

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
既存添加物等の安全性に関する研究
平成 18 年度分担研究報告書

L-アスパラギンの安全性に関する研究

分担研究者： 今井田克己 香川大学医学部 腫瘍病理学 教授

研究要旨：L-アスパラギンは(L-asparagine)は旨みを出す調味料や栄養分を付け加える栄養強化剤の用途として既存添加物名簿に記載されている。その安全性評価の一環としてラットを用いた90日間の反復投与毒性試験を実施した。5%、2.5および1.25%のL-アスパラギン混餌飼料を90日間自由に摂取させ、対照群にはL-アスパラギンをコーンスターチで置き換えた合成基礎飼料のみを摂取させた。飼料は毎週2回交換し、毎週1回体重および摂餌量を測定した。投与期間中、一般状態の観察を連日実施した。動物は剖検日前日より絶食させ、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、血液学的検査、血清生化学的検査を行った。その結果、5%投与群のうち、雄では脳、腎臓、精巣で相対重量の増加が、雌ではGLU, PL, K, ALTなどの有意な上昇が見られた。病理学的所見に有意差は見られなかった。以上より無毒性量(NOEL)は飼料中濃度2.5%(雄1.65g/kg体重/day、雌1.73g/kg体重/day)と結論された。

A. 研究目的

L-アスパラギン(L-asparagine; $C_4H_8N_2O_3$)は中性極性側鎖アミノ酸に分類されるアミノ酸の1つで、分子量は132.12g/mol、等電点5.41、水にやや難溶で、酸味や苦みを伴い、旨みを出す調味料として、あるいは栄養分を付け加える栄養強化剤として既存添加物名簿に記載されている。アスパラギンは、生体内ではアスパラギン酸からアスパラギンシンターゼにより生合成され、また、アスパラギン酸とアンモニアにアスパラギナーゼにより分解される非必須アミノ酸である。近年、健康増進ブームでサプリメントとしても大量に摂取されるようになったアミノ酸の1つで、その基本的な健康に関する安全性評価が求められている。そこで、今回、安全性評価の一環としてラットを用いた90日間の反復投与毒性試験を実施した。

B. 研究方法

<動物並びに飼育条件>

5週齢のF344ラット(F344/DuCr1Crj)雌雄各40匹を日本チャールス・リバー社(神奈川)より購入し、約1週間の馴化飼育の後、雌雄とも各群10匹ずつ4群に配した。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 ± 2 度、湿度 $60\pm 10\%$ 、12時間蛍光灯照明、12時間消灯の条件下で行った。動物は、金網ケージに5匹ずつ飼育した。また、飲料水として水道水を自由に摂取させた。

<被験物質並びに投与量>

L-アスパラギンは味の素ライフサイエンス研究所(神奈川)から提供された原体を規定量混じたものを検体として使用した。L-アスパラギンはアミノ酸であるため、mineral mix(AIN-93G)およびvitamin mix(AIN-93G、ともにオリエンタル酵母)を含有する合成飼料に、L-アスパラギンをコーンスターチで置き換えた合成飼料を基礎飼料とした。検体の最高用量を混餌投与の上限とされる5%とし、以下公比2で2.5および1.25%の用量に設定した。L-アスパラギンをそれぞれの濃度で含有する基礎飼料を90日間自由に摂取させ、対照群にはL-アスパラギンをコーンスターチで置き換えた合成基礎飼料を同様に摂取させた。飼料は毎週2回交換した。被験物質の合成基礎飼料への添加および固形化を味の素(株)ライフサイエンス研究所(神奈川)に依頼し、試験に供した。また、飼料中のL-アスパラギンの含量、安定性の確認も同研究所に依頼した。

<観察並びに検索方法>

投与期間中、一般状態の観察を連日実施し、体重および摂餌量は毎週1回測定した。摂餌量は、毎週1回3日間の摂取量をケージ単位で測定し、ケージの収容動物数と日数から1匹あたりの1日平均摂餌量を計算した。動物は剖検日前日より絶食させ、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。

血液学的検査は、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

(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) 及び血小板数 (PLT) について (株) SRL 社 (東京) に依頼し測定した。

血清生化学的検査は、分離した血清を、総蛋白 (TP)、A/G 比、アルブミン (ALB)、ビリルビン (BIL)、総コレステロール (TC)、糖 (GLU)、リン脂質 (PL)、中性脂肪 (TG)、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) および γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GTP) について (株) SRL 社 (東京) に依頼し測定した。

諸臓器は肉眼的に観察後摘出し、脳、下垂体、心臓、肺、肝臓、脾臓、副腎、腎臓、精巣、精囊、前立腺、卵巣、子宮、唾液腺および胸腺の重量を測定した。上記の臓器に加え、鼻腔を含む頭蓋、眼球、ハーダー腺、脊髄、大動脈、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、坐骨神経、精巣上部、凝固腺および膈を 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。対照群と最高投与濃度である 5% 群の全動物については、上記の器官・組織について、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・エオジン染色標本を作製し、検査した。なお、2.5% および 1.25% 群については 5% 投与群で異常所見が得られた場合に病理組織学的な検討を加えることとした。しかし、今回 5% 投与群で病理組織学的異常所見は認められず、追加検討は行わなかった。

<統計学的処理法>

体重、血液学的検査、血清生化学的検査および臓器重量の平均値の差の統計学的な検定について、5% 有意水準で Bartlett 法による等分散検定を行い、その結果が等分散の場合は、Dunnett 法による両側検定を行い、不等分散の場合は Steel 法による両側検定を行った。また、病理学的所見の群間発生個体数の検定には 5% 有意水準で Fischer の正確確立検定を行った。

C. 研究結果

<一般状態および死亡動物>

試験期間中の動物の一般状態については、いずれの群においても特記すべき変化は認められず、

全ての動物が試験終了時まで生存した。

<体重および摂餌量>

試験期間中の各群の体重推移を Fig. 1 に示す。雌雄とも被験物質投与群と対照群との間に差は認められなかった。なお、飼料中の L-アスパラギンの含量は分析の結果、1.25、2.5、5% の飼料でそれぞれ 1.42、2.84、5.68% であった。

試験期間中の摂餌量を Table 1 に示す。ラット一日当りの平均摂餌量は、雄では各群とも約 12g 前後、雌では各群とも約 8g 前後で、雌雄ともに摂餌量の有意な群間差は認められなかった。L-アスパラギンのラット当たり一日平均摂取量は、雄の 1.25、2.5 および 5% 投与群でそれぞれ 171、340、および 710 mg/rat/day、雌ではそれぞれ 118、231 および 475 mg/rat/day であった。また、体重 (kg) 当たり一日平均摂取量は雄の 1.25、2.5 および 5% 投与群でそれぞれ 862、1654 および 3555 mg/kg 体重/day、雌ではそれぞれ 847、1727 および 3511 mg/kg 体重/day であった。L-アスパラギンの 90 日間の総摂取量は、雄の 1.25、2.5 および 5% 投与群でそれぞれ 15.4、30.6 および 63.9g、雌ではそれぞれ 10.6、20.8 および 42.7g であり、雌雄ともに用量にほぼ依存していた。

<血液学的検査>

血液学的検査の結果を Table 2 (雄) および 3 (雌) に示す。雌雄とも対照群と比較して、有意差を示す項目はなかった。

<血清生化学的検査>

血清生化学的検査の結果を Table 4 (雄) および 5 (雌) に示す。雄では対照群と比較して、2.5% 投与群に ALP の有意な減少がみられたが、用量相関性はなかった。

