

アミノ酸加熱分解産物 MeIQx のラットにおける16週間混餌投与の影響

笠原健一郎[#]・古川 文夫・西川 秋佳・田中丸善洋
金 亨津^{*}・池崎信一郎・高橋 道人

Effects of 16-week dietary administration of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline in rats

Ken-ichiro Kasahara[#], Fumio Furukawa, Akiyoshi Nishikawa,
Zen-yo Tanakamaru, Hyoung-Chin Kim^{*},
Shinichiro Ikezaki and Michihito Takahashi

2-Amino-3, 8-dimethylimidazo[4, 5-*f*]quinoxaline (MeIQx), a heterocyclic amine found in cooked meats, is carcinogenic in mice and rats at high doses. In order to examine the toxicity including preneoplastic changes at the lower doses, a total of 170 male Fischer 344 rats were administered MeIQx for 16 weeks at a dose of 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 ppm or 0 ppm in the diet. The numbers of GST-P positive foci and BrdU-labeling indices in the liver were significantly increased by the dietary administration of 10 ppm and 1 ppm or more of MeIQx respectively, when compared with the basal diet-fed control rats. Aberrant crypt foci (ACF) were also significantly increased in the 100 ppm MeIQx group as compared to the control value. No histopathological changes indicating obvious toxicity of MeIQx were observed in the major organs other than the liver and large intestine. In conclusion, our results clearly indicate that MeIQx selectively targets the liver and large intestine of rats as organs for the toxicity, but dose not affect the other major organs at low doses.

Keywords : MeIQx, toxicity, liver, colon

(Received May 30, 1997)

緒 言

2-Amino-3, 8-dimethylimidazo[4, 5-*f*]quinoxaline (MeIQx) は加熱した食品, 特に焦げた部分に多く含まれるアミノ酸加熱分解産物 heterocyclic amines (HCAs) の一つで, Kasai らによって1981年に fried beef から分離された¹⁾ (Fig. 1). HCAs はクレアチニン, アミノ酸, 糖などの混合物が加熱されることにより生成され, ラットにおける長期投与では400ppmの混餌投与で肝臓, ジンバル腺, 陰核腺および皮膚に²⁾, マウスでは600ppmの混餌投与で肝臓, 肺および造血器における腫瘍発生が報告されている³⁾. しかしながら, MeIQxを含めたHCAsの低濃度域における生体への影響については十分な知見が得られていない. 今回, 低濃度域を含む MeIQx を用いた16週間の亜慢性毒性試験を行い, ラットの主要臓器における毒性影響について病理組織学的に検索した.

試験材料および方法

1. 被験物質および使用動物

MeIQx はナード研究所 (大阪) より購入した. 3週齢の F344/DuCrj 系雄性ラット (SPF), 170匹を日本チャールス・リバー社 (神奈川) より購入し, 無作為に7群 (1, 2群; 各群10匹, 3~7群; 各群30匹) に分け試験に供した. 動物の飼育は, 室温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時間消灯のバリエーションシステム飼育室にて行った. 動物はポリカーボネート製ケージに5匹ずつ収容した. 床敷は三協ラボサービ

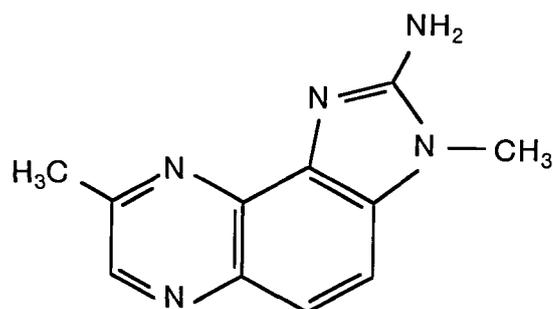


Fig. 1. Chemical structure of MeIQx

[#] To whom correspondence should be addressed: Ken-ichiro Kasahara; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo, 158, Japan; Tel: 03-3700-9819 Fax: 03-3700-2348 E-mail: Kasahara@nihs.go.jp

