

1日平均摂餌量を計算した。実験開始後32週間後に、麻酔下で開腹、腹部大動脈より採血し、瀉血による屠殺後剖検した。採取した血液は、(株)エスアールエル(東京都)に依頼し、赤血球(RBC)、白血球(WBC)、ヘモグロビン(Hb)、ヘマトクリット(Ht)、血小板(Plt)、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)を測定した。遠心分離して得た血清を用いて、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アルカリフォスファターゼ(ALP)、 $\gamma$ -グルタミントランスペプチダーゼ( $\gamma$ -GTP)、総ビリルビン(T-Bil)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(Cr)、糖(Glu)、総コレステロール(T-Cho)、中性脂肪(TG)、総蛋白(TP)、アルブミン(Alb)、カルシウム(Ca)、無機リン(IP)、ナトリウム(Na)、カリウム(K)、塩化物(Cl)を測定した。剖検時、諸臓器を肉眼的に観察し、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、唾液腺、胸腺は重量測定後に、リンパ節(頸部、腸間膜、回盲部)、下垂体、甲状腺、上皮小体、鼻腔、気管、舌、唾液腺(顎下腺、舌下腺)、食道、胃、小腸、大腸、膵臓、膀胱、精囊、前立腺、乳腺、脊髄、坐骨神経、大動脈、眼球、ハーダー氏腺、皮膚、骨および骨髄(大腿骨、胸骨)、骨格筋、ジンバル腺、その他の肉眼病変部については摘出後直ちに10%緩衝ホルマリン液にて固定した。精巣はGlutaraldehyde Formalin Acetic Acid液にて固定した。下垂体、前立腺、精囊については、固定後に重量を測定した。その後、各組織を切り出し、パラフィン包埋後、薄切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して、病理組織学的に検索を行った。また、肝臓は病理組織標本を作製するとともに、抗体として胎盤型 glutathione S-transferase (GST-P) を用い、肝臓の免疫染色を行った。GST-P 陽性細胞巢は画像処理装置を用いて定量的に解析し、肝臓の切片全体の面積に対する発生個数ならびに面積を算出し、各群毎に統計学的に比較検討した。統計処理では、各検査項目について対照群と各投与群との間の統計学的有意差検定を行い、危険率5%( $P<0.05$ )と1%( $P<0.01$ )のレベルで判定した。平均値の差の検定はPost-hocの多重比較法を用いて行った。また、頻度についてはFisherの直接確率検定を、程度のある病変についてはMann-Whitney検定を行った。

本研究の実験は全て香川大学総合生命科学研究センター、動物実験部門において行われ、動物実験の開始前には実験計画書を実験動物委員会に提出し、その承諾を得た上で実験動物の愛護上の問題に配慮し行った。

## C. 研究結果

### <一般状態および死亡動物>

実験期間中、一部の動物が死亡した。特に2%投与群において、DMBDD 処置終了後3~4週間後および14~27週間後に死亡例が見られた。生存曲線をFig. 2に示した。一般状態では、1群で5匹、2群で9匹、3群で9匹、4群で8匹、5群で5匹、DMH投与開始後の第3~4週において、皮下投与穿刺部に潰瘍を形成したが、いずれも第6週で癒痕治癒傾向となった。これはDMHの皮下投与に伴う変化であり、病変の発生において群間に有意な差は見られなかった。

### <体重>

試験期間中の各群の体重推移をFig. 3およびTable 1に示した。第6、7、14、19、23~28週目の体重において、被験物質投与群の第2群(0.03%投与群)では、0%(対照群)と比べて、有意な増加が認められた。また、第7週目には被験物質投与群の第5群(2%投与群)において0%(対照群)比較して有意に低値を示した。

### <摂餌量>

試験期間中の各群の摂餌量の推移をFig. 4およびTable 2に示した。第7、8週目に、被験物質投与群の第5群(2%投与群)で、0%(対照群)と比べて有意な減少が認められた。また、被験物質投与群の第5群(2%投与群)で、第11、16、17、21、22、26、30、32週目において、第4群(0.5%投与群)で、第13、17、22、30、32週目において、0%(対照群)と比べて有意な増加が認められた。

試験期間中におけるラット1匹1日あたりの平均の摂餌量をTable 3に示した。ラット1匹1日当たりの平均の摂餌量は、各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。

### <血液学的検査および血液生化学的検査>

血液学的検査の結果をTable 4に示した。血液学的検査において、各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。

血清生化学的検査の結果をTable 5に示した。被験物質投与群の第5群(2%投与群)において、TP、 $\gamma$ -GTPの有意な高値が観察された。また、同じ第5群(2%投与群)において、T-Bil、AST、ALTの有意な低値が観察された。その他の血清生化学的検査の項目で有意な差異は認めなかった。

### <臓器重量>

試験終了時の臓器の絶対重量と相対重量の結果

を Table 6, 7 に示した。被験物質投与群の第 4 群 (0.5% 投与群) および第 5 群 (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。また、被験物質投与群の第 5 群 (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。

#### <肝の GST-P 陽性細胞巢>

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を Table 8 に示した。被験物質投与群の第 4 群 (0.5% 投与群) および第 5 群 (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。

#### <病理学的検査>

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および腫瘍性病変の病理組織学的検討の結果を Table 9 に示した。

非腫瘍性病変は、被験物質投与群の第 3 群

(0.125% 投与群) および第 4 群 (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、被験物質投与群の第 4 群 (0.5% 投与群) および第 5 群 (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。その他腫瘍性病変について各被験物質投与群間で有意な差異を認めなかった。

