

200837008A

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評価に関する研究  
平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鰐渕 英機

平成21 (2009) 年 4月

## 目 次

### I. 総括研究報告

既存添加物等の安全性に関する研究 -----1

鰐淵 英機（大阪市立大学大学院医学研究科 教授）

### II. 分担研究報告

1. ダンマル樹脂の発がん性等に関する研究 -----16

鰐淵 英機（大阪市立大学大学院医学研究科 教授）

2. ダンマル樹脂の発がん促進作用に関する研究 -----98

今井田 克己（香川大学医学部腫瘍病理学 教授）

3. L-セリンおよびL-プロリンの安全性に関する研究 -----117

中江 大（東京都健康安全研究センター 参事研究員）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----143

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)  
総括研究報告書

既存添加物等の安全性に関する研究

研究代表者 鰐淵 英機 大阪市立大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

本研究では安全性が確認されていない既存添加物のうち、ラット肝発がん促進作用が明らかになったダンマル樹脂について、1年間反復投与毒性試験、2年間発がん性試験および多臓器中期発がん性試験をラットに施行し、3年間かけてその安全性を評価することとした。また、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いくつかのアミノ酸に関しては、健康増進指向により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おり、近年その基本的な安全性評価が求められている。そこで、本研究では、これらのアミノ酸のうち、これまでに亜慢性毒性試験である90日間反復投与毒性試験を実施されていないL-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-プロリン、L-セリンについて、90日間反復投与毒性試験を実施し、基本的な安全性評価を行うこととした。本年度では、前年度に引き続き、ダンマル樹脂の1年間反復投与毒性試験の解析および2年間発がん性試験を実施した。また、ダンマル樹脂の発がん修飾作用の検討および短期多臓器発がんリスク評価試験法の開発を目的とし、ダンマルの16および32週間多臓器発がん性試験を実施した。アミノ酸の安全性評価の一環として、L-セリンおよびL-プロリンの90日間反復投与毒性試験を実施した。

現在までに得られた研究成果は以下の通りである。

- 1) ダンマル樹脂の1年間慢性毒性試験(用量、0、0.03%、0.125%、0.5%、2%)の結果、体重増加抑制が雌雄の2%群で認められた。肝臓の絶対重量および相対重量の有意な増加、貧血および血小板数の有意な高値が雌雄ともに0.5%および2%群で認められた。肝臓においては、雄の2%群でのみ直径0.4mm以上のGST-P陽性細胞巣が認められた。また、雌の0.5%および2%群では対照群に比べ、GST-Pが瀰漫性に過剰発現した。しかし、いずれの臓器においても、腫瘍の発生はみられなかった。  
2年間発がん性試験(用量、0、0.03%、0.5%、2%)の結果、雄においては2%群で対照群と比較して生存率が有意に低下した。また、2%群では雌雄ともに体重増加抑制が認められた。肝臓の絶対重量の有意な増加が雌雄の0.03%以上の群で認められた。肝臓の相対重量の有意な増加が雄の0.03%以上の群、雌の0.5%以上の群で認められた。また、実験開始後87週より、肉眼的消化管出血は雌雄の0.5%および2%群でみられ、その発生頻度は雌雄の2%群ともに対照群と比較して有意に増加した。血液学検査の結果、対照群と比較して、雄の2%群で赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、MCH、MCHCの有意な低値および血小板数の有意な高値が認められ、雌の2%群では、MCH、MCHCの有意な低値、血小板数の有意な高値が認められた。また、解剖時における凝固検査においては、雄の0.5%群でPTおよびAPTTの延長およびフィブリノーゲンの増加が認められ、雌の2%群でPT延長傾向およびフィブリノーゲンの増加が認められた。病理学組織的検索は現在進行中であるが、途中結果では雄の2%群で肝臓腫瘍の発生頻度および発生個数はともに対照群と比較して有意な増加が認められたことから、ダンマル樹脂はラット肝発がん性を有することが明らかとなった。(鰐淵)
- 2) ダンマル樹脂の16週間多臓器発がん性試験では、雄F344ラットに実験開始4週間にイニシエーション処置として5種類の発がん物質を投与し、1週間の休業後、ダンマル樹脂を0.03、0.125、0.5、2.0%の濃度で混餌投与した。肝臓におけるGST-P陽性細胞巣の発生を検討した結果、0.125%投与群以上で単位面積当りの個数で対照群と比較して有意な高値、0.5%投与群以上で単位面積当りの面積において対照群と比較して有意な高値を認めた。一方、大腸においては前がん病変の指標であるACFならびにMDFの発生個数は、全投与群において対照群と比較して有意な差は認められなかった。また、腎臓における過形成性および腫瘍性病変の発生頻度および平均発生個数も全投与群において対照群と比較して有意な差は認められなかった。以上の結果により、ダンマル樹脂はラット肝発がんプロモーション作用を有するが、腎および大腸発がんに影響を及ぼさない可能性が示唆された。他の臓器については現在検索中である。(鰐淵)
- 3) ダンマル樹脂の32週間多臓器中期発がん性試験では、雄F344ラットに5種類の発がん物質による

イニシエーションを行った後、ダンマル樹脂を 0%、0.03%、0.125%、0.5%、2% の濃度で混じた飼料を経口投与した。その結果、0.5% 投与群および 2% 投与群において、肝臓の絶対重量の増加が、また 2% 投与群において、肝臓の相対重量にも増加が見られた。さらに、0.5% 投与群 2% 投与群において、肝 GST-P 陽性細胞巢の面積の有意な増加が見られた。現在、病理組織学的所見の解析が進行中であり、ダンマル樹脂の発がん修飾作用の有無については、すべての実験結果により最終的に判定し、近日中に最終報告として提出予定である。(今井田)。

- 4) L-セリンおよびL-プロリンの 90 日間反復投与毒性試験では、雌雄 F344 ラットに、L-セリンを 0、0.06、0.5、1.5、5.0% の濃度で、あるいは L-プロリンを 0、0.625、1.25、2.5、5.0% の濃度で、それぞれ飼料に混じり、90 日間投与した。その結果、L-セリンと L-プロリンのいずれにおいても、試験期間中の死亡例および一般状態の異常は雌雄の全群で観察されず、試験期間中の各群の体重の推移は全期間を通じて雌雄とも対照群との間に有意な差を認めなかった。血液学的検索、血清生化学的検索および尿性状においては、毒性影響としての意義を持つ変化を認めなかった。病理組織学的検索においては、投与による有意な変化を認めず、自然発生病変の発現についても対照群と投与群の間に有意な差を認めなかった。以上の結果より、本試験条件下における L-セリンの最大無毒性量 (NOAEL) は、雌雄とも 5.0% (雄：2765.0 mg/kg 体重/day 相当、雌：2905.1 mg/kg 体重/day) と結論した。また、L-プロリンの NOAEL は、雌雄とも 5.0% (雄：2772.9 mg/kg 体重/day 相当、雌：3009.3 mg/kg 体重/day) と結論した。(中江)

分担研究者

今井田 克己 香川大学医学部 教授  
中江 大 東京都健康安全センター  
参事研究員

#### A. 研究目的

ダンマル樹脂の主成分は多糖類であり、飲料、冷菓、チューインガムなどに既存食品添加物質 (増粘安定剤、ガムベース) として使用されている。一方、ダンマル樹脂の 90 日反復投与毒性試験においては 0.125% および 2% 群でラット肝重量の有意な増加が認められた。また、ラット肝中期発がん性試験においては 0.125% から肝発がんプロモーション作用を示した。これらの結果を踏まえて、さらにダンマル樹脂が食品添加物としてヒトが長期にわたって摂取する可能性があることを考慮すると、ダンマル樹脂の安全性については、さらに長期間の投与による評価を行う必要がある。そこで、本研究では 1 年間慢性毒性試験、2 年間発がん性試験および多臓器中期発がん性試験をラットに施行し、3 年間かけてその安全性を評価することとした。また、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いくつかのアミノ酸に関しては、健康増進指向により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おり、近年その基本的な安全性評価が求められている。そこで、本研究では、これらのアミノ酸のうち、これまで亜慢性毒性試験である 90 日間反復投与毒性試験を実施されていない L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-プロリン、L-セリンについて、90 日間反復投与毒性試験を実施し、基本的な安全性評価を行うこととした。本年

度では、前年度に引き続き、ダンマル樹脂の 1 年間反復投与毒性試験の解析および 2 年間発がん性試験を実施した。また、ダンマル樹脂の発がん修飾作用の検討および短期多臓器発がんリスク評価試験法の開発を目的とし、ダンマルの 16 および 32 週間多臓器発がん性試験を実施した。アミノ酸の安全性評価の一環として、L-セリンおよび L-プロリンの 90 日間反復投与毒性試験を実施した。

#### B. 研究方法

##### 1. ダンマル樹脂の 1 年間慢性毒性試験および 2 年間発がん性試験

[被験物質]

ダンマル樹脂粉末は、三栄源エフ・エフ・アイ株式会社により供与された。

[投与量の設定]

投与用量は、平成 18 年度に行った 28 日間反復投与毒性試験の結果と、以前に施行された 90 日間反復投与毒性試験およびラット肝中期発がん性試験の結果に基づいて、1 年間慢性毒性試験では 0、0.03%、0.125%、0.5%、2% を、2 年間発がん性試験では 0、0.03%、0.5%、2% を設定した。

[被験物質の安定性]

ダンマル樹脂はオリエンタル MF 基礎飼料に規定量混ぜたもの検体として使用した。被験物質の飼料への添加、固形化はオリエンタル酵母工業株式会社に依頼し、試験に供した。ダンマル樹脂の

