

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	ハイリスクグループにおける評価に関する研究－不確実係数の妥当性について（課題番号：1204）（研究期間：平成24年度～平成25年度）
主任研究者名	研究者名：今井田 克己 所属機関：香川大学医学部 腫瘍病理学

食品添加物を含む化学物質のヒト健康影響評価の際に重要なリスクアセスメントにおいて、いわゆる不確実係数（uncertainty factor）として通常は100（種差:10、個体差:10）が用いられている。化学物質の安全性評価で無毒性量（NOAEL）を設定するときに、動物実験を用いた各種毒性試験では通常は健常な動物が用いられている。しかしながら、ヒトでは糖尿病、高血圧症、高脂血症など生活習慣病に罹患する割合が高く、そのようなヒトに対しても「個体差10」の範疇に収まるかどうかは重要である。

そこで本研究では、被験物質としてアセトアミノフェンと3-MCPD（3-monochloropropane-1,2-diol）を用い、健常な動物と疾患モデル動物（糖尿病、高血圧、高脂血症の各疾患モデル動物）とでNOAELに違いがあるかどうか、もしある場合はその差が個体差10の範囲に収まるかどうかを検討した。

その結果、糖尿病、高脂血症モデル動物では健常動物とのNOAELの差が10未満であった。また、高血圧症モデルではアセトアミノフェンに関しては10未満であったが、3-MCPDではNOAELを特定できず、最低用量の最小毒性量（LOAEL）であった。

結論として、少なくとも今回用いたアセトアミノフェンと3-MCPDに関しては、生活習慣病のヒトに対しても新たな不確実係数を設定する必要はないものと思われた。ただし、一部ではさらに低用量での検討が必要であり、その他の被験物質に関しても更なる検討が必要であると思われる。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	ハイリスクグループにおける評価に関する研究－不確実係数の妥当性について（研究期間：平成24年度～平成25年度）
主任研究者名	所属：香川大学医学部 腫瘍病理学 氏名：今井田 克己（研究課題番号：1204）

I 研究の期間及び研究目標等

1 研究期間

平成24年度～25年度（2年間）

2 研究目的

高脂血症、糖尿病および高血圧は、我が国のみならず欧米においても多数のヒトが基礎疾患として罹患している。これらの基礎疾患や肥満と化学物質の毒性発現との関連を検討する基礎研究は限られている。現在、食品中の化学物質の毒性評価には、健常の実験動物が用いられ、無毒性量 (NOAEL) が決められている。ヒトに対する各種化合物の1日摂取許容量 (ADI) は、一般にそのNOAELに対して、種差10および個体差10の合計100の不確実係数を乗じて算出される。しかし、基礎疾患のあるヒトにおいても、この個体差10の不確実係数で充分か否か、十分な検討がされているとは言えない。

本研究では、これらの基礎疾患と類似の病態を示す疾患モデル動物における90日間反復投与毒性試験を既知の化合物について行い、健常ラットとの比較し、現行の不確実係数の妥当性を検証することを目的とした。

高脂血症、糖尿病および高血圧などいわゆる生活習慣病は、いずれも肝臓、腎臓、血管など全身諸臓器への直接的な影響のみならず、代謝障害を介した影響も懸念される。このような病態にあるヒトへの安全性を含めた不確実係数を設定することが重要と考えられ、検討を行った。

毒性試験の用量設定は、一般的には公比が2～5で行われることが多いため、毒性変化はNOAELより高濃度、2～5倍以上の濃度で見られることが想定される。そこで、表1に示すようにNOAELの濃度を中間用量として、3.3倍量を高用量、10倍量を最高用量とし、1/3量を低用量、1/10量を最低用量として、健常および疾患ラットに投与した。無処置対処群も別途設定した。疾患ラットにおいても、健常ラットで毒性が見られた用量と同じ用量か1/3用量まで毒性変化が見られる場合は、個体差10の範囲内と考えられる。健常ラットの1/10量まで毒性が見られる場合は、実際の毒性用量は10倍を超える可能性がある。

主要な基礎疾患に対する複数の疾患モデル動物を用いて比較検討することによって、現行の不確実係数の妥当性が検証され、食品健康影響評価に関して重要なデータが得られるものと期待され、検討を行った。

(参考)

表1. 投与用量と結果から想定される判定							
	動物	投与用量 (NOAEL x)					判定 健常との差
		0.1	0.33	1	3.3	10	
Case 1	健常	—	—	—	—	○	
	疾患	—	—	—	—	○	10以内
	疾患	—	—	—	○	○	10以内
	疾患	—	—	○	○	○	10以上の可能性あり(ボーダー)
	疾患	—	○	○	○	○	10以上
	疾患	○	○	○	○	○	10以上
Case 2	健常	—	—	—	○	○	
	疾患	—	—	—	—	○	10以内
	疾患	—	—	—	○	○	10以内
	疾患	—	—	○	○	○	10以内
	疾患	—	○	○	○	○	10以上の可能性あり(ボーダー)
	疾患	○	○	○	○	○	10以上
Case 3	健常	—	—	○	○	○	
	疾患	—	—	—	—	○	10以上の可能性あり(問題はない)
	疾患	—	—	—	○	○	10以内
	疾患	—	—	○	○	○	10以内
	疾患	—	○	○	○	○	10以内
	疾患	○	○	○	○	○	10以上の可能性あり(ボーダー)
		○: 毒性あり	—: 毒性なし				

3 研究体制 (※研究項目ごと個別課題ごとに研究担当者及び所属機関名を記入すること。)

研究項目名	個別課題名	研究担当者名 (所属機関名)
糖尿病ラットの毒性感受性	糖尿病ラットの毒性評価	今井田克己 (主任) 香川大学医学部腫瘍病理学
高脂血症ラットの毒性感受性	高脂血症ラットの毒性評価	豊田 武士 (分担) 国立医薬品食品衛生研究所病理部
高血圧症ラットの毒性感受性	高血圧ラットの毒性評価	高橋 智 (分担) 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学

4 倫理面への配慮について

- 1) 動物施設は23℃前後、湿度約60%に保たれ、飲料水、飼料も適切に与えられる。
- 2) 香川大学医学部、国立医薬品食品衛生研究所および名古屋市立大学医学研究科実験動物研究教育センターの実験動物取り扱い規定に基づいて飼育・実験を行う
- 3) 屠殺は深麻酔下で腹部大動脈からの採血による失血死によって行われ、動物に対する苦痛をできるだけ排除する。

II 研究内容及び成果等

1 研究内容及び方法

(1) 研究項目名：糖尿病ラットの毒性感受性

(研究担当者名：今井田 克己 所属機関名：香川大学医学部腫瘍病理学)

1) 個別課題名：糖尿病ラットの毒性評価

肥満を伴わない糖尿病モデルとして、GK/Jcl ラットを用いて、被験物質を無処置対照群を含めて6段階で用量設定し、90日間反復投与毒性試験を行った。対照となる健常動物は、それぞれの疾患モデルのバックグラウンドに最も近い系統を用い、同様に6段階の用量設定で検討した。

24年度は、被験物質として、ヒトおよび動物用医薬品であるが、肝毒性と腎毒性を示すことが知られているアセトアミノフェンについて検討を行った。F344ラットの13週間毒性試験において、800ppmの混餌投与で肝臓および精巣の比重量増加が見られていることから、800ppmを中間用量として、0, 80, 253, 800, 2530, 8000ppmの用量で、それぞれの疾患モデルのラット雄に90日間混餌投与し、いずれも無処置群との比較から総合的にNOAELを決定し、健常動物のNOAELと比較検討した。

25年度は、3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD)について検討を行った。3-MCPDは、酸加水分解植物性タンパクなどに含まれており、ラットの13週間反復投与試験においては9mg/kg bw/dayで腎臓の相対重量の増加が観察されている。その用量に相当する20ppmを中間用量として、0, 2, 6.6, 20, 66, 200ppmの用量で混餌投与し、同様に健常動物と比較検討した。

最終的には疾患モデル動物と健常動物でのNOAELの違いがあるかどうか、あるとしたらその程度はどうかを総合的に判断し、不確実係数の妥当性を検討した。

(2) 研究項目名：高脂血症ラットの毒性感受性

(研究担当者名：豊田 武士 所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所病理部)

1) 個別課題名：高脂血症ラットの毒性評価

(1) で行ったものと同様な検討を、高脂血症・糖尿病モデルとして、Zuckerホモラットを用いて行った。24年度は、被験物質として、アセトアミノフェンについて、25年度は、3-MCPDについて検討を行い、それぞれ、無処置群との比較から総合的にNOAELを決定し、健常動物のNOAELと比較検討した。

(3) 研究項目名：高血圧ラットの毒性感受性

(研究担当者名：高橋 智

所属機関名：名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学)

1) 個別課題名：高血圧ラットの毒性評価

(1) (2) で行ったものと同様な検討を、高血圧モデルとして、SHR/NCrlラットを用いて行った。24年度は、被験物質として、アセトアミノフェンについて、25年度は、3-MCPDについて検討を行い、それぞれ、無処置群との比較から総合的にNOAELを決定し、健常動物のNOAELと比較検討した。

2 研究成果、考察、今後の課題

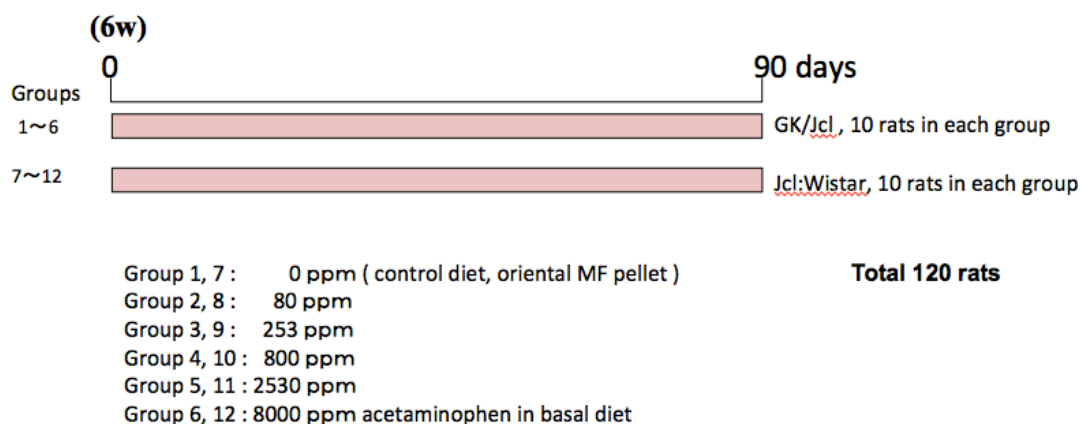
(1) 研究項目名：糖尿病ラットの毒性感受性

(研究担当者名：今井田 克己 所属機関名：香川大学医学部腫瘍病理学)

1) 個別課題名：糖尿病ラットの毒性評価

肥満をともなわない糖尿病モデルとして、GK/Jclラットを用いて、共通の被験物質としてアセトアミノフェンを無処置対照群を含めて6段階で用量設定し、90日間反復投与毒性試験を行った。対照となる健常動物は、疾患モデルのバックグラウンドに最も近い系統として Wistarラットを用い、6段階の用量設定で検討した (図1)。

<図1 実験デザイン>



Experimental design:

内閣府 食品健康影響評価研究 糖尿病モデルラットにおける Acetaminophen の影響—NOAEL の評価—

OECDのガイドライン上、げっ歯類の90日間反復投与毒性試験では、2~4の公比が推奨されているが、公比2の設定で10倍の差異を検出するには、4用量の差異 (1, 2, 4, 8, 16) が必要となり、公比4の設定では2用量の差異がある場合は濃度差が4~16倍の間となるため、評価が困難となる。3Rの観点から群数を必要最小限とし、かつ、すでに報告のある系統における毒性発現用量と、本試験で用いる健常動物の毒性発現用量が異なる可能性も想定すると、健常動物と疾患動物における毒性用量の組み合わせがどのような場合も、公比を $\sqrt{10}$ (約3.16) として5用量に無処置対照群を加えた6群について検討することが最適と考えられる。また、

対照となる健常動物は、それぞれの疾患モデルのバックグラウンドに最も近い系統を用い、同様に6段階の用量設定で検討した。検討項目としては、投与期間中、一般状態および死亡動物の有無を毎日観察し、体重は週1回、摂餌量は2週に1回以上測定した。動物は、投与期間終了後に、深麻酔下で開腹し、腹部大動脈から採血を行った。血液学的検査は、白血球数（WBC）、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）および血小板数（PLT）を測定した。血清生化学的検査は、総蛋白質（TP）、アルブミン（Alb）、トリグリセリド（TG）、総コレステロール（T-Cho）、尿素窒素（BUN）、クレアチニン（Cre）、ナトリウム（Na）、塩素（Cl）、カリウム（K）、カルシウム（Ca）、無機リン（IP）、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）、およびγ-グルタミルトランスペプチダーゼ（γ-GTP）について測定した。採血後動物を放血死させ、剖検を実施するとともに脳、胸腺、肺、心、脾、肝、副腎、腎および精巣を摘出し、重量を測定した。上記の器官に加え、鼻腔、眼球、下垂体、脊髄、甲状腺および上皮小体、気管、胸部大動脈、唾液腺、舌、食道、胃、その他消化管、腸間膜リンパ節、膵、精巣上体、前立腺、精囊、膀胱、皮膚、乳腺、骨および骨髄を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液で、また精巣のみブアン液で固定した。固定臓器を常法に従ってパラフィンに包埋後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し対照群と最高用量群について病理組織学的検査を行った。最高用量群に変化のある臓器については、すべての群について検討を加えた。なお、今回の研究では特に重要な臓器と思われる肝、腎に関してはすべての群での病理組織学的検査を行った。

被験物質として平成24年度は、アセトアミノフェンを選定した。その理由を下記に示す。

ハイリスクグループの疾患として糖尿病を想定し、その疾患モデル動物を用いた検討を予定している。この疾患は、糖尿病性腎症を呈するなど腎病変との関連性が極めて高い疾患である。そこで、ラットへの経口摂取により腎に対しての有害性が明らかな物質で、しかも信頼できる90日間反復投与毒性試験の報告のある物質として、アセトアミノフェンを選定した。アセトアミノフェンはヒトおよび動物医薬品であるが腎毒性が明らかであり、我々が経口摂取する可能性のある物質であるため、そのリスク評価は重要で、今回の研究に用いる被験物質として選定した。

24年度は、被験物質として、ヒトおよび動物用医薬品であるが、肝毒性と腎毒性を示すことが知られているアセトアミノフェンについて検討を行った。F344ラットの13週間毒性試験において、800ppmの混餌投与で肝および精巣の比重量増加が見られていることから、800ppmを中間用量として、0, 80, 253, 800, 2530, 8000ppmの用量で、糖尿病モデル動物であるのGK/Jclラット雄ならびにその健常動物として Wistar ラット雄に90日間混餌投与し、いずれも無処置群との比較から総合的にNOAELを決定し、健常動物のNOAELと比較検討した。

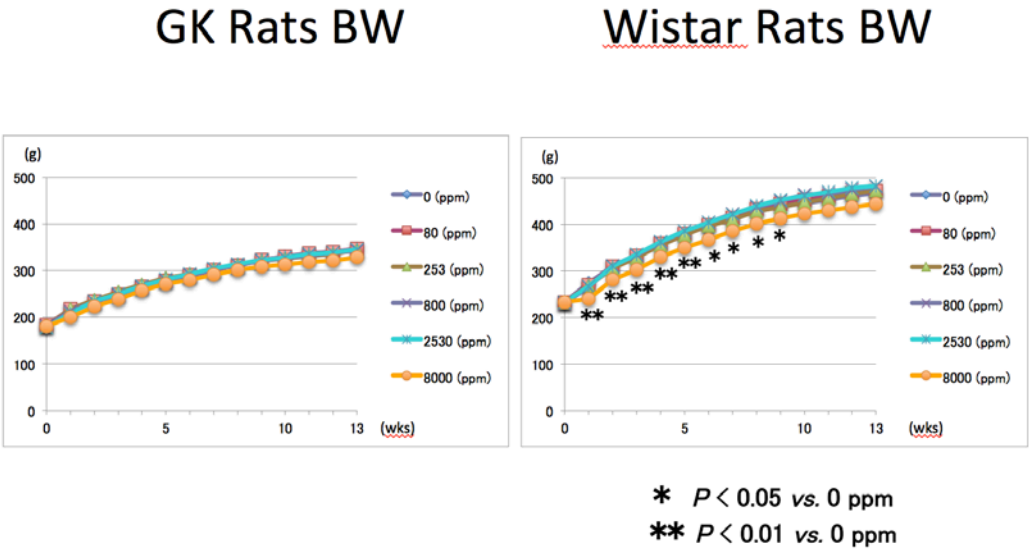
最終的には疾患モデル動物と健常動物でのNOAELの違いがあるかどうか、あるとしたらその程度はどうかを総合的に判断し、不確実係数の妥当性を検討した。

今回、被験物質として用いたアセトアミノフェンはSIGMA社より購入し、各用量になるようにオリエンタル酵母株式会社に固形飼料の作製を依頼した。なお、第1群および第7群の基礎食投与群にはオリエンタルMF固形飼料を使用した。

GK/Jcl ラット雄および Wistar ラット雄は、それぞれ 60 匹ずつ日本クレア社より 5 週齢で

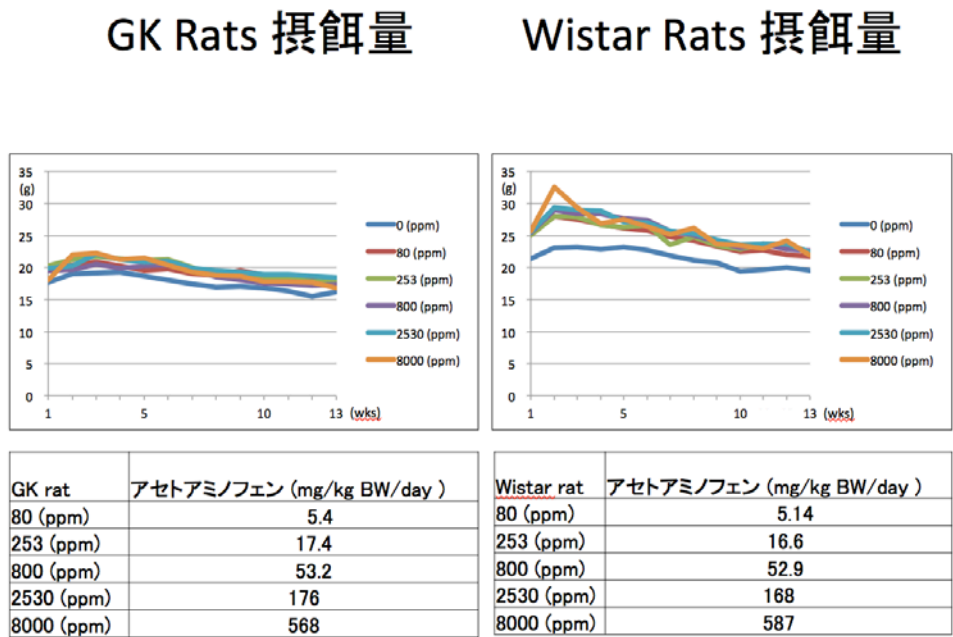
購入し、6週齢より実験を開始した。ラットは3～4匹ずつケージに入れ、体重および摂餌量は週1回ずつ測定した。動物実験は、順調に行われ、無事終了することができた。実験開始から終了までのラットの体重曲線ならびに摂餌量を以下に示す。

<図 2 体重の推移>



実験開始から終了までの体重曲線では、GK ラット、Wistar ラットいずれも 8000ppm の群でコントロール群と比べて、体重が低い傾向が見られた。Wistar ラットにおいては、実験開始後 2 週から 9 週まで、最高用量群（8000ppm）はコントロール群と比べて、有意な体重増加抑制が認められた。

<図 3 摂餌量の推移>



<表 2 剖検時の体重と臓器重量>

Body Weights and Relative Organ Weights													
	0		80		253		800		2530		8000 ppm		
GK rats													
Body weight (g)	328.3	± 18.1	328.5	± 16.2	324.7	± 16.1	325.4	± 13.9	330.1	± 14.1	309.7	± 17.6	
Brain	0.560	± 0.034	0.554	± 0.034	0.564	± 0.033	0.554	± 0.025	0.566	± 0.022	0.580	± 0.059	
Salivary glands	0.174	± 0.009	0.159	± 0.012	0.158	± 0.006	0.171	± 0.012	0.159	± 0.018	0.151	± 0.015	↓↓
Thymus gland	0.050	± 0.021	0.061	± 0.026	0.052	± 0.012	0.056	± 0.026	0.050	± 0.016	0.046	± 0.014	
Heart	0.327	± 0.015	0.324	± 0.029	0.332	± 0.018	0.326	± 0.022	0.335	± 0.038	0.332	± 0.033	
Lungs	0.305	± 0.025	0.311	± 0.018	0.340	± 0.047	0.338	± 0.079	0.295	± 0.020	0.325	± 0.028	
Liver	2.552	± 0.073	2.648	± 0.278	2.583	± 0.127	2.578	± 0.271	2.722	± 0.322	3.000	± 0.136	↑↑↑
Spleen	0.180	± 0.013	0.191	± 0.016	0.187	± 0.016	0.190	± 0.013	0.186	± 0.018	0.182	± 0.024	
Adrenal glands	0.012	± 0.003	0.012	± 0.002	0.014	± 0.005	0.012	± 0.004	0.012	± 0.002	0.013	± 0.004	
Kidneys	0.631	± 0.032	0.649	± 0.050	0.723	± 0.137	0.673	± 0.055	0.670	± 0.068	0.759	± 0.096	↑↑
Testes	0.727	± 0.039	0.708	± 0.031	0.711	± 0.059	0.720	± 0.051	0.708	± 0.035	0.638	± 0.073	↓↓↓
Wistar rats													
Body weight (g)	446.6	± 30.1	452.2	± 16.3	451.7	± 25.6	458.9	± 33.1	462.2	± 26.4	424.1	± 18.4	
Brain	0.454	± 0.031	0.446	± 0.024	0.452	± 0.032	0.451	± 0.039	0.434	± 0.022	0.464	± 0.033	
Salivary glands	0.142	± 0.012	0.132	± 0.019	0.133	± 0.011	0.150	± 0.012	0.136	± 0.010	0.105	± 0.010	↓↓↓
Thymus gland	0.047	± 0.010	0.050	± 0.013	0.057	± 0.016	0.057	± 0.015	0.059	± 0.018	0.052	± 0.011	
Heart	0.289	± 0.019	0.290	± 0.017	0.283	± 0.014	0.294	± 0.018	0.283	± 0.017	0.290	± 0.013	
Lungs	0.308	± 0.027	0.304	± 0.024	0.301	± 0.039	0.301	± 0.047	0.305	± 0.036	0.305	± 0.026	
Liver	2.555	± 0.115	2.502	± 0.090	2.667	± 0.199	2.579	± 0.100	2.590	± 0.115	2.804	± 0.126	↑↑↑
Spleen	0.175	± 0.017	0.175	± 0.012	0.175	± 0.021	0.178	± 0.013	0.170	± 0.011	0.163	± 0.015	
Adrenal glands	0.014	± 0.002	0.014	± 0.002	0.014	± 0.003	0.015	± 0.003	0.014	± 0.002	0.016	± 0.008	
Kidneys	0.513	± 0.039	0.521	± 0.030	0.546	± 0.037	0.547	± 0.046	0.541	± 0.026	0.578	± 0.023	↑↑↑
Testes	0.758	± 0.040	0.727	± 0.043	0.741	± 0.045	0.736	± 0.049	0.731	± 0.058	0.739	± 0.042	

↑ ↓ : p < 0.05 vs control group (0 ppm acetaminophen diet)
↑↑ ↓↓ : p < 0.01 vs control group (0 ppm acetaminophen diet)
↑↑↑ ↓↓↓ : p < 0.001 vs control group (0 ppm acetaminophen diet)

