

表9-3 病理組織学的検査(全動物)

乳腺、卵巣、膵臓、下垂体、前立腺、胃、筋肉、精嚢、精巣、舌、子宮、陰::ジャマイカカシヤ抽出物のラットによる1年間反復投与毒性試験

全動物

Tissue	Group	Male				Female					
		500		500		500		500			
		Cont.	5	50	0	Cont.	5	50	0		
		(0 ppm)				(0 ppm)					
Observation	Animals examined	20	0	0	0	20	20	0	0	0	20
Mammary gland											
FIBROADENOMA	Present					1					
Ovary											
Cyst	±					1				0	
Pancreas											
Atrophy, acinar, focal	±	4		7		6		5			
	+	6		4		1		1			
	All (>±)	10		11		7		6			
Cell infiltration, interstitial	±	12		11		6		8			
Fibrosis, islet	±	1		3		0		0			
	+	1		0		0		0			
	All (>±)	2		3		0		0			
Pituitary											
Aberrant craniopharyngeal tissue	±	1		0		0		1			
Cyst	±	1		5		1		0			
	+	0		0		0		2			
	All (>±)	1		5		1		2			
Hemorrhage, Rathke's pouch	±	0		0		2		1			
	+	0		0		1		1			
	All (>±)	0		0		3		2			
Cystlike structure	±	0		0		2		1			
	+	0		0		3		3			
	All (>±)	0		0		5		4			
Hyperplasia, anterior, focal	±	0		0		1		0			
	+	1		1		1		0			
	All (>±)	1		1		2		0			
ADENOMA, ANTERIOR	Present	0		0		1		0			
Prostate											
Prostatitis	+	0		1							
Stomach											
Cyst, epidermal	±	1		0		0		0			
Skeletal muscle, femoral											
Cell infiltration	±	1		0		0		0			
Seminal vesicle											
Diverticulum	±	1		0							
Cell infiltration, interstitial	±	1		0							
Testis											
Atrophy, seminiferous tubular	±	6		3							
	++	1		3							
	All (>±)	7		6							
Arteritis	+	2		0							
Hyperplasia, Leydig cell, focal	±	19		18							
Tongue											
Cell infiltration, muscle layer	±	0		1		0		1			
Uterus											
Hyperplasia, endometrial, cystic	±					0		1			
	+					1		0			
	All (>±)					1		1			
POLYP, ENDOMETRIAL STROMAL	Present					2		2			
Vagina											
POLYP, VAGINAL STROMAL	Present										

