

20031190

厚生労働科学研究研究費補助金

食品安全確保研究事業

反復投与毒性や発がん性試験等の実施による既存添加物の

安全性評価に関する研究

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 西川秋佳

平成 16 (2004) 年 4 月

目次

I	総括研究報告書	
	反復投与毒性や発がん性試験等の実施による既存添加物の 安全性評価に関する研究	1
	西川秋佳	
II	分担研究報告書	
1	トコトリエノールの安全性評価に関する研究	8
	西川秋佳	
2	フェルラ酸の安全性評価に関する研究	16
	田中卓二	
III	研究成果の刊行に関する一覧表	28
IV	研究成果の刊行物・別刷	34

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
反復投与毒性や発がん性試験等の実施による既存添加物の安全性評価に関する研究

平成 15 年度総括研究報告書

主任研究者 西川秋佳 国立医薬品食品衛生研究所病理部室長

研究要旨 既存添加物は、安全性の面からみれば収載品の多くはそれ自体もしくはその基源が長年食用に供されていたなどの経験はあるものの、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も少なくない。本研究では、安全性を評価するために必要な資料がないことから、基本的な安全性を確認するために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な既存添加物のうち、流通実態の確認かてき規格の明らかなものを対象として、ヒトでの長期摂取による影響を視野においた基本的安全性の評価を目的に、複数の分担研究者と協力し、複数の検体に係る反復投与毒性試験等を実施し、データを横断的に比較考察した。平成 14 年度には苦味料（ヒメマツタケ抽出物）、カムヘース・光沢剤（コーパル樹脂、ホホハロウ、マスチノク、モンタンロウ）、増粘安定剤（アウレオハシウム培養液）、着色料（アルカネフト色素）、製造用剤（メハロン酸）を対象として、ラットを用いる 90 日間反復投与毒性試験を実施し、無毒性量としてヒメマツタケ抽出物は 5%、コーパル樹脂は 1.25%、ホホハロウは 1.25%、アウレオハシウム培養液は 5%、マスチノクは 0.22%未満、アルカネフト色素は 5%、モンタンロウは 0.56%未満及びメハロン酸は 0.2%と推定した。平成 15 年度からは分担研究者を絞り、Ames 試験、染色体異常試験および小核試験のうち 2 試験以上で変異原性が疑陽性以上である 2 品目（トコトリエノールとフェルラ酸）を対象として、1 年間慢性毒性/2 年間発がん性併合試験を開始した。トコトリエノールの試験は、現在試験開始後 31 週を経過しているか、4 匹の死亡が確認された他には、特記すべき一般状態の変化を認めていない。フェルラ酸の試験は、現在試験開始後 29 週を経過しているか、両試験において雌雄とも全群で死亡例は認められていない。

分担研究者

田中卓二 金沢医科大学・腫瘍病理学・教授

A 研究目的

近年、天然性添加物の開発および利用が盛んとなり、一般食品あるいは健康食品に広範に利用されている。これは、消費者の自然天然指向によるところが大きい。しかし、このような天然性添加物の多くは、安全性試験による健康影響の評価がなされていないのか現状であり、広く消費者等からその安全性の評価が求められている。

穀類やパーム油などに豊富に含まれているトコトリエノールは、ビタミンEと化学構造上の類似性を有し、トコフェロールと同様の抗酸化作用を有することから、酸化防止の

目的で食品添加物として使用されている。トコトリエノールの 13 週間反復投与毒性試験では、無毒性量(NOEL)は 0.19% (雄で 120 mg/kg 体重、雌で 130 mg/kg 体重) と推定され、雄の 0.19%投与群で平均赤血球容積の減少、A/G 比の上昇、血清アルカリフォスファターゼの上昇および相対副腎重量の増加がみられたことから、無影響量(NOEL)は未められていない。

イネ科植物の細胞壁に豊富に含有されているフェルラ酸

(4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid)は、その抗酸化活性から、酸化防止剤として食品に利用されている。一方、フェルラ酸の生体影響に関しては、抗変異原作用、腫瘍発生抑制効果、放射線障害防護効果、染色体異常誘発、生殖機能阻害などが知られている。フェルラ

酸のF344ラットを用いた急性毒性に関する報告では、LD₅₀は雄で2445 mg/kg体重、雌で2113 mg/kg体重とされている。F344ラットを用いたフェルラ酸混餌投与(0%、0.32%、0.8%、2%、5%)による13週間反復投与試験(亜慢性毒性試験)では、雌雄ともに最高濃度5%投与群で無処置対照群に比べて、平均体重、摂餌量の有意な低下をみている。また、フェルラ酸混餌投与による臓器重量の変化、生化学的検査結果の変化や組織学的な変化はみられたものの用量相関を認めていない。

このようにトコトリエノールおよびフェルラ酸の亜慢性毒性試験結果の報告はあるか、慢性毒性試験ないし発がん性試験の報告はみられない。そこで、フェルラ酸の1年間反復投与試験およびかん原性試験(2年間)を実施することとした。

B 研究方法

<トコトリエノールの慢性毒性試験/発がん性併合試験>

パーム油より得られたヒタミンE混合物を蒸留により精製したトコトリエノールをエーサイ株式会社(東京)より供与を受けた。トコフェロールを完全に分離することはできないので、組成はα-トコトリエノール21.4%、β-トコトリエノール3.5%、γ-トコトリエノール36.5%、δ-トコトリエノール8.6%、α-トコフェロール20.5%、β-トコフェロール0.7%、γ-トコフェロール1.0%、δ-トコフェロール0.5%であった。粉末基礎食CE-2(日本クレア株式会社、東京)に混和し、適正濃度となるように添加した。投与濃度は、トコトリエノールの13週間反復投与毒性試験の結果から、慢性毒性試験では最高用量を2%とし、0.4%、0.08%、および0%(対照群)の4段階とし、癌原性試験では2%、0.4%および0%(対照群)の3段階とした。トコトリエノール含有飼料は、給餌まで冷暗所(<4℃)に保存した。

雌雄のWistar Hannover ラットを日本クレア株式会社より5週齢で購入し、CE-2基礎飼料と水道水で1週間馴化飼育後に試験に用いた。動物の飼育はハリヤーシステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度

24±1℃、湿度55±5%換気回数18回/時(オールフレノシュ)、12時間蛍光灯照明、12時間消灯の条件下で行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケーンに3~4匹ずつ収納し、床敷は三協ラボサーヒス社(東京)のソフトチップを使い、週2回交換を行った。また、飲料水として水道水を馴化および試験期間中に自由に摂取させた。

慢性毒性試験では、雌雄のWistar Hannover ラット100匹(雌50匹、雄50匹)を使用して、トコトリエノールの1年間反復投与試験を開始した。実験群は、雌雄とも対照群(0%、雄10匹、雌10匹)、0.08%(雄10匹、雌10匹)、0.4%(雄10匹、雌10匹)、2%(雄20匹、雌20匹)の4群で構成した。試験期間は1年とし、試験期間中、体重測定、摂餌量測定、臨床的一般症状の観察を試験開始5週間までは毎週行い、それ以後は5週おきに測定している。試験期間終了時には、全生存動物を剖検する。動物は剖検前日より絶食させ、翌日エーテル麻酔下で腹部大動脈から採血後、屠殺・剖検する。死亡動物および瀕死動物についても剖検し、てきる限り死因を特定する。血液学的検査として、白血球数(WBC)、赤血球数(RBC)、ヘモクロビン量(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)及び血小板数(PLT)について測定し、さらに、白血球の型別分類を行う。血清生化学的検査として、総蛋白(TP)、A/G比、アルブミン(ALB)、ビリルビン(BIL)、総コレステロール(TC)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRN)、カルシウム(Ca)、無機リン(P)、ナトリウム(Na)、カリウム(K)、塩素(Cl)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST)、アラニントランスアミナーゼ(ALT)、アルカリフォスファターゼ(ALP)及びγ-グルタミルトランスペプチダーゼ(γ-GT)について測定する。

かん原性試験では、雌雄のWistar Hannover ラット300匹(雌150匹、雄150匹)を使用したトコトリエノールの2年間の癌原性試験を開始した。実験群は、雌雄とも対照群(0%、雄50匹、雌50匹)、0.4%(雄50匹、雌50匹)、2%(雄50匹、雌50匹)

の3群で構成した。試験期間は2年間とし、試験期間中、体重測定、摂餌量測定、臨床的一般症状の観察を試験開始5週間までは毎週行い、それ以後は5週おきに測定している。試験期間終了時には、全生存動物を剖検する。動物は剖検前日より絶食させ、翌日エーテル麻酔下で腹部大動脈から採血後、屠殺 剖検する。死亡動物および顔死動物についても剖検し、できる限り死因を特定する。

