デヒドロ酢酸ナトリウムとジブチルヒドロキシトルエン の併用投与における毒性^{*1}

(昭和 56 年 2 月 9 日受理)

谷 口 繁^{*2} 山 田 明 男^{*2} 森 田 茂^{*2}
大垣寿美子^{*2} 水 谷 泰 久^{*3}

Absence of Synergistic Toxicity of Two Food Additives, Sodium Dehydroacetate and Dibutyl Hydroxy Toluene, in Rats Treated Orally for 6 Months

(Studies on Synergistic Toxicity of Food Additives. II.)

Shigeru TANIGUCHI^{*2}, Akio YAMADA^{*2}, Shigeru MORITA^{*2}, Sumiko OHGAKI^{*2}
and Yasuhisa MIZUNOYA^{*3}

(^{*2}Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences: 8-34, Toho-cho,
Tennohji-ku, Osaka; ^{*3}Osaka College of Pharmacy: 10-65, Kawai 2-chome,
Matsubara, Osaka)

Toxicological potentiation of two food additives was investigated in male and female Wistar rats given sodium dehydroacetate (DHA-Na) and dibutyl hydroxy toluene (BHT) in the diet for 6 months. The concentrations of the samples in the diet were 0 (control and pair feeding control), DHA-Na 0.05, 0.15 and 0.5%, BHT 0.1, 0.3 and 1%, DHA-Na 0.05% + BHT 0.1%, DHA-Na 0.5% + BHT 0.1% and DHA-Na 0.05% + BHT 1%. Under the present experimental conditions, no marked potentiation of toxicity was observed in the combination of DHA-Na and BHT.

(Received February 9, 1981)

Key words: 相乗毒性 synergism; デヒドロ酢酸ナトリウム sodium dehydroacetate; ジブチルヒドロキシトルエン dibutyl hydroxy toluene; 経口毒性 oral toxicity; 亜急性毒性 subacute toxicity; ラット rat

前報¹⁾に続いて食品添加物の相乗毒性を検討した。本報は保存料であるデヒドロ酢酸ナトリウムと酸化防止剤であるジブチルヒドロキシトルエンをラットに投与し、それらを併用したときの毒性を検討したものである。

実験方法

1. 試 料

デヒドロ酢酸ナトリウム (以下 DHA-Na と略す):

台糖(株)製食品添加物

ジブチルヒドロキシトルエン (以下 BHT と略す):
和光純薬工業(株)製食品添加物

2. 使用動物および飼育法

6 週令の wistar 系ラット (体重, 雄: 130~200 g, 雌: 120~170 g) を用いた。ラットは金網製のかご (幅 18 cm, 奥行 25 cm, 高さ 15 cm) に個別に収容し, 飼料および水を自由に摂取させて飼育した。使用した動物数は 1 群につき雌雄それぞれ 10 匹である。

3. 投与方法および投与量

試料はオリエンタル固型飼料 MF に添加して投与した。その添加濃度は次に示すとおりである。

^{*1} 食品添加物の相乗毒性に関する研究 (第 2 報)

^{*2} 大阪市立環境科学研究所: 大阪市天王寺区東上町 8-34

^{*3} 大阪薬科大学: 大阪府松原市河合 2-10-65

Group	DHA-Na (%)	BHT (%)
1 (Control)	0	0
2 (Pair feeding Control)	0	0
3	0.05	0
4	0.15	0
5	0.5	0
6	0	0.1
7	0	0.3
8	0	1
9	0.05	0.1
10	0.5	0.1
11	0.05	1

なお、これらの用量の設定は次に述べる理由に基づいた。

DHA-Na については、ラットを用いた慢性毒性試験 (22 か月) で、0.3% 群は初期に発育がやや抑制されたがその後回復した。しかし、1% 群では1か月以内に全例が死亡したといわれている*。また BHT については同じくラットを用いた亜急性毒性試験 (3 か月) で、0.45% 群は対照と同等の体重増加を示したが、1.35% 群はかなり発育が抑制され、全期間中に約半数が死亡したと報告されている²⁾。

このことから、DHA-Na および BHT の最大耐量 (死亡を起こさない最大量) は、それぞれ 0.5% および 1% 付近にあるものと推定された。したがって、これらの添加濃度を大量とし、これより公比 3.2 で減少する 2 用量をそれぞれ中等量および小量とし、小量どうしおよび一方の小量と他方の大量の組合わせて相乗毒性試験を行うことにした。

なお、飼料に試料を添加することにより摂餌量が減少し、体重増加の抑制がみられることがあるので、pair feeding 対照群を設けた。すなわち、投与開始後、各群の雄 5 例について 1 週間の摂餌量を測定し、それが最も少なかった DHA-Na 0.5%+BHT 0.1% 群の摂餌量と同じ量の無添加飼料を与える群を pair feeding 対照群とした。

4. 観察および検査法

投与期間は 26 週 (6 か月) である。

体重、摂餌量、摂水量は週 1 回測定し、一般症状は随時観察した。

と殺 1 週間前 (25 週) に尾静脈から採血し、赤血球数、白血球数、型別白血球百分率、ヘモグロビンを測定した。

26 週間にわたる投与を行った後、ラットを 1 昼夜絶食させてからエーテルによる浅麻酔下に頸部血管を切断して血液を採取し、全血についてヘマトクリットを、血清

についてタンパク、A/G、血糖、コレステロール、GPT、GOT、ALP (アルカリ性フォスファターゼ)、尿素窒素を定量した。これらの血液学および血液生化学的検査の方法はいずれも前報¹⁾と同じである。

上記の採血後、動物を放血致死させ、内臓の肉眼的観察を行った後、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳、精巣、卵巣、副腎、下垂体の重量を秤量した。さらに甲状腺、胸腺、胃、膵臓、小腸、骨髄を摘出し、前記の臓器 (脳と下垂体を除く) とともに 10% ホルマリンで固定し組織学的検索の材料とした。これらの臓器はパラフィン切片となし、ヘマトキシリン・エオジンにて重染色を行い鏡検した。なお、組織学的検索は DHA-Na 0.5% 群、BHT 1% 群および三つの併用投与群の計 5 群について、1 群雌雄各 5 匹について行った。

