

Table 3 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 <sup>a</sup>	0	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		

<sup>a</sup>: The number of colonies with independent mutations is shown.

( ): specific mutant frequency

\*: p<0.05 vs. Basal diet.

分担課題：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、本色素成分の alizarin (Alz), lucidin-3-O-primeveroside (LP)と、LPの代謝産物である rubiadin (Rub)について、ラットを用いた短期間・26週間反復投与実験と中期多臓器発がん性試験を実施した。短期間反復投与実験では、6週齢の雄性F344ラットにAlzを0.0016, 0.008, 0.04%, LPを0.06, 0.3, 1.5%, Rubを0.06, 0.3, 1.5%の用量で1週間混餌投与した。26週間反復投与実験では、同ラットにAlz, Rubを各々0.04%の用量で混餌投与した。また、中期多臓器発がん性試験では、同ラットに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週間の休業後、AlzまたはRubを同じ0.008%, 0.04%の2つの用量で23週間混餌投与した。その結果、短期間反復投与実験では、アカネ色素による腫瘍好発部位であった腎髄質外帯・近位尿細管上皮において、Rub投与により核の大小不同とPCNA陽性細胞の有意な増加を認めた。同部位においては、LP投与によるPCNA陽性細胞数の増加も認めた。腎臓における酸化的DNA損傷マーカー8-OHdGレベルは、Alz, LP投与により有意に増加したが、Rub投与では変化が認められなかった。26週間反復投与実験では、腎髄質外帯・近位尿細管上皮においてRub投与により核の大小不同と異型尿細管の発生、PCNA陽性細胞数の増加を認め、Alz投与では同部位におけるPCNA陽性細胞数の増加のみ認めた。また、中期多臓器発がん性試験では、Alz, Rub共に0.04%投与により腎髄質外帯における異型尿細管、異型過形成の発生頻度あるいは個数が有意に増加した。また、腎細胞腺腫やがんが有意差はないものの0.04% Alz群とRub群の2投与群で発生した。肝臓においては、0.04% Rub群でGST-P陽性細胞巣の数が有意に増加し、肝細胞腺腫がRubの2投与群で発生した。大腸においては、0.04% Rub投与により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・がんの発生に対する影響は見られなかった。以上の結果より、色素成分LPの代謝産物Rubがアカネ色素の腎発がんに大きく関与し、肝臓、大腸に対しても発がん標的性を有する可能性が示された。Rubの発がん性は、Rubの直接的DNA損傷によるものであると考えられた。また、Alzも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可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

アカネ色素 (Madder color) は、アカネ科セイウアカネ (*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、その発がんは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。そこで最近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とアカネ色素投与の発がん過程早期に認められる変化と比較した。その結果、アカネ色素による腎発がん過程早期から酸化 DNA 損傷 (8-OHdG) の上昇と酸化ストレス関連遺伝子の発現変動が見出されたものの、lucidin 投与ではアカネ色素と同様の病理組織学的所見、細胞増殖活性の増加、8-OHdG レベルの増加などを認めず、アカネ色素による酸化ストレスの発生に lucidin の関与は低いものと推察された。

そこで本研究では、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。本報告書では、一連の研究結果について報告する。

## B. 研究方法

Alz は市販品 (Sigma-Aldrich, 純度 97%) を購入し使用した。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凍結乾燥品を用いた。即ちセイヨウアカネ (*Rubia tinctorum* L.) の根粉砕品 300 kg から 50% エタノールで色素成分を抽出し、合成吸着樹脂処理した吸着成分を 30% エタノールで脱着、回収、濃縮した。その後、濃縮液をメ

タノールに溶解させ、濾過して得た濾液のアルコールを除去後、シリカゲルに吸着させた。吸着物を酢酸エチル:メタノール:水=80:20:5 で溶出させ、溶出液を一晩静置後、結晶化して回収した。回収した結晶をさらにエタノールに再溶解後濾過し、濾液を濃縮させ、凍結乾燥したものを LP として用いた。HPLC のクロマトグラムから LP の純度は 90.5% (R.T. 31.4 min) と求められたが、不純物の存在を示唆するピークの一つは ruberythric acid (R.T. 29.3 min), もう一つは unknown (R.T. 60.9 min) であり、後者については LP の精製にメタノールを使用していたため、ruberythric acid の OH 基がメチル化したものを検出した可能性が示唆された。また、Rub は既報告 (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、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 (Fig. 1)。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  $\mu$ m 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髄質外帯・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℃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。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細管上皮細胞 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 (Coulchem 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 週の間各々投与した。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 (Fig. 2)。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  $\mu$ m のパラフィン切片を作製し、病理組織学的検索、免疫組織化学的検索に用いた。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