#### D. 考察

今回、F344 ラットを用いて、既存添加物であるダンマル樹脂の発がん修飾作用についてラット多臓器中期発がん試験法により検討した。

実験期間中、一部の動物が死亡した。特に 2% 投与群において、DMBDD 処置終了後 3~4 週間後および 14~27 週間後に死亡例が見られた。ほとんどの例で死亡後剖検を行ったが、DMBDD 処置終了後 3~4 週間後に死亡した症例では、肉眼的に腫瘍形成などは認めず、死因はイニシエーション目的の DMBDD 処置による急性毒性と考えられた。現在、DMBDD 処置終了後 14~27 週間後に死亡した例については、病理組織学的検討を行っている。被験物質投与群の第 5 群 (2% 投与群) において、第 7 週目の体重の有意な減少が見られ、摂餌量においても有意な減少が認められたが、最終体重においては各群間に有意な差異は見られなかった。

血液学的検索では、各群間に有意差を示す項目は

見られず、ダンマル樹脂の毒性を示す項目はなかった。

血清生化学的検索においては、被験物質投与群の第 5 群 (2% 投与群) において、TP、 $\gamma$ -GTP の有意な高値が観察された。また、同じ第 5 群 (2% 投与群) において、T-Bil、AST、ALT の有意な低値が観察された。

臓器重量においては、被験物質投与群の第 4 群 (0.5% 投与群) および第 5 群 (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。また、被験物質投与群の第 5 群 (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、肝機能への影響を示唆するものと考えられた。

肝の 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においては、被験物質投与群の第 4 群 (0.5% 投与群) および第 5 群 (2% 投与群) において、GST-P 陽性細胞巢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、途中経過では、被験物質投与群の第 4 群 (0.5% 投与群) および第 5 群 (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 陽性細胞巢の結果と合わせ、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。

#### E. 結論

ダンマル樹脂による発がん修飾作用の有無についてラット多臓器中期発がん試験法を用いて検討した。最終体重において、各群間に有意な差異は見られなかった。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。2% 投与群では TP、 $\gamma$ -GTP の有意な高値および T-Bil、AST、ALT の有意な低値が観察された。さらに、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。

#### F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

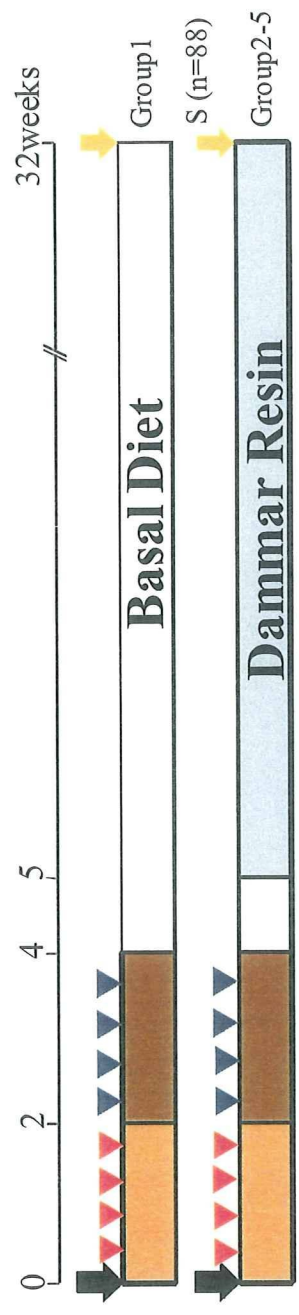
1. Hori Y, Takasuka N, Mutoh M, Kitahashi T, Kojima S, Imaida K, Suzuki M, Kohara K, Yamamoto S, Moriyama N, Sugimura T, Wakabayashi K. Periodic analysis of urethane-induced pulmonary tumors in living A/J mice by respiration-gated X-ray microcomputed tomography. *Cancer Sci.*, 99(9):1774-1777, 2008.
2. Kuno T, Yokohira M, Matsuda Y, Suzuki S, Hashimoto N, Yamakawa K, Saoo K, Imaida K. Lack of modifying potential of 8-methoxypsoralen in the promotion or progression stages of lung carcinogenesis in A/J female mice. *Oncol Rep.*, 20(4):767-72, 2008.
3. Yachida S, Sakamoto M, Imaida K, Yokohira M, Saoo K, Okano K, Wakabayashi H, Maeta H, Suzuki Y. p27 (Kip1) is overexpressed in very early stages of hepatocarcinogenesis. *Cancer Sci.*, 99:11:2152-2159, 2008.
4. Yokohira M, Takeuchi H, Saoo K, Matsuda Y, Yamakawa K, Hosokawa K, Kuno T, Imaida K. Establishment of a bioassay model for lung cancer chemoprevention initiated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in female A/J mice. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 60: 469-473, 2008.
5. Yokohira M, Yamakawa K, Saoo K, Matsuda Y, Hosokawa K, Hashimoto N, Kuno T, Imaida K. Antioxidant Effects of Flavonoids, Used as Food Additives (Purple Corn Color, Enzymatically Modified Isoquercitrin and Isoquercitrin), on Liver Carcinogenesis in a Rat Medium-Term Bioassay. *J. Food Sci.*, 3(7):C561-8, 2008.
6. Yokohira M, Hosokawa K, Yamakawa K, Hashimoto N, Suzuki S, Matsuda Y, Saoo K, Kuno T, Imaida K. A 90-day toxicity study of L-asparagine, a food additive, in F344 rats. *Food Chem. Toxicol.*, 46: 2568-2572, 2008.
7. 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.*, 36: 620-631, 2008.
8. 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.*, 105: 5: 545-553, 2008.
9. 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.*, 73:T26-32, 2008.
10. 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.
11. 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.
12. Goto R, Hoshikawa H, Fujii T, Indo K, Yoshino K, Imaida K, Mori N. Clinicopathological significance of cyclooxygenase-2 expression in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.*, 19: 645-650, 2008.
13. Kitahashi T, Takahashi M, Yamada Y, Oghiso Y, Yokohira M, Imaida K, Tsutsumi M, Takasuka N, Sugimura T, Wakabayashi K. Occurrence of mutations in the epidermal growth factor receptor gene in X-ray-induced rat lung tumors. *Cancer Sci.*, 99:241-245, 2008.

