

シソ抽出物の F344 ラットにおける 13 週間亜慢性毒性試験

劉 雲・小野寺博志*・高木久宜・糀谷高敏・安原加壽雄・三森国敏・広瀬雅雄

A 13-week Subchronic Oral Toxicity Study of *Perilla* Extracts in F344 RatsLiu Yun, Hiroshi Onodera[#], Hisayoshi Takagi, Takatoshi Koujitani, Kazuo Yasuhara, Kunitoshi Mitsumori and Masao Hirose

A 13-week subchronic oral toxicity study of *Perilla* extracts in drinking water containing 0%, 2.5%, 5% and 10% extracts was performed in both sexes of F344 rats. Rats were randomly divided into 4 groups each consisting of 10 males and 10 females. No animals died during the period of administration. There were no treatment-related changes in body weight gain or in hematological or blood biochemistry values. Nor were any treatment-related histopathological changes observed in the highest dose group. These findings indicate that ingestion of 10% *Perilla* extracts in drinking water for 13-week does not cause any toxicological changes in rats.

Keywords: *Perilla* extracts, F344 rats, subchronic toxicity study.

はじめに

シソ抽出物はシソ科シソの種子または葉よりアルコール等で抽出濃縮して得られ、その主成分はテルペノイドで性状は液状である。用途は調味料等の各種食品素材として主に日持向上や香料を目的として使用されている。シソ抽出物についての安全性試験成績は現在まで無く、天然香料やシソ色素として使用されているものについて変異原性は陰性と報告されている¹⁾。また、一般飲食物添加物として使用されているシソ色素のラット、マウスにおける急性経口毒性試験で LD₅₀ 値は 5 g/kg 以上とされている。しかし、その他の毒性に関する情報は無い。そこで、今回シソ抽出物についての毒性を明らかにするためラットにおける 13 週間反復投与毒性試験を行った。

試験材料および方法

1. 被験物質ならびに投与量：

シソ抽出物は梅屋(株)(和歌山)より供与されたものを用いた。13 週間反復投与毒性試験に先立ち、動物の検体摂取状況を検討する目的で、5 %での 2 週間予備試験を行った。その結果、体重増加率、飼料摂取量、検体混入飲料水

の忌避などは対照群と比べ差は無く、むしろ飲水量は増加する傾向が認められた。その結果と被験物質が抽出物であることを考慮して、本試験のシソ抽出物の濃度を最高 20 %とし、以下公比 2 で減じ 10, 5, 2.5, 0 %とした。またシソ抽出物はシヨ糖に溶解しているため、シヨ糖の影響を考慮し、シヨ糖 20 %の溶媒対照群も設定して実験を開始した。しかし実験開始当初よりシソ抽出物投与群は飲料水の消費が激しく、最高で対照群の 10 倍近くまで達した。供給検体の不足と、実摂水量の算定が不可能なため、投与開始 10 日目で最高用量の 20 %および溶媒対照シヨ糖 20 %群を実験から除外して実験を継続した。

2. 動物および方法：

5 週齢の F344 ラット雌雄各 60 匹を日本チャールスリバー(株)より購入し、約 1 週間馴化飼育後、雌雄とも各群 10 匹ずつ 6 群に分けて実験を行った。動物の飼育はバリアーシステムの動物飼育室にて行い、室内環境条件は温度 24±1 °C、湿度は 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。飼料は基礎飼料(CRF-1)を自由に摂取させた。

被験物質の調製は原液を調製時まで 4 °C に保存し、週 2-3 回または不足時に適宜新しいものと交換した。一般状態および死亡動物の有無を毎日観察し、体重および飼料摂取量は毎週測定し摂水量は交換時に残量を測定した。投与開始 13 週後に全生存動物を屠殺剖検し、試験を終了した。

[#] To whom correspondence should be addressed: Hiroshi Onodera; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-Ku, Tokyo, 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-9845 Fax: 03-3700-1425 E-mail address: onodera@nihs.go.jp