雌では 5% 投与群で GLU、PL、TG、K、ALT が有意に増加した。また、1.25% 投与群でも GLU、TG で増加した他、CRN では減少した。

<臓器重量>

最終体重、臓器の実重量および相対重量の結果を Table 6 (a, b) および 7 (a, b) に示す。雄は最終体重が対照群と比較して 1.25 および 5% 投与群で有意な減少を示した。また各臓器の実重量では有意差はなかったが、5% 投与群の相対重量では脳、腎臓、精巣で有意な増加を示した。

雌の最終体重は対照群と比較して各投与群とも有意差は認められなかった。また、各臓器重量も絶対重量、相対重量ともに有意差は見られなかった。

<病理組織学的検索>

病理組織学的所見を Table 8 に示す。最高用量である 5%群の雌雄およびコントロール群である 0%雌雄のそれぞれ 10 匹、計 40 匹について標本作製を行い、病理組織学的検査を行った。肺で炎症性変化やリンパ腫、卵巣で嚢胞形成およびジンバル腺で腺腫が見られたが、群間で発生個体数に有意差は認められなかった。なお、2.5%および 1.25%群については 5%投与群で雌雄とも病理組織学的な異常所見は認められず、病理学的検索は行わなかった。

D. 考察

今回、F344 ラットを用いて既存食品添加物である L-アスパラギンの混餌投与による 90 日間反復投与毒性試験を実施した。その結果、最終体重は雄の 5%および 1.25%投与群で減少したものの、用量相関性は見られず、特に 1.25%投与群での体重減少は生物学的な意味が乏しいと判断した。

血液学的検索では雌雄とも有意差を示す項目は見られず、L-アスパラギンの毒性を示す項目はなかった。

血液生化学的検索においては、雌の 5%投与群で GLU, PL, TG, K, ALT が有意に増加した。また、1.25%投与群でも GLU, TG で有意な増加が見られた他、CRN では有意な減少が見られた。雌の TG はいずれの投与群でも対照群より高値を示したが、今まで当研究室で行った毒性試験で用いた F344 雌ラットの対照群の TG のデータおよび日本チャールス・リバー社の提供している F344/DuCr1Crj ラットの血液生化学的検査データの値と比較すると、今回の投与群での値と大きな開きはなく、今回の対照群の値が特に低いことが分かった。従って、今回の投与群での TG の変化が L-アスパラギン投与による影響とは特定できないと判断した。その他用量相関性が見られない項目を除き、5%投与群で認めた有意な上昇は L-アスパラギン投与による影響と考えられた。

雄の 5%投与群で、最終体重の有意な減少を、さらに同群の臓器重量のうち脳、腎臓、精巣の相対重量の増加を認めた。

病理組織学的検索において、いくつかの所見が得られたが、その発生個体数において群間で有意差は見られなかった。

E. 結論

L-アスパラギンを混餌で 90 日間雌雄のラットに投与したところ、5%投与群で雄では脳、腎臓、精巣で相対重量の増加が、雌では GLU, PL, K, ALT などの有意な上昇が見られた。病理学的所見に有意差は

見られなかった。以上の結果より、無毒性量 (NOAEL) は飼料中濃度 2.5% (雄 1.65g/kg 体重/day、雌 1.73g/kg 体重/day) と結論された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yokohira M, Takeuchi H, Yamakawa K, Saoo K, Matsuda Y, Zeng Y, Hosokawa K, Maeta H, and Imaida K. A COX-2 Inhibitor, SC58125, Promotes Liver Carcinogenesis in a Rat Medium-Term Liver Bioassay, Possibly due to Induction of CYP 2B1 and 3A1, *Jornal of Toxicologic Pathology* 19: 37-45, 2006.
2. Kinoshita Y, Kuratsukuri K, Landas S, Imaida K, Rovito PM Jr, Wang CY, Haas GP. Expression of prostate-specific membrane antigen in normal and malignant human tissues. *World J Surg.*, 30:628-636, 2006.
3. Takeuchi H, Saoo K, Matsuda Y, Yokohira M, Yamakawa K, Zeng Y, Miyazaki M, Fujieda M, Kamataki T, Imaida K. Dose dependent inhibitory effects of dietary 8-methoxypsoralen on NNK-induced lung tumorigenesis in female A/J mice. *Cancer Lett.*, 234: 232-238, 2006.
4. Matsuda Y, Saoo K, Hosokawa K, Yamakawa K, Yokohira M, Zeng Y, Takeuchi H, Imaida K. Post-initiation chemopreventive effects of dietary bovine lactoferrin on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis in female A/J mice. *Cancer Letters*, 246:41-46, 2007.
5. Yokohira M, Takeuchi H, Yamakawa K, Saoo K, Matsuda Y, Zeng Y, Hosokawa K, Imaida K. Bioassay by intratracheal instillation for detection of lung toxicity due to fine particles in F344 male rats. *Exp Toxicol Pathol.* 58: 211-221, 2007.

2. 学会発表

1. 今井田克己、松田陽子、竿尾光祐、横浜政直、鎌滝哲也、ワークショップ7「個別化医療に向けた肺癌研究の最前線」、ヒト肺癌組織における CYP2A6 の発現、第 95 回日本病理学会総会、東京 (2006. 4)
 2. 松田陽子、竿尾光祐、横浜政直、中野正行、今井田克己、神経内分泌分化を示す腺構造と広範な肉腫様変化を示した胃悪性腫瘍の一例、第 95 回日本病理学会総会、東京 (2006. 4)
 3. 山川けいこ、松田陽子、竿尾光祐、横浜政直、大内里恵、長谷川和子、木内重巳、中野正行、今井田克己、肉腫様変化と神経内分泌分化を示す胃低分化腺癌の 1 例、第 47 回日本臨床細胞学会総会、横浜 (2006. 6)
 4. 横平政直、山川けいこ、細川京子、松田陽子、谷内田真一、竿尾光祐、久野壽也、今井田克己、ラット中期多臓器発がん性試験法を用いたアカネ色素の発がん修飾作用、第 65 回日本癌学会学術集会、横浜 (2006. 9)
 5. 久野壽也、山田泰広、廣瀬善信、浅野奈美、尾山武、富田弘之、原明、今井田克己、森幸雄、森秀樹、1,2-dimethylhydrazine (DMH) 誘発ラット大腸前がん病変に対する 6-Methylsulfinylhexylisothiocyanate (6-MSITC) の抑制効果、第 65 回日本癌学会学術集会、横浜 (2006. 9)
 6. 細川京子、松田陽子、山川けいこ、横平政直、竿尾光祐、久野壽也、今井田克己、A/J 雌マウスにおける MeIQx 誘発肺腫瘍と大腸 aberrant crypt foci (ACF) に対する高脂肪食の影響、第 65 回日本癌学会学術集会、横浜 (2006. 9)
 7. 山川けいこ、横平政直、竹内聖、松田陽子、竿尾光祐、細川京子、久野壽也、鎌滝哲也、今井田克己、CYP2A6 阻害剤 8-methoxy-psoralen による NNK 誘発肺腺癌の抑制作用の検討、第 65 回日本癌学会学術集会、横浜 (2006. 9)
 8. 松田陽子、細川京子、山川けいこ、横平政直、竿尾光祐、久野壽也、今井田克己、MeIQx で誘発される肺および大腸の腫瘍性病変に対する bovine lactoferrin の抑制作用、第 65 回日本癌学会学術集会、横浜 (2006. 9)
 9. 谷内田真一、岡野圭一、若林久男、横平政直、竿尾光祐、今井田克己、肝多段階発癌過程における p27 とその関連細胞周期シグナル (Jab1 と Skp2) の遺伝子発現とその臨床的意義、第 65 回日本癌学会学術集会、横浜 (2006. 9)
 10. 北橋宗、高橋真美、板野克久、山川けいこ、横平政直、今井田克己、杉村隆、若林敬二、肺発がん動物モデルにおける EGFR および K-ras 遺伝子変異の検索、第 65 回日本癌学会学術集会、横浜 (2006. 9)
 11. 横平政直、山川けいこ、細川京子、松田陽子、竿尾光祐、久野壽也、今井田克己、経気管内各種微粒子の肺に対する毒性評価～投与量および投与方法の検討、第 23 回日本毒性病理学会、東京 (2007. 1)
 12. 松田陽子、横平政直、鈴木智、細川京子、山川けいこ、久野壽也、今井田克己、キダチアロエ抽出物の 1 年間慢性毒性試験、第 23 回日本毒性病理学会、東京 (2007. 1)
 13. Imaida K, "Lung models for risk assessment" in "Modeling for Detection of Environmental Carcinogens and Modifying Agents in the Asian Pasific", APOCP General Assembly Satellite Meeting, Chiang Mai, Thailand (2006.11)
 14. Kuno T, Yokohira M, Matsuda Y, Mori H, Mori Y, Imaida K, "Chemoprevention of 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic preneoplastic lesion development in Fischer rats by a Wasabi derivative, 6-methylsulfinyl heyl-isothiocyanate" in "In the Forefront of Basic and Translational Cancer Research" 7th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association, Hawaii, USA (2007. 1)
 15. Yokohira M, Yamakawa K, Kuno T, Saoo K, Matsuda Y, Zeng Y, Hosokawa K, Imaida K, "Modifying potentials of dietary D-psicose and D-allose, rare sugars, on liver carcinogenesis in a rat medium-term bioassay" in "International Symposium on Rare Sugar", Takamatsu, Japan (2006.11)
- 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

