

Table 20 (Continued)  
Organ weights (2-year carcinogenicity study)

Treatment	No. of animal	Thymus		Testis	
		Absolute (g)	Relative (%)	Absolute (g)	Relative (%)
<b>Male</b>					
Control	10	0.07 ± 0.04	0.45 ± 0.03	3.3 ± 1.0	0.8 ± 0.2
0.03%	10	0.07 ± 0.05	0.45 ± 0.04	3.4 ± 0.9	0.7 ± 0.2
0.5%	10	0.06 ± 0.03	0.46 ± 0.03	3.5 ± 0.9	0.7 ± 0.2
2%	10	0.07 ± 0.03	0.50 ± 0.03	3.4 ± 0.7	0.9 ± 0.2
<b>Female</b>					
Control	10	0.05 ± 0.02	0.68 ± 0.07	---	---
0.03%	10	0.05 ± 0.02	0.62 ± 0.06	---	---
0.5%	10	0.05 ± 0.02	0.66 ± 0.08	---	---
2%	10	0.05 ± 0.02	0.73 ± 0.06	---	---

Table 21

## Incidence of gross gastrointestinal hemorrhage in 2-year carcinogenicity study

ダンマル樹脂 用量	肉眼的消化管出血 (途中死亡動物数)	肉眼的消化管出血 (終了時における生存動物数)	合計
雄			
0	0(7)	0(43)	0(50)
0.03%	0(9)	0(41)	0(50)
0.5%	2(10)	2(40)	4(50)
2%	13(28)	20(22)	33(50)* **
雌			
0	0(13)	0(37)	0(50)
0.03%	0(7)	0(43)	0(50)
0.5%	3(14)	0(46)	3(50)
2%	4(8)	4(42)	8(50)*

\* Significantly different from 0 % group.

\*\* Significantly different from 2 % female group.

Table 22  
Incidence and number of neoplastic lesions in the liver

Damar resin	No. of rats	Adenoma, hepatocellular		Carcinoma, hepatocellular		Tumor (adenoma+carcinoma)	
		Incidence (%)	Total No.	Incidence (%)	Total No.	Incidence (%)	Multiplicity <sup>a</sup>
<b>Male</b>							
Control	50	2 (4)	3	0 (0)	0	2 (4)	0.1 ± 0.3
0.03%	50 <sup>b</sup>		0.1 ± 0.3				
0.5%	50 <sup>b</sup>						
2%	50	6 (12)	8	18 (36)*	34	21 (42)*	0.8 ± 1.3*
<b>Female</b>							
Control	49 <sup>b</sup>						
0.03%	50 <sup>b</sup>						
0.5%	50 <sup>b</sup>						
2%	50 <sup>b</sup>						

<sup>a</sup> Average number of lesions ± S.D.

<sup>b</sup> Under examination.

\* Significantly different from control group at P<0.01.

Table 23

MEDIUM-TERM MULTI-ORGAN CARCINOGENESIS BIOASSAY OF DAMMAR RESIN IN RATS  
BODY WEIGHT DATA (G, MEAN  $\pm$  S.D.) - PROMOTION PERIOD

GROUP	TREATMENT		LEVEL		WEEKS					
	NO.	DMBDD	CHEMICAL	(%)	5 <sup>b</sup>	6	7	8	9	1
1	+		Dammarresin	0	167.0 $\pm$ 12.0	199.4 $\pm$ 11.3	221.7 $\pm$ 10.4	238.0 $\pm$ 11.8	248.2 $\pm$ 12.0	258.5 $\pm$ 12.2
2	+		Dammarresin	0.03	166.3 $\pm$ 12.3	199.7 $\pm$ 11.3	220.1 $\pm$ 10.8	236.8 $\pm$ 11.0	247.2 $\pm$ 11.5	257.0 $\pm$ 12.0
3	+		Dammarresin	0.125	165.6 $\pm$ 11.8	197.7 $\pm$ 11.1	220.4 $\pm$ 9.0	236.5 $\pm$ 8.6	247.1 $\pm$ 8.6	257.0 $\pm$ 8.6
4	+		Dammarresin	0.5	166.5 $\pm$ 12.4	197.0 $\pm$ 11.2	218.8 $\pm$ 11.4	234.8 $\pm$ 12.2	245.5 $\pm$ 12.1	254.1 $\pm$ 11.5
5	+		Dammarresin	2.0	166.9 $\pm$ 12.0	187.0 $\pm$ 12.0 **	206.0 $\pm$ 12.7 **	220.4 $\pm$ 12.4 **	231.7 $\pm$ 13.0 **	240.7 $\pm$ 12.1 **

