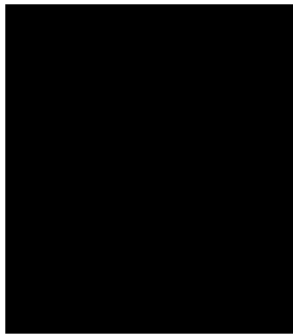


食品添加物安全性再評価費

ラットを用いたブドウ果皮抽出物の90日間亜慢性反復投与試験
(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】

既存添加物の製造用剤として用いられているブドウ果皮抽出物の投与による、ラット耳下腺・腺房細胞や腎臓への影響の再現性の確認と NOAEL を特定する事を目的に、ラットを用いた 90 日間亜慢性反復投与試験を実施した。

6 週齢の F344/DuCrj 系ラット (SPF) 雌雄各群 10 匹、計 20 匹にそれぞれ 0% (基礎飼料)、0.2%、1.0%及び 5.0%の割合でブドウ果皮抽出物を混合した粉末基礎飼料を 90 日間自由に摂取させ、混餌投与した。試験期間中は動物の一般状態の観察 (毎日)、体重及び摂餌量の測定 (週 1 回) を実施し、90 日間投与終了後は全動物を一晩絶食させた後、イソフルラン麻酔下にて開腹し、腹部大動脈より採血し、屠殺、剖検した。剖検時に採血した血液を用いて、血液学的検査と血清生化学的検査を実施した。また、採取した全身諸臓器について臓器重量を測定し、病理組織学的検査を実施した。

試験期間中、一般状態には特記すべき変化は認められず、全ての動物が試験終了時まで生存した。投与各群における毎週の平均体重は、雌雄とも対照群との間に有意差は認められなかった。試験期間中の一個体当たりの平均摂餌量の推移は、雄 5.0%群において 2~4 週目と 90 日目に有意な平均摂餌量の増加が認められたが、雄のその他の群および雌においては、対照群との差はみられなかった。血液検査や血清生化学検査においては、本抽出物の投与に起因すると考えられる毒性学的変化は認められなかった。病理組織学的検査においては、耳下腺・腺房上皮細胞のび慢性好塩基性化と高度な腫大が雌雄とも 5.0%群の全例に認められ、他群では同様の変化はみられなかった。また、雌 5.0%群の腎臓・皮質あるいは髄質において、他群より程度が高い軽度な鉍質沈着を認めた個体数が有意に増加した。

以上より、雌 5.0%群にみられた腎臓・皮質および髄質における鉍質沈着は本抽出物の投与による毒性であると考え、また、生体への意義は不明瞭ながら、雌雄 5.0%群の耳下腺腺房上皮細胞の好塩基化とび慢性腫大が認められたことから、本試験における無毒性量 (NOAEL)は、雌雄とも 1.0% (雄 : 0.6 ± 0.2 g/kg BW/day, 雌 : 0.7 ± 0.1 g/kg BW/day)であると判断した。

【はじめに】

ブドウ果皮抽出物 (grape skin extract; GSE) は、ブドウ科アメリカブドウ (*Vitis labrusca* LINNE) 又はブドウ科ブドウ (*Vitis vinifera* LINNE) のうち、生食用又は醸造用ブドウの甲州、シャルドネ若しくはリースリング種の果皮搾粕より、室温時～微温時エタノールで抽出して得られたものである。主成分はポリフェノールである。本抽出物は、既存添加物の製造用剤(食品の製造や加工のために必要なもの)として使用され、様々な食品、飲料への機能性付与素材として用いられている。使用食品には、赤ワインポリフェノールあるいはぶどうポリフェノール等と表示されている。

本抽出物の毒性に関して、米国で実施された遺伝毒性試験、亜慢性毒性試験の報告がある。遺伝毒性に関しては、あるブドウ果皮抽出物製品をマウスに最高 2,000 mg/kg 単回経口投与し、24 または 48 時間後に骨髄を採取して実施した小核試験の結果、陰性との報告がある¹⁾。また、亜慢性毒性に関しては、前述の小核試験で用いた製品を 2.5% の用量でラットに 90 日間混餌投与した結果、雌雄とも臓器重量、血液学的・血清生化学的検査、病理組織学的検査いずれにおいても投与に関連した有意な変化は認められず、無毒性量 (NOEL) は 2.5% (雄: 1.78 g/kg body weight/day, 雌: 2.15 g/kg body weight/day) と判断されたとの報告がある²⁾。

一方、国内でも既存添加物の安全性再評価の一環として、平成 16 年度にラットを用いた本抽出物の 90 日間反復投与毒性試験が実施された。本抽出物の用量を 1.25%, 2.5%, 5.0% で混餌投与した結果、病理組織学的に耳下腺・腺房細胞の肥大が雌雄の全投与群に用量依存性に増加した。また、雌の 2.5% 以上の群で、腎臓・皮髄境界部への鉍質沈着の発生・程度が増強していた。以上の結果より、無毒性量 (NOEL) は雌雄ともに 1.25% 未満であると考えられ、この試験において NOEL は設定できなかった。

以上のことから、国内に流通する本抽出物による耳下腺・腺房細胞や腎臓への影響の再現性の確認と NOEL を特定する事を目的に、平成 22 年度にラットを用いた用量設定のための予備試験と 90 日間亜慢性反復投与試験(本試験)を実施した。平成 23 年度は、病理組織学的検索など全ての検索を終了したため、本報告書を最終報告とする。

【試験材料及び方法】

1. 試験動物

動物は5週齢のF344/DuCrj系ラット（SPF）雌雄各40匹を日本チャールズ・リバー株式会社（神奈川）より購入し、基礎飼料（CRF-1 固形飼料、オリエンタル酵母工業株式会社）と水道水で1週間馴化飼育した後、無作為に雌雄各4群（各群10匹）に分け試験に供した。動物の飼育はバリエーションシステムの飼育室にて、室温 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、換気回数18回/時（オールフレッシュ）、12時間蛍光灯照明、12時間消灯の条件下で行った。動物は透明なポリカーボネート製ケージ（幅26cm、長さ42cm、高さ17cm）に3~4匹ずつ収容し、床敷きは三協ラボサービス株式会社（東京）のソフトチップを用い、週2回交換した。飲料水として水道水を試験期間中自由に摂取させた。