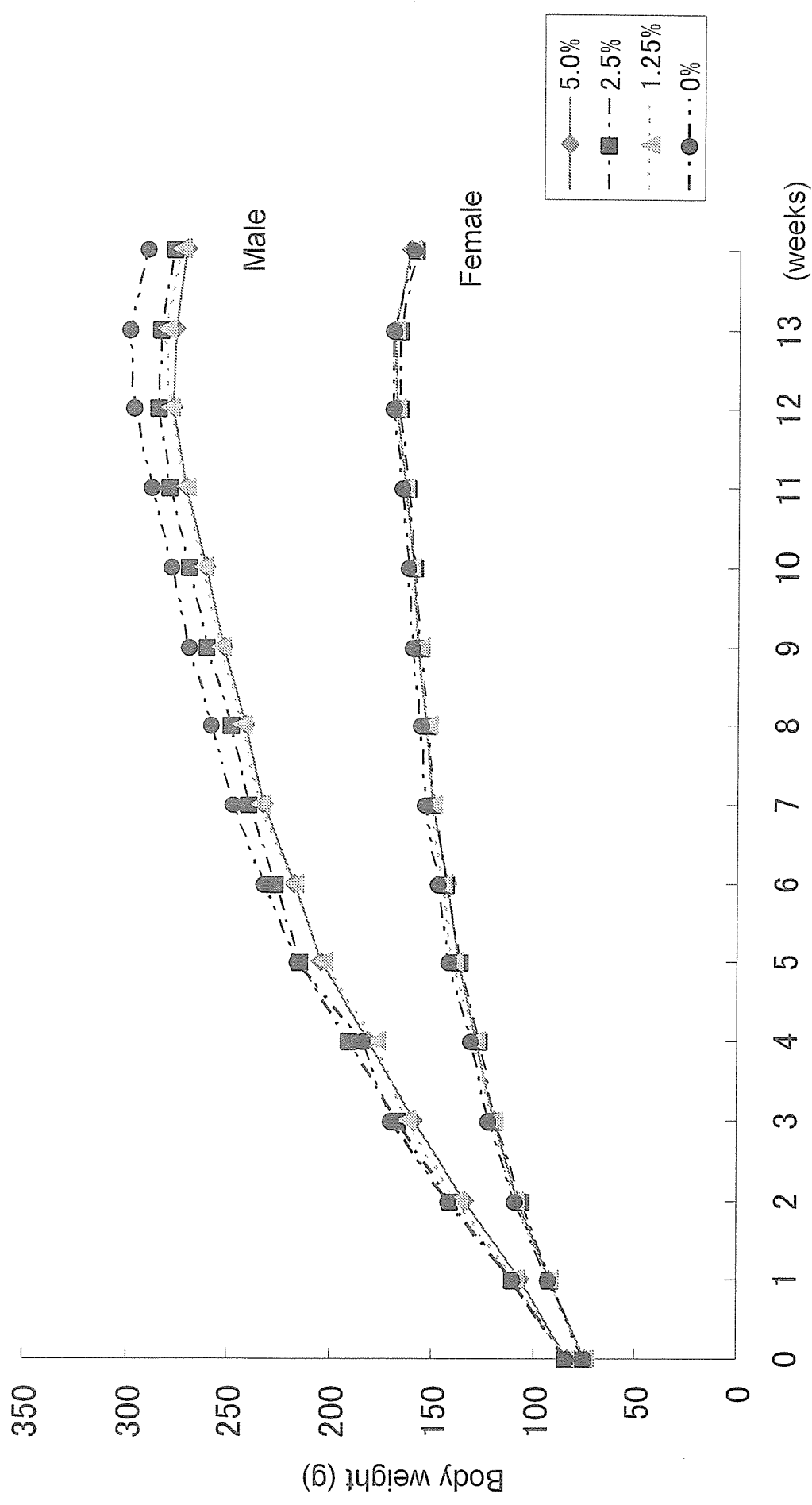


Fig. 1 Body weight curves for male and female F344 rats treated with Asparagine for 90 days

Table 1. Food consumption and intake of Asparagine

Group	Food consumption (g/rat/day)		Intake of Asparagine (mg/rat/day)		Intake of Asparagine (mg/kg/day)		Total intake of Asparagine (g/rat)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
0%	12.4	8.4	--	--	--	--	--	--
1.25%	12.1	8.3	171	118	862	874	15.4	10.6
2.5%	12.0	8.1	340	231	1654	1727	30.6	20.8
5.0%	12.5	8.4	710	475	3555	3511	63.9	42.7

Table 2. Hematological data for F344 male rats given Asparagine for 90 days

Item		Dose level (%)			
		0 (N=10)	1.25 (N=10)	2.5 (N=10)	5.0 (N=9)
RBC	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	856 \pm 19 ^a	880 \pm 52	890 \pm 46	907 \pm 34
Hb	(g/dL)	15.7 \pm 0.5	15.9 \pm 0.9	15.9 \pm 0.7	16.0 \pm 0.6
Ht	(%)	45.5 \pm 1.6	46.4 \pm 3.3	46.9 \pm 2.8	47.2 \pm 2.2
MCV	(fL)	53.2 \pm 0.8	52.7 \pm 1.3	52.7 \pm 0.7	52.1 \pm 0.6
MCH	(pg)	18.2 \pm 0.4	18.0 \pm 0.5	18.0 \pm 0.5	17.7 \pm 0.5
MCHC	(g/dL)	34.4 \pm 0.5	34.3 \pm 1.2	34.2 \pm 0.8	33.8 \pm 0.4
PLT	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	62.5 \pm 3.9	58.0 \pm 8.7	61.5 \pm 8.7	62.8 \pm 7.2
WBC	($\times 10^2/\mu\text{L}$)	60.1 \pm 5.8	58.2 \pm 12.6	64.8 \pm 10.8	70.8 \pm 11.6

a): Mean \pm S. D.

