

201131010B

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21年度～平成23年度 総合研究報告書

研究代表者 西川 秋佳

平成24(2012)年 5月

目 次

I. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 81

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 82

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）
総合研究報告書

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り、マウスにおいて肺発がん性が知られている 1-methylnaphthalene (1-MN) について *gpt delta* マウスを用いた短期包括的試験を実施し、1-MN は標的臓器の肺において遺伝毒性を示さないことが明らかとなった。さらに、げっ歯類において肝発がん性が知られている香料物質の estragole をラットに投与し、発がん過程早期の遺伝子変動を分子病理学的に解析した結果、その肝発がん機序には DNA 付加体形成に起因した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の関与の可能性を示した。（小川）げっ歯類において肝発がん性が報告されている香料の methyl eugenol (MEUG) について *gpt delta* ラットを用いた短期包括的試験を実施し、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を示した。さらに、本短期包括的試験法は一般毒性のみならず GST-P 陽性巣や PCNA 陽性細胞の定量解析により肝発がん性予測ならびに標的臓器における変異原性評価が可能であることを示した。（梅村）げっ歯類において肝発がん性が知られている香料物質 furan-substituted 物質の基本骨格である

furan について、*gpt delta* ラットを用いた短期包括的試験を実施し、本試験法は、一般毒性プロファイル、肝発がん性（GST-P 陽性巣の増加、胆管線維症の発現）ならびに標的臓器における変異原性評価が可能であることを示した。また、furan のラット肝発がん機序に遺伝毒性メカニズムは関与していない可能性を示した。さらに、*gpt delta* マウスを用いた *in vivo* 変異原性包括試験においても、肝臓における *in vivo* 変異原性評価及びコメットアッセイ、骨髄を用いた小核試験の結果が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も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、比較的短期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
安全性生物試験センター長

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

A. 研究目的

食品添加物などの環境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*では小核試験などが実施されるが、*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。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。本試験法では、

一般毒性、変異原性さらに発がん性を短期間に包括的な評価が可能であり、厚生労働行政の中心的課題の一つであ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）

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知られている。しかしながら、その遺伝毒性については明らかではない。本研究では、1-MNの遺伝毒性を明らかにし、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（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）。1-MNとestragoleは和光純薬工業株式会社から、safroleはシグマアルドリッチジャパン株式会社から購入した。本試験は国立医薬品食品衛生研究所「動物実験に関する指針」に従って実施された。実験Iの動物は5週齢の雌雄B6C3F₁系*gpt delta*マウスを国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 動物管理室より受領し、実験IIの動物は5週齢のF344系

ラットを日本エスエルシー株式会社（静岡）より購入した。そしてCRF-1粉末または固形飼料（オリエンタル酵母工業株式会社、東京）と水道水で1週間馴化飼育した。動物の飼育室内の環境は温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数18回/時（オールフレッシュ）、12時間蛍光灯照明/12時間消灯であり、この条件下で飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージ3~5匹ずつ収納し、床敷は三協ラボサービス社（東京）のソフトチップを用い、週2回交換を行った。

〈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、コーン油に肺発がん性が認められた0、0.75または0.15%濃度の1-MNを溶解し、粉末飼料に混じて13週間投与した。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。期間中、餌の交換は週1回、一般状態観察を毎日1回実施した。また、体重および摂餌量の測定は週1回行った。実験終了後、投与最終日に全動物を一晩絶食させ、翌日に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2つの群にはestragoleの 600 mg/kg

bw 4週間強制経口投与あるいは0.5% safroleを同期間混餌投与した。また、2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の免疫染色をした。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。

II. 香料物質の反復投与毒性と病理組織学的解析（小川）

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おり、遺伝毒性試験においては陽性または陰性との結果が得られていることから、その遺伝毒性については未だ明らかではない。本研究では、MEUGの*in vivo* 変異原性を明らかにし、その肝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、F344 *gpt delta*ラットを用いた90日間反復投与毒性試験を行った。

〈実験〉 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、3つの群には10、30または100 mg/kg（発がん用量）のMEUGを強制経口投与した。実験期間中、餌の交換は週1回、一般状態観察を毎日1回実施した。また、体重および摂餌量の測定は週1回行った。実験終了後、投与最終日に全動物を一晩絶食させ、翌日に全部の生存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℃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)