尿細管の増殖性病変の分類として、①異型尿細管: 1 本の異型を伴う腺管で核分裂像、壊死細胞を認めることがあるが稀で、管腔内は正常か、異型細胞または細胞破砕物で塞がれているもの; ②異型過形成: 増殖している異型細胞が単層または多層に配列し、中心が壊死している場合もある病変で、核分裂像は認められることもある。嚢胞状、充実性に増殖または管腔が拡張する場合もある。嚢胞型を除き、大きさは周囲の正常尿細管のサイズの 10 倍を超えないものとし、周囲への圧迫や浸潤、結合組織による被包化は認めない; ③腺腫: 異型尿細管/過形成より大きく充実性に増殖し、周囲への圧排性があるもの; ④腺癌: 腺腫より細胞異型が強い場合や、中心部に壊死があるもの。また、肝臓については前がん病変のマーカーとされる glutathione *S*-transferase placental form (GST-P) 陽性肝細胞巣を検索するため、ホルマリン固定パラフィン切片を用いて免疫染色を実施した。このとき、一次抗体はウサギ・ポリクローナル抗体 (Medical & Biological Laboratories, x1000) を用い、4°C 一晚反応させ、二次抗体以降のステップは VECTASTAIN<sup>®</sup> 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  $\mu$ 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、前がん病変あるいは腫瘍性病変における  $\beta$ -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。 $\beta$ -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  $\beta$ -catenin モノクローナル抗体 (1:500, BD Transduction Laboratories, clone 14, Lexington, KY, USA) を 4°C 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切片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

### (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(Table 1)。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。摂餌量と各検体  
の体重1kgあたりの一日内摂取量をTable 2に示す。  
Alz, LPはいずれの用量でも摂餌量に大きな変動  
を認めず、被験物質の一日内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をTable 3, 4に示す。  
Alz, LP投与では皮質・近位尿管上皮細胞(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管の好

塩基性変性(Fig. 3a)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  
発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  
いそれらのGradeが増加した(Fig. 3b, c)。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(Fig. 4)、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(Fig. 5)。

### (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、肝臓重量をTable 5に示す。  
最終体重、腎臓・肝臓重量(絶対・相対)いずれ  
も投与群と対照群との差は認められなかった。

腎臓で認められた増殖性病変の発生頻度・個数  
をTable 6に示す。腎皮質において、対照群を含  
む全群に近位尿管領域の異型尿管(Fig. 6a)、  
異形過形成(Fig. 6b)、腎細胞腺腫(Fig. 6c)/がん  
(Fig. 6d)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陽性細胞巢の定量結果をFig. 7に示す。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。肝臓で認められた病変の発生頻度をTable 7に示す。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 (Fig. 8) 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の定量的解析結果をTable 8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 9に示す。対照群を含む全群の粘膜上皮において、異形成 (Fig. 9a)、腺腫 (Fig. 9b)、腺がん (Fig. 9c) 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 $\beta$ -cateninの細胞内局在について検索した結果、 $\beta$ -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、または核内のみ認められた。 $\beta$ -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 (Fig. 10a) 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髓質外帯・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 (Fig. 10b) と異型尿細管 (Fig. 10c) が認められた。腎髓質外帯・近位尿細管上皮におけるPCNA陽性細胞数について、各投与群の対照群との相対比をFig. 11に示す。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

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髓質外帯に認められ、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髓質外帯・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の腎髓質外帯・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。

短期間投与と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变化であり, 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 週間反復投与と実験では, 腎髄質外帯・近位尿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 陽性細胞数の増加を認めた。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,  $\beta$ -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

本研究において, アカネ色素の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 がアカネ色素の腎臓がんに関与し、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、アカネ色素の腎臓がんには Alz が誘発した酸化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. 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臓がん過程における酸化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臓がん機序: 特に酸化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臓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臓がんに対する酸化 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臓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臓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. 6<sup>th</sup> European Congress of Toxicologic Pathology, Edinburgh, Scotland, 6<sup>th</sup> 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. Final body, absolute and relative kidneys weights of male F344 rats given Alz, LP and Rub for one week

