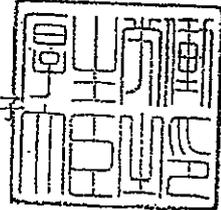




厚生労働省発食安1101第2号
平成23年11月1日

薬事・食品衛生審議会
会長 望月 正隆 殿

厚生労働大臣 小宮山 洋子



諮 問 書

食品衛生法（昭和22年法律第233号）第11条第1項の規定に基づき、下記の事項について、貴会の意見を求めます。

記

サッカリンナトリウムの添加物としての使用基準の改正について

平成23年11月21日

薬事・食品衛生審議会
食品衛生分科会
分科会長 岸 玲子 殿

薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会
添加物部会長 若林 敬二

食品添加物の指定等に関する薬事・食品衛生審議会
食品衛生分科会添加物部会報告について

平成23年11月1日付け厚生労働省発食安1101第2号をもって厚生労働大臣から諮問された、下記の事項について、当部会において審議を行った結果を別添のとおり取りまとめたので、これを報告する。

記

サッカリンナトリウムの添加物としての使用基準の改正について

サッカリンナトリウムの使用基準の改正に関する部会報告書

サッカリンナトリウムは、昭和23年に指定されている。

今回、サッカリンカルシウムの食品健康影響評価においてサッカリン類(サッカリン、サッカリンカルシウム及びサッカリンナトリウム)についてはグループADIとして評価され、サッカリンカルシウムの新規指定において使用基準を設定することから、併せて、サッカリンナトリウムの使用基準を改正するものである。

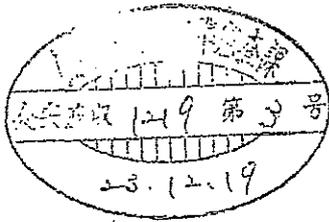
使用基準(改正後)

サッカリンナトリウムは、アイスクリーム類(原料たる液状ミックス及びミックスパウダーを含む。)、あん類、海藻加工品、菓子(原料たる液状ミックス及びミックスパウダーを含む。)、魚介加工品、ジャム、しょう油、シロップ、酢、清涼飲料水、ソース、つくだ煮、漬物、煮豆、乳飲料、乳酸菌飲料、はっ酵乳、氷菓(原料たる液状ミックス及びミックスパウダーを含む。)、フラワーペースト類(小麦粉、でん粉、ナッツ類若しくはその加工品、ココア、チョコレート、コーヒー、果肉又は果汁を主要原料とし、これに砂糖、油脂、粉乳、卵、小麦粉等を加え、加熱殺菌してペースト状とし、パン又は菓子に充てん又は塗布して食用に供するものをいう。)、粉末清涼飲料及びみそ、これらの食品以外の缶詰又は瓶詰食品並びに特別用途表示の許可又は承認を受けた食品以外の食品に使用してはならない。

サッカリンナトリウムは、サッカリンナトリウムとして、こうじ漬、酢漬及びたくあん漬の漬物にあつてはその1kgにつき2.0g以上、粉末清涼飲料にあつてはその1kgにつき1.5g以上、かす漬、みそ漬及びしょう油漬の漬物並びに魚介加工品(魚肉ねり製品、つくだ煮、漬物及び缶詰又は瓶詰食品を除く。)にあつてはその1kgにつき1.2g以上、海藻加工品、しょう油、つくだ煮及び煮豆にあつてはその1kgにつき0.50g以上、魚肉ねり製品、シロップ、酢、清涼飲料水、ソース、乳飲料、乳酸菌飲料及び氷菓にあつては1kgにつき0.30g(5倍以上に希釈して飲用に供する清涼飲料水及び乳酸菌飲料の原料に供する乳酸菌飲料又ははっ酵乳にあつては1.5g、3倍以上に希釈して使用する酢にあつては0.90g)以上、アイスクリーム類、あん類、ジャム、漬物(かす漬、こうじ漬、しょう油漬、酢漬、たくあん漬又はみそ漬を除く。)、はっ酵乳(乳酸菌飲料の原料に供するはっ酵乳を除く。)、フラワーペースト類及びみそにあつてはその1kgにつき0.20g以上、菓子にあつてはその1kgにつき0.10g以上、これらの食品以外の食品及び魚介加工品の缶詰又は瓶詰にあつてはその1kgにつき

0.20g 以上残存しないように使用しなければならない。また、サッカリンカルシウムと併用する場合には、それぞれの残存量の和がサッカリンナトリウムとしての基準値以上であってはならない。ただし、特別用途表示の許可又は承認を受けた場合は、この限りでない。

下線部改正箇所



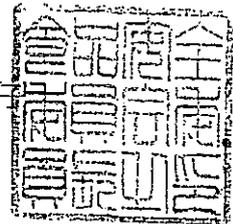
府食第980号
平成23年12月15日

厚生労働大臣

小宮山 洋子 殿

食品安全委員会

委員長 小泉 直



食品健康影響評価の結果の通知について

平成23年11月24日付け厚生労働省発食安1124第1号をもって貴省から当委員会に意見を求められたサッカリンナトリウムに係る食品健康影響評価の結果は下記のとおりですので、食品安全基本法（平成15年法律第48号）第23条第2項の規定に基づき通知します。

なお、食品健康影響評価の詳細は別添のとおりです。

記

サッカリンカルシウム、サッカリンナトリウム及びサッカリンのグループの一日摂取許容量をサッカリンとして3.8 mg/kg 体重/日と設定する。

添加物評価書

サッカリンカルシウム及び サッカリンナトリウム

(第2版)

2011年12月

食品安全委員会

目次

	頁
○審議の経緯.....	4
○食品安全委員会委員名簿.....	4
○食品安全委員会添加物専門調査会専門委員名簿.....	6
○要約.....	7
I. 評価対象品目の概要.....	9
1. 用途.....	9
2. 主成分の名称.....	9
(1) 添加物「サッカリンカルシウム」の主成分.....	9
(2) 添加物「サッカリンナトリウム」の主成分.....	9
① サッカリンナトリウム2水和物.....	9
② サッカリンナトリウム無水物.....	9
3. 化学式又は分子式及び構造式.....	9
(1) サッカリンカルシウム3½水和物の化学式及び構造式.....	9
(2) サッカリンナトリウム2水和物又は無水物の分子式及び構造式.....	9
4. 式量又は分子量.....	9
(1) サッカリンカルシウム3½水和物の式量.....	9
(2) サッカリンナトリウム2水和物及び無水物の分子量.....	9
5. 性状等.....	9
6. 評価要請の経緯.....	11
7. 添加物「サッカリンカルシウム」の指定及び規格基準の設定並びに添加物「サ ッカリンナトリウム」の使用基準の改正の概要.....	12
II. 安全性に係る知見の概要.....	13
1. 体内動態.....	13
(1) サッカリン類.....	13
① 吸収.....	13
② 分布.....	15
③ 生体内変換.....	17
④ 排泄.....	19
(2) 不純物.....	20
① OTSA.....	20
② PTSA.....	21
③ MA.....	21
2. その他の生化学的知見.....	21
(1) サッカリンナトリウム.....	21

(2) サッカリン.....	21
3. 毒性.....	22
(1) 遺伝毒性.....	22
① サッカリン類.....	22
② 不純物.....	32
③ 遺伝毒性のまとめ.....	44
(2) 急性毒性.....	45
① サッカリンナトリウム.....	45
② 不純物.....	45
(3) 反復投与毒性及び発がん性.....	45
① サッカリン類.....	45
② 不純物.....	81
③ 有機酸ナトリウム塩による雄ラット膀胱腫瘍(参考).....	91
④ トリプトファン蓄積～インドール類過剰排泄.....	93
⑤ 反復投与毒性及び発がん性のまとめ.....	94
(4) 生殖発生毒性.....	95
① サッカリン類.....	95
② 不純物.....	101
(5) アレルゲン性.....	106
① サッカリン.....	106
② 不純物.....	107
(6) ヒトにおける知見.....	107
① 膀胱癌に係る疫学的知見.....	107
② その他の疫学的知見.....	117
③ その他のヒトにおける知見.....	118
④ ヒトにおける知見のまとめ.....	119
III. 一日摂取量の推計等.....	120
1. 米国における摂取量.....	120
2. 欧州における摂取量.....	120
3. 我が国における摂取量.....	121
IV. 国際機関等における評価.....	121
1. JECFA における評価.....	121
(1) サッカリン類.....	121
(2) 不純物 MA.....	124
2. IARC における評価.....	125
3. 米国における評価.....	125

4. 欧州における評価.....	126
(1) サッカリン類.....	126
(2) 不純物 BIT.....	128
5. 我が国における評価.....	128
V. 食品健康影響評価.....	129
別紙1：略称.....	132
別紙2：各種毒性試験成績.....	134
参照.....	175

<審議の経緯>

第1版（添加物「サッカリンカルシウム」の指定及び規格基準の設定に係る食品健康影響評価）

2006年 5月22日	厚生労働大臣から添加物の指定及び規格基準の設定に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発食安第0522005号）、関係書類の接受
2006年 5月25日	第144回食品安全委員会（要請事項説明）
2007年 8月27日	第47回添加物専門調査会
2007年 9月28日	第48回添加物専門調査会
2007年10月26日	第49回添加物専門調査会
2007年10月31日	補足資料の提出依頼
2011年 4月20日	補足資料の接受
2011年 4月26日	第94回添加物専門調査会
2011年 5月31日	第95回添加物専門調査会
2011年 6月28日	第96回添加物専門調査会
2011年 7月14日	第390回食品安全委員会（報告）
2011年 7月14日から	2011年8月12日まで 国民からの御意見・情報の募集
2011年 8月23日	添加物専門調査会座長より食品安全委員会委員長へ報告
2011年 8月25日	第396回食品安全委員会（報告） （同日付け厚生労働大臣に通知）

第2版関係（添加物「サッカリンナトリウム」の使用基準の改正に係る食品健康影響評価に伴う改訂）

2011年11月29日	厚生労働大臣から添加物の使用基準の改正に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発食安1124第1号）、関係書類の接受
2011年12月 1日	第409回食品安全委員会（要請事項説明）
2011年12月15日	第412回食品安全委員会（審議） （同日付け厚生労働大臣に通知）

<食品安全委員会委員名簿>

(2006年6月30日まで)

寺田 雅昭 (委員長)
寺尾 允男 (委員長代理)
小泉 直子
坂本 元子
中村 靖彦
本間 清一
見上 彪

(2006年12月20日まで)

寺田 雅昭 (委員長)
見上 彪 (委員長代理)
小泉 直子
長尾 拓
野村 一正
畑江 敬子
本間 清一

(2009年6月30日まで)

見上 彪 (委員長)
小泉 直子 (委員長代理)
長尾 拓
野村 一正
畑江 敬子
廣瀬 雅雄
本間 清一

(2011年1月6日まで)

小泉 直子 (委員長)
見上 彪 (委員長代理)
長尾 拓
野村 一正
畑江 敬子
廣瀬 雅雄
村田 容常

(2011年1月7日から)

小泉 直子 (委員長)
熊谷 進 (委員長代理*)
長尾 拓
野村 一正
畑江 敬子
廣瀬 雅雄
村田 容常

* 2011年1月13日から

<食品安全委員会添加物専門調査会専門委員名簿>

(2007年9月30日まで)

福島 昭治 (座長)
山添 康 (座長代理)
石塚 真由美
井上 和秀
今井田 克己
江馬 眞
大野 泰雄
久保田 紀久枝
中島 恵美
西川 秋佳
林 眞
三森 国敏
吉池 信男

(2009年9月30日まで)

福島 昭治 (座長)
山添 康 (座長代理)
石塚 真由美
井上 和秀
今井田 克己
梅村 隆志
江馬 眞
久保田 紀久枝
頭金 正博
中江 大
中島 恵美
林 眞
三森 国敏
吉池 信男

(2010年12月20日まで)

今井田 克己 (座長)
山添 康 (座長代理)
石塚 真由美
伊藤 清美
井上 和秀
梅村 隆志
江馬 眞
久保田 紀久枝
塚本 徹哉
頭金 正博
中江 大
林 眞
三森 国敏
森田 明美
山田 雅巳

(2011年9月30日まで)

今井田 克己 (座長)
梅村 隆志 (座長代理)
石塚 真由美
伊藤 清美
井上 和秀
江馬 眞
久保田 紀久枝
塚本 徹哉
頭金 正博
中江 大
林 眞
三森 国敏
森田 明美
山添 康
山田 雅巳

<参考人>

福島 昭治

要 約

甘味料として使用される添加物「サッカリンカルシウム」(CAS登録番号:6381-91-5 (サッカリンカルシウム 3½水和物として)) 及び添加物「サッカリンナトリウム」(CAS登録番号:6155-57-3 (サッカリンナトリウム 2水和物として) 又は 128-44-9 (サッカリンナトリウム無水物として)) について、各種試験成績等を用いて食品健康影響評価を実施した。

評価に供した試験成績は、サッカリンカルシウム、サッカリンナトリウム等を被験物質とした遺伝毒性、反復投与毒性、発がん性、生殖発生毒性等に関するものである。

サッカリンカルシウムを被験物質とした十分な試験成績を入手することはできなかった。しかしながら、弱酸と強塩基との塩であるサッカリンカルシウムは添加物としての使用時においてはその他のサッカリンの塩類と同様に強酸である胃液と反応して容易にサッカリンを生成すると推定されることから、本委員会としては、本評価対象品目の安全性評価において、サッカリン及びその塩類(以下「サッカリン類」という。)を被験物質とした試験成績全般を用いて総合的に検討を行うことは可能であると判断した。

サッカリン類の一部は胃で、残りは腸管で吸収される。経口投与したサッカリン類は血漿中で速やかに最高濃度に達した後、血漿中からゆっくりと消失する。経口投与したサッカリン類は組織・器官に分布し、多くは未変化体のまま主に腎尿細管分泌により尿中に排泄される。ヒトにおいてはサッカリン類に蓄積性は認められていない。サッカリン類の不純物も主に尿中に排泄される。その他の生化学的知見については、サッカリン類の添加物としての使用において、安全性に懸念を生じさせるようなものはなかった。

本委員会としては、サッカリン類に生体にとって特段問題となる遺伝毒性はなく、それらに含まれるとされる不純物に生体にとって特段問題となるような遺伝毒性の証拠は得られていないものと判断した。

本委員会としては、少なくとも胎児又は若齢児動物の段階からのサッカリンナトリウムの投与によって雄ラット膀胱に発がん性が認められると判断した。

また、サッカリンナトリウムは、イニシエーション処置をした雄ラット膀胱粘膜に対して、発がんプロモーション作用を有することが報告されているが、雌ラットに対しては認められていない。一方、サッカリンカルシウム及びサッカリンの投与においてはそのような作用は観察されていない。

発がん又は発がんプロモーション作用機序に関与していると考えられる膀胱上皮の細胞増殖活性の上昇は、サッカリンナトリウムの投与により誘発されるものの、尿中にサッカリンイオンが存在するのみでは誘発されず、混合する基礎飼料の性状に影響され、サッカリンナトリウム以外のナトリウム塩の投与によっても誘発される変化であった。サッカリンナトリウムの雄ラット膀胱発がんの作用機序においては、尿中ナトリウム濃度、尿pH、雄ラット特有の尿中たん白、結晶尿等の関与が示唆される。しかし、ラット以外の動物種については明らかな発がん性を示す結果は得られておら

ず、雄ラットについても系統による感受性の差があり、その膀胱発がんは尿中のサッカリンイオンそのものの影響ではないことが示されていることから、サッカリンナトリウムの雄ラット膀胱発がん結果はヒトに外挿できないものと考えた。

一方、その他の毒性として、胎児の段階から長期間投与されたラットを用いた二世代にわたる試験において、サッカリンナトリウム 3.0%投与群の雌雄で摂餌量の低下を伴わない体重増加抑制及び生存胎児数の減少が認められており、本委員会としては、これらの変化を投与に起因する毒性と考え、その下の用量である 1.0% (500 mg/kg 体重/日；サッカリンとして 380 mg/kg 体重/日) をサッカリン類の反復投与毒性に係る NOAEL と評価した。

また、PTSA 以外のサッカリン類の不純物については、膀胱への影響は報告されていない。PTSA についての試験成績では、最低用量の 120 mg/kg 体重/日投与群から雌雄ラットの膀胱粘膜で炎症性傷害像が認められたことから、本委員会としては、その NOAEL は 120 mg/kg 体重/日を下回る用量であると評価した。しかしながら、M 法で製造されたサッカリンナトリウムについての試験及びそれよりも PTSA が多く含まれると考えられる RF 法で製造されたサッカリンナトリウムについての試験のいずれにおいても雌ラットに特段の変化が認められていないことから、本委員会としては、120 mg/kg 体重/日を投与した際に雌雄ラットで認められる毒性変化は、サッカリン類投与試験における混入物として評価した場合には認められないものと判断した。本委員会としては、PTSA 以外のサッカリン類の不純物の NOAEL については、いずれも長期試験に係るものではないが、OTSA が雌雄ともに 20 mg/kg 体重/日、OSBA 及び CBSA-NH₄ が雌雄ともに 1,000 mg/kg 体重/日超、BIT が雌雄ともに 8.42 mg/kg 体重/日、MA が雌雄ともに 150~300 mg/kg 体重/日と評価した。

本委員会としては、サッカリン類の生殖発生毒性に係る NOAEL を 500 mg/kg 体重/日 (サッカリンとして 380 mg/kg 体重/日) と評価した。また、サッカリン類の不純物の生殖発生毒性に係る NOAEL については、OTSA が 25 mg/kg 体重/日、PTSA が 300 mg/kg 体重/日であると評価した。

本委員会としては、入手した疫学的知見その他のヒトに係る知見からは、サッカリン類について、一般人口集団に安全性上の懸念をもたらすような証拠は得られていないと判断した。

本委員会としては、我が国において使用が認められた場合のサッカリン類の推定摂取量を勘案すると、添加物「サッカリンカルシウム」、「サッカリンナトリウム」及び「サッカリン」のグループとして ADI を特定することが必要と判断した。本委員会としては、ラットを用いた二世代にわたる試験の NOAEL 500 mg/kg 体重/日 (「サッカリンナトリウム」として) を根拠とし、安全係数 100 で除した 3.8 mg/kg 体重/日 (サッカリンとして) を、添加物「サッカリンカルシウム」、「サッカリンナトリウム」及び「サッカリン」のグループ ADI とした。また、本委員会として、サッカリン類に含まれるとされる不純物についても評価を行い、それらがサッカリン類の不純物として摂取される限りにおいては、安全性に懸念がないことも確認した。

I. 評価対象品目の概要

1. 用途

甘味料 (参照1、2)

2. 主成分の名称

(1) 添加物「サッカリンカルシウム」の主成分

サッカリンカルシウム 3½水和物

CAS 登録番号：6381-91-5 (サッカリンカルシウム 3½水和物として)

(参照2、3)

(2) 添加物「サッカリンナトリウム」の主成分

① サッカリンナトリウム 2水和物

CAS 登録番号：6155-57-3 (サッカリンナトリウム 2水和物として)

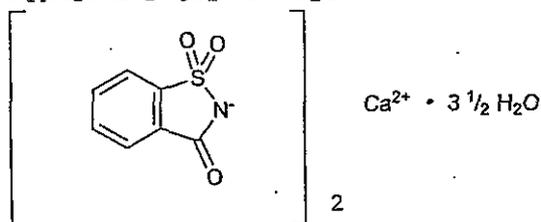
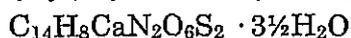
② サッカリンナトリウム無水物

CAS 登録番号：128-44-9 (サッカリンナトリウム無水物として)

(参照4)

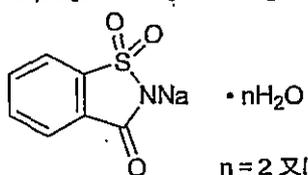
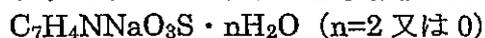
3. 化学式又は分子式及び構造式

(1) サッカリンカルシウム 3½水和物の化学式及び構造式



(参照2、3)

(2) サッカリンナトリウム 2水和物又は無水物の分子式及び構造式



$n=2 \text{ 又は } 0$ (参照4)

4. 式量又は分子量

(1) サッカリンカルシウム 3½水和物の式量

467.48 (参照2)

(2) サッカリンナトリウム 2水和物及び無水物の分子量

241.20 及び 205.17 (参照4)

5. 性状等

評価要請者による添加物「サッカリンカルシウム」の成分規格案では、含量と

して「本品を乾燥したものは、99.0%以上を含む。」、性状として「白色の粉末又は結晶性粉末である。」とされている(参照2)。添加物「サッカリンナトリウム」の成分規格では、含量として「本品を乾燥したものは、サッカリンナトリウム($C_7H_4NNaO_3S$) 99.0~101.0%を含む。」、性状として「無~白色の結晶又は白色の粉末で、味は極めて甘い。」とされている(参照4)。

サッカリンカルシウム、サッカリンナトリウム及びサッカリンの水への溶解度(20℃)は、それぞれ370 g/L、1,000 g/L及び2 g/Lとされている(参照5)。いずれもショ糖水溶液の約300~500倍の甘味を有するといわれている(参照6、7、8、9)。

IARC73⁽¹⁾及びFAS17によれば、サッカリン及びその塩類(以下「サッカリン類」という。)の製造法としては、(i)トルエン及びクロロスルホン酸を出発物質として、OTSA、OSBA塩を経るRF法及び(ii)無水フタル酸(又はフタル酸)及びアンモニア又はMAを出発物質として、2-カルボメトキシベンゼンジアゾニウム塩、2-カルボメトキシベンゼンスルホニルクロリドを経るM法が最も広く用いられているとされている(参照5、10)。RF法又はM法で製造されたサッカリン類の主な不純物としては、OTSA、PTSA、OSBA、PSBA、CBSA及びCBSA-NH₄、BIT、NMS、MA、AS類(表1)等が報告されている(参照11)。評価要請者による添加物「サッカリンカルシウム」の成分規格案では、純度試験の一項目として添加物「サッカリンナトリウム」の成分規格と同様に「オルトルエンスルホンアミドとして25 µg/g以下」との規定がある(参照2、4)。

評価要請者によれば、サッカリンカルシウム及びサッカリンナトリウムは、中性~アルカリ性溶液では安定であるが、酸性溶液では長時間加熱されると分解してOSBAを生じ、甘味を失うとされている。(参照2)

評価要請者は、サッカリンカルシウムについて、反応性が低いことから炭水化物、たん白質、油脂、ビタミン類、ミネラル類といった食品中の成分への影響はないとしている。(参照2)

¹本文中で用いられた略称については、別紙1に名称等を示す。

表1 サッカリン類の不純物(参照11)