実験結果

1. 成長および一般症状

試料を添加した飼料で 26 週 (6 か月) 間ラットを飼育したときの体重の推移を Fig. 1, 2 に示した。

DHA-Na 単独の場合、雌雄とも 0.05% および 0.15% 群の体重増加はいずれも対照群よりも低い傾向にあった。0.5% 群の体重は、初期にはほとんど増加せず、4 週以後においてやや増加の傾向を示したが、全期間を通じての体重増加は対照群よりもかなり低かった。

BHT 単独の場合、雌雄とも 0.1% および 0.3% 群の体重増加はいずれも対照群と差がなかったが、1% 群は低い傾向にあった。

DHA-Na と BHT を併用した場合、雌雄とも小量どうしを組合わせた DHA-Na 0.05%+BHT 0.1% 群の体重増加は対照群と差がなかった。また、一方の小量と他方の大量を組合わせた DHA-Na 0.5%+BHT 0.1% 群および DHA-Na 0.05%+BHT 1% 群はいずれも併用した大量の方の試料の影響を受け、前者は DHA-Na 0.5% 群、後者は BHT 1% 群と同等の体重増加を示した。

なお、DHA-Na 0.5%+BHT 0.1% 群に対しては pair feeding 対照群を設けた。5 週以後、投与群の体重は pair feeding 対照群よりもやや低く、とくに雄ではその傾向が強かったが、22 週以降はほとんど差がなくなった。

投与期間中、対照群の雄 1 例、pair feeding 対照群の雌雄各 1 例、BHT 0.1% 群の雌 1 例、BHT 1% 群の雄 1 例、DHA-Na 0.5%+BHT 0.1% 群の雄 3 例、DHA-Na 0.05%+BHT 1% 群の雄 1 例に死亡がみられたが、いずれも肺炎による死亡で試料によるものとは考えられなかった。また、各群とも一般症状に著しい変化は認められなかった。

2. 摂餌量および摂水量

Fig. 3, 4 に示したように、摂餌量は DHA-Na 0.5% 群と DHA-Na 0.5%+BHT 0.1% 群で、摂水量は

* 池田良雄: 私信。

Fig. 1. Body weight changes in male rats treated with sodium dehydroacetate (DHA-Na) and dibutyl hydroxy toluene (BHT) for 6 months

○—○, control; ○---○, pair feeding control; △—△, DHA-Na 0.05%; △---△, DHA-Na 0.15%; △-.-△, DHA-Na 0.5%; ×—×, BHT 0.1%; ×---×, BHT 0.3%; ×-.-×, BHT 1%; ●—●, DHA-Na 0.05%+BHT 0.1%; ●---●, DHA-Na 0.5%+BHT 0.1%; ●-.-●, DHA-Na 0.05%+BHT 1%

Fig. 2. Body weight changes in female rats. The same symbols as Fig. 1 are used.

DHA-Na 0.5% 群で減少した。

摂餌量および添加濃度から算出した試料の摂取量は Table 1 に示すとおりである。

3. 血液学的検査および血液生化学的検査

その結果を Table 2, 3 に示した。

DHA-Na 単独投与群で用量と変化の間に一定の傾向が認められたのは、雌雄のタンパクと血糖の減少、雄の GOT と尿素窒素の減少、雌のヘモグロビンの増加とコレステロールの減少である。しかし、血糖と GOT を除くこれらはいずれも 0.5% 群と pair feeding 対照群との間に差がなく、DHA-Na による変化とは考えられなかった。また、血糖と GOT については 0.5% 群で数値

上有意差が認められたが、値そのものはいずれも正常値の範囲内にあった。

BHT 単独投与群で用量と変化の間に一定の傾向が認められたものは雌雄のヘモグロビンの減少、雄の A/G, GOT, ALP の減少、雌のタンパク、コレステロール、尿素窒素の増加、赤血球数の減少である。これらの中にもその値が正常値の範囲内にあるものが多く、BHT による影響と考えられるのは、雄の A/G, ALP の減少、雌のコレステロールの増加である。

併用投与群については DHA-Na および BHT 各々の単独投与群との差を検定した。双方に対して有意差が認められたものは雄の血糖の増加、GOT の減少であった。

Fig. 3. Food and water intake in male rats. The same symbols as Fig. 1 are used.

Fig. 4. Food and water intake in female rats. The same symbols as Fig. 1 are used.

Table 1. Estimated Intake of Sodium Dehydroacetate (DHA-Na) and Dibutyl Hydroxytoluene (BHT) in Male and Female Rats

Group	Concentration in the diet (%)		Estimated intake (mg/kg body weight)			
	DHA-Na	BHT	Male		Female	
			DHA-Na	BHT	DHA-Na	BHT
1	(Control)		—	—	—	—
2	(Pair feeding control)		—	—	—	—
3	0.05	—	34	—	40	—
4	0.15	—	108	—	120	—
5	0.5	—	428	—	431	—
6	—	0.1	—	70	—	72
7	—	0.3	—	208	—	216
8	—	1	—	719	—	720
9	0.05	0.1	34	69	34	67
10	0.5	0.1	411	82	414	80
11	0.05	1	36	710	38	757

Table 2. Hematological and Hematochemical Findings in Male Rats Orally Treated with Sodium Dehydroacetate (DHA-Na) and Dibutyl Hydroxytoluene (BHT) for 6 Months

