

Table 2-1. Sample preparation

Dose level	Ozokerite	Olive oil	CRF-1
0% (Control) :	0 g /	150 ml /	5 Kg
0.25% :	12.5 g /	150 ml /	5 Kg
0.5% :	25 g /	150 ml /	5 Kg
1% :	50 g /	150 ml /	5 Kg

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

Dose level	Food consumption		Daily intake (g/day)		Total intake (g/rat)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
0% (Control)	11.6	9.0	-	-	-	-
0.25%	11.5	9.2	0.03	0.02	0.61	0.48
0.5%	12.4	9.3	0.06	0.05	1.31	0.97
1%	12.4	9.6	0.12	0.10	2.60	2.01

Table 2-3. Serum biochemical data for F344 rats treated with Ozokerite for 3weeks (Pre-study 2)

	Dose level			
	0% (Control)	0.25%	0.5%	1%
Male				
T.Bil(mg/dl)	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.01 *
TG(mg/dl)	159.2 ± 48.4	97.2 ± 14.8 **	52.4 ± 11.1 **	55.8 ± 21.9 **
T.Chol(mg/dl)	78.0 ± 2.7	79.6 ± 2.7	88.2 ± 1.5 **	82.8 ± 2.6 **
AST(UU/l)	76.6 ± 2.7	74.8 ± 3.8	89.0 ± 3.6 **	84.8 ± 2.9 **
ALT(UU/l)	36.8 ± 2.5	40.2 ± 2.7	49.2 ± 4.5 **	51.2 ± 2.4 **
ALP(UU/l)	1925 ± 116	1929 ± 177	1903 ± 86	1882 ± 128
γ-GTP(UU/l)	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0
Female				
T.Bil(mg/dl)	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.01 **	0.04 ± 0.01 *	0.05 ± 0.01 **
TG(mg/dl)	99.6 ± 28.7	50.6 ± 35.2 **	51.0 ± 12.9 **	48.2 ± 22.4 **
T.Chol(mg/dl)	84.4 ± 2.7	87.6 ± 2.1	89.8 ± 5.3	90.6 ± 6.5 *
AST(UU/l)	72.6 ± 3.1	77.6 ± 3.0	87.2 ± 5.9 **	85.6 ± 10.9 **
ALT(UU/l)	27.8 ± 3.1	32.8 ± 5.4	41.8 ± 4.9 **	42.0 ± 4.7 **
ALP(UU/l)	1228 ± 68	1073 ± 91 *	1180 ± 129	1056 ± 61 **
γ-GTP(UU/l)	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0

Mean ± S.D

*, **: P<0.05, P<0.01 vs. Control Group

Table 2-4. Body and relative organ weights of F344 rat treated with Ozokerite in 3weeks (Pre-study 2)

	Dose level			
	0% (Control)	0.25%	0.5%	1%
Male				
Body Weight(g)	186 ± 7	189 ± 9	197 ± 10	197 ± 8
Lungs(g%)	0.41 ± 0.02	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.02	0.40 ± 0.01
Spleen(g%)	0.27 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.00	0.26 ± 0.01
Liver(g%)	3.62 ± 0.08	3.52 ± 0.14	3.70 ± 0.07	3.55 ± 0.08
Kidneys(g%)	0.70 ± 0.03	0.67 ± 0.01 *	0.70 ± 0.02	0.66 ± 0.02 **
Female				
Body Weight(g)	131 ± 4	128 ± 6	130 ± 6	128 ± 7
Lungs(g%)	0.48 ± 0.02	0.50 ± 0.01	0.49 ± 0.02	0.49 ± 0.02
Spleen(g%)	0.28 ± 0.01	0.31 ± 0.02 **	0.30 ± 0.02 *	0.28 ± 0.01
Liver(g%)	3.20 ± 0.14	3.36 ± 0.11	3.45 ± 0.13 *	3.30 ± 0.12
Kidneys(g%)	0.73 ± 0.01	0.72 ± 0.02	0.71 ± 0.02	0.71 ± 0.02

Mean ± S.D

*, **, P<0.05, P<0.01 vs. Control Group

Fig. 1 Growth curves for F344 rats treated with Ozokerite for 3 weeks
(Preliminary study 1)

