

200734019A

別紙1

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 西川 秋佳

平成20(2008)年 4月

目 次

I. 総括研究報告		
既存添加物の慢性毒性及び発がん性に関する研究	-----	1
西川秋佳		
II. 分担研究報告		
1. オゾケライトの慢性毒性・発がん性に関する研究	-----	12
西川秋佳		
2. アカネ色素成分による <i>in vivo</i> 突然変異誘発性に関する研究	-----	25
梅村隆志		
3. アカネ色素成分の発がん性とその標的性に関する研究	-----	35
渋谷 淳		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	47
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	48

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

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 病理部長

研究要旨

既存添加物オゾケライトのラットを用いた1年間の慢性毒性試験および2年間の発がん性試験を実施した。雌雄F344ラットに、慢性毒性試験では0.2, 0.1および0.05%, 発がん性試験では0.2および0.1%の用量で混餌投与した。慢性毒性試験では、雄0.1%以上で体重増加抑制、雌雄0.05%以上で貧血所見がみられた。血清ASTおよびALTが雌雄全投与群において対照群の値より約2倍以上増加した。相対器官重量は、肺が雄0.1%以上、雌0.2%で、肝臓および脾臓が雌雄0.1%以上で、腎臓が雄0.2%でそれぞれ増加した。これらの結果から、オゾケライトの長期反復投与はラットの肺、肝臓、脾臓および腎臓に毒性影響を及ぼす可能性が示唆され、現在検索中の病理組織学的検査結果を待って総合評価する。なお、発がん性試験は、現在、動物実験を継続中である。

アカネ色素の腎および肝発がん機序解明のため、その構成成分および代謝物の*in vivo*変異原性をレポーター遺伝子導入ラットで検討した。雄*gpt delta*ラットにアカネ色素とその構成成分alizalin (Alz), lucidin-3-primeveroside (LP)およびLPの代謝物rubiadin (Rub)を0.04-5.0%混餌投与した。投与後8週目に腎臓および肝臓を採取し、器官重量およびDNA中8-OHdG量を測定した。腎相対重量はアカネ色素群、LP群およびAlz群で、肝相対重量はアカネ色素群およびRub群で上昇した。腎8-OHdG量はアカネ色素群で上昇傾向を示し、LP群およびAlz群で上昇した。肝8-OHdG量はLP群およびRub群で上昇傾向を示し、アカネ色素群とAlz群で上昇した。以上の結果から、アカネ色素による腎および肝発がん機序にその構成成分が引き起こす酸化的DNA損傷が関与する可能性が示された。今後、肝臓および腎臓における*gpt*遺伝子突然変異頻度、変異スペクトラムの解析を加えて、その発がん機序解明を目指す。

また、アカネ色素成分の発がん標的性をラット中期多臓器発がん性試験で検討した。雄のF344ラットに5種のイニシエーター (DEN; MNU; DMH; BBN; DHPN)を各々4週間投与し、1週間の休薬後、AlzまたはRubを0.008%, 0.04%の用量で23週間混餌投与した。腎臓、肝臓を採取し、病理組織学的検索と共に、肝臓の前がん病変マーカーであるGST-P陽性肝細胞巢の免疫組織化学的検索を実施した。その結果、Alz, Rubともに0.04%投与で腎髄質外帯における近位尿細管上皮細胞の異型尿細管、異型過形成の発生が増加した。また、腎細胞腺腫や癌がAlzとRubの0.04%投与群で発生した。肝臓については、0.04% Rub群でGST-P陽性肝細胞巢数が増加し、肝細胞腺腫がRubの投与群で発生した。以上より、AlzとRubとも腎髄質外帯の近位尿細管上皮を標的とした発がんプロモーション作用を示し、アカネ色素による腎発がんにはAlzによる酸化的DNA損傷やRubによる直接的DNA損傷の関与が示唆された。さらに、Rubには肝細胞に対するプロモーション作用が見い出された。

分担研究者

梅村隆志 国立医薬品食品衛生研究所病理部 第一室長

渋谷 淳 東京農工大学大学院共生科学技術研究院動物生命科学部門 准教授

## 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C<sub>29</sub>~C<sub>53</sub>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、その安全性についてはこれまでほとんど報告はなく、90日間反復投与毒性試験が近年実施され、諸臓器における肉芽腫形成が報告された。そこで今回、さらに長期投与の影響を検索する目的でラットを用いた1年間の慢性毒性および2年間の発がん性試験を実施した。

一方、アカネ色素Madder color (MC)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アントラキノン系の色素である。本邦において畜肉加工品や菓子類の着色料として使用されていた。しかし、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、腎臓と肝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、一日摂取許容量 (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消除され、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。

アカネ色素の腎発がん機構の解明を目的として、これまでアカネ色素の90日間の投与により、近位尿細管上皮の変性、再生、核の大小不同、細胞増殖の亢進の他、酸化的ストレス関連遺伝子の発現上昇を見出し、その発がん過程に酸化的ストレスの関与の可能性を報告した。さらに、本研究において、18年度にアカネ色素の腎発がん性を示す色素成分の同定を目的として、alizin (Alz), lucidin-3-primeveroside (LP) およびLPの代謝物であるlucidinとrubiadin (Rub)を短期間投与した結果、RubおよびLPによって、アカネ色素による腎腫瘍の好発部位である髓質外帯尿細管上皮における核の大小不同および細胞増殖の亢進の他、酸化的ストレス関連遺伝子数の用量および時間依存的な発現上昇が認められている。一方で、LPの代謝物であるRubはDNAの直接傷害性を有することが知られていることから、アカネ色素の発がんメカニズムにはその構成成分および代謝物による遺伝子の直接傷害性とキノラジカルの生成を介した酸化的ストレスの関与の両方が関与すると考えられる。本年度は、MC, Alz, LP, Rubの*in vivo*突然変異誘発性の検討を目的として*gpt* deltaラットにそれぞれ8週間混餌投与して、発がん標的臓器の腎臓および肝臓における*gpt*遺伝子変異頻度を検索する。現在動物実験を終了し、腎臓および肝臓のDNA中8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)量を測定した。また、AlzとRubの発がん標的性の有無を明らかにするために、ラットを用いてプロモーション時期での投与による中期多

臓器発がん性試験を実施し、全身諸臓器を採取したが、本年度はアカネ色素の発がん標的である腎臓と肝臓の病理組織学的検索結果について報告する。

## B. 研究方法

### I. オゾケライトの慢性毒性・発がん性に関する研究（西川）

オゾケライトは原体として株式会社加藤洋行（大阪）から供与を受けた。投与濃度は、既に実施された予備試験の結果に基づき、慢性毒性試験では最高用量を0.2%とし、以下の用量を公比2で除して、0.1、0.05%に設定し、発がん性試験では0.2、0.1%に設定した。オゾケライトはCRF-1粉末基礎飼料にオリーブ油を溶剤とし飼料に添加して自由に摂取させ、対照群にはオリーブ油のみを添加した粉末飼料を摂取させた。

