

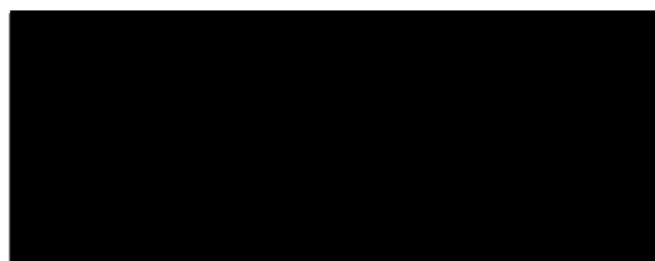
平成 16 年度

# 食品・添加物等規格基準に関する試験検査等について


ブドウ果皮抽出物のラットを用いた 90 日間反復投与毒性試験

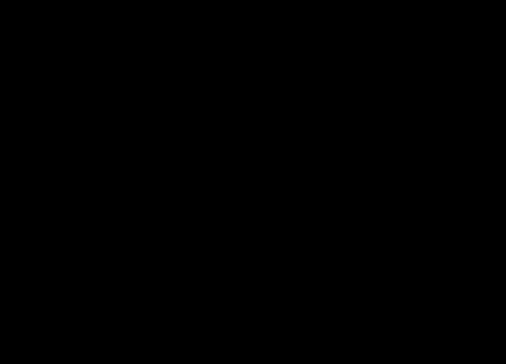
機 関 名

研究責任者名



試験表題：ブドウ果皮抽出物のラットを用いた90日間反復投与毒性試験

試験番号： 

試験実施施設： 

試験責任者： 

## I 要約

ブドウ果皮抽出物をラットに飼料中濃度 0%、1.25%、2.5%および 5.0%にて 90 日間投与し、反復経口投与毒性試験を実施した。

投与期間中に死亡動物を認めず、一般状態、体重、摂水量、眼科学的検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査および器官重量において、投与に関連すると考えられる毒性学的に意義のある変化は認められなかった。

摂餌量では、5.0%群雄で実験第 13 週に、また、同群雌では投与期間を通して高値傾向が観察された。これらは、高濃度で被験物質を混じたことによる影響であると推察された。

肉眼的病理学検査では、5.0%および 2.5%群雌雄の全例に耳下腺の腫大が認められ、病理組織学的検査では、1.25%群を含む被験物質投与全群の雌雄に耳下腺の腺房細胞の肥大が観察された。また、5.0%群雌および 2.5%群雌において、腎臓の皮髄境界部の鉍質沈着の発生頻度および程度の増強が認められた。いずれの変化も被験物質による影響と考えられた。

以上、病理学的検査における投与の影響を示唆するこれらの変化に基づき、無毒性量 (NOAEL) は雌雄とも 1.25%未満であると考えられ、本試験においては特定することはできなかった。

## II 目的


ブドウ果皮抽出物は、以前にラットでの 90 日間反復投与毒性試験 (Bentivegna *et al.*, 2002) が実施されており、その安全性が確認されている。しかし、過去の実験においては、最高投与量が飼料中濃度 2.5% に設定されており、2.5% よりも高い濃度においては安全性の確認がされていない。そこで今回、最高投与量を飼料中濃度 5.0% とし、以下公比 2 で除した 2.5% および 1.25% の濃度でラットに 13 週間混餌投与し、90 日間反復投与毒性試験を実施した。

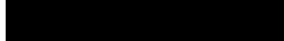
## III 実験方法

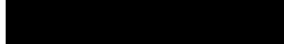
### 1. 被験物質

本試験に使用した被験物質は、食品添加物協会より供給されたものを使用した。その名称、製品名、製造元、ロット番号、性状、純度および保存条件は下記に示す通りであった。

名 称： ブドウ果皮抽出物

製 品 名： 

製 造 元： 

ロット番号： 

性 状： 渋みとぶどう臭を持つ紫色微粉末

純 度： 総ポリフェノール (カテキン当量 OD280nm) 94.5%

保 存 条 件： 10~20℃ (実測値：14~20℃)

### 2. 供試動物

4 週齢の F344/DuCrIj 系ラット (SPF 動物) 雌雄各 46 匹を、日本チャールス・リバー(株) [〒243-0214 神奈川県厚木市下古沢 795 番地] より購入後、6 日間の検疫および馴化期間中に体重の測定 (2 回) と一般状態の観察 (毎日) を行い、異常の認められない動物を選び 5 週齢より被験物質の投与を開始した。群分け後の残余動物については試験系から除外した。

供試動物は「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」に基づいてラットを選択した。また、使用した系統は微生物学的に統御され、遺伝的に安定であり、累積データが豊富であること等を考慮して選択した。

### 3. 動物管理

#### (1)飼育条件

飼育室： ██████████

温度：実測値； 21~23℃（設定値； 22±3℃）

相対湿度：実測値； 51~58%（設定値； 55±10%）

照明時間：12時間／日（7:00~19:00）

換気回数：15回以上／時間

飼育：2匹／ケージ（検疫・馴化期間も同様）

ケージ交換頻度：2ないし3回／週

給餌器交換頻度：1回／週

給水瓶交換頻度：2回／週

#### (2)収容ケージおよび床敷

プラスチック製ケージ（トキワ科学器械㈱、W260×L412×H195mm）を常圧蒸気殺菌して使用した。床敷はベータチップ（Northeastern Products Co., NY, USA）を高圧蒸気滅菌して使用した。ステンレス製ケージ蓋は高圧蒸気滅菌して使用した。

床敷中の環境汚染物質については、オリエンタル酵母工業㈱より定期的に分析値を入手し、当研究所で定めている最大許容濃度以下であることを確認した（IX 添付資料1）。

#### (3)飼料および給餌方法

オリエンタル酵母工業㈱製γ線照射（6.0kGy）粉末飼料 MF（Lot No. ██████████ ██████████）を用いた。調製飼料の給餌には、ケージ内に設置した給餌器（日本クレア㈱、CL-0921）を使用し、自由に摂取させた。給餌器（蓋）はソフト酸化水で消毒後、また給餌器（ガラス製容器）は高圧蒸気滅菌後使用した。

飼料中の環境汚染物質については、オリエンタル酵母工業㈱よりロット毎に分析値を入手し、当研究所で定めている基準に適合していることを確認した（IX 添付資料2）。

#### (4)飲料水および給水方法

██████████を、透明な給水瓶を用いて動物に自由に摂取させた。給水瓶および給水栓はソフト酸化水で消毒したものを使用した。

飲料水は、水道法による水質基準に適合していることを確認した（IX 添付資料3）。

#### (5) 個体識別法

馴化、検疫期間中は、ケージラベルに試験番号、仮ケージ番号、仮動物番号および動物管理責任者名を明記した。動物の個体識別は、上記内容とケージ内動物番号（マジックインキ法による）の組み合わせで行った。

群分け後は、ケージラベルに試験番号、ケージ番号、被験物質名、投与用量、群番号、動物番号、実験（飼育）期間とその開始および終了年月日、試験責任者名を明記し、更に投与用量毎に異なった色のカラーテープをそれに貼付した。動物の個体識別は、上記内容とケージ内動物番号（イヤープンチ法およびマジックインキ法による）の組み合わせで行った。

#### 4. 被験物質の投与方法、投与期間および投与経路の選択理由

投与経路は、被験物質にヒトが暴露される経路である経口とし、混餌投与方法を採用した。投与期間は、「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 90 日間とした。

#### 5. 飼料の調製

被験物質のブドウ果皮抽出物の必要量を秤量後、ミキサーHP-50M 型（関東混合機工業㈱）にて所定の濃度となる様に粉末飼料 MF と 30 分間混合攪拌して投与飼料とした。調製は 4 週以内に 1 回実施し、調製飼料は室温で保存した。

#### 6. 群構成および使用動物数

雌雄ラット各 46 匹をコンピューターによる体重を基にした乱塊法により、1 群 10 匹雌雄各 4 群に群分けし、群分け時の体重が各群間に統計学的な有意差のないことを確認した。また、実験開始時の動物の体重範囲は、平均体重の±20%以内であった。群分けは実験開始の前日に行った。投与開始時（実験開始時）における動物の体重範囲は、雄で 85~93 g、雌で 69~79 g であった。設定した濃度群、使用動物数および動物番号を次表に示した。

表 投与濃度および群の構成

性別	群	被験物質	飼料中濃度 (%)	匹数	動物番号
雄	1	ブドウ果皮抽出物	0	10	0504001~010
	2	ブドウ果皮抽出物	1.25	10	0504011~020
	3	ブドウ果皮抽出物	2.5	10	0504021~030
	4	ブドウ果皮抽出物	5.0	10	0504031~040
雌	5	ブドウ果皮抽出物	0	10	0504041~050
	6	ブドウ果皮抽出物	1.25	10	0504051~060
	7	ブドウ果皮抽出物	2.5	10	0504061~070
	8	ブドウ果皮抽出物	5.0	10	0504071~080

#### 7. 投与量の設定理由

先行して実施した「ブドウ果皮抽出物のラットを用いた 2 週間用量設定試験 ( )」において、最高投与量の 5.0%においても何ら毒性学的影響を認めなかった。従って、規定の 5.0%を本試験における最高投与量とし、以下公比 2 で 2.5%および 1.25%とした。

#### 8. 調製飼料中における被験物質の安定性、均一性および濃度確認試験

先行して実施した「ブドウ果皮抽出物のラットを用いた 2 週間用量設定試験」において、調製飼料中における被験物質の均一性および室温保存 4 週間の安定性が確認されている (IX 添付資料 4) ため、飼料調製頻度を 4 週間以内とし、本試験においては均一性および安定性の分析は実施しなかった。

濃度確認試験は、初回調製飼料において実施した。飼料調製時にミキサーの中部より約 50 g を採取し、各濃度調製飼料中の被験物質の濃度を確認した。濃度確認の分析値は設定濃度の±16%で評価した。

以下に「ブドウ果皮抽出物のラットを用いた 2 週間用量設定試験」にて実施した、均一性試験および安定性試験、さらに本試験にて実施した濃度確認試験 (IX 添付資料 5) の結果について記載した。

### (1)均一性試験

設定濃度(%)	採取部位	分析値(%)		平均値(%)
1.25	上部	1.25	(97.7) <sup>a)</sup>	1.28
	中部	1.27	(99.2)	
	下部	1.31	(102.3)	
2.5	上部	2.40	(98.4)	2.44
	中部	2.42	(99.2)	
	下部	2.49	(102.0)	
5.0	上部	4.91	(98.8)	4.97
	中部	4.96	(99.8)	
	下部	5.05	(101.6)	

<sup>a)</sup>: 数値は平均値に対する%を示す。

調製飼料の上部、中部および下部の変動は、当研究所の標準作業手順書に定められている許容範囲（平均値の±10%）内であり、均一性は良好であることが確認された。

### (2)安定性試験

設定濃度 (%)	分析値(%)		
	保存開始前	2 週後	4 週後
1.25	1.28	1.33 (104) <sup>a)</sup>	1.28 (100)
5.0	4.97	5.25 (106)	4.93 (99)

<sup>a)</sup>: 数値は保存開始前の分析値に対する%を示す。

室温保存2週および4週後の分析値は、1.25%および5.0%ともに当研究所の標準作業手順書に定められている許容範囲（保存開始時の±10%）内であることから、室温条件で4週間安定であることが確認された。

### (3)濃度確認試験

設定濃度(%)	分析値(%)	
0	0	-
1.25	1.29	(103) <sup>a)</sup>
2.5	2.57	(103)
5.0	5.09	(102)

