

201033024A

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

食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法
の開発に関する研究
(H21-食品-一般-010)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西川 秋佳

平成23(2011)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発に関する研究 --- 1

西川秋佳

II. 分担研究報告

1. 香料物質の反復投与毒性と網羅的遺伝子解析 ----- 9

西川秋佳

2. 香料物質の反復投与毒性と *in vivo* 変異原性解析 ----- 26

梅村隆志

3. 香料物質の反復投与毒性と病理組織学的解析 ----- 38

小川久美子

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 50

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 51

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) 総括研究報告書

食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発に関する研究

研究代表者 西川 秋佳 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター長
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 小川久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長

研究要旨

レポーター遺伝子導入動物 *gpt delta* は点突然変異に加えて、欠失変異を効率よく検出することが確認されている。香料としての用途がある 1-methylnaphthalene (1-MN) はマウス肺発がん性の報告があることから、*gpt delta* マウスを用いた 1-MN の 90 日間反復投与毒性試験を行った結果、1-MN は遺伝毒性を示さないことが明らかとなった。肝発がん性が知られている香料物質 estragole (ES) を F344 ラットに 4 週間投与し、網羅的遺伝子発現解析を実施した結果、ES 投与群で前がん病変である GST-P 陽性肝細胞巢が有意に増加し、cDNA マイクロアレイ解析により発現増加した 1635 個の遺伝子と発現低下した 6896 個の遺伝子が抽出され、ES の発がん機序には DNA 付加体が寄与する遺伝毒性のみならず細胞増殖やアポトーシスなどの関与が示された。ある種の香料物質の骨格をなす furan は *gpt delta* ラット肝において GST-P 陽性肝細胞巢を増加させたが、*in vivo* 遺伝毒性は陰性であった。しかし、投与群において、胆管線維症が肝尾状葉特異的に認められ、furan の遺伝毒性については肝臓の葉別の解析を含めた検討が必要であると考えられたため、*gpt delta* ラットに furan 0, 8 mg/kg を 4 ないし 8 週間強制経口投与し、尾状葉におけるレポーター遺伝子解析を実施した結果、*gpt* および *Sp1* 変異頻度に有意な変化は認められなかったことから furan 誘発肝発がん機序に遺伝毒性メカニズムは関与していないことが示唆された。香料物質 methyleugenol (MEUG) はげっ歯類における肝発がん性が報告されているが、その発がん機序についての詳細は明らかではないため、*gpt delta* ラットを用いた 90 日間反復投与毒性試験を行った結果、雌雄ともに 100 mg/kg の投与群で GST-P 陽性肝細胞巢が増加した。今後、肝臓における *gpt* ならびに *redlgam* 変異頻度の解析を行い、MEUG の *in vivo* 変異原性を明らかにする。

A. 研究目的

食品添加物として分類される香料物質は、その使用量がごく微量であるという特性から JECFA においては threshold of toxicological concern (TTC) の概念に基づい

て、当該物質の試験データがなくても構造クラス分類から類推されるヒト暴露値との安全マージン等による安全性評価が実施されている。我が国では少なくとも 90 日間反復投与試験と遺伝毒性試験が求められてい

るが、発がん性試験は対象外である。しかしながら、香料の中にはその化学構造中に発がん性が知られている置換基を有する物質もあり、その発がん性が危惧されているものもある。また、何種類もの香料を組み合わせる種々の香りを再現するという使用特性から、膨大な数の香料物質の安全性データが迅速かつ効率的に収集されることが望まれる。

本研究では、これらの問題解決に大きく寄与することが期待できる *gpt delta* ラットおよびマウスを用いた前がん病変の解析を含む反復投与毒性試験データ、遺伝毒性データを短期的に同時に得ることができる短期包括的試験法の開発を目指す。*gpt delta* ラットおよびマウスは、臓器・組織レベルで一般毒性と遺伝毒性（点突然変異および欠失変異）を同時に検索可能なレポーター遺伝子を導入した遺伝毒性検索モデル動物である。被験物質としては JECFA で発がん性等の懸念のために評価保留となっている香料の furan-substituted 物質、alkoxy-substituted allylbenzenes、1-methylnaphthalene などを対象とした。本試験系において、遺伝毒性または明らかな前がん病変が検出されれば、長期間の発がん性試験を実施するまでもなく使用禁止等の処置がとれるものと予想され、国民の多くが危惧している食の安全に対する厚生労働行政の責務遂行に大いに役立つものと期待できる。

B. 研究方法

実験 1： 6 週齢の B6C3F₁ 系 *gpt delta* マウス雌雄各 30 匹ずつを実験に供した。動物は約 1 週間の馴化飼育後、雌雄とも各群

10 匹ずつ 3 群に分けて、コーン油に溶解した 1-MN を 0.075% または 0.15% の濃度で 13 週間混餌投与した。対照群には媒体であるコーン油を餌に混ぜて 13 週間投与した。実験終了後、動物をエーテル麻酔下で腹部大動脈より採血し、血液学および血清生化学的検査を行った。解剖時、脳、心臓、肺、腎臓、副腎、胸腺、脳、脾臓、肝臓及び精巢の重量を測定し、全身臓器について病理組織学的検査を行った。発がん標的臓器である肺においては、細胞増殖活性の指標である PCNA 免疫染色を行い、一部を *gpt assay* 用に採取し、液体窒素により凍結し、測定まで -80°C で保存した。

実験 2： 4 週齢の雄 F344 ラット 10 匹を 2 群に分けて、投与群には 600 mg/kgbw ES を 4 週間強制経口投与した。また、対照群には媒体であるコーン油を 4 週間強制経口投与した。実験終了後には、全ての動物をエーテル麻酔下で放血致死させ、標的臓器である肝臓を採取し、それぞれの重量を測定後、病理組織学的検査、前がん指標である GST-P 免疫染色をした。マイクロアレイ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。

実験 3： 7 週齢、雄の F344 系 *gpt delta* ラットに発がん用量として報告されている 8 mg/kg をコーンオイルに溶解させ、週 5 日、4 あるいは 8 週間、強制経口投与した。対照群には媒体であるコーンオイルを同期間強制経口投与した。投与期間中は、一般状態観察を連日実施した。剖検時にイソフルラン麻酔下にて腹部大動脈より放血致死させ、肝臓を採取後、肝臓全体および各

葉毎（外側左葉、中間葉、右葉、尾状葉）の重量測定を行い、一部は病理組織検索用に10%中性ホルマリン溶液にて保存し、残りは *in vivo* 変異原性評価のために-80℃にて凍結保存した。病理組織学的検索は、ホルマリン固定後、常法によりパラフィン切片を作製し、病理組織学的検索を実施した。

