

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西川 秋佳

平成21（2009）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	-----	15
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	-----	41
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	-----	48
渋谷淳		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	60
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	62

既存添加物の慢性毒性及び発がん性に関する研究

研究代表者 西川秋佳 国立医薬品食品衛生研究所病理部長

研究分担者 梅村隆志 国立医薬品食品衛生研究所病理部室長

研究分担者 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

研究要旨

オゾケライトの慢性毒性・発がん性に関する研究において、1年間の慢性毒性試験では血清生化学的検査より全投与群で肝障害が示唆され、全投与群の肺、0.1%以上投与群の肝臓および脾臓の重量増加が認められた。これらの変化は肉芽腫形成によるものであることを確認した。発がん性試験では、雌雄の0.1及び0.2%投与群で体重増加抑制が認められたが、2年間の投与を予定通りに終了、全動物を剖検し、病理組織学的に検索中である。アカネ色素成分の発がん性とその標的性に関する研究において、中期多臓器発がん性試験の結果、色素成分ルシジン配糖体の代謝産物ルビアディンがアカネ色素の腎発がんに関与し、肝臓、大腸に対しても発がん標的性を有する可能性が示された。ルビアディンの発がん性は、直接的DNA損傷によるものであると考えられた。また、アリザリンも腎発がん標的性を有し、その機序に酸化的ストレスによる発がんプロモーション作用が関与している可能性が示された。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において、腎DNA中8-OHdG量はアリザリン投与群で顕著に上昇することを確認した。一方、*gpt* 遺伝子突然変異頻度は、アカネ色素、ルシジン配糖体及びルビアディン投与群で有意に上昇したが、アリザリン群では変化は認められなかった。AT:TAトランスバージョン変異頻度の上昇はアカネ色素、ルシジン配糖体及びルビアディン投与群で共通して認められ、ルビアディン投与群では顕著に上昇した。現在、アカネ色素のもう一つの発がん標的臓器である肝臓についても同様の検討を行っている。

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。

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、その発がんにキノン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

1. オゾケライトの慢性毒性・発がん性に関する研究

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。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, 調整から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。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)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 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 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), 平均赤血球色素量(MCH), 平均赤血球色素濃度(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), アラントランスアミナーゼ(ALT), アルカリフォスタファアーゼ(ALP), γ -グルタミルトランスペプチターゼ(γ -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、精嚢、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。動物は、エーテル麻酔下で腹部大動脈を切断・放血殺後、剖検した。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、精嚢、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. 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

被験物質 MC 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。

試験方法は以下のとおりである。被験物質の投与用量の設定は、MC を腎発がん用量の5.0%とし、Alz および LP については MC 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。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。

トランスジーン回収は次のように実施した。腎臓と肝臓からゲノム DNA を採取し Transpack (Stratagene) を用いて λ ファージの *in vitro* パッケージング反応を行い、ゲノム DNA から λ EG10DNA をファージ粒子として回収した。*gpt* 点突然変異頻度の検索

のため、回収したファージ粒子を大腸菌 YG6020 に感染させ 6-チオグアニン(6-TG) とクロラムフェニコール (Cm) を含む培地上で生育するコロニーを単離した。単離したコロニーについては、再度、6-TG と Cm を含むプレートにストリークして生育することを確認した。また、ファージ粒子の懸濁液を適宜希釈した後に YG6020 株に感染させ、Cm のみを含む培地上で生育したコロニー数を計測した。Cm プレートで生育したコロニー数に希釈倍率を掛けて回収した総ファージ数(あるいは回収した総トランスジーン数)を求めた。6-TG と Cm に耐性となったコロニー数を総ファージ数で除して *gpt* 変異頻度 (MF) を算出した。また、6-TG と Cm に耐性となったコロニーの *gpt* 遺伝子配列を決定して変異部位を同定した。

