


食品添加物規格基準設定等試験検査

食品添加物安全性再評価

委託者：厚生省食品化学課




受託者： 

(平成8年度品目)

シソ抽出物の F344 ラットにおける 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 


はじめに：

シソ抽出物は シソ科シソの種子または葉をアルコール等で抽出濃縮して得られ、その主な成分は テルペノイド類であり性状は粘性を有する液状である。用途は 調味料等の各種食品素材として主に着色や香料で梅風味を目的として広く一般に使用されている。シソ抽出物についての安全性試験成績は現在まで行われておらず、天然香料やシソ色素として使用されているものについての遺伝毒性試験は陰性と報告されている¹⁾。また、一般飲料食品添加物として使用されているシソ色素のラット、マウスにおける急性経口毒性試験のLD₅₀値は5g/kg以上とされている。しかし、現在までその他毒性に関する情報はなく、今回シソ抽出物の動物反復投与についての毒性を明らかにするためラットにおける90日間反復投与毒性試験を行った。

試験材料および方法

1. 被験物質ならびに投与量：

シソ抽出物は[]より供与されたものを用いた。90日間反復経口投与毒性試験に先立ち、動物の検体摂取状況を検討する目的で、5%での2週間の予備試験を行った。その結果、体重増加率、飼料摂取量、検体混入飲料水の忌避などは認められず、むしろ飲水量は対照群と比べ増加する傾向が認められた。その結果と被験物質が抽出物であることを考慮して、本試験のシソ抽出物の濃度を最高20%とし、以下公比2で減じ10, 5, 2.5, 0%で実験を開始することにした。また原体のシソ抽出物はシヨ糖に溶解しているため、シヨ糖の影響を考慮し、シヨ糖20%の溶媒対照群も設定して実験を行った。しかし実験開始当初よりシソ抽出物投与群は飲料水の消費が激しく、最高で対照群の10倍近くまで達した。原体であるシソの収穫は年に一度であることより検体の供給不足と、実際の摂水量の算出が不可能と考え、投与開始10日目で最高用量の20%および溶媒対照シヨ糖20%群を実験から除外して実験を継続した。

シソ抽出物は原料の赤シソ生葉約300gから抽出し約1kgの製品とし、その品質基準は色価によって規定されるが製造ロットによりテルペノイド類の含有量は異なる。今回の実験にはシソ抽出物原体にペリルアルデヒド量として5ppm含有していた(日本食品分析センター)ものを用いた。

2. 動物および方法：

生後5週齢のF344ラット雌雄各60匹を日本チャールスリバー(株)より購入し、約1週間馴化飼育後、雌雄とも各群10匹ずつ6群に分けて実験を行った。動物飼育はバリアーシステムの動物飼育室にて、室内環境条件は温度24±1℃、湿度は55±5%、換気回数18回/時間、蛍光照明12時間(7-19時)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5匹ずつ収容し、床敷は三協ラボサービス(株)のソフトチップを用い、週2回交換した。飼料は基礎固形飼料(CRF-1)を自由に摂取させた。

被験物質の調製は原液を調整時まで冷蔵庫で4℃保存し、週2-3回または不足時に適宜新しいものと用事調製交換した。一般状態および死亡動物の有無は毎日観察を行い、体重および飼料摂取量は毎週測定し、摂水量は交換時に測定した。投与開始90日後に全生存動物を屠殺剖検し、試験を終了した。動物は屠殺の前日より一晩絶食後、エーテル麻酔下で開腹し、腹部大動脈より注射筒により採血を行い放血死させた。血液学的検査には多項目自動血球計数装置(東

