

200501039A

厚生労働科学研究費補助金
食品の安心・安全確保推進研究事業
既存添加物の発がん性等に関する研究
平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者	神谷 研二	広島大学原爆放射線医科学研究所
分担研究者	三森 国敏	東京農工大学大学院
	関田 清司	国立医薬品食品衛生研究所

平成18年(2006)4月

目 次

I. 総括研究報告書

既存添加物の発がん性等に関する研究.....	1
神谷研二	

II. 分担研究報告

1. ホコッシン抽出物のラットによる1年間反復投与毒性／発がん性併用試験	46
神谷研二	
2. ルチン酵素分解物のラットによる1年間反復投与毒性試験	66
三森国敏	
3. ジャマイカカシア抽出物のラットによる1年間反復投与毒性試験	82
関田清司	

既存添加物の発がん性等に関する研究

主任研究者 神谷研二 広島大学原爆放射線医科学研究所 教授

研究要旨

既存添加物は、長年食用に使用された経験はあるものの、動物実験による毒性試験などの科学的な安全性データに欠けるものが少なくない。そこで本研究では、90日反復投与毒性試験や変異原性試験が実施された既存添加物のうちから、その結果を考慮しホコッシ抽出物、ルチン酵素分解物、及びジャマイカカッシア抽出物を選定し、これらの1年間反復投与毒性試験、並びにホコッシ抽出物の発がん性試験を実施し安全性評価を行う。その結果を厚生労働行政に反映することで、我国独特の多い既存添加物の安全性確保を目指す。

- 1) オランダピユ(マメ科)の種からエタノール抽出して得られた食品添加物ホコッシ抽出物を長期反復摂取した場合の慢性毒性、及び発がん性を検索する目的で、Wistar Hannover系ラットを用いて1年間反復投与毒性/発がん性併用試験を実施した。その結果、雄ラットで1%以上、雌ラットでは0.2%以上のホコッシ抽出物の投与で体重の増加抑制が認められ、雌雄ラットラットの1%以上で摂餌量の低下が認められた。一方、血液・生化学検査や病理学的検査では、ホコッシ抽出物に起因すると考えられる毒性所見は認められなかった。F344ラットを用いた90日間反復投与毒性試験では病理検査で精巣と卵巣への毒性が認められたがWistar Hannover系ラットでは、異常所見を認めなかった。以上より1年間反復投与毒性試験におけるホコッシ抽出物の無毒量は、雄ラット0.2%、雌ラット0.04%であると考えられた。また、発がん性試験の研究経過は順調である。
- 2) 添加物の規格基準作成の一環として、ルチン酵素分解物の反復投与毒性を検討するためルチン酵素分解物の0.04, 0.2, 1ならびに5%混合飼料を52週間Wistar Hannover (GALAS)系ラットに投与した。被験物質投与との関連を示唆する動物の死亡、体重変化、血液検査血液生化学検査及び臓器重量における異常はみられなかった。投与期間中の一般状態観察では、雌雄ラットの5%投与群において被験物質投与に起因すると考えられる着床尿が認められ、尿検査では雌雄ラットの1%及び5%投与群で濃色尿(Straw-colored)が、雌雄ラットの5%投与群でカルシウム1日排泄量の高値が認められた。剖検では、雌雄ラットとも5%投与群の全例の骨表面に、被験物質に起因したと考えられる色調の変化(黄色化)が認められた。現在、病理組織学的検査を実施中であり、この結果を含めて、今後、ルチン酵素分解物の反復投与毒性を総合的に評価する。
- 3) 本試験に先立ち行った、ジャマイカカッシア抽出物のラット90日間反復投与毒性試験で肝臓への影響が明らかとなった。そこで、さらに長期間投与した場合の安全性及び毒性に関する情報を得る目的で、ラットを用いたジャマイカカッシア抽出物0, 5, 50, 500及び5000ppm添加飼料投与による1年間反復投与毒性試験を行った。現在、病理組織学的検査を残し試験は終了した。これまでに得られた結果では、肝臓重量の増加が雄ラットの500ppm以上の投与群と雌の5000ppm投与群で認められた。また、腎臓、副腎及び甲状腺重量の増加が雌雄ラットの5000ppm投与群で認められた。これらのほかにも、尿タンパク質の増加が雌雄ラットの5000ppm投与群で認められた。また、雌雄ラットの5000ppm投与群では、血液学的検査及び血液生化学的検査の一部の項目で有意差を認める変化が観察された。先に実施した90日間反復投与毒性試験と比較すると、被験物質をより長期間投与することにより、肝臓及び腎臓重量の増加はより大きな影響を受けることが明らかとなった。また副腎への影響が新たに示唆された。

被験物質投与群で認められた変化については、今後、病組織学的検査結果と併せてその毒性的意義を含め総合的に評価する。

- 4) 1年間反復投与毒性/発がん性併用試験では、試験開始直後に購入先のラット飼育生産施設でラットの肺パスツレラ (*Pasteurella pneumotropica*) 感染の発生が明らかとなった。そのため本試験を途中で中止し、ラットおよび施設での上記の病原体陰性を確認後、試験を再開することとした。このため、実験の遅れを余儀なくされた。

分担者研究者

三森国敏 東京農工大学大学院
共生科学技術研究部
動物生命科学部門 教授
関田清司 国立医薬品食品衛生研究所
毒性部 室長

性試験や変異原性試験が実施された既存添加物のうちから、その結果を考慮しホコッシ抽出物、ルチン酵素分解物、及びジャマイカカシヤ抽出物を選定し、これらの1年間反復投与毒性試験、並びにホコッシ抽出物の発がん性試験を実施する。その結果を厚生労働行政に反映することで、我国独特のものが多し既存添加物の安全性確保を目指す。

A. 研究目的

既存添加物は、平成7年5月の食品衛生法の改正にともなう経過措置として、使用が認められているものである。既存添加物の多くは、それ自体もしくはその起源が、長年食用に供されていた等の経験はあるものの、安全性の面から見れば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が少なくない。法改正時の国会附帯決議で、既存添加物については速やかに安全性の見直しを行い、有害であることが実証された場合には、使用禁止等必要な措置を講じることとされている。平成13年12月に採択された日本生協連合会からの国会請願の中でも、天然添加物を含めた食品添加物に対する安全性確保は大きな柱の1つとなっている。平成8年度の厚生科学研究「既存添加物の安全性評価に関する調査研究」において、既存添加物489品目のうち139品目については、今後反復投与毒性試験の実施を含め、その安全性について検討することが必要であるとされた。当該139品目については、平成11年度までに14品目について安全性に問題ないとされ、さらに、平成13年度までに、16品目程度についての安全性評価が行われている。残りの109品目の基本的安全性を評価するためには、ヒトでの生涯摂取を想定した発がん性・慢性毒性を含む安全性を検討する必要がある、そのためラット等の動物モデルを用いて長期反復投与による安全性評価を行う。

本研究では、ラットによる90日反復投与毒

B. 研究方法

既にラットによる90日反復投与毒性や変異原性試験が実施された既存添加物のうちから、その結果を考慮し検討品目としてホコッシ抽出物、ルチン酵素分解物、およびジャマイカカシヤ抽出物を選定した。今年度からホコッシ抽出物、ルチン酵素分解物、及びジャマイカカシヤ抽出物の1年間反復投与毒性試験、並びにホコッシ抽出物の発がん性試験を実施した。1年間反復投与毒性/発がん性併用試験の実施は、国立医薬品食品衛生研究所で確立されているプロトコール/ガイドラインに準じて行なう。

B-1 ラットおよび飼育条件

F344/DuCrj ラット (SPF) および Wistar Hannover (GALAS) 系ラットをそれぞれ日本チャールス・リバー (株) と日本クレア (株) より購入し、基礎飼料 (CRF-1 粉末飼料: オリエンタル酵母工業 (株)), CE-2: 日本クレア株式会社) と水道水で1週間以上の馴化飼育後、健康な雌雄ラットを実験に用いた。

飼育は温度 21.0~25.0°C, 湿度 40~70%, 換気回数 10~25 回/時間, 蛍光照明 12 時間に制御された動物室で、ポリカーボネート製ケージ (床敷使用) に2~3 匹ずつ収容して行った。

B-2 予備試験

B-2-1 ホコッシ抽出物

ラット 90 日反復投与毒性試験では、F344 ラットを用いて試験が行われ、精巣と卵巣への毒性が有ることが確認された。しかし、F344 雄ラットには、自然発生の精巣間細胞腫が非常に高頻度に発生するため、1 年間反復投与毒性/発がん性併用試験に適したラット系統を用いる必要がある。そのため今回の実験では Wistar Hannover (GALAS) 系ラットを用いて試験を行うが、ホコッシ抽出物の投与量に関する資料は、F344 ラット以外には存在しない。従って、Wistar Hannover (GALAS) 系ラットに 16 週間の混餌試験を別途実施し適切な投与量を決定する必要がある。4 週齢の Wistar Hannover (GALAS) 系ラット雌雄ラット各 10 匹を日本クレア株式会社より購入し、7 日間の馴化飼育後、雌雄ラットとも各群 10 匹ずつ 4 群に分け試験を実施した。ホコッシ抽出物の投与濃度は、1%、0.2%、および 0.04%とした。一般状態及び死亡ラットの有無を毎日観察し、体重及び摂餌量については週 1 回測定した。

