

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、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、腫瘍性病変病理組織学的検索を行った。

統計学的処理法として、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。

<倫理面への配慮>

動物実験は国立医薬品食品衛生研究所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。

C. 研究結果

「1年間慢性毒性試験」

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25-30g、雌で約20g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1452mg/kg/日、0.4%群で297mg/kg/日、0.08%群で70mg/kg/日、雌では2%群で1875mg/kg/日、0.4%群で467mg/kg/日、0.08%群で68mg/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、プロトロンビ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およびプロトロ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。

病理組織学的検索結果をTable 1に示す。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、膀胱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。

「2年間がん原性試験」

体重の推移を Fig. 1 及び 2 に示す。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(Fig. 3 及び 4)。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(Table 2)、雌では用量に相関した有意な低値を示した(Table 3)。諸臓器の重量は、雄では群間差はみられなかったが(Table 2)、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(Table 3)。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(Table 3)。

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(Table 4)。現在、その他臓器の病理組織学的検索を継続中である。

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。

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。

F. 健康危険情報

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の情報と考えられ、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, Kinoshita 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, Miyachi 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.

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： MeIQ_x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(KBrO₃)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

- 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）
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし
- 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 *OGG1* 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 *OGG1*
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)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし

Table 1. Histopathological findings in male and female rats given tocotorienol for 12 months

Sex	Dose	Male					Female				
		No. of animals examined					No. of animals examined				
		Control	0.08 %	0.4 %	20 %		Control	0.08 %	0.4 %	20 %	
		10	10	10	14	10	10	10	10	20	
Heart	Focal inflammation	0	0	2	2	0	0	0	0	0	
Lung	Intravascular calcification	1	0	1	2	0	1	0	0	0	
	Foamy cell infiltration	1	2	1	6	2	3	2	12		
Liver	Spongiosis hepatitis	0	0	0	12	0	0	0	0	19	
	Focal necrosis	1	2	0	0	0	0	0	1	1	
	Bile duct hyperplasia	0	2	4	1	0	1	0	2	2	
	Perivascular cell infiltration	0	1	1	0	0	0	0	0	0	
	Altered foci										
	eosinophilic	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
	basophilic	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
	clear	0	1	1	1	0	1	0	0	0	
Kidney	Hyalin cast	5	4	4	1	0	0	1	0	0	
	Tubular regeneration	3	5	4	2	0	0	0	0	0	
	Cortical cyst	0	0	1	0	0	0	0	1	1	
	Calcification	0	0	0	1	3	4	7	8		
Spleen	Extramedullary hematopoiesis	0	1	0	0	0	2	0	0	0	
	Atrophy of white pulp	0	0	0	0	0	2	1	1	1	
Fore stomach	Ulceration	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
Glandular stomach	Atrophy/Dilatation of gland	0	0	1	2	0	0	0	0	0	
Uterus	Cystic dilatation	-	-	-	-	0	1	2	2	2	
Pancreas	Acinar atrophy	0	0	0	0	0	0	1	1	1	
	Vacuolization of acinar cells	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
Adrenal gl.	Cortical vacuolization	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
	Angiectasis	0	0	0	1	0	0	0	1	1	
Pituitary gl.	Cystic dilatation/Angiectasis	1	1	0	2	0	0	2	3	3	
	Anterior hyperplasia	0	0	0	1	2	0	0	0	0	
	Anterior adenoma	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
Thyroid gl.	Follicular cell hyperplasia	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
	C-cell adenoma	0	0	1	1	0	0	1	1	1	

Table 2 Relative organ weights of Wistar Hannover male rats treated with tocotrienol in 104 weeks

	Group 1(0%)	Group 2(0.4%)	Group 3(1%)
Body Weight(g)	558.1 ± 86.3 ^{a)}	561.3 ± 52.3	530.4 ± 65.1
Brain(g)	2.23 ± 0.16	2.24 ± 0.09	2.24 ± 0.09
Lungs(g)	1.5 ± 0.12	1.53 ± 0.15	1.53 ± 0.18
Heart(g)	1.39 ± 0.26	1.44 ± 0.25	1.43 ± 0.18
Spleen(g)	1.04 ± 0.25	0.99 ± 0.2	1.71 ± 3.68
Liver(g)	14.29 ± 2.73	14.7 ± 2.58	14.19 ± 2.68
Adrenals(mg)	83.53 ± 111.41	58.75 ± 14.67	62.74 ± 30.01
Kidneys(g)	3.47 ± 0.75	3.44 ± 0.75	3.37 ± 0.5
Testes(g)	3.98 ± 1.26	3.79 ± 0.73	3.82 ± 0.81

