

食品添加物規格基準設定等試験検査経費

食品添加物安全性再評価試験  
(平成11年度報告)

没食子酸の90日間反復投与毒性試験  
(最終報告書)



担当者



部長

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



## 【はじめに】

没食子酸 (1,2,3-trihydroxy benzoic acid, gallic acid) は、ブナ科ウラジロガシ (*Quercus stenophylla*), モッコクノキ (*Quercus infectoria*) にモッコクシバチが寄生, 産卵することにより生ずる虫こぶ (没食子) や, ウルシ科ヌルデ (*Rhus javanica*) にヌルデノミミフシが寄生して生ずる虫こぶ (五倍子) より水, エタノールまたは有機溶剤で抽出して得られたタンニンを加水分解したものである。性状は, 白~淡類黄色の結晶性粉末で, 臭気はほとんどなく, 味は収れん性でわずかに酸味がある。溶解度は, 水, 沸騰水, アルコール, エーテル, グリセロール, アセトンに可溶, ベンゼン, クロロホルム及び石油エーテルに難溶である<sup>1)-3)</sup>。

没食子酸は酸化防止剤として食品に添加されている<sup>3)</sup>。また, 食品以外の分野でも, インキ用原料, 発色剤, 塗料用原料, 医薬品原料, 写真用薬品製造原料, 解膠剤として用いられている。変異原性はAmes試験において, *Salmonella typhimurium* TA98, TA100で陰性であり, S-9添加でも同様の結果を示した<sup>4)</sup>。ラットにおけるLD<sub>50</sub>値は経口, 皮下投与とも5.0g/kgであることが報告されている<sup>1)</sup>。我が国では合成添加物に比較して天然添加物についての規格の作成や安全性評価が立ち遅れており, 今回, 天然添加物の安全性再評価の一環として, 没食子酸の90日間反復投与毒性試験を実施したので報告する。

## 【試験材料及び方法】

### 1. 被験物質及び動物

被験物質として, [REDACTED] 製の精製没食子酸粉末 (純度98%以上) を用いた。

動物は5週齢のF344/DuCrj系ラット (SPF) 雌雄各50匹を日本チャールス・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6日間馴化飼育した後, 全動物の体重を測定

し、群間に体重の偏りがないように雌雄各5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匹もしくは4匹ずつ収容し、床敷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回交換を行った。飲料水として、水道水を試験期間中自由に摂取させた。

## 2. 試験方法

没食子酸添加飼料の製造及び飼料に添加した没食子酸の安定性試験は [REDACTED] に依頼した。安定性試験は、5%及び0.2%の割合で没食子酸を混合した粉末飼料について、製造直後、2週間冷蔵保存（ $4^{\circ}\text{C}$ ）後、4週間冷蔵保存（ $4^{\circ}\text{C}$ ）後、及び4週間冷蔵保存（ $4^{\circ}\text{C}$ ）した後1週間室温放置した後に、飼料中の没食子酸含量を求めた。その結果、いずれの飼料においても保存期間中に没食子酸含量の変化は認められなかった。従って、本試験での飼料の保存方法は4週間冷蔵保存（ $4^{\circ}\text{C}$ ）とし、飼料の製造は4週ごとに行なった。

投与実験は、雌雄各4群を被験物質投与群とし、5%、1.7%、0.6% 及び0.2%の割合で没食子酸を添加した粉末飼料を90日間自由に摂取させた。その他に、対照群として雌雄各1群には没食子酸を含まない基礎飼料（CRF-1粉末飼料）を同期間自由に摂取させた。試験期間中、全動物の一般状態を連日観察し、体重及び摂餌量の測定を週1回行った。投与最終日に全動物を一晩絶食させた後、エーテル深麻酔下を開腹、腹部大動脈より採血し、瀉血、屠殺、剖検した。諸臓器は肉眼的に観察した後摘出し、脳、肺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓及び精巣については重量測定の後、また鼻腔を含む頭蓋、下垂体、舌、気管、甲状腺、食道、胃、小腸、大腸、膵臓、膀胱、前立腺、精嚢腺、子宮、膣、乳腺、リンパ節、胸骨、大腿骨、脊髄、眼球、皮膚及び筋肉など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。ただし、精巣は、対照群及び5%投与群の各5匹について、その片側をブアン氏液にて固定した。その後、

各臓器及び組織を切り出し、通常の方法によりパラフィン包埋後、薄切片を製作し、ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色を施して、病理組織学的に検索を行った。また、腎臓は、雄の対照群と最高用量群についてベルリンブルー染色を行った。採取した血液については、多項目自動血球計数装置 (M-2000 型、東亜医用電子株式会社、兵庫) にて白血球 (WBC) 数、赤血球 (RBC) 数、ヘモグロビン (Hb) 量、ヘマトクリット (Ht) 値、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) 及び血小板 (PLT) 数の測定を行ったほか、実験動物用血液細胞自動分析装置 (MICROX HEG-120A 型、立石電機株式会社、東京) にて杆状核好中球 (Band)、分葉核好中球 (Seg)、好酸球 (Eosin)、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 ○  
XXXXXXXXXX に依頼し下記検査項目について測定を行った。

