

F344 ラットにおけるアカネ色素の90日間反復投与毒性試験 —慢性毒性・発がん性予備試験—

梶富直哉#・渋谷 淳・豊田和弘・仁保直子・畝山智香子・広瀬雅雄

A 90-day Repeated Dose Toxicity Study of Madder Color in F344 Rats: A Preliminary Study for Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies

Naoya Masutomi#, Makoto Shibutani, Kazuhiro Toyoda, Naoko Niho, Chikako Uneyama and Masao Hirose

A 90-day toxicity study of madder color was performed in F344 rats by feeding the pellet diet containing 0, 0.6, 1.2, 2.5 and 5.0 % of test substance to clarify its toxic potential and to determine the dose levels for the following chronic toxicity/carcinogenicity studies. Body weight gain and food consumption were dose-dependently decreased at 1.2 % or more in males and at 2.5 % or more in females throughout the experimental period. All animals were survived until the end of experiment and subjected to autopsy. Hematologically, the following parameters were fluctuated in relation to the treatment: decreases in the red blood cells, hemoglobin, and hematocrit in females at 2.5 % or more; increase of platelets in males at 2.5 % or more, and in females at 5 %; increase in white blood cells in males at 5 %. Serum protein parameters were also affected by the treatment in males at 1.2 % or more and in females at all doses. Increase in the serum calcium level was observed in males at 2.5 % or more and in females at 5 %. Serum inorganic phosphorus level was also increased in males at 1.2 % or more and in females at 2.5 % or more. At autopsy, both absolute and relative kidney weights of females increased dose-dependently at 0.6 % or more. Relative liver weight in females also increased at 1.2 % or more. Histopathologically, microvesicular vacuolar degeneration of proximal tubules was observed in the kidney of both sexes (males at 1.2 % or more; females at 0.6 % or more). In addition, mononuclear cell infiltration (both sexes) and hyaline casts and tubular regeneration (male) appeared in the kidney at 5 %. In the female liver, focal liver cell necrosis associated with mononuclear cell infiltration was evident at 5%. The results demonstrate the toxic effects of madder color on the liver (in females at 5 %) and kidney (in males at 1.2 % or more; in females at 0.6 % or more) of F344 rats when treated orally for 90 days. In addition, toxicities in hematopoietic system and/or bone would probably be appeared when rats are treated with 1.2 % or more of madder color for long-term over 90 days. NOAEL was determined to be 0.6 % in males, but could not be determined in females under the condition of this study. Based on the results of this study, the dose levels for subsequent chronic toxicity and carcinogenicity studies were determined to be 0.2, 1.0 and 5.0%, and 2.5 and 5.0%, respectively.

Keywords: madder color, repeated dose toxicity study, rat

緒 言

アカネ色素 (Madder color) は、アカネ科セイヨウアカネ (*Rubia tinctorum* LINNE) の根から抽出される天然のアントラキノン系色素である。その色素成分は原料として用いるセイヨウアカネの種類や産地によって多少異なるが、Ruberthric acid や Lucidsin-3-O-primeveroside, Munjistin, Pseudopurpurin, Alizarin, Lucidin, Rubiadin,

Nordamnacnata 等が確認されている¹⁾。アカネ色素は熱や光に対して安定であり、水やエタノールに溶解し、酸性で黄色、中性で赤色を呈し、菓子やデザート、農産加工品、乳飲料、清涼飲料等の着色料として使用されている。

アカネ色素の毒性に関しては、SD系ラットにおける14日間反復経口投与試験のLD50値が雌雄とも5,000 mg/kg以上であり¹⁾、B6C3F1系マウスに5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3 %の割合で90日間混餌投与した結果、雌雄ともに毒性学的影響は認められない²⁾と報告されている。一方、変異原性に関しては細菌を用いた復帰変異試験では代謝活性化の有無に関わらず陽性^{3)~5)}、細菌を用いたDNA修復試験(Rec assay)では代謝活性化なしで弱陽性⁴⁾、ddyマウスを用いた小核試験では陰性⁶⁾であった。発がん性に関しては、長期

To whom correspondence should be addressed:
Naoya Masutomi; Division of Pathology, Kamiyoga 1-18-1,
Setagaya-ku, Tokyo, 158-8501, Japan; Tel:03-3700-9821;
Fax:03-3700-1425; E-mail: masutomi@nihs.go.jp

反復投与によるがん原性試験は実施されておらず、diethylnitrosamine, N-methylnitrosurea 及び dihydroxy-di-N-propylnitrosamine を処置した雄のF344系ラットに2種類のアカネ色素製品をそれぞれ5及び2.5%の用量で16週間混餌投与した多臓器中期発がん性試験において、いずれの臓器においても発がん促進作用が認められていない⁷⁾との報告があるのみである。変異原性試験の知見からアカネ色素が発がん性を有する可能性も推測されるが、その発がん性評価や許容一日摂取量 (ADI) 算出のための十分なデータがない。

我が国では合成添加物に比較して天然添加物についての規格の作成や安全性評価が立ち遅れている。今回、天然添加物の安全性再評価の一環として、アカネ色素の慢性毒性/発がん性併合試験を計画し、その用量設定のための予備試験として90日間の反復投与毒性試験を実施した。

試験材料及び方法

1. 動物

動物は4週齢のF344/DuCrj系ラット (SPF) 雌雄各50匹を日本チャールス・リバー株式会社 (神奈川) より購入し、基礎飼料 (CRF-1 固形飼料, オリエンタル酵母工業株式会社) と水道水で1週間馴化飼育した後、無作為に雌雄各5群 (各群10匹) に分け、試験に供した。動物の飼育はバリヤースシステムの飼育室にて、室温 24 ± 1 °C、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時間消灯の条件下で行った。動物は透明なポリカーボネート製ケージ (幅26 cm、長さ42 cm、高さ17 cm) に5匹ずつ収容し、床敷きは三協ラボサービス株式会社 (東京) のソフトチップを用い、週2回交換を行った。飲料水として、水道水を試験期間中自由に摂取させた。