飼料への添加、安定性を検索した結果、固形飼料の一ヶ月保存品に含量のばらつきや減少が認められなかった。

#### [動物並びに飼育条件]

5週齢のF344ラット雌雄各250匹を日本チャールズリバー株式会社から入手し、約1週間の馴化飼育後、6週齢にて試験に供した。動物数は、1年間反復投与毒性試験について1群当り雌雄各10匹、2年間発がん性試験について1群当たり雌雄各50匹を用いる。動物の飼育は大阪市立大学大学院医学研究科動物実験施設のバリアーシステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 、12時間蛍光灯照明、12時間消灯の条件下で行う。動物はプラスチックケージに3匹ずつ飼育し、飲料水として、水道水を自由摂取させる。ケージおよびチップを週1回交換する。

#### [観察並びに検索方法]

食品添加物の1年間慢性毒性試験法ガイドラインならびにがん原性試験法ガイドラインに準じて行う。観察並びに検索項目は以下の通りである。

#### [一般状態、体重、摂餌量]

全動物は、一般状態を毎日観察し、投与開始の13週後まで週1回体重および摂餌量を測定し、その後について1ヶ月に1回測定する。1日あたりのダンマル樹脂摂取量( $\text{mg/kg/day}$ )は、その結果より算出する。

#### [血液学および血液生化学的検査]

動物は、採血の前日午後5時より絶食させ、解剖時腹部大動脈より採血する。血液学的検査として、赤血球数(RBC)、白血球数(WBC)、血小板数(Plt)、ヘモグロビン量(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)を測定する。血液生化学的検査として、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)、 $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ活性( $\gamma$ -GPT)を測定する。

#### [尿性状検査]

尿性状は、52週(1年間慢性毒性試験)あるいは104週(2年間慢性毒性試験)に尿検査試験紙(N-マルティスティックス、シーメンスメディカルソリューションズ・ダイアグノスティックス株式会社、東京)を用いて、蛋白、ケトン体、糖、比重、潜血、pH、ビリルビン、ウロビリノーゲンと亜硝酸塩のレベルを判定し。

#### [病理組織学的検査]

1年間慢性毒性試験については12ヶ月の投与終了後に、2年間発がん性試験については24ヶ月の投与終了後に、それぞれ全生存例を安楽死させて詳細な剖検を行う。

剖検においては、以下に示す器官、臓器を採取し、下線を付したのものについて重量を測定した後、全てを10%中性緩衝ホルマリン液により固定する。ただし、精巣および眼球については、必要に応じて適切な固定液を用いることがある。採取する器官、臓器は、リンパ節(頸部、腸間膜)、胸腔内大動脈、顎下腺、耳下腺、胸骨、大腿骨(骨髄を含む)、胸腺、気管、肺、心、甲状腺および上皮小体(固定後)、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)、肝、脾、腎、副腎、膀胱、精囊、前立腺、精巣、精巣上体、卵巣および卵管、子宮、膣、脳、下垂体、坐骨神経、大腿筋、脊髄(頸部および腰部)、眼球およびハーダー腺、大腿骨、胸骨、頭蓋骨および鼻腔、その他の肉眼的異常部位である。

死亡例および瀕死による切迫屠殺例については、上記と同様に解剖し死因を究明するが、重量の測定は実施しない。切迫例については、可能な限り末梢血の塗抹標本を作製する。

病理組織学的検索は、対照群および高用量群の全動物について、以下に示す器官、組織の固定標本から切り出しを行い、通常の方法でパラフィン包埋して薄切し、ヘマトキリン/エオジン染色を施して鏡検する。該当する器官、臓器は、リンパ節(頸部、腸間膜)、胸腔内大動脈、顎下腺、耳下腺、胸骨、大腿骨(骨髄を含む)、鼻腔、胸腺、気管、肺、心、甲状腺および上皮小体、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)、肝、脾、腎、副腎、膀胱、精囊、前立腺、精巣、精巣上体、卵巣および卵管、子宮、膣、脳、下垂体、坐骨神経、大腿筋、脊髄(頸部および腰部)、眼球およびハーダー腺、その他の肉眼的異常部位である。その他の用量群の全動物については、胸腺、肺、肝、脾、腎、副腎、精巣、卵巣とその他の肉眼的異常部位および高用量群において投与に関連した異常が観察された器官、組織について、上述と同様の方法で病理組



組織学的検査を行なう。

#### [統計学的解析]

体重、摂餌量、臓器重量、血液学および血清生化学的検査結果については、Barlett法による等分散検定を行った。等分散の場合はパラメトリックのDunnett法による両側検定を行い、不等分散の場合はノンパラメトリックのSteel法による両側検定を行った。尿検査と病理組織学的検査結果については、Fischerの直接確率検定法を用いて統計学的解析を実施する。

#### [倫理面への配慮]

大阪市立大学の動物飼育施設における動物実験取り扱い規約に基づき、動物を飼育する。屠殺は動物に苦痛を与えないためにエーテル麻酔下にて実施する。

## 2. ダンマル樹脂の16週多臓器中期発がん性試験

#### [一般状態]

実験開始後、1日1回(午前)、全ての動物について一般行動、中毒症状、生死等について観察し、個体別に記録した。また午後の観察時には動物の生死の確認を行った。

#### [体重]

実験開始時およびその後、毎週1回、全動物について電子天秤LA4200型(ザルトリウス株)を用いて個体別に体重を測定した。また、計画屠殺時に各動物の1晩(約16時間)絶食後の体重(剖検日体重)を測定した。

#### [摂餌量]

実験開始後、毎週1回、2日間の摂取量を電子天秤LA4200型(ザルトリウス株)を用いてケージ単位で測定し、1匹当りの1日平均摂取量を計算した。また、投与期間中の被験物質摂取量を算出した。

#### [摂水量]

実験開始後、毎週1回、2日間の摂取量を電子天秤LA4200型(ザルトリウス株)を用いてケージ単位で測定し、1匹当りの1日平均摂取量を計算した。また、BBNおよびDHPN投与期間中は、各物質の摂取量を算出した。

#### [血液学的検査]

全生存動物について解剖前日の夕方(16:00頃)より飼料を取り除くことおよびケージ交換により絶食させ、エーテル麻酔下により開腹後、腹部大動脈より採血した血液の一部をEDTA-2K入り採

血瓶に取り、血液凝固を阻止し、スピナー法により塗抹標本作製、Wright法で染色した。この標本は白血病診断の一助として使用するもので、帳票データには反映しなかった。また、採取した血液の残りを遠心分離して血清を採取し、-70度以下で冷凍保管中である。

#### [肉眼的病理学検査]

全生存動物について、全身の諸器官・組織の肉眼的病理学検査を実施し、10%緩衝ホルマリン液にて保存した。大腸については、摘出後、結腸および直腸を結紮し、10%緩衝ホルマリンを粘膜が充分にのばされるまで注入した。約3分間固定後、腸管膜結合部に沿って切開し、濾紙に張り付けて伸展した状態で10%緩衝ホルマリン液にて固定し、固定後肉眼的観察を行い剖検記録用紙に記録した。

#### [器官重量]

下記の器官について重量を測定し、剖検日体重を用いて器官重量体重比を算出した。

心臓、脾臓、胸腺、下垂体\*、甲状腺(上皮小体を含む)\*、副腎、肝臓、腎臓、精巣、脳

\*: 固定後測定する。

#### [大腸 Aberrant crypt (ACF) および mucin-depleted foci (MDF) の検索]

全動物について摘出した大腸(結腸および直腸)の両端を結紮し、10%緩衝ホルマリンを粘膜が充分のばされるまで注入した。約3分間固定後、腸間膜に沿って切開し、濾紙に貼り付けて伸展した状態でホルマリン固定した。固定後肉眼的観察を行い剖検記録用紙に記録した。1%アルシアンブルーにて大腸を染色し、顕微鏡下でACFおよびMDFを検索した。

#### [病理組織学的検査]

全動物について下記の器官・組織について常法に従い、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色標本作製し、鏡検している。

脾臓、リンパ節(頸部、腸間膜)、胸腺、下垂体、甲状腺(上皮小体を含む)、乳腺、副腎、鼻腔、気管、肺(気管支を含む)、舌、食道、胃(前胃および腺胃)、小腸(十二指腸、空腸、回腸)、肝臓\*、膵臓、腎臓、膀胱、前立腺、精囊、脊髓(胸部)、脳(大脳、小脳)、胸骨および大腿骨(骨髄を含む)、ジンバル腺、その他肉眼病変部

\*: 肝臓については、作製したパラフィン包埋ブロックを免疫組織化学的検査にも用いた。

下記器官/組織については摘出し、10%緩衝ホルマリン液にて保存するが、病理組織学的検査は実施しなかった。

心臓、唾液腺（顎下腺、舌下腺）、精巣、精巣上体、皮膚、眼球、ハーダー氏腺

#### [肝臓の免疫組織化学的検査]

実験終了時、生存している全動物の肝臓（左外側葉および中間葉）をパラフィン包埋、薄切し、ABC法にて胎盤型 Glutathione S-transferase (GST-P) および Cytokeratin 8/18 を免疫組織化学的に染色した。GST-P 陽性細胞巣および Cytokeratin 8/18 陽性細胞巣の個数および面積を、病理標本画像解析装置 IPAP-WIN [住化テクノサービス株式会社] を用いて計測した後、肝臓切片 1cm<sup>2</sup> 当りの GST-P 陽性細胞巣（直径 0.2mm 以上）および Cytokeratin 8/18 陽性細胞巣（直径 0.2mm 以上）の個数および面積を算出し、定量的解析を行った。なお、残余の肝臓は 10%緩衝ホルマリン液にて保存した。

#### [統計学的解析]

体重、摂餌量、臓器重量、血液学的および血清生化学的検査結果については、Barlett法による等分散検定を行った。等分散の場合はパラメトリックのDunnett法による両側検定を行い、不等分散の場合はノンパラメトリックのSteel法による両側検定を行った。尿検査と病理組織学的検査結果については、Fischerの直接確率検定法を用いて統計学的解析を実施する。

