

表 6 病理組織学的検査結果 (雄)

Organ/Tissue	Findings	Grade	Control group n = 10	Wormwood extracts 2% group n = 10
Liver	Microgranuloma	+	7	3
Spleen			0	0
Kidney	Basophilic tubule Carcification	+ +	1 1	5 1
Heart	Necrosis of cardiomyocytes	+	2	0
Muscle			0	0
Tongue			0	0
Lung	Hemorrhage (focal)	+	1	0
Cerebrum	Carcification	+	2	0
Cerebellum			0	0
Submandibular gland	Vacuolation of serous acini	+ ++	4 0	3 2
Submandibular lymph node			0	0
Skin			0	0
Eye			0	0
Harderian gland			0	0
Artery			0	0
Thymus			0	0
Trachea			0	0
Prostate	Aggregation of mononuclear cells	+	4	2
Seminal vesicle			0	0
Urinary bladder			0	0
Pancreas			0	0
Forestomach			0	0
Glandular stomach			0	0
Duodenum			0	0
Jejunum			0	0
Ileum			0	0
Cecum			0	0
Colon			0	0
Rectum			0	0
Mesentery lymph node			0	0
Testis			0	0
Epididymidis	Granuloma		0	0
Pituitary gland	Rathke's pouch		0	0
	Pars distalis	Cyst	+	2
		Hypertrophy	+	0
	Pars intermedia	Cyst like structure	+	1
	Pars nervosa			0
Thyroid gland	Hypertrophy	+	1	2
Adrenal gland			0	0
Peripheral nerve			0	0
Eye			0	0
Harderian gland			0	0
Femur			0	0
Sternum			0	0
Spinal cord	Cervical vertebrae		0	0
	Thoracic vertebrae		0	0
	Lumbar vertebrae		0	0

+ : slight, ++ : moderate

表 7 病理組織学的検査結果 (雌)

Organ/Tissue	Findings	Grade	Control group n = 10	Wormwood extracts 2% group n = 10
Liver	Microgranuloma	+	1	4
Spleen			0	0
Kidney	Basophilic tubule	+	2	4
	Hyaline cast	+	0	1
	Calcification	+	4	3
Lung			0	0
Heart			0	0
Muscle		+	0	0
Tongue		+	0	0
Cerebrum	Calcification	+	1	0
Cerebellum			0	0
Submandibular gland	Vacuolation of serous acini	+	4	4
		++	0	1
Submandibular lymph node			0	0
Skin			0	0
Mammary gland			0	0
Eye			0	0
Harderian gland			0	0
Artery			0	0
Thymus			0	0
Trachea	Cystic dilatation, tracheal gland	+	0	1
Uterus			0	0
Ovary			0	0
Vagina			0	0
Urinary bladder			0	0
Pancreas			0	0
Forestomach			0	0
Glandular stomach			0	0
Duodenum			0	0
Jejunum			0	0
Ileum			0	0
Cecum			0	0
Colon			0	0
Rectum			0	0
Mesentery lymph node			0	0
Pituitary gland	Rathke's pouch	+	0	1
	Pars distalis	Cyst	+	0
	Pars intermedia	Cyst like structure	+	1
	Pars nervosa		0	0
Thyroid gland	Hypertrophy	+	0	1
Adrenal gland			0	0
Peripheral nerve			0	0
Eye			0	0
Harderian gland			0	0
Femur			0	0
Sternum			0	0
Spinal cord	Cervical vertebrae		0	0
	Thoracic vertebrae		0	0
	Lumbar vertebrae		0	0

+: slight, ++: moderate

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書

ガムベース等の安全性に関する研究
－米糠スフィンゴ糖脂質のラットにおける 13 週間反復投与試験－

分担研究者 三森国敏 東京農工大学 農学部 獣医学科 家畜病理学講座 教授

研究要旨 添加物の規格基準作成の一環として、米糠スフィンゴ糖脂質を雌雄の Wistar Hannover (GALAS)系ラットに 13 週間反復投与し、その毒性について検討した。動物を雌雄各 8 匹ずつ 4 群に分け、米糠スフィンゴ糖脂質の 0, 60, 250 及び 1000mg/kg を 13 週間強制経口投与した。その結果、いずれの投与群においても死亡動物は認められず、体重増加量、血液学的及び血清生化学的検査、臓器重量測定において被験物質投与に起因した変化は何ら認められなかった。現在、病理組織学的検査を実施中である。

A. 研究目的

スフィンゴ糖脂質は、スフィンゴ脂質の一つであり、スフィンゴ脂質はスフィンゴシンに代表される長鎖のアミノアルコールを持つ脂質の総称で、角質層中の細胞間脂質の約 50%を占めている。加齢に伴い、スフィンゴ脂質が減少することが知られており、加齢とともに多くなる皮膚からの水分喪失の増加の原因の一つと考えられている。スフィンゴ糖脂質にはセラプロシド、ガングリオシドなどがあり、親水基として糖鎖、疎水基としてセラミドを持つ両親媒性の機能性複合糖質である。スフィンゴ糖脂質は、細胞膜外層においてコレステロールや GPI 型糖タンパク質、Src などのリン酸化酵素とマイクロドメインを形成し、細胞内・細胞間の情報伝達、接着、増殖、分化等を制御していると考えられている。従来、化粧品の素材として、合成スフィンゴ糖脂質や牛由来の動物性スフィンゴ糖脂質が多く利用されてきたが、近年、植物由来のスフィンゴ糖脂質が注目され、利用されている。今回実験に用いるスフィンゴ

糖脂質は米糠より精製した天然物であり、水系の商品に使用できる化粧品水性基材の他、健康食品や食品添加物用にも用いられている。現在、米糠スフィンゴ糖脂質の毒性に関する情報がほとんどないことから、米糠スフィンゴ糖脂質の反復投与による毒性変化を明らかにする目的で、ラットを用いた 13 週間反復投与毒性試験を実施した。

B. 研究方法

1. 被験物質および投与量：

米糠スフィンゴ糖脂質は、株式会社岡安商店（埼玉）より供与されたものを用いた。13 週間反復投与毒性試験に先立ち、被験物質の投与形態の状態を確認するため、0.5% Carboxy Methyl Cellulose (CMC) 溶液に懸濁して検討したところ、2000mg/kg (200mg/mL)以上では調製薬物の粘調性が極めて高く、投与操作が困難であったことから、本実験における最高投与量を 1000mg/kg(100mg/mL)と設定した。以下公比約 4 で減じ、250, 60mg/kg を中間用量群及び低用量群にそれぞれ設

定した。

2. 動物および方法：

5週齢のWistar Hannover (GALAS)ラット雌雄各32匹を日本クレア株式会社より購入し、約1週間の馴化飼育後、雌雄とも各群8匹ずつ4群に分けて実験を行った。動物の飼育はバリアーシステムの動物飼育室にて行い、室内環境条件は、温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 10\%$ 、換気回数18回/時間、蛍光照明12時間(7-19時)とした。動物をラット用吊下げ型金網ケージに2匹或いは3匹/ケージ収容し、固型基礎飼料(CE-2, 日本クレア株式会社)および上水道水を自由に摂取させた。