血清生化学的検査項目：総蛋白 (TP)、アルブミン・グロブリン比 (A/G)、アルブミン (Alb)、グルコース (Glc)、総コレステロール (TC)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRN)、ナトリウム (Na)、クロール (Cl)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、無機リン (P)、aspartate aminotransferase (AST)、alanine aminotransferase (ALT)、アルカリホスファターゼ (ALP)、直接ビリルビン (DBL)、間接ビリルビン (IBL)、 $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GTP)。

### 3. 統計学的処理方法 ○

血液学的・血清生化学的検査結果及び臓器の絶対重量と相対重量については、各群の分散比を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、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、Dunnet 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。病変については、発生頻度を Fisher の直接確率の方法で検定し、病変の強さを Mann-Whitney の U 検定で統計処理した。

## 【結 果】

### 1. 一般状態

試験期間中の動物の一般状態については、いずれの群においても特記すべき変化は認められず、すべての動物が試験終了時まで生存した。

### 2. 体 重

試験期間中の各群の体重の推移をFig.1に示した。雄では、5%投与群において試験開始後1週目から統計学的に有意な体重増加抑制が認められ( $p<0.01$ )、試験終了まで持続した。また、1.7%投与群において試験開始後7週及び8週目に一次的に有意な体重増加抑制が認められ( $p<0.05$ )、以後、軽度の体重増加抑制傾向が試験終了まで持続した。雌では、5%投与群において試験開始後1週目から統計学的に有意な体重増加抑制が認められ( $p<0.01$ )、試験終了まで持続した。また、1.7%投与群において試験開始後9週目頃から試験終了まで有意な体重増加抑制が持続した( $p<0.05$ )。

### 3. 摂餌量及び被験物質摂取量

試験期間中の摂餌量の推移をFig.2に、ラット1匹1日当たりの平均摂餌量及び被験物質摂取量をTable 1に示した。摂餌量の推移については、雌雄とも対照群と被験物質投与群との間に明らかな差は認められなかった。また、平均摂餌量に関しても対照群と被験物質投与群との間に差はみられず、被験物質である没食子酸の摂取量も被験物質の用量段階にほぼ相関していた。

### 4. 血液学的及び血清生化学的検査結果

血液学的及び血清生化学的検査の結果をTable 2, 3に示した。対照群に対する有意差検定の結果、血液学的検査に関しては、雄の0.6%以上の群でHb量、Ht値の投与用量に関連した減少が認められた。また、0.6%及び5%投与群においてRBC数の減少、5%投与群においてMCV及びMCHの減少が認められた。雌では、

1.7%以上の群で投与量に依存したMCVの減少が認められた。その他、5%投与群において、RBC数、Hb量、Ht値及びMCHの減少が認められた。

血清生化学的検査に関しては、雄において、0.6%以上の群でGlcの減少とPの弱い増加を認めたが、用量依存性は認められなかった。また、1.7%以上の群でCRNの低下、5%投与群でTP、Alb、ALPの増加を認めたが、いずれも軽度な変動であった。雌においては、1.7%以上の群でCRNの低下とPの増加を認めたが、いずれも程度は弱く、用量依存性は明らかではなかった。5%投与群ではA/Gの低下、BUNの上昇、Clの低下を認めたが変動は軽度であった。

この他、血液像の型別分類の結果をTable 4に示した。その結果、雌雄とも、いずれの型の白血球においても被験物質投与群と対照群との間に差はみられなかった。一方、雌雄とも5%投与群で有核赤血球の比率が有意に高かった。

## 5. 臓器重量

絶対重量及び相対重量をそれぞれTable 5, 6に示した。雄では、1.7%以上の群で肝、腎（左）及び精巣（左）の相対重量の増加を認めたが、肝で用量依存性が認められた以外はいずれも軽度の変動であった。また、5%投与群で脳、肺及び心の絶対重量の減少と脾、肝の絶対重量の増加、脳、肺（右）、心、脾、腎、精巣の相対重量の増加を認めたが、肝及び脾で明らかな変動がみられた以外はいずれも軽度であった。雌では1.7%以上の群で肝の相対重量の用量依存性の増加、5%投与群で脳、心の絶対重量の減少と脾重量の増加、及び脳、脾、腎の相対重量の増加を認めた。しかし、肝、脾の変動以外はいずれも程度は弱く、明らかな用量依存性も認められなかった。その他の臓器の重量については雌雄ともに対照群との間に差はみられなかった。

## 6. 病理組織学的検索結果

病理組織学的検索の結果をTable 7に示した。雌雄とも1.7%以上の投与群において肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大、5%投与群において脾臓のヘモジデリン沈着、髄外造血の亢進及びうっ血及び腎臓の近位尿細管上皮にベルリンブルー染色陰性の褐色色素沈着を認めた。

## 【考 察】

F344ラットを用いて没食子酸の混餌投与による90日間反復投与毒性試験を実施した。今回の試験において死亡例はみられず、一般状態及び摂餌量においても、被験物質投与による用量依存性の明らかな差は認められなかった。しかし、試験開始後1週目より、雌雄とも最高用量群で統計学的に有意な体重増加抑制が観察され、この変化は没食子酸投与に起因するものと考えられた。

