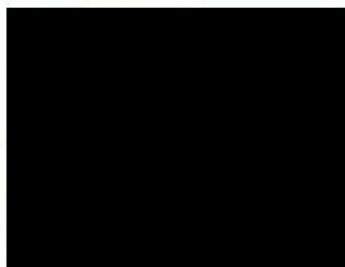


令和2年度 既存添加物の安全性に関する試験

ラットを用いたミルラの90日間反復経口投与毒性試験

報告書



国立医薬品食品衛生研究所

安全性生物試験研究センター



【概要】

既存添加物として指定されているミルラの安全性評価のため、ラットを用いた90日間反復経口投与毒性試験を実施した。

6週齢の雌雄 F344 ラットにミルラを 0、5,000、15,000 又は 50,000 ppm の濃度で90日間混餌投与し、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、血液学的検査、臓器重量測定、肉眼的病理学的検査を実施した。

その結果、雌雄ともに 50,000 ppm 群において体重増加抑制が認められ、雄の 50,000 ppm 群の腎臓において近位尿細管上皮における軽度の硝子滴が認められた。

以上の結果から、本試験におけるミルラの無毒性量は、雌雄ともに中間用量である 15,000 ppm（雄：0.85 g/kg BW/day、雌：0.95 g/kg BW/day）と判断された。

試験概要

1.1 試験表題

令和元年度 ミルラの安全性に関する試験 ラットを用いたミルラの 90 日間反復経口投与毒性試験（本試験）

1.2 試験番号

[Redacted]

1.3 試験目的

ミルラをラットに 90 日間混餌投与し、反復投与による毒性を明らかにすることを目的とする。

1.4 ガイドライン

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

1.5 動物愛護

本施設はヒューマンサイエンス振興財団動物実験実施施設認証センターの評価を受け、厚生労働省の通知「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」（厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知 平成 27 年 2 月 20 日 科発 0220 第 1 号）に適合した施設であると認定されている。本試験は国立医薬品食品衛生研究所「動物実験等の適正な実施に関する規程」に従って計画し、同所の動物実験委員会による審査・承認を経て実施した。

1.6 試験実施施設

[Redacted]

1.7 試験管理責任者

[Redacted]

1.8 試験責任者

[Redacted]

1.9 試験主担当者

[Redacted]

2 被験物質

名称	: ミルラ
供給源	: [REDACTED]
CAS No.	: なし
性状	: 不均一な粒子 均一に粉餌に混じるため株式会社東邦冷熱株式会社（〒476-0005 愛知県東海市新宝町 507 の 2）において低温粉碎したものを被験物質とした。 低温粉碎品・500 μ m Pass（中心粒径 75 μ m） （分級目開き：500 μ m 篩（30Mesh））
ロット番号	: 情報なし
含量	: 情報なし
保管条件	: 冷暗所に密栓して保管
取り扱い上の注意	: 使用時には手袋、マスク及び保護メガネ等の適切な保護具を着用し、肌及び目への接触を避ける。

3 試験系

3.1 動物

動物種	: ラット
系統	: F344/DuCrIj (SPF 動物)
性	: 雌雄
入荷時週齢	: 5 週齢
投与開始時週齢	: 6 週齢
購入（使用）匹数	: 雌雄各 44 匹（40 匹）
供給源	: 日本チャールス・リバー株式会社
所在地	: 〒243-0214 神奈川県厚木市下古沢 795
検疫・馴化期間	: 1 週間以上
群分け後の余剰動物の処置	: 主試験群の剖検日の翌日に同様に安楽殺した。

3.2 試験系選択理由

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

3.3 飼育条件

適切な生物学的防御がなされた環境の部屋で動物を飼育する。

飼育室	: [REDACTED]
-----	--------------

温度	: 23±1° C
相対湿度	: 50±5%
照明時間	: 12 時間/日 (7:00~19:00)
換気回数	: 20 回/時間
飼育匹数	: 3 または 4 匹/ケージ
ケージ交換頻度	: 2 回以上/週
給水瓶交換頻度	: 2 回以上/週

3.4 収容ケージ及び床敷

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

3.5 飼料及び給餌方法

飼料	: オリエンタル酵母工業株式会社製粉末飼料 (CRF-1)
給餌方法	: ケージ内に飼料を入れた粉餌給餌器を設置し、自由摂取

3.6 飲料水及び給水方法

飲料水	: 調製水
給水方法	: 透明な給水瓶を用いて自由摂取

3.7 群分け方法

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

3.8 個体識別法

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

4 試験方法

4.1 投与期間及び投与方法

被験物質の投与期間は 90 日以上とし、被験物質と十分に混和した 4.4 項に記載の粉末飼料を自由摂取させて投与した。対照群には被験物質を含まない粉末飼料を自由摂取させた。

4.2 投与量及び群構成

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

性別	投与濃度 (ppm)	匹数	動物番号
雄	0	10	1~10
	5,000	10	11~20
	15,000	10	21~30
	50,000	10	31~40
雌	0	10	101~110
	5,000	10	111~120
	25,000	10	121~130
	50,000	10	131~140

4.3 被験物質投与量の設定理由

14日間反復投与用量設定予備試験¹において、50,000 ppm群の雌雄で被験物質投与による毒性影響がみられなかったことから、本試験における被験物質の投与濃度は、最高用量を50,000 ppmに設定し、以下公比3で除した15,000 ppm及び5,000 ppmに設定した。

4.4 投与経路及び投与方法の選択理由

投与経路は、ヒトが被験物質に曝露される可能性の最も大きい経路である経口投与とした。

4.5 飼料の調製方法及び調製頻度

被験物質は電子天秤を用いて秤量し、乳鉢で少量の粉末飼料と十分に混合させた。秤量時、電子天秤は水平に保った。厚手ポリエチレン袋に、所定の濃度となるように残りの粉末飼料と共に加えてよく攪拌して混合し、投与飼料とした。投与飼料は1週間に1回調製した。

4.6 観察及び測定項目

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

4.6.1 一般状態

被験物質投与期間中に1日1回以上、全ての動物について一般状態、生死などについて観察し、月~金曜日においては観察結果を個体別に記録した。

4.6.2 体重

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

4.6.3 摂餌量

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

4.6.4 尿検査

投与第 12 週から 13 週に、雌雄各群 5 匹（動物番号順）について以下の検査を実施した。

動物は検査当日、採尿ラックに移し蓄尿を開始した。蓄尿中は採尿ラック用の給水瓶を用いて 3.6 項に記載の飲料水を投与した。蓄尿中の給餌は行わなかった。採尿ラックへの移動は群単位で実施した。約 4 時間の蓄尿後、尿サンプル（新鮮尿）を回収し、下記項目の試験紙法による検査を実施した。

