

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 14 年度～16 年度 総合研究報告書

主任研究者 西川秋佳

平成 17 年 4 月

# 目次

I. 総合研究報告書	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 西川秋佳

(資料) 厚生労働科学研究費補助金(食品・化学物質安全総合研究事業)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14年度分担研究報告書

- ヒメマツタケ (*Agaricus blazei* Murrill) 抽出物の安全性評価に関する研究
- ガムベース(コーパル樹脂およびホホバロウ)の安全性評価に関する研究
- アウレオバジウム培養液の安全性評価に関する研究
- マスチックの安全性評価に関する研究
- アルカネット色素の安全性評価に関する研究
- モンタンロウ (Montan wax) の安全性評価に関する研究
- メバロン酸の安全性評価に関する研究

(資料) 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
- フェルラ酸の安全性評価に関する研究

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	170
--------------------	-----

III. 研究成果の刊行物・別刷	171
------------------	-----

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）  
総合研究報告書

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

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、動物実験など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 109 品目のうち、流通実態の確認が困難なもの及び規格の明らかでないものを除いた 30 品目程度について、平成 14 年度から 16 年度の 3 年間で、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、複数の分担研究者と協力し、複数の検体に係る 90 日間反復投与毒性試験および 1 年間慢性毒性／2 年間発がん性併合試験を実施し、データを相互に比較考察することにより、横断的に既存添加物の安全性について検討した。平成 14 年度には、苦味料（ヒメマツタケ抽出物）、ガムベース・光沢剤（コーパル樹脂、ホホバロウ、マスチック、モンタンロウ）、増粘安定剤（アウレオバシジウム培養液）、着色料（アルカネット色素）、製造用剤（メバロン酸）を対象として、ラットを用いる 90 日間反復投与毒性試験を実施した。その結果、無毒性量は、ヒメマツタケ抽出物 5%、コーパル樹脂 1.25%、ホホバロウ 1.25%、アウレオバシジウム培養液 5%、マスチック 0.22%未満、アルカネット色素 5%、モンタンロウ 0.56%未満及びメバロン酸 0.2%と考えられた。平成 15 年度から 16 年度にかけては、トコ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。Wistar Hannover ラットを用いたトコリエノールの 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って無毒性量を求める予定である。また、F344/DuCrj ラットを用いたフェルラ酸の 1 年間慢性毒性・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。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・教授  
鰐淵英機 大阪市立大学医学部・助教授  
廣瀬善信 岐阜大学医学部・講師  
今井田克己 香川大学医学部・教授  
中江 大 佐々木研究所・部長

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。

A. 研究目的

近年、天然性添加物の開発および利用が盛

ヒメマツタケ (*Agaricus blazei* Murrill) はハラタケ科に属する食用キノコで、現在は食用としてよりも主に食薬キノコおよび機能性食品として広く用いられている。その抽

出物は苦味料として食品添加物に使用されている。既存の食品添加物ではあるが、マウス Sarcoma-180 固形癌および線維肉腫に対する抗腫瘍活性、ヒトリンパ性白血病細胞の増殖阻害作用、急性肝障害モデルラットにおける肝機能改善効果を有することが報告されている。また、ヒメマツタケ抽出物は変異原性が陰性であり、さらに変異原物質 methyl methanesulfonate を処置したハムスターV79 細胞において comet assay で抗変異原作用を有することも確認されている。

コーパル樹脂 copal resin は、ナンヨウスギ科アガティクスロランティフォリア

(*Agathis loranthifolia* SALISB.) の幹の分泌液から、低沸点部を蒸留により除去後、室温にてエタノールで抽出し、ろ液からエタノールを留去して得られたもので、アガテンジカルボン酸を主構成成分とする。なお、ナンヨウナギ (*Agathis*) 属樹木の樹脂は一般にコーパルと称される。コーパル樹脂の性状は、黄一黄褐色の貝殻状断面を呈する塊状固体で、芳香があり、水に不溶で、一部エタノールに可溶である。その主な使用対象食品にはチューインガムがあり、米国では接着剤に使用されている。また、速乾性で、硬質の塗膜を作る油絵具のペインティングオイルの原料や箔下バニスの原料として使用されている。

ホホバロウはツゲ科ホホバ (*Simmondsia californica* NUTT.) の果実から採油したホホバ脂より分離して得られる高融点ロウ物質で、その主成分はイコセン酸イコセニルである。その性状は無色一淡金色の粘性液体で、わずかに特有のにおいを発する。水に不溶、冷エタノールに難溶、熱エタノールに可溶、油脂に可溶で、その主な使用対象食品はチューインガムである。また、化粧品 (口紅)、クレヨン、美容、医薬品等にも使用されている。

アウレオバジウム培養液は既存添加物で、アウレオバジウム菌 (黒酵母) の培養液を滅菌して得られる粘稠な液体で、 $\beta$ -1,3-1,6-グルカン を主成分としており、食品の増粘安定剤として用いられている。また、本多糖類は茸類やその抽出液中に含まれており、近年健

康食品としても注目されている。

マスチックは天然物由来の既存添加物で、マスチカジエノン酸を主成分としており、ガムベースとして用いられている。特性として、加熱すると粘性のある流動体となるが、主に、チューインガムベースを可塑化し、樹脂的なテクスチュアを付与する。