被験物質は、投与物質調製時までは 4°C で保存し、週1或いは2回調製を行った。被験物質は0.5% CMC 溶液に100, 25 or 6mg/mLの濃度で懸濁して調製し、投与時まで 4°C で保存した。1日1回週5回(月曜日-金曜日)、シリンジおよびゾンデを用いて胃内強制経口投与した。一般状態及び死亡動物の有無を毎日観察し、体重及び摂餌量及び飲水量を毎週測定した。なお、摂餌量及び飲水量は、給餌或いは給水量から残餌或いは残水量を差引いた量として算出した。投与開始13週後に全生存動物を屠殺剖検し、試験を終了した。

動物をエーテル麻酔下で開腹し、腹部大動脈より採血を行った。血液学的検査には多項目自動血球計数装置(Sysmex SE-9000型, Sysmex)を用い、赤血球数(RBC)、ヘモグロビン濃度(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)及び白血球数(WBC)を測定するとともに、血液塗沫標本を作製し、血液細胞自動分析装置(MICROX HEG-120A型, 立石電気)を用いて以下の

血液像について分類した。分葉核好中球(SEG)、好酸球(Eos)、リンパ球(LYMP)、単球(MONO)。また、総蛋白(TP)、アルブミン・グロブリン比(A/G)、総コレステロール(TC)、血中尿素窒素(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)、グルタミン酸オキサロアセテック トランスアミラーゼ(GOT)、グルタミン酸ピルビック トランスアミラーゼ(GPT)、アルカリホスファターゼ(ALP)及びアルブミン(ALB)の各項目についての血清生化学的検査を株式会社SRLで実施した。動物を剖検後、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、下垂体、副腎、甲状腺、精巣、子宮、卵巣の重量を測定した。また、上記臓器に加え、主要臓器を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した後、常法に従い薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、対照群と高用量群について病理組織学的検索を行った。

3. 統計学的解析：

体重、摂餌量、飲水量、血液学的検査、血清生化学的検査及び臓器重量の各測定値について群毎に平均値及び標準偏差を求め、多重比較検定を行った。すなわち、Bartlett法により分散の均一性を調べ、均一な場合はDunnettの検定を行ない、不均一な場合はDunnett型の順位和検定を行った。有意水準は危険率5%以下とした。

C. 研究結果

1. 死亡動物及び体重変化：

実験全期間を通じ、死亡動物は認められなかった。

体重は、雌雄いずれの投与群でも実験期間中を通じ対照群と同様の推移を示した(図1, 表1)。

2. 摂餌量及び飲水量：

摂餌量は雌雄いずれの投与群も実験期間を通し、対照群との間に差は認められなかった。飲水量も同様に雌雄いずれの投与群でも実験期間を通し、対照群との間に差は認められなかった（表1）。

3. 血液学的及び血清生化学的検査：

血液学的検査では、雌の 1000mg/kg 投与群において白血球百分比における EOS の割合が有意な増加($p<0.01$)を示した。雄では被験物質投与に起因した変化は認められなかった（表2）。

血清生化学的検査では、雄の 250mg/kg 投与群で BUN 値が有意な増加($p<0.05$)を示した。また 1000mg/kg 投与群では A/G 比が有意に低下($p<0.05$)を示した。雌では被験物質投与に起因した変化は認められなかった（表3）。

4. 臓器重量：

雌の 250mg/kg 以上の投与群で子宮及び卵巣の相対重量の有意な減少（子宮 $p<0.05$ 、卵巣 $p<0.01$ ）が認められた（表4, 5）。雄では被験物質投与に起因した変化は認められなかった。

7. 病理組織学的所見：

現在、標本作製作業中である。

D. 考察

米糠スフィンゴ糖脂質の反復投与による毒性変化を明らかにする目的で、雌雄ラットに13週間反復混水投与した。

血液学的検査において認められた雌 1000mg/kg 投与群での白血球百分比における EOS の割合増加は、同群の1匹の動物が高値を示しているが、WBC 値には変化が認められないことから、毒性学的意義は低いものと考えられた。血清生化学的

検査で認められた雄の 250mg/kg 投与群における BUN 値の有意な増加は投与量に相関しないことから偶発的な変化と考えられた。また雄 1000mg/kg 投与群における A/G 比の低下は、いずれもその変動幅がわずかであることやその他の関連項目に変化がみられないことから毒性学的意義はないものと判断した。臓器重量測定において雌の 250mg/kg 以上の投与群で認められた子宮及び卵巣の相対重量の減少は、病理学的検査結果を待って判断したい。その他、現在進行中の病理組織学的検査以外の検査項目においては対照群との間に差は認められなかった。なお、現在、病理組織標本作製中である。

E. 結論

Wistar Hannover (GALAS)ラットを雌雄各8匹ずつ4群に分け、米糠スフィンゴ糖脂質の0, 60, 250及び1000mg/kgを13週間強制経口反復投与した。いずれの投与群においても死亡動物は認められず、体重増加量、血液学的及び血清生化学的検査及び臓器重量においても被験物質投与に起因した変化は何ら認められなかった。なお、現在、病理組織標本作製中である。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案特許：なし
3. その他：なし