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

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ス・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 週の間に関与した。すなわち、実験開始日に 100 mg/kg BW の 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 の 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 の 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 は平成 18 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る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。大腸については、結腸から肛門まで一括採取し、長軸方向に切り開いてホルマリン固定した。固定後、aberrant crypt foci (ACF) を検索するために、0.2% メチレンブルーで染色し、実体顕微鏡下で ACF 数を計測した。ACF を検索後、大腸を肛門側から 6 等分し、さらに各分割組織の長軸方向に 3 分割し、各切面を観察できるようにパラフィン包埋し、常法に従って厚さ 3 μ m のパラフィン切片を作製した。その後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を用いた病理組織学的検索と、異形成あるいは腫瘍性病変における β -catenin の細胞内局在を検討するための免疫組織化学的検索を実施した。 β -catenin の免疫染色は、パラフィン切片を 10 mM citrate buffer (pH 6.0) 下で、オートクレーブにより 121°C、15 分間加熱し抗原の不活化をした後、抗 β -catenin モノクローナル抗体 (1:500, BD Transduction Laboratories, clone 14, Lexington, KY, USA) を 4°C で一晚反応させた。二次抗体以降の反応は、

peroxidase-labeled amino acid polymer 法 (Histofine Simple Stain Rat MAX-PO, ニチレイ社製) により行い、3, 3'-diaminobenzidine で可視化、ヘマトキシリンで核染した。その後、大腸の異形成、腫瘍性病変ごとに β -cateninの細胞内局在(核内あるいは細胞質内)を検索した。Alz, Rubの26週間反復投与実験では、動物は5週齢の雄性F344ラットを日本チャールス・リバーから購入した。一週間の馴化後、1群15匹ずつ、合計3群に分け、2処置群にAlz, Rubを各々0.04%の用量で混餌投与し、対照群には基礎飼料のみを与えた。26週間の反復投与後、腎臓を採取し、常法に従いホルマリン固定パラフィン切片を作製し、左右腎臓の短軸方向各1切面について病理組織学的検索を実施した。本検索で認められた腎尿細管の前がん病変である異型尿細管の定義は以下の通りである：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。また、腎髄質外帯・近位尿細管上皮細胞の細胞増殖活性を検索するために、proliferating cell nuclear antigen (PCNA)の免疫染色を実施し、尿細管上皮細胞1000個あたりのPCNA陽性細胞数を求めた。

(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. オゾケライトの慢性毒性・発がん性に関する研究

一般状態及び死亡例について、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。発がん性試験では、雄の対照群、0.1%群、0.2%群の生存率は、それぞれ86%、78%、68%で、雌の対照群、0.1%群、0.2%群の生存率は、それぞれ86%、74%、80%であった。また、投与期間中、全投与群において、消瘦、腹部膨満、貧血等の一般状態の異常が認められていた。

体重について、慢性毒性試験では、雄の0.1および0.2%群で、体重増加抑制が認められ、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。発がん性試験では、雌雄の全ての投与群で体重増加抑制が認められ、雄の0.2%群では投与15週目より、0.1%群では20週目より、雌の0.2%群では投与65週目より、0.1%群では投与75週目より有意な増加率の減少を認めた。

摂餌量について、慢性毒性試験では、雄では全ての群において投与期間を通じて約12gから16g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7gから10g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。発がん性試験では, 摂餌量は, 雄では全ての群において投与期間を通じて約8gから15g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7gから11gの間で推移した。1日当りの平均摂餌量は, 雄の0, 0.1 および0.2%群で, それぞれ13.0, 12.8 および12.9 g, 雌の0, 0.1 および0.2%群では, それぞれ8.9, 9.1 および9.3 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0.1 および0.2%群で42.8 および86.7 mg/kg 体重/day, 雌の0.1 および0.2%群で47.8 および97.9 mg/kg 体重/dayであった。104週間での総摂取量は, 雄の0.1 および0.2%群で31.2 および63.3 g, 雌の0.1 および0.2%群では34.9 および71.5 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, ALT およびP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%群で認められたが, これは投与濃度に相関した変化ではなかった。

