

厚生労働科学研究費補助金

食品安全確保研究事業

天然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 鰐渕 英機

平成 16 (2004) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

- 天然添加物の発がん性等に関する研究 ----- 1
鰐渕 英機 (大阪市立大学大学院医学研究科 助教授)

II. 分担研究報告

1. プロポリス抽出物の発がん性等に関する研究 ----- 8
鰐渕 英機 (大阪市立大学大学院医学研究科 助教授)
2. キダチアロエ抽出物の発がん性等に関する研究 ----- 12
今井田 克己 (香川大学医学部 教授)
3. カテキンの発がん性等に関する研究 ----- 15
中江 大 ((財) 佐々木研究所 部長)

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 19

厚生労働科学研究費補助金(食品安全確保事業)
総括研究報告書

天然添加物の発がん性等に関する研究

主任研究者 鰐淵 英機 大阪市立大学大学院医学研究科助教授

研究要旨

本研究では安全性評価の確立していない天然添加物の長期曝露の安全性を評価するため、変異原性が疑陽性以上であり、平成14年度までに90日反復投与毒性試験等が施行された3品目(プロポリス抽出物、キダチアロエ抽出物、カテキン)を選び、1年間慢性毒性試験および発がん性試験をラットに施行し、3年間かけてその安全性を評価することとした。本年度は、品質性の保証された標準検体の入手と90日反復投与毒性試験等から考察した本試験の用量の設定、添加飼料での安定性等が検討された。なお、試験計画では、使用する動物は雌雄のF344ラットの予定であったが、ブリーダーの日本チャールズリバーのSPFでの事故が原因で、ラットの供給が長期間に渡って遅れるため、急遽、供給可能なラットで、本研究に使用が適していると判断されたBr/Han WIST@Jcl(GALAS)ラット(日本クレア株式会社)を使用することとなった。

現在まで得られた研究成果は下記の通りである。

- 1) プロポリスの発がん性について検索を開始した。試験用量は、平成14年度までに施行された1年間慢性毒性試験の結果を参考に2.5%、0.5%および対照群とした。プロポリス粉末(アピ株式会社供与)を入手し、検体の飼料への添加、安定性を検索した結果、固形飼料への成形の過程で、成分のばらつきや減少が見られたため、粉末飼料での投与と決定した。動物を用いた本試験は、平成16年4月より実施する。(鰐淵)
- 2) キダチアロエ抽出物の1年間慢性毒性試験および発がん性試験の開始の準備を行った。キダチアロエ抽出物は、90日間反復投与毒性試験では4%群で軟便が、1%および4%投与群で好中球比の著しい増加が報告されている。従って、本研究では最高用量を4%とし発がん性試験では4、0.8%および対照群を、1年間慢性毒性試験では、1年間慢性毒性試験では、4、0.8、0.16%および対照群を設けて、実験を開始する。(今井田)
- 3) カテキンを12および24ヶ月投与した際に発現する慢性毒性および発がん性について検索することを目的として、混餌投与による慢性毒性/発がん性併合試験を実施した。本年度は、ヒト摂取相当量も考慮して投与用量を3・10・0.3・0.02%に設定し、試料調整時の安定性確認を含む各種の事前準備を終えた。動物を用いた本試験は、平成16年4月より実施する。(中江)

分担研究者

今井田 克己 香川大学医学部 教授
中江 大 (財)佐々木研究所 部長

A 研究目的

食品添加物の多くはヒトが長期にわたって摂取する可能性が高いことから、基本的な安全性が確立されていない天然添加物について可及的速やかな安全性評価は食品衛生上急務と考えられる。本研究では、天然添加物のなかで変異原性が疑陽性以上であり、90日間反復投与毒性試験が施行された品目の中から、3品目(プロポリス抽出物、キダチアロエ抽出物、カテキン)を選び、1年間慢性毒性試験および発がん性試験をラットに施行し、3年間かけてその安全性を評価することとした。特に、選定された3品目は、近年の健康食品ブームのなか、急速に消費されるようになり、長期曝露の安全性評価が待たれている。

B 研究方法

1 プロポリス抽出物の発がん性に関する研究(鰐淵)

<被験物質並びに投与量>

プロポリス抽出物はアピ株式会社(岐阜市)から供与されたプロポリス粉末を使用した。プロポリス粉末は、ブラシル産を原材料とし、アルコールで溶解し不純物である花粉等の夾雑物を遠心分離により除去後、アルコールを除去し、デキストリン(粉末化剤)を50%加え粉末化したものである。

2年間発がん性試験に用いる投与量は、平成14年度までに施行された1年間慢性試験の結果等を参考にして、最高用量をプロポリス含量として2.5%とし、最低用量を0.5%とした。プロポリスはオリエンタルMF基礎飼料に規定量混ぜたもの検体として使用した。プロポリス粉末には50%のデキストリンが粉末化剤として添加されているため、添加飼料は(2.5%プロポリス+2.5%

デキストリン) 添加群、(0.5%プロポリス+2.5%デキストリン) 添加群、対照群として 2.5%デキストリン添加とした。被験物質の飼料への添加、固形化はオリエンタル酵母工業株式会社に依頼し、試験に供する。

プロポリスの飼料中含量および安定性を検索する指標として、*p*-クマル酸相当量、アルテピリンC、ハノカリン、ドゥルパニンを測定した。すなわち、日本健康栄養食品協会のプロポリス規格基準として、HPLCの全ピーク面積を *p*-クマル酸として換算し、*p*-クマル酸相当量としている。また、アルテピリンC、ハノカリン、ドゥルパニンは、ブラシル産プロポリスの主要成分であり、抗癌作用を確認しているプレニル基を持つ桂皮酸誘導体である。これらを添加飼料作成の過程でサンプリングし、含量、安定性の検索をHPLC法にて行った。

<動物並びに飼育条件>

5週齢の BrlHan WIST@Jcl (GALAS) ラノト雌雄各 150 匹を日本クレア株式会社から入手し、約 1 週間の馴化飼育後、2 年間発がん性試験に用いる。動物の飼育は大阪市立大学大学院医学研究科動物実験施設のバリアーシステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 10\%$ 、12 時間蛍光灯照明、12 時間消灯の条件下で行う。動物はプラスチックケースに 3 匹づつ飼育し、飲料水として、水道水を自由摂取させる。ケースおよびチップを週 1 回交換する。

<観察並びに検索方法>

食品添加物のがん原性試験法ガイドラインに準じて行う。観察並びに検索項目は以下の通りである。

[一般状態、体重、摂餌量]

全動物は、一般状態を毎日観察し、投与開始の 6 ヶ月後まで週 1 回体重および摂餌量を測定し、その後について 1 ヶ月に 1 回測定する。1 日あたりのプロポリス摂取量 (mg/kg/day) は、その結果より算出する。

[病理組織学的検査]

24 か月の投与終了後に、それぞれ全生存例を安楽死させて詳細な剖検を行う。

剖検においては、以下に示す器官・臓器を採取し、下線を付したのものについて重量を測定した後、全てを 10% 中性緩衝ホルマリン液により固定する。ただし、精巣および眼球については、必要に応じて適切な固定液を用いることかある。採取する器官・臓器は、リンパ節(頸部・腸間膜) 胸腔内大動脈・顎下腺 耳下腺・胸骨・大腿骨(骨髄を含む)・胸腺 気管・肺 心 甲状腺および上皮小体(固定後) 舌・食道 前胃 腺胃 十二指腸・小腸(空腸 回腸) 大腸(盲腸・結腸

直腸)・肝 脾 膵・腎 副腎・膀胱・精囊・前立腺 精巣 精巣上体 卵巣および卵管 子宮・膣・脳 下垂体・坐骨神経・大腿筋・脊髄(頸部および腰部) 眼球およびハーダー腺 大腿骨・胸骨・頭蓋骨および鼻腔・その他の肉眼的異常部位である。

死亡例および瀕死による切迫屠殺例については、上記と同様に解剖し死因を究明するが、重量の測定は実施しない。切迫例については、可能な限り末梢血の塗抹標本作製する。

病理組織学的検索は、対照群および高用量群の全動物について、以下に示す器官・組織の固定標本から切り出しを行い、通常の方法でパラフィン包埋して薄切し、ヘマトキリン/エオシン染色を施して鏡検する。該当する器官・臓器は、リンパ節(頸部・腸間膜) 胸腔内大動脈・顎下腺・耳下腺・胸骨・大腿骨(骨髄を含む)・鼻腔・胸腺 気管・肺・心・甲状腺および上皮小体 舌 食道・前胃 腺胃・十二指腸 小腸(空腸 回腸) 大腸(盲腸・結腸 直腸) 肝 脾・腎 副腎 膀胱 精囊 前立腺 精巣・精巣上体 卵巣および卵管 子宮・膣・脳 下垂体 坐骨神経・大腿筋 脊髄(頸部および腰部) 眼球およびハーダー腺・その他の肉眼的異常部位である。その他の用量群の全動物については、胸腺 肺 肝 脾 腎 副腎 精巣 卵巣とその他の肉眼的異常部位および高用量群において投与に関連した異常が観察された器官・組織について、上述と同様の方法で病理組織学的検査を行なう。

[統計学的解析]

体重 摂餌量・臓器重量 血液学および血清生化学的検査結果については、ANOVA による解析を行い、群間に有意差が観察された場合に、Dunnett の方法で対照群と各被験物質投与群の間で検定を行なう。尿検査と病理組織学的検査結果については、Fischer の直接確率検定法を用いて統計学的解析を実施する。なお、腫瘍および前がん病変については、必要に応じて別途検定方法を選択して行う。

2 キダチアロエ抽出物の発がん性等に関する研究(今井田)

