

Table 3 生化学 mean±SD *: controlに比し有意差あり (P<0.05)

	TP	A/G	Alb	BUN	Na	K	Cl	Ca	IP	T-Cho	TG	GOT	GPT	ALP	ガンマGTP
雌0.56%	5.49 ±0.3	0.784 ±0.036	2.41 ±0.15	25.7 ±2.4*	143 ±1	3.9 ±0.2	102 ±1	10 ±0.2	6.55 ±0.66	67.5 ±6	33 ±8.5	115 ±13	38.4 ±4.3*	446 ±220*	0.5 ±0.5
雌1.67%	5.63 ±0.19	0.778 ±0.034	2.46 ±0.07	21.3 ±1.2	142 ±1	3.8 ±0.1	102 ±1	10.2 ±0.3	6.26 ±0.61	73.2 ±7.1	34.9 ±13.7	109 ±27	44.3 ±24.5	432 ±152*	0.2 ±0.4
雌5%	5.37 ±0.13	0.796 ±0.03	2.38 ±0.06	20.2 ±1.3*	141 ±1	4 ±0.2	104 ±1	10 ±0.2	6.11 ±0.72	71.8 ±5	23.5 ±9.2	96 ±9*	37.8 ±4.2*	398 ±73*	0.4 ±0.5
雌control	5.47 ±0.17	0.796 ±0.029	2.42 ±0.07	22.1 ±0.7	143 ±1	3.8 ±0.2	101 ±1	10.1 ±0.2	5.83 ±0.92	67.3 ±7.8	27.9 ±17.4	127 ±14	51.7 ±11.1	632 ±50	0.4 ±0.5
雌0.56%	5.79 ±0.21	0.691 ±0.026*	2.36 ±0.1	19.4 ±0.9*	142 ±1	4.5 ±0.2	101 ±2	10.1 ±0.3	6.53 ±0.34	54.8 ±3.9	76 ±29	104 ±17	63.9 ±29.1	574 ±100*	0.1 ±0.3
雌1.67%	5.68 ±0.42	0.722 ±0.157	2.35 ±0.39	18.7 ±0.7*	142 ±1	4.6 ±0.6	102 ±2	10 ±0.9	6.43 ±0.9	63.3 ±7.1	45.8 ±22.4	94 ±27	55.4 ±40.2	458 ±138*	0.1 ±0.3
雌5%	5.66 ±0.23	0.8 ±0.036*	2.51 ±0.06*	18.1 ±1.8*	141 ±1	4.4 ±0.3	101 ±1	10 ±0.3	6.34 ±0.39	63 ±3.9	52 ±16.5*	68 ±7*	40.7 ±4	546 ±72*	0
雌control	5.74 ±0.2	0.727 ±0.026	2.41 ±0.09	21.7 ±2.4	140 ±1	4.5 ±0.3	100 ±1	10.3 ±0.3	6.45 ±0.4	58.6 ±5.9	98.9 ±43.6	91 ±14	61.1 ±16.1	711 ±148	0.4 ±0.5

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）
平成 14 年度分担研究報告書

モンタンロウ (Montan wax) の安全性評価に関する研究
分担研究者 今井田克己 香川医科大学 腫瘍病理学 教授

研究要旨： モンタンロウ (Montan wax) は褐炭またはリグナイトから抽出したもので、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として既存食品添加物として登録されている。変異原性試験は行われているものの、混餌による反復投与毒性に関する報告はない。そのため、安全性評価の一環としてラットを用いた 90 日間の反復投与毒性試験を実施した。モンタンロウを被験物質とし、予備試験に基づき、最高用量を混餌投与の上限とされる 5 % とし、以下公比 3 で 1.67 および 0.56 % の用量を設定した。各濃度の CRF・1 飼料を 90 日間自由に摂取させ、対照群には CRF・1 飼料のみを同様に摂取させた。飼料は毎週 2 回交換し、毎週 1 回体重および摂餌量を測定した。投与期間中、一般状態の観察を連日実施した。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、血液学的検査、血清生化学的検査および病理学的検査を実施した。その結果、最終体重は雄 0.56% 投与群で減少したものの、その他の投与群では雌雄各々の対照群と有意差はなかった。雌雄ともすべての被験物質投与群で、肝に多発性でびまん性の肉芽腫炎症病変 (granulomatous inflammation) が認められた他、肝重量の増加、肝機能異常を示す AST, ALT の高値、白血球数の増加など、多くのパラメーターで低用量群 (0.56%) から有意な異常値が認められ、今回の実験からは無毒性量の設定は出来なかった。

A. 研究目的

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たものより得られたもので、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。そのため、今回、安全性評価の一環としてラットを用いた 90 日間の反復投与毒性試験を実施した。

B. 研究方法

<動物並びに飼育条件>

5 週齢の F344 ラット (F344/DuCrj) 雌雄各 40 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 群に配した。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 ± 2 °C、湿度 60 ± 10 %、12 時間蛍光灯照明、12 時間消灯の条件下で行った。動物は、金網ケージに 5 匹ずつ飼育した。また、飲料水として水道水を自由に摂取させた。

<被験物質並びに投与量>

モンタンロウは(株)ロッテ中央研究所 (埼玉) から提供された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。本品は褐炭またはリグナイトより、有機溶媒で抽出したものより得られたもので、淡黄～黄色の塊状またはフレーク状で、わずかに特有のにおいがある。予備試験に基づき、検体の最高用量を混餌投与の上限とされる 5 % とし、以下公比 3 で 1.67 および 0.56% の用量に設定した。それぞれの濃度の CRF・1 固形飼料を 90 日間自由に摂取させ、対照群には CRF・1 固形飼料のみを同様に摂取させた。飼料は毎週 2 回交換した。被験物質の CRF・1 基礎飼料への添加および固形化をオリエンタル酵母工

