

Table 4 Histopathology in the livers of B6C3F1 *gpt* delta mice treated with Furan for 13 weeks

	Male			Female		
	0 mg/kg	2 mg/kg	15 mg/kg	0 mg/kg	2 mg/kg	15 mg/kg
Number of animals examined	5	5	5	5	5	5
Liver						
Centrilobular hepatocyte hypertrophy	0	1	0	0	0	0
Focal necrosis	0	0	1	0	0	0
Subcapsular infiltration of inflammatory cells	0	5	5	0	4	5

Table 5 *gpt* mutant frequencies in the livers of B6C3F₁ *gpt* delta male mice treated with Furan for 4 weeks

Dose	Animal No.	Cm ^R Colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R Colonies	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
0 mg/kg	1	8.19	2	0.24	0.37 ± 0.23
	2	3.24	2	0.62	
	3	4.77	2	0.42	
	4	24.21	1	0.04	
	5	3.87	2	0.52	
2 mg/kg	11	15.57	4	0.26	0.31 ± 0.28
	12	3.83	3	0.78	
	13	22.37	4	0.18	
	14	3.33	1	0.30	
	15	20.97	1	0.05	
15 mg/kg	21	14.45	6	0.42	0.27 ± 0.13
	22	15.30	N.D.	-	
	23	18.63	4	0.21	
	24	16.92	3	0.18	
	25	10.53	N.D.	-	

N.D.: No mutant colonies were detected on the plate, with those data being excluded from the calculation of mutant frequency.

Table 6 Spi mutant frequencies in the livers of B6C3F1 *gpt* delta male mice treated with Furan for 4 weeks

Dose	Animal No.	Plaques within XL-1 Blue MRA (x 10 ⁵)	Plaques within WL95 (P2)	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
0 mg/kg	1	8.01	N.D.	-	0.41 ± 0.23
	2	4.41	N.D.	-	
	3	2.97	N.D.	-	
	4	21.51	8	0.37	
	5	4.50	2	0.44	
2 mg/kg	11	17.19	8	0.47	0.39 ± 0.16
	12	3.96	2	0.51	
	13	14.58	2	0.14	
	14	3.24	1	0.31	
	15	23.40	12	0.51	
15 mg/kg	21	10.98	5	0.46	0.41 ± 0.11
	22	7.92	3	0.38	
	23	29.97	7	0.23	
	24	20.79	9	0.43	
	25	7.56	4	0.53	

N.D.: No mutant colonies were detected on the plate, with those data being excluded from the calculation of mutant frequency.

Table 7 *gpt* mutant frequencies in the livers of B6C3F1 *gpt* delta female mice treated with Furan for 4 weeks

Dose	Animal No.	Cm ^R Colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R Colonies	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
0 mg/kg	31	2.16	N.D.	-	0.33 ± 0.14
	32	7.70	3	0.39	
	33	14.09	5	0.35	
	34	23.27	3	0.13	
	35	6.93	3	0.43	
2 mg/kg	41	6.39	1	0.16	0.22 ± 0.08
	42	14.27	3	0.21	
	43	3.69	1	0.27	
	44	18.81	6	0.32	
	45	14.94	2	0.13	
15 mg/kg	51	25.25	7	0.28	0.41 ± 0.12
	52	17.51	9	0.51	
	53	14.40	5	0.35	
	54	4.68	N.D.	-	
	55	7.97	4	0.50	

N.D.: No mutant colonies were detected on the plate, with those data being excluded from the calculation of mutant frequency.

Table 8 Spi^r mutant frequencies in the livers of B6C3F1 *gpt* delta female mice treated with Furan for 4 weeks

Dose	Animal No.	Plaques within XL-1 Blue MRA (x 10 ⁵)	Plaques within WL95 (P2)	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
0 mg/kg	31	1.68	5	1.07	0.46 ± 0.34
	32	11.79	3	0.25	
	33	21.96	8	0.36	
	34	23.13	6	0.26	
	35	10.62	4	0.38	
2 mg/kg	41	10.89	7	0.64	0.39 ± 0.24
	42	16.74	3	0.18	
	43	3.15	1	0.32	
	44	20.07	3	0.15	
	45	17.28	11	0.64	
15 mg/kg	51	30.42	10	0.33	0.37 ± 0.11
	52	21.60	7	0.32	
	53	16.56	5	0.30	
	54	6.39	N.D.	0.00	
	55	12.87	7	0.54	

N.D.: No mutant colonies were detected on the plate, with those data being excluded from the calculation of mutant frequency.

