

内 閣 府 食 品 安 全 性 委 員 会
平成 15 年度食品安全確保総合調査

アマメシバ粉末のラットを用いた反復投与毒性試験調査報告書

(平成 15 年度調査分)

平成 16 年 3 月

株式会社三菱化学安全科学研究所

目次

1. 要旨.....	4
2. 調査目的, 概要, 実施体制, 実施期間.....	5
2.1 調査目的.....	5
2.2 概要.....	5
2.2.1 表題.....	5
2.2.2 試験番号.....	5
2.2.3 試験目的.....	5
2.2.4 適用ガイドライン.....	5
2.2.5 適用 GLP	5
2.2.6 信頼性基準.....	6
2.2.7 試験委託者.....	6
2.3 実施体制.....	6
2.3.1 試験受託者.....	6
2.3.2 試験施設.....	6
2.3.3 外部委託.....	7
2.3.4 試験責任者.....	7
2.4 実施期間.....	7
3. 試験計画書の検討・作成について.....	9
4. 材料および方法.....	10
4.1 被験物質および媒体.....	10
4.1.1 被験物質.....	10
4.1.2 媒体.....	10
4.2 試験動物.....	11
4.2.1 動物種.....	11
4.2.2 系統.....	11
4.2.3 系統選択理由.....	11
4.2.4 微生物レベル.....	11
4.2.5 購入先.....	11
4.2.6 購入動物数.....	11
4.2.7 検疫・馴化.....	11
4.2.8 群分け.....	11
4.2.9 投与時週齢.....	11
4.2.10 投与時体重.....	12
4.2.11 動物の識別.....	12

4.2.12 余剰動物の処置.....	12
4.3 動物飼育.....	12
4.3.1 飼育室.....	12
4.3.2 飼育環境.....	12
4.3.3 飼育器材.....	12
4.3.4 飼料.....	13
4.3.5 飲用水.....	13
4.3.6 収容動物数.....	13
4.3.7 微生物モニタリング.....	13
4.4 投与.....	14
4.4.1 経路・方法.....	14
4.4.2 経路選択理由.....	14
4.4.3 方法選択理由.....	14
4.4.4 回数・期間.....	15
4.4.5 用量および用量の設定理由.....	15
4.4.6 投与液量.....	15
4.5 投与液の調製.....	15
4.5.1 方法・頻度.....	15
4.5.2 投与液の安定性の確認.....	15
4.5.3 投与液の濃度および均一性の確認.....	15
4.6 群構成.....	16
4.7 観察・測定項目.....	16
4.7.1 一般状態.....	16
4.7.2 体重.....	16
4.7.3 摂餌量.....	16
4.7.4 眼科学的検査.....	17
4.8 統計学的解析.....	17
4.9 コンピュータシステムの使用.....	17
5. 毒性試験調査について.....	19
5.1 被験物質の品質および夾雑物の確認.....	19
5.2 結果.....	19
5.2.1 一般状態.....	19
5.2.2 体重.....	19
5.2.3 眼科学的検査.....	19

添付資料-1	全体試験計画書「アマメシバ粉末のラットを用いた経口投与による 52 週間反復投与毒性試験」および試験計画書変更書.....	21
添付資料-2	「アマメシバ粉末のラットを用いた経口投与による 52 週間反復投与 毒性試験」におけるアマメシバ粉末の品質の確認（本試験）	49
添付資料-3	「アマメシバ粉末のラットを用いた経口投与による 52 週間反復投与 毒性試験」におけるアマメシバ粉末中の夾雑物分析（本試験） ...	55
Tables and Appendices.....		69

最終頁：109

1. 要旨

アマメシバ粉末の大量長期投与による安全性を調査する目的でラットを用いた 52 週間反復投与毒性試験を計画した。平成 15 年度分の調査は反復投与毒性試験の全体試験計画書の作成と、その計画に準拠した動物への投与の開始である。

全体試験計画書の試験概要は次の通りである。投与量は雌雄とも最高用量を 1000 mg/kg, 以下 500 および 250 mg/kg とし、対照群を含めた 4 用量を設定した。動物は雌雄とも 1 群 60 匹とし、投与 13 および 26 週経過後に雌雄各群 20 匹を中間解剖用、52 週経過後に雌雄各群 20 匹を最終解剖用と設定した。検査項目はアマメシバ粉末の肺への影響を調査する目的から特に肺を中心とした病理学的検査（器官重量・病理解剖検査・病理組織学的検査）、血液ガス分析およびメトヘモグロビン濃度分析としたが、その他に被験物質の全身への影響を調査するため毒性試験で通常実施される動物の一般状態、体重および摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、眼科学的検査を検査項目に加えた。

平成 15 年度の業務としては次の通り行った。アマメシバ粉末を入手し、投与開始前に試験に使用する全量を混合機に入れて同一な被験物質とし、冷蔵保存したものを試験に用いた。また、投与開始前にアマメシバ粉末の品質等を調べる目的で過酸化水素と夾雑物の分析を行ったが、試験に影響を及ぼすと考えられるような変化は認められなかった。投与開始は雄が 2004 年 3 月 18 日、雌が 2004 年 3 月 23 日で、2004 年 3 月 24 日迄に雄は計 7 回、雌は計 2 回ラット用胃ゾンデを装着したシリンジを用いて強制経口投与した。投与液はアマメシバ粉末を各群毎に注射用水に毎日懸濁させて調製し、投与液量は 1 匹あたり 7.5mL/kg とした。全動物を投与前と投与後の 2 回毎日観察し、投与開始日から体重と摂餌量の測定を開始した。その他に投与開始前に雌雄とも各群の一部の動物を用いて眼科学的検査を実施した。眼科学的検査において認められた変化は本試験に用いたラットでしばしば認められる自然発生性の変化と考えられた。また、動物の一般状態等においても特に異常は認められなかった。

2. 調査目的, 概要, 実施体制, 実施期間

2.1 調査目的

アマメシバ粉末等の長期摂取が原因と疑われる閉塞性細気管支炎の発症事例に関して、これまでに閉塞性細気管支炎を引き起こす原因物質やその作用機序が特定されていないことから、同食品中の原因物質等の特定のために動物試験の実施によるデータ集積を行い、アマメシバ粉末等に係るリスク評価の取組みに資することを目的とする。

2.2 概要

ラットを用いてアマメシバ粉末の長期毒性試験を行うために、試験計画書の検討および作成を行い、作成した全体試験計画書に準拠して試験を開始した。

2.2.1 表題

アマメシバ粉末のラットを用いた経口投与による 52 週間反復投与毒性試験

2.2.2 試験番号

B040030

2.2.3 試験目的

アマメシバ粉末をラットに 52 週間反復経口投与した時の毒性変化を明らかにする。

2.2.4 適用ガイドライン

直接適用されるガイドラインはないが、以下のガイドラインを参考に実施した。

- ・医薬品の製造（輸入）承認申請に必要な毒性試験のガイドラインについて
（薬審 1 第 24 号，平成元年 9 月 11 日）
- ・単回及び反復投与毒性試験ガイドラインの改正について
（薬新薬第 88 号，平成 5 年 8 月 10 日）
- ・反復投与毒性試験に係るガイドラインの一部改正
（医薬審第 655 号，平成 11 年 4 月 5 日）

2.2.5 適用 GLP

直接適用される GLP はないが、以下の GLP を参考に実施した。

- ・「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」
（厚生省令第 21 号，平成 9 年 3 月 26 日）

2.2.6 信頼性基準

試験の信頼性を確保するため、申請資料の信頼性の基準（薬事法施行規則第 18 条の 4 の 3，平成 9 年 3 月 27 日）に準拠して実施した。

2.2.7 試験委託者

内閣府 食品安全委員会事務局
東京都千代田区永田町二丁目 13 番 10 号
プルデンシャルタワー6F

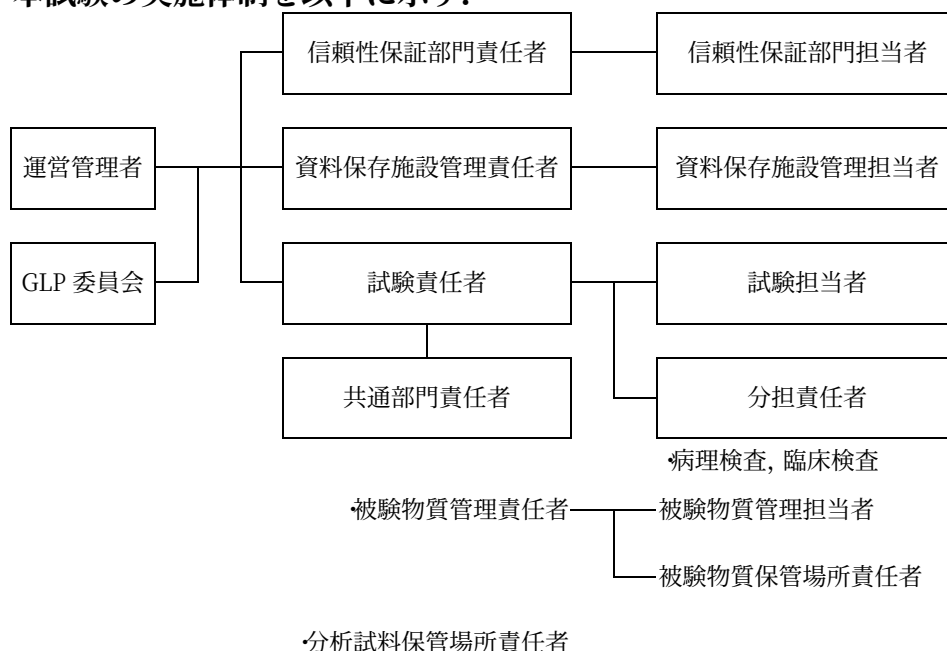
2.3 実施体制

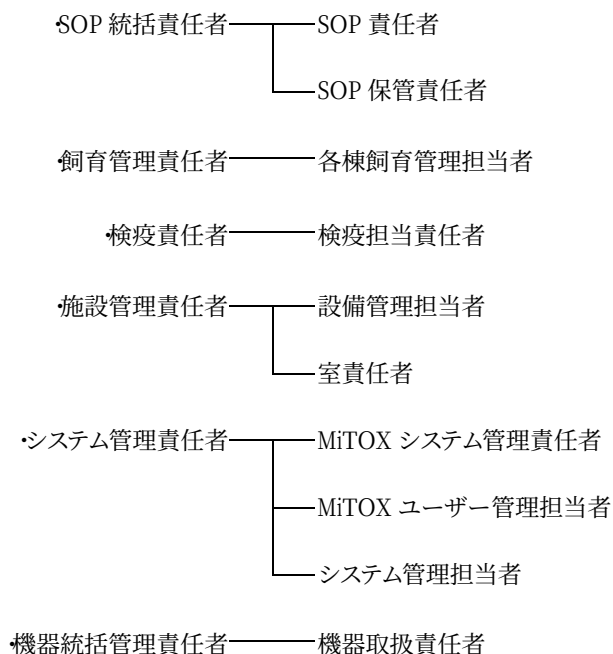
2.3.1 試験受託者

株式会社三菱化学安全科学研究所
東京都港区芝二丁目 1 番 30 号

2.3.2 試験施設

株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
茨城県鹿島郡波崎町砂山 14 番地
本試験の実施体制を以下に示す。





2.3.3 外部委託

被験物質中の過酸化物質および夾雑物分析：

財団法人日本食品分析センター

東京都渋谷区元代々木町 52 番 1 号

2.3.4 試験責任者

千田哲士

株式会社三菱化学安全科学研究所

鹿島研究所 毒性第 1 研究部

2.4 実施期間

試験契約	2004 年 1 月 27 日
全体試験計画書検討	2004 年 1 月 28 日～3 月 4 日
外部委託契約（財団法人日本食品分析センター）	2004 年 1 月 29 日
全体試験計画書作成	2004 年 3 月 5 日
試験開始	2004 年 3 月 5 日
アマメシバ粉末の品質の確認およびアマメシバ粉末中の夾雑物分析（本試験）	

の試験計画書作成	2004 年 3 月 10 日
動物入荷	2004 年 3 月 12 日
眼科学的検査（投与開始前）	2004 年 3 月 17 日（雄）
	2004 年 3 月 22 日（雌）
投与開始日	2004 年 3 月 18 日（雄）
	2004 年 3 月 23 日（雌）
微生物モニタリング動物血清採取	2004 年 3 月 18 日（雄）
および剖検（第 1 日）	2004 年 3 月 23 日（雌）
アマメシバ粉末の品質の確認およびアマメシバ粉末中の夾雑物分析（本試験）	
の試験報告書作成	2004 年 3 月 24 日
試験経過（雄：第 7 日，雌：第 2 日）	2004 年 3 月 24 日
履行期間	2004 年 3 月 25 日

3. 試験計画書の検討・作成について

全体試験計画書（添付資料-1）作成に当たって次の事項に留意した。

- ・ 全体試験計画書は、医薬品毒性試験法ガイドラン（平成元年9月11日薬審1第24号厚生省薬務局審査第一課長・審査第二課長・生物製剤課長通知別添）の「〔2〕反復毒性試験」に準拠した。
- ・ 供試動物は、毒性試験に広く用いられるラットとした。
群構成における1群当たりの動物数は、病理学的検査において詳細なデータの収集が必要であることから、20匹とした。
- ・ 投与方法は、被験物質が人に経口的に摂取された場合について評価する必要があること。また、被験物質の多量投与ができることから、強制経口投与とした。
- ・ ヒトで認められた所見は閉塞性細気管支炎であることから、主となる検査項目としては肺を中心とした病理解剖検査、病理組織学的検査であるが、その他に血液ガス分析、血中メトヘモグロビン量および長期投与に伴う全身への影響を調べるため、毒性試験で通常実施される動物の一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、眼科学的検査も検査項目とした。

その他に、アマメシバ粉末のサンプルについて残留農薬、カビ毒等の分析を行い、投与に際して、問題がないことを確認することとした。

4. 材料および方法

4.1 被験物質および媒体

4.1.1 被験物質

- (1) 名称 : アマメシバ粉末 (略称 SA : SA は帳票で被験物質名として使用する)
- (2) 学名 : *Sauropus androgynus* (Linn.) Merr. (*S. albicans*)
- (3) 購入先 : 株式会社一條
沖縄県浦添市仲間一丁目 5 番 10 号
商品名 : よこださん家のあまめしば
製造年月日 : 2003 年 07 月 09 日
賞味期限 : 2005 年 01 月 07 日
- (4) 購入量 : 40kg (1 袋 100g 入り, 400 袋). 購入した 400 袋の全てを W 型混合機 (株式会社パウレック) に入れて, 30 分間攪拌したものを使用した.
- (5) 保存条件 : 冷蔵 (許容範囲 : 1~15°C) ・暗所
- (6) 保管場所 : 株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
被験物質保管場所 (42) に保管した.
- (7) 品質の確認 : 投与開始前に財団法人日本食品分析センターに過酸化物質の分析を依頼した.
- (8) 被験物質中の夾雑物分析
投与開始前に財団法人日本食品分析センターに下記の項目の分析を依頼した.
総水銀, カドミウム, 鉛, 総クロム, ヒ素 (As として), γ -BHC, DDT, アルドリン, ディルドリン, エンドリン, ヘプタクロル, マラチオン, パラチオン, アフラトキシン B1, アフラトキシン B2, アフラトキシン G1, アフラトキシン G2, PCB, エストラジオール, ニトロソジメチルアミン, ニトロソジエチルアミン
- (9) 取扱上の注意 : 保護具 (ゴム手袋, 眼鏡およびマスク) 着用

4.1.2 媒体 (対照群の投与液としても使用した)

注射用水 (株式会社大塚製薬工場)

使用 Lot No. : 3L84 (使用期限 : 2008 年 12 月)

4.2 試験動物

4.2.1 動物種

ラット

4.2.2 系統

Crj:CD(SD)IGS

4.2.3 系統選択理由

げっ歯類を用いた毒性試験に広く使用され、背景データが豊富であり、多数の個体の入手が可能であることから選択した。

4.2.4 微生物レベル

SPF（Specific pathogen free の略で、特に指定された病気（微生物、寄生虫）のない動物を指す）

4.2.5 購入先

日本チャールス・リバー株式会社

4.2.6 購入動物数

雌雄各 260 匹

4.2.7 検疫・馴化

5 日間の検疫・馴化を行った。その間、全例について一般状態を 1 日 1 回観察し、健康状態が良好であることを確認するとともに、動物入荷日および検疫終了日に体重測定し、体重増加に異常のないことを確認した。それ以降も馴化は継続し、投与開始日まで 1 日 1 回観察した。

4.2.8 群分け

検疫・馴化期間中の一般状態観察結果および体重測定結果から、健康状態が良好な動物を選抜後、投与前日に体重層別無作為抽出法により、各群の平均体重がほぼ均一になるように群分けした。

4.2.9 投与時週齢

6 週齢

4.2.10 投与時体重

投与開始時における動物の体重範囲は雄が 154 ～ 201 g, 雌が 130 ～ 171 g であり, 各個体の体重は雌雄それぞれ平均体重 $\pm$ 20%以内であることを確認した.