アルカネット色素はムラサキ科アルカネット (*Anchusa officinalis*) の根よりエタノール抽出を施して得られたものである。その主成分はキノン系ナフトキノンのアルカニン (alkanin, dioxymethylanthraquinone) であり、この他に alkanin isovalerate、alkanin acetate、デキストリンまたは乳糖を含むことがある。本色素は、北アフリカ・東インド原産でアルカンナとも呼ばれ、同じくナフトキノンであるシコニンの異性体 enantiomers である。従来から、本色素は染め物用として使用され、その根を煎じたものには鎮咳・去痰作用があるとされてかつては薬草として栽培されていたことがあった。食用としては、国産品には現在は使われていないようだが、輸入品で本色素が使用されている該当食品としてはソーセージケーシング、マーガリン、ショートニング、菓子及びワインなどが挙げられている。

モンタンロウ (Montan wax) は褐炭またはリグナイトから有機溶剤で抽出して得られたもので、主成分は脂肪酸とテトラコシルトリアコンタニルアルコールまたは脂肪酸とヘキサコシルトリアコンタニルアルコールのエステルである。モンタンロウはガムベースや菓子、糖衣食品、果実などの表面に光沢性、防湿性等を付与するコーティング剤としての用途があり、既存食品添加物として登録されているものの、これまでに混餌による反復投与毒性に関する報告はほとんどない。

化粧品材料として使用されているメバロン酸は、サルモネラ菌による変異原性試験は陰性であり、ラットの経口および皮下投与による LD<sub>50</sub> は 2 g/kg 以上と報告されているが、反復投与毒性などの安全性情報は報告されていない。

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。

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、LD<sub>50</sub>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。

## B. 研究方法

### <90日間反復投与毒性試験>

#### 1. 被験物質並びに投与方法

ヒメマツタケ抽出物(ABM-EG3)、コーパル樹脂、ホホバロウ、アウレオバジウム培養液、アルカネット色素及びメバロン酸は、それぞれ岩出菌学研究所株式会社(三重)、日本シェラック工業株式会社(大阪)、ミツバ貿易株式会社(商品名ホホパール、東京)、株式会社ソフィー(高知)、大阪化学合金株式会社(神戸)及び旭電化工業株式会社基礎研究所(東京)から供与された。マスチック及びモンタンロウは、株式会社ロッテ(埼玉)から提供された。

予備試験の結果に基づいて、ヒメマツタケ

抽出物、コーパル樹脂或いはホホバロウの用量を5%、2.5%、1.25%、0.63%及び0%に設定し、混餌投与した。同様に、アルカネット色素或いはモンタンロウを5%、1.67%、0.56%及び0%の用量に設定し、混餌投与した。マスチックは、2%、0.67%、0.22%及び0%の用量に設定し、混餌投与した。メバロン酸は、1%、0.2%、0.04%及び0%の用量に設定し、混餌投与した。各原体を基礎粉末飼料CRF-1(オリエンタル酵母工業株式会社、東京)に規定量混じたものを検体として使用した。粉末CRF-1基礎飼料への添加は、オリエンタル酵母工業株式会社に依頼した。それぞれの濃度のCRF-1粉末飼料を90日間自由に摂取させ、対照群(0%群)にはCRF-1粉末飼料のみを同様に摂取させた。飼料は毎週1回交換し、同時に体重および摂餌量を測定した。アウレオバジウム培養液は、乾燥し長期の安定性を確認する分析が困難なため、飲料水に混じり投与することとした。予備試験より、投与最高用量を5%とし、公比3で除して以下1.67%及び0.56%の用量に設定した。検体は週に2回交換し、それぞれの濃度の飲料水を90日間自由に摂取させ、対照群には水道水のみを摂取させた。

#### 2. 動物並びに飼育条件

施設毎に、5週齢のF344ラット(F344/DuCrj)雌雄各40-50匹を日本チャールス・リバー社(神奈川)より購入し、約1週間の馴化飼育の後、雌雄とも各群10匹ずつ4-5群に配した。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±1℃、湿度55±5%、換気回数18回/時間、12時間蛍光灯照明、12時間消灯の条件下で行った。動物は、ポリカーボネート製箱形ケージに5匹ずつ収容し、床敷は三協ラボサービス社(東京)のソフトチップを用い、週2回交換した。また、飲料水として水道水を自由に摂取させた。

#### 3. 観察並びに検索方法

投与期間中、一般状態の観察を連日実施し、体重および摂餌量は毎週1回測定した。動物は剖検日前日より絶食させ、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。

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) 及び血小板数 (PLT) について測定した。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)、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) 及び $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ ( $\gamma$ -GT) 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、ハーダー腺、脊髄、唾液腺、胸腺、胃、小腸、大腸、盲腸、膀胱、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た。病理組織学的検索は原則として雌雄の最高用量群と対照群のみ実施し、変化の認められた場合にはその他の群の検索も行った。

#### 4. 統計学的処理法

血液学的検査、血清生化学的検査及び臓器の相対重量については、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。

<トコトリエノールの慢性毒性試験/発がん性併合試験>

#### 1. 被験物質並びに投与方法

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 $\alpha$ -トコトリエノール 21.4%、 $\beta$ -トコトリエノール 3.5%、 $\gamma$ -トコトリエノール 36.5%、 $\delta$ -トコトリエノール 8.6%、 $\alpha$ -トコフェロール 20.5%、 $\beta$ -トコフェロール 0.7%、 $\gamma$ -トコフェロール 1.0%、 $\delta$ -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°C) に保存した。

#### 2. 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°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。

#### 3. 観察並びに検索方法

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)、 $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ( $\gamma$ -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、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。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>

##### 1. 被験物質並びに投与方法

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。

##### 2. 動物並びに飼育条件

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。

### 3. 観察並びに検索方法

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、膣、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）、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ（ $\gamma$ -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

