

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全性高度化推進研究事業

天然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 鰐淵 英機

平成 17 (2005) 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. プロポリスの発がん性等に関する研究 ----- 9
鰐渕 英機 (大阪市立大学大学院医学研究科 助教授)
2. キダチアロエの発がん性等に関する研究 ----- 13
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 ----- 17
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 ----- 24

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全性高度化推進研究事業)
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。

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。現在(試験開始後約 1 年)まで、最高用量投与群で、多少の体重増加抑制が見られるものの、一般状態は良好である。(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を開始した。キダチアロエ抽出物の投与用量は、発がん性試験では 4、0.8%および対照群、1 年間慢性毒性試験では、4、0.8、0.16% および対照群とした。雌雄とも最高用量投与群で、下痢や軟便が認められ、摂水量の増加と体重増加の抑制が認められるものの、現在(試験開始後 7 ヶ月)まで、一般状態は良好である。(今井田)
- 3) カテキンの混餌投与による慢性毒性/発がん性併合試験を開始した。カテキン投与用量は、 $3 \cdot 1.5 \cdot 0.75 \cdot 0.02\%$ および対照群に設定した。現在(試験開始後 10 ヶ月)まで、ラットの一般状態は良好で、カテキンによる影響は認めていない。(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 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、バッカリン、ドウ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、バッカリン、ドウ

ルパニン、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 Br1Han: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システムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度 24±2℃、湿度 60±10%、12 時間蛍光灯照明、12 時間消灯の条件下で行う。動物はプラスチックケージに 3 匹ずつ飼育し、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・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・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・血液学的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 Br1Han:WIST@Jc1 (GALAS) ラット雌雄各 190 匹ず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 匹ずつ、合計 300 匹を長期発がん性試験に、雌雄 40 匹ずつ合計 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±2℃、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 匹ずつ飼育し、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、ビリルビン、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 350 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 20 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 $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ・湿度 $50 \pm 10\%$ ・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、1.5、0.75% 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、バッカリン、ドウルパニン、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-クマル酸とドウ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。動物実験を開始し、現在 (約 1 年経過) のところ、最高用量 (2.5%) 投与群で体重増加抑制が多少見られるものの、一般状態は各群とも良好である。

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、試験を開始した。現在 (試験開始後 7 ヶ月) のところ、最高用量 (4%) 投与群で、雌雄とも下痢や軟便が認められ、摂水量の増加と、体重増加抑制が見られるものの、一般状態は良好に推移している。

3. カテキンの発がん性等に関する研究 (中江)

カテキンの投与量を 3・1.5・0.75・0.02% および対照群に設定し、試験を開始した。現在 (試験開始 10 ヶ月) まで、雌雄とも一般状態は良好で、カテキン投与による影響はみられていない。

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@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)

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。現在まで、カテキンによる影響は見られていない。(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、2.5%、0.5% に設定した。現在 (試験開始後 1 年) までに、プロポリスによる大きな影響は見られていない。(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した。現在 (試験開始後 7 ヶ月) では、高用量 (4%) 投与群では下痢、軟便を認めているが、一般状態は雌雄ラットとも良好である。(今井田)

3) カテキンの混餌投与による慢性毒性/発がん性併合試験を実施している。カテキン投与用量を $3 \cdot 1.5 \cdot 0.75 \cdot 0.02\%$ に設定した。現在 (10 ヶ月) まで、カテキンによる影響は雌雄ラットともに認めていない。(中江)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Okina, M., Yoshida, K., Kuroda, K., Wanibuchi, H., Fukushima, S. and Endo, G.: Determination of trivalent methylated arsenicals in rat urine by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry after solvent extraction. *J. Chromatography B*, 799, 209-215, 2004.

Morimura, K., Romanenko, A., Wei, M., Salim, E. I., Kinoshita, A., Wanibuchi, H., Voizanov, A. and

Fukushima, S.: Possible distinct molecular carcinogenic pathways for bladder cancer in Ukraine, before and after the Chernobyl disaster. *Oncology Reports*, 11, 881-886, 2004.

Hoshi, M., Wanibuchi, H., Salim, E. I., Morimura, L., Murai, T., Nomura, T., Takaoka, K. and Fukushima, S.: Carcinogenic potential of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *J. Toxicol. Pathol.*, 17, 17-23, 2004.

Mukohara, T., Kudoh, S., Matsuura, K., Yamauchi, S., Kimura, T., Yoshimura, N., Kanazawa, H., Hirata, K., Inoue, K., Wanibuchi, H., Fukushima, S. and Yoshikawa, J.: Activated akt expression has significant correlation with EGFR and TGF- α expressions in stage I NSCLC. *Anticancer Res.*, 24, 11-18, 2004.

Doi, K., Wanibuchi, H., Salim, E.I., Shen, J., Wei, M., Mitsunashi, M., Kudoh, S., Hirata, K. and Fukushima, S.: Revised rat multi-organ carcinogenesis bioassay for whole-body detection of chemopreventive agents: modifying potential of *S*-methylcysteine. *Cancer Lett.*, 206, 15-26, 2004.

Wei, M., Wanibuchi, H., Morimura, K., Salim, E.I., Moku, M., Doi, K., Mitsunashi, M., Masuda, C., Shen, J., Kinoshita, A. and Fukushima, S.: Lack of preventive efficacy of FK228, a histone deacetylase inhibitor, against *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in p53^{+/+} and p53^{+/+} mice. *Anticancer Res.*, 24, 785-790, 2004.

Fukushima, S., Wanibuchi, H., Morimura, K., Iwai, S., Nakae, D., Kishida, H., Tsuda, H., Uehara, N., Imaida, K., Shirai, T., Tatematsu, M., Tsukamoto, T., Hirose, M. and Furukawa, F.: 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.*, 80, 109-114, 2004.