2. 被験物質及び飼料の調製

被験物質として、三色会より提供されたアカネ色素を用いた。本品は褐色の粉末で、セイヨウアカネ粉末品から50%エタノールにて抽出→濾過→濃縮→デキストリン添加→スプレードライ→混合→粉碎の過程を経て調製された。分析の結果、色素の主成分はRuberythric acid, Lucidin-3-O-primeveroside 及び Alizarin であり、色素含量はRuberythric acid換算で16.1%、色価 (10%E)は204であった。本被験物質中には、本品を粉末状に保つために30%の割合でデキストリンが添加されている。本試験では各群に与える飼料に被験物質に含まれるものと同一ロットのデキストリンを添加して、対照群を含む各用量の飼料中デキストリン含量が全て1.5%となるように調製した。実際に添加したデキストリンの濃度は、アカネ色素5%混入飼料では0%、2.5%混入飼料では0.75%、1.2%混入飼料では1.14%、0.6%混入飼料では1.32%、無添加飼料では1.5%であった。基礎飼料としてオリエンタル酵母工業株式会社のCRF-1を用

い、上記の割合でアカネ色素およびデキストリンを添加した固形飼料を日本農産工業株式会社 (神奈川) に依頼して製造した。混餌飼料中の色素含量を測定した結果、いずれの濃度においても表示値の75%以内であることが確認された。

3. 試験方法

雌雄各5群 (1群10匹) にそれぞれ5%、2.5%、1.2%及び0.6%の割合でアカネ色素を混入した固形飼料を13週間自由に摂取させた。その他に対照群として雌雄各1群にはアカネ色素を含まない飼料を同期間自由に摂取させた。試験期間中、全動物の一般状態を連日観察し、体重および摂餌量の測定を週1回行った。投与最終日に全動物を一晩絶食させた後、エーテル麻酔下に開腹、腹部大動脈より採血し、瀉血、屠殺、剖検した。諸臓器は肉眼的に観察した後摘出し、脳、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、副腎、脾臓及び精巣については重量測定の後、また鼻腔を含む頭蓋、眼球及びその付属器、下垂体、唾液腺、舌、気管、甲状腺、上皮小体、大動脈、食道、胃、小腸、大腸、膵臓、膀胱、前立腺、精囊腺、凝固腺、精巣上体、卵巣、卵管、子宮、陰、乳腺、リンパ節 (頸部及び腸間膜、胸骨、大腿骨、脊髄、坐骨神経、皮膚および骨格筋等) については摘出後直ちに10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。その後対照群と最高用量群の動物の各臓器および組織を常法に従い切り出し、通常の方法によりパラフィン包埋後、薄切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色を施して、病理組織学的に検索を行った。なお、5%投与群の肝臓と腎臓に投与に起因すると思われる組織学的変化を認めため、残りの投与群の動物の肝および腎のH.E.標本を作製し、追加検索を行った。全例の血液については、多項目自動血球計数装置 (M-2000型, 東亜医用電子株式会社, 兵庫) にて白血球数 (WBC), 赤血球数 (RBC), ヘモグロビン量 (Hb), ヘマトクリット値 (Ht); 平均赤血球容積 (MCV), 平均赤血球血色素量 (MCH), 平均赤血球血色素濃度 (MCHC), 血小板数 (PLT) の測定を行ったほか、血液細胞自動分析装置 (MICROX HEG-120A型, 立石電機株式会社, 東京) にて桿状核好中球 (Neut-B), 分葉核好中球 (Neut-S), 好酸球 (Eosino), 好塩基球 (Baso), リンパ球 (Lymph), 単球 (Mono), 有核赤血球 (Eib) の分類を行った。また、血清を分離後、凍結し、株式会社エスアールエル (東京) に依頼して、総蛋白 (TP), アルブミン (Alb), アルブミン/グロブリン比 (A/G), 総コレステロール (TC), トリグリセライド (TG), 尿素窒素 (BUN), クレアチニン (CRE), カルシウム (Ca), 無機リン (IP), ナトリウム (Na), カリウム (K), クロール (Cl), アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST), アラニントランスアミナーゼ (ALT), アルカリフォスファターゼ (ALP), 直接ビリルビン (DBIL) を測定した。

4. 統計学的処理方法

体重, 血液学的・血清生化学的検査結果および臓器の絶対重量と相対重量については, 各群の分散を 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 Dunnett の方法で対照群と各被験物質投与群との間で有意差検定を行った。肝臓および腎臓に認められたそれぞれの病理組織学的変化の発生頻度については対照群との間で Fisher の直接確率計算法による有意差検定を行った。また各群に現れた病理組織学的変化の程度の対照群との比較は Mann-Whitney 検定により行った。

結 果

1. 一般状態

試験期間中, 雌雄とも被験物質投与動物の尿が投与用量に相関して橙褐色調を示しており, 体内に吸収されたアカネ色素の色素成分が尿中に排泄されたものと考えられた。一般状態についてはこのほかに特記すべき変化は認められず, 全ての動物が試験終了時まで生存した。

2. 体重および摂餌量

投与期間中の各群の体重の推移を Fig.1 に示した。雌雄とも投与期間を通じて 2.5 % 以上の群で対照群に比べて有意な体重増加量の低値が認められた。また有意差は認められなかったが雄の 1.2 % 群でも体重増加量が低値を示した。

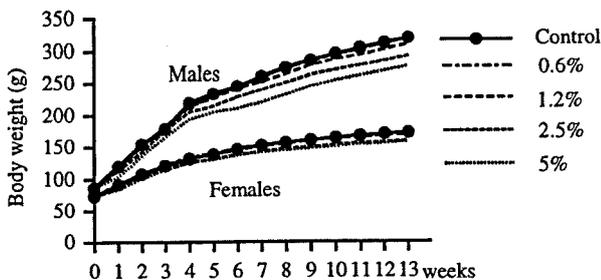


Fig. 1. Growth curves for male and female F344 rats treated with madder color for 13 weeks

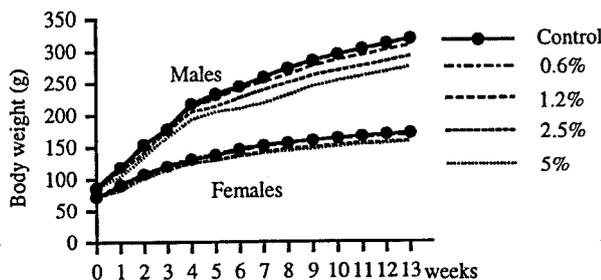


Fig. 2. Daily food intake for male and female F344 rats treated with madder color for 13 weeks

