

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

反復投与毒性や発がん性試験等の実施による既存添加物の
安全性評価に関する研究

平成16年度 総括・分担研究年度終了報告書

主任研究者 西川秋佳

平成17年4月

目次

I. 総括研究年度終了報告	1
反復投与毒性や発がん性試験等の実施による既存添加物の安全性評価に関する研究	
II. 分担研究年度終了報告	
1. トコトリエノールの安全性評価に関する研究 西川秋佳	10
2. フェルラ酸の安全性評価に関する研究 田中卓二	22
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	42
IV. 研究成果の刊行物・別刷	45

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）
反復投与毒性や発がん性試験等の実施による既存添加物の安全性評価に関する研究

平成 16 年度総括研究年度終了報告書

主任研究者 西川秋佳 国立医薬品食品衛生研究所病理部室長

研究要旨： 既存添加物は、安全性の面からみれば収載品の多くはそれ自体もしくはその基源が長年食用に供されていたなどの経験はあるものの、動物実験による毒性試験などの科学的な安全性データに欠けるものも少なくない。本研究では、安全性を評価するために必要な資料がないことから、基本的な安全性を確認するために反復投与毒性試験などの実施による安全性の検討が必要な既存添加物のうち、流通実態の確認ができ規格の明らかなものを対象として、ヒトでの長期摂取による影響を視野においた基本的安全性の評価を目的に、反復投与毒性試験、発がん性試験等を実施してきた。平成 15 年度から 16 年度にかけては、トコトリエノールおよびフェルラ酸を対象として、1 年間慢性毒性/2 年間発がん性併合試験を実施した。穀類やパーム油などに豊富に含まれているトコトリエノールは、ビタミンEと化学構造上の類似性を有し、トコフェロールと同様の抗酸化作用を有することから、酸化防止の目的で食品添加物として使用されている。今回、Wistar Hannover ラットを用いたトコトリエノールの 1 年間慢性毒性・2 年間発がん性併合試験を実施した結果、1 年間の慢性毒性試験より、雌雄の最高用量 2.0% 群において、造血臓器および肝臓に対する影響が示唆された。病理組織学的検索結果を待つて無毒性量を求める予定である。一方、イネ科植物の細胞壁に豊富に含有されているフェルラ酸は、その抗酸化活性から酸化防止剤として食品に利用されている。今回、F344/DuCrj ラットを用いたフェルラ酸の 1 年間慢性毒性・2 年間発がん性併合試験を実施した結果、1 年間の慢性毒性試験では、最高用量の 2% 投与群においても投与に起因する顕著な毒性所見は認められず、無毒性量は雌雄ともに 2% と考えられた。いずれの添加物についても、がん原性試験は継続中である。

分担研究者

田中卓二 金沢医科大学・腫瘍病理学・教授

A. 研究目的

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

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

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

一方、イネ科植物の細胞壁に豊富に含有されているフェルラ酸

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

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

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

B. 研究方法

<トコトリエノールの慢性毒性試験／発がん性併合試験>

パーム油より得られたビタミンE混合物を蒸留により精製したトコトリエノールをエーザイ株式会社（東京）より供与を受けた。トコフェロールを完全に分離することはできないので、被験物質の組成は α -トコトリエノール21.4%、 β -トコトリエノール3.5%、 γ -トコトリエノール36.5%、 δ -トコトリエノール8.6%、 α -トコフェロール20.5%、 β -トコフェロール0.7%、 γ -トコフェロール1.0%、 δ -トコフェロール0.5%であった。粉末基礎食CE-2（日本クレア株式会社、東京）に混和し、適正濃度となるように添加した。投与濃度は、トコトリエノールの13週間反復投与毒性試験の結果から、慢性毒性試験では最高用量を2.0%とし、以下0.4%、0.08%、および0%（対照群）の4段階とし、癌原性試験では2%、0.4%および0%（対照群）の3段階とした。トコトリエノール含有飼料は、給餌まで冷暗所（ $< 4^{\circ}\text{C}$ ）に保存した。

雌雄のWistar Hannover ラットを日本クレア株式会社より5週齢で入手し、CE-2基礎飼料と水道水で1週間馴化飼育後に試験に用いた。動物の飼育はバリヤーシステム

の動物室にて行い、室内の環境条件は温度 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数18回/時（オールフレッシュ）、12時間蛍光灯照明、12時間消灯の条件下で行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに3~4匹ずつ収納し、床敷は三協ラボサービス社（東京）のソフトチップを使い、週2回交換を行った。また、飲料水として水道水を馴化および試験期間中に自由に摂取させた。

1年間慢性毒性試験は、6週齢の雌雄のWistar Hannover ラット100匹（雌50匹、雄50匹）を使用して、トコトリエノールの1年間反復投与試験を実施した。実験群は、雌雄とも対照群（0%、雄10匹、雌10匹）、0.08%（雄10匹、雌10匹）、0.4%（雄10匹、雌10匹）、2.0%（雄20匹、雌20匹）の4群で構成した。試験期間は1年とし、試験期間中、体重測定、摂餌量測定、臨床的一般症状の観察を試験開始5週間までは毎週行い、それ以後は5週おきに測定した。

試験期間終了時には、全生存動物を剖検した。動物は剖検前日より絶食させ、翌日エーテル麻酔下で腹部大動脈から採血後、屠殺・剖検した。死亡動物および瀕死動物についても剖検し、できる限り死因を特定した。血液学的検査として、白血球数（WBC）、赤血球数（RBC）、ヘモグロビン量（Hb）、ヘマトクリット値（Ht）、平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球血色素量（MCH）、平均赤血球血色素濃度（MCHC）およびプロトロンビン時間などについて測定し、さらに、白血球の型別分類を行った。血清生化学的検査として、総蛋白（TP）、A/G比、アルブミン（ALB）、ビリルビン（BIL）、中性脂肪（TG）、総コレステロール（TC）、尿素窒素（BUN）、クレアチニン（CRN）、カルシウム（Ca）、無機リン（P）、ナトリウム（Na）、カリウム（K）、塩素（Cl）、アスパラギン酸トランスアミナーゼ（AST）、アラントランスアミナーゼ（ALT）、アルカリフォスファターゼ（ALP）、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ（ γ -GT）および乳酸脱水素酵素（LDH）などについて測定した。諸臓器は肉眼的に観察後摘出し、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、副腎、腎臓および精巣の重量を測定した。上記の臓器に加え、鼻腔を含む頭蓋、下垂体、眼球、ハ

一ダー腺、脊髄、唾液腺、胸腺、胃、小腸、大腸、盲腸、膵臓、膀胱、皮膚、乳腺、リンパ節、胸骨、大腿骨、気管、食道、甲状腺、舌、大腿筋、三叉神経、坐骨神経、精巣上体、精囊、前立腺、凝固腺、子宮、卵巣および臍を10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。臓器は常法に従い、パラフィン包埋後、薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、病理組織学的検索を行った。統計学的処理法として、血液学的検査値、血清生化学的検査値、体重および臓器重量については、原則として、各群の分散比をBartlettの方法で検定し、等分散の場合は、一元配置分散分析を行い、不等分散の場合はKruskal-Wallisの方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合の多重比較はDunnettの方法で対照群と各被験物質投与群との間で有意差検定を行った。その他の方法も適宜併せ実施した。