Wanibuchi, H., Salim, E. I., Kinoshita, A., Shen, J., Wei, M., Morimura, K., Yoshida, K., Kuroda, K., Endo, G. and Fukushima, S.: Understanding arsenic carcinogenicity by the use of animal models. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198, 366-376, 2004.

Kuroda, K., Yoshida, K., Yoshimura, M., Endo, Y., Wanibuchi, H., Fukushima, S. and Endo G.: Microbial metabolite of dimethylarsinic acid is highly toxic and genotoxic. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198, 345-353, 2004.

- Shen, J., Wanibuchi, H., Salim, E. I., Wei M., Yamachika, T. and Fukushima, S.: Inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats due to JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 5, 253-258, 2004.
- Hoshi, M., Morimura, K., Wanibuchi, H., Wei, M., Okochi, E., Ushijima, T., Takaoka, K. and Fukushima, S.: No-observed effect levels for carcinogenicity and for *in vivo* mutagenicity of a genotoxic carcinogen. *Toxicol. Sci.*, 81, 273-279, 2004.
- Mitsuhashi, M., Morimura, K., Wanibuchi, H., Hayashi, S., Kiyota, A., Wada, S., Nakatani, T. and Fukushima, S.: Di-n-butyl phthalate is toxic to the male reproductive system and its toxicity is enhanced by thioacetamide induced liver injury. *J. Toxicol. Pathol.*, 17, 177-185, 2004.
- Mitsuhashi, M., Morimura, K., Wanibuchi, H., Kiyota, A., Wada, S., Nakatani, T. and Fukushima, S.: Examination of the rat model of liver injury via thioacetamide (TAA) or cebron tetrachloride (CCl₄). *J. Toxicol. Pathol.*, 17, 219-222, 2004.
- Wanibuchi, H. and Fukushima, S.: Analysis of arsenic carcinogenicity-using animal models. *J. Toxicol. Sci.*, 29, 276, 2004.
- Ichihara, T., Wanibuchi, H., Totsuka, Y., Morimura, K., Wei, M., Nakae, D. and Fukushima, S.: Induction of DNA-adducts and increase of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, but no development of preneoplastic lesions in offspring liver with transplacental and trans-breast milk exposure to 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) in rats. *Cancer Sci.*, 95, 943-948, 2004.
- Kakuni, M., Senoh, H., Morimura, K., Wanibuchi, H., Takaba, K., Nagano, K. and Fukushima, S.: Absence of β -catenin mutations in mouse hepatoblastomas induced by *N, N*-dimethylformamide. *J. Toxicol. Pathol.*, 17, 261-265, 2004.
- Wei, M., Morimura, K., Wanibuchi, H., Shen, J., Salim, E. I., Moku, M., Hakoi, K. and Fukushima, S.: JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, inhibits induction but not growth and invasion of 1,2-dimethylhydrazine-induced tubular adenocarcinomas of colon in rats. *Int. J. Cancer*, 113, 354-358, 2005.
- Kuroda, K., Yoshida, K., Yoshimura, M., Endo, Y., Wanibuchi, H., Fukushima, S. and Endo, G.: Genotoxicity of dimethylarsinous acid: high induction of tetraploids. *Appl. Organometal. Chem.*, 19, 221-225, 2005.
- Fukushima, S., Wanibuchi, H., Morimura, K., Iwai, S., Nakae, D., Kishida, H., Tsuda, N., Uehara, H., Imaida, K., Shirai, T., Tatematsu, M., Tsukamoto, T., Hirose, M., Furukawa, F. 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.*, 80, 109-114, 2004.
- Inaguma, S., Takahashi, S., Imaida, K., Suzuki, S., Shirai T. p-Nonylphenol pretreatment during the late neonatal period has no effect on 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced prostate carcinogenesis in male F344 rats. *Cancer Lett.*, 212, 159-166, 2004.
- Orita, S., Hirose, M., Takahashi, S., Imaida, K., Ito, N., Shudo, K., Ohigashi, H., Murakami, A., Shirai, T. Modifying effects of 1'-acetoxychavicol acetate ACA and the novel synthetic retinoids Re-80, Am-580 and Am55P in a two-stage carcinogenesis model in female rats. *Toxicol. Pathol.*, 32, 250-257, 2004.
- Li, J.Q., Wu, F., Masaki, T., Kubo, A., Fujita, J., Dixon, D.A., Beauchamp, .RD., Ishida, T., Kuriyama, S., Imaida, K. Correlation of Skp2 with carcinogenesis, invasion, metastasis, and prognosis in colorectal tumors. *Int. J. Oncol.*, 25, 87-95, 2004.
- J.Q. Li, K. Imaida. Roles of immunohistochemical expression of cyclin A and cyclin-dependent kinase 2 in colorectal tumors. *Handbook of immunohistochemistry and in situ hybridization of human carcinomas, Vol. 2: Molecular pathology, colorectal carcinoma, and prostate carcinoma.* pp. 207-214, ed. Hayat, M.A., 2005, Elsevier Academic Press, London
- Shirai T, Kawabe M, Ichihara T, Fujiwara O, Taki M, Watanabe S, Wake K, Yamanaka Y, Imaida K, Asamoto M, Tamano S. Chronic exposure to a 1.439 GHz electromagnetic field used for cellular phones does not promote N-ethylnitrosourea induced central nervous system tumors in F344 rats. *Bioelectromagnetics.* 26: 59-68, 2005.
- Ichihara T, Miyashita K, Kawabe M, Imaida K, Asamoto M, Ogiso T, Tamano S, Hirose M, Shirai T. Lack of combination hepatocarcinogenicity of harman, norharman and amitrole when given with NaNO₂ in the rat. *Journal of Toxicological Sciences*, 30: 1-6, 2005.
- Zeng Y, Yokohira M, Saoo K, Takeuchi H, Chen Y, Yamakawa K, Matsuda Y, Kakehi Y, Imaida K. Inhibition of prostate carcinogenesis in probasin/SV40 T antigen transgenic rats by raloxifene, an antiestrogen with anti-androgen action, but not nimesulide, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor.

