



平成 15 年度

既存添加物の安全性に関する試験

(90 日間反復投与毒性試験)

レイシ抽出物のラットを用いる
90 日間反復経口投与毒性試験

国立医薬品食品衛生研究所 委託

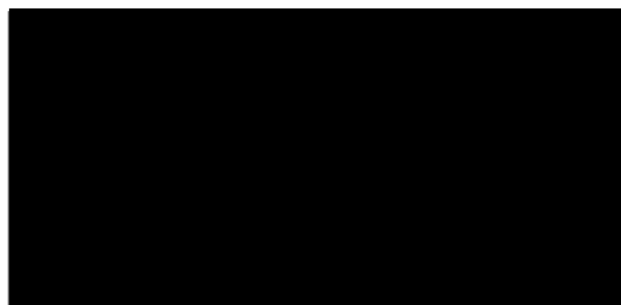




表 題 レイシ抽出物のラットを用いる 90 日間反復経口投与毒性試験

試 験 委 託 者 国立医薬品食品衛生研究所
東京都世田谷区上用賀 1-18-1

被 験 物 質 名 レイシ抽出物

試 験 項 目 ラットを用いる 90 日間反復投与毒性試験

試 験 実 施 施 設

請 負 契 約 者



レイシ抽出物のラットを用いた90日間反復経口投与毒性試験

試験責任者

要旨

レイシ抽出物をF344/DuCrj, SPF雌雄ラットにそれぞれ0(対照), 100, 300及び1000 mg/kgの用量で13週間反復経口投与し, その毒性について検討した. なお, 対照として, 0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液を被験物質混合物と同容量の10 mL/kgで投与する群を設けた.

1. 投与期間を通してレイシ抽出物各群の動物で死亡の発生はなく, 一般状態, 体重, 摂餌量, 眼科的検査, 尿検査及び血液学的検査において, 被験物質投与に関連した変化は認められなかった.

2. 血液生化学的検査では, 1000 mg/kg群の雄でアルブミン(量)の高値, 300及び1000 mg/kg群の雄で β -グロブリン比の低値, 並びに1000 mg/kg群の雌で γ -GTPの高値が認められた.

3. 器官重量では, 300 mg/kg群の雄で肝臓の相対重量の高値, 1000 mg/kg群の雌雄で肝臓の絶対及び相対重量の高値が認められた. また, 300 mg/kg群の雄で腎臓の相対重量の高値, 1000 mg/kg群の雄で腎臓の絶対及び相対重量の高値が認められた. 更に, 1000 mg/kg群の雄で脾臓の絶対及び相対重量の高値が認められ, 同群の雌で副腎の絶対及び相対重量の高値が認められた.

4. 剖検及び病理組織学的検査では, 被験物質投与に関連した変化は認められなかった.

以上のように, レイシ抽出物投与群の雄では, 300 mg/kg以上の群で肝臓及び腎臓重量の高値, 並びに β -グロブリン比の低値が認められ, 1000 mg/kg群で脾臓重量の高値及びアルブミン(量)の高値が認められた. 一方, 雌では, 1000 mg/kg群で肝臓及び副腎重量の高値, 並びに γ -GTPの高値が認められた. したがって, 本試験条件下におけるレイシ抽出物の無影響量 (NOEL) は雄で100 mg/kg, 雌で300 mg/kgと推察された.

A. 目的

既存添加物, レイシ抽出物のラットを用いる90日間経口投与毒性試験を行い, 安全性評価の資料を得ることを目的とした.

B. 方法

1 被験物質及び媒体

日本食品添加物協会より提供されたレイシ抽出物(ロット番号)を被験物質として使用した. 本被験物質は黄~褐色の粉末で特有の臭いと苦味を有し, 苦味料として使用されている. 媒体には, 0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC-Na) 溶液(原末のロット番号

ナカライテスク株式会社)を使用した. CMC-Na を精製水に溶解して0.5w/v%溶液とした. 調製は週1回以上の頻度で行い, 調製後の残余の媒体はその都度廃棄した. 被験物質は低温室の保管庫に冷暗所で密封保存(実測温度範囲 2.4~6.4°C)し, 媒体の原末は室温保存(実測温度範囲 18~25°C)した.

2 使用動物及び飼育条件

5週齢のF344/DuCrj, SPFラット(供給源: 日本チャールス・リバー株式会社, 生産場: 厚木飼育センター)を雌雄各45匹購入し, 雄で8日間, 雌で9日間の検疫馴

化を行った。この間に、全例について一般状態の観察を毎日1回（群分け日は2回）の頻度で、入荷時を含め体重測定を雄で3回、雌で4回行い、異常がないことを確認したのち、健康な動物のみそれぞれ雌雄各40匹を選んで6週齢で試験に使用した。投与時の体重は、雄が129.2×146.2g、雌が97.1×107.0gであった。動物は、温度24℃（許容範囲21～27℃）、湿度55%（許容範囲35～75%）、照明12時間（午前7時～午後7時）及び換気回数13～15回/時に設定した飼育室（XXXXXXXXXX）でステンレスチール製ケージ（260W×200H×380D mm）に個別に収容して飼育した。ただし、検疫馴化期間中は、1ケージ当たり3匹収容した。なお、試験期間中の温度の実測値は最高25℃、最低21℃、湿度の実測値は最高60%、最低24%であった。飼料は高圧蒸気滅菌処理した固型飼料（CRF-1、オリエン

タル酵母工業株式会社）を、飲水は次亜塩素酸ナトリウムを添加（約2 ppm）した井戸水を自動給水装置又は給水瓶（尿採取時）によりそれぞれ自由に摂取させた。飼料は財団法人 日本食品分析センターにて、また、飲水については株式会社鶴城にて分析を行い、いずれも許容基準に適合していることを確認した。飼育器材は高圧蒸気滅菌したものを使用した。ケージ架台は4週間に1回、ケージは2週間に1回、受皿は週2回の頻度でそれぞれ交換するとともに、飼育室は毎日清掃し、消毒薬を浸したモップで清拭した。消毒薬は次亜塩素酸ナトリウム及び逆性石けん（2種類）を1週間ごとに変えて用いた。

3 試験群構成、投与量設定の根拠及び群分け

試験群構成を次表に示した。

試験群	投与量 (mg/kg)	濃度 (w/v%)	投与容量 (mL/kg)	性別	使用 動物数	動物番号
対照群	0	0	10	♂	10	401～410
				♀	10	451～460
低用量群	100	1	10	♂	10	411～420
				♀	10	461～470
中用量群	300	3	10	♂	10	421～430
				♀	10	471～480
高用量群	1000	10	10	♂	10	431～440
				♀	10	481～490

本試験の投与量は先に実施したレイシ抽出物の2週間反復経口投与毒性予備試験（投与量：100、300及び1000 mg/kg、各群雄3匹、No. XXXXXXXXXX、XXXXXXXXXX）の結果から設定した。投与期間を通して各群の動物で死亡の発生はなく、一般状態の観察、体重、摂

餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検及び器官重量のいずれの検査においても、レイシ抽出物投与に関連する毒性徴候は認められなかった。したがって、本試験の投与量は「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」における最大投与量である1000 mg/kgを高用量に設定し、

以下公比約 3 を以って 300 及び 100 mg/kg を中用量及び低用量に設定した。

群分けは、投与開始の前日に、その日の体重を基に層別連続無作為化法で行い、群分け後の動物には動物番号を刻印した耳標により個体識別するとともに、各ケージには試験番号、動物番号、投与量及び性別を表示したラベルを付けた。群分けで除外した残余の動物は試験系から除外した。

4 投与経路、投与方法及び投与期間

投与経路は、「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」で指定されていること、飼料(飲水)中の被験物質の分析が困難であることから、強制経口投与を選択した。動物には胃管(RZ-1, テフロン製, 日本クレア株式会社)を用いて 1 日 1 回, 週 7 日投与で 13 週間, 毎日午後に強制経口投与した。投与の際, 被験物質混合物をスターラーで攪拌しながら使用した。投与容量は 10 mL/kg とし, 個体ごとの投与液量は最新体重を基に算出した。対照群には 0.5 w/v% CMC-Na 溶液のみを同様に投与した。なお, 投与開始日を投与 1 日として, 投与開始週を投与 1 週目として起算した。

5 被験物質と媒体との混合物調製法及び調製頻度

必要量の被験物質をメノウ製乳鉢で十分に摩砕したのち, 少量の 0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液を徐々に加え懸濁液とした。調製は用時に行った。なお, 本試験の有効成分の分析が不可能なことから, 混合物中での安定性及び濃度分析は実施しなかった。

6 観察, 検査及び測定 of 頻度並びに方法

1) 一般状態の観察

投与期間中は毎日投与前, 投与後 1~2 時間の 2 回, 一般状態の観察及び生死の確認を行った。

2) 体重測定

週 1 回の頻度で測定し, 最終投与日にも測定した。なお, 剖検日に最終体重を測定した。

3) 摂餌量の測定

週 1 回の頻度で測定し, 最終投与日にも測定した。飼料を入れた給餌器を秤量してケージにセットし, 翌日の約 24 時間後に給餌器をケージから取り出して残量を秤量した。この差し引きを 1 日当たりの摂餌量とした。なお, 摂餌量の表示は残量の測定日とし, 残量測定日と体重測定日は同一日に実施した。

4) 眼科的検査

投与開始前並びに投与 13 週目に実施した。投与開始前の検査は全例について行い, 投与 13 週目の検査は各群の雌雄とも動物番号の大きいものから 5 例ずつについて行った。外観を肉眼的に観察したのち, スリットランプ(SL-5, 興和オプチメド株式会社)を用い, 角膜, 虹彩, 結膜, 水晶体及び硝子体の観察を行った。次いで眼底カメラ(RC-2, 興和オプチメド株式会社)を用いて眼底の観察を行った。なお, 水晶体, 硝子体及び眼底の観察は散瞳剤(ミドリン P, 参天製薬株式会社)の点眼後に行った。

5) 尿検査

投与 13 週目に実施した。検査日の投与前の時間帯(午前 8~12 時)に, すべての動物を代謝ケージに個別に収容し, 絶食・給水下で新鮮尿を採取した。その後, 給

餌・給水下で 24 時間蓄積尿を採取した。
また、一部の動物でカリウム値が測定上限
を超える値であったため、2 倍希釈尿を用

いてナトリウム、カリウム及びクロールの
再測定を行い、いずれも再測定値を採用し
た。測定項目及び検査方法を次表に示した。

項目	方法	単位又は表示
尿量	メスシリンダー測定	mL
色調	肉眼的観察	
浸透圧	氷点降下法 OSMOMETER OM801, VOGEL 社	Osm/kg
ナトリウム	電極法 PVA- α III, 株式会社アナリティカル・ インスツルメンツ	mEq/24hr
カリウム	電極法 PVA- α III, 株式会社アナリティカル・ インスツルメンツ	mEq/24hr
クロール	電量滴定法 PVA- α III, 株式会社アナリティカル・ インスツルメンツ	mEq/24hr

以上の 6 項目は 24 時間蓄積尿を用いて検査した。

PH	試験紙法	5-9
蛋白質	試験紙法	--++++
ブドウ糖	試験紙法	--++++
ケトン体	試験紙法	--+++
ビリルビン	試験紙法	--+++
潜血	試験紙法	--+++
ウロビリノーゲン	試験紙法	<1, 1, 4, 8, 12 mg/dL

以上の 7 項目は新鮮尿を用いてプレテスト 8aII(和光純薬工業株式会社)
により検査した。

尿沈渣：採取した新鮮尿を 470×g で 5 分間遠心分離し、得られた沈渣を鏡
検し、以下の基準で判定した。鏡検は、弱拡大(100 倍)で全視野を観察し、
標本内の有形成分が均等に分布していることを確認した。次いで、強拡大
(400 倍)で数視野を観察し、有形成分の判別と数量の算定を行った。