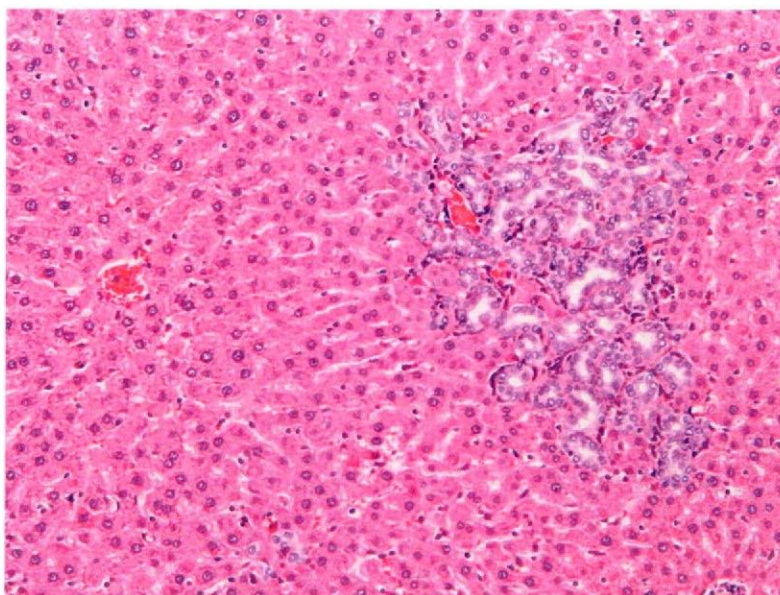
±; minimal, +; mild, ++; moderate

表10 病理組織学的検査(途中死亡動物)
 ジャマイカカシヤ抽出物のラットによる1年間反復投与毒性試験

Tissue	Group	Femal
		5000 ppm
Observation	Animals examined	2
Kidney		
NEPHROBLASTOMA	Present	1
Liver		
Altered cell focus	±	2
Necrosis, focal	±	2
Necrosis, centrilobular	±	2
Spleen		
Hematopoiesis, extramedullary	++	1
Adrenal		
PHEOCHROMOCYTOMA, MALIGNANT	Present	1
Bone+Bone marrow, femoral		
Hematopoiesis, increased	++	1
Bone+Bone marrow, sternal		
Hematopoiesis, increased	++	1
Harderian gland		
Pigmentation, intra-acinar	±	1
Heart		
Mineralization, myocardial	±	1
Lymph node, mesenteric		
Accumulation, macrophage	±	1
Lung(bronchus)		
Accumulation, foamy cell	±	1
Tumor infiltration/metastasis	±	1
Uterus		
POLYP, ENDOMETRIAL STROMAL		1

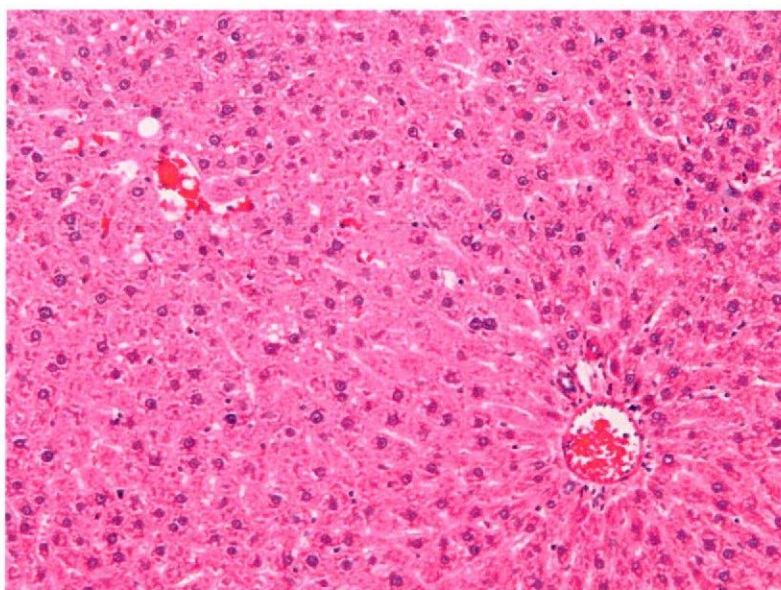
±; minimal, +; mild, ++; moderate

写真 1



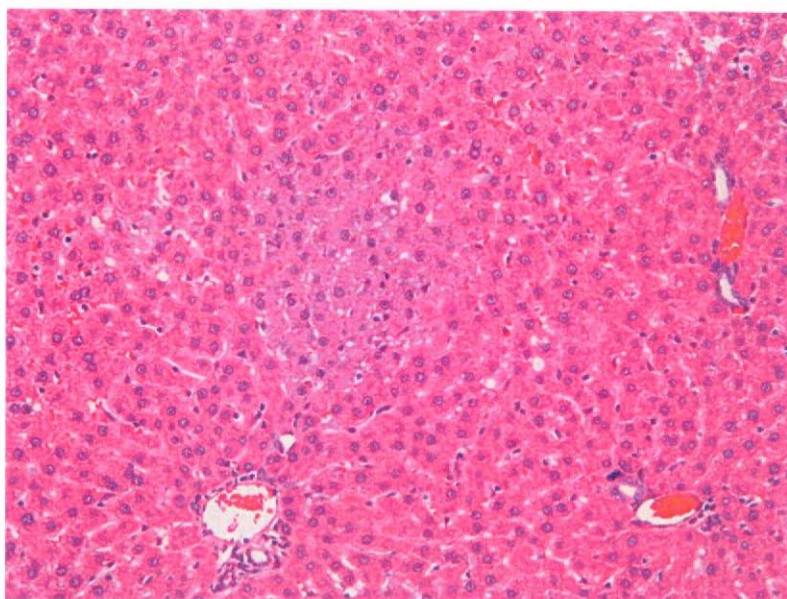
Organ : Liver
Dose : 0ppm
Animal No. : 1
Sex : Male
Finding : Proliferation of bile ducts
HE Stain X100

