

201131010A

別紙1

厚生労働科学研究費補助金

食品の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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西川 秋佳

平成24(2012)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 ----- 10

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 ----- 29

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 ----- 49

小川久美子

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 68

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 69

厚生労働科学研究費補助金（食品の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

研究要旨

本研究は、一般毒性、変異原性および発がん性（前がん病変）評価を同一動物で実施する *gpt delta* ラットあるいはマウスを用いた短期包括的試験法の開発を目的とし、以下の研究を実施した。（西川）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) はマウスの肺に発がん性が報告されており、その発がん機序解明を目的に、発がん用量の1-MNを *gpt delta* マウスに投与して、標的臓器肺における *in vivo* 変異原性を検索した。その結果、レポーター遺伝子変異頻度に変化は認められず、1-MN肺発がん機序への遺伝毒性メカニズムの関与はないことが示唆された。さらに、ラットの肝に発がん性が知られているestragole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抗アポトーシスなどの促進作用が寄与していることが明らかになった。（小川）香料のmethyleugenol (MEUG) はげっ歯類において肝発がん性が報告されている。今回、*gpt delta* ラットを用いた短期包括的試験法により、MEUGの *in vivo* 変異原性を検索するとともに一般毒性ならびに発がん性について総合的な評価を行った。その結果、MEUGはラットの肝臓において *in vivo* 変異原性を有し、その発がん機序には遺伝毒性メカニズムが関与していることが明らかとなった。また、本包括的試験法の有用性が確認された。（梅村）げっ歯類において肝発がん性が知られている香料furan-substituted物質の基本骨格であるfuranについて、*gpt delta* マウスを用いた *in vivo* 変異原性試験、肝臓におけるコメットアッセイ、骨髄を用いた小核試験の結果がいずれも陰性であったことから、furanのマウスにおける肝発がん機序に遺伝毒性メカニズムが関与していない可能性を示した。以上より、本試験法を用いることで、比較的短時間で発がん性を含めた評価が可能であり、さらに、評価物質の発がん機序をも明確にすることができ、ヒトの食に対する安全を担保する上で大きく貢献するものと考えられた。

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	A. 研究目的 食品添加物等、化学物質のヒトに対する安全性は一般毒性試験、遺伝毒性試験、発がん性試験、生殖発生毒性試験など様々な毒性試験の結果を総合的に捉えた上で担保されている。発がん性試験はこれら毒性試験の中で最も多くの動物数と長期間の投与
梅村隆志	国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長	
小川久美子	国立医薬品食品衛生研究所 病理部 部長	

を必要とし、剖検や病理組織学的検査などを含めると、最短でも3~4年を要する。遺伝毒性試験では、*in vitro*試験であるAmes試験や染色体異常試験、*in vivo*では小核試験が実施されるが、*in vivo*小核試験では検索する細胞・組織が赤血球および骨髄に限定されるため、発がん標的臓器における遺伝毒性をどの程度正確に反映しているか不明な点がある。これらに加え、近年、動物愛護の観点から実験動物数削減の声が高まっていることも踏まえ、本研究は、臓器・組織レベルでの点突然変異ならびに欠失変異を検索可能な*gpt delta*ラットあるいはマウスを用い、前癌病変を含む反復投与試験データ、遺伝毒性データを13週間という比較的短期間で同一個体において得ることができる短期包括的試験法の開発を目指している。

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量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。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、発がん性が危惧されているものもある。本試験法で、一般毒性、変異原性さらには発がん性までの評価が可能となれば、発がん性試験を実施するまでもなく、使用禁止などの処置を取ることが可能となり、厚生労働省が抱えているヒトの食の安全と安心に大きく貢献するものと期待される。

B. 研究方法

I. 反復投与毒性試験の病理組織学的解析ならびに網羅的遺伝子解析 (西川)

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同様に投与した。実験終了後、動物をイソフルラン麻酔下で腹腔内静脈より採血し、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、肝臓及び精巣の重量を測定し、全身諸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の免疫染色を行い、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20匹を4群に分けて、estragoleを600 mg/kgbwの用量で強制経口投与、またsafroleを0.5%の濃度に混じた粉末飼料をそれぞれ4週間投与した。また、二つの対照群には媒体であるコーン油を4週間強制経口投与または混餌投与した。実験終了後には、全ての動物をイソフルラン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を免疫染色した。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。

