

厚生労働科学研究費補助金

食品安全確保研究事業

既存添加物の発がん性等に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者	神谷 研二	広島大学原爆放射線医科学研究所
分担研究者	三森 国敏	東京農工大学
	関田 清司	国立医薬品食品衛生研究所

平成16年（2003）3月

# 目 次

## I 総括研究報告書

既存添加物の発がん性等に関する研究 ----- 1

神谷研二

## II 分担研究報告

1 補骨子抽出物のラットによる1年間反復投与毒性／発がん性併用試験----- 7

神谷研二

2 ルチン酵素分解物のラットによる1年間反復投与毒性試験----- 11

三森国敏

3 シヤマイカカノシカ抽出物のラットによる1年間反復投与毒性試験----- 14

関田清司

既存添加物の発がん性等に関する研究  
-ラットによる1年間反復投与毒性/発がん性併用試験-

主任研究者 神谷研二 広島大学原爆放射線医科学研究所 所長

研究要旨

1) 添加物の規格基準作成の一環として、添加物を長期間に亘り反復投与したときに出現する毒性・発がん性変化とその用量および毒性・発がん性変化の出現しない用量に関する情報を得る目的で1年間反復投与毒性/発がん性併用試験を開始した。補骨子抽出物の場合は、Wistar Hannover(GALAS)系ラットへの適切な投与量を決定する必要がある、その予備試験として4週間の餵餌試験を別途実施した。現在試験を継続中である。ルチン酵素分解物の場合は、放射線照射によるルチン酵素分解物の変性が懸念されたことから、予備試験として放射線照射/非照射ルチン酵素分解物の比較試験を計画し、現在、実施中である。

シャマイカカシア抽出物の場合は、F344/DuCrj ラットによる1年間反復投与毒性試験を開始した。

2) 1年間反復投与毒性試験では、試験開始直後に購入先のラット飼育生産施設でラットの肺パスツレラ感染の発生が明らかとなった。そのため本試験を途中停止し、ラットおよび施設での上記の病原体陰性を確認後、試験を再開することとした。

分担研究者

三森国敏 東京農工大学 教授  
関田清司 国立医薬品食品衛生研究所  
毒性部室長

A 研究目的

既存添加物は、平成7年5月の食品衛生法の改正にともなう経過措置として、使用が認められているものである。既存添加物の多くは、それ自体もしくはその起源が、長年食用に供されていた等の経験はあるものの、安全性の面から見れば動物実験などによる毒性試験などの科学的な安全性データに欠けるものが少なくない。法改正時の国会附帯決議で、既存

添加物については速やかに安全性の見直しを行い、有害であることが実証された場合には、使用禁止等必要な措置を講じることとされている。平成13年12月に採択された日本生協連合会からの国会請願の中でも、天然添加物を含めた食品添加物に対する安全性確保は大きな柱の1つとなっている。平成8年度の厚生科学研究「既存添加物の安全性評価に関する調査研究」において、既存添加物489品目のうち139品目については、今後反復投与毒性試験の実施を含め、その安全性について検討することが必要であるとされた。当該139品目については、

平成11年度までに14品目について安全性に問題ないとされ、さらに、平成13年度までに、16品目程度についての安全性評価が行われている。残りの109品目の基本的安全性を評価するためには、新たな反復投与毒性試験などの実施による安全性の検討が必要である。従って、ヒトでの生涯摂取を想定した安全性を検討する為には、発がん性を含む生涯摂取の安全性をラット等の動物モデルによる1年間反復投与毒性/発がん性併用試験の実施により評価する。その結果を厚生労働行政に反映することで、我国独特のものが多く既存添加物の安全性確保を目指す。

## B 研究方法

既にラットによる90日反復投与毒性や変異原性試験が実施された既存添加物のうちから、その結果を考慮し検討品目として補骨子抽出物、ルチン酵素分解物、およびジャマイカカシヤ抽出物を選定した。今年度に選定した品目について、3年計画で2年間の投与期間を含むラットによる1年間反復投与毒性/発がん性併用試験を開始する。1年間反復投与毒性/発がん性併用試験の実施は、国立医薬品食品衛生研究所で確立されているプロトコール/ガイドラインに準じて行なう。本年度は、1年間反復投与毒性/発がん性併用試験を開始した。

### 1 被験物質および投与量

**補骨子抽出物** ヒガンマル醤油株式会社より提供された補骨子エタノールエキスをを用いた。投与量は、先に実施された

ラット90日反復投与毒性試験の資料を基に決定した。補骨子抽出物を混餌投与したラットは、雄0.75%、雌0.38%以上の混餌飼料で体重増加抑制がみられた。一方、雌雄の15%以上で精巢の組織学的異常が認められ、この変化が慢性投与でどうなるかを検討する必要がある。この様な事から、1年間反復投与毒性/発がん性併用試験としては最高濃度投与量を1%として以下公比5で減し0.2, 0.04, および0.008%とした。対照群には、基礎飼料を、各投与群には前述の各濃度の補骨子抽出物混餌飼料を自由に摂取させる。

**ルチン酵素分解物** 三菱源エフ・エフ・アイより供与されたものを用いた。本試験における添加飼料中の被験物質濃度は先に実施されたラット90日間混餌投与試験において、通常、食品添加物の混餌投与試験における最高濃度の上限とされている5%投与群においても顕著な毒性徴候が認められなかったことから、5%を最高投与量として、以下公比5で減じ、10, 0.2, および0.04%とした。対照群には基礎飼料を、各投与群には前述の各濃度のルチン酵素分解物混合飼料を自由に摂取させる。なお、基礎固型飼料ならびにルチン酵素分解物混合固型飼料には10kGyの放射線を照射し滅菌処理を施した飼料を使用した。

