

Table 3 Relative organ weights of Wistar Hannover female rats treated with tocotorienol in 52 weeks

Organ	Group 1 (0%)	Group 2 (0.08%)	Group 3 (0.4%)	Group 4 (2%)
	No. of rats	10	10	20
Body Weight (g)	287 ± 23 ^{a)}	290 ± 29	322 ± 57 *	250 ± 21 **
Brain (g)	1.96 ± 0.05	1.94 ± 0.10	1.99 ± 0.10	1.96 ± 0.08
Lungs (g)	0.52 ± 0.03	0.50 ± 0.05	0.51 ± 0.04	0.48 ± 0.11
Heart (g)	0.76 ± 0.07	0.76 ± 0.06	0.84 ± 0.07**	0.78 ± 0.06
Spleen (g)	0.53 ± 0.04	0.56 ± 0.11	0.56 ± 0.06	0.49 ± 0.08
Liver (g)	7.13 ± 1.02	7.17 ± 0.79	8.18 ± 0.94 *	7.52 ± 0.88
Adrenals (mg)	30.7 ± 5.13	31.0 ± 4.86	30.0 ± 3.83	32.0 ± 4.10
Kidneys (g)	0.85 ± 0.10	0.85 ± 0.06	0.95 ± 0.08**	0.83 ± 0.06
Organ/body	Group 1 (0%)	Group 2 (0.08%)	Group 3 (0.4%)	Group 4 (2%)
Brain (g%)	0.69 ± 0.06	0.68 ± 0.09	0.64 ± 0.11	0.79 ± 0.06**
Lungs (g%)	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.03	0.16 ± 0.02	0.19 ± 0.04
Heart (g%)	0.26 ± 0.03	0.26 ± 0.02	0.27 ± 0.03	0.31 ± 0.03**
Spleen (g%)	0.18 ± 0.02	0.19 ± 0.04	0.18 ± 0.03	0.20 ± 0.03
Liver (g%)	2.48 ± 0.25	2.48 ± 0.23	2.57 ± 0.26	3.01 ± 0.24**
Adrenals (g%)	10.7 ± 1.79	10.7 ± 1.64	9.5 ± 1.70	12.9 ± 1.90**
Kidneys (g%)	0.30 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.30 ± 0.05	0.33 ± 0.02**

^{a)} Mean ± S.D.

*** $P < 0.05$, 0.01 vs. Group 1

Table 4 Hematological and serum biochemical data for Wistar Hannover male rats treated with tocotrienol for 52 weeks

Item	Group 1 (0%)	Group 2 (0.08%)	Group 3 (0.4%)	Group 4 (2%)
No. of rats	10	10	10	14
RBC ($10^4/\mu\text{l}$)	826 \pm 22 ^{a)}	780 \pm 65*	825 \pm 34	825 \pm 41
Hb (g/dl)	15.3 \pm 0.3	14.7 \pm 0.9*	14.7 \pm 0.5	14.6 \pm 0.7*
Ht (%)	49.1 \pm 1.1	46.4 \pm 3.2**	47.1 \pm 2.0	47.2 \pm 2.1*
MCV (FL)	59.4 \pm 1.3	59.4 \pm 2.1	57.1 \pm 1.8**	57.2 \pm 1.4**
MCH (pg)	18.3 \pm 0.7	18.9 \pm 0.9	17.8 \pm 0.6	17.7 \pm 0.6*
MCHC (g/dl)	31.1 \pm 0.6	31.7 \pm 0.7*	31.3 \pm 0.7	31 \pm 0.7
WBC ($10^2/\mu\text{l}$) ^{b)}	3960 \pm 967	2820 \pm 751**	3430 \pm 503	3450 \pm 958
Seg (%)	34.3 \pm 8.3	35.8 \pm 9.0	31.9 \pm 6.8	36.5 \pm 11.2
Eosino (%)	1.17 \pm 0.41	1.63 \pm 0.92	1.57 \pm 0.79	1.43 \pm 0.53
Lymph (%)	63.5 \pm 8.4	61.8 \pm 8.5	66.0 \pm 7.6	61.5 \pm 11.4
Mono (%)	1.88 \pm 0.83	1.38 \pm 0.52	1.43 \pm 0.53	1.64 \pm 0.81
APTT (sec)	45.7 \pm 26.7	27.4 \pm 6.4*	32.2 \pm 5.6	51.7 \pm 17.3
Prothrombin time (sec)	13.0 \pm 1.7	12.3 \pm 0.9	12.3 \pm 1.1	18.6 \pm 5.5**
Fibrinogen (mg/dl)	274 \pm 46	286 \pm 54	272 \pm 23	253 \pm 18
TP(g/dl)	6.67 \pm 0.29	6.58 \pm 0.30	6.60 \pm 0.26	6.58 \pm 0.23
A/G	1.55 \pm 0.15	1.63 \pm 0.27	1.72 \pm 0.20	1.92 \pm 0.25**
Alb(g/dl)	4.25 \pm 0.21	4.26 \pm 0.28	4.29 \pm 0.19	4.39 \pm 0.18
Total Bil (mg/dl)	0.06 \pm 0.02	0.07 \pm 0.02	0.07 \pm 0.01	0.07 \pm 0.02
Direct Bil (mg/dl)	0.04 \pm 0.02	0.05 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01**
Indirect Bil (mg/dl)	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01
Triglyceride (mg/dl)	165 \pm 449	147 \pm 79	111 \pm 45*	90 \pm 15**
Total Chol (mg/dl)	106 \pm 28	104 \pm 32	85 \pm 13	93 \pm 19
Free Chol (mg/dl)	27.2 \pm 8.00	27.3 \pm 7.7	23.1 \pm 3.4	25.9 \pm 5.6
Ester Chol (mg/dl)	85.2 \pm 21.2	82.4 \pm 26.3	65.8 \pm 10.3*	71.3 \pm 13.6
Chol ester ratio (%)	77.1 \pm 1.3	75.4 \pm 1.7**	74.6 \pm 1.3**	74.8 \pm 1.4**
Free fatty acid ($\mu\text{EQ/l}$)	674 \pm 121	727 \pm 64	677 \pm 149	661 \pm 166
Phospholipid (mg/dl)	165 \pm 28	160 \pm 39	139 \pm 18*	143 \pm 22
ChE (IU/l)	4.9 \pm 0.9	4.4 \pm 0.7	4.5 \pm 0.9	4.4 \pm 0.8
Glucose (mg/dl)	170 \pm 13	159 \pm 9	155 \pm 14*	154 \pm 14**
BUN (mg/dl)	19.0 \pm 1.9	19.1 \pm 3.7	19.1 \pm 2.9	21.1 \pm 2.1
CRN (mg/dl)	0.30 \pm 0.04	0.3 \pm 0.03	0.32 \pm 0.03	0.30 \pm 0.03
Ca (mg/dl)	10.1 \pm 0.2	10.1 \pm 0.4	10.1 \pm 0.3	10.3 \pm 0.4
P (mg/dl)	4.67 \pm 0.36	4.86 \pm 0.42	4.81 \pm 0.32	5.34 \pm 0.54*
Na (mEQ/l)	140 \pm 2	139 \pm 3	143 \pm 2*	144 \pm 2**
K (mEQ/l)	4.24 \pm 0.29	4.26 \pm 0.20	4.51 \pm 0.28*	4.29 \pm 0.33
Cl (mEQ/l)	100 \pm 2	100 \pm 2	103 \pm 1**	104 \pm 1**
AST (IU/l)	94 \pm 24	101 \pm 24	104 \pm 27	133 \pm 71*
ALT (IU/l)	51 \pm 14	50 \pm 16	57 \pm 18	106 \pm 51**
γ -GTP (IU/l)	2 \pm 0	2 \pm 0	2 \pm 0	2 \pm 0
ALP (IU/l)	341 \pm 59	370 \pm 84	391 \pm 156	616 \pm 119**
LDH (IU/l)	1540 \pm 916	1690 \pm 667	1730 \pm 751	676 \pm 595**