Group	Concentration (%)	No. of rats	Erythro. ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	Leuco. ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	Differentiation of leucocyte (%)			Hb (g/dl)
					Lympho.	Neutro.	Eosino.	
1	0 (Control)	9	858 $\pm$ 168	46 $\pm$ 27	76.6 $\pm$ 11.5	16.9 $\pm$ 6.5	1.9 $\pm$ 0.6	15.8 $\pm$ 0.9
2	0(Pair feeding control)	9	778 $\pm$ 53	48 $\pm$ 19	83.1 $\pm$ 5.8	13.6 $\pm$ 5.1	2.3 $\pm$ 1.1	16.3 $\pm$ 1.2
3	DHA-Na 0.05%	10	707 $\pm$ 79 ^{a)}	39 $\pm$ 20	83.2 $\pm$ 3.8	14.4 $\pm$ 3.7	1.5 $\pm$ 0.6	16.0 $\pm$ 1.3
4	DHA-Na 0.15%	10	713 $\pm$ 82 ^{a)}	39 $\pm$ 12	81.3 $\pm$ 8.0	16.0 $\pm$ 7.3	1.7 $\pm$ 1.1	15.7 $\pm$ 0.9
5	DHA-Na 0.5%	10	767 $\pm$ 71	34 $\pm$ 14	77.9 $\pm$ 4.3	19.3 $\pm$ 3.5	3.6 $\pm$ 6.6	16.2 $\pm$ 1.1
6	BHT 0.1%	10	740 $\pm$ 69	39 $\pm$ 20	79.0 $\pm$ 4.2	18.3 $\pm$ 3.7	2.3 $\pm$ 0.9	15.0 $\pm$ 0.9
7	BHT 0.3%	10	755 $\pm$ 55	45 $\pm$ 23	85.7 $\pm$ 4.2 ^{a)}	12.7 $\pm$ 3.4	0.9 $\pm$ 0.4 ^{b)}	14.9 $\pm$ 1.0
8	BHT 1%	9	868 $\pm$ 114	68 $\pm$ 27	84.3 $\pm$ 3.8	12.6 $\pm$ 3.9	1.9 $\pm$ 1.1	14.4 $\pm$ 1.1 ^{a)}
9	DHA-Na 0.05%+BHT 0.1%	10	752 $\pm$ 89	61 $\pm$ 24 ^{c)}	78.5 $\pm$ 4.8	18.0 $\pm$ 6.0	2.6 $\pm$ 2.1	16.1 $\pm$ 1.0 ^{c)}
10	DHA-Na 0.5%+BHT 0.1%	7	728 $\pm$ 83	50 $\pm$ 12 ^{c)}	81.6 $\pm$ 5.2	15.6 $\pm$ 4.1	1.9 $\pm$ 1.2	15.5 $\pm$ 1.2
11	DHA-Na 0.05%+BHT 1%	9	931 $\pm$ 191 ^{d)}	66 $\pm$ 29 ^{c)}	82.6 $\pm$ 2.7	14.1 $\pm$ 4.2	2.1 $\pm$ 1.3	14.9 $\pm$ 0.8 ^{a),c)}

Group	Ht (%)	Total protein (g/dl)	A/G	Glucose (mg/dl)	Total chole. (mg/dl)	GPT (KU)	GOT (KU)	ALP (K-A U)	BUN (mg/dl)
1	50.6±3.1	6.9±0.3	1.09±0.03	60.0±9.6	119.7±17.3	21±8	129±35	16.7±4.1	18.1±3.8
2	52.5±2.1	6.6±0.3	1.10±0.17	74.4±17.1 ^{a)}	100.0±14.3 ^{a)}	16±4	58±9 ^{b)}	19.0±5.7	13.4±1.1 ^{b)}
3	50.1±1.7	6.8±0.3	1.05±0.32	60.5±10.2	97.2±8.9 ^{b)}	24±18	102±23	14.2±2.5	16.1±3.0
4	49.1±1.3	6.9±0.3	1.12±0.34	64.3±18.1	112.3±16.2	20±12	112±30	13.2±2.8 ^{a)}	17.2±4.1
5	49.7±2.1	6.4±0.4 ^{a)}	1.38±0.46	48.0±12.9 ^{a)}	113.9±28.6	21±24	76±35 ^{a)}	17.1±6.3	12.9±3.0 ^{b)}
6	50.0±2.6	6.8±0.3	1.09±0.37	83.1±12.9 ^{b)}	110.9±24.9	10±3 ^{b)}	78±20 ^{b)}	15.2±3.5	15.3±3.8
7	48.9±2.2	7.1±0.2 ^{a)}	0.80±0.20 ^{b)}	78.6±11.6 ^{b)}	126.2±22.6	12±5 ^{b)}	69±22 ^{b)}	14.0±3.4	14.7±2.3 ^{a)}
8	48.7±4.8	7.0±0.3	0.69±0.18 ^{b)}	62.0±12.7	122.6±40.0	14±6 ^{a)}	72±20 ^{b)}	10.8±3.3 ^{b)}	18.4±4.1
9	48.4±1.1 ^{e)}	6.7±0.3	0.72±0.16	69.7±12.8 ^{e)}	99.5±27.8	18±11 ^{e)}	79±37 ^{a)}	14.6±4.1	16.4±4.3
10	48.5±2.0	6.7±0.3	0.83±0.16 ^{b),e)}	76.3±16.4 ^{a),d)}	117.1±35.5	24±28	70±43	15.7±6.6	14.1±1.9 ^{a)}
11	48.1±1.1 ^{a),d)}	7.1±0.3 ^{a),e)}	0.61±0.17 ^{b),d)}	80.6±13.3 ^{b),d),f)}	132.4±36.1	12±5 ^{a)}	48±5 ^{b),d),f)}	11.4±3.6 ^{a)}	16.4±2.3

Mean±S.D. ^{a)} Significantly different from control ($p<0.05$), ^{b)} ($p<0.01$), ^{c)} Significantly different from DHA-Na-treated group ($p<0.05$), ^{d)} ($p<0.01$), ^{e)} Significantly different from BHT-treated group ($p<0.05$), ^{f)} ($p<0.01$)

Table 3. Hematological and Hematochemical Findings in Female Rats Orally Treated with Sodium Dehydroacetate (DHA-Na) and Dibutyl Hydroxytoluene (BHT) for 6 Months