<ヒメマツタケ抽出物の90日間反復投与毒性試験>

試験期間中の動物の一般状態については、いずれの群においても特記すべき変化は認められず、全ての動物が試験終了時まで生存した。体重推移は雌雄とも被験物質投与群と対照群との間に差は認められなかった。ラット一日当りの平均摂餌量は、雄では各群とも約14g前後、雌では各群とも約9g前後で、雌雄ともに摂餌量の有意な群間差は認められなかった。ヒメマツタケ抽出物のラット当



たりの一日平均摂取量(mg/rat/day)は、雄の0.63%、1.25%、2.5%および5%投与群でそれぞれ89、172、354および711、雌ではそれぞれ58、113、223および450であった。また、ヒメマツタケ抽出物の体重当たりの一日平均摂取量(mg/kg/day)は雄の0.63%、1.25%、2.5%および5%投与群でそれぞれ340、669、1346および2654、雌ではそれぞれ376、744、1491および2965であった。ヒメマツタケ抽出物の90日間の総摂取量は、雄の0.63%、1.25%、2.5%および5%投与群でそれぞれ8.0g、15.5g、31.9gおよび64.0g、雌ではそれぞれ5.2g、10.2g、20.1gおよび40.5gであり、雌雄ともに用量にほぼ依存していた。

血液学的検査について、雄では全投与群でいずれの項目においても対照群と比較して有意な変化は認められなかった。雌では5%投与群でMCVの有意な増加がみられたが、他の項目では有意差は認められなかった。

血清生化学的検査について、雄では対照群と比較してALBが1.25%投与群で、TCが0.63%および1.25%投与群で、BUNが2.5%以上の投与群で、Clが1.25%および2.5%投与群でそれぞれ有意な増加を示した。一方、CRNは0.63%以上投与群で対照群と比較して有意な減少を示した。雌ではBUNが1.25%投与群で有意な増加を示したが、他の項目では有意差は認められなかった。

臓器重量に関しては、雌雄とも最終体重および各臓器の実重量において対照群と比較して各投与群とも有意差は認められなかった。相対重量において雄では対照群と比較して肝重量が1.25%および2.5%投与群で、雌では脳重量が2.5%投与群で有意な増加を示した。

病理組織学的検索の結果、雌雄ともに肝に小肉芽腫および髓外造血、心筋に軽度の炎症性細胞浸潤などが散見されたが、対照群および5%投与群に同程度に観察された。雄のみに観察された変化として、腎に好塩基性尿管および近位尿管上皮細胞の軽度の硝子滴沈着が観察されたが、対照群および5%投与群に同程度であった。また、雌では腎髄質に鉍質沈着が散見されたが、両群間に程度の差は認められなかった。雌雄ともにヒメマツ

タケ抽出物の投与に起因すると思われる病変は認められなかった。

<コーパル樹脂の90日間反復投与毒性試験>

試験期間中の動物の一般状態については、いずれの群においても特記すべき変化は認められず、全ての動物が試験終了時まで生存した。体重推移は、雌雄とも被験物質投与群と対照群との間に差は認められなかった。ラット一日当りの平均摂取量は、雄では各群とも約15g前後、雌では各群とも約9g前後で、雌雄ともに摂取量の有意な群間差は認められなかった。コーパル樹脂のラット当たりの一日平均摂取量(mg/rat/day)は、雄の0.625%、1.25%、2.5%および5%投与群でそれぞれ93、188、382および782、雌ではそれぞれ59、119、246および492であった。また、コーパル樹脂の体重当たりの一日平均摂取量(mg/kg/day)は雄の0.625%、1.25%、2.5%および5%投与群でそれぞれ296、596、1272および2596、雌ではそれぞれ371、760、1572および3223であった。コーパル樹脂の90日間の総摂取量は、雄の0.625%、1.25%、2.5%および5%投与群でそれぞれ8.3g、16.9g、34.3gおよび70.3g、雌ではそれぞれ5.3g、10.7g、22.2gおよび44.3gであり、雌雄ともに用量にほぼ依存していた。

血液学的検査について、雄では対照群と比較してMCVが2.5%投与群および5%投与群で有意な増加を、MCHCが5%投与群で有意な低下を示したが、他の項目では有意差は認められなかった。雌ではWBCが2.5%投与群で、RBCが1.25%投与群で、Hbが1.25%投与群および2.5%投与群で、Htが1.25%投与群で、MCVが5%投与群で、MCHが1.25%以上の投与群で、MCHCが1.25%投与群および5%投与群で、PLTが5%投与群でいずれも有意な低下を認めた。白血球の型別分類では、2.5%投与群で好酸球および単球の比率が対照群に比較して有意に減少していた。

血清生化学的検査について、雄では対照群と比較してTPが2.5%投与群および5%投与群で、Albが2.5%投与群および5%投与群で、A/G比が2.5%投与群で、TCが2.5%投与群および5%投与群で、Naが2.5%投与群で、

Caが2.5%投与群それぞれ有意な増加を示した。一方、ALPは5%投与群で対照群と比較して有意な減少を示した。雌では対照群と比較してTPが2.5%投与群および5%投与群で、Albが5%投与群で、A/G比が5%投与群で、TCが2.5%投与群および5%投与群で、Kが2.5%投与群でそれぞれ有意な増加を示した。一方、NaおよびClは2.5%投与群で対照群と比較して有意な減少を示したが、他の項目では有意差は認められなかった。

臓器重量に関しては、雄では対照群に比較して肝重量が0.625%、1.25%、2.5%および5%投与群で有意な増加を示し、脳重量が5%投与群で有意な低下を示した。雌では対照群に比較して最終体重が2.5%投与群および5%投与群で有意な低下を示し、肝重量が1.25%、2.5%および5%投与群で有意な増加を示した。一方、心重量は2.5%および5%投与群で、腎重量は5%投与群で、卵巣重量は0.625%および2.5%投与群で対照群に比べ有意な低下を示した。相対重量においては雄では肝重量が0.625%、1.25%、2.5%および5%投与群で、脾重量および精巣重量が5%投与群でいずれも対照群と比較して有意な増加を示した。雌では対照群と比較して肝重量が1.25%、2.5%および5%投与群で有意に増加し、卵巣重量は0.625%投与群および5%投与群で有意な低下を示した。