^{a)} Mean \pm S.D.

^{b)} Seg, Segmented leukocyte; Eosino, Eosinophilic leukocyte; Baso, Basophilic leukocyte; Lymph, Lymphocyte; Mono, Monocyte

*, **: Significantly different from the group 1 at $P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively.

Table 5 Hematological and serum biological data for Wistar Hannover female rats treated with tocotrienol for 52 weeks

Item	Group 1 (0%)	Group 2 (0.08%)	Group 3 (0.4%)	Group 4 (2%)
No. of rats	10	10	10	20
RBC ($10^4/\mu\text{l}$)	710 \pm 31.2 ^{a)}	713 \pm 46.3	693 \pm 35	696 \pm 32
Hb (g/dl)	14.4 \pm 0.6	14.5 \pm 0.7	14.2 \pm 0.7	13.7 \pm 0.5 ^{**}
Ht (%)	45.8 \pm 2.1	45.4 \pm 2.3	44.1 \pm 2.6	42.6 \pm 2.1 ^{**}
MCV (fL)	64.6 \pm 1.78	63.6 \pm 1.71	63.6 \pm 1.26	61.1 \pm 1.52 ^{**}
MCH (pg)	20.5 \pm 0.5	20.2 \pm 0.9	20.4 \pm 0.5	19.7 \pm 0.9 ^{**}
MCHC (g/dl)	31.4 \pm 0.7	31.8 \pm 0.4	32.1 \pm 0.6	32.2 \pm 1.0 [*]
WBC ($10^2/\mu\text{l}$) ^{b)}	2590 \pm 656	2210 \pm 584	2790 \pm 764	2920 \pm 1130
Seg (%)	31.9 \pm 8.8	33.7 \pm 10.6	27.3 \pm 10.9	31.4 \pm 11.1
Eosino (%)	1.63 \pm 0.74	1.29 \pm 0.49	2.00 \pm 1.55	1.36 \pm 0.50
Lymph (%)	64.9 \pm 9.1	63.7 \pm 10.5	69.5 \pm 10.8	66.0 \pm 11.6
Mono (%)	2.11 \pm 0.78	1.89 \pm 0.78	2.50 \pm 1.07	2.06 \pm 0.94
APTT (sec)	44.0 \pm 8.9	39.0 \pm 8.6	39.9 \pm 5.7	49.1 \pm 8.0
Prothrombin time (sec)	11.6 \pm 0.6	12.4 \pm 2.1	12.2 \pm 0.6	11.3 \pm 0.5
Fibrinogen (mg/dl)	167 \pm 26	155 \pm 41	179 \pm 17	158 \pm 48
TP (g/dl)	6.79 \pm 0.27	7.13 \pm 0.33 [*]	6.95 \pm 0.23	7.04 \pm 0.32 [*]
A/G	2.36 \pm 0.35	2.18 \pm 0.36	2.20 \pm 0.26	2.15 \pm 0.31
Alb (g/dl)	4.91 \pm 0.19	5.03 \pm 0.25	4.91 \pm 0.17	4.85 \pm 0.33
Total Bil (mg/dl)	0.10 \pm 0.03	0.09 \pm 0.03	0.08 \pm 0.01	0.07 \pm 0.02 ^{**}
Direct Bil (mg/dl)	0.07 \pm 0.02	0.07 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01	0.06 \pm 0.02 [*]
Indirect Bil (mg/dl)	0.02 \pm 0.01	0.03 \pm 0.02	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01 ^{**}
Triglyceride (mg/dl)	46.3 \pm 28.1	62.3 \pm 73.4	72.4 \pm 35.9	43.1 \pm 26.2
Total Chol (mg/dl)	78.3 \pm 13.0	94.2 \pm 15.8 [*]	77.9 \pm 17.8	80.7 \pm 14.9
Free Chol (mg/dl)	21.4 \pm 3.8	25.6 \pm 4.3 [*]	21.4 \pm 4.8	22.3 \pm 4.4
Ester Chol (mg/dl)	61.3 \pm 10.1	73.0 \pm 11.3 [*]	60.9 \pm 13.8	61.6 \pm 11.1
Chol ester ratio (%)	76.6 \pm 2.6	76.2 \pm 1.2	76.3 \pm 1.1	75.9 \pm 1.6
Free fatty acid ($\mu\text{EQ/l}$)	556 \pm 147	621 \pm 160	597 \pm 190	571 \pm 211
Phospholipid (mg/dl)	150 \pm 17	179 \pm 23 ^{**}	153 \pm 28	146 \pm 18
ChE (IU/l)	5.8 \pm 1.6	6.0 \pm 1.2	6.0 \pm 1.9	6.6 \pm 1.7
Glucose (mg/dl)	146 \pm 18	144 \pm 21	146 \pm 6	140 \pm 23
BUN (mg/dl)	19.9 \pm 2.7	18.5 \pm 2.6	19.1 \pm 4.7	21.9 \pm 3.2
CRN (mg/dl)	0.30 \pm 0.04	0.28 \pm 0.03	0.30 \pm 0.03	0.32 \pm 0.04
Ca (mg/dl)	10.2 \pm 0.2	10.4 \pm 0.5	10.2 \pm 0.2	10.1 \pm 0.3
P (mg/dl)	4.67 \pm 0.64	5.05 \pm 0.78	4.83 \pm 0.54	4.74 \pm 0.55
Na (mEQ/l)	143 \pm 2	142 \pm 2	143 \pm 1	143 \pm 1
K (mEQ/l)	3.93 \pm 0.31	4.31 \pm 0.66	4.04 \pm 0.36	3.74 \pm 0.40
Cl (mEQ/l)	103 \pm 2	102 \pm 2	103 \pm 1	104 \pm 1
AST (IU/l)	98.9 \pm 36.5	85.8 \pm 14.1	92.5 \pm 29.3	85.1 \pm 16.4