業株式会社に依頼し、試験に供した。

<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。摂餌量は、毎週1回3日間の摂取量をケージ単位で測定し、ケージの収容動物数と日数から1匹あたりの1日平均摂餌量を計算した。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)、平均赤血球色素量(MCH)、平均赤血球色素濃度(MCHC)及び血小板数(PLT)について(株)SRL社(東京)に依頼し測定した。

血清生化学的検査は、分離した血清を、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)、糖(GLU)、リン脂質(PL)、中性脂肪(TG)、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)およびγ-グルタミルトランスペプチダーゼ(γ-GTP)について(株)SRL社(東京)に依頼し測定した。

諸臓器は肉眼的に観察後摘出し、脳、下垂体、心臓、肺、肝臓、脾臓、副腎、腎臓、精巣、精嚢、前立腺、卵巣、子宮、唾液腺および胸腺の重量を測定した。上記の臓器に加え、鼻腔を含む頭蓋、眼球、ハーダー腺、脊髄、大動脈、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、坐骨神経、精巣上体、凝固腺および膈を10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。対照群と5%群の全動物については、上記の器官・組織について、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・エオジン染色標本作製し、検査した。0.56%および1.67%群については肉眼病変部について標本作成を行い、病理組織学的に検査した。

<統計学的処理法>

体重、血液学的検査、血清生化学的検査および臓器重量の平均値の差の統計学的な検定について、5%有意水準でBartlett法による等分散検定

を行い、その結果が等分散の場合は、Dunnett法による両側検定を行い、不等分散の場合はSteel法による両側検定を行った。

C. 研究結果

<一般状態および死亡動物>

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。

<体重および摂餌量>

試験期間中の各群の体重推移をFig. 1に示す。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。

試験期間中の摂餌量をTable 1に示す。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>

血液学的検査の結果をTable 2および3に示す。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>

血清生化学的検査の結果をTable 4および5に示す。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、 γ -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>

最終体重、臓器の実重量および相対重量の結果をTable 6および7に示す。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%投与群で精巣上体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>

病理組織学的検索の結果をTable 8および9に示す。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。

D. 考察

今回、F344ラットを用いて既存食品添加物であるモンタンロウの混餌投与による90日間反復投与毒性試験を実施した。その結果、最終体重は雄0.56%投与群で減少したものの、その他の投与群では雌雄各々の対照群と有意差はなかったが、雌雄とも被験物質の投与に起因すると思われる毒性病変が認められた。

血液学的検索では雌雄とも赤血球系の項目では減少、もしくは減少傾向を示し、逆に白血球数は対照群の値のほぼ2倍の高値を示した。

血液生化学的検索においては、雌雄とも多くの項目で被験物質投与による変化が認められ、特にAST、ALTなどでは対照群より5倍前後の高値を示し、強い肝障害を示す結果となった。

最終体重及び各臓器重量においては0.56%投与群の雄でのみ、対照群より有意に減少していたもののその他の群ではすべて群間の差は見られなかった。多くの臓器、特に肝、脾、肺では雌雄ともすべての被験物質投与群で有意な臓器重量の増加を実重量、相対重量ともに認めた。

病理組織学的検索の結果、雌雄とも肝に多発性、びまん性の肉芽腫様炎症像が高度に認められ、肝細胞の壊死を伴い、血中のAST、ALTの上昇を裏づける結果であった。また、肺ではびまん性にリンパ球浸潤を伴う微小な結節性病変が見られ、肺重量の増加の原因と考えられた。また、腸間膜リンパ節には投与濃度に依存した小肉芽腫の発生が見られた。

これら、一連の病変は被験物質の投与に起因した結果と考えられ、0.56%以上ではモンタンロウは比較的強い毒性を示すと考えられた。

E. 結論

モンタンロウを混餌で90日間雌雄のラットに投与したところ、すべての被験物質投与群に肝を中心としてモンタンロウの投与に起因する病変が認められたため、無毒性量は設定できなかった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. S. Fukushima, H. Wanibuchi, K. Morimura, M. Wei, D. Nakae, Y. Konishi, H. Tsuda, N. Uehara, K. Imaida, T. Shirai, M. Tatematsu, T. Tsukamoto, M. Hirose, F. Furukawa, K. Wakabayashi, Y. Totsuka. Lack of a Dose-response relationship for carcinogenicity in the rat liver with low doses of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline or N-nitrosodiethylamine. *Jpn J Cancer Res*, 93: 1076-1082, 2002.
2. T. Shirai, M. Asamoto, S. Takahashi, K. Imaida. Diet and prostate cancer. *Toxicology*, 181-182:89-94, 2002.
3. T. Shirai, K. Kato, M. Futakuchi, S. Takahashi, S. Suzuki, K. Imaida, M. Asamoto. Organ differences in the enhancing potential of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine on carcinogenicity in the prostate, colon and pancreas. *Mutat Res*, 506-507: 129-136, 2002.
4. F. Wu, J. Li, H. Miki, M. Nishioka, J. Fujita, M. Ohmori, K. Imaida, S. Kuriyama. p107 Expression in colorectal tumours rises during carcinogenesis and falls during invasion. *Eur J Cancer*, 38:1838-1848, 2002.
5. F. Wu, J. Fujita, M. Murota, J.Q. Li, T. Ishida, M. Nishioka, K. Imaida, S. Kuriyama. CYFRA 21-1 is released in TNF-alpha-induced apoptosis in the hepatocellular carcinoma cell line HuH-7. *Int J Oncol*, 21:441-445, 2002.
6. M. Futakuchi, M. Hirose, K. Imaida, S. Takahashi, K. Ogawa, M. Asamoto, T. Miki, T. Shirai. Chemoprevention of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridine-induced colon carcinogenesis by 1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone after initiation with 1,2-dimethylhydrazine in F344 rats. *Carcinogenesis*, 23:283-287, 2002.
7. A. Hagiwara, H. Yoshino, T. Ichihara, M. Kawabe, S. Tamano, H. Aoki, T. Koda, M. Nakamura, K. Imaida, N. Ito, T. Shirai. Prevention by natural food anthocyanins, purple sweet potato color and red cabbage color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine. *J. Toxicol. Sci.*, 27:57-68, 2002.
8. S. Takahashi, S. Inaguma, Y.M. Cho, K. Imaida, J. Wang, O. Fujiwara, T. Shirai. Lack of mutation induction with exposure to 1.5 GHz electromagnetic near fields used for cellular phones in brains of Big Blue mice. *Cancer Res*, 62:1956-1960, 2002.
9. N. Niho, M. Shibutani, K. Toyoda, H. Sato, A. Hirose, K. Imaida, M. Takahashi, Y. Hayashi, M. Hirose. Dose- and timeresponse studies of sodium o-phenylphenate urinary bladder carcinogenicity in rats. *Food Chem Toxicol*, 40:715-722, 2002.
10. J.Q. Li, H. Miki, F. Wu, K. Saoo, M. Nishioka, M. Ohmori, K. Imaida. Cyclin A correlates with carcinogenesis and metastasis, and p27kip1 correlates with lymphatic invasion, in colorectal neoplasms. *Hum Pathol*, 33:1006-1015, 2002.
11. H. Tsuda, S. Fukushima, H. Wanibuchi, K. Morimura, D. Nakae, K. Imaida, M. Tatematsu, M. Hirose, K. Wakabayashi, M.A. Moore. 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 Pathol*, 31:80-86, 2003.
12. S. Fukushima, H. Wanibuchi, K. Morimura, M. Wei, D. Nakae, Y. Konishi, H. Tsuda, N. Takasuka, K. Imaida, T. Shirai, M. Tatematsu, T. Tsukamoto, M. Hirose, F. Furukawa. 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.
13. J.Q. Li, A. Kubo, F. Wu, H. Usuki, J. Fujita, S. Bandoh, T. Masaki, K. Saoo, H. Takeuchi, S. Kobayashi, K. Imaida, H. Maeta, T. Ishida, S. Kuriyama. Cyclin B1, unlike cyclin G1,

