

Fig. 3 Food consumption for F344 rat treated with Ozokerite for 52weeks in the 1-year chronic study

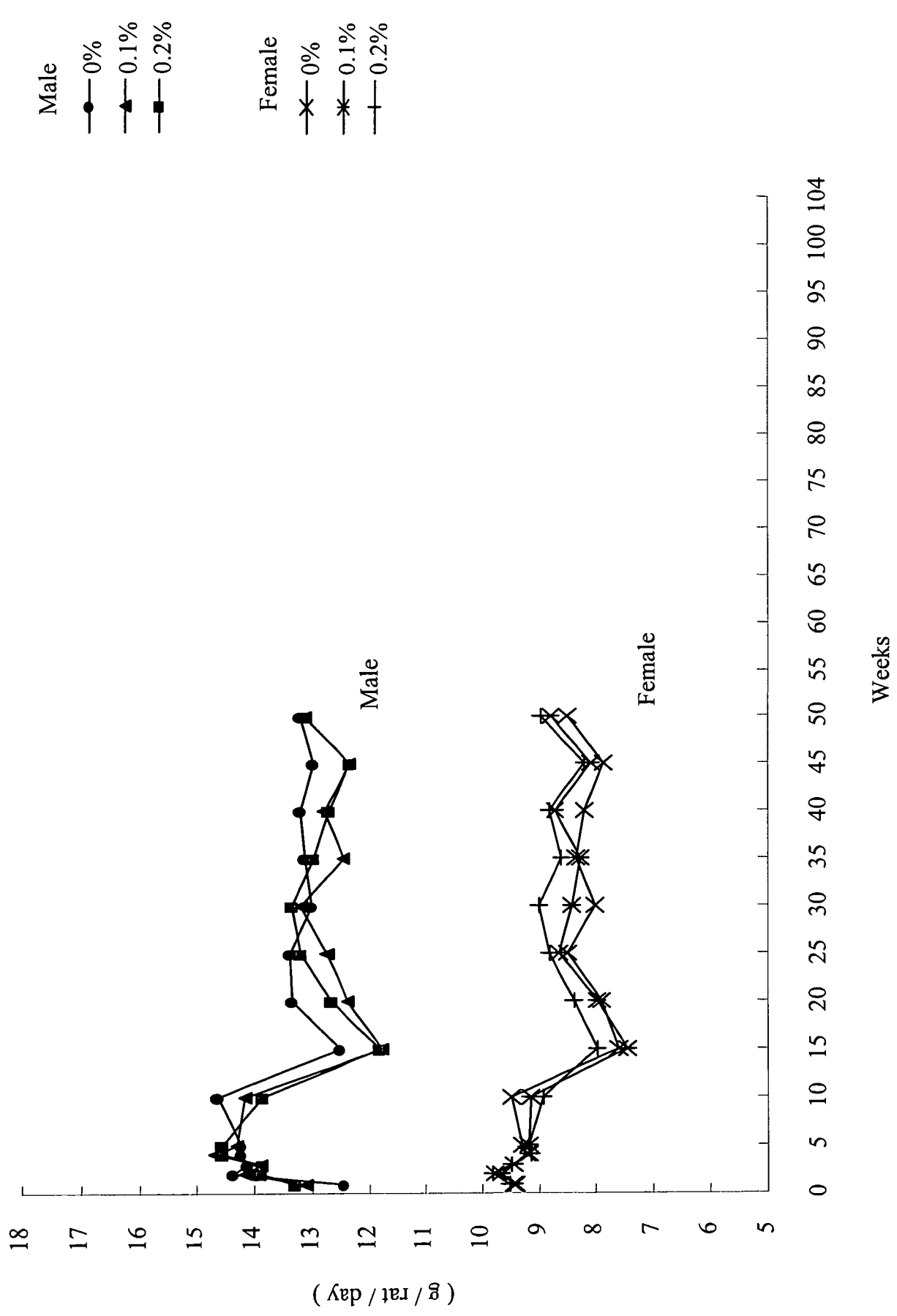


Fig. 4 Food consumption for F344 rat treated with Ozokerite for 104 weeks in the 2-year carcinogenic study

Table 1 Food consumption and intake of Ozokerite in F344 rats treated for 52 weeks

Group	Food consumption (g/rat/day)		Intake of Ozokerite			
	Male	Female	Daily (mg/kg bw/day)		Total (g/kg bw)	
			Male	Female	Male	Female
0%	13.8	8.9	—	—	—	—
0.05%	13.7	9.1	25.5	27.8	9.3	10.1
0.1%	13.8	9.0	50.3	54.9	18.4	20.0
0.2%	14.0	9.0	104.2	110.6	38.0	40.4

All values are group means.