体重増加抑制の程度は試験期間を通じた平均として, 雄では 5% 群で 12.0%, 2.5% 群で 6.6%, 1.2% 群で 2.1% であり, 雌では 5% 群で 6.6%, 2.5% 群で 5.5% であった。

Table 1. Food consumption and intake of madder color

Group	Food consumption (g/rat/day)		Daily intake (g/rat)		Total intake (g/rat)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
control	14.5	9.2	-	-	-	-
0.6%	14.6	9.5	0.09	0.06	8.0	5.2
1.2%	14.1	9.3	0.17	0.11	15.4	10.2
2.5%	13.5	8.8	0.34	0.22	30.7	20.0
5%	13.3	8.6	0.67	0.43	60.6	39.1

試験期間中の摂餌量の推移を Fig.2 に, 平均摂餌量及び被験物質摂取量を Table 1 に示した。雄では 1.2% 以上の群で, 雌では 2.5 % 以上の群で対照群に比べて摂餌量の減少が認められた。減少の程度は試験期間を通じた平均として, 雄では 5% 群で 8.2%, 2.5% 群で 6.9%, 1.2% 群で 2.5% であり, 雌では 5% 群で 7.0%, 2.5% 群で 4.8% であった。

3. 血液学および血清生化学的検査

血液学および血清生化学的検査の結果を Table 2 および 3 に示した。血液学的検査では雄で MCH, MCHC の低値および PLT の高値が 2.5% 以上の群で, WBC の高値が 5% 群で認められた。雌では RBC, Hb, Ht の低値が 2.5% 以上の群で, PLT の高値が 5% 群で認められた。なお白血球型別分類において, 雄の 1.2% 以上の群で桿状核好中球率の低値が認められたが, 本試験では対照群の桿状核好中球率がラットで通常認められる値⁸⁾よりも高値を示したことを反映したものであり, 毒性学的意義には乏しいと判断した。この他にも雌雄で統計学的有意差の認められる項目が散見されたが明らかな用量相関性を伴わない変化であった。

血清生化学的検査では雄で TP, Alb, BUN, IP, DBIL の高値及び A/G の低値が 1.2% 以上の群で, Ca, Na, K の高値が 2.5% 以上の群で, TG の低値が 5% 群で認められた。雌では TP の高値および A/G の低値が 0.6% 以上の群で, TC, TG, DBIL の高値が 1.2% 以上の群で, IP の高値および Cl の低値が 2.5% 以上の群で, Ca の高値が 5% 群で認められた。雌雄で認められた AST および ALT の低値, 雌のみで認められた ALP の低値は通常毒性指標とする変化と逆方向への変化であることから毒性学的意義の乏しい変化であると考えられた。これらの他にも雌雄で統計学的有意差の認められる項目が散見されたが明らかな用量相関性を伴わない変化であった。

4. 臓器重量

絶対重量および相対重量をそれぞれ Table 4, 5 に示した。雄では肺 (左右) の絶対重量の低値が認められたが, 相対重量には対照群との差は認められなかったことから, 体重の低値に連動した変化であると考えられた。雌では肝臓の

Table 2. Hematological and serum biochemical data of F344 male rats treated with madder color for 13 weeks

Items	Groups				
	Control	0.6%	1.2%	2.5%	5%
RBC ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	919.5 \pm 20.59 ^{a)}	938.6 \pm 20.27	915.3 \pm 22.33	924.8 \pm 27.98	912.9 \pm 22.55
Hb (g/dL)	15.1 \pm 0.24	15.4 \pm 0.37	15.0 \pm 0.34	15.0 \pm 0.40	14.8 \pm 0.37
Ht (%)	43.8 \pm 0.99	45.1 \pm 0.76*	43.7 \pm 1.14	44.7 \pm 1.23	43.7 \pm 1.09
MCV (fL)	47.6 \pm 0.50	48.1 \pm 0.44	47.8 \pm 0.43	48.3 \pm 0.28**	47.9 \pm 0.38
MCH (pg)	16.5 \pm 0.20	16.3 \pm 0.20	16.4 \pm 0.10	16.2 \pm 0.3*	16.2 \pm 0.20**
MCHC (g/dL)	34.6 \pm 0.42	34.0 \pm 0.56	34.4 \pm 0.44	33.6 \pm 0.48**	33.8 \pm 0.3**
PLT ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	78.8 \pm 1.66	76.9 \pm 4.08	77.9 \pm 3.15	82.9 \pm 4.31*	87.8 \pm 3.1**
WBC ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	41.6 \pm 4.70	38.6 \pm 3.44	41.9 \pm 4.79	44.5 \pm 4.45	48.8 \pm 4.31*
Differential cell counts (%)					
Neut-B	1.3 \pm 0.92	0.4 \pm 0.57	0.3 \pm 0.35*	0.2 \pm 0.24*	0.1 \pm 0.16*
Neut-S	20.7 \pm 4.91	26.8 \pm 5.40*	24.3 \pm 3.36	20.8 \pm 2.45	23.9 \pm 5.55
Eosino	1.2 \pm 0.59	1.3 \pm 0.65	1.1 \pm 0.81	0.3 \pm 0.35**	0.9 \pm 0.66
Baso	0.0 \pm 0.00	0.1 \pm 0.16	0.0 \pm 0.00	0.0 \pm 0.00	0.1 \pm 0.16
Lymph	76.8 \pm 4.64	71.1 \pm 5.73*	74.3 \pm 3.49	78.4 \pm 2.67	75.1 \pm 5.42
Mono	0.1 \pm 0.16	0.4 \pm 0.63	0.1 \pm 0.21	0.4 \pm 0.57	0.1 \pm 0.16
Ebl	2.3 \pm 1.89	1.5 \pm 1.78	1.2 \pm 0.92	1.8 \pm 1.40	2.3 \pm 1.49
TP (g/dL)	6.6 \pm 0.17	6.8 \pm 0.17	6.9 \pm 0.11**	7.1 \pm 0.11**	7.3 \pm 0.11**
Alb (g/dL)	4.5 \pm 0.06	4.6 \pm 0.15	4.6 \pm 0.09**	4.7 \pm 0.08**	4.8 \pm 0.08**
A/G	2.1 \pm 0.15	2.1 \pm 0.09	2.0 \pm 0.09*	2.0 \pm 0.08	1.9 \pm 0.08**
TC (mg/dL)	76.3 \pm 2.36	74.4 \pm 5.19	76.8 \pm 4.57	72.7 \pm 7.99	78.9 \pm 4.25
TG (mg/dL)	94.6 \pm 15.90	95.2 \pm 19.90	102.7 \pm 20.76	75.6 \pm 15.70	70.0 \pm 19.37*
BUN (mg/dL)	19.5 \pm 1.08	20.1 \pm 1.49	22.4 \pm 1.71**	20.7 \pm 2.41	22.5 \pm 0.93**
CRE (mg/dL)	0.3 \pm 0.03	0.3 \pm 0.03	0.3 \pm 0.00	0.3 \pm 0.00	0.3 \pm 0.00
Ca (mg/dL)	10.4 \pm 0.17	10.2 \pm 0.13	10.5 \pm 0.15	10.6 \pm 0.13**	10.8 \pm 0.16**
IP (mg/dL)	5.7 \pm 0.31	6.1 \pm 0.30	6.8 \pm 0.36**	7.3 \pm 0.25**	7.6 \pm 0.24**
Na (mEq/dL)	144.5 \pm 0.52	145.4 \pm 0.96	144.5 \pm 0.70	145.7 \pm 0.95**	145.5 \pm 0.85*
K (mEq/dL)	4.2 \pm 0.24	4.4 \pm 0.29	4.4 \pm 0.17	4.6 \pm 0.19**	4.5 \pm 0.16*
Cl (mEq/dL)	104.4 \pm 0.69	104.5 \pm 0.85	103.9 \pm 0.88	103.6 \pm 0.84	103.7 \pm 1.16
AST (IU/L)	71.7 \pm 4.69	79.8 \pm 5.03**	72.8 \pm 6.03	75.3 \pm 6.57	66.6 \pm 3.60
ALT (IU/L)	52.6 \pm 2.37	55.8 \pm 4.98	53.2 \pm 3.68	43.4 \pm 5.06**	39.4 \pm 3.2**
ALP (IU/L)	353.1 \pm 18.00	349.0 \pm 20.64	347.6 \pm 16.67	332.5 \pm 23.29	350.4 \pm 4.24
DBIL (mg/dL)	0.1 \pm 0.00	0.2 \pm 0.03	0.3 \pm 0.03*	0.5 \pm 0.03*	0.9 \pm 0.04*