Table 9 *gpt* mutant frequencies in the livers of B6C3F₁ *gpt* delta male mice treated with Furan for 13 weeks

Dose	Animal No.	Cm ^R Colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R Colonies	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
0 mg/kg	36	3.92	2	0.51	0.63 ± 0.32
	37	7.29	7	0.96	
	38	4.19	4	0.96	
	39	14.54	3	0.21	
	40	13.19	7	0.53	
2 mg/kg	46	3.06	5	1.63	0.58 ± 0.63
	47	9.72	5	0.51	
	48	9.72	5	0.51	
	49	0.27	N.D.	-	
	50	22.50	5	0.22	
15 mg/kg	56	2.03	5	2.47	0.68 ± 1.01
	57	17.51	1	0.06	
	58	7.88	4	0.51	
	59	14.13	2	0.14	
	60	21.60	5	0.23	

N.D.: No mutant colonies were detected on the plate, with those data being excluded from the calculation of mutant frequency.

Table 10 Spi mutant frequencies in the livers of B6C3F1 *gpt* delta male mice treated with Furan for 13 weeks

Dose	Animal No.	Plaques within XL-1 Blue MRA (x 10 ⁵)	Plaques within WL95 (P2)	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
0 mg/kg	36	26.37	7	0.27	0.27 ± 0.11
	37	11.79	1	0.08	
	38	30.15	11	0.36	
	39	22.23	7	0.31	
	40	39.06	9	0.23	
2 mg/kg	46	11.43	2	0.17	0.23 ± 0.06
	47	27.72	6	0.22	
	48	60.12	17	0.28	
	49	52.11	9	0.17	
	50	59.13	17	0.29	
15 mg/kg	56	9.54	2	0.21	0.20 ± 0.06
	57	58.14	6	0.10	
	58	60.48	15	0.25	
	59	21.33	5	0.23	
	60	52.74	12	0.23	

Table 11 *gpt* mutant frequencies in the livers of B6C3F1 *gpt* delta female mice treated with Furan for 13 weeks

Dose	Animal No.	Cm ^R Colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R Colonies	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
0 mg/kg	96	24.12	8	0.33	0.43 ± 0.39
	97	7.11	7	0.98	
	98	36.90	3	0.08	
	99	5.94	2	0.34	
	100	-	-	-	
2 mg/kg	106	26.91	2	0.07	0.21 ± 0.23
	107	37.53	3	0.08	
	108	14.49	7	0.48	
	109	0.09	-	-	
	110	-	-	-	
15 mg/kg	116	19.98	7	0.35	0.89 ± 0.98
	117	3.42	1	0.29	
	118	9.90	20	2.02	
	119	0.09	N.D.	-	
	120	-	-	-	

N.D.: No mutant colonies were detected on the plate, with those data being excluded from the calculation of mutant frequency.

Table 12 Spi^r mutant frequencies in the livers of B6C3F1 *gpt* delta female mice treated with Furan for 13 weeks

Dose	Animal No.	Plaques within XL-1 Blue MRA (x 10 ⁵)	Plaques within WL95 (P2)	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± S.D.
0 mg/kg	96	70.56	14	0.20	0.17 ± 0.04
	97	12.78	N.D.	-	
	98	54.54	8	0.15	
	99	7.38	N.D.	-	
	100	0.18	N.D.	-	
2 mg/kg	106	43.20	10	0.23	0.28 ± 0.05
	107	61.38	20	0.33	
	108	29.70	8	0.27	
	109	0.18	N.D.	-	
	110	-	-	-	
15 mg/kg	116	48.42	11	0.23	0.22 ± 0.04
	117	7.92	2	0.25	
	118	11.16	2	0.18	
	119	-	-	-	
	120	-	-	-	

N.D.: No mutant colonies were detected on the plate, with those data being excluded from the calculation of mutant frequency.