### 3. ダンマル樹脂の 32 週多臓器中期発がん性試験 分担報告書参照（今井田）

### 4. L-セリンおよびL-プロリンの 90 日間反復投与 毒性試験 分担報告書参照（中江）

## C. 研究結果

### 1. ダンマル樹脂の 1 年間慢性毒性試験

実験期間中、全動物が生存した。ダンマル樹脂投与に関連した一般状態への影響は認められなかった。

最終体重は、雌雄の 2%群で対照群と比較して有意な低値が認められた。一方、雄の 0.03%群で、雌の 0.03%および 0.125%群で対照群と比較して有意な高値を示した。

実験期間中におけるダンマル樹脂摂取量はその投与量にほぼ関連した。

血液学的検査および血清生化学的検査において、対照群と比較して以下の有意な変化を認めた。赤血球数では雄の 2%群に有意な低値を認めた。へ

モグロビン量では雌雄の 0.5%および 2%群に有意な低値を認めた。血小板数では雌雄の 0.5%および 2%群に有意な高値を認めた。MCV では雄の 2%群、雌の 0.5%および 2%群に有意な低値を認めた。MCH と MCHC では雄の全投与群に、雌の 0.125%以上の群に有意な低値を認めた。AST、ALT および ALP では雌雄の 0.5%と 2%群に有意な低値を認めた。γ-GTP では雌の 0.5%と 2%群に有意な高値を認めた。血清総蛋白濃度では雌の 0.125%以上群に有意な高値を認めた。トリグリセリド濃度では雄の 0.5%と 2%群に有意な低値を認めた。総コレステロール濃度では雄の 2%群、雌の 0.5%および 2%群に有意な高値を認めた。その他の項目で散発的に有意差がみられたが、用量相関性がみられないため毒性学的意義に乏しい所見とみなした。

尿性状の検索結果は、雄 2%群において、対照群と比較して尿蛋白濃度の有意な高値が認められた。

肝臓の絶対重量および相対重量の有意な高値が雌雄の 0.5%および 2%群に認められた。脾臓の絶対重量の有意な高値が雌雄の 2%群に認められた。腎臓の相対重量の有意な低値が雌の 0.03%、0.125%および 0.5%群に認められた。心臓の絶対重量の有意な高値が雄の 0.03%群に認められた。心臓の相対重量の有意な高値が雄の 2%群、雌の 0.125%群に認められた。脳の相対重量の有意な高値が雄の 2%群、雌の 0.03%群に認められた。精巣の相対重量の有意な高値が雄の 2%群に認められた。

病理組織学的検索では、肝臓において、雄の対照群、0.03%、0.125%、0.5%群で中等度ないし高度の胆管増生が認められたが、2%群ではその程度が有意に軽減した。炎症細胞の浸潤および肉芽腫はすべての群に散発的に認められ、各群間に有意な差はなかった。

ラット肝前がん病変の指標である S-トランスフェラーゼ (GST-P) の発現を免疫組織化学的に検索した。雄ラットにおいて、その発生を定量的に解析した結果、単位面積あたりの GST-P 陽性細胞巣の数は各群間に有意な差はなかったが、直径 0.4mm 以上の陽性細胞巣は 2%群でのみ認められた。雌ラットにおいて、GST-P は 0.5%と 2%群では瀰漫性に発現しており、定量解析が困難のため、その発現量を 4 段階で定性的に評価した。その結果、0.5%と 2%群で対照群と比較して GST-P の発現は用量依存的に有意に増加した。なお、0.03%、0.125%では対照群との間に有意な差はなかった。

腎臓における病理組織学的検索の結果、雄においては、0.5%および 2%群で円柱が高頻度に観察された。他の臓器における病理組織学的変化については、対照群と比較して有意差を示すものは認

めなかった。

## 2. ダンマル樹脂の2年間発がん性試験

実験終了時の生存率は、雄においては2%群(44%)で対照群(86%)と比較して有意に低下した。雌においては各被験物投与群と対照群との間に有意な差は見られなかった。

最終体重は、2%群の雌雄ともに対照群と比較して有意な低値が認められた。一方、雌の0.03%群で対照群と比較して有意な高値が認められた。実験期間中におけるダンマル樹脂摂取量はその投与量にほぼ関連した。

血液学的検査においては、雄の2%群で赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、MCH、MCHCの有意な低値、血小板数の有意な高値が認められた。雌の2%群では、MCH、MCHCの有意な低値、血小板数の有意な高値が認められた。また、解剖時における凝固検査においては、雄の2%群は測定しなかったが、0.5%群でPTおよびAPTT延長が認められた。フィブリノーゲンの増加は雄の0.5%および雌の2%群で認められた。

血清生化学的検査においては、AST、ALTおよびALPでは雌雄の0.5%と2%群に有意な低値を認めた。γ-GTPでは雄の2%群、雌の0.5%と2%群に有意な高値を認めた。血清総蛋白濃度およびALPでは雄の2%群に有意な低値を認めた。また、Ca濃度では雌雄の0.5%と2%群に有意な高値を認めた。

尿性状の全項目において、雌雄とも対照群と間に有意な差を認めなかった。

肝臓の絶対重量の有意な高値が雌雄の0.03%、0.5%および2%群で認められた。肝臓の相対重量の有意な高値が雄の0.03%、0.5%および2%群、雌の0.5%および2%群で認められた。また、脾臓の絶対重量は、雄の0.03%および0.5%投与群で高値傾向、2%群では有意な高値を示した。

実験開始後87週より、肉眼的消化管出血は雄の0.5%および2%群ではそれぞれ4, 33例、雌の0.5%および2%群ではそれぞれ3, 8例みられた。その発生頻度は雌雄の2%群で対照群と比較して有意に増加した。また、雌の2%群と比較して、雄の2%群での発生頻度が有意に高かった。なお、対照群および0.03%では肉眼的消化管出血はみられなかった。

病理学組織的検索は現在進行中であり、途中結果では、雄2%群で肝臓腫瘍の発生頻度および発生個数はともに対照群と比較して有意な高値が認められた。

## 3. ダンマル樹脂の16週間多臓器発がん性試験

肝臓の絶対重量では0.5%および2.0%投与群で高値を示し、相対重量においては0.03%、0.5%および2.0%投与群で有意な高値を示した。甲状腺の絶対重量では0.5%投与群のみ有意な高値を、相対重量では0.5%および2.0%投与群で有意な高値を示した。

大腸を盲腸側から肛門側までを4つに等分割した部位1~4について結節の観察を行った。結節は、0%群で3個、0.03%群にて2個、2.0%群にて2個観察された。部位別における発生頻度、分布、大きさおよび大きさ毎の平均結節数においては、統計学的に有意な差は認められなかった。また、大腸のACFおよびMDFのcrypt数毎の発生個数は、全投与群において対照群と比較して有意な差は認められなかった。

腎臓においては、尿細管異型的過形成、尿細管腺腫、移行上皮過形成、移行上皮乳頭腫、尿細管腺腫、尿細管癌、腎芽腫、血管腫の病変が認められたが、その発生頻度および平均発生個数は、全投与群において、対照群と比較して有意な差は認められず、用量との関連も認められなかった。

0.5%および2.0%投与群において、GST-P陽性細胞巢の肝臓単位面積当りの個数および面積の平均値では、対照群と比較して統計学的に有意な高値が認められた。0.125%投与群においては、GST-P陽性細胞巢の肝臓単位面積当りの個数で対照群と比較し有意な高値が認められた。

## 4. ダンマル樹脂の32週間多臓器発がん性試験

0.5%投与群および2%投与群において、肝臓の絶対重量の有意な高値が観察された。2%投与群において、肝臓の相対重量にも有意な高値が観察された。その他の臓器では有意な差異を認めなかった。

GST-P陽性細胞巢の肝臓切片全体の面積に対する発生個数ならびに面積の結果、0.5%投与群および2%投与群において、GST-P陽性細胞巢の面積の有意な増加を認めた。

病理学的所見は現在も解析進行中であり、以下は肝臓の結果のみを示す。肝臓における非腫瘍性病変は、0.125%投与群および0.5%投与群において、のう胞性病変が観察されたが、各群間で発生個体数に有意差は認められなかった。

腫瘍性病変は、0.5%投与群および2%投与群において、hepatocellular carcinomaが観察されたが、発生個体数に有意差は認められなかった。

## 5. L-セリンおよびL-プロリンの90日間反復投与毒性試験

L-セリンにおいて、試験期間中の死亡例および一般状態の異常は雌雄の全群で観察されず、試験



期間中の各群の体重の推移は全期間を通じて雌雄とも対照群との間に有意な差を認めなかった。摂餌量および摂水量については、L-セリン投与の影響を示唆する変化を認めなかった。血液学的検索において、投与群に平均赤血球容積・平均赤血球血色素量・平均赤血球血色素濃度の減少が散見されたが、これらの変化は、いずれも所謂正常値の範囲内に留まる軽度な変化であり、用量相関性が明確でなく、血液塗抹標本に赤血球形態に異常が認められず、病理組織学的検索で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-セリン投与に関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、雌雄の5.0%群に血清総蛋白濃度の減少、雄の5.0%群にアルブミン濃度の減少が認められ、これらの変化は、用量相関性を示したことからL-セリン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、毒性影響としての意義を持たないものと判断した。尿性状においては、有意な変化を認めなかった。病理学的検索においては、雌雄の5.0%群で腎臓の相対重量の増加が認められたが、用量相関性が明らかでなかった。病理組織学的検索においては、投与による有意な変化を認めず、自然発生病変の発現についても対照群と投与群の間に有意な差を認めなかった。

