

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

反復投与毒性や発がん性試験等の実施による

既存添加物の安全性に関する研究

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 西川秋佳

平成 18 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書	1
反復投与毒性や発がん性試験等の実施による既存添加物の安全性に関する研究	
II. 分担研究報告書	
1. トコトリエノールの安全性評価に関する研究	17
西川秋佳	
2. フェルラ酸の安全性評価に関する研究	33
田中卓二	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	65
IV. 研究成果の刊行物・別刷	68

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）
反復投与毒性や発がん性試験等の実施による既存添加物の安全性に関する研究
平成 17 年度総括研究報告書

主任研究者 西川秋佳 国立医薬品食品衛生研究所病理部室長

研究要旨： 穀類やパーム油などに豊富に含まれているトコトリエノールは、ビタミンEと化学構造上の類似性を有し、トコフェロールと同様の抗酸化作用を有することから、酸化防止の目的で食品添加物として使用されている。F344 ラットを用いた 13 週間反復投与毒性試験では、雄の 0.75% 投与群で肝細胞肥大などがみられたことから、無毒性量(NOEL)は 0.19%（雄で 120 mg/kg 体重、雌で 130 mg/kg 体重）と推定されている。今回、Wistar Hannover ラットを用いたトコトリエノールの 1 年間慢性毒性・2 年間発がん性併合試験を実施した。1 年間の慢性毒性試験の雌雄 2.0%群において、造血臓器および肝臓に対する影響が示唆され、病理組織学的検索の結果、肝臓の海綿状変性が認められたことから、NOEL は雌雄ともに 0.4%（雄で 297 mg/kg 体重、雌で 467 mg/kg 体重）と推定された。がん原性試験は 2 年間の動物実験を終了し、剖検にて雌雄 2.0%群において肝臓の結節性病変が多発しているのが観察され、それらは病理組織学的に結節性再生性過形成、肝細胞腺腫ないし肝細胞癌であることが確認された。一方、イネ科植物の細胞壁に豊富に含まれているフェルラ酸の発がん性の有無を明らかにする目的で、最高用量を 2.0%とし、公比 2 で、1.0%、0.5% および 0% (対照群)の 4 混餌投与群を設定した F344 ラットによる 2 年間（106 週）の発がん性試験を行った。その結果、血液生化学検査にフェルラ酸投与によると考えられる変化を認めなかった。また、腫瘍を含む各種増殖性病変の発生頻度に群間で用量依存性の有意な差を認めず、フェルラ酸投与に起因すると考えられる腫瘍性病変の発生は観察されなかった。このことから、フェルラ酸に発がん性は認められないと考えられた。

A. 研究目的

近年、天然性添加物の開発および利用が盛んとなり、一般食品あるいは健康食品にも広範に利用されている。これは、消費者の自然・天然指向によるところが大きい。しかし、このような天然性添加物の多くは、安全性試験による健康影響の評価がなされていないのが現状であり、広く消費者等からその安全性の評価が求められている。

穀類やパーム油などに豊富に含まれているトコトリエノールは、ビタミンEと化学構造上の類似性を有し、トコフェロールと同様の抗酸化作用を有することから、酸化防止の目的で食品添加物として使用されている。ラットを用いたトコトリエノールの 13 週間反復投与毒性試験では、無毒性量(NOEL)は

0.19%（雄で 120 mg/kg 体重、雌で 130 mg/kg 体重）と推定され、雄の 0.19%投与群で平均赤血球容積の減少、A/G 比の上昇、血清アルカリフォスファターゼの上昇および相対副腎重量の増加がみられたことから、無影響量(NOEL)は求められていない。慢性毒性試験および癌原性試験は実施されていないことから、今回ラットを用いた 1 年間慢性毒性・2 年間発がん性併合試験を実施した。

一方、イネ科植物の細胞壁に豊富に含まれているフェルラ酸 (4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid)は、その抗酸化活性から、酸化防止剤として食品に利用されている。フェルラ酸の生体影響に関しては、抗変異原作用、腫瘍発生抑制効果、放射線障害防護効果、染色体異常誘発、生殖機能阻害などが知られている。フェルラ酸の急性

毒性に関しては、F344 ラットを用いた試験においてLD₅₀は雄 2445 mg/kg 体重、雌 2113 mg/kg 体重と報告されている。F344 ラットを用いたフェルラ酸混餌投与(0%、0.32%、0.8%、2%、5%)による13週間反復投与試験(亜慢性毒性試験)では、雌雄ともに最高濃度5%投与群で無処置対照群に比べて、平均体重、摂餌量の有意な低下をみている。また、フェルラ酸混餌投与による臓器重量の変化、生化学的検査結果の変化や組織学的な変化はみられたものの用量相関を認めていない。このようにフェルラ酸の急性毒性や亜慢性毒性試験結果が散見されるが、慢性毒性試験ないし発がん性試験の報告はみられず、本研究においてフェルラ酸の慢性毒性・発がん性併合試験を実施することとした。先にフェルラ酸の1年間反復投与試験を実施し、フェルラ酸の1年間反復投与によると考えられる臨床兆候や体重変化、摂餌量の変化、血液学的検査値の変化、血液生化学的検査値の変化、体重および臓器重量の変化は認められず、病理組織学的な異常も認めなかったことを報告した。本報告では、フェルラ酸の慢性毒性・発がん性併合試験のうち発がん性試験の結果について報告する。

B. 研究方法

動物実験は国立医薬品食品衛生研究所および金沢医科大学の動物実験実施規定ガイドラインに沿って実施した。動物飼育については、空調や清潔な住環境の維持に努めた。

<トコトリエノールの慢性毒性・がん原性試験>

パーム油より得られたビタミンE混合物を蒸留により精製したトコトリエノールをエーザイ株式会社(東京)より供与された。トコフェロールを完全に分離することはできないため、被験物質の組成は α -トコトリエノール21.4%、 β -トコトリエノール3.5%、 γ -トコトリエノール36.5%、 δ -トコトリエノール8.6%、 α -トコフェロール20.5%、 β -トコフェロール0.7%、 γ -トコフェロール1.0%、 δ -トコフェロール0.5%であった。粉末基礎食CE-2(日本クレア株式会社、東京)に混和

し、適正濃度となるように添加した。投与濃度は、トコトリエノールの13週間反復投与毒性試験の結果から、慢性毒性試験では最高用量を2.0%とし、以下0.4%、0.08%、および0%(対照群)の4段階とし、癌原性試験では2.0%、0.4%および0%(対照群)の3段階とした。トコトリエノール含有飼料は、給餌まで冷暗所(4℃以下)に保存した。雌雄のWistar Hannover ラットを日本クレア株式会社より5週齢で入手し、CE-2基礎飼料と水道水で1週間馴化飼育後に試験に用いた。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度24±1℃、湿度55±5%、換気回数18回/時(オールフレッシュ)、12時間蛍光灯照明、12時間消灯の条件下で行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに3~4匹ずつ収納し、床敷は三協ラボサービス社(東京)のソフトチップを使い、週2回交換を行った。また、飲料水として水道水を馴化および試験期間中に自由に摂取させた。

統計学的処理法として、血液学的検査値、血清生化学的検査値、体重および臓器重量については、原則として、各群の分散比をBartlettの方法で検定し、等分散の場合は一元配置分散分析を行い、不等分散の場合はKruskal-Wallisの方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合の多重比較はDunnnettの方法で対照群と各被験物質投与群との間で有意差検定を行った。腫瘍の発生頻度については、Fisherの直接確率法により、対照群と各被験物質投与群との間で有意差検定を行った。その他の方法も適宜併せ実施した。

「トコトリエノール1年間慢性毒性試験」

6週齢の雌雄のWistar Hannover ラット100匹(雌50匹、雄50匹)を使用して、トコトリエノールの1年間反復投与試験を実施した。実験群は、雌雄とも対照群(0%、雄10匹、雌10匹)、0.08%(雄10匹、雌10匹)、0.4%(雄10匹、雌10匹)、2.0%(雄20匹、雌20匹)の4群で構成した。試験期間は1年とし、試験期間中、体重測定、摂餌量測定、一般症状の観察を試験開始5週間までは毎週行い、それ以後は5週おきに測定した。試

験期間終了時には、全生存動物を剖検した。動物は剖検前日より絶食させ、翌日エーテル麻酔下で腹部大動脈から採血後、屠殺・剖検した。死亡動物および瀕死動物についても剖検し、できる限り死因を特定した。

血液学的検査として、白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン量 (Hb)、ヘマトクリット値 (Ht)、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) およびプロトロンビン時間などについて測定し、さらに、白血球の型別分類を行った。血清生化学的検査として、総蛋白 (TP)、A/G 比、アルブミン (ALB)、ビリルビン (BIL)、中性脂肪 (TG)、総コレステロール (TC)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRN)、カルシウム (Ca)、無機リン (P)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、塩素 (Cl)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、アラニントランスアミナーゼ (ALT)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GT) および乳酸脱水素酵素 (LDH) などについて測定した。

諸臓器は肉眼的に観察後摘出し、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、副腎、腎臓および精巣の重量を測定した。上記の臓器に加え、鼻腔を含む頭蓋、下垂体、眼球、ハーダー腺、脊髄、唾液腺、胸腺、胃、小腸、大腸、盲腸、膵臓、膀胱、皮膚、乳腺、リンパ節、胸骨、大腿骨、気管、食道、甲状腺、舌、大腿筋、三叉神経、坐骨神経、精巣上部、精囊、前立腺、凝固腺、子宮、卵巣および膣を 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。臓器は常法に従い、パラフィン包埋後、薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、病理組織学的検索を行った。

