

## クロロフィルの F344ラットを用いた13週間亜慢性毒性試験

古川文夫<sup>#</sup>・笠原健一郎・西川秋佳・今沢孝喜・広瀬雅雄

## A 13-week Subchronic Oral Toxicity Study of Chlorophyll in F344 Rats

Fumio Furukawa<sup>#</sup>, Ken-ichiro Kasahara, Akiyoshi Nishikawa,  
Takayoshi Imazawa and Masao Hirose

A 13-week subchronic toxicity study of chlorophyll (containing 40% oil) was performed in both sexes of F344 rats by feeding of CRF-1 powder diet containing 0, 0.18%, 0.55%, 1.66% and 5%, and vehicle (oil) alone. No animals died during the administration period and no changes in body weights and food intakes were found in any dosed groups. Some hematological, serum biochemical and histopathological changes were observed for the 5% -treated group, but these did not suggest obvious toxicity. These findings indicate that the treatment with 1.66% chlorophyll in diet for 13 weeks does not cause any changes in rats and the 5% feeding is not obviously toxic.

**Keywords:** Chlorophyll, F344 rat, Subchronic Toxicity

## はじめに

クロロフィルは植物界に広く存在するポルフィリン系色素で、コンフリーやアルファルファなどの食用緑色野菜やクロレラを原料とし、エタノールまたは有機溶剤で抽出して得られる<sup>1)</sup>。一般に食品添加物としてのクロロフィルは、変性を防ぐためにアセトン抽出物に食用油を加えた油溶性の緑色着色料である。主色素はクロロフィル a およびクロロフィル b の混合物で、クロロフィル成分としては10~11%を占め、性状は緑色から暗緑色のペースト状を呈し、アセトン、クロロホルム、エタノールに溶解するが、水に不溶である<sup>1)</sup>。用途としてはチューインガム、魚肉練製品、チョコレートに0.08~0.18%、健康食品に0.1~0.25%の割合で添加されている。その他に生菓子、ワサビ漬けなどに使用されている<sup>1)</sup>。

クロロフィルは化学構造上、一種のポルフィリン環の中央にマグネシウムがキレート結合をしている。このマグネシウムが酸性または加熱により離脱し、フェオフィチンとなる<sup>2)</sup>。このフェオフィチンからクロロフィルラーゼによりフィチル基が取れるとフェオフォルバイドとなる<sup>2)</sup>。フェオフォルバイドは光過敏症の原因物質であり、特にフェオフォルバイド a およびピロフェオフォルバイドは強い光過敏毒性をもつことが報告されている<sup>2)</sup>。このようにクロ

ロフィル分解産物の毒性についての報告は多々あるが、これまでにクロロフィルの毒性評価に関する報告はほとんどない。

今回、実験 I としてクロロフィルの安全性評価の一環として、13週間の亜慢性毒性試験を実施するとともに、実験 II としてクロロフィルの溶媒の影響を検討する目的で、クロロフィル非含有溶媒対照の毒性試験も追加実施した。

## 実験材料および方法

## 1. 動物ならびに飼育条件

5週齢の F344ラット雌雄各70匹を日本チャールス・リバー(株)より購入し、約1週間の馴化飼育の後、実験 I として雌雄とも各群10匹ずつ5群に配した。また、実験 II として雌雄とも各群10匹を2群に配した。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度24±1℃、湿度55±5%、換気回数18回/時間、蛍光照明12時間(7~19時)とした。動物は、ポリカーボネート製箱型ケージに5匹ずつ収容し、床敷は三協ラボサービス(株)のソフトチップを用い、週2回交換した。また、飲料水として水道水を自由に摂取させた。

## 2. 被験物質ならびに投与量

クロロフィルは原体として日本葉緑素(株)から供与を受けた。実験に使用したクロロフィルは、ムラサキ科コンフリーよりアセトン抽出で得られたクロロフィル抽出物が60%に食用油(デザイン200C:日本リーバ)40%を加えたものである。主色素はクロロフィル a およびクロロフィル b の混合物で、クロロフィル成分としては18.5%である。

