

室温 24±1℃、湿度 55±5%、換気 18 回/時、照明サイクル 12 時間 (照明 5:00~17:00 時) の動物室で、ポリカーボネート製ケージ (W26 cm×L42 cm×H17 cm、床敷使用) に 5 匹ずつ収容して行った。

3. 投与方法、用量設定および群構成

被験物質の投与は粉末飼料 (CRF-1 粉末飼料) による混餌投与で行った。用量設定は、予備試験として実施した 0、0.1、1.0、3.0 および 5.0% (w/w) 添加飼料による 13 日間反復投与試験 (雄、3~5 匹/群) の結果を参考に決定した。結果は次の通りであった。体重および摂餌量では、添加飼料の忌避が投与開始日に 1.0%群以上で認められた。5.0%群では摂餌量の低下と体重増加抑制が認められた。血液学的検査では影響は認められなかった。血液生化学的検査では総タンパク質、アルブミンおよび総コレステロールの増加とアルカリホスファターゼの減少傾向が 1.0%群以上で認められた。臓器重量では肝臓重量の増加が 0.1%群以上で、また、脾臓重量の減少が 3.0 および 5.0%群で認められた。

本試験での用量は、予備試験の肝臓重量の増加を基に、最高用量を 0.5%添加飼料投与 (0.5%群) とし、以下公比 10 で減じた 0.05% (0.05%群) および 0.005%添加飼料投与 (0.005%群) を設けた。試験は上記 3 群に基礎飼料だけを投与する対照群を加えた 4 群で行った。各群の動物数は雌雄各 10 匹とした。各群への動物の割付は、被験物質投与開始日前日に、当日の体重と 3 日前の体重から雌雄別にノルム値を求め、健康で、ノルム値の小さい雌雄各 40 匹を選び、次いで、雌雄別に、体重を層別化し、各群の平均体重が出来るだけ均等になるように割り付けた。

添加飼料製造は、メーカーの成分保証期間が 1 年間あること、予備試験で影響が観察された

こと、および当所の飼料製造能力を考慮に入れ、2 週に 1 回行った。

4. 検査項目および方法

1) 一般状態、体重、摂餌量および被験物質摂取量

全動物を対象に、ケージの外側より毎日 1 回一般状態の観察を行うとともに、体重測定日には、手に取り、より詳細に一般状態の観察を行った。体重は全動物を対象に個別に投与開始日、投与開始後 1 および 3 日、以後は週 1 回測定した。また、臓器の相対重量算出のため、剖検日にも絶食後の体重を測定した。摂餌量は、体重測定日にケージ単位に、測定間隔期間中の累積摂取量を測定し、計算により 1 日 1 匹当たりの摂餌量 (g/ラット/日) を求めた。体重 1kg に対する 1 日当たりの被験物質摂取量 (mg/kg/日) は、各週の平均体重、平均摂餌量および被験物質添加濃度から、計算により週ごとに求めた。

2) 血液学的検査および血液生化学的検査

90 日間の投与終了後、一晚 (約 16 時間) 除餌を施した動物より、剖検の前に、エーテル麻酔下で血液試料を眼窩静脈叢より採取した。

血液学的検査では、全血を用いて赤血球数 (RBC)、白血球数 (WBC)、ヘモグロビン量 (Hb)、ヘマトクリット値 (Ht)、血小板数 (Plt)、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) を Sysmex M-2000 (シスメックス (株)) で測定した。また、ライト染色血液塗抹標本を作製し、白血球百分比を MICROX HEG120A (オムロン (株)) にて観察した。

血液生化学的検査では、血清を用いて、総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、グルコース (Glc)、総コレステロール (T-Cho)、トリグリセリド

(TG)、総ビリルビン(T-Bil)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRN)、アスパラギン酸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(AIT)、γ-グルタミルトランスペプチターゼ(γ-GTP)、アルカリホスファターゼ(ALP)、ナトリウム(Na)、カリウム(K)、クロール(Cl)、カルシウム(Ca)およびリン(P)の項目について日立7150形自動分析装置(日立製作所)で測定した。また、アルブミン/グロブリン比(A/G)をTPとAlbの測定値から算出した。

3) 剖検、臓器重量測定および病理組織学的検査

血液試料を採取後、エーテル麻酔下で頸動脈放血により動物を致死させ、剖検を実施した。摘出臓器のうち、脳、心臓、肺、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣あるいは卵巣、および副腎については重量測定を行った。また、重量測定臓器に加え、下垂体、舌、眼球、唾液腺、甲状腺、骨髄(大腿骨)、気管、大動脈、脾臓、食道、胃、小腸(十二指腸、空腸、回腸)、大腸(盲腸、結腸、直腸)、リンパ節(腸間膜)、膀胱、大腿骨、骨格筋、脊髄、坐骨神経、精巣上体、精囊、前立腺および子宮を病理組織学的検査に供するためにリン酸緩衝10%ホルマリン液中で浸漬して固定保存した。その後、常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色病理標本作製し、検査を行った。観察は食品添加物の90日間反復投与毒性試験ガイドラインに準じて対照群と高用量群の観察を行い、被験物質投与による変化が認められた場合に中間用量群を行うこととした。

4) 統計解析法

一般毒性試験における多重比較のためのアル

ゴリズム(ASSIT: algorithm for simultaneous statistical inference in toxicology)法¹⁾により統計解析を行った。すなわち、Bartlettの方法により分散の一様性を検定し、分散が一様な場合は一元配置の分散分析を、分散が一様でない場合はKruskal-Wallisの方法によって順位和検定を行い、群間に有意差が認められた場合はDunnett法に基づき対照群と各群間の一対比較検定を行った。いずれも有意水準は5%とした。

(倫理面の配慮: 試験実施機関の動物倫理規定に基づき、動物への苦痛等を避けるため解剖などは麻酔下で実施した)

C. 研究結果

1. 一般状態

試験期間を通じて、いずれの群でも死亡例は認められず、一般状態にも変化は認められなかった。

2. 体重および摂餌量

雌雄の体重および摂餌量の推移を図1に示した。体重では、群間の差は認められなかった。摂餌量では、対照群に比べ0.5%群で、雄の7日および雌の1日目に低値が認められたが、その後は群間に明らかな差は認められなかった。また、全投与期間を通じて平均した平均摂餌量でも、雌雄ともに、群間の差は認められなかった(表1)。

3. 被験物質摂取量

各週ごとに求めた被験物質摂取量をさらに全投与期間を通じて平均した平均被験物質摂取量を表1に示した。用量設定に対応した摂取が認められ、最高用量群である0.5%群の平均被験物質摂取量は雄で284.2 mg/kg/日、雌で309.8 mg/kg/日であった。

4. 血液学的検査

雄の結果を表2に、雌の結果を表3に示した。雄では MCV および MCH が、雌では Hb および Ht がそれぞれ 0.5% 群で有意な減少が認められた。

5. 血液生化学的検査

雄の結果を表4に示した。AIP の減少が全処置群で、T-Bil の減少が 0.05 および 0.5% 群で認められた。さらに、0.5% 群では TP、Alb および Ca の増加と TG および AsT の減少が認められた。

雌の結果を表5に示した。0.5% 群で TP、Alb および Ca の増加と AIP の減少が雄同様に認められた。また、雄では認められなかった T-Cho、 γ -GTP および P の増加も認められた。0.005 および 0.05% 群に有意差は認められなかった。

6. 臓器重量

雄の結果を表6に、雌の結果を表7に示した。肝臓の絶対および相対重量の増加が雌雄の 0.5% 群で認められた。その他、雄では 0.5% 群の腎臓相対重量の有意な増加が認められた。雌では、0.5% 群で心臓の絶対および相対重量の増加が、0.05 および 0.5% で肺の相対重量の有意な減少が認められた。