写真 2



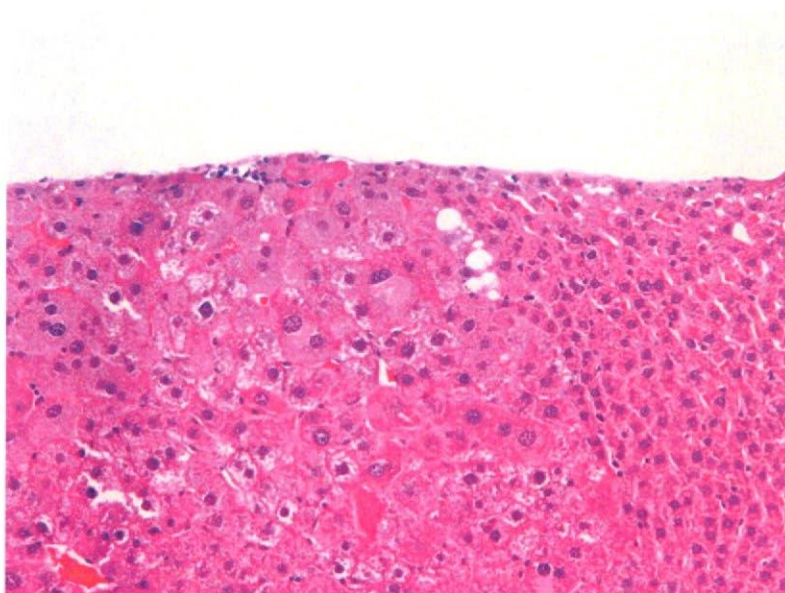
Organ : Liver
Dose : 5000ppm
Animal No. : 94
Sex : Male
Finding : Central hypertrophy of hepatocytes
HE Stain X100

写真 3



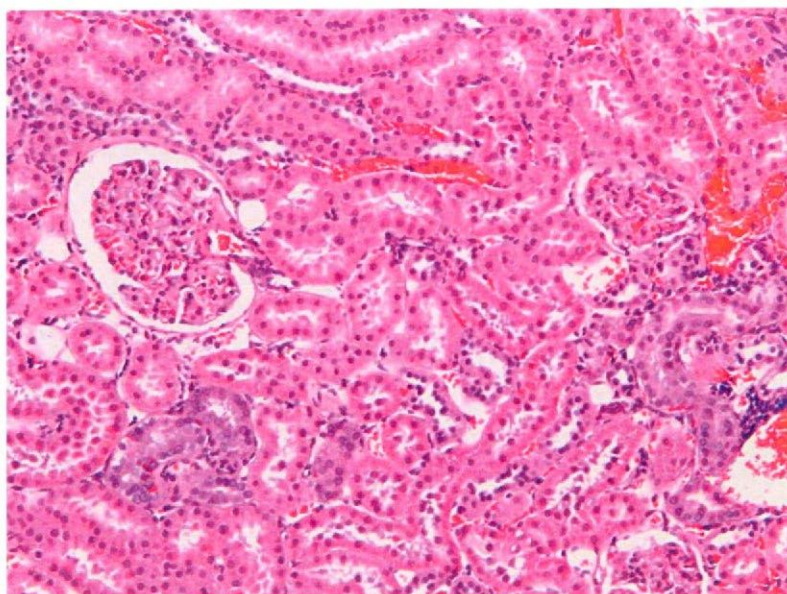
Organ : Liver
Dose : 0ppm
Animal No. : 7
Sex : Male
Finding : Altered cell focus(minimal)
HE Stain X100

写真 4



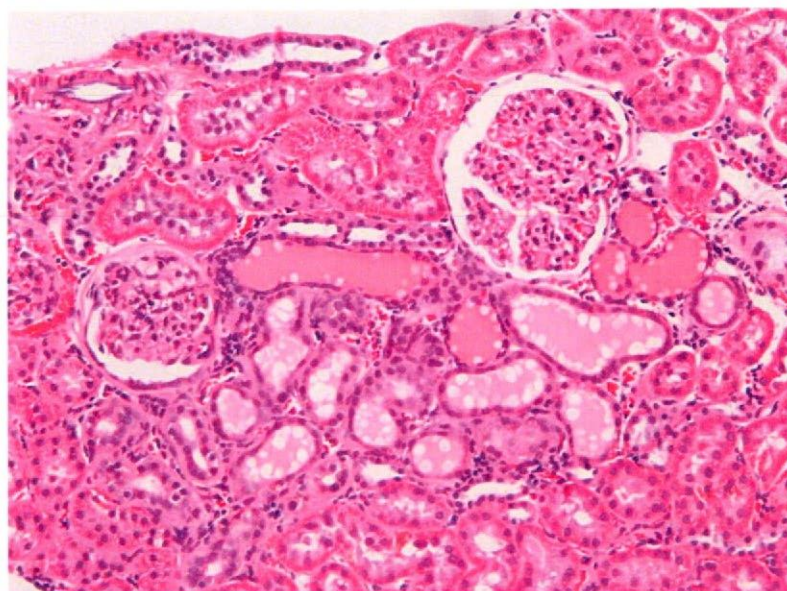
Organ : Liver
Dose : 5000ppm
Animal No. : 92
Sex : Male
Finding : Altered cell focus(moderate)
HE Stain X100

