

Table 4-1 Serum biochemical data for F344 rats treated with Ozokerite for 52 weeks (Male)

Sex	Male			
	Item / Dose	0%	0.05%	0.1%
No. of animals	10	10	10	10
TP (g/dL)	7.3 ± 0.2 ^a	6.9 ± 0.2 ^{**}	6.8 ± 0.3 ^{**}	6.7 ± 0.1 ^{**}
A/G	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.7 ± 0.2	1.8 ± 0.1
Alb (g/dL)	4.6 ± 0.1	4.3 ± 0.1 ^{**}	4.3 ± 0.1 ^{**}	4.3 ± 0.1 ^{**}
T.Bil (mg/dL)	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.03	0.12 ± 0.06 ^{**}
TG (mg/dL)	139 ± 49	69 ± 19 [*]	53 ± 10 ^{**}	54 ± 13 ^{**}
T.Cho (mg/dL)	118 ± 9	118 ± 14	109 ± 11	111 ± 10
BUN (mg/dL)	17.5 ± 1.4	18.8 ± 1.9	18.5 ± 1.5	18.0 ± 0.9
CRN (mg/dL)	0.27 ± 0.02	0.30 ± 0.03 [*]	0.31 ± 0.02 [*]	0.30 ± 0.02 [*]
AST (IU/L)	126 ± 27	301 ± 44 ^{**}	326 ± 78 ^{**}	351 ± 70 ^{**}
ALT (IU/L)	81 ± 14	213 ± 40 ^{**}	171 ± 43 ^{**}	168 ± 43 ^{**}
ALP (IU/L)	480 ± 55	460 ± 45	571 ± 137	653 ± 163
γ - GTP (IU/L)	5 ± 2	2 ± 0	3 ± 1 [*]	5 ± 3
Ca (mg/dL)	10.6 ± 0.2	10.5 ± 0.2	10.4 ± 0.2	10.4 ± 0.2
P (mg/dL)	4.5 ± 0.6	4.5 ± 0.5	4.6 ± 0.7	4.7 ± 0.2
Na (mEQ/L)	145 ± 1	145 ± 1	145 ± 2	146 ± 1
Cl (mEQ/L)	103 ± 1	104 ± 1	105 ± 1 ^{**}	105 ± 1 ^{**}
K (mEQ/L)	4.6 ± 0.3	4.9 ± 0.2 ^{**}	5.0 ± 0.2 ^{**}	5.1 ± 0.2 ^{**}

a : Mean ± S.D.

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

Table 4-2 Serum biochemical data for F344 rats treated with Ozokerite for 52 weeks (Female)

Sex	Female				
	Item / Dose	0%	0.05%	0.1%	0.2%
	No. of animals	10	10	10	10
	TP (g/dL)	7.5 ± 0.3 ^a	7.0 ± 0.2**	6.6 ± 0.4**	6.6 ± 0.4**
	A/G	2.2 ± 0.1	1.9 ± 0.1**	1.8 ± 0.2**	1.8 ± 0.2**
	Alb (g/dL)	5.1 ± 0.2	4.5 ± 0.1**	4.3 ± 0.3**	4.3 ± 0.3**
	T.Bil (mg/dL)	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.16 ± 0.13*	0.10 ± 0.03**
	TG (mg/dL)	88 ± 23	57 ± 18**	62 ± 20*	58 ± 19**
	T.Cho (mg/dL)	126 ± 10	137 ± 13	138 ± 14	137 ± 15
	BUN (mg/dL)	15.6 ± 0.7	16.2 ± 1.5	16.6 ± 1.8	17.9 ± 1.6**
	CRN (mg/dL)	0.27 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.30 ± 0.02*
	AST (IU/L)	84 ± 22	170 ± 60*	330 ± 224**	209 ± 100**
	ALT (IU/L)	37 ± 5	72 ± 16**	106 ± 41**	77 ± 21**
	ALP (IU/L)	180 ± 24	237 ± 104	467 ± 185**	294 ± 58**
	γ-GTP (IU/L)	2 ± 0	3 ± 1	6 ± 2**	5 ± 2**
	Ca (mg/dL)	10.5 ± 0.3	10.3 ± 0.3	10.3 ± 0.4	10.3 ± 0.2
	P (mg/dL)	3.9 ± 0.4	4.5 ± 0.5*	4.9 ± 0.5**	4.8 ± 0.5**
	Na (mEq/L)	145 ± 2	144 ± 1	143 ± 3	144 ± 1
	Cl (mEq/L)	104 ± 2	105 ± 1	107 ± 3**	106 ± 1
	K (mEq/L)	4.3 ± 0.3	4.5 ± 0.2	5.0 ± 0.3**	4.9 ± 0.3**

