

内閣府食品安全性委員会  
平成16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16年度調査分)

平成17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.....	6
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.....	6
2.3.4 試験責任者.....	6
2.4 実施期間.....	7
3. 材料および方法.....	9
3.1 被験物質および媒体.....	9
3.1.1 被験物質.....	9
3.1.2 媒体.....	9
3.2 試験動物.....	10
3.2.1 動物種.....	10
3.2.2 系統.....	10
3.2.3 系統選択理由.....	10
3.2.4 微生物レベル.....	10
3.2.5 購入先.....	10
3.2.6 購入動物数.....	10
3.2.7 検疫・馴化.....	10
3.2.8 群分け.....	10
3.2.9 投与時週齢.....	10
3.2.10 投与時体重.....	11
3.2.11 動物の識別.....	11
3.2.12 余剰動物の処置.....	11

3.3	動物飼育.....	11
3.3.1	飼育室.....	11
3.3.2	飼育環境.....	11
3.3.3	飼育器材.....	11
3.3.4	飼料.....	12
3.3.5	飲用水.....	12
3.3.6	収容動物数.....	13
3.3.7	微生物モニタリング.....	13
3.4	投与.....	14
3.4.1	経路・方法.....	14
3.4.2	経路選択理由.....	14
3.4.3	方法選択理由.....	14
3.4.4	回数・期間.....	14
3.4.5	回数・期間の選択理由.....	14
3.4.6	用量および用量の設定理由.....	14
3.4.7	投与液量.....	14
3.5	投与液の調製.....	15
3.5.1	方法・頻度.....	15
3.5.2	投与液の安定性の確認.....	15
3.5.3	投与液の濃度および均一性の確認.....	15
3.6	群構成.....	15
3.7	観察・測定項目.....	16
3.7.1	一般状態.....	16
3.7.2	体重.....	16
3.7.3	摂餌量.....	17
3.7.4	血液学的検査.....	17
3.7.5	血液ガス分析およびメトヘモグロビン濃度.....	18
3.7.6	血液生化学的検査.....	18
3.7.7	尿検査.....	19
3.7.8	眼科学的検査.....	20
3.7.9	病理学的検査.....	21
3.8	統計学的解析.....	23
3.9	コンピュータシステムの使用.....	23
4.	毒性試験調査について.....	25
4.1	被験物質の品質および夾雑物の確認.....	25

4.2	結果	25
4.2.1	死亡動物	25
4.2.2	一般状態	25
4.2.3	体重	25
4.2.4	摂餌量	26
4.2.5	血液学的検査	26
4.2.6	血液ガス分析およびメトヘモグロビン濃度	26
4.2.7	血液生化学的検査	26
4.2.8	尿検査	26
4.2.9	眼科学的検査	27
4.2.10	器官重量	27
4.2.11	剖検所見	27
4.2.12	病理組織所見	29
添付資料-1	試験計画書変更書（平成 16 年度変更分）	33
添付資料-2	試験実施体制	47
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」における投与開始後 6 箇月のアマメシバ粉末の品質の確認	51
添付資料-4	「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」における投与開始後 6 箇月のアマメシバ粉末中の夾雑物分析	57
添付資料-5	微生物モニタリング成績（第 1 日，第 92 日，第 183 日）	63
添付資料-6	「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）」の病理組織標本作製	67
添付資料-7	「アマメシバのマウスにおける 32 週間反復経口毒性試験」	99
添付資料-8	「いわゆる健康食品等であるアマメシバを粉末状にした食品の分析試験」に関する研究報告書	253
Figures		257
Tables		263

最終頁：440

## 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。

全体試験計画書を平成15年度に作成し、そ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。

なお、平成16年度に全体試験計画書の一部を変更（検査対象動物の明確化、血液ガス分析等ための採血法の明確化、病理組織標本作製施設の変更等）した（添付資料1参照）。

平成16年度の業務としてはアマメシバ粉末をラットに52週間反復経口投与後、上記の検査を実施した。また、アマメシバによる影響を経時的に把握する目的で13および26週間投与後に中間解剖を実施した。本報告書はその結果を記載したものである。

## 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

平成 16 年度の調査として①アマメシバ粉末のラットへの 52 週間反復投与, ②投与期間中の供試動物の一般状態観察および体重等の測定, ③被験物質の品質および被験物質中の夾雑物の分析, ④中間屠殺および各種検査, ⑤最終屠殺, ⑥関連情報の整理を行った.