動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所「動物実験の適正な実施に関する規程」「厚生労働省の所管する実施機関における実験動物等の実施に関する基本指針」に従って計画され、動物実験計画は国立医薬品食品衛生研究所の動物実験委員会の承認後に動物愛護に十分配慮して実施した。

2. 被験物質及び飼料の調整

被験物質として、ブドウ果皮抽出物は、日本食品添加物協会から提供された XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX（ぶどうポリフェノールPPR）を用いた。今回用いた製品は、平成16年度に実施された90日間反復投与試験で用いられたものと同一で、別ロットのものであった。本抽出物はフランス産で、渋みとぶどう臭を持つ水溶性の紫~黒色微粉末であり、抗酸化作用やフリーラジカル除去作用を有するとして健康食品等に用いられている。本抽出物の品質規格書によると、成分として総ポリフェノール92%以上（カテキン当量 OD 280 nm）、そのうちオリゴメトリック・プロアントシアニジン（OPC）15%以上（バニリン法による分析）、アントシアニン1%以上（亜硫酸水素ナトリウム脱色法による分析）、レスベラトール100 ppm以上（HPLC法による分析）が含まれる。

事前に実施した用量設定のための予備試験において、雌雄のラット（各5匹/群）に0.2%、1.0%、2.5%、5.0%の用量で基礎飼料に混じて4週間反復投与した結果、予備試験期間中の体重、平均摂餌量、臓器重量、血液検査いずれの検索項目においても対照群との間に有意差や投与による影響は認められなかった。よって、本試験におけるブドウ果皮抽出物の用量は、0.2%、1.0%、5.0%に決定した。

投与飼料は、基礎飼料であるオリエンタル酵母工業株式会社の粉末CRF-1にブドウ

果皮抽出物を混合し所定の濃度となるよう調整した。混合飼料の調整については、2週間に1回行い、週1回摂餌量を測定した。給餌した飼料は2週間に一回全て入れ替え、新鮮な混合飼料を与えた。

ブドウ果皮抽出物の飼料中安定性試験は、日本食品分析センター（多摩市、東京）に依頼して実施した。飼料中安定性試験は、0.2%及び5.0%ブドウ果皮抽出物混合飼料中のレスベラトロール（*trans*体と*cis*体の合計）とアントシアニン類を各々高速液体クロマトグラフ及び分光光度計により測定した。検体の保存条件は、調整直後、室温保存1週間または2週間、冷蔵保存2週間または4週間とした。測定の結果（Table 1）、いずれの用量、保存条件においても、レスベラトロールあるいはアントシアニン類の飼料中の濃度に顕著な変化は見られなかったことから、上記保存条件下ではブドウ果皮抽出物の飼料中での安定性は保持されていると判断した。

3. 試験方法

本試験は、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）に従って実施された。雌雄各群10匹、計20匹にそれぞれ0%（基礎飼料）、0.2%、1.0%及び5.0%の割合でブドウ果皮抽出物を混合した粉末飼料を90日間自由に摂取させた。試験期間中、動物の一般状態を平日は毎日観察し、体重及び摂餌量の測定を週1回行った。90日間投与終了後、全動物を一晩絶食させた後、イソフルラン麻酔下にて開腹し、腹部大動脈より採血し、屠殺、剖検した。諸臓器は肉眼的に観察した後に摘出し、脳、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および卵巣については秤量後に、また鼻腔を含む頭蓋、下垂体、唾液腺（耳下腺、舌下腺、下顎腺）、気管、甲状腺、上皮小体、大動脈、食道、胃、小腸、大腸、膵臓、膀胱、前立腺、精囊腺、凝固腺、精巣上体、卵管、子宮、膣、リンパ節（頸部及び腸間膜）、胸骨、大腿骨、脊髄（頸、胸、腰部）、坐骨神経、皮膚及び骨格筋および肉眼的異常部位については摘出後直ちに10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。また、眼球及びその付属器は、頭蓋から摘出後直ちにダビットソン固定した。解剖時に採取した全例の血液について、多項目自動血球計数装置（K-4500型、東亜医用電子株式会社、兵庫）にて赤血球数（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）、白血球数（WBC）の測定を行ったほか、血液細胞自動分析装置（MICROX HEG-120A型、立石電機株式会社、東京）にて桿状核好中球（Neut-B）、分葉核好中球（Neut-S）、好酸球（Eosino）、好塩基球（Baso）、リンパ球（Lymph）、単球（Mono）、有核赤血球（Ebl）の分類を行った。また、血清を分離後、凍結し、XXXXXXXXXXに依頼して、

総蛋白(TP), アルブミン(Alb), 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(IP), ナトリウム(Na), カリウム(K), クロール(Cl), アスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST), アラニントランスアミナーゼ(ALT), アルカリフォスファターゼ(ALP)を測定した。病理組織学的検査は、雌雄とも対照群及び5.0%群の固定した全身諸臓器について実施した。耳下腺を含む唾液腺については、雌雄とも対照群を含む全群について病理組織学的に評価した。また、雌の腎臓については、石灰沈着の程度を評価するため、対照群を含む全群の腎臓組織標本を観察した。

4. 統計学的処理方法

体重、摂餌量、臓器の絶対重量と相対重量、血液検査結果、血清生化学検査結果、雌の腎臓にみられた石灰沈着の発生部位数については、各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、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 の方法で対照群と各被験物質投与群との間で有意差検定を行った。また、病理組織学的変化の発生頻度については対照群との間で Fisher の直接確率計算法による有意差検定を行った。

【結果】

1. 一般状態

試験期間中、投与群の雌雄とも体毛が被験物質色である黒～紫色に着色し、用量依存性にその程度は増していた。一般状態にはその他特記すべき変化は認められず、全ての動物が試験終了時まで生存した。

2. 体重及び摂餌量の推移

試験期間中の体重の推移を Fig. 1 に示す。雌雄とも、投与各群における毎週の平均体重は対照群との間に有意差は認められなかった。

試験期間中の一個体当たりの平均摂餌量の推移を Fig. 2 に示す。雄5.0%群において2～4週目と90日目に有意な平均摂餌量の増加が認められた。雄のその他の群および雌においては、対照群との差はみられなかった。実験期間中の平均一日摂餌量と、ブドウ果皮抽出部の平均一日摂取量および総摂取量を Table 2 に示す。雄の1.0%以上、雌の5.0%群で平均一日摂餌量がやや増加し、それに伴いブドウ果皮抽