Carcinogenesis. 2005 in press.

Zeng Y, Saoo K, Yokohira M, Takeuchi H, Yamakawa K, Matsuda Y, J.Q. Li, Imaida K. Dietary D-psicose, a rare sugar, does not show any modifying effects in a medium-term liver carcinogenesis bioassay in F344 male rat. *J. Toxicol. Pathol.*, 2005, in press.

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.

Nakae D, Uematsu F, Kishida H, Kusuoka O, Katsuda S, Yoshida M, Takahashi M, Maekawa A, Denda A, Konishi Y, Kotake Y and Floyd RA, Inhibition of the development of hepatocellular carcinomas by phenyl *N-tert*-butyl nitron in rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. *Cancer Lett*, 2004, 206, 1-13.

Takahashi M, Shimomoto T, Miyajima K, Yoshida M, Katashima S, Uematsu F, Maekawa A and Nakae D, Effects of estrogens and metabolites on endometrial carcinogenesis in young adult mice initiated with *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine. *Cancer Lett*, 2004, 211, 1-9.

Yoshida M, Katashima S, Ando J, Tanaka T, Uematsu F, Nakae D and Maekawa A, Dietary indole-3-carbinol promotes endometrial adenocarcinoma development in rats initiated with *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, with induction of cytochrome P450s in the liver and consequent modulation of estrogen metabolism. *Carcinogenesis*, 2004, 25, 2257-2264.

Katsuda S, Yoshida M, Saarinen N, Smeds A, Nakae D, Santti R and Maekawa A, Chemopreventive effects of hydroxymatairesinol on uterine carcinogenesis in Donryu rats. *Exp Biol Med*, 2004, 229, 417-424.

Uematsu F, Yoshida M, Takahashi M, Abe M, Igarashi M, Watanabe N, Suzuki N, Maekawa A and Nakae D, *a*-Naphthylisothiocyanate induces intrahepatic bile duct with greater proliferation in female rats than in males. *J Toxicol Pathol*, 2004, 17, 205-210.

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. *Toxicol Pathol*, 2004, 32, 264-268.

2. 学会発表

Wanibuchi, H., Morimura, K. and Fukushima, S.: Risk assessment of low dose carcinogenesis by genotoxic

carcinogens. Symposium, JSTP/ISTP (IATP) 2004, Feb. 15-18, International Conference Center Kobe, 2004

鰐淵英機：発がん物質の閾値—中期発がん検索法による解析—。シンポジウム講演，第 77 回日本産業衛生学会，4 月 13-16 日，名古屋，2004

鰐淵英機：膀胱癌の病理。シンポジウム講演，日本病理学会近畿支部総会および第 25 回学術集会，5 月 29 日，大阪，2004

鰐淵英機、福島昭治：砒素の発がん機序の解明—動物モデルを用いた解析—。シンポジウム講演，第 31 回日本トキシコロジー学会学術年会，7 月 6-8 日，大阪，2004

鰐淵英機、福島昭治：にんにく等に含まれる有機イオウ化合物によるがん予防。シンポジウム講演，第 11 回日本がん予防研究会，7 月 15-16 日，東京，2004

Wanibuchi, H.: Modifying effect of essential amino acids in chemical carcinogenesis. The Fourth Workshop on the Assessment of Adequate Intake of Dietary Amino Acids, October 28-29, Kobe, Japan, 2004

鰐淵英機：発がん試験における低用量域での反応。教育セミナー講演，第 5 回日本毒性病理学会教育セミナー，11 月 25 日，名古屋，2004

鰐淵英機：ヒト発がん物質である砒素の発癌秩序の解明—動物モデルを用いた実験病理学的解析—。第 50 回日本病理学会秋期特別総会，12 月 2-3 日，名古屋，2004

鰐淵英機、木下アンナ、森村圭一朗、柚木孝之、村井 隆、福島昭治：無機ヒ素代謝産物である MMA、DMA、TMAO の肝発がん促進作用の分子生物学的解析。第 93 回日本病理学会，6 月 9-11 日，札幌，2004

鰐淵英機、木下アンナ、魏 民、サリムエリサイド、柚木孝之、森村圭一朗、福島昭治：有機ヒ素化合物の MMA、DMA、TMAO の肝発がん促進作用の分子生物学的解析。第 63 回日本癌学会学術総会，9 月 29-10 月 1 日，福岡，2004

鰐淵英機、木下アンナ、魏 民、萩原淳司、柚木孝之、福島昭治：有機ヒ素化合物の MMA、DMA、TMAO の肝発がん促進作用の分子病理学的解析。

第21回日本毒性病理学会, 1月20-21日, 東京, 2005

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)

白川 敦子、吉野 正、市村 浩一、佐藤 由美子、大森 正樹、今井田 克己 Intravascular large B-cell lymphoma, Asian variant の2例、第93回日本病理学会総会、2004. 6. 11 札幌

鎌滝哲也、藤枝正輝、今井田克己、「チトクローム P450 の遺伝的多型と喫煙者における発がんリスク」応用薬理学会 シンポジウム 新潟薬科大学 2004. 8 新潟

今井田克己、竹内聖、竿尾光祐、宮崎雅史、鎌滝哲也、「発がん機構に基づいたがん予防戦略」 「CYP2A6 阻害物質による肺発がん抑制作用」 2004. 9. 29 日本癌学会総会 シンポジウム 福岡

