

200501039B

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15年度～平成17年度 総合研究報告書

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

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 15 年度～平成 17 年度 総合研究報告書

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…………… 107

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…………… 141

三森国敏

3. ジャマイカカッシア抽出物のラットによる1年間反復投与毒性試験…………… 193

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、1年間反復投与毒性試験では、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。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による体重増加抑制の無毒性量は、雄ラット0.2%、雌ラット0.04%であると推定された。

一方、発がん性試験では、ホコッシ抽出物をラットに2年間反復投与しその影響を検討した。投与期間中の一般状態の観察では、1%雄ラット群と0.2%以上の雌ラット群で毒性試験と同様なホコッシ抽出物の投与による摂餌量の低下とそれに伴う体重の増加抑制が認められた。特に、雌ラットの1%群では、顕著な体重の増加抑制に伴い生存率の有意な増加も認められ、その原因はカロリー制限によるものと推定された。血液・生化学検査では、いくつかの検査項目で、有意な変化を認めたが、これらの変化は軽微で、用量相関が認められないことから、被験物質投与による影響とは推定できなかった。一方、血中ホルモンの測定では、estradiol、及びprogesteroneでは、異常を認めなかったが、雄ラット1%群のtestosterone値に軽度の増加を認めた。しかし、検体数が少なく各検査値にばらつきが多いことから、ホコッシ抽出物の影響と断定することは出来なかった。また、甲状腺関連ホルモン値には異常がなく、ホコッシ抽出物は甲状腺障害を誘発しない事が示された。病理学的検査では、種々の臓器・組織に様々な非増殖性、および増殖性病変が観察された。非増殖性病変の発生頻度には、被験物質の明確な容量依存性は認められず、被験物質投与の影響を示唆する所見は得られなかった。一方、増殖性病変では、雄ラット1%群の下垂体腫瘍に有意に高い腫瘍発生率が観察された。しかし、これ以外の実験群の発生率では、有意な増加や被験物質との明確な容量依存性は認められなかった。以上より、ホコッシ抽出物の大量投与により雄ラットでは下垂体腫瘍の発症が促進される可能性が示唆された。上記以外の増殖性病変では、対象群に比べ有意に増加した病変は認められず、被験物質の容量依存性も認められないことから、偶発性あるいは自然発生性と推定された。以上より、発がん性試験におけるホコッシ抽出物による体重増加抑制の無毒性量は、雄ラット0.2%、雌ラット0.04%であると推定された。

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色尿が認められ、尿検査では雌雄の1%及び5%投与群で濃色尿が、雌雄の5%投与群でカルシウム1日排泄量の高値が、雄の5%投与群で尿中カルシウム濃度の高値が認められた。剖検では、雌雄とも5%投与群の全例の骨表面に、被験物質の沈着を示唆する色調の変化(黄色化)が認められた。病理組織学的検査では、雄の5%投与群で、腎盂の鉍質沈着が対照群と比較して高頻度に認められ、鉍質沈着と関連する変化と考えられる、腎盂の炎症性細胞残渣、炎症性細胞浸潤もしくは移行上皮過形成のいずれかを認める個体数も増加した。以上の成績より、雌雄の5%投与群に認められたカルシウム1日排泄量の増加、雄の5%投与群の尿中カルシウム濃度の高値ならびに腎臓における腎盂への鉍質沈着の増加は、毒性学的影響とみなされ、本試験における無毒性量は雌雄とも1%(雄:634.43 mg/kg/day, 雌:788.31 mg/kg/day)と判断された。

- 3) ジャマイカカシヤ抽出物0, 5, 50, 500及び5000ppm添加飼料によるラットの1年間反復投与毒性試験を行った。5及び50ppm群では被験物質投与による影響は認められなかった。死亡は雌の5000ppm群で2例認められた。血液学的検査では、Hb, Ht, MCV及びMCHの軽度の減少が5000ppm群の雌雄で認められた。血液生化学的検査では、TP及びAlbの増加が雄の500ppm以上の群及び雌の5000ppm群で、ALP及びT-Bilの減少が5000ppm群の雌雄で、TGの増加及びALT, AsT及びChEの減少が雄の5000ppm群, Glc, T-Cho, PL及びγ-GTPの増加が雌の5000ppm群で認められた。尿検査では、タンパク質の増加が雌の500ppm以上の群及び雄の5000ppm群で認められた。臓器重量では、肝臓重量増加が雄の500ppm以上の群及び雌の5000ppm群で、腎臓、副腎及び甲状腺重量増加が5000ppm群の雌雄、心臓重量増加が雌の5000ppm群で認められた。病理組織学的検査では、肝細胞肥大が雄の500ppm以上の群及び雌の5000ppm群で、変異肝細胞巢の出現頻度(動物数)及び大きさの増加が雄の5000ppm群で、慢性進行性腎症及び甲状腺濾胞細胞の瀰慢性過形成が5000ppm群の雌雄、及び脾臓での赤芽球系の髄外造血の軽微な亢進が雄の5000ppm群で見られた。

以上のことから、ジャマイカカシヤ抽出物の無毒性量(NOEL)は、雄では肝臓の重量及び病理組織学的変化を、雌では尿タンパク質の増加を指標に雌雄ともに50ppm(雄で 2.1 ± 0.6 mg/kg/day, 雌で 2.5 ± 0.6 mg/kg/day)と推定した。また、変異肝細胞巢の出現頻度と大きさの増加が雄の5000ppm群で認められたことより、大量投与による肝臓への発がん促進作用の可能性が示唆された。

- 4) 1年間反復投与毒性/発がん性併用試験では、試験開始直後に入手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