出物の平均一日摂取量、総摂取量も公比5をやや上回っていた。

3. 最終体重及び臓器重量

最終体重と絶対・相対臓器重量を Table 3, 4 に示す。最終体重と絶対臓器重量については、雌雄とも投与群において対照群との間に有意差は認められなかった。また、相対臓器重量については、雌雄の 5.0%群の脳と雄 5.0%群の心臓および精巣重量が、対照群に比し有意に増加していた。その他の臓器の相対重量は、いずれの投与群においても対照群との間に有意差は認められなかった。

4. 血液及び血清生化学検査

血液検査の結果を Table 5 に示す。雌の 0.2%, 1.0%群において、採血の失敗により検査に必要な血液量を得られなかったため、各々1または2匹分の検体を検査から除外した。雄の 5.0%群において MCV 値の有意な増加が認められたが、対照群の値との差は小さく用量相関性は認められなかった。その他の検査項目については、雌雄のいずれの群でも有意な変動は認められなかった。

血清生化学検査の結果を Table 6 に示す。総ビリルビン値の有意な増加または低下が 5.0%群の雌雄に各々認められた。また、TG 値が雌雄とも 5.0%群で対照群に比し有意に低下した。雄では Cl 値が 0.2%, 5.0%群で共に有意に低下していたが、用量依存性はみられなかった。その他の項目については、いずれの投与群においても有意な変化は認められなかった。

5. 解剖時における諸臓器の肉眼所見

耳下腺の大型化が、雌雄とも 5.0%群の全例で認められた。耳下腺の大型化の程度は雄の方が大きかった。同変化は、雄 1.0%群の 1 例を除き、同群雌および他群では肉眼的に認められなかった。その他の臓器については、用量依存性の変化は認められなかった。

6. 病理組織学的検査

耳下腺の病理組織学的検査の結果を Table 7 に示す。雌雄とも 5.0%群の全例において腺房上皮細胞の好塩基性化と高度な腫大がび漫性に認められた (Fig. 3)。腺房上皮細胞の好塩基性化は、雌雄とも対照群を含め 0.2%, 1.0%群にも認められたが、いずれも腫大を伴わず、ごく一部の腺房上皮細胞に限局して観察されたのみであった。その他、腺房上皮細胞のび漫性空胞化が雌雄とも対照群と 5.0%群を

除く投与群の全例に、一部の腺房上皮細胞のアポトーシスが雌雄とも対照群を含む全投与群の全例に、軽度な巣状単核細胞浸潤が雄では全投与群の、雌では対照群を含む全群で一部の動物に散見され、その程度は同様であった。唾液腺以外の諸臓器に認められた病理組織学的所見を Table. 8 に示す。各所見の発生頻度は、雌雄の 5.0%群ともに対照群との有意な差は認められなかった。雌の腎臓にみられた軽微あるいは軽度な鉍質沈着は、対照群、5.0%群とも全例に認められた。また、5.0%群での沈着部位数の増加を考慮して、0.2%および 1.0%群を含めて沈着の程度を評価した。その結果、両側の腎臓組織切片にみられた皮質あるいは髄質における鉍質沈着の程度は、対照群と 0.2%、1.0%群では軽微 (slight) な変化であったが、5.0%群では他群より程度が高い軽度 (mild) な変化が見られる個体が有意に増加した。

【考察】

今回の試験は、平成 16 年度に実施された本抽出物のラットを用いた 90 日間反復投与毒性試験³⁾において雌雄の 1.25%以上の投与群にみられた耳下腺・腺房上皮細胞の腫大について、再現性を確認するために実施した。その結果、ブドウ果皮抽出物は、本試験でも 5.0%の用量で雌雄のラットに耳下腺・腺房上皮細胞の好塩基性化と高度な腫大を誘発したことから、この変化は本抽出物により誘発される変化であることが確認できた。ただし、耳下腺・腺房上皮細胞の腫大については、苦み成分として知られるタンニン酸をマウスに 5.0%の用量で 10 日間混餌投与した研究でも同様に認められていること⁷⁾、また、本試験において、耳下腺の腫大による壊死等の増加や体重変化を始め、摂餌量、血液・血清生化学的検査項目に毒性変化が認められていないことから、ブドウ果皮抽出物による耳下腺・腺房上皮細胞の腫大は毒性影響としても軽度なものであり、苦み成分に対する反応である可能性が高いと判断した。

雌の腎臓において、皮質あるいは髄質に軽微～軽度の鉍質沈着が認められ、5.0%群では軽度な鉍質沈着を示す個体が対照群に比し有意に多かった。本所見は、前述の平成 16 年度に実施された同物質のラット 90 日間反復投与毒性試験³⁾でも対照群を含む全群にみられ、2.5%以上の用量で病変の程度が高くなっていた。同所見は雌ラットに自然発生性に観察されるが⁸⁾、投与群でその程度が増強しており、再現性があることから、雌の腎臓にみられた鉍質沈着は、ブドウ果皮抽出物の投与による毒性影響であると考えた。しかし、血清生化学検査において腎障害を示唆する所見は認められず、本変化の発生機序も不明で、病変の程度が軽微あるいは軽度であるこ

とから、本変化はブドウ果皮抽出物による毒性ではあるものの、軽度なものと考えた。

臓器重量について、雌雄の 5.0%群の脳と雄 5.0%群の心臓、精巣の相対重量が、対照群に比し有意に増加していた。病理組織学的検索の結果、雌雄 5.0%群のこれらの臓器において対照群との間に発生頻度の差がある変化は認められなかったことから、雌雄の脳と雄の心臓、精巣の相対重量の増加は、毒性学的に意義のある変化ではないと考えた。

血清生化学検査において、TG 値が雌雄とも 5.0%群で対照群に比し有意に低下していた。この TG 値の変化は、雌雄に用量依存性に生じていることから、ブドウ果皮抽出物の投与に起因する変化であると考えた。本抽出物にはポリフェノールが含まれており、ラットやモルモットにおいて、ポリフェノールは血中 TG 濃度を低下させることが報告されている^{4)~6)}。よって、今回みられた TG 値の低下は、ブドウ果皮抽出物による毒性変化ではなく成分であるポリフェノールの影響と考えられた。血清生化学検査について、5.0%群にみられたその他のデータの変動（総ビリルビン値、Cl）は、雌雄で変動の仕方が異なり明らかな用量相関性が認められなかったことや、胆道系への以上がその他の検査項目で認められなかったことから、毒性学的に意義のある変化ではないと判断した。

以上より、雌 5.0%群にみられた腎臓・皮質および髄質における鉍質沈着は本抽出物の投与による毒性であると考え、また、生体への意義は不明瞭ながら、雌雄 5.0%群の耳下腺腺房上皮細胞の好塩基化とび慢性腫大が認められたことから、本試験における無毒性量 (NOAEL)は、雌雄とも 1.0% (雄 : 0.6 ± 0.2 g/kg BW/day, 雌 : 0.7 ± 0.1 g/kg BW/day)であると判断した。

【参考文献】

- 1) Erexson, G. L. 2003. Lack of in vivo clastogenic activity of grape seed and grape skin extracts in a mouse micronucleus assay. Food Chem. Toxicol. 41: 347-350.
- 2) 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: 1731-1743.