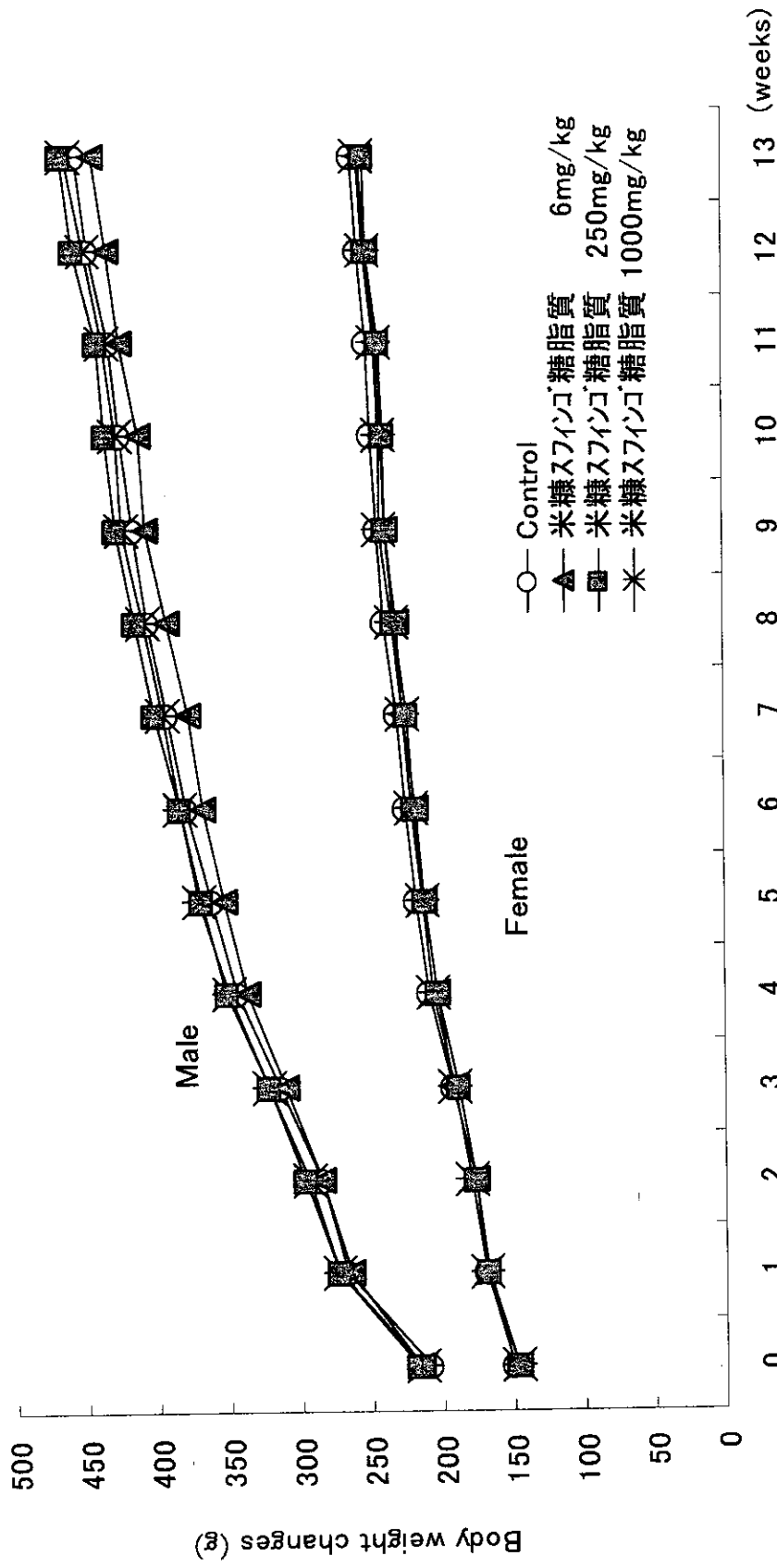


図1 体重の推移

表 1. 体重, 摂餌量, 飲水量

	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Final body weight (g)	Diet intake (g/rat/day)	Water consumption (g/rat/day)
Male	0	8	456.1 ± 54.6 ^{a)}	25.9	36.3
	60	8	443.6 ± 39.7	25.2	33.9
	250	8	466.8 ± 26.3	26.5	33.6
	1000	8	463.4 ± 33.4	26.4	34.2
Female	0	8	262.3 ± 17.1	19.6	32.6
	60	8	255.4 ± 12.5	19.1	25.9
	250	8	252.5 ± 12.1	19.7	40.9
	1000	8	257.8 ± 13.6	19.6	31.5

表2 血液学的検査結果

Dose level (mg/kg)	0	60	250	1000
No. of animals	8	8	8	8
Male				
RBC $\times 10^4/\text{mm}^3$	712.9 \pm 49.2 ^{a)}	736.6 \pm 31.8	755.4 \pm 24.0	750.1 \pm 49.2
HB g/dl	13.6 \pm 0.7	14.1 \pm 0.4	14.0 \pm 0.4	14.0 \pm 0.7
HT %	40.1 \pm 2.4	41.3 \pm 2.3	41.4 \pm 1.4	41.1 \pm 2.9
MCV m^3	56.4 \pm 1.7	55.9 \pm 1.6	54.8 \pm 1.7	54.6 \pm 0.7
MCH pg	19.1 \pm 0.6	19.0 \pm 0.8	18.6 \pm 0.5	18.6 \pm 0.5
MCHC %	34.0 \pm 0.9	34.3 \pm 1.2	34.0 \pm 0.9	34.1 \pm 1.1
WBC /ml	2737.5 \pm 776.3	3387.5 \pm 603.4	3487.5 \pm 1172.8	3387.5 \pm 1089.5
Differential cell count (%)				
SEG	17.9 \pm 7.4	15.4 \pm 4.1	16.0 \pm 5.0	16.4 \pm 4.4
EOS	1.7 \pm 1.0	3.0 \pm 1.9	1.7 \pm 0.6	2.4 \pm 1.1
MONO	2.0 \pm 1.4	1.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.9	1.5 \pm 0.8
LYMP	79.4 \pm 8.9	81.4 \pm 6.0	81.9 \pm 5.0	81.0 \pm 4.7
Female				
RBC $\times 10^4/\text{mm}^3$	659.1 \pm 39.0	640.1 \pm 27.0	655.3 \pm 22.7	638.9 \pm 22.0
HB g/dl	13.6 \pm 0.6	13.3 \pm 0.6	13.6 \pm 0.5	13.4 \pm 0.7
HT %	39.1 \pm 2.4	38.0 \pm 2.1	38.8 \pm 1.6	38.0 \pm 2.1
MCV m^3	59.4 \pm 2.9	59.5 \pm 1.9	59.1 \pm 1.5	59.5 \pm 2.1
MCH pg	20.5 \pm 0.9	20.8 \pm 0.5	20.8 \pm 0.5	21.0 \pm 0.8
MCHC %	34.6 \pm 1.2	34.9 \pm 0.8	35.0 \pm 0.8	35.4 \pm 0.9
WBC /ml	1900.0 \pm 1028.2	1862.5 \pm 855.1	1425.0 \pm 525.8	2512.5 \pm 693.7
Differential cell count (%)				
SEG	17.8 \pm 6.0	15.4 \pm 2.7	16.1 \pm 5.0	13.9 \pm 4.4
EOS	1.3 \pm 0.5	1.5 \pm 0.6	2.3 \pm 0.6	4.0 \pm 1.4 ^{**}
MONO	1.9 \pm 1.5	1.2 \pm 0.4	1.3 \pm 0.5	2.2 \pm 1.3
LYMP	79.4 \pm 6.6	83.1 \pm 2.3	82.0 \pm 4.1	83.8 \pm 4.8

a) : Mean \pm S.D.