亜医用電子 M-2000 型) を用い、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン濃度 (Hb)、ヘマトクリット値 (Ht)、白血球数 (WBC) および血小板数 (PLT) を測定するとともに、血液塗末標本を作製し、血液細胞自動分析装置 (立石電気 MICROX HEG-120A 型) を用いて以下の血液像について分類した。分葉核好中球 (Seg)、好酸球 (Eosin)、リンパ球 (Lymph)、単球 (Mono)、有核赤血球 (Ebl)。また血液を遠心分離(3000rpmX10min)によって血清を採取し以下の項目について測定した。総蛋白 (TP)、アルブミン、グロブリン比 (A/G)、総コレステロール (TC)、トリグリセライド (TG)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRE)、カルシウム (Ca)、無機リン (P)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、クロール (Cl)、グルタミック オキサロアセテック トランスアミラーゼ (GOT)、グルタミック ピルビック トランスアミラーゼ (GPT)、アルカルホス ファターゼ (ALP)、およびアルブミン (Alb) について血清生化学的検査を [REDACTED] で実施した。動物を剖検後、脳、心、肺、腎、副腎、脾、肝および精巣は重量を測定後、上記臓器に加え主要臓器を 10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。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・エオジン染色を施し、対照群と最高用量群について病理組織学的検索を行った。

統計学的解析：体重、血液学的検査、血清生化学的検査および臓器重量の測定値は Bartlett の等分散検定を行い、分散が等しい場合には一元配置分散を行った。群間に有意な差が認められた場合、各群の動物数が等しい時には Dunnett 法、また動物数が等しくない場合は Scheffe 法により平均値の比較を行った。分散が等しくない場合には Kruskal-Wallis の検定を行い。有意差が認められた場合は、ノンパラメトリックの Dunnett 法または Scheffe 法による検定を行った。

1. 結果：

(1) 死亡動物および体重推移：

実験全期間を通じ死亡動物は認められなかった。

体重は雄の 10%群で 9 週目以降に軽度の増加抑制傾向が認められたが、有意な変動ではなかった (Fig 1, Table 1)。雌も同様に 10%群で 7 週以降に増加抑制が認められたが、10 週目以降は他の群と同等の推移を示した。

(2) 摂水量および飼料摂取量：

摂水量は検体の用量に比例し増加する傾向を示し、雄の 10%群では対照群の約 2 倍、雌ではさらにその傾向が著しく 10%群で対照群の 4 倍にまで増加した。しかし飼料摂取量は摂水量とは逆に最高投与群で減少する傾向を示した (Table 1)。摂水量から積算した一日検体摂取量は検体投与群で摂水量が増加したため、公比 2 での用量設定値より過度に摂取する結果となった。

(3) 血液学的および血清生化学的検査：

血液学的検査では、雄の 5%および 10%群で WBC の有意な増加が認められたが、雌では変動が認められなかった (Table 2)。血液像での白血球百分率では、雄の全投与群で Seg が有意に減少し、Lymph が有意に増加した。

その他、雌の 2.5%および 5%群で Seg が減少し、5%群で Lymph が減少した

が、これらの変化は用量に相関するものではなく(Table2)、偶発的な変動とみなした。

血清生化学的検査は雄ではTCが雄の5%以上の群と雌の全投与群で有意に増加した(Table3)。雄の5%以上の群ではAlbとTPが増加し、A/G比はさらに10%群でも増加した。雌の10%群ではさらにNaとALPも増加した。雌雄の5%以上の群ではGPTが減少し、10%群ではさらにGOTも減少した。さらに雄の5%以上の群ではBUNが減少したが、これらの変動は用量相関や変動項目の関連性から毒性学的に意義のあるものとは考えられなかった。

その他、P,K,Cl,Na,ALPが5%以上の群で有意な変動を示したが、投与濃度に関連する変化ではなかった。

(4) 臓器重量：

雄では10%群で肝臓と心臓、肺の相対重量が有意に増加した。雌では、全投与群で心臓の絶対・相対重量が増加し、肝の絶対・相対重量は5%以上の群で増加した。さらに雌の5%以上の群で肺の絶対重量、10%群では肺の相対重量も増加した。

その他、用量に関連する臓器重量の変化はなかった。

(5) 病理組織学的所見：

軽度な心筋炎が雌の10%群に3例、対照群に3例、雄の10%群に4例、対照群に7例認められた。肝臓の軽度な細胞浸潤が雌の10%群に9例、対照群に9例、雄の10%群に10例、対照群に9例認められた。膵臓の軽度リンパ球細胞浸潤が雄の10%群に4例、対照群に3例、雌の対照群に3例認められた。肺の軽度な血管周囲細胞浸潤が雌の10%群に3例、対照群に3例、雄の10%群に4例、対照群に5例認められた。腎臓尿細管好酸性円柱あるいは遠位尿細管の軽度な好塩基性化が雄の10%群に10例、対照群に9例(Table6)に認められた。これらの病理所見は自然発生性の変化でありまた、対照群と比べてその発生頻度および程度においても差は認められなかった。