「トコトリエノール 2 年間がん原性試験」

6 週齢の雌雄の Wistar Hannover ラット 300 匹 (雌 150 匹、雄 150 匹) を使用して、トコトリエノールの 2 年間の癌原性試験を実施した。実験群は、雌雄とも対照群 (0%、雄 50 匹、雌 50 匹)、0.4% (雄 50 匹、雌 50 匹)、2.0% (雄 50 匹、雌 50 匹) の 3 群で構成した。試験期間は 2 年間とし、試験期間中、体重測定、摂餌量測定、一般症状の観察を試験開始

5 週間までは毎週行い、それ以後は 5 週おきに測定した。

試験期間終了時には、全生存動物を剖検した。動物は剖検前日より絶食させ、翌日エーテル麻酔下で腹部大動脈から採血後、屠殺・剖検した。死亡動物および瀕死動物についても剖検し、できる限り死因を特定した。諸臓器は肉眼的に観察後摘出し、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、副腎、腎臓および精巣の重量を測定した。上記の臓器に加え、鼻腔を含む頭蓋、下垂体、眼球、ハーダー腺、脊髄、唾液腺、胸腺、胃、小腸、大腸、盲腸、膵臓、膀胱、皮膚、乳腺、リンパ節、胸骨、大腿骨、気管、食道、甲状腺、舌、大腿筋、三叉神経、坐骨神経、精巣上部、精囊、前立腺、凝固腺、子宮、卵巣および膣を 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。臓器は常法に従い、パラフィン包埋後、薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、腫瘍性病変の確認を中心に病理組織学的検索を行った。

<フェルラ酸の 2 年間がん原性試験>

雌雄の F344/DuCrj ラットを日本チャールズ・リバー株式会社 (横浜) より 4 週齢で購入し、1 週間馴化飼育後に試験に用いた。馴化および試験期間中、ラットを自動給水装置付きベルト式飼育棚のステンレス製懸垂式ケージに 4 ないし 3 匹ずつ収容し、室温 23 \pm 2 $^{\circ}$ C、湿度 50 \pm 10%、照明 12 時間・換気回数毎時 10 回のバリア飼育室にて飼育した。5 週齢時に雌雄のラットの体重測定し、ランダム方式により各実験群に分け、飼料及び水道水 (細菌ろ過器を経由) を自由に摂取させた。米糠原油より抽出、精製したフェルラ酸

(*trans* 型、LotNo.F02977、純度 99.9%) を築野食品工業株式会社 (和歌山) より供与を受け、粉末基礎食 CRF-1 (オリエンタル酵母株式会社、東京) に予め混和した後(プレミックス)、適正濃度となるように CRF-1 に添加し、固形飼料とした。投与濃度は、フェルラ酸の急性毒性試験、亜慢性毒性試験の結果から、最高用量を 2.0% とし、公比 2 で、1.0%、0.5%、および 0% (対照群) の 4 段階とした。フェルラ酸含有飼料は、給餌まで冷暗所 (4 $^{\circ}$ C 以下) に保存した。なお、添加飼料および飲水は自由摂取とした。

雌雄の F344/DuCrj ラット 416 匹 (雌 208 匹、雄 208 匹) を使用して 2 年間フェルラ酸がん原性試験を開始した。実験群は、雌雄とも対照群 0% (雄 52 匹、雌 52 匹)、0.5% (雄 52 匹、雌 52 匹)、1.0% (雄 52 匹、雌 52 匹)、2.0% (雄 52 匹、雌 52 匹) の 4 群で構成した。試験期間は、2 年間 (106 週) とし、試験期間中、体重測定 (実験開始後 55 週までは週 1 回、以降は 2 週に 1 回)、摂餌量の測定 (毎日)、臨床的一般症状の観察 (3 回/日) を行った。試験終了時には、全動物を一晩絶食させた後、エーテル麻酔下に開腹し、腹部大動脈より採血し、瀉血、屠殺、剖検を行った。諸臓器は肉眼的に観察した後、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、精巣、卵巣、子宮は重量測定後に、また鼻腔を含む頭蓋、眼球およびその付属器、下垂体、唾液腺、舌、気管、甲状腺、上皮小体、大動脈、食道、胃、小腸、大腸、膵臓、膀胱、前立腺、精囊腺、凝固腺、精巣上体、卵管、膣、乳腺、リンパ節、胸骨、大腿骨、脊髄、座骨神経、皮膚および骨格筋等については摘出後、直ちに 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。

血液学的検査は、雌雄とも各群 10 匹を無作為に選別し、白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン量 (Hb)、ヘマトクリット値 (Ht)、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)、血小板数 (PLT) および白血球型別分類として桿状核好中球

(Neut-B)、分葉核好中球 (Neut-S)、好酸球 (Eosino)、好塩基球 (Baso)、リンパ球 (Lymph)、単球 (Mono) について(株)SRL 社 (東京) に依頼し測定を行った。

血液生化学検査は、雌雄とも各群 10 匹を無作為に選別し、採血した血液より血清を分離し、(株)SRL 社に依頼し、総蛋白量 (TP)、アルブミン (Alb)、アルブミン/グロブリン比 (A/G)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、アラニントランスアミナーゼ (ALT)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GTP)、総ビリルビン (T.Bil)、クレアチニン (CRE)、尿素窒素 (BUN)、総コレステロール (TC)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、クロール (Cl)、カルシウム (Ca)、無機リン

(IP) についても(株)SRL 社に依頼し測定を行った。

病理検査組織学的検査においては、全動物について 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した上記の諸臓器を定法に従いパラフィン包埋し、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、光学顕微鏡下にて観察した。

統計学的処理法として、血液学的検査、血液生化学検査、臓器重量および臓器の相対重量については Tukey-Kramer 多重比較検定法を用いて、対照群と各被験物質投与群との間で有意差検定を行い、 $P < 0.05$ を統計学的有意差とした。

C. 研究結果

<トコトリエノールの慢性毒性・発がん性試験>

「トコトリエノールの慢性毒性試験」

雄の最高用量 (2.0%) において 6 匹の死亡が確認された。死亡例の剖検では、脳底部および腸間膜リンパ節などにおける出血が主な所見であった。その他の群においては、死亡および特記すべき一般状態の異常は認められなかった。平均体重は雌雄ともに対照群と比べて 2.0% 群で有意な低値を示したが、雌の 0.4% 群においては有意な増加を示した。1 日当たりの平均摂餌量は、雄において 25-30 g、雌で約 20 g であり、雄では 0.4% 群および 2.0% 群において減少傾向を認め、雌では 0.08% 群に減少傾向が認められた。トコトリエノールの 1 年間の平均摂取量 (体重 kg 当り) は、雄では 2.0% 群で 1452 mg/kg/日、0.4% 群で 297 mg/kg/日、0.08% 群で 70 mg/kg/日、雌では 2% 群で 1875 mg/kg/日、0.4% 群で 467 mg/kg/日、0.08% 群で 68 mg/kg/日であり、雌雄ともに投与濃度に相関していた。雄 2.0% 群の肝臓の実重量が対照群と比較して有意に減少した。相対重量では、雄 2.0% 群の脳、肺、心臓、副腎、腎臓および精巣、雌 2.0% 群の脳、心臓、肝臓、副腎および腎臓において有意な増加が認められた。血液学的検査では、雄の 0.4% 以上の群で、MCV の有意な減少が認められ、2.0% 群において、Hb、Ht および MCH の有意な減少が認められた。雌で

は、2.0%群において、Hb、Ht、MCV および MCH で有意な減少が認められ、MCHC は軽度であるが有意な増加を示した。雄 2.0%群において、プロトンボン時間の有意な延長がみられた。血清生化学的検査では、雄の 0.4%以上の群で、TG およびグルコースの有意な減少、Na および Cl の有意な増加が認められた。2.0%群において、A/G 比、P、AST、ALT、ALP、直接 Bil およびプロトンビン時間の有意な増加が、LDH では有意な減少が認められた。また、コレステロールエステル比は、全ての投与群において有意に減少した。雌では、2.0%群において TP および ALP の有意な増加、総 Bil、直接 Bil および間接 Bil の有意な減少が認められた。

病理組織学的検索の結果、雌雄の 2.0%投与群において、肝臓の海綿状変性が高頻度で認められた。また、肺胞内への泡沫細胞の限局的な集簇は、対照群にも散見されたが、2.0%投与群でその発生頻度が高かった。その他に、肝内胆管増生、腎臓の尿円柱・再生尿細管・石灰化、脾臓の白脾髄萎縮、膵臓の腺房細胞萎縮などの加齢に伴う病変、さらに下垂体前葉腺腫、甲状腺 C 細胞腺腫などの自然発生と思われる腫瘍が散見されたが、その出現頻度に群間で差はみられなかった。雄の 2.0%投与群で認められた 6 例の途中死亡動物では、全例に肝海綿状変性が観察され、胸部リンパ節、心内膜下、膀胱粘膜下などに出血巣がみられた。

「トコトリエノールのがん原性試験」

体重の推移に関して、雄の高用量 2.0%群においては、実験開始 4 ヶ月目頃からしだいに死亡例が増加しはじめ、死亡率が 42%に達した 50 週目に投与量を 2.0%から 1.0%に引き下げ、実験を継続した。剖検時の生存率は、雄で対照群 76%、低用量群 80%及び高用量群 46%、雌で対照群 74%、低用量群 84%及び高用量群 94%であった。摂餌量は、雄の高用量群では投与期間を通じて低い値で推移したが、雌では群間に大差はなかった。最終体重は、雄では群間差はみられなかったが、雌では用量に相関した有意な低値を示した。諸臓器の重量は、雄では群間差はみられなかったが、雌では腎臓の絶対重量が用量相関性

に有意に減少し、肺、心臓及び脾臓の絶対重量が高用量(2.0%→1.0%)群で有意に減少した。また、雌では肺及び心臓の相対重量は用量相関性に有意に増加し、肝臓及び腎臓の相対重量は高用量(2.0%→1.0%)群で有意に増加した。