**ジャマイカカシヤ抽出物** ジャマイカカシヤ (*Prickles 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製品 (Stan Chem International Ltd, England)

を国内販売会社（東和産業株式会社，大阪）より購入する。被験物質の投与は粉末飼料（CRF-1）による混餌投与とし，90日間反復投与毒性試験を根拠に0，5，50，500および5000ppm添加飼料投与の5群を設ける。各群の動物数は雌雄各20匹とし，投与開始前日にノルム値を用いた山崎らの方法で群分けする<sup>1)</sup>。

添加飼料製造は，実験担当者か当研究所飼料製造室で行う。

## 2 ラットおよび飼育条件

F344/DuCrj ラット（SPF）および Wistar Hannover(GALAS)系ラットをそれぞれ日本チャールス・リハー(株)と日本クレア(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)，CE-2 日本クレア株式会社）と水道水で1週間馴化飼育後，健康な雌雄を実験に用いる。

飼育は温度21.0～25.0℃，湿度40～70%，換気回数10～25回/時間，蛍光照明12時間に制御された動物室で，ポリカーボネート製ケージ（床敷使用）に2～3匹ずつ収容して行う。

## 3 予備試験

1) 補骨子抽出物 ラット90日反復投与毒性試験では，F344ラットを用いて試験が行われ，精巣毒性が有ることが確認された。しかし，F344雄ラットには，自然発生の精巣間細胞腫が非常に高頻度に発生するため，1年間反復投与毒性/発がん性併用試験に適したラット系統を用いる必要がある。そのため今回の実験では Wistar Hannover(GALAS)系ラットを用いて試験を行うが，補骨子抽出物の投与量に関する資料は，F344ラット以外には

存在しない。従って，Wistar Hannover(GALAS)系ラットに4週間の混餌試験を別途実施し適切な投与量を決定する必要がある。4週齢の Wistar Hannover(GALAS)系ラット雌雄各10匹を日本クレア株式会社より購入し，7日間の馴化飼育後，雌雄とも各群10匹ずつ4群に分け試験を実施した。補骨子抽出物の投与濃度は，1%，0.2%，および0.04%とした。一般状態及び死亡ラットの有無を毎日観察し，体重及び摂餌量については週1回測定した。

2) ルチン酵素分解物 ルチン酵素分解物混合飼料の作製時に被験物質を放射線照射した際，被験物質の色調に変化が認められた。これより放射線照射によるルチン酵素分解物の変性が懸念されたことから，予備試験として放射線照射/非照射ルチン酵素分解物の比較試験を開始した。すなわち，4週齢の Wistar Hannover (GALAS)ラット雌雄各24匹を日本クレア株式会社より購入し，7日間の馴化飼育後，雌雄とも各群8匹ずつ3群に分けて試験を開始した。ルチン酵素分解物混合粉末飼料は，使用時までには4口で保存し，動物に与えた飼料は安定性が確保されている期間内に適宜交換した。一般状態及び死亡動物の有無を毎日観察し，体重及び摂餌量については週1回1回測定した。投与開始28日後に全生存動物を屠殺剖検し，以下は後述の本試験方法に準拠して実施した。

## 4 1年間反復投与毒性/発がん性併用試験

1年間反復投与毒性試験は，4週齢の

F344/DuCrj ラットおよび Wistar Hannover ラットを購入し、雌雄とも各群20匹ずつ5群に分けて試験を開始する。被験物質混合飼料は、使用時まで4℃で保存し、動物に与えた飼料は安定性が確保されている期間内に適宜交換する。一般状態及び死亡動物の有無を毎日観察し、体重及び摂餌量については投与開始後3ヵ月まで週1回、以後は4週に1回測定する。摂餌量は、体重測定日にケージ単位に、7日分(最初の1週間は3あるいは4日)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)を求める。被験物質摂取量(mg/kg/日)は、当該測定日の平均体重、平均摂餌量および被験物質添加濃度から、計算により求める。投与開始50週前後に尿量、尿pH、蛋白、ケトン体、ビリルビン、ウロヒリノーゲン、潜血、比重、電解質(Na, K, Cl, Ca)について検査を実施し、投与開始52週後に全生存動物を屠殺剖検する。剖検は、エーテル麻酔下で開腹、腹部大動脈より採血し、瀉血により屠殺後剖検した。諸臓器は、肉眼的に観察した後摘出し、脳、胸腺、肺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓、下垂体、精巣及び卵巣については重量測定後、甲状腺、胃、小腸、大腸、子宮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、各臓器および組織を切り出し、通常の方法によりパラフィン包埋後、薄切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン(HE)染色を施して、病理組織学的に検索を行う。採血した血液は、白血球(WBC)、赤血球(RBC)、ヘモグロビン(Hg)、ヘマトクリット(Ht)、血小板(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)、ならびに好中球(Neutro)、

リンパ球(Lymph)、単球(Mono)、好酸球(Eosino)、および好塩基球(Baso)の白血球分画を測定する。また、血清を分離し、総蛋白(TP)、アルブミン(ALB)、アルブミン グロブリン比(A/G比)、総コレステロール(T-CHO)、中性脂肪(TG)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRE)、ナトリウム(Na)、クロール(Cl)、カリウム(K)、カルシウム(Ca)、グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)、グルタミン酸ピルヒン酸トランスアミナーゼ(GPT)、アルカリフォスファターゼ(ALP)、 $\gamma$ -glutamyl transpeptidase( $\gamma$ -GTP)、総ビリルビン(T-Bil)を測定する。

## 5 統計学的解析

一般毒性試験における多重比較のためのアルコリスム(ASSIT algorithm for simultaneous statistical inference in toxicology)法<sup>1)</sup>により統計解析を行う。