	-	+	++	+++
上皮細胞	1 視野に 3 個未 満	1 視野に 3 個以 上 10 個未満	1 視野に 10 個 以上 20 個未満	1 視野に 20 個以上
赤血球	1 視野に 10 個 未満	1 視野に 10 個 以上 30 個未満	1 視野に 30 個 以上 100 個未 満	1 視野に赤血球が 重なり合ったり過 密状態で数の確認 が不可能な場合

白血球	1 視野に 3 個未満	1 視野に 3 個以上 20 個未満	1 視野に 20 個以上 40 個未満	1 視野に 40 個以上
円柱	すべての視野に皆無	すべての視野で 1 個以上	-	-
非細胞沈渣*	1 視野に 10 個未満	1 視野に 10 個以上 20 個未満	1 視野に 20 個以上 30 個未満	1 視野に結晶が重なり合ったり過密状態で数の確認が不可能な場合

倍率: ×400

*: 主に磷酸塩, 蔞酸塩結晶

6) 血液学的検査

投与期間終了後に、すべての動物を 18～24 時間絶食させたのち、ペントバルビタール・ナトリウム 30 mg/kg を腹腔内投与して麻酔したのち、後大静脈腹部から血液約 2 mL を採取した。血液凝固系検査には、採取した血液の一部 0.9 mL を 3.8%クエン酸ナトリウム 0.1 mL を入れた試験管に分注し、1,870×g で 15 分間遠心分離(約 4°C)して得られた血漿を用いた。他の検査には、残りの血液約 1 mL を EDTA-2K 2 mg 加採血ビン (SB-41, シスメックス株式会社) に分注したものをを用いた。測定項目及び検査方法を次頁の表に示した。なお、300 mg/kg 群の雌 1 例 (No. 477) において、採血後の分注ミスにより検査に必要な血液量を確保できず、総合血液学検査装置 (ADVIA 120) を用いて測定する血球系の 10 項目を測定できなかった。そのため、300 mg/kg 群の雌の血球系 10 項目については、9 例で評価を行った。また、EDTA-2K 2 mg 加血液の一部から血液塗抹標本として、網状赤血球数用 (New methylene blue 超生体染色) 及び白血球百分比用 (好中球, 好酸球, 好塩基球, リンパ球及び単

球, May-Grünwald-Giemsa 染色) を各 1 枚作製した。検査結果より、血液塗抹検査の必要性はないと判断したことから、標本はそのまま保存した。

項目	方法	単位
白血球数	レーザー光学法	$\times 10^3/\mu\text{L}$
赤血球数 (RBC)	レーザー光学法	$\times 10^4/\mu\text{L}$
ヘモグロビン量 (Hgb)	シアンメトヘモグロビン法	g/dL
ヘマトクリット値	$\frac{\text{RBC} \times \text{MCV}}{10^3}$	%
平均赤血球容積 (MCV)	レーザー光学法	fL
平均赤血球血色素量 (MCH)	$\frac{\text{Hgb}}{\text{RBC}} \times 10^3$	pg
平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	$\frac{\text{Hgb}}{\text{RBC} \times \text{MCV}} \times 10^5$	g/dL
網状赤血球率	RNA 染色レーザー光学法	%
血小板数	レーザー光学法	$\times 10^4/\mu\text{L}$
白血球百分率	レーザー光学法・酵素染色吸光度散乱光量分類法	%

以上の 10 項目は総合血液学検査装置 (ADVIA 120, Bayer Diagnostics Manufacturing Ltd.) を用いて測定した。

プロトロンビン時間 (PT)	散乱光検出方式	秒
活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)	散乱光検出方式	秒

以上の 2 項目は全自動血液凝固測定装置 (Sysmex CA-5000, シスメックス株式会社) を用いて測定した。

7) 血液生化学的検査

血液学的検査用の採血に引き続き、後大静脈腹部から血液約 3 mL を採取し、室温で約 60 分間放置後、 $1,870 \times g$ で 10 分間遠心分離 (約 4°C) し、得られた血清を検査に用いた。測定項目及び検査方法を次頁の

表に示した。なお、300 mg/kg 群の雌 1 例 (No. 477) において、上述の採血後の分注ミスにより検査に必要な血液量を確保できず、電解質の 3 項目を測定できなかった。そのため、300 mg/kg 群の雌の電解質 3 項目については、9 例で評価を行った。

項目	方法	単位
総蛋白質 (T. Protein)	Biuret 法	g/dL
アルブミン	BCG 法	g/dL
総ビリルビン (T. Bilirubin)	Vanadate oxidation 法	mg/dL
AST	UV-rate 法	IU/L
ALT	UV-rate 法	IU/L
γ-グルタミルトランスペプチダーゼ (γ-GTP)	L-γ-Glutamyl-3-hydroxymethyl-4-nitroanilide 基質法	IU/L
アルカリ性フォスファターゼ (ALP)	p-Nitrophenylphosphate 基質法	IU/L
総コレステロール (T. Cholesterol)	COD-HDAOS 法	mg/dL
トリグリセライド	GPO-HDAOS 法, glycerol blanking 法	mg/dL
リン脂質	Choline oxidase-DAOS 法	mg/dL
グルコース	Hexokinase-G-6-PDH 法	mg/dL
尿素窒素 (BUN)	Urease-G1DH 法	mg/dL
クレアチニン	Jaffé 法	mg/dL
無機リン (IP)	PNP-XOD 法	mg/dL
カルシウム (Ca)	MXB 法	mg/dL

以上の 15 項目は自動分析装置(7170, 株式会社日立製作所)を用いて測定した。

血清蛋白質分画	Cellulose acetate 膜電気泳動法	%
A/G 比	血清蛋白質分画より算出	

以上の 2 項目は全自動電気泳動分析装置(FED-III, コスモ株式会社)を用いて測定した。

ナトリウム (Na)	電極法	mEq/L
カリウム (K)	電極法	mEq/L
クロール (Cl)	電量滴定法	mEq/L

以上の 3 項目は電解質分析装置(PVA-αIII, 株式会社アナリティカル・インスツルメンツ)を用いて測定した。

8) 剖検

投与期間終了時の採血後に、放血致死させ、速やかに解剖してすべての器官及び組織について異常の有無を検査した。動物は、剖検前に 18~24 時間絶食させた。

脳
下垂体
顎下腺(舌下腺を含む)*
甲状腺(上皮小体を含む)
心臓
肺(気管支を含む)

胸腺
肝臓
脾臓
腎臓*
副腎*
精囊

前立腺
精巣*
精巣上部*
卵巣*
子宮

9) 器官重量の測定

剖検後、次項の器官重量を測定し、剖検日の体重を基に体重比器官重量を算出した。アスタリスクマークを付けた両側器官については、左右別々に測定し、その合計の値も算出した。

10) 病理組織学的検査

病理組織標本の作製

剖検後、すべての動物について、下記の各器官・組織を 10%中性緩衝ホルマリン溶液(ただし、眼球、視神経及びハーダー腺は 2.5%グルタルアルデヒド溶液で、精

巣及び精巣上部はブアン液でそれぞれ前固定)で固定して保存した。対照群及び高用量群の各器官・組織についてパラフィン切片としたのち、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。

大脳
小脳
延髄
下垂体
脊髄(胸部)
眼球
視神経
ハーダー腺
ジンバル腺
下顎部リンパ節
顎下腺
舌下腺
耳下腺
甲状腺
上皮小体
肺(気管支を含む)
気管

舌
鼻腔(鼻甲介)
心臓
胸腺
肝臓
膵臓
脾臓
腎臓
副腎
食道
胃
十二指腸
空腸
回腸
盲腸
結腸
直腸

腸間膜リンパ節
膀胱
精囊
前立腺
精巣上部
精巣
卵巣及び卵管
子宮
膣
大腿骨(骨髄を含む)
胸骨(骨髄を含む)
乳腺
皮膚(下腹部)
大動脈(胸部)
坐骨神経
大腿二頭筋

病理組織学的検査

対照群及び高用量群の上記のすべての器官・組織について、病理組織学的検査を実施した。中用量群及び低用量群、並びに肉眼所見のみられた器官・組織については、高用量群の検査で被験物質投与の影響が認められなかったことから、病理組織学的検査は実施しなかった。

7 統計学的処理

体重、摂餌量、尿検査（数値データ）、血液学的検査、血液生化学的検査、器官重量及び体重比器官重量については、各群ごとに平均値と標準偏差を求め、Bartlett法により分散の均一性を検定した（有意水準5%）。分散が均一な場合はDunnettの多重比較検定を用いて、分散が不均一な場合はSteelの多重比較検定を用いて対照群との比較を行った。尿検査の試験紙法による結果及び尿色調及び尿沈渣については、グレードを数値に変換したのちSteelの多重比較検定を行った。また、剖検の結果についてはFisherの正確確率検定法により、病理組織学的検査の結果についてはMann-WhitneyのU検定法により検定を行った。比較を行った群は、数値データの場合と同一とした。いずれの場合も有意水準を1及び5%とした。

C. 結果

1 一般状態

一般状態の観察結果をTable 1に示した。

投与期間を通して、いずれの群の動物においても死亡は認められず、レイシ抽出物各群の雌雄で被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

なお、偶発性的変化として、1000 mg/kgの雌1例で投与81日から切歯の異常（左側の上顎切歯の歯折）が認められたが、投与90日には回復する可逆的な変化であった。

2 体重

体重の推移をFig. 1及びTable 2に示した。

投与期間を通して、レイシ抽出物各群の雌雄で対照群とほぼ同様な体重推移を示した。

3 摂餌量

摂餌量の推移をFig. 2及びTable 3に示した。

投与期間を通して、レイシ抽出物各群の雌雄で被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

なお、有意な変化として、100 mg/kg群の雄で投与36日に摂餌量の高値、300 mg/kg群の雌で投与91日に摂餌量の低値、1000 mg/kg群の雄で投与36及び64日に摂餌量の高値が認められた。しかし、いずれも一過性の軽度な変化であり、体重推移に変化は認められていないことから、本変化の毒性学的意義はないと判断した。

4 眼科的検査

検査結果を Table 4 に示した。

投与開始前の検査では、全例で変化は認められなかった。投与 13 週目の検査では、レイシ抽出物各群の雌雄で変化は認められなかった。

5 尿検査

検査結果を Table 5 に示した。

レイシ抽出物各群の雌雄で各検査パラメータに変化は認められなかった。

6 血液学的検査

検査結果を Table 6 に示した。

レイシ抽出物各群の雌雄で各検査パラメータに被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

なお、1000 mg/kg 群の雌で MCH 及び MCHC の高値が認められたが、赤血球数、ヘモグロビン量などのパラメータに変化は認められていないことから、被験物質投与との関連性はないと判断した。

7 血液生化学的検査

検査結果を Table 7 に示した。

1000 mg/kg 群の雄でアルブミン(量)の高値及び AST の低値、300 及び 1000 mg/kg 群の雄で β -グロブリン比及びクロールの低値が認められた。また、1000 mg/kg 群の雌で γ -GTP の高値が認められた。これらの変化は、いずれも生理的変動範囲内の軽度な変化であった。

その他、100 mg/kg 群の雄で γ -GTP の高値及びカルシウムの低値が認められ、300 mg/kg 群の雄でナトリウムの低値が認められたが、同様の変化は 1000 mg/kg 群で