剖検時の各群の体重および相対臓器重量を示す。GK ラットでは、コントロール群(0ppm)と比べて、2530ppm, 8000ppm の群において唾液腺の相対重量が有意に低下し、8000ppm の群で肝および腎の相対重量が有意に増加、8000ppm の群で精巣の相対重量が有意に低下していた。

<表 3 血球・生化学データおよび臓器重量のみによる結果のまとめ>

Temporary adverse effects

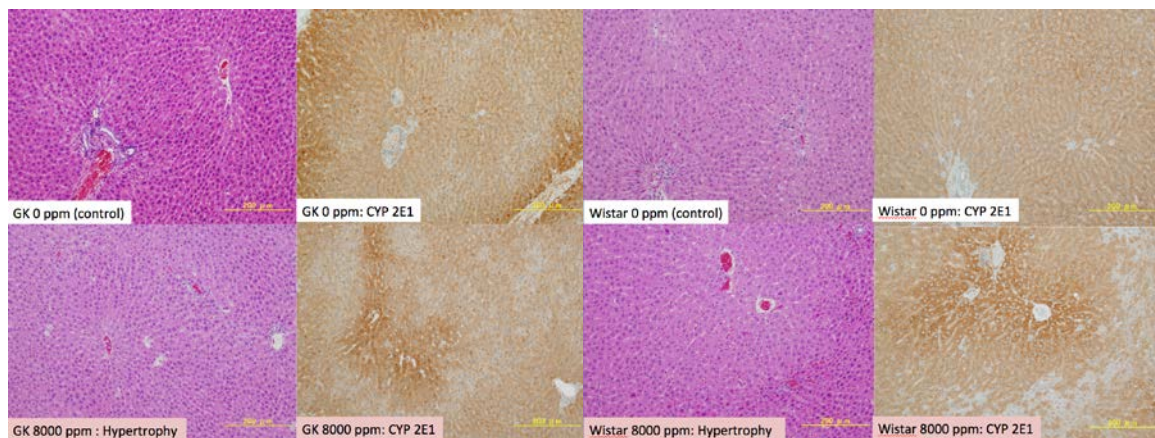
	80	253	800	2530	8000 ppm		80	253	800	2530	8000 ppm
GK rats						Wistar rats					
Body Weight	-	-	-	-	-	Body Weight	-	-	-	-	-
Relative Weights						Relative Weights					
Liver	-	-	-	-	↑	Liver	-	-	-	-	↑
Kidneys	-	-	-	-	↑	Kidney	-	-	-	-	↑
Salivary glands	-	-	-	↓	↓	Salivary glands	-	-	-	-	↓
Testes	-	-	-	-	↓						
Blood test						Blood test					
RBC	-	-	-	-	↓	RBC	-	-	-	-	↓
Hb	-	-	-	-	↓	MCV	-	-	-	-	↑
MCV	-	-	-	-	↑	MCH	-	-	-	-	↑
Biochemical test						Biochemical test					
Alb	-	-	-	-	↑	Cre	-	-	-	-	↓
Na	-	-	-	-	↑	BUN	-	-	-	-	↓
Ca	-	-	-	-	↑						
Cre	-	-	-	-	↓	HbA1c	-	-	-	-	-
TG	-	-	-	-	↓	Glu	-	-	-	-	-
Cholesterol	-	-	-	-	↑	尿糖	↑	-	-	-	-
T.Bil	-	-	-	↑	↑						
BUN	-	-	-	-	↓						
TP	-	-	-	-	↑						
HbA1c	-	-	-	-	↓						
Glu	-	-	-	-	-						
尿糖	-	↑	-	-	-						

では、アセトアミノフェンの NOAEL は 10 倍未満であった。

病理組織学的評価を行うまでに得られた血球・生化学データおよび解剖時の臓器重量のみによる結果をまとめると左記の結果となり、GK rats、Wistar rats の 8000ppm 投与群では、肝、腎などの臓器重量の有意な増加が見られた (Wistar rats の NOAEL は 2530 ppm)。GK rats の 2530ppm 以上の投与群で、T.Bil の有意な増加が見られた (GK rats の NOAEL は 800 ppm)。以上より、病理組織学的評価を除いたデータでは、糖尿病モデル動物と健常動物と

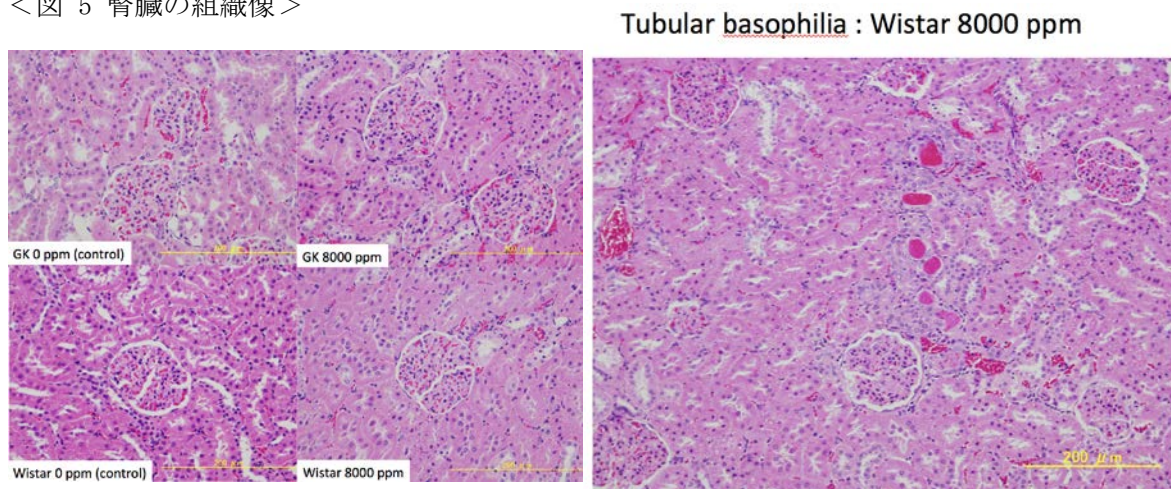
病理組織学的評価の結果を以下に示す。

<図 4 肝臓の組織像と CYP2E1 抗体による免疫染色による検討>



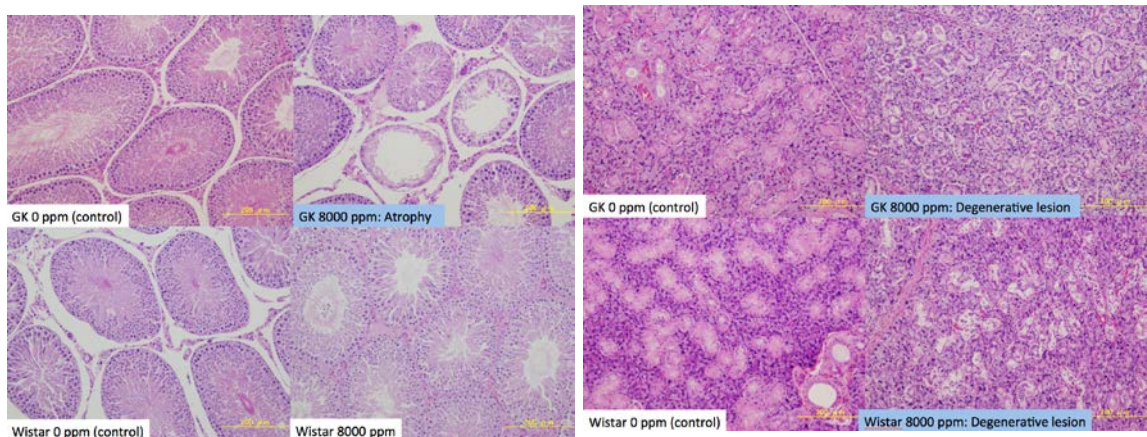
GK ラット、Wistar ラットいずれにおいても、コントロール群（0 ppm）と比べて、最高用量群（8000ppm）と 2530ppm 投与群の動物で、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大の所見が認められた。

<図 5 腎臓の組織像>



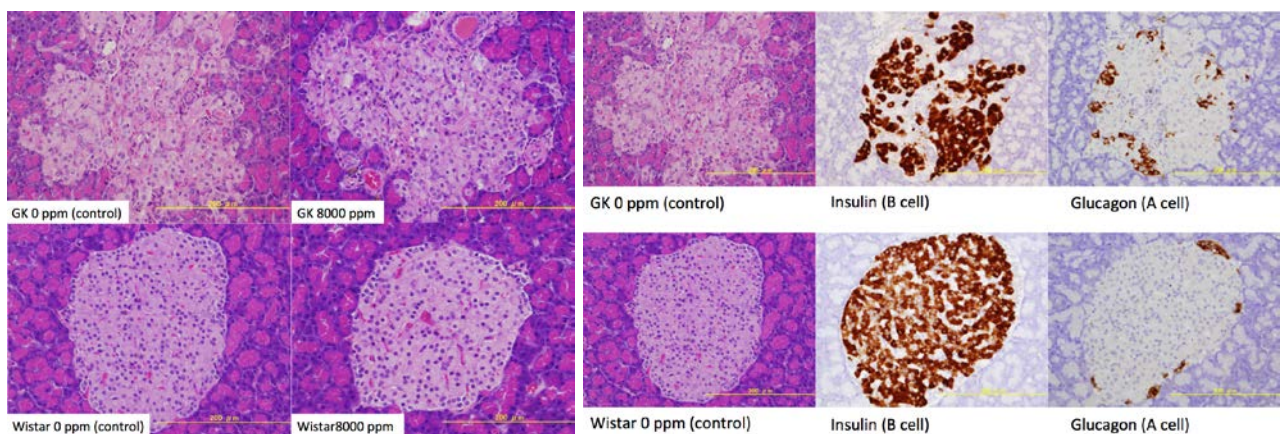
GK ラット、Wistar ラットいずれにおいても、全ての群において、infiltration, mononuclear（リンパ球浸潤）は認められ、群間で差は見られなかった。Wistar ラットの最高用量群（8000ppm）と 2530ppm 投与群の動物で、Tubular basophilia の所見が認められた。

<図 6 精巣と唾液腺の組織像>



精巣については、GK ラットの 8000 ppm、2530 ppm において atrophy を認め、Wistar ラットでは 8000ppm で atrophy が観察された。唾液腺については、GK ラット、Wistar ラットいずれにおいても、最高用量群（8000ppm）と 2530ppm 投与群の動物に degeneration が認められた。

<図 7 膵臓の組織像とインスリン抗体、グルカゴン抗体による免疫染色による検討>



GK ラットでは、Wistar ラットと比べ、膵臓のラ氏島に線維化やインスリンを産生する B 細胞の相対的な減少が報告されているが、今回の実験で用いた GK ラットにおいてもラ氏島の形状がヒトデ型を示し、インスリン抗体やグルカゴン抗体による免疫染色による検討でも、グルカゴン産生能に差は認められないが、インスリン産生性を示す B 細胞の相対的な減少を確認することができた。この所見は、GK ラット全てに認められ、アセトアミノフェン投与用量では変化が見られず、群間で差は見られなかった。

以上を総合すると、下記のようにまとめられた。

<表 4 病理組織学的評価のまとめ>

病理組織所見

Tissue	Findings	GK rat					
		0	80	253	800	2530 8000 ppm	
Liver	Infiltration, mononuclear	10/10	10/10	10/10	11/11	11/11	11/11
	Hypertrophy, hepatocellular: CYP2E1(+)	0/10	0/10	0/10	0/10	2/11	11/11
Kidney	Infiltration, mononuclear	3/10	2/10	2/10	2/11	3/11	4/11
	Glomerulopathy, mesangioproliferative	0/10	0/10	0/10	0/11	0/11	0/11
	Tubular basophilia	0/10	0/10	0/10	0/11	0/11	0/11
Testis	Atrophy, tubular	0/10	0/10	0/10	0/11	1/11	1/11
Salivary gland	Degenerative lesion	0/10	0/10	0/10	0/11	2/11	11/11
Pancreas	Fibrosis at islets of Langerhans	10/10	-	-	-	-	11/11
	Relative decrease of B cell	10/10	-	-	-	-	11/11

Tissue	Findings	Wistar rat					
		0	80	253	800	2530 8000 ppm	
Liver	Infiltration, mononuclear	10/10	10/10	10/10	11/11	11/11	11/11
	Hypertrophy, hepatocellular: CYP2E1(+)	0/10	0/10	0/10	0/10	1/11	11/11
Kidney	Infiltration, mononuclear	2/10	1/10	1/10	3/11	1/11	2/11
	Glomerulopathy, mesangioproliferative	0/10	0/10	0/10	0/11	0/11	0/11
	Tubular basophilia	0/10	0/10	0/10	0/11	1/11	1/11
Testis	Atrophy, tubular	0/10	0/10	0/10	0/11	0/11	2/11
Salivary gland	Degenerative lesion	0/10	0/10	0/10	0/11	1/11	2/11
Pancreas	Fibrosis at islets of Langerhans	0/10	-	-	-	-	0/11
	Relative decrease of B cell	0/10	-	-	-	-	0/11

オレンジの枠組みで囲われた病理組織所見が、病理組織学的な検討により観察された adverse effect に相当する所見であり、緑色の線で示す、800 ppm と 2530 ppm の間に境界があると考えられ、GK ラット、Wistar ラットいずれにおいても同様な結果であった。

<表 5 血球・生化学データ、臓器重量および病理組織学的評価のまとめ>

Adverse effects

	80	253	800	2530	8000 ppm		80	253	800	2530	8000 ppm
GK rats							Wistar rats				
Body Weight	-	-	-	-	-		Body Weight	-	-	-	-
Relative Weights							Relative Weights				
Liver	-	-	-	-	↑		Liver	-	-	-	↑
Kidneys	-	-	-	-	↑		Kidney	-	-	-	↑
Salivary glands	-	-	-	↓	↓		Salivary glands	-	-	-	↓
Testes	-	-	-	-	↓						
Blood test							Blood test				
RBC	-	-	-	-	↓		RBC	-	-	-	↓
Hb	-	-	-	-	↓		MCV	-	-	-	↑
MCV	-	-	-	-	↑		MCH	-	-	-	↑
Biochemical test							Biochemical test				
Alb	-	-	-	-	↑		Cre	-	-	-	↓
Na	-	-	-	-	↑		BUN	-	-	-	↓
Ca	-	-	-	-	↑						
Cre	-	-	-	-	↓		Liver, Hypertrophy	-	-	-	+
TG	-	-	-	-	↓						
Cholesterol	-	-	-	-	↑						
T.Bil	-	-	-	↑	↑						
BUN	-	-	-	-	↓						
TP	-	-	-	-	↑						
Liver, Hypertrophy	-	-	-	+	+						
Salivary degeneration	-	-	-	+	+						

赤線で示される境界は、中間報告書までで判明していた血球・生化学データおよび臓器重量のみによる評価である（表 5）。病理組織学的評価を含めた検討では、GK ラット、Wistar

ラットいずれも 800 ppm と 2530 ppm の間に境界が引かれ（緑線）、いずれの動物においても、アセトアミノフェンの NOAEL は 800ppm であった。

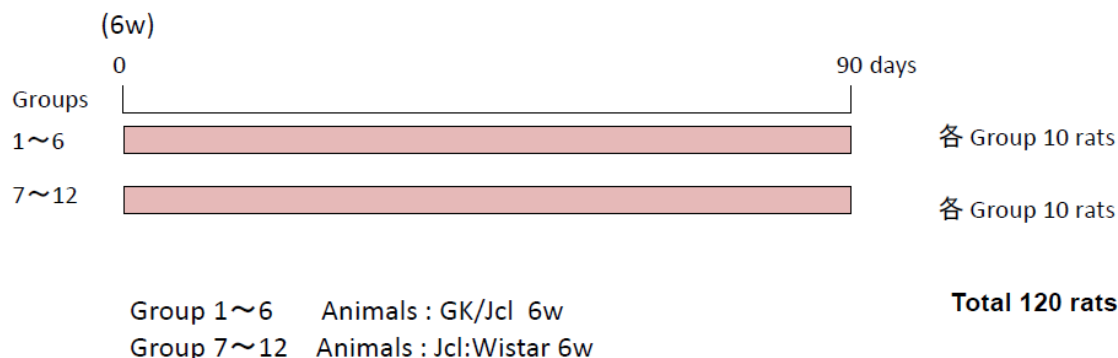
今回の検討では、糖尿病疾患モデル動物と健常動物でのアセトアミノフェンのNOAELに違いが見られなかった。糖尿病という疾患を有する場合においても、アセトアミノフェンの場合、個体差10の不確実係数で充分である妥当性が示された。

平成25年度は、肥満をともしない糖尿病モデルとして、GK/Jclラットを用いて、共通の被験物質として 3-MCPDを無処置対照群を含めて6段階で用量設定し、90日間反復投与毒性試験を行った。対照となる健常動物は、疾患モデルのバックグラウンドに最も近い系統として Wistarラットを用い、同様に6段階の用量設定で検討した（図8）。

<図 8 実験デザイン>

13ET: Experimental design:

内閣府 食品健康影響評価研究 3-MCPDに対する糖尿病ラットの毒性評価



MF 固型(自由摂取) + 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD, 飲水投与)

Groups 1 and 7 : 0 ppm(水道水)
 Groups 2 and 8 : 9 ppm
 Groups 3 and 9 : 28.5 ppm
 Groups 4 and 10 : 90 ppm
 Groups 5 and 11 : 285 ppm
 Groups 6 and 12 : 900 ppm

OECDのガイドライン上、げっ歯類の90日間反復投与毒性試験では、2～4の公比が推奨されているが、公比2の設定で10倍の差異を検出するには、4用量の差異(1, 2, 4, 8, 16)が必要となり、公比4の設定では2用量の差異がある場合は濃度差が4～16倍の間となるため、評価が困難となる。3Rの観点から群数を必要最小限とし、かつ、すでに報告のある系統における毒性発現用量と、本試験で用いる健常動物の毒性発現用量が異なる可能性も想定すると、健常動物と疾患動物における毒性用量の組み合わせがどのような場合も、公比を $\sqrt{10}$ (約3.16)として5用量に無処置対照群を加えた6群について検討することが最適と考えられた。また、対照となる健常動物は、それぞれの疾患モデルのバックグラウンドに最も近い系統を用い、同様に6段階の用量設定で検討した。検討項目としては、投与期間中、一般状態および死亡動物の有無を毎日観察し、体重は週1回以上、摂水量は1週に2回以上測定した。動物は、投与期間終了後に、深麻酔下で開腹し、腹部大動脈から採血を行った。血液学的検査は、白血球数(WBC)、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)および血小板数(PLT)を測定した。血清生化学的検査は、総蛋白質(TP)、アルブミン(Alb)、トリグリセリド(TG)、総コレステロール(T-Cho)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(Cre)、ナトリウム(Na)、塩素(Cl)、カリウム(K)、カルシウム(Ca)、無機リン(IP)、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)、および γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(γ -

GTP) について測定した。採血後動物を放血死させ、剖検を実施するとともに脳、胸腺、肺、心、脾、肝、副腎、腎および精巣を摘出し、重量を測定した。上記の器官に加え、鼻腔、眼球、下垂体、脊髄、甲状腺および上皮小体、気管、胸部大動脈、唾液腺、舌、食道、胃、その他消化管、腸間膜リンパ節、膵、精巣上体、前立腺、精囊、膀胱、皮膚、乳腺、骨および骨髄を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液で、また精巣のみGFA液で固定した。固定臓器を常法に従ってパラフィンに包埋後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し対照群と最高用量群について病理組織学的検査を行う。最高用量群に変化のある臓器については、すべての群について検討を加える。なお、今回の研究では特に重要な臓器と思われる腎及び精巣に関してはすべての群での病理組織学的検査を行う。

被験物質として今年度は、3-MCPDを選択した。3-MCPDは、0, 9, 28.5, 90, 285, 900 ppmの用量で飲水投与し、同様に健常動物と比較検討した。いずれも対照群との比較から総合的にNOAELを決定し、モデル動物と健常動物でのNOAELの違いがあるかどうか、あるとしたらその程度はどうかを総合的に判断し、不確実係数の妥当性を検討する。

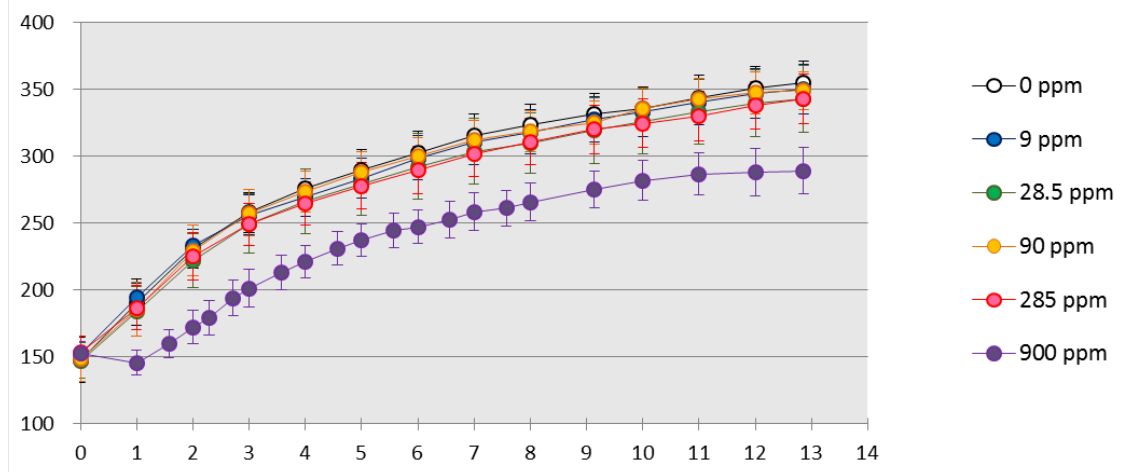
今回、被験物質として用いた 3-MCPD は和光純薬工業株式会社より購入し、各用量になるように水道水で用時希釈した。基礎食としてオリエンタル MF 固形飼料を使用した。

GK/Jclラット雄およびWistarラット雄は、それぞれ60匹ずつ日本クレア社より4週齢で購入し、6週齢より実験を開始した。ラットは2匹ずつケージに入れ、体重は週1回以上、摂水量は週2回以上測定し、併せて飲水の交換も行った。

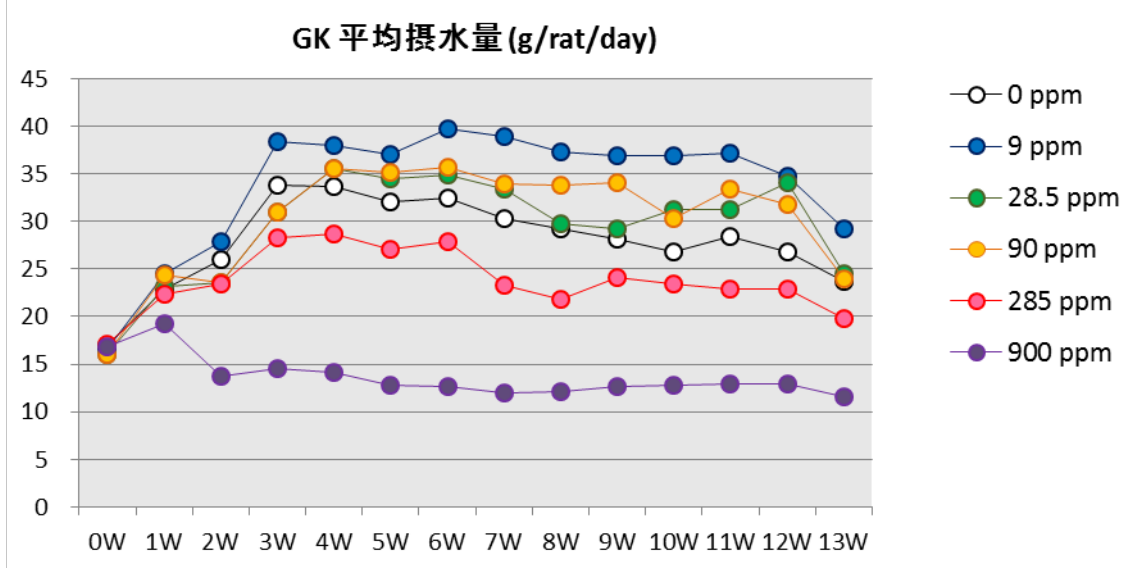
動物実験は2013年6月26日に開始し、9月25, 26, 27日に屠殺剖検を終了した。