実験4： 5週齢のF344 *gpt delta* ラット雌雄各40匹を約1週間の馴化飼育後、雌雄とも各群10匹ずつ4群に分け、検体投与群には10、30または100 mg/kgのMEUGを強制経口投与した。また、対照群には溶媒を同様に投与した。実験終了後、全生存動物を剖検し、脳、心臓、肺、腎臓、副腎、胸腺、脳、脾臓、肝臓及び精巣の重量を測定した。また、腹大動脈血より、血液学、血清生化学の検索を行った。さらに、全身臓器について病理組織学的検査を行った。発がん標的臓器である肝臓においては、ラット肝前がん病変マーカーであるGST-P陽性肝細胞巢の量的解析のための免疫染色を行った。また、肝臓の一部を *gpt assay* 用に採取し、液体窒素により凍結し、測定まで-80℃で保存した。

（倫理面への配慮）

実験動物は、立医薬品食品衛生研究の動物実験ガイドラインに準拠し、実験動物委員会の承認に基づき実施した。特に、動物愛護の精神に則って動物飼育を行い、動物処置には倫理基準に充分配慮し、実験終了時、安楽死においても深麻酔下、苦痛に配慮した。また、申請者ならびに研究協力者の健康保持のため、本研究で被験物質として使用する化合物、各実験

で使用する薬品は、安全キャビネット等で厳重に注意して取り扱った。

C. 研究結果

実験1： 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。対照群と比べて雄の1-MN群は第2週以降で体重増加抑制が認められた。実験期間中に雄の0.15%群と雌の全投与群で摂餌量の低値が認められた。臓器重量においては、雄の0.075%以上群で心臓と脾臓の絶対重量と脾臓の相対重量、また、0.15%投与群の心臓の相対重量が対照群に比べて有意に減少した。雌では、0.15%投与群の心臓と肝臓の絶対重量が対照群に比べて有意に減少した。血液学的検査においては投与群と対照群の間に有意な差は認められなかった。雄の0.15%または0.075%以上投与群でリン脂質、BUN (blood urea nitrogen)、CRN (creatinine)、Ca (calcium)が対照群に比べて有意に減少し、0.15%投与群のAST (aspartate aminotransferase)とALT (alanine aminotransferase)は対照群に比べて有意に増加した。雌では、0.15%投与群においてリン脂質と総コレステロールは対照群に比べ有意に減少し、Cl (chlorine)は有意な増加した。病理組織学的検査では、投与に起因した顕著な変化は認められなかった。また、肺におけるPCNA免疫染色の結果、単位面積あたりのPCNA陽性細胞数に対照群と投与群の間に有意な差はなかった。肺における *gpt* と Spi-Aッセイにおいては、雌雄ともに群間に有意な変化はなかった。

実験2： 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つ

た。体重は、ES 投与群で対照群に比べ有意な減少が認められた。さらに、ES 投与群の肝臓の相対または絶対重量は対照群に比べ有意に増加した。病理組織学的検査において ES 投与群に肝細胞変異増殖巣が認められた。前癌病変マーカーである GST-P 陽性肝細胞巣の量的解析では、ES 投与群で GST-P 陽性肝細胞巣の数、面積ともに対照群に比べ有意な増加が見られた。cDNA マイクロアレイ解析では、ES で発現増加した 1635 個遺伝子と発現低下した 6896 個遺伝子が抽出された。その中には、代謝に関連する *Cyp1a1*, *Cyp2b1*, *Aldh1a1*, *Gpx2*, *Nqo1*, *Sult2a2*, DNA 修復に関連する *Polh*, *Polk*, *Mgmt*, p53 の発現を抑制する *Mdm2*, 細胞増殖に関連する *Ccna2*, *Ccne1*, *Ccnd1*, *Ccng1*, *Mmp12*, *Abcc3* などが含まれていた。

実験 3： 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ず、死亡例も認められなかった。4 および 8 週目において、最終体重に有意な差は認められなかった。肝臓重量においては、中間葉の絶対および相対重量、右葉および肝全体の相対重量の有意な高値が投与 4 週目から認められ、8 週目においては、尾状葉の絶対および相対重量の有意な低値、肝臓全体、外側左葉、中間葉および右葉の絶対および相対重量の有意な高値が認められた。4 週目において、小葉辺縁性好塩基性変化（外側左葉：5/5 例、中間葉：5/5 例、右葉：5/5 例、尾状葉：5/5 例）、被膜下炎症細胞浸潤（外側左葉：5/5 例、中間葉：0/5 例、右葉：1/5 例、尾状葉：5/5 例）、肝細胞のアポトーシス（外側左葉：5/5 例、中間葉：5/5 例、

右葉：4/5 例、尾状葉：5/5 例）および oval cell の増殖（外側左葉：2/5 例、中間葉：2/5 例、右葉：2/5 例、尾状葉：1/5 例）が認められた。8 週目においても小葉辺縁性好塩基性変化（外側左葉：5/5 例、中間葉：2/5 例、右葉：3/5 例、尾状葉：5/5 例）、被膜下炎症細胞浸潤（外側左葉：3/5 例、中間葉：0/5 例、右葉：0/5 例、尾状葉：4/5 例）、肝細胞のアポトーシス（外側左葉：2/5 例、中間葉：0/5 例、右葉：3/5 例、尾状葉：0/5 例）および oval cell の増殖（外側左葉：5/5 例、中間葉：1/5 例、右葉：4/5 例、尾状葉：4/5 例）が認められ、尾状葉においては胆管線維症が 1/5 例に観察された。投与 4 週目の尾状葉における *gpt* および Spi mutant frequency (MF) において、対照群と比較し、有意な差は認められなかった。投与 8 週目の尾状葉あるいは外側左葉における *in vivo* 変異原性評価の結果においても、尾状葉および外側左葉共に *gpt* および Spi MF に有意な差は認められなかった。

実験 4： 試験期間中に雌の投与群で 3 匹が誤投与により死亡した。その他、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。実験期間中の体重推移では、雌雄ともに投与群と対照群の間に有意な差はなかった。実験期間中の摂餌量は雌雄ともに有意な変化はなかった。臓器重量においては、雄の 100 mg/kg 投与群で肝臓の絶対および相対重量と雌の 100 mg/kg 投与群の相対肝重量が対照群に比べ有意に増加した。雄の 100 mg/kg 投与群の絶対腎重量、30 mg/kg 以上の投与群の相対腎重量および 100 mg/kg 投与群の相対精巣重量が対照群に比べて有意に増加した。雌では、30

mg/kg 以上の投与群の絶対心重量と 100 mg/kg 投与群の腎臓と脳の相対重量が対照群に比べ有意に増加した。血液学的検査においては、雌の 30 mg/kg 投与群の白血球数と 100 mg/kg 投与群の血小板数が対照群に比べ有意に増加した。血清生化学的検査では、雄の 30 mg/kg 以上の投与群で Cl と AST が対照群に比べ有意に減少した。さらに、30 mg/kg 投与群の phospholipid と 100 mg/kg 投与群の A/G 比は有意に増加し、100 mg/kg 投与群の CRN と ALT は有意に減少した。雌では、100 mg/kg 投与群のアルブミンと CRN が対照群に比べて有意に減少し、Cl と IP (無機リン) は有意に増加した。さらに、30 mg/kg 以上の投与群では総ビリルビンが有意に減少した。また、肝臓における GST-P 免疫染色においては、100 mg/kg 投与群で雌雄ともに GST-P 陽性肝細胞巢の数、面積ともに対照群に比べ有意に増加した。