No.	不純物 (CAS登録番号)	製造法別検出例		備考
		RF法	M法	
1	OTSA (88-19-7)	有		RF法で製造されたサッカリン類に最大6,000ppm含有との報告があるとされている。(参照12) 我が国では添加物「サッカリンナトリウム」及び「サッカリン」の成分規格で25ppm以下と規定。(参照13) JECFA、米国規格では25ppm以下(トルエンスルホンアミド類として)と規定。(参照3、14) EU規格では乾燥重量ベースで10ppm以下と規定。(参照6、7)
2	PTSA (70-55-3)	有		RF法で製造されたサッカリン類にOTSAの2~3%相当量含有との報告があるとされている。(参照2) 米国規格では25ppm以下(トルエンスルホンアミド類として)と規定。(参照14) EU規格では乾燥重量ベースで10ppm以下と規定。(参照6、7)
3	OSBA (632-24-6)	有	有	Riggin & Kinzer (1983) の報告によれば、RF法で製造されたサッカリン類に最大181ppm、M法で製造されたサッカリン類に最大41ppm含有との報告があるとされている。(参照15、16) 製品を加熱した際の分解生成物でもあるとされている。(参照2)
4	PSBA (138-41-0)	有	有	Riggin & Kinzer (1983) の報告によれば、RF法で製造されたサッカリン類に最大1,057ppm、M法で製造されたサッカリン類に痕跡量検出との報告があるとされている。(参照16) EU規格では乾燥重量ベースで25ppm以下と規定。(参照6、7)
5	CBSA (σ体632-25-7) CBSA-NH ₄ (σ体6939-89-5)	有	有	Riggin & Kinzer (1983) の報告によれば、RF法で製造されたサッカリン類、M法で製造されたサッカリン類ともに痕跡量検出との報告があるとされている。(参照16)
6	BIT (2634-33-5)		有	Rigginら(1983)の報告における引用によれば、サッカリン類に1~2ppm含有との報告があるとされている。(参照17) EFSA(2006)による引用によれば、市販サッカリンに最大800ppm含有との報告があるとされている。(参照18)
7	NMS (15448-99-4)		有	FAS19においても引用されているRigginら(1983)の報告によれば、サッカリン類に0.15ppm含有していたとされている。(参照17、19)
8	MA (134-20-3)		有	FAS19においても引用されているRigginら(1983)の報告によれば、サッカリン類に0.05ppm含有していたとされている。(参照17、19)
9	AS類 5-AS (22094-61-7) 6-AS (22094-62-8) 7-AS (89975-86-0)		有	Radfordら(1985)の報告によれば、サッカリンナトリウム中に5-ASが59~92ppm、6-ASが40~60ppm含まれていたとされている。7-ASの存在は確認されたが、量が検出下限値に近いため定量できなかったとされている。(参照20)

6. 評価要請の経緯

評価要請者によれば、サッカリン類(カルシウム塩、ナトリウム塩等)は様々な食品の甘味料等として広く欧米諸国等で使用されている添加物であるとされている。(参照2)

米国では、添加物「サッカリンカルシウム」及び「サッカリンナトリウム」は、添加物「サッカリン」及び「サッカリンアンモニウム」とともに、(i)清涼飲料等(液体1オンス当たりサッカリンとして12mg以下)、調理・卓上用砂糖代替品(砂糖相当量スプーン1杯当たりサッカリンとして20mg以下)及び加工食品(一食分当たりサッカリンとして30mg以下)への甘味料としての添加又は(ii)ビタミン・ミネラルのチュアブル錠のかさ減少及び風味増強、(iii)チューインガムの風味及び物理学的特性の保持若しくは(iv)フレーバー・チップスの風味増強といった目的での使用が認められている。(参照2、21)

EUでは、添加物「サッカリン並びにそのナトリウム、カリウム及びカルシウム塩」(E954)は、清涼飲料(80~100 mg/L以下)、デザート類(100 mg/kg以下)、菓子類等(80~1,200 mg/L又はkg以下)、ビタミン・ミネラルサプリメント(80~3,000 mg/L又はkg以下)といった食品への甘味料としての添加が認められている。(参照2、22)

我が国では、添加物「サッカリンカルシウム」は未指定である。添加物「サッカリンナトリウム」については、1901年に初めてその使用(治療上の目的に供する飲食物の調味)が許可され、1948年には現行食品衛生法における指定がなされている。類似の添加物としては、1961年に添加物「サッカリン」が指定(チューインガム以外の食品に使用してはならない。)されている。(参照2)

厚生労働省は、2002年7月の薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会での了承事項に従い、①JECFAで国際的に安全性評価が終了し、一定の範囲内で安全性が確認されており、かつ、②米国及びEU諸国等で使用が広く認められていて国際的に必要性が高いと考えられる食品添加物については、企業等からの指定要請を待つことなく、主体的に指定に向けた検討を開始する方針を示している。

この方針に従い厚生労働省において添加物「サッカリンカルシウム」についての評価資料が取りまとめられ、当該添加物の指定及び規格基準の設定について、食品安全基本法(平成15年法律第48号)第24条第1項第1号の規定に基づき、食品安全委員会に対して、食品健康影響評価の依頼がなされ、2011年8月、当該食品健康影響評価の結果が食品安全委員会委員長から厚生労働大臣あて通知されている。

その後、厚生労働省において当該食品健康影響評価の結果に基づく管理措置について検討が行われたところ、添加物「サッカリンナトリウム」の使用基準の改正が必要となったことから、今般、食品安全基本法第24条第1項第1号の規定に基づき、食品安全委員会に対して、食品健康影響評価の依頼がなされたものである。

7. 添加物「サッカリンカルシウム」の指定及び規格基準の設定並びに添加物「サッカリンナトリウム」の使用基準の改正の概要

厚生労働省は、食品安全委員会の添加物「サッカリンカルシウム」の指定及び規格基準の設定に係る食品健康影響評価結果の通知を受けた後に、添加物「サッカリンカルシウム」について、添加物「サッカリンナトリウム」と同様に、「こうじ漬、酢漬及びたくあん漬の漬物」、「粉末清涼飲料」、「かす漬、みそ漬及びしょう油漬の漬物並びに魚介加工品(魚肉ねり製品、つくだ煮、漬物及び缶詰又は瓶詰食品を除く。）」、「海藻加工品、しょう油、つくだ煮及び煮豆」、「魚肉ねり製品、シロップ、酢、清涼飲料水、ソース、乳飲料、乳酸菌飲料及び氷菓」、「アイスクリーム類、あん類、ジャム、漬物(かす漬、こうじ漬、しょう油漬、酢漬、たくあん漬又はみそ漬を除く。）」、「はっ酵乳(乳酸菌飲料の原料に供するはっ酵乳を除く。）」、「フラワーペースト類及びみそ」、「菓子」、「魚介加工品の缶詰又は瓶詰」等への使用に関する基準を定め、JECFA等を参考に成分規格を定めた上で新たに添加物として指定しようとするものであるとしている。(参照1、2)

また、厚生労働省は、食品安全委員会の添加物「サッカリンナトリウム」の使用基準の改正に係る食品健康影響評価結果の通知を受けた後に、添加物「サ

「サッカリンナトリウム」の使用基準に「また、サッカリンカルシウムと併用する場合には、それぞれの残存量の和がサッカリンナトリウムとしての基準値以上であってはならない。」を加える改正を行おうとするものであるとしている。(参照4)

II. 安全性に係る知見の概要

1. 体内動態

(1) サッカリン類

サッカリン類を被験物質とした体内動態に関する試験成績として以下のよう
な報告がある。なお、サッカリンカルシウムを被験物質とした体内動態に
関する十分な試験成績を入手することはできなかった。しかしながら、弱酸と強
塩基との塩であるサッカリンカルシウムは添加物としての使用時においては
サッカリンナトリウム及びその他のサッカリン類と同様に強酸である胃液と
反応して容易にサッカリンを生成すると推定されることから、本評価対象品目
の使用における体内動態については、サッカリン類に係る体内動態に関する試
験成績を用いて検討を行うこととした。

① 吸収

a. 消化管内 pH と吸収部位

FAS17 及び FAS32 によれば、サッカリンは、その pKa が 2.2 であるこ
とから、強酸性条件下ではほとんど解離しない（生体内に吸収されやすい
化学形）が、生体内の生理学的な pH 条件下においてはほぼ完全に解離す
るとされている。サッカリンの一部は胃で吸収される。胃内 pH の低い動
物種（モルモット (1.4)、ウサギ (1.9)）では胃内 pH が高い動物種（ラ
ット (4.2)）よりも胃でよく吸収される。また、サッカリンは、胃よりも
高い pH 条件下にある腸管ではゆるやかに吸収される（参照 10、23）。
なお、ヒト胃液の pH は約 1.0~2.5 であるとされている（参照 24）。

b. 血中濃度からの考察

FAS32 における引用によれば、Sweatman & Renwick (1980) 及び
Sweatman (1981) は、ヒト及びラットにおいて、静脈内投与したサッカ
リンは血漿中から速やかに消失したが、単回経口投与したサッカリンは血
漿中で速やかに最高濃度に達するものの血漿中からゆっくりと消失した
とし、この経口投与後の血漿からの消失の延長は、腸管での緩やかな吸収
によるものであるとしている。（参照 23）

IARC73 における引用によれば、Colburn ら (1981) は、ヒト女性 6
例にサッカリン（化学形不詳）を平均 100~300 mg/人/日反復経口摂取さ
せたところ、血漿中サッカリン濃度は摂取 0.5~1 時間後に最高に達し、
血漿中からの消失半減期は 7.5 時間であったとしている。また、Pantarotto
ら (1981) は、ヒト男性（各群 5 例）にサッカリンナトリウム (0.8、2.5、
5.5 mg/kg 体重) を単回経口摂取させたところ、血漿中サッカリンナトリ
ウム濃度は摂取 30~60 分後に最高に達したとしている。（参照 5）

c. 糞便中排泄量からの考察

FAS32 では、サッカリン類を静脈内投与したときの糞便中への排泄量は極微量であることから、サッカリン類を経口投与したときの糞便中排泄量は、サッカリン類の未吸収量の指標として用いられている。FAS32 では、Sweatman ら (1981) はヒトにサッカリン (2,000 mg/人) を単回経口摂取させたときの糞便中排泄量が投与量の 1~8%であったとしている一方、Renwick (1985) はラットにサッカリンを経口投与したときの糞便中排泄量が投与量の 3~39%であったとしていることから、ラットの胃腸でのサッカリン吸収の程度は変動しやすいとされている。(参照 2 3)

d. 尿中排泄量からの考察

FAS32 では、サッカリン類は生体内に吸収されると生体内変化をほとんど受けないうまま主として尿中に排泄されることから、サッカリン類を経口投与したときの尿中排泄量は、サッカリン類の生体内吸収量の指標として用いられている。(参照 2 3)

IARC73 における引用によれば、Sweatman & Renwick (1979) は、Arnold ら (1980) のラットを用いた二世代にわたる試験と同様の試験条件下において、雄ラットにサッカリン (5% ; 約 2,500 mg/kg 体重/日相当) を胎児の段階から混餌投与し、その体重が 290 g に達した時点で^[3H]サッカリンナトリウム (5%) を 24 時間混餌投与する試験を実施している。その結果、投与後 48 時間以内にほとんどの放射能は未変化体 (サッカリン) として排泄 (13~14%が糞便中、残りが尿中) されている。(参照 5)

IARC73 及び FAS32 における引用によれば、Sweatman ら (1981) は、ヒトにサッカリンナトリウム 2 g を単回経口摂取させたときのサッカリンの消化管吸収率を尿中排泄量及び血漿中濃度-時間曲線下面積に基づき 85%と算出している。また、Roberts & Renwick (1985) は、ヒトにサッカリンナトリウム (1 g/人/日) を 4 週間反復経口摂取させたところ、投与量の約 80%が尿中から回収されたとしている (参照 2 3)。IARC73 における引用によれば、Ball ら (1977) は、ヒト女性 1 例及び男性 2 例に^[3-14C]サッカリンを単回経口摂取させたところ、非標識サッカリン (1 g/人/日) の 21 日間反復経口摂取をその前又は後に行わせた場合のいずれにおいても、^[3-14C]サッカリン摂取後 24 時間尿中に、摂取した放射能の 85~92%がサッカリン (未変化体) として排泄されたとしている (参照 5)。

e. 食餌

FAS32 における引用によれば、Anderson ら (1987) 及び Fisher ら (1989) は、雄 F344 ラットにサッカリンカルシウム又はサッカリンナト

リウム (5, 7.5% ; 2,500, 3,750 mg/kg 体重/日⁽²⁾) を Prolab 3200 を用いて混餌投与したところ、尿中及び糞便中にそれぞれほぼ同量のサッカリンが排泄されたとしている。一方、同用量のサッカリンナトリウムを AIN-76A (配合飼料) を用いて混餌投与したところ、サッカリンの尿中排泄量は糞便中排泄量の 10~20 倍となり、吸収がよくなったとしている (参照 2 3)。これにより、サッカリンの消化管での吸収は食餌により影響を受けるものと考えられる。

② 分布

FAS32 によれば、雄ラット成獣に、サッカリン (1~10% ; 500~5,000 mg/kg 体重/日⁽²⁾) を混餌投与して定常状態に至ったときのサッカリンの組織・器官分布は、単回投与後の組織・器官分布と一貫性が見られたことから、サッカリンに組織・器官での蓄積性の証拠はないとされている。(参照 2 3)

a. 器官内及び組織内濃度

FAS32 によれば、ラット成獣にサッカリンを単回経口投与すると、サッカリンはほとんどの組織・器官に分布するが、特に排泄器官 (腎臓及び膀胱)、次いで血漿中に高濃度の分布が認められるとされている。(参照 2 3)

IARC73、FAS17 及び FAS32 においても引用されている Lethco & Wallace (1975) の報告によれば、体重約 400 g の Osborne-Mendel ラット (各タイムインターバル雄 1 匹) に [3-¹⁴C] サッカリン (50 mg/kg 体重) を単回強制経口投与 (胃内挿管) し、投与 1、2、4、8、24、48 又は 72 時間後にと殺する試験が実施されている。その結果、投与 1 時間後には各組織・器官のほとんどすべてにおいて放射能が検出され、中でも肝臓、腎臓及び膀胱に比較的高い分布が見られたとされている。肝臓及び腎臓においては投与 8 時間後に投与量の 1.3% 及び 2.0%、膀胱においては投与 4 時間後に投与量の 0.3% の放射能が認められたとされている。また、投与群の膀胱を生理食塩水 5.0 mL で 8 回繰り返し洗浄しても、放射能の膀胱組織への保持が見られたとされている。(参照 5、10、23、25)

IARC73 及び FAS19 においても引用されている Sweatman & Renwick (1982) の報告によれば、雌雄ラット成獣にサッカリンナトリウム (0、5% ; 0、2,500 mg/kg 体重/日⁽²⁾) を 4 週間混餌投与した後に交配して児動物を得て、母動物にはさらに哺育期後期まで投与を継続し、児動物には離乳後に親動物と同様の投与を行う試験が実施されている。その結果、妊娠 17、19 及び 20 日の胎児の膀胱壁中のサッカリン濃度は、肝臓及び腎臓中

² JECFA で用いられている換算値 (IPCS: EHC70) を用いて摂取量を推定。

動物種	最終体重 (kg)	摂餌量 (g/動物/日)	摂餌量 (g/kg 体重/日)
マウス	0.02	3	150
ラット (若)	0.10	10	100
ラット (老)	0.40	20	50
イヌ	10.0	250	25

の濃度よりも高く、また、母動物の膀胱壁中の濃度よりも約2倍高かったとされている。胎児の膀胱壁中サッカリン濃度については、妊娠期間による差は認められなかったが、雌よりも雄での高値傾向が認められたとされている。児動物の肝臓、腎臓及び尿中のサッカリン濃度については、離乳前よりも離乳後に増加が見られたとされている。児動物の膀胱壁中の濃度については、離乳前後での差は認められなかったほか、雌よりも雄での高値傾向が認められたが、個体間のバラツキが大きかったことから、この雄での高値傾向は、膀胱腫瘍発生増加の性差を説明するには不十分な知見であるとされた。また、妊娠17～20日の胎児の膀胱壁中のサッカリン濃度は、新生児のそれよりも低かったとされている。以上より、妊娠期や授乳期に母動物を通してサッカリンナトリウムに暴露された雄ラットにおいて、膀胱腫瘍発生増加の性差及び世代間の差を説明しうるような膀胱壁中のサッカリンナトリウムの過剰蓄積の証拠は得られなかったと結論されている。(参照19、26)

b. 胎盤、胎児、乳汁への移行性

(a) ヒト

FAS32においても引用されているCohen-Addadら(1986)の報告によれば、妊娠最終月にサッカリン(25～100 mg/人/日)を摂取していたと推定された妊娠女性6例(うち5例は糖尿病患者)について、出産後2時間以内の母体血血清及び臍帯血血清中のサッカリン濃度を測定する試験が実施されている。その結果、3例の臍帯血血清中サッカリン濃度はごく低濃度(50 ng/mL未満)、他の3例の臍帯血血清中サッカリン濃度は110～160 ng/mLであり、後者のうち2例の臍帯血血清中サッカリン濃度は、母体血血清中濃度よりも高かったとされている。(参照23、27)

(b) ラット等

FAS17及びFAS32における引用によれば、Ballら(1977)は、ラットにおいてサッカリンが胎盤を通過したと報告している。(参照10、23)

IARC73における引用によれば、Pitkinら(1971)は、妊娠後期のアカゲザル5匹に ^{14}C サッカリンを4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/分の速度で60分間かけて点滴静注したところ、放射能は胎盤を速やかに通過して胎児の中樞神経系を除く全組織・器官に分布したとしている。母体内での放射能の消失は胎児体内での消失よりも速やかであり、点滴静注終了2時間後において胎児血中の放射能濃度は母体血中濃度よりも高かったとしている。(参照5)

IARC73における引用によれば、West(1979)は、妊娠SDラットにサッカリン(5%; 2,500 mg/kg 体重/日⁽²⁾)を妊娠14日以降混餌投与し、さらに妊娠19日に ^{35}S サッカリン100 μCi (266 mCi/mmol; 68.7 μg 相当)をサッカリン100 mgとともに単回強制経口投与(胃内挿管)する試験を実施している。その結果、 ^{35}S サッカリン投与5時間後まで

に、母体血中では投与量の 0.03~0.04%相当の^[35S]サッカリンが認められたのに対し、胎児血中では 0.008%相当の^[35S]サッカリンが認められたとしている。また、FAS17 における引用によれば、West (1979) は、ラットの乳汁中からサッカリンを検出したと報告している。(参照 5、10)

IARC73 及び FAS19 においても引用されている Sweatman & Renwick (1982) の報告によれば、妊娠 19 日の SD ラット (雌 19 匹) に^[3H]サッカリンナトリウム二水和物 (50 mg/kg 体重) を単回経口投与し、投与 48 時間後まで母動物及び胎児の肝臓、腎臓及び膀胱壁並びに母動物の血漿及び羊水におけるサッカリン濃度の推移を調べる試験が実施されている。その結果、特に膀胱壁中のサッカリン濃度の減少が母動物に比べ胎児で遅延したが、胎児膀胱中濃度は母体と同じ程度かわずかに上回る程度であったとされている。胎児の各臓器のサッカリン暴露において性差は認められなかったとされている。(参照 5、19、26)

c. 血漿中のたん白との結合、血球への分配

FAS17 においても引用されている Renwick (1985) のレビューによれば、Agren & Bock (1973) は、サッカリンは血漿たん白と可逆的に結合し、その結合率はラットで 3%、24~35%、69~86%、ヒトで 70~80% であるとする報告があるとしている。(参照 23、28)

③ 生体内変換

FAS32 においても引用されている Renwick (1985) のレビューによれば、ヒト及び多くの実験動物での試験成績を総合し、サッカリンは生体内変換を受けないとされている。(参照 23、28)

a. ヒト

FAS17 における引用によれば、Byard ら (1974) は、男性 4 例に^[phe-14C]サッカリン (500 mg/人) を単回経口摂取させたところ、摂取後 48 時間排泄物中から摂取放射能の 98%以上 (尿中 92.3%及び糞中 5.8%) が回収されたとしている。また、摂取後 48~72 時間排泄物中からは摂取放射能の 0.3%が回収されたが、当該放射能はサッカリン代謝物に係るものではなかったことから、ヒトは他の動物種と同様にサッカリンを代謝しないと結論している。(参照 10)

b. ラット

FAS17 においても引用されている Minegishi ら (1972) の報告によれば、体重約 300 g の Wistar ラット (雄 4 匹⁽³⁾) に^[35S]サッカリン (300 mg/kg 体重) を単回強制経口投与 (胃内挿管) する試験が実施されている。その結果、投与後 96 時間尿中の放射能は投与量の 66.9~74.1%であり、当該放射能のすべてが未変化体に係るものであったとされている。

³ うち 2 匹については、非標識サッカリンを投与前 4~6 週間飲水投与したとされている。

(参照 10、29)

IARC73 及び FAS17 における引用によれば、Byard & Golberg (1973) は、フェノバルビタール前処置によって肝臓の薬物代謝酵素の誘導を試みたラットに [phe-¹⁴C] サッカリンナトリウムを単回経口投与したところ、その代謝に影響は見られなかったとしている (参照 5、10)。また、FAS32 における引用によれば、Hasegawa ら (1984) は、雄ラットにサッカリンナトリウム 5% 混餌を 14 日間投与しても、その肝臓でのチトクロム P-450 の誘導は認められなかったとしている。(参照 23)

FAS32 における引用によれば、Lutz & Schlatter (1977) は、放射能標識したサッカリンが *in vivo* でラットの肝臓又は膀胱の DNA と結合しなかったことから、生体内でサッカリンは親電子化合物に変換されないとしている。(参照 23)

c. モルモット

FAS17 においても引用されている Minegishi ら (1972) の報告によれば、体重約 350 g のモルモット (雄 3 匹) に [³⁵S] サッカリン (150 mg/kg 体重) を単回強制経口投与 (胃内挿管) する試験が実施されている。その結果、投与後 96 時間尿中の放射能は投与量の 95.3~99.9% であり、当該放射能のすべてが未変化体に係るものであったとされている。(参照 10、29)

d. サル

IARC73 における引用によれば、Pitkin ら (1971) は、アカゲザルに投与されたサッカリンが尿中に未変化体のまま速やかに排泄されたとしている。(参照 5)

IARC73 における引用によれば、Byard & Golberg (1973) は、フェノバルビタール前処置によって肝臓の薬物代謝酵素の誘導を試みたサルに [¹⁴C] サッカリンナトリウムを単回経口投与したところ、その代謝に影響は見られなかったとしている。(参照 5)

e. OSBA 等への代謝の可能性

FAS17 における引用によれば、Kennedy ら (1972) は、サッカリンを投与したラット尿中から CBSA-NH₄ を検出したと報告している。(参照 10)

IARC73 及び FAS17 においても引用されている Lethco & Wallace (1975) の報告によれば、約 3 か月齢の SD ラット又はサッカリンナトリウム (0.01、0.1、1.0% ; 5、50、500 mg/kg 体重/日) を 1 年間混餌投与した SD ラット (各群雌雄各 4 匹) に [3-¹⁴C] サッカリンナトリウム (5、50、500 mg/kg 体重) を単回経口投与する試験が実施されている。その結果、1 年間混餌投与のないラットでは [3-¹⁴C] サッカリンナトリウム投与後 7 日間の尿中放射能及び糞便中放射能は投与量の約 55~87% 及び約 11~