\*\* : Significantly different from control group at P<0.01.

b : After re-allocation

GROUP	TREATMENT		LEVEL		WEEKS					
	NO.	DMBDD	CHEMICAL	(%)	1	2	3	4	5	6
1	+		Dammarresin	0	261.7 $\pm$ 11.8	266.0 $\pm$ 12.2	271.6 $\pm$ 12.7	275.2 $\pm$ 12.8	279.7 $\pm$ 12.9	284.0 $\pm$ 13.4
2	+		Dammarresin	0.03	260.9 $\pm$ 11.7	265.8 $\pm$ 13.0	271.2 $\pm$ 14.0	274.8 $\pm$ 14.2	279.6 $\pm$ 15.1	284.5 $\pm$ 16.3
3	+		Dammarresin	0.125	261.2 $\pm$ 9.2	266.0 $\pm$ 10.3	271.7 $\pm$ 10.6	274.4 $\pm$ 9.9	279.3 $\pm$ 10.6	283.3 $\pm$ 12.3
4	+		Dammarresin	0.5	258.5 $\pm$ 12.1	263.0 $\pm$ 12.0	268.9 $\pm$ 12.5	272.3 $\pm$ 13.6	277.8 $\pm$ 14.4	283.5 $\pm$ 15.5
5	+		Dammarresin	2.0	244.4 $\pm$ 12.9 **	247.2 $\pm$ 14.1 **	252.7 $\pm$ 13.2 **	254.7 $\pm$ 13.8 **	260.2 $\pm$ 14.6 **	265.4 $\pm$ 14.7 **

\*\* : Significantly different from control group at P<0.01.

Table 24

MEDIUM-TERM MULTI-ORGAN CARCINOGENESIS BIOASSAY OF DAMMAR RESIN IN RATS  
ORGAN WEIGHT DATA (G. MEAN  $\pm$  S.D.) - PROMOTION PERIOD

GROUP NO.	TREATMENT	TEST CHEMICAL LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	Body <sup>a</sup> weight	Brain	Pituitary	Thyroids	Heart
1	+	Dammar resin	20	268.9 $\pm$ 12.8	1.8930 $\pm$ 0.0564	0.0073 $\pm$ 0.0011	0.0162 $\pm$ 0.0022	0.7993 $\pm$ 0.0353
2	+	Dammar resin	20	270.6 $\pm$ 15.8	1.9106 $\pm$ 0.0231	0.0073 $\pm$ 0.0011	0.0155 $\pm$ 0.0014	0.8124 $\pm$ 0.0759
3	+	Dammar resin	20	270.6 $\pm$ 11.0	1.8919 $\pm$ 0.0280	0.0069 $\pm$ 0.0010	0.0155 $\pm$ 0.0018	0.8199 $\pm$ 0.0366
4	+	Dammar resin	20	268.8 $\pm$ 14.6	1.8961 $\pm$ 0.0437	0.0082 $\pm$ 0.0009 *	0.0184 $\pm$ 0.0038 *	0.8110 $\pm$ 0.0570
5	+	Dammar resin	19	251.3 $\pm$ 13.9 **	1.8544 $\pm$ 0.0627 *	0.0071 $\pm$ 0.0010	0.0166 $\pm$ 0.0017	0.7808 $\pm$ 0.0468