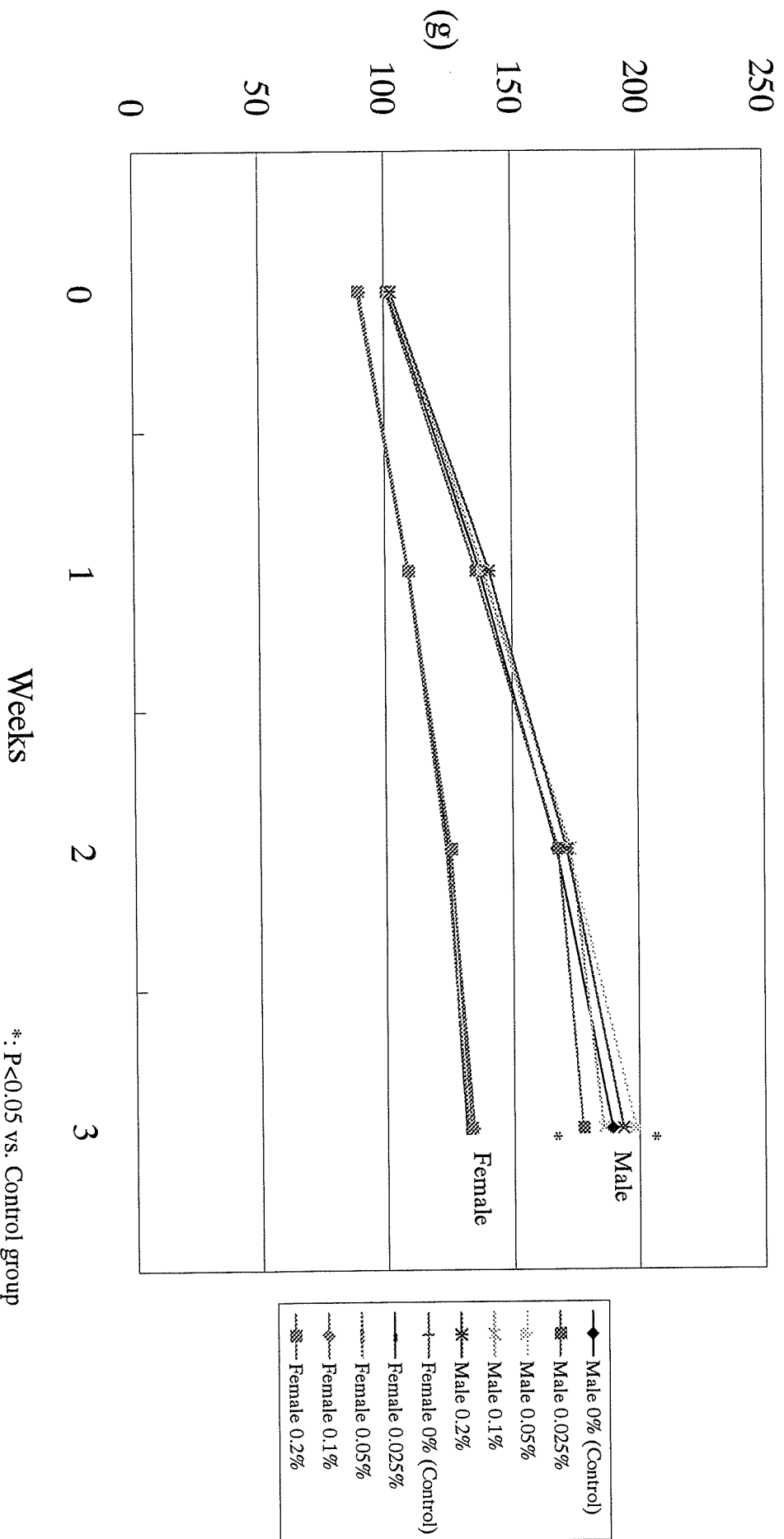


Fig. 2 Growth curves for F344 rats treated with Ozokerite for 3 weeks
(Preliminary study 2)