<動物並びに飼育条件>

5週齢の BrlHan WIST@Jcl (GALAS) ラノト雌雄各 190 匹づつを日本クレアから入手し、約 1 週間の馴化飼育後、雌雄 150 匹づつ、合計 300 匹を長期発がん性試験に、雌雄 40 匹づつ合計 80 匹を 1 年間慢性毒性試験に用いる。動物の飼育は香川大学動物実験施設のバリアーシステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、

湿度 60±10%、12 時間蛍光灯照明、12 時間消灯の条件下で行う。動物は全網ケージに 5 匹づつ飼育し、飲料水として、水道水を自由摂取させる。

<被験物質並びに投与量>

キダチアロエは日本粉末薬品株式会社（大阪市）から、提供されたものを用いた。このキダチアロエ原体をオリエンタル MF 基礎飼料に規定量混ぜたものを検体として使用した。90 日間反復投与毒性試験のデータに基づき、最高用量を 4% として、以下公比 5 として、発がん性試験には 4%、0.8%、0% を、1 年間慢性毒性試験には、4%、0.8%、0.16%、0% の用量に設定した。

<観察並びに検索方法>

食品添加物のがん原性試験法ガイドラインならびに 1 年間反復投与毒性試験法ガイドラインに準じて行う。すなわち、6 週齢の雌雄 Wistar-Hanover ラットを用いて、被験物質を原則として 1 年間または 2 年間連続して混餌投与する。観察並びに検査項目は 1 の鱈淵らに準じるが、1 年間慢性毒性試験では、投与期間終了後、全生存動物を剖検し、血液学的、血液生化学的及び病理組織学的に検査する。血液学的検査として、赤血球数、白血球数、血小板数、血色素量、ヘマトクリット値等を測定する。血液生化学的検査として、総蛋白、アルブミン、A/G 比、コレステロール、中性脂肪、ヒルルビン、尿素窒素、クレアチニン、AST、ALT、 γ -GTP、アルカリホスファターゼ、電解質等を測定する。

3 カテキンの発がん性等に関する研究（中江）

<被験物質>

緑茶カテキン（サンフェノン 100S）は、太陽化学株式会社より供与された。

<動物および飼育条件>

動物は、BrlHan WIST@Jc1 (GALAS) ラット（日本クレア株式会社）雌雄各 300 匹を用い、5 週齢にて入荷後に約 1 週間の検疫・馴化期間を置き、6 週齢にて試験に供する。動物数は、12 ヶ月間慢性毒性試験について 1 群当り雌雄各 10 匹、24 ヶ月間発がん性試験について 1 群当たり雌雄各 50 匹を用いる。各群への動物の割り付けは、適切な無作為抽出法を用いて行う。動物は、バリエーションシステム内の温度・湿度を制御した動物室内で飼育する。室内の環境は、温度 25 ± 5°C 湿度 50 ± 10% 換気回数 12 回/時 12 時間/日照明の条件下とする。雄動物は最大 3 匹ずつを、雌は最大 4 匹ずつを、それぞれ、ソフトチップを敷いたポリカーボネイト製のプラスチックケージに収容し、ケージおよびチップを週 1 回交換する。飲料水は、水道水を自由摂取させる。

<投与用量の設定>

90 日間反復毒性試験の結果に基づき、本研究における慢性毒性/発がん性併合試験の投与用量は、3、10、0.3% に設定した。なお、本試験においては、カテキンが食品添加物として多くの食品に使用されている現実を踏まえ、ヒト摂取相当量での検索も必要であると考え、カテキンの 1 日当たりヒト摂取量に相当する 0.02% を最低用量に設定した。

<観察並びに検索方法>

食品添加物のがん原性試験法ガイドラインならびに 1 年間反復投与毒性試験法ガイドラインに準じて行う。（1 の鱈淵ならびに 2 今井田の項を参照）

C 研究結果

1 プロポリス抽出物の発がん性に関する研究（鱈淵）

プロポリスの飼料中含量を検索した結果、プロポリスの MF 基礎粉末飼料への添加では、日本健康栄養食品協会のプロポリス規格基準としての p-クマル酸相当量、プロポリス中の活性物質であるアルテピリン C、バノカリン、トゥルパニンは、ミキサー中での混合ムラはみとめられなかった。しかしながら、固形成後の MF+プロポリス添加飼料では、主要成分である p-クマル酸とトゥルパニンの含有量が減少して測定された。すなわち、成形の際の加水や加熱により、分解または変化した可能性があると考えられた。よって、本実験では、固形化せずに粉末飼料として投与することとした。動物実験は平成 16 年 4 月から開始される。

2 キダチアロエ抽出物の発がん性等に関する研究（今井田）

キダチアロエの投与用量をがん原性試験では 4%、0.8%、0% に、また、1 年間反復投与毒性試験では 4%、0.8%、0.16%、0% に決定した。また、各用量の混餌飼料を作製し、その安定性ならびに均一性の検査を行っている。

3 カテキンの発がん性等に関する研究（中江）

本年度は、被験物質に関する供給の担保と事前準備を終え、動物およびその他の必要物資を確保した。動物を用いた本試験は、平成 16 年 4 月より実施する。

D 考察

天然添加物のプロポリス抽出物、キダチアロエ抽出物、カテキンの 1 年間慢性毒性試験および 2 年間発がん性試験を開始した。当初予定し

ていた、F344 ラット (F344/DuCrJ ラット・日本チャールズリバー) の入手が、フリーダーである日本チャールズリバーの感染事故により長期間困難となった。そこで、急遽、現在世界標準化ラットとしての方向性を模索している Wistar-Hanover ラット BrlHan WIST@Jc1 (GALAS) ラット (日本クレア株式会社) に注目し、使用することとなった。実験の開始が遅れて、計画に多少の支障が生じたが、結果として、今回用いる Wistar-Hanover ラットの長期試験 (1 年または 2 年間) での自然発生腫瘍の頻度等、基礎的なデータが得られるものと期待される。(鰐淵)

今回、Wistar-Hanover ラットを用いた天然添加物であるキダチアロエのがん原性試験、及び、1 年間慢性毒性試験を開始した。研究は開始したところであるが、得られる結果は天然添加物の毒性、安全性に関する基礎的なデータが得られるものと期待される。(今井田)

本年度はカテキンの 1 年間慢性毒性試験・2 年間発がん性試験を開始した。現在、実験を開始したばかりで考察できることはない。(中江)

E 結論

1) プロポリスの長期曝露の安全性評価のために 2 年間発がん性試験を開始した。投与用量は 1 年間慢性毒性試験の結果を参考にし、25%、05% に設定した。プロポリス含有飼料の固形成形化の過程で、プロポリス主要成分である *p*-クマル酸とドゥルパニンの含有量が減少して測定されたため、粉末飼料で投与することとした。(鰐淵)

2) 天然添加物であるキダチアロエのがん原性試験、1 年間反復毒性投与試験を Wistar-Hanover の雌雄ラットを用いて開始する。投与濃度は 90 日間反復投与毒性試験の結果をもとに、がん原性試験では、4%、08%、0%、1 年間反復投与毒性試験では 4%、018%、016%、0% とした。(今井田)

3) 本研究は、カテキンの安全性評価の一環として、ラットのほぼ一生にわたる 24 ヶ月間に亘って投与した際に発現する慢性毒性および発がん性について検索することを目的として、混餌投与による慢性毒性/発がん性併合試験を実施するものである。本年度は、90 日間反復毒性試験結果およびヒト摂取相当量に基づいて、投与用量を 31003・002% に設定し、試料調整等にかかわるカテキンの安定性の確認を含む各種の事前準備を終えた。動物を用いた本試験は、平成 16 年 4 月より実施する。(中江)

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

Salim, E I, Wanibuchi, H, Morimura, K, Wei, M, Mitsuhashi, M, Yoshida, K, Endo, G and Fukushima, S Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in p53 heterozygous knockout and wild-type C57BL/6J mice *Carcinogenesis*, 24, 335-342, 2003

Fukushima, S, Wanibuchi, H, Morimura, K, Wei, M, Nakae, D, Konishi, Y, Tsuda, H, Takasuka, N, Imaida, K, Shirai, T, Tatemitsu, M, Tsukamoto, T, Hirose, M and Furukawa, F Lack of initiation activity in rat liver of low doses of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline *Cancer Lett*, 191, 35-40, 2003

Mitsuhashi, M, Wanibuchi, H, Wei, M, Doi, K, Morimura, K, Masuca, C, Wada, S, Nakatani, T, Kakizoe, T and Fukushima, S Lack of inhibition of BBN-induced bladder carcinogenesis in C57BL/6 mice by intravesical instillation of KRN 7000 *J Toxicol Pathol*, 16, 19-23, 2003

Seike, N, Wanibuchi, H, Morimura, K, Wei, M, Nishikawa, T, Hirata, K, Yoshikawa, J and Fukushima, S Enhancement of lung carcinogenesis by nonylphenol and genistein in a F344 rat multiorgan carcinogenesis model *Cancer Lett*, 192, 25-36, 2003

Karim, R, Wanibuchi, H, Wei, M, Morimura, K, Salim, E I and Fukushima, S Enhancing risk of ethanol on MeIQx-induced rat hepatocarcinogenesis is accompanied with increased levels of cellular proliferation and oxidative stress *Cancer Lett*, 192, 37-47, 2003

Mitsuhashi, M, Wanibuchi, H, Wei, M, Doi, K, Morimura, K, Masuda, C, Wada, S, Nakatani, T, Kakizoe, T and Fukushima, S No inhibition of urinary bladder carcinogenesis in rats with intravesical instillation of α -galactosylceramide *Asian Pacific J Cancer Prev*, 4, 45-50, 2003

Romanenko, A, Morimura, K, Wanibuchi, H, Wei, M, Zaparin, W, Vinnichenko, W, Kinoshita, A, Vozianov, A and Fukushima, S Urinary bladder lesions induced by persistent chronic low-dose ionizing radiation *Cancer Sci*, 94, 328-333, 2003