検査項目：潜血、pH、ケトン体、尿糖、蛋白、ウロビリノーゲン、ビリルビン

4.6.5 血液学的検査

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

採取した血液の一部を抗凝固剤（EDTA-2K）入りの試験管（ベノジェクト II 真空採血管、テルモ株式会社）に移し、下記の項目について自動血球計算装置 IDEXX プロサイト Dx（アイデックスラボラトリーズ株式会社）を用いて測定した。再測定を実施した場合、再測定を実施した理由並びに採用、不採用としたデータ及びその理由を明確に記録した。

検査項目：赤血球数（RBC）、ヘモグロビン濃度（HGB）、ヘマトクリット値（HCT）、平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球血色素量（MCH）、平均赤血球血色素濃度（MCHC）、血小板数（PLT）、白血球数（WBC）、網状赤血球数（RET）、白血球分画（好中球；Neutrophil、好酸球；Eosinophil、好塩基球；Basophil、単球；Monocyte、リンパ球；Lymphocyte）

4.6.6 血清生化学的検査

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

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GTP)、総ビリルビン (T-BIL)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRE)、ブドウ糖 (GLU)、総コレステロール (T-CHO)、トリグリセリド (TG)、総蛋白 (TP)、アルブミン (ALB)、A/G 比 (A/G)、無機リン (IP)、カルシウム (Ca)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、塩素 (Cl)

4.6.7 病理学的検査

投与期間終了時に、第 4.6.6 項において採血し、放血致死させた動物について、下記の病理学的検査を行った。

4.6.7.1 肉眼的病理学検査

全生存動物について、全身の諸器官・組織の肉眼的病理学検査を実施し、下記の器官・組織を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液にて保存した。固定液に浸した臓器は振盪器にて一晩以上振盪した後、可能な限り速やかに切り出しを行った。ただし、眼球はダビッドソン固定液にて固定・保存し、3~5 日以内に切り出しを実施し、残臓器は 10%中性緩衝ホルマリン液に保存した。また、精巣はブアン液にて固定した翌日から 70%エタノールで保存し、切り出し後の残臓器は 10%中性緩衝ホルマリン液に保存した。鼻腔を含む頭蓋、胸骨、大腿骨及び脊椎（頸部、胸部及び腰部横断）は、10%ギ酸及び 10%中性緩衝ホルマリン混合液等で脱灰処理を行った。

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

全生存動物について、全身の諸器官・組織の肉眼的病理学検査を実施し、下記の器官・組織を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液にて保存した。固定液に浸した臓器は振盪器にて一晩以上振盪した後、可能な限り速やかに切り出しを行った。ただし、眼球はダビッドソン固定液にて固定・保存し、3~5 日以内に切り出しを実施し、残臓器は 10%中性緩衝ホルマリン液に保存した。

4.6.7.2 器官重量

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

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

*：固定後測定した。**：測定後 10%中性緩衝ホルマリン液を注入した。

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

4.6.7.3 病理組織学的検査

雌雄の対照群及び最高用量群の全てについては、採取した器官・組織（4.6.6.1 項参照）について常法に従い、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製した。後述の第 6.6.1 項目の器官重量より、雌雄ともに絶対および相対重量に有意な差が認められた肝臓と腎臓は、5,000 ppm 群および 15,000 ppm 群も標本作成をした。雄の腎臓については、抗 α_{2u} -グロブリンを用いた免疫組織化学的染色を実施した。抗原賦活化処理は protease K を用いて行い、1 次抗体には抗 α_{2u} -グロブリン抗体(R&D Systems 社製)、2 次抗体には VECTASTAIN Elite ABC Kit (VECTOR LABORATORIES 社製) を使用した。発色は diaminobenzidine 法にて行い、発色後にヘマトキシリンにて対比染色を行った。

4.7 統計処理

試験期間中の体重、摂餌量、血液学的・血清生化学的検査結果及び器官重量については各群の分散を Bartlett の方法で検定し、多重比較を Dunnett 等の方法により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。病理所見については、発生頻度を Fisher の正確確率検定、グレーディングを Mann-Whitney の U 検定により有意差検定を行った。 $P < 0.05$ の場合を統計学的に有意と判定した。

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

- 1) 第 4.6.1 項の一般状態観察において、土及び日曜日は記録を行わなかったが、XXXXXXXXXX に観察を依頼し、異常を報告されなかったため、試験結果に影響はないと判断した。
- 2) 第 4.6.4 項の尿検査において、時間内に採尿できなかった個体について、同じ週の別日に改めて実施した。また、試験計画書では各群 5 匹から採尿し尿検査を実施する予定だったが、畜尿時に著しく採尿できなかった群が散見されたため予備の畜尿時では、採尿できなかった個体と予備個体として初回に畜尿を行わなかったラットも用いて採尿を行った。そのため、群によって試

験数が異なるが、雌の 15,000 ppm 群では 4 匹、その他の群では 5 匹以上から検査を実施できていることから試験の結果には影響が無いと判断した。

- 3) 第 4.6.4 項目の尿検査において、試験計画書では採尿ラックに移動させた後にも飼料の給餌を行う予定だったが、雌雄ともに給餌器から餌をこぼす行動が散見されたため、畜尿時に採尿チューブに飼料が混入することを避けるため給餌は行わなかった。給餌停止時間は 4 時間と短時間であるため、試験結果に影響はないと判断した。
- 4) 第 4.6.5 項の血液学的検査および第 4.6.6 項の血清生化学検査において、雌の 15,000 ppm 群の 1 例において、採血量の不足により測定が行えなかった。しかしながら、同群の他の個体で評価できていることから、試験の結果には影響しないと判断した。
- 5) 第 4.6.7.3 項の病理組織学的検査における欠損臓器を Appendix 1 に示す。雄の対照群の 3 例の縦隔リンパ節、50,000 ppm 群の 1 例の縦隔リンパ節、1 例のジンバル腺、雌の対照群の 3 例の縦隔リンパ節、2 例のジンバル腺、50,000 ppm 群の 2 例の縦隔リンパ節、1 例のジンバル腺については、解剖中あるいは標本作製過程における臓器の紛失により病理組織学的検査が実施できなかった。しかしながら、各群の他の個体で評価できていることから、試験の結果には影響しないと判断した。