化学構造中に発がん性が知られている置換基を有する香料物質の代表例にfuran-substituted物質が挙げられる。Furan-substituted物質の基本骨格であるfuranはげっ歯類において肝臓での発がん性が確認されており、近年、レトルト食品や缶詰製品などの加熱食品中にその存在が認められていることから、ヒトへの健康被害が危惧されている。しかしながら、Furanの遺伝毒性は明確になっていないため、その発がん機序は不明である。本研究では、本試験法の有用性を示すと共に、その発がん機序解明を目的とし、furanの*gpt* deltaラットあるいはマウスを用いた短期包括的試験並びに各種解析を行った。Furanは和光純薬工業株式会社から購入した。本試験は国立医薬品食品衛生研究所「動物実験に関する指針」に従って実施された。動物は6週齢の雌雄F344系*gpt* deltaラットを日本エスエルシー株式会社(静岡)より購入、5週齢の雌雄B6C3F₁系*gpt* deltaマウスを国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 動物管理室より受領し、CRF-1固形飼料(オリエンタル酵母工業株式会社、東京)と水道水で1週間

馴化飼育した。動物の飼育室内の環境は温度24±1℃、湿度55±5%、換気回数18回/時(オールフレッシュ)、12時間蛍光灯照明/12時間消灯であり、この条件下で飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージ3~5匹ずつ収納し、床敷は三協ラボサービス社(東京)のソフトチップを用い、週2回交換を行った。

<実験1> 7週齢のF344系*gpt* deltaラット雌雄各群10匹に発がん用量として報告されている8 mg/kgを最高用量に設定し、発がん用量であり、これまでの13週間亜慢性毒性試験で毒性影響が認められた最低用量である4 mg/kgを下回る2 mg/kgを低用量に設定した。Furanはコーンオイルに溶解させ、週5日、13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。期間中、餌の交換は週1回、一般状態観察を連日実施した。また、体重および摂餌量の測定は週1回行った。投与最終日に全動物を一晩絶食させ、翌日の剖検時にエーテル麻酔下にて採血を行い、血液学的検査および血清生化学的検査を実施した。主要臓器の重量測定を行い、他の器官・組織と共にホルマリン固定後、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。*In vivo*変異原性の評価として、肝臓におけるレポーター遺伝子変異頻度解析および骨髄における小核試験を実施した。さらに、肝臓における前癌病変であるGST-P陽性肝細胞巢の定量解析を実施した。

<実験2> 7週齢の雄の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静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、各葉の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、各葉の残りは*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。*In vivo*変異原性の評価として、外側左葉及び尾状葉におけるレポーター遺伝子変異頻度の解析を行った。

＜実験3＞ 6週齢の雄のB6C3F₁系*gpt delta*マウスに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、週5日、4あるいは13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、コメッ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。

統計処理は以下のように実施した。体重、臓器重量、血液学検査、血清生化学的検査、肝組織中レポーター遺伝子変異頻度および

コメットアッセイについては、各群の分散比をBartlettの方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、不等分散の場合はKruskal-Wallisの方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Dunnnettの方法で対照群と投与群との間の有意差検定を行った。骨髄を用いた小核試験については、Fischerの直接確率検定を行った。

（倫理面への配慮）

動物実験は、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（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%以上の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)。血清生化学的検査においては、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 (chloride) の有意な増加が見られた (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. 3)。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 (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、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 (Table 8)。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 (Table 8)。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 8)。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 (Fig. 4)。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 (Table 9)。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)。

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。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. 6)。雌雄の摂餌量を Fig. 7 と Fig. 8 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 投与群の相対精巣重量が対照群に比べて有意に増加した (Table 10)。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 10)。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 12)。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、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 (Table 13)。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 14)。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 15~18)。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 19)。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. 9)。細胞増殖活性の指標である PCNA の免疫染色では、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. 10)。

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

<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ず、死亡例も認められなかった (Fig. 11)。雌雄ともに摂餌量に変化は認められなかった (Fig.

