



食品添加物安全性再評価費

食品添加物安全性試験

(平成 15 年度報告書)

アカネ色素の慢性毒性・発がん性併合試験
(中間報告)

平成 16 年 6 月 18 日

担当者	渋谷 淳
	井上 薫
	李 京烈
	森川 朋美
部長	広瀬 雅雄

国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター 病理部
(東京都世田谷区上用賀 1 - 1 8 - 1)

[目的]

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、Ruberythric 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⁾、ラット肝細胞およびマウス肝細胞を用いたDNA adduct試験で陽性⁷⁾であった。発がん性に関しては、diethylnitrosamine, N-methylnitrosurea 及び N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine 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⁸⁾との報告があるが、最近、ACI/SegHsdラットを用いた780日間反復投与による発がん性試験において有意差はないものの肝臓と腎臓に腫瘍の増加が見られた⁹⁾との報告がなされた。しかし、アカネ色素に発がんリスクありとする上述の報告は、体重および摂餌量のデータを記載していないこと、病理組織学的検査を実施した組織・臓器の種類が少ないこと、各群の動物数が少ないことなど不十分な点も多い。

我々は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実施した。用量設定のための予備試験として、アカネ色素を0.6, 1.2, 2.5, 5%の割合で90日間混餌反復投与した結果¹⁰⁾、雄では1.2%群、雌では0.6%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器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ラメータの変動が雌雄の1.2%以上の群で散見された。この結果から、飼料に混入するアカネ色素用量を0%、0.2%、1.0%、5% (慢性毒性) または0%、2.5%、5% (発がん性) とし、慢性毒性/発がん性併合試験を行った。

慢性毒性試験の途中経過については昨年度報告し、慢性毒性/発がん性併合試験については現在、病理組織学的検査を継続している。

[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4群(慢性毒性試験, 各群10匹)及び3群(発がん性試験, 各群50匹)に分け、試験に供した。動物の飼育はバリエーションシステムの飼育室にて、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26cm、長さ42cm、高さ17cm)に3~4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

被験物質として用いたアカネ色素は、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、各々、34.3%、53.0%、12.7%の割合で存在し、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、アカネ色素無添加飼料では1.5%、0.2%混入飼料では1.44%、1.0%混入飼料では1.2%、2.5%混入飼料では0.75%、5%混入飼料では0%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±5%以内であることが確認された。混合飼料中のRuberythric acid及びLucidin-3-O-primeverosideの安定性を0.2%、2.5%及び5%混合飼料で検討した結果、製造後8週間冷蔵保存後、1週間24℃保存した飼料中の両物質の残存率は何れも95%以上であった。

3. 試験方法

慢性毒性試験は雌雄各10匹（1群20匹）にそれぞれ0%、0.2%、1.0%および5%の割合でアカネ色素を混入した粉末飼料を53週間自由に摂取させた。発がん性試験は雌雄各50匹（1群100匹）にそれぞれ0%、2.5%、5%の割合でアカネ色素を混入した粉末飼料を104週間自由に摂取させた。試験期間中、動物の一般状態を観察し、体重および摂餌量の測定を初めの12週間は毎週、その後は4週毎に行った。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、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、座骨神経、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。全例の血液については、多項目自動血球計数装置（K-4500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 (Ebl) 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)を測定した。

病理組織学的検査において, 腎臓と、腸間膜リンパ節 (慢性毒性試験のみ) について観察された主な病変を検索し, 対照群との比較を統計学的に行った。腫瘍性病変の診断については, 成書の記述に従い¹³⁾, 腺腫は切片上に見られた腫瘍の直径が正常尿細管約5本以上であるものとし, それ以下のものは異型尿細管とした。腺がんは切片上に見られた腫瘍の直径がより大きく, 細胞異型性が強く, 腫瘍組織内に壊死巣が認められるものとした。

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。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 の直接確立計算法による有意差検定を行い, 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 法で行った。発がん性試験における生存率は Logrank test による有意差検定を行った。

[結果]

・慢性毒性試験

1. 一般状態

試験期間中、雌雄とも被験物質投与動物の皮膚が投与用量に応じて橙褐色調を示した。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。雄では 5%投与群で 1 週目から投与期間を通じて、雌では 1%及び 5%投与群で 1 週目から投与期間を通じて対照群に比べて有意な体重の低値が認められた。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%投与群で 12.0%、雌では 1%投与群で 7.9%、5%投与群で 16.0%であった。

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 5%投与群で、雌では 1%及び 5%投与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%投与群で 6.2%、雌では 1%投与群で 6.5%、5%投与群で 14.3%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 PLT の高値および RBC, Hb, Ht, の低値が 5%群で認められた。雌では WBC, PLT の高値および RBC, Ht の低値が 5%群で認められた。なお白血球型別分類において、雌の 0.2%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 F344/DuCrj ラットで通常認められる値¹¹⁾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。この他にも雌で統計学的有意差の認められる項目が散見されたが、用量に関連した明らかな変化ではなく、毒性学的意義には乏しいと判断した。