動物は屠殺の前日より一晩絶食後、エーテル麻酔下で開腹し、腹部大動脈より採血を行った。血液学的検査には多項目自動血球計数装置（東亜医用電子 Sysmex M-2000 型）を用い、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン濃度 (Hb)、ヘマトクリット値 (Ht)、白血球数 (WBC) および血小板数 (PLT) を測定するとともに、血液塗末標本を作製し、血液細胞自動分析装置（立石電気 MICROX HEG-120A 型）を用いて以下の血液像について分類した。分葉核好中球 (Seg)、好酸球 (Eosin)、リンパ球 (Lymph)、単球 (Mono)、有核赤血球 (Ebl)。また総蛋白 (TP)、アルブミン・グロブリン比 (A/G)、総コレステロール (TC)、トリグリセライド (TG)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRN)、カルシウム (Ca)、無機リン (P)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、クロール (Cl)、グルタミン オキサロアセテック トランスアミラーゼ (GOT)、グルタミン ピルピック トランスアミラーゼ (GPT)、アルカルホス ファターゼ (ALP)、およびアルブミン (Alb) の各項目についての血清生化学的検査を (株) SRL で実施した。動物を剖検後、脳、心、肺、腎、副腎、脾、肝および精巣の重量を測定した。また、上記臓器に加え主要臓器を 10 % 中性緩衝ホルマリン液で固定した後、常法に従い薄切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、対照群と最高用量群について病理組織学的検索を行った。

3. 統計学的解析：

体重、血液学的検査、血清生化学的検査および臓器重量の測定値は Bartlett の方法による等分散の検定を行い、分散が等しい場合には一元配置分散を行った。群間に有意な差が認められた場合、各群の動物数が等しい時には Dunnett 法、また動物数が等しくない場合は Scheffe 法により平均値の比較を行った。分散が等しくない場合には Kruskal-Wallis の検定を行い、有意差が認められた場合は、ノンパラメトリックの Dunnett 法または Scheffe 法による検定を行った。

4. 結 果：

(1) 死亡動物および体重変化：

実験全期間を通じ死亡動物は認められなかった。

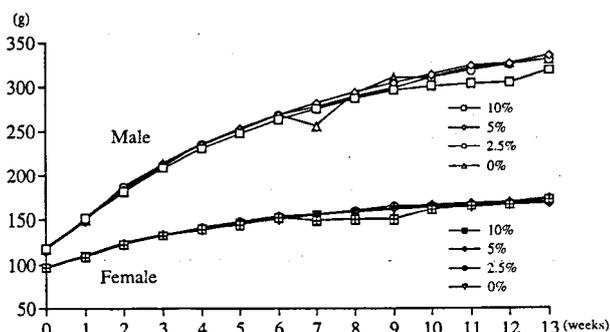


Fig.1. Body weight curve in rats given water containing *Perilla* extracts for 13 weeks

体重は雄の 10 % 群で 9 週目以降軽度の増加抑制傾向が認められたが、有意な変動ではなかった (Fig.1, Table1)。雌も同様に 10 % 群で 7 週以降増加抑制傾向が認められたが、10 週目以降は他の群と同様の推移を示し、実験最終時には差は認められなくなった。

(2) 摂水量および飼料摂取量：

摂水量は検体の用量に比例して増加したが、雄の 10 % 群では対照群の約 2 倍、雌ではその傾向が著しく 10 % 群で対照群の約 4 倍に増加した。しかし飼料摂取量は摂水量とは逆に最高投与群で減少する傾向を示した (Table1)。摂水量から積算した一日検体摂取量は投与群で摂水量が増加したため、実験開始時の公比 2 での設定より大きく上回った。

(3) 血液学および血清生化学的検査：

血液学的検査では、雄の 5 % および 10 % 群と雌の 10 % 群で WBC の有意な増加が認められた (Table2)。血液像での白血球百分率では、雄の全投与群で Seg が有意に増加し、Lymph が有意に増加した。

その他、雌の 2.5 % および 5 % 群で Seg が増加し、5 % 群で Lymph が減少した。雌の 5 % 群では Mono の増加が

Table 1. Body weight, water consumption, food intake in rats given water containing *Perilla* extracts for 13 weeks