鎌滝哲也、藤枝正輝、今井田克己、「CYP2A6 の遺伝子多型と喫煙による肺がんリスク：肺がん予防を目指して」 2004. 10. 25, 26 日本肺癌学会総会 横浜

今井田克己、「いわゆる'健康食品'を含む健康食品をめぐる」「機能性食品の安全性評価に関する基本的な考え方」 2004. 11. 2 日本食品化学学会 シンポジウム 大阪

横平政直、竹内聖、山川けいこ、竿尾光祐、松田陽子、曾于、塩岡忠夫、今井田克己、「ラット肝中期発癌性試験法(伊東法)を用いた各種 COX 阻害剤による肝発癌の修飾作用」 2004. 9. 29 日

本癌学会総会 福岡

竹内聖、竿尾光祐、松田陽子、横平政直、山川けいこ、曾于、高橋真美、若林敬二、今井田克己、「MeIQx および高脂肪食によるマウス肺発がん性の検討」 2004. 9. 29 日本癌学会総会 福岡

竿尾光祐、竹内聖、松田陽子、横平政直、山川けいこ、曾于、鎌滝哲也、今井田克己、「ヒト肺癌組織における CYP2A の発現」 2004. 9. 30 日本癌学会総会 福岡

山川けいこ、竿尾光祐、竹内聖、松田陽子、横平政直、曾于、宮崎雅史、鎌滝哲也、今井田克己、「Methoxsalen 混餌投与による NNK 誘発 A/J マウス肺発癌の抑制効果と肺腫瘍の CYP2A 発現」 2004. 10. 1 日本癌学会総会 福岡

松田陽子、竿尾光祐、竹内聖、横平政直、山川けいこ、曾于、宮崎雅史、鎌滝哲也、今井田克己、「Methoxsalen による NNK 誘発 A/J マウス肺発がん抑制効果の用量相関性」 2004. 10. 1 日本癌学会総会 福岡
PhIP を中心とした Heterocyclic amines による多臓器毒性：シンポジウム 2

今井田克己「多臓器毒性を病理する」第21回日本毒性病理学会、浜松、2005. 1. 21

曾于、竿尾光祐、松田陽子、横平政直、今井田克己、Modifying potential of dietary D-psicose, a rare sugar, in a medium-term liver carcinogenesis bioassay. 第21回日本毒性病理学会、浜松、2005. 1. 21

横平政直、竿尾光祐、松田陽子、竹内聖、曾于、今井田克己、経気管内各種微粒量子の肺に対する毒性評価、第21回日本毒性病理学会、浜松、2005. 1. 21

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, Uematsu F, Hatanaka Y, Konishi Y, Maekawa A, Takahashi M and Yoshida M. Altered expression of gene products involved as a complex in

the endogenous hepatocarcinogenesis of rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. 23rd Annual Meeting of the Society of Toxicologic Pathology (Salt Lake City, 2004).

Nakae D, Uematsu F, Hatanaka Y, Konishi Y, Floyd RA and Kotake Y. Altered expression of gene products and aberrant signal transduction profiles in the liver of rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet, a model for non-alcoholic fatty liver disease. 3rd JSH Single Topic Conference (Kochi, 2004).

中江 大, 高橋 正一, 吉田 緑, 植松 史行, 阿部 正義. ラットにおけるコリン欠乏アミノ酸食による肝発がん高リスク環境の誘導. 第9回日本フードファクター学会 (東浦, 2004).

中江 大, 植松 史行, 畑中 豊, 五十嵐 麻希,

谷 洋一, 阿部 正義, 小西 陽一, 前川 昭彦, 高橋 正一, 吉田 緑. コリン欠乏アミノ酸食によるラット内因性肝発がん早期におけるサイトカイン関連因子動態の変化とその意義. 第63回日本癌学会学術総会 (福岡, 2004).

中江 大, 吉田 緑, 前川 昭彦. 肺腺がんに対する化学予防効果の評価のためのラットモデルの作成. 第93回日本病理学会総会 (札幌, 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

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全性高度化推進研究事業)
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 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。品質性の保証された標準検体の入手し、BrlHan: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。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 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。現在 (試験開始後 1 年) まで、プロポリス高用量 (2.5%) 群で多少の体重増加抑制が見られるものの、一般状態は良好である。

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 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、バッカリン、ドウ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、バッカリン、ドウルパニンは、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@Jcl(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システムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度 24±2°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。動物はプラスチックケージに 3 匹ずつ飼育し、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・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・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、ヘマトキシリン/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・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・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、バックリン、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。動物実験は現在ではほぼ 1 年が経過するが、プロポリス高用量 (2.5%) 群で多少の体重増加抑制が見られるものの、一般状態は良好に推移している。

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: Br1Han: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、2.5%、0.5% 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。現在 (試験経過後 1 年) まで、最高用量 (2.5%) 投与群で多少の体重増加抑制がみられるのみで、プロポリスの影響はあまり認められていない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Okina, M., Yoshida, K., Kuroda, K., Wanibuchi, H., Fukushima, S. and Endo, G.: Determination of trivalent methylated arsenicals in rat urine by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry after solvent extraction. *J. Chromatography B*, 799, 209-215, 2004.

Morimura, K., Romanenko, A., Wei, M., Salim, E. I., Kinoshita, A., Wanibuchi, H., Voizianov, A. and Fukushima, S.: Possible distinct molecular carcinogenic pathways for bladder cancer in Ukraine, before and after the Chernobyl disaster. *Oncology Reports*, 11, 881-886, 2004.

Hoshi, M., Wanibuchi, H., Salim, E. I., Morimura, L., Murai, T., Nomura, T., Takaoka, K. and Fukushima, S.: Carcinogenic potential of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ) in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *J. Toxicol. Pathol.*, 17, 17-23, 2004.