6 試験結果

6.1 生存率及び一般状態

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

6.2 体重

体重測定の結果を Fig. 1 に示す。雄は、0 ppm 群と比較して 50,000 ppm 群で 2 週目と 7 週目以降に有意な体重の低値が認められた。雌は、0 ppm 群と比較して 5,000 ppm 群で 4、6、7、8 及び 11 週目に、50,000 ppm 群で 4、6 及び 7 週目と 11 週目以降に有意な体重の低値が認められた。

6.3 摂餌量

試験期間中の各群における 1 匹の 1 日あたりの平均摂餌量及びミルラの摂取量を Table 1 に、90 日間の平均摂餌量の推移の結果を Fig. 2 に示す。雌雄ともに摂餌量に被験物質投与の明らかな影響は認められなかった。

6.4 尿検査

13 週目の尿検査試験紙による尿検査結果を Table 2 に示す。雄の対照群に 5 例、5,000 ppm 群に 5 例、15,000 ppm 群に 5 例、50,000 ppm 群に 6 例、雌の対照群に

1例、5,000 ppm群に1例、15,000 ppm群に1例、50,000 ppm群に4例、尿中蛋白(±~2+)が認められた。雄の対照群に5例、5,000 ppm群に5例、15,000 ppm群に5例、50,000 ppm群に6例、雌の5,000 ppm群に1例ケトン体(±~3+)が認められた。雄の対照群に1例、雌の50,000 ppm群に2例ビリルビン(1+)が認められた。潜血、尿糖、ウロビリノーゲンはいずれも認められなかった。

6.5 血液学的検査

血液学的検査結果をTable 3に示す。雄の50,000 ppm群においてPLTの有意な高値が認められた。

6.6 血清生化学的検査

血清生化学的検査をTable 4に示す。雄の15,000 ppm群からASTおよびALPの有意な低値が認められた。50,000 ppm群ではTPおよびALBの有意な高値とALTの有意な低値が認められた。雌の50,000 ppm群ではBUNの有意な高値とALPおよびTGの有意な低値が認められた。

6.6.1 器官重量

最終体重及び臓器重量をTable 5に示す。最終体重について、雌雄ともに50,000 ppm群で有意な体重の低値が認められた。臓器重量測定では、雄の50,000 ppm群において脾臓の絶対重量の有意な減少、肝臓の絶対および相対重量の有意な増加、腎臓の相対重量の有意な増加が認められた。雌の5,000 ppm群と50,000 ppm群では肝臓の、50,000 ppm群では腎臓の相対重量の有意な増加が認められた。50,000 ppm群では、副腎の絶対重量の減少が認められた。

6.6.2 病理組織学的検査

剖検時に実施した肉眼的検査において、雌雄ともに被験物質投与に関連する変化は認められなかった。病理組織学的検査の結果、雄50,000 ppm投与群の腎臓において、近位尿細管上皮における軽度の硝子滴の出現が認められた。その他の器官・組織においては、自然発生性変化が対照群及び50,000 ppm群で散見されたものの、統計学的に有意な変化は認められなかった。抗ラット α_{2u} -グロブリン抗体を用いた免疫組織化学的染色の結果、腎臓近位尿細管上皮において認められた硝子滴において陽性反応が認められた(Fig 2)。しかしながら、免疫組織化学的手法による α_{2u} -グロブリン沈着の評価を行ったところ、50,000 ppm群における α_{2u} -グロブリン沈着の明らかな増加は認められなかった(Table 7)。

7 考察及び結論

体重については、雌雄ともに50,000 ppm群で有意な低値が認められた。摂餌量に変化がみられないことから、これら体重変化は被験物質投与による影響と考えられた。

尿検査では、雌雄ともに尿中蛋白（±、1+、2+）の判定の個体が各群で認められたが、血清生化学検査において腎機能障害に関する変化を欠き、また用量依存性も認められてないことから毒性学的意義は乏しいと考えられた。雄のすべての個体、雌の高用量群 1 例でケトン体（±～3+）の判定と雄の対照群 1 例、雌の 50,000 ppm 群 2 例においてビリルビン（1+）の判定の個体が認められたが、用量依存性を欠くことから毒性学的意義は乏しいと考えられた。

血液学検査では、雄の 50,000 ppm 群において血小板数の有意な上昇が見られたが、白血球および赤血球系パラメーターの変化を欠き、骨髄を含む造血器においても関連する病理組織学的変化は認められず、用量依存性も認められないことから、毒性学的意義は乏しいと判断した。

血清生化学的検査では、雄の 50,000 ppm 群において AST、ALT および ALP の有意な低値、ALB の有意な高値が認められたが、肝毒性を示す変化とは逆の変化であること、病理組織学的検査においても肝臓に変化はみられていないことから、毒性学的意義は乏しいと判断した。また、同群では TP と ALB の有意な上昇が認められたが、病理組織学検査においてこれらの原因となる変化はみられていないことから、偶発的な変化と判断した。雌の 50,000 ppm 群では BUN の有意な高値が認められたが、腎毒性を示唆する CRE の変化がなく、組織傷害を示唆する所見もないことから毒性学的意義は乏しいと判断された。同群では TG および ALP の有意な低値が認められたが、肝毒性を示す変化とは逆の変化であること、病理組織学的検査においてもこれらの原因となる変化はみられていないことから、毒性学的意義は乏しいと判断した。

器官重量では雄の 50,000 ppm 群で肝臓の絶対および相対重量の有意な増加が、雌の 50,000 ppm 群および 5,000 ppm 群では肝臓の相対重量の有意な増加が認められたが、血清生化学検査において肝毒性を示唆する変化は認められず、病理組織学検査においても肝臓に変化はみられていないことから、毒性学的意義は乏しいと判断した。雄の 50,000 ppm 群では脾臓の、雌の 50,000 ppm 群では副腎の絶対重量の減少がみられたが、相対重量に変化はないことから体重変化に起因する変化と考えられた。雌の 50,000 ppm 群では腎臓の相対重量の有意な増加が認められたが、用量相関性がないことから毒性学的意義は乏しいと考えられた。一方、雄の 50,000 ppm 群では腎臓の相対重量の有意な増加が認められ、同群では近位尿細管上皮における硝子滴の出現が見られたことから、これ等の変化の関連が疑われた。これらの硝子滴は雄ラットのみでみられたことから、 α_{2u} -グロブリンを疑い抗 α_{2u} -グロブリン抗体による免疫組織化学染色を実施したが、対照群に比して 50,000 ppm 群における α_{2u} -グロブリンの増加は認められなかったことから、硝子滴の出現は α_{2u} -グロブリン以外の要因によるものと考えられた。

以上のとおり、雌雄の F344 ラットに 0 ppm、5,000 ppm、15,000 ppm、50,000 ppm の用量でミルラを 90 日間混餌投与した本試験において、雌雄ともに 50,000 ppm 群では体重増加抑制が認められ、雄の 50,000 ppm 群の腎臓では硝子滴の出現が認められた。したがって、本試験の条件下におけるミルラの無毒性量は、雌雄ともに中間用量である 15,000 ppm（雄：0.85g/kg BW/day、雌：0.95 g/Kg BW/day）と判断された。

8 参考文献

1. 既存添加物の安全性に関する試験 ラットを用いたミルラの 90 日間反復経口投与毒性試験：用量設定のための予備試験（XXXXXXXXXX、試験番号：XXXXXX）

Table 1. Food consumption and intake of myrrh of F344 rats treated with myrrh for 90 days.

