

**Table 5** 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

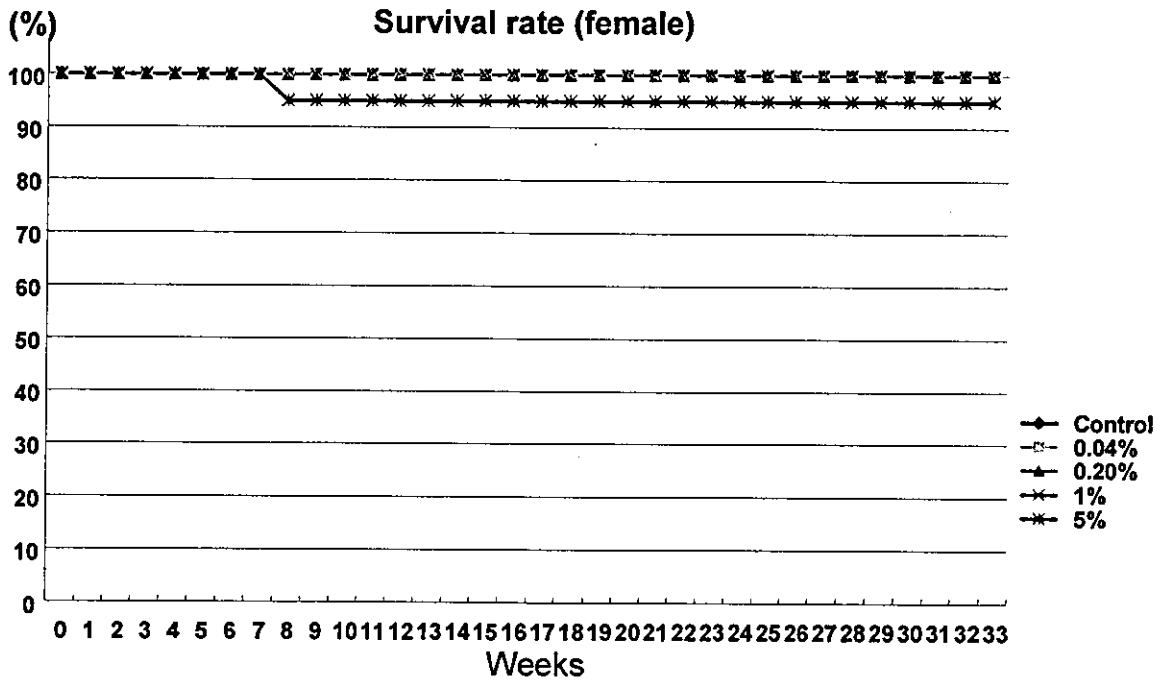
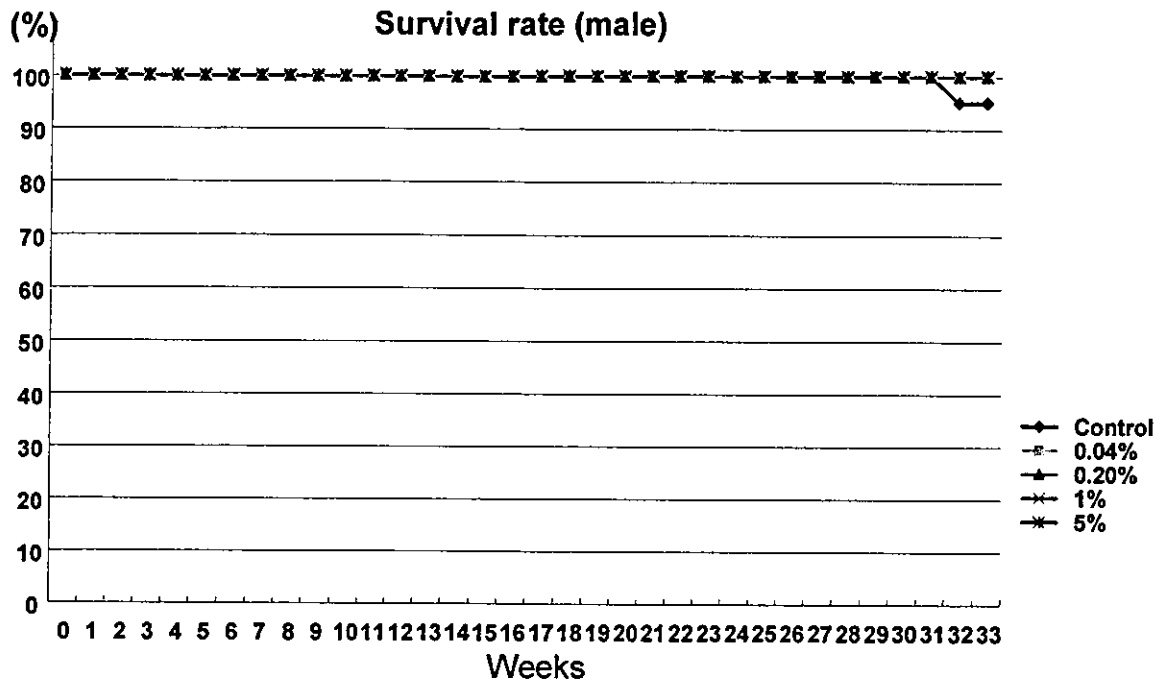