被験物質の添加飼料中の安定性を検討するため、本試験での最高濃度である0.2%オゾケライト混餌飼料、0%オゾケライト混餌飼料（オリーブ油のみを添加）、オゾケライトをオリーブ油に懸濁したもの（混合濃度0.27%）を調製し、4℃・遮光下で、調製から1日後、1週間後、1ヵ月後、3ヶ月後まで保存した。各サンプルを国立医薬品食品衛生研究所・食品添加物部に依頼しGC / MS分析を行った結果、トータルイオンクロマトグラフ（TIC）で、オゾケライトの成分の減少や、新たなピークの出現は認められなかった。また、オゾケライトの主成分である直鎖飽和炭化水素含有量の経時測定の結果、CRF-1粉末基礎飼料中およびオリーブ油中で、調製から1日後、1週間、1ヵ月および3ヶ月後で大きな変化は認められなかった。これらの結果を基に、オゾケライト添加飼料はオリエンタル酵母株式会社に3ヶ月ごとに作製を依頼し、使用時までは4℃・遮光下で保存した。

5週齢のF344/DuCrjラット雌雄各190匹

を日本チャールス・リバー社（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）と水道水で約1週間の馴化飼育のあと、慢性毒性試験は雌雄とも各群10匹ずつ4群に、発がん性試験は雌雄とも各群50匹の3群に配した。動物の飼育はバリヤーシステムの動物舎で行い、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。雄は3匹ずつ、雌は4匹ずつポリカーボネート製箱型ケージに収容し、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、飲料水として水道水を自由に摂取させた。

慢性毒性試験では、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開始から5週目までは毎週1回測定し、5週目以降からは毎月1回測定した。動物は、剖検日前日より一晩絶食させ、翌日エーテル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 M-2000、東亜医用電子社；東京）を用いて、白血球数（WBC）、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）、平均赤血球血色素量（MCH）、平均赤血球血色素濃度（MCHC）および血小板数（PLT）について測定した。血清生化学的検査は、分離した血清を凍結保存し、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ターゼ（ALP）、 $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチターゼ（ $\gamma$ -G

TP) についてSRL社(東京)にて測定した。諸臓器は肉眼的に観察後摘出し、脳、肺、心臓、脾臓、肝臓、腎臓、副腎および精巣の重量を測定した。上記の臓器に加え、鼻腔を含む頭蓋骨、下垂体、眼球、ハーダー腺、脊髄、唾液腺、胃、小腸、大腸、膵臓、膀胱、皮膚、乳腺、リンパ節、気管、食道、甲状腺、舌、大腿筋、坐骨神経、精巣上体、精囊、前立腺、子宮、卵巣および膣を10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。

発がん性試験では、慢性毒性試験と同様に一般状態の観察を連日実施し、体重および摂餌量を開始から5週目までは毎週1回、5週目以降からは毎月1回測定した。現在投与開始から56週目を経過し、動物実験を継続中である。

## II. アカネ色素成分による *in vivo* 突然変異誘発性に関する研究(梅村)

アカネ色素は原体として三栄源エフ・エフ・アイ株式会社(大阪)から供与を受けた。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(三栄源エフ・エフ・アイ株式会社, 大阪)。また、Rubは既存の報告をもとに合成したもの(純度99.9%)を使用した(アルプス薬品工業株式会社, 岐阜)。

動物は4週齢の雄性F344 *gpt delta* ラットを日本エスエルシーから購入し、一週間の馴化後、実験に供した。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、換気回数 18 回/時(オールフレッシュ)、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯であり、この条件下で飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに5匹ずつ収納し、床敷は三共ラボサービス社(東京)のソフトチップを用い、週2回交換を行った。また、飲料水として水道水を試験期間

中自由に摂取させた。

被験物質の投与用量設定は、MCを腎発がん用量の5.0%とし、AlzおよびLPについてはアカネ色素成分含量(Alz 1.58%, LP 6.60%)から算出し、それぞれ0.08%および0.3%とした。さらにLPの代謝物であるRubについても0.3% LPから代謝されると想定される0.04%を設定した。被験物質は各用量でCRF-1粉末飼料(日本チャールズ・リバー社, 神奈川)に混じて8週間自由に摂取させた。対照群には被験物質を含まないCRF-1粉末飼料を同期間自由に摂取させた。試験期間中、餌の交換は週1回、一般状態観察を連日実施した。また、体重および摂餌量の測定は週1回行った。8週間の投与の後に動物はエーテル麻酔下にて放血致死させ、標的臓器である腎臓および肝臓を採取し、それぞれの重量を測定した。肝臓と乳頭部を除去した腎臓の一部は病理組織学的検索に用いるため、常法に従いパラフィン包埋後、薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(H&E)染色を施した。*gpt* assayおよび8-OHdG測定用のサンプルは液体窒素により凍結し、測定まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

腎臓および肝臓のDNA中8-OHdGの測定はNakaeらの方法を参考にした。DNAはDNAエキストラクターWBキット(和光純薬社製)を用いて抽出し、nuclease P1とalkaline phosphataseにより消化した。得られた試料は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)/紫外・可視吸光度検出器(UV)/電気化学検出器(ECD)により測定を行った。HPLCポンプはGynkotek 480(Gynkotek社製)を、カラムはUltrasphere ODS(4.6 x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Beckman Coulter社製)UVはGilson 118(Gilson社製)、EDはCoulochem II(ESA社製)を使用した。移動相には10 mM リン酸一ナトリウム塩 / methanol = 96 / 4 (v/v) (1.0 mL/min)を送液し、分析カラムで分離した

後 deoxyguanosine (dG) を UV 290 nm で、8-OHdG を ED 300 mV で検出し、8-OHdG 値は 8-OHdG / 10<sup>5</sup>dG 量として算出した。

### III. アカネ色素成分の発がん性とその標的性に関する研究 (渋谷)

Alz は市販品 (Sigma-Aldrich, 純度 97%) を購入し使用した。また、Rub は以前の報告 (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、1 群 20 または 25 匹ずつ、合計 5 群に分けた。

全群ともに 5 種のイニシエーター (*N*-diethylnitrosamine, DEN; *N*-methylnitrosourea, MNU; 1, 2-dimethylhydrazine, DMH; *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN); 2, 2'-dihydroxy-di-*n*-propylnitrosamine; DHPN) を実験開始後 4 週の間各々投与した。すなわち、実験開始日に 100 mg/kg BW DEN を単回腹腔内投与した後、0.05% BBN を 2 週間飲水投与し、その間週 2 回、計 4 回 20 mg/kg BW MNU を腹腔内投与した。さらに、次の 2 週間は 0.1% DHPN を飲水投与し、その間週 2 回、計 4 回 40 mg/kg BW DMH を皮下投与した。1 週間の休薬後、実験 5 週目から Alz, Rub とともに 0.008%, 0.04% の用量で 23 週間混餌投与した。0.04% Alz はアカネ色素の発がん用量域に含まれる濃度であり、0.04% Rub は昨年度の実験結果で体重増加抑制がみられた 0.06% より低く、腎臓等に病変が発生すると予想された用量として設定した。対照群には実験 5 週目から基礎飼料のみを与えた。実験 28 週目に生存していた動物を解剖し、全身臓器を採取した。採取した左右の腎臓については乳頭部を含む両腎の短軸断のスライスを各 4 断面、肝臓については左葉から 2 断面、中間葉から 1 断面切り出し、ホルマリン固定した。常法に従い厚さ 3  $\mu$ m のパラフィ

