

厚生労働科学研究費補助金  
食品の安全性高度推進研究事業  
既存添加物の発がん性等に関する研究

平成 16 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 17 年 (2005) 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. ホコッシ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 ..... 21

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 ..... 29

三森国敏

3. ジャマイカカシミア抽出物のラットによる 1 年間反復投与毒性試験  
..... 43

関田清司

## 既存添加物の発がん性等に関する研究

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・教授

### 研究要旨

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ホコッシ抽出物、ルチン酵素分解物、及びジャマイカカシミア抽出物の1年間反復投与毒性/発がん性併用試験を開始し以下の成果を得た。

1) ホコッシ抽出物には精巢毒性が有り、精巢への影響も含めホコッシ抽出物の慢性毒性、及び発がん性を検索するため、F344 ラットの代わりに Wistar Hannover 系ラットを用いて1年間反復投与毒性/発がん性併用試験を開始した。そのため Wistar Hannover 系ラットへの適切な投与量を決定する必要があるため、その予備試験として16週間の混餌試験を別途実施し投与量を決定した。

1年間反復投与毒性/発がん性併用試験は、現在16週間を経過したが、一般状態に異常は認められない。体重増加の推移は、雄ラットでは1.0%以上のホコッシ抽出物混合飼料群で、雌ラットでは0.2%以上の投与群で、対照群に比べ有意な体重増加抑制を認めた。一方、混合飼料の摂餌量は、雌雄ラット共に1.0%以上群でそれぞれ対照群に比べ有意な摂餌量の減少を認めた。

2) ルチン酵素分解物の1年間反復投与毒性試験を開始した。本試験に先立ち、予備試験として、放射線照射および非照射ルチン酵素分解物の5%混合飼料を28日間 Wistar Hannover (GALAS)系ラットに投与し、その毒性の比較を行った。その結果、放射線照射/非照射ルチン分解物がラットに及ぼす影響にはほとんど差は認められなかった。予備試験の結果を受け、放射線照射滅菌処理ルチン酵素分解物混合飼料(0.04, 0.2, 1, 5%)を用いた同系雌雄ラットにおける52週間混餌投与試験を開始した。

3) ジャマイカカシミア抽出物のF344/DuCrjラットによる1年間反復投与毒性試験を開始した。現在までに13週間を経過したが一般状態、体重および摂餌量に変化は認められない。

4) 1年間反復投与毒性/発がん性併用試験では、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トレラ (*Pasteurella pneumotropica*) 感染の発生が明らかとなった。そのため本試験を途中で中止し、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。このため、実験の遅れを余儀なくされた。

### 分担者研究者

三森国敏 東京農工大学  
農学部獣医病理学研究室 教授  
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

の改正にとま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

### A. 研究目的

既存添加物は、平成7年5月の食品衛生法

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、ヒトでの生涯摂取を想定した発がん性・慢性毒性を含む安全性を検討する必要があり、そのためラット等の動物モデルを用いて長期反復投与による安全性評価を行う。

本研究では、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、その結果を考慮しホコッシ抽出物、ルチン酵素分解物、及びジャマイカカシア抽出物を選定しこれらの1年間反復投与毒性試験、並びにホコッシ抽出物の発がん性試験を実施する。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い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ホコッシ抽出物、ルチン酵素分解物、およびジャマイカカシア抽出物を選定した。今年度からホコッシ抽出物、ルチン酵素分解物、及びジャマイカカシア抽出物の1年間反復投与毒性試験、並びにホコッシ抽出物の発がん性試験を実施した。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。

### 1. 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・リバー (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 匹づつ収容して行う。

### 2. 予備試験

1) ホコッシ抽出物: 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、ホコッシ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16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群に分けて試験を実施した。ホコッシ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℃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. 被験物質とその投与量、及び実験群の設定：

ホコッシ抽出物：ヒガシマル醤油株式会社より提供されたホコッシ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と予備試験の結果を基に決定した。予備試験では、全ての濃度のホコッシ抽出物混合飼料による16週間の飼育でラットの全身状態に変化は認められなかった。体重の増加は、0.2%と0.04%のホコッシ抽出物混合飼料群では対照群に比べ有意な変化を認めなかった。しかし、1.0%群では、体重増加の抑制を認めた(図1)。一方、ホコッシ抽出物を混餌投与したF344ラットでは、雄0.75%、雌0.38%以上の混餌飼料で体重増加抑制がみられ、1.5%以上では精巣及び卵巣の組織学的異常を認めている。以上の結果より、1年間反復投与毒性試験では、精巣及び卵巣の組織学的異常を確認する必要があるためホコッシ抽出物混合飼料濃度の最高用量を1.5%とし、それ以下の用量を1%、0.2%、及び0.04%とした。一方、発がん性試験では、長期飼育をする必要から、ホコッシ抽出物混合飼料濃度の最高用量を1.0%とし、それ以下の用量を0.2%、及び0.04%とした。1年間反復投与毒性/発がん性併用試験では、4週齢のWistar Hannover (GALAS)ラット雌雄各260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、各実験群を設定した。1年間反復投与毒性試験、及び発がん性試験における各実験群の被験物質投与濃度とラット数を表1、及び表2に示した。

表1. 1年間反復投与毒性試験

	実験群 (添加濃度)	雄ラット (n=60)	雌ラット (n=60)
①	0%	10	10
②	0.04%	10	10
③	0.2%	10	10
④	1.0%	10	10
⑤	1.5%	20	20

表2. 発がん性試験

	実験群 (添加濃度)	雄ラット (n=200)	雌ラット (n=200)
①	0%	50	50
②	0.04%	50	50
③	0.2%	50	50
④	1.0%	50	50

ルチン酵素分解物：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、1.0、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。実験群の設定は、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した。

ジャマイカカシア抽出物：ジャマイカカシア (*Prickrasma 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) より購入した。被験物質の

投与はヒトでの摂取経路を考慮に入れ、粉末飼料 (CRF-1 粉末飼料, オリエンタル酵母(株)) による混餌投与で行なっている。用量設定は、90日間反復投与毒性試験 (0, 50, 500 および 5000ppm 添加飼料) の結果を参考に決定した。90日試験では、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を最高用量に、以下公比10で除した500, 50および5ppmを設定した。

実験群の設定を以下の表に示した。各群への動物の割付は、被験物質投与開始前日に、当日の体重と3日前の体重から雌雄別にノルム値を求め、健康で、ノルム値の小さい雌雄各100匹を選び、次いで、雌雄別に、体重を層別化し、各群の平均体重が出来るだけ均等になるように割り付けた。

#### 【群構成】

群	添加濃度 (ppm)*	動物数	
		雄	雌
対照	0	20	20
5 ppm	5	20	20
50 ppm	50	20	20
500 ppm	500	20	20
5000 ppm	5000	20	20

\*添加飼料製造は、実験担当者が当研究所飼料製造室で2週間毎に行っている。

#### 4. 1年間反復投与毒性/発がん性併用試験

##### 1) 1年間反復投与毒性試験：

4週齢のF344/DuCrjラットまたはWistar Hannoverラットを購入し、被験物質添加濃度の最高用量群では雌雄とも各群20匹ずつ、その他の群では雌雄とも各群10匹以上のラットを用いて対照群を含め合計5群の実験群を設定する。被験物質混合飼料は、使用時までは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。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・エオジン (H. E.) 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)、グルタミン酸ピルビ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。

##### 2) 発がん性試験：

投与開始24ヶ月後に全生存動物を屠殺剖検し、器官・組織の肉眼的観察及び病理組織学的検索を行う。剖検の方法や病理標本の作製は前述の通りである。剖検に先立ち生存ラットを採血し血液検査と血液塗抹標本の作製を行う。

##### 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。

### C. 研究結果と D. 考察

#### 1) ホコッシ抽出物 :

ホコッシ抽出物のラット 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、この目的に適したラットシステム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、ホコッシ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 16 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を実施した。その結果、全ての濃度のホコッシ抽出物混合飼料による 16 週間の飼育でラットの全身状態に変化は認められなかった。体重増加は、0.2%、及び 0.04% のホコッシ抽出物混合飼料群では対照群に比べ有意な変化を認めなかった。しかし、1.0% 群では、体重増加の抑制を認めた (図 1)。一方、ホコッシ抽出物を混餌投与した F344 ラットでは、雄 0.75%、雌 0.38% 以上の混餌飼料で体重増加抑制がみられ、1.5% 以上では精巣及び卵巣の組織学的異常を認めている。以上の結果より、1 年間反復投与毒性試験では、精巣及び卵巣の組織学的異常を確認する必要があるためホコッシ抽出物混合飼料濃度の最高用量を 1.5% とし、それ以下の用量を 1%、0.2%、及び 0.04% とした。一方、発がん性試験では、長期飼育をする必要から、ホコッシ抽出物混合飼料濃度の最高用量を 1.0% とし、それ以下の用量を 0.2%、及び 0.04% とした。

この用量を用いて 1 年間反復投与毒性/発がん性併用試験を開始し、16 週間を経過した。ラットの一般状態は良好で死亡例も認めていない。1 年間反復投与毒性試験での体重増加の推移は、雄ラットでは 1.0% ホコッシ抽出物混合飼料群で、雌ラットでは 0.2% 以上

の投与群で、対照群に比べ有意な体重増加抑制 ( $p < 0.01$ ) を認めた (図 2, 表 3)。一方、混合飼料の摂餌量は、雌雄ラット共に 1.0% 群でそれぞれ対照群に比べ有意な摂餌量の減少 ( $p < 0.05$ ) を認めており、被験物質摂取量に影響があるものと考えられる (図 2, 表 3)。

発がん性併用試験での体重増加の推移は、雄ラットでは 1.0% ホコッシ抽出物混合飼料群で、雌ラットでは 0.2% 以上の投与群で、対照群に比べ有意な体重増加抑制 ( $p < 0.01$ ) を認めた (図 3, 表 4)。一方、混合飼料の摂餌量は、雄ラットでは 1.0% 群で、雌ラットでは 0.2% 及び 1.0% 群で、それぞれ対照群に比べ有意な摂餌量の減少 ( $p < 0.01$ ) を認めており、被験物質摂取量に影響があるものと考えられる (図 3, 表 4)。

#### 2) ルチン酵素分解物 :

2) -1 予備試験: 放射線照射および非照射ルチン酵素分解物の比較試験を実施した。実験期間を通して、雌雄いずれの群にも一般状態の異常や死亡動物は認められなかった (図 4)。摂餌量および飲水量に関しては、雌雄いずれの群も実験期間を通し、各対照群との間、あるいは照射 5% 群と非照射 5% 群の間に有意差は認められなかった (表 5)。血液学的検査では、雄の照射 5% 群と非照射 5% 群で、対照群に比べ PLT 値の有意な上昇が認められたが、両 5% 群間での有意差は認められなかった。雄の照射 5% 群では、対照群および非照射 5% 群に比べ MCV 値の有意な低下が認められた。雌においては、照射 5% 群と非照射 5% 群で、対照群に比べ HT 値に有意な低下が認められたが、両 5% 群間での有意差は認められなかった (表 6)。血液生化学的検査では、雄の照射 5% 群において対照群に比べ有意な TP 値の上昇および Na 値の低下が認められた。非照射 5% 群においては、対照群に比べ TP 値、ALB 値、BUN 値および Ca 値の有意な上昇が認められた。両 5% 群間の比較では、照射 5% 群に BUN 値および Na 値の有意な低下が認められた。一方、雌においては、照射 5% 群と非照射 5% 群で対照群に比べ有意な ALT 値の増加および TC 値の減少が認められたが、両群間での有意差は認められなかった (表 7)。臓器重量に関しては、雄のいずれの群間でも

有意差は認められなかった。一方、雌の胸腺相対重量が、照射5%群および非照射5%とともに対照群に比べ有意な低値を示したが、両5%群間での有意差は認められなかった(表8)。尿検査では、肉眼的に、照射5%群ならびに非照射5%群の尿において被験物質投与に起因したと考えられる着色尿(黄色調、両群同等度)が認められた。また、尿検査紙(ウリエースKc, TELMO)による解剖前の尿潜血検査では、雄の非照射5%群の投与前検査にて陽性を示した一例で、潜血の陽性反応が認められた(データは示さず)。剖検時には、照射5%群ならびに非照射5%群全例の骨表面に、被験物質に起因したと考えられる色調の変化(黄色化)が認められた。病理組織学的検査では、雄の照射5%群において肝で小肉芽腫、腎で好塩基性尿細管、および下垂体で嚢胞形成が、非照射5%群においては、肝で小肉芽腫、心筋で炎症細胞(リンパ球)浸潤、腎で好塩基性尿細管、下垂体で嚢胞形成、および副腎形成がそれぞれ観察されたが、これら病変の大多数は対照群にも認められた。雌の照射5%群では、肝で小肉芽腫、心筋で炎症細胞(リンパ球)浸潤、腎で好塩基性尿細管、鉍物沈着および間質組織への炎症性細胞浸潤、気管支腺の拡張、膵臓で腺房細胞の限局性萎縮、および甲状腺で濾胞異形成が観察された。非照射5%群では、肝で小肉芽腫、腎で好塩基性尿細管、鉍物沈着および間質組織への炎症性細胞浸潤、膵臓で腺房細胞の限局性萎縮、小腸でリンパ過形成およびハーダー腺でリンパ球浸潤巣が観察された。これらのうち、肝および腎で観察された変化は、対照群においても観察された。色調変化が認められた骨では、病理組織学的変化は認められなかった(表9)。

以上の結果から、雄の血液検査においてMCV値、BUN値、およびNa値について照射5%群と非照射5%群の間で差が認められた。また、雌における病理組織検査で、いくつかの所見に違いが認められた。しかしながら、血液検査での差違は、いずれも背景データの変動範囲内であった。また、病理検査で認められた所見はいずれも、これらの発生頻度が低く(8例中1または2)、しばしば自然発生性にも観察される変化であることから、両被験物質

による動物への影響には違いがないものと判断した。尿および骨で認められた被験物質に起因すると思われる黄色化も、照射5%群および非照射5%群の全例で認められ、放射線照射/非照射による明らかな差は認められなかった。従って、放射線照射ルチン酵素分解物と非照射ルチン酵素分解物による動物への影響には違いがないものと判断し、放射線照射滅菌操作を施したルチン酵素分解物混合飼料を用い本試験を開始した。なお、予備試験で認められた被験物質投与群での変化については、その毒性学的意義も含め本試験の結果を基に総合的に判断するものとする。

2) - 2 1年間反復投与毒性試験：本試験では、同じ動物舎での感染症が疑われたため、計画より5ヶ月遅れて実験を開始した。現在までに、投与開始から33週間が経過し、雄の対照群において左頬部腫瘤の大型化による切迫殺例(32週目)が、雌の5%投与群において胆道系障害による切迫殺例(8週目)が一例ずつ発生しているが、被験物質に起因すると考えられる死亡および一般状態の異常は認められていない(図5, 6)。尿については、雌雄の5%群の尿において被験物質投与に起因していると考えられる着色尿が認められている。本試験については、現在までに投与開始より33週間が経過し、被験物質に起因すると考えられる著変は認められていない。最終解剖を2005年7月に予定しており、その後、随時検査を進める予定である。

3) ジャマイカカussia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。

ジャマイカカシア抽出物の F344/DuCrj ラットによる 1 年間反復投与毒性試験を開始したが、開始直後に、購入先のラット飼育生産施設で肺パスツレラのラットへの感染が明らかとなった。試験に使用したラットも、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、病原体陰性 F344/DuCrj ラットの供給再開を待って、新たに入手した F344/DuCrj ラットを用いた 1 年間反復投与毒性試験を開始した。F344/DuCrj ラットの供給再開には約 9 ヶ月を要した。現在 13 週を経過中であるが、いづれの群においても死亡は認められず、一般状態にも変化は認められない。体重は、雌雄各群とも順調に増加し、群間差も認められない(図 7, 表 10)。5000ppm 添加飼料では、被験物質に起因する特有の臭気を感じるが、動物に忌避行動は認められない。摂餌量にも群間差は認められない(図 7, 表 10)。被験物質摂取量では、用量に対応した被験物質摂取量が維持されている(表 10)。

#### 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。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。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 月に開始し

た。

#### E. 結論

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ホコッシ抽出物、ルチン酵素分解物、及びジャマイカカシア抽出物の 1 年間反復投与毒性/発がん性併用試験を開始し以下の成果を得た。

- 1) ホコッシ抽出物には精巢毒性が有り、精巢への影響も含めホコッシ抽出物の慢性毒性、及び発がん性を検索するため、F344 ラットの代わりに Wistar Hannover 系ラットを用いて 1 年間反復投与毒性/発がん性併用試験を開始した。そのため 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 16 週間の混餌試験を別途実施し投与量を決定した。1 年間反復投与毒性/発がん性併用試験は、現在 16 週間を経過したが、一般状態に異常は認められない。体重増加の推移は、雄ラットでは 1.0% 以上のホコッシ抽出物混合飼料群で、雌ラットでは 0.2% 以上の投与群で、対照群に比べ有意な体重増加抑制を認めた。一方、混合飼料の摂餌量は、雌雄ラット共に 1.0% 以上群でそれぞれ対照群に比べ有意な摂餌量の減少を認めた。
- 2) ルチン酵素分解物の 1 年間反復投与毒性試験を開始した。本試験に先立ち、予備試験として、放射線照射および非照射ルチン酵素分解物の 5% 混合飼料を 28 日間 Wistar Hannover (GALAS) 系ラットに投与し、その毒性の比較を行った。その結果、放射線照射/非照射ルチン分解物がラットに及ぼす影響にはほとんど差は認められなかった。予備試験の結果を受け、放射線照射滅菌処理ルチン酵素分解物混合飼料 (0.04, 0.2, 1, 5%) を用いた同系雌雄ラットにおける 52 週間混餌投与試験を開始した。
- 3) ジャマイカカシア抽出物の F344/DuCrj ラットによる 1 年間反復投与毒性試験を開始した。現在までに 13 週を経過したが一般状態、体重および摂餌量に変化は認められない。
- 4) 1 年間反復投与毒性/発がん性併用試験では、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 (*Pasteurella*

*pneumotropica*) 感染の発生が明らかとなった。  
そのため本試験を途中で中止し、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。このため、実験の遅れを余  
儀なくされた。

**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

図1 ホコッシ抽出物の予備試験 16週間反復投与毒性試験

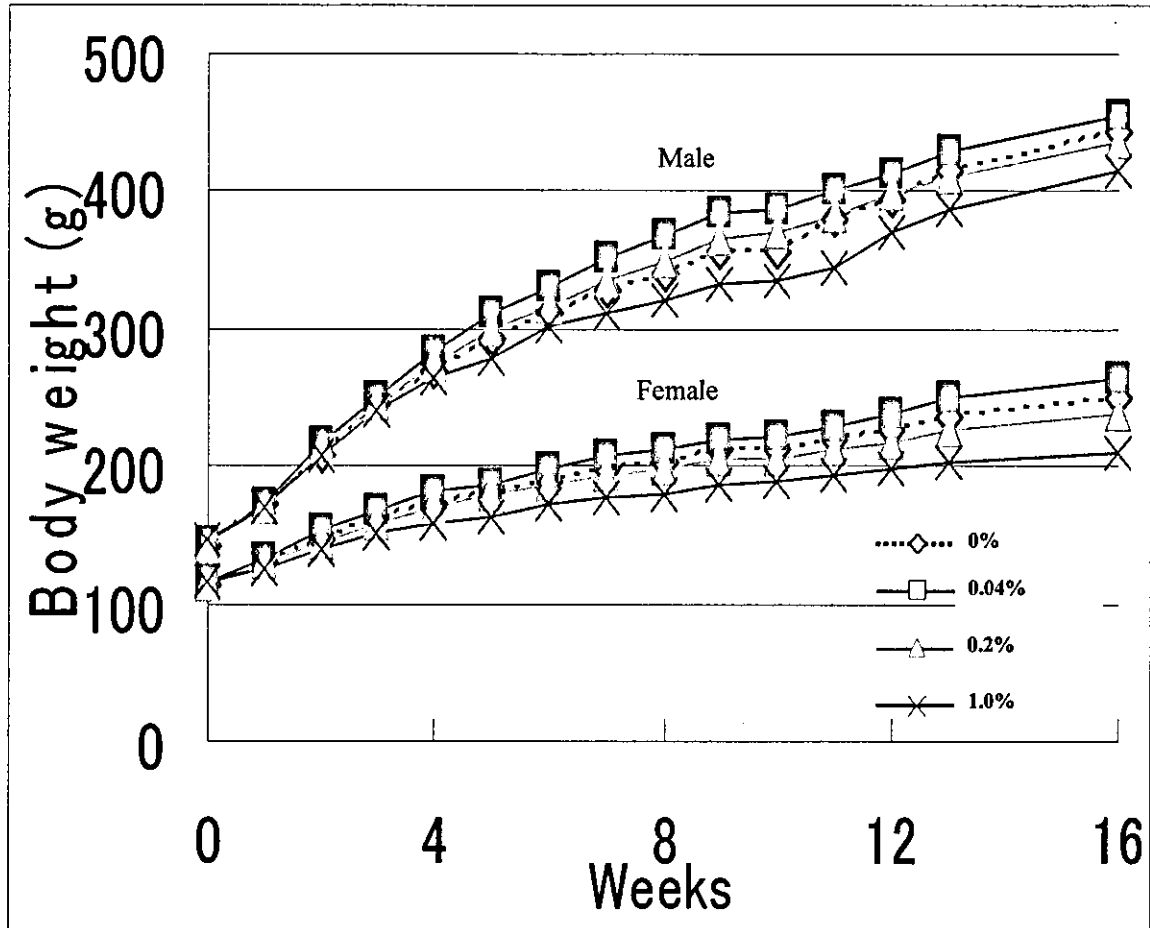


図2 1年間反復投与毒性試験(体重・摂餌量)

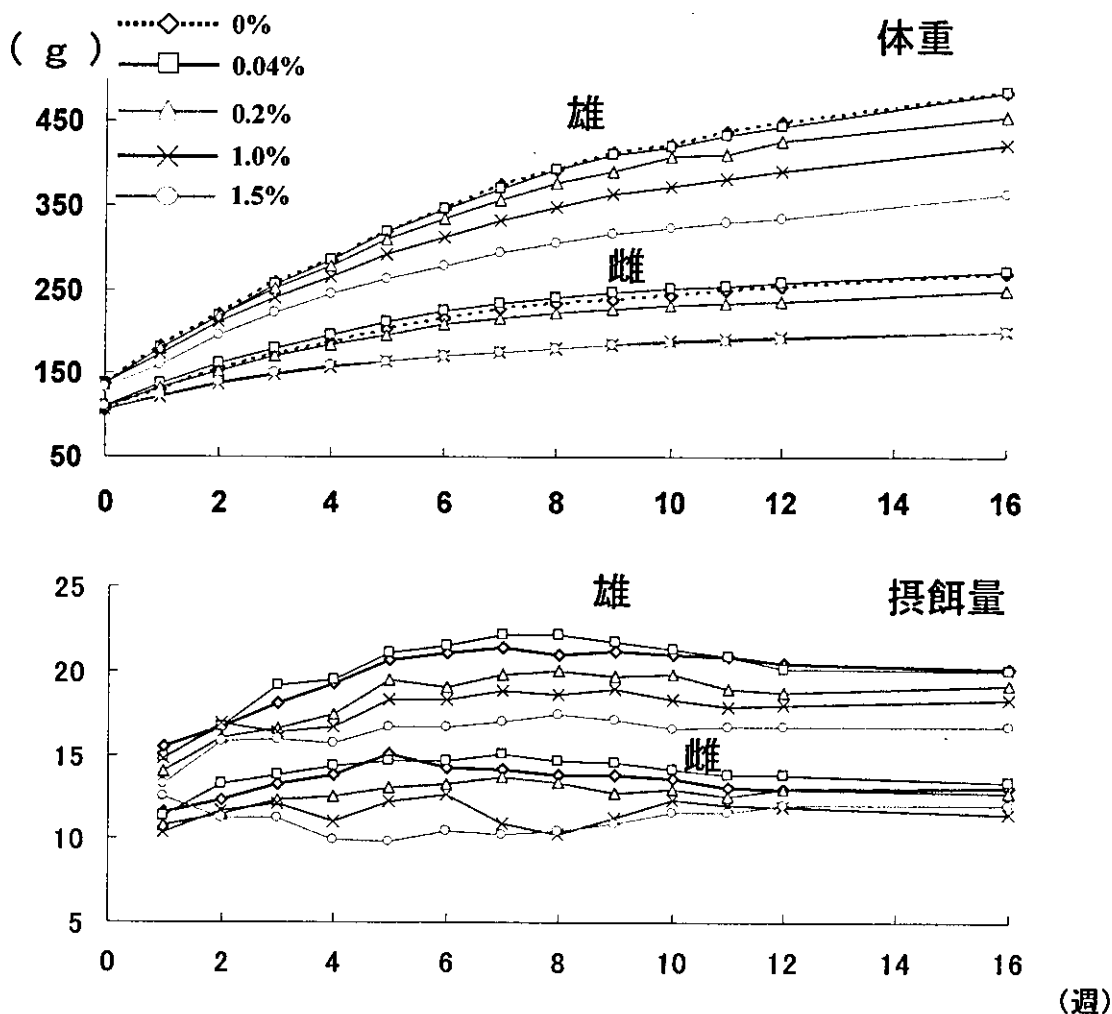


表3 1年間反復投与毒性試験 16週までの平均摂取量および体重

性	群	被験物質摂取量 mg/kg/day	平均摂餌量 g/rat/day	16週目の体重 (g)
雄	0%	0.00 ±	15.84 ± 0.50	485.4 ± 46.8
	0.04%	3.11 ± 0.02	16.02 ± 1.10	483.3 ± 49.5
	0.2%	14.28 ± 0.03	14.77 ± 0.40	456.3 ± 42.2
	1.0%	64.92 ± 0.20	14.23 ± 0.40*	422.4 ± 49.6
	1.50%	82.93 ± 0.16	13.09 ± 0.46**	363.4 ± 23.3
雌	0%	0.00 ±	10.05 ± 0.21	268.6 ± 26.1
	0.04%	1.12 ± 0.00	10.40 ± 0.23	271.7 ± 19.0
	0.2%	5.17 ± 0.04	9.51 ± 0.94	250.1 ± 22.6
	1.0%	21.56 ± 0.11	8.62 ± 0.94*	200.7 ± 11.9
	1.5%	25.37 ± 0.17	8.43 ± 0.79*	200.4 ± 14.4

図3 発がん性試験(体重・摂餌量)

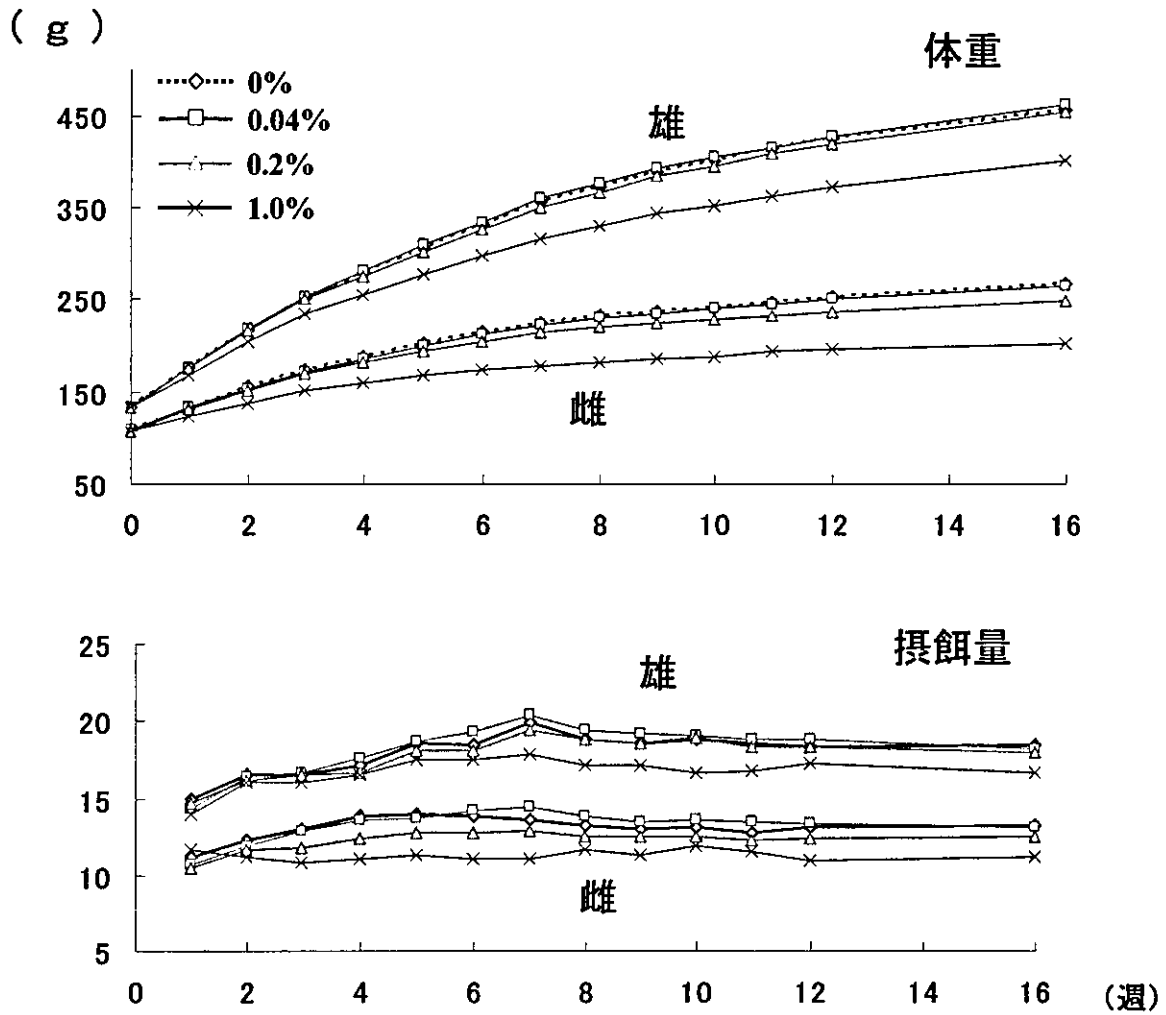


表4 発がん性試験 16週までの平均摂取量および体重

性	群	被験物質摂取量 mg/kg/day	平均摂餌量 g/rat/day	16週目の体重 (g)
雄	0%	0.00 ±	18.07 ± 0.86	456.2 ± 35.4
	0.04%	3.32 ± 0.01	18.22 ± 0.78	461.1 ± 38.9
	0.2%	16.21 ± 0.08	17.57 ± 0.99	452.9 ± 39.3
	1.0%	75.55 ± 0.22	16.68 ± 0.56**	400.0 ± 39.8
雌	0%	0.00 ±	13.12 ± 0.50	267.4 ± 24.8
	0.04%	1.41 ± 0.01	13.22 ± 0.67	265.9 ± 23.7
	0.2%	6.54 ± 0.02	12.30 ± 0.50**	248.4 ± 22.2
	1.0%	28.03 ± 0.15	11.28 ± 1.10**	202.2 ± 13.8

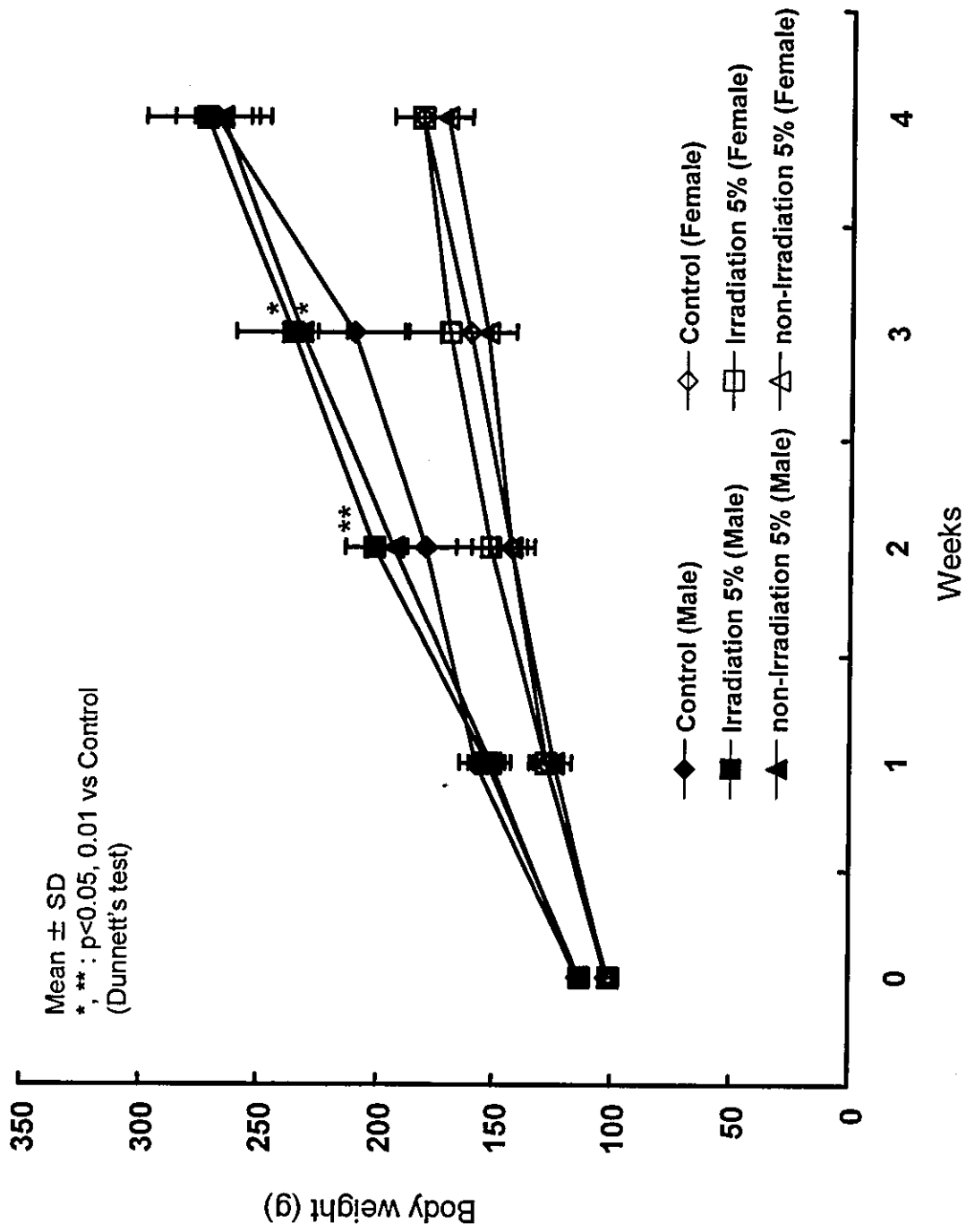


Figure 4: Body weight changes of rats given enzymatic decompositions of rutin for 4 weeks (Preliminary study)

表 5 Final body weight, diet consumption, and water consumption of rats given enzymatic decompositions of rutine for 4 weeks (Preliminary study)

	Group	No. of animals	Final body weight (g)	Diet consumption (g/rat/day)	Water consumption (g/rat/day)
Male	Control	8	268.4 ± 18.1 <sup>a)</sup>	20.6 ± 4.7	34.9 ± 8.1
	Irradiation 5%	8	272.2 ± 26.3	20.1 ± 4.9	44.8 ± 10.1
	non-Irradiation 5%	8	266.0 ± 12.3	19.9 ± 4.7	37.2 ± 7.2
-----					
Female	Control	8	181.9 ± 12.2	14.8 ± 1.1	24.9 ± 2.5
	Irradiation 5%	8	182.3 ± 12.0	15.5 ± 1.7	29.8 ± 3.5
	non-Irradiation 5%	8	171.7 ± 10.6	14.8 ± 1.8	26.2 ± 2.1

a) : Mean ± SD

表6 Hematological data in rats given enzymatic decompositions of rutin for 4 weeks (Preliminary study)

Group	Control	Irradiation 5%	non-Irradiation 5%
No. of animals	8	8	8
<b>Male</b>			
RBC × 10 <sup>4</sup> /ml	667.3 ± 27.6 <sup>a)</sup>	702.6 ± 39.0	679.5 ± 20.1
HB g/dl	13.2 ± 0.6	13.6 ± 0.5	13.5 ± 0.5
HT %	40.5 ± 1.7	40.7 ± 1.3	38.2 ± 7.0
PLT × 10 <sup>4</sup> /ml	72.7 ± 6.9	83.7 ± 6.5 **	84.9 ± 6.6 **
MCV fl	60.9 ± 2.2	57.9 ± 2.3 * #	60.0 ± 1.6
MCH pg	19.8 ± 0.5	19.4 ± 0.7	19.8 ± 0.7
MCHC %	32.7 ± 0.5	33.4 ± 0.4	33.1 ± 0.9
WBC /μl	3975.0 ± 815.5	4762.5 ± 972.4	4875.0 ± 1500.2
Differential cell count (%)			
SEG	8.5 ± 3.8	7.3 ± 3.5	6.6 ± 4.8
LYMP	90.6 ± 3.9	92.1 ± 4.1	93.0 ± 4.8
MONO	0.1 ± 0.4	0.1 ± 0.4	0.3 ± 0.5
EOS	0.8 ± 0.7	0.5 ± 0.5	0.1 ± 0.4
<hr/>			
<b>Female</b>			
RBC × 10 <sup>4</sup> /ml	705.3 ± 29.6	677.4 ± 32.3	695.9 ± 44.8
HB g/dl	13.8 ± 0.4	13.4 ± 0.5	13.3 ± 0.5
HT %	41.5 ± 1.0	40.1 ± 1.2 *	39.9 ± 1.2 *
PLT × 10 <sup>4</sup> /ml	71.3 ± 5.4	78.6 ± 8.3	75.0 ± 12.7
MCV fl	58.9 ± 2.6	59.3 ± 1.8	57.5 ± 2.7
MCH pg	19.6 ± 0.5	19.7 ± 0.5	19.1 ± 0.6
MCHC %	33.3 ± 0.8	33.3 ± 0.6	33.3 ± 0.8
WBC /μl	4312.5 ± 714.0	3987.5 ± 1048.0	4037.5 ± 1534.3
Differential cell count (%)			
SEG	9.8 ± 4.4	6.1 ± 5.2	10.6 ± 9.3
LYMP	88.9 ± 4.9	93.0 ± 5.3	88.8 ± 9.9
MONO	0.1 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.7
EOS	1.0 ± 0.9	0.9 ± 0.6	0.4 ± 0.7

a) : Mean ± SD

\*, \*\*: Significantly different from the control group at p<0.05, 0.01, respectively (Dunnett's test)

# : Significantly different from the non-Irradiation group at p<0.05 (t-test)



表 7 Biochemical data in rats given enzymatic decompositions of rutine for 4 weeks (Preliminary study)

Group		Control	Irradiation 5%	non-Irradiation 5%
No. of animals		8	8	8
Male				
TP	g/dl	5.6 ± 0.2 <sup>a)</sup>	5.8 ± 0.2 *	5.9 ± 0.1 **
ALB	g/dl	2.8 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.0 ± 0.1 *
A/G		1.0 ± 0.04	1.0 ± 0.05	1.0 ± 0.04
AST	IU/l	61.4 ± 4.7	64.6 ± 9.1	63.3 ± 4.8
ALT	IU/l	30.8 ± 3.0	31.0 ± 4.3	32.5 ± 4.6
ALP	IU/l	995.6 ± 241.1	1075.6 ± 302.2	925.5 ± 212.6
CRE	mg/dl	0.2 ± 0.01	0.3 ± 0.02	0.3 ± 0.03
BUN	mg/dl	21.3 ± 1.8	21.0 ± 2.3 #	24.0 ± 2.6 *
TC	mg/dl	63.3 ± 9.1	57.4 ± 3.7	59.5 ± 3.6
Na	mEq/l	141.8 ± 0.7	140.6 ± 1.1 *#	141.8 ± 0.9
K	mEq/l	3.6 ± 0.3	3.8 ± 0.3	3.7 ± 0.2
Cl	mEq/l	100.8 ± 1.8	100.8 ± 1.8	100.9 ± 0.8
Ca	mg/dl	11.1 ± 0.3	11.4 ± 0.4	11.4 ± 0.1 *
IP	mg/dl	8.2 ± 0.3	8.0 ± 0.3	8.3 ± 0.7
-----				
Female				
TP	g/dl	5.8 ± 0.2	5.7 ± 0.3	5.8 ± 0.2
ALB	g/dl	3.0 ± 0.1	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.1
A/G		1.1 ± 0.05	1.1 ± 0.06	1.1 ± 0.12
AST	IU/l	52.3 ± 6.1	52.4 ± 6.1	50.3 ± 5.5
ALT	IU/l	26.0 ± 3.5	22.1 ± 2.7 *	21.5 ± 2.4 *
ALP	IU/l	516.1 ± 115.5	562.1 ± 156.0	440.1 ± 122.8
CRE	mg/dl	0.2 ± 0.02	0.2 ± 0.02	0.2 ± 0.02
BUN	mg/dl	20.3 ± 3.0	22.0 ± 2.6	21.5 ± 1.9
TC	mg/dl	61.1 ± 6.8	51.9 ± 5.1 *	52.1 ± 8.7 *
Na	mEq/l	140.0 ± 1.2	140.4 ± 0.7	140.6 ± 0.9
K	mEq/l	3.8 ± 1.0	3.9 ± 0.7	3.9 ± 0.8
Cl	mEq/l	102.1 ± 2.0	102.8 ± 2.4	102.1 ± 1.6
Ca	mg/dl	11.1 ± 0.3	11.1 ± 0.7	11.0 ± 0.3
IP	mg/dl	6.8 ± 0.6	7.1 ± 0.4	7.5 ± 0.6

a) : Mean ± SD

\*, \*\*: Significantly different from the control group at p<0.05, 0.01, respectively (Dunnett's test)

# : Significantly different from the non-Irradiation group at p<0.05 (t-test)

表 8 Relative organ weights (g/100g BW) in rats given enzymatic decompositions of rutin for 4 weeks (Preliminary study)

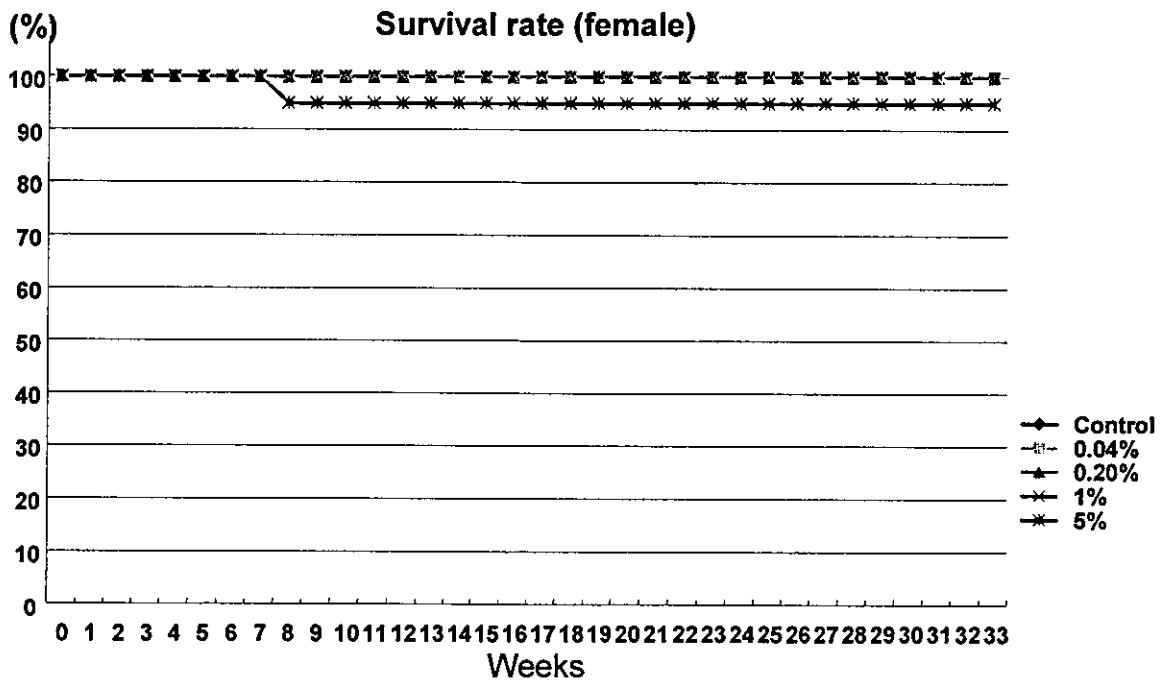
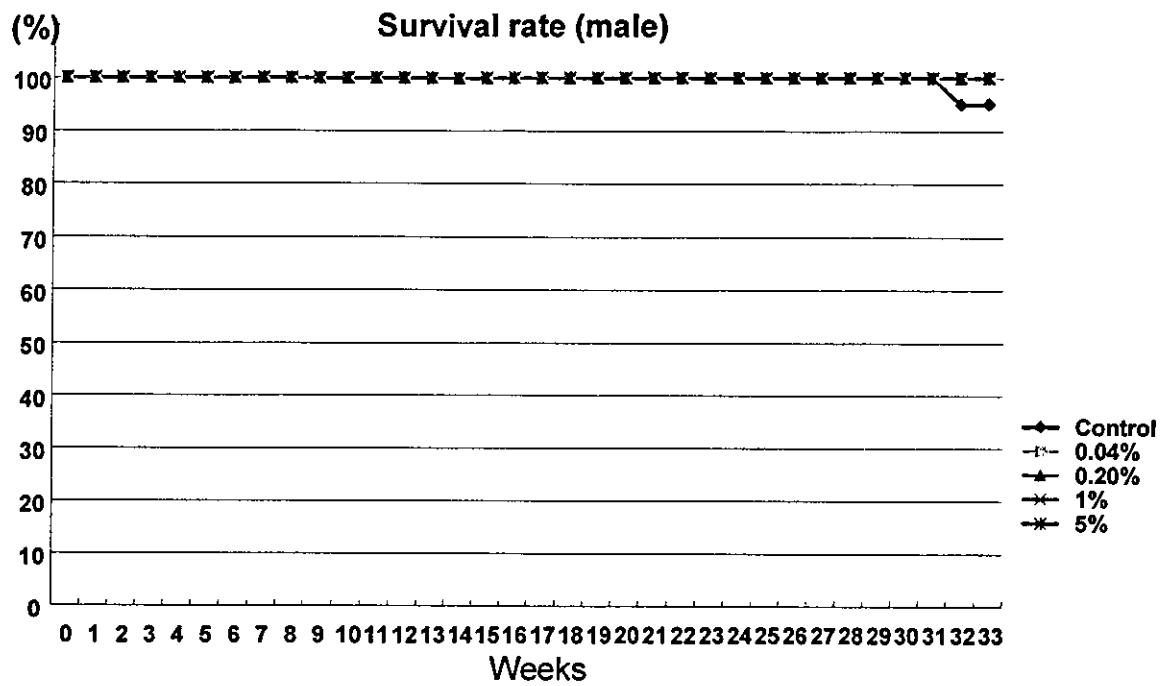
Group	Control	Irradiation 5%	non-Irradiation 5%
No. of animals	8	8	8
<b>Male</b>			
Body weight	268.4 ± 18.1 <sup>a)</sup>	272.2 ± 26.3	266.0 ± 12.3
Organ			
Brain	0.68 ± 0.05	0.67 ± 0.06	0.69 ± 0.03
Heart	0.32 ± 0.04	0.30 ± 0.03	0.31 ± 0.02
Lung	0.40 ± 0.05	0.39 ± 0.04	0.45 ± 0.10
Liver	4.26 ± 0.49	4.26 ± 0.30	4.08 ± 0.19
Kidneys	0.66 ± 0.11	0.72 ± 0.17	0.77 ± 0.07
Spleen	0.22 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.23 ± 0.02
Thymus	0.21 ± 0.05	0.18 ± 0.02	0.21 ± 0.04
Adrenals	0.020 ± 0.005	0.021 ± 0.003	0.020 ± 0.003
Pituitary gland	0.003 ± 0.002	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.000
Thyroid glands	0.007 ± 0.002	0.008 ± 0.003	0.009 ± 0.003
Testes	1.07 ± 0.08	1.08 ± 0.06	1.08 ± 0.09
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>			
<b>Female</b>			
Body weight	181.9 ± 12.2	182.3 ± 12.0	171.7 ± 10.6
Organ			
Brain	0.98 ± 0.07	0.95 ± 0.06	1.01 ± 0.06
Heart	0.33 ± 0.03	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.02
Lung	0.49 ± 0.02	0.49 ± 0.02	0.46 ± 0.04
Liver	4.05 ± 0.24	3.94 ± 0.27	3.88 ± 0.18
Kidneys	0.81 ± 0.06	0.84 ± 0.06	0.85 ± 0.03
Spleen	0.25 ± 0.03	0.23 ± 0.01	0.23 ± 0.05
Thymus	0.27 ± 0.04	0.22 ± 0.03 *	0.22 ± 0.03 *
Adrenals	0.040 ± 0.007	0.045 ± 0.007	0.041 ± 0.005
Pituitary gland	0.006 ± 0.002	0.005 ± 0.001	0.006 ± 0.002
Thyroid glands	0.010 ± 0.005	0.012 ± 0.004	0.013 ± 0.005
Ovaries	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.02

a) : Mean ± SD

\* : Significantly different from the control group at p<0.05 (Dunnett's test)

表 9 Histopathological findings in rats given enzymatic decompositions of rutine for 4 weeks (Preliminary study)

Organ	Abnormal findings	No. of animals observed abnormalities		
		Control (n=8)	Irradiation 5% (n=8)	non- Irradiation 5% (n=8)
<b>Male</b>				
Liver	Microgranuloma	2	3	4
Lung	Hemorrhage, focally	0	0	1
Kidney	Basophilic tubule	3	2	4
Heart	Cell infiltration, lymphocytic	0	0	1
	Mineralization	0	0	1
Pituitary gland	Cyst	1	1	3
Adrenal gland	Accessory adrenocortical tissue	0	0	1
Harderian gland	Cell infiltration, lymphocytic	1	0	0
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>				
<b>Female</b>				
Liver	Microgranuloma	1	3	2
Kidney	Basophilic tubule	4	2	3
	Interstitial cell infiltration, lymphocytic	0	1	1
	Mineralization	5	4	4
Trachea	Dilatation, tracheal gland	0	3	0
Pancreas	Acinar cell atrophy, lobular	0	1	0
Small intestine	Lymphoid hyperplasia, focal	0	0	1
Thyroid gland	Follicular cell dysplasia	0	2	1
Harderian gland	Cell infiltration, lymphocytic	0	0	2



☒ 5 Survival rates of rats given enzymatic decompositions of rutin for 33 weeks (in progress)