



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)

ログウッド色素のラットを用いる
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

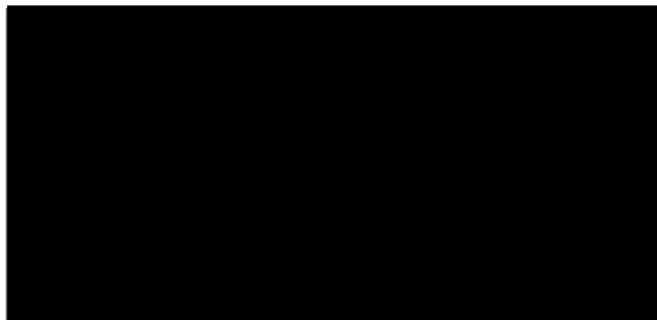




表 題 ログウッド色素のラットを用いる 90 日間反復経口投与
毒性試験

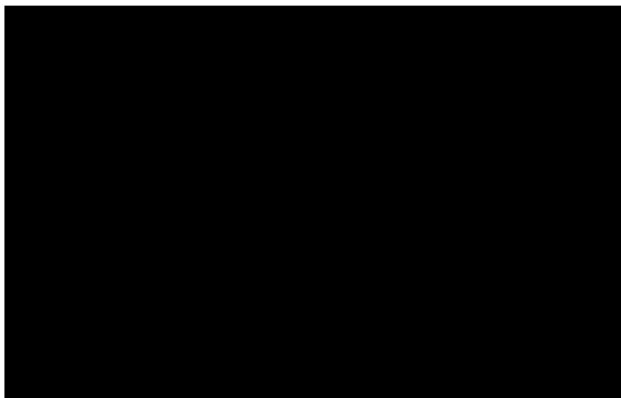
試 験 委 託 者 国立医薬品食品衛生研究所
東京都世田谷区上用賀 1-18-1

被 験 物 質 名 ログウッド色素

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



ログウッド色素のラットにおける90日間反復経口投与毒性試験

試験責任者

要旨

ログウッド色素をラットに90日間(13週間)にわたって投与した場合の毒性を検索するため、本被験物質を0, 20, 100および500 mg/kg/dayの用量で、各群雌雄10匹ずつのFischerFラット(F344/DuCrj)に強制経口投与した。試験期間中、動物の一般状態と死亡の有無を毎日観察し、体重および摂餌量を毎週1回測定した。雌雄各群5匹について投与終了前(13週時)に眼科学的検査および尿検査を実施し、全動物について、13週間投与終了後に血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量測定および剖検を実施した。病理組織学的検査は、0および500 mg/kg/day群雌雄の全身臓器・組織および20および100 mg/kg/day群雌雄の腎臓を対象に実施した。

死亡率、一般状態の観察、摂餌量、眼科学的検査、血液生化学的検査ないし剖検では、被験物質による毒性と考えられる所見は認められなかった。その他の検査では以下のような毒性変化が認められた。

500 mg/kg/day群：雄では、投与初期の体重増加量が低かったことが影響し、全投与期間を通じて、統計学的に有意ではないが対照群よりも軽度に低い体重値が認められた。尿検査では、雌に有意な尿量の増加および尿比重の低下が観察された。血液学的検査では、雌にリンパ球および単球の減少を伴う白血球数の有意な減少が認められた。臓器重量測定の結果、雄の腎臓相対重量に有意な増加が認められ、病理組織学的検査で雌雄全例(各10/10例)の腎臓の近位尿細管上皮にリポフスチンを含有する褐色色素の沈着が観察された。

100および20 mg/kg/day投与群：雌雄において、被験物質投与に起因する毒性変化は観察されなかった。

以上の結果に基づき、ログウッド色素を90日間ラットに反復経口投与した場合の無毒性量(NOEL)は以下のように判断された。

	<u>雄</u>	<u>雌</u>
無毒性量 (NOEL) :	100 mg/kg/day	100 mg/kg/day

当該試験に先だって実施した14日間反復経口投与毒性試験(雄3匹/群で実施、用量: 0, 30, 100, 300, 1000 mg/kg/day)では、1000 mg/kg/day群の3例中2例および100mg/kg/day群の3例中1例の腎臓で顕著な重量増加と明瞭な近位尿細管腔拡張が観察され、主にその所見に基づいて当該試験の用量設定がなされた。しかし当該試験においては、近位尿細管腔拡張は雌雄いずれの投与群にも観察されなかった。14日間反復経口投与毒性試験における同病変の発生頻度には明らかな用量相関性がなかったが、自然発生する種類のものではないため、やはり被験物質の投与によって生じたものと考えられた。当該試験において発生が全くなかったことを考慮すると、近位尿細管腔拡張は被験物質投与後の早い時期に発現する変化である可能性が推測される。

A. 目的

ログウッド色素をラットに 90 日間 (13 週間) にわたって連続強制経口投与し、その亜急性毒性を検索して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

1.1 名称

ログウッド色素(Logwood colour)

1.2 ロット番号

■■■■■

1.3 提供者

日本食品添加物協会

1.4 基原・製法・本質等

マメ科ログウッド (Haematoxylon campe-chianum) の心材より、熱時水で抽出して得られたものである。主色素はヘマトキシリンである。黒褐色を呈する。用途は着色料。

1.5 性状等

赤紫色粉末

ヘマトキシリンは、スオウ色素と同様にアルカリ性で、空気中容易に酸化されて、赤色のヘマテインになる。これに酢酸を加えるとヘマテインが結晶となって析出する。

ヘマトキシリンは、熱湯、熱エタノール、アルカリ、グリセリンに可溶。

1.6 保管上の注意

空気を遮断して室温暗所に保管。

2 試験動物

2.1 試験動物

日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センター (神奈川県) で生産された Fischer 系 SPF ラット (F344/Du Crj) の雌雄動物を用いた。