血清生化学的検査では雄で A/G, Alb, TG, ALP の低値及び CRE, IP の高値が 5%群で、TC, AST, ALT の低値が 1%以上の群で認められた。

雌では A/G, Alb, TC, ALT の低値および IP の高値が 5%群で, K の高値が 1%以上の群で認められた。

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。雄では心臓の絶対重量の低値が 5%群で, 肝臓, 腎臓 (左右) の絶対重量の高値が 1%群で認められ, 脳, 肺 (左右), 心臓, 副腎 (左右), 精巣 (左右) の相対重量の高値が 5%群で, 脾臓, 肝臓, 腎臓 (左右) の相対重量の高値が 1%以上の群で認められた。雌では肺 (左右), 心臓の絶対重量の低値が 5%群で, 腎臓 (左右) の絶対重量の高値が 1%以上の群で認められ, 脳, 肺 (左右), 心臓, 脾臓, 肝臓の相対重量の高値が 1%以上の群で, 副腎の相対重量の高値が 1%群で, 腎臓の相対重量の高値が 0.2%以上の群で認められた。

5. 病理組織学的所見

腎臓と腸間膜リンパ節の病理組織学的検査の結果を Table 6 に示した。雄では, 腎臓の近位尿細管上皮に空胞変性 (Fig. 3A), 再生尿細管, 間質への単核細胞の浸潤, 髓質の近位尿細管上皮における核の大小不同 (Anisokaryosis; Fig. 3B) 及び異型尿細管 (Fig. 3C) が 1%以上の群で用量に依存して認められ, 統計的有意差は空胞変性で 1%以上の群から, 他の所見では 5%群のみで認められた。また, 5%群の 1 例に尿細管腺腫が認められた。雌の腎臓では近位尿細管上皮の空胞変性と髓質の近位尿細管上皮における核の大小不同が 1%以上の群で認められたが, 統計的有意差は空胞変性で 1%以上の群から, 核の大小不同では 5%群で認められた。雌においても異型尿細管の出現が 5%群で有意に認められた。また, 雄の腸間膜リンパ節に髓洞の拡張が 5%群で認められた。

・発がん性試験

1. 一般状態

試験期間中, 雌雄とも被験物質投与動物の皮膚が投与用量に応じて橙褐色調を示した。試験期間における生存率の推移を Fig. 4 に示した。群間に生存率の有意差は認められなかった。104 週時の各群の生存率は雄

では対照群で 78%，2.5%投与群で 84%，5%投与群で 92%，雌では対照群で 86%，2.5%投与群で 88%，5%投与群で 94%であり，投与群で高い傾向がみられた。

2. 体重，摂餌量および腎重量

投与期間中の各群の体重の推移を Fig. 5 に示した。全投与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。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 2.5%投与群で 9.1%，5%投与群で 15.2%，雌では 2.5%投与群で 12.5%，5%投与群で 16.5%であった。最終体重も雌雄の投与群で，用量相関性かつ有意な減少が認められた (Table 7)。

試験期間中の摂餌量の推移を Fig. 6 に示した。摂餌量は試験期間を通じた平均として，雄では 2.5%投与群で 3.8%，5%投与群で 1.9%，雌では 2.5%投与群で 10.3%，5%投与群で 12.3%減少した。

実験終了時の腎重量は雌雄とも全投与群で有意に増加した (Table 7)。

3. 病理組織学的検査

全身臓器・組織の病理組織評価を継続中であるが，腎臓において認められた前がん病変および腫瘍の発生頻度を Table 8 に示した。アカネ色素投与群において尿細管上皮の核の大小不同，異型尿細管，尿細管腺腫 (Fig. 7A)・腺がん (Fig. 7B, C) が認められ，これら病変の発生頻度は，雌雄ともに対照群に比べて有意に高く，雄での尿細管上皮細胞の核の大小不同，腺腫・腺がんの発生頻度は，2.5%群に比べ 5%群で有意に高かった。

[考察]

・慢性毒性試験

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 5%群で，雌では 5%及び 1%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（雄：0.96，雌：0.94），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。

血液学的検査の結果として，雄で PLT の高値および RBC，Hb，Ht の低値が 5%群で認められ，雌では WBC，PLT の高値および RBC，Ht の低値が 5%群で認められた。13 週間の亜慢性毒性試験においても WBC，PLT の高値および RBC，Hb，Ht の低値が認められており¹⁰⁾，造血器官への影響が示唆された。しかし，病理組織学的検査の結果，脾臓，骨髓等造血組織において被験物質の投与に起因すると考えられる組織変化は認められなかった。また，血清生化学的検査から，A/G，Alb の低値が雌雄の 5%群で，TC の低値が雄の 1%以上の群および雌の 5%群で認められたことから肝臓への毒性が疑われた。しかし，病理組織学的検査の結果，肝臓において被験物質の投与に起因すると考えられる組織変化は認められなかった。また，CRE の高値が雄の 5%群で認められており，雌雄の 1%以上の群で腎臓の絶対重量の高値が認められていることから，腎臓への毒性が疑われた。病理組織学的検査の結果，雄で腎臓の近位尿細管上皮に空胞変性，再生尿細管；間質への単核細胞の浸潤，髓質の近位尿細管上皮における核の大小不同及び異型尿細管が 1%以上の群で用量に依存して認められ，統計的有意差は空胞変性で 1%以上の群から，他の所見では 5%群のみで認められた。雌の腎臓では近位尿細管上皮の空胞変性と髓質の近位尿細管上皮における核の大小不同が 1%以上の群で認められたが，統計的有意差は空胞変性で 1%以上の群から，核の大小不同では 5%群で認められた。雌においても異型尿細管の出現が 5%群で有意に認められた。異型尿細管は前がん病変と考えられており，更に雄の 5%群の 1 例に尿細管腺腫が認められていることから，明らかにアカネ色素の腎臓に対する発がん標的性を示唆している。これらの変化については，後述する 2 年間投与例での腎臓における腫瘍性病変の出現やその病理組織学的解析結果と併せて評価する。雌雄で認められた ALT の低値，雄のみで認められた AST，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。