^{*} 韓国化学研

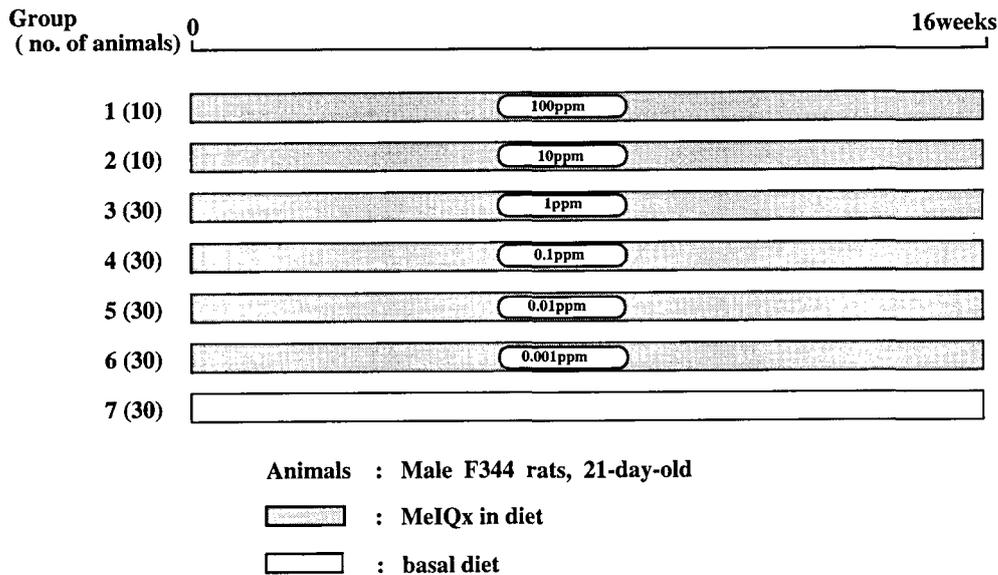


Fig. 2. Experimental design

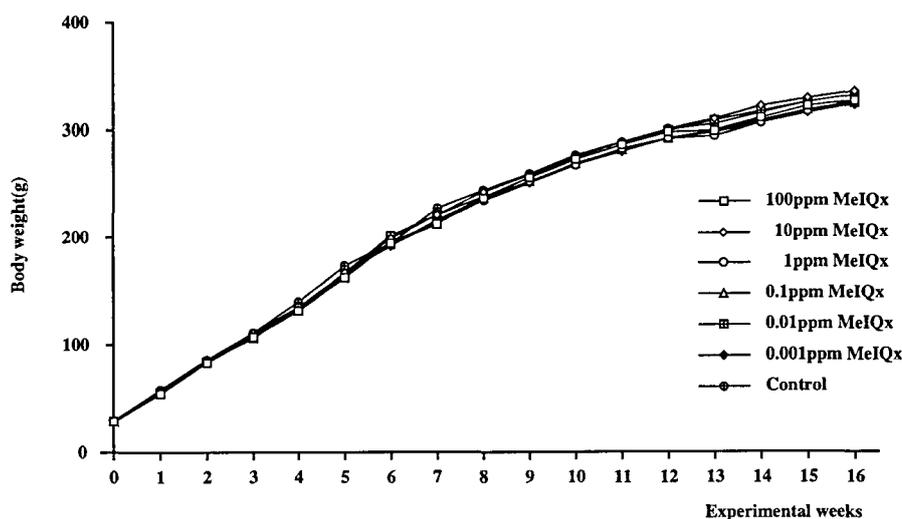


Fig. 3. Body weight curves for rats treated with MeIQx for 16 weeks

ス社(東京)のソフトチップ用い, 週2回の交換を行った。飲料水は水道水を自由摂取させた。

2. 試験方法

被験物質投与群(1~6群)は最高用量を100ppmとし, 以下公比10で減じて最低用量を0.001ppmとした MeIQx を, 基礎飼料 MF 粉に混合し(オリエンタル酵母工業(株), 東京), 16週間自由摂取させた。また, 対照群(7群)には同期間基礎飼料のみを与えた(Fig.2)。試験期間中, 全動物の一般状態を観察し, 体重を週1回, 摂餌量を第4週まで週1回, その後4週間に1回の計測を行った。投与最終日に全動物を一晩絶食させた。エーテル麻酔下で開腹, 腹部大動脈より放血死させた後, 剖検を行い, 諸臓器を摘出後, 肉眼的に観察した。心臓, 肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副

腎, 精巣は臓器重量測定後, 甲状腺(上皮小体を含む), 胸腺, 脾臓, 消化管, 生殖器, 膀胱, 皮膚および肉眼的異常部位と共に10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。固定後, 各臓器および組織を切り出し, 常法に従ってパラフィン包埋後薄切, ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施し, 対照群および最高用量群について病理組織学的検索を行った。また, いずれかの臓器に変化が見られた場合, 当該臓器の全用量群について同様の検索を行った。肝臓は解剖時に全動物の左葉1ヶ所, 中間葉2ヶ所を切り出した。これらの組織切片は冷ホルマリン液で固定し, パラフィン包埋後薄切, glutathione S-transferase placental form (GST-P) および 5-bromodeoxyuridine (BrdU) について免疫組織化学的染色を実施した。GST-P 染色は抗 GST-P 抗

