

## 桑葉抽出物のラットにおける90日間反復混餌投与毒性試験

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
巻/号	444
掲載ページ	p. 191-197
発行年月	2003年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 報 文

## 桑葉抽出物のラットにおける 90 日間反復混餌投与毒性試験

(平成 15 年 3 月 31 日受理)

宮澤 眞紀\*<sup>1,†</sup> 宮原智江子\*<sup>1</sup> 佐藤修二\*<sup>1</sup> 酒井案理\*<sup>2</sup>

## Ninety-day Dietary Toxicity Study of Mulberry Leaf Extract in Rats

Maki MIYAZAWA\*<sup>1,†</sup>, Chieko MIYAHARA\*<sup>1</sup>, Shuji SATOH\*<sup>1</sup> and Anri SAKAI\*<sup>2</sup>(\*<sup>1</sup>Kanagawa Prefectural Institute of Public Health: 1-3-1, Shimomachiya, Chigasaki-shi, Kanagawa 253-0087, Japan; \*<sup>2</sup>Research Center, Toyotama Koryo Co., Ltd.: 65, Numata, Minamishigara-shi, Kanagawa 250-0115, Japan; †Corresponding author)

Mulberry leaf extract was studied toxicologically in male and female SD rats. The extract was administered orally at concentrations of 0% (control group), 0.1%, 0.4% and 1% in basal diet for 90 days. No remarkable change in test animals of both sexes was observed in terms of body weight gain or at necropsy. Hematology and blood chemistry revealed no abnormalities. Pathological examination revealed no toxic change in any organ observed. These findings indicate that dietary intake of 1% mulberry leaf extract for 90 days (884.5 mg/kg/day for males and 995.7 mg/kg/day for females as mean daily intake) causes no toxicological change in rats.

(Received March 31, 2003)

**Key words:** 桑葉抽出物 mulberry leaf extract; ラット rat; 90 日間反復混餌投与毒性試験 90-day dietary toxicity study; 桑 *Morus alba* L.

## 緒 言

クワ (マグワ *Morus alba* L.) は、中国、朝鮮原産で、日本各地でも養蚕用に古来より栽培されてきた。クワの根皮は、桑白皮 (MORI CORTEX; Mulberry Bark) として日本薬局方に収載された生薬であり、主として鎮咳去痰薬として処方される<sup>1)</sup>が、血糖下降作用<sup>2)~4)</sup>、 $\alpha$ -glucosidase 活性阻害作用<sup>5), 6)</sup>、血圧降下作用<sup>7)</sup>、環状 AMP ホスホジエステラーゼ阻害作用<sup>8)</sup>、トロンボキサン B<sub>2</sub> 産生阻害作用<sup>9)</sup>、抗発ガンプロモーター作用<sup>10)</sup>を示すことが報告されている。一方、桑葉は薬用に用いられることは少なく、一部の地域でお茶として飲用されてきたにすぎない。

近年、養蚕の衰退に伴い余剰となった桑葉の有効利用が模索され、桑葉を食品素材として転化するため、桑葉の持つ機能性についての研究が行われてきた。その結果、桑葉は食物繊維、カルシウム、カリウムといった電解質やタンパク質などを豊富に含むことが明らかになった<sup>11)</sup>。また、生理作用として、桑葉に含まれる 1-deoxynojirimycin (DNJ) に血糖上昇抑制作用<sup>4)</sup>、桑葉のメタノールエキス中ブタノール可溶画分およびメタノール不溶画分に脂質代謝制御作用<sup>12)</sup>、フラボノイド類に抗酸化能<sup>13)</sup>が報告されてい

る。さらに、乾燥桑葉には発ガン抑制効果<sup>14)</sup>があることが明らかとなり、健康の維持・増進、成人病の予防に有効な食品となる可能性が示されている。

しかし、桑葉はお茶として飲用されてきた歴史を持つものの、食物として連用する場合の科学的な安全性に関する報告は極めて少ない<sup>15)</sup>。そこで、今回、桑葉の安全性を評価するために、桑葉抽出物におけるラットを用いた 90 日間反復混餌投与毒性試験を実施した。

## 材料および方法

## 1. 被験物質

実験に使用した桑葉抽出物の原料には、タイ産の 9 月から 10 月に収穫した桑葉を用いた。桑葉抽出物の調製は、食用に供することを目的に、著者らの方法<sup>16)</sup>を改良し、以下の方法で行った。すなわち、製茶機を用いて桑葉を乾燥させ、その乾燥桑葉 35 kg を 304 L の 50% エタノールで 2 時間かくはん抽出し、抽出物をろ過して不溶物を除去した。ろ液を 50°C 以下で減圧濃縮した後、凍結乾燥することにより桑葉抽出物 6.82 kg を得た。本品 (Lot No. 01510) は、桑葉の成分である DNJ を 1.1% 含有していた。桑葉抽出物は調製時まで低温で保管した。