GK/Jclラットの体重曲線ならびに摂水量を図9及び10に示した。

<図 9 GK rat : 各群の平均体重 (g) の推移>



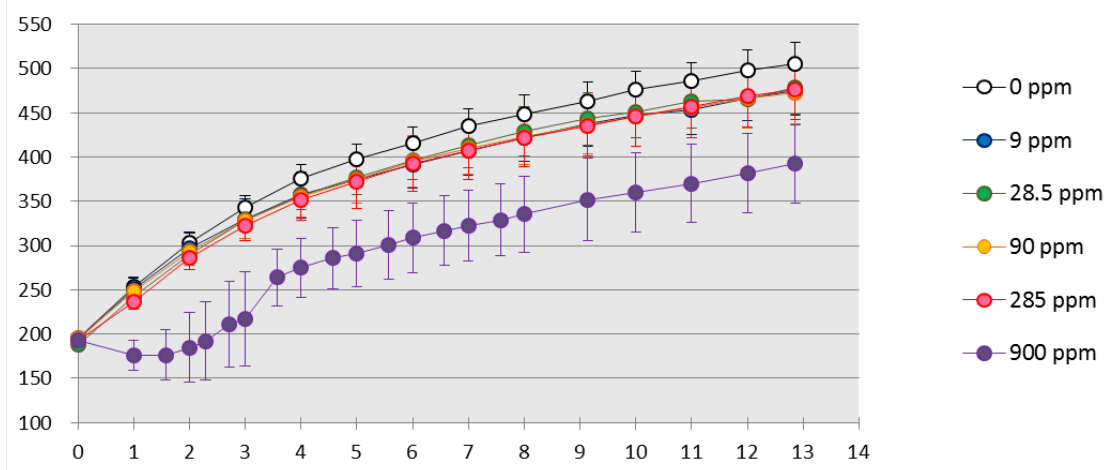
<図 10 GK rat：各群の 1 匹当りの平均摂水量 (g/rat/day) の推移>



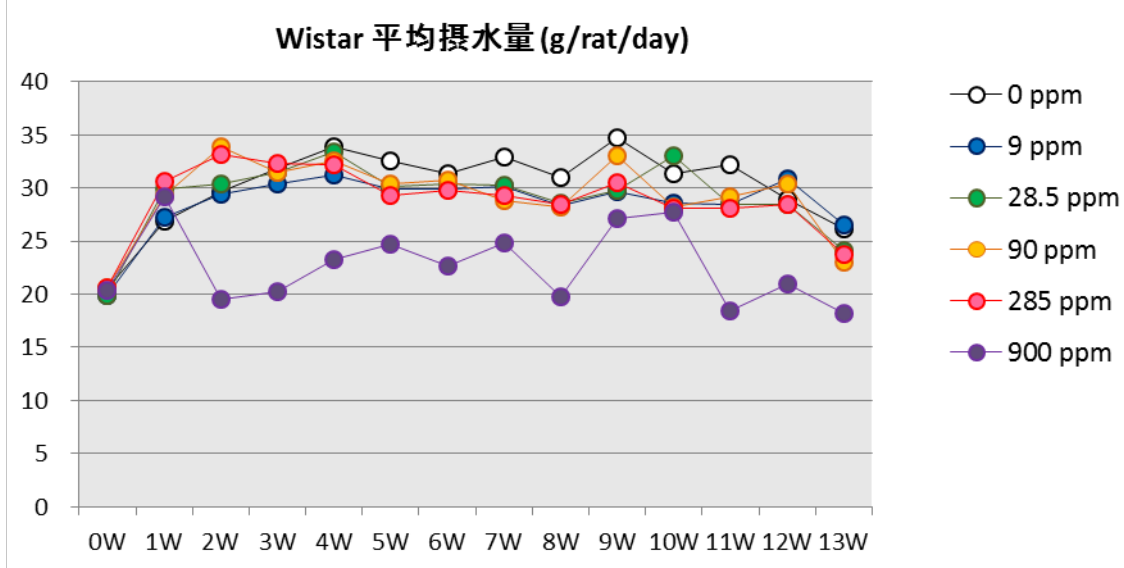
試験期間を通して死亡又は瀕死例は認められなかった。体重は投与 1 週以降、最高投与量である 900 ppm 群で統計学的に有意 ($P<0.001$) な低値が認められた。摂水量については 285 ppm 以上の群で低値傾向が認められた。

一方、健常動物として用いた Wistar ラットの体重ならびに摂餌量を図 11、12 に示した。

<図 11 Wistar rat：各群の平均体重 (g) の推移>



<図 12 Wistar rat：各群の1匹当りの平均摂水量 (g/rat/day) の推移>



900 ppm 群の1例で皮温下降、体重減少及び消瘦が認められ、投与3週（投与19日）に死亡した。また、900 ppm 群の3例について、死亡例と同様に皮温下降と消瘦が認められたため、投与4週（投与22日）に早期剖検に供した。体重はGKラットと同様に、投与1週以降、最高投与量である900 ppm 群に統計学的に有意 ($P<0.001$) な低値が認められた。285 ppm 群では、投与1週にのみ有意 ($P<0.05$) な体重の低値が認められた。摂水量については900 ppm 群で低値傾向が認められた。

体重、摂水量及び3-MCPD濃度から計算した3-MCPDの平均摂取量を、表6に示す。

<表 6 3-MCPD平均摂取量>

3-MCPD (ppm)		0	9	28.5	90	285	900
GK	(mg/kg/day)	0.0	1.1	3.2	10.0	25.9	54.4
Wistar	(mg/kg/day)	0.0	0.7	2.4	7.5	23.9	74.2

285 ppm以下の平均摂取量はWistarラットに比べGKラットの方が大きかったこと、並びにGKラットでは2.1倍以上、Wistarラットでは3.1倍以上の用量間比が確保されていたことから、毒性評価上問題なかった。

GKラット及びWistarラットの血液学的検査結果を表7及び8に示す。

<表 7 GK rat : 血液学的検査結果>

Group	0 ppm	9 ppm	28.5 ppm	90 ppm	285 ppm	900 ppm
No. of Samples	10	10	10	9	10	9
WBC / μ L	11600.0 $\pm$ 2701.0	11610.0 $\pm$ 2665.2	11100.0 $\pm$ 2367.4	9511.1 $\pm$ 2420.5	9540.0 $\pm$ 1465.3	9755.6 $\pm$ 1283.7
RBC $\times 10^4/\mu$ L	922.0 $\pm$ 22.0	915.8 $\pm$ 29.1	905.3 $\pm$ 19.7	885.7 $\pm$ 78.7	840.6 $\pm$ 31.1 ***	805.3 $\pm$ 20.9 ***
Hb g/dL	16.61 $\pm$ 0.39	16.55 $\pm$ 0.35	16.36 $\pm$ 0.25	15.92 $\pm$ 1.35	15.44 $\pm$ 0.30 ***	14.92 $\pm$ 0.35 ***
Ht %	48.34 $\pm$ 0.97	47.18 $\pm$ 1.14	46.63 $\pm$ 0.91	45.98 $\pm$ 3.69	44.83 $\pm$ 2.77 **	42.69 $\pm$ 1.49 ***
MCV fL	52.44 $\pm$ 0.54	51.52 $\pm$ 0.64	51.51 $\pm$ 0.59	51.96 $\pm$ 0.86	53.32 $\pm$ 2.26	53.01 $\pm$ 0.85
MCH pg	18.02 $\pm$ 0.23	18.09 $\pm$ 0.33	18.09 $\pm$ 0.24	18.00 $\pm$ 0.32	18.38 $\pm$ 0.46	18.54 $\pm$ 0.24 **
MCHC g/dL	34.35 $\pm$ 0.56	35.10 $\pm$ 0.42	35.07 $\pm$ 0.36	34.62 $\pm$ 0.47	34.53 $\pm$ 1.83	34.97 $\pm$ 0.69
PLT $\times 10^4/\mu$ L	105.61 $\pm$ 8.15	103.07 $\pm$ 6.80	104.91 $\pm$ 8.53	106.02 $\pm$ 8.64	107.97 $\pm$ 8.19	114.89 $\pm$ 7.82
Band %	0.1 $\pm$ 22.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.5	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.5
Seg %	25.0 $\pm$ 0.4	21.8 $\pm$ 3.7	23.5 $\pm$ 5.2	26.8 $\pm$ 5.8	25.6 $\pm$ 6.3	25.8 $\pm$ 7.7
Lymph %	73.5 $\pm$ 1.0	76.0 $\pm$ 3.7	74.9 $\pm$ 5.6	71.7 $\pm$ 6.1	73.1 $\pm$ 6.1	72.4 $\pm$ 8.1
Mono %	1.1 $\pm$ 0.5	1.7 $\pm$ 1.3	1.0 $\pm$ 0.8	1.4 $\pm$ 0.9	0.7 $\pm$ 0.8	0.4 $\pm$ 0.5
Eos %	0.3 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.7	0.3 $\pm$ 0.5	0.1 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.7	1.0 $\pm$ 0.7
Baso %	0.0 $\pm$ 0.6	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Retic %	2.35 $\pm$ 0.23	2.65 $\pm$ 1.13	2.69 $\pm$ 0.89	2.69 $\pm$ 1.51	2.74 $\pm$ 0.91	2.63 $\pm$ 0.91
HbA1c %	5.31 $\pm$ 8.15	5.60 $\pm$ 0.58	5.41 $\pm$ 0.39	5.36 $\pm$ 0.47	5.14 $\pm$ 0.14	4.76 $\pm$ 0.17 *

mean $\pm$ S.D. Significant differences from the 0 ppm group [Dunnett's test (parametric); * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001]

285 ppm 以上の群で、赤血球数、ヘモグロビン値及びヘマトクリットの有意な低値が認められた。

<表 8 Wistar rat : 血液学的検査結果>

Group	0 ppm	9 ppm	28.5 ppm	90 ppm	285 ppm	900 ppm
No. of Samples	10	10	10	10	10	6
WBC / μ L	11010.0 $\pm$ 3304.4	9590.0 $\pm$ 1870.5	9840.0 $\pm$ 1596.0	9970.0 $\pm$ 1117.6	10830.0 $\pm$ 1067.8	9333.3 $\pm$ 1608.3
RBC $\times 10^4/\mu$ L	867.9 $\pm$ 34.6	850.0 $\pm$ 24.2	845.2 $\pm$ 32.7	829.0 $\pm$ 25.7 *	785.9 $\pm$ 27.1 ***	709.8 $\pm$ 40.1 ***
Hb g/dL	15.62 $\pm$ 0.49	15.43 $\pm$ 0.44	15.36 $\pm$ 0.31	15.10 $\pm$ 0.23 *	14.33 $\pm$ 0.53 ***	12.73 $\pm$ 0.52 ***
Ht %	46.20 $\pm$ 1.62	44.85 $\pm$ 1.11	45.38 $\pm$ 1.16	44.51 $\pm$ 1.31 *	42.41 $\pm$ 1.41 ***	37.92 $\pm$ 1.83 ***
MCV fL	53.27 $\pm$ 1.78	52.94 $\pm$ 1.46	53.72 $\pm$ 1.18	53.70 $\pm$ 0.84	53.99 $\pm$ 1.74	53.45 $\pm$ 0.85
MCH pg	18.01 $\pm$ 0.61	18.17 $\pm$ 0.59	18.19 $\pm$ 0.42	18.22 $\pm$ 0.44	18.24 $\pm$ 0.79	17.95 $\pm$ 0.43
MCHC g/dL	33.82 $\pm$ 0.79	34.28 $\pm$ 0.44	33.86 $\pm$ 0.41	33.94 $\pm$ 0.67	33.78 $\pm$ 0.58	33.58 $\pm$ 0.63
PLT $\times 10^4/\mu$ L	126.80 $\pm$ 4.32	119.80 $\pm$ 7.08	122.90 $\pm$ 9.98	122.90 $\pm$ 8.17	124.50 $\pm$ 6.88	123.83 $\pm$ 6.05
Band %	0.2 $\pm$ 0.4	0.1 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.7	0.2 $\pm$ 0.4	0.0 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.4
Seg %	26.1 $\pm$ 4.4	27.2 $\pm$ 6.9	29.5 $\pm$ 7.7	29.4 $\pm$ 8.6	22.5 $\pm$ 8.7	23.3 $\pm$ 4.3
Lymph %	72.3 $\pm$ 4.9	70.8 $\pm$ 7.2	69.4 $\pm$ 8.6	69.1 $\pm$ 8.5	76.7 $\pm$ 8.6	75.8 $\pm$ 5.4
Mono %	0.6 $\pm$ 0.7	0.9 $\pm$ 1.1	0.2 $\pm$ 0.4	0.8 $\pm$ 0.8	0.7 $\pm$ 0.8	0.3 $\pm$ 0.5
Eos %	0.8 $\pm$ 1.1	1.0 $\pm$ 0.8	0.6 $\pm$ 0.8	0.5 $\pm$ 0.7	0.1 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.8
Baso %	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Retic %	2.24 $\pm$ 0.79	2.39 $\pm$ 0.84	2.09 $\pm$ 0.93	2.20 $\pm$ 0.59	2.40 $\pm$ 0.48	2.12 $\pm$ 0.59
HbA1c %	4.46 $\pm$ 0.07	4.40 $\pm$ 0.07	4.43 $\pm$ 0.12	4.38 $\pm$ 0.09	4.37 $\pm$ 0.07	4.32 $\pm$ 0.10 **

mean $\pm$ S.D. Significant differences from the 0 ppm group [Dunnett's test (parametric); * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001]

90 ppm 以上の群で、赤血球数、ヘモグロビン値及びヘマトクリットの有意な低値が認められた。

GKラット及びWistarラットの血液化学的検査結果を表9及び10に示す。

<表 9 GK rat : 血液化学的検査結果>

Group		0 ppm	9 ppm	28.5 ppm	90 ppm	285 ppm	900 ppm
No. of Samples		10	10	10	10	10	10
TP	g/dL	6.45 ± 0.11	6.51 ± 0.14	6.47 ± 0.16	6.45 ± 0.14	6.55 ± 0.17	6.56 ± 0.35
ALB	g/dL	4.59 ± 0.06	4.58 ± 0.14	4.63 ± 0.12	4.62 ± 0.15	4.77 ± 0.12 *	4.68 ± 0.15
A/G	ratio	2.49 ± 0.14	2.39 ± 0.19	2.55 ± 0.17	2.54 ± 0.19	2.71 ± 0.21	2.52 ± 0.28
TG	mg/dL	52.6 ± 13.8	56.8 ± 20.1	61.4 ± 21.2	51.1 ± 21.6	39.8 ± 7.9	26.1 ± 10.2 ***
T-Chol	mg/dL	102.1 ± 3.4	102.3 ± 5.1	106.0 ± 3.7	101.2 ± 4.1	103.5 ± 4.1	89.5 ± 8.6 **
PL	mg/dL	153.7 ± 5.6	154.8 ± 6.3	160.7 ± 7.6	153.1 ± 8.4	151.9 ± 5.9	129.2 ± 11.7 ***
UN	mg/dL	12.55 ± 1.23	13.55 ± 1.08	12.98 ± 0.97	13.84 ± 1.50	12.55 ± 0.74	16.01 ± 1.94 ***
Cre	mg/dL	0.248 ± 0.017	0.254 ± 0.019	0.244 ± 0.017	0.234 ± 0.027	0.220 ± 0.013 *	0.205 ± 0.028 ***
Na	mEq/L	134.1 ± 3.0	133.6 ± 2.5	133.7 ± 3.0	133.7 ± 3.3	135.4 ± 2.8	135.0 ± 2.7
Cl	mEq/L	104.6 ± 2.1	103.1 ± 1.7	102.6 ± 2.9	103.1 ± 3.0	105.1 ± 2.3	103.5 ± 1.6
K	mEq/L	9.36 ± 1.53	9.36 ± 1.59	9.25 ± 1.74	9.46 ± 1.92	8.53 ± 1.33	8.28 ± 1.46
Ca	mg/dL	9.26 ± 0.16	9.21 ± 0.25	9.18 ± 0.18	9.14 ± 0.35	9.09 ± 0.24	9.04 ± 0.51
IP	mg/dL	5.85 ± 0.52	6.22 ± 0.27	5.94 ± 0.37	5.64 ± 0.49	5.35 ± 0.45	5.93 ± 0.95
AST	U/L	58.0 ± 8.4	58.0 ± 4.5	55.0 ± 5.1	58.9 ± 9.2	51.8 ± 3.3	62.0 ± 20.2
ALT	U/L	37.2 ± 7.5	35.0 ± 4.8	32.3 ± 3.3	36.2 ± 7.8	29.3 ± 3.7 *	36.3 ± 6.8
ALP	U/L	383.5 ± 29.7	399.9 ± 61.6	371.1 ± 33.2	386.9 ± 45.9	328.8 ± 20.8	345.1 ± 22.2
T-Bil	mg/dL	0.095 ± 0.005	0.102 ± 0.008	0.103 ± 0.012	0.096 ± 0.013	0.099 ± 0.009	0.092 ± 0.026
Glc	mg/dL	239.8 ± 31.6	259.1 ± 26.9	257.4 ± 39.5	267.5 ± 44.2	234.3 ± 25.7	222.4 ± 26.6

mean ± S.D. Significant differences from the 0 ppm group [Dunnett's test (parametric); * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001]

900 ppm群で、トリグリセリド、総コレステロール及び尿素窒素の、並びに285 ppm以上の群でクレアチニンの有意な低値が認められた。

<表 10 Wistar rat : 血液化学的検査結果>

Group		0 ppm	9 ppm	28.5 ppm	90 ppm	285 ppm	900 ppm
No. of Samples		10	10	10	10	10	6
TP	g/dL	6.44 ± 0.25	6.19 ± 0.19 *	6.35 ± 0.14	6.44 ± 0.12	6.29 ± 0.22	6.28 ± 0.17
ALB	g/dL	4.29 ± 0.07	4.29 ± 0.12	4.40 ± 0.07	4.43 ± 0.09	4.39 ± 0.17	4.43 ± 0.19
A/G	ratio	2.04 ± 0.26	2.26 ± 0.18 *	2.25 ± 0.14	2.24 ± 0.13	2.32 ± 0.17 **	2.42 ± 0.19 **
TG	mg/dL	222.0 ± 81.0	183.4 ± 59.6	166.9 ± 47.9	213.0 ± 46.1	168.6 ± 37.5	148.5 ± 34.3
T-Chol	mg/dL	70.5 ± 12.2	69.6 ± 7.5	67.9 ± 5.0	72.1 ± 8.3	73.5 ± 9.1	76.3 ± 11.6
PL	mg/dL	125.5 ± 19.6	122.0 ± 12.3	118.1 ± 9.0	128.3 ± 10.2	125.4 ± 11.1	126.5 ± 15.1
UN	mg/dL	16.43 ± 1.87	16.19 ± 1.19	15.16 ± 1.42	14.86 ± 1.55	13.97 ± 0.80 *	21.33 ± 3.94 ***
Cre	mg/dL	0.335 ± 0.036	0.305 ± 0.024	0.292 ± 0.024 **	0.260 ± 0.024 ***	0.206 ± 0.025 ***	0.222 ± 0.038 ***
Na	mEq/L	137.2 ± 2.0	137.5 ± 1.8	138.1 ± 1.6	137.5 ± 1.5	138.0 ± 1.2	137.3 ± 1.2
Cl	mEq/L	104.3 ± 1.3	104.4 ± 1.8	104.3 ± 1.7	105.4 ± 2.0	106.0 ± 1.2	105.5 ± 1.2
K	mEq/L	7.75 ± 1.39	7.40 ± 1.20	7.22 ± 0.93	7.64 ± 1.28	7.58 ± 1.24	7.83 ± 1.12
Ca	mg/dL	9.37 ± 0.27	9.28 ± 0.22	9.34 ± 0.23	9.38 ± 0.24	9.18 ± 0.19	9.12 ± 0.19
IP	mg/dL	6.25 ± 0.61	6.44 ± 0.48	6.30 ± 0.49	6.22 ± 0.46	6.42 ± 0.37	7.00 ± 0.44 *
AST	U/L	71.8 ± 10.3	67.2 ± 6.9	70.0 ± 12.4	72.0 ± 12.1	68.2 ± 8.7	71.2 ± 6.6
ALT	U/L	29.8 ± 4.5	31.1 ± 3.5	33.8 ± 6.7	38.4 ± 13.3	29.7 ± 6.1	28.7 ± 5.8
ALP	U/L	268.6 ± 28.0	279.6 ± 39.7	300.1 ± 68.1	286.0 ± 44.8	248.2 ± 36.8	258.5 ± 46.4
T-Bil	mg/dL	0.054 ± 0.007	0.050 ± 0.011	0.054 ± 0.008	0.053 ± 0.011	0.058 ± 0.008	0.053 ± 0.008
Glc	mg/dL	167.6 ± 21.9	162.9 ± 29.6	158.0 ± 14.8	158.0 ± 11.7	169.0 ± 22.8	164.2 ± 15.5

mean ± S.D. Significant differences from the 0 ppm group [Dunnett's test (parametric); * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001]

28.5 ppm以上の群で、クレアチニンの有意な低値が認められた。900 ppm群で尿素窒素及び無機リンの有意な高値が認められた。

GKラット及びWistarラットの相対臓器重量を表11及び12に示す。

<表 11 GK rat : 相対臓器重量>

Group		0 ppm	9 ppm	28.5 ppm	90 ppm	285 ppm	900 ppm
No. of Samples		10	10	10	10	10	10
Body weight	g	335.76 ± 14.97	332.33 ± 18.58	323.92 ± 22.11	330.25 ± 14.78	323.70 ± 15.89	275.69 ± 17.60 ***
Brain	%	0.56 ± 0.02	0.56 ± 0.03	0.58 ± 0.03	0.56 ± 0.02	0.59 ± 0.02	0.67 ± 0.04 ***
Thymus	%	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.03
Lung	%	0.31 ± 0.02	0.32 ± 0.03	0.32 ± 0.02	0.35 ± 0.03 *	0.33 ± 0.05	0.35 ± 0.04
Heart	%	0.32 ± 0.01	0.34 ± 0.03	0.32 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.35 ± 0.03	0.36 ± 0.05 *
Spleen	%	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.02
Liver	%	2.68 ± 0.11	2.75 ± 0.31	2.78 ± 0.17	2.89 ± 0.35	2.76 ± 0.05	2.92 ± 0.20
Salivary glands	%	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01
Adrenal glands	%	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Kidneys	%	0.67 ± 0.03	0.71 ± 0.08	0.73 ± 0.06	0.81 ± 0.12 ***	0.87 ± 0.03 ***	1.02 ± 0.07 ***
Testes	%	0.71 ± 0.06	0.74 ± 0.06	0.80 ± 0.10 *	0.72 ± 0.06	0.76 ± 0.05	0.65 ± 0.10

mean ± S.D. Significant differences from the 0 ppm group [Dunnett's test (parametric); * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001]

90 ppm以上の群で、相対腎臓重量の有意な高値が認められた。900 ppm群で、相対精巣重量(左)の有意な低値が認められた。

<表 12 Wistar rat : 相対臓器重量>

Group		0 ppm	9 ppm	28.5 ppm	90 ppm	285 ppm	900 ppm
No. of Samples		10	10	10	10	10	6
Body weight	g	483.53 ± 22.56	452.58 ± 27.83	457.39 ± 29.58	452.73 ± 34.94	456.61 ± 32.51	376.56 ± 44.40 ***
Brain	%	0.43 ± 0.03	0.46 ± 0.02	0.47 ± 0.03	0.47 ± 0.03	0.46 ± 0.04	0.55 ± 0.05 ***
Thymus	%	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01
Lung	%	0.31 ± 0.05	0.32 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.31 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.33 ± 0.04
Heart	%	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.02 *	0.30 ± 0.01 ***	0.30 ± 0.02 ***	0.33 ± 0.02 ***
Spleen	%	0.17 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.21 ± 0.02 ***
Liver	%	2.73 ± 0.29	2.75 ± 0.16	2.65 ± 0.16	2.79 ± 0.24	2.96 ± 0.16	3.02 ± 0.15 *
Salivary glands	%	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.00	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01
Adrenal glands	%	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Kidneys	%	0.54 ± 0.03	0.56 ± 0.04	0.58 ± 0.03	0.62 ± 0.03 *	0.81 ± 0.09 ***	1.07 ± 0.12 ***
Testes	%	0.69 ± 0.10	0.77 ± 0.03	0.74 ± 0.04	0.78 ± 0.07 *	0.74 ± 0.09	0.82 ± 0.08 **

mean ± S.D. Significant differences from the 0 ppm group [Dunnett's test (parametric); * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001]