2.2 入荷時の動物の週齢、数および体重範囲

5 週齢のラットを雌雄それぞれ 47 匹ずつ入荷した (雌雄 ■■■■■)。出荷時の体重範囲は雄 70~90 g, 雌 65~85 g であった。

2.3 検疫および馴化

入荷後、雄は 7 日間、雌は 8 日間試験環境に馴化させ、その後群分けして被験物質の投与を開始した。馴化期間中は毎日ケージサイドから一般状態の観察を行なった。また、入荷日および群分け直前に触診を含む一般状態の観察を実施し、馴化期間中 1 回、全動物について眼科学的検査を実施した。眼科学的検査で眼に異常が観察された雌雄各 1 匹は群分けに用いなかった。

2.4 投与開始時の週齢および体重範囲

雌雄ともに 6 週齢で被験物質の投与を開始した (投与開始日: 雄 ■■■■■, 雌 ■■■■■)。投与開始時の体重は、雄 102~116g, 雌 90~98g であった。

3 動物飼育

3.1 飼育環境

温度 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ，湿度 $50 \pm 20\%$ ，換気回数 10 回以上／時間 (オールフレッシュエア方式)，照明時間 12 時間／日 (午前 7 時点灯，午後 7 時消灯) に設定された動物飼育室で動物を飼育した。

3.2 ラックおよび飼育ケージ

群分け前は，ステンレス鋼製可動ラックにステンレス鋼製金網ケージ (310W×440D×230H mm) を装着し，各ケージに原則として雌雄別に 6 匹ずつ収容した。群分け後は，ステンレス鋼製個別飼育用可動ラックにステンレス鋼製個別飼育用金網ケージ (160W×230D×180H mm) を装着し，個体別に収容した。各ラックには被験物質名，試験番号および性別を，また，各ケージには被験物質名，試験の種類，試験番号，動物種，用量群，性別および動物番号を記した標識を付けて識別した。

群分け後，ラック，ケージおよび給餌器は，原則として 4 週間に 1 回の頻度で洗浄・滅菌したものと交換した。各動物に対する照明条件を均等にするために，交換時にケージのローテーションを行なった。ローテーションはラックの最上段のケージを最下段に，他の段は下段より順次上段に移動させる方法で実施した。

3.3 飼料

飼料には CRF-1 固型飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社，東京都) を用いた。財団法人日本食品分析センター

(東京都) において，発送前の飼料の分析を行い，下記の物質について，混入濃度を求めた。

水銀，カドミウム，鉛，ヒ素，セレン， γ -BHC，DDT(含類縁物質)，アルドリリン，ディルドリン，エンドリン，ヘプタクロール，マラチオン，パラチオン，アフラトキシシン(B1，B2，G1，G2)，ポリ塩化ビフェニール，エストラジオール，ジメチルニトロソアミン，ジエチルニトロソアミン

分析の結果，各汚染物質の含有量は，当研究所の許容基準内にあり，問題はなかった。

飼料は，群分け前は，ステンレス鋼製固型飼料給餌器に，群分け後は，同個別飼育用固型飼料給餌器に入れて自由摂取させた。

3.4 飲料水

急速濾過・活性炭吸着装置を通したのち次亜塩素酸ナトリウムおよび紫外線によって殺菌した井戸水を，プラスチック製給水びんに入れて動物に自由に摂取させた。飲料水に関しては，原則として毎年 6 月と 12 月に，財団法人東京顕微鏡院 食と環境の科学センター (東京都) が次表の A の汚染物質の濃度を，また，財団法人残留農薬研究所化学部が B の汚染物質の濃度を分析した。

A: ヒ素，鉛，総水銀，カドミウム，セレン，ポリ塩化ビフェニール，N-ニト

ロソ化合物，総トリハロメタン

B：有機塩素系農薬，有機リン系農薬，シマン，チウラム，チオベンカルブ，1,3-ジクロロプロペン

採取の飲料水に関する分析結果では，問題は認められなかった。

4 動物の群分け

試験に用いる動物は馴化を終えた健康な動物から選択し，群分けに供した。投与開始日（雄 []，雌 []）に体重を測定し，雌雄別々に，体重値に基づいた層別無作為抽出法で各用量群に配分した。この時，各群間の体重に統計学的有意差のみられないこと，また，雌雄各々について，各個体の体重が平均体重の80～120%の範囲内にあることを確認した。試験に用いない動物は投与開始時に当該動物室から排除した。

5 動物の個体識別

群分け前は，被毛の一部を塩基性フクシン飽和70%エタノール溶液で染色することにより，ケージ内での個体識別を行なった。動物のケージ内番号と染色部位の関係を以下に示す。

- No.1 頭部
- No.2 背
- No.3 臀部
- No.4 頭部および背部
- No.5 背部および臀部
- No.6 無印

群分け後の個体識別は耳鑑札法で行なった。また，一般状態の観察および投与時の個体確認を容易にするために，雌雄の各用量群（10匹）について，動物番号の小さい順に個体識別としてピクリン酸飽和70%エタノール溶液にて被毛の一部を染色した。次に染色部位（略号）を示す。

- No.1 頭部（ア）
- No.2 背部（セ）
- No.3 臀部（シ）
- No.4 頭部および背部（アセ）
- No.5 背部および臀部（セシ）
- No.6 頭部，背部および背部（アセシ）
- No.7 頭部から背部（ア-セ）
- No.8 背部から臀部（セ-シ）
- No.9 頭部から背部から臀部（ア-セ-シ）
- No.10 無印（ム）

6 被験物質

6.1 被験物質の投与方法および投与期間

被験物質が飼料中で安定であるか否かは不明であったため，混餌投与ではなく強制経口投与方法を選択した。経口による暴露は，ヒトで予想される本被験物質の主たる暴露経路に一致する。投与は週7日間，91日間（13週間）にわたって実施した。被験物質の投与液をスターラー等で攪拌しつつ均質な状態に保ち，注射筒内に吸い上げ，胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与は，午前11時から午後3時までの間に

実施した。投与容量は、体重 1 kg 当り 10 mL とした。対照群の動物には溶媒のみを同様の方法で投与した。

6.2 被験物質投与液の調製

各用量群について、必要量の被験物質に、注射用水（大塚製薬株式会社，東京都）を用いて調製した 0.5% Carboxymethyl Cellulose Sodium Salt (CMC：和光純薬工業株式会社，大阪府) 水溶液を加え，スターラーでの攪拌により得た懸濁液を投与液とした。投与液は用時調製した。