Mukohara, T., Kudoh, S., Matsuura, K., Yamauchi, S., Kimura, T., Yoshimura, N., Kanazawa, H., Hirata, K., Inoue, K., Wanibuchi, H., Fukushima, S. and Yoshikawa, J.: Activated akt expression has significant correlation with EGFR and TGF- α expressions in stage I NSCLC. *Anticancer Res.*, 24, 11-18, 2004.

Doi, K., Wanibuchi, H., Salim, E.I., Shen, J., Wei, M., Mitsuhashi, M., Kudoh, S., Hirata, K. and Fukushima, S.: Revised rat multi-organ carcinogenesis bioassay for whole-body detection of chemopreventive agents: modifying potential of *S*-methylcysteine. *Cancer Lett.*, 206, 15-26, 2004.

Wei, M., Wanibuchi, H., Morimura, K., Salim, E.I., Moku, M., Doi, K., Mitsuhashi, M., Masuda, C., Shen, J., Kinoshita, A. and Fukushima, S.: Lack of preventive efficacy of FK228, a histone deacetylase inhibitor, against *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in p53^{+/-} and p53^{+/+} mice. *Anticancer Res.*, 24, 785-790, 2004.

Fukushima, S., Wanibuchi, H., Morimura, K., Iwai, S., Nakae, D., Kishida, H., Tsuda, H., Uehara, N., Imaida, K., Shirai, T., Tatematsu, M., Tsukamoto, T., Hirose, M. and Furukawa, F.: 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.*, 80, 109-114, 2004.

Wanibuchi, H., Salim, E. I., Kinoshita, A., Shen, J., Wei, M., Morimura, K., Yoshida, K., Kuroda, K., Endo, G. and Fukushima, S.: Understanding arsenic carcinogenicity by the use of animal models. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198, 366-376, 2004.

Kuroda, K., Yoshida, K., Yoshimura, M., Endo, Y., Wanibuchi, H., Fukushima, S. and Endo G.: Microbial metabolite of dimethylarsinic acid is highly toxic and genotoxic. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198, 345-353, 2004.

Shen, J., Wanibuchi, H., Salim, E. I., Wei M., Yamachika, T. and Fukushima, S.: Inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats due to JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 5, 253-258, 2004.

Hoshi, M., Morimura, K., Wanibuchi, H., Wei, M., Okochi, E., Ushijima, T., Takaoka, K. and Fukushima, S.: No-observed effect levels for carcinogenicity and for *in vivo* mutagenicity of a genotoxic carcinogen. *Toxicol. Sci.*, 81, 273-279, 2004.

Mitsuhashi, M., Morimura, K., Wanibuchi, H., Hayashi, S., Kiyota, A., Wada, S., Nakatani, T. and Fukushima, S.: Di-*n*-butyl phthalate is toxic to the male reproductive system and its toxicity is enhanced by thioacetamide induced liver injury. *J. Toxicol. Pathol.*, 17, 177-185, 2004.

Mitsuhashi, M., Morimura, K., Wanibuchi, H., Kiyota, A., Wada, S., Nakatani, T. and Fukushima, S.: Examination of the rat model of liver injury via thioacetamide (TAA) or carbon tetrachloride (CCl₄). *J. Toxicol. Pathol.*, 17, 219-222, 2004.

Wanibuchi, H. and Fukushima, S.: Analysis of arsenic carcinogenicity-using animal models. *J. Toxicol. Sci.*, 29, 276, 2004.

Ichihara, T., Wanibuchi, H., Totsuka, Y., Morimura, K., Wei, M., Nakae, D. and Fukushima, S.: Induction of DNA-adducts and increase of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, but no development of preneoplastic lesions in offspring liver with transplacental and trans-breast milk exposure to 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx) in rats. *Cancer Sci.*, 95, 943-948, 2004.

Kakuni, M., Senoh, H., Morimura, K., Wanibuchi, H., Takaba, K., Nagano, K. and Fukushima, S.: Absence of β -*catenin* mutations in mouse hepatoblastomas

induced by *N, N*-dimethylformamide. *J. Toxicol. Pathol.*, 17, 261-265, 2004.

Wei, M., Morimura, K., Wanibuchi, H., Shen, J., Salim, E. I., Moku, M., Hakoi, K. and Fukushima, S.: JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, inhibits induction but not growth and invasion of 1,2-dimethylhydrazine-induced tubular adenocarcinomas of colon in rats. *Int. J. Cancer*, 113, 354-358, 2005.

Kuroda, K., Yoshida, K., Yoshimura, M., Endo, Y., Wanibuchi, H., Fukushima, S. and Endo, G.: Genotoxicity of dimethylarsinous acid: high induction of tetraploids. *Appl. Organometal. Chem.*, 19, 221-225, 2005.

2. 学会発表

Wanibuchi, H., Morimura, K. and Fukushima, S.: Risk assessment of low dose carcinogenesis by genotoxic carcinogens. Symposium, JSTP/ISTP (IATP) 2004, Feb. 15-18, International Conference Center Kobe, 2004

鰐淵英機：発がん物質の閾値－中期発がん検索法による解析－. シンポジウム講演, 第 77 回日本産業衛生学会, 4 月 13-16 日, 名古屋, 2004

鰐淵英機：膀胱癌の病理. シンポジウム講演, 日本病理学会近畿支部総会および第 25 回学術集会, 5 月 29 日, 大阪, 2004

鰐淵英機、福島昭治：砒素の発がん機序の解明－動物モデルを用いた解析－. シンポジウム講演, 第 31 回日本トキシコロジー学会学術年会, 7 月 6-8 日, 大阪, 2004

鰐淵英機、福島昭治：にんにく等に含まれる有機イオウ化合物によるがん予防. シンポジウム講演, 第 11 回日本がん予防研究会, 7 月 15-16 日, 東京, 2004