Table 3. Hematological data for F344 female rats given Asparagine for 90 days

Item		Dose level (%)			
		0 (N=10)	1.25 (N=10)	2.5 (N=10)	5.0 (N=9)
RBC	(x10 ⁴ /μL)	836±19 ^a	839±22	856±25	855±47
Hb	(g/dL)	16.2±0.3	16.1±0.3	16.3±0.4	16.4±0.4
Ht	(%)	46.5±1.3	46.8±1.6	48.1±1.6	47.1±3.0
MCV	(fL)	55.8±0.8	55.7±0.9	56.1±0.6	55.1±0.7
MCH	(pg)	19.1±0.3	19.0±0.	19.1±0.3	19.0±1.2
MCHC	(g/dL)	35.0±0.7	34.4±0.8	33.8±0.6	34.8±2.9
PLT	(x10 ⁴ /μL)	63.2±5.3	57.2±14.5	64.6±8.0	61.5±5.6
WBC	(x10 ² /μL)	46.8±13.1	53.7±8.3	51.4±15.2	54.6±13.5

a): Mean±S.D.

Table 4. Serum biochemical data for F344 male rats given Asparagine for 90 days

Item		Dose level (%)			
		0 (N=10)	1.25 (N=10)	2.5 (N=10)	5.0 (N=9)
TP	(g/dL)	7.0±0.1 ^{a)}	7.1±0.2	7.2±0.2	7.0±0.2
A/G		1.7±0.1	1.7±0.2	1.5±0.2	1.6±0.2
ALB	(g/dL)	4.4±0.1	4.4±0.2	4.3±0.2	4.3±0.1
BIL	(mg/dL)	0.05±0.01	0.05±0.01	0.04±0	0.04±0.01
TC	(mg/dL)	70.1±3.8	66.8±12.9	61.2±9.2	72.6±14.0
GLU	(mg/dL)	168±29	165±18	149±14	165±17
PL	(mg/dL)	116±7	114±20	103±14	117±19
TG	(mg/dL)	112±24	122±49	112±32	143±38
BUN	(mg/dL)	15.2±0.9	16.9±1.6	15.5±1.6	17.3±2.3
CRN	(mg/dL)	0.25±0.01	0.25±0.02	0.26±0.01	0.26±0.02
Ca	(mg/dL)	10.6±0.3	10.6±0.5	10.8±0.2	10.5±0.2
P	(mg/dL)	5.3±0.7	5.4±1.0	5.2±0.6	4.6±0.7
Na	(mEq/L)	140±1.1	139±2.0	140±0.7	139±1.1
Cl	(mEq/L)	101.7±1.1	100.6±1.4	101.3±1.2	100.9±1.1
K	(mEq/L)	3.9±0.6	4.1±0.5	3.8±0.3	4.0±0.3
AST	(IU/L)	61.2±7.0	65.7±6.3	65.4±4.7	68.3±9.2
ALT	(IU/L)	33.4±5.4	37.3±6.4	38.2±5.1	39.6±7.9
ALP	(IU/L)	437.3±22.8	431.9±38.5	396.5±27.0*	424.0±33.8
γ-GTP	(IU/L)	< 2	< 2	< 2	< 2

a): Mean±S.D.

*: Significantly different from the control group at p<0.05, respectively

Table 5. Serum biochemical data for F344 female rats given Asparagine for 90 days

Item	Dose level (%)			
	0 (N=10)	1.25 (N=10)	2.5 (N=10)	5.0 (N=9)
TP	(g/dL) 7.2±0.2 ^{a)}	7.1±0.4	7.3±0.3	7.1±0.3
A/G	2.0±0.1	2.0±0.3	2.0±0.1	2.0±0.2
ALB	(g/dL) 4.8±0.1	4.7±0.2	4.9±0.2	4.7±0.1
BIL	(mg/dL) 0.05±0	0.05±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01
TC	(mg/dL) 63.2±9.2	69.9±10.2	68.6±13.5	78.4±18.4
GLU	(mg/dL) 106.6±7.3	120.6±8.2 ^{**}	115.9±7.6	131.9±12.6 ^{**}
PL	(mg/dL) 114.7±13.0	127.8±13.7	129.6±19.3	143.9±27.3 ^{**}
TG	(mg/dL) 21.8±8.2	53.7±22.8 ^{**}	65.9±8.4 ^{**}	68.8±20.5 ^{**}
BUN	(mg/dL) 16.1±1.4	16.3±1.8	16.2±0.9	17.1±1.6
CRN	(mg/dL) 0.27±0.02	0.24±0.03 [*]	0.27±0.01	0.25±0.02
Ca	(mg/dL) 10.3±0.3	10.4±0.2	10.7±0.1	10.9±1.5
P	(mg/dL) 5.9±0.7	5.8±1.4	4.8±0.4	5.0±0.9
Na	(mEq/L) 141±1.5	141±1.7	143±1.1	140±2.3
Cl	(mEq/L) 104±2.0	104±1.2	103±1.1	101±5.4
K	(mEq/L) 4.1±0.3	4.4±1.0	4.5±0.4	4.8±0.6 [*]
AST	(IU/L) 68.6±4.6	69.3±5.5	69.3±5.5	77.2±12.2
ALT	(IU/L) 26.8±2.4	27.7±2.6	28.5±2.0	32.4±3.4 ^{**}
ALP	(IU/L) 307.4±43.6	339.6±50.2	339.1±58.0	349.3±49.1
γ-GTP	(IU/L) < 2	< 2	< 2	2.4±1.3

a): Mean±S.D. *, **, Significantly different from the control group at p<0.05, p<0.01, respectively

Table 6-a. Absolute organ weights of F344 male rats given Asparagine for 90 days

Item	Dose level (%)			
	0 (N=10)	1.25 (N=10)	2.5 (N=10)	5.0 (N=10)
Body weight (g)	290 ± 8 ^{a)}	273 ± 15 [*]	276 ± 11	271 ± 14 ^{**}
Absolute (g)				
Brain	1.92 ± 0.07	1.95 ± 0.06	1.93 ± 0.06	1.94 ± 0.04
Thymus	0.21 ± 0.03	0.23 ± 0.09	0.19 ± 0.03	0.21 ± 0.06
Lung	1.12 ± 0.15	1.26 ± 0.49	1.49 ± 0.63	1.25 ± 0.46
Heart	0.88 ± 0.05	0.86 ± 0.05	0.86 ± 0.08	0.85 ± 0.07
Spleen	0.61 ± 0.03	0.64 ± 0.26	0.62 ± 0.04	0.59 ± 0.05
Liver	6.21 ± 0.25	6.10 ± 0.48	6.22 ± 0.53	6.10 ± 0.44
Adrenals	0.048 ± 0.011	0.044 ± 0.011	0.048 ± 0.013	0.044 ± 0.008
Kidneys	1.51 ± 0.09	1.51 ± 0.10	1.53 ± 0.04	1.51 ± 0.08
Testes	2.90 ± 0.11	2.85 ± 0.10	2.90 ± 0.09	2.91 ± 0.13
Pituitary				
Salivary glands	0.47 ± 0.02	0.44 ± 0.04	0.46 ± 0.03	0.44 ± 0.04
Prostate				
Seminal vesicle				

a): Mean ± S.D. ; * , ** : Significantly different from the control group at p < 0.05, p < 0.01, respectively