28.5 ppm以上の群で相対心臓重量, 90 ppm以上の群で相対腎臓重量の有意な高値がそれぞれ認められた。

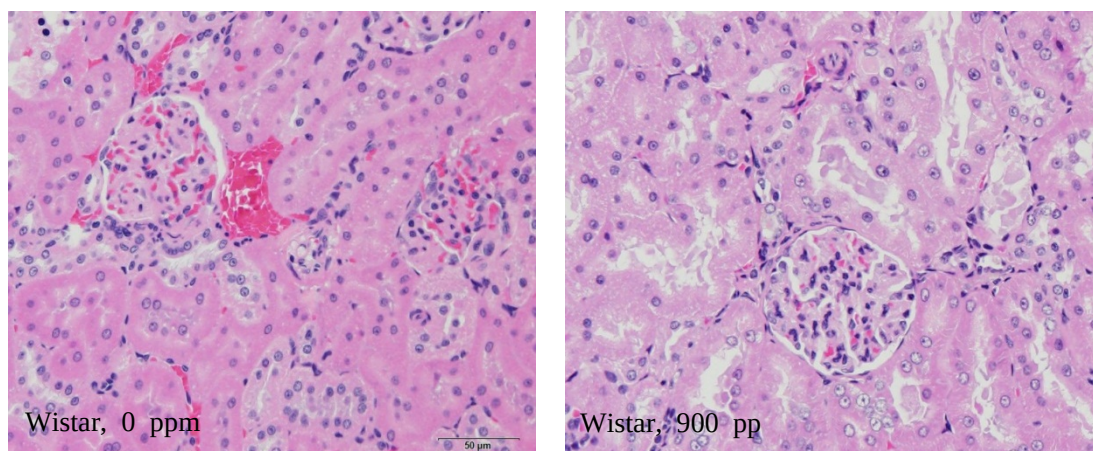
<表 13 血液学的検査, 血液化学的検査及び臓器重量結果のまとめ>

Concentration (ppm)	9	28.5	90	285	900	Concentration (ppm)	9	28.5	90	285	900
GK rats						Wistar rats					
Body Weight	-	-	-	-	↓	Body Weight	-	-	-	↓	↓
Urinalysis	-	-	-	-	-	Urinalysis	-	-	-	-	-
Hematology						Hematology					
RBC	-	-	-	↓	↓	RBC	-	-	↓	↓	↓
Hb	-	-	-	↓	↓	Hb	-	-	↓	↓	↓
Ht	-	-	-	↓	↓	Ht	-	-	↓	↓	↓
Blood Chemistry						Blood Chemistry					
UN	-	-	-	-	↑	UN	-	-	-	-	↑
Creatinine	-	-	-	↓	↓	Creatinine	-	↓	↓	↓	↓
IP	-	-	-	-	-	IP	-	-	-	-	↑
Relative Organ Weight						Relative Organ Weight					
Heart	-	-	-	-	↑	Heart	-	↑	↑	↑	↑
Kidneys	-	-	↑	↑	↑	Kidneys	-	-	↑	↑	↑

病理組織学的評価の実施前までに得られた血液学的検査, 血液化学的検査及び臓器重量結

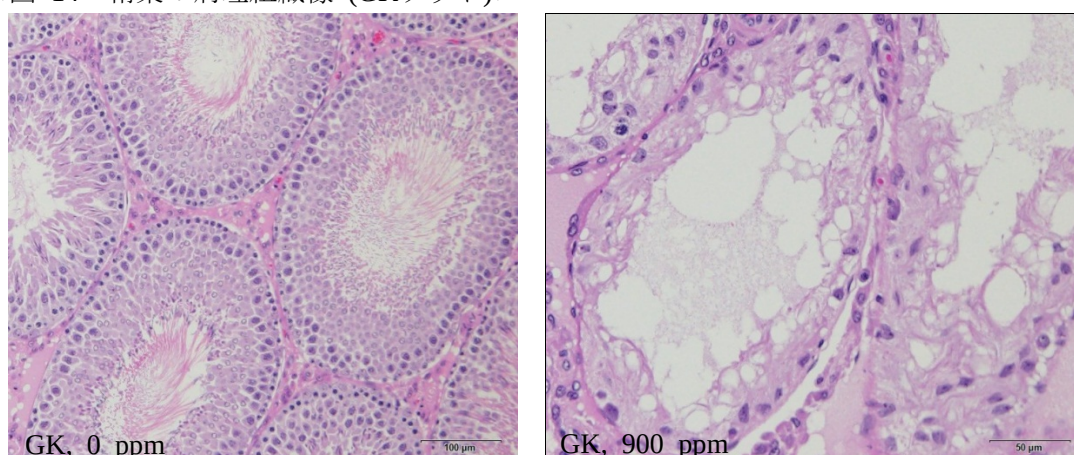
果を表13に示す。3-MCPDの暫定的なNOAELは、糖尿病モデル動物のGKラットでは28.5 ppm、健常動物であるWistarラットでは9 ppmであり、これらNOAELの差は10倍未満であった。

<図 13 腎臓の病理組織像 (Wistarラット)>



900 ppm群の病理組織学的検査では、腎臓の尿細管の拡張及び硝子円柱の増加が認められ、GK及びWistarともに同様の所見であった。

<図 14 精巣の病理組織像 (GKラット)>



Wistarラットの900 ppm群では、精巣の精上皮の変性と精細管萎縮が1例に認められたが、GKラットでは片側又は両側性の精子形成低下、精上皮の変性及び精細管萎縮が9例に認められ、精巣上体管上皮細胞の単細胞壊死及び管腔の精子消失も併せて認められた。

今後、285 ppm以下の群の病理組織像についての検索を進め、最終的なNOAELを検討する。

(2) 研究項目名：高脂血症ラットの毒性感受性

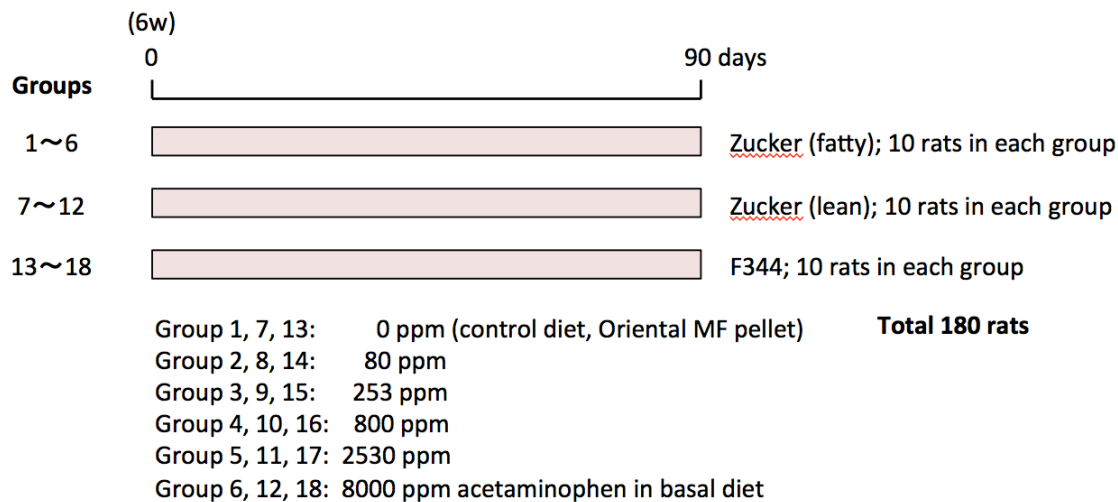
(研究担当者名：豊田 武士 所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所病理部)

1) 個別課題名：高脂血症ラットの毒性評価

持続的な高血糖を伴わない高脂血症モデルであるZucker (Cr1j:ZUC-*Lepr*^{fa}) ラットを用いて、共通の被験物質としてアセトアミノフェンを無処置対照群を含めて6段階で用量設定し、90日間反復投与毒性試験を行った。対照となる健常動物は、疾患モデルのヘテロ接合体型ならびに野生型個体 (Lean)、およびF344ラットを用い、同様に6段階の用量設定で検討した (図

14)。

<図 14 実験デザイン>



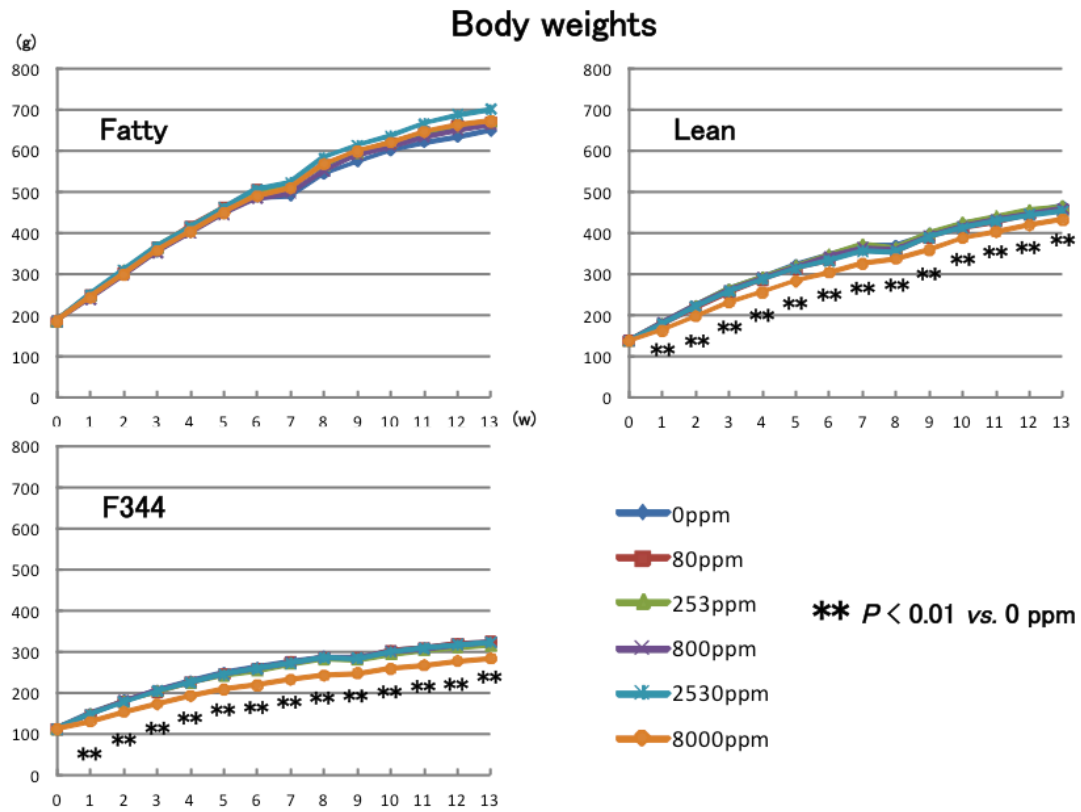
被験物質の選定および用量の設定基準は、研究項目 1. と同様である。F344ラットを用いたアセトアミノフェンの13週間反復経口投与試験において、800 ppmで肝および精巣の相対重量増加が見られていることから、800 ppmを中間用量とし、公比 $\sqrt{10}$ (約3.16) で0, 80, 253, 800, 2530, 8000 ppmの6群を設定した。Zuckerラットはホモ接合体 (fa/fa) をもつ個体 (Fatty) が高脂血症を伴う肥満を呈する一方、対照となるLean (ヘテロ接合体型 (fa/+) ならびに野生型 (+/+) を含む) は正常の発育を示す。本研究では追加の対照群としてF344ラットを用い、同様に6段階の用量設定で検討した。最終的に疾患モデル動物 (Fatty) と健常動物 (LeanおよびF344) との間にNOAELの違いがあるか、あるとすればその程度について総合的に判断し、不確実係数の妥当性を検討した。

検討項目として、投与期間中は一般状態および死亡動物の有無を毎日観察した。動物は投与期間終了後に深麻酔下で開腹し、腹部大動脈から採血を行った。血液学的検査として、白血球数 (WBC)、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) および血小板数 (PLT) を測定した。血清生化学的検査として、総蛋白質 (TP)、アルブミン (Alb)、トリグリセリド (TG)、総コレステロール (T-Cho)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cre)、ナトリウム (Na)、塩素 (Cl)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、無機リン (IP)、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) および γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GTP) を測定した。採血後動物を放血死させ、剖検を実施するとともに脳、胸腺、肺、心、脾、肝、副腎、腎および精巣を摘出し、重量を測定した。上記の器官に加え、鼻腔、眼球、下垂体、脊髄、甲状腺および上皮小体、気管、胸部大動脈、唾液腺、舌、食道、胃、その他消化管、腸間膜リンパ節、膵、精巣上体、前立腺、精囊、膀胱、皮膚、乳腺、骨および骨髓を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液で、また精巣のみブアン液で固定した。固定臓器を常法に従ってパ

ラフィンに包埋後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、対照群と最高用量群について病理組織学的検査を行った。最高用量群に変化のある臓器については、すべての群について検討を加えた。なお、今回の研究では、特に重要な臓器と思われる肝および腎について、すべての群で病理組織学的検査を行った。

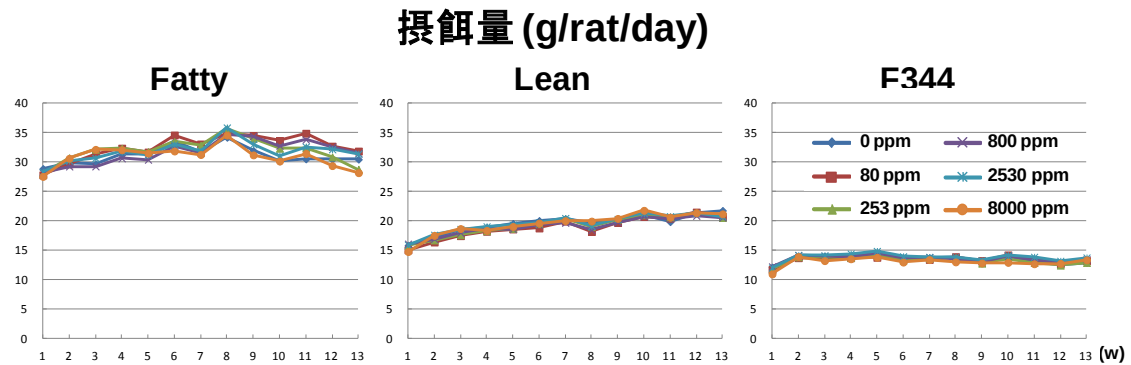
被験物質として用いたアセトアミノフェンはSIGMA社より購入し、各用量になるようにオリエンタル酵母株式会社に固形飼料（基礎飼料：MF）の作製を依頼した。Zuckerラット（FattyならびにLean）およびF344ラット（雄、5週齢）は、それぞれ60匹ずつ日本チャールス・リバー株式会社より購入し、1週間の馴化期間後、6週齢の時点で実験を開始した。LeanおよびF344ラットは3～4匹ずつ、Fattyラットは2匹ずつケージに入れ、体重および摂餌量を週1回測定した。実験期間中におけるラットの平均体重および摂餌量の推移を以下に示す。

<図 15 体重の推移>



実験開始後1週目以降、LeanおよびF344ラットの最高用量群（8000 ppm群）の体重増加量は、対照群（0 ppm群）と比べて有意に低かった。一方、Fattyラットでは各群間で有意差は認められなかった。

<図 16 摂餌量の推移>



実験期間を通じて、いずれのラットにおいても、群間での摂餌量の顕著な変化は認められなかった。各週ごとの平均体重と摂餌量から算出したアセトアミノフェン摂取量は、投与濃度に比例して増加を示した。

<表 14 剖検時の体重と臓器重量 (Zuckerラット) >

Body weights and relative organ weights (Zucker)

	0 ppm	80 ppm	253 ppm	800 ppm	2530 ppm	8000 ppm
Fatty						
Body weight (g)	628.3 ± 59.6	647.2 ± 52.1	652.6 ± 59.3	649.4 ± 61.5	678.3 ± 34.0	657.0 ± 57.1
Brain	0.294 ± 0.025	0.294 ± 0.019	0.288 ± 0.029	0.290 ± 0.024	0.279 ± 0.026	0.283 ± 0.030
Thymus	0.042 ± 0.013	0.042 ± 0.012	0.043 ± 0.009	0.042 ± 0.012	0.047 ± 0.007	0.045 ± 0.007
Lungs	0.175 ± 0.026	0.167 ± 0.028	0.177 ± 0.042	0.160 ± 0.041	0.177 ± 0.025	0.167 ± 0.036
Heart	0.206 ± 0.021	0.208 ± 0.025	0.200 ± 0.019	0.204 ± 0.029	0.195 ± 0.014	0.201 ± 0.018
Spleen	0.114 ± 0.036	0.106 ± 0.015	0.105 ± 0.018	0.106 ± 0.027	0.100 ± 0.018	0.097 ± 0.015
Liver	3.877 ± 1.014	4.687 ± 1.078	3.929 ± 1.040	4.149 ± 0.716	3.909 ± 0.905	3.755 ± 0.439
Adrenals	0.009 ± 0.002	0.009 ± 0.001	0.007 ± 0.002	0.008 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.008 ± 0.001
Kidneys	0.566 ± 0.101	0.584 ± 0.100	0.545 ± 0.126	0.548 ± 0.102	0.544 ± 0.063	0.574 ± 0.090
Testes	0.431 ± 0.092	0.479 ± 0.054	0.483 ± 0.061	0.453 ± 0.061	0.439 ± 0.057	0.385 ± 0.092
Lean						
Body weight (g)	450.6 ± 15.4	438.2 ± 25.3	449.6 ± 14.0	443.9 ± 15.7	438.8 ± 21.6	418.9 ± 26.0**
Brain	0.435 ± 0.024	0.467 ± 0.030	0.463 ± 0.029	0.465 ± 0.013	0.464 ± 0.031	0.482 ± 0.036**
Thymus	0.070 ± 0.008	0.066 ± 0.015	0.077 ± 0.008	0.073 ± 0.010	0.065 ± 0.012	0.069 ± 0.011
Lungs	0.265 ± 0.040	0.282 ± 0.038	0.262 ± 0.043	0.288 ± 0.045	0.248 ± 0.046	0.289 ± 0.065
Heart	0.258 ± 0.022	0.262 ± 0.021	0.264 ± 0.012	0.266 ± 0.016	0.263 ± 0.022	0.264 ± 0.028
Spleen	0.130 ± 0.024	0.125 ± 0.014	0.130 ± 0.018	0.124 ± 0.009	0.121 ± 0.018	0.122 ± 0.015
Liver	2.659 ± 0.196	2.695 ± 0.227	2.640 ± 0.192	2.638 ± 0.165	2.668 ± 0.141	2.781 ± 0.130
Adrenals	0.009 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.010 ± 0.001	0.010 ± 0.001**	0.008 ± 0.001
Kidneys	0.601 ± 0.023	0.624 ± 0.062	0.607 ± 0.060	0.604 ± 0.046	0.589 ± 0.022	0.635 ± 0.049
Testes	0.693 ± 0.039	0.708 ± 0.061	0.735 ± 0.046	0.749 ± 0.050	0.740 ± 0.058	0.664 ± 0.118

Each value represents the mean ± S.D.

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

Zuckerラットの剖検時体重および相対臓器重量を示す。Leanラットでは、対照群 (0 ppm群) と比べて、8000 ppm群において脳の相対重量が有意に増加した。一方Fattyラットでは、いずれの項目においても有意な変化は認められなかった。

<表 15 剖検時の体重と臓器重量 (F344ラット) >

Body weights and relative organ weights (F344)

	0 ppm	80 ppm	253 ppm	800 ppm	2530 ppm	8000 ppm
F344						
Body weight (g)	313.5 ± 9.7	314.0 ± 9.9	305.3 ± 10.7	312.4 ± 9.8	312.6 ± 14.4	275.0 ± 16.4**
Brain	0.609 ± 0.024	0.646 ± 0.088	0.641 ± 0.019	0.625 ± 0.027	0.622 ± 0.025	0.701 ± 0.043**
Thymus	0.067 ± 0.017	0.059 ± 0.006	0.061 ± 0.013	0.066 ± 0.011	0.065 ± 0.009	0.062 ± 0.005
Lungs	0.281 ± 0.022	0.273 ± 0.021	0.276 ± 0.032	0.292 ± 0.042	0.283 ± 0.021	0.290 ± 0.037
Heart	0.274 ± 0.009	0.276 ± 0.010	0.296 ± 0.024**	0.286 ± 0.016	0.284 ± 0.008	0.298 ± 0.015**
Spleen	0.194 ± 0.010	0.196 ± 0.008	0.199 ± 0.012	0.198 ± 0.006	0.195 ± 0.008	0.182 ± 0.010*
Liver	2.243 ± 0.087	2.270 ± 0.070	2.349 ± 0.125	2.270 ± 0.084	2.355 ± 0.094	2.595 ± 0.167**
Adrenals	0.011 ± 0.002	0.011 ± 0.002	0.012 ± 0.002	0.012 ± 0.002	0.011 ± 0.001	0.012 ± 0.002
Kidneys	0.583 ± 0.033	0.593 ± 0.047	0.610 ± 0.043	0.585 ± 0.048	0.588 ± 0.017	0.636 ± 0.036*
Testes	0.915 ± 0.059	0.953 ± 0.034	0.985 ± 0.034*	0.940 ± 0.084	0.959 ± 0.044	1.008 ± 0.054**

Each value represents the mean ± S.D.

