

2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) 投与 Donryu ラットに誘発した拡張型心筋症

石 村 美 祐

広島大学原爆放射線医科学研究所 細胞再生研究分野 (主任: 渡邊敦光教授)

受付: 平成 14 年 4 月 30 日

受理: 平成 14 年 6 月 18 日

2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) は加熱食品に由来するヘテロサイクリックアミンであり, ラット大腸, 前立腺及び乳腺に対する強力な環境発癌物質の1つである。PhIP の 75 mg/kg/day を18週齢の雄Crj:Donryuラットに隔日10回強制経口投与した。52週の試験期間における死亡率が40%と, 対照群及び 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) 群 (20及び15%) に比べ高値を示した。この死亡例の75%が心肥大を示し, 拡張型心筋症の特徴を示していた。超微形態的に心筋細胞で筋原線維の減少, ミトコンドリア数の増加及び変性, 筋小胞体の拡張等が認められた。

次に, PhIPの 20, 40 及び 75 mg/kg/dayを同様に投与し, 心臓の変化を経時的に検討した。試験期間中に 40 mg/kg 群の1例及び 75 mg/kg 群の4例が死亡し, 心臓重量は対照動物を含む生存例に比較して高値を示し, 心肥大を呈した。死亡例の 75 mg/kg 群の投与開始後4週から左心室の炎症性細胞浸潤, 心筋細胞の空胞化/壊死, 線維化が認められ, 投与開始後26週まで観察された。死亡例ではさらに心房内血栓形成や右心室拡張も認められた。40 mg/kg 群では投与開始後4週に, 少数例で心筋細胞の空胞化がみられた。投与開始後26週以降に心筋細胞の変性/壊死, 炎症性細胞浸潤や線維化が認められた。超微形態的には筋原線維の減少, 筋小胞体の拡張, ミトコンドリア数の増加, 筋形質の腫脹が 40 mg/kg以上の群で認められた。20 mg/kg 群では4週後に, 炎症性細胞浸潤や心筋細胞の空胞化が少数例にみられた。投与開始4週後に投薬各群の血圧が一時的に有意な低値を示した。投与開始4週後に PhIP-DNA adduct レベルの増加が用量依存的に認められたが, 投与開始13週後 (75 mg/kg 群) では低値を示した。

以上から, PhIP の高用量投与により Donryu ラットにみられた心肥大を伴う死亡例の増加は, PhIP による心筋障害に起因する拡張型心筋症に起因するものであり, その原因に心筋細胞における PhIP-DNA adduct の形成が関与していると考えられた。

Key words : PhIP, MeIQx, Donryu rat, Intubation, Dilated cardiomyopathy

近年, 焼魚や焼肉の炭化部分に含まれる多くのヘテロサイクリックアミンがラットやマウスの様々な器官に対して腫瘍原性を持つことが示されてきている。それゆえ, これらは強力な人に対する発癌物質の候補と考えられている。特に 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) は調理肉や調理魚中に生成されるもっとも豊富な変異原性ヘテロサイクリックアミンとして知られており¹⁴⁾, ビールやワイン中にも見出されている⁷⁾。PhIP はラットに大腸がん, 前立腺がん, 乳がんなど欧米型の腫瘍を誘発することが報告されている^{4,10,11)}, それら発癌

ターゲット器官に加え, 膵臓, 心臓, 肺にも多量の DNA adducts を生成する事が知られている^{5,17)}。別のヘテロサイクリックアミンである 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) は肝腫瘍を誘発することが報告されている⁶⁾。一方, PhIP 投与によりラット心筋に障害が起きることが報告されており^{1,2)}, この障害はミトコンドリア機能低下に起因することが示唆されている^{13,15)}。そこで我々は, PhIP の心臓への影響を明らかにするため, PhIP 及び MeIQx を投与した Donryu ラットの長期間観察を行い, 心臓の病理組織学的及び超微形態学的変化, 並びに経時的

な血圧変化, 心組織像の推移, 更に DNA adduct の関与について検討した。

材料及び方法

使用動物

Crj:Donryu ラット (Charles River Japan Inc., Hino, Japan) を4週齢で入荷し, 床敷を敷いたプラスチックケージに3-4例ずつ飼育し, 固形飼料 (MF, Oriental Yeast, Tokyo, Japan) 及び水道水を自由摂取させた。動物室環境は, 温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 10\%$, 照明周期12時間 (点灯7:00-19:00) であった。投薬開始時, 18週齢で体重範囲は500-521 g であった。なお, 動物の取り扱い は 広島大学動物実験指針に基づき行った。

被験物質

PhIP (PhIP hydrochloride, NARD Institute, Osaka, Japan) 及び MeIQx (国立がんセンター研究所 若林敬二部長より供与を受けた) はいずれも蒸留水に溶解し, 1.5% 溶液とした。投与量は 5 ml/kg とした。対照群には蒸留水を同様に投与した。

PhIP 及び MeIQx 投与後の長期観察 (実験1)

