

Table 7 Granuloma formation of F344 rats treated with Ozokerite for 52 weeks

Sex	Male					Female				
	Dose	No. of animals examined	Control	0.05 %	0.1 %	0.2 %	Control	0.05 %	0.1 %	0.2 %
			10	10	10	10				
Liver			0	10 ^a	10 ^a	10 ^a	0	10 ^a	10 ^a	10 ^a
Spleen			0	6	9	9	0	10	10	10
Mesenteric lymph node			0	10	9	9	1	10	10	10
Pancreatic lymph node			0	3	8	9	2	7	9	10
BALT			0	0	0	6	0	2	2	6
GALT			0	0	0	2	0	0	0	2
Submandibular lymph node			0	0	0	2	0	2	6	6
Hilar lymph node			0	2	2	7	1	5	5	7

BALT: Bronchus-associated lymphoid tissue

GALT: Gut-associated lymphoid tissue

a: included histiocytosis

Table 8 Others histopathological findings of F344 rats treated with Ozokerite for 52 weeks

Sex	Male						Female						
	Dose	Control		0.05 %		0.1 %		0.05 %		0.1 %		0.2 %	
		No. of animals examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Heart													
Focal inflammation	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Lung													
Foamy cell infiltration	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Liver													
Microgranuloma	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bile duct hyperplasia	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Cholangiofibrosis	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Altered foci basophilic clear	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Kidney													
Hyaline droplet	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hyaline cast	1	1	0	0	2	0	0	1	0	1	0	0	0
Tubular regeneration	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Calcification	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0
Spleen													
Extramedullary hematopoiesis	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	1	0
Hemosiderin disposition	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Testis													
Atrophy	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Uterus													
Atrophy	-	-	-	-	-	-	-	0	1	0	0	0	0
Endometrial stromal polyp	-	-	-	-	-	-	-	0	0	2	1	0	0
Pancreas													
Acinar atrophy	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
Adrenal gl.													
Cortical vacuolization	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pheochromocytoma	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pituitary gl.													
Cystic dilatation/Angiectasis	0	1	0	0	1	0	0	3	2	1	1	0	0
Anterior hyperplasia	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Anterior adenoma	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Thyroid gl.													
C-cell hyperplasia	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0

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

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

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
研究協力者 石井 雄二 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

既存添加物アカネ色素（Madder color : MC）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* 突然変異誘発性についてレポーター遺伝子 *gpt* 導入ラットを用いて検討した。雄性 F344 *gpt* delta ラットに 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 及び 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、本年度は腎臓及び肝臓 DNA 中の *gpt* 点突然変異頻度の検索を行った。*gpt* assay の結果、腎臓の突然変異頻度 (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。変異スペクトラム解析の結果、GC:TA transversion や GC:AT transition 変異が全投与群で増加し、さらに AT:TA transversion 変異の増加が MC, LP 及び Rub 群で共通して認められた。一方、肝臓では Rub 群でのみ MF の有意な上昇が認められたが、MC 及び LP では変化は見られず、変異スペクトルの解析においても特徴的な変異は認められなかった。これらの結果から、MC の腎発がんには LP とその代謝物である Rub による直接的 DNA 損傷が関与することが示唆された。一方、肝発がんには構成成分の遺伝子傷害性の関与は低いことが示唆された。

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。MC の腎発がん機構の解明を目的として、これまで MC 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 MC 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、MC による腎腫瘍の好発部位である髄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。また、19 年度において、*gpt* delta ラットに MC, LP, Alizalin 及

び Rub を 8 週間投与した腎臓の 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 MC 群と Alz 群で対照群に比べて有意な上昇が認められた。一方、LP の代謝物である Rub は DNA の直接傷害性を有し¹⁾、変異原性を示す²⁾ことから、MC 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両方が関与すると考えられる。

本研究は、MC、Alz、LP 及び Rub の *in vivo* 突然変異誘発性の検討を目的として、平成 19 年度は、これら被験物質をそれぞれ、5.0、0.08、0.3 及び 0.04% の濃度で 8 週間混餌投与し、発がん標的臓器の腎臓および肝臓の DNA 中 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) 量の測定結果を報告した。本年度は DNA 中の *gpt* 遺伝子変異頻度 (MF) の検索と変異コロニーのスペクトル解析の結果について報告する。

B. 研究方法

1. 被験物質および実験動物

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。

2. 試験方法

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、一般状態観察を毎日実施した。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。