	Group 1(0%)	Group 2(0.4%)	Group 3(1%)
Brain(g%)	0.42 ± 0.14	0.4 ± 0.05	0.43 ± 0.06
Lungs(g%)	0.28 ± 0.06	0.27 ± 0.02	0.29 ± 0.07
Heart(g%)	0.25 ± 0.06	0.26 ± 0.05	0.27 ± 0.05
Spleen(g%)	0.19 ± 0.04	0.18 ± 0.03	0.33 ± 0.7
Liver(g%)	2.58 ± 0.43	2.62 ± 0.42	2.72 ± 0.74
Adrenals(mg%)	15.84 ± 23.09	10.48 ± 2.51	12.53 ± 9.12
Kidneys(g%)	0.63 ± 0.15	0.62 ± 0.15	0.65 ± 0.18
Testes(g%)	0.72 ± 0.26	0.68 ± 0.13	0.72 ± 0.14

a): Mean ± S.D.

Table 3 Relative organ weights of Wistar Hannover female rats treated with tocotrienol in 104 weeks

	Group 1(0%)	Group 2(0.4%)	Group 3(1%)
Body Weight(g)	409.9±74.4 ^{a)}	361.5±69.9 ^{**}	319.0±54.8 ^{**}
Brain(g)	2.06±0.09	2.06±0.09	2.04±0.08
Lungs(g)	1.16±0.11	1.12±0.11	1.07±0.12 [*]
Heart(g)	1.02±0.12	0.98±0.13	0.93±0.12 ^{**}
Spleen(g)	0.86±0.19	0.83±0.39	0.65±0.22 ^{**}
Liver(g)	9.05±2.22	8.54±1.62	8.91±2.2
Adrenals(mg)	72.27±12.9	75.69±18.4	74.55±18.48
Kidneys(g)	2.21±0.26	2.07±0.29 [*]	1.99±0.24 ^{**}

	Group 1(0%)	Group 2(0.4%)	Group 3(1%)
Brain(g%)	0.52±0.1	0.59±0.12 ^{**}	0.66±0.1 ^{**}
Lungs(g%)	0.29±0.05	0.32±0.05 [*]	0.34±0.05 ^{**}
Heart(g%)	0.25±0.03	0.28±0.03 ^{**}	0.30±0.03 ^{**}
Spleen(g%)	0.21±0.06	0.24±0.12	0.21±0.07
Liver(g%)	2.23±0.53	2.38±0.34	2.80±0.52 ^{**}
Adrenals(mg%)	17.99±3.64	21.6±6.61 [*]	24.03±7.36 ^{**}
Kidneys(g%)	0.55±0.09	0.59±0.1	0.63±0.1 ^{**}

a):Mean±S.D.