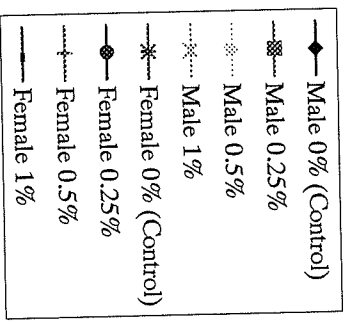
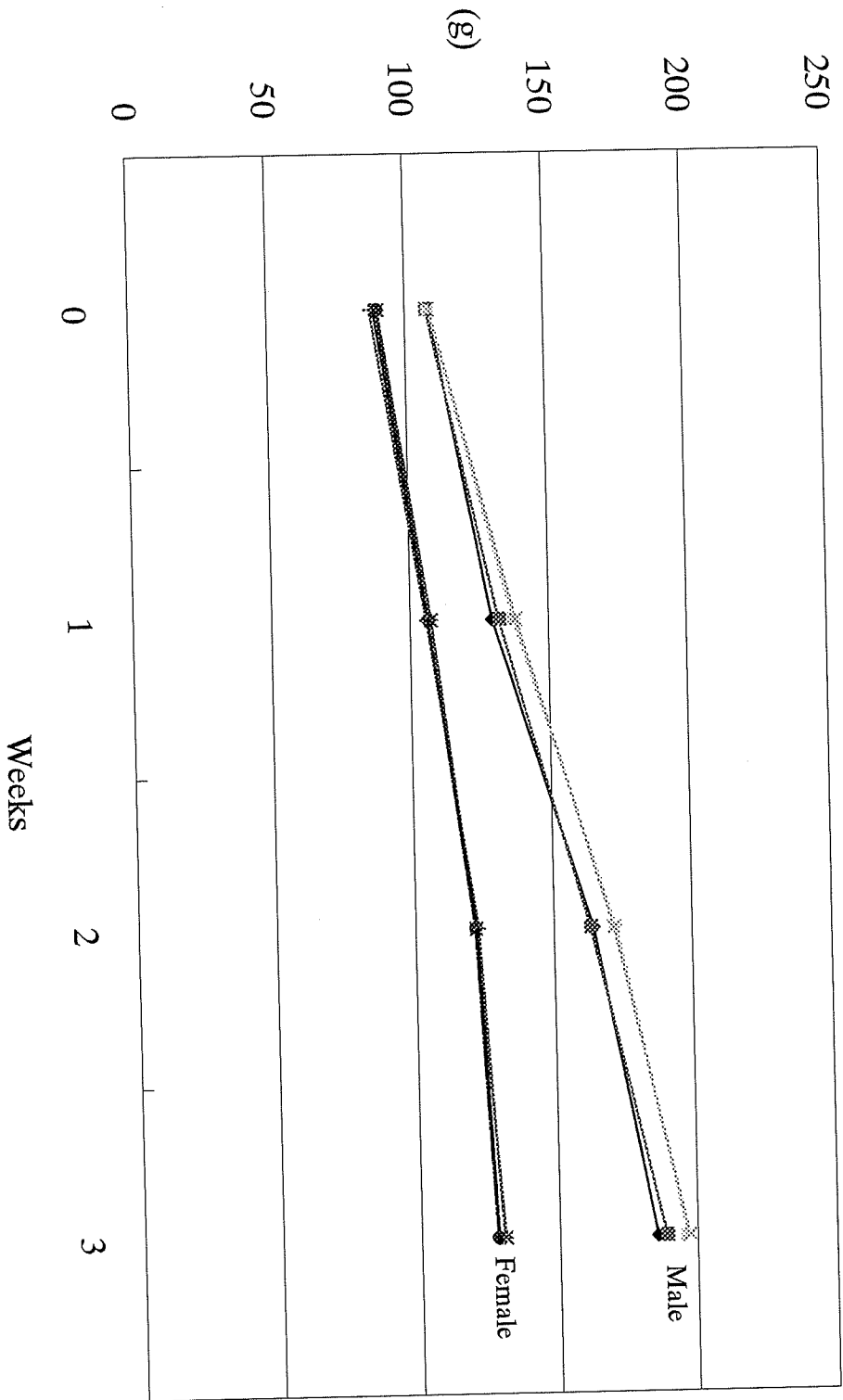


Fig. 3-1 Growth curves for F344 rats treated with Ozokerite for 3 weeks
(1-year chronic study)