- increases significantly during colorectal carcinogenesis and during later metastasis to lymph nodes. *Int J Oncol*, 22:1101-1110, 2003.
14. I. Narama, K. Imaida, H. Iwata, D. Nakae, A. Nishikawa, T. Harada. A review of nomenclature and diagnostic criteria for proliferative lesions in the liver of rats by a working group of the Japanese Society of Toxicologic Pathology. *J. Toxicol. Pathol.*, 16:1-17, 2003.
2. 学会発表
1. K. Imaida, T. Shirai M. Taki, O. Fujiwara : Lack of tumor promotion potential of the electromagnetic near field used for cellular phones (900MHz and 1.5GHz) on rat liver and mouse skin carcinogenesis. 24th Annual Meeting of the Bioelectromagnetics Society (BEMS) Quebec Canada (2002.6)
 2. K. Imaida, T. Shirai M. Taki and O. Fujiwara : Cancer Risk with Electromagnetic Near Fields Used for Cellular Phones Asian Pacific Organization for Cancer Prevention (APOCP) First General Assembly Conference "Inflammation and Cancer" in conjunction with a UICC Symposium "Asian Cancer Prevention - Today and Tomorrow" Nagoya (2002.10)
 3. 黎家慶、臼杵尚志、正木勉、竿尾光祐、竹内聖、栗山茂樹、今井田克己 : Cyclin B1 の過剰発現は大腸がんの発生ならびにリンパ節転移と相関する。第 61 回日本癌学会総会 (2002. 10)
 4. 加藤浩司、今井田克己、朝元誠人、曹永晩、稲熊真悟、鈴木周五、杉浦論、白井智之 : PhIP 誘発ラット前立腺がんに対する Atrazine の修飾作用の検討 第 61 回日本癌学会総会 (2002. 10)
 5. 竹下文隆、今井田克己、小川久美子、稲熊真悟、曹永晩、加藤浩司、白井智之 : DMBA ラット前立腺発がんに対する Nonylphenol と Genistein の影響 第 61 回日本癌学会総会 (2002. 10)
 6. 稲熊真悟、今井田克己、鈴木周五、二口充、加藤浩司、竹下文隆、朝元誠人、白井智之 : 前立腺発がんおよび 4-nonylphenol の影響 第 61 回日本癌学会総会 (2002. 10)
 7. Imaida, K., Tamano, S., Hagiwara, K., Fukushima, S., Shirai, T., Ito, N. : Application of Rat Medium-term Bioassays for Detecting Carcinogenic and Modifying Potentials on Respective Target Organ Carcinogenesis by Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs). International Symposium on Endocrine Active Substances and Supplementary. Workshop Workshop 4: Simple, Rapid Assay for Conventional Definitive Testing of Endocrine Disruptor Hazard Yokohama (2002.11)
 8. 竹下文隆、今井田克己、二口充、小川久美子、鈴木周五、白井智之 : 4-Nonylphenol 投与によるラット再生尿細管の増加 第 19 回日本毒性病理学会 (2003. 1)
 9. 堤友子、萩原昭裕、今井則夫、土井悠子、難波江恭子、朝元誠人、今井田克己、白井智之 : 遺伝子組み替えトウモロコシのラットを用いた 13 週間反復投与毒性試験 第 19 回日本毒性病理学会 (2003. 1)
 10. 今井田克己、竿尾光祐、竹内聖、山川けいこ、池田美子、横平政直 : SV40T-antigen 遺伝子導入ラットの前立腺癌発生過程における arctiin 投与による影響 第 62 回日本癌学会総会 (2003. 9)
 11. 白井智之、河部真弓、渡辺聡一、和気加奈子、今井田克己、玉野静光 : 携帯電話で使用されている 1.5GHz 高周波電磁波の長期近傍界曝露によるラット ENU 経胎盤脳腫瘍発生におよぼす影響 第 62 回日本癌学会総会 (2003. 9)
 12. 竹内聖、竿尾光祐、山川けいこ、池田美子、宮崎雅史、山崎浩史、鎌滝哲也、今井田克己 : Methoxsalen による NNK 誘発 A/J マウス肺発癌の抑制効果 第 62 回日本癌学会総会 (2003. 9)
- 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