7. 剖検所見

0.5% 群では、雌雄の全例で肝臓の軽度の肥大が観察された。

8. 病理組織学的検査

肝臓では、びまん性の肥大が 0.5% 群の雄で 7/10 例、雌で 10/10 例に認められた。また、甲状腺では、濾胞細胞の過形成が雄で 7/9 例、雌で 10/10 例に観察された。この変化は 0.05%

群以下では観察されなかった。また、他の臓器では被験物質投与に関連するような変化は認められなかった。

D. 考察

一般状態、摂餌量および体重に被験物質投与の影響を示唆する変化は認められず、被験物質は体重増加を含む一般状態に影響を及ぼさないものと考えられた。

血液学的検査で認められた雄の 0.5% 群での MCV と MCH および雌の 0.5% 群での Hb および Ht の減少は対照群に対して 1.8~2.5% 程度の軽度の変化であり、RBC を含む赤血球関連検査項目にも変化が認められないことから、統計学的な有意差は認められるものの、毒性学的に意義のある変化とは考えられなかった。

血液生化学的検査では幾つかの項目で有意差が認められた。酵素では、AIP が雄の 0.005~0.5% 群および雌の 0.5% 群で、AsT が雄の 0.5% 群でそれぞれ減少し、 γ -GTP の増加が雌の 0.5% 群で認められた。これらの酵素の増加は肝臓障害の指標として知られているところであり、 γ -GTP の増加は変化の程度からも肝臓への影響を示唆した変化と考えられた。AIP の減少は、予備試験 (雄、0、0.1、1.0、3.0 および 5.0% 添加飼料の 13 日間投与) の結果と一致した変化であり、被験物質投与との関連性が示唆された。AIP の減少は一般的に毒性学的意義は薄いと考えられており、現時点ではその意義については考察しえなかったが、雄の 0.005 および 0.05% 群の変化は、対照群に対してそれぞれ 6.9 および 7.5% と軽度の減少であり、両群での AIP の変化は正常範囲内の変動と考え、毒性変化とはしなかった。蛋白および非蛋白窒素では、TP と Alb の増加が雌雄の 0.5% 群で認められた。脂質では、TG の減少が雄 0.5% 群で、T-Cho の

増加が雌 0.5%群で認められた。電解質では、Ca が雌雄の 0.5%群で、P が雌 0.5%群でそれぞれ増加した。その他、T-Bil の減少が雄 0.05 および雌雄の 0.5%群で認められた。これらの変化はより高濃度を投与した予備試験の結果（但し T-Bil と無機物は測定していない）とほぼ一致しており、被験物質投与との関連性を完全には否定できなが、TP と Alb の変化は小さく、A/G 比にも変化が認められないこと、Ca、P および T-Bil の変化は極軽度の変化であることから、いずれも正常範囲内の変動と考え、統計学的な有意差は認められるものの、毒性学的に意義のある変化とは考えられなかった。これに対して、TG および T-Chol の変化は、比較的大きな変化として認められた。

0.5%群の雌雄において、肝臓の絶対および相対重量の増加が認められ、病理組織学的検査では肝細胞の肥大が観察された。また、雄では腎臓の相対重量の増加が認められたが病理組織学的検査を含み他の検査では、腎障害を示唆するような変化は認められなかった。

病理組織学的検査では、0.5%群の雌雄で、肝細胞の肥大に加え、甲状腺濾胞細胞の過形成が認められた。この変化については、肝臓の薬物代謝酵素の誘導により T₄ の排泄が促進され、血中の T₄ レベルが低下したことにより、視床下部/下垂体/甲状腺系へのフィードバック機構が働き、甲状腺濾胞細胞の過形成が生じたと推察された。

E. 結論

ジャマイカカシア抽出物を 0、0.005、0.05 および 0.5%含有する飼料をラットに 90 日間反復投与する毒性試験を行った。0.005 および 0.05%群では雌雄ともに、毒性学的に意味のある変化は認められなかった。0.5%群では肝臓への影響を示唆する変

化として、肝臓の絶対および相対重量増加、病理組織学的検査において肝細胞の肥大および肝臓の酵素誘導を介した二次的变化と考えられる甲状腺濾胞細胞の過形成が雌雄で認められた。また、雌の血液生化学的検査では、 γ -GTP や T-CHO の増加も認められた。

これらのことから、本試験条件下でのジャマイカカシア抽出物の無毒性量は雌雄とも 0.05%（雄：27.9 mg、雌 30.1mg/kg/day）と推察された。

参考文献

- 1) 山崎実, 野口雄次, 丹田 勝, 新谷 茂, 一般毒性試験における統計的手法, 対照群との多重比較のためのアルゴリズム, 武田研究所報, 40, 163-167 (1981).

F. 健康危機情報

ラットの試験において、肝臓への影響と無毒性量が推定された。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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

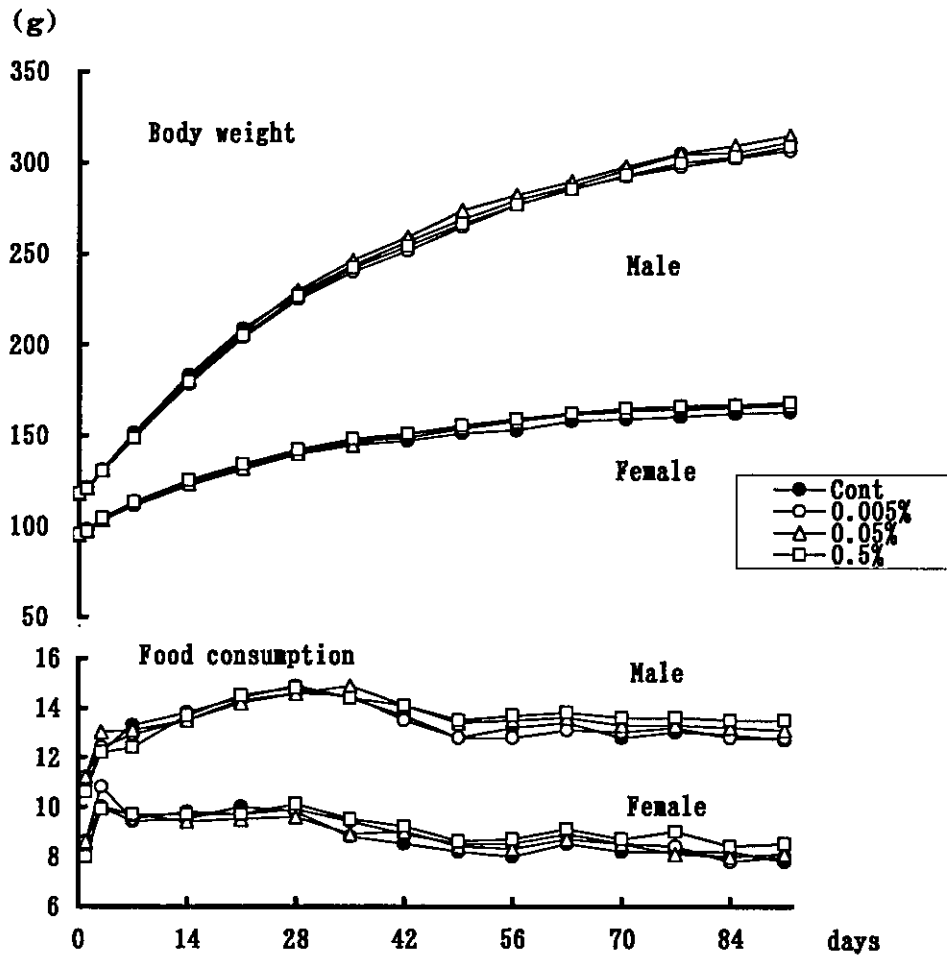


図1 投与期間中の体重及び摂餌量の推移(ジャマイカカシア抽出物のラットによる90日間反復投与毒性試験)