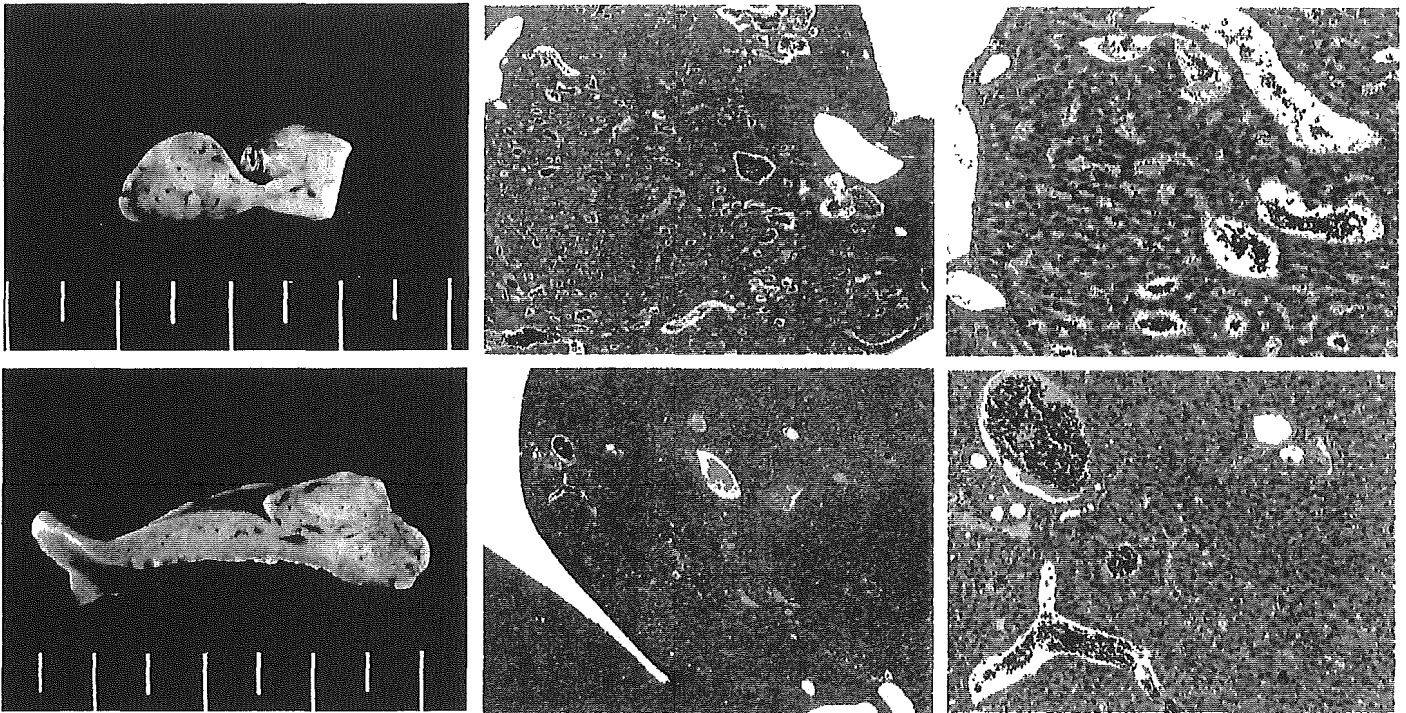
^{*}, ^{**}:p<0.05,0.01 vs Group 1

Table 4. Incidence of liver lesions in male and female rats given tocotrienol for 2 years

Sex	Treatment	No. of animals	Spongiosis	Nodular regenerative hyperplasia	Hepatocellular			
					Adenoma Incidence	Adenoma Multiplicity	Carcinoma Incidence	Carcinoma Multiplicity
Male	Control	—	—	—	—	—	—	—
	Tocotrienol (2%/1%)	23	23/23 (100)	23/23 (100)	1/23 (4)	0.04 ± 0.20	1/23 (4)	0.04 ± 0.20
Female	Control	38	0/38	0/38	0/38	0	0/38	0
	Tocotrienol (2%/1%)	47	47/47 (100)	45/47 (96)	7/47 (15) *	0.19 ± 0.50 *	0/47	0