がん原性試験は動物実験を終了し、剖検にて雌雄高用量群において肝臓の結節性病変が多発しているのが観察され、それらは病理組織学的に結節性再生性過形成、肝細胞腺腫ないし肝細胞癌であることを確認した。現在、その他臓器の病理組織学的検索を継続中である。

<フェルラ酸のがん原性試験>

投与開始後、3 週目からフェルラ酸投与群ラットに脱毛を観察したが、その後症状は改善した。試験期間中、その他の特記すべき臨床徴候を認めなかった。雄および雌ラットの生存率については、試験終了までに、対照群で雄 10 匹、雌 10 匹、0.5%投与群で雄 18 匹、雌 10 匹、1.0%投与群で雄 10 匹、雌 7 匹、2.0%投与群で雄 10 匹、雌 13 匹の死亡を認めた。各試験群の平均生存日数は、雄で対照群：723 ± 50、0.5%投与群：704 ± 72、1.0%投与群：711 ± 59、2.0%投与群：715 ± 78、雌で対照群：723 ± 48、0.5%投与群：727 ± 35、1.0%投与群：728 ± 44、2.0%投与群：706 ± 84 と、雌雄とも各群間に有意の差を認めなかった。試験期間中の平均体重の推移については、雌雄とも、平均体重増加率は、2.0%フェルラ酸投与群は対照群とほぼ同様の体重増加を示したが、0.5%および 1.0%フェルラ酸投与群では対照群に比べやや高い傾向を示した。ラット 1 日当たりの平均摂餌量は、雌雄とも対照群に比べ 0.5%および 1.0%フェルラ酸投与群では有意 ($P<0.001$ ないし $P<0.005$) に低いが、2.0%雄フェルラ酸投与群では対照群より多い (雄) か、ほぼ同等 (雌) であり、平均摂餌量の変化に用量依存性はみられなかった。

血液学的検査の結果、雌雄とも、対照群に比べフェルラ酸投与群に有意な変化を認めなかった。血液生化学的検査の結果、雄では、1.0%および 2.0%フェルラ酸投与群において、対照群に比べ TP、AST、ALT の有意な低値

が、2.0%フェルラ酸投与群においてALPの有意な低値が、1.0%フェルラ酸投与群においてTGの有意な高値が認められたが、いずれの変化も用量依存性はみられず偶発的な変化と考えられた。雌では、2.0%フェルラ酸投与群において、対照群に比べA/G比の有意な高値とBUNの有意な低値が、1.0%および2.0%フェルラ酸投与群において、対照群に比べASTの有意な低値が、0.5%、1.0%および2.0%フェルラ酸投与群において、対照群に比べALT、ALPの有意な低値が認められたが、いずれの変化も用量とは関連のない偶発的な変化と考えられた。なお、本試験では、採血量の不足のため、Na、Clの測定が出来なかった。

試験終了時の体重および臓器重量（絶対重量および相対重量）について、雄では、各群間に平均体重、相対臓器重量に有意の差を認めなかったが、1.0%フェルラ酸投与群において、対照群に比べ肝および精巣の絶対重量の有意な増加を認めたが、用量相関を認めず偶発的な変化と考えられた。雌の平均体重では、対照群に比べ0.5%フェルラ酸投与群で有意の増加をみ、絶対臓器重量では、1.0%および2.0%フェルラ酸投与群で膵重量と副腎重量の有意な低値を、2.0%フェルラ酸投与群で心重量の有意な低値をみとめたが、いずれも用量相関はみられず、偶発的な変化と考えられた。一方、雌の相対臓器重量でも、1.0%フェルラ酸投与群で膵重量に有意な低値を、2.0%フェルラ酸投与群で副腎重量の有意な低値をみとめた。

これらの動物では、雄で肺、前胃、肝、前立腺、精巣、造血器系、下垂体、甲状腺、副甲状腺、副腎、膵、骨、中皮、皮膚に、雌では舌、前胃、小腸、肝、子宮、卵巣、造血器系、下垂体、甲状腺、副腎、皮膚、乳腺に増殖性病変が発生した。その発生頻度では、雄の2%フェルラ酸投与群で皮膚線維腫の発生頻度が対照群に比べて有意な増加を示したが、用量相関はなかった。また、雌の1.0%および2.0%フェルラ酸投与群で肝内胆管増殖性病変の発生頻度が対照群に比べて有意な低下を示したが、用量相関はなかった。試験終了時に犠牲死させた動物における増殖性病変の発生頻度では、雄で肺、舌、前胃、肝、

前立腺、精巣、造血器系、甲状腺、副腎、膵、中皮、皮膚、乳腺に、雌では肺、舌、前胃、肝、子宮、卵巣、髄膜、造血器系、甲状腺、副腎、膵、皮膚、乳腺に増殖性病変が発生した。そのうち、雄の2.0%フェルラ酸投与群で肝内胆管増殖性病変の発生頻度が対照群に比べて有意な低値を示し、0.5%および1.0%フェルラ酸投与群で皮膚悪性線維組織球腫の発生頻度が対照群に比べて有意な高値を示したが、用量相関をみなかった。雌の2.0%フェルラ酸投与群で肝内胆管増殖性病変の発生頻度が対照群に比べて有意な高値を示したが、肝内胆管周囲炎に対する反応性変化と考えられた。これら、試験期間中の途中死亡および試験終了時の犠牲死させた動物の増殖性病変の発生頻度をまとめると、雄では、1.0%フェルラ酸投与群で白血病の発生頻度が対照群に比べて有意な高値を示し、2.0%フェルラ酸投与群では肝内胆管増殖性病変の発生頻度が対照群に比べて有意な低値を示したが、いずれも有意な用量相関を示さなかった。一方、雌では、いずれの増殖性病変の発生頻度も群間に有意の差を示さなかった。

一方、非増殖性病変も全群に発生した。試験期間中に死亡した動物における非増殖性病変の発生頻度、試験終了時に犠牲死させた動物における非増殖性病変の発生頻度、これら試験期間中の途中死亡および試験終了時の犠牲死させた動物の非増殖性病変の発生頻度を合わせた頻度は、いずれも群間に有意の差を示さなかった。

D. 考察

Wistar Hannover ラットを用いた1年間の慢性毒性試験の結果、雄の2.0%群で6匹の死亡が確認されたが、その他の群には一般状態の異常はみられなかった。体重では、雌雄の2.0%群において有意な減少が認められたが、雌の0.4%群では増加傾向がみられた。摂餌量は、雄の2.0%および0.4%群、雌の2.0%および0.08%群で減少傾向を示したが、雌の0.4%群ではむしろ増加傾向を示していた。これらの事から、この体重変化はトコトリエノール投与の影響によるものと考えられた。血液学的検査では、雌雄の2.0%群において、Hb、Ht およびMCHの有意な減

少が認められ、造血臓器に対する影響が示唆された。血清生化学的検査では、雄の2.0%群においてAST、ALTおよびALPの有意な増加がみられたが、雌の2.0%群ではALPの有意な増加のみが認められ、ASTやALTはむしろ低下傾向を示した。いずれにしても、肝機能障害が示唆されたが、あまり強いものとは考えられなかった。雄の2.0%群において、直接ビリルビンの有意な増加が認められたが、雌の2.0%群においては、総ビリルビン、直接ビリルビンおよび間接ビリルビンは逆にいずれも有意に低下した。コレステロールエステル比では雄の全投与群で有意に減少したが、雌では影響がなかった。この変化は、トコトリエノールが有するコレステロール合成阻害の特性によるものと考えられた。また、雄の0.4%以上の群において、TGおよびグルコースの有意な減少、NaおよびClの有意な増加が認められた。

病理組織学的に雌雄の2.0%投与群において、肝臓の海綿状変性が高頻度で認められ、雄の2.0%投与群で途中死亡した6匹全例にも肝海綿状変性が観察されたことから、この肝臓における病変はトコトリエノールの投与に起因した変化と考えられるが、がん原性試験で認められた肝腫瘍性病変の発生との関連は不明である。途中死亡した雄2.0%群の剖検では、脳底部や腸間膜リンパ節などの出血が死因と考えられたため、血液凝固成分について測定した結果、プロトロンビン値が有意な高値を示した。これら死亡例に観察された他の胸部リンパ節、心内膜下、膀胱粘膜下などにおける出血巣もトコトリエノールの投与に起因した出血傾向によるものと考えられた。

Wistar Hannover ラットを用いた2年間のがん原性試験では、雄の最高用量群において、死亡率が42%に達した50週目に投与量を2.0%から1.0%に引き下げ、実験が継続された。その他の群には用量の変更は無かった。がん原性試験は動物実験を終了し、剖検にて雌雄最高用量群において、肝臓の結節性病変が多発しているのが観察され、それらは病理組織学的に結節性再生性過形成、肝細胞腺腫ないし肝細胞癌であることが確認された。

また、フェルラ酸の発がん性の有無を明ら

かにする目的で、最高用量を2.0%とし、公比2で、1.0%、0.5%、および0%(対照群)の4混餌投与群を設定した2年間(106週)の発がん性試験を実施した。一般状態では、投与開始後3週目からフェルラ酸投与群ラットに脱毛を観察したが一過性のものであり、その他の臨床徴候も観察されなかった。試験期間中の死亡動物数は、対照群で雄10匹、雌10匹であったのに対し、0.5%投与群では雄18匹、雌10匹、1.0%投与群では雄10匹、雌7匹、2.0%投与群では雄10匹、雌13匹と、フェルラ酸投与に起因すると考えられるものは認めなかった。試験開始後296日に最も早期に死亡した2.0%フェルラ酸投与群の雌ラットの死因は、両側水腎症でありフェルラ酸投与に起因しない先天性病変によるものと考えられた。さらに、各試験群の雌雄の平均生存日数も群間に有意の差を認めなかった。

