

申請者からの提出資料 (第 24 回専門調査会での審議に関する補足資料)

ネオチームの提出依頼補足資料

2005 年 8 月 30 日に開催されました第 24 回添加物専門調査会でご指摘のありました補足資料を提出いたします。

1. 以下の毒性試験における各パラメータについて、背景データを提出すること。

- ・マウス 13 週間混餌投与試験 (肝重量、肝比重量)
- ・ラット 13 週間混餌投与試験 (アルカリホスファターゼ (ALP)、平均赤血球容積 (MCV)、赤血球数 (RBC)、総コレステロール (CHO)、グロブリン (Glb))
- ・イヌ 13 週間混餌投与試験 (ALP)
- ・ラット 52 週間混餌投与試験 (下垂体腺腫)

(提出資料)

下記背景データを添付いたしました。

資料 1-1: マウス 13 週間混餌投与試験 (肝重量、肝比重量)

資料 1-2: ラット 13 週間混餌投与試験 (血液学的検査、血液化学的検査)
(添付資料 5-1-2 より抜粋)

資料 1-3: イヌ 13 週間混餌投与試験 (ALP)

資料 1-4: ラット 52 週間混餌投与試験 (下垂体腺腫)

これらの背景データの概要を、表 1-1、表 1-2 にまとめました。

尚、概要書の記載 (142 頁) を一部修正致しましたので、該当頁を添付いたしました。

(資料 1-5)

表 1-1 背景データに関する情報

	データ名	動物種	試験期間	対照群動物総数	試験機関名	試験実施時期	備考
資料 1-1	肝重量	CrI:CD-1 [®] (ICR)BR VAF/ Plus [™] マウス (Charles River UK Limited)	13 週間	雄：256 匹、雌：260 匹	Hazleton Wisconsin, Inc. ^{a)}	1988 年 1 月 1 日 ~ 1995 年 12 月 31 日 (試験開始時期)	合計 15 試験の対照群データ ネオテームのマウス 13 週間混 餌投与試験： In-life；1994 年 8 月 ~ 11 月 報告書作成年；1995 年
	肝比重量			雄：255 匹、雌：260 匹			
資料 1-2	アルカリホス ファターゼ(ALP)	CrI:CD [®] (SD)BR VAF/ Plus [™] ラット (Charles River UK Limited)	10 ~ 12 週齢 (平均 11 週齢： 試験 6 週間に相 当)	雄：135 匹、雌：134 匹	Huntingdon Life Sciences Ltd.	不明	添付資料 5-1-2、 774 ~ 782 頁の抜粋 ネオテームのラット 13 週間混 餌投与試験： In-life；1994 年 8 月 ~ 11 月 報告書作成年；1995 年
	平均赤血球容積 (MCV)			雄：340 匹、雌：341 匹			
	赤血球数 (RBC)			雄：114 匹、雌：107 匹			
	総コレステロー ル (CHO)			雄：354 匹、雌：354 匹			
	グロブリン (Glb) (計算値) 総たん白質 - アルブミン			雄：119 匹、雌：111 匹			
	雄：354 匹、雌：354 匹						
	雄：105 匹、雌：105 匹						
	雄：290 匹、雌：291 匹						
	総たん白質 雄：135 匹、雌：134 匹						
	雄：344 匹、雌：350 匹						
	アルブミン 雄：120 匹、雌：119 匹						
	雄：338 匹、雌：340 匹						
資料 1-3	アルカリホス ファターゼ(ALP)	ビーグル犬 (Hazleton Research Products ^{b)})	22 ~ 33 週齢 (試験 0 ~ 13 週間 に相当)	雄：601 匹、雌：591 匹	Hazleton Wisconsin, Inc. ^{a)}	ネオテームの試験 実施期間とほぼ同 じ期間	ネオテームの犬 13 週間混餌投 与試験： In-life；1994 年 9 月 ~ 1995 年 1 月 報告書作成年；1995 年
資料 1-4	下垂体腺腫	CrI:CD [®] (SD)BR VAF/ Plus [™] ラット (Charles River UK Limited)	52 週間	雄：212 匹、雌：217 匹	Huntingdon Life Sciences Ltd.	1986 年 3 月 ~ 1993 年 11 月 (試験開始時期)	合計 13 試験の対照群データ ネオテームのラット 52 週間混 餌投与試験： In-life；1996 年 4 月 ~ 1997 年 5 月 報告書作成年；1997 年

a) 現在は、Covance Laboratories, Inc.、 b) 現在は、Covance Research Products.

表 1-2 背景データまとめ

	データ名	試験期間	背景データ				
			性	平均	最小値	最大値	
資料 1-1	肝重量	13 週間	雄	1.55	0.97	2.13	
			雌	1.24	0.80	1.68	
	肝比重量	13 週間	雄	4.72	3.71	5.74	
			雌	4.87	3.97	5.78	
資料 1-2	アルカリホス ファターゼ (ALP)	6 週間	雄	184	6	362	
			雌	102	25	179	
		13 週間	雄	94	0	198	
			雌	55	4	105	
	平均赤血球容 積 (MCV)	6 週間	雄	56	50	61	
			雌	55	50	60	
		13 週間	雄	51	47	55	
			雌	53	49	57	
	赤血球数 (RBC)	6 週間	雄	8.38	7.30	9.46	
			雌	7.86	6.89	8.83	
		13 週間	雄	8.89	7.81	9.97	
			雌	8.17	7.30	9.04	
	総コレステ ロール (CHO)	6 週間	雄	72	38	106	
			雌	77	43	112	
		13 週間	雄	75	41	109	
			雌	86	51	121	
	グロブリン (Glb)	6 週間	雄	3.1	2.7	3.4	
			雌	2.9	2.7	3.0	
		13 週間	雄	3.3	3.0	3.5	
			雌	3.0	2.8	3.2	
	資料 1-3	アルカリホス ファターゼ (ALP) (IU/L)	0-13 週間	雄	-	71	287
				雌	-	73	256
	資料 1-4	下垂体腺腫 (%)	52 週間	雄	12.74	0.0	30.0
				雌	13.82	0.0	27.8

2. 体重増加量の減少に係る考察について

(指摘事項)

提出資料では、各毒性試験において認められるネオテーム投与による体重増加量の減少については、嗜好性の低下に起因した摂餌量の低下が原因とし、毒性とみなしてはいない。しかし、仮に、摂餌量の低下に伴い、体重増加量が減少していると推察したとしても、それ以上に体重増加量が減少している可能性があり、体重増加量の減少の要因として、摂餌量の減少以外の要因も考えられる。