当該試験に先行した 14 日間反復経口投与毒性試験において，調製投与液中の被験物質の実濃度を確認するために，当該試験で用いた 0，2，10 および 50 mg/mL の調製投与液について被験物質濃度の分析を行なった。その結果，2，10 および 50 mg/mL の調製投与液において，実測被験物質濃度は設定値の 103～106% の範囲内であった。また，0 mg/mL の投与液に被験物質の混入はなかった。

7 試験群の設定および使用動物数

当該試験の用量設定のためのデータを採取する目的で，14 日間反復経口投与毒性試験を実施した。同試験では，各群雄 3 匹の Fischer 系 SPF ラット

(F344/DuCrj) に本被験物質を 0，30，100，300 および 1000 mg/kg/day の用量で 14 日間強制経口投与し，その毒性を検索した。その結果，一般状態観察では，1000 および 300 mg/kg/day 群において，投与第 1～15 日に黒色糞と赤紫色尿が 3 例中 3 例に認められた。また 100 mg/kg/day 群においても，投与第 8～15 日に赤紫色尿が 3 例中 3 例に観察された。臓器重量では，1000 mg/kg/day 群の 3 例中 2 例および 100 mg/kg/day 群の 3 例中 1 例において，腎臓重量の増加が認められた。腎臓の病理組織学的検査を 1000 mg/kg/day 群の 3 例および重量増加の認められた 100 mg/kg/day 群の 1 例について実施したところ，重量増加のみられた 1000 mg/kg/day 群の 2 例および 100 mg/kg/day 群の 1 例に明瞭な近位尿細管腔拡張が認められた。

次表に，14 日間反復経口投与毒性試験の結果に基づいて設定した当該試験の用量群ならびに各群の使用動物数および動物番号（耳鑑札番号）を示した。

用量 (mg/kg/day)	濃度 (mg/mL)	使用動物数 (動物番号)	
		雄	雌
0	0	10 (201~210)	10 (241~250)
20	2	10 (211~220)	10 (251~260)
100	10	10 (221~230)	10 (261~270)
500	50	10 (231~240)	10 (271~280)

8 観察および検査項目

8.1 死亡率

全動物について、投与期間中少なくとも1日2回、瀕死状態ないし死亡の有無をケージサイドから観察した。

各用量群の死亡率は、死亡・切迫殺動物数を分子、使用動物数を分母とする分数表示により、投与週ごとの累積死亡率として表した。

8.2 一般状態の観察

全動物について、1日2回被験物質投与の前後に一般状態の観察を実施した。また、触診を含む観察を少なくとも毎週1回実施した。触診を含む観察によって何らかの異常が認められた場合は、その発見日、状態、強度および持続期間を記録した。

8.3 体重

全動物について、投与開始日（投与第1日とする）を初回として、投与期間中1週間（7日間）ごとおよび投与終了日（最終週は6日間であったため、投与終了日には6日間隔で測定）に体重を測

定した。各用量群の群平均体重を各測定日ごとに雌雄別に算出した。また全動物について、殺処分前に最終体重を測定した。最終体重については個体別値のみを報告書に記載した。

8.4 摂餌量

全動物について、毎週1回連続7日分の摂餌量を測定し（最終週は6日間であったため、最終週のみ6日間分の値を測定）、1日あたりの摂餌量（個体別平均摂餌量）を算出した。これらの値から、測定週ごとに各用量群における群平均摂餌量（g/rat/day）を雌雄別に算出した。さらに、これら週ごとの群平均摂餌量を平均し、全投与期間を通じた総平均摂餌量を雌雄別に求めた。

8.5 眼科学的検査

馴化期間中に全動物について、投与13週時には雌雄各群動物番号が小さい5匹について、ハロゲン検眼鏡（株式会社ナイツ、東京都）による観察を含む眼科学的検査を行なった。眼科学的検査では以下の部位を観察した。

眼球，眼瞼，結膜，角膜，前眼房，
瞳孔，虹彩，水晶体／硝子体，眼底

8.6 尿検査

投与 13 週時に雌雄各群動物番号の小さい 5 匹について尿検査を実施した。各動物を個体別採尿ケージに入れ，自然排泄により約 4 時間後までに得られた新鮮尿を用いて以下の A の項目を検査した。また，動物を同ケージに約 24 時間入れて蓄積尿を採取し，B の項目を検査した。

A：尿色，ブドウ糖，ビリルビン，ケトン体，潜血，pH，蛋白質，ウロビリノーゲン，尿沈渣

B：尿量，尿比重，ナトリウム，カリウム，塩素

ブドウ糖，ビリルビン，ケトン体，潜血，pH，蛋白質およびウロビリノーゲンの検査は，試験紙マルティスティックス®SG (バイエルメディカル株式会社，東京都) の呈色の程度を，クリニテック®50 (バイエルメディカル株式会社) で準定量的に計測することによって行なった。尿沈渣は，鏡検した。尿比重は手持屈折計 (株式会社アタゴ，東京都) で測定した。尿中ナトリウム，カリウムおよび塩素は JCA-BM1250 自動分析装置 (日本電子株式会社，東京都) を用いて測定し，尿量を乗じて 1 日あたりの総排泄量を算出した。

8.7 血液学的検査

13 週間投与終了後に，全動物につい

て血液学的検査を実施した。投与を終えた動物を一晩絶食させた後エーテル麻酔下で開腹し，後大静脈よりヘパリン処理した注射筒を用いて採血した。EDTA 処理した各採取血液の一部を試料とし，総合血液学検査装置 アドヴィア 120 (Bayer Corporation, New York, U.S.A.) を用いて以下の項目を測定した。

ヘマトクリット値 (Ht)，血色素量 (Hb)，赤血球数 (RBC)，平均赤血球容積 (MCV)，平均赤血球血色素量 (MCH)，平均赤血球血色素濃度 (MCHC)，血小板数 (PLT)，網赤血球数 (Retics)，白血球数 (WBC)，白血球のディファレンシャルカウント [リンパ球 (L)，好中球 (N)，単球 (M)，好酸球 (E)，好塩基球 (B)，大型非染色球 (LUC) 括弧内は略号