ン切片を作製し、病理組織学的検索、免疫組織化学的検索に用いた。出現した増殖性病変について、腎臓では発生頻度と個数を、肝臓では発生頻度を検索した。腎臓に出現した尿細管の増殖性病変は、①異型尿細管：1 本の異型を伴う腺管で核分裂像、壊死細胞を認めることがあるが稀で、管腔内は正常か、異型細胞または細胞破砕物で塞がれているもの；②異型過形成：増殖している異型細胞が単層または多層に配列し、中心が壊死している場合もある病変で、核分裂像は認められることもある。嚢胞状、充実性に増殖または管腔が拡張する場合もある。嚢胞型を除き、大きさは周囲の正常尿細管のサイズの 10 倍を超えないものとし、周囲への圧迫や浸潤、結合組織による被包化は認めないもの；③腺腫：異型尿細管／過形成より大きく充実性に増殖し、周囲への圧排性があるもの；④腺癌：腺腫より細胞異型が強い場合や、中心部に壊死があるもの、に分類した。

肝臓については前がん病変のマーカーとされる glutathione *S*-transferase placental form (GST-P) 陽性肝細胞巣を検索するため、ホルマリン固定パラフィン切片を用いて免疫染色を実施した。このとき、一次抗体はウサギ・ポリクローナル抗体 (Medical & Biological Laboratories, x1000) を使い、4℃ 一晚反応させ、二次抗体以降のステップは Vectastain<sup>®</sup> 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。その後、左葉と中間葉に認められた直径 0.2 mm 以上の GST-P 陽性肝細胞巣の数と面積について定量解析を実施した。

### IV. 統計学的処理方法

体重、臓器重量、血液学的検査値および血清生化学検査値については、各群の分散日を Bartlett の方法で検定し、等分散の場

合は一元配置の分散分析を行い、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、Dunnet の方法で対照群と投与群との間の有意差検定を行った。8-OHdG 量および GST-P 陽性肝細胞巢の数と面積について、群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Dunnet の方法で対照群と投与群との間の有意差検定を行った。

#### (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。実験動物に関しては、「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実施した。また、DNA 組換え動物の使用についても、「国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則」に従い、遺伝子組み換え実験計画書を作成し、審査を受けた。

### C. 研究結果

#### 1. オゾケライトの慢性毒性・発がん性に関する研究 (西川)

慢性毒性試験では、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。雄の 0.1 および 0.2% 群で、体重増加抑制がみられ、投与 25 週目に 0.2% 群で、45 週目より 0.1% 以上の投与群で有意な増加率の減少を認めた。雌では投与期間を通じて、投与群と対照群との間に有意な変化は認められず、全ての群で同様な推移を示した。摂餌量は、雄では全ての群において投与期間を

通じて約 12 g から 16 g の間で推移し、雌では全ての群において投与期間を通じて、約 7 g から 10 g の間で推移した。1 日当りの平均摂餌量は、雄の 0, 0.05, 0.1 および 0.2% 群で、それぞれ 13.8, 13.7, 13.8 および 14.0 g, 雌の 0, 0.05, 0.1 および 0.2% 群では、それぞれ 8.9, 9.1, 9.0 および 9.0 g であり、雌雄ともに、対照群と投与群との間に明らかな差は見られなかった。1 日当りの被験物質の摂取量は、雄の 0.05, 0.1 および 0.2% 群で 25.5, 50.3 および 104.2 mg/kg 体重/day, 雌の 0.05, 0.1 および 0.2% 群で 27.8, 54.9 および 110.6 mg/kg 体重/day であった。52 週間での総摂取量は、雄の 0.05, 0.1 および 0.2% 群で 9.3, 18.4 および 38.0 g, 雌の 0.05, 0.1 および 0.2% 群では 10.1, 20.0 および 40.4 g であり、雌雄ともに用量公比にほぼ相関していた。血液学的検査の結果、対照群と比較して、雄では全ての投与群で HGB および MCHC の有意な減少が認められた。また、0.1 および 0.2% 群で HCT, MCV, MCH および PLT の有意な減少が認められ、WBC の有意な増加が 0.2% 群で認められた。雌では、0.1 および 0.2% 群で HGB, HCT, MCH および PLT の有意な減少が認められ、全ての投与群で MCV の有意な減少が認められた。また、WBC の有意な増加が 0.1 および 0.2% 群で認められた。白血球百分比については現在検索中である。血清生化学的検査では、雄の全ての投与群で TP, Alb および TG の有意な減少が、CRN, AST および ALT の有意な増加が認められた。また T.Bil の有意な増加が 0.2% 群で、Cl の有意な増加が 0.1 および 0.2% 群で、K の有意な増加が全ての投与群で認められた。γ-GTP の有意な減少が 0.1% 群で認められたが、これは投与濃度に相関した変化ではなかった。雌では、全ての投与群で TP, A/G 比, Alb および TG の有意な減少が、AST および ALT の有意な増加が認められた。また BUN および CRN の有意な増加が 0.2% 群で、



T.Bil, ALP,  $\gamma$ -GTP および K の有意な増加が 0.1% および 0.2% 群で, Cl の有意な増加が 0.1% 群で認められた. 臓器実重量では, 雌雄ともに全ての投与群で肺の重量が有意に増加し, 0.1 および 0.2% 群で脾臓, 肝臓の重量が有意に増加した. また雄では, 腎臓の重量が 0.2% 群で有意に増加し, 精巣の重量が 0.1 および 0.2% 群で, 有意に減少した. 雌では心臓の重量が 0.05% 群で有意に減少した. 臓器相対重量では, 雌雄ともに 0.1 および 0.2% 群で, 脾臓および肝臓の重量の有意な増加が認められた. その他, 雄では肺の重量が 0.1 および 0.2% 群で, 腎臓の重量が 0.2% 群で有意に増加した. また, 脳重量が 0.1% 群で有意に増加した. 雌では肺の重量が 0.2% 群で有意に増加した. 慢性毒性試験の病理組織学的検査は現在進行中である.

発がん性試験では, 投与開始時から現在まで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ていない. 雄の 0.1 および 0.2% 群で体重増加抑制がみられ, 0.2% 群では投与 15 週目より, 0.1% 群では 20 週目より有意な増加率の減少を認めた. 50 週時点の対照群に対する体重減少率はそれぞれ 6% および 7% である. 雌では投与期間を通じて, 投与群と対照群との間に有意な変化は認められず, 同様な推移を示している. 摂餌量は, 雄では全ての群において約 12 g から 15 g の間で推移し, 雌では全ての群において約 7 g から 10 g の間で推移している.

## II. アカネ色素成分による *in vivo* 突然変異誘発性に関する研究 (梅村)

試験期間中の動物の一般状態については特記すべき変化は認められなかった. 対照群と比べて MC 群は第 1 週, LP 群は第 2 週および Alz 群では第 3 週以降で有意な増加抑制が認められた. 一日当たりの平均摂取量

は, 対照群で 17.6 g, MC 群で 13.4 g, LP 群で 17.2 g, Alz 群で 15.3 g および Rub で 16.6% であった. 肝絶対重量では対照群と比べて Alz 投与群で有意な減少が認められ, 肝相対重量では MC 群と Rub 群で対照群に比べ有意な増加が認められた. 腎絶対重量では対照群との間に統計学的有意差は認められなかったのに対し, 腎相対重量は MC 群, LP 群および Alz 群で対照群に比べ有意な増加が認められた. 病理組織学的検査については現在検索中である.

腎臓における 8-OHdG レベルは対照群に比べて, MC 群で上昇傾向が, LP 群および Alz 群で有意な上昇が認められた. 肝臓では LP 群および Rub 群で上昇傾向が, MC および Alz 群で対照群に比べて有意な上昇が認められた.