14. 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
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Yokohira M, Mastuda Y, Suzuki S, Hosokawa K, Yamakawa K, Hashimoto N, Saoo K, Nabae 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.
19. 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.
2. 学会発表
1. 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)
  2. 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)
  3. 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)
  4. 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)
  5. 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)
  6. Masanao Yokohira, Toshiya Kuno, Keiko Yamakawa, Nozomi Hashimoto, Satoshi Suzuki, Katsumi Imaida, Effects of nano-sized particles of CuO and TiO2 by intratracheal instillation on DHPN lung, 第 67 回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2008.10)
  7. 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)
  8. 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)
9. 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)
  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)
  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)
  12. 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ーマイクロサイズ粒子との比較によるー, 第 25 回日本毒性病理学会総会 (2009. 01)

#### 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



Animals: 6-week-old, male F344 rats

Test chemical: Dammar in the diet

Basal diet: MF

Treatment

- ➔ DEN: 100mg/kg body weight, i.p., single dose, at day0.
  - ▼ MNU: 20mg/kg body weight, i.p., 4 times, during weeks 1 and 2.
  - BBN: 0.05% in the drinking water, during weeks 1 and 2.
  - ▲ DMH: 40mg/kg body weight, s.c., 4 times, during weeks 3 and 4.
  - DHPN: 0.1% in the drinking water, during weeks 3 and 4.
- S: Sacrifice