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

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

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く既存添加物の安全性確保を目指す。

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ア抽出物を選定した。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ア抽出物の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) より入手し、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℃、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) 系ラット雌雄各 10 匹を日本クレア株式会社より入手し、7 日間の馴化飼育後、雌雄ラットとも各群 10 匹ずつ 4 群に分けて試験を実施した。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) ラット雌雄各 24 匹を日本クレア株式会社より入手し、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入手し、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、及び表 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入手し、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 ジャマイカカッシア抽出物

ジャマイカカッシア (*Pricrasma 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) より入手した (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）の累積摂餌量を測定し、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。被験物質摂餌量 (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、一晩（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ダーゼ (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、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、分散が一樣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。分散が一樣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した。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した。剖検の方法や病理標本の作製は1年間反復投与毒性試験と同様である。剖検に先立ち生存ラットを採血し血液検査と血液生化学検査を行った。一方、ホコッシ抽出物の投与により雄ラットでの精巣の萎縮や雌ラットでの卵巣の黄体形成不全が観察されることから、内分泌系の異常が惹起される可能性が示唆された。そこで、ホルモン動態の解析を合わせ行った。検査項目としては、性ホルモンである estradiol, testosterone, progesterone, 及び下垂体・甲状腺関連ホルモンである thyroid-stimulating hormone (TSH), triiodothyronine (T₃), thyroxine (T₄) である。ホルモンの測定はラジオイムノアッセイで行った。また、尿検査を実施した。

(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)。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2と表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関連していた。

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ラットの臓器絶対重量の結果を表8に、ラットの体重に対する相対的臓器重量のそれを表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 一般状態と生存率

ラットにホコッシ抽出物を2年間反復投与し、全身状態と生存率を観察した。対象群を含む全ての実験群に雌雄ラット共に死亡例が認められ、その結果を表10に示した。雌ラットの1%群では、有意な死亡数の減少を認めた（ $p < 0.005$ ）。しかし、投与量に相関した衰弱や死亡例は認められなかった。これら実験群の生存曲線を図3,4に示した。最高用量である1%ホコッシ抽出物を投与した雌マウス群では、生存曲線が延長し生存率の有意な増加を認めた。これ以外の実験群では、ホコッシ抽出物の投与量に相関した生存率や生存曲線の変化は認められなかった。瀕死のラットや死亡したラットについては、剖検を行い、病理標本を作製し詳細な検索を実施した（表24-1,24-2）。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なかった。

C-1-3-2 体重

試験開始からの各群における体重の推移を図5と表11に示した。雄ラットでは、1%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%群が投与開始2週間目から、1%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%群に対して統計学的に有意であり、試験終了時まで同様に推移した（表11）。特に、雌ラット1%群の体重増加抑制は顕著であった。

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12に示した。雄ラットでは、1%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%群で、3週目より0.2%群で摂餌量の低下が認められ、0.2%群は断続的に、1%群では、継続して低下が認められた。

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13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%群で0%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-1-3-4 血液学的検査及び血液生化学的検査

血液学的及び血液生化学的検査の結果を表14, 15に示した。0%群に対する有意差検定の結果、血液学的検査では、雄ラットの赤血球数、白血球数、及び血小板数とも有意な変化は認められなかった(表14)。赤血球のMCVとMCHでは、0.2%と1%群に軽微な増加を認めた。一方、雌ラットでは赤血球数、白血球数とも有意な変化は認められなかった。血小板数では、0.2%群に軽微な増加を認めた。しかし、これらの変化は軽微であり、また用量相関も認められなかった。

血液生化学的検査では、雄ラット1%群でGOT, GPT, T-Cholの低下を認めた。雌ラット1%群では、TpとAlbの増加、TGの低下が認められた(表15)。しかし、これらの変化は軽微で明確な用量依存性は認められなかった。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-1-3-5 血漿中のホルモン測定

性ホルモンであるestradiol, testosterone, progesteroneの測定値を表16に示した。雄ラットestradiolと雌ラットtestosteroneは、測定限界以下の値を示した。雌ラットestradiolと雌雄ラットのprogesteroneは、対照群と1%群で有意差を認めなかった。しかし、progesterone値は、雌雄ラットとも低下傾向を認めた。一方、雄ラット1%群のtestosterone値は対照群に比べ増加を認めた(p=0.03)。

下垂体の甲状腺刺激ホルモン(TSH)や甲状腺ホルモン(T_3 , T_4)は、食事性ヨウ素の影響を強く受ける。そこで、基礎資料として低ヨウ素食の影響を解析し、結果を表17に示した。低ヨウ素食により T_4 の著明な減少とそれに伴うTSHの増加が認められた。低ヨウ素食においても T_3 の値は、低下傾向ながら保たれていた。次に、甲状腺が障害を受けた場合の甲状腺関連ホルモンの変動を解析し表17に示した。甲状腺の障害は放射線照射で行った。放射線照射した甲状腺では、TSHの増加を認めた。その結果、甲状腺ホルモン(T_3 , T_4)の低下は認められなかった。また、低ヨウ素食が障害を受けた甲状腺に及ぼす影響は、障害の無い甲状腺と同様で、 T_4 の著明な減少とそれに伴うTSHの増加が認められた。

この場合も T_3 の値は、低下傾向ながら保たれていた。年齢の影響も解析したが同様の結果であった(資料省略)。これらの基礎データを基に被験物質ホコッシンが、甲状腺刺激ホルモン(TSH)と甲状腺ホルモン(T_3 , T_4)に及ぼす影響を解析した。結果を表18に示した。雌雄ラットともに被験物質がこれらホルモンの値に影響を与えなかった。また、用量依存性も認められなかった。

C-1-3-6 尿検査

表19に結果を示した。検査項目のウロビリノーゲン、pH、比重では、対照群に比べ異常値を認めなかった。白血球、蛋白質、ブドウ糖、潜血、及びケトン体では、異常値を認めたが、対照群に比べ差異が無く、この異常値には被験物質の用量依存性は認められなかった。