L-プロリンにおいて、試験期間中の死亡例および一般状態の異常は雌雄の全群で観察されず、試験期間中の各群の体重の推移は全期間を通じて雌雄とも対照群との間に有意な差を認めなかった。摂餌量および摂水量については、L-プロリン投与の影響を示唆する変化を認めなかった。血液学的検索においては、投与群において、血色素量、ヘマトクリット値および平均赤血球血色素量の減少が認められたが、いずれも正常値の範囲内に留まる軽度な変化で、用量相関性が明確でなかった。血清生化学的検索において、投与群に血糖値・クレアチニン濃度・尿酸濃度・尿素窒素濃度の減少が散見されたが、これらの変化は、用量相関性が明確でなく、相応する臓器重量の変動や病理組織学的変化がないことから、毒性影響としての意義を持たないものと判断した。尿性状においては、有意な変化を認めなかった。病理学的検索においては、雄の2.5および5.0%群の脾臓と、雄の5.0%群の腎臓の相対重量が有意な増加を示したが、相応する病理組織学的変化がないことから、毒性影響としての意義を持たないものと判断した。病理組織学的検索においては、投与による有意な変化を認めず、自然発生病変の発現についても対照群と投与群の間に有意な差を認めなかった。

#### D. 考察

##### 1. ダンマル樹脂の1年間慢性毒性試験および2年間発がん性試験

1年間慢性毒性試験では、2%群では雌雄ともに体重増加抑制が認められた。雌雄の0.5%および2%群で肝臓の絶対重量および相対重量の有意な増加が認められた。血液学検査においては、雌雄の0.5%および2%群でヘモグロビン量の有意な低値、血小板数の有意な高値がみられた。腎臓においては、雄の0.5%および2%群で円柱が高頻度に観察された。また、雄の2%群において、対照群と比較して尿蛋白濃度の有意な高値が認められた。肝臓においては、すべての群に腫瘍性病変はみられなかったが、雄の2%群でのみ直径0.4mm以上のGST-P陽性細胞巣が認められた。また、雌の0.5%と2%群では対照群に比べ、GST-Pは瀰漫性に過剰発現した。以上の結果より、1年間慢性毒性試験では、ダンマル樹脂投与に起因すると考えられる変化が雌雄とも0.5%以上の群で認められた。

2年間発がん性試験では、実験終了時の生存率は、雄においては2%群(44%)で対照群(86%)と比較して有意に低下した。また、2%群では雌雄ともに体重増加抑制が認められた。肝臓の絶対重量の有意な増加が雌雄の0.03%、0.5%および2%群で認められた。肝臓の相対重量の有意な増加が雄の0.03%、0.5%および2%群、雌の0.5%および2%群で認められた。また、実験開始後87週より、肉眼的消化管出血は雌雄の0.5%および2%群でみられ、その発生頻度は雌雄の2%群ともに対照群と比較して有意に増加した。なお、対照群および0.03%では肉眼的消化管出血はみられなかった。血液学検査の結果、対照群と比較して、雄の2%群で赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、MCH、MCHCの有意な低値および血小板数の有意な高値が認められ、雌の2%群では、MCH、MCHCの有意な低値、血小板数の有意な高値が認められた。また、解剖時における凝固検査においては、雄の0.5%群でPTおよびAPTTの延長およびフィブリノーゲンの増加が認められ、雌の2%群でPT延長傾向およびフィブリノーゲンの増加が認められた。これらのことから、雄の0.5%以上の群および雌の2%群で凝固障害が起きた可能性が示唆された。また、肉眼的消化管出血の発生頻度は雌の2%群と比較して、雄の2%群で有意に高かったことから、凝固障害による出血は雄の2%群の生存率の低下に関与する可能性が示唆された。病理学組織的検索は現在進行中であり、途中結果では雄の2%群で肝臓腫瘍の発生頻度および発生個数はともに対照群と比較して有意な高値が認められたことから、ダンマル樹脂はラット肝に発がん性を

示すことが明らかとなった。

## 2. ダンマル樹脂の 16 週間多臓器発がん性試験

肝臓における GST-P 陽性細胞巣においては、0.125%投与群以上で単位面積当りの個数で対照群と比較して有意な高値、0.5%投与群以上で単位面積当りの面積において対照群と比較して有意な高値を認めた。一方、ACF ならびに MDF の発生個数は、全投与群において対照群と比較して有意な差は認められなかった。腎臓における過形成性および腫瘍性病変の発生頻度および平均発生個数も全投与群において対照群と比較して有意な差は認められなかった。以上の結果により、ダンマル樹脂のラット肝発がんプロモーション作用が確認された。また、腎および大腸発がんに対して、ダンマル樹脂投与による影響の可能性は低いと考えられた。

## 3. ダンマル樹脂の 32 週間多臓器発がん性試験

肝の GST-P 陽性細胞巣の肝臓切片全体の面積に対する発生個数ならびに面積の結果においては、0.5%および 2% 投与群において、GST-P 陽性細胞巣の面積の有意な増加が見られ、ダンマル樹脂の高用量摂取群における発がん性の可能性を示唆するものと考えられる。

病理組織学的検討は現在進行中であるが、途中結果では、0.5%および 2% 投与群において、肝臓に hepatocellular carcinoma が観察された。発生個体数に有意差は認められなかったが、GST-P 陽性細胞巣の結果と合わせ、ダンマル樹脂の肝臓への発がん性の可能性を示唆するものと考えられる。

## 4. L-セリンおよび L-プロリンの 90 日間反復投与毒性試験

雌雄のラットに 0.625-5.0%濃度の L-プロリン添加飼料を 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験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摂水量の増加および減少が認められたが、これらの変化には、用量相関性が認められず、L-プロリン投与に関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、雌雄の投与群で HGB・HCT・MCH の減少が認められたが、これらの変化は、いずれも所謂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-プロリン投与に関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、雄の投与群で GLU の減少、雌の投与群で BUN の減少、雌雄の投与群で CRE・UA の減少が認められたが、その変化は、軽度で所謂正常値の範囲内であり、相応する臓器重量の変動や病理組織学的変化がないことから、L-プロリン投与に関する毒性影響とは判断しなかった。

L-プロリンの安全性に関する情報は少なく、Kampel らは雌の SD ラットに L-プロリンあるいは L-プロリンを 50 mg/kg 体重/day で 1 ヶ月間飲水投与した実験で L-プロリン投与のラットに何の毒性影響も見られなかったと報告した。Abernathy らは、離乳した雄のラットに L-プロリンを 3%添加した 14%カゼイン食を 10 日間あるいは 20 日間摂取させ、体重増加率に変化がなかったことを報告した。Sauberlich は、離乳した雄の SD ラットに L-プロリンを 5%添加した低タンパク食 (6%カゼイン食) を 4 週間摂取させ、軽度の体重増加抑制が認められたと報告した。今回の Fischer 344 ラットによる L-プロリンの 90 日間投与試験においては、雄の 2.5・5.0%群で平均摂餌量の軽度な減少、雌の 0.625・1.25%群で平均摂餌量の軽度な増加が認められたが、L-プロリン投与による体重の変動を認めなかった。

## E. 結論

### 1. ダンマル樹脂の 1 年間慢性毒性試験および 2 年間発がん性試験

1 年間慢性毒性試験では、体重増加抑制が雌雄の 2%群で認められた。肝臓の絶対重量および相対重量の有意な増加、貧血および血小板数の有意な高値が雌雄ともに 0.5%以上の群で認められた。腎臓に及ぼす毒性影響として、雄の 0.5%以上の群で円柱の発生頻度の増加、2%群で尿蛋白濃度の上昇が観察された。一方、いずれの臓器においても、腫瘍の発生はみられなかった。上述したように、ダンマル樹脂投与による毒性影響が雌雄ともに 0.5%以上の群で認められた。

2 年間発がん性試験では、雄においては 2%群で対照群と比較して生存率が有意に低下した。2%群では雌雄ともに体重増加抑制が認められた。肝臓の絶対重量の有意な増加が雌雄の 0.03%以上の群で認められた。肝臓の相対重量の有意な増加が雄の 0.03%以上の群、雌の 0.5%以上の群で認められた。また、雄の 0.5%以上の群および雌の 2%群で凝固障害が起きたことが示唆された。病理学組織的検索は現在進行中であり、途中結果では雄の 2%群で肝臓腫瘍の発生頻度および発生個数は

ともに対照群と比較して有意な高値が認められたことから、ダンマル樹脂はラット肝に発がん性を示すことが明らかとなった。

## 2. ダンマル樹脂の16週間多臓器発がん性試験

ダンマル樹脂はラット肝発がんプロモーション作用を有するが、腎および大腸発がんに影響を及ぼさない可能性が示唆された。

## 3. ダンマル樹脂の32週間多臓器発がん性試験

0.5% 投与群 2% 投与群において、GST-P 陽性細胞巢の肝臓切片全体の面積に対し、GST-P 陽性細胞巢の面積の有意な増加が見られた。現在、病理組織学的所見の解析が進行中であり、ダンマル樹脂の発がん修飾作用の有無については、すべての実験結果により最終的に判定し、近日中に最終報告として提出予定である。

## 4. L-セリンおよびL-プロリンの90日間反復投与毒性試験

本試験条件下における L-セリンの最大無毒性量 (NOAEL) は、雌雄とも 5.0% (雄: 2765.0 mg/kg 体重/day 相当、雌: 2905.1 mg/kg 体重/day 相当) と結論した。また、L-プロリンの NOAEL は、雌雄とも 5.0% (雄: 2772.9 mg/kg 体重/day 相当、雌: 3009.3 mg/kg 体重/day 相当) と結論した。

## F. 健康危険情報

検討中 (ダンマル樹脂については肝発がん性を有する可能性がある)

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Yamaguchi T, Wei M, Hagihara N, Omori M, Wanibuchi H and Fukushima S. Lack of mutagenic and toxic effects of low dose potassium bromate on kidney in the Big Blue rat. *Mutat Res*, 652, 1-11, 2008.

Salim E S, Morimura K, Menesi A, Mohammed El-Lity, Fukushima S and Wanibuchi H. Elevated oxidative stress and DNA damage and repair levels in urinary bladder carcinomas associated with Schistosomiasis. *Int J Cancer*. 123, 601-608, 2008.