Table 6-b. Relative organ weights of F344 male rats given Asparagine for 90 days

Item	Dose level (%)			
	0 (N=10)	1.25 (N=10)	2.5 (N=10)	5.0 (N=10)
Body weight (g)	290±8 ^{a)}	273±15*	276±11	271±14**
Relative (g/100g B. W.)				
Brain	0.66±0.03	0.72±0.05	0.70±0.04	0.72±0.04*
Thymus	0.07±0.01	0.08±0.04	0.07±0.01	0.08±0.03
Lung	0.39±0.04	0.47±0.21	0.54±0.25	0.47±0.19
Heart	0.30±0.02	0.32±0.02	0.31±0.03	0.31±0.02
Spleen	0.21±0.01	0.23±0.09	0.22±0.01	0.22±0.02
Liver	2.14±0.08	2.23±0.08	2.25±0.12	2.25±0.09
Adrenals	0.017±0.004	0.016±0.004	0.017±0.004	0.016±0.003
Kidneys	0.52±0.03	0.55±0.02	0.55±0.03	0.56±0.03*
Testes	1.00±0.02	1.04±0.05	1.05±0.07	1.07±0.05*
Pituitary				
Salivary glands	0.16±0.01	0.16±0.01	0.17±0.01	0.16±0.01
Prostate				
Seminal vesicle				

a): Mean±S.D. * **: Significantly different from the control group at p<0.05, p<0.01, respectively

Table 7-a. Absolute organ weights of F344 female rats given Asparagine for 90 days

Item	Dose level (%)			
	0 (N=10)	1.25 (N=10)	2.5 (N=10)	5.0 (N=10)
Body weight (g)	160±8 ^{a)}	161±8	158±8	162±4
Absolute (g)				
Brain	1.79±0.04	1.76±0.11	1.81±0.06	1.77±0.08
Thymus	0.15±0.03	0.15±0.04	0.16±0.03	0.16±0.02
Lung	0.83±0.13	0.75±0.08	0.76±0.10	0.74±0.06
Heart	0.56±0.02	0.55±0.04	0.55±0.03	0.54±0.02
Spleen	0.36±0.03	0.35±0.02	0.37±0.03	0.36±0.02
Liver	3.21±0.17	3.29±0.29	3.37±0.23	3.40±0.22
Adrenals	0.050±0.004	0.053±0.021	0.045±0.005	0.048±0.08
Kidneys	0.90±0.04	0.92±0.06	0.92±0.05	0.93±0.05
Pituitary				
Salivary glands	0.31±0.02	0.31±0.02	0.30±0.02	0.28±0.02
Ovaries	0.081±0.007	0.084±0.015	0.086±0.009	0.088±0.012
Uterus				

a): Mean±S.D.

Table 7-b. Relative organ weights of F344 female rats given Asparagine for 90 days

Item	Dose level (%)			
	0 (N=10)	1.25 (N=10)	2.5 (N=10)	5.0 (N=10)
Body weight (g)	160 ± 8 ^{a)}	161 ± 8	158 ± 8	162 ± 4
Relative (g/100g B. W.)				
Brain	1.12 ± 0.06	1.09 ± 0.07	1.15 ± 0.08	1.09 ± 0.04
Thymus	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.03	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.01
Lung	0.52 ± 0.09	0.46 ± 0.04	0.48 ± 0.05	0.46 ± 0.03
Heart	0.35 ± 0.03	0.34 ± 0.01	0.35 ± 0.02	0.33 ± 0.01
Spleen	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.22 ± 0.01
Liver	2.02 ± 0.11	2.04 ± 0.11	2.13 ± 0.07	2.10 ± 0.13
Adrenals	0.031 ± 0.002	0.033 ± 0.013	0.029 ± 0.004	0.030 ± 0.005
Kidneys	0.56 ± 0.03	0.57 ± 0.03	0.58 ± 0.02	0.58 ± 0.02
Pituitary				
Salivary glands	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.02
Ovaries	0.051 ± 0.005	0.052 ± 0.009	0.054 ± 0.006	0.054 ± 0.008
Uterus				

a): Mean ± S.D.

Table 8. Summary of histopathological findings.

Sex	Male		Female	
	5.0	0.0	5.0	0.0
Asparagine level (%)	10	10	10	10
Effective number of rats	10	10	10	10
Liver				
Extra lobular	1	0	4	2
Lung/bronchial				
Accumulation, foam cell/(1)a	5	2	6	6
Accumulation, foam cell/(2)a	0	0	1	2
Acute inflammation/(1)a	5	2	4	5
Acute inflammation/(2)a	1	2	1	0
Acute inflammation/(3)a	0	0	0	1
Granulation	0	0	1	0
Monocytic cell leukemia	2	0	2	0
Ovary				
Simple cyst	0	0	0	1
Zymbal's gland				
Sebaceous adenoma	1	0	0	0

a : Numbers in parenthesis indicate the grades of lesion : (1) Slight (2) Moderate (3) Severe
 There were no significant intergroup differences by Fischer's exact test.