<sup>a)</sup>: 数値は設定濃度に対する%を示す。

各濃度飼料中の被験物質の含量は当研究所の標準作業手順書に定められている許容範囲（設定濃度の±16%）内であることから、適切に調製されていることが確認された。

## 9. 観察および測定項目

### (1)一般状態

実験開始後、1日1回（午前）、全ての動物について一般行動、中毒症状、生死等について観察し、個体別に記録した。また午後の観察時には動物の生死の確認を行った。

### (2)体重

実験開始時およびその後、毎週1回、全動物について電子天秤 LC2200 型（ザルトリウス㈱）を用いて個体別に体重を測定した。また、計画屠殺時に各動物の1晩（約16時間）絶食後の体重（剖検日体重）を測定した。

### (3)摂餌量および被験物質摂取量

実験開始後、毎週1回、2日間の摂取量を電子天秤 LC2200 型（ザルトリウス㈱）を用いてケージ単位で測定し、1匹当りの1日平均摂取量を計算した。また、投与期間中の被験物質摂取量を算出した。

### (4)摂水量

実験開始後、毎週1回、2日間の摂取量を電子天秤 LC2200 型（ザルトリウス㈱）を用いてケージ単位で測定し、1匹当りの1日平均摂取量を計算した。

### (5)眼科学的検査

被験物質投与第13週に、雌雄各群の6匹（動物番号順）について前眼房、中間透光体、眼底あるいはその他の部位を倒像検眼鏡 L-3740（㈱イナミ）を用いて検査を行い、代表例について眼底カメラ RC-2（㈱KOWA）を用いて眼底の写真撮影を実施した。散瞳剤としてミドリンP（参天製薬㈱）を使用した。

## (6)尿検査

被験物質投与第13週に、雌雄各群の6匹（動物番号順）について採尿ラック（日本チャールス・リバー㈱）を用いて4時間（9:00～13:00）の蓄尿を行い、項目1)から13)の尿検査を実施した。なお、採尿中の給餌・給水は行わなかった。項目14)の尿pHは、別に強制排尿にて得た新鮮尿についてpHメーターを用いて実施した。測定項目および測定法は次の通りであった。

項目	測定法および測定機器
1) 尿量	重量測定法 電子天秤 LC2200 型 (ザルトリウス㈱)
2) 色調	肉眼的観察法
3) 潜血	マルチスティックス (バイエルメディカル㈱)
4) ケトン体	マルチスティックス (バイエルメディカル㈱)
5) 尿糖	マルチスティックス (バイエルメディカル㈱)
6) 蛋白	マルチスティックス (バイエルメディカル㈱)
7) ウロビリノーゲン	マルチスティックス (バイエルメディカル㈱)
8) ビリルビン	マルチスティックス (バイエルメディカル㈱)
9) 沈渣	Sternheimer & Malbin 染色後鏡検
10) 比重	アタゴ血清蛋白屈折計 N (㈱アタゴ)
11) ナトリウム(NA)	日立 7070 形自動分析装置 (㈱日立製作所)
12) カリウム(K)	日立 7070 形自動分析装置 (㈱日立製作所)
13) 塩素(CL)	日立 7070 形自動分析装置 (㈱日立製作所)
14) 尿 pH	pHメーターF-51 型 (㈱堀場製作所)

## (7)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下記の検査を実施した。検査は、動物を解剖前日の夕方(16:00頃)より飼料を取り除くことにより絶食させ(この時、床敷きの交換も実施した)、エーテル麻酔下にて開腹後、腹部大動脈より採取した血液の一部を用いて実施した。血液は、抗凝固剤として項目 1)~10)には EDTA-2K を、項目 11), 12)にはクエン酸ナトリウムを用いて凝固を阻止した。なお、偏りを小さくするための動物の採血(屠殺)順は、最初の群の最も若い動物番号を第1番目とし、以後、次群の最も若い動物番号へと順次進め、最終群到達後は最初の群に戻る方法で実施した。

項目 1)~10)の測定には、多項目自動血球分析装置 XT-2000i (シスメックス(株))を用いた。項目 11), 12)についてはドライヘマトシステム COAG1 (株)エイアンドティー)を用いた。なお、多項目自動血球分析装置で測定できなかった場合のために、白血球型別百分率および網状赤血球数については血液塗抹標本を作製したが、問題を認めなかったため、白血球型別百分率用は使用せず、網状赤血球数用は廃棄した。

項目	測定法
1) 赤血球数(RBC)	シースフローDC 検出方式
2) 白血球数(WBC)	フローサイトメトリー法
3) 血色素量(HGB)	SLS ヘモグロビン法
4) ヘマトクリット値(HCT)	シースフローDC 検出方式
5) 血小板数(PLT)	シースフローDC 検出方式
6) 平均赤血球血色素量(MCH)	算出法
7) 平均赤血球容積(MCV)	算出法
8) 平均赤血球血色素濃度(MCHC)	算出法
9) 白血球型別百分率* (DIFFERENTIAL COUNT OF WBC)	フローサイトメトリー法
10) 網状赤血球数(RET)	フローサイトメトリー法
11) プロトロンビン時間(PT)	粘性検知法
12) 活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)	粘性検知法

\* ; [好中球(NEUT)、リンパ球(LYMPH)、単球(MONO)、好酸球(EO)、好塩基球(BASO)]

### (8)血液生化学的検査

検査は、全生存動物について、前項で採取した血液の残りを遠心分離して得た血清を用いて実施した。測定項目および測定法は以下の通りであった。

測定機器は、日立 7070 形自動分析装置を用いた。

項 目	測 定 法
1) アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)	リンゴ酸脱水素酵素共役・UV法 (JSCC法)
2) アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)	乳酸脱水素酵素共役・UV法 (JSCC法)
3) アルカリフォスファターゼ (ALP)	酵素活性測定法 (GSCC法)
4) $\gamma$ -グルタミルトランスアミナーゼ ( $\gamma$ -GTP)	酵素活性測定法 (L- $\gamma$ -グルタミル-3-カルボキシル-4-ニトロアニリン基質法)
5) 総ビリルビン(T-BIL)	アゾビリルビン法
6) 尿素窒素(BUN)	酵素法 (ウリアーゼ・GLDH法)
7) クレアチニン(CRE)	ヤッフェ法
8) ブドウ糖(GLU)	ヘキソキナーゼ法
9) 総コレステロール(T-CHO)	酵素法
10) リン脂質(PL)	酵素法
11) トリグリセリド (TG)	酵素法 (遊離グリセロール消去法)
12) 総蛋白(TP)	ビウレット法
13) アルブミン(ALB)	BCG法
14) A/G比(A/G)	算出法
15) 無機リン(IP)	フィスク・サバロー法
16) カルシウム(CA)	OCPC法
17) マグネシウム(MG)	キシリジナルブルー法
18) ナトリウム(NA)	電極法
19) カリウム(K)	電極法
20) 塩素(CL)	電極法

## (9)病理学的検査

投与期間終了後、動物を放血致死させ、下記の病理学的検査を行った。

### 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、採取した器官・組織（下記 3）項参照）は 10%緩衝ホルマリン液（但し、精巣は Glutaraldehyde Formalin Acetic acid(GFA)液にて前固定後、眼球は採取時にハーダー氏腺を外し、Formaldehyde-Glutaraldehyde 混合固定(GF)液にて前固定後）にて保存した。

### 2)器官重量

下記の器官について重量を測定し、剖検日体重を用いて器官重量体重比（相対重量）を算出した。

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（卵管を含む）、子宮、唾液腺、胸腺、甲状腺（上皮小体を含む）\*

\*：固定後測定した。

### 3)病理組織学的検査

雌雄の対照群および最高投与群（第 1, 4, 5 および 8 群）の全てについては下記の器官・組織について常法に従い、パラフィン包埋、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、鏡検した。その他の群については、肉眼病変部および標的器官・組織（最高投与群で被験物質投与に起因すると考えられる変化を認めた雌雄の耳下腺および雌の腎臓）につき検査した。

心臓、脾臓、リンパ節（頸部、腸間膜）、胸腺、下垂体、甲状腺（上皮小体を含む）、副腎、鼻腔（鼻甲介）、気管、肺（気管支を含む）、舌、唾液腺（顎下腺、舌下腺）、食道、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、前立腺、精囊、精巣上体、卵巣、卵管、子宮、乳腺、膣、脳（大脳、小脳）、脊髄（胸部）、坐骨神経、大動脈、眼球、ハーダー氏腺、皮膚、骨および骨髄（大腿骨、胸骨）、骨格筋、ジンバル腺、その他肉眼病変部

## 10. 統計処理

対照群と各投与群（第1群と第2~4群, 第5群と第6~8群）との間の統計学的な有意差検定を行い、危険率5% ( $P < 0.05$ ) または1% ( $P < 0.01$ ) のレベルで判定した。統計学的解析は、対照群と各投与群の体重、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査および器官重量の各測定値の平均値の差の検定について、5%有意水準で Bartlett 法による等分散検定を行った。等分散の場合は、パラメトリックの Dunnett 法による片側検定を行い、不等分散の場合は、ノンパラメトリックの Steel 法による片側検定を行った。また、尿検査、肉眼的病理学検査および病理組織学的検査における発生頻度の差の検定については、Fisher の直接確率検定（片側）を、程度のある病変については Mann-Whitney 検定（両側）を行った。眼科学的検査については異常を認めなかったことから統計学的解析は実施しなかった。また、一般状態、摂餌量、摂水量については統計処理を行わなかった。

#### IV 実験成績

##### 1. 生存率 (TABLE 1)

投与期間中、いずれの群においても死亡例は認められなかった。

##### 2. 一般状態 (TABLE 2, APPENDIX A)

投与期間中、雌雄ともにいずれの投与群においても一般状態に著変は認められなかった。

##### 3. 体重 (FIGURE 1, TABLE 3, APPENDIX B)

5.0%群雄 (第4群) において、投与第5および6週に有意な低値が認められた。その他の投与群においては、投与期間を通じて対照群 (第1, 5群) と比較して有意な差は認められなかった。

##### 4. 摂餌量および被験物質摂取量 (TABLES 4,5, APPENDIX C)

摂餌量においては、5.0%群雄 (第4群) で投与第13週に高値傾向が、また、5.0%群雌 (第8群) で投与期間を通して高値傾向が認められた。1.25%群雌 (第6群) において、投与第10週に高値傾向が認められたが、他の週では対照群雌 (第5群) とほぼ同程度であり、一過性の変動と考えられた。その他の群においては、対照群 (第1, 5群) とほぼ同様の値を示した。

被験物質であるブドウ果皮抽出物の13週間の投与期間中における平均摂取量は、5.0%群の雄で3281 mg/kg/day、雌で3558 mg/kg/day、2.5%群の雄で1572 mg/kg/day、雌で1665 mg/kg/day および1.25%群の雄で768 mg/kg/day、雌で831 mg/kg/day であった。

##### 5. 摂水量 (TABLE 6, APPENDIX D)

5.0%群雌 (第8群) において投与第1週に低値傾向が、また2.5%群雌 (第7群) では、実験第1および5週に低値傾向が認められたが、いずれの変動においても、一過性の変動であり、偶発的な変化と考えられた。その他の投与群においては、投与期間中、対照群 (第1, 5群) とほぼ同様の値を示した。

## 6. 眼科学的検査 (TABLE 7, APPENDIX E)

投与第 13 週に実施した眼科学的検査において、検査を実施した対照群および投与各群雌雄の動物 (雌雄各 6 例/群) に異常は認められなかった。

## 7. 尿検査 (TABLE 8, APPENDIX F)

pH の有意な低値が 5.0%群雄 (第 4 群) で認められた。

沈渣における結晶の有意な低値が 1.25%群雌 (第 6 群) で認められたが、用量に関連した変化ではないことから、偶発的な変動と考えられた。

尿量の有意な低値が雄の全投与群で認められた。

その他の検査項目では、対照群と各投与群との間に有意な変化は認められなかった。

## 8. 血液学的検査 (TABLE 9, APPENDIX G)

赤血球数(RBC)の有意な低値が 5.0%群雄 (第 4 群) で認められた。

血色素量(HGB)の有意な低値が 5.0%群雄および 2.5%群雄 (第 3, 4 群) で認められた。

ヘマトクリット値(HCT)の有意な低値が 5.0%群雄 (第 4 群) で認められた。

平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)の有意な低値が 5.0%群雄および 2.5%群雄 (第 3, 4 群) で認められた。