なお，必要となった場合に参照する可能性を考慮して，EDTA 処理した各血液試料からメイグリュンワルド・ギムザ染色を施した血液塗抹標本を作製した。しかし，当該試験ではそれらの血液塗抹標本を参照する必要は生じなかった。

8.8 血液生化学的検査

13 週間投与終了後に全動物について血液生化学的検査を実施した。前項に述べた採取血液の一部より得た血漿を試料として，以下の項目を測定した。

アルカリホスファターゼ (ALP)，グ

ルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT), グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT), γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGTP), クレアチニン (Creat), 尿素窒素 (BUN), 総蛋白 (TP), アルブミン (Alb), グロブリン (Glob), アルブミン/グロブリン比 (A/G ratio), 血糖 (Gluc), 総コレステロール (T.Chol), トリグリセライド (TG), 総ビリルビン (T.Bil), カルシウム (Ca), 無機リン (P), ナトリウム (Na), カリウム (K), 塩素 (Cl) 括弧内は略号

測定には JCA-BM1250 自動分析装置 (日本電子株式会社, 東京都) を用いた。

9 病理学的検査

9.1 臓器重量

13 週間投与終了後の全動物について, 剖検後に, 下垂体および甲状腺 (上皮小体を含む) を除く以下の臓器の固定前の絶対重量を測定し, 比体重値 (相対重量) を算出した。下垂体および甲状腺 (上皮小体を含む) については, 1 日固定後の重量を測定した。

脳, 下垂体, 甲状腺 (上皮小体を含む, 両側), 唾液腺 (顎下腺および舌下腺), 心臓, 肺, 胸腺, 肝臓, 腎臓 (両側), 脾臓, 副腎 (両側), 精巣 (両側), 精巣上体 (両側), 精囊 (凝固腺を含む), 前立腺 (腹葉), 卵巣 (両側), 子宮

9.2 剖検

全動物について 13 週間投与終了後に

剖検を実施した。動物は, エーテルの深麻酔下で腹大動脈・後大静脈を切断して放血により安楽死させた後に剖検した。剖検前には動物を一晩絶食させた。剖検では, 各個体の全身を詳細に観察し, 肉眼的異常を記録した。

9.3 組織採取

剖検時に全動物から以下の臓器および組織を採取し, 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した。ただし, 肺についてはホルマリン液を気管から注入した後に浸漬固定した。また, 13 週間投与終了後の計画殺動物の精巣および精巣上体は FSA 液 (ホルマリン-ショ糖-酢酸混合液) で 5~7 日間固定した後, 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した。

脳 (大脳, 小脳, 橋および延髄), 脊髄 (頸部, 胸部および腰部), 坐骨神経 (片側), 下垂体, 胸腺, 甲状腺および上皮小体 (両側), 副腎 (両側), 脾臓, 骨および骨髓 (胸骨, 片側大腿骨および頸部, 胸部, 腰部椎骨), 膝関節 (片側), リンパ節 (頸部および腸間膜), 心臓, 大動脈, 唾液腺 (顎下腺および舌下腺), 食道, 胃 (前胃および腺胃), 肝臓, 膵臓, 十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸, 頭部 (鼻腔, 副鼻腔, 舌, 口腔粘膜, 中耳およびジンバル腺を含む), 咽頭, 喉頭, 気管, 肺 (気管支を含む), 腎臓 (両側), 膀胱, 精巣 (両側), 精巣上体 (両側), 前立腺 (腹葉), 精のう (両側), 凝固腺 (両側), 卵巣 (両側), 卵管 (両側), 子宮 (頸部を含む), 膈, 眼球 (両側), 視神経 (両側), ハーダー腺 (両側),

下腿三頭筋 (片側), 皮膚 (腰背部), 乳腺 (腹部), 肉眼的異常部位

9.4 病理組織学的検査

次に示す動物/臓器・組織を対象にして病理組織学的検査を実施した。

0 および 500 mg/kg/day 群の全動物から採取した下に示す臓器・組織

20 および 100 mg/kg/day 群の全動物から採取した腎臓および肉眼的異常部位

脳 (大脳, 小脳, 橋および延髄), 脊髄 (頸部, 胸部および腰部), 坐骨神経 (片側), 下垂体, 胸腺, 甲状腺 (両側), 上皮小体 (両側), 副腎 (両側), 脾臓, 骨および骨髄 (胸骨および片側大腿骨), リンパ節 (頸部および腸間膜), 心臓, 大動脈, 唾液腺 (顎下腺および舌下腺), 舌, 食道, 胃 (前胃および腺胃), 肝臓, 膵臓, 十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸, 鼻腔, 気管, 気管支, 肺, 腎臓 (両側), 膀胱, 精巣 (両側), 精巣上体 (両側), 前立腺 (腹葉), 精のう (両側), 卵巣 (両側), 卵管 (両側), 子宮 (角部および頸部), 瞳, 眼球 (網膜および視神経を含む, 両側), ハーダー腺 (両側), ジンバル腺, 下腿三頭筋 (片側), 皮膚 (腰背部), 乳腺 (腹部), 肉眼的異常部位

顕微鏡観察は, 通常の方法によって作製したパラフィン切片にヘマトキシリン・エオジン染色を施して行なった。また, 0 および 500 mg/kg/day 群の雌雄各 2 例の腎臓について, ベルリン青染色およびシュモール染色を行ない, 観

察した。

10 有意差検定¹⁾

各検査項目について, 対照群と各被験物質投与群間の統計学的有意差の有無を危険率 5 および 1% レベルで解析した。

体重, 摂餌量, 尿比重, 尿量, 尿中ナトリウム, 尿中カリウム, 尿中塩素, 血液学的検査項目, 血液生化学的検査項目および臓器重量のデータについては, まず Bartlett の等分散検定を行なった。この検定によって全用量群における分散が均一であるという判定が出た場合には, 一元配置分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた場合には, Dunnett の多重比較法を実施して対照群と各投与群間における有意差の有無を判定した。Bartlett の等分散検定で各群の分散が等しくないという判定が出た場合は, Kruskal-Wallis のノンパラメトリックな分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた場合には, Dunnett 型の多重比較法を用いて対照群と各投与群間における平均順位の有意差の有無を判定した。