** : Significantly different from the control at $p < 0.01$

表3 血清生化学的検査結果

Dose level (%)	0	60	250	1000
No. of animals	8	8	8	8
Male				
TP g/dl	5.9 ± 0.5 ^{a)}	6.1 ± 0.2	6.3 ± 0.2	6.0 ± 0.4
A/G	1.8 ± 0.2	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.2 [*]
TC mg/dl	50.8 ± 7.0	50.6 ± 4.5	51.6 ± 6.2	50.6 ± 7.9
BUN mg/dl	23.9 ± 1.7	23.3 ± 2.6	26.6 ± 0.8 [*]	24.0 ± 2.2
CRE mg/dl	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.30 ± 0.00	0.30 ± 0.00
Ca mg/dl	9.6 ± 0.4	9.6 ± 0.2	9.7 ± 0.2	9.6 ± 0.5
IP mg/dl	4.8 ± 0.5	4.7 ± 0.5	4.5 ± 0.4	4.7 ± 0.6
Na mEQ/l	147.9 ± 2.2	146.0 ± 1.5	146.3 ± 0.7	147.1 ± 1.6
K mEQ/l	3.2 ± 0.3	3.2 ± 0.2	3.4 ± 0.2	3.2 ± 0.2
Cl mU/dl	107.0 ± 3.5	105.4 ± 1.8	105.9 ± 2.0	106.3 ± 2.7
GOT IU/l	74.5 ± 6.8	73.5 ± 8.9	67.4 ± 5.7	73.9 ± 13.9
GPT IU/l	50.6 ± 10.9	44.8 ± 5.2	43.6 ± 6.0	44.6 ± 11.1
ALP IU/l	396.8 ± 150.5	387.1 ± 93.6	409.4 ± 145.0	379.1 ± 149.3
ALB g/dl	3.8 ± 0.4	3.9 ± 0.1	51.6 ± 0.2	3.7 ± 0.3
Female				
TP g/dl	6.2 ± 0.4	6.1 ± 0.4	6.2 ± 0.4	6.3 ± 0.5
A/G	2.2 ± 0.3	2.1 ± 0.4	1.9 ± 0.2	2.3 ± 0.4
TC mg/dl	53.5 ± 9.7	49.0 ± 9.2	50.8 ± 7.6	53.1 ± 8.3
BUN mg/dl	22.5 ± 2.6	23.3 ± 1.9	23.1 ± 2.7	24.2 ± 3.0
CRE mg/dl	0.3 ± 0.0	0.27 ± 0.0	0.30 ± 0.00	0.30 ± 0.00
Ca mg/dl	9.4 ± 0.7	9.3 ± 0.5	9.4 ± 0.3	9.7 ± 0.6
IP mg/dl	4.4 ± 1.3	4.5 ± 0.7	4.7 ± 0.7	4.7 ± 0.7
Na mEQ/l	147.9 ± 1.7	147.9 ± 1.4	148.5 ± 1.2	146.5 ± 1.6
K mEQ/l	3.0 ± 0.5	2.9 ± 0.3	2.8 ± 0.2	3.0 ± 0.2
Cl mU/dl	108.4 ± 2.5	109.5 ± 2.4	109.3 ± 1.8	108.0 ± 3.9
GOT IU/l	69.1 ± 18.9	66.0 ± 18.1	64.5 ± 13.7	67.0 ± 15.8
GPT IU/l	44.5 ± 14.8	44.1 ± 17.1	43.9 ± 13.1	44.1 ± 15.8
ALP IU/l	224.3 ± 124.0	179.5 ± 58.9	199.5 ± 62.8	231.6 ± 106.7
ALB g/dl	4.3 ± 0.4	4.1 ± 0.4	4.1 ± 0.3	4.4 ± 0.4

a) : Mean±S.D.

* : Significantly different from the control at p<0.05

表4 臟器重量(雄)

Dose level (%)	0	60	250	1000
No. of animals	8	8	8	8
Body weight	456.1 ± 54.6 ^{a)}	443.6 ± 39.7	466.8 ± 26.3	463.4 ± 33.4
Absolute (g)				
Brain	2.07 ± 0.09	2.06 ± 0.09	2.06 ± 0.07	2.10 ± 0.06
Heart	1.09 ± 0.13	1.12 ± 0.12	1.15 ± 0.10	1.18 ± 0.07
Lung	1.32 ± 0.14	1.27 ± 0.11	1.32 ± 0.11	1.36 ± 0.05
Liver	14.48 ± 1.38	14.60 ± 1.39	15.42 ± 1.25	14.51 ± 1.28
Kidney	2.78 ± 0.48	2.71 ± 0.41	2.80 ± 0.23	2.77 ± 0.23
Spleen	0.71 ± 0.07	0.76 ± 0.10	0.77 ± 0.11	0.70 ± 0.07
Thymus	0.38 ± 0.03	0.39 ± 0.09	0.38 ± 0.09	0.41 ± 0.10
Adrenal	0.010 ± 0.002	0.010 ± 0.002	0.010 ± 0.002	0.011 ± 0.002
Pituitary gland	0.066 ± 0.011	0.066 ± 0.015	0.073 ± 0.010	0.075 ± 0.015
Thyroid gland	0.024 ± 0.006	0.029 ± 0.013	0.028 ± 0.005	0.024 ± 0.002
Testis	3.56 ± 0.24	3.57 ± 0.31	3.61 ± 0.15	3.66 ± 0.30

Relative (g/100g B.W.)				
Brain	0.46 ± 0.05	0.47 ± 0.04	0.44 ± 0.03	0.46 ± 0.04
Heart	0.24 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.02
Lung	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.29 ± 0.02
Liver	3.20 ± 0.12	3.29 ± 0.12	3.30 ± 0.12	3.14 ± 0.23
Kidney	0.61 ± 0.04	0.61 ± 0.06	0.60 ± 0.03	0.60 ± 0.05
Spleen	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.15 ± 0.02
Thymus	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.09 ± 0.02
Adrenal	0.002 ± 0.000	0.002 ± 0.001	0.002 ± 0.000	0.002 ± 0.001
Pituitary gland	0.014 ± 0.002	0.015 ± 0.003	0.016 ± 0.002	0.016 ± 0.003
Thyroid gland	0.005 ± 0.001	0.006 ± 0.003	0.006 ± 0.001	0.005 ± 0.001
Testis	0.79 ± 0.11	0.81 ± 0.07	0.78 ± 0.05	0.79 ± 0.09

a) : Mean ± S.D.

表5 臟器重量 (雌)

Dose level (%)	0	60	250	1000
No. of animals	8	8	8	8
Body weight	262.3 ± 17.1 ^{a)}	255.4 ± 12.5	252.5 ± 12.1	257.8 ± 13.6
Absolute (g)				
Brain	1.88 ± 0.09	1.93 ± 0.05	1.90 ± 0.08	1.86 ± 0.08
Heart	0.77 ± 0.06	0.77 ± 0.03	0.78 ± 0.04	0.76 ± 0.05
Lung	1.02 ± 0.11	0.97 ± 0.06	0.99 ± 0.07	1.00 ± 0.07
Liver	9.01 ± 0.97	8.93 ± 0.66	9.00 ± 0.68	9.19 ± 0.83
Kidney	1.74 ± 0.21	1.68 ± 0.10	1.73 ± 0.16	1.74 ± 0.15
Spleen	0.55 ± 0.05	0.54 ± 0.07	0.49 ± 0.06	0.76 ± 0.58
Thymus	0.33 ± 0.09	0.34 ± 0.08	0.29 ± 0.03	0.33 ± 0.06
Adrenal	0.015 ± 0.003	0.015 ± 0.002	0.015 ± 0.001	0.016 ± 0.002
Pituitary gland	0.084 ± 0.008	0.091 ± 0.009	0.089 ± 0.010	0.081 ± 0.012
Thyroid gland	0.022 ± 0.006	0.018 ± 0.002	0.019 ± 0.003	0.017 ± 0.008
Uterus	0.871 ± 0.241	0.723 ± 0.241	0.655 ± 0.205	0.745 ± 0.415
Ovary	0.099 ± 0.020	0.111 ± 0.024	0.093 ± 0.008	0.102 ± 0.013

Relative (g/100g B.W.)				
Brain	0.71 ± 0.05	0.76 ± 0.03	0.75 ± 0.03	0.72 ± 0.03
Heart	0.29 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.41 ± 0.29	0.30 ± 0.01
Lung	0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.03	0.39 ± 0.02	0.39 ± 0.02
Liver	3.37 ± 0.25	3.50 ± 0.18	3.57 ± 0.19	3.56 ± 0.23
Kidney	0.65 ± 0.06	0.66 ± 0.04	0.68 ± 0.05	0.68 ± 0.06
Spleen	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.29 ± 0.21
Thymus	0.12 ± 0.03	0.13 ± 0.03	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.02
Adrenal	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.000	0.006 ± 0.001
Pituitary gland	0.032 ± 0.004	0.036 ± 0.004	0.035 ± 0.003	0.031 ± 0.004
Thyroid gland	0.008 ± 0.002	0.007 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.006 ± 0.003
Uterus	1.834 ± 0.787	1.383 ± 0.470	1.088 ± 0.361	1.091 ± 0.618 *
Ovary	0.223 ± 0.053	0.213 ± 0.048	0.154 ± 0.015	0.148 ± 0.020 **

a) : Mean ± S.D.