C-1-3-7 臓器重量

実験終了時における雌雄ラットの臓器絶対重量を表20, 21に体重に対する相対的体重比の結果を表22, 23にそれぞれ示した。0%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。雄ラットでは、1%群で肺と肝臓、0.2%群で肺、0.04%群で肺と精巣の絶対臓器重量の減少認めた。しかし、表22に示す様に体重に対する相対的な臓器重量比では、0.2%群の肺を除き有意差を認めなかった。肺の値も、変動範囲はごく軽度であり、用量相関が認められなかった。一方、雌ラットでは、1%群の心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、及び子宮、0.2%群の肺、肝臓、及び腎臓で絶対臓器重量の減少認めた(表21)。しかし、ラット体重が1%と0.2%の被験物質投与群では有意に減少することを加味した相対的臓器重量比では、これらの臓器の値は対照群に比べ全て増加した。特に、1%群では体重減少が著明で、その結果、表23に示す様に体重に対する相対的な臓器重量比では、多くの臓器で逆に有意な増加を認めた。

C-1-3-8 病理組織学的検査

表24-1, 24-2に観察予定期間である24カ月以前に死亡、或いは瀕死状態のため剖検(切迫殺)した雌雄ラットの病理組織所見を示した。種々の臓器・組織に非増殖性、および増殖性病変が観察された。しかしその発生頻度には、被験物質の明確な容量依存性は認められず、被験

物質投与の影響を示唆する所見は得られなかった。

24 カ月の実験期間を終了後に剖検した全ラットに観察された全ての非増殖性、および増殖性病変を表 25-1、25-2 に記載した。

種々の臓器・組織に非増殖性、および増殖性病変が観察された。しかし、非腫瘍性病変の発生頻度には、被験物質の明確な容量依存性は認められなかった。一方、腫瘍性病変については、全実験動物における腫瘍性病変の発生率を明らかにするため、途中死亡例や切迫殺したラットの腫瘍性病変も追加して表 26、27 に記載した。即ち、本実験で用いた全ラットの種々の臓器・組織に観察された全ての腫瘍性病変を表にまとめた。雄ラットの下垂体腫瘍では、その発生率は 0% 群では 14% (7/50) であるのに対し 1% 群では 36% (18/50) と有意に高い腫瘍発生率が観察された ($p < 0.05$)。しかし、0.04% 群、及び 0.2% 群の下垂体腫瘍の発生率には、対照群に比べ有意な増加は認められなかった。同様に、0.04% 群の下垂体腫瘍の発生率には、被験物質の明確な容量依存性は認められなかった。雌マウスの下垂体腫瘍の発生率では、各群ともに対照群と有意差を認めなかった。一方、雌ラットの子宮内膜の adenomatous polyp の発生は、0% 群では認められなかったのに対し、1% 群では 6% (3/50) の発生率を認めた。しかし、この発生率は、有意な増加ではない。これ以外の臓器・組織においても表 26、27 に示す如く様々な腫瘍性病変が認められた。しかしその発生頻度には、被験物質の明確な容量依存性は認められず、被験物質投与の影響を示唆する所見は得られなかった。

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 1 例、投与 32 週に対照群の雄 1 例、投与 39 週に 5% 投与群の雄 1 例ならびに投与 45 週に対照群の雄 1 例が、一般状態の悪化もしくは予後不良と判断され、切迫屠殺された。投与 36 週から投与期間終了まで雌雄 5% 投与群の全例に顕著な着色尿が観察された。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 (Fig. 1, Table 1-1, 2)。

C-2-2-2 体重及び摂餌量

体重及び体重増加量は、雌雄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。 (Fig. 2, Table 2)。摂餌量は、雄 5% 投与群では、投与 2 週からほぼ投与終了まで、雌 5% 投与群では投与 3~5 週で、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 (Fig. 3, Table 3)。

C-2-2-3 被験物質摂取量

雌雄各群の平均被験物質摂取量は 0.04% 投与群で、雄が 25.24 mg/kg、雌が 31.26 mg/kg、0.2% 投与群で、雄が 125.49 mg/kg、雌が 157.82 mg/kg、1% 投与群で、雄が 634.43 mg/kg、雌が 788.31 mg/kg、5% 投与群で、雄が 3329.95 mg/kg、雌が 4066.4 mg/kg であった (Table 4)。

C-2-2-4 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。 (Table 5)。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。 (Table 6)。

C-2-2-5 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 (Table 7, 8)。

C-2-2-6 尿検査

新鮮尿の定性検査では、雌の 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。24時間蓄尿では、肉眼的に雌雄の1%及び5%投与群で濃色尿 (Straw-colored あるいは Yellowish-brown) が観察された (Table 9)。また、雌雄5%投与群で、カルシウム1日排泄量の高値が認められ、さらに雄の5%投与群では尿中カルシウム濃度の増加が認められた。尿中カリウムならびにクロール濃度の増加は雄1%投与群に、それら一日排泄量の増加は、雄の1及び5%投与群に認められた (Table 10)。

C-2-2-7 剖検

剖検時では、雄1%投与群の少数例及び雌雄の5%投与群の全例に、被験物質の沈着を示唆する大腿骨表面の色調の変化 (黄色化) が認められた。その他、被験物質投与との関連を示唆する所見はみられなかった (Table 11)。