血小板数(PLT)の有意な低値が 5.0%群雌 (第 8 群) で認められた。

網状赤血球数(RETICULOCYTE)の有意な高値が 2.5%群雌 (第 7 群) で認められた。

プロトロンビン時間(PT)の有意な延長が 5.0%群雄 (第 4 群) で認められた。

2.5%群雌 (第 7 群) で認められた網状赤血球数の有意な高値は、用量相関がないことから、偶発的な変動と考えられた。

その他の測定項目では、対照群と各投与群との間に有意な変化は認められなかった。

## 9. 血液生化学的検査 (TABLE 10, APPENDIX H)

アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)の有意な高値が 5.0%群雌 (第 8 群) で認められた。

アルカリホスファターゼ(ALP)の有意な高値が 5.0%群雄 (第 4 群) で認められた。

総ビリルビン(T-BIL)の有意な高値が 5.0%群雌および 2.5%群雌 (第 7, 8 群) で認められた。

総コレステロール(T-CHO)およびリン脂質(PL)の有意な低値が 5.0%群雌雄および 2.5%群雌 (第 4, 7, 8 群) でそれぞれ認められた。

中性脂肪(TG)の有意な低値が 5.0%群雄および 2.5%群雌 (第 3, 4 群) で認められた。

総蛋白およびアルブミン(ALB)の有意な低値が 5.0%群雌 (第 4 群) で認められた。

塩素(CL)の有意な高値が雄の投与全群 (第 2~4 群) で認められた。

その他の測定項目では、対照群と各投与群との間に有意な変化は認められなかった。

## 10. 病理学的検査

### (1)肉眼的病理学検査 (TABLE 11, APPENDIX I)

肝臓の横隔膜結節が、対照群雄を除く全ての群 (第 2~8 群) において 1~3 例認められた。

卵巣 (右) の嚢胞が 1.25%群 (第 6 群) で 1 例認められた。

子宮の拡張が雌の全ての群 (第 5~8 群) で 1~4 例認められた。

肝臓、卵巣および子宮で認められた変化は、いずれも対照群 (第 1, 5 群) との間には有意な差は認められなかった。

耳下腺については、2.5%群雌雄および 5.0%群雌雄 (第 3, 4, 7, 8 群) における全ての動物で腫大が認められ、対照群 (第 1, 5 群) と比べて有意であった。

### (2)器官重量および器官重量体重比 (TABLES 12,13, APPENDICES J,K)

器官重量で、対照群と比較して統計学的に有意な変動を認めたのは次のとおりであった。

脳では、5.0%群雌および 1.25%群雌 (第 6, 8 群) で有意な高値が認められた。

副腎では、5.0%群雌および 1.25%群雌 (第 6, 8 群) で有意な高値が認められた。

卵巣では、1.25%群 (第 6 群) で有意な高値が認められた。

1.25%群で認められた卵巣の有意な高値については、用量との関連性が認められなかった。

器官重量体重比で、対照群と比較して統計学的に有意な変動を認めたのは次のとおりであった。

脳では、1.25%群雄 (第 2 群) で有意な低値が認められた。

下垂体では、1.25%群雄 (第 2 群) で有意な低値が認められた。

肺では、5.0%群雌 (第 8 群) で有意な高値が認められた。

脾臓では、5.0%群雌（第8群）で有意な高値が認められた。

副腎では、5.0%群雌（第8群）で有意な高値が認められた。

唾液腺では、5.0%群雌（第8群）で有意な高値が認められた。

1.25%群雄で認められた脳および下垂体の有意な低値については、用量との関連性が認められなかった。

### (3)病理組織学的検査 (TABLE 14, APPENDIX L)

#### 1)脈管系

心臓では、軽微な限局性炎症が5.0%群雄（第4群）1例に認められた。

大動脈では、変化は認められなかった。

#### 2)造血器系

頸部リンパ節では、軽微な形質細胞浸潤が5.0%群の雄（第4群）3例、雌（第8群）1例および対照群の雄（第1群）6例に認められた。

骨髄では、軽微な肉芽腫性炎症が、5.0%群の雌および対照群の雌（第5, 8群）各1例に、軽度な同所見が5.0%群の雌（第8群）1例および対照群の雌（第5群）2例に認められた。

腸間膜リンパ節、脾臓および胸腺では、変化は認められなかった。

#### 3)内分泌器系

下垂体では、ラトケ囊遺残が対照群の雌雄（第1, 5群）各1例に認められた。

甲状腺では、異所性胸腺が5.0%群の雄（第4群）1例、対照群の雄（第1群）2例に認められた。

上皮小体および副腎では変化は認められなかった。

#### 4)呼吸器系

鼻腔では、鼻涙管の軽微なリンパ球浸潤が5.0%群の雄（第4群）1例に、鼻腔の軽度な炎症が5.0%群の雌（第8群）1例に認められた。

肺では、軽微な鉍質沈着が対照群の雄（第1群）1例に認められた。

気管では変化は認められなかった。

#### 5)消化器系

耳下腺では、5.0%、2.5%および1.25%群の雌雄全例に、それぞれ高度、中等度および軽微～軽度な腺房細胞の肥大が認められ、いずれも対照群と比較して有意な高値を示した。肉眼的病理学検査で、5.0%群の雌雄および2.5%群の雌雄全例に

認められた耳下腺の腫大は、病理組織学的にはいずれも腺房細胞の肥大であった。

盲腸では、軽微な鉍質沈着が対照群の雌（第5群）1例に認められた。

膵臓では、軽微な腺房細胞の萎縮が対照群の雌（第5群）1例に認められた。

肝臓では、軽微なリンパ球浸潤が5.0%群の雌（第8群）1例に認められた。なお、肉眼的病理学検査において認められた肝臓の横隔膜結節については、病理組織学的にはいずれも著変は認められなかった。

舌、唾液腺、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、結腸および直腸では、変化は認められなかった。

#### 6)泌尿器系

腎臓では、軽微な尿細管の再生が、5.0%群雄および対照群の雄（第1, 4群）各2例に、軽度な同所見が対照群の雄（第1群）2例に認められた。5.0%、2.5%および1.25%群の雌（第6~8群）全例に、それぞれ軽度~中等度、軽度~中等度および軽微~軽度な皮髄境界部の鉍質沈着が認められ、対照群（第5群）と比較して有意であった。

膀胱では変化は認められなかった。

#### 7)生殖器系

前立腺では、軽微なリンパ球浸潤が対照群（第1群）3例に認められ、軽微な炎症が5.0%群（第4群）3例および対照群（第1群）1例に認められた。

卵巣では、軽度な嚢胞が1.25%群（第6群）の1例に認められた。肉眼的病理学検査で認められた卵巣の嚢胞は、病理組織学的に嚢胞であった。

子宮では、軽微ないし軽度な内腔の拡張が雌（第5~8群）の全例にそれぞれ1~2例認められた。肉眼的病理学検査で認められた子宮の拡張は、病理組織学的にいずれも子宮の内腔の拡張であった。

精巣、精巣上体、精嚢、乳腺、卵管および膣では変化は認められなかった。

#### 8)運動器系および感覚器系

ジンバル腺では、軽微な炎症が5.0%群の雌（第8群）1例に認められた。

眼球では、軽微な網膜の萎縮が5.0%群の雄（第4群）1例に認められた。なお、本動物については、確認のため左眼球についても検索を実施（他の動物は右眼球のみを検索）したが、異常が認められなかったことから、被験物質による影響はないと判断した。

大腿骨、胸骨、骨格筋、皮膚およびハーダー氏腺では変化は認められなかった。

#### 9)神経系

脳、脊髄および坐骨神経では変化は認められなかった。

以上、被験物質投与の影響と考えられる変化は、被験物質投与群の雌雄全例にみられた耳下腺の腺房細胞の肥大のほか、5.0%、2.5%群の雌における腎臓の皮髄境界部の鉍質沈着で、発生頻度および程度の増強が認められ、統計学的に有意であった。その他の所見については、いずれも統計学的な差は認められなかった。

## V 考察および結論

F344/DuCrIcrlj 系ラットの雌雄各群 10 匹に、ブドウ果皮抽出物を飼料中濃度 0%、1.25%、2.5%および 5.0%で 13 週間混餌投与し、反復経口投与毒性試験を実施した。

投与期間中に死亡例はなく、一般状態、摂水量および眼科学的検査において、被験物質の投与に関連した変化は認められなかった。

体重では、5.0%群雄で実験第 5 および 6 週に、対照群と比較して有意な低値が認められたが、その後は対照群とほぼ同程度の値を示しており、一過性の変動と考えられた。

摂餌量では、5.0%群雄で実験第 13 週に、また、同群雌では投与期間を通して高値傾向が認められた。Bentivegna ら(Bentivegna *et al.*, 2002)の報告では、ブドウ果皮抽出物を 2.5%の濃度で SD ラットに 13 週間混餌投与したところ、雄で摂餌量の高値が認められている。Bentivegna らは、ブドウ果皮抽出物の体重への影響はないことから、被験物質を高濃度で混じたことによる、代償性の反応であると報告している。本試験においては、高用量群 (5.0%) で摂餌量の高値傾向が認められており、同様の機序によるものと推察された。

尿検査では、pH の有意な低値が 5.0%群雄に、尿量の有意な低値が雄の全投与群にそれぞれ認められた。尿検査において、これらを除く他の項目では有意な差を認めず、摂水量や血液生化学的検査の腎機能に関連する項目についても、何ら変化を認めていない。また、病理組織学的検査において腎臓に被験物質の投与と関連のある変化は認められていないことから、毒性学的には意義のない変化と考えられた。

血液学的検査では、赤血球数およびヘマトクリット値の有意な低値が 5.0%群雄に、血色素量および MCHC の有意な低値が 5.0%群雄および 2.5%群雄にそれぞれ認められた。いずれも貧血を示唆する指標であるが、造血器系器官に病理学的変化が認められなかったことから、毒性学的に意義のある変化とは考えなかった。また、5.0%群雌においては、血小板数の有意な低値が、5.0%群雄においては PT の有意な延長が認められた。これらの変化は統計学的に有意性を示したが、いずれも当研究所の背景データの範囲内であり、病理学的にも変化が認められなかったことから、毒性学的に意義のある変化とは考えなかった。

血液生化学的検査では、ALT、ALP、総ビリルビンの有意な高値および総蛋白、アルブミンの有意な低値が 5.0%群雄または雌で認められた。これらの項目は肝機能の指

標となるパラメータであるが、肝重量および肝臓の病理組織学的検査において、これらの変動に関連する所見は認められていないことから、偶発的な変動と判断された。また、5.0%および2.5%群雌雄で総コレステロールおよびリン脂質の低値が、5.0%群雄および2.5%群雄でトリグリセリドの低値が認められた。ブドウ果皮抽出物と同様にアントシアニン系色素である、ムラサキイモ色素 (Sano *et al.*, 1996) や他のアントシアニン系色素 (Nabae *et al.*, 2003) の13週間毒性試験でも観察された毒性学的には意義のない変化であるが、抗肥満効果があるとされることから注目すべき所見である (Koda *et al.*, 2005; Tsuda *et al.*, 2003)。塩素の有意な高値が雄の投与全群で認められたが、他の電解質には変動は見られず、当研究所の背景データな範囲内であることから、偶発的な変化と判断された。

器官重量体重比では、肺、脾臓、副腎および唾液腺の有意な高値が5.0%群雌において認められたが、いずれも軽微な変動であり、病理組織学的検査において、器官重量の変動に関連した変化を認めていないことから、偶発的な変化と考えられた。