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

F344ラットの剖検時体重および相対臓器重量を示す。対照群と比較し、8000 ppm群において脳・心・肝・腎および精巣の相対重量が有意に増加し、脾臓の相対重量は有意に低下していた。

<表 16 血液学・血清生化学的検索および臓器重量による結果のまとめ>

Temporary adverse effects

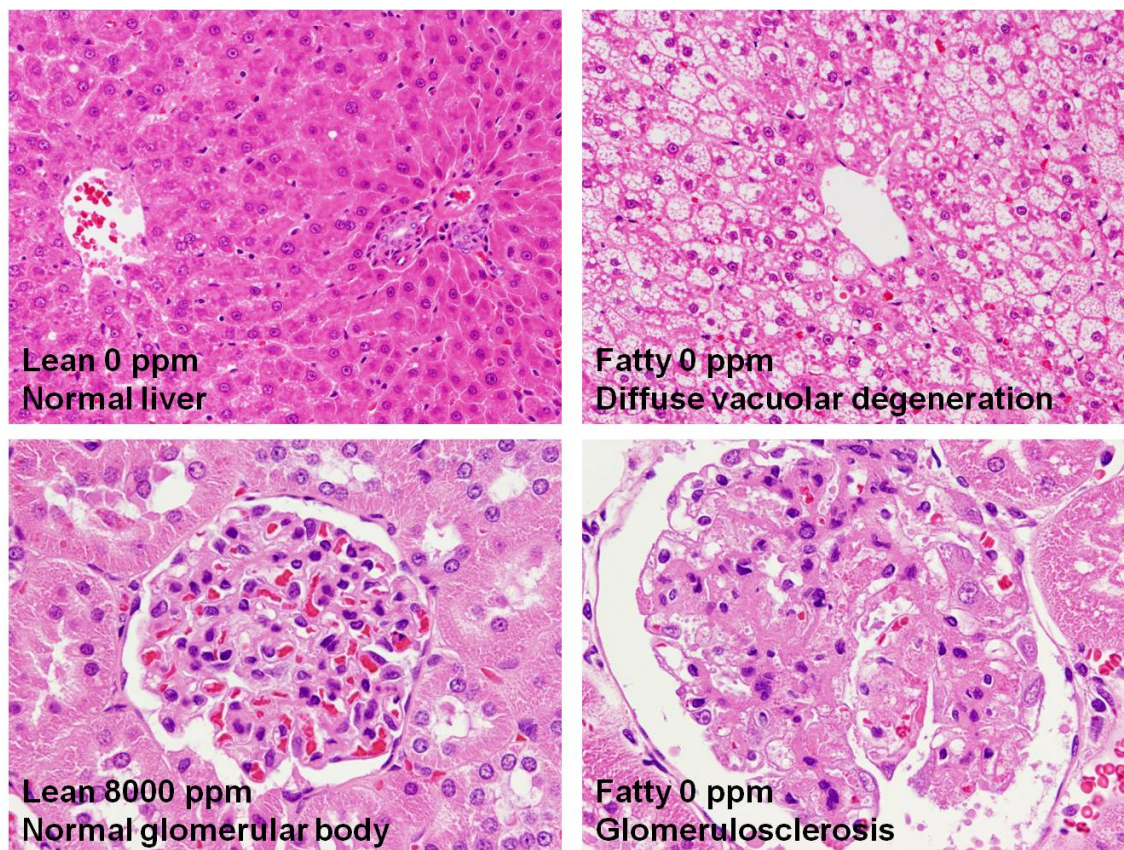
	80	253	800	2530	8000 ppm
Fatty					
Body weight	-	-	-	-	-
Relative organ weights	-	-	-	-	-
Blood test	-	-	-	-	-
Biochemical test					
T-Chol	-	-	-	-	-
TG	-	-	-	-	-
Lean					
Body weight	-	-	-	-	↓
Relative organ weights					
Brain	-	-	-	-	↑
Blood test					
MCV	-	-	-	-	↑
MCH	-	-	-	-	↑
Biochemical test					
T-Chol	-	-	-	-	↓
TG	-	-	-	-	-

	80	253	800	2530	8000 ppm
F344					
Body weight	-	-	-	-	↓
Relative organ weights					
Brain	-	-	-	-	↑
Heart	-	-	-	-	↑
Spleen	-	-	-	-	↓
Liver	-	-	-	-	↑
Kidneys	-	-	-	-	↑
Testes	-	-	-	-	↑
Blood test					
MCV	-	-	-	-	↑
MCH	-	-	-	-	↑
Biochemical test					
T-Chol	-	-	-	-	↑
TG	-	-	-	-	-
Cre	-	-	-	-	↓
AST	-	-	-	-	↓
ALT	-	-	-	-	↓

病理組織学的評価の実施前までに得られた、血液学・血清生化学的検索および臓器重量による結果をまとめると、LeanおよびF344ラットの8000 ppm群において、体重増加抑制および

臓器重量の変動など、各パラメータの異常値が認められた（暫定NOAELは2530 ppm）。Fattyラットにおいては、肥満モデルの指標として体重・T-Chol・TGがLeanおよびF344ラットと比較して顕著な高値を示したが、アセトアミノフェン投与による影響は認められなかった（暫定NOAELは8000 ppm以上）。以上より、病理組織学的評価を除いたデータでは、高脂血症モデル動物と健常動物とでは、アセトアミノフェンの暫定的なNOAELの差は10倍未満であった。

<図 17 肝臓および腎臓の組織像>



<表 17 病理組織学的評価のまとめ (Fatty) >

Table. Histopathological findings for male Zucker (fatty) rats treated with acetaminophen for 13 weeks.

		Dose (ppm)	0	80	253	800	2530	8000
Organs and findings		No. of animals	10	10	10	10	10	10
Liver	Microgranuloma		1	0	3	0	0	1
	Vacuolar degeneration, moderate		4	4	6	3	6	5
	Vacuolar degeneration, severe		5	6	4	7	4	3
	Necrosis, focal		0	1	0	0	0	0
Kidney	Glomerulosclerosis, focal		7	6	5	5	7	6
	Regenerative tubules		7	9	7	7	8	8
	Inflammation, interstitial, focal		2	2	2	1	3	1
	Hyaline cast		9	10	8	8	9	10
	Mineralization		8	4	5	4	6	3
	Dilation of pelvis		0	0	1	0	2	0
	Pyelonephritis		0	0	1	0	0	0
	Papillary necrosis		0	0	1	0	0	1
	Mononuclear cell infiltration, focal		1	-	-	-	-	0
	Osseous metaplasia		1	-	-	-	-	0
Pancreas	Mononuclear cell infiltration, focal		1	-	-	-	-	2
Testis	Degeneration/atrophy, tubular, unilateral		2	-	-	-	-	1
	Degeneration/atrophy, tubular, bilateral		2	-	-	-	-	4
	Dilation, tubular, unilateral		1	-	-	-	-	0
Epididymis	Increase of cell debris		3	-	-	-	-	4
	Atrophy, ductal		4	-	-	-	-	3
	Sperm granuloma		1	-	-	-	-	1
Prostate	Mononuclear cell infiltration, focal		4	-	-	-	-	9
	Atrophy		1	-	-	-	-	0

:- Not evaluated.

Fattyラットの肝臓では、肝細胞のび慢性空胞変性が中等度～高度に認められた（脂肪肝）（図17上段）。また、腎臓における自然発生病変として糸球体の硬化（図17下段）、再生性尿細管および尿円柱が高い頻度で観察されたが、アセトアミノフェン投与による影響は認められなかった。

<表 18 病理組織学的評価のまとめ (Lean) >

Table. Histopathological findings for male Zucker (lean) rats treated with acetaminophen for 13 weeks.

		Dose (ppm)	0	80	253	800	2530	8000
Organs and findings		No. of animals	10	10	10	10	10	10
Liver	Microgranuloma		7	5	5	6	3	5
	Hepatocellular hypertrophy, centrilobular		0	0	0	0	0	1
Kidney	Regenerative tubules		1	1	1	1	0	0
	Inflammation, interstitial, focal		1	2	1	1	4	0
	Hyaline cast		1	1	2	3	1	0
	Mineralization		0	1	0	0	0	0
	Dilation of pelvis		1	0	2	0	1	0
	Cyst		0	0	1	0	0	1
	Papillary necrosis		0	1	0	0	0	0
Heart	Mononuclear cell infiltration, focal		1	-	-	-	-	0
Lung	Osseous metaplasia		1	-	-	-	-	1
Pancreas	Mononuclear cell infiltration, focal		0	-	-	-	-	1
Testis	Degeneration/atrophy, tubular, unilateral		2	-	-	-	-	1
	Dilation, tubular, unilateral		1	-	-	-	-	0
Epididymis	Increase of cell debris		2	-	-	-	-	1
	Atrophy, ductal		1	-	-	-	-	1
	Sperm granuloma		2	-	-	-	-	0
Prostate	Mononuclear cell infiltration, focal		7	-	-	-	-	9
Harderian gland	Mononuclear cell infiltration, focal		0	-	-	-	-	4

:- Not evaluated.

Leanラットでは、8000 ppm群の1例の肝臓に小葉中心性肝細胞肥大が観察された。その他の所見について、アセトアミノフェン投与による影響は認められなかった。

<表 19 病理組織学的評価のまとめ (F344) >

Table. Histopathological findings for male F344 rats treated with acetaminophen for 13 weeks.

		Dose (ppm)	0	80	253	800	2530	8000
Organs and findings		No. of animals	10	10	10	10	10	10
Liver	Microgranuloma		4	2	3	2	3	3
	Hepatocellular hypertrophy, centrilobular		0	0	0	0	0	1
Kidney	Regenerative tubules		0	1	2	0	0	1
	Inflammation, interstitial, focal		1	2	1	1	0	2
	Hyaline cast		0	0	0	1	0	0
	Mineralization		1	0	1	0	0	2
	Mononuclear cell infiltration, focal		5	-	-	-	-	3
Pancreas	Mononuclear cell infiltration, focal		1	-	-	-	-	1
Tongue	Inflammation, focal, mild		0	-	-	-	-	1
Testis	Degeneration/atrophy, tubular, unilateral		1	-	-	-	-	0
	Degeneration/atrophy, tubular, bilateral		1	-	-	-	-	0
Epididymis	Increase of cell debris		2	-	-	-	-	1
Prostate	Mononuclear cell infiltration, focal		3	-	-	-	-	5
	Atrophy		0	-	-	-	-	2

:- Not evaluated.

F344ラットでは、8000 ppm群の1例の肝臓に小葉中心性肝細胞肥大が観察された。その他の所見について、アセトアミノフェン投与による影響は認められなかった。

<表 20 血液学・血清生化学的検索、臓器重量および病理組織学的評価のまとめ>

Adverse effects

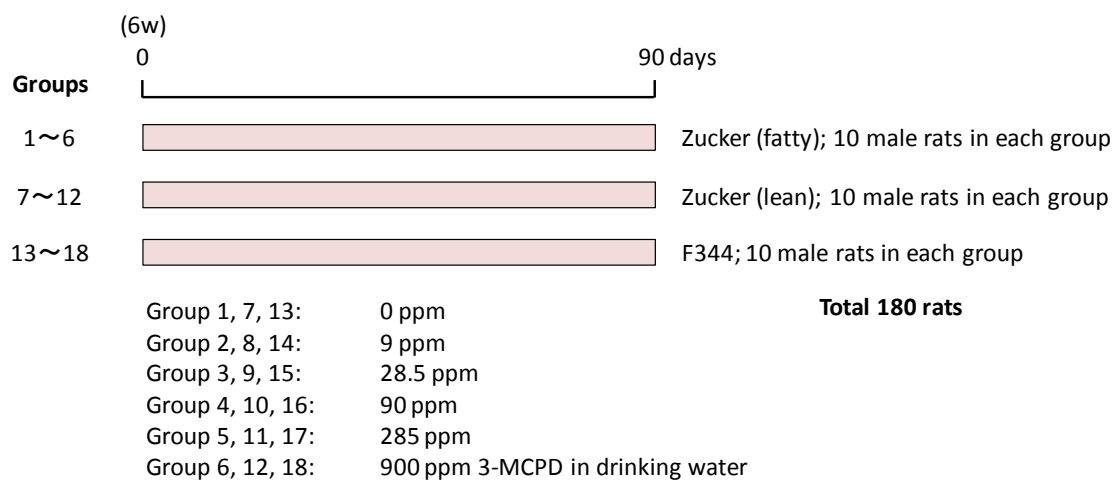
Dose (ppm)	80	253	800	2530	8000	Dose (ppm)	80	253	800	2530	8000
Fatty						F344					
Body weight	-	-	-	-	-	Body weight	-	-	-	-	↓
Relative organ weights	-	-	-	-	-	Relative organ weights					
Hematology	-	-	-	-	-	Brain	-	-	-	-	↑
Serum biochemistry						Heart	-	-	-	-	↑
T-Chol	-	-	-	-	-	Spleen	-	-	-	-	↓
TG	-	-	-	-	-	Liver	-	-	-	-	↑
Histopathology	-	-	-	-	-	Kidneys	-	-	-	-	↑
Lean						Testes	-	-	-	-	↑
Body weight	-	-	-	-	↓	Hematology					
Relative organ weights						MCV	-	-	-	-	↑
Brain	-	-	-	-	↑	MCH	-	-	-	-	↑
Hematology						Serum biochemistry					
MCV	-	-	-	-	↑	T-Chol	-	-	-	-	↑
MCH	-	-	-	-	↑	TG	-	-	-	-	-
Serum biochemistry						Cre	-	-	-	-	↓
T-Chol	-	-	-	-	↓	AST	-	-	-	-	↓
TG	-	-	-	-	-	ALT	-	-	-	-	↓
Histopathology	-	-	-	-	-	Histopathology	-	-	-	-	-

病理組織学的評価による検討では、いずれのラットにおいても、アセトアミノフェン投与による有意な影響は認められなかった。

以上の結果から、アセトアミノフェンのNOAELはLeanおよびF344ラットでは2530 ppm、Fattyラットでは8000 ppm以上と判断された。したがって、高脂血症モデル動物と健常動物とのNOAELの差は約3.2倍であり、現行の不確実係数（x10）の範囲内に収まることが示された。

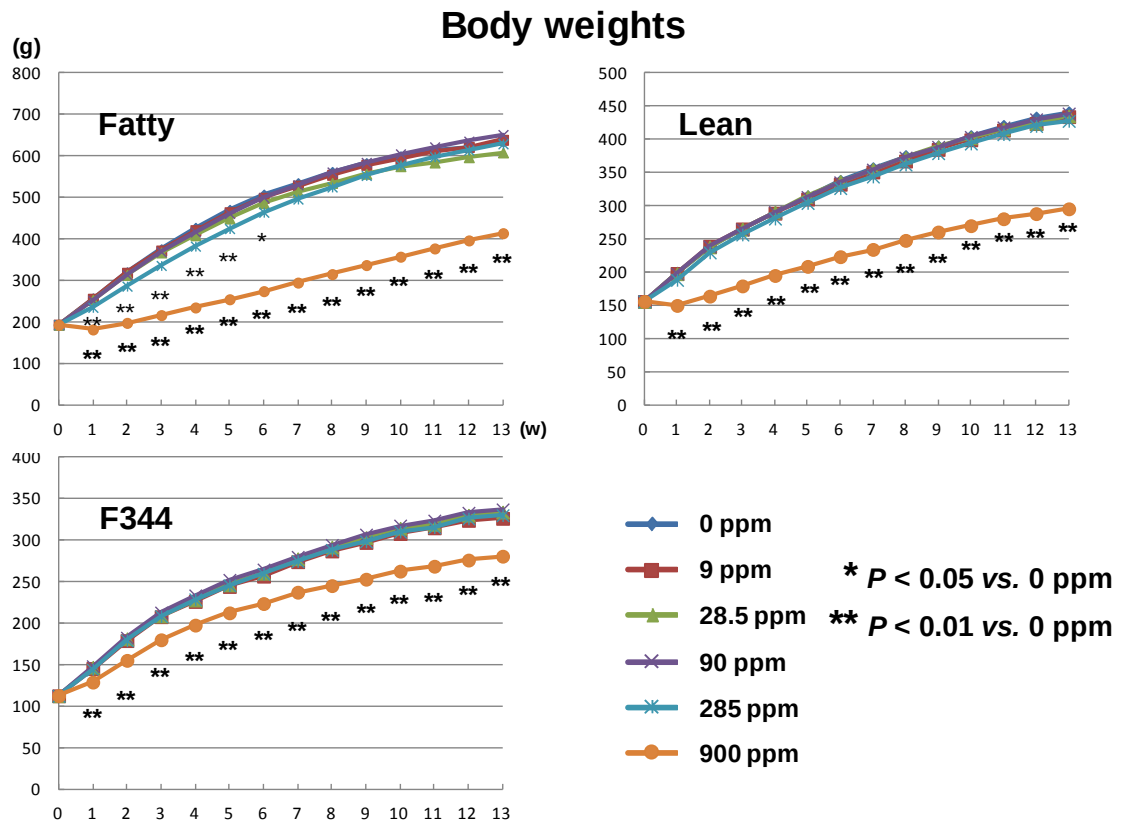
平成25年度は、3-MCPDについて検討を行った。3-MCPDは、酸加水分解植物性タンパクなどに含まれており、ラットの13週間反復投与試験において、9 mg/kg bw/dayで腎臓相対重量の増加が観察されている。その用量に相当する90 ppmを中間用量として、公比 $\sqrt{10}$ （約3.16）で0, 9, 28.5, 90, 285, 900 ppmの用量で飲水投与し、高脂血症モデル動物と健常動物のNOAELの差を同様に比較検討した。

<図 18 実験デザイン>



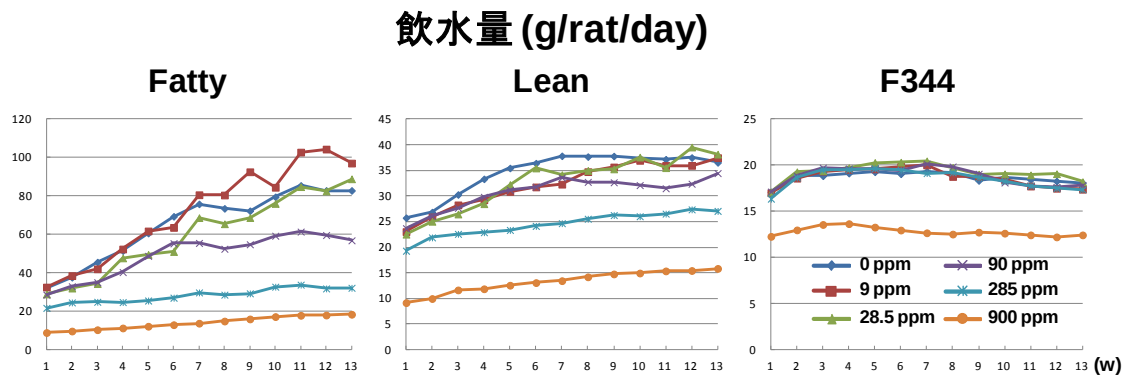
実験方法および検索項目は、アセトアミノフェンの場合と同様である。被験物質として用いた3-MCPDは、和光純薬工業株式会社より購入した。Zuckerラット（FattyならびにLean）およびF344ラット（雄、5週齢）は、それぞれ60匹ずつ日本チャールス・リバー株式会社より購入し、1週間の馴化期間後、6週齢の時点で実験を開始した。LeanおよびF344ラットは3~4匹ずつ、Fattyラットは2匹ずつケージに入れ、体重を週1回測定し、週2回飲水の交換ならびに飲水量測定を行った。実験期間中におけるラットの平均体重および飲水量の推移を以下に示す。

<図 19 体重の推移>



実験開始後1週目以降、すべてのラットの最高用量群（900 ppm群）の体重増加量は、対照群と比べて有意に低かった。Fattyラットでは、285 ppm群でも1～6週目にかけて有意な体重増加抑制が認められた。

＜図 20 飲水量の推移＞



3-MCPD 摂取量 (mg/kg bw/day)

Fatty		Lean		F344	
9 ppm	1.3	9 ppm	0.9	9 ppm	0.7
28.5 ppm	3.5	28.5 ppm	2.8	28.5 ppm	2.2
90 ppm	9.0	90 ppm	8.3	90 ppm	6.7
285 ppm	17.9	285 ppm	21.7	285 ppm	21.3
900 ppm	42.5	900 ppm	52.2	900 ppm	54.0

実験期間を通じて、すべてのラットの900 ppm群で飲水量の顕著な低下が認められた。Fatty およびLeanラットでは、285 ppm群の飲水量も対照群と比べて低く、90 ppm群でも7-8週目以降に低下する傾向がみられた。各群の3-MCPD摂取量は、概ね投与濃度に比例して増加したが、900 ppm群では飲水量の低下を反映しやや低い値となった。

<表 21 剖検時の体重と臓器重量 (Zuckerラット) >

Body weights and relative organ weights (Zucker)

	0 ppm	9 ppm	28.5 ppm	90 ppm	285 ppm	900 ppm
Fatty						
Body weight (g)	616.9 ± 36.4	616.3 ± 50.7	587.3 ± 75.7	633.8 ± 62.6	617.2 ± 47.5	408.5 ± 76.9**
Brain	0.310 ± 0.019	0.309 ± 0.029	0.325 ± 0.047	0.304 ± 0.035	0.307 ± 0.024	0.455 ± 0.090**
Thymus	0.040 ± 0.011	0.040 ± 0.012	0.039 ± 0.011	0.041 ± 0.006	0.045 ± 0.014	0.037 ± 0.012
Lungs	0.164 ± 0.029	0.167 ± 0.032	0.175 ± 0.022	0.164 ± 0.018	0.175 ± 0.024	0.171 ± 0.050
Heart	0.217 ± 0.011	0.217 ± 0.018	0.228 ± 0.027	0.216 ± 0.028	0.213 ± 0.015	0.251 ± 0.024**
Spleen	0.108 ± 0.012	0.109 ± 0.014	0.111 ± 0.015	0.115 ± 0.012	0.108 ± 0.012	0.108 ± 0.006
Liver	4.803 ± 0.437	4.892 ± 0.914	4.718 ± 0.537	4.719 ± 0.576	4.498 ± 0.986	3.221 ± 0.291**
Adrenals	0.010 ± 0.002	0.010 ± 0.001	0.010 ± 0.002	0.008 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.012 ± 0.002*
Kidneys	0.602 ± 0.090	0.649 ± 0.122	0.666 ± 0.145	0.701 ± 0.133	0.787 ± 0.108**	0.977 ± 0.109**
Testes	0.494 ± 0.050	0.523 ± 0.053	0.498 ± 0.117	0.522 ± 0.102	0.506 ± 0.073	0.722 ± 0.117**
Lean						
Body weight (g)	428.8 ± 48.4	425.2 ± 20.9	423.1 ± 37.9	425.2 ± 43.9	417.1 ± 26.9	293.2 ± 33.7**
Brain	0.468 ± 0.053	0.471 ± 0.029	0.487 ± 0.039	0.480 ± 0.033	0.483 ± 0.027	0.668 ± 0.065**
Thymus	0.069 ± 0.014	0.069 ± 0.013	0.067 ± 0.012	0.068 ± 0.007	0.074 ± 0.010	0.076 ± 0.012
Lungs	0.302 ± 0.026	0.269 ± 0.029	0.239 ± 0.025**	0.255 ± 0.043*	0.272 ± 0.062	0.337 ± 0.039
Heart	0.280 ± 0.025	0.273 ± 0.012	0.275 ± 0.018	0.275 ± 0.016	0.300 ± 0.031	0.348 ± 0.048**
Spleen	0.123 ± 0.018	0.123 ± 0.007	0.126 ± 0.007	0.127 ± 0.011	0.132 ± 0.014	0.155 ± 0.012**
Liver	2.685 ± 0.357	2.630 ± 0.096	2.616 ± 0.277	2.717 ± 0.308	2.859 ± 0.127	2.780 ± 0.143
Adrenals	0.010 ± 0.001	0.010 ± 0.002	0.010 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.013 ± 0.002**
Kidneys	0.650 ± 0.057	0.635 ± 0.039	0.663 ± 0.044	0.715 ± 0.046	0.877 ± 0.047**	1.120 ± 0.121**
Testes	0.795 ± 0.112	0.760 ± 0.146	0.792 ± 0.139	0.777 ± 0.143	0.755 ± 0.078	1.020 ± 0.145**

Values are mean ± S.D. * and **: Significantly different from the controls at $p < 0.05$ and 0.01 , respectively.

Zuckerラットの剖検時体重および相対臓器重量を示す。Fattyラットでは、対照群 (0 ppm) と比べて、脳・心・副腎・精巣重量の増加および肝重量の低下が900 ppm群で認められた。また、腎相対重量は285 ppm以上の群で有意に増加した。Leanラットでは、脳・心・脾・副腎・精巣の増加が900 ppm群で、腎重量の増加が285 ppm以上の群で認められた。

<表 22 剖検時の体重と臓器重量 (F344ラット) >

Body weights and relative organ weights (F344)

	0 ppm	9 ppm	28.5 ppm	90 ppm	285 ppm	900 ppm
F344						
Body weight (g)	319.9 ± 9.7	315.5 ± 15.8	322.6 ± 8.0	325.4 ± 11.4	319.5 ± 11.0	271.2 ± 16.5**
Brain	0.617 ± 0.020	0.620 ± 0.028	0.613 ± 0.021	0.608 ± 0.017	0.625 ± 0.019	0.727 ± 0.045**
Thymus	0.058 ± 0.004	0.057 ± 0.008	0.057 ± 0.004	0.057 ± 0.004	0.058 ± 0.004	0.065 ± 0.006*
Lungs	0.300 ± 0.030	0.281 ± 0.027	0.275 ± 0.039	0.284 ± 0.038	0.309 ± 0.040	0.328 ± 0.050
Heart	0.286 ± 0.011	0.279 ± 0.010	0.286 ± 0.009	0.291 ± 0.007	0.299 ± 0.011*	0.324 ± 0.015**
Spleen	0.205 ± 0.013	0.196 ± 0.007	0.199 ± 0.005	0.200 ± 0.008	0.210 ± 0.007	0.226 ± 0.008**
Liver	2.371 ± 0.079	2.329 ± 0.100	2.385 ± 0.056	2.512 ± 0.161*	2.600 ± 0.086**	2.872 ± 0.145**
Adrenals	0.013 ± 0.002	0.012 ± 0.001	0.012 ± 0.002	0.012 ± 0.001	0.012 ± 0.002	0.013 ± 0.002
Kidneys	0.594 ± 0.021	0.588 ± 0.031	0.623 ± 0.038	0.655 ± 0.040**	0.737 ± 0.035**	0.956 ± 0.044**
Testes	0.976 ± 0.044	0.969 ± 0.039	0.948 ± 0.032	0.941 ± 0.040	0.977 ± 0.034	1.089 ± 0.068**

Values are mean ± S.D. * and **: Significantly different from the controls at $p < 0.05$ and 0.01 , respectively.

