

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：厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課

受託者：[REDACTED]

(平成16年度品目)

ダイズサポニンのF344ラットにおける90日間反復投与毒性試験

最終報告書

[REDACTED]

国立医薬品食品衛生研究所

[REDACTED]

[REDACTED]

要約

ダイズサポニン¹を0、1.25、2.5及び5%の濃度で添加した混合飼料を1群雌雄各10匹のF344ラットに90日間自由摂取させ、その安全性を検討した。その結果、実験期間中に被験物質投与に起因した死亡は認められなかった。雄の5%投与群及び雌の5、2.5%投与群では、投与2週目より試験期間を通じて対照群と比較し有意な体重増加抑制がみられ、雌の1.25%投与群でも11週目から有意な抑制を認めたが、摂餌量に変化は認められなかった。血液学的検査において、雄の5%投与群でRBCおよびHtが有意に低値を、MCVが有意に高値を示し、貧血傾向が示唆された。血清生化学的検査において、雄の5%群および雌の2.5%以上の各群でBUNの増加が、また雄の5%群および雌の1.25%以上の群で腎臓の相対重量の増加がみられ、投与による影響が示唆されたが、病理組織学的変化は認められなかった。また、雄の2.5%以上投与群ではTPおよびAlbが有意に増加し、雌の1.25%以上の群でTGが有意に減少した。肝重量において雄の1.25%以上の群で実重量および相対重量の増加が、雌の2.5%以上の群で相対重量の増加がみられ投与の影響と考えられたが、病理組織学的な変化は認められなかった。その他、雄の5%投与群全例に前立腺腹葉の萎縮、雌では膣の粘液産生亢進像と上皮の萎縮ならびに卵巣における閉鎖卵胞の増加がそれぞれ5%群の3、4、4例、2.5%投与群の2、2、2例に観察された。以上の結果より、ダイズサポニンの無毒性量は雌雄とも1.25%（雄707.2mg/kg b.w./day、雌751.8mg/kg b.w./day）未満と判断された。

はじめに

ダイズサポニン¹⁾はマメ科ダイズ (*Glycine max* MERRILL) の種子を粉砕し、水又はエタノールで抽出し、精製して得られたもので、ステロイドサポニンに分類されるソヤサポニン (Soyasaponin) 等のサポニンを主成分とする。食品添加物としては乳化剤として飲料、乳化食品、菓子類等に使用されているが¹⁾、健康補助食品としても用いられている。これまでにサポニンの細胞毒性及び細胞死の誘導^{2,3)} と共に抗酸化^{4,5)}、コレステロール低下⁶⁾、抗ウイルス⁷⁾、がん細胞増殖抑制⁸⁻¹²⁾ や抗変異原性¹³⁻¹⁴⁾ など、様々な作用が報告されているが、安全性評価を目的とした毒性試験に関する報告は見られない。そこで今回、既存添加物安全性再評価の一環としてダイズサポニンのラットにおける90日間反復経口投与毒性試験を実施した。

実験材料および方法

被験物質および投与量

ダイズサポニンは特有の味及びにおいを有する淡黄色～淡褐色の粉末で水、メタノール、含水エタノール等に可溶で油脂に殆ど溶けない物質である。今回の実験には常磐植物化学研究所より提供された、純度94%のダイズサポニンを使用した。このダイズサポニンを粉末基礎飼料 (CRF-1, オリエンタル酵母工業) に混合した飼料を実験に供した。本混合飼料中のダイズサポニンは室温下で4週間保存した際の安定性が確認されていることから、使用時まで室温で保管し、動物に与えた飼料は安定性が確認されている期間内に適宜交換した。本試験における投与用量は、本試験に先立って実施した2週間の予備試験の結果に基づき最高用量を5%とし、以下公比2で減じて2.5%あるいは1.25%の濃度で混ぜて投与し、対照群として0%群をもうけた。

動物、投与方法および検査項目

5週齢のF344/DuCrjラット (SPF) 雌雄各40匹を日本チャールス・リバーより購入し、1週間の馴化飼育後、6週齢で実験に供した。動物は温度 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数18回/時 (オールフレッシュ)、12時間の明暗サイクルに制御されたバリアーシステムの飼育室で、床敷としてソフトチップ (三協ラボサービス) を敷いたプラスチックケージに1ケージあたり3または4匹ずつ収容して飼育し、ケージおよび床敷を週2回交換した。

投与開始当日の体重に基づいて、各群の平均体重が近似するように雌雄とも1群10匹からなる4群に分け5、2.5、1.25あるいは0%のダイズサポニン添加飼料および水道水を90日間自由に摂取させた。

実験期間中、一般状態および死亡動物の有無を毎日観察し、体重および摂餌量を週1回測定した。投与期間終了後に全動物を一晩絶食後、エーテル麻酔下で開腹し、腹部大動脈より採血を行った。血液学的検査として赤血球数 (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)、血小板数(Plt)および白血球数(WBC)を多項目自動血球計数装置(K-4500型, シスメックス)を用いて測定すると共に、Wright染色した塗抹標本を作製し、桿状核好中球(Band)、分葉核好中球(Seg)、好酸球(Eosino)、好塩基球(Baso)、リンパ球(Lympho)、単球(Mono)および有核赤血球(Eb1)について血液細胞自動分析装置(MICROX HEG-120A型, 立石電気)を用いて計測した。また、遠心分離により得た血清について総蛋白(TP)、アルブミン(Alb)、アルブミン/グロブリン比(A/G)、グルコース(Glucose)、総ビリルビン(Bil)、トリグリセライド(TG)、総コレステロール(T-Cho)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(Cre)、カルシウム(Ca)、無機リン(IP)、ナトリウム(Na)、クロール(Cl)、カリウム(K)、アラニントランスアミナーゼ(ALT)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ(AsT)、アルカリホスファターゼ(ALP)および γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(γ GTP)の各項目を[]に委託して測定した。採血終了後動物を放血死させ、剖検を実施すると共に、脳、胸腺、肺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓および精巣を摘出し、重量を測定した。また、上記組織に加えリンパ節(頸部、腸間膜)、唾液腺、骨および骨髄(胸骨、大腿骨)、気管、大動脈、甲状腺および上皮小体、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)、膀胱、精囊、前立腺、尿道球腺、精巣上体、卵巣、子宮、膣、下垂体、坐骨神経、三叉神経、骨格筋、皮膚、乳腺、脊髄、鼻腔、眼球およびその附属器を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液で、また精巣のみブアン液で固定した。常法に従ってこれらをパラフィンに包埋後、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して対照群と高用量群について、また前立腺、卵巣および膣は低・中間用量群についても病理組織学的検査を行った。

