

令和3年度 既存添加物の安全性に関する試験

ラットを用いたオリゴガラクトン酸の90日間反復経口投与毒性試験

(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



## 【概要】

既存添加物として指定されているオリゴガラクトン酸の安全性評価のため、ラットを用いた 90 日間反復経口投与毒性試験を実施した。

6 週齢の雌雄 Crl:CD(SD)ラットにオリゴガラクトン酸を 0、100、300、1000 mg/kg 体重/日の用量で 91 日間強制経口投与し、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、尿検査、血液学的検査、血清生化学検査、器官重量測定、肉眼病理学および病理組織学的検査を実施した。

その結果、いずれの検査項目においても被験物質投与による毒性影響は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下におけるオリゴガラクトン酸の無毒性量は、雌雄ともに 1000 mg/kg 体重/日以上と判断された。

## 1. 試験概要

### 1.1 試験表題

令和3年度 既存添加物の安全性に関する試験 ラットを用いたオリゴガラクチュロン酸の90日間反復経口投与毒性試験

### 1.2 試験番号



### 1.3 試験目的

オリゴガラクチュロン酸をラットに91日間強制経口投与し、反復投与による毒性を明らかにすることを目的とした。

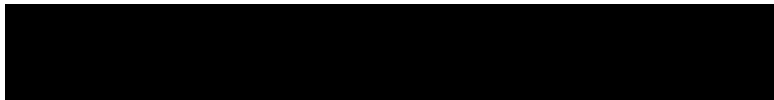
### 1.4 ガイドライン

「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」（平成8年3月22日 衛化第29号：厚生省生活衛生局通知）に可能な限り準じて実施した。

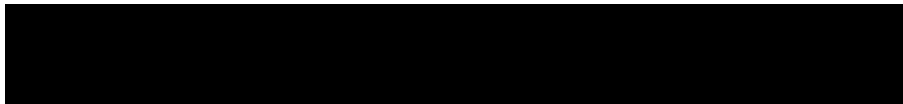
### 1.5 動物愛護

本施設は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基本指針」（厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知 平成27年2月20日 科発0220第1号）に適合した施設であると認定されている。本試験は国立医薬品食品衛生研究所「動物実験等の適正な実施に関する規程」に従って計画し、同所の動物実験委員会による審査・承認を経て実施した。

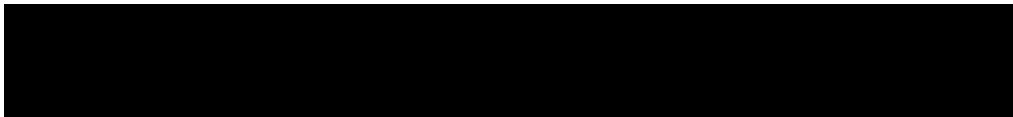
### 1.6 試験実施施設




### 1.7 試験管理責任者



### 1.8 試験責任者



### 1.9 試験主担当者



## 2 被験物質

名称	: オリゴガラクトン酸 (品名: <span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span> )
供給源	: <span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span>
CAS No.	: なし
性状	: 黄褐色液体、特有のにおいを有する。
ロット番号	: <span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span>
含量	: 100%
保管条件	: 冷凍 (-18℃以下) にて保管。解凍後は、冷蔵で密栓して保管し、4 か月以内に使用した。
取り扱い上の注意	: 使用時には手袋、マスク及び保護メガネ等の適切な保護具を着用し、肌及び目への接触を避けた。

## 3 媒体

名称	: 蒸留水
製造元	: 株式会社大塚製薬工場
ロット番号	: <span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span>
保管条件	: 室温。ただし、投与液として分注した後は冷暗所 (冷蔵庫) に密栓して保存。

## 4 試験系

### 4.1 動物

動物種	: ラット
系統	: CrI:CD (SD) (SPF 動物)
性	: 雌雄
入荷時週齢	: 5 週齢
投与開始時週齢	: 6 週齢
購入 (使用) 匹数	: 雌雄各 42 匹 (40 匹)
供給源	: 日本チャールス・リバー株式会社
所在地	: 〒243-0214 神奈川県厚木市下古沢 795
検疫・馴化期間	: 7 日間
群分け後の余剰動物の処置	: 余剰動物は試験系から除外した。

### 4.2 試験系選択理由

「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」に基づいて齧歯類の1つとしてラットを選択した。本系統は、微生物学的に統御され、遺伝的に安定であることから決定した。

### 4.3 飼育条件

適切な生物学的防御がなされた環境の部屋で動物を飼育した。

飼育室	:	<span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span>
温度	:	23±1°C
相対湿度	:	50±5%
照明時間	:	12 時間/日 (7:00~19:00)
換気回数	:	20 回/時間
飼育匹数	:	2 匹/ケージ
ケージ交換頻度	:	2 回以上/週
給水瓶交換頻度	:	2 回以上/週

#### 4.4 収容ケージ及び床敷

ケージ	:	プラスチック製ケージ (W258×D418×H186 mm)
ケージ蓋	:	ステンレス製
床敷	:	ソフトチップ (三協ラボサービス株式会社)

#### 4.5 飼料及び給餌方法

飼料	:	オリエンタル酵母工業株式会社製固型飼料 (CRF-1)
給餌方法	:	ケージ蓋に取り付けられている給餌器に入れて、自由摂取

#### 4.6 飲料水及び給水方法

飲料水	:	調製水
給水方法	:	透明な給水瓶を用いて自由摂取

#### 4.7 群分け方法

群分け方法	:	群分け実施日の体重に基づき無作為に実施
群分け実施日	:	実験開始前日

#### 4.8 個体識別法

ケージラベルに試験番号、性別、群名、ケージ番号、被験物質名及び投与濃度、動物番号、試験開始日、剖検日、試験主担当者名を明記する。動物の個体識別は、上記内容とピクリン酸による背部皮膚へのマーキング、および油性インクによる尾部へのマーキングを用いて行った。

### 5 試験方法

#### 5.1 投与期間及び投与方法

被験物質の投与は、毎日1回(週7日)、投与期間は91日とした。被験物質投与液はディスポーザブルシリンジ及びプラスチック製ディスポーザブル経口ゾンデを用いて5 mL/kgの容量で強制経口投与を行った。対照群には同様の方法で媒体を投与した。投与容量は直近の体重に基づいて個体別に算出した。投与容量がシリンジの目盛りの最大容量を超えないよう、適切な容量のシリンジを選択した。実際の投与容量の小数点以下の有効数字は、使用するシリンジの最小目盛りを下回らないように設定した。被験物質の投与は原則として午前中に実施した。