B-2-2 ルチン酵素分解物

ルチン酵素分解物混合飼料の作製時に被験物質を放射線照射した際、被験物質の色調に変化が認められた。これより放射線照射によるルチン酵素分解物の変性が懸念されたことから、予備試験として放射線照射/非照射ルチン酵素分解物の比較試験を開始した。すなわち、4 週齢の Wistar Hannover (GALAS) ラット雌雄ラット各 24 匹を日本クレア株式会社より購入し、7 日間の馴化飼育後、雌雄ラットとも各群 8 匹ずつ 3 群に分けて試験を開始した。ルチン酵素分解物混合粉末飼料は、使用時までには 4℃で保存し、動物に与えた飼料は安定性が確保されている期間内に適宜交換した。一般状態及び死亡動物の有無を毎日観察し、体重及び摂餌量については週 1 回 1 回測定した。投与開始 28 日後に全生存動物を屠殺剖検し、以下は後述の本試験方法に準拠して実施した。

B-3 被験物質とその投与量、及び実験群の設定

B-3-1 ホコッシ抽出物

ヒガシマル醤油株式会社より提供されたホコッシエタノールエキスをを用いた。投与量は、先に実施されたラット 90 日反復投与毒性試

験の資料と予備試験の結果を基に決定した。予備試験では、全ての濃度のホコッシ抽出物混合飼料による 16 週間の飼育でラットの全身状態に変化は認められなかった。体重の増加は、0.2%と 0.04%のホコッシ抽出物混合飼料群では対照群に比べ有意な変化を認めなかった。しかし、1.0%群では、体重増加の抑制を認めた (図 1)。一方、ホコッシ抽出物を混餌投与した F344 ラットでは、雄ラット 0.75%、雌ラット 0.38%以上の混餌飼料で体重増加抑制がみられ、1.5%以上では精巣及び卵巣の組織学的異常を認めている。以上の結果より、1 年間反復投与毒性試験では、精巣及び卵巣の組織学的異常を確認するためホコッシ抽出物混合飼料濃度の最高用量を 1.5%とし、それ以下の用量を 1%、0.2%、及び 0.04%とした。一方、発がん性試験では、長期飼育をする必要から、ホコッシ抽出物混合飼料濃度の最高用量を 1.0%とし、それ以下の用量を 0.2%、及び 0.04%とした。1 年間反復投与毒性/発がん性併用試験では、4 週齢の Wistar Hannover (GALAS) ラット雌雄ラット各 260 匹を日本クレア株式会社より購入し、11 日間の馴化飼育後、各実験群を設定した。1 年間反復投与毒性試験、及び発がん性試験における各実験群の被験物質投与濃度とラット数を表 1-1、及び表 1-2 に示した。

表 1. 1 年間反復投与毒性試験

	実験群 (添加濃度)	雄ラット (n=60)	雌ラット (n=60)
①	0%	10	10
②	0.04%	10	10
③	0.2%	10	10
④	1.0%	10	10
⑤	1.5%	20	20

表 2. 発がん性試験

	実験群 (添加濃度)	雄ラット (n=200)	雌ラット (n=200)
①	0%	50	50
②	0.04%	50	50
③	0.2%	50	50
④	1.0%	50	50

B-3-2 ルチン酵素分解物

三栄源エフ・エフ・アイより供与されたも

のを用いた。本試験における添加飼料中の被験物質濃度は先に実施されたラット 90 日間混餌投与試験において、通常、食品添加物の混餌投与試験における最高濃度の上限とされている 5% 投与群においても顕著な毒性徴候が認められなかったことから、5% を最高投与量として、以下公比 5 で減じ、1.0, 0.2, および 0.04% とした。対照群には基礎飼料を、各投与群には前述の各濃度のルチン酵素分解物混合飼料を自由に摂取させる。なお、基礎固型飼料ならびにルチン酵素分解物混合固型飼料には 10kGy の放射線を照射し滅菌処理を施した飼料を使用した。実験群の設定は、4 週齢の Wistar Hannover (GALAS) ラット雌雄ラット各 100 匹を日本クレア株式会社より購入し、11 日間の馴化飼育後、雌雄ラットとも各群 20 匹ずつ 5 群に分けて試験を開始した。

B-3-3 ジャマイカカシア抽出物

ジャマイカカシア (*Pterocarpus excelsa* (SW.) Planch) 原木の幹、枝を乾燥し、粉碎して苦味成分を熱湯で抽出、沈殿、ろ過を繰返して濃縮精製した製品 (Stan Chem International Ltd, England) を国内販売会社 (東和産業株式会社、大阪) より購入した (ロット番号 2019301/2 及び 2019551)。形状は淡黄色微粉末で、特有の臭気を有し、有効成分としてクワシンとネオクワシンを No. 2019301/2 は 11.9% 及び 41.7%, No. 2019551 は 11.7% 及び 42.4% をそれぞれ含有 (HPCL 分析, Stan chemical international limited) した。試験には、ロットによる成分差を避けるため両製品を等量混合して用いた。被験物質の投与はヒトでの摂取経路を考慮に入れ、粉末飼料 (CRF-1 粉末飼料, オリエンタル酵母(株)) による混餌投与で行なっている。用量設定は、90 日間反復投与毒性試験 (0, 50, 500 および 5000ppm 添加飼料) の結果を参考に決定した。90 日試験では、肝臓重量の増加が 5000ppm 投与群の雌雄ラットで認められた。また、血清アルカリフォスファターゼの減少が雄ラットの全処置群で認められた。これらのことから、肝臓への影響が発現すると予測される 5000ppm を最高用量に、以下公比 10 で除した 500, 50 および 5ppm を設定した。

実験群の設定を以下の表に示した。各群への動物の割付は、被験物質投与開始前日に、当日の体重と 3 日前の体重から雌雄ラット別にノルム値を求め、健康で、ノルム値の小さい雌雄ラット各 100

匹を選び、次いで、雌雄ラット別に、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。

【群構成】

群	添加濃度 (ppm)*	動物数	
		雄	雌
対照	0	20	20
5 ppm	5	20	20
50 ppm	50	20	20
500 ppm	500	20	20
5000 ppm	5000	20	20

*添加飼料製造は、実験担当者が当研究所飼料製造室で 2 週間毎に行っている。

B-4 1 年間反復投与毒性/発がん性併用試験

B-4-1 1 年間反復投与毒性試験

B-4-1-1 被験物質とラットの観察

被験物質混合飼料は、使用時までには 4℃ で保存し、動物に与えた飼料は安定性が確保されている期間内に適宜交換した。一般状態及び死亡動物の有無を毎日観察し、体重及び摂餌量については投与開始後 3 ヶ月まで週 1 回、以後は 4 週に 1 回測定した。摂餌量は、体重測定日にケージ単位に、7 日分 (最初の 1 週間は 3 あるいは 4 日) 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。被験物質摂取量 (mg/kg/日) は、当該測定日の平均体重、平均摂餌量および被験物質添加濃度から、計算により求めた。

B-4-1-2 血液学的検査及び血液生化学的検査

1 年間の投与終了時に全生存動物について行った。動物は採血に先立ち、一晚 (約 16 時間) 除餌を行った。採血はエーテル麻酔下で眼窩静脈叢より行い、以下の検査を実施した。

血液学的検査は、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)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC) を全血の希釈法で測定した。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 HEG50S (シスメックス (株)) で観察した。

血液生化学的検査は、血清を用いて、総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRN)、尿酸 (UA)、グルコース (Glc)、中

性脂肪 (NEFA), リン脂質 (PL), トリグリセリド (TG), 総コレステロール (T-Cho), 総ビリルビン (T-Bil), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT), アルカリホスファターゼ (ALP), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AsT), コリンエステラーゼ (ChE), γ -グルタミルトランスペプチターゼ (γ -GTP), ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP), 乳酸脱水素酵素 (LDH), カルシウム (Ca), リン (P), ナトリウム (Na), カリウム (K) 及びクロール (Cl) の項目について測定した。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。

B-4-1-3 尿検査

投与終了 1 週間前に, 全生存動物についてウロビリノーゲン, タンパク質, pH, 潜血, ケトン体, ビリルビン, ブドウ糖の 7 項目を尿検査試験紙 (N-マルティスティックス, バイエルメディカル株式会社) を用いて測定した。

B-4-1-4 剖検, 臓器重量及び病理組織学的検査

1 年間の投与終了時の計画解剖日まで生存していた動物は, 血液試料採取後, エーテル麻酔下で頸動脈放血により動物を致死させた後, 剖検と各臓器の摘出を行った。摘出臓器のうち, 脳, 脳下垂体, 甲状腺, 心臓, 肺, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 精巣あるいは卵巣及び副腎について, 重量測定を行った。なお, 下垂体及び甲状腺はホルマリン固定後に行った。また, 重量測定臓器に加え, 下垂体, 舌, 眼球, 唾液腺, 胸骨, 胸腺, 気管, 大動脈, 膵臓, 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, 前立腺及び子宮は病理組織学的検査に供するために 10% 中性緩衝ホルマリン液中で浸漬して固定保存 (精巣はブアン固定) した。途中死亡動物についても同様に, 剖検と病理組織学的検査のための臓器保存を行った。その後, 各臓器および組織を切り出し, 通常の方法によりパラフィン包埋後, 薄切片を作成し, ヘマトキシリン・エオジン (H. E.) 染色を施して, 病理組織学的に検索を行った。

B-4-1-5 統計処理

体重, 摂餌量, 血液学的検査値, 血液生化学的検査値ならびに臓器重量については, 群毎に平均値及び標準偏差を求めた。また平均値の差の有意性を検定した。予備試験では各群間の直接比較検定 (F-t 検定など) を行った。検定は最初に

Bartlett の方法で分散を検定し, 分散が一様な場合で各群の例数が同じ場合は, 対照群との間で Dunnett の多重比較, 同じでない場合は Scheffe の多重比較で検定した。分散が一様でない場合はノンパラメトリックの Dunnett 法あるいは Scheffe 法により検定した。いずれも有意水準は 5% とした。