a) : Mean \pm SD*, **: Significantly different from control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively

相対重量、腎臓（左右）の絶対重量および相対重量の高値が0.6%以上の群で、肝臓の絶対重量の高値が1.2%以上の群で認められた。なお雌の2.5%以上の群では心臓および脳の相対重量が高値を示したが、組織変化を伴わなかったことから体重の低値を反映した変化と考えられた。

5. 病理組織学的所見

病理組織学的検索の結果を Table 6 に示した。雄では腎臓に近位尿管上皮のびまん性の空胞変性が1.2%以上の群で、尿管再生、硝子円柱および間質への単核細胞浸潤が5%群で認められた (Fig.3A)。この他に好酸性小体の減少あるいは消失が0.6%以上の群で認められた (Fig.3A,B)。雌では腎臓に近位尿管上皮の空胞変性が0.6%以上の群で、間質への単核細胞浸潤が5%群で認められた。また雌の肝臓では限局性の肝細胞壊死および単核細胞浸潤が5%

群で認められた (Fig.4)。この他にも対照群を含む雌雄の各群で組織変化が認められたが、対照群と投与群との間に変化の程度及び発生率の差は認められなかった。

考 察

今回、F344 ラットを用いてアカネ色素の混餌投与による13週間の亜慢性毒性試験を実施した。一般状態観察では、アカネ色素の尿排泄を反映したと考えられる橙褐色尿が認められたが、被験物質投与に起因すると考えられる異常は認められなかった。体重増加量及び摂餌量の低値が雄では1.2%以上の群で、雌では2.5%以上の群で認められた。体重の増加抑制の程度は摂餌量の減少の程度とよく相関しており、今回認められた体重増加抑制は主に摂餌量の減少に起因するものと考えられた。

Table 3. Hematological and serum biochemical data of F344 female rats treated with madder color for 13 weeks