* : Significantly different from the control at p<0.05

** : Significantly different from the control at p<0.01

苦味料等の安全性に関する研究

-ジャマイカカссия抽出物、サンダラック樹脂およびグレープフルーツ種子抽出物のラットによる 90 日間反復投与毒性試験-

分担研究者 関田清司 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
毒性部室長

研究協力者 小川幸男 同 毒性部室長
菅野 純 同 毒性部部長

研究要旨 ジャマイカカссия抽出物 (JQ)、サンダラック樹脂 (SR) およびグレープフルーツ種子抽出物 (GF) をラットに 90 日間反復投与し、体重、血液学的検査値および臓器重量などに及ぼす影響について検討した。JQ では、雌雄の 0.5% 添加飼料投与群で肝臓への影響が示唆された。SR では、雄の 1.0%、雌雄の 5.0% 添加飼料投与群で肝臓の相対重量増加との関連性が示唆された。GF では、雌雄ともに 1000 mg/kg/日までの投与で影響は認められなかった。

A. 研究目的

既存添加物の一部の物質については、動物などによる毒性試験成績が無く、科学的根拠に基づく安全性に関する資料が不十分であると言われている。その中の一つであるジャマイカカссия抽出物、サンダラック樹脂およびグレープフルーツ種子抽出物について、ラットによる 90 日間反復投与毒性試験を実施し、安全性および毒性に関する情報を得ることを目的とする。

なお、以下のセッションでは混乱を避けるため、

I. ジャマイカカссия抽出物のラットによる 90 日間反復投与毒性試験、II. サンダラック樹脂のラットによる 90 日間反復投与毒性試験、III. グレープフルーツ種子抽出物のラットによる 90 日間反復投与毒性試験に分けて、それぞれに研究方法、結果、考察、結語を続けて詳述する。

I. ジャマイカカссия抽出物のラットによる 90 日反復投与毒性試験

B-I. 研究方法（ジャマイカカссия抽出物）

1. 被験物質

ジャマイカカссия抽出物はジャマイカカссия (*Picrasma excelsa* (SW.) Planch) 原木の幹、枝を乾燥し、粉碎して苦味成分を熱湯で抽出、沈殿、ろ過を繰返して濃縮精製したものを用いた (Stan Chem International Ltd, England, Lot No.1301-3)。形状は淡黄色微粉末で、有効成分としてクワシン (quassin) とネオクワシン (neo-quassin) をそれぞれ 15.8% および 40.6% 含有していた (HPLC 分析、Stan Chem International Ltd)。用途は苦味料でキニーネに良く似た約 60 倍の苦味を有すると言われている。

2. 動物および飼育条件

5 週齢の F344/DuCrj ラット (SPF)、雌雄各 47 匹を日本チャールス・リバー (株) より購入

し、基礎飼料（CRF-1 粉末飼料、オリエンタル酵母工業（株））と水道水で1週間馴化飼育後、健康な雌雄各40匹を実験に供した。飼育は室温 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、換気18回/時、照明サイクル12時間（照明5:00~17:00時）の動物室で、ポリカーボネート製ケージ（W26 cm×L42 cm×H17 cm、床敷使用）に5匹ずつ収容して行った。

3. 投与方法、用量設定および群構成

被験物質の投与は粉末飼料（CRF-1 粉末飼料）による混餌投与で行った。用量設定は、予備試験として実施した0、0.1、1.0、3.0および5.0%（w/w）添加飼料による13日間反復投与試験（雄、3~5匹/群）の結果を参考に決定した。結果は次の通りであった。体重および摂餌量では、添加飼料の忌避が投与開始日に1.0%群以上で認められた。5.0%群では摂餌量の低下と体重増加抑制が認められた。血液学的検査では影響は認められなかった。血液生化学的検査では総タンパク質、アルブミンおよび総コレステロールの増加とアルカリホスファターゼの減少傾向が1.0%群以上で認められた。臓器重量では肝臓重量の増加が0.1%群以上で、また、脾臓重量の減少が3.0および5.0%群で認められた。

本試験での用量は、予備試験の肝臓重量の増加を基に、最高用量を0.5%添加飼料投与（0.5%群）とし、以下公比10で減じた0.05%（0.05%群）および0.005%添加飼料投与（0.005%群）を設けた。試験は上記3群に基礎飼料だけを投与する対照群を加えた4群で行った。各群の動物数は雌雄各10匹とし、投与開始前日にノルム値を用いた山崎らの方法¹⁾で群分けを行った。試験開始後は、それぞれの飼料を自由に摂取させた。

添加飼料製造は、メーカーの成分保証期間が2001年9月~2004年9月であったことと、予

備試験で影響が観察されたこと、および当所の飼料製造能力を考慮に入れ、3週に1回行った。

4. 検査項目および方法

1) 一般状態、体重、摂餌量および被験物質摂取量

全動物を対象に、ケージの外側より毎日1回一般状態の観察を行うとともに、体重測定日には、手に取りより詳細に一般状態の観察を行った。体重は全動物を対象に個別に投与開始日、投与開始後1および3日、以後は週1回測定した。また、臓器の相対重量算出のため、剖検日にも絶食後の体重を測定した。摂餌量は、体重測定日にケージ単位に、測定間隔期間中の累積摂取量を測定し、計算により1日1匹当たりの摂餌量（g/ラット/日）を求めた。体重1kgに対する1日当たりの被験物質摂取量（mg/kg/日）は、各週の平均体重、平均摂餌量および被験物質添加濃度から、計算により週ごとに求めた。

2) 血液学的検査および血液生化学的検査

90日間の投与終了後、一晚（約16時間）除餌を施した動物より、剖検の前に、エーテル麻酔下で血液試料を眼窩静脈叢より採取した。

血液学的検査では、全血を用いて赤血球数（RBC）、白血球数（WBC）、ヘモグロビン量（Hb）、ヘマトクリット値（Ht）、血小板数（Plt）、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）をSysmex M-2000（シスメックス（株））で測定した。また、ライト染色血液塗抹標本を作製し、白血球百分比をMICROX HEG120A（オムロン（株））にて観察した。

血液生化学的検査では、血清を用いて、総蛋白（TP）、アルブミン（Alb）、グルコース（Glc）、総コレステロール（T-Cho）、トリグリセリド

(TG)、総ビリルビン(T-Bil)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRN)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AsT)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(AIT)、γ-グルタミルトランスペプチターゼ(γ-GTP)、アルカリホスファターゼ(AIP)、ナトリウム(Na)、カリウム(K)、クロール(Cl)、カルシウム(Ca)およびリン(P)の項目について日立7150形自動分析装置(日立製作所)で測定した。また、アルブミン/グロブリン比(A/G)をTPとAlbの測定値から算出した。