Group	Final body weight (g)	Kidneys	
		Absolute (g)	Relative (g/100 g bw)
Control <sup>a)</sup> (for Alz and LP)	146.8 ± 6.4	1.24 ± 0.09	0.843 ± 0.023
Alz (% in diet)			
0.0016	146.5 ± 7.5	1.21 ± 0.07	0.826 ± 0.013
0.008	144.9 ± 8.1	1.21 ± 0.07	0.834 ± 0.011
0.04	142.2 ± 7.4	1.24 ± 0.08	0.871 ± 0.016*
LP (% in diet)			
0.06	143.3 ± 9.8	1.23 ± 0.08	0.857 ± 0.017
0.3	144.3 ± 11.8	1.21 ± 0.10	0.839 ± 0.009
1.5	141.5 ± 7.2	1.18 ± 0.06	0.834 ± 0.014
-----			
Control (for Rub)	143.3 ± 6.5	1.15 ± 0.07	0.802 ± 0.020
Rub (% in diet)			
0.06	134.7 ± 4.8*	1.14 ± 0.05	0.846 ± 0.024
0.3	105.1 ± 4.6**	0.90 ± 0.04**	0.855 ± 0.028
1.5	75.5 ± 3.4**	0.78 ± 0.04**	1.035 ± 0.075**

\*, \*\*: Significantly different from the control at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively (Dunnett's test or Dunnett type rank-sum test).

<sup>a)</sup> Number of animals examined was six in all groups.

Abbreviations: Alz, alizarin; LP, lucidin-3-*O*-primeveroside; Rub, rubiadin.

Table 2. Food consumption and chemical intake of male F344 rats given Alz, LP and Rub for one week

Group	Food consumption (g/kg bw/day)	Mean chemical intake (mg/kg bw/day)
Control (for Alz and LP)	92.6	0
Alz (% in diet)		
0.0016	100.4	1.61
0.008	94.7	7.57
0.04	99.6	39.82
LP (% in diet)		
0.06	95.2	57.14
0.3	90.0	270.11
1.5	90.8	1362.63
-----		
Control (for Rub)	89.0	0
Rub (% in diet)		
0.06	85.9	51.56
0.3	54.0	162.09
1.5	26.0	389.94

Abbreviations: Alz, alizarin; LP, lucidin-3-*O* -primeveroside; Rub, rubiadin.

Table 3. Histopathological findings of the kidneys of male F344 rats given Alz or LP for one week

Lesion	Grade	Control	Alz (% in diet)			LP (% in diet)		
			0.0016	0.008	0.04	0.06	0.3	1.5
Proximal tubules, cortex								
Microvesicular vacuolar degeneration	(±/+/++)	0	5 (5/0/0)***	6 (6/0/0)****	6 (1/3/2)****	0	1 (1/0/0)	6 (0/4/2)****
Hyaline droplet degeneration	(±/+/+/+/+)	6 (1/5/0/0)	6 (4/2/0/0)	6 (5/1/0/0)*	6 (2/1/3/0)	6 (0/4/2/0)	6 (0/2/3/1)*	6 (0/2/4/0)*
Basophilic degeneration	(±/+/++)	0	0	0	6 (2/2/2)****	0	0	2 (0/0/2)

Grade (distribution of each lesion): ±: <20%, +: 20–50%, ++: 50–70%, +++: >70% of proximal tubules in the cortex

\*: p<0.05, \*\*: p<0.01 (Fisher's exact probability test)

\*: p<0.05, \*\*: p<0.01 (Mann-Whitney's U-test)

Abbreviations: Alz, alizarin; LP, lucidin-3-O'-primeveroside; Rub, rubiadin.

