

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

総合分担研究報告書

L-アスパラギン酸、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-アスパラギン酸、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。

試験は、雌雄各50匹（各群10匹）のF344/DuCr1Cr1j系ラット（6週齢）に、L-アスパラギン酸を0・0.05・1.25・2.5・5.0%の濃度で、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-アスパラギン酸投与に関係する変化としては、血清生化学的検索において、雄の2.5%以上群と雌の5.0%群の総コレステロール濃度、雄の0.05%以上群と雌の1.25%以上群のトリグリセリド濃度に用量相関性減少がみられたが、相応する臓器重量の変動や明確な病理組織学的変化がないことから、発生機序解明等の検討を要するものの、当面、適応性の変化で毒性影響としての意義を持たないものと判断した。また、雄の2.5%以上群と雌の5.0%群で尿素窒素濃度、雄の2.5%以上群と雌の1.25%以上群でクレアチニン濃度、雄の2.5%群と雌の1.25%以上群で尿酸濃度に減少がみられた。尿性状検索においては、雄の5.0%群のビリルビン陽性と、1.25%以上群のケトン体および蛋白陽性の発生頻度、雌の1.25%および2.5%群のケトン体陽性と、2.5%以上群の蛋白陽性の発生頻度が増加した。病理学的検索においては、雄の5.0%群で腎臓の相対重量が増加し、病理組織学的検索において、雄の2.5%以上群の腎臓で、管腔の拡張を伴った再生尿細管が高頻度に認められた。これら泌尿器系に関連した検索結果のうち、雄の2.5%および5.0%群でみられた変化は腎臓の相対重量の増加および組織学的変化を伴っており、L-アスパラギン酸投与に関係する毒性影響としての生物学的有意性を持つものと判断した。さらに、組織学的検索では、雌雄の5.0%群で顎下線の腺房細胞の軽度な肥大が、雌雄の2.5%および5.0%群で耳下腺の腺房細胞の肥大が、それぞれ認められた。これらの変化については、適応性の変化である可能性もあり、発生機序解明等の検討を要するが、現段階では、L-アスパラギン酸投与に関係する毒性影響としての生物学的有意性を持つものと判断した。

L-セリン投与に関係する変化としては、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用量相関性減少がみられたが、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。

L-プロリン投与に関係する変化としては、特段認めなかった。

以上の結果より、本試験条件下における最大無毒性量（NOAEL）は、L-アスパラギン酸について雌雄とも1.25%（雄：696.6 mg/kg 体重/day 相当、雌：715.2 mg/kg 体重/day 相当）、L-セリンについて雌雄とも5.0%（雄：2765.0 mg/kg 体重/day 相当、雌：2905.1 mg/kg 体重/day 相当）、L-プロリンについて雌雄とも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-アスパラギン酸、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-アスパラギン酸は、白色の結晶性粉末で、匂いがなく、酸味と旨みを有するため、酸味の改良・味質の調整・こく味の付与などを目的とする調味料として、果汁飲料や清涼飲料水などに主に使用される。また、L-アスパラギン酸は、アミノ酸の強化を目的として、いわゆる栄養飲料や健康飲料にも使用されている<sup>3)</sup>。さらに近年、国民の健康増進ブームにより、L-アスパラギン酸は、サプリメントとしても大量に摂取されるようになってきているL-セリンは、白色

の結晶性粉末で、匂いがなく、甘味と旨みを有するため、飲料などの調味料として使用されるほか<sup>4)</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>5)</sup>。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>。L-プロリンは、コラーゲンの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>4,5)</sup>。しかしながら、安全性に関する情報は、L-アスパラギン酸についてほとんどなく、L-セリン<sup>6,7)</sup>およびL-プロリン<sup>6-10)</sup>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>11)</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-アスパラギン酸（CAS No. 56-84-8, ロット番号 0010663004, 純度100.2%）、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/DuCrIj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, 表II-1, 表III-1）と細菌ろ過器を経由させた水道水を

自由に摂取させる条件下で 1 週間馴化飼育を行った後、視診上健康な雌雄各 50 匹を 6 週齢で試験に供した。各群の動物数は、雌雄各 10 匹とし、投与開始日の体重をもとに、体重別層化無作為抽出法により群分けを行った。動物は、自動給水装置付きベルト式飼育棚のステンレス製懸垂式ケージに 1 匹ずつ収容し、バリアーシステム内の飼育室にて、室温 22-24℃・湿度 50-60%・換気回数毎時 10 回・12 時間蛍光灯照明の条件下で飼育した。

### 3. 投与用量の設定

L-アスパラギン酸は、経口投与によるラットの LD<sub>50</sub> が 16 g/kg 体重以上<sup>12)</sup>であることから、栄養学的に添加可能な 5.0%を最高とし、以下、公比を 2 として 2.5・1.25%の 3 段階の投与用量を設定した。さらに、本試験においては、L-アスパラギン酸が栄養補助食品として摂取されている現実を踏まえ、ヒト摂取相当量での検索も必要であると考え、いわゆる健康食品として市販されている製品における 1 日あたりヒト摂取量に相当する 0.05%を、最低用量として追加した。

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>12)</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>5)</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>12)</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-アスパラギン酸は 0 (対照)・0.05・1.25・2.5・5.0%の濃度で、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, 表 II-1, 表 III-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 回に分けて製造した飼料のそれぞれについて、作製時に測定した。添加飼料中の被験物質の安定性は、以下の通り確認した。保存条件下での安定性については、第 1 回製造分の最低および最高濃度添加飼料を 4-5℃の保冷庫に保存し、保存 30 日目に中層部より試料を採取した。給餌条件下での安定性については、同飼料の一部を動物飼育室内において通常の飼料交換期間 (7 日間) 放置したのから試料を採取した。安定性は、それらの飼料中の被験物質濃度を測定し、初期値 (理論濃度に見合う値であることを予め確認) に対する比率を算出し、90-110%である場合に確保されたものと判定した。

### 6. 検索項目

検索項目は、以下の通りであった。

#### 【一般状態、体重、摂餌・摂水量】

全動物の一般状態は毎日観察し、体重および摂餌・摂水量は週 1 回測定した。

#### 【血液学的検索】

全動物は、採血前日の 16 時より絶食させた後、解剖時にエーテル麻酔下に開腹し、腹部大動脈より採血して、血液学および血清生化学的検索を行った。血液学的検索は、抗凝固剤 EDTA-2K を入れた試験管に試料を採取し、多項目自動血球計数装置 (KX-21NV, シスメックス株式会社, 兵庫) にて、赤血球数 (RBC)・白血球数 (WBC)・血色素量 (HGB)・ヘマトクリット値 (HCT)・平均赤血球容積 (MCV)・平均赤血球血色素量 (MCH)・平均赤血球血色素濃度 (MCHC)・血小板数 (PLT) を測定した。さらに、May-Grunwald-Giemsa 染色した血液塗沫標

本を用いて、光学顕微鏡下において、血球形態の観察と白血球分画の検索を行った。

#### 【血清生化学的検索】

血清生化学的検索は、血清を用い、自動分析装置 (TBA-120FR, 東芝メディカルシステムズ株式会社, 東京) にて、血清総蛋白濃度 (TP) ・アルブミン濃度 (ALB) ・アルブミン/グロブリン比 (A/G) ・血糖値 (GLU) ・総コレステロール濃度 (T-CHO) ・トリグリセリド濃度 (TG) ・総ビリルビン濃度 (T-BIL) ・尿素窒素濃度 (BUN) ・クレアチニン濃度 (CRE) ・尿酸濃度 (UA) ・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) ・ $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ活性 (GGT) ・アルカリホスファターゼ活性 (ALP) ・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) を測定した。

