

平成 28 年度 指定添加物（香料）の安全性に関する試験

F344 ラットを用いた 5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールの 90 日間反復投与毒性試験
(最終報告書)



国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター



【要旨】

食品添加物（香料）として使用されている 5 メチル 2 フェニル 2 ヘキセナールについて、ラットを用いた 90 日間亜慢性反復経口投与毒性試験を実施した。

6 週齢の F344/DuCrj 系ラット雌雄各群 10 匹に、コーン油を溶媒として本剤を 0、8、24、70 mg/kg BW の用量で 90 日間強制経口投与した。試験期間中、被験物質の投与に起因した一般状態の変化は認められなかった。試験期間中の体重の推移および摂餌量に投与による影響はみられなかった。血液学的検査および血清生化学的検査では投与に起因する変化は認められなかった。臓器重量の検索では、70 mg/kg BW 群では雄において精巣の絶対重量が、雌において肝臓の絶対および相対重量の増加が認められたが、病理組織学的検査において、投与に起因する変化は認められなかった。以上の結果から、本試験における 5 メチル 2 フェニル 2 ヘキセナールの無毒性量 (NOAEL) は雌雄ともに 70 mg/kg BW/day と判断された。

【はじめに】

食品添加物は、保存料、甘味料、着色料、香料など、食品の製造過程または食品の加工・保存・着香の目的で使用されている。日本国内では、食品衛生法第 10 条に基づき、安全性と有効性が評価され厚生労働大臣の指定を受けたものは「指定添加物」として使用が許可されている (1)。指定添加物のうち香料については、「類又は誘導体として指定されている 18 項目の香料」(18 類) として化学構造の特徴による一括名称で指定した 18 分類に該当する物質が通知されている。また、食品への大量添加は香味の悪化を招くことから使用量は自ずと制限されヒトの摂取量は非常に低いといった特殊性を有する。そのため、他の食品添加物と異なり、その特殊性を考慮した安全性評価がなされている。我が国では、「国際的に汎用されている香料の安全性評価の方法について」(平成 15 年 11 月) (2) に基づき評価が行われ、一般毒性試験においては、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives, JECFA) の判断樹による評価法を基にし、対象となる香料について構造クラスの分類を行い、Threshold of Toxicological Concern (TTC) の考えに基づいた構造クラスごとに設定された摂取許容値と推定摂取量との比較で安全性の評価がされている。しかし、この香料の一括分類による安全性評価法では、品目毎の詳細な毒性情報に乏しく、諸外国ではポジティブリスト化や再評価を行う動向もあることから、我が国においても香料 18 類の安全性について再検討が求められている。

5 メチル 2 フェニル 2 ヘキセナールは (CAS No. 21834 92 4) は、18 類のうち「芳香族アルデヒド類 (17 類)」に分類される香料である (3)。国際的には JECFA (JECFA No. 1472 ; 第 63 回会合、2004) 及び米国食品香料製造者協会 (Flavor and Extract Manufacturers' Association of the United States, FEMA; FEMA No. 3199 ;

Grade, Generally Recognized As Safe (GRAS)) 等の評価機関で食用香料として認可されている。

本研究では、5 メチル 2 フェニル 2 ヘキセナールの安全性評価のため、F344 ラットを用いた 90 日間反復投与毒性試験を実施した。平成 27 年度は用量設定のための予備試験を実施し、その結果に基づいて本年度は 90 日間反復投与試験の動物実験を実施して全項目の検索を終了したので、本報告書ではその結果を示し、最終報告とする。

【材料と方法】

1. 動物ならびに飼育条件

5 週齢の F344/DuCrj ラット雌雄各 40 匹を日本チャールス・リバー株式会社（神奈川県）より購入し、1 週間・検疫後、群間の偏りを少なくする群分け方法である適正層別方式（4）を用いて、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飼育施設で行い、室内の環境条件は温度 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数 18 回 / 時間、12 時間蛍光灯照明、12 時間消灯の条件下で行った。動物はポリカーボネート製箱型ケージに 2~3 匹ずつ収容し、床敷には三協ラボサービス株式会社（東京）のソフトチップを用い週 2 回交換した。

本動物試験は、国立医薬品食品衛生研究所「動物実験の適正な実施に関する規定」に基づき、動物実験計画書を作成し、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会による審査・承認を経て、動物愛護に十分配慮し実施した。本動物実験施設は GLP 適合施設ではないが、(財) ヒューマンサイエンス振興財団動物実験実施施設認証センターの評価を受け、厚生労働省の通知「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する指針」に適合した施設であると認定されている。また、本試験は「食品添加物の指定及び使用基準に関する指針」(5) に準拠して実施した。