表1 平均摂餌量及び平均被験物質摂取量(ジャマイカカシア抽出物のラットによる90日間反復投与毒性試験)

Group	Cont	0.005 %	0.05 %	0.5 %
Male				
Mean food intake (g/rat/day)	13.5 ± 0.7	13.4 ± 0.7	13.7 ± 0.6	13.8 ± 0.6
Mean jamaica quassia extract intake (mg/kg b.w. /day)	0 ±	2.8 ± 0.7	27.9 ± 0.7	284.2 ± 66.1
Female				
Mean food intake (g/rat/day)	8.7 ± 0.7	8.9 ± 0.7	8.8 ± 0.6	9.1 ± 0.6
Mean jamaica quassia extract intake (mg/kg b.w. /day)	0 ±	3.1 ± 0.6	30.1 ± 6.0	309.8 ± 56.6

Values are mean ± SD.

表2 雄の血液学的検査値(ジャマイカカシア抽出物のラットによる90日間反復投与毒性試験)

Group		Cont	0.005 %	0.05 %	0.5 %
No. of animals		10	10	10	10
RBC	10 ⁴ /μl	968 ± 23	954 ± 22	968 ± 18	968 ± 24
Hb	g/dl	16.0 ± 0.3	15.8 ± 0.3	16.0 ± 0.4	15.7 ± 0.4
Ht	%	46.2 ± 1.3	45.5 ± 1.1	45.8 ± 0.9	45.2 ± 1.1
MCV	fl	47.8 ± 0.6	47.7 ± 0.5	47.3 ± 0.2	46.7 ± 0.3 **
MCH	pg	16.5 ± 0.2	16.5 ± 0.2	16.5 ± 0.2	16.2 ± 0.2 **
MCHC	g/dl	34.6 ± 0.5	34.7 ± 0.3	34.8 ± 0.4	34.7 ± 0.3
Plt	10 ⁴ /μl	40.1 ± 8.9	41.3 ± 4.6	38.6 ± 8.3	44.0 ± 9.8
WBC	10 ² /μl	76.4 ± 8.9	71.1 ± 11.2	73.4 ± 9.9	72.5 ± 10.2
Differential counts (%)					
Baso.		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Eosino.		1.1 ± 1.1	1.1 ± 0.6	1.7 ± 0.8	1.0 ± 1.1
Neut-B		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Neut-S		20.2 ± 2	19.4 ± 5.3	18.6 ± 4.5	19.9 ± 4.6
Lympho.		77.6 ± 2.6	78.5 ± 5.5	78.3 ± 4.9	77.8 ± 5.7
Mono.		1.2 ± 0.6	1.1 ± 0.6	1.5 ± 1.0	1.4 ± 1.4

Each value represents mean ±SD.

Significantly different from the control : ** P<0.01.

RBC: red blood cell count, Hb: hemoglobin, Ht: hematocrit, MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, Plt: platelet count, WBC: white blood cell count, Baso: basophil, Eosino: eosinophil, Neut-B: band neutrophil, Neut-S: segmented neutrophil, Lympho: lymphocyte, Mono: monocyte.

表3 雌の血液学的検査値(ジャマイカカシア抽出物のラットによる90日間反復投与毒性試験)

Group		Cont	0.005 %	0.05 %	0.5 %
No. of animals		10	10	10	10
RBC	10 ⁴ /μl	924 ± 34	918 ± 13	915 ± 23	914 ± 26
Hb	g/dl	16.0 ± 0.4	16.0 ± 0.2	16.1 ± 0.2	15.6 ± 0.3 *
Ht	%	46.2 ± 1.7	45.6 ± 0.6	45.8 ± 1.1	45.1 ± 1.1 *
MCV	fl	50.0 ± 0.7	49.7 ± 0.2	50.0 ± 0.2	49.3 ± 0.2
MCH	pg	17.4 ± 0.4	17.5 ± 0.3	17.6 ± 0.3	17.1 ± 0.3
MCHC	g/dl	34.7 ± 0.7	35.1 ± 0.5	35.2 ± 0.6	34.7 ± 0.5
Plt	10 ⁴ /μl	43.7 ± 15.1	45.8 ± 17.8	48.2 ± 11.1	49.7 ± 11.7
WBC	10 ² /μl	59.8 ± 6.7	54.6 ± 13.0	55.6 ± 14.1	61.4 ± 11.6
Differential counts (%)					
Baso.		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Eosino.		0.8 ± 0.6	1.2 ± 0.7	1.1 ± 1.0	1.3 ± 0.8
Neut-B		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Neut-S		13.0 ± 3.5	11.3 ± 3.8	14.5 ± 3.8	12.1 ± 4.2
Lympho.		84.7 ± 3.5	86.2 ± 3.8	82.6 ± 3.9	85.1 ± 4.8
Mono.		1.5 ± 0.6	1.3 ± 0.7	1.8 ± 0.8	1.6 ± 0.9

Each value represents mean ±SD.

Significantly different from the control : * P<0.05.

RBC: red blood cell count, Hb: hemoglobin, Ht: hematocrit, MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, Plt: platelet count, WBC: white blood cell count, Baso: basophil, Eosino: eosinophil, Neut-B: band neutrophil, Neut-S: segmented neutrophil, Lympho: lymphocyte, Mono: monocyte.

表4 雄の血液生化学的検査値(ジャマイカカッサ抽出物のラットによる90日間反復投与毒性試験)

Group		Cont	0.005 %	0.05 %	0.5 %
No. of Animals		10	10	10	10
TP	g/dl	6.6 ± 0.2	6.5 ± 0.1	6.6 ± 0.1	7.1 ± 0.21 **
Alb	g/dl	4.0 ± 0.2	3.9 ± 0.1	4.0 ± 0.1	4.4 ± 0.17 **
A/G		1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1
BUN	mg/dl	20.7 ± 1.4	21.0 ± 2.5	19.4 ± 3.0	21.8 ± 1.1
CRN	mg/dl	0.35 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.34 ± 0.02
Glc	mg/dl	123 ± 3	116 ± 9	118 ± 7	120 ± 11
TG	mg/dl	107 ± 34	94 ± 32	81 ± 24	60 ± 24 **
T-Cho	mg/dl	72 ± 5	69 ± 7	69 ± 4	71 ± 9
T-Bil	mg/dl	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.01 **	0.03 ± 0.01 **
AIP	mu/ml	318 ± 21	296 ± 23 *	294 ± 18 *	262 ± 14 **
AIT	mu/ml	72 ± 15	64 ± 12	59 ± 9 *	60 ± 6
AsT	mu/ml	94 ± 25	82 ± 9	87 ± 12	73 ± 10 **
γ-GTP	mu/ml	0.93 ± 0.76	0.72 ± 0.42	0.77 ± 0.55	0.71 ± 0.63
Ca	mg/dl	10.0 ± 0.3	10.0 ± 0.2	10.0 ± 0.2	10.4 ± 0.2 *
P	mg/dl	5.5 ± 0.4	5.4 ± 0.3	5.5 ± 0.4	5.8 ± 0.4
Na	mEq/l	141 ± 1	141 ± 1	140 ± 1	141 ± 1
K	mEq/l	4.5 ± 0.4	4.3 ± 0.2	4.5 ± 0.3	4.5 ± 0.3
Cl	mEq/l	95 ± 2	96 ± 2	96 ± 1	94 ± 2

Each value represents mean ± SD.