考察

今回行った90日反復経口投与毒性試験では、5%以上の投与群で飲水量が増加したが、この変化は、シソ抽出物に添加されたショ糖を動物が好んで摂取したことによるものと考えられた。体重は雄の10%群で9週以降増加抑制を示し、10%群には何らかの被験物質投与に関連した変化が発現したものと推察されたが、ショ糖摂取による影響の可能性が示唆された。

血液学的検査では、雄の5%以上の投与群でWBCの有意な増加が見られ、雄の全投与群でSegが減少し、Lymphが増加した。しかし、10%群のWBC数は無処置ラットの背景データに比し明らかに高いものではなく、造血関連臓器に病理組織学的にも投与に関連した異常が認められなかったことから、これらの変動は毒性学的に意義のあるものとは考えられなかった。

血清生化学的検査では、雄の5%以上の群でTC,Alb,TPが増加し、A/G比は雄の10%でも増加した。TCは雌の全投与群でも増加した。また、雌の10%群ではNaとALPも増加した。しかし、これらの検査項目の変動は無処置ラットでの背景データ範囲内であり、かつ、病理組織学的にこれらの変動を裏付ける形態

学的変化が肝臓や造血器系組織でみられなかったことから、これらの変動は投与に起因するものとみなさなかった(2-5)。

臓器重量では、雄の10%群で肝臓と心臓の相対重量が増加し、雌の5%以上の群で肝臓の絶対・相対重量および雌の全投与群で心臓の絶対・相対重量が増加した。しかし、病理組織学的には心臓および肝臓に臓器障害性を示唆する変化は何ら認められなかったことから、これらが投与に関連した毒性とみなすことは出来なかった。

以上の結果より、シソ抽出物を10%飲料水に混じり90日間雌雄F344ラットに投与した本実験では、何ら投与に起因する毒性変化は見られなかったことから無毒性量は雄で10%(109.6mg/kg/日)、雌で10%(86.7mg/kg/日)と判定された。

文献

1. 藤井正美、清水孝、中村幹雄：“概説 食用天然色素”光琳 東京(1993)
2. 高田幸一、豊田和弘、正田俊之、畝山智香子、田村啓、高橋道人：カロブ色素のF344ラットを用いた13週間亜慢性毒性試験。Bull. Natl. Inst. Health Sci.,115,93-98(1997)
3. 小野寺博志、三森国敏、安原加壽雄、竹川潔、高橋道人：ファフィア色素のF344ラットにおける13週間亜慢性毒性試験。Bull. Natl. Inst. Health Sci.,115,99-106(1997)
4. 高木久宜、安原加壽雄、三森国敏、小野寺博志、竹川潔、高橋道人：ペクチン分解物のラットにおける13週間亜急性毒性試験。Bull. Natl. Inst. Health Sci.,115,119-124(1997)
5. 古川文夫、笠原健一郎、西川秋佳、今沢孝喜、広瀬雅雄：クロロフィルのF344ラットを用いた13週間亜慢性毒性試験。Bull. Natl. Inst. Health Sci.,116,107-112(1998).

Fig. and Table

Fig.1 Body weight curve in rats given water containing Siso extracts for 13 weeks

Table.1 Body weight , water consumption, food intake in rats given water containing Siso extracts for 13 weeks

Table.2 Hematological changes in rats given water containing Siso extracts for 13 weeks

Table.3 Serum chemistry in rats given water containing Siso extracts for 13 weeks

Table.4 Organ weight of male rats given water containing Siso extracts for 13 weeks

Table.5 Organ weight of female rats given water containing Siso extracts for 13 weeks

Table.6 Histopathological findings in rats given water containing Siso extracts for 13 weeks

Fig. 1 Body weight curve in rats given water containing *Perilla* extracts for 13 weeks