## 5.2 投与量及び群構成

被験物質の投与量及び投与濃度並びに1群当たりの匹数及び動物番号は、下表の通りである。

性別	投与量 (mg/kg 体重/日)	投与濃度 (mg/mL)	匹数	動物番号
雄	0	0	10	101~110
	100	20	10	111~120
	300	60	10	121~130
	1000	200	10	131~140
雌	0	0	10	201~210
	100	20	10	211~220
	300	60	10	221~230
	1000	200	10	231~240

## 5.3 被験物質投与量の設定期理由

28日間用量設定試験<sup>1)</sup>において、最高用量(1000 mg/kg 体重/日)群の雄に軽度の体重増加抑制及び血清中塩素の増加が、雌にヘマトクリット値の低下が認められたことから、本試験における被験物質の投与量は、最高用量を限度用量の1000 mg/kg 体重/日とし、以下公比約3で除した300 mg/kg 体重/日及び100 mg/kg 体重/日に設定した。

## 5.4 投与経路及び投与方法の選択理由

投与経路は、ヒトが被験物質に曝露される可能性の最も大きい経路である経口投与とした。飼料及び飲水中の被験物質の安定性に関する情報が不足していることから、強制経口投与を選択した。

## 5.5 被験物質投与液の調製方法及び調製頻度

被験物質を電子天秤に乗せたバイアル瓶またはビーカーに秤量し、媒体である蒸留水で共洗いをしながらメスシリンダーに移した。規定量にメスアップし、攪拌して最高用量の1000 mg/kg 体重/日群用(200 mg/mL)溶液を調製した。さらに同溶液を媒体によって希釈し、300および100 mg/kg 体重/日群用(60及び20 mg/mL)溶液を段階的に調製した。秤量時、電子天秤は水平に保った。攪拌時は調製液を泡立たせないように注意した。安定性試験の実施が困難であるため、用時調製とした。

## 5.6 観察及び測定項目

投与開始日を投与1日(Day 1)と起算し、投与1~7日を投与1週、剖検日は投与91日の翌日(Day 92)とした。

### 5.6.1 一般状態

被験物質投与期間中に1日2回(投与前及び投与後)以上、全ての動物について一般状態、生死などについて観察し、個体別に記録した。

### 5.6.2 体重

投与 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85 及び 91 日の投与前に測定した。また、剖検日に各動物の 1 晩（約 16 時間）絶食後の体重（剖検日体重）を測定した。各時点において全ての動物を電子天秤に乗せ、個体別に体重を測定した。測定時、電子天秤は水平に保った。

### 5.6.3 摂餌量

給餌量を投与 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 及び 85 日に、残餌量を投与 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85 及び 91 日に測定した。各時点において各ケージの給餌量及び残餌量を電子天秤にて測定し、1 匹あたりの 1 日平均摂餌量を算出した。測定時、電子天秤は水平に保った。

### 5.6.4 尿検査

投与第 13 週に、雌雄各群 5 匹（動物番号順）について以下の検査を実施した。

動物は検査当日、投与後に採尿ラックに移し蓄尿を開始した。蓄尿中は採尿ラック用の給水瓶及び給餌器を用いて 4.5 項及び 4.6 項に記載の飼料及び飲料水を自由摂取させた。約 4 時間の蓄尿後、尿サンプル（新鮮尿）を回収し、下記項目の試験紙法による検査を実施した。試験紙の判定には半自動尿分析装置オーションイレブン AE-4021（アークレイ株式会社）を用いた。

検査項目：潜血、pH、ケトン体、尿糖、蛋白、ウロビリノーゲン、ビリルビン

### 5.6.5 血液学的検査

被験物質投与期間終了時の全生存動物について検査を実施した。検査試料（血液）の採取は、採取前日の夕方から絶食（給水は継続）させた動物を、当日にイソフルラン麻酔下で開腹し、腹部大動脈から行った。動物の採血（屠殺）順は、群ごとに絶食時間が偏らないよう留意した。

採取した血液の一部を抗凝固剤（EDTA-2K）入りの試験管（ベノジェクト II 真空採血管、テルモ株式会社）に移し、下記の項目について自動血球計算装置 IDEXX プロサイト Dx（アイデック スラボラトリーズ株式会社）を用いて測定した。

検査項目：赤血球数（RBC）、ヘモグロビン濃度（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）、白血球数（WBC）、網状赤血球数（RET）、白血球分画（好中球；Neutrophil、好酸球；Eosinophil、好塩基球；Basophil、単球；Monocyte、リンパ球；Lymphocyte）

### 5.6.6 血清生化学検査

被験物質投与期間終了時の全生存動物について検査を実施した。前項で採取した血液の残りを血清分離剤（ポリエステルゲル）及び凝固促進用シリカ微粒子入りの試験管（BD バキュティナ採血管、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）に分注し、遠心分離して血清を得た。血清は-20℃以下で保存した。測定はオリエンタル酵母工業株式会社に委託して実施した。測定項目は以下の通りである。

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）、 $\gamma$ -グルタミル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（CRE）、ブドウ糖（GLU）、総コレステロール（T-CHO）、

トリグリセリド (TG)、総蛋白 (TP)、アルブミン (ALB)、A/G 比 (A/G)、無機リン (IP)、カルシウム (Ca)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、塩素 (Cl)

### 5.6.7 病理学的検査

投与期間終了時に、第 5.6.5 項において採血し、放血致死させた動物について、下記の病理学的検査を行った。

#### 5.6.7.1 肉眼的病理学検査

全生存動物について、全身の諸器官・組織の肉眼的病理学検査を実施し、下記の器官・組織を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液にて保存した。固定液に浸した臓器は振盪器にて一晚以上振盪した後、可能な限り速やかに切り出しを行った。ただし、眼球はダビッドソン固定液にて固定・保存し、3～5 日以内に切り出しを実施し、残臓器は 10%中性緩衝ホルマリン液に保存した。また、精巣は改変ダビッドソン固定液にて固定し、翌日～3 日以内に切り出しを実施、切り出し後の残臓器は 10%中性緩衝ホルマリン液に保存した。鼻腔を含む頭蓋、胸骨、大腿骨及び脊椎（頸部、胸部及び腰部横断）は、10%ギ酸及び 10%中性緩衝ホルマリン混合液で脱灰処理を行った。

