

## 納豆菌ガムの F344 ラットを用いた 90 日間亜慢性毒性試験

中村英明・今沢孝喜\*・西川秋佳・古川文夫・池田尚子・宮内 慎・広瀬雅雄

A 90-day Subchronic Oral Toxicity Study of *Bacillus subtilis* Gum in F344 Rats

Hideaki Nakamura, Takayoshi Imazawa\*, Akiyoshi Nishikawa, Fumio Furukawa, Takako Ikeda, Makoto Miyauchi and Masao Hirose

A 90-day subchronic toxicity study of *Bacillus subtilis* gum was performed in both sexes of F344 rats by feeding of CRF-1 pellet diet containing 0%, 0.18%, 0.55%, 1.66% and 5%. Rats were randomly allocated to 5 groups, each consisting of 10 males and females.

No animals died during the administration period and no differences in body weights and food intakes were found among groups of either sex. Kidney weight was significantly increased in both sexes in the groups given concentrations of 1.66% or more. However, the increases of kidney weight were slight in themselves and other data on serum biochemistry and histopathology did not show any apparent toxicological signs including renal toxicity.

These findings indicate that the treatment of *Bacillus subtilis* gum in the diet for 90 days does not exert serious toxicity in rats even at the highest dose.

Keywords: *Bacillus subtilis* gum, F344 rat, subchronic toxicity, food additive

## はじめに

納豆菌ガムは納豆菌 (*Bacillus subtilis*) の培養液から精製される, ポリグルタミン酸を主成分とする食品添加物である。主に増粘安定剤, 製造用材に使用されており, 加工食品に添加することにより, 増粘安定, 品質改良, 保水, 栄養補助などの効果を有する。性状は白色若しくは淡黄色の粉末で, 臭いは無いか又はわずかに特異な臭いがある。この物質は既知の食品添加物ではあるが, これまでに毒性評価に関する報告はない。そのため, 今回, 安全性評価の一環としてラットを用いた 90 日間の亜慢性毒性試験を実施した。

## 実験材料及び方法

## 1. 動物並びに飼育条件

5 週齢の F344 ラット (F344/DuCrj) 雌雄各 50 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, 雌雄とも各群 10 匹ずつ 5 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  $24 \pm 1$  °C, 湿度  $55 \pm 5$  %, 換気回数 18 回/時間, 12 時間蛍光灯照明, 12 時間消灯の条件下で行った。動物は, ポリカーボネート製箱形ケージに 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. 被験物質並びに投与量

納豆菌ガムは味の素 (株) から提供された原体を, オリエンタル酵母 (株) において基礎飼料 CRF-1 に規定量混じてペレットとしたものを検体として使用した。検体は最高用量を 5 % とし, 以下公比 3 で用量を 1.66, 0.55, 0.18 % に設定した。それぞれの濃度のペレットを 90 日間自由に摂取させ, 対照群には CRF-1 固形飼料のみを同様に摂取させた。

## 3. 観察並びに検索方法

投与期間中, 一般状態の観察を連日実施し, 体重及び摂餌量は毎週 1 回測定した。動物は, 剖検日前日より絶食させ, 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, シスメックス社) 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), 平均赤血球容積 (MCV), 平均赤血球血色素量 (MCH), 平均赤血球血色素濃度 (MCHC) 及び血小板数 (PLT) につい

\* To whom correspondence should be addressed: Takayoshi Imazawa; Division of Pathology, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-9819; Fax: 03-3700-1425; E-mail: imazawa@nihs.go.jp

て測定した。

血清生化学的検査は、分離した血清を、総蛋白 (TP) A/G 比, アルブミン (AIB), ブドウ糖 (Glu), 総コレステロール (T.Cho), 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), 塩素 (Cl), コリンエステラーゼ (ChE),  $\gamma$ -グルタミルトランスアミナーゼ ( $\gamma$ -GT), 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), 乳酸脱水素酵素 (LDH) 及びアルカリフォスファターゼ (ALP) について (株) SRL 社 (東京) に依頼し測定した。

諸臓器は肉眼的に観察後摘出し、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、副腎、腎臓及び精巣の重量を測定した。上記の臓器に加え、鼻腔を含む頭蓋、下垂体、眼球、ハーダー腺、脊髓、唾液腺、胸腺、胃、小腸、大腸、膵臓、膀胱、皮膚、乳腺、リンパ節、気管、食道、甲状腺、舌、大腿筋、坐骨神経、精巣上体、精囊、前立腺、子宮、卵巣及び陰を 10 % 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。病理組織学的検索は、雌雄の各 5 % 群と対照群のみ実施した。臓器は常法に従い、パラフィン包埋後、薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。