## 2. 動物および飼育条件

4 週齢の SD (IGS) 系の雌雄ラット (SPF) を日本チャールス・リバー (株) より購入し、市販固形飼料 CE-2 (日本クレア (株)) とフィルターでろ過した水道水を自由摂取さ

† 連絡先

\*<sup>1</sup> 神奈川県衛生研究所: 〒253-0087 神奈川県茅ヶ崎市下町屋 1-3-1\*<sup>2</sup> 豊玉香料 (株) 中央研究所: 〒250-0115 神奈川県南足柄市沼田 65

せ、1週間検疫および馴化飼育後、一般状態に異常が見られない雌雄各40匹を試験に使用した。飼育は室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ の条件下で行い、自動飼育装置のアルミ製ケージ(22 cm $\times$ 35 cm $\times$ 20 cm, トキワ科学(株))に2匹ずつ収容した。

### 3. 投与方法および群構成

雌雄各3群を被験物質投与群とし、基礎飼料のみを与えた対照群を含め計4群とした。自然発症糖尿病ラットを用いた血糖制御試験において、5%および2.5%桑葉を飼料に添加した結果、投与4週後から有意差はないもの体重増加抑制傾向が認められた<sup>17)</sup>。このことから、被験物質の収率(19.5%)より、5%桑葉に相当する1%桑葉抽出物を飼料添加最高用量とし、0.4%および0.1%を中用量および低用量とした。

基礎飼料はCE-2(日本クレア(株))を用い、混合固形飼料の調製は日本クレア(株)に30日ごとに依頼した。飼料は90日間自由摂取させ、各群の動物数は雌雄各10匹とした。

### 4. 検査項目および方法

#### 1) 一般状態、体重、摂餌量および被験物質摂取量

試験期間を通して、毎日動物の生死の確認および一般症状を観察し、1週間に1回、体重を測定した。摂餌量の測定は週1回行い、1日当たりの平均摂餌量を算出した。

#### 2) 血液学的検査

90日間の投与終了後、全例について、採血前日(剖検日前日)の17:00から一晩絶食させ、エーテル麻酔下で腹部大動脈より採血を行った。血液は、EDTA-2Na加試験管(テルモ(株), VT-050NA)に採取した。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)、平均赤血球色素量(MCH)、平均赤血球色素濃度(MCHC)、血小板数(PLT)を、自動血球計測装置FU-800(Sysmex)で測定した。同時に、血液塗抹標本を作製し、May-Grünwald-Giemsa染色を行い、白血球百分比を算定した。

#### 3) 血液生化学的検査

血液学的検査の項で採血した血液から得られた血清を用い、総タンパク(TP)、アルブミン(Alb)、遊離脂肪酸(NEFA)、遊離コレステロール(F-Cho)、総コレステロール(T-Cho)、トリグリセライド(TG)、リン脂質(PL)、グルコース(Glu)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(Cre)、尿酸(UA)、総ビリルビン(T-Bil)、アスパルテート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)、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチターゼ( $\gamma$ -GTP)、アルカリフォスファターゼ(ALP)、無機リン(IP)、カルシウム(Ca)、マグネシウム(Mg)について、スーパーZ818(日本モニター(株))で測定した。

電解質(Na, Cl, K)は、(株)SRLに依頼し、測定した。

#### 4) 剖検および器官重量

エーテル麻酔下で検査用血液を採取した後、動物を放血致死させ、全身の器官・組織について異常の有無を肉眼的

に観察した。剖検時に、脳、下垂体、胸腺、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、副腎、前立腺、卵巣、子宮の重量を測定した。

#### 5) 病理組織検査

雌雄対照群および1%投与群の臓器について、病理組織検査を行った。脳、下垂体、舌、眼球、Harder腺、唾液腺、甲状腺、気管、食道、胸腺、心臓、肺、大動脈、胃、十二指腸、空回腸、結腸、肝臓、膵臓、脾臓、腸間膜リンパ節、腎臓、膀胱、副腎、皮膚、大腿筋、骨髄、精巣、精巣上体、精囊・凝固腺、前立腺、卵巣、子宮および膈を、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、常法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い鏡検した。

#### 6) 統計処理

各群の測定データについて、Bartlett法による分散性の分析を行った。等分散の場合には一元配置法による分散分析を行い、等分散でない場合は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は、例数が等しいときはDunnett法による対照群との群間比較を行った。血液学的検査データについては例数が異なるため、Scheffe法により対照群との群間比較を行った。有意水準は5%とした。