Table 2 Hematological data for F344 rats treated with Ozokerite for 52 weeks

Sex	Male					Female				
	Item / Dose	0%	0.05%	0.1%	0.2%	0%	0.05%	0.1%	0.2%	0.2%
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
RBC ($10^4/\mu\text{L}$)	967.1 \pm 58.3 ^a	941.4 \pm 111.0	974.9 \pm 42.5	967.9 \pm 21.0	930.6 \pm 62.3	938.3 \pm 47.2	859.3 \pm 101.7	855.0 \pm 79.7		
HGB (g/dL)	16.2 \pm 0.9	14.7 \pm 0.4**	13.5 \pm 1.1**	13.2 \pm 0.9**	16.6 \pm 1.2	15.7 \pm 1.2	13.6 \pm 2.3**	13.3 \pm 2.0**		
HCT (%)	51.4 \pm 3	48.3 \pm 1.2	45.8 \pm 3.3**	45.4 \pm 1.9**	52.8 \pm 3.5	50.4 \pm 2.7	44.8 \pm 5.9**	43.8 \pm 5.7**		
MCV (fL)	53.2 \pm 0.5	49.9 \pm 1.2	47.0 \pm 2.3**	46.9 \pm 1.9**	56.8 \pm 0.3	53.7 \pm 1.0*	52.1 \pm 1.4**	51.1 \pm 4.1**		
MCH (pg)	16.8 \pm 0.2	15.2 \pm 0.6	13.9 \pm 1.0**	13.6 \pm 0.8**	17.8 \pm 0.5	16.8 \pm 0.8	15.7 \pm 0.9**	15.5 \pm 1.4**		
MCHC (g/dL)	31.5 \pm 0.3	30.4 \pm 0.7**	29.5 \pm 0.8**	29.1 \pm 0.8**	31.3 \pm 0.9	31.2 \pm 1.1	30.2 \pm 1.3	30.3 \pm 0.8		
PLT ($10^4/\mu\text{L}$)	58.2 \pm 13.5	56.8 \pm 4.7	52.2 \pm 5.2* ^b	47.0 \pm 10.3** ^c	58.1 \pm 18.5	57.0 \pm 3.7	48.6 \pm 10.6**	46.7 \pm 7.2** ^c		
WBC ($10^4/\mu\text{L}$)	34.7 \pm 10.5	39.1 \pm 6.3	51.5 \pm 16.5	63.8 \pm 27.1**	26.7 \pm 4.9	31.1 \pm 14.5	58.8 \pm 38.6*	48.8 \pm 19.9**		

a : Mean \pm S.D.

b : n = 8

c : n = 9

* , ** : P < 0.05 , 0.01 vs. 0% (control) group

Table 3 Serum biochemical data for F344 rats treated with Ozokerite for 52 weeks

Sex	Male				Female				
	Item / Dose	0%	0.05%	0.1%	0.2%	0%	0.05%	0.1%	0.2%
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10	10	10
TP (g/dL)	7.3 ± 0.2 ^a	6.9 ± 0.2 **	6.8 ± 0.3 **	6.7 ± 0.1 **	7.5 ± 0.3	7.0 ± 0.2 **	6.6 ± 0.4 **	6.6 ± 0.4 **	6.6 ± 0.4 **
A/G	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.7 ± 0.2	1.8 ± 0.1	2.2 ± 0.1	1.9 ± 0.1 **	1.8 ± 0.2 **	1.8 ± 0.2 **	1.8 ± 0.2 **
Alb (g/dL)	4.6 ± 0.1	4.3 ± 0.1 **	4.3 ± 0.1 **	4.3 ± 0.1 **	5.1 ± 0.2	4.5 ± 0.1 **	4.3 ± 0.3 **	4.3 ± 0.3 **	4.3 ± 0.3 **
T.Bil (mg/dL)	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.03	0.12 ± 0.06 **	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.16 ± 0.13 *	0.10 ± 0.03 **	0.10 ± 0.03 **
TG (mg/dL)	139 ± 49	69 ± 19 *	53 ± 10 **	54 ± 13 **	88 ± 23	57 ± 18 **	62 ± 20 *	58 ± 19 **	58 ± 19 **
T.Cho (mg/dL)	118 ± 9	118 ± 14	109 ± 11	111 ± 10	126 ± 10	137 ± 13	138 ± 14	137 ± 15	137 ± 15
BUN (mg/dL)	17.5 ± 1.4	18.8 ± 1.9	18.5 ± 1.5	18.0 ± 0.9	15.6 ± 0.7	16.2 ± 1.5	16.6 ± 1.8	17.9 ± 1.6 **	17.9 ± 1.6 **
CRN (mg/dL)	0.27 ± 0.02	0.30 ± 0.03 *	0.31 ± 0.02 *	0.30 ± 0.02 *	0.27 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.30 ± 0.02 *	0.30 ± 0.02 *
AST (IU/L)	126 ± 27	301 ± 44 **	326 ± 78 **	351 ± 70 **	84 ± 22	170 ± 60 *	330 ± 224 **	209 ± 100 **	209 ± 100 **
ALT (IU/L)	81 ± 14	213 ± 40 **	171 ± 43 **	168 ± 43 **	37 ± 5	72 ± 16 **	106 ± 41 **	77 ± 21 **	77 ± 21 **
ALP (IU/L)	480 ± 55	460 ± 45	571 ± 137	653 ± 163	180 ± 24	237 ± 104	467 ± 185 **	294 ± 58 **	294 ± 58 **
γ-GTP (IU/L)	5 ± 2	2 ± 0	3 ± 1 *	5 ± 3	2 ± 0	3 ± 1	6 ± 2 **	5 ± 2 **	5 ± 2 **
Ca (mg/dL)	10.6 ± 0.2	10.5 ± 0.2	10.4 ± 0.2	10.4 ± 0.2	10.5 ± 0.3	10.3 ± 0.3	10.3 ± 0.4	10.3 ± 0.2	10.3 ± 0.2
P (mg/dL)	4.5 ± 0.6	4.5 ± 0.5	4.6 ± 0.7	4.7 ± 0.2	3.9 ± 0.4	4.5 ± 0.5 *	4.9 ± 0.5 **	4.8 ± 0.5 **	4.8 ± 0.5 **
Na (mEQ/L)	145 ± 1	145 ± 1	145 ± 2	146 ± 1	145 ± 2	144 ± 1	143 ± 3	144 ± 1	144 ± 1
Cl (mEQ/L)	103 ± 1	104 ± 1	105 ± 1 **	105 ± 1 **	104 ± 2	105 ± 1	107 ± 3 **	106 ± 1	106 ± 1
K (mEQ/L)	4.6 ± 0.3	4.9 ± 0.2 **	5.0 ± 0.2 **	5.1 ± 0.2 **	4.3 ± 0.3	4.5 ± 0.2	5.0 ± 0.3 **	4.9 ± 0.3 **	4.9 ± 0.3 **