試験期間中の平均体重増加率は、雌雄とも2.0%フェルラ酸投与群は対照群とほぼ同様のものであったが、0.5%フェルラ酸投与群、1.0%フェルラ酸投与群では対照群に比べやや高い傾向を示した。平均摂餌量(1日/ラット)は、雌雄とも0.5%および1.0%フェルラ酸投与群では対照群に比べ有意($P<0.001$ ないし $P<0.005$)に低い、2.0%雄フェルラ酸投与群では対照群より多い(雄)かほぼ同じ(雌)であり、これらの差に用量依存性をみなかった。血液学的検査の結果では、雌雄とも対照群に比べフェルラ酸投与に起因する有意な変化を認めなかった。血液生化学的検査結果については、雄では、1.0%ないし2.0%フェルラ酸投与によりTP、AST、ALT、ALPの有意な低値や1.0%フェルラ酸投与によりTGの有意な高値を認めたが、用量依存性はなく偶発的な変化が示唆された。雌では、1.0%ないし2.0%フェルラ酸によりA/G比の有意な高値、BUNの有意な低値、AST、ALT、ALPの有意な低値を認めたものの、用量とは関連しない偶発的な変化と考えられた。試験終了時の平均体重は、雌で0.5%フェルラ酸投与により有意な増加をみたのみであった。臓器重量に関しては、1.0%フェルラ酸投与により雄の肝および精巣の絶対重量の有意な増加が観察されたが、相対重量に有意の差は

なく、偶発的なものと考えられた。雌の絶対臓器重量では、1.0%ないし2.0%フェルラ酸投与により脾と副腎の絶対重量の有意な低値を、2.0%フェルラ酸投与により心絶対重量の有意な低値をみとめたが、相対臓器重量では、1.0%フェルラ酸投与による脾と2%フェルラ酸投与による副腎の有意な低値をみとめたのみであり、偶発変化あるいは発生病変に起因するものと考えられた。

諸臓器に発生した病変の病理組織学的検索では、非増殖性病変の発生頻度に群間に有意の差を認めなかった。腫瘍を含む増殖性病変は、雄の各群で肺、舌、前胃、肝、前立腺、精巣、造血器系、甲状腺、下垂体、甲状腺、副甲状腺、副腎、脾、骨、中皮、皮膚、乳腺に、雌では肺、舌、前胃、小腸、肝、子宮、卵巣、髄膜、造血器系、下垂体、甲状腺、副腎、脾、皮膚、乳腺に発生したが、いずれの発生も用量相関はなく、自然発症あるいは偶発性のものと考えられた。

E. 結論

Wistar Hannover ラットを用いた1年間の慢性毒性試験の雌雄2.0%投与群において、病理組織学的検索の結果、肝臓の海綿状変性が認められたことから、NOAELは雌雄ともに0.4%(雄で297 mg/kg 体重、雌で467 mg/kg 体重)と推定された。Wistar Hannover ラットを用いたがん原性試験は動物実験を終了し、剖検にて雌雄2.0%群において肝臓の多発性結節性病変が観察され、それらは病理組織学的に結節性再生性過形成、肝細胞腺腫ないし肝細胞癌であることが確認された。

また、フェルラ酸の発がん性の有無を明らかにする目的で、最高用量を2.0%とし、公比2で、1.0%、0.5%、および0%(対照群)の4混餌投与群を設定した2年間(106週)の発がん性試験を行った結果、腫瘍を含む各種増殖性病変の発生頻度に群間で用量依存性の有意な差を認めず、フェルラ酸投与に起因すると考えられる腫瘍性病変の発生は観察されなかった。したがって、フェルラ酸には発がん性は認められないと考えられた。

F. 健康危険情報

トコリエノールを高用量投与した雌雄ラットの肝臓に腫瘍性病変の発生がみられたことから、グレードBの情報と史料され、経過を注視する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanki K, Nishikawa A, Masumura K, Umemura T, Imazawa T, Kitamura Y, Nohmi T, Hirose M. *In vivo* mutational analysis of liver DNA in *gpt* delta transgenic rats treated with the hepatocarcinogens *N*-nitrosopyrrolidine, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline and di(2-ethylhexyl)phthalate. *Mol. Carcinogen.*, 42: 9-17, 2005.
- 2) Nishikawa A, Imazawa T, Kuroiwa Y, Kitamura Y, Kanki K, Ishii Y, Umemura T, Hirose M. Induction of colon tumors in C57BL/6j mice fed MeIQx, IQ or PhIP followed by dextran sulfate sodium treatment. *Toxicol. Sci.*, 84: 243-248, 2005.
- 3) Kuroiwa Y, Nishikawa A, Imazawa T, Kanki K, Kitamura Y, Umemura T, Hirose M. Lack of subchronic toxicity of an aqueous extract of *Agaricus blazei* Murrill in F344 rats. *Food Chem. Toxicol.*, 43: 1047-1053, 2005.
- 4) Kuroiwa Y, Nishikawa A, Imazawa T, Kitamura Y, Kanki K, Umemura T, Hirose M. Lack of carcinogenicity of *d*-xylose given in the diet to F344 rats for two years. *Food Chem. Toxicol.*, 43: 1399-1404, 2005.
- 5) Nishikawa A, Ikeda T, Son H-Y, Okazaki K, Imazawa T, Umemura T, Kimura S, Hirose M. Pronounced synergistic promotion of *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine-initiated thyroid tumorigenesis in rats treated with excess soybean and iodine-deficient diets. *Toxicol. Sci.*, 86: 258-263, 2005.
- 6) Kitamura Y, Nishikawa A, Nakamura H, Furukawa F, Imazawa T, Umemura T, Uchida K, Hirose M. Effects of *N*-acetylcysteine, quercetin, and phytic acid on spontaneous hepatic and renal lesions in LEC rats. *Toxicol. Pathol.*, 33: 584-592, 2005.
- 7) Yoon B-I, Kaneko T, Hirabayashi Y, Imazawa T, Nishikawa A, Kodama Y, Kanno J, Yodoi J, Han J-H, Hirose M, Inoue T. Electron microscopical evidence of the

- protective function of thioredoxin (TRX/ADF) transgene against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)-induced cellular toxicity in the liver and brain. *J. Toxicol. Pathol.*, 18: 41-46, 2005.
- 8) Watanabe T, Mori T, Kitamura Y, Umemura T, Okamura M, Kashida Y, Nishikawa A, Hirose M, Mitsumori, K., Lack of initiating activity of kojic acid on hepatocarcinogenesis in F344 rats. *J. Toxicol. Pathol.* 18, 79-84 (2005).
 - 9) Kitamura Y, Yamagishi M, Okazaki K, Umemura T, Imazawa T, Nishikawa A, Matsumoto W, Hirose M. Lack of chemopreventive effects of alpha-eleostearic acid on 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA) and 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced mammary and colon carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. *Food Chem. Toxicol.*, 44: 271-277, 2006.
 - 10) Nishikawa A, Sai K, Okazaki K, Son HY, Kanki K, Nakajima M, Kinae N, Nohmi T, Trosko JE, Inoue T, Hirose M. MX, a by-product of water chlorination, lacks *in vivo* genotoxicity in *gpt* delta mice but inhibits gap junctional intercellular communication in rat WB cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 47: 48-55, 2006.
 - 11) Kuroiwa Y, Nishikawa A, Imazawa T, Kitamura Y, Kanki K, Ishii Y, Umemura T, Hirose M. A subchronic toxicity study of *dunaliella* carotene in F344 rats. *Food Chem. Toxicol.*, 44: 138-145, 2006.
 - 12) Kitamura Y, Umemura T, Okazaki K, Kanki K, Imazawa T, Masegi T, Nishikawa A, Hirose M. Enhancing effects of simultaneous treatment with sodium nitrite on 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline-induced rat liver, colon and Zymbal's gland carcinogenesis after initiation with diethylnitrosamine and 1,2-dimethylhydrazine. *Int. J. Cancer*, 118: 2399-2404, 2006.
 - 13) Umemura T, Kuroiwa Y, Kitamura Y, Ishii Y, Kanki K, Kodama Y, Itoh K, Yamamoto M, Nishikawa A, Hirose M. A crucial role of *nrf2* in *in vivo* defense against oxidative damage by an environmental pollutant, pentachlorophenol. *Toxicol. Sci.*, 90: 111-119, 2006.
 - 14) Umemura T, Kodama Y, Nishikawa A, Hioki K, Nomura T, Kanki K, Kuroiwa Y, Ishii Y, Kurokawa Y, Hirose M. Nine-week detection of six genotoxic lung carcinogens using the rasH2/BHT mouse model. *Cancer Lett.*, 231: 314-318, 2006.
 - 15) Okazaki K, Ishii Y, Kitamura Y, Maruyama S, Umemura T, Miyauchi M, Yamagishi M, Imazawa T, Nishikawa A, Yoshimura Y, Nakazawa H, Hirose M. Dose-dependent promotion of rat forestomach carcinogenesis by combined treatment with sodium nitrite and ascorbic acid after initiation with *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine: possible contribution of nitric oxide-associated oxidative DNA damage. *Cancer Sci.*, 97: 175-182, 2006.
 - 16) Ishii Y, Umemura T, Kanki K, Kuroiwa Y, Nishikawa A, Ito R, Saito K, Nakazawa H, Hirose M. Possible involvement of NO-mediated oxidative stress in induction of rat forestomach damage and cell proliferation by combined treatment with catechol and sodium nitrite. *Arch Biochem Biophys.*, 447: 127-135, 2006.
 - 17) Kuroiwa Y, Nishikawa A, Kitamura Y, Kanki K, Ishii Y, Umemura T, Hirose M. Protective effects of benzyl isothiocyanate and sulforaphane but not resveratrol against initiation of pancreatic carcinogenesis in hamsters. *Cancer Lett.*, 241: 275-280, 2006.
 - 18) Ishii Y, Iijima M, Umemura T, Nishikawa A, Iwasaki Y, Ito R, Saito K, Hirose M, Nakazawa H. Determination of nitrotyrosine and tyrosine by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry and immunohistochemical analysis in livers of mice administered acetaminophen. *J Pharm Biomed Anal.*, 41: 1325-1331, 2006.
 - 19) Kitamura Y, Umemura T, Kanki K, Ishii Y, Kuroiwa Y, Masegi T, Nishikawa A, Hirose M. Lung as a new target in rats of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline carcinogenesis: results of a two-stage model initiated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Cancer Sci.*, 97: 368-373, 2006.
 - 20) Kitamura Y, Yamagishi M, Okazaki K, Furukawa F, Imazawa T, Nishikawa A, Hirose M. Lack of enhancing effects of sodium nitrite on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)-induced mammary

- carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett.*, 235: 69-74, 2006.
- 21) Umemura T, Kanki K, Kuroiwa Y, Ishii Y, Okano K, Nohmi T, Nishikawa A, Hirose M. *In vivo* mutagenicity and initiation following oxidative DNA lesion in the kidneys of rats given potassium bromate. *Cancer Sci.*, 97: 829-835, 2006.
 - 22) Kuroiwa Y, Umemura T, Nishikawa A, Kanki K, Ishii Y, Kodama Y, Masumura KI, Nohmi T, Hirose M. Lack of *in vivo* mutagenicity and oxidative DNA damage by flumequine in the livers of *gpt* delta mice. *Arch Toxicol.*, in press.
 - 23) Nishikawa A, Furukawa F, Kitamura Y, Kanki K, Ishii Y, Kuroiwa Y, Umemura T, Hirose M. A new medium-term pancreatic carcinogenesis model in hamsters and screening of chemopreventive agents. In: Tanaka, T. and Tsuda, H. eds., *Carcinogenesis and Modification of Carcinogenesis*, 97-108, Research Signpost, India, 2005.
 - 24) Nishikawa, A. Modification of experimental carcinogenesis by cigarette smoke and its constituents. In: Cho, C.H. and Purohit V. eds., *Alcohol, Tobacco and Cancer*, 237-252, Karger, Basel, 2006.
 - 25) Nishikawa, A. Environmental factors synergistically interacting with iodine deficiency on thyroid carcinogenesis. In: *Trends in Cancer Research*, Research Trends, India, in press.
 - 26) Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S., Yamaguchi, F., Kataoka, S., Ariga, T. and Tanaka, T. A polyisoprenylated benzophenone garcinol inhibits azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. In: Tanaka, T. and Tsuda, H. (Eds.), *Carcinogenesis and Modification of Carcinogenesis*, pp. 187-198, Research Signpost, Kerala (India), 2005.
 - 27) Kohno, H., Suzuki, R. Sugie, S., Sumida, T., Azuma, Y., Ogawa, H. and Tanaka, T. The prevention effects of β -cryptoxanthin and hesperidin rich powder prepared from *Citrus unshiu* Marc. juice on chemically induced tongue and colon carcinogenesis in rats. In: Tanaka, T. and Tsuda, H. (Eds.), *Carcinogenesis and Modification of Carcinogenesis*, pp. 199-211, Research Signpost, Kerala (India), 2005.
 - 28) Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S. and Kometani, T. The modifying effects of hesperidin glycoside on chemically-induced tongue and colon carcinogenesis. In: Tanaka, T. and Tsuda, H. (Eds.), *Carcinogenesis and Modification of Carcinogenesis*, pp. 213-227, Research Signpost, Kerala (India), 2005.
 - 29) Tanaka, T. Identification of cancer chemopreventive agents by preclinical assays. In: Tanaka, T. and Tsuda, H. (Eds.), *Carcinogenesis and Modification of Carcinogenesis*, pp. 257-281, Research Signpost, Kerala (India), 2005.
 - 30) Tanaka, T., Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S., Takahashi, M. and Wakabayashi, K. Colonic adenocarcinomas rapidly induced by the combined treatment with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine and dextran sodium sulfate in male ICR mice possess β -catenin gene mutations and increases immunoreactivity for β -catenin, cyclooxygenase-2, and inducible nitric oxide synthase. *Carcinogenesis*, 26: 229-238, 2005.
 - 31) Kwon, K.H., Murakami, A., Tanaka, T. and Ohigashi, H. Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. *Biochem. Pharmacol.*, 69: 395-406, 2005.
 - 32) Sugie, S., Ohnishi, M., Ushida, J., Yamamoto, T., Hara, A., Koide, A., Mori, Y., Kohno, H., Suzuki, R., Tanaka, T., Wakabayashi, K. and Mori, H. Effect of α -naphthyl isothiocyanate on 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)-induced mammary carcinogenesis in rats. *Int. J. Cancer*, 115: 346-350, 2005.
 - 33) Yoshida, K., Tanaka, T., Hirose, Y., Yamaguchi, F., Kohno, H., Toida, M., Hara, A., Sugie, S., Shibata, T. and Mori, H. Dietary garcinol inhibits 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in rats. *Cancer Lett.*, 221: 29-39, 2005.
 - 34) Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S. and Tanaka, T. Dose-dependent promoting effect of dextran sodium sulfate on mouse colon carcinogenesis initiated with azoxymethane. *Histol. Histopathol.*, 20: 483-492, 2005.
 - 35) Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S. and Tanaka, T. β -Catenin mutations in a mouse model of inflammation-related colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine and

- dextran sodium sulfate. *Cancer Sci.*, 96: 69-76, 2005.
- 36) Sano, T., Kagawa, M., Okuno, M., Ishibashi, N., Hashimoto, M., Yamamoto, M., Suzuki, R., Kohno, H., Matsushima-Nishiwaki, R., Takano, Y., Tsurumi, H., Kojima, S., Friedman, S.L., Moriwaki, H. and Tanaka, T. Prevention of rat hepatocarcinogenesis by acyclic retinoid is accompanied by reduction in emergence of both TGF- α -expressing oval-like cells and activated hepatic stellate cells. *Nutr. Cancer*, 51: 197-206, 2005.
- 37) Sugie, S., Vinh, P.Q., Rahman, K.M.W., Ushida, J., Kohno, H., Suzuki, R., Hara, A., Quang, L.B., Tanaka, T. and Mori, H. Suppressive effect of 1,4-phenylene diisothiocyanate on *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Int. J. Cancer*, 117: 524-530, 2005.
- 38) Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S. and Tanaka, T. Suppression of colitis-related mouse colon carcinogenesis by a COX-2 inhibitor and PPAR ligands. *BMC Cancer*, 5: 46, 2005.
- 39) Ishigamori, H., Hosokawa, M., Kohno, H., Tanaka, T., Miyashita, K. and Takahashi, K. Docosahexanoic acid-containing phosphatidylethanolamine enhances HL-60 cell differentiation by regulation of *c-jun* and *c-myc* expression. *Mol. Cell. Biochem.*, 275: 127-133, 2005.
- 40) Suzui, M., Inamine, M., Kaneshiro, T., Morioka, T., Yoshimi, N., Suzuki, R., Kohno, H. and Tanaka, T. Indole-3-carbinol inhibits the growth of human colon carcinoma cells but enhances the tumor multiplicity and volume of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. *Int. J. Oncol.*, 27: 1391-1399, 2005.
- 41) Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S., Tsuda, H. and Tanaka, T. Dietary supplementation with silymarin inhibits 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced prostate carcinogenesis in male F344 rats. *Clin Cancer Res.*, 11: 4962-4967, 2005.
- 42) Yasui, Y., Hosokawa, M., Sahara, T., Suzuki, R., Ohgiya, S., Kohno, H., Tanaka, T. and Miyashita, K. Bitter melon seed fatty acid rich in 9*c*,11*t*,13*t*-conjugated linolenic acid induces apoptosis and up-regulates the GADD45, p53 and PPAR γ in human colon cancer Caco-2 cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 73: 113-119, 2005.
- 43) Hara, A., Sakata, K., Yamada, Y., Kuno, T., Kitaori, N., Oyama, T., Hirose, Y., Murakami, A., Tanaka, T. and Mori, H. Suppression of beta-catenin mutation by dietary exposure of auraptene, a citrus antioxidant, in *N,N*-diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinomas in rats. *Oncol. Rep.*, 14: 345-351, 2005.
- 44) Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Hata, K., Sugie, S., Niho, N., Sakano, K., Takahashi, M. and Wakabayashi, K. Dextran sodium sulfate promotes colorectal carcinogenesis in *Apc^{Mm}* mice: Inflammation stimuli by dextran sodium sulfate results in development of multiple colonic neoplasms. *Int. J. Cancer*, 118: 25-34, 2006.
- 45) Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S., Nakagama, H. and Tanaka, T. Strain differences in susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis*, 27: 162-169, 2006.
- 46) Kawamori, T., Osta, W., R. Johnson, K.R., Pettus, B.J., Bielawski, J., Tanaka, T., Wargovich, M.J., Reddy, B.S., Obeid, L.M., Hannun, Y.A. and Zhou, D. Sphingosine kinase 1 is up-regulated in colon carcinogenesis. *FASEB J.*, 20: 386-388, 2006.
- 47) Suzuki, R., Kohno, H., Suzui, M., Yoshimi, N., Tsuda, H., Wakabayashi, K. and Tanaka, T. An animal model for the rapid induction of tongue neoplasms in human *c-Ha-ras* proto-oncogene transgenic rats by 4-nitroquinoline 1-oxide: Its potential use for preclinical chemoprevention studies. *Carcinogenesis*, 27: 619-630, 2006.
- 48) Kohno, H., Suzuki, R., Curini, M., Epifano, F., Maltese, F., Gonzales, S.P. and Tanaka, T. Dietary administration with prenyloxycompounds, auraptene and collinin, inhibits colitis-related colon carcinogenesis in mice. *Int. J. Cancer*, 118: 2936-2942, 2006.
- 49) Miyamoto, S., Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S., Murakami, A., Ohigashi, H. and Tanaka, T. Preventive effects of chrysin on the development of azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Oncol. Rep.*, 15: 1169-1173, 2006.
- 50) Yasui, Y., Hosokawa, M., Kohno, H., Tanaka, T. and Miyashita, K. Growth inhibition and apoptosis induction by all-trans-conjugated

linolenic acids on human colon cancer cells.
Anticancer Res., 26: 1855-1860, 2006.