3) 平成 16 年度 食品・添加物等規格規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 (報告書)

4) Aprikian, O., Duclos, V., Guyot S., Besson, C., Manach, C., Bernalier, A., Morand, C., Remesy, C. and Demigne, C. 2003. Apple pectin and polyphenol-rich apple concentrate are more effective together than separately on cecal fermentations and plasma lipids in rats. *J. Nutr.* 133: 1860-1865.

5) Zern, T. L., West, K. L. and Fernandez, M. L. 2003. Grape polyphenols decrease plasma triglycerides and cholesterol accumulation in the aorta of ovariectomized Guinea pigs. *J. Nutr.* 133: 2268-2272.

6) Nakamura, Y. and Tonogai Y. 2002. Effects of grape seed polyphenoles on serum and hepatic lipid contents and fecal steroid excretion in normal and hypercholesterolemic rats. *J. Health Sci.* 48: 570-578.

7) da Costa., G., Lamy, E., Capela e Silva, F., Andersen, J., Sales Baptista, E. and Coelho, A. V. 2008. Salivary amylase induction by tannin-enriched diets as a possible countermeasure against tannins. *J. Chem. Ecol.* 34: 376-387.

8) 日本毒性病理学会編 毒性病理組織学 (第 1 版) 日本毒性病理学会 2000 年

Table 1. 飼料中のブドウ果皮抽出物成分レスベラトロール、アントシアニン類の安定性

保存条件	レスベラトロール (<i>trans</i> 体及び <i>cis</i> 体の合計, mg/100 g)	
	0.2% GSE ^{a)}	5.0% GSE ^{a)}
保存開始時	0.08	1.65
室温保存1週間	0.09	1.68
室温保存2週間	0.08	1.73
冷蔵保存2週間	0.08	1.75
冷蔵保存4週間	0.09	1.72

*高速液体クロマトグラフィーによる検索

保存条件	試料溶液中のアントシアニン類(吸光度)	
	0.2% GSE ^{a)}	5.0% GSE ^{a)}
保存開始時	0.027	0.562
室温保存1週間	0.026	0.534
室温保存2週間	0.029	0.553
冷蔵保存2週間	0.027	0.556
冷蔵保存4週間	0.027	0.535

* 分光光度計による検索

^{a)}: Grape skin extract

Table 2. Daily food consumption, daily GSE intake and total intake of GSE in F344 rats treated with GSE for 90 days.

Males	Mean daily food consumption (g/animal/day)	Mean daily GSE intake (g/kg BW/day)	Total GSE intake (g/kg BW)
Control	15.8 ± 0.6 ^a	0.0 ± 0.0	0.0
0.2% GSE	15.7 ± 0.9	0.1 ± 0.0	10.9
1.0% GSE	16.1 ± 0.6	0.6 ± 0.2	55.5
5.0% GSE	17.0 ± 1.2	3.3 ± 0.8	302.4
Females	Mean daily food consumption (g/animal/day)	Mean daily GSE intake (g/kg BW/day)	Total GSE intake (g/kg BW)
Control	10.5 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.0
0.2% GSE	10.6 ± 0.4	0.1 ± 0.0	12.4
1.0% GSE	10.4 ± 0.5	0.7 ± 0.1	61.7
5.0% GSE	10.9 ± 0.5	3.6 ± 0.7	327.1

^a: Mean ± SD

Table 3.

Final body and absolute organ weights of F344 rats treated with grape skin extract (GSE) for 90 days.

No. of animals examined	Control	0.2% GSE	1.0% GSE	5.0% GSE
	10	10	10	10
Males				
BW (g)	332.9 ± 13.7 ^a	331.7 ± 13.1	334.2 ± 17.3	319.8 ± 17.7
Brain (g)	1.97 ± 0.04	1.97 ± 0.05	2.01 ± 0.04	2.02 ± 0.05
Thymus (g)	0.20 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.21 ± 0.05	0.19 ± 0.03
Heart (g)	0.94 ± 0.04	0.94 ± 0.04	0.93 ± 0.05	0.94 ± 0.04
Lungs (g)	1.14 ± 0.10	1.12 ± 0.12	1.13 ± 0.06	1.15 ± 0.13
Spleen (g)	0.65 ± 0.04	0.65 ± 0.04	0.66 ± 0.04	0.63 ± 0.04
Liver (g)	7.97 ± 0.57	7.86 ± 0.52	8.00 ± 0.47	7.56 ± 0.46
Adrenals (g)	0.042 ± 0.002	0.040 ± 0.004	0.039 ± 0.002	0.041 ± 0.005
Kidneys (g)	2.00 ± 0.13	1.99 ± 0.12	2.01 ± 0.09	1.97 ± 0.11
Testes (g)	3.07 ± 0.12	3.08 ± 0.33	2.91 ± 0.64	3.16 ± 0.13
Females				
BW (g)	177.8 ± 4.9	178.0 ± 10.0	176.2 ± 7.9	172.0 ± 5.3
Brain (g)	1.79 ± 0.05	1.80 ± 0.03	1.80 ± 0.04	1.81 ± 0.05
Thymus (g)	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.15 ± 0.01
Heart (g)	0.57 ± 0.02	0.57 ± 0.02	0.56 ± 0.03	0.56 ± 0.02
Lungs (g)	0.77 ± 0.06	0.76 ± 0.05	0.77 ± 0.06	0.78 ± 0.09
Spleen (g)	0.39 ± 0.02	0.39 ± 0.03	0.38 ± 0.02	0.38 ± 0.01
Liver (g)	3.81 ± 0.21	3.89 ± 0.23	3.85 ± 0.23	3.68 ± 0.17
Adrenals (g)	0.042 ± 0.004	0.043 ± 0.003	0.038 ± 0.006	0.043 ± 0.002
Kidneys (g)	1.12 ± 0.05	1.10 ± 0.04	1.08 ± 0.06	1.12 ± 0.06
Ovaries (g)	0.051 ± 0.005	0.048 ± 0.004	0.051 ± 0.006	0.050 ± 0.004

^a: Mean ± SD

Table 4.