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、予備試験では各群間の直接比較検定(F-t 検定など)を、本試験では対照群と投与群で多重比較検定(Dunnett の検定など)を行う。いずれの検定においても有意水準は危険率5%以下とする。

## 6 倫理面への配慮

本試験は、食品添加物の1年間反復投与毒性/発がん性併用試験ガイドラインに準して行われている。動物からの採血や解剖においては麻酔下で行うなどの動物への苦痛を軽減するなどの配慮を行っている。また、主任研究者や各分担研究者は当該施設の動物実験倫理規定を遵守して行っている。

### C 研究結果とD 考察

1) 補骨子抽出物 ラット90日反復投与毒性試験では、F344 ラットに精巣毒性か有ることか確認された。従って、慢性毒性試験及び発がん性試験では、補骨子抽出物の精巣への影響を検討する必要がある。しかし、F344 雄ラットには、自然発生の精巣間細胞腫が非常に高頻度に発生するためこの目的に適したラット系統を用いて1年間反復投与毒性/発がん性併用試験をする必要がある。そのため今回の実験では Wistar Hannover(GALAS)系ラットを用いて試験を行うが、補骨子抽出物の投与量に関する資料は、F344 ラット以外には存在しない。従って、Wistar Hannover(GALAS)系ラットに4週間の混餌試験を別途実施し、適切な投与量を決定する予備試験とした。現在試験を継続中である。

2) ルチン酵素分解物 ルチン酵素分解物含有固形飼料作製の予備作製段階において、被験物質に放射線照射滅菌操作を施した際、被験物質の色調に変化が認められた。本変化より放射線照射によるルチン酵素分解物の変性が懸念されたことから、本試験を開始するに先立ち、ラットにおける放射線照射/非照射ルチン酵素分解物の28日間混餌投与比較試験を予備試験として計画し、現在試験を実施中である。

3) ジャマイカカシヤ抽出物 同一ロットの被験物質の購入に努力したが販売量あるいは流通量が少ないためか、試験に必要な量を同一ロットで揃えることが出来なかった。入手した製品は Stan Chem International Ltd (英国) 製 Lot No 2019301/2

および2019551の各700gであった。形状は淡黄色微粉末で、添付された分析証明書によれば有効成分としてクワシン (quassin) とネオクワシン (neo-quassin) を Lot No 2019301/2 の製品は11.9%および41.7%, Lot No 2019551 製品は11.7%および42.4%含有していた (HPCL 分析, Stan Chem International Ltd)。以上のように被験物質のロットにより有効成分が若干異なることから、試験には両ロットの製品を等量混合して用いる事にした。

試験計画書に基づき購入した F344 ラットを用いて混餌投与法による1年間反復投与毒性試験を開始した。試験開始時と7日後の各群の体重は以下の通りである。

群 (匹数)	試験開始時 体重 (g)	7 日後体重 (g)
雄 Cont (20)	111.2±4.4	140.0±5.5
5 ppm(20)	111.4±5.1	138.1±7.1
50 ppm(20)	111.4±4.9	139.2±7.7
500 ppm(20)	111.3±4.9	138.2±7.8
5000 ppm(20)	111.3±4.8	139.2±6.9
雌 Cont(20)	92.3±2.6	106.7±4.1
5 ppm(20)	92.5±3.1	106.9±3.1
50 ppm(20)	92.8±2.5	106.0±2.5
500 ppm(20)	92.2±3.0	105.9±3.8
5000 ppm(20)	92.5±2.8	108.0±4.5

### 4) ラット購入先の飼育生産施設でのラットへの肺パスツレラ感染の発生

日本チャールスリハーより購入した F344/DuCrj ラット (SPF) を用いて試験を開始したが、試験開始直後に日本チャールスリハーから緊急連絡の形でラットの飼育生産

施設で肺パスツレラ（*Pasteurella pneumotropica*）の感染の事実が発表された。購入動物についても肺パスツレラの感染の可能性が高いと判断された。また日本チャールスリハーからも同様の見解を得た。そこで、試験結果への影響と二次感染（肺パスツレラの感染力は極めて高い）防止の観点から本試験を途中で停止し、上記の病原体陰性のF344/DuCrj ラットの供給再開（約6ヵ月後）を待って、試験を再開することとした。一方、Wistar Hannover (GALAS)ラットについても、当該試験動物飼育エリアの別飼育室のラットに肺パスツレラ感染が確認されたことから、当該飼育施設の全動物を殺処分し、飼育施設の消毒、清浄化をはかることとした。したがって、本試験も中止し、全動物を安楽死させ、試験実施を中断した。再試験は2004年7月に開始する予定である。

#### E 結論

1) 添加物の規格基準作成の一環として、添加物を長期間に亘り反復投与したときに出現する毒性・発がん性変化とその用量および毒性・発がん性変化の出現しない用量に関する情報を得る目的で1年間反復投与毒性/発がん性併用試験を開始した。補骨子抽出物の場合は、Wistar Hannover(GALAS)系ラットへの適切な投与量を決定する必要があり、その予備試験として4週間の混餌試験を別途実施した。現在試験を継続中である。ルチン酵素分解物の場合は、放射線照射によるルチン酵素分解物の変性が懸念されたことから、予備試験として放射線照射/非照射ルチン酵素分解物の比較試験を計画し、現在、実施中である。

シヤマイカカノシア抽出物の場合は、F344/DuCrj ラットによる1年間反復投与毒性試験を開始した。

2) 1年間反復投与毒性試験では、試験開始直後に購入先のラット飼育生産施設でラットの肺パスツレラ感染の発生が明らかとなった。そのため本試験を途中停止し、ラットおよび施設での上記の病原体陰性を確認後、試験を再開することとした。