II. 香料物質の反復投与毒性と病理組織学的解析 (小川)

5週齢のF344 *gpt delta*ラット雌雄各40匹を1週間の馴化飼育後、雌雄とも各群10匹の4群に分けて、10、30または100 mg/kgのMEUGを強制経口投与した。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、血液学、血清生化学の検索を行った。さらに、全身諸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の免疫染色と細胞増殖活性のマーカーであるPCNAの免疫染色を行い、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。

III. 反復投与毒性試験材料による*in vivo*変異原性解析 (梅村)

6週齢の雄のB6C3F₁系*gpt delta*マウスにfuranの発がん用量として報告されている15 mg/kgあるいは非発がん用量である2 mg/kgをコーンオイルに溶解させ、4あるいは13週間、週5日で強制経口投与した。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。剖検時にエーテル麻酔下にて腹部大動静脈より放血致死させ、肝臓を採取後、肝臓重量測定を行い、一部は細胞洗浄用緩衝液に懸濁させ、電気泳動を行い、コメントアッセイを実施し、他の一部を病理組織検索用にホルマリン固定後、定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。残りの肝臓からはゲノムDNAを採取し、*in vivo*変異原性評価を実施した。また、大腿骨髄から骨髄細胞を採取し、*in vivo*小核試験を実施し

た。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国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、動物の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

I. 反復投与毒性試験の病理組織学的解析ならびに網羅的遺伝子解析 (西川)

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。血清生化学的検査では、雄の 0.075%以上の投与群のリン脂質、BUN (blood urea nitrogen)、CRN (creatinine)と 0.15%投与群の Ca (calcium) が対照群に比べて有意に減少した。さらに、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、総コレステロールの有意な減少とCl (塩素)の有意な増加が見られた。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 (Fig. 4)。肺における *gpt* と SpiA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。

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った。体重は、estragole 投与群と safrole 投与群でそれぞれの対照群に比べ有意な減少が認められた。さらに、estragole 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は、estragole 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 の免疫染色では、estragole 投与群で GST-P 陽性細胞巢の数、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、estragole 投与群で発現増加した遺伝子 1635 個と発現低下した遺伝子 6896 個、safrole 投与群で発現増加した遺伝子 221 個と発現低下した遺伝子 95 個が抽出された。そして estragole と safrole で共通に発現増加した遺伝子 120 個と発現低下した遺伝子が 62 個抽出された。その中には DNA 修復に関連する *Mgmt*、p53 の発現を抑制する *Mdm2*、細胞増殖に関連する *Ceng1*、*Mmp12* などが含まれていた。これらの一部の変動遺伝子について real-time RT-PCR 確認したところ、マイクロアレイ

解析と同様な結果が得られた。

II. 香料物質の反復投与毒性と病理組織学的解析 (小川)

試験期間中に雌の投与群で 3 匹が投与ミスで死亡した。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。体重増加曲線では、雌雄ともに投与群と対照群の間に有意な差がなかった。摂餌量は実験期間中に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 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が対照群に比べ有意に減少し、100 mg/kg 投与群の腎臓と脳の前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 WBC と 100 mg/kg 投与群の Plt 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 (塩素) と AST (aspartate aminotransferase) が有意に減少した。さらに、100 mg/kg 投与群で A/G と IP (inorganic phosphate) が対照群に比べ有意に増加し、CRN および ALT が有意に減少した。また、30 mg/kg 投与群でリン脂質が有意に増加した。雌では、100 mg/kg 投与群において Alb (albumin)、CRN、が対照群に比べ有意に減少し、Cl と IP が対照群に比べて有意に増加した。また、30 mg/kg 以上の投与群で T-Bil (total bilirubin) が有意

に減少した。病理組織学的検査では、雄の 10 mg/kg 投与群の肺動脈における鉍質沈着と雌の投与群の脾臓の褐色色素沈着の発生率が有意に増加した。標的臓器である肝臓における *in vivo* 変異原性の検索では、雌雄ともに 100 mg/kg 投与群で *gpt* と *red/gam* の変異頻度が対照群に比べ有意に増加した。また、変異コロニーのスペクトラム解析では、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。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数、面積ともに対照群に比べ有意に増加した。細胞増殖活性の指標である PCNA 免疫染色では、100 mg/kg 投与群で雌雄ともに陽性細胞率が有意に増加した。