3. 統計学的処理

体重、血液学的検査値、血清生化学的検査値および臓器の絶対重量と相対重量については、各群の分散比をBartlettの方法で検定し、等分散の場合は一元配置分散分析を行い、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法により有意差検定を行った。病理組織学的検査の病変については、各群の発生率をフィッシャーの直接確立計算法により検定した。

結果

1. 一般状態

実験期間を通して死亡動物は認められなかった。一般状態についても投与に起因した明らかな変化は認められなかった。

2. 体重及び摂餌量

体重は対照群と比較して投与2週目より雄の5%投与群及び雌の5、2.5%投与群で対照群

に比べて有意な増加抑制を示した (Fig. 1)。投与11週目からは雌の1.25%投与群でも対照群に比べて有意な体重増加抑制が見られた (Fig. 1)。摂餌量については投与1週目に雌雄の5%投与群で対照群に比べて減少したが(対照群：雄、11.2；雌、8.8 g/rat/day、5%投与群：雄、8.9；雌、7.2 g/rat/day)、3週目以降は雌雄とも明らかな群間の差はみられなかった (Fig. 2)。投与期間を通した被験物質平均摂取量は1.25%群の雄で707.2、雌で751.8 mg/kg b.w./day、2.5%群の雄で1449.1、雌で1498.6 mg/kg b.w./day、5%の雄で2830.4、雌で3028.1 mg/kg b.w./dayと飼料中被験物質濃度に応じて増加した (Table 1)。

3. 血液学的検査および血清生化学的検査

血液学的検査において、雄の5%投与群ではRBCおよびHtが有意に低値を、MCVが有意に高値を示したが、雌の投与群では有意な変化は認められなかった (Table 2, 3)。

血清生化学的検査において、雄の5%投与群ではBUNの値が有意に上昇し、2.5%以上の投与群ではTP、AlbおよびCaの値が有意な増加を示した。またAsTの値が2.5%以上の投与群で被験物質投与量に依存して有意な減少を示した (Table 4)。一方、雌では5%群でKの値が有意に上昇し、Clの値が有意に減少した。またBUNの値が2.5%以上の投与群で被験物質投与量に依存して有意な増加を示し、Creの値は被験物質投与量に依存して有意な減少を示した。1.25%以上の投与群ではBilおよびTGの値が有意な減少を示した。その他、1.25あるいは2.5%群のみで有意差のある項目がみられたが、用量依存性のない変化であった。

(Table 5)。

4. 臓器重量

雄の5%群において心臓および脾臓の実重量が有意に減少した。脳の実重量は2.5%以上の投与群において投与量依存的に有意な減少を示した。肝臓の実重量が1.25および2.5%投与群で有意に増加し、5%群では増加傾向を示した。また肝臓の体重当たりの相対重量は、1.25%以上の群において被験物質投与量依存的に有意な増加を示した。また脳の相対重量において1.25および2.5%群では有意な減少を、5%投与群では有意な増加を示した。5%投与群では腎臓の相対重量が有意に増加した (Table 6)。

雌では5%群において肺の実重量が有意に減少した。心臓および脾臓の実重量は2.5%以上の群において投与量依存的に有意な減少を示した。脳および腎臓の相対重量は1.25%以上の群において投与量依存的に有意な増加を示した。肝臓の相対重量が2.5%以上の群で有意に増加した (Table 7)。

5. 病理組織学的検査

被験物質の投与に起因すると考えられる所見が、雄では前立腺、雌では膣および卵巣に認められた (Table 8, 9)。即ち、雄の5%投与群全動物で前立腺腹葉の上皮細胞萎縮が観察され有意な高発生率を示したが、1.25および2.5%群では認められなかった。萎縮した上皮には、しばしば空胞形成がみられ、腺腔内の分泌物は減少していた (Fig. 3)。雌の膣

において5%投与群の3例、2.5%投与群の2例で粘液産生亢進像が、5%投与群の4例、2.5%投与群の2例で上皮の萎縮が観察された (Fig. 4)。また卵巣において5%投与群の4匹、2.5%投与群の2匹で閉鎖卵胞の増加が認められた (Fig. 5)。その他、対照群および5%投与群の各臓器種々の所見がみられたが、その発生に群間の明らかな差はなく、乳腺及び子宮に変化はみられなかった。

考察

雄の5%投与群及び雌の5、2.5%投与群では、投与2週目より試験期間を通じて対照群と比較し有意な体重増加抑制がみられ、雌では1.25%群でも11週目から有意な抑制がみられたが、摂餌量に著しい変化が認められないことから、この体重増加抑制はダイズサポニン投与による飼料効率の低下などによるものと考えられた。サポニンによる腸運動の低下¹⁵⁾、タンパク消化不良¹⁶⁾、消化管上皮細胞膜の障害及び栄養輸送の抑制¹⁷⁾などの作用が報告されており、今回の体重増加抑制に関連している可能性が示唆される。

血液学的検査において、雄の5%投与群ではRBCおよびHtの値が有意に低値を、MCVの値が有意に高く、貧血傾向を示していると考えられた。サポニンは細胞膜コレステロールと形成する不溶性複合体が膜穴をあけることにより溶血作用を示すことが知られている¹⁸⁾。雄の5%投与群でみられた貧血傾向はダイズサポニンによる赤血球に対する影響が関連している可能性が示唆された。

血清生化学的検査において、雄の5%群および雌の2.5%以上の各群でBUNの増加とCreの減少が、また雄の5%群および雌の1.25%以上の群で腎臓の相対重量の増加がみられ、ダイズサポニンによる腎臓に対する影響が示唆された。しかし関連すると思われる病理組織学的な変化は認められなかったため、毒性学的意義は低いと考えられた。雄2.5%以上投与群ではTPおよびAlbが有意な高値を示し、雌の1.25%以上群ではTGの減少がみられた。肝重量においても雄の1.25%以上の群で実重量および用量相関性の相対重量の増加が、雌の2.5%以上の群で相対重量の増加がみられ、肝臓における軽度の影響が示唆された。しかし、病理組織学的検査では、肥大や障害など毒性に関連すると思われる明らかな変化は認められなかった。また、雄2.5%以上の投与群ではCaが有意な高値を示したが、IPには変化がなく、骨などにも関連する病理組織学的変化が認められなかったことから、毒性とは考えなかった。雄の2.5%以上の群でAsTの減少がみられたが、逸脱酵素の低下であり、やはり毒性とは考えなかった。その他、雌でみられたKの増加あるいはClおよびBilの減少は用量反応性の乏しい軽微な変化であり、毒性を示すものではないと考えられた。