F344ラットの剖検時体重および相対臓器重量を示す。F344ラットでは、900 ppm群で脳・胸

腺・脾・精巣、285 ppm以上の群で心、90 ppm以上の群で肝・腎相対重量の有意な増加が認められた。

<表 23 血液学・血清生化学的検索および臓器重量のみによる結果のまとめ>

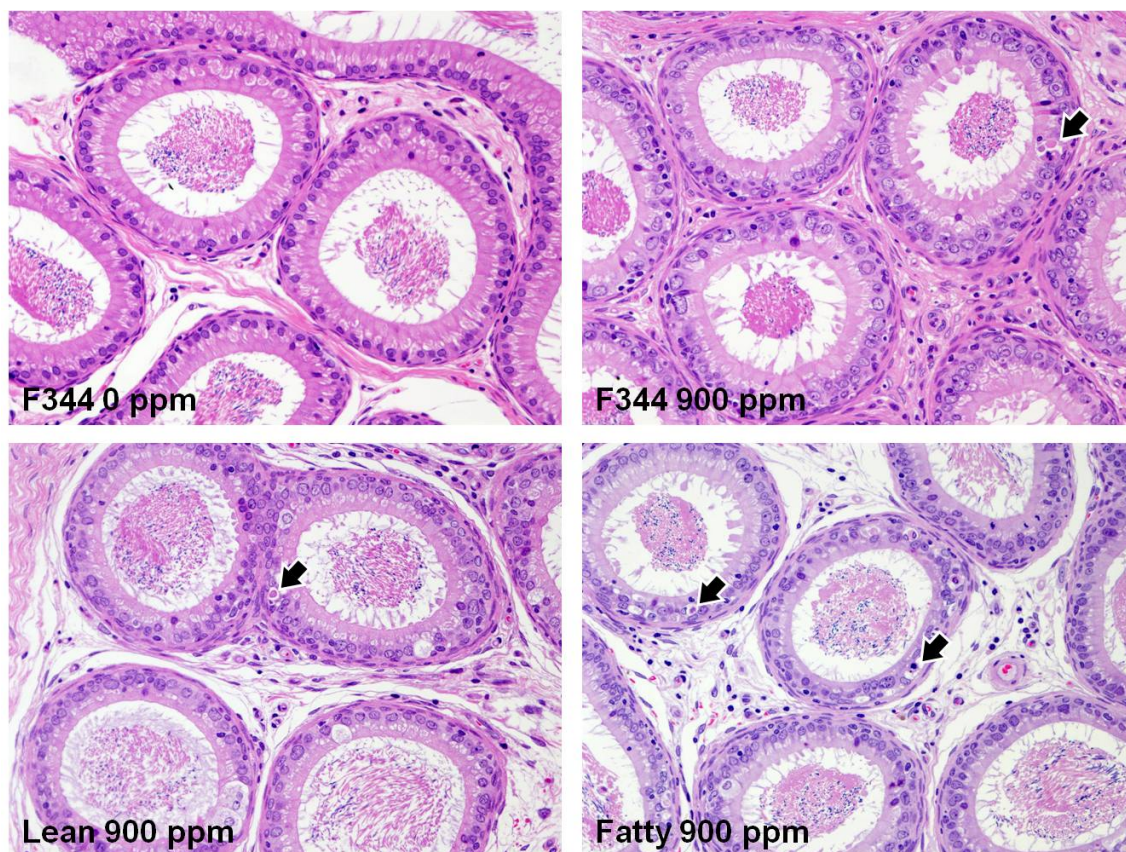
Adverse effects											
Fatty						Lean					
Dose (ppm)	9	28.5	90	285	900	Dose (ppm)	9	28.5	90	285	900
Body weight	-	-	-	-	↓	Body weight	-	-	-	-	↓
Relative organ weights						Relative organ weights					
Brain	-	-	-	-	↑	Brain	-	-	-	-	↑
Heart	-	-	-	-	↑	Heart	-	-	-	-	↑
Liver	-	-	-	-	↓	Spleen	-	-	-	-	↑
Adrenals	-	-	-	-	↑	Adrenals	-	-	-	-	↑
Kidneys	-	-	-	↑	↑	Kidneys	-	-	-	↑	↑
Testes	-	-	-	-	↑	Testes	-	-	-	-	↑
Hematology						Hematology					
WBC	-	-	-	-	↓	WBC	-	-	-	↓	↓
RBC	-	-	-	↓	↓	RBC	-	-	-	↓	↓
HGB	-	-	↓	↓	↓	HGB	-	-	-	↓	↓
HCT	-	-	↓	↓	↓	HCT	-	-	-	↓	↓
MCV	-	-	-	-	↑	Serum biochemistry					
MCH	-	-	-	-	↑	TP	-	-	-	-	↓
MCHC	-	-	-	↑	↑	A/G	-	-	-	-	↑
PLT	-	-	-	-	↓	Glucose	-	-	-	-	↓
Serum biochemistry						TG	-	-	-	-	↓
A/G	-	-	-	-	↑	BUN	-	-	-	-	↑
Alb	-	-	-	-	↑	Cre	-	-	↓	↓	↓
Cre	-	-	-	↓	↓	Na	-	-	-	-	↓
Cl	-	-	-	-	↑	K	-	-	-	-	↓
Ca	-	-	-	↓	↓	ALT	-	-	-	-	↑
IP	-	-	-	-	↑	ALP	-	-	-	-	↑

Dose (ppm)	9	28.5	90	285	900
F344					
Body weight	-	-	-	-	↓
Relative organ weights					
Brain	-	-	-	-	↑
Thymus	-	-	-	-	↑
Heart	-	-	-	↑	↑
Spleen	-	-	-	-	↑
Liver	-	-	↑	↑	↑
Kidneys	-	-	↑	↑	↑
Testes	-	-	-	-	↑
Hematology					
RBC	-	-	-	-	↓
HGB	-	-	-	↓	↓
HCT	-	-	-	-	↓
MCV	-	-	-	↓	↓
MCH	-	-	↓	↓	↓
Serum biochemistry					
TP	-	-	-	-	↑
A/G	-	-	-	-	↑
Alb	-	-	-	↑	↑
Bil	-	-	-	-	↓
T-Chol	-	-	-	↑	↑
Cre	-	-	↓	↓	↓

病理組織学的評価の実施前までに得られた、血液学・血清生化学的検索および臓器重量による結果を表に示す。すべてのラットの900 ppm群において、有意な体重増加抑制が認められた。また、すべてのラットに共通して、血液学的にRBC・HGB・HCTの低下、臓器重量では脳・心・腎・精巣相対重量の増加、血清生化学的にA/Gの増加およびCreの低下が観察された。

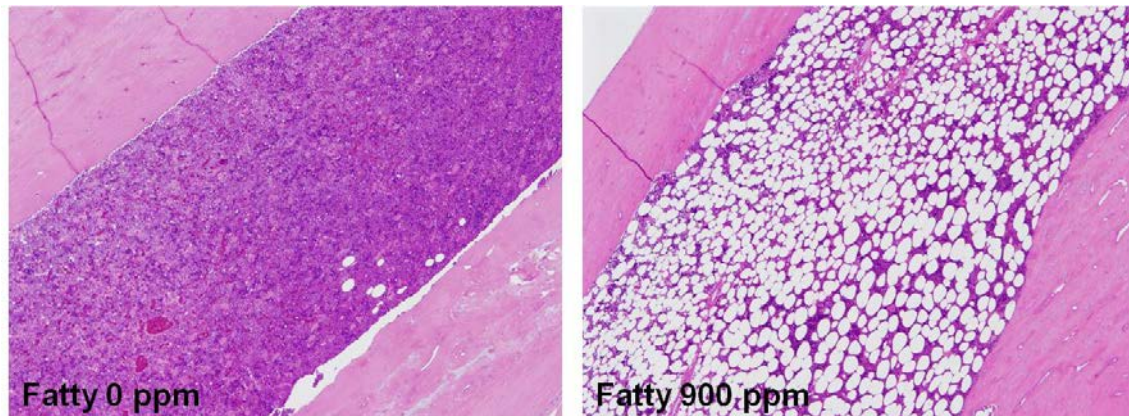
以上より、病理組織学的評価を除いたデータでは、高脂血症モデル動物と健常動物とでは、3-MCPDの暫定的なNOAELの差は10倍未満（いずれのラットでも90 ppm）と判断された。

＜図 21 精巣上体の組織像＞



すべてのラットにおいて、3-MCPD投与に関連する病変が精巣上体に認められた。900 ppm 群の精巣上体頭部における精巣上体管上皮細胞には、しばしばアポトーシス（矢印）が認められた。また、同部位の上皮細胞は対照群と比較して配列を乱し、核の大型化や陥凹などの多形性を示した。これらの病変は用量依存的に強まる傾向が認められ、現在、標本上の腺管数に対してのアポトーシスを有する腺管数について定量的解析を進めている。

<図 22 骨髄の組織像>



Fattyラットの大腿骨では、900 ppm群において骨髄の脂肪化が顕著に認められた。現在、中間用量群の骨髄について病理組織学的評価を進めている。

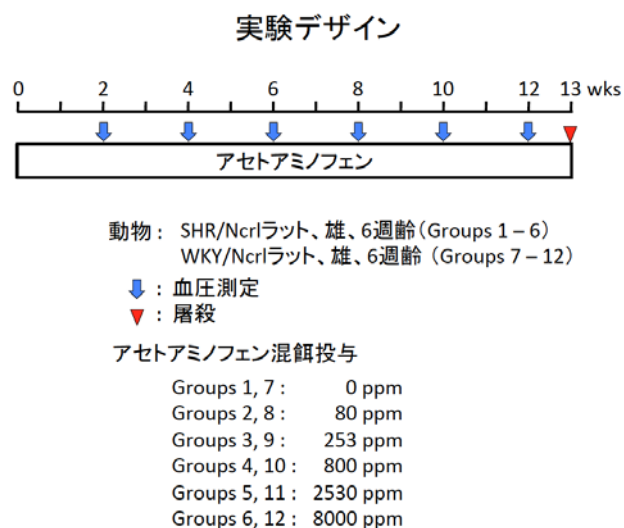
(3) 研究項目名：高血圧ラットの毒性感受性

(研究担当者名：高橋 智)

所属機関名：名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学)

1) 個別課題名：高血圧ラットの毒性評価

高血圧モデルとして、SHR/NCr1 ラットを用いて、肝・腎毒性が知られているアセトアミノフェンを無処置対照群を含めて 6 段階で用量設定し、90 日間反復投与毒性試験を行った。対照となる健常動物は、疾患モデルのバックグラウンドに最も近い WKY/NCr1 ラットを用い、同様に 6 段階の用量設定で検討した。



本研究の実験内容、方法について示す。アセトアミノフェンの用量は、F344 ラットの 13 週間毒性試験において、800ppm の混餌投与で肝および精巣の比重量増加が見られていることから 800ppm を中間用量とし、糖尿病ラット、高脂血症ラットの毒性評価と同様に公比を

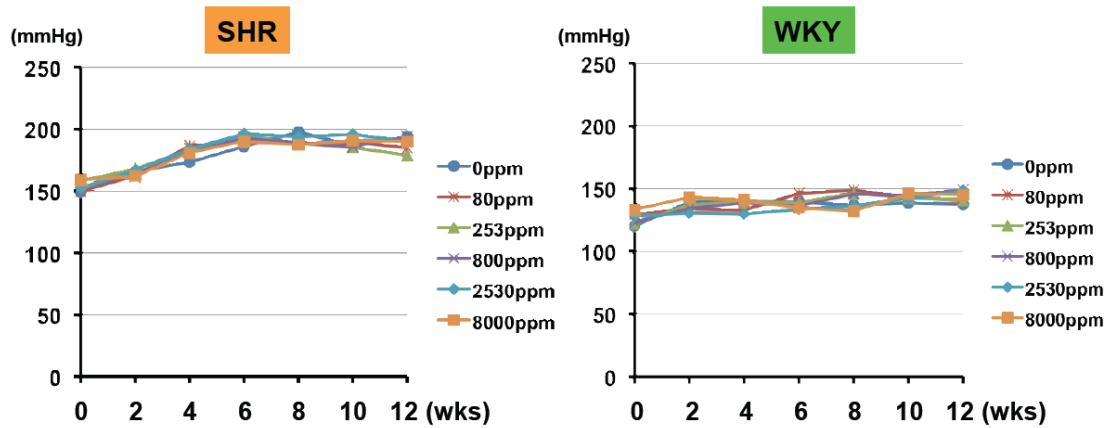
√10 (約 3.16) として 0, 80, 253, 800, 2530, 8000ppm の用量で 5 用量を設定し、無処置対照群を加えた 6 群で検討した。高血圧モデルラットとして SHR/NCrl 雄ラットを用い、対照となる健常動物は SHR/NCrl ラットのバックグラウンドに最も近い系統である WKY/NCrl 雄ラットを用いた。今回用いたアセトアミノフェンは SIGMA 社より購入し、各用量になるようにオリエンタル酵母株式会社に固形飼料の作製を依頼した。なお、1 群および 7 群の基礎食投与群にはオリエンタル MF 固形飼料を使用した。SHR/NCrl 雄ラットおよび WKY/NCrl 雄ラットは、それぞれ 60 匹ずつ日本チャールズリバー社より 5 週齢で購入し、6 週齢より実験を開始した。ラットは 2~3 匹ずつケージに入れ、24 時間温度・湿度が調節された飼育室で飼育した。検討項目としては、投与期間中、一般状態および死亡動物の有無を毎日観察し、体重、摂餌量とも週 1 回測定した。また血圧を非観血的血圧測定装置を用いて 2 週に 1 回測定した。動物は投与期間終了後に、深麻酔下で開腹し、腹部大動脈から採血を行う。血液学的検査は、白血球数 (WBC)、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) および血小板数 (PLT) を測定する。血清生化学的検査は、総蛋白質 (TP)、アルブミン (Alb)、トリグリセリド (TG)、総コレステロール (T-Cho)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cre)、ナトリウム (Na)、塩素 (Cl)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、無機リン (IP)、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)、および γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GTP) について測定した。採血後動物を放血死させ、剖検を実施するとともに脳、胸腺、肺、心、脾、肝、副腎、腎および精巣を摘出し、重量を測定した。鼻腔は異常の有無を観察した。上記の器官に加え、眼球、下垂体、脊髄、甲状腺および上皮小体、気管、胸部大動脈、唾液腺、舌、食道、胃、その他消化管、腸間膜リンパ節、膵、精巣上体、前立腺、精囊、膀胱、皮膚、乳腺、骨および骨髄を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液で、また精巣のみブアン液で固定した。固定臓器を常法に従ってパラフィンに包埋後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本作製し対照群と最高用量群について病理組織学的検査を行った。最高用量群に変化のある臓器については、すべての群について検討を加えた。なお、今回の研究では特に重要な臓器と思われる肝に関してはすべての群での病理組織学的検査を行った。

<研究成果、考察、今後の課題>

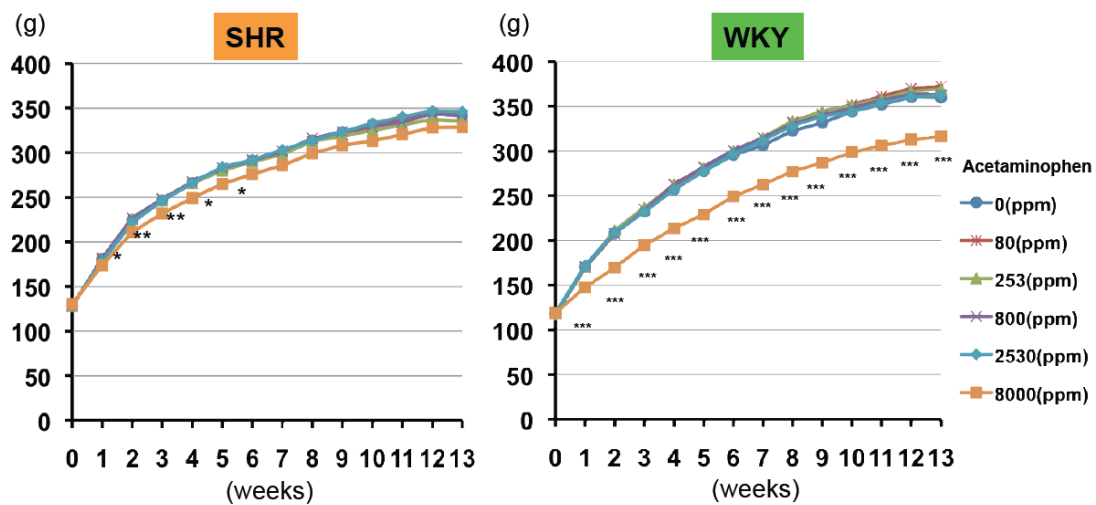
実験開始から終了までの血圧測定の結果では、SHR ラットは WKY ラットに比べて、血圧が高い傾向があることが示された。体重曲線では、SHR および WKY ラットいずれも 8000ppm の群で対照群と比べて体重が低い傾向がみられ、WKY ラットでは有意に体重増加抑制がみられた。

SHR および WKY ラットの最終体重および相対臓器重量を示す。SHR ラットでは、対照群と比較して、8000ppm の群において腎臓の相対重量が有意に増加し、2530ppm 以上の群で肝臓の相対重量が有意に増加していた。WKY ラットでは、対照群と比べて、8000ppm の群において、脳、胸腺、肝臓および腎臓の相対重量が有意に増加し、2530ppm 以上の群で脾臓の相対重量が有意に増加していた。

血圧測定結果(アセトアミノフェン)



体重曲線(アセトアミノフェン)



*, P<0.05, **, P<0.01, ***, P<0.001 vs 0 ppm, respectively

体重および臓器（絶対・相対）重量（SHRラット）

Absolute (g)	Acetaminophen					
	0 ppm	80 ppm	253 ppm	800 ppm	2530 ppm	8000 ppm
Brain	1.92±0.04	1.93±0.05	1.93±0.07	1.88±0.04	1.91±0.04	1.94±0.05
Thymus	0.133±0.030	0.124±0.021	0.115±0.023	0.123±0.034	0.133±0.016	0.136±0.017
Lungs	1.227±0.092	1.243±0.100	1.220±0.136	1.276±0.221	1.262±0.068	1.257±0.080
Heart	1.37±0.09	1.39±0.08	1.41±0.14	1.36±0.10	1.40±0.11	1.35±0.11
Spleen	0.596±0.042	0.582±0.043	0.570±0.07	0.592±0.044	0.608±0.04	0.549±0.04
Liver	9.48±0.42	9.51±0.75	9.13±0.8	9.49±0.67	10.3±0.8	10.8±0.6***
Adrenal glands	0.0355±0.0091	0.0420±0.0034	0.0403±0.0058	0.0391±0.0038	0.0402±0.0068	0.0388±0.0059
Kidneys	2.20±0.16	2.34±0.21	2.18±0.17	2.21±0.12	2.28±0.17	2.26±0.16
Testes	3.03±0.11	3.04±0.11	3.01±0.09	2.94±0.10	2.99±0.10	2.93±0.10

Relative (%)	Acetaminophen					
	0 ppm	80 ppm	253 ppm	800 ppm	2530 ppm	8000 ppm
Body weight	341.4±18.0	341.8±18.9	335.2±24.1	341.8±19.7	346.0±19.7	328.7±11.8
Brain	0.563±0.025	0.567±0.024	0.579±0.031	0.552±0.030	0.554±0.027	0.592±0.021
Thymus	0.039±0.008	0.036±0.005	0.034±0.006	0.036±0.009	0.039±0.005	0.041±0.005
Lungs	0.359±0.017	0.364±0.024	0.364±0.028	0.372±0.048	0.365±0.021	0.383±0.020
Heart	0.401±0.015	0.406±0.020	0.421±0.043	0.398±0.016	0.404±0.021	0.411±0.033
Spleen	0.174±0.006	0.170±0.013	0.170±0.012	0.173±0.008	0.176±0.007	0.167±0.009
Liver	2.776±0.102	2.781±0.097	2.720±0.108	2.776±0.115	2.966±0.159**	3.288±0.140***
Adrenal glands	0.010±0.002	0.012±0.001	0.012±0.002	0.011±0.001	0.012±0.002	0.012±0.002
Kidneys	0.643±0.023	0.685±0.039	0.650±0.022	0.647±0.018	0.658±0.043	0.689±0.055*
Testes	0.886±0.033	0.889±0.032	0.900±0.052	0.862±0.045	0.867±0.038	0.895±0.030

*, P<0.05, **, P<0.01, ***, P<0.001 vs 0 ppm respectively

体重および臓器（絶対・相対）重量（WKYラット）

Absolute (g)	Acetaminophen					
	0 ppm	80 ppm	253 ppm	800 ppm	2530 ppm	8000 ppm
Brain	2.07±0.04	2.09±0.04	2.10±0.03	2.08±0.05	2.08±0.03	2.02±0.03*
Thymus	0.133±0.02	0.137±0.019	0.140±0.011	0.145±0.017	0.141±0.020	0.141±0.011
Lungs	1.15±0.06	1.15±0.08	1.28±0.25	1.18±0.05	1.29±0.35	1.08 ±0.06
Heart	1.31±0.30	1.26±0.09	1.59±0.56	1.21±0.11	1.53±0.67	1.04±0.09
Spleen	0.559±0.027	0.596±0.032*	0.600±0.038*	0.584±0.023	0.596±0.026*	0.441±0.036***
Liver	8.59±0.57	8.85±0.60	8.61±0.45	8.46±0.38	8.78±0.54	8.78±0.81
Adrenal glands	0.0407±0.0046	0.0419±0.0060	0.0409±0.0061	0.0415±0.0066	0.0419±0.0074	0.0397±0.0064
Kidneys	2.13±0.17	2.33±0.12	2.31±0.19	2.26±0.11	2.29±0.14	2.03±0.13
Testes	2.56±0.12	2.55±0.11	2.60±0.10	2.70±0.17	2.61±0.13	2.06±0.40

Relative (%)	Acetaminophen					
	0 ppm	80 ppm	253 ppm	800 ppm	2530 ppm	8000 ppm
Body weight	359.6±16.2	372.4±15.8	369.4±14.6	363.3±13.0	363.1±6.7	316.3±16.2***
Brain	0.577±0.025	0.561±0.021	0.571±0.022	0.573±0.019	0.574±0.015	0.652±0.035***
Thymus	0.037±0.004	0.037±0.004	0.038±0.004	0.040±0.005	0.039±0.005	0.045±0.004***
Lungs	0.319±0.023	0.309±0.015	0.347±0.072	0.324±0.015	0.358±0.095	0.349±0.022
Heart	0.365±0.089	0.338±0.024	0.432±0.152	0.334±0.025	0.424±0.185	0.334±0.032
Spleen	0.155±0.004	0.160±0.005	0.163±0.007**	0.161±0.009	0.165±0.006*	0.142±0.007**
Liver	2.389±0.077	2.371±0.089	2.335±0.062	2.327±0.042	2.427±0.135	2.822±0.170***
Adrenal glands	0.011±0.001	0.011±0.001	0.011±0.002	0.011±0.002	0.012±0.002	0.013±0.002
Kidneys	0.612±0.029	0.624±0.017	0.626±0.036	0.623±0.021	0.633±0.036	0.654±0.026*
Testes	0.712±0.035	0.685±0.019	0.707±0.022	0.746±0.057	0.721±0.041	0.666±0.141