#### 【尿性状検索】

尿性状は、解剖直前に尿検査試験紙 (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・ダイアグノスティクス株式会社, 東京) を用いて、ウロビリノーゲン・ビリルビン・ケトン体・糖・蛋白・pH と、亜硝酸塩のレベルを判定した。

#### 【病理学的検索】

剖検においては、以下に示す組織・器官を採取し、肉眼的な検索を行い、下線を付したのについては重量を測定した後、10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。採取した組織・器官は、脳・下垂体・脊髄 (頸部) ・坐骨神経・眼球・ハーダー腺・ジンバル腺・胸腔内大動脈・甲状腺/上皮小体 (固定後重量測定) ・鼻腔・気管・肺・胸腺・心臓・脾臓・顎下腺/舌下腺・耳下腺・外涙腺・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) ・肝臓・膵臓・副腎・腎臓・膀胱・精巣・精巣上体・精囊/凝固腺・前立腺・包皮腺・卵巣・輸卵管・子宮・陰核腺・皮膚・乳腺・リンパ節 (顎下部・腸間膜) ・大腿筋・胸骨 (骨髄を含む) ・大腿骨 (骨髄を含む) ・頭蓋骨 とその他の肉眼的異常部位とした。

組織学的検索は、全動物について、採取

した組織・器官の固定標本から組織片を切り出し、定法に従いパラフィン包埋し、薄切後にヘマトキシリン・エオジン染色して、光学顕微鏡下において観察した。

#### 7. 統計学的解析

体重・摂餌量・摂水量・器官重量・血液学および血清生化学的検索結果の統計学的解析に当たっては、各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合に一元配置の分散分析により、不等分散の場合に Kruskal-Wallis の方法により、それぞれ検定を行った。群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Dunnett の方法で有意差検定を行った。尿性状および病理組織学的検索結果については、対照群との間で、Fisher の直接確立検定を行った。統計処理ツールは StatLight (Yukms 株式会社, 東京) を用いた。

#### 8. 倫理面への配慮

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

#### C. 研究結果

##### D. 考察

これらについて、本報告書では、以下の通り、被験物質ごとに、L-アスパラギン酸・L-セリン・L-プロリンの順で記載する。

##### I. L-アスパラギン酸

##### I-C. 研究結果

##### 1. 一般状態、体重、摂餌・摂水量、添加飼料中の被験物質濃度・安定性

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

試験期間中の各群の体重の推移は、図 I-1・I-2 に示した通りであり、雌雄とも、

全期間を通じて対照群との間に有意な差を認めなかった。試験期間中の各群の摂餌量の推移は図 I-3・I-4 に、摂水量の推移は図 I-5・I-6 に、平均摂餌量・摂水量および被験物質摂取量は表 I-2 に示した。平均摂餌量は、雄の 2.5% 群および雌の 5.0% 群で有意な増加を認めた。受け皿にこぼした餌の量は、いずれの群も少量で、試験期間中を通し各群とも平均 0.1 g 以下 (0-0.8 g/rat/day) であった。摂水量の推移は、雌雄とも投与群で増加傾向がみられ、平均摂水量は、雄の全投与群および雌の 1.25% 以上群で有意な増加を認めた。

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

## 2. 血液学的検索

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

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

## 3. 血清生化学的検索

血清生化学的検索結果は、表 I-7・I-8 に示した。T-CHO は雄の 2.5% 以上群と雌の 5.0% 群において減少し、TG は雄の 0.05% 以上群と雌の 1.25% 以上群において減少した。また、BUN は雄の 2.5% 以上群と雌の 5.0% 群、CRE は雄の 2.5% 以上群と雌の 1.25% 以上群、UA は雄の 2.5% 群と雌の 1.25% 以上群で、それぞれ減少した。その他の指標において、統計学的有意性を持つものの、軽微で用量相関性を欠く変化を散見したが、これらは、偶発的なものであり、生物学的有意性を持たないものと判断した。

## 4. 尿性状検索

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

## 4. 病理学的検索

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

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

病理組織学的検索の結果は、表 I-13 に示した。雄においては、2.5% 以上群の腎臓に、管腔の拡張を伴った再生尿細管を高頻度に観察した。また、唾液腺においては、雌雄の 5.0% 群で顎下線の腺房細胞の軽度な肥大を、雌雄の 2.5% 以上群で耳下腺の腺房細胞の肥大を、それぞれ腺全体にびまん性に観察した。肥大した腺房細胞においては、核の濃縮を伴っていた。耳下腺の肥大は雌雄とも 2.5% 群よりも 5.0% 群で顕著であった。なお、舌下線および舌根部小唾液腺においては、腺房細胞の肥大が明らかでなかった。その他の器官・組織においては、被験物質投与の影響と思われる組織変化を観察しなかった。

## I-D. 考察

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

判断した。

血液学的検索においては、雄の投与群で RBC・HCT の増加や MCH・MCHC の減少などの変化があり、雌の 5.0%群でも MCH・MCHC の減少が認められた。しかしながら、これらの変化は、いずれも所謂正常値の範囲内<sup>13)</sup>に留まる軽微なもので、用量相関性が明確でなく、さらに、血液塗抹標本において赤血球形態に異常が認められず、病理組織学的検索において骨髄および脾臓など造血器系に変化が認められなかったことから、偶発的なものであり、L-アスパラギン酸投与に関係する毒性影響としての生物学的有意性を持たないものと判断した。

血清生化学的検索においては、雄の 2.5%以上群と雌の 5.0%群の T-CHO と、雄の 0.05%以上群と雌の 1.25%以上群の TG が減少した。これらは、用量相関性を示すことから、L-アスパラギン酸投与の影響と考えられたが、いずれも所謂正常値の範囲内<sup>14)</sup>に留まる軽微なもので、相応する臓器重量の変動や明確な病理組織学的変化がないことから、毒性影響である可能性について発生機序解明等による検討を必要とするものの、当面、適応性の変化と判断した。

血清生化学的検索においては、さらに、雄の 2.5%以上群と雌の 5.0%群の BUN、雄の 2.5%以上群と雌の 1.25%以上群の CRE、雄の 2.5%群および雌の 1.25%以上群の UA の減少を認めた。また、尿性状検索においては、雄の 5.0%群のピリルビン陽性と、1.25%以上群のケトン体および蛋白陽性の発生頻度が増加した。雌においては、1.25 および 2.5%群でケトン体陽性、2.5%以上群で蛋白陽性の発生頻度が増加した。泌尿器系については、雄の 5.0%群で腎臓の相対重量が増加し、病理組織学的検索において、雄の 2.5%以上群の腎臓で、管腔の拡張を伴った再生尿細管が高頻度に認められた。さらに、統計学的有意性は得られなかったが、雄の 2.5%以上群の腎臓では炎症性細胞浸潤も比較的高頻度に観察された。雌については、相応する臓器重量変動や病理組織学的変化が認められなかった。これら泌尿器系に関連した検索結果のうち、雄の 2.5 および 5.0%群でみられた変化は腎臓の相対重量の増加および組織学的変化を伴っており、L-アスパラギン酸投与に関連する毒性影響と