4.2.11 動物の識別

群分け前は尾に油性インクで標識して識別し, ケージには試験番号, ケージ番号, 検疫・馴化期間中の動物番号, 動物種, 系統および性別, 群分け以降はイヤープンチ法で個体識別し, 試験番号, 被験物質名, 群名 (用量), 動物番号, 動物種, 系統および性別を記載したラベルを付けた.

4.2.12 余剰動物の処置

余剰動物は投与開始日に試験系から除外するとともに, 微生物モニタリング用動物として雄 8 匹, 雌 12 匹を選び, 飼育を継続した. なお, 雌雄の動物数が異なるが, 微生物モニタリングを行う場合, 雌雄は問題にならず, 今回試験期間中, 微生物モニタリングを 4 回実施 (第 1, 92, 183 および 365 日) し, 1 回あたり 5 匹を予定したため雌雄の数が異なった.

4.3 動物飼育

4.3.1 飼育室

ラット・マウス飼育室 (飼育室番号: 4152 室)

4.3.2 飼育環境

使用した飼育室は検疫・馴化から投与期間を通して以下の飼育環境に自動調整され, 飼育に問題となるようなことはなかった.

- (1) 温度 : 許容範囲 19.0～25.0℃ (実測値: 22.6～23.9℃)
- (2) 相対湿度: 許容範囲 35.0～75.0% (実測値: 40.5～57.1%)
- (3) 換気 : 6～20 回/時, オールフレッシュエアー供給
- (4) 照明時間: 12 時間/日 (7:00-19:00)

4.3.3 飼育器材

- (1) ケージ : オートクレーブ滅菌したステンレス製吊り下げ型金網ケージ (195W × 325D × 180H mm, トキワ科学器械株式会社) を使用し, 群分け日に交換した.
- (2) 給餌器 : オートクレーブ滅菌した固型用ステンレス製給餌器 (トキワ科学器械株式会社) を使用し, 群分け日と雌の検疫終了翌日に交換し

- た。
- (3) 架台 : オートクレーブ滅菌したステンレス製架台（オートフラッシュ対応自動給水管付，トキワ科学器械株式会社）を使用し，ケージ交換時に交換した。
 - (4) トレー : オートクレーブ滅菌したアルミニウム製トレー（トキワ科学器械株式会社）に実験動物用床敷（ベータチップ，日本チャールス・リバー株式会社）を敷いて，群分け日と雌の検疫終了翌日に交換した。

4.3.4 飼料

- (1) 種類 : 放射線滅菌した実験動物用固型飼料（CR-LPF，オリエンタル酵母工業株式会社）
使用 Lot No. : 031211, 040119
- (2) 給餌法 : 自由摂取とした。飼料は給餌器交換時に交換した。
- (3) 汚染物質の確認 :
使用するロットについて，飼料供給業者が財団法人日本食品分析センターに委託して分析した残留農薬等の汚染物質の分析結果を入手し，試験施設の標準操作手順書の基準に適合していることを確認している。

4.3.5 飲用水

- (1) 種類 : 5 μ m フィルター濾過後，紫外線照射した水道水
- (2) 給水法 : 自動給水装置（トキワ科学器械株式会社）を用いて自由摂取とした。
- (3) 分析 : 株式会社ダイヤ分析センターに依頼して水質検査を年 2 回の頻度で実施し，得られた分析値が試験施設の標準操作手順書の基準に適合していることを確認している。

4.3.6 収容動物数

個別飼育（1 匹／ケージ）とした。

4.3.7 微生物モニタリング

当該飼育室の微生物学的クリーン度を保証するため，本試験の余剰動物から検疫番号の小さい番号順に雄 8 匹，雌 12 匹を選び，飼育を継続した。飼育場所は排気口に近い場所とした。また，飼育期間中は毒性試験動物と同様の頻度で体重測

定を行った。また、動物の一般状態観察を毎日1回行い、抗体検査の採血時は剖検を行った。ただし、いずれのデータについても集計および統計学的解析は行わなかった。抗体検査の採血は第1日に、下記の表に従ってそれぞれ雄2匹、雌3匹を、非絶食下でチオペンタールナトリウム（ラボナール、田辺製薬株式会社）を腹腔内投与して麻酔し、後大静脈より採血した。採取した血液は室温・遮光下で30分間以上放置後、遠心分離（3,000 rpm, 1,500 g 以上, 10 分間, 約 4℃）し血清を得た。得られた血清は 0.1% アジ化ナトリウム添加生理食塩液で 10 倍希釈し、1 匹当たり 2 mL 以上のサンプルを冷蔵保存した（許容範囲：1～15℃）。保存した血清は、財団法人実験動物中央研究所に血清採取後 2 週間以内に送付し、下記の項目について血清反応による抗体検査を行う予定である。

検査時期

検査時期	動物数（動物番号）	
	雄	雌
第1日（投与初日）	2（20107-20108）	3（60110-60112）

検査項目

ティザー菌	<i>Clostridium piliforme</i> (Tyzzer's organism)
唾液腺涙腺炎ウイルス	Sialodacryoadenitis virus
ハンタウイルス	Hantavirus
肺マイコプラズマ	<i>Mycoplasma pulmonis</i>
センダイウイルス	Sendai virus (HVJ)

4.4 投与

4.4.1 経路・方法

経口投与。ラット用胃ゾンデを装着したシリンジを用いて強制経口投与した。

4.4.2 経路選択理由

被験物質は食品であることから、ヒトが被験物質を経口的に摂取した場合の安全性を評価するため選択した。

4.4.3 方法選択理由

ラットに確実に経口投与する方法として広く用いられていることから選択した。

4.4.4 回数・期間

1日1回, 2004年3月24日迄に雄は投与開始日(2004年3月18日)より計7回, 雌は投与開始日(2004年3月23日)より計2回, 11:00~15:00の間に投与した。

4.4.5 用量および用量の設定理由

ヒトにおいて被験物質の粉末の長期摂取が原因と疑われる閉塞性細気管支炎の発症事例が報告されている。従って, 本被験物質を大量長期に摂取した場合の毒性を把握する目的から, 最高用量はヒトにおける発症事例での摂取量および適用ガイドランで規定されている投与量の上限を考慮して 1000 mg/kg とし, 以下公比2で 500 および 250 mg/kg の計3用量を設定した。また, 媒体のみを投与する対照群を設けた。

4.4.6 投与液量

7.5 mL/kg とし, 至近日に測定した体重に基づいて, 各個体の量を算出した。

4.5 投与液の調製

4.5.1 方法・頻度

予め7日分の被験物質を使用日毎に分けて秤量後, メートルグラスに入れパラフィルムで封をした。使用日に注射用水を適当量加えてなじませた後, 注射用水を加えて所定量にメスアップし, 投与液とした。投与液の調製は用時調製とし, 被験物質の秤量および投与液の調製は黄色蛍光灯下で行った。なお, 対照群は媒体である注射用水をそのまま投与した。

投与時, 対照群を除く投与液はスターラーを用いて攪拌した状態で使用した。また, 投与終了後の媒体を含めた投与液はその日のうちに廃棄した。

4.5.2 投与液の安定性の確認

投与液の安定性の確認は行わなかったが, 使用日毎に調製し, 調製後6時間以内に投与していることから, 試験の評価に影響を及ぼすものではないと判断した。

4.5.3 投与液の濃度および均一性の確認

投与液の濃度および均一性の確認は行わなかったが, 投与液の調製後, 調製記録を再度確認し, 被験物質の秤量値, 媒体のメスアップ量等の調製方法に問題がないか確認していることから, 投与液の濃度に問題はないと判断した。また, 投与中の投与液はスターラーで攪拌していることから投与液の均一性も保たれていると判断した。

4.6 群構成

投与群の群構成を次に示す.

群名	濃度 (mg/mL)	投与期間 ^{\$} (週)	雄	雌
対照	0	52	20 * ¹ (10101-10120) * ²	20(50101-50120)
		26	20 (10121-10140)	20(50121-50140)
		13	20 (10141-10160)	20(50141-50160)
250 mg/kg	33.3	52	20 (10201-10220)	20(50201-50220)
		26	20 (10221-10240)	20(50221-50240)
		13	20 (10241-10260)	20(50241-50260)
500 mg/kg	66.7	52	20 (10301-10320)	20(50301-50320)
		26	20 (10321-10340)	20(50321-50340)
		13	20 (10341-10360)	20(50341-50360)
1000 mg/kg	133.3	52	20 (10401-10420)	20(50401-50420)
		26	20 (10421-10440)	20(50421-50440)
		13	20 (10441-10460)	20(50441-50460)

*¹, 動物数; *², 動物番号

^{\$}, 各投与期間終了時の解剖は2日間で行い, 第1日に各群先頭から10例を, 第2日に残りの10例を解剖する. なお, 投与は各動物とも計画解剖日の前日まで行う.

4.7 観察・測定項目

全生存例について下記の項目を検査した. なお, 日と週の表記については, 投与開始日を第1日, 第1日~第7日を第1週とした.

4.7.1 一般状態

全例について, 1日2回(投与前, 投与後)一般状態を観察した.

4.7.2 体重

全例の体重を雌雄とも第1日に測定した.

4.7.3 摂餌量

ケージ毎の風袋込み重量を雌雄の第1日に測定した. 第8日に雌雄とも測定し, 測定期間の1匹あたりの1日平均摂餌量を算出する予定である.

4.7.4 眼科学的検査

投与開始前日（群分け日）に下記に示す動物について、照明を暗くした状態で、直像鏡を用いて対光反射を検査し、スリットランプ（SL-14，興和株式会社）を用いて前眼部および中間透光体を、双眼倒像鏡（オメガ 200，ハイネ社）を用いて眼底を検査した。前眼部，中間透光体および眼底検査は散瞳剤（ミドリン P，参天製薬株式会社）点眼後に行った。

群名	眼科学的検査対象動物	
	雄	雌
対照	15 ^{*1} (10101-10115) ^{*2}	15(50101-50115)
250 mg/kg	15 (10201-10215)	15(50201-50215)
500 mg/kg	15 (10301-10315)	15(50301-50315)
1000 mg/kg	15 (10401-10415)	15(50401-50415)

^{*1}，動物数； ^{*2}，動物番号

4.8 統計学的解析

体重について多重比較検定法で統計学的有意性を解析した。すなわち Bartlett 法による分散の均一性を調べ、分散が等しい場合は一元配置分散分析、分散が等しくない場合は Kruskal-Wallis の検定を行った。それらの結果、群間に有意差が認められた場合は Dunnett 法（分散が等しい場合）あるいは Dunnett 型（分散が等しくない場合）の多重比較検定によって対照群との間で平均値の差の検定を行った。Bartlett 法，一元配置分散分析および Kruskal-Wallis の検定の有意水準は 5 %，その他の検定は 1 および 5 %とした。検定は安全性試験システム（MiTOX，三井造船システム技研株式会社）を用いて解析した。

一般状態，眼科学的検査については，統計学的解析を実施しなかった。

4.9 コンピュータシステムの使用

体重データの収集および統計学的解析には安全性試験システム（MiTOX，三井造船システム技研株式会社）を使用した。当該システムのコンピュータプロトコールにはデータ収集範囲，データ収集の日程等を登録した。コンピュータシステムのプロトコール番号として，B040030_（_は空白）を用いた。また，微生物モニタリング用動物についても毒性試験動物と同様に上記の安全性試験システムを用いてデータ収集した。なお，コンピュータシステムのプロトコール番号として，

B040030M を用いた。

データ収集および解析：体重（微生物モニタリング用動物を含む）、群分け、投与液量算出、摂餌量

データ集計：一般状態（微生物モニタリング用動物を含む）

5. 毒性試験調査について

5.1 被験物質の品質および夾雑物の確認（添付資料-2, 3）

試験に影響を及ぼすと考えられるような変化は認められなかった。

5.2 結果

投与開始日(雄：2004 年 3 月 18 日，雌：2004 年 3 月 23 日)から 2004 年 3 月 24 日までの試験成績を以下に記す。

5.2.1 一般状態（Table 1, Appendix 1）

雌雄とも全動物で異常は認められなかった。

5.2.2 体重（Table 2, Appendix 2）

投与開始日の被験物質投与群の体重は雌雄とも対照群と同様であった。

5.2.3 眼科学的検査（Table 3, Appendix 3）

投与開始前の検査において角膜混濁，水晶体微粒混濁および水晶体限局性混濁が雌雄で認められたが，いずれも本試験に用いたラットでしばしば認められる自然発生性の変化と考えられた。

添付資料-1

全体試験計画書

アマメシバ粉末のラットを用いた経口投与による 52 週間反復投与毒性試験

－アマメシバ粉末のラットを用いた反復投与毒性試験調査－

(試験番号：B040030)

および

試験計画書変更書

全体試験計画書

アマメシバ粉末のラットを用いた経口投与による
52 週間反復投与毒性試験

－アマメシバ粉末のラットを用いた反復投与毒性試験調査－

(試験番号：B040030)