a : Mean ± S.D.

*, ** : P < 0.05, 0.01 vs. 0% (control) group

Table 4 Organ weights of F344 rat treated with Ozokerite for 52weeks

Sex	Male				Female				
	Item / Dose	0%	0.05%	0.1%	0.2%	0%	0.05%	0.1%	0.2%
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Body weight (g)	403.9 ± 22.5 ^a	394.1 ± 17.8	377.3 ± 21.7 *	377.3 ± 20.1 *	210.2 ± 5.9	211.4 ± 19.6	215.8 ± 8.7	207.7 ± 10.2	
Absolute (g)									
Brain	2.05 ± 0.04	2.05 ± 0.05	2.22 ± 0.54	2.07 ± 0.04	1.87 ± 0.03	1.87 ± 0.06	1.88 ± 0.04	1.84 ± 0.04	
Lungs	1.12 ± 0.07	1.30 ± 0.07 **	1.33 ± 0.11 **	1.37 ± 0.09 **	0.77 ± 0.00	0.83 ± 0.05 *	0.89 ± 0.07 **	0.91 ± 0.05 **	
heart	1.06 ± 0.06	1.03 ± 0.05	1.02 ± 0.06	1.05 ± 0.06	0.70 ± 0.03	0.63 ± 0.04 **	0.69 ± 0.05	0.68 ± 0.07	
Spleen	0.70 ± 0.05	1.09 ± 0.19	1.41 ± 0.27 **	1.76 ± 0.31 **	0.45 ± 0.02	0.65 ± 0.10	1.06 ± 0.34 **	1.05 ± 0.34 **	
Liver	9.22 ± 0.80	10.35 ± 0.65	11.84 ± 1.64 **	13.28 ± 1.32 **	4.53 ± 0.27	6.05 ± 1.25	10.06 ± 3.37 **	9.97 ± 3.37 **	
Adrenals	0.037 ± 0.004	0.036 ± 0.004	0.039 ± 0.004	0.037 ± 0.004	0.042 ± 0.005	0.059 ± 0.059	0.042 ± 0.004	0.044 ± 0.004	
Kidneys	2.15 ± 0.14	2.21 ± 0.11	2.21 ± 0.15	2.35 ± 0.10 **	1.37 ± 0.08	1.34 ± 0.10	1.44 ± 0.15	1.43 ± 0.13	
Testis	3.39 ± 0.29	3.28 ± 0.21	3.16 ± 0.13 *	2.87 ± 0.53 **					
Relative (g%)									
Brain	0.51 ± 0.03	0.52 ± 0.02	0.59 ± 0.16 **	0.55 ± 0.03	0.89 ± 0.03	0.89 ± 0.06	0.87 ± 0.04	0.89 ± 0.04	
Lungs	0.28 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.35 ± 0.03 **	0.36 ± 0.02 **	0.37 ± 0.02	0.40 ± 0.05	0.41 ± 0.03	0.44 ± 0.03 *	
heart	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.02	0.28 ± 0.03	0.33 ± 0.02	0.30 ± 0.04	0.32 ± 0.02	0.33 ± 0.03	
Spleen	0.17 ± 0.01	0.28 ± 0.04	0.38 ± 0.07 **	0.47 ± 0.10 **	0.22 ± 0.01	0.31 ± 0.10	0.49 ± 0.15 **	0.50 ± 0.16 **	
Liver	2.28 ± 0.10	2.62 ± 0.12	3.15 ± 0.46 **	3.53 ± 0.38 **	2.16 ± 0.12	2.86 ± 1.25	4.66 ± 1.56 **	4.80 ± 1.57 **	
Adrenals	0.009 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.010 ± 0.002	0.010 ± 0.001	0.020 ± 0.003	0.028 ± 0.059	0.019 ± 0.002	0.021 ± 0.002	
Kidneys	0.53 ± 0.02	0.56 ± 0.04	0.59 ± 0.04	0.62 ± 0.05 **	0.65 ± 0.04	0.64 ± 0.10	0.67 ± 0.07	0.69 ± 0.06	
Testis	0.84 ± 0.07	0.83 ± 0.06	0.84 ± 0.06	0.76 ± 0.13					

a : Mean ± S.D.