Significantly different from the control : * P<0.05. ** P<0.01.

TP: total protein, Alb: albumin, A/G: albumin-globulin ratio, BUN: blood urea nitrogen, CRN: creatinine, Glc: glucose, TG: triglyceride, T-Cho: total cholesterol, T-Bil: total bilirubin, ALP: alkaline phosphatase, AIT: alanine aminotransferase, AsT: aspartate aminotransferase, γ-GTP: γ-glutamyltranspeptidase, Ca: calcium, P: inorganic phosphorus, Na: sodium, K: potassium, Cl: chloride.

表5 雌の血液生化学的検査値(ジャマイカカッサ抽出物のラットによる90日間反復投与毒性試験)

Group		Cont	0.005 %	0.05 %	0.5 %
No. of Animals		10	10	10	10
TP	g/dl	6.1 ± 0.2	6.2 ± 0.2	6.1 ± 0.2	6.7 ± 0.1 **
Alb	g/dl	3.7 ± 0.1	3.8 ± 0.1	3.7 ± 0.1	4.0 ± 0.1 **
A/G		1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.1
BUN	mg/dl	18.8 ± 3.2	17.8 ± 2.7	17.6 ± 1.3	20.2 ± 2.8
CRN	mg/dl	0.31 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.02
Glc	mg/dl	115 ± 14	108 ± 10	111 ± 9	113 ± 7
TG	mg/dl	77 ± 33	56 ± 24	56 ± 15	52 ± 15
T-Cho	mg/dl	80 ± 5	80 ± 7	78 ± 9	105 ± 7 **
T-Bil	mg/dl	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.00 **
AIP	mu/ml	208 ± 17	201 ± 19	192 ± 13	164 ± 17 **
AIT	mu/ml	53 ± 4	49 ± 4	53 ± 9	47 ± 6
AsT	mu/ml	80 ± 9	81 ± 11	82 ± 7	72 ± 10
γ-GTP	mu/ml	0.11 ± 0.27	0.09 ± 0.24	0.06 ± 0.13	5.40 ± 1.02 **
Ca	mg/dl	9.6 ± 0.2	9.5 ± 0.2	9.6 ± 0.3	9.9 ± 0.3 *
P	mg/dl	4.0 ± 0.6	3.8 ± 0.5	4.1 ± 0.5	4.6 ± 0.4 *
Na	mEq/l	139 ± 1	139 ± 2	140 ± 1	139 ± 1
K	mEq/l	4.1 ± 0.4	4.0 ± 0.4	4.1 ± 0.2	4.2 ± 0.4
Cl	mEq/l	97 ± 3	98 ± 4	97 ± 2	96 ± 1

Each value represents mean ± SD.

Significantly different from the control : * P<0.05. ** P<0.01.

TP: total protein, Alb: albumin, A/G: albumin-globulin ratio, BUN: blood urea nitrogen, CRN: creatinine, Glc: glucose, TG: triglyceride, T-Cho: total cholesterol, T-Bil: total bilirubin, ALP: alkaline phosphatase, AIT: alanine aminotransferase, AsT: aspartate aminotransferase, γ-GTP: γ-glutamyltranspeptidase, Ca: calcium, P: inorganic phosphorus, Na: sodium, K: potassium, Cl: chloride.

表6 雄の臓器重量(ジャマイカカссия抽出物のラットによる90日間反復投与毒性試験)

Group	Cont	0.005 %	0.05 %	0.5 %
No. of Animals	10	10	10	10
Body weight (g)	304.5 ± 11.2	299.5 ± 13.8	306.9 ± 16.9	299.8 ± 10.6
Absolute organ weight				
Brain (g)	1.94 ± 0.05	1.91 ± 0.04	1.95 ± 0.04	1.93 ± 0.03
Heart (g)	0.90 ± 0.05	0.89 ± 0.06	0.91 ± 0.05	0.90 ± 0.04
Lung (g)	0.91 ± 0.07	0.92 ± 0.04	0.91 ± 0.05	0.88 ± 0.05
Liver (g)	7.18 ± 0.53	7.08 ± 0.58	7.20 ± 0.34	8.69 ± 0.51 **
Kidney (g)	1.75 ± 0.13	1.73 ± 0.10	1.82 ± 0.11	1.84 ± 0.11
Spleen (g)	0.61 ± 0.04	0.60 ± 0.03	0.60 ± 0.03	0.61 ± 0.03
Testis (g)	3.00 ± 0.11	2.97 ± 0.17	3.21 ± 0.53	3.09 ± 0.13
Adrenal (mg)	34.0 ± 8.0	35.0 ± 5.0	34.0 ± 3.0	37.0 ± 3.0
Thymus (g)	0.20 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.17 ± 0.01 *
Relative organ weight (100g body weight)				
Brain (g)	0.64 ± 0.02	0.64 ± 0.02	0.64 ± 0.04	0.64 ± 0.02
Heart (g)	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.01
Lung (g)	0.30 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.29 ± 0.01
Liver (g)	2.36 ± 0.11	2.36 ± 0.14	2.35 ± 0.08	2.90 ± 0.09 **
Kidney (g)	0.58 ± 0.03	0.58 ± 0.02	0.59 ± 0.02	0.61 ± 0.02 **
Spleen (g)	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01
Testis (g)	0.99 ± 0.04	0.99 ± 0.03	1.05 ± 0.18	1.03 ± 0.03
Adrenal (mg)	11.3 ± 2.3	11.6 ± 1.9	11.0 ± 1.4	12.3 ± 1.2
Thymus (g)	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.00

Each value represents mean ± SD.

Significantly different from the control : * P<0.05. ** P<0.01.

表7 雌の臓器重量(ジャマイカカссия抽出物のラットによる90日間反復投与毒性試験)

Group	Cont	0.005 %	0.05 %	0.5 %
No. of Animals	10	10	10	10
Body weight (g)	157.1 ± 5.5	160.8 ± 5.7	162.3 ± 6.0	161.6 ± 8.7
Absolute organ weight				
Brain (g)	1.78 ± 0.03	1.79 ± 0.04	1.79 ± 0.04	1.77 ± 0.02
Heart (g)	0.53 ± 0.03	0.54 ± 0.03	0.54 ± 0.02	0.57 ± 0.04 **
Lung (g)	0.67 ± 0.05	0.67 ± 0.04	0.64 ± 0.03	0.64 ± 0.04
Liver (g)	3.49 ± 0.20	3.41 ± 0.15	3.55 ± 0.26	4.89 ± 0.29 **
Kidney (g)	1.05 ± 0.07	1.04 ± 0.03	1.04 ± 0.05	1.08 ± 0.06
Spleen (g)	0.36 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.37 ± 0.03
Ovary (mg)	53.0 ± 7.0	52.0 ± 8.0	55.0 ± 8.0	56.0 ± 12.0
Adrenal (mg)	40.0 ± 5.0	41.0 ± 4.0	39.0 ± 3.0	44.0 ± 4.0
Thymus (g)	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.02
Relative organ weight (100g body weight)				
Brain (g)	1.13 ± 0.04	1.11 ± 0.04	1.11 ± 0.05	1.10 ± 0.06
Heart (g)	0.33 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.33 ± 0.01	0.35 ± 0.02 *
Lung (g)	0.43 ± 0.03	0.42 ± 0.02	0.39 ± 0.02 **	0.40 ± 0.02 *
Liver (g)	2.22 ± 0.12	2.12 ± 0.07	2.19 ± 0.09	3.03 ± 0.12 **
Kidney (g)	0.67 ± 0.03	0.65 ± 0.03	0.64 ± 0.03	0.67 ± 0.02
Spleen (g)	0.23 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.01
Ovary (mg)	34.0 ± 5.0	32.0 ± 5.0	34.0 ± 5.0	34.0 ± 6.0
Adrenal (mg)	25.6 ± 3.7	25.6 ± 2.6	23.9 ± 1.4	27.3 ± 1.7
Thymus (g)	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01

Each value represents mean ± SD.