<sup>#</sup>To whom correspondence should be addressed: Fumio Furukawa; Division of Pathology, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-9819; Fax 03-3700-1425; E-mail: furukawa@nihs.go.jp

実験Ⅰとして、既実施した予備試験の結果に基づき、最高用量を5%とし、公比3で除して以下の用量を1.66, 0.55, 0.18%に設定した。それぞれ粉末飼料(オリエンタル酵母社)に混じて13週間自由に摂取させ、また対照群には粉末飼料のみを同様に摂取させた。

実験Ⅱとして、溶媒の影響を検討するため、クロロフィル非含有溶媒対照飼料(デザイン200Cと $\alpha$ -トコフェロール含有)および粉末飼料のみを同様に摂取させた。

### 3. クロロフィル含有および非含有飼料の調製方法

遮光ビンにクロロフィル0.1%の濃度になるように $\alpha$ -トコフェロール(シグマ社)を酸化防止のために加えた。 $\alpha$ -トコフェロールの添加濃度は、事前に飼料の安定性試験を実施して決定した。アセトンで溶解後、それを粉末飼料に混じり、5%クロロフィル添加飼料を調製、ドラフト内に24時間放置し、脱アセトンを行った。飼料は隔週ごとに5%濃度飼料を作製して分注後、真空パックで密封、冷凍庫に保存した。飼料は保存飼料を基に週2回作製し、粉末給餌器の上にステンレス板を置き遮光した。またクロロフィル非含有溶媒添加飼料を同様の手順で調製した。

### 4. 観察ならびに検索方法

投与期間中、一般状態の観察を連日実施し、体重および摂餌量は毎週1回測定した。動物は、剖検日前日より一晩絶食させ、翌日エーテル麻酔下で腹部大動脈から採血後、屠殺剖検した。

血液学的検査は、自動血球計数装置(Sysmex M-2000, 東亜医用電子社)を用いて、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)、MCV、MCH、MCHCおよび血小板数(PLT)について測定した。

血清生化学的検査は、分離した血清を凍結後、総蛋白(TP)、A/G比、アルブミン(Alb)、総コレステロール(T.Chol)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRN)、ナトリウム(Na)、塩素(Cl)、カリウム(K)、カルシウム(Ca)、無機リン(P)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ(AsT)、アラントランスアミナーゼ(AIT)、アルカ

リフォスファターゼ(ALP)および $\gamma$ -グルタミルトランスアミナーゼ( $\gamma$ -GT)についてSRL社に依頼し測定した。

諸臓器は肉眼的に観察後摘出し、脳、下垂体、肺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓および精巣の重量を測定した。上記の臓器に加え、眼球、ハーダー腺、脊髄、胃、小腸、大腸、膵臓、膀胱、皮膚、乳腺、リンパ節、気管、食道、甲状腺、胸腺、舌、大腿筋、精巣上体、精囊、前立腺、子宮および腔を10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。固定臓器は、全例の全臓器を常法に従い、パラフィン包埋後、薄切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。

### 5. 統計学的処理法

体重、血清生化学的検査、血液学的検査および臓器重量の測定値は、分散分析(ANOVA)による検定を行った。

## 結 果

### 1. 一般状態および死亡動物

実験ⅠおよびⅡでの投与期間中の死亡動物は認められず、いずれの動物においても一般状態の異常は認められなかった。

### 2. 体重および摂餌量

実験Ⅰにおいて、体重は雄の1.66%群が投与4週から対照群を若干上回って推移したが、その他の投与群ではほぼ同様な推移を示した。雌では対照群とほぼ同様の体重増加が認められ、被験物質投与に起因すると思われる異常は認められなかった。実験Ⅱでも異常は認められなかった。

摂餌量を表1に示す。実験Ⅰでは、雌雄とも投与期間を通じて対照群とほぼ同様な推移を示した。1日当たりの摂餌量は雄において対照群が13.7gであるのに比し、各投与群はいずれも14g以上であり、摂餌量の減少は認められなかった。また雌においても同様の傾向が認められた。クロロフィルの総摂取量は、雄では5%群で195.4g/kg体重、1.66%群で66.1g、0.55%群で22.7g、0.18%群で7.5g、雌では5%群で239.8g、1.66%群で93.0g、0.55%群で27.3g、0.18%群で9.2gであり、雌雄ともに投与