GROUP NO.	TREATMENT	TEST CHEMICAL LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	Thymus	Liver	Kidneys	Spleen
1	+	Dammar resin	20	0.1353 $\pm$ 0.0218	6.1394 $\pm$ 0.3184	1.7370 $\pm$ 0.0864	0.7419 $\pm$ 0.0814
2	+	Dammar resin	20	0.1307 $\pm$ 0.0164	6.2441 $\pm$ 0.4899	1.7390 $\pm$ 0.1221	0.7972 $\pm$ 0.2235
3	+	Dammar resin	20	0.1403 $\pm$ 0.0129	6.3831 $\pm$ 0.4245	1.7433 $\pm$ 0.1110	0.7669 $\pm$ 0.0896
4	+	Dammar resin	20	0.1391 $\pm$ 0.0155	6.7107 $\pm$ 0.4158 **	1.7511 $\pm$ 0.1124	0.7498 $\pm$ 0.0777
5	+	Dammar resin	19	0.1259 $\pm$ 0.0133	7.3861 $\pm$ 0.4649 **	1.6726 $\pm$ 0.1173	0.7241 $\pm$ 0.0574

GROUP NO.	TREATMENT	TEST CHEMICAL LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	Adrenals	Testes
1	+	Dammar resin	20	0.0334 $\pm$ 0.0029	2.5020 $\pm$ 0.1081
2	+	Dammar resin	20	0.0341 $\pm$ 0.0033	2.4954 $\pm$ 0.1125
3	+	Dammar resin	20	0.0340 $\pm$ 0.0026	2.4659 $\pm$ 0.1845
4	+	Dammar resin	20	0.0340 $\pm$ 0.0033	2.4637 $\pm$ 0.1473
5	+	Dammar resin	19	0.0345 $\pm$ 0.0035	2.4723 $\pm$ 0.1201

a : The value presented were obtained after the animals were fasted overnight.

\*, \*\*: Significantly different from control group at P<0.05, 0.01, respectively.

\*\* : Significantly different from control group at P<0.01.

Table 25

MEDIUM-TERM MULTI-ORGAN CARCINOGENESIS BIOASSAY OF DAMMAR RESIN IN RATS  
ORGAN TO BODY WEIGHT RATIO DATA (G/100G BW, MEAN  $\pm$  S.D.) - PROMOTION PERIOD

GROUP	TREATMENT	LEVEL	NO. OF EXAMINE	Brain	Pituitary	Thyroids	Heart
NO.	DMBDD	CHEMICAL (%)	D				
1	+	Dammarresin	20	0.7052 $\pm$ 0.0305	0.0028 $\pm$ 0.0006	0.0060 $\pm$ 0.0010	0.2978 $\pm$ 0.0149
2	+	Dammarresin	20	0.7084 $\pm$ 0.0406	0.0027 $\pm$ 0.0005	0.0057 $\pm$ 0.0007	0.3009 $\pm$ 0.0304
3	+	Dammarresin	20	0.7004 $\pm$ 0.0309	0.0025 $\pm$ 0.0005	0.0057 $\pm$ 0.0008	0.3032 $\pm$ 0.0149
4	+	Dammarresin	20	0.7070 $\pm$ 0.0308	0.0031 $\pm$ 0.0003 *	0.0069 $\pm$ 0.0016 *	0.3020 $\pm$ 0.0195
5	+	Dammarresin	19	0.7392 $\pm$ 0.0319 **	0.0028 $\pm$ 0.0006	0.0068 $\pm$ 0.0009 *	0.3110 $\pm$ 0.0164 *
* ** : Significantly different from control group at P<0.05, 0.01, respectively.							
GROUP	TREATMENT	LEVEL	NO. OF EXAMINE	Thymus	Liver	Kidneys	Spleen
NO.	DMBDD	CHEMICAL (%)	D				
1	+	Dammarresin	20	0.0505 $\pm$ 0.0089	2.2844 $\pm$ 0.0755	0.6465 $\pm$ 0.0277	0.2767 $\pm$ 0.0341
2	+	Dammarresin	20	0.0483 $\pm$ 0.0054	2.3089 $\pm$ 0.1416	0.6432 $\pm$ 0.0351	0.2972 $\pm$ 0.0932
3	+	Dammarresin	20	0.0520 $\pm$ 0.0057	2.3579 $\pm$ 0.0931 *	0.6443 $\pm$ 0.0289	0.2844 $\pm$ 0.0397
4	+	Dammarresin	20	0.0518 $\pm$ 0.0054	2.4976 $\pm$ 0.0922 **	0.6520 $\pm$ 0.0321	0.2798 $\pm$ 0.0335
5	+	Dammarresin	19	0.0503 $\pm$ 0.0057	2.9392 $\pm$ 0.0983 **	0.6654 $\pm$ 0.0267	0.2888 $\pm$ 0.0267
* ** : Significantly different from control group at P<0.05, 0.01, respectively.							
GROUP	TREATMENT	LEVEL	NO. OF EXAMINE	Adrenals	Testes		
NO.	DMBDD	CHEMICAL (%)	D				
1	+	Dammarresin	20	0.0125 $\pm$ 0.0013	0.9316 $\pm$ 0.0402		
2	+	Dammarresin	20	0.0127 $\pm$ 0.0015	0.9247 $\pm$ 0.0586		
3	+	Dammarresin	20	0.0127 $\pm$ 0.0011	0.9132 $\pm$ 0.0805		
4	+	Dammarresin	20	0.0127 $\pm$ 0.0013	0.9184 $\pm$ 0.0611		
5	+	Dammarresin	19	0.0138 $\pm$ 0.0014 **	0.9865 $\pm$ 0.0728 *		
* ** : Significantly different from control group at P<0.05, 0.01, respectively.							