40%であり、1年間混餌投与のあったラットではそれらが約68~85%及び約10~18%であったとされている。1年間混餌投与のあったラットの[3-¹⁴C]サッカリンナトリウム投与後7日間尿中放射能の99%超がサッカリンに係るものであり、ごく微量がOSBA及び炭酸イオンに係るものであるとされている。Lethco & Wallaceは、[3-¹⁴C]サッカリンナトリウム投与後7日間尿中に、脱炭酸により[3-¹⁴C]が外れた物質が存在(同定は行っていない。)し、それはおそらくベンゼンスルホンアミドであると推定している。なお、IARCワーキンググループは、このOSBA及びベンゼンスルホンアミドについて、当該試験の被験物質のバッチに既に不純物として含まれていた可能性を排除することができないとしている。また、別途雄のSDラット、ゴールデンハムスター、Hartleyモルモット、NZWウサギ又はビーグル犬に[3-¹⁴C]サッカリン(5、50、500 mg/kg体重)を単回強制経口投与(胃内挿管)する試験が実施されている。その結果、投与後2日間尿中の総放射能に対するOSBAに係る放射能の比は、SDラットで0.43~1.78%、ゴールデンハムスターで0.08~0.82%、Hartleyモルモットで0.25~0.69%、NZWウサギで0.18~0.49%、ビーグル犬で0.15~0.73%であったとされている。この結果から、Lethco & Wallaceは、動物種及び用量にかかわらず尿中から実質的に同レベルで検出されたOSBAについて、生体内で、酵素分解というよりはむしろ化学的分解によりサッカリンから生成したものであることが示唆されたとしている。(参照5、10、25)

Renwickのレビュー(1985)では、サッカリン類を経口投与したときのその代謝物については、生成していたとしても微量であり、サッカリン類の毒性又は作用機序において意義のあるものではないと考えられている。(参照28)

④ 排泄

FAS32では、ヒト及びラットへのサッカリン類の経口投与及び非経口投与のいずれにおいても、サッカリン類の主要な消失経路は尿中排泄であり、この尿中排泄は主に腎尿細管分泌により行われるとされている。(参照23)

FAS17における引用によれば、Byard & Golberg(1973)は、SDラット(雄4匹、雌2匹)に[phe-¹⁴C]サッカリン(40 mg/kg体重)を単回経口投与したところ、投与後96時間尿中、投与後48時間糞便中及び投与後4~8時間胆汁中からそれぞれ投与量の90%以上、3~4%及び0.3%以下の放射能が検出されたとし、いずれも未変化体に係るものと同定している。(参照10)

FAS32における引用によれば、Sweetman & Renwick(1980)は、ヒト及びラットともにサッカリンとプロベネシド(陰イオン腎尿細管分泌阻害剤)を併用するとサッカリンの血漿クリアランスが低下することから、腎尿細管分泌がサッカリンの主たる排泄機構であるとしている。ラットでは、サッカリンの腎尿細管分泌は血漿中サッカリン濃度200 µg/mL超で飽和するとしている。Sweetmanら(1981)は、ラットにサッカリン(5%; 2,500 mg/kg

体重/日)を混餌投与すると、その腎クリアランスは低下し、サッカリンが血漿中及び組織・器官中に蓄積するとしている(参照23)。Renwick (1985)のレビューにおける引用によれば、Renwick & Sweatman (1979)は、ラット膀胱でのサッカリンの再吸収はあってもその速度は非常に遅いとしている(参照28)。

IARC73における引用によれば、Bourgoignieら(1980)は、SDラット成獣にサッカリンナトリウムを点滴静注し、その排泄を見る試験を実施している。その結果、サッカリンナトリウムの腎臓排泄はその血漿中濃度にかかわらずイヌリンの腎臓排泄を上回り、サッカリンナトリウムの腎尿細管分泌はその血漿中濃度が140~200 µg/mLのときに最大となったが、サッカリンナトリウムの腎尿細管再吸収の証拠は認められなかったとしている。また、サッカリンナトリウムをp-アミノ馬尿酸ナトリウムと同時に点滴静注するとサッカリンナトリウムの腎クリアランスが阻害されたことから、Bourgoignieらは、サッカリン類の腎尿細管排泄が有機酸陰イオン輸送システムによる担体輸送によっていると推察している。サッカリン類の腎尿細管分泌パターン及び尿中サッカリン類濃度に性差は認められなかったとしている。(参照5)

FAS32における引用によれば、Sweatmanら(1981)は、ヒトにサッカリン(2,000 mg/人)を単回経口摂取させても腎クリアランスの低下は認められなかったとしている(参照23)が、Renwick(1985)のレビューによれば、このSweatmanらの試験では血漿中サッカリン濃度が最高で約60 µg/mLと、ラットの腎尿細管分泌飽和レベルに達していないことから、当該試験結果はサッカリンの腎尿細管再分泌に種差があるという根拠にはならないとしている。(参照28)

(2) 不純物

① OTSA

IARC73及びSIARにおける引用によれば、Renwickら(1978)は、雌Wistarラットに[methyl-¹⁴C]OTSA(0、20、125、200 mg/kg体重)を単回強制経口投与(胃内挿管)する試験を実施している。その結果、投与後7日間に投与量の94%の放射能が排泄され、うち5~7%が糞便中に、用量にかかわらず78%が尿中に排泄されたとしている。他方、24時間尿中への放射能排泄量は、20、125及び200 mg/kg体重投与群でそれぞれ投与量の79%、58%及び36%であったことから、OTSAの尿中排泄速度はその用量に応じて遅くなるとしている。

別途ヒト男女各1例に[methyl-¹⁴C]OTSA(0.2 mg/kg体重)を単回経口摂取させたところ、摂取後1、2及び4日間尿・糞便中への放射能排泄量は、投与量の56%、86%及びほぼ100%であったとしている。

さらに、ヒトに0.4 mg/kg体重、雌Wistarラットに200 mg/kg体重の同位体標識OTSAを単回強制経口摂取(胃内挿管)させたところ、それぞれの尿中に排泄された主な代謝物は、2-スルファモイルベンジルアルコール及びその硫酸抱合体又はグルクロン酸抱合体(ヒト35%、ラット80%)及びサッカリン(ヒト35%、ラット3%)のほか、OSBA(ヒト4%、ラット2%)、

N-アセチルトルエンスルホンアミド (ヒト 2%、ラット 6%) 及び OTSA (未変化体) (ヒト 3%、ラット 5%) であつたとしている。(参照 5、30)

IARC73 及び SIAR においても引用されている Minegishi ら (1972) の報告によれば、体重約 300 g の雄 Wistar ラットに [³⁵S]OTSA (300 mg/kg 体重) を単回経口投与する試験が実施されている。その結果、投与後 24 及び 96 時間尿中に排泄された放射能は、投与量の 62.9~66.7% 及び 83.4~85.8% であり、投与後 96 時間糞便中に排泄された放射能は投与量の 7.4~12.2% であつたとされている。なお、尿中に排泄された放射能の約 50% は OSBA に係るものであつたとされている。(参照 29、30)

② PTSA

Minegishi ら (1972) の報告によれば、体重約 300 g の雄 Wistar ラットに [³⁵S]PTSA (300 mg/kg 体重) を単回経口投与する試験が実施されている。その結果、投与後 24 及び 96 時間尿中に排泄された放射能は、投与量の 54.0~71.6% 及び 68.4~84.5% であり、投与後 96 時間糞便中に排泄された放射能は投与量の 2.6~8.2% であつたとされている。なお、尿中に排泄された放射能の約 50% は PSBA に係るものであつたとされている。(参照 29)

③ MA

FAS14 によれば、MA はラットの肝臓及び腸粘膜並びにブタの肝臓のホモジネートによりメタノールとアントラニル酸に加水分解されるとの報告があるといわれている。FAS14 によれば、メタノールはよく知られた経路により二酸化炭素及び水に代謝され、アントラニル酸はヒトで通常見られる代謝物であつて、グルクロン酸抱合体又は *o*-アミノ馬尿酸として尿中に排泄される。(参照 31)

2. その他の生化学的知見

(1) サッカリンナトリウム

FAS32 における引用によれば、Heaton & Renwick (1991) は、ラットを用いた一世代及び二世代にわたる試験においてサッカリンナトリウム 7.5% (3,750 mg/kg 体重/日⁽²⁾) を混餌投与したところ、肝臓中のチトクロム P-450、チトクロム b5 及び NADPH-チトクロム P-450 還元酵素の濃度、アリル炭化水素ヒドロキシラーゼ活性並びにグルタチオン量に影響を及ぼさなかったが、ジメチルニトロソアミン-*N*脱メチル化活性については性別や週齢にかかわらず増加したと報告している。(参照 23)

(2) サッカリン

FAS32 における引用によれば、Lok ら (1982) は、サッカリンが *in vitro* でウレアーゼ及びプロテアーゼの活性を阻害したとし、Renwick (1989) は、サッカリンが炭水化物の消化を阻害して糞便中に多糖類の排泄が見られたほか、サッカリンが *in vitro* でアミラーゼ、スクラーゼ (インペルターゼ) 及びイソマルターゼの活性を阻害したとしている。(参照 23)

IARC73 における引用によれば、Negro ら (1994) は、70 歳の女性 1 例に、

サッカリンが唯一の共通成分である医薬品 3 剤を経口投与したところ、AST、ALT、 γ -GTP 及びアルカリホスファターゼの活性が増加し、別途サッカリンのみを投与しても同様の変化が再現されている。(参照 5)

3. 毒性

上述のとおり、サッカリンカルシウム及びサッカリンナトリウムは、添加物としての使用時においてはその他のサッカリン類と同様に胃内においてサッカリンを生成すると推定される。したがって、本評価対象品目の毒性については、サッカリンカルシウム又はサッカリンナトリウムを被験物質とした試験成績のほか、その他のサッカリン類を被験物質とした試験成績も用いて総合的に検討を行うこととした。

(1) 遺伝毒性

サッカリンは、酸であり、生体内の生理学的な pH 条件下においては陰イオンとして存在していることから、一般的に発がん物質に見られるような求電子反応を起こしやすい性質をもたないとされている。Renwick (1985) の報告によれば、[5- 3 H]サッカリンをリン酸緩衝液と精製 DNA リン酸緩衝溶液との平衡透析に供したところ、精製 DNA リン酸緩衝溶液での濃度が低かったことから、サッカリンイオンそのものの DNA 親和性は無視しうるとされている(参照 28)。

① サッカリン類

サッカリンカルシウム、サッカリンナトリウム、サッカリン、サッカリンカリウム又はサッカリンマグネシウムを被験物質とした遺伝毒性に関する試験成績として以下のような報告がある。

a. DNA 損傷を指標とする試験

(a) UDS 試験

(サッカリンナトリウム)

IARC22 における引用によれば、Ochi & Tonomura (1978) は、サッカリンナトリウムについてのヒト線維芽細胞を用いた UDS 試験を実施しており、用量に関連した UDS の増加が見られたとしている(参照 32) が、抄録からの引用であり、その詳細は明らかにされていない。

IARC73 における引用によれば、Jeffrey & Williams (1999) は、サッカリンナトリウムについての F344 ラット及び SD ラットの初代培養肝細胞を用いた UDS 試験(最高濃度 10.25 mg/mL)を実施しており、いずれも代謝活性化系非存在下で陰性であったとしている。(参照 5)

(b) コメット試験

(サッカリンナトリウム、サッカリン)

Sasaki ら (2002) の報告によれば、8 週齢の ddy マウス(各群雄 4 匹)にサッカリンナトリウム又はサッカリン(0、100、1,000、2,000 mg/kg 体重)を単回経口投与し、投与 3 時間後又は 24 時間後にと殺し

て、その腺胃、結腸、肝臓、腎臓、膀胱、肺、脳及び骨髄を用いたコメット試験が実施されている。その結果、無処置対照群と比較して、1,000 mg/kg 体重以上のサッカリン投与群の結腸並びにサッカリンナトリウム投与群の腺胃及び結腸で DNA 移動距離の有意な増加が認められたとされている。それ以外の組織・器官で DNA 移動距離の増加は認められていない。(参照 3 3)

Bandyopadhyay ら (2008) の報告によれば、8~10 週齢の Swiss マウス (各群雄 4 匹) にサッカリン (0、50、100、200 mg/kg 体重) を単回強制経口投与 (胃内挿管) し、投与 18 時間後にと殺して、その大腿骨から採取した骨髄細胞を用いたコメット試験が実施されている。その結果、50 mg/kg 体重以上の投与群で tail DNA (%) 及び tail extent (μM) の有意な増加が認められたとされている。(参照 3 4)

(c) *in vitro* SCE 試験

(サッカリンナトリウム)

Abe & Sasaki (1977) の報告によれば、サッカリンナトリウムについての Don を用いた SCE 試験 (最高濃度 50 mM) が実施されており、対照群の約 2 倍の SCE 誘発が認められたとされている。(参照 3 5)

Wolff & Rodin (1978) の報告によれば、M 法で製造されたサッカリンナトリウム又はそれを高度に精製したもの (不純物を 1~5ppm 含有) についての CHO を用いた SCE 試験 (観察対象とした最高濃度 1.0%⁴) が実施されており、いずれの被験物質群においても SCE 誘発の増加が認められたとされている。また、同じ被験物質についてのヒト血液由来初代培養リンパ球を用いた SCE 試験 (観察対象とした最高濃度 0.5%⁵) が実施されており、いずれの被験物質群においても SCE 誘発の増加が濃度依存的に認められたとされている。(参照 3 6)

IARC73 における引用によれば、Brogger ら (1979) は、サッカリンナトリウムについてのヒト初代培養リンパ球を用いた SCE 試験 (最高濃度 0.5 mg/mL) を実施しており、代謝活性化系非存在下で陰性であったとしている。(参照 5)

Ray-Chaudhuri ら (1982) の報告によれば、サッカリンナトリウムについての V79 を用いた SCE 試験 (最高濃度 1 mg/mL) が実施されており、0.1 mg/mL 群で SCE 誘発の増加が認められたが、最高濃度 1 mg/mL 群 (細胞毒性は見られていない。) では SCE 誘発の増加は認められなかったとされている。(参照 3 7)

IARC73 における引用によれば、Dropkin ら (1985) は、妊娠 10 日の ICR マウスにサッカリンナトリウム (2,000 mg/kg 体重) を単回腹腔内投与し、子宮内暴露した胚細胞での SCE 誘発性を見る試験を実施し

⁴ M 法製造品 1.5~5.0%、精製品 1.2~5.0%については細胞増殖抑制が認められたため観察対象とされていない。

⁵ M 法製造品 0.6~1.5%、精製品 0.6~0.9%については細胞増殖抑制が認められたため観察対象とされていない。

しており、陰性であったとしている。(参照5)

(サッカリン)

IARC73における引用によれば、Saxholm ら (1979) は、サッカリンについてのヒト初代培養リンパ球を用いた SCE 試験 (最高濃度 0.1 mg/mL) を実施しており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとしている。また、Brøgger ら (1979) は、同様の試験 (最高濃度 0.5 mg/mL) を実施し、代謝活性化系非存在下で陰性であったとしている。(参照5)

(d) *in vivo* SCE 試験

(サッカリンナトリウム)

Renner (1979) の報告によれば、10~11 週齢のチャイニーズ・ハムスター (各群 5 匹 (性別匹数不詳)) に精製サッカリンナトリウム (0、1,000、5,000、7,500、10,000 mg/kg 体重) を単回強制経口投与 (胃内挿管) し、骨髓細胞中の SCE 誘発性を見る試験が実施されている。その結果、7,500 mg/kg 体重以上の投与群で陰性対照群の 1.5 倍以上の SCE 誘発が認められたとされている。(参照38)

(e) DNA 損傷を指標とするその他の試験

(サッカリンナトリウム)

IARC73における引用によれば、Lutz & Schlatter (1977) は、SD ラット 2 匹に³⁵S]サッカリンナトリウム (推定) (372、390 mg/kg 体重) を単回強制経口投与 (胃内挿管) し、投与 50 時間後にと殺してその肝臓及び膀胱の DNA との結合性を見る試験を実施しており、陰性であったとしている。(参照5)

(サッカリン)

IARC73における引用によれば、Sina ら (1983) は、サッカリンについてのラット初代培養肝細胞を用いた DNA 一本鎖切断試験 (最高濃度 0.549 mg/mL) を実施しており、代謝活性化系非存在下で弱い陽性であったとしている。(参照5)

b. 遺伝子突然変異を指標とする試験

(a) 微生物を用いる復帰突然変異試験

(サッカリンナトリウム)

Stoltz ら (1977) の報告によれば、M 法で製造されたサッカリンナトリウム (Arnold ら (1980) のラットを用いた二世代にわたる試験に用いられたものと同ロット品) についての細菌 (*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535 及び TA1537) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 5 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。(参照39)

IARC73における引用によれば、Batzinger ら (1977) は、サッカリンナトリウム 4 検体 (最高用量 2,500 mg/kg 体重) を単回経口投与した

マウスの尿についての細菌 (*S. typhimurium* (株不詳)) を用いた復帰突然変異試験を実施しており、いずれも代謝活性化系非存在下で陽性であったとしている。また、別途同様の投与を行ったマウスの腹腔内を経由した細菌 (*S. typhimurium* TA98 及び TA100) を用いた復帰突然変異試験を実施しており、3 検体は代謝活性化系非存在下で陽性であったが、高度に精製された 1 検体は陰性であったとしている。(参照 5)

Ashby ら (1978) の報告によれば、サッカリンナトリウムについての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535 及び TA1538) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 2.5 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系存在下で陰性であったとされている。(参照 40)

IARC73 における引用によれば、Pool (1978) は、サッカリンナトリウムについての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535 及び TA1537) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 1 mg/plate) を実施しており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとしている。(参照 5)

IARC73 における引用によれば、Connor ら (1979) は、サッカリンナトリウム (最高用量 100 mg/kg 体重) を単回静脈内投与したラットの胆汁についての細菌 (*S. typhimurium* (株不詳)) を用いた復帰突然変異試験を実施しており、代謝活性化系非存在下で陰性であったとしている。(参照 5)

Eckhardt ら (1980) の報告によれば、RF 法で製造されたサッカリンナトリウム (OTSA を 27ppm 含有) についての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び TA1538) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 40 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。また、VB 培地を ZLM 培地に替えても、代謝活性化系存在下のすべての菌株で陰性であったとされている。(参照 41)

IARC73 における引用によれば、de Flora (1981) は、サッカリンナトリウムについての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び TA1538) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 10.25 mg/plate) を実施しており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとしている。(参照 5)

IARC73 における引用によれば、Imamura ら (1983) は、サッカリンナトリウムについての細菌 (*S. typhimurium* TA100) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 10 mg/plate) を実施しており、代謝活性化系存在下で陰性であったとしている。(参照 5)

Ishidate ら (1984) の報告によれば、サッカリンナトリウムについての細菌 (*S. typhimurium* TA92、TA94、TA98、TA100、TA1535 及び

TA1537) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 10.0 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。(参照 4 2)

Bandyopadhyay ら (2008) の報告によれば、サッカリンナトリウムについての細菌 (*S. typhimurium* TA97a 及び TA100) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 10 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。(参照 3 4)

(サッカリン)

Ashby ら (1978) の報告によれば、サッカリン (不純物として OSBA を含有) についての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535 及び TA1538) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 2.5 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系存在下で陰性であったとされている。(参照 4 0)

IARC73 における引用によれば、Rao ら (1979) は、サッカリンについての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び TA1538) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 5 mg/plate) を実施しており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとしている。(参照 5)

Herbold (1981) の報告によれば、RF 法で製造されたサッカリンについての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535 及び TA1537) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 12.5 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。また、当該サッカリンを水溶液中で 2 時間還流した後に乾燥したものについての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535 及び TA1537) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 2.5 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。(参照 4 3)

Ishidate ら (1984) 並びに能美及び松井 (1991) の報告によれば、サッカリン (純度 100.0%) についての細菌 (*S. typhimurium* TA92、TA94、TA98、TA100、TA1535 及び TA1537) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 10.0 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。(参照 4 2、4 4)

Mortelmans ら (1986) の報告によれば、サッカリンについての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535 及び TA1537) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 10 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。(参照 4 5)

(b) ショウジョウバエを用いる遺伝子突然変異試験
(サッカリンナトリウム)

Eckhardt ら (1980) の報告によれば、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster* Basc 系雌及びその野生型雄) に RF 法で製造されたサッカリンナトリウム (OTSA を 27ppm 含有) (0, 400 mM) を 3 日間飲水投与する伴性劣性致死試験が実施されており、劣性致死発生率の増加は認められなかったとされている。(参照 4 1)

(サッカリン)

Kramers (1977) の報告によれば、M 法で製造された別ロットのサッカリン「P&B」及びサッカリン「S1022」についてのショウジョウバエ (*D. melanogaster* Basc 系雌及びその野生型雄) を用いた伴性劣性致死試験 (「P&B」単回腹部注入 0, 5, 25 mM, 3 日間混餌投与 0, 5, 25 mM, 「S1022」単回腹部注入 0, 5 mM) が実施されており、「P&B」で弱い陽性、「S1022」で陰性であったとされている。Kramers は、別途 OTSA 及び PTSA について実施した試験結果と、「S1022」は「P&B」よりも新しかったことを踏まえ、「P&B」に認められた弱い陽性は OTSA 及び PTSA 以外の不安定な不純物によるものと推定している。(参照 4 6)

(c) マウスリンフォーマ TK 試験

(サッカリンナトリウム)

IARC73 における引用によれば、Clive ら (1979) は、非精製サッカリンナトリウム又は精製サッカリンナトリウムについての L5178Y tk⁺/-3.7.2c を用いたマウスリンフォーマ TK 試験 (最高濃度: 非精製サッカリンナトリウム 19.0 mg/mL, 精製サッカリンナトリウム 12.5 mg/mL) を実施しており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとしている。(参照 5)

(d) *in vivo* トランスジェニック動物突然変異試験

(サッカリンナトリウム)

Turner ら (2001) の報告によれば、12 週齢の Big Blue™ ラット (各群雄 10 匹) にサッカリンナトリウム (0, 5%) を 10 日間混餌投与し、14 日目にと殺してその肝臓及び膀胱の DNA を採取し、*lacI* の変異頻度を見る *in vivo* トランスジェニック動物突然変異試験が実施されている。その結果、被験物質の投与に関連した *lacI* 変異頻度の増加は肝臓及び膀胱のいずれにおいても認められなかったとされている。なお、本試験においては、陽性対照として用いた 4-アミノビフェニルの投与によって肝臓及び膀胱のいずれにおいても *lacI* 変異頻度が有意に増加したことが確認されている。(参照 4 7)

(e) 遺伝子突然変異を指標とするその他の試験

(サッカリンナトリウム)

SIAR においても引用されている Fahrig (1982) の報告によれば、C57/BL6JHan×T 交雑種妊娠マウス (対照群 39 匹、投与群 84~99 匹) に RF 法で製造されたサッカリンナトリウム (OTSA を 27ppm 含有) (0, 1,000 mg/kg 体重) を妊娠 10 日に単回腹腔内投与し、得られた児

動物の色素細胞の劣勢ホモ遺伝子の形質（茶色又は灰色がかったスポット）又は色素細胞死（白色又は灰白色のスポット）の出現頻度を見るマウススポット試験が実施されている。その結果、3回繰り返し行われた試験で投与群全体でのスポットの出現頻度は1/701匹で、対照群でのスポットの出現頻度（0/182匹）との間に有意差は認められなかったことから陰性であったとされている。（参照30、48）

Suzuki & Suzuki (1988) の報告によれば、サッカリンナトリウムについてのRSaを用いたNa⁺/K⁺-ATPase遺伝子座突然変異によるウアバイン耐性獲得を指標とする遺伝子突然変異試験が、細胞生存率が50%を下回る濃度（22.5 mg/mL）まで実施されており、突然変異頻度の増加が認められたとされている。（参照49）