2年間がん原性試験は、6週齢の雌雄のWistar Hannover ラット300匹(雌150匹、雄150匹)を使用して、トコトリエノールの2年間の癌原性試験を実施した。実験群は、雌雄とも対照群(0%、雄50匹、雌50匹)、0.4%(雄50匹、雌50匹)、2.0%(雄50匹、雌50匹)の3群で構成した。試験期間は2年間とし、試験期間中、体重測定、摂餌量測定、臨床的一般症状の観察を試験開始5週間までは毎週行い、それ以後は5週おきに測定した。試験期間終了時には、全生存動物を剖検する。動物は剖検前日より絶食させ、翌日エーテル麻酔下で腹部大動脈から採血後、屠殺・剖検する。死亡動物および瀕死動物についても剖検し、できる限り死因を特定した。

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

<フェルラ酸の慢性毒性試験/発がん性併合試験>

米糠原油より抽出、精製したフェルラ酸(trans型、Lot No.F02977、純度99.9%)を築野食品工業株式会社(和歌山)より供与を受け、粉末基礎食CRF-1(オリエンタル酵母株式会社、東京)に予め混和した後(プ

レミックス)、適正濃度となるようにCRF-1に添加し、固形飼料とした。投与濃度は、フェルラ酸の急性毒性試験、亜慢性毒性試験の結果から、最高用量を2%とし、1%、0.5%、および0%(対照群)の4段階とした。フェルラ酸含有飼料は、給餌まで冷蔵所(<4℃)に保存した。

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

1年間反復投与試験として、雌雄のF344/DuCrjラット100匹(雌50匹、雄50匹)を使用して、フェルラ酸の1年間反復投与試験を行った。実験群は、雌雄とも対照群(0%、雄10匹、雌10匹)、0.5%(雄10匹、雌10匹)、1%(雄10匹、雌10匹)、2%(雄20匹、雌20匹)の4群で構成した。試験期間は1年間とし、試験期間中臨床的一般症状の観察を毎日行い、体重測定、摂餌量の測定は毎週行った。全動物を一晩絶食させた後、エーテル麻酔下に開腹し、腹部大動脈より採血し、瀉血、屠殺、剖検を行った。諸臓器は肉眼的に観察した後、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、精巣、卵巣、子宮は重量測定後に、また鼻腔を含む頭蓋、眼球およびその付属器、下垂体、唾液腺、舌、気管、甲状腺、上皮小体、大動脈、食道、胃、小腸、大腸、膵臓、膀胱、前立腺、精囊腺、凝固腺、精巣上体、卵管、臍、乳腺、リンパ節、胸骨、大腿骨、脊髄、坐骨神経、皮膚および骨格筋等については摘出後、直ちに10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。血液学的検査は、白血球数(WBC)、赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)、血小板数(PLT)および白血球型別分類とし

て桿状核好中球 (Neut·B)、分葉核好中球 (Neut·S)、好酸球 (Eosino)、好塩基球 (Baso)、リンパ球 (Lymph)、単球 (Mono) について(株)SRL社(東京)に依頼し測定を行った。血液生化学検査は採血した血液より血清を分離し、(株)SRL社に依頼し、総蛋白量 (TP)、アルブミン (Alb)、アルブミン/グロブリン比 (A/G)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、アラニントランスアミナーゼ (ALT)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GTP)、総ビリルビン (T.Bil)、クレアチニン (CRE)、尿素窒素 (BUN)、総コレステロール (TC)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、クロール (Cl)、カルシウム (Ca)、無機リン (IP) についても(株)SRL社に依頼し測定を行った。病理検査組織学的検査においては、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した諸臓器を定法に従いパラフィン包埋し、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、光学顕微鏡下にて観察した。統計学的処理法は、血液学的検査、血液生化学検査、臓器重量および臓器の相対重量については Bonferroni 多重比較検定法を用いて、対照群と各被験物質投与群との間で有意差検定を行い、 $P < 0.05$ を統計学的有意差とした。

2年間がん原性試験として、雌雄の F344/DuCrj ラット 416 匹 (雌 208 匹、雄 208 匹) を使用して 2 年間フェルラ酸がん原性試験を開始した。実験群は、雌雄とも対照群 (0%、雄 52 匹、雌 52 匹)、0.5% (雄 52 匹、雌 52 匹)、1% (雄 52 匹、雌 52 匹)、2% (雄 52 匹、雌 52 匹) の 4 群で構成した。試験期間は、2 年間とし試験期間中、体重測定 (実験開始後 55 週までは週 1 回、以降は 2 週に 1 回)、摂餌量の測定 (毎日)、臨床的一般症状の観察 (3 回/日) を行っている。試験期間終了時には、全生存動物を剖検する。動物は剖検前日より絶食させ、翌日エーテル麻酔下で腹部大動脈から採血後、屠殺・剖検する。死亡動物および瀕死動物についても剖検し、できる限り死因を特定した。

倫理面への配慮として、動物実験は金沢医大動物実験実施規定のガイドラインに沿って実施した。動物飼育については、空調や清

潔な住環境の維持に努めている。

C. 研究結果

<トコリエノールの慢性毒性試験/発がん性併合試験>

「1 年間慢性毒性試験」

雄の 2.0% 群において 6 匹の死亡が確認された。死亡例の剖検では、脳底部および腸間膜リンパ節などにおける出血が主な所見であった。その他の群においては、死亡および特記すべき一般状態の異常は認められなかった。

平均体重は雌雄ともに対照群と比べて 2.0% 群で有意な低値を示したが、雌の 0.4% 群においては有意な増加を示した。

1 日当たりの平均摂餌量は、雄において 25-30 g、雌で約 20 g であり、雄では 0.4% 群および 2.0% 群において減少傾向を認め、雌では 0.08% 群に減少傾向が認められた。

トコリエノールの 1 年間の総摂取量は、雄では 2.0% 群で 184 g、0.4% 群で 35.3 g、0.08% 群で 8.76 g、雌では 2% 群で 141 g、0.4% 群で 38.5 g、0.08% 群で 5.03 g であり、雌雄ともに投与濃度に相関していた。

臓器重量の結果については、雄 2.0% 群の肝臓の実重量が対照群と比較して有意に減少した。相対重量では、雄 2.0% 群の脳、肺、心臓、副腎、腎臓および精巣、雌 2.0% 群の脳、心臓、肝臓、副腎および腎臓において有意な増加が認められた。

血液学的検査では、雄の 0.4% 以上の群で、MCV の有意な減少が認められ、2.0% 群において、Hb、Ht および MCH の有意な減少が認められた。雌では、2.0% 群において、Hb、Ht、MCV および MCH で有意な減少が認められ、MCHC は軽度であるが有意な増加を示した。雄 2.0% 群において、プロトロンビン時間の有意な延長がみられた。

血清生化学的検査では、雄の 0.4% 以上の群で、TG およびグルコースの有意な減少、Na および Cl の有意な増加が認められた。2.0% 群において、A/G 比、P、AST、ALT、ALP、直接 Bil およびプロトロンビン時間の有意な増加が、LDH では有意な減少が認め