臓器重量では、雄の5%群で心臓および脾臓の実重量が、雌の5%群では肺、心臓および脾臓の実重量が有意に減少したが、相対重量では変化がなく、病理組織学検査でも関連する変化が見られなかったことから体重増加抑制による変化であると考えられた。体重の変化に影響されにくいとされる脳については雄の実重量で低値を、雌雄の実重量及び相対重量で高値を示したが、病理組織学的変化はみられず、毒性学的意義の乏しい変化であると考

えられた。

病理組織学的所見において、雄の5%投与群全動物で前立腺腹葉の萎縮が観察された。雌の膣において5%投与群の3匹、2.5%投与群の2匹で粘液産生亢進像が5%投与群の4例、2.5%投与群の2例で上皮の萎縮が観察された。また卵巣において5%投与群の4匹、2.5%投与群の2匹で閉鎖卵胞の増加がみられた。サポニンとはステロイドホルモンと基本的な化学構造が類似していることから性ホルモン受容体と反応することが知られ¹⁹⁾、サポニン-受容体複合体はアンドロゲン受容体およびテストステロン代謝酵素の発現を抑制するとの報告もある²⁰⁾。またエシア (*Combretodendron africanum*) から抽出したサポニンは雌ラットへの投与による子宮重量増加、血中黄体ホルモン値低下および発情周期の停止などが報告されており²¹⁾、ステロイド系サポニンはステロイド産生遺伝子を直接抑制し、また卵胞顆粒膜細胞の増殖を抑制することが知られている²²⁾。今回雄の前立腺あるいは雌の膣及び卵巣でみられた病変はダイズサポニンによるステロイドホルモン及びその受容体に対する影響が関連している可能性が示唆された。

以上の結果より、ダイズサポニンを最高用量5%とし、以下公比2で減じて2.5%あるいは1.25%の濃度で混じて投与して90日間雌雄のF344ラットに混餌投与した本試験では、雄の1.25%以上群で肝相対重量の増加、5%投与群において体重増加抑制、血清BUNの高値、腎臓の相対重量増加、病理組織学的検査で前立腺腹葉の萎縮が認められたことから、ダイズサポニンの無毒性量は雄ラットで1.25% (707.2mg/kg b.w./day) 未満と判断された。また雌では1.25%以上の群で体重増加抑制、血清TGの有意な減少、腎相対重量の有意な増加、また、2.5%以上の群でBUNの増加および病理組織学的検査における膣の粘液産生亢進像および上皮の萎縮、卵巣の閉鎖卵胞の増加が認められたことから、雌における無毒性量は1.25% (751.8mg/kg b.w./day) 未満と判断された。

参考文献

- 1) 既存添加物名簿収載品目リスト注解書, 日本食品添加物協会, 331 (1999)
- 2) Khalil, A. H., El-Adaway, T. A.: *Food Chem.* 50, 197-201 (1994)
- 3) Kim, S. E., Lee, Y. H., Park, J. H., Lee, S. K.: *Anticancer Res.* 19, 487-491 (1999)
- 4) Ohminami, H., Kimura, Y., Okuda, H., Arich, S., Yoshikawa, M., Kitagawa, I.: *Planta Med.* 50, 440-441 (1984)
- 5) Yoshiki, Y., Kiomi, M., Kahara, T., Okubo, K.: *Plant Sci.* 116, 125-129 (1996)
- 6) Sugano, M., Goto, S., Yamada, Y., Yoshida, K., Hashimoto, Y., Matsuo, T., Kimoto, T.: *J Nutr.* 120, 977-985 (1990)
- 7) Okubo, K., Kudou, S., Uchida, T., Yoshiki, Y., Yoshikoshi, M., Tonomura, M.: Soybean saponin and isoflavonoids: structure and antiviral activity against humans immunodeficiency virus in vitro, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 330-339 (1994)
- 8) Yoshiki, Y., Kudou, S., Okubo, K.: *Biosci Biotechnol Biochem.* 62, 2291-2299 (1998)

- 9) Konoshima, T., Kokumai, M., Kozuka, M., Tokuda, H., Nishino, H., Iwashima, A.: *J Nat Prod.* 55, 1776-1778 (1992)
- 10) Rao, A. V., Sung, M.-K.: *J Nutr.* 125, 717S-724S (1995)
- 11) Sung, M.-K., Kendall, C. W. C., Rao, A. V.: *Food Chem Toxicol.* 33, 357-366 (1995)
- 12) Koratker, R., Rao, A. V.: *Nutr Cancer* 27, 206-209 (1997)
- 13) Berhow, M. A., Wagner, E. D., Vaughn, S. F., Plewa, M. J.: *Mutat Res.* 448, 11-22 (2000)
- 14) Jun, S.-H., Kim, S.-E., Sung, M.-K.: *J Med Food* 5, 235-240 (2002)
- 15) Klita, P. T., Mathison, G. W., Fenton, T. W.: *J Anim Sci.* 74, 1144-1156 (1996)
- 16) Potter, S. M., Jimenez-Flores, R., Pollack, J., Lone, T. A., Berber-Jimenez, M. D.: *J Agric Food Chem.* 41, 1287-1291 (1993)
- 17) Matsuda, H., Li, Y. H., Murakami, Y., Yamahara, J., Yoshikawa, M.: *Bioorg Med Chem.* 7, 323-327 (1999)
- 18) Bangham, A. D., Horne, R. W., Glauert, A. M., Dingle, J. T., Lucy, J. A.: *Nature.* 196, 952-955. (1962)
- 19) Punnonen, R., Lukola, A.: *Brit Med J.* 281, 1110 (1980)
- 20) Liu, W. K., Xu, S. X., Che, C. T.: *Life Sci.* 67, 1297-1306 (2000)
- 21) Benie, T., El-Izzi, A., Tahiri, C., Duval, J., Thieulant, M. L. T. I.: *J Ethnopharmacol.* 29, 13-23 (1990)
- 22) Tamura, K., Honda, H., Mimaki, Y., Sashida, Y., Kogo, H.: *Brit J Pharmacol.* 121, 1796-1802 (1997)