2. 被験物質および投与濃度

5 メチル 2 フェニル 2 ヘキセナール (lot. No. ■■■■■ ; ■■■■■) は、無色~淡黄色の透明な液体である。製造元による検査成績は、比重 ($d_{20/20}$) 0.977、屈折率 ($n_{20/D}$) 1.533、含量 (GC 法) 96.0%であったことから、本試験では主成分単一物質として取り扱った。本被験物質は、日本香料協会の供与により入手し、入手後は遮光気密容器に入れ密封し、使用まで $5 \sim 6^{\circ}\text{C}$ の冷暗所で保管した。

本試験における用量設定および群構成は、平成 27 年度に実施した 28 日間投与による予備試験の結果に基づき、溶媒投与群（対照群）、被験物質の 8 mg/kg BW 投与群（8 mg/kg BW 群）、同 24 mg/kg BW 投与群（24 mg/kg BW 群）、同 70 mg/kg BW 投与群（70 mg/kg BW 群）の 4 群とした。投与方法は、投与液量を体重 1kg 当たり 5ml とし、テフロン製胃ゾンデを装着した注射筒を用いて、1 日 1 回、90 日間にわたって胃内に投与

した。投与は午前中（9:00~12:00）に行った。各個体の投与液量は、一週毎の測定体重を基に算出した。

3. 試験方法

雌雄各群10匹、計80匹のラットにそれぞれ0, 8, 24, 70 mg/kg BWの用量でコーン油（和光純薬工業株式会社、大阪）に本剤を溶解し、強制経口投与にて90日間投与を行った。飼料（固型CRF 1、オリエンタル酵母工業株式会社、東京）および飲料水（水道水）は自由摂取させた。試験期間中、動物の一般状態および生死を毎日観察し、体重および摂餌量の測定は投与2週目まで週2回、以降週1回実施した。

投与終了後、全動物を前日17時より絶食させた後、イソフルラン麻酔下にて開腹し、腹部大動脈より採血後、放血殺し、剖検した。全身を肉眼的に観察した後に、脳、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および卵巣を摘出し秤量した。秤量臓器および鼻腔を含む頭蓋、下垂体、唾液腺（耳下腺、舌下腺、下顎腺）、気管、甲状腺、上皮小体、大動脈、食道、胃、小腸、大腸、膵臓、膀胱、前立腺、精嚢腺、凝固腺、精巣上体、卵管、子宮、膈、リンパ節（頸部および腸間膜）、胸骨、大腿骨、脊髄（頸、胸、腰部）、坐骨神経、皮膚（乳腺含む）および骨格筋を摘出し、直ちに10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬した（肺は固定液を注入した後、浸漬）。また、眼球およびその付属器は、頭蓋から摘出後直ちにダビッドソン固定した。精巣はブアン液で固定した。鼻腔を含む頭蓋、胸骨、大腿骨および脊椎（頸、胸、腰部横断）は、10%ギ酸および10%ホルマリン混合液で脱灰処理を行った。雌雄の対照群および70 mg/kg BW群の全臓器と、低用量群および中間用量群の肝臓、腎臓および精巣について、定法に従ってヘマトキシリン・エオジン（HE）染色標本を作製し病理組織学的検索を実施した。

解剖時に採取した全例の血液について、0.5% EDTA 2K処理後に [REDACTED]にて赤血球数（RBC）、ヘモグロビン量（Hb）、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）、白血球数（WBC）の測定および算出を行った。また、白血球分画は [REDACTED]にて、桿状核好中球（band form neutrophils）、分葉核好中球（segmented neutrophils）、好酸球（eosinophils）、好塩基球（basophils）、リンパ球（lymphocytes）、単球（monocytes）および網状赤血球（reticulocytes）の分類を行った。また、血清生化学的検索として、総タンパク（TP）、アルブミン/グロブリン比（A/G）、アルブミン（Alb）、総ビリルビン（Total Bil）、グルコース、トリグリセリド（TG）、総コレステロール（TC）、血液尿素窒素（BUN）、クレアチニン（CRN）、ナトリウム（Na）、クロール（Cl）、カリウム（K）、カルシウム（Ca）、無機リン（IP）、アスパラギン酸トランスアミナーゼ（AST）、アラニントランスアミナーゼ（ALT）、アルカリフォスファターゼ