血液学的検査では、雄において0.6%投与群からHb量、Ht値の投与用量に依存した減少が認められた。RBC数は1.7%投与群では有意な変化とならなかったものの、0.6%以上の群でおおむね用量に関連した減少を示した。また、5%投与群のみにMCV及びMCHの減少が認められた。雌においては、1.7%以上の群でMCVの投与用量に依存した減少が認められた。RBC数、Hb量及びHt値に関しては、有意な減少は5%投与群のみであったが1.7%以上の群で用量に関連した減少を示した。また、5%投与群のみにMCHの減少が認められた。さらに、雌雄とも5%投与群で有核赤血球が増加していた。病理組織学的検索では、雌雄とも5%投与群において脾臓にヘモジデリン沈着、髄外造血の亢進及びうっ血が認められた。臓器重量では雌雄とも脾臓の絶対・相対重量の増加が認められ、特に最高用量群の相対重量は雌雄それぞれ対照群の1.9倍、1.7倍であった。以上のことから、没食子酸投与により溶血性貧血が誘発されたと考えられた。しかし、病理組織学的に脾臓で認められた病変の頻度及び程度が弱かったこと、肝臓でヘモジデリン沈着が認められなかったこと、雌雄とも5%投与群において腎臓の近位尿細管上皮に褐色色素沈着が認められたが、ベルリンブルー染色では陰性であり、ヘモジデリン由来の色素ではないと考えられたこと、また直接及び間接ビリルビンに対照群と比較して明らかな変動がみられなかったことから、最高用量群においても貧血の程度は弱いものであると考えられた。

肝臓に関しては、雌雄とも小葉中心性の肝細胞肥大が認められ、最高用量群の相対重量は対照群の1.4倍に増加した。薬物代謝酵素の誘導により小葉中心性の肝細胞肥大が認められる化学物質が数多く知られており<sup>5)</sup>、没食子酸もその可能性が考えられた。その他、雄ではAlb及びALPの増加がみられたが、A/G、

AST, ALTのいずれも対照群との間に明らかな差を認めなかった。雌に関しても、A/Gに減少傾向、 $\gamma$ -GTPに増加傾向がみられた以外は、明らかな変動がなかったことから、これらの変化と肝臓への障害性との関連性は低いと推察された。

腎臓に関しては、雌雄とも5%投与群においてBUNが軽度に高値を示し、その他にCRN及びいくつかの電解質の軽度の増減が認められた。しかし、CRNの変化は減少であり、電解質の増減は微弱なものであったことなどから毒性学的意義は低いと考えられた。一方、相対腎重量については明らかな用量依存性は認められなかったものの対照群に比較して最大で16%の増加がみられ、病理組織学的にも最高用量群の近位尿細管上皮に褐色色素沈着が認められたことから、これらの一連の変化は没食子酸投与による腎臓への影響であることが示唆された。

以上の結果から、雌雄ラットに対して没食子酸を投与した際の毒性は血液、肝臓及び腎臓に発現し、今回の実験条件下では、雄の0.6%以上の群でのRBC数、Hb量、Ht値の減少を根拠に、没食子酸の無毒性量(NOEL)は0.2%であると考えられた。

#### 【文 献】

- 1) 今堀和友, 山川民夫監修: 生化学辞典, 東京化学同人, pp. 1258, 東京 (1990)
- 2) 藤原喜久男, 粟飯原景昭監修: 食品衛生ハンドブック, 南山堂, pp. 445, 東京 (1992)
- 3) 奥田拓男編集: 天然薬物辞典, 廣川書店, pp. 157, 427, 東京 (1986)
- 4) Ching S-C. and Chung K-T., Mutagenicity and antimutagenicity studies of tannic acid and its related compounds. *Fd. Chem. Toxicol.* 38:1-5, 2000.
- 5) Amacher D.E., Schomaker S.J. and Burkhardt J.E., The relationship among microsomal enzyme induction, liver weight and histological change in rat toxicology studies. *Fd. Chem. Toxicol.* 36:831-839, 1998.