Group (%)	Final body weight (g)	Water consumption (g/rat/day)	Diet intake (g/rat/day)	Daily <i>Perilla</i> extracts intake (g/kg/day)	
Male	0	320.4 ± 13.9	22.2	14.4	0.0
	2.5	317.8 ± 13.0	24.7	14.5	1.94
	5	323.1 ± 12.0	33.1	14.2	5.12
	10	305.5 ± 19.1	42.6	12.6	13.9
Female	0	158.5 ± 5.4	14.8	8.7	0.0
	2.5	160.4 ± 8.7	30.5	9.2	4.76
	5	162.8 ± 9.0	47.3	8.4	14.5
	10	162.0 ± 6.5	60.2	6.3	37.1

Table 2 Hematological changes in rats given water containing *Perilla* extracts for 13 weeks

Dose level (%)	0				2.5				5				10																
	No. of animals				10				10				10																
Male																													
RBC	10 ¹² /l	9.53±0.22*	9.62±0.18	9.65±0.15	9.34±0.30	Hb	g/dl	15.7±0.3	15.7±0.3	15.8±0.2	15.4±0.4	Ht	%	45.6±1.0	45.7±1.0	45.7±0.7	44.5±1.5	Ebl	count/200 WBC	1.8±2.6	2.0±1.2	1.8±1.8	0.7±0.8	WBC	10 ⁹ /l	4.27±0.45	4.18±0.27	4.30±0.55*	4.69±0.43*
Differential cell count (%)																													
Seg		43.7±5.7	34.1±7.4*	27.1±3.3*	26.3±4.3*	Eosin		1.2±0.8	0.8±1.0	1.4±0.8	2.0±1.2	Lymph		54.9±5.2	64.3±3.1*	71.1±3.6*	71.5±4.3*	Mono		0.2±0.2	0.2±0.3	0.4±0.3	0.2±0.3						
Female																													
RBC	10 ¹² /l	8.95±0.40	9.03±0.27	9.09±0.46	9.01±0.24	Hb	g/dl	15.9±0.7	15.9±0.4	16.1±0.7	16.0±0.7	Ht	%	45.6±2.1	46.0±1.3	46.3±2.3	46.3±1.2	Ebl	count/200 WBC	2.4±1.9	2.1±1.6	1.5±1.4	3.3±1.8	WBC	10 ⁹ /l	3.72±0.78	3.81±0.36	3.79±0.32	4.59±0.35*
Differential cell count (%)																													
Seg		20.3±3.6	24.2±3.8*	28.1±5.9*	23.2±5.8	Eosin		1.2±0.5	1.0±0.7	1.3±0.8	1.2±0.7	Lymph		77.3±4.6	74.5±3.5	69.7±5.9*	75.2±5.3	Mono		0.2±0.3	0.3±0.4	0.9±0.9*	0.4±0.4						

a) Mean ± S.D.
*: Significantly different from the control at p<0.05.

認められた。

血清生化学的検査は雄では TC が雄の 5 %以上の群と雌の全投与群で有意に増加した (Table3)。雄の 5 %以上の群では Alb と TP が増加し、A/G 比はさらに 10 %群でも増加した。雌の 10 %群ではさらに Na と ALP も増加した。

雌雄の 5 %以上の群では GPT が減少し、10 %群ではさらに GOT も減少した。さらに雄の 5 %以上の群では BUN が減少したが、これらは毒性学的に意義のあるものではなかった。

その他、P, K, Cl, Na, ALP が 5 %以上の群で有意な変動を示したが、投与濃度に関連する変化ではなかった。

(4) 臓器重量:

雄では 10 %群で肝と心・肺の相対重量が有意に増加した (Table4)。雌では、全投与群で心の絶対・相対重量が増加し、肝の絶対・相対重量は 5 %以上の群で増加した。さらに雌の 10 %群の肺の絶対重量が増加した (Table5)。

Table 3 Serum chemistry in rats given water containing *Perilla* extracts for 13 weeks