Table 1. Food consumption and intake of chlorophyll

	Group	Food consumption (g/rat/day)		Daily intake (g/kg/day)		Total intake (g/kg)	
		Male	Female	Male	Female	Male	Female
Exp. I	5%	14.0	9.4	2.146	2.635	195.366	239.841
	1.66%	14.8	9.6	0.726	0.911	66.146	92.950
	0.55%	14.7	9.5	0.249	0.300	22.705	27.323
	0.18%	14.5	9.8	0.082	0.100	7.532	9.157
	0%	13.7	9.4	—	—	—	—
Exp. II	vehicle	12.5	7.1	—	—	—	—
	0%	13.8	8.1	—	—	—	—

Table. 2 Serum biochemical and hematological data of F344 male rats treated with chlorophyll for 13 weeks

♂	Experiment I					Experiment II	
	5%	1.66%	0.55%	0.18%	0%	Vehicle	0%
TP (g/dl)	6.3 ± 0.2 <sup>a)</sup>	6.4 ± 0.2	6.4 ± 0.1	6.4 ± 0.2	6.3 ± 0.2	6.6 ± 0.2	6.5 ± 0.2
A/G	2.4 ± 0.1	2.5 ± 0.1*	2.6 ± 0.1*	2.5 ± 0.1*	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.3	2.3 ± 0.1
AIB (g/dl)	4.4 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.6 ± 0.1*	4.5 ± 0.1	4.4 ± 0.2	4.6 ± 0.2	4.5 ± 0.1
T.Cho (mg/dl)	61 ± 4	68 ± 5	66 ± 3	66 ± 7	66 ± 6	71 ± 6	66 ± 6
BUN (mg/dl)	20.5 ± 1.1	20.4 ± 1.8	19.0 ± 0.6	19.0 ± 1.8	18.8 ± 1.0	17.6 ± 1.0	18.0 ± 1.1
CRN (mg/dl)	0.3 ± 0	0.3 ± 0	0.3 ± 0	0.3 ± 0	0.2 ± 0	0.3 ± 0	0.3 ± 0
Ca (mg/dl)	10.5 ± 0.3	10.5 ± 0.2	10.5 ± 0.3	10.7 ± 0.2	10.4 ± 0.1	10.5 ± 0.1	10.3 ± 0.2
P (mg/dl)	6.2 ± 0.5	5.9 ± 0.3*	6.1 ± 0.2*	6.1 ± 0.4*	6.6 ± 0.3	5.6 ± 0.3	5.8 ± 0.4
Na (mEq/l)	144 ± 1	145 ± 1	143 ± 1*	144 ± 1	145 ± 1	146 ± 1	146 ± 1
K (mEq/l)	4.7 ± 0.2	4.7 ± 0.3	4.6 ± 0.1	4.4 ± 0.3*	4.7 ± 0.2	4.4 ± 0.1	4.4 ± 0.3
Cl (mEq/l)	104 ± 1	105 ± 1	104 ± 1	105 ± 1	105 ± 1	106 ± 1	106 ± 1
γ-GT (IU/l)	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0
AsT (IU/l)	114 ± 17*	105 ± 12*	86 ± 10	78 ± 6	88 ± 10	86 ± 31	83 ± 12
AIT (IU/l)	69 ± 10*	69 ± 6*	67 ± 9	62 ± 4	59 ± 5	61 ± 11	57 ± 5
ALP (IU/l)	357 ± 14	333 ± 24	309 ± 28	320 ± 16	312 ± 101	336 ± 45	325 ± 20
WBC (10 <sup>2</sup> /μl)	52 ± 12*	48 ± 5	40 ± 4	41 ± 4	39 ± 7	44 ± 6	41 ± 6
RBC (10 <sup>4</sup> /μl)	969 ± 73	962 ± 40	893 ± 59	912 ± 22	925 ± 77	960 ± 25*	931 ± 24
Hb (g/dl)	16.0 ± 1.0	16.0 ± 0.6	15.2 ± 0.9	15.6 ± 0.3	15.8 ± 1.2	15.8 ± 0.3	15.4 ± 0.4
Ht (%)	46.5 ± 3.4	46.2 ± 1.8	42.9 ± 2.8	43.8 ± 0.9	44.4 ± 3.7	46.7 ± 1.0*	44.9 ± 1.1
MCV (fl)	48.0 ± 0.4	48.0 ± 0.3	48.0 ± 0.2	48.1 ± 0.4	48.0 ± 0.4	48.1 ± 0.4	48.2 ± 0.4
MCH (pg)	16.5 ± 0.2*	16.6 ± 0.1*	17.0 ± 0.3	17.1 ± 0.2	17.1 ± 0.4	16.5 ± 0.2	16.5 ± 0.2
MCHC (g/dl)	34.4 ± 0.4*	34.7 ± 0.3*	35.4 ± 0.5	35.7 ± 0.4	35.6 ± 1.0	33.8 ± 0.3	34.2 ± 0.3
PLT (10 <sup>12</sup> /μl)	79.1 ± 5.5	79.3 ± 4.3	77.4 ± 6.2	77.0 ± 4.7	78.0 ± 5.8	75.7 ± 1.7*	77.7 ± 2.0