(): % *: p<0.05 vs. Control

Nodular regenerative hyperplasia



Hepatocellular adenoma



Hepatocellular carcinoma

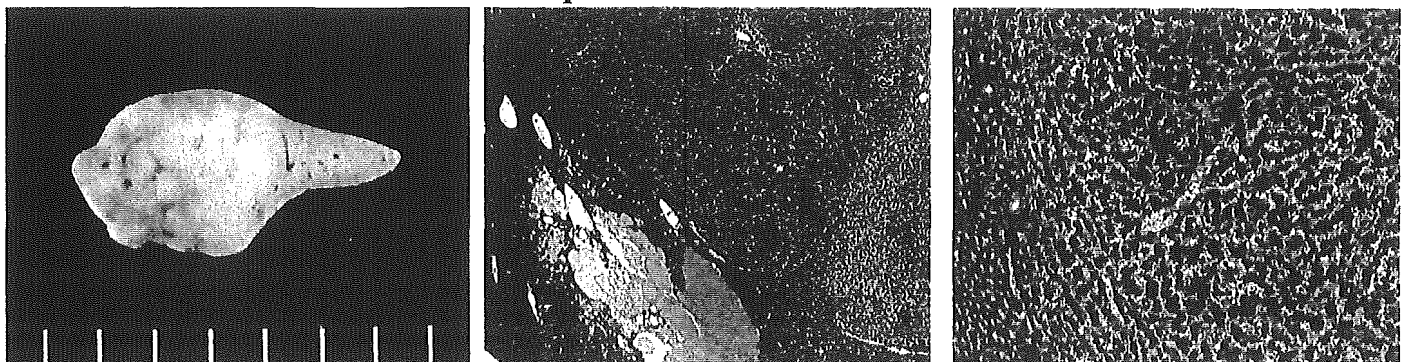