Group	Concentration (%)	No. of rats	Erythro. ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Leuco. ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Differentiation of leucocyte (%)				Hb (g/dl)
					Lympho.	Neutro.	Eosino.	Mono.	
1	0 (Control)	10	776 $\pm$ 57	56 $\pm$ 31	84.9 $\pm$ 4.6	13.5 $\pm$ 4.4	1.1 $\pm$ 0.7	0.6 $\pm$ 0.5	15.0 $\pm$ 0.5
2	0 (Pair feeding control)	9	678 $\pm$ 92 ^{a)}	38 $\pm$ 7	83.7 $\pm$ 3.7	13.4 $\pm$ 3.2	2.2 $\pm$ 2.8	0.6 $\pm$ 0.5	16.5 $\pm$ 1.0 ^{b)}
3	DHA-Na 0.05%	10	738 $\pm$ 63	72 $\pm$ 50	80.7 $\pm$ 6.1	17.2 $\pm$ 5.2	1.6 $\pm$ 1.6	0.6 $\pm$ 0.7	15.3 $\pm$ 1.5
4	DHA-Na 0.15%	10	754 $\pm$ 124	54 $\pm$ 33	85.5 $\pm$ 4.6	12.7 $\pm$ 4.3	1.3 $\pm$ 0.6	0.6 $\pm$ 0.7	15.3 $\pm$ 0.9
5	DHA-Na 0.5%	10	693 $\pm$ 150	51 $\pm$ 28	87.1 $\pm$ 6.1	12.7 $\pm$ 5.0	1.7 $\pm$ 1.0	0.6 $\pm$ 0.7	16.2 $\pm$ 1.2 ^{b)}
6	BHT 0.1%	9	731 $\pm$ 109	58 $\pm$ 19	84.9 $\pm$ 3.2	12.4 $\pm$ 4.0	1.9 $\pm$ 1.5	0.8 $\pm$ 0.8	15.1 $\pm$ 1.1
7	BHT 0.3%	10	751 $\pm$ 173	58 $\pm$ 38	83.3 $\pm$ 4.6	13.4 $\pm$ 3.8	1.7 $\pm$ 1.4	1.0 $\pm$ 1.0	14.3 $\pm$ 1.0
8	BHT 1%	10	628 $\pm$ 110 ^{b)}	44 $\pm$ 11	84.3 $\pm$ 3.6	14.0 $\pm$ 3.6	1.2 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.6	13.7 $\pm$ 1.3 ^{b)}
9	DHA-Na 0.05% + BHT 0.1%	10	657 $\pm$ 106 ^{b)}	52 $\pm$ 18	82.3 $\pm$ 3.1	13.8 $\pm$ 4.3	1.9 $\pm$ 0.7 ^{a)}	0.7 $\pm$ 0.5	14.6 $\pm$ 1.0
10	DHA-Na 0.5% + BHT 0.1%	10	692 $\pm$ 67 ^{b)}	54 $\pm$ 15	83.9 $\pm$ 4.9	11.2 $\pm$ 3.4	1.5 $\pm$ 0.8	0.8 $\pm$ 0.7	16.1 $\pm$ 1.3 ^{a)}
11	DHA-Na 0.05% + BHT 1%	10	690 $\pm$ 67 ^{b)}	65 $\pm$ 15 ^{c)}	86.2 $\pm$ 4.0 ^{c)}	13.4 $\pm$ 3.2	2.1 $\pm$ 1.2 ^{a), c)}	0.6 $\pm$ 0.7	15.0 $\pm$ 1.3

Group	Ht (%)	Total protein (g/dl)	A/G	Glucose (mg/dl)	Total chole. (mg/dl)	GPT (KU)	GOT (KU)	ALP (K-A U)	BUN (mg/dl)
1	49.6±1.8	7.0±0.3	1.38±0.57	72.6±8.6	106.0±14.7	20±9	85±32	9.2±2.6	16.0±1.4
2	48.4±3.0	6.7±0.5	1.39±0.48	73.8±8.6	83.2±7.0 ^{b)}	16±7	65±9	12.4±6.5	15.2±3.6
3	47.8±3.7	6.9±0.4	1.29±0.41	70.4±11.8	115.3±38.5	16±7	92±22	10.3±3.8	15.8±2.8
4	48.1±2.0	6.8±0.4	1.32±0.46	68.0±16.4	103.6±27.7	17±5	79±17	10.4±3.6	16.0±3.3
5	52.1±4.1	6.2±0.6 ^{b)}	1.53±0.70	52.6±10.8 ^{b)}	83.6±9.8 ^{b)}	16±4	75±24	10.1±6.5	16.2±2.8
6	49.4±1.9	7.2±0.4	1.30±0.56	90.3±16.5 ^{b)}	105.0±24.7	31±10 ^{a)}	108±34	6.8±2.6	14.5±1.7
7	47.5±2.2 ^{a)}	7.4±0.6	0.98±0.49	88.0±12.8 ^{b)}	151.7±44.7 ^{b)}	24±26	79±44	6.3±3.2 ^{a)}	17.5±3.8
8	47.8±2.3	7.8±0.4 ^{b)}	0.97±0.20	69.1±13.2	181.7±33.6 ^{b)}	22±26	90±40	8.1±4.3	19.2±3.3 ^{a)}
9	48.2±1.5	7.2±0.5	1.15±0.38	80.2±15.3	131.2±24.8 ^{a),e)}	38±42	104±53	8.6±3.8	16.3±3.0
10	48.7±1.5 ^{c)}	6.4±0.5 ^{b),c)}	1.30±0.46	53.4±9.7 ^{b)}	98.4±11.7 ^{d)}	19±9 ^{e)}	65±13 ^{d)}	9.6±3.8	17.1±3.4
11	46.3±2.2 ^{b)}	7.7±0.4 ^{b),d)}	1.14±0.29	80.3±6.9 ^{a),e)}	198.5±61.1 ^{b),d)}	27±20	83±54	10.0±4.3	18.1±4.6