認められておらず、生理的変動範囲内の軽度な変化であることから、被験物質投与との関連性はないと考えられた。

100 及び 300 mg/kg 群の雌では、各検査パラメータに被験物質投与による変化は認められなかった。

8 剖検

検査結果を Table 8 に示した。

レイシ抽出物各群の雌雄で、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。なお、肝臓の横隔膜面結節が対照群の雄 1 例及び雌 2 例、100 及び 300 mg/kg 群の雌雄各 2 例、並びに 1000 mg/kg 群の雄 1 例及び雌 2 例に認められたが、その発現頻度に対照群との差はないことから、被験物質投与との関連性はないと判断した。これらのほか、卵管の嚢胞が対照群の雌 1 例に認められた。

9 器官重量

測定結果を Table 9 に示した。

300 mg/kg 群の雄で肝臓の相対重量の高値、1000 mg/kg 群の雌雄で肝臓の絶対及び相対重量の高値が認められた。また、300 mg/kg 群の雄で腎臓の相対重量の高値、1000 mg/kg 群の雄で腎臓の絶対及び相対重量の高値が認められた。更に、1000 mg/kg 群の雄で脾臓及び前立腺の絶対及び相対重量の高値が認められ、同群の雌で副腎の絶対及び相対重量の高値が認められた。

その他、100 mg/kg 群の雌で肺の相対重量の低値が認められたが、生理的変動範囲内の軽度な変化であり、300 及び 1000 mg/kg 群に同様な変動が認められないこ

とから、被験物質投与との関連性はないものと考えられた。

10 病理組織学的検査

検査結果を Table 10 に示した。

レイシ抽出物各群の雌雄で、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

なお、1000 mg/kg 群の雄各 1 例で、前立腺の腺腔への好中球滲出、下垂体前葉の嚢胞及び肺の骨化性がみられ、雌各 1 例で脾臓の巣状の腺房萎縮及び卵巣の嚢胞が認められたが、本変化はいずれも 1 例のみの軽度な変化であることから、被験物質投与との関連性はないと判断した。

その他、対照群及び 1000 mg/kg 群の動物で以下の変化が認められた。

鼻腔では、好中球性細胞浸潤が対照群の雄 1 例及び 1000 mg/kg 群の雌雄各 1 例に認められた。

ハーダー腺では、リンパ球性細胞浸潤が対照群の雄 1 例及び雌 2 例、並びに 1000 mg/kg 群の雌 5 例に認められた。

腎臓では、皮髄境界部の鉍質沈着が対照群の雌 5 例及び 1000 mg/kg 群の雌 7 例に認められた。

肺では、肺動脈の鉍質沈着が対照群の雌雄各 2 例及び 1000 mg/kg 群の雌雄各 1 例に認められた。

胸骨骨髄では、巣状萎縮が対照群の雌 1 例及び 1000 mg/kg 群の雌 1 例に認められた。

大腿骨骨髄では、巣状萎縮が対照群の雌 3 例及び 1000 mg/kg 群の雌 3 例に認められた。

甲状腺では、鰓後体遺残が対照群の雌 2 例及び 1000 mg/kg 群の雌 1 例に認められた。

これらの所見は、対照群と 1000 mg/kg 群との間で出現頻度及びその程度に差異はないことから、被験物質投与との関連性はないと考えられた。これらのほか、対照群の雄 1 例で心筋層の巣状の変性が認められた。

D. 考察および結論

レイシ抽出物の安全性に関する非臨床試験の一環として、レイシ抽出物を F344/DuCrj, SPF 雌雄ラットにそれぞれ 0(対照), 100, 300 及び 1000 mg/kg の用量で 13 週間反復経口投与し、その毒性について検討した。なお、対照として、0.5w/v%CMC-Na 溶液を被験物質混合物と同容量の 10 mL/kg で投与する群を設けた。

投与期間を通してレイシ抽出物各群の動物で死亡の発生はなく、一般状態、体重、摂餌量、眼科的検査、尿検査及び血液学的検査においても、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

肝機能に関連した変化として、300 mg/kg 以上の群の雄及び 1000 mg/kg 群の雌で肝臓重量の高値が認められた。血液生化学的検査では 1000 mg/kg 群の雄でアルブミン(量)の高値、300 及び 1000 mg/kg 群の雄で β -グロブリン比の低値、並びに 1000 mg/kg 群の雌で γ -GTP の高値が認められたが、いずれの血液生化学的パラメータは生理的変動範囲内の軽度な変化であった。これら肝臓重量の高値及び血液生化学的パラメータの変動は、肝臓の病理組織学的検査において器質的な変化は認められていないことから、毒性学的な意義は乏しいものと考えられた。その他、血液生化学的検査において 1000 mg/kg 群の雄で AST

の低値が認められたが、本変化は低値を示す変動であり、生理的変動範囲内の軽度な変化であることから、毒性学的意義はないと判断し、NOELの推定根拠から除外した。

腎臓及び副腎の機能に関連した変化として、300 mg/kg以上の群の雄で腎臓重量の高値、1000 mg/kg群の雌で副腎重量の高値が認められた。血液生化学的検査では300及び1000 mg/kg群の雄でクロールの低値が認められた。血中クロールの変化は、生理的変動範囲内の軽度な変化であることに加え、クロールと関連の深いナトリウムの変動を伴わない変化であること、また尿中のナトリウム及びカリウム総排泄量をはじめとする尿中パラメータにおいて変化が認められていないこと、更に腎臓及び副腎の病理組織学的検査において器質的な変化が認められていないことから、被験物質投与の影響ではないと判断し、NOELの推定根拠から除外した。これらのことから、腎臓及び副腎重量の高値に関し、その変化の毒性学的な意義は乏しいものと考えられた。

上記の変化に加え、1000 mg/kg群の雄で脾臓重量の高値が認められたが、脾臓の病理組織学的検査において器質的な変化

が認められなかったことから、本変化の毒性学的な意義は乏しいものと考えられた。

その他、1000 mg/kg群の雄で前立腺重量の高値が認められたが、生理的変動範囲内の軽度な変化であり、そのほかの生殖器の重量に変化が認められていないこと、前立腺の病理組織学的検査において被験物質投与に関連した変化が認められていないことから、本変化は被験物質投与との関連性はないと判断し、NOELの推定根拠から除外した。

剖検及び病理組織学的検査では、レイシ抽出物各群の雌雄で被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

以上のように、レイシ抽出物投与群の雄では、300 mg/kg以上の群で肝臓及び腎臓重量の高値、並びに β -グロブリン比の低値が認められ、1000 mg/kg群で脾臓重量の高値及びアルブミン(量)の高値が認められた。一方、雌では、1000 mg/kg群で肝臓及び副腎重量の高値、並びに γ -GTPの高値が認められた。したがって、本試験条件下におけるレイシ抽出物の無影響量(NOEL)は雄で100 mg/kg、雌で300 mg/kgと推察された。

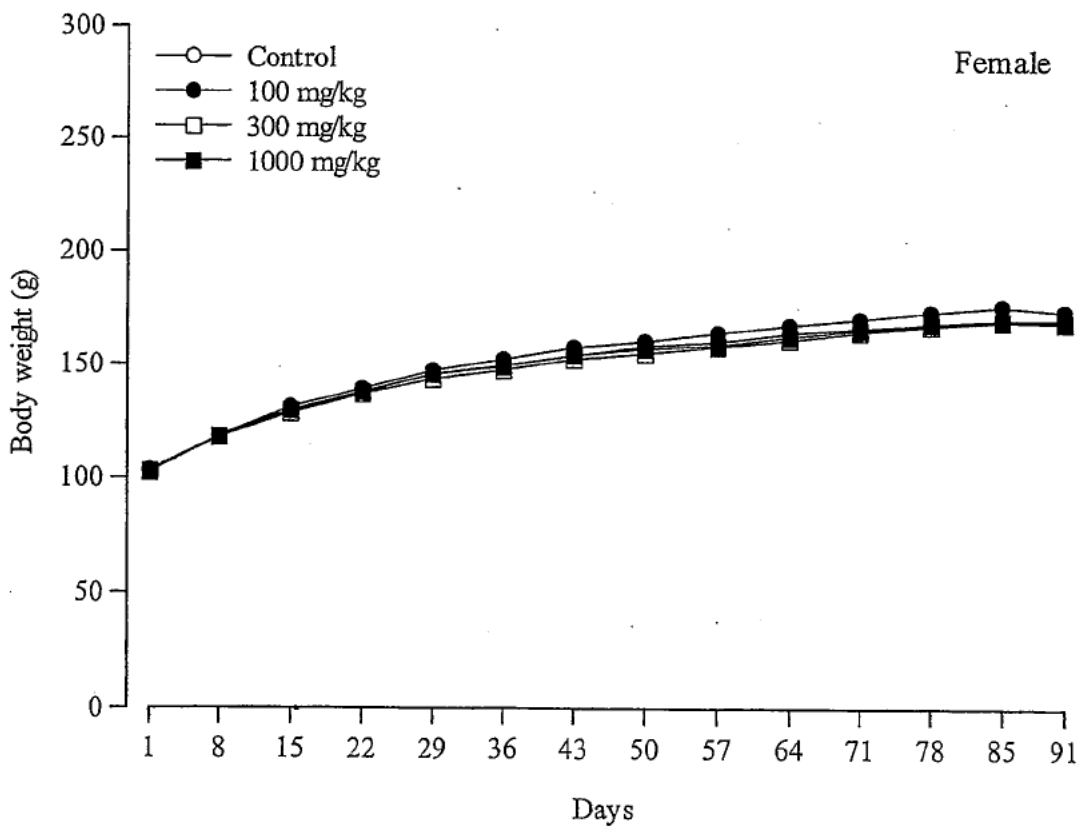
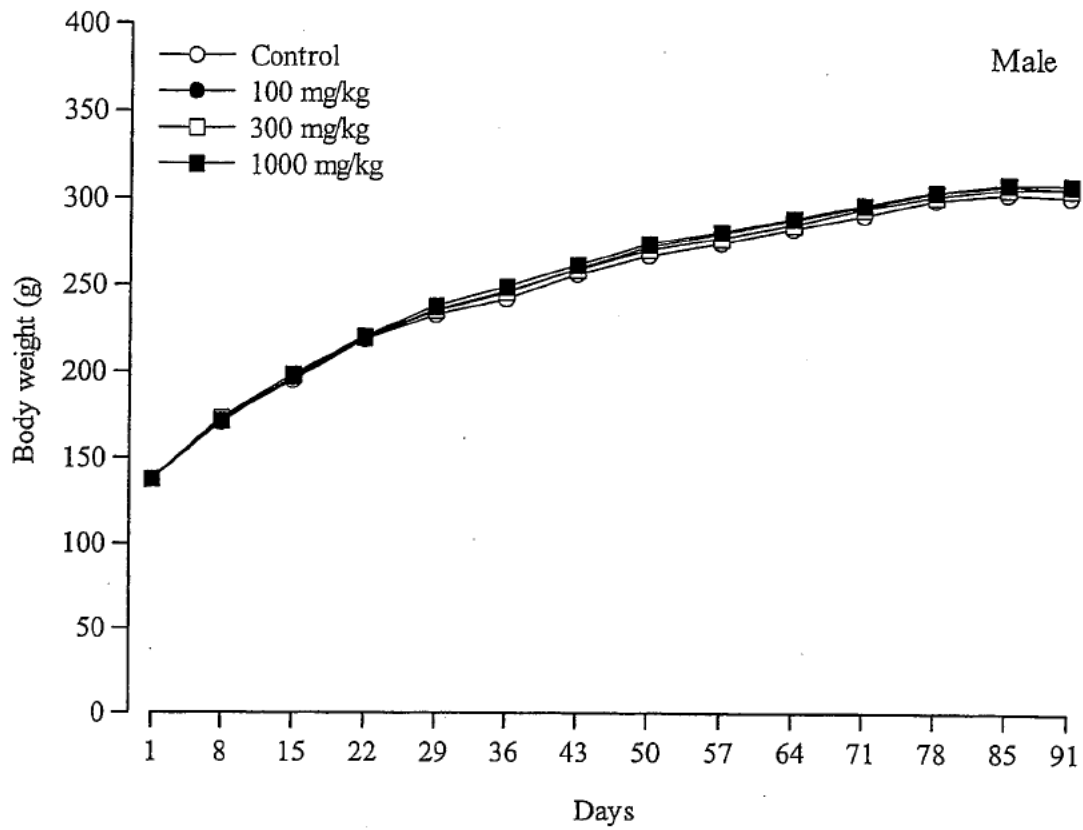