心臓、脾臓、リンパ節（頸部、縦隔、腸間膜）、胸腺、下垂体、甲状腺（上皮小体を含む）、副腎、頭蓋（鼻腔を含む）、気管、肺（気管支を含む）、舌、唾液腺（顎下腺、舌下腺）、食道、胃（前胃、腺胃）、小腸（十二指腸、空腸、回腸）、大腸（盲腸、結腸、直腸）、肝臓、脾臓、腎臓、膀胱、精巣、精巣上部、前立腺、精囊、卵巣、卵管、子宮、乳腺、膣、脳（大脳、小脳）、脊髄（頸部、胸部及び腰部）、三叉神経、坐骨神経、大動脈（胸部）、眼球、ハーダー腺、皮膚、胸骨及び大腿骨（骨髄を含む）、大腿部骨格筋、ジンバル腺、その他肉眼病変部

#### 5.6.7.2 器官重量

全生存動物について、下記の器官の重量について電子天秤を用いて測定し、剖検日体重を用いて器官重量体重比を算出した。測定時、電子天秤は水平に保った。腎臓、副腎、精巣、及び卵巣は左右別に測定した。

脳、下垂体\*、心臓、肺（気管支を含む）\*\*、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、前立腺\*、精囊\*、卵巣（卵管を含まない）、唾液腺（顎下腺及び舌下腺）\*、胸腺、甲状腺（上皮小体を含む）\*。

\*：固定後測定した。\*\*：測定後 10%中性緩衝ホルマリン液を注入した。

#### 5.6.7.3 病理組織学的検査

雌雄の対照群及び最高用量群の全てについては、採取した器官・組織（5.6.7.1 項参照）について常法に従い、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色標本を作製し、鏡検した。その他の群については、採材した器官・組織について同様にパラフィン包埋まで実施した。

### 5.7 統計処理

試験期間中の体重、摂餌量、血液学的・血清生化学的検査結果及び器官重量については各群の分散を Bartlett の方法で検定し、対照群と各被験物質投与群との間で Dunnett 等の方法による多重

比較検定を行った。病理所見については、発生頻度を Fisher の正確確率検定、グレーディングを Mann-Whitney の U 検定により有意差検定を行った。 $P < 0.05$  の場合を統計学的に有意と判定した。

## 6 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および試験計画書に従わなかったこと

- 1) 投与 4 週目に雄の 1000 mg/kg 体重/日群の 1 ケージにおいて、給餌器が外れたことによる一時的な逸出および餌こぼしがみられた。摂餌量測定に影響を及ぼす事象と判断し、当該ケージの 4 週目の摂餌量値は不採用として残りのケージにて試験結果の集計を行った。なお、残りの 4 ケージにおける摂餌量は、対照群との間に差はみられなかった。
- 2) 投与 6 週目に雄の 300 mg/kg 体重/日群の 1 例 (No.124) の両頬に創傷が確認された。同居個体との闘争によるものと考えられたため、当該ケージの 2 匹を個別飼育に変更した。変更後、創傷は自然治癒した。変更後の 2 例の一般状態、体重および摂餌量に異常は認められなかったため、試験結果に影響はないと判断した。
- 3) 第 5.6.4 項の尿検査において、試験計画書に使用機器が記載されていなかった。半自動尿分析装置オーションイレブン AE-4021 (アークレイ株式会社) を用いて試験紙の判定を行ったが、試験結果に影響はないと判断した。
- 4) 第 5.6.4 項の尿検査において、雌雄各群動物番号順に 5 匹を用いて実施することとしていたが、雄の 1000 mg/kg 体重/日群の 1 例 (No.133) について採尿量が不十分で検査ができなかったため、同群の別の 1 例 (No.136) で採尿、検査を行った。当該群の尿検査は 5 例で実施されたため、試験結果には影響しないと判断した。
- 5) 第 5.6.5 項の血液学的検査において、雄の 1000 mg/kg 体重/日群の 1 例 (No.133) について採取した血液に血餅が確認された。また、血液凝固の影響と考えられる PLT 値の減少が認められたため、当該動物の結果は血液学的検査の統計学的検定に含めなかった。残りの例数で評価は可能であると判断し、試験結果の集計を行った。
- 6) 第 5.6.7.2 項の器官重量測定において、雌の 300 mg/kg 体重/日群の 1 例の肺について、重量測定前にホルマリン注入固定を行ったため、肺の重量測定を行えなかった。残りの例数で評価は可能であると判断し、試験結果の集計を行った。
- 7) 第 5.6.7.1 項の肉眼的病理学検査に関して、切り出し時に雄の 300 mg/kg 体重/日群の 1 例の大腿骨および雌の 100 mg/kg 体重/日群の 1 例の片側眼球の紛失が確認された。当該動物の肉眼的病理学検査で異常は認められず、また低及び中用量群であり病理組織学的検査は行わなかったため、試験結果には影響しないと判断した。
- 8) 第 5.6.7.3 項の病理組織学的検査における欠失臓器を Appendix 1 に示す。標本作製過程における臓器の欠失により病理組織学的検査を実施できなかったが、いずれも残りの例数で評価は可能であると判断し、試験結果の集計を行った。

## 7 試験結果

### 7.1 生存率及び一般状態

試験期間中、雌雄すべての群において死亡はみられず、一般状態観察においても雌雄の投与群において被験物質投与に関連する変化は観察されなかった。

### 7.2 体重

体重測定の結果を Figure 1 に示す。試験期間中、雌雄ともに被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

### 7.3 摂餌量

平均摂餌量の推移を Figure 2 に示す。試験期間中、雌雄ともに被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

### 7.4 尿検査

尿検査結果を Table 1 に示す。

雄の 1000 mg/kg 体重/日投与群の 2 例、雌の 1000 mg/kg 体重/日投与群の 1 例で、ケトン体(1+)が認められた。他の検査項目において、被験物質投与群において対照群と比較して明らかな異常は認められなかった。