尿検査項目 (尿比重, 尿量, ナトリウム, カリウムおよび塩素を除く) のデータについては, Kruskal-Wallis のノンパラメトリックな分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べ, その結果群間に有意差が認められた場合には, Dunnett 型の多重比較法を用いて対照群と各投与群間における平均順位の有意

差の有無を判定した。

死亡率，ならびに一般状態の観察所見，眼科学的検査所見，剖検所見，病理組織学的所見の発生頻度については，Fisherの直接確率計算法（片側検定）を用いて解析した。

C. 結果

1 死亡率 (Table 1 および 2)

雌雄のいずれの投与群においても動物の死亡はなかった。

2 一般状態の観察 (Table 3 および 4)

500 および 100 mg/kg/day 群の雌雄全例 (10 例中 10 例) で，投与第 1～13 週に黒色 (黒色調の増強した) 糞と赤紫色尿が観察された。また，20 mg/kg/day 群の雌雄でも投与第 6～13 週に赤紫色尿が観察され，この期間中に 1 回以上赤紫色尿を示した動物は各性とも 10 例中 9 例に達した。

3 体重 (Fig 1 および 2, Table 5 および 6)

500 mg/kg/day 群の雄では，投与初期 (投与 1～3 週) に体重増加量が低かったことが影響し，全投与期間を通じて，統計学的には有意でないが対照群よりも軽度に低い体重値が認められた。その他の被験物質投与群と対照群との間

には，注目すべき体重差は認められなかった。

4 摂餌量 (Table 7 および 8)

雌雄いずれの投与群においても，摂餌量は対照群と同等であった。

5 眼科学的検査 (Table 9 および 10)

投与 13 週時の眼科学的検査において，雌 20 mg/kg/day 群の 5 例中 1 例に自然発生性と考えられる角膜の混濁が認められたが，その他の検査動物に異常は認められなかった。

6 尿検査 (Table 11 および 12)

投与 13 週時の尿検査において，500 mg/kg/day 群の雌雄各 5 例中 5 例に赤紫色尿が認められた。また，500 mg/kg/day 群の雌において，有意な尿量の増加および尿比重の低下が観察された。

7. 血液学的検査 (Table 13 および 14)

13 週間投与終了後の検査において，被験物質投与群で対照群と比較して統計学的有意差が認められた項目を本文表 1 に示す。500 mg/kg/day 群の雄に血小板数 (PLT) の有意な増加が認められ，500 mg/kg/day 群の雌にリンパ球数 (L) および単球数 (M) の減少を伴う白血球数 (WBC) の有意な減少がみられた。

本文表 1. 血液学的検査で認められた統計学的に有意な変動

項目	用量群 (mg/kg/day)					
	雄			雌		
	20	100	500	20	100	500
血小板数 (PLT)	103	103	↑107	104	104	102
白血球数 (WBC)	106	102	96	94	98	↓85
リンパ球数 (L)	110	107	101	93	98	↓84
単球数 (M)	107	86	79	100	80	↓70

表中の数値は対照群を 100 とした時の相対値。

↑↓, p<0.01; ↓, p<0.05 (Dunnett の多重比較検定).

8 血液生化学的検査 (Table 15 および 16)

13 週間投与終了後の検査において、被験物質投与群で対照群と比較して統計学的有意差が認められた項目を、本文表 2 に示す。500 mg/kg/day 群の雌雄にクレアチニ

ン(Creat) および総ビリルビン (T.Bil) の有意な減少が認められた。また、100 mg/kg/day 群の雌においても、総ビリルビン (T.Bil) の有意な減少がみられた。

本文表 2. 血液生化学的検査で認められた統計学的に有意な変動

項目	用量群 (mg/kg/day)					
	雄			雌		
	20	100	500	20	100	500
クレアチニン (Creat)	100	97	↓89	97	100	↓89
総ビリルビン (T.Bil)	100	100	↓60	100	↓80	↓40

表中の数値は対照群を 100 とした時の相対値。

↓, p<0.01; ↓, p<0.05 (Dunnett の多重比較検定).

9 臓器重量 (Table 17 および 18)

13 週間投与終了後の検査において、被験物質投与群で対照群と比較して統計学的に有意な変動を示した臓器重量を本文

表 3 に示す。

500 mg/kg/day 群の雄で腎臓の相対重量が有意に増加した。

本文表 3. 統計学的に有意な臓器重量の変動

臓器	用量群 (mg/kg/day)					
	雄			雌		
	20	100	500	20	100	500
腎臓 相対	103	103	↑111	102	100	105

表中の数値は対照群を 100 とした時の相対値。

↑, p<0.01 (Dunnett の多重比較検定).

10 剖検 (Table 19 および 20)

被験物質投与群で対照群と比較して発生頻度に統計学的有意差が認められた剖検所見を本文表 4 に示す。

500 mg/kg/day 群の雌雄において、大腸の内容物黒色化の発生頻度が対照群と比較して有意に増加した。

本文表 4. 統計学的に有意な肉眼病変発生頻度の変動

臓器/所見	用量群 (mg/kg/day)							
	雄				雌			
	0	20	100	500	0	20	100	500
大腸：(検査動物数) 内容物黒色化	(10) 0	(10) 0	(10) 0	(10) ↑10	(10) 0	(10) 0	(10) 0	(10) ↑10

表中の数値は所見が認められた動物数。

↑, p<0.01 (Fisher の直接確率計算法)。

11 病理組織学的検査 (Table 21 および 22, 写真図版)

被験物質投与群で対照群と比較して発生頻度に統計学的有意差が認められた病理組織学的変化を本文表 5 に示す。

軽度な近位尿細管上皮褐色色素沈着が

認められた。

他の群に同病変の発生はなかった。500 mg/kg/day 群の雌雄でみられた褐色色素はシュモール染色陽性、ベルリン青染色陰性であり、リポフスチンを含むものであることが確認された。

本文表 5. 統計学的に有意な病理組織所見発生頻度の変動

臓器/所見	用量群 (mg/kg/day)							
	雄				雌			
	0	20	100	500	0	20	100	500
腎臓：(検査動物数) 近位尿細管上皮褐色色素沈着	(10) 0	(10) 0	(10) 0	(10) ↑10	(10) 0	(10) 0	(10) 0	(10) ↑10