したがって、体重増加量の減少について、摂餌量の低下に伴うものとした科学的根拠を明確に示すと同時に、それ以外の要因の有無についても考察すること。

(回答)

餌の嗜好性が低下した場合の体重増加量の減少ならびにその程度につきましては、ラットを用いて種々の基礎検討を行い、その成績は科学論文として報告しています。これら論文は既に安全性評価資料の参考文献として提出しておりますので、その内容をここにまとめ、摂餌量の低下と体重増加量の減少について考察致しました。

ネオテームのラットを用いた安全性試験では投与量 (mg/kg 体重/日) を一定に維持するためにネオテーム濃度を動物の成長に合わせて増加させました。特にラットの成長期にはネオテーム濃度が大きく増加したにもかかわらず、摂餌効率は変化していません。また、臨床観察あるいは病理学的検査においてネオテーム投与に起因する毒性所見は認められず、その他の検査項目についてもラットの体重増加量の変動を裏付ける所見は得られていません。アルカリホスファターゼについては、その上昇の程度と体重増加量の変動の程度を比較すると、必ずしも一致していないことから、やはり体重増加量の低下を来たす要因でないと判断されます (表 2-1、表 2-2)。

さらに、摂餌量と体重増加量との関係を検索した基礎検討試験により、摂餌量の僅かな低下が大きな体重増加量の低下を導くことが検証され、ラットの毒性試験で観察された程度の体重増加量の変動は摂餌量の変動のみで引き起こされることが明らかとなっています。

以上より、体重増加量の低下は摂餌量の低下で引き起こされたものであり、毒性を示す所見ではないと考えています。

表 2-1 アルカリホスファターゼの変動と体重変動

「ネオテームのラットを用いた混餌投与による 13 週間毒性試験及び 4 週間回復性試験」
(添付資料 5-1-2)

投与群 (mg/kg/日)	アルカリホスファターゼ				体重			
	6週間		13週間		6週間		13週間	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
100	-10.5	13.2	-7.2	1.7	0.0	-6.3	0.0	-4.1
300	-4.7	11.0	3.1	10.0	-3.8	-2.7	-5.5	-2.1
1000	16.3	27.5	19.6*	21.7	-4.0	-3.9	-4.5	-5.2
3000	12.8	28.6	20.6*	36.7*	-11.0**	-5.1	-14.3**	-4.1

表中の値は平均値の対照群に対する変動率(%)、*p<0.05、**p<0.001

表 2-2 アルカリホスファターゼの変動と体重変動

「*in utero* でネオテームを暴露した F₁ ラットを用いたネオテームの混餌投与による 52 週間毒性試験及び 4 週間回復性試験」(添付資料 5-1-4)

投与群 (mg/kg/日)	アルカリホスファターゼ				体重			
	13週間		52週間		13週間		52週間	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
10	21.5	3.9	6.8	-4.5	1.6	-1.5	5.3	-3.8
30	14.0	-2.6	-4.1	-13.6	-2.6	2.6	-3.8	1.5
100	0.0	18.2	-16.4	-6.8	-7.1*	-6.4	-9.9*	-11.5*
300	8.6	5.2	11.0	4.5	-6.8*	-3.9	-7.5	-12.7**
1000	29.0*	-16.9	6.8	-20.5	-5.4	-3.3	-4.0	-13.4**

表中の値は平均値の対照群に対する変動率(%)、*p<0.05、**p<0.01

参考文献 7-1-1 (指定要請添付資料概要 3 頁 : 文献 34 又は 113 頁 : 文献 1 に該当)

Mayhew DA, Comer CP, Stargel WW. Food consumption and body weight changes with neotame, a new sweetener with intense taste: differentiating effects of palatability from toxicity in dietary safety studies. Regul. Toxicol. Pharmacol. (2003) 38: 124-143.

参考文献 7-1-2 (指定要請添付資料概要 3 頁 : 文献 35 又は 113 頁 : 文献 2 に該当)

Flamm WG, Blackburn GL, Comer CP, Mayhew DA, Stargel WW. Long-term food consumption and body weight changes in neotame safety studies are consistent with the allometric relationship observed for other sweeteners and during dietary restrictions. Regul. Toxicol. Pharmacol. (2003) 38: 144-156.

(参考文献 7-1-1 の要約)

餌の嗜好性試験 (指定要請添付資料 5-1-20) において、高甘味度甘味料であるネオテームを添加した飼料と基礎飼料をそれぞれ別の餌缶に容れ、同時に与えた環境下では、ラットは基礎飼料を好んだ。また、ネオテームを添加した飼料のみを与えた環境下では、ネオテーム濃度が高いほどラットの摂餌量は減少した。これらの事実よりネオテームを添加した餌に対する嗜好性の低下が実証され、ネオテーム濃度の変動は摂餌量に影響を及ぼすことが判明した。安全性試験においてもラット、マウス及びイヌの最大許容投与量は、ネオテーム濃度が約 35,000 ppm 以上で認められる嗜好性の著しい低下に伴った体重増加量の減少によって決定されている。また、これら安全性試験においては投与量 (mg/kg 体重/日) を一定に維持するためにネオテーム濃度を動物の成長に合わせて増加したが、摂餌効率率はラットの成長期においては変化しなかった。さらに、ラットの長期毒性試験成績の解析により、観察された程度の体重増加量の変動は摂餌量の変動のみで引き起こされることが明らかとなった (参考文献 7-1-2)。以上より、体重変動はネオテームの無影響量 (NOEL) を設定する評価項目として適切でないものと結論付けられた。

ラットの 2 年間混餌投与 (104 週間) 試験 (指定要請添付資料 5-1-10) における摂餌量と体重との関係を本論文の図 6 と 7 に示した。図 6 では、すべてのネオテーム添加群の 13 ~ 78 週に、一貫して用量相関のない摂餌量の減少が見られている。これらは試験後期でネオテーム濃度が 910 ~ 24,000 ppm に達したことにより生じた嗜好性の低下に起因するものと考えられ、嗜好性試験の成績とよく一致している。また、図 7 に見られるが如く、50 ~ 1,000mg/kg 体重という用量範囲では 20 倍の用量変動にかかわらず、雌雄ともに体重変動に用量相関はない。これらの事実は、ネオテームの高甘味度に起因する餌に対する嗜好性の低下現象に閾値が存在することを示唆するものであり、参考文献 7-1-2 の対比関係 (allometric relationship) と本論文の表 3 のアルゴリズムに表されている。