2004 年 3 月 5 日

株式会社三菱化学安全科学研究所

1 / 24

1. 試験実施概要

1.1. 表題

アマメシバ粉末のラットを用いた経口投与による 52 週間反復投与毒性試験

1.2. 試験番号

B040030

1.3. 試験目的

アマメシバ粉末をラットに 52 週間反復経口投与した時の毒性変化を明らかにする。

1.4. 適用ガイドライン（参考）

医薬品の製造（輸入）承認申請に必要な毒性試験のガイドラインについて

（薬審 1 第 24 号，平成元年 9 月 11 日）

単回及び反復投与毒性試験ガイドラインの改正について

（薬新薬第 88 号，平成 5 年 8 月 10 日）

反復投与毒性試験に係るガイドラインの一部改正

（医薬審第 655 号，平成 11 年 4 月 5 日）

1.5. 適用 GLP

なし

1.6. 信頼性基準

申請資料の信頼性の基準

（薬事法施行規則第 18 条の 4 の 3，平成 9 年 3 月 27 日）

1.7. 信頼性保証部門による調査項目

試験計画書草案，試験計画書，試験計画書変更書（作成した場合），生データ，最終報告書草案および最終報告書を調査し，信頼性保証証明書を最終報告書に添付する。

1.8. 試験委託者

内閣府 食品安全委員会事務局

東京都千代田区永田町二丁目 13 番 10 号

プルデンシャルタワー6F

1.9. 試験受託者

株式会社三菱化学安全科学研究所
東京都港区芝二丁目 1 番 30 号

1.10. 試験施設

株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
茨城県鹿島郡波崎町砂山 14 番地
(病理組織学的検査の鏡検業務)

株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所 大阪分室
大阪市中央区伏見町四丁目 1 番 1 号

1.11. 外部委託

被験物質中の過酸化物質および夾雑物分析：

財団法人日本食品分析センター
東京都渋谷区元代々木町 52 番 1 号

病理組織標本作製：

株式会社バイオ病理研究所
大分県東国東郡国東町小原 1200-2

1.12. 試験責任者

千田哲士
株式会社三菱化学安全科学研究所
鹿島研究所 毒性第 1 研究部

1.13. 分担責任者

病理検査	飯田 晶敏
臨床検査	豊田 直人

1.14. 試験日程

試験開始	2004 年 3 月 5 日
動物入荷	2004 年 3 月 12 日
投与開始日	2004 年 3 月 18 日 (雄)

	2004 年 3 月 23 日 (雌)
13 週間投与終了時剖検	2004 年 6 月 17, 18 日 (雄)
	2004 年 6 月 22, 23 日 (雌)
26 週間投与終了時剖検	2004 年 9 月 16, 17 日 (雄)
	2004 年 9 月 21, 22 日 (雌)
52 週間投与終了時剖検	2005 年 3 月 17, 18 日 (雄)
	2005 年 3 月 22, 23 日 (雌)
最終報告書草案提出予定	2006 年 2 月 28 日
試験終了予定	2006 年 3 月 31 日

1.15. 試験計画書の変更

試験計画書を変更する場合は、変更内容およびその理由を記載した試験計画書変更書を作成し、試験責任者が日付を記し署名、捺印する。

1.16. 保存

次項に示す試験関係資料を鹿島研究所の資料保存室に保存する。保存期間は最終報告書作成後 10 年間とし、以後の保存は試験委託者と協議の上、決定する。

財団法人日本食品分析センターで発生するアマメシバ粉末中の過酸化物質および夾雑物に関する分析計画書および変更書（作成した場合）、分析報告書、生データについても鹿島研究所の資料保存室に保存する。

株式会社バイオ病理研究所で発生する病理標本作製計画書および変更書（作成した場合）、病理標本作製報告書、生データは株式会社バイオ病理研究所の資料保存施設に保存する。保存期間は最終報告書作成後 10 年間とし、以後の保存は株式会社三菱化学安全科学研究所と外部委託先で協議の上、決定する。

1.17. 保存する資料

- (1) 試験計画書
- (2) 試験計画書変更書（作成した場合）
- (3) 被験物質
- (4) 被験物質に関する資料
- (5) 使用動物に関する資料
- (6) 試験結果に関する資料
- (7) アマメシバ粉末中の過酸化物質および夾雑物分析（外部委託）に関する資料
- (8) 病理組織標本作製計画書および変更書（作成した場合）、病理組織標本作製報

告書の写し

- (9) 標本
- (10) 通信記録等の記録文書
- (11) 最終報告

1.18. その他

本試験の実施に際し、「動物実験に関する指針（㈱三菱化学安全科学研究所鹿島研究所）」に基づき、鹿島研究所 動物実験倫理委員会の承認を得た。

2. 材料および方法

2.1. 被験物質および媒体

2.1.1. 被験物質

- (1) 名称 : アマメシバ粉末 (略称 SA : SA は帳票で被験物質名として使用する)
- (2) 学名 : *Sauropus androgynus* (Linn.) Merr. (*S. albicans*)
- (3) 購入先 : 株式会社一條
沖縄県浦添市仲間一丁目 5 番 10 号
商品名 : よこださん家のあまめしば
- (4) 購入量 : 40kg (1 袋 100g 入り, 400 袋). 購入した 400 袋の全てを W 型混合機 (株式会社パウレック) に入れて, 30 分間攪拌したものを使用する.
- (5) 保存条件 : 冷蔵 (許容範囲: 1~15°C) ・ 暗所
- (6) 保管場所 : 株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
被験物質保管場所 (42)
- (7) 品質の確認 : 過酸化物質を投与開始前, 投与開始後 6 カ月および投与終了後に測定することにより確認する. 分析は財団法人日本食品分析センターに依頼して行う. 測定法の詳細については財団法人日本食品分析センターで作成する分析計画書に記載する. なお, 分析報告書については本試験の最終報告書に添付すると同時にその内容を最終報告書に反映させる.
- (8) 被験物質中の夾雑物分析
投与開始前に下記の項目を分析する. なお, アフラトキシン B1, アフラトキシン B2, アフラトキシン G1, アフラトキシン G2 については投与 6 カ月後および最終投与終了後についても分析する.
総水銀, カドミウム, 鉛, 総クロム, ヒ素 (As として), γ -BHC, DDT, アルドリン, デルドリン, エンドリン, ヘプタクロル, マラチオン, パラチオン, アフラトキシン B1, アフラトキシン B2, アフラトキシン G1, アフラトキシン G2, PCB, エストラジオール, ニトロソジメチルアミン, ニトロソジエチルアミン

分析は財団法人日本食品分析センターに依頼して行う。測定の詳細については財団法人日本食品分析センターで作成する分析計画書に記載する。なお、分析報告書については本試験の最終報告書に添付すると同時にその内容を最終報告書に反映させる。

(9) 取扱上の注意：保護具（ゴム手袋，眼鏡およびマスク）着用

(10) 残余被験物質の処理：

残余被験物質については，実験終了後，一部（約 2 g）を保存し，その残りは廃棄する。

2.1.2. 媒体（対照群の投与液を兼ねる）

注射用水（株式会社大塚製薬工場）

2.2. 試験動物

2.2.1. 動物種

ラット

2.2.2. 系統

Crj:CD(SD)IGS

2.2.3. 系統選択理由

げっ歯類を用いた毒性試験に広く使用され，背景データが豊富であり，多数の個体の入手が可能である。

2.2.4. 微生物レベル

SPF

2.2.5. 購入先

日本チャールス・リバー株式会社

2.2.6. 購入動物数

雌雄各 260 匹

2.2.7. 検疫・馴化 (KSOP/AMC/3001)

5 日間の検疫・馴化を行う。その間、全例について一般状態を 1 日 1 回観察し、健康状態が良好であることを確認するとともに、動物入荷時および検疫終了時に体重測定し、体重増加に異常のないことを確認する。それ以降も馴化は継続し、投与開始日まで 1 日 1 回観察する。

2.2.8. 群分け (KSOP/ANH/2002)

検疫・馴化期間中の一般状態観察結果および体重測定結果から、健康状態が良好な動物を選抜後、投与前日に体重層別無作為抽出法により、各群の平均体重がほぼ均一になるように群分けする。

2.2.9. 投与時週齢

6 週齢

2.2.10. 投与時体重

投与開始時における動物の体重範囲は、雌雄それぞれ平均体重 $\pm 20\%$ 以内とし、それ以外の動物は除外する。

2.2.11. 動物の識別 (KSOP/ANH/1001, 2004)

群分け前は尾に油性インクで標識して識別し、ケージには試験番号、ケージ番号、検疫・馴化期間中の動物番号、動物種、系統および性別、群分け以降はイヤープンチ法で個体識別し、試験番号、被験物質名、群名 (用量)、動物番号、動物種、系統および性別を記載したラベルを付ける。

2.2.12. 余剰動物の処置 (KSOP/AMC/3002 ; KSOP/ANH/2021)

余剰動物は投与開始日に試験系から除外するとともに、微生物モニタリング用動物として雄 8 匹、雌 12 匹を選び、飼育を継続する。他の余剰動物は炭酸ガス吸入により安楽死処分する。

2.3. 動物飼育

2.3.1. 飼育室

ラット・マウス飼育室 (4152 室)

2.3.2. 飼育環境 (KSOP/AMC/1001, 1002, 1003)

- (1) 温度 : 許容範囲 19.0～25.0℃
- (2) 相対湿度 : 許容範囲 35.0～75.0%
- (3) 換気 : 6～20 回／時, オールフレッシュエアー供給
- (4) 照明時間 : 12 時間／日 (7:00-19:00)

2.3.3. 飼育器材 (KSOP/AMC/3002, 4003)

- (1) ケージ : オートクレーブ滅菌したステンレス製吊り下げ型金網ケージ (195W × 325D × 180H mm, トキワ科学器械株式会社) を使用し, 群分け日と投与開始日から 12～16 日間に 1 回の頻度で交換する.
- (2) 給餌器 : オートクレーブ滅菌した固型用ステンレス製給餌器 (トキワ科学器械株式会社) を使用し, 群分け日と投与開始日から 5～9 日間に 1 回の頻度で交換する. 更に, 雌については検疫終了翌日にも交換する.
- (3) 架台 : オートクレーブ滅菌したステンレス製架台 (オートフラッシュ対応自動給水管付, トキワ科学器械株式会社) を使用し, ケージ交換時に交換する.
- (4) トレー : オートクレーブ滅菌したアルミニウム製トレー (トキワ科学器械株式会社) に実験動物用床敷 (ベータチップ, 日本チャールス・リバー株式会社) を敷いて, 群分け日と投与開始日から 5～9 日間に 1 回の頻度で交換する. 更に, 雌については検疫終了翌日にも交換する.

2.3.4. 飼料 (KSOP/AMC/4002, 5001)

- (1) 種類 : 放射線滅菌した実験動物用固型飼料 (CR-LPF, オリエンタル酵母工業株式会社)
- (2) 給餌法 : 新鮮尿採取時を除き, 自由摂取とする. 飼料は給餌器交換時に交換する. また, 各計画解剖日の前日の夕方から該当動物について絶食する.
- (3) 汚染物質の確認 :
使用するロットについて, 飼料供給業者が財団法人日本食品分析センターに委託して分析した残留農薬等の汚染物質の分析結果を入手し, 標準操作手順書の基準に適合していることを確認する.

2.3.5. 飲用水 (KSOP/AMC/4001, 5002)

- (1) 種類 : 5 μ m フィルター濾過後, 紫外線照射した水道水
- (2) 給水法 : 新鮮尿採取時を除き, 自動給水装置 (トキワ科学器械株式会社) を用いて自由摂取とする.
- (3) 分析 : 株式会社ダイヤ分析センターに依頼して水質検査を年 2 回の頻度で実施し, 得られた分析値が標準操作手順書の基準に適合していることを確認する.

2.3.6. 収容動物数 (KSOP/AMC/3002)

個別飼育とする.

2.3.7. 微生物モニタリング (KSOP/ANH/2020, 2021)

当該飼育室の微生物学的クリーン度を保証するため, 本試験の余剰動物から検疫番号の小さい番号順に雄 8 匹, 雌 12 匹を選び, 飼育を継続する. 飼育場所は排気口に近い場所とする. また, 飼育期間中は毒性試験動物と同様の頻度で体重測定を行う. また, 動物の一般状態観察を毎日 1 回行い, 抗体検査の採血時は剖検を行う. ただし, いずれのデータについても集計および統計学的解析は行わない. 抗体検査の採血は第 1 日, 第 92 日, 第 183 日および第 365 日に, 下記の表に従ってそれぞれ雄 2 匹, 雌 3 匹を, 非絶食下でチオペンタールナトリウム (ラボナール, 田辺製薬株式会社) を腹腔内投与して麻酔し, 後大静脈より採血する. 採取した血液は室温・遮光下で 30 分間以上放置後, 遠心分離 (3,000 rpm, 1,500 g 以上, 10 分間, 約 4°C) し血清を得る. 得られた血清は 0.1% アジ化ナトリウム添加生理食塩液で 10 倍希釈し, 1 匹当たり 2 mL 以上のサンプルを冷蔵保存する (許容範囲: 1~15°C). 保存した血清は, 財団法人実験動物中央研究所に血清採取後 2 週間以内に送付し, 下記の項目について血清反応による抗体検査を行う. 得られた抗体検査結果, 一般状態観察結果, 体重推移および剖検所見から動物の健康状態を判定する. なお, 最終報告書には微生物感染の有無のみを記載し, 個々のデータについては生データに保存するのみとする.

検査時期

検査時期	動物数（動物番号）	
	雄	雌
第 365 日	2（20101-20102）	3（60101-60103）
第 183 日	2（20103-20104）	3（60104-60106）
第 92 日	2（20105-20106）	3（60107-60109）
第 1 日	2（20107-20108）	3（60110-60112）

検査項目

ティザー菌	<i>Clostridium piliforme</i> (Tyzzer's organism)
唾液腺涙腺炎ウイルス	Sialodacryoadenitis virus
ハンタウイルス	Hantavirus
肺マイコプラズマ	<i>Mycoplasma pulmonis</i>
センダイウイルス	Sendai virus (HVJ)

2.4. 投与

2.4.1. 経路・方法（KSOP/ANH/2010）

経口投与。ラット用胃ゾンデを装着したテフロン製シリンジを用いて強制経口投与する。

2.4.2. 経路選択理由

ヒトが被験物質を経口的に摂取した場合の安全性を評価するため。

2.4.3. 方法選択理由

ラットに確実に経口投与する方法として広く用いられている。

2.4.4. 回数・期間

1日1回, 13, 26 または 52 週間（第 13 週間投与後解剖動物：91 ないしは 92 回, 第 26 週間投与後解剖動物：182 ないしは 183 回, 第 52 週間投与後解剖動物：364 ないしは 365 回), おおよそ 11:00～17:00 に投与する。

2.4.5. 回数・期間の選択理由

被験物質を長期間摂取した場合の影響を把握するため 52 週間とする。また, 13

および 26 週間投与後に解剖を行うことにより、被験物質の影響を経時的に把握することができる。

2.4.6. 用量および用量の設定理由

ヒトにおいて被験物質の粉末の長期摂取が原因と疑われる閉塞性細気管支炎の発症事例が報告されている。従って、本被験物質を大量長期に摂取した場合の毒性を把握する目的から最高用量は適用ガイドランで規定されている投与量の上限である 1000 mg/kg とし、以下公比 2 で 500 および 250 mg/kg の計 3 用量を設定する。また、媒体のみを投与する対照群を設ける。

2.4.7. 投与液量

7.5 mL/kg とし、至近日に測定した体重に基づいて、各個体の量を算出する。

2.5. 投与液の調製

2.5.1. 方法・頻度 (KSOP/TSB/5001)

予め 6～8 日分の被験物質を使用日毎に分けて秤量しておく。使用日に被験物質をメートルグラスに入れる。次に注射用水を適当量加えてなじませた後、注射用水を加えて所定量にメスアップし、投与液とする。投与液の調製は用時調製とし、被験物質の秤量および投与液の調製は黄色蛍光灯下で行う。なお、対照群は媒体である注射用水をそのまま投与する。

投与時、対照群を除く投与液はスターラーを用いて攪拌した状態で使用する。また、投与終了後の媒体を含めた投与液はその日のうちに廃棄する。

2.5.2. 投与液の安定性の確認

行わない。

2.5.3. 投与液の濃度および均一性の確認

行わない。

2.6. 群構成

投与群の群構成を以下に示す。

群名	濃度 (mg/mL)	投与期間 ^{\$} (週)	雄	雌
対照	0	52	20 * ¹ (10101-10120) * ²	20(50101-50120)
		26	20 (10121-10140)	20(50121-50140)
		13	20 (10141-10160)	20(50141-50160)
250 mg/kg	33.3	52	20 (10201-10220)	20(50201-50220)
		26	20 (10221-10240)	20(50221-50240)
		13	20 (10241-10260)	20(50241-50260)
500 mg/kg	66.7	52	20 (10301-10320)	20(50301-50320)
		26	20 (10321-10340)	20(50321-50340)
		13	20 (10341-10360)	20(50341-50360)
1000 mg/kg	133.3	52	20 (10401-10420)	20(50401-50420)
		26	20 (10421-10440)	20(50421-50440)
		13	20 (10441-10460)	20(50441-50460)

*1, 動物数； *2, 動物番号

\$, 各投与期間終了時の解剖は2日間で行い, 第1日に各群先頭から10例を, 第2日に残りの10例を解剖する. なお, 投与は各動物とも計画解剖日の前日まで行う.