両試験ともに、諸臓器は肉眼的に観察後摘出し、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、副腎、腎臓および精巣の重量を測定する。上記の臓器に加え、鼻腔を含む頭蓋、下垂体、眼球、ハーター腺、脊髄、唾液腺、胸腺、胃、小腸、大腸、盲腸、膵臓、膀胱、皮膚、乳腺、リンパ節、胸骨、大腿骨、気管、食道、甲状腺、舌、大腿筋、三叉神経、坐骨神経、精巣上体、精嚢、前立腺、凝固腺、子宮、卵巣および膈を10%中性緩衝ホルマリン液にて固定する。臓器は常法に従い、パラフィン包埋後、薄切切片を作製し、ヘマトキシリン エオン染色を施し、慢性毒性試験では対照群と最高用量群について、かん原性試験では全ての群について病理組織学的検索を行う。

血液学的検査、血清生化学的検査及び臓器の相対重量については、原則として、各群の分散比をBartlettの方法で検定し、等分散の場合は、一元配置分散分析を行い、不等分散の場合はKruskal-Wallisの方法により検定を行う。群間に有意差が認められた場合の多重比較はDunnettの方法で対照群と各被験物質投与群との間で有意差検定を行う。その他の方法も適宜併せ実施する。

倫理面への配慮として、動物実験は国立医薬品食品衛生研究所の動物実験実施規定ガイドラインに沿って実施した。動物飼育については、空調や清潔な住環境の維持に努めている。

<フェルラ酸の慢性毒性試験/発がん性併合試験>

米糠原油より抽出、精製したフェルラ酸(trans型、LotNo F02977、純度99.9%)を築野食品工業株式会社(和歌山)より供与を受け、粉末基礎食CRF-1(オリエンタル酵母株式会社、東京)に予め混和した後(プレミックス)、適正濃度となるようにCRF 1

に添加し、固形飼料とした。投与濃度は、フェルラ酸の急性毒性試験、亜慢性毒性試験の結果から、最高用量を2%とし、1%、0.5%、および0%(対照群)の4段階とした。フェルラ酸含有飼料は、給餌まで冷暗所(<4℃)に保存している。

雌雄のF344/DuCrjラットを日本チャールス・リバー株式会社、横浜)より4週齢で購入し、1週間馴化飼育後に試験に用いた。馴化および試験期間中、ラットを自動給水装置付きヘルト式飼育棚のステンレス製懸垂式ケーンに4ないし3匹ずつ収容し、室温23±2℃、湿度50±10%、照明12時間 換気回数毎時10回のバリア飼育室にて飼育した。5週齢時に雌雄のラットを体重測定し、ランダム方式により各実験群に分け、飼料及び水道水(細菌ろ過器を経由)を自由に摂取させた。

慢性毒性試験では、雌雄のF344/DuCrjラット100匹(雌50匹、雄50匹)を使用して、フェルラ酸の1年間反復投与試験を開始した。実験群は、雌雄とも対照群(0%、雄10匹、雌10匹)、0.5%(雄10匹、雌10匹)、1%(雄10匹、雌10匹)、2%(雄20匹、雌20匹)の4群で構成した。試験期間は、1年とし試験期間中、体重測定、摂餌量の測定、臨床的一般症状の観察(3回/日)を毎日行っている。試験期間終了時には、全生存動物を剖検する。動物は剖検前日より絶食させ、翌日エーテル麻酔下で腹部大動脈から採血後、屠殺 剖検する。死亡動物および顔死動物についても剖検し、できる限り死因を特定する。1年間反復投与試験では、血液学的検査として、白血球数(WBC)、赤血球数(RBC)、ヘモクロヒン量(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)及び血小板数(PLT)について測定し、さらに、白血球の型別分類を行う。血清生化学的検査として、総蛋白(TP)、A/G比、アルブミン(ALB)、ヒルルヒン(BIL)、総コレステロール(TC)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRN)、カルシウム(Ca)、無機リン(P)、ナトリウム(Na)、カリウム(K)、塩素(Cl)、アスパラキシン酸トランスアミナーゼ(AST)、ア

ラニントランスアミナーゼ (ALT)、アルカリフォスファターゼ (ALP) 及びγ-グルタミルトランスペプチダーゼ (γ-GT) について測定する。

かん原性試験では、雌雄の F344/DuCrj ラット 416 匹 (雌 208 匹、雄 208 匹) を使用した 2 年間フェルラ酸かん原性試験を開始した。実験群は、雌雄とも対照群 (0%、雄 52 匹、雌 52 匹)、0.5% (雄 52 匹、雌 52 匹)、1% (雄 52 匹、雌 52 匹)、2% (雄 52 匹、雌 52 匹) の 4 群で構成した。試験期間は、2 年間とし試験期間中、体重測定、摂餌量の測定、臨床的一般症状の観察 (3 回/日) を毎日行っている。試験期間終了時には、全生存動物を剖検する。動物は剖検前日より絶食させ、翌日エーテル麻酔下で腹部大動脈から採血後、屠殺・剖検する。死亡動物および瀕死動物についても剖検し、できる限り死因を特定する。

両試験ともに、諸臓器は肉眼的に観察後摘出し、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、副腎、腎臓および精巣の重量を測定する。上記の臓器に加え、鼻腔を含む頭蓋、下垂体、眼球、ハーター腺、脊髄、唾液腺、胸腺、胃、小腸、大腸、盲腸、膵臓、膀胱、皮膚、乳腺、リンパ節、胸骨、大腿骨、気管、食道、甲状腺、舌、大腿筋、三叉神経、坐骨神経、精巣上体、精囊、前立腺、凝固腺、子宮、卵巣および膈を 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定する。臓器は常法に従い、パラフィン包埋後、薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオン染色を施し、病理組織学的検索を行う。

血液学的検査、血清生化学的検査及び臓器の相対重量については、原則として、各群の分散比を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は、一元配置分散分析を行い、不等分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行う。群間に有意差が認められた場合の多重比較は Dunnett の方法で対照群と各被験物質投与群との間で有意差検定を行う。その他の方法も適宜併せ実施する。

倫理面への配慮として、動物実験は本学動物実験実施規定のカイトラインに沿って実施した。動物飼育については、空調や清潔な住環境の維持に努めている。

C 研究結果

<トコトリエノールの慢性毒性試験/発がん性併合試験>

1 年間の慢性毒性試験は、現在試験開始後 31 週を経過し、雄の 2% 投与群において 1 匹の死亡が確認された。その他の群においては、特記すべき一般状態の異常は認められていない。平均体重は、雄の 2% 投与群で増加抑制を示し、投与 1 週目より有意な減少が認められた。雌もまた、2% 投与群で投与 5 週目より有意な減少が認められた。その他、特記すべき臨床徴候は認められていない。

2 年間かん原性試験は、現在試験開始後 31 週を経過し、雄の 2% 投与群において 3 匹の死亡が確認された。その他の群においては、特記すべき一般状態の異常は認められていない。平均体重は、雄雌ともに最高用量の 2% 投与群で増加抑制を示し、投与 2 週目より有意な減少が認められた。その他、特記すべき臨床徴候は認められていない。

<フェルラ酸の慢性毒性試験/発がん性併合試験>

1 年間の慢性毒性試験は、現在試験開始後 29 週を経過しているが、雌雄とも全群で死亡例を認めていない。投与開始後、3 週目からフェルラ酸投与群に脱毛が観察されたか、現在は回復している。対照群にはそのような症状は認めていない。その他、特記すべき臨床徴候を認めていない。雄の平均体重は、対照群に比へフェルラ酸投与群で高い傾向を示し、雌の平均体重は、対照群およびフェルラ酸投与群とも同様の体重増加率を示している。ラット 1 日当たりの平均摂餌量は、雌雄とも対照群に比へフェルラ酸投与群では低く、雄では対照群の約 3/4-4/5、雌では対照群の約 3/4-3/5 であるか、用量依存性を認めていない。

2 年間かん原性試験は、現在試験開始後 29 週を経過している。現在までに、雌雄とも全群で死亡例を認めていない。投与開始後、3 週目からフェルラ酸投与群ラットに脱毛を観察したか、現在は回復している。対照群にそのような徴候は、観察されていない。その他、特記すべき臨床徴候を認めていない。雌雄とも、平均体重は 2% フェルラ酸投与群は対照群とほぼ同様の体重増加を示している

か、0.5%フェルラ酸投与群、1%フェルラ酸投与群では対照群に比へ高い傾向を示している。ラット1日当たりの平均摂餌量は、雌雄とも対照群に比へフェルラ酸投与群では低く、雄では対照群の約4/5、雌では対照群の約3/5〜3/4であるか、用量依存性はみられない。