Fig.1 トコトリエノール癌原性試験 ラット雄の体重曲線

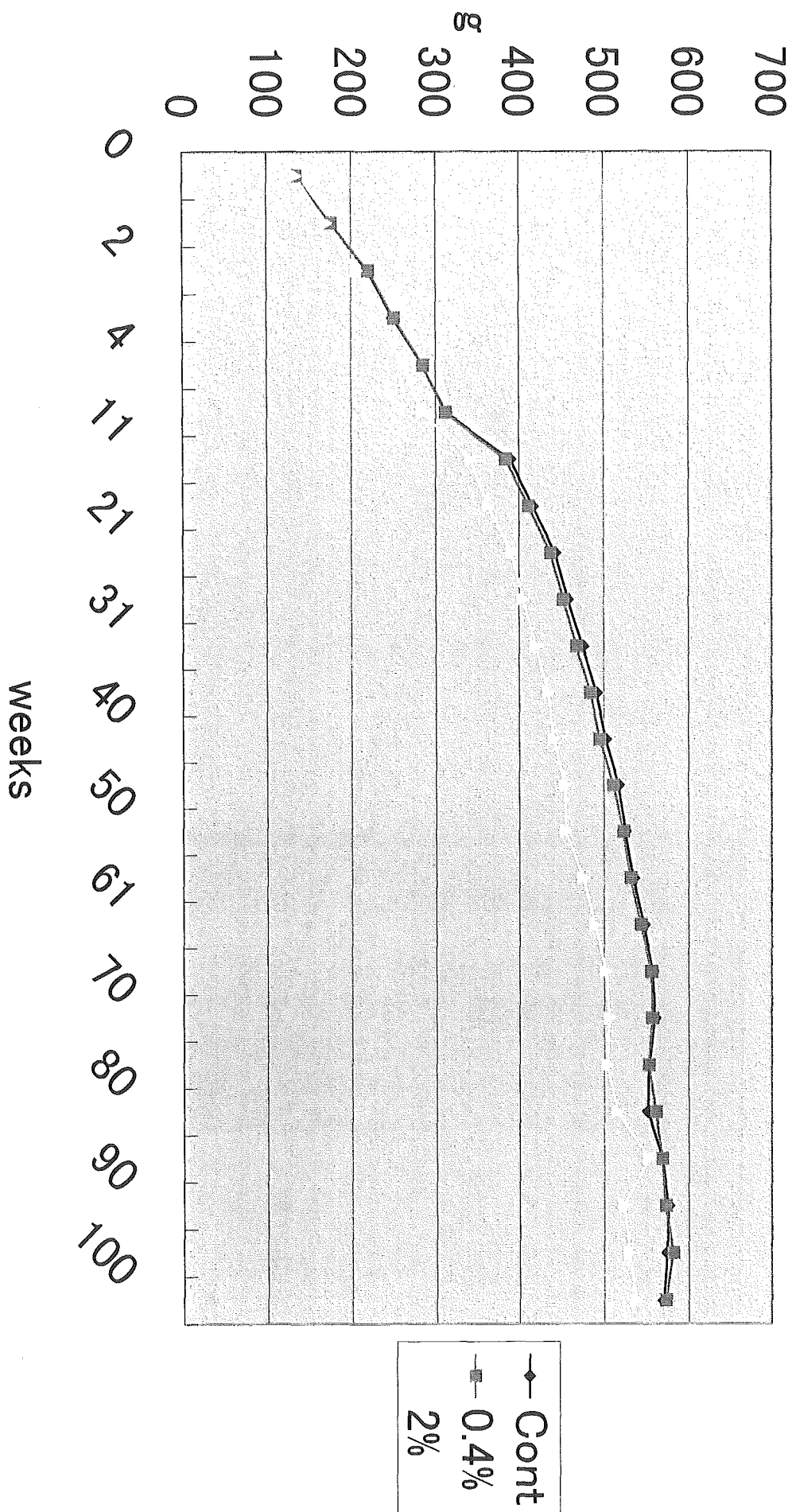


Fig.2 トコトリエノール癌原性試験 ラット雌の体重曲線

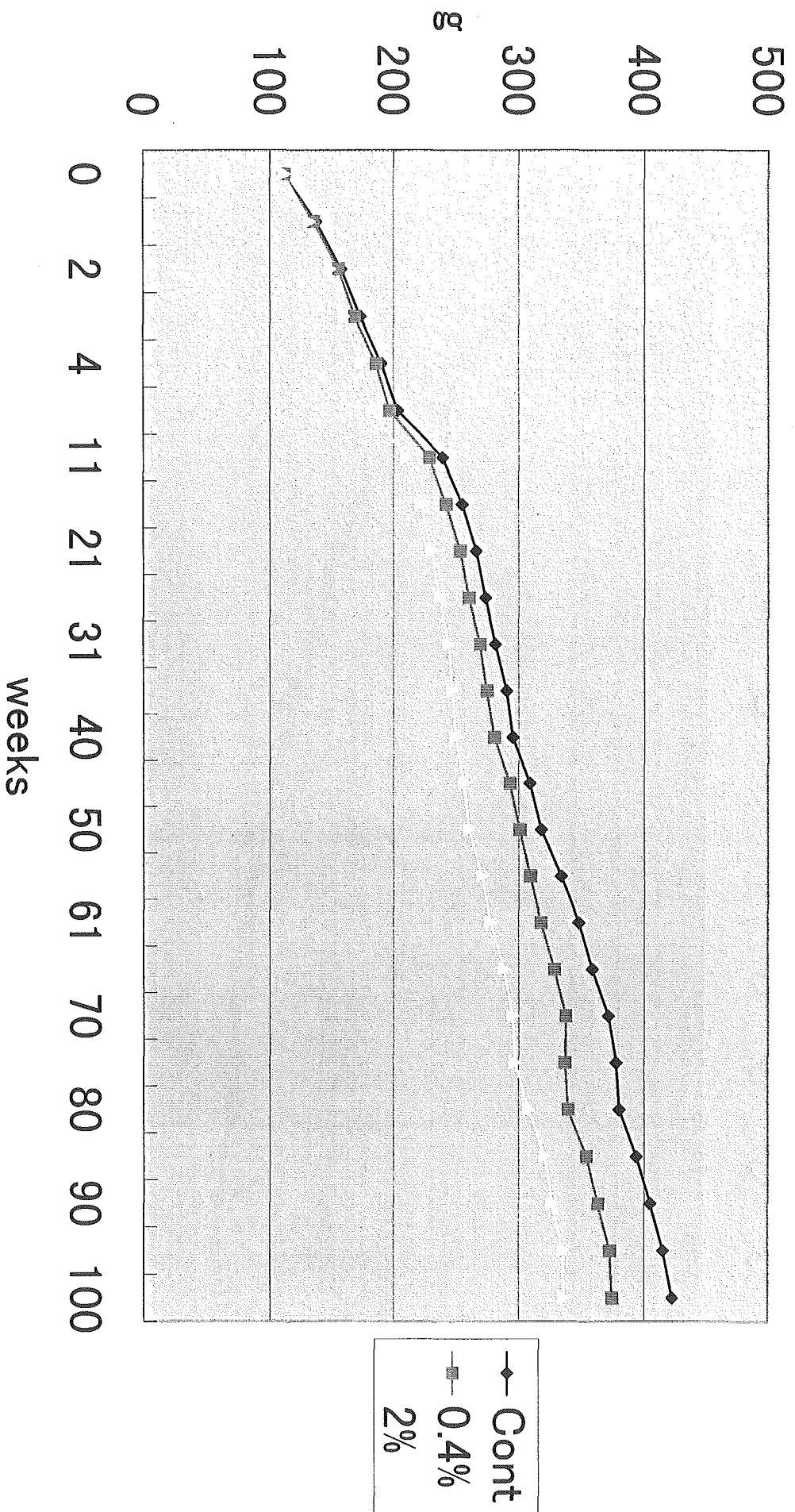