Fig 1. Body weight changes - Male, Female

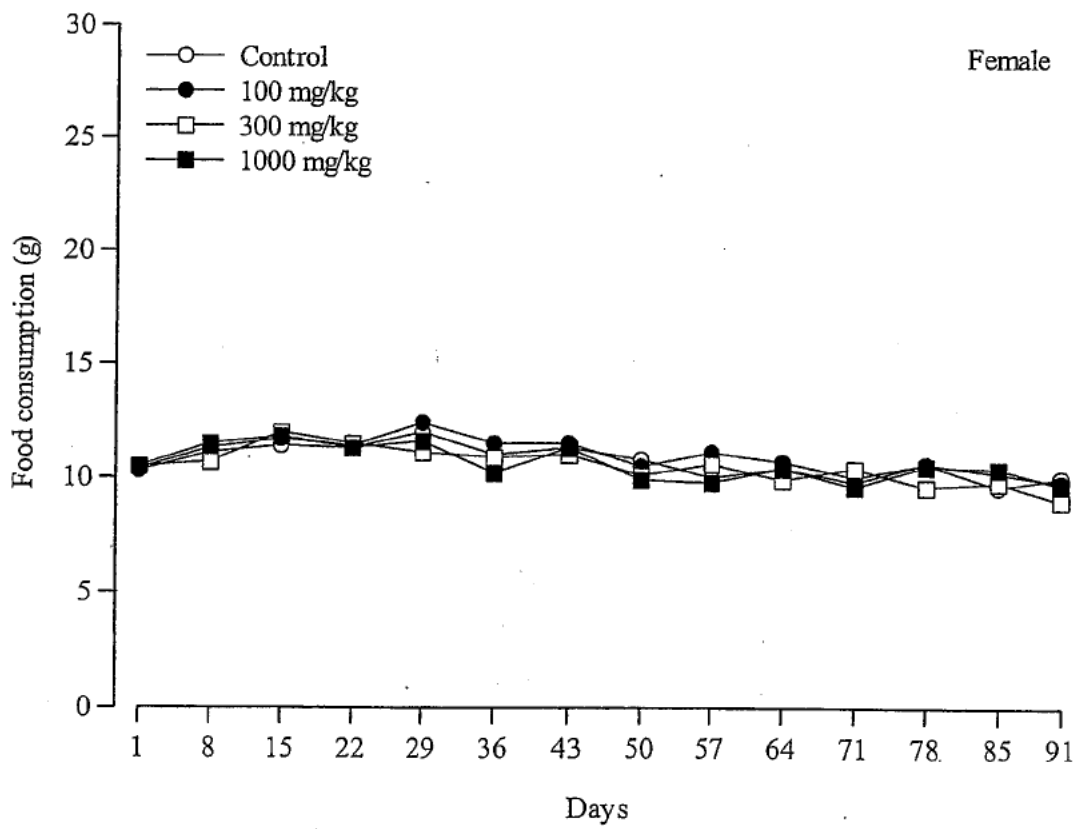
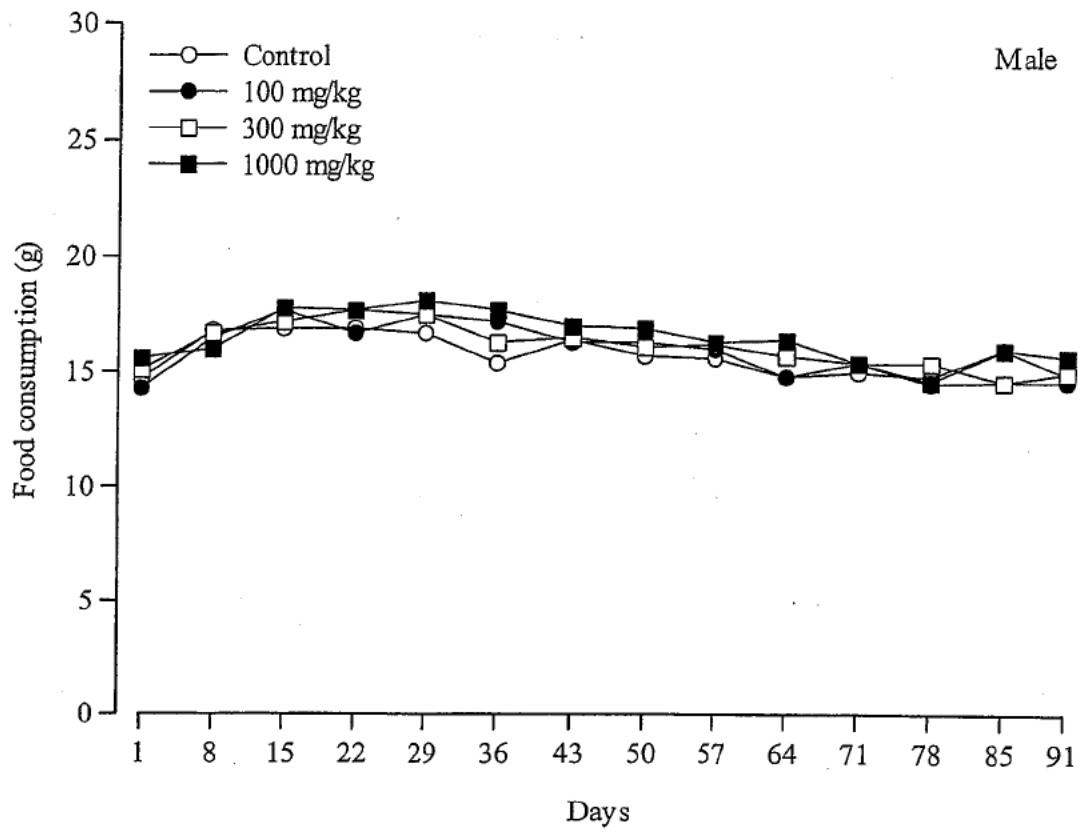


Fig 2. Food consumption -Male, Female

Table 1 Incidence of clinical sign
Male, Female

Study No. [REDACTED]

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																						
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
Male	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	100 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	300 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	1000 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Female	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
			No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		100 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
			No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
300 mg/kg		Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
1000 mg/kg		Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
Abnormality of tooth		Number of examined	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		No abnormality	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 1 - continued
Incidence of clinical sign
Male, Female

Study No. [REDACTED]

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																									
			46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68			
Male	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
	100 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
	300 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
	1000 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
Female	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
	100 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
	300 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
	1000 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		Abnormality of tooth	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Table 1 - continued Incidence of clinical sign
Male, Female

Study No. [REDACTED]

Sex	Group and dose	Clinical sign	Days																											
			69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91					
Male	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	100 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	300 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
1000 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
	No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
Female	Control	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
	100 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	300 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
1000 mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
	Abnormality of tooth	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Table 2 Body weights
Male, Female

Study No. [REDACTED]

Sex	Group and dose	Body weight (g) on day														
		1	8	15	22	29	36	43	50	57	64	71	78	85	91	
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	137.3	171.6	194.7	218.7	232.7	242.0	256.2	267.0	274.3	282.4	290.2	299.2	302.8	301.3
	S.D.	±4.5	±4.5	±5.8	±7.2	±7.9	±9.1	±10.2	±10.9	±12.0	±11.5	±13.5	±14.1	±14.2	±13.4	
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Mean		137.3	170.5	196.4	219.1	235.0	245.5	259.5	272.2	279.5	287.7	295.2	303.5	307.7	306.2	
S.D.	±4.8	±7.6	±9.6	±8.9	±8.5	±8.0	±8.3	±8.8	±8.9	±10.5	±11.0	±11.9	±11.2	±11.6		
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Mean	137.7	173.1	198.1	219.8	235.7	246.2	258.9	270.5	277.2	284.9	294.1	301.4	308.6	308.2
	S.D.	±4.9	±7.1	±8.1	±10.3	±10.6	±12.2	±15.7	±15.6	±13.8	±15.1	±16.4	±17.3	±17.1	±18.5	
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
Mean		137.7	171.5	198.3	220.3	238.0	249.2	261.7	273.9	280.8	288.4	296.3	304.1	308.6	308.2	
S.D.	±5.0	±7.7	±10.1	±12.1	±12.7	±14.2	±14.1	±15.5	±16.3	±16.0	±15.7	±17.0	±17.0	±15.7		
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Mean	103.5	118.3	129.5	137.4	145.6	149.5	153.6	158.1	159.9	163.7	165.9	167.8	169.7	170.1
	S.D.	±3.0	±3.8	±4.0	±4.2	±4.7	±5.4	±6.6	±7.6	±7.4	±7.1	±7.3	±8.7	±9.1	±9.5	
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
Mean		102.9	118.4	131.3	139.1	147.2	152.1	157.4	160.1	163.9	167.2	170.0	173.1	175.8	173.7	
S.D.	±2.3	±3.1	±4.6	±5.4	±5.8	±5.9	±5.5	±5.2	±4.9	±4.9	±6.0	±7.4	±6.1	±7.3		
Female	300 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Mean	103.1	117.8	128.5	136.9	143.5	147.5	152.1	154.8	157.7	160.7	164.3	167.1	169.0	168.6
	S.D.	±1.5	±3.8	±4.6	±6.3	±7.2	±8.0	±9.1	±8.9	±9.2	±9.8	±10.5	±10.6	±11.1	±11.6	
	1000 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
Mean		102.5	118.4	129.8	137.8	145.6	149.0	154.0	156.9	158.5	162.1	165.2	168.0	169.8	169.4	
S.D.	±2.9	±4.3	±5.3	±5.4	±5.2	±6.2	±5.5	±6.1	±4.8	±5.8	±6.2	±6.3	±6.7	±7.3		

Not significantly different from control.

Table 3 Food consumption
Male, Female

Study No. [REDACTED]

Sex	Group and dose	Food consumption(g) on day														
		1	8	15	22	29	36	43	50	57	64	71	78	85	91	
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	14.7	16.8	16.9	16.9	16.7	15.4	16.4	15.7	15.6	14.8	15.0	14.8	16.0	14.9
	S.D.	±0.6	±1.0	±1.2	±0.7	±0.6	±1.3	±0.9	±1.6	±1.2	±1.1	±1.0	±1.2	±1.4	±0.9	
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
100 mg/kg	Mean	14.3	16.5	17.7	16.7	17.5	17.2**	16.3	16.3	16.0	14.8	15.4	14.5	14.6	14.6	
	S.D.	±1.2	±0.9	±1.5	±0.8	±1.9	±1.0	±1.6	±1.0	±1.8	±1.4	±1.2	±1.5	±2.0	±1.6	
300 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	15.1	16.7	17.2	17.7	17.5	16.3	16.5	16.1	16.2	15.7	15.4	15.4	14.6	15.0	
1000 mg/kg	S.D.	±1.1	±1.2	±0.8	±1.6	±1.3	±0.6	±1.3	±1.4	±1.4	±1.4	±1.3	±1.1	±1.2	±1.5	
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	10.3	11.1	11.4	11.3	12.0	11.0	11.3	10.8	10.0	10.4	9.8	10.6	9.6	10.0
100 mg/kg	S.D.	±0.7	±1.0	±0.8	±0.8	±1.1	±0.5	±0.8	±1.2	±1.3	±0.8	±0.9	±0.7	±1.5	±0.9	
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
300 mg/kg	Mean	10.4	11.3	11.7	11.4	12.4	11.5	11.5	10.5	11.1	10.7	10.0	10.6	10.2	9.8	
	S.D.	±0.8	±0.6	±0.7	±0.9	±0.8	±0.9	±1.1	±1.0	±1.3	±0.8	±1.2	±1.1	±1.3	±0.8	
1000 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	10.5	10.7	12.0	11.5	11.1	10.9	11.0	10.1	10.6	9.9	10.4	9.6	9.8	9.0*	
1000 mg/kg	S.D.	±0.9	±0.5	±0.8	±1.2	±1.4	±0.9	±0.7	±1.0	±0.7	±1.1	±0.9	±0.7	±1.3	±1.2	
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
1000 mg/kg	Mean	10.5	11.5	11.8	11.3	11.6	10.2	11.3	9.9	9.8	10.4	9.6	10.5	10.4	9.7	
	S.D.	±1.1	±0.7	±0.6	±0.8	±1.1	±0.9	±0.9	±1.1	±1.5	±0.7	±1.0	±1.3	±1.0	±1.0	

*: P<0.05, **: P<0.01 (significantly different from control).

