄ともに各群 50 匹で試験を開始し、継続中である。現在、開始から 3 週目を経過したが、両試験において、雌雄とも体重及び摂餌量で、被験物質投与群と対照群との間に有意差は無く、同様な推移を示している。

A. 研究目的

オゾケライトはワックスシュールの鉱脈に含まれるロウを精製したもので、成分は C₂₉～C₅₃ の炭化水素である。既存添加物としては主にチューインガムのガムベースとして使用されている。他、口紅、リップクリーム等の化粧品の油性成分の固化剤としても使用されている。しかし、その安全性データは限られており、遺伝毒性は陰性であるが、最近報告されたラット 90 日間強制経口投与毒性試験で肝臓等の諸臓器に肉芽腫

の形成がみられている。そこで今回、さらに長期投与の影響を検索する目的で実施する慢性毒性および発がん性試験の用量設定のための予備試験を行なった。

B. 研究方法

（予備試験 1）

4 週齢の F344/DuCrj ラット雌雄各 25 匹を日本

チャールス・リバー(株)より購入し、約1週間の馴化飼育の後、雌雄とも各群5匹ずつ5群に配した。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行い、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5匹ずつ収容し、床敷は三協ラボサービス(株)のソフトチップを用い、週2回交換した。また、飲料水として水道水を自由に摂取させた。

被験物質は株式会社加藤洋行から供与を受けたオゾケライト 075 (Lot No. 06-0619) を使用した。強制経口投与による 90 日間反復投与毒性試験では、全投与群で雌雄ともに血液生化学的及び病理組織学的検査において肝障害が認められたと報告されていることから、その中用量である 100 mg/kg 体重をもとに、体重および摂餌量から概算した 0.2% を最高用量とし、以下の用量は公比 2 で除して、0.1%、0.05%、0.025% に設定した。オゾケライトは CRF-1 粉末飼料 (オリエンタル酵母株式会社) にオリーブ油を溶剤とし飼料に添加し、3 週間自由に摂取させ、対照群にはオリーブ油のみを添加した粉末飼料を同様に摂取させた。各飼料は Table 1-1 に示した配合で調製した。

投与期間中、一般状態の観察を連日実施し、体重および摂餌量は毎週1回測定した。エーテル麻酔下で腹部大動脈から採血後、剖検した。血清生化学的検査は、分離した血清を凍結後、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)、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)、アルカリフォスファターゼ (ALP) および γ -グルタミルトランスアミナーゼ (γ -GTP) について SRL 社 (東京) に依頼し測定した。諸臓器は肉眼的に観察後摘出し、肺、

脾臓、肝臓および腎臓の重量を測定した。

統計学的処理は、血清生化学的検査値、体重および臓器の相対重量については、各群の分散比を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置分散分析を行い、不等分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合の多重比較は Bonferroni/Dunn の方法で対照群と被験物質投与群との間で有意差検定を行った。

(予備試験 2)

4 週齢の F344/DuCrj ラット雌雄各 20 匹を日本チャールス・リバー(株)より購入し、約1週間の馴化飼育の後、雌雄とも各群5匹ずつ4群に配した。動物の飼育は予備試験1と同様に行なった。

被験物質は株式会社加藤洋行から供与を受けたオゾケライト 075 (Lot No. 06-0619) を使用した。予備実験1の最高用量群で明らかな肝毒性が認められなかったことから、0.25% を低用量として、公比 2 で乗じて以上の用量を 0.5%、1% に設定した。各飼料は Table 2-1 に示した配合で調製し、予備試験1と同様に3週間投与した。

動物の観察、検索方法ならびに統計学的処理は、予備試験1と同様に行なった。

(本試験)

予備試験の結果から、慢性毒性・発がん性試験での投与濃度は 0.2% を最高濃度とし、慢性毒性試験を 0%、0.05%、0.1%、0.2%、発がん性試験を 0%、0.1%、0.2% の各用量に設定した。動物は慢性毒性試験および発がん性試験において、4 週齢の F344/DuCrj ラット雌雄各 10 匹および雌雄各 50 匹を用いた。試験は「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」に準拠して実施中である。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌による経口投与であり、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

(予備試験1)