B-4-2 ホコッシ抽出物の発がん性試験

ホコッシ抽出物の発がん性を検索するために表 2 の実験群のラットに各濃度のホコッシ抽出物を投与し, 24ヶ月後に全生存動物を屠殺剖検する。剖検では, 器官・組織の肉眼的観察を行い, 組織を切り出し病理組織学的検索を実施する。剖検の方法や病理標本の作製は前述の通りである。剖検に先立ち生存ラットを採血し血液検査と血液塗抹標本の作製を行う。

(倫理面の配慮)

本試験は, 国立医薬品食品衛生研究所の動物倫理規定に従った毒性試験法ガイドラインに準じて行われる試験であり, 動物からの採血や解剖においては麻酔下で行うなどの動物への苦痛を軽減するなどの配慮を行った。また, 各動物実験施設の動物実験倫理規定を遵守して行った。

C. 研究結果

C-1 ホコッシ抽出物

C-1-1 予備試験

Wistar Hannover (GALAS) 系ラットに 16 週間の混餌試験を別途実施し, 適切な投与量を決定する予備試験を実施した。その結果, 全ての濃度のホコッシ抽出物混合飼料による 16 週間の飼育でラットの全身状態に変化は認められなかった。体重は, 0.2%, 及び 0.04% ホコッシ抽出物混合飼料群では対照群に比べ有意な変化を認めなかった。しかし, 1.0% 群では, 体重増加の抑制を認めた (図 1-1)。一方, ホコッシ抽出物を混餌投与した F344 ラットでは, 雄ラット 0.75%, 雌ラット 0.38% 以上の混餌飼料で体重増加抑制がみられ, 1.5% 以上では精巣及び卵巣の組織学的異常を認めている。以上の結果より, 1 年間反復投与毒性試験では, 精巣及び卵巣の組織学的異常を確認するためホコッシ抽出物混合飼料濃度の最高用量を 1.5% とし, 以下の用

量を1%, 0.2%, 及び0.04%とした。一方、発がん性試験では、長期飼育をする必要から、ホコッシ抽出物混合飼料濃度の最高用量を1.0%とし、以下の用量を0.2%, 及び0.04%とした。

C-1-2 1年間反復投与毒性試験

C-1-2-1 一般状態

試験期間中の動物の一般状態は、いずれの実験群においてもホコッシ抽出物に起因すると考えられる特記すべき変化は認められなかった。

C-1-2-2 体重

試験期間中の各群の体重推移を図1-2と表1-3に示した。雄ラットでは、1%投与群で投与開始4週間目から、1.5%投与群で投与開始1週間目から体重の増加抑制が認められた。また、雌ラットでは、0.2%群で投与開始11週間目から、1%並びに1.5%投与群で投与開始1週間目から体重の増加抑制が認められた。雌雄ラット共に認められた体重の増加抑制は、0%投与群に対して統計学的に有意であり、試験終了まで同様な推移であった。

C-1-2-3 摂餌量および被験物質摂取量

各群の摂餌量の推移を表1-4に示した。雄ラットでは、0.2, 1, 1.5%投与群で投与開始3週間目より0%群に対して摂餌量の有意な低下が認められたが、その差は、0.2%投与群で4週間目、1%投与群は16週間目に消失した。1.5%投与群では、試験終了時まで継続した。雌ラットでは、投与開始3週間目より1および1.5%投与群で摂餌量の低下が認められ、1%投与群では、9週目まで継続し、1.5%投与群では、試験終了時まで認められた。

試験期間中におけるラット一匹一日当たりの平均の摂餌量と体重1kg一日当たりの被験物質摂取量を表1-5に示した。ラット一匹一日当たりの平均摂餌量については、雌雄ラットとも1および1.5%投与群で0%投与群に対して有意な摂餌量の低下が認められた。またホコッシ抽出物の摂取量も被験物質の用量段階にほぼ相関していた。

C-1-2-4 血液学的検査および血清生化学的検査

血液学的及び血清生化学的検査の結果を表1-6, 7に示した。0%投与群に対する有意差検定の結果、血液生化学的検査では、GOT (雌雄ラ

ット1.5%)の低下、TGの低下(雌雄ラット1%以上)が認められ、血液学的検査では、白血球数の増加(雌雄ラット0.04%)、リンパ球の増加(雌ラット1%以上)が認められた。その他、雌雄ラットいずれにおいてもいくつかの検査項目で有意差が認められたが、これらの値はすべて正常範囲であり、明らかな用量相関性は認められなかった。

C-1-2-5 臓器重量

実験終了時における雄ラットの臓器絶対重量および相対重量の結果を表1-8に、雌ラットのそれを表1-9に示した。0%投与群に対する有意差検定の結果、雌雄ラットともにいくつかの臓器で有意差が認められたが、これらの値の変動範囲はごく軽度であり、その範囲も生物学的に正常範囲であった。

C-1-2-6 病理組織学的検索

検索した全ての臓器において、0%投与群に比べ、ホコッシ抽出物の投与群に特異的な変化は認められなかった。また、ホコッシ抽出物の投与量に相関して変化する病理組織学的な病変も認められなかった。

C-1-3 ホコッシ抽出物の発がん性試験

C-1-3-1 一般状態

現在、ラットにホコッシ抽出物の反復投与を継続しており順調に経過している。雌雄ラット共に0%投与群を除く全てのホコッシ抽出物投与群で死亡例が認められるが、投与量に相関した衰弱や死亡例は認められていない。詳細な死因等については、現在病理標本を作製し検索中である。その他、試験期間中の動物の一般状態は、いずれの実験群においてもホコッシ抽出物に起因すると考えられる特記すべき変化は認められていない。

C-1-3-2 体重

試験開始から63週間までの各群の体重推移を図1-3と表1-10に示した。雄ラットでは、1%投与群で投与開始1週間目から体重の増加抑制が認められた。また、雌ラットでは、0.2%投与群が投与開始2週間目から、1%投与群で投与開始1週間目から体重の増加抑制が認められた。雌雄ラット共に認められた体重の増加抑制は、0%投与群に対して統計学的に有意であり、試験終了まで同様な推移であった。

C-1-3-3 摂餌量および被験物質摂取量

各群の摂餌量の推移を表 1-11 に示した。雄ラットでは、1%投与群で投与開始 5 週間目より 0%群に対して摂餌量の有意な低下が認められたが、その差は、25 週間目に消失した。雌ラットでは、投与開始 2 週間目より 1%投与群で、3 週目より 0.2%投与群で摂餌量の低下が認められ、0.2%投与群は断続的に、1%投与群は、63 週目まで継続して低下が認められている。

試験期間中におけるラット一匹一日当たりの平均の摂餌量と体重 1kg 一日当たりの被験物質摂取量を表 1-12 に示した。ラット一匹一日当たりの平均摂餌量については、雌雄ラットとも 1%投与群で 0%投与群に対して有意な摂餌量の低下が認められている。またホコッシ抽出物の摂取量も被験物質の用量段階にほぼ関連していた。

C-2 ルチン酵素分解物

C-2-1 ルチン酵素分解物の予備試験

本試験に先立ち、予備試験として、放射線照射および非照射ルチン酵素分解物の 5%混合飼料を 28 日間 Wistar Hannover (GALAS) 系ラットに投与し、その毒性の比較を行った。検査項目は、90 日反復投与毒性試験に準じ、血液検査、血液生化学検査、尿検査、及び病理検査を行った。その結果、放射線照射/非照射ルチン分解物がラットに及ぼす影響にはほとんど差は認められなかった。予備試験の結果を受け、放射線照射滅菌処理ルチン酵素分解物混合飼料 (0.04, 0.2, 1, 5%) を用いた同系雌雄ラットにおける 52 週間混餌投与試験を実施した。

C-2-2 ルチン酵素分解物の 1 年間反復投与毒性試験

C-2-2-1 死亡動物及び一般症状

投与 7 週に 5%投与群の雌ラット 1 例、投与 32 週に対照群の雄ラット 1 例、投与 39 週に 5%投与群の雄ラット 1 例ならびに投与 45 週に対照群の雄ラット 1 例が、一般状態の悪化により切迫屠殺された。投与 36 週から投与期間終了まで雌雄ラット 5%投与群の全例に顕著な着床尿が観察された。その他、被験物質投与との関連を示唆する症状の発現はみられなかった (図 2-1, 表 2-1-1, 2)。

C-2-2-2 体重及び摂餌量

体重は、雌雄ラットとも対照群と被験物質投与群間で顕著な差はみられなかった。(図 2-2)。摂餌量は、雄ラットの 5%投与群に対照群と比較して高値を示したが、その他の被験物質投与群では、対照群との顕著な差はみられなかった (図 2-2, 3)。

C-2-2-3 血液学・血液生化学的検査

血液学的検査では、被験物質投与との関連を示唆する変化は認められなかった。(表 2-2)。

血液生化学的検査では、被験物質投与との関連を示唆する変化は認められなかった。(表 2-3)。

C-2-2-4 臓器重量

臓器重量に関して、雌雄ラットとも被験物質投与との関連を示唆する顕著な変化は認められなかった (表 2-4, 5)。

C-2-2-5 尿検査

新鮮尿の定性検査では、雌ラット 5%投与群で尿 pH の低値傾向が認められた。尿蛋白、ブドウ糖、潜血、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲンに顕著な変化はみられなかった (データは示さず)。24 時間蓄尿では、肉眼的に雌雄ラットの 1%及び 5%投与群で濃色尿 (Straw-colored) が観察された。また、雌雄ラットの 5%投与群でカルシウム 1 日排泄量の高値が認められた (表 2-6)。