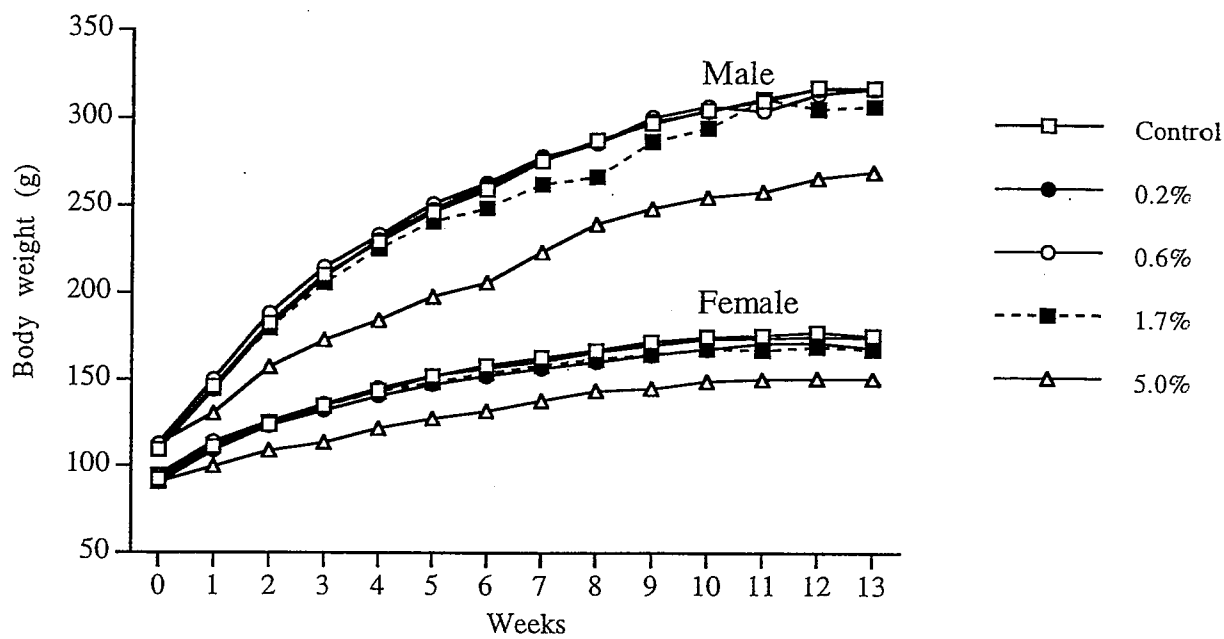


Fig. 1. Growth curves of male and female F344 rats treated with gallic acid for 90 days

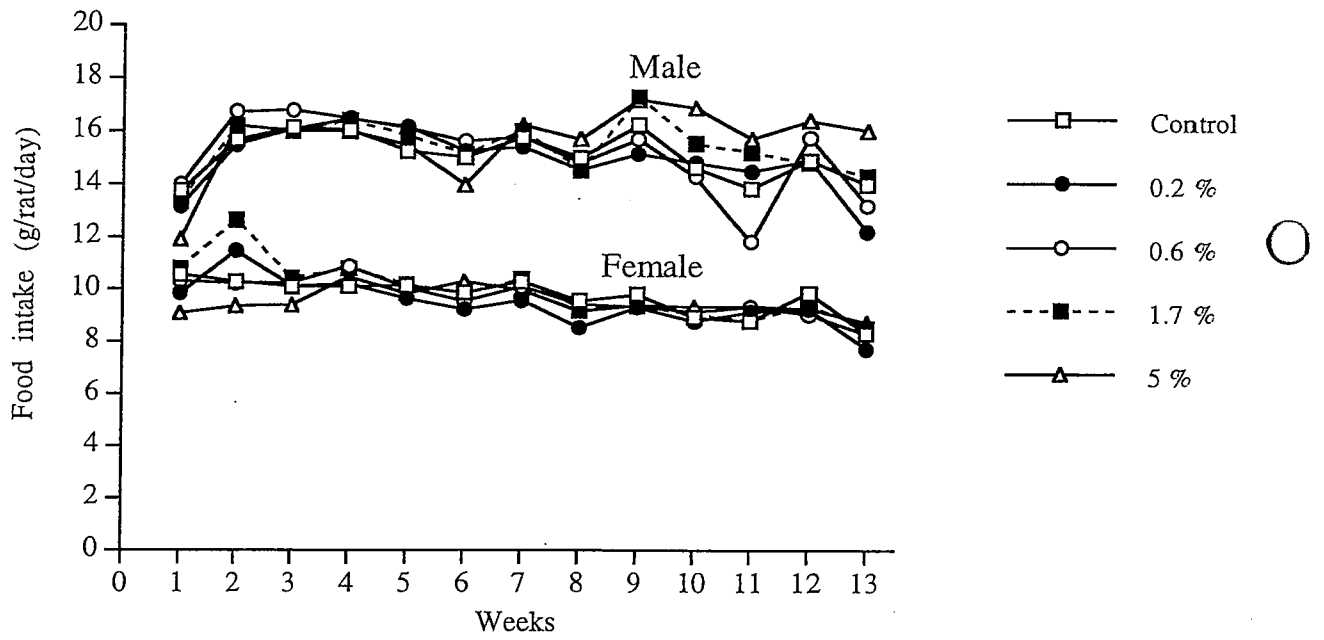


Fig. 2 Daily food intakes of male and female F344 rats treated with gallic acid for 90 days

Table 1. Average daily intakes of food or gallic acid per rat

Sex	Groups	No. of rats examined	Daily intakes of	
			Food (g/rat)	Gallic acid (mg/rat)
Male	Control	10	15.1	—
	0.2 %	10	14.9	30
	0.6 %	10	15.2	91
	1.7 %	10	15.4	262
	5 %	10	15.7	783
Female	Control	10	9.7	—
	0.2 %	10	9.4	19
	0.6 %	10	9.7	58
	1.7 %	10	10.0	169
	5 %	10	9.5	475

Table 2. Hematological and serum biochemical data of F344 male rats treated with gallic acid for 90 days