(ALP)、 γ グルタミルトランスペプチダーゼ (γ GTP) を

に委託して測定した。

4. 統計学的処理法

試験期間中の体重、摂餌量、血液学的・血清生化学検査結果および臓器重量については各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置分散分析を、不等分散の場合は Kruskal Wallis の方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Dunnett の方法で対照群と各被験物質投与群との間で有意差検定を行った。病理組織学的変化の検定については、発生頻度を Fisher の直接確率法で、グレードを Mann Whitney の U 検定で行った。いずれの検定においても、 $p < 0.05$ の場合を統計学的に有意と判定した。

【結果】

1. 一般状態、体重および摂餌量

試験期間中、動物の死亡および一般状態の異常は認められず、試験期間中の体重および摂餌量は雌雄ともに全ての投与群において対照群と同様に推移した (Fig. 1 および 2)。

2. 血液学的検査および血清生化学的検査

血液学的検査を Table 1 に示す。雄では、投与群と対照群との間に有意な変化は認められなかった。雌では、血液塗抹標本による血球百分率比の検索において、単球比の有意な減少が 24 mg/kg BW 群 ($p < 0.05$) および 70 mg/kg BW 群 ($p < 0.01$) に認められた。

血清生化学的検査結果を Table 2 に示す。雄では Total Bil の有意な減少が 8 mg/kg BW 群と 70 mg/kg BW 群 ($p < 0.05$) にみられた。雌では投与群と対照群との間に有意な変化は認められなかった。

3. 臓器重量

最終体重および臓器重量の結果を Table 3 に示す。最終体重において、雌雄ともに投与群と対照群との間に有意な差は認められなかった。雄では精巣の絶対重量の有意な増加が 70 mg/kg BW 群で認められ、相対重量も上昇傾向を示した。雌では肝臓の絶対重量及び相対重量がともに 70 mg/kg BW 群において有意に増加した。

4. 病理組織学的検索

剖検時に実施した肉眼的検査において、投与に関連する臓器・組織の異常は認められなかった。

病理組織学的検索結果を Table 4 及び 5 に示す。肝臓では小肉芽腫、肝細胞の空胞化、変異肝細胞巣および胆管増生が一部の動物で観察されたが、用量相関性は認められなかった。腎臓では雄において再生尿細管がすべての群で認められ、雌雄において単核細胞浸潤および鉍質沈着が一部の動物で観察されたが、用量相関性は認められなかった。心臓では雄において心筋の変性および単核細胞浸潤が観察されたが、用量相関性は認められなかった。肺では雌雄において肺泡マクロファージの集簇および動脈の鉍質沈着が、鼻腔では雌雄ともにエオジン好性球状物質の発現例数が増加したものの統計学的有意差は認められなかった。その他の臓器において種々の病理組織学的所見が観察されたが、その発生頻度に統計学的有意差は認められなかった。

【考察】

本試験において、雌雄とも生存率および一般状態に投与に関連した変化は認められなかった。また、体重、摂餌量についても投与による影響は認められなかった。

血液学的検査では、雌において単球の減少が 24 mg/kg BW 群以上で認められたが、組織学的にも関連する所見は認められないことから、毒性学的意義は乏しいと考えられた。

血清生化学的検査では、Total Bil の減少が雄の 8 mg/kg BW 群および 70 mg/kg BW 群で認められたが、軽微な変化であること、用量相関性がないこと、毒性変化とは逆の変動であることから毒性学的意義は乏しいと考えられた。

臓器重量の検索では、肝臓の絶対および相対重量の増加が雌の 70 mg/kg BW 群にみられたことから、投与に伴う影響と考えられたが、軽微な変化であり、血清生化学的検査において肝障害を示す変化は認められず、組織学的に明らかな毒性変化は認められなかった。雄では、精巣の絶対重量の用量依存的な上昇傾向が認められ、70 mg/kg BW 群で有意な高値を示したが相対重量に変化はみられず、精巣には組織学的に明らかな毒性変化も認められなかった。したがって、これらの変化に毒性学的意義は乏しいと考えられた。

病理組織学的検査では、各臓器において種々の病理組織学的所見が観察されたが、いずれも F344 ラットの背景病変として知られる変化もしくは対照群においても同等に認められた変化であるため、被験物質投与の影響ではないと考えられた。

【結論】

5 メチル 2 フェニル 2 ヘキセナールを F344 ラットに 0, 8, 24 および 70 mg/kg BW で 90 日間強制経口投与し、その毒性影響を検討した。その結果、投与期間を通じて死亡は見られず、一般状態、体重および摂餌量においても 5 メチル 2 フェニル 2 ヘキセナール投与による変化は認められなかった。また、投与後に実施した血液学的検査、血液生化学的検査、器官重量、剖検および病理組織学検査においても被験物質