12)。雄の 8 mg/kg 投与群で最終体重の有意な低値が認められ (Fig. 11)、心臓の実重量の有意な低値、脾臓、肝臓および腎臓の相対重量の有意な高値が認められた。雌においては、8 mg/kg 投与群で肝臓の実重量および相対重量、脾臓の相対重量の有意な高値が認められた (Table 20)。血液学的検査では、雄の 8 mg/kg 投与群で PLT の高値が認められた (Table 21)。血清生化学的検査では、雄の 2 mg/kg 以上の群で ALP の高値、8 mg/kg で A/G 比、T-Bil の有意な高値が認められた。雌においては、2 mg/kg 以上の群で T-Bil の有意な高値が認められた (Table 22)。病理組織学的検査では、雄の 2 mg/kg 以上の群で胆管線維症、胆管増生および卵円形細胞の増生が認められ、8 mg/kg においては肝細胞のアポトーシス、空胞変性およびクッパー細胞の色素沈着も高頻度に認められた。雌においては、2 mg/kg 以上の群で卵円形細胞の増生およびクッパー細胞の色素沈着が認められ、8 mg/kg においては胆管線維症、胆管増生および肝細胞のアポトーシスも高頻度に認められた (Table 23)。小核試験の結果、雄の 8 mg/kg 投与群において、対照群と比較し、小核出現頻度の 2~3 倍程度の有意な増加が認められた。一方、雌において変化は認められなかった (Table 24)。肝臓のレポーター遺伝子変異頻度解析の結果、雌雄共に *gpt* および Spi mutant frequency (MF) は、対照群と比較し有意な差は認められなかった (Table 25~28)。肝臓における GST-P 陽性肝細胞巢の定量解析の結果、雌雄共に 8 mg/kg において、GST-P 陽性肝細胞巢の面積および数の有意な増加が認められた (Fig. 13, 14)。

<実験2> 試験期間中の動物の一般状態に

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 (Table 29)。肝臓病理組織学検査では、投与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 (Table 30)。*In vivo* 変異原性評価の結果、投与4週目の尾状葉における *gpt* および *Spi* 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 (Table 31、32)。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 (Table 33~36)。

＜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。13週目の15 mg/kg 投与の雄において、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 投与群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 (Table 37、38)。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 (Table 39、40)。*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 (Table 41~48)。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 (Table 49)。*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 (Fig. 15~17)。

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。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関連した臓器に顕著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0.075%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、臓器重量においてこれらに関連する顕著な変化は認められておらず、病理組織学的にも関連した臓器に顕著な変化が認められないこと

から、これらの変動は1-MNによるものではないと考えられる。

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、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。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が示唆された。しかし、長期発がん性試験において、肺は標的臓器であり、気管支/肺腺腫の増加が見られることから、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ことが示唆された。1-MNの発がんメカニズムを明らかにするには更なる実験が必要であることが示唆された。

実験2では、*estragole*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、*estragole*投与群の肝臓において変異増殖巣、GST-P陽性細胞巣の数、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*estragole*と*safrole*ともに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*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。一方、*estragole*と*safrole*はラットの肝臓において特異的DNA付加体を形成し、二つとも遺伝毒性を有す

ることが報告されていることから、estragoleの肝発がん早期過程には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。(西川)

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。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。さらに、肝臓はMEUGの標的臓器であることから、これらの変化はMEUGの投与によるものであると考えられた。雄の100 mg/kgまたは300mg/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おらず、また病理組織学的検査においても有意な変化がないことから、これらの変化は毒性学的意義を有しないと考えられる。

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、また病理組織学的検査においても有意な変化がないことから、これらの変化は毒性学的意義を有しないと考えられる。

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。また、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も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たことから、*gpt delta*ラットを用いた毒性試験はMEUGの一般毒性評価が可能であることが示唆された。

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

実験1では、*gpt delta*ラットを用い、furanの短期包括的試験を実施した。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。雄の8 mg/kgにおいて体重増加抑制が認められた。摂餌量に関しては、雌雄共に投与群に変化は認め

られなかった。肝臓重量の高値が 8 mg/kg の雌雄に認められ、血清生化学的検査では、胆管系障害を示唆する T-Bil および ALP の有意な高値が認められた。肝臓の病理組織学的検索においては、投与群で胆管線維症、胆管増生、卵円形細胞の増生、クッパー細胞の色素沈着、肝細胞のアポトーシスおよび空胞変性が認められた。これら胆管系障害、肝細胞障害といった肝臓を標的とした毒性変化は何れも過去に報告されている変化と同様のものであった。また、雌雄の 8 mg/kg において、肝臓における前癌病変である GST-P 陽性肝細胞巢の数および面積の有意な増加が認められた。胆管線維症は、肝細胞癌および肝胆管癌への進展を示唆するものと考えられた。*In vivo* 変異原性評価の結果、雌雄共にレポーター遺伝子変異頻度に変化は認められなかった。一方、小核試験において陽性の結果を示した。Furan は染色体異常誘発性を有する可能性が示唆されたが、標的臓器でのレポーター遺伝子変異頻度に変化が認められなかった。しかしながら、furan 誘発肝胆管癌は肝臓の尾状葉特異的に出現することが報告されており、実験 1 における肝胆管癌の前がん病変である胆管線維症も尾状葉にのみ認められた。従って、furan の変異原性については葉別の解析を含めてさらなる検討が必要であると考えられた。