なお、雄の対照群に 1 例、潜血（±：溶血）が認められた。

### 7.5 血液学的検査

血液学的検査結果を Table 2 に示す。雌雄ともに被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

### 7.6 血清生化学検査

血清生化学検査結果を Table 3 に示す。雌雄ともに被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

### 7.7 病理学的検査

#### 7.7.1 器官重量

剖検時の最終体重及び器官重量を Table 4 に示す。雄の 300 mg/kg 体重/日投与群（中用量群）に脾臓絶対重量の有意な低下が、100 mg/kg 体重/日投与群（低用量群）に前立腺の絶対・相対重量の有意な低下が認められた。いずれも用量との関連が認められなかったため、被験物質投与による影響ではないと判断した。

#### 7.7.2 病理組織学的検査

剖検時に実施した肉眼的検査において、雌雄ともに被験物質投与に関連する変化は認められなかった。

病理組織学的検索結果を Table 5 に示す。自然発生性変化が対照群及び 1000 mg/kg 体重/日投与群で散見されたものの、被験物質投与の影響はみられなかった。

## 8 考察及び結論

一般状態観察、体重、摂餌量、血液学的検査、血清生化学検査、器官重量および病理組織学的検査において、被験物質投与による影響はみられなかった。

尿検査において、1000 mg/kg 体重/日投与群の雄 2 例および雌 1 例で、ケトン体の増加 (1+) がみられた。血清生化学検査及び病理組織学的検査において肝臓および腎臓機能障害に関連する異常が認められなかったため、毒性学的意義は乏しいと判断された。以上より、雌雄の CrI:CD(SD) ラットに 100、300 および 1000 mg/kg 体重/日の用量でオリゴガラクチュロン酸を 91 日間反復経口投与した結果、全ての検査項目で被験物質投与による明らかな毒性変化は認められなかった。したがって、本試験条件下におけるオリゴガラクチュロン酸の無毒性量は、雌雄ともに 1000 mg/kg 体重/日以上と判断された。

## 9 参考文献

1. 令和 2 年度 既存添加物の安全性に関する試験 ラットを用いたオリゴガラクチュロン酸の 90 日間反復経口投与毒性試験のための 28 日間用量設定試験 (国立医薬品食品衛生研究所 ■■■■、試験番号：■■■■)

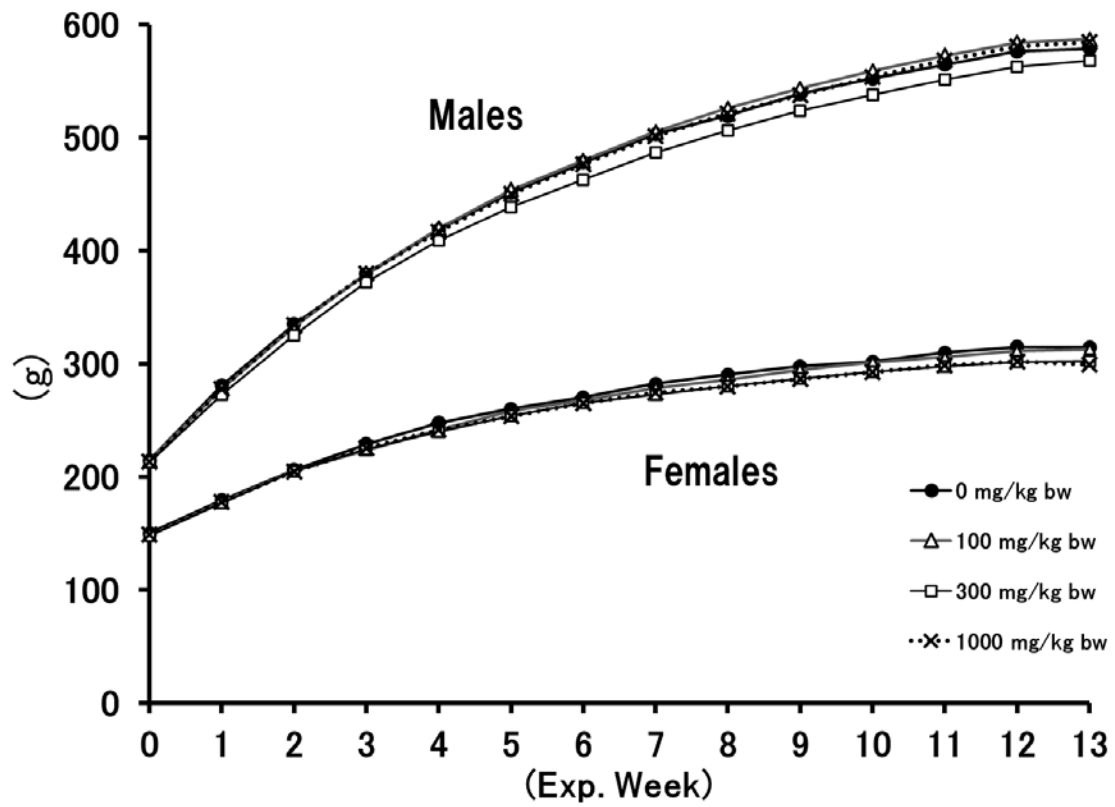


Figure 1. Body weight curves for male and female SD rats treated with oligogalacturonic acid for 13 weeks.