参考文献 1) 山崎実, 野口雄次, 丹田 勝, 新谷 茂 武田研究所報 40(3/4), 163~167(1981)

#### F 健康危機情報

特になし

#### G 研究発表

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



## 既存添加物の発がん性等に関する研究

### -補骨子抽出物のラットによる1年間反復投与毒性/発がん性併用試験-

主任研究者 神谷研二 広島大学原爆放射線医科学研究所 所長  
研究協力者 樫本尚樹 同 大学院生  
水野久美子 同 技能補佐員

#### 研究要旨

補骨子抽出物には、精巣毒性が有ることがF344ラットで確認されている。しかし、F344雄ラットには、自然発生の精巣間細胞腫が非常に高頻度に発生するため、異なるラット系統を用いて1年間反復投与毒性/発がん性併用試験を実施する必要がある。そこで今回の実験では、補骨子抽出物を長期間反復投与したときに出現する毒性・発がん性変化とその用量および毒性・発がん性変化の出現しない用量に関する情報を得る目的でWistar Hannover系ラットによる1年間反復投与毒性/発がん性併用試験を開始する。そのためにはWistar Hannover系ラットへの適切な投与量を決定する必要があり、その予備試験として4週間の混餌試験を別途実施した。現在試験を継続中である。

#### A 研究目的

補骨子抽出物は、マメ科の植物オランダヒユ（*Psoralea corylifolia* L）の成熟果実である補骨子をエタノール抽出した天然素材由来の食品添加物であり、その成分はエタノール60%、水分20%、エタノールおよび水分を除いた乾熱残分が20%である。主成分の一つであるハクチオールはこの乾熱残分に含まれており、補骨子抽出物に65%含まれている。ハクチオールは強い抗菌作用を有し、その用途として唐揚げ等の食品の日持ち向上剤として使用されている。補骨子には、冠動脈拡張、抗菌、抗がん作用などに活性があることが知られ、白斑、疥癬の局所治療薬等として用いられる。現在までに、マウス単回経口投与による急性毒性

試験における補骨子抽出物におけるLD<sub>50</sub>値は雄で6113mg/kg、雌で5300mg/kg、さらにSalmonella及びEsherichia coliに対する変異原性は陰性であることが確認されている。一方、90日反復投与毒性試験では、体重増加抑制やγ-GTPの有意な増加が認められ、病理学的解析では精巣におけるライティノヒ細胞の萎縮と精細管内伸長精子細胞の消失並びに円形精子細胞の減少、雌では卵巣の黄体形成不全が観察され、明らかな毒性変化が認められている。本研究では、補骨子抽出物の長期間投与の影響を観察する事を目的としてWistar Hannover(GALAS)系ラットを用いた1年間反復投与毒性/発がん性併用試験を開始した。

## B 研究方法

### 1 被験物質および投与量

補骨子抽出物はヒガシマル醤油株式会社より提供された補骨子エタノールエキスを用いた。投与量は、先に実施されたラット90日反復投与毒性試験（食品添加物規格基準設定試験 食品添加物安全性再評価試験 補骨子抽出物の90日反復投与毒性試験 平成10年度最終報告書 平成12年5月30日）の資料を基に決定した。補骨子抽出物を混餌投与したラットは、雄0.75%、雌0.38%以上の混餌飼料で体重増加抑制がみられた。一方、雌雄の15%以上で精巣の組織学的異常が認められ、この変化が慢性投与でどうなるかを検討する必要がある。この様な事から、1年間反復投与毒性/発がん性併用試験としては最高濃度投与量を1%として、以下公比5で減じ0.2%、0.04%、0.008%とした。対照群には、基礎飼料を、各投与群には前述の各濃度の補骨子抽出物混餌飼料を自由に摂取させる。

### 2 ラットおよび飼育条件

Wistar Hannover(GALAS)系ラットを日本クレア(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)、CE-2 日本クレア株式会社)と水道水で1週間馴化飼育後、健康な雌雄を実験に用いる。

飼育は温度21.0~25.0℃、湿度40~70%、換気回数10~25回/時間、蛍光照明12時間に制御された動物室で、ポリカーボネート製ケージ(床敷使用)に2~3匹ずつ収容して行う。

### 3 予備試験

ラット90日反復投与毒性試験では、F344 ラットを用いて試験が行われ、精巣毒性が有ることが確認された。従って、1年間反復投与毒性/発がん性併用試験では、補骨子抽出物の精巣への影響を検討する必要がある。しかし、F344 雄ラットには、自然発生の精巣間細胞腫が非常に高頻度に発生するため、この目的に適したラット系統を用いる必要がある。そのため今回の実験では Wistar Hannover(GALAS)系ラットを用いて試験を行うが、補骨子抽出物の投与量に関する資料は、F344 ラット以外には存在しない。従って、Wistar Hannover(GALAS)系ラットに4週間の混餌試験を別途実施し適切な投与量を決定する必要がある。4週齢の Wistar Hannover(GALAS)系ラットの雌雄各10匹を日本クレア株式会社より購入し、7日間の馴化飼育後、雌雄とも各群10匹ずつ4群に分けて試験を実施した。補骨子抽出物の投与濃度は、1%、0.2%、および0.04%とした。一般状態及び死亡ラットの有無を毎日観察し、体重及び摂餌量については週1回測定した。

### 4 1年間反復投与毒性/発がん性併用試験

1年間反復投与毒性試験では、4週齢の Wistar Hannover (GALAS)ラット雌雄各100匹を日本クレア株式会社より購入し、11日間の馴化飼育後、雌雄とも各群20匹ずつ5群に分けて試験を開始する。雌雄各4群を被験物質投与群とし、1%、0.2%、0.04%、および0.008%の割合で補骨子抽出物を混合した飼料(CRF-1,オリエンタル酵母工業(株))を試験期間中自由に摂取させた。その他に対照群とし