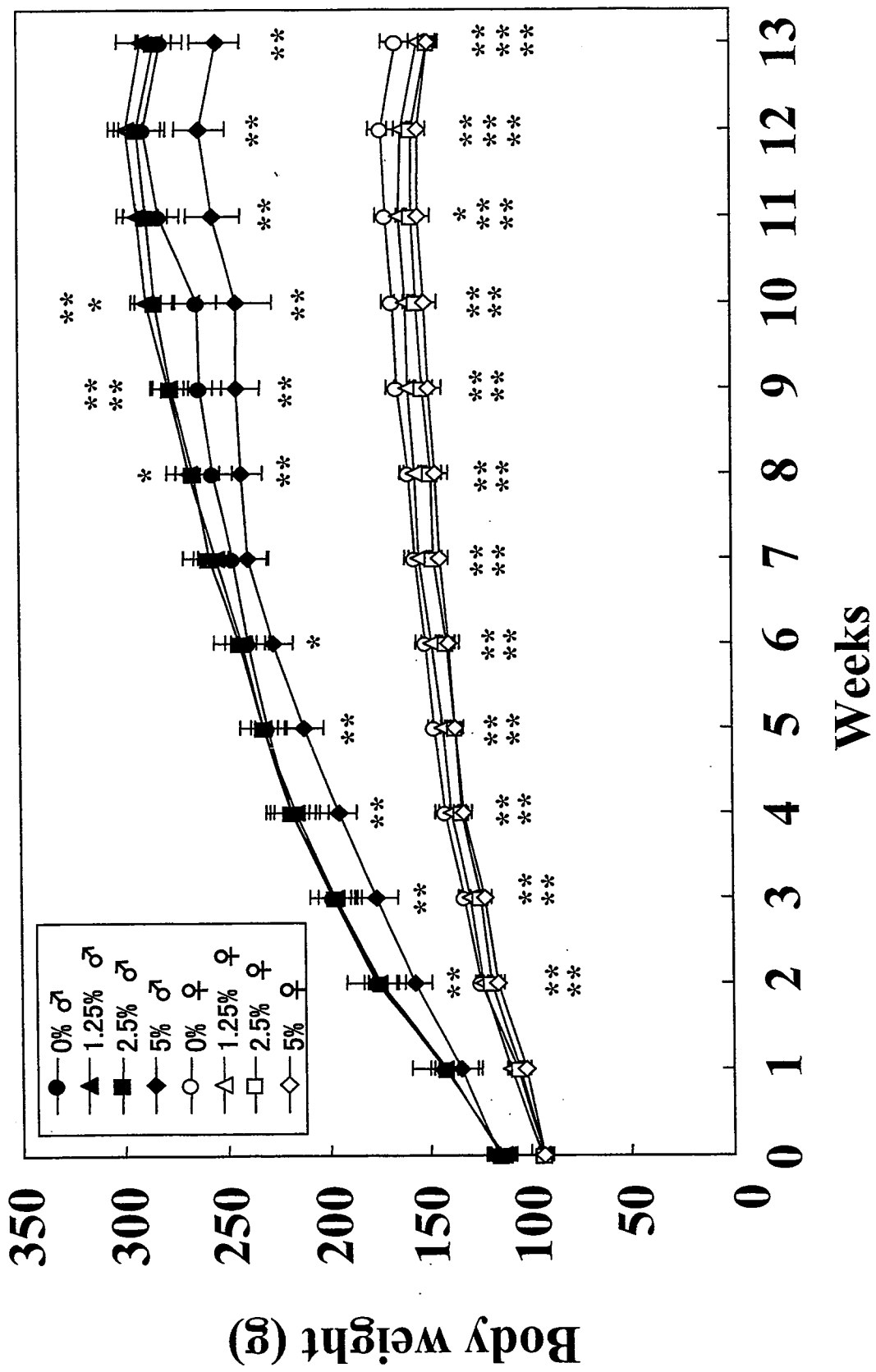


Fig.1 Body weight curves of rats fed diet containing soybean saponin

*,**,: Significantly