ALT (IU/l)	43.9 \pm 13.5	36.3 \pm 7.2	53.0 \pm 24.7	47.3 \pm 11.6
γ -GTP (IU/l)	2 \pm 0	2 \pm 0	2 \pm 0	2 \pm 0
ALP (IU/l)	138 \pm 95	143 \pm 73	214 \pm 196	300 \pm 200 [*]
LDH (IU/l)	1230 \pm 677	1330 \pm 508	1190 \pm 433	1010 \pm 513

^{a)} Mean \pm S.D.

^{b)} Seg, Segmented leukocyte; Eosino, Eosinophilic leukocyte; Baso, Basophilic leukocyte; Lymph, Lymphocyte; Mono, Monocyte

^{*}, ^{**}: Significantly different from the group 1 at $P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively.

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

フェルラ酸の安全性評価に関する研究
分担研究者 田中卓二 金沢医科大学腫瘍病理学教授

研究要旨：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。F344 ラットを用いたフェルラ酸混餌投与による 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。このようにフェルラ酸の急性毒性や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ので、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）を実施した。両試験ともに、投与用量は雌雄とも対照群（0%）、0.5%、1%および 2%の 4 群とした。その結果、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。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。

A. 研究目的

近年、消費者の自然・天然指向を背景に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。しかし、このような天然添加物の多くは、安全性試験による健康影響の評価が十分にはなされていないのが現状であり、その安全性の評価が早急に求められている。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。このようにフェルラ酸の急性毒性や亜慢性毒性試験結果が散見されるが、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）を実施し、1 年間反復投与試験は終了し病理学的検査を、がん原性試験は継続観察を行っている。

B. 研究方法

1. 実験動物および投与方法

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。

2.被験物質および飼料の調製

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、給餌まで冷暗所(<4℃)に保存した。

3.試験方法

倫理面への配慮として、動物実験は本学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

「フェルラ酸1年間反復投与試験」

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、精嚢腺、凝固腺、精巣上体、卵管、膈、乳腺、リンパ節、胸骨、大腿骨、脊髄、座骨神経、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ぺプチダーゼ(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。

「フェルラ酸がん原性試験(2年間)」

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。

C. 結果

「フェルラ酸1年間反復投与試験」

一般症状： 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。

体重および摂餌量： フェルラ酸投与群試験期間中における各群の平均体重の推移をFig. 1（雄）、Fig. 2（雌）に示した。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をTable 1に示した。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： 血液学的検査の結果をTable 2（雄）、Table 3（雌）に示した。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： 血液生化学的検査の結果をTable 4（雄）、Table 5（雌）に示す。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： 体重および臓器重量の結果をTables 6、7（雄）、Tables 8、9

（雌）に示す。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す。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。

病理組織学的所見： 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。

「フェルラ酸がん原性試験（2年間）」

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。現在までの平均体重の推移をFig. 3（雄）、Fig. 4（雌）に示す。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をTable 10に示すが、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いない。

D. 考察

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

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。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.

- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) Kohno H, Suzuki R, Sugie S, Tsuda H, Tanaka T. Lack of modifying effects of 4-ter *t*-octylphenol and benzyl butyl phthalate on 3,2-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced prostate carcinogenesis in rats. *Cancer Sci.* 2004 95: 300-305.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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

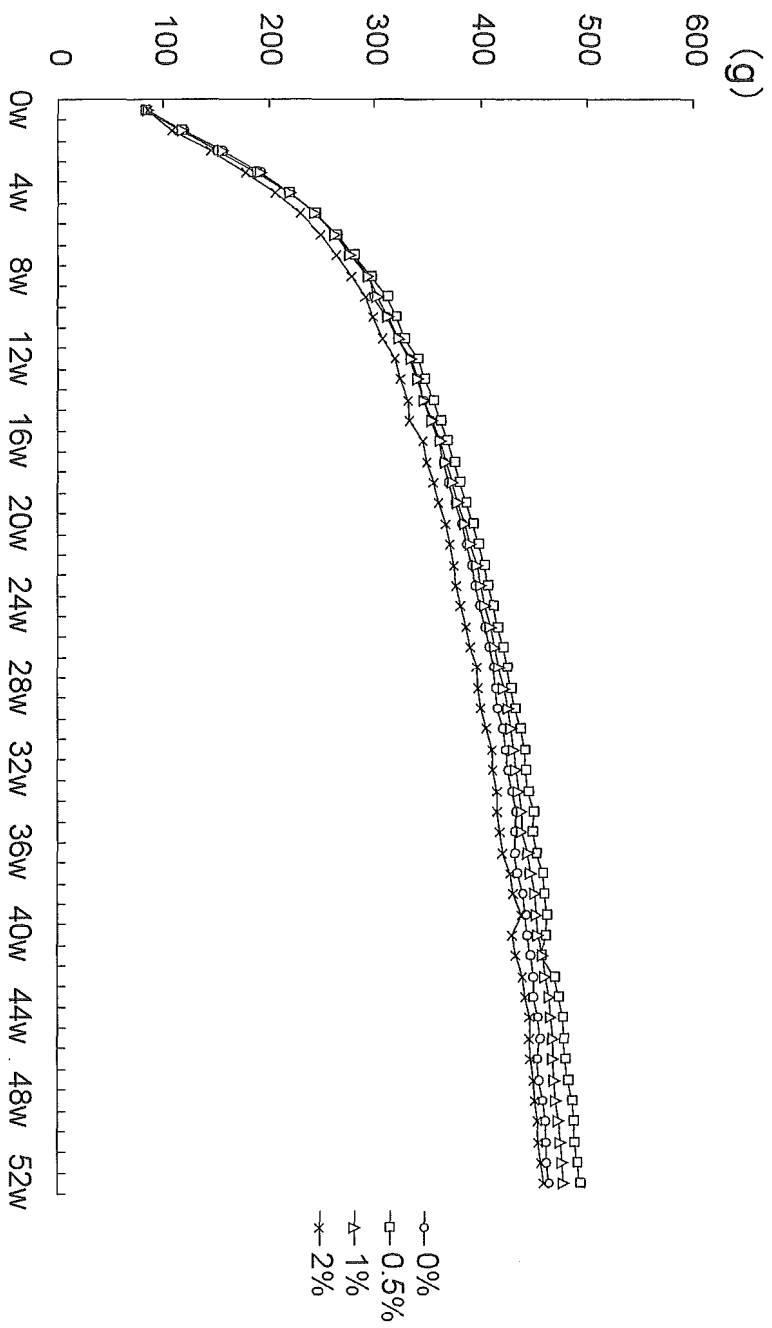


Fig.1. Body weight curves for male F344 rats with ferulic acid for 52 weeks

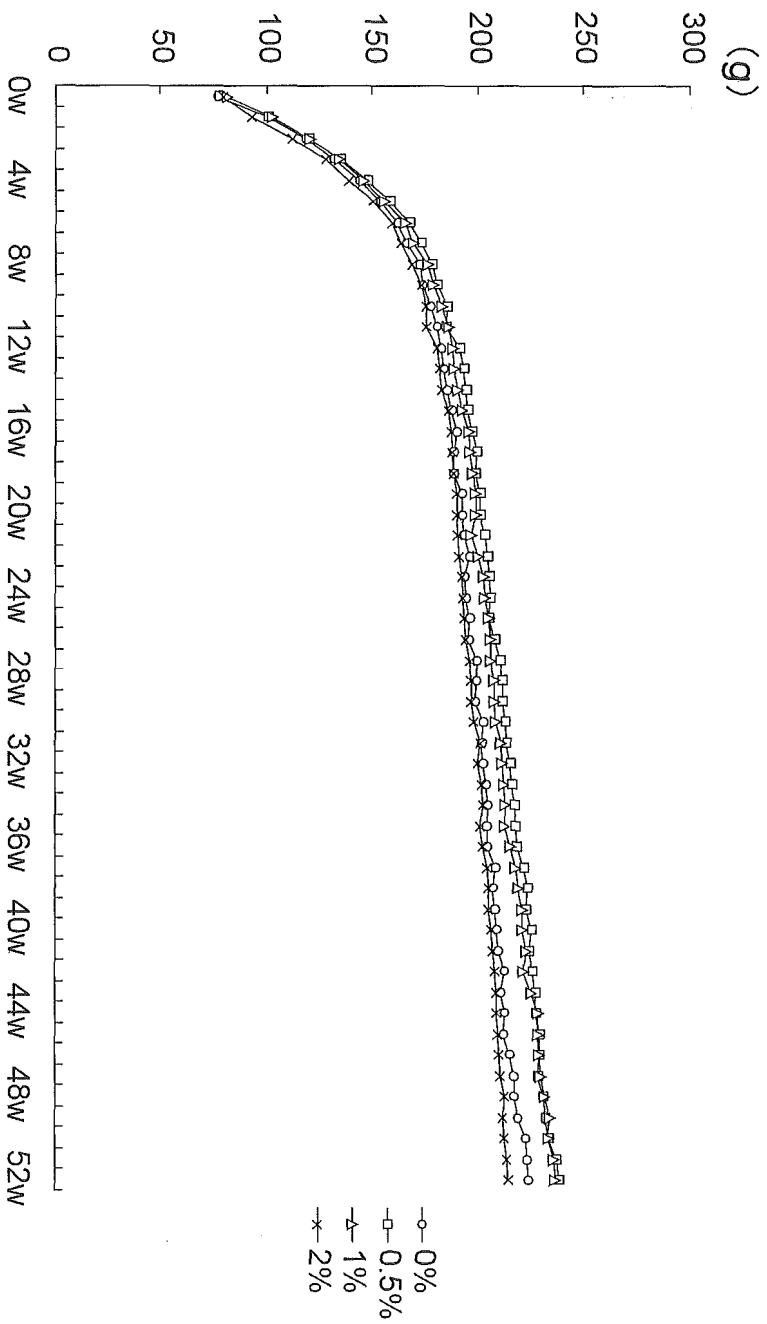


Fig. 2. Body weight curves for female F344 rats with ferulic acid for 52 weeks

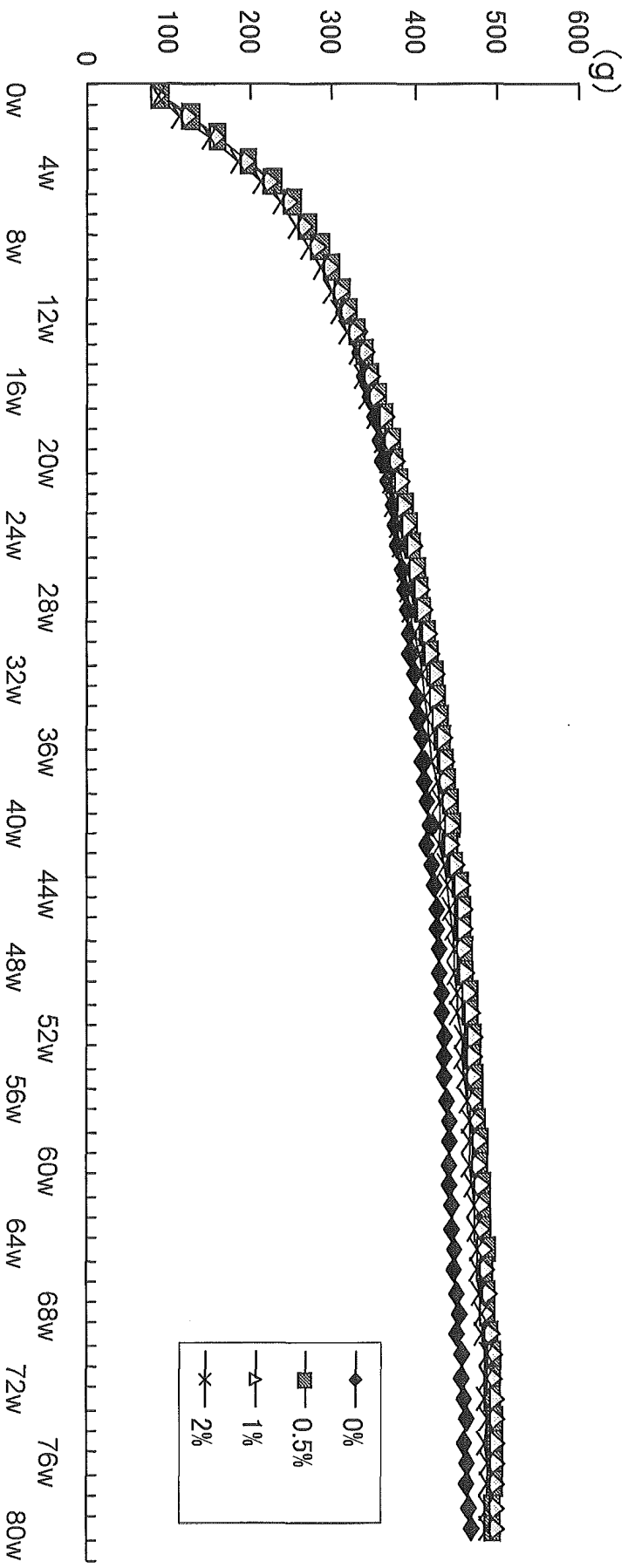


Fig. 3. Body weight curves for male F344 rats in a 2 year-bioassay of ferulic acid