## III. アカネ色素成分の発がん性とその標的性に関する研究 (渋谷)

各群で途中死亡例が認められ, 投与終了まで生存した動物数は対照群 11 匹, 0.008% Alz 群 18 匹, 0.04% Alz 群 17 匹, 0.008% Rub 群 21 匹, 0.04% Rub 群 20 匹であった. 最終体重, 腎臓・肝臓重量 (絶対・相対) いずれも投与群と対照群との差は認められなかった. 腎皮質において, 対照群を含む全群に近位尿細管上皮の異型尿細管, 異形過形成, 腎細胞腺腫/癌の発生を認めたが, 発生頻度, 個数とも対照群との間に差は認められなかった. 一方, アカネ色素による腫瘍好発部位である髄質外帯でも同様に, 対照群を含む全群で異型尿細管, 異形過形成の発生を認めたが, 0.04% Alz 群では異形過形成の発生頻度が有意に増加し, 0.04% Rub 群では異型尿細管, 異形過形成の頻度, 個数とも有意に増加していた. さらに, 対照群では認めなかった腎細胞腺腫/癌が有意差はないものの 0.04% Alz 群と 0.008% 以上の Rub 群で発生し, その頻度は Rub の方が高かった. その他, 腎間葉

系腫瘍や腎盂の移行上皮過形成、癌が各々の群に発生したが、対照群との有意差や投与群における用量依存性は認められなかった。

肝臓における GST-P 陽性細胞巢は対照群を含む全群に認められた。単位面積あたりの発生個数が 0.04% Rub 群のみで有意に増加していた。この群での面積及び他の群の発生個数や面積については、対照群との差は認められなかった。肝臓で認められた非増殖性病変として、びまん性肝細胞腫大と核の大小不同などの核変化が、対照群を含む全群の全ての動物で同等に認められた。変異肝細胞巢以外の増殖性病変として、肝細胞腺腫が Rub 群の各用量で 1 例ずつ発生したが、他の群では認められなかった。その他、肝細胞過形成（過形成性結節）、血管肉腫、胆管上皮の過形成が各々各群に認められたが、対照群との差や用量依存性はみられなかった。

#### D. 考察

今回、F344ラットを用いてオゾケライトの混餌投与による慢性毒性試験および発がん性試験を実施した。慢性毒性試験の結果、試験期間中死亡動物は認められず、一般状態の異常も認められなかった。体重推移では、雄では0.1%以上の投与群で体重増加抑制がみられ、25週目に0.2%群で、45週目からは0.1および0.2%で有意な差が認められた。雌では、投与期間を通じて対照群と投与群の間に有意な差は認められず、同様な推移を示した。摂餌量では、雌雄ともに対照群と投与群の間に明らかな差はなくほぼ同じ値であり、単位体重当りの被験物質摂取量も、用量相関性をもって増加した。また、対照群と投与群の摂取量に差がないことから、雄の0.1および0.2%群での体重抑制は被験物質投与に起因するものと考えられた。血液学的検査では、赤血球系項目、

血小板および白血球の値にそれぞれ変化がみられた。赤血球系項目では、雌雄ともにHGB, HCT, MCVおよびMCHが0.1および0.2%群で有意に減少し、雄のHGBおよびMCHC, 雌のMCVが0.05%群から有意に減少したことから、雌雄ともに0.05%以上の投与群で軽度の貧血が起きていると考えられた。血小板では雌雄ともに0.1および0.2%群で有意な減少が、白血球では雄の0.2%、雌の0.1および0.2%群で有意な増加が認められた。なお、現在白血球百分比を検索中である。血清生化学的検査では、雌雄ともに全ての投与群でASTおよびALTの有意な増加が認められ、全ての投与群において対照群の値より約2倍以上の高値を示した。これらは投与濃度に相関した変化ではなかったが、0.05%以上の投与群で明らかな肝障害が引き起こされていると考えられた。また、TP, AlbおよびTGの有意な減少が雌雄全ての投与群で認められた。雄の0.2%群ではT.Bilの有意な増加が認められた。雌の0.1%および0.2%群ではT.Bil, ALPおよびγ-GTPの有意な増加が認められた。これらの変化、さらには前述の血小板数の減少および白血球の増加は、前述の肝障害を原因としたものである可能性も考えられた。その他、雄ではCRNの有意な増加が全ての投与群で認められ、雌ではBUNおよびCRNの有意な増加が0.2%投与群で認められたことから、腎毒性が引き起こされている可能性が示唆された。電解質系における種々の変化はこれに起因している可能性が考えられた。臓器重量では、血液学的および血清生化学的検査で有意な変化を示した項目の関連臓器として、肝臓、脾臓および腎臓の重量が変化した。肝臓および脾臓では雌雄ともに0.1および0.2%群で実重量・相対重量ともに有意に増加した。相対重量においては、雌雄ともに投与濃度に相関性が認められた。また、腎臓では雄の0.2%群で、実重量・相対重量ともに有意に増加した。その

他の臓器では、雌雄ともに肺の実重量が全ての投与群で有意に増加し、相対重量では雄では0.1%および0.2%群で、雌では0.1%群で有意に増加したことから、肺の障害が示唆された。また、雄の脳の相対重量と、雌の心臓の実重量の変化は、それぞれ投与濃度との相関性は認められず、被験物質投与に起因する変化ではないと考えられた。

一方、アカネ色素の構成成分とその代謝物の*in vivo*変異原性について追究することを目的に、*gpt delta*ラットに8週間投与し、実験期間中の体重推移、肝臓および腎臓の臓器重量、8-OHdG量および*in vivo*変異原性について検討した。その結果、実験終了時のラットの最終体重はアカネ色素、AlzおよびLP群では増加抑制が見られた。MCについてはこれまでの実験においても同様の体重増加抑制が認められており、腎毒性の影響も考えられるが、今回は摂餌量の減少が実験期間を通じて認められていることから、その影響も無視できないと思われた。AlzおよびLPによる体重増加抑制についてはこれまで報告されておらず、摂餌量についても減少はみられないことから、AlzおよびLPの腎毒性に起因することも考えられるが、現在検索中である病理組織学的検査の結果を待って考察する。肝相対重量はアカネ色素群とRub群で対照群に比べ有意に増加した。アカネ色素群では体重減少があり、実重量の増加は認められていないが、アカネ色素自体、肝を標的臓器にしていることを考慮に入れると、Rub群での変化も含めて毒性学的意義がある可能性が考えられた。腎相対重量はアカネ色素群、LP群およびAlz群で対照群に比べ有意な増加が認められ、Rub群においても有意差はないものの実重量、比重量とも増加傾向を示した。これらの標的臓器が腎臓であること考え合わせると、何れも何らかの毒性影響を及ぼしている可能性が考えられ、病理組織学的解析を加えて考察する予定である。腎臓