Dose of myrrh (ppm)	No. of animals examined	Food consumption (g/rat/day)	Mean daily intake of myrrh (g/kg BW/day)	Total intake of myrrh (g/kg BW)
<i>Males</i>				
0	10	14.23 (57.74) ^a	0.00	0.00
5,000	10	14.11 (57.44)	0.29	3.73
15,000	10	14.02 (56.95)	0.85	11.10
50,000	10	14.16 (59.95)	3.00	38.97
<i>Females</i>				
0	10	9.73 (62.27)	0.00	0.00
5,000	10	9.42 (62.71)	0.31	4.08
15,000	10	9.81 (63.62)	0.95	12.41
50,000	10	9.66 (64.37)	3.22	41.84

^a:Values in parentheses are for food consumption calculated as g/kg BW/day.

Abbreviations:BW;body weight.

Table 2. Urinalysis data in F344 rats treated with myrrh.

		Myrrh			
		0 ppm	5,000 ppm	15,000 ppm	50,000 ppm
<i>Males</i>					
No. of animals		5	5	5	6
Protein	-				
	±		2		2
	1+	2	2	4	4
	2+	3	1	1	
Glucose	-	5	5	5	6
Occult blood	-	5	5	5	6
Ketone body	-				
	±		1		
	1+		1	1	4
	2+	5	3	3	2
	3+			1	
Urobilinogen	0	5	5	5	6
Bilirbin	-	4	5	5	6
	1+	1			
pH	6.5				
	7				1
	8		2	1	3
	8.5	5	3	4	2
<i>Females</i>					
No. of animals		7	8	4	5
Protein	-	7	7	4	1
	±				1
	1+		1		1
	2+				2
Glucose	-	7	8	4	5
Occult blood	-	7	8	4	5
Ketone body	-	7	7	4	5
	±				
	1+		1		
	2+				
	3+				
Urobilinogen	0	7	8	4	5
Bilirbin	-	7	8	4	3
	1+				2
pH	6.5				
	7		1		
	7.5	1	1	1	
	8	3	4	2	
	8.5	3	2	1	5

Table 3. Hematology data for F344 rats treated with myrrh for 90 days.

		Myrrh			
		0 ppm	5,000 ppm	15,000 ppm	50,000 ppm
Males					
No. of animals	examined	10	10	10	10
WBC	($10^3/\mu\text{L}$)	3.8 ± 0.7 ^a	3.6 ± 0.7	3.6 ± 0.9	3.8 ± 0.3
RBC	($10^6/\mu\text{L}$)	9.1 ± 0.3	9.1 ± 0.2	9.0 ± 0.1	9.1 ± 0.1
HGB	(g/dL)	14.9 ± 0.4	14.8 ± 0.3	14.7 ± 0.3	14.9 ± 0.3
HCT	(%)	43.2 ± 1.1	43.2 ± 1.7	42.8 ± 0.8	43.6 ± 0.9
MCV	(fl)	47.6 ± 0.4	47.2 ± 0.4	47.8 ± 0.5	47.9 ± 0.5
MCH	(pg)	16.4 ± 0.2	16.3 ± 0.2	16.4 ± 0.2	16.4 ± 0.1
MCHM	(g/dL)	34.5 ± 0.3	34.5 ± 0.2	34.2 ± 0.2	34.2 ± 0.2
PLT	($10^3/\mu\text{L}$)	583.4 ± 22.7	609.5 ± 38.6	604.7 ± 25.5	617.1 ± 16.3*
RET	(%)	2.3 ± 0.2	2.3 ± 0.2	2.3 ± 0.2	2.2 ± 0.1
Differential leukocyte counts					
Neutrophils	(%)	22.4 ± 5.6	25.5 ± 4.8	24.1 ± 5.2	24.6 ± 5.6
Lymphocyte	(%)	72.0 ± 6.8	68.4 ± 5.6	70.1 ± 6.0	69.8 ± 5.9
Monocytes	(%)	4.2 ± 1.1	4.6 ± 1.1	4.3 ± 1.1	4.0 ± 0.9
Esosinophils	(%)	1.0 ± 0.3	1.1 ± 0.3	1.2 ± 0.4	1.3 ± 0.3
Basophils	(%)	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1
Females					
No. of animals	examined	10	10	9 ^b	10
WBC	($10^3/\mu\text{L}$)	3.3 ± 0.7	3.3 ± 0.6	3.2 ± 0.4	3.5 ± 0.4
RBC	($10^6/\mu\text{L}$)	8.8 ± 0.3	8.8 ± 0.1	8.8 ± 0.1	8.7 ± 0.2
HGB	(g/dL)	15.5 ± 0.5	15.5 ± 0.2	15.5 ± 0.3	15.3 ± 0.4
HCT	(%)	45.3 ± 1.4	45.2 ± 0.5	45.4 ± 0.8	44.7 ± 1.2
MCV	(fl)	51.5 ± 0.3	51.6 ± 0.3	51.8 ± 0.3	51.6 ± 0.2
MCH	(pg)	17.7 ± 0.2	17.7 ± 0.1	17.7 ± 0.1	17.7 ± 0.1
MCHM	(g/dL)	34.3 ± 0.3	34.3 ± 0.3	34.2 ± 0.2	34.3 ± 0.1
PLT	($10^3/\mu\text{L}$)	621.8 ± 52.6	578.9 ± 43.3	659.6 ± 43.9	662.7 ± 72.7
RET	(%)	2.1 ± 0.2	2.2 ± 0.3	2.3 ± 0.3	2.3 ± 0.3
Differential leukocyte counts					
Neutrophils	(%)	19.8 ± 3.2	19.3 ± 2.4	18.5 ± 3.2	17.1 ± 2.8
Lymphocyte	(%)	75.7 ± 3.3	75.6 ± 2.3	76.7 ± 3.5	78.1 ± 2.7
Monocytes	(%)	3.2 ± 0.4	3.6 ± 0.4	3.3 ± 0.7	3.3 ± 0.3
Esosinophils	(%)	1.1 ± 0.3	1.2 ± 0.3	1.1 ± 0.4	1.2 ± 0.2
Basophils	(%)	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1

^a: Values are means ± SDs.