られた。また、コレステロールエステル比は、全ての投与群において有意に減少した。雌では、2.0%群においてTPおよびALPの有意な増加、総 Bil、直接 Bil および間接 Bil の有意な減少が認められた。病理組織学的所見は、現在検索中である。

「2年間がん原性試験」

雄の最高用量 2.0%群においては、実験開始 4 ヶ月目頃からしだいに死亡例が増加しはじめ、死亡率が 42%に達した 50 週目に投与量を 2.0%から 1.0%に引き下げ、実験を継続中である。その他の群では、雄の 0.4%群および 0%群では各 1 匹の死亡が、雌の 0%群および 0.4%群で各 2 匹の死亡がそれぞれ確認されている。

<フェルラ酸の慢性毒性試験/発がん性併合試験>

「1年間慢性毒性試験」

投与開始後、42 週目に 0.5%フェルラ酸投与群の雄において 1 匹の死亡動物が確認されたが、剖検によっても死亡原因を特定できなかった。また、投与開始後、3 週目からフェルラ酸投与群に脱毛が観察されたが、8 週目にはほぼ回復し、対照群との差はそれ以降、認められなかった。その他、特記すべき臨床徴候は認められなかった。

雌雄とも平均体重は、フェルラ酸投与群では対照群に比較して被験物質に起因すると考えられる体重変動は認めなかった。試験期間中の各群ラット 1 日当たりの平均摂餌量は、雌雄とも対照群に比べフェルラ酸投与群では低値を示したが、各群間に有意な変化は認めなかった。

血液学的検査の結果について、雄では、対照群に比べフェルラ酸投与群による有意な変化は認めなかった。雌では、白血球数の低値、赤血球数高値、血小板数の低値、白血球型別百分率における好中球の比率低値、リンパ球の比率高値、単球の比率高値で対照群に対する有意な変化が認められたが、いずれも濃度依存性はなく偶発的なものであり、毒性学的には意義のない変化と考えられた。

血液生化学的検査の結果について、雄では、2%フェルラ酸投与群において、対照群に比べ AST、ALT、CRE、BUN の低値が認められたが、いずれも軽微なものであり偶発的な変化と考えられた。雌では、1%フェルラ酸投与群において対照群に比べ IP の有意な低値が認められたが用量とは関連のない偶発的な変化と考えられた。

体重および臓器重量に関して、雄では、0.5%フェルラ酸投与群において、対照群に比べ有意な体重増加を示した。雌では、対照群に比べ 0.5%フェルラ酸投与群で肺重量の低値、1%フェルラ酸投与群で腎重量の高値、2%フェルラ酸投与群で脾重量および腎重量の高値などいくつかの有意な差が散見されたが、いずれも軽微なものであり偶発的な変化と考えられた。

病理組織学的検査では、いずれの臓器においても被験物質投与に起因すると考えられる病変は認められなかった。

「2年間がん原性試験」

現在、試験開始後 80 週を経過している。投与開始後、3 週目からフェルラ酸投与群ラットに脱毛を観察したが、現在は回復している。その他、特記すべき臨床徴候を認めていない。現在までに、0%フェルラ酸投与群で雄 2 匹雌 3 匹、0.5%フェルラ酸投与群雄 4 匹雌 0 匹、1%フェルラ酸投与群雄 2 匹雌 1 匹、2%フェルラ酸投与群雄 3 匹雌 3 匹の死亡例を認めている。雌雄とも、平均体重は、2%フェルラ酸投与群は対照群とほぼ同様の体重増加を示しているが、0.5%フェルラ酸投与群、1%フェルラ酸投与群では対照群に比べ高い傾向を示している。ラット 1 日当たりの平均摂餌量は、雌雄とも対照群に比べフェルラ酸投与群では低く、雄では対照群の約 4/5、雌では対照群の約 3/5-3/4 であるが、用量依存性はみられてない。

D. 考察

<トコトリエノールの慢性毒性試験/発がん性併合試験>

今回、Wistar Hannover ラットを用いた 1

年間の慢性毒性試験を実施し、2年間のがん原性試験を継続した。1年間の慢性毒性試験の結果、雄の2.0%群で6匹の死亡が確認されたが、その他の群には一般状態の異常はみられなかった。体重では、雌雄の2.0%群において有意な減少が認められたが、雌の0.4%群では増加傾向がみられた。摂餌量は、雄の2.0%および0.4%群、雌の2.0%および0.08%群で減少傾向を示したが、雌の0.4%群ではむしろ増加傾向を示していた。これらの事から、この体重変化は被験物質の影響によるものと考えられた。

血液学的検査では、雌雄の2.0%群において、Hb、HtおよびMCHの有意な減少が認められ、造血臓器に対する影響が示唆された。血清生化学的検査では、雄の2.0%群においてAST、ALTおよびALPの有意な増加がみられたが、雌の2.0%群ではALPの有意な増加のみが認められ、ASTやALTはむしろ低下傾向を示した。いずれにしても、肝機能障害が示唆されたが、あまり強いものとは考えられなかった。雄の2.0%群において、直接ビリルビンの有意な増加が認められたが、雌の2.0%群においては、総ビリルビン、直接ビリルビンおよび間接ビリルビンは逆にいずれも有意に低下した。コレステロールエステル比では雄の全投与群で有意に減少したが、雌では影響がなかった。この変化は、トコトリエノールが有するコレステロール合成阻害の特性によるものと考えられた。また、雄の0.4%以上の群において、TGおよびグルコースの有意な減少、NaおよびClの有意な増加が認められた。

途中死亡した雄2.0%群の動物の剖検では、脳底部や腸間膜リンパ節などの出血による死亡が多く見られたため、血液凝固成分について測定した結果、プロトロンビン値が有意な高値を示した。がん原性試験は、雄の最高用量2.0%群において、死亡率が42%に達した50週目に投与量を2.0%から1.0%に引き下げた。その他の群は用量の変更無く、実験を継続中である。

<フェルラ酸の慢性毒性試験／発がん性併合試験>

1年間の慢性毒性試験では、最高用量の

2%投与群においても投与に起因する顕著な毒性所見は認められず、無毒性量は雌雄ともに2%と考えられた。がん原性試験は、試験開始後80週を経過し、各群数匹の死亡例がみられているが、特記すべき腫瘍の発現は認められていない。

E. 結論

Wistar Hannover ラットを用いたトコトリエノールの1年間の慢性毒性試験より、雌雄の2.0%群において、造血臓器および肝臓に対する影響が示唆された。病理組織学的検索結果を待って無毒性量を求める。また、F344/DuCrj ラットを用いたフェルラ酸の1年間慢性毒性試験を実施し、無毒性量を2%と推定した。がん原性試験は継続中である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kitamura Y, Nishikawa A, Nakamura H, Furukawa F, Imazawa T, Umemura T, Uchida K, Hirose M. Effects of *N*-acetylcysteine, quercetin, and phytic acid on spontaneous hepatic and renal lesions in LEC rats. *Toxicol Pathol.* 2005 33: 584-592.
- 2) Kitamura Y, Yamagishi M, Okazaki K, Umemura T, Imazawa T, Nishikawa A, Matsumoto W, Hirose M. Lack of chemopreventive effects of alpha-eleostearic acid on 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA) and 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced mammary and colon carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol.* 2005, in press.
- 3) Nishikawa A, Sai K, Okazaki K, Son HY, Kanki K, Nakajima M, Kinase N, Nohmi T, Trosko JE, Inoue T, Hirose M. MX, a by-product of water chlorination, lacks *in vivo* genotoxicity in *gpt* delta mice but inhibits gap