C-2-2-8 病理組織学的検査

雄の5%投与群で、腎臓において腎盂の鉍質沈着が対照群 (1/18例) に比較して高頻度 (13/19例) に認められた。その他、種々の臓器・組織に観察された非増殖性及び増殖性病変の発生頻度に、明確な用量依存性は認められず、偶発性あるいは自然発生性と推察され、被験物質投与との関連を示唆する所見は認められなかった (Table 12)。なお、一般状態の悪化により切迫屠殺された対照群の雄2例 (動物番号1114及び1115) は、剖検で、それぞれ左頬部皮下ならびに、右腹部皮下に腫瘤が認められ、組織学的には、血管肉腫ならびに未分化肉腫であった。5%投与群で切迫殺された雄1例 (動物番号1502) は、肝臓、脾臓及び骨髄に腫瘍細胞の浸潤が観察され、骨髄性白血病と判断された。また、同じく5%投与群で切迫殺された雌1例 (動物番号2507) は、肝臓の壊死及び肝外胆管拡張、膵臓の膿瘍形成が観察され、これらによって全身状態が悪化したものと考えられた (Appendix 1, 2)。これら切迫殺動物に観察された所見は自然発生性もしくは偶発性と推察され、被験物質投与との関連はないものと判断された。

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

雄では、死亡例は認められなかった。また、一般状態観察でも変化は認められなかった。

雌では、5000ppm群で切迫解剖例 (No.593, 33週) 及び死亡例 (No.590, 51週) が各1例認められたが、切迫解剖例で著しい衰弱が認められた他は一般状態に変化は認められなかった。

C-3-1-2 体重及び摂餌量

体重では、群間に差は認められなかった。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や摂餌量低下は認められなかった。その他の群でも、摂餌量に変化は認められなかった (図1, 表1)。

C-3-1-3 被験物質摂取量

5ppm, 50ppm, 500ppm及び5000ppm群の平均被験物質摂取量 (mg/kg/日) は雄で 0.21 ± 0.01 , 2.1 ± 0.6 , 20.6 ± 6.4 及び 210.7 ± 60.2 , 雌で 0.25 ± 0.01 , 2.5 ± 0.6 , 25.0 ± 5.4 及び 258.2 ± 57.8 と設定用量に一致した摂取が認められた (表1)。

C-3-1-4 血液学的検査

雌雄の5000ppm群で、Hb, Ht, MCV及びMCHの有意な減少が認められた。この他、偶発的な変化と考えられるWBCの有意な増加が雄の500ppm群で認められた。また、白血球百分比の検査で雌500ppm群の1例 (No. 573) 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 (表2, 3)。

C-3-1-5 血液生化学的検査

雄では、500ppm以上の群でTP及びAlbの有意な増加が、また5000ppm群でTGの有意な増加とT-Bil, ALP, ALT, AsT及びChEの有意な減少が認められた。TGでは50ppm群でも有意な増加が認められたがこの群での変化は偶発的な変化と考えられた。

雌では、5000ppm群で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群で認められた (表4, 5)。

C-3-1-6 尿検査

雄の5000ppm群及び雌の500ppm以上の群でタンパク質の有意な増加が認められた。このほかの項目では、変化は認められなかった (表6)。

C-3-1-7 剖検所見

途中死亡動物: 切迫解剖例 (33週, 雌5000ppm群No. 593) では腎臓の腫瘤 (25×30mm, 片側) が、死亡例 (51週, 雌5000ppm群No. 590) では、副

腎の肥大(4×4mm, 片側)が認められた。

計画解剖動物：雌雄の5000ppm群で、肝臓及び甲状腺の肥大がほぼ全例で観察された。また、雄では5000ppm群の1例(No. 91)に副腎の肥大(10×10mm, 片側)及び50ppm群の1例(No. 45)に上皮小体の著しい肥大(片側)が観察された。雌では500ppm群の1例(No. 573)に脾臓の腫大が認められた。

C-3-1-8 臓器重量

肝臓の実重量及び相対重量の有意な増加が雄の500ppm以上の群及び雌の5000ppm群で認められた。また、腎臓、副腎及び甲状腺の実重量及び相対重量の有意な増加が5000ppm群以上の雌雄で認められた。その他、雌の5000ppm群では、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認められた(表7, 8)。

C-3-1-9 病理組織学的検査

主な変化は肝臓、腎臓、甲状腺及び脾臓にみられた(表9-1)。代表例を写真1~12に示した。この他の組織検査では被験物質の影響を示唆する変化は認められなかった(表9-2, 3)。

9-1) 肝臓(表9-1)

小葉中心性の肝細胞肥大が5000ppm群の雌雄全例(死亡及び切迫解剖例は除く)で軽微から中等度に、500ppm群の雄4例で軽微にみられた。さらに、5000ppm群雄では変異肝細胞巣がほぼ全例で観察され、その数及び大きさが対照群雄と比較して増加していた。すなわち、対照群雄においては小葉1個の大きさを超えない小さな変異肝細胞巣(±)が半数例に観察されたのみであったが、5000ppm群雄では小葉1個の大きさを超える大きな変異肝細胞巣が1(+ないし数個混在++)している例も認められた。一方、5000ppm群雌でも変異肝細胞巣がほぼ全例で観察されたが、小葉1個の大きさを超える大きな変異肝細胞巣は観察されず、対照群雌においてもほぼ全例で観察されることより対照群と比較して明らかな差は認められなかった。また、加齢に伴って観察される胆管の増生が雄で対照群及び5000ppm群全例で観察されたが、その程度が対照群と比較して5000ppm群で減弱していた。雌においては対照群と比較して5000ppm群で発現頻度にわずかな減少傾向がみられた。

9-2) 腎臓(表9-1)

この種の動物で加齢に伴って観察される慢性進行性腎症が対照群及び5000ppm群雄全例で観察され、その程度が5000ppm群雄では対照群と比較して増強していた。すなわち、対照群雄では尿円柱、好塩基性尿細管、間質への細胞浸潤、糸球体の硬化などがわずかに観察されるのみであったが、5000ppm群雄ではこれらの変化の分布が増加していた。また、5000ppm群雌では軽微な慢性進行性腎症の発現頻度が対照群雌と比較して増加していた。なお33週で切迫解剖した5000ppm群の雌1例(No. 593)では、腎臓に腎芽腫が認められた(表10)。