Relative organ weight of F344 rats treated with grape skin extract (GSE) for 90 days.

	Control	0.2% GSE	1.0% GSE	5.0% GSE
No. of animals examined	10	10	10	10
Males				
Brain (g/100 g BW)	0.59 ± 0.02 ^a	0.59 ± 0.02	0.60 ± 0.03	0.63 ± 0.03**
Thymus (g/100 g BW)	0.05 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Heart (g/100 g BW)	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.29 ± 0.01*
Lungs (g/100 g BW)	0.34 ± 0.03	0.34 ± 0.03	0.34 ± 0.02	0.36 ± 0.04
Spleen (g/100 g BW)	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01
Liver (g/100 g BW)	2.39 ± 0.10	2.37 ± 0.10	2.39 ± 0.05	2.36 ± 0.10
Adrenals (mg/100g BW)	12.6 ± 0.7	12.1 ± 1.5	11.8 ± 0.9	12.9 ± 1.5
Kidneys (g/100 g BW)	0.60 ± 0.02	0.60 ± 0.02	0.60 ± 0.02	0.62 ± 0.02
Testes (mg/100g BW)	0.92 ± 0.04	0.93 ± 0.11	0.87 ± 0.18	0.99 ± 0.06*
Females				
Brain (g/100 g BW)	1.01 ± 0.02	1.02 ± 0.06	1.02 ± 0.04	1.05 ± 0.03*
Thymus (g/100 g BW)	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01
Heart (g/100 g BW)	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.33 ± 0.01
Lungs (g/100 g BW)	0.43 ± 0.04	0.43 ± 0.04	0.44 ± 0.03	0.45 ± 0.05
Spleen (g/100 g BW)	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01
Liver (g/100 g BW)	2.14 ± 0.08	2.19 ± 0.07	2.19 ± 0.09	2.14 ± 0.07
Adrenals (mg/100g BW)	23.6 ± 2.1	24.4 ± 2.2	21.4 ± 3.3	25.0 ± 1.9
Kidneys (g/100 g BW)	0.63 ± 0.02	0.62 ± 0.03	0.62 ± 0.02	0.65 ± 0.04
Ovaries (mg/100g BW)	28.5 ± 2.6	27.2 ± 2.3	29.0 ± 3.0	28.9 ± 2.6

^a: Mean ± SD

*, **: Significantly different from controls at p<0.05 and p<0.01, respectively.

Table 5. Hematological data for F344 rats treated with grape skin extract (GSE) for 90 days

	Group			
	Control	0.2% GSE	1.0% GSE	5.0% GSE
Males				
No. of animals examined	10	10	10	10
RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	925.9 \pm 33.5 ^a	935.7 \pm 30.3	958.4 \pm 48.9	951.5 \pm 39.6
Hb (g/dl)	15.3 \pm 0.6	15.4 \pm 0.5	15.5 \pm 0.5	15.5 \pm 0.5
Ht (%)	49.3 \pm 1.7	50.1 \pm 1.6	51.1 \pm 2.6	51.2 \pm 2.1
MCV (fl)	53.3 \pm 0.4	53.5 \pm 0.6	53.3 \pm 0.3	53.9 \pm 0.3*
MCH (pg)	16.5 \pm 0.4	16.4 \pm 0.3	16.2 \pm 0.4	16.3 \pm 0.5
MCHC (g/dl)	31.0 \pm 0.7	30.7 \pm 0.5	30.4 \pm 0.7	30.3 \pm 1.0
Plt ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	69.7 \pm 2.2	69.1 \pm 7.1	73.5 \pm 2.6*	69.6 \pm 5.7
WBC ($\times 10^2/\mu\text{l}$)	31.7 \pm 7.3	34.7 \pm 10.4	34.0 \pm 8.9	31.3 \pm 4.5
Differential leukocyte counts				
No. of animals examined	10	10	10	10
Band form neutrophils (%)	0.8 \pm 0.4	1.1 \pm 0.7	1.2 \pm 0.6	1.2 \pm 0.8
Segmented neutrophils (%)	27.3 \pm 3.1	29.2 \pm 4.1	26.6 \pm 4.2	29.5 \pm 3.9
Eosinophils (%)	1.3 \pm 0.6	1.7 \pm 0.9	0.9 \pm 0.7	0.8 \pm 0.4
Basophils (%)	0.2 \pm 0.3	0.2 \pm 0.2	0.1 \pm 0.2	0.1 \pm 0.2
Lymphocytes (%)	69.9 \pm 2.9	67.6 \pm 4.4	70.6 \pm 4.7	68.0 \pm 4.5
Monocytes (%)	0.7 \pm 0.5	0.4 \pm 0.3	0.7 \pm 0.6	0.4 \pm 0.5
Reticulocytes (/ 100 cells)	0.5 \pm 0.6	0.8 \pm 0.7	0.6 \pm 0.6	0.7 \pm 0.7
Females				
No. of animals examined	10	10	9 ^b	10
RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	900.4 \pm 52.7	884.0 \pm 22.4	878.9 \pm 52.2	899.1 \pm 33.4
Hb (g/dl)	15.8 \pm 0.7	15.5 \pm 0.5	15.3 \pm 0.9	15.6 \pm 0.4
Ht (%)	51.1 \pm 2.8	49.9 \pm 1.2	49.7 \pm 2.9	50.9 \pm 1.9
MCV (fl)	56.8 \pm 0.4	56.5 \pm 0.3	56.5 \pm 0.2	56.6 \pm 0.3
MCH (pg)	17.6 \pm 0.6	17.6 \pm 0.4	17.4 \pm 0.3	17.4 \pm 0.6
MCHC (g/dl)	31.0 \pm 1.0	31.1 \pm 0.8	30.8 \pm 0.5	30.7 \pm 1.0
Plt ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	74.8 \pm 4.4	72.0 \pm 4.7	68.5 \pm 12.4	75.9 \pm 4.2
WBC ($\times 10^2/\mu\text{l}$)	23.5 \pm 2.9	21.0 \pm 3.3	20.4 \pm 6.0	19.5 \pm 3.2
Differential leukocyte counts				
No. of animals examined	10	9 ^b	8 ^b	10
Band form neutrophils (%)	1.1 \pm 0.9	1.0 \pm 0.6	1.0 \pm 0.8	1.2 \pm 0.8
Segmented neutrophils (%)	25.4 \pm 7.6	30.5 \pm 5.5	26.0 \pm 5.5	31.1 \pm 4.7
Eosinophils (%)	1.0 \pm 0.7	1.6 \pm 1.4	1.7 \pm 1.0	1.2 \pm 0.6
Basophils (%)	0.3 \pm 0.4	0.3 \pm 0.4	0.6 \pm 0.2	0.6 \pm 0.5
Lymphocytes (%)	71.5 \pm 8.6	66.2 \pm 6.4	70.1 \pm 5.7	65.4 \pm 4.9
Monocytes (%)	0.8 \pm 0.5	0.5 \pm 0.4	0.6 \pm 0.6	0.6 \pm 0.6
Reticulocytes (/ 100 cells)	1.1 \pm 0.6	1.9 \pm 1.0	0.7 \pm 0.9	1.6 \pm 1.0