肉眼的病理学検査では、5.0%群雌雄および2.5%群雌雄の全例に耳下腺の腫大が認められた。病理組織学的に検索したところ、それぞれ中等度および高度な腺房細胞の肥大であることが確認された。また、肉眼的には変化が観察されなかった1.25%群雌雄においても、軽微～軽度な耳下腺の腺房細胞の肥大が認められ、いずれも対照群と比較して有意であった。耳下腺が肥大する原因として、 $\beta 1$  アドレナリン受容体が刺激されることで、げっ歯類の耳下腺の腺房細胞が過形成あるいは肥大 (Barka, 1965; Selye *et al.*, 1961) となり、その結果、耳下腺が3~5倍に腫大 (Selye *et al.*, 1961; Brown-Grant *et al.*, 1961) することが報告されている。しかし、以前に報告のあるブドウ果皮抽出物の90日間毒性試験 (Bentivegna *et al.*, 2002) では、2.5%の混餌投与で耳下腺への影響は報告されていない。

病理組織学的検査では、腎臓において、5.0%群雌および2.5%群雌に軽度～中等度の皮髄境界部の鉍質沈着が認められ、対照群と比較して有意であった。鉍質沈着はラットの雌にしばしば観察される所見であるが、電解質や蛋白、脂肪の不均衡が鉍質沈着を引き起こすとされている。また、卵巣を摘出したラットでは鉍質沈着の発生が減少し、逆に去勢術を行った雄ラットやエストラジオールを投与された雌ラットでは発生が増加するといったようにホルモンの影響が関係することが報告されているが、その発生原因については確立されていない (Boorman *et al.*, 1990; Iwata *et al.*, 1986; Peter *et*

al., 1986)。今回の結果においては、血液生化学的検査において、雌の投与群で総コレステロールおよびリン脂質の低値が認められており、腎臓の鉍質沈着の増加との関連が疑われるが、同様に抗肥満効果のあるムラサキイモ色素等では、腎臓の鉍質沈着を増加させるという報告はされていない。この変化については、被験物質による影響と考えられたが、その発生原因は明確ではなかった。

ブドウ果皮抽出物を飼料中濃度 5.0%、2.5%および 1.25%でラットの雌雄に 90 日間投与した結果、肉眼的病理学検査において耳下腺の腫大が 5.0%および 2.5%群の雌雄全例に、病理組織学的検査において耳下腺の腺房細胞の肥大が全投与群雌雄に認められた。さらに、5.0%群雌および 2.5%群雌の腎臓において、皮髄境界部の鉍質沈着の発生率および程度の増強が認められた。以上、肉眼的病理学検査および病理組織学的検査において、投与の影響が示唆された毒性学的な変化に基づき、無毒性量 (NOAEL) は雌雄とも 1.25%未満であると考えられ、本試験においては特定できなかった。

## VI 文献

- Brown-Grant K., 1961, Enlargement of salivary gland in mice treated with isopropylnoradrenaline. *Nature*, 191: 1076-8.
- Selye H. R., Veilleux R., and Cantin M., 1961, Excessive stimulation of salivary gland growth by isoproterenol. *Science*, 133: 44-5.
- Barka T., 1965, Induced cell proliferation: the effect of isoproterenol. *Exp. Cell Res.* 37: 662-9.
- Iwata, H., Hirouchi, Y., Inoue, H. and Enomoto, M., 1986, Pathological study on nephrocalcinosis in Fischer 344/DuCrj rats. *Exp. Anim.*, 35: 229-305.
- Peter, C.P., Burek, J.D. and Van Zeieten, M.J., 1986, Spontaneous nephropathies in rats. *Toxicol. Pathol.*, 14, 91-101.
- Boorman, G.A., Eustis, S.L., Elwell, M.R., Montgomery, Jr, C.A. and MacKenzie, W.F., 1990, Pathology of the Fischer Rat. Academic Press, Inc., San Diego, CA.
- Sano, M., Tamano, S., Hagiwara, A., Kawabe, M., Nakamura, M., Imaida, K., and Hirose, M., 1996, 13-week oral toxicity study of pigments extracted from the purple sweet potato in F344/DuCrj rats. *Jpn. J. Food Chem.*, 3: 99-105.
- Bentivegna, S.S. and Whitney, K.M., 2002, Subchronic 3-month oral toxicity study of grape seed and grape skin extracts. *Food Chem. Toxicol.*, 40: 1731-43.
- Nabae, K., Ichihara, T., Kawabe, M., Hagiwara, A., Tamano, S., Tsushima, Y., Uchida, K., Aoki, H., and Koda, T., 2003, 90-Day oral toxicity study of purple corn color in rats. In: 9th Annual Meeting, Japanese Society of Food Chemistry, Tokyo, pp. 35.
- Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoki, H., and Osawa, T., 2003, Dietary cyanidin 3-O- $\gamma$ -D-glucoside-rich purple corn color prevents development of obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *J. Nutr.*, 133: 2125-30.
- Koda, T. and Onishi, K., 2005, Physiological functions of purple corn color. *Foods Food Ingredients J. Jpn.*, 210: 744-50.

VII 図および総括表

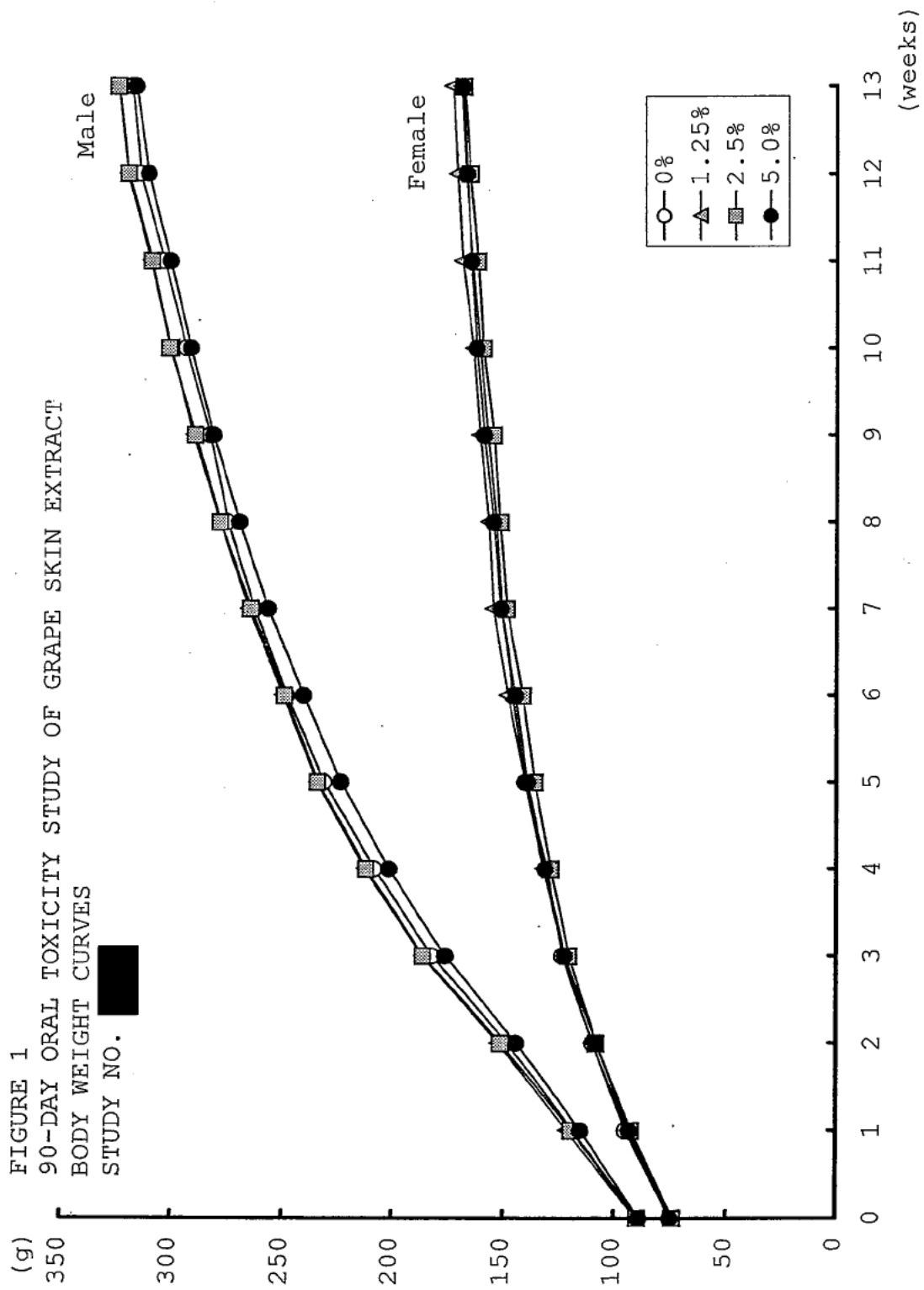


TABLE 1  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 SURVIVAL DATA (NO. OF SURVIVALS)  
 STUDY NO. ██████████

SEX	GROUP NO.	LEVEL (%)	NO. OF ANIMALS	WEEKS														TOTAL NO. OF SURVIVALS (%)	
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
MALE	1	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10(100)
	2	1.25	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10(100)
	3	2.5	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10(100)
	4	5.0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10(100)
FEMALE	5	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10(100)
	6	1.25	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10(100)
	7	2.5	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10(100)
	8	5.0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10(100)

TABLE 2  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 GENERAL CONDITION DATA

SITE AND FINDING	GROUP NO.	SEX							
		MALE				FEMALE			
STUDY NO. [REDACTED]	LEVEL (%)	1	2	3	4	5	6	7	8
		0	1.25	2.5	5.0	0	1.25	2.5	5.0
	NO. OF ANIMALS	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
Normal		10	10	10	10	10	10	10	10

TABLE 3  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 BODY WEIGHT DATA (G, MEAN  $\pm$  S.D.)

SEX	STUDY NO.	GROUP NO.	LEVEL (%)	WEEKS			
				0	1	2	3
MALE		1	0	89.4 $\pm$ 2.2	119.0 $\pm$ 3.5	148.5 $\pm$ 5.7	182.2 $\pm$ 5.9
		2	1.25	90.4 $\pm$ 1.6	121.9 $\pm$ 4.0	152.7 $\pm$ 7.3	186.5 $\pm$ 7.4
		3	2.5	89.6 $\pm$ 2.0	119.7 $\pm$ 3.9	151.4 $\pm$ 5.9	186.0 $\pm$ 6.6
		4	5.0	88.9 $\pm$ 1.7	115.5 $\pm$ 3.5	144.7 $\pm$ 7.6	176.3 $\pm$ 10.0
FEMALE		5	0	74.8 $\pm$ 2.0	95.1 $\pm$ 2.8	110.2 $\pm$ 2.6	124.0 $\pm$ 4.4
		6	1.25	74.7 $\pm$ 3.0	94.1 $\pm$ 3.3	110.3 $\pm$ 4.7	123.2 $\pm$ 5.3
		7	2.5	73.7 $\pm$ 2.7	92.6 $\pm$ 4.2	108.5 $\pm$ 5.2	120.9 $\pm$ 4.9
		8	5.0	74.7 $\pm$ 1.9	93.3 $\pm$ 2.4	108.5 $\pm$ 2.5	122.9 $\pm$ 3.7

TABLE 3  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 BODY WEIGHT DATA (G, MEAN  $\pm$  S.D.)