厚生労働科学研究費補助金「食品の安心安全確保推進研究事業」
既存添加物の安全性評価に関する研究
平成 18 年度分担研究報告書

L-アスパラギン酸の安全性に関する研究

分担研究者：中江 大 東京都健康安全研究センター 参事研究員

研究要旨：本研究は、厚生労働科学研究費補助金「食品の安心・安全確保推進研究事業（既存添加物の安全性評価に関する研究）」の一環として、食品添加物として使用されている L-アスパラギン酸の亜慢性毒性の有無を検索する目的で、ラットを用いた混餌投与による 90 日間反復投与毒性試験を実施した。試験は、雌雄各 50 匹（各群 10 匹）の F344/DuCr1Cr1j 系ラット（6 週齢）に、L-アスパラギン酸を 0・0.05・1.25・2.5・5.0%の濃度で飼料に混じり、90 日間投与した。その結果、死亡例および一般状態の異常は、雌雄の全群で観察されなかった。雄の 2.5%群および雌の 5.0%群で摂餌量の増加が、雌雄の 2.5%以上群で摂水量の増加が、それぞれ認められたが、これらの変化は、L-アスパラギン酸添加による飼料の味の変化等に起因するものであり、L-アスパラギン酸投与に関係する毒性影響としての生物学的有意性を持たないものと判断した。血液学的検索においては、投与群の雌雄に赤血球数およびヘマトクリット値の増加と、平均赤血球血色素量および平均赤血球血色素濃度の減少が認められた。しかしながら、これらの変化は、いずれも正常値の範囲内に留まる軽微なもので、用量相関性が明確でなく、さらに、血液塗抹標本において赤血球形態に異常が認められず、病理組織学的検索において造血器系に変化が認められなかったことから、偶発的なものであり、L-アスパラギン酸投与に関係する毒性影響としての生物学的有意性を持たないものと判断した。血清生化学的検索においては、雄の 2.5%以上群と雌の 5.0%群の総コレステロール濃度、雄の 0.05%以上群と雌の 1.25%以上群のトリグリセリド濃度に減少がみられた。これらは、用量相関性も示すことから、L-アスパラギン酸投与の影響と考えられたが、相応する臓器重量の変動や明確な病理組織学的変化がないことから、発生機序解明等による検討を必要とするものの、当面、適応性の変化で毒性影響としての意義を持たないものと判断した。さらに、雄の 2.5%以上群と雌の 5.0%群の尿素窒素濃度、雄の 2.5%以上群と雌の 1.25%以上群のクレアチニン濃度、雌の 1.25%以上群の尿酸濃度に減少がみられた。これらに関連しては、尿性状検索において、雄の 5.0%群のビリルビン陽性と、1.25%以上群のケトン体および蛋白陽性の発生頻度、雌の 1.25 および 2.5%群のケトン体陽性と、2.5%以上群の蛋白陽性の発生頻度が増加したほか、雄の 5.0%群で腎臓の相対重量が増加し、病理組織学的検索において、雄の 2.5%以上群の腎臓で、管腔の拡張を伴った再生尿細管が高頻度に認められた。雌については、相応する臓器重量の変動や病理組織学的変化がなかった。これらの変化は、L-アスパラギン酸投与に関係する毒性影響としての生物学的有意性を持つものと判断した。病理組織学的検索においては、さらに、雌雄の 5.0%群で顎下腺の腺房細胞の軽度な肥大が、雌雄の 2.5 および 5.0%群で耳下腺の腺房細胞の肥大が、それぞれ認められた。この変化については、適応性の変化である可能性もあり、発生機序解明等による検討を必要とするものの、当面、L-アスパラギン酸投与に関係する毒性影響としての生物学的有意性を持つものと判断した。以上の結果より、本試験条件下における L-アスパラギン酸の無毒性量（NOEL）は雌雄とも 0.05%（27.9 mg/kg 体重/day 相当）であるものと結論した。

A. 研究目的

平成 7 年 5 月の食品衛生法改正により、食品添加物の指定制の範囲が従来の化学的合成品から天然香料等を除くすべての添加物に拡大され、販売・製造・使用等がなされてきた化学的合成品以外の添加物（天然添加物）については、経過措置として、その範囲を既存添加物名簿として確定した上で、引き続き、販売・製造・輸入等が認められた。しかし、これら既存添加物名簿に掲げられた天然添加物は、従来から指定されている添加物

と異なり、品目毎に安全性のチェックがなされているものではなく、その安全性の確認が求められている。これらの既存添加物について、平成 8 年度の厚生科学研究は、該当する 489 品目の内 139 品目に安全性を評価するために必要な資料がないことから、それらの基本的な安全性を確認するため、反復投与毒性試験などの実施による検討が必要であると結論した。さらにその後、平成 11 年度の厚生省生活衛生局食品化学課による食品添加物安全性評価に関する調査研究は、当該 139 品目の内、14 品目の安全性が確認された一方、残る 125 品目について、安全性試験の実施を含め、

さらに情報を収集することが必要であると結論した¹⁾。

以上の状況に鑑み、本研究は、厚生労働科学研究費補助金「食品の安心・安全確保推進研究事業（既存添加物の安全性評価に関する研究）」の一環として、L-アスパラギン酸の亜慢性毒性の有無を検索する目的で、ラットを用いた混餌投与による90日間反復投与毒性試験を実施した。

L-アスパラギン酸は、白色の結晶性粉末で、匂いがなく、酸味と旨みを有するため、酸味の改良・味質の調整・こく味の付与などを目的とする調味料として、果汁飲料や清涼飲料水などに主に使用される。また、L-アスパラギン酸は、アミノ酸の強化を目的として、いわゆる栄養飲料や健康飲料にも使用されている²⁾。さらに近年、国民の健康増進ブームにより、L-アスパラギン酸は、サプリメントとしても大量に摂取されるようになってきているが、その危険・有害性に関する明確な報告がほとんどなく、したがって早急に基本的な安全性評価を行うことが求められている。

B. 試験方法

本研究における試験方法は、食品添加物の90日間反復投与毒性試験法ガイドライン³⁾に準じて行った。なお、本試験は、当センター環境保健部生体影響科において、多田 幸恵 主任研究員の主導下に、小縣 昭夫 科長以下科員の協力により実施された。

1. 被験物質

被験物質は、味の素株式会社（神奈川）より供与された L-アスパラギン酸 [ロット番号 0010663004, 純度 100.2% (中和滴定法による)] を用いた。

2. 動物および飼育条件

動物は、F344/DuCrIj ラット系の雌雄の SPF 動物各 55 匹を、日本チャールス・リバー株式会社（神奈川）より 5 週齢で入手し、基礎飼料（改変 AIN93G 粉末飼料、オリエンタル酵母工業株式会社、東京、表 1）と細菌ろ過器を経由させた水道水を自由に摂取させる条件下で 1 週間馴化飼育を行った後、視診上健康な雌雄各 50 匹を、6 週齢で試験に供した。各群の動物数は、雌雄各 10 匹とし、投与開始日の体重をもとに、体重別層化無作為抽出法により群分けを行った。動物は、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 1 匹ずつ収容し、バリアーシステム内の飼育室にて、室温 22~24℃・湿度 50~60%・換気回数毎時 10 回・12 時間蛍光灯照明の条件下

で飼育した。

3. 投与用量の設定

L-アスパラギン酸は、経口投与によるラットの LD₅₀ が 16 g/kg 体重以上²⁾ であることから、栄養学的に添加可能な 5.0% を最高とし、以下、公比を 2 として 2.5・1.25% の 3 段階の投与用量を設定した。さらに、本試験においては、L-アスパラギン酸が栄養補助食品として摂取されている現実を踏まえ、ヒト摂取相当量での検索も必要であると考へ、いわゆる健康食品として市販されている製品における 1 日あたりヒト摂取量に相当する 0.05% を、最低用量として追加した。

4. 被験物質の調整および投与

L-アスパラギン酸は、基礎飼料である前述の改変 AIN93G 粉末飼料に、0 (対照)・0.05・1.25・2.5・5.0% の濃度で添加した飼料を、オリエンタル酵母工業株式会社に試験期間中 3 回に分けて製造させ、投与した (表 1)。L-アスパラギン酸添加飼料は、投与までの期間を 4~5℃ の保冷庫に保存し、細菌ろ過器を経由させた水道水と共に、動物に自由摂取させた。

5. 添加飼料中の被験物質の濃度および安定性

添加飼料中の L-アスパラギン酸濃度は、3 回に分けて製造した飼料のそれぞれについて、作製時に測定した。さらに、添加飼料中の L-アスパラギン酸安定性は、第 1 回製造分の 0.05% および 5.0% 添加飼料について、使用中間期および使用最終日の L-アスパラギン酸濃度を測定した。