*, ** : P < 0.05 , 0.01 vs. 0% (control) group

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

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

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

研究要旨

既存添加物アカネ色素の腎および肝発がん機序解明を目的に、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 *gpt* 導入ラットを用いて検討した。雄性 F344 *gpt* delta ラットにアカネ色素 (MC) とその構成成分である alizalin (Alz), lucidin-3-primeveroside (LP) および LP の代謝物である rubiadin (Rub) をそれぞれ、5.0, 0.08, 0.3 および 0.04% の濃度で混餌投与した。投与後 8 週目に腎臓および肝臓を採取し、臓器重量の測定および DNA 中 8-OHdG 量の測定を行った。

腎相対重量は 5.0% MC 群, 0.3 % LP 群および 0.08% Alz 群で、肝相対重量は 5.0% MC 群および 0.04% Rub 群で対照群に比べ有意な上昇が認められた。腎臓の DNA 中 8-OHdG 量は MC 群に上昇傾向が、LP 群および Alz 群で対照群に比べ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 群と Alz 群で対照群に比べて有意な上昇が認められた。これらの結果から、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明らかとなった。今後、肝臓および腎臓における *gpt* 遺伝子突然変異頻度、変異スペクトラム解析を加えて、その発がん機序解明を目指す予定である。

A. 研究目的

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。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、alizalin (LP), 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¹⁾ 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ン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) 量を測定したので報告する。

B. 研究方法

1. 被験物質および実験動物

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（三栄源エフ・エフ・アイ株式会社, 大阪）。また、Rub は既存の報告²⁾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±1°C, 湿度 55±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ピス社（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。

2. 試験方法

被験物質の投与用量の設定は、MC を腎臓がん用量の 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。8-OHdG 測定および *gpt* assay 用のサンプルは液体窒素により凍結し、測定まで -80°C で保存した。

3. DNA 中 8-OHdG の測定

腎臓および肝臓の DNA 中 8-OHdG の測定は Nakae³⁾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 μm, 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 / 10⁵dG 量として算出した。

4. 統計学的処理方法

体重および臓器重量については、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 の方法で対象群と投与群との間の有意差検定を行った。

8-OHdG 量については、群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Dunnet C の方法で対象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. 一般状態および生存率

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。

2. 体重

試験期間中の体重推移を Fig. 1 に示す。対象群と比べて 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。

3. 摂餌量

各群の摂餌量を Fig. 2 に示す。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。

4. 臓器重量

臓器絶対重量および相対重量を Table 1 に示す。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。

5. 病理組織学的検索

病理組織学的検査については現在検索中である。

6. DNA 中 8-OHdG の測定

肝臓および腎臓の DNA 中 8-OHdG レベルを Fig. 3 および Fig. 4 に示す。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。

D. 考察

本研究では、アカネ色素の構成成分とその代謝物の *in vivo* 変異原性について検討することを目的に、*gpt delta* ラットによる 8 週間の投与を実施した。今回は *in vivo* 変異原性試験結果を除く、試験期間中の体重推移、肝臓および腎臓の臓器重量および 8-OHdG 量の測定結果について報告した。

実験終了時のラットの最終体重は MC、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試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る。一方、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。MC 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、MC 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 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、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。また MC 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を示していた。

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 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 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。

E. 結論

今回の検討の結果、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、肝臓および腎臓における *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。