^b: Number of effective animals was reduced to nine for due to the failure of blood sampling.

*,**,: Significantly different from the controls at p<0.05 and p<0.01, respectively (Dunnett's test)

Table 4. Serum biochemistry data for F344 rats treated with myrrh for 90 days.

	Myrrh			
	0 ppm	5,000 ppm	15,000 ppm	50,000 ppm
Males				
No.of animals examined	10	10	10	10
TP (g/dL)	6.3 ± 0.2 ^a	6.4 ± 0.1	6.3 ± 0.2	6.7 ± 0.1*
ALB (g/dL)	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.5 ± 0.0*
A/G	2.1 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.1 ± 0.1
BUN (mg/dL)	19.5 ± 2.1	19.8 ± 1.1	19.1 ± 1.5	20.1 ± 1.7
CRE (mg/dL)	0.36 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.35 ± 0.02	0.35 ± 0.01
Na (mEq/L)	142.7 ± 1.0	142.8 ± 0.8	142.6 ± 1.4	142.8 ± 0.8
K (mEq/L)	4.2 ± 0.1	4.2 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.1 ± 0.2
Cl (mEq/L)	103.2 ± 1.2	102.7 ± 0.6	103.3 ± 1.0	102.4 ± 1.0
Ca (mEq/L)	10.5 ± 0.1	10.6 ± 0.2	10.6 ± 0.2	10.7 ± 0.1
IP (mEq/L)	4.9 ± 0.4	4.7 ± 0.6	5.1 ± 0.8	5.2 ± 0.6
AST (IU/L)	107.3 ± 12.8	94.4 ± 10.1	87.8 ± 21.9*	69.9 ± 7.9*
ALT (IU/L)	57.5 ± 7.6	52.2 ± 4.6	52.8 ± 18.9	39.1 ± 3.4*
ALP (IU/L)	377.4 ± 24.9	363.6 ± 34.1	344.0 ± 26.1**	337.0 ± 10.4*
γ-GT	<3	<3	<3	<3
T-CHO (mg/dL)	60.0 ± 7.6	62.8 ± 8.0	60.6 ± 3.0	62.7 ± 5.1
T-BIL (mg/dL)	0.044 ± 0.010	0.043 ± 0.012	0.045 ± 0.005	0.038 ± 0.006
TG (mg/dL)	77.5 ± 21.5	89.4 ± 29.5	76.3 ± 32.6	59.6 ± 22.6
GLU (mg/dL)	147.7 ± 20.5	147.0 ± 14.1	148.0 ± 17.5	142.4 ± 17.6
Females				
No.of animals examined	10	10	9 ^b	10
TP (g/dL)	6.4 ± 0.2	6.4 ± 0.2	6.3 ± 0.1	6.5 ± 0.2
ALB (g/dL)	4.4 ± 0.2	4.5 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.5 ± 0.1
A/G	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.8	2.3 ± 0.9
BUN (mg/dL)	18.1 ± 1.0	18.2 ± 1.1	17.3 ± 1.7	20.3 ± 2.9*
CRE (mg/dL)	0.35 ± 0.02	0.33 ± 0.01	0.34 ± 0.05	0.39 ± 0.17
Na (mEq/L)	142.7 ± 1.3	142.3 ± 0.8	143.1 ± 0.8	142.3 ± 0.7
K (mEq/L)	4.0 ± 0.2	3.9 ± 0.2	3.9 ± 0.1	4.1 ± 0.3
Cl (mEq/L)	103.7 ± 1.5	103.3 ± 0.5	105.0 ± 1.2*	104.1 ± 0.9
Ca (mEq/L)	10.4 ± 0.2	10.5 ± 0.1	10.4 ± 0.1	10.5 ± 0.1
IP (mEq/L)	5.2 ± 0.2	5.1 ± 0.4	5.1 ± 0.4	5.3 ± 0.5
AST (IU/L)	78.3 ± 10.7	76.2 ± 8.9	72.8 ± 4.7	71.6 ± 9.0
ALT (IU/L)	33.2 ± 5.2	34.4 ± 2.9	33.0 ± 3.7	31.0 ± 4.2
ALP (IU/L)	259.0 ± 18.8	250.2 ± 23.6	242.6 ± 19.0	216.0 ± 18.7**
γ-GT	<3	<3	<3	<3
T-CHO (mg/dL)	88.1 ± 10.0	86.8 ± 7.5	92.4 ± 6.7	90.9 ± 8.2
T-BIL (mg/dL)	0.051 ± 0.013	0.053 ± 0.009	0.042 ± 0.007	0.038 ± 0.010
TG (mg/dL)	36.4 ± 9.9	34.7 ± 8.9	31.3 ± 8.6	28.7 ± 6.4*
GLU (mg/dL)	117.9 ± 16.7	115.4 ± 12.2	126.1 ± 14.5	129.3 ± 15.8

^a: Values are means ± SDs.

^b: Number of effective animals was reduced to for due to the failure of blood sampling.

***: Significantly different from the controls at p<0.05 and p<0.01, respectively (Dunnett's test)

Table 5. Body and organ weights data for F344 rats treated with myrrh for 90 days.