18週齢の雄 Crj:Donryu ラット60例を対照群を含む3群 (各群20例) に分け, 投薬群に PhIP あるいは

MeIQx の 75 mg/kg/day を隔日10回強制経口投与した。全例について体重を毎月1回測定した。投薬開始52週後まで観察を行い, その後, 生存例全例について剖検し, 心臓重量を測定, さらに比体重値を算出した。途中死亡例についても同様に行った。全例の心臓について病理組織学的検査を実施し, さらに, 対照群2例及び PhIP 投与群6例の心臓 (左心室) について電子顕微鏡観察を実施した。左心室拡張の程度を以下の様に左室壁の菲薄化の程度で評価した。心臓の横断組織標本を用い, 左室長径部及び短径部の2ヵ所について $(\text{左室外径} - \text{左室内径}) / \text{左室外径}$ を計測・算出し, その平均値を dilatation index とて比較した。また投薬開始52週後の屠殺時に採血し, 生化学的検査を行った (広島市医師会センター)。

PhIP 投与後の経時的観察 (実験2)

18週齢の Crj:Donryu ラット36例を対照群を含む4群 (各群9例) に分け, PhIP の 20, 40 及び 75 mg/kg/day を隔日10回強制経口投与した。全例の体重を毎月1回測定した。全例の血圧を投薬前に1回, 投薬開始後は毎月1回, 非観血式自動血圧測定装置 (Softron BP-98A, (株) ソフトロン) を用いた tail cuff 法で測定した。投与開始4, 13及び26週後に各群3例ずつを剖検し, 心臓重量を測定し, 比体重値を算出した。

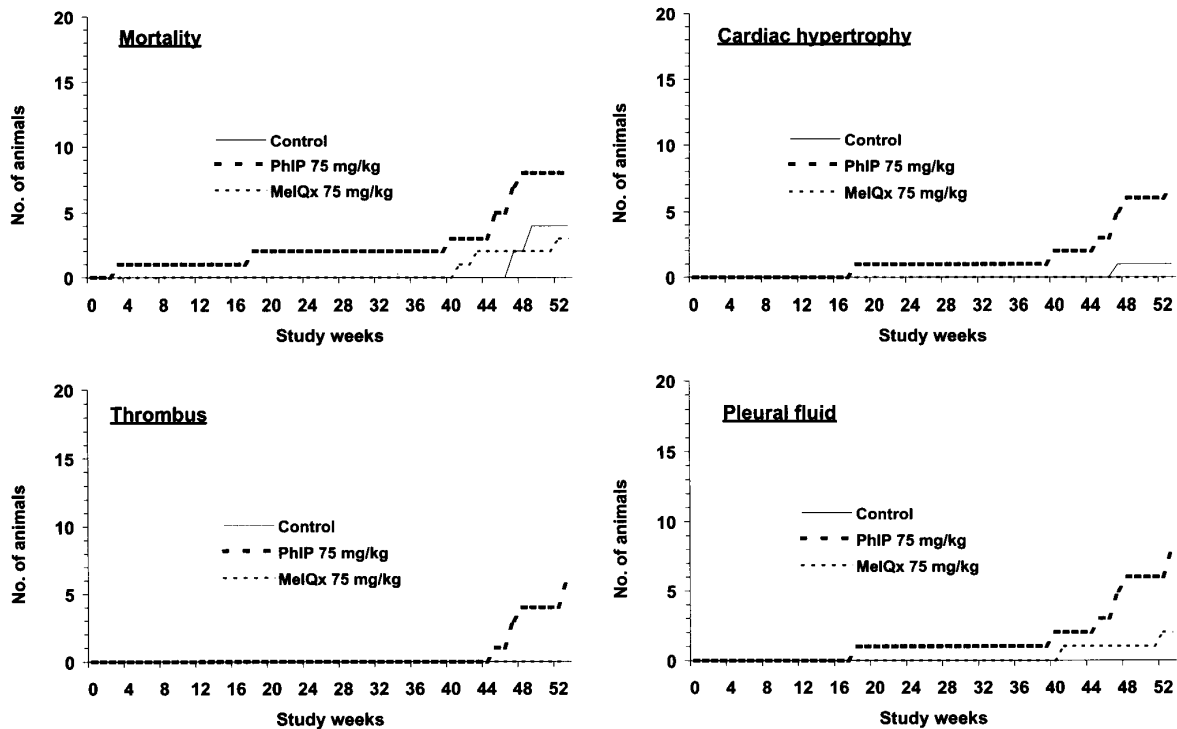


Fig. 1. Mortality and incidences of cardiac hypertrophy, left atrial thrombosis and pleural fluid. Data in each week represents the cumulative number of animals in each group. Week 0 reveals the commencement of the treatment.