写真 5



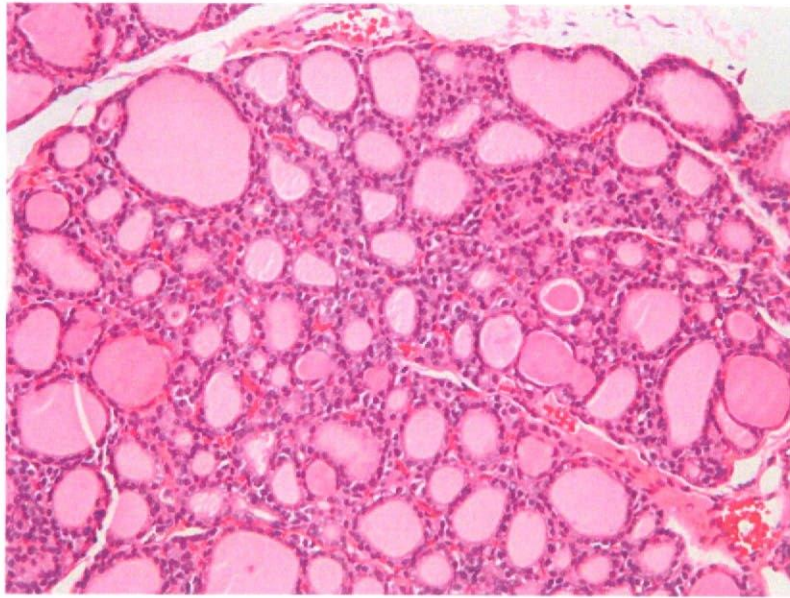
Organ : Kidney
Dose : 0ppm
Animal No. : 1
Sex : Male
Finding : Chronic progressive nephropathy (minimal)
HE Stain X100

写真 6



Organ : Kidney
Dose : 5000ppm
Animal No. : 99
Sex : Male
Finding : Chronic progressive nephropathy (moderate)
HE Stain X100

写真 7

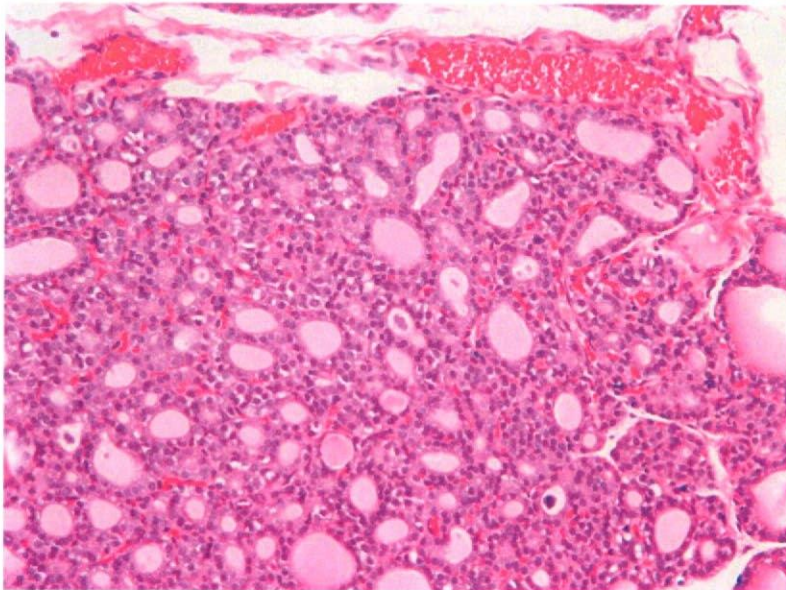


Organ : Thyroid
Dose : 0ppm
Animal No. : 1
Sex : Male
Finding : No remarkable changes