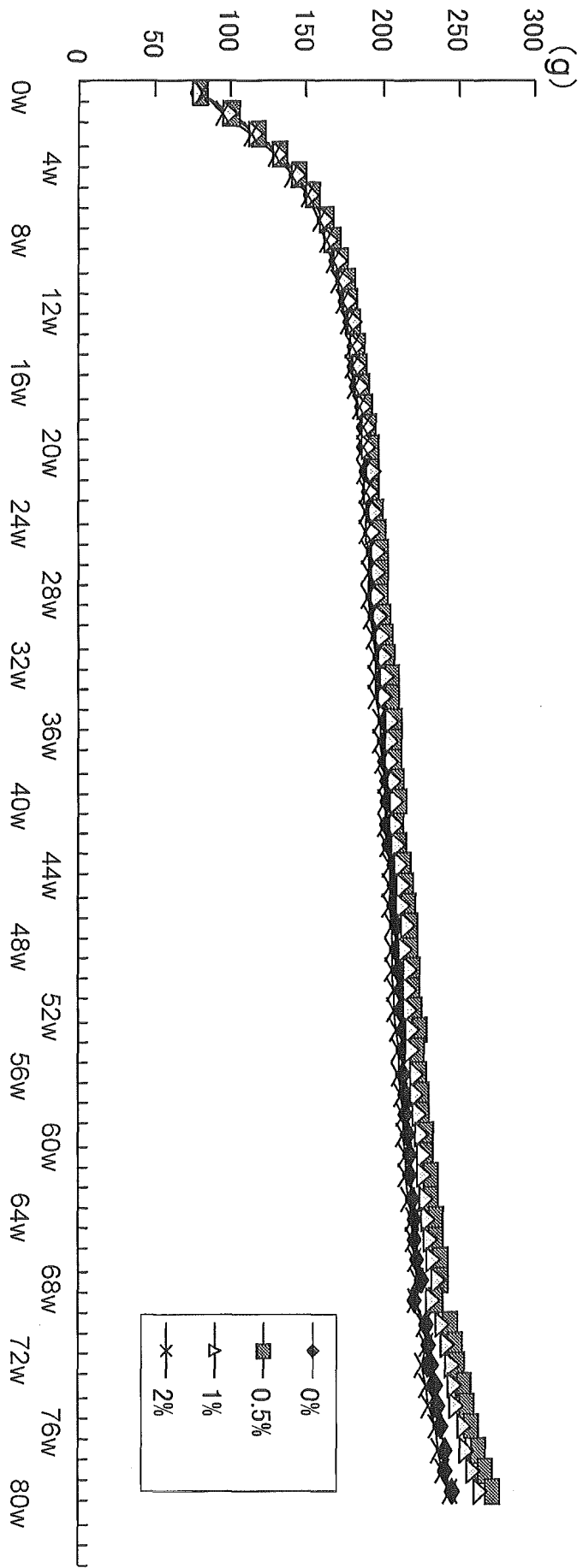


Fig. 4. Body weight curves for female F344 rats in a 2 year-bioassay of ferulic acid

Table 1. Food consumption and intake of ferulic acid

Sex	Dose	Food consumption	Intake of ferulic acid		Total intake of ferulic acid
		(g/rat/day)	(mg/rat/day)	(mg/kg/day)	(g/rat)
Male	0	14.2 ± 1.1 ^a	–	–	–
	0.5	11.9 ± 2.0	59.5 ± 10.1	120.1 ± 20.4	21.7 ± 3.7
	1.0	12.0 ± 2.4	119.8 ± 23.6	250.5 ± 49.3	43.6 ± 8.6
	2.0	12.8 ± 2.7	255.0 ± 53.8	557.6 ± 117.6	92.8 ± 19.6
Female	0	8.5 ± 1.2	–	–	–
	0.5	6.7 ± 1.9	33.7 ± 9.7	140.4 ± 40.4	11.3 ± 3.5
	1.0	7.0 ± 2.0	70.4 ± 20.3	294.1 ± 84.8	25.6 ± 7.4
	2.0	7.8 ± 2.4	155.4 ± 48.0	717.4 ± 221.6	56.6 ± 17.5

^a Means ± SD.