SEX	STUDY NO.	GROUP NO.	GROUP LEVEL (%)	WEEKS						
				4	5	6	7			
MALE	1	0	208.6 $\pm$ 5.6	231.5 $\pm$ 6.1	248.4 $\pm$ 7.0	263.2 $\pm$ 7.5				
	2	1.25	213.2 $\pm$ 7.4	234.6 $\pm$ 7.9	250.5 $\pm$ 9.3	265.6 $\pm$ 9.7				
	3	2.5	212.1 $\pm$ 6.5	234.3 $\pm$ 7.3	249.5 $\pm$ 7.7	264.5 $\pm$ 8.4				
	4	5.0	202.0 $\pm$ 8.9	224.0 $\pm$ 7.9 *	240.9 $\pm$ 6.0 *	256.9 $\pm$ 6.5				
FEMALE	5	0	131.2 $\pm$ 5.3	141.1 $\pm$ 5.5	146.6 $\pm$ 6.5	151.6 $\pm$ 6.8				
	6	1.25	132.8 $\pm$ 5.7	141.0 $\pm$ 6.2	148.7 $\pm$ 8.6	155.4 $\pm$ 9.3				
	7	2.5	129.4 $\pm$ 6.9	136.9 $\pm$ 6.2	142.2 $\pm$ 6.7	149.2 $\pm$ 6.7				
	8	5.0	131.9 $\pm$ 3.3	139.9 $\pm$ 4.7	145.5 $\pm$ 4.6	152.0 $\pm$ 5.5				

\* : Significantly different from control group at P<0.05.

TABLE 3  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 BODY WEIGHT DATA (G, MEAN  $\pm$  S.D.)

SEX	STUDY NO.	GROUP NO.	LEVEL (%)	WEEKS						
				8	9	10	11			
MALE	1	0	275.2 $\pm$ 7.1	283.4 $\pm$ 8.5	294.4 $\pm$ 9.3	304.4 $\pm$ 9.8				
	2	1.25	278.8 $\pm$ 9.4	290.9 $\pm$ 11.5	301.6 $\pm$ 12.1	310.8 $\pm$ 11.5				
	3	2.5	278.5 $\pm$ 8.5	290.0 $\pm$ 8.3	302.1 $\pm$ 8.6	310.0 $\pm$ 9.0				
	4	5.0	269.9 $\pm$ 6.6	282.0 $\pm$ 5.8	292.3 $\pm$ 4.8	301.9 $\pm$ 4.8				
FEMALE	5	0	154.2 $\pm$ 6.3	158.0 $\pm$ 6.9	161.7 $\pm$ 7.0	165.3 $\pm$ 8.2				
	6	1.25	157.6 $\pm$ 8.7	161.7 $\pm$ 10.1	164.8 $\pm$ 9.0	169.7 $\pm$ 8.6				
	7	2.5	152.4 $\pm$ 6.6	155.5 $\pm$ 7.9	160.4 $\pm$ 7.9	162.8 $\pm$ 8.7				
	8	5.0	155.5 $\pm$ 6.7	159.9 $\pm$ 7.9	163.3 $\pm$ 7.6	165.6 $\pm$ 7.9				

TABLE 3  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 BODY WEIGHT DATA (G, MEAN ± S.D.)

STUDY NO.	GROUP	LEVEL (%)	WEEKS		
			12	13	13
MALE	1	0	315.4 ± 10.3	319.2 ± 11.7	319.2 ± 11.7
	2	1.25	321.4 ± 11.4	325.3 ± 11.1	325.3 ± 11.1
	3	2.5	320.8 ± 8.9	325.5 ± 8.2	325.5 ± 8.2
	4	5.0	311.7 ± 6.2	317.4 ± 5.5	317.4 ± 5.5
FEMALE	5	0	168.2 ± 7.4	170.2 ± 6.7	170.2 ± 6.7
	6	1.25	171.7 ± 8.7	173.7 ± 8.1	173.7 ± 8.1
	7	2.5	166.3 ± 8.6	168.8 ± 10.3	168.8 ± 10.3
	8	5.0	167.6 ± 7.7	169.5 ± 7.7	169.5 ± 7.7

TABLE 4  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 FOOD CONSUMPTION DATA (G/ANIMAL/DAY, MEAN)

STUDY NO.	SEX	GROUP	LEVEL (%)	WEEKS												
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
MALE		1	0	11.02	12.48	13.42	13.98	14.42	14.88	14.26	13.88	14.58	14.72	14.78	14.76	14.38
			1.25	11.58	12.84	14.08	14.34	15.06	15.18	14.76	14.78	14.88	15.38	14.88	15.30	14.76
			2.5	11.66	12.98	14.48	14.92	15.24	15.24	14.78	14.78	14.92	15.20	15.74	16.12	15.68
			5.0	11.66	13.08	14.08	14.68	15.24	15.48	14.96	15.14	15.36	15.42	15.84	16.10	16.22
FEMALE		5	0	9.14	8.94	9.44	8.64	9.18	9.32	8.50	8.74	8.78	8.56	8.84	9.18	
			1.25	8.86	9.62	9.36	9.26	9.84	9.62	9.06	8.92	9.44	10.14	9.66	9.62	
			2.5	8.58	9.48	9.26	9.12	9.32	9.46	8.94	8.48	9.16	9.22	9.08	9.68	
			5.0	9.16	9.84	10.16	9.88	10.24	10.06	9.96	9.56	10.00	10.00	10.32	10.34	

TABLE 5  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 MATERIAL INTAKE DATA (MG/KG/DAY, MEAN)

SEX	GROUP NO.	GROUP LEVEL (%)	WEEKS											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9			
MALE	1	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2	1.25	1187.81	1051.62	943.82	841.16	802.49	757.42	694.92	662.93	639.70	639.70	639.70	639.70
	3	2.5	2434.90	2142.24	1946.92	1759.41	1626.59	1527.57	1397.71	1327.35	1286.07	1286.07	1286.07	1286.07
	4	5.0	5046.92	4520.88	3993.32	3632.17	3402.49	3212.59	2911.97	2805.49	2723.28	2723.28	2723.28	2723.28
FEMALE	5	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	6	1.25	1177.55	1091.37	949.89	872.19	871.99	808.57	729.43	708.22	730.06	730.06	730.06	730.06
	7	2.5	2318.92	2186.17	1916.74	1761.08	1703.23	1666.63	1496.44	1391.78	1473.87	1473.87	1473.87	1473.87
	8	5.0	4909.26	4534.32	4132.65	3745.52	3661.93	3456.38	3275.60	3075.84	3126.71	3126.71	3126.71	3126.71

TABLE 5  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 MATERIAL INTAKE DATA (MG/KG/DAY, MEAN)

SEX	STUDY NO.	GROUP NO.	LEVEL (%)	WEEKS				TOTAL (mg/kg)	AVERAGE (mg/kg/day)
				10	11	12	13		
MALE	1	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	2	1.25	637.94	598.98	595.80	567.79	69876.66	767.88	
	3	2.5	1258.72	1269.72	1256.52	1204.89	143070.27	1572.20	
	4	5.0	2637.72	2623.34	2582.23	2555.02	298531.94	3280.57	
FEMALE	5	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	6	1.25	771.23	712.22	699.84	680.72	75622.96	831.02	
	7	2.5	1435.09	1396.16	1456.46	1447.94	151553.57	1665.42	
	8	5.0	3062.46	3116.97	3084.30	3073.85	323790.53	3558.14	

TABLE 6  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 WATER CONSUMPTION DATA (G/ANIMAL/DAY, MEAN)

SEX	STUDY NO.	GROUP	LEVEL (%)	WEEKS												
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
MALE	1	0	15.22	16.84	18.08	18.16	18.46	18.20	18.02	18.04	19.14	19.40	18.32	17.88	16.70	
	2	1.25	15.24	16.72	17.94	18.26	18.04	17.88	18.92	17.96	18.38	18.20	17.06	17.38	15.88	
	3	2.5	15.48	16.48	18.58	18.22	18.28	17.66	18.18	17.68	17.54	18.12	18.38	18.28	16.72	
	4	5.0	14.48	15.52	17.22	17.82	17.62	17.28	17.42	17.28	17.58	17.46	16.80	17.22	16.18	
FEMALE	5	0	13.82	14.52	14.82	13.72	14.70	13.54	13.18	12.96	13.52	13.64	12.86	13.02	12.28	
	6	1.25	13.12	15.08	14.72	14.54	14.16	14.26	13.98	13.32	13.56	14.72	13.06	13.12	12.32	
	7	2.5	12.32	13.68	13.64	13.12	12.98	12.28	12.58	12.48	12.62	12.44	12.62	12.72	12.32	
	8	5.0	12.06	13.58	13.82	13.88	13.94	13.22	13.02	13.24	13.26	13.22	13.20	12.98	12.70	

TABLE 7  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 OPHTHALMOSCOPIC FINDING DATA

STUDY NO. ■■■■■ STRUCTURE <sup>a</sup>	SEX -----		MALE				FEMALE			
	GROUP NO.	-----	1	2	3	4	5	6	7	8
FINDINGS LEVEL (%) -----	0	-----	0	1.25	2.5	5.0	0	1.25	2.5	5.0
No. of examined -----	(6)	-----	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)
Normal	6	-----	6	6	6	6	6	6	6	6

<sup>a</sup> : Anterior chamber, Optic media, Ocular fundus and others were examined.

TABLE 8  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 URINALYSIS DATA

SEX	STUDY NO.	GROUP NO.	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	GLUCOSE				BILIRUBIN			KETONE BODIES								
					-	±	1+	2+	3+	-	1+	2+	3+	-	±	1+	2+	3+		
MALE		1	0	6	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	1	4	1	0
		2	1.25	6	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	1	0	4	1	0	0
		3	2.5	6	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0
		4	5.0	6	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	1	1	3	1	0	0
FEMALE		5	0	6	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	0
		6	1.25	6	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	0
		7	2.5	6	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	0
		8	5.0	6	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	0

TABLE 8  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 URINALYSIS DATA

STUDY NO.	GROUP	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	OCCULT BLOOD			PROTEIN			UROBILINOGEN							
				-	±	3+	-	±	3+	0.1	1	2	4	8			
MALE	1	0	6	6	0	0	0	0	2	4	0	0	6	0	0	0	0
	2	1.25	6	6	0	0	0	0	2	4	0	0	6	0	0	0	0
	3	2.5	6	6	0	0	0	0	1	5	0	0	6	0	0	0	0
	4	5.0	6	6	0	0	0	0	0	3	3	0	6	0	0	0	0
FEMALE	5	0	6	6	0	0	0	0	0	5	1	0	6	0	0	0	0
	6	1.25	6	6	0	0	0	0	1	5	0	0	6	0	0	0	0
	7	2.5	6	6	0	0	0	0	1	5	0	0	6	0	0	0	0
	8	5.0	6	6	0	0	0	0	1	5	0	0	6	0	0	0	0

TABLE 8  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 URINALYSIS DATA

STUDY NO.	SEX	GROUP NO.	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	pH	SPECIFIC GRAVITY	APPEARANCE		
							N	C	B R
	MALE	1	0	6	7.138 ± 0.254	1.0412 ± 0.0144	6	0	0 0
		2	1.25	6	7.177 ± 0.309	1.0493 ± 0.0142	6	0	0 0
		3	2.5	6	6.953 ± 0.257	1.0605 ± 0.0153	6	0	0 0
		4	5.0	6	6.693 ± 0.278 *	1.0553 ± 0.0212	6	0	0 0
	FEMALE	5	0	6	6.987 ± 0.357	1.0470 ± 0.0154	6	0	0 0
		6	1.25	6	7.095 ± 0.407	1.0428 ± 0.0151	6	0	0 0
		7	2.5	6	6.943 ± 0.390	1.0432 ± 0.0215	6	0	0 0
		8	5.0	6	6.990 ± 0.420	1.0452 ± 0.0208	6	0	0 0

N : Normal (Pale yellow), C : Clouded, B : Brown, R : Red

\* : Significantly different from control group at P<0.05.