C-2-2-6 剖検及び病理組織学的検査

剖検時には、雌雄ラットとも 5%投与群の全例の骨表面に、被験物質に起因したと考えられる色調の変化 (黄色化) が認められた。

病理組織学的検査は現在実施中である。

C-3 ジャマイカカシア抽出物

C-3-1 ジャマイカカシア抽出物の 1 年間反復投与毒性試験

C-3-1-1 死亡及び一般状態

投与開始 33 週目に 5000ppm 投与群の雌ラット 1 例を著しい衰弱が観察されたため、切迫解剖した。さらに、雌ラット 5000ppm 投与群では、51 週目に 1 例の死亡が認められた。このほかの群では雌雄ラットとも、死亡は認められなかった。

一般状態観察では、被験物質投与との関連で、特記する変化は認められなかった。

C-3-1-2 体重及び摂餌量

体重は、雌雄ラット各群とも順調に増加し、群

間に差は認められなかった(図3-1)。

5000ppm添加飼料は、被験物質に起因する弱い、特有の臭気を有したが、飼料に対する忌避行動、摂餌量低下あるいは増加は認められなかった。このほかの群でも、摂餌量に差は認められなかった(図3-1、表3-1)。

C-3-1-3 被験物質摂取量

設定用量に対応した摂取が認められ、最高用量5000ppm投与群の平均被験物質摂取量は、雄ラットで210.7mg/kg/日、雌ラットで258.2mg/kg/日であった(表3-1)。

C-3-1-4 血液学的検査

雄ラットでは、5000ppm投与群で、Hb、Ht、MCV及びMCHCの有意な減少が認められた。このほか、偶発的な変化と考えられるWBCの有意な増加が雄ラットの500ppm投与群で認められた(表3-2)。

雌ラットでも、雄ラット同様、5000ppm投与群で、Hb、Ht、MCV及びMCHCの有意な減少が認められた(表3-3)。白血球百分比では、雌ラット500ppm投与群の1例に赤血球の大小不同像を伴ったリンパ性白血病の像が観察された。

C-3-1-5 血液生化学的検査

雄ラットでは、TP及びAlbの有意な増加が500ppm及び5000ppm投与群で認められた。また、TGの有意な増加とT-Bil、ALP、ALT、AsT及びChEの有意な減少が5000ppm投与群で認められた。TGは50ppm投与群でも有意差が認められた(表3-4)。

雌ラットでは、TP、Alb、Glc、PL、T-Cho及びγ-GTPの有意な増加とT-Bil及びALPの有意な減少が5000ppm投与群で認められた。また、偶発的な変化と考えられるChEの増加が500ppm投与群で認められた(表3-5)。

C-3-1-6 尿検査

雌雄ラットの5000ppm投与群でタンパク質の増加が認められた。このほかの項目では、変化は認められなかった(表3-6)。

C-3-1-7 剖検所見

途中死亡動物：33週で切迫解剖した例(雌ラット5000ppm)では腎臓(片側)の腫瘤(25×30mm)が、また51週の死亡例(雌ラット5000ppm)では、副腎(片側)の肥大(4×4mm)が認められた。

計画解剖動物：雌雄ラットとも、5000ppm投与群で、肝臓及び甲状腺の肥大が大多数の動物で観察された。また、雄ラット5000ppm

投与群の1例に副腎(片側)の肥大(10×10mm)が、雌ラット500ppm投与群の1例に甲状腺あるいは上皮小体(片側)の著しい肥大が観察された。これらのほかに特記する変化は認められなかった。

C-3-1-8 臓器重量

雄ラットでは、肝臓実重量及び相対重量の有意な増加が500ppm及び5000ppm投与群で認められた。また、甲状腺、腎臓及び副腎の実重量及び相対重量の有意な増加が5000ppm投与群で認められた(表3-7)。

雌ラットでは、5000ppm投与群で、雄ラットと同様、肝臓、腎臓、副腎及び甲状腺の増加が認められた。これらのほかに、心臓の実重量と相対重量、肺及び脾臓の相対重量に有意な増加が5000ppm投与群で認められた(表3-8)。

C-3-1-9 病理組織学的検査

現在、標本作製を行っている。

C-4 ラット購入先の飼育生産施設でのラットへの肺パストツレラ感染の発生

日本チャールスリバーより購入したF344/DuCrjラット(SPF)を用いて試験を開始したが、試験開始直後に日本チャールスリバーから緊急連絡の形でラットの飼育生産施設で肺パストツレラ(*Pasteurella pneumotropica*)の感染の事実が発表された。購入動物についても肺パストツレラの感染の可能性が高いと判断された。また日本チャールスリバーからも同様の見解を得た。そこで、試験結果への影響と二次感染(肺パストツレラの感染力は極めて高い)防止の観点から本試験を途中で停止し、上記の病原体陰性のF344/DuCrjラットの供給再開(約6ヵ月後)を待って、試験を再開することとした。一方、Wistar Hannover(GALAS)ラットについても、当該試験動物飼育エリアの別飼育室のラットに肺パストツレラ感染が確認されたことから、当該飼育施設の全動物を殺処分し、飼育施設の消毒、清浄化をはかることとした。したがって、本試験も中止し、全動物を安楽死させ、試験実施を中断した。再試験は2004年7月に開始したため、実験の遅れを余儀なくされた。

D. 考察

D-1 ホコッシ抽出物

ホコッシ抽出物は、オランダピユ(マメ

科)の種をエタノール抽出して得られた、食品の日持ち向上剤である。元来、冠状動脈拡張、抗菌、抗癌作用が示唆されており、白斑、疥癬の局所治療薬として使用されてきた。その主成分は抗菌作用を有するバクチオールである。このようにホコッシ抽出物は、既に食品にも日持ち向上剤として使用されており、安全性は高いと考えられる。ホコッシ抽出物については、これまでの安全性評価の結果から、マウス単回経口投与による急性毒性試験におけるホコッシ抽出物におけるLD₅₀値は雄ラットで6113mg/kg、雌ラットで5300mg/kgである。AMES試験は陰性、マウス小核試験は陰性であるが、染色体異常試験は陽性であることが確認されている。また、ホコッシ抽出物のラット90日反復投与毒性試験では、F344ラットに精巣と卵巣への毒性が有ることが確認された。しかし、F344雄ラットには、自然発生の精巣間細胞腫が非常に高頻度に発生するため、この目的に適したラットシステムを用いて慢性毒性試験をする必要がある。本検討では、自然発生の精巣腫瘍の発生頻度が低いWistar Hannover(GALAS)系ラットを用いて1年間反復投与毒性/発がん性併用試験を実施した。現在までに、1年間反復投与毒性試験を終了し、発がん性試験については、現在、投与を継続中である。

1年間反復投与毒性試験では、ホコッシ抽出物に起因すると考えられる一般状態の変化は試験期間を通して認められなかった。体重増加及び摂餌量は雄ラットで高用量1%以上、雌ラットで中用量0.2%以上の用量で体重増加抑制が認められ、摂餌量も雌雄ラットともに中用量0.2%以上で減少した。血液生化学的検査では、GOT(雌雄ラット1.5%)の低下、TGの低下(雌雄ラット1%以上)が認められ、血液学的検査では、白血球数の増加(雌雄ラット0.04%)、リンパ球の増加(雌ラット1%以上)が認められた。しかし、これらの値の変動範囲はごく軽度であり、その範囲も生物学的に正常範囲で、他の関連するパラメーターにも変化が認められなかったことから毒性学的意義に乏しい変化と考えられた。剖検所見では、腎、心臓や肝臓等の各臓器に変化は認められず、対照群との間に差を認めなかった。臓器重量では、各臓器の絶対重量値にいくつ

かの臓器で有意差(絶対重量低下)が認められたが、相対重量値の結果(相対重量増加)を鑑みて、ホコッシ投与群の低体重に起因するものと考えられた。また、精巣重量にも変化は認められず、萎縮も確認されなかった。病理組織学的検査においても、対照群に比べホコッシ抽出物に起因すると考えられる特異的な組織学的変化は認められず、精巣および卵巣の器質的な変化も認められなかった。このことから、F344ラットを用いた報告と同様の変化はWistar Hannover系ラットでは確認できず、F344ラットでのホコッシ抽出物による精巣と卵巣の障害は系統差によるものと考えられた。

現在進行中の発がん性試験では、一般状態において試験開始から数例の死亡例が認められた。当該個体の病理検索は終了しておらず、詳細な衰弱および死亡の原因は不明であるが、投与量に相関したものではない。しかしながら、0%投与群を除く雌雄ラット全てのホコッシ投与群で、死亡あるいは衰弱した個体が認められていることから、今後の経過観察に注意を要する。また、体重および摂餌量においても1年間反復投与試験と同様に、0.2%投与群以上で統計学的に有意な低下が認められており、1年を越えるホコッシ抽出物の摂取による生体への影響について、今後の経過を注意して観察したいと考えている。

D-2 ルチン酵素分解物

ルチン酵素分解物の長期間投与の影響を検討することを目的とした慢性毒性試験を実施した。その結果、現時点では被験物質投与との関連を示唆する動物の死亡、体重変化は認められず、血液検査、血液生化学検査及び臓器重量においても毒性学的に問題となる変化は認められていない。投与期間中の一般状態観察では、雌雄ラットの5%投与群において着床尿が観察され、尿検査では雌雄ラットの1%及び5%投与群で濃色尿(Straw-colored)が認められたが、被験物質に起因したものと考えられた。剖検において雌雄ラットの5%投与群の全例に観察された被験物質に起因すると考えられる骨表面の色調の変化(黄色化)、尿検査で雌雄ラットの5%投与群に認められたカルシウム1日排泄量の高値についての毒