Table 2. Hematological data in F344 male rats given ferulic acid for 52 weeks

Item	Dose level (%)			
	0	0.5	1.0	2.0
WBC	($\times 10^2/\mu\text{L}$) 44.3 \pm 10.2 ^a	43.9 \pm 13.8	41.4 \pm 9.1	37.1 \pm 6.7
RBC	($\times 10^4/\mu\text{L}$) 893.4 \pm 37.0	896.2 \pm 16.0	902.3 \pm 17.3	899.1 \pm 22.3
Hb	(g/dL) 14.6 \pm 0.2	14.7 \pm 0.3	14.8 \pm 0.3	14.7 \pm 0.6
Ht	(%) 44.7 \pm 0.9	44.7 \pm 0.9	45.2 \pm 0.5	44.6 \pm 1.1
MCV	(fL) 50.2 \pm 1.5	49.9 \pm 0.9	50.1 \pm 0.7	49.6 \pm 0.7
MCH	(pg) 16.4 \pm 0.5	16.5 \pm 0.2	16.4 \pm 0.3	16.3 \pm 0.4
MCHC	(g/dL) 32.7 \pm 0.3	33.0 \pm 0.6	32.7 \pm 0.6	32.9 \pm 1.0
PLT	($\times 10^4/\mu\text{L}$) 58.7 \pm 5.5	54.6 \pm 7.1	56.9 \pm 7.1	53.5 \pm 5.6
Differential cell counts (%)				
Neutro	43.3 \pm 18.5	35.8 \pm 6.8	44.0 \pm 9.4	38.6 \pm 6.2
Eosino	1.1 \pm 0.8	1.2 \pm 0.8	0.5 \pm 0.5	1.0 \pm 1.3
Baso	0.2 \pm 0.4	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.3
Lymph	53.0 \pm 18.3	59.8 \pm 7.1	51.4 \pm 9.9	57.6 \pm 6.6
Mono	2.4 \pm 0.8	3.2 \pm 1.2	4.1 \pm 2.3	2.7 \pm 1.1

^a Means \pm SD.

Table 3. Hematological data in F344 female rats given ferulic acid for 52 weeks

Item	Dose level (%)			
	0	0.5	1.0	2.0
WBC	($\times 10^2/\mu\text{L}$) 27.6 \pm 7.0	20.4 \pm 3.4 ^b	21.4 \pm 5.0	21.1 \pm 4.0 ^b
RBC	($\times 10^4/\mu\text{L}$) 779.0 \pm 13.4	800.6 \pm 24.8 ^b	811.2 \pm 15.2 ^c	795.7 \pm 12.0
Hb	(g/dL) 14.3 \pm 0.3	14.6 \pm 0.5	14.6 \pm 0.2	14.2 \pm 0.3
Ht	(%) 42.4 \pm 1.2	44.8 \pm 1.5	47.4 \pm 5.3	43.6 \pm 0.9
MCV	(fL) 54.4 \pm 0.7	55.9 \pm 0.7	56.0 \pm 1.0	55.0 \pm 0.8
MCH	(pg) 18.3 \pm 0.3	18.2 \pm 0.4	18.0 \pm 0.3	17.9 \pm 0.3
MCHC	(g/dL) 33.7 \pm 0.6	32.5 \pm 0.5	32.3 \pm 0.4	32.5 \pm 0.6
PLT	($\times 10^4/\mu\text{L}$) 55.5 \pm 6.0	43.1 \pm 7.9 ^d	43.0 \pm 8.8 ^d	46.7 \pm 7.5
Differential cell counts (%)				
Neutro	36.6 \pm 20.0	16.4 \pm 9.7 ^d	22.4 \pm 10.9	20.7 \pm 8.3
Eosino	0.7 \pm 0.7	1.1 \pm 1.2	1.2 \pm 0.5	1.3 \pm 1.1
Baso	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.4
Lymph	59.9 \pm 19.7	80.7 \pm 10.0 ^d	72.6 \pm 11.0	75.4 \pm 9.0
Mono	2.4 \pm 1.1	1.7 \pm 0.5	3.8 \pm 0.5 ^b	2.4 \pm 1.3

^a Means \pm SD.

Significantly different from control group by one-way ANOVA, Bonferroni multiple comparison test (^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.001$ and ^d $P < 0.01$).

Table 4. Serum biochemical data in F344 male rats given ferulic acid for 52 weeks

Item	Dose level (%)			
	0	0.5	1.0	2.0
TP (g/dL)	6.6 ± 0.1 ^a	6.6 ± 0.1	6.6 ± 0.2	6.6 ± 0.1
Alb (g/dL)	2.7 ± 0.1	2.8 ± 0.1	2.8 ± 0.1	2.8 ± 0.1
A/G	0.71 ± 0.02	0.73 ± 0.02	0.71 ± 0.02	0.74 ± 0.03
AST (IU/dL)	132.5 ± 12.5	134.3 ± 16.2	135.8 ± 18.8	109.9 ± 9.9 ^b
ALT (IU/dL)	108.4 ± 12.6	100.1 ± 17.8	105.7 ± 15.7	85.0 ± 10.1 ^b
ALP (IU/dL)	890.0 ± 88.7	940.4 ± 98.1	864.9 ± 106.9	802.1 ± 80.7
γ-GTP (IU/dL)	5.1 ± 3.3	5.2 ± 3.0	4.4 ± 1.4	4.1 ± 1.6
T.Bil (mg/dL)	0.02 ± 0.04	0.01 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
CRE (mg/dL)	0.31 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.28 ± 0.02 ^b	0.24 ± 0.02 ^c
BUN (mg/dL)	19.6 ± 1.2	19.3 ± 1.0	18.4 ± 1.1	17.3 ± 0.8 ^c
T-Cho (mg/dL)	121.0 ± 11.6	130.6 ± 17.9	122.7 ± 11.0	113.4 ± 10.2
Na (mEq/dL)	141.9 ± 0.7	142.8 ± 1.5	143.5 ± 1.4	143.6 ± 0.7
K (mEq/dL)	4.5 ± 0.2	4.5 ± 0.4	4.2 ± 0.3	4.2 ± 0.3
Cl (mEq/dL)	101.4 ± 0.7	101.7 ± 0.5	102.9 ± 1.5	103.6 ± 1.4
Ca (mEq/dL)	10.2 ± 0.1	10.4 ± 0.3	10.3 ± 0.2	10.4 ± 0.2
IP (mEq/dL)	4.5 ± 0.3	4.3 ± 0.3	4.2 ± 0.4	4.7 ± 0.2

^a Means ± SD.