HE Stain

X100

写真 8

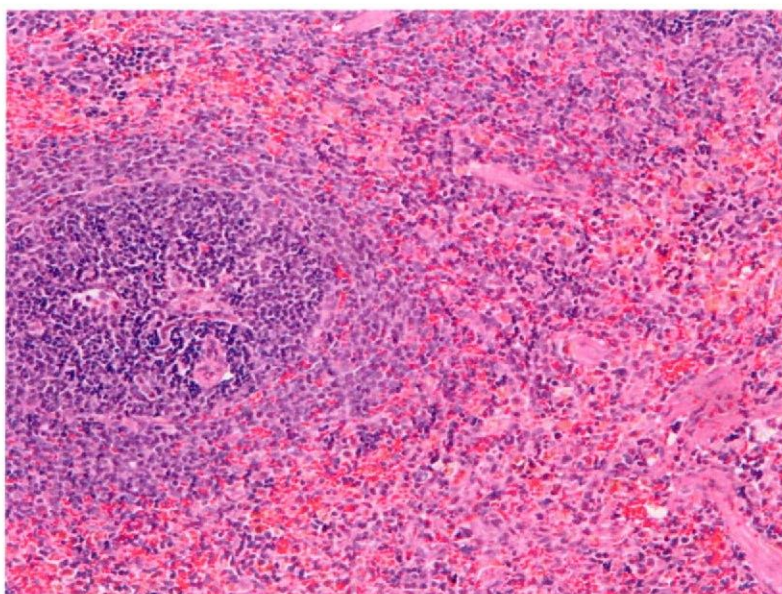


Organ : Thyroid
Dose : 5000ppm
Animal No. : 87
Sex : Male
Finding : Diffuse follicular hyperplasia

HE Stain

X100

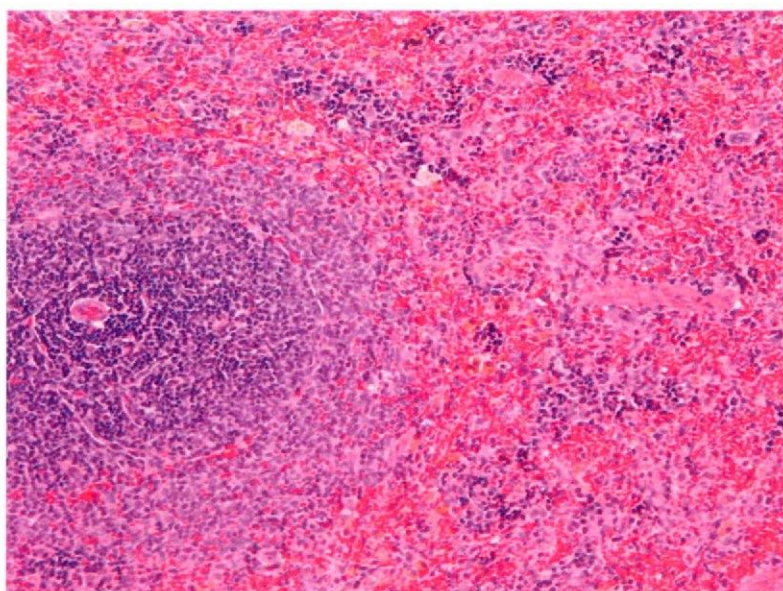
写真 9



Organ : Spleen
Dose : 0ppm
Animal No. : 2
Sex : Male
Finding : No remarkable changes

HE Stain X100

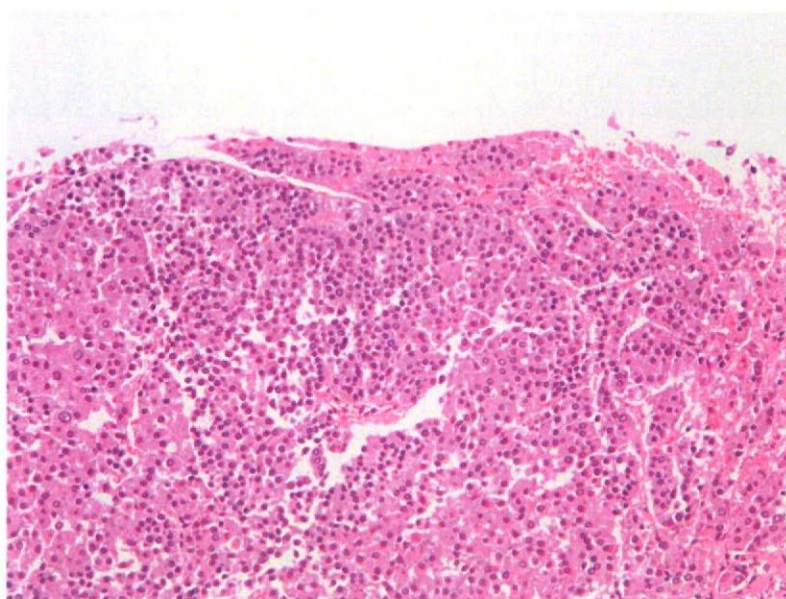
写真 10



Organ : Spleen
Dose : 5000ppm
Animal No. : 86
Sex : Male
Finding : Extramedullary hematopoiesis