<sup>a)</sup>: Mean ± S.D.

\*: Significantly different from the respective control group at p &lt; 0.05

Table. 3 Serum biochemical and hematological data of F344 female rats treated with chlorophyll for 13 weeks

♀	Experiment I					Experiment II	
	5%	1.66%	0.55%	0.18%	0%	Vehicle	0%
TP (g/dl)	6.1 ± 0.2 <sup>a)</sup>	6.3 ± 0.2	6.3 ± 0.3	6.3 ± 0.2	6.2 ± 0.3	6.7 ± 0.3	6.5 ± 0.2
A/G	3.1 ± 0.1	3.0 ± 0.2	3.3 ± 0.4	2.9 ± 0.2*	3.3 ± 0.3	2.9 ± 0.2	2.8 ± 0.2
AIB (g/dl)	4.6 ± 0.1	4.7 ± 0.2	4.8 ± 0.2	4.7 ± 0.2	4.7 ± 0.2	5.0 ± 0.2	4.8 ± 0.1
T.Cho (mg/dl)	85 ± 8	95 ± 9	94 ± 10	92 ± 12	94 ± 11	95 ± 14	94 ± 9
BUN (mg/dl)	17.4 ± 1.3	18.2 ± 1.6	18.1 ± 2.4	18.8 ± 2.3	18.2 ± 2.4	16.2 ± 1.6	15.6 ± 1.5
CRE (mg/dl)	0.3 ± 0	0.3 ± 0	0.3 ± 0	0.3 ± 0	0.3 ± 0	0.3 ± 0	0.3 ± 0
Ca (mg/dl)	10.2 ± 0.1*	10.4 ± 0.21	10.3 ± 0.4	10.4 ± 0.2	10.7 ± 0.5	10.6 ± 0.4	10.2 ± 0.2
P (mg/dl)	5.6 ± 0.3*	6.2 ± 0.5	6.2 ± 0.7	5.9 ± 0.4*	6.9 ± 1.0	5.0 ± 0.8	5.4 ± 0.5
Na (mEq/l)	144 ± 1	145 ± 1	145 ± 2	146 ± 1	145 ± 2	147 ± 3*	144 ± 1.1
K (mEq/l)	4.4 ± 0.2	4.1 ± 0.4	4.4 ± 0.6	4.0 ± 0.3	4.6 ± 0.9	4.0 ± 0.7	4.0 ± 0.3
Cl (mEq/l)	106 ± 1	106 ± 2	106 ± 1	107 ± 1	107 ± 2	107 ± 2	108 ± 1
γ-GT (IU/l)	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0
AsT (IU/l)	89 ± 7*	78 ± 6	75 ± 5	71 ± 6	74 ± 6	72 ± 8	69 ± 7
AIT (IU/l)	48 ± 5*	39 ± 4	41 ± 3	40 ± 3	42 ± 5	41 ± 5	39 ± 3
ALP (IU/l)	234 ± 26	204 ± 17	221 ± 23	201 ± 34	219 ± 25	201 ± 27	198 ± 34
WBC (10 <sup>2</sup> /μl)	38 ± 5*	38 ± 6*	29 ± 7	32 ± 5	29 ± 8	28 ± 9*	41 ± 9
RBC (10 <sup>4</sup> /μl)	884 ± 33	820 ± 46	844 ± 42	805 ± 54*	864 ± 42	862 ± 23	861 ± 26
Hb (g/dl)	16.0 ± 0.7	15.2 ± 0.7	15.6 ± 0.7	15.1 ± 1.1	15.8 ± 0.6	15.2 ± 0.4	15.4 ± 0.4
Ht (%)	44.4 ± 1.7	41.5 ± 2.5	42.7 ± 2.1	41.0 ± 2.8	43.6 ± 2.2	43.3 ± 1.1	43.4 ± 1.3
MCV (fl)	53.2 ± 9.6	50.6 ± 0.2	50.6 ± 0.2	50.9 ± 0.4	50.5 ± 0.2	50.2 ± 0.2	49.4 ± 3.3
MCH (pg)	18.1 ± 0.2	18.6 ± 0.2	18.5 ± 0.4	18.7 ± 0.4	18.4 ± 0.2	17.7 ± 0.1	17.9 ± 0.1
MCHC (g/dl)	36.2 ± 0.4	36.8 ± 0.6	36.6 ± 0.7	36.8 ± 0.8	36.4 ± 0.5	35.1 ± 0.2	35.5 ± 0.3
PLT (10 <sup>12</sup> /μl)	75.8 ± 4.7	77.6 ± 3.3	77.1 ± 5.4	74.6 ± 5.0	78.2 ± 5.4	75.8 ± 6.0	79.2 ± 4.8