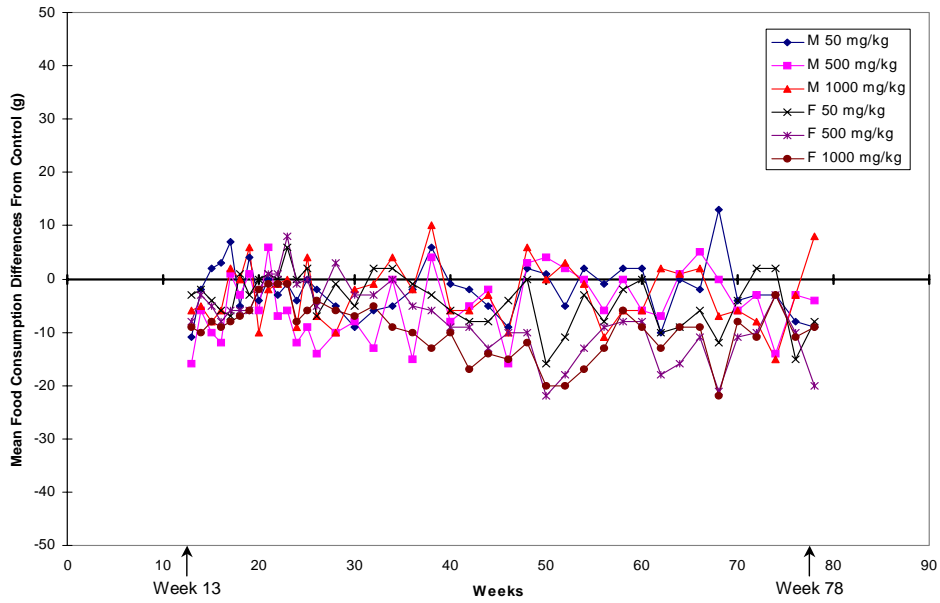


図6 ネオテームのラットを用いた2年間混餌投与試験(指定要請添付資料5-1-10):ネオテーム添加群の13~78週に、一貫して用量相関のない摂餌量の減少が見られる。(参考文献7-1-1)

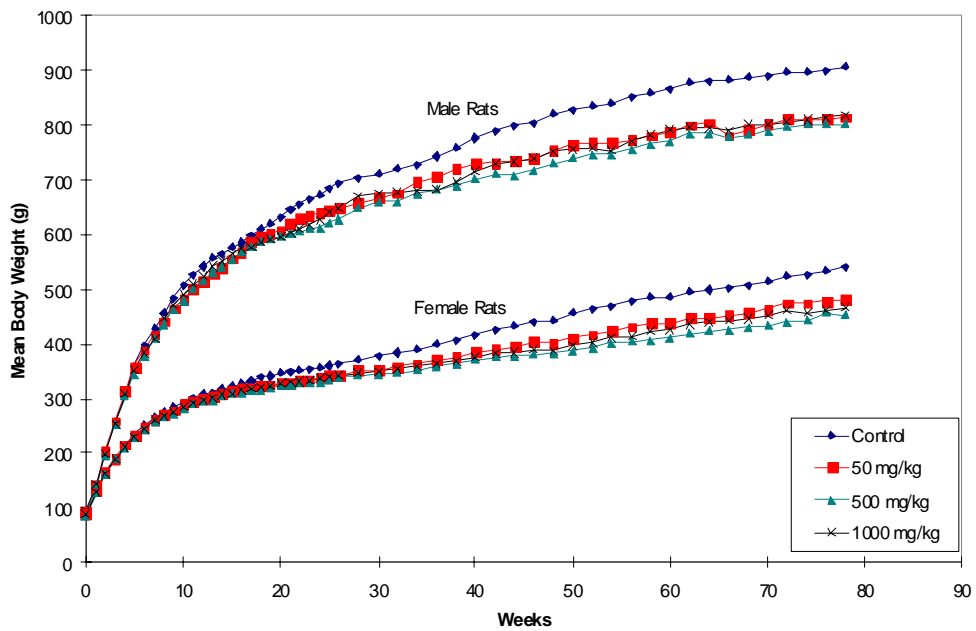


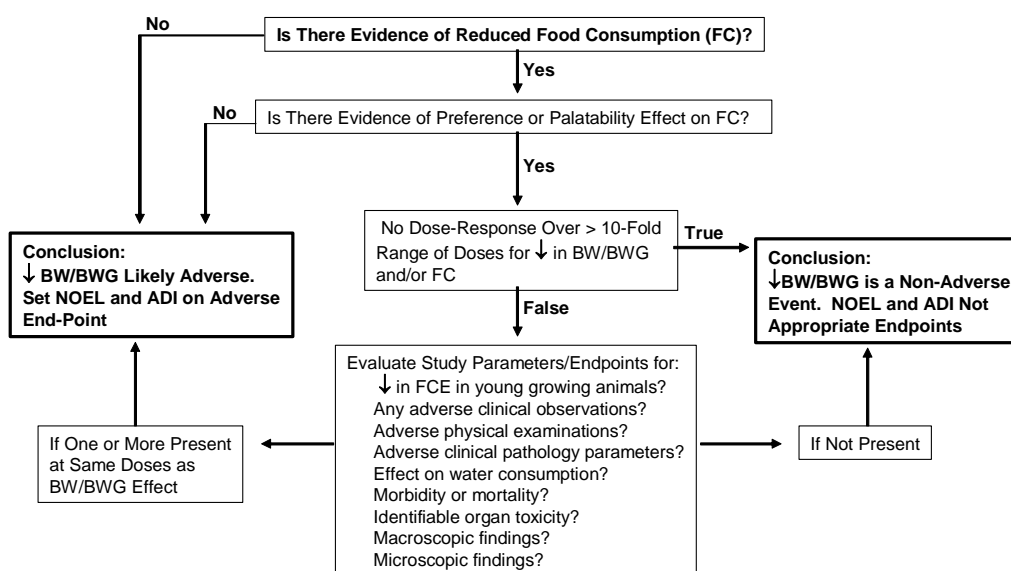
図7 ネオテームのラットを用いた2年間混餌投与試験(指定要請添付資料5-1-10):20倍以上の用量範囲(50~1,000 mg/kg 体重/日)でも体重減少には用量依存性がみられない。(参考文献7-1-1)

(参考文献 7-1-2 の要約)