病理組織学的検索では、雌雄ともに肝に軽度の脂肪変性が散見されたが、対照群およびコーパル樹脂投与群に同程度に観察された。その他の臓器では雌雄とも腎尿細管上皮細胞に軽度の硝子滴沈着や腎髄質の鉍質沈着が散見されたが、対照群およびコーパル樹脂投与群に同程度であり、雌雄差も認められなかった。雌雄ともにコーパル樹脂投与に起因すると思われる病変は認められなかった。

#### <ホホバロウの90日間反復投与毒性試験>

試験期間中の動物の一般状態に関しては、いずれの群においても特記すべき変化は認められず、全ての動物が試験終了時まで生存した。体重推移は、雄では対照群に比較して0.625%投与群および1.25%投与群で体重増加増強傾向が、2.5%投与群および5%投与群で体重増加抑制傾向がみられた。雌では被験

物質投与群と対照群との間に差は認められなかった。ラット一日当りの平均摂餌量は、雄では各群とも約14g前後、雌では各群とも約9g前後で、雌雄ともに摂餌量の有意な群間差は認められなかった。ホホバロウのラット当たり一日平均摂取量(mg/rat/day)は、雄の0.625%、1.25%、2.5%および5%投与群でそれぞれ93、183、340および657、雌ではそれぞれ59、119、217および414であった。また、ホホバロウの体重当たり一日平均摂取量(mg/kg/day)は雄の0.625%、1.25%、2.5%および5%投与群でそれぞれ294、581、1176および2351、雌ではそれぞれ361、722、1401および2741であった。ホホバロウの90日間の総摂取量は、雄0.625%、1.25%、2.5%および5%投与群でそれぞれ8.4g、16.4g、30.6gおよび59.1g、雌ではそれぞれ5.3g、10.7g、19.5gおよび37.2gであり、雌雄ともに用量にほぼ依存していた。

血液学的検査について、雄では対照群と比較してRBCが0.625%投与群、1.25%投与群および2.5%投与群で有意な増加を、Htが0.625%投与群および5%投与群で有意な増加を、MCVが1.25%投与群で有意な低下と5%投与群で有意な増加を、MCHが0.625%投与群、1.25%投与群および2.5%投与群で有意な低下を、MCHCが5%投与群で有意な低下を、PLTが5%投与群で有意な増加を示した。また、白血球の型別分類では、対照群に比較して好中球が0.625%投与群および5%投与群で有意な低下を、リンパ球が5%投与群で有意な増加を、単球が0.625%投与群で有意な増加を認めた。雌ではRBCが2.5%投与群で、Hbが2.5%投与群で、Htが2.5%投与群で、MCVが2.5%投与群および5%投与群で対照群に比較して有意な低下を示し、MCHが1.25%投与群で、MCHCが2.5%投与群で有意な増加を示したが、他の項目に差はなかった。

血清生化学的検査について、雄では対照群と比較してTPが0.625%投与群で、ALPが5%投与群で、TCが0.625%投与群、2.5%投与群および5%投与群で、Crが5%投与群で、Naが2.5%投与群でそれぞれ有意な増加を示した。一方、A/Gは0.625%投与群で、BUN

は1.25%投与群および2.5%投与群で対照群と比較して有意な減少を示した。雌では対照群と比較してASTが5%投与群で、ALTが5%投与群で、ALPが5%投与群で、BUNが2.5%投与群および5%投与群で、Crが1.25%投与群および2.5%投与群でそれぞれ有意な増加を示した。一方、A/GおよびIPは1.25%投与群で対照群と比較して有意な減少を示し、0.625%投与群のALTは有意な低下を示した。

臓器重量に関しては、雄では対照群に比較して最終体重が2.5%投与群及び5%投与群で低値であったが、有意差はなかった。脾重量は0.625%および1.25%投与群で、腎重量は0.625%投与群で有意な増加を示したが、脳重量は0.625%投与群で有意な低下を示した。雌では対照群に比較して最終体重が5%投与群で有意な低下を示し、腎重量が5%投与群で有意な低下を示した。相対重量においては雄では脳重量、肺重量、脾重量、腎重量、精巣重量が5%投与群でいずれも対照群と比較して有意な増加を示したが、脳重量は0.625%投与群で有意な低下を示した。雌では対照群と比較して脳重量が5%投与群で有意な増加を示した。

病理組織学的検索の結果、雌雄ともに肝においては極く軽度の脂肪変性が、腎尿細管上皮細胞に極く軽度の硝子滴沈着や腎髄質の鉍質沈着を散見したが、対照群およびホホバロウ投与群に同程度に観察され、雌雄差もみられなかった。雌雄ともにホホバロウ投与に起因すると思われる病変は認められなかった。

#### <アウレオバシジウム培養液の90日間反復投与毒性試験>

試験期間中の動物の一般状態については、いずれの群においても特記すべき変化は認められず、全ての動物が試験終了時まで生存した。試験期間中の各群の体重推移については、雌雄とも被験物質投与群と対照群との間に差は認められなかった。ラット一日当りの平均摂餌量は、雌雄ともに各群間に有意な差は認められなかった。ラット一日当りの平均摂水量は雌雄ともに各群間に有意な差は認められなかった。すなわち、アウレオバジウ