*, P<0.05, **, P<0.01, ***, P<0.001 vs 0 ppm, respectively

次に血液・生化学データを示す。SHR ラットでは 8000ppm 群で MCH, T-cho, ALP の増加、RBC, ALT の低下、2530ppm 以上の群で MCV の増加、253ppm 以上の群で K の低下を認めた。一方、WKY ラットでは 8000ppm 群で Hb, Ht, MCV, MCH, T-cho, ALP の増加、Alb, Cre の低下、2530ppm 以上の群で Ca の増加、800ppm 以上の群で TP の低下が観察された。

血液・生化学データ (SHRラット)

	Acetaminophen					
	0 ppm	80 ppm	253 ppm	800 ppm	2530 ppm	8000 ppm
WBC(/ml)	8580±2669	7643±2157	8058±2467	8623±2264	7679±1864	9304±2102
RBC(10 ² /μl)	1003.0±19.0	980.3±17.5*	988.1±11.9	987.6±26.6	982.5±14.5	962.4±19.5***
Hb(g/dl)	15.9±0.4	15.7±0.3	15.8±0.4	15.7±0.5	15.7±0.4	16.0±0.4
Ht(%)	44.7±0.9	44.3±0.9	44.3±0.9	44.4±1.4	44.3±0.7	44.8±0.8
MCV(fl)	44.5±0.5	45.2±0.2**	44.8±0.5	44.9±0.4	45.0±0.4*	46.5±0.5***
MCH(pg)	15.9±0.2	16.0±0.1	15.9±0.2	15.9±0.1	16.0±0.2	16.6±0.2***
MCHC(%)	35.6±0.4	35.5±0.2	35.5±0.3	35.3±0.4	35.4±0.5	35.6±0.5
Plt(X10 ⁴ /μl)	87.8±3.8	89.8±4.0	83.8±4.8	86.4±6.0	87.0±3.1	90.3±3.5

	Acetaminophen					
	0 ppm	80 ppm	253 ppm	800 ppm	2530 ppm	8000 ppm
TP(g/dl)	6.07±0.19	5.86±0.23	5.92±0.15	5.78±0.23*	5.73±0.25**	5.96±0.22
Alb(g/dl)	4.11±0.13	3.97±0.18	4.01±0.11	3.93±0.16	3.92±0.16*	4.1±0.18
TG(mg/dl)	17.4±1.9	19.7±4.2	22.1±6.9	24.6±10.2*	22.3±4.2	22.8±3.7
T-choi(mg/dl)	47.6±2.8	45±4.2	42.3±6.8*	44.5±2.9	50.9±4.8	61.4±3.47***
BUN(mg/dl)	26.3±2.7	25.3±1.9	25.5±3.5	27.4±3.7	26.1±4.7	26.8±4.5
Cre(mg/dl)	0.275±0.032	0.243±0.021	0.259±0.03	0.259±0.029	0.256±0.024	0.255±0.033
Na(mEq/dl)	137.4±1.0	137.6±0.8	137.5±1.1	138.1±1.2	137.8±1.2	137.5±1.0
Cl(mEq/dl)	100.6±1.2	101.1±1.2	101.4±0.7	101.1±0.9	101.3±0.7	101.2±1.2
K(mRq/dl)	6.84±0.46	6.64±0.51	6.17±0.42**	6.19±0.47*	6.1±0.5**	6.19±0.4**
Ca(mg/dl)	9.09±0.2	9.07±0.19	9.05±0.48	9.2±0.3	9.14±0.21	9.32±0.09
P(mg/dl)	6.28±0.54	6.37±0.45	6.49±0.65	6.51±0.77	6.19±0.78	6.69±0.61
AST(IU/l)	123.2±17.0	118.8±11.1	122.7±22.2	125±47.2	114.9±13.4	100.1±9.6
ALT(IU/l)	51.8±7.9	45.8±5.5	45.6±4.3	42.9±5.9*	48.7±13.4	41.8±4.8*
ALP(IU/l)	475.7±68.9	502.6±78.0	459.2±51.7	508±104.8	489±58.2	570.5±83.4*
γ-GTP(IU/l)	<3	<3	<3	<3	<3	<3

*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001 vs 0 ppm, respectively

血液・生化学データ (WKYラット)

	Acetaminophen					
	0 ppm	80 ppm	253 ppm	800 ppm	2530 ppm	8000 ppm
WBC (/ml)	5621±915	5112±1066	5996±1318	6194±1359	5931±805	6837±1239
RBC (10 ² /μl)	890.8±15.4	861.7±20.2**	886.4±20.5	894.5±24.0	886.8±21.0	876.5±17.8
Hb (g/dl)	15.0±0.3	14.6±0.3*	14.9±0.4	15.1±0.4	14.9±0.4	15.7±0.3***
Ht (%)	42.5±0.8	41.3±0.9*	42.3±1.1	42.9±1.2	42.5±0.9	44.4±0.9***
MCV (fl)	47.7±0.5	47.9±0.3	47.8±0.3	48.0±0.3	48.0±0.4	50.7±0.2***
MCH (pg)	16.8±0.1	16.9±0.1	16.9±0.2	16.8±0.2	16.8±0.1	17.9±0.1***
MCHC (%)	35.3±0.3	35.3±0.3	35.2±0.3	35.1±0.4	35.1±0.4	35.4±0.3
Plt (x10 ⁴ /μl)	51.1±2.5	48.3±7.2	51.8±2.5	49.6±6.8	50.0±2.6	51.7±2.3

	Acetaminophen					
	0 ppm	80 ppm	253 ppm	800 ppm	2530 ppm	8000 ppm
TP (g/dl)	5.95±0.08	5.68±0.08***	5.83±0.17	5.73±0.17**	5.69±0.21***	5.58±0.12***
Alb (g/dl)	3.9±0.07	3.71±0.10***	3.79±0.07	3.75±0.07**	3.8±0.12	3.67±0.12***
TG (mg/dl)	45.7±13.6	42.7±6.8	37.5±13.3	36.7±13.3	40.5±6.5	36.3±11.2
T-choi (mg/dl)	90.5±4.8	86.4±2.8	87±4.4	89.1±4.4	91.1±5.0	102.9±4.2***
BUN (mg/dl)	20.5±1.9	19.59±1.3	19.3±2.4	18.4±2.4	17.7±2.0**	19.8±2.2
Cre (mg/dl)	0.308±0.039	0.301±0.02	0.299±0.026	0.295±0.026	0.285±0.024	0.262±0.022***
Na (mEq/dl)	138.2±1.2	138.5±0.7	138.6±1.1	138.7±1.1	139.4±0.5*	138.4±1.0
Cl (mEq/dl)	99.8±1.4	100.4±0.7	100.5±1.0	100.4±1.0	100.7±2.0	100.3±0.6
K (mRq/dl)	5.81±0.46	5.72±0.38	5.57±0.48	5.67±0.48	5.22±0.28**	5.42±0.31
Ca (mg/dl)	9.35±0.33	9.25±0.23	9.43±0.16	9.34±0.16	9.45±0.21	9.49±0.22
P (mg/dl)	5.90±0.5	6.05±0.45	6.32±0.37	6.19±0.37	6.54±0.37**	6.49±0.49*
AST (IU/l)	78.5±6.1	80.7±5.2	87.3±7.8*	82.9±7.8	83.4±7.6	78.7±8.6
ALT (IU/l)	41.2±4.2	35.1±1.2	36.2±8.0	38.8±8.0	36.4±4.3	47±8.8
ALP (IU/l)	479.8±51.4	447.3±35.2	442.8±50.3	441.7±50.3	428.5±60.0	654.5±150.7***
γ-GTP (IU/l)	<3	<3	<3	<3	<3	<3

*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001 vs 0 ppm, respectively

次に病理組織学的所見について示す。肝においては小円形細胞浸潤、脂肪変性、小葉中心領域におけるアポトーシスが観察され、SHR ラットでは各群間で差はみられなかったが、WKY ラットでは 8000ppm 群において小円形細胞浸潤の程度が有意に軽症となっていた。その他の臓器においては、SHR ラットの 8000ppm 群では膵腺房組織の focal な萎縮が、WKY ラットの 8000ppm 群ではハーダー腺における炎症細胞浸潤がそれぞれ対照群に比較して有意に減少していた。WKY ラットの膵、SHR ラットのハーダー腺には目立った変化はみられなかった。心、大動脈、鼻腔、気管、肺、舌、顎下腺、食道、前胃、腺胃、小腸、大腸、腎、膀胱、甲状腺、副甲状腺、副腎、下垂体、前立腺、精巣、精巣上体、脾、胸腺、リンパ節、骨髄、大脳、小脳、脊髄、眼球、皮膚、乳腺においては SHR および WKY ラットのいずれにおいても著変は見られなかった。

Histopathological Findings in Liver of Rats Treated with Acetaminophen

SHR	Acetaminophen (ppm) No. of rats	0 10	80 10	253 10	800 10	2530 10	8000 11
Inflammatory cell infiltrates mononuclear		10	10	10	10	10	11
mild -----		5	3	5	5	4	4
moderate -----		4	5	3	5	4	6
severe -----		1	2	2	0	2	1
Fatty change		2	2	3	1	0	3
diffuse -----		2	0	3	1	0	3
focal -----		0	2	0	0	0	0
Apoptosis, centrilobular -----		4	5	4	4	3	6

WKY	Acetaminophen (ppm) No. of rats	0 10	80 10	253 10	800 10	2530 11	8000 11
Inflammatory cell infiltrates mononuclear		10	10	10	10	11	11
mild -----		1	2	3	3	0	10***
moderate -----		7	7	6	6	9	1
severe -----		2	1	1	1	2	0
Fatty change		0	0	0	0	1	2
diffuse -----		0	0	0	0	1	2
focal -----		0	0	0	0	0	0
Apoptosis, centrilobular -----		5	5	7	6	8	7

Histopathological Findings : Respiratory and Digestive Systems

Acetaminophen (ppm) No. of rats	SHR		WKY	
	0 10	8000 11	0 10	8000 11
Nasal cavity				
No abnormality detected	3	0	6	7
Inflammatory infiltrates	7	11	4	4
Trachea				
No abnormality detected	10	11	10	11
Lung				
No abnormality detected	9	11	10	11
Alveolar hemorrhage	1	0	0	0
Tongue				
No abnormality detected	10	11	10	11
Submandibular gland				
No abnormality detected	10	11	10	11
Esophagus				
No abnormality detected	10	11	10	11
Forestomach				
No abnormality detected	10	11	10	11
Glandular stomach				
No abnormality detected	10	11	10	11
Small intestine				
No abnormality detected	10	11	10	11
Large intestine				
No abnormality detected	10	11	10	11
Pancreas				
No abnormality detected	4	11	10	11
Atrophy, acinar, focal	5	1*	0	0
Inflammatory infiltrates	1	1	0	0
Acinar cell adenoma	1	0	0	0

Histopathological Findings : Cardiovascular, Endocrine and Hematopoietic Systems

Acetaminophen (ppm) No. of rats	SHR		WKY	
	0 10	8000 11	0 10	8000 11
Heart				
No abnormality detected	10	11	9	11
Inflammatory infiltrates	0	0	1	0
Aorta				
No abnormality detected	10	11	10	11
Thyroid gland				
No abnormality detected	10	11	7	6
Ultimobranchial body remnant	0	0	3	5
Parathyroid gland				
No abnormality detected	10	11	10	11
Adrenal gland				
No abnormality detected	0	0	10	11
Fatty change, zona fasciculata	10	11	0	0
Pituitary gland				
No abnormality detected	5	7	9	10
Cyst	5	4	1	1
Spleen				
No abnormality detected	10	11	10	11
Thymus				
No abnormality detected	10	11	10	11
Lymph nodes, mesenteric				
No abnormality detected	10	11	10	11
Bone marrow, vertebrate				
No abnormality detected	10	11	10	11

Histopathological Findings : Urinary and Male Reproductive Systems

Acetaminophen (ppm) No. of rats	SHR		WKY	
	0 10	8000 11	0 10	8000 11
Kidney				
No abnormality detected	5	7	9	11
Inflammatory infiltrates	4	4	0	0
Regeneration, tubule	2	4	1	0
Papillary necrosis	0	1	0	0
Urinary bladder				
No abnormality detected	6	8	9	10
Inflammatory infiltrates	4	3	1	1
Prostate gland				
No abnormality detected	10	11	7	5
Inflammatory infiltrates	0	0	3	6
Testis				
No abnormality detected	10	11	5	5
Atrophy, tubular	0	0	5	6
Multinucleated giant cells	0	0	1	0
Epididymis				
No abnormality detected	0	0	6	7
Inflammatory infiltrates	10	11	2	3
Sperm granuloma	0	1	3	2

Histopathological Findings : Nervous and Integument Systems

Acetaminophen (ppm) No. of rats	SHR		WKY	
	0 10	8000 11	0 10	8000 11
Cerebrum				
No abnormality detected	10	11	10	11
Cerebellum				
No abnormality detected	10	11	10	11
Spinal cord				
No abnormality detected	10	11	10	11
Eye				
No abnormality detected	10	11	10	11
Harderian gland				
No abnormality detected	10	11	6	11
Inflammatory infiltrates	0	0	4	0*
Skin				
No abnormality detected	10	11	6	3
Inflammatory infiltrates, subcutis	0	0	3	8
Granulation, subcutis	0	0	3	6
Mammary gland				
No abnormality detected	10	10	10	11
Inflammatory infiltrates	0	1	0	0

Summary of the Data (Acetaminophen)

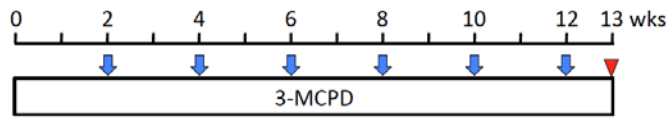
SHR	Acetaminophen (ppm)				
	80	253	800	2530	8000
Body weight	-	-	-	-	-
Organ weight	-	-	-	-	-
Liver (absolute)	-	-	-	-	↑
Liver (relative)	-	-	-	↑	↑
Kidneys (relative)	-	-	-	-	↑
Blood pressure	-	-	-	-	-
Blood data	-	-	-	-	-
RBC	↓	-	-	-	↓
MCV	↑	-	-	↑	↑
MCH	-	-	-	-	↑
Biochemical data	-	-	-	-	-
T-chol	-	↓	-	-	↑
K	-	↓	↓	↓	↓
ALT	-	-	↓	-	↓
ALP	-	-	-	-	↑
Histopathology	-	-	-	-	-
Pancreas, atrophy, acinar	-	-	-	-	↓
WKY	Acetaminophen (ppm)				
	80	253	800	2530	8000
Body weight	-	-	-	-	↓
Organ weight	-	-	-	-	-
Liver (relative)	-	-	-	-	↑
Kidneys (relative)	-	-	-	-	↑
Brain (absolute)	-	-	-	-	↓
Brain (relative)	-	-	-	-	↑
Thymus (relative)	-	-	-	-	↑
Spleen (absolute)	↑	↑	-	↑	↓
Spleen (relative)	-	↑	-	↑	↓
Blood pressure	-	-	-	-	-
Blood data	-	-	-	-	-
Hb	↓	-	-	-	↑
Ht	↓	-	-	-	↑
MCV	-	-	-	-	↑
MCH	-	-	-	-	↑
Biochemical data	-	-	-	-	-
TP	↓	-	↓	↓	↓
Alb	↓	-	↓	-	↓
T-chol	-	-	-	-	↑
Cre	-	-	-	-	↓
P	-	-	-	↑	↑
ALP	-	-	-	-	↑
Histopathology	-	-	-	-	-
Liver, inflammation	-	-	-	-	↓
Harderian gland inflammation	-	-	-	-	↓

体重、解剖時の臓器重量、血液・生化学データおよび病理組織学的変化を示す。SHR ラットでは、253ppm 以上でカリウム値の異常、2530ppm 以上で肝重量の増加、MCV の増加を認めたが、カリウム値は低下であることから毒性を示唆する変化ではないと考え、NOAEL を 800ppm とした。WKY ラットでは、800ppm 以上で総蛋白量の低下、2530ppm 以上でリン値の上昇を認め、前者を毒性変化と考え、NOAEL を 253ppm とした。以上より、高血圧モデル動物と健常動物とでは、アセトアミノフェンの NOAEL の差は 10 倍未満であった。

平成25年度は、3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) について検討を行った。3-MCPD は、酸加水分解植物性タンパクなどに含まれており、ラットの13週間反復投与試験において、9 mg/kg bw/dayで腎臓相対重量の増加が観察されている。その用量に相当する90 ppmを中間用量として、公比 $\sqrt{10}$ (約3.16) で0, 9, 28.5, 90, 285, 900 ppmの用量で飲水投与し、高血圧モデル動物と健常動物のNOAELの差を同様に比較検討した。

高血圧モデルとして、SHR/NCr1 ラットを用いて、肝・腎毒性が知られている 3-MCPD を無処置対照群を含めて 6 段階で用量設定し、90 日間反復投与毒性試験を行った。対照となる健常動物は、疾患モデルのバックグラウンドに最も近い WKY/NCr1 ラットを用い、同様に 6 段階の用量設定で検討した。

実験デザイン



動物： SHR/Ncr1ラット、雄、6週齢 (Groups 1–6)
WKY/Ncr1ラット、雄、6週齢 (Groups 7–12)

↓： 血圧測定

▼： 屠殺

3-MCPD飲料水投与

Groups 1, 7: 0 ppm

Groups 2, 8: 9 ppm

Groups 3, 9: 28.5 ppm

Groups 4, 10: 90 ppm

Groups 5, 11: 285 ppm

Groups 6, 12: 900 ppm

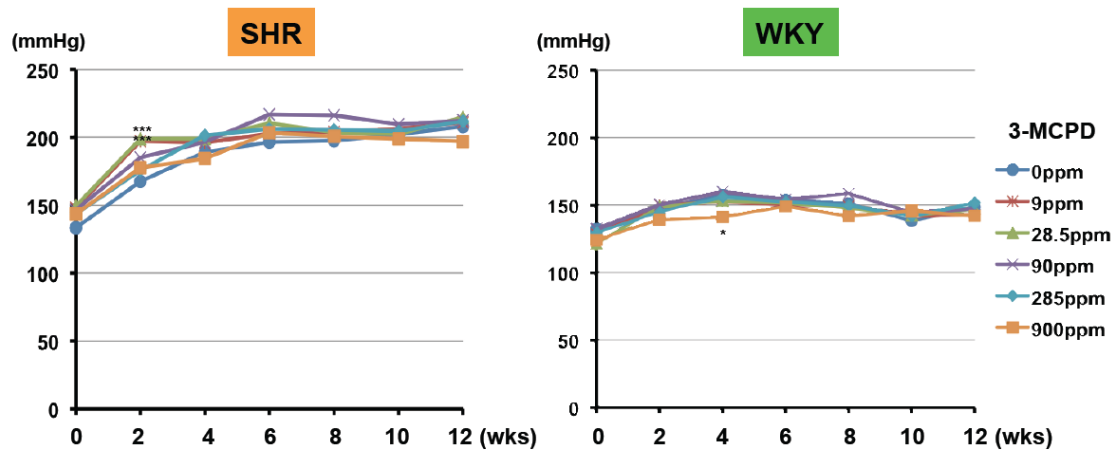
本研究の実験内容、方法について示す。3-MCPD の用量は、SD ラットの 96 週間毒性試験を参考に 90ppm を中間用量とし、糖尿病ラット、高脂血症ラットの毒性評価と同様に公比を $\sqrt{10}$ (約 3.16) として 0, 9, 28.5, 90, 285, 900ppm の用量で 5 用量を設定し、無処置対照群を加えた 6 群で検討した。高血圧モデルラットとして SHR/NCrl 雄ラットを用い、対照となる健常動物は SHR/NCrl ラットのバックグラウンドである WKY/NCrl 雄ラットを用いた。今回用いた 3-MCPD は和光純薬工業株式会社より購入し、水道水による希釈により用事調製した。1 群および 7 群には水道水のみ使用した。SHR/NCrl 雄ラットおよび WKY/NCrl 雄ラットは、それぞれ 60 匹ずつ日本チャールズリバー社より 5 週齢で購入し、6 週齢より実験を開始した。ラットは 2~3 匹ずつケージに入れ、24 時間温度・湿度が調節された飼育室で飼育した。検討項目としては、投与期間中、一般状態および死亡動物の有無を毎日観察し、体重を週 1 回、飲水量を週 2 回測定した。また、血圧を非観血的血圧測定装置を用いて 2 週に 1 回測定した。動物は投与期間終了後に、深麻酔下で開腹し、腹部大動脈から採血を行った。血液学的検査は、白血球数 (WBC)、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) および血小板数 (PLT) を測定する。血清生化学的検査は、総蛋白質 (TP)、アルブミン (Alb)、トリグリセリド (TG)、総コレステロール (T-Cho)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cre)、ナトリウム (Na)、塩素 (Cl)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、無機リン (IP)、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)、および γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GTP) について測定した。採血後動物を放血死させ、剖検を実施するとともに脳、胸腺、肺、心、脾、肝、副腎、腎および精巣を摘出し、重量を測定した。鼻腔は異常の有無を観察した。上記の器官に加え、眼球、下垂体、脊髄、甲状腺および上皮小体、気管、胸部大動脈、唾液腺、舌、食道、胃、その他消化管、腸間膜リンパ節、膵、精巣上体、前立腺、精囊、膀胱、皮膚、

乳腺、骨および骨髄を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液で、また精巣のみブアン液で固定した。固定臓器を常法に従ってパラフィンに包埋後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本作製し対照群と最高用量群について病理組織学的検査を行った。最高用量群に変化のある臓器については、すべての群について検討を加えた。なお、今回の研究では特に重要な臓器と思われる精巣・腎に関してはすべての群での病理組織学的検査を行った。

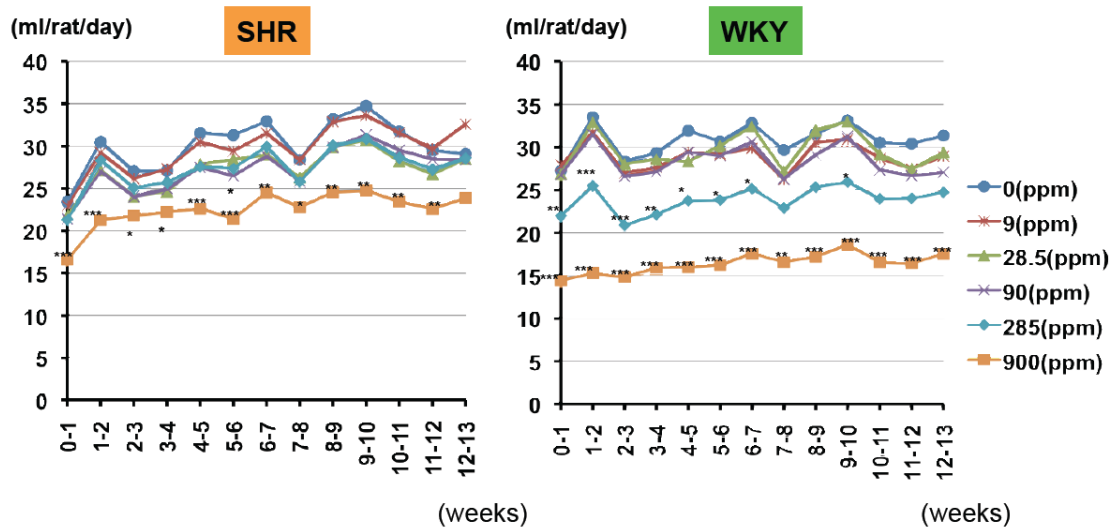
<研究成果、考察、今後の課題>

実験開始から終了までの血圧測定の結果では、SHR ラットは WKY ラットに比べて、血圧が高い傾向があることが示された。また、SHR ラットの 900ppm、WKY ラットの 285ppm 以上の群で飲水量の減少、体重増加抑制がみられた。

