

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 (H18 - 食品 - 一般 - 007)

総合研究報告書

研究代表者

西川 秋佳 (国立医薬品食品衛生研究所 病理部)

平成21(2009)年 4月

研究分担者

梅村 隆志 (国立医薬品食品衛生研究所 病理部)
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)

目 次

I. 総合研究報告		
既存添加物の慢性毒性及び発がん性に関する研究	-----	1
研究代表者 西川秋佳		
(資料)		
1. オゾケライトの慢性毒性・発がん性に関する研究	-----	21
研究分担者 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	-----	47
研究分担者 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	-----	60
研究分担者 渋谷淳		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	85
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	87

既存添加物の慢性毒性及び発がん性に関する研究（H18 - 食品 - 一般 - 007）

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

既存添加物の安全性確認のため、オゾケライトの慢性毒性・発がん性併合試験を実施し、アカネ色素成分の発がん性と *in vivo* 突然変異誘発性について追究した。食品添加物の試験法ガイドラインに準拠して、オゾケライトを雌雄 F344 ラットに 1 年間慢性毒性試験では 0.05、0.1 及び 0.2% 濃度で、2 年間発がん性試験では 0.1 及び 0.2% 濃度で混餌投与した。また、アカネ色素成分の発がん性について、前がん病変を指標とする 26 週間までの短期投与試験と肝臓、腎臓及び大腸を主たる標的とするラット中期多臓器発がんモデルで検討し、*in vivo* 突然変異誘発性を *gpt delta* ラットを用いて検索した。オゾケライトの慢性毒性試験において、全投与群で肝障害が示唆され、病理組織学的に肺、肝臓、脾臓、リンパ節等における肉芽腫形成が確認された。発がん性試験は、2 年間の投与を予定通りに終了し、腫瘍性病変の発生状況について病理組織学的に検索中である。アカネ色素成分を短期投与した結果、ルシジン配糖体とその代謝物ルビアディンはアカネ色素による腎発がん部位に類似の病変を誘発した。また、中期多臓器発がん性試験の結果、ルビアディンは腎臓のみならず、肝臓、大腸に対しても発がん標的性を有する可能性、ならびに他の色素成分アリザリンにも腎発がん性のある可能性が示された。一方、*in vivo* 突然変異誘発性に関して、アリザリン投与群で腎 DNA 中 8-OHdG 量が顕著に上昇したが、*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、特徴的な変異ペクトラムを共有していた。これらの成績は、オゾケライトの安全性評価に供されるとともに、アカネ色素と同様の発がん性アントラキノン成分を含む食品や食品添加物の安全性評価に役立つものと期待できる。

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。

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が、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やその代謝産物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。

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、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、MCによる腎腫瘍の好発部位である髓質外帯尿管上皮における

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た。一方で、LPの代謝物であるRubはDNAの直接傷害性を有し、変異原性を示すことから、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ンジカル生成を介した酸化ストレスの関与の両方が関与すると考えられる。本研究では、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、*gpt delta* ラットにそれぞれ8週間混餌投与し、発がん標的臓器である腎臓および肝臓におけるDNA中8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) 量の測定と*gpt* 遺伝子変異頻度 (MF) を検索した。

また本研究では、平成18年度に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や非遺伝毒性成分の一つである 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。平成19年度からは、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た中期多臓器発がん性試験を実施し、主にアカネ色素で発がん性が認められた肝臓、腎臓と、本色素投与によりDNA付加体形成が認められるとの報告がある大腸について検索した。さらに平成20年度には、Alz、Rubの腎臓に対する慢性影響を検索するため、両物質の26週間反復投与実験を実施した。

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 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ーゼ (ALP), γ -グルタミルトランスベプチターゼ (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。

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。

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

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。動物の飼育はバリヤー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

ブルは液体窒素により凍結し、測定まで -80°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 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。トランスジーン の回収として、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 AEG10DNA 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, LP および Rub は、上記と同一のものを使用した。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、実験に供した。

(1) Alz, LP, Rub のラットを用いた短期間投与実験

無処置群 (6 匹) の他に各物質について 3 用量 (6 匹/群) を設定した。Alz, LP についてはアカネ色素の発がん性試験での腎発がん用量 (5.0%) での各色素の成分含量 (Alz 1.58%, LP 6.60%) を算出し、それを中間用量とした用量 (Alz: 0.0016, 0.008, 0.04%, LP: 0.06, 0.3, 1.5%) を、Rub については参考となるデータがなかったため、LP と同じ用量 (0.06, 0.3, 1.5%) で 1 週間混餌投与した。投与 1 週目に腎臓を採取し、動物実験を終了した。動物実験は、各物質の入手時期が異なったため、Alz, LP と Rub に対してそれぞれ対照群を設定して別々に実施した。採取した腎臓について、乳頭部を含む両腎の短軸断のスライスをホルマリン固定し、常法に従い厚さ 3 μm のパラフィン切片を作製し、HE 染色後、病理組織学