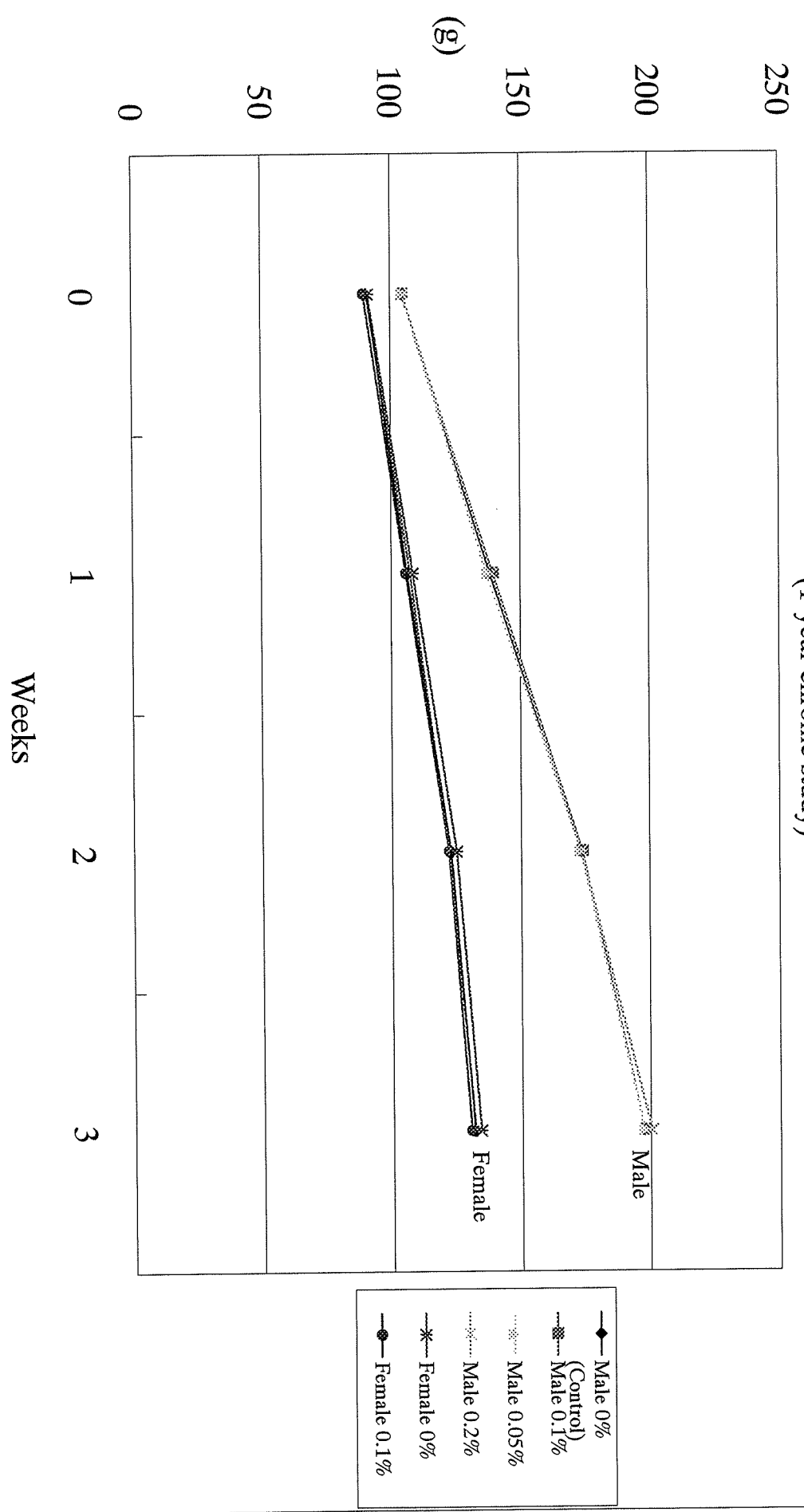


Fig. 3-2 Food consumption for F344 rats treated with Ozokerite for 3 weeks
(1-year chronic study)