Table 26

MEDIUM-TERM MULTI-ORGAN CARCINOGENESIS BIOASSAY OF DAMMAR RESIN IN RATS  
ABERRANT CRYPT FOCI (ACF) DATA

GROUP	TREATMENT		LEVEL	NO. OF EXAMINED	ACF					TOTAL
	+	-			1	2	3	4 ≤ ACF		
1	+	DMBDD	0	20	4.6 ± 4.0	25.9 ± 15.7	34.7 ± 18.7	58.9 ± 33.8	124.0 ± 63.8	
2	+	Dammarresin	0.03	20	6.1 ± 4.1	26.0 ± 13.2	37.0 ± 18.6	61.7 ± 43.7	130.7 ± 73.5	
3	+	Dammarresin	0.125	20	4.0 ± 2.9	21.4 ± 13.1	31.0 ± 16.3	52.4 ± 44.6	108.7 ± 70.8	
4	+	Dammarresin	0.5	20	5.0 ± 3.1	23.0 ± 11.9	33.9 ± 16.8	68.4 ± 32.1	130.3 ± 58.6	
5	+	Dammarresin	2.0	19a	5.8 ± 3.0	28.4 ± 15.6	41.1 ± 20.4	73.0 ± 41.0	148.3 ± 74.7	

MEDIUM-TERM MULTI-ORGAN CARCINOGENESIS BIOASSAY OF DAMMAR RESIN IN RATS  
ABERRANT CRYPT FOCI (ACF) DATA

GROUP	TREATMENT		LEVEL	NO. OF EXAMINED	TOTAL	
	+	-			AC/ACF	AC
1	+	DMBDD	0	20	438.0 ± 238.6	3.46 ± 0.34
2	+	Dammarresin	0.03	20	465.1 ± 291.3	3.40 ± 0.44
3	+	Dammarresin	0.125	20	392.6 ± 291.4	3.52 ± 0.49
4	+	Dammarresin	0.5	20	483.6 ± 229.3	3.76 ± 0.49*
5	+	Dammarresin	2.0	19a	547.3 ± 291.1	3.63 ± 0.25

Table 27

MEDIUM-TERM MULTI-ORGAN CARCINOGENESIS BIOASSAY OF DAMMAR RESIN IN RATS  
MUCIN-DEPLETED FOCI (MDF) DATA

GROUP NO.	TREATMENT		LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	MDF				TOTAL
	DMBDD	TEST CHEMICAL			1	2	3	4 ≤ MDF	
1	+	Dammar resin	0	20	2.2 ± 2.0	2.6 ± 1.7	1.7 ± 1.3	1.2 ± 1.8	7.6 ± 4.1
2	+	Dammar resin	0.03	20	2.7 ± 1.9	2.7 ± 2.1	1.5 ± 1.5	1.1 ± 1.5	8.0 ± 4.3
3	+	Dammar resin	0.125	20	3.2 ± 2.3	2.5 ± 1.4	1.3 ± 1.2	1.1 ± 1.4	8.1 ± 4.1
4	+	Dammar resin	0.5	20	2.5 ± 2.1	2.4 ± 1.8	1.4 ± 1.3	1.6 ± 1.8	7.8 ± 4.2
5	+	Dammar resin	2.0	19a	2.6 ± 1.8	3.7 ± 2.4	1.9 ± 1.8	1.4 ± 1.5	9.6 ± 4.6

a : One animal died during the course of study.