途中死亡例についても同様に行った。全例の心臓について病理組織学的検査を実施し、さらに、全群の生存例全例の心臓（左心室）について電子顕微鏡観察を実施した。

免疫組織学的染色：投薬開始4及び13週後の剖検例全例の心臓（左心室）を冷アセトンで2日間固定後、パラフィン包埋した。脱パラフィン後、薄切し、0.5% H₂O₂/methanolに30分、0.05% Tween20/PBSに室温3分2回、500µg/ml RNase/PBSに37°C30分、3N HClに15分、0.01% trypsinに37°C10分、さらに5% skim milk/PBSに40分処理した。次に、標本は抗 PhIP-DNA adduct 抗体(1:10000)で4°C一昼夜処理され、ビオチン標識ヤギ抗ウサギ IgG 及び ABC(Vectastain ABC elite kit, Vector Laboratories)で処理された。ジアミノベンジジンによりペルオキシダーゼ標識部位を染色し、ヘマトキシリン・エオジン染色で対比染色した。陰性対照には免疫血清または1µg/ml PhIP-modified DNAで4°C一昼夜処置した同濃度の抗 PhIP-DNA adduct 抗体を一次抗体として用いた¹⁶⁾。

PhIP-DNA adduct 測定：投薬開始4週後(20, 40及び

75 mg/kg 群)及び13週後(75 mg/kg 群)の剖検例全例の心臓(左心室)からフェノール/クロロホルム法でDNAを抽出し、³²P post label法の改良付加物増感法を用いてPhIP-DNA adduct量を測定した³⁾。各個体について3~5回測定を行い、その平均値を各個体の値とした。

統計学的解析

体重、器官重量及び血圧の各測定値について、実験1ではDunnett検定、実験2ではWilliams検定を用い、対照群と各投与群との平均値の差について解析を行った。全ての検定の有意水準は両側5%及び1%とした。

結 果

実験 1

投与期間中にPhIP群では体重減少、MeIQx群では体重増加抑制がみられたが、いずれもその後の観察期間中に対照群レベルまで回復した。

52週の試験期間におけるPhIP群の死亡率は40%であり、対照群及びMeIQx群(20及び15%)に比べ高値を示した(Fig. 1)。PhIP群では死亡例の75%が心肥大を示し(対照群及びMeIQx群:25及び0%)、さらに、左心房内血栓形成及び胸水貯留も認められた(Fig. 1)。この様なうっ血性心不全を示し更に浮腫で死亡例は投与開始後18週目に初めてみられたが、投与開始後40週目以降にその発現率の増加がみられた。生存例も含めたPhIP群の心肥大発現率は35%であった(対照群及びMeIQx群:5及び0%)。なお、PhIP群の生存例で心肥大を示したのは1例のみであった。

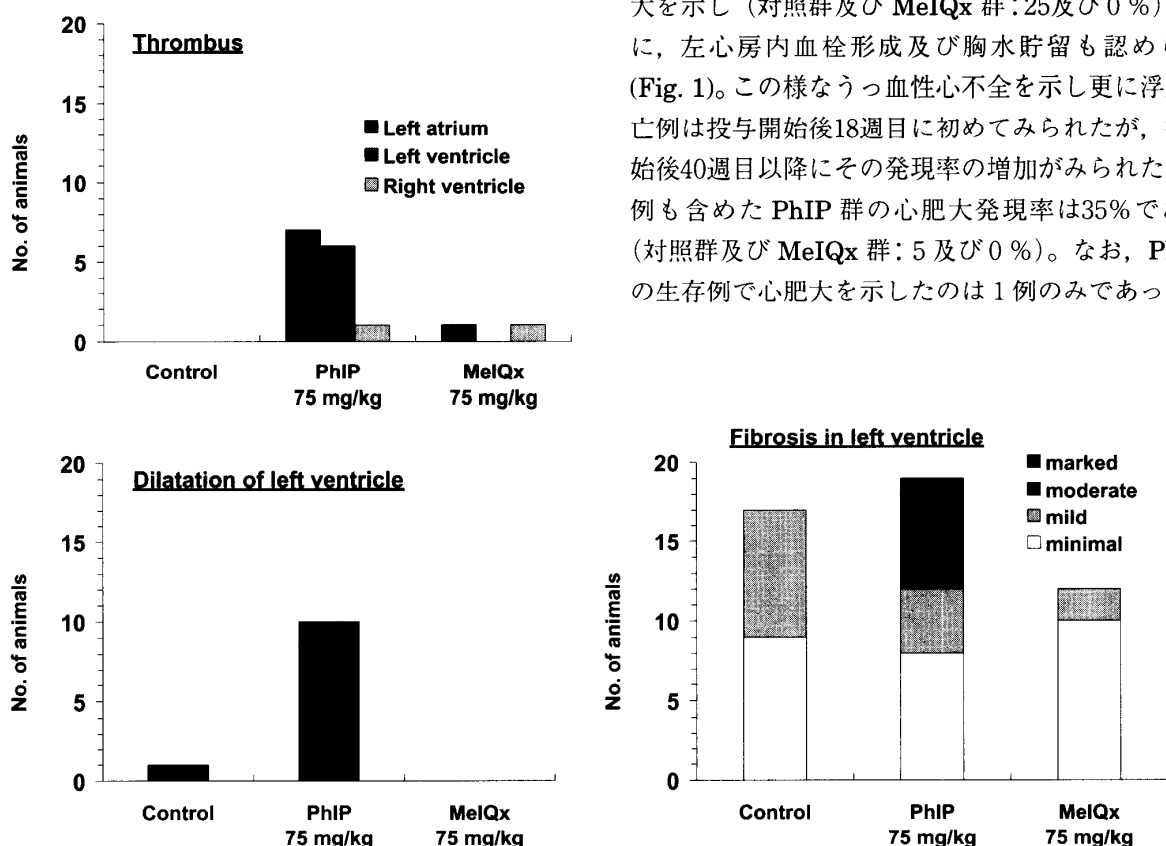


Fig. 2. Histopathological findings of the heart in PhIP or MeIQx-treated Donryu rats. Each data represents the incidences of thrombus, dilatation of left ventricle and fibrosis in left ventricle of the heart.