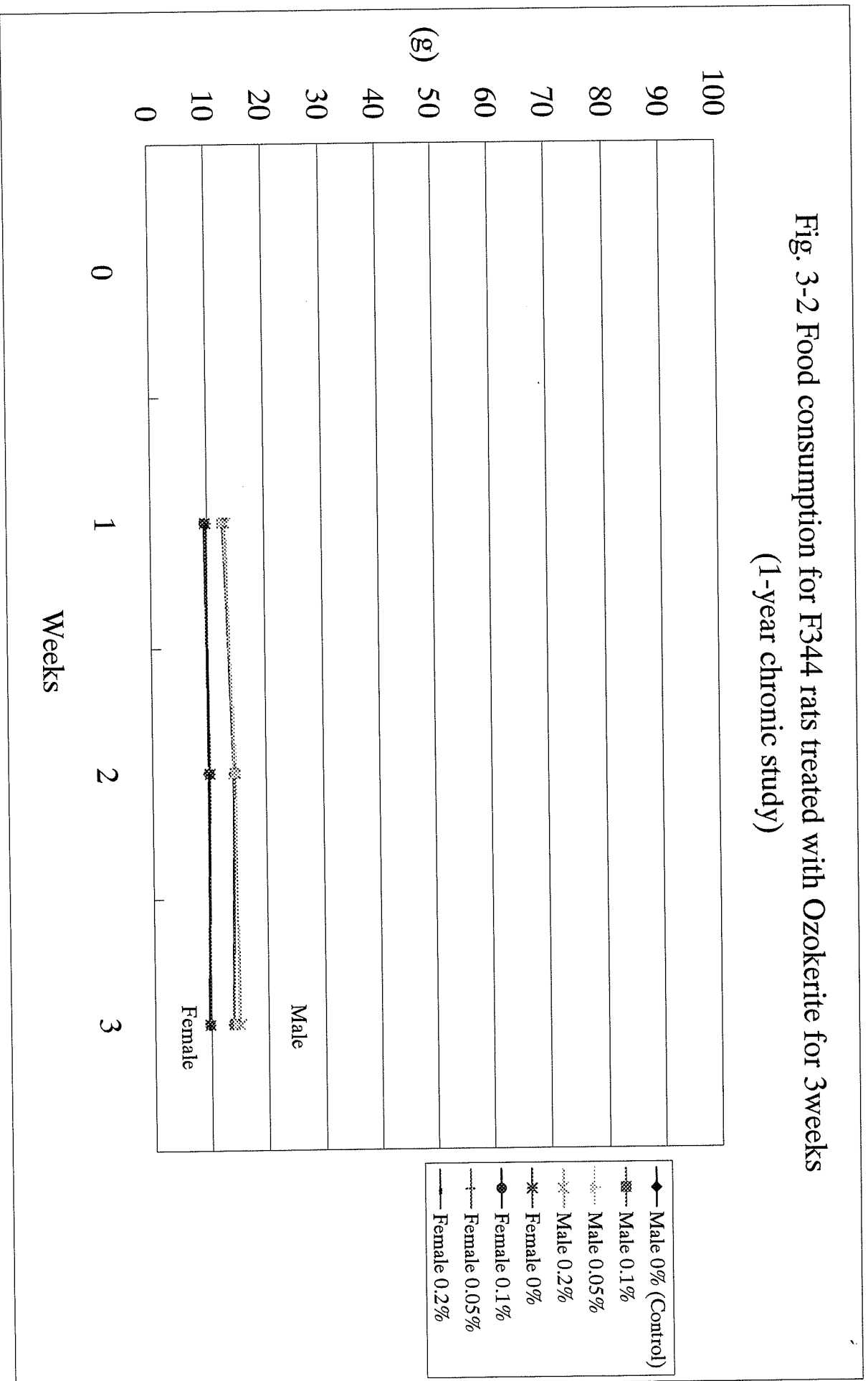


Fig. 3-3 Growth curves for F344 rats treated with Ozokerite for 3 weeks
(2-year carcinogenicity study)