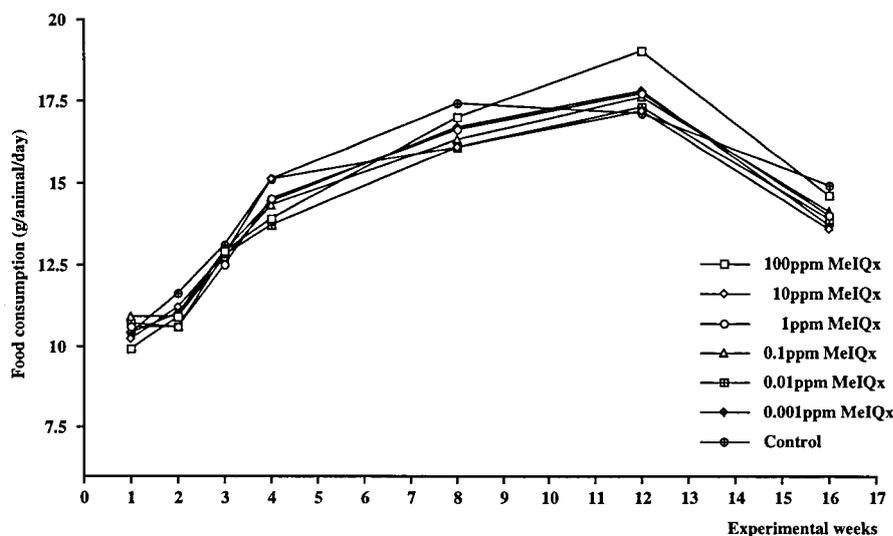


Fig. 4. Food consumption of rats treated with MeIQx for 16 weeks

Table 1. Histopathological findings of major organs other than the liver and large intestine

Control(No. rats examined= 30)				100ppm MeIQx(No.rats examined=10)			
Organ	Findings	No. of rats with	%	Organ	Findings	No. of rats with	%
Thyroid	ultimobranchial cyst	3	10.0	Thyroid	ultimobranchial cyst	2	20.0
Heart	cellular infiltration	6	20.0	Heart	ectopic thymus	1	10.0
Lung	calcification of arterial wall	1	3.3	Heart	cellular infiltration	1	10.0
	ossification	1	3.3	Kidney	tubular basophilia	1	10.0
Spleen	capsulitis	1	3.3	Prostate	cellular infiltration	1	10.0
Kidney	tubular basophilia	2	6.7				
	hyaline cast	3	10.0				
Pancreas	focal atrophy	2	6.7				
Testis	atrophy of seminiferous tubule	1	3.3				