#### 4. 統計学的処理法<sup>1)</sup>

血液学的検査、血清生化学的検査及び臓器の相対重量については、各群の分散比を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は、一元配置分散分析を行い、不等分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合の多重比較は Dunnett の方法で対照群と各被験物質投与群との間で有意差検定を行った。

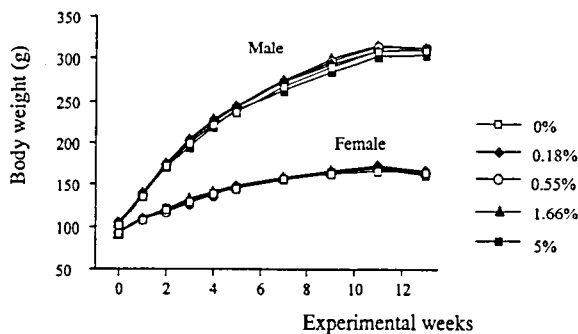


Fig.1. Body weight curves for rats treated with *Bacillus subtilis* gum for 90 days

Table 1. Food consumption and intake of *Bacillus subtilis* gum

Dose level (%)	Food consumption (g/animal/day)		Daily intake (mg/kg/day)		Total intake (g/kg)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
5	13.4	8.5	2616.4	2727.6	238.1	248.2
1.66	13.7	8.7	875.9	931.7	79.7	84.8
0.55	13.5	8.5	288.0	302.8	26.2	27.6
0.18	13.9	8.7	97.6	102.3	8.9	9.3
0	14.0	8.9	-	-	-	-

## 結 果

### 1. 一般状態及び死亡動物

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. 体重及び摂餌量

投与期間中の各群の体重推移を Fig. 1 に示した。雌雄とも被験物質投与群と対照群との間に差は認められなかった。

摂餌量を Table 1 に示した。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。

被験物質摂取量は用量公比にほぼ相関した値を示し、雌雄間に大きな差はなかった。

### 3. 血液学的及び血清生化学的検査

血液学的及び血清生化学的検査の結果を Table 2 及び 3 に示した。

血液学的検査では、雄で RBC の有意な増加が 0.55 % 群に、MCHC の有意な減少が 1.66 % 群で認められたが、用量相関性は認められなかった。雌では MCV の有意な減少及び MCHC の有意な増加が 5 % 群で認められた。

Table 2. Hematological and serum biochemical data for F344 male rats treated with *Bacillus subtilis* gum for 90 days