Table 4. Histopathological findings of the kidneys of male F344 rats given Rub for one week

Lesion (Grade)	Control	Rub (% in diet)		
		0.06	0.3	1.5
Proximal tubules, outer medulla				
Basophilic degeneration (+++)	0	6**	6**	6**
Cytoplasmic swelling (+/+/+/+)	0	6 (6/0)****	6 (6/0)****	6 (0/6)****
Anisonucleosis (+/+/+/+/+)	0	6 (6/0/0)****	6 (0/6/0)****	6 (0/0/6)****
Microvesicular vacuolar degeneration (±/+)	3 (3/0)	6 (4/2)*	5 (0/5)*	6 (6/0)
Apoptosis (±)	0	0	0	6**
Proximal tubules, cortex				
Hyaline droplet degeneration (±/+)	6 (3/3)	6 (0/6)	0**	0**

Grade (distribution of each lesion): ±: <20%, +: 20–50%, ++: 50–70%, +++: >70% of the proximal tubules in each area

\*: p<0.05, \*\*: p<0.01 (Fisher's exact probability test)

\*: p<0.05, \*\*: p<0.01 (Mann-Whitney's U-test)

Abbreviations: Rub, rubiadin.

Table 5.

Final body, kidney and liver weights of F344 rats treated with Alz or Rub in a medium-term multi-organ carcinogenesis bioassay

Group	No. of animal examined	Final BW (g)	Kidney (absolute) (g)	Kidney (relative) (g/100g bw)	Liver (absolute) (g)	Liver (relative) (g/100 g bw)
Control	11	287.2 ± 21.4	1.91 ± 0.27	0.67 ± 0.09	7.54 ± 0.91	2.62 ± 0.22
0.008% Alz	18	287.1 ± 18.4	1.99 ± 0.30	0.69 ± 0.09	7.32 ± 0.92	2.54 ± 0.25
0.04% Alz	17	278.0 ± 16.7	3.75 ± 6.53	1.37 ± 2.42	7.01 ± 0.69	2.52 ± 0.14
0.008% Rub	21	279.0 ± 20.6	1.98 ± 0.30	0.71 ± 0.08	7.08 ± 0.69	2.54 ± 0.16
0.04% Rub	20	283.2 ± 17.8	2.04 ± 0.32	0.72 ± 0.11	7.97 ± 0.98	2.81 ± 0.23

Table 6.

Incidence and multiplicity of proliferative lesions in the kidney of rats treated with Alz or Rub in a medium-term multi-organ carcinogenesis bioassay

Lesion	Incidence (%)					Multiplicity (/animal)				
	Control	Alizarin (%)		Rubiadin (%)		Control	Alizarin (%)		Rubiadin (%)	
		0.008	0.04	0.008	0.04		0.008	0.04	0.008	0.04
<b>Cortex</b>										
Atypical tubule	100.0	100.0	94.1	100.0	95.0	4.5	5.4	2.9	3.4	4.7
Atypical hyperplasia	36.4	33.3	64.7	23.8	45.0	0.5	0.4	1.2	0.2	0.8
Renal cell adenoma	9.1	16.7	17.6	33.3	25.0	0.1	0.2	0.2	0.4	0.3
Renal cell carcinoma	0	5.6	0	4.8	0	0	0	0	0	0
<b>Outer medulla</b>										
Atypical tubule	36.4	72.2	29.4	71.4	85.0*	0.6	1.2	0.5	1.2	3.5**
Atypical hyperplasia	45.5	27.8	88.2*	47.6	95.0**	1.1	0	2.4	0.6	3.9**
Renal cell adenoma	0	0	5.9	23.8	15.0	0	0	0.1	0.2	0.2
Renal cell carcinoma	0	0	5.9	0	10.0	0	0	0.1	0	0.1
<b>Mesenchyme</b>										
Renal mesenchymal tumor	63.6	83.3	94.1	95.2*	90.0	1.6	1.8	2.4	2.0	2.1
<b>Pelvis</b>										
Transitional cell hyperplasia	18.2	0	5.9	9.5	15.0	0.2	0	0.1	0.1	0.2
Transitional cell carcinoma	0	5.6	11.8	0	0	0	0.1	0.1	0	0

\*, \*\*: Significantly different from the controls at p&lt;0.05 and p&lt;0.01, respectively.

Table 7.