^aMean \pm SD.^bNumbers are excluded animals of which blood samples were insufficiently collected.

Abbreviations: RBC, red blood cell; Hb, hemoglobin; Ht, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; Plt, platelet; WBC, white blood cell.

*: Significantly different from controls at $p < 0.05$. (Dunnnett's test or Dunnnett type rank-sum test).

Table 6. Serum biochemical data of F344 rats treated with grape skin extract (GSE) for 90 days.

	Group			
	Control	0.2% GSE	1.0% GSE	5.0% GSE
Males				
No. of animals examined	10	10	10	10
TP (g/dL)	6.35 ± 0.31 ^a	6.50 ± 0.12	6.20 ± 0.34	6.35 ± 0.23
A/G	1.69 ± 0.07	1.74 ± 0.10	1.71 ± 0.07	1.78 ± 0.06
Alb (g/dL)	3.99 ± 0.21	4.13 ± 0.11	3.92 ± 0.19	4.07 ± 0.16
Total Bil (mg/dL)	0.028 ± 0.006	0.030 ± 0.007	0.024 ± 0.007	0.037 ± 0.007*
Glucose (mg/dL)	127.8 ± 15.9	132.0 ± 22.5	133.8 ± 19.5	130.6 ± 20.6
TG (mg/dL)	94.9 ± 22.3	92.4 ± 38.3	82.7 ± 20.2	61.7 ± 18.0*
TC (mg/dL)	60.9 ± 4.8	60.3 ± 7.7	60.6 ± 5.6	56.6 ± 1.8
BUN (mg/dL)	18.1 ± 1.7	18.2 ± 0.5	17.6 ± 1.7	18.0 ± 1.1
CRN (mg/dL)	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.28 ± 0.01
Na (mEQ/L)	135.6 ± 4.9	140.3 ± 2.9	135.9 ± 6.2	139.2 ± 3.9
Cl (mEQ/L)	96.7 ± 4.3	101.4 ± 2.6*	98.1 ± 4.7	101.0 ± 3.7*
K (mEQ/L)	4.28 ± 0.22	4.43 ± 0.18	4.21 ± 0.22	4.34 ± 0.20
Ca (mg/dL)	9.59 ± 0.55	10.16 ± 0.41	9.72 ± 0.59	9.74 ± 0.39
IP (mg/dL)	4.92 ± 0.47	5.31 ± 0.50	5.31 ± 0.41	5.20 ± 0.60
AST (IU/L)	83.8 ± 8.6	82.6 ± 16.4	71.3 ± 8.8	82.9 ± 16.4
ALT (IU/L)	42.1 ± 3.0	40.7 ± 5.9	40.3 ± 4.0	41.3 ± 6.1
ALP (IU/L)	354.2 ± 21.1	360.6 ± 21.2	336.5 ± 32.0	355.7 ± 19.8
γ-GTP (IU/L)	<3	<3	<3	<3
Females				
No. of animals examined	10	10	10	10
TP (g/dL)	6.44 ± 0.18	6.50 ± 0.20	6.42 ± 0.17	6.31 ± 0.17
A/G	2.05 ± 0.14	2.02 ± 0.15	2.00 ± 0.12	1.99 ± 0.13
Alb (g/dL)	4.33 ± 0.12	4.34 ± 0.16	4.27 ± 0.09	4.18 ± 0.12*
Total Bil (mg/dL)	0.035 ± 0.007	0.030 ± 0.008	0.025 ± 0.010*	0.025 ± 0.007*
Glucose (mg/dL)	99.9 ± 8.5	96.4 ± 18.0	97.1 ± 13.7	85.7 ± 9.7
TG (mg/dL)	38.2 ± 14.0	34.1 ± 11.3	31.8 ± 10.7	23.1 ± 7.7*
TC (mg/dL)	88.5 ± 4.6	89.9 ± 6.8	88.5 ± 6.2	82.8 ± 3.7
BUN (mg/dL)	16.2 ± 1.6	16.5 ± 1.3	15.4 ± 1.6	16.8 ± 1.2
CRN (mg/dL)	0.30 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.02
Na (mEQ/L)	140.2 ± 2.3	141.0 ± 1.5	140.7 ± 1.6	140.1 ± 2.5
Cl (mEQ/L)	104.1 ± 1.5	104.4 ± 1.8	104.2 ± 2.3	103.6 ± 2.2
K (mEQ/L)	4.16 ± 0.12	4.10 ± 0.14	4.14 ± 0.15	4.12 ± 0.11
Ca (mg/dL)	9.62 ± 0.28	9.67 ± 0.20	9.53 ± 0.26	9.39 ± 0.30
IP (mg/dL)	3.78 ± 0.46	3.89 ± 0.49	3.94 ± 0.52	4.18 ± 0.54
AST (IU/L)	81.7 ± 19.8	74.2 ± 11.1	77.8 ± 10.3	80.6 ± 11.7
ALT (IU/L)	31.8 ± 7.2	28.2 ± 4.3	30.5 ± 4.1	32.0 ± 4.3
ALP (IU/L)	228.3 ± 26.8	234.3 ± 24.1	232.0 ± 25.3	226.6 ± 15.2
γ-GTP (IU/L)	<3	<3	<3	<3

^aMean±SD. ^bNumbers are excluded animals of which blood samples were insufficiently collected.