性学的意義及びルチン酵素分解物の反復投与毒性については、現在実施中の病理組織学的検査結果も含めて総合的に考察する。

D-3 ジャマイカカシア抽出物

苦味料ジャマイカカシア抽出物の安全性評価の一環として、先に行ったラットの90日間反復投与毒性試験の結果、5000ppm添加飼料投与で肝臓への影響が認められた。そこで、さらに長期間投与した場合の安全性及び毒性に関する情報を得る目的で、ラット用いた1年間反復投与毒性試験を行った。現在、病理組織学的検査を残し試験は終了した。

その結果、血液検査ではHb、Ht、MCV及びMCHCの減少傾向が5000ppm投与群の雌雄ラットで認められた。同様の傾向は90日間反復投与毒性試験でも認められた変化であり、被験物質投与との関連性は否定出来ないものの、変化は軽度(10%以下)であり、正常範囲内の変動と考えられた。

血液生化学検査では、雌雄ラット共通の変化として、5000ppm投与群でTP及びA1bの増加(雄ラットでは500ppm投与群から)とALP及びT-Bilの減少が認められた。これらの変化に加え、雄ラットの5000ppm投与群では、TGの有意な増加及びALT、AsT、ChEの有意な減少が認められた。また雌ラット5000ppm投与群では、Gl c、T-Cho、PL及び γ -GTPの有意な増加が認められた。これらの変化の一部は90日間反復投与毒性試験の5000ppm投与群でも認められた変化であった。しかしながら、TPとA1bの変化(5%前後)は小さく、またA/G比には差を認めない変化であった。T-Bilの変化は極軽度で、一般的に毒性学的意義は薄いと考えられている減少の変化であった。ALP、ALT、AsT、ChEなどの酵素の変化も、一般的に毒性学的意義は薄いと考えられている減少の変化であった。これに対し、雄ラットのTG及び雌ラットのPL及びT-Choの変化は比較的大きな増加(20%強)であった。また、雌ラットの γ -GTPの増加は小さいものの、 γ -GTPの増加は肝臓障害の指標として知られている変化であった。

尿検査では、蛋白質の増加が雌雄ラットの5000ppm投与群で認められた。5000ppm投与群では腎臓重量の増加が認められているが、血清蛋白は増加傾向を示しており、その毒性学的意義については考察できなかった。

剖検及び臓器重量では、雌雄ラット共通の変化として、肝臓重量増加が雄ラットの500ppm以上の投与群と雌ラットの5000ppm投与群で認められた。また、腎臓、副腎、甲状腺重量の有意な増加が5000ppm投与群で認められた。90日間反復投与毒性試験では、雌雄ラットの5000ppm投与群の肝臓重量と雄ラットの5000ppm投与群の腎臓重量で有意な増加が認められている。今回の結果は、被験物質をより長期間投与することにより、肝臓及び腎臓重量の増加はより大きな影響を受けることを示唆した。また、90日間反復投与毒性試験では明らかでなかった副腎重量の増加が今回の試験で明らかとなり、5000ppm投与群の雌雄ラットの各1例で認められた副腎の腫瘍と併せて、副腎への影響が示唆された。甲状腺重量測定は、90日間反復投与毒性試験では実施しておらず、直接の比較はできなかった。しかしながら、90日間反復投与毒性試験では、5000ppm投与群の甲状腺で濾胞細胞の過形成が認められていることから、甲状腺重量の増加は1年間投与により新たに生じた変化ではないと考えられた。これらのほかに、今回の試験では、雌ラットの5000ppm投与群で心臓の実・相対重量、肺及び脾臓の相対重量の有意な増加が認められた。しかしながら、軽度(10%以下)な変化であった。

なお、被験物質投与群で認められた変化については、今後、病理組織学的検査の結果と併せて、その毒性学的意義を含め総合的に評価する。

E. 結論

添加物の規格基準作成の一環として、添加物を長期間に亘り反復投与したときに出現する毒性・発がん性変化とその用量および毒性・発がん性変化の出現しない用量に関する情報を得る目的でホコッシ抽出物、ルチン酵素分解物、及びジャマイカカシア抽出物の1年間反復投与毒性/発がん性併用試験を開始し以下の成果を得た。

1) オランダピユ(マメ科)の種からエタノール抽出して得られた食品添加物ホコッシ抽出物を長期反復摂取した場合の慢性毒性、及び発がん性を検索する目的で、Wistar Hannover系ラットを用いて1年間反復投与毒性/発がん性併用試験を実施した。その結果、雄ラットで1%

以上、雌ラットでは0.2%以上のホコッシ抽出物の投与で体重の増加抑制が認められ、雌雄ラットの1%以上で摂餌量の低下が認められた。一方、血液・生化学検査や病理学的検査では、ホコッシ抽出物に起因すると考えられる毒性所見は認められなかった。F344ラットを用いた90日間反復投与毒性試験では病理検査で精巣と卵巣への毒性が認められたがWistar Hannover系ラットでは、異常所見を認めなかった。以上より1年間反復投与毒性試験におけるホコッシ抽出物の無毒性量は、雄ラット0.2%、雌ラット0.04%であると考えられた。また、発がん性試験の研究経過は順調である。

2) 添加物の規格基準作成の一環として、ルチン酵素分解物の反復投与毒性を検討するためルチン酵素分解物の0.04, 0.2, 1ならびに5%混合飼料を52週間Wistar Hannover (GALAS)系ラットに投与した。被験物質投与との関連を示唆する動物の死亡、体重変化、血液検査血液生化学検査及び臓器重量における異常はみられなかった。投与期間中の一般状態観察では、雌雄ラットの5%投与群において被験物質投与に起因すると考えられる着床尿が認められ、尿検査では雌雄ラットの1%及び5%投与群で濃色尿 (Straw-colored) が、雌雄ラットの5%投与群でカルシウム1日排泄量の高値が認められた。剖検では、雌雄ラットとも5%投与群の全例の骨表面に、被験物質に起因したと考えられる色調の変化 (黄色化) が認められた。現在、病理組織学的検査を実施中であり、この結果を含めて、今後、ルチン酵素分解物の反復投与毒性を総合的に評価する。

3) ジャマイカカシヤ抽出物の安全性の評価の一環として、ラット用いた1年間反復投与毒性試験を行った。現在、病理組織学的検査を残し試験は終了した。これまでに得られた結果では、肝臓重量増加が雄ラットの500ppm以上の投与群と雌ラットの5000ppm投与群で認められた。また、腎臓、副腎、甲状腺重量の有意な増加が5000ppm投与群で認められた。これらのほかにも、尿タンパク質の増加が雌雄ラットの5000ppm投与群で認められた。また、雌雄ラットの5000ppm投与群では、血液学的検査及び血液生化学的検査の一部の項目で有意差を認める変化が観察された。先に行った90日間反復投与毒性試験と比較すると、被験物質をより長期間投

与することにより、肝臓及び腎臓重量の増加はより大きな影響を受けることが明らかとなった。また、副腎重量の増加が明らかとなり、5000ppm投与群の雌雄ラット各1例で認められた副腎の腫瘍の発生と併せて、副腎への影響が新たに示唆された。

なお、被験物質投与群で認められた変化については、今後、病理組織学的検査の結果と併せて、その毒性学的意義を含め総合的に評価する。

4) 1年間反復投与毒性/発がん性併用試験では、試験開始直後に購入先のラット飼育生産施設でラットの肺パスツレラ (*Pasteurella pneumotropica*) 感染の発生が明らかとなった。そのため本試験を途中で中止し、ラットおよび施設での上記の病原体陰性を確認後、試験を再開することとした。このため、実験の遅れを余儀なくされた。

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
特になし

G. 研究発表
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

図1-2 ラット体重の推移(ホコッシ抽出物の1年間反復投与毒性試験)

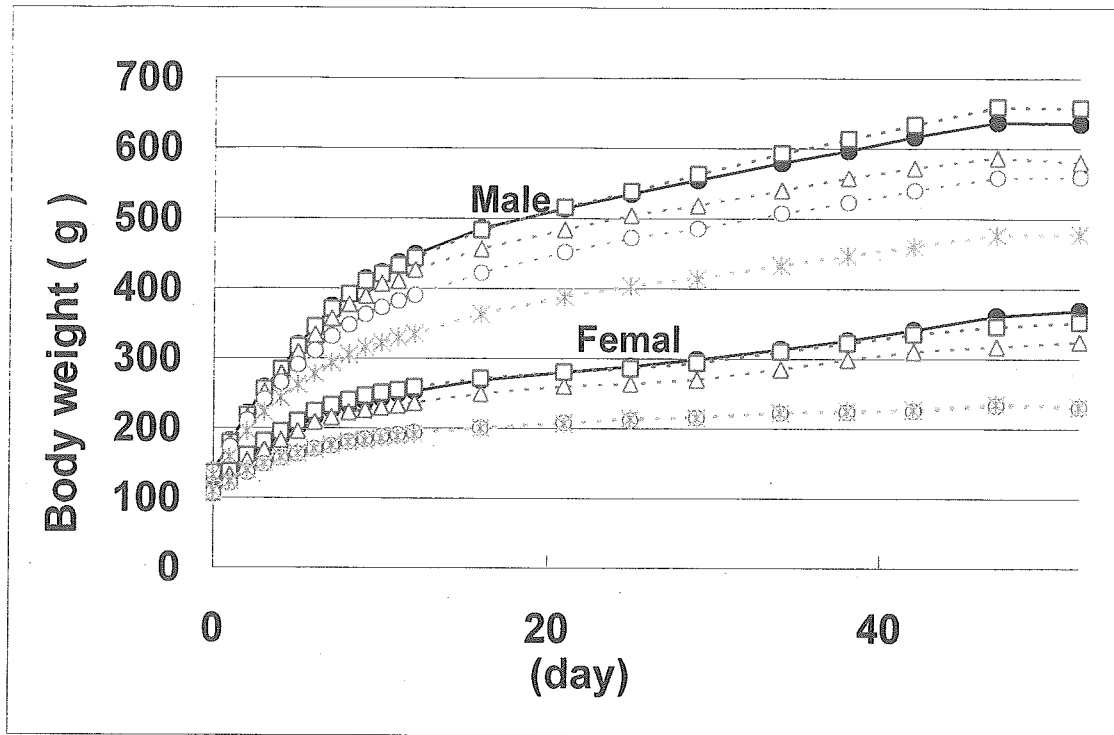


表1-3 ラット体重の推移(ホコッシ抽出物の1年間反復投与毒性試験)