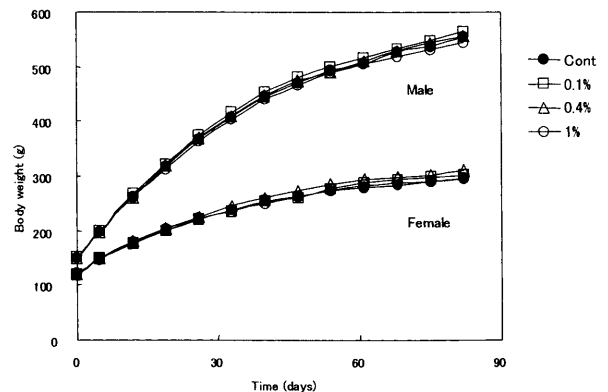


Fig. 1. Mean body weight of male and female rats fed diet containing mulberry leaf extract for 90 days

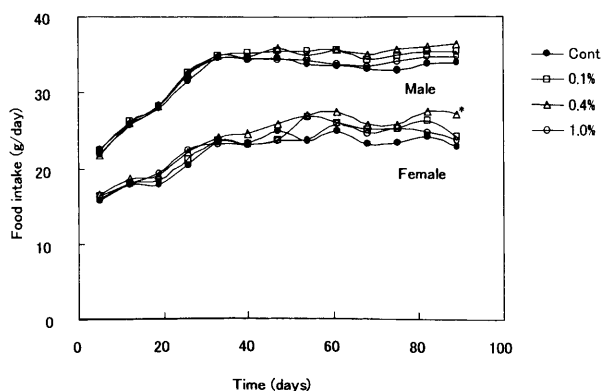


Fig. 2. Mean food intake of male and female rats fed diet containing mulberry leaf extract for 90 days. Significantly different from control: \* $p < 0.05$

**Table 1.** Mean Body Weight, Food Intake and Mulberry Leaf Extract Intake of Male and Female Rats Fed Diet Containing Mulberry Leaf Extract for 90 Days

Sex	Male				
	Group	Cont.	0.1%	0.4%	1%
Mean body weight (g)		402.1±134.2	409.1±136.9	404.1±135.5	398.6±131.9
Mean food intake (g/rat/day)		31.7±3.8	32.8±4.3	32.9±4.6	32.0±4.2
Mean mulberry leaves extract intake (mg/kg/day)		0.0±0.0	88.3±27.0	357.1±104.3	884.1±266.6
Sex	Female				
	Group	Cont.	0.1%	0.4%	1%
Mean body weight (g)		233.5±57.3	236.3±60.0	241.7±62.4	234.7±56.9
Mean food intake (g/rat/day)		22.0±3.0	22.9±3.4	24.0±3.7	22.6±3.0
Mean mulberry leaves extract intake (mg/kg/day)		0.0±0.0	100.4±15.6	410.5±61.8	995.7±150.6

**Table 2.** Hematological Findings in Male and Female Rats Fed Diet Containing Mulberry Leaf Extract for 90 Days

Sex	Male				
	Group	Cont.	0.1%	0.4%	1%
Number of animals		10	9	9	9
WBC ( $10^2/\mu\text{L}$ )		94±28	101±26	83±32	78±22
RBC ( $10^4/\mu\text{L}$ )		891±42	907±35	889±28	889±35
Hb (g/dL)		16.1±0.5	16.3±0.5	16.3±0.4	16.0±0.5
Ht (%)		47.1±1.9	48.0±1.6	47.6±1.1	47.0±1.7
MCV (fl)		53.0±1.8	52.9±2.0	53.6±1.4	52.9±1.3
MCH (pg)		18.1±0.7	18.0±0.5	18.4±0.6	18.0±0.5
MCHC (%)		34.2±0.4	33.9±0.5	34.3±0.3	34.1±0.3
PLT ( $10^4/\mu\text{L}$ )		106±9	109±12	110±10	116±13
Differential white blood cell counts (%)					
N-sta		0.6±0.6	1.0±1.0	0.8±0.7	0.9±0.9
N-seg		8.7±2.9	8.3±2.9	8.9±3.9	9.9±3.9
Baso		0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Eosino		1.4±0.8	1.1±0.5	1.6±1.1	1.1±0.8
Lymp		84.2±4.4	83.4±5.4	82.7±5.4	82.2±5.8
Mono		3.3±1.8	4.0±3.0	3.7±1.3	3.4±1.8
Others		1.8±0.5	2.2±1.3	2.4±0.7	2.5±3.0
Sex	Female				
	Group	Cont.	0.1%	0.4%	1%
Number of animals		9	10	9	9
WBC ( $10^2/\mu\text{L}$ )		41±13	32±9	39±11	38±12
RBC ( $10^4/\mu\text{L}$ )		845±36	805±36	810±20	820±32
Hb (g/dL)		16.2±0.6	15.7±0.5	16.0±0.4	15.9±0.5
Ht (%)		46.8±2.0	45.2±1.5	46.4±1.4	46.3±1.8
MCV (fl)		55.4±2.0	56.2±1.8	57.3±1.3	56.5±1.5
MCH (pg)		19.2±0.6	19.5±0.5	19.7±0.5	19.4±0.5
MCHC (%)		34.7±0.4	34.7±0.5	34.4±0.5	34.4±0.6
PLT ( $10^4/\mu\text{L}$ )		103±15	98±11	97±7	95±11
Differential white blood cell counts (%)					
N-sta		0.5±0.5	0.7±0.9	1.1±0.7	0.8±0.9
N-seg		10.3±3.3	12.6±7.5	10.9±4.5	15.7±6.2
Baso		0.1±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Eosino		1.5±1.3	1.4±1.8	1.1±1.1	2.2±1.0
Lymp		83.4±3.7	81.9±8.2	83.7±4.8	78.1±7.2
Mono		2.5±1.1	2.0±1.2	2.1±1.4	1.7±1.1
Others		1.8±0.8	1.6±1.0	1.2±0.9	1.5±1.3