		Myrrh			
		0 ppm	5,000 ppm	15,000 ppm	50,000 ppm
No. of animals		10	10	10	10
Males					
No. of animals examined		10	10	10	10
Body weight	(g)	300.3 ± 12.8 ^a	303.0 ± 16.5	303.9 ± 14.9	285.3 ± 8.0*
Brain	(g)	1.95 ± 0.03	1.95 ± 0.04	1.96 ± 0.04	1.94 ± 0.03
	(g/100gBW)	0.65 ± 0.02	0.64 ± 0.03	0.65 ± 0.03	0.68 ± 0.02
Thymus	(g)	0.17 ± 0.03	0.17 ± 0.03	0.17 ± 0.03	0.17 ± 0.02
	(g/100gBW)	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Heart	(g)	0.87 ± 0.04	0.89 ± 0.07	0.88 ± 0.06	0.85 ± 0.05
	(g/100gBW)	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.30 ± 0.02
Spleen	(g)	0.62 ± 0.06	0.62 ± 0.06	0.61 ± 0.03	0.56 ± 0.02*
	(g/100gBW)	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01
Liver	(g)	6.80 ± 0.38	6.93 ± 0.55	7.01 ± 0.40	7.35 ± 0.39*
	(g/100gBW)	2.26 ± 0.07	2.29 ± 0.08	2.31 ± 0.07	2.57 ± 0.08**
Kidney	(g)	1.77 ± 0.10	1.80 ± 0.10	1.80 ± 0.10	1.81 ± 0.10
	(g/100gBW)	0.59 ± 0.03	0.59 ± 0.02	0.59 ± 0.04	0.63 ± 0.03*
Lung	(g)	0.89 ± 0.06	0.88 ± 0.05	0.88 ± 0.07	0.82 ± 0.09
	(g/100gBW)	0.30 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.03
Testes	(g)	3.00 ± 0.06	2.94 ± 0.20	2.96 ± 0.19	2.87 ± 0.29
	(g/100gBW)	1.00 ± 0.03	0.97 ± 0.01	0.97 ± 0.06	1.01 ± 0.08
Adrenal	(g)	0.032 ± 0.007	0.028 ± 0.008	0.029 ± 0.004	0.035 ± 0.008
	(mg/100gBW)	10.74 ± 2.46	9.32 ± 2.59	9.55 ± 1.21	12.23 ± 2.63
Pituitary	(g)	0.009 ± 0.002	0.008 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.009 ± 0.001
	(mg/100gBW)	2.92 ± 0.60	2.71 ± 0.43	2.80 ± 0.39	2.99 ± 0.32
Thyroid	(g)	0.018 ± 0.003	0.015 ± 0.001	0.016 ± 0.002	0.019 ± 0.002
	(mg/100gBW)	5.93 ± 1.15	5.07 ± 0.71	5.25 ± 0.66	6.64 ± 0.80
Salivary glands	(g)	0.57 ± 0.05	0.57 ± 0.05	0.57 ± 0.03	0.58 ± 0.07
	(g/100gBW)	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.02
Seminal vesicle	(g)	1.10 ± 0.06	1.06 ± 0.12	1.13 ± 0.11	1.04 ± 0.16
	(g/100gBW)	0.37 ± 0.03	0.35 ± 0.04	0.37 ± 0.03	0.36 ± 0.05
Prostate	(g)	0.74 ± 0.06	0.77 ± 0.08	0.70 ± 0.09	0.73 ± 0.11
	(g/100gBW)	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.23 ± 0.03	0.26 ± 0.04
Females					
No. of animals examined		10	10	10	10
Body weight	(g)	177.0 ± 6.2	170.0 ± 9.2	175.9 ± 6.2	167.3 ± 8.2*
Brain	(g)	1.82 ± 0.04	1.82 ± 0.08	1.83 ± 0.04	1.80 ± 0.05
	(g/100gBW)	1.03 ± 0.05	1.07 ± 0.06	1.04 ± 0.04	1.08 ± 0.04
Thymus	(g)	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.14 ± 0.05
	(g/100gBW)	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.09 ± 0.03
Heart	(g)	0.59 ± 0.03	0.57 ± 0.03	0.58 ± 0.04	0.57 ± 0.03
	(g/100gBW)	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.34 ± 0.02
Spleen	(g)	0.41 ± 0.03	0.39 ± 0.02	0.40 ± 0.03	0.41 ± 0.08
	(g/100gBW)	0.23 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.25 ± 0.05
Liver	(g)	3.79 ± 0.16	3.67 ± 0.26	3.85 ± 0.15	3.99 ± 0.24
	(g/100gBW)	2.14 ± 0.13	2.16 ± 0.09**	2.19 ± 0.04	2.39 ± 0.09**
Kidneys	(g)	1.10 ± 0.03	1.07 ± 0.05	1.11 ± 0.05	1.11 ± 0.07
	(g/100gBW)	0.62 ± 0.03	0.63 ± 0.02	0.63 ± 0.02	0.67 ± 0.02**
Lung	(g)	0.67 ± 0.05	0.66 ± 0.07	0.67 ± 0.04	0.69 ± 0.07
	(g/100gBW)	0.38 ± 0.03	0.39 ± 0.05	0.38 ± 0.02	0.41 ± 0.03
Ovaries	(g)	0.051 ± 0.011	0.057 ± 0.010	0.056 ± 0.012	0.050 ± 0.015
	(mg/100gBW)	28.81 ± 5.85	33.27 ± 5.86	31.95 ± 7.02	29.70 ± 8.18
Adrenals	(g)	0.039 ± 0.005	0.039 ± 0.006	0.036 ± 0.004	0.032 ± 0.004**
	(mg/100gBW)	22.01 ± 3.10	23.12 ± 2.90	20.58 ± 1.92	19.14 ± 2.36
Pituitary	(g)	0.013 ± 0.001	0.023 ± 0.032	0.012 ± 0.002	0.011 ± 0.001
	(mg/100gBW)	7.29 ± 0.62	7.43 ± 1.24	6.70 ± 1.08	6.67 ± 0.61
Thyroid	(g)	0.011 ± 0.002	0.012 ± 0.002	0.012 ± 0.002	0.012 ± 0.002
	(mg/100gBW)	6.49 ± 1.08	7.00 ± 1.16	6.89 ± 0.87	7.24 ± 1.48
Salivary glands	(g)	0.42 ± 0.03	0.42 ± 0.02	0.43 ± 0.01	0.42 ± 0.02
	(g/100gBW)	0.24 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.25 ± 0.01

^aValues are means ± SDs.

*,**Significantly different from the controls at p<0.05 and p<0.01, respectively (Dunnett's test)

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

Table 6. Histopathological findings for F344 rats treated with myrrh for 90 days.

	Male				Female			
	0 ppm	5,000 ppm	15,000 ppm	50,000 ppm	0 ppm	5,000 ppm	15,000 ppm	50,000 ppm
Number of animals	10	10	10	10	10	10	10	10
Liver								
Sinusoidal dilatation, minimal	0	0	0	1	0	0	0	0
Microgranuloma, minimal	0	0	0	0	1	1	0	0
Kidney								
Hyalin droplet, proximal tubule, slight	0	2	1	5 *	0	0	0	0
Heart								
Myocardial degeneration / mononuclear cell infiltration, minimal	2	-	-	2	0	-	-	0
Pituitary								
Cyst, pars distalis	1	-	-	1	0	-	-	0
Testes								
Atrophy, tubular, unilateral	0	-	-	1	-	-	-	-
Harderian gland								
Infiltrate, inflammatory cell, lymphocytic	0	-	-	0	1	-	-	0

*; Significantly different from the control at p<0.05 (Fisher's exact test)

Table 7. α_{2u} -Globulin accumulation analyzed by immunohistochemical staining in the kidney of F344 rats treated with myrrh for 90 days.