臓器重量について, 慢性毒性試験の臓器実重量では, 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, 脳の重量が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。発がん性試験では、臓器実重量では、雌雄ともに全ての投与群で肺、脾臓、肝臓および腎臓の重量が有意に増加した。また雄では、精巣の重量が0.2%群で有意に減少し、心臓の重量が有意に増加した。雌では心臓および副腎の重量が全ての投与群で有意に増加した。臓器相対重量では、雌雄ともにすべての投与群で、肺、脾臓、肝臓、副腎および腎臓の重量が有意に増加した。その他、雄の全ての投与群、雌の0.2%投与群で脳の重量の有意な増加が認められ、雄の0.2%投与群、雌の全ての投与群で心臓の重量の有意な増加が認められた。

病理組織学的検索において、慢性毒性試験では肉芽腫の形成が雌雄の全投与群に認められた。肝臓では投与群の動物全例で肉芽腫形成が認められ、ヒスチオサイトーシスも認められた。脾臓、腸間膜リンパ節では、雄のほぼ全例、雌の全例で肉芽腫形成が認められ、雌雄の脾リンパ節、消化管関連リンパ組織、肺門リンパ節、雌の気管支周囲リンパ組織、顎下リンパ節では高頻度に認められた。雄の気管支周囲リンパ組織、顎下リンパ節、雌雄の消化管関連リンパ組織では、0.2%群で肉芽腫の形成が認められた。その他の病理所見として、塩基性変異肝細胞巣、腎臓の硝子滴、硝子円柱、脾臓の髓外造血、子宮の内膜間質ポリープ、下垂体ののう胞様病変が比較的高頻度に認められた。発がん性試験の病理組織学的検査は、今後実施する。

2. 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

gpt 点突然変異頻度の検索と変異スペクトラムの解析において、腎臓の *gpt* MF は、MC、LP 及び Rub 群で対照群に比べ有意な上昇が認められた。中でも Rub 群では対照群に比べ約 9 倍の顕著な上昇が認められた。シーケンス解析より、GC:TA transversion 及び GC:AT transition 変異が全ての投与群で増加した。また、Rub 群では AT:TA transversion 変異頻度が対照群に比べ有意に増加し、その上昇は MC 及び LP 群でも共通して認められた。肝臓の *gpt* MF は、Rub 群でのみ対照群に比べ約 6 倍の有意な上昇が認められ、MC 及び LP 群で変化は認められなかった。シーケンス解析の結果、Rub 群では、AT-TA transversion、GC-AT 及び AT-GC transition 変異頻度の上昇傾向が認められたが、他の投与群では特徴的な変化は認められなかった。

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

中期多臓器発がん性試験では、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。大腸における ACF の定量的解析結果を Table 1 に示す。大腸近位部（盲腸側）、中間部、遠位部（肛門側）において、ACF の発生個数、発生頻度は、Alz、Rub 投与群とも対照群に比し有意に減少または減少傾向を示した。大腸における前がん病変（異形成、*dysplasia*）と腫瘍性病変についての病理組織学的検索の結果、対照群を含む全群の粘膜上皮において、異形成、腺腫、腺がんが認められた。0.04% Rub 群において、異形