Yamaguchi C, Wanibuchi H, Kakehashi A, Tanaka R and Fukushima S. Chemopreventive effects of a serratane-type triterpenoid, 3 $\alpha$ -methoxyserrat-14-en-21 $\beta$ -ol (PJ-1), against rat lung carcinogenesis. *Food Chem Toxicol*, 46, 1882-1888, 2008.

Murai T, Mori S, Kang J S, Morimura K, Wanibuchi H, Totsuka Y and Fukushima S. Evidence of a threshold-effect for 2-amino-3, 8-dimethylimidazo [4, 5-f] quinoxaline liver carcinogenicity in F344/DuCrj Rats. *Toxicol Pathol*, 36, 472-477, 2008.

福島昭治、魏 民、梯アンナ、鰐淵英機. 発がん物質にも閾値が存在する. *Mycotoxins*, 58, 119-128, 2008.

Kang J S, Wanibuchi H, Morimura K, Wongpoomchai R, Chusiri Y, Gonzalez FJ and Fukushima S. Role of CYP2E1 in thioacetamide-induced mouse hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 228, 295-300, 2008.

Hayashi S, Fujii E, Kato A, Kimura K, Mizoguchi K, Suzuki M, Sugimoto T, Takanashi H, Itoh Z, Omura S and Wanibuchi H. Characterization of multinuclear hepatocytes induced in rats by mitemincal (GM-611), an erythromycin derivative. *Toxicol Pathol*, 36, 858-865, 2008.

Yokohira M, Kuno T, Yamakawa K, Hosokawa K, Matsuda Y, Hashimoto N, Suzuki S, Saoo K, Imaida K. Lung toxicity of 16 fine particles

on intratracheal instillation in a bioassay model using F344 male rats. *Toxicol. Pathol.*, 2008. in press.

Yokohira M, Hosokawa K, Yamakawa K, Saoo K, Matsuda Y, Zeng Y, Kuno T, Imaida K. Potential inhibitory effects of D-allose, a rare sugar, on liver preneoplastic lesion development in a F344 rat medium-term bioassay. *J. Biosci. Bioeng.*, 2008. in press.

Yokohira M, Yamakawa K, Hosokawa K, Matsuda Y, Kuno T, Saoo K, Imaida K. Promotion potential of madder color in a medium-term multi-organ carcinogenesis bioassay model in F344 rats. *J. Food Sci.*, 2008. in press.

Ikeda M, Yamakawa K, Saoo K, Matsuda U, Hosokawa K, Takeuchi H, Li J-Q, Zeng Y, Yokohira M, Imaida K. Induction of multiple granulomas in the liver with severe hepatocyte damage by montan wax, a natural food additive, in a 90-day toxicity study in F344 rats. *Food Chem. Toxicol.*, 46: 654-661, 2008.

Matsuda Y, Yokohira M, Suzuki S, Hosokawa K, Yamakawa K, Zeng Y, Ninomiya F, Saoo K, Kuno T, Imaida K. One-year chronic toxicity study of Aloe arborescens Miller var. natalensis Berger in Wistar Hannover rats. A pilot study. *Food Chem. Toxicol.*, 46:733-739, 2008.

Goto R, Hoshikawa H, Fujii T, Indo K, Yoshino K, Imaida K, and Mori N. Clinicopathological significance of cyclooxygenase-2 expression in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.*, 19: 645-650, 2008.

Tsukasa Kitahashi, Mami Takahashi, Yutaka Yamada, Yoichi Oghiso, Masanao Yokohira, Katsumi Imaida, Masahiro Tsutsumi, Nobuo Takasuka, Takashi Sugimura, and Keiji Wakabayashi., Occurrence of mutations in the epidermal growth factor receptor gene in X-ray-induced rat lung tumors. *Cancer Sci.*, 99:241-245, 2008.

Nozomi Hashimoto, Shinichi Yachida, Keiichi Okano, Hisao Wakabayashi, Katsumi Imaida, Kazutaka Kurokohchi, Tsutomu Masaki, Hisoka Kinoshita, Masahiro Tominaga, Tetsuo Ajiki, Yonson Ku, Takehiro Okabayashi, Kazuhiro

- Hanazaki, Makoto Hiroi, Sadanobu Izumi, Shohei Mano, Setsuo Okada, Yukihiko Karasawa, Takashi Maeba, Yasuyuki Suzuki. Immunohistochemically detected expression of p27<sup>kip1</sup> and skp2 predicts survival in patients with intrahepatic cholangiocarcinomas. *Ann Surg Oncol.*, 16: 395-403, 2009.
- Matsuda Y, Takeuchi H, Yokohira M, Saoo K, Hosokawa K, Yamakawa K, Zeng Y, Totsuka Y, Wakabayashi K, Imaida K. Enhancing effects of a high fat diet on 2-amino-3, 8-dimethylimidazo [4, 5-f] quinoxaline (MeIQx) induced lung tumorigenesis in female A/J mice. *The Molecular Medicine Reports*, 2009 in press.
- Takeuchi H, Saoo K, Matsuda Y, Yokohira M, Yamakawa K, Zeng Y, Kuno T, Kamataki T and Imaida K. 8-Methoxypsoralen, a Potent Human CYP2A6 Inhibitor, Inhibits Lung Adenocarcinoma Development Induced by 4- (Methylnitrosamino)-1- (3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in Female A/J Mice. *The Molecular Medicine Reports*, 2009 in press.
- Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Suzuki S, Saoo K, Kuno T, Imaida K. A Lung Carcinogenic Bioassay of CuO and TiO2 Nanoparticles with Intratracheal Instillation Using F344 Male Rats: *J. Toxicol. Pathol.*, 2009. in press.
- Yokohira M, Mastuda Y, Suzuki S, Hosokawa K, Yamakawa K, Hashimoto N, Saoo K, Nabaek K, Doi Y, Kuno T, Imaida K. Equivocal Colonic Carcinogenicity of *Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger at High Dose Level in a Wistar Hannover Rat Two-year Study. *J. Food Sci.*, 2009. in press.
- Yokohira M, Kuno T, Yamakawa K, Hashimoto N, Ninomiya F, Suzuki S, Saoo K, Imaida K. An Intratracheal Instillation Bioassay System for Detection of Lung Toxicity Due to Fine Particles in F344 Rats: *J. Toxicol. Pathol.*, 2009. in press.
- Abe M, Suzuki N, Yoshida M, Usuda K, Furukawa S, Juneja LR, Okubo T, Nakae D. Possible carcinogenic risks of copper gluconate and their prevention by co-administered green tea catechins evaluated by a rat medium-term multi-organ carcinogenicity bioassay protocol. *Food Chem Toxicol* 46, 1760-1770, 2008.
- Abe M, Usuda K, Hayashi S, Ogawa I, Furukawa S, Igarashi M, Nakae D. Carcinogenic risk of copper gluconate evaluated by a rat medium-term liver carcinogenicity bioassay protocol. *Arch Toxicol* 82, 563-571, 2008.
- Tada Y, Yano N, Takahashi H, Yuzawa K, Ando H, Kubo Y, Nagasawa A, Uehara S, Ogata A, Nakae D. Toxic effects of L-aspartic acid at high dose levels on kidneys and salivary glands in Fischer 344 rats detected in a 90-day feeding study. *Food Chem Toxicol* 46, 2789-2795, 2008.
- Nakae D, Onodera H, Fueki O, Urano T, Komiyama N, Sagami F, Kai S, Nishimura C, Inoue T. Points to consider on the non-clinical safety evaluation of anticancer drugs. *J Toxicol Sci* 33, 123-126, 2008.
- Nakae D, Wanibuchi H, Konishi Y, Fukushima S. Possible involvement of adaptation mechanisms in the achievement of an ineffective dose range for the carcinogenicity of genotoxic carcinogens. *Genes Environ* 30, 125-131, 2008.
- Sakamoto Y, Nakae D, Fukumori N, Tayama K, Maekawa A, Imai K, Hirose A, Nishimura T, Ohashi N, Ogata A. Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344 rats. *J Toxicol Sci* 34, 65-76, 2009.
- Igarashi M, Watanabe M, Yoshida M, Sugaya K, Endo Y, Miyajima N, Abe M, Sugano S, Nakae D. Enhancement of lung carcinogenesis initiated with 4- (N-hydroxymethylnitrosamino)-1- (3-pyridyl)-1-butanone by the *Ogg1* gene deficiency in female, but not male, mice. *J Toxicol Sci*, in press.
2. 学会発表  
加藤あゆみ、梯アツナ、魏 民、多胡善幸、山野 荘太郎、村井 隆、鰐淵英機：マウス肝発がんにおける前がん病変マーカーの検索および機序解

析. 第 24 回日本毒性病理学会, 名古屋 (2008. 02)

梯アンナ, 魏 民, 森村圭一郎, 串田昌彦, 福島昭治, 鰐淵英機: ラット肝発がんにおける GST-P 陽性細胞巢のプロテオームおよびバイオマーカー解析. 第 24 回日本毒性病理学会, 名古屋 (2008. 02)

土井賢一郎, 加藤あゆみ, 多胡善幸, 山野荘太郎, 大西真里子, 鰐淵英機: ラット肝発がん性試験法 (伊東法) を用いたマスティックの発がん性評価. 第 24 回日本毒性病理学会, 名古屋, (2008. 02)

植松直美, 梯アンナ, 魏 民, 森村圭一郎, 北野光昭, 福島昭治, 鰐淵英機: OGG1 遺伝子欠損マウスにおける多臓器発がんの検討. 第 24 回日本毒性病理学会, 名古屋, (2008. 02)

大西真里子, 大森雅子, 増村健一, 能美健彦, 鰐淵英機, 福島昭治: ラット肝における 1,4-ジオキサン発がん性および *in vivo* 変異原性の検討. 第 24 回日本毒性病理学会, 名古屋, (2008. 02)

魏 民, 森村圭一郎, 梯アンナ, 串田昌彦, 當眞香織, 鰐淵英機, 福島昭治: 臭素酸カリウムのラット腎臓における変異原性と発がん性の閾値の存在. 第 24 回日本毒性病理学会, 名古屋, (2008. 02)

山野荘太郎, 柚木孝之, 梯アンナ, 森 聖, 福島昭治, 鰐淵英機: ラット膀胱発癌におけるロイシン, イソロイシンの修飾作用の検討. 第 24 回日本毒性病理学会, 名古屋, (2008. 02)

多胡善幸, 梯アンナ, 今中麻幸代, 魏 民, 森村圭一郎, 林 修次, 鰐淵英機: 大豆イソフラボンのラット乳腺発がんおよび子宮に対する修飾作用. 第 24 回日本毒性病理学会, 名古屋, (2008. 02)

Wei M, Kakehashi A, Doi K, Toma K, Morimura K and Wanibuchi H. Promoting effects of diphenylarsinic acid on hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine in rats. The 99<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (2008. 4, San Diego, CA. Philadelphia, U. S. A.)