投与に起因すると考えられる毒性変化は認められなかった。従って、本試験における 5 メチル 2 フェニル 2 ヘキセナールの無毒性量は雌雄ともに 70 mg/kg BW/day と結論した。

【参考文献】

1. 厚生労働省、最終改正・平成 27 年 7 月 29 日厚生労働省令第 126 号、「食品衛生法施行規定」(昭和 23 年 7 月 13 日厚生省令第 23 号)、別表 1、<http://law.e.go.jp/htmldata/S23/S23F03601000023.html>、(2016 年 6 月 30 日、閲覧)。
2. 国際的に汎用されている香料の安全性評価の方法について・最終報告(平成 15 年 11 月 4 日、香料安全性評価法検討会)、[http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOME.nsf/pages/PDF/\\$FILE/flavoursafety1.pdf](http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOME.nsf/pages/PDF/$FILE/flavoursafety1.pdf)、(2016 年 6 月 30 日、閲覧)。
3. 厚生労働省、「食品添加物、添加物のリスト等・18 類香料リスト」、http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuten/ (2016 年 6 月 30 日、閲覧)
4. 阿部正信、1986、長期毒性試験に用いるラット・マウスの体重変化の解析による群分けの適正層別方式の確立、薬理と治療 14 ; 7285 7302。
5. 国立医薬品食品衛生研究所、最終更新 2015 年 4 月 14 日、「OECD テストガイドライン」(反復投与毒性試験 TG407、1995. 7. 27 採択)、http://www.nihs.go.jp/hse/chem_info/oecdindex.html (2016 年 6 月 30 日、閲覧)

Table 1 Hematological data for F344 rats treated with 5-methyl-2-phenyl-2-hexenal for 13 weeks.

	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal (mg/kg BW)			
	0	8	24	70
No. of animals examined	10	10	10	10
Males				
RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	882.1 \pm 16.9	888.5 \pm 18.9	883.3 \pm 17.9	887.7 \pm 17.5
Hb (g/dl)	14.7 \pm 0.3	14.8 \pm 0.2	14.8 \pm 0.3	14.8 \pm 0.3
HCT (%)	40.4 \pm 0.9	40.8 \pm 0.6	40.7 \pm 0.6	40.8 \pm 0.6
MCV (fl)	45.9 \pm 0.7	46.1 \pm 0.6	46.1 \pm 0.6	46.1 \pm 0.6
MCH (pg)	16.7 \pm 0.1	16.7 \pm 0.1	16.7 \pm 0.2	16.6 \pm 0.2
MCHC (g/dl)	36.5 \pm 0.4	36.3 \pm 0.2	36.3 \pm 0.3	36.2 \pm 0.4
Plt ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	64.2 \pm 3.2	63.5 \pm 4.2	62.8 \pm 2.7	62.3 \pm 2.9
WBC ($\times 10^2/\mu\text{l}$)	47.2 \pm 8.0	45.2 \pm 9.3	44.3 \pm 7.3	45.7 \pm 7.5
Differential leukocyte counts				
Band form neutrophils (%)	2.0 \pm 0.8	2.0 \pm 1.2	1.2 \pm 0.9	2.6 \pm 1.4
Segmented neutrophils (%)	20.8 \pm 3.1	24.4 \pm 5.0	24.2 \pm 3.7	22.1 \pm 3.7
Eosinophils (%)	1.1 \pm 0.3	1.1 \pm 0.8	1.1 \pm 0.7	1.4 \pm 0.8
Basophils (%)	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Lymphocytes (%)	75.3 \pm 3.9	72.1 \pm 4.4	73.1 \pm 4.4	73.5 \pm 5.2
Monocytes (%)	1.0 \pm 0.8	0.5 \pm 0.5	0.5 \pm 0.7	0.5 \pm 0.5
Reticulocytes (/ 200 cells)	2.8 \pm 1.5	2.0 \pm 1.6	2.5 \pm 1.9	1.5 \pm 1.9
Females				
RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	817.1 \pm 13.8	801.7 \pm 40.0	814.8 \pm 19.8	811.7 \pm 21.3
Hb (g/dl)	14.6 \pm 0.2	14.3 \pm 0.7	14.6 \pm 0.3	14.4 \pm 0.3
HCT (%)	41.1 \pm 0.7	40.5 \pm 1.8	40.9 \pm 1.3	41.0 \pm 1.1
MCV (fl)	50.5 \pm 0.5	50.7 \pm 0.7	51.2 \pm 3.5	50.5 \pm 0.5
MCH (pg)	17.9 \pm 0.1	17.9 \pm 0.1	17.9 \pm 0.1	17.8 \pm 0.1
MCHC (g/dl)	35.5 \pm 0.3	35.3 \pm 0.5	35.5 \pm 0.5	35.2 \pm 0.5
Plt ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	62.5 \pm 2.5	61.8 \pm 4.6	65.4 \pm 4.1	62.5 \pm 2.2
WBC ($\times 10^2/\mu\text{l}$)	34.5 \pm 4.7	29.2 \pm 4.5	32.7 \pm 5.0	30.8 \pm 5.4
Differential leukocyte counts				
Band form neutrophils (%)	0.9 \pm 0.3	1.4 \pm 1.3	0.7 \pm 0.9	1.1 \pm 1.1
Segmented neutrophils (%)	13.7 \pm 3.2	15.5 \pm 2.6	13.3 \pm 2.9	15.1 \pm 3.8
Eosinophils (%)	0.7 \pm 0.8	1.2 \pm 1.0	1.6 \pm 1.3	0.9 \pm 0.6
Basophils (%)	0 \pm 0	0.1 \pm 0.2	0 \pm 0	0 \pm 0
Lymphocytes (%)	82.9 \pm 4.1	82.1 \pm 4.7	84.2 \pm 2.8	85.0 \pm 5.4
Monocytes (%)	2.5 \pm 1.4	1.5 \pm 0.8	0.8 \pm 0.6*	0.4 \pm 0.5**
Reticulocytes (/ 100 cells)	5.1 \pm 4.2	7.1 \pm 4.3	6.7 \pm 2.7	4.0 \pm 3.1