て雌雄各1群には、補骨子抽出物を含まない基礎飼料（CRF-1飼料）を同期間自由に摂取させた。補骨子抽出物混合飼料は、使用時まで4℃で保存し、動物に与えた飼料は安定性が確保されている期間内に適宜交換する。一般状態及び死亡動物の有無を毎日観察し、体重及び摂餌量については投与開始後3ヵ月まで週1回、以後は4週に1回測定する。摂餌量は、体重測定日にケージ単位に、7日分（最初の1週間は3あるいは4日）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）を求める。被験物質摂取量（mg/kg/日）は、当該測定日の平均体重、平均摂餌量および被験物質添加濃度から、計算により求める。投与開始50週間後に尿量、尿pH、蛋白、ケトン体、ヒリルヒン、ウロヒリノーゲン、潜血、比重、電解質（Na, K, Cl, Ca）について検査を実施し、投与開始52週後に全生存動物を屠殺剖検する。

剖検は、エーテル麻酔下で開腹、腹部大動脈より採血し、瀉血により屠殺後剖検した。諸臓器は、肉眼的に観察した後摘出し、脳、胸腺、肺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓、下垂体、精巣及び卵巣については重量測定後、甲状腺、胃、小腸、大腸、子宮については摘出後直ちに10%中性緩衝ホルマリノ液にて固定した。その後、各臓器および組織を切り出し、通常の方法によりパラフィン包埋後、薄切片を作成し、ヘマトキシリンエオソン（HE）染色を施して、病理組織学的に検索を行う。採血した血液は広島市医師会臨床検査センターに依頼し白血球（WBC）、赤血球（RBC）、ヘモクロヒン（Hg）、ヘマトクリント（Ht）、血小板（PLT）、平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球色素量（MCH）、平均赤血球色素濃

度（MCHC）、ならびに好中球（Neutro）、リンパ球（Lymph）、単球（Mono）、好酸球（Eosino）、および好塩基球（Baso）の白血球分画を測定する。また、血清を分離し、総蛋白（TP）、アルブミン（ALB）、アルブミン グロブリン比（A/G比）、総コレステロール（T-CHO）、中性脂肪（TG）、尿素窒素（BUN）、クレアチニン（CRE）、ナトリウム（Na）、クロール（Cl）、カリウム（K）、カルシウム（Ca）、グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ（GOT）、グルタミン酸ピルヒノ酸トランスアミナーゼ（GPT）、アルカリフォスファターゼ（ALP）、 $\gamma$ -glutamyl transpeptidase（ $\gamma$ -GTP）、総ヒリルヒン（T-Bil）を測定する。

## 5 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、予備試験では各群間の直接比較検定（F-t 検定 など）を、本試験では対照群と投与群で多重比較検定（Dunnett の検定など）を行う。いずれの検定においても有意水準は危険率5%以下とする。

## 6 倫理面への配慮

本試験は、食品添加物の1年間反復投与毒性/発がん性併用試験ガイドラインに準じて行われている。動物からの採血や解剖においては麻酔下で行うなどの動物への苦痛を軽減するなどの配慮を行っている。また、主任研究者や各研究協力は当該施設の動物実験倫理規定を遵守して行っている。

## C 研究結果

補骨子抽出物のラット90日反復投与毒性試験では、F344 ラットに精巣毒性が有ることか確認された。しかし、F344 雄ラットには、自然発生の精巣間細胞腫が非常に高頻度に発生するため、この目的に適したラット系統を用いて慢性毒性試験をする必要がある。そのため今回の実験では Wistar Hannover(GALAS)系ラットを用いて試験を行うが、補骨子抽出物の投与量に関する資料は、F344 ラット以外には存在しない。従って、Wistar Hannover(GALAS)系ラットに4週間の混餌試験を別途実施し、適切な投与量を決定する予備試験とした。現在試験を継続中である。

#### D 結語

補骨子抽出物は、精巣毒性か有ることか F344 ラットで確認されている。しかし、F344 雄ラットには、自然発生の精巣間細胞腫が非常に高頻度に発生するため、異なるラット系統を用いて1年間反復投与毒性/発がん性併用試験を実施する必要がある。そこで今回の実験では、補骨子抽出物を長期間反復投与したときに出現する毒性・発がん性変化とその用量および毒性・発がん性変化の出現しない用量に関する情報を得る目的で Wistar Hannover 系ラットによる1年間反復投与毒性/発がん性併用試験を開始する。そのためには Wistar Hannover 系ラットへの適切な投与量を決定する必要があり、その予備試験として4週間の混餌試験を別途実施した。現在試験を継続中である。

#### F 健康危機情報

特になし

#### G 研究発表

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

既存添加物の発がん性等に関する研究  
-ルチン酵素分解物のラットによる1年間反復投与毒性試験-

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、ルチン酵素分解物を雌雄の Wistar Hannover (GALAS)系ラットに1年間混餌投与し、その毒性について検討する。動物を雌雄各20匹ずつ5群に分け、対照群には基礎飼料（固型）のみ、各投与群にはルチン酵素分解物を0.04, 0.2, 1および5%の割合で添加した固型飼料を1年間投与混餌投与する。現在、予備試験を実施しており、本試験については準備中である。

