

Table 12 Histopathological findings in rats treated with the enzymatically-decomposed rutin by dietary administration for 52 weeks. (Continued)

ORGAN FINDING	SEX TEST ARTICLE DOSE GRADE	MALE									
		CONTROL		0.04%		0.20%		1%		5%	
		-	+ + + + + + +	-	+ + + + + + +	-	+ + + + + + +	-	+ + + + + + +	-	+ + + + + + +
ADRENAL GLAND		18	20	20	20	20	19	20	20	19	
APLASIA' MEDULLA' UNILATERAL		18 0 0 0	20 0 0 0	19 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	
CYST' CORTEX		17 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	
GANGLIONEUROMA' BENIGN		17 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	
HEMORRHAGE' CYSTIC' CORTICAL		18 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	
HYPERPLASIA' NODULAR' CORTICAL		18 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	
HYPERTROPHY' CORTICAL CELL		17 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	
VACUOLIZATION' CYTOPLASMIC' CORTICAL CELL		17 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	17 3 0 0	17 2 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	17 2 0 0	
TESTIS		18	20	20	20	20	19	20	20	19	
TUBULAR ATROPHY		16 0 2 0	19 1 0 0	19 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	
EPIDIDYMIS		18	20	20	20	20	19	20	20	19	
HYPERTROPHY' EPITHELIAL CELL' EFFERENT DUCT		16 1 1 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	
HYOSPERMIA		16 0 2 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	
VACUOLIZATION' CYTOPLASMIC' EPITHELIAL CELL		10 8 0 0	5 15 0 0	13 7 0 0	10 10 0 0	10 10 0 0	10 9 0 0	10 10 0 0	10 10 0 0	10 9 0 0	
PROSTATE		18	20	20	20	20	19	20	20	19	
ACCUMULATION' CELL DEBRIS' ACINI		15 3 0 0	19 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	16 3 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	16 3 0 0	
CELLULAR INFILTRATION' INFLAMMATORY		18 0 0 0	20 0 0 0	19 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	
SEMINAL VESICLE		18	20	20	20	20	19	20	20	19	
CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL		18 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	18 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	18 1 0 0	
SKELETAL MUSCLE		18	20	20	20	20	19	20	20	19	
CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL		18 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	18 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	18 1 0 0	
SUBCUTIS		18	20	20	20	20	19	20	20	19	
HEMANGIOSARCOMA		18 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	
SARCOMA' NOS		18 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	
MAMMARY GLAND		14	18	15	19	15	15	19	19	15	
CELLULAR INFILTRATION' INFLAMMATORY		14 0 0 0	18 0 0 0	15 0 0 0	19 0 0 0	15 0 0 0	15 0 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0	15 0 0 0	
DEGENERATION' ALVEOLAR/DUCTAL		14 0 0 0	18 0 0 0	15 0 0 0	19 0 0 0	15 0 0 0	15 0 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0	15 0 0 0	
DEPOSIT' PIGMENT		14 0 0 0	17 1 0 0	15 0 0 0	19 0 0 0	15 0 0 0	15 0 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0	15 0 0 0	
DILATATION' DUCT		14 0 0 0	18 0 0 0	15 0 0 0	19 0 0 0	15 0 0 0	15 0 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0	15 0 0 0	
MINERALIZATION		14 0 0 0	18 0 0 0	15 0 0 0	19 0 0 0	15 0 0 0	15 0 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0	15 0 0 0	

--:NOT REMARKABLE.+ :SLIGHT.++ :MODERATE.+++ :MARKED

Table 12 Histopathological findings in rats treated with the enzymatically-decomposed rutin by dietary administration for 52 weeks. (Continued)

ORGAN FINDING	SEX TEST ARTICLE DOSE	MALE			
		CONTROL	0.04%	0.20%	1% 5%
	GRADE	- + + + + +	- + + + + +	- + + + + +	- + + + + +
FEMUR BONE MARROW	NO.OF ANIMALS	18	20	20	19
CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL		18 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	18 0 1 0
STERNUM BONE MARROW	NO.OF ANIMALS	18	20	20	19
CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL		18 0 0 0	19 0 1 0	20 0 0 0	18 0 1 0
EYE	NO.OF ANIMALS	18	20	20	19
ATROPHY' RETINA' FOCAL		17 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	18 1 0 0
CATARACT		18 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
HARDERIAN GLAND	NO.OF ANIMALS	18	20	20	19
CELLULAR INFILTRATION' MONONUCLEAR CELL		18 0 0 0	18 2 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
ADIPOSE TISSUE	NO.OF ANIMALS	18	20	20	19
LIPOMA' ABDOMINAL CAVITY		18 0 0 0	20 0 0 0	19 1 0 0	19 0 0 0
LIPOMA' PERIEPIDIDYMIS		17 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
PREPUTIAL GLAND	NO.OF ANIMALS	18	20	20	19
ABSCESS		18 0 0 0	19 1 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
CELLULAR INFILTRATION' MONONUCLEAR CELL		12 6 0 0	18 2 0 0	15 5 0 0	13 4 2 0
LYMPH NODE	NO.OF ANIMALS	18	20	20	19
CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL' ABDOMINAL LN		18 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	18 0 1 0
PLASMACYTOSIS' POPLTEAL LN		18 0 0 0	20 0 0 0	19 0 1 0	19 0 0 0