Mean±S.D. ^{a)} Significantly different from control ($p<0.05$), ^{b)} ($p<0.01$), ^{c)} Significantly different from DHA-Na-treated group ($p<0.05$), ^{d)} ($p<0.01$), ^{e)} Significantly different from BHT-treated group ($p<0.05$), ^{f)} ($p<0.01$)

Table 4. Organ Weights in Male Rats Orally Treated with Sodium Dehydroacetate (DHA-Na) and Dibutyl Hydroxytoluene (BHT) for 6 Months

Group	Concentration (%)	No. of rats	Body wt. (g)	Liver (g)		Kidney (g)		Spleen (g)		Heart (g)	
				Absol.	Relat.	Absol.	Relat.	Absol.	Relat.	Absol.	Relat.
1	0 (Control)	9	547±113	15.07±3.03	2.78±0.32	3.44±0.74	0.63±0.08	1.11±0.35	0.20±0.06	1.64±0.13	0.29±0.09
2	0 (Pair feeding control)	9	344±16 ^{b)}	8.75±0.76 ^{b)}	2.54±0.13	2.25±0.22 ^{b)}	0.65±0.04	0.46±0.07 ^{b)}	0.13±0.02 ^{b)}	1.03±0.10 ^{b)}	0.30±0.02
3	DHA-Na 0.05%	10	506±65	14.65±3.25	2.86±0.31	1.49±0.86	0.68±0.09	0.97±0.26	0.19±0.03	1.53±0.14	0.30±0.02
4	DHA-Na 0.15%	10	504±61	14.67±2.02	2.91±0.19	3.29±0.44	0.65±0.03	1.01±0.17	0.19±0.02 ^{a)}	1.49±0.13 ^{a)}	0.29±0.02
5	DHA-Na 0.5%	10	333±34 ^{b)}	13.20±1.94	3.95±0.30 ^{b)}	2.59±0.36 ^{b)}	0.77±0.06 ^{b)}	0.87±0.18	0.26±0.04 ^{a)}	1.10±0.13 ^{b)}	0.33±0.02
6	BHT 0.1%	10	565±83	15.81±3.60	2.76±0.26	3.52±0.67	0.61±0.03	1.06±0.35	0.18±0.04	1.61±0.29	0.28±0.03
7	BHT 0.3%	10	567±91	18.39±3.53 ^{a)}	3.23±0.23 ^{b)}	3.59±0.69	0.63±0.07	1.01±0.36	0.17±0.05	1.60±0.20	0.28±0.02
8	BHT 1%	9	515±41	20.01±4.53 ^{a)}	3.94±0.82 ^{b)}	3.27±0.46	0.63±0.08	0.85±0.28	0.16±0.05	1.54±0.15	0.30±0.03
9	DHA-Na 0.05% + BHT 0.1%	10	506±82	13.75±2.44	2.73±0.40	3.07±0.35	0.61±0.08	0.77±0.17 ^{a),e)}	0.15±0.04 ^{a),e)}	1.48±0.11 ^{a)}	0.29±0.02
10	DHA-Na 0.5% + BHT 0.1%	7	346±35 ^{b),f)}	11.72±2.89 ^{a),e)}	3.34±0.48 ^{a),d),f)}	2.40±0.49	0.69±0.07 ^{e)}	0.66±0.20 ^{b),e),f)}	0.18±0.05 ^{d)}	1.12±0.12 ^{b),f)}	0.32±0.01 ^{e)}
11	DHA-Na 0.05% + BHT 1%	9	465±81	17.53±3.64	3.78±0.57 ^{b),d)}	3.11±0.53	0.67±0.06 ^{f)}	0.88±0.36	0.18±0.05	1.42±0.20	0.30±0.02

Group	Lung (g)		Brain (g)		Testis (g)		Adrenal (mg)		Pituitary (mg)	
	Absol.	Relat.	Absol.	Relat.	Absol.	Relat.	Absol.	Relat.	Absol.	Relat.
1	2.40±0.39	0.45±0.07	2.00±0.12	0.38±0.08	3.16±0.84	0.61±0.23	59±15	11.2±3.8	12.2±2.0	2.3±0.3
2	1.62±0.33 ^{b)}	0.47±0.11	1.87±0.14	0.54±0.05 ^{b)}	3.08±0.34	0.89±0.10 ^{b)}	44±3	12.8±0.8	10.0±0.9 ^{b)}	2.9±0.2 ^{b)}
3	2.21±0.30	0.44±0.08	2.00±0.08	0.40±0.03	3.30±0.26	0.66±0.08	51±13	9.9±1.7	11.5±1.7	2.3±0.2
4	2.10±0.41	0.41±0.06	1.87±0.08 ^{b)}	0.38±0.03	3.51±0.21	0.70±0.07	48±7	9.6±1.3	11.3±1.5	2.2±0.2
5	1.63±0.24 ^{b)}	0.49±0.04	1.70±0.10 ^{b)}	0.51±0.05 ^{b)}	3.15±0.47	0.94±0.08 ^{b)}	48±6	14.4±2.4 ^{a)}	8.2±1.1 ^{b)}	2.5±0.3
6	2.39±0.38	0.43±0.10	2.07±0.14	0.37±0.04	3.54±0.31	0.63±0.09	48±12	8.4±1.6	12.0±8.7	2.1±0.5
7	2.48±0.85	0.46±0.26	2.10±0.18	0.38±0.06	3.48±0.32	0.62±0.11	49±8	8.7±1.4	12.8±2.0	2.3±0.4
8	2.20±0.36	0.40±0.05	1.95±0.08	0.38±0.03	3.45±0.35	0.67±0.06	51±9	10.1±1.8	12.1±2.4	2.3±0.4
9	2.15±0.48	0.43±0.14	1.96±0.05	0.39±0.06	3.38±0.51	0.67±0.10	50±14	10.1±3.5	12.0±1.4	2.4±0.4
10	2.04±1.47	0.60±0.45	1.61±0.10 ^{b),c)}	0.46±0.04 ^{a)}	2.87±0.60	0.82±0.11 ^{a),c),d)}	45±5 ^{a)}	13.1±1.1 ^{d)}	9.3±2.4 ^{a)}	2.7±0.6
11	2.50±0.82 ^{d)}	0.55±0.22	1.91±0.09	0.42±0.06	3.31±0.25	0.72±0.10	54±27	11.6±5.2	9.2±2.9 ^{a),e),f)}	2.0±0.5