Item	Dose level (%)				
	5	1.66	0.55	0.18	0
WBC( $10^3/\mu$ l)	51 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	45 $\pm$ 7	45 $\pm$ 5	42 $\pm$ 4	45 $\pm$ 4
RBC( $10^6/\mu$ l)	932 $\pm$ 31	946 $\pm$ 27	956 $\pm$ 28*	936 $\pm$ 25	923 $\pm$ 25
Hb(g/dl)	15.4 $\pm$ 0.5	15.5 $\pm$ 0.5	15.8 $\pm$ 0.3	15.5 $\pm$ 0.4	15.4 $\pm$ 0.3
Ht(%)	44.6 $\pm$ 1.6	44.7 $\pm$ 1.6	45.1 $\pm$ 1.2	44.3 $\pm$ 1.2	44.0 $\pm$ 1.2
MCV(fL)	47.9 $\pm$ 0.4	47.2 $\pm$ 0.7	47.2 $\pm$ 0.3	47.3 $\pm$ 0.5	47.6 $\pm$ 0.3
MCH(pg)	16.6 $\pm$ 0.2	16.4 $\pm$ 0.3	16.5 $\pm$ 0.2	16.5 $\pm$ 0.2	16.7 $\pm$ 0.2
MCHC(g/dl)	34.6 $\pm$ 0.4	34.7 $\pm$ 0.9*	35.0 $\pm$ 0.4	34.9 $\pm$ 0.4	35.0 $\pm$ 0.4
PLT( $10^{11}/\mu$ l)	79.2 $\pm$ 3.6	77.6 $\pm$ 4.1	78.6 $\pm$ 3.1	77.0 $\pm$ 2.2	78.7 $\pm$ 3.3
TP(g/dl)	6.8 $\pm$ 0.2*	6.7 $\pm$ 0.1	6.7 $\pm$ 0.2	6.7 $\pm$ 0.2	6.6 $\pm$ 0.4
A/G	2.0 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.2
AIB(g/dl)	4.6 $\pm$ 0.1	4.6 $\pm$ 0.1	4.5 $\pm$ 0.1	4.5 $\pm$ 0.1	4.5 $\pm$ 0.3
Glu(mg/dl)	129 $\pm$ 5	133 $\pm$ 14	131 $\pm$ 6	129 $\pm$ 8	135 $\pm$ 10
T.Cho(mg/dl)	70 $\pm$ 4	78 $\pm$ 9	72 $\pm$ 2	73 $\pm$ 6	71 $\pm$ 8
BUN(mg/dl)	25.6 $\pm$ 1.4**	23.4 $\pm$ 2.1	22.3 $\pm$ 0.8	21.3 $\pm$ 1.2**	23.4 $\pm$ 1.6
CRN(mg/dl)	0.3 $\pm$ 0.0*	0.3 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0
Ca(mg/dl)	10.3 $\pm$ 0.2	10.4 $\pm$ 0.2	10.4 $\pm$ 0.2	10.4 $\pm$ 0.1	10.3 $\pm$ 0.4
P(mg/dl)	6.1 $\pm$ 0.3**	5.9 $\pm$ 0.3	5.7 $\pm$ 0.2	5.6 $\pm$ 0.3	5.6 $\pm$ 0.4
Na(mEQ/l)	145 $\pm$ 1**	145 $\pm$ 1**	145 $\pm$ 1**	143 $\pm$ 1	143 $\pm$ 1
K(mEQ/l)	4.1 $\pm$ 0.2	4.0 $\pm$ 0.3	3.8 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.2	4.0 $\pm$ 0.2
Cl(mEQ/l)	103 $\pm$ 1	104 $\pm$ 1**	104 $\pm$ 1**	103 $\pm$ 1	103 $\pm$ 1
AsT(IU/l)	72 $\pm$ 8	75 $\pm$ 12	71 $\pm$ 10	75 $\pm$ 6	66 $\pm$ 5
AIT(IU/l)	52 $\pm$ 8	53 $\pm$ 5	52 $\pm$ 4	52 $\pm$ 5	48 $\pm$ 3
LDH(IU/l)	338 $\pm$ 154	386 $\pm$ 342	115 $\pm$ 57	358 $\pm$ 317	203 $\pm$ 93
ALP(IU/l)	344 $\pm$ 24	336 $\pm$ 36*	342 $\pm$ 29	371 $\pm$ 21	371 $\pm$ 29

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

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

Table 3. Hematological and serum biochemical data for F344 female rats treated with *Bacillus subtilis* gum for 90 days

Item	Dose level (%)				
	5	1.66	0.55	0.18	0
WBC( $10^3/\mu\text{l}$ )	36±6 <sup>a)</sup>	37±8	43±13	38±5	34±7
RBC( $10^4/\mu\text{l}$ )	897±22	896±21	881±23	887±34	871±28
Hb(g/dl)	16.0±0.4	16.0±0.4	15.8±0.4	15.9±0.6	15.6±0.5
Ht(%)	44.6±1.2	45.0±0.9	44.4±1.2	44.8±1.8	43.9±1.5
MCV(FL)	49.8±0.2**	50.2±0.4	50.5±0.3	50.5±0.3	50.4±0.4
MCH(pg)	17.8±0.1	17.8±0.1	17.9±0.1	17.9±0.1	17.9±0.2
MCHC(g/dl)	35.8±0.3*	35.5±0.3	35.5±0.2	35.4±0.2	35.4±0.4
PLT( $10^3/\mu\text{l}$ )	82.9±4.8	81.7±5.1	84.3±4.9	82.9±3.5	83.7±6.6
TP(g/dl)	6.5±0.2	6.8±0.3	6.7±0.1	6.6±0.2	6.7±0.3
A/G	2.5±0.2	2.6±0.2	2.6±0.2	2.8±0.3	2.7±0.1
AIB(g/dl)	4.7±0.1**	4.9±0.2	4.8±0.2	4.8±0.2	4.9±0.2
Glu(mg/dl)	116±7	122±6*	119±12	111±8	111±10
T.Cho(mg/dl)	96±7	102±9	93±8	97±9	95±9
BUN(mg/dl)	22.9±1.5	18.3±1.0	19.7±2.7	20.9±3.0	20.7±3.2
CRN(mg/dl)	0.3±0.0	0.3±0.1	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0
Ca(mg/dl)	10.3±0.2	10.6±0.2	10.5±0.2	10.3±0.3	10.5±0.2
P(mg/dl)	5.4±0.3	5.3±0.5	5.5±0.5	5.9±0.4*	5.3±0.5
Na(mEQ/l)	145±1	146±1	145±1	144±1	145±1
K(mEQ/l)	3.8±0.1	3.8±0.2	3.8±0.2	3.9±0.2	3.9±0.3
Cl(mEQ/l)	107±2	106±1	107±1	106±2	105±2
ChE(IU/l)	7.2±0.6*	7.7±0.9	8.1±1.3	8.6±0.7	8.2±0.6
AsT(IU/l)	66±4	65±5*	72±10	78±3	74±11
AlT(IU/l)	39±4	36±4	38±5	38±5	36±4
LDH(IU/l)	107±56*	116±61	186±162	631±109**	313±329
ALP(IU/l)	211±28**	233±30	247±31	248±20	256±16