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

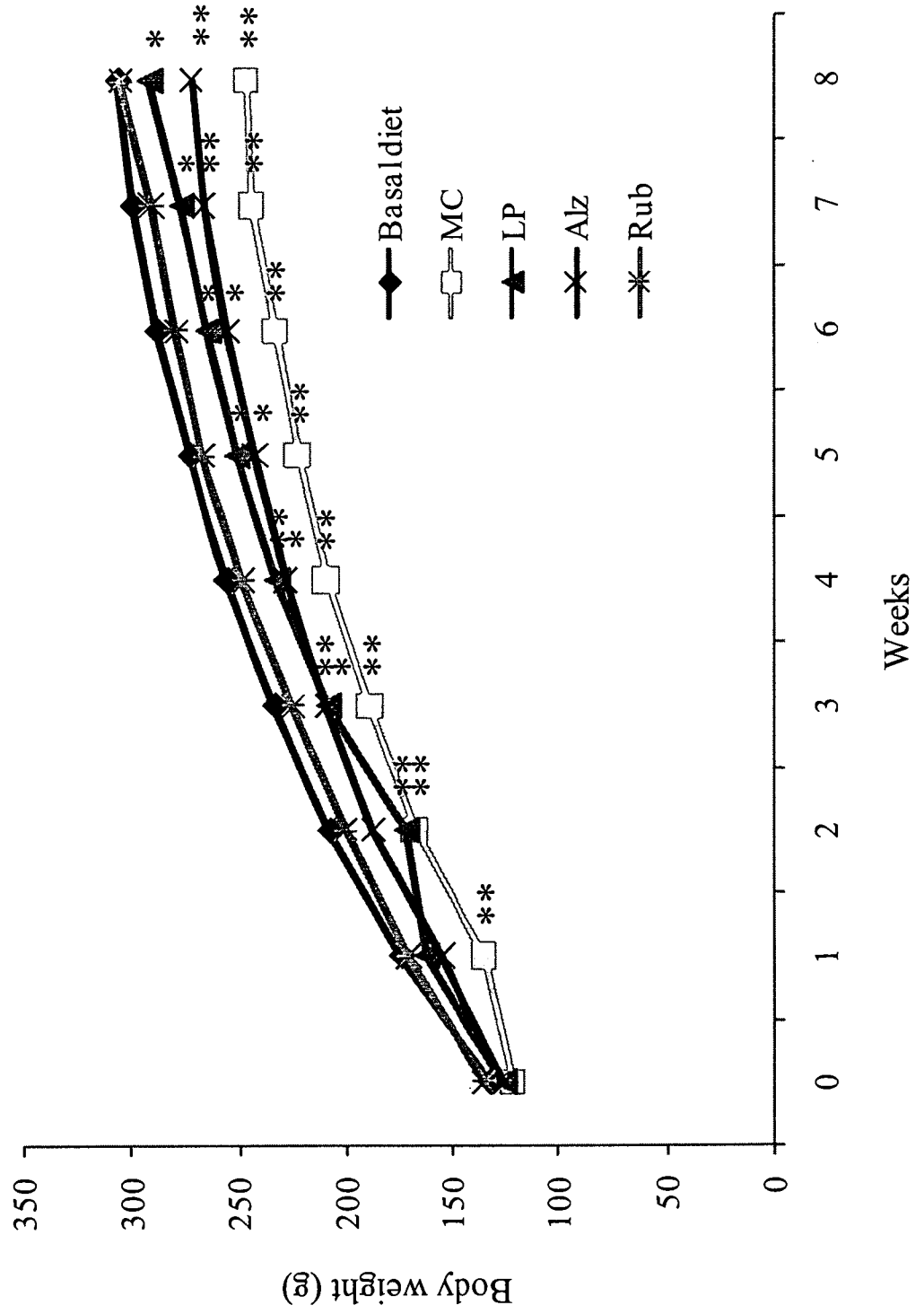
なし

【参考文献】

- 1) Poginsky B., Westendorf J., Blomeke B., Marquardt H., Hewer A., Grover PL., Phillips DH. : Evaluation of DNA-binding activity of hydroxyanthraquinones occurring in *Rubia tinctorum* L, *Carcinogenesis*, 12 (7), 1265-1271 (1991)
- 2) Blomeke B., Poginsky B., Schmutte C., Marquardt H., Westendorf J. : Formation of genotoxic metabolites from anthraquinone glycosides, present in *Rubia tinctorum* L, *Mutat. Res.*, 265 (2), 263-272 (1992)
- 3) Nakae D., Mizumoto Y., Kobayashi E. ,

Noguchi O. , Konishi Y. , Improved genomic/nuclear DNA extraction for 8-hydroxydeoxyguanosine analysis of

small amount of rat liver tissue, *Cancer Lett.* , 97, 233-239 (1995)



*, **: p<0.05, 0.01 vs. Basal diet group.

Fig. 1 Growth curves for F344 *gpt* delta rats treated with MC, LP, Alz or Rub for 8 weeks