Table 13 Comet assay in the livers of B6C3F1 *gpt* delta male mice treated with Furan for 13 weeks

	Male			Female		
	Tail moment	Tail length	Tail intensity	Tail moment	Tail length	Tail intensity
0 mg/kg	0.21 ± 0.14	17.27 ± 2.48	2.02 ± 1.21	0.05 ± 0.02	15.15 ± 0.54	0.54 ± 0.21
2 mg/kg	0.19 ± 0.08	18.11 ± 1.50	1.69 ± 0.67	0.07 ± 0.05	14.55 ± 1.48	0.76 ± 0.43
15 mg/kg	0.06 ± 0.03	15.76 ± 1.33	0.70 ± 0.38	0.07 ± 0.05	16.14 ± 0.63	0.78 ± 0.42

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病理組織学的解析

研究分担者 小川 久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部部長
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

天然調味料や香料の一つであり、ミカンコミバエの誘引薬として使用されている methyleugenol (MEUG) はげっ歯類に肝発がん性が報告されているが、その遺伝毒性についてはいまだ明らかではない。一方、近年開発されたレポーター遺伝子導入動物 *gpt delta* マウスは反復投与試験と同条件で実施できる *in vivo* 変異原性試験として注目されている。そこで本研究では、*gpt delta* ラットを用いて 90 日間反復投与毒性試験を行う短期包括試験を MEUG に適用し、MEUG の一般毒性、*in vivo* 変異原性ならびに発がん性を検索し、その発がん機序を明らかにするとともに *gpt delta* ラットを用いた包括試験法の有用性を確認した。その結果、臓器重量において、雄の 100 mg/kg 投与群の肝臓の絶対及び相対重量と雌の 100 mg/kg 投与群の肝臓の相対重量が有意に増加した。血液学的検査においては、雌の 30 mg/kg または 100 mg/kg 投与群で WBC と Plt の数が対照群に比べて有意に増加した。血清生化学的検査では、30 mg/kg 以上の投与群で雄の A/G、Phospholipid、CRN、Cl、IP、AST、ALT と雌の Alb、T-Bil、CRN、Cl、IP が対照群に比べ有意に増加または減少した。しかし、病理組織学的検査では、毒性学的意義を有する変化はなかった。肝臓における *gpt* と Spi アッセイにおいては、雌雄ともに発がん用量である 100 mg/kg 投与群でのみ *gpt* ならびに *red/gam* 変異頻度の有意な増加が見られた。さらに、肝臓における GST-P または PCNA 免疫染色においても、雌雄ともに 100mg/kg の投与群で 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。これらの結果から、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* ラットを用いた本試験法により、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。

A. 研究目的

天然調味料や香料であり、ミカンコミバエの誘引薬として広く使用されている Methyl eugenol (MEUG) はげっ歯類において肝発が

ん性が報告されている。しかし、遺伝毒性試験において陽性または陰性との結果が得られており、その遺伝毒性については不明である。一方、近年開発されたレポーター

遺伝子を導入した *gpt delta* ラットを用いた *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。

そこで本研究では、*gpt delta* ラットを用いて 90 日間反復投与毒性試験を行う短期包括試験を MEUG に適用し、MEUG の一般毒性、*in vivo* 変異原性ならびに発がん性を検索し、その発がん機序を明らかにするとともに *gpt delta* ラットを用いた包括試験法の有用性を確認した。

B. 研究方法

5 週齢の F344 *gpt delta* ラット雌雄各 40 匹ずつを約 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、肝臓及び精巢の重量を測定し、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。

(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

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。(Fig. 1)。雌雄の摂餌量を Fig. 2 と Fig.3 に示す。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 投与群の相対精巢重量が対照群に比べて有意に増加した (Table 1)。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 (Table 2)。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 (Table 3)。血清生化学的検査では、雄の 30 mg/kg 以上の投与群で Cl (Chloride) と AST (aspartate aminotransferase) 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、CRN (creatinine) および ALT (alanine aminotransferase) が有意に増加または減少した。雌では、100 mg/kg 投与群において

Alb、CRN、T-Bil (Total Bilirubin)、Cl、IP (inorganic phosphate) が対照群に比べて有意に増加または減少した (Table 4)。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 (Table 5)。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 (Table 6~9)。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 (Table 10)。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 (Fig. 4)。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 (Fig. 5)。