（サッカリン）

Mahon & Dawson (1982) の報告によれば、HTマウス（各群雌9～24匹）について、雄Tマウスと交配し、サッカリン（0、75、750、1,500、3,000、5,000、7,500 mg/kg 体重/日）を妊娠8、9又は10日に単回強制経口投与（胃内挿管）し、得られた児動物の表皮の有色スポット出現の有無を生後28日に観察するマウススポット試験が実施されている。その結果、有色スポットの出現率は対照群で0.9%に対し投与群全体で3.6%と有意な高値が見られたが、被験物質の用量との関連性は認められず、投与日の違いによる差も認められなかったとされている。（参照50）

c. 染色体異常を指標とする試験

(a) ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

（サッカリンカルシウム）

Ashby & Ishidate (1986) 並びに林及び松岡 (1998) の報告によれば、サッカリンカルシウム（純度99%超）についてのCHL/TUを用いた染色体異常試験（代謝活性化系非存在下での24時間及び48時間連続処理）（観察対象とした最高濃度：24時間連続処理16.0 mg/mL、48時間連続処理12.0 mg/mL⁶⁾）が実施されている。その結果、24時間連続処理では12.0 mg/mL以上、48時間連続処理では8.0 mg/mL以上の濃度で陽性（構造異常）であったとされている。サッカリンのカルシウム塩のほか、ナトリウム塩及びカリウム塩の等張水溶液はいずれも染色体異常を誘発したこと、いずれの塩も4 mg/mL未満（イオン濃度として塩化ナトリウム1 mg/mL未満に相当）の濃度では染色体異常を誘発せず、塩化ナトリウム1.5～3 mg/mL相当濃度ではいずれも染色体異常を誘発したこと、サッカリンでは陰性であったこと等から、Ashby & Ishidateは、高濃度でのみ陽性という結果は、細胞内イオン不均衡によるものではないかと推定している。（参照51、52）

（サッカリンナトリウム）

⁶⁾ 48時間連続処理の16.0 mg/mLでは細胞毒性が認められたとされている。

Kristoffersson (1972) の報告によれば、サッカリンナトリウムについての Cl-1-15 を用いた染色体異常試験 (最高濃度 1 mg/mL) が実施されている。その結果、構造異常誘発の有意な増加が認められ、濃度依存性が示唆されている。(参照 5 3)

Chang & Stacey (1974) の報告によれば、サッカリンナトリウムについてのヒト末梢血由来初代培養リンパ球を用いた染色体異常試験 (観察対象とされた最高濃度 2.0 mg/mL) が実施されており、観察対象とした最高濃度 (2.0 mg/mL) 群 (細胞にゆがみが生じ、分裂指数はほぼ 0 にまで低下していた。) においてのみ染色体切断の有意な増加が認められたとされている。(参照 5 4)

Abe & Sasaki (1977) の報告によれば、サッカリンナトリウムについての Don を用いた染色体異常試験 (最高濃度 50 mM) が実施されており、試験結果にバラツキが見られたが、少なくとも最高濃度群では、分裂指数が 50% を下回っていたものの染色体異常の誘発が認められたとされている。(参照 3 5)

Masubuchi ら (1978) の報告によれば、サッカリンナトリウム (純度 99.93% ; OTSA を 45ppm 含有) についての CHO-K1 を用いた染色体異常試験 (20 mg/mL) が実施されており、代謝活性化系非存在下で染色体異常 (構造異常) の誘発が認められたとされている。(参照 5 5)

Ishidate ら (1984) 並びに Ashby & Ishidate (1986) の報告によれば、サッカリンナトリウムについての CHL/IU を用いた染色体異常試験 (代謝活性化系非存在下での 24 時間及び 48 時間連続処理) (観察対象とした最高濃度 12.0 mg/mL⁽⁷⁾) が実施されており、24 時間連続処理では 8.0 mg/mL 以上、48 時間連続処理では 4.0 mg/mL 以上の濃度で陽性 (構造異常) であったとされている。(参照 4 2、5 1)

(サッカリン)

Ishidate ら (1984) 、Ashby & Ishidate (1986) 並びに林及び松岡 (1998) の報告によれば、サッカリンについての CHL/IU を用いた染色体異常試験 (代謝活性化系非存在下での 24 時間及び 48 時間連続処理) (最高濃度 6.0 mg/mL (析出が認められなかったのは 2.0 mg/mL まで)⁽⁸⁾) が実施されており、陰性であったとされている。(参照 4 2、5 1、5 2)

(サッカリンカリウム)

Ashby & Ishidate (1986) 並びに林及び松岡 (1998) の報告によれば、サッカリンカリウムについての CHL/IU を用いた染色体異常試験 (代謝活性化系非存在下での 24 時間及び 48 時間連続処理) (観察対象

⁷ 16.0 mg/mL では細胞毒性が認められたとされている。

⁸ 水に溶けにくいので DMSO を溶媒に用いたが、4.0 mg/mL 以上で析出が認められたとされている。

とした最高濃度 8.0 mg/mL⁹⁾ が実施されており、最高濃度 8.0 mg/mL でのみ陽性（構造異常）であったとされている。（参照 5 1、5 2）

（サッカリンマグネシウム）

Ashby & Ishidate (1986) 並びに林及び松岡 (1998) の報告によれば、サッカリンのカルシウム塩、ナトリウム塩及びカリウム塩がいずれも染色体異常を誘発したのは、これらの金属イオンが DNA のマグネシウム結合部位においてマグネシウムイオンと競合するためであるとの仮説を検証するために、サッカリンマグネシウムについての CHL/TU を用いた染色体異常試験（代謝活性化系非存在下での 24 時間及び 48 時間連続処理）（最高濃度 12.0 mg/mL）が実施されており、8.0 mg/mL 以上の濃度で陽性（構造異常）であったとされている。Ashby & Ishidate は、サッカリンのマグネシウム塩が他の塩と実質的に同等の染色体異常誘発性を示したことから、サッカリン類の染色体異常誘発性が上記仮説によるものである可能性は弱まったとしている。（参照 5 1、5 2）

（b）*in vivo* 染色体異常試験

（サッカリンナトリウム、サッカリン）

Srám & Zudová (1974) の報告によれば、ICR マウス（各群雄 10 匹）にサッカリンナトリウム（0、200 mg/kg 体重）を 12 時間おきに 5 回腹腔内投与する試験が実施されており、ディアキネシス期の精母細胞における転座、XY 染色体の分離及び一価染色体が、対照群の 0.7% に見られたのに対し、投与群の 6.1% に見られたとされているが、有意な増加であったのか否かについては明らかにされていない。（参照 5 6）

IARC73 における引用によれば、van Went-de Vries & Kragten (1975) はチャイニーズ・ハムスターにサッカリンナトリウム（1,500 mg/kg 体重/日）を 3 日間経口投与する *in vivo* 骨髄染色体異常試験を実施しており、陰性であったとしている。（参照 5）

IARC73 における引用によれば、Machemer & Lorke (1975) は、サッカリンナトリウム（5,000 mg/kg 体重）を 2 回経口投与したチャイニーズ・ハムスターの精母細胞を用いた *in vivo* 精母細胞染色体異常試験を実施しており、陰性であったとしている。（参照 5）

Léonard & Léonard (1979) の報告によれば、12 週齢の C57BL マウス（各群雄 5 匹）にサッカリンナトリウム（0、1,000、2,000、4,000 mg/kg 体重）を単回腹腔内投与し投与 48 時間後にと殺する試験並びにサッカリンナトリウム（2,000 mg/kg 体重）を単回腹腔内投与し投与 1、2、4 又は 10 日後にと殺する試験が実施されている。その結果、いずれの投与群の骨髄においても染色体異常の誘発は認められず、陰性であったとされている。また、12 週齢の C57BL マウス（各群雄 10～20 匹）にサッカリンナトリウム（2,000 mg/kg 体重）を単回腹腔内投与し投与

⁹⁾ 12.0 mg/mL では細胞毒性が認められたとされている。

3 か月後にと殺する試験及びサッカリン (20 g/L) を約 3 か月間飲水投与 (自由摂取) しと殺する試験が実施されている。その結果、いずれの第一分裂期の精母細胞においても相互転座は認められず、陰性であったとされている。(参照 5 7)

IARC73 における引用によれば、Pecevski ら (1983) は、サッカリンナトリウム (500 mg/kg 体重) を 10 回反復経口投与した C3H×101 マウスの精母細胞を用いた *in vivo* 精母細胞染色体異常試験を実施しており、陰性であったとしている。(参照 5)

IARC73 における引用によれば、Dropkin ら (1985) は、妊娠 10 日の ICR マウスにサッカリンナトリウム (2,000 mg/kg 体重) を単回腹腔内投与し、子宮内暴露した胚細胞を用いて染色体異常試験を実施しており、陰性であったとしている。(参照 5)

IARC73 における引用によれば、Prasad & Rai (1987) はサッカリンナトリウム (1,000 mg/kg 体重/日) を 24 週間混餌投与した ICR マウスの骨髓細胞又は精母細胞を用いた *in vivo* 染色体異常試験を実施しており、いずれにおいても陽性であったとしている。(参照 5)

(サッカリン)

Durnev ら (1995) の報告によれば、サッカリン (5、50 mg/kg 体重/日) を C57BL/6 マウスに 5 日間経口投与する *in vivo* 染色体異常試験が実施されており、染色体異常の誘発は認められなかったとしている。(参照 5 8)

(c) げっ歯類を用いる小核試験

(サッカリンナトリウム、サッカリン)

Léonard & Léonard (1979) の報告によれば、12 週齢の C57BL マウス (各群雄 10 匹) にサッカリンナトリウム (2,000 mg/kg 体重) を単回腹腔内投与し投与 6 時間後又は 48 時間後にと殺する試験並びにサッカリン (20 g/L) を約 3 か月間飲水投与 (自由摂取) した後にと殺する試験が実施されている。その結果、いずれの対照群及び投与群においても小核多染性赤血球の割合は 4%未満であり、陰性であったとされている。(参照 5 7)

Eckhardt ら (1980) の報告によれば、NMRI マウス (各群雌雄各 4 匹) に RF 法で製造されたサッカリンナトリウム (OTSA を 27ppm 含有) を 2 日間強制経口投与 (胃内挿管) 又は腹腔内投与する *in vivo* 骨髓小核試験 (経口 0、1,025 mg/kg 体重/日、腹腔内 0、205、410、1,025 mg/kg 体重/日) が実施されており、いずれにおいても小核多染性赤血球の割合の有意な増加は認められなかったとされている。(参照 4 1)

(d) げっ歯類を用いる優性致死試験

(サッカリンナトリウム)

Rao & Qureshi (1972) の報告によれば、10~12 週齢の雄 CBA マウスにサッカリンナトリウム (1.72%) を 30 日間飲水投与し、その後 10~12 週齢の雌 101 マウスと毎週雌雄 3:1 で 4 週間かけて交配し、妊娠した雌 101 マウスを帝王切開する優性致死試験が実施されている。その結果、交配 1~4 週のいずれの群においても、投与群の優性致死率は対照群よりも有意に高かったとされている。(参照 59)

Machemer & Lorke (1975) の報告によれば、発情前期にあることを確認した雌マウスにサッカリンナトリウム (0, 10,000 mg/kg 体重) を単回強制経口投与し、投与 4 時間後に無処置雄マウスと雌雄 2:1 で交配し、翌朝膣栓が確認されてから 14 日目に帝王切開する試験が実施されている。その結果、サッカリンナトリウムの投与に関連した優性致死の誘発は認められなかったとされている。(参照 60)

IARC73 における引用によれば、Lorke & Machemer (1975) は、マウスにサッカリンナトリウム (2,000 mg/kg 体重/日) を 10 週間混餌投与する優性致死試験を実施しており、陰性であったとしている。(参照 5)

(サッカリン)

Machemer & Lorke (1973) の報告によれば、体重 25~30 g の NMRI マウス (各群雄 20 匹) について、サッカリン (0, 5,000 mg/kg 体重/日) を 5 日間飲水投与し、投与最終日から雌 BOM マウス (合計 24 匹) と毎週雌雄 3:1 で 8 週間 (精子形成の全ステージを包含) かけて交配し、妊娠した雌 BOM マウスを妊娠 14 日に帝王切開する優性致死試験が実施されている。その結果、着床後胚死亡率については、被験物質の投与による影響は認められなかったとされている。着床前損失率については、交配 1~8 週のいずれの群ともに正常の範囲内であり、交配 3 週の対照群と投与群との間のみ統計学的有意差が見られたものの生物学的意義のない変化であるとされている。以上より Machemer & Lorke は、本試験においてサッカリンの投与に関連した優性致死の誘発は認められなかったとしている。(参照 61)

② 不純物

サッカリン類の不純物 (表 1 (11 頁) 参照) を被験物質とした遺伝毒性に関する試験成績として以下のような報告がある。

a. OTSA

(a) 遺伝子突然変異を指標とする試験

(微生物を用いる復帰突然変異試験)

SIAR においても引用されている Stoltz ら (1977) の報告によれば、OTSA (純度 99.9% 超) についての細菌 (*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535 及び TA1537) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 1 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。(参照 30, 39)

SIAR においても引用されている Ashby ら (1978) の報告によれば、OTSA についての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535 及び TA1538) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 2.5 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系存在下で陰性であったとされている。(参照 30、40)

Poncelet ら (1979) の報告によれば、OTSA についての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1530、TA1535、TA1537 及び TA1538) を用いた復帰突然変異試験 (最高濃度：代謝活性化系 (Arochlor 1254 又はフェノバルビタール投与ラット由来) 存在下 1,000 mM、代謝活性化系非存在下 100 mM) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。(参照 62)

SIAR においても引用されている Eckhardt ら (1980) の報告によれば、OTSA (PTSA を 1%未満含有) についての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び TA1538) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 18 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。一方、TA98 について、VB 培地をその他の最少培地 (ZLM 培地：VB 培地よりもグルコース、クエン酸及び無機イオンの割合が少ない。) に替えたところ、代謝活性化系非存在下では陰性であったが、代謝活性化系存在下では 3.6 mg/plate 以上の投与群で陰性対照群の 2~3 倍の復帰突然変異誘発¹⁰⁾が再現性をもって認められたとされている。(参照 30、41)

SIAR においても引用されている Herbold (1981) の報告によれば、OTSA についての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535 及び TA1537) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 18 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。また、別途 OTSA についての細菌 (*S. typhimurium* TA98) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 18 mg/plate) が 2 種類の VB 培地 (うち一方は Eckhardt ら (1980) が用いたものと同バッチ) 及び ZLM 培地を用いて実施されており、代謝活性化系 (Eckhardt ら (1980) と同一条件) 存在下で陰性であったとされている。Herbold は、本試験において Eckhardt ら (1980) の試験結果を再現することはできなかったとしている。さらに、サッカリン抽出濃縮物¹¹⁾ (OTSA を 24~337ppm 含有) についての細菌 (*S. typhimurium* TA98) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 2.5 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。(参照 30、43)

Riggin ら (1983) の報告によれば、OTSA についての細菌 (*S. typhimurium* TA98) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 2 mg/plate)

¹⁰ 代謝活性化系の調製時に NADPH 添加を省略すると、この復帰突然変異誘発作用は消失したとされている。

¹¹ サッカリン水溶液に塩酸を加えて pH を 5.3~5.5 としジクロロメタン抽出を行い、水洗した後にジクロロメタン相を濃縮したものであるとされている。

が実施されており、代謝活性化系存在下で陰性であったとされている。
(参照 17)

JETOC (1996) の報告によれば、OTSA についての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び TA1538 並びに *Escherichia coli* WP2 *uvrA*) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 5 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。(参照 63)

SIAR においても引用されている厚生省 (当時) の平成 9 年度既存化学物質安全性点検結果によれば、OTSA についての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535 及び TA1537 並びに *E. coli* WP2 *uvrA*) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 5 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。
(参照 30、64)

(ショウジョウバエを用いる遺伝子突然変異試験)

Kramers (1977) の報告によれば、ショウジョウバエ (*D. melanogaster* Basc 系雌及びその野生型雄) に OTSA (5 mM) を 3 日間混餌投与又は単回腹部注入する伴性劣性致死試験が実施されており、陰性であったとされている。(参照 46)

Eckhardt ら (1980) の報告によれば、ショウジョウバエ (*D. melanogaster* Basc 系雌及びその野生型雄) に OTSA (PTSA を 1% 未満含有) (0、2.5 mM) を 3 日間飲水投与する伴性劣性致死試験が実施されており、1 回目の交配で伴性劣性致死発生率の有意な増加が見られたとされている (参照 41)。しかしながら、2 回目及び 3 回目の交配では有意な増加は見られていない。

(遺伝子突然変異を指標とするその他の試験)

SIAR における引用によれば、Litton Bionetics Inc. (1978) は、OTSA についての酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* D4) を用いた遺伝子突然変異試験 (最高用量 1 mg/plate) を実施しており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとしている。(参照 30)

SIAR においても引用されている Fahrig (1982) の報告によれば、妊娠 C57/BL6JHan×T 交雑マウス (対照群 39 匹、投与群 80~83 匹) に OTSA (0、1,000 mg/kg 体重) を妊娠 10 日に単回経口投与し、得られた児動物の色素細胞の劣勢ホモ遺伝子の形質 (茶色又は灰色がかったスポット) 又は色素細胞死 (白色又は灰白色のスポット) の出現頻度を見るマウススポット試験が実施されている。その結果、対照群でのスポットの出現頻度は 0/182 匹であったのに対し、投与群でのスポットの出現頻度は 3 回繰り返された試験でそれぞれ 1/183 匹、4/285 匹及び 1/171 匹と、1 回のみ有意な増加が見られたとされている。Fahrig は、このことをもって OTSA の変異原性の有無について明確な分類を行うことは

不可能であるとしている。(参照30、48)

SIARにおいても引用されている Suzuki & Suzuki (1988) の報告によれば、OTSA についての RSa を用いた Na⁺/K⁺-ATPase 遺伝子座突然変異によるウアバイン耐性獲得を指標とする遺伝子突然変異試験 (最高濃度 1.8 mg/mL) が実施されており、遺伝子突然変異の誘発は認められなかったとされている。(参照30、49)

(b) 染色体異常を指標とする試験

(ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験)

SIAR においても引用されている Masubuchi ら (1978) の報告によれば、OTSA についての CHO-K1 を用いた染色体異常試験 (最高濃度 0.4 mg/mL) が実施されており、代謝活性化系非存在下で陰性であったとされている。(参照30、55)

SIAR においても引用されている厚生省 (当時) の平成9年度既存化学物質安全性点検結果によれば、OTSA についての CHL/TU を用いた染色体異常試験 (観察対象とした最高濃度: 短時間処理 3 mg/mL、24 時間及び 48 時間連続処理 1.5 mg/mL⁽¹²⁾) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。(参照30、65)

(げっ歯類を用いる小核試験)

SIAR においても引用されている Eckhardt ら (1980) の報告によれば、NMRI マウス (各群雌雄各4匹) に OTSA (PTSA を1%未満含有) を懸濁液として2日間強制経口投与 (胃内挿管) 又は腹腔内投与する *in vivo* 骨髄小核試験 (経口 0、1,026 mg/kg 体重/日、腹腔内 0、171、342、685、1,026 mg/kg 体重/日) が実施されており、いずれにおいても小核多染性赤血球の割合の有意な増加は認められなかったとされている。(参照30、41)

b. PTSA

(a) 遺伝子突然変異を指標とする試験

(微生物を用いる復帰突然変異試験)

Eckhardt ら (1980) の報告によれば、PTSA についての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び TA1538) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 18 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。一方、TA98 について、VB 培地を他の最少培地 (ZLM 培地) に替えたところ、代謝活性化系非存在下では陰性であったが、代謝活性化系存在下では 9.6 mg/plate 以上の投与群で陰性対照群の 2~3 倍の復帰突然変異誘発⁽¹³⁾ が再現性をもって認められたとされている。(参照41)

Poncelet ら (1980) の報告によれば、PTSA についての細菌 (*S.*

¹² 24 時間連続処理及び 48 時間連続処理ともに 2.25 mg/mL 以上の濃度群は細胞毒性が認められたため観察対象とされていない。

¹³ 代謝活性化系の調製時に NADPH 添加を省略すると、この復帰突然変異誘発作用は消失したとされている。

typhimurium TA98、TA100、TA1530、TA1535 及び TA1538) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 0.04 mol/plate) が実施されている。その結果、被験物質は TA98 及び TA1538 に対し細胞毒性を示したが、自然発生によるものを上回る復帰突然変異頻度の誘発は認められなかったとされている。(参照 6 6)

Herbold (1981) の報告によれば、PTSA についての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535 及び TA1537) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 18 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。また、別途 PTSA についての細菌 (*S. typhimurium* TA98) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 14.4~18 mg/plate¹⁴⁾) が、2 種類の VB 培地 (うち一方は Eckhardt ら (1980) が用いたものと同バッチのもの) 及び ZLM 培地を用いて実施されており、代謝活性化系 (Eckhardt ら (1980) と同一条件) 存在下で陰性であったとされている。Herbold は、本試験において Eckhardt ら (1980) の試験結果を再現することはできなかったとしている。(参照 4 3)

厚生省 (当時) の平成 3 年度既存化学物質安全性点検結果によれば、PTSA (純度 99.9%) についての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535 及び TA1537 並びに *E. coli* WP2 *uvrA*) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 5 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。(参照 6 7)

(ショウジョウバエを用いる遺伝子突然変異試験)

Kramers (1977) の報告によれば、ショウジョウバエ (*D. melanogaster* Basc 系雌及びその野生型雄) に PTSA (5 mM) を腹部注入する伴性劣性致死試験が実施されており、陰性であったとされている。(参照 4 6)

Eckhardt ら (1980) の報告によれば、ショウジョウバエ (*D. melanogaster* Basc 系雌及びその野生型雄) に PTSA (0、2.5 mM) を 3 日間飲水投与する伴性劣性致死試験が実施されており、1 回目の交配で伴性劣性致死発生率の有意な増加が見られたとされている (参照 4 1)。しかしながら、2 回目及び 3 回目の交配では有意な増加は見られていない。

(遺伝子突然変異を指標とするその他の試験)

Suzuki & Suzuki (1988) の報告によれば、PTSA についての R_{Sa} を用いた Na⁺/K⁺-ATPase 遺伝子座突然変異によるウアバイン耐性獲得を指標とする遺伝子突然変異試験 (最高濃度 1.8 mg/mL) が実施されており、突然変異の誘発は認められなかったとされている。(参照 4 9)

¹⁴ 最高用量は VB 培地群で 14.4 mg/plate、ZLM 培地群で 18 mg/plate であったとされている。

(b) 染色体異常を指標とする試験

(ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験)

Masubuchi ら (1978) の報告によれば、PTSA についての CHO-K1 を用いた染色体異常試験 (最高濃度 0.4 mg/mL) が実施されており、代謝活性化系非存在下で陰性であったとされている。(参照 5 5)

厚生省 (当時) の平成 3 年度既存化学物質安全性点検結果によれば、PTSA (純度 99.9%) についての CHL/TU を用いた染色体異常試験 (観察対象とした最高濃度: 短時間処理 1.7 mg/mL、連続処理 1.3 mg/mL) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。(参照 6 8)