表中の数値は所見が認められた動物数。

↑, p<0.01 (Fisher の直接確率計算法)。

D. 考察および結論

ログウッド色素をラットに 90 日間 (13

週間) にわたって投与した場合の毒性を検索するため、本被験物質を 0, 20, 100

および 500 mg/kg/day の用量で、各群雌雄 10 匹ずつの Fischer 系 SPF ラット (F344/DuCrj) に強制経口投与した。

当該試験に先だって実施した 14 日間反復経口投与毒性試験で、当該試験で用いたものと同じ濃度の投与液を調製してその中の被験物質濃度を測定した。その結果、設定値に近い実測被験物質濃度の投与液が調製されていることが確認され、投与液調製法は適切であることが証明された。そのため、当該試験では投与液をその方法で調製して投与を実施した。

試験の結果、死亡率、摂餌量および眼科学的検査では、被験物質投与に起因すると考えられる所見は認められなかった。

500 mg/kg/day 群の雄では、投与初期の体重増加量が低かったことが影響し、全投与期間を通じて、統計学的に有意ではないが対照群よりも軽度に低い体重値が観察された。この体重の変化は被験物質の投与によって生じたものではないかと考えられた。

一般状態の観察では、500 および 100 mg/kg/day 群の雌雄それぞれ 10 例中 10 例で、投与第 1~13 週に黒色 (黒色調の増強した) 糞と赤紫色尿が観察され、20 mg/kg/day 群の雌雄それぞれ 10 例中 9 例でも投与第 6~13 週に赤紫色尿が観察された。また、投与 13 週時の尿検査においても、500 mg/kg/day 群の雌雄各 5 例中 5 例に赤紫色尿が認められた。しかし、これらの変化は被験物質が糞や尿の中へ単に排出されたことによるものであると推測でき、被験物質投与に起因はするが、毒性的に意味のある変化とは考えられなかった。剖検時には、500 mg/kg/day 群の雌

雄で大腸内容物黒色化の発生頻度の統計学的に有意な増加が観察された。この変化も腸内容物中に被験物質が混入したことによって生じたものであり、病理組織学的検査において大腸自体に異常が認められなかったことから、毒性的に意味のある変化とは考えられなかった。

投与 13 週時の尿検査では、尿色の変化の他に、500 mg/kg/day 群の雌で有意な尿量の増加とそれに伴う尿比重の低下が観察された。同群の腎臓では被験物質投与の影響と考えられる近位尿細管上皮への褐色色素沈着が病理組織学的検査で観察されたことから、尿検査で認められた変化との関連性が疑われた。

血液学的検査では、500 mg/kg/day 群の雄に血小板数 (PLT) の有意な増加が認められた。しかし、同変化は軽度かつ雄のみの変化であり、また、病理組織学的検査において骨髄にこれに関連するとみなされる異常は観察されなかった。したがって、血小板数の増加は偶発的に観察された可能性が高いと考えられた。500 mg/kg/day 群の雌では、リンパ球数 (L) および単球数 (M) の減少を伴う白血球数 (WBC) の有意な減少がみられた。この所見に関連すると考えられる胸腺の重量低下や病理組織学的変化は認められなかったが、被験物質投与に関連して発生した可能性を否定することはできなかった。

血液生化学的検査の結果、500 mg/kg/day 群の雌雄にクレアチニン (Creat) の有意な減少、500 mg/kg/day 群の雌雄および 100 mg/kg/day 群の雌に総ビリルビン (T.Bil) の有意な減少が認められた。クレアチニンの減少は、肝臓におけるクレアチン生成の

減少あるいは筋疾患による筋肉量の減少の際にみられる変化であることが知られている。しかし、今回の血液生化学的検査および病理組織学的検査で、肝臓および筋肉の異常を示唆する所見は認められなかった。そのため、この変化は被験物質投与に関連して発生したものではあるが、毒性学的な意義はないと判断された。総ビリルビンの減少も一般的には毒性学的意義が乏しいが、血色素量の減少に伴って観察されることが知られている。当該試験での総ビリルビンの減少は雌雄に共通して観察されたが、血色素量の減少等は認められなかった。したがって、この変化も被験物質投与の影響によるものであろうと思われたが、毒性学的に意味のある変化ではないと判断された。

臓器重量測定の結果、500 mg/kg/day 群の雄で腎臓相対重量の有意な増加が観察された。病理組織学的検査では、同群雌雄それぞれ10例中10例の腎臓に近位尿細管上皮褐色色素沈着が観察され、特殊染色を行なった結果、この褐色色素はリポフスチン含有していることが示された。腎臓重量増加はこの病変と関連性を有するのではないかと考えられた。

当該試験のための予備試験として実施した14日間反復経口投与毒性試験(雄3匹/群で実施、用量:0, 30, 100, 300, 1000 mg/kg/day)では、1000 mg/kg/day 群の3例中2例および100 mg/kg/day 群の3例中1例の腎臓で顕著な重量増加と明瞭な組織

学的変化(近位尿細管腔拡張)が観察されたことから、標的臓器は腎臓であろうと考えられ、主にその所見を基準として当該試験の用量設定がなされた。前述のように、当該試験においても腎臓が標的臓器であることを支持する所見が得られたが、近位尿細管腔拡張は500 mg/kg/dayを投与した動物においてさえ観察されなかった。14日間反復経口投与毒性試験ではこの腎臓病変の発生頻度に明瞭な用量相関性がなかった(すなわち、300 mg/kg/day 群での発生はなかった)ため、それが偶発所見であった可能性を完全に否定することはできなかった。しかし、通常、その病変は無処置動物に観察されるものではない点から被験物質投与に関連して発生したと考えられ、当該試験において発生が全くなかったことを考慮すると、被験物質投与開始後の早い時期に一時的に発生する変化である可能性が推測された。