D 考察

<トコトリエノールの慢性毒性試験／発がん性併合試験>

現在、試験開始後31週であるか、両試験において雄の最高用量群(2%)で少数の死亡例が認められており、その後の経過次第では、用量の変更(減少)を視野に入れる必要がある。

<フェルラ酸の慢性毒性試験／発がん性併合試験>

現在、試験開始後29週であるか、両試験において雌雄とも全群で死亡例は認められておらず、順調に経過している。

F 健康危険情報 特になし。

G 研究発表

1 論文発表

- 1) Mori, Y, Koide, A, Kobayashi, Y, Furukawa, F, Hirose, M, Nishikawa, A Effects of cigarette smoke and a heterocyclic amine, MeIQx on cytochrome P-450, mutagenic activation of various carcinogens and glucuronidation in rat liver Mutagenesis, 18 87-93, 2003
- 2) Son, H-Y, Nishikawa, A, Okazaki, K, Kanki, K, Yamagishi, M, Imazawa, T, Umemura, T, Hirose, M Prolonged effects of β -estradiol 3-benzoate on thyroid tumorigenesis in gonadectomized rats pretreated with *N*-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine Cancer Lett, 190 21-29, 2003
- 3) Furukawa, F, Nishikawa, A, Lee, I-S, Kanki, K, Umemura, T, Okazaki, K, Kawamori, T, Wakabayashi, K, Hirose, M A COX-2 inhibitor, nimesulide, inhibits

post-initiation phase of *N*-nitrosobis(2-oxopropyl) amine- induced pancreatic carcinogenesis in hamsters Int J Cancer, 104 269-273, 2003

- 4) Umemura, T, Kodama, Y, Kanki, K, Iatropoulos, M, Nishikawa, A, Hirose, M, Williams, GM Pentachlorophenol (but not phenobarbital) promotes intrahepatic biliary cysts induced by diethylnitrosamine to cholangio cystic neoplasms in B6C3F1 mice possibly due to oxidative stress Toxicol Pathol, 31 10-13, 2003
- 5) Yamagishi, M, Natsume, M, Osakabe, N, Okazaki, K, Furukawa, F, Imazawa, T, Nishikawa, A, Hirose, M Chemoprevention of lung carcinogenesis by cacao liquor proanthocyanidins in a male rat multi-organ carcinogenesis model Cancer Lett, 191 49-57, 2003
- 6) Nishikawa, A, Morse, M A, Chung, F-L Inhibitory effects of 2-mercaptoethane sulfonate and 6-phenylhexyl isothiocyanate on urinary bladder tumorigenesis in rats induced by *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine Cancer Lett, 193 11-16, 2003
- 7) Narama, I, Imaida, K, Iwata, H, Nakae, D, Nishikawa, A, 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, 16 1-17, 2003
- 8) Son, H-Y, Nishikawa, A, Kanki, K, Okazaki, K, Kitamura, Y, Lee, K-Y, Umemura, T, Hirose, M Synergistic interaction between excess caffeine and deficient iodine on the promotion of thyroid carcinogenesis in rats pretreated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine Cancer Sci, 94 334-337, 2003
- 9) Umemura, T, Kai, S, Hasegawa, R, Kanki, K, Kitamura, Y, Nishikawa, A, Hirose, M Prevention of dual promoting effects of pentachlorophenol, an environmental pollutant, on diethylnitrosamine- induced hepato- and cholangiocarcinogenesis in mice by green tea infusion Carcinogenesis, 24 1105-1109, 2003
- 10) Kanki, K, Nishikawa, A, Furukawa, F, Kitamura, Y, Imazawa, T, Umemura, T, Hirose, M A 13-week subchronic toxicity

- study of paprika color in F344 rats Food Chem Toxicol , 41 1337-1343, 2003
- 11) Okazaki, K., Umemura, T, Imazawa, T, Nishikawa, A, Masegi, T, Hirose, M Enhancement of urinary bladder carcinogenesis by combined treatment with benzyl isothiocyanate and *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in rats after initiation Cancer Sci , 94 948-952, 2003
 - 12) Imazawa, T, Nishikawa, A, Toyoda, K, Furukawa, F, Mitsui, M, Hirose, M Sequential alteration of apoptosis, *p53* expression, and cell proliferation in the rat pancreas treated with 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide Toxicol Pathol , 31 625-631, 2003
 - 13) Masumura, K, Horiguchi, M, Nishikawa, A, Umemura, T, Kanki, K, Kanke, Y, Nohmi, T Low dose genotoxicity of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx) in *gpt* delta transgenic mice Mutat Res , 541 91-102, 2003
 - 14) Kitamura, Y, Yamagishi, M, Okazaki, K, Son, H-Y, Imazawa, T, Nishikawa, A, Iwata, T, Yamauchi, Y, Kasai, M, Tsutsumi, K, Hirose, M Lack of significant inhibitory effects of a plant lignan tracheloside on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)-induced mammary carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats Cancer Lett , 200 133-139, 2003
 - 15) Son, H-Y, Nishikawa, A, Okazaki, K, Lee, K, Imazawa, T, Hirose, M Lack of modifying effects of atrazine and/or tamoxifen on thyroid carcinogenesis in rats pretreated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) Food Chem Toxicol , 41 1811-1816, 2003
 - 16) Lee, I-S, Nishikawa, A *Polyozellus multiplex*, a Korean wild mushroom, as a potent chemopreventive agent against stomach cancer Life Sci , 73 3225-3234, 2003
 - 17) Kitamura, Y, Nishikawa, A, Furukawa, F, Nakamura, H, Okazaki, K, Umemura, T, Imazawa, T, Hirose, M A subchronic toxicity study of shea nut color in Wistar rats Food Chem Toxicol , 41 1537-1542, 2003
 - 18) Son, H-Y, Nishikawa, A, Okazaki, K, Kitamura, Y, Kanki, K, Lee, K-Y, Umemura, T, Hirose, M Specificity of co-promoting effects of caffeine on thyroid carcinogenesis in rats pretreated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine Toxicol Pathol , 32 338-344, 2004
 - 19) Nishikawa, A, Furukawa, F, Lee, I-S, Tanaka, T, Hirose, M Potent chemopreventive agents against pancreatic cancer Curr Cancer Drug Targets, 4 373-384, 2004
 - 20) Umemura, T, Kitamura, Y, Kanki, K, Maruyama, S, Okazaki, K, Imazawa, T, Nishimura, T, Hasegawa, R, Nishikawa, A, Hirose, M Dose-related changes of oxidative stress and cell proliferation in kidneys of male and female F344 rats exposed to potassium bromate Cancer Sci , 95 393-398, 2004
 - 21) Yoshida, K, Tanaka, T, Kohno, H, Yanai, Y, Yamada, Y, Hirose, Y, Sugie, S, Kawamori, T, Wakabayashi, K, Mori, H A COX-2 inhibitor, nimesulide, inhibits chemically- induced rat tongue carcinogenesis through suppression of cell proliferation activity and COX-2 and iNOS expression Histol Histopathol , 18 39-48, 2003
 - 22) Tanaka, T, Kohno, H, Nomura, E, Taniguchi, H, Tsuno, T, Tsuda, H A novel geranylated derivative, ethyl 3(4'-geranyloxy-3'-methoxyphenyl)-2-propenoate, synthesized from ferulic acid suppresses carcinogenesis and inducible nitric oxide synthase in rat tongue Oncology, 64 166-175, 2003
 - 23) Kohno, H, Sugie, S, Vinh, P Q, Mori, H, Tanaka, T Cancer chemoprevention by silymarin Res Adv Cancer, 3 55-66, 2003
 - 24) Yoshida, K, Hirose, Y, Tanaka, T, Yamada, Y, Kuno, T, Kohno, H, Katayama, M, Qiao, Z, Sakata, K, Sugie, S, Shibata, T, Mori, H Inhibitory effects of troglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor γ ligand, in rat tongue carcinogenesis initiated with 4-nitroquinoline 1-oxide Cancer Sci , 94 365-371, 2003
 - 25) Tanaka, T, Kohno, H, Suzuki, R, Yamada, Y, Sugie, S, Mori, H A novel inflammation-related mouse colon