しての生物学的有意性を持つものと判断した。

雌雄の 2.5%以上群で認められた唾液腺の腺房細胞の肥大は、その程度において用量相関性を示し、2.5%群より 5.0%群で顕著に認められた。実験動物における唾液腺の肥大はこれまでも報告されている<sup>15-22)</sup>。Buchner らは、唾液腺の肥大を発現させるメカニズムとして、神経性機序（イソプロテレノール、門歯の切断、蛋白分解酵素、多量の餌、テオフィリン、代償性肥大）、内分泌性機序およびその他の機序（ビタミン A 欠乏等）を挙げている<sup>17)</sup>。一方、Burdock らは、旨み・風味を付与する 5'-phosphodiesterase および 5'-adenylicdeaminase の混餌投与により顎下腺の肥大がみられたが、強制経口投与で肥大がみられなかったと報告し、その発生機序について、被験物質が口腔内の受容体に結合し、自律神経を刺激したことに起因するものと考察している<sup>22)</sup>。彼らは、この報告において、唾液腺の肥大が生理的な適応反応であり、毒性影響でない可能性があるものと指摘しているが、同時にその考察を支持する明確な根拠がないとも記述している<sup>22)</sup>。本研究で観察した被験物質投与による唾液腺の肥大については、同様に適応性の変化である可能性を否定できず、その当否について、発生機序解明等による検討を必要とするが、当面、L-アスパラギン酸投与に関係する毒性影響としての生物学的有意性を持つものと判断した。

## II. L-セリン

### II-C. 研究結果

#### 1. 一般状態、体重、摂餌・摂水量、添加飼料中の被験物質濃度・安定性

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

試験期間中の各群の体重の推移は、図 II-1・II-2 に示した通りであり、雌雄とも、全期間を通じて対照群との間に有意な差を認めなかった。各群の 1 日平均摂餌量の推

移は図Ⅱ-3・Ⅱ-4に、摂水量の推移は図Ⅱ-5・Ⅱ-6に示した。摂餌量の推移は、雌の5.0%群で、0および2週に有意な減少を認めしたが、雄および雌の他の群に有意な差を認めなかった。摂水量の推移は、雄の0.06%群で投与10週に有意な減少を、雄の1.5%群で投与4, 6, 7および8週に有意な増加を認めた。雌では、有意な変化を認めなかった。試験期間中の平均摂餌・摂水量および被験物質摂取量は、表Ⅱ-2に示した。平均摂餌量は、雄の0.06%群および雌の5.0%群で有意な減少を認めた。平均摂水量は、雄の1.5%群で有意な増加を、雌の5.0%群で有意な減少を認めた。

添加飼料中の被験物質の濃度は、各濃度の飼料の3回に分けて製造したそれぞれにおいて、92.7-112.1 (105.1 ± 5.4) の測定値/理論値 (%) を示した。また、安定性については、4-5℃の保存条件下で30日間保存後、給餌条件下で7日間放置後それぞれの飼料において、濃度の減少をみなかった。

## 2. 血液学的検索

血液学的検索結果は表Ⅱ-3・Ⅱ-4に、白血球分画の検索結果は表Ⅱ-5・Ⅱ-6に、それぞれ示した。雄においては、0.06および1.5%群でMCHCの減少が、5.0%群でMCV・MCH・MCHCの減少が認められた。雌においては、0.5%群でMCHC、1.5%群でMCH・MCHC、5.0%群でMCV・MCH・MCHCの減少が、それぞれ認められた。また、雌の5.0%群では、RBC・PLTの増加が認められた。

血液塗抹標本の観察では、雌雄いずれの群においても、赤血球・白血球・血小板の形態に異常を認めなかった。白血球分画は、雄の5.0%群および雌の0.5%群でリンパ球の比率が有意に減少し、雌の0.5%群で好中球の比率が有意に増加した。

## 3. 血清生化学的検索

血清生化学的検索結果は、表Ⅱ-7・Ⅱ-8に示した。雌雄の5.0%群でTP・ASTの減少、雄の5.0%群でALBの減少、雄の1.5%以上群でUAの減少が認められた。GGTは投与群で増加傾向を示し、雌の5.0%群で有意に増加した。電解質は、雄でKの減少傾向が認められ、0.5%以上群において統計学的有意差

を示した。また、雄の1.5%群および雌の0.5%以上群ではNaの増加、雌の0.5%以上群ではClの増加が認められた。

## 4. 尿性状検索

尿性状に関する検索結果は、表Ⅱ-9・Ⅱ-10に示した。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。

## 5. 病理学的検索

最終体重および器官重量は、表Ⅱ-11・Ⅱ-12に示した。雄の0.06%群および雌の1.5%群で、甲状腺の絶対重量の減少および増加がそれぞれ認められた。相対重量においては、雄の0.06%群で精巣重量の増加、雌雄の5.0%群で腎臓重量の増加、雌の5.0%群で脳、脾臓および肝臓重量の増加が認められた。

解剖時に行った病理肉眼的検索においては、被験物質投与の影響によると考えられる変化は認められなかった。

肝臓および腎臓における病理組織学的検索結果を表Ⅱ-13に示した。対照群との間に投与による有意な変化は認められず、自然発生病変の発現においても対照群と投与群の間に有意な差を認めなかった。その他の器官・組織においては、被験物質投与の影響と思われる組織変化を観察しなかった。

## Ⅱ-D. 考察

以上、本研究においては、雌雄のラットに0.06-5.0%濃度のL-セリン添加飼料を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または減少が認められたが、これらの変化は、用量相関性が認められず、L-セリン投与に関係する毒性影響としての生物学的有意性を持たないものと判断した。Harperらは<sup>6)</sup>、不均衡なアミノ酸投与の影響を総論した著述の中で、いくつかの文献を引用し、L-セリン過剰投与の実験では、体重の増加抑制がみられるとした報告とみられないとした報告があり、これらの実験から一つの結論を導くのは難しいと述べている。今回の試験においては、雄の0.06%

群および雌の 5.0%群で、平均摂餌量の低下が認められたが、L-セリン投与による体重の減少を認めなかった。

血液学的検索においては、雌雄の投与群で MCV・MCH・MCHC の減少、雌の 5.0%群で RBC・PLT の増加が認められた。しかしながら、これらの変化は、いずれも所謂正常値の範囲内<sup>13)</sup>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髓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-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は、TP および ALB が投与群で減少傾向を示し、雌雄の 5.0%群で TP の減少、雄の 5.0%群で ALB の減少が有意な変化として認められた。TP および ALB の減少は、用量相関性を示すことから L-セリン投与の影響と考えられたが、その変化が軽度で所謂正常値の範囲内<sup>14)</sup>であり、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。坂井らは、アミノ酸の一種であるロイシンの大量混餌投与により血中 ALB の低下を経験している。また、河又らは、セリンの 14 日間混餌投与によりスレオニンの血中濃度が低下することを確認している。これらの事実は、残念ながら未発表であるが、ロイシンあるいはセリンの大量投与が他のアミノ酸の代謝にも影響を及ぼすことを示唆しており、スレオニンの低下が ALB の合成低下や消費の増加に繋がり、血中アルブミンの低下に繋がった可能性が考えられる。また、スレオニンの低下には、代謝酵素であるセリンデヒドラターゼ (SDH) の発現誘導が関与しているものと考えられている (坂井、私信)。Imai ら<sup>23)</sup>および Kanamoto ら<sup>24)</sup>は、過剰なタンパク食摂取により SDH の発現が増加すると報告している。Nakagawa らは、セリンによる SDH の発現誘導を述べている<sup>25)</sup>。したがって、今回の L-セリン添加カゼイン 20%食の投与、特に高濃度群における血中 TP および ALB の低下は、SDH の発現誘導とそれに関連したスレオニンの低下による栄養学的な変化と考えられる。