Table 4 Ophthalmological findings
Male, Female

Study No. [REDACTED]

Sex	Group and dose	Ophthalmological findings	Time in weeks	
			Before	13w
Male	Control	Number of examined No abnormality	10 10	5 5
	100 mg/kg	Number of examined No abnormality	10 10	5 5
	300 mg/kg	Number of examined No abnormality	10 10	5 5
Female	Control	Number of examined No abnormality	10 10	5 5
	100 mg/kg	Number of examined No abnormality	10 10	5 5
	300 mg/kg	Number of examined No abnormality	10 10	5 5
Male	Control	Number of examined No abnormality	10 10	5 5
	100 mg/kg	Number of examined No abnormality	10 10	5 5
	300 mg/kg	Number of examined No abnormality	10 10	5 5
Female	Control	Number of examined No abnormality	10 10	5 5
	100 mg/kg	Number of examined No abnormality	10 10	5 5
	300 mg/kg	Number of examined No abnormality	10 10	5 5

Table 5 Urinary findings
Male, Female, Week 13

Study No. [REDACTED]

Sex	Group and dose	Urine volume (mL/24hr)	Osmotic pressure (Osm/kg)	Na (mEq/24hr)	K (mEq/24hr)	Cl (mEq/24hr)
Male	Control	N	10	10	10	10
		Mean	8.0	1.622	0.879	1.808
	S.D.	±1.4	±0.218	±0.166	±0.114	±0.167
	100 mg/kg	N	10	10	10	10
Mean		7.6	1.829	0.873	1.891	1.263
S.D.	±2.7	±0.452	±0.170	±0.234	±0.175	
300 mg/kg	N	10	10	10	10	10
	Mean	8.9	1.612	0.831	1.774	1.200
S.D.	±3.4	±0.558	±0.207	±0.234	±0.234	
1000 mg/kg	N	10	10	10	10	10
	Mean	9.4	1.507	0.913	1.942	1.250
S.D.	±2.6	±0.401	±0.136	±0.173	±0.157	
Female	Control	N	10	10	10	10
		Mean	6.5	1.554	0.822	1.336
	S.D.	±1.9	±0.385	±0.117	±0.185	±0.148
	100 mg/kg	N	10	10	10	10
Mean		6.9	1.392	0.777	1.234	0.883
S.D.	±3.3	±0.351	±0.205	±0.339	±0.253	
300 mg/kg	N	10	10	10	10	10
	Mean	6.7	1.452	0.734	1.298	0.922
S.D.	±2.6	±0.378	±0.185	±0.289	±0.209	
1000 mg/kg	N	10	10	10	10	10
	Mean	5.3	1.616	0.691	1.197	0.822
S.D.	±1.7	±0.384	±0.191	±0.282	±0.190	

Not significantly different from control.

Table 5 - continued

Urinary findings
Male, Female, Week 13

Study No. [REDACTED]

Sex	Group and dose	Number of animals	Color		pH		Protein		Glucose	Ketone body	Bilirubin	
			Y		8.0	8.5	-	±				+
Male	Control	10	10		6	4	2	5	3	10	10	10
	100 mg/kg	10	10		4	6	1	4	5	10	10	10
	300 mg/kg	10	10		5	5	2	6	2	10	10	10
	1000 mg/kg	10	10		6	4	2	5	3	10	10	10
Female	Control	10	10		8	2	9	1	0	10	10	10
	100 mg/kg	10	10		9	1	10	0	0	10	10	10
	300 mg/kg	10	10		4	6	10	0	0	10	10	10
	1000 mg/kg	10	10		5	5	7	3	0	10	10	10

Not significantly different from control.

Abbreviation: Y, yellow.

Grade sign: -, none; ±, trace; +, slight; ++, moderate; +++, severe; +++++, very severe.

Table 5 - continued
Urinary findings
Male, Female, Week 13

Sex	Group and dose	Number of animals	Occult blood	Urobilinogen (mg/dL)
Male	Control	10	10	<1
	100 mg/kg	10	10	10
	300 mg/kg	10	10	10
	1000 mg/kg	10	10	10
Female	Control	10	10	10
	100 mg/kg	10	10	10
	300 mg/kg	10	10	10
	1000 mg/kg	10	10	10

Not significantly different from control.
Grade sign: -, none; ±, trace; +, slight; ++, moderate; +++, severe; ++++, very severe.

Table 5 - continued
Urinary findings
Male, Female, Week 13

Sex	Group and dose	Number of animals	Urinary sediment					
			Epithelial cells	Erythrocytes	Leukocytes	Casts	Crystals	
Male	Control	10	10	10	10	10	0	0
	100 mg/kg	10	10	10	10	10	9	1
	300 mg/kg	10	10	10	10	10	10	0
	1000 mg/kg	10	10	10	10	10	10	0
Female	Control	10	10	10	10	10	9	1
	100 mg/kg	10	10	10	10	10	10	0
	300 mg/kg	10	10	10	10	10	10	0
	1000 mg/kg	10	10	10	10	10	10	0

Not significantly different from control.

Grade signs are as follows.

Epithelial cells: -, < 3/field; +, 3/field ≤ and < 10/field; ++, 10/field ≤ and < 20/field; +++, ≥ 20/field.
 Erythrocytes: -, < 10/field; +, 10/field ≤ and < 30/field; ++, 30/field ≤ and < 100/field; +++, countless.
 Leukocytes: -, < 3/field; +, 3/field ≤ and < 20/field; ++, 20/field ≤ and < 40/field; +++, ≥ 40/field.
 Casts: -, none; +, ≥ 1/all field.
 Crystals: -, < 10/field; +, 10/field ≤ and < 20/field; ++, 20/field ≤ and < 30/field; +++, countless.

Table 6 Hematological findings
Male, Female, Week 13

Study No. [REDACTED]

Sex	Group and dose	Leukocytes (10 ³ / μL)	Erythrocytes (10 ⁴ / μL)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Reticulocyte (%)	Platelets (10 ⁴ / μL)	PT (sec)	APTT (sec)	
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Mean	6.33	926	15.7	46.7	50.4	16.9	33.6	2.1	66.6	16.2	23.5
		S.D.	±0.57	±26	±0.3	±1.1	±0.5	±0.2	±0.3	±0.2	±4.8	±1.6	±1.3
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	6.94	924	15.6	46.4	50.3	16.9	33.7	2.1	66.6	17.7	23.7
		S.D.	±0.89	±20	±0.3	±1.0	±0.4	±0.2	±0.4	±0.2	±4.2	±2.5	±1.9
	300 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	6.84	926	15.7	46.3	50.0	16.9	33.9	2.1	67.6	16.0	23.5
		S.D.	±0.76	±20	±0.3	±0.9	±0.4	±0.2	±0.4	±0.2	±3.6	±1.2	±1.2
1000 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	6.33	912	15.5	45.9	50.3	16.9	33.6	2.3	69.3	15.8	22.8	
	S.D.	±0.56	±23	±0.2	±0.8	±0.7	±0.4	±0.5	±0.2	±3.4	±1.0	±1.5	
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Mean	4.68	822	14.7	43.2	52.5	17.9	34.0	2.3	76.2	14.3	19.1
		S.D.	±0.70	±21	±0.4	±1.0	±0.3	±0.2	±0.3	±0.3	±4.2	±0.4	±0.6
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	4.83	834	14.9	43.8	52.6	17.9	34.0	2.2	78.5	14.0	19.0
		S.D.	±0.75	±16	±0.4	±0.8	±0.3	±0.2	±0.4	±0.2	±4.4	±0.7	±0.5
	300 mg/kg	N	9#	9#	9#	9#	9#	9#	9#	9#	9#	10	10
		Mean	4.45	825	14.9	43.5	52.7	18.0	34.2	2.2	78.7	13.9	18.8
		S.D.	±0.47	±32	±0.6	±1.7	±0.4	±0.2	±0.4	±0.3	±3.3	±0.5	±0.7
1000 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	5.17	809	14.7	42.5	52.6	18.1**	34.5*	2.4	79.9	13.7	19.1	
	S.D.	±0.64	±19	±0.3	±1.1	±0.3	±0.1	±0.4	±0.4	±4.5	±0.6	±0.8	

*: P<0.05, **: P<0.01 (significantly different from control).
#: Data for one female in the 300 mg/kg group were eliminated from the Table 6 owing to a short sample (technical error).

Table 6 - continued Hematological findings
Male, Female, Week 13

Sex	Group and dose	Differential leukocyte count											
		Eosinophil		Neutrophil		Lymphocyte		Basophil		Monocyte		Large unstained cell	
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	1.3	24.1	71.4	0.2	1.7	1.3	1.3	1.7	1.3	1.3	1.3
		S.D.	±0.2	±4.7	±5.3	±0.1	±0.5	±0.4	±0.4	±0.5	±0.4	±0.4	±0.4
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	1.3	24.3	71.1	0.2	1.9	1.2	1.2	1.9	1.2	1.2	1.2
		S.D.	±0.3	±2.3	±2.5	±0.1	±0.3	±0.3	±0.3	±0.3	±0.3	±0.3	±0.3
	300 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	1.3	23.3	72.1	0.2	1.7	1.4	1.4	1.7	1.4	1.4	1.4
		S.D.	±0.3	±2.7	±3.3	±0.1	±0.4	±0.3	±0.3	±0.4	±0.3	±0.3	±0.3
	1000 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	1.2	22.9	72.5	0.2	1.9	1.4	1.4	1.9	1.4	1.4	1.4
		S.D.	±0.2	±3.0	±3.6	±0.1	±0.5	±0.4	±0.4	±0.5	±0.4	±0.4	±0.4
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	1.2	18.5	77.8	0.2	1.3	1.0	1.0	1.3	1.0	1.0	1.0
		S.D.	±0.3	±3.2	±3.4	±0.1	±0.3	±0.2	±0.2	±0.3	±0.2	±0.2	±0.2
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	1.2	21.6	74.8	0.1	1.2	1.1	1.1	1.2	1.1	1.1	1.1
		S.D.	±0.3	±4.6	±4.7	±0.0	±0.3	±0.2	±0.2	±0.3	±0.2	±0.2	±0.2
	300 mg/kg	N	9#	9#	9#	9#	9#	9#	9#	9#	9#	9#	9#
		Mean	1.2	19.9	76.4	0.1	1.3	1.0	1.0	1.3	1.0	1.0	1.0
		S.D.	±0.3	±5.7	±6.3	±0.1	±0.3	±0.2	±0.2	±0.3	±0.2	±0.2	±0.2
	1000 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	1.0	21.5	75.0	0.1	1.3	1.1	1.1	1.3	1.1	1.1	1.1
		S.D.	±0.2	±6.4	±6.7	±0.0	±0.3	±0.2	±0.2	±0.3	±0.2	±0.2	±0.2

Not significantly different from control.
#: Data for one female in the 300 mg/kg group were eliminated from the Table 6 owing to a short sample (technical error).