TABLE 8  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 URINALYSIS DATA

SEX	STUDY NO.	GROUP	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	MICROSCOPIC EXAMINATION														
					EPITHELIAL CELLS						CRYSTALS						CASTS		
					-	±	1+	2+	3+	-	±	1+	2+	3+	-	±	1+	2+	3+
MALE	1		0	6	5	1	0	0	0	1	1	0	0	4	6	0	0	0	0
	2		1.25	6	6	0	0	0	0	2	1	0	1	2	6	0	0	0	0
	3		2.5	6	5	1	0	0	0	0	0	1	2	3	6	0	0	0	0
	4		5.0	6	6	0	0	0	0	1	1	1	0	3	6	0	0	0	0
FEMALE	5		0	6	3	3	0	0	0	0	2	1	0	3	6	0	0	0	0
	6		1.25	6	4	2	0	0	0	4	1	0	0	1*	6	0	0	0	0
	7		2.5	6	5	1	0	0	0	2	0	0	0	4	6	0	0	0	0
	8		5.0	6	5	1	0	0	0	4	0	0	1	1	6	0	0	0	0

\* : Significantly different from control group at P<0.05.

TABLE 8  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 URINALYSIS DATA

STUDY NO.	SEX	GROUP NO.	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	MICROSCOPIC EXAMINATION						URINE VOLUME (IN GRAMS)				
					RBC			WBC							
					-	±	1+	2+	3+	-	±	1+	2+	3+	
	MALE	1	0	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	1.62 ± 0.41
		2	1.25	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0.82 ± 0.39 **
		3	2.5	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0.63 ± 0.12 **
		4	5.0	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0.95 ± 0.31 **
	FEMALE	5	0	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0.67 ± 0.42
		6	1.25	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0.48 ± 0.26
		7	2.5	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0.85 ± 0.23
		8	5.0	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0.62 ± 0.34

\*\* : Significantly different from control group at P<0.01.

TABLE 8  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 URINALYSIS DATA

STUDY NO.	SEX	GROUP NO.	GROUP LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	NA (mEq/l)	K (mEq/l)	CL (mEq/l)
	MALE	1	0	6	57.30 ± 43.96	181.507 ± 77.581	56.92 ± 53.01
		2	1.25	6	63.82 ± 24.10	187.200 ± 60.821	34.72 ± 16.51
		3	2.5	6	81.27 ± 27.07	224.567 ± 40.182	56.65 ± 21.16
		4	5.0	6	87.27 ± 45.95	245.000 ± 140.427	81.73 ± 80.21
	FEMALE	5	0	6	78.05 ± 35.98	184.687 ± 71.830	61.05 ± 30.70
		6	1.25	6	71.53 ± 27.27	157.360 ± 74.481	30.80 ± 41.84
		7	2.5	6	87.07 ± 40.98	198.787 ± 119.760	83.47 ± 49.81
		8	5.0	6	98.47 ± 32.64	209.727 ± 97.329	49.57 ± 39.46

TABLE 9  
90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
HEMATOLOGY DATA

SEX	STUDY NO.	GROUP NO.	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	WBC ( $\times 10^2/\mu\text{l}$ )	RBC ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	HGB (g/dl)	HCT (%)
MALE	[REDACTED]	1	0	10	47.34 $\pm$ 9.43	939.5 $\pm$ 17.2	15.49 $\pm$ 0.15	43.51 $\pm$ 0.44
		2	1.25	10	47.79 $\pm$ 6.79	936.5 $\pm$ 10.7	15.45 $\pm$ 0.19	43.46 $\pm$ 0.47
		3	2.5	10	45.72 $\pm$ 6.75	928.0 $\pm$ 11.7	15.27 $\pm$ 0.21 *	43.15 $\pm$ 0.40
		4	5.0	10	44.20 $\pm$ 5.45	920.8 $\pm$ 19.3 *	15.13 $\pm$ 0.25 **	43.00 $\pm$ 0.64 *
FEMALE	[REDACTED]	5	0	10	31.98 $\pm$ 3.93	874.1 $\pm$ 20.3	15.50 $\pm$ 0.39	43.86 $\pm$ 1.09
		6	1.25	10	31.58 $\pm$ 4.71	880.2 $\pm$ 38.3	15.50 $\pm$ 0.68	44.25 $\pm$ 2.20
		7	2.5	9a	30.39 $\pm$ 4.88	878.1 $\pm$ 26.9	15.56 $\pm$ 0.38	44.49 $\pm$ 1.45
		8	5.0	10	32.99 $\pm$ 7.60	865.2 $\pm$ 23.4	15.33 $\pm$ 0.46	43.51 $\pm$ 0.95

\*, \*\* : Significantly different from control group at  $P < 0.05$ ,  $0.01$ , respectively.

a : One sample volume was insufficient for complete analysis.

TABLE 9  
90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
HEMATOLOGY DATA

STUDY NO.	SEX	GROUP NO.	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	MCV (fl.)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	PLT ( $\times 10^9/\mu\text{l}$ )
	MALE	1	0	10	46.31 $\pm$ 0.51	16.50 $\pm$ 0.21	35.60 $\pm$ 0.15	74.24 $\pm$ 4.72
		2	1.25	10	46.42 $\pm$ 0.50	16.48 $\pm$ 0.18	35.56 $\pm$ 0.16	73.90 $\pm$ 4.33
		3	2.5	10	46.49 $\pm$ 0.34	16.45 $\pm$ 0.20	35.37 $\pm$ 0.27 *	74.65 $\pm$ 2.92
		4	5.0	10	46.71 $\pm$ 0.50	16.43 $\pm$ 0.12	35.21 $\pm$ 0.28 **	72.52 $\pm$ 4.13
	FEMALE	5	0	10	50.18 $\pm$ 0.51	17.73 $\pm$ 0.13	35.33 $\pm$ 0.31	73.16 $\pm$ 4.32
		6	1.25	10	50.25 $\pm$ 0.56	17.60 $\pm$ 0.13	35.03 $\pm$ 0.30	73.41 $\pm$ 3.87
		7	2.5	9a	50.67 $\pm$ 0.68	17.71 $\pm$ 0.18	34.99 $\pm$ 0.52	71.74 $\pm$ 3.61
		8	5.0	10	50.32 $\pm$ 0.35	17.71 $\pm$ 0.19	35.24 $\pm$ 0.52	67.72 $\pm$ 2.45 **

\*, \*\* : Significantly different from control group at  $P < 0.05$ ,  $0.01$ , respectively.

a : One sample volume was insufficient for complete analysis.

TABLE 9  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 HEMATOLOGY DATA

SEX	GROUP NO.	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	DIFFERENTIAL COUNT OF WBC (%)				
				NEUT	LYMPH	MONO	EO	BASO
MALE	1	0	10	20.01 ± 1.54	76.72 ± 1.52	2.10 ± 0.56	1.17 ± 0.31	0.00 ± 0.00
	2	1.25	10	20.14 ± 1.79	76.52 ± 2.50	2.25 ± 0.66	1.09 ± 0.26	0.00 ± 0.00
	3	2.5	10	20.15 ± 2.36	76.61 ± 2.78	1.95 ± 0.56	1.25 ± 0.39	0.04 ± 0.08
	4	5.0	10	20.25 ± 2.00	76.47 ± 2.61	2.32 ± 0.76	0.96 ± 0.22	0.00 ± 0.00
FEMALE	5	0	10	16.83 ± 2.17	79.32 ± 2.58	2.20 ± 0.53	1.59 ± 0.59	0.06 ± 0.13
	6	1.25	10	20.12 ± 5.45	76.63 ± 5.82	2.02 ± 0.78	1.23 ± 0.40	0.00 ± 0.00
	7	2.5	9a	20.37 ± 6.77	75.43 ± 7.23	2.58 ± 0.31	1.53 ± 0.38	0.09 ± 0.18
	8	5.0	10	19.34 ± 4.06	77.05 ± 4.36	2.26 ± 0.56	1.27 ± 0.38	0.08 ± 0.13

a : One sample volume was insufficient for complete analysis.

TABLE 9  
90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
HEMATOLOGY DATA

STUDY NO.	SEX	GROUP NO.	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	RETICULOCLYTE (%)	COAGULATION TIME		
						PT (SEC)	APTT (SEC)	APTT (SEC)
	MALE	1	0	10	2.784 ± 0.179	14.02 ± 0.62	15.74 ± 2.75	
		2	1.25	10	2.795 ± 0.265	14.47 ± 0.42	17.01 ± 1.17	
		3	2.5	10	2.803 ± 0.110	14.33 ± 0.52	16.15 ± 1.87	
		4	5.0	10	2.842 ± 0.202	14.57 ± 0.70 *	16.38 ± 2.03	
	FEMALE	5	0	10	2.377 ± 0.329	13.70 ± 0.54 (n=8) b	13.09 ± 2.00 (n=8) b	
		6	1.25	10	2.609 ± 0.194	13.86 ± 0.76	13.16 ± 2.11	
		7	2.5	9a	2.691 ± 0.254 *	13.84 ± 0.89 (n=9) c	13.04 ± 2.24 (n=9) c	
		8	5.0	10	2.443 ± 0.211	14.15 ± 0.87	14.29 ± 1.64	

\* : Significantly different from control group at P<0.05.

a : One sample volume was insufficient for complete analysis.

b : Two samples omitted from the analysis for coagulated.

c : One sample omitted from the analysis for coagulated.

TABLE 10  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 CLINICAL CHEMISTRY DATA

STUDY NO.	GROUP NO.	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	AST (U/l)	ALT (U/l)	ALP (IU/l)	$\gamma$ -GTP (IU/l)
MALE	1	0	10	98.2 ± 8.5	59.5 ± 4.9	291.6 ± 19.2	0.09 ± 0.10
	2	1.25	10	102.8 ± 14.0	63.0 ± 9.0	294.5 ± 10.4	0.14 ± 0.16
	3	2.5	10	98.9 ± 14.8	61.8 ± 6.9	293.5 ± 13.4	0.12 ± 0.13
	4	5.0	10	99.1 ± 12.9	64.2 ± 8.9	306.9 ± 9.6 *	0.17 ± 0.13
FEMALE	5	0	10	85.4 ± 8.3	44.4 ± 3.4	223.9 ± 16.4	0.69 ± 0.30
	6	1.25	10	87.6 ± 4.6	45.5 ± 6.9	234.5 ± 25.4	0.74 ± 0.16
	7	2.5	10	87.0 ± 13.7	49.7 ± 6.2	247.3 ± 40.5	0.91 ± 0.21
	8	5.0	10	87.8 ± 10.1	50.8 ± 7.5 *	231.0 ± 21.3	1.07 ± 0.47

\* : Significantly different from control group at P<0.05.

TABLE 10  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 CLINICAL CHEMISTRY DATA

STUDY NO.	GROUP NO.	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	T-BIL (mg/dl)	BUN (mg/dl)	CRE (mg/dl)	GLU (mg/dl)
SEX MALE	1	0	10	0.042 ± 0.008	18.48 ± 0.79	0.531 ± 0.024	151.1 ± 16.2
	2	1.25	10	0.045 ± 0.007	19.11 ± 1.36	0.536 ± 0.029	151.4 ± 12.6
	3	2.5	10	0.040 ± 0.007	18.89 ± 1.34	0.544 ± 0.030	152.9 ± 12.4
	4	5.0	10	0.038 ± 0.006	19.48 ± 1.27	0.526 ± 0.036	152.1 ± 12.3
SEX FEMALE	5	0	10	0.052 ± 0.009	18.18 ± 1.55	0.570 ± 0.036	111.2 ± 9.7
	6	1.25	10	0.059 ± 0.006	19.65 ± 5.69	0.565 ± 0.030	118.4 ± 13.9
	7	2.5	10	0.060 ± 0.009 *	18.87 ± 1.14	0.551 ± 0.015	115.8 ± 14.5
	8	5.0	10	0.060 ± 0.007 *	19.07 ± 1.29	0.564 ± 0.043	116.1 ± 15.9

\* : Significantly different from control group at P<0.05.