--:NOT REMARKABLE,+ :SLIGHT,++:MODERATE,+++ :MARKED  
LN:LYMPH NODE



Table 12 Histopathological findings in rats treated with the enzymatically-decomposed rutin by dietary administration for 52 weeks. (Continued)

ORGAN FINDING	SEX	TEST ARTICLE DOSE	FEMALE							
			CONTROL	0.04%	0.20%	1%	5%			
								GRADE	GRADE	GRADE
BRAIN										
DILATATION' VENTRICLE			20	20	20	20	20	19		
MINERALIZATION' VENTRICLE			20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0		
			20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0		
SPINAL CORD			20	20	20	20	20	19		
SWELLING' AXONAL			20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0		
HEART										
CARDIOMYOPATHY			20	20	20	20	20	19		
CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL			20 0 0 0	19 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	18 1 0 0		
HEMORRHAGE' EPICARDIAL			20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0		
			20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0		
LUNG										
CALCIFICATION' VESSEL			20	20	20	20	20	19		
CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL			20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 1 0 0	15 4 0 0		
FOCAL FIBROSIS' ALVEOLAR WALL			20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0		
GRANULOMA			20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0		
HISTIOCYTOSIS' ALVEOLAR			20 0 0 0	17 3 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	18 1 0 0		
TRACHEA										
CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL			20	20	20	20	20	19		
CELLULAR INFILTRATION' MONONUCLEAR CELL			20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0		
DILATATION' GLAND' TRACHEAL			19 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0		
			20 0 0 0	17 3 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	18 1 0 0		

--:NOT REMARKABLE,+;SLIGHT,++;MODERATE,+++;MARKED

Table 12 Histopathological findings in rats treated with the enzymatically-decomposed rutin by dietary administration for 52 weeks. (Continued)

ORGAN FINDING	SEX	TEST ARTICLE DOSE	FEMALE				
			CONTROL	0.04%	0.20%	1%	5%
GRADE			- + ++ +++	- + ++ +++	- + ++ +++	- + ++ +++	- + ++ +++
NO.OF ANIMALS							
LIVER			20	20	20	20	19
CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL			20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
CHOLANGITIS' EXTRAHEPATIC			20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
DEPOSIT' PIGMENT' GLISSON'S SHEATH			20 0 0 0	19 0 1 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
DEPOSIT' PIGMENT' KUPFFER CELL			20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
FOCAL NECROSIS' HEPATOCELLULAR			20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
FOCUS ALTERAD HEPATOCYTE' CLEAR CELL			20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
FOCUS ALTERAD HEPATOCYTE' VACUOLATED CELL			20 0 0 0	19 1 0 0	20 0 0 0	19 1 0 0	18 1 0 0
HEMATOPOIESIS' EXTRAMEDULLARY			20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
HYPERTROPHY' BILE DUCT			20 0 0 0	19 1 0 0	18 2 0 0	19 1 0 0	19 0 0 0
HYPERTROPHY' HEPATOCELLULAR			20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
INCREASE' MITOTIC FIGURE' HEPATOCELLULAR			20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
MICROGRANULOMA			20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
NECROSIS' COAGULATIVE			20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
SINGLE CELL NECROSIS' HEPATOCELLULAR			20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
SPONGIOSIS HEPATIS			20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
PANCREAS			20	20	20	20	19
ABSCESS			20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
ATROPHY' ACINAR CELL' FOCAL			19 1 0 0	19 1 0 0	18 2 0 0	19 1 0 0	18 1 0 0
CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL			20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
DEPOSIT' PIGMENT			20 0 0 0	20 0 0 0	19 1 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0

--:NOT REMARKABLE,+ :SLIGHT,++:MODERATE,+++ :MARKED



Table 12 Histopathological findings in rats treated with the enzymatically-decomposed rutin by dietary administration for 52 weeks. (Continued)