D-セリンによる腎臓の近位尿細管直部の壊死はよく知られており<sup>26-28)</sup>、この尿細管壊死の発現には D-amino acid oxidase が関与しているとの報告がある<sup>29)</sup>。Ganote らは、SD ラットを用いて D-セリンと L-セリンの腹腔内投与試験を行い、尿細管の壊死が D-セリン投与群でのみ認められ、L-セリン投与で認められなかったことを報告している<sup>27)</sup>。今回の Fischer 344 ラットによる L-セリンの 90 日間投与試験においても、D-セリンによる腎障害の特徴である重度のタンパク尿および糖尿は雌雄共に観察されず、病理組織学的検索においても腎臓の変化は観察されなかった。

### Ⅲ. L-プロリン

#### Ⅲ-C. 研究結果

##### 1. 一般状態、体重、摂餌・摂水量、添加飼料中の被験物質濃度・安定性

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

試験期間中の各群の体重の推移は、図Ⅲ-1・Ⅲ-2 に示した通りであり、雌雄とも、全期間を通じて対照群との間に有意な差を認めなかった。各群の 1 日平均摂餌量の推移は図Ⅲ-3・Ⅲ-4 に、摂水量の推移は図Ⅲ-5・Ⅲ-6 に示した。摂餌量の推移は、雄の 2.5%群で 10 週に、雄の 5.0%群で 2・12 週に、雌の 5.0%群で 0 週に有意な減少を認めた。摂水量の推移は、雄の 1.25%群で 9 週に、雌の 0.625%群で 8 週に、雌の 2.5%群で 10 週に、雌の 5.0%群で 3 週に有意な増加を認めた。試験期間中の平均摂餌・摂水量および被験物質摂取量は、表Ⅲ-2 に示した。平均摂餌量は、雄の 2.5%以上群で有意な減少を、雌の 0.625・1.25%群で有意な増加を認めた。平均摂水量は、雄の 0.625%群および雌の全投与群で有意な増加を認めた。

添加飼料中の被験物質の濃度は、各濃度の飼料の 3 回に分けて製造したそれぞれにおいて、100.1-113.9 (107.2 ± 4.0) の測定値/理論値 (%) を示した。また、安定性については、4-5℃の保存条件下で 30 日間



保存後、給餌条件下で7日間放置後それぞれの飼料において、濃度の減少をみなかった。

## 2. 血液学的検索

血液学的検索結果は表Ⅲ-3・Ⅲ-4に、白血球分画の検索結果は表Ⅲ-5・Ⅲ-6に、それぞれ示した。雄においては、0.625%群でHGBの減少、1.25%群でHGB・HCTの減少が認められた。雌においては、1.25%群でHGB・MCHの減少、5.0%群でMCHの減少が認められた。

血液塗抹標本の観察では、雌雄いずれの群においても、赤血球・白血球・血小板の形態に異常を認めなかった。白血球分画は、雄においては、有意な変化を認めなかった。雌においては、2.5%群でリンパ球の比率が有意に減少し、好中球の比率が有意に増加した。

## 3. 血清生化学的検索

血清生化学的検索結果は、表Ⅲ-7・Ⅲ-8に示した。雄の0.625%以上群ではGLUの減少、雌雄の5.0%群ではCREの減少、雌雄の5.0%群・雄の2.5%群・雌の0.625%群ではUAの減少が認められた。電解質については、雄の5.0%群でKの減少およびCaの増加、雌の5.0%群でNaの増加が認められた。

## 4. 尿性状検索

尿性状に関する検索結果は、表Ⅲ-9・Ⅲ-10に示した。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。

## 5. 病理学的検索

絶対および相対器官重量は、最終体重と共に、表Ⅲ-11・Ⅲ-12に示した。絶対重量においては、雄において有意な変化を認めなかった。雌においては、0.625%群で脾臓・肝臓・腎臓・子宮、1.25%群で腎臓、5.0%群で甲状腺/上皮小体のそれぞれに増加を認めた。相対重量においては、雄の2.5%群で脾臓、雄の5.0%群で脾臓・腎臓のそれぞれに増加を認めた。雌においては、変化がなかった。

解剖時に行った病理肉眼的検索においては、被験物質投与の影響によると思われる変化を認めなかった。

肝臓および腎臓における病理組織学的検索結果は、表Ⅲ-13に示した。対照群との間に投与による有意な変化は認められず、自然発生病変の発現においても対照群と投与群の間に有意な差を認めなかった。その他の器官・組織においては、被験物質投与の影響と思われる組織変化を観察しなかった。

## Ⅲ-D. 考察

以上、本研究においては、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-プロリン投与に関係する毒性影響としての生物学的有意性を持たないものと判断した。

血液学的検索において、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<sup>13)</sup>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髓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-プロリン投与に関係する毒性影響としての生物学的有意性を持たないものと判断した。

血清生化学的検索において、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<sup>14)</sup>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-プロリン投与に関係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<sup>6-10)</sup>、Kampelらは雌のSDラットにD-プロリンあるいはL-プロリンを50mg/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<sup>9)</sup>。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<sup>9)</sup>。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<sup>10)</sup>。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

以上の結果より、血清脂質の変化が毒性影響である可能性と唾液腺の変化が適応性変化である可能性の可否を決定するための発生機序検索が進行中であるものの、本試験条件下における L-アスパラギン酸の最大無毒性量 (NOAEL) は、雌雄とも 1.25% (雄: 696.6 mg/kg 体重/day 相当, 雌: 715.2 mg/kg 体重/day 相当) と結論した。

L-セリンの 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。

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. 文献

- 1) 厚生労働省行政情報：既存添加物名簿収載品目リスト, <http://www.ffcr.or.jp/zaidan/MHWinfo.nsf/allc0985ea3cb14b492567ec002041df/c3f4c591005986d949256fa900252700?OpenDocument>
- 2) 厚生省生活衛生局食品化学課発表資料：食品衛生調査会毒性・添加物合同部会議事録, [http://www1.mhlw.go.jp/shingi/s0012/txt/s1214-1\\_13.txt](http://www1.mhlw.go.jp/shingi/s0012/txt/s1214-1_13.txt)
- 3) 谷村顕雄：L-アスパラギン酸, 第 7 版食品添加物公定書解説書, 廣川書店, 東京, pp32-34, 1999.
- 4) 谷村顕雄. L-セリン. 第 7 版食品添加物公定書解説書, 廣川書店, 東京, pp1030-1032, 1999.
- 5) ワールドサプリ .JP, <http://www.worldsuppli.jp/1975.html>
- 6) Harper AE, Benevenga NJ, Wohlhueter RM. Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. *Physiol Rev* 50, 428-558, 1970.
- 7) Garlick PJ. The nature of human hazards associated with excessive intake of amino acids. *J Nutr* 134, 1633S-1639S, 2004.
- 8) Kempel D, Kupferschmidt R, Lubec G. Toxicity of D-proline. In: Lubec G, Rosenthal GA, (Eds), *Amino Acids. Chemistry, Biology and Medicine*, ESCOM Leiden, Netherlands, pp. 1164-1171, 1990.
- 9) Abernathy RP, Miller J. Effects of imbalances or antagonisms among nonessential amino acids on growth and nitrogen utilization by rats. *J Nutr* 86, 231-235, 1965.
- 10) Sauberlich HE. Studies on the toxicity and antagonism of amino acids for weanling rats. *J Nutr* 75, 61-72, 1961.
- 11) 食品添加物の指定および使用基準改正に関する指針：安全性に関する試験の標準的実施方法, <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syokuten/960322/betu.html>
- 12) Huntingdon Research Centre. Acute oral toxicity to rat of twenty five amino acids. unpublished confidential report. 1971.
- 13) Mitruka BM, Rawnsley HM. Hematological reference values. In: *Clinical Biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and normal humans*, Masson Publishing, New York, pp57-130, 1981.
- 14) Mitruka BM, Rawnsley HM. Clinical biochemical reference values. In:

- Clinical Biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and normal humans, Masson Publishing, New York, pp153-314, 1981.
- 15) Schneyer CA. Salivary gland changes after isoproterenol-induced enlargement. *Am J Physiol* 203, 232-236, 1962.
  - 16) Brenner GM, Stanton HC. Adrenergic mechanism responsible for submandibular salivary glandular hypertrophy in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 173, 166-175, 1970.
  - 17) Buchner A, Sreebny LM. Enlargement of salivary glands. Review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 34, 209-222, 1972.
  - 18) Schneyer CA, Galbraith WM, Mellett L. Unexpected beta adrenergic effects of the antitumor agent, cyclocytidine on rat salivary glands. *Proc Soc Exp Biol Med* 148, 1206-1211, 1975.
  - 19) Abe K, Dawes C. The secretion of protein and of some electrolytes in response to alpha- and beta-adrenergic agonists by rat parotid and submandibular salivary glands enlarged by chronic treatment with isoproterenol. *J Dent Res* 59, 1081-1089, 1980.
  - 20) Mehansho H, Clements S, Sheares BT, Smith S, Carlson DM. Induction of proline-rich glycoprotein synthesis in mouse salivary glands by isoproterenol and by tannins. *J Biol Chem* 260, 4418-4423, 1985.
  - 21) Jackson CD, Blackwell BN. Subchronic studies of doxylamine in Fischer 344 rats. *Fundam Appl Toxicol* 10, 243-253, 1988.
  - 22) Burdock GA, Flamm WG, Carabin IG. Toxicity and mutagenicity studies of DN-50000 ((R)) and RP-1 ((R)) enzymes. *Food Chem Toxicol* 38, 429-442, 2000.
  - 23) Imai S, Kanamoto R, Yagi I, Kotaru M, Saeki T, Iwami K. Response of the induction of rat liver serine dehydratase to changes in the dietary protein requirement. *Biosci Biotechnol Biochem* 67, 383-387, 2003.
  - 24) Kanamoto R, Fujita K, kumasaki M, Imai S, Kotaru M, Saeki T, Iwami K. Inverse correlation between the nitrogen balance and induction of rat serine dehydratase (SDH) by dietary protein. *Biosci Biotechnol Biochem* 68, 888-893, 2004.
  - 25) Nakagawa H, Miura S, Kimura H, Kanatsuna T. Studies on substrate induction of serine dehydratase of rat liver. *J Biochem* 66, 549-564, 1969.
  - 26) Carone FA, Ganote CE. D-serine nephrotoxicity. The nature of proteinuria, glucosuria, and aminoaciduria in acute tubular necrosis. *Arch Pathol* 99, 658-662, 1975.
  - 27) Ganote CE, Peterson DR, Carone FA. The nature of D-serine-induced nephrotoxicity. *Am J Pathol* 77, 269-282, 1974.
  - 28) Wachstein M, Besen M. Electron microscopy of renal coagulative necrosis due to DL-Serine, with special reference to mitochondrial pyknosis. *Am J Pathol* 44, 383-400, 1964.
  - 29) Maekawa M, Okamura T, Kasai N, Hori Y, Summer KH, Konno R. D-amino-acid oxidase is involved in D-serine-induced nephrotoxicity. *Chem Res Toxicol* 18, 1678-1682, 2005.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yamada D, Yoshida M, Williams YN, Fukami T, Kikuchi S, Masuda M, Maruyama T, Ohta T, Nakae D, Maekawa A, Kitamura T, Murakami Y.

- Disruption of spermatogenic cell adhesion and male infertility in mice lacking TSLC1/IGSF4, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule. *Mol Cell Biol* 26, 3610-3624, 2006.
2. Kobayashi M, Takao K, Shiota Y, Sugita Y, Takahashi M, Nakae D, Samejima K. Inhibition of putrescine aminopropyltransferase influences rat liver regeneration. *Biol Pharm Bull* 29, 863-867, 2006.
  3. Uematsu F, Takahashi M, Yoshida M, Igarashi M, Nakae D. Methylation of neutral endopeptidase 24.11 promoter in rat hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 97, 611-617, 2006.
  4. Abe M, Suzuki N, Yoshida M, Igarashi M, Usuda K, Furukawa S, Maekawa A, Juneja LR, Okubo T, Nakae D. Preliminary evaluation of toxicologic and carcinogenic risks of copper gluconate in rats given multiple carcinogens. *J Toxicol Pathol* 19, 129-135, 2006.
  5. Nakae D, Ogata A, Uehara S, Takahashi Mas, Totsuka Y, Takahashi Mam, Wakabayashi K. Assessment of carcinogenic risks of chemicals applicable for cancer high-risk groups. *Organohalogen Compounds* 69, 1821-1824, 2007.
  6. Tada Y, Fujitani T, Yano N, Takahashi H, Yuzawa K, Ando H, Kubo Y, Nagasawa A, Kamimura H, Ogata A, Nakae D, Uehara S. Effects of tetrabromobisphenol A, a flame retardant, on the liver of ICR mice. *Organohalogen Compounds* 69, 2643-2646, 2007.
  7. Igarashi M, Yoshida M, Watanabe M, Yamada T, Sakurai R, Endo Y, Miyajima N, Maekawa A, Oikawa T, Sugano S, Nakae D. Involvement of mutation-based inhibition of  $\beta$ -catenin phosphorylation at ser33 in the malignant progression of lung (pre)neoplastic lesions induced by *N*-nitrosobis(2-hydroxypropyl) amine in male Fischer 344 rats. *Lung* 185, 271-278, 2007.
  8. Floyd RA, Kotake Y, Towner RA, Guo W-X, Nakae D, Konishi Y. Nitric oxide and cancer development. *J Toxicol Pathol* 20, 77-92, 2007.
  9. Denda A, Kitayama W, Kishida H, Murata N, Tamura K, Kusuoka O, Tsutsumi M, Nishikawa F, Kita E, Nakae D, Konishi Y, Kuniyasu H. Expression of inducible nitric oxide (NO) synthase but not prevention by its gene ablation of hepatocarcinogenesis with fibrosis caused by a choline-deficient, L-amino acid-defined diet in rats and mice. *Nitric Oxide* 16, 164-176, 2007.
  10. Satoh K, Nonaka R, Ogata A, Nakae D, Uehara S. Effects of oseltamivir phosphate (Tamiflu) and its metabolite (GS4071) on monoamine neurotransmission in the rat brain. *Biol Pharm Bull* 30, 1816-1818, 2007.
  11. 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.
  12. 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.
  13. 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.
14. 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.
  15. 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.
  16. 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.
  17. 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.
  18. 2. 学会発表
  19. Floyd RA, Towner R, Guo W-X, Hensley K, Broyles RH, Nakae D, Kotake Y. Nitric oxide in hepatocellular carcinoma development (第97回米国癌学会年次総会, 2006年4月, 米国 Columbia 特別区 Washington 市).
  20. Guo W-X, Broyles RH, Towner R, Hensley K, Nakae D, Kotake Y, Floyd RA. Involvement of S-nitrosylation and PTEN inactivation in choline deficiency-induced hepatocellular carcinoma (第97回米国癌学会年次総会, 2006年4月, 米国 Columbia 特別区 Washington 市).
  21. 中江 大, 吉田 緑, 前川 昭彦. カテキンとグルコン酸銅の単独および複合安全性に関するラット中期多臓器発がん性試験法を用いた検索. 第95回日本病理学会総会 (2006年4-5月, 東京都新宿区).
  22. 辰巳 公平, 大橋 一夫, 久永 倫聖, 金廣 裕道, 片岡 美穂, 立野 知世, 吉里 勝利, 中江 大, 嶋 緑倫, 吉岡 章, 中島 祥介. 分離肝細胞の遠距離輸送試験および移植試験. 肝細胞移植治療実現化に向けた検討. 第13回肝細胞研究会 (2006年6月, 北海道旭川市).
  23. 阿部 正義, 鈴木 紀子, 吉田 緑, 五十嵐 麻希, 臼田 浩二, 古川 賢, 植松 史行, 高橋 正一, 前川 明彦, 中江 大. カテキン及びグルコン酸銅を用いたラット中期多臓器発がん性試験法による検討. 第33回日本トキシコロジー学会学術集会 (2006年7月, 愛知県名古屋市).
  24. 伊藤 和美, 渡辺 恭子, 熊谷 和善, 鈴木 洋子, 斉藤 有司, 寺田 仁美, 清沢 直樹, 寺西 宗広, 古川 忠司, 矢本 敬, 中江 大, 真鍋 淳. F344 ラットにおける acetaminophen 誘発肝障害に 3-aminobenzamid が与える影響. 第33回日本トキシコロジー学会学術集会 (2006年7月, 愛知県名古屋市).
  25. Nakae D, Floyd RA. Antioxidant and signal-normalizing properties of phenyl *N*-*tert*-butyl nitron and its derivatives in chemoprevention of hepatocellular carcinoma. International Conference, Frontiers of Pharmacology and Toxicology (2006年8月, 米国 Illinois 州 Chicago 市).
  26. 中江 大, 増村 健一, 高橋 正一, 鰐 渕 英機, 梅村 隆志, 西川 秋佳, 広瀬 雅雄, 能美 健彦. *gpi delta* ラットを用いた内因性および外因性肝発がん早期段階における遺伝子突然変異の発生とその系統差. 第21回発癌病理研究会 (2006年8月, 徳島県徳島市).
  27. 五十嵐 麻希, 渡邊 学, 吉田 緑, 山田 俊幸, 櫻井 拓也, 前川 昭彦, 及川 恒之, 菅野 澄夫, 中江 大.