Incidence of histopathological changes in the liver of rats treated with Alz or Rub in a medium-term multi-organ carcinogenesis bioassay

Lesions	Control (n=) 11	Incidence (%)			
		Alz 0.008%	Alz 0.04%	Rub	
				0.008%	0.04%
<b>Non-proliferative lesions</b>					
Hepatocellular hypertrophy, diffuse	100	100	100	100	100
Nuclear alteration (anisokaryosis, binucleated, vacuolated)	100	100	100	100	100
<b>Proliferative lesions</b>					
Altered hepatocellular foci	100	100	100	100	100
Hepatocellular adenoma	0	0	0	4.8	5
Hepatocellular hyperplasia	0	0	0	0	10
Hemangiosarcoma	0	0	0	4.8	0
Cholangiocellular hyperplasia	9.1	11.1	0	0	0

Table 8. 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 9. 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 10. Histopathological findings for the renal proximal tubules of F344 rats treated with alizarin or rubiadin for 26 weeks

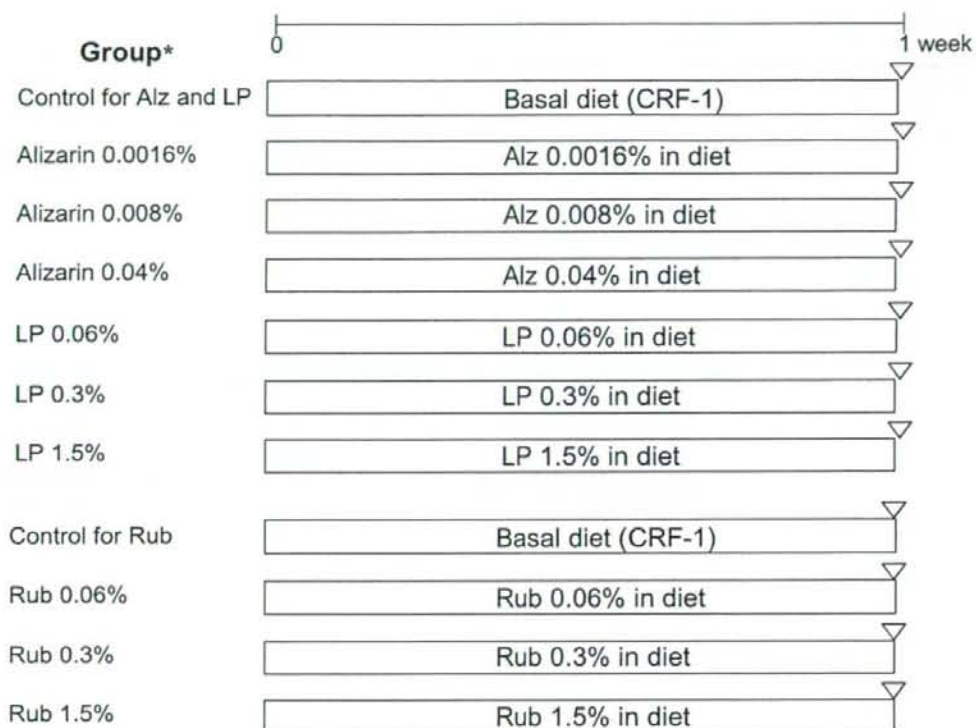
Lesion (Grade)	Control	0.04% Alz	0.04% Rub
	(n) <sup>a</sup> 15	15	15
<b>Cortex</b>			
Hyaline droplet deposition ( $\pm$ /+/++/+++) <sup>b</sup>	10 (10/0/0/0)	0*	10 (0/0/0/10)*
Vacuolar degeneration ( $\pm$ /+)	0	10 (9/1)*	0
<b>Outer medulla</b>			
Karyomegaly (+)	0	0	10*
Atypical tubule ( $\pm$ )	0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

<sup>a</sup> Number of animals examined

<sup>b</sup> Grade (distribution of each lesion);  $\pm$ : <20%, +: 20–50%, ++: 50–70%, +++: >70%.

\*:  $p < 0.01$  vs. controls

Abbreviations: Alz, alizarin; Rub, rubiadin.