Items	Groups				
	Control	0.6%	1.2%	2.5%	5%
RBC ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	906.2 \pm 21.51 ^{a)}	903.9 \pm 21.33	884.2 \pm 28.16	858.5 \pm 48.79**	825.3 \pm 31.29**
Hb (g/dL)	16.0 \pm 0.32	16.0 \pm 0.29	15.6 \pm 0.47	15.1 \pm 0.83*	14.6 \pm 0.53*
Ht (%)	46.1 \pm 1.23	46.0 \pm 1.14*	44.7 \pm 1.45	43.2 \pm 2.43**	42.3 \pm 1.47**
MCV (fL)	50.9 \pm 0.32	50.9 \pm 0.29	50.6 \pm 0.32	50.3 \pm 0.46**	51.3 \pm 0.33
MCH (pg)	17.6 \pm 0.13	17.7 \pm 0.20	17.6 \pm 0.18	17.6 \pm 0.09	17.6 \pm 0.13
MCHC (g/dL)	34.7 \pm 0.39	34.7 \pm 0.43	34.8 \pm 0.39	34.9 \pm 0.26	34.4 \pm 0.30
PLT ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	81.2 \pm 4.29	80.5 \pm 3.71	80.6 \pm 4.34	86.0 \pm 5.34	91.8 \pm 5.76**
WBC ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	38.7 \pm 4.77	38.8 \pm 4.37	38.2 \pm 6.27	40.0 \pm 5.98	42.9 \pm 5.45
Differential cell counts (%)					
Neut-B	0.0 \pm 0.00	0.2 \pm 0.34	0.2 \pm 0.34	0.0 \pm 0.00	0.0 \pm 0.00
Neut-S	15.9 \pm 6.18	15.7 \pm 4.84	15.3 \pm 2.83	16.1 \pm 4.68	16.9 \pm 5.27
Eosino	1.4 \pm 1.13	0.9 \pm 0.34	1.6 \pm 1.15	1.4 \pm 0.94	0.9 \pm 0.66
Baso	0.0 \pm 0.00	0.0 \pm 0.00	0.0 \pm 0.00	1.0 \pm 0.16	0.0 \pm 0.00
Lymph	82.6 \pm 6.13	83.1 \pm 4.83	82.8 \pm 3.51	82.4 \pm 4.94	81.8 \pm 4.80
Mono	0.2 \pm 0.24	0.2 \pm 0.35	0.2 \pm 0.24	0.1 \pm 0.16	0.5 \pm 0.80
Ebl	2.7 \pm 1.42	3.8 \pm 2.57	1.6 \pm 1.65	1.5 \pm 1.35	2.6 \pm 2.46
TP (g/dL)	6.5 \pm 0.09	6.8 \pm 0.17*	6.8 \pm 0.21*	6.9 \pm 0.01*	7.1 \pm 0.17*
Alb (g/dL)	4.7 \pm 0.14	4.8 \pm 0.13	4.7 \pm 0.16	4.7 \pm 0.10	4.7 \pm 0.14
A/G	2.8 \pm 0.27	2.6 \pm 0.22*	2.3 \pm 0.16**	2.1 \pm 0.14**	2.0 \pm 0.16**
TC (mg/dL)	90.7 \pm 8.01	99.2 \pm 7.07	105.0 \pm 5.83**	108.6 \pm 9.01**	118.0 \pm 8.53**
TG (mg/dL)	31.8 \pm 7.45	42.7 \pm 12.49	48.2 \pm 15.92*	48.8 \pm 12.42**	46.9 \pm 8.09*
BUN (mg/dL)	19.3 \pm 1.74	19.2 \pm 0.65	19.1 \pm 2.40	19.9 \pm 1.51	20.0 \pm 1.74
CRE (mg/dL)	0.3 \pm 0.00	0.3 \pm 0.03	0.3 \pm 0.03	0.3 \pm 0.03	0.3 \pm 0.05
Ca (mg/dL)	10.4 \pm 0.24	10.5 \pm 0.23	10.3 \pm 0.23	10.3 \pm 0.06	10.9 \pm 0.19*
IP (mg/dL)	6.2 \pm 0.30	6.5 \pm 0.53	6.4 \pm 0.29	6.7 \pm 0.36*	7.1 \pm 0.34**
Na (mEq/dL)	145.3 \pm 0.67	146.4 \pm 0.69	145.7 \pm 0.82	145.8 \pm 1.03	145.4 \pm 1.07
K (mEq/dL)	4.1 \pm 0.24	4.1 \pm 0.27	4.2 \pm 0.20	4.2 \pm 0.21	4.2 \pm 0.12
Cl (mEq/dL)	106.8 \pm 1.23	107.1 \pm 0.99	105.9 \pm 0.57	104.6 \pm 1.17**	105.1 \pm 0.99**
AST (IU/L)	78.1 \pm 8.84	78.4 \pm 7.01	67.7 \pm 4.24**	73.0 \pm 4.81	69.4 \pm 3.95**
ALT (IU/L)	41.0 \pm 2.71	40.5 \pm 3.44	35.4 \pm 2.59**	34.5 \pm 2.92**	35.3 \pm 3.34**
ALP (IU/L)	258.9 \pm 47.44	229.3 \pm 19.29	210.5 \pm 11.46*	215.6 \pm 24.14*	246.8 \pm 20.09
DBIL (mg/dL)	0.1 \pm 0.03	0.2 \pm 0.03	0.4 \pm 0.05*	0.6 \pm 0.03*	1.1 \pm 0.07*

a): Mean \pm SD

*, **: Significantly different from control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively

血液学的検査の結果として、RBC, Hb, Htの低値が雌の2.5%以上の群で、PLTの高値が雄の2.5%以上および雌の5%群で、WBCの高値が雄の5%群で認められた。5%投与群での病理組織学的検査では骨髄などの造血器官に変化を検出できなかったが、雄では1.2%以上、雌では2.5%以上の群では造血器系への影響があることが示唆された。なお雄の2.5%以上の群ではMCH, MCHCの低値が認められたが、軽度な変化であり他の赤血球系パラメータに変動が認められないことから毒性学的意義は乏しいと考えられた。

血清生化学的検査から、血清蛋白への影響としてTPの高値、A/Gの低値が雄の1.2%以上の群および雌の0.6%以上の群で認められた。加えて雄ではAlbの高値が1.2%以上の群で認められた。雄ではAlbが高値を示し雌では変動しなかったにもかかわらず、雌雄でTPの高値とA/Gの低値

が認められたことから、グロブリン画分の蛋白質が増加していることが考えられた。雌では0.6%群より肝臓の絶対重量および相対重量が高値を示し、雄でも統計学的有意差は認められないものの0.6%以上の群で肝重量が高値を示す傾向が認められた。肝重量の高値は肝臓における蛋白合成の亢進を反映した変化である可能性が考えられるが、病理組織学的にはそれを裏付ける変化は認められず毒性学的意義には乏しい変化と考えられた。一方、血清生化学検査では肝毒性指標の変動は認められなかったものの、雌の5%投与群では限局性の肝細胞壊死およびその壊死巣への単核細胞浸潤が認められ、この用量では肝臓への障害作用があることが示された。その他にDBILの高値が雌雄の各投与群で認められたが、肝胆道系への傷害を示す変化は認められなかった。剖検時に投与動物の血清が尿の色調と同様に用量相関的に橙褐色調を示すことが確認されており、

Table 4. Absolute organ weights of F344 rats treated with madder color for 13 weeks (g)