MEDIUM-TERM MULTI-ORGAN CARCINOGENESIS BIOASSAY OF DAMMAR RESIN IN RATS  
MUCIN-DEPLETED FOCI (MDF) DATA

GROUP NO.	TREATMENT		LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	TOTAL MD		MD/MDF
	DMBDD	TEST CHEMICAL			MD	MD	
1	+	Dammar resin	0	20	17.8 ± 12.9	2.28 ± 0.62	
2	+	Dammar resin	0.03	20	17.6 ± 13.4	2.12 ± 0.41	
3	+	Dammar resin	0.125	20	17.1 ± 10.2	2.04 ± 0.59	
4	+	Dammar resin	0.5	20	18.3 ± 10.9	2.31 ± 0.75	
5	+	Dammar resin	2.0	19a	22.1 ± 11.7	2.29 ± 0.55	

a : One animal died during the course of study.



Table 28

## MEDIUM-TERM MULTI-ORGAN CARCINOGENESIS BIO ASSAY OF DAMMAR RESIN IN RATS

QUANTITATIVE DATA FOR GST-P POSITIVE FOCI (MEAN  $\pm$  S.D.)

GROUP NO.	TREATMENT		LEVEL (%)	NO.OF EXAMINED	NO./cm <sup>2</sup>	GST-P POSITIVE FOCI AREA(mm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> )
	DMBD	D				
1	+		0	20	2.837 $\pm$ 1.735	0.201 $\pm$ 0.162
2	+		0.03	20	2.741 $\pm$ 1.446	0.158 $\pm$ 0.111
3	+		0.125	20	4.310 $\pm$ 2.079	0.308 $\pm$ 0.159*
4	+		0.5	20	4.937 $\pm$ 1.476**	0.377 $\pm$ 0.157**
5	+		2.0	19	6.598 $\pm$ 2.716**	0.488 $\pm$ 0.243**

\*, \*\* : Significantly different from control group at P<0.05, 0.01, respectively.

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）

総合分担研究報告書

L-アスパラギンおよびダンマル樹脂の安全性評価に関する研究

研究分担者 今井田克己 香川大学医学部 腫瘍病理学 教授

研究要旨

H18年度の研究として、L-アスパラギン(L-asparagine)の安全性評価に関する研究を行った。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。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。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。

H19年度およびH20年度の研究として、ダンマル樹脂(Dammar resin)の安全性評価に関する研究を行った。ラット多臓器中期発がん性試験法を用いて、食品添加物で既存添加物として登録されているダンマル樹脂の発がん修飾作用を検討した。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。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、肝の前癌病変である胎盤型glutathione S-transferase(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。

A. 研究目的

食品添加物で既存添加物として登録されている、L-アスパラギン(L-asparagine;  $C_4H_8N_2O_3$ )およびダンマル樹脂(Dammar resin)の安全性評価に関する研究を行った。

L-アスパラギン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。

またダンマル樹脂は、マレーシアなど東南アジアで、ラワン属の樹木から採取される軟質の現存樹脂であり、フタバガキ科(*Shorea wiesneri* SCHREFF.)又はナンヨウスギ科(*Agathis dammara* L. C. RICHARD, *Agathis lanceolata* PANCH.)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、主成分は多糖類である。従来油絵の保護ワニスとして使用されているが、現在増粘安定剤としてガムなどの食品に用いられている。しかし、その発がんリスクに関してはいまだ詳細な検討が行われていないのが現状である。そこで、ラット多臓器中期発がん性試験法を用いて、ダンマル樹脂を経口投与させ、主要臓器における発がん修飾作用を検討した。

B. 研究方法

<L-アスパラギン(L-asparagine)の安全性評価に関する研究>

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(神奈川県)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 $24\pm 2$ 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。L-アスパラギンは味の素ライフサイエンス研究所(神奈川県)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(神奈川県)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。