D. 考察

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。肝臓における GST-P と PCNA 免疫染色においては、100 mg/kg 投与群で雌雄ともに対照群に比べ有意な増加が見られた。これまでの報告から肝臓は MEUG の毒性標的臓器であることから、これらの変化は MEUG の投与によるものであると考えられた。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と 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。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、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 で phospholipid の有意の上昇、100 mg/kg 投与群で A/G、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、T-Bil、CRN が有意に減少、Cl、IP が有意に増加した。しかし、臓器重量においてこれらに関連する有意な変化が認められておらず、また当該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。一方、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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

【参考文献】

- 1) National Toxicology Program (NTP) 2000. Toxicology and carcinogenesis studies of methyleugenol (CAS No. 93 15 12) in F344/n rats and B6C3F1 mice (gavage studies). DRAFT NTP-TR-491; NIH Publication No.98 3950

Table 1. Final body and organ weights for male *gpt* delta rats given 0, 10, 30 or 100 mg/kg MEUG for 13 weeks

Group	Control	10 mg/kg MEUG	30 mg/kg MEUG	100 mg/kg MEUG
No. of animal	10	10	10	10
Body weight	300.0 ± 17.4 ^a	325.0 ± 10.4	322.4 ± 13.7	310.2 ± 35.4
Absolute(g)				
Liver	8.09 ± 0.49	8.22 ± 0.41	8.54 ± 0.41	9.43 ± 0.70 ^{**}
Lung	1.16 ± 0.14	1.15 ± 0.06	1.16 ± 0.11	1.16 ± 0.10
Kidney	1.82 ± 0.11	1.78 ± 0.07	1.84 ± 0.07	1.93 ± 0.08 [*]
Brain	1.93 ± 0.05	1.94 ± 0.03	1.96 ± 0.03	1.96 ± 0.04
Spleen	0.65 ± 0.04	0.65 ± 0.03	0.65 ± 0.03	0.67 ± 0.03
Thymus	0.24 ± 0.05	0.20 ± 0.02	0.22 ± 0.05	0.21 ± 0.03
Heart	0.85 ± 0.06	0.84 ± 0.01	0.84 ± 0.04	0.84 ± 0.04
Adrenal	0.06 ± 0.06	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0	0.05 ± 0.00
Gonad	2.93 ± 0.11	2.91 ± 0.09	2.96 ± 0.13	3.00 ± 0.08
Relative(g/100g B.W.)				
Liver	2.45 ± 0.07	2.53 ± 0.08	2.65 ± 0.08	3.09 ± 0.45 ^{**}
Lung	0.35 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.36 ± 0.03	0.38 ± 0.05
Kidney	0.55 ± 0.01	0.55 ± 0.01	0.57 ± 0.01 [*]	0.63 ± 0.08 ^{**}
Brain	0.59 ± 0.03	0.60 ± 0.02	0.61 ± 0.03	0.64 ± 0.10
Spleen	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.22 ± 0.04
Thymus	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.01
Heart	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.28 ± 0.04
Adrenal	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Gonad	0.89 ± 0.05	0.89 ± 0.03	0.92 ± 0.03	0.99 ± 0.15 [*]

^{*,**}: Significantly different from the controls at the levels of $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Dunnet's test) ^a Mean ± SD.

Table 2. Final body and organ weights for female *gpt* delta rats given 0, 10, 30 or 100 mg/kg MEUG for 13 weeks