A 研究目的

ルチン酵素分解物は、ルチンを酵素処理（ナリンシナーゼ、ヘスペリシナーゼ又はラムノシダーゼ）・精製して得られ、その主成分はイソクエルシトリンであり、酸化防止剤、あるいは酵素処理イソクエルシトリンの原料として使用されている。イソクエルシトリンのアグリコンでフラボノール的一种であるクエルセチンは、配糖体として植物に広く存在するが、遺伝毒性を示すことや雄ラットに腎腫瘍を誘発することが報告されている。また、ルチン酵素分解物についてはラット90日間混餌投与試験において、雄の5%投与群で体重増加抑制、ヘモグロビン量およびヘマトクリント値の低下が認められたことが報告されている。今回は、ルチン酵素分解物の長期間投与の影響を検討することを目的として Wistar Hannover (GALAS)系ラットを用いた1年間混餌投与試験を開始した。

B 研究方法

1 被験物質および投与量

ルチン酵素分解物は、三栄源エフ・エフ・

アイより供与されたものを用いた。本試験における添加飼料中の被験物質濃度は先に実施されたラット90日間混餌投与試験（食品添加物安全性再評価、最終報告書 ルチン酵素分解物の Wistar ラットにおける90日間反復投与毒性試験、平成14年7月12日）において、通常、食品添加物の混餌投与試験における最高濃度の上限とされている5%投与群においても顕著な毒性徴候が認められなかったことから、5%を最高投与量として、以下公比5で減じ、10, 0.2及び0.04%とした。対照群には基礎飼料を、各投与群には前述の各濃度のルチン酵素分解物混合飼料を自由に摂取させる。なお、基礎固型飼料ならびにルチン酵素分解物混合固型飼料には10kGyの放射線を照射し滅菌処理を施した飼料を使用した。

2 予備試験（ラットにおける放射線照射／非照射ルチン酵素分解物の28日間混餌投与比較試験）

ルチン酵素分解物混合飼料の作製時に被験物質を放射線照射した際、被験物質の色調に変化が認められた。これより放射線照射によるルチン酵素分解物の変性が懸念されたこと

から、予備試験として放射線照射／非照射ルチン酵素分解物の比較試験を開始した。すなわち、4週齢のWistar Hannover (GALAS)ラット雌雄各24匹を日本クレア株式会社より購入し、7日間の馴化飼育後、雌雄とも各群8匹ずつ3群に分けて試験を開始した。動物の飼育室内環境条件は、温度21.0～25.0℃、湿度40～70%、換気回数10～25回／時間、蛍光照明12時間(7-19時)とした。動物をラット群飼育用金網ケージに3または2匹／ケージで収容し、対照群には基礎飼料(CE-2, 日本クレア株式会社)を、投与群には予め5%濃度に混合・作製された放射線照射あるいは非照射のルチン酵素分解物混合粉末飼料(製造依頼先, 日本クレア株式会社)を自由に摂取させた。ルチン酵素分解物混合粉末飼料は、使用時までには4℃で保存し、動物に与えた飼料は安定性が確保されている期間内に適宜交換した。一般状態及び死亡動物の有無を毎日観察し、体重及び摂餌量については週1回1回測定した。投与開始28日後に全生存動物を屠殺剖検し、以下は後述の本試験方法に準拠して実施した。

### 3 本試験(1年間反復投与毒性試験)

4週齢のWistar Hannover (GALAS)ラット雌雄各100匹を日本クレア株式会社より購入し、11日間の馴化飼育後、雌雄とも各群20匹ずつ5群に分けて試験を開始する。動物の飼育室内環境条件は、温度21.0～25.0℃、湿度40～70%、換気回数10～25回／時間、蛍光照明12時間(7-19時)とする。動物をラット群飼育用金網ケージに2匹／ケージで収容し、対照群には放射線滅菌固型基礎飼料(CE-2, 日本クレア株式会社)を、各投与群には前述の各濃度のルチン酵素分解物混合固型飼料を自由に摂取させる。

ルチン酵素分解物混合固型飼料は、使用時までには4℃で保存し、動物に与えた飼料は安定性が確保されている期間内に適宜交換する。一般状態及び死亡動物の有無を毎日観察し、体重及び摂餌量については投与開始後3ヵ月まで週1回、以後は4週に1回測定する。投与開始50週間後に尿量、尿pH、蛋白、ケトン体、ヒルルヒン、ウロビリノーゲン、潜血、比重、電解質(Na, K, Cl, Ca)について検査を実施し、投与開始1年後に全生存動物を屠殺剖検する。

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う。血液学的検査は赤血球数(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)について測定を実施し、さらに血液塗抹標本作製し、白血球分画を観察する。また、採血した血液から血清を分離し、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)、グルタミンクオキサロアセテックトランスアミラーゼ(GOT)、グルタミンクピルヒ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三菱化学ヒューセルで実施する。

動物は剖検後、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、下垂体、副腎、甲状腺・上皮小体、精巣、卵巣の重量を測定する。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、常法に従い病理組織標本作製し、病理組織学的検索を行う。

#### 4 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、予備試験では各群間の直接比較検定（F-t 検定など）を、本試験では対照群と投与群で多重比較検定（Dunnett の検定など）を行う。いずれの検定においても有意水準は危険率 5%以下とする。

#### 5 倫理面への配慮

本試験は、食品添加物の 1 年間反復投与毒性/発がん性併用試験ガイドラインに準じて行われている。動物からの採血や解剖においては麻酔下で行うなどの動物への苦痛を軽減するなどの配慮を行っている。また、分担研究者や各研究協力者は当該施設の動物実験倫理規定を遵守して行っている。

#### C 研究結果

今回、ルチン酵素分解物含有固形飼料作製の予備作製段階において、被験物質に放射線照射滅菌操作を施した際、被験物質の色調に変化が認められた。本変化より放射線照射によるルチン酵素分解物の変性が懸念されたことから、本試験を開始するに先立ち、ラットにおける放射線照射/非照射ルチン酵素分解物の 28 日間混餌投与比較試験を予備試験として開始し、現在試験を継続中である。