ム培養液の摂取量は雌雄とも5%投与、1.67%投与、0.56%投与でそれぞれ用量に依存していた。

雌雄とも最終体重、各臓器の実重量および相対重量において、対照群と比較して各投与群とも有意差は認められなかった。雄では赤血球数とHbが0.56%投与群で、またMCVは1.67%と5%投与群で、対照群に比較して有意に減少した。一方、血小板数が1.67%投与群で有意に増加した。また、雌ではMCHCが1.67%投与群で有意に増加した。他の項目では有意差は認められなかった。

雄では対照群と比較して、TGおよびBUNが5%投与群で有意に増加した。一方、ASTおよびTCは5%投与群で、CRNおよびNaは1.67%以上の投与群で、ALPは1.67%投与群で、有意に減少した。また、雌ではPが0.57%および5%で有意な減少を示した。他の項目では有意差は認められなかった。

病理組織学的検索の結果、雌の肝に巣状の軽度の小肉芽腫および髓外造血、雄では心筋に軽度の炎症性細胞浸潤などが散見されたが、対照群および5%投与群に同程度に観察された。雌雄ともにアウレオバシジウム培養液の投与に起因すると思われる病変は認められなかった。

#### <マスチックの90日間反復投与毒性試験>

試験期間中の動物の一般状態については、いずれの群においても特記すべき変化は認められず、全ての動物が試験終了時まで生存した。雄では、2%投与群で1週間後より対照群に比較し有意に体重が低く、最終の90日までその低体重は認められた。雌では8週間と最終の90日で、2%投与群で対照群に比較し有意に体重が低かった。ラット一日当りの平均摂餌量は、雌雄ともに有意な群間差はなかった。

雄では白血球数が2%投与群で、対照群と比較して有意に増加していた。また、血小板数は0.67%、2%投与群で対照群と比較して有意に増加していた。分核好中球とリンパ球分画は、中間用量の0.67%投与群で対照群と比較して有意に増加していた。一方、雌では明らかな差異は認めなかった。

雄では対照群と比較してTP、ALBが、0.67%以上の投与群で、TCが2%投与群で、Caが2%投与群で、ALPが2%投与群で、それぞれ有意な増加を示した。一方、CRNは0.67%以上投与群で、TGは2%投与群で、対照群と比較して有意な減少を示した。雌ではTPが2%投与群で、TCが0.67%以上の投与群で、BUNが2%投与群で、 $\gamma$ -GTが2%投与群で、有意な増加を示したが、Pは0.22%以上の投与群で有意な減少を示し、ALPは2%投与群で、有意に増加したが、0.22%および0.67%では逆に減少を示した。他の項目では有意差は認められなかった。最終体重は雄では2%投与群で、雌では0.67%以上投与群で、対照群と比較して有意に減少していた。

臓器重量について、肝臓は実重量では、雌雄とも、0.67%以上投与群で有意に増加したが、相対重量では雄は0.22%以上の投与群で、雌は0.67%以上投与群で有意に増加した。胸腺の実重量は、雄では0.22%以上の投与群で、雌では0.22%のみで減少を示した。

病理組織学的検索の結果、雌雄ともに肝に小肉芽腫および髄外造血、心筋に軽度の炎症性細胞浸潤などが散見されたが、対照群および2%投与群に同程度に観察された。雄のみに観察された変化として、腎に腎尿細管腫大、尿細管の硝子滴沈着が観察されたが、対照群および2%投与群に同程度であった。また、雌では1例に副腎皮質の局所的な萎縮が見られた。しかし、雌雄ともにマスチックの投与に起因すると思われる病変は認められなかった。

#### <アルカネット色素の90日間反復投与毒性試験>

実験期間を通じて、すべての動物において一般状態（外観・体位・反応性・行動・神経系・呼吸状態・排泄状態など）に著変は見られなかった。また、アルカネット色素混餌投与により体重増加において各群間に統計学的有意差は認められず、摂餌量の増減にはすべての実験各群で一定の傾向はなかった。解剖時に測定した諸臓器の重量には有意な群間差を認めなかった。

血液学的検査により、0.56%あるいは5%

アルカネット色素投与群雄ラットにおいて白血球減少、5%アルカネット色素投与群雄ラットで貧血、1.67%あるいは5%アルカネット色素投与群雌ラットで血小板増加、アルカネット色素投与群雌ラット全群で白血球分画の変化（好中球増加とリンパ球減少）がみられた。

血液生化学的検査において、5%アルカネット色素投与群雌ラットでアルブミン増加、0.56%あるいは5%アルカネット色素投与群雌ラット及びアルカネット色素投与雄ラット全群でBUN減少、1.67%あるいは5%アルカネット色素投与群雌ラットでクレアチニン減少、5%アルカネット色素投与群雄ラットでトリクリセリド減少、5%アルカネット色素投与群雌雄ラットでGOT減少、0.56%あるいは5%アルカネット色素投与群雌ラットでGPT減少、アルカネット色素投与雌雄ラット全群でALP減少がみられた。

病理組織学的検索の結果、いずれの臓器にもアルカネット色素の投与に起因すると考えられる毒性変化は観察されなかった。

#### <モンタンロウの90日間反復投与毒性試験>

試験期間中の動物の一般状態については、いずれの群においても特記すべき変化は認められず、全ての動物が試験終了時まで生存した。体重推移は、雌雄とも被験物質投与群と対照群との間に差は認められなかった。ラット一日当りの平均摂餌量は、雄では各群とも約16g前後、雌では各群とも約11g前後で、雌雄ともに摂餌量の有意な群間差は認められなかった。モンタンロウのラット当たり一日平均摂取量(mg/rat/day)は、雄の0.56%、1.67%および5%投与群でそれぞれ86、257、および813、雌ではそれぞれ59、169および560であった。また、体重(kg)当たり一日平均摂取量(mg/kg/day)は雄の0.56%、1.67%および5%投与群でそれぞれ401、1159および3837、雌ではそれぞれ414、1200および3868であった。モンタンロウの90日間の総摂取量は、雄の0.56%、1.67%および5%投与群でそれぞれ7.7g、23.1gおよび73.2g、雌ではそれぞれ5.3g、15.2gおよび50.4gであり、雌雄ともに用量にほぼ依