投与期間中の死亡動物は認められず、いずれの動物においても一般状態の異常は認められなかった。

試験期間中の各群の体重推移を Fig. 1-1 に示す。雄では、0.025%群の最終体重が有意に減少し、0.05%群で有意に増加したが、投与濃度との相関性は無く、被験物質投与に起因する変化ではないと考えられた。雌では、投与期間を通じて被験物質投与群と対照群の間に有意差は認められず、同様な推移を示した。

雌雄各群の摂餌量及び被験物質摂取量を Table 1-2 に示す。一匹当たりの平均摂餌量は、雄では各群約 13 g、雌では約 10 g であり雌雄ともに各群における摂餌量にほとんど差は見られなかった。被験物質の3週間の総摂取量は雄の 0.025%投与群で 0.06 g、0.05%投与群で 0.15 g、0.1%投与群で 0.27 g、0.2%群で 0.56 g、雌ではそれぞれ 0.05 g、0.1g、0.21 g、0.41 g であり、投与予定量の被験物質を供試動物が摂取したことが確認できた。体重あたりの被験物質摂取量に雌雄差はみられなかった。

血清生化学的検査の結果を Table 1-3 に示す。雄では、TG が 0.05%群で有意に増加したが、0.2 %群では有意に減少した。T.Cho は 0.05%以上の投与群において有意に増加した。AST は、

0.1%群で有意に減少したが、0.2%群では有意に増加した。ALT は、0.1%以上の投与群で有意に増加した。ALP は 0.1%投与群で有意に増加したが、0.2%投与群では減少した。雌では、T.Cho が 0.2%投与群で有意に増加した。AST は 0.025%投与群と 0.1%投与群で有意に増加したが、0.2%投与群では有意な増加は認められず、投与量に相関した変化ではなかった。ALP は、0.2%投与群で有意に減少した。

諸臓器の相対重量の結果を Table 1-4 に示す。対照群と比較して、雌の 0.05%投与群で肝臓の相対重量の有意な増加が認められた。その他の臓器では、雌雄ともに各群間に有意な差を認めなかった。

(予備試験2)

投与期間中の死亡動物は認められず、いずれの動物においても一般状態の異常は認められなかった。

試験期間中の各群の体重推移を Fig. 2-1 に示す。雌雄ともにいずれの投与群も対照群との間に有意な変化は認められなかった。

雄各群の摂餌量及び被験物質摂取量を Table 2-2 に示す。一匹当たりの平均摂餌量は、雄では各群約 12 g、雌では約 9 g であり、雌雄ともに各群における摂餌量に明らかな差は見られなかった。オゾケライトの3週間の総摂取量は雄の 0.25%投与群で 0.61 g、0.5%投与群で、1.31 g、1%投与群で 2.6 g、雌ではそれぞれ 0.48 g、0.97g、2.01 g であり、投与予定量の被験物質を供試動物が摂取したことが確認できた。体重あたりの被験物質摂取量に雌雄差はみられなかった。

血清生化学的検査の結果を Table 2-3 に示す。対照群と比較し、雄では T.Bill が 1%で有意に増加し、TG は全ての投与群で有意に減少した。T.Cho は 0.5%、1%投与群で有意に増加した。

ASTおよびALTは0.5%以上の投与群で有意に増加した。雌ではT.Billが全ての投与群で有意に増加し、TGは全ての投与群で有意に減少した。T.Choは1%投与群で有意に増加した。ASTおよびALTは0.5%以上の投与群で有意に増加した。ALPは0.25%投与群、1%投与群で有意に減少した。

諸臓器の相対重量の結果をTable 2-4に示す。雄の腎臓相対重量は0.25%、1%投与群で有意に減少した。雌では、0.25%、0.5%投与群で脾臓相対重量が有意に増加し、0.5%投与群で肝臓相対重量が有意に増加した。しかし、何れも用量相関性がなく投与に起因する変化ではないと考えられた。

(本試験)

現在、開始から3週目を経過したが、両試験において、雌雄とも体重および摂餌量で、被験物質投与群と対照群との間に有意差は無く、同様な推移を示している(Fig. 3-1~ 3-4)。