また本試験については、試験計画に従い、動物を入荷し、1 週間の順化期間の後、投与を開始した。しかしながら、当該試験動物飼育エリアの別飼育室で飼育されていたラットの出荷元でパスツレラ・ニューモトロピカの感染が確認され、さらに当該飼育エリア別飼育室のラットにおいても確認検査によりパスツレラ・ニューモトロピカ感染が確認されたこ

とから、当該飼育施設の全動物を殺処分し、飼育施設の消毒、清浄化をはかることとした。したがって、本試験も中止し、全動物を安楽死させ、試験実施を中断した。再試験は 2004 年 7 月に開始する予定である。

#### D 結語

添加物の規格基準作成の一環として、ルチン酵素分解物を雌雄の Wistar Hannover (GALAS)系ラットに 1 年間混餌投与し、その毒性について検討する。動物を雌雄各 20 匹ずつ 5 群に分け、対照群には基礎飼料（固型）のみ、各投与群にはルチン酵素分解物を 0.04, 0.2, 1 および 5%の割合で添加した固型飼料を 1 年間投与混餌投与する。現在、予備試験を実施しており、本試験については準備中である。

#### 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

## 既存添加物の発がん性等に関する研究

### -ジャマイカカノシア抽出物のラットによる1年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 シヤマイカカノシア抽出物のF344/DuCrjラットによる1年間反復投与毒性試験を開始した。しかし、試験開始直後に購入先のラット飼育生産施設でラットの肺パスツレラ (*Pasteurella pneumotropica*) 感染の発生が明らかとなった。当該試験に使用したラットは感染が発生した同じ飼育室に同時期に飼育されていたラットが供給されていることから肺パスツレラの感染の可能性が高いと判断された。そこで、試験結果への影響と当研究所内での二次感染の防止の観点から本試験を途中停止し、上記の病原体陰性F344/DuCrjラットの供給再開（約6ヵ月後）を待って、試験を再開することとした。

#### A 研究目的

既存添加物の一部については、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シヤマイカカノシア抽出物(主な用途は苦味料)について、90日間反復投与毒性試験を実施したところ、5000ppm添加飼料投与で肝臓への影響が示唆される結果が得られた。そこで、さらに長期間投与した場合の安全性および毒性に関する情報を得る目的でラットによる1年間反復投与毒性試験を開始した。

#### B 研究方法

試験計画書を作成しこれに基づいて試験を開始した。以下に試験計画書の概略を述べ

る。

##### 1 被験物質

シヤマイカカノシア抽出物はシヤマイカカノシア (*Prickasma excelsa* (SW) Planch) 原木の幹、枝を乾燥し、粉砕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製品 (Stan Chem International Ltd、England) を国内販売会社 (東和産業株式会社、大阪) より購入する。

##### 2 動物および飼育条件

5週齢のF344/DuCrjラット (SPF)、雌雄各110匹を日本チャールス・リハー (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 100 匹を用いる。

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）に制御された当研究所の動物室で、ポリカーボネート製ケージ（W26 cm×L42 cm×H17 cm、床敷使用）に 2～3 匹ずつ収容して行う。

### 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）による混餌投与とし、0、5、50、500 および 5000ppm 添加飼料投与の 5 群を設ける。各群の動物数は雌雄各 20 匹とし、投与開始前日にノルム値を用いた山崎らの方法で群分けする<sup>1)</sup>。

用量設定根拠 90 日間反復投与毒性試験（0、50、500 および 5000ppm）の結果を参考に決定した。当該試験では、肝臓重量の増加が 5000ppm 投与群の雌雄で認められた。また、血清アルカリフォスファターゼの減少が雄の全処置群で認められた。これらのことから、肝臓への影響が発現すると予測される 5000ppm を最高用量とした。また一般にアルカリフォスファターゼの減少は毒性学的意義は無い変化と考えられているが、本試験ではこの変化にも着目し最低用量を 5ppm と設定した。

添加飼料製造は、実験担当者が当研究所飼料製造室で行う。

### 4 検査項目および方法

#### 4-1) 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。体重測定は全動物

を対象に個別に投与開始日、投与開始後 3 および 7 日、以後 3 ヶ月までは週 1 回、3～6 ヶ月は隔週、以後は 4 週に 1 回行う。摂餌量は、体重測定日にケージ単位に、7 日分（最初の 1 週間は 3 あるいは 4 日）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）を求める。被験物質摂取量（mg/kg/日）は、当該測定日の平均体重、平均摂餌量および被験物質添加濃度から、計算により求める。

#### 4-2) 血液学的検査および血液生化学的検査

1 年間の投与終了後、一晚（約 16 時間）除餌を施した各群雌雄各 10 匹についてエーテル麻酔下で血液試料を眼窩静脈叢より採取し、以下の検査を実施する。また、投与期間中に切迫屠殺の必要が生じた個体についても可能な範囲で同様の検査を行う。

血液学的検査は、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 K-4500（シスメックス（株））で測定する。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））にて観察する。

血液生化学的検査は、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（ALT）、γ-グルタミルトランスペプチ

ターゼ ( $\gamma$ -GTP)、アルカリホスファターゼ (ALP)、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) の項目について自動分析装置 (日立製作所) で測定する。また、アルブミン/グロブリン比 (A/G) を TP と Alb の測定値から算出する。

#### 4-3) 尿検査

投与終了 1 週間前に 1 群雌雄各 10 匹以上の個体について半定量試験法 (ラブスティノクス R、ハイエルメディカル株式会社) を用いて、潜血、ケトン体、ブドウ糖、PH を測定する。