血圧測定結果(3-MCPD)

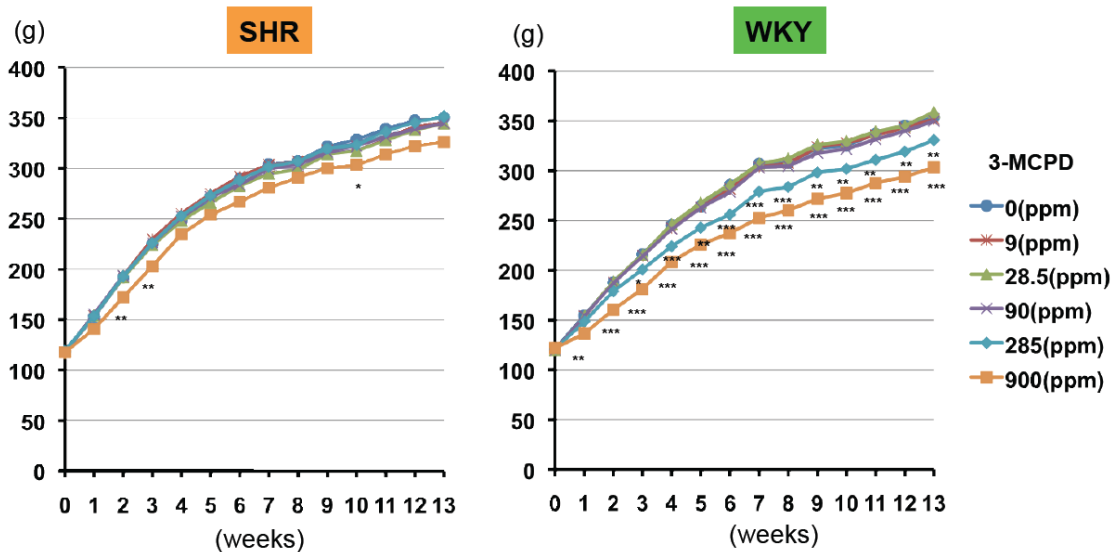


摂水量(3-MCPD)



*, **, ***; P<0.05, P<0.01, and P<0.001 vs 0 ppm, respectively

体重曲線(3-MCPD)



*, **, ***; P<0.05, P<0.01, and P<0.001 vs 0 ppm, respectively

SHR ラットでは、腎臓の絶対重量が 90ppm 以上、相対重量がすべての 3-MCPD 投与群において有意に増加した。また、900ppm の群では肝臓の相対重量が有意に増加し、肺および脾臓の絶対重量が有意に低下した。一方 WKY ラットでは、腎臓の絶対重量が 28.5ppm 以上、相対重量がすべての 3-MCPD 投与群において有意に増加した。また、285ppm 以上の群における肝相対重量および 900ppm 群における脳相対重量の増加、900ppm 群における肺・心・脾・肝絶対重量および 285ppm 以上の群における副腎絶対重量の低下が観察された。

体重および臓器（絶対・相対）重量（SHRラット）

Absolute (g)	3-MCPD					
	0 ppm	9 ppm	28.5 ppm	90 ppm	285 ppm	900 ppm
Brain	1.95±0.07	1.94±0.05	1.94±0.07	1.93±0.06	1.94±0.02	1.93±0.03
Thymus	0.138±0.05	0.121±0.016	0.155±0.055	0.150±0.049	0.173±0.039	0.125±0.035
Lungs	1.20±0.06	1.17±0.08	1.18±0.08	1.20±0.09	1.21±0.06	1.11±0.07**
Heart	1.35±0.07	1.30±0.08	1.33±0.09	1.40±0.10	1.46±0.11	1.32±0.07
Spleen	0.657±0.060	0.607±0.049	0.628±0.041	0.613±0.032	0.618±0.051	0.598±0.043*
Liver	9.93±1.21	9.98±0.96	9.89±0.65	10.0±0.9	10.4±0.70	9.86±0.51
Adrenal glands	0.0406±0.022	0.0407±0.0043	0.0416±0.0062	0.0403±0.0047	0.0419±0.0042	0.0385±0.0037
Kidneys	2.16±0.20	2.28±0.14	2.34±0.19	2.53±0.22***	2.78±0.15***	2.78±0.16***
Testes	2.90±0.39	3.02±0.18	2.92±0.13	2.99±0.18	3.02±0.10	2.93±0.19

Relative (%)	3-MCPD					
	0 ppm	9 ppm	28.5 ppm	90 ppm	285 ppm	900 ppm
Body weight	336.7±25.3	335.2±29.8	332.8±17.6	335.0±22.6	340.8±14.4	315.5±16.5
Brain	0.580±0.037	0.583±0.044	0.584±0.034	0.579±0.038	0.571±0.020	0.612±0.034
Thymus	0.040±0.013	0.036±0.004	0.046±0.017	0.045±0.016	0.051±0.012	0.040±0.011
Lungs	0.356±0.017	0.349±0.017	0.355±0.013	0.358±0.022	0.355±0.018	0.353±0.022
Heart	0.404±0.037	0.390±0.027	0.400±0.019	0.419±0.022	0.427±0.032	0.418±0.021
Spleen	0.195±0.012	0.181±0.008*	0.188±0.013	0.183±0.005	0.181±0.011*	0.189±0.011
Liver	2.940±0.162	2.978±0.097	2.972±0.097	2.992±0.083	3.062±0.112	3.127±0.087**
Adrenal glands	0.012±0.001	0.012±0.001	0.012±0.002	0.012±0.001	0.012±0.001	0.012±0.001
Kidneys	0.641±0.031	0.681±0.026*	0.702±0.033***	0.755±0.031***	0.816±0.028***	0.880±0.036***
Testes	0.869±0.152	0.904±0.061	0.878±0.039	0.897±0.050	0.887±0.045	0.931±0.085

*, P<0.05, **, P<0.01, ***, P<0.001 vs 0 ppm respectively

体重および臓器（絶対・相対）重量（WKYラット）

Absolute (g)	3-MCPD					
	0 ppm	9 ppm	28.5 ppm	90 ppm	285 ppm	900 ppm
Brain	2.09±0.08	2.10±0.08	2.10±0.04	2.10±0.05	2.08±0.07	2.06±0.05
Thymus	0.156±0.036	0.160±0.086	0.154±0.021	0.142±0.031	0.138±0.011	0.132±0.015
Lungs	1.17±0.11	1.11±0.03	1.22±0.24	1.07±0.09	1.07±0.09	0.98±0.06**
Heart	1.38±0.33	1.20±0.09	1.43±0.43	1.22±0.12	1.29±0.20	1.09±0.10*
Spleen	0.581±0.044	0.576±0.023	0.608±0.065	0.575±0.046	0.559±0.031	0.512±0.036**
Liver	9.08±0.57	9.16±0.35	9.34±0.75	9.26±0.64	9.07±0.50	8.22±0.48**
Adrenal glands	0.0467±0.0108	0.0435±0.0030	0.0406±0.0043	0.0413±0.0047	0.0394±0.0046*	0.0371±0.0048**
Kidneys	2.14±0.15	2.25±0.11	2.34±0.15**	2.48±0.17***	2.54±0.10***	2.58±0.11***
Testes	2.56±0.20	2.61±0.16	2.55±0.12	2.54±0.14	2.16±0.46**	2.44±0.23

Relative (%)	3-MCPD					
	0 ppm	9 ppm	28.5 ppm	90 ppm	285 ppm	900 ppm
Body weight	349.9±16.0	352.6±12.9	353.5±21.5	346.2±19.8	327.0±10.8**	300.5±11.7***
Brain	0.580±0.037	0.583±0.044	0.584±0.034	0.579±0.038	0.571±0.020*	0.612±0.034***
Thymus	0.044±0.010	0.045±0.008	0.044±0.005	0.041±0.007	0.042±0.004	0.044±0.005
Lungs	0.334±0.036	0.315±0.015	0.343±0.052	0.309±0.012	0.327±0.029	0.325±0.016
Heart	0.398±0.112	0.339±0.025	0.402±0.099	0.351±0.025	0.394±0.063	0.364±0.036
Spleen	0.166±0.013	0.163±0.006	0.172±0.009	0.166±0.007	0.171±0.008	0.170±0.008
Liver	2.592±0.086	2.597±0.057	2.640±0.090	2.675±0.084	2.774±0.131***	2.734±0.124**
Adrenal glands	0.013±0.003	0.012±0.001	0.012±0.001	0.012±0.001	0.012±0.001	0.012±0.002
Kidneys	0.611±0.025	0.639±0.012*	0.661±0.026***	0.715±0.020***	0.778±0.024***	0.859±0.021***
Testes	0.733±0.060	0.741±0.055	0.724±0.057	0.735±0.032	0.662±0.145	0.814±0.088

*, P<0.05, **, P<0.01, ***, P<0.001 vs 0 ppm, respectively

次に血液・生化学データを示す。SHRラットでは285ppm以上の群でAlbの増加、Creの低下を認め、900ppmの群でMCH, K値の低下がみられた。一方、WKYラットでは90ppm以上の群でWBC, RBC, Hb, Ht, Cre, ASTの低下、285ppm以上の群でMCH, TGの低下、900ppm群でT-chol, K値の低下が観察された。

血液・生化学データ(SHRラット)

	3-MCPD					
	0 ppm	9 ppm	28.5 ppm	90 ppm	285 ppm	900 ppm
WBC (/ml)	10144±1611	9543±714	9555±1771	9700±2013	11132±1434	8916±1135
RBC (10 ³ /μl)	964.2±97.1	1006±21.6	994.9±15.3	1008.3±24.6	987.8±20.2	964.9±15.5
Hb (g/dl)	15.5±1.7	16.1±0.5	15.8±0.3	15.8±0.5	15.8±0.3	15.2±0.4
Ht (%)	43.8±0.9	45.0±0.9	44.3±0.9	44.4±1.4	44.3±0.7	43.3±0.8
MCV (fl)	45.5±1.0	44.7±0.4	44.6±0.3*	44.0±0.5***	44.8±0.4	44.9±1.1
MCH (pg)	16.0±0.2	16.0±0.2	15.8±0.2	15.6±0.2***	15.9±0.2	15.8±0.2*
MCHC (%)	35.2±1.1	35.7±0.5	35.5±0.4	35.5±0.4	35.6±0.3	35.2±0.3
Plt (x10 ⁴ /μl)	83.7±5.3	81.9±3.5	85.6±5.8	84.2±7.5	87.1±3.1	84.9±6.2

	3-MCPD					
	0 ppm	9 ppm	28.5 ppm	90 ppm	285 ppm	900 ppm
TP (g/dl)	6.27±0.23	6.28±0.20	6.10±0.19	6.24±0.47	6.37±0.20	6.35±0.22
Alb (g/dl)	4.32±0.22	4.48±0.17	4.35±0.18	4.32±0.15	4.51±0.14*	4.52±0.13*
TG (mg/dl)	30.8±7.5	31.1±4.7	29.2±9.99	28.2±7.6	31.3±10.6	27.2±8.9
T-chol (mg/dl)	60.0±3.6	58.5±6.9	56.1±4.0	60.2±0.5	62.5±4.5	63.4±8.1
BUN (mg/dl)	21.9±1.6	23.4±1.7	23.2±1.9	22.2±1.8	21.7±2.2	21.0±1.5
Cre (mg/dl)	0.249±0.02	0.245±0.015	0.233±0.011	0.232±0.019	0.199±0.018***	0.199±0.023***
Na (mEq/dl)	140.7±0.9	141.1±0.7	139.9±1.0	139.6±1.6	140.9±0.9	141.6±1.3
Cl (mEq/dl)	105.3±1.1	106.1±1.1	104.5±1.6	104.7±1.6	105.6±1.9	105.5±1.6
K (mEq/dl)	4.76±0.15	5.09±0.20**	5.03±0.12*	5.03±0.37*	4.91±0.2	4.43±0.28**
Ca (mg/dl)	9.58±0.24	9.46±0.10	9.29±0.37*	9.30±0.26*	9.53±0.18	9.49±0.23
P (mg/dl)	6.32±0.20	6.26±0.34	6.02±0.35	6.14±0.65	6.19±0.33	6.04±0.39
AST (IU/l)	118.4±12.7	128.5±23.4	114.0±15.5	123.8±50.2	104.5±18.9	99.0±19.2
ALT (IU/l)	48.7±6.0	40.9±4.9*	36.8±2.9***	40.6±4.8*	40.0±4.8**	43.2±8.7
ALP (IU/l)	426.3±47.8	447.2±47.6	422.0±35.2	404±29.0	403.8±39.3	412.2±22.6
γ-GTP (IU/l)	<3	<3	<3	<3	<3	<3

*, P<0.05, **, P<0.01, ***, P<0.001 vs 0 ppm, respectively

血液・生化学データ(WKYラット)

	3-MCPD					
	0 ppm	9 ppm	28.5 ppm	90 ppm	285 ppm	900 ppm
WBC (/ml)	6475±956	5899±852	5772±1286	5281±631*	5050±387**	5662±1281
RBC (10 ² /μl)	879.6±19.2	871.6±14.2	867.5±21.2	849±10.7***	838.6±7.2***	829.6±17.7***
Hb (g/dl)	14.5±0.3	14.5±0.2	14.5±0.4	14.1±0.2**	13.7±0.2***	13.6±0.4***
Ht (%)	42.7±3.4	41.3±0.6	41.2±1.1	40.2±0.7**	39.4±0.4***	39.2±1.0***
MCV (fl)	48.5±3.5	47.4±0.2	47.5±0.5	47.4±0.2	47.0±0.4	47.3±0.5
MCH (pg)	16.5±0.1	16.6±0.2	16.8±0.1***	16.6±0.1	16.4±0.1*	16.4±0.2*
MCHC (%)	34.1±2.1	35.0±0.4	35.2±0.4*	35.0±0.2	34.8±0.4	34.6±0.4
Plt (x10 ⁴ /μl)	50.2±4.3	49.6±4.7	47.1±2.6	47.7±2.7	50.5±2.6	49.7±2.8

	3-MCPD					
	0 ppm	9 ppm	28.5 ppm	90 ppm	285 ppm	900 ppm
TP (g/dl)	5.99±0.17	6.03±0.16	6.07±0.12	5.92±0.12	5.99±0.13	5.97±0.19
Alb (g/dl)	4.15±0.15	4.23±0.13	4.18±0.08	4.16±0.08	4.21±0.08	4.22±0.13
TG (mg/dl)	56.4±10.9	48.5±7.5	49.5±9.9	49.5±9.9	44.3±6.9*	41.4±10.6**
T-cho (mg/dl)	99.5±5.5	100.8±5.3	99.8±4.8	100.2±4.8	96.3±6.5	91.1±6.3**
BUN (mg/dl)	17.0±2.0	18.4±1.6	18.5±1.6	18.7±1.6	19.3±1.5*	18.6±2.0
Cre (mg/dl)	0.311±0.023	0.304±0.03	0.288±0.023	0.263±0.023***	0.250±0.024***	0.215±0.020***
Na (mEq/dl)	139.3±0.82	138.7±2.5	138.7±1.9	138.2±1.9	139.7±0.8	139.7±0.8
Cl (mEq/dl)	102.9±0.57	101.6±1.4	102.0±1.6	102.2±1.6	103.1±1.7	102.6±1.2
K (mEq/dl)	4.51±0.14	4.52±0.27	4.42±0.27	4.53±0.27	4.43±0.15	4.16±0.28*
Ca (mg/dl)	9.59±0.31	9.43±0.31	9.45±0.13	9.36±0.13	9.33±0.21	9.32±0.29
P (mg/dl)	5.74±0.27	5.55±0.29	5.49±0.36	5.48±0.35	5.31±0.43	5.43±0.65
AST (IU/l)	81.0±5.64	76.2±7.4	80.8±4.1	72.1±4.1**	69.9±4.6***	72.1±7.2**
ALT (IU/l)	40.0±5.44	36.5±4.2	39.3±4.1	36.5±4.1	37.0±6.6	38.5±4.9
ALP (IU/l)	512.8±74.9	537.0±48.4	523.2±37.2	502.1±37.2	501.4±67.9	498.4±56.1
γ-GTP (IU/l)	<3	<3	<3	<3	<3	<3

*, P<0.05, **, P<0.01, ***, P<0.001 vs 0 ppm, respectively

次に腎における病理組織学的所見について示す。腎においては尿細管病変、ボーマン嚢病変、炎症細胞浸潤が観察され、尿細管円柱が SHR ラットでは 900ppm 群、WKY ラットでは 285ppm 以上の群においてが有意に高頻度に認められた。その他の臓器においては、現在検討中である。

Histopathological Findings in **Kidney** of Rats Treated with 3-MCPD

SHR	3-MCPD (ppm)	0	9	28.5	90	285	900
	No. of rats	10	10	10	10	11	11
No abnormality detected		0	0	0	0	0	0
Tubular changes		10	9	8	9	10	11
Single cell necrosis		6	7	8	8	4	4
Regeneration		6	5	4	4	8	8
Nephropathy, retrograde		2	0	1	0	1	2
Cast, hyaline		2	1	2	6	6	10***
Glomerular changes							
Bowman's capsule metaplasia/hyperplasia		3	5	10**	10**	6	1
Inflammation							
Inflammatory cell infiltrates		5	3	4	9	10*	9

WKY	3-MCPD (ppm)	0	9	28.5	90	285	900
	No. of rats	10	10	10	10	11	11
No abnormality detected		0	0	0	0	0	0
Tubular changes		10	10	10	10	11	11
Single cell necrosis		9	10	9	10	11	11
Regeneration		2	1	1	0	4	3
Nephropathy, retrograde		0	0	2	0	0	0
Cast, hyaline		2	2	5	3	7*	7*
Glomerular changes							
Bowman's capsule metaplasia/hyperplasia		3	10**	10**	10**	7	4
Inflammation							
Inflammatory cell infiltrates		2	1	6	1	3	3

Summary of the Data (3-MCPD)

SHR	3-MCPD (ppm)				
	9	28.5	90	285	900
Body weight	-	-	-	-	-
Organ weight					
Liver (relative)	-	-	-	-	↑
Kidneys (absolute)	-	-	↑	↑	↑
Kidneys (relative)	↑	↑	↑	↑	↑
Lungs (absolute)	-	-	-	-	↓
Spleen (absolute)	-	-	-	-	↓
Blood pressure	-	-	-	-	-
Blood data					
MCH	-	-	↓	-	↓
Biochemical data					
Alb	-	-	-	↑	↑
Cre	-	-	-	↓	↓
K	↑	↑	↑	-	↓
Histopathology					
Kidney					
Cast, tubules	-	-	-	-	↑

WKY	3-MCPD (ppm)				
	9	28.5	90	285	900
Body weight	-	-	-	↓	↓
Organ weight					
Liver (absolute)	-	-	-	-	↓
Liver (relative)	-	-	-	↑	↑
Kidney (absolute)	-	↑	↑	↑	↑
Kidneys (relative)	↑	↑	↑	↓	↑
Brain (relative)	-	-	-	↑	↑
Lungs (absolute)	-	-	-	-	↓
Heart (absolute)	-	-	-	-	↓
Spleen (absolute)	-	-	-	-	↓
Adrenal (absolute)	-	-	-	↓	↓
Blood pressure	-	-	-	-	-
Blood data					
WBC	-	-	↓	↓	↓
RBC	-	-	↓	↓	↓
Hb	-	-	↓	↓	↓
Ht	-	-	↓	↓	↓
MCH	-	↑	-	↓	↓
Biochemical data					
TP	↓	-	-	↓	↓
T-chol	↓	-	-	-	↓
Cre	-	-	↓	↓	↓
K	-	-	-	-	↓
AST	-	-	↓	↓	↓
Histopathology					
L Kidney					
Cast, tubules	-	-	-	↑	↑

体重、解剖時の臓器重量、血液・生化学データおよび病理組織学的変化を示す。SHR および WKY ラットのいずれにおいても、3-MCPD を投与したすべての群で腎臓の相対重量の増加が観察された。低用量群では体重の変化はみられていないことから腎相対重量の増加を毒性所見と考え、SHR ラット、WKY ラットの両者とも、LOAEL を 9ppm とした。以上、今回のデータからは高血圧モデル動物と健常動物における 3-MCPD の NOAEL は言及することができず、9ppm 以下の用量での検討が必要であると考えられた。

（２）研究全体の成果、考察及び結論

糖尿病疾患モデル動物での検討：

糖尿病疾患モデル動物と健常動物でのアセトアミノフェンの NOAEL に違いはなかった。糖尿病という疾患を有する場合においても、アセトアミノフェンの場合、個体差 10 の不確実係数で充分である妥当性が示された。また、3-MCPD の暫定的な NOAEL は、糖尿病モデル動物の GK ラットでは 28.5 ppm、健常動物である Wistar ラットでは 9 ppm であり、これら NOAEL の差は 10 倍未満であった。今後、285 ppm 以下の群の病理組織像についての検索を進め、最終的な NOAEL の比較検討する。

高脂血症モデル動物での検討：

アセトアミノフェンの NOAEL は Lean および F344 ラットでは 2530 ppm、Fatty ラットでは 8000 ppm 以上と判断された。したがって、高脂血症モデル動物と健常動物との NOAEL の差は約 3.2 倍であり、現行の不確実係数 (x10) の範囲内に収まることが示された。病理組織学的評価を除いたデータでは、高脂血症モデル動物と健常動物とでは、3-MCPD の暫定的な NOAEL の差は 10 倍未満（いずれのラットでも 90 ppm）と判断された。

高血圧モデル動物での検討：

高血圧モデル動物と健常動物とでは、アセトアミノフェンの NOAEL の差は 10 倍未満であった。3-MCPD に関しては腎相対重量の増加を毒性所見と考え、SHR ラット、WKY ラットの両者とも、LOAEL を 9ppm とした。従って、今回のデータからは高血圧モデル動物と恒常動物における 3-MCPD の NOAEL は言及することができず、9ppm 以下の用量での検討が必要であると考えられた。

多くの人が罹患するいわゆる生活習慣病の代表である糖尿病、高脂血症、高血圧のそれぞれの疾患モデル動物と比較対照となる健常動物を用いて NOAEL に違いがあるかどうか、あるとしたら個体差 10 の範囲に収まるかどうかを検討した。被験物質としてはアセトアミノフェンと 3-MCPD を用いた。その結果、糖尿病、高脂血症に関しては NOAEL に差はないか、あるいは 10 倍未満であることが明らかとなり、通常のリスク評価で用いられている個体差としての不確実係数は 10 のままでよいことが明らかとなった。高血圧に関しては、アセトアミノフェンに関しては 10 倍未満であったが、3-MCPD は最低用量でも疾患モデル動物も対照とした健常動物にも毒性が見られたことから LOAEL しか得られず、3-MCPD の NOAEL を検討するにはさらに低用量での検討が必要であると思われた。

Ⅲ 本研究を基に発表した論文等

- 1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト
なし
- 2 本研究を基にした学会発表の実績
なし
- 3 特許及び特許出願の数と概要
なし
- 4 その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）
なし

IV 主任研究者による研究全体の自己評価

項目	評価結果	評価コメント
1 研究の妥当性	5	化学物質のヒトへの食品健康影響評価には、通常健常な動物を用いて行っているが、糖尿病など生活習慣病のハイリスクのヒトへの評価としての不確実係数も、健常者と同じでよいかどうかを明らかにした。
2 研究目標の達成度	5	当初の目標のとおり、生活習慣病の代表である糖尿病、高脂血症、高血圧のそれぞれの疾患モデル動物と健常な動物とで比較・検討し、それぞれが個体差10の不確実係数の範囲内であることを明らかにした。
3 研究成果の有用性	4	トへの健康影響評価の際に、健常な人への評価だけでなく生活習慣病のヒトへの評価に有用である。
合 計	14	
総合コメント： 多くのヒトが罹患する可能性の高い、糖尿病、高脂血症、高血圧等の生活習慣病のヒトへの食品健康影響評価を行う際に、現在行われている評価法で良いかどうかの検証を明らかにできた。この種類の研究は今までなされてこなかったため、基礎的なデータがなかったが、今回の研究で得られた知見は重要な情報を提供できたと考えている。		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述する。