Group	Control	10 mg/kg MEUG	30 mg/kg MEUG	100 mg/kg MEUG
No. of animal	10	9	9	9
Body	189.0 ± 5.6	190.3 ± 8.3	187.6 ± 5.3	176.5 ± 9.7
Absolute(g)				
Liver	4.26 ± 0.22	4.34 ± 0.22	4.29 ± 0.22	4.38 ± 0.20
Lung	0.84 ± 0.10	0.8 ± 0.05	0.83 ± 0.09	0.80 ± 0.07
Kidney	1.09 ± 0.04	1.09 ± 0.03	1.09 ± 0.04	1.07 ± 0.04
Brain	1.78 ± 0.03	1.8 ± 0.04	1.77 ± 0.05	1.75 ± 0.04
Spleen	0.41 ± 0.02	0.42 ± 0.02	0.4 ± 0.03	0.40 ± 0.02
Thymus	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.18 ± 0.02
Heart	0.55 ± 0.03	0.54 ± 0.02	0.52 ± 0.02 *	0.50 ± 0.02 **
Adrenal	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.01
Relative(g/100g B.W.)				
Liver	2.26 ± 0.12	2.28 ± 0.14	2.29 ± 0.11	2.48 ± 0.08 **
Lung	0.45 ± 0.06	0.42 ± 0.04	0.44 ± 0.05	0.45 ± 0.05
Kidney	0.58 ± 0.02	0.58 ± 0.02	0.58 ± 0.02	0.61 ± 0.03 *
Brain	0.94 ± 0.03	0.95 ± 0.04	0.94 ± 0.03	1.00 ± 0.06 *
Spleen	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.23 ± 0.02
Thymus	0.1 ± 0.01	0.09 ± 0.04	0.1 ± 0.01	0.10 ± 0.01
Heart	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.01
Adrenal	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00

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

Table 3. Hematological data for F344 *gpt* delta rats given 0, 10, 30 or 100 mg/kg MEUG for 13 weeks

Item	Dose of ME			
	0	10 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg
Male				
No. of animals examined	10	10	10	10
WBC ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	34.9 \pm 5.6	46.1 \pm 7.7	46.5 \pm 5.8	48.7 \pm 7.5
RBS ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	923.5 \pm 31.9	964.1 \pm 42.1	919.1 \pm 33.9	945.7 \pm 34.3
Hb (g/dL)	15.8 \pm 0.6	15.6 \pm 0.2	15.4 \pm 0.5	15.8 \pm 0.6
Ht (%)	51.7 \pm 2	51.1 \pm 2.1	50.0 \pm 1.8	51.4 \pm 1.8
MCV (fL)	56.0 \pm 0.5	53.0 \pm 0.4	54.3 \pm 0.3	54.4 \pm 0.5
MCH (pg)	17.2 \pm 0.2	16.2 \pm 0.6	16.7 \pm 0.4	16.7 \pm 0.4
MCHC (g/dL)	30.6 \pm 0.5	30.5 \pm 1	30.8 \pm 0.7	30.8 \pm 0.8
Plt ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	74.6 \pm 8.1	66.1 \pm 4.2	71.6 \pm 5.7	70.3 \pm 3.3
Differential leukocyte counts (%)				
Band form neutrophils	1.6 \pm 1.1	1.4 \pm 1.0	2.1 \pm 1.1	1.6 \pm 1.0
Segmented neutrophils	28.5 \pm 9.4	35.4 \pm 8.5	29.5 \pm 6.3	29.9 \pm 6.2
Eosinophils	1.5 \pm 1.0	1.0 \pm 0.3	1.2 \pm 0.5	0.8 \pm 0.7
Basophils	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Lymphocytes	68.0 \pm 8.7	61.9 \pm 8.1	66.7 \pm 6.2	67.7 \pm 6.2
Monocytes	0.3 \pm 0.4	0.2 \pm 0.3	0.5 \pm 0.7	0.2 \pm 0.3
Reticulocytes	1.4 \pm 1.2	2.6 \pm 1.5	2.7 \pm 2.1	4.0 \pm 2.1
Female				
No. of animals examined	10	9	9	9
WBC ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	34.9 \pm 5.6	34.6 \pm 10.6	44.8 \pm 8.9 ^a	31.7 \pm 5.6
RBS ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	923.5 \pm 31.9	916.5 \pm 31.0	896.7 \pm 29.2	877.0 \pm 56.9
Hb (g/dL)	15.8 \pm 0.6	15.5 \pm 0.6	15.4 \pm 0.4	15.5 \pm 0.8
Ht (%)	51.7 \pm 2	50.9 \pm 1.8	50.0 \pm 1.6	49.1 \pm 2.8
MCV (fL)	56.0 \pm 0.5	55.6 \pm 0.4	55.8 \pm 0.4	56.7 \pm 0.2
MCH (pg)	17.2 \pm 0.2	17.0 \pm 0.2	17.2 \pm 0.4	17.9 \pm 0.5
MCHC (g/dL)	30.6 \pm 0.5	30.5 \pm 0.3	30.8 \pm 0.7	31.5 \pm 1.0
Plt ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	74.6 \pm 8.1	72.4 \pm 2.7	59.3 \pm 3.3	84.7 \pm 5.4 ^{a*}
Differential leukocyte counts (%)				
Band form neutrophils	1.1 \pm 0.7	1.3 \pm 0.7	1.9 \pm 0.7	2.0 \pm 1.0
Segmented neutrophils	21.5 \pm 4.6	25.1 \pm 4.1	20.3 \pm 5.0	20.7 \pm 5.3
Eosinophils	1.1 \pm 0.7	1.3 \pm 0.6	1.0 \pm 0.9	0.7 \pm 0.5
Basophils	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Lymphocytes	75.9 \pm 5.2	72.1 \pm 4.2	76.1 \pm 4.9	76.2 \pm 5.7
Monocytes	0.4 \pm 0.4	0.2 \pm 0.3	0.6 \pm 0.5	0.4 \pm 0.4
Reticulocytes	4.4 \pm 2.7	4.4 \pm 3.0	5.9 \pm 2.5	6.6 \pm 4.2