Fig. 2 Survival rates of rats given enzymatic decompositions of rutine for 33 weeks (in progress)

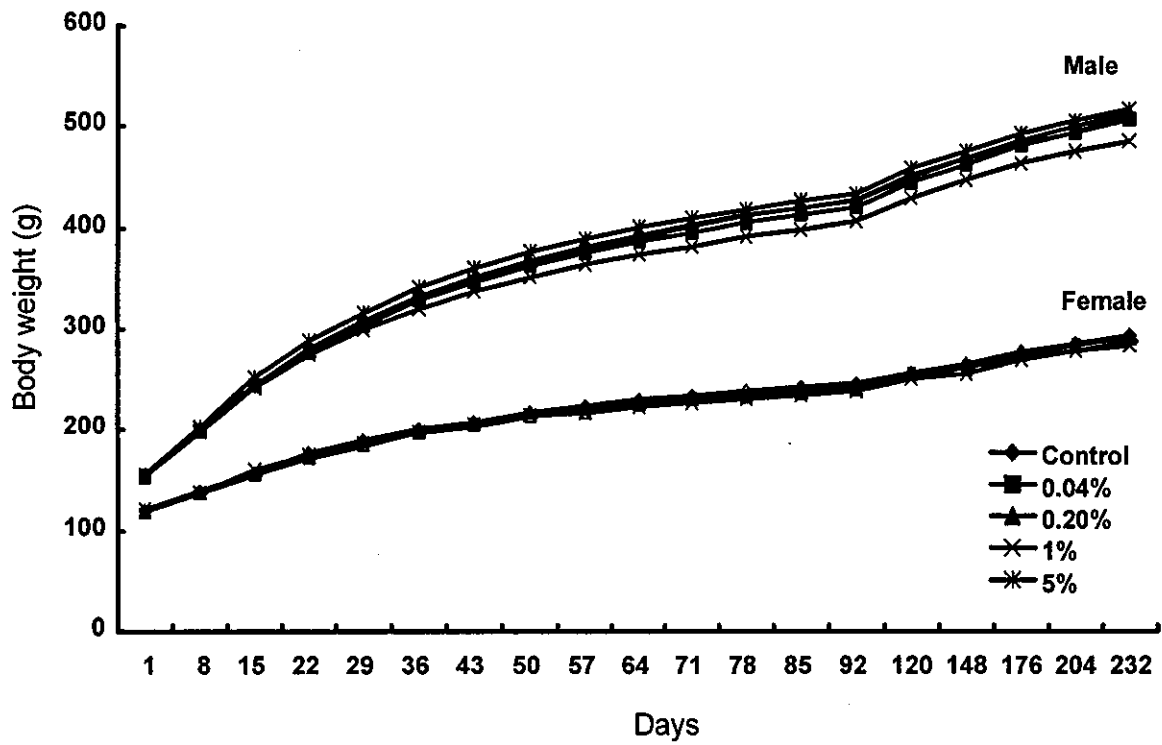


Fig. 3 Body weight changes of rats given enzymatic decompositions of rutin for 33 weeks (in progress)