- N*-nitrosobis(hydroxypropyl) amine (BHP) 誘発肺増殖性病変の悪性化と  $\beta$ -catenin 活性の相関について検討. 第 65 回日本癌学会学術総会(2006年9月, 神奈川県横浜市).
28. 阿部 正義, 吉田 緑, 五十嵐 麻希, Juneja L, 中江 大. ラット中期多臓器発がん性試験法を用いたカテキン及びグルコン酸銅の発がんリスクの評価. 第 65 回日本癌学会学術総会 (2006年9月, 神奈川県横浜市).
  29. 増村 健一, 中江 大, 坂元 康晃, 高橋 正一, 鰐淵 英機, 梅村 隆志, 広瀬 雅雄, 能美 健彦. F344系およびSD系 *gpt delta* ラットを用いたコリン欠乏アミノ酸食による内因性ラット肝発がん突然変異誘発能の解析. 第 65 回日本癌学会学術総会 (2006年9月, 神奈川県横浜市).
  30. 傳田 阿由美, 中江 大, 笹平 智則, 木下 アンナ, 鰐淵 英機, 福島 昭治, 國安 弘基. コリン欠乏アミノ酸 (CDAA) 食によるマウス肝発がんに対する *Ogg1* 遺伝子欠損の修飾効果. 第 65 回日本癌学会学術総会 (2006年9月, 神奈川県横浜市).
  31. Sakamoto Y, Masumura K, Takahashi S, Nakae D, Nohmi T. Dietary choline deficiency induces oxidative mutagenesis in the liver of *gpt delta* rats (食餌中のコリン欠乏は *gpt delta* ラットの肝臓に酸化的突然変異を誘発する). 第 35 回日本環境変異原学会退会 (2006年11月, 大阪府堺市).
  32. Nakae D, Masumura K, Sakamoto Y, Takahashi M, Wanibuchi H, Umemura T, Nishikawa A, Hirose M, Nohmi T. Generation of gene mutation in *gpt delta* rats by the modification of food composition and its involvement in endogenous and exogenous hepatocarcinogenesis with strain difference. 第 11 回日本フードファクター学会学術集会 (2006年11月, 愛知県犬山市).
  33. 中江 大, 増村 健一, 坂元 康晃, 高橋 正一, 鰐淵 英機, 梅村 隆志, 西川 秋佳, 広瀬 雅雄, 能美 健彦. *gpt delta* ラットにおける食餌アミノ酸食化による突然変異の誘発と肝発がん早期段階における遺伝子突然変異の発生と役割の発がん機構・系統による差異. 第 23 回日本毒性病理学会年次学術集会 (2007年1月, 東京都千代田区).
  34. 五十嵐 麻希, 吉田 緑, 渡邊 学, 菅野 澄夫, 中江 大. *OGG1* 遺伝子欠損マウスにおける NNK の肺発がん性. 第 23 回日本毒性病理学会年次学術集会 (2007年1月, 東京都千代田区).
  35. 阿部 正義, 臼田 浩二, 古川 賢, Raj JL, 大久保 勉, 中江 大. ラット中期肝発がん性試験法を用いたカテキン及びグルコン酸銅の発がんリスクの評価. 第 23 回日本毒性病理学会年次学術集会 (2007年1月, 東京都千代田区).
  36. 中江 大, 増村 健一, 坂元 康晃, 鰐淵 英機, 西川 秋佳, 広瀬 雅雄, 能美 健彦. *gpt delta* ラットの肝発癌早期段階におけるにおける遺伝子突然変異の発生と役割の発癌機構・系統による差異. 第 96 回日本病理学会総会 (2007年3月, 大阪府大阪市).
  37. 阿部 正義, 臼田 浩二, 古川 賢, Raj JL, 大久保 勉, 中江 大. ラットにおけるグルコン酸銅およびカテキンの単独または複合投与による肝発がんリスクの検索. 第 34 回日本トキシコロジー学会 学術年会 (2007年6月, 東京都江戸川区).
  38. 辰巳 公平, 大橋 一夫, 柴田 優, 嶋 緑倫, 片岡 美穂, 立野 知世, 吉里 勝利, 久永 倫聖, 金廣 裕道, 中島 祥介, 中江 大, 吉岡 章. 血友病 B 新規治療法としての細胞治療の実現化をめざした肝細胞増殖系の確立. 第 14 回肝細胞研究会 (2007年6月, 鹿児島県鹿児島市).
  39. 中江 大, 阿部 正義, 臼田 浩二, 古川 賢, 鈴木 紀子, 吉田 緑, Juneja LR, 大久保 勉. ラット中期多臓器発がん性試験法により検出されたグルコン酸銅の肝・前胃発がん性に対する緑茶カテキンの抑制効果. 第 14 回日本がん予防学会 (がん予防大会 in TOKYO 2007) (2007年7月, 東京都千代田区).
  40. Nakae D, Ogata A, Uehara S, Takahashi