HE Stain X100

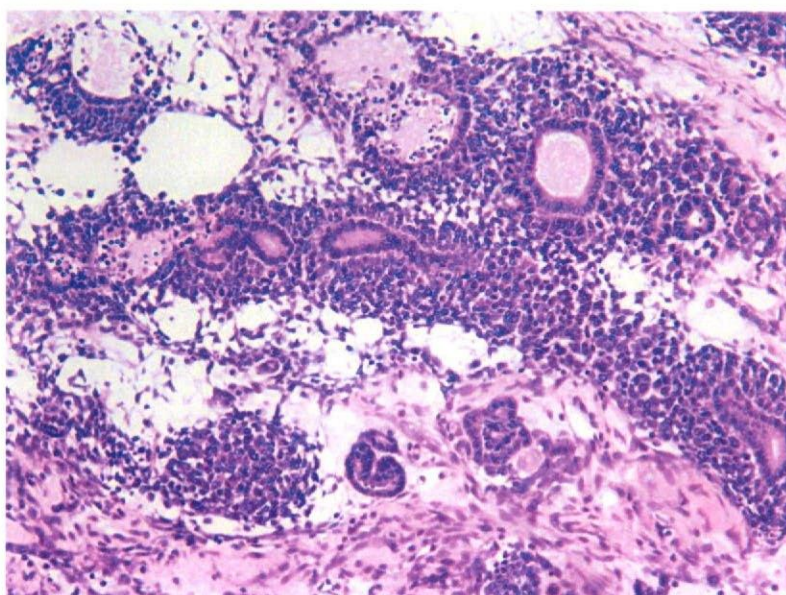
写真 11



Organ : Adrenal
Dose : 5000ppm
Animal No. : 590
Sex : Female
Finding : Malignant pheochromocytoma

HE Stain X100

写真 12



Organ : Kidney
Dose : 5000ppm
Animal No. : 593
Sex : Female
Finding : Nephroblastoma

HE Stain X100

既存添加物の発がん性等に関する研究

-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-

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

研究協力者	渡邊敦光	同	名誉教授
	豊島めぐみ	同	助教
	増田雄司	同	助教
	樫本尚樹	同	大学院生
	水野久美子	同	技能補佐員

研究要旨

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。

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、ラットにホコッシ抽出物を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、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。

A. 研究目的

ホコッシ抽出物は、マメ科の植物オランダビュ (*Psoralea corylifolia* L.) の成熟果実であるホコッシをエタノール抽出した天然素材由来の食品添加物であり、その成分はエタノール60%、水分20%、エタノールおよび水分を除いた乾熱残分が20%である。主成分の一つであるバクチオールはこの乾熱残分に含まれており、ホコッシ抽出物に6.5%含まれている。バクチオールは強い抗菌作用を有し、その用途として唐揚げ等の食品の日持ち向上剤として使用されている。ホコッシには、冠動脈拡張、抗菌、抗がん作用などに活性があることが知られ、白斑、疥癬の局所治療薬等として用いられる。現在までに、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のLD₅₀値は雄ラットで6113mg/kg、雌ラットで5300 mg/kgである。Salmonella 及び Esherichia coli に対する変異原性は陰性、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。一方、90日反復投与毒性試験では、体重増加抑制やγ-GTPの有意な増加が認められ、病理学的解析では精巣におけるライディッシュ細胞の萎縮と精細管内伸長精子細胞の消失並びに円形精子細胞の減少、雌ラットでは卵巣の黄体形成不全が観察され、明らかな毒性変化が認められている。本研究では、ホコッシ抽出物の長期間投与の影響に関する安全性評価を行う事を目的としてラットを用いた1年間反復投与毒性/発がん性併用試験を実施する。

B. 研究方法

1. 被験物質

ホコッシ抽出物は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。基礎飼料 (CRF-1 粉末飼料: オリエンタル酵母工業 (株)) にホコッシエタノールエキスを混入し目的の濃度の混餌飼料を作成した。

2. ラットおよび飼育条件

Wistar Hannover 系ラットを入手し、基礎飼料 (CRF-1 粉末飼料) と水道水で1週間馴化飼育後、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。