- carcinogenesis model induced by
azoxymethane and dextran sodium sulfate
Cancer Sci , 94 965-973, 2003
- 26) Suzuki, R , Kohno, H , Sugie, S , Sasaki, K ,
Yoshimura, T , Wada, K , Tanaka, T
Preventive effects of extract of leaves of
ginkgo (*Ginkgo biloba*) and its component
bilobalide on azoxymethane-induced
colonic aberrant crypt foci in rats Cancer
Lett , 210 159-169, 2004
- 27) Tanaka, T, Kohno, H , Suzuki, R , Sugie,
S Lack of modifying effects of an
estrogenic compound atrazine on
7,12-dimethylbenz(*a*)anthracene-induced
ovarian carcinogenesis in rats Cancer Lett ,
210 129-137, 2004
- 28) Kohno, H , Suzuki, R , Yasui, Y , Hosokawa,
M , Miyashita, K , Tanaka, T Pomegranate
seed oil rich in conjugated linolenic acid
suppresses chemically induced colon
carcinogenesis in rats Cancer Sci , 95
481-486, 2004
- 29) Kohno, H , Yasui, Y , Suzuki, R , Hosokawa,
M , Miyashita, K , Tanaka, T Dietary seed
oil rich in conjugated linolenic acid from
bitter melon inhibits azoxymethane-induced
rat colon carcinogenesis through elevation
of colonic PPARgamma expression and
alteration of lipid composition Int J
Cancer, 110 896-901, 2004
- 30) Kohno, H , Suzuki, R , Sugie, S , Tsuda, H ,
Tanaka, T Lack of modifying effects of
4-*tert*-octylphenol and benzyl butyl
phthalate on
3,2-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced
prostate carcinogenesis in rats Cancer Sci ,
95 300-305, 2004

2 学会発表
省略

H 知的所有権の取得状況

- 1 特許取得 なし
- 2 実用新案登録 なし
- 3 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）
反復投与毒性や発がん性試験等の実施による既存添加物の安全性評価に関する研究
平成 15 年度分担研究報告書

トコトリエノールの安全性評価に関する研究
分担研究者 西川秋佳 国立医薬品食品衛生研究所病理部室長

研究要旨 既存添加物は、安全性の面からみれば収載品の多くはそれ自体もしくはその基源か長年食用に供されていたなどの経験はあるものの、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も少なくない。穀類やパーム油などに豊富に含まれているトコトリエノールは、ヒタミンEと化学構造上の類似性を有し、トコフェロールと同様の抗酸化作用を有することから、酸化防止の目的で食品添加物として使用されている。トコトリエノールの 13 週間反復投与毒性試験では、無毒性量(NOEL)は 0.19% (雄で 120 mg/kg 体重、雌で 130 mg/kg 体重) と推定され、雄の 0.19%投与群で平均赤血球容積の減少、A/G 比の上昇、血清アルカリフォスファターゼの上昇および相対副腎重量の増加がみられたことから、無影響量(NOEL)は求められていない。慢性毒性試験および癌原性試験は実施されていないことから、今回 1 年間慢性毒性 2 年間発がん性併合試験を開始した。現在、試験開始後 31 週を経過しているが、4 匹の死亡が確認された他には、特記すべき一般状態の変化を認めていない。

A 研究目的

近年、天然性添加物の開発および利用が盛んとなり、一般食品あるいは健康食品に広範に利用されている。これは、消費者の自然天然指向によるところが大きい。しかし、このような天然性添加物の多くは、安全性試験による健康影響の評価がなされていないのが現状であり、広く消費者等からその安全性の評価が求められている。

穀類やパーム油などに豊富に含まれているトコトリエノールは、ヒタミンEと化学構造上の類似性を有し、トコフェロールと同様の抗酸化作用を有することから、酸化防止の目的で食品添加物として使用されている。トコトリエノールの 13 週間反復投与毒性試験では、無毒性量(NOEL)は 0.19% (雄で 120 mg/kg 体重、雌で 130 mg/kg 体重) と推定され、雄の 0.19%投与群で平均赤血球容積の減少、A/G 比の上昇、血清アルカリフォスファターゼの上昇および相対副腎重量の増加がみられたことから、無影響量(NOEL)は求められていない。慢性毒性試験および癌原性試験は実施されていないことから、今回 1 年間慢性毒性 2 年間発がん性併合試験を開

始した。

B 研究方法

<被験物質並びに投与方法>

パーム油より得られたヒタミンE混合物を蒸留により精製したトコトリエノールをエーサイ株式会社(東京)より供与を受けた。トコフェロールを完全に分離することはできないので、組成は α -トコトリエノール 21.4%、 β -トコトリエノール 3.5%、 γ -トコトリエノール 36.5%、 δ -トコトリエノール 8.6%、 α -トコフェロール 20.5%、 β -トコフェロール 0.7%、 γ -トコフェロール 1.0%、 δ -トコフェロール 0.5%であった。粉末基礎食 CE-2 (日本クレア株式会社、東京)に混和し、適正濃度となるように添加した。投与濃度は、トコトリエノールの 13 週間反復投与毒性試験の結果から、慢性毒性試験では最高用量を 2%とし、0.4%、0.08%、および 0%(対照群)の 4 段階とし、癌原性試験では 2%、0.4%および 0%(対照群)の 3 段階とした。トコトリエノール含有飼料は、給餌まで冷暗所 (< 4℃) に保存した。

<動物並びに飼育条件>

雌雄の Wistar Hannover ラットを日本クレア株式会社より 5 週齢で購入し、CE-2 基礎飼料と水道水で 1 週間馴化飼育後に試験に用いた。動物の飼育はハリヤーシステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 換気回数 18 回/時(オールフレッシュ)、12 時間蛍光灯照明、12 時間消灯の条件下で行った。動物は透明なポリカーホネット製箱型ケージに 3~4 匹ずつ収納し、床敷は三協ラホサーヒス社(東京)のソフトチップを使い、週 2 回交換を行った。また、飲料水として水道水を馴化および試験期間中に自由に摂取させた。

<1 年間慢性毒性試験>

雌雄の Wistar Hannover ラット 100 匹(雌 50 匹、雄 50 匹)を使用して、トコトリエノールの 1 年間反復投与試験を開始した。実験群は、雌雄とも対照群(0%、雄 10 匹、雌 10 匹)、0.08% (雄 10 匹、雌 10 匹)、0.4% (雄 10 匹、雌 10 匹)、2% (雄 20 匹、雌 20 匹) の 4 群で構成した。試験期間は 1 年とし、試験期間中、体重測定、摂餌量測定、臨床的一般症状の観察を試験開始 5 週間までは毎週行い、それ以後は 5 週おきに測定している。

<2 年間癌原性試験>

雌雄の Wistar Hannover ラット 300 匹(雌 150 匹、雄 150 匹)を使用したトコトリエノールの 2 年間の癌原性試験を開始した。実験群は、雌雄とも対照群(0%、雄 50 匹、雌 50 匹)、0.4% (雄 50 匹、雌 50 匹)、2% (雄 50 匹、雌 50 匹) の 3 群で構成した。試験期間は 2 年間とし、試験期間中、体重測定、摂餌量測定、臨床的一般症状の観察を試験開始 5 週間までは毎週行い、それ以後は 5 週おきに測定している。

<剖検および検査項目>

試験期間終了時には、全生存動物を剖検する。動物は剖検前日より絶食させ、翌日エーテル麻酔下で腹部大動脈から採血後、屠殺剖検する。死亡動物および瀕死動物についても剖検し、できる限り死因を特定する。

1 年間反復投与試験では、血液学的検査と

して、白血球数(WBC)、赤血球数(RBC)、ヘモクロミン量(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球色素量(MCH)、平均赤血球色素濃度(MCHC)及び血小板数(PLT)について測定し、さらに、白血球の型別分類を行う。血清生化学的検査として、総蛋白(TP)、A/G 比、アルブミン(ALB)、ヒルルヒン(BIL)、総コレステロール(TC)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRN)、カルシウム(Ca)、無機リン(P)、ナトリウム(Na)、カリウム(K)、塩素(Cl)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST)、アラントランスアミナーゼ(ALT)、アルカリフォスファターゼ(ALP)及び γ グルタミルトランスペプチターゼ(γ GT)について測定する。

両試験ともに、諸臓器は肉眼的に観察後摘出し、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、副腎、腎臓および精巣の重量を測定する。上記の臓器に加え、鼻腔を含む頭蓋、下垂体、眼球、ハーター腺、脊髄、唾腺、胸腺、胃、小腸、大腸、盲腸、膵臓、膀胱、皮膚、乳腺、リンパ節、胸骨、大腿骨、気管、食道、甲状腺、舌、大腿筋、三叉神経、坐骨神経、精巣上体、精囊、前立腺、凝固腺、子宮、卵巣および膈を 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定する。臓器は常法に従い、パラフィン包埋後、薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色を施し、病理組織学的検索を行う。

<統計学的処理法>

血液学的検査、血清生化学的検査及び臓器の相対重量については、原則として、各群の分散比を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は、一元配置分散分析を行い、不等分散の場合は Kruskal Wallis の方法により検定を行う。群間に有意差が認められた場合の多重比較は Dunnett の方法で対照群と各被験物質投与群との間で有意差検定を行う。その他の方法も適宜併せ実施する。