Sex	Group	Weeks					
		0w	1w	2w	3w	4w	5w
Male	0	137.4 ± 9.3 ^a	181.0 ± 9.7	220.6 ± 9.5	257.5 ± 12.3	284.2 ± 15.2	319.1 ± 21.5
	0.04	136.5 ± 13.3	179.3 ± 16.0	218.6 ± 17.8	255.9 ± 21.7	284.8 ± 23.0	317.6 ± 26.5
	0.2	138.0 ± 7.4	179.2 ± 10.2	216.8 ± 14.4	252.1 ± 18.2	279.1 ± 20.5	309.7 ± 24.6
	1.0	136.5 ± 9.7	173.5 ± 14.7	211.1 ± 16.3	241.3 ± 22.8	265.8 ± 26.4*	290.9 ± 29.6**
	1.5	132.6 ± 7.7	159.8 ± 9.6**	196.3 ± 10.6**	222.8 ± 11.9**	244.2 ± 12.6**	262.8 ± 14.7**
		6w	7w	8w	9w	10w	11w
	0	345.6 ± 25.6	374.1 ± 31.0	392.4 ± 33.9	413.5 ± 35.8	422.2 ± 37.3	436.3 ± 38.9
	0.04	345.4 ± 31.0	370.6 ± 35.0	391.9 ± 35.8	410.6 ± 38.5	420.5 ± 40.4	432.8 ± 42.6
	0.2	334.2 ± 28.1	357.4 ± 31.3	377.4 ± 33.8	390.0 ± 31.1	407.4 ± 37.9	410.9 ± 32.5
	1.0	310.9 ± 33.8**	331.6 ± 35.9**	348.0 ± 39.4**	362.9 ± 41.8**	372.8 ± 42.8**	382.1 ± 44.0**
	1.5	278.2 ± 15.6**	293.9 ± 16.4**	306.2 ± 17.5**	315.9 ± 17.6**	322.5 ± 18.8**	330.2 ± 19.4**
		12w	16w	21w	25w	29w	34w
	0	448.2 ± 40.3	485.4 ± 46.8	513.9 ± 46.94	534.9 ± 50.0	554.4 ± 51.1	579.2 ± 56.2
	0.04	443.3 ± 47.0	483.3 ± 49.5	515.4 ± 59.16	538.7 ± 69.2	562.8 ± 75.4	592.6 ± 83.4
	0.2	426.8 ± 41.4	456.3 ± 42.2	483.6 ± 46.30	504.7 ± 51.7	518.9 ± 54.8	540.4 ± 61.0
1.0	390.5 ± 45.9**	422.4 ± 49.6**	452.0 ± 56.6**	472.4 ± 62.9**	485.8 ± 70.4**	507.4 ± 78.2*	
1.5	335.4 ± 20.6**	363.4 ± 23.3**	387.9 ± 25.5**	403.4 ± 27.2**	414.8 ± 29.8**	433.1 ± 32.1**	
	38w	42w	47w	52w			
0	596.5 ± 58.2	616.6 ± 62.6	637.0 ± 65.8	635.4 ± 63.4			
0.04	613.2 ± 87.5	633.8 ± 90.8	659.5 ± 96.1	657.5 ± 98.4			
0.2	558.0 ± 66.3	572.1 ± 69.1	586.8 ± 69.5	580.4 ± 75.1			
1.0	522.9 ± 82.0*	540.3 ± 88.7*	558.4 ± 93.3*	559.0 ± 93.7*			
1.5	447.2 ± 33.1**	460.8 ± 34.2**	476.5 ± 36.3**	477.3 ± 37.8**			
Female	0	106.3 ± 6.3	131.1 ± 8.8	154.5 ± 9.9	172.7 ± 11.6	186.7 ± 14.1	201.3 ± 15.8
	0.04	109.6 ± 5.4	137.5 ± 7.4	161.1 ± 9.1	180.8 ± 11.3	195.6 ± 12.0	210.1 ± 12.1
	0.2	108.1 ± 7.1	133.0 ± 9.8	153.6 ± 11.4	169.8 ± 11.7	183.8 ± 13.2	196.4 ± 15.0
	1.0	106.7 ± 6.5	121.4 ± 7.4**	137.0 ± 7.5**	148.7 ± 7.5**	157.0 ± 9.4**	163.3 ± 9.7**
	1.5	110.6 ± 5.2	124.0 ± 6.6*	140.0 ± 8.5**	150.0 ± 9.9**	159.2 ± 10.2**	164.1 ± 11.8**
		6w	7w	8w	9w	10w	11w
	0	216.3 ± 16.4	226.8 ± 17.2	232.5 ± 18.9	238.4 ± 20.0	242.8 ± 18.3	249.4 ± 20.7
	0.04	224.5 ± 14.1	233.2 ± 14.8	240.1 ± 16.2	246.5 ± 16.1	251.0 ± 15.7	254.7 ± 18.1
	0.2	209.2 ± 16.3	216.2 ± 17.8	223.3 ± 18.7	226.5 ± 18.0	230.3 ± 20.2	233.1 ± 19.3*
	1.0	170.5 ± 11.2**	174.8 ± 10.3**	180.4 ± 12.0**	184.8 ± 12.5**	188.3 ± 10.5**	190.9 ± 12.0**
	1.5	171.0 ± 13.3**	176.2 ± 12.9**	180.7 ± 13.9**	183.2 ± 14.3**	186.6 ± 12.9**	189.4 ± 13.0**
		12w	16w	21w	25w	29w	34w
	0	252.9 ± 21.2	268.6 ± 26.1	280.5 ± 29.8	288.5 ± 34.3	298.6 ± 35.6	313.3 ± 45.8
	0.04	259.2 ± 17.5	271.7 ± 19.0	281.0 ± 18.1	285.9 ± 21.6	294.4 ± 19.3	310.5 ± 24.6
	0.2	236.8 ± 20.0*	250.1 ± 22.6**	260.9 ± 26.9*	264.0 ± 31.2*	270.5 ± 32.8*	285.6 ± 38.9*
1.0	194.3 ± 9.9**	200.7 ± 11.9**	208.4 ± 13.3**	212.3 ± 14.7**	216.4 ± 13.7**	222.6 ± 15.1**	
1.5	192.0 ± 14.0**	200.4 ± 14.4**	207.4 ± 15.2**	214.4 ± 13.7**	215.8 ± 15.6**	223.4 ± 18.6**	
	38w	42w	47w	52w			
0	325.9 ± 48.0	341.3 ± 54.0	361.3 ± 63.4	368.8 ± 69.0			
0.04	322.7 ± 25.6	335.8 ± 31.8	346.6 ± 35.4	352.4 ± 35.6			
0.2	299.2 ± 46.6*	311.2 ± 55.5*	317.7 ± 59.0**	324.7 ± 67.1*			
1.0	223.8 ± 13.5**	225.7 ± 15.2**	233.3 ± 13.8**	230.6 ± 15.4**			
1.5	225.2 ± 16.4**	227.7 ± 16.5**	236.0 ± 17.9**	232.3 ± 20.2**			

^a: Mean±SD

*, **: Significantly different from the untreated control value at the levels of $p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively.

表1-4 ラットの平均摂餌量(ホコッソ抽出物の1年間反復投与毒性試験)