9-3) 甲状腺(表9-1)

濾胞細胞の瀰漫性過形成が5000ppm群の雄7例雌6例でみられた。すなわち、濾胞上皮細胞が立方状あるいは円柱状に肥大して濾胞径の縮小した濾胞の増加が認められた。しかし、大きな濾胞も混在して濾胞の大きさは均一ではなく、同様の所見が対照群の雄1例にも観察された。

9-4) 脾臓(表9-1)

赤芽球系の髄外造血の軽微な亢進が、5000ppm群の雄ほぼ全例でみられ、対照群雄と比較してその出現頻度が増強していた。雌においては、対照群及び5000ppm群ほぼ全例で観察され、対照群と5000ppm群間に差は認められなかった。

9-5) 副腎(表9-2, 10)

51週で死亡した5000ppm群の雌1例(No. 590)では、副腎に褐色細胞腫が観察され、被膜外への浸潤及び肺への遠隔転移も認められることより悪性と判断した。同例も含め褐色細胞腫が5000ppm群雄1例(No. 91)雌2例(No. 588, 590)に認められたが、5000ppm群と対照群の間で副腎髄質における巣状過形成の発現頻度に差は認められなかった。

9-6) その他の臓器(表9-2, 9-3)

種々の臓器に組織学的変化が観察されたが、その出現状況や病理組織学的性状は対照群と5000ppm群との間に差は認められなかった。

C-4 ラット入手先の飼育生産施設でのラットへの肺パスツレラ感染の発生

日本チャールスリバーより入手した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ツレラ (*Pasteurella pneumotropica*) の感染の事実が発表された。入手動物についても肺パス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系統を用いて慢性毒性試験をする必要がある。本研究では、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。

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への障害は系統差によるものと考えられた。

発がん性試験におけるラットの一般状態の観察では、投与期間中にホコッシ抽出物の投与と相関するラットの特徴的な症状は体重以外には認められなかった。体重は、雄ラットでは1%群、雌ラットでは、1%群及び0.2%群で有意な体重増加の抑制がみられた(図5,表11)。ホコッシ抽出物を混入した摂餌量をみると体重増加抑制と摂餌量の減少が相関するため、この体重増加の抑制は、摂餌量の減少によるものと推定される。一方、観察期間中の生存率をみると、雄ラットではホコッシ抽出物を投与した影響は認められなかった。し

かし、雌ラットでは、1%群で有意な生存率の増加が観察された ($p < 0.005$, 表 10, 図 3, 4)。ホコッシ抽出物を投与した雌ラット 1%群では、前述した様に摂餌量の有意な減少とそれに相関する有意な体重減少が認められた。動物実験では、カロリー制限が寿命の延長を促進することが明らかにされている。従って、この生存率の増加は、ホコッシ抽出物の直接的な効果ではなく、摂餌量の減少と体重減少が相乗的に効果を及ぼしたものと推定された。この様に、観察期間中のラットの肉眼的な所見には、ホコッシ投与と相関する特徴的な毒性影響は認められなかった。

実験途中で死亡、あるいは瀕死状態に陥り剖検したラットの病理所見では、様々な非増殖性、および増殖性病変が観察された (表 24-1, 24-2)。しかし、これらの病変の発生頻度には、被験物質の明確な容量依存性は認められず、被験物質投与の影響を示唆する所見は得られなかった。

24ヵ月の観察期間を終了し剖検したラットの血液・生化学検査の結果では、ホコッシ投与と相関する特徴的な毒性影響は認められなかった (表 14, 15)。すなわち、雄ラットの赤血球MCVとMCH、及び雌ラットの血小板数に对照群に比べ有意差を認めたが、これらの変化は軽微であり用量相関が認められないことから、被験物質投与による影響とは推定できなかった。また、生化学検査では、雄ラット1%群のT-Choや雌ラット1%群のTGで有意な低下が認められたが、この低下は、摂餌量の減少と体重減少によるものと推定された。その他の検査項目にもいくつかの軽微な変化が認められたが、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が認められないことから被験物質投与による毒性影響とは推定できなかった。

一方、ホコッシ抽出物の投与が血中ホルモンに及ぼす影響を検討した (表 16, 17, 18)。性ホルモンであるestradiol、及びprogesteroneへの影響は、雌雄ラットともに認められなかった (表 16)。しかし、雄ラットのtestosterone値では、对照群に比べ1%群で有意な増加を認めた ($p = 0.03$)。F344ラットを用いた90日間の反復投与毒性試験では、ホコッシ抽出物を投与した3%群では精巣の臓器重量の減少、及び1.5%以上の投与群で精巣ライディヒ細胞の萎縮や

円形精子細胞の減少等が認められている。この検査結果からは、testosterone値の低下が予想されるが、本研究結果では増加を認めた。本検査では、検体数が少ない上に各検査値にばらつきがあることから、この高値をホコッシ抽出物の投与による影響と断定することは出来ない。今後検体を増やし再検討する必要がある。一方、下垂体の甲状腺刺激ホルモン (TSH) や甲状腺ホルモン (T_3 , T_4) では、雌雄ラットともに被験物質の影響は認められなかった。この事より、ホコッシ抽出物は、甲状腺に対し障害などの毒性影響を有しないことが明らかになった (表 17, 18)。また、尿検査の結果では、いくつかの検査項目で異常値を認めたが、对照群に比べ差異が無く、被験物質の用量依存性が認められないことより、ホコッシ抽出物の投与による腎臓・膀胱への毒性影響と推定することは出来なかった (表 19)。この事は、腎臓の病理学的解析からも確認された (表 25-1)。