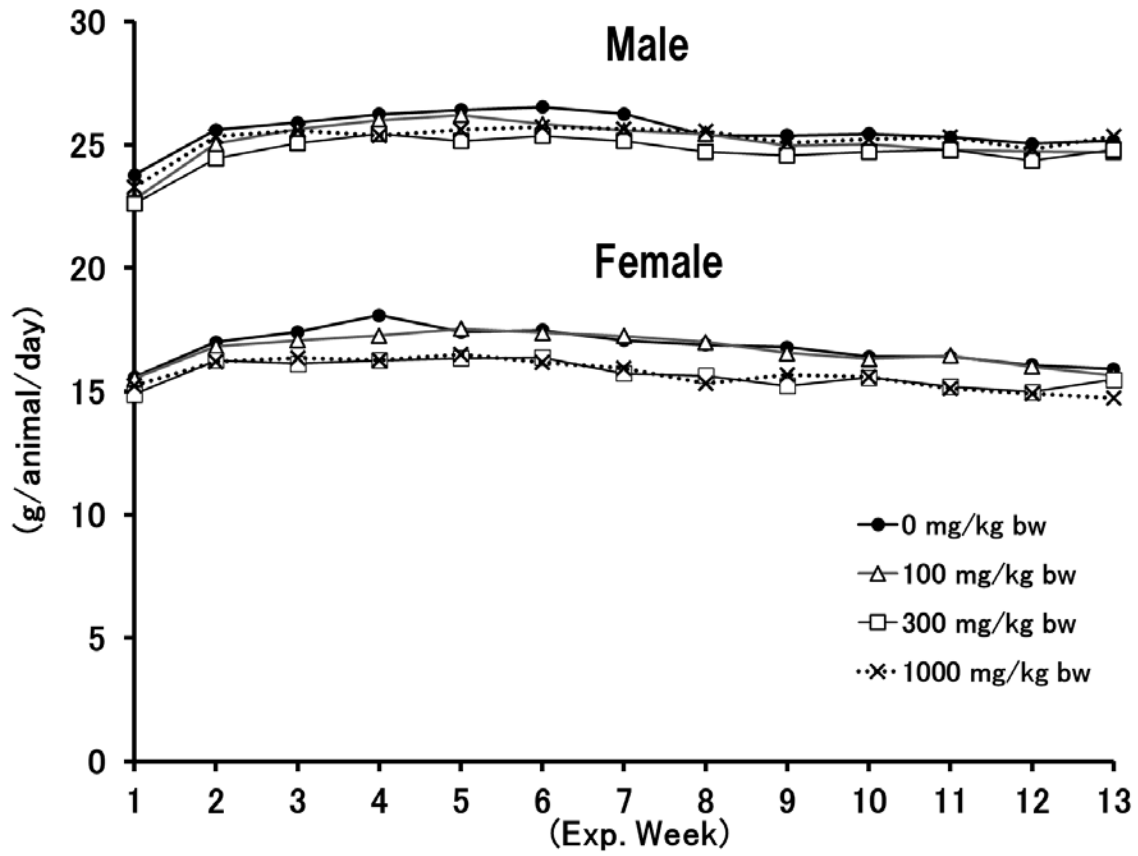


Figure 2. Daily food intake for male and female SD rats treated with oligogalacturonic acid for 13 weeks.

**Table 1. Urinalysis data for SD rats treated with oligogalacturonic acid at weeks 13.**

Dose	Oligogalacturonic acid (mg/kg bw/day)			
	0	100	300	1000
No. of animals examined	5	5	5	5
<b>Males</b>				
Protein	-	0	0	0
	±	1	2	0
	1+	3	3	4
	2+	1	0	1
Glucose	-	5	5	5
	±	0	0	0
	1+	0	0	0
	2+	0	0	0
Occult blood	-	4	5	5
	±(溶血)	1	0	0
	1+	0	0	0
	2+	0	0	0
	1+(非溶血)	0	0	0
Ketone body	-	5	5	2
	±	0	0	3
	1+	0	0	0
Urobilinogen	NORMAL	5	5	5
	1+	0	0	0
	2+	0	0	0
Bilirubin	-	5	5	5
	1+	0	0	0
	2+	0	0	0
pH	6.5	0	0	0
	7.0	2	0	0
	7.5	0	0	0
	8.0	2	4	4
	8.5	1	1	1
<hr/>				
<b>Females</b>				
Protein	-	3	0	2
	±	2	3	1
	1+	0	1	2
	2+	0	1	0
Glucose	-	5	4	5
	±	0	1	0
	1+	0	0	0
	2+	0	0	0
Occult blood	-	5	5	5
	±(溶血)	0	0	0
	1+	0	0	0
	2+	0	0	0
	1+(非溶血)	0	0	0
Ketone body	-	5	4	5
	±	0	1	0
	1+	0	0	0
Urobilinogen	NORMAL	5	4	5
	1+	0	1	0
	2+	0	0	0
Bilirubin	-	5	4	5
	1+	0	1	0
	2+	0	0	0
pH	6.5	0	0	0
	7.0	0	1	2
	7.5	1	1	2
	8.0	3	3	1
	8.5	1	0	0