体 (MBL, 名古屋), BrdU 染色は抗 BrdU 抗体 (DAKO, 京都) を用いた. GST-P は Vectastain Elite ABC キット (フナコシ, 東京) で, また, BrdU はストレプトアビジン-ビオチン複合体法により行った. 染色後, 全葉の GST-P 陽性肝細胞巢数および単位面積あたりの BrdU 陽性率を光学顕微鏡下で計測した. 大腸は全動物について, ホルマリン固定後, 2% メチレンブルーで粘膜面を染色し, 透過顕微鏡下で aberrant crypt foci (ACF) の発生個数を計測した. 計測後, 他臓器と同様に組織学的検索に供した. 体重, 臓器重量, 摂餌量および摂水量, 肝 GST-P 陽性細胞巢数, BrdU 陽性率および大腸 ACF 数について各群毎に平均値および標準偏差を求め, 対照群との差を Student の t 検定により

統計学的に解析した.

結 果

1. 一般状態

試験期間中の動物の一般状態については, いずれの群においても特記すべき変化は見られず, すべての動物が試験終了時まで生存した.

2. 体重および臓器重量

試験期間中の各群の体重推移を Fig. 3 に示す. いずれの投与群も対照群との間に差は見られなかった. また臓器重量においても各投与群とも対照群との間に差は見られなかった.

3. 摂餌量

各群の摂餌量を Fig. 4に示す。いずれの投与群も試験期間を通して対照群との間に差は見られなかった。

4. 病理組織学的検索

HE染色標本による光顕的検索では、100ppm MelQx 投与群の肝臓において好塩基性肝細胞巣が観察されたが、10 ppm以下の群では観察されなかった。免疫染色の結果、単位面積当たりのGST-P陽性肝細胞巣数(／cm²)は10ppmおよび100ppm群で各々平均1.04および58.25であり、対照群の平均0.38に比し、有意な増加(p<0.05および0.001)がみられた。また、肝細胞のBrdU陽性率(%)は1 ppm, 10 ppmおよび100ppm投与群で、各々平均0.28, 0.36および0.50であり、対照群の平均0.18に比し、有意に(p<0.05或いは0.01)増加した。大腸ACFは大型の杯細胞を多数有するcryptからなり、対照群を含む全群に観察されたが、対照群および投与群の間に形態学的な差異は認められなかった。また、その数は100ppm MelQx 投与群の平均4.1個であり対照群の平均1.0個に比し、有意に(p<0.01)増加した。

その他の臓器では、甲状腺における鰓後体遺残(対照群3例, 100ppm MelQx 投与群2例)および異所性胸腺(100 ppm MelQx 投与群1例)、心筋間質におけるリンパ球、マクロファージを主とする細胞浸潤(対照群6例, 100ppm MelQx 投与群1例)、肺における血管壁の石灰化(対照群1例)および骨化生(対照群1例)、脾臓における被膜炎(対照群1例)、腎臓における好塩基性尿細管(対照群2例, 100ppm MelQx 投与群1例)および硝子様円柱(対照群3例)、膵腺房の限局性萎縮(対照群2例)、前立腺間質における細胞浸潤(100ppm MelQx 投与群1例)、精巣における精細管萎縮(対照群1例)が観察された。しかしながら、発生例数および変化の程度において対照群と100ppm MelQx 投与群との間に明らかな差異は見られなかった(Table 1)。