Items	Groups				
	Control (10) <sup>a)</sup>	0.2 % (10)	0.6 % (10)	1.7 % (10)	5 % (10)
WBC ( $\times 10^2/\mu\text{l}$ )	44.6 $\pm$ 5.0 <sup>b)</sup>	42.0 $\pm$ 4.7	41.3 $\pm$ 5.6	41.3 $\pm$ 5.6	46.1 $\pm$ 4.7
RBC ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	953 $\pm$ 27	942 $\pm$ 31	912 $\pm$ 26*	924 $\pm$ 32	909 $\pm$ 35**
Hb (g/dl)	15.5 $\pm$ 0.3	15.5 $\pm$ 0.4	15.0 $\pm$ 0.3*	15.0 $\pm$ 0.5*	14.3 $\pm$ 0.5**
Ht (%)	45.4 $\pm$ 1.4	45.4 $\pm$ 1.4	43.5 $\pm$ 1.2*	43.7 $\pm$ 1.5*	42.1 $\pm$ 1.4**
MCV (fl)	47.6 $\pm$ 0.5	48.2 $\pm$ 0.5*	47.7 $\pm$ 0.5	47.4 $\pm$ 0.4	46.3 $\pm$ 0.6**
MCH (pg)	16.3 $\pm$ 0.2	16.5 $\pm$ 0.2	16.4 $\pm$ 0.2	16.3 $\pm$ 0.2	15.7 $\pm$ 0.2**
MCHC (g/dl)	34.2 $\pm$ 0.4	34.2 $\pm$ 0.4	34.4 $\pm$ 0.4	34.3 $\pm$ 0.5	34.0 $\pm$ 0.5
PLT ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	76.2 $\pm$ 3.9	75.6 $\pm$ 4.4	80.0 $\pm$ 4.1	75.4 $\pm$ 4.7	75.5 $\pm$ 5.9
TP (g/dl)	6.4 $\pm$ 0.2	6.3 $\pm$ 0.2	6.3 $\pm$ 0.1	6.5 $\pm$ 0.2	6.9 $\pm$ 0.1**
A/G	2.1 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.1
Alb (g/dl)	4.3 $\pm$ 0.1	4.3 $\pm$ 0.1	4.3 $\pm$ 0.1	4.4 $\pm$ 0.1	4.7 $\pm$ 0.1**
Glc (mg/dl)	90 $\pm$ 17	72 $\pm$ 24	54 $\pm$ 8**	70 $\pm$ 17*	67 $\pm$ 14*
TC (mg/dl)	70 $\pm$ 5	65 $\pm$ 4	67 $\pm$ 5	79 $\pm$ 8**	69 $\pm$ 4
BUN (mg/dl)	19.9 $\pm$ 1.9	19.2 $\pm$ 1.2	18.6 $\pm$ 1.2	20.6 $\pm$ 2.4	22.0 $\pm$ 1.7*
CRN (mg/dl)	0.29 $\pm$ 0.0	0.26 $\pm$ 0.1	0.27 $\pm$ 0.0	0.23 $\pm$ 0.0*	0.20 $\pm$ 0.0**
Na (mEQ/l)	143 $\pm$ 1	143 $\pm$ 1	143 $\pm$ 0	144 $\pm$ 1	144 $\pm$ 1
Cl (mEQ/l)	105 $\pm$ 1	106 $\pm$ 1*	106 $\pm$ 1*	106 $\pm$ 1	104 $\pm$ 1
K (mEQ/l)	4.5 $\pm$ 0.1	4.6 $\pm$ 0.2	4.6 $\pm$ 0.3	4.7 $\pm$ 0.4	4.8 $\pm$ 0.3
Ca (mg/dl)	10.5 $\pm$ 0.2	10.3 $\pm$ 0.2	10.5 $\pm$ 0.2	10.6 $\pm$ 0.1	10.5 $\pm$ 0.2
P (mg/dl)	5.4 $\pm$ 0.3	5.5 $\pm$ 0.2	6.0 $\pm$ 0.1**	5.8 $\pm$ 0.3**	5.8 $\pm$ 0.3**
AST (IU/l)	87 $\pm$ 11	86 $\pm$ 13	78 $\pm$ 3.7	86 $\pm$ 13	74 $\pm$ 16
ALT (IU/l)	60 $\pm$ 5	55 $\pm$ 5	52 $\pm$ 13	57 $\pm$ 9	50 $\pm$ 13
ALP (IU/l)	354 $\pm$ 14	370 $\pm$ 21	351 $\pm$ 23	366 $\pm$ 31	397 $\pm$ 45*
$\gamma$ -GTP (IU/l)	2.1 $\pm$ 0.3 <sup>c)</sup>	< 2	< 2	3.1 $\pm$ 1.7 <sup>c)</sup>	2.7 $\pm$ 0.9 <sup>c)</sup>
DBL (IU/l)	0.11 $\pm$ 0.0	0.09 $\pm$ 0.1	0.06 $\pm$ 0.1	0.10 $\pm$ 0.0	0.11 $\pm$ 0.0
IBL (IU/l)	0.01 $\pm$ 0.0	0.02 $\pm$ 0.0	0.04 $\pm$ 0.1	0.00 $\pm$ 0.0	0.03 $\pm$ 0.0

a) : Numbers in parenthesis represent the number of animals examined.

b) : Mean  $\pm$  S. D.

c) : Some animals in these groups showed the value below detection limit (<2.0). Number of such animals were 9 in control group, 6 in 1.7% group, and 6 in 5% group. The mean value in each group was estimated by counting the value of below detection limit as 2.0.