#### 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添付資料-2 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

病理組織標本作製(13 および 26 週計画解剖動物, 26 週計画解剖までの死亡動物):  
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

### 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

平成16年度（実行期間：平成16年4月1日から平成17年3月31日迄）に実施した主要な検査項目および検査時期等を以下に示す。

平成16年度試験契約	2004年4月1日
第13週尿検査	2004年6月11, 12日（雄） 2004年6月16, 17日（雌）
第13週眼科学的検査	2004年6月14日（雄） 2004年6月19日（雌）
第13週血液ガスおよびメトヘモグロビン濃度分析	2004年6月16日（雄） 2004年6月21日（雌）
第13週間投与終了時微生物モニタリング動物血清採取	2004年6月17日（雄） 2004年6月22日（雌）
第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）
第26週尿検査	2004年9月10, 11日（雄） 2004年9月15, 16日（雌）
第26週眼科学的検査	2004年9月13日（雄） 2004年9月18日（雌）
第26週血液ガスおよびメトヘモグロビン濃度分析	2004年9月15日（雄） 2004年9月20日（雌）
第26週間投与終了時微生物モニタリング動物血清採取	2004年9月16日（雄） 2004年9月21日（雌）
第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）
第52週尿検査	2005年3月11, 12日（雄） 2005年3月16, 17日（雌）
第52週眼科学的検査	2005年3月14日（雄）

	2005年3月19日（雌）
第52週血液ガスおよびメトヘモグロビン濃度分析	2005年3月16日（雄）
	2005年3月21日（雌）
第52週間投与終了時微生物モニタリング動物血清採取	2005年3月17日（雄）
	2005年3月22日（雌）
第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）
履行期間	2005年3月31日

### 3. 材料および方法

#### 3.1 被験物質および媒体

##### 3.1.1 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した)
- (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(実測値: 1.5~7.5℃, 許容範囲: 1~15℃)・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 : 投与開始後6ヵ月後に財団法人日本食品分析センターに過酸化物価の分析を依頼した(添付資料3).
- (8) 被験物質中の夾雑物分析  
投与6ヵ月後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(添付資料4).  
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
- (9) 取扱上の注意 : 保護具(ゴム手袋, 眼鏡およびマスク)着用

##### 3.1.2 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)を使用した. 使用したロット番号を以下に示した.

3E75N, 3L79N, 3L84, 4B79, 4C71, 4C72N,  
4C73N, 4C78, 4D76N, 4G77N, 4J96N, 4K72N

## 3.2 試験動物

### 3.2.1 動物種

ラット

### 3.2.2 系統

Crj:CD(SD)IGS

### 3.2.3 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。

### 3.2.4 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)

### 3.2.5 購入先

日本チャールス・リバー株式会社

### 3.2.6 購入動物数 (平成 15 年度に実施されたものであるが、試験の流れを把握するため記載した)

雌雄各 260 匹

### 3.2.7 検疫・馴化 (平成 15 年度に実施されたものであるが、試験の流れを把握するため記載した)

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。

### 3.2.8 群分け (平成 15 年度に実施されたものであるが、試験の流れを把握するため記載した)

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。

### 3.2.9 投与時週齢 (平成 15 年度に実施されたものであるが、試験の流れを把握するため記載した)

6 週齢

**3.2.10 投与時体重**（平成 15 年度に実施されたものであるが、試験の流れを把握するため記載した）  
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±20%以内であることを確認した。

**3.2.11 動物の識別**（平成 15 年度に実施されたものであるが、試験の流れを把握するため記載した）  
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。

### 3.2.12 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。他の余剰動物は試験番号 B040322 の試験に移管した。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、1 回あたり雄が 2 例、雌が 3 例と雌雄の数が異なった（3.3.7 項参照）。

## 3.3 動物飼育

### 3.3.1 飼育室

ラット・マウス飼育室（飼育室番号：4152 室）

### 3.3.2 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下で飼育された。飼育期間中に一過性に温湿度の逸脱が認められたが、動物への影響は認められなかった。

- (1) 温度 : 実測値 20.9～25.3°C（許容範囲 19.0～25.0°C）
- (2) 相対湿度 : 実測値 40.5～86.9%（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）

### 3.3.3 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、群分け日および投与開始日から 14 日間に 1 回の頻度で交換した。
- (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, 群分け日と投与開始日から 7 日間に 1 回の頻度で交換した. 更に, 雌については検疫終了翌日にも交換した.