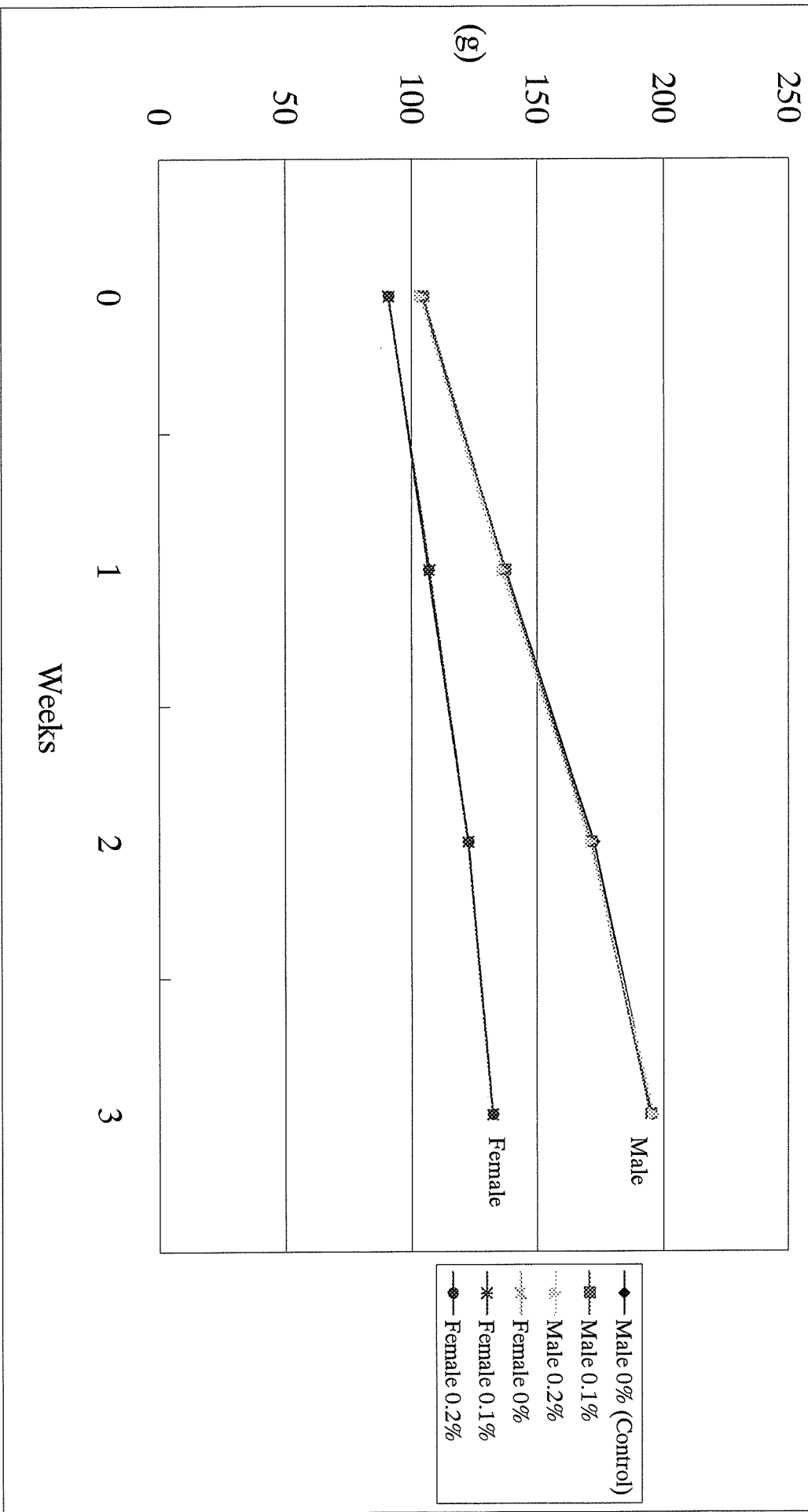
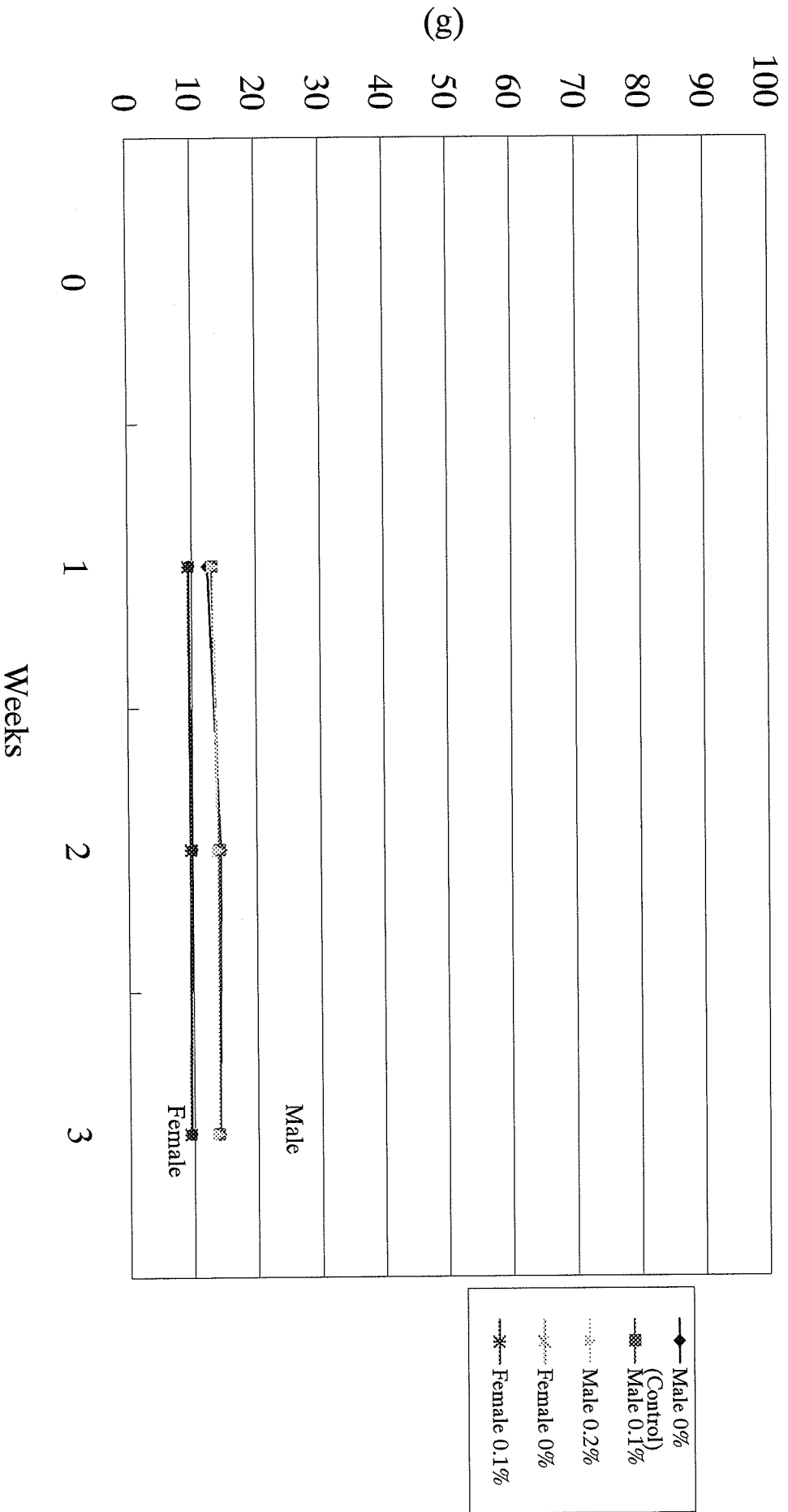