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

Table 3. Hematological and serum biochemical data of F344 female rats treated with gallic acid for 90 days

Items	Groups			
	Control (10) <sup>a)</sup>	0.2 % (10)	0.6 % (10)	5 % (10)
WBC ( $\times 10^2 / \mu 1$ )	37.1 $\pm$ 6.1 <sup>b)</sup>	33.8 $\pm$ 3.1	33.5 $\pm$ 4.4	30.7 $\pm$ 2.5
RBC ( $\times 10^4 / \mu 1$ )	866 $\pm$ 71	881 $\pm$ 14	866 $\pm$ 21	844 $\pm$ 35
Hb (g/dl)	15.3 $\pm$ 1.1	15.7 $\pm$ 0.3	15.4 $\pm$ 0.3	14.9 $\pm$ 0.5
Ht (%)	43.8 $\pm$ 3.5	44.4 $\pm$ 0.8	43.6 $\pm$ 1.0	42.1 $\pm$ 1.7
MCV (fl)	50.6 $\pm$ 0.2	50.4 $\pm$ 0.3	50.3 $\pm$ 0.3	49.9 $\pm$ 0.3 <sup>**</sup>
MCH (pg)	17.7 $\pm$ 0.2	17.8 $\pm$ 0.2	17.7 $\pm$ 0.3	17.6 $\pm$ 0.3
MCHC (g/dl)	35.0 $\pm$ 0.5	35.3 $\pm$ 0.4	35.3 $\pm$ 0.4	35.3 $\pm$ 0.6
PLT ( $\times 10^4 / \mu 1$ )	78.7 $\pm$ 6.7	77.8 $\pm$ 5.9	75.0 $\pm$ 3.1	79.1 $\pm$ 3.4
TP (g/dl)	6.4 $\pm$ 0.2	6.2 $\pm$ 0.1 <sup>*</sup>	6.2 $\pm$ 0.2 <sup>*</sup>	6.4 $\pm$ 0.2
A/G	2.8 $\pm$ 0.1	2.7 $\pm$ 0.2	2.7 $\pm$ 0.2	2.7 $\pm$ 0.2
Alb (g/dl)	4.7 $\pm$ 0.1	4.5 $\pm$ 0.1 <sup>**</sup>	4.5 $\pm$ 0.1 <sup>**</sup>	4.6 $\pm$ 0.1
Glc (mg/dl)	27 $\pm$ 11	22 $\pm$ 4	21 $\pm$ 7	21 $\pm$ 6
TC (mg/dl)	90 $\pm$ 16	90 $\pm$ 9	90 $\pm$ 7	98 $\pm$ 8
BUN (mg/dl)	16.5 $\pm$ 1.4	15.5 $\pm$ 1.2	16.6 $\pm$ 2.1	16.7 $\pm$ 1.1
CRN (mg/dl)	0.27 $\pm$ 0.0	0.23 $\pm$ 0.0	0.27 $\pm$ 0.0	0.20 $\pm$ 0.0 <sup>**</sup>
Na (mEQ/l)	144 $\pm$ 1	144 $\pm$ 1	144 $\pm$ 1	144 $\pm$ 1
Cl (mEQ/l)	108 $\pm$ 1	108 $\pm$ 1	108 $\pm$ 1	107 $\pm$ 1
K (mEQ/l)	4.1 $\pm$ 0.3	4.4 $\pm$ 0.2	4.3 $\pm$ 0.3	4.3 $\pm$ 0.3
Ca (mg/dl)	10.5 $\pm$ 0.3	10.2 $\pm$ 0.1 <sup>**</sup>	10.4 $\pm$ 0.2	10.5 $\pm$ 0.2
P (mg/dl)	5.3 $\pm$ 0.3	5.2 $\pm$ 0.2	5.6 $\pm$ 0.3	5.7 $\pm$ 0.3 <sup>*</sup>
AST (IU/l)	77 $\pm$ 8	80 $\pm$ 5	80 $\pm$ 4	73 $\pm$ 14
ALT (IU/l)	44 $\pm$ 5	43 $\pm$ 5	42 $\pm$ 4	41 $\pm$ 5
ALP (IU/l)	236 $\pm$ 21	217 $\pm$ 11	233 $\pm$ 26	197 $\pm$ 18 <sup>**</sup>
$\gamma$ -GTP (IU/l)	2.3 $\pm$ 0.5 <sup>c)</sup>	2.1 $\pm$ 0.3 <sup>c)</sup>	2.2 $\pm$ 0.4 <sup>c)</sup>	2.2 $\pm$ 0.4 <sup>c)</sup>
DBL (IU/l)	0.04 $\pm$ 0.1	0.07 $\pm$ 0.0	0.04 $\pm$ 0.1	0.03 $\pm$ 0.0
IBL (IU/l)	0.06 $\pm$ 0.1	0.03 $\pm$ 0.0	0.06 $\pm$ 0.1	0.07 $\pm$ 0.0

a) : Numbers in parenthesis represent the number of animals examined.

b) : Mean  $\pm$  S. D.

c) : Some animals in these groups showed the value below detection limit (<2.0). Number of such animals were 7 in control group, 9 in 0.2% group, 8 in 0.6% group, and 8 in 1.7% group. The mean value in each group was estimated by counting the value of below detection limit as 2.0.