Sex	Group	Weeks						
		1w	2w	3w	4w	5w	6w	7w
Male	0	15.46 ± 0.73 ^a	16.66 ± 0.67	18.08 ± 0.60	19.20 ± 0.50	17.67 ± 0.92	24.00 ± 0.93	21.38 ± 0.71
	0.04	14.82 ± 1.12	16.71 ± 0.85	19.16 ± 1.06	19.41 ± 1.25	18.01 ± 1.16	24.49 ± 2.24	22.13 ± 2.19
	0.2	13.98 ± 1.26	16.06 ± 1.07	16.54 ± 1.14*	17.40 ± 0.51*	16.64 ± 0.54	21.73 ± 0.67	19.76 ± 0.48
	1.0	14.68 ± 1.26	16.85 ± 1.07	16.31 ± 1.14*	16.61 ± 0.51**	15.69 ± 0.54*	20.89 ± 0.67	18.84 ± 0.48*
	1.5	13.29 ± 2.76	15.77 ± 0.79	15.88 ± 0.47**	15.66 ± 0.80**	14.24 ± 0.53**	19.00 ± 2.07**	16.93 ± 0.62**
		8w	9w	10w	11w	12w	16w	21w
	0	20.93 ± 0.71	21.18 ± 0.59	20.97 ± 0.85	20.78 ± 0.81	20.39 ± 0.67	20.05 ± 0.41	19.01 ± 0.56
	0.04	22.12 ± 1.57	21.67 ± 1.54	21.22 ± 1.61	20.83 ± 1.79	20.05 ± 1.34	19.96 ± 1.11	19.73 ± 0.25
	0.2	19.97 ± 0.20	19.66 ± 1.07	19.76 ± 0.99	18.92 ± 0.54	18.73 ± 0.28	19.08 ± 0.26	17.99 ± 0.48
	1.0	18.61 ± 0.20*	18.89 ± 1.07*	18.25 ± 0.99*	17.88 ± 0.54*	17.96 ± 0.28*	18.28 ± 0.26*	17.86 ± 0.48
	1.5	17.42 ± 0.77**	17.08 ± 0.61**	16.56 ± 0.45**	16.67 ± 1.10**	16.61 ± 1.12**	16.66 ± 0.41**	16.15 ± 0.35**
		25w	29w	34w	38w	42w	47w	52w
	0	20.26 ± 0.66	17.52 ± 0.85	18.43 ± 1.19	19.63 ± 1.23	19.55 ± 1.10	19.67 ± 1.40	18.98 ± 0.61
	0.04	20.96 ± 1.09	19.49 ± 2.18	19.88 ± 1.10	20.33 ± 1.51	20.22 ± 1.61	21.33 ± 1.70	22.38 ± 2.62*
	0.2	19.81 ± 0.64	16.97 ± 0.76	18.24 ± 1.09	18.84 ± 0.94	18.52 ± 1.27	18.67 ± 1.15	20.09 ± 1.25
1.0	19.64 ± 0.64	16.77 ± 0.76	17.58 ± 1.09	18.57 ± 0.94	17.90 ± 1.27	18.62 ± 1.15	20.58 ± 1.25	
1.5	17.84 ± 0.52**	15.81 ± 1.87	16.18 ± 0.56*	16.68 ± 0.51**	16.84 ± 0.41*	16.97 ± 0.34*	19.20 ± 0.44	
Female	0	11.54 ± 2.13	12.29 ± 0.39	13.26 ± 0.40	13.80 ± 0.79	12.93 ± 2.73	16.28 ± 0.97	14.14 ± 1.13
	0.04	11.31 ± 0.91	13.25 ± 0.67	13.76 ± 0.21	14.36 ± 0.06	12.57 ± 0.29	16.76 ± 0.14	15.11 ± 0.31
	0.2	10.77 ± 2.52	11.41 ± 0.78	12.27 ± 0.31	12.52 ± 1.27	11.20 ± 0.74	15.16 ± 1.01	13.68 ± 1.00
	1.0	10.31 ± 2.52	11.67 ± 0.78	12.05 ± 1.14*	10.96 ± 1.05**	10.39 ± 2.26	14.37 ± 2.12	10.91 ± 2.33*
	1.5	12.44 ± 4.11	11.18 ± 0.97	11.24 ± 0.50**	9.91 ± 1.05**	8.45 ± 1.18**	11.93 ± 1.49**	10.28 ± 0.88**
		8w	9w	10w	11w	12w	16w	21w
	0	13.79 ± 1.69	13.76 ± 0.08	13.58 ± 0.16	13.05 ± 0.28	12.92 ± 0.16	13.04 ± 0.33	12.55 ± 0.15
	0.04	14.64 ± 0.44	14.57 ± 0.25	14.04 ± 0.73	13.76 ± 0.70	13.77 ± 0.73	13.33 ± 0.73	13.40 ± 1.69
	0.2	13.35 ± 0.65	12.74 ± 0.55	12.92 ± 0.68	12.45 ± 0.59	12.93 ± 0.95	12.70 ± 0.99	12.15 ± 0.93
	1.0	10.26 ± 1.50**	11.23 ± 0.11**	12.26 ± 1.46	11.95 ± 1.44	11.82 ± 1.43	11.44 ± 1.44	11.66 ± 1.26
	1.5	10.47 ± 0.98**	10.86 ± 0.93**	11.56 ± 1.96	11.54 ± 1.49	11.97 ± 2.33	11.96 ± 1.45	13.04 ± 3.40
		25w	29w	34w	38w	42w	47w	52w
	0	15.00 ± 0.09	11.48 ± 0.20	12.32 ± 0.74	13.36 ± 0.56	13.58 ± 0.48	13.60 ± 0.66	14.30 ± 0.91
	0.04	15.17 ± 0.63	11.75 ± 0.81	13.21 ± 0.99	13.60 ± 1.11	13.28 ± 0.84	13.28 ± 0.39	14.45 ± 0.77
	0.2	14.93 ± 0.60	10.94 ± 0.43	12.23 ± 0.59	13.09 ± 1.01	12.38 ± 0.96	12.59 ± 0.48	14.27 ± 0.92
1.0	14.41 ± 1.81	11.03 ± 1.46	11.58 ± 0.99	11.48 ± 0.80	11.24 ± 0.31*	11.72 ± 1.41	12.50 ± 0.37	
1.5	14.50 ± 2.71	11.41 ± 2.85	11.80 ± 2.93	12.13 ± 3.49	10.65 ± 1.04**	12.62 ± 1.58	14.81 ± 1.11	

^a: Mean±SD

*,**: Significantly different from the untreated control value at the levels of $p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively.

表1-5 ラットの平均被験物質摂取量(ホコッシ抽出物の1年間反復投与毒性試験)

Sex	Group	Final body weight (g)	Mean food consumption (g/day/rat)	Mean daily intake of Hokosshi (mg/day/kg)
Male	0	635.4 ± 63.4 ^a	19.06 ± 1.99	0 ± 0
	0.04	657.5 ± 98.4	19.14 ± 2.38	15.82 ± 4.04
	0.2	580.4 ± 75.1	18.29 ± 2.25	76.27 ± 18.09
	1.0	559.0 ± 93.7*	17.92 ± 1.93*	405.28 ± 93.02
	1.5	477.3 ± 37.8**	16.46 ± 1.74**	644.84 ± 135.60
Female	0	368.8 ± 69.0	13.07 ± 1.61	0 ± 0
	0.04	352.4 ± 35.6	13.40 ± 1.64	19.20 ± 3.72
	0.2	324.7 ± 67.1*	12.54 ± 1.70	97.48 ± 15.41
	1.0	230.6 ± 15.4**	11.58 ± 1.64**	572.61 ± 92.35
	1.5	232.3 ± 20.2**	11.93 ± 2.63*	875.32 ± 170.16

^a: Mean ± SD

*, ** : Significantly different from the untreated control value at the levels of p<0.05, p<0.01, respectively.

表1-6 血液学的検査値(ホコッソ抽出物の1年間反復投与毒性試験)

	Group				
	0	0.04	0.2	1	1.5
Males					
No. of rats examined	12	11	12	12	23
RBC count($10^4/\text{mm}^3$)	866.7 ^a ± 41.0	804.1 ± 188.8	883.3 ± 32.3	847.4 ± 39.8	835.9 ± 34.4
Hb(g/dl)	15.0 ± 0.7	14.3 ± 2.6	15.3 ± 0.5	15.0 ± 0.5	14.9 ± 0.5
Ht(%)	41.3 ± 1.8	39.4 ± 6.9	42.0 ± 1.3	41.7 ± 1.2	41.6 ± 1.3
Plt count($10^4/\text{mm}^3$)	114.2 ± 15.0	94.4 ± 25.1 ^{**}	111.7 ± 14.6	95.7 ± 11.8 ^{**}	93.2 ± 11.3 ^{**}
MCV(fl)	47.7 ± 1.4	51.0 ± 9.5	47.6 ± 1.5	49.2 ± 1.6	49.9 ± 1.6
MCH(pg)	17.3 ± 0.4	18.4 ± 3.0	17.4 ± 0.5	17.8 ± 0.5	17.9 ± 0.5
MCHC(g/dl)	36.4 ± 0.4	36.2 ± 0.7	36.5 ± 0.5	36.1 ± 0.4	35.8 ± 0.3 ^{**}
WBC count(/ mm^3)	1617.5 ± 758.0	2210.9 ± 1138.1	2115.8 ± 778.2	1940.8 ± 590.6	1379.6 ± 529.3
No. of rats examined	12	11	12	12	23
neutrophils(%)	32.6 ± 9.0	36.3 ± 18.8	36.5 ± 8.8	38.5 ± 9.5	34.6 ± 8.3
Lymphocytes(%)	61.5 ± 9.8	56.8 ± 19.1	57.3 ± 9.3	55.9 ± 9.1	59.9 ± 8.6
Monocytes(%)	3.7 ± 1.8	4.8 ± 4.9	4.4 ± 2.0	3.9 ± 2.6	3.6 ± 1.7
Eosinophils(%)	2.1 ± 0.7	2.1 ± 1.6	1.9 ± 0.6	1.7 ± 0.7	1.9 ± 1.0
Females					
No. of rats examined	12	11	12	12	24
RBC count($10^4/\text{mm}^3$)	765.6 ± 34.5	766.7 ± 40.1	756.5 ± 40.7	755.7 ± 52.0	747.2 ± 38.3
Hb(g/dl)	14.6 ± 0.6	14.6 ± 0.6	14.5 ± 0.7	14.2 ± 0.8	13.8 ± 0.8*
Ht(%)	40.7 ± 1.9	40.7 ± 1.6	40.8 ± 1.8	40.2 ± 2.2	39.1 ± 2.2
Plt count($10^4/\text{mm}^3$)	96.0 ± 8.4	87.5 ± 9.2	88.2 ± 10.7	91.0 ± 16.0	94.7 ± 10.6
MCV(fl)	53.2 ± 1.5	53.1 ± 1.9	54.1 ± 2.7	53.3 ± 2.2	52.4 ± 1.8
MCH(pg)	19.0 ± 0.4	19.1 ± 0.6	19.2 ± 0.7	18.8 ± 0.6	18.5 ± 0.6*
MCHC(g/dl)	35.9 ± 0.4	36.0 ± 0.5	35.6 ± 0.6	35.4 ± 0.5*	35.3 ± 0.4 ^{**}
WBC count(/ mm^3)	794.2 ± 223.8	1100.9 ± 386.2*	862.5 ± 329.3	782.5 ± 138.4	637.9 ± 224.4
No. of rats examined	12	11	12	12	24
neutrophils(%)	44.4 ± 13.1	38.0 ± 14.6	39.4 ± 10.9	27.8 ± 8.1 ^{**}	30.5 ± 8.0 ^{**}
Lymphocytes(%)	48.2 ± 13.1	55.1 ± 15.6	52.5 ± 11.8	66.9 ± 9.4 ^{**}	64.4 ± 9.9 ^{**}
Monocytes(%)	4.9 ± 4.7	4.9 ± 2.5	5.2 ± 4.6	2.9 ± 1.5	2.3 ± 2.9
Eosinophils(%)	2.5 ± 0.9	2.0 ± 1.0	3.0 ± 1.3	2.5 ± 1.5	2.8 ± 2.7

^a: Mean±SD

*,** : Significantly different from the untreated control value at the levels of $p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively.