2.7. 観察・測定項目

全生存例について下記の項目を検査する. なお, 日と週の表記については, 投与開始日を第1日, 第1日～第7日を第1週とする.

2.7.1. 一般状態 (KSOP/ANH/1002, 2005)

全例について, 1日2回(投与前, 投与後)観察する. 衰弱動物については, 必要に応じて瀕死期解剖する.

2.7.2. 体重 (KSOP/ANH/2003)

全例の体重を以下の予定で測定する. また, 各測定日間の体重増加量を算出する.
第1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85, 91, 99, 113, 127, 141, 155, 169, 182, 197, 211, 225, 239, 253, 267, 281, 295, 309, 323, 337, 351 および 364 日

2.7.3. 摂餌量 (KSOP/ANH/2006)

ケージ毎の風袋込み重量を以下の予定で測定し, 各測定期間の1匹あたりの1日

平均摂餌量を算出する。

第 1～8, 8～15, 15～22, 22～29, 29～36, 36～43, 43～50, 50～57, 57～64, 64～71, 71～78, 78～85, 87～91, 92～99, 106～113, 120～127, 134～141, 148～155, 162～169, 178～182, 190～197, 204～211, 218～225, 232～239, 246～253, 260～267, 274～281, 288～295, 302～309, 316～323, 330～337, 344～351 および 360～364 日

2.7.4. 血液学的検査 (KSOP/ANH/2020, 2021; KSOP/CLI/1103, 1201, 1202, 2001, 2101, 2201, 2301, 2401, 2411, 2421, 2431, 2501)

投与期間終了時の各計画解剖時（第 13 週間投与後解剖動物：第 92 日（各群先頭番号から 10 例）および 93 日（各群残りの 10 例）、第 26 週間投与後解剖動物：183 日（各群先頭番号から 10 例）および 184 日（各群残りの 10 例）、第 52 週間投与後解剖動物：365 日（各群先頭番号から 10 例）および 366 日（各群残りの 10 例））に、前日の夕方から絶食を実施した対象動物の全生存動物について、チオペンタールナトリウム（ラボナール、田辺製薬株式会社）を腹腔内投与して麻酔し、後大静脈より採血する。採取した血液を用いて下記の項目を測定する。(9), (10) の測定には、凝固阻止剤として 3.2 w/v %クエン酸三ナトリウム水溶液を使用し、遠心分離（12,000 rpm, 10,000 g 以上, 3 分間, 約 4℃）して得られる血漿を用いる。その他の項目の測定には、凝固阻止剤 EDTA-2K で処理した血液を用いる。瀕死期解剖動物についても可能な限り測定する。残余の血液および血漿は廃棄する。

項 目	方 法	測定機器
(1) 赤血球数	球状化处理二次元レーザーFCM 法	(a)
(2) ヘモグロビン濃度	シアンメトヘモグロビン法	(a)
(3) ヘマトクリット値	球状化处理二次元レーザーFCM 法	(a)
(4) 平均赤血球容積 (MCV)	(1), (3)より算出	-
(5) 平均赤血球血色素量 (MCH)	(1), (2)より算出	-
(6) 平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	(2), (3)より算出	-
(7) 網赤血球数	RNA 染色によるレーザーFCM 法	(a)
(8) 血小板数	球状化处理二次元レーザーFCM 法	(a)
(9) プロトロンビン時間 (PT)	光散乱検出方式	(b)
(10) 活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)	光散乱検出方式	(b)
(11) 白血球数	酸性界面活性剤によるレーザーFCM 法	(a)
(12) 白血球百分率	Wright 染色塗抹標本について測定	(c)

測定機器： (a), ADVIA120 (バイエル メディカル株式会社)
 (b), CA-510 (シスメックス株式会社)
 (c), MICROX HEG-50, HEG-50VF (オムロン株式会社)

2.7.5. 血液生化学的検査 (KSOP/CLI/1103, 1201, 3001, 3101, 3201)

各計画解剖時に、採取した血液の一部を室温・遮光下で 30 分間以上放置後、遠心分離 (3,000 rpm, 1500 g 以上, 10 分間, 約 4°C) して得られる血清を用いて下記の項目を可能な限り測定する。瀕死期解剖動物についても可能な限り測定する。測定は原則として採血当日に行う。測定できない場合は、約-80°C (許容範囲:-60°C 以下) のフリーザー内で保存する。残余の血清は約 -80°C (許容範囲:-60°C 以下) のフリーザー内で保存し、試験終了時まで廃棄する。

項 目	方 法	測定機
(1) ASAT (GOT)	UV-rate 法 (JSCC 改良法)	(a)
(2) ALAT (GPT)	UV-rate 法 (JSCC 改良法)	(a)
(3) γ GT	γ -グルタミル-p-ニトロアニリド 基質法 (SSCC 改良法)	(a)
(4) ALP	p-ニトロフェニルリン酸基質法 (JSCC 改良法)	(a)
(5) 総ビリルビン	酵素法 (BOD 法)	(a)
(6) 尿素窒素	酵素-UV 法 (Urease-LEDH 法)	(a)
(7) クレアチニン	酵素法 (Creatininase-POD 法)	(a)
(8) グルコース	酵素-UV 法 (HK-G6PDH 法)	(a)
(9) 総コレステロール	酵素法 (CO-HDAOS 法)	(a)
(10) リン脂質	酵素法 (COD-DAOS 法)	(a)
(11) トリグリセライド	酵素法 (GPO-HDAOS 法, グリセリン消去法)	(a)
(12) 総蛋白	Biuret 法	(a)
(13) アルブミン	BCG 法	(a)
(14) A/G 比	総蛋白およびアルブミンより算出	-
(15) カルシウム	OCPC 法	(a)
(16) 無機リン	酵素法 (PNP-XOD-POD 法)	(a)
(17) ナトリウム (Na)	イオン選択電極法	(a)
(18) カリウム (K)	イオン選択電極法	(a)
(19) クロール (Cl)	イオン選択電極法	(a)
(20) グロブリン分画	セルロースアセテート膜電気泳動法	(b)

測定機器： (a), TBA-200FR (株式会社東芝)
 (b), Epalyzer (株式会社ヘレナ研究所)

2.7.6 血液ガス分析およびメトヘモグロビン濃度

各計画解剖前の投与期間終了週 (第 13 週間投与後解剖動物：第 91 日, 第 26 週間投与後解剖動物：第 182 日, 第 52 週間投与後解剖動物：364 日) に無麻酔下で尾動脈より採血した血液を用いて以下の項目を測定する。なお、測定の詳細については試験計画書変更書を作成する。

項 目	方 法	測定機器
(1) 酸素分圧 (PaO ₂)	電極法	(a)
(2) メトヘモグロビン	吸光度	(a)

測定機器：(a), バイエル 850 (バイエル メディカル株式会社)

2.7.7 尿検査 (KSOP/ANH/1003; KSOP/CLI/1103, 3001, 4001, 4101, 4202, 4203, 4204, 4301)

各計画解剖前の投与期間終了週（第 13 週検査：第 86 日，第 26 週検査：第 177 日，第 52 週検査：第 359 日）の投与前の 7:00～13:00 の間に餌水を与えない状態で下記に示す動物の新鮮尿を採取して下記の (1)～(7) および (13) の項目を検査する。その後，餌水を与えながら約 20 時間蓄積尿を採取し，下記の (8)～(12) の項目を検査する。(10)～(12) の検査に用いた残りの尿は約-80℃（許容範囲：-60℃以下）のフリーザー内で保存し，試験終了時までには廃棄する。その他の尿は測定終了次第廃棄する。

<尿検査対象動物>

群名	尿検査対象動物	
	雄	雌
対照	15 * ¹ (10101-10115) * ²	15(50101-50115)
250 mg/kg	15 (10201-10215)	15(50201-50215)
500 mg/kg	15 (10301-10315)	15(50301-50315)
1000 mg/kg	15 (10401-10415)	15(50401-50415)

*¹, 動物数； *², 動物番号

<尿検査項目>

項 目	方 法	測定機器
(1) pH	試験紙法 (マルティスティックス, バイエル メディカル株式会社)	(a)
(2) 蛋白	試験紙法 (マルティスティックス, バイエル メディカル株式会社)	(a)
(3) グルコース	試験紙法 (マルティスティックス, バイエル メディカル株式会社)	(a)
(4) ケトン体	試験紙法 (マルティスティックス, バイエル メディカル株式会社)	(a)
(5) ビリルビン	試験紙法 (マルティスティックス, バイエル メディカル株式会社)	(a)
(6) 潜血	試験紙法 (マルティスティックス, バイエル メディカル株式会社)	(a)

(7)	ウロビリノーゲン	試験紙法 (マルティステックス, バイエル メディカル株式会社)	(a)
(8)	尿量	メスシリンダーで測定	-
(9)	比重	屈折法	(b)
(10)	ナトリウム (Na)	イオン選択電極法	(c)
(11)	カリウム (K)	イオン選択電極法	(c)
(12)	クロール (Cl)	電量滴定法	(c)
(13)	尿沈渣	Sternheimer-Malbin 染色した標本を鏡検	-
測定機器： (a), クリニテック 100 (バイエル メディカル株式会社)			
(b), ユリコン-JE (株式会社アタゴ)			
(c), PVA- α III (株式会社エイアンドティー)			

2.7.8. 眼科学的検査 (KSOP/CLI/6201)

投与開始前日 (群分け日), 各計画解剖前の投与期間終了週 (第 13 週検査: 第 89 日, 第 26 週検査: 第 180 日, 第 52 週検査: 第 362 日) に下記に示す動物について, 照明を暗くした状態で, ペンライト等を用いて対光反射を検査し, スリットランプ (SL-14, 興和株式会社) を用いて前眼部および中間透光体を, 双眼倒像鏡 (オメガ 200, ハイネ社) を用いて眼底を検査する。前眼部, 中間透光体および眼底検査は散瞳剤 (ミドリリン P, 参天製薬株式会社) 点眼後に行う。

群名	眼科学的検査対象動物	
	雄	雌
対照	15 * ¹ (10101-10115) * ²	15(50101-50115)
250 mg/kg	15 (10201-10215)	15(50201-50215)
500 mg/kg	15 (10301-10315)	15(50301-50315)
1000 mg/kg	15 (10401-10415)	15(50401-50415)

*1, 動物数; *2, 動物番号

2.7.9. 病理学的検査

(1) 器官重量 (KSOP/PAT/2201)

投与期間終了時の各計画解剖時 (第 13 週間投与後解剖動物: 第 92 日 (各群先頭番号から 10 例) および 93 日 (各群残りの 10 例), 第 26 週間投与後解剖動物: 183 日 (各群先頭番号から 10 例) および 184 日 (各群残りの 10 例), 第 52 週間投与後解剖動物: 365 日 (各群先頭番号から 10 例) および 366 日 (各群残りの 10 例) の全生存動物について, 下記の器官重量を測定する (両側性の器官はま

めて測定する)。甲状腺および下垂体はホルマリン固定後に測定する。また、解剖日に体重を測定し、その体重に基づいて相対重量を算出する。死亡動物の体重は測定するが、器官重量は測定しない。

肝臓、腎臓、副腎、甲状腺（上皮小体を含む）、下垂体、卵巣、子宮、前立腺（腹葉）、精嚢（前立腺背葉・側葉を含む）、精巣、脳、唾液腺（顎下、舌下）、肺、心臓、脾臓

(2) 病理解剖検査 (KSOP/PAT/2001, 2002, 2101)

各計画解剖動物と瀕死期解剖動物は採血後、腹大動脈を切断・放血し、安楽死させた後、剖検する。死亡動物は発見後速やかに剖検する。

(3) 器官・組織の採取および固定 (KSOP/PAT/3001, 3002, 3101)

各計画解剖動物と瀕死期解剖動物の下記器官・組織を採取し、10 vol %中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定し、保存する。ただし、精巣はブアン液で、眼球、ハーダー腺、視神経はダビドソン液でそれぞれ固定後、10 vol %中性リン酸緩衝ホルマリン液で保存する（死亡動物は 10 vol %中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定・保存する）。

心臓、リンパ節（下顎・腸間膜・肺門）、胸腺、脾臓、気管、肺および気管支、舌、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、唾液腺（顎下・舌下・耳下、両側）、肝臓、膵臓、腎臓（両側）、膀胱、精巣（両側）、精嚢、前立腺（腹葉・側葉・背葉）、精巣上体（両側）、下垂体、甲状腺および上皮小体（両側）、副腎（両側）、大腿骨および骨髄（片側）、胸骨および骨髄、皮膚、乳腺、眼球（両側）、ハーダー腺（両側）、視神経（両側）、大脳、小脳、脊髄、卵巣（両側）、子宮、膣、大動脈（胸部）、骨格筋（大腿部、片側）、坐骨神経（片側）、その他肉眼的異常部位

(4) 器官・組織の送付 (KSOP/MAN/8001)

全動物の上記器官・組織の 10 vol %中性リン酸緩衝ホルマリン浸漬標本を下記に送付する。

株式会社バイオ病理研究所
大分県東国東郡国東町小原 1200-2
金林 輝彦

(5) 病理標本作製

株式会社バイオ病理研究所においてヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製する。標本作製の詳細については株式会社バイオ病理研究所において作成する病理標本作製計画書に記載する。完成した病理組織標本（プレパラート）、パラフィンブロック標本および 10 vol %中性リン酸緩衝ホルマリン浸漬標本は全て株式会社三菱化学安全科学研究所が受領する。