存していた。

血液学的検査について、雄では対照群と比較して、被験物質投与の全群に RBC、Hb、Ht、MCV 及び MCH の有意な減少がみられ、0.56% および 1.67% 投与群で MCHC に、5% 投与群で PLT に有意な減少がみられた。また、全投与群に WBC の有意な増加がみられた。雌では対照群と比較して、全投与群に Hb、Ht、MCV、MCH、MCHC 及び PLT の有意な減少がみられ、0.56% および 1.67% 投与群で RBC に有意な減少がみられた。また、全投与群に WBC の有意な増加がみられた。

血清生化学的検査について、雄では対照群と比較して、全投与群に TC、PL、BUN、K、AST、ALT、ALP の有意な上昇がみられ、0.56% および 1.67% 投与群で BIL に、1.67% 投与群で Cl に有意な上昇がみられた。一方、全投与群に TG の減少が、1.67% および 5% 投与群で ALB、5% 投与群で A/G に有意な減少がみられた。雌では全投与群に BIL、TC、PL、K、AST、ALT、ALP、 $\gamma$ -GTP の有意な上昇がみられ、1.67% および 5% 投与群で BUN、CRN に有意な上昇がみられた。一方、全投与群に A/G、ALB、Na の有意な減少が、5% 投与群で Cl に有意な減少がみられた。

臓器重量に関しては、雄は最終体重が対照群と比較して 0.56% 投与群で有意な減少を示した。また各臓器の実重量において、対照群と比較して全投与群で肺、脾臓、肝臓が有意な増加を示した。また、対照群と比較して、全投与群で唾液腺、0.56% および 1.67% 投与群で心臓、0.56% 投与群で精巣上部に有意な減少が認められた。相対重量において、対照群と比較して、全投与群で肺、脾臓、肝臓が、0.56% および 1.67% 投与群で精巣が、0.56% 投与群で腎臓が有意な増加を示した。雌の最終体重は対照群と比較して各投与群とも有意差は認められなかったが、各臓器の実重量において、対照群と比較して全投与群で肺、脾臓、肝臓、腎臓、0.56% および 5% 投与群で卵巣が有意な増加を示した。相対重量において、対照群と比較して、全投与群で肺、脾臓、肝臓が有意な増加を示した。また、対照群と比較して、5% 投与群で下垂体および唾液腺、0.56% および 1.67% 投与群で心臓、

0.56% 投与群で子宮に有意な減少が認められた。

病理組織学的検索の結果、雌雄とも被験物質投与の全群の肝臓に多発性の肉芽腫様炎症像 (granulomatous inflammation) が認められた。肝全体にびまん性に見られる多発性の結節性病変で一部では多核巨細胞を含む線維性細胞の結節性増殖と、それを中心とするリンパ球浸潤が認められた。また、肝小葉内でもリンパ球浸潤が見られ、肝細胞の壊死も確認され、血中の AST、ALT などの異常高値を反映した組織像を示していた。肺では巣状に白血球浸潤を伴う微小病変がびまん性に見られ、腸間膜リンパ節に granulation が雌雄の被験物質投与の全群に観察された。

<メバロン酸の 90 日間反復投与毒性試験>

試験期間中および休薬期間中の一般状態について、いずれの群にも投与に関連した変化は観察されず、死亡動物も認められなかった。体重推移は、雌雄とも 1% 群で有意な体重増加抑制 (雄で 9 週、雌で 3, 4, 5 および 10 週時) あるいは抑制傾向が散見されたが、休薬期間は対照群との間に有意な差異は雌雄とも観察されなかった。0.2% 群以下の投与群の体重は投与および休薬期間ともに対照群と同様の値で推移した。試験期間中の摂餌量は、投与期間および回復期間ともに雌雄のいずれの投与群においても対照群との間に有意な差異は観察されなかった。メバロン酸の体重当たりの一日平均摂取量 (mg/kg/day) は雄 0.04%、0.2%、1% 群で 29.50、149.54、709.94 mg/kg、雌の雄 0.04%、0.2%、1% 群で 31.29、155.46、750.47 mg/kg と算出した。メバロン酸の 90 日間の総摂取量は雄の雄 0.04%、0.2%、1% 群で 0.48、2.5、11.89 g/rat、雌の雄 0.04%、0.2%、1% 群で 0.35、1.75、8.43 g/rat であり、雌雄ともに用量にほぼ依存していた。

血液学的検査について、投与終了後の 1% 群において、雄で赤血球数が、雌でヘモグロビンおよびヘマトクリット値が有意に減少し、それぞれ軽度な貧血傾向が観察された。0.2% 以下の投与群および全ての群の休薬期間終了後において、対照群との間で有意差は観察されず、貧血傾向も認められなかった。

血液化学学検査について、90 日間の投与

終了後の1%群において、雌雄でALTの上昇、雄でASTの上昇、雌でA/G比の低下、総コレステロールおよび中性脂肪値の有意な増加が認められた。0.2%以下の投与群および全ての群の回復試験群において、対照群との間で有意差は観察されなかった。白血球百分比は、全ての投与群において、対照群との間に有意差は観察されなかった。