PhIP 群の死亡例の心臓重量は他の群に比較して高値を示したが、PhIP 群の生存例の値は対照群との差はみられなかった。

屠殺時の生化学的検査では各群で差は認められなかった（結果は示さず）。

心臓の病理組織学的観察 (Fig. 2) では、左心室及び中隔の線維化並びに左心室及び左心房の器質化血栓形成が PhIP 群に認められた。心室壁の線維化は対照群を含むいずれの群でも加齢にともなう変化として高率にみられたが、PhIP 群ではその程度が増加していた。また、PhIP 群では左心室拡張が高頻度に認められた

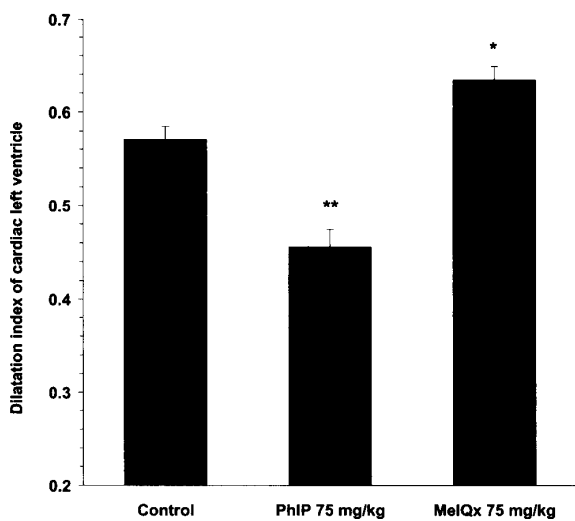


Fig. 3. Dilatation index of the cardiac left ventricle in PhIP or MeIQx-treated Donryu rats. Each data reveals the value of wall thickness/outer diameter of cardiac left ventricle.

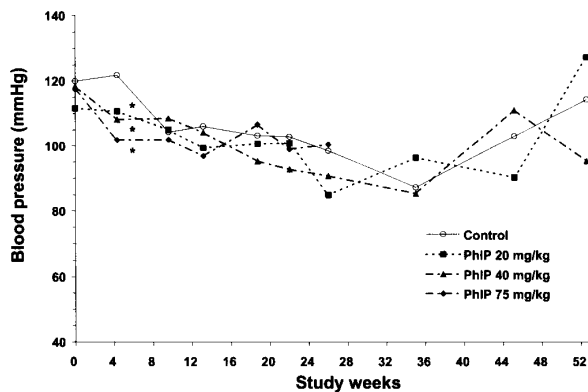


Fig. 5. Blood pressures in PhIP-treated Donryu rats. Each data reveals the mean value in each group. Week 0 reveals the commencement of the treatment. * $p < 0.05$ vs. control.

(Fig. 3)。これら組織学的変化は主に心肥大を示した死亡例/生存例にみられ、心肥大のみられなかった生存例の組織変化は軽微であった。

心臓の電子顕微鏡的観察 (Fig. 4) では、検査した PhIP 群全例の心筋細胞で筋原線維の減少が認められた。また、6例中4例 (66%) でミトコンドリア数の増加、5例 (83%) でミトコンドリアの変性が、3例