Doi K, Wei M, Yamano S, Onishi M, Fukushima S and Wanibuchi H. Fatigue and Cancer: Enhancing potential of fatigue on MNNG-induced gastric carcinogenesis in rat model. The 99<sup>th</sup> Annual

Meeting of the American Association for Cancer Research (2008. 4, San Diego, CA. Philadelphia, U. S. A.)

Onishi M, Omori M, Wei M, Masumura K, Nohmi T, Wanibuchi H and Fukushima S. Existence of thresholds for carcinogenicity and *in vivo* mutagenicity of 1,4-dioxane in liver of rats. The 99<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (2008. 4, San Diego, CA. Philadelphia, U. S. A.)

Yamano S, Kato A, Kakehashi A, Wei M, Morimura K, Doi K, Toma K and Wanibuchi H. Cytokeratin 8/18 as a novel biomarker of preneoplastic lesions in mice hepatocarcinogenesis. The 99<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (2008. 4, San Diego, CA. Philadelphia, U. S. A.)

土井賢一郎, 田中雅彰, 魏 民, 渡辺恭良, 福島昭治, 鰐淵英機: 疲労と癌: 疲労がラット胃発がんに及ぼす影響と病理メカニズム. 第 97 回日本病理学会総会, 金沢 (2008. 05)

魏 民, 梯アンナ, 土井賢一郎, 森村圭一郎, 福島昭治, 鰐淵英機: ジフェニルアルシン酸のラット肝発がんプロモーション作用. 第 97 回日本病理学会総会, 金沢 (2008. 05)

大西真里子, 植松直美, 當眞香織, 串田昌彦, 鰐淵英機: ラット肝における 1,4-ジオキサンの発がん性及び *in vivo* 変異原性の検討. 第 97 回日本病理学会総会, 金沢 (2008. 05)

多胡善幸, 梯アンナ, 北野光昭, 森村圭一郎, 林修次, 鰐淵英機: 大豆イソフラボンのラット乳腺および子宮発がんに対する修飾作用. 第 97 回日本病理学会総会, 金沢 (2008. 05)

山野荘太郎, 柚木孝之, 森 聖, 植松直美, 福島昭治, 鰐淵英機: ラット膀胱発癌におけるロイシン, イソロイシンの修飾作用の検討. 第 97 回日本病理学会総会, 金沢 (2008. 05)

梯アンナ, 森村圭一郎, 猪上麻幸代, 魏 民, 福島昭治, 鰐淵英機: チェルノブイリ原発事故後の長期低用量放射線暴露による膀胱がんの発生. 第 97 回日本病理学会総会, 金沢 (2008. 05)

植松直美, 梯アンナ, 魏 民, 北野光昭, 福島昭



治、鰐淵英機：Ogg1 遺伝子欠損マウスにおける多臓器発がんの検討。第 97 回日本病理学会総会，金沢（2008. 05）

土井賢一郎、魏 民、梯アンナ、鰐淵英機、田中雅彰、渡辺恭良：疲労がラット胃発がんを促進する可能性、ならびに病態生理の解析。がん予防大会 2008 福岡，福岡（2008. 05）

梯アンナ、魏 民、猪上麻幸代、當眞香織、多胡善幸、鰐淵英機、福島昭治：プロポリスはラットに発癌性を示さない。がん予防大会 2008 福岡，福岡（2008. 05）

梯アンナ、魏 民、猪上麻幸代、當眞香織、多胡善幸、福島昭治、鰐淵英機：ラットを用いたプロポリスの発がん性試験。日本食品化学学会第 14 回総会・学術大会，西宮（2008. 05）

多胡善幸、梯アンナ、魏 民、鰐淵英機：スギナの安全性評価に関する研究。日本食品化学学会第 14 回総会・学術大会，西宮（2008. 05）

山野荘太郎、多胡善幸、梯アンナ、魏 民、鰐淵英機：マウス肺扁平上皮がんモデルの開発。第 23 回発癌病理研究会，鳥羽（2008. 08）

土井賢一郎、魏 民、植松真美、當眞香織、福島昭治、鰐淵英機：疲労は MNNG 誘発ラット胃発がんの早期過程を促進する。第 67 回日本癌学会学術総会，名古屋（2008. 10）

魏 民、森村圭一朗、梯アンナ、土井賢一郎、福島昭治、鰐淵英機：Oncomodulin はラット膀胱発がんの早期マーカーとして有用である。第 67 回日本癌学会学術総会，名古屋（2008. 10）

植松真美、梯アンナ、今中麻幸代、魏 民、森 聖、鰐淵英機：マウスにおける肝前がん病変マーカーの検索。第 67 回日本癌学会学術総会，名古屋（2008. 10）

梯アンナ、今中麻幸代、魏 民、大西真里子、福島昭治、鰐淵英機：ラット肝発がんにおける GST-P 陽性細胞巢のプロテオーム及びバイオマーカーの検討。第 67 回日本癌学会学術総会，名古屋（2008. 10）

大西真里子、多胡善幸、當眞香織、串田昌彦、山野荘太郎、鰐淵英機：スギナ (*Equisetum arvense* L.) の 90 日間反復投与毒性試験。第 67 回日本癌

学会学術総会，名古屋（2008. 10）

山野荘太郎、多胡善幸、梯アンナ、植松真美、大西真里子、鰐淵英機：A/J マウスを用いた NTCU 誘発肺扁平上皮癌の経時変化観察。第 67 回日本癌学会学術総会，名古屋（2008. 10）

多胡善幸、梯アンナ、北野光昭、山野荘太郎、大西真里子、鰐淵英機：大豆イソフラボンのラット乳腺および子宮発がんに対する修飾作用。第 67 回日本癌学会学術総会，名古屋（2008. 10）

鰐淵英機：ラット膀胱発がん物質の早期検出マーカーの開発。第 15 回岐山毒性病理セミナー，岐阜（2008. 11）

魏 民、梯アンナ、菅 直人、山田貴宣、鰐淵英機：ジフェニルアルシン酸の肝発がん性影響の検討。第 14 回ヒ素シンポジウム，東京（2008. 11）

横平政直；橋本希；久野壽也；今井田克己，ラット気管内投与法による微粒子の肺毒性評価への挑戦，第 24 回日本毒性病理学会，名古屋（2008. 02）

橋本 希，横平 政直，山川 けいこ，細川 京子，鈴木 智，久野 壽也，今井田 克己，L-asparagine のラット 90 日間反復経口投与毒性試験，第 24 回日本毒性病理学会，名古屋（2008. 02）

横平政直；久野壽也；山川けいこ；細川京子；橋本希；竿尾光祐；今井田克己，F344 ラット気管内投与法による微粒子 16 種の肺毒性評価，第 97 回日本病理学会総会，金沢（2008. 05）

岸宗佑、横平政直、久野壽也、橋本希、竿尾光祐、今井田克己、NNK 誘発マウス肺腺癌と肺腺腫における EGFR、ER および PR。第 97 回日本病理学会総会，金沢（2008. 05）

Toshiya Kuno, Masanao Yokohira, Nozomi Hashimoto, Satoshi Suzuki, Keiko Yamakawa, Katsumi Imaida, Streptozocin is a potent lung carcinogen in A/J mice, 第 67 回日本癌学会学術総会，名古屋（2008. 10）

Masanao Yokohira, Toshiya Kuno, Keiko Yamakawa, Nozomi Hashimoto, Satoshi Suzuki, Katsumi Imaida, Effects of nano-sized particles of CuO and TiO<sub>2</sub> by intratracheal instillation on DHPN lung, 第 67 回日本癌学会学術総会，名古屋（2008. 10）

Satoshi Suzuki, Masanao Yokohira, Nozomi Hashimoto, Toshiya Kuno, Keiko Yamakawa, Kousuke Saoo, Katsumi Imaida, A study on the threshold for MeIQx carcinogenesis in combination with NNK using A/J mice, 第67回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2008. 10)

Keiko Yamakawa, Nozomi Hashimoto, Masanao Yokohira, Toshiya Kuno, Satoshi Suzuki, Katsumi Imaida, Effect of intragastric administration of nanoparticles on liver carcinogenesis in a rat medium-term, 第67回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2008. 10)

Nozomi Hashimoto, Masano Yokohira, Toshiya Kuno, Keiko Yamakawa, Satoshi Suzuki, Kousuke Saoo, Tadashi Uchino, Hiroshi Tokunaga, Katsumi Imaida, Intratracheal instillation of CuO nanoparticles promotes liver carcinogenesis in F344 male rats, 第67回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2008. 10)

久野壽也、横平政直、橋本希、今井田克己、竿尾光祐、山本美佐子、鼻腔腫瘍, 第97回スライドカンファレンス, 広島 (2008. 11)

横平政直; 橋本希; 鈴木智; 竿尾光祐; 久野壽也; 今井田克己, 片肺虚脱の試みによるマウス肺中期腫瘍モデルの作成と胸膜中皮腫モデルへの可能性, 第25回日本毒性病理学会総会 (2009. 01)

橋本希; 横平政直; 鈴木智; 竿尾光祐; 久野壽也; 今井田克己, 気管内投与によるCuOナノサイズ粒子の急性変化の検討—マイクロサイズ粒子との比較による—, 第25回日本毒性病理学会総会 (2009. 01)

中江 大, 吉田 緑, 前川 昭彦. Ogg1 遺伝子欠損によるNNK誘発マウス肺腺系発がんの促進, 第97回日本病理学会総会 (2008年5月, 石川県金沢市).