## 既存添加物の発がん性等に関する研究

### -ジャマイカカシヤ抽出物のラットによる1年間反復投与毒性試験-

分担研究者 関田清司 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター  
毒性部室長

研究協力者 小川幸男 同 毒性部室長  
菅野 純 同 毒性部部長

研究要旨 ジャマイカカシヤ抽出物の F344/DuCrj ラットによる 1 年間反復投与毒性試験を昨年度に開始したところ、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 (*Pasteurella pneumotropica*) 感染ラットの発生が明らかとなった。試験に使用したラットは感染が確認された飼育室に同時期に飼育されていたことから、感染の可能性が高いと判断された。そこで、試験結果への影響と当研究所内での二次感染の防止の観点から本試験を途中停止し、上記の病原体陰性 F344/DuCrj ラットの供給再開を待って、新たに 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 13 週を経過した。現在までに一般状態、体重および摂餌量に変化は認められない。

#### A. 研究目的

既存添加物の安全性に関して、一部の既存添加物については安全性の評価に必要な資料そのものがないことから、これらの添加物の基本的な安全性を確認するには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とされている。その中の一つであるジャマイカカシヤ抽出物（主な用途は苦味料）について、90 日間反復投与毒性試験を実施したところ、5000ppm 添加飼料投与で肝臓への影響が示唆される結果が得られた。そこで、さらに長期間投与した場合の安全性および毒性に関する情報を得ることを目的とした。

#### B. 研究方法

昨年度、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、試験開始直後にラット購入先より飼育生産施設での肺パスツレラのラットへの感染が公表された。試験に供したラットは SPF 動物として販売されているもので、肺パスツレラについても陰性とされている。しかし、使用ラットは肺パスツレラ感染が確認された飼育室で飼育され、購入日と感染が確認された時期は一週間の間隔しかなかった。また、生産施設での感染検査は一定の間隔で少数の動物について実施されている。これらのことから、使用ラットも感染している可能性が極めて高いと判断された。また、生産施設からも同じ見解を得た。そこで、試験結果への影

響と本研究所内での二次感染防止の観点から本試験を途中停止し、上記の病原体陰性 F344/DuCrj ラットの供給再開（約 9 ヶ月）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。現在、13 週を経過した。

なお、F344/DuCrj ラットの供給再開を待った理由については結果および考察の項での述べる。

### 1. 被験物質

Stan chemical international limited(英国)製造のジャマイカカシミア抽出物、ロット番号 2019301/2 および 2019551 を用いて行なっている。形状は淡黄色微粉末で、特有の臭気を有し、有効成分としてクワシン (quassin) とネオクワシン (neo-quassin) を No.2019301/2 は 11.9% および 41.7%、No. 2019551 は 11.7% および 42.4% をそれぞれ含有 (HPCL 分析、Stan chemical international limited) する。試験には、両製品を等量混合したものをを用いている。

### 2. 動物および飼育条件

5 週齢の F344 ラット (F344/DuCrj、SPF、日本チャールスリバー株式会社) 雌雄各 110 匹を入手し、1 週間の馴化飼育後、健康な雌雄各 100 匹を試験に供した。

飼育は室温  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、換気 18 回/時、照明サイクル 12 時間 (照明 5:00~17:00 時) に制御された動物室で、ポリカーボネート製ケージ (W26 cm×L42 cm×H17 cm、床敷使用) に 2~3 匹ずつ収容して行っている。