的検索に用いた。発現した病変については群当たりの発生頻度やその強さを求めた。また、アカネ色素投与で腫瘍好発部位であった髓質外帯・近位尿管上皮細胞の増殖活性を検索するため、ホルマリン固定パラフィン切片を用いて proliferating cell nuclear antigen (PCNA)の免疫染色を実施した。このとき、一次抗体はマウス・モノクローナル抗体 (Dako, clone PC10, x100) を用い、4°C 一晚反応させ、二次抗体以降のステップは VECTASTAIN®Elite ABC KIT (Vector Laboratories)を用いた ABC 法にて実施し、3, 3'-diaminobenzidine で可視化、ヘマトキシリンで核染した。PCNA 陽性細胞数は、各動物の片腎の髓質外帯について、光学顕微鏡を用いて 200 倍で観察し、1 視野に認められた近位尿管上皮細胞 1000 個中の陽性細胞数を求め、5 視野の平均値を算出し、さらに、対照群との相対比を求めた。また、腎組織内の 8-OHdG レベルを測定するため、ホルマリン固定したスライス以外の腎組織から皮質-髓質外帯を採取し、新鮮凍結した。凍結腎組織は、実験直前に凍結したまま 200 mg を測り取り、直ちに市販の DNA 抽出キット (DNA Extractor WB Kit; 和光純薬) を用いて核 DNA を抽出した。抽出した核 DNA をヌクレアーゼ PI とアルカリフォスファターゼでデオキシヌクレオチドに消化した後、electrochemical detection system (Coulcochem II) を用いて HPLC-ECD 法で測定し、各群の 8-OHdG レベルと対照群との相対比を求めた。

(2) Alz, Rub のラット中期多臓器発がん性試験

動物は、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 週間の休薬後、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 は前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。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 μm 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。発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。腎臓に発現した尿管の増殖性病変の分類として、①異型尿管：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°C一晩反応させ、二次抗体以降のステップは VECTASTAIN®Elite ABC KIT (Vector Laboratories)を用いたABC法にて実施し、3,3'-diaminobenzidine で可視化、ヘマトキシリンで核染した。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。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 μm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、前がん病変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、大腸の前がん病変、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。

(3) Alz, Rub の26週間反復投与と実験

動物は、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。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、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。

(統計学的処理方法)

体重、臓器重量等については、各群の分散を 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、Dunnett 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、Dunnett C の方法で対照群と投与群との間の有意差検定を行った。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)

投与実験は混餌による経口投与であり、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

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 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。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 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。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。発がん性試験の臓器実重量では, 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、脾臓の髄外造血、子宮の内膜間質ポリープ、下垂体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

試験期間中の動物の一般状態および生存率については特記すべき変化は認められなかった。体重については、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17.6g、MC群で13.4g、LP群で17.2g、Alz群で15.3gおよびRubで16.6%であった。臓器重量について、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。

DNA中8-OHdGの測定の結果、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。

gpt assayと変異コロニーのスペクトラム解析では、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。シーケンス解析により、GC:TA transversionやGC:AT transition 変異頻度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 変異頻度、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

(1) Alz, LP, Rubのラットを用いた短期間

投与実験

最終体重はRub投与群において0.06%から用量の増加に伴い、対照群に比し減少した。また、腎重量は0.04% Alz投与群で相対重量が増加し、Rub投与群では0.3%以上群で用量の増加に伴う絶対重量の減少と1.5%群で相対重量の増加が認められた。LPはいずれの用量でも体重、腎重量に変動を及ぼさなかった。Alz, LPはいずれの用量でも摂餌量に大きな変動を認めず、被験物質の一日摂取量は混餌用量の公比5をほぼ反映して増加を示したが、Rubは0.3%以上の群で顕著な摂餌量の減少に伴う検体摂取量の減少を示した。