different from respective sex 0% group at $p < 0.05$, 0.01

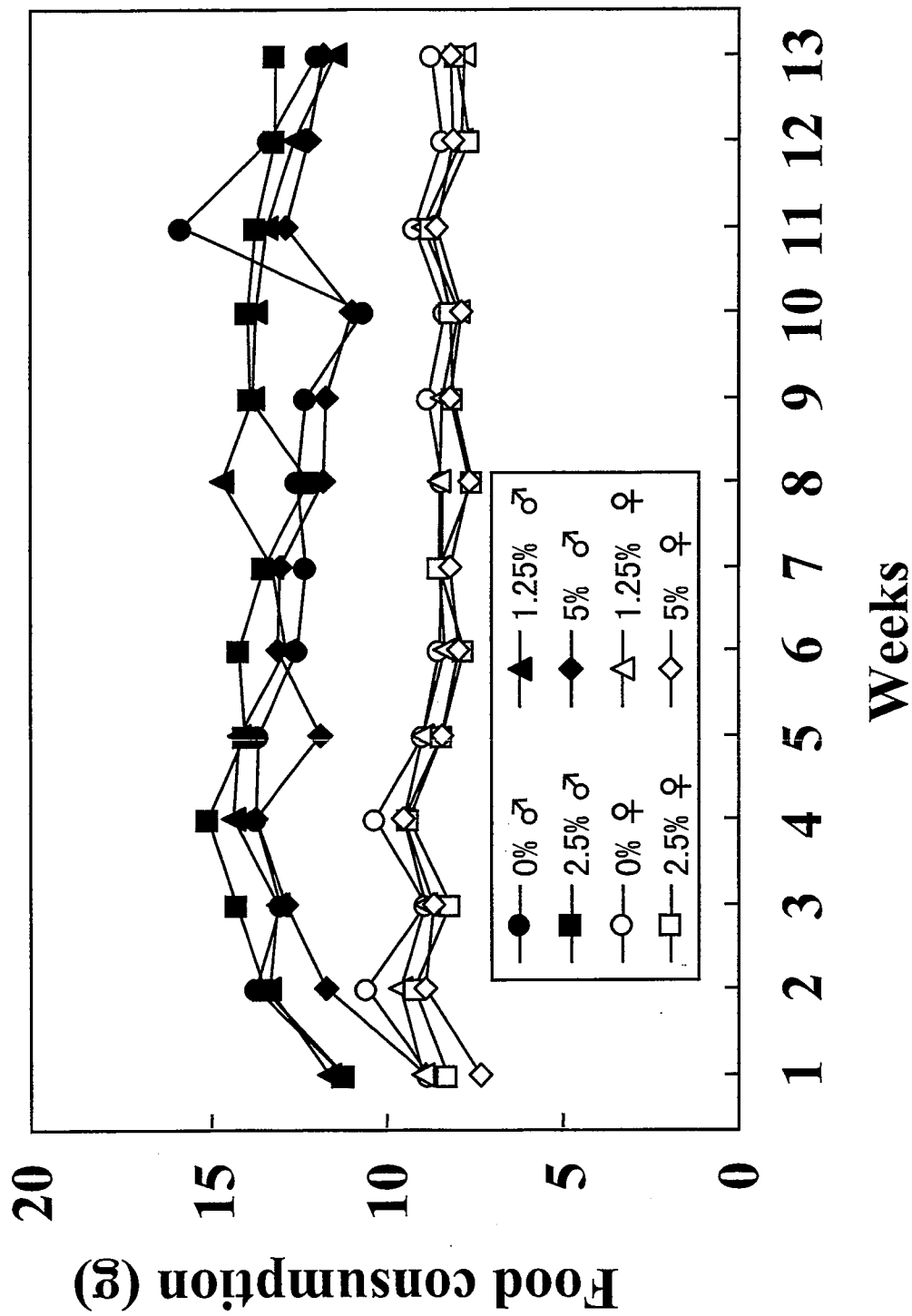
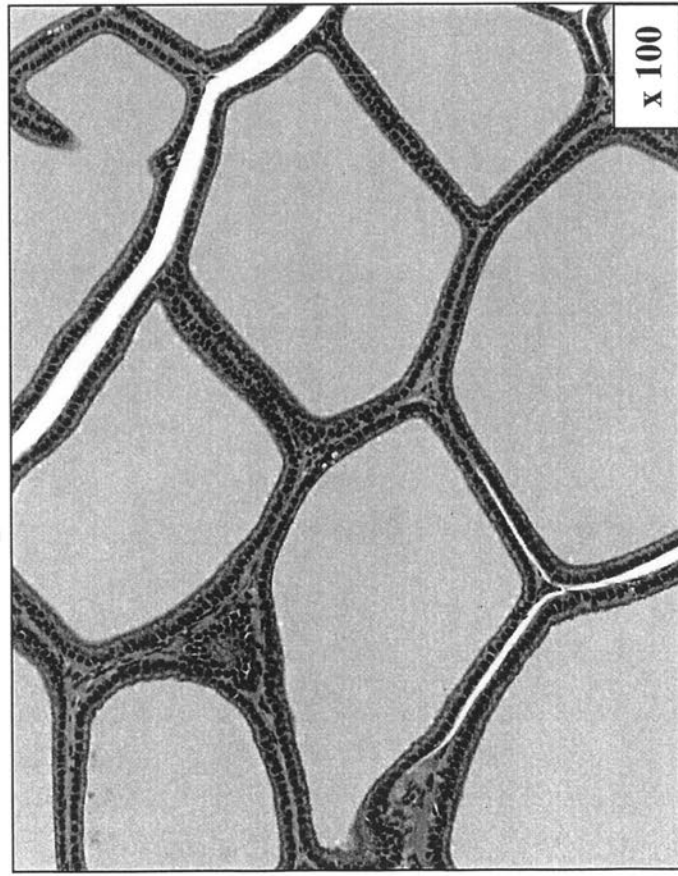