当該試験の結果に基づき、ログウッド色素を90日間ラットに反復経口投与した場合の無毒性量(NOEL)は以下のように判断された。

雄: 100 mg/kg/day

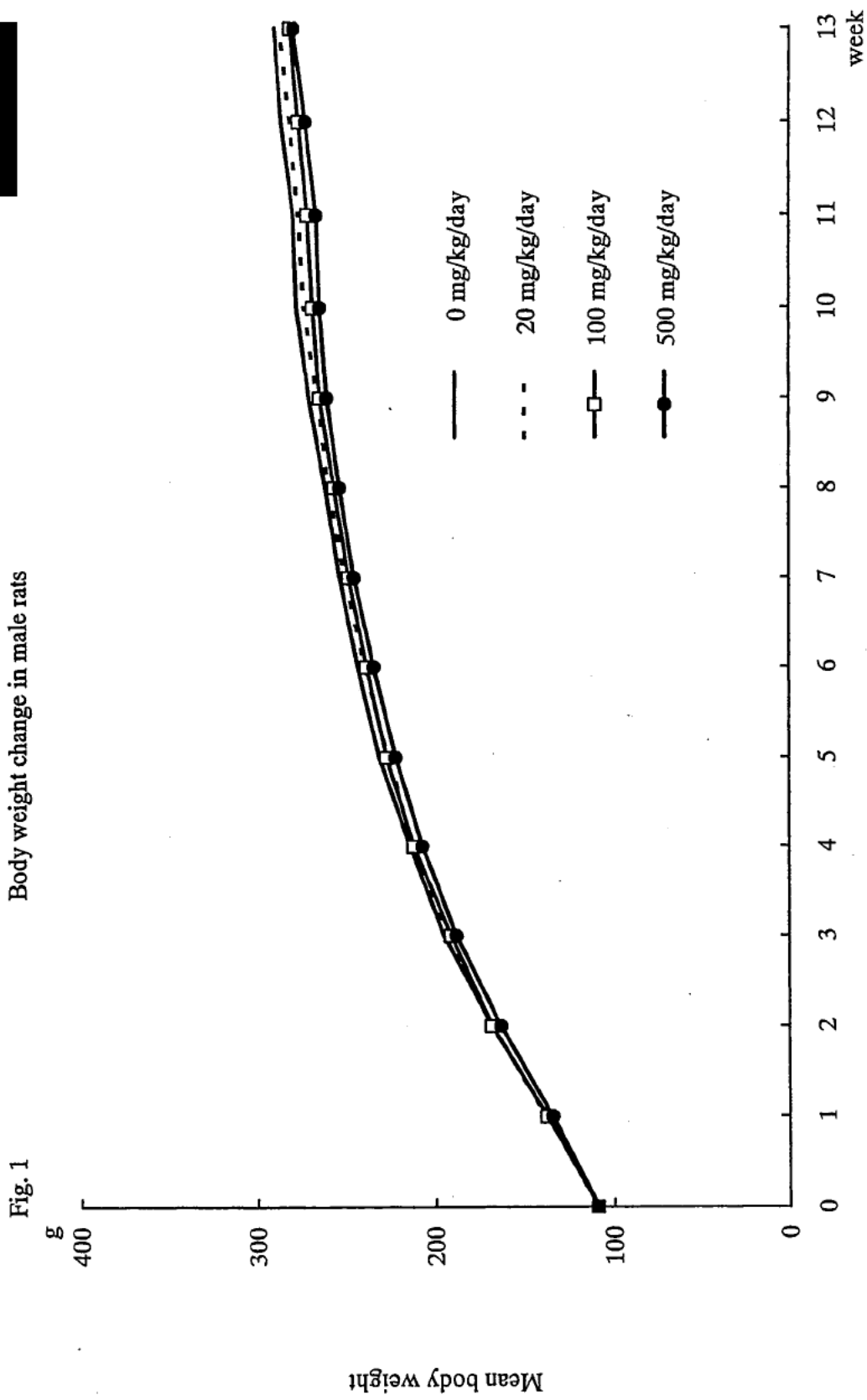
雌: 100 mg/kg/day

E. 参考文献

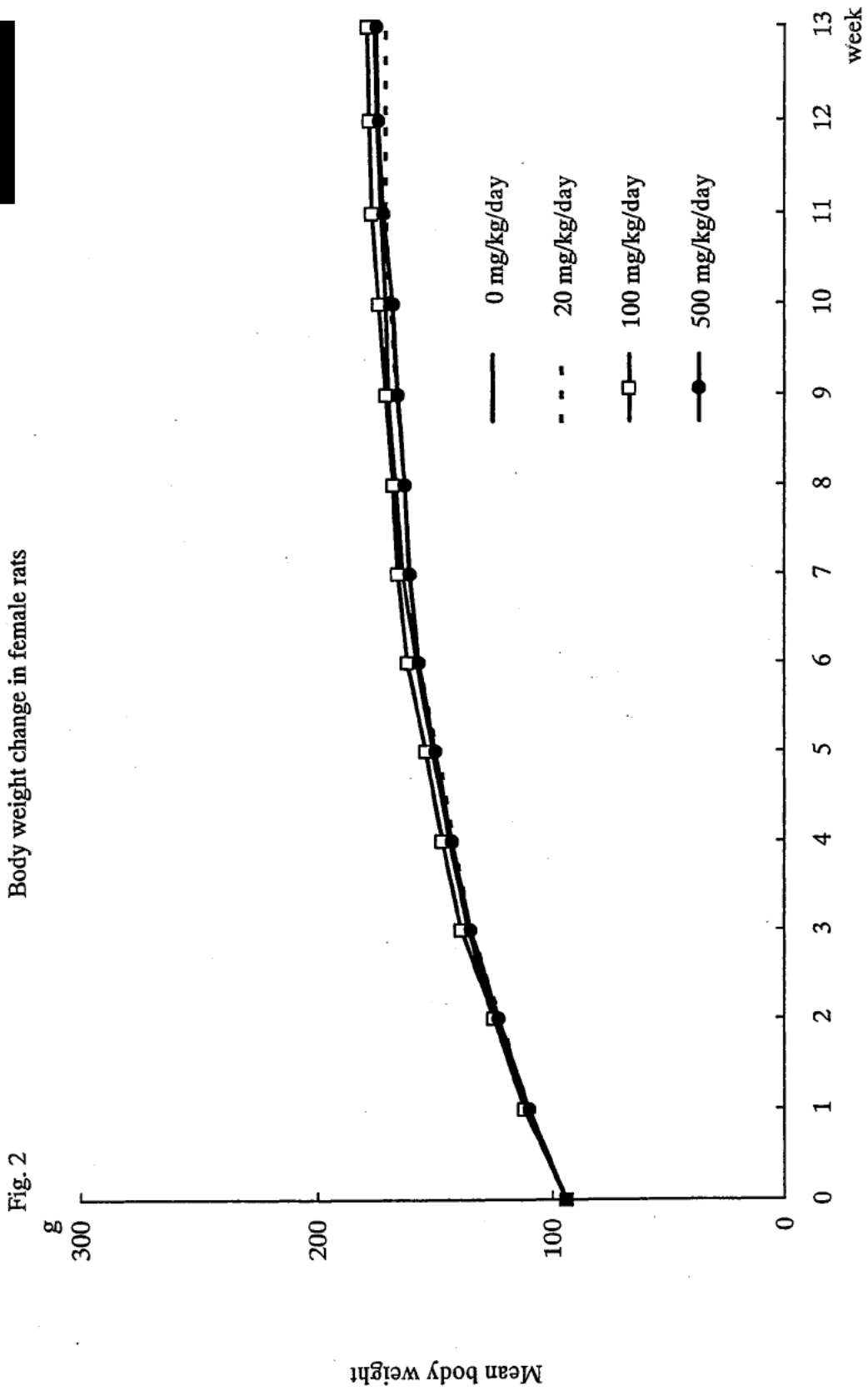
1) Gad, S.C. and Weil, C.S.: Statistics for Toxicologists. In: Principles and Methods of Toxicology (3rd edition), edited by Hayes, A.W., pp. 221-274, Raven Press, N.Y., 1994.