<sup>a)</sup>: Mean ± S.D.

\*: Significantly different from the respective control group at p &lt; 0.05

濃度に依存した摂取量であった。実験Ⅱでは無処置対照群と溶媒対照群の間に摂取量に関する差は認められなかった。

### 3. 血液学および血清生化学的検査

血液学および血清生化学的検査の結果を表2および3に示す。実験Ⅰの雄において、AsTおよびAITは1.66%以上の群、A/G比は1.66%群~0.18%群、ALBは0.55%群で対照群に比し有意に増加し、Pは1.66%群~0.18%群、Naは0.55%群、Kは0.18%群で有意に減少した。WBCは5%群で有意に増加し、MCHおよびMCHCは1.66%以上の群で有意に減少した。雌でもAsTおよびAITが5%群で対照群に比し有意に増加したが、投与量に相関するものではなかった。また、A/G比は0.18%群、Caは5%群、Pは5%群および0.18%群で対照群に比し有意に減少した。WBCは1.66%以上の群で有意に増加し、RBCは0.18%群で有意に減少した。

実験Ⅱの雄において、RBCおよびHtは溶媒対照群で無処置対照群に比し有意に増加し、PLTは有意に減少した。雌においては、Naは溶媒対照群で対照群に比し有意に増加し、WBCは溶媒対照群で対照群に比し有意に減少した。また、実験ⅠおよびⅡで、白血球型別分類については雌雄ともに各群間に有意差を認めなかった。