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

Table 4. Differential leukocyte counts in rats fed diet containing gallic acid for 90 days

	Groups				
	Control (10) <sup>a)</sup>	0.2 % (10)	0.6 % (10)	1.7 % (10)	5 % (10)
<b>Male</b>					
Band (%)	0.0 ± 0.0 <sup>b)</sup>	0.1 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.2	0.0 ± 0.0
Seg (%)	17.0 ± 2.2	21.5 ± 4.4	23.2 ± 4.0	19.8 ± 3.6	19.9 ± 5.8
Eosin (%)	1.0 ± 0.6	1.5 ± 0.5	1.3 ± 1.0	0.7 ± 0.8	0.8 ± 0.6
Baso (%)	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Lymph (%)	81.0 ± 2.4	75.3 ± 3.9	73.6 ± 3.7	77.2 ± 3.9	77.7 ± 5.1
Mono (%)	1.0 ± 0.8	1.6 ± 1.0	1.9 ± 1.1	2.0 ± 0.9	1.6 ± 1.1
Ebl (No.)	0.8 ± 0.4	0.9 ± 1.0	1.3 ± 1.3	1.3 ± 1.1	3.2 ± 2.6**
<b>Female</b>					
Band (%)	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.2
Seg (%)	16.3 ± 3.3	16.1 ± 3.2	18.2 ± 5.5	16.9 ± 4.1	19.5 ± 5.0
Eosin (%)	1.4 ± 0.6	0.8 ± 0.7	1.4 ± 0.6	1.1 ± 0.8	1.0 ± 0.9
Baso (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Lymph (%)	80.5 ± 3.2	81.5 ± 3.4	79.0 ± 6.0	80.5 ± 3.4	78.4 ± 5.5
Mono (%)	1.7 ± 1.2	1.3 ± 0.7	1.4 ± 0.8	1.4 ± 0.6	1.1 ± 0.4
Ebl (No.)	2.2 ± 1.9	2.1 ± 1.6	1.6 ± 1.6	1.7 ± 1.5	5.5 ± 3.9**

a) : Numbers in parenthesis represent the number of animals examined.

b) : Mean ± S. D.

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

Table 5. Absolute organ weights of F344 rats treated with gallic acid for 90 days (g)

	Groups				
	Control (10) <sup>a)</sup>	0.2 % (10)	0.6 % (10)	1.7 % (10)	5 % (10)
<b>Male</b>					
Body weight	306.0 ± 16.3 <sup>b)</sup>	304.3 ± 8.7	302.9 ± 14.4	295.6 ± 14.4	258.1 ± 12.9 <sup>**</sup>
Brain	1.933 ± 0.046	1.933 ± 0.045	1.917 ± 0.039	1.903 ± 0.037	1.874 ± 0.023 <sup>**</sup>
Lung (R)	0.654 ± 0.064	0.663 ± 0.060	0.639 ± 0.031	0.624 ± 0.049	0.593 ± 0.035 <sup>*</sup>
Lung (L)	0.347 ± 0.032	0.373 ± 0.060	0.339 ± 0.017	0.336 ± 0.027	0.306 ± 0.017 <sup>*</sup>
Heart	0.901 ± 0.045	0.901 ± 0.055	0.885 ± 0.029	0.901 ± 0.048	0.842 ± 0.060 <sup>*</sup>
Spleen	0.590 ± 0.022	0.598 ± 0.012	0.601 ± 0.037	0.596 ± 0.028	0.833 ± 0.101 <sup>**</sup>
Liver	7.117 ± 0.537	7.028 ± 0.394	6.895 ± 0.504	7.639 ± 0.516	8.450 ± 0.690 <sup>**</sup>
Adrenal g. (R)	0.014 ± 0.003	0.015 ± 0.002	0.015 ± 0.003	0.017 ± 0.004	0.016 ± 0.003
Adrenal g. (L)	0.017 ± 0.003	0.016 ± 0.002	0.016 ± 0.004	0.019 ± 0.005	0.018 ± 0.003
Kidney (R)	0.960 ± 0.069	0.946 ± 0.053	0.955 ± 0.055	0.975 ± 0.042	0.923 ± 0.060
Kidney (L)	0.981 ± 0.076	0.963 ± 0.043	0.979 ± 0.065	0.997 ± 0.038	0.945 ± 0.076
Testis (R)	1.439 ± 0.082	1.477 ± 0.054	1.471 ± 0.109	1.478 ± 0.089	1.554 ± 0.105
Testis (L)	1.498 ± 0.058	1.508 ± 0.054	1.558 ± 0.067	1.537 ± 0.059	1.563 ± 0.061
<b>Female</b>					
Body weight	165.6 ± 5.3	159.2 ± 6.7	164.5 ± 4.1	158.7 ± 5.7 <sup>*</sup>	141.8 ± 7.3 <sup>**</sup>
Brain	1.772 ± 0.021	1.735 ± 0.045	1.796 ± 0.042	1.749 ± 0.041	1.731 ± 0.025 <sup>*</sup>
Lung (R)	0.494 ± 0.065	0.449 ± 0.0890.	0.470 ± 0.056	0.466 ± 0.052	0.444 ± 0.038
Lung (L)	0.249 ± 0.016	0.270 ± 0.061	0.253 ± 0.026	0.237 ± 0.007	0.230 ± 0.022
Heart	0.592 ± 0.040	0.538 ± 0.038 <sup>**</sup>	0.571 ± 0.038	0.559 ± 0.022	0.543 ± 0.034 <sup>*</sup>
Spleen	0.372 ± 0.019	0.355 ± 0.025	0.375 ± 0.012	0.386 ± 0.025	0.577 ± 0.046 <sup>**</sup>
Liver	3.526 ± 0.163	3.367 ± 0.173	3.504 ± 0.145	3.657 ± 0.230	4.194 ± 0.159 <sup>**</sup>
Adrenal g. (R)	0.018 ± 0.003	0.019 ± 0.002	0.020 ± 0.002	0.018 ± 0.003	0.017 ± 0.004
Adrenal g. (L)	0.019 ± 0.005	0.020 ± 0.003	0.022 ± 0.004	0.020 ± 0.002	0.017 ± 0.002
Kidney (R)	0.561 ± 0.029	0.545 ± 0.0330.	0.568 ± 0.013	0.550 ± 0.025	0.545 ± 0.028
Kidney (L)	0.565 ± 0.035	0.547 ± 0.022	0.570 ± 0.027	0.571 ± 0.017	0.552 ± 0.029