3. トランスジーン回収

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。

4. *gpt* 点突然変異頻度の検索

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。

5. 統計学的処理方法

gpt MF 及び変異スペクトラムにおける特異的 MF については、一元配置の分散分析と Tukey の多重比較検定により行った。

(倫理面への配慮)

平成 19 年度分担報告書に記載した通り、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. *gpt* 点突然変異頻度の検索と変異スペクトラムの解析

Table 1 に示すように、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 (Table 2)。

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 (Table 1)。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 (Table 2)。

D. 考察

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。

E. 結論

本年度の結果から、MCによる腎発がんには、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、肝発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。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

石井雄二, 岡村俊也, 田崎雅子, 井上智紀, 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

石井雄二, 岡村俊也, 田崎雅子, 井上智紀, 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

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)

Table 1 *gpt* mutant frequencies in the kidneys and livers of F344 *gpt* delta rats treated with MC, LP, Alz or Rub.

Treatment	Animal No.	Kidney				Liver			
		Cm ^R colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean±SD (x 10 ⁻⁵)	Cm ^R colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean±SD
Basal diet	1	1.44	0	— ^a	—	1.94	2	0.52	
	2	1.44	2	1.39		2.52	2	1.79	
	3	4.10	2	0.49	0.59 ± 0.54	1.89	3	1.59	0.97 ± 0.55
	4	3.74	1	0.27		2.25	1	0.44	
	5	4.55	1	0.22		1.30	2	1.53	
MC	6	3.29	9	2.74		1.35	1	0.77	
	7	1.80	8	4.44		1.48	2	1.35	
	8	2.88	6	2.08	2.42 ± 1.26*	1.71	3	1.75	1.29 ± 0.40
	9	1.62	2	1.23		0.90	0	—	
	10	3.69	6	1.63		1.53	2	1.31	
LP	11	2.16	7	3.24		0.95	1	1.06	
	12	2.12	6	2.84		2.88	1	0.35	
	13	1.75	3	1.71	2.32 ± 0.69**	1.13	1	0.89	1.19 ± 0.90
	14	1.75	3	1.71		0.86	0	—	
	15	1.89	4	2.12		0.41	1	2.47	
Alz	16	3.83	4	1.05		0.45	0	—	
	17	5.22	3	0.57		1.26	2	1.59	
	18	2.84	4	1.41	1.70 ± 1.42	1.80	3	1.67	1.91 ± 0.42
	19	2.66	10	3.77		1.22	3	2.47	
	20	N.D.	N.D.	N.D.		1.40	3	2.15	
Rub	21	4.37	18	4.12		0.36	4	11.11	
	22	3.78	18	4.76		1.49	8	5.39	
	23	N.D.	N.D.	N.D.	5.36 ± 2.15**	0.50	0	—	6.42 ± 3.17**
	24	3.51	30	8.55		0.81	4	4.94	
	25	1.76	7	3.99		0.95	4	4.23	

^a: The data was excluded for the calculation of the MF because of no detection of *gpt* mutant colony on the plate.
N.D.: no detectable because of accidental error. **: p<0.05, 0.01 vs. Basal diet.

Table 2 Mutation spectra of *gpt* mutant colonies.

Site	Kidney						Liver					
	Basal diet	MC	LP	Alz	Rub	Basal diet	MC	LP	Alz	Rub		
Base substitution												
Transversions												
GC-TA	0 ^a	2 (0.18)	5 (0.50)	5 (0.40)	6 (0.44)	1 (0.79)	2 (0.27)	0	0	1 (0.70)		
GC-CG	1 (0.10)	9 (0.81)	0	2 (0.16)	2 (0.14)	0	1 (0.17)	0	0	0		
AT-TA	1 (0.10)	4 (0.36)	4 (0.40)	1 (0.08)	36 (2.64)*	0	1 (0.13)	0	3 (0.34)	4 (1.30)		
AT-CG	0	2 (0.18)	1 (0.10)	3 (0.24)	4 (0.29)	0	0	0	0	3 (0.51)		
Transitions												
GC-AT	0	2 (0.18)	4 (0.40)	4 (0.32)	8 (0.59)	2 (0.21)	2 (0.27)	2 (0.20)	3 (0.21)	3 (1.27)		
AT-GC	2 (0.20)	4 (0.36)	3 (0.30)	4 (0.32)	5 (0.37)	5 (0.53)	1 (0.12)	0	4 (0.55)	6 (2.01)		
Deletion												
Single bp	0	6 (0.27)	3 (0.30)	2 (0.16)	4 (0.29)	0	1 (0.13)	2 (0.21)	1 (0.14)	3 (0.65)		
Over 2bp	1 (0.10)	1 (0.09)	0	0	1 (0.07)	0	2 (0.27)	0	0	2 (1.39)		
Insertion	1 (0.10)	0	3 (0.30)	0	7 (0.51)	1 (0.15)	0	0	0	1 (0.17)		
Complex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Total	6	27	23	21	73	9	10	4	11	23		

: The number of colonies with independent mutations is shown.