ORGAN FINDING	SEX TEST ARTICLE DOSE GRADE	FEMALE				
		CONTROL	0.04%	0.20%	1%	5%
KIDNEY		20	20	20	20	19
CELL DEBRIS' INFLAMMATORY' PELVIS		17 3 0 0	18 2 0 0	19 1 0 0	17 3 0 0	17 2 0 0
CELLULAR INFILTRATION' INFLAMMATORY' PELVIS		20 0 0 0	19 1 0 0	19 1 0 0	19 1 0 0	19 0 0 0
CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
CHANGE' BASOPHILIC' RENAL TUBULE		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
CHRONIC NEPHROPATHY		19 1 0 0	19 1 0 0	19 1 0 0	20 0 0 0	18 1 0 0
CYST		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
DEGENERATION' RENAL TUBULE' FOCAL		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	18 1 0 0
DILATATION' PELVIS		19 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 1 0 0	18 0 1 0
DILATATION' RENAL TUBULE		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
FOCUS' LYMPHOID CELL		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
HYALINE CAST		18 2 0 0	19 1 0 0	18 2 0 0	19 1 0 0	17 2 0 0
HYPERPLASIA' TRANSITIONAL CELL' PELVIS		19 1 0 0	19 1 0 0	19 1 0 0	15 5 0 0	18 1 0 0
MINERALIZATION' CORTICO-MEDULLARY JUNCTION		4 15 1 0	6 13 1 0	5 14 1 0	7 13 0 0	0 19 0 0
MINERALIZATION' PELVIS		9 11 0 0	12 7 1 0	14 5 1 0	11 8 1 0	11 6 2 0
NECROSIS' PAPILLARY		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
NECROSIS' RENAL TUBULE		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
PYKNOSES' COLLECTING DUCT		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
URINARY BLADDER		20	20	20	20	19
CELLULAR INFILTRATION' INFLAMMATORY		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
PROTEINACEOUS PLUG		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
THICKENING' MUCOSA		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
VACUOLIZATION' CYTOPLASMIC' MUCOSAL CELL		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
SPLEEN		20	20	20	20	19
CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
DEPOSIT' HEMOSIDERIN		0 13 7 0	4 15 1 0**	1 16 3 0	1 16 3 0	2 12 5 0
HEMATOPOIESIS' EXTRAMEDULLARY		20 0 0 0	19 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
THYMUS		20	20	20	20	19
ATROPHY		5 13 2 0	13 7 0 0 *	15 5 0 0 **	14 6 0 0 *	10 9 0 0
CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
CYST		20 0 0 0	20 0 0 0	18 2 0 0	18 2 0 0	18 1 0 0
HEMORRHAGE		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
LYMPHOID HYPERPLASIA		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 1 0 0	19 0 0 0
NECROSIS		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0

-NOT REMARKABLE;+SLIGHT;+MODERATE;+++MARKED  
\* : P<0.05; \*\* : P<0.01 (SIGNIFICANT DIFFERENCE FROM CONTROL)

Table 12 Histopathological findings in rats treated with the enzymatically-decomposed rutin by dietary administration for 52 weeks. (Continued)

ORGAN FINDING	SEX TEST ARTICLE DOSE						FEMALE					
	CONTROL		0.04%		0.20%		1%		5%			
	- + + + + +	- + + + + +	- + + + + +	- + + + + +	- + + + + +	- + + + + +	- + + + + +	- + + + + +	- + + + + +			
MESENTERIC LN	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19		
ATROPHY' PARACORTEK	19 1 0 0	12 8 0 0 *	17 3 0 0	18 2 0 0	15 4 0 0	19 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0		
CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL	20 0 0 0	20 0 0 0	19 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0		
CYST' SINUSOIDAL	20 0 0 0	20 0 0 0	19 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0		
ERYTHROCYTES' SINUS	19 1 0 0	19 1 0 0	17 3 0 0	18 2 0 0	18 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0		
HYPERPLASIA' ENDOTHELIAL CELL	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0		
SINUS HISTIOCYTOSIS	20 0 0 0	19 1 0 0	19 1 0 0	18 2 0 0	18 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0		
TONGUE	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19		
CELLULAR INFILTRATION' INFLAMMATORY	20 0 0 0	19 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0		
PAROTID GLAND	20	20	20	20	20	20	S	20	20	19		
CELLULAR INFILTRATION' MONONUCLEAR CELL	19 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0		
LACRIMAL GLAND	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19		
CELLULAR INFILTRATION' INFLAMMATORY	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0		
CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0		
CELLULAR INFILTRATION' MONONUCLEAR CELL' PERIDUI'	16 3 1 0	15 5 0 0	14 6 0 0	14 6 0 0	16 3 0 0	16 3 0 0	14 6 0 0	14 6 0 0	16 3 0 0	16 3 0 0		
HARDERIAN ALTERATION	20 0 0 0	19 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 1 0 0	20 0 0 0	19 1 0 0	19 1 0 0	18 1 0 0	18 1 0 0		
SUBMANDIBULAR LN	20	20	20	20	20	20	20	20	20	18		
CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	18 0 0 0		
DEPOSIT' PIGMENT	16 4 0 0	18 2 0 0	12 8 0 0	15 5 0 0	15 3 0 0	15 3 0 0	15 5 0 0	15 5 0 0	15 3 0 0	15 3 0 0		
ERYTHROCYTES' SINUS	19 1 0 0	20 0 0 0	19 1 0 0	20 0 0 0	17 1 0 0	17 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	17 1 0 0	17 1 0 0		
HEMORRHAGE	19 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	18 0 0 0	18 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	18 0 0 0	18 0 0 0		
HYPERPLASIA' LYMPHOCYTE	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	18 0 0 0		
PLASMACYTOSIS	16 4 0 0	17 3 0 0	17 3 0 0	18 2 0 0	16 2 0 0	16 2 0 0	18 2 0 0	18 2 0 0	16 2 0 0	16 2 0 0		
STOMACH	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19		
CYST' LAMINA PROPRIA	19 1 0 0	20 0 0 0	19 1 0 0	19 1 0 0	16 3 0 0	16 3 0 0	19 1 0 0	19 1 0 0	16 3 0 0	16 3 0 0		
EDEMA' SUBMUCOSA'	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	18 1 0 0	18 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	18 1 0 0	18 1 0 0		
METAPLASIA' SQUAMOUS CELL	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	18 1 0 0	18 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	18 1 0 0	18 1 0 0		
VACUOLIZATION' CYTOPLASMIC' SQUAMOUS CELL	18 2 0 0	19 1 0 0	19 1 0 0	19 1 0 0	18 1 0 0	18 1 0 0	19 1 0 0	19 1 0 0	18 1 0 0	18 1 0 0		
DUODENUM	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19		
DILATATION' CYSTIC' CRYPT	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0		