Group	Dammar Resin	No. of rats
1	0%	22
2	0.03%	22
3	0.125%	22
4	0.50%	22
5	2%	22

Fig.1 Experimental Design

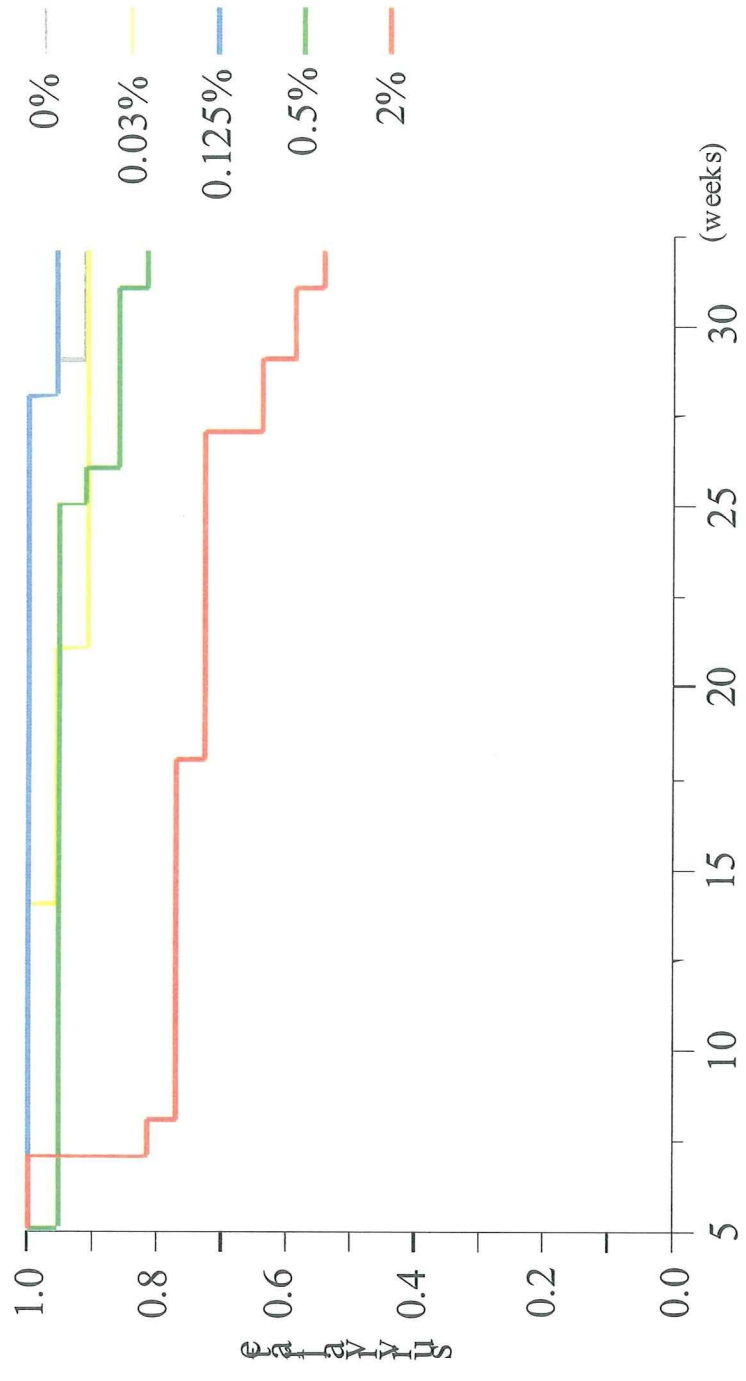


Fig.2 Survival curve

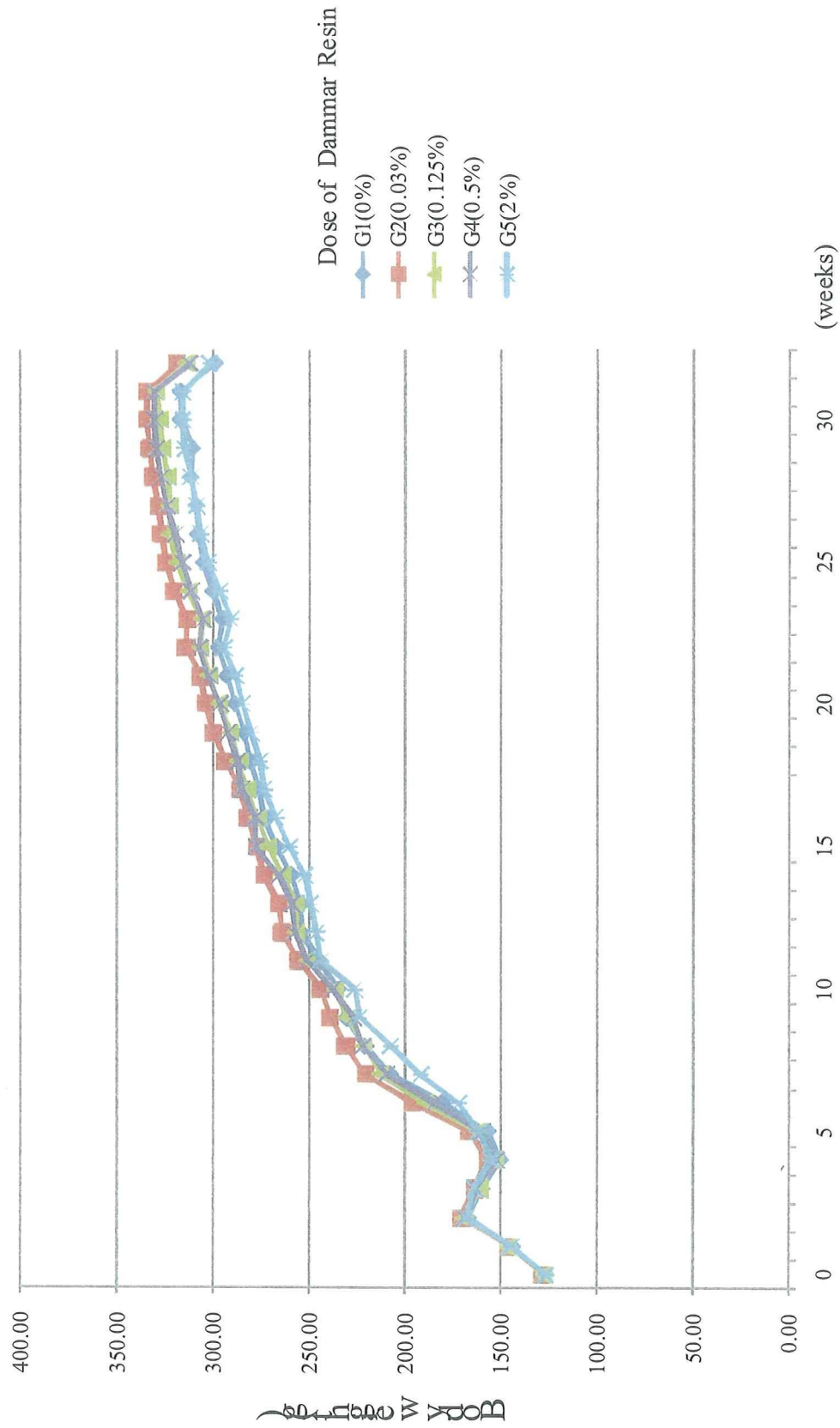


Fig.3 Body weight curves



Table 1 Body Weights

	0%	0.03%	0.125%	0.5%	2%
0	126.43 ± 5.30	128.26 ± 3.70	127.89 ± 7.64	126.97 ± 6.07	126.52 ± 5.34
1	144.19 ± 6.72	146.38 ± 5.49	146.36 ± 8.82	144.80 ± 7.53	144.42 ± 6.58
2	167.06 ± 7.34	170.82 ± 7.12	169.30 ± 9.28	168.74 ± 8.43	167.61 ± 6.72
3	160.25 ± 8.82	163.72 ± 9.16	161.31 ± 8.95	162.69 ± 9.47	163.96 ± 8.59
4	150.03 ± 13.46	157.00 ± 10.78	153.38 ± 12.70	152.23 ± 12.96	155.09 ± 12.76
5	156.58 ± 14.90	166.48 ± 13.71	162.05 ± 14.52	159.35 ± 15.04	161.57 ± 14.12
6	180.62 ± 16.56	196.19 ± 13.83*	189.28 ± 16.01	184.91 ± 15.90	171.80 ± 16.78
7	207.85 ± 14.87	220.90 ± 12.94*	212.75 ± 14.53	209.72 ± 14.51	191.48 ± 18.22*
8	220.97 ± 13.23	230.76 ± 12.58	221.35 ± 14.73	221.76 ± 13.57	207.29 ± 13.18
9	230.32 ± 13.77	238.96 ± 13.39	230.08 ± 15.64	230.46 ± 14.03	223.70 ± 16.13
10	234.79 ± 13.25	243.81 ± 13.81	236.29 ± 15.73	237.62 ± 13.84	225.96 ± 9.97
11	244.28 ± 13.51	255.42 ± 12.92	250.93 ± 16.22	250.96 ± 13.83	243.70 ± 9.33
12	253.98 ± 13.65	264.03 ± 13.69	256.79 ± 17.16	257.50 ± 15.07	246.04 ± 10.28
13	254.56 ± 14.19	265.72 ± 13.80	256.85 ± 17.99	258.76 ± 15.76	248.97 ± 9.54
14	259.10 ± 14.78	273.70 ± 15.30*	264.13 ± 18.98	265.53 ± 15.56	252.19 ± 10.56