Ogawa, M, Wanibuchi, H, Nishikawa, M, Yano, Y, Otani, S, Totsuka, Y, Wakabayashi, K, Nakae, D and Fukushima, S Post-initiation inhibition of MeIQx hepatocarcinogenesis in rats by cysteine *Osaka City Med J*, 49, 21-30, 2003

- Kinoshita, A , Wanibuchi, H , Morimura, K , Wei, M , Shen, J , Imaoka, S , Funae, Y and Fukushima, S Phenobarbital at low dose exerts hormesis in rat hepatocarcinogenesis by reducing oxidative DNA damage, altering cell proliferation, apoptosis and gene expression *Carcinogenesis*, 24, 1389-1399, 2003
- Fukushima, S , Morimura, K and Wanibuchi, H Thresholds for carcinogenicity of environmental carcinogens *J Toxicol Sci* , 28, 241, 2003
- Shen, J , Wanibuchi, H , Salim, E I , Wei, M , Kinoshita, A , Yoshida, K , Endo, G and Fukushima, S Liver tumorigenicity of trimethylarsine oxide in male Fischer 344 rats-association with oxidative DNA damage and enhanced cell proliferation *Carcinogenesis*, 24, 1827-1835, 2003
- Shen, J , Wanibuchi, H , Salim, E I , Wei, M , Doi, K , Yoshida, K , Endo, G , Morimura, K and Fukushima, S Induction of glutathione *S*-transferase placental form positive foci in liver and epithelial hyperplasia in urinary bladder, but no tumor development in male Fischer 344 rats treated with monomethylarsonic acid for 104 weeks *Toxicology and Applied Pharmacology*, 193, 335-345, 2003
- Mitsuhashi, M , Wanibuchi, H , Morimura, K , Doi, K , Wei, M , Wada, S , Nakatani, T and Fukushima, S Significance of overexpression of metallothionein in mouse urinary bladder focal lesions induced by treatment with *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine *Cancer Sci* , 94, 1052-1058, 2003
- Wei, M , Morimura, K , Wanibuchi, H , Shen, J , Doi, K , Mitsuhashi, M , Moku, M , Salim, E I and Fukushima, S Chemopreventive effect of JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis *Cancer Lett*, 202, 11-16, 2003
- K Imaida, S Tamano, A Hagiwara, S Fukushima, T Shirai, and N Ito Application of rat medium-term bioassays for detecting carcinogenic and modifying potentials of endocrine active substances *Pure Appl Chem* 75 2491-2495, 2003
- H Takeuchi, K Saoo, M Yokohira, M Ikeda, H Maeta, M Miyazaki, H Yamazaki, T Kamataki, and K Imaida Pretreatment with 8-methoxypsoralen, a potent human CYP2A6 inhibitor, strongly inhibits lung tumorigenesis induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in female A/J mice *Cancer Res* , 63 7581-7583, 2003
- H Tsuda, S Fukushima, H Wanibuchi, K Morimura, D Nakae, K Imaida, M Tatematsu, M Hirose, K Wakabayashi, M A Moore Value of GST-P positive preneoplastic hepatic foci in dose-response studies of hepatocarcinogenesis Evidence for practical thresholds with both genotoxic and nongenotoxic carcinogens A review of recent work *Toxicol Pathol*, 31 80-86, 2003
- S Fukushima, H Wanibuchi, K Morimura, M Wei, D Nakae, Y Konishi, H Tsuda, N Takasuka, K Imaida, T Shirai, M Tatematsu, T Tsukamoto, M Hirose, F Furukawa Lack of initiation activity in rat liver of low doses of 2-amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5-f]quinoxaline *Cancer Lett*, 191 35-40, 2003
- J Q Li, A Kubo, F Wu, H Usuki, J Fujita, S Bando, T Masaki, K Saoo, H Takeuchi, S Kobayashi, K Imaida, H Maeta, T Ishida, S Kuriyama Cyclin B1, unlike cyclin G1, increases significantly during colorectal carcinogenesis and during later metastasis to lymph nodes *Int J Oncol*, 22 1101-1110, 2003
- I Narama, K Imaida, H Iwata, D Nakae, A Nishikawa, T Harada A review of nomenclature and diagnostic criteria for proliferative lesions in the liver of rats by a working group of the Japanese Society of Toxicologic Pathology *J Toxicol Pathol* , 16 1-17, 2003
- S Fukushima, H Wanibuchi, K Morimura, S Iwai, D Nakae, H Kishida, H Tsuda, N Uehara, K Imaida, T Shirai, M Tatematsu, T Tsukamoto, M Hirose, F Furukawa Existence of a threshold for induction of aberrant crypt foci in the rat colon with low doses of 2-amino- 1-methyl-6 phenylimidazo[4,5-b] pyridine *Toxicol Sci* , in press, 2004
- Nakae D, Kishida H, Enami T, Konishi Y, Hensley KL, Floyd RA and Kotake Y, Effects of *N*-*tert*-butyl nitron and its derivatives on the early phase of hepatocarcinogenesis in rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet *Cancer Sci*, 2003, 94 26-31
- Tsuda H, Fukushima S, Wanibuchi H, Morimura K, Nakae D, Imaida K, Tatematsu M, Hirose M, Wakabayashi K and Moore MA, values of GST-P positive preneoplastic hepatic foci in dose-response studies of hepatocarcinogenesis Evidence for practical thresholds with both genotoxic and nongenotoxic carcinogens A review of recent work *Toxicol Pathol*, 2003, 31 80-86
- Fukushima S, Wanibuchi H, Morimura K, Wei M, Nakae D, Konishi Y, Tsuda H, Takasuka N, Imaida K, Shirai T, Tatematsu M, Tsukamoto T, Hirose M and Furukawa F, Lack of initiation activity in rat liver of

low doses of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[2,5-f]quinoxaline *Cancer Lett*, 2003, 191 35-40

Narama I, Imaida K, Iwata H, Nakae D, Nihikawa A and Harada T, A review of nomenclature and diagnostic criteria for proliferative lesions in the liver of rats by a working group of the Japanese Society of Toxicologic Pathology, *J Toxicol Pathol*, 2003, 16, 1-18

Yoshida M, Shimomoto T, Katashima S, Shirai T, Nakae D, Watanabe G, Taya K and Maekawa A, Effects of maternal exposure to nonylphenol on growth and development of the female reproductive system and uterine carcinogenesis in rats *J Toxicol Pathol*, 2003, 16 259-266

Shimomoto T, Yoshida M, Takahashi M, Uematsu F, Maekawa A and Nakae D, A case report of a choroid plexus carcinoma spontaneously occurring in the right lateral ventricle of a 14-week-old, female Donryu rat *Toxicol Pathol*, 2004, 32, 264-268

Yoshida M, Katsuda S, Nakae D and Maekawa A, Lack of toxicity or carcinogenicity of S-170, a sucrose fatty acid ester, in F344 rats *Food Chem Toxicol*, 2004, 42 667-676

2 学会発表

鰐淵英機、カリム レザウル、カン シン ソク、李 昌治、森村圭一朗、福島昭治 MeIQx の低用量発がん性に及ぼすアルコール摂取の影響 第19回日本毒性病理学会, 1月23-24日, 東京, 2003 (第19回日本毒性病理学会講演要旨集 0-1, p 37)

Wanibuchi, H, Karim, R, Puatanachokchai, R, Kang, J S, Morimura, K and Fukushima, S Enhancing risk by ethanol in low-dose MeIQx-induced rat hepatocarcinogenesis 94th Annual Meeting, American Association for Cancer Research July 11-14, Washington, D C, U S A, 2003 (AACR proceedings, vol 44, March 2003, 2426, p 475)

鰐淵英機 発がん物質の低用量発がんリスクの評価 第92回日本病理学会, 4月23-25日, 福岡, 2003 (日本病理学会誌第92巻第1号 WS12-3, p 165)

鰐淵英機、森村圭一朗、沈 鈞、カン シン ソク、木下アンナ、内藤沙紀、福島昭治 ゲニステインのラット肺発癌促進作用 日本食品化学学会第9回総会 学術大会, 6月13-14, 東京, 2003 (日本食品化学学会第9回総会 学術大会講演要旨集, 一般講演 10, p 38)

鰐淵英機、サリムエリサイト、森村圭一朗、李 昌治、カンシンソク、福島昭治 ビルハルト住血吸虫由来膀胱癌における酸化ストレスとDNA 傷害および修復遺伝子の変化 第62回日本癌学会総会, 9月25-27日, 名古屋, 2003 (日本癌学会総会記事 3662-PP, p 532)

鰐淵英機、木下アンナ、福島昭治 OGG1 ノックアウトマウスにおけるDMAの発がん性 シンポジウム講演, 第11回ヒ素シンポジウム, 10月14日-15日, 札幌, 2003 (第11回ヒ素シンポジウム講演要旨集 2A-16, p 79-80)

鰐淵英機 環境発癌物質のホルミシス現象 第3回分子予防環境医学研究会, 12月19-20, 東京, 2003

Wanibuchi, H, Morimura, K and Fukushima, S Risk assessment of low dose carcinogenesis by genotoxic carcinogens JSTP/IFSTP(IATP), February 15-18, Kobe, 2003 (JSTP/IFSTP(IATP) program & abstracts symposium1-1, p 25)

竹下文隆、今井田克己、二口充、小川久美子、鈴木周五、白井智之 4-Nonylphenol 投与によるラット再生尿細管の増加 第19回日本毒性病理学会 (2003 1)

堤友子、萩原昭裕、今井則夫、土井悠子、難波江恭子、朝元誠人、今井田克己、白井智之 遺伝子組み替えトウモロコシのラットを用いた13週間反復投与毒性試験 第19回日本毒性病理学会 (2003 1)

今井田克己、白井 智之 電磁波と発がん性 第92回日本病理学会総会、ワークショップ「発癌実験」(2003 4 23)