成の発生頻度、発生個数が対照群に比し有意に増加していた。また、同群では腺腫、腺がんの発生増加傾向が認められた。その他、0.008% Rub 群において平滑筋肉腫が2例認められた。大腸に認められた粘膜上皮の異形成、腺腫、腺がん組織におけるβ-cateninの細胞内局在について検索した結果、β-cateninは異形成では細胞質内に、腺腫・がんでは細胞質と核内の両方、または核内のみに認められた。β-cateninの細胞内局在は、Alz, Rub投与による影響を受けていなかった。Alz, Rubの26週間反復投与試験における腎臓の病理組織学的検索の結果、腎皮質の近位尿細管上皮において、硝子滴の沈着が対照群と0.04% Rub群に認められ、その程度はRub群で有意に高かった。また、皮質・近位尿細管上皮では空胞変性がAlz群のみに認められた。アカネ色素による腫瘍好発部位であった髄質外帯・近位尿細管上皮において、Rub投与群の全例に核の大小不同と異型尿細管が認められた。腎髄質外帯の近位尿細管上皮細胞のPCNA陽性細胞数は、Alz, Rub投与により有意に増加していた。

D. 考察

1. オゾケライトの慢性毒性・発がん性に関する研究

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。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。病理組織学的検査では、血液学および血清生化学的検査で有意な変化を示し、臓器重量でも有意に増加した肝臓、脾臓において、全ての投与群で肉芽腫の形成が認められた。他にも、全身諸リンパ節で肉芽腫の形成が認められ、肺の臓器重量の有意な増加は、気管支周囲リンパ組織に肉芽腫が形成したことによると考えられた。オゾケライトは難分解性高分子化合物であることから、その大量投与により体内に吸収されたオゾケライトに対してヒスチオサイトーシスが惹起され、全身性の肉芽腫性炎に移行したも

のと考えられた。また、雄の0.1%群、雌の0.1および0.2%群で脾臓の髄外造血が少数例認められ、血液学的検査から示唆された貧血傾向と一致したが、その程度は弱いと考えられた。その他、各臓器で病変が認められたが、自然発生によるものと考えられた。腎臓においても、自然発生と考えられる病変のみであったため、血清生化学的検査および臓器重量から示唆された腎毒性は無いもしくは軽微であると考えられた。

発がん性試験の結果、試験期間中、全ての投与群において、消瘦、腹部膨満、貧血等の一般状態の異常が認められており、これらは投薬の影響であると考えられた。体重推移では、慢性毒性試験と同じく、雄の0.1%以上の投与群で体重増加抑制が認められ、雌においても0.2%群では投与65週より、0.1%群では投与75週より有意な増加率の減少を認めた。対照群と投与群との摂餌量に明らかな差は認められなかったため、この体重抑制は、被験物質投与に起因するものと考えられた。臓器重量において、慢性毒性試験と同じく、雌雄の全ての投与群の肺、脾臓、肝臓で重量の有意な増加が認められた。おそらくこれらの臓器内で肉芽腫性炎症が進行していると考えられた。その他に、雌雄の脳、心臓、副腎、腎臓の重量が有意な増加を示したが、病理組織学的検査と併せて、今後考察する。

2. 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

本研究では、MC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、これらを8週間混餌投与した *gpt delta* ラットの腎臓と肝臓における *in vivo*

変異原性試験の結果について報告した。平成 19 年度の結果から、腎臓 DNA 中の 8-OHdG レベルは LP 及び Alz 群で有意な上昇が、MC 群で上昇傾向が認められ、本年度の変異スペクトラムの解析結果では、GC-TA transversion 変異が全投与群で増加したことから、酸化ストレスの関与が示唆された。しかし、*gpt* MF は 8-OHdG の顕著な増加が見られた Alz 群で変化はなく、8-OHdG の増加が見られなかった Rub 群で有意な上昇が認められた。さらに Rub 群で認められた AT-TA transversion 変異頻度の上昇は、MC 及び LP 群にも共通して認められたことから、MC、LP 及び Rub 群の *gpt* MF の上昇には酸化的 DNA 損傷よりも、Rub による DNA の直接的傷害が強く関与していることが示唆された。一方、肝臓の 8-OHdG レベルの変化は腎臓と同様の傾向が見られたが、その程度は腎臓に比べいずれの投与群においても軽度であった。さらに *gpt* assay の結果から、Rub 群で *gpt* MF の有意な上昇が認められたものの、MC 群において変化が見られなかったことから、MC による肝発がん機序に突然変異誘発性は関与しないことが示唆された。また、Rub 群では腎臓、肝臓ともに他の投与群よりも顕著に *gpt* MF の上昇が認められたことから、本実験で投与した Rub の濃度は LP の投与によって生体内で生成する量よりも高濃度であったと考えられる。