- (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, 群分け日と投与開始日から 7 日間に 1 回の頻度で交換した. 更に, 雌については検疫終了翌日にも交換した.

### 3.3.4 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)  
使用したロット番号を以下に示した.  
031211, 040119, 040204, 040317, 040413,  
040518, 040907, 041008, 041110, 041207
- (2) 給餌法 : 新鮮尿採取日を除き, 自由摂取させた. 飼料は給餌器交換時に交換した. 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を行った.
- (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た.

### 3.3.5 飲用水

- (1) 種類 : 5 μm 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) を用いて自由摂取させた.
- (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た.

### 3.3.6 収容動物数

個別飼育（1匹／ケージ）とした。

### 3.3.7 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、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。平成16年度の微生物モニタリングは第92日、第183日および365日に、下記の表に従って行った。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）を動物に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, 2,050 g, 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（実測値2.5～11℃、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、下記の検査項目について血清反応による抗体検査を行った。第92日および第183日の抗体検査の結果はすべて陰性であった。第365日の抗体検査については現在検査を依頼中である。なお、平成15年度に実施した投与開始時の微生物モニタリングの結果を平成16年度にその結果を入手したが、これらもすべて陰性であった（添付資料5参照）。

#### 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)

### 3.4 投与

#### 3.4.1 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。

#### 3.4.2 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。

#### 3.4.3 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。

#### 3.4.4 回数・期間

1日1回、第13週投与後解剖動物は91ないし92日間、第26週投与後解剖動物は182ないし183日間、第52週投与後解剖動物は364ないし365日間、いずれも11:00～15:47の間に投与した。

#### 3.4.5 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週間とした。また、被験物質の影響を経時的に把握するため13および26週間投与後に計画解剖を行った。

#### 3.4.6 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。

#### 3.4.7 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、各個体の量を算出した。

### 3.5 投与液の調製

#### 3.5.1 方法・頻度

予め 6～8 日分の被験物質を使用日毎に分けて秤量後，メートルガ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。

#### 3.5.2 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。

#### 3.5.3 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。

### 3.6 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 <sup>§</sup> (週)	雄	雌
対照	0	52	20 * <sup>1</sup> (10101-10120) * <sup>2</sup>	20(50101-50120)
		26	20 (10121-10123, 10125-10141)	20(50121-50140)
		13	20 (10124, 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

<sup>§</sup>, 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例を解剖した. 但し, 26週間投与終了後の解剖において250および1000 mg/kg群の雄で血液ガス分析およびメトヘモグロビン濃度測定のための採血に不適と判断された動物(動物番号 10240 および 10438)の解剖は第1日に行い, 動物番号 10230 および 10430 の解剖は第2日に行った. なお, 投与は各動物とも計画解剖日の前日まで行った.

### 3.7 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.

#### 3.7.1 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. なお, 計画解剖日の計画解剖動物については1回, 午前中に観察した. 衰弱動物については瀕死期解剖した.

#### 3.7.2 体重

全例の体重を雌雄とも下記の日に測定した. また, 各測定日間の体重増加量を算出した.