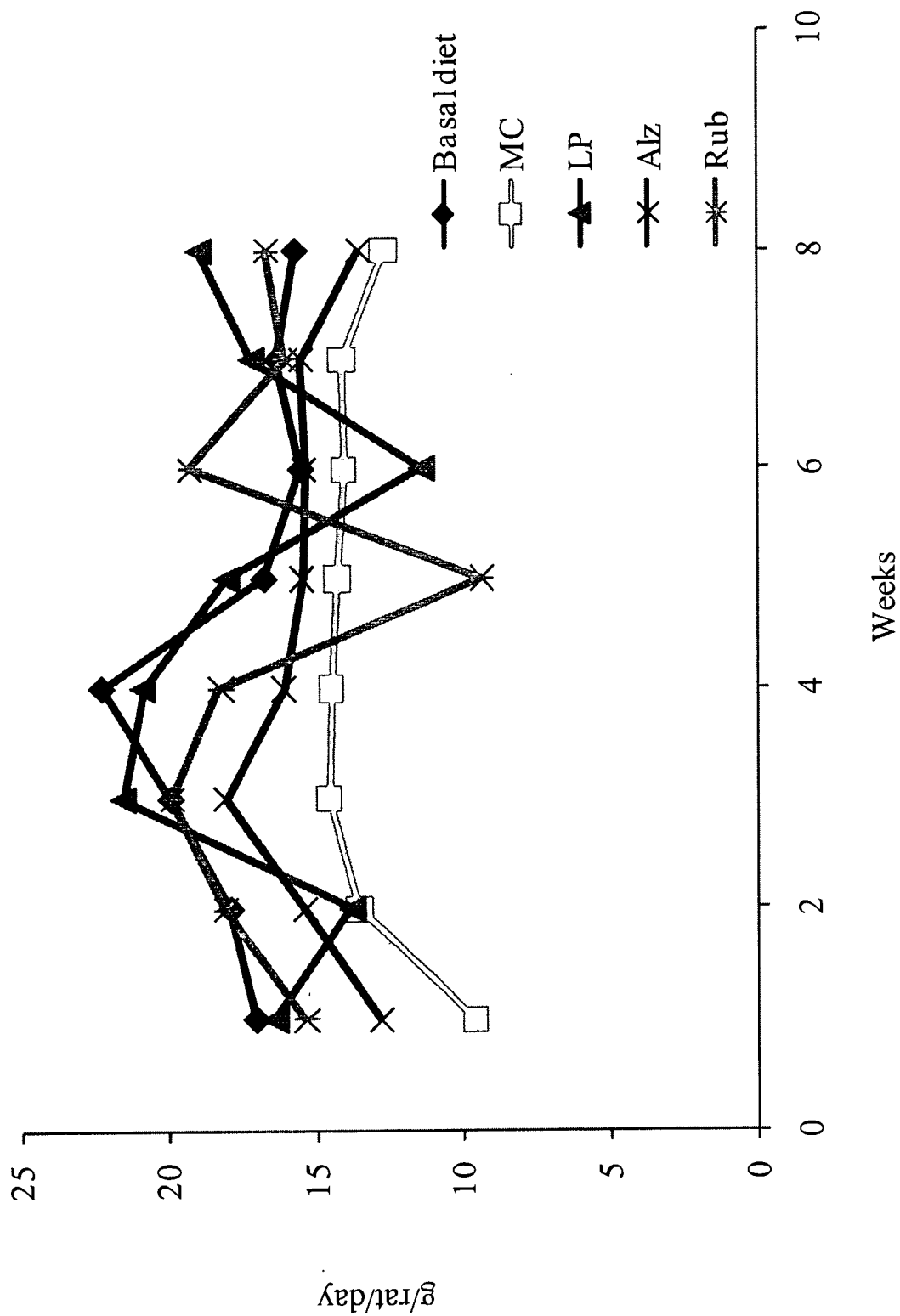
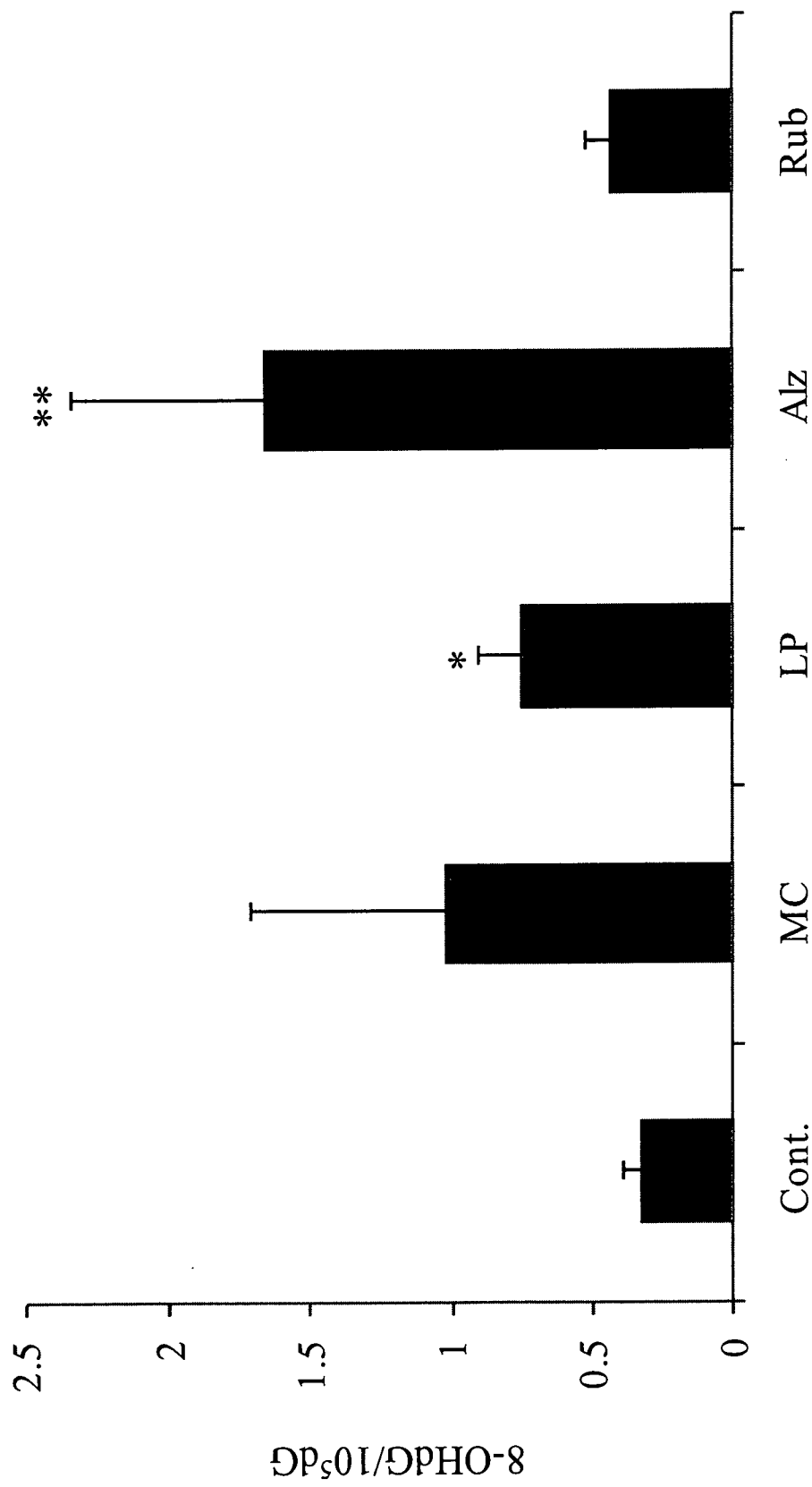