D. 考察

実験 1 では、1-MN の短期包括的試験法による解析と肺発がん機序を明らかにすることを目的に、*gpt delta* マウスによる 90 日間の反復投与毒性試験を実施した。マウスの最終体重は 1-MN の投与により低値傾向が見られ、実験期間中に投与群の摂餌量も低値を示していた。1-MN 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や摂餌量の低値が認められていることから、これらの変化は今までの報告と一致しており、1-MN の投与の影響によるものと考えられた。雄の心臓と脾臓重量では、絶対および相対ともに 0.15% 投与群で対照群に比べ有意な減少が認められた。また、

雌の 0.15% 投与群の心臓と肝臓の絶対重量が対照群に比べて有意に減少した。これらの変化は長期発がん性試験での報告と一致しており、何れも 1-MN が何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。しかし、血液学的または血清生化学的検査に関連する変化が認められておらず、病理組織学的検査においても有意な変化が見られないことから、これらの変化の毒性学的意義は低いものと考えられた。血清生化学的検査において、雄の 0.15% 投与群でリン脂質、BUN、CRN、Ca、AST、ALT が、雌の 0.15% 投与群においてリン脂質、総コレステロール、Cl が対照群に比べて有意に増加または減少した。しかし、臓器重量においてこれらに関連する顕著な変化が認められておらず、病理組織学的にもこれらに関連する顕著な変化が認められないことから、これらの変動に明らかな毒性学的意義はないものと考えられた。肺の PCNA 陽性細胞数において、雌雄ともに対照群と投与群の間に有意な変化は見られなかった。さらに、臓器重量および病理組織学的検査においても対照群と投与群の間に顕著な変化が見られなかった。さらに、肺組織を用いた *gpt* ならびに *red/gam* 変異頻度の解析においても投与群と対照群の間に有意な変化が見られなかった。長期発がん性試験において、肺は標的臓器であり、気管支/肺胞上皮腺腫の増加がみられるているが、これらの結果は 1-MN が *gpt delta* マウスにおいて遺伝毒性を有しないことを強く示唆しており、1-MN の肺発がん機序には遺伝毒性メカニズムが関与しない可能性が考えられた。

実験 2 では、ES 投与群で体重の有意な減少、肝重量の有意な増加が認められた。さ

らに、ES 投与群の肝臓において肝変異増殖巣、GST-P 陽性肝細胞巣の数、面積ともに有意に増加した。肝臓におけるマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析において、代謝に関連する *Cyp1a1*、*Cyp2b1*、*Aldh1a1*、*Gpx2*、*Nqo1*、*Sult2a2*、DNA 修復に関連する *Polh*、*Polk*、*Mgmt*、*p53* の発現を抑制する *Mdm2*、細胞増殖に関連する *Ccna2*、*Ccne1*、*Ccnd1*、*Ccng1*、*Mmp12*、*Abcc3* などが含まれていた。一方、ES はラットの肝臓において特異的 DNA 付加体を形成することが報告されていることから、ES の肝発がん早期過程には DNA 修復、アポトーシスや細胞増殖に関連する遺伝子が関与していることが考えられた。

実験 3 では、furan 誘発肝内胆管癌の発生が葉特異的であることを考慮し、雄の F344 系 *gpt delta* ラットに 0, 8 mg/kg の furan を 4 あるいは 8 週間強制経口投与し、肝臓葉毎の病理組織学的検索、腫瘍標的葉である尾状葉および非標的葉である外側左葉における *in vivo* 変異原性評価を実施した。試験期間中、一般状態に変化は認められず、死亡例も認められなかった。4 あるいは 8 週目における最終体重に変化は認められなかった。肝臓重量においては、中間葉、右葉および肝全体の重量の有意な高値が投与 4 週目から認められ、8 週目においては、尾状葉の重量の有意な低値、肝臓全体、外側左葉、中間葉および右葉の重量の有意な高値が認められた。病理組織学的検索の結果、投与 4 週目より小葉中心性肝細胞肥大、被膜下炎症細胞浸潤、肝細胞のアポトーシスおよび oval cell の増殖が各葉で認められた。8 週目の尾状葉においては、これらの変化に加え、胆管線維症が 1/5 例に認められた。

Furan 誘発肝内胆管癌の葉特異性については、尾状葉における炎症に対し増殖した oval cell の肝細胞再生・分化機構が、持続的な furan 投与による微小環境の変化により破綻し、肝内胆管癌へと進展すると考えられている。しかしながら、本実験での病理組織学的検索から、肝臓各葉における病理組織的变化に差は認められなかった。従って、furan 誘発肝内胆管癌の誘発機序は微小環境の変化が主な原因ではないと考えられた。*In vivo* 変異原性評価の結果、腫瘍標的葉である尾状葉において、4 および 8 週目における *gpt* ならびに Spi MF に有意な差は認められなかった。また、腫瘍非標的葉である 8 週目の外側左葉においても *gpt* および Spi MF に有意な差は認められなかった。尾状葉に肝内胆管癌の前がん病変である胆管線維症が認められた投与 8 週目における *in vivo* 変異原性評価の結果、陰性であったことから、furan による肝内胆管癌誘発機序に遺伝毒性メカニズムは関与していない可能性が示唆された。

実験 4 では、MEUG の *gpt delta* ラットを用いた短期包括試験を実施し、一般毒性、*in vivo* 変異原性ならびに発がん性を評価した。雄の 100 mg/kg 投与群で肝臓の絶対および相対重量と雌の 100 mg/kg 投与群の相対肝重量が対照群に比べ有意に増加した。長期発がん性試験において、肝臓が MEUG の標的臓器であることから、これらの変化は MEUG の投与に起因した変化であると考えられた。さらに、雄の 100 mg/kg または 30 mg/kg 以上の投与群において腎臓の絶対及び相対重量、100 mg/kg 投与群の相対精巣重量が対照群に比べて有意に増加した。雌では、30 mg/kg 以上の投与群の絶対心重量