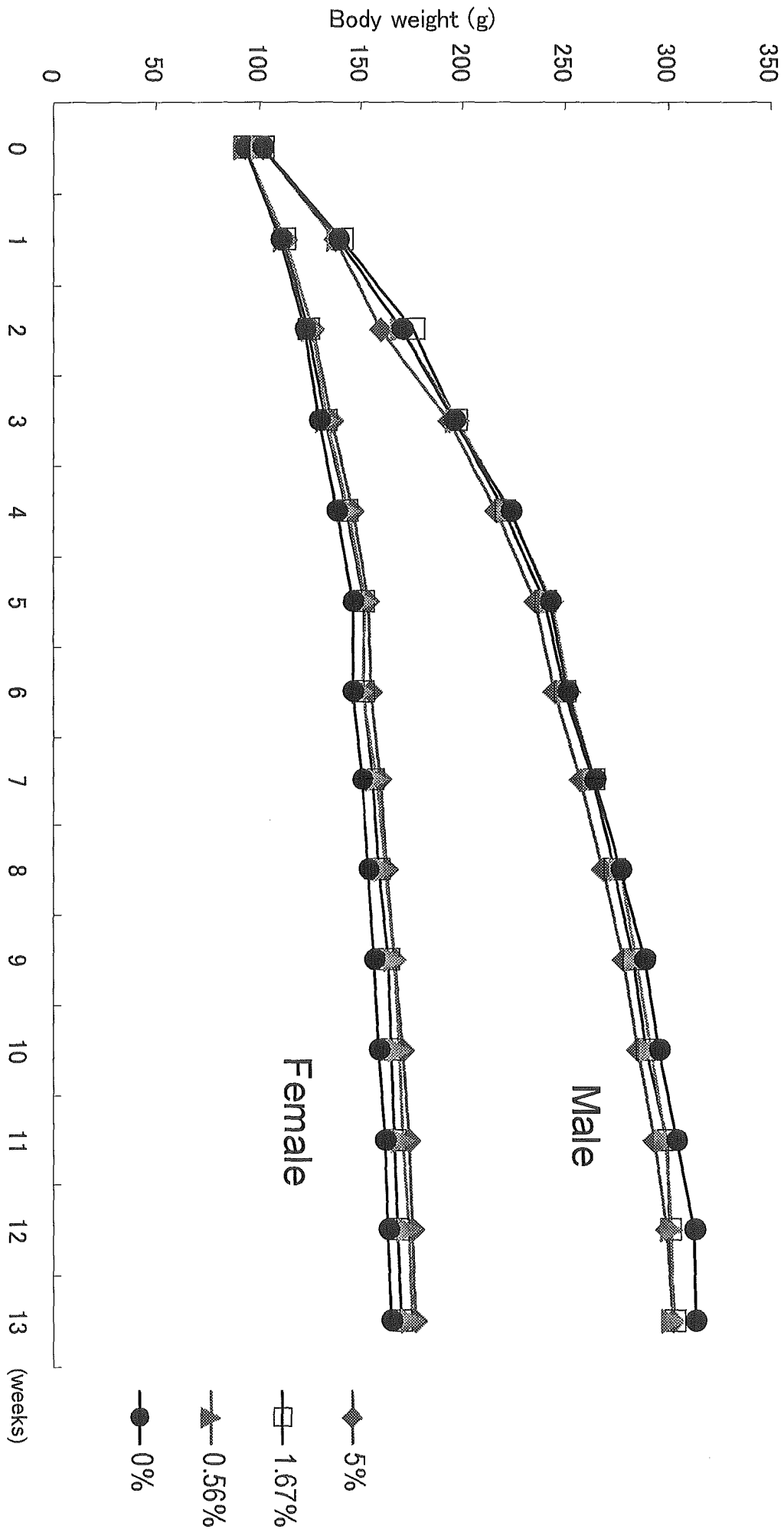


Fig. 1 Body weight curves for male and female F344 rats treated with Montan wax for 90 days

Table 1. Food consumption and intake of Montan Wax

Group	Food consumption (g/rat/day)		Intake of Montan wax (mg/rat/day)		Intake of Montan wax (mg/kg/day)		Total intake of Montan wax (g/rat)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
	16.0	10.0	—	—	—	—	—	—
0%	16.0	10.0	—	—	—	—	—	—
0.56%	15.3	10.6	86	59	401	414	7.7	5.3
1.67%	15.4	10.1	257	169	1159	1200	23.1	15.2
5%	16.3	11.2	813	560	3837	3868	73.2	50.4

Table 2. Hematological data for F344 male rats given Montan wax for 90 days

Item	Dose level (%)			
	0	0.56	1.67	5
RBC ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	840 \pm 19 ^{a)}	786 \pm 23 ^{**}	788 \pm 32 ^{**}	811 \pm 26 [*]
Hb (g/dL)	15.4 \pm 0.3	13.2 \pm 0.6 ^{**}	13.1 \pm 0.5 ^{**}	14.2 \pm 0.6 ^{**}
Ht (%)	44.9 \pm 1.2	39.8 \pm 1.4 ^{**}	39.6 \pm 1.2 ^{**}	41.6 \pm 1.5 ^{**}
MCV (fL)	53.4 \pm 0.5	50.7 \pm 1.1 ^{**}	50.3 \pm 1.0 ^{**}	51.3 \pm 0.5 ^{**}
MCH (pg)	18.3 \pm 0.5	16.8 \pm 0.4 ^{**}	16.8 \pm 0.4 ^{**}	17.6 \pm 0.5 ^{**}
MCHC (g/dL)	34.4 \pm 0.5	33.0 \pm 1.1 ^{**}	33.1 \pm 0.3 ^{**}	34.1 \pm 0.6
PLT ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	72.7 \pm 5.7	79.2 \pm 16.1	70.3 \pm 8.4	59.8 \pm 7.6 ^{**}
WBC ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	49.6 \pm 5.7	85.7 \pm 14.9 ^{**}	86.9 \pm 14.6 ^{**}	95.2 \pm 28.6 ^{**}

a): Mean \pm S.D.