a) : Mean±S.D.

\*,\*\* : Significantly different from the control group at p&lt;0.05, p&lt;0.01, respectively.

血清生化学的検査では、雄で Na の有意な増加が 0.55 % 以上の群で、Cl の有意な増加が 0.55 及び 1.66 % の群で、また P の有意な増加及び増加傾向が 0.18 % 以上の群で認められた。雌では ALP の有意な減少及び減少傾向が投与群で認められた。このほかに TP, AIB, BUN などいくつかの項目で有意差が散見されたが、用量相関性は認められなかった。なお、雄の ChE 及び  $\gamma$ -GT、雌の  $\gamma$ -GT は全ての群で測定値が検出限界以下であった。

#### 4. 臓器重量

相対重量の結果を Table 4 に示した。腎(右)重量の増加が 5 % 群の雌雄に、腎(左)重量の増加が 1.66 % 以上の群の雌雄に認められた。また、脾臓重量の増加が雄の 5 % 群に、肝重量及び副腎(左)重量の増加が雌の 5 % 群に認められた。そのほかの臓器では、雌雄とも対照群との間に有意差は認められなかった。

#### 5. 病理組織学的検索

病理組織学的検索の結果、対照群及び 5 % 群共に雄では肝臓の小肉芽腫、腎臓の好塩基性尿細管の出現及び鉍質沈着、雌では肝臓の小肉芽腫が散見されたが群間に差は認められなかった。

Table 4. Final body weights and relative organ weights of rats treated with *Bacillus subtilis* gum for 90 days

♂	Dose level (%)				
	5	1.66	0.55	0.18	0
Body Weight(g)	303.0±15.2 <sup>a)</sup>	312.6±14.6	311.9±11.2	312.2±14.4	308.9±14.0
Brain(g%)	0.64±0.04	0.63±0.03	0.62±0.02	0.63±0.03	0.62±0.03
Heart(g%)	0.30±0.02	0.29±0.02	0.29±0.01	0.29±0.01	0.29±0.01
Lung(R)(g%)	0.21±0.02	0.21±0.01	0.21±0.01	0.22±0.03	0.26±0.18
(L)(g%)	0.11±0.01	0.11±0.01	0.11±0.01	0.12±0.03	0.13±0.07
Liver(g%)	2.35±0.15	2.37±0.07	2.33±0.04	2.28±0.05	2.28±0.08
Spleen(g%)	0.21±0.01*	0.20±0.00	0.20±0.01	0.20±0.01	0.20±0.01
Adrenal(R)(mg%)	5.3±0.6	5.1±0.4	5.5±0.7	5.2±0.7	5.0±0.5
(L)(mg%)	5.6±0.4	5.7±0.5	6.1±1.0	6.0±1.1	6.1±0.9
Kidney(R)(g%)	0.32±0.02**	0.30±0.01	0.29±0.01	0.30±0.01	0.28±0.01
(L)(g%)	0.33±0.02**	0.31±0.02**	0.31±0.02	0.31±0.02	0.29±0.01
Testis(R)(g%)	0.49±0.03	0.49±0.03	0.49±0.02	0.48±0.02	0.48±0.02
(L)(g%)	0.50±0.03	0.50±0.03	0.49±0.02	0.49±0.02	0.49±0.02