2. 学会発表

- 1) 西川秋佳、今沢孝喜、梅村隆志、神吉けい太、黒岩有一、広瀬雅雄： MeIQxによるマウス大腸発がんイニシエーション作用 第94回日本病理学会総会 (2005. 4)
- 2) 黒岩有一、西川秋佳、今沢孝喜、神吉けい太、北村泰樹、梅村隆志、広瀬雅雄：ヒメマツタケ抽出物のラット亜慢性毒性試験 第11回日本食品化学学会総会・学術大会 (2005. 4)
- 3) Nishikawa A, Kitamura Y, Kuroiwa Y, Kanki K, Ishii Y, Umemura T, Nakamura Y, Sato K, Ohtsuki K, Hirose M: Chemopreventive effects of naturally occurring isothiocyanates on pancreatic carcinogenesis in hamsters ISCaP Symposium in Kyoto: Molecular Targeting Cancer Chemoprevention (2005. 5)
- 4) 石井雄二、梅村隆志、西川秋佳、神吉けい太、黒岩有一、中澤裕之、広瀬雅雄：アセトアミノフェン誘発肝障害におけるカテコールの増強効果 第32回日本トキシコロジー学会学術年会(2005. 6-7)
- 5) 梅村隆志、西川秋佳、神吉けい太、黒岩有一、石井雄二、広瀬雅雄：緑茶中抽出物による環境汚染物質ペンタクロロフェノール(PCP)のマウス肝及び肝内胆管発がん促進作用に対する予防効果 第12回がん予防研究会(2005. 7)
- 6) 西川秋佳：化学物質による遺伝子変異やDNA adductは必ず *in vivo* 発癌するのか？第28回日本学術会議トキシコロジー研究連絡委員会シンポジウム(2005. 9)
- 7) 西川秋佳、神吉けい太、梅村隆志、増村健一、黒岩有一、児玉幸夫、能美健彦、広瀬雅雄：Pentachlorophenol投与マウス肝における遺伝子突然変異の解析 第64回日本癌学会学術総会 (2005. 9)
- 8) 神吉けい太、西川秋佳、梅村隆志、増村健一、石井雄二、黒岩有一、児玉幸夫、能美健彦、広瀬雅雄： $p53^{+/-}$ *gpt delta* マウス肝臓におけるアクロレイン経口投与による *in vivo* 遺伝子変異の検索 第64回日本癌学会学術総会 (2005. 9)
- 9) 黒岩有一、梅村隆志、北村泰樹、神吉けい太、児玉幸夫、伊東健、山本雅之、西川秋佳、広瀬雅雄：肝発がん物質ペンタクロロフェノールに対する *Nrf2* 欠損マウスの感受性 第64回日本癌学会学術総会 (2005. 9)
- 10) 李仁善、兪美姫、林孝權、李效静、李孝妹、西川秋佳：スモモの抗酸化及び抗癌効果 第64回日本癌学会学術総会 (2005. 9)
- 11) 梅村隆志、神吉けい太、黒岩有一、石井雄二、岡野圭太、能美健彦、西川秋佳、広瀬雅雄：ラット腎発がん剤臭素酸カリウム($KBrO_3$)による酸化的DNA損傷、*in vivo* 変異原性およびイニシエーション活性 第64回日本癌学会学術総会 (2005. 9)
- 12) 森幸雄、立松憲次郎、西川秋佳、梅村隆志、広瀬雅雄：ニコチンのラット及びハムスターの肝 cytochrome P450 1A2 によるヘテロサイクリックアミンの変異原的活性化に及ぼす影響 日本環境変異原学会第34回大会 (2005. 11)
- 13) 中村考志、中村慧、浅井祐美、和田豊明、田仲究、松尾友明、岡本繁久、西川秋佳、佐藤健司、大槻耕三：大根中で酵素的に生成するすい臓がん抑制成分 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate 日本環境変異原学会第34回大会 (2005. 11)
- 14) 佐藤利瑞、西井しのぶ、西川秋佳、河村俊治、山本智子、山田勉、川瀬里衣子、河合尚基、長田宏巳、岡野匡雄：多彩な組織像を示した子宮頸部の mucinous adenocarcinoma の1例 第44回日本臨床細胞学会秋期大会 (2005. 11)
- 15) 神吉けい太、西川秋佳、梅村隆志、増村健一、石井雄二、黒岩有一、児玉幸夫、能美健彦、広瀬雅雄： $p53^{+/-}$ *gpt delta* マウスにおけるアクロレイン経口投与による *in vivo* 遺伝子変異の検索 第22回日本毒性病理学会総会・学術大会 (2006. 1)
- 16) 黒岩有一、石井雄二、梅村隆志、神吉けい太、西川秋佳、中澤裕之、広瀬雅雄：茶抽出物(カテキン類)と亜硝酸ナトリ

- ウムの併用投与による前胃発がん促進作用 第22回日本毒性病理学会総会・学術大会 (2006. 1)
- 17) 梅村隆志、神吉けい太、黒岩有一、石井雄二、岡野圭太、能美健彦、西川秋佳、広瀬雅雄： 臭素酸カリウムによるラット腎 *OGGI* mRNA および 8-hydroxydeoxyguanosine の変動と *in vivo* 変異原性ならびにイニシエーション活性 第22回日本毒性病理学会総会・学術大会 (2006. 1)
- 18) Nishikawa A, Imazawa T, Kanki K, Kuroiwa Y, Hirose M: Involvement of *trans*-4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in LEC rat hepatic lesions. 45th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2006. 3)
- 19) Umemura T, Kanki K, Kuroiwa Y, Ishii Y, Okano K, Nohmi T, Nishikawa A, Hirose M: *In vivo* mutagenicity and initiation activity following overexpression of *OGGI* and increase of 8-hydroxyguanine formation in the kidney of rats given potassium bromate. 45th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2006. 3)
- 20) Kuroiwa Y, Umemura T, Kitamura Y, Ishii Y, Kanki K, Kodama Y, Itoh K, Yamamoto M, Nishikawa A, Hirose M: A crucial role of *nrf2* in *in vivo* defense system against an environmental pollutant, pentachlorophenol exposure. 45th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2006. 3)
- 21) 西川秋佳： 遺伝毒性発がん物質の閾値とその要因 国際シンポジウム「環境因子、特に遺伝毒性発がん物質の閾値：安全と安心の接点をめざして」(2006. 3)
- 22) 中村考志、中村慧、浅井祐美、和田豊明、田仲究、松尾友明、岡本繁久、西川秋佳、佐藤健司、大槻耕三： 京ダイコンのからみ成分の合成酵素と基質の品種間差異 日本農芸化学会 2006 年度大会 (2006. 3)
- 23) 杉江茂幸、山田泰広、釘 僑、森下由起夫、田中卓二、森 秀樹： *DL*-Alanine の慢性毒性。第21回日本毒性病理学会 (2005, 1)
- 24) 鈴木里加子、高橋真美、甲野裕之、杉江茂幸、若林敬二、田中卓二。
2-Amino-1-methyl-6-imidazo[4,5-*b*]-pyridine (PhIP)あるいは1,2-dimethylhydrazine (DMH)を用いた炎症関連マウス大腸発がん。第21回日本毒性病理学会 (2005, 1)
- 25) 田中卓二：オーラプテン：ヒトへの応用を目指して。文部科学省特定領域「発がんと防御（個体レベルでの新しい病理形態学的がん研究の推進と支援に関する委員会）シンポジウム-動物発がんヒト発がんの架け橋-」(2005, 2)
- 26) 杉江茂幸、甲野裕之、鈴木里加子、田中卓二、中釜 斉：AOM/DSS マウス大腸発がんモデルにおける系統差の検討。日本癌学会カンファレンス「がんゲノム研究の新戦略-オーダーメイド医療を目指して-」(2005, 3)
- 27) 武田公一、宇都宮洋才、山崎 尚、覚道、健一、宮嶋正康、稲田健一、田中卓二：Helicobacter pylori 感染スナネズミ腺胃における auraptene の修飾作用。第94回日本病理学会総会 (2005, 4)
- 28) 鈴木里加子、甲野裕之、杉江茂幸、田中卓二。Azoxymethane/dextran sodium sulfate (DSS)誘発マウス大腸発がんにあらず DSS 投与期間の影響。第94回日本病理学会総会 (2005, 4)
- 29) 杉江茂幸、ビィン・ファン・クワン、盛弘強、甲野裕之、鈴木里加子、田中卓二、森 秀樹。OH-BBN 誘発ラット膀胱発がんモデルにおける benzyliothiocyanate、phenylethyl isothiocyanate の修飾効果。第94回日本病理学会総会 (2005, 4)
- 30) 甲野裕之、鈴木里加子、杉江茂幸、津田洋幸、田中卓二。Silymarin による 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl 誘発ラット前立腺発がん修飾効果。第94回日本病理学会総会 (2005, 4)
- 31) Sugie, S., Kato, K., Kitaori, N., Yoshida, K., Kohno, H., Suzuki, R., Shimada, S., Mori, H. and Tanaka, T. Chemopreventive effects of yeast, Zinc (Zn) and enriched Zn yeast on 4-nitroquinoline oxide-induced rat tongue carcinogenesis. 96th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (2005, 4)
- 32) Kawamori, T., Osta, W., Johnson, K.R., Pettus, B.J., Tanaka, T., Wargovich, M.J.,