今井田克己 電波と安全にお付き合いいただくために、電波の生体への影響評価 平成15年度ARIB講演会(2003 7 3)

今井田克己、竿尾光祐、竹内聖、山川けいこ、他田美子、横平政直 SV40T-antigen 遺伝子導入ラットの前立腺癌発生過程における arct11n 投与による影響 第62回日本癌学会総会 (2003 9)

白井智之、河部真弓、渡辺聡一、和気加奈子、今井田克己、王野静光 携帯電話で使用されている1.5GHz 高周波電磁波の長期近傍界曝露によ

るラット ENU 経胎盤脳腫瘍発生におよぼす影響
第 62 回日本癌学会総会 (2003 9)

竹内聖、竿尾光祐、山川けいこ、池田美子、宮崎雅史、山崎浩史、鎌滝哲也、今井田克己
Methoxsalen による NNK 誘発 A/J マウス肺発癌の抑制効果 第 62 回日本癌学会総会 (2003 9)

T Shirai, M Kawabe, K Ichihara, O Fujiwara, M Takai, S Watanabe, K Wake, Y Yamanaka, K Imaida and S Tamano Chronically exposure to the 1.5GHz electromagnetic near-field used for cellular phones does not promote ethylnitrosourea-induced central nervous system tumors in F344 rats
6th International Congress of the European Bioelectromagnetics Association (EBEA)
Budapest, Hungary (2003 11 13-15)

K Imaida, T Shirai, N It In vivo models for assessment of carcinogenicity and chemopreventive potential of food compounds Bangkok, Thailand (2003 11 15-16)

M Ikeda, K Saoo, K Yamakawa, H Takeuchi, M Yokohira, Y Hosotani, Y Zeng, K Hosokawa, S Kinouchi, K Imaida Introduction of multiple granulation in the liver with severe hepatocyte damage by montan wax, a food additive, in a 90-day toxicity study in F344 rats JSTP/IFSTP(IATP) (2004 2 15-18)

M Yokohira, H Takeuchi, K Yamakawa, K Saoo, M Ikeda, Y Hosotani, Y Zeng, K Hosokawa, K Imaida, M Shiraishi Sequential change in acute lung damage due to intratracheal instillation of Quartz in F344 male rats establishment of a biological bioassay for detection of lung toxicity by fine particles JSTP/IFSTP(IATP) (2004 2 15-18)

H Takeuchi, K Saoo, M Yokohira, M Miyazaki, H Yamazaki, T Kamataki, K Imaida Inhibitory effect of methoxsalen, a potent human CYP2A6 inhibitor, on NNK-induced A/J female mice lung tumorigenesis American Association for Cancer Research 95th Annual Meeting(2004 3 27-31)

Nakae D Immunohistochemical detection of the altered expression of proteins involved in rat carcinogenesis and their digital image analysis by automated cellular scanning system (Ariol SL-50) Joint International Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology and the International Federation of Societies of Toxicologic Pathologists Co-sponsored by the International Academy of Toxicologic Pathology (Kobe, 2004)

Nakae D, takahashi M, Masumura K, Umemura T, Uematsu F, Yoshida M, Igarashi M, Watanabe N, Maekawa A, Nishikawa A, Hirsose M and Nohmi T Profile of somatic mutation induced *in vivo* in *gpt* delta transgenic rat fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet International Joint Meeting on Food Factors and Free Radicals in Health and Disease (Kyoto, 2003)

中江 大, 吉田 緑, 傳田 阿由美, 辻内 俊文, 堤 雅弘, 小西 陽一, 前川 昭彦 発がん機序における内的要因としての reactive oxygen and nitrogen oxide species-induced stress の意義 第 92 回日本病理学会総会 (福岡, 2003)

中江 大, 高橋 正一, 吉田 緑, 植松 史行, 前川 昭彦 高リスク群における発がんリスク 第 30 回日本トキシコロジー学会学術年会 (相模原, 2003)

Takahashi M, Shimomoto T, Uematsu F, Yoshida M, Maekawa A and Nakae D Effect of Estrogen and its steroid metabolites on uterine carcinogenesis in mice initiated with *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine 94th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (Washington DC, 2003)

Yoshida M, Katsshima S, Uematsu F, Takahashi M, Maekawa A and Nakae D development of an animal model for evaluation of chemopreventive efficacies against lung adenocarcinomas using *N*-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine-induced rat lung carcinogenesis protocol 22nd Annual Meeting of the Society of Toxicologic Pathology (Savannah, 2003)

Uematsu F, Takahashi M, Yoshida M, Maekawa A, Rusyn I and Nakae D Comprehensive expression analysis of hepatocellular carcinomas induced in rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet 95th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (Orlando, 2004)

H 知的所有権の所得状況
特許取得
なし
実用新案登録
なし
その他
なし

厚生労働科学研究費補助金(食品安全確保事業)
分担研究報告書

プロポリスの発がん性等に関する研究
分担研究者 鱒淵 英機 大阪市立大学大学院医学研究科助教授

研究要旨

本研究では安全性評価の確立していない天然添加物の長期曝露の安全性を評価するため、変異原性が疑陽性以上であり、平成14年度までに90日反復投与毒性試験等が施行された品目のうち、プロポリスについて、2年間発がん性試験をラットに施行し、3年間かけてその安全性を評価することとした。本年度は、品質性の保証された標準検体の入手と90日反復投与毒性試験等から考察した本試験の用量の設定、添加飼料での安定性等が検討された。なお、試験計画では、使用する動物は雌雄のF344ラットの予定であったが、ブリーダーの日本チャールズリバーのSPFでの事故が原因で、ラットの供給が長期間に渡って遅れるため、急速、供給可能なラットで、本研究に使用が適していると判断されたBrlHan WIST@Jc1(GALAS)ラット(日本クレア株式会社)を使用することとなった。投与用量は、平成14年度までに施行された1年間慢性毒性試験等の結果を参考に25%、05%および対照群とした。プロポリス粉末(アピ株式会社供与)を入手し、検体の飼料への添加、安定性を検索した結果、固形飼料への成形の過程で、成分のばらつきや減少が見られたため、粉末飼料での投与と決定した。動物を用いた本試験は、平成16年4月より実施する。

A 研究目的

食品添加物の多くはヒトが長期にわたって摂取する可能性が高いことから、基本的な安全性が確立されていない既存添加物について可及的速やかな安全性評価は食品衛生上急務と考えられる。本研究では、天然添加物のなかで変異原性が疑陽性以上であり、1年間反復投与毒性試験が施行され、肝の前がん病変の指標とされるGST-P陽性細胞巢の出現がみられ、発がん性が疑われるプロポリス抽出物を選び、2年間発がん性試験をラットに施行し、3年間かけてその安全性を評価することとした。近年の健康食品ブームのなか、プロポリスは急速に消費量が増加し、長期曝露の安全性評価が待たれている。

B 研究方法

<被験物質並びに投与量>

プロポリス抽出物はアピ株式会社(岐阜市)から供与されたプロポリス粉末を使用した。プロポリス粉末は、ブラジル産を原材料とし、アルコールで溶解し不純物である花粉等の夾雑物を遠心分離により除去後、アルコールを除去し、デキストリン(粉末化剤)を50%加え粉末化したものである。

2年間発がん性試験に用いる投与量は、平成14年度までに施行された1年間慢性試験の結果等を参考にして、最高用量をプロポリス含量として25%とし、最低用量を05%とした。プロポリスはオリエンタルMF基礎飼料に規定量混ぜたもの検体として使用した。プロポリス粉末には

50%のデキストリンが粉末化剤として添加されているため、添加飼料は(25%プロポリス+25%デキストリン)添加群、(05%プロポリス+25%デキストリン)添加群、対照群として25%デキストリン添加とした。被験物質の飼料への添加、固形化はオリエンタル酵母工業株式会社に依頼し、試験に供する。

プロポリスの飼料中含量および安定性を検索する指標として、*p*-クマル酸相当量、アルテピリンC、パソカリン、トゥルパニンを選定した。すなわち、日本健康栄養食品協会のプロポリス規格基準として、HPLCの全ピーク面積を*p*-クマル酸として換算し、*p*-クマル酸相当量としている。また、アルテピリンC、パソカリン、ドゥルパニンは、ブラジル産プロポリスの主要成分であり、抗癌作用を確認しているプレニル基を持つ桂皮酸誘導体である。これらを添加飼料作成の過程でサンプリングし、含量、安定性の検索をHPLC法にて行った。

<動物並びに飼育条件>

5週齢のBrlHan WIST@Jc1(GALAS)ラット雌雄各150匹を日本クレア株式会社から入手し、約1週間の馴化飼育後、2年間発がん性試験に用いる。動物の飼育は大阪市立大学大学院医学研究科動物実験施設のバリアーステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60\pm 10\%$ 、12時間蛍光灯照明、12時間消灯の条件下で行う。動物はプラスチックケージに3匹づつ飼育し、飲料水として、水道水を自由摂取させる。ケージおよびチップを週1回交換する。

<観察並びに検索方法>

食品添加物のがん原性試験法ガイドラインに準じて行う。観察並びに検索項目は以下の通りである。

[一般状態、体重、摂餌量]

全動物は、一般状態を毎日観察し、投与開始の6ヶ月後まで週1回体重および摂餌量を測定し、その後について1ヶ月に1回測定する。1日あたりのプロポリス摂取量(mg/kg/day)は、その結果より算出する。

[病理組織学的検査]