坂本 義光, 福森 信隆, 上原 眞一, 広瀬 明彦, 西村 哲治, 前川 昭彦, 今井 清, 小縣 昭夫, 中江 大. ラットにおける多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の陰嚢腔内投与による中皮腫の誘発. 第35回日本トキシコロジー学会学術年会 (2008年6月, 東京都渋谷区).

田山 邦昭, 藤谷 知子, 坂本 義光, 小縣 昭夫, 中江 大, 上原 眞一. Diethylstilbestrolのマウス新生仔期あるいは成熟期投与による精子傷害性の相違. 第35回日本トキシコロジー学会学術年会 (2008年6月, 東京都渋谷区).

藤谷 知子, 小縣 昭夫, 中江 大, 上原 眞一, 高橋 博, 矢野 範男, 安藤 弘, 湯澤 勝廣, 久保 喜一. ハウスダスト除去を目的とした噴霧型家庭用品のマウスへの経口投与の影響. 第35回日本トキシコロジー学会学術年会 (2008年6月, 東京都渋谷区).

田中 豊人, 高橋 省, 大石 眞之, 小縣 昭夫, 中江 大. ピペロニルブトキシドの次世代マウスの自発行動に及ぼす影響. 第35回日本トキシコロジー学会学術年会 (2008年6月, 東京都渋谷区).

山口 敦美, 藤谷 知子, 小縣 昭夫, 中江 大, 上原 眞一. 農薬 chlorpropham (CIPC)のICRとBALB/cマウスの免疫系に及ぼす影響. 第35回日本トキシコロジー学会学術年会 (2008年6月, 東京都渋谷区).

辰巳 公平, 大橋 一夫, 民西 早苗, 櫻井 嘉彦, 中江 大, 岡野 光夫, 吉岡 章, 嶋 緑倫. 肝再生と凝固因子・線溶因子. 第15回肝細胞研究会 (2008年6月, 静岡県静岡市).

Nakae D, Wanibuchi H, Konishi Y, Fukushima S. Possible involvement of adaptation mechanisms in the achievement of an ineffective dose range for the carcinogenicity of genotoxic carcinogens. International Symposium on Genotoxic and carcinogenic Thresholds (遺伝毒性発がん物質の閾値に関する国際シンポジウム) (2008年7月, 東京都港区).

高橋 省, 大橋則雄, 中江 大, 小縣昭夫. ラット及びマウスの雄生殖機能に対するパラジクロロベンゼンの影響. 第11回環境ホルモン学会研究発表会 (2008年12月, 東京都江東区).

中江 大, 坂本義光, 前川昭彦, 今井 清, 西村 哲治, 広瀬明彦, 小縣昭夫. ラットにおける多層カーボンナノチューブの陰嚢腔内投与による中皮腫の誘発. 第23回発癌病理研究会 (2008年8月, 三重県鳥羽市).

中江 大, 坂本義光, 前川昭彦, 今井 清, 西村 哲治, 広瀬明彦, 小縣昭夫. 多層カーボンナノチ

チューブ(MWCNT)の発がんハザード同定とナノマテリアルのリスク評価におけるその意義。化学生物総合管理学会特別講演会(2008年9月,東京都文京区)。

中江 大, 坂本義光, 前川昭彦, 今井 清, 西村哲治, 広瀬明彦, 小縣昭夫。ラットにおける多層カーボンナノチューブの陰嚢腔内投与による中皮腫の誘発。第67回日本癌学会学術総会(2008年10月, 愛知県名古屋市)。

高橋美和, 吉田 緑, 井上 薫, 中江 大, 西川秋佳。ラットを用いたカテキンの慢性毒性・発がん性試験。第67回日本癌学会学術総会(2008年10月, 愛知県名古屋市)。

佐藤かな子, 野中良一, 大橋則雄, 中江 大, 小縣昭夫。食品添加物・赤色着色料によるアロマターゼ活性阻害。第13回日本フードファクター学会学術集会(2008年11月, 東京都江戸川区)。

Satoh K, Nonaka R, Oyama K, Ohashi N, Nakae D, Ogata A, Shimizu M, Oshio S, Takeda K. The effects of in utero exposure to a migrant, 4,4-butylidenebis(6-t-butyl-m-cresol), from nitrile-butadiene rubber gloves on monoamine neurotransmitter in rats. International Symposium on the Environmental Risks of Chemicals (化学物質の環境リスクに関する国際シンポジウム)(2008年12月, 東京都江東区)。

Tanaka T, Takahashi O, Oishi S, Ohashi N, Nakae D, Ogata A. Effects of tartrazine on behavioral development in a three-generation toxicity study in mice. International Symposium on the Environmental Risks of Chemicals (化学物質の環境リスクに関する国際シンポジウム)(2008年12月, 東京都江東区)。

坂本義光, 中江 大, 福森信隆, 田山邦昭, 前川昭彦, 今井 清, 西村哲治, 広瀬明彦, 大橋則雄, 小縣昭夫。ラットにおける多層カーボンナノチューブによる中皮腫の誘発。第25回日本毒性病理学会年次学術集会(2009年1月, 静岡県浜松市)。

多田幸恵, 矢野範男, 高橋 博, 湯澤勝廣, 安藤弘, 久保喜一, 長澤明道, 大橋則雄, 小縣昭夫, 中江 大。Fischer 344 ラットによるL-セリンの90日間反復投与毒性試験。第25回日本毒性病理学会年次学術集会(2009年1月, 静岡県浜松市)。

小縣昭夫, 坂本義光, 福森信隆, 齋藤育江, 栗田雅行, 大橋則雄, 矢口久美子, 中江 大, 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の生体影響について。大気環境学会関東支部講演会(2009年3月, 東京都北区)。

<その他>

## II. 知的所有権の取得状況

特許取得

なし

実用新案登録

なし

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)  
既存添加物等の安全性に関する研究  
平成 20 年度分担研究報告書

ダンマル樹脂の発がん性等に関する研究

研究分担者：鰐淵 英機 大阪市立大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

前年度に引き続き、ダンマル樹脂の 1 年間反復投与毒性試験の解析および 2 年間発がん性試験を実施した。また、短期多臓器発がんリスク評価試験法を開発する目的で、ダンマルの 16 週間多臓器発がん性試験を実施した。本年度の研究成果は以下にとりまとめる。

1 年間慢性毒性試験では、雌雄 F344 ラットにダンマル樹脂を 0.03、0.125、0.5、2%の濃度で混餌投与し、実験開始 52 週経過後屠殺し、全身諸臓器について病理組織学的検査を実施した。その結果、体重増加抑制が雌雄の 2%群で認められた。肝臓の絶対重量および相対重量の有意な増加、貧血および血小板数の有意な高値が雌雄ともに 0.5%および 2%群で認められた。肝臓においては、雄の 2%群でのみ直径 0.4mm 以上の GST-P 陽性細胞巣が認められた。また、雌の 0.5%および 2%群では対照群に比べ、GST-P が瀰漫性に過剰発現した。腎臓では雄の 0.5%および 2%群で円柱の発生頻度の増加、また尿性状検査においては 2%群で尿蛋白濃度の上昇が観察された。なお、いずれの臓器においても、腫瘍の発生はみられなかった。上述したように、ダンマル樹脂投与による毒性影響が雌雄ともに 0.5%以上の群で認められた。

2 年間発がん性試験では、雌雄 F344 ラットにダンマル樹脂を 0.03、0.125、0.5、2%の濃度で混餌投与し、実験開始 104 週経過後屠殺し、全身諸臓器について病理組織学的検査を実施した。その結果、雄においては 2%群で対照群と比較して生存率が有意に低下した。また、2%群では雌雄ともに体重増加抑制が認められた。肝臓の絶対重量の有意な増加が雌雄の 0.03%以上の群で認められた。肝臓の相対重量の有意な増加が雄の 0.03%以上の群、雌の 0.5%以上の群で認められた。また、実験開始後 87 週より、肉眼的消化管出血は雌雄の 0.5%および 2%群でみられ、その発生頻度は雌雄の 2%群ともに対照群と比較して有意に増加した。なお、対照群および 0.03%では肉眼的消化管出血はみられなかった。血液学検査の結果、対照群と比較して、雄の 2%群で赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、MCH、MCHC の有意な低値および血小板数の有意な高値が認められ、雌の 2%群では、MCH、MCHC の有意な低値、血小板数の有意な高値が認められた。また、解剖時における凝固検査においては、雄の 0.5%群で PT および APTT の延長およびフィブリノーゲンの増加が認められ、雌の 2%群で PT 延長傾向およびフィブリノーゲンの増加が認められた。これらのことから、雄の 0.5%以上の群および雌の 2%群で凝固障害が起きた可能性が示唆された。病理学組織的検索は現在進行中であるが、途中結果では雄の 2%群で肝臓腫瘍の発生頻度および発生個数はともに対照群と比較して有意な増加が認められたことから、ダンマル樹脂はラット肝発がん性を有することが明らかとなった。