6. 検索項目

検索項目は、以下の通りであった。

【一般状態、体重、摂餌・摂水量】

全動物の一般状態は毎日観察し、体重および摂餌・摂水量は週 1 回測定した。なお、摂餌量は、受け皿にこぼした餌の量を給餌量から差し引いて求めた。

【血液学的検索】

全動物は、採血前日の 16 時より絶食させた後、解剖時にエーテル麻酔下に開腹し、腹部大動脈より採血して、血液学および血清生化学的検索を行った。血液学的検索は、抗凝固剤 EDTA-2K を入れた試験管に試料を採取し、多項目自動血球計数装置 (KX-21NV, シスメックス株式会社、兵庫) にて、赤血球数 (RBC)・白血球数 (WBC)・血色素量 (HGB)・ヘマトクリット値 (HCT)・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) を測定した。さらに、May-Glünwald-Giemsa 染色した血液塗沫標本を用いては、光学顕微鏡下において、血球形態の観察と白血球分画の検索を行った。

【血清生化学的検索】

血清生化学的検索は、血清を用い、自動分析装置 (TBA-120FR, 東芝メディカルシステムズ株式会社, 東京) にて、血清総蛋白濃度 (TP) ・アルブミン/グロブリン比 (A/G), アルブミン濃度 (ALB), ビリルビン濃度 (BIL), トリグリセリド濃度 (TG) ・総コレステロール濃度 (TCHO) ・尿素窒素濃度 (UN) ・クレアチニン濃度 (CRE) ・ナトリウム濃度 (Na) ・カリウム濃度 (K) ・クロール濃度 (Cl) ・カルシウム濃度 (Ca) ・無機リン濃度 (IP) ・アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性 (AST) ・アラニンアミノトランスフェラーゼ活性 (ALT) ・アルカリホスファターゼ活性 (ALP) ・ γ -グルタミルトランスフェラーゼ活性 (γ -GPT) を測定した。

【尿性状検索】

尿性状は、解剖直前にエームス尿検査試験紙 (N-マルチスティックス, バイエルメディカル株式会社, 東京) を用いて、ウロビリノーゲン・ビリルビン・ケトン体・糖・蛋白・亜硝酸のレベルと、pH を判定した。呈色の判定には、尿分析装置 (クリニテック 200+, マイルス三共株式会社, 東京) を用いた。

【病理学的検索】

剖検においては、以下に示す組織・器官を採取し、肉眼的な検索を行い、下線を付したものについて重量を測定した後、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。採取した組織・器官は、脳・下垂体・眼球・ハーダー腺・鼻腔・唾液腺・甲状腺/上皮小体 (固定後重量測定)・胸腺・気管・肺・心臓・舌・食道・前胃・腺胃・十二指腸・小腸 (空腸・回腸)・大腸 (盲腸・結腸・直腸)・脾臓・肝臓・膵臓・副腎・腎臓・膀胱・皮膚・精巢・精巢上体・精囊/凝固腺・前立腺・包皮腺・卵巣・卵管・子宮・膈・乳腺・リンパ節 (頸部・腸間膜)・胸腔内大動脈・坐骨神経・大腿筋・脊髄 (頸部・腰部)・胸骨 (骨髄を含む)・大腿骨 (骨髄を含む)・頭蓋骨と、その他の肉眼的異常部位とした。

組織学的検索は、全動物について、採取した組織・器官の固定標本から切片を切り出し、定法に従いパラフィン包埋し、薄切後にヘマトキシリン・エオジン染色して、光学顕微鏡下において観察した。

7. 統計学的解析

体重・摂餌量・摂水量・器官重量・血液学および血清生化学的検索結果の統計学的解析に当たっては、各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合に一元配置の分散分析により、不等分散の場合に Kruskal-Wallis の方法により、それぞれ検定を行った。群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Dunnet (例数が等しい時) あるいは Scheffe (例数が等しくない時) の方法で有意差検定を行った。尿性状および病理組織学的検索結果については、対照群との間で、Fisher の直接確立検定を行った。

8. 倫理面への配慮

本研究は、当センターの研究調整委員会および動物実験委員会による事前審査を受け、そのモニター下に、実験動物の適切な扱いに関する国内外の法規・規則・ガイドライン等に準拠して行った。

C. 研究結果

本研究においては、以下の結果を得た。

1. 一般状態、体重、摂餌・摂水量、添加飼料中の被検物質濃度・安定性

投与期間中、雌雄とも全群で死亡例はなく、一般状態については特記すべき変化は認められなかった。なお、血液学および尿性状検索の結果において、有効匹数が 10 匹を下回る群があるのは、試料採取の失敗によるものである。

試験期間中の各群の体重の推移は、図 1・2 に示した通りであり、雌雄とも、全期間を通じて対照群との比較で有意な差を認めなかった。

試験期間中の各群の摂餌量の推移は図 3・4 に、平均摂餌量および被検物質摂取量は表 2 に示した。1 日平均摂餌量の推移は、雌雄とも投与群で増加傾向がみられ、雄の 2.5% 群および雌の 5.0% 群で有意な増加を認めた。受け皿にこぼした餌の量は、いずれの群も少量で、試験期間中を通し各群とも平均 0.1 g 以下 (0-0.8 g/rat/day) であった。

試験期間中の各群の摂水量の推移は、図 5・6 に示した通りで、雌雄とも投与群で増加傾向がみられ、雌雄の 2.5% 以上群で有意な増加を持続して認めた。

添加飼料中の被検物質の濃度は最大でも理論値から 10% を越えて解離することなく、また、15 日間または 30 日間の保存後も濃度の減少がみることがなかった。

2. 血液学的検索

血液学的検索結果は表 3・4 に、白血球分画に関する検索結果は表 5・6 に、それぞれ示した。雄においては、1.25 および 5.0%群で RBC の増加が、1.25%以上群で HCT の増加が、0.05・1.25・5.0%群で MCH の減少が、0.05%以上群で MCHC の減少が、それぞれ認められた。雌においては、5.0%群で MCH および MCHC の減少が認められた。

血液塗抹標本の観察では、雌雄いずれの群においても、赤血球・白血球・血小板の形態に異常を認めなかった。白血球分画は、雌雄とも対照群との間に有意な差を認めなかった。

3. 血清生化学的検索

血清生化学的検索結果は、表 7・8 に示した。総コレステロール濃度は雄の 2.5%以上群と雌の 5.0%群において減少し、トリグリセリド濃度は雄の 0.05%以上群と雌の 1.25%以上群において減少した。また、尿素窒素濃度は雄の 2.5%以上群と雌の 5.0%群、クレアチニン濃度は雄の 2.5%以上群と雌の 1.25%以上群、尿酸濃度は雌の 1.25%以上群で、それぞれ、減少した。その他の指標において、統計学的有意性を持つものの、軽微で用量相関性を欠く変化を散見したが、これらは、偶発的なものであり、生物学的有意性を持たないものと判断した。

4. 尿性状検索

尿性状に関する検索結果は、表 9・10 に示した。雄においては、5.0%群でビリルビン陽性、1.25%以上群でケトン体および蛋白陽性の発生頻度が増加した。雌においては、1.25 および 2.5%群でケトン体陽性、2.5%以上群で蛋白陽性の発生頻度が増加した。

4. 病理学的検索

絶対および相対器官重量は、最終体重と共に、表 11・12 に示した。雄においては、1.25%群で心臓の相対重量が、5.0%群で腎臓の相対重量が、それぞれ増加した。雌においては、対照群との間に有意な差を認めなかった。