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

今回の中期多臓器発がん性試験の大腸における検索で、Rub の発がん標的性が肝臓、腎臓だけでなく、大腸の粘膜上皮にも認め

られることが明らかになった。ただし、Rub の大腸に対する発がん促進作用は、前がん病変の指標としても知られる ACF の検索において増加していなかったこと、 β -catenin の腫瘍性病変における核内蓄積に変化が認められなかったこと、異形成は有意に増加したがその発生頻度は低かったことから、弱い作用であると考えられた。これは、アカネ色素や lucidin をラット、マウスに投与すると形成される DNA 付加体が、肝臓、腎臓に比し大腸では少ないという報告を反映していると考えられた。Alz については、大腸において異形成、腫瘍性病変の発生に影響を与えなかったことから、Alz は腎臓のみに発がん標的性を有することが示唆された。アカネ色素の 2 年間の発がん性試験において、大腸に腫瘍性病変が認められなかったが、アカネ色素成分の LP が代謝されてできた Rub の量が少なかったことや、前述のとおり Rub の大腸における作用が弱いことが要因であると考えられた。

26 週間反復投与実験において、Rub 投与によりアカネ色素での腫瘍好発部位に核の大小不同や異型尿管が認められた。核の大小不同は腎髄質・近位尿管上皮にアカネ色素投与 4 週間目から認められたが、Rub 投与では 1 週間目から継続して 26 週間投与後にも認められたことから、Rub の遺伝毒性に伴う発がん関連の変化であると考えられる。また、Rub は 26 週間反復投与により腎発がん物質（イニシエーター）を必要とせず異型尿管を誘発したことから、Rub は腎臓・近位尿管に対する強力な発がん物質であることが明らかになった。昨年度実施したラット中期多臓器発がん性試験において、Rub の腎臓における発がん促進作

用が見出されたが、今回の26週間反復投与実験の結果から、Rubは発がんプロモーターとしてというよりイニシエーターとして腎臓に作用することが示唆された。以上の結果から、アカネ色素のラット腎臓に対する発がん性にはRubが大きく関与している可能性が示された。Alzについては、髄質外帯・近位尿細管上皮において病理組織学的変化を誘発しなかったが、Rubと同様に同部位の細胞増殖活性を亢進させていた。昨年度の検索で、AlzはRubに比し弱いながらも腎臓がん促進作用を有することが明らかになっており、Alzは酸化的DNA損傷を誘発することから、今回見られた細胞増殖活性の亢進は、おそらくAlzによる酸化的ストレスに関連した変化であると考えられた。

E. 結論

1. オゾケライトの慢性毒性・発がん性に関する研究

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%以上の雌雄で肉芽腫形成による肝臓、脾臓および全身諸リンパ節の障害が引き起こされる可能性が示された。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、無毒性量 (NOAEL) は、0.05%未満であると考えられた。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、現在病理組織学的検査を実施中である。

2. 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

本年度の結果から、MCによる腎臓がんには、Rub等の変異原性物質によるDNAの直接傷害が関与することが示された。一方、肝臓がんには構成成分による遺伝子傷害性は関与しないことが示唆された。

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

本年度の中期多臓器発がん性試験を用いた大腸における検索で、Rubは大腸・粘膜上皮に弱い発がん標的性を有する可能性が示された。昨年度の検索結果と合わせて総合的に考えると、アカネ色素成分LPの代謝産物Rubは腎髄質外帯・近位尿細管上皮、肝細胞、大腸・粘膜上皮に対して、アカネ色素成分のAlzは腎髄質外帯の近位尿細管上皮に対して発がん標的性があり、アカネ色素による腎臓がんには、Rubの直接的DNA損傷による発がんイニシエーション作用とAlzによる酸化的ストレスが関与した発がんプロモーション作用が関与している可能性が示された。