- junctional intercellular communication in rat WB cells. *Environ Mol Mutagen.* 2005, in press.
- 4) Kuroiwa Y, Nishikawa A, Imazawa T, Kitamura Y, Kanki K, Ishii Y, Umemura T, Hirose M. A subchronic toxicity study of dunaliella carotene in F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 2005, in press.
 - 5) Kitamura Y, Yamagishi M, Okazaki K, Furukawa F, Imazawa T, Nishikawa A, Hirose M. Lack of enhancing effects of sodium nitrite on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-induced mammary carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett.* 2005, in press.
 - 6) Kuroiwa Y, Nishikawa A, Imazawa T, Kitamura Y, Kanki K, Umemura T, Hirose M. Lack of carcinogenicity of *D*-xylose given in the diet to F344 rats for two years. *Food Chem Toxicol.* 2005 43: 1399-1404.
 - 7) Nishikawa A, Ikeda T, Son HY, Okazaki K, Imazawa T, Umemura T, Kimura S, Hirose M. Pronounced synergistic promotion of *N*bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine-initiated thyroid tumorigenesis in rats treated with excess soybean and iodine-deficient diets. *Toxicol Sci.* 2005 86: 258-263.
 - 8) Kuroiwa Y, Nishikawa A, Imazawa T, Kanki K, Kitamura Y, Umemura T, Hirose M. Lack of subchronic toxicity of an aqueous extract of *Agaricus blazei* Murrill in F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 2005 43: 1047-1053.
 - 9) Nishikawa A, Imazawa T, Kuroiwa Y, Kitamura Y, Kanki K, Ishii Y, Umemura T, Hirose M. Induction of colon tumors in C57BL/6J mice fed MeIQx, IQ, or PhIP followed by dextran sulfate sodium treatment. *Toxicol Sci.* 2005 84: 243-248.
 - 10) Nishikawa A, Mori Y, Lee IS, Tanaka T, Hirose M. Cigarette smoking, metabolic activation and carcinogenesis. *Curr Drug Metab.* 2004 5: 363-373.
 - 11) Hirose A, Hasegawa R, Nishikawa A, Takahashi M, Ema M. Revision and establishment of Japanese drinking water quality guidelines for di(2-ethylhexyl) phthalate, toluene and vinyl chloride -- differences from the latest WHO guideline drafts. *J Toxicol Sci.* 2004 29: 535-539.
 - 12) Kanki K, Nishikawa A, Masumura K, Umemura T, Imazawa T, Kitamura Y, Nohmi T, Hirose M. *In vivo* mutational analysis of liver DNA in *gpt* delta transgenic rats treated with the hepatocarcinogens *N*-nitrosopyrrolidine, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline, and di(2-ethylhexyl)phthalate. *Mol Carcinog.* 2005 42: 9-17.
 - 13) Son HY, Nishikawa A, Okazaki K, Kitamura Y, Kanki K, Lee KY, Umemura T, Hirose M. Specificity of co-promoting effects of caffeine on thyroid carcinogenesis in rats pretreated with *N*bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Toxicol Pathol.* 2004 32: 338-344.
 - 14) Nishikawa A, Furukawa F, Lee IS, Tanaka T, Hirose M. Potent chemopreventive agents against pancreatic cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2004 4: 373-384.
 - 15) Umemura T, Kitamura Y, Kanki K, Maruyama S, Okazaki K, Imazawa T, Nishimura T, Hasegawa R, Nishikawa A, Hirose M. Dose-related changes of oxidative stress and cell proliferation in kidneys of male and female F344 rats exposed to potassium bromate. *Cancer Sci.* 2004 95: 393-398.
 - 16) Suzuki R, Kohno H, Suzui M, Yoshimi N, Tsuda H, Wakabayashi K, Tanaka T. An animal model for the rapid induction of tongue neoplasms in human *c-Ha-ras* proto-oncogene transgenic rats by 4-nitroquinoline 1-oxide: its potential use for preclinical chemoprevention studies. *Carcinogenesis.* 2005, in press.

- 17) Suzui M, Inamine M, Kaneshiro T, Morioka T, Yoshimi N, Suzuki R, Kohno H, Tanaka T. Indole-3-carbinol inhibits the growth of human colon carcinoma cells but enhances the tumor multiplicity and volume of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. *Int J Oncol.* 2005 27: 1391-1399.
- 18) Hata K, Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Qiang SH, Yamada Y, Oyama T, Kuno T, Hirose Y, Hara A, Mori H. beta-Catenin-accumulated crypts in the colonic mucosa of juvenile Apc(Min/+) mice. *Cancer Lett.* 2005, in press.
- 19) Hata K, Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Qiang SH, Kuno T, Hirose Y, Hara A, Mori H. Lack of enhancing effects of degraded lambda-carrageenan on the development of beta-catenin-accumulated crypts in male DBA/2J mice initiated with azoxymethane. *Cancer Lett.* 2005, in press.
- 20) Yasui Y, Hosokawa M, Sahara T, Suzuki R, Ohgiya S, Kohno H, Tanaka T, Miyashita K. Bitter gourd seed fatty acid rich in 9c,11t,13t-conjugated linolenic acid induces apoptosis and up-regulates the GADD45, p53 and PPARgamma in human colon cancer Caco-2 cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2005 73: 113-119.
- 21) Yoshida K, Tanaka T, Hirose Y, Yamaguchi F, Kohno H, Toida M, Hara A, Sugie S, Shibata T, Mori H. Dietary garcinol inhibits 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in rats. *Cancer Lett.* 2005 221: 29-39. Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Nakagama H, Tanaka T. Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis* 2005, in press.
- 22) Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Hata K, Sugie S, Niho N, Sakano K, Takahashi M, Wakabayashi K. Dextran sodium sulfate strongly promotes colorectal carcinogenesis in Apc (Min/+) mice: Inflammatory stimuli by dextran sodium sulfate results in development of multiple colonic neoplasms. *Int J Cancer* 2005, in press
- 23) Kohno H, Suzuki R, Sugie S, Tsuda H, Tanaka T. Dietary supplementation with silymarin inhibits 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced prostate carcinogenesis in male F344 rats. *Clin Cancer Res.* 2005 11: 4962-4967.
- 24) Sugie S, Vinh PQ, Rahman KM, Ushida J, Kohno H, Suzuki R, Hara A, Quang le B, Tanaka T, Mori H. Suppressive effect of 1,4-phenylene diisothiocyanate on *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Int J Cancer* 2005 117: 524-530.
- 25) Suzuki R, Kohno H, Murakami A, Koshimizu K, Ohigashi H, Yano M, Tokuda H, Nishino H, Tanaka T. Citrus nobiletin inhibits azoxymethane-induced large bowel carcinogenesis in rats. *Biofactors* 2004 22: 111-114.
- 26) Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Tanaka T. Dose-dependent promoting effect of dextran sodium sulfate on mouse colon carcinogenesis initiated with azoxymethane. *Histol Histopathol.* 2005 20: 483-492.
- 27) Kohno H, Suzuki R, Sugie S, Tanaka T. Beta-Catenin mutations in a mouse model of inflammation-related colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci.* 2005 96: 69-76.
- 28) Sugie S, Ohnishi M, Ushida J, Yamamoto T, Hara A, Koide A, Mori Y, Kohno H, Suzuki R, Tanaka T, Wakabayashi K, Mori H. Effect of alpha-naphthyl isothiocyanate on 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)-induced mammary