腎臓の病理組織学的所見として、Alz, LP投与では皮質・近位尿細管上皮細胞(PTC)に変化が認められ、微小空胞変性は、Alz投与では0.0016%以上群で、LP投与では0.3%以上群で用量相関性にGradeが増加した。硝子滴変性は対照群を含む全ての動物に認められたが、そのGradeはAlz 0.008%群とLP 0.3%以上の群で対照群に比し増加していた。また、アカネ色素投与1週目で認められたものと同様の近位尿細管の好塩基性変性がAlz, LPとも最高用量群(それぞれ0.04%, 1.5%)で各々6例中6例、2例に認められた。Rub投与ではアカネ色素による腎臓がんの好発部位である髄質外帯のPTCに核の大小不同と細胞質腫大を伴う好塩基性変性が、0.06%以上の全動物に認められ、用量の増加に伴いこれらのGradeが増加した。これらの変化は、Rubの高用量で髓放線に沿って皮質にも拡大していた。また、1.5%群では、PTCにアポトーシスが散見された。その他、髄質外帯PTCの微小空胞変性が対照群を含む全群に認め

られたが、病変の発生頻度、Gradeとも0.06, 0.3%群で対照群に比し増加していた。また、皮質PTCの硝子滴変性が対照群と0.06%群に認められたが、0.3%以上群では認められなかった。

次に、髄質外帯のPTC1000個あたりのPCNA陽性細胞数を検索した結果、0.04% Alz群では対照群との間に差は認めず、LP投与群では0.3%群で対照群に比し増加傾向を示し、1.5%群では有意に増加(1.9倍)した。Rub投与群では、0.06%群で対照群に比し有意な増加(3倍)を示したが、0.3%以上の群では細胞毒性のため差は認められなかった。

腎組織(皮質+髄質外帯)における8-OHdGレベルを測定した結果、0.04% Alz群、1.5% LP群で増加を示し、対照群との相対比は各々3倍、2.6倍であった。Rub投与群では、0.06%群、1.5%群とも対照群との差は認められなかった。

(2) Alz, Rubのラット中期多臓器発がん性試験

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。

腎臓で認められた増殖性病変の発生頻度・個数について、腎皮質において対照群を含む全群に近位尿細管領域の異型尿細管、異形過形成、腎細胞腺腫/がんの発生を認めたが、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、移行上皮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 陽性細胞巢の定量の結果、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。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、対照群との頻度の差や用量依存性はみられなかった。

大腸における ACF の定量的解析の結果、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、または核内のみで認められた。 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。

(3) Alz, Rub の 26 週間反復投与実験

腎臓の病理組織学的検索結果を Table 10 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る髄質外帯・近位尿細管上皮において、Rub 投与群の全例にカリオメガリーと異型尿細管が認められた。腎髄質外帯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、*gpt delta* ラットによる8週間の投与を実施し、実験期間中の体重推移、肝臓および腎臓の臓器重量、8-OHdG量の測定及び *in vivo* 変異原性試験の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。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た。

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た。

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。さらに、*gpt* assay で認められた変異コロニーのスペクトラム解析の結果において、すべての投与群で GC-TA transversion 変異頻度の上昇が認められたことから、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 群で顕著な上昇が認められた。また、Rub 群で有意な上昇が認められた AT-TA transversion 変異頻度の上昇は、MC 及び LP 群に共通して認められたことから、MC、LP 及び Rub 群で認められた *gpt* MF の上昇は酸化的 DNA 損傷ではなく、Rub による DNA の直接的傷害によるものと考えられた。

一方、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が、その上昇は腎臓に比べいずれも軽度であった。さらに *gpt* assay では、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おいてその構成成分及び代謝物の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 *gpt* MF の顕著な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

Alz, LP, Rub を 1 週間投与したとき、ラットの最終体重は、Alz, LP 投与群では変化が認められず、Rub 投与群では低用量群から用量依存的な低値が見られた。これは後述する Rub の腎毒性による全身状態の悪化とそれに伴う摂餌量の減少によるものと考えられた。この群では病理組織学的に近位尿細管上皮細胞の腫大と核の大小不同を伴う好塩基性変化が髄質外帯に認められ、その程度は用量依存的に増加し、特に最高用量群 (1.5%) では、上皮細胞の腫大や核の大小不同が高度で、アポトーシス像も散見された。

Rub 投与では一週間目から腎髄質外帯・近位尿細管上皮細胞の核の大小不同が認められ、この変化は 26 週間投与後にも継続して認められた。同部位の核の大小不同は、アカネ色素を投与した際には 4 週目から認められ、本色素の 90 日試験、慢性毒性・発がん性試験においても認められた変化で、その発生頻度は、用量に相関して増していた。核の大小不同は、遺伝毒性の有無に関わらず、オクラトキシン A やクロロホルムなどの腎発がん物質の投与により尿細管上皮に認められ、腫瘍発生に関与する可能性のある変化であると考えられている。本病変は Alz や LP 投与では認められず、Rub 用量の増加に伴い程度が増していたことから、アカネ色素でみられた同様の本病変は主に Rub によることが示唆された。また、Rub (0.06%) による同部位での PCNA 陽性尿細管上皮細胞の増加はアカネ色素投与でも認められ、同部位での細胞増殖活性の亢