a) : Numbers in parenthesis represent the number of animals examined.

b) : Mean ± S. D.

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

Table 6. Relative organ weights of F344 rats treated with gallic acid for 90 days (g%)

	Groups				
	Control (10) <sup>a)</sup>	0.2 % (10)	0.6 % (10)	1.7 % (10)	5 % (10)
Male					
Brain	0.63 ± 0.03 <sup>b)</sup>	0.64 ± 0.02	0.63 ± 0.03	0.65 ± 0.03	0.73 ± 0.03 <sup>**</sup>
Lung (R)	0.21 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.23 ± 0.01 <sup>**</sup>
Lung (L)	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.00	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.01
Heart	0.29 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.29 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.33 ± 0.01 <sup>**</sup>
Spleen	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.32 ± 0.04 <sup>**</sup>
Liver	2.32 ± 0.10	2.31 ± 0.11	2.27 ± 0.09	2.58 ± 0.10 <sup>**</sup>	3.27 ± 0.13 <sup>**</sup>
Adrenal g. (R)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00 <sup>*</sup>
Adrenal g. (L)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Kidney (R)	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.36 ± 0.01 <sup>**</sup>
Kidney (L)	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.34 ± 0.01 <sup>*</sup>	0.37 ± 0.02 <sup>**</sup>
Testis (R)	0.47 ± 0.03	0.49 ± 0.02	0.49 ± 0.04	0.50 ± 0.04	0.60 ± 0.04 <sup>**</sup>
Testis (L)	0.49 ± 0.02	0.50 ± 0.03	0.52 ± 0.03	0.52 ± 0.02 <sup>*</sup>	0.61 ± 0.03 <sup>**</sup>
Female					
Brain	1.07 ± 0.04	1.09 ± 0.03	1.09 ± 0.04	1.10 ± 0.04	1.22 ± 0.07 <sup>**</sup>
Lung (R)	0.30 ± 0.04	0.28 ± 0.06	0.29 ± 0.04	0.29 ± 0.03	0.31 ± 0.03
Lung (L)	0.15 ± 0.01	0.17 ± 0.04	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.00	0.16 ± 0.01
Heart	0.54 ± 0.04	0.57 ± 0.04	0.54 ± 0.01	0.57 ± 0.04	0.60 ± 0.06
Spleen	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.41 ± 0.04 <sup>**</sup>
Liver	2.13 ± 0.08	2.12 ± 0.09	2.13 ± 0.06	2.30 ± 0.10 <sup>**</sup>	2.96 ± 0.18 <sup>**</sup>
Adrenal g. (R)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Adrenal g. (L)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Kidney (R)	0.34 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.35 ± 0.01	0.35 ± 0.02	0.38 ± 0.02 <sup>**</sup>
Kidney (L)	0.34 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.35 ± 0.01	0.36 ± 0.01	0.39 ± 0.02 <sup>**</sup>

a) : Numbers in parenthesis represent the number of animals examined.

b) : Mean ± S. D.

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



Table 7. Histopathologic changes following dietary administration of gallic acid to F344 rats for 90 days

Organ/Finding	No. of Animals Examined	Male					Female					
		Control		1.7%		5%	Control		0.6%		1.7%	5%
		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<b>Spleen</b>												
-Hemosiderin deposition (Total)		0	0	0	0	10 ##,**	0	0	0	0	0	8 ##,**
-		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
±		0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	8
+		0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0
<b>-Extramedullary hematopoiesis (Total)</b>												
-		0	0	0	0	10 ##,**	0	0	0	0	0	8 ##,**
±		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
+		0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	3
		0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	5
<b>-Congestion (Total)</b>												
-		0	0	0	0	10 ##,**	0	0	0	0	0	10 ##,**
±		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
+		0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2
		0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	8
<b>Liver</b>												
-Liver all hypertrophy (Total)		0	0	0	0	10 ##,**	10 ##,**	10 ##,**	0	0	1	10 ##,**
-		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
±		0	0	0	0	10	0	0	0	1	1	1
+		0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	9
<b>Kidney</b>												
-Pigment, deposition, proximal tubular epithelia (Total)		0	0	0	0	10 ##,**	10 ##,**	10 ##,**	0	0	0	10 ##,**
-		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
±		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
+		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
++		0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0

## : Significantly different from the control (p<0.01 by Mann-Whitney test)

\*\* : Significantly different from the control (p<0.01 by Fischer's exact test)