Values are means \pm SDs.

*, **: significantly different from the 0 mg/kg BW group at $p < 0.05$ and 0.01 , respectively (Dunnett's test or Dunnett type rank-sum test).

Table 2 Serum biochemical data for F344 rats treated with 5-methyl-2-phenyl-2-hexenal for 13 weeks

	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal (mg/kg BW)			
	0	8	24	70
No. of animals examined	10	10	10	10
Males				
TP (g/dL)	6.5±0.2	6.6 ± 0.2	6.3±0.3	6.6 ± 0.1
A/G ratio	2.1±0.1	2.2 ± 0.1	2.2±0.1	2.2 ± 0.1
Alb (g/dL)	4.5±0.1	4.5 ± 0.1	4.6±0.2	4.6 ± 0.1
Total Bil (mg/dL)	0.06±0.01	0.05 ± 0.01**	0.05±0.01	0.05 ± 0.01*
Glucose (mg/dL)	168.0±17.0	168.3 ± 11.8	172.1±14.4	167.5 ± 12.4
TG (mg/dL)	80.3±21.2	95.4 ± 27.7	93.4±20.2	101.8 ± 17.8
TC (mg/dL)	57.9±4.9	56.6 ± 6.2	59.0±3.2	57.9 ± 2.3
BUN (mg/dL)	21.6±2.2	20.8 ± 1.6	20.8±1.4	20.3 ± 1.5
CRN (mg/dL)	0.37±0.02	0.36 ± 0.05	0.35±0.02	0.34 ± 0.2
Na (mEQ/L)	144.0±1.1	143.3 ± 2.5	143.4±1.0	144.0 ± 0.5
Cl (mEQ/L)	105.5±1.0	104.7 ± 4.1	103.9±1.7	104.2 ± 0.8
K (mEQ/L)	4.3±0.1	4.3 ± 0.2	4.3±0.2	4.3 ± 0.1
Ca (mg/dL)	10.5±0.2	10.5 ± 0.2	10.6±0.2	10.5 ± 0.1
IP (mg/dL)	5.4±0.7	5.4 ± 0.6	5.6±0.7	5.8 ± 0.7
AST (IU/L)	82.3±15.2	84.5 ± 16.3	83.5±11.6	81.3 ± 6.1
ALT (IU/L)	58.9±8.3	58.4 ± 9.8	60.1±6.9	57.2 ± 6.3
ALP (IU/L)	573.2±50.8	562.6 ± 42.0	570.3±39.7	573.8 ± 26.7
γ-GTP (IU/L)	<3	<3	<3	<3
Females				
TP (g/dL)	6.2±0.1	6.1 ± 0.2	6.1±0.1	6.3 ± 0.2
A/G ratio	2.5±0.1	2.5 ± 0.4	2.5±0.1	2.4 ± 0.1
Alb (g/dL)	4.4±0.1	4.3 ± 0.3	4.4±0.1	4.4 ± 0.1
Total Bil (mg/dL)	0.06±0.01	0.05 ± 0.02	0.05±0.01	0.05 ± 0.01
Glucose (mg/dL)	129.1±19.0	137.0 ± 24.4	120.3±19.6	132.2 ± 26.0
TG (mg/dL)	47.3±14.9	46.4 ± 22.7	39.9±15.0	45.7 ± 26.8
TC (mg/dL)	73.8±5.3	74.6 ± 5.1	73.6±5.1	72.2 ± 9.2
BUN (mg/dL)	19.7±2.5	18.7 ± 2.3	17.9±2.2	18.5 ± 2.4
CRN (mg/dL)	0.36±0.02	0.34 ± 0.02	0.34±0.01	0.34 ± 0.02
Na (mEQ/L)	143.7±1.5	143.9 ± 1.3	143.7±1.7	144.2 ± 0.6
Cl (mEQ/L)	107.1±3.8	108.4 ± 4.5	106.0±4.7	107.4 ± 2.7
K (mEQ/L)	4.3±0.2	4.3 ± 0.3	4.3±0.2	4.2 ± 0.1
Ca (mg/dL)	9.9±0.2	9.9 ± 0.3	10.0±0.2	10.0 ± 0.2
IP (mg/dL)	4.6±0.5	4.4 ± 0.6	4.8±0.6	5.1 ± 0.7
AST (IU/L)	88.4±22.5	89.9 ± 13.1	89.2±14.1	85.0 ± 15.4
ALT (IU/L)	59.3±16.4	59.5 ± 11.1	59.0±8.2	55.4 ± 8.8
ALP (IU/L)	379.3±47.7	385.1 ± 47.5	372.6±67.5	364.5 ± 78.2
γ-GTP (IU/L)	<3	<3	<3	<3