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 F344 *gpt* delta rats given 0, 10, 30 or 100 mg/kg MEUG for 13 weeks

Item	Dose of methyl eugenol (P.O.)			
	Cont	10 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg
Male				
No. of animals examined	10	10	10	10
TP (g/dl)	6.56 ± 0.14 ^a	6.57 ± 0.14	6.65 ± 0.12	6.45 ± 0.20
A/G	1.84 ± 0.05	1.96 ± 0.14	1.93 ± 0.09	2.05 ± 0.12**
Alb (g/dl)	4.25 ± 0.08	4.35 ± 0.10	4.38 ± 0.08	4.33 ± 0.16
T-Bil (mg/dl)	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
Glucose (mg/dl)	172.00 ± 14.72	159.50 ± 16.33	150.70 ± 14.71	160.10 ± 20.52
TG (mg/dl)	134.70 ± 30.59	168.30 ± 21.06	193.90 ± 68.33	188.00 ± 62.09
Phospholipid (mg/dl)	114.10 ± 7.37	119.00 ± 4.64	129.20 ± 10.79*	125.70 ± 15.78
TC (mg/dl)	70.40 ± 2.67	70.10 ± 4.89	72.70 ± 5.21	66.20 ± 7.48
BUN (mg/dl)	18.61 ± 1.55	19.57 ± 1.15	19.86 ± 1.84	19.45 ± 2.40
CRN (mg/dl)	0.33 ± 0.03	0.33 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.29 ± 0.02**
Na (mEq/l)	144.20 ± 0.79	144.80 ± 0.42	144.20 ± 0.92	144.00 ± 1.25
Cl (mEq/l)	104.50 ± 0.85	103.70 ± 0.82	103.30 ± 1.06*	103.20 ± 1.40*
K (mEq/l)	4.35 ± 0.21	4.23 ± 0.19	4.26 ± 0.16	4.16 ± 0.21
Ca (mg/dl)	10.09 ± 0.17	10.07 ± 0.23	10.18 ± 0.20	10.21 ± 0.41
IP (mg/dl)	4.80 ± 0.57	5.18 ± 0.67	5.20 ± 0.52	5.75 ± 0.34**
AST (IU/l)	107.50 ± 23.80	92.60 ± 15.69	83.40 ± 19.96*	78.40 ± 7.83**
ALT (IU/l)	75.00 ± 21.09	63.90 ± 11.11	62.00 ± 22.14	55.40 ± 7.60*
ALP (IU/l)	410.80 ± 22.70	427.10 ± 26.33	409.20 ± 25.68	383.50 ± 35.19
Female				
No. of animals examined	10	9	9	9
TP (g/dl)	7.11 ± 0.33	6.96 ± 0.23	6.83 ± 0.29	6.67 ± 0.27
A/G	2.27 ± 0.15	2.24 ± 0.17	2.28 ± 0.18	2.24 ± 0.11
Alb (g/dl)	4.93 ± 0.22	4.80 ± 0.15	4.74 ± 0.24	4.61 ± 0.17**
T-Bil (mg/dl)	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01*	0.05 ± 0.01**
Glucose (mg/dl)	129.50 ± 18.82	115.78 ± 11.69	133.67 ± 13.35	131.00 ± 18.48
TG (mg/dl)	56.40 ± 22.13	43.00 ± 13.81	69.56 ± 40.40	57.56 ± 21.23
Phospholipid (mg/dl)	176.60 ± 20.15	169.67 ± 12.63	177.89 ± 14.84	177.11 ± 14.26
TC (mg/dl)	103.30 ± 11.20	101.56 ± 8.71	103.89 ± 6.83	102.00 ± 7.21
BUN (mg/dl)	17.11 ± 2.22	15.89 ± 1.22	15.96 ± 1.50	17.01 ± 0.82
CRN (mg/dl)	0.33 ± 0.03	0.34 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.29 ± 0.01**
Na (mEq/l)	144.40 ± 0.52	144.67 ± 0.71	145.00 ± 0.87	145.11 ± 1.54
Cl (mEq/l)	104.90 ± 0.88	105.67 ± 0.87	105.56 ± 0.88	106.78 ± 1.99*
K (mEq/l)	4.06 ± 0.22	3.98 ± 0.17	3.92 ± 0.10	3.94 ± 0.22
Ca (mg/dl)	10.36 ± 0.31	10.09 ± 0.17	10.39 ± 0.21	10.37 ± 0.24
IP (mg/dl)	4.47 ± 0.46	4.40 ± 0.39	4.49 ± 0.56	4.96 ± 0.33**
AST (IU/l)	71.70 ± 13.28	72.89 ± 8.91	64.56 ± 7.58	66.78 ± 9.81
ALT (IU/l)	39.50 ± 5.13	35.44 ± 5.50	35.56 ± 3.81	35.44 ± 6.54
ALP (IU/l)	266.80 ± 34.54	273.78 ± 40.76	275.11 ± 30.70	266.22 ± 29.80