のDNA中8-OHdG量は対照群に比べてAlzでは約5倍、LPで約2.5倍の有意な上昇が認められた。アカネ色素についても有意とはならないものの明らかな上昇傾向が認められた。これらの結果はこれまでの報告と同様の傾向であった。肝臓のDNA中8-OHdG量は対照群に比べてMC群で約2倍、Alz群で約2.5倍の有意な上昇が認められた。さらにLP群およびRub群においても8-OHdG量の上昇傾向が認められた。これらの結果からアカネ色素による肝発がんについても腎臓同様にアカネ色素構成成分およびその代謝物による酸化的DNA損傷が関与することが示唆された。Rubは変異原性を有することが知られているが、腎臓での8-OHdGの上昇は確認されていなかったことから、酸化的DNA損傷ではなくDNAの直接傷害によってアカネ色素の腎発がん性に関与していると考えられていた。しかし、肝臓では8-OHdGの増加傾向が確認されたことから、DNAの直接傷害だけでなく、その代謝過程において他の構成成分と同様に酸化ストレスを引き起こす可能性が示唆された。今後、肝臓および腎臓の*gpt*遺伝子突然変異頻度、変異スペクトラムの解析を行うことで、アカネ色素の腎および肝発がん機序における各構成成分の関与を明らかにし、アカネ色素の発がん機序解明を目指す予定である。

また、今回の研究で肝臓と腎臓に対するAlzとRubの発がん標的性の有無が明らかになった。腎臓においては、AlzとRubの投与により髓質外帯の近位尿管部位における異型尿管、異型過形成の発生が有意に増加し、腎細胞腺腫・がんの発生を認め、この部位におけるプロモーション作用が明らかとなった。また、Alz群では、0.04%群のみで異型過形成の発生頻度が増加したのに対し、Rub群では0.04%で異型尿管、異型過形成の発生頻度と個数がともに有意に増加したことや、腎細胞腺腫が0.008%から発生したことから、本実験条件下では

Rub の発がんプロモーション作用は Alz より強いことが考えられた。昨年度実施した Alz, Rub の短期投与実験で、Alz は腎皮質に存在する近位尿細管上皮の変化（微小空胞変性、好塩基性変化）のみ誘発し、髄質外帯の近位尿細管上皮における変化（核の大小不同や細胞増殖促進）の発生には関与しないことが示された。しかし、今回の研究では弱いながら Alz の同部位での発がんプロモーション作用が見いだされる結果となった。Alz の短期間投与実験で腎組織内（皮質－髄質を含むスライス）において酸化的 DNA 損傷マーカーである 8-OHdG レベルが増加していたことから、今回みられた腎発がんプロモーション作用には酸化的ストレスの関与している可能性が示唆された。Rub の短期間投与実験では、皮質の変化は認めず、投与初期から腎髄質外帯の近位尿細管上皮の核の大小不同や細胞増殖促進が確認されている。一方、腎組織内の 8-OHdG レベルの変化は認めず、遺伝毒性があるとの報告があることから、Rub の髄質外帯の近位尿細管上皮に対する作用にはまず第一に直接的 DNA 損傷の関与が考えられた。腎発がんとの関連では、アカネ色素成分の LP の代謝産物である Rub でイニシエーション、Alz でプロモーションの生じている可能性が推察されるが、Rub の短期間投与で見いだされた標的細胞の増殖活性の付与や核の大小不同といった変化は、遺伝子傷害性だけでは説明ができない部分が多いため今後の検討が必要と考えられる。肝臓においては、Rub 投与により、前がん病変である GST-P 陽性細胞集数の増加を認めた。しかし、面積は増加を示さなかったため、Rub は肝臓の前がん病変の細胞増殖性に対する影響は弱い（あるいは限られている）と推察されるが、肝細胞腺腫の発生を認めたことから、Rub は弱いながらも肝発がんプロモーション作用を有する可能性が示唆された。Rub の強い遺伝毒性作用を

考慮すると、アカネ色素による肝発がん性には、細胞増殖活性を亢進させるようなプロモーション作用よりも、遺伝子傷害性の蓄積といったイニシエーション作用のウエイトが大きいものと推察された。アカネ色素の肝発がん性に対しても酸化的ストレスの関与が示唆されており、今後、この関連で関与成分を追究する必要がある。

## E. 結論

オゾケライトを雌雄のF344ラットに、0, 0.05, 0.1, 0.2%の用量で52週間混餌投与した結果、0.05%以上の雌雄で肝障害および軽度の貧血が引き起こされる可能性が示された。また、雌雄ともに0.2%以上で腎障害が疑われ、0.1%以上で肺の重量が増加した。

これらの血液学的検査、血清生化学的検査および臓器重量の結果をふまえ、無影響量 (NOEL) および無毒性量 (NOAEL) は、現在検索中である病理学的検査の結果を待って総合的に評価をする予定である。発がん性試験に関しては、オゾケライトを雌雄のF344ラットに、0, 0.1, 0.2%の用量で投与し、現在動物実験を継続中である。

一方、アカネ色素構成成分およびその代謝物が肝臓および腎臓で酸化的ストレスを引き起こし、アカネ色素の発がん性に関与することが示唆された。これらの結果を踏まえて、今後、肝臓および腎臓での *gpt* 遺伝子突然変異頻度、変異スペクトラム解析を加えて、その発がん機序解明を目指す。

また、今回の中期多臓器発がん性試験で、Rub, Alzとも腎髄質外帯の近位尿細管上皮を標的とした発がんプロモーション作用を示し、アカネ色素による腎発がんにはAlzによる酸化的ストレスやRubによる直接的DNA損傷の関与している可能性が示唆された。Rubでは更に、弱いながらも肝細胞に対するプロモーション作用が見いだされ、Rubによる発がん作用の可能性が示唆され

た.

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Inoue, K., Shibutani, M., Masutomi, N., Toyoda, K., Takagi, H., Uneyama, C., Nishikawa, A., Hirose, M.: A 13-week subchronic toxicity study of madder color in F344 rats. Food Chem. Toxicol. 46(1): 241-252, 2008.

Inoue, K., Shibutani, M., Masutomi, N., Toyoda, K., Takagi, H., Takahashi, M., Fujimoto, H., Hirose, M., Nishikawa, A.: One-year chronic toxicity of madder color in F344 rats – Induction of preneoplastic/neoplastic lesions in the kidney and liver. Food Chem. Toxicol. (submitted)

### 2. 学会発表

井上 薫, 渋谷 淳, 吉田 緑, 高橋美和, 広瀬雅雄, 西川秋佳: アカネ色素成分とその代謝産物の中期多臓器発がん性試験による腎発がんプロモーション作用の検索. 第24回日本毒性病理学会, 名古屋, 第24回日本毒性病理学会講演要旨集: p87 (P-79), 2月, 2008

井上 薫, 渋谷 淳, 吉田 緑, 高橋美和, 富士本仁, 広瀬雅雄, 西川秋佳: 腎障害性を有するアカネ色素成分あるいは代謝産物の腎発がんプロモーション作用について, 第145回日本獣医学会学術総会, 神奈川, 第145回日本獣医学会学術総会講演要旨集: pp176 (BP-27), 3月, 2008