3. 予備試験

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。従って、1 年間反復投与毒性/発がん性併用試験では、ホコッシ抽出物の精巣と卵巣への影響を検討する必要がある。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る必要がある。そのため今回の実験では Wistar Hannover 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 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。予備試験に於ける投与量は、先に実施されたラット 90 日反復投与毒性試験 (食品添加物規格基準設定試験 食品添加物安全性再評価試験 ホコッシ抽出物の 90 日反復投与毒性試験 平成 10 年度最終報告書 平成 12 年 5 月 30 日) の資料を基に決定した。ホコッシ抽出物を混餌投与した F344 ラットは、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た。一方、雌雄ラットの 1.5%以上で精巣の組織学的異常が認められ、この変化が慢性投与でどうなるかを検討する必要がある。以上の事から、予備試験としては最高濃度投与量を 1%として、以下公比 5 で減じ 0.2%、0.04%とした。試験方法は、4 週齢の Wistar Hannover (GALAS) 系ラットの雌雄ラットを入手し、7 日間の馴化飼育後、雌雄ラットとも各群 10 匹ずつ 4 群に分け試験を実施した。対照群には、基礎飼料を、被験物質投与群には前述の各濃度のホコッシ抽出物混餌飼料を自由に摂取させた。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。

4. 1 年間反復投与毒性/発がん性併用試験

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)ラット雌雄ラットを入手し、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

1年間反復投与毒性試験では、4群の被験物質投与群を設定し1.5%, 1%, 0.2%, および0.04%の割合でホコッシ抽出物を混合した飼料 (CRF-1, オリエンタル酵母工業 (株)) を試験期間中自由に摂取させた。発がん性試験では、3群の被験物質投与群を設定し同様に1%, 0.2%, および0.04%の割合でホコッシ抽出物を混合した飼料を試験期間中自由に摂取させた。両実験の対照群では、雌雄ラット各1群にホコッシ抽出物を含まない基礎飼料 (CRF-1 飼料) を同期間自由に摂取させた。ホコッシ抽出物混合飼料は、使用時まで4°C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ヵ月まで週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。

1) 1年間反復投与毒性試験:

投与開始50週前後に尿量、尿pH、蛋白、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン、潜血、比重、電解質 (Na, K, Cl, Ca) について検査を実施し、投与開始52週後に全生存動物を屠殺剖検した。剖検は、エーテル麻酔下で開腹、腹部大動脈より採血し、瀉血により屠殺後剖検した。諸臓器は、肉眼的に観察した後摘出し、脳、胸腺、肺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓、子宮、精巣及び卵巣については重量測定後、甲状腺、胃、小腸、大腸については摘出後直ちに10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。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。採血した血液は広島市医師会臨床検査センターに依頼し白血球 (WBC)、赤血球 (RBC)、ヘモグロビン (Hb)、ヘマトクリット (Ht)、血小板 (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)、ならびに好中球 (Neutro)、リンパ球 (Lymph)、単球 (Mono)、好酸球 (Eosino)、および好塩基球 (Baso) の白血球分画を測定した。また、血清を分離し、総蛋白 (TP)、アルブミン (ALB)、アルブミン・グロブリン比 (A/G比)、総コレステロール (T-CHO)、中性脂肪 (TG)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRE)、ナトリウム (Na)、クロール (Cl)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、 γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP)、総ビリルビン (T-Bil) を測定した。

2) 発がん性試験:

投与開始24ヶ月後に全生存動物を屠殺剖検し、器官・組織の肉眼的観察及び病理組織学的検索を行った。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

に行った。剖検に先立ち生存ラットを採血し血液学的検査と血液生化学検査を行った。血液学的検査と血液生化学検査の項目は1年間反復投与毒性試験と同一である。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に行った。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。尿検査を実施した。検査項目は、pH, 白血球, 蛋白質, ケトン体, ブドウ糖, 潜血, ウロビリノーゲン, 比重の8項目で、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。

5. 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た。実験群の統計解析では各群間の直接比較検定 (χ^2 検定など) と, 対照群と投与群で多重比較検定 (Dunnett の検定など) を行った。いずれの検定においても有意水準は危険率5%以下とした。

(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った。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, 広島大学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

(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必要があ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。

(2) 1年間反復投与毒性試験

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。

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%群で投与開始4週間目から, 1.5%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%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, 試験終了まで同様な推移であった。