### 4. 臓器重量

相対重量の結果を表4に示す。実験Ⅰで雄1.66%群の精巢(右)重量が対照群に比し有意に減少した以外、雌雄ラットのその他の臓器では、対照群と比し有意差は認められ

なかった。また、実験Ⅱにおいても、両群間に有意差は認められなかった。

### 5. 病理組織学的所見

病理組織学的所見の結果を表5に示した。肝臓における類洞壁細胞の空胞変性が雌雄の1.66%群、0.55%群および0.18%群で全例、肝細胞の空胞変性が雌雄の1.6%群、0.55%群および0.18%群ではほぼ全例認められたが、5%群には観察されなかった。その組織像は、類洞壁細胞が空胞を有し、その空胞内に結晶状の物質が散見された。これらの空胞を有する類洞壁細胞が肝細胞を圧排する像や、崩壊像も観察された。これに対し、肝細胞にみられた空胞は比較的小型であり、結晶状の物質の存在も明らかではなかった。その他に、組織球を主体とする小肉芽腫が雌では5%群で軽微であるが9例みられた。いずれの変化も肝小葉内に散在し、分布に偏りはみられなかった。肝細胞の変化は類洞壁細胞の変化がみられた部位に一致して観察されたが、肉芽腫の発生部位との関連性は明らかでなかった。

腸間膜リンパ節の小肉芽腫が雄では5%群で1例、雌では5%群で2例、大腿骨の骨髄では組織球を主体とする大型の肉芽腫が雌では5%群で2例、1.66%群で1例、胸骨骨髄においても大腿骨骨髄と同様の所見が1.66%群で1例に認められた。対照群には変化が認められなかった。

実験Ⅱでは溶媒対照群および対照群の肝臓、骨髄において上記の変化は見られなかった。

Table 4 Relative organ weights of rats treated with chlorophyll

♂	Experiment I					Experiment II	
	5%	1.66%	0.55%	0.18%	0%	Vehicle	0%
Body Weight(g)	326.0 ± 14.30 <sup>a)</sup>	339.1 ± 15.12	325.5 ± 16.12	324.0 ± 21.46	324.0 ± 13.42	309.9 ± 14.1	315.2 ± 13.4
Liver(g%)	2.24 ± 0.05	2.24 ± 0.05	2.22 ± 0.07	2.25 ± 0.07	2.24 ± 0.05	2.19 ± 0.06	2.24 ± 0.05
Heart(g%)	0.29 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.01
Kidney(R)(g%)	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.29 ± 0.01
(L)(g%)	0.30 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.29 ± 0.01
Testis(R)(g%)	0.47 ± 0.03	0.45 ± 0.04*	0.46 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.49 ± 0.02	0.49 ± 0.02	0.48 ± 0.02
(L)(g%)	0.48 ± 0.03	0.46 ± 0.02	0.49 ± 0.02	0.48 ± 0.02	0.48 ± 0.02	0.49 ± 0.04	0.49 ± 0.02
Brain(g%)	0.62 ± 0.02	0.58 ± 0.03	0.61 ± 0.02	0.61 ± 0.04	0.61 ± 0.02	0.62 ± 0.03	0.61 ± 0.03
Lung(R)(g%)	0.22 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.02 ± 0.03	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.01
(L)(g%)	0.12 ± 0.00	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01
Adrenal(R)(g%)	0.0047 ± 0.0008	0.004 ± 0	0.005 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.005 ± 0	0.005 ± 0
(L)(g%)	0.0052 ± 0.0008	0.005 ± 0	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.005 ± 0.001
Spleen(g%)	0.21 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.01

  

♀	Experiment I					Experiment II	
	5%	1.66%	0.55%	0.18%	0%	Vehicle	0%
Body Weight(g)	178.6 ± 7.910	175.9 ± 5.855	177.6 ± 4.448	180.8 ± 6.202	175.3 ± 6.486	153.5 ± 7.1	155.4 ± 8.0
Liver(g%)	2.20 ± 0.12	2.20 ± 0.06	1.94 ± 0.68	2.22 ± 0.09	2.17 ± 0.07	2.18 ± 0.28	2.14 ± 0.10
Heart(g%)	0.33 ± 0.02	0.34 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.35 ± 0.03	0.35 ± 0.02	0.33 ± 0.01	0.35 ± 0.01
Kidney(R)(g%)	0.32 ± 0.02	0.33 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.34 ± 0.02	0.33 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.32 ± 0.01
(L)(g%)	0.32 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.56 ± 0.71	0.34 ± 0.02	0.33 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.33 ± 0.01
Brain(g%)	1.01 ± 0.04	1.03 ± 0.04	1.03 ± 0.03	1.02 ± 0.03	1.02 ± 0.05	1.13 ± 0.05	1.12 ± 0.05
Lung(R)(g%)	0.28 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.26 ± 0.01	0.28 ± 0.03
(L)(g%)	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.02
Adrenal(R)(g%)	0.011 ± 0.001	0.011 ± 0.001	0.011 ± 0.001	0.011 ± 0.002	0.012 ± 0.001	0.011 ± 0.001	0.011 ± 0.002
(L)(g%)	0.012 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.013 ± 0.007	0.013 ± 0.002	0.013 ± 0.001	0.011 ± 0.002	0.012 ± 0.003
Spleen(g%)	0.24 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.23 ± 0.01