D. 考察

予備試験1の血清生化学的検査の結果、最高用量である0.2%群において、肝障害を示唆するASTおよびALTの有意な増加が雄において認められたが、その変化は軽微であり、雌では明らかな変化はみられなかった。そこで、雌雄共に明らかな毒性の出現する投与濃度を求める目的で、さらに高濃度のオゾケライトを投与する予備試験2を実施した。その結果、血清生化学的検査において、ASTおよびALTの増加が雌雄ともに0.5%以上に、総ビリルビンの増加が雄の1%、雌の0.25%以上に、トリグリセライドの減少が雌雄の全投与群で認められ、これらの変化は90日間反復投与試験でも観察されていたことから、

オゾケライトは0.25%以上の混餌投与で雌雄のラットに肝障害を引き起こす可能性が示唆された。

以上の結果から、慢性毒性・発癌性試験での投与濃度は0.2%を最高用量とし、慢性毒性試験を0%、0.05%、0.1%、0.2%、発がん性試験を0%、0.1%、0.2%の各用量に設定して開始し、現在、開始から3週目を経過したが、両試験において、雌雄とも体重および摂餌量で、被験物質投与群と対照群との間に有意差は無く、同様な推移を示している。

E. 結論

予備試験の結果、オゾケライトは0.25%以上の混餌投与で雌雄のラットに肝障害を引き起こす可能性が示唆されたことから、本試験での投与濃度は0.2%を最高濃度とし、慢性毒性試験では0.05%、0.1%、0.2%、発がん性試験では0.1%、0.2%の各用量に設定した。慢性毒性試験は雌雄ともに各群10匹、発がん性試験は雌雄ともに各群50匹で試験を開始し、継続中である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究業績

なし

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

Table 1-1. Sample preparation

Dose level	Ozokerite	Olive oil	CRF-1
0% (Control) :	0 g /	30 ml /	5 Kg
0.025% :	1.25 g /	30 ml /	5 Kg
0.05% :	2.5 g /	30 ml /	5 Kg
0.1% :	5 g /	30 ml /	5 Kg
0.2% :	10 g /	30 ml /	5 Kg

Table 1-2. Food consumption and intake of Ozokerite for 3weeks (Pre-study 1)

Dose level	Food consumption		Daily intake (g/day)		Total intake (g/rat)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
0% (Control)	12.5	9.9	-	-	-	-
0.025%	12.2	9.4	0.003	0.002	0.06	0.05
0.05%	13.9	9.2	0.007	0.005	0.15	0.10
0.1%	12.8	9.9	0.013	0.010	0.27	0.21
0.2%	13.5	9.7	0.027	0.019	0.56	0.41

Table 1-4. Body and relative organ weights of F344 rat treated with Ozokerite in 3weeks (Pre-study 1)

	Dose level				
	0% (Control)	0.025%	0.05%	0.1%	0.2%
Male					
Body Weight(g)	189 ± 8	177 ± 6*	199 ± 4*	186 ± 9	194 ± 5
Lungs(g%)	0.42 ± 0.02	0.41 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.43 ± 0.02	0.41 ± 0.01
Spleen(g%)	0.26 ± 0.03	0.24 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.27 ± 0.01
Liver(g%)	3.96 ± 0.11	4.07 ± 0.18	3.80 ± 0.08	4.10 ± 0.11	3.86 ± 0.12
Kidneys(g%)	0.67 ± 0.02	0.67 ± 0.02	0.68 ± 0.03	0.68 ± 0.03	0.67 ± 0.02
	Dose level				
	0% (Control)	0.025%	0.05%	0.1%	0.2%
Female					
Body Weight(g)	134 ± 3	131 ± 4	132 ± 6	133 ± 5	133 ± 3
Lungs(g%)	0.50 ± 0.01	0.51 ± 0.02	0.48 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.51 ± 0.03
Spleen(g%)	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.31 ± 0.03
Liver(g%)	3.60 ± 0.17	3.57 ± 0.10	3.84 ± 0.19*	3.74 ± 0.23	3.47 ± 0.14
Kidneys(g%)	0.75 ± 0.03	0.73 ± 0.03	0.72 ± 0.03	0.72 ± 0.02	0.74 ± 0.02

Mean ± S.D

*: P<0.05 vs. Control Group