*, **: Significantly different from the control group at p<0.05, p<0.01, respectively

Table 3. Hematological data for F344 female rats given Montan wax for 90 days

Item	Dose level (%)				
	0	0.56	1.67	5	
RBC	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	768 \pm 23 ^{a)}	730 \pm 37	737 \pm 18*	766 \pm 51
Hb	(g/dL)	15.4 \pm 0.4	13.1 \pm 0.8**	12.8 \pm 0.7**	13.4 \pm 0.8**
Ht	(%)	44.3 \pm 1.6	39.2 \pm 1.9**	38.2 \pm 1.3**	40.2 \pm 2.9**
MCV	(fL)	57.7 \pm 0.9	53.6 \pm 0.5**	51.9 \pm 1.4**	52.6 \pm 2.1**
MCH	(pg)	20.0 \pm 0	18.0 \pm 0.7**	17.1 \pm 0.9**	17.6 \pm 1.1**
MCHC	(g/dL)	34.7 \pm 0.5	33.4 \pm 1.3*	33.2 \pm 0.8**	33.2 \pm 0.8**
PLT	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	75.2 \pm 4.5	63.4 \pm 7.3**	62.3 \pm 8.0**	57.4 \pm 4.0**
WBC	($\times 10^2/\mu\text{L}$)	43.9 \pm 20.1	88.0 \pm 36.7**	116.8 \pm 20.5**	89.1 \pm 33.8**

a): Mean \pm S.D.

*, **: Significantly different from the control group at $p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively

Table 4. Serum biochemical data for F344 male rats given Montan wax for 90 days

Item	Dose level (%)			
	0	0.56	1.67	5
TP (g/dL)	6.3±0.2 ^{a)}	6.3±0.1	6.2±0.1	6.2±0.1
A/G	2.0±0.1	1.9±0.2	2.0±0.1	1.9±0.1*
ALB (g/dL)	4.2±0.1	4.1±0.2	4.1±0.1*	4.0±0.1**
BIL (mg/dL)	0±0	0.1±0.1**	0.1±0.1*	0±0.1
TC (mg/dL)	54.2±6.3	96.5±14.5**	91.7±12.3**	87.6±12.3**
GLU (mg/dL)	156±18	148±19	143±11	155±17
PL (mg/dL)	105±5	150±15**	136±11**	139±15**
TG (mg/dL)	79.0±12.1	38.4±10.2**	35.5±13.0**	57.6±9.5**
BUN (mg/dL)	18.1±1.6	21.5±2.3**	23.3±2.4**	23.1±2.2**
CRN (mg/dL)	0.28±0.02	0.30±0.02	0.33±0.02**	0.34±0.03**
Ca (mg/dL)	9.6±0.1	9.8±0.3	9.8±0.2*	9.8±0.1
P (mg/dL)	5.6±0.4	5.6±0.6	5.8±0.3	5.4±0.3
Na (mEq/L)	141±0.7	141±0.8	141±1.2	141±1.1
Cl (mEq/L)	102.3±0.7	103.1±1.5	103.4±0.8*	102.9±1.7
K (mEq/L)	4.3±0.3	5.5±0.8**	5.5±0.4**	5.1±0.6*
AST (IU/L)	92.9±17.3	442.5±100.2**	445.5±136.0**	426.5±95.4**
ALT (IU/L)	56.1±7.6	227.6±63.9**	235.7±69.6**	242.1±55.5**
ALP (IU/L)	285.8±14.3	378.1 ±47.5**	406.0±76.2**	414.4±84.5**
γ-GTP (IU/L)	< 2	2.4±1.0	2.1±0.3	2.5±1.3

a): Mean±S.D.

*, **, ***: Significantly different from the control group at p<0.05, p<0.01, respectively

Table 5. Serum biochemical data for F344 female rats given Montan wax for 90 days

Item	Dose level (%)			
	0	0.56	1.67	5
TP	(g/dL) 6.4±0.3 ^{a)}	6.2±0.2	6.2±0.1	6.2±0.2
A/G	2.3±0.1	1.8±0.1**	1.9±0.1**	1.8±0.1**
ALB	(g/dL) 4.5±0.2	4.0±0.2**	4.0±0.1**	4.0±0.2**
BIL	(mg/dL) 0±0	0.09±0.05**	0.16±0.11**	0.14±0.05**
TC	(mg/dL) 67.4±9.1	104.9±10.7**	112.2±16.2**	108.4±11.3**
GLU	(mg/dL) 129.2±20.6	134.4±15.5	145.7±18.1	146.6±19.1
PL	(mg/dL) 142.3±15.1	175.6±19.4**	193.3±20.2**	188.3±14.9**
TG	(mg/dL) 60.8±25.7	55.5±14.3	55.2±11.2	63.9±16.0
BUN	(mg/dL) 20.5±1.7	21.4±1.7	23.3±2.6**	23.7±1.7**
CRN	(mg/dL) 0.31±0.02	0.33±0.02	0.34±0.03*	0.34±0.02*
Ca	(mg/dL) 9.9±0.3	9.7±0.3	9.7±0.2	9.9±0.3
P	(mg/dL) 5.1±0.6	4.4±0.8	4.4±0.5	5.3±1.0
Na	(mEq/L) 144±2.9	142±1.4*	141±1.7*	141±1.4*
Cl	(mEq/L) 104±0.9	105±1.3	105±0.7	102±1.5**
K	(mEq/L) 4.4±0.4	5.2±0.5*	5.2±0.3**	5.6±1.2*
AST	(IU/L) 85.5±7.2	460.1±99.4**	598.2±218.0**	458.0±169.3**
ALT	(IU/L) 40.4±4.6	175.7±36.1**	195.1±54.5**	172.3±56.6**
ALP	(IU/L) 226.5±20.5	318.0±91.0*	413.4±118.5**	414.3±123.3**
γ -GTP	(IU/L) < 2	6.4±3.0**	8.6±4.3**	9.2±5.8**

a): Mean±S.D.