a : Mean ± S.D.

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

Table 5-1 Organ weight of F344 rats treated with Ozokerite for 52 weeks (Male)

Item	Male			
	0%	0.05%	0.1%	0.2%
No. of animals	10	10	10	10
Body weight (g)	403.9 ± 22.5 a	394.1 ± 17.8	377.3 ± 21.7 *	377.3 ± 20.1 *
Absolute (g)				
Brain	2.05 ± 0.04	2.05 ± 0.05	2.22 ± 0.54	2.07 ± 0.04
Lungs	1.12 ± 0.07	1.30 ± 0.07 **	1.33 ± 0.11 **	1.37 ± 0.09 **
heart	1.06 ± 0.06	1.03 ± 0.05	1.02 ± 0.06	1.05 ± 0.06
Spleen	0.70 ± 0.05	1.09 ± 0.19	1.41 ± 0.27 **	1.76 ± 0.31 **
Liver	9.22 ± 0.80	10.35 ± 0.65	11.84 ± 1.64 **	13.28 ± 1.32 **
Adrenals	0.037 ± 0.004	0.036 ± 0.004	0.039 ± 0.004	0.037 ± 0.004
Kidneys	2.15 ± 0.14	2.21 ± 0.11	2.21 ± 0.15	2.35 ± 0.10 **
Gonads	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
Lungs	0.28 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.35 ± 0.03 **	0.36 ± 0.02 **
heart	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.02	0.28 ± 0.03
Spleen	0.17 ± 0.01	0.28 ± 0.04	0.38 ± 0.07 **	0.47 ± 0.10 **
Liver	2.28 ± 0.10	2.62 ± 0.12	3.15 ± 0.46 **	3.53 ± 0.38 **
Adrenals	0.009 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.010 ± 0.002	0.010 ± 0.001
Kidneys	0.53 ± 0.02	0.56 ± 0.04	0.59 ± 0.04	0.62 ± 0.05 **
Gonads	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% group

Table 5-2 Organ weight of F344 rats treated with Ozokerite for 52 weeks (Female)

Item	Female			
	0%	0.05%	0.1%	0.2%
No. of animals	10	10	10	10
Body weight (g)	210.2 ± 5.9	211.4 ± 19.6	215.8 ± 8.7	207.7 ± 10.2
Absolute (g)				
Brain	1.87 ± 0.03	1.87 ± 0.06	1.88 ± 0.04	1.84 ± 0.04
Lungs	0.77 ± 0.00	0.83 ± 0.05 *	0.89 ± 0.07 **	0.91 ± 0.05 **
heart	0.70 ± 0.03	0.63 ± 0.04 **	0.69 ± 0.05	0.68 ± 0.07
Spleen	0.45 ± 0.02	0.65 ± 0.10	1.06 ± 0.34 **	1.05 ± 0.34 **
Liver	4.53 ± 0.27	6.05 ± 1.25	10.06 ± 3.37 **	9.97 ± 3.37 **
Adrenals	0.042 ± 0.005	0.059 ± 0.059	0.042 ± 0.004	0.044 ± 0.004
Kidneys	1.37 ± 0.08	1.34 ± 0.10	1.44 ± 0.15	1.43 ± 0.13
Relative (g%)				
Brain	0.89 ± 0.03	0.89 ± 0.06	0.87 ± 0.04	0.89 ± 0.04
Lungs	0.37 ± 0.02	0.40 ± 0.05	0.41 ± 0.03	0.44 ± 0.03 *
heart	0.33 ± 0.02	0.30 ± 0.04	0.32 ± 0.02	0.33 ± 0.03
Spleen	0.22 ± 0.01	0.31 ± 0.10	0.49 ± 0.15 **	0.50 ± 0.16 **
Liver	2.16 ± 0.12	2.86 ± 1.25	4.66 ± 1.56 **	4.80 ± 1.57 **
Adrenals	0.020 ± 0.003	0.028 ± 0.059	0.019 ± 0.002	0.021 ± 0.002
Kidneys	0.65 ± 0.04	0.64 ± 0.10	0.67 ± 0.07	0.69 ± 0.06

a : Mean ± S.D.