F. 健康危険情報

アカネ色素の発がん成分として、代謝物ルピアジンが深く関与している可能性が示された。ルピアジンはノニジュース等に含有されていることが知られているため、関連食品における含有量調査を急ぐ必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Inoue, K., Shibutani, M., Masutomi, N., Toyoda, K., Takagi, H., Uneyama, C., Hirose, M.: A 13-week subchronic

- toxicity study of madder color in F344 rats. Food Chem. Toxicol. (2008) 46: 241-252.
- 2) 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. (2008) 46: 3303-3310.
- 3) Inoue, K., Yoshida, M., Takahashi, M., Shibutani, M., Takagi, H., Hirose, M., Nishikawa, A.: Induction of kidney and liver cancers by the natural food additive madder color in a two-year rat carcinogenicity study. Food Chem. Toxicol. (2008) 47: 184-191.
- 4) Inoue, K., Yoshida, M., Takahashi, M., Fujimoto, H., Ohnishi, K., Nakashima, K., Shibutani, M., Hirose, M., Nishikawa, A.: Possible contribution of rubiadin, a metabolite of madder color, to renal carcinogenesis in rats. Food Chem Toxicol. (2009) 47: 752-759.
- 5) Inoue, K., Yoshida, M., Takahashi, M., Fujimoto, H., Shibutani, M., Hirose, M., Nishikawa, A.: Carcinogenic potential of alizarin and rubiadin, components of madder color, in a rat medium-term multi-organ bioassay (submitted)
- 2.学会発表
- 1) 鈴木裕太, 木島綾希, 田崎雅子, 井上知紀, 岡村俊也, 石井雄二, 梅村隆志, 西川秋佳: ラットにおけるオゾケライトの慢性反復投与毒性試験. 第25回日本毒性病理学会 2009年1月28日
- 2) 石井雄二, 岡村俊也, 田崎雅子, 井上知紀, 増井則夫, 福原 潔, 能美健彦, 梅村隆志, 西川秋佳: アカネ色素ラット腎発がん過程に関与する色素成分の検索. 第25回日本毒性病理学会, 浜松, 第25回日本毒性病理学会講演要旨集: p106 (P-78), 1月, 2009
- 3) 石井雄二, 岡村俊也, 田崎雅子, 井上知紀, 能美健彦, 梅村隆志, 西川秋佳: *gpt* delta ラットを用いたアカネ色素成分による *in vivo* 突然変異誘発性の検討. 第37回日本環境変異原学会, 沖縄, 第37回日本環境変異原学会講演要旨集: p130 (P-047), 12月, 2008
- 4) 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的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
- 5) 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: 特に酸化的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
- 6) 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

- 7) 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
- 8) Kaoru Inoue, Makoto Shibutani, Miwa Takahashi, Hitoshi Fujimoto, Gye-Hyeong Woo, Takashi Umemura, Masao Hirose, Akiyoshi Nishikawa. Renal Toxicity analysis of madder color constituents and metabolites for the development of renal carcinogenicity in rats. International Conference of Food Factors for Health 2007. Kyoto, Japan, Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition (2007) 41 (supplement): p93 (P074), November, 2007.
- 9) 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
- 10) 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 回日本獣医学学会学術総会, 神奈川, 第 145 回日本獣医学学会学術総会講演要旨集: pp176 (BP-27), 3 月, 2008
- 11) Kaoru Inoue, Midori Yoshida, Miwa Takahashi, Hitoshi Fujimoto, Makoto Shibutani, Masao Hirose, Akiyoshi Nishikawa: Potent carcinogenicity of madder-color-related alizarin and rubiadin in a rat medium-term multi-organ bioassay. 6th European Congress of Toxicologic Pathology, Edinburgh, Scotland, 6th European Congress of Toxicologic Pathology Final Program: P66 (P16), September, 2008.
- 12) Kaoru Inoue, Midori Yoshida, Miwa Takahashi, Makoto Shibutani, Masao Hirose, Akiyoshi Nishikawa: A rat medium-term multi-organ assay for a madder color component and metabolite. 第 67 回日本癌学会学術集会, 名古屋市, 第 67 回日本癌学会学術集会講演要旨集: p116 (P-1012), 10 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）
平成 20 年度分担研究報告書