ネオテームのラットを用いた長期毒性試験(指定要請添付資料 5-1-4 及び 10)において、体重増加の変化率は摂餌量の変化率よりも数倍大きかった。そこで体重変動が毒性を示す所見か、あるいは軽度かつ長期に摂餌量が減少したことに伴う所見かどうかを検索するために、ラットにおける摂餌量の変化率と体重増加の変化率が直線的で比が 1 対 1 であるかどうかを検証した。検証には、サッカリン 1 試験(ラット 825 匹)、スクラロース 2 試験(ラット 480 匹)、ネオテーム 2 試験(ラット 630 匹)及び食餌制限試験 5 試験(ラット 1000 匹以上)の成績を用いて、摂餌量の変化率と投与 52 週間後の体重増加の変化率とを比較した。その結果、Non-transformed プロットでは摂餌量の変化率と体重増加の変化率には直線性が認められなかった。しかしながら、両対数(log-log)評価では摂餌量の変化率と体重増加の変化率は直線性を示し($R^2=0.97$)、投与 52 週目のラットにおける摂餌量の変化率と体重増加の変化率の関係は、雄において% BWG = 3.45 (% FC^{0.74})、雌において% BWG = 5.28 (% FC^{0.68})と算出された。つまり、摂餌量の変化率と体重増加の変化率は必ずしも直線的ではなくその比は 1 対 1 ではないことが明らかとなり、摂餌量の僅かな低下が体重増加量の大きな低下を導くことが検証された。これらの体重増加の変化率と摂餌量の変化率との相対的な関係はネオテームを含む全ての高甘味度甘味料で一貫して認められた。以上の成績より、強い味を有する物質が餌に添加されている時、体重は無影響量(NOEL)を設定する評価項目として妥当ではないと結論付けられた。

表 3 (参考文献 7-1-2)

Algorithm to Establish Body Weight Effects as Not Adverse*



* MTD for long-term studies from subchronic studies (Up to 5% in diet (FDA) or ↓BWG not more than 10%)

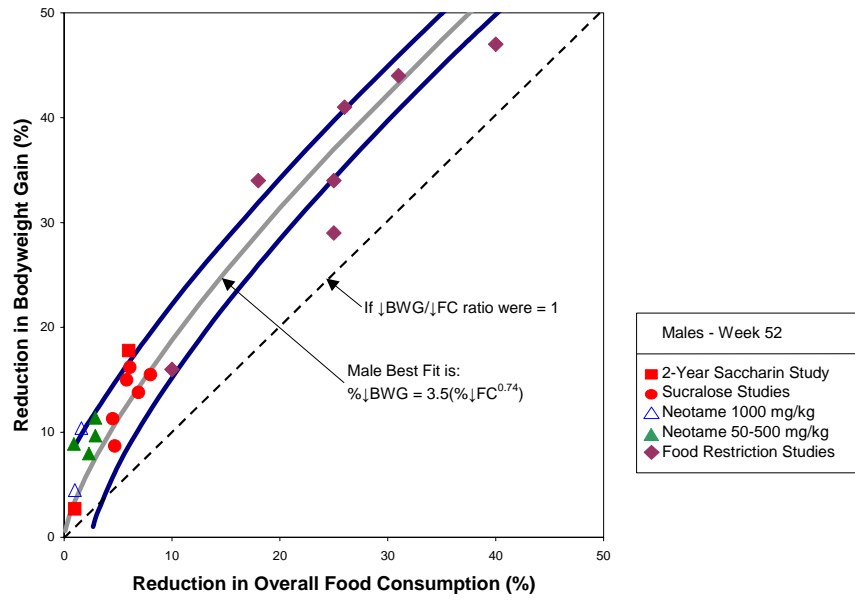


图 1 (参考文献 7-1-2)

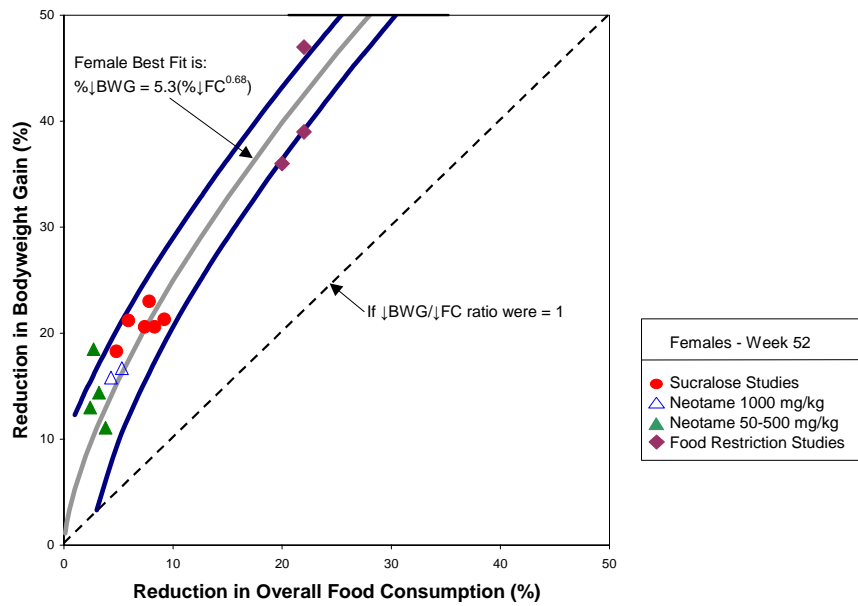


图 2 (参考文献 7-1-2)

マウス 13 週間混餌投与試験 背景データ

①肝重量

PRINTED: THU, SEP 15, 2005

COMBINED ORGAN WEIGHTS SUMMARY TOTALS

S E L E C T I O N C R I T E R I A S U M M A R Y

COMBINED ORGAN WEIGHT SUMMARY REPORT - HLA 2.2.0; OUTPUT GENERATED ON THU, SEP 15, 2005, 2:13 PM; BY: NANCY DIEDRICH

STUDY SELECTIONS:

01 SPECIES..... MICE
 02 STRAIN..... CD-1
 03 STUDY-NUMBER..... @
 04 STUDY-TYPE..... 13W
 05 STUDY-START-DATE..... 880101-951231
 06 AGE-AT-START-OF-STUDY.. @
 07 SUPPLIER-ID..... @
 08 HOUSING-LOCATIONS..... @
 09 STUDY-COMPL-DATE..... @
 10 PATHOLOGIST-ID..... @
 11 ROUTE OF ADMIN..... @
 12 VEHICLE..... @