(6) 病理組織学的検査（KSOP/PAT/4001, 4002, 4004）

各計画解剖動物の対照群と 1000 mg/kg 群の全動物ならびに死亡・瀕死期解剖動物の上記器官・組織，死亡・瀕死期解剖動物を含む全動物の肺，肉眼的異常部位について鏡検する。検査の結果，1000 mg/kg 群で被験物質投与の影響が疑われる変化が認められた場合は，その他の群の動物について当該器官・組織も検査する。また，病理診断のために特殊染色が有効と判断される場合は，その目的に合致した染色を実施し，鏡検する。この時試験計画書変更書を作成する。なお，鏡検は大阪分室で実施し，ヘマトキシリン・エオジン染色標本の鹿島研究所と大阪分室間の移動は，KSOP/PAT/1102 に従う。

2.8. 統計学的解析（KSOP/STA/1001, 1004）

計量データは，多重比較検定法で統計学的有意性を解析する。すなわち Bartlett 法による分散の均一性を調べ，分散が等しい場合は一元配置分散分析，分散が等しくない場合は Kruskal-Wallis の検定を行う。それらの結果，群間に有意差が認められた場合は Dunnett 法（分散が等しい場合）あるいは Dunnett 型（分散が等しくない場合）の多重比較検定によって対照群との間で平均値の差の検定を行う。グレードのある計数データは，Kruskal-Wallis の検定を行い，有意差が認められた場合は Dunnett 型の多重比較検定によって対象群と各用量群を比較する。

Bartlett 法，一元配置分散分析および Kruskal-Wallis の検定の有意水準は 5 %，その他の検定は 1 および 5 %とする。検定は安全性試験システム（MiTOX，三井造船システム技研株式会社）を用いて解析する。

統計学的解析の対象項目は下記の通りである。一般状態，眼科学的検査，病理解剖検査および病理組織学的検査結果については，統計学的解析を実施しない。

計量データ：体重，体重増加量，摂餌量，血液学的検査，血液生化学的検査，酸素分圧，メトヘモグロビン濃度，尿検査（尿量，比重，ナトリウム，カリウム，クロール），器官重量，器官相対重量

計数データ：尿検査（pH，蛋白，グルコース，ケトン体，ビリルビン，潜血，ウ

ロビリノーゲン，尿沈渣)

2.9. コンピュータシステムの使用 (KSOP/SYS/2002, 2003, 2004)

以下に示すデータの収集および統計学的解析には安全性試験システム (MiTOX, 三井造船システム技研株式会社) を使用する。当該システムのコンピュータプロトコールにはデータ収集範囲，データ収集の日程等を登録する。コンピュータシステムのプロトコール番号として，B040030_ (_は空白) を用いる。また，微生物モニタリング用動物についても毒性試験動物と同様に上記の安全性試験システムを用いてデータ収集する。なお，コンピュータシステムのプロトコール番号として，B040030M を用いる。

データ収集および解析：

体重 (微生物モニタリング用動物を含む)，群分け，投与液量算出，摂餌量，血液学的検査，血液生化学的検査，酸素分圧，メトヘモグロビン濃度，尿検査，器官重量，器官相対重量，病理組織学的所見

データ集計：一般状態 (微生物モニタリング用動物を含む)，剖検所見 (微生物モニタリング用動物を含む)

3. 最終報告書

最終報告書は、以下の項目を含む。

陳述書（試験責任者）

表題

試験目的

試験委託者

試験施設

信頼性基準

外部委託

試験日程

保存資料、保存場所および保存期間

要約

材料および方法

試験結果

一般状態

体重

摂餌量

血液学的検査

血液生化学的検査

血液ガス分析およびメトヘモグロビン濃度

尿検査

眼科学的検査

器官重量

剖検所見

病理組織学的所見

考察および結論

文献（もしあれば）

添付する図表等

一般状態

体重

体重増加量

摂餌量

血液学的検査

血液生化学的検査

血液ガス分析およびメトヘモグロビン濃度
尿検査
眼科学的検査
器官重量および器官相対重量
剖検所見
病理組織学的所見
アマメシバ粉末中の過酸化物質および夾雑物に関する分析報告書
信頼性保証証明書（信頼性保証部門）

4. 試験責任者署名および捺印

試験委託者： 内閣府 食品安全委員会事務局

表 題： アマメシバ粉末のラットを用いた経口投与による 52 週間反復投与
毒性試験

試験番号： B040030

試験責任者： 2004 年 3 月 5 日 千田 哲士



千田哲士
株式会社三菱化学安全科学研究所
鹿島研究所 毒性第 1 研究部

試験計画書変更書

1. 試験委託者

内閣府 食品安全委員会事務局

2. 表題

アマメシバ粉末のラットを用いた経口投与による 52 週間反復投与毒性試験

3. 試験番号

B040030

4. 変更書番号

1

5. 試験施設

株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

6. 試験責任者署名および捺印

試験責任者： 2004年 3 月 16 日

千田 哲士



千田 哲士

株式会社三菱化学安全科学研究所
鹿島研究所 毒性第 1 研究部

7. 変更内容

変更 1

変更箇所

12 ページ, 2.5.1 方法・頻度, 下線部は変更箇所を示す.

変更前

予め 6～8 日分の被験物質を使用日毎に分けて秤量しておく。使用日に被験物質をメートルグラスに入れる。次に注射用水を適当量加えてなじませた後, 注射用水を加えて所定量にメスアップし, 投与液とする. 投与液の調製は用時調製とし, 被験物質の秤量および投与液の調製は黄色蛍光灯下で行う. なお, 対照群は媒体である注射用水をそのまま投与する.

変更後

予め 6～8 日分の被験物質を使用日毎に分けて秤量後, メートルグラスに入れパラフィルムで封をする。使用日に注射用水を適当量加えてなじませた後, 注射用水を加えて所定量にメスアップし, 投与液とする. 投与液の調製は用時調製とし, 被験物質の秤量および投与液の調製は黄色蛍光灯下で行う. なお, 対照群は媒体である注射用水をそのまま投与する.

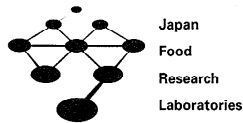
変更理由

秤量した被験物質をメートルグラスに入れて保存した方が, 投与当日の調剤が迅速に行えるため.

以上

添付資料-2

「アマメシバ粉末のラットを用いた経口投与による 52 週間反復
投与毒性試験」におけるアマメシバ粉末の品質の確認（本試験）



試 験 報 告 書

第 104013767-001 号
2004年(平成16年)03月23日

試験委託者 株式会社 三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

検 体 アマメシバ粉末

表 題 「アマメシバ粉末のラットを用いた経口投与による52週間反復投与毒性試験」における
アマメシバ粉末の品質の確認(本試験)

2004年(平成16年)02月03日当センターに提出された
上記検体について試験した結果は次のとおりです。

財団法人

日本食品分析センター

東京本部 〒151-0062 東京都渋谷区元代々木町52番1号
大阪支所 〒564-0091 大阪府吹田市豊津町3番1号
名古屋支所 〒460-0011 名古屋市中区大須4丁目5番13号
九州支所 〒812-0034 福岡市博多区下呉服町1番12号
多摩研究所 〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目11番10号
千歳研究所 〒066-0052 北海道千歳市文京2丁目3番

本報告書を他に掲載するときは当センターの承認を受けて下さい。

「アマメシバ粉末のラットを用いた経口投与による52週間反復投与毒性試験」におけるアマメシバ
粉末の品質の確認(本試験)

1 試験委託者

株式会社 三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
茨城県鹿島郡波崎町砂山14番地

2 委託責任者

土志田 和夫

3 検 体

アマメシバ粉末

4 試験受託者

財団法人 日本食品分析センター
東京都渋谷区元代々木町52番1号

5 試験実施施設

財団法人 日本食品分析センター 名古屋支所
愛知県名古屋市中区大須4丁目5番13号

6 試験責任者

栄養科学部 油脂分析課
後藤 浩文

7 試験実施期間

2004年03月10日～2004年03月16日

8 試験概要

検体について、抽出油の過酸化価の試験を3回実施した。

財団法人 日本食品分析センター

9 試験結果

抽出油の過酸化物価の試験結果を表-1示した。

表-1 試験結果

試験回数	抽出油の過酸化物価 (meq/kg)
1回目	33.7
2回目	34.5
3回目	29.6
平均値	32.6

10 試験方法

1) 油脂の抽出

検体30 gをポリ容器に量りとり、ジエチルエーテルを150 ml加え、ふたをして振とう機にて20分間振とうした。振とう後、無水硫酸ナトリウムにて脱水ろ過し、ろ液を重量既知のなす形フラスコにとった。無水硫酸ナトリウムを50 mlのジエチルエーテルにて洗浄し、先のろ液と合わせたものをロータリーエバポレーター(40℃減圧下)にて溶媒留去し、さらに真空ポンプで完全に溶媒を留去したものを抽出油とし、抽出油の重量を求めた。

2) 過酸化物価の測定

酢酸-クロロホルム混液を30 ml加えて抽出油を溶解し、窒素ガスを封入した。飽和ヨウ化カリウム溶液を0.5 ml加え、暗所に5分間静置後、水を30 ml加え激しく振とうした。次に、デンプン溶液を1 ml加え、0.01 mol/lチオ硫酸ナトリウム標準溶液にて紫色が消失する点を終点として滴定し、以下の計算式により過酸化物価を算出した。

$$\text{過酸化物価 (meq/kg)} = \frac{A \times F \times 10}{B}$$

A: 0.01 mol/lチオ硫酸ナトリウム標準溶液使用量(ml)

F: 0.01 mol/lチオ硫酸ナトリウム標準溶液のファクター

B: 抽出油重量(g)

11 信頼性基準

試験に関しては薬事法施行規則(昭和36年2月1日厚生省告示第1号)第18条の4の3(申請資料の信頼性の基準)及び新医薬品等の申請資料の信頼性の基準の遵守について(平成10年12月1日医薬審第1058号)に従った。

以 上

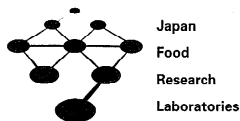
本資料は、私(他2名)が実施した試験に基づいて作成されたものに相違ありません。

2004. 3. 24

後藤 浩文 

添付資料-3

「アマメシバ粉末のラットを用いた経口投与による 52 週間反復
投与毒性試験」におけるアマメシバ粉末中の夾雑物分析（本試験）



試 験 報 告 書

第 104013767-002 号
2004年(平成16年)03月23日

試験委託者 株式会社 三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

検 体 アマメシバ粉末

表 題 「アマメシバ粉末のラットを用いた経口投与による52週間反復投与毒性試験」における
アマメシバ粉末中の夾雑物分析(本試験)

2004年(平成16年)02月03日当センターに提出された
上記検体について試験した結果は次のとおりです。

財団法人

日本食品分析センター

東京本部 〒151-0062 東京都渋谷区元代々木町52番1号
大阪支所 〒554-0061 大阪府吹田市豊津町3番1号
名古屋支所 〒460-0011 名古屋市中区大須4丁目5番13号
九州支所 〒812-0034 福岡市博多区下呉服町1番12号
多摩研究所 〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目11番10号
千歳研究所 〒066-0052 北海道千歳市文京2丁目3番

本報告書を他に掲載するときは当センターの承認を受けて下さい。

「アマメシバ粉末のラットを用いた経口投与による52週間反復投与毒性試験」におけるアマメシバ
粉末中の夾雑物分析(本試験)

1 試験委託者

株式会社 三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
茨城県鹿島郡波崎町砂山14番地

2 委託責任者

土志田 和夫

3 検 体

アマメシバ粉末

4 試験受託者

財団法人 日本食品分析センター
東京都渋谷区元代々木町52番1号

5 試験実施施設

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所
東京都多摩市永山6丁目11番10号

財団法人 日本食品分析センター 大阪支所
大阪府吹田市豊津町3番1号

6 試験責任者

無機試験部 無機分析二課
西村 勉

7 試験分担責任者

応用試験部 応用試験課
岩田 仁

応用試験部 微量分析課
北原 由美

財団法人日本食品分析センター

無機試験部 無機分析課

木村 慎太郎

試験研究部 分析化学課

伊佐川 聡

8 試験実施期間

2004年03月10日～2004年03月19日

9 試験概要

検体について、総水銀、カドミウム、鉛、ヒ素(Asとして)、総クロム、 γ -BHC、DDT、アルドリン、ディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル、マラチオン、パラチオン、アフラトキシンB₁、アフラトキシンB₂、アフラトキシンG₁、アフラトキシンG₂、PCB、エストラジオール、ニトロソジメチルアミン、ニトロソジエチルアミンの定量試験を各3回実施した。

10 試験結果

試験結果を表-1に示した。

表-1-1 試験結果

試験項目	試験回数	結果	検出限界
総水銀	1回目	0.01 ppm	—
	2回目	0.01 ppm	—
	3回目	0.01 ppm	—
	平均値	0.01 ppm	—
カドミウム	1回目	0.33 ppm	—
	2回目	0.37 ppm	—
	3回目	0.35 ppm	—
	平均値	0.35 ppm	—
鉛	1回目	0.73 ppm	—
	2回目	0.72 ppm	—
	3回目	0.75 ppm	—
	平均値	0.73 ppm	—
ヒ素(Asとして)	1回目	検出せず	0.1 ppm
	2回目	検出せず	0.1 ppm
	3回目	検出せず	0.1 ppm
総クロム	1回目	1.8 ppm	—
	2回目	1.7 ppm	—
	3回目	1.8 ppm	—
	平均値	1.8 ppm	—

表-1-2 試験結果

試験項目	試験回数	結果	検出限界
γ-BHC	1回目	検出せず	0.005 ppm
	2回目	検出せず	0.005 ppm
	3回目	検出せず	0.005 ppm
DDT	1回目	検出せず	0.05 ppm
	2回目	検出せず	0.05 ppm
	3回目	検出せず	0.05 ppm
アルドリン	1回目	検出せず	0.01 ppm
	2回目	検出せず	0.01 ppm
	3回目	検出せず	0.01 ppm
ディルドリン	1回目	検出せず	0.01 ppm
	2回目	検出せず	0.01 ppm
	3回目	検出せず	0.01 ppm
エンドリン	1回目	検出せず	0.01 ppm
	2回目	検出せず	0.01 ppm
	3回目	検出せず	0.01 ppm
ヘプタクロル	1回目	検出せず	0.01 ppm
	2回目	検出せず	0.01 ppm
	3回目	検出せず	0.01 ppm
馬拉チオン	1回目	検出せず	0.05 ppm
	2回目	検出せず	0.05 ppm
	3回目	検出せず	0.05 ppm
パラチオン	1回目	検出せず	0.05 ppm
	2回目	検出せず	0.05 ppm
	3回目	検出せず	0.05 ppm
アフラトキシンB ₁	1回目	検出せず	5 ppb
	2回目	検出せず	5 ppb
	3回目	検出せず	5 ppb
アフラトキシンB ₂	1回目	検出せず	5 ppb
	2回目	検出せず	5 ppb
	3回目	検出せず	5 ppb
アフラトキシンG ₁	1回目	検出せず	5 ppb
	2回目	検出せず	5 ppb
	3回目	検出せず	5 ppb
アフラトキシンG ₂	1回目	検出せず	5 ppb
	2回目	検出せず	5 ppb
	3回目	検出せず	5 ppb
PCB	1回目	検出せず	0.01 ppm
	2回目	検出せず	0.01 ppm
	3回目	検出せず	0.01 ppm
エストラジオール	1回目	検出せず	0.01 ppm
	2回目	検出せず	0.01 ppm
	3回目	検出せず	0.01 ppm