(): specific mutant frequency

*: p<0.05 vs. Basal diet.

アカネ色素成分の発がん性とその標的性に関する研究

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

研究協力者 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、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。今回は同試験の大腸における検索について報告する。また、新たに Alz, Rub の 26 週間反復投与試験を実施したので、腎臓での検索結果を報告する。ラット中期多臓器発がん性試験は、6 週齢の雄性 F344 ラットに 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) を各々 4 週間投与し、1 週間の休薬後、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。大腸を採取し、病理組織学的検索と共に、前がん病変である aberrant crypt foci (ACF) の定量的検索と、異形成、腫瘍性病変における β -catenin の細胞内局在について免疫組織学的検索を実施した。その結果、Rub 投与により大腸・粘膜上皮の異形成の発生頻度、発生個数が対照群に比し有意に増加し、腺腫・がんも増加傾向を示した。Alz 投与では同部位における異形成、腺腫・がんの発生に変動は見られなかった。ACF は Alz, Rub により増加せず、むしろ有意に減少していた。また、異形成、腫瘍性病変における β -catenin の細胞内局在については、腫瘍性病変において β -catenin の核内蓄積が増加していたが、Alz, Rub 投与による影響は認められなかった。以上より、Rub は大腸・粘膜上皮に発がん標的性を有することが示唆された。一方、26 週間反復投与試験では、6 週齢の雄性 F344 ラットに Alz, Rub を各々 0.04% の用量で 26 週間混餌投与した。その結果、腎髄質外帯・近位尿細管において、Rub 投与により核の大小不同と異型尿細管が認められ、細胞増殖活性も増加していた。Alz では、同部位に病理組織学的変化は認められなかったが、細胞増殖活性が増加していた。以上を総合すると、アカネ色素代謝産物の一つ Rub は、アカネ色素と同様のラット腎発がん性を有すること、及びラット大腸にも発がん標的性を有する可能性が示された。

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 (Alz), ruberythric acid と lucidin-3-*O*-primeveroside (LP) 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、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 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生成による酸化的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、酸化的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を比較した。その結果、アカネ色素による腎発がん過程早期から酸化的 DNA 損傷 (8-OHdG)の上昇と酸化的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的ストレスの発生に lucidin の関与は低いものと推察された。

そこで平成 18 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 LP や非遺伝毒性の成分の一つである Alz および 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、アカネ色素投与と早期に認められた腎皮質の変化 (近位尿細管上皮細胞の微小空胞変性、好塩基性変化) 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性 Rub による直接的 DNA 損傷の関与が示唆された。

さらに昨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。昨年度までにアカネ色素に発がん性が認められた肝臓、腎臓における病理組織学的検索を実施し、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性には、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 による肝発がん作用の可能性が示唆された。

本年度は昨年度に引き続き、ラット中期多臓器発がん性試験について、アカネ色素や lucidin によりラットやマウスにおいて DNA 付加体形成が報告されている大腸の病理組織学的検索結果について報告する。また、本年度は、Alz と Rub をラットに 26 週間反復投与し、腎臓について病理組

織学的検索を実施したので、その検索結果についても報告する。

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 週間に各々投与した。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 週間の休業後、実験 5 週目から Alz, Rub 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 (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。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で一晩反応させた。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、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、動物に与える苦痛を最小限に留めた。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

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結果を

Table 2に示す。対照群を含む全群の粘膜上皮において、異形成(Fig. 2a)、腺腫(Fig. 2b)、腺がん(Fig. 2c)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結果をTable 3に示す。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(Fig. 3a)と異型尿細管(Fig. 3b)が認められた。腎髄質外帯・近位尿細管上皮におけるPCNA陽性細胞数について、各投与群と対照群との相対比をFig. 4に示した。同部位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

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細管が認められた。核の大小不同は腎髄質・近位尿細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細管を誘発したことから、Rubは腎臓・近位尿細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発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

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発がんには、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. 研究発表

1. 論文発表

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.

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.

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.

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.

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

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

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

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

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.

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

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.