24か月の投与終了後に、それぞれ全生存例を安楽死させて詳細な剖検を行う。

剖検においては、以下に示す器官・臓器を採取し、下線を付したのものについて重量を測定した後、全てを10%中性緩衝ホルマリン液により固定する。ただし、精巣および眼球については、必要に応じて適切な固定液を用いることがある。採取する器官・臓器は、リンパ節(頸部・腸間膜) 胸腔内大動脈 顎下腺・耳下腺・胸骨 大腿骨(骨髄を含む) 胸腺 気管・肺 心 甲状腺および上皮小体(固定後) 舌 食道・前胃 腺胃 十二指腸・小腸(空腸 回腸)・大腸(盲腸 結腸 直腸)・肝 脾 腎・副腎 膀胱・精囊・前立腺・精巣・精巣上体 卵巣および卵管・子宮・膈・脳 下垂体 坐骨神経・大腿筋・脊髄(頸部および腰部)・眼球およびハーダー腺 大腿骨 胸骨・頭蓋骨および鼻腔 その他の肉眼的異常部位である。

死亡例および瀕死による切迫屠殺例については、上記と同様に解剖し死因を究明するが、重量の測定は実施しない。切迫例については、可能な限り末梢血の塗抹標本作製する。

病理組織学的検索は、対照群および高用量群の全動物について、以下に示す器官・組織の固定標本から切り出しを行い、通常の方法でパラフィン包埋して薄切し、ヘマトキリン/エオジン染色を施して鏡検する。該当する器官・臓器は、リンパ節(頸部 腸間膜)・胸腔内大動脈 顎下腺 耳下腺 胸骨 大腿骨(骨髄を含む) 鼻腔・胸腺・気管・肺 心・甲状腺および上皮小体 舌・食道・前胃 腺胃 十二指腸・小腸(空腸・回腸)・大腸(盲腸 結腸・直腸)・肝 脾 腎・副腎・膀胱 精囊 前立腺 精巣 精巣上体 卵巣および卵管・子宮・膈 脳・下垂体 坐骨神経 大腿筋・脊髄(頸部および腰部) 眼球およびハーダー腺・その他の肉眼的異常部位である。その他の用量群の全動物については、胸腺 肺 肝・脾 腎・副腎・精巣 卵巣とその他の肉眼的異常部位および高用量群において投与に関連した異常が観察された器官・組織に

ついて、上述と同様の方法で病理組織学的検査を行なう。

[統計学的解析]

体重・摂餌量 臓器重量・血液学および血清生化学的検査結果については、ANOVAによる解析を行い、群間に有意差が観察された場合に、Dunnettの方法で対照群と各被験物質投与群の間で検定を行なう。尿検査と病理組織学的検査結果については、Fischerの直接確率検定法を用いて統計学的解析を実施する。なお、腫瘍および前がん病変については、必要に応じて別途検定方法を選択して行う。

C 研究結果

プロポリスの飼料中含量を検索した結果、プロポリスのMF基礎粉末飼料への添加では、日本健康栄養食品協会のプロポリス規格基準としてのp-クマル酸相当量、プロポリス中の活性物質であるアルテピリンC、バノカリン、ドゥルパニンは、ミキサー中での混合ムラはみとめられなかった。しかしながら、固形成形後のMF+プロポリス添加飼料では、主要成分であるp-クマル酸とドゥルパニンの含有量が減少して測定された。すなわち、成形の際の加水や加熱により、分解または変化した可能性があると考えられた。よって、本実験では、固形化せずに粉末飼料として投与することとした。動物実験は平成16年4月から開始される。

D 考察

天然添加物のプロポリス抽出物、キダチアロエ抽出物、カテキンの1年間慢性毒性試験および2年間発がん性試験を開始した。当初予定していた、F344ラット(F344/DuCrjラット 日本チャールズリバー)の入手が、ブリーダーである日本チャールズリバーの感染事故により長期間困難となった。そこで、急遽、現在世界標準化ラットとしての方向性を模索しているWistar-Hanoverラット BrlHan WIST@Jcl(GALAS)ラット(日本クレア株式会社)に注目し、使用することとなった。実験の開始が遅れて、計画に多少の支障が生じたが、結果として、今回用いるWistar-Hanoverラットの長期試験(1年または2年間)での自然発生腫瘍の頻度等、基礎的なデータが得られるものと期待される。

E 結論

プロポリスの長期曝露の安全性評価のために2年間発がん性試験を開始した。投与用量は1年間慢性毒性試験の結果を参考にし、25%、05%に設定した。プロポリス含有飼料の固形成形化

の過程で、プロポリス主要成分である *p*-クマル酸とドゥルパニンの含有量が減少して測定されたため、粉末飼料で投与することとした。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

Salim, E I, Wanibuchi, H, Morimura, K, Wei, M, Mitsuhashi, M, Yoshida, K, Endo, G and Fukushima, S Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in p53 heterozygous knockout and wild-type C57BL/6J mice *Carcinogenesis*, 24, 335-342, 2003

Fukushima, S, Wanibuchi, H, Morimura, K, Wei, M, Nakae, D, Konishi, Y, Tsuda, H, Takasuka, N, Imaida, K, Shirai, T, Tatemitsu, M, Tsukamoto, T, Hirose, M and Furukawa, F Lack of initiation activity in rat liver of low doses of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline *Cancer Lett*, 191, 35-40, 2003

Mitsuhashi, M, Wanibuchi, H, Wei, M, Doi, K, Morimura, K, Masuca, C, Wada, S, Nakatani, T, Kakizoe, T and Fukushima, S Lack of inhibition of BBN-induced bladder carcinogenesis in C57BL/6 mice by intravesical instillation of KRN 7000 *J Toxicol Pathol*, 16, 19-23, 2003

Seike, N, Wanibuchi, H, Morimura, K, Wei, M, Nishikawa, T, Hirata, K, Yoshikawa, J and Fukushima, S Enhancement of lung carcinogenesis by nonylphenol and genistein in a F344 rat multiorgan carcinogenesis model *Cancer Lett*, 192, 25-36, 2003

Karim, R, Wanibuchi, H, Wei, M, Morimura, K, Salim, E I and Fukushima, S Enhancing risk of ethanol on MeIQx-induced rat hepatocarcinogenesis is accompanied with increased levels of cellular proliferation and oxidative stress *Cancer Lett*, 192, 37-47, 2003

Mitsuhashi, M, Wanibuchi, H, Wei, M, Doi, K, Morimura, K, Masuda, C, Wada, S, Nakatani, T, Kakizoe, T and Fukushima, S No inhibition of urinary bladder carcinogenesis in rats with intravesical instillation of α -galactocylceramide *Asian Pacific J Cancer Prev*, 4, 45-50, 2003

Romanenko, A, Morimura, K, Wanibuchi, H, Wei, M, Zaporin, W, Vinnichenko, W, Kinoshita, A, Vozianov, A and Fukushima, S Urinary bladder lesions induced by persistent chronic low-dose ionizing radiation *Cancer Sci*, 94, 328-333, 2003

Ogawa, M, Wanibuchi, H, Nishikawa, M, Yano, Y, Otani, S, Totsuka, Y, Wakabayashi, K, Nakae, D and Fukushima, S Post-initiation inhibition of MeIQx hepatocarcinogenesis in rats by cysteine *Osaka City Med J*, 49, 21-30, 2003

Kinoshita, A, Wanibuchi, H, Morimura, K, Wei, M, Shen, J, Imaoka, S, Funae, Y and Fukushima, S Phenobarbital at low dose exerts hormesis in rat hepatocarcinogenesis by reducing oxidative DNA damage, altering cell proliferation, apoptosis and gene expression *Carcinogenesis*, 24, 1389-1399, 2003

Fukushima, S, Morimura, K and Wanibuchi, H Thresholds for carcinogenicity of environmental carcinogens *J Toxicol Sci*, 28, 241, 2003

Shen, J, Wanibuchi, H, Salim, E I, Wei, M, Kinoshita, A, Yoshida, K, Endo, G and Fukushima, S Liver tumorigenicity of trimethylarsine oxide in male Fischer 344 rats-association with oxidative DNA damage and enhanced cell proliferation *Carcinogenesis*, 24, 1827-1835, 2003

Shen, J, Wanibuchi, H, Salim, E I, Wei, M, Doi, K, Yoshida, K, Endo, G, Morimura, K and Fukushima, S Induction of glutathione *S*-transferase placental form positive foci in liver and epithelial hyperplasia in urinary bladder, but no tumor development in male Fischer 344 rats treated with monomethylarsonic acid for 104 weeks *Toxicology and Applied Pharmacology*, 193, 335-345, 2003

Mitsuhashi, M, Wanibuchi, H, Morimura, K, Doi, K, Wei, M, Wada, S, Nakatani, T and Fukushima, S Significance of overexpression of metallothionein in mouse urinary bladder focal lesions induced by treatment with *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine *Cancer Sci*, 94, 1052-1058, 2003

Wei, M, Morimura, K, Wanibuchi, H, Shen, J, Doi, K, Mitsuhashi, M, Moku, M, Salim, E I and Fukushima, S Chemopreventive effect of JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis *Cancer Lett*, 202, 11-16, 2003

2 学会発表

鰐淵英機、カリム レザウル、カン シン ソク、李 昌治、森村圭一朗、福島昭治 MeIQx の低用量発がん性に及ぼすアルコール摂取の影響 第19回日本毒性病理学会, 1月23-24日, 東京, 2003 (第19回日本毒性病理学会講演要旨集 0-1, p 37)

Wanibuchi, H, Karim, R, Puatanachokchai, R, Kang,

J S, Morimura, K and Fukushima, S Enhancing risk by ethanol in low-dose MeIQx-induced rat hepatocarcinogenesis 94th Annual Meeting, American Association for Cancer Research July 11-14, Washington, D C, U S A, 2003 (AACR proceedings, vol 44, March 2003, 2426, p 475)

鰐渕英機 発がん物質の低用量発がんリスクの評価 第 92 回日本病理学会, 4 月 23-25 日, 福岡, 2003 (日本病理学会誌第 92 巻第 1 号 WS12-3, p 165)