臓器重量では、90日間の投与終了後の1%群において、雌雄とも肝臓の絶対および相対重量が増加したが、0.2%以下の投与群では同様の変動は観察されず、全ての群の休薬群において、対照群との間で臓器重量の有意な差異は観察されなかった。肉眼的に、1%群の雌雄の肝臓が脂肪肝様を呈した。0.2%以下の群にはこのような変化は認められなかった。

病理組織学的検索においても1%群の肝臓で投与に関連した変化が観察された。小葉中心性の肝細胞脂肪化が同群の雌雄全例に観察され、一部では小葉中心部だけでなく全域に微細な肝細胞脂肪化が認められた。程度は雄で中等度を示す個体が多く、雌では軽度であり、雄でより強く認められた。また、同群の雌雄全例に軽度な炎症細胞の集簇巣が肝実質内に散見された。同様の変化は0.2%以下の群では認められなかった。そのほか雄で心筋炎、腎尿細管の好酸性小体あるいは雌の腎臓で石灰沈着が散見された。これらはいずれも本系統のこの時期の動物に観察される変化であり、程度・頻度ともに投与に関連した変動は認められなかった。休薬期間終了後の検査では、肝臓に肉眼的異常はいずれの群においても観察されず、病理組織学的検査では1%群の肝細胞脂肪化は著しく減少していた。同群の雄では軽度な脂肪化が残るものの、雌では数例に軽微な脂肪化が観察されるのみであった。また、肝細胞に脂肪化が残る個体ではリンパ球集積および小肉芽腫など炎症が慢性化した組織像が散見された。腎臓、脾臓、骨髄など造血器系の臓器には投与に関連した異常は認められなかった。

<トコト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・30g、雌で約20g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。

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。

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。

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

ラット 90 日間反復投与毒性試験の結果、ヒメマツタケ抽出物、アウレオバシジウム培養液及びアルカネット色素では最高用量でも明らかな毒性影響は見られず、NOAEL は 5%と考えられた。コーパル樹脂では肝重量増加と血清生化学所見、ホホバロウでは摂餌量減少と血清生化学所見を根拠に、NOAEL は 1.25%と考えられた。マスチックでは肝重量増加などが、モンタンロウでは肝肉芽腫などが最低用量から観察され、無毒性量はそれぞれ 0.22%未満及び 0.56%未満と考えられた。また、メバロン酸では肝細胞脂肪化及び血清生化学所見を根拠に、NOAEL は 0.2%と考えられた。このように、マスチック

クとモンタンロウの無毒性量の推定には、低用量投与による追試験が必要と思われる。

トコトリエノールの1年間慢性毒性試験では、最高用量の2.0%群で死亡、体重増加抑制およびAST、ALT、ALP、直接 Bil 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における出血がみられたため、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。トコトリエノールのがん原性試験は、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。フェルラ酸のがん原性試験は、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

ヒメマツタケ抽出物（苦味料）、コーパル樹脂（ガムベース・光沢剤）、ホホバロウ（ガムベース・光沢剤）、マスチック（ガムベース・光沢剤）、モンタンロウ（ガムベース・光沢剤）、アウレオバシジウム培養液（増粘安定剤）、アルカネット色素（着色料）およびメバロン酸（製造用剤）を対象として、ラットを用いた90日間反復投与毒性試験を実施した。その結果、無毒性量は、ヒメマツタケ抽出物5%、コーパル樹脂1.25%、ホホバロウ1.25%、アウレオバシジウム培養液5%、マスチック0.22%未満、アルカネット色素5%、モンタンロウ0.56%未満及びメバロン酸0.2%と考えられた。

また、トコトリエノール（酸化防止剤）およびフェルラ酸（酸化防止剤）のラットを用いた1年間慢性毒性・2年間発がん性併合試験を実施した。その結果、トコトリエノールを投与した雌雄の最高用量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ことになる。一方、フェルラ酸の

1年間慢性毒性試験の結果、無毒性量は2.0%と推定された。トコトリエノールおよびフェルラ酸のがん原性試験は継続中である。

#### F. 健康危険情報

ヒトの健康影響に対する重大な危険情報はみられていない。

#### 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, Kinai 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.
- 7) 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.
  - 8) 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.
  - 9) 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.
  - 10) 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.
  - 11) Nishikawa A, Mori Y, Lee IS, Tanaka T, Hirose M. Cigarette smoking, metabolic activation and carcinogenesis. *Curr Drug Metab.* 2004 5: 363-373.
  - 12) 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.
  - 13) 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.
  - 14) 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.
  - 15) Nishikawa A, Furukawa F, Lee IS, Tanaka T, Hirose M. Potent chemopreventive agents against pancreatic cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2004 4: 373-384.
  - 16) 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.
  - 17) 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.
  - 18) 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.
  - 19) 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.
- 20) 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.
  - 21) 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.
  - 22) 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.
  - 23) 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
  - 24) 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.
  - 25) 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.
  - 26) 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.
  - 27) 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.
  - 28) 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.
  - 29) 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.
  - 30) 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.
- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) 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.
- 34) 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 PPAR $\gamma$  expression and alteration of lipid composition. *Int J Cancer* 2004 110: 896-901.
- 35) Kohno H, Suzuki R, Sugie S, Tsuda H, Tanaka T. Lack of modifying effects of 4-ter *t*-octylphenol and butyl butyl phthalate on 3,2-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced prostate carcinogenesis in rats. *Cancer Sci.* 2004 95: 300-305.
- 36) Hosokawa M, Kudo M, Maeda H, Kohno H, Tanaka T, Miyashita K. Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the PPAR $\gamma$  ligand, troglitazone, on colon cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2004 1675: 113-119.
- 37) 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.
- 38) 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 $\cdot$ alpha expression and cell proliferation. *Carcinogenesis.* 2004 25: 979-985.
- 39) Salim, E. I., Wanibuchi, H., Morimura, K., Wei, M., Mitsuhashi, M., Yoshida, K., Endo, G. and Fukushima, S.: Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in p53 heterozygous knockout and wild-type C57BL/6J mice. *Carcinogenesis*, 24, 335-342, 2003.
- 40) Fukushima, S., Wanibuchi, H., Morimura, K., Wei, M., Nakae, D., Konishi, Y., Tsuda, H., Takasuka, N., Imaida, K., Shirai, T., Tatemetsu, M., Tsukamoto, T., Hirose, M. and Furukawa, F.: Lack of initiation activity in rat liver of low doses of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline. *Cancer Lett.*, 191, 35-40, 2003.
- 41) Tsuda, H., Fukushima, S., Wanibuchi, H., Morimura, K., Nakae, D., Imaida, K., Tatematsu, M., Hirose, M., Wakabayashi, K. and Moore, M.A.: Value of GST-P positive preneoplastic hepatic foci in dose-response studies of hepatocarcinogenesis: Evidence for practical thresholds with both genotoxic and nongenotoxic carcinogens. A review of recent work. *Toxicol. Pthol.*, 31, 80-86, 2003.
- 42) Mitsuhashi, M., Wanibuchi, H., Wei, M., Doi, K., Morimura, K., Masuca, C., Wada, S., Nakatani, T., Kakizoe, T. and Fukushima, S.: Lack of inhibition of BBN-induced bladder