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

Table 5 Histopathological features in the livers of F344 *gpt* delta rats given 0, 10, 30 or 100 mg/kg MEUG for 13 weeks.

Sex	Organs	Findings	Groups No. of animals	Male				Female				
				Cont	10 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	Cont	10 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	
				10	10	10	10	10	9	9	9	
	Survival rate			100%	100%	100%	100%	100%	90%	90%	90%	90%
	Liver	Altered foci		0*(0 ^b)	1(10)	0(0)	1(10)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
		Focal necrosis		3(30)	3(30)	3(30)	6(60)	2(20)	3(33.3)	2(22.2)	2(22.2)	2(22.2)
		Single cell necrosis		4(40)	6(60)	3(30)	2(20)	7(70)	6(66.7)	1(11.1)	3(33.3)	3(33.3)
		Centrilobular hepatocell hypertrophy		0(0)	0(0)	0(0)	2(20)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
		Microgranuloma		1(10)	0(0)	0(0)	1(10)	5(50)	5(55.6)	2(22.2)	0(0)	0(0)
		Angiectasis		2(20)	2(20)	2(20)	1(10)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	Spleen	Brown pigmentation		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	5(55.6)**	5(55.6)**	4(44.4)**	4(44.4)**
		Fibrosis		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(11.1)	0(0)	0(0)	0(0)
	Lung	Focal hemorrhage		0(0)	0(0)	1(10)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
		Mineralization		0(0)	6(60)**	1(10)	1(10)	0(0)	0(0)	1(11.1)	1(11.1)	1(11.1)
		Collection of foam cell		1(10)	0(0)	0(0)	0(0)	1(10)	0(0)	0(0)	1(11.1)	1(11.1)
		Osseous metaplasia		0(0)	0(0)	1(10)	0(0)	1(10)	0(0)	1(11.1)	0(0)	0(0)
	Kidney	Hyalin cast		1(10)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
		Tubular regeneration		8(80)	8(80)	10(100)	9(90)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
		Mineralization		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(11.1)	0(0)	1(11.1)	1(11.1)
		Inflammatory cell infiltration		0(0)	0(0)	1(10)	0(0)	1(10)	1(11.1)	0(0)	1(11.1)	1(11.1)
	Heart	Focal myocardial inflammation		10(100)	9(90)	9(90)	8(80)	1(10)	2(22.2)	1(11.1)	0(0)	0(0)
		Fibrotic degeneration		0(0)	1(10)	1(10)	0(0)	1(10)	1(11.1)	2(22.2)	0(0)	0(0)
		Endocardial proliferation		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(11.1)	0(0)	0(0)	0(0)
		Arteritis		0(0)	0(0)	0(0)	1(10)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	Tongue	Inflammatory cell infiltration		1(10)	0(0)	0(0)	1(10)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	Mammary gland	Proliferation		4(40)	2(20)	6(60)	2(20)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
		Granuloma		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(11.1)	0(0)	0(0)	0(0)