-:NOT REMARKABLE,+:SLIGHT,++:MODERATE,+++:MARKED  
LN:LYMPH NODE  
\*: P<0.05 (SIGNIFICANT DIFFERENCE FROM CONTROL)



Table 12 Histopathological findings in rats treated with the enzymatically-decomposed rutin by dietary administration for 52 weeks. (Continued)

ORGAN FINDING	SEX TEST ARTICLE DOSE	FEMALE								
		CONTROL	0.04%	0.20%	1%	5%				
		GRADE	GRADE	GRADE	GRADE	GRADE				
ILEUM										
CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL' SUBMUCOSA	NO.OF ANIMALS	20	20	20	20	20	20	20	19	19
		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0
CECUM										
CALCIFICATION' LAMINA PROPRIA	NO.OF ANIMALS	20	20	20	20	20	20	20	19	19
CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0
		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0
COLON										
CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL	NO.OF ANIMALS	20	20	20	20	20	20	20	19	19
		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0
RECTUM										
CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL	NO.OF ANIMALS	20	20	20	20	20	20	20	19	19
EDEMA' SUBMUCOSA		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0
		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0
PITUITARY GLAND										
ADENOMA' PARS DISTALIS	NO.OF ANIMALS	20	20	20	20	20	20	20	19	19
CYST' PARS DISTALIS		20 0 0 0	19 1 0 0	19 1 0 0	18 2 0 0	18 2 0 0	18 2 0 0	17 2 0 0	17 2 0 0	17 2 0 0
CYST' PARS INTERMEDIA		19 1 0 0	20 0 0 0	17 3 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0
HYPERPLASIA' PARS DISTALIS		20 0 0 0	19 1 0 0	17 3 0 0	19 1 0 0	19 1 0 0	19 1 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0
		17 3 0 0	19 1 0 0	17 3 0 0	18 2 0 0	18 2 0 0	18 2 0 0	15 4 0 0	15 4 0 0	15 4 0 0
THYROID GLAND										
ADENOMA' C-CELL	NO.OF ANIMALS	20	20	20	20	20	20	20	19	19
CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0
DYSPLASIA		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0
HYPERPLASIA' C-CELL		18 2 0 0	17 3 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	17 2 0 0	17 2 0 0
HYPERPLASIA' CYSTIC' FOLLICULAR CELL		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0
HYPERPLASIA' FOCAL' FOLLICULAR CELL		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0
HYPERTROPHY' FOLLICULAR CELL		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0
PARATHYROID GLAND										
ADENOMA	NO.OF ANIMALS	19	20	20	20	20	20	20	19	19
HYPERPLASIA' NODULAR		19 0 0 0	20 0 0 0	19 1 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0
		19 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	18 1 0 0	18 1 0 0	18 1 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0	19 0 0 0

--:NOT REMARKABLE,+;SLIGHT,++;MODERATE,+++;MARKED

Table 12 Histopathological findings in rats treated with the enzymatically-decomposed rutin by dietary administration for 52 weeks. (Continued)