## H. 知的財産権の出願・登録状況

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

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 病理部長

研究要旨

既存添加物として使用されているオゾケライトの長期投与の影響を検索する目的で、ラットを用いた1年間の慢性毒性試験および2年間の発がん性試験を実施した。雌雄 F344 ラットに、慢性毒性試験では0.2, 0.1 および0.05%, 発がん性試験では0.2 および0.1%の用量で混餌投与した。慢性毒性試験では、病理組織学的検索を除く検査項目について解析を終了した。雄の0.1%以上の投与群で投与開始15週目以降、体重増加抑制がみられた。血液学的検査では、雌雄ともに0.05%以上で貧血所見がみられた。血小板は雌雄ともに0.1%以上で減少し、白血球は雄で0.2%, 雌で0.1%以上の投与群で増加した。血清生化学的検査では、ASTおよびALTが雌雄ともに全投与群において対照群の値より約2倍以上の増加を示した。臓器重量では、肺の実重量が雌雄ともに0.05%以上で、相対重量が雄の0.1%以上、雌の0.2%の投与群で増加した。肝臓および脾臓では、雌雄ともに0.1%以上の群で実重量・相対重量ともに増加した。また、腎臓は雄の0.2%で実重量・相対重量ともに増加した。これらの結果から、オゾケライトの長期反復投与はラット肺、肝臓および腎臓に毒性を示す可能性が示唆され、現在検索中である病理学的検査の結果を待って総合的に評価をする。なお、発がん性試験においては、現在、動物実験を継続中である。

A. 研究目的

オゾケライトはワックスシュールの鉦脈に含まれるロウを精製したもので、成分はC<sub>29</sub>~C<sub>53</sub>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、その安全性についてはこれまでほとんど報告はなく、90日間反復投与毒性試験が近年報告された。そこで今回、さらに長期投与の影響を検索する目的でラットを用いた1年間の慢性毒性および2年間の発がん性試験を実施した。

B. 研究方法

1. 被験物質および実験動物

オゾケライトは原体として株式会社加藤

洋行（大阪）から供与を受けた。投与濃度は、既実施された予備試験の結果に基づき、慢性毒性試験では最高用量を0.2%とし、以下の用量を公比2で除して、0.1, 0.05%に設定し、発がん性試験では0.2, 0.1%に設定した。オゾケライトはCRF-1粉末基礎飼料にオリーブ油を溶剤とし飼料に添加して自由に摂取させ、対照群にはオリーブ油のみを添加した粉末飼料を摂取させた。

また被験物質の添加飼料中の安定性を検討するため、本試験での最高濃度である0.2%オゾケライト混餌飼料、0%オゾケライト混餌飼料（オリーブ油のみを添加）、オゾケライトをオリーブ油に懸濁したもの（混合濃度0.27%）を調製し、4℃・遮光下で、調製から1日後、1週間後、1ヵ月後、3

ヶ月後まで保存した。各サンプルを国立医薬品食品衛生研究所・食品添加物部に依頼し GC / MS 分析を行った結果、トータルイオンクロマトグラフ (TIC) で、オゾケライトの成分の減少や、新たなピークの出現は認められなかった。また、オゾケライトの主成分である直鎖飽和炭化水素含有量の経時測定の結果、CRF-1 粉末基礎飼料中およびオリーブ油中で、調製から 1 日後、1 週間、1 ヶ月および 3 ヶ月後で大きな変化は認められなかった。これらの結果を基に、オゾケライト添加飼料はオリエンタル酵母株式会社に 3 ヶ月ごとに作製を依頼し、使用時まで 4℃・遮光下で保存した。

動物は 5 週齢の F344/DuCrj ラット雌雄各 190 匹を日本チャールス・リバー社 (神奈川県) 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) と水道水で約 1 週間の馴化飼育のあと、慢性毒性試験は雌雄とも各群 10 匹ずつ 4 群に、発がん性試験は雌雄とも各群 50 匹 3 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舎で行い、室内の環境条件は温度 24±1℃、湿度 55±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。雄は 3 匹ずつ、雌は 4 匹ずつポリカーボネート製箱型ケージに収容し、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、飲料水として水道水を自由に摂取させた。

## 2. 試験方法

### 2-1. 慢性毒性試験

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開始から 5 週目までは毎週 1 回測定し、5 週目以降からは毎月 1 回測定した。動物は、剖検日前日より一晩絶食させ、翌日エーテル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 M-2000, 東亜医用電子社; 東京)

を用いて、白血球数 (WBC)、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)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC) および血小板数 (PLT) について測定した。

血清生化学的検査は、分離した血清を凍結保存し、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ラーゼ (ALP)、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチターゼ ( $\gamma$ -GTP) について SRL 社 (東京) にて測定した。

諸臓器は肉眼的に観察後摘出し、脳、肺、心臓、脾臓、肝臓、腎臓、副腎および精巣の重量を測定した。上記の臓器に加え、鼻腔を含む頭蓋骨、下垂体、眼球、ハーダー腺、脊髄、唾液腺、胃、小腸、大腸、膵臓、膀胱、皮膚、乳腺、リンパ節、気管、食道、甲状腺、舌、大腿筋、坐骨神経、精巣上体、精囊、前立腺、子宮、卵巣および膣を 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。

### 2-2. 発がん性試験

慢性毒性試験と同様に一般状態の観察を連日実施し、体重および摂餌量を開始から 5 週目までは毎週 1 回、5 週目以降からは毎月 1 回測定した。現在投与開始から 56 週目を経過し、動物実験を継続中である。

## 3. 統計学的処理方法

血液学的検査値、血清生化学的検査値および臓器重量については、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Dunnett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。

#### (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。実験動物に関しては、「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、実施した。

### C. 研究結果

#### 1. 一般状態および生存率

##### 1-1. 慢性毒性試験

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。

##### 1-2. 発がん性試験

投与開始時から現在まで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ていない。

#### 2. 体重

##### 2-1. 慢性毒性試験

慢性毒性試験期間中の体重の推移を Fig. 1 に示す。雄の 0.1 および 0.2% 群で、体重増加抑制がみられ、投与 25 週目に 0.2% 群で、45 週目より 0.1% 以上の投与群で有意な増加率の減少を認めた。雌では投与期間を通じて、投与群と対照群との間に有意な変化は認められず、全ての群で同様な推移を示した。

##### 2-2. 発がん性試験

発がん性試験開始から現在までの体重の推移を Fig. 2 に示す。雄の 0.1 および 0.2% 群で体重増加抑制がみられ、0.2% 群では投与 15 週目より、0.1% 群では 20 週目より有意な増加率の減少を認めた。50 週時点の対照群に対する体重減少率はそれぞれ 6% および 7% である。雌では投与期間を通じて、投与群と対照群との間に有意な変化は認められず、同様な推移を示している。

### 3. 摂餌量

#### 3-1. 慢性毒性試験

摂餌量の推移を Fig. 3 に示す。摂餌量は、雄では全ての群において投与期間を通じて約 12 g から 16 g の間で推移し、雌では全ての群において投与期間を通じて、約 7 g から 10 g の間で推移した。雌雄各群の摂餌量および被験物質摂取量を Table 1 に示す。1 日当りの平均摂餌量は、雄の 0, 0.05, 0.1 および 0.2% 群で、それぞれ 13.8, 13.7, 13.8 および 14.0 g、雌の 0, 0.05, 0.1 および 0.2% 群では、それぞれ 8.9, 9.1, 9.0 および 9.0 g であり、雌雄ともに、対照群と投与群との間に明らかな差は見られなかった。

1 日当りの被験物質の摂取量は、雄の 0.05, 0.1 および 0.2% 群で 25.5, 50.3 および 104.2 mg/kg 体重/day、雌の 0.05, 0.1 および 0.2% 群で 27.8, 54.9 および 110.6 mg/kg 体重/day であった。52 週間での総摂取量は、雄の 0.05, 0.1 および 0.2% 群で 9.3, 18.4 および 38.0 g、雌の 0.05, 0.1 および 0.2% 群では 10.1, 20.0 および 40.4 g であり、雌雄ともに用量公比にほぼ相関していた。