### 3. 投与方法、投与用量および群構成

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。

群構成は以下の表に示した。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. 検査項目および方法

#### 4-1) 一般状態、体重、摂餌量および被験物質摂取量

一般状態の観察は、毎日 1 回行なっている。体重測定は投与開始日、投与開始後 3 および 7 日、以後 3 ヶ月までは週 1 回行なった。今後、3~6 ヶ月は隔週、以後は 4 週に 1 回行う。摂餌量は体重測定日にケージ単位に、7 日分 (最初の 1 週間は 3 あるいは 4 日) の累積摂取量を測定し、計算により 1 日 1 匹当たりの摂餌量 (g/ラット/日) を求めている。また、被験物質摂取

量 (mg/kg/日) は、体重測定日ごとに、その日の平均体重、平均摂餌量および被験物質添加濃度より求めている。

#### 4-2) 血液学的検査および血液生化学的検査

1 年間の投与終了時に生存動物の全例について、一晚 (約 16 時間) 除餌を施した動物よりエーテル麻酔下で血液試料を眼窩静脈叢より採取し、以下の検査を実施する。また、投与期間中に切迫屠殺の必要が生じた個体についても可能な範囲で同様の検査を行う。

血液学的検査は、全血を用いて赤血球数 (RBC)、白血球数 (WBC)、ヘモグロビン量 (Hb)、ヘマトクリット値 (Ht)、血小板数 (Plt)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球色素量 (MCH)、平均赤血球色素濃度 (MCHC) を Sysmex K-4500 (シスメックス (株)) で測定する。また、ライト染色血液塗抹標本作製し、白血球百分比を MICROX HEG120A (オムロン (株)) にて観察する。

血液生化学的検査は、血清を用いて、総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、グルコース (Glc)、総コレステロール (T-Cho)、トリグリセリド (TG)、総ビリルビン (T-Bil)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRN)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AsT)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (AIT)、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチターゼ ( $\gamma$ -GTP)、アルカリホスファターゼ (AIP)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、クロール (Cl)、カルシウム (Ca) およびリン (P) の項目について自動分析装置 (日立製作所) で測定する。また、アルブミン/グロブリン比 (A/G) を TP と Alb の測定値から算出する。

#### 4-3) 尿検査

投与終了 1 週間前に 1 群雌雄各 10 匹以上の個体について半定量試験法 (ラブスティックス

R、バイエルメディカル株式会社) を用いて、潜血、ケトン体、ブドウ糖、PH を測定する。

#### 4-4) 剖検、臓器重量測定および病理組織学的検査

投与期間中に死亡あるいは切迫屠殺した個体を含む全個体について剖検を実施する。摘出臓器のうち、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣あるいは卵巣、および副腎については重量測定を行う (死亡動物を除く)。また、重量測定臓器に加え、下垂体、舌、眼球、唾液腺、甲状腺、胸骨、胸腺、骨髄 (大腿骨)、気管、大動脈、膵臓、食道、胃、小腸 (十二指腸、空腸、回腸)、大腸 (盲腸、結腸、直腸)、リンパ節 (腸間膜)、膀胱、大腿骨、骨格筋、脊髄、坐骨神経、精巣上体、精囊、前立腺および子宮は、病理組織学的検査に供するためにリン酸緩衝 10%ホルマリン液中で浸漬して固定保存する。

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

#### 4-5) 統計解析法

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

### C. 研究結果および考察

#### 1. F344/DuCrj ラットの供給を待って試験を、再開した理由

1) 報告者らは一連の既存添加物の毒性試験で、本系統のラットを一貫して用いており、背景データが豊富である。また、今回の試験の実施の根拠となった 90 日間反復投与毒性試験も同系等のラットを用いて実施されている。

2) F344/DuCrj ラットの供給再開には約9ヶ月程度を要するとの予測がなされた。一方、他の系統に変えて試験を行う場合にも、系統差を考慮した予備試験の実施とその結果に基づく試験計画書作成が新に必要であり、時間的な短縮は望めない。

3) 本系統は他のラットよりも摂餌量が少なく(SD系ラットなどの半分)、今回のように被験物質を大量に準備できない場合の試験に適している。

以上のことから、F344/DuCrj ラットの供給を待って、試験を再開した。

## 2. 被験物質

同一ロットの被験物質の入手に努力したが、必要量1.4kgを同一ロットで揃えることが出来なかった。入手した被験物質は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することにより、投与期間を通じて同じ成分の被験物質が摂取されるよう配慮した。