		Groups				
		Control	0.6%	1.2%	2.5%	5%
Male	Body weight	310.9 ± 15.28 ^{a)}	307.1 ± 14.50	297.3 ± 16.50	288.9 ± 36.15*	261.7 ± 16.8*
	Brain	1.94 ± 0.045	1.92 ± 0.041	1.94 ± 0.050	1.89 ± 0.042	1.90 ± 0.052
	Thymus	0.21 ± 0.034	0.21 ± 0.030	0.20 ± 0.021	0.19 ± 0.037	0.18 ± 0.030
	Lung (R)	0.66 ± 0.048	0.65 ± 0.038	0.63 ± 0.057	0.59 ± 0.036**	0.61 ± 0.032*
	Lung (L)	0.35 ± 0.017	0.34 ± 0.012	0.34 ± 0.022	0.31 ± 0.018**	0.32 ± 0.019**
	Heart	0.88 ± 0.079	0.95 ± 0.082	0.88 ± 0.057	0.86 ± 0.069	0.81 ± 0.045
	Spleen	0.63 ± 0.051	0.64 ± 0.031	0.65 ± 0.038	0.65 ± 0.032	0.63 ± 0.048
	Liver	7.37 ± 0.474	7.57 ± 0.353	7.64 ± 0.489	7.47 ± 0.433	7.67 ± 0.614
	Adrenal (R)	0.017 ± 0.003	0.017 ± 0.002	0.018 ± 0.003	0.019 ± 0.002	0.017 ± 0.003
	Adrenal (L)	0.020 ± 0.002	0.020 ± 0.002	0.019 ± 0.004	0.021 ± 0.002	0.021 ± 0.002
	Kidney (R)	0.94 ± 0.090	0.97 ± 0.051	0.98 ± 0.045	0.96 ± 0.059	0.93 ± 0.045
	Kidney (L)	0.98 ± 0.056	1.00 ± 0.073	1.01 ± 0.058	0.97 ± 0.043	0.95 ± 0.075
	Testis (R)	1.46 ± 0.083	1.51 ± 0.068	1.49 ± 0.084	1.52 ± 0.088	1.51 ± 0.067
Testis (L)	1.49 ± 0.079	1.53 ± 0.069	1.52 ± 0.094	1.53 ± 0.048	1.52 ± 0.090	
Female	Body weight	162.6 ± 4.86	162.3 ± 7.17	159.1 ± 8.03	150.1 ± 6.02**	148.0 ± 6.5**
	Brain	1.76 ± 0.038	1.79 ± 0.054	1.78 ± 0.037	1.77 ± 0.048	1.76 ± 0.032
	Thymus	0.17 ± 0.024	0.17 ± 0.023	0.17 ± 0.019	0.15 ± 0.014	0.16 ± 0.042
	Lung (R)	0.44 ± 0.018	0.43 ± 0.038	0.45 ± 0.025	0.43 ± 0.026	0.43 ± 0.042
	Lung (L)	0.24 ± 0.026	0.24 ± 0.018	0.24 ± 0.022	0.24 ± 0.015	0.23 ± 0.021
	Heart	0.54 ± 0.035	0.53 ± 0.025	0.55 ± 0.026	0.52 ± 0.023	0.52 ± 0.027
	Spleen	0.38 ± 0.022	0.39 ± 0.026	0.39 ± 0.030	0.41 ± 0.057	0.41 ± 0.018
	Liver	3.48 ± 0.145	3.66 ± 0.226	3.78 ± 0.189**	3.71 ± 0.269	3.85 ± 0.185**
	Adrenal (R)	0.019 ± 0.002	0.021 ± 0.003	0.019 ± 0.002	0.020 ± 0.003	0.019 ± 0.003
	Adrenal (L)	0.020 ± 0.003	0.023 ± 0.003	0.021 ± 0.003	0.020 ± 0.003	0.018 ± 0.003
	Kidney (R)	0.51 ± 0.032	0.55 ± 0.026*	0.59 ± 0.037**	0.56 ± 0.036**	0.58 ± 0.027**
	Kidney (L)	0.52 ± 0.027	0.56 ± 0.025	0.59 ± 0.035**	0.57 ± 0.037**	0.57 ± 0.027**

a) : Mean ± SD

*, **: Significantly different from control at p < 0.05 and p < 0.01, respectively

Table 5. Relative organ weights of F344 rats treated with madder color for 13 weeks (g%)

		Groups				
		Control	0.6%	1.2%	2.5%	5%
Male	Brain	0.63 ± 0.028 ^{a)}	0.63 ± 0.030	0.65 ± 0.023	0.66 ± 0.064	0.73 ± 0.042
	Thymus	0.07 ± 0.010	0.07 ± 0.009	0.07 ± 0.007	0.07 ± 0.015	0.07 ± 0.013
	Lung (R)	0.21 ± 0.015	0.21 ± 0.016	0.21 ± 0.020	0.21 ± 0.023	0.23 ± 0.012
	Lung (L)	0.11 ± 0.007	0.11 ± 0.006	0.11 ± 0.009	0.11 ± 0.011	0.12 ± 0.006
	Heart	0.28 ± 0.021	0.31 ± 0.025	0.30 ± 0.015	0.30 ± 0.034	0.31 ± 0.015
	Spleen	0.20 ± 0.012	0.21 ± 0.007	0.22 ± 0.009	0.23 ± 0.019	0.24 ± 0.014
	Liver	2.37 ± 0.067	2.47 ± 0.053	2.57 ± 0.067	2.60 ± 0.185	2.93 ± 0.106
	Adrenal (R)	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.000	0.006 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.007 ± 0.001
	Adrenal (L)	0.006 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.008 ± 0.000
	Kidney (R)	0.30 ± 0.017	0.32 ± 0.009	0.33 ± 0.011	0.33 ± 0.034	0.36 ± 0.018
	Kidney (L)	0.31 ± 0.012	0.32 ± 0.016	0.34 ± 0.001	0.34 ± 0.030	0.36 ± 0.009
	Testis (R)	0.47 ± 0.025	0.49 ± 0.022	0.50 ± 0.018	0.53 ± 0.061	0.58 ± 0.026
	Testis (L)	0.48 ± 0.023	0.50 ± 0.022	0.51 ± 0.027	0.54 ± 0.057	0.58 ± 0.018
Female	Brain	1.08 ± 0.043	1.10 ± 0.039	1.12 ± 0.050	1.18 ± 0.032**	1.19 ± 0.038**
	Thymus	0.10 ± 0.015	0.10 ± 0.011	0.11 ± 0.014	0.10 ± 0.009	0.11 ± 0.028
	Lung (R)	0.27 ± 0.011	0.27 ± 0.018	0.28 ± 0.019	0.29 ± 0.020	0.29 ± 0.026
	Lung (L)	0.15 ± 0.014	0.15 ± 0.010	0.15 ± 0.010	0.16 ± 0.009	0.16 ± 0.015
	Heart	0.33 ± 0.013	0.33 ± 0.009	0.35 ± 0.017	0.35 ± 0.013*	0.35 ± 0.018**
	Spleen	0.23 ± 0.010	0.24 ± 0.011	0.24 ± 0.011	0.28 ± 0.048	0.28 ± 0.010
	Liver	2.13 ± 0.059	2.25 ± 0.081*	2.37 ± 0.066**	2.47 ± 0.121**	2.61 ± 0.077**
	Adrenal (R)	0.011 ± 0.001	0.013 ± 0.002	0.012 ± 0.001	0.013 ± 0.002	0.013 ± 0.002
	Adrenal (L)	0.013 ± 0.001	0.014 ± 0.002	0.013 ± 0.002	0.013 ± 0.002	0.012 ± 0.002
	Kidney (R)	0.31 ± 0.016	0.34 ± 0.012**	0.37 ± 0.018**	0.37 ± 0.014**	0.39 ± 0.009**
	Kidney (L)	0.32 ± 0.011	0.34 ± 0.014*	0.37 ± 0.018**	0.38 ± 0.018**	0.39 ± 0.013**