Wanibuchi, H.: Modifying effect of essential amino

acids in chemical carcinogenesis. The Fourth Workshop on the Assessment of Adequate Intake of Dietary Amino Acids, October 28-29, Kobe, Japan, 2004

鰐淵英機：発がん試験における低用量域での反応. 教育セミナー講演, 第 5 回日本毒性病理学会教育セミナー, 11 月 25 日, 名古屋, 2004

鰐淵英機：ヒト発がん物質である砒素の発癌秩序の解明－動物モデルを用いた実験病理学的解析－. 第 50 回日本病理学会秋期特別総会, 12 月 2-3 日, 名古屋, 2004

鰐淵英機、木下アンナ、森村圭一郎、柚木孝之、村井 隆、福島昭治：無機ヒ素代謝産物である MMA、DMA、TMAO の肝発がん促進作用の分子生物学的解析. 第 93 回日本病理学会, 6 月 9-11 日, 札幌, 2004

鰐淵英機、木下アンナ、魏 民、サリムエリサイド、柚木孝之、森村圭一郎、福島昭治：有機ヒ素化合物の MMA、DMA、TMAO の肝発がん促進作用の分子生物学的解析. 第 63 回日本癌学会学術総会, 9 月 29-10 月 1 日, 福岡, 2004

鰐淵英機、木下アンナ、魏 民、萩原淳司、柚木孝之、福島昭治：有機ヒ素化合物の MMA、DMA、TMAO の肝発がん促進作用の分子病理学的解析. 第 21 回日本毒性病理学会, 1 月 20-21 日, 東京, 2005

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（食品の安全性高度化推進研究事業）
分担研究報告書

キダチアロエの発がん性等に関する研究
分担研究者 今井田克己 香川大学医学部腫瘍病理学教授

研究要旨： 科学的な安全性評価の確立していない天然添加物のうち、変異原性が擬陽性以上で、90日間反復投与毒性試験等の終了した品目の中から、キダチアロエに関して食品添加物としての安全性を評価することとし、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、現在動物実験は順調に進行中である。

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、科学的な長期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ている。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 $60\pm 10\%$ 、12時間蛍光灯照明、12時間消灯の条件下で行っている。動物は全て網ケージに3-5匹づつ飼育し、飲料水として、水道水を自由摂取させている。動物実験は平成16年8月に開始し、現在約7ヶ月を経過している。

<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%の用量に設定して長期試験を開始した。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飼料を摂取させている。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、試験に供している。

<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っている。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回測定し、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回測定している。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、ビリルビン、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。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が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、平成16年8月より試験を開始し、雌雄とも4%キダチアロエ投与群で下痢や軟便が認められ、同群でそれに伴う摂水量の増加と、体重増加の抑制が認められているものの、動物の一般状態は良好で試験は順調に進行している。なお、下痢あるいは軟便の状況は雌より雄の方が強い症状となっている。

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。現在、約7ヵ月を経過しているが、最高用量に設定した4%のキダチアロエでは、推測された現象であるものの、この下痢などに関する感受性に関しては、今回用いた Wistar-Hanover と F344 あるいは SD ラット等との系統差もあるも

のと考えられる。

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した。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、現在約7ヵ月を経過しているが、最高用量群の4%投与群で雌雄とも下痢や軟便になっているものの、一般状態に異常はなく、順調に推移している。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Fukushima, S., Wanibuchi, H., Morimura, K., Iwai, S., Nakae, D., Kishida, H., Tsuda, N., Uehara, H., Imaida, K., Shirai, T., Tatematsu, M., Tsukamoto, T., Hirose, M., Furukawa, F. 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.*, 80, 109-114, 2004.

Inaguma, S., Takahashi, S., Imaida, K., Suzuki, S., Shirai T. p-Nonylphenol pretreatment during the late neonatal period has no effect on 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced prostate carcinogenesis in male F344 rats. *Cancer Lett.*, 212, 159-166, 2004.

Orita, S., Hirose, M., Takahashi, S., Imaida, K., Ito, N., Shudo, K., Ohgashi, H., Murakami, A., Shirai, T. Modifying effects of 1'-acetoxychavicol acetate ACA and the novel synthetic retinoids Re-80, Am-580 and Am55P in a two-stage carcinogenesis model in female rats. *Toxicol. Pathol.*, 32, 250-257, 2004.

Li, J.Q., Wu, F., Masaki, T., Kubo, A., Fujita, J., Dixon, D.A., Beauchamp, R.D., Ishida, T., Kuriyama, S., Imaida, K. Correlation of Skp2 with carcinogenesis, invasion, metastasis, and prognosis in colorectal tumors. *Int. J. Oncol.*, 25, 87-95, 2004.

J.Q. Li, K. Imaida. Roles of immunohistochemical expression of cyclin A and cyclin-dependent kinase 2 in colorectal tumors. *Handbook of immunohistochemistry and in situ hybridization of human carcinomas, Vol. 2: Molecular pathology, colorectal carcinoma, and prostate carcinoma.* pp. 207-214, ed. Hayat, M.A., 2005,

Elsevier Academic Press, London

Shirai T, Kawabe M, Ichihara T, Fujiwara O, Taki M, Watanabe S, Wake K, Yamanaka Y, Imaida K, Asamoto M, Tamano S. Chronic exposure to a 1.439 GHz electromagnetic field used for cellular phones does not promote N-ethylnitrosourea induced central nervous system tumors in F344 rats. *Bioelectromagnetics*. 26: 59-68, 2005.

Ichihara T, Miyashita K, Kawabe M, Imaida K, Asamoto M, Ogiso T, Tamano S, Hirose M, Shirai T. Lack of combination hepatocarcinogenicity of harman, norharman and amitrole when given with NaNO₂ in the rat. *Journal of Toxicological Sciences*, 30: 1-6, 2005.