*, **: Significantly different from the control group at p<0.05, p<0.01, respectively

Table 6-a. Absolute organ weights of F344 male rats given Montan wax for 90 days

Item	Dose level (%)			
	0	0.56	1.67	5
Body weight (g)	302 ± 10 ^{a)}	288 ± 9*	291 ± 12	293 ± 14
Absolute (g)				
Brain	1.89 ± 0.07	1.87 ± 0.05	1.81 ± 0.08	1.83 ± 0.09
Thymus	0.21 ± 0.07	0.18 ± 0.09	0.17 ± 0.09	0.18 ± 0.06
Lung	0.87 ± 0.09	1.17 ± 0.16**	1.12 ± 0.09**	0.97 ± 0.06*
Heart	0.83 ± 0.06	0.77 ± 0.03*	0.77 ± 0.05*	0.79 ± 0.06
Spleen	0.61 ± 0.05	1.10 ± 0.12**	1.21 ± 0.26**	0.97 ± 0.07**
Liver	6.73 ± 0.35	10.79 ± 1.52**	10.57 ± 1.11**	9.97 ± 1.64**
Adrenals	0.048 ± 0.016	0.039 ± 0.009	0.042 ± 0.008	0.039 ± 0.006
Kidneys	1.71 ± 0.11	1.74 ± 0.09	1.68 ± 0.08	1.67 ± 0.10
Testes	2.96 ± 0.08	2.97 ± 0.10	3.00 ± 0.15	2.94 ± 0.12
Pituitary	0.0085 ± 0.0008	0.0089 ± 0.0006	0.0085 ± 0.0004	0.0081 ± 0.0010
Salivary glands	0.45 ± 0.03	0.37 ± 0.02**	0.38 ± 0.03**	0.36 ± 0.03**
Prostate	0.83 ± 0.10	0.70 ± 0.14	0.73 ± 0.11	0.71 ± 0.15
Seminal vesicle	0.76 ± 0.09	0.62 ± 0.07**	0.80 ± 0.13	0.73 ± 0.10

a): Mean ± S.D.
 *, **, ***: Significantly different from the control group at p < 0.05, p < 0.01, respectively

Table 6-b. Relative organ weights of F344 male rats given Montan wax for 90 days

Item	Dose level (%)			
	0	0.56	1.67	5
Body weight (g)	302 ± 10 ^{a)}	288 ± 9*	291 ± 12	293 ± 14
Relative (g/100g B. W.)				
Brain	0.65 ± 0.04	0.64 ± 0.04	0.63 ± 0.04	0.61 ± 0.04
Thymus	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.03	0.06 ± 0.03	0.06 ± 0.02
Lung	0.29 ± 0.03	0.41 ± 0.05**	0.38 ± 0.03**	0.33 ± 0.01**
Heart	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.27 ± 0.01
Spleen	0.20 ± 0.01	0.38 ± 0.05**	0.42 ± 0.09**	0.33 ± 0.02**
Liver	2.23 ± 0.08	3.75 ± 0.57**	3.63 ± 0.39**	3.41 ± 0.57**
Adrenals	0.016 ± 0.005	0.014 ± 0.003	0.014 ± 0.003	0.013 ± 0.002
Kidneys	0.56 ± 0.03	0.60 ± 0.03**	0.58 ± 0.02	0.57 ± 0.02
Testes	0.98 ± 0.02	1.03 ± 0.04*	1.03 ± 0.05*	1.01 ± 0.05
Pituitary	0.0029 ± 0.0003	0.0031 ± 0.0002	0.0029 ± 0.0002	0.0027 ± 0.0004
Salivary glands	0.15 ± 0.01	0.13 ± 0.01**	0.13 ± 0.01**	0.12 ± 0.01**
Prostate	0.28 ± 0.04	0.24 ± 0.04	0.25 ± 0.04	0.24 ± 0.05
Seminal vesicle	0.26 ± 0.03	0.21 ± 0.02**	0.28 ± 0.05	0.24 ± 0.03

a): Mean ± S.D.
 *, **: Significantly different from the control group at p < 0.05, p < 0.01, respectively

Table 7-a. Absolute organ weights of F344 female rats given Montan wax for 90 days

Item	Dose level (%)			
	0	0.56	1.67	5
Body weight (g)	159±13 ^{a)}	166±10	163±8	170±3
Absolute (g)				
Brain	1.76±0.04	1.76±0.04	1.72±0.06	1.77±0.05
Thymus	0.16±0.03	0.17±0.07	0.15±0.04	0.19±0.04
Lung	0.63±0.05	0.82±0.06**	0.81±0.08**	0.84±0.13**
Heart	0.50±0.03	0.49±0.04	0.48±0.03	0.51±0.03
Spleen	0.37±0.02	0.77±0.08**	0.78±0.07**	0.75±0.03**
Liver	3.56±0.31	6.70±0.68**	7.49±1.38**	7.24±0.58**
Adrenals	00.4±0.01	0.05±0.01	0.04±0.01	0.05±0.01
Kidneys	1.02±0.06	1.09±0.07*	1.09±0.07*	1.14±0.07**
Pituitary	0.011±0.001	0.011±0.002	0.011±0.001	0.010±0.001
Salivary glands	0.29±0.02	0.29±0.02	0.28±0.02	0.28±0.01
Ovaries	0.067±0.010	0.090±0.021*	0.085±0.013	0.085±0.019*
Uterus	0.47±0.09	0.40±0.05	0.40±0.06	0.52±0.22

a): Mean±S.D.
*, **, . Significantly different from the control group at p<0.05, p<0.01, respectively

Table 7-b. Relative organ weights of F344 female rats given Montan wax for 90 days