考 察

³²P-postlabeling methodによる検索では、0.4~400ppmのMelQx投与によって、用量および投与期間に相関した肝臓におけるDNA-adduct formationが報告されている⁹⁾。また、MelQxおよびそのDNA-adductが投与終了後も数日間検出されており、標的臓器における停滞が示唆されている⁹⁾。HE標本による検索では100ppm投与群に肝細胞の小増殖巣が観察されたが、本実験でみられたように好塩基性を示す小増殖巣は、その後結節性増殖巣、さらには肝癌に進展するものが多いと考えられている⁹⁾。GST-PおよびBrdUによる免疫組織化学的検索によって、各々10ppmおよび1 ppm投与における単位面積当たりの陽性細胞巣数あるいは陽性率の有意な増加が観察され、より低い濃度で

の前腫瘍性病変の検索が可能となった。また、投与12週時における0.1ppm, 0.01ppm, 0.001ppm各投与群ラットのMelQx平均摂取量は各々1.80, 0.17, 0.018μg/rat/dayであったが、ヒトにおけるMelQx曝露量(0.2~2.6μg/person/day)に近似しており⁹⁾、MelQxの発癌リスクを評価する上で有用な結果と考えられた。

他のHCAsである2-hydroxyamino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline(IQ)および2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-c]pyridine(PIhP)によるラット大腸の腫瘍発生が知られているが^{7,8)}、MelQx投与による大腸腫瘍そのものの発生は観察されていない⁹⁾。しかしながら、MelQxを含めこれらHCAsによるACFの誘発実験では、いずれにおいても有意な増加が認められており^{9,10)}。IQによって増加したACFではKi-ras geneのtransversion(codon12; GGT→GAT, codon13; GGC→GCC)が報告されている。Azoxymethane誘発の大腸腫瘍ではras geneのmutationが⁸⁾観察されているにもかかわらず、IQによる大腸腫瘍ではras mutationは認められていないことから、これらHCAsによるACF誘発は大腸腫瘍発生における初期段階の変化と考えられている¹¹⁾。今回の実験においても100ppmのMelQx投与によってACFが有意に増加し、MelQx投与群でc-K-ras geneのtransversion(codon12; GGT→GAT)が1例のみ観察されたが、その形態を含め、対照群との間に明らかな差異は見られなかった¹²⁾。ACFの生物学的な意義および大腸発癌との関連性については今後さらに詳細な検討が必要と思われる。

一方、PIhPの長期投与によってラットの心筋細胞に変性、壊死などの毒性病変が観察されており、その作用機序として心筋ミトコンドリアにおけるDNA-adduct formationが考えられている¹³⁾。このような心臓病変を形成するPIhPのadduct formationは主として心臓、肺、膵臓および大腸であり、肝臓では最も低い頻度であることが報告されている。これに対して、MelQx投与によって形成されるDNA-adduct formationは主として肝臓、腎臓、膵臓および大腸で認められているが¹⁴⁾、400ppmのMelQx投与によって、ごく僅かながら心臓におけるDNA-adduct formationが観察されており¹⁵⁾、心病変誘発の可能性は否定できない。しかしながら、今回の実験で観察された心臓における軽度の細胞浸潤は対照群を含む全群に見られ、またその程度も軽微なものであった。従って、本実験条件下で観察された心病変は、他の臓器に観察された病変同様、発生例数、およびその病理学組織学的性状から本系統ラットに好発する自然発生病変と考えられた。

以上、16週間のMelQx投与によって、肝臓および大腸に前腫瘍性病変が増加し、MelQxによる発癌の標的性を示唆する所見が得られたが、その他の臓器では100ppmのMelQx投与においても顕著な毒性影響は見られなかった。