	Dose level (%)			
	0	2.5	5	10
Male				
TP	7.01±0.14*	7.00±0.24	7.19±0.16*	7.16±0.16*
A/G	1.94±0.08	2.07±0.13*	2.01±0.15	2.07±0.11*
TC	77.5±5.56	76.6±7.09	84.9±7.80*	85.6±7.55*
RUN	23.5±2.19	21.8±1.85	21.8±0.90*	19.3±1.60*
CRN	0.28±0.04	0.28±0.08	0.30±0.00	0.32±0.04
P	10.5±0.15	10.4±0.33	10.6±0.16	10.6±0.17
Ca	5.72±0.42	5.39±0.33	5.32±0.43*	5.79±0.59
Na	145.1±0.74	144.7±1.06	146.5±1.51	144.1±1.29
K	4.14±0.13	4.19±0.17	3.90±0.30*	4.21±0.34
Cl	104.3±0.95	105.1±0.88*	106.6±0.97*	103.5±1.43
GOT	85.9±14.4	83.4±10.5	82.9±6.95	67.7±5.40*
GPT	65.1±9.04	65.9±9.12	57.2±5.18*	46.3±5.68*
ALP	353.5±27.2	358.4±21.6	378.0±18.5*	363.6±27.6
Alb	4.62±0.11	4.72±0.13	4.80±0.15*	4.83±0.12*
Female				
TP	7.01±0.20	6.83±0.20	6.96±0.18	6.89±0.17
A/G	2.46±0.11	2.41±0.14	2.33±0.11*	2.54±0.20
TC	102.1±5.94	109.6±6.43*	114.1±7.62*	109.2±7.15*
BUN	20.9±1.37	19.4±0.86*	20.3±1.83	17.8±1.63*
CRN	0.30±0.00	0.28±0.04	0.25±0.07	0.23±0.05
Ca	10.6±0.23	10.4±0.11*	10.4±0.21*	10.6±0.21
P	5.90±0.40	5.86±0.56	5.89±0.27	5.97±0.54
Na	144.7±0.82	146.5±1.08*	144.5±1.27	146.5±1.51*
K	4.20±0.37	3.88±0.20	4.20±0.37	3.90±0.30
Cl	107.2±1.62	107.2±1.79	107.2±1.62	106.6±0.97
GOT	70.0±6.50	72.5±3.21	66.8±3.97	59.8±2.86*
GPT	42.4±3.06	43.8±4.94	37.8±2.86*	32.1±2.47*
ALP	235.9±15.7	230.5±19.9	243.1±18.4	285.3±24.1*
Alb	4.98±0.14	4.82±0.17*	4.87±0.14	4.94±0.14

a): Mean ± S.D.

*: Significantly different from the control at p<0.05.

Table 4 Organ weight of male rats given water containing *Perilla* extracts for 13 weeks

	Dose level (%)			
	0	2.5	5.0	10.0
Body weight (g)	320.4 ± 13.9	317.8 ± 13.0	323.1 ± 12.0	305.5 ± 19.1
Absolute (g)				
Brain	1.932 ± 0.046*	1.979 ± 0.044	1.971 ± 0.066	1.959 ± 0.078
Heart	0.918 ± 0.051	0.959 ± 0.050	0.932 ± 0.046	0.950 ± 0.073
Lung	1.012 ± 0.079	0.990 ± 0.035*	0.974 ± 0.061	0.993 ± 0.081
Liver	7.425 ± 0.301	7.436 ± 0.370	7.735 ± 0.577	7.431 ± 0.371
Kidney	1.958 ± 0.115	1.912 ± 0.078	1.892 ± 0.090	1.828 ± 0.169
Adrenal	0.077 ± 0.003	0.078 ± 0.005	0.074 ± 0.006	0.035 ± 0.002
Spleen	0.631 ± 0.023	0.604 ± 0.021	0.622 ± 0.024	0.568 ± 0.123
Testis	3.125 ± 0.117	2.971 ± 0.493	3.081 ± 0.091	3.062 ± 0.162
Relative (g/100g B.W.)				
Brain	0.610 ± 0.025	0.611 ± 0.024	0.611 ± 0.021	0.644 ± 0.048
Heart	0.287 ± 0.009	0.302 ± 0.021	0.289 ± 0.018	0.311 ± 0.013*
Lung	0.316 ± 0.023	0.299 ± 0.015	0.302 ± 0.025	0.325 ± 0.014
Liver	2.318 ± 0.049	2.341 ± 0.076	2.393 ± 0.133	2.436 ± 0.085*
Kidney	0.611 ± 0.025	0.602 ± 0.024	0.586 ± 0.016	0.598 ± 0.037
Adrenal	0.011 ± 0.001	0.012 ± 0.001	0.010 ± 0.002	0.011 ± 0.002
Spleen	0.197 ± 0.007	0.190 ± 0.009	0.192 ± 0.005	0.184 ± 0.035
Testis	0.976 ± 0.032	0.981 ± 0.018	0.958 ± 0.030	1.003 ± 0.023