**Table 2. Hematology data for SD rats treated with oligogalacturonic acid for 13 weeks.**

Dose (mg/kg bw/day)		0	100	300	1000
No. of animals examined		10	10	10	9 <sup>a</sup>
<b>Males</b>					
WBC	( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	5.92 $\pm$ 1.70	6.36 $\pm$ 1.63	6.19 $\pm$ 1.09	6.01 $\pm$ 1.83
RBC	( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	8.6 $\pm$ 0.3	8.7 $\pm$ 0.2	8.7 $\pm$ 0.4	8.7 $\pm$ 0.4
HGB	(g/dL)	14.8 $\pm$ 0.6	15.2 $\pm$ 0.4	14.9 $\pm$ 0.4	15.0 $\pm$ 0.4
HCT	(%)	43.5 $\pm$ 2.1	44.7 $\pm$ 1.7	44.1 $\pm$ 1.2	44.4 $\pm$ 1.3
MCV	(fL)	50.4 $\pm$ 1.8	51.1 $\pm$ 1.3	50.5 $\pm$ 2.1	51.0 $\pm$ 1.5
MCH	(pg)	17.1 $\pm$ 0.5	17.4 $\pm$ 0.3	17.1 $\pm$ 0.6	17.2 $\pm$ 0.4
MCHC	(g/dL)	34.0 $\pm$ 0.7	34.0 $\pm$ 0.5	33.9 $\pm$ 0.4	33.8 $\pm$ 0.4
PLT	( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	1038.2 $\pm$ 145.6	1009.3 $\pm$ 66.1	1035.6 $\pm$ 118.4	1041.1 $\pm$ 86.3
RET	(%)	2.3 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 0.5	2.2 $\pm$ 0.2
	( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	199.9 $\pm$ 19.3	192.0 $\pm$ 27.2	219.3 $\pm$ 39.0	195.6 $\pm$ 16.5
Differential leukocyte counts					
Neutrophil	(%)	19.3 $\pm$ 4.9	18.0 $\pm$ 5.0	20.0 $\pm$ 6.6	18.4 $\pm$ 5.8
	( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	1.13 $\pm$ 0.40	1.11 $\pm$ 0.30	1.21 $\pm$ 0.31	1.06 $\pm$ 0.34
Eosinophil	(%)	2.1 $\pm$ 1.2	2.0 $\pm$ 0.5	1.9 $\pm$ 0.5	1.9 $\pm$ 0.4
	( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0.13 $\pm$ 0.10	0.12 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.04	0.11 $\pm$ 0.03
Basophil	(%)	0.3 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.1
	( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0.02 $\pm$ 0.02	0.02 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01
Lymphocyte	(%)	73.7 $\pm$ 4.6	74.4 $\pm$ 4.8	73.5 $\pm$ 6.2	75.1 $\pm$ 5.6
	( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	4.37 $\pm$ 1.34	4.77 $\pm$ 1.40	4.59 $\pm$ 1.12	4.58 $\pm$ 1.64
Monocyte	(%)	4.6 $\pm$ 1.4	5.2 $\pm$ 2.0	4.4 $\pm$ 2.0	4.3 $\pm$ 2.5
	( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0.28 $\pm$ 0.13	0.34 $\pm$ 0.16	0.26 $\pm$ 0.10	0.25 $\pm$ 0.14
<b>Females</b>					
WBC	( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	3.87 $\pm$ 1.17	3.38 $\pm$ 1.05	3.72 $\pm$ 0.67	4.33 $\pm$ 1.17
RBC	( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	8.1 $\pm$ 0.4	7.9 $\pm$ 0.3	8.2 $\pm$ 0.3	8.1 $\pm$ 0.2
HGB	(g/dL)	14.9 $\pm$ 0.5	14.8 $\pm$ 0.6	14.8 $\pm$ 0.4	14.7 $\pm$ 0.4
HCT	(%)	43.3 $\pm$ 2.0	43.1 $\pm$ 1.8	43.3 $\pm$ 1.2	42.7 $\pm$ 1.3
MCV	(fL)	53.8 $\pm$ 1.2	54.6 $\pm$ 1.4	52.9 $\pm$ 1.8	53.0 $\pm$ 1.4
MCH	(pg)	18.5 $\pm$ 0.5	18.7 $\pm$ 0.4	18.1 $\pm$ 0.5	18.2 $\pm$ 0.5
MCHC	(g/dL)	34.4 $\pm$ 0.5	34.3 $\pm$ 0.4	34.2 $\pm$ 0.6	34.3 $\pm$ 0.3
PLT	( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	1003.1 $\pm$ 78.1	977.8 $\pm$ 70.9	1053.0 $\pm$ 161.2	1025.6 $\pm$ 113.1
RET	(%)	2.2 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 0.6	2.1 $\pm$ 0.4	2.1 $\pm$ 0.3
	( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	176.4 $\pm$ 22.5	187.2 $\pm$ 41.4	172.7 $\pm$ 28.4	166.2 $\pm$ 27.1
Differential leukocyte counts					
Neutrophil	(%)	14.0 $\pm$ 5.8	15.5 $\pm$ 4.7	12.6 $\pm$ 3.2	16.4 $\pm$ 12.1
	( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0.52 $\pm$ 0.20	0.52 $\pm$ 0.23	0.46 $\pm$ 0.10	0.70 $\pm$ 0.55
Eosinophil	(%)	2.1 $\pm$ 0.8	1.8 $\pm$ 0.6	2.0 $\pm$ 1.0	1.4 $\pm$ 0.4
	( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0.08 $\pm$ 0.04	0.06 $\pm$ 0.03	0.07 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0.03
Basophil	(%)	0.6 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.5	0.4 $\pm$ 0.2
	( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0.02 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01
Lymphocyte	(%)	78.8 $\pm$ 7.0	78.3 $\pm$ 4.7	81.4 $\pm$ 3.1	78.3 $\pm$ 11.5
	( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	3.08 $\pm$ 1.12	2.66 $\pm$ 0.87	3.04 $\pm$ 0.65	3.41 $\pm$ 1.14
Monocyte	(%)	4.4 $\pm$ 1.9	3.9 $\pm$ 0.9	3.6 $\pm$ 1.2	3.5 $\pm$ 1.8
	( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0.16 $\pm$ 0.06	0.13 $\pm$ 0.05	0.13 $\pm$ 0.05	0.15 $\pm$ 0.09

Values are means  $\pm$  SDs.<sup>a</sup> :Number of effective animals was reduced to nine due to the failure of blood sampling.