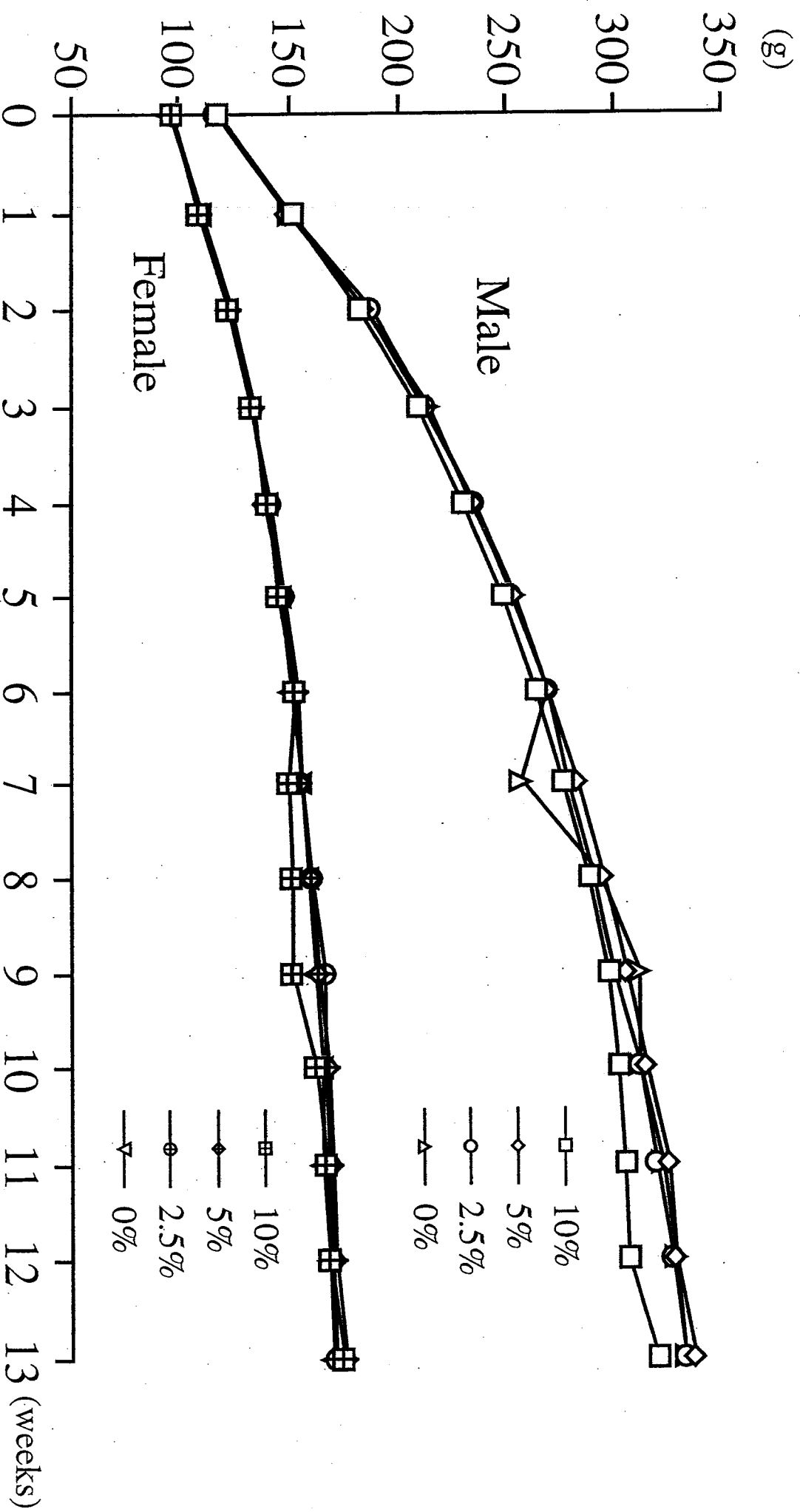


Table 1 Body weight, water consumption, food intake in rats given water containing *Perilla* extracts for 13 weeks