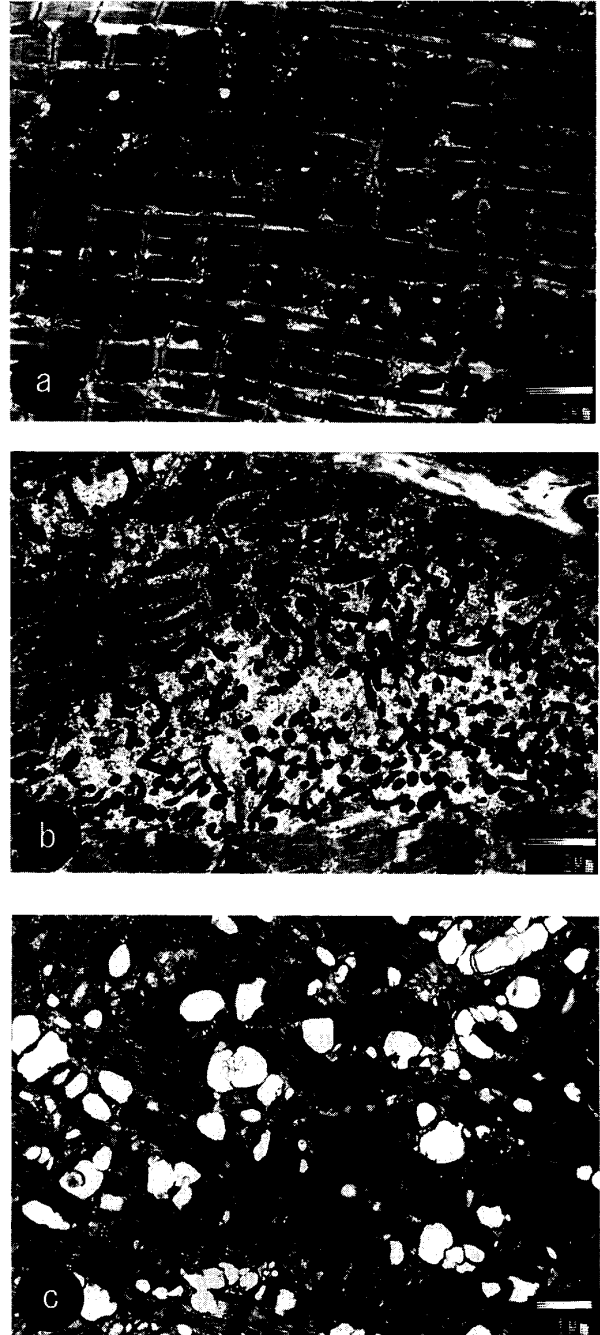


Fig. 4. Electronmicroscopic findings of the heart (left ventricle). (a) Control, (b) PhIP 75 mg/kg, Decrease of myofibrils and proliferation of mitochondria, (c) PhIP 75 mg/kg, Dilatation of sarcoplasmic reticulum.

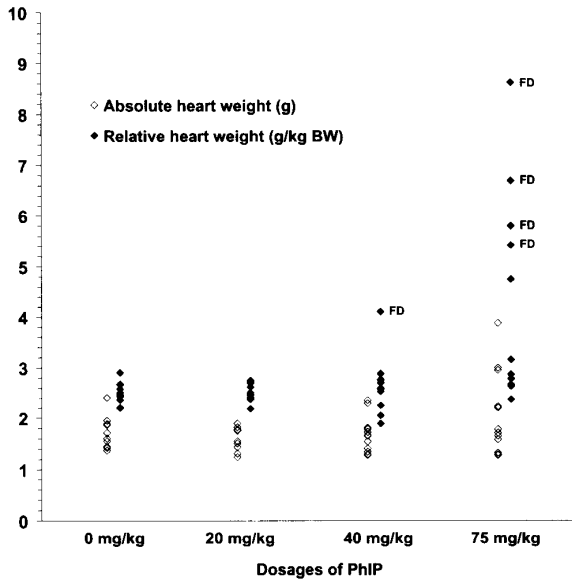


Fig. 6. Heart weights and relative weights to body weight in PhIP-treated Donryu rats. Each point reveals the value of each animal. The points marked with FD represents the values of dead animals.

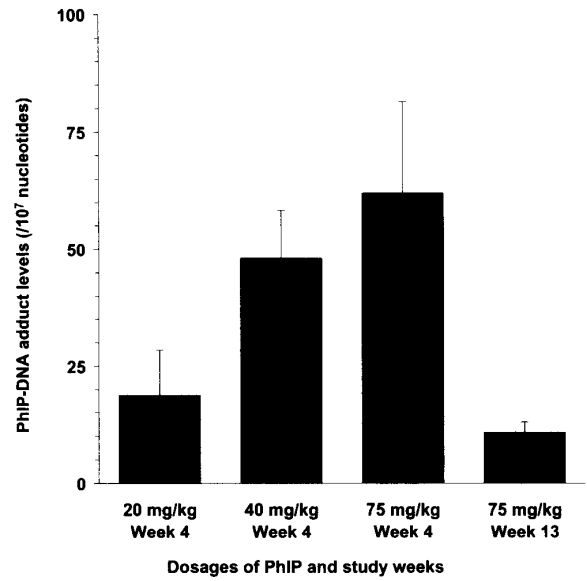


Fig. 7. PhIP-DNA adduct levels in the heart of PhIP-treated Donryu rats. Each value reveals the mean±S.E. in each group. Tissues were sampled in 4 weeks (20, 40 and 75 mg/kg groups) and 13 weeks (75 mg/kg group) after the commencement of the treatment.

Table 1. Microscopic findings in the heart of PhIP-treated Donryu rats

	Dosage of PhIP		0mg/kg				20mg/kg				40mg/kg				75mg/kg		
	Study weeks		4	13	26	52	4	13	26	52	4	13	26	52	4	13	26
			(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(2)	(3)	(4)*	(3)	(2)	(6)*	(4)*	(2)
Left ventricle																	
Mononuclear cell Infiltration			0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	4	3	0
Vacuolization of myocardium			0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	3	2	3	2	2
Necrosis of myocardium			0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Fibrosis			0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	3	3	1
Organized thrombus			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Dilatation of ventricle			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Right ventricle																	
Dilatation of ventricle			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1
Left atrium																	
Organized thrombus			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0
Right atrium																	
Organized thrombus			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Number in parenthesis reveals the number of animals examined. FD: animals found dead

*Data of the dead animals were included in the data of the proximate week of the study period.