III. 反復投与毒性試験材料による *in vivo* 変異原性解析 (梅村)

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。13 週目の 15 mg/kg の雄において、最終体重に有意な低値が認められた。肝臓重量においては、15 mg/kg において絶対あるいは相対重量の有意な高値が 4 週目から認められた。肝臓病理組織学的検索の結果、4 週目において、小葉中心性肝細胞肥大 (2 mg/kg : 雄 2/5 例 ; 15 mg/kg : 雄 5/5 例、雌 : 1/5 例)、被膜下炎症細胞浸潤 (15 mg/kg : 雄 1/5 例、雌 3/5 例) が認められた。13 週目では、小葉中心性肝細胞肥大 (2 mg/kg : 雄 1/5 例)、被膜下炎症細胞浸潤 (2 mg/kg : 雄 4/5 例、雌 5/5 例 ; 15 mg/kg : 雄 5/5 例、雌 5/5 例)、限局性の肝細胞壊死 (15 mg/kg : 雄 1/5 例) が認められた。 *In vivo* 変異原性評価の結果、投与 4 及び 13 週目の雌雄の肝

臓における *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 13 週目の肝臓におけるコメットアッセイの結果、雌雄共に対照群と比較し、tail moment、tail length 及び tail intensity のいずれの項目においても著差は認められなかった。 *In vivo* 小核試験の結果、雌においては著差は認められなかった。投与 4 週目の雄の 2 mg/kg 以上では小核出現頻度の有意な増加が認められたが、投与 13 週目では対照群と比較し、有意な差は認められなかった。

D. 考察

I. 反復投与毒性試験の病理組織学的解析ならびに網羅的遺伝子解析 (西川)

実験1では、1-MNの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。実験終了時の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。従って、この体重増加抑制は摂餌量低下に起因したものと考えられた。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おり、これらの変化は今までの報告と一致していた。

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 の投与に起因した変化であると考えられた¹⁾。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該当臓器に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 0.075% 以上の投与群のリン脂質、BUN、CRN と 0.15%投与群の Ca の低値が見られた。さらに、0.15%投与群の AST と ALT の高値も認められた。雌では、0.15%投与群においてリン脂質、総コレステロールの高値と Cl の低値が見られた。しかし、変化の程度は小さく、臓器重量において関連する顕著な変化が認められておらず、病理組織学的にも該当臓器に顕著な変化が認められないことから、これらの変動に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、肺重量および病理組織学的検査においても投与群に顕著な変化は見られなかった。また、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。従って、1-MNは発がん標的臓器の肺において *in vivo* 変異原性を示さないことが明らかとなり、1-MNの肺発がん過程に遺伝毒性メカニズムは関与しないことが強く示唆された。さらに、肺を含めた全身諸臓器に明らかな毒性影響を示さなかったことから、1-MNの肺発がん性についてはさらなる検証が必要であると考えられた。

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GST-P陽性細胞巢

の数、面積ともに有意に増加した。また、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ESとsafroleに共通して発現増加した遺伝子の中には、DNA修復に関連する *Mgmt*、*p53* の発現を抑制する *Mdm2*、細胞増殖に関連する *Ccng1*、*Mmp12* などが含まれていた。そして、これらの一部の変動遺伝子についてreal-time RT-PCR確認したところ、マイクロアレイ解析と同様な結果が得られた。ESとsafroleはラットの肝臓において特異的DNA付加体を形成し、それらが遺伝毒性に関与する可能性が指摘されており^{2, 3)}、また今回の結果から、ESの肝発がん過程早期にはDNA修復、アポトーシス抑制や細胞増殖に関連する遺伝子が関与していることが示された。

II. 香料物質の反復投与毒性と病理組織学的解析 (小川)

本実験では、MEUGの *in vivo* 変異原性を明らかにし、その発がん機序を解明するとともに *gpt delta* ラットを用いた包括試験法の有用性を確認するために、*gpt delta* ラットによる90日間の反復投与毒性試験を実施した。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。これまでの報告によると肝臓はMEUGの毒性標的臓器であることから、これらの変化はMEUGの投与に起因するものであると考えられた。雄の100 mg/kgで腎臓の絶対重量、また30 mg/kg以上の投与群において絶対及び相対重量、100 mg/kg投与群で精巣相対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おらず、また病理組織学的検査においても当該臓器に顕著な変化がないことから、これら変化の毒性学的意義を低いものと考えられた。