<倫理面への配慮>

動物実験は国立医薬品食品衛生研究所の動物実験実施規定ガイドラインに沿って実施した。動物飼育については、空調や清潔な住環境の維持に努めている。

C 研究結果

<1年間慢性毒性試験>

現在、試験開始後31週を経過し、雄の2%投与群において1匹の死亡が確認された。その他の群においては、特記すべき一般状態の異常は認められていない。

現在までの体重推移をFig 1 (雄) およびFig 2 (雌) に示す。平均体重は、雄の2%投与群で体重増加抑制がみられ、投与1週目より有意な減少が認められた。雌もまた、2%投与群で投与5週目より有意な減少が認められた。その他、特記すべき臨床徴候を認められていない。

<2年間癌原性試験>

現在、試験開始後31週を経過し、雄の2%投与群において3匹の死亡が確認された。その他の群においては、特記すべき一般状態の異常は認められていない。

現在までの体重推移をFig 3 (雄) およびFig 4 (雌) に示す。平均体重は、雄雌ともに最高用量の2%投与群で体重増加抑制がみられ、投与2週目より有意な減少が認められた。その他、特記すべき臨床徴候を認められていない。

D 考察

現在、試験開始後31週であるが、両試験において雄の最高用量群(2%)で少数の死亡例が認められており、その後の経過次第では、用量の変更(減少)を視野に入れる必要がある。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1 論文発表

- 1) Mori, Y, Koide, A, Kobayashi, Y, Furukawa, F, Hirose, M, Nishikawa, A Effects of cigarette smoke and a heterocyclic amine, MeIQx on cytochrome P-450, mutagenic activation of various carcinogens and glucuronidation in rat liver Mutagenesis, 18 87-93, 2003
- 2) Son, H-Y, Nishikawa, A, Okazaki, K,

Kanki, K, Yamagishi, M, Imazawa, T, Umemura, T, Hirose, M Prolonged effects of β -estradiol 3-benzoate on thyroid tumorigenesis in gonadectomized rats pretreated with *N*-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine Cancer Lett, 190 21-29, 2003

- 3) Furukawa, F, Nishikawa, A, Lee, I-S, Kanki, K, Umemura, T, Okazaki, K, Kawamori, T, Wakabayashi, K, Hirose, M A COX-2 inhibitor, nimesulide, inhibits post-initiation phase of *N*-nitrosobis(2-oxopropyl) amine- induced pancreatic carcinogenesis in hamsters Int J Cancer, 104 269-273, 2003
- 4) Umemura, T, Kodama, Y, Kanki, K, Iatropoulos, M, Nishikawa, A, Hirose, M, Williams, G M Pentachlorophenol (but not phenobarbital) promotes intrahepatic biliary cysts induced by diethylnitrosamine to cholangio cystic neoplasms in B6C3F1 mice possibly due to oxidative stress Toxicol Pathol, 31 10-13, 2003
- 5) Yamagishi, M, Natsume, M, Osakabe, N, Okazaki, K, Furukawa, F, Imazawa, T, Nishikawa, A, Hirose, M Chemoprevention of lung carcinogenesis by cacao liquor proanthocyanidins in a male rat multi-organ carcinogenesis model Cancer Lett, 191 49-57, 2003
- 6) Nishikawa, A Morse, M A, Chung, F -L Inhibitory effects of 2-mercaptoethane sulfonate and 6-phenylhexyl isothiocyanate on urinary bladder tumorigenesis in rats induced by *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine Cancer Lett, 193 11-16, 2003
- 7) Narama, I, Imaida, K, Iwata, H, Nakae, D, Nishikawa, A, 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, 16 1-17, 2003
- 8) Son, H-Y, Nishikawa, A, Kanki, K, Okazaki, K, Kitamura, Y, Lee, K-Y, Umemura, T Hirose, M Synergistic interaction between excess caffeine and deficient iodine on the promotion of thyroid carcinogenesis in rats pretreated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine Cancer Sci, 94 334-337, 2003

- 9) Umemura, T, Kai, S, Hasegawa, R, Kanki, K, Kitamura, Y, Nishikawa, A, Hirose, M Prevention of dual promoting effects of pentachlorophenol, an environmental pollutant, on diethylnitrosamine- induced hepato- and cholangiocarcinogenesis in mice by green tea infusion *Carcinogenesis*, 24 1105-1109, 2003
- 10) Kanki, K, Nishikawa, A, Furukawa, F, Kitamura, Y, Imazawa, T, Umemura, T, Hirose, M A 13-week subchronic toxicity study of paprika color in F344 rats *Food Chem Toxicol*, 41 1337-1343, 2003
- 11) Okazaki, K, Umemura, T, Imazawa, T, Nishikawa, A, Masegi, T, Hirose, M Enhancement of urinary bladder carcinogenesis by combined treatment with benzyl isothiocyanate and *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in rats after initiation *Cancer Sci*, 94 948-952, 2003
- 12) Imazawa, T, Nishikawa, A, Toyoda, K, Furukawa, F, Mitsui, M, Hirose, M Sequential alteration of apoptosis, *p53* expression, and cell proliferation in the rat pancreas treated with 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide *Toxicol Pathol*, 31 625-631, 2003
- 13) Masumura, K, Horiguchi, M, Nishikawa, A, Umemura, T, Kanki, K, Kanke, Y, Nohmi, T Low dose genotoxicity of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx) in *gpt* delta transgenic mice *Mutat Res*, 541 91-102, 2003
- 14) Kitamura, Y, Yamagishi, M, Okazaki, K, Son, H-Y, Imazawa, T, Nishikawa, A, Iwata, T, Yamauchi, Y, Kasai, M, Tsutsumi, K, Hirose, M Lack of significant inhibitory effects of a plant lignan tracheloside on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)-induced mammary carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats *Cancer Lett*, 200 133-139, 2003
- 15) Son, H-Y, Nishikawa, A, Okazaki, K, Lee, K, Imazawa, T, Hirose, M Lack of modifying effects of atrazine and/or tamoxifen on thyroid carcinogenesis in rats pretreated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) *Food Chem Toxicol*, 41 1811-1816, 2003
- 16) Lee, I-S, Nishikawa, A *Polyozellus multiplex*, a Korean wild mushroom, as a potent chemopreventive agent against stomach cancer *Life Sci*, 73 3225-3234, 2003
- 17) Kitamura, Y, Nishikawa, A, Furukawa, F, Nakamura, H, Okazaki, K, Umemura, T, Imazawa, T, Hirose, M A subchronic toxicity study of shea nut color in Wistar rats *Food Chem Toxicol*, 41 1537-1542, 2003
- 18) Son, H-Y, Nishikawa, A, Okazaki, K, Kitamura, Y, Kanki, K, Lee, K-Y, Umemura, T, Hirose, M Specificity of co-promoting effects of caffeine on thyroid carcinogenesis in rats pretreated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine *Toxicol Pathol*, 32 338-344 2004
- 19) Nishikawa, A, Furukawa, F, Lee, I-S, Tanaka, T, Hirose, M Potent chemopreventive agents against pancreatic cancer *Curr Cancer Drug Targets*, 4 373-384, 2004
- 20) Umemura, T, Kitamura, Y, Kanki, K, Maruyama, S, Okazaki, K, Imazawa, T, Nishimura, T, Hasegawa, R, Nishikawa, A, Hirose, M Dose-related changes of oxidative stress and cell proliferation in kidneys of male and female F344 rats exposed to potassium bromate *Cancer Sci*, 95 393-398, 2004
- 2 学会発表
省略
- H 知的所有権の取得状況
- 1 特許取得 なし
 - 2 実用新案登録 なし
 - 3 その他 なし

Fig. 1 Growth curves for Wistar Hannover male rats treated with Tocotrienol for 31 Weeks (Chronic toxicity)