Values are mean±S.D.

WBC: leucocytes; RBC: erythrocytes; Hb: hemoglobin; Ht: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; PLT: platelets; N-sta: stab neutrophils; N-seg: segmented neutrophils; Baso: basophils; Eosino: eosinophils; Lymp: lymphocytes; Mono: monocytes

**Table 3.** Blood Chemical Findings in Male and Female Rats Fed Diet Containing Mulberry Leaf Extract for 90 Days

Sex	Male				
	Group	Cont.	0.1%	0.4%	1%
Number of animals		10	10	10	10
TP (g/dL)		5.54±0.28	5.60±0.29	5.63±0.25	5.62±0.24
Alb (g/dL)		4.31±0.26	4.23±0.18	4.27±0.17	4.40±0.17
NEFA (mEq/L)		0.6±0.2	0.6±0.1	0.7±0.1	0.6±0.1
F-Cho (mg/dL)		10±3	10±3	10±2	10±4
T-Cho (mg/dL)		59±16	58±11	60±9	66±17
TG (mg/dL)		56±40	56±18	52±16	51±18
PL (mg/dL)		92±19	89±14	88±11	97±20
Glu (mg/dL)		180±15	189±17	168±22	184±23
BUN (mg/dL)		16.6±3.0	15.8±1.5	16.4±1.5	16.9±2.5
Cre (mg/dL)		0.27±0.05	0.30±0.04	0.29±0.03	0.27±0.04
UA (mg/dL)		1.9±0.5	1.6±0.2	1.7±0.2	1.9±0.6
T-Bil (mg/dL)		0.14±0.07	0.17±0.02	0.18±0.03	0.18±0.03
AST (U/L)		149±34	143±34	156±37	143±35
ALT (U/L)		33±6	29±5	32±10	31±10
γ-GTP (IU/L)		0.60±0.83	0.38±0.23	0.67±0.56	0.45±0.69
ALP (U/L)		224±35	218±36	215±36	214±64
IP (mg/dL)		6.8±0.8	6.9±0.7	6.8±0.5	6.9±0.6
Ca (mg/dL)		8.2±0.4	8.1±0.3	8.1±0.3	8.3±0.4
Mg (mg/dL)		1.7±0.1	1.8±0.1	1.8±0.1	1.8±0.2
Na (mEq/L)		140±1	141±2	141±2	140±1
Cl (mEq/L)		102±1	102±1	103±1	102±1
K (mEq/L)		5.1±0.5	4.8±0.3	4.8±0.4	4.9±0.5