Significantly different from control group by one-way ANOVA, Bonferroni multiple comparison test (^b $P < 0.01$ and ^c $P < 0.001$).

Table 5. Serum biochemical data in F344 male rats given ferulic acid for 52 weeks

Item		Dose level (%)			
		0	0.5	1.0	2.0
TP	(g/dL)	7.2 ± 0.3	7.3 ± 0.3	7.2 ± 0.3	7.5 ± 0.4
Alb	(g/dL)	3.3 ± 0.2	3.4 ± 0.2	3.3 ± 0.2	3.5 ± 0.2
A/G		0.85 ± 0.06	0.88 ± 0.05	0.86 ± 0.04	0.87 ± 0.04
AST	(IU/dL)	79.8 ± 13.9	81.4 ± 13.3	85.0 ± 17.5	69.1 ± 6.2
ALT	(IU/dL)	50.1 ± 5.6	46.9 ± 6.3	50.0 ± 8.2	44.6 ± 5.6
ALP	(IU/dL)	478.7 ± 62.5	473.8 ± 64.8	513.6 ± 67.0	468.9 ± 51.0
γ-GTP	(IU/dL)	0.6 ± 0.5	0.3 ± 0.5	0.6 ± 0.7	0.6 ± 0.5
T.Bil	(mg/dL)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
CRE	(mg/dL)	0.27 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.27 ± 0.01	0.28 ± 0.03
BUN	(mg/dL)	19.0 ± 1.5	18.4 ± 2.3	18.9 ± 1.5	19.1 ± 2.2
T-Cho	(mg/dL)	125.5 ± 8.8	132.7 ± 10.6	128.5 ± 13.8	158.5 ± 18.4
Na	(mEq/dL)	142.8 ± 0.9	143.5 ± 1.0	142.9 ± 1.0	143.5 ± 1.1
K	(mEq/dL)	3.9 ± 0.3	3.8 ± 0.2	3.9 ± 0.2	3.9 ± 0.2
Cl	(mEq/dL)	103.5 ± 1.7	101.8 ± 1.3	101.6 ± 1.7	102.3 ± 1.1
Ca	(mEq/dL)	10.5 ± 0.4	10.6 ± 0.2	10.6 ± 0.3	10.7 ± 0.4
IP	(mEq/dL)	3.3 ± 0.4	3.6 ± 0.3	4.1 ± 0.6 ^b	3.7 ± 0.4

^a Means ± SD.

Significantly different from control group by one-way ANOVA, Bonferroni multiple comparison test (^b $P < 0.01$).

Table 6. Final body weight and organ weights data in F344 male rats given ferulic acid for 52 weeks

Item	Dose level (%)			
	0	0.5	1.0	2.0
Body weight (g)	467.3 ± 17.2	495.3 ± 16.2 ^b	478.3 ± 14.3	457.3 ± 28.0
Absolute (g)				
Brain	2.16 ± 0.13	2.31 ± 0.09 ^c	2.38 ± 0.09 ^d	2.35 ± 0.05 ^d
Lungs	1.85 ± 0.12	1.75 ± 0.14	2.06 ± 0.18	2.03 ± 0.22
Heart	1.21 ± 0.07	1.25 ± 0.05	1.23 ± 0.06	1.19 ± 0.09
Spleen	0.71 ± 0.03	0.71 ± 0.03	0.76 ± 0.05	0.75 ± 0.05
Pancreas	0.48 ± 0.06	0.48 ± 0.10	0.57 ± 0.17	0.62 ± 0.19
Liver	14.09 ± 0.87	15.05 ± 1.02	14.71 ± 0.79	14.57 ± 0.90
Adrenals	0.068 ± 0.081	0.045 ± 0.004	0.044 ± 0.004	0.042 ± 0.003
Kidneys	2.56 ± 0.18	2.70 ± 0.19	2.93 ± 0.15	2.81 ± 0.18
Testes	3.24 ± 0.39	3.26 ± 0.33	3.37 ± 0.27	3.26 ± 0.42

^a Means ± SD.

Significantly different from control group by one-way ANOVA, Bonferroni multiple comparison test (^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ and ^d $P < 0.001$).

Table 7. Relative organ weights data in F344 male rats given ferric acid for 52 weeks

Item	Dose level (%)			
	0	0.5	1.0	2.0
Relative (g/100g B.W.)				
Brain	0.46 ± 0.03	0.47 ± 0.02	0.50 ± 0.02	0.51 ± 0.01
Lungs	0.40 ± 0.03	0.35 ± 0.03 ^b	0.43 ± 0.04	0.44 ± 0.05
Heart	0.26 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.02
Spleen	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01
Pancreas	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.12 ± 0.04	0.14 ± 0.04 ^b
Liver	3.02 ± 0.19	3.03 ± 0.20	3.07 ± 0.17	3.19 ± 0.20
Adrenals	0.015 ± 0.017	0.009 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.009 ± 0.001
Kidneys	0.55 ± 0.04	0.55 ± 0.04	0.61 ± 0.03 ^c	0.61 ± 0.04 ^c
Testes	0.69 ± 0.08	0.66 ± 0.07	0.70 ± 0.06	0.71 ± 0.09

^a Means ± SD.

Significantly different from control group by one-way ANOVA, Bonferroni multiple comparison test (^b $P < 0.05$ and ^c $P < 0.01$).