Abbreviations: TP, total protein; A/G, albumin: globulin ratio; Alb, albumin; Bil, bilirubin; TG, triglyceride; TC, total cholesterol; BUN, blood urea nitrogen; CRN, creatinine; Na, sodium; Cl, chloride; K, potassium; Ca, calcium; IP, inorganic phosphate; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; γ-GTP, gamma glutamyl transpeptidase.

*: Significantly different from controls at $p < 0.05$ (Dunnett's test or Dunnett type rank-sum test).

Table. 7 Histopathological findings in the granular epithelium of the parotid glands in F344 rats treated with grape skin extract (GSE) for 90 days.

No. of animals examined	Males			
	Control 10	0.2% GSE 10	1.0% GSE 10	5.0% GSE 10
Vacuolation (++) ^{a)}	10	10	10	0**
Apoptosis (±)	10	10	10	10
Basophilization (±/++)	2/0	6/0	3/0	0/10**
Hypertrophy, severe	0	0	0	10**
Mononuclear cell infiltration, slight (±)	0	5*	2	1
Regeneration with apoptosis, focal	0	0	1	0
No. of animals examined	Females			
	Control 10	0.2% GSE 10	1.0% GSE 10	5.0% GSE 10
Vacuolation (++)	10	10	10	0**
Apoptosis (±)	10	10	10	10
Basophilization (±/++)	3/0	4/0	8/0	0/10**
Hypertrophy, severe	0	0	0	10**
Mononuclear cell infiltration, slight (±)	5	3	3	1
Atrophy (±)	1	2	2	0

^{a)}: ±: focal (<20% of the tissue section); ++: diffuse (90%< of the tissue section)

*, **: Significantly different from controls at p<0.05 and p<0.01, respectively.

Table 8. Histopathological findings in male and female F344 rats treated with grape skin extract (GSE) for 90 days.

Males		Control	5.0% GSE		
Findings	(n=)	10	10		
Liver					
Microgranuloma, focal, slight		7	4		
Bile duct proliferation, focal, slight		1	0		
Kidneys					
Regeneration, proximal tubules, cortex, focal, slight		10	9		
Eosinophilic body, proximal tubules, cortex and/or outer medulla		10	10		
Mononuclear cell infiltration, interstitium, cortex, slight		1	2		
Mineralization, slight, cortex-outer medulla junction		1	0		
Pancreas					
Focal atrophy, exocrine gland, slight		1	3		
Basophilic gland, exocrine gland, focal, slight		1	0		
Mononuclear cell infiltration, focal, slight		2	3		
Regeneration and mononuclear cell infiltration, exocrine		1	0		
Accessory spleen		1	0		
Stomach					
Tissue malformation, glandular stomach		0	1		
Large Intestine					
Activation of lymphatic follicles, focal		1	0		
Mesenteric lymph node					
Increase of lymphocytes		0	1		
Heart					
Myocarditis, right ventricle		1	0		
Mononuclear cell infiltration, focal, slight		7	8		
Fibrosis, papillary muscles, focal, slight		5	2		
Testis					
Atrophy, focal, seminiferous tubules		1	0		
Epididymis					
Round cell debris in the tubules		1	0		
Accessory sex organs					
Mononuclear cell infiltration, dorsolateral prostate		2	1		
Mononuclear cell infiltration, seminal vesicle		1	0		
Adrenal gland					
Focal hyperplasia, fascicular zone		1	0		
Harder's gland					
Mononuclear cell infiltration, focal, slight		2	1		

Females		Control	0.2% GSE	1.0% GSE	5.0% GSE
Findings	(n=)	10	10	10	10
Liver					
Mononuclear cell infiltration, focal, slight		8			7
Focal necrosis, slight		0			1
Kidneys					
Regeneration, proximal tubules, cortex, focal, slight		1			1
Mineralization, cortex and/or medulla ^a (slight/mild)		10 (10/0)	9 (9/0)	9 (9/0)	10 (5*/5*)
Pancreas					
Mononuclear cell infiltration, focal, slight		2			2
Focal atrophy, exocrine, slight		1			2
Intestine					
Granulomatous inflammation, propria mucosae and Peyer's patch, focal		0			1
Heart					
Mononuclear cell infiltration, focal, slight		5			6
Fibrosis, focal, slight, papillary muscles		0			1
Tongue					
Granuloma, focal,		0			1
Harder's gland					
Granulomatous inflammation, focal, slight		1			1
Mononuclear cell infiltration, focal, slight		0			2
Bone marrow, femur					
Granuloma, focal		1			3
Increase of mast cell, slight, diffuse		0			2

^a Since the degree of mineralization increased at 5.0%, female kidneys in 0.2% and 1.0% groups were additionally observed.

*: Significantly different from controls at p<0.05.

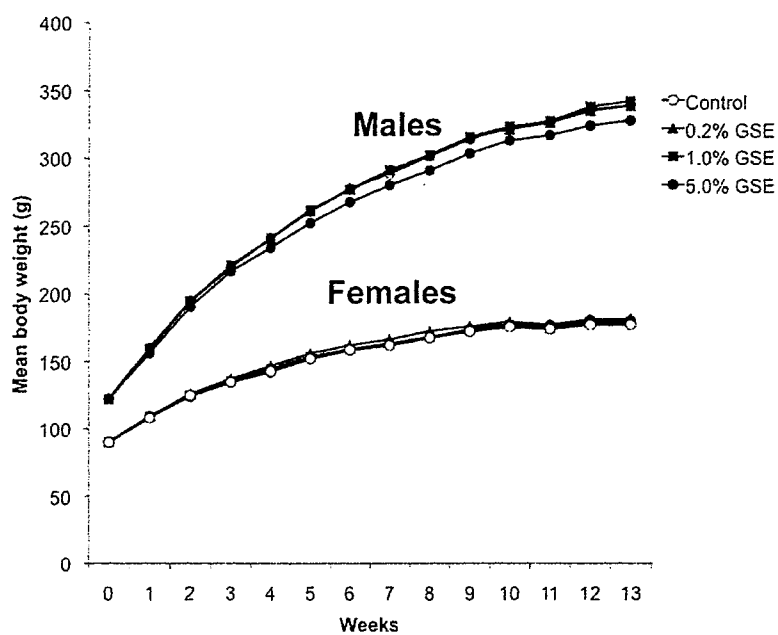


Fig. 1 Mean body weight of F344 rats treated with GSE for 90 days.