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)、ヘマトクリット値(Ht)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)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 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ( $\gamma$ -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、精嚢、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、精巣上体、凝固腺および陰を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。

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。

#### <ダンマル樹脂(Dammar resin)の安全性評価に関する研究>

5週齢のF344ラット(F344/DuCr1Crj)雄110匹を日本チャールス・リバー社(神奈川県)より購入し、約1週間の馴化飼育の後、各群22匹ずつ5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 $24\pm 2$ 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。各群に実験開始日に100mg/kg b.w. diethylnitrosamine (DEN, 東京化成, Cas No. 55-18-5)を腹腔内投与、第2、5、8、11日に20mg/kg b.w. N-methylnitrosourea (MNU, Sigima, Cas No. 684-93-5)を腹腔内投与、第14、17、20、23日に40mg/kg b.w. dimethylhydrazine (DMH, Aldrich, Cas No. 306-37-6)を皮下投与した。さらに、これらの投与と並行して第1~2週に0.05% N-butyl-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN, 東京化成, Cas No. 3817-11-6)を、第3~4週に0.1%N-Bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN, ナカライ, Cas No. 53609-64-6)をそれぞれ飲料水投与し(DMBDD処置)、イニシエーション処置とした。実験開始第5週目から1~5群にそれぞれ27週間、

ダンマル樹脂をオリエンタル MF 飼料中に 0%, 0.03%, 0.125%, 0.5%, 2% の濃度で混じて、それを自由に摂取させた。被験物質の飼料への添加および固形化をオリエンタル酵母工業株式会社に依頼し、試験に供した。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。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(A1b)、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。

本研究の実験はいずれも、全て香川大学総合生命科学センター、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

<L-アスパラギン(L-asparagine)の安全性評価に関する研究>

#### [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。

#### [血液学的検査および血清生化学的検査]

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。2.5%投与群で TG が増加し、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 5.0% 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。

### <ダンマル樹脂 (Dammar resin) の安全性評価に関する研究>

#### [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。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 週で癒着傾向となった。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。

#### [体重および摂餌量]

試験期間中の各群の体重推移を Fig. 2 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。

試験期間中の各群の摂餌量の推移を Fig. 3 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 9 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 10 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 11 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 12、13 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 陽性細胞巣]

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を Table 14 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 陽性細胞巣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 15 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。その他腫瘍背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

#### <L-アスパラギン (L-asparagine) の安全性評価に関する研究>

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%投与群で認められた有意な上昇は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。

#### <ダンマル樹脂 (Dammar resin) の安全性評価に関する研究>

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

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(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。また、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. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Imaida K, Yokohira Y, Kuno T. Detection of Carcinogenic and Modifying Potentials by Test Compounds Using a Mouse Lung Carcinogenesis Bioassay: *J. Toxicol. Pathol.*, 20: 117-123, 2007.
9. Matsuda Y, Saoo K, Yamakawa K, Yokohira M, Suzuki S, Kuno T, Kamataki T, Imaida K. Overexpression of CYP2A6 in Human Colorectal Tumors. *Cancer Sci.*, 98: 1582-1585, 2007.
10. Matsuda Y, Yamakawa K, Saoo K, Hosokawa K, Yokohira M, Kuno T, Iwai J, Shirai T, Obika K, Kamataki T, Imaida K. CYP2A6 overexpression in human lung cancers correlates with a high malignant status. *Oncol Rep.* 18:53-57, 2007.
11. 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.
12. 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.

13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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
20. 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
21. 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] quin oxaline (MeIQx) induced lung tumorigenesis in female A/J mice. *The Molecular Medicine Reports*, 2009 in press.
22. 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.
23. Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Suzuki S, Saoo K, Kuno T, Imaida K. A Lung Carcinogenic Bioassay of CuO and TiO<sub>2</sub> Nanoparticles with Intratracheal Instillation Using F344 Male Rats: *J. Toxicol. Pathol.*, 2009. in press.
24. Yokohira M, Matsuda 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.