表-1-3 試験結果

試験項目	試験回数	結果	検出限界
ニトロソジメチルアミン	1回目	検出せず ^{a)}	0.01 ppm
	2回目	検出せず ^{a)}	0.01 ppm
	3回目	検出せず ^{a)}	0.01 ppm
ニトロソジエチルアミン	1回目	検出せず ^{a)}	0.01 ppm
	2回目	検出せず ^{a)}	0.01 ppm
	3回目	検出せず ^{a)}	0.01 ppm

11 試験方法

1) 総水銀

検体1 gをなす形フラスコに採取し、硫酸及び硝酸を加え、還流冷却器を接続し、ガスバーナー上で湿式分解を行った。放冷後、過マンガン酸カリウム0.5 gを加え加熱した。放冷後、20 %塩化ヒドロキシルアンモニウム溶液を少量加え、過マンガン酸カリウム溶液の色が消えたことを確認後、水銀発生用フラスコに移し、水を加えて100 mlとし試験溶液とした。

試験溶液について、10 %塩化第一スズ溶液2 mlを加え、水銀分析計で測定し、検体中の総水銀を定量した。

〈水銀分析計操作条件〉

機 種：HG200〔平沼産業株式会社〕

波 長：253.7 nm

2) カドミウム及び鉛

検体2 gをケルダールフラスコに採取し、硫酸5 ml及び硝酸を適宜加えながら、完全に分解するまでガスバーナー上で湿式分解を行った。放冷後、水及び20 %塩酸10 mlを加え、ガスバーナー上で煮沸した。この液を分液漏斗に移し、50 %クエン酸アンモニウム溶液10 mlを加えた後、チモールブルー溶液を指示薬として、アンモニア水を用いて中和し放冷した。分液漏斗に水を加えて100 mlとした後、3 %ピロリジンジチオカルバミン酸アンモニウム溶液5 mlを加えてよくかくはんした。その後、酢酸ブチル5 mlを加えて、5分間振とう抽出した後、静置して酢酸ブチル層をとり試験溶液とした。

この試験溶液について、原子吸光度法によりカドミウム及び鉛を測定し、検体中のカドミウム及び鉛を定量した。

〈原子吸光光度計操作条件〉

機 種：AA-890[日本ジャーレラッシュ株式会社]
光 源：鉛中空陰極ランプ[浜松ホトニクス株式会社]
カドミウム中空陰極ランプ[浜松ホトニクス株式会社]
波 長：鉛 283.3 nm
カドミウム 228.8 nm
フレイム：空気 7.0 l/min-アセチレン 0.7 l/min

3) ヒ素(Asとして)

検体1 gをケルダールフラスコに採取し、硫酸5 ml及び硝酸を適宜加えながら、完全に分解するまでガスバーナー上で湿式分解を行った。放冷後ビーカーに移し、40 %ヨウ化カリウム溶液5 mlを加えて30分間放置した後、10 %アスコルビン酸溶液5 mlと水を加えて50 mlに定容したものを試験溶液とした。

この試験溶液に0.6 %水素化ホウ素ナトリウム-0.5 %水酸化ナトリウム溶液及び10 mol/lの塩酸を加えながら、水素化物発生原子吸光光度法によりヒ素を測定し、検体中のヒ素を定量した。

〈水素化物発生原子吸光分析計操作条件〉

機 種：SpectrAA 220[バリアン テクノロジーズ ジャパン リミテッド]
水素化物発生装置：VGA-77型[バリアン テクノロジーズ ジャパン リミテッド]
光 源：ヒ素中空陰極ランプ[バリアン テクノロジーズ ジャパン リミテッド]
ガス圧力：アルゴン 0.4 kgf/cm²
測定波長：193.7 nm
石英加熱セル温度：925 °C

4) 総クロム

検体3 gをビーカーに採取し、予備灰化した後、500 °Cで完全に灰化した。放冷後、6 mol/l塩酸3 mlを加え、ホットプレート上で蒸発乾固した後、さらに塩酸2 mlを加え加熱した。この液をろ紙(No. 5A)でろ過し、水で50 mlに定容したものを試験溶液とした。

この試験溶液について、誘導結合プラズマ発光光度法によりクロムを測定し、検体中の総クロムを定量した。

〈誘導結合プラズマ発光分光装置操作条件〉

機 種：Optima 3300DV[株式会社 パーキンエルマージャパン]

高周波出力：1,300 W

ガス流量：アルゴン(プラズマガス) 15 l/min

アルゴン(補助ガス) 1.0 l/min

アルゴン(キャリアーガス) 0.80 l/min

試料導入力：1.50 ml/min

ネブライザー：クロスフロー型

プラズマ観測位：水平方向

波 長：267.716 nm

内標準元素として、371.029 nm(イットリウム)

5) γ -BHC, DDT, アルドリン, ディルドリン, エンドリン及びヘプタクロル

検体5 gを遠心管に採取し、セライト5 gを加えて拡散した後、水30 ml及びアセトン100 mlを加えて、60分間振とう抽出した。抽出液を吸引ろ過した後、ろ紙上の残留物をアセトン50 mlで洗浄し、ろ液と洗浄液を合わせ、アセトンを用いて200 mlに定容した。その溶液20 mlを分液漏斗に分取し、水200 ml、ヘキサン100 ml及び塩化ナトリウム10 gを加え5分間振とう抽出した。静置後、ヘキサン層を分取した後、更に水層にヘキサン50 mlを加えて、5分間振とう抽出し、最初のヘキサン層と合わせ、無水硫酸ナトリウムを用いて脱水ろ過後、ヘキサン層を減圧濃縮乾固した。残留物にヘキサン10 mlを加えて溶解後、予備洗浄したFlorisil カートリッジカラム(Sep-Pak)に4 mlを負荷し、ヘキサン及びジエチルエーテルの混液(85:15)10 mlで溶出した。溶出液を減圧濃縮乾固し、残留物にヘキサン2 mlを加えて溶解したものを試験溶液とした。

この試験溶液について、ガスクロマトグラフ法で γ -BHC, p,p'-DDE, p,p'-DDD, p,p'-DDT, o,p'-DDE, o,p'-DDD, o,p'-DDT, アルドリン, ディルドリン, エンドリン及びヘプタクロルを測定し、p,p'-DDE, p,p'-DDD, p,p'-DDT, o,p'-DDE, o,p'-DDD及びo,p'-DDTの和をDDTとして、検体中の各成分の濃度を定量した。

〈ガスクロマトグラフ操作条件〉

機 種：6890[HEWLETT-PAKARD Company]

検 出 器：ECD

カ ラ ム：DB-1701[J&W SCIENTIFIC], ϕ 0.25 mm $\times$ 30 m, 膜厚 0.25 μ m温 度：注入口 250 $^{\circ}$ C, 検出器 300 $^{\circ}$ Cカラム 80 $^{\circ}$ C(2 min保持) $\rightarrow$ 30 $^{\circ}$ C/min昇温 $\rightarrow$ 190 $^{\circ}$ C $\rightarrow$ 3.6 $^{\circ}$ C/min昇温 $\rightarrow$ 280 $^{\circ}$ C(5 min保持)

ガス流量：ヘリウム(キャリアーガス) 2.5 ml/min

窒素(追加ガス) 30 ml/min

注 入 量：2 μ l

6) マラチオン及びパラチオン

検体5 gを遠心管に採取し、セライト5 gを加えて拡散した後、水30 ml及びアセトン100 mlを加えて、60分間振とう抽出した。抽出液を吸引ろ過した後、ろ紙上の残留物をアセトン50 mlで洗浄し、ろ液と洗浄液を合わせ、アセトンを用いて200 mlに定容した。その溶液20 mlを分液漏斗に分取し、水200 ml、ヘキサン100 ml及び塩化ナトリウム10 gを加え5分間振とう抽出した。静置後、ヘキサン層を分取した後、更に水層にヘキサン50 mlを加えて、5分間振とう抽出し、最初のヘキサン層と合わせ、無水硫酸ナトリウムを用いて脱水ろ過後、ヘキサン層を減圧濃縮乾固した。残留物にヘキサン10 mlを加えて溶解後、予備洗浄したFlorisil カートリッジカラム (Sep-Pak) に4 mlを負荷し、ヘキサン及びアセトンの混液(95:5) 20 mlで溶出した。溶出液を減圧濃縮乾固し、残留物にアセトン2 mlを加えて溶解したものを試験溶液とした。

この試験溶液について、ガスクロマトグラフ法でマラチオン、パラチオンを測定し、検体中の各成分の濃度を定量した。

〈ガスクロマトグラフ操作条件〉

機種：6890[Agilent Technologies]

検出器：FPD Pフィルター

カラム：DB-1701[J&W SCIENTIFIC], ϕ 0.25 mm×15 m, 膜厚 0.25 μ m

温度：注入口及び検出器 250 $^{\circ}$ C

カラム 80 $^{\circ}$ C (1 min保持)→20 $^{\circ}$ C/min昇温→280 $^{\circ}$ C (4 min保持)

ガス流量：ヘリウム(キャリアーガス) 2 ml/min

ヘリウム(追加ガス) 28 ml/min, 水素 75 ml/min, 空気 100 ml/min

注入量：2 μ l

7) アフラトキシンB₁, アフラトキシンB₂, アフラトキシンG₁及びアフラトキシンG₂

検体約5 gを遠心管に採取し、アセトニトリル及び水の混液(9:1) 50 mlを正確に加え、30分間振とう後、遠心分離した。上澄み液10 mlを正確に分取し、約40 $^{\circ}$ Cで減圧濃縮乾固した。アセトニトリル及び水の混液(9:1) 5 mlを正確に加え溶解した後、多機能カラム (MultiSep #228[Romer Labs, Inc.]) に静かに注入し、最初に溶出される溶出液約1.5 mlを試験管に集め、試験溶液とした。

この試験溶液について高速液体クロマトグラフ法により、アフラトキシンB₁, B₂, G₁及びG₂を測定し、検体中の各成分の濃度を定量した。

〈高速液体クロマトグラフ操作条件〉

機 種：LC-10AS[株式会社 島津製作所] (PHREDフォトケミカルリアクター装着)
検 出 器：蛍光分光検出器 RF-10AxL[株式会社 島津製作所]
カ ラ ム：Mightysil RP-18 GP ϕ 4.6 mm $\times$ 250 mm (5 μ m) [関東化学株式会社]
カラム温度：40 $^{\circ}$ C
移 動 相：水及びメタノールの混液 (6:4)
蛍光励起波長：365 nm, 蛍光測定波長：450 nm
流 量：0.7 ml/min
注 入 量：10 μ l

8) PCB

検体約10 gをなす形フラスコに採取し、1 mol/l水酸化カリウム-エタノール溶液100 mlを加え、90 $^{\circ}$ C水浴上で1時間還流抽出を行った。還流終了後、抽出液が室温になるまで放置し、得られた抽出液にヘキサン100 ml及び精製水100 mlを加え、10分間振とう抽出を行った。ヘキサン層を採取し、精製水100 mlを加えて洗浄後、ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムを用いて脱水ろ過した。得られたヘキサン抽出液を40 $^{\circ}$ C以下で約5 mlまで減圧濃縮した。この濃縮液を予備洗浄したフロリジルカラム*にヘキサンを用いて負荷し、ヘキサン200 mlで溶出させた。得られた溶出液を40 $^{\circ}$ C以下で減圧濃縮乾固後、ヘキサンを用いて2 mlに定容し、試験溶液とした。

この試験溶液について、ガスクロマトグラフ法によりPCBの定量を行った。

* フロリジル20 gをヘキサンを用いて内径2 cmのクロマト管に湿式充填したもの。

〈ガスクロマトグラフ操作条件〉

機 種：5890 SERIES II Plus [HEWLETT-PACKARD Company]
検 出 器：ECD
カ ラ ム：HP-1 [Agilent Technologies]
 ϕ 0.53 mm $\times$ 10 m, 膜厚 2.65 μ m
温 度：注入口 240 $^{\circ}$ C, 検出器 300 $^{\circ}$ C
カラム 170 $^{\circ}$ C (1 min保持) $\rightarrow$ 5 $^{\circ}$ C/min昇温 $\rightarrow$ 230 $^{\circ}$ C (1 min保持)
ガス圧力：ヘリウム(キャリアーガス) 40 kPa
注 入 量：2 μ l

9) エストラジオール

検体2 gを遠心管に採取し、水3 mlとアセトニトリル及びメタノールの混液(8:2)70 mlを加えて、ホモジナイザーで30秒間かくはんした後、2,500 r/minで5分間遠心分離した。上澄み液を分取した後、残留物にアセトニトリル及びメタノールの混液(8:2)50 mlを加えて、15分間振とうした後、2,500 r/minで5分間遠心分離した。上澄み液を分取し、最初の上澄み液と合わせ、脱脂綿でろ過した後、ろ液にアセトニトリルを飽和させたヘキサン60 mlを加えて、5分間振とう抽出した。得られたアセトニトリル-メタノール層を分取し、メタノール60 mlを加えた後、減圧濃縮、乾固した。残留物に10 %塩化ナトリウム溶液100 ml及びジクロロメタン40 mlを加え、5分間振とう抽出後、静置してジクロロメタン層を分取した。残った水層に、更にジクロロメタン40 mlを加え、5分間振とう抽出後、ジクロロメタン層を分取し、最初のジクロロメタン層と合わせ、無水硫酸ナトリウムを用いて脱水ろ過後、ジクロロメタン層を減圧濃縮、乾固した。残留物をシクロヘキサン及び酢酸エチルの混液(8:2)10 mlに溶解し、孔径0.45 μm のメンブランフィルターでろ過した後、シクロヘキサン及び酢酸エチルの混液(8:2)を溶離液とし、ろ過液の5 mlについてゲル浸透クロマトグラフィーを行い、エストラジオールの溶出画分を分取した。この画分を減圧濃縮、乾固した後、ジクロロメタン及びヘキサンの混液(1:1)5 mlを加えて溶解し、予備洗浄したFlorisil カートリッジカラム(Sep-Pak)に負荷し、ジクロロメタン及びヘキサンの混液(1:1)5 mlを加えて洗浄後、ジクロロメタン及びアセトンの混液(95:5)12 mlで溶出した。溶出液を減圧濃縮、乾固し、残留物にメタノール0.5 mlを加えて溶解したものを試験溶液とした。

試験溶液を孔径0.45 μm のメンブランフィルターでろ過した後、高速液体クロマトグラフ法によりエストラジオールを測定し、検体中の濃度を定量した。

〈ゲル浸透クロマトグラフ操作条件〉

機 種：送液ポンプ；PU614[ジーエルサイエンス株式会社]
オートサンプラー；MIDAS[ジーエルサイエンス株式会社]
フラクションコレクター；FC693[ジーエルサイエンス株式会社]
カ ラ ム：Shodex CLN pak EV-2000AC ϕ 20 mm $\times$ 30 cm[昭和電工株式会社]
Shodex CLN pak EV-G ϕ 20 mm $\times$ 10 cm(ガードカラム)[昭和電工株式会社]
カラム温度：室温
移 動 相：シクロヘキサン及び酢酸エチルの混液(8:2)
流 量：5.0 ml/min
注 入 量：5 ml
分取画分：70～130 ml