REPORT OPTIONS:

USE TISSUE ALIASING - NO
 INCLUDE EXCL WEIGHTS - NO
 PRODUCE CONDENSED REPORT - NO
 REPORT FORMAT - 4
 REPORT BODY WEIGHT RATIOS - NO
 USE SPECIAL PRINTER - YES

ANIMAL/TISSUE SELECTIONS:

13 SEX..... @
 14 GROUP..... @
 15 DEATH-CODE..... @
 16 WEEKS-ON-STUDY..... @
 17 AGE-AT-DEATH..... @
 18 TISSUES..... LI

STUDY NUMBER / ANIMALS QUALIFIED:

220D/32	230D/15	410D/20	610D/20	730D/40	970D/20	1040D/20	1570D/39
1600D/20	1910D/40	2030D/12	2060D/40	2080D/38	2470D/20	2700D/140	

COMBINED ORGAN WEIGHTS SUMMARY TOTALS

TISSUE	SEX	POP	AVERAGE AGE	MEAN	SD	NORMAL MIN	NORMAL MAX	ACTUAL MIN	ACTUAL MAX
LIVER	MALE	256	13	1.549150	0.288643	0.971865	2.126436	1.055900	2.452200
	FEMALE	260	13	1.239569	0.220748	0.798074	1.681065	0.709600	2.214000

②肝比重量

PRINTED: THU, SEP 15, 2005

COMBINED ORGAN WEIGHTS SUMMARY TOTALS (BWT RATIOS %)

S E L E C T I O N C R I T E R I A S U M M A R Y

COMBINED ORGAN WEIGHT SUMMARY REPORT - HLA 2.2.0; OUTPUT GENERATED ON THU, SEP 15, 2005, 2:16 PM; BY: NANCY DIEDRICH

STUDY SELECTIONS:

01 SPECIES..... MICE
02 STRAIN..... CD-1
03 STUDY-NUMBER..... @
04 STUDY-TYPE..... 13W
05 STUDY-START-DATE..... 880101-951231
06 AGE-AT-START-OF-STUDY.. @
07 SUPPLIER-ID..... @
08 HOUSING-LOCATIONS..... @
09 STUDY-COMPL-DATE..... @
10 PATHOLOGIST-ID..... @
11 ROUTE OF ADMIN..... @
12 VEHICLE..... @

REPORT OPTIONS:

USE TISSUE ALIASING - NO
INCLUDE EXCL WEIGHTS - NO
PRODUCE CONDENSED REPORT - NO
REPORT FORMAT - 4
REPORT BODY WEIGHT RATIOS - YES
USE SPECIAL PRINTER - YES

ANIMAL/TISSUE SELECTIONS:

13 SEX..... @
14 GROUP..... @
15 DEATH-CODE..... @
16 WEEKS-ON-STUDY..... @
17 AGE-AT-DEATH..... @
18 TISSUES..... LI

STUDY NUMBER / ANIMALS QUALIFIED:

220D/32	230D/15	410D/20	610D/20	730D/40	970D/20	1040D/20	1570D/39
1600D/20	1910D/40	2030D/12	2060D/40	2080D/38	2470D/20	2700D/139	

COMBINED ORGAN WEIGHTS SUMMARY TOTALS (BWT RATIOS %)

TISSUE	SEX	POP	AVERAGE AGE	MEAN	SD	NORMAL MIN	NORMAL MAX	ACTUAL MIN	ACTUAL MAX
LIVER	MALE	255	13	4.724007	0.508424	3.707159	5.740854	3.751282	6.664912
	FEMALE	260	13	4.874166	0.454484	3.965199	5.783134	3.734737	6.454810

Haematology - background data for CD rats between 10 and 12 weeks of age

Report 95/0211

0774

Parameter	Units	Sex	N	Average age (weeks)	Mean	SD	Normal range [#]		Actual range	
							Min	Max	Min	Max
PCV	%	Male	119	11	47	3	41	53	40	54
		Female	111	11	43	3	38	49	35	49
Hb	g%	Male	119	11	15.7	0.7	14.4	17.0	13.7	17.2
		Female	111	11	14.9	0.9	13.2	16.6	12.5	16.9
RBC	mil/cmm	Male	119	11	8.38	0.55	7.30	9.46	7.10	9.70
		Female	111	11	7.86	0.49	6.89	8.83	6.41	9.14
MCHC	%	Male	114	11	34	1	31	37	31	37
		Female	107	11	34	1	32	37	32	38
MCV	cμ	Male	114	11	56	3	50	61	49	63
		Female	107	11	55	2	50	60	49	61
MCH	pg	Male	114	11	19	1	17	21	17	21
		Female	107	11	19	1	17	21	17	21
Platelets	1000/cmm	Male	119	11	1116	165	790	1442	752	1610
		Female	111	11	1118	163	796	1440	489	1553
Total WBC	1000/cmm	Male	119	11	15.0	3.6	7.9	22.1	7.6	26.4
		Female	111	11	12.0	3.5	5.0	19.0	4.9	21.9
PT	secs	Male	116	11	13.8	2.2	9.4	18.1	11.3	25.4
		Female	117	11	13.7	1.3	11.1	16.4	11.4	18.4

SD Standard deviation.
 # Calculated as Mean +/- SD multiplied by t-value (for N df).

Haematology - background data for CD rats between 16 and 22 weeks of age

Report 95/0211
0775

Parameter	Units	Sex	N	Average age (weeks)	Mean	SD	Normal range# Min	Max	Actual range Min	Max
PCV	%	Male	354	18	45	2	41	50	39	51
		Female	354	18	43	2	39	47	37	49
Hb	g%	Male	354	18	15.6	0.7	14.3	16.9	13.0	17.3
		Female	354	18	15.2	0.6	13.9	16.4	12.9	16.9
RBC	mil/cmm	Male	354	18	8.89	0.55	7.81	9.97	6.99	10.35
		Female	354	18	8.17	0.44	7.30	9.04	6.33	9.48
MCH	%	Male	354	18	18	1	16	19	15	20
		Female	354	18	19	1	17	20	16	21
MCV	cμ	Male	354	18	51	2	47	55	46	58
		Female	354	18	53	2	49	57	47	65
MCHC	pg	Male	354	18	34	1	33	36	32	37
		Female	354	18	35	1	33	37	32	37
Platlets	1000/ cmm	Male	345	18	1015	144	733	1297	521	1423
		Female	345	18	1009	139	737	1282	516	1453
Total WBC	1000/ cmm	Male	354	18	15.0	3.3	8.5	21.5	8.0	29.6
		Female	354	18	10.1	3.0	4.3	16.0	3.4	20.8
PT	secs	Male	218	18	14.1	1.9	10.4	17.8	11.3	23.8
		Female	220	18	13.5	1.2	11.2	15.8	11.5	17.0

SD Standard deviation.
Calculated as Mean +/- SD multiplied by t-value (for N df).