- Reddy, B.S., Obeid, L.M., Hannun, Y.A. and Zhou, D. Sphingosine kinase 1 is up-regulated in colon carcinogenesis. 96th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (2005, 4)
- 33) Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Hata, K., Sugie, S., Niho, N., Sakano, K., Takahashi, M. and Wakabayashi, K. Dextran sodium sulfate strongly promotes colorectal carcinogenesis in *Apc^{Min}* mice: Inflammatory stimuli by dextran sodium sulfate results in development of multiple colonic neoplasms. 96th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (2005, 4)
- 34) Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S., Hirose, Y., Nakagama, H. and Tanaka, T. Strain difference in sensitivity to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. 96th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (2005, 4)
- 35) Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S., Takahashi, M., Wakabayashi, K. and Tanaka, T. β -Catenin mutations in colonic adenocarcinomas in male ICR mice initiated with three different colonic carcinogens (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine, azoxymethane and 1,2-dimethylhydrazine) and promoted by dextran sodium sulfate. 96th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (2005, 4)
- 36) Tanaka, T. Pre-clinical study on cancer chemoprevention by non-nutritive constituents in citrus fruit. ISCaP “Molecular Targeting Cancer Chemoprevention” – ProBRAIN Joint Symposium “citrus constituents and Cancer Prevention” (2005, 5)
- 37) Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S., Tsuda, H. and Tanaka, T. Dietary supplementation with silymarin inhibits 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced prostate carcinogenesis in male F344 rats. ISCaP “Molecular Targeting Cancer Chemoprevention” (2005, 5)
- 38) Suzuki, R., Kohno, H., Hata, K., Sumida, T., Sugawara, K., Sugie, S. and Tanaka, T. Modifying effect of citrus unshiu segment membrane on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in C57BL/KsJ-*db/db* mice. ISCaP “Molecular Targeting Cancer Chemoprevention” (2005, 5)
- 39) Sugie, S., Kato, K., Kitaori, N., Yoshida, K., Kohno, H., Suzuki, R., Shimada, S., Tanaka, T. and Mori, H. Chemopreventive effects of yeast, Zinc and zinc-enriched yeast on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. ISCaP “Molecular Targeting Cancer Chemoprevention” (2005, 5)
- 40) 田中卓二 : Indole-3-carbinol による発がん修飾 : 特に大腸発がんへの影響についての考察。第 1 2 回日本がん予防研究会・第 2 8 回日本がん疫学研究会合同シンポジウム (2005, 7)
- 41) 浅野奈美、原 明、宮崎康雄、岡 直樹、智慧蘭、尾山 武、盛 弘強、加藤恵三、坂田佳子、久野壽也、森 秀樹、田中卓二 : Zerumbone による diethylnitrosamine (DEN) 誘発ラット肝発癌に対する影響。第 1 2 回日本がん予防研究会 (2005, 7).
- 42) 甲野裕之、鈴木里加子、杉江茂幸、田中卓二 : AOM/DSS 誘発マウス大腸発がんに対するクマリン系フラボノイドによる修飾効果。第 1 2 回日本がん予防研究会 (2005, 7)
- 43) 森 幸雄、立松憲次郎、杉江茂幸、田中卓二、森 秀樹 : α -Naphthyl isothiocyanate の実験発がん抑制作用における代謝活性化の役割。第 1 2 回日本がん予防研究会 (2005, 7)
- 44) 鈴木里加子、甲野裕之、杉江茂幸、田中卓二、津田洋幸 : ヒト正常型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラットの 4-NQO 誘発舌発がんとその抑制。第 1 2 回日本がん予防研究会 (2005, 7)
- 45) 久野壽也、廣瀬善信、山田泰広、浅野奈美、尾山 武、原 明、森 秀樹、杉江茂幸、田中卓二 : 玄米発酵食による *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine 誘発マウス膀胱癌抑制効果の検討。第 1 2 回日本がん予防研究会 (2005, 7)
- 46) 杉江茂幸、甲野裕之、鈴木里加子、田中卓二、盛 弘強、森 秀樹 : BBN 誘発ラット膀胱発がんモデルにおける benzylisothiocyanate (BITC)、phenylethyl

- isothiocyanate (PEITC)の修飾効果。第12回日本がん予防研究会 (2005, 7)
- 47) 唐 明希、小川久美子、朝元誠人、外岩戸尚美、Azman Seeni、鈴木周五、高橋智、白井智之、田中卓二：Nobiletin および Auraptene による probasin/SV40 T 抗原トランスジェニックラット前立腺癌の抑制効果。第12回日本がん予防研究会 (2005, 7)
- 48) 鈴木里加子、甲野裕之、杉江茂幸、仁保直子、坂野克久、高橋真美、若林敬二、田中卓二：*Apc^{Mim}* マウス大腸発がんに対する dextran sodium sulfate の影響。第20回発癌病理研究会 (2005, 8)
- 49) Suzuki, R., Kohno, H., Hata, K. and Tanaka, T. Dextran sodium sulfate strongly promotes the development of intestinal lesions in *Apc^{Mim}* mice. 18th Asia Pacific Cancer Conference – Toward the Tailored Therapy for Cancer (2005, 9)
- 50) 田中卓二：がん化学予防前臨床試験のための動物実験モデル。第64回日本癌学会シンポジウム S5 「がん化学予防の実践と戦略」 (2005, 9)
- 51) 鈴木里加子、甲野裕之、畑 和也、杉江茂幸、仁保直子、坂野克久、高橋真美、若林敬二、田中卓二：*Apc^{Mim}* マウス大腸発がんに対する dextran sodium sulfate の影響。第64回日本癌学会ワークショップ W3-8 「炎症とがん」 (2005, 9)
- 52) 甲野裕之、鈴木里加子、山口かずえ、杉江茂幸、若林敬二、田中卓二：AOM/DSS 誘発マウス大腸発がんに対する COX-2 阻害剤および PPAR リガンドの修飾作用。第64回日本癌学会 (2005, 9)
- 53) 宇都宮洋才、稲田健一、武田公一、田中卓二：*Helicobacter pylori* 感染スナネズミ腺胃における auraptene の作用。第64回日本癌学会 (2005, 9)
- 54) 浅野奈美、原 明、宮崎康雄、岡 直樹、智慧蘭、尾山 武、盛 弘強、加藤恵三、坂田佳子、久野壽也、田中卓二、森秀樹：Zerumbone による diethylnitrosamine (DEN) 誘発ラット肝発癌に対する影響。第64回日本癌学会 (2005, 9)
- 55) シーニ アズマン、小川久美子、朝元誠人、高橋 智、唐 明希、田中卓二、白井智之：ヒト大腸癌細胞株を用いた柑橘類化合物 Auraptene と Nobiletin の化学予防効果の解析。第64回日本癌学会 (2005, 9)
- 56) 唐 明希、小川久美子、朝元誠人、外岩戸尚美、シーニ アズマン、田中卓二、白井智之：Nobiletin および Auraptene による probasin/SV40 T 抗原トランスジェニックラット前立腺癌の抑制効果。第64回日本癌学会 (2005, 9)
- 57) 畑 和也、盛 弘強、山田泰広、尾山 武、久野壽也、廣瀬善信、原 明、田中卓二、森 秀樹：幼若な *Apc^{Mim}* mice の大腸にも β -catenin-accumulated crypts は存在する。第64回日本癌学会 (2005, 9)
- 58) 杉江茂幸、甲野裕之、鈴木里加子、中釜 齊、田中卓二：AOM/DSS マウス大腸発がんモデルにおける系統差の検討。第64回日本癌学会 (2005, 9)
- 59) 中西雅子、田澤 大、田中卓二、杉村 隆、中釜 齊：PhIP と DSS により誘発されるマウス大腸発がんにおける炎症の影響。第64回日本癌学会 (2005, 9)
- 60) 甲野裕之、鈴木里加子、杉江茂幸、田中卓二：炎症関連マウス大腸発がんに対するウルソデオキシコール酸の修飾作用およびその機構解析。第16回日本消化器癌発生学会総会 (2005, 10)
- 61) 森 幸雄、立松憲次郎、杉江茂幸、田中卓二、森秀樹：ナフトフラボンによるラット肝のシトクロム P450 1A、ヘテロサイクリックアミンの変異原的活性化及び UDP-グルクロン酸抱合の誘導。第34回日本環境変異原学会 (2005, 11)
- 62) Tanaka T. Inflammation-related colon carcinogenesis. 2005 Annual Meeting of Korean Society for Free Radical Research (2005, 11)
- 63) Tanaka T. An animal model for the inflammation-related colon carcinogenesis. Symposium 4: Cellular Signaling Network Regulating Inflammation: A Prime Target for Disease Prevention and Therapy. The Annual Meeting of the Korea Society of Pharmaceutical Sciences (2005, 11)
- 64) Kohno, H., Suzuki, R., Miyamoto, S., Sumida, T., Sugawara, K., Sugie, S. and