血清電解質の変動としては IP の高値が雌雄の 5%群で，K の高値が雌の 1%以上の群で認められた。IP の変動からは骨代謝への影響が示唆されるが，Ca の値に影響は認められなかった。病理組織学的検査の結果，

被験物質の投与に起因すると考えられる骨組織の変化は認められなかった。また、アカネ色素の腸管からのリンパ経路での吸収を示唆する腸間膜リンパ節の髓洞の拡張が雄の5%群で認められた。

この他、心臓の絶対重量の低値が雌雄の5%群で、肺の絶対重量の低値が雌の5%群で認められたが、病理組織学的検査の結果に異常は認められず、体重低下に伴う変化であり、毒性学的には意義の乏しい変化であると考えられた。

以上の結果から本試験条件下における無毒性量 (NOAEL) は、雌雄ともに0.2%と結論された。

・発がん性試験

病理組織学的検査の結果、アカネ色素投与により雌雄とも近位尿細管上皮の核の大小不同、異型尿細管が全例に発生し、腺腫・腺がんの発生頻度は用量依存性に、かつ有意に増加し、アカネ色素は腎臓に対し明らかに発癌性を有することが示された。ACI/SegHsd ラットを用いた780日間反復投与による発がん性試験により、腎臓や肝臓において有意差はないものの用量依存的に腫瘍発生頻度の上昇が認められたことが報告されており⁹⁾、これは今回の結果を裏付けている。また、アカネ色素成分の一種、lucidin (Fig. 8; 構造式) やセイヨウアカネの根からエタノール抽出した際に lucidin から形成される化合物 (lucidin ethylether) が、Ames テスト (S9mix (-)/(+))、V79 細胞を用いた HPRT 遺伝子の single-strand break アッセイやラット初代肝細胞を用いた DNA 修復アッセイ、C3H/M2 マウス線維芽細胞を用いた形質転換アッセイにより遺伝毒性を示したこと¹²⁾ や、前述の ACI/SegHsd ラットを用いた780日間反復投与による発がん性試験において、肝臓、腎臓での DNA adduct レベルの増加が示されたこと⁹⁾ などから、発がんが細胞傷害性に加え、遺伝毒性メカニズムで発生した可能性を示唆している。現在までに発がん性試験の病理組織学的検査は腎臓のみ終了しているが、今後、その他の全身臓器の病理組織学的検査を実施し、肝臓など他臓器への標的性を明らかにするとともに、遺伝毒性の可能性を含め、発がんメカニズムを解明することが重要である。

[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) B. Poginsky, J. Westendorf, B. Blömeke, H. Marquardt, A. Hewer, P. Grover, and D. Phillips : *Carcinogenesis*, **12**, 1265-1271, (1991)
- 8) A. Hagiwara, et.al. : *Jpn. J. Food Chem.*, **4**, 99-106, (1997)
- 9) J. Westendorf, W. Pfau and A. Schute : *Carcinogenesis*, **19** 2163-2168, (1998)
- 10) N. Masutomi, M. Shibutani, K. Toyoda, N. Niho, C. Uneyama and M. Hirose : *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **118**, 55-62, (2000)
- 11) 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)
- 12) J. Westendorf, B. Poginsky, H. Marquardt, G. Groth and H. Marquardt: *Cell Biol. Toxicol.*, **4**, 225-239. (1988)
- 13) C. A. Montgomery, Jr., J. C. Seely. 10. Kidney, In: Pathology of the Fisher Rat. G. Boorman, S. Eustis, M. Elwell, C. Montgomery, Jr., W. MacKenzie. (eds.), pp.137-141. Academic Press, Inc. (1990)

Table 1. Food consumption and intake of madder color in rats given madder color for 53 weeks

Group	Food consumption (g/rat/day)		Daily intake (g/rat)		Total intake (g/rat)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Control	14.2	9.5	-	-	-	-
0.2%	15.2	9.7	0.03	0.02	11.2	7.2
1.0%	14.9	8.8	0.15	0.09	55.3	32.7
5.0%	13.3	8.1	0.66	0.40	246.5	149.7

Table 2. Hematological and serum biochemical data of F344 male rats given madder color for 53 weeks