Values are means ± SDs.

*, **: significantly different from the 0 mg/kg BW group at p<0.05 and 0.01, respectively (Dunnett's test or Dunnett type rank-sum test).

Table 3 Body and organ weights data for F344 rats treated with 5-methyl-2-phenyl-2-hexenal for 13 weeks

		5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal (mg/kg BW)			
		0	8	24	70
No. of animals examined		10	10	10	10
Males					
Body weight	(g)	333.4 ± 11.1	332.9 ± 8.6	336.0 ± 11.7	336.3 ± 6.2
Brain	(g)	2.00 ± 0.03	1.98 ± 0.04	1.99 ± 0.05	2.01 ± 0.05
	(g/100gBW)	0.60 ± 0.02	0.60 ± 0.01	0.59 ± 0.02	0.60 ± 0.01
Thymus	(g)	0.16 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.01
	(g/100gBW)	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.00
Heart	(g)	0.90 ± 0.05	0.89 ± 0.04	0.88 ± 0.04	0.90 ± 0.04
	(g/100gBW)	0.27 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.27 ± 0.01
Lungs	(g)	1.02 ± 0.08	0.95 ± 0.06	1.02 ± 0.15	0.97 ± 0.07
	(g/100gBW)	0.31 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.30 ± 0.05	0.29 ± 0.02
Spleen	(g)	0.57 ± 0.03	0.56 ± 0.02 ^{a)}	0.58 ± 0.04	0.56 ± 0.02
	(g/100gBW)	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.01 ^{a)}	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.01
Liver	(g)	7.90 ± 0.75	7.72 ± 0.43	8.04 ± 0.63	8.12 ± 0.24
	(g/100gBW)	2.37 ± 0.15	2.32 ± 0.09	2.39 ± 0.12	2.41 ± 0.05
Kidneys	(g)	1.82 ± 0.11	1.82 ± 0.07	1.84 ± 0.10	1.87 ± 0.06
	(g/100gBW)	0.54 ± 0.02	0.55 ± 0.01	0.55 ± 0.02	0.56 ± 0.01
Adrenals	(mg)	39.2 ± 4.1	38.9 ± 3.4	37.8 ± 5.3	37.7 ± 4.8
	(mg/100gBW)	11.8 ± 1.4	11.7 ± 1.0	11.3 ± 1.6	11.2 ± 1.4
Testes	(g)	3.14 ± 0.09	3.17 ± 0.10	3.20 ± 0.08	3.25 ± 0.07*
	(g/100gBW)	0.94 ± 0.04	0.95 ± 0.02	0.95 ± 0.03	0.97 ± 0.02
Females					
Body weight	(g)	182.7 ± 4.4	180.1 ± 5.1	180.8 ± 5.2	181.5 ± 4.7
Brain	(g)	1.83 ± 0.02	1.81 ± 0.04	1.83 ± 0.04	1.81 ± 0.04
	(g/100gBW)	1.00 ± 0.02	1.01 ± 0.02	1.01 ± 0.03	1.00 ± 0.04
Thymus	(g)	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.03	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.01
	(g/100gBW)	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01
Heart	(g)	0.55 ± 0.03	0.55 ± 0.03	0.56 ± 0.03	0.56 ± 0.02
	(g/100gBW)	0.30 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.01
Lungs	(g)	0.67 ± 0.05	0.67 ± 0.05	0.67 ± 0.06	0.68 ± 0.04
	(g/100gBW)	0.37 ± 0.02	0.37 ± 0.03	0.37 ± 0.03	0.38 ± 0.02
Spleen	(g)	0.37 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.39 ± 0.01	0.38 ± 0.02
	(g/100gBW)	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01
Liver	(g)	3.81 ± 0.09	3.89 ± 0.40	3.81 ± 0.17	4.01 ± 0.15*
	(g/100gBW)	2.08 ± 0.04	2.16 ± 0.22	2.11 ± 0.05	2.21 ± 0.05**
Kidneys	(g)	1.08 ± 0.03	1.08 ± 0.04	1.09 ± 0.05	1.11 ± 0.02
	(g/100gBW)	0.59 ± 0.02	0.60 ± 0.02	0.60 ± 0.03	0.61 ± 0.02
Adrenals	(mg)	37.6 ± 5.2	41.6 ± 7.9	40.6 ± 4.5	40.0 ± 3.7
	(mg/100gBW)	20.6 ± 2.8	23.1 ± 4.4	22.5 ± 2.6	22.0 ± 2.2
Ovaries	(mg)	47.1 ± 4.6	44.3 ± 4.9	46.9 ± 3.6	45.8 ± 3.1
	(mg/100gBW)	25.8 ± 2.2	24.6 ± 2.5	26.0 ± 1.9	25.3 ± 1.8