ORGAN FINDING	SEX TEST ARTICLE DOSE GRADE	FEMALE				
		CONTROL	0.04%	0.20%	1%	5%
		- + ++ +++	- + ++ +++	- + ++ +++	- + ++ +++	- + ++ +++
ADRENAL GLAND		20	20	20	20	19
APLASIA' MEDULLA' UNILATERAL		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
CYST'CORTEX		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	18 1 0 0
GANGLIONEUROMA' BENIGN		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
HEMORRHAGE' CYSTIC' CORTICAL		20 0 0 0	19 1 0 0	20 0 0 0	18 2 0 0	19 0 0 0
HYPERPLASIA' NODULAR' CORTICAL		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	18 1 0 0
HYPERTROPHY' CORTICAL CELL		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
VACUOLIZATION' CYTOPLASMIC' CORTICAL CELL		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
OVARY		20	20	20	20	19
ATROPHY		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 1 0 0	19 0 0 0
CYST' CORPUS LUTEUM		20 0 0 0	19 1 0 0	19 1 0 0	19 1 0 0	19 0 0 0
CYST' FOLLICULAR		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	18 1 0 0
DEPOSIT' PIGMENT		14 6 0 0	17 3 0 0	17 3 0 0	12 8 0 0	17 2 0 0
HEMORRHAGE		18 2 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
UTERUS		20	20	20	20	19
ATROPHY' ENDOMETRIUM		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 1 0 0	19 0 0 0
CELLULAR INFILTRATION' INFLAMMATORY' ENDOMETRIU		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	18 1 0 0
DILATATION' ENDOMETRIAL GLAND		18 2 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	17 2 0 0
DILATATION' LUMEN		18 2 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	17 2 0 0
HYPERPLASIA' CYSTIC' ENDOMETRIUM		20 0 0 0	19 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
POLYP' ENDOMETRIAL STROMA		18 2 0 0	19 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	16 3 0 0
SKELETAL MUSCLE		20	20	20	20	19
CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
SUBCUTIS		20	20	20	20	19
HEMANGIOSARCOMA		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
SARCOMA' NOS		20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	19 0 0 0
MAMMARY GLAND		19	20	20	20	16
CELLULAR INFILTRATION' INFLAMMATORY		19 0 0 0	19 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	16 0 0 0
DEGENERATION' ALVEOLAR/DUCTAL		19 0 0 0	18 2 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	16 0 0 0
DEPOSIT' PIGMENT		19 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	16 0 0 0
DILATATION' DUCT		19 0 0 0	18 2 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	16 0 0 0
MINERALIZATION		18 1 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	20 0 0 0	16 0 0 0

-.:NOT REMARKABLE,+;SLIGHT,++;MODERATE,+++;MARKED



Table 12 Histopathological findings in rats treated with the enzymatically-decomposed rutin by dietary administration for 52 weeks. (Continued)

ORGAN FINDING	SEX TEST ARTICLE DOSE	FEMALE				
		CONTROL	0.04%	0.20%	1%	5%
GRADE		- + + + + +	- + + + + +	- + + + + +	- + + + + +	- + + + + +
FEMUR BONE MARROW CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL	NO.OF ANIMALS	20 20 0 0 0	20 20 0 0 0	20 20 0 0 0	20 20 0 0 0	19 19 0 0 0
STERNUM BONE MARROW CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL	NO.OF ANIMALS	20 20 0 0 0	20 20 0 0 0	20 20 0 0 0	20 20 0 0 0	19 19 0 0 0
EYE ATROPHY' RETINA' FOCAL CATARACT	NO.OF ANIMALS	20 19 1 0 0 20 0 0 0	20 20 0 0 0 20 0 0 0	20 19 1 0 0 20 0 0 0	20 19 1 0 0 20 0 0 0	19 18 1 0 0 18 1 0 0
HARDERIAN GLAND CELLULAR INFILTRATION' MONONUCLEAR CELL	NO.OF ANIMALS	20 20 0 0 0	20 20 0 0 0	20 20 0 0 0	20 20 0 0 0	19 19 0 0 0
ADIPOSE TISSUE LIPOMA' ABDOMINAL CAVITY LIPOMA' PERIEPIDIDYMIS	NO.OF ANIMALS	20 20 0 0 0 20 0 0 0	20 19 1 0 0 20 0 0 0	20 20 0 0 0 20 0 0 0	20 20 0 0 0 20 0 0 0	19 19 0 0 0 19 0 0 0
CLITORAL GLAND ABSCESS CELLULAR INFILTRATION' INFLAMMATORY DILATATION' DUCT	NO.OF ANIMALS	20 20 0 0 0 15 5 0 0 20 0 0 0	20 20 0 0 0 17 3 0 0 20 0 0 0	20 18 2 0 0 16 4 0 0 20 0 0 0	20 20 0 0 0 16 4 0 0 20 0 0 0	19 19 0 0 0 16 3 0 0 17 1 1 0
LYMPH NODE CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL' ABDOMINAL I PLASMACYTOSIS' POPLITEAL LN	NO.OF ANIMALS	20 20 0 0 0 20 0 0 0	20 20 0 0 0 20 0 0 0	20 20 0 0 0 20 0 0 0	20 20 0 0 0 20 0 0 0	19 19 0 0 0 19 0 0 0

--:NOT REMARKABLE,+:SLIGHT,++:MODERATE,+++MARKED LN:LYMPH NODE

Table 13 Incidence of histopathological findings in renal pelvis of rats treated with the enzymatically-decomposed rutin by dietary administration for 52 weeks.