<sup>a)</sup>: Mean ± S.D.

\*: Significantly different from the respective control group at p < 0.05

Table. 5 Histopathological findings in rats treated with chlorophyll

		Male					Female																
		5%		1.66%		0.55%		0.18%		0%		5%		1.66%		0.55%		0.18%		0%			
		-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
Liver	vacuolar degeneration of sinusoidal cell	10	0	0	10	0	10	0	10	0	10	0	0	10	0	10	0	0	10	0	10	0	
	vacuolar degeneration of hepatocyte	10	0	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	0	10	0	10	0	1	9	10	0
Mesenteric lymph node	microgranuloma	9	1	10	0	10	0	10	0	10	0	8	2	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0
Femoral bone marrow	microgranuloma	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	8	2	9	1	10	0	10	0	10	0	10	0
Sternum bone marrow	microgranuloma	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	9	1	10	0	10	0	10	0	10	0
Small intestine	microgranuloma	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0

- : negative and/or weakly positive, + : positive

## 考 察

クロロフィルの毒性は、マウスへの経口投与で LD<sub>50</sub> ≥ 10 g/kg, 腹腔内投与で LD<sub>50</sub> = 400 g/kg, 静脈内投与で LD<sub>50</sub> = 285 g/kg, モルモットの静脈内投与で LD<sub>50</sub> = 80 g/kg であり, 変異原性試験は Ames test の TA 98, TA100, TA1537, TA1535 および TA1538 を用いた試験で陰性の報告がある<sup>1)</sup>. 一方, クロロフィルは 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2) およびその誘導体である 3-hydroxyamino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole に対して, ショウジョウバエの系<sup>3)</sup> および Ames 試験系<sup>4)</sup> において変異原性を阻害するとの報告がある. さらにクロロフィリンは *in vivo* で 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) の乳腺発癌を抑制し, 乳腺における PhIP-DNA 付加体の形成も抑制した報告もある<sup>5)</sup>. クロロフィルの毒性の報告はないが, その分解産物であるフェオフォルバイド a やピロフェオフォルバイド a は, 光照射下において活性酸素を生成し, これが細胞障害を引き起こし, 皮膚過敏症を発生させる報告がある<sup>2)</sup>. 実験に供した飼料には, 日本葉緑素に依頼してフェオフォルバイドを測定した結果, 検出されなかった. クロロフィルは動物室内の条件下で放置すると, 微量のフェオフィチンが生成され, クロロフィラーゼの存在下でフェオフォルバイドが生成される. しかしクロロフィルのアセトン抽出物中にはクロロフィラーゼが存在しないために, フェオフォルバイドは生成されなかったものと考えられる. 飼料中における分解を防止するために α-トコフェロールを添加し, 粉末給餌器に遮光

用のステンレス板を置き, 飼料は頻回に交換した.