3) 剖検、臓器重量測定および病理組織学的検査

血液試料を採取後、エーテル麻酔下で頸動脈放血により動物を致死させ、剖検を実施した。摘出臓器のうち、脳、心臓、肺、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣あるいは卵巣、および副腎については重量測定を行った。また、重量測定臓器に加え、下垂体、舌、眼球、唾液腺、甲状腺、骨髄(大腿骨)、気管、大動脈、膵臓、食道、胃、小腸(十二指腸、空腸、回腸)、大腸(盲腸、結腸、直腸)、リンパ節(腸間膜)、膀胱、大腿骨、骨格筋、脊髄、坐骨神経、精巣上体、精囊、前立腺および子宮は、今後予定している病理組織学的検査に供するためにリン酸緩衝10%ホルマリン液中で浸漬して固定保存した。

4) 統計解析法

体重、血液学的検査値などの測定(定量)値は、一般毒性試験における多重比較のためのアルゴリズム(ASSIT: algorithm for simultaneous statistical inference in toxicology)法¹⁾により統計解析を行った。すなわち、Bartlettの方法により分散の一様性を検定し、分散が一様な場合は一元配置の分散分析を、分散が一様でない場合は

Kruskal-Wallisの方法によって順位和検定を行い、群間に有意差が認められた場合はDunnett法に基づき対照群と各群間の一対比較検定を行った。いずれも有意水準は5%とした。

(倫理面の配慮:試験実施機関の動物倫理規定に基づき、動物への苦痛等を避けるため解剖などは麻酔下で実施した)

C-1. 研究結果(ジャマイカカシミア抽出物)

1. 一般状態

試験期間を通じて、いずれの群でも死亡例は認められず、一般状態にも変化は認められなかった。

2. 体重および摂餌量

雌雄の体重および摂餌量の推移を図I-1に示した。体重では、群間の差は認められなかった。摂餌量では、対照群に比べ0.5%群で、雄の7日および雌の1日目に低値が認められた。また、投与期間の中期以降では、雌雄ともに僅かながら高値を示す傾向で推移した。しかし、全投与期間を通じて平均した平均摂餌量では、雌雄ともに、群間の差は認められなかった(表I-1)。

3. 被験物質摂取量

各週ごとに求めた被験物質摂取量をさらに全投与期間を通じて平均した平均被験物質摂取量を表I-1に示した。用量設定に対応した摂取が認められ、最高用量群である0.5%群の平均被験物質摂取量は雄で284.2 mg/kg/日、雌で309.8 mg/kg/日であった。

4. 血液学的検査

雄の結果を表I-2に、雌の結果を表I-3に示した。雄ではMCVおよびMCHが、雌ではHbおよびHtがそれぞれ0.5%群で有意な減少が認められた。

5. 血液生化学的検査

雄の結果を表 I-4 に示した。AIP の減少が全処置群で、T-Bil の減少が 0.05 および 0.5%群で認められた。さらに、0.5%群では TP、Alb および Ca の増加と TG および AsT の減少が認められた。

雌の結果を表 I-5 に示した。0.5%群で TP、Alb および Ca の増加と AIP の減少が雄同様に認められた。また、雄では認められなかった T-Cho、 γ -GTP および P の増加も認められた。0.005 および 0.05%群に有意差は認められなかった。

6. 臓器重量

雄の結果を表 I-6 に、雌の結果を表 I-7 に示した。肝臓の絶対および相対重量の増加が雌雄の 0.5%群で認められた。その他、雄では 0.5%群の腎臓で絶対重量の軽度の増加傾向を伴う相対重量の有意な増加が認められた。雌では、0.5%群で心臓の絶対および相対重量の増加が、0.05 および 0.5%で肺の相対重量の有意な減少が認められた。

D-I. 考察 (ジャマイカカシア抽出物)

一般状態、摂餌量および体重に被験物質投与の影響を示唆する変化は認められず、被験物質は体重増加を含む一般状態に影響を及ぼさないものと考えられた。

血液学的検査で認められた雄の 0.5%群での MCV と MCH および雌の 0.5%群での Hb および Ht の減少は対照群に対して 1.8~2.5%程度の極軽度の変化であり、RBC を含む赤血球関連検査項目にも変化が認められなかったことより、統計学的な有意差は認められるものの、毒性学的に意義のある変化とは考えられなかった。

血液生化学的検査では幾つかの項目で有意差

が認められた。酵素では、AIP が雄の 0.005~0.5%群および雌の 0.5%群で、AsT が雄の 0.5%群でそれぞれ減少し、 γ -GTP の増加が雌の 0.5%群で認められた。これらの酵素の増加は肝臓障害の指標として知られているところであり、 γ -GTP の増加は変化の程度からも肝臓への影響を示唆した変化と考えられた。AIP の減少は、予備試験 (雄、0、0.1、1.0、3.0 および 5.0%添加飼料の 13 日間投与) の結果と一致した変化であり、被験物質投与との関連性が示唆された。AIP の減少は一般的に毒性学的意義は薄いと考えられており、現時点ではその意義については考察しえなかったが、雄の 0.005 および 0.05%群の変化は、対照群に対してそれぞれ 6.9 および 7.5%と軽度の減少であり、両群での AIP の変化は正常範囲内の変動と考え、毒性変化とはしなかった。蛋白および非蛋白窒素では、TP と Alb の増加が雌雄の 0.5%群で認められた。脂質では、TG の減少が雄 0.5%群で、T-Cho の増加が雌 0.5%群で認められた。電解質では、Ca が雌雄の 0.5%群で、P が雌 5.0%群でそれぞれ増加した。その他、T-Bil の減少が雄 0.05 および雌雄の 0.5%群で認められた。これらの変化はより高濃度を投与した予備試験の結果 (但し T-Bil と無機物は測定していない) とほぼ一致しており、被験物質投与との関連性を完全には否定できなが、TP と Alb の変化は小さく、A/G 比にも変化が認められないこと、Ca、P および T-Bil の変化は極軽度の変化であることから、いずれも正常範囲内の変動と考え、統計学的な有意差は認められるものの、毒性学的に意義のある変化とは考えられなかった。これに対して、TG および T-Cho の変化は、比較的大きな変化として認められた。

臓器重量測定で認められた、雌雄の 0.5%群の肝臓の絶対および相対重量増加は被験物質投与による影響を示唆した変化と考えられた。しかし、

0.05%群以下では、増加傾向は認められなかった。その他、雄で腎臓の相対重量の増加が認められたが、増加の程度は極軽度のものであり、また、血液生化学的検査においても腎障害を示唆するような変化は認められなかったことより、現時点では毒性変化とは考えられなかった。

本実験条件では病理組織学的検査が実施されていない。これを実施することにより、さらに毒性特性が明らかになるものと考ええる。

E-I. 結論 (ジャマイカカシミア抽出物)

ジャマイカカシミア抽出物の安全性の評価に必要な情報を得る目的で、各被験物質をラットに90日間反復投与し、一般状態、体重、血液および臓器重量に及ぼす影響について検討した。ジャマイカカシミア抽出物の0.5%添加飼料の投与では肝臓への影響が示唆された。病理組織学的検査が実施されていない本実験条件での無毒性量を肝臓重量を基に暫定的に求めると、雌雄ともに0.05% (雄で27.9 mg/kg/日、雌で0.1 mg/kg/日) と評価された。

今後、病理組織学的検査を実施することにより、さらに毒性特性を明らかにしたい。

参考文献

I-1) 山崎実, 野口雄次, 丹田 勝, 新谷 茂, 一般毒性試験における統計的手法, 対照群との多重比較のためのアルゴリズム, 武田研究所報, 40, 163-167 (1981).