SEX	ORGAN FINDING	CONTROL		0.04%		0.20%		1%		5%																
		-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total										
MALE	KIDNEY	18				20			20			19														
	CELL DEBRIS' INFLAMMATORY' PELVIS	11	6	1	0	7	15	5	0	0	5	17	3	0	0	3	13	7	0	0	7	8	10	1	0	11
	CELLULAR INFILTRATION' INFLAMMATORY' PELVIS	15	2	1	0	3	20	0	0	0	0	17	2	1	0	3	18	2	0	0	2	14	5	0	0	5
	HYPERPLASIA' TRANSITIONAL CELL' PELVIS	15	2	1	0	3	16	4	0	0	4	17	3	0	0	3	18	2	0	0	2	11	8	0	0	8
	MINERALIZATION' PELVIS	17	0	1	0	1	15	5	0	0	5	17	3	0	0	3	16	4	0	0	4	6	12	1	0	13*
	INCIDENCE OF ANIMALS WITH FINDINGS IN RENAL PELVIS	7/18		8/20		5/20		8/20		15/19*																
FEMALE	KIDNEY	20				20			20			19									17	2	0	0	2	
	CELL DEBRIS' INFLAMMATORY' PELVIS	17	3	0	0	3	18	2	0	0	2	19	1	0	0	1	17	3	0	0	3	17	2	0	0	2
	CELLULAR INFILTRATION' INFLAMMATORY' PELVIS	20	0	0	0	0	19	1	0	0	1	19	1	0	0	1	19	1	0	0	1	19	0	0	0	0
	HYPERPLASIA' TRANSITIONAL CELL' PELVIS	19	1	0	0	1	19	1	0	0	1	19	1	0	0	1	15	5	0	0	5	18	1	0	0	1
	MINERALIZATION' PELVIS	9	11	0	0	11	12	7	1	0	8	14	5	1	0	6	11	8	1	0	9	11	6	2	0	8
	INCIDENCE OF ANIMALS WITH FINDINGS IN RENAL PELVIS	11/20		8/20		7/20		11/20		8/19																

\*: P<0.05 (SIGNIFICANT DIFFERENCE FROM CONTROL)



Appendix 1 Macroscopic findings of sacrificed rats treated with the enzymatically-decomposed rutin by dietary administration for 52 weeks.

SEX	TEST ARTICLE AND DOSE	ANIMAL NO.	ORGAN	FINDING
MALE	CONTROL	1114	SUBCUTIS	MASS' LEFT CHEEK
		1115	SUBCUTIS	MASS' RIGHT ABDOMEN
	5%	1502	APPEARANCE FEMUR	STAINING' UROGENITAL REGION COLORED' YELLOWISH
FEMAL	5%	2517	APPEARANCE LIVER	STAINING' UROGENITAL REGION ENLARGEMENT FOCUS' RED
			PANCREAS	DILATATION' EXTRAHEPATIC BILE DUCT ENLARGEMENT
			ABDOMINAL CAVITY FLUID	
			LYMPH NODE	ENLARGED' PERIPANCREATIC

Appendix 2 Histopathological findings of sacrificed rats treated with the enzymatically-decomposed rutin by dietary administration for 52 weeks.