25. 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. 今井田克己, 松田陽子, 竿尾光祐, 横平政直, 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, 横平政直, 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, 横平政直, 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. Toshiya Kuno, Masanao Yokohira, Yoko Matsuda, Hideki Mori, Yukio Mori, Katsumi Imaida, Chemoprevention of 1, 2-dimethylhydrazine-induced colonic preneoplastic lesion development in Fischer rats by a Wasabi derivative, 6-methylsulfinylhexylisothiocyanate, 第 7 回日本癌学会・米国癌学会合同会議, U. S. A. (2007. 1)
15. 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)
16. 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）
17. 松田陽子、横平政直、竿尾光祐、久野壽也、今井田克己，A/J 雌マウスに NNK を投与した際に見られる遺伝子発現の経時的变化と 8-MOP が与える影響，第96回日本病理学会総会，大阪（2007.3）
  18. 竿尾光祐、松田陽子、横平政直、久野壽也、中野正行、今井田克己，Hep-per 1 に陽性反応を示した細胆管細胞癌の1例，第96回日本病理学会総会，大阪（2007.3）
  19. 久野壽也、横平政直、松田陽子、今井田克己，タバコ由来ニトロサミン暴露マウスの気道及び上部消化管における性ホルモンの影響，第96回日本病理学会総会，大阪（2007.3）
  20. 横平政直；細川京子；山川けいこ；松田陽子；久野壽也；竿尾光祐；今井田克己，ラット肝中期発癌性試験（伊東法）を用いた酵素処理イソクエルシトリンによる肝発癌の修飾作用，がん予防大会 in Tokyo 2007，東京（2007.7）
  21. Toshiya Kuno, Kousuke Saoo, Masanao Yokohira, Keiko Yamakawa, Nozomi Hashimoto, Kyoko Hosokawa, Yoko Matsuda, Katsumi Imaida, Modulation effects of NNK-induced lung tumor by CYP2A inhibitor, 8-MOP administrated during promotion or progression phase, 第66回日本癌学会学術総会、横浜（2007.10）
  22. Kyoko Hosokawa, Masanao Yokohira, Keiko Yamakawa, Kousuke Saoo, Yoko Matsuda, Satoshi Suzuki, Toshiya Kuno, Katsumi Imaida, Enzymatically modified isoquercitrin and isoquercitorin, in a rat medium-term liver carcinogenesis bioassay. 第66回日本癌学会学術総会、横浜（2007.10）
  23. Keiko Yamakawa, Masanao Yokohira, Toshiya Kuno, Yoko Matsuda, Nozomi Hashimoto, Kyoko Hosokawa, Kousuke Saoo, Katsumi Imaida, Potential of inhibitory effects by D-allose, a rare sugar, on liver carcinogenesis in a rat medium-term bioassay, 第66回日本癌学会学術総会、横浜（2007.10）
  24. Masanao Yokohira, Toshiya Kuno, Kousuke Saoo, Keiko Yamakawa, Satoshi Suzuki, Kyoko Hosokawa, Yoko Matsuda, Shigemi Kinouchi, Katsumi Imaida, Establishment of a bioassay for lung tumorigenesis due to fine particles instilled intratracheally in F344 rats, 第66回日本癌学会学術総会、横浜（2007.10）
  25. Nozomi Hashimoto, Shinichi Yachida, Keiichi Okano, Hisao Wakabayashi, Katsumi Imaida, Yasuyuki Suzuki, Expression of p27 Skp2 predicts postoperative survival for patients with intrahepatic cholangiocarcinoma, 第66回日本癌学会学術総会、横浜（2007.10）
  26. Yoko Matsuda, Keiko Yamakawa, Kousuke Saoo, Masanao Yokohira, Kyoko Hosokawa, Toshiya Kuno, Zenya Naito, Katsumi Imaida, Short-Term Effect of Various Chemicals on NNK-Induced Lung Tumorigenesis in A/J Female Mice, 第66回日本癌学会学術総会、横浜（2007.10）
  27. Satoshi Suzuki, Masanao Yokohira, Toshiya Kuno, Keiko Yamakawa, Kyoko Hosokawa, Yoko Matsuda, Tadao Shioka, Katsumi Imaida, A study on threshold for 2-Amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline (MeIQx) carcinogenesis in lung using A/J mice, 第66回日本癌学会学術総会、横浜（2007.10）
  28. 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）
  29. 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）
  30. 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）
  31. 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）
  32. 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)
33. 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)
34. 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)
35. 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)
36. 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)
37. 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)
38. 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)
39. 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)