Table 2. Ultrastructural findings in the heart (left ventricular myocardium) of PhIP-treated Donryu rats

	Dosage of PhIP		0mg/kg/day				20mg/kg/day				40mg/kg/day				75mg/kg/day		
	Study weeks		4	13	26	52	4	13	26	52	4	13	26	52	4	13	26
			(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(2)	(3)	(3)	(3)	(2)	(3)	(3)	(2)
Decrease of myofibrils			0	0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	1	3	2	2
Dilatation of sarcoplasmic reticulum			0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	2	1	2	2	2
Proliferation of mitochondria			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
Swelling of sarcoplasm			0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	3	2	1

Number in parenthesis reveals the number of animals examined.

(50%)で筋小胞体の拡張が認められた。ミトコンドリア数の増加は筋原線維の減少がみられた部位に多く観察された。なお、検査した PhIP 群 6 例中、肉眼的に心肥大がみられたのは 1 例のみであった。

実験 2

試験期間中に 40 mg/kg 群の 1 例 (投薬開始後 4 週) 及び 75 mg/kg 群の 4 例 (投薬開始後 2~12 週) が死亡し、これらの例は心肥大, 左心室拡張, 左心房血栓, あるいは胸水/腹水を示していた。投与期間中は体重減少が投薬各群でみられ, 20 及び 40 mg/kg 群はその後対照群と同程度までに回復したが, 75 mg/kg 群は試験期間中, 対照群に対し低値を示した。投与開始 4 週後に投薬各群の血圧が対照群に対し有意な低値を示したが, それ以降はいずれの時点においても投薬群と対照群との間に差はみられなかった (Fig. 5)。投薬群の死亡例の心臓重量は対照群及び投薬群の生存例に比較して高値を示し, 死亡例と生存例の値に著明な差が認められた (Fig. 6)。

心臓の病理組織学的観察 (Table 1) では, 75 mg/kg 群の投与開始後 4 週から左心室の炎症性細胞浸潤, 心筋細胞の空胞化/壊死, 線維化が認められ, 投与開始後 26 週まで観察された。死亡例ではさらに心房内血栓形成や右心室拡張も認められた。40 mg/kg 群では投与開始後 4 週に, 少数例で心筋細胞の空胞化のみがみられたが, 投与開始後 26 週以降に心筋細胞の変性/壊死, 炎症性細胞浸潤や線維化が認められた。20 mg/kg 群では投与開始後 4 週に, 炎症性細胞浸潤や心筋細胞の空胞化が少数例にみられたのみで, その後は心臓に異常は認められなかった。

心臓の電子顕微鏡的観察では, 筋原線維の減少が投与開始後 4 週から 40 mg/kg 以上の群で認められた。また, 筋小胞体の拡張が 75 mg/kg 群では投与開始後 4 週から, 40 mg/kg 群では投与開始後 13 週から認められた。ミトコンドリア数の増加は投与開始後 13 週から 75 mg/kg 群で認められた。その他, 光学顕微鏡的に心筋細胞の空胞に相当すると考えられる筋形質の腫脹が 40 mg/kg 以上の群で投与開始後 4 週から認められた (Table 2)。

PhIP-DNA adduct 免疫染色では投与開始 4 週後に, 投薬各群全例で心筋細胞核周囲に弱陽性所見が認められた。投与開始 13 週後ではいずれの群でも陰性であった。また, 心筋細胞中の PhIP-DNA adduct レベルは投与開始 4 週後に用量依存的な増加が認められ, 投与開始 13 週後 (75 mg/kg 群) には低値を示した (Fig. 7)。

考 察

心肥大を伴った死亡例の増加が PhIP を投与した Donryu ラットに観察された。肥大心は左心室拡張, 左心房内血栓形成を示し, 拡張型心筋症の特徴を呈していたことから, うっ血性心不全で死亡したと考えられた。死亡例にみられた肥大心の組織像は線維化が強く, 心不全における終末像と考えられたが, 心筋細胞の空胞化/壊死など, 心筋細胞障害を示唆する所見がみられたことから, PhIP 投与により心機能障害が生じ, 心収縮力の低下から心不全に至ったと考えられた。血圧は PhIP 投与 4 週後に一時的な低下がみられており, 心筋障害に起因した初期の心機能障害が起こっていたと推察された。また, その後の血圧に異常はないことから, 心肥大の要因として血圧上昇による圧負荷の増大はなかったと考えられた。なお, 心肥大にもなつてみられた胸水貯留, 心房/心室内血栓形成, 全身性浮腫は心機能低下に伴う二次的変化と考えられた。心不全による死亡は投与後 40 週から増加したことから, 心筋細胞の障害から心機能不全に至るまで平均約 10 ヶ月以上を要すると考えられた。また, 心肥大は死亡例に特徴的であり, 心重量の増加もほとんど死亡例のみに用量依存的にみられ, 生存例の心重量は対照群と同等であったが, 組織学的には生存例においても 40 mg/kg 以上を投与した場合, 投与開始後 1~3 ヶ月から心筋細胞の障害が観察されたことから, 心筋障害の進行がある閾値を越えると急速に心機能不全, 死亡に至ると考えられた。

PhIP 投与により心筋障害が生じることはすでに報告されており, Davis ら¹⁾は PhIP や 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) などの心臓に DNA adduct を形成するヘテロサイクリックアミン投与により, 心臓に心筋細胞の壊死を伴う慢性炎症巣, 筋原線維融解及び T 管の拡張が発現すること, また, 高橋ら¹⁵⁾は F344 ラットにおいて心筋の変性/壊死, 異常ミトコンドリアの増生を報告している。しかしながら, これらの報告では心筋病変に起因する心機能障害や生存率への影響は報告されていない。今回, Donryu ラットで長期観察することにより既報の心臓病変に加え, 心不全にまで至る PhIP の強い心毒性作用が示された。