(げっ歯類を用いる小核試験)

Eckhardt ら (1980) の報告によれば、NMRI マウス (各群雌雄各 4 匹) に PTSA を懸濁液として 2 日間強制経口投与 (胃内挿管) 又は腹腔内投与する *in vivo* 骨髄小核試験 (経口 0、855 mg/kg 体重/日、腹腔内 0、428、855 mg/kg 体重/日) が実施されており、いずれにおいても小核多染性赤血球の割合の有意な増加は認められなかったとされている。(参照 4 1)

c. OSBA

(a) 遺伝子突然変異を指標とする試験

(微生物を用いる復帰突然変異試験)

Ashby ら (1978) の報告によれば、OSBA についての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535 及び TA1538) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 2.5 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系存在下で陰性であったとされている。(参照 4 0)

Poncelet ら (1979) の報告によれば、OSBA についての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1530、TA1535、TA1537 及び TA1538) を用いた復帰突然変異試験 (最高濃度: 代謝活性化系 (Arochlor 1254 投与ラット由来) 存在下 1,000 mM、代謝活性化系 (フェノバルビタール投与ラット由来) 存在下及び代謝活性化系非存在下 100 mM) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。(参照 6 2)

Eckhardt ら (1980) の報告によれば、OSBA についての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び TA1538) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 7.2 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。また、VB 培地を他の最少培地 (ZLM 培地) に替えても、代謝活性化系存在下のすべての菌株で陰性であったとされている。(参照 4 1)

Herbold (1981) の報告によれば、OSBA についての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535 及び TA1537) を用いた復帰突

然変異試験 (最高用量 2.5 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。(参照 4 3)

Riggin ら (1983) の報告によれば、OSBA についての細菌 (*S. typhimurium* TA98) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 2 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系存在下で陰性であったとされている。(参照 1 7)

(ショウジョウバエを用いる遺伝子突然変異試験)

Eckhardt ら (1980) の報告によれば、ショウジョウバエ (*D. melanogaster* Basc 系雌及びその野生型雄) に OSBA (0、250 mM) を 3 日間飲水投与する伴性劣性致死試験が実施されており、伴性劣性致死発生率の増加は認められなかったとされている。(参照 4 1)

(遺伝子突然変異を指標とするその他の試験)

Suzuki & Suzuki (1988) の報告によれば、OSBA についての RSa を用いた Na⁺/K⁺-ATPase 遺伝子座突然変異によるウアバイン耐性獲得を指標とする遺伝子突然変異試験 (最高濃度 0.9 mg/mL) が実施されており、突然変異の誘発は認められなかったとされている。(参照 4 9)

(b) 染色体異常を指標とする試験

(ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験)

Masubuchi ら (1978) の報告によれば、OSBA についての CHO-K1 を用いた染色体異常試験 (最高濃度 0.4 mg/mL) が実施されており、代謝活性化系非存在下で陰性であったとされている。(参照 5 5)

(げっ歯類を用いる小核試験)

Eckhardt ら (1980) の報告によれば、NMRI マウス (各群雌雄各 4 匹) に OSBA を 2 日間強制経口投与 (胃内挿管) 又は腹腔内投与する *in vivo* 骨髄小核試験 (経口 0、1,000 mg/kg 体重/日、腹腔内 0、400、1,000 mg/kg 体重/日) が実施されており、いずれにおいても小核多染性赤血球の割合の有意な増加は認められなかったとされている。(参照 4 1)

d. PSBA

(a) 遺伝子突然変異を指標とする試験

(微生物を用いる復帰突然変異試験)

Eckhardt ら (1980) の報告によれば、PSBA についての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び TA1538) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 3.6 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。また、VB 培地を他の最少培地 (ZLM 培地) に替えても、代謝活性化系存在下のすべての菌株で陰性であったとされている。(参照 4 1)

Poncelet ら (1980) の報告によれば、PSBA についての細菌 (*S.*

typhimurium TA98、TA100、TA1530、TA1535 及び TA1538) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 0.04 mol/plate) が実施されている。その結果、被験物質は TA98 及び TA1538 に対し細胞毒性を示したが、自然発生によるものを上回る復帰突然変異頻度の誘発は認められなかったとされている。(参照 6 6)

Herbold (1981) の報告によれば、PSBA についての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535 及び TA1537) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 2.5 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。(参照 4 3)

(ショウジョウバエを用いる遺伝子突然変異試験)

Eckhardt ら (1980) の報告によれば、ショウジョウバエ (*D. melanogaster* Basc 系雌及びその野生型雄) に PSBA (0、500 mM) を 3 日間飲水投与する伴性劣性致死試験が実施されており、伴性劣性致死発生率の増加は認められなかったとされている。(参照 4 1)

(遺伝子突然変異を指標とするその他の試験)

Suzuki & Suzuki (1988) の報告によれば、PSBA についての RSa を用いた Na⁺/K⁺-ATPase 遺伝子座突然変異によるウアバイン耐性獲得を指標とする遺伝子突然変異試験 (最高濃度 0.9 mg/mL) が実施されており、突然変異の誘発は認められなかったとされている。(参照 4 9)

(b) 染色体異常を指標とする試験

(げっ歯類を用いる小核試験)

Eckhardt ら (1980) の報告によれば、NMRI マウス (各群雌雄各 4 匹) に PSBA を 2 日間強制経口投与 (胃内挿管) 又は腹腔内投与する *in vivo* 骨髄小核試験 (経口 0、1,000 mg/kg 体重/日、腹腔内 0、400、1,000 mg/kg 体重/日) が実施されており、いずれにおいても小核多染性赤血球の割合の有意な増加は認められなかったとされている。(参照 4 1)

e. CBSA 及び CBSA-NH₄

(a) 遺伝子突然変異を指標とする試験

Poncelet ら (1979) の報告によれば、CBSA 又は CBSA-NH₄ についての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1530、TA1535、TA1537 及び TA1538) を用いた復帰突然変異試験 (最高濃度: 代謝活性化系 (Arochlor 1254 又はフェノバルビタール投与ラット由来) 存在下 1,000 mM、代謝活性化系非存在下 100 mM) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。(参照 6 2)

Poncelet ら (1980) の報告によれば、*p*-CBSA についての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1530、TA1535 及び TA1538) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 0.04 mol/plate) が実施されている。その結果、被験物質は TA98 及び TA1538 に対し細胞毒性を示したが、

自然発生によるものを上回る復帰突然変異頻度の誘発は認められなかったとされている。(参照 6 6)

Herbold (1981) の報告によれば、*o*-CBSA 又は *p*-CBSA についての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535 及び TA1537) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 2.5 mg/plate) では、いずれも代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。(参照 4 3)

Riggin ら (1983) の報告によれば、*o*-CBSA についての細菌 (*S. typhimurium* TA98) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 2 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系存在下で陰性であったとされている。(参照 1 7)

(b) 染色体異常を指標とする試験

Masubuchi ら (1978) の報告によれば、*o*-CBSA についての CHO-K1 を用いた染色体異常試験 (最高濃度 0.4 mg/mL) が実施されており、代謝活性化系非存在下で陰性であったとされている。(参照 5 5)

f. BIT

(a) DNA 損傷を指標とする試験

(微生物を用いる DNA 修復試験)

Zani ら (1991) の報告によれば、BIT についての細菌 (*Bacillus subtilis* H17 (*rec*⁺) 及び M45 (*rec*⁻)) を用いた DNA 修復試験 (孢子寒天法) (最高用量 1.2 mg/disk) が実施されており、代謝活性化系非存在下で陰性であったとされている。(参照 6 9)

Ozaki ら (2004) の報告によれば、BIT (純度 100%) についての細菌 (*B. subtilis* H17 (*rec*⁺) 及び M45 (*rec*⁻)) を用いた DNA 修復試験 (孢子寒天法) (最高用量 0.0060 mg/disk) が実施されており、代謝活性化系非存在下で陽性であったとされている。(参照 7 0)

(*in vivo* UDS 試験)

SCCNFP (2004) の報告書によれば、BIT (BIT として 0、375、750 mg/kg 体重) を単回経口投与した Wistar ラットから投与 2 時間後又は 16 時間後に摘出した肝臓の細胞を用いる *in vivo* UDS 試験が実施されている。その結果、UDS の誘発は認められなかったとされている。(参照 7 1)

(コメット試験)

Ozaki ら (2004) の報告によれば、BIT (純度 100%) についての HL-60 を用いたコメット試験 (最高濃度 0.0050 mg/mL) が実施されており、陽性であったとされている。(参照 7 0)

(b) 遺伝子突然変異を指標とする試験

(微生物を用いる復帰突然変異試験)

Riggin ら (1983) の報告によれば、BIT についての細菌 (*S. typhimurium* TA98) を用いた復帰突然変異試験 (観察対象とした最高用量 0.01 mg/plate¹⁵⁾) が実施されており、代謝活性化系存在下で陰性であったとされている。(参照 17)

Zani ら (1991) の報告によれば、BIT についての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535 及び TA1537) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 0.5 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。(参照 69)

SCCNFP (2004) の報告書によれば、BIT (純度 99.02%) についての細菌 (*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535 及び TA1537 並びに *E. coli* WP2 *uvrA* pKM101) を用いた復帰突然変異試験 (OECD TG471) (最高用量 0.175~0.180 mg/plate) が実施されているが、被験物質の毒性のために低用量のみでの観察となっており、SCCNFP は本試験結果を評価に用いることはできないとしている。(参照 71)

(遺伝子突然変異を指標とするその他の試験)

SCCNFP (2004) の報告書によれば、BIT (純度 99.02%) についての CHO-K1 を用いた HGPRT 遺伝子座に係る前進突然変異試験 (OECD TG476) (最高濃度 0.0052 mg/mL) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず遺伝子突然変異の誘発は認められなかったとされている。(参照 71)

(c) 染色体異常を指標とする試験

(ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験)

SCCNFP (2004) の報告書によれば、BIT (純度 99.02%) についての CHO-K1 を用いた染色体異常試験 (OECD TG473) (最高濃度: 代謝活性化系非存在下 0.0050 mg/mL、代謝活性化系存在下 0.0064 mg/mL) が実施されており、代謝活性化系非存在下の全濃度群及び代謝活性化系存在下の最高濃度群でのみ染色体異常の誘発が認められたとされている。(参照 71)

(げっ歯類を用いる小核試験)

SCCNFP (2004) の報告書によれば、MF1 マウスに BIT (BIT として 0、63.15、126.3、210.5 mg/kg 体重/日) を 2 日間強制経口投与 (胃内挿管) する *in vivo* 骨髄小核試験 (OECD TG474) が実施されており、小核多染性赤血球の有意な増加は認められなかったとされている。(参照 71)

g. NMS

Riggin ら (1983) の報告によれば、NMS についての細菌 (*S. typhimurium* TA98) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 2 mg/plate)

¹⁵ 0.1 mg/plate では細胞毒性が見られたとされている。

が実施されており、代謝活性化系存在下で陰性であったとされている。(参照 17)

h. MA

(a) DNA 損傷を指標とする試験

(微生物を用いる DNA 修復試験)

FAS56 においても引用されている小田ら (1978) の報告によれば、MA についての細菌 (*B. subtilis* H17 (*rec*⁺) 及び M45 (*rec*⁻)) を用いた DNA 修復試験 (ストリーク法) (最高用量 0.023 mg/disk) が実施されており、代謝活性化系非存在下で陰性であったとされている。(参照 72、73)

FAS56 においても引用されている兪 (1985) の報告によれば、MA についての細菌 (*B. subtilis* H17 (*rec*⁺) 及び M45 (*rec*⁻)) を用いた DNA 修復試験 (孢子寒天法) (最高用量 0.02 mL/disk) が実施されており、代謝活性化系非存在下で弱い陽性であったとされている。(参照 72、74)

(UDS 試験)

FAS56 においても引用されている Yoshimi ら (1988) の報告によれば、MA についてのラット初代培養肝細胞を用いた UDS 試験 (最高濃度 1 mM) が実施されており、陰性であったとされている。(参照 72、75)

(b) 遺伝子突然変異を指標とする試験

FAS56 においても引用されている Kasamaki ら (1982) の報告によれば、MA についての細菌 (*S. typhimurium* TA98 及び TA100) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 0.5 mg/palte) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。(参照 72、76)

Shimizu & Takemura (1983) の報告によれば、MA についての細菌 (*S. typhimurium* TA97、TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538 及び TA2637 並びに *E. coli* WP2 *uvrA* 及び WP2 *uvrA*/pKM) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 5 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。なお、代謝活性化系存在下の TA98 にノルハルマンを添加したところ復帰突然変異の誘発が認められたとされている。(参照 77)

Riggin ら (1983) の報告によれば、MA についての細菌 (*S. typhimurium* TA98) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 2 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系存在下で陰性であったとされている。(参照 17)

兪 (1985) の報告によれば、MA についての細菌 (*E. coli* WP2 *uvrA*)

を用いた復帰突然変異試験（最高用量 2.0 mg/plate）が実施されており、代謝活性化系非存在下で陰性であったとされている。（参照 7 4）

FAS56 においても引用されている Mortelmans ら（1986）の報告によれば、MA（純度 99%）についての細菌（*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535 及び TA1537）を用いた復帰突然変異試験（観察対象とされた最高用量 1.8 mg/plate¹⁶）が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。（参照 4 5、7 2）

FAS56 においても引用されている藤田及び佐々木（1987）の報告によれば、MA についての細菌（*S. typhimurium* TA97 及び TA102）を用いた復帰突然変異試験（最高用量 1 mg/plate）が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。（参照 7 2、7 8）

(c) 染色体異常を指標とする試験

FAS56 においても引用されている Kasamaki ら（1982）の報告によれば、MA についての B241 を用いた染色体異常誘発性に係る試験（最高濃度 0.05 mM）が実施されており、染色体異常の増加が認められたとされている（参照 7 2、7 6）。JECFA は、本試験について、染色体異常頻度を最大化させた非標準的な試験であることを指摘している（参照 7 2）。

i. AS

(a) 遺伝子突然変異を指標とする試験

(5-AS)

Radford ら（1985）の報告によれば、5-AS についての細菌（*S. typhimurium* TA98 及び TA100）を用いた復帰突然変異試験（最高用量 10 mg/plate）が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。（参照 2 0）

(6-AS)

Ashby ら（1978）の報告によれば、6-AS についての細菌（*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535 及び TA1538）を用いた復帰突然変異試験（最高用量 2.5 mg/plate）が実施されており、代謝活性化系存在下で陰性であったとされている。（参照 4 0）

Radford ら（1985）の報告によれば、6-AS についての細菌（*S. typhimurium* TA98 及び TA100）を用いた復帰突然変異試験（最高用量 10 mg/plate）が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。（参照 2 0）

(7-AS を含む混合物)

¹⁶ TA98、TA100 及び TA1535 並びに代謝活性化系（ラット肝由来 S9mix）非存在下の TA1537 については 1.8 mg/plate で細胞毒性が見られたため、観察対象は 1 mg/plate までとされている。

Radford ら (1985) の報告によれば、M 法でのサッカリンナトリウム製造時の不純物からサッカリン、OSBA、5-AS 及び 6-AS を除去し濃縮した物について、7-AS が含まれていることを確認した上で、細菌 (*S. typhimurium* TA98 及び TA100) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 10 mg/plate) が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。(参照 20)

j. その他

Stoltz ら (1977) の報告によれば、M 法で製造されたサッカリンナトリウム (Arnold ら (1980) のラットを用いた二世世代にわたる試験に用いられたものと同一ロット品) 水溶液の有機溶剤抽出物についての細菌 (*S. typhimurium* TA98、及び TA100) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 0.3 mL/plate) が実施されており、代謝活性化系の存在下で陽性であったとされている。Stoltz らは、抽出に用いた有機溶剤のみの対照群及び一度有機溶剤抽出に供したサッカリンナトリウムの有機溶剤再抽出物群については陰性であり、様々な組成の有機溶剤群のいずれについても陽性であったとしている。また、Stoltz らは、その他のロットの M 法製サッカリンナトリウム及び様々なロットの RF 法製サッカリンナトリウムについて代謝活性化系存在下で TA98 を用いて試験を実施したところ、陰性のロットもあったとしている。(参照 39)

③ 遺伝毒性のまとめ

a. サッカリン類

サッカリン類に DNA 損傷誘発性が認められたとの報告はあるものの、生体内の生理学的な pH 条件下においては易溶性の陰イオンとして存在しており DNA への親和性は無視しうると考えられる。細菌を用いる復帰突然変異試験は陰性であり、さらに、*in vivo* トランスジェニック動物突然変異試験の結果も陰性であることから、遺伝子突然変異誘発性はない。サッカリンナトリウムについては *in vitro* 試験で弱い染色体異常誘発性が認められたが、*in vivo* 試験では陰性であった。サッカリンカルシウムについても *in vitro* で認められた染色体異常誘発性は、高濃度においてのみであり、既知見より弱いものと考えられる。したがって、いずれについても生体にとって特段問題となる染色体異常誘発性の証拠は得られていない。以上を総合的に判断すると、本委員会としては、サッカリン類には生体にとって特段問題となる遺伝毒性はないものとする。

b. 不純物

OTSA、PTSA、OSBA、PSBA、CBSA、CBSA-NH₄、BIT 及び MA に、生体にとって特段問題となる遺伝毒性はないものとする。また、NMS 及び AS 類については、微生物を用いた復帰突然変異試験のみが行われていて、いずれも陰性の結果であった。以上より総合的に判断すると、本委員会としては、サッカリン類の不純物 (表 1 (11 頁) 参照) に、生体にとって特段問題となるような遺伝毒性の証拠は得られていないものとする。

(2) 急性毒性

① サッカリンナトリウム

サッカリンカルシウムを被験物質とした急性毒性に関する試験成績を確認することは出来なかった。サッカリンナトリウムを被験物質とした急性毒性に関する試験成績としては表2のような報告がある。

表2 急性毒性に関する試験成績概要 (サッカリンナトリウム)

投与経路	動物種	LD ₅₀ (mg/kg 体重)	参照
経口	Wistar ラット	14,200	10, 79
経口	Mongrel ラット	17,000	10, 79
経口	マウス	17,500	10, 79
経口	ハムスター (雄)	7,400 (8日間投与)	10
	(雌)	8,700 (8日間投与)	
経口	ウサギ	5,000~8,000	10

② 不純物

OTSA、PTSA、BIT 及び MA に関する試験成績として表3のような報告がある。

表3 急性毒性に関する試験成績概要 (不純物)

不純物	投与経路	動物種	LD ₅₀ (mg/kg 体重)	参照	
OTSA	経口	ラット (雄)	2,000 超	80	
		(雌)	1,000~2,000		
PTSA	経口	ラット (雌雄)	2,000 超	81	
		ラット	2,330	82	
BIT	経口	ラット (雄)	2,100 ⁽¹⁷⁾	71における引用	
		(雌)	1,050		
MA	経口	ラット	2,910	83	
		マウス	3,900		
		モルモット	2,780		
		ラット	3,000		31における引用
		モルモット	4,000		
		ラット	5,825		72における引用

(3) 反復投与毒性及び発がん性

① サッカリン類

サッカリン類を被験物質とした反復投与毒性及び発がん性に関する試験成績として以下のような報告がある。

なお、Clayson & Cooper (1970) のレビューによれば、膀胱の一部分を尿に触れないように外科的処置して既知の膀胱発がん物質を経口投与すると尿に触れない部分には腫瘍の発生がないこと等から、膀胱発がん物質又はその代謝物は血流ではなく尿路によって作用部位に運ばれるとの考え方が当時既にほぼ確立されている。(参照84)

また、Chapman (1969) の報告によれば、体重 100~150 g の Long Evans ラット、Holtzman ラット及び F344 ラット (匹数不詳) に 2-AAF (0.05%) を 1 年間混餌投与する試験が実施されている。その結果、投与開始 7 か月後以降生存した動物 153 匹のうち、剖検時に線虫 *Trichosomoides crassicauda* への感染がなかった 78 匹には膀胱腫瘍の発生は認められなかったが、感染が認められた 75 匹中 5 匹には膀胱腫瘍の発生が認められたとされている。

¹⁷ 被験物質の含量は 82.3% (ほかに水分 17.7%) とされている。

肝臓、乳腺及び聴覚器での腫瘍発生率は *T. crassicauda* 感染の影響を受けなかったとされている。以上より Chapman は、*T. crassicauda* への感染がラットの膀胱腫瘍の誘発要因となる可能性を指摘している（参照 85）。以下の試験成績のいくつかにおいても、膀胱腫瘍の発生と寄生虫の有無との関係について検討がなされている。

a. ラット

(a) Fitzhugh ら (1951) のラット 2 年間試験

IARC73 及び FAS17 においても引用されている Fitzhugh ら (1951) の報告によれば、21 日齢の Osborne-Mendel ラット (各群雌雄各 10 匹) にサッカリン (製法及び純度不詳) (0、1、5%) を最長 2 年間混餌投与する試験が実施されている。その結果、5% 投与群の雌雄で腹部リンパ肉腫が 7/18 匹 (性別匹数不詳) に認められたとされている。膀胱についての病理組織学的検査は行われていない (参照 5、10、86)。IARC ワーキンググループは、動物数が少ないことを含め、不適切な試験であると指摘している (参照 5)。本委員会としては、IARC ワーキンググループの指摘を是認し、本試験成績を評価に用いないこととした。

(b) Taylor ら (1968) のラット 38 日間試験

FAS17 においても引用されている Taylor ら (1968) の報告によれば、体重 75~100 g のラット (週齢不詳) (各群雌雄各 14 匹) にサッカリンナトリウム (0、0.5% ; 0、約 400 mg/kg 体重/日) を 38 日間混餌投与し、39 日目にと殺して肝臓及び腎臓について剖検及び病理組織学的検査を行う試験が実施されている。その結果、対照群を含む各群 4 匹が試験中に死亡したとされている。一般状態については、対照群を含む全群に下痢が見られたが、各群間で行動に明らかな差は認められなかったとされている。体重については、投与群に摂餌量の低下を伴う顕著な増加抑制が見られたが、摂餌効率については対照群との差は認められず、これについて Taylor らは忌避によるものと推定している。剖検及び病理組織学的検査においては、投与群の肝臓及び腎臓に炎症性及び水腫性の病変 (程度不詳) が見られたとされている。これについて Taylor らは、下痢及び脱水による物理的影響か、当該ラット固有の疾患に関連したものではないかと推定している。JECFA は、本試験成績について、肝臓及び腎臓の病変の程度が報告されていないことを指摘している (参照 10、79)。本委員会としては、病理組織学的検査の詳細な結果が確認できないことから、本試験成績を評価に用いないこととした。

(c) Lessel (1971) のラット 2 年間試験

IARC73 においても引用されている Lessel (1971) の報告によれば、Boots-Wistar ラット (週齢不詳) (各群雌雄各 20 匹) に RF 法で製造されたサッカリン (純度不詳) (0、0.005、0.05、0.5、5%) を 2 年間混餌投与する試験が実施されている。その結果、体重については、5% 投与群の雌雄で投与開始後 6 か月間の増加抑制が認められ、本試験では摂餌量の記録が行われていないものの、Lessel は 5% 投与群の摂餌量は他の投与群よりも明らかに多かったとしている。投与開始 18 か月後の時