と 100 mg/kg 投与群の腎臓と脳の相対重量が対照群に比べ有意に増加した。しかし、血液学的または血清生化学的検査において、これらと関連する変化が認められていない。現在、病理組織学的検査が終了してないことから、これらの結果を踏まえてその毒性学的意義については評価をする必要があると考えられる。血清生化学的検査では、雄の 30 mg/kg 以上の投与群で Cl と AST が有意に減少した。さらに、30 mg/kg または 100 mg/kg 投与群で phospholipid, A/G 比、CRN および ALT が有意に減少した。雌では、100 mg/kg 投与群において Alb、CRN、Cl、IP が対照群に比べて有意に減少した。これらの変化についても、病理組織学的検査の結果と合わせて、その毒性学的意義について考察する予定である。肝臓における GST-P 免疫染色では、雌雄ともに 100 mg/kg 投与群で GST-P 陽性肝細胞巢の数、面積ともに対照群に比べ有意に増加した。MEUG は長期発がん性試験において 37 mg/kg 以上の投与群で肝腫瘍の発生率が有意に増加したことが報告されており、今回の結果はそれを裏付けるものであると考えられた。今後、MEUG の遺伝毒性を検索するために肝組織を用いて *gpt* ならびに *red/gam* 変異頻度の解析を行い、MEUG の *in vivo* 変異原性を明らかにし、一般毒性試験ならびに発がん性試験結果と合わせて、MEUG の包括的な評価を行う予定である。

E. 結論

gpt delta マウスを用いた短期包括的試験法において、1-MN 投与による顕著な反復投与毒性は見られず、1-MN は *gpt delta* マウス肺に *in vivo* 遺伝毒性を示さないことが明

らかとなった。ES のラット肝発がん過程には遺伝毒性のみならず細胞増殖やアポトーシスの関与の可能性が示された。ラット肝葉毎の *in vivo* 遺伝毒性評価の結果から、*uran* 誘発肝発がん機序に遺伝毒性メカニズムは関与していないと考えられた。*gpt delta* ラットに 90 日間反復投与毒性試験を実施した結果、MEUG の肝毒性ならびに肝前がん病変が有意に増加したことから、肝発がん性が示唆された。今後、*gpt* ならびに *red/gam* 変異頻度の解析を行い、MEUG の *in vivo* 遺伝毒性を検索し、包括的に毒性評価と共に、その発がんメカニズムを明らかにする。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果

1. 論文発表

Ishii Y, Suzuki Y, Hibi D, Jin M, Fukuhara K, Umemura T, Nishikawa A, Detection and quantification of specific DNA adducts by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the livers of rats given estragole at the carcinogenic dose, Chem. Res. Toxicol., 24: 532-541 (2011).

2. 学会発表

鈴木裕太, 木島綾希, 日比大介, 金 美蘭, 石井雄二, 児玉幸夫, 能美健彦, 梅村隆志, 西川秋佳: *gpt delta* マウスを用いた食品添加物 estragole の *in vivo* 変異原性の解析 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2010.6)

梅村隆志, 金 美蘭, 鈴木裕太, 日比大介,

井上知紀, 石井雄二, 児玉幸夫, 能美健彦,
西川秋佳: *gpt delta* マウスを用いた包括的
毒性試験法による 1-メチルナフタレインの
in vivo 遺伝毒性の検索
第 69 回日本癌学会学術総会 (2010.9)

金 美蘭, 鈴木裕太, 日比大介, 井上知紀,
石井雄二, 能美健彦, 梅村隆志, 西川秋佳:
サフロール投与 F344 *gpt delta* ラット肝に
おける遺伝毒性と酸化的 DNA 損傷の検索
第 69 回日本癌学会学術総会 (2010.9)

金 美蘭, 鈴木裕太, 日比大介, 井上知紀,
石井雄二, 能美健彦, 梅村隆志, 西川秋佳:
F344 *gpt delta* ラットを用いた包括的試験
法によるサフロールの *in vivo* 遺伝毒性と酸
化的 DNA 損傷の検索
第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集
会 (2011.1)

鈴木裕太, 石井雄二, 木島綾希, 日比大介,
金 美蘭, 児玉幸夫, 能美健彦, 梅村隆志,

西川秋佳: Estragole マウス肝発がん機序
への遺伝子障害性メカニズムの関与
第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集
会 (2011.1)

北澤隆宏, 鈴木裕太, 木島綾希, 日比大介,
金 美蘭, 石井雄二, 能美健彦, 梅村隆志,
西川秋佳: 食品中の CYP1A2 誘導剤の複
合投与による estragole の *in vivo* 変異原性
への影響
第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集
会 (2011.1)

日比大介, 鈴木裕太, 金 美蘭, 石井雄二,
能美健彦, 梅村隆志, 西川秋佳: Furan 肝
発がん誘発機序における遺伝毒性メカニズ
ムの関与
第 69 回日本癌学会学術総会 (2010.9)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安心・安全確保推進研究事業) 分担研究報告書

食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発に関する研究

分担課題：香料物質の反復投与毒性と網羅的遺伝子解析

1-methylnaphthalene 及び estragole に関する遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験

研究分担者 西川秋佳 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター長
研究協力者 石井雄二 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター病理部

研究要旨

有機材料の不完全燃焼で発生する多環芳香族炭水化物の一つの成分である 1-methylnaphthalene (1-MN) はマウス肺発がん性が報告されており、さらに体内に蓄積されアデノシンと結合することが知られている。しかし、その遺伝毒性については明らかではない。一方、近年開発されたレポーター遺伝子導入動物 *gpt delta* マウスは点突然変異に加えて、欠失変異を効率よく検出することが確認されている。このような背景から、本研究では、実験 1 として、1-MN の一般毒性、*in vivo* 変異原性ならびに発がん性を包括的に評価し、さらにその発がん機序解明を目的として、*gpt delta* マウスを用いた 90 日間反復投与毒性試験を行った。さらに実験 2 として、香料として使用され、ラットでの肝発がん性が知られている estragole (ES) を F344 系ラットに 4 週間投与して、網羅的遺伝子発現解析を実施し、その発がん過程早期に関わる遺伝子群を把握した。実験 1 では、臓器重量、血液学や血清生化学的検査、病理組織学的検査において、投与による顕著な変化は見られなかった。肺における *gpt* と Spi アッセイにおいては、雌雄ともに投与群で有意な変化はなかった。さらに、肺における PCNA 陽性細胞率でも雌雄ともに投与群と対照群の間に有意な変化はなかった。これらの結果から、1-MN を *gpt delta* マウスに報告されている発がん用量を投与しても、明らかな毒性ならびに遺伝毒性を示さないことが明らかとなった。実験 2 では、対照群に比べ体重の有意な減少と肝臓の絶対及び相対重量の有意な増加が認められた。肝臓の病理組織学的検査では、ES 投与群で変異増殖巣が認められた。GST-P 免疫染色では、ES 投与群で GST-P 陽性肝細胞巣の数、面積ともに有意に増加した。cDNA マイクロアレイ解析においては、ES 投与により発現増加した 1635 個の遺伝子と発現低下した 6896 個の遺伝子が抽出された。その中には DNA 修復に関連する *Polh*, *Polk*, *Mgmt*, *p53* の発現を抑制する *Mdm2*、細胞増殖に関連する *Ccna2*, *Ccne1*, *Ccnd1*, *Ccng1*, *Mmp12*, *Abcc3* などが含まれていた。このような結果から、ES の発がん機序には DNA 付加体が寄与する遺伝毒性のみならず細胞増殖やアポトーシスなどの関与が示された。