a) : Mean ± SD

*, **: Significantly different from control at p < 0.05 and p < 0.01, respectively

Table 6. Histological findings in male and female rats treated with madder color for 13 week

Sex Group	No. of animals examined	Male					Female				
		control_0.6%		1.2%	2.5%	5%	control_0.6%		1.2%	2.5%	5%
		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Liver											
Focal necrosis, hepatocytes	Total incidence	10	- ^{a)}	-	-	10	9	10	8	9	10##
	Grade ±	10				10	6	8	7	3	0
	+	0				0	3	1	1	5	2
	++	0				0	0	0	1	8	
Mononuclear cell infiltration	Total incidence	10	-	-	-	10	10	10	10	10	10##
	Grade ±	10				10	7	8	7	4	0
	+	0				0	3	1	3	5	2
	++	0				0	1	0	1	8	
Kidney											
Tubular regeneration	Total incidence	10	10##	9##	10##	10#	3	1	1	2	4
	Grade ±	1	8	7	7	0	3	1	1	2	4
	+	8	1	2	3	4	0	0	0	0	0
	++	1	1	0	0	6	0	0	0	0	0
Hyaline cast	Total incidence	8	3	5	2*	9	5	5	6	5	7
	Grade ±	8	3	5	2	4	5	5	6	4	7
	+	0	0	0	0	5	0	0	0	1	0
	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Microvesicular vacuolar degeneration, proximal tubules	Total incidence	10	10	10##	10##	10##	10	10##	10##	10##	10##
	Grade ±	10	10	4	0	0	10	0	0	0	0
	+	0	0	6	10	4	0	10	5	0	0
	++	0	0	0	0	6	0	0	5	10	10
Mononuclear cell infiltration	Total incidence	6	6	8	9	10##	4	2	1	5	10*##
	Grade ±	6	6	7	8	3	4	2	1	4	7
	+	0	0	1	1	7	0	0	0	1	3
	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eosinophilic body	Total incidence	10	10##	10##	4**##	0**##	0	0	0	0	0
	Grade ±	0	0	8	4	0	0	0	0	0	0
	+	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0
	++	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	+++	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a) : Not examined
 ± : very slight, + : slight, ++ : moderate, +++ : severe
 *, ** : Significantly different from control at p < 0.05 and p < 0.01, respectively (Fisher's test)
 #, ## : Significantly different from control at p < 0.05 and p < 0.01, respectively (Mann-Whitney test)

血中に移行したアカネ色素の影響によりDBILの測定値が高値を示した可能性が高いと考えられた。

血清電解質の変動としてはCaの高値が雄の2.5%以上の群、雌の5%群で認められ、IPの高値が雄の1.2%以上、雌の2.5%以上の群で認められた。本試験では骨に病理組織学的変化は検出されなかったが、CaおよびIPの変動からは骨代謝への影響が示唆され、今後実施予定の慢性毒性試験において骨への影響を精査することが必要であると考えられた。上記の他にBUN, Na, K, Clの増減が認められたが、正常なF344ラットにおいて認められる範囲内での変動であり^{9)~14)}、毒性学的意義の乏しい変化と判断した。また雌雄でTGの増減が認められたが、雌雄で変化の方向性が逆であり、バラツキも大きかったことから偶発的变化と判断した。

肝臓以外に認められた病理組織変化として、腎臓に近位尿管上皮のびまん性の空胞変性が雄の1.2%以上の群と雌の0.6%以上の群で認められ、腎臓の絶対重量および相対重量の高値が雌の0.6%以上の群で認められた。本試験では尿の生化学検査を実施していないことから尿管障害としての空胞変性の意義を評価することは困難であるが、28日間の反復投与試験などの対照群を含む動物で通常認められる自然発生性変化であることから、障害性変化として

は軽度なものであると考えられた。一方5%群の雌雄の腎臓で単核細胞浸潤が認められ、雄では硝子円柱および尿管の再生が認められたことから、この用量では明らかな腎臓障害作用があると考えられた。なお雄では各投与群で腎臓の好酸性小体の減少あるいは消失が認められた。好酸性小体の本体と考えられているα2uグロブリンは主に肝臓で生合成され、血流を介して尿管に蓄積される。肝細胞毒性物質等の投与によりその生合成が低下し、腎臓への蓄積が低下することが考えられる¹⁵⁾が、本試験の雄の投与群では肝毒性を示唆するパラメータの変動を認めていない。またこの蛋白質は性ホルモンを含むステロイドホルモンによる転写調節を受けることが知られているが¹⁶⁾、本試験では内分泌器や生殖器にステロイドホルモンの変動に関連すると考えられる変化は認められなかった。従って本変化の原因は明らかではなかったが、変化の質を考慮すると毒性学的には意義の乏しい変化であると考えられた。