II. サンダラック樹脂のラットによる90日間反復投与毒性試験

B-II. 研究方法 (サンダラック樹脂)

本試験は、業務委託契約「サンダラック樹脂の90日間反復投与毒性試験：試験番号C-02-002」に基づき、財団法人食品薬品安全センター秦野研究所で実施した。

1. 被験物質

サンダラック樹脂は、ヒノキ科サンダラック (*Tetraclinis articulata*) の分泌液を、室温でエタノール抽出により精製したものをを用いた(株式会社岐阜セラック製造所、精製サンダラック、ロット番号 G-41986)。被験物質は日本食品添加物協会を通じて入手したが、食品添加物としての販売実績は岐阜セラック製造所ではないとの報告を受けている。分析は実施されていないが、既存添加物名簿には主成分はサンダラコピマール酸、用途はガムベースで主な使用対象食品はチューインガムと記載されている。

2. 動物および飼育条件

5週齢の雌雄 F344 系ラット (F344/DuCrj, SPF、日本チャールス・リバー (株)) それぞれ45匹搬入し、検疫と飼育環境への馴化を兼ねて7日間飼育した。試験には、検疫・馴化期間中、外観および一般状態に異常が認められなかった雌雄各40匹を使用した。動物は、基準温度22~25℃、湿度50~65%、換気約15回/時間、照明12時間(照明7:00~19:00時)に環境制御された飼育室で、金属製金網床ケージ(アルミニウムおよびステンレス製、220w×270d×190h mm)に個別収容し、飼育した。飲料水として、水道水(秦野市水道局給水)を自動給水した。

3. 投与方法、用量設定および群構成

被験物質の投与は粉末飼料(CRF-1粉末飼料、オリエンタル酵母工業株)による混餌投与で行った。

用量設定は、予備試験でサンダラック樹脂5.0%添加飼料を忌避することなく摂取することが確認されたことと、「食品添加物の指定および使用基準改正に関する指針」を参考に、最高用量

を5.0%添加飼料投与(5.0%群)とし、以下公比5で減じた1.0%(1.0%群)および0.2%添加飼料投与(0.2%群)を設けた。試験は上記3群に基礎飼料だけを投与する対照群を加えた4群で行った。各群の動物数は雌雄各10匹とし、検疫終了時の体重に基づき、体重別層化無作為抽出法により、群分けを行った。試験開始後は、それぞれの飼料を自由に摂取させた。

添加飼料調製はオリエンタル酵母工業(株)において実施し、使用まで冷暗所で密封保存した。

1) 一般状態、体重、摂餌量および被験物質摂取量

動物の生死、一般状態を毎日観察した。体重は投与開始日に測定し、以降、投与期間中は週1回の頻度で測定した。また、臓器の相対重量算出のため、剖検日にも絶食後の体重を測定した。摂餌量は、投与開始日の給餌量および翌日の残餌量を測定して1日摂餌量を算出した。以降、投与期間中は週1回の頻度と同様に1日摂餌量の算出を行った。体重1kgに対する1日当たりの被験物質摂取量(mg/kg/日)は、各週の平均体重、平均摂餌量および被験物質添加濃度から、計算により週ごとに求めた。

2) 血液学的検査

90日間の投与終了後、18時間絶食を施した動物より、ペントバルビタールナトリウム腹腔内投与麻酔下で開腹して、EDTA・3Kを抗凝固剤として用い、後大静脈から採血した。この血液を用いて赤血球数(RBC)、血色素量(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)、白血球数(WBC)、白血球分類および血小板数(Plt)を血液自動分析装置(Cell-Dyn3500SL、ダイナボット)で測定した。

また、網状赤血球の増減を観察する必要が生じた場合に備え、塗沫標本を作製した。

3) 血液生化学的検査

血液学的検査用の採血に引き続き、ヘパリンを抗凝固剤として採取した血液の血漿を用いて、総蛋白(TP)、アルブミン(Alb)、グルコース(Glc)、総コレステロール(T-Cho)、トリグリセリド(TG)、総ビリルビン(T-Bil)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRN)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AsT)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、γ-グルタミルトランスペプチターゼ(γ-GTP)、アルカリホスファターゼ(ALP)、カルシウム(Ca)およびリン(P)の項目を遠心方式生化学自動分析装置(COBAS-FARA、ロシュ)で、およびナトリウム(Na)、カリウム(K)、クロール(Cl)の項目を全自動電解質分析装置(EA05、A&T)で測定した。またアルブミン/グロブリン比(A/G)をTPとAlbの測定値から算出した。

4) 剖検、臓器重量測定および病理組織学的検査

採血後、必要に応じて瀉血し動物を屠殺した後、臓器、組織を肉眼的に観察した。続いて、脳、心臓、肺、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣あるいは卵巣、および副腎については重量測定を行った。これらの臓器に加え、下垂体、舌、眼球、唾液腺、甲状腺、骨髄(大腿骨)、気管、大動脈、膵臓、食道、胃、小腸(十二指腸、空腸、回腸)、大腸(盲腸、結腸、直腸)、リンパ節(腸間膜)、膀胱、大腿骨、骨格筋、脊髄、坐骨神経、精巣上体、精囊、前立腺および子宮は、今後予定している病理組織学的検査に供するために0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン液中に浸漬して固定保存した(精巣および精巣上体はブアン液を用いて固定)。

5) 統計解析法

体重、摂餌量および血液学的検査、血液生化学的検査結果の数値ならびに臓器重量について、群毎に平均値および標準偏差を求めた。また平均値の差の有意性を検定した。検定は最初に Bartlett の方法で分散を検定し、分散が一様な場合は、分散分析に続き対照群との間で Dunnett の多重比較で検定し、分散が一様でない場合は Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意差が認められた場合に Dunnett の多重比較で、対照群と被験物質投与群を比較した。いずれも有意水準は5%とした。

C-I. 研究結果 (サンダラック樹脂)

1. 一般状態

投与期間中にいずれの群においても死亡例は認められなかった。一般状態の観察では、雌の対照群および5.0%群の1匹に、それぞれ左および右眼周囲の腫れが投与第82~89日および81~87日に認められたが、その他の変化は認められなかった。

2. 体重および摂餌量

雌雄の体重および摂餌量の推移を図 II-1 に示した。体重では群間の差は認められなかった。摂餌量は、雄の1.0%群で投与開始後21日に、5.0%群で14、21および89日に有意な増加が認められた。しかし、全投与期間を通じて平均した平均摂餌量では、群間の差は認められなかった(表 II-1)。雌では差は認められなかった。

3. 被験物質摂取量

各週で求めた被験物質摂取量をさらに全投与期間を通じて平均した平均被験物質摂取量を表 II-1 に示した。用量設定に対応した摂取が認めら

れ、最高用量群である5.0%群での平均被験物質摂取量は雄で3294.4 mg/kg/日、雌で3564.7 mg/kg/日であった。

4. 血液学的検査

雄の結果を表 II-2 に、雌の結果を表 II-3 に示した。Ht の減少が雌雄5.0%群で、また MCHC の増加が雄5.0%群で認められた。白血球百分比の観察では、雌の0.5%群で単球の増加およびリンパ球の減少が、また5.0%群でリンパ球の減少が認められた。