**Table 3. Serum biochemistry data for SD rats treated with oligogalacturonic acid for 13 weeks.**

Dose (mg/kg bw/day)		0	100	300	1000
No. of animals examined		10	10	10	10
<b>Males</b>					
TP	(g/dL)	6.15 ± 0.21	6.25 ± 0.28	6.21 ± 0.22	6.18 ± 0.23
A/G		2.08 ± 0.25	2.05 ± 0.20	1.96 ± 0.25	2.00 ± 0.11
ALB	(g/dL)	4.13 ± 0.19	4.18 ± 0.12	4.09 ± 0.11	4.10 ± 0.15
T-BIL	(mg/dL)	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01
GLU	(mg/dL)	123.0 ± 17.1	119.1 ± 13.5	128.1 ± 19.2	122.1 ± 13.3
TG	(mg/dL)	67.2 ± 26.8	58.4 ± 14.1	66.7 ± 36.3	56.2 ± 21.4
T-CHO	(mg/dL)	63.0 ± 14.4	61.0 ± 11.9	69.6 ± 19.6	62.1 ± 13.1
BUN	(mg/dL)	16.4 ± 1.5	15.1 ± 1.3	15.3 ± 1.5	15.8 ± 1.6
CRE	(mg/dL)	0.34 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.33 ± 0.04	0.32 ± 0.03
Na	(mEQ/L)	141.8 ± 1.5	141.3 ± 2.1	141.1 ± 2.3	141.7 ± 1.7
Cl	(mEQ/L)	102.4 ± 2.3	101.2 ± 1.8	101.2 ± 2.0	101.6 ± 2.0
K	(mEQ/L)	4.42 ± 0.17	4.53 ± 0.20	4.51 ± 0.25	4.59 ± 0.28
Ca	(mg/dL)	9.86 ± 0.32	9.97 ± 0.32	9.93 ± 0.37	10.10 ± 0.33
IP	(mg/dL)	5.75 ± 0.58	5.76 ± 0.53	6.02 ± 0.68	6.14 ± 0.49
AST	(IU/L)	106.6 ± 19.2	95.6 ± 17.0	94.7 ± 21.8	101.2 ± 17.9
ALT	(IU/L)	33.0 ± 5.8	31.0 ± 5.7	30.7 ± 7.4	31.3 ± 6.1
ALP	(IU/L)	296.2 ± 81.8	262.2 ± 59.9	259.4 ± 66.9	271.5 ± 58.8
γ-GTP	(IU/L)	<3	<3	<3	<3
<b>Females</b>					
TP	(g/dL)	6.78 ± 0.36	7.00 ± 0.49	7.01 ± 0.35	6.96 ± 0.34
A/G		2.76 ± 0.47	3.03 ± 0.53	2.96 ± 0.40	3.16 ± 0.66
ALB	(g/dL)	4.96 ± 0.39	5.25 ± 0.55	5.23 ± 0.41	5.25 ± 0.38
T-BIL	(mg/dL)	0.09 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.09 ± 0.03
GLU	(mg/dL)	106.0 ± 17.0	106.6 ± 21.4	105.6 ± 16.7	109.9 ± 18.3
TG	(mg/dL)	66.1 ± 46.6	52.1 ± 37.7	32.9 ± 14.9	39.8 ± 19.2
T-CHO	(mg/dL)	78.1 ± 13.3	73.9 ± 20.6	69.3 ± 12.1	79.9 ± 17.9
BUN	(mg/dL)	14.9 ± 1.7	14.6 ± 1.8	15.7 ± 1.7	15.3 ± 1.6
CRE	(mg/dL)	0.37 ± 0.03	0.36 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.40 ± 0.03
Na	(mEQ/L)	141.5 ± 1.1	141.4 ± 1.5	141.6 ± 1.2	142.4 ± 1.1
Cl	(mEQ/L)	103.2 ± 1.4	102.9 ± 1.8	103.6 ± 1.4	103.6 ± 1.4
K	(mEQ/L)	4.12 ± 0.28	4.19 ± 0.20	4.28 ± 0.26	4.05 ± 0.20
Ca	(mg/dL)	10.29 ± 0.23	10.48 ± 0.35	10.44 ± 0.36	10.41 ± 0.30
IP	(mg/dL)	5.61 ± 0.53	5.15 ± 0.88	5.81 ± 0.62	5.61 ± 0.66
AST	(IU/L)	98.9 ± 18.4	100.1 ± 28.1	98.6 ± 14.9	112.5 ± 42.8
ALT	(IU/L)	26.0 ± 7.1	28.7 ± 14.5	25.0 ± 5.9	33.4 ± 25.3
ALP	(IU/L)	146.9 ± 37.9	120.3 ± 28.8	142.4 ± 29.4	133.3 ± 41.9
γ-GTP	(IU/L)	<3	<3	<3	<3

Values are means ± SDs.