今回の実験では雌雄ともに体重の増加抑制, または臓器重量の減少はほとんど認められなかった. 病理組織学的検索で全動物の全臓器を検索した結果, 肝および種々のリンパ節に軽度の変化がみられた. 雌雄の 5% 投与群を除く投与各群で, 肝細胞および類洞壁細胞の空胞変性が認められた. この変化は発生部位がほぼ一致していることから相互の関連性が示唆されるが, 類洞壁細胞の空胞性変化は肝細胞のそれに比し, 程度が強いこと, 双方の空胞に形態的な差異が認められることなどから, 発生機序が異なる可能性も推測された. これらの変化は発生部位が散在性で, 用量相関性も認められていないことから, 被験物質投与に起因する可能性は低いと考えられる. その他に雌の 5% 群で肝の小肉芽腫が発生したが, この病変は軽微で, 5% 群のみに発生し被験物質の用量相関性がないこと, 雌に限定していることから, 被験物質投与に起因する可能性は低いと考えられた.

雌雄の腸間膜リンパ節および雌のバイエル板, 大腿骨および胸骨骨髓に肉芽腫性変化が観察され, 5% 投与群で増加あるいは増強される傾向が示されたが, 発生が比較的低頻度であることから被験物質投与による影響とは断定できなかった. また雌雄の 1.66% 以上の群で AsT および AIT は増加したが, それに相応する病理組織学的変化は認められなかったことから, 被験物質投与による影響とは断定できなかった. その他に雄の投与群の A/G 比, ALB, P, Na, K, WBC, MCH および MCHC, 雌の投与群の A/G 比, Ca, P, WBC, RBC, 実験Ⅱの雄における RBC, Ht,

PLT, 雌におけるNa, WBCの変動は比較的軽度な変動であり, いずれも亜慢性毒性試験における対照群の背景データの範囲内にあり, 他の関連するパラメータにも著しい変化が認められなかったことから, 毒性学的意義に乏しい変化と考えられた<sup>6-8)</sup>. 実験Ⅱの溶媒対照群の雄においてRBC, HtおよびPLTに, 雌のNaおよびWBCに変動が認められたが, 変動幅が比較的小さいことから, 実験Ⅰと同様に毒性学的意義に乏しい変化と考えられた.

以上の結果, クロロフィルを混餌で13週間雌雄のラットに投与したところ, 被験物質に起因すると思われる変化は最高濃度の5%でも病理組織学的に顕著な毒性変化は認められなかったため, 無毒性量は5%と考えられるが, 肝臓およびリンパ節の肉芽腫形成を踏まえ, 無影響量は1.66%と推定された.

#### 文 献

- 1) 藤井正美監修, 清水孝重, 中村幹雄著: “概説「食用天然色素」” pp.127-131 光琳 東京 (1993)
- 2) 糸川嘉則責任編集, 毒性試験講座16 食品, 食品添加物 pp.173-187 地人書館 東京 (1992)
- 3) Negishi, T., Arimoto, S., Nishizaki, C. and Hayatsu, H.: Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2). *Carcinogenesis*, **10**, 145-149 (1989)
- 4) Arimoto, S., Ohara, Y., Namba, T., Negishi, T. and Hayatsu, H.: Inhibition of the mutagenicity of amino acid pyrolysis products by hemin and other biological pyrrole pigments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 245-250 (1980)
- 5) Hasegawa, R., Hirose, M., Kato, T., Hagiwara, A., Boonyaphiphat, P., Nagao, M., Ito, N. and Shirai, T.: Inhibitory effect of chlorophyllin on PhIP-induced mammary carcinogenesis in female F344 rats. *Carcinogenesis*, **16**, 2243-2246 (1995)
- 6) 池崎信一郎, 西川秋佳, 古川文夫, 今沢孝喜, 榎並倫宣, 三井雅之, 高橋道人: F344ラットを用いたL-ヒスチジン塩酸塩の13週間亜慢性毒性試験. 衛生試験所報告, **112**, 57-63 (1994)
- 7) 池崎信一郎, 西川秋佳, 古川文夫, 今沢孝喜, 三井雅之, 榎並倫宣, 高橋道人: ジョサマイシンのF344ラットにおける13週間亜慢性毒性試験. 衛生試験所報告, **113**, 44-50 (1995)
- 8) 小野寺博志, 三森国敏, 安原加壽雄, 竹川 潔, 高橋道人: ファファイア色素のF344ラットにおける13週間亜慢性毒性試験. 国立医薬品食品衛生研究所報告, **115**, 99-106 (1997)