^{a)} Number of effective animals was reduced to nine due to the failure of tissue sampling.

Values are means ± SDs.

*, **: significantly different from the 0 mg/kg BW group at p<0.05 and 0.01, respectively (Dunnett's test or Dunnett type rank-sum test).

Table 4 Histopathological findings in male F344 rats treated with 5-methyl-2-phenyl-2-hexenal for 13 weeks.

Organs	Findings		5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal (mg/kg BW)			
			0	8	24	70
<i>Males</i>		<i>No. of animal examined</i>	<i>10</i>	<i>10</i>	<i>10</i>	<i>10</i>
Harderian gl.	Inflammation, minimal		2			1
Heart	Focal myocardial degeneration / mononuclear cell infiltration		6			3
Lung	Alveolar macrophage accumulation, minimal		0			2
	Mineralization, artery		6			8
Liver	Microgranuloma, minimal		5	2	1	3
	Vacuolation, hepatocellular, centrilobular, slight		0	2	1	0
	Vacuolation, hepatocellular, periportal, moderate		0	0	0	0
	Focus of cellular alteration, basophilic		0	0	0	1
	Bile duct proliferation		1	0	0	1
Kidney	Tubular regeneration		6	6	6	9
	Mononuclear cell infiltration, cortex, minimal		0	1	0	1
	Mineralization		2	0	0	0
Glandular stomach	Erosion, minimal		0			2
Prostate	Inflammation, minimal		2			1
Nasal cavity	Eosinophilic globules		3			5

Table 5 Histopathological findings in female F344 rats treated with 2-ethylbutanal for 13 weeks.

Organs	Findings		5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal (mg/kg BW)			
			0	8	24	70
Females		<i>No. of animal examined</i>	<i>10</i>	<i>10</i>	<i>10</i>	<i>10</i>
Pituitary	Cyst		0			1
Harderian gl.	Inflammation, minimal		2			0
Lung	Alveolar macrophage accumulation, minimal		2			2
	Mineralization, artery		5			6
Liver	Microgranuloma, minimal		1	3	0	1
	Vacuolation, hepatocellular, centrilobular, slight		0	0	0	0
	Vacuolation, hepatocellular, periportal, moderate		0	1	0	0
Kidney	Mononuclear cell infiltration, cortex, minimal		1	1	0	0
	Mineralization		2	0	0	0
Nasal cavity	Eosinophilic globules		2			5
Skeletal muscle	Mononuclear cell infiltration, focal		0			1
Spinal cord	Squamous cyst		0			1