Items	Groups				
	Control	0.20%	1%	5%	
RBC	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	887.1 \pm 40.9 ^{a)}	898.6 \pm 38.5	887.4 \pm 18.9	832.6 \pm 43.0**
Hb	(g/dL)	14.7 \pm 0.6	15.0 \pm 0.8	14.7 \pm 0.5	13.9 \pm 0.9*
Ht	(%)	46.7 \pm 1.8	47.0 \pm 2.2	46.4 \pm 1.1	43.8 \pm 2.4**
MCV	(fL)	52.6 \pm 0.6	52.3 \pm 0.4	52.3 \pm 0.5	52.6 \pm 0.6
MCH	(pg)	16.6 \pm 0.5	16.7 \pm 0.4	16.5 \pm 0.4	16.7 \pm 0.6
MCHC	(g/dL)	31.6 \pm 0.8	31.9 \pm 0.5	31.6 \pm 0.6	31.8 \pm 0.8
PLT	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	69.8 \pm 4.0	70.0 \pm 4.6	68.0 \pm 3.7	81.8 \pm 6.7**
WBC	($\times 10^2/\mu\text{L}$)	37.8 \pm 3.9	37.9 \pm 5.0	38.2 \pm 7.6	43.2 \pm 10.5
Differential cell counts (%)					
	Neut-B	0.8 \pm 0.7	1.0 \pm 1.0	1.4 \pm 0.5	0.8 \pm 0.7
	Neut-S	30.3 \pm 4.2	26.0 \pm 4.0	26.8 \pm 3.5	37.5 \pm 10.1
	Eosino	1.5 \pm 1.1	0.7 \pm 0.6	0.8 \pm 0.8	1.2 \pm 0.9
	Baso	0.1 \pm 0.2	0.1 \pm 0.2	0.2 \pm 0.3	0.3 \pm 0.4
	Lymph	65.4 \pm 4.4	70.2 \pm 4.6	68.8 \pm 3.3	59.2 \pm 11.1
	Mono	2.0 \pm 1.0	2.0 \pm 1.2	2.0 \pm 0.7	1.1 \pm 0.9
	Elb	3.0 \pm 2.3	3.3 \pm 2.0	3.4 \pm 2.6	4.9 \pm 5.4
TP	(g/dL)	6.8 \pm 0.2	6.8 \pm 0.2	6.8 \pm 0.2	6.8 \pm 0.2
A/G		1.9 \pm 0.1	2.0 \pm 0.2	2.0 \pm 0.2	1.7 \pm 0.1**
Alb	(g/dL)	4.4 \pm 0.1	4.5 \pm 0.2	4.5 \pm 0.1	4.3 \pm 0.1**
TG	(mg/dL)	108.9 \pm 33.4	119.3 \pm 31.2	103.3 \pm 33.9	69.4 \pm 29.5*
TC	(mg/dL)	105.9 \pm 10.3	104.8 \pm 8.9	91.8 \pm 9.2*	82.5 \pm 14.6**
BUN	(mg/dL)	16.7 \pm 1.5	16.2 \pm 0.6	16.2 \pm 0.7	15.7 \pm 1.1
CRE	(mg/dL)	0.32 \pm 0.04	0.32 \pm 0.02	0.30 \pm 0.02	0.39 \pm 0.04**
Na	(mEq/dL)	143.9 \pm 2.1	144.1 \pm 1.4	144.6 \pm 0.8	145.2 \pm 1.3
Cl	(mEq/dL)	102.2 \pm 1.5	102.2 \pm 1.5	102.6 \pm 0.8	102.3 \pm 1.9
K	(mEq/dL)	4.4 \pm 0.3	4.3 \pm 0.2	4.5 \pm 0.2	4.5 \pm 0.3
Ca	(mg/dL)	10.5 \pm 0.3	10.5 \pm 0.2	10.6 \pm 0.3	10.4 \pm 0.3
IP	(mg/dL)	5.3 \pm 0.4	5.5 \pm 0.3	5.5 \pm 0.3	5.9 \pm 0.4**
AST	(IU/L)	77.9 \pm 9.5	75.7 \pm 10.7	64.3 \pm 7.4**	65.3 \pm 7.9**
ALT	(IU/L)	52.8 \pm 7.9	50.6 \pm 9.8	37.6 \pm 5.3**	31.1 \pm 7.9**
ALP	(IU/L)	275.1 \pm 45.9	281.9 \pm 27.0	239.2 \pm 39.9	177.5 \pm 34.4**

^{a)} Mean \pm SD

*, **: Significantly different from control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Dunnet's test)

Table 3. Hematological and serum biochemical data of F344 female rats given madder color for 53 weeks