TEST ARTICLE AND DOSE	ANIMAL NO.	ORGAN	FINDING	GRADE	
CONTROL	1114	KIDNEY	CYST	+	
			MINERALIZATION' PELVIS	+	
			DEPOSIT' HEMOSIDERIN	+	
		SPLEEN	ATROPHY	+	
		THYMUS	CELLULAR INFILTRATION' MONONUCLEAR CELL	+	
		PAROTID GLAND	HEMORRHAGE	+	
	SUBMANDIBULAR LN	HEMANGIOSARCOMA	+		
		SUBCUTIS			
	1115	PANCREAS	DEPOSIT' PIGMENT	+	
		SPLEEN	HEMATOPOIESIS' EXTRAMEDULLARY	+	
		PITUITARY GLAND	CYST' PARS INTERMEDIA	+	
		EPIDIDYMIS	VACUOLIZATION' CYTOPLASMIC' EPITHELIAL CELL	+	
		SUBCUTIS	SARCOMA' NOS	+	
		PREPUTIAL GLAND	CELLULAR INFILTRATION' MONONUCLEAR CELL	+	
5%	1502	HEART	CARDIOMYOPATHY	+	
		TRACHEA	DILATATION' GLAND' TRACHEAL	+	
		LIVER	CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL	+	
		KIDNEY	MINERALIZATION' PELVIS	++	
	URINARY BLADDER		CELL DEBRIS' INFLAMMATORY' PELVIS	+	
			PROTEINACEOUS PLUG	+	
		SPLEEN	HEMATOPOIESIS' EXTRAMEDULLARY	+	
			CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL	+	
	THYMUS		ATROPHY	+	
		MESENTERIC LN	ATROPHY' PARACORTEX	++	
		EPIDIDYMIS	VACUOLIZATION' CYTOPLASMIC' EPITHELIAL CELL	+	
		FEMUR BONE MARROW	CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL	++	
		STERNUM BONE MARROW	CELLULAR INFILTRATION' LEUKEMIA CELL	++	
		PREPUTIAL GLAND	CELLULAR INFILTRATION' MONONUCLEAR CELL	+	
			ABSCESS	+	
		2517	HEART LIVER	HEMORRHAGE' EPICARDIAL	+
				NECROSIS' COAGULATIVE	+
				CHOLANGITIS' EXTRAHEPATIC	++
				HYPERPLASIA' BILE DUCT	+
			PANCREAS KIDNEY	ABSCESS	+
NECROSIS' RENAL TUBULE	+				
THYMUS STOMACH ADRENAL GLAND UTERUS	MINERALIZATION' CORTICO-MEDULLARY JUNCTION		+		
	NECROSIS		+		
	EDEMA' SUBMUCOSA'		++		
	HYPERTROPHY' CORTICAL CELL		++		
	CELLULAR INFILTRATION' INFLAMMATORY' ENDOMETRIUM		+		

-NOT REMARKABLE +:SLIGHT, ++:MODERATE, +++:MARKED  
LN:Lymph Node



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）

分担研究報告書

## 既存添加物の発がん性等に関する研究

・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・

分担研究者 関田清司 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター  
毒性部室長

研究協力者 小川幸男 同 毒性部室長  
菅野 純 同 毒性部部長

研究要旨 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  $\gamma$ -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、変異肝細胞巣の出現頻度（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髓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（NOAEL）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  $2.1 \pm 0.6$  mg/kg/day、雌で  $2.5 \pm 0.6$  mg/kg/day）と推定した。また、変異肝細胞巣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。

## A. 研究目的

既存添加物の安全性を評価する上で、その一部については、評価に必要な資料が存在しないことから、反復投与毒性試験などの実施が必要とされている。その様なものの中の一つであるジャマイカカシヤ抽出物のラットによる90日間反復投与毒性試験を実施したところ、5000ppm 添加飼料投与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毒性に関する情報を得る目的で、ラットを用いた1年間反復投与毒性試験を行った。

ジャマイカカシヤ抽出物はニガキ科ジャマイカカシヤの幹枝または樹皮より、水抽出されたもので、有効成分として苦味成分のクワシン (quassin) とネオクワシン (neo-quassin) を含有し、苦味料として用いられている<sup>1)</sup>。

## B. 研究方法

### 1. 被験物質

Stan chemical international limited (英国) 製造のジャマイカカシヤ抽出物、ロット番号 No.2019301/2 及び No.2019551 を用いた。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% をそれぞれ含有していた (HPCL 分析、Stan chemical international limited 添付資料)。試験には、ロットによる成分の違いを避けるため両製品を等量混合して用いた。

### 2. 動物及び飼育条件

5週齢の F344 ラット (F344/DuCrj, SPF、日本チャールスリバー株式会社) 雌雄各 110 匹を入手し、1週間の馴化飼育後、健康な雌雄各 100 匹を試験に供した。

飼育は室温 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) に制御された動物室で、ポ

リカーボネート製ケージ (W26 cm×L42 cm×H17 cm、床敷使用) に 2~3 匹ずつ収容し行った。

### 3. 投与方法、投与用量及び群構成

被験物質の投与はヒトでの摂取経路を考慮し、混餌投与で行った。

用量設定は、先に行ったラットの 90 日間反復投与毒性試験 (0、50、500 及び 5000ppm 添加飼料) の結果を参考に決定した。すなわち 90 日間反復投与毒性試験では、肝臓重量の増加と肝細胞の肥大が 5000ppm 投与群の雌雄で認められた。また、毒性学的意義は不明であるが血清アルカリフォスファターゼの減少が雄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 及び 5ppm を設定した。

群構成は下記の表に示した。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別に各個体のノルム値を求め<sup>2)</sup>、最初に健康で、ノルム値の小さい雌雄各 100 匹を選んだ。次いで、雌雄別に、体重を層別化し、各群の平均体重が近づくように割り付けた。