Haematology - background data for CD rats between 20 and 26 weeks of age

Report 95/0211

0776

Parameter	Units	Sex	N	Average age (weeks)	Mean	SD	Normal range# Min	Max	Actual range Min	Max
PCV	%	Male	75	21	46	2	43	50	43	50
		Female	73	21	44	2	40	47	40	48
Hb	g%	Male	75	21	15.8	0.5	14.7	16.9	14.8	17.3
		Female	73	21	15.1	0.5	14.1	16.2	13.8	16.2
RBC	mil/cmm	Male	75	21	9.24	0.42	8.39	10.08	8.35	10.11
		Female	73	21	8.25	0.35	7.56	8.94	7.37	9.06
MCH	%	Male	75	21	17	1	16	19	15	19
		Female	73	21	18	1	17	20	16	20
MCV	cμ	Male	75	21	50	2	47	54	46	54
		Female	73	21	53	2	49	56	49	57
MCHC	pg	Male	70	21	34	1	33	36	32	36
		Female	68	21	35	1	33	36	33	36
Platelets	1000/ cmm	Male	70	21	1015	118	779	1250	739	1239
		Female	68	21	1014	122	771	1258	697	1353
Total WBC	1000/ cmm	Male	75	21	14.7	2.9	8.9	20.5	8.6	21.4
		Female	73	21	9.6	2.2	5.2	14.1	5.1	16.0
PT	secs	Male	5	22	14.3	0.6	12.8	15.8	13.5	15.0
		Female	5	22	13.1	0.6	11.5	14.7	12.1	13.7

SD Standard deviation.

Calculated as Mean +/- SD multiplied by t-value (for N df).

Blood chemistry - background data for CD rats between 10 and 12 weeks of age

Report 95/0211

0777

Parameter	Units	Sex	N	Average age (weeks)	Mean	SD	Normal range [#]		Actual range	
							Min	Max	Min	Max
AP	iu/l	Male	135	11	184	90	6	362	98	790
		Female	134	11	102	39	25	179	53	335
ALT	iu/l	Male	130	11	41	9	24	58	24	86
		Female	129	11	33	9	15	51	20	70
AST	iu/l	Male	135	11	96	20	56	136	60	184
		Female	134	11	86	17	51	120	57	148
OCT	iu/l	Male	15	11	5.6	1.5	2.5	8.7	3.2	8.2
		Female	15	11	5.4	1.5	2.1	8.7	3.7	9.3
GGT	iu/l	Male	35	11	0	1	0*	1	0	2
		Female	35	11	0	1	0*	2	0	2
Urea	mg%	Male	130	11	26	6	13	38	15	55
		Female	130	11	35	10	16	54	20	77
Creatinine	mg%	Male	120	11	0.4	0.1	0.2	0.7	0.1	0.7
		Female	120	11	0.5	0.1	0.3	0.8	0.3	0.9
Glucose	mg%	Male	135	11	110	17	76	143	65	163
		Female	134	11	106	16	75	138	77	148
Total bilirubin	mg%	Male	95	11	0.2	0.1	0.0	0.3	0.0	0.3
		Female	95	11	0.2	0.1	0.0	0.3	0.0	0.3

SD Standard deviation.

Calculated as Mean +/- SD multiplied by t-value (for N df).

* Minimum value was negative, reset to 0.

Blood chemistry - background data for CD rats between 10 and 12 weeks of age

Report 95/0211

0778

Parameter	Units	Sex	N	Average age (weeks)	Mean	SD	Normal range# Min	Max	Actual range Min	Max
Total cholesterol	mg%	Male	105	11	72	17	38	106	38	140
		Female	105	11	77	18	43	112	45	125
Total protein	g%	Male	135	11	6.2	0.4	5.5	6.9	5.2	7.2
		Female	134	11	6.3	0.4	5.6	7.0	5.2	7.6
Albumin	g%	Male	120	11	3.1	0.2	2.8	3.5	2.6	3.6
		Female	119	11	3.4	0.3	2.9	4.0	2.8	4.3
A/G ratio	:1	Male	120	11	1.0	0.1	0.8	1.3	0.8	1.4
		Female	119	11	1.2	0.2	0.9	1.6	0.8	1.8
Sodium	mmol/l	Male	135	11	141	2	136	146	134	147
		Female	135	11	140	3	135	145	132	145
Potassium	mmol/l	Male	135	11	3.9	0.3	3.2	4.5	3.1	5.4
		Female	135	11	3.8	0.3	3.1	4.4	3.0	5.1
Chloride	mmol/l	Male	135	11	105	2	101	109	98	109
		Female	135	11	106	3	100	112	97	111
Calcium	mmol/l	Male	145	11	2.6	0.1	2.4	2.8	2.4	3.0
		Female	145	11	2.6	0.1	2.4	2.8	2.4	3.0
Phosphorus	mmol/l	Male	145	11	2.5	0.3	1.9	3.2	1.8	5.4
		Female	145	11	2.0	0.2	1.6	2.5	1.2	2.6

SD Standard deviation.

Calculated as Mean +/- SD multiplied by t-value (for N df).

Blood chemistry - background data for CD rats between 16 and 22 weeks of age

Report 95/0211

0779

Parameter	Units	Sex	N	Average age (weeks)	Mean	SD	Normal range# Min	Max	Actual range Min	Max
AP	iu/l	Male	340	18	94	53	0*	198	0	710
		Female	341	18	55	26	4	105	14	330
ALT	iu/l	Male	370	18	41	17	7	74	0	303
		Female	370	18	42	23	0*	87	13	319
AST	iu/l	Male	370	18	88	22	46	131	0	252
		Female	370	18	90	36	20	160	50	450
OCT	iu/l	Male	98	18	6.7	5.8	0.0*	18.2	1.3	48.5
		Female	98	18	7.1	5.2	0.0*	17.4	2.2	37.5
GGT	iu/l	Male	266	18	0	1	0*	1	0	4
		Female	265	18	0	1	0*	2	0	7
Urea	mg%	Male	370	18	26	5	16	37	0	55
		Female	370	18	34	8	18	50	18	75
Creatinine	mg%	Male	340	18	0.5	0.1	0.3	0.7	0.0	0.9
		Female	340	18	0.6	0.1	0.3	0.8	0.2	0.9
Glucose	mg%	Male	370	18	121	21	79	163	0	202
		Female	370	18	123	18	89	158	80	166
Total Bilirubin	mg%	Male	216	18	0.1	0.1	0.0	0.3	0.0	0.5
		Female	220	18	0.1	0.1	0.0	0.3	0.0	0.3

SD Standard deviation.