血清生化学的検査では、では、30 mg/kg 以上の投与群で Cl と AST の低値と 100 mg/kg 投与群で A/G と IP の高値、CRN および ALT の低値が見られた。また、30 mg/kg 投与群でリン脂質の高値が認められた。雌では、100 mg/kg 投与群において Alb と CRN の低値、Cl と IP の高値が見られた。さらに、30 mg/kg 以上の投与群で T-Bil の低値も認められた。しかし、臓器重量に関連する有意な変化が認められておらず、また該当臓器の病理組織学的検査においても顕著な変化がないことから、これら変化の毒性学的意義は低いものと考えられた。

発がん標的臓器の肝臓において、雌雄ともに100 mg/kg投与群でレポーター遺伝子 *gpt*と*red/gam*の変異頻度が上昇するとともにGST-P陽性細胞の数、面積ならびにPCNA陽性細胞率が有意に増加した。MEUGは長期の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ていることが報告されている¹⁾。従って、MEUGは*gpt delta*ラットの肝臓において*in vivo*変異原性を有し、その発がん機序には遺伝毒性メカニズムが関与していることが明らかになった。さらに、今回の実験において以前の報告と同様にMEUGの投与による肝重量の増加が認められ、*gpt delta*ラットを用いた短期包括試験法はMEUGの一般毒性、*in vivo*変異原性ならびに発がん

性を同一個体で評価が可能であることが示され、本試験法の有用性が確認された。

III. 反復投与毒性試験材料による*in vivo*変異原性解析（梅村）

本研究では、furanのマウスにおける肝発がん機序解明を目的とし、雌雄の*gpt delta*マウス各群10例にコーンオイルに溶解させたfuran 0、2及び15 mg/kgを4あるいは13週間強制経口投与し、肝臓における病理組織学的検索に加え、肝臓におけるレポーター遺伝子変異解析（*in vivo*変異原性評価）及びコメットアッセイ（DNA損傷傷の評価）、さらに、骨髄における小核試験（染色体異常誘発性の評価）の3種の*in vivo*遺伝毒性試験を同一個体で実施した。

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。最終体重においては、投与13週目の15 mg/kgにおいて有意な低値が認められた。肝臓重量においては、15 mg/kgにおいて絶対あるいは相対重量の有意な高値が4週目から認められた。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及び被膜下炎症細胞浸潤が認められ、投与13週目の15 mg/kgの雄において肝細胞壊死も認められた。

肝臓の*in vivo*変異原性評価の結果、4及び13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、肝臓のコメットアッセイにおいてもtail moment、tail length及びtail intensityのいずれの項目においても著差は認められなかった。骨髄を用いた小核試験の結果、投与4週目の雄で小核出現頻度の有意な増加が認められたものの、13週目では変化は認められなかった。これらの結果から、furanは弱いながら

も染色体異常誘発性を有する可能性が考えられたが、標的臓器におけるDNA損傷性及び遺伝子突然変異誘発性が認められないことから、furanのマウスにおける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。

E. 結論

*gpt delta*マウスに発がん用量の1-MNを投与したところ、標的臓器肺における*in vivo*変異原性は認められず、1-MN肺発がん機序への遺伝毒性メカニズムの関与はない可能性が示された。また、estragoleの肝発がん過程にはDNA付加体が寄与する遺伝毒性に加えて、細胞増殖やアポトーシス抑制などの促進作用が寄与していることが示された。

MEUGはラットの肝臓において*in vivo*変異原性を有し、その発がん機序には遺伝毒性メカニズムが関与していることが明らかになった。また、*gpt delta*ラットを用いた本包括的試験法がMEUGの一般毒性、*in vivo*遺伝毒性ならびに発がん性の評価を総合的に評価可能であることが示され、その有用性が確認された。

マウスを用いた*in vivo*遺伝毒性包括試験の結果から、furan誘発マウス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強く示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

M. Jin, A. Kijima, Y. Suzuki, D. Hibi, T. Inoue, Y. Ishii, T. Nohmi, A. Nishikawa, K. Ogawa, T. Umemura: *In vivo* genotoxicity of 1-methylnaphthalene from comprehensive toxicity studies with B6C3F₁ *gpt delta* mice. J. Toxicol. Sci., in press.

Suzuki Y, Umemura T, Hibi D, Inoue T, Jin M, Ishii Y, Sakai H, Nohmi T, Yanai T, Nishikawa A, Ogawa K. Possible involvement of genotoxic mechanisms in estragole-induced hepatocarcinogenesis in rats. Arch Toxicol., in press.