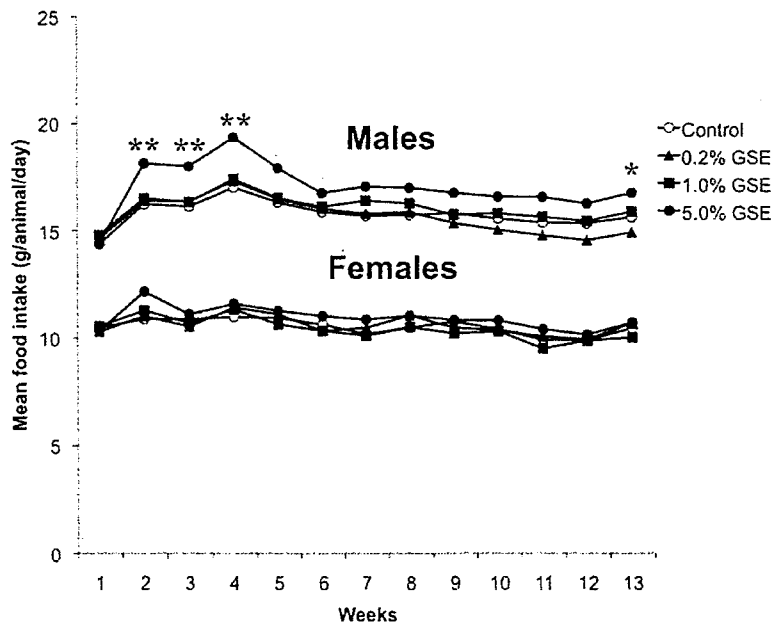


Fig. 2 Mean food intake of F344 rats treated with GSE for 90 days.

*, **: Significantly different from controls at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

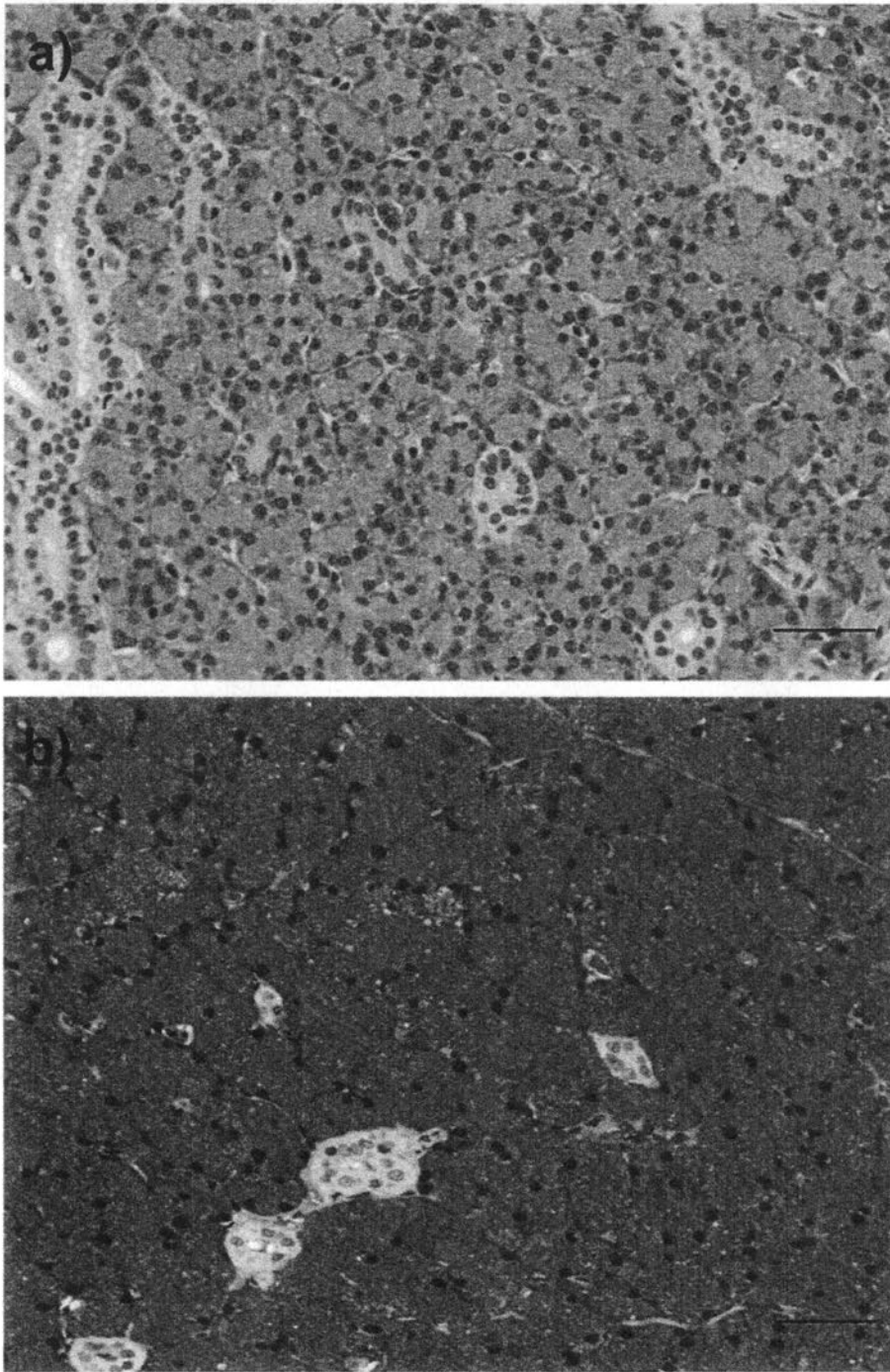


Fig. 3 Histopathological findings of the parotid gland in male F344 rats treated with GSE for 90 days. a) control and b) 5.0% GSE group. Severe hypertrophy and basophilization in the glandular epithelium was diffusely observed in 5.0% group. Bars= 50 μ m.