15	266.99 ± 14.71	277.22 ± 14.91	271.35 ± 18.24	277.68 ± 17.30	259.94 ± 11.62
16	273.22 ± 14.77	281.74 ± 17.86	276.98 ± 17.99	277.85 ± 16.48	267.36 ± 13.67
17	275.79 ± 14.98	286.09 ± 19.43	282.73 ± 19.30	285.09 ± 17.39	273.43 ± 13.12
18	280.70 ± 16.34	294.00 ± 17.43	286.82 ± 20.27	287.43 ± 17.79	275.49 ± 13.65
19	283.92 ± 16.59	299.70 ± 18.08*	290.92 ± 21.11	292.45 ± 18.51	280.21 ± 13.33
20	288.77 ± 17.03	303.73 ± 18.21	297.24 ± 21.58	296.32 ± 20.15	284.99 ± 12.76
21	292.77 ± 18.27	306.63 ± 21.00	302.30 ± 21.55	302.20 ± 19.63	288.21 ± 12.44
22	297.32 ± 19.74	314.01 ± 19.02	306.67 ± 22.56	307.10 ± 20.22	294.34 ± 12.95
23	295.31 ± 20.96	313.61 ± 19.00*	305.91 ± 21.52	305.08 ± 20.17	290.49 ± 14.14
24	300.16 ± 21.56	320.10 ± 20.60*	312.53 ± 21.92	311.39 ± 21.70	296.52 ± 13.46
25	304.60 ± 23.32	324.45 ± 20.50*	318.42 ± 22.41	315.70 ± 22.77	302.29 ± 13.58
26	307.59 ± 22.20	326.66 ± 20.38*	322.40 ± 22.50	319.21 ± 23.42	306.31 ± 13.26
27	308.76 ± 22.65	328.44 ± 21.34*	322.25 ± 23.69	323.79 ± 20.49	308.46 ± 15.89
28	311.33 ± 21.80	331.55 ± 21.76*	323.22 ± 24.05	326.78 ± 20.25	311.27 ± 15.18
29	310.33 ± 28.65	332.61 ± 22.67	326.11 ± 25.03	329.43 ± 20.52	314.53 ± 16.80
30	316.31 ± 21.55	333.93 ± 23.45	327.73 ± 25.82	329.86 ± 19.95	315.34 ± 17.96
31	316.58 ± 21.31	334.26 ± 24.98	329.57 ± 25.37	330.21 ± 21.26	315.33 ± 16.75
32	299.17 ± 21.74	318.18 ± 24.36	313.83 ± 25.20	312.26 ± 20.33	301.41 ± 13.58

\* Represents significant difference from 0% (control) group (p<0.05)