Group (%)	Final body weight (g)	Water consumption (g/rat/day)	Diet intake (g/rat/day)	Daily <i>Perilla</i> extracts intake (g/kg/day)
Male				
0	320.4 ± 13.9	22.2	14.4	0.0
2.5	317.8 ± 13.0	24.7	14.5	1.94
5	323.1 ± 12.0	33.1	14.2	5.12
10	305.5 ± 19.1	42.6	12.6	13.9
Female				
0	158.5 ± 5.4	14.8	8.7	0.0
2.5	160.4 ± 8.7	30.5	9.2	4.76
5	162.8 ± 9.0	47.3	8.4	14.5
10	162.0 ± 6.5	60.2	6.3	37.1

Table 2 Hematological changes in rats given water containing *Perilla* extracts for 13 weeks

Dose level (%)		0	2.5	5	10
No. of animals		10	10	10	10
Male					
RBC	10 ¹² /l	9.53 ± 0.22 ^{a)}	9.62 ± 0.18	9.65 ± 0.15	9.34 ± 0.30
Hb	g/dl	15.7 ± 0.3	15.7 ± 0.3	15.8 ± 0.2	15.4 ± 0.4
Ht	%	45.6 ± 1.0	45.7 ± 1.0	45.7 ± 0.7	44.5 ± 1.5
Ebl	Count/200WBC	1.8 ± 2.6	2.0 ± 1.2	1.8 ± 1.8	0.7 ± 0.8
WBC	10 ⁹ /l	4.27 ± 0.45	4.18 ± 0.27	4.80 ± 0.55*	4.69 ± 0.43*
Differential cell count (%)					
Seg		43.7 ± 5.7	34.1 ± 7.4*	27.1 ± 3.3*	26.3 ± 4.3*
Eosino		1.2 ± 0.8	0.8 ± 1.0	1.4 ± 0.8	2.0 ± 1.2
lymph		54.9 ± 5.2	64.3 ± 8.1*	71.1 ± 3.6*	71.5 ± 4.3*
Mono		0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.3	0.4 ± 0.3	0.2 ± 0.3
Female					
RBC	10 ¹² /l	8.95 ± 0.40	9.03 ± 0.27	9.09 ± 0.46	9.03 ± 0.24
Hb	g/dl	15.9 ± 0.7	15.9 ± 0.4	16.1 ± 0.7	16.0 ± 0.2
Ht	%	45.6 ± 2.1	46.0 ± 1.3	46.3 ± 2.3	46.3 ± 1.2
Ebl	Count/200WBC	2.4 ± 1.9	2.1 ± 1.6	1.5 ± 1.4	3.3 ± 1.8
WBC	10 ⁹ /l	3.72 ± 0.78	3.81 ± 0.36	3.79 ± 0.32	4.59 ± 0.35*
Differential cell count (%)					
Seg		20.3 ± 3.6	24.2 ± 3.8*	28.1 ± 5.9*	23.2 ± 5.8
Eosino		1.2 ± 0.5	1.0 ± 0.7	1.3 ± 0.8	1.2 ± 0.7
lymph		77.3 ± 4.6	74.5 ± 3.5	69.7 ± 5.9*	75.2 ± 5.3
Mono		0.2 ± 0.3	0.3 ± 0.4	0.9 ± 0.9*	0.4 ± 0.4

a) Mean ± S.D.

* : Significantly different from the control at p<0.05.

Table 3 Serum chemistry in rats given water containing *Perilla* extracts for 13 weeks