Ishii Y, Inoue K, Takasu S, Jin M, Matsushita K, Kuroda K, Fukuhara K, Nishikawa A, Umemura T. Determination of Lucidin-Specific DNA Adducts by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry in the Livers and Kidneys of Rats Given Lucidin-3-O-primeveroside. Chem Res Toxicol., 25 (5): 1112-1118, 2012.

Jin M, Kijima A, Suzuki Y, Hibi D, Inoue T, Ishii Y, Nohmi T, Nishikawa A, Ogawa K, Umemura T. Comprehensive toxicity study of safrole using a medium-term animal model with *gpt delta* rats. Toxicology. 18;290(2-3):312-21, 2011.

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 (4): 532-541, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

2. 学会発表

梅村隆志、金 美蘭、木島綾希、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（2010年9月・大阪）

金 美蘭、鈴木裕太、日比大介、木島綾希、石井雄二、能美健彦、西川秋佳、梅村隆志：*Safrole*、*piperonyl butoxide*または*estragole*で処理したF344ラットの肝臓における遺伝子発現プロファイルの比較。第38回日本トキシコロジー学会（2011年7月・横浜）

金 美蘭、鈴木裕太、日比大介、井上知紀、石井雄二、能美健彦、西川秋佳、梅村隆志：F344 *gpt delta*ラットを用いた包括的毒性試験法によるメチルオイケノールの*in vivo*遺伝毒性の検索。第70回日本癌学会（2011年10月・名古屋）

日比 大介、木島 綾希、鈴木 裕太、金 美蘭、石井 雄二、増井 則夫、能美 健彦、梅村 隆志、西川 秋佳：*gpt delta* ラットを用いた新しい短期包括的試験法によるフランの毒性評価。第26回日本毒性病理学会、金沢、第26回日本毒性病理学会講演要旨集：p54 (O-11)、2月、2010

厚生労働科学研究費補助金
(食品の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

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 金 美蘭 国立医薬品食品衛生研究所 病理部流動研究員

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) はマウス肺に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知られている。本研究では、1-MN の発がん機序の解明を目的として、*gpt delta* マウスを用いた 90 日間反復投与毒性試験を行った。その結果、臓器重量、血液学ならびに血清生化学的検査、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レポーター遺伝子変異頻度の変化はなかった。さらに、肺における PCNA 免疫染色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 は発がん性が報告されている肺において遺伝毒性を含めた毒性影響を示さないことが明らかとなった。また、ラットでの肝発がん性が知られている香料 estragole (ES) を F344 系ラットに 4 週間投与して、網羅的遺伝子解析を実施し、変動遺伝子を肝発がん物質である safrole と比較して、ES の発がん過程早期に関わる遺伝子群の把握を試みた。ES 投与群で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。また、GST-P 免疫染色を用いた定量解析の結果、GST-P 陽性肝細胞巢の数、面積ともに有意に増加した。cDNA マイクロアレイ解析により、ES 投与で発現増加した 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。これらの内、safrole と共通して変動した遺伝子は、*Mgmt*, *Mdm2*, *Ccng1*, *Mmp12* であった。これらの一部の遺伝子について real time RT-PCR により確認を行った。以上より、ES の発がん機序には DNA 付加体が寄与する遺伝毒性に加え、細胞増殖や抗アポトーシスなどの促進作用が寄与していることが示された。

A. 研究目的

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¹⁾。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、1-MN 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 (実験 1)。

さらに、同じく香料として使用され、ラットにおいて肝発がん性が認められている estragole (ES) の発がん機序を明らかにするために F344 ラットを用いて網羅的遺伝子発現解析を実施し、構造類似化合物として、同じく allyl 基を有し、ES の methoxy 側鎖の代わりに methylenedioxy 環を有するげっ歯類肝発がん物 safrole と比較した (実験 2)。

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、動物をイソフルラン麻酔下で腹腔内静脈より採血し、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、肝臓および精巣の重量を測定し、全身諸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* ならびに Spi assay 用に採取し、液体窒素により凍結し、-80°C で保存した。

実験 2 : 4 週齢の雄 F344 ラット 20 匹を 4 群に分け、ES を 600mg/kg bw の用量で強制経口投与、safrole を 0.5% の濃度で飼料に混ぜて、それぞれ 4 週間投与した。またそれぞれの対照群には媒体であるコーン油を同様の方法で投与した。投与終了後には、全動物をイソフルラン麻酔下で放血致死させ、標的臓器である肝臓を採取し、重量測定後、病理組織学的検査ならびに GST-P 免疫染色を施した。マイクロアレイ用のサンプルは液体窒素により凍結し、-80°C で保存した。