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

G. 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. Quantitative analysis of ACF and crypts in the large intestine of rats treated with Alz or Rub in a medium-term multi-organ carcinogenesis bioassay.

<Proximal>

Group	No. of animal examined	Sum of multiplicity of foci			Total no. of crypt	Crypts/foci
		<4	≥4	Total		
Control	11	24.2 ± 10.1	3.5 ± 2.4	27.6 ± 10.8	60.4 ± 23.2	2.24 ± 0.43
0.008% Alz	10	12.1 ± 7.9*	3.4 ± 6.7	15.5 ± 13	41.7 ± 46.3	2.33 ± 0.59
0.04% Alz	10	10.3 ± 4.7**	0.9 ± 1.3	11.2 ± 5.7*	21.1 ± 10.4**	1.91 ± 0.22
0.008% Rub	15	15.3 ± 10.4	2.1 ± 4.6	17.4 ± 14	39.0 ± 46.6*	2.00 ± 0.62
0.04% Rub	15	14.8 ± 12.5	1.5 ± 2.1	16.3 ± 13	35.9 ± 29.5	2.28 ± 1.12

<Middle>

Group	No. of animal examined	Sum of multiplicity of foci			Total no. of crypt	Crypts/foci
		<4	≥4	Total		
Control	11	50.5 ± 19.3	39.0 ± 21.4	89.5 ± 37.1	329.9 ± 150.2	3.64 ± 0.51
0.008% Alz	10	25.6 ± 13.3**	22.3 ± 8.8*	47.9 ± 21.6**	191.6 ± 71.0*	4.21 ± 0.67
0.04% Alz	10	23.8 ± 9.8**	28.3 ± 11.2	52.1 ± 19.7*	212.9 ± 79.0*	4.14 ± 0.47
0.008% Rub	15	33.7 ± 17.0*	22.6 ± 11.9*	56.3 ± 26.9*	197.5 ± 95.0**	3.53 ± 0.48
0.04% Rub	15	35.4 ± 18.2	24.1 ± 13.3*	59.5 ± 27.9*	206.4 ± 100.7*	3.49 ± 0.52

<Distal>

Group	No. of animal examined	Sum of multiplicity of foci			Total no. of crypt	Crypts/foci
		<4	≥4	Total		
Control	11	86.6 ± 32.2	49.6 ± 21.4	136.3 ± 43	438.8 ± 141	3.22 ± 0.30
0.008% Alz	10	37.6 ± 21.1**	31.4 ± 26.1	69.0 ± 44.7**	256.8 ± 181.3	3.25 ± 1.28
0.04% Alz	10	56.0 ± 24.7	34.1 ± 18.8	90.1 ± 36.9	298.1 ± 132.7	3.31 ± 0.40
0.008% Rub	15	67.9 ± 30.6	44.6 ± 34	112.5 ± 60.9	379.6 ± 235.3	3.31 ± 0.32
0.04% Rub	15	65.7 ± 29.6	25.3 ± 18	90.9 ± 39.7	265.3 ± 132.9	2.85 ± 0.54

*, **: p<0.05 and p<0.01 vs. controls, respectively.

Abbreviations: Alz, Alizarin; Rub, Rubiadin.

Table 2. Incidences and multiplicity of proliferative lesions in the large intestine of rats treated with Alz or Rub in a medium-term multi-organ carcinogenesis bioassay.

Group	No. of animals examined	Incidence (%)			Multiplicity			Leiomyosarcoma (Incidence)
		Dysplasia	Adenoma	Adeno-carcinoma	Dysplasia	Adenoma	Adeno-carcinoma	
Control	11	18.2	27.3	27.3	0.18	0.27	0.55	0
0.008% Alz	18	27.8	38.9	22.2	0.28	0.44	0.33	0
0.04% Alz	17	53	47.1	35.3	0.82	0.47	0.41	0
0.008% Rub	21	23.8	47.6	42.9	0.24	0.57	0.62	2
0.04% Rub	20	75.0*	60	65	1.00*	0.85	0.90	0

*: $p < 0.01$ vs. controls

Abbreviations: Alz, Alizarin; Rub, Rubiadin.

Table 3. Histopathological findings for the renal proximal tubules of F344 rats treated with alizarin or rubiadin for 26 weeks

Lesion (Grade)	Control	0.04% Alz	0.04% Rub
	(n=)* 15	15	15
Cortex			
Hyaline droplet deposition (\pm / $+$ / $++$ / $+++$) ^b	10 (10/ 0/ 0/ 0)	0*	10 (0/ 0/ 0/10)*
Vacuolar degeneration (\pm / $+$)	0	10 (9/1)*	0
Outer medulla			
Karyomegaly (+)	0	0	10*
Atypical tubule (\pm)	0	0	10*

*Number of animals examined

^b Grade (distribution of each lesion); \pm : <20%, +: 20-50%, ++: 50-70%, +++:>70%.