Items		Groups			
		Control	0.20%	1%	5%
RBC	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	781.1 \pm 49.5 ^{a)}	787.5 \pm 40.1	738.4 \pm 57.6	689.8 \pm 63.2**
Hb	(g/dL)	13.5 \pm 1.5	13.6 \pm 1.4	13.0 \pm 1.0	12.3 \pm 1.2
Ht	(%)	44.4 \pm 2.8	44.9 \pm 2.3	42.0 \pm 3.2	39.3 \pm 3.6**
MCV	(fL)	56.8 \pm 0.3	57.0 \pm 0.3	56.9 \pm 0.6	57.0 \pm 0.7
MCH	(pg)	17.3 \pm 1.1	17.3 \pm 1.8	17.7 \pm 0.2	17.8 \pm 0.5
MCHC	(g/dL)	30.3 \pm 1.9	30.3 \pm 3.1	31.0 \pm 0.5	31.1 \pm 0.9
PLT	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	59.2 \pm 6.3	61.1 \pm 3.4	64.8 \pm 5.3	82.6 \pm 13.3**
WBC	($\times 10^2/\mu\text{L}$)	21.8 \pm 3.5	24.1 \pm 2.1	24.3 \pm 4.9	32.9 \pm 9.4**
Differential cell counts (%)					
	Neut-B	1.1 \pm 0.7	0.3 \pm 0.7**	0.4 \pm 0.4**	0.4 \pm 0.4*
	Neut-S	19.1 \pm 6.1	20.0 \pm 6.1	20.2 \pm 7.8	31.9 \pm 7.0**
	Eosino	1.0 \pm 0.4	0.6 \pm 0.6	1.3 \pm 0.6	0.7 \pm 0.6
	Baso	0.1 \pm 0.2	0.1 \pm 0.2	0.1 \pm 0.2	0.1 \pm 0.3
	Lymph	77.7 \pm 6.9	76.7 \pm 6.9	76.7 \pm 7.5	65.4 \pm 7.4**
	Mono	1.0 \pm 0.8	2.4 \pm 0.9**	1.3 \pm 0.6	1.6 \pm 0.6
	Elb	6.8 \pm 4.2	7.0 \pm 4.9	6.8 \pm 3.3	8.1 \pm 4.0
TP	(g/dL)	7.1 \pm 0.4	7.0 \pm 0.5	6.9 \pm 0.3	6.8 \pm 0.4
A/G		2.2 \pm 0.2	2.3 \pm 0.2	2.1 \pm 0.2	1.9 \pm 0.2**
Alb	(g/dL)	4.9 \pm 0.4	4.8 \pm 0.4	4.7 \pm 0.2	4.4 \pm 0.2**
TG	(mg/dL)	65.9 \pm 15.3	47.9 \pm 11.7	58.3 \pm 18.0	56.1 \pm 14.5
TC	(mg/dL)	124.9 \pm 13.7	111.8 \pm 11.7	116.8 \pm 16.1	106.0 \pm 8.3**
BUN	(mg/dL)	17.2 \pm 1.8	17.2 \pm 2.3	17.1 \pm 1.5	19.0 \pm 1.3
CRE	(mg/dL)	0.35 \pm 0.04	0.33 \pm 0.02	0.32 \pm 0.03	0.33 \pm 0.03
Na	(mEq/dL)	143.8 \pm 1.2	143.9 \pm 1.1	144.0 \pm 1.2	143.6 \pm 1.5
Cl	(mEq/dL)	102.5 \pm 1.9	103.5 \pm 1.8	102.7 \pm 2.5	100.5 \pm 1.4
K	(mEq/dL)	3.9 \pm 0.3	4.0 \pm 0.2	4.2 \pm 0.3**	4.4 \pm 0.2**
Ca	(mg/dL)	10.5 \pm 0.5	10.5 \pm 0.5	10.4 \pm 0.4	10.2 \pm 0.3
IP	(mg/dL)	5.0 \pm 0.5	5.1 \pm 0.6	5.1 \pm 0.5	5.9 \pm 0.6**
AST	(IU/L)	61.7 \pm 4.6	66.9 \pm 8.8	62.2 \pm 4.1	66.0 \pm 7.2
ALT	(IU/L)	30.7 \pm 2.7	30.6 \pm 2.4	27.6 \pm 5.2	20.2 \pm 3.1**
ALP	(IU/L)	121.0 \pm 19.9	123.6 \pm 23.4	120.3 \pm 23.1	115.6 \pm 16.4

^{a)} Mean \pm SD

*, **: Significantly different from control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Dunnet's test)

Table 4. Absolute organ weights of F344 rats given madder color for 53 weeks (g)