Mean±S.D. Absol.: Absolute weight, Relat.: Relative weight (g/100 g body weight), ^{a)} Significantly different from control (p<0.05), ^{b)} (p<0.01), ^{c)} Significantly different from DHA-Na-treated group (p<0.05), ^{d)} (p<0.01), ^{e)} Significantly different from BHT-treated group (p<0.05), ^{f)} (p<0.01)

Table 5. Organ Weights in Female Rats Orally Treated with Sodium Dehydroacetate (DHA-Na) and Dibutyl Hydroxytoluene (BHT) for 6 Months

Group	Concentration (%)	No. of rats	Body wt. (g)	Liver (g)		Kidney (g)		Spleen (g)		Heart (g)	
				Absol.	Relat.	Absol.	Relat.	Absol.	Relat.	Absol.	Relat.
1	0 (Control)	10	303±50	8.87±1.06	2.83±0.14	2.14±0.23	0.69±0.04	0.63±0.10	0.20±0.02	1.06±0.14	0.33±0.02
2	0 (Pair feeding control)	9	230±15 ^{b)}	7.09±0.60 ^{b)}	3.08±0.22	1.75±0.14 ^{b)}	0.76±0.07 ^{a)}	0.56±0.19	0.24±0.08	0.84±0.05 ^{b)}	0.37±0.03 ^{a)}
3	DHA-Na 0.05%	10	291±38	8.94±1.88	3.06±0.42	2.06±0.25	0.71±0.05	0.62±0.14	0.21±0.03	1.03±0.07	0.35±0.03
4	DHA-Na 0.15%	10	265±26 ^{a)}	8.04±0.93	3.32±0.97	1.69±0.20 ^{b)}	0.64±0.04 ^{a)}	0.57±0.12	0.21±0.03	0.83±0.06 ^{b)}	0.31±0.03
5	DHA-Na 0.5%	10	190±19 ^{b)}	6.71±0.56 ^{b)}	3.55±0.25 ^{b)}	1.49±0.13 ^{b)}	0.79±0.05 ^{b)}	0.46±0.06 ^{b)}	0.24±0.03 ^{a)}	0.67±0.05 ^{b)}	0.35±0.03
6	BHT 0.1%	9	299±45	8.11±0.65	2.75±0.43	1.94±0.19	0.65±0.07	0.53±0.08 ^{a)}	0.18±0.02	0.91±0.11 ^{a)}	0.31±0.04
7	BHT 0.3%	10	299±56	10.79±1.33 ^{b)}	3.69±0.67 ^{b)}	2.06±0.34	0.70±0.09	0.63±0.10	0.21±0.05	0.97±0.08	0.33±0.05
8	BHT 1%	10	271±22	11.53±0.91 ^{b)}	4.28±0.21 ^{b)}	1.89±0.19 ^{a)}	0.65±0.11	0.56±0.10	0.20±0.03	0.93±0.07 ^{a)}	0.34±0.01
9	DHA-Na 0.05% + BHT 0.1%	10	306±48	9.36±1.48 ^{a)}	3.06±0.28 ^{a)}	1.98±0.24	0.65±0.05 ^{c)}	0.63±0.14	0.21±0.05	0.97±0.10	0.32±0.03 ^{c)}
10	DHA-Na 0.5% + BHT 0.1%	10	205±16 ^{b),d)}	7.35±0.73 ^{b),e)}	3.58±0.21 ^{b),f)}	1.61±0.19 ^{b),f)}	0.78±0.05 ^{b),f)}	0.50±0.13 ^{a)}	0.24±0.06 ^{e)}	0.79±0.09 ^{b),d),e)}	0.39±0.03 ^{b)}
11	DHA-Na 0.05% + BHT 1%	10	279±34	10.99±1.41 ^{b),e),f)}	3.95±0.25 ^{b),d),e)}	1.90±0.18 ^{a)}	0.68±0.05	0.59±0.13	0.21±0.03	1.04±0.30	0.37±0.09

Group	Lung (g)		Brain (g)		Ovary (mg)		Adrenal (mg)		Pituitary (mg)	
	Absol.	Relat.	Absol.	Relat.	Absol.	Relat.	Absol.	Relat.	Absol.	Relat.
1	1.69±0.22	0.55±0.11	1.84±0.06	0.59±0.06	87±11	28±6	62±10	19.7±2.5	10.6±3.1	3.4±0.8
2	1.20±0.15 ^{b)}	0.52±0.05	1.79±0.08	0.78±0.06 ^{b)}	92±16	40±7 ^{b)}	62±9	26.9±3.8 ^{b)}	10.0±1.6	4.3±0.7 ^{a)}
3	1.69±0.37	0.59±0.16	1.75±0.07 ^{a)}	0.61±0.08	93±24	32±9	66±13	22.9±4.3	9.9±1.9	3.5±0.8
4	1.41±0.11 ^{b)}	0.53±0.07	1.74±0.08 ^{b)}	0.66±0.05 ^{a)}	89±21	34±9	59±9	22.5±3.4	9.4±1.2	3.6±0.5
5	1.20±0.27 ^{b)}	0.64±0.18	1.51±0.08 ^{b)}	0.80±0.06 ^{b)}	52±17 ^{b)}	27±9	45±6 ^{b)}	24.2±4.7 ^{a)}	5.9±1.4 ^{b)}	3.1±0.7
6	1.68±0.47	0.58±0.23	1.79±0.07	0.61±0.10	93±20	32±9	61±9	21.0±5.5	10.6±1.0	3.6±0.3
7	1.64±0.32	0.55±0.18	1.77±0.15	0.61±0.10	89±21	31±11	67±14	23.2±7.4	11.7±2.8	4.1±1.0
8	1.64±0.25	0.60±0.13	1.82±0.06	0.67±0.05 ^{b)}	87±20	32±8	63±11	23.4±6.0	11.6±3.2	4.3±1.1
9	1.55±0.34	0.51±0.13	1.84±0.08 ^{c)}	0.61±0.08	100±11 ^{a)}	33±7	66±11	21.8±4.0	12.1±2.3 ^{c)}	4.0±0.8
10	1.22±0.22 ^{b), c)}	0.59±0.08	1.53±0.03 ^{b), d), f)}	0.75±0.05 ^{b), f)}	74±20 ^{a), c)}	36±8 ^{a), c)}	51±6 ^{b), c)}	24.8±3.6 ^{b)}	7.7±1.6 ^{a), c), f)}	3.8±0.7 ^{c)}
11	1.37±0.17 ^{b), c), d), f)}	0.49±0.07 ^{c)}	1.80±0.08	0.65±0.07	82±19	30±9	60±5	22.1±4.1	10.5±1.8	3.8±0.7