*: p<0.01 vs. controls

Abbreviations: Alz, alizarin; Rub, rubiadin.

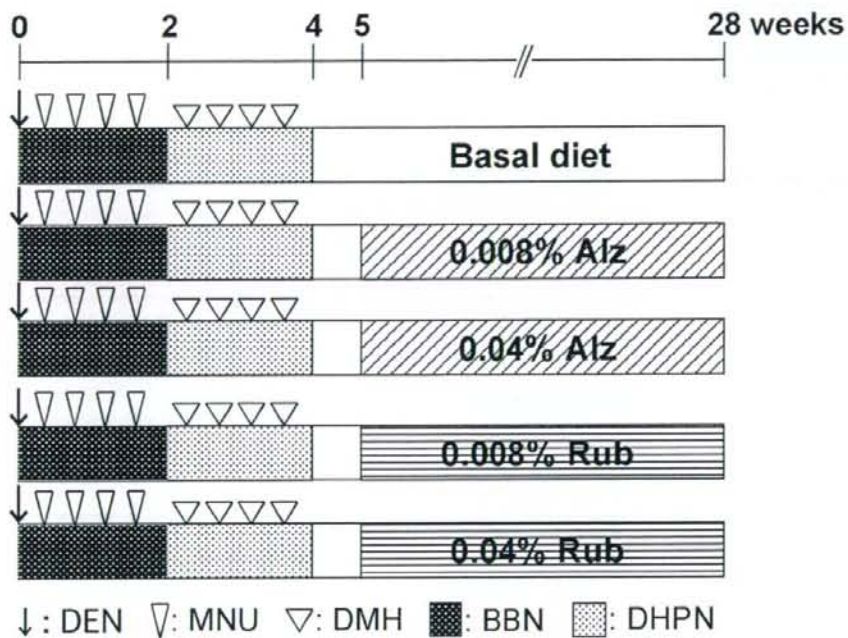


Fig. 1
 Experimental design of a rat medium-term multi-organ carcinogenic assay

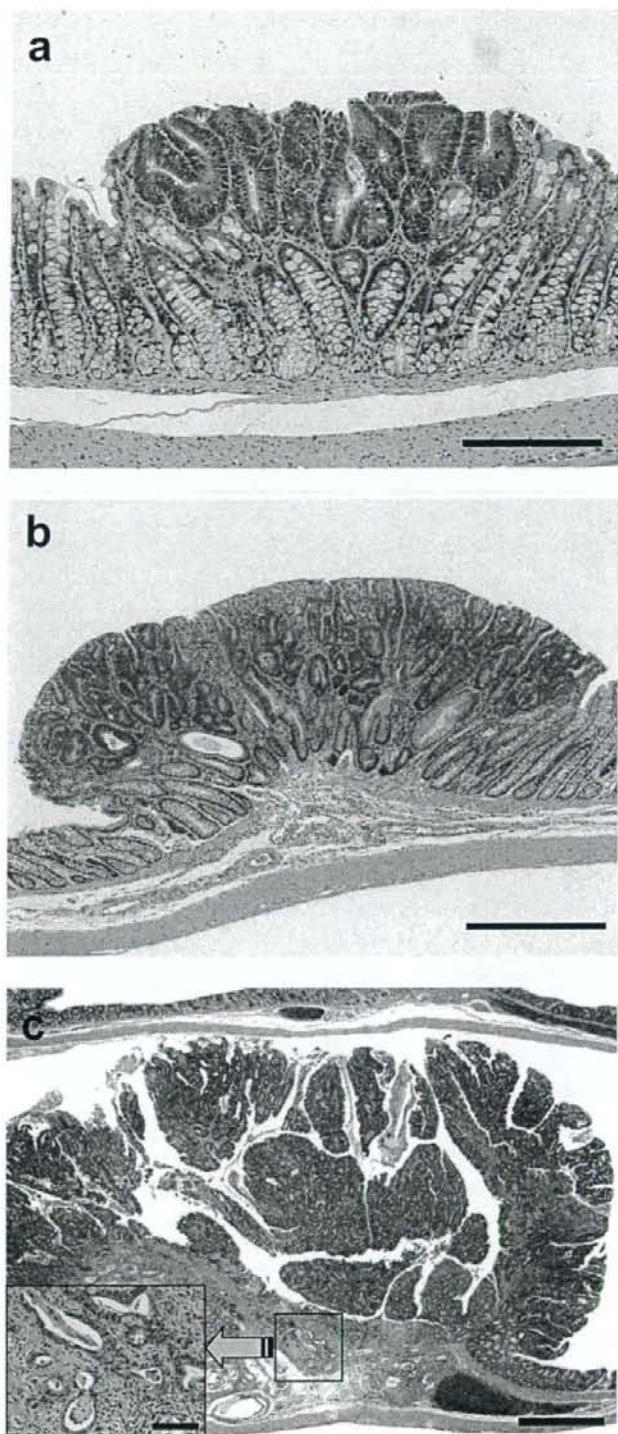


Fig. 2
Representative proliferative lesions in the large intestine of rats