〈高速液体クロマトグラフ操作条件〉

機 種：LC-10ATvp[株式会社 島津製作所]
検 出 器：蛍光分光検出器 RF-10Axi[株式会社 島津製作所]
カ ラ ム：YMC-Pack ODS AM-312, $\phi 6.0 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$ [株式会社 ワイエムシイ]
カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$
移 動 相：水及びアセトニトリルの混液 (7:3)
流 量：1.0 ml/min
測定波長：蛍光励起波長 280 nm, 蛍光測定波長 305 nm
注 入 量：50 μl

10) ニトロソジメチルアミン及びニトロソジエチルアミン

検体約 20 g をなす形フラスコに採取した。水酸化バリウム八水和物 20 g, 塩化ナトリウム 20 g, 水 100 ml, 1 %スルファミン酸アンモニウムの 0.5 mol/l 硫酸溶液 15 ml 及び消泡剤 1 滴を加え, 水蒸気蒸留を行った。予め受器にジクロロメタン 100 ml を入れ, 留液 250 ml を捕集した。捕集した留液に塩化ナトリウム 20 g を加え, 振とう抽出を行った。ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムを用いて脱水ろ過した後, 水層にジクロロメタン 100 ml を加え, 同様に振とう抽出及び脱水ろ過を繰り返した。得られたジクロロメタン抽出液を 20 $^{\circ}\text{C}$ 以下で減圧濃縮後, 更に窒素ガス気流下で 4 ml まで濃縮したものを試験溶液とした。

この試験溶液について熱エネルギー分析器(以下「TEA」と略す。)付ガスクロマトグラフ法により, *N*-ニトロソジメチルアミン及び*N*-ニトロソジエチルアミンの定量を行う。

〈ガスクロマトグラフ-TEA操作条件〉

機 種：GC部; GC-17A[株式会社 島津製作所]
検 出 器：TEA部; Model-610[Thermo Electron Corporation Analytical Instruments]
カ ラ ム：DB-WAX[J&W SCIENTIFIC]
 $\phi 0.32 \text{ mm} \times 30 \text{ m}$, 膜厚 0.5 μm
温 度：試料注入口 220 $^{\circ}\text{C}$
インターフェイス 200 $^{\circ}\text{C}$
熱分解炉 475 $^{\circ}\text{C}$
カラム 40 $^{\circ}\text{C}$ (1 min 保持) $\rightarrow$ 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 昇温 $\rightarrow$ 160 $^{\circ}\text{C}$ (1 min 保持)
注入方法：スプリットレス
ガス圧力：高純度窒素(キャリアーガス) 50 kPa
注 入 量：2 μl

12 信頼性基準

試験に関しては薬事法施行規則(昭和36年2月1日厚生省告示第1号)第18条の4の3(申請資料の信頼性の基準)及び新医薬品等の申請資料の信頼性の基準の遵守について(平成10年12月1日医薬審第1058号)に従った。

以 上

本資料は、私(他23名)が実施した試験に基づいて作成されたものに相違ありません。

平成16年3月24日
西村 勉

Tables and Appendices

Table 1 Clinical Sign - Summary	1
Table 2 Body Weight - Summary	3
Table 3 Ophthalmoscopy - Summary.....	5
 Appendix 1 Clinical Sign.....	 7
Appendix 2 Body Weight.....	23
Appendix 3 Ophthalmoscopy.....	39

Table 1 Clinical Sign - Summary

Male

Test Substance Dose(mg/kg)	Findings	Day																				
		1			2			3			4			5			6			7		
		10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10
SA 0	Number of Animals	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
	No Abnormality	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
SA 250	Number of Animals	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
	No Abnormality	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
SA 500	Number of Animals	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
	No Abnormality	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
SA 1000	Number of Animals	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
	No Abnormality	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;
Time 10, Before dose; Time 20, After dose;

Female

Table 1 Clinical Sign - Summary

Test Substance Dose (mg/kg)	Findings	Day					
		Time		1		2	
SA 0	Number of Animals No Abnormality	60	60	60	60	60	60
SA 250	Number of Animals No Abnormality	60	60	60	60	60	60
SA 500	Number of Animals No Abnormality	60	60	60	60	60	60
SA 1000	Number of Animals No Abnormality	60	60	60	60	60	60

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;
Time 10, Before dose; Time 20, After dose;

Male

Table 2 Body Weight - Summary

Test Substance Dose (mg/kg)	Day	Mean S.D. n	1
SA 0		182.9 8.5 60	
SA 250		181.2 9.0 60	
SA 500		180.5 8.8 60	
SA 1000		179.9 8.2 60	

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Female

Table 2 Body Weight - Summary

Test Substance Dose (mg/kg)	Day	1
SA	Mean	150.6
	S.D.	8.5
	n	60
SA	Mean	150.9
	S.D.	8.5
	n	60
SA	Mean	149.8
	S.D.	8.7
	n	60
SA	Mean	150.3
	S.D.	8.1
	n	60

Significantly different from control : *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 3 Ophthalmoscopy -- Summary

Structure or function Findings	Test Substance Dose (mg/kg)	Number of Animals Examined	Male					
			SA	SA	SA	SA	SA	SA
			pre-dose	pre-dose	pre-dose	pre-dose	pre-dose	pre-dose
Light reflex								
No abnormality			15	15	15	15	15	15
Anterior portion								
No abnormality			13	12	14	15	15	15
Corneal opacity			2	3	1	0	0	0
Optic media								
No abnormality			7	10	12	9	9	9
Particulate opacity in lens			7	3	3	3	3	3
Focal opacity in lens			1	2	0	5	5	5
Ocular fundus								
No abnormality			15	15	15	15	15	15

Table 3 Ophthalmoscopy – Summary

Structure or function Findings	Test Substance Dose (mg/kg) Number of Animals Examined :	SA : 0 <15> pre-dose	Female			
			SA 250 <15> pre-dose	SA 500 <15> pre-dose	SA 1000 <15> pre-dose	
Light reflex						
No abnormality		15	15	15	15	
Anterior portion						
No abnormality		11	9	9	13	
Corneal opacity		4	6	6	2	
Optic media						
No abnormality		4	7	8	4	
Particulate opacity in lens		11	8	6	8	
Focal opacity in lens		3	2	6	8	
Ocular fundus						
No abnormality		15	15	15	15	

Appendix 1-1		Clinical Sign		SA		0 ng/kg		Male	
Animal Number	Findings	Day Time	1 2 3 4 5 6 7	10 20 10 20 10 20 10 20	10 20 10 20 10 20 10 20	10 20 10 20 10 20 10 20	10 20 10 20 10 20 10 20	10 20 10 20 10 20 10 20	10 20 10 20 10 20 10 20
10101	No Abnormality								
10102	No Abnormality								
10103	No Abnormality								
10104	No Abnormality								
10105	No Abnormality								
10106	No Abnormality								
10107	No Abnormality								
10108	No Abnormality								
10109	No Abnormality								
10110	No Abnormality								
10111	No Abnormality								
10112	No Abnormality								
10113	No Abnormality								
10114	No Abnormality								
10115	No Abnormality								
10116	No Abnormality								
10117	No Abnormality								
10118	No Abnormality								
10119	No Abnormality								
10120	No Abnormality								
10121	No Abnormality								
10122	No Abnormality								
10123	No Abnormality								
10124	No Abnormality								
10125	No Abnormality								
10126	No Abnormality								
10127	No Abnormality								
10128	No Abnormality								
10129	No Abnormality								
10130	No Abnormality								
10131	No Abnormality								
10132	No Abnormality								
10133	No Abnormality								
10134	No Abnormality								
10135	No Abnormality								
10136	No Abnormality								
10137	No Abnormality								
10138	No Abnormality								
10139	No Abnormality								
10140	No Abnormality								

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;
Time 10, Before dose; Time 20, After dose;

Appendix 1-1		Clinical Sign		SA		0 mg/kg		Male	
Animal Number	Findings	Day Time	1 10	2 20	3 10	4 20	5 10	6 20	7 10 20
10141	No Abnormality								
10142	No Abnormality								
10143	No Abnormality								
10144	No Abnormality								
10145	No Abnormality								
10146	No Abnormality								
10147	No Abnormality								
10148	No Abnormality								
10149	No Abnormality								
10150	No Abnormality								
10151	No Abnormality								
10152	No Abnormality								
10153	No Abnormality								
10154	No Abnormality								
10155	No Abnormality								
10156	No Abnormality								
10157	No Abnormality								
10158	No Abnormality								
10159	No Abnormality								
10160	No Abnormality								

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;
Time 10, Before dose; Time 20, After dose;

Appendix 1- 2		Clinical Sign		SA		250 mg/kg		Male	
Animal Number	Findings	Day Time	1 10	2 20	3 10	4 20	5 10	6 20	7 10 20
10201	No Abnormality								
10202	No Abnormality								
10203	No Abnormality								
10204	No Abnormality								
10205	No Abnormality								
10206	No Abnormality								
10207	No Abnormality								
10208	No Abnormality								
10209	No Abnormality								
10210	No Abnormality								
10211	No Abnormality								
10212	No Abnormality								
10213	No Abnormality								
10214	No Abnormality								
10215	No Abnormality								
10216	No Abnormality								
10217	No Abnormality								
10218	No Abnormality								
10219	No Abnormality								
10220	No Abnormality								
10221	No Abnormality								
10222	No Abnormality								
10223	No Abnormality								
10224	No Abnormality								
10225	No Abnormality								
10226	No Abnormality								
10227	No Abnormality								
10228	No Abnormality								
10229	No Abnormality								
10230	No Abnormality								
10231	No Abnormality								
10232	No Abnormality								
10233	No Abnormality								
10234	No Abnormality								
10235	No Abnormality								
10236	No Abnormality								
10237	No Abnormality								
10238	No Abnormality								
10239	No Abnormality								
10240	No Abnormality								

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;
Time 10, Before dose; Time 20, After dose;

Appendix 1-2		Clinical Sign		SA		250 mg/kg		Male	
Animal Number	Findings	Day Time	1 10	2 20	3 10	4 20	5 10	6 20	7 20
10241	No Abnormality								
10242	No Abnormality								
10243	No Abnormality								
10244	No Abnormality								
10245	No Abnormality								
10246	No Abnormality								
10247	No Abnormality								
10248	No Abnormality								
10249	No Abnormality								
10250	No Abnormality								
10251	No Abnormality								
10252	No Abnormality								
10253	No Abnormality								
10254	No Abnormality								
10255	No Abnormality								
10256	No Abnormality								
10257	No Abnormality								
10258	No Abnormality								
10259	No Abnormality								
10260	No Abnormality								
+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe; Time 10, Before dose; Time 20, After dose;									

Appendix 1-3 Clinical Sign

Animal Number	Findings	Day		1		2		3		4		5		6		7		Male
		Time		10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	
10301	No Abnormality																	
10302	No Abnormality																	
10303	No Abnormality																	
10304	No Abnormality																	
10305	No Abnormality																	
10306	No Abnormality																	
10307	No Abnormality																	
10308	No Abnormality																	
10309	No Abnormality																	
10310	No Abnormality																	
10311	No Abnormality																	
10312	No Abnormality																	
10313	No Abnormality																	
10314	No Abnormality																	
10315	No Abnormality																	
10316	No Abnormality																	
10317	No Abnormality																	
10318	No Abnormality																	
10319	No Abnormality																	
10320	No Abnormality																	
10321	No Abnormality																	
10322	No Abnormality																	
10323	No Abnormality																	
10324	No Abnormality																	
10325	No Abnormality																	
10326	No Abnormality																	
10327	No Abnormality																	
10328	No Abnormality																	
10329	No Abnormality																	
10330	No Abnormality																	
10331	No Abnormality																	
10332	No Abnormality																	
10333	No Abnormality																	
10334	No Abnormality																	
10335	No Abnormality																	
10336	No Abnormality																	
10337	No Abnormality																	
10338	No Abnormality																	
10339	No Abnormality																	
10340	No Abnormality																	

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;
Time 10, Before dose; Time 20, After dose;

Appendix 1-3		Clinical Sign		SA		500 ng/kg		Male	
Animal Number	Findings	Day Time	1 10	2 20	3 10	4 20	5 10	6 20	7 20
10341	No Abnormality								
10342	No Abnormality								
10343	No Abnormality								
10344	No Abnormality								
10345	No Abnormality								
10346	No Abnormality								
10347	No Abnormality								
10348	No Abnormality								
10349	No Abnormality								
10350	No Abnormality								
10351	No Abnormality								
10352	No Abnormality								
10353	No Abnormality								
10354	No Abnormality								
10355	No Abnormality								
10356	No Abnormality								
10357	No Abnormality								
10358	No Abnormality								
10359	No Abnormality								
10360	No Abnormality								

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;
Time 10, Before dose; Time 20, After dose;

Appendix 1- 4 Clinical Sign

Animal Number	Findings	Day		1		2		3		4		5		6		7		Male
		Time	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	
10401	No Abnormality																	
10402	No Abnormality																	
10403	No Abnormality																	
10404	No Abnormality																	
10405	No Abnormality																	
10406	No Abnormality																	
10407	No Abnormality																	
10408	No Abnormality																	
10409	No Abnormality																	
10410	No Abnormality																	
10411	No Abnormality																	
10412	No Abnormality																	
10413	No Abnormality																	
10414	No Abnormality																	
10415	No Abnormality																	
10416	No Abnormality																	
10417	No Abnormality																	
10418	No Abnormality																	
10419	No Abnormality																	
10420	No Abnormality																	
10421	No Abnormality																	
10422	No Abnormality																	
10423	No Abnormality																	
10424	No Abnormality																	
10425	No Abnormality																	
10426	No Abnormality																	
10427	No Abnormality																	
10428	No Abnormality																	
10429	No Abnormality																	
10430	No Abnormality																	
10431	No Abnormality																	
10432	No Abnormality																	
10433	No Abnormality																	
10434	No Abnormality																	
10435	No Abnormality																	
10436	No Abnormality																	
10437	No Abnormality																	
10438	No Abnormality																	
10439	No Abnormality																	
10440	No Abnormality																	

†, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;
Time 10, Before dose; Time 20, After dose;

Appendix 1-4		Clinical Sign		SA		1000 ng/kg		Male	
Animal Number	Findings	Day Time	1 10	2 20	3 10	4 20	5 10	6 20	7 10 20
10441	No Abnormality								
10442	No Abnormality								
10443	No Abnormality								
10444	No Abnormality								
10445	No Abnormality								
10446	No Abnormality								
10447	No Abnormality								
10448	No Abnormality								
10449	No Abnormality								
10450	No Abnormality								
10451	No Abnormality								
10452	No Abnormality								
10453	No Abnormality								
10454	No Abnormality								
10455	No Abnormality								
10456	No Abnormality								
10457	No Abnormality								
10458	No Abnormality								
10459	No Abnormality								
10460	No Abnormality								
+ , Present; 1 , Slight; 2 , Moderate; 3 , Severe;									
Time 10 , Before dose; Time 20 , After dose;									