## 3. 投与開始3ヶ月後までの一般状態、体重、摂餌量および被験物質摂取量

### 3-1) 一般状態

いずれの群においても、死亡は認められず、一般状態にも変化は認められない。

### 3-2) 体重および摂餌量

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1、表1)。

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1、表1)。

### 3-2) 被験物質摂取量

用量に対応した被験物質摂取量が維持されている(表1)。

## D. 結語

ジャマイカカシヤ抽出物の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。現在13週を経過中であるが、一般状態、体重および摂餌量に変化は認められない。

## E. 健康危機管理

なし

## F. 研究発表

なし

## G. 知的財産の出願・登録状況

なし



図 1 体重および摂餌量

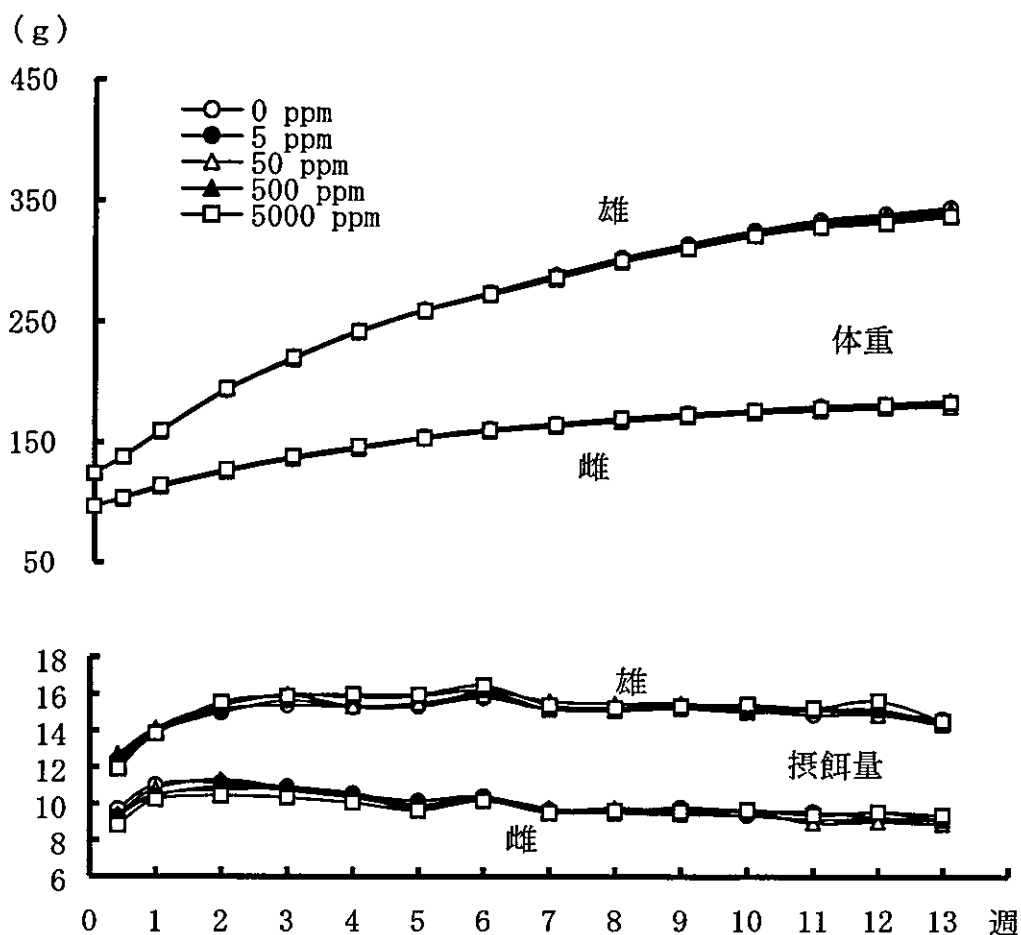


表 1 13週目までの平均被験物質摂取量

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