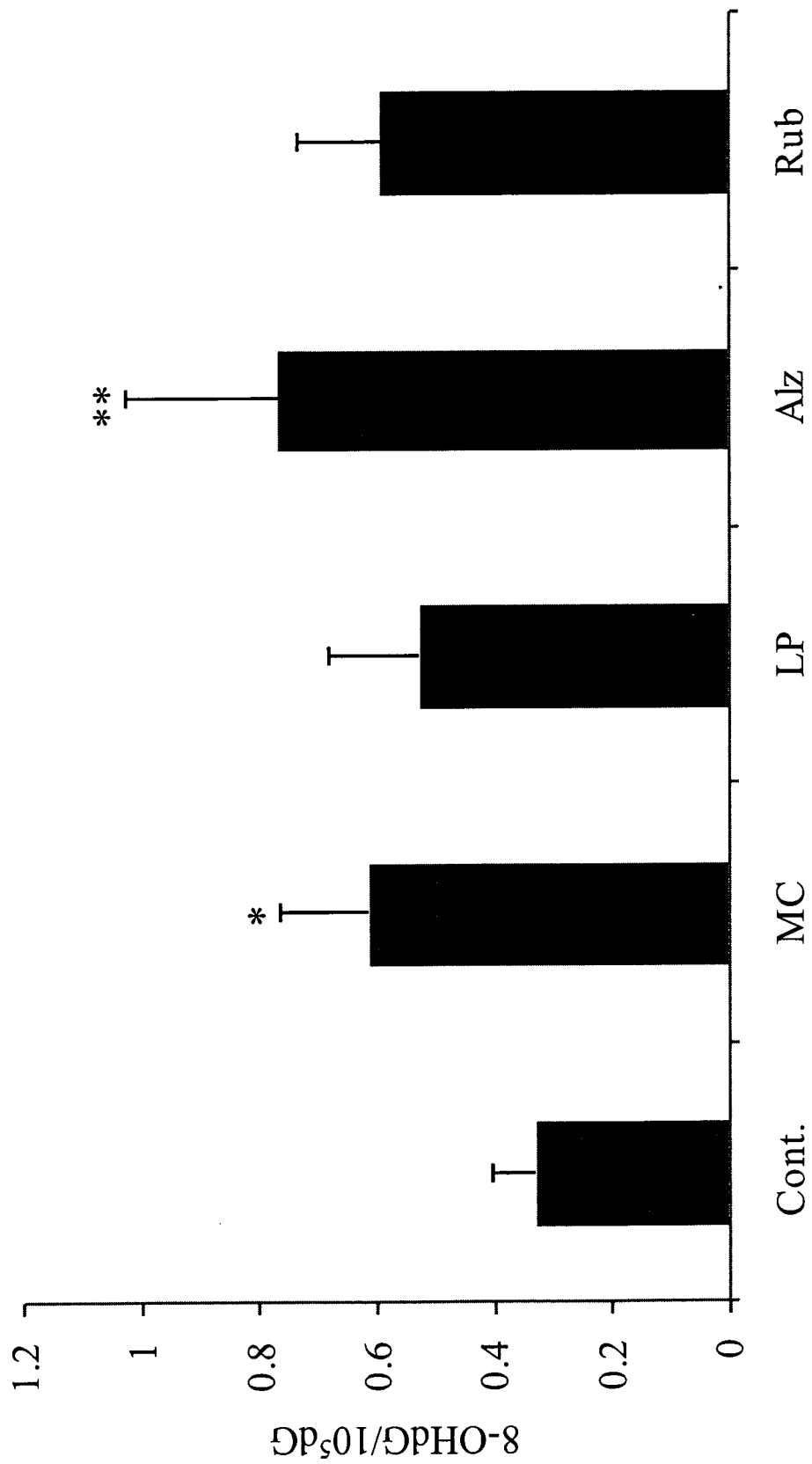