解剖時に行った病理肉眼的検索においては、被検物質投与の影響によると考えられる変化を認めなかった。

病理組織学的検索の結果は、表 13 に示した。雄においては、2.5%以上群の腎臓に、管腔の拡張を伴った再生尿細管を高頻度に観察した。また、唾液腺においては、雌雄の 5.0%群で顎下線の腺房細胞の軽度な肥大を、雌雄の 2.5%以上群で耳下線の腺房細胞の肥大を、それぞれ腺全体にびまん性に観察した。肥大した腺房細胞においては、核の濃縮を伴っていた。耳下線の肥大は雌雄とも 2.5%

群よりも 5.0%群で顕著であった。なお、舌下線および舌根部小唾液腺においては、腺房細胞の肥大が明らかでなかった。その他の器官・組織においては、被検物質投与の影響と思われる組織変化を観察しなかった。

D. 考察

以上の結果より、本研究においては、雌雄のラットに 0.05-5.0%濃度の L-アスパラギン酸添加飼料を 90 日間摂取させた結果、いずれの投与群においても死亡例を観察せず、一般状態や体重の推移にも被検物質投与の影響を認めなかった。一方、雌雄の一部の投与群で摂餌量や飲水量の増加が認められたが、これらの変化は、L-アスパラギン酸添加による飼料の味の変化等に起因すると思われる。L-アスパラギン酸投与に係する毒性影響としての生物学的有意性を持たないものと判断した。

血液学的検索においては、雄の投与群で RBC および HCT の増加や MCH および MCHC の減少などの変化があり、雌の 5.0%群でも MCH および MCHC の減少が認められた。しかしながら、これらの変化は、いずれも正常値の範囲内⁴⁾に留まる軽微なもので、用量相関性が明確でなく、さらに、血液塗抹標本において赤血球形態に異常が認められず、病理組織学的検索において骨髄および脾臓など造血器系に変化が認められなかったことから、偶発的なものであり、L-アスパラギン酸投与に係する毒性影響としての生物学的有意性を持たないものと判断した。

血清生化学的検索においては、雄の 2.5%以上群と雌の 5.0%群の総コレステロール濃度と、雄の 0.05%以上群と雌の 1.25%以上群のトリグリセリド濃度が減少した。これらは、用量相関性を示すことから、L-アスパラギン酸投与の影響としての生物学的有意性を持つものと考えられたが、相応する臓器重量の変動や明確な病理組織学的変化がないことから、毒性影響である可能性について発生機序解明等による検討を必要とするものの、当面、適応性の変化と判断した。

血清生化学的検索においては、さらに、雄の 2.5%以上群と雌の 5.0%群の尿素窒素濃度、雄の 2.5%以上群と雌の 1.25%以上群のクレアチニン濃度、雌の 1.25%以上群の尿酸濃度の減少を認めた。これらに関連して、尿性状検索においては、雄の 5.0%群のビリルビン陽性と、1.25%以上群のケトン体および蛋白陽性の発生頻度が増加した。雌においては、1.25 および 2.5%群でケトン体陽性、2.5%以上群で蛋白陽性の発生頻度が増加した。泌尿器系については、雄の 5.0%群で腎臓の相対重量

が増加し、病理組織学的検索において、雄の2.5%以上群の腎臓で、管腔の拡張を伴った再生尿細管が高頻度に認められた。さらに、統計学的有意性は得られなかったが、雄の2.5%以上群の腎臓では炎症性細胞浸潤も比較的高頻度に観察された。雌については、相応する臓器重量変動や病理組織学的変化がなく、尿性状の変化も軽微で用量相関性が明確でなかったが、血清生化学的变化の存在から、雄と同様の現象が、雄よりきわめて軽度で発生したものと考えられた。以上より、これらの変化はL-アスパラギン酸投与に関する毒性影響としての生物学的有意性を持つものと判断した。

雌雄の2.5%以上群で認められた唾液腺の腺房細胞の肥大は、その程度において用量相関性を示し、2.5%群より5.0%群で顕著に認められた。実験動物における唾液腺の肥大はこれまでも報告されている⁵⁻¹²⁾。Buchnerらは、唾液腺の肥大を発現させるメカニズムとして、神経性機序(イソプロテレノール、門歯の切断、蛋白分解酵素、多量の餌、テオフィリン、代償性肥大)、内分泌性機序およびその他の機序(ビタミンA欠乏等)を挙げている⁷⁾。一方、Burdockらは、旨み・風味を付与する5'-phosphodiesteraseおよび5'-adenylicdeaminaseの混餌投与により顎下腺の肥大がみられたが、強制経口投与で肥大がみられなかったと報告し、その発生機序について、被検物質が口腔内の受容体に結合し、自律神経を刺激したことに起因するものと考察している¹²⁾。彼らは、この報告において、唾液腺の肥大が生理的な適応反応であり、毒性影響でない可能性があるものと指摘しているが、同時にその考察を支持する明確な根拠がないとも記述している¹²⁾。本研究で観察した被検物質投与による唾液腺の肥大については、同様に適応性の変化である可能性を否定できず、その当否について、発生機序解明等による検討を必要とするが、当面、L-アスパラギン酸投与に関する毒性影響としての生物学的有意性を持つものと判断した。

E. 結論

以上の結果より、血清脂質の変化が毒性影響である可能性と唾液腺の変化が適応性変化である可能性の可否を決定するための発生機序検索が進行中であるものの、本試験条件下における無毒性量(NOEL)は雌雄とも0.05%(27.9 mg/kg体重/day相当)であるものと結論した。なお、本研究の結果は、上記の血清脂質と唾液腺の変化に関する発生機序検索が終了した後に、適当な学術集会演題および論文として発表する予定である。

F. 文献

- 1) 厚生省生活衛生局食品化学課発表資料: 食品衛生調査会毒性・添加物合同部会議事録, http://www1.mhlw.go.jp/shingi/s0012/txt/s1214-1_13.txt
- 2) 谷村顕雄: L-アスパラギン酸, 第7版食品添加物公定書解説書, 廣川書店, 東京, pp32-34, 1999.
- 3) 食品添加物の指定および使用基準改正に関する指針: 安全性に関する試験の標準的実施方法, <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syokuten/960322/betu.html>
- 4) Mitruka BM: Clinical Biochemical and hematological reference value in normal experimental animals and normal humans, Masson Publishing, New York, pp58-67, 1981.
- 5) Schneyer CA: Salivary gland changes after isoproterenol-induced enlargement. *Am J Physiol*, 1962, 203: 232-236.
- 6) Brenner GM, Stanton HC: Adrenergic mechanism responsible for submandibular salivary glandular hypertrophy in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 1970, 173: 166-175.
- 7) Buchner A, Sreebny LM: Enlargement of salivary glands. Review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1972, 34: 209-222.
- 8) Schneyer CA, Galbraith WM, Mellett LB: Unexpected beta adrenergic effects of the antitumor agent, cyclocytidine, on rat salivary glands. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1975, 148: 1206-1211.
- 9) Abe K, Dawes C: The secretion of protein and of some electrolytes in response to alpha- and beta-adrenergic agonists by rat parotid and submandibular salivary glands enlarged by chronic treatment with isoproterenol. *J Dent Res*, 1980, 59: 1081-1089.
- 10) Mehansho H, Clements S, Sheares BT, Smith S, Carlson DM: Induction of proline-rich glycoprotein synthesis in mouse salivary glands by isoproterenol and by tannins. *J Biol Chem*, 1985, 260: 4418-4423.
- 11) Jackson CD, Blackwell BN: Subchronic studies of doxylamine in Fischer 344 rats. *Fundam Appl Toxicol*, 1988, 10: 243-253.