剖検時での各実験群の臓器重量からホコッシ抽出物が臓器重量に及ぼす影響を検討した (表 20, 21, 22, 23)。雌雄ラットともにいくつかの臓器で重量が有意に変化することが認められた。しかし、ラット体重は高濃度の被験物質投与に伴い減少することから、これらの臓器重量の減少は体重減少に相関して減少したと考えられた。実際、表 22 に示す様に体重に対する相対的な臓器重量比では、雄ラットでは0.2%群の肺を除き有意差をみとめなかった。肺の値も、変動範囲はごく軽度であり、用量相関が認められないことから偶発的な変化と推定された。同様に、雌ラットは、1%と0.2%の被験物質投与群では有意に体重が減少することから、これらの臓器重量の減少は体重減少に相関して減少したと考えられた。特に、1%群では体重減少が著明で、その結果、表 23 に示す様に体重に対する相対的な臓器重量比では、逆に有意な増加が認められた。0.2%群についても同様な増加が認められている。従って、雌雄ラットの絶対臓器重量の減少は、体重減少に伴う変化と推定された。

ホコッシ抽出物投与による発がんへの影響を解析した (表 26, 27)。雄ラットの下垂体腫瘍では、1%群で有意に高い腫瘍発生率が観察された ($p < 0.05$)。しかし、0.04%群、及び0.2%群の下垂体腫瘍の発生率には、有意な

増加や被験物質との明確な容量依存性は認められなかった。また、雌ラットの下垂体腫瘍の発生率には有意な増加は認められなかった。以上の事より、ホコッシ抽出物の大量投与により雄ラットでは下垂体腫瘍の発症が促進される可能性が示唆された。今後の検討が必要である。また、雌ラットでは、1%群の子宮内膜に6% (3/50) の頻度で adenomatous polyp の発生を認めた。しかし、この発生率は、対象群に比べ有意な増加ではなく、被験物質の明確な容量依存性が認められないことから、被験物質投与の影響を示唆する所見とは推定できなかった。

上記以外の臓器・組織においても様々な腫瘍性病変が認められた (表 26, 27)。しかしその発生率には、対照群に比べ有意な増加は認められず、またその発生にも被験物質の明確な容量依存性は認められず、被験物質投与の影響を示唆する所見は得られなかった。従って、これらの腫瘍発生は、偶発性あるいは自然発生性と推定された。

ホコッシ抽出物の投与による非増殖性病変に及ぼす影響を解析した (表 25-1, 25-2)。種々の臓器・組織に非増殖性病変が観察された。しかし、非腫瘍性病変の発生率には、対照群に比べ有意な増加は認められず、またその発生にも被験物質の明確な容量依存性は認められなかった。従って、これらの非増殖性病変の発生は、偶発性あるいは自然発生性と推定された。

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、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なかった。先に実施されたラット 90 日間混餌投与試験では、雄の 5%投与群でヘモグロビン量及びヘマトクリット値の有意な低下が認められたが、本試験において貧血を示唆する所見は認められなかった。

投与期間中の一般状態観察では、雌雄の 5%投与群において着色尿が観察され、尿検査では雌雄の 1%及び 5%投与群で濃色尿 (Straw-colored あるいは Yellowish-

brown) が認められた。この変化は先に実施されたラット 90 日間混餌投与試験においても観察されており、被験物質あるいはその代謝物の尿中排泄を示唆するものと考えられた。雌雄の 5%投与群で観察された摂餌量増加の原因は不明であるが、高濃度 (5%) の被験物質混合飼料給餌による相対的な摂取量増加が一部関与しているものと推察され、毒性学的意義の低い変化と考えられた。

剖検において、雄の 1%投与群の一部および雌雄の 5%投与群の全例で被験物質の沈着を示唆する骨表面の色調の変化 (黄色化) が観察された。また、尿検査で、雌の 5%投与群で尿 pH の低値傾向及び雌雄の 5%投与群でカルシウム 1 日排泄量の高値が認められ、さらに雄の 5%投与群については尿中カルシウム濃度の高値が観察された。一方、血液生化学検査では、雌雄の 5%投与群において血漿中カルシウム濃度に顕著な変化はみられなかった。通常、体内カルシウム量は消化管からの吸収、尿細管での再吸収及び骨代謝に依存し、これらは pH 及びホルモンによる調節を受けており、病理組織学的検査では骨組織に異常は認められず、上皮小体及び甲状腺旁濾胞細胞にも被験物質投与との関連を示唆する変化は認められていないものの、ルチン酵素分解物投与により、体内カルシウム動態に変動が起きている可能性が示唆された。

尿中カルシウム量の変化との関連が疑われる変化として、雄の 5%投与群では、腎盂の鉍質沈着が対照群と比較して高頻度に認められた。沈着物の性状は不明であるが、尿中カルシウム濃度の高値により、カルシウム塩として濃縮尿中に析出しやすい状態となり、腎盂への鉍質沈着が促進された可能性が考えられた。また、腎盂への鉍質沈着や結石形成は、自然発生病変としても認められ、これに伴って観察される炎症性細胞浸潤や反応性の移行上皮の過形成は、鉍質沈着に起因する一連の変化と考えられることから、腎盂における鉍質沈着、炎症性細胞残渣、炎症性細胞浸潤もしくは移行上皮過形成のいずれかの所見を認めた個体数を比較したところ、雄の 5%投与群で有意な発生頻度の増加が認められた。一方、雌の 5%投与群では、対照群との顕著な差はみられなかった (Table 13)。なお、ルチン酵

素分解物の主成分イソクエルシトリンのアグリコンであるクエルセチンは、発がん性試験において、5%投与で雄ラットの腎に尿細管上皮の過形成及び腫瘍が発現したことが報告されているが、本試験では、雌雄の腎において、被験物質投与に起因すると考えられる尿細管上皮の障害ならびに増殖性病変の発現は認められなかった。