A. 研究目的

香料の 1-Methylnaphthalene (1-MN) は B6C3F1 系マウスにおける肺発がん性が報告されている。さらに、有機材料の不完全燃焼で発生する多環芳香族炭水化物の一つの成分であることから 1-MN は体内に蓄積し、アデノシンと結合することが報告されている。しかし、その遺伝毒性については明らかではない。一方、近年開発されたレポーター遺伝子を導入した *gpt delta* マウスを用いた *in vivo* 変異原性試験は、点突然変異に加えて、欠失変異を効率よく検出でき、環境変異原性物質の検出に有力な試験法として期待されている。このような背景から、本研究では、実験 1 として、1-MN の一般毒性、*in vivo* 変異原性ならびに発がん性を包括的に評価し、また、その発がん機序解明を目的として、*gpt delta* マウスを用いた 90 日間反復投与毒性試験を行った。さらに実験 2 として、同じく香料として使用され、第 69 回国連食糧農業機関・世界保健機関合同食品添加物専門家委員会 Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) において、その発がん機序が不明である理由により引き続き評価保留となった estragole (ES) のラット肝発がん機序を明らかにするために F344 ラットを用いて、肝前がん病変の量的解析、網羅的遺伝子発現解析を実施した。

B. 研究方法

実験 1 : 6 週齢の B6C3F1 系 *gpt delta* マウス雌雄各 30 匹ずつを実験に供した。動物は約 1 週間の馴化飼育後、雌雄とも各群 10 匹ずつ 3 群に分けて、コーン油に溶解した 1-MN を 0.075% または 0.15% の濃度で 13

週間混餌投与した。対照群には媒体であるコーン油を餌に混ぜて 13 週間投与した。実験終了後、動物をエーテル麻酔下で腹部大動脈より採血し、血液学および血清生化学的検査を行った。解剖時、脳、心臓、肺、腎臓、副腎、胸腺、脳、脾臓、肝臓及び精巢の重量を測定し、全身臓器について病理組織学的検査を行った。発がん標的臓器である肺においては、細胞増殖活性の指標である PCNA 免疫染色を行い、一部を *gpt assay* 用に採取し、液体窒素により凍結し、測定まで -80°C で保存した。

実験 2 : 4 週齢の雄 F344 ラット 10 匹を 2 群に分けて、投与群には 600mg/kgbw ES を 4 週間強制経口投与した。また、対照群には媒体であるコーン油を 4 週間強制経口投与した。実験終了後には、全ての動物をエーテル麻酔下で放血致死させ、標的臓器である肝臓を採取し、それぞれの重量を測定後、病理組織学的検査、前がん指標である GST-P 免疫染色をした。マイクロアレイ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。

(倫理面への配慮)

実験動物は、立医薬品食品衛生研究の動物実験ガイドラインに準拠し、実験動物委員会の承認に基づき実施した。特に、動物愛護の精神に則って動物飼育を行い、動物処置には倫理基準に充分配慮し、実験終了時、安楽死においても深麻酔下、苦痛に配慮した。また、申請者ならびに研究協力者の健康保持のため、本研究で被験物質として使用する化合物、各実験で使用する薬品は、安全キャビネット等で厳重に注意して取り扱った。

C. 研究結果

実験 1：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。対照群と比べて雄の 1-MN 群は第 2 週以降で体重増加抑制が認められた (Fig. 1)。雌雄の摂餌量を Fig. 2 と Fig. 3 に示す。実験期間中に雄の 0.15% 群と雌の全投与群で摂餌量の低値が認められた。臓器重量においては、雄の 0.075% 以上群で心臓と脾臓の絶対重量と脾臓の相対重量、また、0.15% 投与群の心臓の相対重量が対照群に比べて有意に減少した (Table 1)。雌では、0.15% 投与群の心臓と肝臓の絶対重量が対照群に比べて有意に減少した (Table 2)。血液学的検査においては投与群と対照群の間に有意な差は認められなかった (Table 3)。雄の 0.15% または 0.075% 以上投与群でリン脂質、BUN (blood urea nitrogen)、CRN (creatinine)、Ca (calcium) が対照群に比べて有意に減少し、0.15% 投与群の AST (aspartate aminotransferase) と ALT (alanine aminotransferase) は対照群に比べて有意に増加した。雌では、0.15% 投与群においてリン脂質と総コレステロールは対照群に比べ有意に減少し、Cl (chloride) は有意な増加した (Table 4)。病理組織学的検査では、投与に起因した顕著な変化は認められなかった (Table 5)。また、肺における PCNA 免疫染色の結果、単位面積あたりの PCNA 陽性細胞数に対照群と投与群の間に有意な差はなかった (Fig. 4)。肺における *gpt* と Spi⁻アッセイにおいては、雌雄ともに群間に有意な変化はなかった (Table 6)。

実験 2：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つ

た。体重は、ES 投与群で対照群に比べ有意な減少が認められた (Table 7)。さらに、ES 投与群の肝臓の相対または絶対重量は対照群に比べ有意に増加した (Table 7)。病理組織学的検査において ES 投与群に肝細胞変異増殖巣が認められた。前癌病変マーカーである GST-P 陽性肝細胞巣の量的解析では、ES 投与群で GST-P 陽性肝細胞巣の数、面積ともに対照群に比べ有意な増加が見られた (Table 7)。cDNA マイクロアレイ解析では、ES で発現増加した 1635 個遺伝子と発現低下した 6896 個遺伝子が抽出された。その中には、代謝に関連する *Cyp1a1*、*Cyp2b1*、*Aldh1a1*、*Gpx2*、*Nqo1*、*Sult2a2*、DNA 修復に関連する *Polh*、*Polk*、*Mgmt*、p53 の発現を抑制する *Mdm2*、細胞増殖に関連する *Ccna2*、*Ccne1*、*Ccnd1*、*Ceng1*、*Mmp12*、*Abcc3* などが含まれていた (Table 8)。