Fig.2 Food intake of rats fed diet containing soybean saponin

○ ○

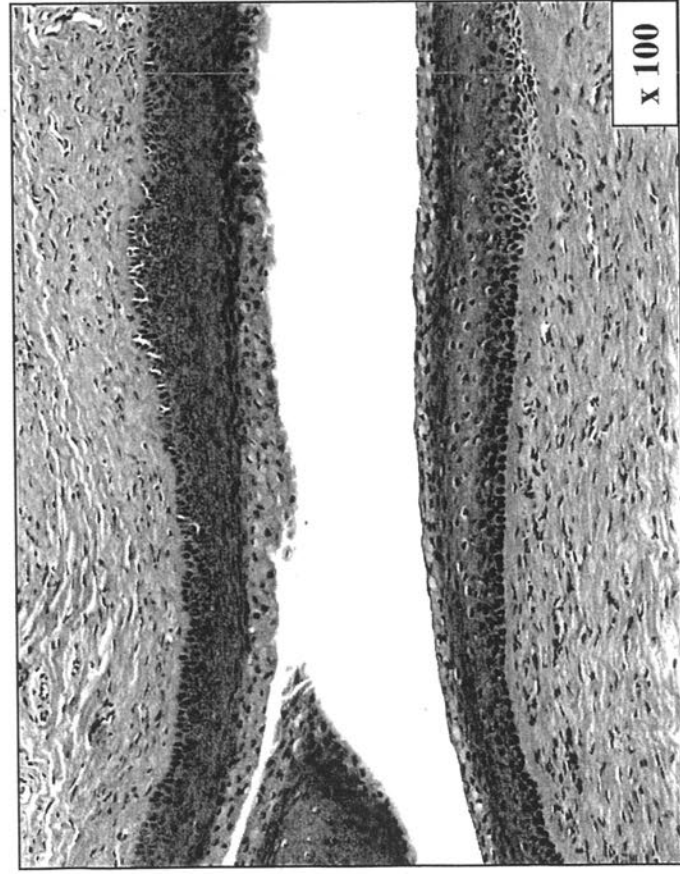


Control

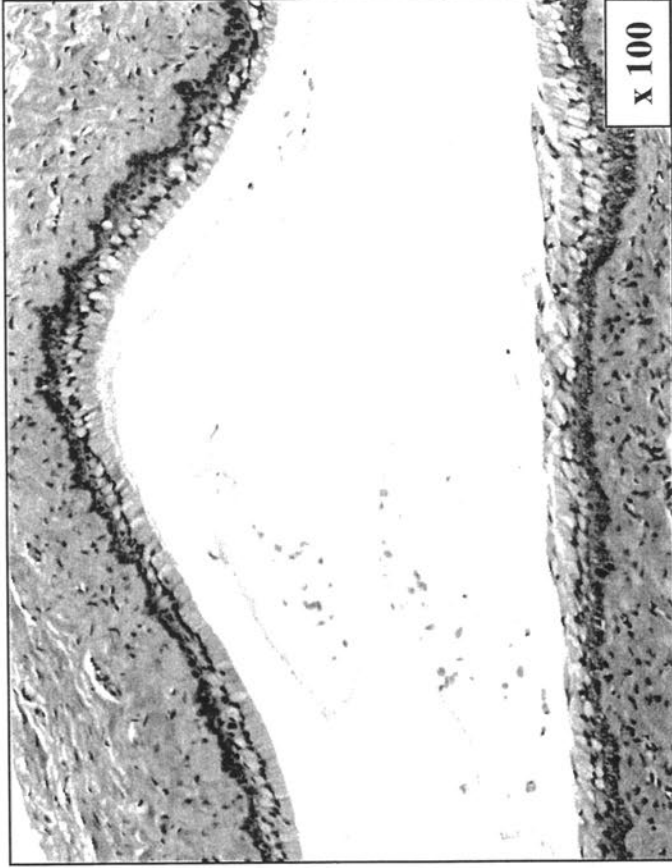


Soybean saponin 5%

Fig.3 Atrophy of ventral prostates in rats fed diet containing soybean saponin

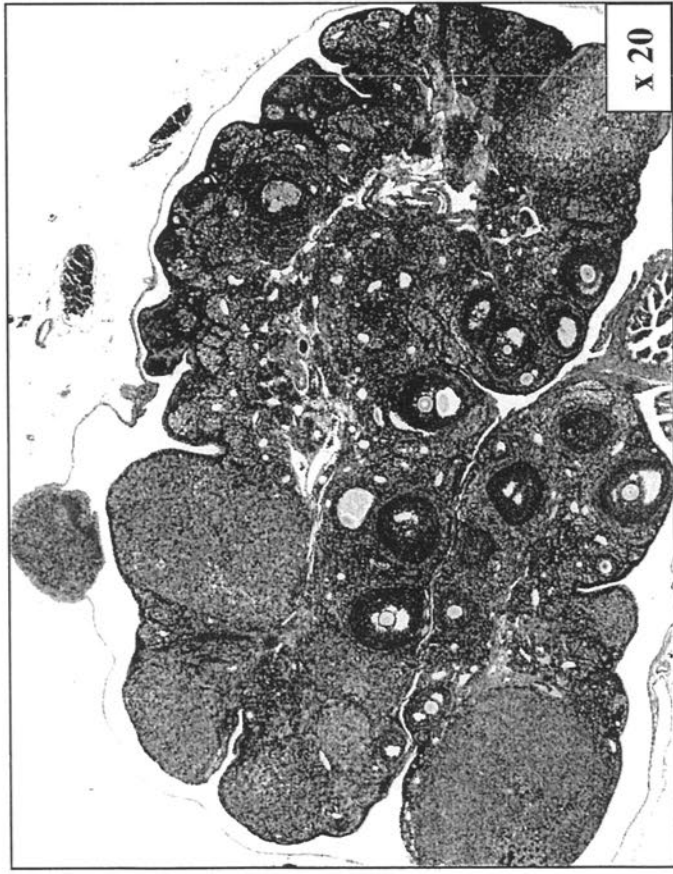


Control



Soybean saponin 5%

Fig.4 Mucinification of vaginas in rats fed diet containing soybean saponin



Control



Soybean saponin 5%

Fig.5 Increased atretic follicles of ovaries in rats fed diet containing soybean saponin

Table 1 Body weight, food consumption and the amount of consumed soybean saponin in rats fed diet containing soybean saponin for 13 weeks

	Dose level (%)	Animal.No	Body weights		Food consumption (g/rat/day)	Intakes of soybean saponin (mg/kg b.w./day)
			Initial(g)	Terminal(g)		
Male	0	10	114.0 ± 6.9	279.4 ± 10.6	12.8	—
	1.25	10	113.4 ± 6.5	289.3 ± 11.0	13.2	707.2
	2.5	10	114.9 ± 6.8	283.1 ± 8.4	13.5	1449.1
	5.0	10	115.6 ± 6.6	253.4 ± 12.0**	12.0	2830.4
Female	0	10	93.1 ± 3.4	165.5 ± 6.5	9.0	—
	1.25	10	94.3 ± 2.5	154.7 ± 4.4**	8.6	751.8
	2.5	10	94.0 ± 3.2	149.4 ± 4.1**	8.3	1498.6
	5.0	10	93.1 ± 2.3	148.9 ± 4.4**	8.3	3028.1

Each value represents the mean or mean ± S.D. throughout the experimental period.

** : Significantly different from the control at $p < 0.01$

Table 2 Hematology in male rats fed diet containing soybean saponin for 13 weeks

Dose level (%)	0 (control)		1.25		2.5		5	
	No. of animals		10		10		10	
RBC	10 ¹⁰ /L	860 ± 28	856 ± 13	858 ± 24	823 ± 10*			
Hb	g/dL	16.0 ± 0.4	15.8 ± 0.5	15.6 ± 0.7	15.5 ± 0.7			
Ht	%	47.2 ± 1.5	46.7 ± 0.7	46.7 ± 1.3	45.7 ± 0.4*			
MCV	fL	54.9 ± 0.5	54.6 ± 0.5	54.5 ± 0.4	55.5 ± 0.4*			
MCH	pg	18.6 ± 0.3	18.4 ± 0.6	18.2 ± 0.5	18.9 ± 0.8			
MCHC	g/dL	33.9 ± 0.4	33.7 ± 0.9	33.5 ± 0.9	34.0 ± 1.4			
Plt	10 ¹⁰ /L	76.9 ± 6.7	72.6 ± 3.7	74.2 ± 3.4	78.7 ± 4.6			
WBC	10 ⁸ /L	39.7 ± 8.9	43.9 ± 9.3	47.4 ± 8.1	52.0 ± 17.2			
Ebl	count/200 WBC	1.5 ± 1.1	2.4 ± 1.2	1.2 ± 1.1	1.6 ± 1.5			
Differential cell count (%)								
Band		0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.2	0.0 ± 0.0			
Seg		17.5 ± 6.2	18.1 ± 4.9	17 ± 2.4	17.1 ± 5.1			
Eosino		0.6 ± 0.6	1.2 ± 1.0	0.5 ± 0.5	1.0 ± 0.7			
Baso		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0			
Lympho		81.6 ± 5.8	80.4 ± 4.4	82.3 ± 2.1	81.1 ± 5.3			
Mono		1.5 ± 1.1	2.4 ± 1.2	1.2 ± 1.1	1.6 ± 1.5			

Each value represents the mean ± S.D.