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%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%群で4週間目, 1%群は16週間目に消失した。1.5%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%群で摂餌量の低下が認められ、1%群では、9週目まで継続し、1.5%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%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関連していた。

4) 血液学的検査およ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6、7に示した。0%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。

5) 臓器重量

実験終了時におけるラットの臓器絶対重量および相対重量の結果を表8、及び表9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。

6) 病理組織学的検査

検索した全ての臓器において、0%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。

(3) 発がん性試験

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。

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。

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関連していた。

4) 血液学的検査およ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-Cho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。

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シが、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。

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。

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重量比の結果を表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。

8) 病理組織学的検索

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。

D. 考察

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5300 mg/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

でも、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

小板数に対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、対照群に比べ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、対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变化と推定された。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。

E. 結論

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。

F. 健康危機情報

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。

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 ホコッシ抽出物の予備試験 16週間反復投与毒性試験

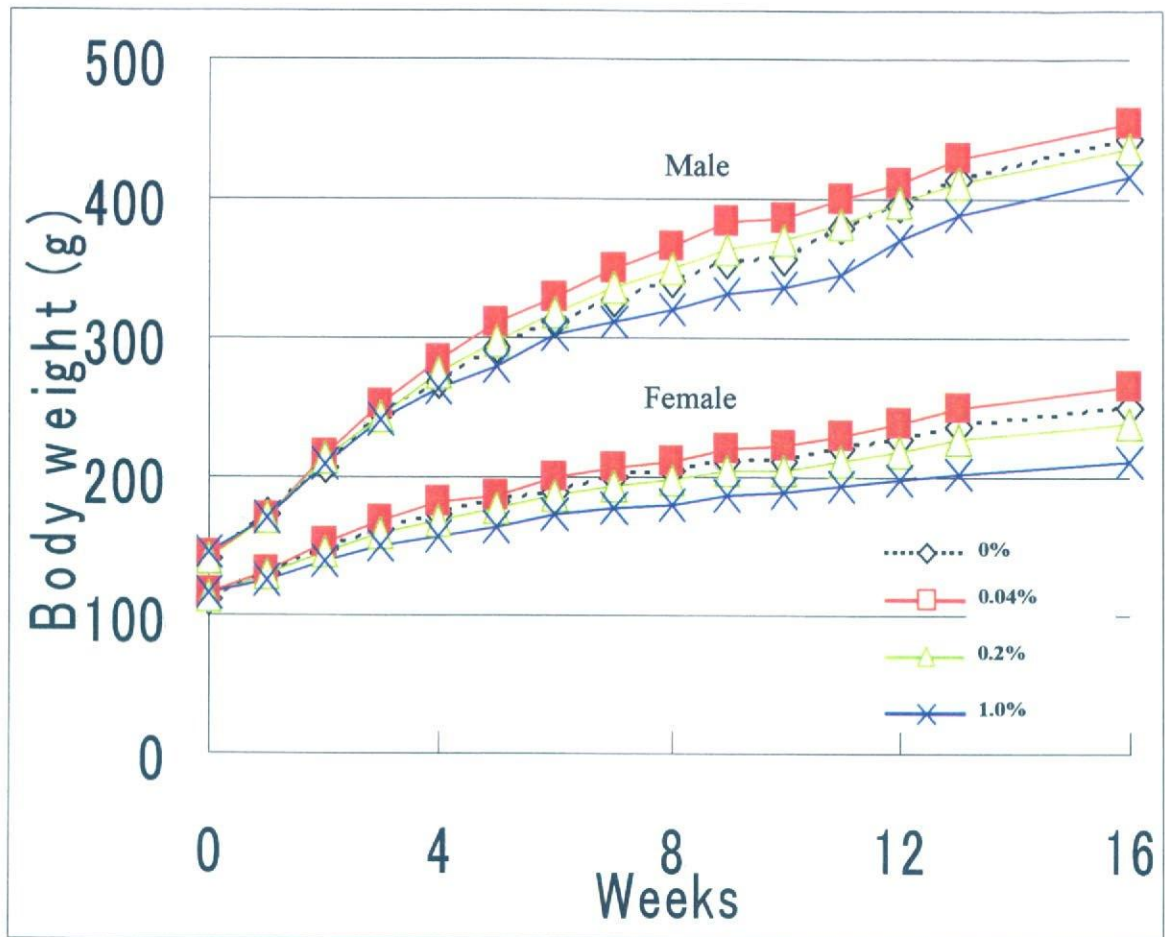


図2 ラット体重の推移(ホコッシ抽出物の1年間反復投与毒性試験)