D. 考察

実験 1 では、1-MN の短期包括的試験法による解析と肺発がん機序を明らかにすることを目的に、*gpt* delta マウスによる 90 日間の反復投与毒性試験を実施した。マウスの最終体重は 1-MN の投与により低値傾向が見られ、実験期間中に投与群の摂餌量も低値を示していた。1-MN 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や摂餌量の低値が認められていることから、これらの変化は今までの報告と一致しており、1-MN の投与の影響によるものであると考えられた。

雄の心臓と脾臓重量では、絶対および相対ともに 0.15% 投与群で対照群に比べ有意な減少が認められた。また、雌の 0.15% 投与群の心臓と肝臓の絶対重量が対照群に比

べて有意に減少した。これらの変化は長期発がん性試験での報告と一致しており、何れも 1-MN が何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。しかし、血液学的または血清生化学的検査に関連する変化が認められておらず、病理組織学的検査においても有意な変化が見られないことから、これらの変化の毒性学的意義は低いものと考えられた。

血清生化学的検査において、雄の 0.15% 投与群でリン脂質、BUN、CRN、Ca、AST、ALT が、雌の 0.15% 投与群においてリン脂質、総コレステロール、Cl が対照群に比べて有意に増加または減少した。しかし、臓器重量においてこれらに関連する顕著な変化が認められておらず、病理組織学的にもこれらに関連する顕著な変化が認められないことから、これらの変動に明らかな毒性学的意義はないものと考えられた。肺の PCNA 陽性細胞数において、雌雄ともに対照群と投与群の間に有意な変化は見られなかった。さらに、臓器重量および病理組織学的検査においても対照群と投与群の間に顕著な変化が見られなかった。さらに、肺組織を用いた *gpt* ならびに *red/gam* 変異頻度の解析においても投与群と対照群の間に有意な変化が見られなかった。長期発がん性試験において、肺は標的臓器であり、気管支/肺胞上皮腺腫の増加が見られるているが、これらの結果は 1-MN が *gpt delta* マウスにおいて遺伝毒性を有しないことを強く示唆しており、1-MN の肺発がん機序には遺伝毒性メカニズムが関与しない可能性が考えられた。実験 2 では、ES 投与群で体重の有意な減少、肝重量の有意な増加が認められた。さらに、ES 投与群の肝臓において肝

変異増殖巣、GST-P 陽性肝細胞巣の数、面積ともに有意に増加した。肝臓におけるマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析において、代謝に関連する *Cypl1*、*Cyp2b1*、*Aldh1a1*、*Gpx2*、*Nqo1*、*Sult2a2*、DNA 修復に関連する *Polh*、*Polk*、*Mgmt*、p53 の発現を抑制する *Mdm2*、細胞増殖に関連する *Ccna2*、*Ccne1*、*Ccnd1*、*Ccng1*、*Mmp12*、*Abcc3* などが含まれていた。一方、ES はラットの肝臓において特異的 DNA 付加体を形成することが報告されていることから、ES の肝発がん早期過程には DNA 修復、アポトーシスや細胞増殖に関連する遺伝子が関与していることが考えられた。

E. 結論

gpt delta マウスを用いた短期包括的試験法において、1-MN 投与による顕著な毒性変化は見られなかった。さらに、1-MN は *gpt delta* マウスの肺に *in vivo* 変異原性を示さないことが明らかとなった。一方、ES の肝発がん過程には遺伝毒性のみならず細胞増殖やアポトーシスの関与の可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果

1. 論文発表

Ishii Y, Suzuki Y, Hibi D, Jin M, Fukuhara K, Umemura T, Nishikawa A, Detection and quantification of specific DNA adducts by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the livers of rats given estragole at the carcinogenic dose, *Chem. Res. Toxicol.*, 24: 532-541 (2011).

2. 学会発表

鈴木裕太, 木島綾希, 日比大介, 金 美蘭,
石井雄二, 児玉幸夫, 能美健彦, 梅村隆志,
西川秋佳: *gpt delta* マウスを用いた食品添
加物 estragole の *in vivo* 変異原性の解析
第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会
(2010.6)

梅村隆志, 金 美蘭, 鈴木裕太, 日比大介,
井上知紀, 石井雄二, 児玉幸夫, 能美健彦,
西川秋佳: *gpt delta* マウスを用いた包括的
毒性試験法による 1-メチルナフタレインの
in vivo 遺伝毒性の検索
第 69 回日本癌学会学術総会 (2010.9)

金 美蘭, 鈴木裕太, 日比大介, 井上知紀,
石井雄二, 能美健彦, 梅村隆志, 西川秋佳:
サフロール投与 F344 *gpt delta* ラット肝に
おける遺伝毒性と酸化的 DNA 損傷の検索
第 69 回日本癌学会学術総会 (2010.9)

金 美蘭, 鈴木裕太, 日比大介, 井上知紀,
石井雄二, 能美健彦, 梅村隆志, 西川秋佳:
F344 *gpt delta* ラットを用いた包括的試験
法によるサフロールの *in vivo* 遺伝毒性と酸
化的 DNA 損傷の検索
第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集
会 (2011.1)

鈴木裕太, 石井雄二, 木島綾希, 日比大介,
金 美蘭, 児玉幸夫, 能美健彦, 梅村隆志,
西川秋佳: Estragole マウス肝発がん機序
への遺伝子障害性メカニズムの関与
第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集
会 (2011.1)

北澤隆宏, 鈴木裕太, 木島綾希, 日比大介,
金 美蘭, 石井雄二, 能美健彦, 梅村隆志,
西川秋佳: 食品中の CYP1A2 誘導剤の複
合投与による estragole の *in vivo* 変異原性
への影響
第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集
会 (2011.1)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

【参考文献】

- 1) Murata Y., Denda A., Maruyama H.,
Konishi Y., Chronic Toxicity and
Carcinogenicity Studies of
1-Methylnaphthalene in B6C3F1 mice,
Fundam and Appl Toxicol.,21 (1), 44-51
(1993)
- 2) Harvy R.G., and Halonen M., Intraction
between carcinogenic hydrocarbons and
nucleosides. Cancer Res., 28,
2183-2186(1968)
- 3) Phillips DH, DNA adducts derived from
ssafole, estragole, and related compounds,
and from benzene and its metabolites.
IARC Sci Publ.125:131-140(1994)
- 4) Fennell TR, Wiseman RW, Miller JA,
Miller EC, Major role of hepatic
sulfotransferase activity in the metabolic
activation, DNA adduct formation, and
carcinogenicity of
1'-hydroxy-2',3'-dehydroestragole in
infant male C57BL/6J x C3H/HeJ F1 mice.
Cancer Res. 45:5310-5320(1985)

Table 1. Final body and organ weights for male *gpt* delta mice given 1-MN for 13 weeks