\*No. of animals: 6 (in each group)

▽ sacrifice

**Fig. 1 Experimental design of a short-term study**



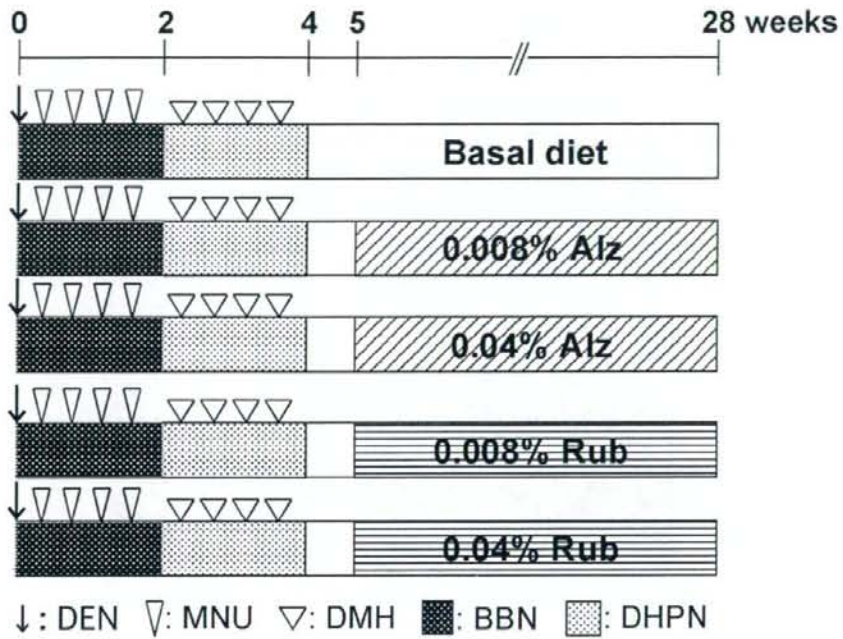
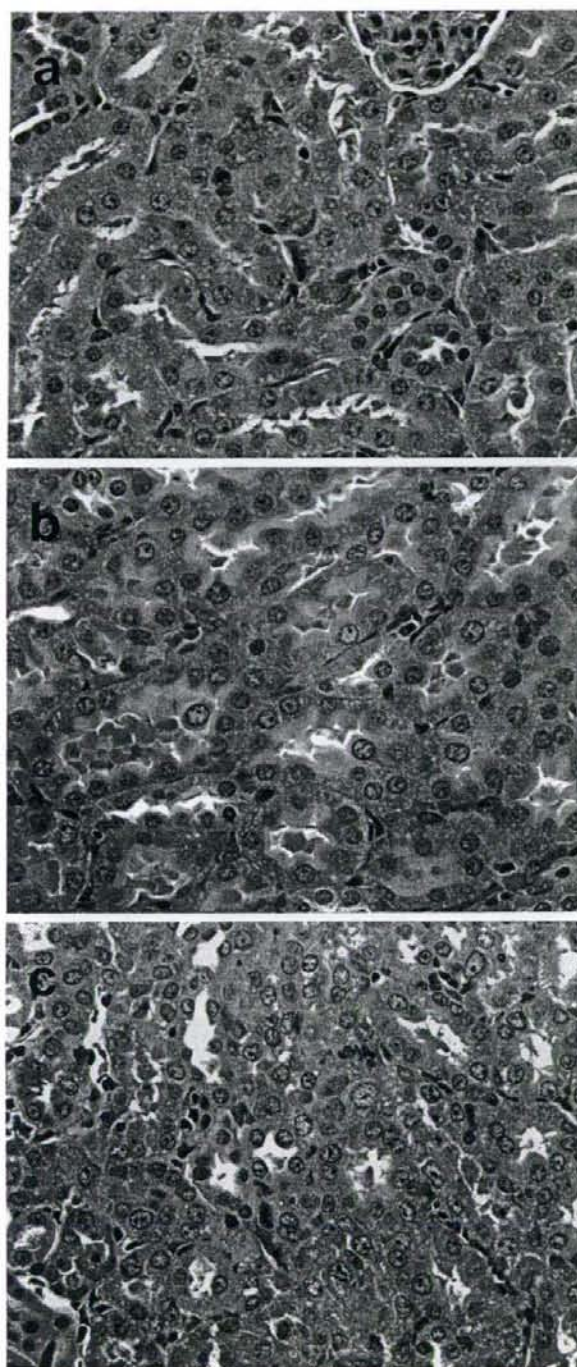


Fig. 2  
 Experimental design of a rat medium-term multi-organ carcinogenic assay



**Fig. 3** Representative histopathological lesions in the renal proximal tubules of male F344 rats treated with Alz, LP or Rub for one week. Basophilic degeneration observed in the renal cortex treated with 0.04% Alz (a). Microvesicular vacuolar degeneration is also noted. Anisonucleosis accompanied with cytoplasmic swelling and basophilic degeneration of tubular epithelial cells in the outer medulla treated with 0.06% (b) and 1.5% (c) Rub. Apoptosis of the tubular epithelial cells is often observed in 1.5% Rub group (c). Abbreviations: Alz, alizarin; LP, lucidin-3-*O*-primeveroside; Rub, rubiadin.