*: Significantly different from the control at p < 0.05

Table 3 Hematology in female rats fed diet containing soybean saponin for 13 weeks

Dose level (%)	0 (control)		1.25		2.5		5	
	10		10		10		10	
No. of animals	10		10		10		10	
RBC $10^{10}/L$	834 ± 27	831 ± 24	835 ± 29	819 ± 31				
Hb g/dL	15.5 ± 0.5	15.4 ± 0.4	15.5 ± 0.5	15.2 ± 0.4				
Ht %	46.5 ± 1.4	46.3 ± 1.2	46.7 ± 1.6	45.8 ± 1.6				
MCV fL	55.7 ± 0.2	55.7 ± 0.3	55.9 ± 0.2	55.9 ± 0.3				
MCH pg	18.6 ± 0.3	18.6 ± 0.3	18.6 ± 0.3	18.6 ± 0.3				
MCHC g/dL	33.4 ± 0.5	33.3 ± 0.4	33.2 ± 0.5	33.3 ± 0.5				
Plt $10^{10}/L$	73.4 ± 3.5	76.0 ± 3.8	78.4 ± 8.7	75.6 ± 4.9				
WBC $10^8/L$	36.5 ± 8.2	33.0 ± 6.1	32.4 ± 9.1	29.3 ± 8.6				
Ebl count/200 WBC	3.4 ± 2.1	2.4 ± 1.8	2.6 ± 2.1	3.8 ± 1.9				
Differential cell count (%)								
Band	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.2	0.0 ± 0.0				
Seg	20.7 ± 5.6	16.5 ± 3.2	15.7 ± 5.8	16.2 ± 4.1				
Eosino	1.1 ± 1.0	0.8 ± 0.7	1.1 ± 1.0	1.2 ± 0.7				
Baso	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0				
Lympho	77.3 ± 5.6	82.2 ± 3.2	82.9 ± 6.1	82.5 ± 4.4				
Mono	0.8 ± 1.0	0.5 ± 0.5	0.3 ± 0.4	0.2 ± 0.3				

Each value represents the mean ± S.D.

Table 4 Serum biochemistry in male rats fed diet containing soybean saponin for 13 weeks

Dose level (%)	0 (control)		1.25		2.5		5	
	No. of animals		10		10		10	
TP	g/dL	6.4 ± 0.2	6.6 ± 0.1	6.8 ± 0.2**	6.7 ± 0.3*			
Alb	g/dL	4.5 ± 0.1	4.6 ± 0.1	4.7 ± 0.1**	4.7 ± 0.2**			
A/G		2.3 ± 0.2	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.2	2.4 ± 0.2			
Glucose	mg/dL	118.8 ± 16.7	132.1 ± 14.5	147.5 ± 7.8**	134.7 ± 19.7			
Bil	mg/dL	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.04 ± 0.01			
T-Cho	mg/dL	64.3 ± 6.8	63.7 ± 3.2	67.9 ± 7.7	62.8 ± 7.7			
TG	mg/dL	50.4 ± 7.8	58.0 ± 13.0	81.7 ± 26.7*	61.5 ± 30.0			
γGTP	IU/L	<2	<2	<2	<2			
AsT	IU/L	99.6 ± 6.3	87.0 ± 8.6	84.2 ± 18.7*	75.4 ± 12.3**			
AlT	IU/L	57.2 ± 5.2	61.1 ± 8.6	59.4 ± 16.1	50.5 ± 7.3			
ALP	IU/L	448.6 ± 18.2	434.6 ± 30.4	452.9 ± 28.6	449.0 ± 40.1			
BUN	mg/dL	19.3 ± 1.7	18.4 ± 1.4	20.9 ± 2.2	21.3 ± 1.9*			
Cre	mg/dL	0.34 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.32 ± 0.03	0.31 ± 0.02			
Ca	mg/dL	10.9 ± 0.2	11.2 ± 0.2	11.4 ± 0.2**	11.4 ± 0.4**			
IP	mg/dL	6.4 ± 0.4	6.5 ± 0.4	6.3 ± 0.5	6.4 ± 0.8			
Na	mEQ/L	151.2 ± 1.6	149.8 ± 1.3	149.3 ± 1.8	149.7 ± 1.8			
K	mEQ/L	5.0 ± 0.3	5.0 ± 0.2	4.8 ± 0.2	5.1 ± 0.4			
Cl	mEQ/L	105.4 ± 1.4	104.9 ± 1.9	105.1 ± 0.88	105.9 ± 1.2			

Table 5 Serum biochemistry in female rats fed diet containing soybean saponin for 13 weeks

	Dose level (%)			
	0 (control)	1.25	2.5	5
No. of animals	10	10	10	10
TP g/dL	6.3 ± 0.2	6.3 ± 0.2	6.3 ± 0.3	6.2 ± 0.2
Alb g/dL	4.5 ± 0.2	4.5 ± 0.1	4.4 ± 0.2	4.5 ± 0.1
A/G	2.4 ± 0.3	2.4 ± 0.2	2.4 ± 0.4	2.6 ± 0.2
Glucose mg/dL	101.7 ± 10.6	81.8 ± 7.9**	86.3 ± 11.2*	100.7 ± 15.9
Bil mg/dL	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01**	0.04 ± 0.01**	0.04 ± 0.01**
T-Cho mg/dL	85.6 ± 9.0	73.0 ± 8.2*	73.9 ± 13.0*	78.7 ± 5.5
TG mg/dL	43.9 ± 18.1	29.5 ± 8.6*	30.3 ± 10.4*	30.0 ± 10.2*
γ GTP IU/L	<2	<2	<2	3.0 ± 0.7
AsT IU/L	81.5 ± 5.8	84.9 ± 6.9	87.3 ± 8.5	79.0 ± 7.1
AIT IU/L	39.8 ± 4.2	39.3 ± 5.3	45.2 ± 3.6*	40.7 ± 4.0
ALP IU/L	351.9 ± 53.0	321.5 ± 29.2	367.7 ± 31.8	375.3 ± 31.8
BUN mg/dL	17.2 ± 1.6	17.4 ± 1.6	19.3 ± 2.0*	20.4 ± 1.9**
Cre mg/dL	0.33 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.31 ± 0.02*	0.29 ± 0.02**
Ca mg/dL	10.7 ± 0.2	10.5 ± 0.3	10.5 ± 0.3	10.6 ± 0.4
IP mg/dL	5.2 ± 0.6	5.3 ± 0.6	5.5 ± 0.7	5.9 ± 0.8
Na mEQ/L	149.1 ± 2.2	149.4 ± 3.8	149.2 ± 2.5	148.1 ± 3.6
K mEQ/L	4.4 ± 0.4	4.3 ± 0.2	4.5 ± 0.4	4.8 ± 0.3*
Cl mEQ/L	109.3 ± 2.5	108.7 ± 2.0	108.5 ± 1.7	106.8 ± 1.7*

Table 6 Organ weight of male rats fed diet containing soybean saponin for 13 weeks