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

Table 6-1 Organ weight of F344 rats treated with Ozokerite for 104 weeks (Male)

Item	Male			
		0%	0.1%	0.2%
No. of animals	42	39	34	
Body weight (g)	399.2 ± 37.0 ^a	376.4 ± 50.3 **	358.1 ± 23.0 **	
Absolute (g)				
Brain	2.10 ± 0.05	2.10 ± 0.06	2.09 ± 0.05	
Lungs	1.27 ± 0.13	1.47 ± 0.19 **	1.55 ± 0.27 **	
heart	1.07 ± 0.08	1.12 ± 0.15	1.15 ± 0.12 **	
Spleen	1.13 ± 0.53	2.57 ± 2.10 **	3.53 ± 4.83 **	
Liver	11.03 ± 1.36	16.98 ± 3.28 **	19.85 ± 5.43 **	
Adrenals	0.052 ± 0.029	0.059 ± 0.034	0.061 ± 0.053	
Kidneys	2.43 ± 0.15	2.55 ± 0.25 *	2.57 ± 0.48 **	
Gonads	3.80 ± 1.57	3.14 ± 1.56	3.20 ± 3.39 *	
Relative (g%)				
Brain	0.53 ± 0.05	0.56 ± 0.05 **	0.59 ± 0.04 **	
Lungs	0.32 ± 0.04	0.39 ± 0.04 **	0.44 ± 0.08 **	
heart	0.27 ± 0.02	0.30 ± 0.04	0.32 ± 0.04 **	
Spleen	0.29 ± 0.14	0.71 ± 0.69 **	1.00 ± 1.41 **	
Liver	2.76 ± 0.21	4.57 ± 1.09 **	5.55 ± 1.52 **	
Adrenals	0.013 ± 0.007	0.016 ± 0.010 **	0.017 ± 0.014 **	
Kidneys	0.61 ± 0.05	0.69 ± 0.11 **	0.74 ± 0.07 **	
Gonads	0.96 ± 0.39	0.84 ± 0.42	0.91 ± 0.91	

a : Mean ± S.D.

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

Table 6-2 Organ weight of F344 rats treated with Ozokerite for 104 weeks (Female)

Item	Female		
	0%	0.1%	0.2%
No. of animals	42	35	35
Body weight (g)	278.0 ± 32.7 a	254.1 ± 26.0 **	245.3 ± 23.9 **
Absolute (g)			
Brain	1.92 ± 0.04	1.91 ± 0.05	1.91 ± 0.05
Lungs	0.94 ± 0.29	1.09 ± 0.19 **	1.10 ± 0.16 **
heart	0.76 ± 0.06	0.83 ± 0.13 *	0.86 ± 0.21 **
Spleen	0.76 ± 0.48	3.25 ± 6.08 **	2.56 ± 4.00 **
Liver	7.43 ± 1.86	13.98 ± 3.79 **	16.34 ± 5.12 **
Adrenals	0.073 ± 0.083	0.067 ± 0.012 **	0.070 ± 0.021 **
Kidneys	1.69 ± 0.14	1.84 ± 0.20 **	1.96 ± 0.47 **
Relative (g %)			
Brain	0.70 ± 0.10	0.76 ± 0.09	0.79 ± 0.09 **
Lungs	0.35 ± 0.14	0.44 ± 0.10 **	0.45 ± 0.08 **
heart	0.28 ± 0.04	0.33 ± 0.06 **	0.36 ± 0.10 **
Spleen	0.28 ± 0.20	1.29 ± 2.33 **	1.06 ± 1.65 **
Liver	2.67 ± 0.56	5.57 ± 1.71 **	6.73 ± 2.29 **
Adrenals	0.026 ± 0.028	0.027 ± 0.006 **	0.029 ± 0.010 **
Kidneys	0.61 ± 0.09	0.73 ± 0.12 **	0.81 ± 0.23 **

a : Mean ± S.D.