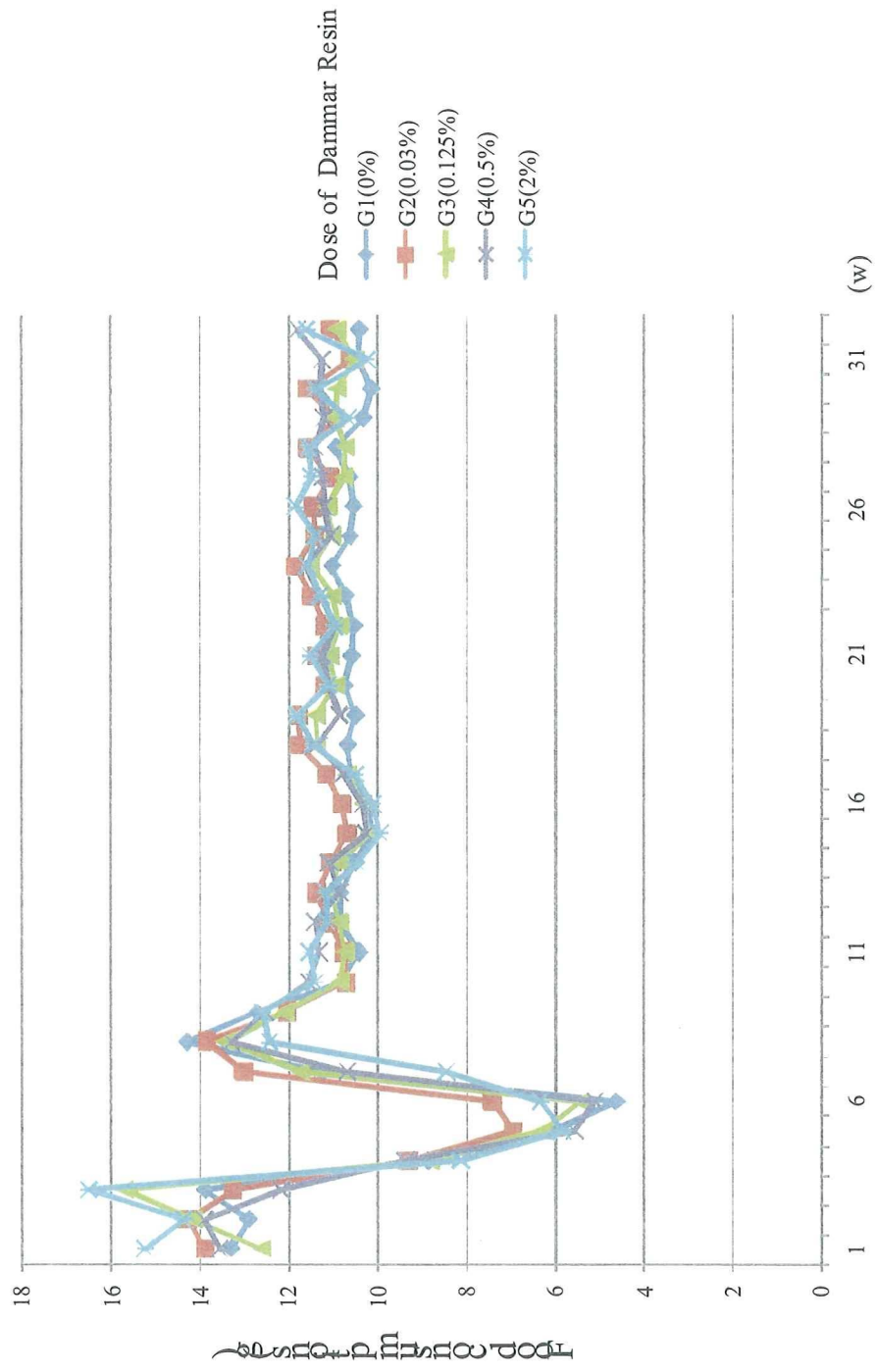


Fig.4 Food Consumptions

Table 2 Food Consumptions

	0%	0.03%	0.125%	0.5%	2%
1	13.29±2.01	13.89±1.26	12.59±0.26	13.55±2.11	15.23±0.45
2	12.90±1.59	14.26±2.33	14.15±1.26	13.89±0.45	14.37±2.46
3	13.87±3.68	13.24±2.16	15.69±5.44	12.17±1.03	16.05±6.73
4	8.37±3.15	9.28±1.28	8.81±1.04	9.37±0.91	8.12±1.58
5	6.03±1.30	6.96±0.57	6.29±1.26	5.56±1.64	5.84±0.37
6	4.64±0.43	7.41±1.12	5.42±1.05	5.11±0.71	6.33±3.72
7	11.24±2.32	13.01±1.43	11.71±1.11	10.67±1.34	8.44±1.48*
8	14.28±2.01	13.84±0.73	13.42±0.53	13.29±0.70	12.42±1.24*
9	12.71±0.44	12.03±0.76	12.09±0.45	12.52±0.42	12.59±1.22
10	10.80±0.73	10.77±0.99	10.83±0.31	11.54±0.39	11.40±0.60
11	10.41±0.55	10.74±0.47	10.73±0.60	11.31±0.40	11.53±0.53*
12	10.84±0.51	11.09±0.45	10.87±0.57	11.39±0.35	11.13±0.55
13	10.64±0.56	10.83±0.52	11.05±0.44	11.50±0.67*	10.89±0.87
14	10.49±0.77	11.04±0.61	10.86±0.79	11.08±0.56	10.48±1.18
15	10.87±0.87	11.25±0.88	10.64±1.06	11.24±0.66	10.61±0.68
16	10.84±0.62	11.08±1.10	11.23±0.55	11.23±0.51	11.80±0.65*
17	11.03±0.64	11.53±1.34	11.57±0.60	12.26±0.61*	12.28±0.77*
18	10.67±0.64	11.75±0.83	11.35±0.66	11.34±0.47	11.45±0.79
19	10.50±0.71	11.77±0.92	11.38±0.63	10.85±1.96	11.82±0.71
20	10.58±0.76	11.23±0.98	10.76±0.84	10.85±0.82	11.63±1.28
21	10.59±0.64	11.34±0.63	11.08±0.77	11.23±0.51	11.52±0.69*
22	10.45±0.19	11.15±0.25	11.15±0.22	11.35±0.11*	11.41±0.22*
23	10.72±0.65	11.50±0.71	11.01±0.75	11.31±0.37	11.27±0.61
24	11.03±0.89	11.85±0.66	11.49±0.70	11.61±0.57	11.57±0.68
25	10.61±1.04	11.41±0.78	11.02±0.84	11.05±0.91	11.41±1.16
26	10.53±0.76	11.43±0.69	11.13±0.68	11.19±0.98	11.83±1.37*
27	10.62±0.61	11.08±1.26	10.75±1.27	11.22±0.63	11.48±0.77
28	10.94±0.57	11.57±0.77	10.72±1.31	11.40±0.44	11.54±0.84
29	10.30±0.53	10.91±1.29	10.93±0.65	11.20±0.43	10.66±2.17
30	10.14±1.32	11.57±0.81	10.90±0.78	11.28±0.46*	11.51±0.64*
31	10.41±0.71	10.61±1.56	10.51±1.10	11.24±0.44	10.24±2.24
32	10.41±0.62	11.06±1.23	10.91±0.73	11.79±1.10*	11.58±0.46*

\* Represents significant difference from 0% (control) group (p<0.05)

Table 3 Average of Food consumptions

Group	Dose of		No.*	Food consumption (g/rat/day)
	Dammar	Resin		
1	0%		20	10.66 ± 1.79
2	0.03%		20	11.27 ± 1.46
3	0.125%		21	10.99 ± 1.72
4	0.50%		18	11.16 ± 1.51
5	2%		12	11.22 ± 2.14

\*Effective numbers of rats

Table 4 Hematological data

Item	Dammar Resin (%)	Dose level (%)				
		0.00 (N=20)	0.03 (N=20)	0.125 (N=21)	0.50 (N=18)	2.00 (N=12)
RBC	(x10 <sup>4</sup> /μL)	829±57a)	828±93	819±94	849±65	810±137
Hb	(g/dL)	14.4±1.7	14.1±2.1	14.2±2.0	14.5±1.1	13.9±2.6
Ht	(%)	44.3±4.0	43.7±5.3	42.8±5.5	43.6±3.1	41.7±6.6
MCV	(fL)	53.4±1.9	52.9±1.1	52.2±2.7	51.3±1.2	51.7±1.6
MCH	(pg)	17.4±1.4	16.8±1.0	17.3±1.2	17.0±0.3	16.9±0.7
MCHC	(g/dL)	32.4±1.4	32.0±1.5	33.3±0.9	33.1±0.7	33.1±2.0
PLT	(x10 <sup>4</sup> /μL)	64.5±9.8	68.0±10.8	61.3±9.7	59.3±5.0	61.7±4.6
WBC	(x10 <sup>2</sup> /μL)	44.9±7.7	45.3±8.2	48.9±11.4	52.5±8.0	49.4±8.4

a): Mean±S.D.