	Dose level (%)	No. of animals			
		0	2.5	5	10
Male					
TP	g/dl	7.01 ± 0.14 ^{a)}	7.00 ± 0.24	7.19 ± 0.16*	7.16 ± 0.16*
A/G		1.94 ± 0.08	2.07 ± 0.13*	2.01 ± 0.15	2.07 ± 0.11*
TC	mg/dl	77.5 ± 5.56	76.6 ± 7.09	84.9 ± 7.80*	85.6 ± 7.55*
BUN	mg/dl	23.5 ± 2.19	21.8 ± 1.85	21.8 ± 0.90*	19.3 ± 1.60*
CRN	mg/dl	0.28 ± 0.04	0.28 ± 0.08	0.30 ± 0.00	0.32 ± 0.04
Ca	mg/dl	10.5 ± 0.15	10.4 ± 0.33	10.6 ± 0.16	10.6 ± 0.17
P	mg/dl	5.72 ± 0.42	5.39 ± 0.33	5.32 ± 0.43*	5.79 ± 0.59
Na	mEq/l	145.1 ± 0.74	144.7 ± 1.06	146.5 ± 1.51	144.1 ± 1.29
K	mEq/l	4.14 ± 0.13	4.19 ± 0.17	3.90 ± 0.30*	4.21 ± 0.34
Cl	mU/dl	104.3 ± 0.95	105.1 ± 0.88*	106.6 ± 0.97*	103.5 ± 1.43
GOT	IU/l	85.9 ± 14.4	83.4 ± 10.5	82.9 ± 6.95	67.7 ± 6.40*
GPT	IU/l	65.1 ± 9.04	65.9 ± 9.12	57.2 ± 5.18*	46.3 ± 5.68*
ALP	IU/l	353.5 ± 27.2	358.4 ± 21.6	378.0 ± 18.5*	363.8 ± 27.6
Alb	g/dl	4.62 ± 0.11	4.72 ± 0.13	4.80 ± 0.15*	4.83 ± 0.12*
Female					
TP	g/dl	7.01 ± 0.20	6.83 ± 0.20	6.96 ± 0.18	6.89 ± 0.17
A/G		2.46 ± 0.11	2.41 ± 0.14	2.33 ± 0.11*	2.54 ± 0.20
TC	mg/dl	102.1 ± 6.94	109.6 ± 6.45*	114.1 ± 7.62*	109.2 ± 7.15*
BUN	mg/dl	20.9 ± 1.37	19.4 ± 0.86*	20.3 ± 1.83	17.8 ± 1.63*
CRN	mg/dl	0.30 ± 0.00	0.28 ± 0.04	0.25 ± 0.07	0.23 ± 0.05
Ca	mg/dl	10.6 ± 0.23	10.4 ± 0.11*	10.4 ± 0.21*	10.6 ± 0.21
P	mg/dl	5.99 ± 0.40	5.86 ± 0.56	5.89 ± 0.27	5.97 ± 0.54
Na	mEq/l	144.7 ± 0.82	146.5 ± 1.08*	144.5 ± 1.27	146.5 ± 1.51*
K	mEq/l	4.20 ± 0.37	3.88 ± 0.20	4.20 ± 0.37	3.90 ± 0.30
Cl	mU/dl	107.2 ± 1.62	107.2 ± 1.79	107.2 ± 1.62	106.6 ± 0.97
GOT	IU/l	70.0 ± 6.50	72.5 ± 3.21	66.8 ± 3.97	59.8 ± 2.86*
GPT	IU/l	42.4 ± 3.06	43.8 ± 4.94	37.8 ± 2.86*	32.1 ± 2.47*
ALP	IU/l	235.9 ± 35.7	230.5 ± 19.9	243.1 ± 18.4	285.3 ± 24.1*
Alb	g/dl	4.98 ± 0.14	4.82 ± 0.17*	4.87 ± 0.14	4.94 ± 0.14

a) Mean ± S.D.

* : Significantly different from the control at p<0.05.

Table 4 Organ weight of male rats given water containing *Perilla* extracts for 13 weeks