TABLE 10  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 CLINICAL CHEMISTRY DATA

STUDY NO.	GROUP NO.	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	T-CHO (mg/dl)	PL (mg/dl)	TG (mg/dl)	TP (g/dl)
MALE	1	0	10	54.8 ± 2.4	111.7 ± 4.5	97.2 ± 17.1	6.15 ± 0.12
	2	1.25	10	52.6 ± 3.6	108.1 ± 8.3	87.9 ± 15.7	6.12 ± 0.16
	3	2.5	10	52.6 ± 3.0	105.6 ± 5.7	76.6 ± 15.0 *	6.07 ± 0.12
	4	5.0	10	50.6 ± 3.7 **	101.8 ± 7.4 **	79.6 ± 22.5 *	5.95 ± 0.14 **
FEMALE	5	0	10	84.8 ± 4.9	160.8 ± 10.4	24.1 ± 7.3	5.89 ± 0.13
	6	1.25	10	80.2 ± 6.7	154.5 ± 10.6	30.1 ± 5.5	5.86 ± 0.23
	7	2.5	10	75.4 ± 7.2 **	147.2 ± 11.1 **	30.1 ± 9.8	5.84 ± 0.19
	8	5.0	10	73.0 ± 5.0 **	139.8 ± 9.3 **	22.6 ± 10.1	5.81 ± 0.13

\*, \*\* : Significantly different from control group at P<0.05, 0.01, respectively.

TABLE 10  
90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
CLINICAL CHEMISTRY DATA

STUDY NO.	GROUP NO.	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	ALB (g/dl)	A/G	IP (mg/dl)	CA (mg/dl)
MALE	1	0	10	2.74 ± 0.07	0.801 ± 0.014	6.00 ± 0.48	10.25 ± 0.18
	2	1.25	10	2.74 ± 0.05	0.811 ± 0.023	5.98 ± 0.44	10.20 ± 0.18
	3	2.5	10	2.72 ± 0.06	0.812 ± 0.019	6.01 ± 0.38	10.16 ± 0.16
	4	5.0	10	2.68 ± 0.06 *	0.819 ± 0.023	5.94 ± 0.44	10.17 ± 0.13
FEMALE	5	0	10	2.77 ± 0.07	0.889 ± 0.028	5.68 ± 0.71	9.93 ± 0.17
	6	1.25	10	2.75 ± 0.12	0.884 ± 0.034	5.50 ± 0.75	9.95 ± 0.25
	7	2.5	10	2.76 ± 0.07	0.897 ± 0.034	5.93 ± 1.07	10.07 ± 0.34
	8	5.0	10	2.73 ± 0.07	0.885 ± 0.029	5.37 ± 0.93	9.83 ± 0.16

\* : Significantly different from control group at P<0.05.

TABLE 10  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 CLINICAL CHEMISTRY DATA

SEX	STUDY NO.	GROUP NO.	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	MG (mg/dl)	NA (mEq/l)	K (mEq/l)	CL (mEq/l)
MALE	[REDACTED]	1	0	10	2.11 ± 0.14	142.61 ± 0.57	4.305 ± 0.194	102.34 ± 0.54
		2	1.25	10	2.14 ± 0.13	142.77 ± 0.77	4.311 ± 0.197	103.17 ± 0.37 **
		3	2.5	10	2.03 ± 0.11	142.71 ± 0.65	4.293 ± 0.291	103.06 ± 0.90 *
		4	5.0	10	2.09 ± 0.12	142.58 ± 0.33	4.460 ± 0.257	103.33 ± 0.65 **
FEMALE	[REDACTED]	5	0	10	2.20 ± 0.12	142.61 ± 1.07	4.126 ± 0.463	104.62 ± 0.82
		6	1.25	10	2.15 ± 0.25	142.98 ± 1.63	4.390 ± 0.371	104.26 ± 0.93
		7	2.5	10	2.22 ± 0.35	143.15 ± 1.54	4.316 ± 0.562	104.38 ± 1.54
		8	5.0	10	2.07 ± 0.13	142.88 ± 0.83	3.994 ± 0.203	105.57 ± 1.12

\*, \*\* : Significantly different from control group at P<0.05, 0.01, respectively.

TABLE 11  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 GROSS PATHOLOGY DATA  
 STUDY NO. [REDACTED]

ORGAN AND FINDINGS	SEX		MALE				FEMALE			
	GROUP NO.	LEVEL (%)	1	2	3	4	5	6	7	8
No. of animals examined	10	10	10	10	2.5	5.0	10	10	10	10
Not remarkable	10	9	0	0	0	0	7	3	0	0
Liver : Diaphragmatic nodule	0	1	1	2	2	3	2	3	3	2
Ovary : Cyst (R)	-	-	-	-	-	-	0	.1	0	0
Uterus : Distended	-	-	-	-	-	-	1	4	3	1
Parotid gland : Enlargement	0	0	10**	10**	10**	10**	0	0	10**	10**

\*\* : Significantly different from control group at P<0.01.

TABLE 12  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 ORGAN WEIGHT DATA (G, MEAN  $\pm$  S.D.)  
 STUDY NO. [REDACTED]

SEX	GROUP NO.	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	Body <sup>a</sup> weight	Brain	Pituitary	Thyroids
MALE	1	0	10	304.4 $\pm$ 11.4	1.9646 $\pm$ 0.0326	0.0090 $\pm$ 0.0007	0.0181 $\pm$ 0.0015
	2	1.25	10	309.5 $\pm$ 10.7	1.9298 $\pm$ 0.0506	0.0081 $\pm$ 0.0013	0.0188 $\pm$ 0.0015
	3	2.5	10	308.9 $\pm$ 8.5	1.9705 $\pm$ 0.0463	0.0087 $\pm$ 0.0009	0.0175 $\pm$ 0.0018
	4	5.0	10	300.7 $\pm$ 5.6	1.9520 $\pm$ 0.0320	0.0089 $\pm$ 0.0014	0.0187 $\pm$ 0.0018
FEMALE	5	0	10	161.3 $\pm$ 6.7	1.7845 $\pm$ 0.0249	0.0110 $\pm$ 0.0009	0.0127 $\pm$ 0.0015
	6	1.25	10	165.1 $\pm$ 8.6	1.8149 $\pm$ 0.0346 *	0.0112 $\pm$ 0.0015	0.0141 $\pm$ 0.0014
	7	2.5	10	159.8 $\pm$ 9.3	1.8129 $\pm$ 0.0265	0.0107 $\pm$ 0.0011	0.0126 $\pm$ 0.0017
	8	5.0	10	159.8 $\pm$ 6.8	1.8187 $\pm$ 0.0346 *	0.0110 $\pm$ 0.0016	0.0131 $\pm$ 0.0028

\* : Significantly different from control group at P<0.05.

a : The values presented were obtained after the animals were fasted overnight.

TABLE 12  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 ORGAN WEIGHT DATA (G, MEAN ± S.D.)

SEX	GROUP	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	Lungs			Heart			Thymus		
				Mean	± S.D.	Mean	± S.D.	Mean	± S.D.	Mean	± S.D.	Mean
MALE	1	0	10	0.9428	± 0.0515	0.9306	± 0.0624	0.1649	± 0.0217			
	2	1.25	10	0.9399	± 0.0224	0.9212	± 0.0455	0.1689	± 0.0185			
	3	2.5	10	0.9623	± 0.0459	0.9335	± 0.0295	0.1674	± 0.0098			
	4	5.0	10	0.9495	± 0.0450	0.9091	± 0.0475	0.1616	± 0.0189			
FEMALE	5	0	10	0.6775	± 0.0179	0.5562	± 0.0276	0.1526	± 0.0132			
	6	1.25	10	0.7026	± 0.0541	0.5745	± 0.0473	0.1601	± 0.0167			
	7	2.5	10	0.6859	± 0.0378	0.5604	± 0.0212	0.1524	± 0.0146			
	8	5.0	10	0.7072	± 0.0388	0.5644	± 0.0271	0.1507	± 0.0123			

TABLE 12  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 ORGAN WEIGHT DATA (G, MEAN ± S.D.)  
 STUDY NO. [REDACTED]

SEX	GROUP NO.	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	Liver	Kidneys	Spleen
MALE	1	0	10	7.4470 ± 0.3485	1.8834 ± 0.1021	0.5968 ± 0.0359
	2	1.25	10	7.3530 ± 0.3426	1.8570 ± 0.0663	0.5969 ± 0.0303
	3	2.5	10	7.5655 ± 0.3972	1.9074 ± 0.0848	0.5997 ± 0.0215
	4	5.0	10	7.3462 ± 0.2628	1.8716 ± 0.0752	0.5833 ± 0.0258
FEMALE	5	0	10	3.7552 ± 0.1521	1.0826 ± 0.0456	0.3875 ± 0.0186
	6	1.25	10	3.8134 ± 0.1761	1.1417 ± 0.0786	0.3937 ± 0.0310
	7	2.5	10	3.7722 ± 0.2498	1.1062 ± 0.0590	0.3877 ± 0.0266
	8	5.0	10	3.8139 ± 0.2403	1.1235 ± 0.0617	0.4014 ± 0.0162

TABLE 12  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 ORGAN WEIGHT DATA (G, MEAN  $\pm$  S.D.)  
 STUDY NO. [REDACTED]

SEX	GROUP NO.	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	Adrenals	Salivary glands	Testes / Ovaries
MALE	1	0	10	0.0394 $\pm$ 0.0046	0.5000 $\pm$ 0.0219	3.1208 $\pm$ 0.1029
	2	1.25	10	0.0410 $\pm$ 0.0028	0.4960 $\pm$ 0.0158	3.1084 $\pm$ 0.0917
	3	2.5	10	0.0423 $\pm$ 0.0040	0.5068 $\pm$ 0.0208	3.1856 $\pm$ 0.0725
	4	5.0	10	0.0402 $\pm$ 0.0038	0.5058 $\pm$ 0.0209	3.1887 $\pm$ 0.0830
FEMALE	5	0	10	0.0421 $\pm$ 0.0029	0.3264 $\pm$ 0.0181	0.0864 $\pm$ 0.0078
	6	1.25	10	0.0464 $\pm$ 0.0055 *	0.3393 $\pm$ 0.0134	0.0988 $\pm$ 0.0138 *
	7	2.5	10	0.0453 $\pm$ 0.0026	0.3318 $\pm$ 0.0269	0.0874 $\pm$ 0.0084
	8	5.0	10	0.0469 $\pm$ 0.0049 *	0.3466 $\pm$ 0.0242	0.0912 $\pm$ 0.0142

\* : Significantly different from control group at  $P < 0.05$ .