Table 5 Serum biochemical data

Item	Dammar Resin (%)	Dose level (%)				
		0.00 (N=20)	0.03 (N=20)	0.125 (N=21)	0.50 (N=18)	2.00 (N=12)
TP (g/dL)	6.6±0.3 <sup>a)</sup>	6.6±0.3	6.5±0.5	6.8±0.3	7.1±0.3*	
ALB (g/dL)	4.5±0.2	4.5±0.4	4.4±0.3	4.6±0.2	4.8±0.2	
BIL (mg/dL)	0.07±0.02	0.06±0.01	0.05±0.02	0.04±0.02	0.03±0.01*	
TC (mg/dL)	73.7±7.5	67.3±9.1	70.2±8.1	69.6±7.9	75.2±9.0	
GLU (mg/dL)	147±13	151±17	146±18	146±16	153±16	
TG (mg/dL)	77.4±24	89.9±21	89.0±32	61.8±16	61.4±44	
BUN (mg/dL)	20.9±1.9	21.9±1.7	22.3±1.9	20.2±1.9	21.4±7.0	
CRN (mg/dL)	0.30±0.02	0.34±0.02	0.33±0.04	0.29±0.02	0.28±0.02	
Ca (mg/dL)	10.4±0.3	10.5±0.2	10.1±0.4	10.3±0.3	10.6±0.2	
P (mg/dL)	5.1±0.8	4.8±0.5	4.6±0.6	5.0±0.3	5.4±0.4	
Na (mEq/L)	144±1.4	144±1.9	139±3.0	141±2.8	143±1.2	
Cl (mEq/L)	107.5±2.0	107.4±1.6	103.3±2.4	104.6±2.9	106.9±3.1	
K (mEq/L)	3.9±0.4	4.3±0.7	4.8±0.7	4.4±0.7	4.2±0.3	
AST (IU/L)	104.6±11.3	111.05±24.4	102.3±22.0	83.2±11.4	75.0±10.1*	
ALT (IU/L)	72.9±6.9	73.0±16.7	65.4±12.7	58.1±7.1	59.6±10.8*	
ALP (IU/L)	456.5±66.5	573.5±37.8	444.2±88.1	398.6±49.4	409.0±128.7	
?-GTP (IU/L)	3.0±0.01	3.2±0.5	3.1±0.5	3.4±0.6	3.8±1.7*	

a): Mean±S.D.

\*: Significantly different from the 0% (control) group at p<0.05.

Table 6 Absolute organ weights

Item	Dammar Resin dose level (%)				
	0.00 (N=20)	0.03 (N=20)	0.125 (N=21)	0.50 (N=18)	2.00 (N=12)
Body weight (g)	299±22 <sup>a)</sup>	318±24	314±25	312±20	301±14
Absolute (g)					
Organs					
Brain	1.98±0.05	1.98±0.05	1.99±0.05	1.98±0.05	1.94±0.03
Thymus	0.10±0.05	0.18±0.17	0.17±0.21	0.14±0.07	0.14±0.07
Lungs	1.18±0.08	1.19±0.08	1.13±0.11	1.20±0.26	1.15±0.11
Heart	0.91±0.04	0.92±0.05	0.93±0.08	0.95±0.04	0.90±0.06
Spleen	0.96±0.12	0.92±0.20	0.86±0.19	0.97±0.12	0.84±0.09
Liver	6.47±0.64	6.68±1.67	6.93±0.79	7.46±0.64*	8.71±1.11*
Adrenals	0.05±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01
Kidneys	1.95±0.14	1.97±0.17	2.51±2.28	1.98±0.15	1.98±0.38
Testes	2.64±0.17	2.69±0.29	2.62±0.24	2.75±0.31	2.76±0.12
Salivary glands	0.41±0.04	0.43±0.06	0.42±0.04	0.42±0.03	0.43±0.05

a): Mean±S.D.

\*: Significantly different from the 0% (control) group at p<0.05, respectively.

Table 7 Relative organ weights

Item	Dammar Resin dose level (%)				
	0.00 (N=20)	0.03 (N=20)	0.125 (N=21)	0.50 (N=18)	2.00 (N=12)
Body weight (g)	299±22 <sup>a)</sup>	318 ±24	314 ±25	312 ±20	301 ±14
Relative (g/100g B. W.) Organs					
Brain	0.66 ±0.06	0.63 ±0.05	0.64 ±0.05	0.64 ±0.04	0.65 ±0.03
Thymus	0.03 ±0.02	0.06 ±0.06	0.05 ±0.06	0.04 ±0.02	0.05 ±0.02
Lung	0.40 ±0.03	0.38 ±0.03	0.36 ±0.03	0.38 ±0.07	0.38 ±0.03
Heart	0.30 ±0.03	0.29 ±0.02	0.30 ±0.03	0.31 ±0.02	0.30 ±0.02
Spleen	0.33 ±0.06	0.29 ±0.09	0.28 ±0.07	0.31 ±0.05	0.28 ±0.03
Liver	2.16 ±0.11	2.08 ±0.49	2.21 ±0.13	2.39 ±0.10	2.89 ±0.30*
Adrenals	0.02 ±0.003	0.01 ±0.002	0.01 ±0.003	0.01 ±0.003	0.01 ±0.002
Kidneys	0.65 ±0.05	0.62 ±0.06	0.80 ±0.71	0.64 ±0.04	0.66 ±0.11
Testes	0.89 ±0.06	0.85 ±0.11	0.84 ±0.09	0.88 ±0.11	0.92 ±0.05
Salivary glands	0.14 ±0.02	0.14 ±0.02	0.13 ±0.01	0.13 ±0.01	0.14 ±0.01

a): Mean±S.D.