		Groups			
		Control	0.20%	1%	5%
Male	Body weight	396.1 ± 31.9 ^{a)}	412.4 ± 22.5	400.8 ± 21.4	326.4 ± 21.3**
	Brain	2.01 ± 0.08	2.05 ± 0.04	2.07 ± 0.07	2.02 ± 0.04
	Lung (R)	0.75 ± 0.07	0.75 ± 0.05	0.76 ± 0.06	0.70 ± 0.05
	Lung (L)	0.39 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.39 ± 0.09	0.37 ± 0.03
	Heart	1.07 ± 0.09	1.09 ± 0.06	1.11 ± 0.09	0.98 ± 0.08*
	Spleen	0.70 ± 0.06	0.74 ± 0.06	0.76 ± 0.07	0.73 ± 0.06
	Liver	8.7 ± 0.7	9.5 ± 0.7	10.0 ± 0.9**	8.6 ± 1.2
	Adrenal (R)	0.017 ± 0.005	0.018 ± 0.004	0.018 ± 0.002	0.017 ± 0.003
	Adrenal (L)	0.017 ± 0.003	0.019 ± 0.002	0.018 ± 0.004	0.017 ± 0.003
	Kidney (R)	1.1 ± 0.08	1.2 ± 0.08	1.3 ± 0.11**	1.2 ± 0.11
	Kidney (L)	1.1 ± 0.08	1.2 ± 0.06	1.4 ± 0.27**	1.2 ± 0.11
	Testis (R)	1.4 ± 0.4	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1
	Testis (L)	1.6 ± 0.3	1.6 ± 0.4	1.7 ± 0.1	1.8 ± 0.7
	Females	Body weight	200.4 ± 6.3	192.2 ± 10.4	176.8 ± 8.2**
Brain		1.85 ± 0.03	1.85 ± 0.04	1.77 ± 0.21	1.82 ± 0.05
Lung (R)		0.52 ± 0.03	0.51 ± 0.02	0.51 ± 0.03	0.45 ± 0.02**
Lung (L)		0.29 ± 0.02	0.27 ± 0.01	0.28 ± 0.02	0.25 ± 0.02**
Heart		0.64 ± 0.03	0.63 ± 0.04	0.66 ± 0.06	0.58 ± 0.04*
Spleen		0.46 ± 0.03	0.45 ± 0.04	0.45 ± 0.03	0.43 ± 0.03
Liver		4.4 ± 0.2	4.3 ± 0.3	4.3 ± 0.4	4.2 ± 0.2
Adrenal (R)		0.018 ± 0.003	0.019 ± 0.004	0.020 ± 0.056	0.017 ± 0.002
Adrenal (L)		0.018 ± 0.002	0.020 ± 0.004	0.021 ± 0.004	0.016 ± 0.003
Kidney (R)		0.63 ± 0.02	0.64 ± 0.04	0.73 ± 0.05**	0.69 ± 0.05*
Kidney (L)		0.63 ± 0.03	0.65 ± 0.04	0.73 ± 0.05**	0.69 ± 0.04**

^{a)} Mean ± SD

*, **: Significantly different from control at p<0.05 and p<0.01, respectively (Dunnet's test)

Table 5. Relative organ weights of F344 rats given madder color for 53 weeks (g)

			Groups			
			Control	0.20%	1%	5%
Male	Brain	(g/100g b.w.)	0.51 ± 0.04 ^{a)}	0.50 ± 0.03	0.52 ± 0.02	0.62 ± 0.03**
	Lung (R)	(g/100g b.w.)	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.22 ± 0.01**
	Lung (L)	(g/100g b.w.)	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.11 ± 0.01**
	Heart	(g/100g b.w.)	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.01	0.28 ± 0.02	0.30 ± 0.02**
	Spleen	(g/100g b.w.)	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.011*	0.22 ± 0.01**
	Liver	(g/100g b.w.)	2.20 ± 0.09	2.31 ± 0.07	2.49 ± 0.13**	2.63 ± 0.22**
	Adrenal (R)	(mg/100g b.w.)	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.005 ± 0.001*
	Adrenal (L)	(mg/100g b.w.)	0.004 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.005 ± 0.001
	Kidney (R)	(g/100g b.w.)	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.01	0.32 ± 0.02**	0.36 ± 0.02**
	Kidney (L)	(g/100g b.w.)	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.36 ± 0.07**	0.36 ± 0.02**
	Testis (R)	(g/100g b.w.)	0.36 ± 0.11	0.43 ± 0.03	0.42 ± 0.03	0.51 ± 0.03**
	Testis (L)	(g/100g b.w.)	0.40 ± 0.08	0.38 ± 0.09	0.43 ± 0.55	0.55 ± 0.19**
Females	Brain	(g/100g b.w.)	0.93 ± 0.03	0.97 ± 0.07	1.01 ± 0.14*	1.14 ± 0.05**
	Lung (R)	(g/100g b.w.)	0.26 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.29 ± 0.01**	0.28 ± 0.01*
	Lung (L)	(g/100g b.w.)	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.16 ± 0.01*	0.16 ± 0.01*
	Heart	(g/100g b.w.)	0.32 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.37 ± 0.03**	0.36 ± 0.02**
	Spleen	(g/100g b.w.)	0.23 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.25 ± 0.01*	0.27 ± 0.02**
	Liver	(g/100g b.w.)	2.21 ± 0.08	2.25 ± 0.11	2.44 ± 0.15**	2.60 ± 0.10**
	Adrenal (R)	(mg/100g b.w.)	0.009 ± 0.002	0.010 ± 0.002	0.011 ± 0.003	0.010 ± 0.001
	Adrenal (L)	(mg/100g b.w.)	0.009 ± 0.001	0.012 ± 0.002	0.012 ± 0.002**	0.010 ± 0.002
	Kidney (R)	(g/100g b.w.)	0.31 ± 0.01	0.33 ± 0.020	0.41 ± 0.02**	0.43 ± 0.03**
	Kidney (L)	(g/100g b.w.)	0.32 ± 0.01	0.34 ± 0.02*	0.41 ± 0.02**	0.43 ± 0.02**