Calculated as Mean +/- SD multiplied by t-value (for N df).

* Minimum value was negative, reset to 0.

Blood chemistry - background data for CD rats between 16 and 22 weeks of age

Report 95/0211

0780

Parameter	Units	Sex	N	Average age (weeks)	Mean	SD	Normal range# Min	Max	Actual range Min	Max
Total Cholesterol	mg%	Male	290	18	75	17	41	109	0	144
		Female	291	18	86	18	51	121	41	159
Total Protein	g%	Male	344	18	6.4	0.4	5.6	7.2	5.3	7.7
		Female	350	18	6.7	0.5	5.7	7.6	5.4	8.2
Albumin	g%	Male	338	18	3.1	0.3	2.6	3.7	2.4	3.8
		Female	340	18	3.7	0.4	2.9	4.4	2.4	4.8
A/G ratio	:1	Male	328	18	1.0	0.1	0.7	1.2	0.6	1.4
		Female	330	18	1.2	0.2	0.9	1.6	0.8	1.8
Sodium	mmol/l	Male	349	18	140	8	125	156	0	146
		Female	350	18	140	3	135	145	129	148
Potassium	mmol/l	Male	349	18	3.9	0.4	3.1	4.7	0.0	5.6
		Female	350	18	3.7	0.3	3.0	4.4	2.6	5.1
Chloride	mmol/l	Male	342	18	104	6	92	116	0	110
		Female	350	18	106	3	101	111	99	113
Calcium	mmol/l	Male	350	18	2.6	0.2	2.3	3.0	0.0	3.0
		Female	350	18	2.6	0.2	2.3	2.9	2.2	3.2
Phosphorus	mmol/l	Male	289	18	2.1	0.2	1.6	2.5	0.0	2.8
		Female	290	18	1.7	0.3	1.2	2.2	0.9	2.5

SD Standard deviation.
Calculated as Mean +/- SD multiplied by t-value (for N df).

Blood chemistry - background data for CD rats between 20 and 26 weeks of age

Report 95/0211

0781

Parameter	Units	Sex	N	Average age (weeks)	Mean	SD	Normal range [#]		Actual range	
							Min	Max	Min	Max
AP	iu/l	Male	76	21	77	21	36	119	45	147
		Female	70	21	46	14	17	74	14	83
ALT	iu/l	Male	76	21	39	12	16	63	24	110
		Female	70	21	57	40	0*	136	20	319
AST	iu/l	Male	76	21	82	19	43	121	56	141
		Female	70	21	104	55	0*	213	55	450
GGT	iu/l	Male	66	21	0	0	0*	1	0	2
		Female	65	21	0	1	0*	1	0	2
Urea	mg%	Male	71	21	29	3	22	35	22	40
		Female	70	21	38	8	22	54	25	72
Creatinine	mg%	Male	71	21	0.4	0.1	0.2	0.7	0.2	0.8
		Female	70	21	0.5	0.1	0.2	0.7	0.2	0.7
Glucose	mg%	Male	86	21	125	15	94	155	86	163
		Female	80	21	122	15	92	152	81	162
Total Bilirubin	mg%	Male	11	21	0.1	0.0	0.0	0.2	0.1	0.2
		Female	10	22	0.1	0.1	0.0	0.3	0.1	0.2

SD Standard deviation.

Calculated as Mean +/- SD multiplied by t-value (for N df).

* Minimum value was negative, reset to 0.

Blood chemistry - background data for CD rats between 20 and 26 weeks of age

Report 95/0211

0782

Parameter	Units	Sex	N	Average age (weeks)	Mean	SD	Normal range [#]		Actual range	
							Min	Max	Min	Max
Total Cholesterol	mg%	Male	86	21	75	15	45	105	38	111
		Female	80	21	92	22	48	135	41	153
Total Protein	g%	Male	86	21	6.5	0.3	5.9	7.1	5.5	7.5
		Female	85	21	6.9	0.5	5.9	7.8	5.6	8.2
Albumin	g%	Male	86	21	3.1	0.3	2.6	3.7	2.4	3.7
		Female	85	21	3.8	0.4	3.0	4.5	2.7	4.8
Sodium	mmol/l	Male	80	21	140	3	134	146	133	148
		Female	80	21	139	2	134	144	132	143
Potassium	mmol/l	Male	80	21	4.0	0.4	3.2	4.7	3.1	5.6
		Female	85	21	3.7	0.3	3.1	4.3	3.0	4.5
Chloride	mmol/l	Male	80	21	105	2	101	109	99	110
		Female	80	21	106	2	102	111	100	111
Calcium	mmol/l	Male	91	21	2.6	0.1	2.4	2.9	2.5	2.9
		Female	90	21	2.7	0.1	2.4	2.9	2.4	3.0
Phosphorus	mmol/l	Male	31	21	2.1	0.2	1.7	2.5	1.8	2.6
		Female	35	21	1.7	0.2	1.2	2.2	1.1	2.0

SD Standard deviation.

Calculated as Mean +/- SD multiplied by t-value (for N df).



Covance Laboratories Inc.
3301 Kinsman Boulevard
Madison, Wisconsin 53704-2523
Tel: 608/241-4471
Fax: 608/241-7227

September 21, 2005

Dale A. Mayhew, PhD
c/o The NutraSweet Company
200 World Trade Center
Merchandise Mart
Suite 936
Chicago, IL 60654-1001

Dear Dr. Mayhew,

Per your request, below are serum alkaline phosphatase reference ranges constructed in 1996 for beagle dogs, 22 to 33 weeks of age, supplied by Hazleton Research Products (later called Covance Research Products). The data used to construct these ranges were obtained from animals in studies conducted in approximately the same timeframe as the Neotame studies that you referenced (HWI 6211-295 and HWI 6211-304) in our phone conversation.