Fig. 3-4 Food consumption for F344 rats treated with Ozokerite for 3 weeks
(2-year carcinogenicity study)



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：アカネ色素の発がん性に関する成分に関する研究

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

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：既存添加物として使用されていたアカネ色素の腎発がんに関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。雄性 F344 ラットにアカネ色素成分の alizarin (Alz), lucidin-3-O-primeveroside (LP)と LP の代謝産物である rubiadin (Rub)を 0.0016, 0.008, 0.04% (Alz)または 0.06, 0.3, 1.5% (LP, Rub)の用量で混餌投与し、投与後 1 週目に腎臓を採取し、病理組織学的検索、PCNA の免疫染色による尿細管上皮細胞増殖活性の検索、8-OHdG レベルの測定を実施した。その結果、Alz, LP 投与により腎皮質近位尿細管上皮細胞 (PTC)の微小空胞変性が各々0.0016%以上群, 0.3%以上群に出現し、好塩基性変性が各々の最高用量群に認められた。一方、Rub 投与により、アカネ色素による腎腫瘍の好発部位である髓質外帯 PTC に核の大小不同を伴う好塩基性変性が認められた。アカネ色素で増加を示した髓質外帯 PTC の PCNA 陽性細胞数は、0.04% Alz 投与では変化はなく、LP 投与では 1.5%で増加 (0.3%で増加傾向) し、Rub 投与では 0.06%群のみで強く増加した。腎組織内の 8-OHdG レベルは、0.04% Alz, 1.5% LP で増加したが、0.06, 1.5% Rub では変化しなかった。以上の結果より、アカネ色素投与早期に認められた腎皮質の変化 (PTC の微小空胞変性、好塩基性変性) は Alz と LP 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髓質外帯の尿細管変化 (核の大小不同、細胞増殖活性亢進) は Rub に起因したものと考えられ、Rub による遺伝毒性陽性所見から、アカネ色素による腎発がんは Rub による直接的 DNA 損傷の関与が示唆された。

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、その成分は主に 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について経時的な解析を行い、さらに lucidin をラットに投与した際に現れる腎変化と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 (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

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碎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.) の根粉碎品 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, 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 (Fig. 1)。動物実験は, 各物質の入手時期が異なったため, Alz, 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, 研究所の利用規程に従った。

C. 研究結果

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 (Table 1)。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。摂餌量と各検体の体重 1 kg あたりの一日摂取量を Table 2 に示した。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。

腎臓の病理組織学的所見を Table 3, 4 に示した。Alz, 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 (Fig. 2a) 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髄質外帯の 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 (Fig. 2b, c)。これらの変化は、Rub の高用量で髄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、髄質外帯 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、髄質外帯の PTC1000 個あたりの PCNA 陽性細胞数を検索した結果 (Fig. 3), 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+髄質外帯) における 8-OHdG レベルを測定した結果、0.04% Alz 群, 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 (Fig. 4)。

D. 考察

本研究では、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与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, 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变化であり、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、腫瘍発生に関与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 投与では酸化的 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、酸化的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、それが酸化的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

今回の検索で、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的ストレスが関与す

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 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

Table 1. Final body, absolute and relative kidneys weights of male F344 rats given Alz, LP and Rub for one week