#### 4-4) 剖検、臓器重量測定および病理組織学的検査

投与期間中に死亡あるいは切迫屠殺した個体を含む全個体について剖検を実施する。摘出臓器のうち、脳、心臓、肺、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う (死亡動物を除く)。また、重量測定臓器に加え、下垂体、舌、眼球、唾液腺、甲状腺、胸腺、骨髄 (大腿骨)、気管、大動脈、脾臓、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、精巣上部、精囊、前立腺および子宮は、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する。

病理組織検査は HE 染色標本を作製し、対照群と最高用量群について最初に実施する。更に変化が認められた場合は他の用量群についても実施する。また、死亡および屠殺動物についても同様の検査を実施する。

#### 4-5) 統計解析法

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<sup>1)</sup>により統計解析を行う。

#### 4-6) 倫理面への配慮

本試験は、食品添加物の 1 年間反復投与毒性/発がん性併用試験ガイドラインに準じて行われている。動物からの採血や解剖においては麻酔下で行うなどの動物への苦痛を軽減するなどの配慮を行っている。また、分担研究者や各研究協力者は当該施設の動物実験倫理規定を遵守して行っている。

### C 研究結果および考察

#### 1 被験物質

同一ロットの被験物質の購入に努力したが販売量あるいは流通量が少ないためか、試験に必要な量を同一ロットで揃えることが出来なかった。入手した製品は Stan Chem International Ltd (英国) 製 Lot No 2019301/2 および 2019551 の各 700g であった。形状は淡黄色微粉末で、添付された分析証明書によれば有効成分としてクワシン (quassin) とネオクワンシン (neo-quassin) を Lot No 2019301/2 の製品は 11.9% および 41.7%、Lot No 2019551 製品は 11.7% および 42.4% 含有していた (HPCL 分析、Stan Chem International Ltd)。

以上のように被験物質のロットにより有効成分が若干異なることから、試験には両ロットの製品を等量混合して用いる事にした。

#### 2 投与の開始

試験計画書に基づき購入した F344 ラットを用いて混餌投与方法による 1 年間反復投与毒性試験を開始した。試験開始時と 7 日後の各群の体重は以下の通りである。

群 (匹数)	試験開始時体重 (g)	7 日後体重 (g)
雄 Cont (20)	111.2 ± 4.4	140.0 ± 5.5
5 ppm(20)	111.4 ± 5.1	138.1 ± 7.1
50 ppm(20)	111.4 ± 4.9	139.2 ± 7.7
500 ppm(20)	111.3 ± 4.9	138.2 ± 7.8
5000 ppm(20)	111.3 ± 4.8	139.2 ± 6.9
雌 Cont(20)	92.3 ± 2.6	106.7 ± 4.1
5 ppm(20)	92.5 ± 3.1	106.9 ± 3.1
50 ppm(20)	92.8 ± 2.5	106.0 ± 2.5
500 ppm(20)	92.2 ± 3.0	105.9 ± 3.8
5000 ppm(20)	92.5 ± 2.8	108.0 ± 4.5

### 3 ラット購入先の飼育生産施設でのラットへの肺パスツレラ感染の発生

日本チャールスリバーより購入した F344/DuCrj ラット (SPF) を用いて試験を開始したが、試験開始直後に日本チャールスリバーから緊急連絡の形でラットの飼育生産施設で肺パスツレラ (*Pasteurella pneumotropica*) の感染の事実が発表された。

試験に使用した動物は SPF 動物として購入したもので、肺パスツレラについても陰性とされている。しかし、試験に用いた動物はラットへの肺パスツレラ感染が確認された飼育室で飼育され、購入日と感染か確認時期は一週間の隔たりしかない。また生産施設での感染検査は一定の間隔で少数の動物について実施されていることから、購入動物についても肺パスツレラの感染の可能性が高いと判断された。また日本チャールスリバーからも同様の見解を得た。そこで、試験結果への影響とラットやマウスを用いて同時に複数回の試験を実施している本研究所内での二次感染 (肺パスツレラの感染力は極めて高い) 防止の観点から本試験を途中で停止し、上記の病原体陰性の F344/DuCrj ラットの供給再開 (約 6 ヶ月後) を待って、試験を再開することとした。

F344/DuCrj ラットの供給を待つ理由としては、1) 既存添加物の毒性試験では、本系統のラットを一貫して用いてきており、背景データが豊富である。また、今回の試験実施に先立って実施された 90 日間反復投与毒性試験も同系統のラットを使用している。2) 本系統のラットは他のラットよりも摂餌量が少なく、今回のように被験物質の大量入手が困難な場合も、比較的少量の被験物質で試験が実施できる。今回の被験物質必要量も本系統のラットの摂餌量を基に計算している。3) F344/DuCrj は日本チャールスリバー厚木飼育センター内の一動物室のみで飼育生産されている系統であり、この施設を清浄にし、再び動物を供給する体制が出来るまでには約 6 ヶ月が必要とされている。

### D 結語

シヤマイカカノシア抽出物を長期間に亘り反復投与したときに発現する毒性変化とその用量および毒性変化の発現しない用量に関する情報を得る目的で F344/DuCrj ラットによる 1 年間反復投与毒性試験を開始した。しかし、試験開始直後に購入先のラット飼育生産施設でラットの肺パスツレラ感染の発生が明らかとなった。当該試験に使用したラットは感染が発生した同じ飼育室に同時期に飼育されていたラットが供給されていることから肺パスツレの感染の可能性が高いと判断された。そこで、試験結果への影響と当研究所内での二次感染の防止の観点から本試験を途中停止し、上記の病原体陰性 F344/DuCrj ラットの供給再開（約 6 ヶ月後）を待って、試験を再開することとした。

参考文献 1) 山崎実, 野口雄次, 丹田 勝, 新谷 茂 武田研究所報 40(3/4), 163～167(1981)

**E 健康危機管理**

なし

**F 研究発表**

なし

**G 知的財産の出願・登録状況**

なし