16 週間多臓器発がん性試験では、雄 F344 ラットに実験開始 4 週間にイニシエーション処置として 5 種類の発がん物質を投与し、1 週間の休薬後、ダンマル樹脂を 0.03、0.125、0.5、2.0%の濃度で混餌投与し、実験開始 16 週経過後屠殺し、全身諸臓器について病理組織学的検査を実施した。肝臓における GST-P 陽性細胞巣の発生を検討した結果、0.125%投与群以上で単位面積当りの個数で対照群と比較して有意な高値、0.5%投与群以上で単位面積当りの面積において対照群と比較して有意な高値を認めた。一方、大腸においては前がん病変の指標である ACF ならびに MDF の発生個数は、全投与群において対照群と比較して有意な差は認められなかった。また、腎臓における過形成性および腫瘍性病変の発生頻度および平均発生個数も全投与群において対照群と比較して有意な差は認められなかった。以上の結果により、ダンマル樹脂はラット肝発がんプロモーション作用を有するが、腎および大腸発がんに影響を及ぼさない可能性が示唆された。他の臓器については現在検索中である。

A. 研究目的

ダンマル樹脂はフタバガキ科又はナンヨウスギ科の分泌液より、熱時エタノール又は酢酸エチルで抽出し、ろ液から溶媒を留去し、乾燥して得

られたものである。ダンマル樹脂の主成分は多糖類であり、飲料、冷菓、チューインガムなどに天然食品添加物質（増粘安定剤、ガムベース）として使用されている。

一方、ダンマル樹脂の 90 日反復投与毒性試験においては 0.125% および 2% 群でラット肝重量の有意な増加が認められた。また、ラット肝中期発がん性試験においては 0.125% から肝発がんプロモーション作用を示した。これらの結果を踏まえて、さらにダンマル樹脂が食品添加物としてヒトが長期にわたって摂取する可能性があることを考慮すると、ダンマル樹脂の安全性については、さらに長期間の投与による評価を行う必要がある。そこで、本研究では 1 年間慢性毒性試験および 2 年間発がん性試験をラットに施行し、3 年間かけてその安全性を評価することとした。

## B. 研究方法

### [被験物質]

ダンマル樹脂粉末は、三栄源エフ・エフ・アイ株式会社により供与された。

### [投与量の設定]

投与用量は、平成 18 年度に行った 28 日間反復投与毒性試験の結果と、以前に施行された 90 日間反復投与毒性試験およびラット肝中期発がん性試験の結果に基づいて、1 年間慢性毒性試験では 0、0.03%、0.125%、0.5%、2% を、2 年間発がん性試験では 0、0.03%、0.5%、2% を設定した。16 週間多臓器発がん性試験では 0、0.03%、0.125%、0.5%、2% を設定した。

### [被験物質の安定性]

ダンマル樹脂はオリエンタル MF 基礎飼料に規定量混ぜたもの検体として使用した。被験物質の飼料への添加、固形化はオリエンタル酵母工業株式会社に依頼し、試験に供した。ダンマル樹脂の飼料への添加、安定性を検索した結果、固形飼料の一ヶ月保存品に含量のばらつきや減少が認められなかった。

### [動物並びに飼育条件]

5 週齢の雌雄 F344 ラットを日本チャールズリバー株式会社から入手し、約 1 週間の馴化飼育後、6 週齢にて試験に供した。動物数は、1 年間慢性毒性試験について 1 群当り雌雄各 10 匹、2 年間発がん性試験について 1 群当たり雌雄各 50 匹を用いる。16 週間多臓器発がん性試験について 1 群当たり雄各 20 匹を用いる。動物の飼育は大阪市立大学大学院医学研究科動物実験施設のバリアーシステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 10\%$ 、12 時間蛍光灯照明、12 時間消灯の条件下で行う。動物はプラスチックケージに 3 匹ずつ飼育し、飲料水として、水道水を自由摂取させる。ケージおよびチップを週 1 回

交換する。

### [観察並びに検索方法]

#### 1. 1 年間慢性毒性試験および 2 年間発がん性試験

食品添加物の 1 年間慢性毒性試験法ガイドラインならびにがん原性試験法ガイドラインに準じて行う。観察並びに検索項目は以下の通りである。

#### [一般状態、体重、摂餌量]

全動物は、一般状態を毎日観察し、投与開始の 13 週間まで週 1 回体重および摂餌量を測定し、その後について 1 ヶ月に 1 回測定する。1 日あたりのダンマル樹脂摂取量 (mg/kg/day) は、摂餌量の結果より算出する。

#### [血液学的および血液生化学的検査]

1 年間慢性毒性試験および 2 年間発がん性試験では、血液学的及び血液生化学的検査を実施する。動物は、採血の前日午後 5 時より絶食させ、解剖時腹部大動脈より採血する。血液学的検査として、赤血球数 (RBC)、白血球数 (WBC)、血小板数 (Plt)、ヘモグロビン量 (Hb)、ヘマトクリット値 (Ht)、平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC) を測定する。血液生化学的検査として、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)、 $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ活性 ( $\gamma$ -GPT) を測定する。

#### [尿性状検査]

尿性状は、52 週 (1 年間慢性毒性試験) あるいは 104 週 (2 年間慢性毒性試験) に尿検査試験紙 (N-マルチスティックス、シーメンスメディカルソリューションズ・ダイアグノスティクス株式会社、東京) を用いて、蛋白、ケトン体、糖、比重、潜血、pH ビリルビン、ウロビリノーゲンと亜硝酸塩のレベルを判定し。

#### [病理組織学的検査]

1 年間慢性毒性試験については 12 ヶ月の投与終

了後に、2年間発がん性試験については24ヶ月の投与終了後に、それぞれ全生存例を安楽死させて詳細な剖検を行う。

剖検においては、以下に示す器官、臓器を採取し、下線を付したのものについて重量を測定した後、全てを10%中性緩衝ホルマリン液により固定する。ただし、精巣および眼球については、必要に応じて適切な固定液を用いることがある。採取する器官、臓器は、リンパ節(頸部、腸間膜)、胸腔内大動脈、顎下腺、耳下腺、胸骨、大腿骨(骨髄を含む)、胸腺、気管、肺、心、甲状腺および上皮小体(固定後)、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)、肝、脾、腎、副腎、膀胱、精囊、前立腺、精巣、精巣上体、卵巣および卵管、子宮、膣、脳、下垂体、坐骨神経、大腿筋、脊髄(頸部および腰部)、眼球およびハーダー腺、大腿骨、胸骨、頭蓋骨および鼻腔、その他の肉眼的異常部位である。

死亡例および瀕死による切迫屠殺例については、上記と同様に解剖し死因を究明するが、重量の測定は実施しない。切迫例については、可能な限り末梢血の塗抹標本作製する。

病理組織学的検索は、対照群および高用量群の全動物について、以下に示す器官、組織の固定標本から切り出しを行い、通常の方法でパラフィン包埋して薄切し、ヘマトキリン/エオジン染色を施して鏡検する。該当する器官、臓器は、リンパ節(頸部、腸間膜)、胸腔内大動脈、顎下腺、耳下腺、胸骨、大腿骨(骨髄を含む)、鼻腔、胸腺、気管、肺、心、甲状腺および上皮小体、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)、肝、脾、腎、副腎、膀胱、精囊、前立腺、精巣、精巣上体、卵巣および卵管、子宮、膣、脳、下垂体、坐骨神経、大腿筋、脊髄(頸部および腰部)、眼球およびハーダー腺、その他の肉眼的異常部位である。その他の用量群の全動物については、胸腺、肺、肝、脾、腎、副腎、精巣、卵巣とその他の肉眼的異常部位および高用量群において投与に関連した異常が観察された器官、組織について、上述と同様の方法で病理組織学的検査を行う。

## 2. 16週間多臓器発がん性試験

### 一般状態

実験開始後、1日1回(午前)、全ての動物について一般行動、中毒症状、生死等について観察し、個体別に記録した。また午後の観察時には動物の生死の確認を行った。

### 体重

実験開始時およびその後、毎週1回、全動物について電子天秤 LA4200 型(ザルトリウス株)を用いて個体別に体重を測定した。また、計画屠殺時に各動物の1晩(約16時間)絶食後の体重(剖検日体重)を測定した。

### 摂餌量

実験開始後、毎週1回、2日間の摂取量を電子天秤 LA4200 型(ザルトリウス株)を用いてケージ単位で測定し、1匹当りの1日平均摂取量を計算した。また、投与期間中の被験物質摂取量を算出した。

### 摂水量

実験開始後、毎週1回、2日間の摂取量を電子天秤 LA4200 型(ザルトリウス株)を用いてケージ単位で測定し、1匹当りの1日平均摂取量を計算した。また、BBN および DHPN 投与期間中は、各物質の摂取量を算出した。

### 血液学的検査

全生存動物について解剖前日の夕方(16:00頃)より飼料を取り除くことおよびケージ交換により絶食させ、エーテル麻酔下により開腹後、腹部大動脈より採血した血液の一部を EDTA-2K 入り採血瓶に取り、血液凝固を阻止し、スピナー法により塗抹標本作製、Wright 法で染色した。この標本は白血病診断の一助として使用するもので、帳票データには反映しなかった。また、採取した血液の残りを遠心分離して血清を採取し、-70度以下で冷凍保管中である。

### 肉眼的病理学検査

全生存動物について、全身の諸器官・組織の肉眼的病理学検査を実施し、10%緩衝ホルマリン液にて保存した。大腸については、摘出後、結腸および直腸を結紮し、10%緩衝ホルマリンを粘膜が十分にのばされるまで注入した。約3分間固定後、腸管膜結合部に沿って切開し、濾紙に張り付けて伸展した状態で10%緩衝ホルマリン液にて固定し、固定後肉眼的観察を行い剖検記録用紙に記録した。

### 器官重量

下記の器官について重量を測定し、剖検日体重を用いて器官重量体重比を算出した。

心臓、脾臓、胸腺、下垂体\*、甲状腺(上皮小体を含む)\*、副腎、肝臓、腎臓、精巣、脳

\*固定後測定する。