- carcinogenesis in rats. *Int J Cancer* 2005 115: 346-350.
- 29) Tanaka T, Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Takahashi M, Wakabayashi K. Colonic adenocarcinomas rapidly induced by the combined treatment with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine and dextran sodium sulfate in male ICR mice possess beta-catenin gene mutations and increases immunoreactivity for beta-catenin, cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. *Carcinogenesis* 2005 26: 229-238.
- 30) Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Sasaki K, Yoshimura T, Wada K, Tanaka T. Preventive effects of extract of leaves of ginkgo (*Ginkgo biloba*) and its component bilobalide on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Cancer Lett.* 2004 210: 159-169.
- 31) Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Sugie S. Lack of modifying effects of an estrogenic compound atrazine on 7,12-dimethylbenz(*a*)anthracene-induced ovarian carcinogenesis in rats. *Cancer Lett.* 2004 210: 129-137.
- 32) Kohno H, Suzuki R, Yasui Y, Hosokawa M, Miyashita K, Tanaka T. Pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats. *Cancer Sci.* 2004 95: 481-486.
- 33) Kohno H, Yasui Y, Suzuki R, Hosokawa M, Miyashita K, Tanaka T. Dietary seed oil rich in conjugated linolenic acid from bitter melon inhibits azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis through elevation of colonic PPARgamma expression and alteration of lipid composition. *Int J Cancer* 2004 110: 896-901.
- 34) Kohno H, Suzuki R, Sugie S, Tsuda H, Tanaka T. Lack of modifying effects of 4-*tert*-octylphenol and benzyl butyl phthalate on 3,2-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced prostate carcinogenesis in rats. *Cancer Sci.* 2004 95: 300-305.
- 35) Hosokawa M, Kudo M, Maeda H, Kohno H, Tanaka T, Miyashita K. Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the PPARgamma ligand, troglitazone, on colon cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2004 1675: 113-119.
- 36) Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Tanaka T. Sequential observations on the occurrence of preneoplastic and neoplastic lesions in mouse colon treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci.* 2004 95: 721-727.
- 37) Kagawa M, Sano T, Ishibashi N, Hashimoto M, Okuno M, Moriwaki H, Suzuki R, Kohno H, Tanaka T. An acyclic retinoid, NIK-333, inhibits *N*-diethylnitrosamine-induced rat hepatocarcinogenesis through suppression of TGF-alpha expression and cell proliferation. *Carcinogenesis.* 2004 25: 979-985.
2. 学会発表
省略
- H. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
反復投与毒性や発がん性試験等の実施による既存添加物の安全性評価に関する研究
平成 16 年度分担研究年度終了報告書

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

研究要旨： 穀類やパーム油などに豊富に含まれているトコトリエノールは、ビタミンEと化学構造上の類似性を有し、トコフェロールと同様の抗酸化作用を有することから、酸化防止の目的で食品添加物として使用されている。トコトリエノールの13週間反復投与毒性試験では、無毒性量(NOEL)は0.19%（雄で120 mg/kg 体重、雌で130 mg/kg 体重）と推定され、雄の0.19%投与群で平均赤血球容積の減少、血清アルカリフォスファターゼの上昇などがみられたことから、無影響量(NOEL)は求められていない。今回、Wistar Hannover ラットを用いたトコトリエノールの1年間慢性毒性・2年間発がん性併合試験を実施した。1年間の慢性毒性試験より、雌雄の2.0%群において、造血臓器および肝臓に対する影響が示唆された。病理組織学的検索結果を待って無毒性量を求める予定である。がん原性試験は継続中である。

A. 研究目的

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

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

B. 研究方法

<被験物質並びに飼料の調製>

パーム油より得られたビタミンE混合物を蒸留により精製したトコトリエノールをエーザイ株式会社(東京)より供与を受けた。トコフェロールを完全に分離することはできないので、被験物質の組成は α -トコトリエノール21.4%、 β -トコトリエノール3.5%、 γ -トコトリエノール36.5%、 δ -トコトリエノール8.6%、 α -トコフェロール20.5%、 β -トコフェロール0.7%、 γ -トコフェロール1.0%、 δ -トコフェロール0.5%であった。粉末基礎食CE-2（日本クレア株式会社、東京）に混和し、適正濃度となるように添加した。投与濃度は、トコトリエノールの13週間反復投与毒性試験の結果から、慢性毒性試験では最高用量を2.0%とし、以下0.4%、0.08%、および0%(対照群)の4段階とし、癌原性試験では2%、0.4%および0%(対照群)の3段階とした。トコトリエノール含有飼料は、給餌まで冷暗所(<4℃)に保存した。

<実験動物並びに飼育条件>

雌雄のWistar Hannover ラットを日本ク

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

<試験方法>

「1年間慢性毒性試験」

6週齢の雌雄のWistar Hannover ラット100匹（雌50匹、雄50匹）を使用して、トコトリエノールの1年間反復投与試験を実施した。実験群は、雌雄とも対照群（0%、雄10匹、雌10匹）、0.08%（雄10匹、雌10匹）、0.4%（雄10匹、雌10匹）、2.0%（雄20匹、雌20匹）の4群で構成した。試験期間は1年とし、試験期間中、体重測定、摂餌量測定、臨床的一般症状の観察を試験開始5週間までは毎週行い、それ以後は5週おきに測定した。

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

血液学的検査として、白血球数（WBC）、赤血球数（RBC）、ヘモグロビン量（Hb）、ヘマトクリット値（Ht）、平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球血色素量（MCH）、平均赤血球血色素濃度（MCHC）およびプロトロンビン時間などについて測定し、さらに、白血球の型別分類を行った。血清生化学的検査として、総蛋白（TP）、A/G比、アルブミン（ALB）、ビリルビン（BIL）、中性脂肪（TG）、総コレステロール（TC）、尿素窒素（BUN）、クレアチニン（CRN）、カルシウム（Ca）、無機リン（P）、ナトリウム（Na）、カリウム（K）、塩素（Cl）、アスパラギン酸トランスアミナーゼ（AST）、アラニントランスアミ

ナーゼ（ALT）、アルカリフォスファターゼ（ALP）、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ（ γ -GT）および乳酸脱水素酵素（LDH）などについて測定した。

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

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

「2年間がん原性試験」

6週齢の雌雄のWistar Hannover ラット300匹（雌150匹、雄150匹）を使用して、トコトリエノールの2年間の癌原性試験を実施した。実験群は、雌雄とも対照群（0%、雄50匹、雌50匹）、0.4%（雄50匹、雌50匹）、2.0%（雄50匹、雌50匹）の3群で構成した。試験期間は2年間とし、試験期間中、体重測定、摂餌量測定、臨床的一般症状の観察を試験開始5週間までは毎週行い、それ以後は5週おきに測定した。