\*: Significantly different from the 0% (control) group at p<0.05, respectively



Table 8 GST-P Positive Foci

Group	Dose of		GST-P Positive Foci		
	Dammar Resin	No. <sup>a</sup>	No./cm <sup>2</sup>	AREA (mm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> )	
1	0	20	6.363 ± 3.478	0.670 ± 0.660	
2	0.03	20	5.977 ± 3.792	0.586 ± 0.345	
3	0.125	21	5.859 ± 3.594	0.598 ± 0.439	
4	0.50	18	6.754 ± 2.439	1.182 ± 1.283*	
5	2	12	7.850 ± 2.553	1.748 ± 1.154**	

<sup>a</sup> Effective number of rats

\*, \*\* : Represents significant difference from 0% (control) group (P<0.05, 0.01).

Table 9 Summary of histopathological findings.

Organ	Findings	Group					
		No. of rats	1 (0%)	2 (0.03%)	3 (0.125%)	4 (0.5%)	5 (2%)
Liver	Biliary cyst/(2)a	20	0	0	1	3	0
	Cystic degeneration/(2)a	20	1	2	4	5	0
	Necrosis/(2)a	20	2	0	1	0	0
	Vacuolation, cytoplasmic(2)a	20	0	0	1	0	0
	Hyperplasia, bile duct	2	2	3	1	1	0
	Adenoma, hepatocellular	1	1	0	0	0	0
	Hemangioma	2	2	0	0	0	0
	Hepatocellular carcinoma	0	0	0	0	1	2

a: Numbers in parenthesis indicate the grades of lesion: (1) Minimal (2) Slight (3) Moderate (4) Marked (5) Severe

There were no significant intergroup differences.

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 20 年度分担研究報告書

L-セリンおよびL-プロリンの安全性に関する研究  
研究分担者：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-セリンおよび L-プロリン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。平成 19 年度から 20 年度にかけては L-セリンの試験を、平成 20 年度には L-プロリンの試験を、それぞれ実施した。

試験は、雌雄各 50 匹（各群 10 匹）の F344/DuCr1Crlj 系ラット（6 週齢）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管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-セリン投与に係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。

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 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。

## 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<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>。

以上の状況に鑑み、本研究は、厚生労働科学研究費補助金による「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-セリンあるいはL-プロリン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-セリンは、白色の結晶性粉末で、匂いがなく、甘味と旨味を有するため、飲料などの調味料として使用されるほか<sup>3)</sup>、近年の健康増進ブームにより、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、さらにサプリメントとしても流通している<sup>4)</sup>。一方、L-プロリンは、独特の甘みと苦みを有し、アルコールに易溶な唯一のアミノ酸で水への溶解度も並はずれて大きいことから、各種の食品に調味料や栄養強化の目的で使用される<sup>3)</sup>。さらに、L-プロリンは、コラーゲンの生合成に欠かせない物質であることから、化粧品および健康食品としても使用される<sup>3,4)</sup>。しかしながら、安全性に関する情報は、L-セリン<sup>5-6)</sup>およびL-プロリン<sup>5-9)</sup>のいずれについても限られており、以上の状況下で大量摂取の可能性があることから、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<sup>10)</sup>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研究科において、多田 幸恵 主任研究員の主導下に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-セリン（CAS No. 56-45-1, ロット番号 0000033701, 純度 100.3%）および L-プロリン

（CAS No. 147-85-3, ロット番号 LSR7-8-45, 純度 99.8%以上）を用いた。

### 2. 動物および飼育条件

動物は、それぞれの被験物質について、F344/DuCr1Cr1j ラット系の雌雄の SPF 動物各 53 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 I-1 あるいは表 II-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-セリンは、経口投与によるラットの LD<sub>50</sub> が 14.0 (12.8-15.3) g/kg 体重であることから<sup>11)</sup>、栄養学的に添加可能な 5.0%を最高とし、以下、公比を約 3 として 1.5・0.5%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-セリン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え、いわゆる健康食品として市販されていて L-セリン含有量の多い製品の 1 日あたり推奨摂取量<sup>4)</sup>から換算した 0.06%を、最低用量として追加した。

L-プロリンは、経口投与によるラットの LD<sub>50</sub> が >16.0g/kg 体重であることから<sup>11)</sup>、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・0.625%の 3 段階の投与用量を設定した。

### 4. 被験物質の調整および投与

基礎飼料である前述の改変 AIN93G 粉末飼料に、L-セリンは 0 (対照)・0.06・0.5・1.5・5.0%の濃度で、L-プロリンは 0 (対照)・0.625・1.25・2.5・5.0%の濃度で添加した飼料（表 I-1 あるいは表 II-1）を、それぞれ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。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、動物に自由に摂取させた。

### 5. 添加飼料中の被験物質の濃度および安定性

添加飼料中の被験物質の濃度は、3 回に分けて