	Male			
	0 ppm	5,000 ppm	15,000 ppm	50,000 ppm
Number of animals	10	10	10	10
α_{2u} -globulin accumulation, very slight	5	4	3	5
α_{2u} -globulin accumulation, slight	5	6	7	5

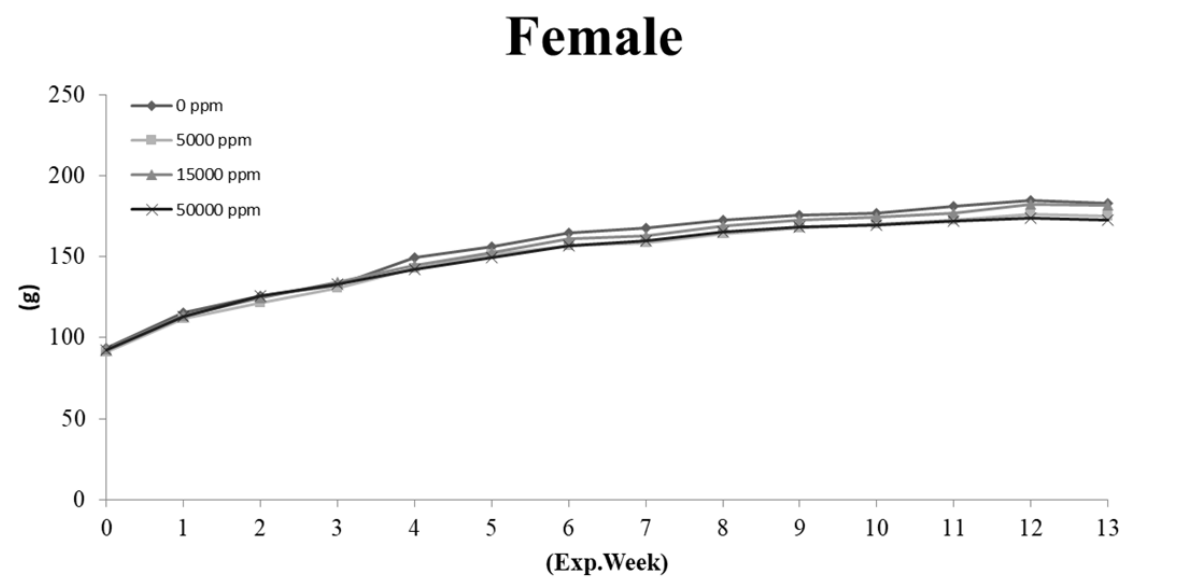
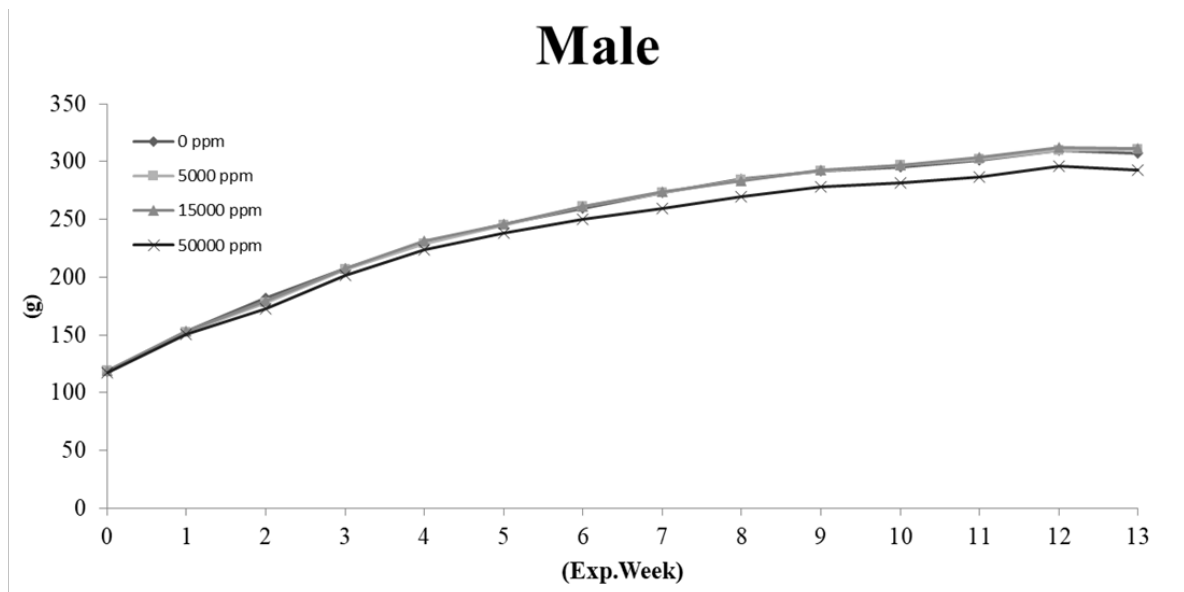


Fig. 1. Body weight curves for male and female F344 rats treated with myrrh for 90 days.