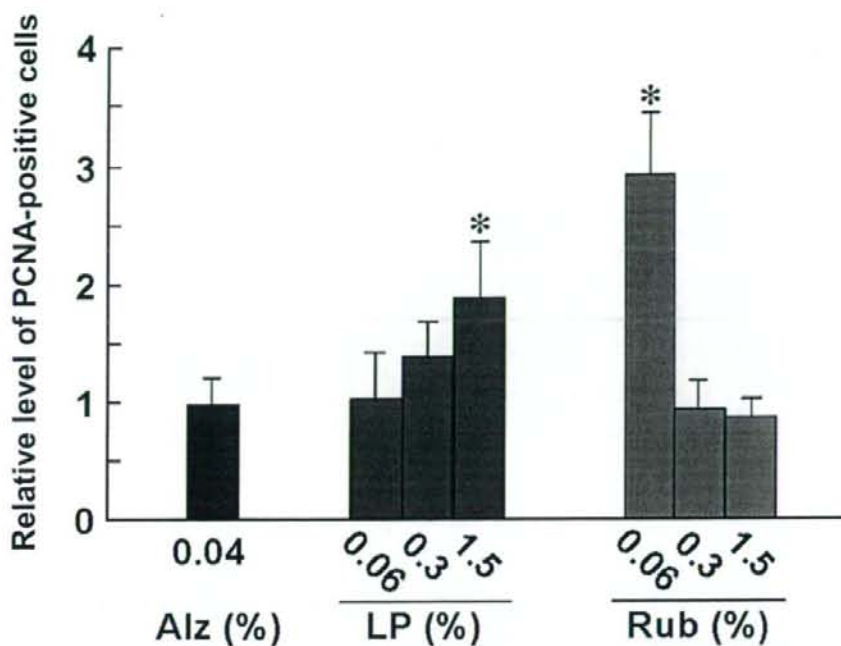


Fig. 4  
 Relative levels of PCNA-positive proximal tubular epithelial cells in the renal outer medulla of male F344 rats treated with Alz, LP or Rub for one week. \* $p < 0.01$  vs. control group. Abbreviations: Alz, alizarin; LP, lucidin-3-O-primeveroside; Rub, rubiadin.

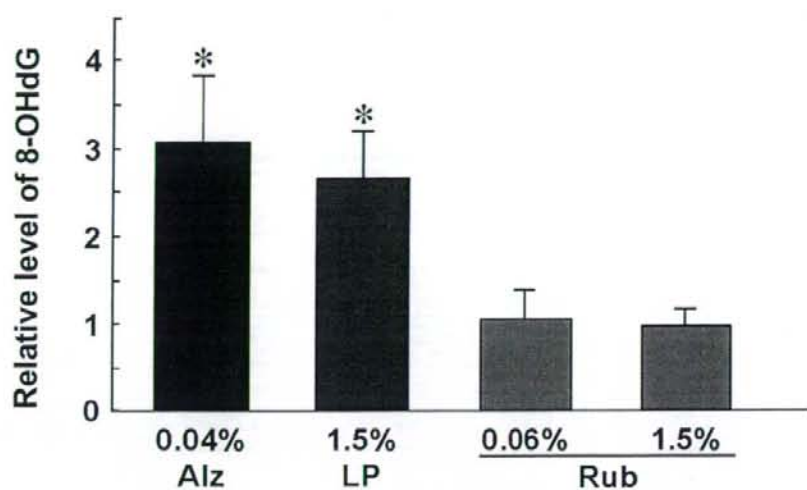


Fig. 5  
 Relative levels of 8-OHdG in the kidneys of male F344 rats treated with Alz, LP or Rub for one week. \* $p < 0.01$  vs. control group. Abbreviations: Alz, alizarin; LP, lucidin-3-O-primeveroside; Rub, rubiadin.