#### 3-2. 発がん性試験

投与開始から、現在までの摂餌量の推移を Fig. 4 に示す。摂餌量は、雄では全ての群において約 12 g から 15 g の間で推移し、雌では全ての群において約 7 g から 10 g の間で推移している。



#### 4. 血液学的検査および血清生化学的検査

慢性毒性試験での血液学および血清生化学的検査の結果を Table 2 および 3 に示す。

血液学的検査の結果、対照群と比較して、雄では全ての投与群で HGB および MCHC の有意な減少が認められた。また 0.1 および 0.2% 群で HCT, MCV, MCH および PLT の有意な減少が認められ、WBC の有意な増加が 0.2% 群で認められた。雌では、0.1 および 0.2% 群で HGB, HCT, MCH および PLT の有意な減少が認められ、全ての投与群で MCV の有意な減少が認められた。また、WBC の有意な増加が 0.1 および 0.2% 群で認められた。白血球百分比については現在検索中である。

血清生化学的検査では、雄の全ての投与群で TP, Alb および TG の有意な減少が、CRN, AST および ALT の有意な増加が認められた。また T.Bil の有意な増加が 0.2% 群で、Cl の有意な増加が 0.1 および 0.2% 群で、K の有意な増加が全ての投与群で認められた。γ-GTP の有意な減少が 0.1% 群で認められたが、これは投与濃度に相関した変化ではなかった。雌では、全ての投与群で TP, A/G 比, Alb および TG の有意な減少が、AST および ALT の有意な増加が認められた。また BUN および CRN の有意な増加が 0.2% 群で、T.Bil, ALP, γ-GTP および K の有意な増加が 0.1% および 0.2% 群で、Cl の有意な増加が 0.1% 群で認められた。

#### 5. 臓器重量

慢性毒性試験における臓器重量の結果を Table 4 に示す。臓器実重量では、雌雄ともに全ての投与群で肺の重量が有意に増加し、0.1 および 0.2% 群で脾臓、肝臓の重量が有意に増加した。また雄では、腎臓の重量が 0.2% 群で有意に増加し、精巣の重量が 0.1 および 0.2% 群で、有意に減少した。雌では心臓の重量が 0.05% 群で有意に減少した。臓器相対重量では、雌雄ともに 0.1 および

0.2% 群で、脾臓および肝臓の重量の有意な増加が認められた。その他、雄では肺の重量が 0.1 および 0.2% 群で、腎臓の重量が 0.2% 群で有意に増加した。また、脳は重量が 0.1% 群で有意に増加した。雌では肺の重量が 0.2% 群で有意に増加した。

#### 6. 病理組織学的検索

慢性毒性試験の病理組織学的検査は現在進行中である。

#### D. 考察

今回、F344 ラットを用いてオゾケライトの混餌投与による慢性毒性試験および発がん性試験を実施した。

慢性毒性試験の結果、試験期間中死亡動物は認められず、一般状態の異常も認められなかった。体重推移では、雄では 0.1% 以上の投与群で体重増加抑制がみられ、25 週目に 0.2% 群で、45 週目からは 0.1 および 0.2% で有意な差が認められた。雌では、投与期間を通じて対照群と投与群の間に有意な差は認められず、同様な推移を示した。

摂餌量では、雌雄ともに対照群と投与群の間に明らかな差はなくほぼ同じ値であり、単位体重当りの被験物質摂取量も、用量相関性をもって増加した。また、対照群と投与群の摂取量に差がないことから、雄の 0.1 および 0.2% 群での体重抑制は被験物質投与に起因するものと考えられた。

血液学的検査では、赤血球系項目、血小板および白血球の値にそれぞれ変化がみられた。赤血球系項目では、雌雄ともに HGB, HCT, MCV および MCH で 0.1 および 0.2% 群で有意な減少が認められ、雄の HGB および MCHC、雌の MCV では 0.05% 群から有意な減少が認められたことから、雌雄ともに 0.05% 以上の投与群で軽度の貧血が起きていると考えられた。血小板では雌雄ともに 0.1 および 0.2% 群で有意な減少が、白血球では雄の 0.2%、雌の 0.1 および 0.2% 群で有

意な増加が認められた。なお、白血球については現在白血球百分比を検索中である。

血清生化学的検査では、雌雄ともに全ての投与群で AST および ALT の有意な増加が認められ、全ての投与群において対照群の値より約 2 倍以上の高値を示した。これらは投与濃度に相関した変化ではなかったが、0.05%以上の投与群で明らかな肝障害が引き起こされていると考えられた。また、TP, Alb および TG の有意な減少が雌雄全ての投与群で認められた。雄の 0.2%群では T.Bill の有意な増加が認められた。雌の 0.1%および 0.2%群では T.Bill, ALP および  $\gamma$ -GTP の有意な増加が認められた。これらの変化、さらには前述の血小板数の減少および白血球の増加は、前述の肝障害を原因としたものである可能性も考えられた。その他、雄では CRN の有意な増加が全ての投与群で認められ、雌では BUN および CRN の有意な増加が 0.2%投与群で認められたことから、腎毒性が引き起こされている可能性が示唆された。電解質系における種々の変化はこれに起因している可能性が考えられた。

臓器重量では、血液学および血清生化学的検査で有意な変化を示した項目の関連臓器として、肝臓、脾臓および腎臓の重量が変化した。肝臓および脾臓では雌雄ともに 0.1 および 0.2%群で実重量・相対重量ともに有意に増加した。相対重量においては、雌雄ともに投与濃度に相関性が認められた。また、腎臓では雄の 0.2%群で、実重量・相対重量ともに有意に増加した。その他の臓器では、雌雄ともに肺の実重量が全ての投与群で有意に増加し、相対重量では雄では

0.1%および 0.2%群で、雌では 0.1%群で有意に増加したことから、肺の障害が示唆された。また、雄の脳の相対重量と、雌の心臓の実重量の変化は、それぞれ投与濃度に相関性は認められず、被験物質投与に起因する変化ではないと考えられた。

#### E. 結論

オゾケライトを雌雄の F344 ラットに、0, 0.05, 0.1, 0.2%の用量で 52 週間混餌投与した結果、0.05%以上の雌雄で肝障害および軽度の貧血が引き起こされる可能性が示された。また雌雄ともに 0.2%以上で腎障害の誘発が疑われた。また、雌雄ともに 0.1%以上で肺の重量が増加した。これらの血液学的検査、血清生化学的検査および臓器重量の結果をふまえ、無影響量 (NOEL) および無毒性量 (NOAEL) は、現在検索中である病理学的検査の結果を待って総合的に評価をする予定である。

また、発がん性試験に関しては、オゾケライトを雌雄の F344 ラットに、0, 0.1, 0.2%の用量で投与し、現在動物実験を継続中である。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