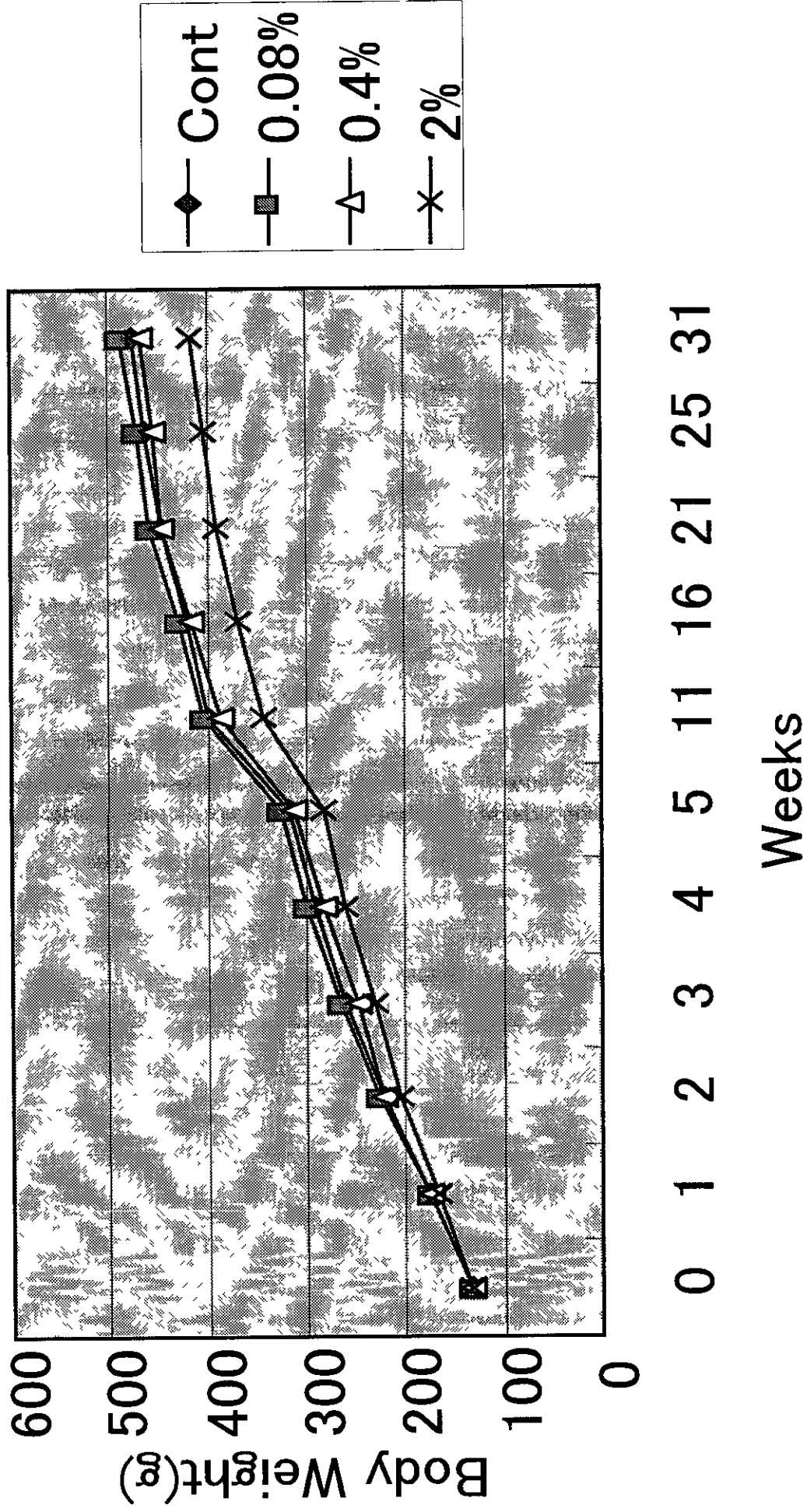


Fig. 2 Growth curves for Wistar Hannover female rats treated with Tocotrienol for 31 Weeks (Chronic toxicity)

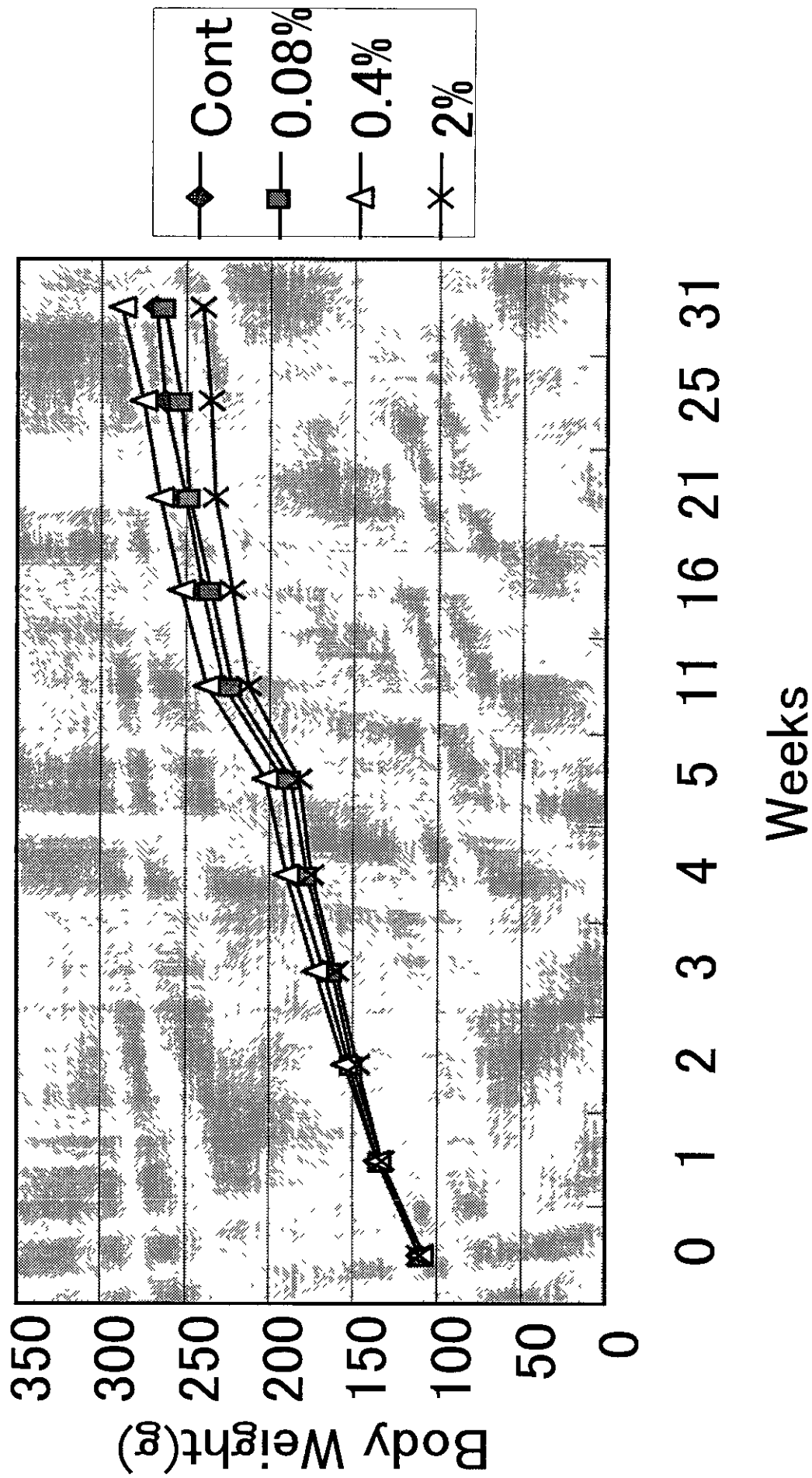


Fig. 3 Growth curves for Wistar Hannover male rats treated with Tocotrienol for 31 Weeks (Carcinogenicity)