Significantly different from the control : * P<0.05, ** P<0.01.

表 8 病理組織学的所見

Group	Male				Female			
	Cont	0.005 %	0.05 %	0.5%	Cont	0.005 %	0.05 %	0.5%
Liver								
Number of animal examined	10	-	10	10	10	-	10	10
Hypertrophy, diffuse	0 ^{a)}	-	0	7	0	-	0	10
Thyroid								
Number of animal examined	9	-	7	9	8	-	7	10
Follicular cell hyperplasia	0	-	0	7	0	-	0	10

^{a)} Number of animals with lesion

分担研究報告書

既存添加物の安全性確保上必要な品質問題に関する研究
－米糠スフィンゴ糖脂質のラットにおける 13 週間反復投与試験－

分担研究者 三森国敏 東京農工大学 農学部 獣医学科 家畜病理学講座 教授

研究要旨

添加物の規格基準作成の一環として、米糠スフィンゴ糖脂質を雌雄の Wistar Hannover (GALAS) 系ラットに 13 週間反復投与し、その毒性について検討した。動物を雌雄各 8 匹ずつ 4 群に分け、米糠スフィンゴ糖脂質の 0, 60, 250 および 1000 mg/kg を 13 週間強制経口投与した。その結果、いずれの投与群においても死亡動物は認められず、体重増加量、血液学的及び血清生化学的検査、臓器重量および病理組織学的検査において被験物質投与に起因した変化は何ら認められなかった。以上より、本試験における米糠スフィンゴ糖脂質のラットに対する無毒性量は 1000 mg/kg であると考えられた。

A. 研究目的

スフィンゴ糖脂質は、スフィンゴ脂質の一つであり、スフィンゴ脂質はスフィンゴシンに代表される長鎖のアミノアルコールを持つ脂質の総称で、哺乳動物の皮膚角質層の細胞間脂質の約 50% を占めている。加齢に伴い、スフィンゴ脂質が減少することが知られており、加齢とともに多くなる皮膚からの水分喪失の増加の原因の一つと考えられている。スフィンゴ糖脂質にはセレブロシド、ガングリオシドなどがあり、親水基として糖鎖、疎水基としてセラミドを持つ両親媒性の機能性複合糖質である。スフィンゴ糖脂質は、細胞膜外層においてコレステロールや GPI 型糖タンパク質、Src などのリン酸化酵素とミクロドメインを形成し、細胞内・細胞間の情報伝達、接着、増殖、分化等を制御していると考え

られている。大部分のスフィンゴ糖脂質は、セラミドにグルコースが転移される反応によって合成が開始され、この転移反応を触媒するグルコシルセラミド合成酵素のノックアウトマウスは胎生致死であるため、スフィンゴ糖脂質は個体の生存あるいは初期発生に必須なものと考えられている。今回実験に用いたスフィンゴ糖脂質は米糠より精製した天然物であり、水系の商品に使用できる化粧品水性基材、また、健康食品や食品添加物用にも用いられている。現在、スフィンゴ糖脂質の毒性に関する情報がほとんどないことから、スフィンゴ糖脂質の反復投与による毒性変化を明らかにする目的で、ラットを用いた 13 週間反復投与毒性試験を実施した。

B. 研究方法

1. 被験物質および投与量：

米糠スフィンゴ糖脂質は、日本食品添加物協会より供与されたものを用いた。13週間反復投与毒性試験に先立ち、被験物質の投与形態の状態を確認するため、0.5% Carboxy Methyl Cellulose に懸濁させ検討したところ、1000 mg/kg(100 mg/mL) 以上では調製薬物の粘調性が極めて高く、投与操作に困難を極めたことから、本実験における最高投与量を 1000 mg/kg (100 mg/mL)と設定した。以下公比4で減じ、250、60 mg/kg を中間用量群及び低用量群にそれぞれ設定した。

2. 動物および方法：

5週齢の Wistar Hannover (GALAS)ラット雌雄各 32 匹を日本クレア株式会社より購入し、約1週間の馴化飼育後、雌雄とも各群 8 匹ずつ 4 群に分けて実験を行った。動物の飼育はバリアシステムの動物飼育室にて行い、室内環境条件は、温度 24±2°C、湿度 55±10%、換気回数 18 回/時間、蛍光照明 12 時間 (7-19 時)とした。動物をラット用吊下げ型金網ケージに 2 匹或いは 3 匹/ケージ収容し、固型基礎飼料 (CE-2、日本クレア株式会社) および上水道水を自由に摂取させた。

被験物質は、投与物質調製時までは 4°C で保存し、週 1 或いは 2 回調製を行った。なお、調製後被験物質の保存期間は本実験開始前に実施した安定性試験の結果に従い、7 日以内とした。一般状態及び死亡動物の有無を毎日観察し、体重及び摂餌量及び飲水量を毎週測定した。なお、摂餌量及び飲水量は、給餌或いは給水量から残餌或いは残水量を差引いた量として算出した。投与開始 13 週後に全生存動物を屠殺剖検

し、試験を終了した。

動物をエーテル麻酔下で開腹し、腹部大動脈より採血を行った。血液学的検査には多項目自動血球計数装置 (Sysmex, Sysmex SE-9000 型) を用い、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン濃度 (HB)、ヘマトクリット値 (HT)、MCV、MCH、MCHC 及び白血球数 (WBC) を測定するとともに、血液塗沫標本を作製し、血液細胞自動分析装置 (立石電気 MICROX HEG-120A 型) を用いて以下の血液像について分類した。分葉核好中球 (SEG)、好酸球 (Eos)、リンパ球 (LYMP)、単球 (MONO)。また、総蛋白 (TP)、アルブミン・グロブリン比 (A/G)、総コレステロール (TC)、血中尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRE)、カルシウム (Ca)、無機リン (IP)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、クロール (Cl)、グルタミンクオキサロアセテック トランスアミラーゼ (GOT)、グルタミンク ピルビック トランスアミラーゼ (GPT)、アルカリホスファターゼ (ALP) 及びアルブミン (ALB) の各項目についての血清生化学的検査を株式会社 S R L で実施した。動物を剖検後、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、下垂体、副腎、甲状腺、精巣、子宮、卵巣の重量を測定した。また、上記臓器に加え、主要臓器を 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した後、常法に従い薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、対照群と高用量群について病理組織学的検索を行った。

3. 統計学的解析：

体重、摂餌量、飲水量、血液学的検査、血清生化学的検査及び臓器重量の各測定値について群毎に平均値及び標準偏差を求め、多重比較検定を行った。すなわち、

Bartlett 法により分散の均一性を調べ、均一な場合は Dunnett の検定を行ない、不均一な場合は Dunnett 型の順位和検定を行った。有意水準は危険率 5%以下とした。

C. 研究結果

1. 死亡動物及び体重変化：

実験全期間を通じ、死亡動物は認められなかった。

体重は、雌雄いずれの投与群でも実験期間中を通じ対照群と同様の推移を示した (Figure 1, Table 1)。

2. 摂餌量及び飲水量：

摂餌量は雌雄いずれの投与群も実験期間を通じ、対照群との間に差は認められなかった。飲水量も同様に雌雄いずれの投与群でも実験期間を通じ、対照群との間に差は認められなかった (Table 1)。