Males (n=601)
71 - 287 IU/L

Females (n=591)
73 - 256 IU/L

Best Regards,

Robert L. Hall, DVM, PhD
Diplomate, ACVP (Clinical Pathology)

Historical Histopathology Data

Pituitary Tumours

CD Rats

Animals sacrificed after 52 weeks on study

Information from 52 week chronic toxicity studies and 52 week interim sacrifice animals from long term studies

Data produced for Nutrasweet - for use with NST029 - Issued 14 August 1997

The following abbreviations have been used in the accompanying tables:-

- chr Chronic toxicity study
- ct Combined onc/tox study
- dt Dietary
- lad Laboratory Animal Diet (high protein)
- og Oral Gavage
- rm Rodent Maintenance diet (low protein)
- sc Subcutaneous
- * Percentages based on number of tissues examined

Incidence of Pituitary tumours in control CD rats from selected studies performed at Huntingdon Life Sciences, Eye.

Scheduled Sacrifice - Animals killed after 52 weeks on study

MALES

code number	cdr056	cdr045	cdr074	cdr075	cdr076	cdr123	cdr109	cdr081	cdr083	cdr084	cdr085	cdr091	cdr118
start date	Mar-86	Jun-87	Jan-90	Feb-90	Apr-90	Dec-90	Dec-90	Jan-91	Feb-91	Jun-91	Jul-91	Jan-93	Nov-93
route of admin.	dt	dt	og	sc	og	dt	og	dt	og	dt	dt	dt	dt
study type	ct	ct	chr	chr	chr	chr	chr	ct	chr	ct	dct	ct	ct
no/cage	1	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
diet	lad2	lad2	lad1	lad1	lad1	lad2	lad1	lad2	lad1	lad2	rm1	rm1	rm1
study duration (weeks)	104	104	52	52	52	52	52	90	52	101	104	104	104

TOTALS	range of percentages*	
	min	max
number of animals	213	
Pituitary		
No examined	212	
B-Adenoma incidence percentage*	27 12.74%	0.0% - 30.0%
M-Carcinoma incidence percentage*	1 0.47%	0.0% - 10.0%

25

Historical Histopathology Data

14/09/2005

Incidence of Pituitary tumours in control CD rats from selected studies performed at Huntingdon Life Sciences, Eye.

Scheduled Sacrifice - Animals killed after 52 weeks on study

FEMALES

code number	cdr056	cdr045	cdr074	cdr075	cdr076	cdr123	cdr109	cdr081	cdr083	cdr084	cdr085	cdr091	cdr118
start date	Mar-86	Jun-87	Jan-90	Feb-90	Apr-90	Dec-90	Dec-90	Jan-91	Feb-91	Jun-91	Jul-91	Jan-93	Nov-93
route of admin.	dt	dt	og	sc	og	dt	og	dt	og	dt	dt	dt	dt
study type	ct	ct	chr	chr	chr	chr	chr	ct	chr	ct	dtc	ct	ct
no/cage	1	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
diet	lad2	lad2	lad1	lad1	lad1	lad2	lad1	lad2	lad1	lad2	rm1	rm1	rm1
study duration (weeks)	104	104	52	52	52	52	52	92	52	102	104	104	104

TOTALS	range of percentages*	
	min	max
number of animals	217	
Pituitary		
No examined	217	
B-Adenoma incidence percentage*	30	
	13.82%	0.0% 27.8%
M-Carcinoma incidence percentage*	1	
	0.46%	0.0% 5.0%

26

病理解剖学的検査；52 週間投与終了時及び 4 週間回復終了時に剖検し、下記の器官・組織を検査した。

頭 (含む鼻甲介)、脳、脊髄、眼及び視神経、坐骨神経、心、胸部大動脈、肺、気管、喉頭、咽頭、舌、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膵、肝、腎、副腎、膀胱、下垂体、甲状腺 (含上皮小体)、唾液腺 (顎下腺)、ジンバル腺、パリエル板、卵管、ハーダー腺、涙腺、胸腺、脾、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、精巣、精巣上体、前立腺、精囊、乳腺、卵巣、子宮 (含頸部)、膈、骨格筋 (大腿)、胸骨、大腿骨、皮膚

検体投与による変化は認められなかった。

病理組織学的検査；病理解剖学的検査を実施した器官・組織の内、下線を付した組織について病理標本を作製し、鏡検した。

下垂体腺腫の発生頻度が 30 mg/kg/日投与群の雌で統計学的に有意に増加した。

性		雄					雌				
投与群 (mg/kg/日)		10	30	100	300	1,000	10	30	100	300	1,000
下垂体	腺腫	0/17	2/20	2/16	2/20	2/18	2/20	7/19*	1/20	4/20	3/19

*: $p < 0.05$ (Fisher 正確検定)、(値は病変の見られた動物数/検査動物数)

しかし、この所見には用量依存性は見られず、また、その 30 mg/kg/日よりも高い用量での発生頻度は対照群の背景データの範囲内にあったので、検体投与の影響とは考えられなかった。100、300 及び 1,000 mg/kg/日投与群の雄の鼻甲介に出血が高頻度に観察されたが、用量依存性が見られず、また、雌には認められなかったため、検体投与の影響とは考えられなかった。

血漿中濃度；52 週間投与期間中に血漿中のネオテーム及び NC-00751 濃度を測定した。サテライト群の 0、10、30、100、300 及び 1,000 mg/kg/日投与群の雌雄各 6 匹から、投与 1、13、26 及び 53 週目の 8 時に採血し、更に、100、300 及び 1,000 mg/kg/日投与群では AUC 値を得るため雌雄各 6 匹から投与 1 及び 13 週目の 14、20 及び 2 時にも採血した。

結果を次頁の表に示した。100 mg/kg/日以下の投与群の午前 8 時における血漿中ネオテーム濃度は、ほとんどの試料で検出限界以下を示した。一方、300 及び 1,000 mg/kg/日投与群の血漿中ネオテーム濃度は、それぞれ最大約 40 及び 35 ng/mL を示し、その成績に性差は認められなかった。NC-00751 は 10 mg/kg/日投与群でもほとんどの試料で検出された。1,000 mg/kg/日投与群の平均 NC-00751 濃度は雄で最大約 2,700 ng/mL、雌で最大約 1,900 ng/mL であり、雄の方が高値を示した。NC-00751 の血漿中濃度と AUC は投与 1 及び 13 週目では雌雄とも投与量に対して線形的に増大し、投与 26 及び 53 週目においても雌は線形性を維持したが、雄ではその傾きは雌よりも小さかった。