オゾケライトの慢性毒性・発がん性に関する研究

研究分担者	西川 秋佳	国立医薬品食品衛生研究所	病理部長
研究協力者	梅村 隆志	国立医薬品食品衛生研究所	病理部室長
研究協力者	石井 雄二	国立医薬品食品衛生研究所	病理部
研究協力者	木島 綾希	国立医薬品食品衛生研究所	病理部

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、すべての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。病理組織学的検査では、雌雄ともに全ての投与群で肝臓、脾臓および全身諸リンパ節に肉芽腫の形成が認められた。これらの結果から、難分解性化合物であるオゾケライトの長期反復投与によってラット肝臓、脾臓および全身諸リンパ節に肉芽腫を形成することが示された。なお、発がん性試験においては、動物実験が終了した。雄の 0.1% 以上の投与群で投与開始 15 週以降、雌の 0.1% 以上の投与群で試験開始 65 週以降、体重増加抑制がみられた。臓器重量では、雌雄の肺、脾臓、肝臓、腎臓の実重量・相対重量の有意な増加がみられた。現在、病理組織学的検査を実施中である。

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。

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%）を調整し、4℃・遮光下で、調整から 1 日後、1 週間後、1 ヶ月後、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、調整から 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、使用時までには 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）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ーゼ (ALP), γ -グルタミルトランスペプチターゼ (γ -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。動物は, エーテル麻酔下で腹部大動脈を切断・放血屠殺後, 剖検した。

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。

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

投与期間中の生存率の推移を Fig. 1-1, 1-2 に示す。雄の対照群, 0.1% 群, 0.2% 群の生存率は, それぞれ 86%, 78%, 68% で, 雌の対照群, 0.1% 群, 0.2% 群の生存率は, それぞれ 86%, 74%, 80% であった。また, 投与期間中, 全投与群において, 消瘦, 腹部膨満, 貧血等の一般状態の異常が認められていた。

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. 2 に示す。雄の 0.1 および 0.2%群で、体重増加抑制が認められ、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

発がん性試験期間中の体重の推移を Fig. 3 に示す。雌雄の全ての投与群で体重増加抑制が認められ、雄の 0.2%群では投与 15 週目より、0.1%群では 20 週目より、雌の 0.2%群では投与 65 週目より、0.1%群では投与 75 週目より有意な増加率の減少を認めた。

3. 摂餌量

3-1. 慢性毒性試験

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はほぼ相関していた。

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. 5 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 8g から 15 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 11 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 2 に示す。1 日当りの平均摂餌量は、雄の 0, 0.1 および 0.2%群で、それぞれ 13.0, 12.8 および 12.9 g、雌の 0, 0.1 および 0.2%群では、それぞれ 8.9, 9.1 および 9.3 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 0.1 および 0.2%群で 42.8 および 86.7 mg/kg 体重/day、雌の 0.1 および 0.2%群で 47.8 および 97.9 mg/kg 体重/dayであった。104 週間での総摂取量は、雄の 0.1 および 0.2%群で 31.2 および 63.3 g、雌の 0.1 および 0.2%群では 34.9 および 71.5 g であり、雌雄ともに用量公比にはほぼ相関していた。

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 3-1, 3-2 および 4-1, 4-2 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