Group	Control		0.075% 1-MN		0.15% 1-MN	
	No. of animals examined	10	10	10	10	10
Body weight		33.1±1.8 ^a	33.1±3.7		30.7±2.0	
Absolute(g)						
Liver		1.35±0.10	1.32±0.18		1.21±0.11	
Lung		0.18±0.03	0.17±0.02		0.17±0.02	
Kidney		0.46±0.08	0.45±0.03		0.45±0.04	
Brain		0.49±0.01	0.48±0.01		0.48±0.01	
Spleen		0.09±0.01	0.07±0.02*		0.06±0.01**	
Thymus		0.03±0.01	0.03±0.01		0.03±0.01	
Heart		0.97±0.06	0.81±0.24*		0.72±0.03**	
Adrenal		0.01±0.00	0.01±0.00		0.01±0.00	
Gonad		0.21±0.03	0.22±0.03		0.21±0.03	
Relative(g/100g B.W.)						
Liver		4.09±0.27	3.99±0.19		3.93±0.23	
Lung		0.55±0.07	0.52±0.07		0.51±0.17	
Kidney		1.38±0.24	1.38±0.11		1.47±0.12	
Brain		1.47±0.10	1.47±0.15		1.57±0.12	
Spleen		0.27±0.04	0.21±0.04*		0.21±0.05*	
Thymus		0.09±0.02	0.08±0.04		0.08±0.01	
Heart		2.94±0.21	2.48±0.77		2.35±0.19**	
Adrenal		0.02±0.00	0.02±0.01		0.02±0.01	
Gonad		0.63±0.08	0.67±0.08		0.67±0.07	

*, **: Significantly different from the controls at the levels of $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Dunnnett's test)

^a Mean±SD.

Table 2. Final body and organ weights for female *gpt* delta mice given 1-MN for 13 weeks

Group	0.075% 1-MN			0.15% 1-MN		
	No. of animals examined	Control	10	10	10	10
Body		25.6±1.4 ^a	25.5±2.6	24.8±1.3		
Absolute (g)						
Liver		1.08±0.06	1.04±0.06	1.00±0.07 [*]		
Lungs		0.17±0.02	0.17±0.02	0.17±0.02		
Kidneys		0.34±0.02	0.33±0.02	0.33±0.02		
Brain		0.52±0.01	0.50±0.02	0.51±0.01		
Spleen		0.08±0.01	0.08±0.01	0.07±0.01		
Thymus		0.04±0.01	0.04±0.01	0.08±0.10 ^{*** b)}		
Heart		0.13±0.01	0.12±0.01	0.12±0.01		
Adrenals		0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00		
Relative (g/100g B.W.)						
Liver		4.28±0.43	4.12±0.29	4.05±0.27		
Lungs		0.66±0.08	0.67±0.12	0.68±0.09		
Kidneys		1.33±0.13	1.29±0.11	1.32±0.10		
Brain		2.03±0.11	1.99±0.16	2.04±0.10		
Spleen		0.32±0.03	0.30±0.04	0.30±0.04		
Thymus		0.14±0.02	0.15±0.02	0.35±0.44		
Heart		0.51±0.02	0.49±0.04	0.47±0.04		
Adrenals		0.03±0.01	0.03±0.01	0.04±0.01		

*, **, Significantly different from the controls at the levels of $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Dunnett's test)

^a Mean ± SD ^{b)} lymphoma was observed in one mouse

Table 3. Hematological data for male and female *gpt* delta mice given 1-MN for 13 weeks

Item	Dose of 1-MN (% in diet)		
	0	0.075	0.15
Males			
No. of animals examined	10	10	10
WBC ($\times 10^2 / ?$)	24.2 \pm 15.0 ^a	22.0 \pm 9.0	15.0 \pm 7.0
RBS ($\times 10^4 / ?$)	963 \pm 40	959 \pm 64	965 \pm 63
Hb (g/dL)	13.9 \pm 0.6	14.0 \pm 1.0	14.1 \pm 0.8
Ht (%)	50.6 \pm 2.0	50.5 \pm 3.2	50.5 \pm 3.2
MCV (fL)	53.0 \pm 0.0	52.6 \pm 0.5	52.0 \pm 0.0
MCH (pg)	14.4 \pm 0.2	14.7 \pm 0.3	14.6 \pm 0.4
MCHC (g/dL)	27.5 \pm 0.4	27.8 \pm 0.4	27.9 \pm 0.7
Plt ($\times 10^4 / ?$)	138.0 \pm 8.0	134.0 \pm 14.0	137.0 \pm 17.0
Differential leukocyte counts (%)			
Band form neutrophils	5.3 \pm 1.8	2.6 \pm 0.9*	3.9 \pm 2.4
Segmented neutrophils	14.8 \pm 3.2	16.8 \pm 3.9	27.5 \pm 13.5*
Eosinophils	1.3 \pm 0.9	0.6 \pm 0.4	1.1 \pm 0.4
Basophils	0.3 \pm 0.5	0.4 \pm 0.2	0.3 \pm 0.3
Lymphocytes	77.0 \pm 4.5	79.0 \pm 3.7	66.4 \pm 16.0
Monocytes	0.9 \pm 0.3	0.6 \pm 0.3	0.6 \pm 0.5
Reticulocytes	0.7 \pm 0.6	0.2 \pm 0.3	0.8 \pm 0.5
Females			
No. of animals examined	10	10	10
WBC ($\times 10^2 / ?$)	16.0 \pm 8.0	17.0 \pm 11.0	17.0 \pm 8.0
RBS ($\times 10^4 / ?$)	998 \pm 45	991 \pm 67	977 \pm 53
Hb (g/dL)	14.8 \pm 0.6	14.7 \pm 0.9	14.4 \pm 0.8
Ht (%)	53.0 \pm 2.4	52.9 \pm 3.5	51.6 \pm 2.9
MCV (fL)	53.1 \pm 0.4	53.4 \pm 0.5	52.9 \pm 0.5
MCH (pg)	14.8 \pm 0.1	14.9 \pm 0.3	14.8 \pm 0.4
MCHC (g/dL)	27.8 \pm 0.1	27.8 \pm 0.5	28.0 \pm 0.5
Plt ($\times 10^4 / ?$)	115.0 \pm 7.0	112.0 \pm 9.0	113.0 \pm 8.0
Differential leukocyte counts (%)			
Band form neutrophils	3.1 \pm 1.7	2.2 \pm 1.1	2.6 \pm 1.5
Segmented neutrophils	10.7 \pm 3.9	10.4 \pm 3.2	10.9 \pm 3.4
Eosinophils	1.0 \pm 0.6	1.1 \pm 0.7	1.1 \pm 0.6
Basophils	0.1 \pm 0.2	0.4 \pm 0.2*	0.4 \pm 0.2*
Lymphocytes	84.7 \pm 5.1	85.3 \pm 3.8	84.4 \pm 4.2
Monocytes	0.5 \pm 0.3	0.5 \pm 0.3	0.4 \pm 0.3
Reticulocytes	0.5 \pm 0.4	0.4 \pm 0.3	0.3 \pm 0.3

Abbreviations: WBC, white blood cell; Hb, hemoglobin; Ht, hematocrit; MCV, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; Plt, platelet.