- carcinogenesis in C57BL/6 mice by intravesical instillation of KRN 7000. *J. Toxicol. Pathol.*, 16, 19-23, 2003.
- 43) Seike, N., Wanibuchi, H., Morimura, K., Wei, M., Nishikawa, T., Hirata, K., Yoshikawa, J. and Fukushima, S.: Enhancement of lung carcinogenesis by nonylphenol and genistein in a F344 rat multiorgan carcinogenesis model. *Cancer Lett.*, 192, 25-36, 2003.
- 44) Karim, R., Wanibuchi, H., Wei, M., Morimura, K., Salim, E.I. and Fukushima, S.: Enhancing risk of ethanol on MeIQx induces rat hepatocarcinogenesis is accompanied with increased levels of cellular proliferation and oxidative stress. *Cancer Lett.*, 192, 37-47, 2003.
- 45) Mitsuhashi, M., Wanibuchi, H., Wei, M., Doi, K., Morimura, K., Masuda, C., Wads, S., Nakatani, T., Kakizoe, T. Fukushima, S.: No inhibition of urinary bladder carcinogenesis in rats with intravesical instillation of  $\alpha$ -galactocylceramide. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 4, 45-50, 2003.
- 46) Romanenko, A., Morimura, K., Wanibuchi, H., Wei, M., Zamarin, W., Vinnichenko, W., Kinoshita, A., Vozianov, A. and Fukushima, S.: Urinary bladder lesions induced by persistent chronic low-dose ionizing radiation. *Cancer Sci.*, 94, 328-333, 2003.
- 47) Ogawa, M., Wanibuchi, H., Nishikawa, M., Yano, Y., Otani, S., Totsuka, Y., Wakabayashi, K., Nakae, D. and Fukushima, S.: Post-initiation inhibition of MeIQx hepatocarcinogenesis in rats by cysteine. *Osaka City Med. J.*, 49, 21-30, 2003.
- 48) Kinoshita, A., Wanibuchi, H., Morimura, K., Wei, M., Shen, J., Imaoka, S., Funae, Y. and Fukushima, S.: Phenobarbital at low dose exerts hormesis in rat hepatocarcinogenesis by reducing oxidative DNA damage, altering cell proliferation, apoptosis and gene expression. *Carcinogenesis*, 24, 1389-1399, 2003.
- 49) Murai, T., Koide, A., Miyauchi, H., Inoue, S., Maruyama, T., Makino, S., Mori, S., Wanibuchi, H., Mori, Y. and Fukushima, S.: Promoting effect of sodium L-ascorbate on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced renal pelvic carcinogenesis in SD/cShi rats of both sexes. *J. Toxicol. Pathol.*, 16, 2003.
- 50) Kuno T, Yamada Y, Hirose Y, Katayama M, Sakata K, Hara A, Saji S, Mori H. Induction of apoptosis by sulindac in azoxymethane-induced possible colonic premalignant lesions in rats. *Jpn. J. Cancer Res.* 93: 242-246, 2002.
- 51) Zheng Q, Hirose Y, Yoshimi N, Murakami A, Koshimizu K, Ohigashi H, Sakata K, Matsumoto Y, Sayama Y, Mori H. Further investigation of the modifying effect of various chemopreventive agents on apoptosis and cell proliferation in human colon cancer cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 128: 539-546, 2002.
- 52) Yamada Y, Oyama T, Hirose Y, Hara A, Sugie S, Yoshida K, Yoshimi N, Mori H. beta-Catenin mutation is selected during malignant transformation in colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 24: 91-97, 2003.
- 53) Hirose Y, Kuno T, Yamada Y, Sakata K, Katayama M, Yoshida K, Qiao Z, Hata K, Yoshimi N, Mori H. Azoxymethane-induced beta-catenin-accumulated crypts in colonic mucosa of rodents as an intermediate biomarker for colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 24: 107-111, 2003.
- 54) Mori H, Yamada Y, Hirose Y, Kuno T, Katayama M, Sakata K, Yoshida K, Sugie S, Hara A, Yoshimi N. Chemoprevention of large bowel carcinogenesis; the role of control of cell proliferation and significance of beta-catenin-accumulated crypts as a new biomarker. *Eur. J. Cancer Prev.*