#### 【群構成】

群	添加濃度 (ppm)	動物数	
		雄 (個体番号)	雌 (個体番号)
対照	0	20 (1-20)	20 (501-520)
5 ppm	5	20 (21-40)	20 (521-540)
50 ppm	50	20 (41-60)	20 (541-560)
500 ppm	500	20 (61-80)	20 (561-580)
5000 ppm	5000	20 (81-100)	20 (581-600)



#### 4. 添加飼料の調製

所定量の被験物質を秤量し、基礎飼料 (CRF-1 粉末飼料、オリエンタル酵母工業株式会社) と混合して 5、50、500 及び 5000 (w/w) ppm の濃度になるように添加飼料を調製した。5000ppm 添加飼料では、被験物質特有の臭いが感じ取れた。調製は飼料中の被験物質の安定性を 4 週間まで確認していたことから、2~4 週間に 1 度、当研究所で行った。安定性の分析は (財) 日本食品分析センターで行った。

#### 5. 検査項目及び方法

##### 5-1) 一般状態、体重、摂餌量及び被験物質摂取量

一般状態の観察は、毎日 1 回行った。体重測定は投与開始日、投与開始後 3 及び 7 日、以後 3 ヶ月までは週 1 回、3~6 ヶ月は隔週、以後は 4 週に 1 回行った。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。また、被験物質摂取量 (mg/kg/日) を体重測定日に、その日の平均体重、平均摂餌量及び被験物質添加濃度より求めた。

##### 5-2) 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)、平均赤血球色素量 (MCH)、平均赤血球色素濃度 (MCHC) を Sysmex K-4500 (シスメックス (株)) を用い全血について希釈法で測

定した。また、ライト染色血液塗抹標本を製し、白血球百分比を MICROX HEG50S (シスメックス (株)) で測定した。

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)、アルカリホスファターゼ (ALP)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、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)、 $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ ( $\gamma$ -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 7180 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。

##### 5-3) 尿検査

投与終了 1 週間前に、全生存動物について pH、タンパク質、ケトン体、ブドウ糖、潜血、ビリルビン、ウロビリノーゲンの 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。

##### 5-4) 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、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、舌、眼球、唾液



腺、胸骨、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で固定保存（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、常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色病理標本を作製し、鏡検を行った。鏡検は食品添加物の1年間反復投与毒性試験ガイドラインに準じて対照群と最高用量群を行い、被験物質投与の影響が疑われた臓器（肝臓、腎臓、脾臓、甲状腺）については、影響が疑われた群の下の用量まで行った。

#### 5-5) 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及び臓器重量は、群毎に平均値及び標準偏差を求めた。また有意差検定を行った。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。

尿検査値の有意差検定はグレード分けしたデータを Mann-Whitney のU検定により行った。

病理組織学的検査の有意差検定はグレード分けしたデータは Mann-Whitney のU検定により、また陽性グレード動物の発現頻度（合計動物数）は Fisher の正確確立検定により検定した。

いずれの検定でも、有意差水準は5%とした。

倫理面の配慮：国立医薬品食品衛生研究

所動物実験に関する指針等の動物倫理規定に基づき、動物への苦痛等を避けるため採血などは麻酔下で実施した。

### C. 研究結果

#### 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。

#### 2. 体重及び摂餌量（図1、表1）

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。

#### 3. 被験物質摂取量（表1）

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

#### 4. 血液学的検査（表2、3）

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。



## 5. 血液生化学的検査 (表 4、5)

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変化と考えられた。

雌では、5000ppm 群で TP、Alb、Glc、PL、T-Cho 及び  $\gamma$ -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、偶発的変化と考えられる ChE の増加が 500ppm 群で認められた。

## 6. 尿検査 (表 6)

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。

## 7. 剖検所見

途中死亡動物：切迫解剖例 (33 週、雌 5000ppm 群 No.593) では腎臓の腫瘍(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。

## 8. 臓器重量 (表 7、8)

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。

## 9. 病理組織学的検査 (表 9-1、9-2、9-3、10)

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。

#### D. 考察

苦味料ジャマイカカシヤ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 Gle、T-Cho、PL 及び  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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 群雄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、対照群雄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、ジャマイカカシア抽出物の F344 ラットによる中期肝発がん性試験で GST-P 陽性肝細胞巣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<sup>3)</sup>。同様に、今回の雄の結果はジャマイカカシア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、ジャマイカカシア抽出物の無毒性量 (NOAEL) 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  $2.1 \pm 0.6$  mg/kg/day、

雌で  $2.5 \pm 0.6$  mg/kg/day) と推定した。また、変異肝細胞巣の発現頻度 (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. 結語

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  $\gamma$ -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、変異肝細胞巣の発現頻度 (動物数) と大きさの増加が雄の 5000ppm 群で認められた。また、慢性進