^a Mean \pm SD. *: Significantly different from the controls at the levels of $p < 0.05$ (Dunnett's test)

Table 4. Serum biochemistry for male and female *gpt* delta mice given 1-MN for 13 weeks

Item	Dose of 1-MN (% in diet)			
	0	0.075	0.15	0.3
Males				
No. of animals examined	9	8	10	10
TP (g/dl)	5.3 ± 0.3 *	5.3 ± 0.2	5.2 ± 0.1	5.2 ± 0.2
Alb (g/dl)	3.1 ± 0.2	3.1 ± 0.2	3.1 ± 0.2	3.1 ± 0.2
T-Bil (mg/dl)	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
TG (mg/dl)	99.0 ± 41.8	73.8 ± 21.6	68.1 ± 24.7	68.1 ± 24.7
Phospholipid (mg/dl)	232.3 ± 22.8	218.9 ± 15.2	207.4 ± 5.6*	207.4 ± 5.6*
TC (mg/dl)	119.6 ± 12.5	121.3 ± 8.1	113.9 ± 5.8	113.9 ± 5.8
BUN (mg/dl)	31.1 ± 3.8	28.6 ± 2.0	26.6 ± 3.7*	26.6 ± 3.7*
CRN (mg/dl)	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01**	0.09 ± 0.01**
Na (mEq/l)	152.2 ± 1.9	151 ± 1.4	152.3 ± 1.5	152.3 ± 1.5
Cl (mEq/l)	115.4 ± 1.4	115.4 ± 1.3	116.9 ± 3.0	116.9 ± 3.0
K (mEq/l)	5.3 ± 0.7	5.4 ± 1.4	5.0 ± 0.3	5.0 ± 0.3
Ca (mg/dl)	9.2 ± 0.3	8.9 ± 0.2*	8.9 ± 0.3*	8.9 ± 0.3*
IP (mg/dl)	8.1 ± 1.0	7.5 ± 1.1	8.1 ± 0.6	8.1 ± 0.6
AST (IU/l)	37.1 ± 2.8	37.3 ± 3.2	50.6 ± 15.6	50.6 ± 15.6
ALT (IU/l)	20.3 ± 2.1	20.9 ± 4.5	30.1 ± 10.4	30.1 ± 10.4
ALP (IU/l)	199.6 ± 19.2	209.1 ± 26.1	220.5 ± 21.0	220.5 ± 21.0
Females				
No. of animals examined	10	10	9	9
TP (g/dl)	5.3 ± 0.1	5.2 ± 0.1	5.2 ± 0.1	5.2 ± 0.1
Alb (g/dl)	3.4 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.4 ± 0.1
T-Bil (mg/dl)	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01
TG (mg/dl)	38.1 ± 26.6	29.9 ± 23.0	22.9 ± 17.3	22.9 ± 17.3
Phospholipid (mg/dl)	189.2 ± 8.1	181.0 ± 7.9	172.3 ± 16.6*	172.3 ± 16.6*
TC (mg/dl)	104.6 ± 4.8	98.6 ± 7.1	97.1 ± 7.1*	97.1 ± 7.1*
BUN (mg/dl)	20.9 ± 4.1	24.4 ± 10.4	25.3 ± 5.4	25.3 ± 5.4
CRN (mg/dl)	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.02
Na (mEq/l)	150.2 ± 1.2	150.9 ± 0.9	151.6 ± 2.2	151.6 ± 2.2
Cl (mEq/l)	115.6 ± 1.5	115.9 ± 1.4	117.6 ± 2.1*	117.6 ± 2.1*
K (mEq/l)	5.4 ± 0.4	5.4 ± 0.7	5.2 ± 0.2	5.2 ± 0.2
Ca (mg/dl)	8.9 ± 0.2	9 ± 0.3	8.7 ± 0.2	8.7 ± 0.2
IP (mg/dl)	7.5 ± 1.0	7.7 ± 1.3	7.2 ± 0.6	7.2 ± 0.6
AST (IU/l)	39.6 ± 2.4	38.6 ± 3.4	40.3 ± 4.1	40.3 ± 4.1
ALT (IU/l)	18 ± 2.1	16.7 ± 1.2	18.4 ± 2.5	18.4 ± 2.5
ALP (IU/l)	344.9 ± 48.1	361.3 ± 54.7	343.6 ± 29.6	343.6 ± 29.6

Abbreviations: TP, total protein; Alb, albumin; T-Bil, total bilirubin; TG, triglyceride; TC, Total cholesterol; BUN, blood urea nitrogen; CRN, creatinine; Na, sodium; Cl, chlorine; K, potassium; Ca, calcium; IP, inorganic phosphate; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase

*, **: Significantly different from the controls at the levels of $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Dunnett's test)
* Mean ± SD

Table 5. *gpt* mutant frequencies in the liver of *gpt* delta mice given 1-MN for 13 weeks

Groups	Animal No.	CmR colonies(x10 ⁵)	6-TG ^R and CmR colonies	Mutant Frequency (x10 ⁻⁵)	Mean±S.D.
Male					
Control	1	9.8	3	0.31	0.34±0.17
	2	12.3	5	0.41	
	3	15.2	9	0.59	
	4	15.1	2	0.13	
	5	4.0	1	0.25	
0.075% 1-MN	11	11.4	5	0.26	0.33±0.13
	12	2.1	1	0.47	
	13	5.3	1	0.19	
	14	23.5	5	0.30	
	15	18.2	6	0.33	
0.15% 1-MN	21	18.0	9	0.61	0.54±0.06
	23	6.1	4	0.49	
	24	24.5	17	0.57	
	25	22.4	11	0.49	
	31	7.1	1	0.14	
Control	32	50.5	3	0.06	0.17±0.10
	33	43.4	10	0.23	
	34	36.0	4	0.11	
	35	18.3	6	0.33	
	41	41.1	7	0.17	
0.075% 1-MN	42	36.4	3	0.08	0.17±0.09
	43	40.6	6	0.15	
	44	38.0	12	0.32	
	45	49.2	6	0.12	
	51	25.8	6	0.23	
0.15% 1-MN	52	29.3	11	0.38	0.20±0.14
	53	33.9	7	0.21	
	54	30.2	5	0.17	
	55	55.8	0	0.00	