3. 血液学的及び血清生化学的検査：

血液学的検査では、雌の 1000 mg/kg 投与群において白血球百分比における EOS の割合が有意な増加 ($p < 0.01$) を示した。雄では被験物質投与に起因した変化は認められなかった (Table 2)。

血清生化学的検査では、雄の 250 mg/kg 投与群で BUN 値が有意な増加 ($p < 0.05$) を示した。また 1000 mg/kg 投与群では A/G 比が有意に低下 ($p < 0.05$) を示した。雌では被験物質投与に起因した変化は認められなかった (Table 3)。

4. 臓器重量：

重量測定を行った全ての臓器の実重量ならびに相対重量では、雌雄いずれの投与群も対照群との間に差は認められなかった (Table 4, 5)。

5. 病理組織学的所見：

雄雌ともに対照群ならびに 1000 mg/kg 投与群について観察を実施した。雄の 1000 mg/kg 投与群では、肝臓の小肉芽腫、肺の肺胞内出血、腎臓の好塩基性尿細管および石灰沈着、心臓の心筋炎、顎下腺の顆粒膨大部の空胞化、気管支腺の拡張、前立腺の慢性炎症、下垂体のラケット囊遺残、前葉の囊胞形成がそれぞれ観察された (Table 6)。雌の 1000 mg/kg 投与群では、肝臓の小肉芽腫および小葉周辺性のヘモジデリン沈着、腎臓の好塩基性尿細管および石灰沈着、心臓の心筋炎、顎下腺の顆粒膨大部の空胞化、気管支腺の拡張、下垂体のラケット囊遺残、前葉の囊胞形成、副副腎がそれぞれ観察された。これらの発現頻度は、雄雌とも対照群との間に差はほとんどみられなかった (Table 7)。

D. 考察

米糠スフィンゴ糖脂質の反復投与による毒性変化を明らかにする目的で、雌雄ラットに 13 週間強制反復経口投与した。

血液学的検査において認められた雌 1000 mg/kg 投与群での白血球百分比における EOS の割合増加は、同群の 1 匹の動物が高値を示しているが、WBC 値には変化が認められないことから、毒性学的意義は低いものと考えられた。血清生化学的検査で認められた雄の 250 mg/kg 投与群における BUN 値の有意な増加は投与量に相関しないことから偶発的な変化と考えられた。また雄 1000 mg/kg 投与群における A/G 比の低下は、いずれもその変動幅がわずかであることやその他の関連項目に変化がみられないことから毒性学的意義はないものと判断した。病理学的検査では、幾つかの

臓器に軽微な変化がみられたが、何れも対照群と 1000 mg/kg 投与群との間で発現頻度に差がみられないことより、被験物質に起因したものではなく、自然発生性の変化であると判断した。その他、検査項目においては対照群との間に差は認められなかった。

以上より、米糠スフィンゴ糖脂質の 1000 mg/kg を経口投与してもラットには何ら毒性変化は認められなかったことから、本試験における米糠スフィンゴ糖脂質のラットに対する無毒性量は 1000 mg/kg であると考えられた。

E. 結論

Wistar Hannover (GALAS)ラットを雌雄各 8 匹ずつ 4 群に分け、米糠スフィンゴ糖脂質の 0, 60, 250 及び 1000 mg/kg を 13 週間強制経口反復投与した。いずれの投与群においても死亡動物は認められず、体重増加量、血液学的及び血清生化学的検査及び臓器重量においても被験物質投与に起因した変化は何ら認められなかった。

以上より、米糠スフィンゴ糖脂質の 1000 mg/kg を経口投与してもラットには何ら毒性変化はみられなかった事から、本試験における米糠スフィンゴ糖脂質のラットに対する無毒性量は 1000 mg/kg であると考えられた。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案特許：なし
3. その他：なし

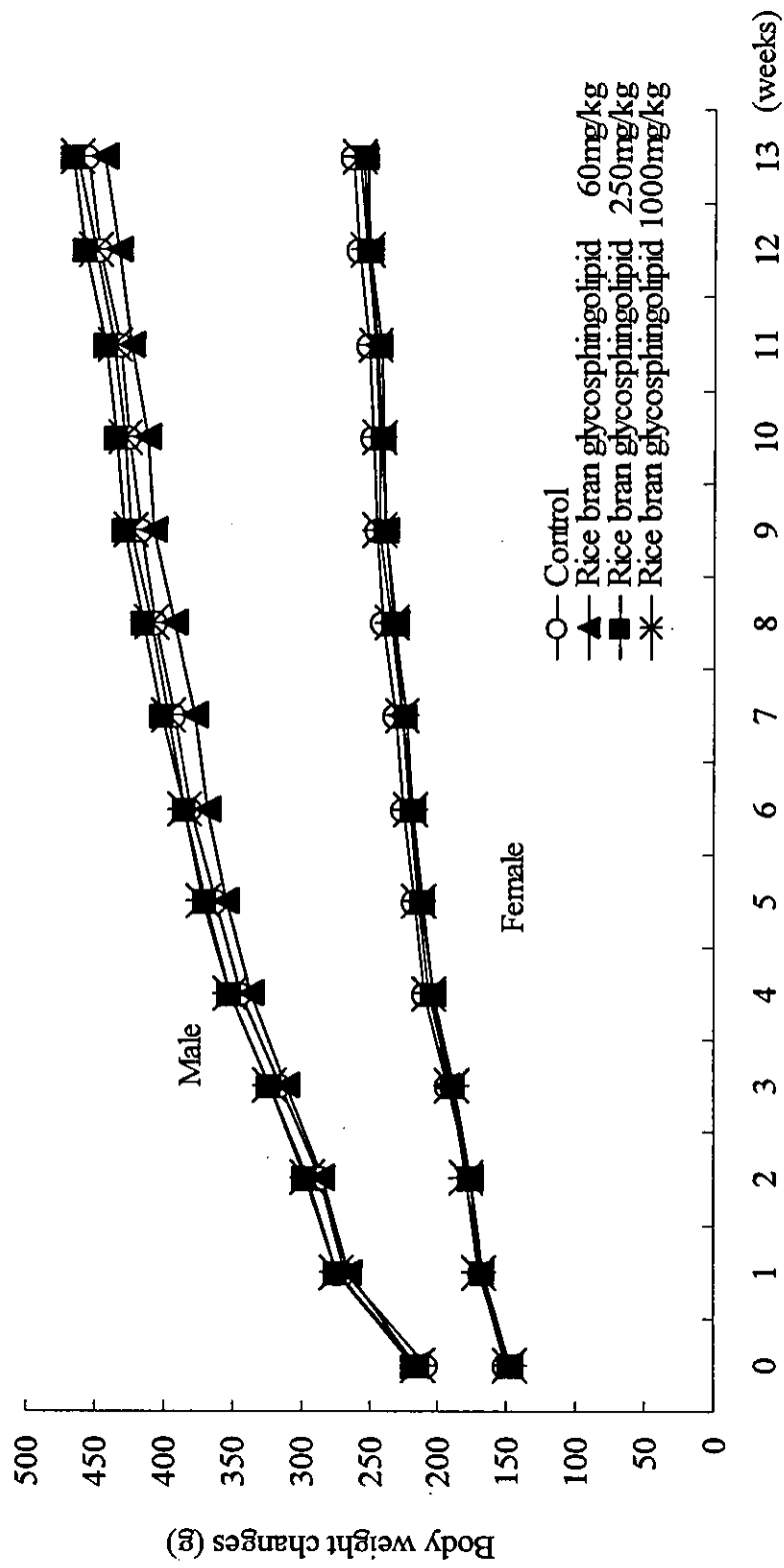


Figure 1. Growth curves of rats treated with rice bran glycosphingolipid

Table 1. Body weight, water consumption, food intake in rats treated with rice bran glycosphingolipid for 13 weeks

Dose level (mg/kg)	No. of animals	Final body weight (g)	Diet intake (g/rat/day)	Water consumption (g/rat/day)
Male	0	456.1 ± 54.6 ^{a)}	25.9	36.3
	60	443.6 ± 39.7	25.2	33.9
	250	466.8 ± 26.3	26.5	33.6
	1000	463.4 ± 33.4	26.4	34.2
.....				
Female	0	262.3 ± 17.1	19.2	32.6
	60	255.4 ± 12.5	19.1	25.9
	250	252.5 ± 12.1	19.7	40.9
	1000	257.8 ± 13.6	19.6	31.5

a) : Mean±S.D.