Dose level (%)	0 (control)		1.25		2.5		5	
	10		10		10		10	
No. of animals	279.4 ± 10.6		289.3 ± 11.0		283.1 ± 8.4		253.4 ± 12.0**	
Body weight (g)	279.4 ± 10.6		289.3 ± 11.0		283.1 ± 8.4		253.4 ± 12.0**	
Absolute								
Brain (g)	1.944 ± 0.050		1.934 ± 0.041		1.894 ± 0.030*		1.865 ± 0.050**	
Thymus (g)	0.165 ± 0.013		0.170 ± 0.011		0.183 ± 0.029		0.159 ± 0.024	
Lungs (g)	0.954 ± 0.102		0.966 ± 0.089		0.917 ± 0.058		0.906 ± 0.078	
Heart (g)	0.840 ± 0.043		0.876 ± 0.052		0.830 ± 0.040		0.782 ± 0.036*	
Spleen (g)	0.571 ± 0.029		0.603 ± 0.036		0.562 ± 0.032		0.533 ± 0.026*	
Liver (g)	6.057 ± 0.394		6.623 ± 0.401**		6.969 ± 0.356**		6.388 ± 0.362	
Adrenals (mg)	36.2 ± 6.3		34.8 ± 4.5		32.1 ± 5.0		32.0 ± 5.4	
Kidneys (g)	1.676 ± 0.099		1.703 ± 0.124		1.680 ± 0.059		1.673 ± 0.128	
Testes (g)	3.120 ± 0.050		3.123 ± 0.080		3.092 ± 0.122		2.980 ± 0.207	
Relative								
Brain (g%)	0.696 ± 0.013		0.669 ± 0.023*		0.670 ± 0.020*		0.737 ± 0.033**	
Thymus (g%)	0.059 ± 0.004		0.059 ± 0.005		0.065 ± 0.010		0.063 ± 0.009	
Lung (g%)	0.341 ± 0.034		0.334 ± 0.024		0.324 ± 0.020		0.359 ± 0.040	
Heart (g%)	0.301 ± 0.011		0.303 ± 0.016		0.293 ± 0.013		0.309 ± 0.009	
Spleen (g%)	0.204 ± 0.006		0.208 ± 0.008		0.199 ± 0.010		0.211 ± 0.010	
Liver (g%)	2.167 ± 0.087		2.288 ± 0.064**		2.461 ± 0.088**		2.521 ± 0.084**	
Adrenals (mg%)	13.0 ± 2.5		12.0 ± 1.6		11.4 ± 2.0		12.7 ± 2.3	
Kidneys (g%)	0.600 ± 0.024		0.588 ± 0.028		0.594 ± 0.014		0.660 ± 0.032**	
Testes (g%)	1.118 ± 0.045		1.080 ± 0.037		1.093 ± 0.043		1.177 ± 0.081	

Each value represents the mean ± S.D.

*, **: Significantly different from the control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively

Table 7 Organ weight of female rats fed diet containing soybean saponin for 13 weeks

Dose level (%)	0 (control)		1.25		2.5		5	
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10	10
Body weight (g)	165.5 ± 6.5	154.7 ± 4.4**	149.4 ± 4.1**	148.9 ± 4.4**				
Absolute								
Brain (g)	1.778 ± 0.029	1.801 ± 0.025	1.775 ± 0.035	1.772 ± 0.032				
Thymus (g)	0.163 ± 0.017	0.159 ± 0.017	0.162 ± 0.031	0.159 ± 0.014				
Lungs (g)	0.767 ± 0.129	0.681 ± 0.041	0.724 ± 0.143	0.638 ± 0.028**				
Heart (g)	0.561 ± 0.042	0.554 ± 0.051	0.506 ± 0.020**	0.497 ± 0.032**				
Spleen (g)	0.392 ± 0.021	0.373 ± 0.014	0.367 ± 0.048*	0.344 ± 0.015**				
Liver (g)	3.601 ± 0.203	3.493 ± 0.194	3.550 ± 0.236	3.544 ± 0.272				
Adrenals (mg)	36.2 ± 3.6	37.4 ± 6.2	34.7 ± 3.0	35.3 ± 3.3				
Kidneys (g)	1.030 ± 0.048	1.018 ± 0.037	0.994 ± 0.037	0.995 ± 0.035				
Relative								
Brain (g%)	1.076 ± 0.041	1.165 ± 0.027**	1.188 ± 0.028**	1.191 ± 0.042**				
Thymus (g%)	0.099 ± 0.012	0.103 ± 0.010	0.108 ± 0.020	0.106 ± 0.008				
Lung (g%)	0.462 ± 0.069	0.441 ± 0.029	0.484 ± 0.092	0.429 ± 0.023				
Heart (g%)	0.339 ± 0.021	0.358 ± 0.027	0.338 ± 0.010	0.334 ± 0.024				
Spleen (g%)	0.237 ± 0.012	0.241 ± 0.011	0.246 ± 0.030	0.231 ± 0.007				
Liver (g%)	2.175 ± 0.070	2.258 ± 0.116	2.375 ± 0.124**	2.383 ± 0.204*				
Adrenals (mg%)	21.9 ± 2.1	24.8 ± 3.7	23.2 ± 2.1	23.7 ± 2.1				
Kidneys (g%)	0.623 ± 0.023	0.658 ± 0.023*	0.665 ± 0.026**	0.669 ± 0.031**				

Each value represents the mean ± S.D.

*, **: Significantly different from the control at p<0.05 and p<0.01, respectively

Table 8 Histopathological findings in males fed diet containing soybean saponin for 13 weeks

Organ	Finding	Grade	Dose level (%)			
			No. of animals			
			0	1.25	2.5	5
			10	10	10	10
Liver	Hepatocyte necrosis, focal	+	1			1
Spleen	Extramedullary hematopoiesis	+	2			2
Kidney	Basophilic tubules	+	8			7
Pancreas	Acinar cell atrophy, focal	+	1			2
Heart	Myocarditis	+	8			6
Lung	Inflammation	+	1			2
		++	1			0
Pituitary	Cyst, pars distalis	+	1			0
Testes	Seminiferous tubule atrophy, unilateral	+	2			2
		+++	0			1
		+	2			0
Epididymis	Decreased spermatozoa, unilateral	++	0			1
Prostate	Atrophy of epithelium, ventral lobe	+	0	0	0	10 **
	Mononuclear cell infiltration, focal	+	1	2	5	2

**₂, p<0.01 vs. 0% group

Table 9 Histopathological findings in females fed diet containing soybean saponin for 13 weeks

Organ	Finding	Grade	Dose level (%)			
			No. of animals			
			0	1.25	2.5	5
			10	10	10	10
Kidney	Basophilic tubules	+	1			0
Pancreas	Acinar cell atrophy, focal	+	0			1
Heart	Myocarditis	+	6			6
Lung	Inflammation	+	1			3
		++	1			0
Harderian gland	Mononuclear cell infiltration, focal	+	3			0
Pituitary	Cyst, pars intermedia	+	1			1
	Cyst, pars distalis	+	0			1
Vagina	Mucinification	+	0	0	2	2
		++	0	0	0	1
		+	0	0	2	4
Ovaries	Increased atretic follicles	+	0	0	2	4