TABLE 12  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 ORGAN WEIGHT DATA (G, MEAN  $\pm$  S.D.)  
 STUDY NO. [REDACTED]

SEX	GROUP NO.	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	Seminal vesicles	Prostate	Uterus
MALE	1	0	10	0.7521 $\pm$ 0.0573	0.8552 $\pm$ 0.0970	
	2	1.25	10	0.7206 $\pm$ 0.0991	0.8053 $\pm$ 0.1104	
	3	2.5	10	0.7259 $\pm$ 0.0557	0.7963 $\pm$ 0.0571	
	4	5.0	10	0.7161 $\pm$ 0.0784	0.7859 $\pm$ 0.0803	
FEMALE	5	0	10			0.4959 $\pm$ 0.1662
	6	1.25	10			0.6352 $\pm$ 0.2358
	7	2.5	10			0.5076 $\pm$ 0.1852
	8	5.0	10			0.4982 $\pm$ 0.1069

TABLE 13  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 ORGAN TO BODY WEIGHT RATIO DATA (G/100G BW, MEAN  $\pm$  S.D.)  
 STUDY NO. [REDACTED]

SEX	GROUP NO.	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	Brain	Pituitary	Thyroids
MALE	1	0	10	0.6461 $\pm$ 0.0243	0.0030 $\pm$ 0.0000	0.0059 $\pm$ 0.0006
	2	1.25	10	0.6240 $\pm$ 0.0244 *	0.0025 $\pm$ 0.0005 **	0.0062 $\pm$ 0.0006
	3	2.5	10	0.6384 $\pm$ 0.0224	0.0029 $\pm$ 0.0003	0.0057 $\pm$ 0.0007
	4	5.0	10	0.6493 $\pm$ 0.0086	0.0030 $\pm$ 0.0005	0.0061 $\pm$ 0.0006
FEMALE	5	0	10	1.1083 $\pm$ 0.0530	0.0070 $\pm$ 0.0007	0.0079 $\pm$ 0.0007
	6	1.25	10	1.1014 $\pm$ 0.0526	0.0069 $\pm$ 0.0009	0.0085 $\pm$ 0.0010
	7	2.5	10	1.1373 $\pm$ 0.0564	0.0065 $\pm$ 0.0008	0.0077 $\pm$ 0.0011
	8	5.0	10	1.1395 $\pm$ 0.0391	0.0068 $\pm$ 0.0009	0.0081 $\pm$ 0.0019

\*, \*\* : Significantly different from control group at  $P < 0.05$ ,  $0.01$ , respectively.

TABLE 13  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 ORGAN TO BODY WEIGHT RATIO DATA (G/100G BW, MEAN  $\pm$  S.D.)  
 STUDY NO. [REDACTED]

SEX	GROUP NO.	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	Lungs			Heart			Thymus		
				Mean	S.D.	P	Mean	S.D.	P	Mean	S.D.	P
MALE	1	0	10	0.3097	$\pm$ 0.0134		0.3056	$\pm$ 0.0150		0.0541	$\pm$ 0.0058	
	2	1.25	10	0.3039	$\pm$ 0.0102		0.2981	$\pm$ 0.0196		0.0548	$\pm$ 0.0056	
	3	2.5	10	0.3115	$\pm$ 0.0153		0.3024	$\pm$ 0.0102		0.0544	$\pm$ 0.0037	
	4	5.0	10	0.3158	$\pm$ 0.0155		0.3021	$\pm$ 0.0118		0.0538	$\pm$ 0.0056	
FEMALE	5	0	10	0.4206	$\pm$ 0.0168		0.3449	$\pm$ 0.0128		0.0946	$\pm$ 0.0069	
	6	1.25	10	0.4252	$\pm$ 0.0147		0.3480	$\pm$ 0.0205		0.0971	$\pm$ 0.0092	
	7	2.5	10	0.4295	$\pm$ 0.0132		0.3512	$\pm$ 0.0143		0.0954	$\pm$ 0.0074	
	8	5.0	10	0.4429	$\pm$ 0.0208	**	0.3534	$\pm$ 0.0151		0.0943	$\pm$ 0.0073	

\*\* : Significantly different from control group at  $P < 0.01$ .

TABLE 13  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 ORGAN TO BODY WEIGHT RATIO DATA (G/100G BW, MEAN  $\pm$  S.D.)

STUDY NO.	SEX	GROUP NO.	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	Liver			Kidneys			Spleen		
					Mean	S.D.	P	Mean	S.D.	P	Mean	S.D.	P
	MALE	1	0	10	2.4482	$\pm$ 0.1184		0.6187	$\pm$ 0.0225		0.1958	$\pm$ 0.0067	
		2	1.25	10	2.3756	$\pm$ 0.0652		0.6004	$\pm$ 0.0258		0.1929	$\pm$ 0.0082	
		3	2.5	10	2.4480	$\pm$ 0.0737		0.6177	$\pm$ 0.0211		0.1941	$\pm$ 0.0051	
		4	5.0	10	2.4428	$\pm$ 0.0659		0.6226	$\pm$ 0.0249		0.1940	$\pm$ 0.0086	
	FEMALE	5	0	10	2.3304	$\pm$ 0.1013		0.6720	$\pm$ 0.0382		0.2404	$\pm$ 0.0125	
		6	1.25	10	2.3123	$\pm$ 0.1021		0.6922	$\pm$ 0.0451		0.2382	$\pm$ 0.0091	
		7	2.5	10	2.3614	$\pm$ 0.0937		0.6927	$\pm$ 0.0228		0.2427	$\pm$ 0.0078	
		8	5.0	10	2.3866	$\pm$ 0.1076		0.7032	$\pm$ 0.0293		0.2514	$\pm$ 0.0076	*

\* : Significantly different from control group at  $P < 0.05$ .

TABLE 13  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 ORGAN TO BODY WEIGHT RATIO DATA (G/100G BW, MEAN  $\pm$  S.D.)  
 STUDY NO. [REDACTED]

SEX	GROUP NO.	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	Adrenals	Salivary glands	Testes /Ovaries
MALE	1	0	10	0.0129 $\pm$ 0.0017	0.1645 $\pm$ 0.0071	1.0258 $\pm$ 0.0253
	2	1.25	10	0.0133 $\pm$ 0.0009	0.1606 $\pm$ 0.0082	1.0055 $\pm$ 0.0466
	3	2.5	10	0.0138 $\pm$ 0.0012	0.1641 $\pm$ 0.0072	1.0322 $\pm$ 0.0415
	4	5.0	10	0.0136 $\pm$ 0.0011	0.1682 $\pm$ 0.0080	1.0607 $\pm$ 0.0300
FEMALE	5	0	10	0.0262 $\pm$ 0.0024	0.2027 $\pm$ 0.0117	0.0537 $\pm$ 0.0051
	6	1.25	10	0.0282 $\pm$ 0.0036	0.2059 $\pm$ 0.0087	0.0600 $\pm$ 0.0095
	7	2.5	10	0.0283 $\pm$ 0.0017	0.2078 $\pm$ 0.0125	0.0546 $\pm$ 0.0038
	8	5.0	10	0.0295 $\pm$ 0.0034 *	0.2171 $\pm$ 0.0152 *	0.0571 $\pm$ 0.0082

\* : Significantly different from control group at  $P < 0.05$ .

TABLE 13  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 ORGAN TO BODY WEIGHT RATIO DATA (G/100G BW, MEAN ± S.D.)  
 STUDY NO. ██████████

SEX	GROUP NO.	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	Seminal vesicles	Prostate	Uterus
MALE	1	0	10	0.2475 ± 0.0227	0.2809 ± 0.0282	
	2	1.25	10	0.2332 ± 0.0330	0.2605 ± 0.0373	
	3	2.5	10	0.2349 ± 0.0168	0.2580 ± 0.0184	
	4	5.0	10	0.2384 ± 0.0276	0.2617 ± 0.0290	
FEMALE	5	0	10			0.3066 ± 0.0958
	6	1.25	10			0.3839 ± 0.1400
	7	2.5	10			0.3168 ± 0.1117
	8	5.0	10			0.3106 ± 0.0594

TABLE 14  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 HISTOPATHOLOGICAL DATA  
 STUDY NO. [REDACTED]

ORGAN AND FINDINGS	SEX ----- GROUP NO. ----- LEVEL (%) -----	MALE			
		1	2	3	4
	No. of animals/group -----	0	1.25	2.5	5.0
		10	10	10	10
Heart					
Normal		10			8
Inflammation, focal (1) <sup>a</sup>		0			2
Aorta					
Normal		10			10
Mandibular lymph node					
Normal		4			7
Cellular infiltration, plasma cell (1)		6			3
Mesenteric lymph node					
Normal		10			10
Spleen					
Normal		10			10
Bone marrow					
Normal		10			10
Thymus					
Normal		10			10
Pituitary					
Normal		9			10
Rathke's cleft		1			0
Thyroid					
Normal		8			9
Ectopic thymic tissue		2			1
Parathyroid					
Normal		10			10
Adrenal					
Normal		10			10
Nasal cavity					
Normal		10			9
Cellular infiltration, lymphocyte, nasolacrimal duct (1)		0			1
Trachea					
Normal		10			10
Lungs/bronchi					
Normal		9			10
Mineralization (1)		1			0
Tongue					
Normal		10			10
Salivary gland					
Normal		10			10
Parotid gland			[10] <sup>b</sup>	[10]	
Normal		10	0	0	0
Hypertrophy, acinar cell (1)		0	10	0	0
(3)		0	0	10	0
(4)		0	0	0	10

a : Numbers in parenthesis indicate the grades of lesion : (1) minimal (3) moderate (4) marked

b : Numbers in square bracket are for rats examined microscopically.

\*\* : Significantly different from control group at P<0.01.



TABLE 14  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 HISTOPATHOLOGICAL DATA  
 STUDY NO. [REDACTED]

ORGAN AND FINDINGS	SEX ----- GROUP NO. ----- LEVEL (%) -----	MALE			
		1	2	3	4
No. of animals/group -----		0	1.25	2.5	5.0
		10	10	10	10
Sternum					
Normal		10			10
Musculature					
Normal		10			10
Skin/subcutis					
Normal		10			10
Zymbal's gland					
Normal		10			10
Eye					
Normal		10			9
Atrophy of retina (1) <sup>a</sup>		0			1
Harderian glands					
Normal		10			10
Brain					
Normal		10			10
Spinal cord					
Normal		10			10
Sciatic nerve					
Normal		10			10

a : Numbers in parenthesis indicate the grades of lesion : (1) minimal



TABLE 14  
90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
HISTOPATHOLOGICAL DATA

STUDY NO. [REDACTED]	ORGAN AND FINDINGS	SEX -----	FEMALE			
		GROUP NO. -----	5	6	7	8
		LEVEL (%) -----	0	1.25	2.5	5.0
	No. of animals/group -----		10	10	10	10
Esophagus	Normal		10			10
Stomach	Normal		10			10
Duodenum	Normal		10			10
Jejunum	Normal		10			10
Ileum	Normal		10			10
Cecum	Normal		9			10
	Mineralization (1)a		1			0
Colon	Normal		10			10
Rectum	Normal		10			10
Pancreas	Normal		9			10
	Atrophy, acinar cell (1)		1			0
Liver	Normal		10	[2]b	[3]	9
	Cellular infiltration, lymphocyte (1)		0	0	0	1
Kidney	Normal		0	[10]	[10]	0
	Mineralization, cortico-medullary junction (1)		5	2	0	0
	(2)		5	8	8	3
	(3)		0	0	2	7
Urinary bladder	Normal		10			10
Mammary gland	Normal		10			10
Ovary	Normal		10	[1]		10
	Cyst (2)		0	1		0
Oviduct	Normal		10			10
Uterus	Normal		9	[4]	[3]	8
	Dilatation, lumen (1)		0	2	2	2
	(2)		1	2	1	0

a : Numbers in parenthesis indicate the grades of lesion : (1) minimal (2) slight (3) moderate

b : Numbers in square bracket are for rats examined microscopically.

\*\* : Significantly different from control group at P<0.01.

TABLE 14  
 90-DAY ORAL TOXICITY STUDY OF GRAPE SKIN EXTRACT  
 HISTOPATHOLOGICAL DATA

STUDY NO. [REDACTED]

ORGAN AND FINDINGS	SEX -----	FEMALE			
	GROUP NO. -----	5	6	7	8
	LEVEL (%) -----	0	1.25	2.5	5.0
	No. of animals/group -----	10	10	10	10
Vagina					
Normal		10			10
Femur					
Normal		10			10
Sternum					
Normal		10			10
Musculature					
Normal		10			10
Skin/subcutis					
Normal		10			10
Zymbal's gland					
Normal		10			9
Inflammation (1)a		0			1
Eye					
Normal		10			10
Harderian glands					
Normal		10			10
Brain					
Normal		10			10
Spinal cord					
Normal		10			10
Sciatic nerve					
Normal		10			10

a : Numbers in parenthesis indicate the grades of lesion : (1) minimal