PhIP 投与による心筋障害の原因として, DNA adduct の形成やフリーラジカルによるミトコンドリア障害/機能低下が提唱されている。PhIP は大腸, 前立腺, 乳腺などのターゲット器官に加え, 脾臓, 心臓, 肺にも DNA adducts を生成し, 特に心臓には高レベ

ルの DNA adduct を形成することが知られている^{9,15,17}。今回、心筋組織内 DNA adduct 量が用量依存的に増加していることが確認され、また、PhIP-DNA adduct が投与初期に免疫組織学的に心筋細胞核に検出されたことから、DNA adduct の形成が心筋障害に関与している可能性が示された。同じヘテロサイクリックアミンの一つである MeIQx 投与では心肥大はみられておらず、死亡率の増加もなかった。MeIQx は PhIP に比較し心臓に高レベルの DNA adduct を形成しないことから、このことが心毒性発現の差になった可能性が考えられた。一方、今回の心臓の超微形態像は筋原線維の減少及び筋小胞体の拡張が特徴的であり、David らも同様な所見の報告を行っているが¹¹、これは心毒性を示すことで知られるアドリアマイシンでの心筋像に類似している。アドリアマイシンではフリーラジカル反応や酸化的ストレスの触媒として作用する鉄が心毒性の発現機作に重要な役割を演じていると考えられている⁸。Davis らは抗酸化剤がヘテロサイクリックアミン (IQ, PhIP) による心毒性を抑制することを示し²、DNA adduct 量との相関性はみられなかったことから、彼らはヘテロサイクリックアミンの心毒性メカニズムに DNA adduct は関与せず、フリーラジカルがその原因であるとしている。今後心毒性への DNA adduct 形成及びフリーラジカルとの関連についてのより詳細な解明が必要と思われる。

最近、我々が同条件で F344 ラットや若齢 (6 週齢) の Donryu ラットで行った実験では、加齢 Donryu ラットでみられた様な心肥大や死亡例の増加はみられなかったため (柏原, 渡辺未発表)、心肥大の発現に系統差並びに週齢差があることが示されており、発現機作を含め今後の検討課題である。

今回用いた PhIP の用量は、投薬期間中に体重減少あるいは体重増加抑制がみられたことから、ラットにおける最大耐量に値する量である。PhIP のヒトでの曝露量は 1 日あたり 0.005–0.3 µg/person と報告されており¹⁸、今回心肥大を生じさせた投与量はこの約 10^7 – 10^9 倍に相当する。従って、今回みられたような変化が通常の食生活においてヒトに起こる可能性は非常に低いと考えられるが、個人間での食生活の違い及び長期曝露による影響は考慮すべき事項であり、今後の調査を待たねばならない。

結 論

今回、PhIP の高用量を Donryu ラットに投与することにより心不全による死亡例が多発した。これは PhIP の心筋障害作用に起因する拡張型心筋症を原因

とするものであり、そのメカニズムに心筋細胞における PhIP-DNA adduct の形成が関与していると考えられた。

謝 辞

最後に、御指導を賜った広島大学原爆放射線医科学研究所 渡邊敦光教授、論文校正を御願した広島大学医学部保健学科 梶原博毅教授、電子顕微鏡の撮影に関しては広島大学医学部保健学科 川真田聖一教授、PhIP 並びに MeIQx 等の供与を受けた国立がんセンター研究所 若林敬二博士、PhIP-DNA adduct の免疫組織学的染色についてご支援、ご教授いただいた、名古屋市立大学医学部第一病理学教室 高橋 智先生、PhIP-DNA adduct 測定を実施していただいた国立がんセンターがん予防研究部 戸塚ゆ加里先生、実験の技術的補助をしていただいた、濱田仁美氏、西岡輝之氏に深謝致します。なお、本研究の一部は厚生省がん研究班助成金若林班の援助により実施されました。

参 考 文 献

1. Davis, C.D., Farb, A., Thorgeirsson, S.S., Virmani, R. and Snyderwine, E.G. 1994. Cardiotoxicity of heterocyclic amine food mutagens in cultured myocytes and in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 124 : 201–211.
2. Davis, C.D. and Snyderwine, E.G. 1995. Protective effect of N-acetylcysteine against heterocyclic amine-induced cardiotoxicity in cultured myocytes and in rats. *Food Chem. Toxicol.* 33 : 641–651.
3. Fukutome, K., Ochiai, M., Wakabayashi, K., Watanabe, S., Sugimura, T. and Nagao, M. 1994. Detection of guanine-C8-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine adduct as a single spot on thin-layer chromatography by modification of the ³²P-postlabeling method. *Jpn. J. Cancer Res.* 85 : 113–117.
4. Imaida, K., Hagiwara, A., Yada, H., Masui, T., Hasegawa, R., Hirose, M., Sugimura, T., Ito, N. and Shirai, T. 1996. Dose-dependent induction of mammary carcinomas in female Sprague-Dawley rats with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *Jpn. J. Cancer Res.* 87 : 1116–1120.
5. Kaderlik, K.R., Minchin, R.F., Mulder, G.J., Ilett, K.F., Daugaard, Jenson-M., Teitel, C.H. and Kadlubar, F.F. 1994. Metabolic activation pathway for the formation of DNA adducts of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in rat