Zeng Y, Yokohira M, Saoo K, Takeuchi H, Chen Y, Yamakawa K, Matsuda Y, Kakehi Y, Imaida K. Inhibition of prostate carcinogenesis in probasin/SV40 T antigen transgenic rats by raloxifene, an antiestrogen with anti-androgen action, but not nimesulide, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Carcinogenesis*. 2005 in press.

Zeng Y, Saoo K, Yokohira M, Takeuchi H, Yamakawa K, Matsuda Y, J.Q. Li, Imaida K. Dietary D-psicose, a rare sugar, does not show any modifying effects in a medium-term liver carcinogenesis bioassay in F344 male rat. *J. Toxicol. Pathol.*, 2005, in press.

2. 学会発表

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)

白川 敦子、吉野 正、市村 浩一、佐藤 由美子、大森 正樹、今井田 克己 Intravascular large B-

cell lymphoma, Asian variant の2例、第93回日本病理学会総会、2004.6.11 札幌

鎌滝哲也、藤枝正輝、今井田克己、「チトクローム P450 の遺伝的多型と喫煙者における発がんリスク」応用薬理学会 シンポジウム 新潟薬科大学 2004.8 新潟

今井田克己、竹内聖、竿尾光祐、宮崎雅史、鎌滝哲也、「発がん機構に基づいたがん予防戦略」 「CYP2A6 阻害物質による肺発がん抑制作用」 2004.9.29 日本癌学会総会 シンポジウム 福岡

鎌滝哲也、藤枝正輝、今井田克己、「CYP2A6 の遺伝子多型と喫煙による肺がんリスク：肺がん予防を目指して」 2004.10.25,26 日本肺癌学会総会 横浜

今井田克己、「いわゆる'健康食品'を含む健康食品をめぐる」「機能性食品の安全性評価に関する基本的な考え方」 2004.11.2 日本食品化学学会 シンポジウム 大阪

横平政直、竹内聖、山川けいこ、竿尾光祐、松田陽子、曾于、塩岡忠夫、今井田克己、「ラット肝中期発癌性試験法(伊東法)を用いた各種 COX 阻害剤による肝発癌の修飾作用」 2004.9.29 日本癌学会総会 福岡

竹内聖、竿尾光祐、松田陽子、横平政直、山川けいこ、曾于、高橋真美、若林敬二、今井田克己、「MeIQx および高脂肪食によるマウス肺発がん性の検討」 2004.9.29 日本癌学会総会 福岡

竿尾光祐、竹内聖、松田陽子、横平政直、山川けいこ、曾于、鎌滝哲也、今井田克己、「ヒト肺癌組織における CYP2A の発現」 2004.9.30 日本癌学会総会 福岡

山川けいこ、竿尾光祐、竹内聖、松田陽子、横平政直、曾于、宮崎雅史、鎌滝哲也、今井田克己、「Methoxsalen 混餌投与による NNK 誘発 A/J マウス肺発癌の抑制効果と肺腫瘍の CYP2A 発現」 2004.10.1 日本癌学会総会 福岡

松田陽子、竿尾光祐、竹内聖、横平政直、山川けいこ、曾于、宮崎雅史、鎌滝哲也、今井田克己、「Methoxsalen による NNK 誘発 A/J マウス肺発がん抑制効果の用量相関性」 2004.10.1 日本癌学会総会 福岡

PhIPを中心としたHeterocyclic aminesによる多臓器毒性：シンポジウム2

今井田克己「多臓器毒性を病理する」第21回日本毒性病理学会、浜松、2005.1.21

曾宇、竿尾光祐、松田陽子、横平政直、今井田克己、Modifying potential of dietary D-psicose, a rare sugar, in a medium-term liver carcinogenesis bioassay. 第21回日本毒性病理学会、浜松、2005.1.21

横平政直、竿尾光祐、松田陽子、竹内聖、曾宇、今井田克己、経気管内各種微粒量子の肺に対する毒性評価、第21回日本毒性病理学会、浜松、2005.1.21

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(食品の安全性高度化推進研究事業)
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 佐々木研究所病理部部長

研究要旨：本研究は、食品添加物として使用されている天然化学物質であるカテキンの安全性評価の一環として、動物にほぼ一生にわたり種々の用量でカテキンを摂取させた場合の慢性毒性および発がん性の発現の有無を検索することを目的とし、ラットを用いた混餌投与による慢性毒性・発がん性併合試験を実施している。

本試験は、平成 17 年 3 月現在において試験開始後 10 ヶ月目を迎えた段階であるが、現在までのところ、雌雄いずれの投与群にも、カテキンの投与に関連する一般状態ないし体重の変化を認めていない。ただし、摂餌量については、カテキンを最高用量である 3.0%で投与した群の雌雄において、対照群に比べて有意な増加を断続的に観察した。この現象は、この群の体重に影響が認められていないことから、カテキンの直接的な影響でなく、高用量カテキンにより飼料中の単位重量(g)当たりの栄養・カロリーなどが他群に比較して不足したこと起因する動物の代償的行動であり、摂餌量増加によってそれらの補充を図ったものと考察された。したがって、10 ヶ月間の投与時点におけるカテキンによる影響は、雌雄共に観察されないものと結論した。

A. 研究目的

カテキンは、ツバキ科チャの茎および葉、マメ科ペダアセンヤクの幹枝、アカネ科ガンビル科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。カテキンと総称される中に含まれ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・エピカテキンガレートなどが挙げられる。食品添加物としてのカテキンは、主として酸化防止剤として、水産加工品・食肉加工品・菓子類・油脂・清涼飲料水などに使用されている。なお、カテキンの生物に及ぼす影響としては、抗酸化作用のほかに、発がん抑制作用をはじめとするさまざまな作用が報告されている。