- Mas, Totsuka Y, Takahashi Mam, Wakabayashi K. Assessment of carcinogenic risks of chemicals applicable for cancer high-risk groups. 27th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants. (DIOXIN2007) (2007年9月, 東京都港区).
41. Tada Y, Fujitani T, Yano N, Takahashi H, Yuzawa K, Ando H, Kubo Y, Nagasawa A, Kamimura H, Ogata A, Nakae D, Uehara S. Effects of tetrabromobisphenol A, a flame retardant, on the liver of ICR mice. 27th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants. (DIOXIN2007) (2007年9月, 東京都港区).
  42. Abe M, Jeneja LR, Nakae D. Evaluation of carcinogenic risks of copper gluconate and catechins in a medium-term rat liver bioassay. 第66回日本癌学会総会 (2007年10月, 神奈川県横浜市).
  43. Igarashi M, Yoshida M, Watanabe M, Abe M, Sugano S, Nakae D. Lung carcinogenesis induced by NNK in *Ogg1* knockout mice. 第66回日本癌学会総会 (2007年10月, 神奈川県横浜市).
  44. Maruyama H, Tsutsumi M, Kuniyasu H, Nakae D, Kameya T, Tatsumi M. Expression of insulin-like growth factor II by a stomach cancer associated with hypoglycemia. 第66回日本癌学会総会 (2007年10月, 神奈川県横浜市).
  45. 西川 秋佳, 鰐淵 英機, 原田 孝則, 田村 一利, 中江 大, 玉野 静光, 小川 勝洋. 肝臓の増殖性病変. 第8回日本毒性病理学会教育セミナー (2007年11月, 東京都文京区).
  46. 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, 小縣 昭夫, 上原 眞一, 中江 大. ラットにおけるL-アスパラギン酸の90日間反復投与毒性試験. 第24回日本毒性病理学会年次学術集会(2008年2月, 愛知県名古屋市).
  47. 五十嵐 麻希, 吉田 緑, 渡邊 学, 阿部 正義, 菅野 純夫, 中江 大. *Ogg1* 欠損マウスにおけるNNK誘発肺増殖性病変のEGFR突然変異. 第24回日本毒性病理学会年次学術集会(2008年2月, 愛知県名古屋市).
  48. Floyd RA, Kotake Y, Towner RA, Nakae D, Konishi Y. The role of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and nitric oxide in cancer development. 第24回日本毒性病理学会年次学術集会 (2008年2月, 愛知県名古屋市).
  49. 佐藤 かな子, 野中 良一, 小縣 昭夫, 中江 大, 上原 眞一. リン酸オセルタミビア (タミフル) とその生体内活性体 (GS4071) のラット脳モノアミン神経伝達系におよぼす影響. 第128回日本薬学会年会 (2008年3月, 神奈川県横浜市).
  50. 不破 達, 小縣 昭夫, 福森 信隆, 久保 喜一, 湯澤 勝廣, 安藤 弘, 矢野 範男, 長澤 明道, 高橋 博, 中江 大, 上原 眞一, 児玉 亨, 本多 芳子. 違法ドラッグPMMAの中枢神経作用. 第128回日本薬学会年会 (2008年3月, 神奈川県横浜市).
  51. 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).
  52. 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).
  53. 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).
  54. 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).
55. 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).
56. 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).
57. 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).
58. 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).
59. 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).
60. 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).
61. 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).
62. 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).
63. 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).
64. 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).
65. 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).
66. 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).
67. 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).

68. 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).
69. 小縣昭夫, 坂本義光, 福森信隆, 斎藤育江, 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).

## II. 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

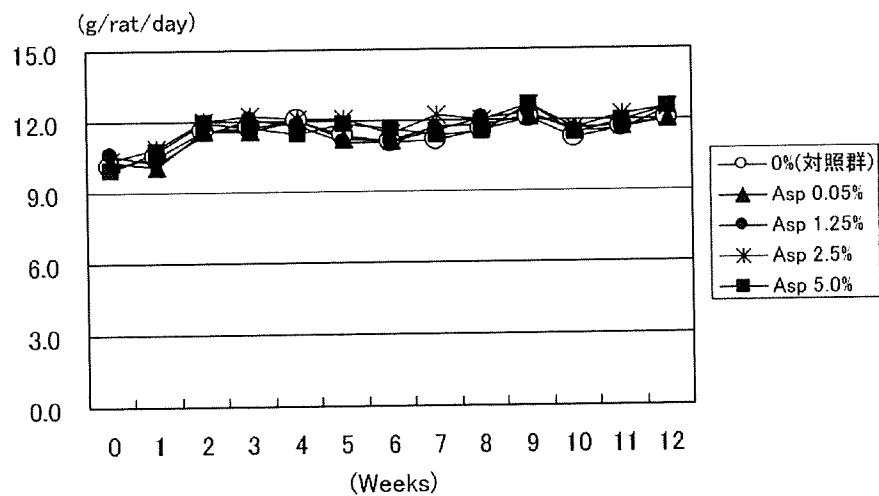


図 I-3. L-アスパラギン酸添加飼料を90日間投与したF344ラットの摂餌量の推移 (雄)

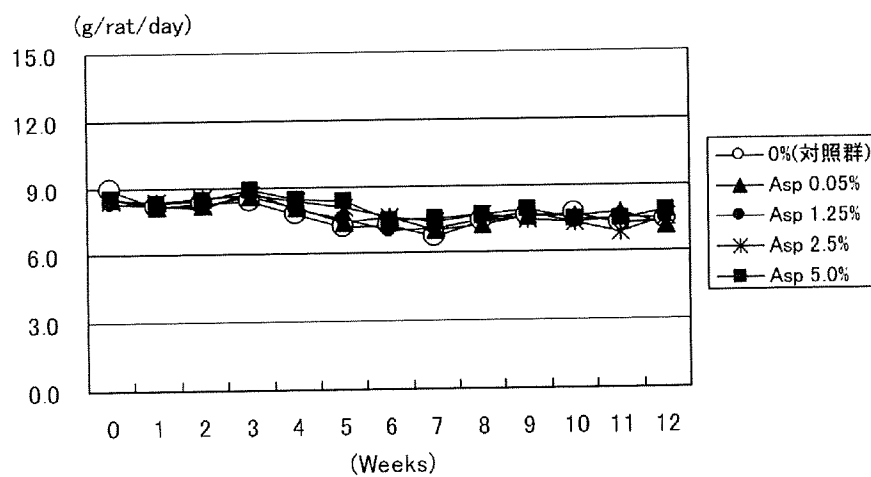


図 I-4. L-アスパラギン酸添加飼料を90日間投与したF344ラットの摂餌量の推移 (雌)