5. 血液生化学的検査

雄の結果を表 II-4 に、雌の結果を表 II-5 に示した。雄では、ALT の減少が1.0 および5.0%群で認められた。これに加え、5.0%群では、TG の減少と BUN の増加が認められた。その他の項目では有意差は認められなかった。雌では、全ての項目で変化は認められなかった。

6. 臓器重量

雄の結果を表 II-6 に、雌の結果を表 II-7 に示した。

雌雄いずれにおいても、測定臓器の絶対重量に群間差は認められなかった。相対重量では、肝臓に有意な増加が雄の1.0 および雌雄の5.0%群で認められた。その他の臓器の相対重量に変化は認められなかった。

D-II. 考察 (サンダラック樹脂)

一般状態観察、体重および摂餌量では、投与最終週に、雌の5.0%群1匹で片眼周囲の腫れが認められたが、対照群でも同様の症状が見られたことから、被験物質投与によるものではなく、粉末飼料が眼に入ったためと考えられた。体重は雌雄各群とも漸次増加し、群間の差は認められなかつ

た。また摂餌量においても、被験物質投与による影響を示唆するような低下や増加は認められなかった。以上の結果から、被験物質は混餌投与試験での最大投与量である5.0%投与においても体重や一般状態に影響を及ぼさないものと考えられた。

血液学的検査で認められた、雌雄の5.0%群でのHtの減少や雄のMCHCの増加は、対照群に対して1.8~3.6%程度の極軽度の減少あるいは増加であり、また、RBCやHbなどの赤血球系の項目にも差が認められなかった。これらのことより、統計学的な有意差は認められるものの、毒性学的意義のない変化と考えられた。その他には、考察を加えるような変化は認められなかった。

血液生化学的検査では、雄のみに有意差が認められた。1.0%および5.0%群でAITの低下および5.0%群でBUNの増加が認められたが、測定値のばらつきが小さかったためについた統計学上の有意差で、毒性学的な意義はない変化と考えられた。5.0%群のTG減少は、比較的大きな変化ではあったが、AITおよびAsTの増加が認められなかったことから、少なくとも肝臓障害に基づくものではないと考えられたが、その原因については明らかにできなかった。

臓器重量では、いずれの測定臓器でも絶対重量に差は認められなかったが、相対重量では雄の1.0%、5.0%群および雌の5.0%群で肝臓の有意な増加が認められ、被験物質投与との関連性が示唆された。

本実験条件では病理組織学的検査が実施されていない。これを実施することにより、さらに毒性特性が明らかになるものとする。

E-I. 結論 (サンダラック樹脂)

サンダラック樹脂の安全性の評価に必要な情

報を得る目的で、被験物質をラットに90日間反復投与し、一般状態、体重、血液および臓器重量などに及ぼす影響について検討した。肝臓の相対重量の増加と被験物質投与の関連性が示唆された。病理組織学的検査が実施されていない本実験条件での無毒性量を肝臓の相対重量を基に暫定的に求めると、雄で0.2% (123.6 mg/kg/日)、雌で1.0% (686.6 mg/kg/日) と評価された。

今後、病理組織学的検査を実施することにより、さらに毒性特性を明らかにしたい。

III. グレープフルーツ種子抽出物のラットによる90日間反復投与毒性試験

本試験は、業務委託契約「F344ラットによるグレープフルーツ種子抽出物の90日間反復強制経口投与毒性試験:試験番号C-B083」に基づき、株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で実施した。

B-III. 研究方法 (グレープフルーツ種子抽出物)

1. 被験物質および媒体

グレープフルーツ種子抽出物は、カルファケミカル(株)のものを使用した(ロット番号2L08CF)。添付されてきた規格書によるとその特性は以下の通りであった。pH8.50 (±0.5)、比重1.01 (±0.1)、パルミチン酸0.19 g/100 g (±0.1)、パルミトリン酸0.30 g/100 g (±0.1)、オレイン酸4.04 g/100 g (±1.0)、性状は淡黄色透明・粘調、安定性は1年間。

投与液の媒体としては、注射用水(日本薬局方、大塚製薬、ロット番号2E96、2G77、2I86、2I99)を用いた。

2. 動物および飼育条件

5週齢のF344/DuCrjラット(SPF)、雌雄各

47 匹を日本チャールス・リバー（株）より購入し、固形飼料（CRF-1、放射滅菌、オリエンタル酵母工業（株））と水道水で1週間馴化飼育後、健康な雌雄各40匹を実験に供した。飼育は室温20～26℃、湿度30～70%、換気10～15回/時、照明サイクル12時間（照明7：00～19：00時）の動物室で、金属製網ケージ（W254×D350×H170mm）に1匹ずつ収容して行った。

3. 投与方法、用量設定および群構成

食品添加物として使用されていることから、毒性試験における投与方法は混餌投与による経口投与が望ましい。しかし、混餌中での安定性が確認できないことから、げっ歯類の毒性試験における一般的な投与方法である強制経口投与を選択した。投与期間は90日間とした。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている1日1回（7回/週）とした。投与容量は5 mL/kg体重とし、フレキシブル胃ゾンデを用いて強制経口投与した。対照群には媒体（注射用水）を同様に投与した。個体ごとの投与液量は最新の体重を基準に算出した。

用量設定は予備試験として実施した0、40、200、1000 mg/kg/日の14日間反復強制経口投与試験（雌雄各5匹/群）の結果を参考に決定した。予備試験の結果では、いずれの用量でも、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査および臓器重量に影響は認められなかった。したがって、予備試験と同様に食品添加物を強制経口投与する場合の最大量である1000 mg/kg/日（1000 mg投与群）を高用量とし、以下公比5で除した200（200 mg投与群）および40 mg/kg/日（40 mg投与群）を設定した。試験は上記3群に媒体（注射用水）を投与した対照群（0 mg/kg/日）を加えた4群で行った。各群の動物数は雌雄各10匹とし、投与開始2日前に、当日の体重により層別

化し、各群の平均体重ができるだけ均等となるよう各群を構成した。動物の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法および無作為抽出法の組合せにより実施した。

投与液の調製は被験物質の原液を正確に秤量し、メスシリンダーに移したのち注射用水を加えて規定量とした（200 mg/mL液）。以下、注射用水で段階的に希釈して40および8 mg/mL液を調製した。調製は、投与当日に用時に行った。

4. 検査項目および方法

1) 一般状態、体重および摂餌量

全動物について、投与期間中毎日3回（投与前、投与直後および投与約2時間後、ただし、土曜日および休日は投与前と投与直後の2回）、体外表、栄養状態、姿勢、行動および排泄物の異常などの一般状態を観察した。

体重および摂餌量測定は、全個体について、投与第1週は投与1および7日の2回、その後は7日ごとに1回/週測定した。そして、摂餌量は測定間隔期間中の累積摂取量を測定し、計算により1日1匹当たりの摂餌量を求めた。また、臓器の相対重量算出のため、剖検日にも絶食後の体重を測定した。

2) 血液学的検査

90日間の投与後、前日から一夜（約16～20時間）絶食させた動物をエーテル麻酔下に開腹し、腹大動脈からEDTA・2K加採血瓶（SB-41：シスメックス株）に血液を採取した。得られた血液を用いて、赤血球数（RBC）、白血球数（WBC）、ヘモグロビン量（Hb）、ヘマトクリット値（Ht）、血小板数（Plt）、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）をコールター全自動8項目血球アナライザーT890（ベックマン・コールター株）