鰐渕英機、森村圭一朗、沈 鈞、カン ソク、木下アンナ、内藤沙紀、福島昭治 ケニステインのラット肺発癌促進作用 日本食品化学学会第 9 回総会 学術大会, 6 月 13-14, 東京, 2003 (日本食品化学学会第 9 回総会 学術大会 講演要旨集, 一般講演 10, p 38)

鰐渕英機、サリムエリサイド、森村圭一朗、李 昌治、カンソク、福島昭治 ヒルハルツ住血吸虫由来膀胱癌における酸化ストレスと DNA 傷害および修復遺伝子の変化 第 62 回日本癌学会総会, 9 月 25-27 日, 名古屋, 2003 (日本癌学会総会記事 3662-PP, p 532)

鰐渕英機、木下アンナ、福島昭治 OGG1 ノックアウトマウスにおける DMA の発がん性 シンポジウム講演, 第 11 回ヒ素シンポジウム, 10 月 14 日-15 日, 札幌, 2003 (第 11 回ヒ素シンポジウム講演要旨集 2A-16, p 79-80)

鰐渕英機 環境発癌物質のホルミシス現象 第 3 回分子予防環境医学研究会, 12 月 19-20, 東京, 2003

Wanibuchi, H, Morimura, K and Fukushima, S Risk assessment of low dose carcinogenesis by genotoxic carcinogens JSTP/IFSTP(IATP), February 15-18, Kobe, 2003 (JSTP/IFSTP(IATP) program & abstracts, symposium1-1, p 25)

H 知的所有権の所得状況

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
分担研究報告書

キダチアロエ抽出物の発がん性等に関する研究
分担研究者 今井田 克己 香川大学医学部教授

研究要旨 天然添加物であるキダチアロエのがん原性試験、1年間反復投与毒性試験を開始した。キダチアロエはAMESテスト陽性、Chromosome法陽性、小核試験陰性と報告されており、90日間反復投与毒性試験を終了している。その結果をもとに、今回の研究ではがん原性試験は4%、0.8%、0%を、1年間反復投与毒性試験では4%、0.8%、0.16%、0%の用量設定とし、Wistar-Hanoverの雌雄ラット計380匹を用いた研究を開始した。

A 研究目的

天然添加物は平成7年の食品衛生法の改正に伴い、従来使用されていたものもその経過措置として使用が認められているものであるが、それ自体長期間食用として、使用されてきたものではあるが、科学的な毒性データが欠けているなど安全性が必ずしも確認されているわけではない。そこで、今年度から、天然添加物のなかで変異原性が疑陽性以上であり、90日間反復投与毒性試験が施行された品目の中から、添加物としての安全性を確認するために、キダチアロエを選び、その長期発がん性試験および1年間慢性毒性試験を行い、キダチアロエの慢性毒性及び発がん性に関する安全性を評価し、キダチアロエをはじめとする添加物に対する国民の安全・安心を与えるような基礎的なデータを得ることを本研究の目的とする。

B 研究方法

<動物並びに飼育条件>

5週齢のWistar-Hanover雌雄各190匹づつを日本クレアから入手し、約1週間の馴化飼育後、雌雄150匹づつ、合計300匹を長期発がん性試験に、雌雄40匹づつ合計80匹を1年間慢性毒性試験に用いる。動物の飼育は香川大学動物実験施設のバリアシステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60\pm 10\%$ 、12時間蛍光灯照明、12時間消灯の条件下で行う。動物は全網ケージに5匹づつ飼育し、飲料水として、水道水を自由摂取させる。

<被験物質並びに投与量>

キダチアロエは日本粉末薬品株式会社（大阪市）から、提供されたものを用いた。その正式名称は食品原料用キダチアロエエキスパウダー、Lot#031031BGで、性状として淡黄色の粉末で、特異なおいがあり、味はきわめて苦い。また、日本粉末薬品株式会社、伊賀工場 品質管理課の試

験成績書によれば、重金属20ppm以下、ヒ素2ppm以下、灰分28.3%、定量分析でバルバロイン類（バルバロイン+イソバルバロイン）0.83%、アロエニン1.91%とのことである。このキダチアロエ原体をオリエンタルMF基礎飼料に規定量混ぜたものを検体として使用した。90日間反復投与毒性試験のデータに基づき、最高用量を4%として、以下公比5として、発がん性試験には4%、0.8%、0%を、1年間慢性毒性試験には、4%、0.8%、0.16%、0%の用量に設定した。それぞれの濃度のオリエンタルMF固形飼料を自由に摂取させ、対照群にはオリエンタルMF飼料を摂取させる。被験物質の飼料への添加および固形化をオリエンタル酵母工業株式会社に依頼し、試験に供する。

<観察並びに検索方法>

食品添加物のがん原性試験法ガイドラインならびに1年間反復投与毒性試験法ガイドラインに準じて行う。すなわち、6週齢の雌雄Wistar-Hanoverラットを用いて、被験物質を原則として1年間または2年間連続して混餌投与する。用量設定としては前述のとおりがん原性試験はキダチアロエ4%、0.8%、0%、1年間慢性毒性試験は4%、0.8%、0.16%、0%とする。動物の一般状態は毎日観察し、摂餌量および飲水量を原則として、週1回測定する。体重は試験開始13週間までは原則として、週1回、その後は月1回測定する。1年間反復投与毒性試験では、投与期間終了後、全生存動物を剖検し、血液学的、血液生化学的及び病理組織学的に検査する。血液学的検査として、赤血球数、白血球数、血小板数、血色素量、ヘマトクリット値等を測定する。血液生化学的検査として、総蛋白、アルブミン、A/G比、コレステロール、中性脂肪、ヒルルピン、尿素窒素、クレアチニン、AST、ALT、 γ -GTP、アルカリホスファターゼ、電解質等を測定する。途中死亡例についても、剖検により十分な肉眼的観察を行い、病理組織学的

検索により可能な限り死因を特定する。がん原性試験でも一般的な観察や死亡例の剖検所見から血清学的異常や血液学的異常か予想される場合は血清や血液塗抹標本を保存する。剖検時、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、脳、胸腺、肺などの臓器重量を秤量する。採取した精巣を除く諸臓器は 10%緩衝ホルマリンに固定し、定法に従って作製したヘマトキシリン・エオジン染色組織標本を病理組織学的に検討する。精巣についてはブアン固定を用いて検索する。1 年間反復投与毒性試験では、各毒性指標の用量相関性について統計学的手法を用いて解析し、無毒性量及び無影響量を推定する。がん原性試験では病理組織学的検索に基づいて、統計学的にがん原性の有無を判定する。

C 研究結果

キダチアロエの投与用量をがん原性試験では 4%, 0.8%, 0% に、また、1 年間反復投与毒性試験では 4%, 0.8%, 0.16%, 0% に決定した。また、各用量の混餌飼料を作製し、その安定性ならびに均一性の検査を行っている。

D 考察

今回、Wistar-Hanover ラットを用いた天然添加物であるキダチアロエのがん原性試験、及び、1 年間慢性毒性試験を開始した。研究は開始したところであるが、得られる結果は天然添加物の毒性、安全性に関する基礎的なデータが得られるものと期待される。また今回用いる Wistar-Hanover ラットの長期試験（1 年または 2 年間）での自然発生腫瘍の頻度等、基礎的なデータが得られるものと期待される。

E 結論

天然添加物であるキダチアロエのがん原性試験、1 年間反復毒性投与試験を Wistar-Hanover の雌雄ラットを用いて開始する。投与濃度は 90 日間反復投与毒性試験の結果をもとに、がん原性試験では、4%, 0.8%, 0%、1 年間反復投与毒性試験では 4%, 0.18%, 0.16%, 0% とした。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

K Imaida, S Tamano, A Hagiwara, S Fukushima, T Shirai, and N Ito Application of rat medium-term

bioassays for detecting carcinogenic and modifying potentials of endocrine active substances *Pure Appl Chem* 75 2491-2495, 2003

H Takeuchi, K Saoo, M Yokohira, M Ikeda, H Maeta, M Miyazaki, H Yamazaki, T Kamataki, and K Imaida Pretreatment with 8-methoxypsoralen, a potent human CYP2A6 inhibitor, strongly inhibits lung tumorigenesis induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in female A/J mice *Cancer Res*, 63 7581-7583, 2003

H Tsuda, S Fukushima, H Wanibuchi, K Morimura, D Nakae, K Imaida, M Tatematsu, M Hirose, K Wakabayashi, M A Moore Value of GST-P positive preneoplastic hepatic foci in dose-response studies of hepatocarcinogenesis Evidence for practical thresholds with both genotoxic and nongenotoxic carcinogens A review of recent work *Toxicol Pathol*, 31 80-86, 2003

S Fukushima, H Wanibuchi, K Morimura, M Wei, D Nakae, Y Konishi, H Tsuda, N Takasuka, K Imaida, T Shirai, M Tatematsu, T Tsukamoto, M Hirose, F Furukawa Lack of initiation activity in rat liver of low doses of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline *Cancer Lett*, 191 35-40, 2003

J Q Li, A Kubo, F Wu, H Usuki, J Fujita, S Bandoh, T Masaki, K Saoo, H Takeuchi, S Kobayashi, K Imaida, H Maeta, T Ishida, S Kuriyama Cyclin B1, unlike cyclin G1, increases significantly during colorectal carcinogenesis and during later metastasis to lymph nodes *Int J Oncol*, 22 1101-1110, 2003

I Narama, K Imaida, H Iwata, D Nakae, A Nishikawa, T Harada A review of nomenclature and diagnostic criteria for proliferative lesions in the liver of rats by a working group of the Japanese Society of Toxicologic Pathology *J Toxicol Pathol*, 16 1-17, 2003