^{a)} Mean ± SD

*,**: Significantly different from control at p<0.05 and p<0.01, respectively (Dunnet's test)

Table 6. Histopathological findings in the kidneys and mesenteric lymph nodes in male and female rats given madder color for 53 weeks

Sex	Group	No. of animals examined	Males				Females			
			Control	0.2%	1%	5%	Control	0.2%	1%	5%
			10	10	10	10	10	10	10	
Kidneys										
Tubular regeneration, focal	Total incidence		1	1	4	10**,##	0	1	0	1
	Grade	±	1	1	4	0	0	0	0	1
		+	0	0	0	10	0	1	0	0
		++	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltration of mononuclear cells, inter:	Total incidence		2	2	5	10**,##	1	1	0	1
	Grade	±	2	2	4	6	0	0	0	0
		+	0	0	1	4	1	1	0	1
		++	0	0	0	0	0	0	0	0
Vacuolar degeneration, proximal tubul epithelium	Total incidence		0	0	10**	10**	5	4	10**,##	10**,##
	Grade	±	0	0	1	0	5	4	1	0
		+	0	0	9	10	0	0	9	10
		++	0	0	0	0	0	0	0	0
Anisokaryosis, proximal tubular epithe outer medulla	Total incidence		1	0	1	10**,##	0	0	1	10**,##
	Grade	±	1	0	1	4	0	0	1	8
		+	0	0	0	6	0	0	0	2
		++	0	0	0	0	0	0	0	0
Atypical tubules, outer medulla	Total incidence		0	0	2	9**	0	0	0	5*
Adenoma, renal tubules	Total incidence		0	0	0	1	0	0	0	0
Mesenteric lymph node										
Dilation, medullary sinus	Total incidence		5	3	6	10**,##	3	2	2	1
	Grade	±	5	3	6	4	3	2	2	1
		+	0	0	0	3	0	0	0	0
		++	0	0	0	3	0	0	0	0

±:very slight, +:slight, ++:moderate

*,**::Significantly different from control at p<0.05 and p<0.01, respectively (Fisher's exact probability test)

#,##::Significantly different from control at p<0.05 and p<0.01, respectively (Mann-Whitney's U-test)

Table 7. Final body, absolute and relative kidney weights of F344 rats given madder color for 104 weeks

Sex	Male			Female		
	Control	2.5%	5%	Control	2.5%	5%
Group						
No. of animals examined ^{a)}	39	42	46	43	44	47
Body weight g	416 ± 47.2 ^{b)}	365.5 ± 28.8*	337 ± 19.9**	259 ± 26.2	206 ± 22.6*	187 ± 11.8**
Kidneys (absolute) g	2.54 ± 0.23	3.01 ± 1.03*	3.36 ± 2.89**	1.64 ± 0.12	2.04 ± 0.66*	1.81 ± 0.14**
Kidneys (relative) g/100g b.w.	0.61 ± 0.07	0.82 ± 0.26*	0.99 ± 0.76**	0.64 ± 0.05	1.00 ± 0.35*	0.97 ± 0.07**

^{a)} Animals those survived until the end of the experiment.

^{b)} Mean ± SD

** : Significantly different from the controls at $p < 0.01$ (Dunnet's test).

Table 8. Incidences of non-neoplastic and neoplastic lesions in the kidney in male and female rats treated with madder color for 104 weeks

Sex Group	Male (%)			Female (%)		
	Control	2.5%	5%	Control	2.5%	5%
No. of animals examined	50	47 ^{b)}	50	50	47 ^{a)b)}	48 ^{b)}
Kidneys						
Anisokaryosis, renal tubules	0	39 (83)**	50 (100)**†	0	47 (100)**	48 (100)**
Atypical tubules	0	47 (100)**	50 (100)**	0	47 (100)**	48 (100)**
Adenoma or Carcinoma, renal tubule	0	19 (40)**	43 (86)**§	0	8 (16)**	15 (31)**
Adenoma	0	18 (38)**	39 (78)**§	0	5 (10)*	13 (27)**
Carcinoma	0	3 (6)	16 (32)**§	0	3 (6)	2 (4)
Mesenchymal tumors	0	1 (2)	0	1 (2)	0	0
Transitional cell carcinoma, renal pelv	0	1 (2)	0	0	0	0

^{a)} One animal which died before 52 weeks was not included.

^{b)} Two or three animals were not examined because of post-mortem degeneration.