a): Mean ± S.D.

*: Significantly different from the control at p<0.05.

その他の臓器重量の変化はなかった。

(5) 病理組織学的所見:

軽度な心筋炎が、雄の 10 %群に 4 例、対照群に 7 例、雌の 10 %群に 3 例、対照群に 3 例見られた。肝臓の軽度な細胞浸潤が、雄の 10 %群に 10 例、対照群に 9 例、雌の 10 %群に 9 例、対照群に 9 例見られた。膵臓の軽度リンパ細胞浸潤が雄の 10 %群に 4 例、対照群に 3 例、雌の対照群に 4 例見られた。肺の軽度な血管周囲細胞浸潤が、雄の 10 %群に 4 例、対照群に 5 例、雌の 10 %群に 3 例、対照群に 3 例見られた。腎臓尿管好酸性円柱の出現、遠位尿管の軽度な好塩基性化が雄の 10 %群に 10 例、対照群に 9 例認められた。また、雄の前立腺に細胞浸潤が 10 %、対照群とも各 1 例見られた (Table 6)。これら散見された病理所見は通常の対照動物でも発生する自然発生病変であり、かつその程度も軽微なものであった。

Table 5 Organ weight of female rats given water containing *Perilla* extracts for 13 weeks

	Dose level (%)			
	0	2.5	5	10
Body weight (g)	151.5 ± 5.4	160.4 ± 3.7	162.8 ± 9.0	162.0 ± 6.5
Absolute (g)				
Brain	1.760 ± 0.056*	1.746 ± 0.080	1.771 ± 0.064	1.759 ± 0.042
Heart	0.522 ± 0.029	0.566 ± 0.029*	0.571 ± 0.051*	0.577 ± 0.052*
Lung	0.672 ± 0.043	0.676 ± 0.078	0.708 ± 0.044	0.727 ± 0.035*
Liver	3.385 ± 0.144	3.495 ± 0.222	3.688 ± 0.199*	3.966 ± 0.237*
Kidney	1.020 ± 0.046	1.010 ± 0.078	1.057 ± 0.047	1.036 ± 0.058
Adrenal	0.077 ± 0.003	0.079 ± 0.003	0.078 ± 0.008	0.078 ± 0.005
Spleen	0.348 ± 0.041	0.361 ± 0.033	0.351 ± 0.020	0.363 ± 0.022
Relative (g/100g B.W.)				
Brain	1.110 ± 0.032	1.090 ± 0.054	1.090 ± 0.050	1.088 ± 0.053
Heart	0.330 ± 0.014	0.353 ± 0.011*	0.351 ± 0.024*	0.357 ± 0.033*
Lung	0.424 ± 0.019	0.421 ± 0.019	0.436 ± 0.026	0.449 ± 0.028
Liver	2.136 ± 0.069	2.178 ± 0.059	2.267 ± 0.072*	2.449 ± 0.105*
Kidney	0.643 ± 0.016	0.629 ± 0.030	0.647 ± 0.019	0.629 ± 0.023
Adrenal	0.023 ± 0.002	0.024 ± 0.002	0.023 ± 0.005	0.024 ± 0.003
Spleen	0.220 ± 0.024	0.225 ± 0.014	0.218 ± 0.007	0.224 ± 0.012

a): Mean ± S.D.