♀	Dose level (%)				
	5	1.66	0.55	0.18	0
Body Weight(g)	161.3±5.1	165.7±9.6	163.8±8.5	164.9±8.1	164.5±5.6
Brain(g%)	1.07±0.05	1.06±0.07	1.06±0.06	1.05±0.06	1.06±0.05
Heart(g%)	0.34±0.02	0.33±0.01	0.32±0.02	0.32±0.01	0.32±0.01
Lung(R)(g%)	0.34±0.20	0.28±0.02	0.27±0.02	0.27±0.02	0.27±0.01
(L)(g%)	0.15±0.01	0.15±0.01	0.14±0.01	0.15±0.03	0.14±0.01
Liver(g%)	2.26±0.07*	2.23±0.09	2.17±0.10	2.16±0.07	2.15±0.09
Spleen(g%)	0.24±0.01	0.23±0.01	0.23±0.01	0.23±0.01	0.23±0.02
Kidney(R)(g%)	0.33±0.02*	0.32±0.02	0.29±0.02	0.30±0.01	0.31±0.02
(L)(g%)	0.34±0.01**	0.32±0.02*	0.31±0.02	0.31±0.01	0.30±0.02
Adrenal(R)(mg%)	11.5±0.8	11.7±1.0	10.3±1.4	10.7±1.5	10.8±1.3
(L)(mg%)	13.0±1.8*	12.7±1.4	12.3±1.6	12.0±1.2	11.2±1.2

a) : Mean±S.D.

\*,\*\* : Significantly different from the control group at p&lt;0.05, p&lt;0.01, respectively.

## 考 察

今回、F344 ラットを用いて納豆菌ガムの混餌投与による 90 日間亜慢性毒性試験を実施した。その結果、一般状態に変化は認められず、死亡動物もなかった。体重及び摂餌量にも有意な差は認められず、被験物質の摂取量も用量に相関して変化した。

血液学的検査では、雄の 0.55 % 群で RBC の増加が、1.66 % 群で MCHC の減少が認められたが、変化は用量に相関せず、変動幅も小さかった。雌では 5 % 群で MCV の減少及び MCHC の増加が認められた。これらの変化は統計学的に有意差はあるものの、関連して変動すると考えられるその他の血液学的検査値にも変化が認められなかったことから毒性学的意義は低いと考えられた。

血清生化学的検査では、雄の 0.55 % 以上の群で Na の増加、0.55 % 及び 1.66 % の群で Cl の増加、投与群で P の増加および増加傾向が認められた。しかし、過去に当部で実施した亜慢性毒性試験の対照群のデータと比較しても、大きな差はなく毒性学的意義は低いと考えられた<sup>2), 3), 4)</sup> 雌では ALP の有意な減少及び減少傾向が投与群で認められたが、

増加ではなく減少であることから毒性学的意義は低いと考えられた。このほかにTP, AIB, BUNなどいくつかの項目で有意差が散見されたが、用量相関性は認められず変動幅も小さなものであった。

臓器重量測定では、腎重量の増加が1.66%以上の群の雌雄にみられたが、関連する血清生化学的変化や病理組織学的な変化は認められず、重篤な変化ではないと考えられた。脾臓重量の増加が雄の5%群に、肝重量及び副腎重量の増加が雌の5%群に認められた。しかし、変動幅が小さく、関連する血清生化学的変化や病理組織学的な変化もみられなかったことから毒性学的な意義は低いと考えられた。

病理組織学的検索の結果、対照群及び5%群ともに雄では肝臓の小肉芽腫、腎臓の好塩基性尿細管の出現及び鉍質沈着、雌では肝臓の小肉芽腫が散見された。これらの変化はF344ラットでの自然発生が知られており、群間にも差は認められなかったことから偶発的な病変であると考えられた<sup>5)</sup>。

以上の結果、納豆菌ガムを混餌で90日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重篤な変

化は認められず、最高用量の5%でも病理組織学的な毒性変化はみられなかったため、無毒性量は5%と考えられた。また無影響量は腎臓の相対重量の変化から0.55%と考えられた。

## 文 献

- 1) 山崎 実, 野口雄次, 丹田 勝, 新谷 茂: ラット一般毒性試験における統計的手法の検討. 武田研究所報, 40, 163-187 (1981)
- 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を用いた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, 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を用いた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)
- 4) 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を用いた13週間亜慢性毒性試験. 国立医薬品食品衛生研究所報告, 116, 107-112 (1998)
- 5) Boorman, G.A., Eutis, S.L., Elwell, M.R., Montgomery, C.A., Jr. And Mackenzie, W.F. (eds) "Pathology of the Fischer Rat, References and Atlas" Academic Press, San Diego (1990)