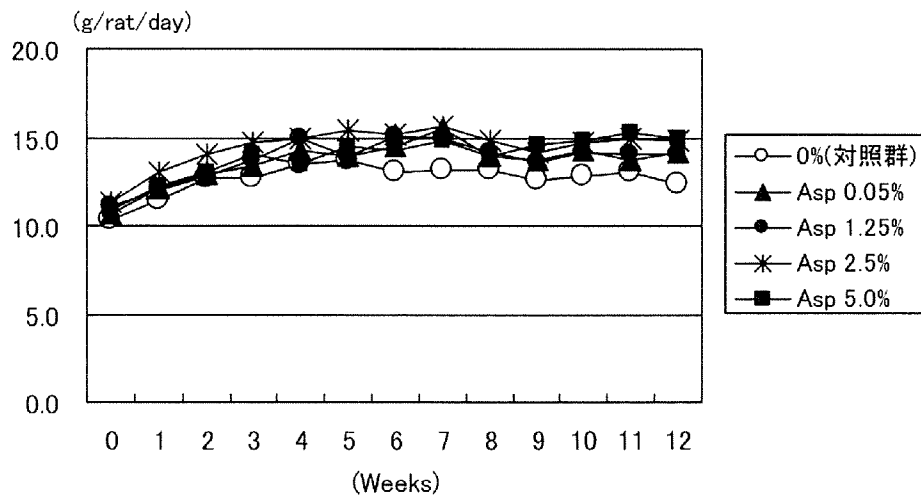


図 I-5. L-アスパラギン酸添加飼料を90日間投与したF344ラットの摂水量の推移 (雄)

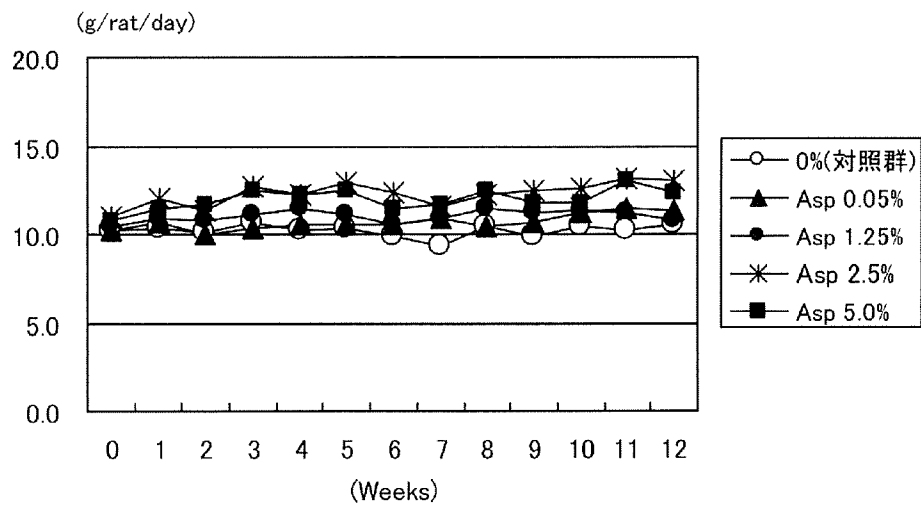


図 I-6. L-アスパラギン酸添加飼料を90日間投与したF344ラットの摂水量の推移 (雌)

表 1-3. L-アスパラギン酸添加飼料を90日間投与したF344ラットの血液性状(雄)

	L-アスパラギン酸用量 (%)				
	0 (対照群)	0.05	1.25	2.5	5.0
試験匹数	9	9	8	10	10
RBC (x10 <sup>12</sup> /μL)	865.2±26.5	877.8±18.6	907.8±14.3 *	894.7±23.8	902.4±26.9 *
WBC (x10 <sup>3</sup> /μL)	46.4±8.6	42.7±7.7	35.0±7.9	48.6±8.9	47.8±8.0
HGB (g/dL)	15.2±0.4	15.0±0.4	15.2±0.2	15.4±0.3	15.4±0.3
HCT (%)	45.6±1.5	46.4±1.1	48.0±0.9 *	47.5±1.2 *	47.8±1.4 *
MCV (fL)	52.8±0.7	52.9±0.4	52.9±0.5	53.1±0.3	53.0±0.5
MCH (pg)	17.6±0.4	17.1±0.3 *	16.8±0.3 *	17.2±0.2	17.1±0.3 *
MCHC (g/dL)	33.3±0.6	32.2±0.3 *	31.7±0.4 *	32.4±0.4 *	32.3±0.5 *
PLT (x10 <sup>3</sup> /μL)	53.3±5.7	52.3±12.3	55.9±3.8	55.6±2.1	54.1±5.1

数値は平均値±標準偏差。対照群との比較で有意差あり(\*P<0.05, Scheffe)

表 1-4. L-アスパラギン酸添加飼料を90日間投与したF344ラットの血液性状(雌)

	L-アスパラギン酸用量 (%)				
	0 (対照群)	0.05	1.25	2.5	5.0
試験匹数	8	8	8	10	10
RBC (x10 <sup>12</sup> /μL)	866.9±26.3	859.2±21.1	866.3±24.2	869.8±18.2	899.7±16.4
WBC (x10 <sup>3</sup> /μL)	33.6±8.1	27.1±5.0	32.8±3.8	36.3±7.3	33.0±5.3
HGB (g/dL)	15.6±0.4	15.3±0.3	15.6±0.3	15.7±0.3	15.9±0.3
HCT (%)	47.2±1.6	46.5±1.2	47.1±1.4	47.5±1.1	48.8±0.9
MCV (fL)	54.4±0.4	54.5±0.2	54.3±0.3	54.5±0.3	54.2±0.3
MCH (pg)	18.0±0.5	18.0±0.3	18.0±0.3	18.1±0.2	17.7±0.2 *
MCHC (g/dL)	36.8±9.7	33.0±0.5	33.1±0.6	33.1±0.4	32.6±0.4 *
PLT (x10 <sup>3</sup> /μL)	52.6±9.1	52.3±6.3	58.1±4.0	56.0±6.8	54.2±11.6

数値は平均値±標準偏差。対照群との比較で有意差あり(\*P<0.05, Scheffe)

表 1-5. L-アスパラギン酸添加飼料を90日間投与したF344ラットの白血球分画(雄)

	L-アスパラギン酸用量 (%)				
	0 (対照群)	0.05	1.25	2.5	5.0
試験匹数	9	9	8	10	10
リンパ球 (%)	82.0±3.0	78.0±7.6	76.1±7.0	82.5±7.0	84.4±5.3
好中球 (%)	15.4±3.5	17.8±7.3	21.1±5.8	15.1±6.6	14.1±4.8
好酸球 (%)	1.0±0.7	1.2±0.8	1.4±2.0	1.2±1.2	0.4±0.5
好塩基球 (%)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
単球 (%)	1.4±1.2	2.7±1.4	1.4±0.9	1.2±0.8	1.1±0.7
その他 (%)	0.1±0.3	0.3±0.7	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

数値は平均値±標準偏差

表 1-6. L-アスパラギン酸添加飼料を90日間投与したF344ラットの白血球分画(雌)

	L-アスパラギン酸用量 (%)				
	0 (対照群)	0.05	1.25	2.5	5.0
試験匹数	8	8	8	10	9
リンパ球 (%)	90.5±4.6	84.9±6.4	84.9±4.9	84.7±5.4	87.9±5.4
好中球 (%)	7.8±4.1	13.4±5.3	13.6±4.7	14.3±5.0	10.2±4.5
好酸球 (%)	0.9±0.8	1.0±1.3	0.6±0.5	0.1±0.3	0.9±1.1
好塩基球 (%)	0.1±0.4	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
単球 (%)	0.8±0.5	0.8±0.7	0.9±1.5	0.9±1.0	1.0±0.9
その他 (%)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

数値は平均値±標準偏差