Sex	Female				
	Group	Cont.	0.1%	0.4%	1%
Number of animals		10	10	10	10
TP (g/dL)		5.95±0.41	6.07±0.31	5.88±0.22	5.92±0.39
Alb (g/dL)		4.93±0.46	5.01±0.27	4.79±0.28	4.78±0.43
NEFA (mEq/L)		0.8±0.1	0.9±0.2	0.7±0.1	0.8±0.1
F-Cho (mg/dL)		15±3	17±5	14±4	16±5
T-Cho (mg/dL)		81±17	83±15	73±13	79±14
TG (mg/dL)		31±8	32±6	30±6	30±5
PL (mg/dL)		137±25	141±20	126±15	133±18
Glu (mg/dL)		135±26	136±26	145±20	127±18
BUN (mg/dL)		15.4±2.2	15.5±1.5	15.7±2.6	16.4±2.4
Cre (mg/dL)		0.33±0.03	0.33±0.04	0.33±0.04	0.33±0.04
UA (mg/dL)		2.2±0.5	1.8±0.5	1.7±0.3	1.6±0.4
T-Bil (mg/dL)		0.16±0.05	0.19±0.02	0.18±0.04	0.21±0.06
AST (U/L)		144±35	128±28	140±34	137±30
ALT (U/L)		30±7	38±16	52±32	44±26
γ-GTP (IU/L)		1.02±0.53	1.21±1.01	1.18±0.41	0.85±0.38
ALP (U/L)		114±25	119±39	102±12	125±14
IP (mg/dL)		4.6±0.7	4.3±0.7	5.1±1.3	5.0±1.0
Ca (mg/dL)		8.2±0.4	8.1±0.2	7.9±0.2	7.9±0.3
Mg (mg/dL)		1.9±0.1	1.9±0.1	2.0±0.1	1.9±0.1
Na (mEq/L)		142±3	141±1	142±1	141±1
Cl (mEq/L)		105±1	105±1	106±1	106±1
K (mEq/L)		4.2±0.4	4.1±0.3	4.0±0.4	4.0±0.4

Values are mean±S.D.

TP: total protein; Alb: albumin; NEFA: non-esterified fatty acid; F-Cho: free cholesterol; T-Cho: total cholesterol; TG: triglyceride; PL: phospholipid; Glu: glucose; BUN: blood urea nitrogen; Cre: creatinine; UA: uric acid; T-bil: total bilirubin; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; γ-GTP: γ-glutamyltranspeptidase; ALP: alkaline phosphatase; IP: inorganic phosphorus; Ca: calcium; Mg: magnesium; Na: sodium; Cl: chloride; K: potassium

Table 4. Organ Weights in Male and Female Rats Fed Diet Containing Mulberry Leaf Extract for 90 Days

Sex	Male						Female									
	Cont.		0.1%		0.4%		1%		Cont.		0.1%		0.4%		1%	
	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
Number of animals	532.7±22.2	539.5±29.9	535.3±36.8	521.7±33.1	274.7±21.1	287.3±23.9	291.8±23.5	277.3±12.7								
Absolute organ weight																
Brain (g)	2.11±0.15	2.14±0.19	2.09±0.12	2.11±0.17	1.94±0.16	1.92±0.07	1.89±0.10	1.92±0.17								
Hypophysis (mg)	13.5±1.2	13.6±2.3	12.7±3.1	12.1±2.6	16.7±2.4	17.8±3.5	16.8±1.3	16.4±2.7								
Thymus (mg)	335±99	351±84	353±75	367±99	294±71	297±48	292±58	322±86								
Heart (g)	1.65±0.18	1.69±0.15	1.61±0.11	1.65±0.18	0.97±0.12	1.00±0.07	1.03±0.08	0.98±0.06								
Lungs (g)	1.64±0.17	1.68±0.13	1.70±0.12	1.65±0.13	1.13±0.10	1.17±0.11	1.17±0.08	1.13±0.04								
Liver (g)	15.04±1.46	15.01±1.16	14.77±1.52	15.27±1.67	7.44±0.84	7.85±1.06	8.04±0.61	7.50±0.47								
Spleen (g)	0.81±0.11	0.83±0.10	0.83±0.06	0.80±0.10	0.54±0.06	0.52±0.10	0.53±0.06	0.51±0.05								
Kidneys (g)	3.60±0.26	3.64±0.31	3.52±0.33	3.58±0.37	1.97±0.12	1.97±0.16	2.02±0.16	2.04±0.12								
Adrenals (mg)	78.2±10.5	72.1±8.5	75.8±11.0	73.5±8.6	82.0±10.2	80.5±10.8	86.0±10.9	85.6±8.7								
Testes (g)	3.43±0.23	3.51±0.16	3.61±0.25	3.32±0.20												
Prostate (g)	0.68±0.15	0.84±0.27	0.88±0.41	0.72±0.19	105.4±25.2	95.2±27.7	95.3±16.6	107.6±23.5								
Ovaries (mg)					0.61±0.15	0.52±0.11	0.58±0.12	0.59±0.15								
Uterus (g)																
Relative organ weight (100 g body weight)																
Brain (g%)	0.40±0.03	0.40±0.03	0.39±0.03	0.41±0.04	0.71±0.07	0.67±0.06	0.65±0.05	0.69±0.07								
Hypophysis (mg%)	2.5±0.3	2.5±0.3	2.4±0.6	2.3±0.4	6.1±1.1	6.2±1.1	5.8±0.8	5.9±1.1								
Thymus (mg%)	63±19	65±16	66±15	70±17	107±23	103±16	100±18	115±28								
Heart (g%)	0.31±0.03	0.31±0.03	0.30±0.02	0.32±0.03	0.35±0.02	0.35±0.02	0.35±0.01	0.36±0.01								
Lungs (g%)	0.31±0.04	0.31±0.01	0.32±0.02	0.32±0.02	0.42±0.05	0.41±0.04	0.40±0.02	0.41±0.02								
Liver (g%)	2.82±0.21	2.78±0.16	2.75±0.12	2.92±0.16	2.71±0.20	2.73±0.23	2.76±0.15	2.70±0.08								
Spleen (g%)	0.15±0.02	0.15±0.02	0.16±0.01	0.15±0.01	0.20±0.02	0.18±0.03	0.18±0.02	0.18±0.02								
Kidneys (g%)	0.68±0.04	0.68±0.04	0.66±0.04	0.68±0.04	0.72±0.06	0.69±0.04	0.69±0.06	0.74±0.06								
Adrenals (mg%)	14.8±2.4	13.4±1.3	14.3±2.4	14.1±1.6	30.0±3.9	28.0±3.4	29.6±4.1	30.9±3.2								
Testes (g%)	0.64±0.05	0.65±0.03	0.68±0.07	0.64±0.06												
Prostate (g%)	0.13±0.03	0.16±0.05	0.16±0.06	0.14±0.04	38.3±9.0	33.0±9.1	32.9±6.4	39.1±9.3								
Ovaries (mg%)					0.23±0.07	0.18±0.04	0.20±0.04	0.21±0.05								
Uterus (g%)																