Fig.3 トコトリエノール癌原性試験 ラット雄の生存曲線

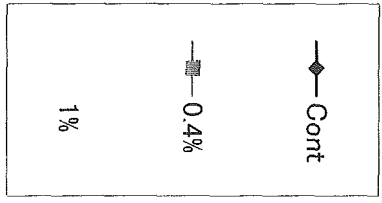
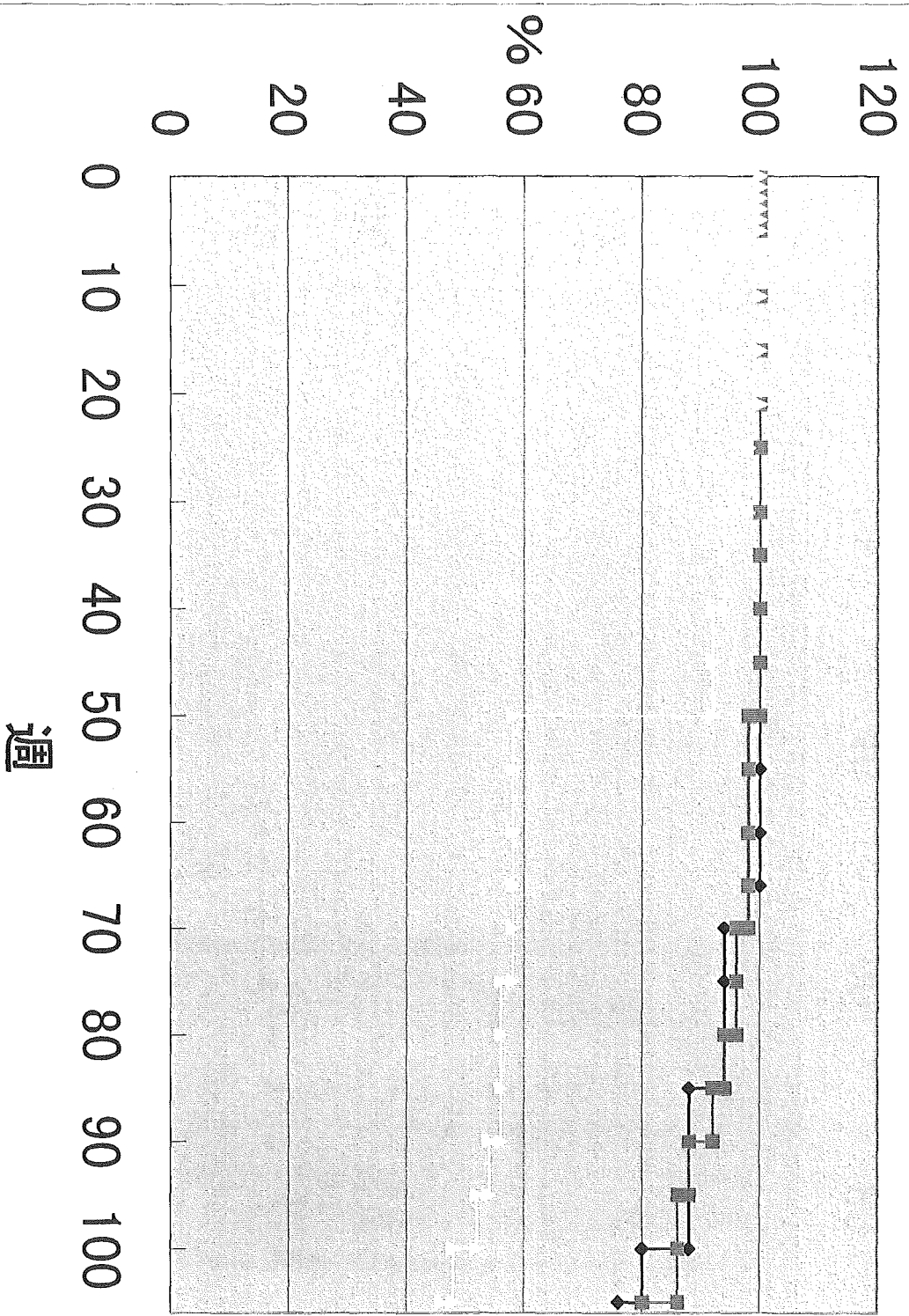
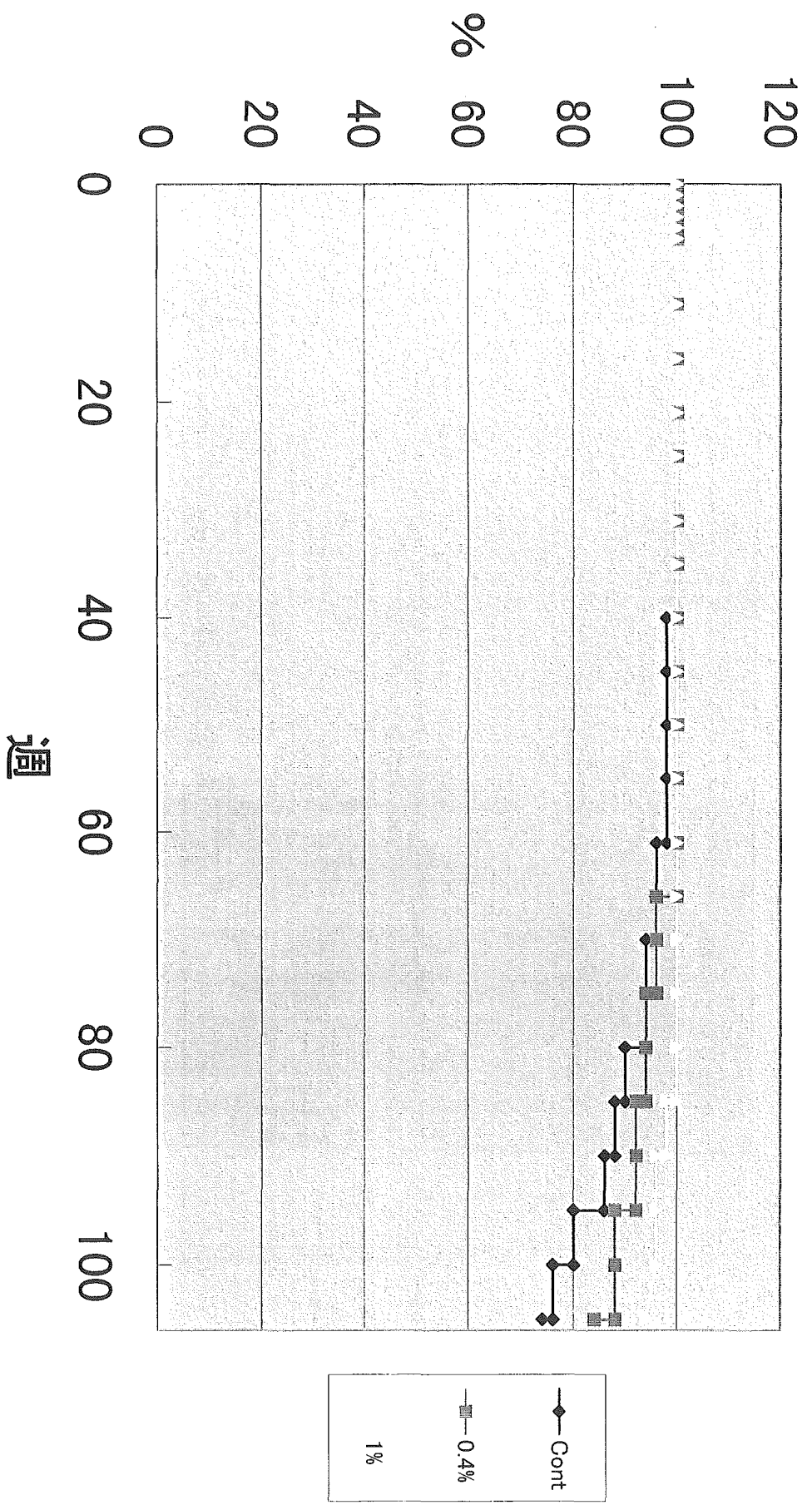