(倫理面への配慮)

実験動物は、国立医薬品食品衛生研究所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、解剖時の安楽死においても深麻酔下で実施し、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 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)。血液学的検査項目に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0.075%以上投与群でリン脂質、BUN (blood urea nitrogen)、CRN (creatinine)、0.15%群で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、総コレステロールの有意な増加とCl (塩素) の有意な減少が見られた (Table 4)。病理組織学的検査では、雄の0.15%投与群の肝臓において単細胞壊死の発生率が有意に増加した。その他、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認められなかった (Fig. 3)。肺における*gpt* とSpiAアッセイにおいては、雌雄ともに投与群でレポーター遺伝子変異頻度に有意な変化はなかった (Table 6, 7)。

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った。体重は、ES投与群とsafrole投与群でそれぞれの対照群に比べ有意な減少が認められた (Table 8)。また、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 8)。肝前癌病変マーカーであるGST-Pの免疫染色による定量解析の結果、ES投与群でGST-P陽性細胞巢の数、面積ともに対照群に比べ有意な増加が見られた (Table 8)。cDNAマイクロアレイ解析では、ES投与群で発現増加した遺伝子1635個と発現低下した遺伝子6896個、safrole投与群で発現増加した遺伝子221個と発現低下した遺伝子95個が抽出された (Fig. 4)。また、ESとsafroleで共通に発現増加した遺伝子120個と発現低下した遺伝子が62個抽出された (Table 9, Fig. 4)。その中にはDNA修復に関連する*Mgmt*、p53の発現を抑制する*Mdm2*、細胞増殖に関連する*Ccng1*、*Mmp12*などが含まれていた。そして、これらの一部の変動遺伝子についてreal-time RT-PCR確認したところ、マイクロアレイ解析と同様な結果が得られた (Fig. 5)。

D. 考察

実験1では、1-MNの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。実験終了時の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。従って、この体重増加抑制は摂餌量低下に起因したものと考えられた。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おり、これらの変化は

今までの報告と一致していた。

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 の投与に起因した変化であると考えられた¹⁾。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該当臓器に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、病理組織学的にも該当臓器に顕著な変化が認められないことから、これらの変動に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、肺重量および病理組織学的検査においても投与群に顕著な変化は見られなかった。また、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。従って、1-MN は発がん標的臓器の肺において *in vivo* 変異原性を示さないことが明らかとなり、1-MN の肺発がん過程に遺伝毒性メカニズムは関与しないことが強く示唆された。さらに、肺を含めた

全身諸臓器に明らかな毒性影響を示さなかったことから、1-MN の肺発がん性についてはさらなる検証が必要であると考えられた。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 GST-P 陽性細胞巢の数、面積ともに有意に増加した。また、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 ES と safrole に共通して発現増加した遺伝子の中には、DNA 修復に関連する *Mgmt*、*p53* の発現を抑制する *Mdm2*、細胞増殖に関連する *Ccng1*、*Mmp12* などが含まれていた。そして、これらの一部の変動遺伝子について real-time RT-PCR 確認したところ、マイクロアレイ解析と同様な結果が得られた。ES と safrole はラットの肝臓において特異的 DNA 付加体を形成し、それらが遺伝毒性に関与する可能性が指摘されており^{2,3)}、また今回の結果から、ES の肝発がん過程早期には DNA 修復、アポト-シス抑制や細胞増殖に関連する遺伝子が関与していることが示された。

E. 結論

gpt delta マウスに発がん用量の 1-MN を投与したところ、標的臓器肺における *in vivo* 変異原性は認められず、1-MN 肺発がん機序への遺伝毒性メカニズムの関与はない可能性が示された。また、ES の肝発がん過程には DNA 付加体が寄与する遺伝毒性に加えて、細胞増殖やアポト-シス抑制などの促進作用が寄与していることが示された。

F. 研究発表

M. Jin, A. Kijima, Y. Suzuki, D. Hibi, T. Inoue, Y. Ishii, T. Nohmi, A. Nishikawa, K. Ogawa, T.

Umemura : *In vivo* genotoxicity of 1-methylnaphthalene from comprehensive toxicity studies with B6C3F₁ *gpt* delta mice. J. Toxicol. Sci., in press.