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

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

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

分担課題：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 病理部第一室長
研究協力者	石井 雄二	国立医薬品食品衛生研究所 病理部研究員

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、臓器重量の測定および DNA 中 8-OHdG 量の測定及び *gpt* 点突然変異頻度の検索を行った。腎相対重量は MC 及び Rub 群で、肝相対重量は MC, LP および Alz 群で対照群に比べ有意な上昇が認められた。腎臓では、DNA 中 8-OHdG 量は MC 群に上昇傾向が、LP 及び Alz 群で対照群に比べ有意な上昇が認められた。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、変異スペクトラム解析の結果、GC:TA transversion や GC:AT transition 変異頻度が全投与群で上昇し、さらに AT:TA transversion 変異頻度の上昇が MC, LP 及び Rub 群で共通して認められた。一方、肝臓では、8-OHdG 量は LP 及び Rub 群で上昇傾向が、MC と Alz 群で対照群に比べて有意な上昇が認められたが、*gpt* MF の有意な上昇は Rub 群のみだった。また、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 の腎発がんには酸化的 DNA 損傷よりも、LP とその代謝物である Rub による直接的な 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直接的な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ノンラジカルの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。

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。

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。

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 μ m, BECKMAN COULTER 社製) UV は GILSON 118 (GILSON 社製), ED は Coulochem II (ESA 社製) を使用した。移動相には 10 mM リン酸一ナトリウム塩 / methanol = 96 / 4 (v/v) (1.0 mL/min) を送液し、分析カラムで分離した後 deoxyguanosine (dG) を UV 290 nm で、8-OHdG を ED 300 mV で検出し、8-OHdG 値は 8-OHdG / 10⁵dG 量として算出した。

4. 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。

5. *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-

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。

6. 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. 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。

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餌量は, 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。

7. *gpt* assay と変異コロニーのスペクトラム解析

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 (Table 3)。

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 2)。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 (Table 3)。

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, *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。

E. 結論

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。

F. 研究成果

1. 発表論文

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關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

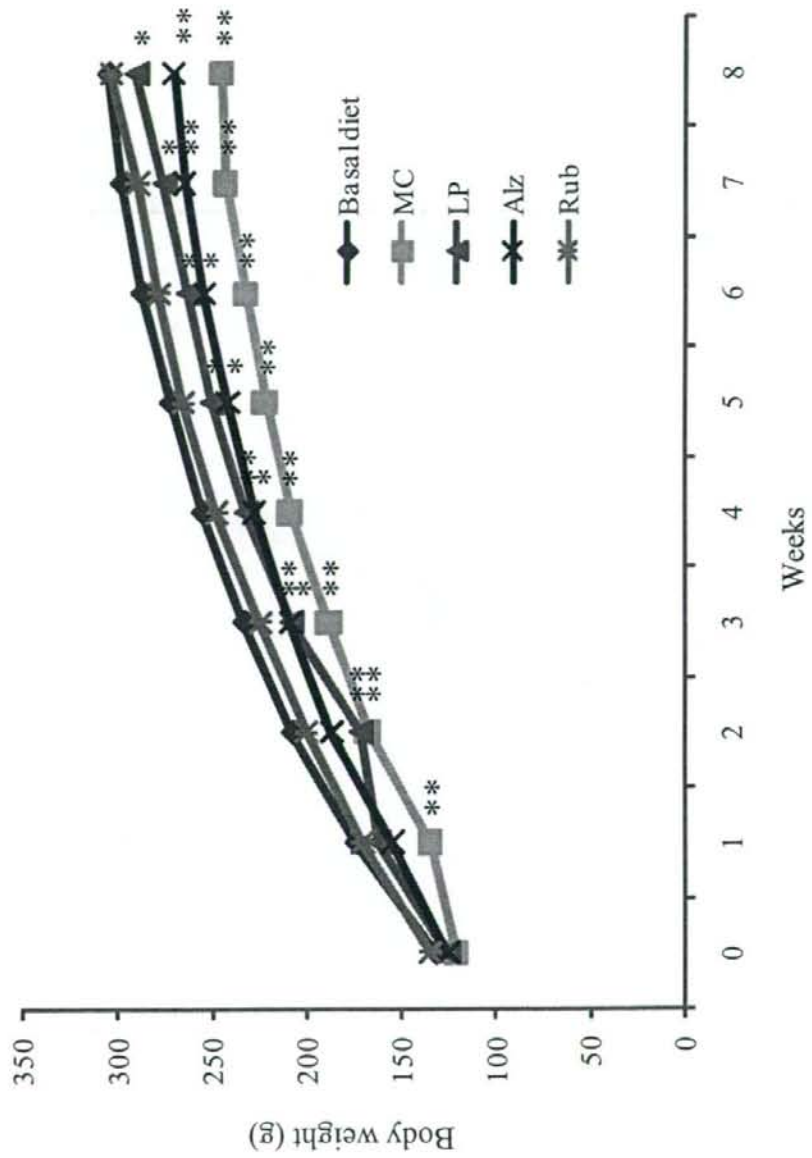
石井雄二, 岡村俊也, 田崎雅子, 井上知紀, 能美健彦, 梅村隆志, 西川秋佳: *gpt delta* ラットを用いたアカネ色素成分による *in vivo* 突然変異誘発性の検討. 第37回日本環境変異原学会, 沖縄, 第37回日本環境変異原学会講演要旨集: p130 (P-047), 12月, 2008