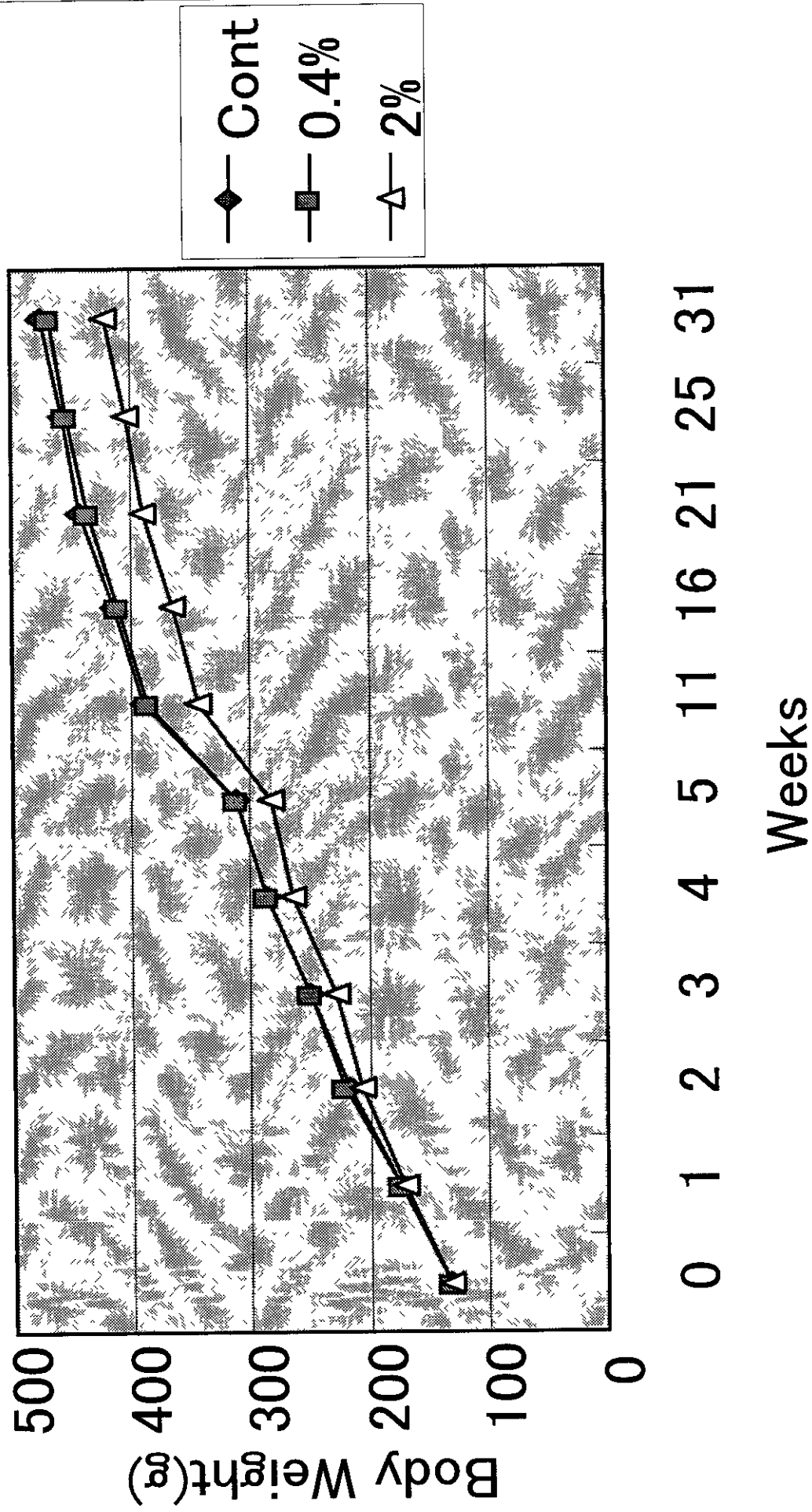
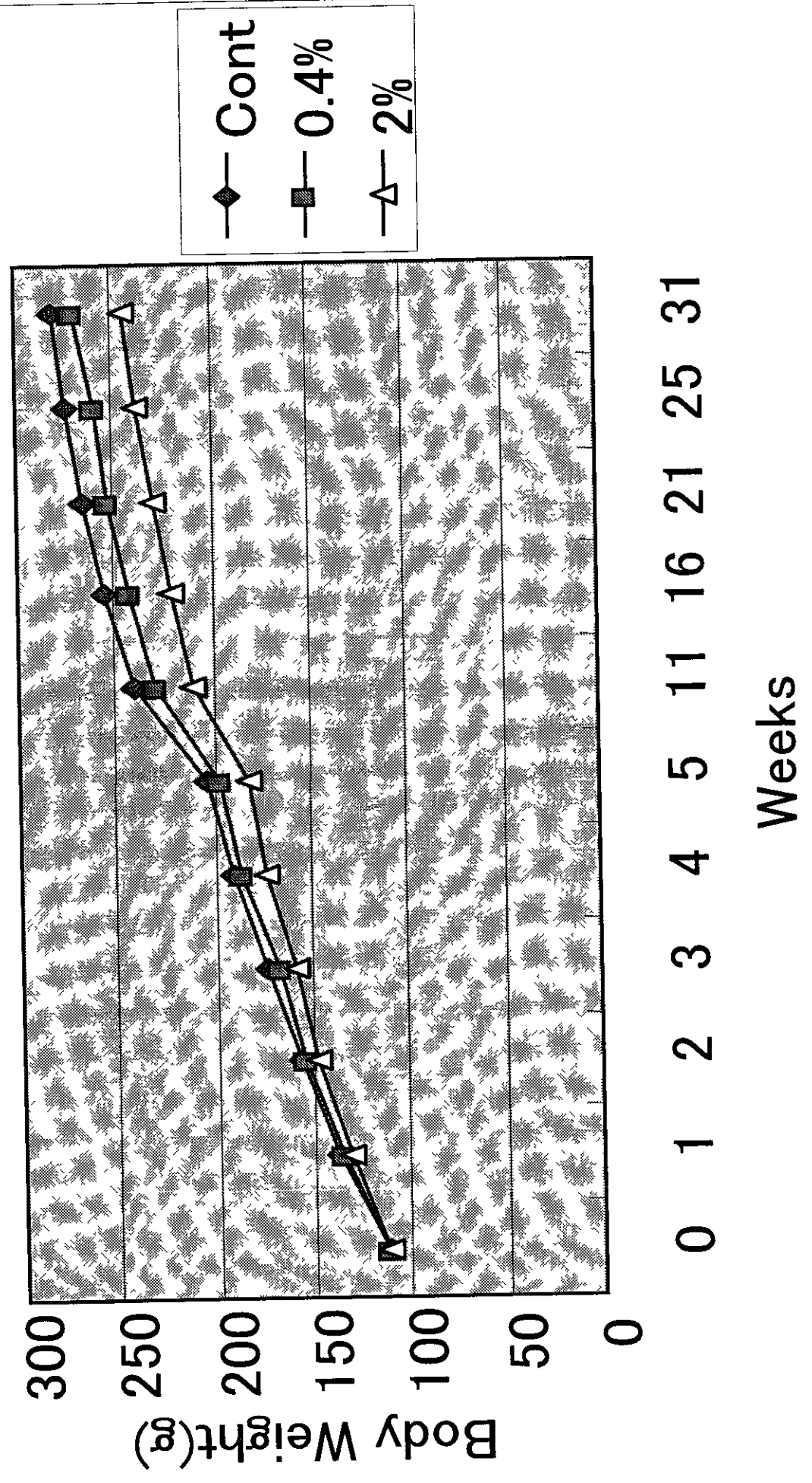


Fig. 4 Growth curves for Wistar Hannover female rats treated with Tocotrienol for 31 Weeks (Carcinogenicity)



厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
反復投与毒性や発がん性試験等の実施による既存添加物の安全性評価に関する研究
平成 15 年度分担研究報告書

フェルラ酸の安全性評価に関する研究
分担研究者 田中卓二 金沢医科大学腫瘍病理学教授

研究要旨 イネ科植物の細胞壁に豊富に含有されているフェルラ酸 (4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid) は、その抗酸化活性から、酸化防止剤として食品に利用されている。一方、フェルラ酸の生体影響に関しては、抗変異原作用、腫瘍発生抑制効果、放射線障害防護効果、染色体異常誘発、生殖機能阻害などが知られている。F344 ラットを用いたフェルラ酸混餌投与による 13 週間反復投与試験（亜慢性毒性試験）では、雌雄ともに最高濃度 5% 投与群で無処置対照群に比へて、平均体重、摂餌量の有意な低下をみている。このようにフェルラ酸の急性毒性や亜慢性毒性試験結果の報告はあるか、慢性毒性試験ないし発がん性試験の報告はみられない。そこで、フェルラ酸の 1 年間反復投与試験およびがん原性試験（2 年間）を実施することとした。現在、試験開始後 29 週を経過しているか、両試験において雌雄とも全群で死亡例は認められていない。

A 研究目的

近年、天然性添加物の開発および利用が盛んとなり、一般食品あるいは健康食品に広範に利用されている。これは、消費者の自然天然指向によるところが大きい。しかし、このような天然性添加物の多くは、安全性試験による健康影響の評価がなされていないのか現状であり、広く消費者等からその安全性の評価が求められている。

イネ科植物の細胞壁に豊富に含有されているフェルラ酸 (4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid) は、その抗酸化活性から、酸化防止剤として食品に利用されている。一方、フェルラ酸の生体影響に関しては、抗変異原作用、腫瘍発生抑制効果、放射線障害防護効果、染色体異常誘発、生殖機能阻害などが知られている。フェルラ酸の F344 ラットを用いた急性毒性に関する報告では、LD₅₀ は雄で 2445 mg/kg 体重、雌で 2113 mg/kg 体重とされている。F344 ラットを用いたフェルラ酸混餌投与（0%、0.32%、0.8%、2%、5%）による 13 週間反復投与試験（亜慢性毒性試験）では、雌雄ともに最高濃度 5% 投与群で無処置対照群に比へて、平均体重、摂餌量の有意な低下をみている。また、フェルラ酸混餌投与による臓器

重量の変化、生化学的検査結果の変化や組織学的な変化はみられたものの用量相関を認めていない。このようにフェルラ酸の急性毒性や亜慢性毒性試験結果の報告はあるか、慢性毒性試験ないし発がん性試験の報告はみられない。そこで、フェルラ酸の 1 年間反復投与試験およびがん原性試験（2 年間）を実施することとした。