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

諸臓器は肉眼的に観察後摘出し、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、副腎、腎臓および精巣の重

量を測定した。上記の臓器に加え、鼻腔を含む頭蓋、下垂体、眼球、ハーダー腺、脊髄、唾液腺、胸腺、胃、小腸、大腸、盲腸、膵臓、膀胱、皮膚、乳腺、リンパ節、胸骨、大腿骨、気管、食道、甲状腺、舌、大腿筋、三叉神経、坐骨神経、精巣上体、精囊、前立腺、凝固腺、子宮、卵巣および膣を10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。臓器は常法に従い、パラフィン包埋後、薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、腫瘍性病変病理組織学的検索を行った。

統計学的処理法として、体重および臓器重量については、原則として、各群の分散比をBartlettの方法で検定し、等分散の場合は、一元配置分散分析を行い、不等分散の場合はKruskal-Wallisの方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合の多重比較はDunnnettの方法で対照群と各被験物質投与群との間で有意差検定を行った。腫瘍の発生頻度については、Fisherの直接確率法により、対照群と各被験物質投与群との間で有意差検定を行った。その他の方法も適宜併せ実施した。

<倫理面への配慮>

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

C. 研究結果

「1年間慢性毒性試験」

雄の2.0%群において6匹の死亡が確認された。死亡例の剖検では、脳底部および腸間膜リンパ節などにおける出血が主な所見であった。その他の群においては、死亡および特記すべき一般状態の異常は認められなかった。

体重の推移をFig. 1に示す。平均体重は雌雄ともに対照群と比べて2.0%群で有意な低値を示したが、雌の0.4%群においては有意な増加を示した(Table 2およびTable 3)。

摂餌量をTable 1に示す。1日当たりの平均摂餌量は、雄において25-30g、雌で約20

gであり、雄では0.4%群および2.0%群において減少傾向を認め、雌では0.08%群に減少傾向が認められた。トコトリエノールの1年間の総摂取量は、雄では2.0%群で184g、0.4%群で35.3g、0.08%群で8.76g、雌では2%群で141g、0.4%群で38.5g、0.08%群で5.03gであり、雌雄ともに投与濃度に相関していた。

臓器重量の結果をTable 2およびTable 3に示す。雄2.0%群の肝臓の実重量が対照群と比較して有意に減少した。相対重量では、雄2.0%群の脳、肺、心臓、副腎、腎臓および精巣、雌2.0%群の脳、心臓、肝臓、副腎および腎臓において有意な増加が認められた。

血液学的および血清生化学的検査の結果をTable 4および5に示す。血液学的検査では、雄の0.4%以上の群で、MCVの有意な減少が認められ、2.0%群において、Hb、HtおよびMCHの有意な減少が認められた。雌では、2.0%群において、Hb、Ht、MCVおよびMCHで有意な減少が認められ、MCHCは軽度であるが有意な増加を示した。雄2.0%群において、プロトロンボン時間の有意な延長がみられた。

血清生化学的検査では、雄の0.4%以上の群で、TGおよびグルコースの有意な減少、NaおよびClの有意な増加が認められた。2.0%群において、A/G比、P、AST、ALT、ALP、直接Bilおよびプロトロンビン時間の有意な増加が、LDHでは有意な減少が認められた。また、コレステロールエステル比は、全ての投与群において有意に減少した。雌では、2.0%群においてTPおよびALPの有意な増加、総Bil、直接Bilおよび間接Bilの有意な減少が認められた。病理組織学的所見は、現在検索中である。

「2年間がん原性試験」

体重の推移をFig. 2に示す。雄の最高用量2.0%群においては、実験開始4ヶ月目頃からしだいに死亡例が増加しはじめ、死亡率が42%に達した50週目に投与量を2.0%から1.0%に引き下げ、実験を継続中である。その他の群では、雄の0.4%群および0%群では各1匹の死亡が、雌の0%群および0.4%

群で各2匹の死亡がそれぞれ確認されている。

D. 考察

今回、Wistar Hannover ラットを用いた1年間の慢性毒性試験を実施し、2年間のがん原性試験を継続した。1年間の慢性毒性試験の結果、雄の2.0%群で6匹の死亡が確認されたが、その他の群には一般状態の異常はみられなかった。体重では、雌雄の2.0%群において有意な減少が認められたが、雌の0.4%群では増加傾向がみられた。摂餌量は、雄の2.0%および0.4%群、雌の2.0%および0.08%群で減少傾向を示したが、雌の0.4%群ではむしろ増加傾向を示していた。これらのことから、この体重変化は被験物質の影響によるものと考えられた。

血液学的検査では、雌雄の2.0%群において、Hb、Ht および MCH の有意な減少が認められ、造血臓器に対する影響が示唆された。血清生化学的検査では、雄の2.0%群においてAST、ALT および ALP の有意な増加がみられたが、雌の2.0%群ではALPの有意な増加のみが認められ、ASTやALTはむしろ低下傾向を示した。いずれにしても、肝機能障害が示唆されたが、あまり強いものとは考えられなかった。雄の2.0%群において、直接ビリルビンの有意な増加が認められたが、雌の2.0%群においては、総ビリルビン、直接ビリルビンおよび間接ビリルビンは逆にいずれも有意に低下した。コレステロールエステル比では雄の全投与群で有意に減少したが、雌では影響がなかった。この変化は、トコトリエノールが有するコレステロール合成阻害の特性によるものと考えられた。また、雄の0.4%以上の群において、TG およびグルコースの有意な減少、Na および Cl の有意な増加が認められた。

途中死亡した雄2.0%群の動物の剖検では、脳底部や腸間膜リンパ節などの出血による死亡が多く見られたため、血液凝固成分について測定した結果、プロトロンビン値が有意な高値を示した。がん原性試験は、雄の最高用量2.0%群において、死亡率が42%に達した50週目に投与量を2.0%から1.0%に引き下げた。その他の群は用量の変更無く、実験

を継続中である。

E. 結論

Wistar Hannover ラットを用いたトコトリエノールの1年間の慢性毒性試験より、雌雄の2.0%群において、造血臓器および肝臓に対する影響が示唆された。病理組織学的検索結果を待つて無毒性量を求める。がん原性試験は継続中である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kitamura Y, Nishikawa A, Nakamura H, Furukawa F, Imazawa T, Umemura T, Uchida K, Hirose M. Effects of *N*-acetylcysteine, quercetin, and phytic acid on spontaneous hepatic and renal lesions in LEC rats. *Toxicol Pathol.* 2005 33: 584-592.
- 2) Kitamura Y, Yamagishi M, Okazaki K, Umemura T, Imazawa T, Nishikawa A, Matsumoto W, Hirose M. Lack of chemopreventive effects of alpha-eleostearic acid on 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA) and 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced mammary and colon carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol.* 2005, in press.
- 3) Nishikawa A, Sai K, Okazaki K, Son HY, Kanki K, Nakajima M, Kinoshita N, Nohmi T, Trosko JE, Inoue T, Hirose M. MX, a by-product of water chlorination, lacks *in vivo* genotoxicity in *gpt* delta mice but inhibits gap junctional intercellular communication in rat WB cells. *Environ Mol Mutagen.* 2005, in press.
- 4) Kuroiwa Y, Nishikawa A, Imazawa T, Kitamura Y, Kanki K, Ishii Y, Umemura T, Hirose M. A subchronic toxicity study of dunaliella carotene