Fig. 2 Food consumption for F344 gpt delta rats treated with MC, LP, Alz or Rub for 8 weeks



** : p<0.01 vs. Basal diet group.

Fig. 3 8-OHdG levels in the kidneys of F344 gpt delta rats treated with MC, LP, Alz or Rub for 8 weeks



*, **, p<0.05, 0.01 vs. Basal diet group.

Fig. 4 8-OHdG levels in the livers of F344 gpt delta rats treated with MC, LP, Alz or Rub for 8 weeks

Table 1 Organ weights of F344 *gpt* delta rats treated with MC, LP, Alz or Rub

Item	Cont.	5.0% MC	0.3% LP	0.08% Alz	0.04% Rub
No. of animals	5	5	5	5	5
Body weight (g)	306.0 ± 15.9	246.2 ± 13.0 **	291.7 ± 9.9 *	271.6 ± 13.8 **	304.8 ± 16.1
Absolute (g)					
Liver	10.79 ± 1.14	9.77 ± 0.90	10.54 ± 0.67	9.48 ± 0.51 *	11.54 ± 0.50
Kidney	1.72 ± 0.14	1.63 ± 0.11	1.77 ± 0.10	1.69 ± 0.10	1.80 ± 0.08
Relative (g%)					
Liver	3.52 ± 0.19	3.96 ± 0.18 **	3.61 ± 0.15	3.49 ± 0.11	3.79 ± 0.13 *
Kidney	0.56 ± 0.03	0.66 ± 0.03 **	0.61 ± 0.03 *	0.62 ± 0.02 **	0.59 ± 0.02

*, **: p<0.05, 0.01 vs. Basal diet group.

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

アカネ色素成分の発がん性とその標的性に関する研究

分担研究者 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
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

ラットに腎及び肝発がん性を示し既存添加物リストから除外されたアカネ色素について、その発がん性を与える成分と発がん標的性の同定を目的として、昨年度までの研究成果を基に、腎臓に酸化的DNA 損傷を及ぼす非遺伝毒性の成分である alizarin (Alz)と、強い遺伝毒性代謝産物である rubiadin (Rub)について、ラットを用いた中期多臓器発がん性試験を実施した。今回は腎臓と肝臓について報告する。6 週齢の雄性 F344 ラットに 5 種のイニシエーター (*N*-diethyl-nitrosamin, DEN; *N*-metylnitrosourea, MNU; 1, 2-dimethylhydrazine, DMH; *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN); 2, 2'-dihydroxy-di-*n*-propylnitrosamine; DHPN)を各々4 週間投与し、1 週間の休業後、Alz または Rub を同じ 0.008%, 0.04%の 2 つの用量で 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 glutathione *S*-transferase placental form (GST-P)陽性肝細胞巣を検索するための免疫組織化学的検索を実施した。その結果、Alz, Rub 共に 0.04%投与により腎髄質外帯における近位尿細管上皮細胞の異型尿細管、異型過形成の発生頻度あるいは個数が有意に増加した。また、腎細胞腺腫や癌が有意差はないものの 0.04% Alz 群と Rub の 2 投与群で発生した。肝臓においては、0.04% Rub 群で GST-P 陽性細胞巣の数が有意に増加し、肝細胞腺腫が Rub の 2 投与群で発生した。以上、Alz と Rub とともに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。

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。

そこで昨年度の本研究では、アカネ色素の構成成分のうち、アカネ色素中での lucidin の実際の存在形態である配糖体の LP や非遺伝毒性の成分の一つである alizarin (Alz), 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、腎発がん性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。その結果、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 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に関与する直接的 DNA 損傷の関与が示唆された。

本年度からの研究では、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た。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

Alz は市販品 (Sigma-Aldrich, 純度 97%) を購入し使用した。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、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*-diethyl-nitrosamin, DEN; *N*-metylnitrosourea, 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 週間に各々投与した。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 週間の休業後、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 (Fig. 1)。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 μ 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の分類として、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；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。また，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)を用い，4℃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。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。

(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

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，肝臓重量を Table 1 に示した。

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。

腎臓で認められた増殖性病変の発生頻度・個数を Table 2 に示した。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 (Fig. 2a)，異形過形成 (Fig. 2b)，腎細胞腺腫 (Fig. 2c) / 癌 (Fig. 2d)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。アカネ色素による腫瘍好発部位である髓質外帯でも同様に，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，0.04% Alz 群では異型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 陽性細胞巣の定量結果を Fig. 3 に示した。GST-P 陽性細胞巣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。肝臓で認められた病変の発生頻度を Table 3 に示した。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。変異肝細胞巣以外の増殖性病変として，肝細胞腺腫 (Fig. 4) 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

位尿細管部位における異型尿細管，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%で異型尿細管，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 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 陽性細胞数増加を認めた。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，肝臓

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する酸化ストレスの関与は不明なので，今後，この関連で関与成分を検討する必要がある。

E. 結論

今回の中期多臓器発がん性試験を用いた検索で，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. 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