表1-7 血液生化学的検査値(ホコッシ抽出物の1年間反復投与毒性試験)

	Dose level(%)				
	0	0.04	0.2	1	1.5
Males					
No. of rats examined	12	11	12	12	24
TP(g/dl)	6.8 ± 0.3 ^a	6.7 ± 0.2	6.8 ± 0.2	6.7 ± 0.2	6.5 ± 0.2**
Alb(g/dl)	4.8 ± 0.2	4.6 ± 0.3*	4.7 ± 0.1	4.6 ± 0.1	4.6 ± 0.1*
A/G	2.4 ± 0.3	2.2 ± 0.3	2.2 ± 0.2	2.2 ± 0.1	2.6 ± 0.3
GOT(IU/l)	102.6 ± 31.7	89.1 ± 11.2	102.4 ± 16.0	93.9 ± 12.2	78.9 ± 11.4**
GPT(IU/l)	49.6 ± 62.9	40.6 ± 7.1	42.4 ± 20.4	38.8 ± 10.2	29.3 ± 5.3
ALP(IU/l)	276.8 ± 59.6	297.1 ± 55.2	297.9 ± 75.5	236.8 ± 49.9	269.6 ± 69.3
γ-GTP(IU/l)	1.3 ± 0.5	3.5 ± 1.8**	3.0 ± 1.5*	1.9 ± 0.9	2.3 ± 1.9
CRE(mg/dl)	0.36 ± 0.03	0.34 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.37 ± 0.06	0.33 ± 0.04
BUN(mg/dl)	15.6 ± 1.8	15.4 ± 2.7	14.4 ± 1.7	15.4 ± 1.9	16.0 ± 2.1
Glu(mg/dl)	138.9 ± 22.2	139.5 ± 12.5	129.8 ± 15.1	129.3 ± 13.0	142.5 ± 13.5
TG(mg/dl)	198.6 ± 38.5	200.5 ± 83.7	151.7 ± 41.5	131.7 ± 57.9*	127.2 ± 55.1**
T-Cho(mg/dl)	97.6 ± 17.6	115.7 ± 25.5	113.3 ± 29.2	107.8 ± 36.2	91.0 ± 16.9
Na(mEQ/l)	140.6 ± 1.1	140.3 ± 1.1	140.7 ± 1.1	141.8 ± 1.5*	141.2 ± 0.9
K(mEQ/l)	5.5 ± 0.3	5.6 ± 0.4	5.4 ± 0.4	4.9 ± 0.3**	5.1 ± 0.4**
Cl(mEQ/l)	102.3 ± 1.6	104.0 ± 2.0*	103.3 ± 1.3	104.8 ± 1.1**	103.5 ± 1.1*
Ca(mg/dl)	10.2 ± 0.2	10.1 ± 0.3	10.2 ± 0.2	10.1 ± 0.3	10.3 ± 0.3
IP(mg/dl)	4.5 ± 0.5	4.5 ± 0.5	5.0 ± 0.6*	5.0 ± 0.5*	5.1 ± 0.4**
Total Bil(mg/dl)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
Female					
No. of rats examined	12	12	12	12	24
TP(g/dl)	7.1 ± 0.3	7.2 ± 0.3	7.2 ± 0.3	7.2 ± 0.4	7.2 ± 0.4
Alb(g/dl)	5.4 ± 0.3	5.6 ± 0.2	5.5 ± 0.3	5.4 ± 0.3	5.2 ± 0.3
A/G	3.1 ± 0.3	3.5 ± 0.6**	3.3 ± 0.4	3.2 ± 0.2	2.7 ± 0.3**
GOT(IU/l)	84.8 ± 19.6	89.8 ± 18.3	102.0 ± 33.1	73.7 ± 13.4	66.1 ± 9.9*
GPT(IU/l)	32.3 ± 7.0	31.6 ± 8.2	42.6 ± 14.8**	26.1 ± 5.4	28.9 ± 5.9
ALP(IU/l)	79.9 ± 41.8	81.6 ± 38.4	74.7 ± 13.4	83.9 ± 50.2	94.0 ± 29.0
γ-GTP(IU/l)	1.5 ± 0.9	2.2 ± 0.8	2.6 ± 0.8**	3.1 ± 1.0**	2.0 ± 0.9
CRE(mg/dl)	0.38 ± 0.04	0.40 ± 0.07	0.42 ± 0.05	0.40 ± 0.06	0.38 ± 0.04
BUN(mg/dl)	18.3 ± 3.7	15.3 ± 3.2	16.4 ± 2.8	17.5 ± 2.8	18.7 ± 4.4
Glu(mg/dl)	129.8 ± 12.2	131.3 ± 16.7	114.8 ± 14.7	115.8 ± 18.4	120.3 ± 17.6
TG(mg/dl)	217.8 ± 109.0	165.3 ± 126.6	181.5 ± 103.9	52.0 ± 31.9**	104.3 ± 42.1**
T-Cho(mg/dl)	84.5 ± 22.0	88.1 ± 23.6	91.8 ± 20.4	58.3 ± 19.7**	58.8 ± 16.2**
Na(mEQ/l)	137.7 ± 1.5	138.5 ± 1.9	137.3 ± 1.5	137.7 ± 1.0	139.4 ± 1.4**
K(mEQ/l)	5.9 ± 0.6	4.8 ± 0.8**	5.3 ± 0.3**	4.8 ± 0.3**	5.0 ± 0.5**
Cl(mEQ/l)	102.8 ± 2.1	103.0 ± 2.4	102.6 ± 1.8	101.9 ± 1.7	104.2 ± 1.9
Ca(mg/dl)	10.3 ± 0.4	10.5 ± 0.5	10.3 ± 0.3	10.4 ± 0.2	10.2 ± 0.3
IP(mg/dl)	3.7 ± 0.8	4.1 ± 0.5	3.1 ± 0.5*	4.6 ± 0.6**	3.8 ± 0.8
Total Bil(mg/dl)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.11 ± 0.03	0.10 ± 0.00

^a : Mean±SD

*,** : Significantly different from the untreated control value at the levels of $p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively.

表1-8 雄ラットの臓器重量(ホコッソ抽出物の1年間反復投与毒性試験)

	Dose level(%)				
	0	0.04	0.2	1.0	1.5
No. of animals	12	11	12	12	24
B.W. (g)	635.4 ± 63.4 ^a	657.5 ± 98.4	595.3 ± 88.4	559.0 ± 93.7	477.3 ± 37.8
Brain (g)	2.00 ± 0.14	1.99 ± 0.17	1.99 ± 0.11	2.01 ± 0.12	1.99 ± 0.13
(g%)	0.32 ± 0.04	0.31 ± 0.06	0.34 ± 0.06	0.37 ± 0.06*	0.42 ± 0.04**
Thymus (g)	0.51 ± 0.14	0.56 ± 0.17	0.50 ± 0.19	0.44 ± 0.21	0.33 ± 0.09**
(g%)	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.03	0.08 ± 0.03	0.07 ± 0.02
Heart (g)	1.43 ± 0.15	1.42 ± 0.19	1.23 ± 0.11**	1.20 ± 0.20**	1.17 ± 0.14**
(g%)	0.23 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.25 ± 0.02*
Lung (g)	1.68 ± 0.20	1.62 ± 0.12	1.53 ± 0.11	1.54 ± 0.21	1.40 ± 0.21**
(g%)	0.27 ± 0.03	0.25 ± 0.04	0.26 ± 0.04	0.28 ± 0.03	0.29 ± 0.04
Liver (g)	14.64 ± 1.75	14.05 ± 2.13	12.87 ± 2.34	12.29 ± 2.40*	10.42 ± 1.27**
(g%)	2.30 ± 0.13	2.14 ± 0.15	2.16 ± 0.18	2.19 ± 0.16	2.18 ± 0.17
Spleen (g)	0.97 ± 0.11	1.17 ± 1.00	0.89 ± 0.18	0.86 ± 0.20	0.77 ± 0.14
(g%)	0.15 ± 0.02	0.18 ± 0.16	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.02
Kidney (g)	2.56 ± 0.22	2.57 ± 0.28	2.49 ± 0.38	2.52 ± 0.49	2.28 ± 0.21*
(g%)	0.40 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.42 ± 0.05	0.45 ± 0.06*	0.48 ± 0.05**
Adrenal (mg)	60.1 ± 9.2	58.2 ± 20.0	69.1 ± 12.7	65.8 ± 11.6	51.7 ± 7.6*
(mg%)	9.5 ± 1.3	9.9 ± 2.3	11.8 ± 2.4*	12.0 ± 2.5*	10.9 ± 1.6
Testis (g)	3.81 ± 0.41	3.65 ± 0.81	3.83 ± 0.36	3.82 ± 0.39	3.70 ± 0.28
(g%)	0.60 ± 0.08	0.55 ± 0.09	0.65 ± 0.10	0.69 ± 0.08*	0.78 ± 0.09**

^a: Mean ± SD

*,** : Significantly different from the untreated control value at the levels of p<0.05, p<0.01, respectively.