Item	Dose level (%)			
	0	0.56	1.67	5
Body weight (g)	159±13 ^{a)}	166±10	163±8	170±3
Relative (g/100g B. W.)				
Brain	1.12±0.10	1.06±0.05	1.06±0.03	1.04±0.02
Thymus	0.10±0.02	0.11±0.04	0.09±0.02	0.11±0.02
Lung	0.40±0.03	0.49±0.03 ^{**}	0.50±0.04 ^{**}	0.49±0.08 ^{**}
Heart	0.31±0.02	0.29±0.02 [*]	0.30±0.01 [*]	0.30±0.02
Spleen	0.24±0.01	0.46±0.04 ^{**}	0.48±0.04 ^{**}	0.44±0.02 ^{**}
Liver	2.25±0.15	4.05±0.51 ^{**}	4.60±0.76 ^{**}	4.26±0.31 ^{**}
Adrenals	0.028±0.007	0.031±0.008	0.026±0.004	0.030±0.005
Kidneys	0.64±0.03	0.66±0.06	0.67±0.03	0.67±0.03
Pituitary	0.0067±0.0010	0.0067±0.0010	0.0065±0.0006	0.0058±0.0007 [*]
Salivary glands	0.19±0.02	0.18±0.02	0.17±0.01	0.17±0.01 [*]
Ovaries	0.043±0.008	0.054±0.015	0.052±0.009	0.050±0.011
Uterus	0.30±0.07	0.24±0.03 [*]	0.25±0.04	0.31±0.13

a): Mean±S.D.

^{*}, ^{**}: Significantly different from the control group at p<0.05, p<0.01, respectively

Table 8. Histological data for main organs of F344 male rats given Montan wax for 90 days

Organs	Dose level (%)			
	0	0.56	1.67	5
No. of animals	10	10	10	10
Liver				
Granulomatous inflammation*	0	10	10	10
Lung				
Focal leukocytic infiltration	1	ND	ND	10
Mesenteric lymph nodes	[9] ^a	[9] ^a		
Granulation	-	5	0	0
	+	4	0	0
	++	0	2	1
	+++	0	8	8

ND: not determined

*: Diffuse multiple microgranulations with severe lymphocytic infiltration

a: Numbers in square bracket are for rats examined microscopically.

Table 9. Histological data for main organs of F344 female rats given Montan wax for 90 days

Organs	Dose level (%)			
	0	0.56	1.67	5
No. of animals	10	10	10	10
Liver				
Granulomatous inflammation*	0	10	10	10
Lung				
Focal leukocytic infiltration	10	ND	ND	0
Mesenteric lymph nodes				
Granulation -	3	0	0	0
+	7	1	0	1
++	0	0	1	0
+++	0	9	9	9

ND: not determined

*: Diffuse multiple microgranulations with severe lymphocytic infiltration

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)
平成 14 年度分担研究報告書

メバロン酸の安全性評価に関する研究
分担研究者 中江 大 佐々木研究所病理部部长

研究要旨：化粧品原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、ラットの急性毒性、皮膚腐食性、皮膚刺激性、眼刺激性および感作性に関する有害性情報は得られているが、反復投与毒性に関する安全性情報は報告されていない。本試験は、被験物質であるメバロン酸の安全性評価の一環として、雌雄ラットを用いて 90 日間反復投与毒性および 4 週間回復性試験を実施した。本試験に先立ち実施した予備試験の結果より本試験での最高用量を 10,000ppm とし、公比 5 として以下 2,000、400ppm の用量を設定し、基礎飼料に混じて自由摂取させ、基礎飼料のみを投与した対照群(0ppm)と比較した。さらに、観察された毒性の回復性を確認するために、基礎飼料にて 4 週間飼育する休薬群を全ての群について設けた。観察項目として、体重、摂餌量を週 1 回、一般状態を一日一回観察した。動物は、投与および休薬期間終了後、エーテル麻酔下で採血・剖検し、血液学的、血液化学的検査および病理学的検査を実施した。また、投与期間・休薬期間終了前に尿検査を行なった。投与に関連した一般状態の変化は観察されなかったが、10,000ppm 群の雌雄で、体重増加抑制あるいは抑制傾向が散見された。摂餌量は対照群と同様の値で推移した。尿検査において異常は観察されなかった。10,000ppm 群の雌雄で肝細胞脂肪化とそれに伴う炎症性変化が認められ、脂肪化による肝細胞破壊により雌雄で血清中 ALT が上昇した。これらの肝臓の変化は、雄でより強く認められたが、雌では血清中の総コレステロールおよび中性脂肪値の上昇も観察された。これらの変化はいずれも 4 週間の休薬期間により回復傾向を示した。また、肝代謝障害に関連したと考えられる軽度な貧血傾向が 10,000ppm 群の雌雄で観察されたが、この傾向は休薬により回復した。2,000ppm 以下の投与群ではメバロン酸投与による毒性影響はいずれの項目においても観察されなかった。これらの結果より、F344 ラットを用いたメバロン酸の 90 日間反復投与毒性試験による影響量は、雌雄とも 10,000ppm(雄 709.94mg/kg/day、雌 750.47mg/kg/day)、無影響量は雌雄とも 2,000ppm(雄 149.54mg/kg/day、雌 155.46mg/kg/day)と結論し、10,000ppm 群で認められた毒性影響は回復あるいは回復傾向を示す可逆性の変化であると考えられた。

A. 研究目的

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 LD50 は 2g/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。本試験は、雌雄のラットを用いて被験物質メバロン酸を 90 日間繰り返し投与し、生じる明らかな毒性変化を惹起する用量とその内容の変化の内容、毒性の認められない用量および毒性の回復性を求めることを目的として実施した。

B. 研究方法

動物および飼育条件

4 週齢の Crj:F344 ラット(チャールス・リバー株式会社、神奈川)雌雄を各 60 匹購入し、約 1 週間の検疫・馴化期間後、5 週齢にて試験に供した。試験に用いた動物数は 1 群当たり雌雄各 15 匹とし、10 匹を 90 日間反復投与毒性観察に、5 匹を回復性観察に用いた。各群への動物の割り付けには、適切な無作為抽出法を用いた。動物は、バリエー