**Table 4. Body and organ weights data for SD rats treated with oligogalacturonic acid for 13 weeks.**

Dose (mg/kg bw/day)		0	100	300	1000
No. of animals examined		10	10	10	10
<b>Males</b>					
Body weight	(g)	560.2 ± 56.5	569.8 ± 31.0	550.0 ± 32.6	565.3 ± 39.1
Brain	(g)	2.10 ± 0.15	2.20 ± 0.11	2.17 ± 0.07	2.18 ± 0.09
	(g/100gBW)	0.38 ± 0.04	0.39 ± 0.02	0.39 ± 0.02	0.39 ± 0.02
Thymus	(g)	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.06	0.30 ± 0.09	0.28 ± 0.10
	(g/100gBW)	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.02
Heart	(g)	1.62 ± 0.19	1.56 ± 0.10	1.52 ± 0.10	1.62 ± 0.18
	(g/100gBW)	0.29 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.02
Lungs	(g)	1.43 ± 0.14	1.45 ± 0.12	1.43 ± 0.07	1.45 ± 0.13
	(g/100gBW)	0.26 ± 0.03	0.26 ± 0.03	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.02
Spleen	(g)	0.87 ± 0.16	0.81 ± 0.11	0.75 ± 0.10*	0.80 ± 0.09
	(g/100gBW)	0.16 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01
Liver	(g)	13.64 ± 2.45	13.61 ± 1.25	13.15 ± 1.40	13.56 ± 1.71
	(g/100gBW)	2.42 ± 0.22	2.38 ± 0.12	2.39 ± 0.20	2.39 ± 0.18
Adrenals	(g)	0.047 ± 0.008	0.055 ± 0.010	0.046 ± 0.006	0.055 ± 0.013
	(mg/100gBW)	8.6 ± 1.9	9.7 ± 1.8	8.3 ± 1.0	9.8 ± 2.4
Kidneys	(g)	3.21 ± 0.30	3.31 ± 0.32	3.10 ± 0.25	3.34 ± 0.33
	(g/100gBW)	0.58 ± 0.05	0.58 ± 0.06	0.56 ± 0.04	0.59 ± 0.03
Testes	(g)	3.51 ± 0.34	3.43 ± 0.25	3.40 ± 0.26	3.58 ± 0.17
	(g/100gBW)	0.63 ± 0.08	0.60 ± 0.05	0.62 ± 0.04	0.63 ± 0.04
Pituitary	(g)	0.015 ± 0.001	0.015 ± 0.001	0.014 ± 0.001	0.015 ± 0.002
	(mg/100gBW)	2.66 ± 0.34	2.70 ± 0.23	2.51 ± 0.15	2.60 ± 0.27
Thyroid	(g)	0.027 ± 0.003	0.030 ± 0.005	0.030 ± 0.005	0.028 ± 0.005
	(mg/100gBW)	4.84 ± 0.79	5.33 ± 0.95	5.49 ± 1.09	5.01 ± 0.83
Salivary gland	(g)	0.79 ± 0.15	0.76 ± 0.08	0.79 ± 0.08	0.73 ± 0.06
	(g/100gBW)	0.14 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.01
Seminal vesicle	(g)	1.85 ± 0.20	1.78 ± 0.23	1.84 ± 0.15	1.89 ± 0.11
	(g/100gBW)	0.33 ± 0.06	0.31 ± 0.04	0.33 ± 0.02	0.34 ± 0.03
Prostate	(g)	1.50 ± 0.13	1.24 ± 0.25*	1.39 ± 0.23	1.58 ± 0.20
	(g/100gBW)	0.27 ± 0.03	0.22 ± 0.05*	0.25 ± 0.04	0.28 ± 0.04
<hr/>					
<b>Females</b>					
Body weight	(g)	304.3 ± 34.2	301.7 ± 40.4	293.0 ± 25.7	289.1 ± 18.4
Brain	(g)	1.96 ± 0.10	1.93 ± 0.06	1.95 ± 0.10	1.93 ± 0.08
	(g/100gBW)	0.65 ± 0.11	0.65 ± 0.08	0.67 ± 0.05	0.67 ± 0.04
Thymus	(g)	0.28 ± 0.10	0.25 ± 0.05	0.24 ± 0.05	0.25 ± 0.03
	(g/100gBW)	0.09 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.09 ± 0.01
Heart	(g)	0.93 ± 0.08	0.92 ± 0.15	0.87 ± 0.05	0.89 ± 0.10
	(g/100gBW)	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.30 ± 0.02	0.31 ± 0.03
Lungs	(g)	1.07 ± 0.09	1.05 ± 0.10	1.00 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.03 ± 0.12
	(g/100gBW)	0.35 ± 0.05	0.35 ± 0.03	0.34 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.03
Spleen	(g)	0.52 ± 0.07	0.48 ± 0.05	0.48 ± 0.07	0.49 ± 0.09
	(g/100gBW)	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.02
Liver	(g)	6.81 ± 1.02	6.73 ± 1.26	6.60 ± 0.78	6.63 ± 0.68
	(g/100gBW)	2.23 ± 0.16	2.22 ± 0.15	2.25 ± 0.14	2.29 ± 0.12
Adrenals	(g)	0.059 ± 0.007	0.059 ± 0.009	0.062 ± 0.006	0.057 ± 0.011
	(mg/100gBW)	19.6 ± 2.3	19.9 ± 3.2	21.4 ± 2.6	19.8 ± 4.1
Kidneys	(g)	1.74 ± 0.16	1.81 ± 0.34	1.70 ± 0.12	1.73 ± 0.12
	(g/100gBW)	0.58 ± 0.07	0.60 ± 0.06	0.58 ± 0.04	0.60 ± 0.03
Ovaries	(g)	0.083 ± 0.017	0.086 ± 0.010	0.070 ± 0.009	0.075 ± 0.015
	(mg/100gBW)	27.1 ± 4.3	28.9 ± 5.6	24.0 ± 3.3	26.1 ± 5.7
Pituitary	(g)	0.018 ± 0.003	0.018 ± 0.002	0.017 ± 0.002	0.019 ± 0.002
	(mg/100gBW)	5.80 ± 0.94	5.94 ± 0.93	5.69 ± 0.77	6.44 ± 0.79
Thyroid	(g)	0.020 ± 0.004	0.021 ± 0.003	0.021 ± 0.003	0.019 ± 0.003
	(mg/100gBW)	6.62 ± 1.34	7.10 ± 1.24	7.13 ± 1.22	6.62 ± 0.79
Salivary gland	(g)	0.46 ± 0.06	0.46 ± 0.06	0.46 ± 0.06	0.48 ± 0.07
	(g/100gBW)	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.02

Values are means ± SDs. \*, Significantly different from the controls at  $P < 0.05$  (Dunnett's test).

<sup>a</sup>: Number of effective animals was reduced to nine due to the failure of organ sampling.

Pituitary, Thyroid, Salivary gland, Seminal vesicle, Prostate : to measure organ weight after formalin fixed.

**Table 5. Histopathological findings for SD rats treated with oligogalacturonic acid for 13 weeks.**

Organs	Findings	Grade	Male		Female		
			Oligogalacturonic acid (mg/kg/day)	0	1000	0	1000
			No. of animals examined	10	10	10	10
Heart	Necrosis, myocardium, focal	±	1	2	0	0	
Spleen	Arteritis	++	1	0	0	0	
Mediastinal lymph node	Pigment deposition	±	0	0	1	0	
Pituitary gland	Cyst, pars distalis	±	3	0	0	0	
Thyroid gland	Ultimobranchial cyst	±	2	2	1	0	
	Cystic follicle	±	0	1	0	0	
	Infiltrate, mononuclear cell	±	0	1	0	0	
Parathyroid gland	Infiltrate, mononuclear cell	+	0	1	0	0	
Adrenal gland	Vacuolation, cortical, increased, focal	±	0	1	0	0	
Lung	Alveolar macrophage aggregation	±	1	2	1	1	
Liver	Necrosis, hepatocyte, focal	±	0	0	0	1	
Pancreas	Fibrosis, islet	+	2	0	0	0	
	Arteritis	+	1	0	0	0	
Kidney	Basophilic tubule	±	1	1	0	0	
	Hyperplasia, tubule	±	1	0	0	0	
	Infiltrate, mononuclear cell, interstitium	±	1	1	0	1	
	Cyst	±	2	1	0	0	
	Infarct	±	2	1	0	0	
Prostate	Infiltrate, mononuclear cell, interstitium	±	3	2	n.e.	n.e.	
Ovary	Cyst, follicular	±	n.e.	n.e.	0	1	
	Cyst, luteal	±	n.e.	n.e.	0	1	
	Hyperplasia, interstitial cell	±	n.e.	n.e.	1	0	
Vagina	Increased mucification	±	n.e.	n.e.	0	1	
		+	n.e.	n.e.	1	0	
Eye ball	Retinal rosettes	±	0	0	1	1	
Harderian gland	Infiltrate, mononuclear cell, interstitium	±	1	1	0	0	

±: minimal, +: mild, ++: moderate

n.e.: not examined

**Appendix 1. Defected organs in histopathological examination.**

Oligogalacturonic acid (mg/kg/day)	Male		Female	
	0	1000	0	1000
No. of animals	10	10	10	10
Parathyroid gland (unilateral)	2	3	2	0
Pituitary gland, pars posterior	2	2	2	3
Pituitary gland, pars intermedia	1	0	0	1
Lymph node, mediastinum	1	2	2	4