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既に実施されている。変異原性試験では、Ames 試験において陽性、ハムスター培養細胞を用いた染色体異常試験において弱い陽性、マウス小核試験において陰性の結果が得られている。ラット 90 日間反復投与毒性試験では、1.25%以上の用量で投与した群の雌雄に、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、この物質が長期にわたってヒトに摂取されている現実を考慮すると、カテキンの安全性は、さらに長期間にわたって動物に投与した場合の毒性・発がん性に関する情報を得た上で、総合的に評価する必要があるものと指摘されている。

以上の背景より、本研究は、カテキンの安全性評価の一環として、動物にほぼ一生にわたり種々の用量でカテキンを摂取させた場合の慢性毒性および発がん性の発現の有無を検索することを目的とし、ラットを用いた混餌投与による慢性毒性・発がん性併合試験を実施している。本試験は、平成 18 年 5 月に 24 ヶ月の動物飼育を終える予定であり、平成 17 年 3 月現在、なお動物飼育が進行中である。したがって、本報告書においては、本試験の現在までの途中経過について記載する。

B. 試験方法

1. 被験物質

被験物質は、太陽化学株式会社より供与された緑茶カテキン（サンフェノン 100S）を用いた。

2. 動物および飼育条件

動物は、BrlHan:WIST@Jcl (GALAS) ラット (日本クレア株式会社) 雌雄各 300 匹を 5 週齢にて入手し、約 1 週間の検疫・馴化期間の後、6 週齢にて試験に供した。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 匹とし、24 ヶ月間発がん性試験について 1 群当たり雌雄各 50 匹とした。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った。

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中である。室内の環境条件は、温度 25 ± 5°C・湿度 50 ± 10%・換気回数 12 回/時・照明 12 時間/日である。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 回交換している。飲料水は、水道水を自由摂取させている。

3. 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混餌投与によるラット 90 日間反復投与毒性試験の結果に基づき、0.3・1.0・3.0%を設定した。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%を最低用量として追加設定した。

4. 被験物質の調製および投与

本試験においては、破碎した基礎飼料 CRF-1(オリエンタル酵母)に指定濃度のカテキンを混じて再固形化した飼料を作成して動物に投与している。なお、対照群には、同様の方法で破碎・再固形化した CRF-1 を投与している。これらの飼料は、動物に自由摂取させている。また、カテキンが飼料調製時の熱処理行程を経ても安定であることは、実際の飼料調製に先立って確認した。

5. 調整飼料中における被験物質の濃度および安定性

調整飼料中におけるカテキンの濃度および保存による安定性については、飼料のロット毎に検索している。

6. 動物実験における検索項目

進行中の動物実験において、平成 17 年 3 月現在までに実施した検索項目は、一般状態・体重・摂餌量であった。これらの検索は、全動物を対象として行った。一般状態は毎日観察し、体重および摂餌量は投与開始後 3 ヶ月間について週 1 回、その後について月 1 回測定した。

C. 試験結果

1. 調整飼料中におけるカテキンの濃度および安定性

調整飼料中のカテキン濃度および安定性について検索した結果は、表 1 に示す。0.02%飼料中の濃度は、カテキンが基礎飼料に元々含まれている成分であるため、対照群とほぼ同様であった。一方、0.3%飼料中の濃度はほぼ 0.3%であったが、1.0%飼料ではほぼ 0.8~0.9%、3.0%飼料ではほぼ

2.0~2.2%であり、後 2 者では指定濃度より低い値を示した。しかし、各ロットの間には、大きなばらつきを認めなかった。安定性については、飼料調製後最長 8 ヶ月間にわたって保存した飼料中のカテキン濃度について分析した結果、保存後においても調製直後とほぼ同様の値を示すことが確認された。

2. 一般状態

一般状態については、カテキン投与に関連した変化ないし試験の評価に著しく影響を及ぼすことが懸念される変化を、対照群を含めた全群に認めなかった。なお、平成 17 年 3 月現在までに死亡あるいは瀕死による切迫屠殺を行った動物は 6 例であり、それらにおいて肉眼所見より推定した死因は以下の通りであった。

<第 1 例>3.0%群の雌；実験開始の 24 週間後；推定死因、悪性リンパ腫あるいはリンパ性白血病

<第 2 例>0%群の雄；実験開始の 25 週間後；推定死因、循環障害(高度な心肥大を認めたため)

<第 3 例>3.0%群の雌；実験開始の 28 週間後；推定死因、不明(共食による顕著な臓器欠損のため)

<第 4 例>1.0%群の雌；実験開始の 31 週間後；推定死因、腎腫瘍

<第 5 例>0%群の雄；実験開始の 32 週間後；推定死因、不明(死因を推定し得る肉眼所見を認めなかったため)

<第 6 例>0%群の雄；実験開始の 32 週間後；推定死因、胸腔内腫瘍

3. 体重

平成 17 年 1 月現在までの体重の推移は、雄について図 1 に、雌について図 2 に示す。体重は、雌雄共に、いずれの投与群においても対照群と同様の値で推移し、有意な増減を認めなかった。

4. 摂餌量

平成 17 年 1 月現在までの摂餌量の推移は、雄について図 3 に、雌について図 4 に示す。摂餌量は、最高用量である 3%のカテキンを投与した群の雌雄において、対照群に比べて有意な増加が断続的に観察された。

D. 考察

本年度の研究においては、調整飼料の保存期間を通じてカテキンの安定性がほぼ担保されることが確認された。一方、調整飼料中のカテキン濃度は、1.0 および 3.0%飼料において指定濃度より低値を示した。しかしながら、ロット間の