以上のように、アカネ色素を雌雄のラットに13週間混餌投与した際には、雌では0.6%群、雄では1.2%群から腎臓に軽度な毒性変化が認められ、雌雄の5%群では腎臓に、雌の5%群では肝臓に障害を示す病理組織学的変化が認められた。また組織変化は伴わないものの、造血管系および骨代謝への影響を示唆する血液学的あるいは血清生化学パ

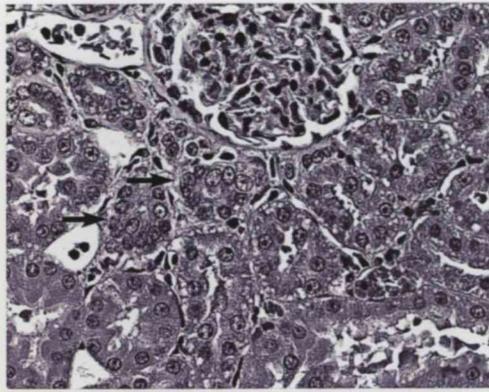


Fig. 3A. Microvesicular vacuolar degeneration of proximal tubules in the kidney of a male rat treated with 5% of madder color. Focus of tubular regeneration (arrow) and lack of eosinophilic bodies are shown as well. (H.E., x1320 magnification)

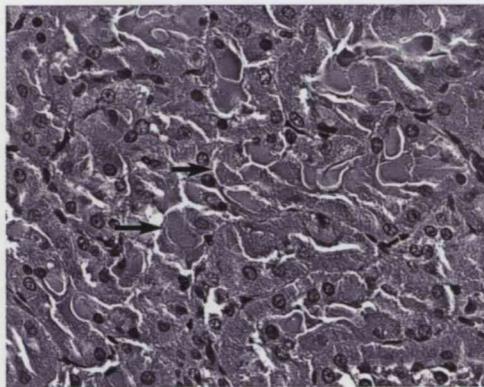


Fig. 3B Eosinophilic bodies in the proximal tubular epithelia (arrow) in the kidney of an untreated male rat (H.E., x1320 magnification)

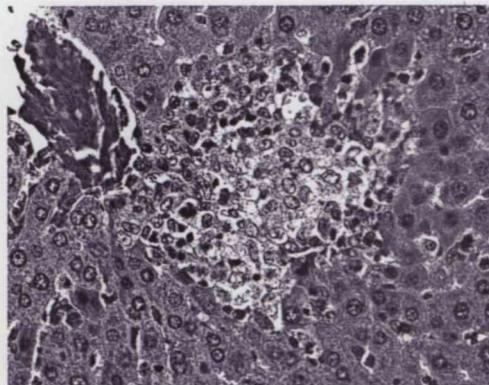


Fig. 4 Focal liver cell necrosis associated with infiltration of mononuclear cells in a rat treated with 5% of madder color (H.E., x1320 magnification)

ラメータの変動が雌雄の1.2%以上の群で散見された。本試験条件下における無毒性量 (NOAEL) は、雄では0.6%, 雌では0.6%未満と結論された。5%群では体重増加量も対

照群に比較して10%前後の低値を示したことから本用量は今後実施されるアカネ色素の慢性毒性試験および発がん性試験の最高用量として十分な用量であると考えられ、現在0.2, 1, 5%の用量段階で慢性毒性試験を、2.5, 5%の用量段階で発がん性試験を実施している。

文 献

- 1) 藤井正美監修：概説・食品天然色素，光琳，東京，pp.67-70 (1993)
- 2) T. Tanaka, N. Ino, A. Okumura, H. Makita and H. Mori: *Jpn. J. Food. Chem.*, **1**, 17-21 (1994)
- 3) M. Asanoma, M. Miyabe and Y. Sakabe: *Nagoyashi Eisei Kenkyushohou*, **30**, 53-57 (1984)
- 4) 蜂谷紀之，滝澤行雄，河村太郎，館野周之，坂部美雄，麻野間正晴，野田正男，石崎睦雄，石橋武二，黒田孝一：トキシコロジーフォーラム，**8**，91-105 (1985)
- 5) Y. Kawasaki, Y. Goda, and K. Yoshihira: *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1504-1509 (1992)
- 6) 石館 基，滝澤行雄，坂部美雄，石崎睦雄，伊藤和敏，館 正知：トキシコロジーフォーラム，**9**，628-633 (1986)
- 7) A. Hagiwara, et.al.: *Jpn. J. Food. Chem.*, **4**, 99-106 (1997)
- 8) A. Ono, K. Sekita, M. Saitoh, T. Umemura, Y. Ogawa, T. Furuya, T. Kaneko, and T. Inoue: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **117**, 91-98 (1999)
- 9) L. Yun, H. Onodera, H. Takagi, T. Koujitani, K. Yasuhara, K. Mitsumori, and M. Hirose: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **117**, 104-107 (1999)
- 10) H. Takagi, H. Onodera, L. Yun, K. Yasuhara, T. Koujitani, K. Mitsumori, and M. Hirose: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **117**, 108-114 (1999)
- 11) T. Imazawa, A. Nishihara, F. Furukawa, T. Ikeda, H. Nakamura, M. Miyauchi, and M. Hirose: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **117**, 115-118 (1999)
- 12) H. Nakamura, T. Imazawa, A. Nishikawa, F. Furukawa, T. Ikeda, M. Miyauchi, and M. Hirose: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **117**, 119-122 (1999)
- 13) M. Miyauchi, F. Furukawa, A. Nishikawa, H. Nakamura, T. Imazawa, and M. Hirose: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **117**, 123-128 (1999)
- 14) N. Niho, T. Tamura, K. Toyoda, C. Uneyama, M. Shibutani, and M. Hirose: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **117**, 129-134 (1999)
- 15) K. Alvares, V. Subbarao, M. S. Rao and J.K. Reddy: *Carcinogenesis*, **17**, 311-316 (1996)
- 16) K. S. Wang, R. B. Hodgetts and W. R. Addison: *J. Mol. Endocrinol.*, **20**, 141-150 (1998)