以上より、本試験では、雌雄の5%投与群に認められたカルシウム一日排泄量の増加、雄の5%投与群の尿中カルシウム濃度の高値ならびに腎臓における腎盂への鉱質沈着の増加が、毒性所見と考えられた。したがって、ルチン酵素分解物のラット52週間混餌投与試験における無毒性量は雌雄とも1%（雄：634.43 mg/kg/day，雌：788.31 mg/kg/day）と判断された。

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、0、5、50、500及び5000ppm添加飼料投与によるラットを用いた1年間反復投与毒性試験を行った。

一般状態、体重及び摂餌量の観察では、雌の5000ppm群で切迫解剖例を含む2例の途中死亡が認められたが、それ以外については、一般状態、体重及び摂餌量に被験物質投与の影響は認められなかった。

血液形態学的検査では、Hb、Ht、MCV及びMCHの減少傾向が5000ppm群の雌雄で認められた。この変化については、脾臓での赤芽球系の髄外造血の軽微な亢進が5000ppm群の雄のほぼ全例で認められること、雌で脾臓重量の軽度増加が認められること、及び赤血球関連項目数値の減少傾向は90日間反復毒性試験でも認められていることより、軽微な変化ではあったが被験物質の影響と考えられた。

血液生化学的検査では、TP及びAlbの増加が雄の500ppm以上の群と雌の5000ppm群で、ALP及びT-Bilの減少が雌雄の5000ppm群で認められた。さらに、雄の5000ppm群ではTGの有意な増加及びALT、AsT、ChEの有意な減少が、また雌の

5000ppm群ではGlc、T-Cho、PL及び γ -GTPの有意な増加が認められた。変化の多くは90日間反復投与毒性試験の結果と一致した変化であり、被験物質投与との関連が示唆された。しかしながら、TP及びAlbの変化はA/G比の変化を伴わない小さな変化であること、尿検査においてタンパク質の増加が雄の5000ppm群と雌の500ppm以上の群で認められること、及び腎臓重量の増加と病理組織学的所見により診断された慢性進行性腎症が雌雄の5000ppm群で認められることから、腎症により血清蛋白質の尿中排泄が増加し、それを補う生理的反応として血清蛋白質の軽度の増加を認めたものとも考えられた。また、ALP、T-Bil、TG、ALT、AsT、ChE、Glc、T-Cho、PL及び γ -GTPの変化については、同群で肝臓重量増加及び小葉中心性の肝細胞肥大が認められたことから、その関連が示唆された。T-Bilの変化は軽微で、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。これに対して雄のTG及び雌のPL及びT-Choの増加は比較的大きな変化であった。また、肝臓障害の指標として知られている γ -GTPの増加が軽微ながら雌で認められた。

尿検査では、前述したようにタンパク質の増加が雄の5000ppm群と雌の500ppm以上の群で認められたが、この他の検査項目では差は認められなかった。

臓器重量及び病理組織学的検査では被験物質投与の影響と考えられる以下のような変化が認められた。

肝臓では、重量増加と肝細胞肥大が5000ppm群の雌雄と500ppm群の雄でみられた。さらに、5000ppm群雄では変異肝細胞巣がほぼ全例で観察され、その数及び大きさが対照群雄と比較して増加していた。すなわち、対照群雄においては小葉1個の大きさを超えない小さな変異肝細胞巣(±)が半数例に観察されたのみであったが、5000ppm群雄では小葉1個の大きさを超える大きな変異肝細胞巣が1(+)ないし数個混在(++)している例も認められた。一方、5000ppm群雌でも変異肝細胞巣がほぼ全例で観察されたが、小葉1個の大きさを超える大きな変異肝細胞巣は観察されず、対照群雌においてもほぼ全例で同程度のものが観察されることより対照群と比較して明らかな差は無いと

判定された。最近、ジャマイカカシヤ抽出物のF344ラットによる中期肝発がん性試験でGST-P陽性肝細胞巢の単位面積あたりの個数及び面積の増加が認められ、肝臓に対する発がんプロモーション作用が報告された³⁾。同様に、今回の雄の結果はジャマイカカシヤ抽出物の肝臓への発がん促進作用の可能性を示唆した変化と考えられた。

腎臓では、重量増加が5000ppm群の雌雄で認められた。同群ではこれに対応した変化と考えられる慢性進行性腎症の程度の増加あるいは頻度(動物数)の増加が認められた。

甲状腺では、濾胞細胞の瀰漫性過形成が5000ppm群の雄7例雌6例でみられた。すなわち、濾胞上皮細胞が立方状あるいは円柱状に肥大して濾胞径の縮小した濾胞の増加が認められた。報告者らが先に行った90日間反復投与毒性試験の5000ppm群で濾胞細胞の過形成が認められており、また本試験においても甲状腺重量に増加が認められることより、被験物質投与の影響と考えられた。しかし、大きな濾胞も混在して濾胞の大きさは均一ではなく、同様の所見が対照群の雄1例にも観察されることより、きわめて軽微な変化と考えられた。

脾臓では、赤芽球系の髄外造血の軽微な亢進が、雄の5000ppm群でその出現頻度(動物数)が増強していた。血液学的検査で認められた赤血球の変化に対する反応性変化の可能性が考えられるが、同様の所見は対照群雄の少数例にも観察されることより、きわめて軽微な変化と考えられた。

副腎では、重量増加が5000ppm群の雌雄で認められた。また、剖検所見として51週で死亡した5000ppm群の雌1例(No.590)及び52週の定期解剖に供した5000ppm群の1例(No.91)に明らかな肥大が認められた。病理組織学的検査においてNo.590では、副腎に褐色細胞腫が観察され、被膜外への浸潤及び肺への遠隔転移も認められることより悪性と判断した。同例も含め褐色細胞腫が5000ppm群雄1例(No.91)雌2例(No.588,590)に認められたが、5000ppm群と対照群の間で副腎髄質における巣状過形成の発現頻度に差はなく、また褐色細胞腫はこの種の動物には時折自然発生することより被験物質投与との関連は明らかではなかった。