Table 2. Hematological changes in rats treated with rice bran glycosphingolipid for 13 week

Dose level (mg/kg)	0	60	250	1000
No. of animals	8	8	8	8
Male				
RBC $\times 10^4/\text{mm}^3$	712.9 \pm 49.2 ^{a)}	736.6 \pm 31.8	755.4 \pm 24.0	750.1 \pm 49.2
HB g/dl	13.6 \pm 0.7	14.1 \pm 0.4	14.0 \pm 0.4	14.0 \pm 0.7
HT %	40.1 \pm 2.4	41.3 \pm 2.3	41.4 \pm 1.4	41.1 \pm 2.9
MCV m^3	56.4 \pm 1.7	55.9 \pm 1.6	54.8 \pm 1.7	54.6 \pm 0.7
MCH pg	19.1 \pm 0.6	19.0 \pm 0.8	18.6 \pm 0.5	18.6 \pm 0.5
MCHC %	34.0 \pm 0.9	34.3 \pm 1.2	34.0 \pm 0.9	34.1 \pm 1.1
WBC /ml	2737.5 \pm 776.3	3387.5 \pm 603.4	3487.5 \pm 1172.8	3387.5 \pm 1089.5
Differential cell count (%)				
SEG	17.9 \pm 7.4	15.4 \pm 4.1	16.0 \pm 5.0	16.4 \pm 4.4
EOS	1.7 \pm 1.0	3.0 \pm 1.9	1.7 \pm 0.6	2.4 \pm 1.1
MONO	2.0 \pm 1.4	1.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.9	1.5 \pm 0.8
LYMP	79.4 \pm 8.9	81.4 \pm 6.0	81.9 \pm 5.0	81.0 \pm 4.7
Female				
RBC $\times 10^4/\text{mm}^3$	659.1 \pm 39.0	640.1 \pm 27.0	655.3 \pm 22.7	638.9 \pm 22.0
HB g/dl	13.6 \pm 0.6	13.3 \pm 0.6	13.6 \pm 0.5	13.4 \pm 0.7
HT %	39.1 \pm 2.4	38.0 \pm 2.1	38.8 \pm 1.6	38.0 \pm 2.1
MCV m^3	59.4 \pm 2.9	59.5 \pm 1.9	59.1 \pm 1.5	59.5 \pm 2.1
MCH pg	20.5 \pm 0.9	20.8 \pm 0.5	20.8 \pm 0.5	21.0 \pm 0.8
MCHC %	34.6 \pm 1.2	34.9 \pm 0.8	35.0 \pm 0.8	35.4 \pm 0.9
WBC /ml	1900.0 \pm 1028.2	1862.5 \pm 855.1	1425.0 \pm 525.8	2512.5 \pm 693.7
Differential cell count (%)				
SEG	17.8 \pm 6.0	15.4 \pm 2.7	16.1 \pm 5.0	13.9 \pm 4.4
EOS	1.3 \pm 0.5	1.5 \pm 0.6	2.3 \pm 0.6	4.0 \pm 1.4 ^{**}
MONO	1.9 \pm 1.5	1.2 \pm 0.4	1.3 \pm 0.5	2.2 \pm 1.3
LYMP	79.4 \pm 6.6	83.1 \pm 2.3	82.0 \pm 4.1	83.8 \pm 4.8

a) : Mean \pm S.D.

** : Significantly different from the control at p<0.01

Table 3. Serum chemistry in rats treated with rice bran glycosphingolipid for 13 weeks

Dose (mg/kg)	0	60	250	1000
No. of animals	8	8	8	8
Male				
TP g/dl	5.9 ± 0.5 ^{a)}	6.1 ± 0.2	6.3 ± 0.2	6.0 ± 0.4
A/G	1.8 ± 0.2	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.2 *
TC mg/dl	50.8 ± 7.0	50.6 ± 4.5	51.6 ± 6.2	50.6 ± 7.9
BUN mg/dl	23.9 ± 1.7	23.3 ± 2.6	26.6 ± 0.8 *	24.0 ± 2.2
CRE mg/dl	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.30 ± 0.00	0.30 ± 0.00
Ca mg/dl	9.6 ± 0.4	9.6 ± 0.2	9.7 ± 0.2	9.6 ± 0.5
IP mg/dl	4.8 ± 0.5	4.7 ± 0.5	4.5 ± 0.4	4.7 ± 0.6
Na mEQ/l	147.9 ± 2.2	146.0 ± 1.5	146.3 ± 0.7	147.1 ± 1.6
K mEQ/l	3.2 ± 0.3	3.2 ± 0.2	3.4 ± 0.2	3.2 ± 0.2
Cl mU/dl	107.0 ± 3.5	105.4 ± 1.8	105.9 ± 2.0	106.3 ± 2.7
GOT IU/l	74.5 ± 6.8	73.5 ± 8.9	67.4 ± 5.7	73.9 ± 13.9
GPT IU/l	50.6 ± 10.9	44.8 ± 5.2	43.6 ± 6.0	44.6 ± 11.1
ALP IU/l	396.8 ± 150.5	387.1 ± 93.6	409.4 ± 145.0	379.1 ± 149.3
ALB g/dl	3.8 ± 0.4	3.9 ± 0.1	51.6 ± 0.2	3.7 ± 0.3
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>				
Female				
TP g/dl	6.2 ± 0.4	6.1 ± 0.4	6.2 ± 0.4	6.3 ± 0.5
A/G	2.2 ± 0.3	2.1 ± 0.4	1.9 ± 0.2	2.3 ± 0.4
TC mg/dl	53.5 ± 9.7	49.0 ± 9.2	50.8 ± 7.6	53.1 ± 8.3
BUN mg/dl	22.5 ± 2.6	23.3 ± 1.9	23.1 ± 2.7	24.2 ± 3.0
CRE mg/dl	0.3 ± 0.0	0.27 ± 0.0	0.30 ± 0.00	0.30 ± 0.00
Ca mg/dl	9.4 ± 0.7	9.3 ± 0.5	9.4 ± 0.3	9.7 ± 0.6
IP mg/dl	4.4 ± 1.3	4.5 ± 0.7	4.7 ± 0.7	4.7 ± 0.7
Na mEQ/l	147.9 ± 1.7	147.9 ± 1.4	148.5 ± 1.2	146.5 ± 1.6
K mEQ/l	3.0 ± 0.5	2.9 ± 0.3	2.8 ± 0.2	3.0 ± 0.2
Cl mU/dl	108.4 ± 2.5	109.5 ± 2.4	109.3 ± 1.8	108.0 ± 3.9
GOT IU/l	69.1 ± 18.9	66.0 ± 18.1	64.5 ± 13.7	67.0 ± 15.8
GPT IU/l	44.5 ± 14.8	44.1 ± 17.1	43.9 ± 13.1	44.1 ± 15.8
ALP IU/l	224.3 ± 124.0	179.5 ± 58.9	199.5 ± 62.8	231.6 ± 106.7
ALB g/dl	4.3 ± 0.4	4.1 ± 0.4	4.1 ± 0.3	4.4 ± 0.4

a) : Mean±S.D.