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

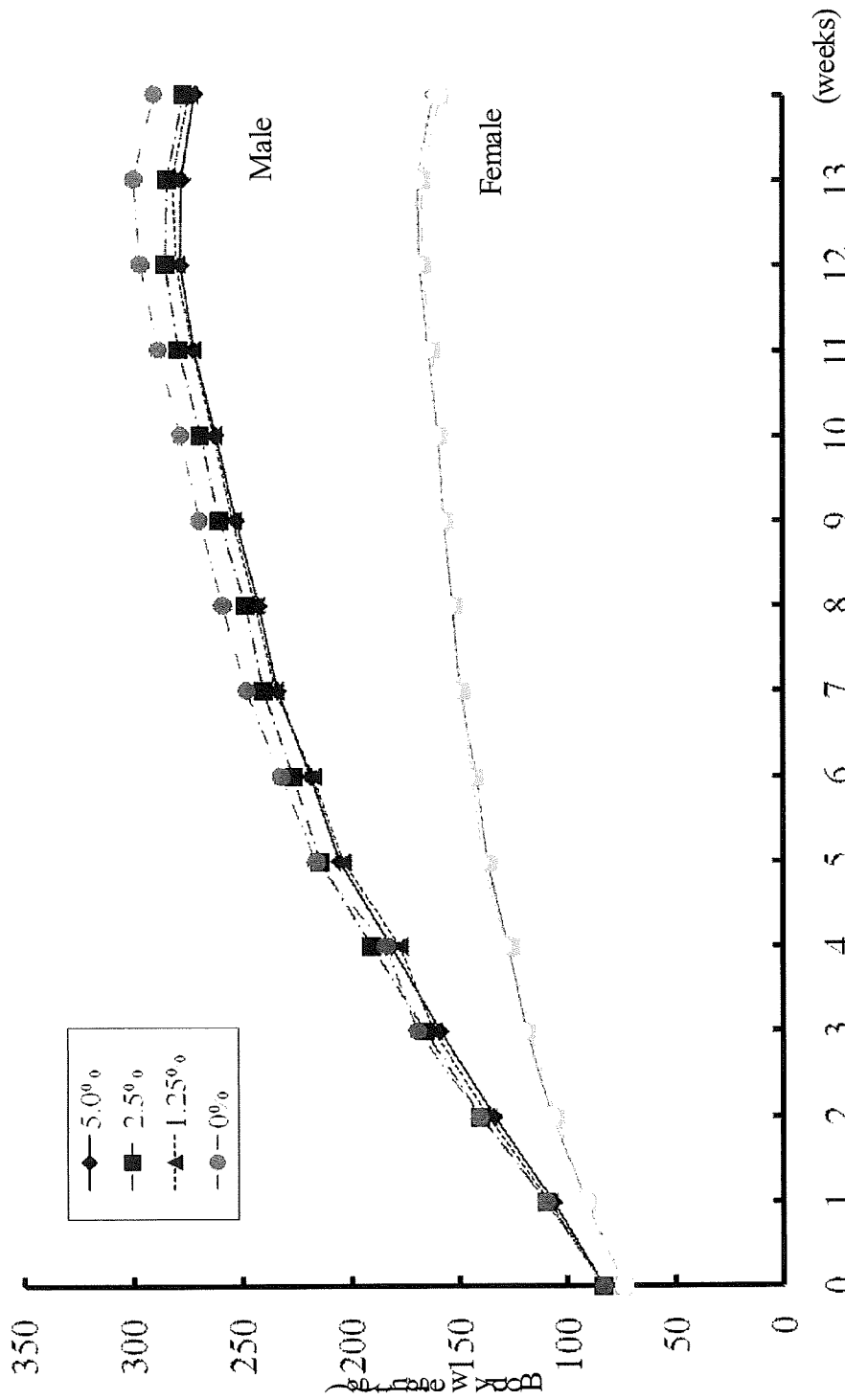


Fig. 1 Body weight curves for male and female F344 rats treated with Asparagine for 90 days