システム内の温度・湿度を制御した動物室内で飼育した。室内の環境は温度 25±5℃、湿度 50±10%、換気回数 12 回/時、12 時間照明の条件下で実施した。動物は最大 3 匹ずつ、ソフトチップを敷いたポリカーボネイト製のプラスチックケージに収容し、ケージおよびチップは週 1 回交換した。飲料水として、水道水を自動給水装置にて自由摂取させた。

被験物質

メバロン酸は、旭電化工業株式会社基礎研究所(東京)から供与された。

予備試験の実施および飼料の調製

本試験における投与用量を設定するために、本試験の開始に先立ち 4 週間の予備試験を行った。予備試験には本試験と同じ系統の雌雄のラットを 1 群あたり 5 匹用いた。予備試験の最高用量は、以前実施した急性毒性試験の結果 LD50 が 2g/kg 以上であったことから、2g/kg よりやや低い 10,000ppm とし、以下 2,000 お

よび 400ppm とした。予備試験では粉末基礎飼料 CRF-1(オリエンタル酵母)にメバロン酸を均一になるよう混じて動物に投与した。調製方法は、まず 10,000ppm 群の粉末飼料を調製後、希釈して 2,000 および 400ppm の調製飼料を作製した。予備試験の結果、投与に関連した一般状態の変化および死亡は認められなかったが、雌雄の最高用量群で肝細胞の脂肪化が観察され、軽度であるものの貧血傾向が観察された。2,000ppm 以下の投与群ではこれらの変化は観察されず、いずれの項目についても対照群と同様の変化を示した。

投与量の設定

予備試験の結果より、本試験の高用量には多数例の死亡を起こすことなく毒性影響が認められる用量である 10,000ppm、低用量にはなんら毒性影響が認められない可能性の高い 400ppm を設定し、公比を 5 とし、中間用量群を 2,000ppm とした。また予備試験において、明らかな毒性が認められたため、これらの毒性の回復性を観察するために各群の雌雄とも 5 匹ずつを用いて 4 週間の休薬群を設けた。

被験物質の調製および投与

本試験では、指定濃度のメバロン酸を含む固形飼料を作製して動物に投与した。対照群には同様の方法で作製した基礎飼料 CRF-1(オリエンタル酵母)を与えた。飼料は動物に自由摂取させた。

被験物質の安定性

本試験に先立ち、調製飼料中の 47 日間の安定性について分析を行った。粉末基礎飼料 CRF-1 にメバロン酸を混じり 25,000ppm となるよう調製後、段階希釈を行い、10,000、2,000、400 および 80ppm の調製飼料を作製した。分析は旭電化工業株式会社基礎研究所にて行なった。その結果、検出濃度は平均値で添加濃度の 90% であり、47 日間において安定であることが確認された。

C. 観察および検査項目

以下の項目について観察および検査を行なった。

一般状態、体重、摂餌量

全動物について、一般状態を毎日観察し、週 1 回体重および摂餌量を測定し、1 日あたりの被験物質摂取量(mg/kg/day)を算出した。

尿検査

解剖約 1 週間前に、全例を対象として以下の項目についてプレテスト(和光純薬)尿検査試験紙を

用いて検査を実施した:潜血、ケトン体、グルコース、蛋白、ビリルビン、ウロビリノーゲン、アスコルビン酸、pH。

血液および血液化学的検査

90 日間の投与期間および 4 週間の休薬期間終了後、解剖に際して全試験動物を対象として以下の検査を行った。採血前日は午後 5 時より絶食させ、後大動脈あるいは静脈より採血した。血液学的検査項目では、抗凝固剤を入れた血液を用いて赤血球数(RBC)、白血球数(WBC)、血小板数(PLT)、血色素量(HB)、ヘマトクリット(HT)、白血球百分比(90 日間投与期間群のみ)を、血液生化学的検査として、血清を用いて血清総蛋白(TP)、アルブミン(ALB)、A/G 比、総コレステロール(TCHO)、トリグリセライド(TG)、ビリルビン(BIL)、クレアチニン(CRE)、アスパルテートアミノトランスフェラーゼ(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、ガンマ-グルタミルトランスフェラーゼ(GGT)、アルカリフォスファターゼ(ALP)、ナトリウム(Na)、カリウム(K)、カルシウム(Ca)、無機リン(IP)を測定した。これらの臓器は白血球百分比を除き、(株)エス・アール・エルに委託して測定を行った。

病理検査

投与および休薬期間終了後、全ての動物を、採血後、安楽死させて詳細な剖検を行った。剖検後、以下の下線を付した器官の重量を測定し、精巣および眼球を除く以下に記す器官・組織については中性緩衝ホルマリン液に固定した。精巣はブアン液に眼球はダビットソン液に固定した:リンパ節(頸部・腸間膜)、胸腔内大動脈、顎下腺・耳下腺、胸骨・大腿骨(骨髄を含む)、胸腺、気管、肺、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、前胃・腺胃、十二指腸、小腸(空・回腸)、大腸(盲腸、結腸、直腸)、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、副腎、膀胱、精囊、前立腺、精巣、精巣上体、卵巣および卵管、子宮、膣、脳、下垂体、坐骨神経、大腿筋、脊髄(頸部および腰部)、眼球およびハーダー腺、その他肉眼的異常部位

病理組織学的検索として、90 日間投与群の対照群および高用量群の全ての動物について、以下の器官・組織を固定後、切り出しを行い、通常の方法でパラフィン包埋・薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して鏡検した:リンパ節(頸部・腸間膜)、胸腔内大動脈、顎下腺・耳下腺、胸骨・大腿骨(骨髄を含む)、胸腺、気管、肺、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、前胃・腺胃、十二指腸、小腸(空・回腸)、大腸(盲腸、結腸、直腸)、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、副腎、膀胱、精囊、前