* : Significantly different from the control at p<0.05

Table 4. Organ weight of male rats treated with rice bran glycosphingolipid for 13 weeks

Dose level (mg/kg)	0	60	250	1000
No. of animals	8	8	8	8
Body weight	456.1 ± 54.6 ^{a)}	443.6 ± 39.7	466.8 ± 26.3	463.4 ± 33.4
Absolute (g)				
Brain	2.07 ± 0.09	2.06 ± 0.09	2.06 ± 0.07	2.10 ± 0.06
Heart	1.09 ± 0.13	1.12 ± 0.12	1.15 ± 0.10	1.18 ± 0.07
Lung	1.32 ± 0.14	1.27 ± 0.11	1.32 ± 0.11	1.36 ± 0.05
Liver	14.48 ± 1.38	14.60 ± 1.39	15.42 ± 1.25	14.51 ± 1.28
Kidney	2.78 ± 0.48	2.71 ± 0.41	2.80 ± 0.23	2.77 ± 0.23
Spleen	0.71 ± 0.07	0.76 ± 0.10	0.77 ± 0.11	0.70 ± 0.07
Thymus	0.38 ± 0.03	0.39 ± 0.09	0.38 ± 0.09	0.41 ± 0.10
Adrenal	0.010 ± 0.002	0.010 ± 0.002	0.010 ± 0.002	0.011 ± 0.002
Pituitary gland	0.066 ± 0.011	0.066 ± 0.015	0.073 ± 0.010	0.075 ± 0.015
Thyroid gland	0.024 ± 0.006	0.029 ± 0.013	0.028 ± 0.005	0.024 ± 0.002
Testis	3.56 ± 0.24	3.57 ± 0.31	3.61 ± 0.15	3.66 ± 0.30

Relative (g/100g B.W.)				
Brain	0.46 ± 0.05	0.47 ± 0.04	0.44 ± 0.03	0.46 ± 0.04
Heart	0.24 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.02
Lung	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.29 ± 0.02
Liver	3.20 ± 0.12	3.29 ± 0.12	3.30 ± 0.12	3.14 ± 0.23
Kidney	0.61 ± 0.04	0.61 ± 0.06	0.60 ± 0.03	0.60 ± 0.05
Spleen	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.15 ± 0.02
Thymus	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.09 ± 0.02
Adrenal	0.002 ± 0.000	0.002 ± 0.001	0.002 ± 0.000	0.002 ± 0.001
Pituitary gland	0.014 ± 0.002	0.015 ± 0.003	0.016 ± 0.002	0.016 ± 0.003
Thyroid gland	0.005 ± 0.001	0.006 ± 0.003	0.006 ± 0.001	0.005 ± 0.001
Testis	0.79 ± 0.11	0.81 ± 0.07	0.78 ± 0.05	0.79 ± 0.09

a) : Mean ± S.D.

Table 5. Organ weight of female rats treated with rice bran glycosphingolipid for 13 weeks

Dose level (mg/kg)	0	60	250	1000
No. of animals	8	8	8	8
Body weight	262.3 ± 17.1 ^{a)}	255.4 ± 12.5	252.5 ± 12.1	257.8 ± 13.6
Absolute (g)				
Brain	1.88 ± 0.09	1.93 ± 0.05	1.90 ± 0.08	1.86 ± 0.08
Heart	0.77 ± 0.06	0.77 ± 0.03	0.78 ± 0.04	0.76 ± 0.05
Lung	1.02 ± 0.11	0.97 ± 0.06	0.99 ± 0.07	1.00 ± 0.07
Liver	9.01 ± 0.97	8.93 ± 0.66	9.00 ± 0.68	9.19 ± 0.83
Kidney	1.74 ± 0.21	1.68 ± 0.10	1.73 ± 0.16	1.74 ± 0.15
Spleen	0.55 ± 0.05	0.54 ± 0.07	0.49 ± 0.06	0.76 ± 0.58
Thymus	0.33 ± 0.09	0.34 ± 0.08	0.29 ± 0.03	0.33 ± 0.06
Adrenal	0.015 ± 0.003	0.015 ± 0.002	0.015 ± 0.001	0.016 ± 0.002
Pituitary gland	0.084 ± 0.008	0.091 ± 0.009	0.089 ± 0.010	0.081 ± 0.012
Thyroid gland	0.022 ± 0.006	0.018 ± 0.002	0.019 ± 0.003	0.017 ± 0.008
Uterus	0.871 ± 0.241	0.723 ± 0.241	0.655 ± 0.205	0.745 ± 0.415
Ovary	0.099 ± 0.020	0.111 ± 0.024	0.093 ± 0.008	0.102 ± 0.013

Relative (g/100g B.W.)				
Brain	0.71 ± 0.05	0.76 ± 0.03	0.75 ± 0.03	0.72 ± 0.03
Heart	0.29 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.41 ± 0.29	0.30 ± 0.01
Lung	0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.03	0.39 ± 0.02	0.39 ± 0.02
Liver	3.37 ± 0.25	3.50 ± 0.18	3.57 ± 0.19	3.56 ± 0.23
Kidney	0.65 ± 0.06	0.66 ± 0.04	0.68 ± 0.05	0.68 ± 0.06
Spleen	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.29 ± 0.21
Thymus	0.12 ± 0.03	0.13 ± 0.03	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.02
Adrenal	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.000	0.006 ± 0.001
Pituitary gland	0.032 ± 0.004	0.036 ± 0.004	0.035 ± 0.003	0.031 ± 0.004
Thyroid gland	0.008 ± 0.002	0.007 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.006 ± 0.003
Uterus	0.332 ± 0.092	0.283 ± 0.091	0.259 ± 0.080	0.291 ± 0.166
Ovary	0.038 ± 0.010	0.044 ± 0.010	0.037 ± 0.003	0.039 ± 0.005

a) : Mean ± S.D.

Table 6. Histopathology of male rats treated with rice bran glycosphingolipid for 13 weeks

		Grade	Control group n = 8	Rice bran glycosphingolipid 1000 mg/kg n = 8
Liver	Microgranuloma	+	3	3
Spleen			0	0
Lung	Hemorrhage, focal	+	1	0
Kidney	Basophilic tubul	+	1	2
	Calcification	+	0	1
Heart	Myocarditis	+	4	2
Muscle			0	0
Tongue			0	0
Cerebrum			0	0
Cerebellum			0	0
Submandibular gland	Vacuolation of striated portion	+	2	0
Submandibular lymph node			0	0
Skin			0	0
Esophagus			0	0
Artery			0	0
Thymus			0	0
Trachea	Dilation, tracheal gland	+	0	1
Prostate	Chronic inflammation	+	2	3
Seminal vesicle			0	0
Coagulation gland			0	0
Urinary bladder			0	0
Pancreas			0	0
Forestomach			0	0
Glandular stomach			0	0
Duodenum			0	0
Jejunum			0	0
Ileum			0	0
Cecum			0	0
Colon			0	0
Rectum			0	0
Mesentery lymph node			0	0
Testis			0	0
Epididymis			0	0
Pituitary gland	Rathke's pouch	+	0	1
	Pars distalis	Cyst	1	1
	Pars intermedia		0	0
	Pars nervosa		0	0
Thyroid gland			0	0
Adrenal gland			0	0
Peripheral nerve			0	0
Eye			0	0
Harderian gland			0	0
Femur			0	0
Sternum			0	0
Spinal cord	Cervical vertebrae		0	0
	Thoracic vertebrae		0	0
	Lumbar vertebrae		0	0

+ : slight