treated with Alz or Rub in a medium-term multi-organ
carcinogenesis bioassay. (a) dysplasia; (b) adenoma; (c)
adenocarcinoma.

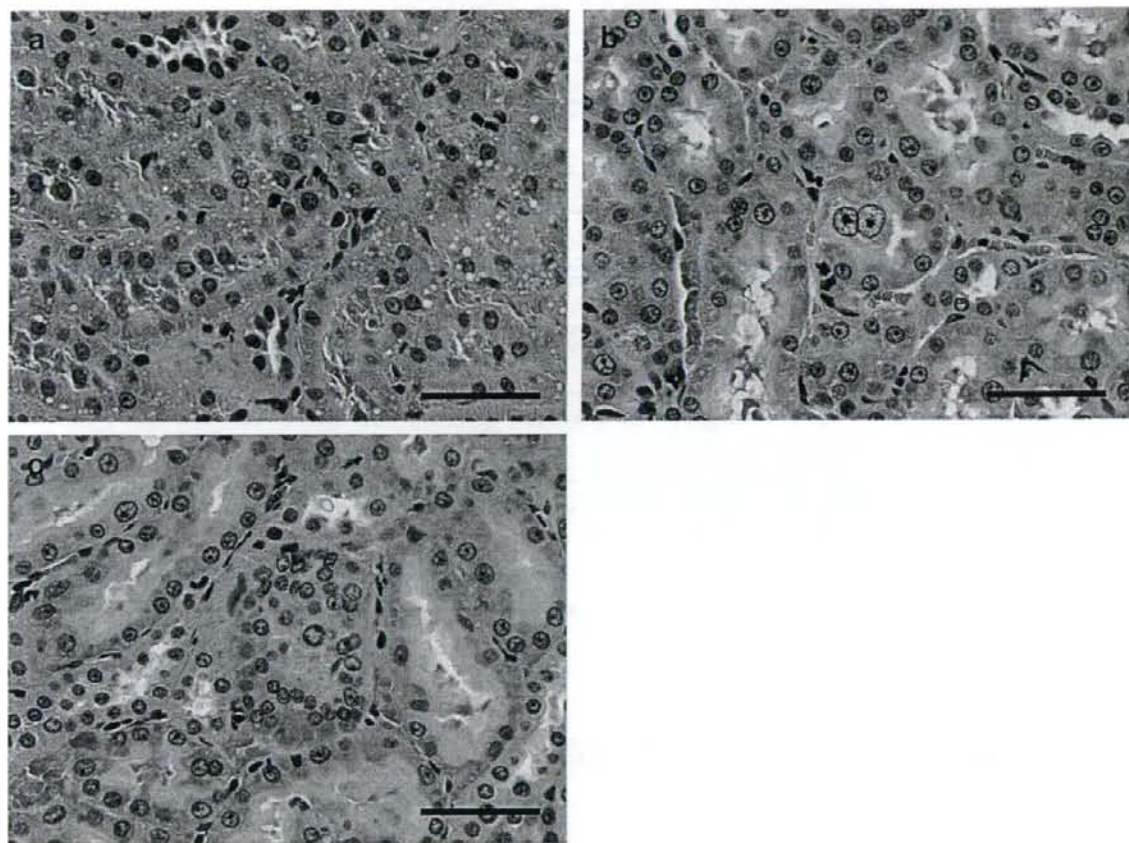


Fig. 3

Representative lesions in the kidney of rats treated with Alz or Rub for 26 weeks. (a) Vacuolar degeneration; (b) karyomegaly; (c) atypical tubule.