Value are mean±S.D.

**Table 5.** Histopathological Findings in Male and Female Rats Fed Diet Containing Mulberry Leaf Extract for 90 Days

Organ	Histopathological changes	Male		Female	
		Cont.	1%	Cont.	1%
Number of animals		10	10	10	10
Lung	Perivascular cell infiltration	1	1	1	0
	Medial calcification in pulmonary artery	0	2	1	0
Heart	Cell infiltration	2	2	0	0
Liver	Microgranuloma	0	0	3	2
Kidney	Mineralization	0	0	3	2
Pancreas	Cell infiltration	1	2	0	0
Prostate	Cell infiltration	3	4	-	-

## 結 果

### 1. 一般状態, 体重, 摂餌量および被験物質摂取量

投与期間中, 雌雄ともに一般症状に異常は見られず, 死亡例もなかった。

体重の推移を Fig. 1 に示した。雌雄ともに, 順調な体重増加が認められ, 投与 10 週以降, 有意差はないものの雄の 1% 桑葉抽出物投与群で体重の増加抑制傾向があった一方, 雌雄の 0.1% および 0.4%, 雌の 1% 投与群では対照群に比べて差はなく, 用量依存性も認められなかった。

試験期間中の摂餌量は, Fig. 2 に示すように推移した。有意差および用量依存性は認められないが, 雌雄とも桑葉抽出物投与群で摂餌量が多くなる傾向が認められ, 雌の 0.4% 桑葉抽出物投与群の最終飼育週間における摂餌量が有意に増加した。

各週で求めた被験物質摂取量を試験期間を通じて平均し, ラット体重当たりの平均被験物質摂取量として Table 1 に示した。雌雄とも, 用量設定に対応した桑葉抽出物の摂取が認められた。1% 投与群での平均被験物質摂取量は, 雄で 884.1 mg/kg/day, 雌で 995.7 mg/kg/day であった。

### 2. 血液学的検査

検査結果を Table 2 に示した。雄対照群および雌 0.1% 投与群以外の各群で 1 例ずつ, 検査中に血液凝固が認められ, 検査から除外した。雌雄ともいずれの項目においても群間に有意差は認められなかったが, 雌の 1% 桑葉抽出物投与群において, 分葉好中球比の増加傾向およびリンパ球比の減少傾向が認められた。

### 3. 血液生化学的検査

検査結果を Table 3 に示した。雌雄とも, いずれの項目においても群間に有意差は認められなかった。しかし, T-Bil が, 雌雄とも桑葉抽出物添加濃度に従い増加する傾向があった。

### 4. 剖検所見

雌雄とも, 桑葉抽出物投与によると思われる肉眼病変は認められなかったが, 腺胃の粘膜がやや肥厚した個体が, 対照群も含めた各群で 1 例見られた。

### 5. 器官重量

雌雄の器官重量およびその体重比を Table 4 に示した。雌雄とも, いずれの器官重量およびその体重比ともに, 群

間に有意差は認められなかった。

### 6. 病理組織検査

病理組織学的検査の結果を Table 5 に示した。雄において, 若干例の個体で, 肺, 心臓, 脾臓, 前立腺で軽度の細胞浸潤および肺動脈周囲の鉍物沈着が観察された。雌において, 若干例で, 肺に細胞浸潤および肺動脈周囲の鉍物沈着, 肝臓に小肉芽巣および腎髄質の鉍物沈着が観察された。しかし, これらの組織変化はいずれも軽度であり, 重篤な病変ではなかった。また, 肉眼的に雌雄ともに各群 1 例ずつ腺胃部の粘膜肥厚が観察されたが, 組織的な異常は認められなかった。また, 雌雄とも対照群との間に発生頻度に関する有意差は認められなかった。

### 考察および結語

桑葉抽出物の反復投与による安全性を確認することを目的に, ラットによる 90 日間反復投与毒性試験を行った。

桑葉抽出物を 1%, 0.4% および 0.1% の割合で混合した飼料を雌雄ラットに 90 日間投与した結果, 雌雄とも, 体重および一般状態に特記すべき変化は認められず, 体重および飼料摂取量も順調に推移した。著者らが以前に行った自然発症糖尿病ラットを用いた血糖制御試験において, 5% および 2.5% 桑葉の飼料添加により, 投与 4 週後から有意差はないものの用量依存的に体重増加抑制傾向が認められた<sup>17)</sup>。SD (IGS) 系ラットでは, 被験物質の収率 (19.5%) より 5% 桑葉に相当する 1% 桑葉抽出物投与において, 雄で投与 10 週以降対照群と比べ平均値で 10 g 以上の体重抑制が見られたものの有意差はなく, 低用量群および中用量群では体重抑制傾向は認められなかった。桑葉の約 4 割を占めるペクチンなどの食物繊維<sup>11)</sup>の多くが 50% エタノール抽出によって除去される。このため, 1% 桑葉抽出物では食物繊維含有量が 5% 桑葉に比べ低くなっており, 食物繊維による食物成分の拡散・消化吸収抑制作用が働かず, 体重増加が抑制されなかったと考えられる。雌の 0.4% 桑葉抽出物投与群の最終飼育週間における摂餌量は有意に増加していたが, 餌をケージ内に掻き出す個体がいたために餌の消費量が見かけ上増加した結果, 統計計算上で有意差 ( $p < 0.05$ ) が出たため, 毒性的に意味のある結果ではないと思われる。飼料摂取量は, 雌雄とも対照群よりは桑葉抽出物投与群の方が高く, 桑葉抽出物が

ラットにとって嫌忌物質ではないことが示唆された。

1%投与群での1日当たりの平均被験物質摂取量は雄で884.1 mg/kg, 雌で995.7 mg/kgであった。試験に使用した桑葉抽出物を収率(19.5%)から乾燥桑葉に換算すると, 雄で4,534 mg/kg, 雌で5,106 mg/kgに相当し, 大量の乾燥桑葉を連続摂取したことになる。

血液学的検査では, 雌の1%桑葉抽出物投与群において, 分葉好中球比の増加傾向およびリンパ球比の減少傾向が認められた。しかし, この群では標準偏差が大きく, 特に異常な値を示した個体でも白血球数や脾臓や骨髄の病理組織所見に異常は認められなかったため, 毒性学的な変化ではないと考えられた。

血液生化学的検査では, 有意差のある変化は認められなかったが, T-Bil が雌雄とも桑葉抽出物添加濃度に従い増加する傾向があった。1%および5%の桑葉混合飼料を28日間SDラットに投与した実験<sup>15)</sup>では, 雌の1%桑葉投与群でT-Bilが有意に高かったが, 増加の程度は軽度であり, 肝臓に炎症や黄疸を伺わせる所見は認められなかった。本実験でも, ASTやALTなどの肝機能を示すパラメータに異常は認められず, 肝臓の組織所見でも著変は認められなかったため, 桑葉または桑葉抽出物が肝機能障害を引き起こす可能性は低いと思われる。

病理組織学的検索の結果, 雄において, 肺, 心臓, 膵臓, 前立腺で軽度の細胞浸潤および肺動脈周囲の鉍物沈着が, 雌では肺の細胞浸潤および肺動脈周囲の鉍物沈着, 肝臓の小肉芽巣および腎髄質の鉍物沈着が観察された。しかし, これらの組織変化はいずれも極めて軽度であり, また, 対照群にも発生していたことから, 毒性学的意義は低いと考えられる。

以上のことから, 1日当たりの平均被験物質摂取量は雄で884.1 mg/kg, 雌で995.7 mg/kgであり, この量においては, SD(IGS)系の雌雄ラットに90日間混餌投与を行っても特記すべき毒性は認められず, 桑葉抽出物の亜慢性毒性は低いものと考察された。

## 文 献

- 1) Ministry of Health and Welfare, Japan, The Japanese Pharmacopoeia, 14th Ed., 2001, p. 908.
- 2) Hikino, H., Mizuno, T., Oshima, Y., Konno, C., Isolation and hypoglycemic activity of moran A, aglycoprotein of *Morus alba* root bark. *Planta. Med.*, **51**, 159-160 (1985).
- 3) Tomoda, M., Biologically active polysaccharides in crude drugs(2). *Gendai Touyou Igaku*, **10**, 79-87 (1989).
- 4) Chen, F., Nakashima, N., Kimura, I., Kimura, M., Hypoglycemic activity and mechanisms of extracts from mulberry leaves (*Folium mori*) and *Cortex mori radices* in streptozotocin-induced diabetic mice. *Yakugaku Zasshi(J. Pharm. Soc. Jpn.)*, **15**, 476-482 (1995).
- 5) Yoshikuni, Y., Inhibition of intestinal  $\alpha$ -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia by moranoline and its n-alkyl derivatives. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 121-128 (1988).
- 6) Yamada, H., Oya, I., Nagai, T., Matsumoto, T., Kiyohara, H., Omura, S., Screening of  $\alpha$ -glucosidase II inhibitor from chinese herbs and its application on the quality control of mulberry bark, *Shouyakugaku Zasshi (Nat. Med.)*, **47**, 47-55 (1993).
- 7) Nomura, T., Fukai, T., Hano, Y., Ikuta, H., Kuwano, M., A new diels-alder adduct from the root of the cultivated mulberry tree (*Morus Lhou (ser.) Koidz.*). *Heterocycles*, **20**, 585-591 (1983).
- 8) Nikaido, T., Ohmoto, T., Nomura, T., Fukai, T., Sankawa, U., Inhibition of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase by phenolic constituents of mulberry tree. *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 4,929-4,934 (1984).
- 9) Kimura, Y., Okuda, H., Nomura, T., Fukai, T., Arichi, S., Effect of flavonoids and related compounds from mulberry tree on arachidonate metabolism in rat platelets. *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 1,223-1,227 (1986).
- 10) Yoshizawa, S., Sukanuma, M., Fujiki, H., Fukai, T., Nomura, T., Sugimura, T., Murusin, isolated from root bark of *Morus alba* L., inhibits tumour promotion of treocidin. *Phytother. Res.*, **3**, 193-195 (1989).
- 11) 谷 孝之, 中岡正吉, 岸美智子, 成松次郎, 有賀 勲, 岸井誠男, ルバープ, 桑葉および鶏卵中の機能性成分等について, 機能性食品に関する共同研究事業報告第1号, 神奈川県, 1992, p. 29-33.
- 12) Doi, K., Kojima, T., Harada, M., Horiguchi, Y., Fujimoto, Y., Effect of various fractions extracted from mulberry leaves on lipid metabolism in rabbit fed a cholesterol diet. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, **52**, 85-90 (1999).
- 13) Doi, K., Kojima, Y., Fujimoto, Y., Mulberry leaves extract inhibits the oxidative modification of rabbit and human low density lipoprotein. *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1,066-1,071 (2000).
- 14) 清水昭男, 中村圭靖, 原田昌興, 鈴木 誠, 高橋恭一, 坂本堅五, 桑葉の発癌抑制効果についての *in vivo* 実験系による検討, 機能性食品に関する共同研究事業報告第2号, 神奈川県, 1996, p. 82-86.
- 15) Mitsuya, M., Suegara, N., Kojima, Y., Taniguchi, K., Abe, S., Yamaguchi, H., Ono, Y., Four-week oral toxicity studies of the leaf powder of mulberry (*Morus alba* L.) in rats. *Pharmacometrics*, **61**, 169-179 (2001).
- 16) 酒井案理, 水崎茂暢, 桑葉中の生理活性物質の検出, 機能性食品に関する共同研究事業報告第2号, 神奈川県, 1996, p. 72-73.
- 17) 宮原智江子, 佐藤修二, 川名清子, 堀口佳哉, 鈴木 誠, 高橋恭一, 有賀 勲, 成松次郎, 正常並びに糖尿病ラットにおける糖吸収に及ぼす桑葉およびルバープの影響, 機能性食品に関する共同研究事業報告第1号, 神奈川県, 1992, p. 29-33.