G. 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) Phillips DH, DNA adducts derived from safrole, estragole, and related compounds, and from benzene and its metabolites. *IARC Sci Publ.*125:131-140(1994)
- 3) 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
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
Lungs	0.18 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.02
Kidneys	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**
Adrenals	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Gonads	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
Lungs	0.55 ± 0.07	0.52 ± 0.07	0.51 ± 0.17
Kidneys	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**
Adrenals	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Gonads	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 (Dunnett's test) ^a Mean ± SD.

Table 2. Final body and organ weights for female *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
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	0.5 ± 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	0.3 ± 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

	Control	0.075 % 1-MN	0.15 % 1-MN
No. of animals examined	10	10	10
Male			
WBC ($\times 10^2/\mu\text{l}$)	24.2 \pm 15.0 ^a	22.0 \pm 9.0	15.0 \pm 7.0
RBS ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	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 ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	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
Female			
No. of animals examined	10	10	10
WBC ($\times 10^2/\mu\text{l}$)	16.0 \pm 8.0	17.0 \pm 11.0	17.0 \pm 8.0
RBS ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	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 ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	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; RBC, red 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

Group	Control	0.075 % 1-MN	0.15 % 1-MN
No. of animals examined	9	8	10
Males			
TP (g/dl)	5.3 ± 0.3 ^a	5.3 ± 0.2	5.2 ± 0.2
Alb (g/dl)	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
TG (mg/dl)	99.0 ± 41.8	73.8 ± 21.6	68.1 ± 24.7
Phospholipid (mg/dl)	232.3 ± 22.8	218.9 ± 15.2	207.4 ± 5.6*
TC (mg/dl)	119.6 ± 12.5	121.3 ± 8.1	113.9 ± 5.8
BUN (mg/dl)	31.1 ± 3.8	28.6 ± 2.0	26.6 ± 3.7*
CRN (mg/dl)	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01**
Na (mEq/l)	152.2 ± 1.9	151 ± 1.4	152.3 ± 1.5
Cl (mEq/l)	115.4 ± 1.4	115.4 ± 1.3	116.9 ± 3.0
K (mEq/l)	5.3 ± 0.7	5.4 ± 1.4	5.0 ± 0.3
Ca (mg/dl)	9.2 ± 0.3	8.9 ± 0.2*	8.9 ± 0.3*
IP (mg/dl)	8.1 ± 1.0	7.5 ± 1.1	8.1 ± 0.6
AST (IU/l)	37.1 ± 2.8	37.3 ± 3.2	50.6 ± 15.6*
ALT (IU/l)	20.3 ± 2.1	20.9 ± 4.5	30.1 ± 10.4*
ALP (IU/l)	199.6 ± 19.2	209.1 ± 26.1	220.5 ± 21.0
No. of animals examined	10	10	9
Females			
TP (g/dl)	5.3 ± 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
T-Bil (mg/dl)	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.07 ± 0.01
TG (mg/dl)	38.1 ± 26.6	29.9 ± 23.0	22.9 ± 17.3
Phospholipid (mg/dl)	189.2 ± 8.1	181.0 ± 7.9	172.3 ± 16.6*
TC (mg/dl)	104.6 ± 4.8	98.6 ± 7.1	97.1 ± 7.1*
BUN (mg/dl)	20.9 ± 4.1	24.4 ± 10.4	25.3 ± 5.4
CRN (mg/dl)	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.09 ± 0.02
Na (mEq/l)	150.2 ± 1.2	150.9 ± 0.9	151.6 ± 2.2
Cl (mEq/l)	115.6 ± 1.5	115.9 ± 1.4	117.6 ± 2.1*
K (mEq/l)	5.4 ± 0.4	5.4 ± 0.7	5.2 ± 0.2
Ca (mg/dl)	8.9 ± 0.2	9.0 ± 0.3	8.7 ± 0.2
IP (mg/dl)	7.5 ± 1.0	7.7 ± 1.3	7.2 ± 0.6
AST (IU/l)	39.6 ± 2.4	38.6 ± 3.4	40.3 ± 4.1
ALT (IU/l)	18.0 ± 2.1	16.7 ± 1.2	18.4 ± 2.5
ALP (IU/l)	344.9 ± 48.1	361.3 ± 54.7	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, chloride; 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) ^a Mean ± SD