Group	Final body weight (g)	Kidneys	
		Absolute (g)	Relative (g/100 g bw)
Control ^{a)} (for Alz and LP)	146.8 ± 6.4	1.24 ± 0.09	0.843 ± 0.023
Alz (% in diet)			
0.0016	146.5 ± 7.5	1.21 ± 0.07	0.826 ± 0.013
0.008	144.9 ± 8.1	1.21 ± 0.07	0.834 ± 0.011
0.04	142.2 ± 7.4	1.24 ± 0.08	0.871 ± 0.016*
LP (% in diet)			
0.06	143.3 ± 9.8	1.23 ± 0.08	0.857 ± 0.017
0.3	144.3 ± 11.8	1.21 ± 0.10	0.839 ± 0.009
1.5	141.5 ± 7.2	1.18 ± 0.06	0.834 ± 0.014

Control (for Rub)	143.3 ± 6.5	1.15 ± 0.07	0.802 ± 0.020
Rub (% in diet)			
0.06	134.7 ± 4.8*	1.14 ± 0.05	0.846 ± 0.024
0.3	105.1 ± 4.6**	0.90 ± 0.04**	0.855 ± 0.028
1.5	75.5 ± 3.4**	0.78 ± 0.04**	1.035 ± 0.075**

*, **: Significantly different from the control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Dunnett's test or Dunnett type rank-sum test).

^{a)} Number of animals examined was six in all groups.

Abbreviations: Alz, alizarin; LP, lucidin-3-*O*-primeveroside; Rub, rubiadin.

Table 2. Food consumption and chemical intake of male F344 rats given Alz, LP and Rub for one week

Group	Food	Mean chemical intake
Control	92.6	0
(for Alz and LP)		
Alz (% in diet)		
0.0016	100.4	1.61
0.008	94.7	7.57
0.04	99.6	39.82
LP (% in diet)		
0.06	95.2	57.14
0.3	90.0	270.11
1.5	90.8	1362.63

Control	89.0	0
(for Rub)		
Rub (% in diet)		
0.06	85.9	51.56
0.3	54.0	162.09
1.5	26.0	389.94

Abbreviations: Alz, alizarin; LP, lucidin-3-*O*-primeveroside; R

Table 3. Histopathological findings of the kidneys of male F344 rats given Alz or LP for one week

Lesion	Grade	Alz (% in diet)					LP (% in diet)	
		Control	0.0016	0.008	0.04	0.06	0.3	1.5
Proximal tubules, cortex								
Microvesicular vacuolar degen (±/+/++)		0	5 (5/0/0)**#	6 (6/0/0)**#	6 (1/3/2)**#	0	1 (1/0/0)	6 (0/4/2)**#
Hyaline droplet degeneration (±/+/++/+++)		6 (1/5/0/0)	6 (4/2/0/0)	6 (5/1/0/0)*	6 (2/1/3/0)	6 (0/4/2/0)	6 (0/2/3/1)*	6 (0/2/4/0)*
Basophilic degeneration (±/+/+++)		0	0	0	6 (2/2/2)**#	0	0	2 (0/0/2)

Grade (distribution of each lesion) ±: <20%, +: 20-50%, ++: 50-70%, +++: >70% of proximal tubules in the cortex

#. p<0.05, ##. p<0.01 (Fisher's exact probability test)

*. p<0.05, **.: p<0.01 (Mann-Whitney's U-test)

Abbreviations: Alz, alizarin; LP, lucidin-3-O-primeveroside; Rub, rubiadin.

Table 4. Histopathological findings of the kidneys of male F344 rats given Rub for one week

Lesion (Grade)	Rub (% in diet)			
	Control	0.06	0.3	1.5
Proximal tubules, outer medulla	0	6**,#	6**,#	6**,#
Basophilic degeneration (+++)	0	6(6/0)**,#	6(6/0)**,#	6(0/6)**,#
Cytoplasmic swelling (++++)	0	6(6/0)**,#	6(0/6/0)**,#	6(0/0/6)**,#
Karyomegaly (+/+/+/+++)	0	6(6/0/0)**,#	6(0/6/0)**,#	6(0/0/6)**,#
Microvesicular vacuolar degeneration (±/+)	3(3/0)	6(4/2)*	5(0/5)*	6(6/0)
Apoptosis (±)	0	0	0	6**,#
Proximal tubules, cortex				
Hyaline droplet degeneration (±/+)	6(3/3)	6(0/6)	0**,#	0**,#

Grade (distribution of each lesion): ±: <20%, +: 20~50%, ++: 50~70%, +++: >70% of the proximal tubules in each area

#: p<0.05, **: p<0.01 (Fisher's exact probability test)

*: p<0.05, **: p<0.01 (Mann-Whitney's U-test)

Abbreviations: Rub, rubiadin.