- Tanaka, T. Citrus unshiu segment membrane suppresses azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci and β -catenin accumulated crypts in male *db/db* mice. 4th Regional APOCP Conference, Symposium IV-Pathology and Chemoprevention (2006, 1)
- 65) Miyamoto, S., Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S. and Tanaka, T. Dietary auraptene inhibits azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in female *db/db* mice. 4th Regional APOCP Conference (2006, 1).
- 66) Tanaka, T. Cancer chemoprevention by lactoferrin and its possible mechanisms. 4th Regional APOCP Conference, Lunchtime Seminar (2006, 1).
- 67) 杉江茂幸、甲野裕之、鈴木里加子、安井由美子、中釜 齊、田中卓二：A/J、SM/Jマウスを用いた PhIP/DSS 大腸発がんモデルにおける系統差の検討。第3回日本癌学会カンファレンス「動物モデルによる新時代のがん研究-発症機構から治療まで-」がん予防研究 (2006, 3).
- 68) Kim, M., Murakami, A., Tanaka, T. and Ohigashi, H. Effects of green tea polyphenols on dextran sulfate sodium-induced colitis in male ICR mice. 97th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (2006, 4).
- 69) Murakami, A., Nishizawa, T., Yasuda, M., Tanaka, T., Colburn, N.H. and Ohigashi, H. Linoleic acid metabolite suppresses skin tumor promotion in mice and induces programmed cell death protein 4 in mouse epidermal JB6 cells. 97th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (2006, 4)
- 70) Kohno, H., Suzuki, R., Miyamoto, S., Sugie, S., Curini, M., Epifano, F., Maltese, F., Gonzales, S.P. and Tanaka, T. Suppression of colitis-related mouse colon carcinogenesis by dietary administration with prenyloxycoumarins, auraptene and collinin. 97th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (2006, 4)
- 71) Sugie, S., Suzuki, R., Kohno, H., Tanaka, T. and Mori, H. Modifying effect of thiol compounds on diethylnitrosamine (DEN)-phenobarbital (PB) induced rat hepatocarcinogenesis. 97th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (2006, 4)
- 72) Tanaka, T., Suzuki, R., Kohno, H., Hata, K., Sugie, S., Miyamoto, S., Sugawara, K., Sumida, T. and Hirose, Y. Diet supplemented with citrus unshiu segment membrane suppresses azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci and β -catenin accumulated crypts in male *db/db* mice. 97th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (2006, 4)
- 73) Epifano, F., Curini, M., Genovese, S., Menghini, L. and Tanaka, T. Synthesis and preliminary colon cancer chemoprevention evaluation of a novel prodrug of 4'-geranyloxy-ferulic acid, active principle of *Acronychia baueri* Schott. GA 2006 - International Congress and 54th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research (2006, 8).
- H. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

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）
反復投与毒性や発がん性試験等の実施による既存添加物の安全性に関する研究
平成 17 年度分担研究年度終了報告書

トコトリエノールの安全性評価に関する研究
分担研究者 西川秋佳 国立医薬品食品衛生研究所病理部室長

研究要旨： 穀類やパーム油などに豊富に含まれているトコトリエノールは、ビタミンEと化学構造上の類似性を有し、トコフェロールと同様の抗酸化作用を有することから、酸化防止の目的で食品添加物として使用されている。F344 ラットを用いた 13 週間反復投与毒性試験では、雄の 0.75% 投与群で肝細胞肥大などがみられたことから、無毒性量(NOEL)は 0.19%（雄で 120 mg/kg 体重、雌で 130 mg/kg 体重）と推定されている。今回、Wistar Hannover ラットを用いたトコトリエノールの 1 年間慢性毒性・2 年間発がん性併合試験を実施した。1 年間の慢性毒性試験の雌雄 2.0% 群において、造血臓器および肝臓に対する影響が示唆され、病理組織学的検索の結果、肝臓の海綿状変性が認められたことから、NOEL は雌雄ともに 0.4%（雄で 297 mg/kg 体重、雌で 467 mg/kg 体重）と推定された。がん原性試験は 2 年間の動物実験を終了し、剖検にて雌雄 2.0% 群において肝臓の結節性病変が多発しているのが観察され、それらは病理組織学的に結節性再生性過形成、肝細胞腺腫ないし肝細胞癌であることが確認された。

A. 研究目的

近年、天然性添加物の開発および利用が盛んとなり、一般食品あるいは健康食品に広範に利用されている。これは、消費者の自然・天然指向によるところが大きい。しかし、このような天然性添加物の多くは、安全性試験による健康影響の評価がなされていないのが現状であり、広く消費者等からその安全性の評価が求められている。

穀類やパーム油などに豊富に含まれているトコトリエノールは、ビタミンEと化学構造上の類似性を有し、トコフェロールと同様の抗酸化作用を有することから、酸化防止の目的で食品添加物として使用されている。ラットを用いたトコトリエノールの 13 週間反復投与毒性試験では、無毒性量(NOEL)は 0.19%（雄で 120 mg/kg 体重、雌で 130 mg/kg 体重）と推定され、雄の 0.19% 投与群で平均赤血球容積の減少、A/G 比の上昇、血清アルカリフォスファターゼの上昇および相対副腎重量の増加がみられたことから、無影響量(NOEL)は求められていない。慢性毒性試験および発がん性試験は実施されていないこと

から、今回ラットを用いた 1 年間慢性毒性・2 年間発がん性併合試験を実施した。

B. 研究方法

<被験物質並びに飼料の調製>

パーム油より得られたビタミンE混合物を蒸留により精製したトコトリエノールをエーザイ株式会社（東京）より供与を受けた。トコフェロールを完全に分離することはできないので、被験物質の組成は α -トコトリエノール 21.4%、 β -トコトリエノール 3.5%、 γ -トコトリエノール 36.5%、 δ -トコトリエノール 8.6%、 α -トコフェロール 20.5%、 β -トコフェロール 0.7%、 γ -トコフェロール 1.0%、 δ -トコフェロール 0.5%であった。粉末基礎食 CE-2（日本クレア株式会社、東京）に混和し、適正濃度となるように添加した。投与濃度は、トコトリエノールの 13 週間反復投与毒性試験の結果から、慢性毒性試験では最高用量を 2.0%とし、以下 0.4%、0.08%、および 0%（対照群）の 4 段階とし、発がん性試験では 2%、0.4% および 0%（対照群）の 3 段階とした。トコト

リエノール含有飼料は、給餌まで冷暗所 (4°C) に保存した。

<実験動物並びに飼育条件>

雌雄の Wistar Hannover ラットを日本クレア株式会社より 5 週齢で入手し、CE-2 基礎飼料と水道水で 1 週間馴化飼育後に試験に用いた。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、換気回数 18 回/時 (オールフレッシュ)、12 時間蛍光灯照明、12 時間消灯の条件下で行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 3~4 匹ずつ収納し、床敷は三協ラボサービス社(東京)のソフトチップを使い、週 2 回交換を行った。また、飲料水として水道水を馴化および試験期間中に自由に摂取させた。

<試験方法>

「1 年間慢性毒性試験」

6 週齢の雌雄の Wistar Hannover ラット 100 匹 (雌 50 匹、雄 50 匹) を使用して、トコトリエノールの 1 年間反復投与試験を実施した。実験群は、雌雄とも対照群 (0%、雄 10 匹、雌 10 匹)、0.08% (雄 10 匹、雌 10 匹)、0.4% (雄 10 匹、雌 10 匹)、2.0% (雄 20 匹、雌 20 匹) の 4 群で構成した。試験期間は 1 年とし、試験期間中、体重測定、摂餌量測定、臨床的一般症状の観察を試験開始 5 週間までは毎週行い、それ以後は 5 週おきに測定した。

試験期間終了時には、全生存動物を剖検した。動物は剖検前日より絶食させ、翌日エーテル麻酔下で腹部大動脈から採血後、屠殺・剖検した。死亡動物および瀕死動物についても剖検し、できる限り死因を特定した。

血液学的検査として、白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン量 (Hb)、ヘマトクリット値 (Ht)、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) およびプロトロンビン時間などについて測定し、さらに、白血球の型別分類を行った。血清生化学的検査として、総蛋白 (TP)、A/G 比、アルブミ

ン (ALB)、ビリルビン (BIL)、中性脂肪 (TG)、総コレステロール (TC)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRN)、カルシウム (Ca)、無機リン (P)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、塩素 (Cl)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、アラニントランスアミナーゼ (ALT)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GT) および乳酸脱水素酵素 (LDH) などについて測定した。

諸臓器は肉眼的に観察後摘出し、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、副腎、腎臓および精巣の重量を測定した。上記の臓器に加え、鼻腔を含む頭蓋、下垂体、眼球、ハルダー腺、脊髄、唾液腺、胸腺、胃、小腸、大腸、盲腸、膵臓、膀胱、皮膚、乳腺、リンパ節、胸骨、大腿骨、気管、食道、甲状腺、舌、大腿筋、三叉神経、坐骨神経、精巣上体、精囊、前立腺、凝固腺、子宮、卵巣および膈を 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。臓器は常法に従い、パラフィン包埋後、薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、病理組織学的検索を行った。

統計学的処理法として、血液学的検査値、血清生化学的検査値、体重および臓器重量については、原則として、各群の分散比を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は、一元配置分散分析を行い、不等分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合の多重比較は Dunnett の方法で対照群と各被験物質投与群との間で有意差検定を行った。その他の方法も適宜併せ実施した。

「2 年間がん原性試験」

6 週齢の雌雄の Wistar Hannover ラット 300 匹 (雌 150 匹、雄 150 匹) を使用して、トコトリエノールの 2 年間の癌原性試験を実施した。実験群は、雌雄とも対照群 (0%、雄 50 匹、雌 50 匹)、0.4% (雄 50 匹、雌 50 匹)、2.0% (雄 50 匹、雌 50 匹) の 3 群で構成した。試験期間は 2 年間とし、試験期間中、体重測定、摂餌量測定、臨床的一般症状の観察を試験開始 5 週間までは毎週行い、それ以後は 5 週おきに測定した。

試験期間終了時には、全生存動物を剖検し