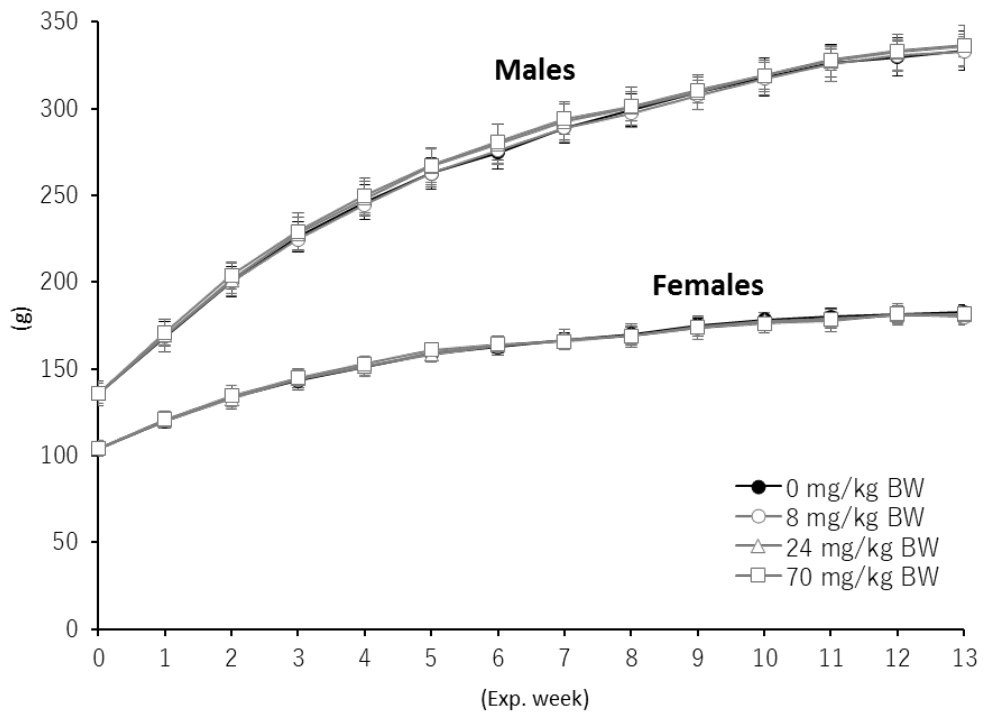


Fig. 1. Body weight curves for F344 rats treated with 5-methyl-2-phenyl-2-hexenal for 13 weeks

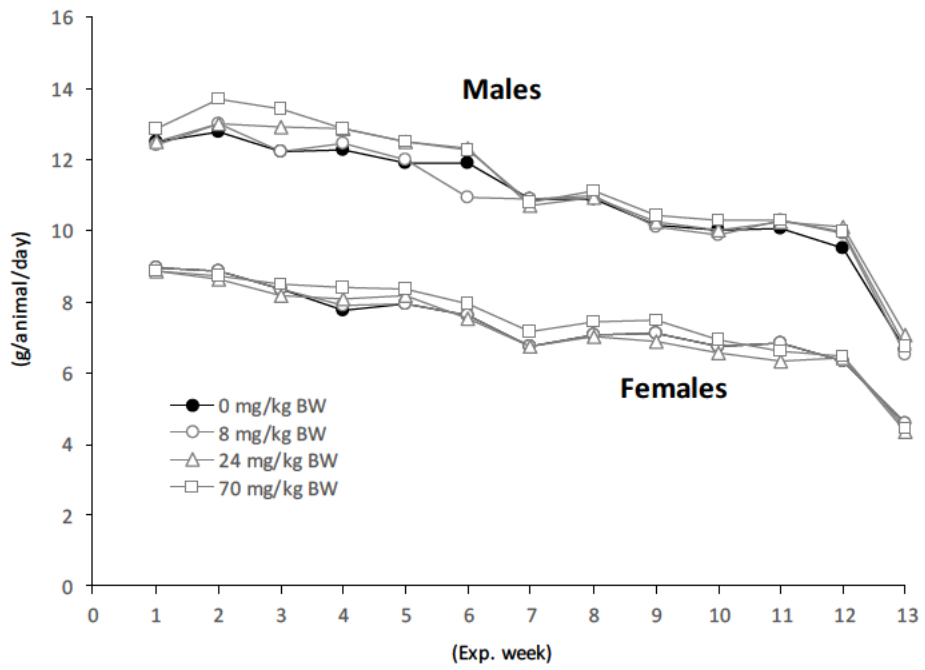


Fig. 2. Daily food intake for F344 rats treated with 5-methyl-2-phenyl-2-hexenal for 13 weeks