その他、5000ppm群の雌で心臓重量の増加が

認められた。この増加は、報告者らが先に行った90日間反復投与毒性試験の5000ppm群でも認められており、被験物質投与との関連性が示唆された。同群では、血液形態学的検査で赤血球関連項目数値の軽度減少が認められており、この減少に対する反応性変化の可能性も考えられた。しかしながら、増加の程度は極軽度で、病理組織学的検査でも変化が認められないことから、きわめて軽微な変化と考えられた。

以上のことから、ジャマイカカシヤ抽出物の無毒性量(NOEL)は、雄では肝臓の重量及び病理組織学的変化を、雌では尿タンパク質の増加を指標に雌雄ともに50ppm(雄で 2.1 ± 0.6 mg/kg/day, 雌で 2.5 ± 0.6 mg/kg/day)と推定した。また、変異肝細胞巢の発現頻度(動物数)と大きさの増加が雄の5000ppm群で認められたことより、大量投与による肝臓への発がん促進作用の可能性が示唆された。

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ヤ抽出物の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、1年間反復投与毒性試験では、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た。雌雄ラット共にホコッシ抽出物の濃度に依存した摂餌量の減少が認められることよりこの体重の増加抑制は、摂餌量の減少によるものと推定された。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による体重増加抑制の無毒性量は、雄ラット0.2%、雌ラット0.04%であると推定された。

一方、発がん性試験では、ホコッシ抽出物を2年間反復投与しその影響を検討した。投与期間中の一般状態の観察では、1%雄ラット群と0.2%以上の雌ラット群で毒性試験と同様なホコッシ抽出物の投与による摂餌量の低下とそれに伴う体重の増加抑制が認められた。特に、雌ラットの1%群では、顕著な体重の増加抑制に伴い生存率の有意な増加も認められ、その原因はカロリー制限によるものと推定された。血液・生化学検査では、いくつかの検査項目で、有意な変化を認めたが、これらの変化は軽微で、用量相関が認められないことから、被験物質投与による影響とは推定できなかった。一方、血中ホルモンの測定では、estradiol、及びprogesteroneでは、異常を認めなかったが、雄ラット1%群のtestosterone値に軽度の増加を認めた。しかし、検体数が少なく各検査値にばらつきが多いことから、ホコッシ抽出物の影響と断定することは出来なかった。また、甲状腺関連ホルモン値には異常がなく、ホコッシ抽出物は甲状腺障害を誘発しない事が示された。病理学的検査では、種々の臓器・組織に様々な非増殖性、および増殖性病変が観察された。非増殖性病変の発生頻度には、被験物質の明確な容量依存性は認められず、被験物質投与の影響を示唆する所見は得られなかった。一方、増殖性病変では、雄ラット1%群の下垂体腫瘍に有意に高い腫瘍発生率が観察された。しかし、これ以外の実験群の発生率では、有意な増加や被験物質との明確な容量依存性は認められなかった。以上より、ホコッシ抽出物の大量投与により雄ラットでは下垂体腫瘍の発症が促進される可能性が示唆された。

上記以外の増殖性病変では、対象群に比べ有意に増加した病変は認められず、被験物質の容量依存性も認められないことから、偶発性あるいは自然発生性と推定された。以上より、2年間反復投与による発がん性試験におけるホコッシ抽出物による体重増加抑制の無毒性量は、雄ラット0.2%、雌ラット0.04%であると推定された。

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色尿が認められ、尿検査では雌雄の1%及び5%投与群で濃色尿が、雌雄の5%投与群でカルシウム1日排泄量の高値が、雄の5%投与群で尿中カルシウム濃度の高値が認められた。剖検では、雌雄とも5%投与群の全例の骨表面に、被験物質の沈着を示唆する色調の変化(黄色化)が認められた。病理組織学的検査では、雄の5%投与群で、腎盂の鈣質沈着が対照群と比較して高頻度に認められ、鈣質沈着と関連する変化と考えられる、腎盂の炎症性細胞残渣、炎症性細胞浸潤もしくは移行上皮過形成のいずれかを認める個体数も増加した。以上の成績より、雌雄の5%投与群に認められたカルシウム1日排泄量の増加、雄の5%投与群の尿中カルシウム濃度の高値ならびに腎臓における腎盂への鈣質沈着の増加は、毒性学的影響とみなされ、本試験における無毒性量は雌雄とも1% (雄: 634.43 mg/kg/day, 雌: 788.31 mg/kg/day) と判断された。

3) ジャマイカカシア抽出物の安全性の評価の一環として、ジャマイカカシア抽出物の0、5、50、500及び5000ppm添加飼料によるラットを用いた1年間反復投与毒性試験を行った。

5及び50ppm群では被験物質投与による影響は観察されなかった。死亡動物は、5000ppm群の雌で2例に認められた。血液形態学検査では、5000ppm群の雌雄でHb、Ht、MCV及びMCHの軽度の減少が認められた。血液生化学的検査では、TP及びAlbの増加が雄の500ppm以上の群及び雌の5000ppm群で、ALP及びT-Bilの減少が5000ppm群の雌雄で、TGの増加及びALT、AsT、ChEの減少が雄の5000ppm群、Glc、T-Cho、PL及びγ-GTPの増加が雌の5000ppm群で認められた。尿検査では、タンパク質の増加が雌の500ppm以上の群及び雄の5000ppm群で認められた。臓器重量では、肝臓重量の増加が雄の500ppm以上の群及び雌の5000ppm群、腎臓、副腎及び甲状腺重量の増加が5000ppm群の雌雄、心臓重量増加が雌の5000ppm群で認め