*: Significantly different from the control at p<0.05.

Table 6 Histopathological findings in rats given water containing *Perilla* extracts for 13 weeks

Organ	Findings	Dose level (%)			
		Male		Female	
		0	10	0	10
Heart	Myocarditis	7	4	3	3
Liver	Cell infiltration	9	10	9	9
Pancreas	Lymphocyte infiltration	3	4	4	0
Lung	Perivascular cell infiltration	5	4	3	3
Kidney	Hyaline cast in tubular epithelia	9	10	0	0
	Basophilic change in tubular epithelia				
Prostate	Cell infiltration	1	1	-	-

考 察

今回の 13 週間反復投与毒性試験では、5 %以上の群で飲水量が増加した、これはシソ抽出物の溶媒として添加されたショ糖を動物が好んで摂取したことによるものと考えられる。体重は 10 %群の雄で 9 週以降、雌で 7 週以後有意ではないが、増加抑制傾向を示した、しかし実験終了時に差は認められなかった。この原因としては摂水量の増加により逆に飼料摂取量が減少したことによる可能性が考えられた。

血液学的検査では、雄の 5 %以上の群および雌の 10 %群で WBC の有意な増加が見られ、雄の全投与群で分葉核好中球 (Seg) が減少し、リンパ球 (Lymph) が増加した。WBC 数の変動は無処置ラットの背景データに比し明らかに高いものではなく、病理組織学的にも造血器関連臓器に投与に関連したと思われる変化は認められなかったことから、これらの変動は毒性学的に意義のあるものとは考えられなかった。

血清生化学的検査では、雄の 5 %以上の群で TC, Alb, TP が、A/G 比は 10 %でも増加した。TC は雌の全投与群でも増加し、10 %群では Na と ALP も増加した。しかし、これらの検査指標の変動値は無処置ラットの背景データの範囲内に入るものであり、かつ、病理組織学的にもこれらの変動を裏付ける形態学的変化は肝や造血器系にみられなかったことから、これらの変動は直接検体投与によって誘発されたものとは考えられなかった²⁻⁵⁾。

臓器重量では、雄の 10 %群で肝と心の相対重量が増加

し、雌の 5 %以上の群で肝の絶対・相対重量および雌の全投与群で心の絶対・相対重量が増加したが、病理組織学的に心および肝に臓器障害性や重量増加を示唆する変化は認められず、これらが直接投与に起因した変化とはみなすことは出来なかった。

以上の結果より、シソ抽出物を 10 %飲料水に混じ 13 週間雌雄の F344 ラットに投与した本実験では、投与に起因すると思われる直接的な毒性変化は認められず、シソ抽出物としての無毒性量を雄で 10 % (13.9 g/kg/日)、雌で 10 % (37.1 g/kg/日) と判定された。

文 献

- 1) 藤井正美, 清水孝重, 中村幹雄: 概説 食用天然色素, 光琳, 東京 76-79 (1993)
- 2) 高田幸一, 豊田和弘, 正田俊之, 畝山智香子, 田村啓, 高橋道人: カロブ色素の F344 ラットを用いた 13 週間亜慢性毒性試験. *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **115**, 93-98 (1997)
- 3) 小野寺博志, 三森国敏, 安原加壽雄, 竹川潔, 高橋道人: ファフィア色素の F344 ラットにおける 13 週間亜慢性毒性試験. *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **115**, 99-106 (1997)
- 4) 高木久宜, 安原加壽雄, 三森国敏, 小野寺博志, 竹川潔, 高橋道人: ベクチン分解物のラットにおける 13 週間亜急性毒性試験. *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **115**, 119-124 (1997)
- 5) 古川文夫, 笠原健一郎, 西川秋佳, 今沢孝喜, 広瀬雅雄: 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. *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **116**, 107-112 (1998)