Fig.4 トコトリエノール癌原性試験 ラット雌の生存曲線



フェルラ酸の安全性評価に関する研究

分担研究報告書

分担研究者 田中卓二 金沢医科大学腫瘍病理学講座

研究要旨： 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% とし、公比 2 で、1%、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。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、消費者の自然・天然指向を背景に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。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十分にはなされていないのが現状であり、その安全性の評価が広く求められているところである。イネ科植物の細胞壁に豊富に含有されているフェルラ酸

(4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid, Fig. 1)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、本分担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

<実験動物および飼育条件>

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±2℃、湿度 50±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。

<被験物質および飼料の調製>

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% とし、公比 2 で、1%、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°

C) に保存した。なお、添加飼料および飲水は自由摂取とした。

<試験方法および観察>

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% (雄 52 匹、雌 52 匹)、2% (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、精嚢腺、凝固腺、精巣上体、卵管、膈、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)、平均赤血球色素量 (MCH)、平均赤血球色素濃度 (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 (Aib)、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>

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。

(倫理面への配慮)

動物実験は本学動物実験実施規定の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。

C. 試験結果

<一般状態および死亡動物>

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。Fig. 2 と Fig. 3 にそれぞれ雄ラット、雌ラットの生存率を示すが、試験終了までに、0% フェルラ酸投与群で雄 10 匹、雌 10 匹、0.5% フェルラ酸投与群で雄 18 匹、雌 10 匹、1% フェルラ酸投与群で雄 10 匹、雌 7 匹、2% フェルラ酸投与群で雄 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 0% フェルラ酸投与群 : 723 ± 50 、0.5% フェルラ酸投与群 : 704 ± 72 、1% フェルラ酸投与群 : 711 ± 59 、2% フェルラ酸投与群 : 715 ± 78 、雌で 0% フェルラ酸投与群 : 723 ± 48 、0.5% フェルラ酸投与群 : 727 ± 35 、1% フェルラ酸投与群 : 728 ± 44 、2% フェルラ酸投与群 : 706 ± 84 と、雌雄とも各群間に有意の差を認めなかった。

<体重および摂餌量>

試験期間中の平均体重の推移を Fig. 4 (雄)、Fig. 5 (雌) に示す。雌雄とも、平均体重増加率は、2% 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% フェルラ酸投与群、1% 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を Table 1 に示すが、雌雄とも対照群に比べ 0.5% お

よび1%フェルラ酸投与群では有意 ($P<0.001$ ないし $P<0.005$) に低い、2%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>

血液学的検査の結果を Table 2 (雄)、Table 3 (雌) に示した。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>