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 P.L., Phillips D.H.: 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

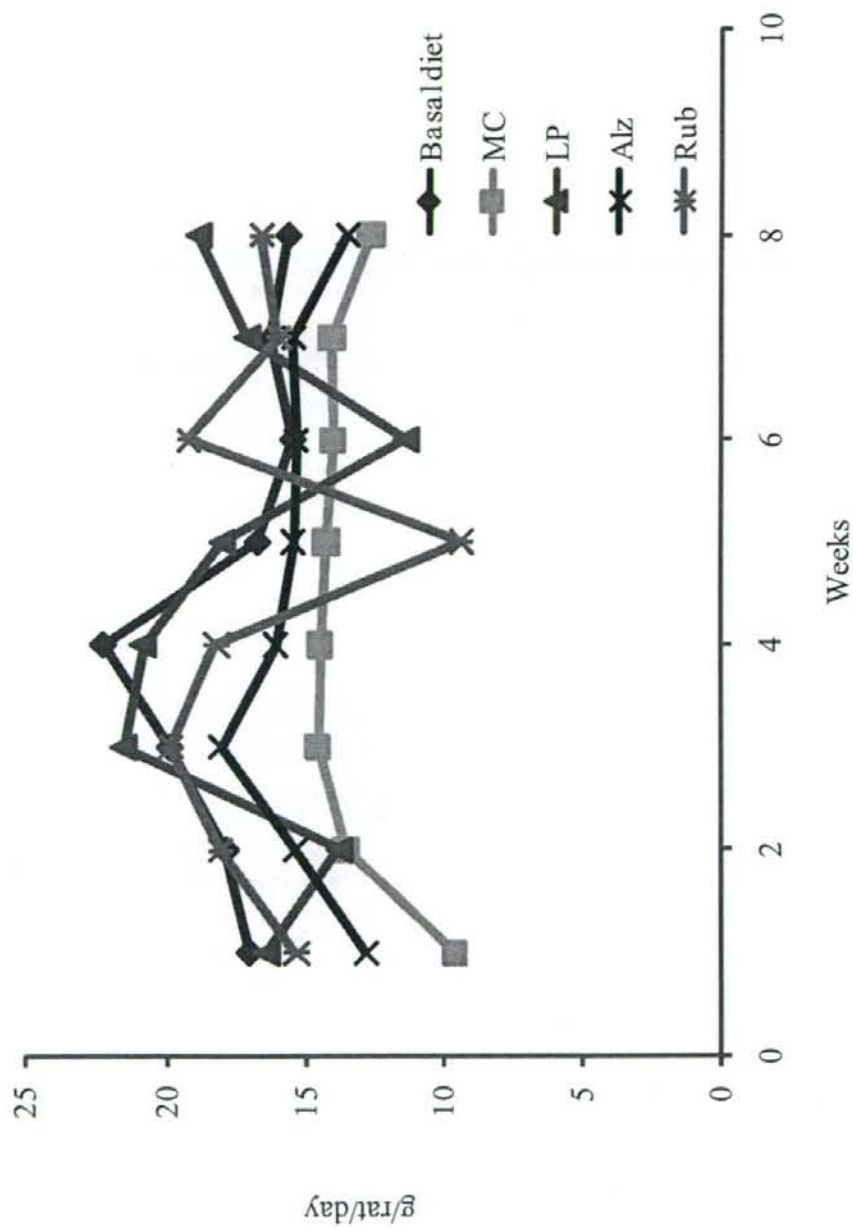


Fig. 2 Food consumption for F344 *gpt* delta rats treated with MC, LP, Alz or Rub for 8 weeks