- in F344 rats. Food Chem Toxicol. 2005, in press.
- 5) Kitamura Y, Yamagishi M, Okazaki K, Furukawa F, Imazawa T, Nishikawa A, Hirose M. Lack of enhancing effects of sodium nitrite on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)-induced mammary carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. Cancer Lett. 2005, in press.
 - 6) Kuroiwa Y, Nishikawa A, Imazawa T, Kitamura Y, Kanki K, Umemura T, Hirose M. Lack of carcinogenicity of *D*-xylose given in the diet to F344 rats for two years. Food Chem Toxicol. 2005 43: 1399-1404.
 - 7) Nishikawa A, Ikeda T, Son HY, Okazaki K, Imazawa T, Umemura T, Kimura S, Hirose M. Pronounced synergistic promotion of *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine-initiated thyroid tumorigenesis in rats treated with excess soybean and iodine-deficient diets. Toxicol Sci. 2005 86: 258-263.
 - 8) Kuroiwa Y, Nishikawa A, Imazawa T, Kanki K, Kitamura Y, Umemura T, Hirose M. Lack of subchronic toxicity of an aqueous extract of *Agaricus blazei* Murrill in F344 rats. Food Chem Toxicol. 2005 43: 1047-1053.
 - 9) Nishikawa A, Imazawa T, Kuroiwa Y, Kitamura Y, Kanki K, Ishii Y, Umemura T, Hirose M. Induction of colon tumors in C57BL/6J mice fed MeIQx, IQ, or PhIP followed by dextran sulfate sodium treatment. Toxicol Sci. 2005 84: 243-248.
 - 10) Nishikawa A, Mori Y, Lee IS, Tanaka T, Hirose M. Cigarette smoking, metabolic activation and carcinogenesis. Curr Drug Metab. 2004 5: 363-373.
 - 11) Hirose A, Hasegawa R, Nishikawa A, Takahashi M, Ema M. Revision and establishment of Japanese drinking water quality guidelines for di(2-ethylhexyl) phthalate, toluene and vinyl chloride -- differences from the latest WHO guideline drafts. J Toxicol Sci. 2004 29: 535-539.
 - 12) Kanki K, Nishikawa A, Masumura K, Umemura T, Imazawa T, Kitamura Y, Nohmi T, Hirose M. *In vivo* mutational analysis of liver DNA in *gpt* delta transgenic rats treated with the hepatocarcinogens *N*-nitrosopyrrolidine, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline, and di(2-ethylhexyl)phthalate. Mol Carcinog. 2005 42: 9-17.
 - 13) Son HY, Nishikawa A, Okazaki K, Kitamura Y, Kanki K, Lee KY, Umemura T, Hirose M. Specificity of co-promoting effects of caffeine on thyroid carcinogenesis in rats pretreated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. Toxicol Pathol. 2004 32: 338-344.
 - 14) Nishikawa A, Furukawa F, Lee IS, Tanaka T, Hirose M. Potent chemopreventive agents against pancreatic cancer. Curr Cancer Drug Targets. 2004 4: 373-384.
 - 15) Umemura T, Kitamura Y, Kanki K, Maruyama S, Okazaki K, Imazawa T, Nishimura T, Hasegawa R, Nishikawa A, Hirose M. Dose-related changes of oxidative stress and cell proliferation in kidneys of male and female F344 rats exposed to potassium bromate. Cancer Sci. 2004 95: 393-398.
2. 学会発表
省略
- H. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

Fig. 1 Growth curves for Wistar Hannover rats treated with tocotrienol for 52 weeks (chronic toxicity study)

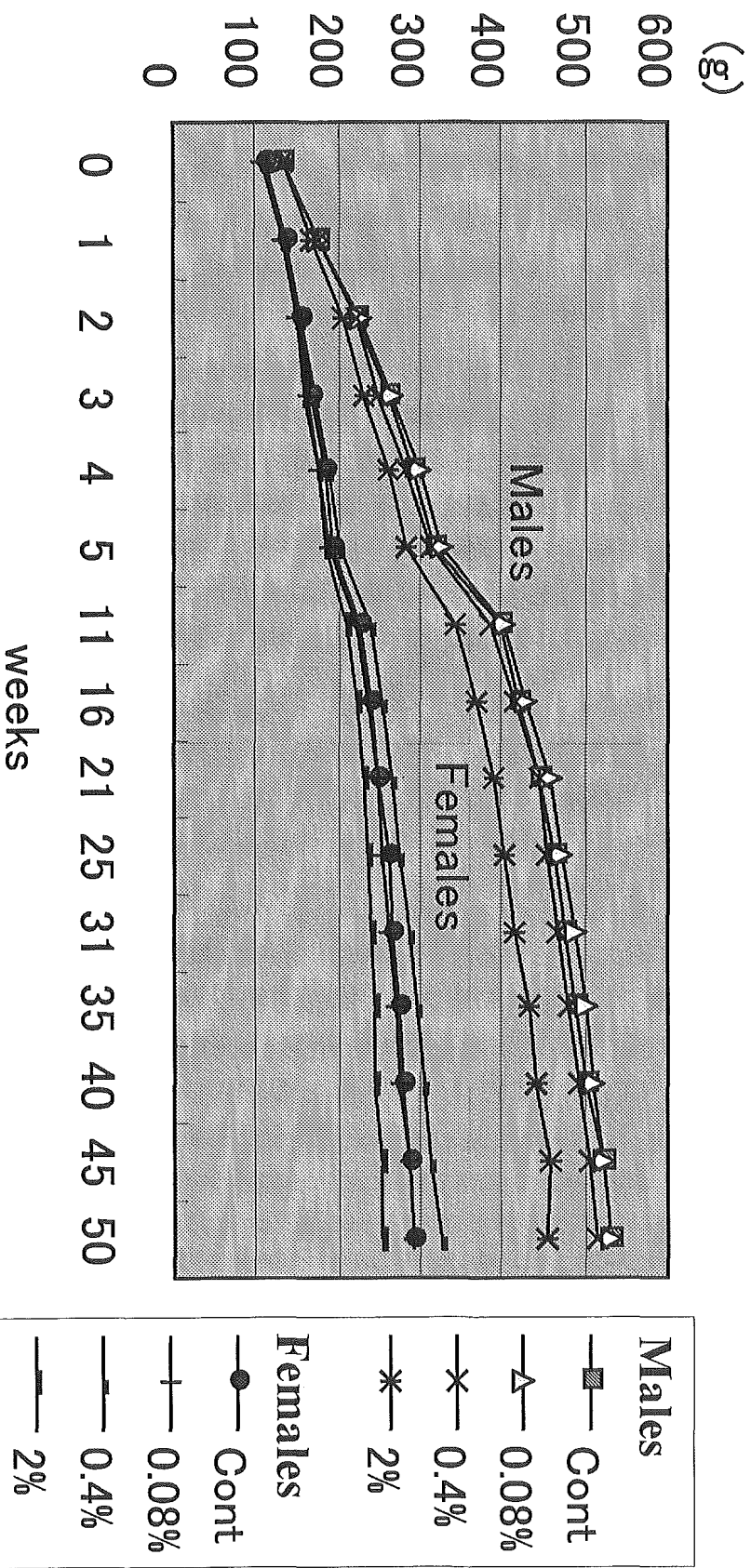


Fig. 2 Growth curves for Wistar Hannover rats treated with tocotrienol for 52 weeks (carcinogenicity study)