進を示唆し、腎腫瘍の発生は、Rub に起因する可能性が考えられた。そして、Rub の腎髄質外帯・近位尿細管上皮に対する発がん性は、中期多臓器発がん性試験において腎前がん病変や腫瘍性病変が増加したこと、26 週間反復投与実験において Rub 単独で腎前がん病変が誘発されたことから支持された。Rub は、*in vitro* の Ames 試験、不定期 DNA 合成試験、DNA 付加体試験で陽性結果を示し、このうち不定期 DNA 合成試験では lucidin より強い陽性、Ames 試験では他の色素成分の 10 分の 1 量でより強い陽性を示すことが報告されている。一方、今回の 1 週間の Rub 投与では酸化的 DNA 損傷を誘発しないことが明らかになった。以上のことから、髄質外帯・近位尿細管上皮で認められた Rub による核の大小不同や前がん病変、腫瘍性病変の発生に、酸化的ストレスは関与せず直接的 DNA 損傷によるものと考えられた。

短期間投与実験での病理組織学的検索において、Alz, LP 投与では腎皮質の近位尿細管上皮細胞に好塩基性変性や微小空胞変性がみられた。また、両物質の最高用量投与により、腎組織内の 8-OHdG レベルが明らかに増加した。これらの皮質・近位尿細管上皮細胞でみられた病理所見は、アカネ色素投与 1 週目で認められたものと同様の変化であり、また、腎組織内の 8-OHdG レベルの増加はアカネ色素投与でも認められた。これらの結果から、アカネ色素投与による腎皮質の病理変化は、Alz と LP に起因し、それに対する酸化的ストレスの関与が示唆された。

ラット中期多臓器発がん性試験では、Alz が髄質外帯の近位尿細管上皮において発が

んプロモーション作用を有することが明らかとなった。また、Alz の 26 週間反復投与実験では、腎髄質外帯・近位尿細管上皮細胞に病理組織学的変化が認められなかったが、細胞増殖活性が亢進していた。前述の通り、Alz 投与により短期間投与で酸化的 DNA 損傷が認められたことから、腎髄質外帯・近位尿細管上皮における細胞増殖活性の亢進や発がんプロモーション作用には酸化的ストレスが関与している可能性が示唆された。

中期多臓器発がん性試験において、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 Alz の発がんプロモーション作用は Rub より弱い可能性が考えられた。

今回の検索で、LP は腎皮質尿細管に微小空胞変性や好塩基性変性を引き起こし、髄質外帯では用量の増加に伴って細胞増殖を亢進させることが明らかになった。また、LP 投与により、腎組織内の 8-OHdG レベルが増加を示した。LP の遺伝毒性に関しては、Ames 試験、不定期 DNA 合成試験で陽性との報告がある。LP は前述した様に、Alz に比し弱いながらも腎皮質の変化の発現に関与し、それが酸化的ストレスに起因することが示唆される。一方で、LP は生体内で Rub に代謝されるため、直接的 DNA 損傷性との関連は不明であるが、生成された Rub により髄質外帯の尿細管上皮細胞増殖亢進を招いた可能性がある。

以上の腎臓における検討により、アカネ

色素の腎発がんは本色素成分の LP の代謝産物である Rub のイニシエーション作用、Alz のプロモーション作用により生じている可能性が推察された。

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性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可能性がある。

中期多臓器発がん性試験の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。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 が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にも符合する。Alz は、大腸において前がん病変、腫瘍性病変の発生に影響を与えなかったことから、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、大腸に腫瘍性病変は認めら

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 の量が少ないことや、前述のとおり Rub の大腸における作用が弱いことに基づくものと考えられた。

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

検討の結果、MC 構成成分およびその代謝物は、腎臓ならびに肝臓で酸化的 DNA 損傷を引き起こすことが明らかになったが、MC による腎発がんには、これら酸化的 DNA 損傷よりも、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。さらに、肝発がんでは構成成分の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

本研究において、アカネ色素の腎発がん

の同定と、それらの発がん標的臓器の同定を試みた結果、色素成分 LP の代謝産物 Rub がアカネ色素の腎発がんが大きく関与し、肝臓、大腸に対しても発がん標的性を有することが明らかになった。Rub の発がん性は、直接的 DNA 損傷に関連するものと考えられた。また、Alz は腎臓に対して発がん標的性を有し、アカネ色素の腎発がんには Alz が誘発した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ことが示唆された。

F. 健康危険情報

アカネ色素の発がん成分として、代謝物ルビアジンが深く関与している可能性が示された。ルビ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*