S Fukushima, H Wanibuchi, K Morimura, S Iwai, D Nakae, H Kishida, H Tsuda, N Uehara, K Imaida, T Shirai, M Tatematsu, T Tsukamoto, M Hirose, F Furukawa Existence of a threshold for induction of aberrant crypt foci in the rat colon with low doses of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine *Toxicol Sci*, in press, 2004

2 学会発表

竹下文隆、今井田克己、二口充、小川久美子、鈴木周五、白井智之 4-Nonylphenol 投与によるラット再生尿細管の増加 第 19 回日本毒性病理学会 (2003 1)

堤友子、萩原昭裕、今井則夫、土井悠子、難波江
恭子、朝元誠人、今井田克己、白井智之 遺伝子
組み替えトウモロコシのラットを用いた 13 週間反
復投与毒性試験 第 19 回日本毒性病理学会 (2003
1)

今井田克己、白井 智之 電磁波と発がん性 第 92
回日本病理学会総会、ワークショップ「発癌実験」
(2003 4 23)

今井田克己 電波と安全にお付き合いいたたくた
めに、電波の生体への影響評価 平成 15 年度 ARIB
講演会(2003 7 3)

今井田克己、竿尾光祐、竹内聖、山川けいこ、池
田美子、横平政直 SV40T-antigen 遺伝子導入ラッ
トの前立腺癌発生過程における arctin 投与による
影響 第 62 回日本癌学会総会 (2003 9)

白井智之、河部真弓、渡辺聡一、和気加奈子、今
井田克己、王野静光 携帯電話で使用されている
1.5GHz 高周波電磁波の長期近傍界曝露によるラッ
ト ENU 経胎盤脳腫瘍発生におよぼす影響 第 62
回日本癌学会総会 (2003 9)

竹内聖、竿尾光祐、山川けいこ、池田美子、宮崎
雅史、山崎浩史、鎌滝哲也、今井田克己 Methoxsalen
による NNK 誘発 A/J マウス肺発癌の抑制効果 第
62 回日本癌学会総会 (2003 9)

T Shirai, M Kawabe, K Ichihara, O Fujiwara, M Taki,
S Watanabe, K Wake, Y Yamanaka, K Imaida and S
Tamano Chronically exposure to the 1.5GHz
electromagnetic near-field used for cellular phones does
not promote ethylnitrosourea-induced central
nervous system tumors in F344 rats
6th International Congress of the European
Bioelectromagnetics Association (EBEA)
Budapest, Hungary (2003 11 13-15)

K Imaida, T Shirai, N It In vivo models for
assessment of carcinogenicity and chemopreventive
potential of food compounds Bangkok, Thailand
(2003 11 15-16)

M Ikeda, K Saoo, K Yamakawa, H Takeuchi, M
Yokohira, Y Hosotani, Y Zeng, K Hosokawa, S
Kinouchi, K Imaida Introduction of multiple
granulation in the liver with severe hepatocyte damage
by montan wax, a food additive, in a 90-day toxicity
study in F344 rats JSTP/IFSTP(IATP) (2004 2 15-18)

M Yokohira, H Takeuchi, K Yamakawa, K Saoo, M
Ikeda, Y Hosotani, Y Zeng, K Hosokawa, K Imaida,
M Shiraishi Sequential change in acute lung damage
due to intratracheal instillation of Quartz in F344 male
rats establishment of a biological bioassay for detection
of lung toxicity by fine particles JSTP/IFSTP(IATP)
(2004 2 15-18)

H Takeuchi, K Saoo, M Yokohira, M Miyazaki, H
Yamazaki, T Kamataki, K Imaida Inhibitory effect of
methoxsalen, a potent human CYP2A6 inhibitor, on
NNK-induced A/J female mice lung tumorigenesis
American Association for Cancer Research 95th Annual
Meeting(2004 3 27-31)

H 知的所有権の取得状況

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(食品安全確保事業)
分担研究報告書

カテキンの発がん性等に関する研究
分担研究者 中江 大 佐々木研究所部長

研究要旨 カテキンは、ツバキ科チャの茎および葉、マメ科ペグアセンヤクの幹枝、アカネ科ガンビールの幹枝および葉などに含まれ、食品添加物として使用されている天然化学物質であり、これまでに抗酸化作用や発がん抑制作用をはじめとする種々の作用を示すものと報告されている。

一方、カテキンに対する安全性評価としては、変異原性試験および混餌投与によるラット 90 日間反復投与毒性試験が実施されている。変異原性試験においては一部で陽性あるいは弱陽性結果が得られており、反復投与毒性試験においては 1 25%以上の用量群の雌雄で投与による影響が認められている。これらの安全性評価の結果を踏まえ、さらにカテキンが長期にわたりヒトに摂取されている現実を考慮すると、カテキンの安全性については、さらに長期間の投与による評価を行う必要がある。

本研究は、カテキンの安全性評価の一環として、ラットのほぼ一生涯にあたる 24 ヶ月間に亘って投与した際に発現する慢性毒性および発がん性について検索することを目的として、混餌投与による慢性毒性/発がん性併合試験を実施するものである。なお、投与用量は、90 日間反復毒性試験結果に基いた 3・1 0・0 3%に加え、ヒト摂取相当量である 0 02%を設定した。本研究は、本年度中に被検物質に関する供給の担保と事前準備を終え、平成 16 年 4 月より動物を用いた本試験を実施する。

A. 研究目的

カテキンは、ツバキ科チャの茎および葉、マメ科ペグアセンヤクの幹枝、アカネ科ガンビールの幹枝および葉などに含まれている化合物の総称である。これに含まれるいわゆるカテキン類としては、カテキン ガロカテキン エピカテキン・エピガロカテキン・エピカテキンガレート・エピガロカテキンガレートなどが挙げられる。カテキンは、これまでに抗酸化作用・発がん抑制作用をはじめとする種々の作用を示すものと報告され、それらに基いて、水産加工品・食肉加工品・菓子類・油脂・清涼飲料水等に食品添加物(酸化防止剤)として使用されている。

一方、カテキンに対する安全性評価としては、変異原性試験および混餌投与によるラット 90 日間反復投与毒性試験が実施されている。変異原性試験においては、Ames 試験にて陽性、ハムスター培養細胞を用いた染色体異常試験にて弱陽性、マウス小核試験にて陰性の結果が得られている。反復投与毒性試験においては、1 25%以上の用量群の雌雄で、投与による影響が認められている。これらの安全性評価の結果を踏まえ、さらにカテキンが長期にわたりヒトに摂取されている現実を考慮すると、カテキンの安全性については、さらに長期間の投与による評価を行う必要がある。

本研究は、カテキンの安全性評価の一環として、ラットのほぼ一生涯にあたる 24 ヶ月間に亘って投与した際に発現する慢性毒性および発がん性について検索することを目的として、混餌

投与による慢性毒性/発がん性併合試験を実施するものである。

B 試験方法

<被験物質>

緑茶カテキン(サンフェノン 100S)は、太陽化学株式会社より供与された。

<動物および飼育条件>

動物は、BrlHan WIST@Jc1(GALAS)ラット(日本クレア株式会社)雌雄各 300 匹を用い、5 週齢にて入荷後に約 1 週間の検疫・馴化期間を置き、6 週齢にて試験に供する。動物数は、12 ヶ月間慢性毒性試験について 1 群当たり雌雄各 10 匹、24 ヶ月間発がん性試験について 1 群当たり雌雄各 50 匹を用いる。各群への動物の割り付けは、適切な無作為抽出法を用いて行う。動物は、バリエーションシステム内の温度 湿度を制御した動物室内で飼育する。室内の環境は、温度 25 ± 5℃ 湿度 50 ± 10% 換気回数 12 回/時 12 時間/日照明の条件下とする。雄動物は最大 3 匹ずつを、雌は最大 4 匹ずつを、それぞれ、ソフトチップを敷いたポリカーボネイト製のプラスチックケージに収容し、ケージおよびチップを週 1 回交換する。飲料水は水道水を自由摂取させる。

<投与用量の設定>

カテキンの投与用量は、本試験に先立って実施されたラットを用いた混餌投与による 90 日間反復毒性試験の結果に基いて設定した。

[90日間反復毒性試験の要約]

90日間反復投与毒性試験は、雌雄の Fisher 344系ラットに、緑茶カテキン(サンフェノン100S、太陽化学株式会社より供与)を5・125・0.3%の用量で混餌投与した。その結果、最高用量である5%を投与した群の雄には、体重増加抑制が観察された。血液生化学的検索では、総コレステロールの減少が雄の全投与群で用量依存性に、中性脂肪の減少が雄の125%以上群と雌の5%群で観察された。この総コレステロールの減少は、緑茶カテキンによるコレステロール吸収阻害作用によるものと考えられた。投与によるその他の変化としては、雌雄の5%群でALT・AST・ALPの有意な増加と相対肝重量の増加が認められたが、病理組織学的検索による肝の形態学的変化を観察しなかった。また、雌雄の5%群では相対腎重量の有意な増加、雌の125%以上群では相対甲状腺重量の有意な増加、雌の5%群では相対甲状腺重量の有意な低下を認めたが、いずれの臓器においても投与に関連した病理組織学的変化を観察しなかった。これらの結果より、90日間反復投与毒性試験における無毒性量は、雌雄とも0.3%と判定した。

[投与用量の設定]

上記の90日間反復毒性試験の結果に基づき、本研究における慢性毒性/発がん性併合試験の投与用量は、3・10・0.3%に設定した。

なお、本試験においては、カテキンが食品添加物として多くの食品に使用されている現実を踏まえ、ヒト摂取相当量での検索も必要であると考え、カテキンの1日当たりヒト摂取量に相当する0.02%を最低用量に設定した。

<被験物質の調製および投与>

本試験においては、指定濃度のカテキンを含むいったん破碎した基礎飼料(CRF-1、オリエンタル酵母株式会社)にカテキンを指定の濃度で混じて再固形化した飼料を動物に投与する。対照群には、同様の方法で破碎・再固形化した基礎飼料を与える。飼料は、動物に自由摂取させる。