Mean±S.D. Absol.: Absolute weight, Relat.: Relative weight (g/100 g body weight), ^{a)} Significantly different from control (p<0.05), ^{b)} (p<0.01), ^{c)} Significantly different from DHA-Na-treated group (p<0.05), ^{d)} (p<0.01), ^{e)} Significantly different from BHT-treated group (p<0.05), ^{f)} (p<0.01)

Table 6. Histological Findings in Male and Female Rats Treated with Sodium Dehydroacetate (DHA-Na) and Dibutyl Hydroxy-toluene (BHT) for 6 Months

Dose	DHA-Na 0.5%		BHT 1%		DHA-Na 0.05% +BHT 0.1%		DHA-Na 0.5% +BHT 0.1%		DHA-Na 0.05% +BHT 1%	
	M (5)	F (5)	M (5)	F (5)	M (5)	F (5)	M (5)	F (5)	M (5)	F (5)
	- ± + + +	- ± + + +	- ± + + +	- ± + + +	- ± + + +	- ± + + +	- ± + + +	- ± + + +	- ± + + +	- ± + + +
Sex (No. of rats)										
Grade										
Liver										
Capillary dilatation	4 0 1 0	4 1 0 0	4 0 1 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	2 2 1 0
Proliferation of interlobular bile duct	3 1 1 0	4 1 0 0	4 1 0 0	2 3 0 0	5 0 0 0	4 1 0 0	4 0 1 0	4 1 0 0	1 4 0 0	5 0 0 0
Leukocytic infiltration	4 0 1 0	5 0 0 0	4 0 1 0	2 1 2 0	4 0 1 0	4 0 1 0	5 0 0 0	5 0 0 0	3 1 1 0	5 0 0 0
Congestion	5 0 0 0	4 1 0 0	3 1 1 0	5 0 0 0	3 0 2 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	4 0 1 0	5 0 0 0
Proliferation of interstitial cells	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	4 1 0 0	5 0 0 0	2 3 0 0	4 1 0 0	4 1 0 0
Kidney										
Tubular dilatation	1 0 4 0	2 0 3 0	1 0 4 0	1 2 2 0	4 0 1 0	5 0 0 0	3 0 2 0	2 2 1 0	3 1 1 0	0 2 3 0
Casts in tubulus	4 0 1 0	5 0 0 0	4 1 0 0	5 0 0 0	3 0 2 0	5 0 0 0	4 0 1 0	5 0 0 0	4 0 1 0	5 0 0 0
Flat epithelial cells in tubulus	4 0 1 0	4 0 1 0	4 0 1 0	4 0 1 0	4 0 1 0	5 0 0 0	4 0 1 0	4 0 1 0	5 0 0 0	3 1 1 0
Cloudy degeneration	5 0 0 0	5 0 0 0	4 1 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
Congestion	5 0 0 0	3 1 1 0	4 0 1 0	4 0 1 0	2 0 3 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
Proliferation of interstitial cells	5 0 0 0	4 1 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	3 0 1 1	5 0 0 0	4 1 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
Necrosis of epithelial cells in tubulus	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	4 0 1 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
Thickening of capsule	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	4 0 1 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
Leukocytic infiltration	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	4 0 1 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
Glomerular atrophy	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	3 1 1 0	5 0 0 0	5 0 0 0
Lung										
Leukocytic infiltration	3 1 1 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	4 1 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
Congestion	5 0 0 0	4 1 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	4 1 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
Spleen										
Congestion	4 0 1 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	4 0 0 1	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
Adrenal										
Atrophy in medullary cells	5 0 0 0	5 0 0 0	4 1 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
Cellular vacuolization in medulla	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	4 0 0 1	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
Congestion in medulla	5 0 0 0	3 0 2 0	5 0 0 0	3 1 1 0	5 0 0 0	4 0 1 0	5 0 0 0	4 0 1 0	5 0 0 0	4 1 0 0
Pancreas										
Islet enlargement	4 1 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	4 0 1 0	5 0 0 0
Proliferation in interstitial tissue	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	4 0 1 0	5 0 0 0
Cellular vacuolization	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	4 0 0 1	5 0 0 0
Bone marrow										
Fatty cells	5 0 0 0	4 0 1 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0

No remarkable findings are observed in heart, testis, ovary, thyroid, thymus, stomach and small intestine.

4. 剖検および臓器重量

肉眼的観察では各投与群とも肺うっ血、肺膿瘍、肝囊虫、精巣萎縮などが散見されたのみで、薬物投与が原因と思われる顕著な所見は認められなかった。臓器重量を Table 4, 5 に示した。

DHA-Na 単独投与群では、ほとんどの臓器に絶対重量の減少、相対重量の増加の傾向がみられた。

BHT 単独投与群で用量と重量の増減の間に一定の傾向がみられたものは、雌雄の肝臓の重量増加で、絶対重量がともに増加した。

併用投与群についてはさらに単独投与群との差を検定した。その結果、雌雄の肝臓の相対重量で単独投与群の双方に対して有意差を示すものがあったが、その値は両単独投与群の値の中間にあった。ほかに精巣でもこれと同じ傾向が認められた。

5. 組織学的検査

組織学的検査の所見を Table 6 に示した。

肝臓と腎臓以外の臓器にはそれほど顕著な変化はみられなかった。肝臓については DHA-Na および BHT の単独投与群のそれぞれの大量とそれらの併用投与群において、肝細胞自体に異変はみられなかったが、小葉間胆管の増生が散見された。腎については、各投与群に尿細管上皮細胞の扁平化ならびに尿細管の拡張がみられた。この変化は雄よりも雌に著明であった。そのほか、各投与群に尿細管上皮細胞の混濁変性および壊死、尿細管円柱などが散見された。なお、これらの変化について単独投与群と併用投与群との間に差はみられなかった。

考 察

保存料である DHA-Na と酸化防止剤である BHT をラットに 6 か月間投与し、その相乗毒性を検討した。

前報¹⁾では単独投与群の中等量同士および、一方の中等量と他方の大量の組合わせで相乗毒性を検討したが、中毒量と思われる大量に対しては、単独では作用を示さないと思われる少量を組合わせた方が、相乗毒性の有無をより明確にすることができるのではなかろうかと考え、今回は少量同士および一方の少量と他の大量を組合わせて試験を行った。

DHA-Na 0.5% 群と DHA-Na 0.5%+BHT 0.1% 群で体重増加は著しく抑制された。しかし、この両群の体重の推移は、DHA-Na 0.5%+BHT 0.1% 群に対して設定した pair feeding 対照群に近いことから、摂餌量の低下がその原因であると考えられた。7 週から 22 週にかけては、DHA-Na 0.5%+BHT 0.1% 群よりも pair feeding 対照群の方の体重増加がやや大きい、これは 5 週頃から DHA-Na 0.5%+BHT 0.1% 群の餌をこぼす量が急になって同群の見掛けの摂餌量が増加し、したがって pair feeding 対照群に与える餌の量が DHA-Na 0.5%+BHT 0.1% 群の実際の摂餌量よりも

多くなったため、このような差を生じたものと思われる。

血液学的検査および血液生化学的検査では DHA-Na の単独投与で血糖と GOT の減少がみられたが、値そのものが正常値の範囲内にあり、とくに意味をもつものとは考えられなかった。BHT の単独投与で雄の A/G、ALP の減少、雌のコレステロールの増加が認められた。このうち、ALP の減少についてはその臨床的意義が明らかでない。しかし、東京都衛研の報告では、BHT 0.05~0.8% 添加した飼料を 6 か月間与えたところ、雌に A/G の減少がみられている³⁾。また、BHT の投与により血清コレステロールが増加したという報告がある⁴⁾。

相乗作用の有無の判定は併用投与群と二つの単独投与群との間で検定を行い、その両者のいずれに対しても有意差が認められたとき、これを相乗作用によるものと考えことにした。血液学的検査および血液生化学的検査において、そのような関係がみられたものは雄の血糖の増加、GOT の減少である。しかし、そのように単独投与群の双方に対して有意差が認められた DHA-Na 0.05%+BHT 1% 群の血糖も、その値は BHT 0.1% 群のそれよりも低く、意味あるものとは考えられなかった。また、GOT の減少についてはその臨床的意義は明らかでない。

臓器重量では DHA-Na 単独投与群で、ほとんどの臓器に絶対重量の減少、相対重量の増加の傾向がみられた。0.5% 群の臓器について、絶対重量で対照群よりも有意に増加したものはなく、また相対重量で対照群よりも有意に減少したものもみられないことから、その変動はいずれも体重の減少に伴うものと考えられた。

BHT の単独投与で肝臓重量増加がみられた。BHT による肝臓重量増加についてはすでに多くの報告がある^{4)~6)}。しかし、併用投与群について単独投与群との差を検定した結果、雌雄の肝臓の相対重量で単独投与群の双方に対して有意差を示すものがあったが、その値は両単独投与群の値の中間にあって相乗的であるとはいえなかった。また組織学的所見においても相乗的と考えられる変化はなかった。

結 論

DHA-Na と BHT を飼料に添加してラットに 6 か月間投与し、その相乗毒性を検討した。添加濃度は DHA-Na 0.05%+BHT 0.1%、DHA-Na 0.5%+BHT 0.1%、DHA-Na 0.05%+BHT 1% であったが、とくに著しい相乗作用は認められなかった。

本研究は昭和46年度厚生省食品衛生調査費の補助のもとに行われたものである。ここに記して謝意を表する。なお、本研究の要旨は日本食品衛生学会第28回学術講演会(1974年10月、長崎)において発表した。

文 献

- 1) 谷口 繁, 山田明男, 森田 茂, 水谷泰久: 食衛誌. **22**, 351~365 (1981).
- 2) 平賀興吾, 林田志信, 市川久次, 米山允子, 藤井孝, 池田虎雄, 矢野範男: 東京衛研年報. **22**, 231~249 (1970).
- 3) 市川久次, 藤井 孝, 小林博義, 坂本義光, 林田志信, 米山允子, 池田虎雄, 矢野範男, 紺野敏秀, 平賀興吾: 同上, **23**, 345~371 (1971).
- 4) Branen, A.L.: J. Amer. Oil Chem. Soc., **52**, 59~63 (1975).
- 5) 東京衛研毒性部: 東京衛研研究報告. 32号, 3~62 (1977).
- 6) 新村寿夫: “食品添加物の生化学と安全性” p. 203 (1979), 地人書館.