Table 7 Biochemical findings
Male, Female, Week 13

Study No. [REDACTED]

Sex	Group and dose	T. Protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G ratio	α_1 -Globulin (%)	α_2 -Globulin (%)	β -Globulin (%)	γ -Globulin (%)	Albumin (%)	T. Bilirubin (mg/dL)	
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Mean	5.9	3.8	1.32	16.2	7.6	15.3	4.0	56.9	0.0
		S.D.	± 0.2	± 0.1	± 0.06	± 0.5	± 0.4	± 0.5	± 0.5	± 1.2	± 0.0
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	5.8	3.8	1.34	16.2	7.5	14.9	4.3	57.2	0.0
		S.D.	± 0.1	± 0.1	± 0.07	± 0.7	± 0.2	± 0.5	± 0.7	± 1.3	± 0.0
	300 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	5.9	3.8	1.34	16.7	7.4	14.7*	4.1	57.2	0.0
		S.D.	± 0.1	± 0.1	± 0.06	± 0.9	± 0.5	± 0.6	± 0.7	± 1.1	± 0.0
1000 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	6.0	3.9*	1.36	16.7	7.5	14.6*	3.7	57.6	0.0	
	S.D.	± 0.1	± 0.1	± 0.07	± 0.5	± 0.5	± 0.5	± 0.5	± 1.3	± 0.0	
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Mean	5.6	3.7	1.41	14.6	6.5	15.1	5.4	58.4	0.0
		S.D.	± 0.2	± 0.2	± 0.06	± 0.9	± 0.4	± 0.6	± 0.4	± 1.1	± 0.0
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	5.5	3.6	1.41	14.5	6.4	15.0	5.6	58.5	0.0
		S.D.	± 0.1	± 0.1	± 0.06	± 1.0	± 0.7	± 0.3	± 0.5	± 1.1	± 0.0
	300 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	5.6	3.7	1.42	14.5	7.0	14.8	5.1	58.6	0.0
		S.D.	± 0.2	± 0.1	± 0.13	± 0.6	± 0.9	± 1.0	± 0.8	± 2.2	± 0.0
1000 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	5.5	3.7	1.41	14.5	6.4	15.2	5.4	58.5	0.0	
	S.D.	± 0.2	± 0.1	± 0.10	± 0.8	± 0.5	± 0.8	± 0.8	± 1.7	± 0.0	

*: P<0.05 (significantly different from control).

Table 7 - continued
Biochemical findings
Male, Female, Week 13

Sex	Group and dose	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	γ -GTP (IU/L)	ALP (IU/L)	T.Cholesterol (mg/dL)	Triglycerides (mg/dL)	Phospholipids (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	BUN (mg/dL)
Male	Control	N 10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean 78	38	0.0	241	74	73	131	132	19.6
		S.D. ± 7	± 4	± 0.1	± 9	± 5	± 22	± 6	± 9	± 1.4
	100 mg/kg	N 10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Mean 76	39	0.2*	247	72	81	133	134	19.6	
	S.D. ± 13	± 7	± 0.1	± 12	± 5	± 21	± 9	± 12	± 2.0	
	300 mg/kg	N 10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Mean 69	34	0.1	249	72	77	132	139	20.2	
	S.D. ± 10	± 4	± 0.2	± 13	± 4	± 19	± 7	± 10	± 0.9	
	1000 mg/kg	N 10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Mean 63**	33	0.1	245	76	71	134	133	19.6	
	S.D. ± 7	± 4	± 0.2	± 10	± 5	± 23	± 9	± 8	± 0.9	
Female	Control	N 10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean 70	31	0.8	179	83	18	151	128	21.7
		S.D. ± 8	± 3	± 0.3	± 13	± 6	± 7	± 14	± 9	± 1.6
	100 mg/kg	N 10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Mean 68	30	1.1	183	78	18	142	121	21.3	
	S.D. ± 7	± 7	± 0.3	± 22	± 8	± 7	± 14	± 7	± 1.5	
	300 mg/kg	N 10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Mean 70	31	0.7	185	83	19	150	134	21.5	
	S.D. ± 7	± 5	± 0.4	± 15	± 10	± 5	± 19	± 13	± 1.6	
	1000 mg/kg	N 10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Mean 67	28	1.2**	191	80	19	142	139	22.1	
	S.D. ± 6	± 3	± 0.3	± 13	± 6	± 5	± 9	± 16	± 2.0	

*: P<0.05, **: P<0.01 (significantly different from control).

Table 7 - continued
Biochemical findings
Male, Female, Week 13

Study No. [REDACTED]

Sex	Group and dose	Creatinine (mg/dL)	IP (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	
Male	Control	N	10	10	10	10	10	
		Mean	0.4	6.6	10.4	145.7	3.90	106.6
		S.D.	±0.0	±0.3	±0.2	±0.7	±0.10	±1.1
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	0.4	6.6	10.1**	145.3	3.84	106.2
		S.D.	±0.1	±0.5	±0.1	±0.7	±0.10	±0.8
	300 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	0.4	6.6	10.4	145.0*	3.88	105.7*
		S.D.	±0.0	±0.4	±0.1	±0.4	±0.08	±0.7
	1000 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	0.4	6.7	10.3	145.1	3.99	105.5*
		S.D.	±0.0	±0.2	±0.1	±0.4	±0.12	±0.8
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	0.4	6.9	10.1	144.5	4.62	107.2
		S.D.	±0.1	±0.4	±0.3	±1.0	±0.43	±1.2
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	0.4	7.2	9.8	144.7	4.42	107.8
		S.D.	±0.1	±0.8	±0.2	±0.8	±0.25	±1.1
	300 mg/kg	N	10	10	10	9#	9#	9#
		Mean	0.4	7.4	10.3	144.4	4.77	106.6
		S.D.	±0.0	±0.6	±0.2	±0.6	±0.28	±1.1
	1000 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10
		Mean	0.5	7.3	10.2	144.1	4.69	105.8
		S.D.	±0.1	±1.1	±0.3	±0.5	±1.00	±2.0

*: P<0.05, **: P<0.01 (significantly different from control).

#: Data for one female in the 300 mg/kg group were eliminated from the Table 7 owing to a short sample (technical error).

Table 8 Necropsy findings
Male, Female, Week 13

Study No. [REDACTED]

Organs and findings	Sex			
	Group and dose	Male		
		Control	100 mg/kg	300 mg/kg
Number of animals	10	10	10	10
Digestive system				
Liver				
Nodule, diaphragmatic	1	2	2	1
Genital system				
Oviduct	NA	NA	NA	NA
Cyst, right				

Not significantly different from control.

NA: not applicable.

No appreciable changes in all other organs and tissues.

Table 8 - continued

Necropsy findings
Male, Female, Week 13

Study No. [REDACTED]

Organs and findings	Sex			
	Control	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
Group and dose				
Number of animals	10	10	10	10
Digestive system				
Liver				
Nodule, diaphragmatic	2	2	2	2
Genital system				
Oviduct				
Cyst, right	1	0	0	0

Not significantly different from control.
No appreciable changes in all other organs and tissues.

Table 9 Organ weights
Male, Female, Week 13

Sex	Group and dose	Final body weight (g)	Brain		Pituitary		Submaxillary glands		Submaxillary gland (Right)	
			(g)	(g/100 gB.W.)	(mg)	(mg/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	282.5	0.69	8.0	2.8	0.39	0.14	0.20	0.07
	S.D.	±12.6	±0.02	±0.5	±0.2	±0.04	±0.01	±0.02	±0.01	
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10
Mean		287.0	0.68	8.1	2.8	0.41	0.14	0.20	0.07	
S.D.	±10.4	±0.03	±0.5	±0.2	±0.03	±0.01	±0.02	±0.00		
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	285.8	0.69	8.3	2.9	0.42	0.15	0.21	0.07
	S.D.	±16.4	±0.03	±0.5	±0.2	±0.03	±0.01	±0.02	±0.01	
	1000 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10
Mean		289.3	0.68	8.4	2.9	0.40	0.14	0.20	0.07	
S.D.	±15.6	±0.03	±0.7	±0.1	±0.04	±0.01	±0.02	±0.01		
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	156.0	1.15	10.4	6.7	0.29	0.19	0.14	0.09
	S.D.	±8.2	±0.05	±1.2	±0.6	±0.02	±0.01	±0.01	±0.01	
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10
Mean		160.1	1.13	10.2	6.4	0.30	0.19	0.15	0.09	
S.D.	±6.2	±0.04	±1.4	±0.7	±0.02	±0.01	±0.01	±0.01		
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	154.5	1.17	9.8	6.3	0.29	0.19	0.15	0.10
	S.D.	±10.5	±0.07	±0.8	±0.4	±0.02	±0.01	±0.01	±0.01	
	1000 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10
Mean		155.7	1.15	10.2	6.5	0.30	0.19	0.15	0.09	
S.D.	±7.2	±0.04	±1.0	±0.5	±0.02	±0.01	±0.01	±0.01		

Not significantly different from control.

Table 9 - continued

Organ weights
Male, Female, Week 13

Study No. [REDACTED]

Sex	Group and dose	Submaxillary gland (Left)		Thyroids		Heart		Lungs		Thymus	
		(g)	(g/100 gB.W.)	(mg)	(mg/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	0.19	0.07	12.7	4.5	0.88	0.31	0.91	0.32	0.12
	S.D.	±0.02	±0.01	±1.7	±0.5	±0.03	±0.02	±0.03	±0.01	±0.02	±0.00
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Mean		0.20	0.07	13.0	4.5	0.88	0.31	0.91	0.32	0.13	
S.D.	±0.01	±0.00	±2.1	±0.6	±0.05	±0.01	±0.04	±0.01	±0.01	±0.01	±0.00
300 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	0.21	0.07	13.6	4.8	0.90	0.32	0.92	0.32	0.13	
S.D.	±0.02	±0.01	±1.3	±0.5	±0.04	±0.01	±0.05	±0.01	±0.01	±0.01	±0.00
1000 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	0.20	0.07	14.5	5.0	0.89	0.31	0.93	0.32	0.14	
S.D.	±0.02	±0.01	±1.8	±0.6	±0.04	±0.01	±0.05	±0.01	±0.01	±0.02	±0.01
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	0.15	0.10	9.0	5.8	0.57	0.36	0.68	0.44	0.14
	S.D.	±0.01	±0.01	±1.0	±0.6	±0.03	±0.02	±0.04	±0.01	±0.02	±0.01
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Mean		0.15	0.09	8.8	5.5	0.57	0.36	0.67	0.42*	0.13	
S.D.	±0.01	±0.01	±1.1	±0.6	±0.04	±0.02	±0.03	±0.02	±0.01	±0.01	±0.01
300 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	0.14	0.10	9.2	6.0	0.56	0.36	0.68	0.44	0.13	
S.D.	±0.01	±0.01	±1.3	±0.9	±0.02	±0.02	±0.03	±0.02	±0.01	±0.01	±0.01
1000 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	0.15	0.10	9.0	5.8	0.56	0.36	0.68	0.44	0.13	
S.D.	±0.01	±0.01	±1.4	±0.9	±0.02	±0.01	±0.03	±0.01	±0.01	±0.02	±0.01

*: P<0.05 (significantly different from control).