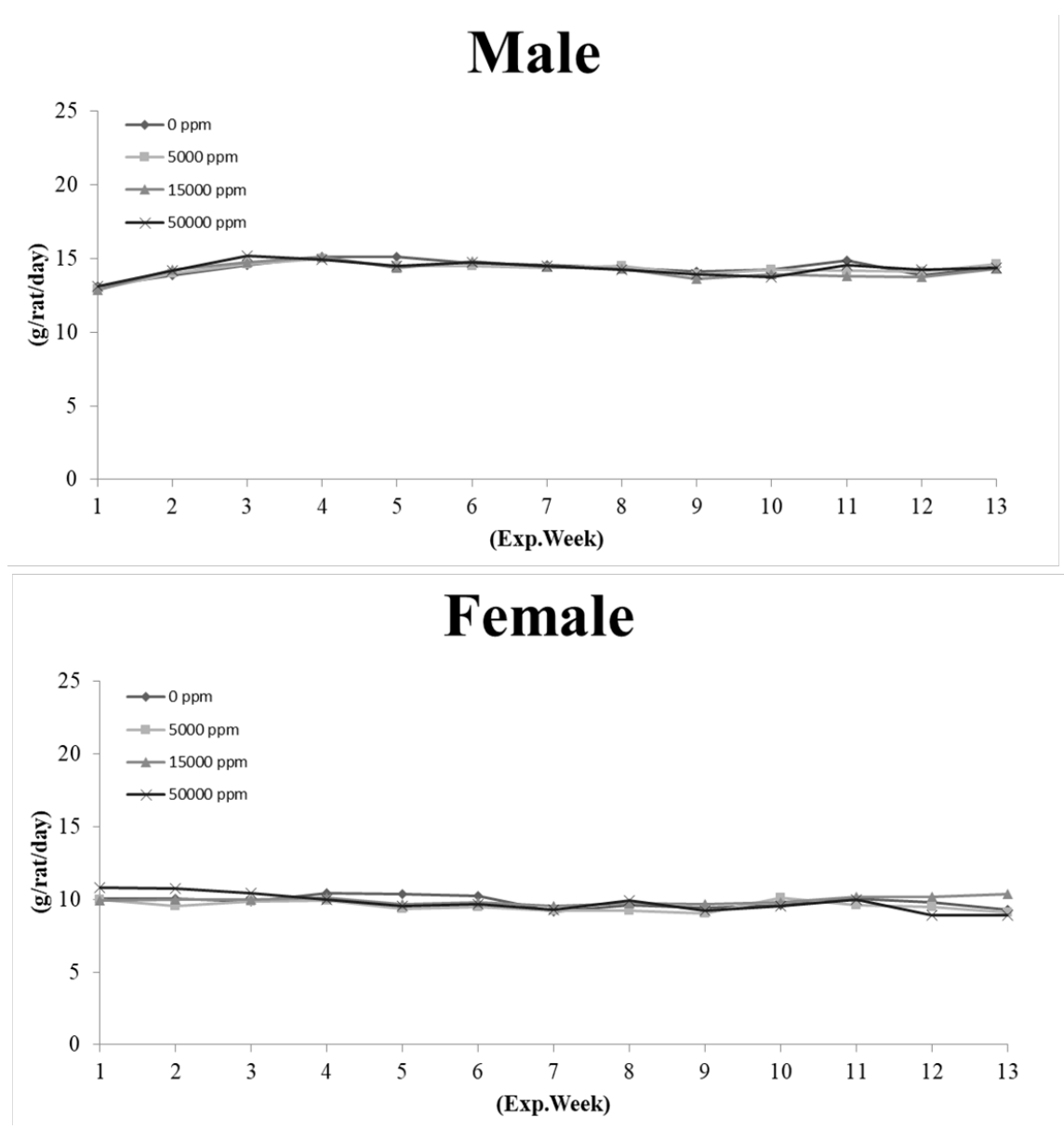


Fig. 2. Daily food intake for male and female F344 rats treated with myrrh for 90 days.

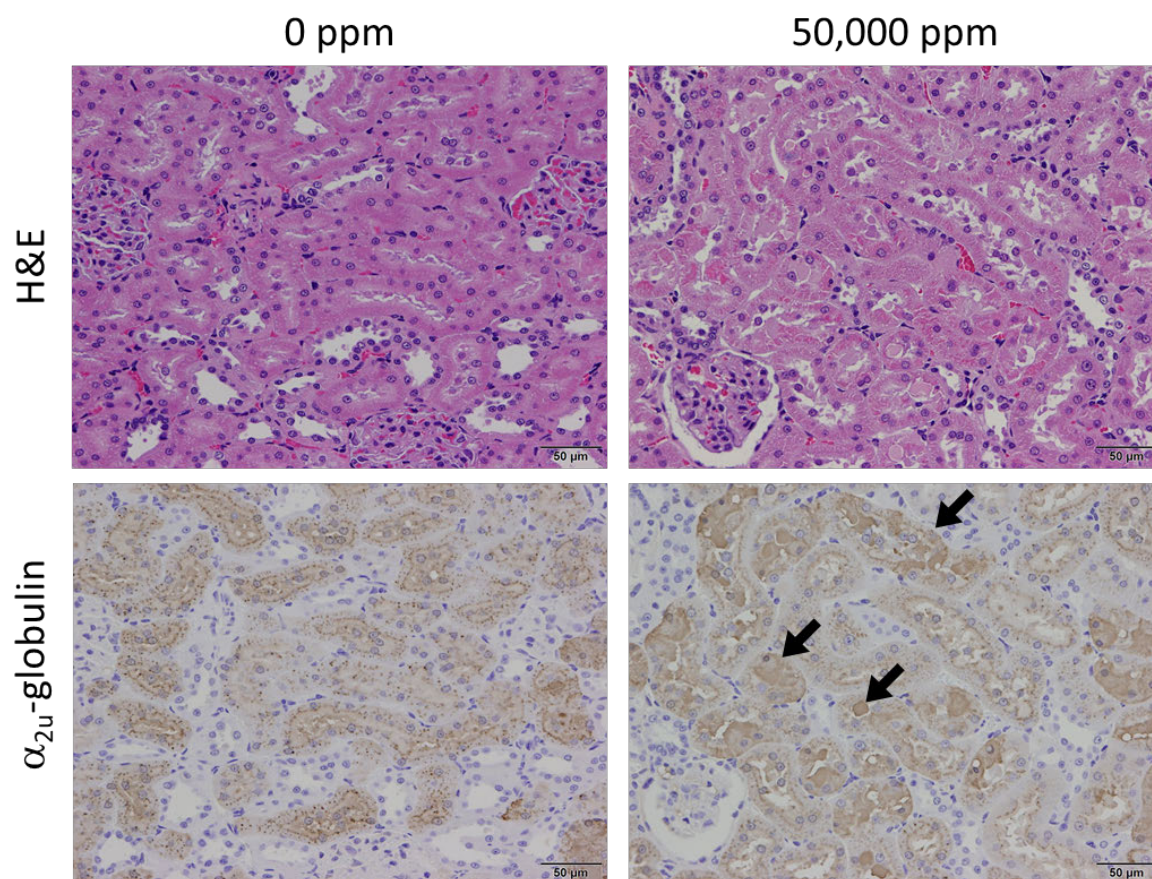


Fig. 3. Histopathological feature in the kidney of F344 rats treated with myrrh for 90 days. Arrows show positive immunohistochemical staining for α_{2u} -globulin.

Appendix 1. Defected organs in histopathological examination in F344 rats treated with myrrh for 90 days.

Organs	Male		Female	
	Control	50,000 ppm	Control	50,000 ppm
Mediastinal lymph nodes	3	1	3	2
Zymbal's gland	0	1	2	1