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

### 3.7.3 摂餌量

ケージ毎の風袋込み重量を下記の日に測定し、各測定期間の 1 匹あたりの 1 日平均摂餌量を算出した。

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

### 3.7.4 血液学的検査

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。ただし、雄の 250 および 1000 mg/kg 群の後半の動物で血液ガス分析およびメトヘモグロビン濃度測定のための採血が不適と判断された動物（動物番号 10240 および 10438）の解剖は第 1 日に行った）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（各群の個体番号の下 2 桁が 01 から 10 の動物）および 366 日（各群残りの動物）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、後大静脈より採血した。採取した血液を用いて下記の項目を測定した。

(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, 12,000 g, 3 分間, 約 4°C）して得られた血漿を用いた。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た。瀕死期解剖動物についても測定した。残余の血液および血漿は廃棄した。

項目	方法	測定機器
(1) 赤血球数	球状化処理二次元レーザー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	球状化処理二次元レーザー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)

### 3.7.5 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 (各群後半の 10 例), 第 26 週間投与後解剖動物：第 182 日 (各群後半の 10 例. ただし, 雄の 250 mg/kg 群は動物番号 10240 を, 雄の 1000 mg/kg 群は動物番号 10438 を除いた後半の 10 例とした), 第 52 週間投与後解剖動物：第 364 日 (各群の個体番号の下 2 桁が 11 から 20 の生存動物)) に無麻酔下で心臓 (左心房ないしは左心室) より約 300  $\mu$ L を採血した。

採血にはシリンジ (1mL) および注射針 (27G) を用い, ヘパリンナトリウム注射液 (5000 単位/5mL, 清水製薬株式会社) を 500  $\mu$ L 以上入れた後, ピストンを 2 回以上完全に押してヘパリンを排出した後に使用した。採血は, 動物を経口投与と同様に保定後, 胸部を触診し, 鼓動が最も大きく感じられる部位を採血部位とした。アルコール綿で採血部位を消毒した。ヘパリン処理したシリンジを採血部位にほぼ垂直に心臓に刺入し, 採血した。採血した血液はシリンジに入れたまま粘土を用いて密封し, 速やかに測定した。また残余の血液は廃棄した。

項目	方法	測定機器
(1) 酸素分圧 (Po <sub>2</sub> )	電極法	(a)
(2) メトヘモグロビン	吸光度法	(a)

測定機器：(a), バイエル 850 (バイエル メディカル株式会社)

### 3.7.6 血液生化学的検査

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, 2050 g, 10 分間, 約 4°C) して得られる血清を用いて下記の

項目を測定した。瀕死期解剖動物についても測定した。測定は採血当日に行った。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、試験終了時までには廃棄する。

項目	方法	測定機器
(1) ASAT (GOT)	UV-rate 法 (JSCC 改良法)	(a)
(2) ALAT (GPT)	UV-rate 法 (JSCC 改良法)	(a)
(3) $\gamma$ GT	$\gamma$ -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)

### 3.7.7 尿検査

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) の項目を検査した。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) の項目を検査した。(10)~(12) の検査に用いた残りの尿は約-80°C（許容範囲：-60°C

以下) のフリーザー内で保存し, 試験終了時までには廃棄する. その他の尿は測定終了次第廃棄した.

<尿検査対象動物>

群名	尿検査対象動物	
	雄	雌
対照	15 * <sup>1</sup> (10101-10115) * <sup>2</sup>	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, パイエル 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, パイエル 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, パイエル 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, パイエル 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, パイエル 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, パイエル メディカル株式会社)	(a)
(7) ウロビリノーゲン	試験紙法 (マルティスティックス, パイエル 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 (パイエル メディカル株式会社)

(b), ユリコン-JE (株式会社アタゴ)

(c), PVA- $\alpha$ III (株式会社エイアンドティー)

3.7.8 眼科学的検査

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: 362 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 * <sup>1</sup> (10101-10115) * <sup>2</sup>	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

### 3.7.9 病理学的検査

#### 3.7.9.1 器官重量

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。ただし，雄の 250 および 1000 mg/kg 群の後半の動物で血液ガス分析およびメトヘモグロビン濃度測定のための採血が不適と判断された動物（動物番号 10240 および 10438）の解剖は第 1 日に行った）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（各群の個体番号の下 2 桁が 01 から 10 の動物）および 366 日（各群残りの動物）の全生存動物および瀕死期解剖動物について，下記の器官重量を（両側性の器官はまとめて）測定した。

甲状腺および下垂体はホルマリン固定後に測定した。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した。死亡動物の体重は測定したが，器官重量は測定しなかった。

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），精囊（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

#### 3.7.9.2 病理解剖検査

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，剖検した。死亡動物は発見後速やかに剖検した。