Table 9 - continued
Organ weights
Male, Female, Week 13

Sex	Group and dose	Liver		Spleen		Kidneys		Kidney (Right)		Kidney (Left)	
		(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	7.26	2.57	0.59	0.21	1.80	0.64	0.88	0.31	0.92
	S.D.	±0.45	±0.06	±0.03	±0.00	±0.08	±0.02	±0.04	±0.01	±0.05	
100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	7.38	2.57	0.61	0.21	1.81	0.63	0.89	0.31	0.92	
S.D.	±0.42	±0.08	±0.04	±0.01	±0.08	±0.02	±0.05	±0.01	±0.04	±0.01	
300 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	7.69	2.69**	0.62	0.22	1.90	0.66*	0.95**	0.33**	0.95	
S.D.	±0.45	±0.05	±0.04	±0.01	±0.08	±0.02	±0.05	±0.01	±0.04	±0.01	
1000 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	8.32**	2.88**	0.66**	0.23**	1.93*	0.67**	0.96**	0.33**	0.97	
S.D.	±0.62	±0.08	±0.05	±0.01	±0.13	±0.02	±0.05	±0.01	±0.08	±0.02	
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	3.95	2.53	0.43	0.28	1.14	0.73	0.57	0.36	0.57
	S.D.	±0.19	±0.08	±0.02	±0.01	±0.03	±0.03	±0.02	±0.01	±0.02	
100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	4.00	2.50	0.42	0.27	1.14	0.71	0.56	0.35	0.57	
S.D.	±0.18	±0.06	±0.03	±0.02	±0.04	±0.01	±0.03	±0.01	±0.02	±0.01	
300 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	4.02	2.60	0.43	0.28	1.14	0.74	0.56	0.37	0.57	
S.D.	±0.24	±0.08	±0.04	±0.02	±0.04	±0.03	±0.02	±0.02	±0.03	±0.02	
1000 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	4.32**	2.78**	0.45	0.29	1.16	0.75	0.58	0.37	0.58	
S.D.	±0.20	±0.04	±0.03	±0.02	±0.03	±0.02	±0.02	±0.01	±0.02	±0.01	

*: P<0.05, **: P<0.01 (significantly different from control).

Table 9 - continued

Organ weights
Male, Female, Week 13

Study No. [REDACTED]

Sex	Group and dose	Adrenals		Adrenal (Right)		Adrenal (Left)		Seminal vesicle		Prostate	
		(mg)	(mg/100 gB.W.)	(mg)	(mg/100 gB.W.)	(mg)	(mg/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	43.2	15.3	7.3	22.7	8.1	1.02	0.36	0.46	0.16
	S.D.	±2.2	±1.2	±0.6	±1.2	±0.7	±0.10	±0.03	±0.04	±0.01	
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Mean		45.6	15.9	7.6	23.8	8.3	1.01	0.35	0.49	0.17	
S.D.	±3.0	±0.7	±0.5	±1.6	±0.4	±0.11	±0.03	±0.10	±0.03		
300 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	44.3	15.5	7.4	23.2	8.1	1.03	0.36	0.49	0.17	
S.D.	±1.5	±1.0	±0.5	±1.1	±0.6	±0.10	±0.04	±0.07	±0.02		
1000 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	45.0	15.6	7.4	23.8	8.2	1.11	0.38	0.56**	0.19**	
S.D.	±3.0	±1.2	±0.5	±1.8	±0.7	±0.12	±0.04	±0.04	±0.01		
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	48.7	31.3	15.0	25.4	16.3	1.12	0.36	0.49	0.17
	S.D.	±2.4	±1.7	±0.8	±2.0	±1.2	±0.10	±0.03	±0.04	±0.01	
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Mean		50.1	31.3	14.9	26.2	16.4	1.11	0.38	0.56**	0.19**	
S.D.	±3.5	±1.8	±1.0	±1.7	±0.9	±0.12	±0.04	±0.04	±0.01		
300 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	50.3	32.6	15.8	26.0	16.9	1.11	0.38	0.56**	0.19**	
S.D.	±4.1	±2.9	±1.3	±2.4	±1.7	±0.12	±0.04	±0.04	±0.01		
1000 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	53.0*	34.1*	16.1	27.9*	17.9*	1.12	0.38	0.56**	0.19**	
S.D.	±2.5	±1.7	±1.1	±1.2	±0.8	±0.12	±0.04	±0.04	±0.01		

*: P<0.05, **: P<0.01 (significantly different from control).

Table 9 - continued
Organ weights
Male, Female, Week 13

Sex	Group and dose	Testes		Testis (Right)		Testis (Left)		Epididymides		Epididymis (Right)	
		(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	3.04	1.08	1.51	0.53	1.53	0.54	0.89	0.32	0.44
	S.D.	±0.14	±0.04	±0.07	±0.02	±0.08	±0.03	±0.05	±0.02	±0.03	
100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	3.06	1.07	1.52	0.53	1.54	0.54	0.91	0.32	0.45	
S.D.	±0.12	±0.03	±0.07	±0.02	±0.06	±0.02	±0.05	±0.05	±0.02	±0.03	
300 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	3.05	1.07	1.52	0.53	1.54	0.54	0.90	0.32	0.45	
S.D.	±0.11	±0.04	±0.04	±0.02	±0.08	±0.03	±0.06	±0.01	±0.01	±0.03	
1000 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	3.10	1.07	1.54	0.53	1.56	0.54	0.94	0.33	0.47	
S.D.	±0.15	±0.03	±0.08	±0.02	±0.08	±0.02	±0.05	±0.01	±0.01	±0.04	
Female	Control	N									
		Mean									
S.D.											
100 mg/kg	N										
	Mean										
S.D.											
300 mg/kg	N										
	Mean										
S.D.											
1000 mg/kg	N										
	Mean										
S.D.											

Not significantly different from control.

Table 9 - continued Organ weights Male, Female, Week 13

Sex	Group and dose	Epididymis (Left)		Ovaries		Ovary (Right)	Ovary (Left)	Uterus		
		(g)	(g/100 gB.W.)	(mg)	(mg/100 gB.W.)	(mg)	(mg/100 gB.W.)	(g)	(g/100 gB.W.)	
Male	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	
		Mean	0.44	0.16	23.4	15.0	23.4	15.0	0.46	0.30
	S.D.	±0.03	±0.01	±2.0	±1.7	±2.0	±1.3	±0.08	±0.05	
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10
Mean		0.46	0.16	25.0	15.3	25.0	15.7	0.41	0.25	
S.D.	±0.03	±0.01	±2.8	±1.2	±2.8	±1.6	±0.08	±0.04		
300 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	0.46	0.16	23.9	15.5	22.9	14.8	0.40	0.26	
S.D.	±0.03	±0.01	±3.9	±2.2	±2.9	±1.7	±0.07	±0.04		
1000 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	0.47	0.16	25.1	16.1	24.0	15.5	0.43	0.28	
S.D.	±0.02	±0.01	±2.8	±1.4	±3.8	±2.6	±0.04	±0.03		
Female	Control	N	10	10	10	10	10	10	10	10
		Mean	46.8	30.0	23.4	15.0	23.4	15.0	0.46	0.30
	S.D.	±3.1	±2.1	±2.7	±1.7	±2.0	±1.3	±0.08	±0.05	
	100 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10
Mean		49.6	31.0	24.6	15.3	25.0	15.7	0.41	0.25	
S.D.	±3.2	±1.4	±2.1	±1.2	±2.8	±1.6	±0.08	±0.04		
300 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	46.8	30.3	23.9	15.5	22.9	14.8	0.40	0.26	
S.D.	±5.1	±2.6	±3.9	±2.2	±2.9	±1.7	±0.07	±0.04		
1000 mg/kg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	49.1	31.6	25.1	16.1	24.0	15.5	0.43	0.28	
S.D.	±4.1	±2.6	±2.8	±1.4	±3.8	±2.6	±0.04	±0.03		

Not significantly different from control.

Table 10 Histopathological findings
Male, Female, Week 13

Study No. [REDACTED]

Organs and findings	Sex														
	Male					Female									
	Control		100 mg/kg		300 mg/kg		1000 mg/kg		1000 mg/kg						
	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total
Digestive system															
Tongue															
Esophagus															
Stomach															
Duodenum															
Jejunum															
Ileum															
Cecum															
Colon															
Rectum															
Submaxillary gland															
Sublingual gland															
Parotid gland															
Liver															
Pancreas															
Atrophy, acinus, focal	10	0	0	0	0						10	0	0	0	0
Respiratory system															
Nasal cavity															
Cellular infiltration, neutrophil	9	1	0	0	1						9	1	0	0	1
Trachea															
Lung															
Metaplasia, osseous	10	0	0	0	0						9	1	0	0	1
Mineralization, artery	8	2	0	0	2						9	1	0	0	1
Hematopoietic system															
Thymus															
Submaxillary lymph node															
Mesenteric lymph node															
Spleen															
Bone marrow (sternum)															
Atrophy, focal	10	0	0	0	0						10	0	0	0	0
Bone marrow (femur)															
Atrophy, focal	10	0	0	0	0						10	0	0	0	0

Not significantly different from control.
Grade sign: -, none; +, slight; ++, moderate; +++, severe.
NR: no remarkable changes.
Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

Table 10 - continued
 Histopathological findings
 Male, Female, Week 13

Study No. [REDACTED]

Organs and findings	Sex		Male												
	Group and dose		Control			100 mg/kg			300 mg/kg			1000 mg/kg			
	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total
Cardiovascular system															
Heart															
Degeneration, myocardium, focal	9	1	(10)	0	1	(0)					10	0	(10)	0	0
Aorta															
NR(10)						(0)					(0)				NR(10)
Urinary system															
Kidney															
Mineralization, corticomedullary	10	0	(10)	0	0	(0)					10	0	(10)	0	0
Urinary bladder															
NR(10)						(0)					(0)				NR(10)
Genital system															
Testis															
NR(10)						(0)					(0)				NR(10)
Epididymis															
NR(10)						(0)					(0)				NR(10)
Prostate															
Cellular exudation, acinus, neutrophil	10	0	(10)	0	0	(0)					9	1	(10)	0	1
Seminal vesicle															
NR(10)						(0)					(0)				NR(10)
Ovary															
NA						NA					NA				NA
Cyst															
Oviduct															
NA						NA					NA				NA
Uterus															
NA						NA					NA				NA
Vagina															
NA						NA					NA				NA
Mammary gland															
NR(10)						(0)					(0)				NR(10)
Endocrine system															
Pituitary															
Cyst, anterior lobe	10	0	(10)	0	0	(0)					9	1	(10)	0	1
Thyroid															
Remnant, ultimobranchial body	10	0	(10)	0	0	(0)					10	0	(10)	0	0
Parathyroid															
NR(10)						(0)					(0)				NR(10)
NR(10)						(0)					(0)				NR(10)
Nervous system															
Cerebrum															
NR(10)						(0)					(0)				NR(10)
Cerebellum															
NR(10)						(0)					(0)				NR(10)

Not significantly different from control.
 Grade sign: -, none; +, slight; ++, moderate; +++, severe.
 NR: no remarkable changes.
 NA: not applicable.
 Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

Table 10 - continued
 Histopathological findings
 Male, Female, Week 13

Organs and findings	Sex																				
	Male						Female														
	Control		100 mg/kg		300 mg/kg		1000 mg/kg		Control		100 mg/kg		300 mg/kg		1000 mg/kg						
Number of animals	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10						
	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	
Nervous system																					
Medulla oblongata																					
Spinal cord																					
Optic nerve																					
Sciatic nerve																					
Special sense organs																					
Eye																					
Harderian gland																					
Cellular infiltration, lymphocyte	9	1	0	0	1																
Zymbal's gland																					
Musculoskeletal system																					
M. biceps femoris																					
Sternum																					
Femur																					
Integumentary system																					
Integument																					

Not significantly different from control.
 Grade sign: -, none; +, slight; ++, moderate; +++, severe.
 NR: no remarkable changes.
 Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

Table 10 - continued

Histopathological findings
Male, Female, Week 13

Study No. [REDACTED]