	thyroid gland	Ultimobranchial cyst		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(11.1)	0(0)	0(0)	0(0)
	Parotid gland	Mineralization		1(10)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	Pituitary gland	Focal hyperplasia of anterior lobe		0(0)	1(10)	1(10)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	Spinal cord cervical	Demyelination		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(11.1)	0(0)	0(0)
	Breastbone	Nonsuppurative necrosis		8(80)	9(90)	9(90)	10(100)	9(90)	9(100)	7(77.8)	9(100)	9(100)
	Salivary gland	Vacuolar degeneration		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(10)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	Cecum	Loss of the mucosal epithelium		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(11.1)	0(0)	0(0)
	Pancreas	Inflammatory cell infiltration		1(10)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
		Atrophy of exocrine gland		1(10)	1(10)	0(0)	4(40)	0(0)	0(0)	1(11.1)	1(11.1)	1(11.1)
		Nesidioblastosis		0(0)	1(10)	0(0)	0(0)	4(40)	2(22.2)	0(0)	1(11.1)	1(11.1)
	Epididymis	Inflammatory cell infiltration		0(0)	2(20)	0(0)	0(0)	-	-	-	-	-
	Prostate gland	Prostatitis		1(10)	0(0)	0(0)	0(0)	-	-	-	-	-
	Ovary	Cyst		-	-	-	-	2(20)	1(11.1)	0(0)	0(0)	0(0)
	Harder gland	Fibrosis		1(10)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
		Inflammatory cell infiltration		1(10)	0(0)	1(10)	1(10)	2(20)	1(11.1)	1(11.1)	1(11.1)	1(11.1)
	Adrenal gland	Cortical hyperplasia		0(0)	1(10)	0(0)	1(10)	1(10)	1(11.1)	0(0)	0(0)	0(0)

a: The number of animals with histopathological lesions. b: The incidence(%) of histopathological lesions -: Not examined
 *, **; Significantly different from the controls at the levels of $p < 0.05$, 0.01 , respectively (Fisher's exact test)

Table 6. *gpt* MFs in the liver of male *gpt* delta rats given 0, 10, 30 or 100 mg/kg MEUG for 13 weeks

Groups	Animal No.	Cm ^R colonies(x10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant Frequency (x10 ⁻⁵)	Mean±S.D.
Control	1	3.4	2	0.59	0.53 ± 0.18
	2	4.5	2	0.44	
	3	4.5	3	0.67	
	4	2.9	2	0.69	
	5	7.6	2	0.27	
10 mg/kg MEUG	11	9.5	4	0.42	0.79 ± 0.34
	12	4.8	6	1.25	
	13	3.0	2	0.66	
	14	1.9	2	1.03 ^a	
	15	5.3	3	0.57	
30 mg/kg MEUG	21	2.5	1	0.40	0.79 ± 0.42
	22	5.5	8	1.45	
	23	4.9	3	0.61	
	24	7.3	7	0.96	
	25	3.6	2	0.55	
100 mg/kg MEUG	31	6.0	12	2.20	1.35 ± 0.60*
	32	4.1	3	0.73	
	33	8.3	8	0.96	
	34	3.5	4	1.14	
	35	3.6	6	1.69	

*: Significantly different from the control group at p<0.05 (Dunnet's test).

^a: Data of animal No.14 was excluded for the calculation of MF because of the poor packaging efficiency of the transgene.