B 研究方法

<実験試料>

米糠原油より抽出、精製したフェルラ酸（trans 型、LotNo F02977、純度 99.9%）を築野食品工業株式会社（和歌山）より供与を受け、粉末基礎食 CRF-1（オリエンタル酵母株式会社、東京）に予め混和した後（プレミックス）、適正濃度となるように CRF-1 に添加し、固形飼料とした。投与濃度は、フェルラ酸の急性毒性試験、亜慢性毒性試験の結果から、最高用量を 2% とし、1%、0.5%、および 0%（対照群）の 4 段階とした。フェルラ酸含有飼料は、給餌まで冷暗所（< 4℃）に保存している。

<実験動物および投与方法>

雌雄の F344/DuCrj ラットを日本チャー

ルス リハー株式会社、横浜)より4週齢で購入し、1週間馴化飼育後に試験に用いた。馴化および試験期間中、ラットを自動給水装置付きベルト式飼育棚のステンレス製懸垂式ケーンに4ないし3匹ずつ収容し、室温 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 10\%$ 、照明12時間・換気回数毎時10回のハリア飼育室にて飼育した。5週齢時に雌雄のラットを体重測定し、ランダム方式により各実験群に分け、飼料及び水道水(細菌ろ過器を経由)を自由に摂取させた。

<フェルラ酸1年間反復投与試験>

雌雄のF344/DuCrjラット100匹(雌50匹、雄50匹)を使用して、フェルラ酸の1年間反復投与試験を開始した。実験群は、雌雄とも対照群(0%、雄10匹、雌10匹)、0.5%(雄10匹、雌10匹)、1%(雄10匹、雌10匹)、2%(雄20匹、雌20匹)の4群で構成した。試験期間は、1年とし試験期間中、体重測定、摂餌量の測定、臨床的一般症状の観察(3回/日)を毎日行っている。

<フェルラ酸かん原性試験(2年間)>

雌雄のF344/DuCrjラット416匹(雌208匹、雄208匹)を使用した2年間フェルラ酸かん原性試験を開始した。実験群は、雌雄とも対照群(0%、雄52匹、雌52匹)、0.5%(雄52匹、雌52匹)、1%(雄52匹、雌52匹)、2%(雄52匹、雌52匹)の4群で構成した。試験期間は、2年間とし試験期間中、体重測定、摂餌量の測定、臨床的一般症状の観察(3回/日)を毎日行っている。

<剖検および検査項目>

試験期間終了時には、全生存動物を剖検する。動物は剖検前日より絶食させ、翌日エーテル麻酔下で腹部大動脈から採血後、屠殺剖検する。死亡動物および顔死動物についても剖検し、できる限り死因を特定する。

1年間反復投与試験では、血液学的検査として、白血球数(WBC)、赤血球数(RBC)、ヘモクロビン量(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)及び血小板数(PLT)について測定し、さらに、白血球の型別分類を行う。

血清生化学的検査として、総蛋白(TP)、A/G比、アルブミン(ALB)、ヒリルヒン(BIL)、総コレステロール(TC)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRN)、カルシウム(Ca)、無機リン(P)、ナトリウム(Na)、カリウム(K)、塩素(Cl)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST)、アラニントランスアミナーゼ(ALT)、アルカリフォスファターゼ(ALP)及び γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(γ -GT)について測定する。

両試験ともに、諸臓器は肉眼的に観察後摘出し、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、副腎、腎臓および精巣の重量を測定する。上記の臓器に加え、鼻腔を含む頭蓋、下垂体、眼球、ハーター腺、脊髄、唾液腺、胸腺、胃、小腸、大腸、盲腸、膵臓、膀胱、皮膚、乳腺、リンパ節、胸骨、大腿骨、気管、食道、甲状腺、舌、大腿筋、三叉神経、坐骨神経、精巣上体、精囊、前立腺、凝固腺、子宮、卵巣および陰を10%中性緩衝ホルマリン液にて固定する。臓器は常法に従い、パラフィン包埋後、薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオニン染色を施し、病理組織学的検索を行う。

<統計学的処理法>

血液学的検査、血清生化学的検査及び臓器の相対重量については、原則として、各群の分散比をBartlettの方法で検定し、等分散の場合は、一元配置分散分析を行い、不等分散の場合はKruskal-Wallisの方法により検定を行う。群間に有意差が認められた場合の多重比較はDunnettの方法で対照群と各被験物質投与群との間で有意差検定を行う。その他の方法も適宜併せ実施する。

<倫理面への配慮>

動物実験は本学動物実験実施規定のガイドラインに沿って実施した。動物飼育については、空調や清潔な住環境の維持に努めている。

C 研究結果

<フェルラ酸1年間反復投与試験>

現在、試験開始後29週を経過しているが、雌雄とも全群で死亡例を認めていない。投与開始後、3週目からフェルラ酸投与群に脱毛

か観察されたか、現在は回復している。対照群にはそのような症状は認めていない。その他、特記すべき臨床徴候を認めていない。

現在までの平均体重の推移を図1（雄）、図2（雌）に示す。雄の平均体重は、対照群に比へフェルラ酸投与群で高い傾向を示し、雌の平均体重は、対照群およびフェルラ酸投与群とも同様の体重増加率を示している。ラット1日当たりの平均摂取量を図3（雄）、図4（雌）に示すか、雌雄とも対照群に比へフェルラ酸投与群では低く、雄では対照群の約3/4-4/5、雌では対照群の約3/4-3/5であるか、用量依存性を認めていない。

<フェルラ酸かん原性試験（2年間）>

現在、試験開始後29週を経過している。現在までに、雌雄とも全群で死亡例を認めていない。投与開始後、3週目からフェルラ酸投与群ラットに脱毛を観察したか、現在は回復している。対照群にそのような徴候は、観察されていない。その他、特記すべき臨床徴候を認めていない。

現在までの平均体重の推移を図5（雄）、図6（雌）に示す。雌雄とも、平均体重は、2%フェルラ酸投与群は対照群とほぼ同様の体重増加を示しているか、0.5%フェルラ酸投与群、1%フェルラ酸投与群では対照群に比へ高い傾向を示している。ラット1日当たりの平均摂取量を図7（雄）、図8（雌）に示すか、雌雄とも対照群に比へフェルラ酸投与群では低く、雄では対照群の約4/5、雌では対照群の約3/5-3/4であるか、用量依存性はみられない。

D 考察

現在、試験開始後29週であるか、両試験において雌雄とも全群で死亡例は認められておらず、順調に経過している。

F 健康危険情報 特になし。

G 研究発表

1 論文発表

- 1) Yoshida, K, Tanaka, T, Kohno, H, Yanai, Y, Yamada, Y, Hirose, Y, Sugie,

S, Kawamori, T, Wakabayashi, K and Mori, H A COX-2 inhibitor, nimesulide, inhibits chemically- induced rat tongue carcinogenesis through suppression of cell proliferation activity and COX-2 and iNOS expression *Histol Histopathol*, 18 39-48, 2003

- 2) Tanaka, T, Kohno, H, Nomura, E, Tamiguchi, H, Tsuno, T and Tsuda, H A novel geranylated derivative, ethyl 3(4'-geranyloxy-3'-methoxyphenyl)-2-propanoate, synthesized from ferulic acid suppresses carcinogenesis and inducible nitric oxide synthase in rat tongue *Oncology*, 64 166-175, 2003
- 3) Kohno, H, Sugie, S, Vinh, P Q, Mori, H, Tanaka, T Cancer chemoprevention by silymarin *Res Adv Cancer*, 3 55-66, 2003
- 4) Yoshida, K, Hirose, Y, Tanaka, T, Yamada, Y, Kuno, T, Kohno, H, Katayama, M, Qiao, Z, Sakata, K, Sugie, S, Shibata, T, Mori, H Inhibitory effects of troglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor γ ligand, in rat tongue carcinogenesis initiated with 4-nitroquinoline 1-oxide *Cancer Sci*, 94 365-371, 2003
- 5) Tanaka, T, Kohno, H, Suzuki, R, Yamada, Y, Sugie, S, Mori, H A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate *Cancer Sci*, 94 965-973, 2003
- 6) Suzuki, R, Kohno, H, Sugie, S, Sasaki, K, Yoshimura, T, Wada, K, Tanaka, T Preventive effects of extract of leaves of ginkgo (*Ginkgo biloba*) and its component bilobalide on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats *Cancer Lett*, 210 159-169, 2004
- 7) Tanaka, T, Kohno, H, Suzuki, R, Sugie, S Lack of modifying effects of an estrogenic compound atrazine on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced ovarian carcinogenesis in rats *Cancer Lett*, 210 129-137, 2004
- 8) Kohno, H, Suzuki, R, Yasui, Y, Hosokawa, M, Miyashita, K, Tanaka, T Pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats *Cancer Sci*, 95 481-486, 2004