Organs and findings	Sex												
	Male					Female							
	Control		100 mg/kg		300 mg/kg		1000 mg/kg		Total				
Group and dose	Control		100 mg/kg		300 mg/kg		1000 mg/kg		Total				
Number of animals	10		10		10		10		Total				
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	Total
Digestive system													
Tongue	NR (10)				(0)								NR (10)
Esophagus	NR (10)				(0)								NR (10)
Stomach	NR (10)				(0)								NR (10)
Duodenum	NR (10)				(0)								NR (10)
Jejunum	NR (10)				(0)								NR (10)
Ileum	NR (10)				(0)								NR (10)
Cecum	NR (10)				(0)								NR (10)
Colon	NR (10)				(0)								NR (10)
Rectum	NR (10)				(0)								NR (10)
Submaxillary gland	NR (10)				(0)								NR (10)
Sublingual gland	NR (10)				(0)								NR (10)
Parotid gland	NR (10)				(0)								NR (10)
Liver	NR (10)				(0)								NR (10)
Pancreas	(10)				(0)								(10)
Atrophy, acinus, focal	10	0	0	0	0				9	1	0	0	1
Respiratory system													
Nasal cavity					(10)				(0)				(10)
Cellular infiltration, neutrophil	10	0	0	0	0				9	1	0	0	1
Trachea	NR (10)				(0)				(0)				NR (10)
Lung	(10)				(0)				(0)				(10)
Metaplasia, osseous	10	0	0	0	0				10	0	0	0	0
Mineralization, artery	8	2	0	0	2				9	1	0	0	1
Hematopoietic system													
Thymus	NR (10)				(0)				(0)				NR (10)
Submaxillary lymph node	NR (10)				(0)				(0)				NR (10)
Mesenteric lymph node	NR (10)				(0)				(0)				NR (10)
Spleen	NR (10)				(0)				(0)				NR (10)
Bone marrow (sternum)	(10)				(0)				(0)				(10)
Atrophy, focal	9	1	0	0	1				9	1	0	0	1
Bone marrow (femur)	(10)				(0)				(0)				(10)
Atrophy, focal	7	3	0	0	3				7	3	0	0	3

Not significantly different from control.

Grade sign: -, none; +, slight; ++, moderate; +++, severe.

NR: no remarkable changes.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

Table 10 - continued
 Histopathological findings
 Male, Female, Week 13

Organs and findings	Sex		Female												
	Group and dose		100 mg/kg			300 mg/kg			1000 mg/kg			Total			
	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total
Cardiovascular system															
Heart															
Degeneration, myocardium, focal	10	0	(10)	0	0	(0)					10	0	(10)	0	0
Aorta						(0)					(0)				NR(10)
Urinary system															
Kidney						(0)					(0)				
Mineralization, corticomedullary	5	5	(10)	0	0	(0)					3	7	(10)	0	7
Urinary bladder						(0)					(0)				NR(10)
Genital system															
Testis						NA					NA				NA
Epididymis						NA					NA				NA
Prostate						NA					NA				NA
Cellular exudation, acinus, neutrophil						NA					NA				NA
Seminal vesicle						NA					NA				NA
Ovary	10	0	(10)	0	0	(0)					9	1	(10)	0	1
Cyst						NR(10)					(0)				NR(10)
Oviduct						NR(10)					(0)				NR(10)
Uterus						NR(10)					(0)				NR(10)
Vagina						NR(10)					(0)				NR(10)
Mammary gland						NR(10)					(0)				NR(10)
Endocrine system															
Pituitary						(10)					(0)				(10)
Cyst, anterior lobe	10	0	0	0	0	(0)					10	0	0	0	0
Thyroid						(10)					(0)				(10)
Remnant, ultimobranchial body	8	2	0	0	0	2					9	1	0	0	1
Parathyroid						NR(10)					(0)				NR(10)
Adrenal						NR(10)					(0)				NR(10)
Nervous system															
Cerebrum						NR(10)					(0)				NR(10)
Cerebellum						NR(10)					(0)				NR(10)

Not significantly different from control.
 Grade sign: -, none; +, slight; ++, moderate; +++, severe.
 NR: no remarkable changes.
 NA: not applicable.
 Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

Organs and findings	Sex		Female													
	Group and dose		Control			100 mg/kg			300 mg/kg			1000 mg/kg				
	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	-	+	++	+++	Total	
Nervous system																
Medulla oblongata																
Spinal cord																
Optic nerve																
Sciatic nerve																
Special sense organs																
Eye																
Harderian gland																
Cellular infiltration, lymphocyte	8	2	0	0	2											
Zymbal's gland																
Musculoskeletal system																
M. biceps femoris																
Sternum																
Femur																
Integumentary system																
Integument																

Not significantly different from control.

Grade sign: -, none; +, slight; ++, moderate; +++, severe.

NR: no remarkable changes.

Figures in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

食品添加物のラットを用いる90日間反復投与毒性試験結果報告書(平成15年度)

1. 一般的事項

食品添加物の名称	レイシ抽出物(Mannentake extract, マンネンタケの菌糸体若しくは子実体又はその培養液から抽出して得られたものをいう。)
別名	マンネンタケ抽出物
主成分/成分	サルノコシカケ目マンネンタケ(<i>Ganoderma lucidum</i> KARST.)の菌糸体若しくは子実体, 又はその培養液より, 水, エタノール又は二酸化炭素で抽出して得られたものである。子実体の苦味成分を有効に含有し, カルシウム, 鉄なども多量に含む。
常温における性状	褐色の粉末で, 特異な苦味がある。
安定性	実施せず
溶解性	水(50 mg/mL)及びメタノール(0.5 mg/mL)に不溶。

2. 投与量設定の根拠となった試験

試験の種類及び期間	14日間反復経口投与毒性予備試験					
動物種	ラット, F344/DuCrj, SPF					
投与経路	強制経口投与					
投与用量(mg/kg)	1群あたりの動物数	一般状態 体重 摂餌量	血液学的検査	血液生化学的検査	器官重量	剖検
0(対照)	雄3例	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
100	雄3例	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
300	雄3例	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
1000	雄3例	異常なし	血小板数の低値	異常なし	異常なし	異常なし

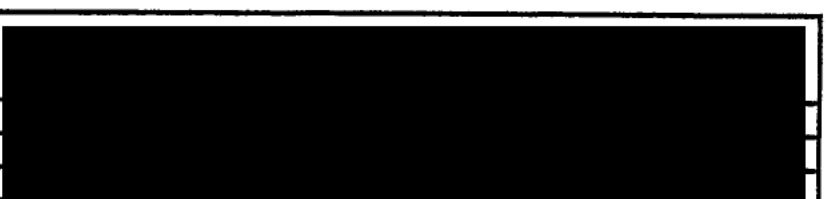
3. 90日間反復経口投与毒性試験

試験実施年度		平成15年度											
使用動物・系統		ラット, F344/DuCrj, SPF		1群あたりの動物数									
投与経路		強制経口投与		雄:10 雌:10									
		群 投与量(mg/kg)		対照 0		低用量 100		中用量 300		高用量 1000			
		性		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀		
体重						—	—	—	—	—	—		
摂餌量		1)投与36日, 2)投与91日, 3)投与36及び64日				▲1)	—	—	△2)	▲3)	—		
一般状態		歯の異常(上顎切歯の歯折, 投与81~90日)		—	—	—	—	—	—	—	1		
眼科的検査				—	—	—	—	—	—	—	—		
尿検査				—	—	—	—	—	—	—	—		
血液学検査		MCHの高値 MCHCの高値				—	—	—	—	—	▲		
血液生化学検査		アルブミン(量)の高値 β-グロブリン比の低値 ASTの低値 γ-GTPの高値 カルシウムの低値 ナトリウムの低値 クロールの低値				—	—	—	—	△	—		
剖検時体重						—	—	—	—	—	—		
器官重量(絶対重量)		肝臓 脾臓 腎臓 副腎 前立腺				—	—	—	—	▲	▲		
器官重量(相対重量)		肺 肝臓 脾臓 腎臓 副腎 前立腺				—	▽	—	—	—	—		
剖検		肝臓 横隔膜面結節 卵管 嚢胞		1	2	2	2	2	2	1	2		
病理組織学的検査		脾臓 巣状 鼻腔 肺 肺動脈 胸骨 骨髄 大腿骨 骨髄 心臓 心筋層 腎臓 皮髄境界部 前立腺 腺腔 卵巣 下垂体 前葉 甲状腺 ハーダー腺		腺房萎縮(+) 好中球性細胞浸潤(+) 鉍質沈着(+) 骨化性(+) 巣状萎縮(+) 巣状萎縮(+) 巣状変性(+) 鉍質沈着(+) 好中球滲出(+) 嚢胞(+) 嚢胞(+, 軽度) 鰓後体遺残(+) リンパ球性細胞浸潤(+)		0	0	**	**	**	**	0	1
NOEL(mg/kg/day)				1	0	**	**	**	**	0	1		
				*	1	*	0	*	0	*	0		
				0	1	**	**	**	**	0	1		
				0	3	**	**	**	**	0	3		
				1	0	**	**	**	**	0	0		
				0	5	**	**	**	**	0	7		
				0	*	**	*	**	*	1	*		
				*	0	*	**	*	**	*	1		
				0	0	**	**	**	**	1	0		
				0	2	**	**	**	**	0	1		
				1	2	**	**	**	**	0	5		

—, 変化なし △, ▽ 5%有意差 ▲, ▼ 1%有意差 数値, 出現例数 *, 当該器官なし **, 検査せず

<p>NOELの推定根拠とした変化</p>	<p>レイシ抽出物投与群の雄では、300 mg/kg群以上の群で肝臓及び腎臓重量の高値、並びにβ-グロブリン比の低値が認められ、1000 mg/kg群で脾臓重量の高値及びアルブミン(量)の高値が認められた。一方、レイシ抽出物投与群の雌では、1000 mg/kg群で肝臓及び副腎重量の高値、並びにγ-GTPの高値が認められた。したがって、本試験条件下におけるレイシ抽出物の無影響量 (NOEL) は雄で100 mg/kg群、雌で300 mg/kgと推察された。</p> <p>なお、摂餌量の変化は、いずれも一過性の軽度なものであり、体重推移に変化は認められていないことから、NOELの推定根拠から除外した。血液学的検査では、1000 mg/kg群の雌でMCH及びMCHCの高値が認められたが、赤血球系パラメータに変化は認められていないことから、被験物質投与との関連性はないと判断した。血液生化学的検査では、300及び1000 mg/kg群の雄でクロールの低値が認められたが、変化の程度は生理的変動範囲内の軽度なもので、関連するパラメータであるナトリウムの変動を伴わない変化であることから、被験物質投与の影響ではないと判断し、NOELの推定根拠から除外した。また、1000 mg/kg群の雄でASTの低値が認められたが、本変化は低値を示す変動であり、生理的変動範囲内の軽度な変化であることから、毒性学的意義はないと判断し、NOELの推定根拠から除外した。器官重量では、前立腺の重量変化が認められたが、変化の程度は生理的変動範囲内の軽度なもので、病理組織学的検査で変化は認められていないこと、他の生殖器の重量及び病理組織学的検査において変化が認められないことから、被験物質投与の影響ではないと判断し、NOELの推定根拠から除外した。その他、血液生化学的検査及び器官重量で有意差が認められるものもあったが、その発現に投与量との関連性がなく、変化の程度は生理的変動範囲内の軽度なものであったため被験物質投与との関連性はないと判断した。</p>
-----------------------	--

4. その他

<p>反復投与毒性試験 実施機関</p>	<p>名称</p>	
	<p>所在地</p>	
<p>試験責任者</p>	<p>職氏名</p>	
<p>試験実施年度</p>		