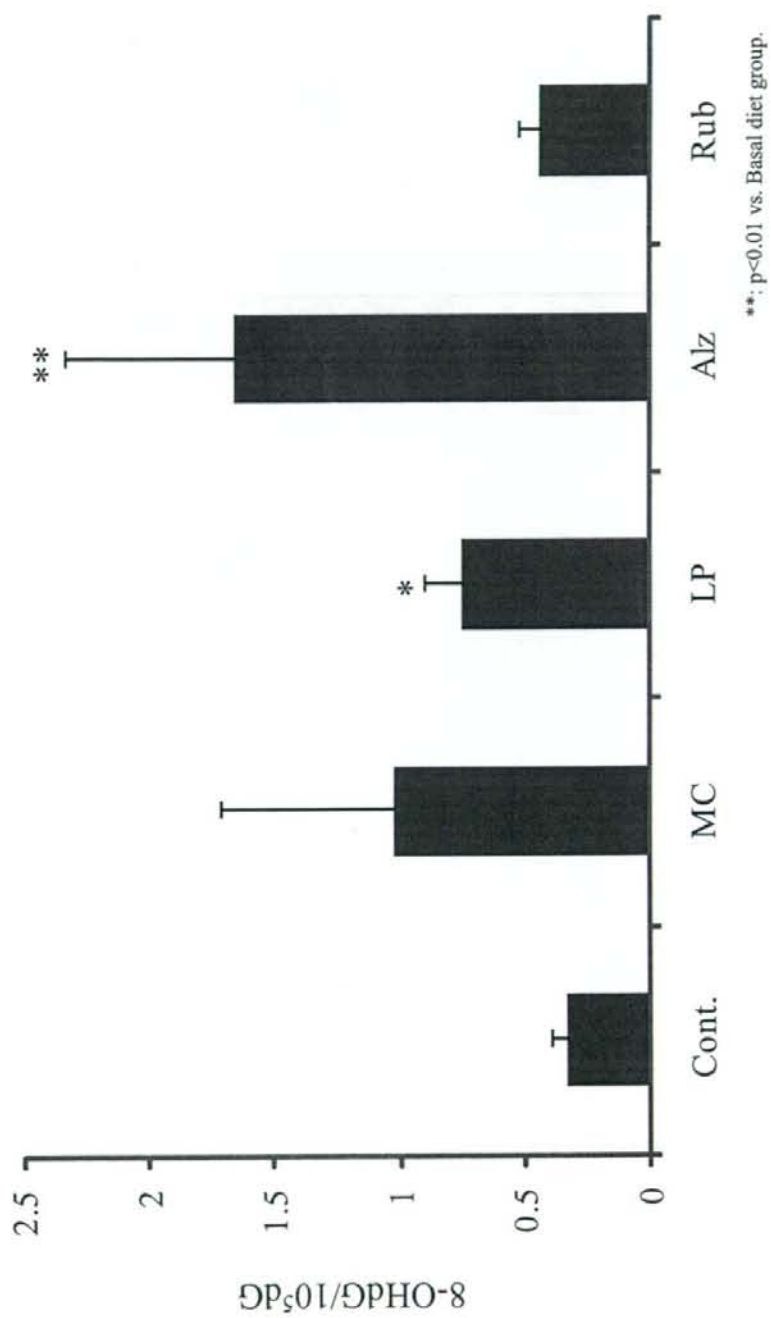
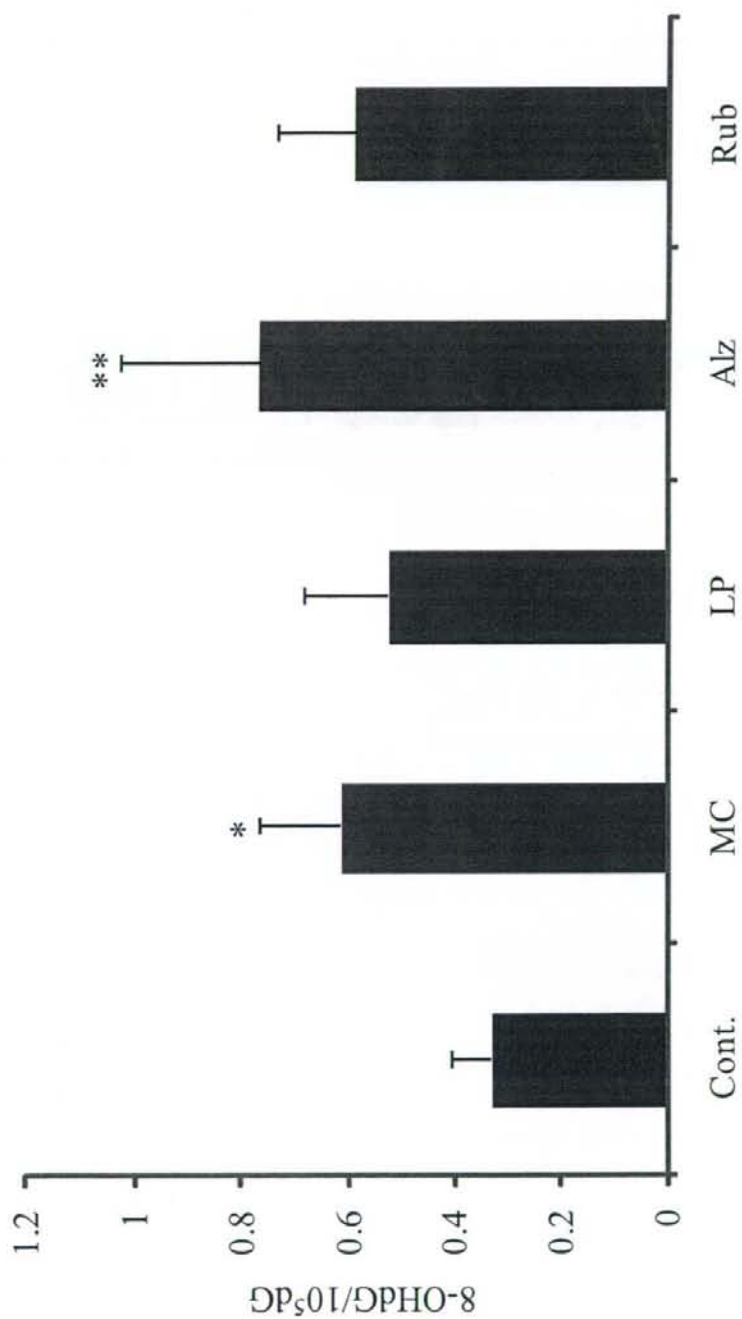


Fig. 3 8-OHdG levels in the kidneys of F344 *gpt* delta rats treated with MC, LP, Alz or Rub for 8 weeks



*, **; $p < 0.05$, 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.

Table 2 *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-TGR and Cm ^R colonies	Mutant frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean±SD	Cm ^R colonies (x 10 ⁵)	6-TGR 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.
 ***: p<0.05, 0.01 vs. Basal diet.