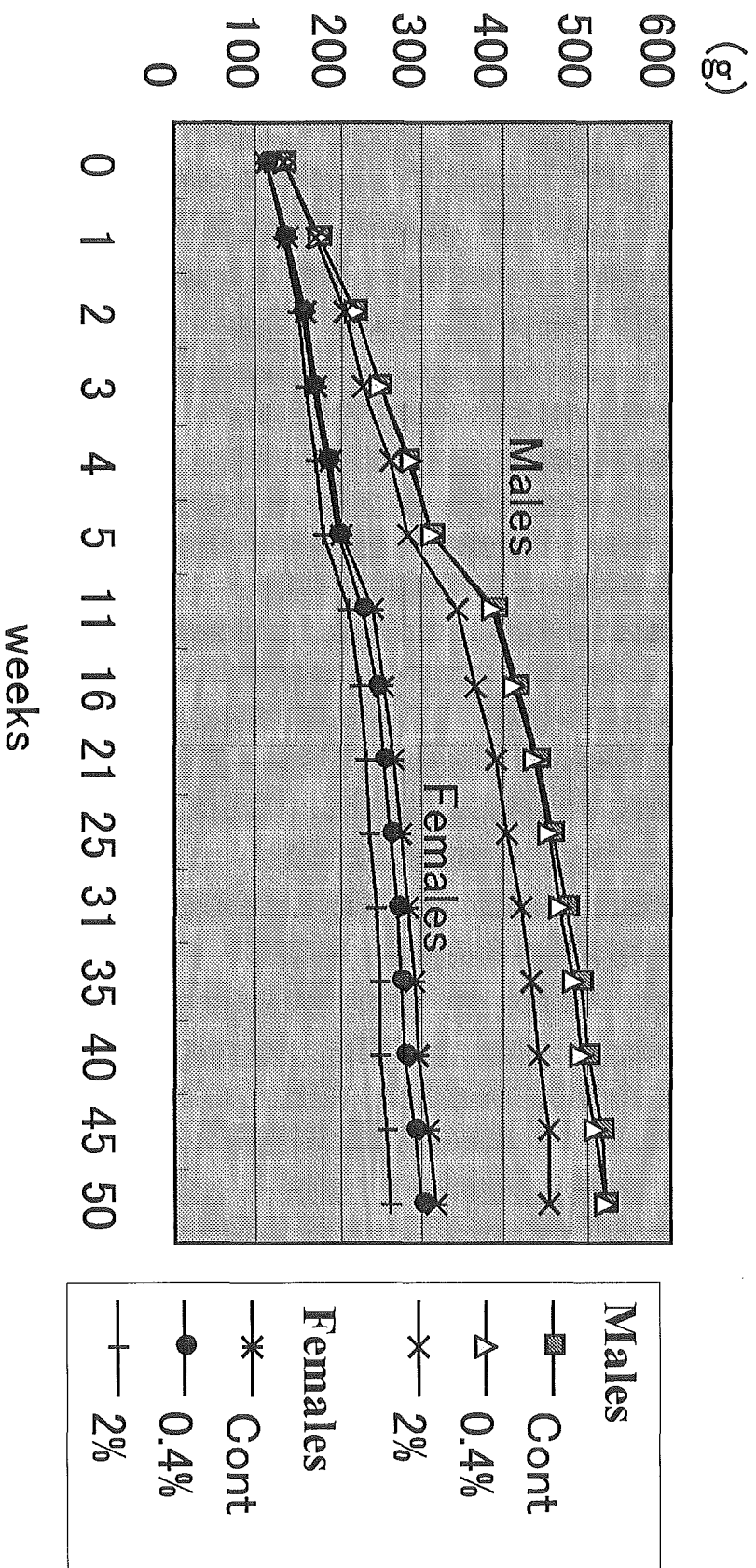


Table 1 Food consumption and intake of tocotrienol

Dose level	Food consumption (g/rat/day)		Daily intake (g/rat/day)		Total intake(g/rat)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Group 1 (0%)	31.6	22.5	-	-	-	-
Group 2 (0.08%)	30.0	17.2	0.02	0.01	8.76	5.03
Group 3 (0.4%)	24.1	26.4	0.97	0.11	35.3	38.5
Group 4 (2.0%)	25.2	19.3	0.50	0.39	184	141

Table 2 Relative organ weights of Wistar Hannover male rats treated with tocotorrienol in 52 weeks

Organ	Group 1 (0%)	Group 2 (0.08%)	Group 3 (0.4%)	Group 4 (2%)
No. of rats	10	10	10	14
Body Weight (g)	522 ± 6 ^{1 a)}	524 ± 43	504 ± 46	454 ± 51 ^{**}
Brain (g)	2.11 ± 0.14	2.16 ± 0.11	2.19 ± 0.09	2.13 ± 0.08
Lungs (g)	0.70 ± 0.07	0.68 ± 0.06	0.72 ± 0.07	0.66 ± 0.04
Heart (g)	1.14 ± 0.13	1.19 ± 0.09	1.18 ± 0.10	1.18 ± 0.13
Spleen (g)	0.76 ± 0.13	0.73 ± 0.10	0.79 ± 0.08	0.72 ± 0.13
Liver (g)	13.5 ± 1.9	13.5 ± 2.1	12.8 ± 1.6	11.8 ± 1.3 [*]
Adrenals (mg)	24.0 ± 3.49	24.5 ± 2.53	21.9 ± 4.23	24.9 ± 5.12
Kidneys (g)	1.33 ± 0.20	1.41 ± 0.16	1.39 ± 0.15	1.32 ± 0.15
Testes (g)	1.91 ± 0.24	1.97 ± 0.17	1.92 ± 0.10	1.84 ± 0.21
Organ/body	Group 1 (0%)	Group 2 (0.08%)	Group 3 (0.4%)	Group 4 (2%)
Brain (g%)	0.41 ± 0.03	0.41 ± 0.03	0.44 ± 0.04	0.47 ± 0.05 ^{**}
Lungs (g%)	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01 [*]
Heart (g%)	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.26 ± 0.03 ^{**}
Spleen(g%)	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.02
Liver (g%)	2.59 ± 0.13	2.57 ± 0.37	2.54 ± 0.23	2.61 ± 0.26
Adrenals (mg%)	4.62 ± 0.60	4.68 ± 0.39	4.35 ± 0.77	5.44 ± 0.66 ^{**}
Kidneys (g%)	0.26 ± 0.02	0.27 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.29 ± 0.02 ^{**}
Testes (g%)	0.37 ± 0.03	0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.03	0.41 ± 0.05 [*]

^{a)} Mean ± S.D.

^{*}, ^{**}, ^{***} $P < 0.05, 0.01$ vs. Group 1