- extrahepatic tissues. *Carcinogenesis* 15 : 1703-1709.
6. **Kato, T., Ohgaki, H., Hasegawa, H., Sato, S., Takayama, S. and Sugimura, T.** 1988. Carcinogenicity in rats of a mutagenic compound, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline. *Carcinogenesis* 9 : 71-73.
 7. **Manabe, S., Suzuki, H., Wada, O. and Ueki, A.** 1993. Detection of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in beer and wine. *Carcinogenesis* 14 : 899-901.
 8. **Minotti, G., Cairo, G. and Monti, E.** 1999. Role of iron in anthracycline cardiotoxicity: new tunes for an old song? *FASEB J.* 13 : 199-212.
 9. **Overvik, E., Ochiai, M., Hirose, M., Sugimura, T. and Nagao, M.** 1991. The formation of heart DNA adducts in F344 rat following dietary administration of heterocyclic amines. *Mutat. Res.* 256 : 37-43.
 10. **Shirai, T., Sano, M., Tamano, S., Takahashi, S., Hirose, M., Futakuchi, M., Hasegawa, R., Imaida, K., Matsumoto, K., Wakabayashi, K., Sugimura, T. and Ito, N.** 1997. The prostate: a target for carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) derived from cooked foods. *Cancer Res.* 57 : 195-198.
 11. **Shirai, T., Tamano, S., Sano, M., Masui, T., Hasegawa, R. and Ito, N.** 1995. Carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in rats: dose-response studies. *Princess Takamatsu Symp.* 23 : 232-239.
 12. **Snyderwine, E.G., Schut, H.A., Sugimura, T., Nagao, M. and Adamson, R.H.** 1994. DNA adduct levels of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in tissues of cynomolgus monkeys after single or multiple dosing. *Carcinogenesis* 15 : 2757-2761.
 13. **Sugiyama, S., Yamada, K., Hayakawa, M., Esumi, H. and Ozawa, T.** 1996. Effects of ubiquinone enriched diet on deterioration of mitochondrial respiratory function caused by fried beef derived mutagenic factor in rats. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 40 : 305-314.
 14. **Sugimura, T.** 1997. Overview of carcinogenic heterocyclic amines. *Mutat. Res.* 376 : 211-219.
 15. **Takahashi, S., Imaida, K., Shirai, T., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T. and Ito, N.** 1996. 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.
 16. **Takahashi, S., Tamano, S., Hirose, M., Kimoto, N., Ikeda, Y., Sakakibala, M., Tada, M., Kadlubar, F.F., Ito, N. and Shirai, T.** 1998. Immunohistochemical demonstration of carcinogen-DNA adducts in tissues of rats given 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP): detection in paraffin-embedded sections and tissue distribution. *Cancer Res.* 58 : 4307-4313.
 17. **Takayama, K., Yamashita, K., Wakabayashi, K., Sugimura, T. and Nagao, M.** 1989. DNA modification by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine in rats. *Jpn. J. Cancer Res.* 80 : 1145-1148.
 18. **Wakabayashi, K., Totsuka, Y., Fukutome, K., Oguri, A., Ushiyama, H. and Sugimura, T.** 1997. Human exposure to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines and comutagenic beta-carbolines. *Mutat. Res.* 376 : 253-259.

Cardiomyopathy in 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) Treated Donryu Rats

Yoshimasa ISHIMURA

Department of Cellular Biology, Research Institute for Radiation Biology and
Medicine, Hiroshima University, Minami-ku, Hiroshima 734-8553, Japan

(Director: Prof. Hiromitsu WATANABE)

2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) is a heterocyclic amine derived from cooked meat and a potent environmental carcinogen for rat colon, prostate and mammary glands. PhIP (75 mg/kg/day) treatment by gavage ten times on alternate days caused increases in mortality and incidence of dilated cardiomyopathy in Crj:Donryu rats after the 52-week study period. Microscopically, vacuolization/necrosis of the cardiac muscle, inflammatory cell infiltration and fibrosis in the left ventricle, atrial thrombosis and left ventricular dilatation were observed in the heart from Week 4 of the study period. Electronmicroscopically, decrease of myofibrils, increase of mitochondria and dilatation of sarcoplasmic reticulum were observed. PhIP (20, 40 and 75 mg/kg/day) treatments decreased blood pressures temporarily in Week 4. PhIP-DNA adduct levels increased in Week 4 of PhIP (20, 40 and 75 mg/kg/day) treatments and decreased in Week 13 of PhIP (75 mg/kg/day) treatment. These results suggest that the increases in mortality and incidences of dilated cardiomyopathy in Crj:Donryu rats by high dose of PhIP treatment were caused by the action of PhIP against the cardiac muscle, which may be related to PhIP-DNA adduct formation in the cardiac muscle cells.