実験 2 では、furan 誘発肝胆管癌の肝臓葉特異性を考慮し、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、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。*In vivo* 変異原性評価の結果、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、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 3 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 corn oil に溶解させた furan 0、2 及び 15 mg/kg を 4 週間あるいは 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週目では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。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、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。

初年度のfuranを用いた短期包括的試験、前年度の葉毎の*in vivo*変異原性評価及び本年度のマウスを用いた*in vivo*遺伝毒性包括試験の結果から、furanは弱いながらも染色体異常誘発性を有することが示唆された。しかし、肝臓における*in vivo*レポーター遺伝子変異頻度に変化が認められないこと、コメットアッセイが陰性であったことから、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と考えられた。また、本試験法を用いることで同一個体において比較的短期間で、一般毒性、*in vivo*変異原性、そして発がん性まで評価可能であることを確認できた。従って、短期包括的毒性試験法は食品添加物の安全性データを迅速かつ効率的に収集でき、ヒトの食に対する安全を担保する上で大きく貢献できる試験法であると考えられた。

F. 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., inpress.

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, 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.

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stragole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（2010年1月・金沢）

G. 知的所有権の取得状況

なし

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 ($\times 10^3/\mu\text{l}$) | 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 ($\times 10^3/\mu\text{l}$) | 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, [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) ^a Mean ± SD

Table 5. Histopathological findings observed in male and female B6C3F1 *gpt* delta mice given 1-MN for 13 weeks

| Organs and findings | 1-MN No. | Male | | | Female | | |
|--|-------------|---------------------------------|--------|---------|---------|--------|-------|
| | | Control | 0.075% | 0.15% | Control | 0.075% | 0.15% |
| | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Survival rate | | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| Liver | | | | | | | |
| Vacuolization | | 0 ^a (0) ^b | 0(0) | 0(0) | 0(0) | 1(10) | 3(30) |
| Focal necrosis | | 0(0) | 0(0) | 0(0) | 5(50) | 5(50) | 7(70) |
| Single cell necrosis | | 0(0) | 3(30) | 5(50)** | 7(70) | 5(50) | 5(50) |
| Kidney | | | | | | | |
| Inflammatory cell infiltration | | 1(10) | 0(0) | 1(10) | 0(0) | 0(0) | 0(0) |
| Vacuolization | | 5(50) | 8(80) | 9(90) | 0(0) | 0(0) | 0(0) |
| Pancreas | | | | | | | |
| Inflammatory cell infiltration | | 0(0) | 0(0) | 0(0) | 1(10) | 0(0) | 0(0) |
| Stomach | | | | | | | |
| Squamous metaplasia | | 1(10) | 0(0) | 0(0) | 0(0) | 0(0) | 0(0) |
| Adrenal gland | | | | | | | |
| Subcapsular cell hyperplasia | | 1(10) | 1(10) | 3(30) | 7(70) | 8(80) | 7(70) |
| Ureter | | | | | | | |
| Papillary hyperplasia | | 0(0) | 0(0) | 1(10) | 0(0) | 0(0) | 0(0) |
| spinal cord cervical | | | | | | | |
| Cyst formation | | 0(0) | 0(0) | 0(0) | 1(10) | 0(0) | 0(0) |
| Tongue | | | | | | | |
| Ulcer | | 0(0) | 0(0) | 0(0) | 0(0) | 0(0) | 1(10) |
| Lymphoreticular tissue | | | | | | | |
| Lymphoma | | 0(0) | 0(0) | 0(0) | 0(0) | 0(0) | 1(10) |

^a: The number of animals with histopathological lesions.

^b: The incidence(%) of histopathological lesions

** : Significantly different from the controls at the levels of $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Fisher's *t* -test)