文 献

- 1) Kasai, H., Shiomi, T., Sugimura, T. and Nishimura, S.: Synthesis of 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4, 5-f]quinoxaline (MelQx), a potent mutagen isolated from fried beef. *Chem. Lett.*, 675~678(1981)
- 2) Kato, T., Ohgaki, H., Hasegawa, H., Sato, S., Takayama, S. and Sugimura, T.: Carcinogenicity in rats of a mutagenic compound, 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4, 5-f]quinoxaline. *Carcinogenesis*, 9, 71~73(1988)
- 3) Ohgaki, H., Hasegawa, H., Suenaga, M., Sato, S., Takayama, S. and Sugimura, T.: Carcinogenicity in mice of mutagenic compound, 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4, 5-f]quinoxaline (MelQx) from cooked food. *Carcinogenesis*, 8, 665~668(1987)
- 4) Yamashita, K., Adachi, M., Kato, S., Nakagama, H., Ochiai, M., Wakabayashi, K., Sato, S., Nagao, M. and Sugimura, T.: DNA adducts formed by 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4, 5-f]quinoxaline in rat liver: dose-response on chronic administration. *Jpn. J. Cancer Res.*, 81, 470~476(1990)
- 5) Franz, C. E., Bangerter, C., Fultz, E., Mayer, K. M., Vogel, J. S. and Turteltaub, K. W.: Dose-response studies of MelQx in rat liver and liver DNA at low doses. *Carcinogenesis*, 16, 367-373(1995)
- 6) Williams, G. M.: The pathogenesis of rat liver cancer caused by chemical carcinogens. *Biochem. Biophys. Acta*, 605, 167~189 (1980)
- 7) Takayama, S., Nakatsuru, Y., Masuda, M., Ohgaki, H., Sato, S. and Sugimura, T.: Demonstration of carcinogenicity in F344rats of 2-amino-3-methylimidazo[4, 5-f]quinoline from broiled sardine, fried beef and beef extract. *Gann*, 75, 467~470(1984)
- 8) Shirai, T., Tamano, S., Sano, M., Masui, T., Hasegawa, R. and Ito, N.: Carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-b] pyridine in rats. *Princess Takamatsu Symp.*, 23, 232~239(1995)
- 9) Kristiansen, E.: The role of aberrant crypt foci induced by the two heterocyclic amines 2-amino-3-methylimidazo[4, 5-f]quinoline (IQ) and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-b]pyridine (PhIP) in the development of colon cancer in mice. *Cancer Lett.*, 110, 187~192(1996)
- 10) Okonogi, H., Ushijima, T., Shimizu, H., Sugimura, T. and Nagao, M.: Induction of aberrant crypt foci in C57BL/6N mice by 2-amino-9H-pyrido[2, 3-b]indole and 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4, 5-f]quinoxaline (MelQx). *Cancer Lett.*, 111, 105~109(1997)
- 11) Tachino, N., Hayashi, R., Liew, C., Bailey, G. and Dashwood, R.: Evidence for ras gene mutation in 2-amino-3-methylimidazo[4, 5-f]quinoline induced colonic aberrant crypts in the rat. *Molecular Carcinogenesis*, 12, 187~192(1995)
- 12) 田中丸善洋, 森 郁生, 西川秋佳, 古川文夫, 金亨津, 池崎信一郎, 野々山孝, 高橋道人: F344ラットの大腸粘膜にみられた aberrant crypt foci の性状-MelQx 誘発例と自然発生例の比較. 第13回日本毒性病理学会, 81 (1997)
- 13) Takahashi, S., Imaida, K., Shirai, T., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T. and Ito, N.: Chronic administration of the mutagenic heterocyclic amine 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-b]pyridine induces cardiac damage with characteristic mitochondrial changes in Fischer rats. *Toxicol. Pathol.*, 24, 273~277(1996)
- 14) Takayama, K., Yamashita, K., Wakabayashi, K., Sugimura, T. and Nagao, M.: DNA modification by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-b]pyridine in rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, 80, 1145~1148 (1989)
- 15) Overvik, E., Ochiai, M., Hirose, M., Sugimura, T. and Nagao, M.: The formation of heart DNA adducts in F344rat following dietary administration of heterocyclic amines. *Mutat. Res.*, 256, 37~43(1991)