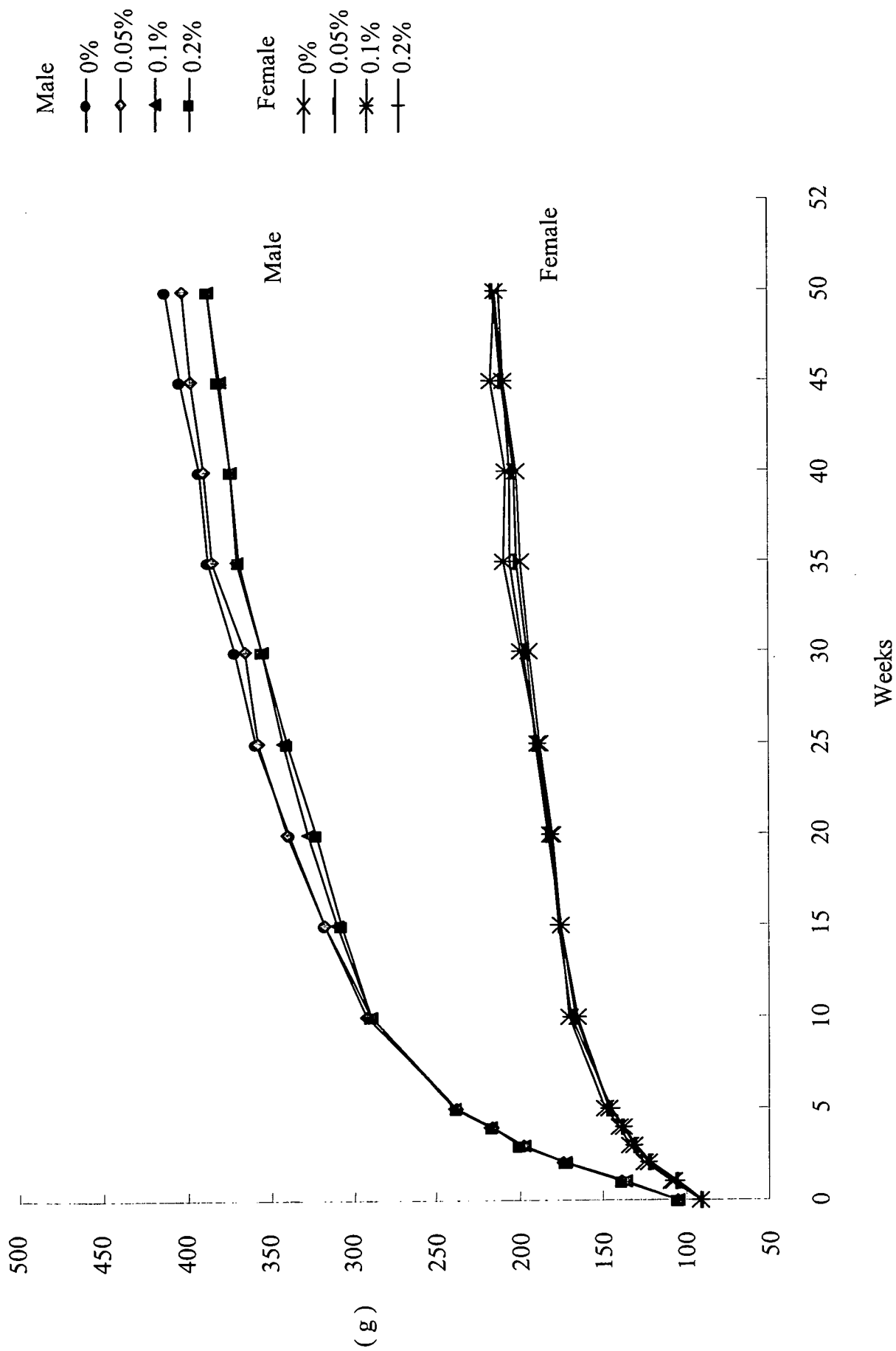


Fig. 1 Growth curves for F344 rat treated with Ozokerite 52weeks in the 1-year chronic study

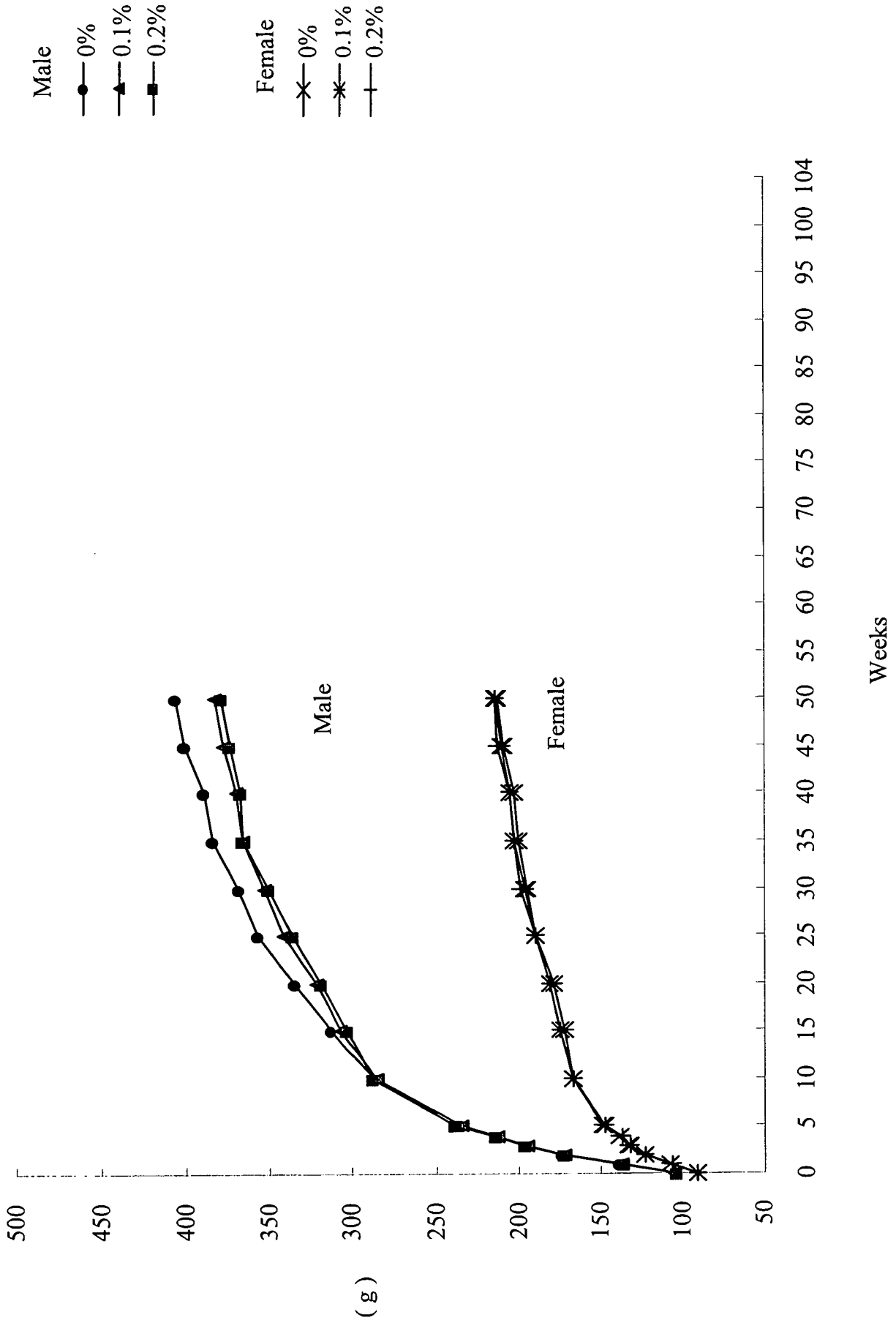


Fig. 2 Growth curves for F344 rat treated with Ozokerite for 104 weeks in the 2-year carcinogenic study