点で対照群の雄 15 匹及び雌 14 匹、5%投与群の雌雄各 10 匹が生存しており、剖検のみで腫瘍発生率を見たところ、被験物質の投与に関連した腫瘍発生の増加は認められなかったとされている。なお、膀胱に寄生虫は認められなかったとされている（参照 5、87）。病理組織学的検査については、剖検で異常が見られた 5 匹のみでの実施にとどまっている。本委員会としては、本試験条件下においてサッカリンの投与に起因する発がん性は認められなかったと判断した。

(d) Schmähl (1973) のラット生涯投与発がん性試験

IARC73 においても引用されている Schmähl (1973) の報告によれば、70~90 日齢の SD ラット（各群雌雄各 52 匹）に RF 法で製造されたサッカリンナトリウム（純度不詳）（0、0.2、0.5%；0、83、210 mg/kg 体重/日）を生産にわたって混餌投与する試験が実施されている。その結果、生存率、体重、血液学的検査、血圧及び組織学的検査（膀胱及び心臓）において被験物質の投与に関連した影響は認められなかったとされている。悪性腫瘍の発生率については、雌雄で差がなく、雌雄合わせて対照群で 13/98 匹、0.2%投与群で 11/94 匹、0.5%投与群で 16/93 匹と対照群と投与群との間に差は認められなかったとされている。また、悪性腫瘍の発生までに要した期間についても、対照群と投与群との間で差は認められなかったとされている。最も多く見られた悪性腫瘍は細網肉腫、悪性血管内皮腫及びリンパ肉腫であったが、いずれの発生率についても対照群と投与群との間に差は認められなかったとされている。なお、膀胱腫瘍の発生は対照群を含む全群で認められておらず、膀胱に寄生虫（*Strongyloides* 属及び *Capillaria* 属）の感染の痕跡が認められた動物は全体の 16%であったとされている（参照 5、88）。本委員会としては、Schmähl の結論を是認し、本試験条件下においてサッカリンナトリウムの投与に起因する腫瘍の発生は認められなかったと判断した。

(e) Ulland ら (1973) のラット 18 か月間試験

IARC73 においても引用されている Ulland ら (1973) の報告によれば、SD ラット（週齢及び各群匹数不詳）にサッカリン（製法、純度及び用量不詳）を 18 か月間投与（投与経路不詳）し、投与終了後 6 か月間の観察を行う試験が実施されている。その結果、対照群及び投与群ともに良性腫瘍の発生率の高値が見られ、発生部位は主に下垂体及び乳腺であったとされているが、腫瘍の種類及びその他の病理組織学的検査結果の詳細は報告されていない（参照 5、89）。IARC ワーキンググループは、不適切な試験であると指摘している（参照 5）。本委員会としては、本試験の結果に関してデータの確認ができないことから、本試験成績を評価に用いないこととした。

(f) Tisdell ら (1974) のラットを用いた二世世代にわたる試験

IARC73 及び FAS17 においても引用されている Tisdell ら (1974) の報告によれば、離乳 SD ラット (F₀) に RF 法で製造されたサッカリン

ナトリウム (純度不詳¹⁸⁾) (0, 0.05, 0.5, 5%; 0, 25, 250, 2,500 mg/kg 体重/日¹⁹⁾) を混餌投与 (飼料: Purina Lab Chow) し、その後交配し、雌については妊娠及び哺育期間中も投与を継続し、得られた児動物 (F₁) (各群雌雄各 20 匹) には離乳後最長 100 週間 F₀ と同様の投与を行い、F₁ における腫瘍発生等を観察する試験が実施されている。その結果、体重については、F₁ の 5% 投与群で投与 9 週に F₀ と同様の増加抑制が見られたが、投与 13 週までには他の群と同様になったとされている。剖検においては、F₁ の 0.05% 以上の投与群の雄で腎炎/腎症の発生率の高値が認められたとされている。病理組織学的検査においては、非腫瘍性病変として、5% 投与群の雄で糸球体萎縮の発生率の増加が認められている。腫瘍性病変としては、甲状腺腺腫が F₁ 雌の 0.05% 投与群で 1 匹、0.5% 投与群で 1 匹、5% 投与群で 2 匹に、子宮扁平上皮癌が F₁ 雌の 0.05% 投与群で 1 匹、0.5% 投与群で 2 匹、5% 投与群で 2 匹に見られたとされている。膀胱移行上皮癌は F₁ 雄の 5% 投与群 7 匹のみに認められ、さらに、F₁ 雄の 0.5% 投与群 1 匹に、多数の核分裂を伴うことから前がん病変と考えられる膀胱移行上皮過形成が認められたとされている。なお、膀胱の寄生虫の有無については報告されていない。そのほか、生存率、一般状態、摂餌量及び血液学的検査において被験物質の投与に関連した変化は認められなかったとされている (参照 5、10、90)。本委員会としては、F₁ 5% 投与群雄の検索動物数は少ないが、統計学的に有意な 7/15 匹に膀胱腫瘍が認められていることから、膀胱腫瘍は雄ラットのみ誘発されるとの Tisdell らの結論を適切と判断した。一方、雌の投与群に見られた子宮の扁平上皮癌については、その発生頻度が統計学的に有意ではないので、サッカリンナトリウムの投与との関連性はないものと判断した。

(g) Munro ら (1975) のラット 26 か月間試験

IARC73 及び FAS17 においても引用されている Munro ら (1975) の報告によれば、体重 50~60 g の離乳 SD ラット (各群雌雄各 60 匹) に RF 法で製造されたサッカリンナトリウム (純度不詳) (0, 90, 270, 810, 2,430 mg/kg 体重/日 (サッカリンとして)) を 26 か月間混餌投与 (飼料: カゼインを 20% 含有する配合飼料) する試験が実施されている。その結果、死亡率については、雄では投与開始 18 か月後の時点で対照群、270 mg/kg 体重/日投与群及び 810 mg/kg 体重/日投与群ともに 40/60 匹を上回る動物が生存していたのに対し、2,430 mg/kg 体重/日投与群では 30/60 匹前後の生存にとどまり、Munro らは、用量に関連した死亡率の増加が認められたとしている。一方、雌ではそのような増加は認められなかったとされている。体重については、2,430 mg/kg 体重/日投与群の雌雄で、投与 10 週前後から下記の軽度の下痢に一部関連したと思われる、摂餌量低下を伴わない増加抑制が認められたとされている。一般状態については、2,430 mg/kg 体重/日投与群の雌雄で腸炎の病理所見を伴わない軽度の下痢がほぼ全投与期間にわたって見られたとされて

¹⁸ FAS17 における引用によれば、Stavric ら (1973) は、Tisdell ら (1974) が用いた被験物質は OTSA を最大 4,660ppm 含有していたとしている。

いる。この下痢について Munro らは、被験物質の投与に関連したものであり、体重増加抑制に一部関連していたと推定している。剖検及び病理組織学的検査においては、90 mg/kg 体重/日投与群の雄 1/51 匹及び雌 1/56 匹、810 mg/kg 体重/日投与群の雄 2/52 匹に膀胱移行上皮乳頭腫の発生が見られたが、当該腫瘍に侵襲性及びその他の悪性腫瘍の特徴は認められなかったとされている。また、リンパ腫/白血病の発生が対照群及び各投与群の雄 2/57 匹、2/51 匹、5/54 匹、2/52 匹及び 7/54 匹に見られたとされている。これについて Munro らは被験物質の投与に関連したものではないとしている。さらに、対照群を含む各群に散見された、尿道を通過しうる微細な膀胱結石については、被験物質の用量に関連したものではなく、膀胱移行上皮乳頭腫の発生との関連性も認められなかったとされている。尿及び膀胱から *T. crassicauda* は見いだされなかったとされている。そのほか、血液学的検査及び尿検査において被験物質の投与に関連した影響は認められなかったとされている(参照5、10、91)。本委員会としては、Munro らの結論を是認し、本試験条件下においてサッカリンナトリウムの投与に起因する腫瘍の発生は認められなかったと判断した。

(h) Furuya ら (1975) のラット 28 か月間試験

IARC73 及び FAS17 においても引用されている Furuya ら (1975) の報告によれば、Wistar ラット (週齢不詳) (各群雄 54~56 匹) にサッカリンナトリウム (製法及び純度不詳) (0、2,500 mg/kg 体重/日) を最長 28 か月間混餌投与する試験が実施されている。その結果、死亡率の増加は認められなかったが、投与群に有意な体重増加抑制が認められたとされている。膀胱腫瘍の発生は対照群及び投与群のいずれにおいても認められなかったとされている(参照5、10、92)。IARC ワーキンググループは、試験成績の報告が不十分であることを指摘している(参照5)。本委員会としては、詳細なデータの確認ができないことから、本試験成績を評価に用いないこととした。

(i) Kennedy ら (1976) のラット 13 週間試験

FAS17 においても引用されている Kennedy ら (1976) の報告によれば、離乳 SD ラット (各群雌雄各 10 匹) について、対照群のほか、表 4 のような混餌投与群を設定し、13 週間の投与を行う試験が実施されている。その結果、⑥群の雄 1 匹が投与 2 週に死亡したが、これは呼吸器感染によるものと推定されている。そのほか、一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、器官重量 (肝臓、腎臓、脾臓、生殖器、心臓及び脳) 並びに剖検及び病理組織学的検査において被験物質の投与に関連した変化は認められなかったとされている(参照 10、93)。本委員会としては、本試験における NOAEL を、雌雄ともに本試験の最高用量である 2% と評価した。

表4 Kennedyら(1976)の試験における群設定

群	用量
①	サッカリンナトリウム 2%
②	OSBA 2%
③	σ CBSA-NH ₄ 2%
④	サッカリンナトリウム 0.01%+OSBA 0.045%+ σ CBSA-NH ₄ 0.045%
⑤	サッカリンナトリウム 0.05%+OSBA 0.225%+ σ CBSA-NH ₄ 0.225%
⑥	サッカリンナトリウム 0.2%+OSBA 0.9%+ σ CBSA-NH ₄ 0.9%

(j) Homburger (1978) のラット 2年間試験

IARC73及びFAS17においても引用されているHomburger(1978)の報告によれば、約8週齢のSDラット(各群雄25匹)について、対照群のほか、モンサント社製サッカリンナトリウム(OTSAを345ppm含有)及びメルク社製サッカリンナトリウム(不純物含量不詳)からそれぞれ実験室で製造したサッカリン(1、5%)を混餌投与する群を設定し、2年間の投与を行う試験が実施されている。なお、投与開始6か月以内に死亡した動物については放棄したとされている。その結果、剖検において異常が見られた組織・器官のすべて及び各群12匹以上の組織・器官について行った病理組織学的検査において、膀胱、下垂体、乳腺及び皮下組織において腫瘍の発生が見られたが、それらの発生率は対照群を含む各群間で同様であったとされている。各サッカリン投与群で膀胱腫瘍の発生が見られた動物数については、第一の試験における1%投与群で乳頭腫1匹、5%投与群で組織学的異型度の低い非侵襲性移行上皮癌1匹、第二の試験における1%投与群で移行上皮癌1匹、5%投与群で0匹であったとされている(参照5、10、94)。IARCワーキンググループは、試験成績の報告が不十分であることを指摘している(参照5)。本委員会としては、IARCワーキンググループの指摘を是認し、本文と表で記載内容が一致しておらず、毒性試験報告としては不適切であることから、本試験成績を評価に用いないこととした。

(k) Anderson (1979) のラット 4週間試験

IARC73及びFAS17における引用によれば、Anderson(1979)は、離乳雄SDラットにサッカリンナトリウム(0、1、3、5、7.5%)を4週間混餌投与する試験を実施している。その結果、尿pHの低下、尿量及び糞便中水分含量の増加、糞便中へのナトリウム及びカリウムの排泄量の増加並びに尿中へのカルシウム、マグネシウム及びリン酸の排泄量の増加が見られたとしている。また、5%以上の投与群に一過性の下痢が見られ、用量相関性の尿中アンモニア及び糞便臭の減少が見られたとされている(参照5、10)。本委員会としては、病理組織学的データ等を確認することができないことから、本試験におけるNOAELを評価することはできないと判断した。

(l) Chowanec & Hicks (1979) のラット 2年間試験

IARC73においても引用されているChowanec & Hicks(1979)の報告によれば、8週齢のWistarラットについて、対照群(雄55匹、雌50匹)のほか、RF法で製造されたサッカリンナトリウム(OTSAを

698ppm含有)を飲水投与(雄75匹、雌50匹;2,000 mg/kg体重/日+塩化アンモニウム(0、0.5%(当初4週間のみ1%))又は混餌投与(飼料:Standard 41B Laboratory Rat Diet)(雌雄各75匹;4,000 mg/kg体重/日)する群を設定し、2年間の投与を行う試験が実施されている。その結果、体重については、サッカリンナトリウム2,000 mg/kg体重/日飲水投与群及び4,000 mg/kg体重/日混餌投与群に顕著な増加抑制が認められ、飲水量については、飲水投与群で減少し、混餌投与群では増加したとされている。尿検査においては、2,000 mg/kg体重/日飲水投与群の雄で、尿pHが投与27週までに7.0を超過(数匹で8.5~9.0に達した。)し、うち3匹で顕著な結晶尿が見られたが、塩化アンモニウム併用群では認められなかったとされている。4,000 mg/kg体重/日混餌投与群雄を含めその他の群では尿pHが6.0~6.5であったとされている。投与開始85週後以降の全投与群の雌雄で尿路移行上皮過形成(軽度)の発生率⁽¹⁹⁾の増加が見られ、4,000 mg/kg体重/日混餌投与群の雌雄では膀胱(11/90匹⁽¹⁹⁾)及び腎臓(22/90匹⁽¹⁹⁾)のいずれにおいても有意な増加(p<0.05)が認められたが、2,000 mg/kg体重/日飲水投与群の雌雄では腎臓(19/101匹⁽¹⁹⁾)においてのみ有意な増加(p<0.05)が認められたとされている。病理組織学的検査では、全投与群の雌雄で腎の直尿細管における血管拡張の発生率の増加が認められたとされている。過形成発生と結晶尿との間に一貫性のある相関性は見出されなかったとされている。一方、腫瘍性病変としては、投与開始85週後以降に、2,000 mg/kg体重/日飲水投与群の雄の尿管(1/64匹⁽¹⁹⁾)及び雌の腎盂(1/37匹⁽¹⁹⁾)並びに4,000 mg/kg体重/日混餌投与群の雄の膀胱(3/49匹⁽¹⁹⁾)に腫瘍の発生が認められ、その膀胱腫瘍が見られた3匹には何らかの鉍質沈着が随伴して認められたとされているが、いずれについても有意な増加は認められていない。なお、膀胱に寄生虫は認められなかったとされている。そのほか、乳腺、子宮、脾臓、精巣、皮膚及び皮下組織の腫瘍並びにリンパ腫及び白血病が投与群に散見されたが、発生率の有意な増加が認められたものはなかったとされている(参照5、95)。IARCワーキンググループは、対照群によく見られるリンパ腫及び白血病が見られていないこと及び病理組織学的検査が不十分であることを指摘している(参照5)。本委員会としては、腎臓内に微小結石が雄の対照群で2/52匹、2,000 mg/kg体重/日飲水投与群で30/71匹、4,000 mg/kg体重/日混餌投与群で16/70匹に見られているにもかかわらず、組織学的検査では膀胱上皮の増殖性病変発生頻度に用量相関性が認められていないというChowaniec & Hicksの報告内容を是認することはできなかった。IARCワーキンググループも指摘しているように、病理組織学的検査が不十分であるとみなさざるを得ないと判断した。したがって、本委員会としては、本試験成績を評価に用いないこととした。

(m) Taylorら(1980)のラットを用いた二世代にわたる試験

IARC73及びFAS17においても引用されているTaylorら(1980)の報告によれば、離乳SDラット(F₀)(各群雄10匹、雌20匹)にRF

¹⁹ 投与85週の時点での生存動物数を分母として算出されている。

法で製造されたサッカリンナトリウム（純度不詳、OTSA を約 350ppm 含有）（0⁽²⁰⁾、0.01、0.1、1.0、5.0、7.5% ; 0、5、50、500、2,500、3,750 mg/kg 体重/日相当）を交配（約 10 週齢時）、妊娠及び出産を経て児動物の離乳まで混餌投与（飼料不詳）した後にと殺し、得られた児動物（F₁）（各群雌雄各 48 匹）についても離乳後から各投与群で生存率が 20% になるまで F₀ と同様の混餌投与を行い、対照群の生存率が 20% になった時点⁽²¹⁾で全生存動物をと殺する試験が実施されている。その結果、生存率、血液学的検査及び器官重量については被験物質の投与に関連した影響は認められなかったとされている。体重については、F₁ の 5.0% 以上の投与群の雌雄の離乳時に低値が見られ、その後も F₁ の 7.5% 投与群の雄に増加抑制が認められたが、その摂餌効率に影響は認められなかったとされている。非腫瘍性病変として慢性肺疾患、慢性腎炎、腎杯ポリープ症等が各群に見られたが、これらについて Taylor らは、加齢ラットに見られる典型的なものであり、被験物質の投与に関連したものではないとしている。F₁ の 7.5% 投与群の雌で膀胱ドーム/中部移行上皮における限局性の単純過形成の発生率の有意な増加が認められ、雄でも統計学的に有意ではないが増加傾向が見られたとされている。これについて Taylor らは、関連性は明らかでないが加齢に伴って発生率が顕著に増加していること、形態学的には前がん病変ではないことを指摘している。F₁ の雄の膀胱腫瘍発生率⁽²²⁾は、対照群で 1/29 匹（3%）、5.0% 投与群で 1/21 匹（5%）、7.5% 投与群で 7/23 匹（30%）⁽²³⁾と、7.5% 投与群で対照群よりも有意に増加したとされている。また、5.0% 以下の投与群では癌の発生は認められなかったとされている。一方、F₁ 雌の膀胱腫瘍発生率は、対照群で 0/24 匹、5.0% 投与群で 0/28 匹、7.5% 投与群で 2/31 匹（移行上皮ポリープ及び移行上皮癌各 1 匹）（6%）と有意な増加は認められなかったとされている。投与開始後 18 か月間以上生存した動物の膀胱に寄生虫及び結石は見られず、中間と殺又は切迫殺され、結石が見られた動物の膀胱に過形成又は腫瘍の発生は認められなかったことから、Taylor らは、*T. crassicauda* 及び結石は本試験における膀胱腫瘍の発生に寄与しなかったとしている（参照 5、10、96）。IARC ワーキンググループは、7.5% 投与群雄での膀胱移行上皮限局性過形成の発生率の増加に有意差が認められなかったのは、おそらく対照群雄での発生率が高かったためであろうと指摘している（参照 5）。本委員会としては、雌の 7.5% 投与群で増加している膀胱の単純過形成は前がん病変ではないとの Taylor らの見解を是認し、また、同群の 1 匹に発現している膀胱移行上皮癌の発現頻度は統計学的に有意ではないことから、雌における膀胱増殖性病変誘発とサッカリンナトリウムの投与との関連性は否定できると判断した。

(n) Arnold ら（1980）のラットを用いた二世世代にわたる試験
IARC73 及び FAS17 においても引用されている Arnold ら（1980）

²⁰ 基礎飼料に、サッカリンナトリウム 5% 相当量のナトリウムを炭酸ナトリウムとして添加したものとされている。

²¹ 離乳の約 28 か月後であったとされている。

²² 投与開始 18 か月後の時点で生存していて病理組織学的検査を受けた動物の数を分母として腫瘍発生率が算出されている。

²³ 膀胱腫瘍 7 匹の内訳は、膀胱移行上皮癌 4 匹、移行上皮乳頭腫 2 匹及び移行上皮ポリープ 1 匹であったとされている。

の報告によれば、32日齢のSDラット (F_0) (各群雌雄各50匹) にM法で製造されたサッカリンナトリウム (水溶性不純物を40~50ppm、OTSAを0.05ppm未満含有) (0、5% ; 0、2,500 mg/kg 体重/日相当) を混餌投与 (飼料: Master Laboratory Cubes) し、投与開始90日後に各群内で雌雄を1:1で1週間交配し、妊娠、出産及び哺育を経て142週まで投与を継続した後に殺するとともに、得られた児動物 (F_1) (各群雌雄各49~50匹) についても、生後21日に離乳後、 F_0 と同様の投与を投与127週まで継続した後に殺する試験が実施されている。その結果、一般状態については、 F_0 及び F_1 ともに5%投与群で水分に富んだ糞便が観察されている。体重については、 F_0 及び F_1 の5%投与群の雌雄で被験物質の投与に関連した増加抑制が認められたとされている。また、20か月齢となった F_1 の対照群及び5%投与群 (各群のうち雌雄各10匹) について24時間摂水量及び24時間尿を検査した結果、5%投与群の雌雄ともに、摂水量及び尿量が1.5~2倍に増加し、尿中へのナトリウム及びリンの排泄量が有意に増加し、尿浸透圧は低下したとされている。尿pHについては雌の対照群と5%投与群との間で有意差は認められなかったとされている。5%投与群の雄ではカルシウムの排泄量の有意な増加も認められたとされている。尿中のクレアチニン、塩素及びカリウムについては雌雄ともに変化が認められなかったとされている。 F_0 及び F_1 の5%投与群の高齢動物 (特に雄) の尿については、ミルク状に濁った外観を呈し、羊毛状の沈渣 (酢酸で溶解したためリン酸塩であると推定されている。) が認められたとされている。そのほか、生存率及び血液学的検査において、被験物質の投与に関連した異常は認められなかったとされている。肉眼的観察では腎臓及び膀胱に結石が散見されたが、フィルターを用いた尿ろ過物の観察では全群に結石が認められ、結石の構成成分についても被験物質の投与に関連した一定の傾向は認められなかったとされている。全動物について実施された病理組織学的検査においては、膀胱における腫瘍性病変として、 F_0 の雄では、良性腫瘍 (膀胱移行上皮乳頭腫) が対照群で1/36匹に対し5%投与群で4/38匹、悪性腫瘍 (膀胱移行上皮癌) が対照群で0/36匹に対し5%投与群で3/38匹に認められ、その良性腫瘍と悪性腫瘍を合算した発生率は対照群よりも有意に高かったとされている ($p < 0.03$)⁽²⁴⁾。なお、 F_0 の雌には膀胱の良性腫瘍及び悪性腫瘍のいずれの発生も認められなかったとされている。また、 F_1 の雄では、良性腫瘍 (膀胱移行上皮乳頭腫) が対照群で0/42匹に対し5%投与群で4/45匹、悪性腫瘍 (膀胱移行上皮癌) が対照群で0/42匹に対し5%投与群で8/45匹に認められ、悪性腫瘍発生率及び全腫瘍発生率はともに対照群よりも有意に高かったとされている ($p < 0.002$ 及び $p < 0.01$)。雌では良性腫瘍の発生は見られなかったが、悪性腫瘍 (膀胱移行上皮癌) が対照群で0/45匹に対し5%投与群で2/49匹に認められたとされている⁽²⁵⁾。膀胱移行上皮の過形成の発生頻度については、雌の対照群と5%投与群との間で有意な差はなか

²⁴ F_0 については、最初に腫瘍が観察された投与開始87週後の時点での生存動物数 (雄は対照群36匹及び投与群38匹、雌は対照群38匹及び投与群40匹) を分母として腫瘍発生率が算出されている。

²⁵ F_1 については、最初に腫瘍が観察された投与開始67週後の時点での生存動物数 (雄は対照群42匹及び投与群45匹、雌は対照群45匹及び投与群49匹) を分母として腫瘍発生率が算出されている。

ったとされている。F₀でも被験物質の投与に関連した膀胱癌の発生が認められたことについて、Arnoldらは、(i) 投与開始時期 (32日齢) が早い (他の試験では6週齢以降) こと、(ii) 投与期間が長く (30~32か月間)、かつ、生存率が良好であったこと等によるものではないかと考察している。なお、本試験において、膀胱に結石が散見されたが、被験物質の投与及び腫瘍発生との関連は認められず、用いられたラットの膀胱に線虫の寄生は認められなかったとされている (参照5、10、97)。本委員会としては、F₁の5%投与群の雌に認められた膀胱移行上皮癌は、その発生頻度に有意差がないこと及びその前がん病変の発生頻度についても有意な増加は見られなかったことから、偶発的なものであり、サッカリンナトリウムの投与に起因するものではないと判断した。

(o) Schmähl & Habs (1980) のラットを用いた二世世代にわたる試験

IARC73においても引用されている Schmähl & Habs (1980) の報告によれば、SD ラット (週齢不詳) (F₀) (各群雌 5~7 匹) にサッカリン (化学形不詳) (OTSA を 10ppm 未満含有) (0、200、1,000、5,000 mg/kg 体重) を妊娠 14 日、17 日及び 20 日に前夜絶飲食させた上で強制経口投与 (胃内挿管) し、得られた児動物 (F₁) を生涯観察した後に剖検 (全組織・器官) 及び病理組織学的検査 (膀胱及び剖検で異常が見られた組織・器官のみ) を行う試験が実施されている。その結果、F₀ 母動物に毒性影響は認められなかったとされている。F₁ 児動物の生後 4 日間死亡率は、対照群で 0/59 匹、200 mg/kg 体重/日投与群で 5/61 匹、1,000 mg/kg 体重/日投与群で 4/62 匹であったのに対し、5,000 mg/kg 体重/日で 9/69 匹と増加が認められ、これについて Schmähl & Habs は被験物質の投与に関連した影響であるとしている。F₁ の投与群の生存期間は被験物質の用量に応じて延長する傾向が見られたが、対照群を含む各群間で生存期間に有意な差は認められなかったとされている。F₁ の投与群に見られた腫瘍については、対照群でも見られていたもの又は当該動物種で通常見られるものであり、被験物質の投与に関連した発生率の増加及び種類の差異は認められなかったとされている。特に、膀胱癌の発生は認められなかったとされている。IARC ワーキンググループは、試験成績の報告が不十分であることを指摘している (参照5、98)。本委員会としては、病理組織学的検査データ等についての報告が不十分であることから、本試験成績を評価に用いないこととした。

(p) Hooson ら (1980) のラット二段階膀胱発がん試験

IARC73においても引用されている Hooson ら (1980) の報告によれば、離乳 Wistar ラット (対照群雌 63 匹、各投与群雌 50 匹) について、表5の①~⑦群を設定し、MNU (0、最大 1.5mg) を飽和水溶液 0.15 mL として尿道カテーテルにより単回膀胱内滴下するイニシエーション段階の処置の2週間から2年間のプロモーション段階の投与を飲水により行う試験 I が実施されている。また、試験 I の開始 6 か月後に、離乳 Wistar ラット (各群雌 50 匹) について、表5の⑧~⑩群を設定し、MNU (0、最大 1.5mg) を①~⑦群と同様に処置した8日後から2年間のプロモーション段階の投与を混餌により行う試験 II が実施されて

いる。その結果、⑧群 (MNU 無処置サッカリン投与群) の全腫瘍発生率は⑥群 (対照群) と同様であったとされている。膀胱腫瘍の発生は認められず、⑧群の 1/49 匹に限局性の膀胱移行上皮過形成 (中等度) が認められたとされているが、その統計学的有意性については報告されていない。MNU 処置により膀胱に増殖性病変が発生したが、②群 (MNU 処置 M 法製サッカリン投与群) 及び④群 (MNU 処置 RF 法製サッカリン投与群) のいずれにおいても①群 (MNU 処置対照群) と比較して膀胱癌の発生率の増加は認められなかったことから、RF 法製サッカリン及び M 法製サッカリンのいずれについても本試験において膀胱発がんプロモーション作用は認められなかったとされている。なお、本試験においてはサッカリンの投与による尿 pH の上昇並びに尿中の結石及び結晶の生成は認められず、膀胱に寄生虫は認められなかったとされている。(参照 5、99)。IARC ワーキンググループは、動物が離乳後数週間は通常飼料を与えられた後に本試験に供されたことを指摘している (参照 5)。本委員会としては、本試験条件下においてサッカリンに膀胱発がんプロモーション作用は認められなかったと判断した。

表 5 Hooson ら (1980) のラット二段階膀胱発がん試験における群設定

群	イニシエーション段階	プロモーション段階 (2年間)
①	MNU 最大 1.5 mg 単回処置	対照
②	MNU 最大 1.5 mg 単回処置	M 法製サッカリン 2,830 mg/kg 体重/日飲水投与
③	MNU 最大 1.5 mg 単回処置	OTSA 0.13 mg/kg 体重/日飲水投与
④	MNU 最大 1.5 mg 単回処置	RF 法製サッカリン 3,250 mg/kg 体重/日飲水投与
⑤	MNU 最大 1.5 mg 単回処置	OTSA 70 mg/kg 体重/日飲水投与
⑥	無処置	対照
⑦	無処置	OTSA 70 mg/kg 体重/日飲水投与
⑧	無処置	M 法製サッカリン 1,740 mg/kg 体重/日混餌投与
⑨	MNU 最大 1.5 mg 単回処置	OTSA 70 mg/kg 体重/日混餌投与
⑩	無処置	OTSA 70 mg/kg 体重/日混餌投与

(q) Nakanishi ら (1980) のラット 32/40 週間試験

IARC73 においても引用されている Nakanishi ら (1980) の報告によれば、10 週齢の F344 ラット (各群雄 30 匹、雌 31~32 匹) にサッカリンナトリウム (純度 99.5%超、OTSA 約 7ppm 含有) (0、0.04、0.2、1、5% ; 0、20、100、500、2,500 mg/kg 体重/日相当) を 32 週間混餌投与する試験が実施されている。その結果、膀胱移行上皮に単純過形成、乳頭状/結節状過形成及び乳頭腫は認められなかったとされている。また、別途 12 週齢の Wistar ラット (対照群雄 18 匹、投与群雄 32 匹) にサッカリンナトリウム (純度 99.5%超、OTSA 約 7ppm 含有) (0、5%) を 32 週間混餌投与する試験 I 及び 8 週齢の Wistar ラット (対照群雄 18 匹、投与群雄 24 匹) に同じ被験物質 (0、5%) を 40 週間混餌投与する試験 II が実施されている。その結果、対照群に過形成の発生は認められなかったが、試験 I 及び II の 5% 投与群でそれぞれ単純過形成が 10/26 匹及び 11/21 匹に、乳頭状過形成・乳頭腫が 5/26 匹及び 9/21 匹に認められたとされている。以上の F344 ラットを用いた試験結果と Wistar ラットを用いた試験結果との違いについて、Nakanishi らは感受性における系統差の存在を指摘している (参照 5、100、101)。本委員会としては、サッカリンナトリウムの膀胱に対する感受性が

F344 ラットと Wistar ラットで異なるという Nakanishi らの結論は適切であると判断した。

(r) Fukushima & Cohen (1980) のラット最長 18 週間経時試験

IARC73 における引用によれば、Fukushima & Cohen (1980) は、6 週齢の雄 F344 ラットにサッカリンナトリウム (5% ; 2,500 mg/kg 体重/日相当) を混餌投与し、投与開始 1、3、5、7、9、12、15 又は 18 週後に 3 匹ずつをと殺する経時試験を実施している。その結果、膀胱移行上皮において、投与開始 3 週後には空胞変性が、投与開始 5 週後には単純過形成が認められ、投与開始 9 週後までには有糸分裂像、過形成巣及び多形性微絨毛を伴い、過形成の程度が増大したとしている。 [³H]チミジン標識率は投与群で常時増加しており、対照群の 5~8 倍に達したとしている (参照 5)。本委員会としては、報告された種々の変化はサッカリンナトリウムの投与に起因するものと判断した。

(s) Murasaki & Cohen (1981) のラット 10 週間試験

IARC73 における引用によれば、Murasaki & Cohen (1981) は、5 週齢の F344 ラット (各群雄 3~4 匹) にサッカリンナトリウム (0.1、0.5、1、2.5、5%) を 10 週間混餌投与したところ、2.5%以上の投与群において [³H]チミジン標識率、過形成並びに単一性及び多形性の微絨毛の用量相関性の増加が認められたとしている。IARC ワーキンググループは、動物数が少ないことを指摘している (参照 5)。本委員会としては、IARC ワーキンググループの指摘を是認し、動物数は少ないものの、過形成の発生が用量依存的であり、チミジン標識率増加の結果とも一致していることから、本試験における軽度の過形成の発生はサッカリンナトリウムの投与に起因するものと判断した。

(t) Lawson & Hertzog (1981) のラット最長 50 週間試験

IARC73 における引用によれば、Lawson & Hertzog (1981) は、3 週齢の雄 SD ラットにサッカリンナトリウム (7.5% ; 3,750 mg/kg 体重/日相当) を最長 50 週間混餌投与しても、投与開始 1 週、15 週及び 50 週の時点での膀胱移行上皮における [³H]チミジン標識率の増加は認められなかったとしている。 (参照 5)

(u) Demers ら (1981) のラット 104 週間試験

IARC73 における引用によれば、Demers ら (1981) は、5 週齢の雄 F344 ラットについて、サッカリンナトリウム (5% ; 2,500 mg/kg 体重/日相当) を混餌投与する群並びに投与 0 週又は 4 週に FANFT 又は L-トリプトファンを並行して処置する群を設定し、104 週間投与を行う試験を実施している。その結果、被験物質の投与に関連した摂水量の増加と、それに伴う尿量の増加及び下痢が認められたとしている。尿中ナトリウム濃度の変化及び結石の生成は認められなかったとしている。唯一認められた異常は、投与初期の 3 か月間に認められた尿 pH の上昇であったとしている (参照 5)。本委員会としては、本試験において 5%投与群で認められた下痢はサッカリンナトリウムの投与に起因する変化と

判断した。

(v) West & Jackson (1981) のラット 16 週間試験

IARC73 における引用によれば、West & Jackson (1981) は、4 週齢の雄 SD ラットにサッカリンナトリウム (0、5% 混餌; 0、2,500 mg/kg 体重/日相当、4% 飲水; 2,000 mg/kg 体重/日相当) を 16 週間投与する試験を実施している。その結果、5% 混餌投与群では摂餌量及び摂水量、尿量、結晶性尿中沈渣並びに尿路上皮過形成 (軽度) の増加が認められたとしている。一方、4% 飲水投与群では尿浸透圧の増加が認められたとしている (参照 5)。本委員会としては、本試験において 5% 投与群で認められた尿路上皮過形成をサッカリンナトリウムの投与に起因する変化と判断した。

(w) Fukushima ら (1983) のラット最長 52 週間経時試験

IARC73 においても引用されている Fukushima ら (1983) の報告によれば、6 週齢の ACI ラット、Wistar ラット、F344 ラット又は SD ラット (対照群雄 40~45 匹、投与群雄 40~48 匹) にサッカリンナトリウム (純度 99.5% : OTSA を 7ppm 含有) (0、5%) を混餌投与 (飼料 : 対照群 Oriental MF、投与群 Oriental M) し、投与開始 12、24 又は 36 週後に各系統投与群 5 匹ずつを中間と殺し、ほかの生存動物については 52 週間の投与を終了した後にと殺する経時試験が実施されている。その結果、各系統投与群のいずれにおいても生存率に影響は見られなかったとされている。体重については、各系統投与群のいずれにおいても低値が認められたとされている。最終と殺群の病理組織学的検査においては、Wistar ラット、F344 ラット及び SD ラットの膀胱に病変は認められなかったとされている。一方 ACI ラットの膀胱については、対照群で単純過形成が 1/28 匹に見られたのに対し、投与群では単純過形成が 25/32 匹、乳頭状/結節状過形成が 20/32 匹、乳頭腫が 9/32 匹、癌が 3/32 匹に認められたとされている。なお ACI ラットについては、投与群の 1 匹に膀胱結石が見られ、対照群及び投与群ともに半数以上の動物の膀胱に *T. crassicauda* が見られたとされている。また、別途 6 週齢の F344 ラット (対照群雄 35 匹、投与群雄 50 匹) にサッカリンナトリウム (純度 99.5% : OTSA を 7ppm 含有) (0、5%) を混餌投与し、投与開始 0、4、8、12、16 又は 20 週後に投与群 5 匹ずつを中間と殺し、ほかの生存動物については 52 週間の投与を終了した後にと殺する経時試験が実施されている。その結果、体重については増加抑制が認められたとされている。走査型電子顕微鏡も用いた病理組織学的検査においては、投与開始 12 週後以降に中間と殺した投与群の 1/5~2/5 匹の膀胱移行上皮に単純過形成及び乳頭状/結節状過形成が見られたとされている。投与開始 4、12 又は 20 週後に中間と殺した投与群の膀胱粘膜の [methyl-³H] チミジン標識率を測定したところ、投与開始 20 週後に有意な増加が認められたとされている (参照 5、102)。IARC ワーキンググループは、試験期間が短いことを指摘している (参照 5)。本委員会としては、IARC ワーキンググループの指摘を是認するが、4 つの系統のラットを用いた 52 週間の投与では系統差が発現するという Fukushima らの結

論は適切であると判断した。

(x) Murasaki & Cohen (1983) の膀胱移行上皮凍結潰瘍処置ラット 2 週間試験

IARC73 における引用によれば、Murasaki & Cohen (1983) は、凍結潰瘍処置された雄 F344 ラットの膀胱移行上皮については、その後のサッカリンナトリウム (0、5%) の 2 週間混餌投与期間中は、対照群及び投与群のいずれにおいても過形成及び微絨毛の形成の程度は同様であったが、凍結潰瘍処置 2~8 週後には投与群において³H]チミジン標識率が増加したとしている (参照 5)。本委員会としては、本試験におけるサッカリンナトリウム 5%投与群における³H]チミジン標識率の増加は投与に起因する変化と判断したが、本試験成績については特殊な状況下で得られたものであることから評価に用いないこととした。

(y) Renwick & Sims (1983) のラット 1 か月間試験

IARC73 における引用によれば、Renwick & Sims (1983) は、雄 SD ラット成獣にサッカリンナトリウム (0、7.5% ; 0、3,750 mg/kg 体重/日相当) を 1 か月間混餌投与したところ、摂水量、合計尿量、排尿頻度及び平均尿量の増加が認められたとしている (参照 5)。本委員会としては、本試験は 1 用量のみの試験であることから、本試験における NOAEL の評価を行わなかった。

(z) Schoenig ら (1985) のラットを用いた二世代にわたる試験

IARC73 においても引用されている Schoenig ら (1985) の報告によれば、約 6 週齢の SD ラット (F₀) (各群雄 52~250 匹、雌 104~500 匹⁽²⁶⁾) に M 法で製造されたサッカリンナトリウム (純度 99%超) (0、1.0、3.0、4.0、5.0、6.25、7.5% ; 0、500、1,500、2,000、2,500、3,125、3,750 mg/kg 体重/日相当) を混餌投与 (飼料 : Purina Rodent Chow No.5001) し、投与開始 62 日後に各群内で雌雄を 2 : 1 で交配し、母動物には妊娠及び哺育期間中も投与を継続し、得られた児動物 (F₁) (各群雄 125~700 匹) には離乳後 (28~38 日齢) からいずれかの群の生存率が 20%になるまで (約 29 か月間) F₀ と同様の投与 (飼料については Purina Rodent Chow No.5002 に変更) を継続する試験が実施されている。加えて、(i) F₀ にその交配 4 日前から妊娠期間中サッカリンナトリウム (5.0%) を混餌投与し、出産後投与を中止して、哺育及び離乳を経た F₁ (以下この項において「妊娠中投与群」という。)、(ii) 哺育 1、2 及び 3 週目の F₀ にサッカリンナトリウムを 1.0、3.0 及び 5.0%混餌投与し、離乳後サッカリンナトリウムを 5.0%混餌投与された F₁ (以下この項において「出生後投与群」という。)、(iii) F₀ に馬尿酸ナトリウム⁽²⁷⁾ を 5.0%混餌投与し、馬尿酸ナトリウムを離乳後に 5.0%、8 週齢以降に

²⁶ Schoenig ら (1985) は、子宮内暴露相付き発がん性試験 3 報 (Tisdell ら (1974)、Taylor ら (1980) 及び Arnold ら (1980)) で雄ラット膀胱腫瘍の発生率増加が報告されていることから、雄ラット膀胱腫瘍発生機序、子宮内暴露相の意義等を確認するため、5.0%未満の投与群においては、既報の結果を勘案して、膀胱腫瘍発生率の統計学的に有意な増加を十分検出できるような数の動物を用いたとしている。

²⁷ サッカリンナトリウムと分子量及び体内動態が類似していることから選択したとされている。

は3.0%⁽²⁸⁾混餌投与されたF₁（以下この項において「馬尿酸塩投与群」という。）が設定されている。

F₀については、4か月間投与が行われた結果、3.0%以上の投与群の雌雄で摂餌量の低下を伴わない体重増加抑制及び同腹生存胎児数の減少、5.0%以上の投与群の雌雄で水分を含んだ多量の糞便、摂水量及び尿量の増加並びに朝の新鮮尿pHの低下が認められたとされている。生存率及び行動に被験物質の投与の影響は認められなかったとされている。F₀の妊娠中投与群では、摂水量が低下したほかは5.0%投与群と同様の変化が認められたが、F₀の出生後投与群では何ら変化が認められなかったとされている。F₀の馬尿酸塩投与群では雌雄ともに体重増加抑制が見られたが、サッカリンナトリウム投与群とは異なり摂餌量の低下を伴っていたとされている。また、F₀の馬尿酸塩投与群で摂水量及び尿量の増加並びに朝の新鮮尿pHの低下が認められたが、サッカリンナトリウム5.0%以上の投与群よりも程度は小さかったとされている。F₀の馬尿酸塩投与群でも同腹生存胎児数の減少が認められたほか、哺育中の死亡及び攻撃的行動の増加が認められたとされている。

離乳前のF₁（雄）については、5.0%以上の投与群に貧血が認められ、F₁（雄）の馬尿酸塩投与群には奇形及び哺育中死亡率の高値が認められたとされている。離乳後のF₁（雄）については、3.0%以上の投与群に、下痢ではないが多量の又は軟らかい糞便が認められたとされている。F₁（雄）の5.0%及び7.5%投与群で生存率の高値が認められたとされている。体重については、F₁（雄）の全投与群（妊娠中投与群を除く。⁽²⁹⁾）に哺育期間中の低値が認められたとされている。特にF₁（雄）の3.0%以上の投与群での低値は、摂餌量の低下を伴わず、かつ、全投与期間にわたって継続していたことから、明らかに被験物質の投与に関連したものであるとされている。これについてSchoenigらは、哺育期間中にF₀の7.5%投与群の摂餌量が約3倍に増加して、最大19 g/kg体重/日に達したことが、離乳前のF₁（雄）の5.0%以上の投与群の貧血や7.5%投与群の低体重といったF₁（雄）の高用量群児動物の衰弱に関連していると考察している。摂水量については、F₁（雄）の3.0%以上の投与群に摂水効率の増加を伴う高値が認められ、F₁（雄）の出生後投与群においてもF₁（雄）の5.0%投与群と同程度の高値が認められたとされている。尿検査においては、投与開始後3か月間にF₁（雄）の3.0%以上の投与群及び出生後投与群で朝の新鮮尿pHの低下が認められたが、投与開始6か月後以降にはそのような低下は見られなくなったとされている。また、F₁（雄）の3.0%以上の投与群及び出生後投与群でほぼ全投与期間にわたって尿量の増加及び尿浸透圧の低下が認められたとされている。器官重量については、F₁（雄）の3.0%以上の投与群及び出生後投与群に膀胱の絶対重量及び相対重量の増加⁽³⁰⁾が認められたが、F₁（雄）の1.0%投与群、妊娠中投与群及び馬尿酸塩投与群にはそのような変化は認

²⁸ 5%混餌投与により新生児期及び離乳期に毒性が認められたため、3%混餌投与に減量されている。

²⁹ 妊娠中投与群でも離乳後10週間一時的な体重の低値が見られたが、これについてSchoenigらは、離乳までは体重に影響は見られなかったことから、離乳時にF₁投与動物の無作為選抜を行った際に比較的体重の低い動物が選ばれたためであると考察している。

³⁰ 乳頭状/結節状過形成又は腫瘍が見られた動物は比較の対象から除外されている。

められなかったとされている。これについて Schoenig らは、尿量の増加のほか、通常の光学顕微鏡による組織学的検査では把握できない平滑筋肥大との関連性を指摘している。剖検では、膀胱移行上皮以外の組織・器官に変化は認められなかったとされている。膀胱移行上皮においては、F₁ (雄) の 3.0%以上の投与群で腫瘍が認められたが、F₁ (雄) の馬尿酸塩投与群には認められなかったとされている。病理組織学的検査 (F₁のみ実施) において、非腫瘍性病変としては、対照群を含む各群に同様の発生率で膀胱炎が認められたほか、膀胱移行上皮の単純過形成発生の増加傾向が見られたとされている。しかしながら、「軽微」と分類されたものを除いた単純過形成の発生率 (2.7%) は、本試験に用いた動物種対照群に通常見られる発生率の範囲内であったとされている。腫瘍性病変としては、原発性の膀胱移行上皮腫瘍に関して、F₁ (雄) の 4.0%以上の投与群全体での良性腫瘍発生率、悪性腫瘍発生率及び全腫瘍発生率並びに F₁ (雄) の 3.0%投与群での全腫瘍発生率に増加が認められたとされている。一方、F₁ (雄) の 1.0%投与群での全腫瘍発生率³¹⁾ (5/658 匹 ; 0.8%) は、対照群のそれ (0/324 匹 ; 0%) と差がなく、当該試験施設での類似の試験における対照群発生率背景データ (0.8%) と同等であったとされている。さらに、F₁ (雄) の 1.0%投与群の 5 匹に認められた腫瘍は F₁ (雄) の 3.0%以上の投与群に認められたものよりも実質的に小さかったこと等から、Schoenig らは、本試験における膀胱腫瘍の発生増加に係る NOEL を 1.0%混餌としている。なお、Schoenig らは、F₁ (雄) の高用量群の生存期間は対照群よりも長く、投与群で腫瘍発生の認められた動物の生存期間は腫瘍発生の認められなかった動物のそれと同様であったことから、本試験においてサッカリンナトリウムの投与により発生した膀胱腫瘍は生命を脅かすようなものではないことを指摘している。また、膀胱での腫瘍発生率と鉍質沈着発生率との間に相関性は認められなかったが、膀胱腫瘍発生の有無と尿量の増加及び尿浸透圧の低下との間に相関性が認められたとされている。これについて Schoenig らは、膀胱腫瘍が発生した動物では、サッカリンナトリウムの吸収によって摂水量が増加して体内循環に多くの水が取り込まれ、上記のような生理学的変化が生じたと推定している。さらに、F₁ (雄) の出生後投与群には膀胱移行上皮腫瘍発生率の増加が認められたのに対し、F₁ (雄) の妊娠中投与群にはその増加が認められなかったことから、Schoenig らは、本試験において子宮内暴露相が膀胱移行上皮腫瘍の発生増加にほぼ関与しなかったと考察している。なお、続発性・転移膀胱移行上皮腫瘍の発生率は対照群を含む各群で同様であったとされている。被験物質の投与に関連した腎臓での過形成及び腫瘍の発生は認められなかったが、1.0%以上の投与群、出生後投与群及び馬尿酸塩投与群に腎臓鉍質沈着の増加が認められたとされている。他方、妊娠中投与群の腎臓鉍質沈着は対照群と同様であったとされている。Schoenig らは、馬尿酸塩投与群でサッカリンナトリウム投与群と同様の沈着が見られたことから、この腎臓鉍質沈着は尿中に多量の鉍質が排泄されたことに関連したものであると考察している。尿管及び尿道には、被験物質

³¹⁾ 膀胱腫瘍の発生が初めて認められた 15 か月齢時点での生存動物数を分母として腫瘍発生率が算出されている。

の投与に関連した病変は認められなかったとされている（参照5、103）。IARC ワーキンググループも、1.0%投与群で被験物質の投与に関連した影響はないことを指摘している。さらに、Squire (1985) が発現した膀胱腫瘍について再度鏡検した結果、有意な増加は4.0%投与群以上であったことを根拠に、3.0%投与群で膀胱移行上皮癌の発生率に有意な増加がないこと¹ ($p=0.25$) を指摘している（参照5）。本委員会としては、IARC ワーキンググループの指摘を是認し、3.0%投与群での膀胱腫瘍発生率にも有意差は見られないことから、本試験における膀胱腫瘍発生に係る NOAEL を3.0%と評価した。また、本委員会としては、3.0%以上の投与群の雌雄で認められた摂餌量の低下を伴わない体重増加抑制及び同腹生存胎児数の減少を投与に起因する変化であると判断し、また、鉍質沈着は馬尿酸塩投与群でも認められたことからサッカリン特有の変化ではないとの Schoenig らの見解を是認し、本試験における腫瘍発生以外の毒性に係る NOAEL を1.0%と評価した。

(a') Schoenig & Anderson (1985) のラットを用いた二世代にわたる試験

IARC73 における引用によれば、Schoenig & Anderson (1985) は、二世代にわたる試験において、7週齢のSDラット (F_0) 及びその児動物 (F_1) にサッカリンナトリウム (0、1、3、5、7.5% ; 0、500、1,500、2,500、3,750 mg/kg 体重/日相当) 又はナトリウムの影響を見るための対照群として馬尿酸ナトリウム (5%) を混餌投与する試験を実施している。その結果、サッカリンナトリウム投与群では、尿量の増加、尿中ナトリウム濃度の増加、尿浸透圧の低下並びに尿中のカリウム及び亜鉛濃度の低下といった尿の生理学的変化のほか、膀胱重量並びに膀胱の水分及びミネラル含量の増加が認められたとしている。馬尿酸ナトリウム投与群でも類似の影響が見られたが、程度はサッカリンナトリウム投与群よりも弱かったとしている。別途設定した出生後直後からの投与群でも同様の変化が認められたが、同じく別途設定した子宮内暴露のみ（出生後は暴露なし）投与群ではそのような変化は認められなかったとしている。性差としては、雌では盲腸重量の増加が認められ、雄では尿中のサッカリンナトリウム及び鉍質の濃度の高値が認められたとしている。5%以上のサッカリンナトリウム投与群の雄では尿中のナトリウム、カリウム、マグネシウム及び亜鉛の濃度が有意に増加したが、そのような増加は同群の雌には認められなかったとしている。Schoenig & Anderson は、本試験において認められたような尿の生理学的変化がサッカリンナトリウム高濃度混餌投与ラットでの膀胱腫瘍発生増加の原因として重要な役割をもつと指摘している（参照5）。本委員会としては、サッカリンナトリウム7.5%投与群に特段の異常所見が見られなかったことから、本試験における NOAEL を、雌雄ともに本試験の最高用量である7.5%と評価した。

(b') Hibino ら (1985) のラット112週間試験

IARC73 においても引用されている Hibino ら (1985) の報告によれば、7週齢のF344ラット（対照群雄31匹、投与群雄68匹）にサッカリンナトリウム (0、5%) を混餌投与（飼料：Oriental MF）し、数回

の中間と殺を経て、投与 112 週の投与終了後に最終と殺する試験が実施されている。その結果、体重については、投与 20 週以降の投与群に増加抑制が認められたとされている。剖検及び病理組織学的検査において、膀胱の単純過形成が、対照群では投与開始 4 週後中間と殺群の 2/6 匹、20 週後中間と殺群の 1/5 匹及び 100 週後中間と殺群の 1/7 匹に散見されたが、投与群ではいずれの中間と殺群においても約 2/3 の動物に認められたとされている。また、膀胱の乳頭状/結節状過形成が、投与開始 8、12、20、80 及び 112 週後中間と殺投与群の約 1/3 の動物に認められたが、対照群では認められなかったとされている。なお、膀胱移行上皮の乳頭腫及び癌は対照群及び投与群のいずれにも認められなかったとされている。また、膀胱に *T. crassicauda* は認められなかったとされている。投与開始 90 週以降の中間と殺投与群 20 匹及び同対照群 11 匹の胃を検査したところ、投与群の 20/20 匹に境界縁の過角化症、5/20 匹に乳頭腫、4/20 匹に腺胃の潰瘍が認められたとされているが、対照群及び投与群ともに扁平上皮癌及び腺癌の発生は認められなかったとされている（参照 5、104）。IARC ワーキンググループは、各群の胃のサンプリングが不完全であることを指摘しており、原著を見る限り胃乳頭腫についての Hibino らの判定には同意できないとしている（参照 5）。本委員会としては、IARC ワーキンググループの指摘のとおり、Hibino らの胃乳頭腫の判定は是認できないものと結論した。したがって、サッカリンナトリウムの投与により胃腫瘍を誘発したとする本試験成績について適切な評価を行うことはできないと判断した。

(c') Fukushima ら (1986) のラット 24 週間試験

IARC73 における引用によれば、Fukushima ら (1986) は、雄 F344 ラットに、サッカリンナトリウム、サッカリン、アスコルビン酸又はアスコルビン酸ナトリウム（各 0、5%；0、2,500 mg/kg 体重/日相当）を混餌投与し、投与 8、16 及び 24 週の尿 pH、尿中ナトリウム濃度、膀胱移行上皮過形成の有無及び走査型電子顕微鏡も用いた病理組織学的変化を見る試験を実施している。その結果、光学顕微鏡を用いた検査では投与 24 週の時点で変化は認められなかったが、走査型電子顕微鏡を用いた検査では、投与 24 週の時点のサッカリンナトリウム投与群の 1/5 匹及び投与 8 週の時点のアスコルビン酸ナトリウム投与群の 1/5 匹の膀胱において、それぞれ軽微な多形性微絨毛が認められたとしている。そのほか、サッカリンナトリウム投与群及びアスコルビン酸ナトリウム投与群には単一性の短い微絨毛や縄状又は葉状の microridge（中等度）が認められたが、サッカリン投与群及びアスコルビン酸投与群には見られなかったとしている。さらに、サッカリンナトリウム投与群及びアスコルビン酸ナトリウム投与群では尿 pH が上昇したが、サッカリン投与群ではそれが逆に低下し、アスコルビン酸投与群では尿 pH が対照群と同程度であったとしている。また、サッカリンナトリウム及びアスコルビン酸ナトリウム投与群では尿中ナトリウム排泄量が増加したが、サッカリン投与群及びアスコルビン酸投与群では増加しなかったとしている（参照 5）。本委員会としては、サッカリンナトリウム 5% 投与群に見られた種々の変化は、アスコルビン酸ナトリウム投与群にも見られたこと

から、サッカリンイオンに起因したものではないと結論した。

(d') Hasegawa & Cohen (1986) のラット 10 週間試験

FAS32 においても引用されている Hasegawa & Cohen (1986) の報告によれば、5 週齢の F344 ラット (各群雄 6 匹) にサッカリンカルシウム、サッカリンナトリウム、サッカリン又はサッカリンカリウム (各 0、5% ; 0、2,500 mg/kg 体重/日⁽²⁾) を 10 週間混餌投与し、と殺 1 時間前に [methyl-³H]チミジン (1 mCi/kg 体重) を腹腔内投与して被験物質投与による膀胱移行上皮細胞増殖への影響を検討する試験が実施されている。その結果、一般状態については、全投与群に水分の多い糞便が見られ、サッカリンカルシウム投与群及びサッカリン投与群に投与開始後 2~3 週間重篤な下痢が認められたとされている。体重については、全投与群に若干の増加抑制が見られ、摂水量については、全サッカリン塩投与群で増加、サッカリン投与群では弱い増加が認められたとされている。血液生化学的検査においては、血中のカリウム、カルシウム及びナトリウムの濃度に投与群間で差は認められなかったとされている。尿検査 (投与 7 日及び 28 日に実施) においては、サッカリンナトリウム投与群でナトリウムイオン濃度の高値、サッカリンカルシウム投与群及びサッカリン投与群ではカルシウムイオン濃度の高値 (投与 28 日のみ) が認められたとされている。また、投与 7 日及び 28 日の投与後 4 時間尿中サッカリン濃度については、投与 28 日のサッカリン投与群でサッカリンカリウム又はサッカリンカルシウム投与群よりも高値が認められたほか、全群で見ると、投与 7 日で 0.18~0.21 mmol/mL、投与 28 日で 0.14~0.19 mmol/mL とおおむね同様であったとされている。いずれの動物にも膀胱結石は認められなかったとされている。病理組織学的検査においては、サッカリンナトリウム投与群での膀胱単純過形成の発生率は、対照群やサッカリン投与群よりも有意に高かったとされている。なお、サッカリンナトリウム投与群の膀胱移行上皮には微絨毛が認められたとされている。膀胱移行上皮細胞の [³H]チミジン標識率については、サッカリンナトリウム投与群 (0.6%)、次いでサッカリンカリウム投与群 (0.2%) で有意な増加が認められた一方で、サッカリンカルシウム投与群 (0.1%) 及びサッカリン投与群 (0.07%) では増加が認められなかったとされている。以上より、Hasegawa & Cohen は、尿中サッカリン濃度と膀胱移行上皮細胞増殖能との間に相関性は認められなかったことから、サッカリンが尿中に存在するだけではラット膀胱移行上皮細胞増殖を増強するのに十分ではないことが示唆されたとしている (参照 23、105)。本委員会としては、Hasegawa & Cohen の結論を妥当と判断した。

(e') Tatematsu ら (1986) のラット 21 日間試験

IARC73 における引用によれば、Tatematsu ら (1986) は、7 週齢の雄 F344 ラットにサッカリンナトリウム (0、5% ; 0、2,500 mg/kg 体重/日相当) を 21 日間混餌投与したところ、投与群の膀胱における [³H]チミジン標識率及びオルニチンデカルボキシラーゼ活性が対照群の約 5 倍になったとしている。(参照 5)

(f') Sakata ら (1986) 及び Yu ら (1992) のラット二段階膀胱発がん試験 IARC73 における引用によれば、Sakata ら (1986) 及び Yu ら (1992) は、ラット二段階膀胱発がん試験において、脂質酸化防止剤 (アスピリン及びノルジヒドログアイアレチン酸) がサッカリンナトリウムの膀胱発がんプロモーション作用を阻害したとしている。この結果から、サッカリンナトリウムの膀胱発がんプロモーション作用には酸化的傷害が関わっていることを指摘している (参照5)。本委員会としては、本試験はサッカリンナトリウムの反復投与毒性又は発がん性を検討したものであることから、本試験成績を評価に用いないこととした。

(g') Anderson ら (1988) のラット 10 週間試験

IARC73 及び FAS32 における引用によれば、Anderson ら (1988) は、離乳雄ラットにサッカリンナトリウム (5% ; 2,500 mg/kg 体重/日相当) 又は等モルのサッカリンカルシウム、サッカリン若しくはサッカリンカリウムを 10 週間混餌投与する試験を実施している。その結果、サッカリンナトリウム投与群及びサッカリンカリウム投与群には尿量の増加及び膀胱移行上皮単純過形成の発生が認められたが、サッカリンカルシウム投与群及びサッカリン投与群にはそのような変化は認められなかったとしている。これらの変化と、尿中サッカリン排泄量及び尿中サッカリン濃度との関連性は認められなかったとしている。また、各投与群間で盲腸重量及び盲腸+内容物の重量の増加に差は認められなかったとしている。FAS32 では、本試験成績により Hasegawa & Cohen (1986) の報告で得られた知見が実質的に確認できたとされている。(参照5、23)

(h') Garland ら (1989) のラット 10 週間試験

IARC73 においても引用されている Garland ら (1989) の報告によれば、5 週齢の F344 ラット (各群雄 10 匹) にサッカリンナトリウム (純度 99.9%) (0、5、7.5% ; 0、2,500、3,750 mg/kg 体重/日相当) を 3 種類の飼料 (Prolab 3200、NIH-07 又は AIN-76A) のいずれかを用いて 10 週間混餌投与し、と殺する試験が実施されている。その結果、膀胱移行上皮の ^3H チミジン標識率は、Prolab 3200 混餌において対照群で 0.05%であったのに対し 7.5%投与群で 0.43%、NIH-07 混餌において対照群で 0.04%であったのに対し 7.5%投与群で 0.14%と増加したが、AIN-76A 混餌においては対照群及び 7.5%投与群ともに 0.04%と増加しなかったとされている。病理組織学的には、Prolab3200 混餌 7.5%投与群で 9 例中 2 例に膀胱粘膜の過形成が見られたとされている。AIN-76A 混餌 7.5%投与群の投与 10 週の尿については、他の 2 飼料混餌投与群のそれと比較して、サッカリンナトリウム濃度及びカルシウム濃度が高く、カリウム濃度が低かったとされている。AIN-76A 混餌 7.5%投与群の尿 pH は 6.0 であり、Prolab 3200 混餌 7.5%投与群の 6.4 よりも低かったとされている。以上より、Garland らは、飼料の種類によってサッカリンナトリウムの細胞増殖増強作用は変化するとしている。(参照5、106)。本委員会としては、Garland らの見解を是認し、サッカリン

ナトリウムの投与による膀胱移行上皮の細胞増殖活性への作用は飼料の種類によって変化すると結論した。

(i') Fisherら (1989) のラット 10 週間試験

IARC73 における引用によれば、Fisherら (1989) は、5 週齢の雄 F344 ラットにサッカリンカルシウム又はサッカリンナトリウム (各 5% ; 2,500 mg/kg 体重/日相当) を Prolab3200⁽³²⁾又は AIN-76A を用いて 10 週間混餌投与する試験を実施している。その結果、サッカリンカルシウム Prolab3200 混餌投与群及びサッカリンナトリウム Prolab3200 混餌投与群のいずれにおいても尿 pH が 6.5 を超過したが、サッカリンカルシウム AIN-76A 混餌投与群及びサッカリンナトリウム AIN-76A 混餌投与群ではいずれにおいても尿 pH が 6.0 を下回ったとしている。尿中ナトリウム排泄量は、AIN-76A 混餌対照群及びサッカリンカルシウム AIN-76A 混餌投与群において最少であったとしている。また、サッカリンナトリウム Prolab3200 混餌投与群においては、サッカリンナトリウム AIN-76A 混餌投与群より尿中ナトリウム濃度が高かったとしている。(参照 5)

(j') Debiec-Rychter & Wang (1990) のラット最長 16 週間試験

IARC73 における引用によれば、Debiec-Rychter & Wang (1990) は、離乳雄 F344 ラットにサッカリンナトリウム (0、5% ; 0、2,500 mg/kg 体重/日) を 2 種類の飼料 (Wayne 又は AIN-76A) のいずれかを用いて最長 16 週間混餌投与する試験を実施している。その結果、AIN-76A 混餌において対照群及び投与群の尿 pH はともに 5.5~6.5 であったが、Wayne 混餌において投与群の尿 pH は 7.4 になったとしている。いずれの投与群においても^[3H]チミジン標識率は対照群の約 5 倍に増加したが、AIN-76A を用いた混餌投与群においては炭酸ナトリウム 2% を添加すると^[3H]チミジン標識率は 6~9 倍に増加したとしている。(参照 5)

(k') Cohenら (1990) のラット 10 週間試験

IARC73 における引用によれば、Cohenら (1990) は、4 週齢の雄 F344 ラットにサッカリンナトリウム (0、3、5、7.5% ; 0、1,500、2,500、3,750 mg/kg 体重/日相当) を混餌投与 (飼料 : Prolab3200) し、投与開始 4、7 又は 10 週後に^[3H]チミジンを注射し、その 1 時間後にと殺する試験を実施している。その結果、3%投与群では、^[3H]チミジン標識率及び過形成の増加は認められなかったが、細胞の壊死及び剥離が認められたとしている。5%投与群では、投与開始 10 週後に^[3H]チミジン標識率が 2 倍に増加し、広範囲にわたって細胞傷害が認められたとしている。7.5%投与群では、投与開始 4 週後に^[3H]チミジン標識率が 3 倍に増加し、投与開始 4 週後及び 10 週後に過形成の増加が認められたとしている。(参照 5)

(l') Hommaら (1991) のラット 80 週間試験

³² Prolab3200 は、ナトリウム、カルシウム、カリウム及びその他のほとんどのイオンを AIN-76A よりも多く含んでいるとされている。

IARC73 においても引用されている Homma ら (1991) の報告によれば、6 週齢の SD ラット (対照群雄 14 匹、投与群雄 36 匹) 又は無アルブミン血症ラット (SD ラット変異種) (対照群雄 12 匹、投与群雄 35 匹) にサッカリンナトリウム (0、5%) を 80 週間混餌投与する試験が実施されている。その結果、生存率及び体重に明らかな変化は認められなかったとされている。膀胱腫瘍の発生は認められなかったが、各系統の投与群各 2 匹の膀胱に単純過形成が見られたとされている (参照 5、107)。IARC ワーキンググループは、試験期間が 2 年間未満であることを指摘している (参照 5)。本委員会としては、IARC ワーキンググループの指摘を妥当と考え、本試験成績を評価に用いないこととした。

(m') Cohen ら (1991) のラット 4 週間試験

IARC73 における引用によれば、Cohen ら (1991) は、5 週齢の雄 F344 ラットにサッカリンナトリウム (7.5%; 3,750 mg/kg 体重/日相当) を混餌投与 (飼料: Prolab3200) し、投与開始 2 週後及び 4 週後にフィルターを用いて尿を採取する試験を実施している。その結果、対照群の尿中には典型的なリン酸結晶が見られた一方、投与群の尿中に見られた沈渣の約 1/2 はケイ酸を含有するギザギザの形状をしたものであり、当該ケイ酸含有結晶は尿路移行上皮表面の microabrasion の原因になったとしている。放射能標識サッカリンナトリウムを添加した尿をゲルろ過に供したところ、放射能を含むたん白画分 2 種類が得られ、一方は $\alpha_2\mu$ -グロブリンのサイズ、もう一方はアルブミンのサイズに合致したとしている。Cohen らは、pH が 6.5 超の尿中では、サッカリン-たん白複合体がケイ酸とともに沈渣を生成すると主張している (参照 5)。本委員会としては、サッカリンナトリウムの投与により形成される結晶に関する Cohen らの見解を妥当と判断した。

(n') Garland ら (1991、1993) のラットを用いた二世世代にわたる試験

IARC73 における引用によれば、Garland ら (1991、1993) は、Schoenig ら (1985) のラットを用いた二世世代にわたる試験のプロトコルでの消化管及び尿管の生理学的変化等を観察する試験を実施している。その結果、サッカリンナトリウム 7.5% 投与群 (7.5% 未満の投与群では測定せず) では、尿 pH、尿中カリウム濃度及び尿中カルシウム濃度の低下並びに尿量、尿中ナトリウム濃度、尿中マグネシウム濃度、尿中リン酸濃度及び尿中アンモニア濃度の増加が認められたとしている。また、サッカリンナトリウム 7.5% 投与群では貧血、血清コレステロール濃度の 50% 増加、血清トリグリセリド濃度の 10 倍増加並びに血清及び肝臓中ビタミン類濃度の減少が認められたが、7.5% 未満の投与群ではそのような変化は認められなかったとしている。Garland らは、これら生理学的変化等について、尿及び膀胱の変化を除き膀胱腫瘍の発生増加に関連性はないとし、それらの多くは食餌での鉄又は葉酸の補給により予防されたことから、鉄不足による貧血に関連したものであるとしている。なお、鉄又は葉酸の補給によって膀胱移行上皮の過形成の頻度が増大したとしている (参照 5)。本委員会としては、本試験において 7.5% 投与群に認められた種々の変化は鉄不足によるものであるとした

Garland らの見解を是認し、これらの変化はサッカリンナトリウムの投与の直接的な影響ではないと判断した。

(o') Cohen ら (1991) のラット二段階膀胱発がん試験

IARC73 においても引用されている Cohen ら (1991) の報告によれば、5 週齢の F344 ラット (各群雄 40 匹) について、表 6 のような対照群及び投与群を設定し、FANFT (0.2%) を 6 週間混餌投与するイニシエーション段階の処置の後、サッカリンカルシウム、サッカリンナトリウム、サッカリン等をプロモーション段階で 72 週間混餌投与する二段階膀胱発がん試験が実施されている。その結果、FANFT 無処置サッカリンナトリウム投与群で膀胱に単純過形成が見られたが、FANFT 無処置のサッカリンカルシウム、サッカリンナトリウム及びサッカリン投与群で膀胱腫瘍発生率の増加は認められなかったとされている。また、FANFT 処置サッカリンカルシウム投与群及び FANFT 処置サッカリン投与群に膀胱発がんプロモーション作用は認められず、サッカリンナトリウム投与群には用量依存的な膀胱発がんプロモーション作用が認められたがサッカリンナトリウム+塩化アンモニウム投与群では、尿の顕著な酸性化を認めるとともに膀胱発がんプロモーション作用の完全な阻害が認められたとされている。FANFT 処置サッカリンナトリウム投与群では FANFT 処置サッカリンカルシウム投与群よりも尿 pH が上昇していた一方で、FANFT 処置サッカリン投与群では低下していたとされている。なお、FANFT 0.2% 混餌投与処置についても、その処置期間中に尿 pH が上昇する一因となったとされている。FANFT 処置塩化ナトリウム投与群に弱い膀胱発がんプロモーション作用が認められたが、FANFT 処置炭酸カルシウム投与群には認められなかったとされている。しかしながら、FANFT 処置炭酸カルシウム投与群では FANFT 処置サッカリンナトリウム投与群よりも尿 pH が上昇したとされている。以上より、Cohen らは、サッカリンナトリウムの膀胱発がんプロモーション作用は尿 pH の 6.5 以上への上昇及び尿中ナトリウム濃度の増加により増強されるとしている (参照 5、108)。IARC ワーキンググループは、本試験について、一世代の試験としては投与期間が短いことを指摘している (参照 5)。本委員会としては、二段階発がん試験としての本試験の投与期間は妥当であり、Cohen らの結論は適切であると判断した。