Appendix 1-5		Clinical Sign		SA		0 mg/kg		Female	
Animal Number	Findings	Day Time	1 10	2 20	10	20	10	20	
50101	No Abnormality								
50102	No Abnormality								
50103	No Abnormality								
50104	No Abnormality								
50105	No Abnormality								
50106	No Abnormality								
50107	No Abnormality								
50108	No Abnormality								
50109	No Abnormality								
50110	No Abnormality								
50111	No Abnormality								
50112	No Abnormality								
50113	No Abnormality								
50114	No Abnormality								
50115	No Abnormality								
50116	No Abnormality								
50117	No Abnormality								
50118	No Abnormality								
50119	No Abnormality								
50120	No Abnormality								
50121	No Abnormality								
50122	No Abnormality								
50123	No Abnormality								
50124	No Abnormality								
50125	No Abnormality								
50126	No Abnormality								
50127	No Abnormality								
50128	No Abnormality								
50129	No Abnormality								
50130	No Abnormality								
50131	No Abnormality								
50132	No Abnormality								
50133	No Abnormality								
50134	No Abnormality								
50135	No Abnormality								
50136	No Abnormality								
50137	No Abnormality								
50138	No Abnormality								
50139	No Abnormality								
50140	No Abnormality								

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;
Time 10, Before dose; Time 20, After dose;

Appendix 1- 5		Clinical Sign		SA		0 mg/kg		Female	
Animal Number	Findings	Day Time	1 10	2 20	10	20	10	20	
50141	No Abnormality								
50142	No Abnormality								
50143	No Abnormality								
50144	No Abnormality								
50145	No Abnormality								
50146	No Abnormality								
50147	No Abnormality								
50148	No Abnormality								
50149	No Abnormality								
50150	No Abnormality								
50151	No Abnormality								
50152	No Abnormality								
50153	No Abnormality								
50154	No Abnormality								
50155	No Abnormality								
50156	No Abnormality								
50157	No Abnormality								
50158	No Abnormality								
50159	No Abnormality								
50160	No Abnormality								
+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe; Time 10, Before dose; Time 20, After dose;									

Appendix 1- 6		Clinical Sign		SA		250 mg/kg		Female	
Animal Number	Findings	Day Time	1 10	2 20	10	20	10	20	
50201	No Abnormality								
50202	No Abnormality								
50203	No Abnormality								
50204	No Abnormality								
50205	No Abnormality								
50206	No Abnormality								
50207	No Abnormality								
50208	No Abnormality								
50209	No Abnormality								
50210	No Abnormality								
50211	No Abnormality								
50212	No Abnormality								
50213	No Abnormality								
50214	No Abnormality								
50215	No Abnormality								
50216	No Abnormality								
50217	No Abnormality								
50218	No Abnormality								
50219	No Abnormality								
50220	No Abnormality								
50221	No Abnormality								
50222	No Abnormality								
50223	No Abnormality								
50224	No Abnormality								
50225	No Abnormality								
50226	No Abnormality								
50227	No Abnormality								
50228	No Abnormality								
50229	No Abnormality								
50230	No Abnormality								
50231	No Abnormality								
50232	No Abnormality								
50233	No Abnormality								
50234	No Abnormality								
50235	No Abnormality								
50236	No Abnormality								
50237	No Abnormality								
50238	No Abnormality								
50239	No Abnormality								
50240	No Abnormality								

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;
Time 10, Before dose; Time 20, After dose;

Appendix 1- 6		Clinical Sign		SA		250 ng/kg		Female	
Animal Number	Findings	Day Time	1 10	2 20	10	20	10	20	
50241	No Abnormality								
50242	No Abnormality								
50243	No Abnormality								
50244	No Abnormality								
50245	No Abnormality								
50246	No Abnormality								
50247	No Abnormality								
50248	No Abnormality								
50249	No Abnormality								
50250	No Abnormality								
50251	No Abnormality								
50252	No Abnormality								
50253	No Abnormality								
50254	No Abnormality								
50255	No Abnormality								
50256	No Abnormality								
50257	No Abnormality								
50258	No Abnormality								
50259	No Abnormality								
50260	No Abnormality								

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;
Time 10, Before dose; Time 20, After dose;

Appendix 1-7 Clinical Sign SA 500 mg/kg Female

Animal Number	Findings	Day Time	1 10	2 20
50301	No Abnormality			
50302	No Abnormality			
50303	No Abnormality			
50304	No Abnormality			
50305	No Abnormality			
50306	No Abnormality			
50307	No Abnormality			
50308	No Abnormality			
50309	No Abnormality			
50310	No Abnormality			
50311	No Abnormality			
50312	No Abnormality			
50313	No Abnormality			
50314	No Abnormality			
50315	No Abnormality			
50316	No Abnormality			
50317	No Abnormality			
50318	No Abnormality			
50319	No Abnormality			
50320	No Abnormality			
50321	No Abnormality			
50322	No Abnormality			
50323	No Abnormality			
50324	No Abnormality			
50325	No Abnormality			
50326	No Abnormality			
50327	No Abnormality			
50328	No Abnormality			
50329	No Abnormality			
50330	No Abnormality			
50331	No Abnormality			
50332	No Abnormality			
50333	No Abnormality			
50334	No Abnormality			
50335	No Abnormality			
50336	No Abnormality			
50337	No Abnormality			
50338	No Abnormality			
50339	No Abnormality			
50340	No Abnormality			

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;
Time 10, Before dose; Time 20, After dose;

Animal Number	Findings	Day Time	1 10	2 20	10	20
50341	No Abnormality					
50342	No Abnormality					
50343	No Abnormality					
50344	No Abnormality					
50345	No Abnormality					
50346	No Abnormality					
50347	No Abnormality					
50348	No Abnormality					
50349	No Abnormality					
50350	No Abnormality					
50351	No Abnormality					
50352	No Abnormality					
50353	No Abnormality					
50354	No Abnormality					
50355	No Abnormality					
50356	No Abnormality					
50357	No Abnormality					
50358	No Abnormality					
50359	No Abnormality					
50360	No Abnormality					

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;
Time 10, Before dose; Time 20, After dose;

Appendix 1- 8		Clinical Sign		SA		1000 ng/kg		Female	
Animal Number	Findings	Day Time	1 10	2 20	10	20	10	20	
50401	No Abnormality								
50402	No Abnormality								
50403	No Abnormality								
50404	No Abnormality								
50405	No Abnormality								
50406	No Abnormality								
50407	No Abnormality								
50408	No Abnormality								
50409	No Abnormality								
50410	No Abnormality								
50411	No Abnormality								
50412	No Abnormality								
50413	No Abnormality								
50414	No Abnormality								
50415	No Abnormality								
50416	No Abnormality								
50417	No Abnormality								
50418	No Abnormality								
50419	No Abnormality								
50420	No Abnormality								
50421	No Abnormality								
50422	No Abnormality								
50423	No Abnormality								
50424	No Abnormality								
50425	No Abnormality								
50426	No Abnormality								
50427	No Abnormality								
50428	No Abnormality								
50429	No Abnormality								
50430	No Abnormality								
50431	No Abnormality								
50432	No Abnormality								
50433	No Abnormality								
50434	No Abnormality								
50435	No Abnormality								
50436	No Abnormality								
50437	No Abnormality								
50438	No Abnormality								
50439	No Abnormality								
50440	No Abnormality								

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;
Time 10, Before dose; Time 20, After dose;

Appendix 1- 8		Clinical Sign		SA		1000 mg/kg		Female	
Animal Number	Findings	Day Time	1 10	2 20	10 10	20 20			
50441	No Abnormality								
50442	No Abnormality								
50443	No Abnormality								
50444	No Abnormality								
50445	No Abnormality								
50446	No Abnormality								
50447	No Abnormality								
50448	No Abnormality								
50449	No Abnormality								
50450	No Abnormality								
50451	No Abnormality								
50452	No Abnormality								
50453	No Abnormality								
50454	No Abnormality								
50455	No Abnormality								
50456	No Abnormality								
50457	No Abnormality								
50458	No Abnormality								
50459	No Abnormality								
50460	No Abnormality								

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;
Time 10, Before dose; Time 20, After dose;

Appendix 2- 1	Body Weight	SA	0 mg/kg	Male	Study No. D040030 Unit : g
Day Animal Number	1				
10101	180				
10102	180				
10103	179				
10104	182				
10105	195				
10106	183				
10107	178				
10108	187				
10109	170				
10110	176				
10111	178				
10112	193				
10113	174				
10114	191				
10115	174				
10116	186				
10117	187				
10118	201				
10119	193				
10120	183				
10121	173				
10122	182				
10123	197				
10124	192				
10125	186				
10126	190				
10127	181				
10128	183				
10129	178				
10130	188				
10131	189				
10132	183				
10133	190				
10134	173				
10135	172				
10136	179				
10137	181				
10138	196				
10139	172				
10140	167				
10141	190				
10142	188				
10143	200				

Study No. E040030
Unit : g

SA 0 mg/kg Male

Appendix 2- 1 Body Weight

Day	1
Animal Number	
10144	169
10145	174
10146	189
10147	190
10148	183
10149	189
10150	171
10151	184
10152	187
10153	164
10154	188
10155	177
10156	183
10157	169
10158	191
10159	180
10160	184

Day	1
Animal Number	
10201	181
10202	176
10203	180
10204	171
10205	168
10206	185
10207	183
10208	179
10209	185
10210	181
10211	189
10212	180
10213	184
10214	188
10215	193
10216	189
10217	160
10218	183
10219	193
10220	154
10221	182
10222	181
10223	189
10224	184
10225	173
10226	190
10227	194
10228	166
10229	189
10230	188
10231	176
10232	177
10233	181
10234	190
10235	178
10236	184
10237	178
10238	201
10239	188
10240	180
10241	191
10242	174
10243	170

Study No. B040030
Unit : g

SA 250 mg/kg Male

Appendix 2- 2 Body Weight

Day	1
Animal Number	
10244	193
10245	171
10246	183
10247	194
10248	178
10249	192
10250	190
10251	176
10252	176
10253	183
10254	169
10255	174
10256	183
10257	187
10258	164
10259	179
10260	176

Appendix 2- 3 Body Weight SA 500 mg/kg Male

Day	1
Animal Number	
10301	180
10302	169
10303	183
10304	172
10305	187
10306	184
10307	187
10308	175
10309	174
10310	191
10311	182
10312	189
10313	183
10314	186
10315	165
10316	165
10317	160
10318	176
10319	170
10320	180
10321	188
10322	175
10323	169
10324	179
10325	200
10326	180
10327	178
10328	174
10329	184
10330	182
10331	173
10332	173
10333	201
10334	189
10335	184
10336	190
10337	170
10338	185
10339	184
10340	180
10341	194
10342	172
10343	195

Study No. E040030
Unit : g

SA 500 mg/kg Male

Appendix 2- 3 Body Weight

Day	1
Animal Number	
10344	167
10345	180
10346	178
10347	179
10348	186
10349	186
10350	180
10351	179
10352	175
10353	191
10354	187
10355	180
10356	188
10357	164
10358	192
10359	175
10360	184

Appendix 2- 4 Body Weight SA 1000 mg/kg Male

Day	Animal Number	1
10401	177	
10402	188	
10403	191	
10404	171	
10405	178	
10406	197	
10407	174	
10408	182	
10409	180	
10410	173	
10411	188	
10412	179	
10413	170	
10414	175	
10415	177	
10416	187	
10417	174	
10418	170	
10419	164	
10420	176	
10421	183	
10422	195	
10423	184	
10424	188	
10425	176	
10426	166	
10427	191	
10428	171	
10429	172	
10430	183	
10431	188	
10432	167	
10433	178	
10434	178	
10435	180	
10436	180	
10437	189	
10438	178	
10439	174	
10440	162	
10441	187	
10442	176	
10443	191	

Appendix 2- 4 Body Weight SA 1000 mg/kg Male

Day	1				
Animal Number					
10444	187				
10445	185				
10446	192				
10447	179				
10448	185				
10449	183				
10450	191				
10451	179				
10452	180				
10453	172				
10454	190				
10455	175				
10456	181				
10457	193				
10458	167				
10459	173				
10460	172				

0 mg/kg Female

SA

Appendix 2- 5 Body Weight

Day 1
Animal Number

50101 152
50102 161
50103 165
50104 155
50105 146
50106 130
50107 146
50108 137
50109 143
50110 138
50111 148
50112 153
50113 147
50114 155
50115 147
50116 163
50117 171
50118 156
50119 164
50120 139
50121 141
50122 142
50123 150
50124 162
50125 149
50126 147
50127 144
50128 165
50129 150
50130 162
50131 152
50132 152
50133 142
50134 148
50135 162
50136 161
50137 155
50138 146
50139 154
50140 153
50141 160
50142 157
50143 154

Appendix 2- 5 Body Weight SA 0 mg/kg Female

Day	1
Animal Number	
50144	162
50145	143
50146	158
50147	144
50148	151
50149	137
50150	155
50151	139
50152	148
50153	158
50154	138
50155	154
50156	152
50157	147
50158	145
50159	139
50160	152

Day Animal Number	1
50201	144
50202	161
50203	155
50204	164
50205	136
50206	137
50207	140
50208	138
50209	151
50210	143
50211	130
50212	147
50213	154
50214	159
50215	144
50216	149
50217	148
50218	166
50219	165
50220	160
50221	144
50222	141
50223	159
50224	145
50225	164
50226	157
50227	144
50228	164
50229	141
50230	146
50231	159
50232	155
50233	153
50234	146
50235	150
50236	147
50237	160
50238	147
50239	149
50240	148
50241	152
50242	149
50243	156

Study No. B040030
Unit : g

SA 250 mg/kg Female

Appendix 2- 5 Body Weight

Day	1
Animal Number	
50244	159
50245	140
50246	145
50247	148
50248	159
50249	149
50250	148
50251	151
50252	141
50253	167
50254	144
50255	162
50256	161
50257	148
50258	155
50259	154
50260	153

Day	1
Animal Number	
50301	163
50302	162
50303	138
50304	155
50305	147
50306	146
50307	137
50308	150
50309	154
50310	159
50311	142
50312	148
50313	143
50314	171
50315	143
50316	138
50317	146
50318	169
50319	133
50320	150
50321	134
50322	163
50323	142
50324	151
50325	152
50326	134
50327	140
50328	140
50329	151
50330	142
50331	164
50332	160
50333	138
50334	153
50335	142
50336	141
50337	155
50338	156
50339	146
50340	162
50341	158
50342	150
50343	157

Appendix 2- 7 Body Weight SA 500 mg/kg Female

Day	1
Animal Number	
50344	156
50345	156
50346	148
50347	147
50348	154
50349	150
50350	146
50351	147
50352	159
50353	151
50354	148
50355	143
50356	151
50357	152
50358	155
50359	152
50360	149

Appendix 2- 8	Body Weight	SA	1000 mg/kg	Female
Day Animal Number	1			
50401	153			
50402	170			
50403	146			
50404	138			
50405	145			
50406	137			
50407	134			
50408	155			
50409	147			
50410	139			
50411	144			
50412	148			
50413	142			
50414	149			
50415	148			
50416	148			
50417	142			
50418	157			
50419	155			
50420	159			
50421	157			
50422	165			
50423	159			
50424	145			
50425	147			
50426	166			
50427	151			
50428	157			
50429	138			
50430	143			
50431	142			
50432	153			
50433	160			
50434	149			
50435	158			
50436	159			
50437	152			
50438	143			
50439	144			
50440	157			
50441	145			
50442	159			
50443	154			

Appendix 2- 8 Body Weight SA 1000 mg/kg Female

Day	1
Animal Number	
50444	141
50445	143
50446	156
50447	150
50448	145
50449	157
50450	149
50451	143
50452	154
50453	152
50454	151
50455	158
50456	141
50457	143
50458	167
50459	161
50460	148

[illegible]

N, Normal; B, Bilateral; R, Right; L, Left;

N, Normal; B, Bilateral; R, Right; L, Left;