血液生化学的検査の結果を Table 4 (雄)、Table 5 (雌) に示す。雄では、1%フェルラ酸投与群および2%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%フェルラ酸投与群において ALP の有意な低値が、1%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%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%フェルラ酸投与群および2%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%フェルラ酸投与群、1%フェルラ酸投与群および2%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。

<臓器重量>

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) の結果を Tables 6、7 (雄)、Tables 8、9 (雌) に示す。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%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したが、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%フェルラ酸投与群および2%フェルラ酸投与群で脾重量と副腎重量の有意な低値を、2%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%フェルラ酸投与群で脾重量に有意な低値を、2%フェル

ラ酸投与群で副腎重量の有意な低値をみとめた。

<病理組織学的所見>

動物に発生した増殖性病変の頻度を Tables 10-15 に示す。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、脾、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 (Tables 10、11) 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 (Table 10)。また、雌の1%フェルラ酸投与群および2%フェルラ酸投与群で肝内胆管増殖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 (Table 11)。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 (Tables 12、13) では、雄で肺、舌、前胃、肝、前立腺、精巣、造血器系、甲状腺、副腎、脾、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、脾、皮膚、乳腺に増殖性病変が発生した。そのうち、雄の2%フェルラ酸投与群で肝内胆管増殖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%フェルラ酸投与群および1%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 (Table 12)。雌の2%フェルラ酸投与群で肝内胆管増殖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

(Table 13)。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 (Tables 14、15)、雄では、1%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%フェルラ酸投与群では肝内胆管増殖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 (Table 14)。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 (Table 15)。

一方、非増殖性病変も全群に発生した。その発生頻度を Tables 16-18 に示す。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

(Table 16)、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 (Table 17)、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 (Table 18) は、いずれも群間に有意の差を示さなかった。

D. 考察

本分担研究では、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%とし、公比2で、1%、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、0%フェルラ酸投与群で雄10匹、雌10匹であったのに対し、0.5%フェルラ酸投与群では雄18匹、雌10匹、1%フェルラ酸投与群では雄10匹、雌7匹、2%フェルラ酸投与群では雄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%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%フェルラ酸投与群は対照群とほぼ同様であったが、0.5%フェルラ酸投与群、1%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%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%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%ないし2%フェルラ酸投与によりTP、AST、ALT、ALPの有意な低値や1%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変化が示唆された。雌では、1%ないし2%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%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%ないし2%フェルラ酸投与により膵と副腎の絶対重量の有意な低値を、2%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%フェルラ酸投与による膵と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、偶発変化あるいはと、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、膵、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、膵、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

本分担研究では、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%とし、公比2で、1%、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

本実験を遂行するに当たり、実験者の健康に特に問題はなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 Signport, Kerala (India), 2005.
- 2) 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 Signport, Kerala (India), 2005.
 - 3) 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 Signport, Kerala (India), 2005.
 - 4) 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 Signport, Kerala (India), 2005.
 - 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) 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.

- 17) Yasui, Y., Hosokawa, M., Sahara, T., Suzuki, R., Ohgiya, S., Kohno, H., Tanaka, T. and Miyashita, K. Bitter gourd seed fatty acid rich in 9c,11t,13t-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.
- 18) 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.
- 19) 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^{Min}* mice: Inflammation stimuli by dextran sodium sulfate results in development of multiple colonic neoplasms. *Int. J. Cancer*, 118: 25-34, 2006.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) Kohno, H., Suzuki, R., Curini, M., Epifano, F., Maltese, F., Gonzales, S.P. and Tanaka, T. Dietary administration with prenyloxycoumarins, auraptene and collinin, inhibits colitis-related colon carcinogenesis in mice. *Int. J. Cancer*, 118: 2936-2942, 2006.
- 24) 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.
- 25) 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) 杉江茂幸、山田泰広、釘 橋、森下由起夫、田中卓二、森 秀樹: DL-Alanine の慢性毒性。第 2 1 回日本毒性病理学会 (2005, 1)
- 2) 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 2 1 回日本毒性病理学会 (2005, 1)
- 3) 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「発がん予防 (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)
- 4) 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)
- 5) 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 9 4 回日本病理学会総会 (2005, 4)
- 6) 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および DSS 投与期間の影響。第 9 4 回日本病理学会総会 (2005, 4)
- 7) 杉江茂幸、ビイン・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 9 4 回日本病理学会総会 (2005, 4)
- 8) 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 9 4 回日本病理学会総会 (2005, 4)
- 9) Sugie, S., Kato, K., Kitaori, N., Yoshida, K., Kohno, H., Suzuki, R., Shimada, S., Mori, H. and