なお、本年度の事前準備作業の一環として、カテキンは、飼料調製に伴う熱処理行程においても安定であるものと確認した。

<被験物質の安定性>

本年度の事前準備作業の一環として、調整した飼料中におけるカテキンの保存環境下での安定性は、本年度の事前準備作業の一環として、現在検索中である。

<観察および検査項目>

観察および検査は、以下の項目について実施する。

[一般状態、体重、摂餌量]

全動物は、一般状態を毎日観察し、投与開始の6ヶ月後まで週1回体重および摂餌量を測定し、その後について1ヶ月に1回測定する。1日あたりのカテキン摂取量(mg/kg/day)は、その結果より算出する。

[尿検査]

慢性毒性試験群については、解剖前に尿検査を実施する。検査項目は、潜血・ケトン体・グルコース・蛋白・ヒルルビン・ウロビリノーゲン・アスコルビン酸・pHである。

[血液学的および血清生化学的検査]

慢性毒性試験群については、解剖時に生存する全動物を対象として、血液学的および血清生化学的検査を実施する。動物は、採血前日の午後5時より絶食させ、解剖時に腹部大動脈あるいは腹部大静脈より採血する。血液学的検査は、抗凝固剤を入れた血液を用い、赤血球数(RBC)・白血球数(WBC)・血小板数(PLT)・血色素量(HB)・ヘマトクリット(HT)・白血球百分比を検索する。血清生化学的検査は、血清を用い、血清総蛋白(TP)・アルブミン(ALB)・A/G比・総コレステロール(TCHO)・トリグリセライド(TG)・ビリルビン(BIL)・クレアチニン(CRE)・アスパルテート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)・ガンマ-グルタミルトランスフェラーゼ(GGT)・アルカリホスファターゼ(ALP)・ナトリウム(Na)・カリウム(K)・カルシウム(Ca)・無機リン(IP)を測定する。

[病理組織学的検査]

慢性毒性試験群については12ヶ月の投与終了後に、発がん性試験群については24ヶ月の投与終了後に、それぞれ全生存例を安楽死させて詳細な剖検を行う。

剖検においては、以下に示す器官・臓器を採取し、下線を付したものについて重量を測定した後、全てを10%中性緩衝ホルマリン液により固定する。ただし、精巣および眼球については、必要に応じて適切な固定液を用いることがある。採取する器官・臓器は、リンパ節(頸部・腸間膜)・胸腔内大動脈・顎下腺・耳下腺・胸骨・大腿骨(骨髄を含む)・胸腺・気管・肺・心・甲状腺および上皮小体(固定後)・舌・食道・前胃・腺胃・十二指腸・小腸(空腸・回腸)・大腸(盲腸・結腸直腸)・肝・膵・脾・腎・副腎・膀胱・精囊・前立腺・精巣・精巣上体・卵巣および卵管・子宮・膈・脳・下垂体・坐骨神経・大腿筋・脊髄(頸部および腰部)・眼球およびハーダー腺・大腿骨

胸骨・頭蓋骨および鼻腔・その他の肉眼的異常部位である。

死亡例および瀕死による切迫屠殺例については、上記と同様に解剖し死因を究明するが、重量の測定は実施しない。切迫例については、可能な限り末梢血の塗抹標本作製する。

病理組織学的検索は、対照群および高用量群の全動物について、以下に示す器官 組織の固定標本から切り出しを行い、通常の方法でパラフィン包埋して薄切し、ヘマトキリン/エオシン染色を施して鏡検する。該当する器官 臓器は、リンパ節(頸部・腸間膜)・胸腔内大動脈・顎下腺 耳下腺 胸骨・大腿骨(骨髄を含む)・鼻腔 胸腺・気管 肺 心 甲状腺および上皮小体 舌 食道・前胃 腺胃 十二指腸・小腸(空腸 回腸) 大腸(盲腸・結腸・直腸) 肝・脾 腎 副腎・膀胱・精囊・前立腺 精巣 精巣上体 卵巣および卵管 子宮・膈・脳・下垂体・坐骨神経・大腿筋・脊髄(頸部および腰部)・眼球およびハーダー腺 その他の肉眼的異常部位である。その他の用量群の全動物については、胸腺 肺・肝・脾 腎・副腎・精巣 卵巣とその他の肉眼的異常部位および高用量群において投与に関連した異常が観察された器官・組織について、上述と同様の方法で病理組織学的検査を行なう。

<統計学的解析>

体重・摂餌量・臓器重量 血液学および血清生化学的検査結果については、ANOVA による解析を行い、群間に有意差が観察された場合に、Dunnett の方法で対照群と各被験物質投与群の間で検定を行なう。尿検査と病理組織学的検査結果については、Fischer の直接確率検定法を用いて統計学的解析を実施する。なお、腫瘍および前がん病変については、必要に応じて別途検定方法を選択して行う。

C 試験結果

本年度は、被検物質に関する供給の担保と事前準備を終え、動物およびその他の必要物資を確保した。動物を用いた本試験は、平成 16 年 4 月より実施する。

D 考察

本年度は、特に考察を要する事項がない。

E 結論

本研究は、カテキンの安全性評価の一環として、ラットのほぼ一生涯にあたる 24 ヶ月間に亘って投与した際に発現する慢性毒性および発がん性

について検索することを目的として、混餌投与による慢性毒性/発がん性併合試験を実施するものである。本年度は、90 日間反復毒性試験結果およびヒト摂取相当量に基いて、投与用量を 3・100302%に設定し、試料調整等にかかわるカテキンの安定性の確認を含む各種の事前準備を終えた。動物を用いた本試験は、平成 16 年 4 月より実施する。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

Nakae D, Kishida H, Enami T, Konishi Y, Hensley KL, Floyd RA and Kotake Y, Effects of *N-tert-butyl* nitron and its derivatives on the early phase of hepatocarcinogenesis in rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet *Cancer Sci*, 2003, 94 26-31

Tsuda H, Fukushima S, Wanibuchi H, Morimura K, Nakae D, Imaida K, Tatematsu M, Hirose M, Wakabayashi K and Moore MA, values of GST-P positive preneoplastic hepatic foci in dose-response studies of hepatocarcinogenesis Evidence for practical thresholds with both genotoxic and nongenotoxic carcinogens A review of recent work *Toxicol Pathol*, 2003, 31 80-86

Fukushima S, Wanibuchi H, Morimura K, Wei M, Nakae D, Konishi Y, Tsuda H, Takasuka N, Imaida K, Shirai T, Tatematsu M, Tsukamoto T, Hirose M and Furukawa F, Lack of initiation activity in rat liver of low doses of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[2,5-f]quinoxaline *Cancer Lett*, 2003, 191 35-40

Narama I, Imaida K, Iwata H, Nakae D, Nihikawa A and Harada T, A review of nomenclature and diagnostic criteria for proliferative lesions in the liver of rats by a working group of the Japanese Society of Toxicologic Pathology, *J Toxicol Pathol*, 2003, 16, 1-18

Yoshida M, Shimomoto T, Katashima S, Shirai T, Nakae D, Watanabe G, Taya K and Maekawa A, Effects of maternal exposure to nonylphenol on growth and development of the female reproductive system and uterine carcinogenesis in rats *J Toxicol Pathol*, 2003, 16 259-266

Shimomoto T, Yoshida M, Takahashi M, Uematsu F, Maekawa A and Nakae D, A case report of a choroids plexus carcinoma spontaneously occurring in the right lateral ventricle of a 14-week-old, female Donryu rat *Toxicol Pathol*, 2004, 32,264-268

Yoshida M, Katsuda S, Nakae D and Maekawa A, Lack of toxicity or carcinogenicity of S-170, a sucrose fatty acid ester, in F344 rats Food Chem Toxicol, 2004, 42 667-676

2 学会発表

Nakae D Immunohistochemical detection of the altered expression of proteins involved in rat carcinogenesis and their digital image analysis by automated cellular scanning system (Ariol SL-50) Joint International Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology and the International Federation of Societies of Toxicologic Pathologists Co-sponsored by the International Academy of Toxicologic Pathology (Kobe, 2004)

Nakae D, takahashi M, Masumura K, Umemura T, Uematsu F, Yoshida M, Igarashi M, Watanabe N, Maekawa A, Nishikawa A, Hirsose M and Nohmi T Profile of somatic mutation induced *in vivo* in *gpt* delta transgenic rat fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet International Joint Meeting on Food Factors and Free Radicals in Health and Disease (Kyoto, 2003)

中江 大, 吉田 緑, 傳田 阿由美, 辻内 俊文, 堤 雅弘, 小西 陽一, 前川 昭彦 発がん機序における内的要因としての reactive oxygen and nitrogen oxide species-induced stress の意義 第 92 回日本病理学会総会 (福岡, 2003)

中江 大, 高橋 正一, 吉田 緑, 植松 史行, 前川 昭彦 高リスク群における発がんリスク

第 30 回日本トキシンコロシー学会学術年会 (相模原, 2003)

Takahashi M, Shimomoto T, Uematsu F, Yoshida M, Maekawa A and Nakae D Effect of Estrogen and its steroid metabolites on uterine carcinogenesis in mice initiated with *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine 94th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (Washington DC, 2003)

Yoshida M, Katsshuma S, Uematsu F, Takahashi M, Maekawa A and Nakae D development of an animal model for evaluation of chemopreventive efficacies against lung adenocarcinomas using *N*-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine-induced rat lung carcinogenesis protocol 22nd Annual Meeting of the Society of Toxicologic Pathology (Savannah, 2003)

Uematsu F, Takahashi M, Yoshida M, Maekawa A, Rusyn I and Nakae D Comprehensive expression analysis of hepatocellular carcinomas induced in rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet 95th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (Orlando, 2004)

H 知的所有権の取得状況

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし