

⊠ 6 Body weight changes of rats given enzymatic decompositions of rutin for 33 weeks (in progress)

図7 体重および摂餌量(ジャマイカカシア抽出物)

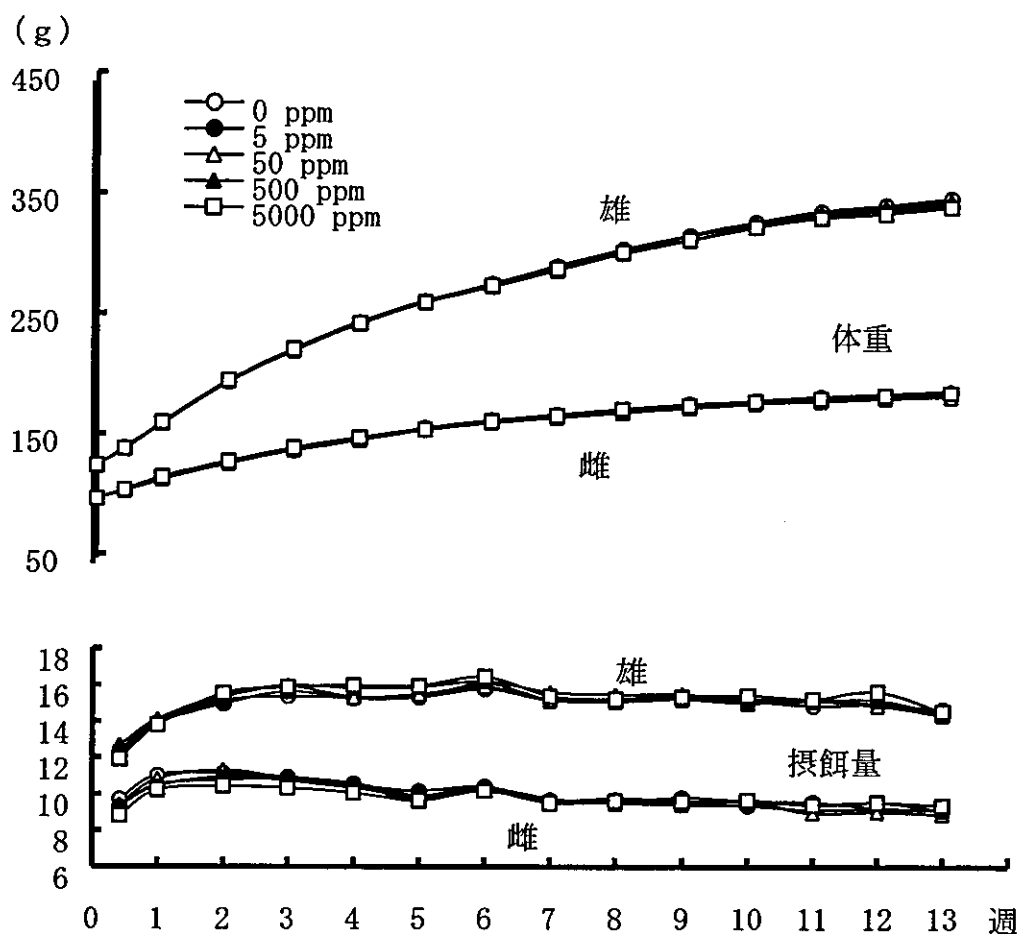


表10 13週目までの平均被験物質摂取量(ジャマイカカシア抽出物)

性 群	被験物質摂取量 mg/kg/day	平均摂餌量 g/rat/day	13週目の体重 g
雄 対照 (0)	0.0 ±	15.0 ± 0.5	344.4 ± 13.2
5 ppm	0.3 ± 0.1	15.1 ± 0.5	338.2 ± 10.1
50 ppm	2.9 ± 0.7	15.1 ± 0.5	340.7 ± 17.1
500 ppm	29.2 ± 7.3	15.4 ± 0.5	342.6 ± 10.9
5000 ppm	294.1 ± 69.3	15.4 ± 0.4	337.5 ± 15.3
雌 対照 (0)	0.0 ±	10.0 ± 0.7	182.5 ± 10.3
5 ppm	0.3 ± 0.1	9.9 ± 0.6	183.6 ± 8.1
50 ppm	3.2 ± 0.8	9.9 ± 0.8	180.0 ± 9.5
500 ppm	32.1 ± 7.0	9.9 ± 0.6	184.7 ± 8.3
5000 ppm	316.3 ± 61.5	9.8 ± 0.7	183.2 ± 7.9

既存添加物の発がん性等に関する研究

—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—

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

研究協力者 樫本尚樹 同 大学院生
水野久美子 同 技能補佐員

研究要旨

ホコッシ抽出物は、精巣毒性が有ることがF344ラットで確認されているが、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。このため、精巣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目的で、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。そのためにはWistar Hannover系ラットへの適切な投与量を決定する必要があり、その予備試験として16週間の摂餌試験を別途実施し、併用試験で用いるホコッシ抽出物混合飼料の濃度を決定した。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。

A. 研究目的

ホコッシ抽出物は、マメ科の植物オランダビユ (*Psoralea corylifolia* L.) の成熟果実であるホコッシをエタノール抽出した天然素材由来の食品添加物であり、その成分はエタノール60%、水分20%、エタノールおよび水分を除いた乾熱残分が20%である。主成分の一つであるバクチオールはこの乾熱残分に含まれており、ホコッシ抽出物に6.5%含まれている。バクチオールは強い抗菌作用を有し、その用途として唐揚げ等の食品の日持ち向上剤として使用されている。ホコッシには、冠動脈拡張、抗

菌、抗がん作用などに活性があることが知られ、白斑、疥癬の局所治療薬等として用いられる。現在までに、マウス単回経口投与による急性毒性試験におけるホコッシ抽出物におけるLD₅₀値は雄で6113mg/kg、雌で5300mg/kg、*Salmonella* 及び *Esherichia coli* に対する変異原性は陰性であることが確認されている。一方、90日反復投与毒性試験では、体重増加抑制やγ-GTPの有意な増加が認められ、病理学的解析では精巣におけるライディッヒ細胞の萎縮と精細管内伸長精子細胞の消失並びに円形精子細胞の減少、雌では卵巣の黄体形成不全が観察され、

明らかな毒性変化が認められている。本研究では、ホコッシ抽出物の長期間投与の影響を観察する事を目的として Wistar Hannover(GALAS)系ラットを用いた1年間反復投与毒性/発がん性併用試験を実施する。

B. 研究方法

1. 被験物質：

ホコッシ抽出物は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。基礎飼料（CRF-1 粉末飼料：オリエンタル酵母工業（株））にホコッシエタノールエキスを混入し目的の濃度の混餌飼料を作成した。

2. ラットおよび飼育条件

Wistar Hannover(GALAS)系ラットを日本クレア（株）より購入し、基礎飼料（CRF-1 粉末飼料）と水道水で1週間馴化飼育後、健康な雌雄を実験に用いた。

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

3. 予備試験

ラット90日反復投与毒性試験では、F344ラットを用いて試験が行われ、精巣毒性が有ることが確認された。従って、1年間反復投与毒性/発がん性併用試験では、ホコッシ抽出物の精巣への影響を検討する必要がある。しかし、F344雄ラットには、自然発生の精巣間細胞腫が非常に高頻度に発生するため、この目的に適したラット系統を用いる必要がある。そのため今回の実験では Wistar Hannover(GALAS)系ラットを用いて

試験を行うが、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。予備試験に於ける投与量は、先に実施されたラット90日反復投与毒性試験（食品添加物規格基準設定試験 食品添加物安全性再評価試験 ホコッシ抽出物の90日反復投与毒性試験 平成10年度最終報告書 平成12年5月30日）の資料を基に決定した。ホコッシ抽出物を混餌投与した F344 ラットは、雄 0.75%、雌 0.38%以上の混餌飼料で体重増加抑制がみられた。一方、雌雄の1.5%以上で精巣の組織学的異常が認められ、この変化が慢性投与でどうなるかを検討する必要がある。以上の事から、予備試験としては最高濃度投与量を1%として、以下公比5で減じ0.2%、0.04%とした。試験方法は、4週齢の Wistar Hannover(GALAS)系ラットの雌雄各10匹を日本クレア株式会社より購入し、7日間の馴化飼育後、雌雄とも各群10匹ずつ4群に分け試験を実施した。対照群には、基礎飼料を、被験物質投与群には前述の各濃度のホコッシ抽出物混餌飼料を自由に摂取させた。一般状態及び死亡ラットの有無を毎日観察し、体重及び摂餌量については週1回測定した。

4. 1年間反復投与毒性/発がん性併用試験

1年間反復投与毒性/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

1年間反復投与毒性試験では、4群の被験物質投与群を設定し1.5%、1%、0.2%、および0.04%の割合でホコッシ抽出物を混合した飼料(CRF-1,オリエンタル酵母工業(株))を試験期間中自由に摂取させた。発がん性試験では、3群の被験物質投与群を設定し同様に1%、0.2%、および0.04%の割合でホコッシ抽出物を混合した飼料を試験期間中自由に摂取させた。両実験の対照群では、雌雄各1群にホコッシ抽出物を含まない基礎飼料(CRF-1 飼料)を同期間自由に摂取させた。ホコッシ抽出物混合飼料は、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投与開始後3ヵ月まで週1回、以後は4週に1回測定した。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)

を求めた。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、計算により求めた。

1) 1年間反復投与毒性試験: 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する。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する。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。採血した血液は広島市医師会臨床検査センターに依頼し白血球(WBC)、赤血球(RBC)、ヘモグロビン(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)、グルタミン酸オキサ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)、

γ -glutamyl transpeptidase (γ -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. 研究結果と考察

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系統を用いて慢性毒性試験をする必要がある。そのため今回の実験では Wistar Hannover(GALAS)系ラットを用いて試験を行うが、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。体重は、0.2%、及び0.04%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、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、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)。

D. 結語

ホコッシ抽出物は、精巣毒性が有ることがF344 ラットで確認されているが、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。このため、精巣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目的で、今回は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。そのためにはWistar Hannover 系ラットへの適切な投与量を決定する必要があり、その予備試験として16週間の混餌試験を別途実施し、併用試験で用いるホコッシ抽出物混合飼料の濃度を決定した。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。

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

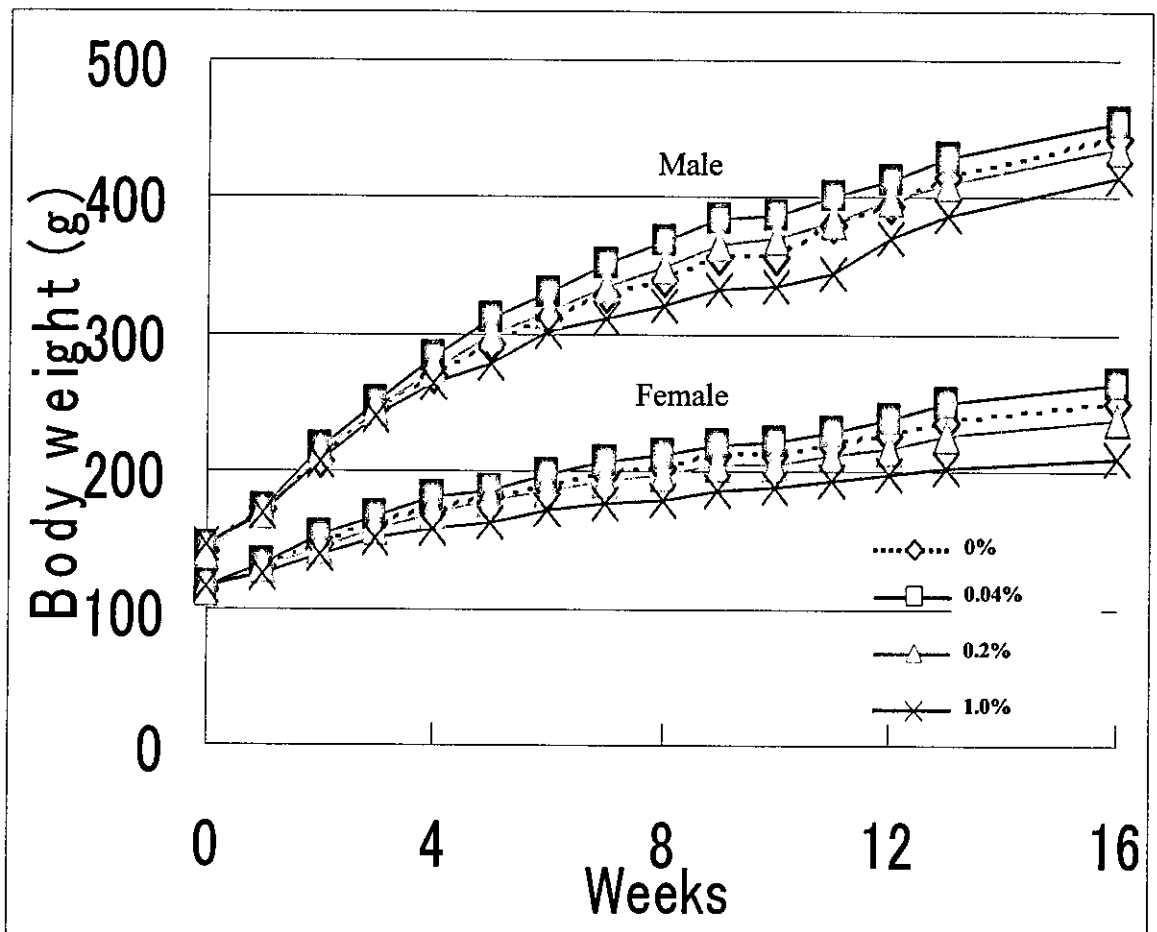


図2 1年間反復投与毒性試験(体重・摂餌量)

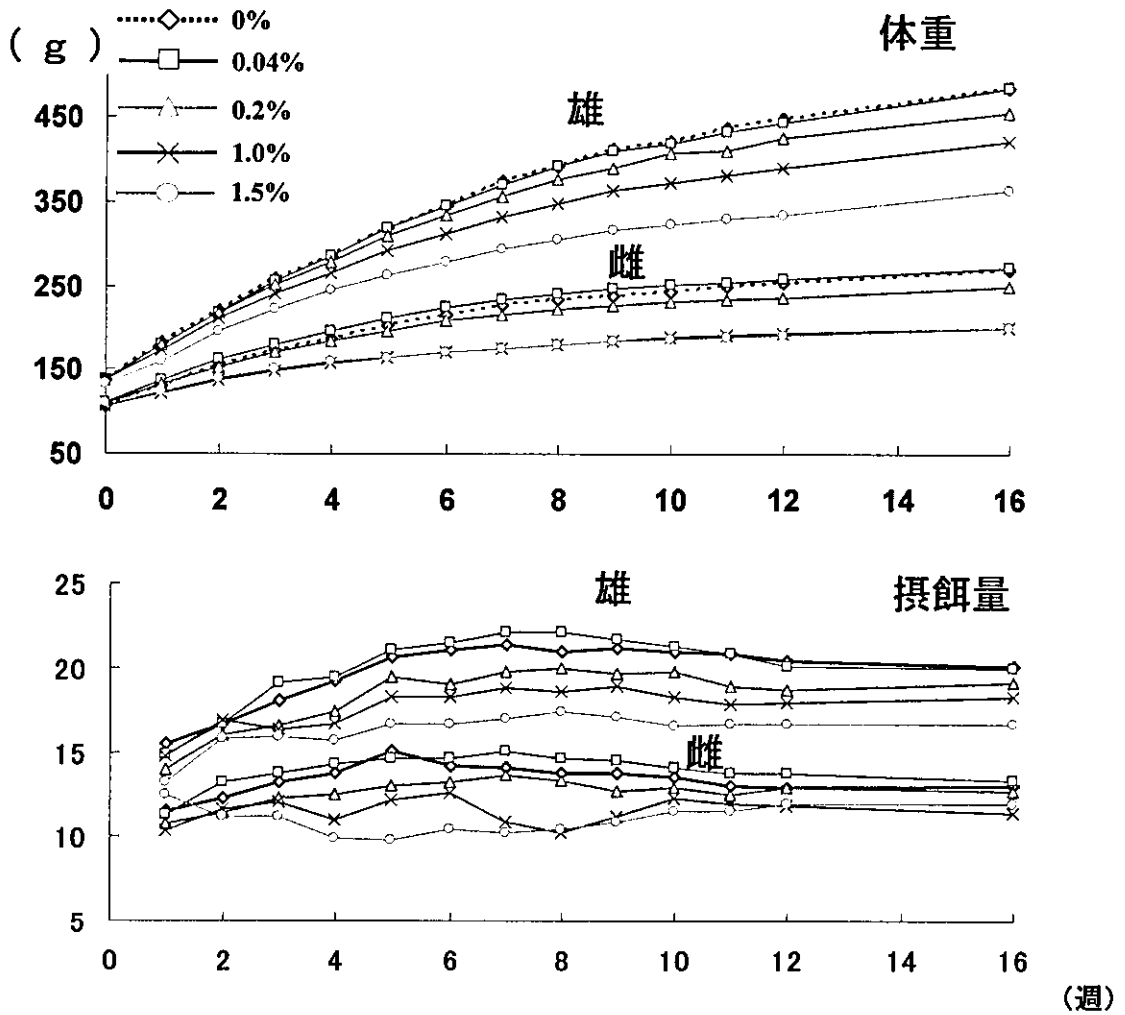


表3 1年間反復投与毒性試験 16週までの平均摂取量および体重

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)

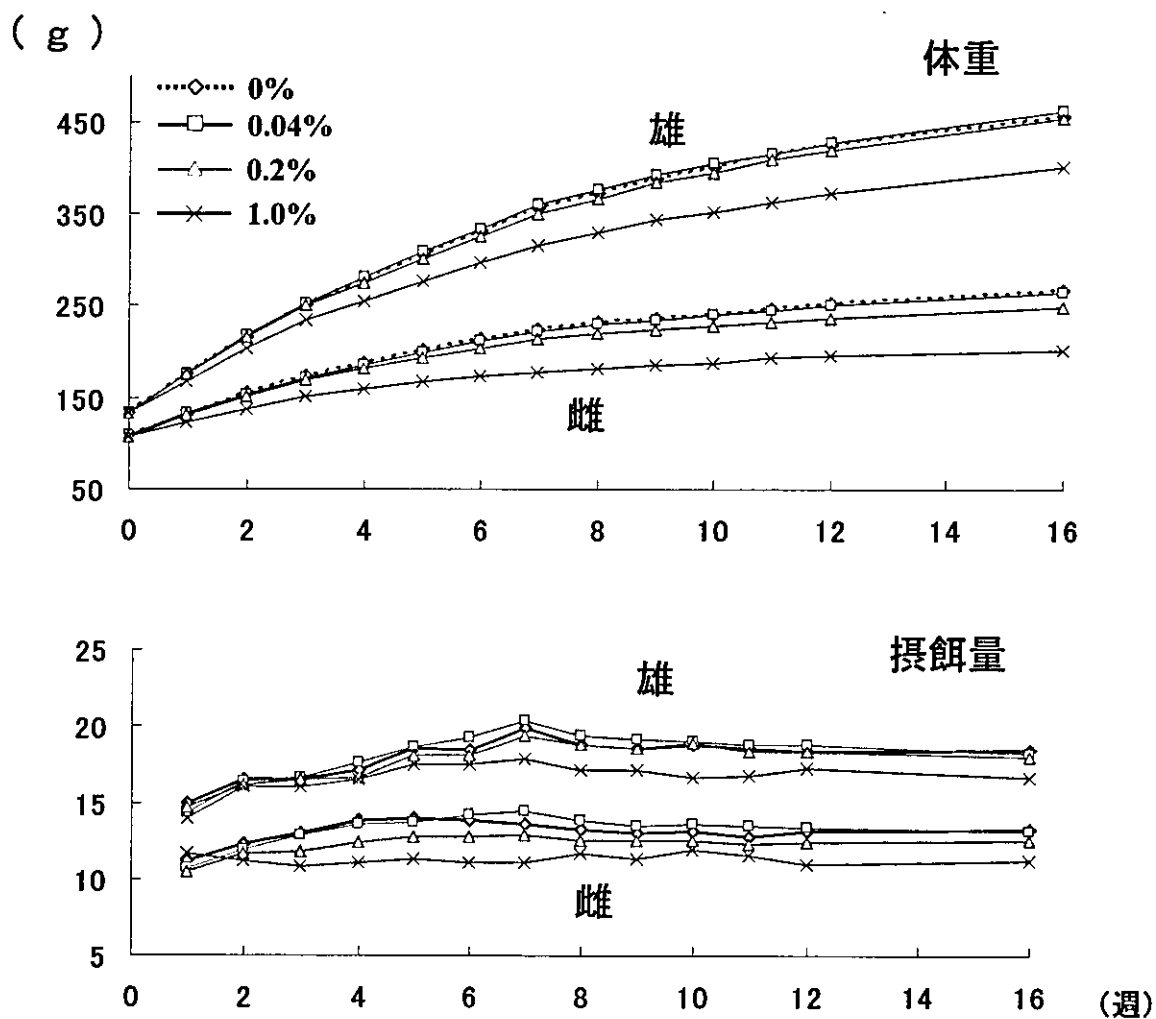


表4 発がん性試験 16週までの平均摂取量および体重

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

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

分担研究者 三森国敏 東京農工大学 農学部 獣医病理学研究室 教授

研究要旨

添加物の規格基準作成の一環として、ルチン酵素分解物の反復投与毒性に関する検討を開始した。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。

A. 研究目的

ルチン酵素分解物は、ルチンを酵素処理（ナリンジナーゼ、ヘスペリジナーゼ又はラムノシダーゼ）・精製して得られ、その主成分はイソクエルシトリンであり、酸化防止剤、あるいは酵素処理イソクエルシトリンの原料として使用されている。イソクエルシトリンのアグリコンでフラボノール的一种であるクエルセチンは、配糖体として植物に広く存在するが、遺伝毒性を示すことや雄ラットに腎腫瘍を誘発することが報告されている。また、ルチン酵素分解物についてはラット90日間混餌投与試験において、雄の5%投与群で体重増加抑制、ヘモグロビン量およびヘマトクリット値の低下が認められたことが報告されている。今回は、ルチン酵素分解物の長期間投与の影響を検討することを目的として Wistar Hannover (GALAS)系ラットを用いた52週間混餌投与試験を開始した。

B. 研究方法

1. 被験物質および投与量：

ルチン酵素分解物は、三栄源エフ・エフ・アイより供与されたものを用いた。本試験における添加飼料中の被験物質濃度は先に実施されたラット90日間混餌投与試験（食品添加物安全性再評価、最終報告書 ルチン酵素分解物の Wistar ラットにおける90日間反復投与毒性試験、平成14年7月12日）において、通常、食品添加物の混餌投与試験における最高濃度の上限とされている5%投与群においても顕著な毒性徴候が認められなかったことから、5%を最高投与量として、以下公比5で減じ、1.0、0.2及び0.04%とした。対照群には基礎飼料を、各投与群には前述の各濃度のルチン酵素分解物混合飼料を自由に摂取させる。なお、基礎固型飼料ならびにルチン酵素分解物混合固型飼料には10kGyの放射線を照射し滅菌処理を施した飼料を使用した。

2. 予備試験（ラットにおける放射線照射/非照射ルチン酵素分解物の4週間混餌投与比較試験）：

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

3. 本試験 (52 週間慢性毒性試験) :

4 週齢の Wistar Hannover (GALAS) ラット雌雄各 100 匹を日本クレア株式会社より購入し、11 日間の馴化飼育後、雌雄と

も各群 20 匹ずつ 5 群に分けて試験を開始した。動物の飼育室内環境条件は、温度 21.0～25.0℃、湿度 40～70%、換気回数 10～25 回/時間、蛍光照明 12 時間 (7-19 時) とした。動物をラット群飼育用金網ケージに 2 匹/ケージで収容し、対照群には放射線滅菌固型基礎飼料 (CE-2、日本クレア株式会社) を、各投与群には前述の各濃度のルチン酵素分解物混合固型飼料を自由に摂取させた。

ルチン酵素分解物混合固型飼料は、使用時までには 4℃ で保存し、動物に与えた飼料は安定性が確保されている期間内に適宜交換した。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投与開始後 3 ヶ月まで週 1 回、以後は 4 週に 1 回測定する。投与開始 50 週間後に尿量、尿 pH、蛋白、ケトン体、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。

動物をエーテル麻酔下で開腹し、腹部大動脈より採血を行う。血液学的検査は赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン濃度 (HB)、ヘマトクリット値 (HT)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC) 及び白血球数 (WBC) について測定を実施し、さらに血液塗抹標本を作製し、白血球分画を観察する。また、採血した血液から血清を分離し、総蛋白 (TP)、アルブミン・グロブリン比 (A/G)、総コレステロール (TC)、血中尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRE)、カルシウム (Ca)、無機リン (IP)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、クロール (Cl)、グルタミン酸オキサロアセテック トランスアミラ

ーゼ (AST)、グルタミン ピルビック トランスアミラーゼ (ALT)、アルカリホスファターゼ (ALP) 及びアルブミン (ALB) の各項目についての血清生化学的検査を三菱化学ビーシーエルで実施する。

動物は剖検後、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、下垂体、副腎、甲状腺・上皮小体、精巣、卵巣の重量を測定する。また、上記臓器に加え、主要臓器を 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した後、常法に従い病理組織標本を作製し、病理組織学的検索を行う。

4. 統計学的解析：

体重、摂餌量、飲水量、血液学的検査、血清生化学的検査及び臓器重量の各測定値について群毎に平均値及び標準偏差を求め、予備試験では各群間の直接比較検定 (F-t 検定 など) を、本試験では対照群と投与群で多重比較検定 (Dunnett の検定 など) を行う。いずれの検定においても有意水準は危険率 5%以下とする。

C. 研究結果

C-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。

C-1-1. 死亡動物および体重変化

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。

体重は、雄の照射 5%群および非照射 5%群で、投与後 2 週目または 3 週目に対照群に比べ有意な体重増加が認められたものの、試験終了時には雄全群がほぼ同値を示した。雌については、いずれの群もほぼ同様の体重推移を示した。また、雌雄と

も体重推移には照射 5%群と非照射 5%群の間に有意差は認められなかった (Fig. 1)。

C-1-2. 摂餌量および飲水量

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 (Table 1)。

C-1-3. 血液学・血液生化学的検査

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 (Table 2)。

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 (Table 3)。

C-1-4. 臓器重量

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%で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 (Table 4)。

C-1-5. 尿検査

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)。

C-1-6. 剖検および病理組織検査

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。

C-2. 本試験

本試験については、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瘍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 (Fig. 2, 3)。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。現在実験を継続中である。

D. 考察

ルチン酵素分解物の長期間投与の影響を検討することを目的とした慢性毒性試験を実施するに先立ち、放射線照射および非照射ルチン酵素分解物の比較を目的とした予備試験を実施した。その結果、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。以上の結果から、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。

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。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

特になし

G. 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

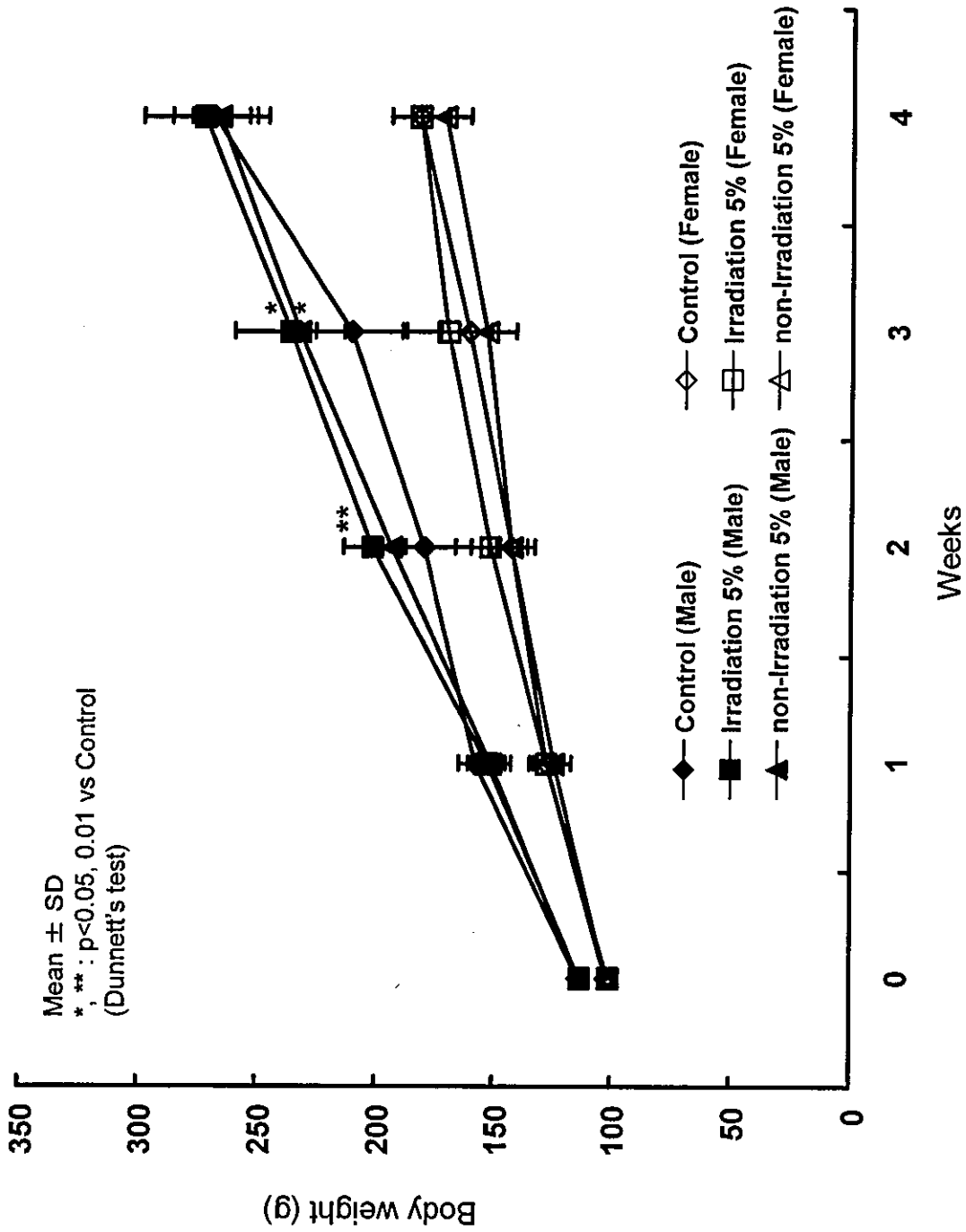


Fig. 1 Body weight changes of rats given enzymatic decompositions of rutin for 4 weeks (Preliminary study)

Table 1 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 ^{a)}	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

Table 2 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
Male			
RBC × 10 ⁴ /ml	667.3 ± 27.6 ^{a)}	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 ⁴ /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
Female			
RBC × 10 ⁴ /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 ⁴ /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)

Table 3 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 ^{a)}	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
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>				
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)

Table 4 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
Male			
Body weight	268.4 ± 18.1 ^{a)}	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;"/>			
Female			
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)