	Dose level (%)			
	0	2.5	5	10
Body weight (g)	320.4 ± 13.9 ^{a)}	317.8 ± 13.0	323.1 ± 12.0	305.5 ± 19.1
Absolute (g)				
Brain	1.952 ± 0.046	1.939 ± 0.044	1.971 ± 0.066	1.959 ± 0.078
Heart	0.919 ± 0.051	0.959 ± 0.050	0.932 ± 0.046	0.950 ± 0.073
Lung	1.012 ± 0.079	0.950 ± 0.035*	0.974 ± 0.061	0.993 ± 0.081
Liver	7.425 ± 0.301	7.436 ± 0.370	7.735 ± 0.577	7.431 ± 0.371
Kidney	1.958 ± 0.115	1.912 ± 0.078	1.892 ± 0.090	1.828 ± 0.169
Adrenal	0.037 ± 0.003	0.038 ± 0.005	0.034 ± 0.006	0.035 ± 0.002
Spleen	0.631 ± 0.023	0.604 ± 0.021	0.622 ± 0.024	0.568 ± 0.123
Testis	3.125 ± 0.117	2.971 ± 0.493	3.081 ± 0.091	3.062 ± 0.162
Relative (g/100g B.W.)				
Brain	0.610 ± 0.025	0.611 ± 0.024	0.611 ± 0.021	0.644 ± 0.048
Heart	0.287 ± 0.009	0.302 ± 0.021	0.289 ± 0.018	0.311 ± 0.013*
Lung	0.316 ± 0.023	0.299 ± 0.015	0.302 ± 0.025	0.325 ± 0.014
Liver	2.318 ± 0.049	2.341 ± 0.076	2.393 ± 0.133	2.436 ± 0.085*
Kidney	0.611 ± 0.025	0.602 ± 0.024	0.586 ± 0.016	0.598 ± 0.037
Adrenal	0.011 ± 0.001	0.012 ± 0.001	0.010 ± 0.002	0.011 ± 0.002
Spleen	0.197 ± 0.007	0.190 ± 0.009	0.192 ± 0.005	0.184 ± 0.035
Testis	0.976 ± 0.032	0.983 ± 0.018	0.958 ± 0.030	1.003 ± 0.023

a) Mean ± S.D.

* : Significantly different from the control at p<0.05.

Table 5 Organ weight of female rats given water containing *Perilla* extracts for 13 weeks

	Dose level (%)			
	0	2.5	5	10
Body weight (g)	158.5 ± 5.4 ^{a)}	160.4 ± 8.7	162.8 ± 9.0	162.8 ± 6.5
Absolute (g)				
Brain	1.760 ± 0.056	1.746 ± 0.080	1.771 ± 0.064	1.759 ± 0.042
Heart	0.522 ± 0.029	0.566 ± 0.029*	0.571 ± 0.051*	0.577 ± 0.052*
Lung	0.672 ± 0.043	0.676 ± 0.038	0.708 ± 0.044	0.727 ± 0.035*
Liver	3.385 ± 0.144	3.495 ± 0.222	3.688 ± 0.199*	3.966 ± 0.237*
Kidney	1.020 ± 0.046	1.010 ± 0.078	1.052 ± 0.047	1.036 ± 0.058
Adrenal	0.037 ± 0.003	0.039 ± 0.003	0.038 ± 0.008	0.038 ± 0.005
Spleen	0.348 ± 0.041	0.361 ± 0.033	0.351 ± 0.020	0.363 ± 0.022
Relative (g/100g B.W.)				
Brain	1.110 ± 0.032	1.090 ± 0.054	1.090 ± 0.050	1.088 ± 0.053
Heart	0.330 ± 0.014	0.353 ± 0.011*	0.351 ± 0.024*	0.357 ± 0.033*
Lung	0.424 ± 0.019	0.421 ± 0.019	0.436 ± 0.026	0.449 ± 0.028
Liver	2.136 ± 0.069	2.178 ± 0.059	2.267 ± 0.072*	2.449 ± 0.105*
Kidney	0.643 ± 0.016	0.629 ± 0.030	0.647 ± 0.019	0.639 ± 0.023
Adrenal	0.023 ± 0.002	0.024 ± 0.002	0.023 ± 0.005	0.024 ± 0.003
Spleen	0.220 ± 0.024	0.225 ± 0.014	0.216 ± 0.007	0.224 ± 0.012

a) Mean ± S.D.

* : Significantly different from the control at p<0.05.

Table 6 Histopathological findings in rats given water containing *Perilla* extracts for 13 weeks

Organ	Findings	Dose level (%)			
		Male		Female	
		0	10	0	10
Heart	Myocarditis	7	4	3	3
Liver	Cell infiltration	9	10	9	9
Pancreas	Lymphocyte infiltration	3	4	4	0
Lung	Perivascular cell infiltration	5	4	3	3
Kidney	Hyaline cast in tubular epithelia	9	10	0	0
	Basophilic change in tubular epithelia				
Prostate	Cell infiltration	1	1	-	-