*, **: Significantly different from control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Fisher's exact probability test)

†: Significantly different from 2.5% group at $p < 0.01$ (Fisher's exact probability test)

§: Significantly different from 2.5% group at $p < 0.01$ (Chi-square test for independence)

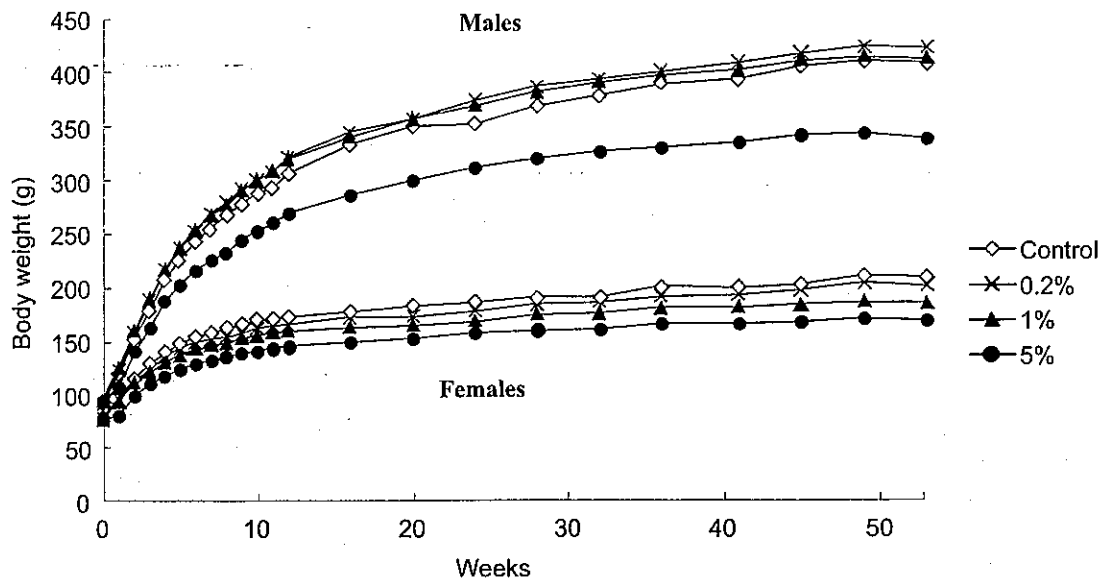


Fig. 1. Growth curves of male and female F344 rats given madder color for 53 weeks

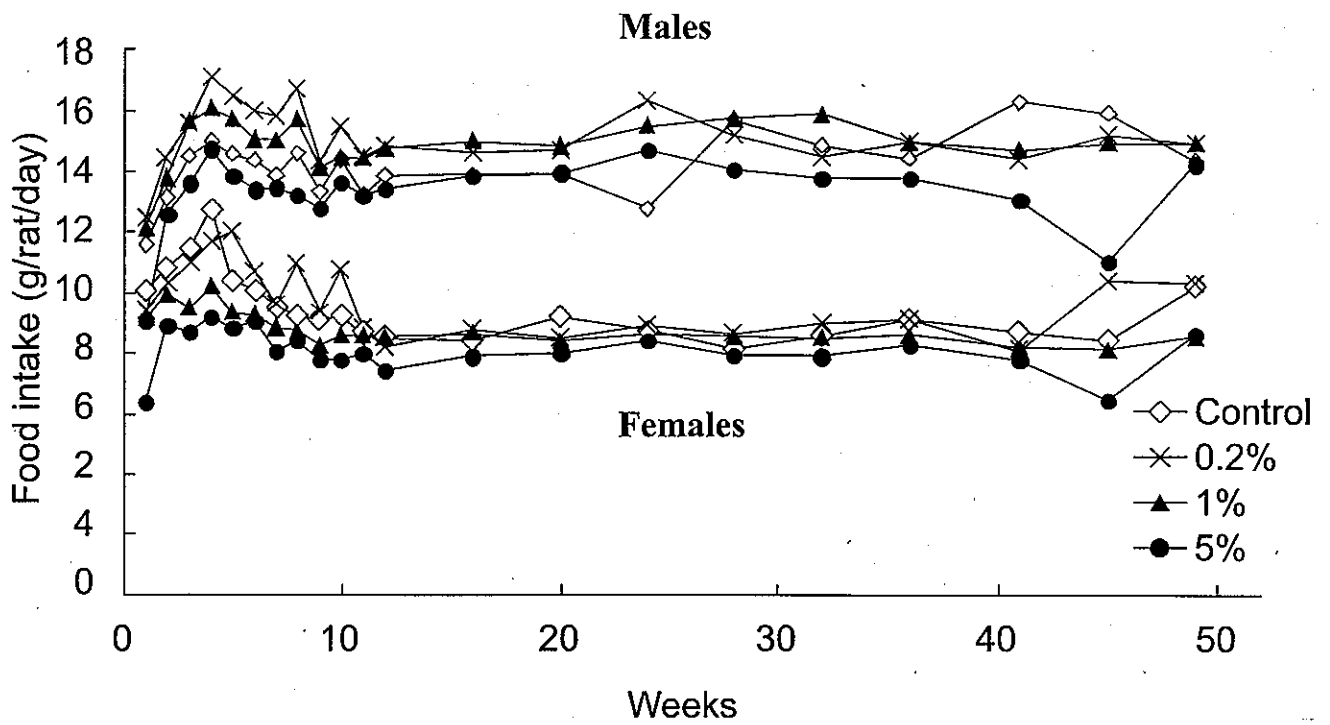


Fig. 2. Daily food intakes of male and female F344 rats given madder color for 53 weeks