Body weight change in male rats



Body weight change in female rats





Mortality - Cumulative death rates in male rats

Table 1

Dose (mg/kg/day)	Week												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
0	0 ^a /10 ^b	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
20	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
100	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
500	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

^a: Cumulative number of animals found dead or killed *in extremis* during the treatment period.

^b: Effective number of animals at each week.



Table 2 Mortality - Cumulative death rates in female rats

Dose (mg/kg/day)	Week												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
0	0 ^a /10 ^b	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
20	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
100	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
500	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

^a: Cumulative number of animals found dead or killed *in extremis* during the treatment period.

^b: Effective number of animals at each week.



Table 3

General clinical observation - Incidence of signs in male rats

Clinical signs	Dose (mg/kg/day)	0	20	100	500
	No. of animals examined	10	10	10	10
No abnormalities detected		10	1	0	0
Excretion:					
Blackish stool		0	0	10 **	10 **
Purplish red urine		0	9 **	10 **	10 **

** : Significantly different from the control at 1% level of probability.

Table 4

General clinical observation - Incidence of signs in female rats

Clinical signs	Dose (mg/kg/day)	0	20	100	500
	No. of animals examined	10	10	10	10
No abnormalities detected		10	1	0	0
Excretion:					
Blackish stool		0	0	10 **	10 **
Purplish red urine		0	9 **	10 **	10 **

** : Significantly different from the control at 1% level of probability.

Table 5 Body weight - Group mean values in male rats

Dose (mg/kg/day)	Week	(g)													
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
0	Mean	109	137	168	195	214	231	243	253	261	270	277	279	286	290
	S.D.	4	7	10	12	12	13	13	13	14	15	16	17	17	15
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
20	Mean	109	137	168	192	212	226	239	250	259	265	273	276	281	287
	S.D.	4	6	6	6	8	9	10	11	12	13	14	15	17	18
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
100	Mean	109	137	168	191	212	227	238	248	256	264	268	271	276	281
	S.D.	4	5	7	9	11	12	13	16	16	16	16	18	19	19
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
500	Mean	109	134	163	188	207	222	234	245	253	260	264	266	272	279
	S.D.	4	4	6	8	9	10	11	11	12	14	20	20	21	22
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals.

Table 6 Body weight - Group mean values in female rats

Dose (mg/kg/day)	Week	(g)													
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
0	Mean	94	111	125	136	144	151	158	164	167	170	171	173	175	176
	S.D.	2	4	4	5	5	6	6	6	7	7	7	10	9	10
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
20	Mean	94	111	122	135	142	149	157	161	163	166	169	171	171	171
	S.D.	2	4	5	6	7	6	7	7	7	9	9	10	10	9
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
100	Mean	94	112	125	139	147	154	162	166	168	171	174	177	178	179
	S.D.	2	3	5	4	3	3	4	5	4	4	4	4	4	4
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
500	Mean	94	110	123	135	143	150	157	161	163	166	168	172	174	175
	S.D.	2	3	4	4	6	7	8	9	9	10	10	11	11	11
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals.

Table 7 Food consumption - Group mean values in male rats

Dose (mg/kg/day)	Week	(g/rat/day)														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Average	
0	Mean	12.3	13.7	14.6	14.9	14.5	13.9	14.4	14.5	13.8	14.0	13.5	13.5	13.5	13.6	13.9
	S.D.	0.8	1.0	1.0	0.7	0.7	0.9	0.9	1.1	0.8	0.8	0.9	0.9	0.7	0.7	0.7
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
20	Mean	12.2	13.8	14.4	15.0	14.1	13.7	14.2	14.0	13.4	14.0	13.5	13.5	13.4	13.4	13.8
	S.D.	0.7	0.5	0.5	0.7	0.6	0.6	0.8	0.8	0.7	1.0	0.7	0.7	0.9	0.8	0.8
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
100	Mean	12.1	13.6	14.3	15.0	14.1	13.8	14.2	14.0	13.4	13.5	12.9	12.9	13.1	13.3	13.6
	S.D.	0.6	0.7	0.6	0.5	0.8	0.7	0.7	0.7	0.8	0.9	1.0	1.0	0.9	1.2	1.2
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
500	Mean	12.1	13.7	14.7	15.0	14.3	13.9	14.4	14.4	13.8	13.2	13.3	13.3	13.9	14.2	13.9
	S.D.	0.5	0.5	0.7	0.5	0.7	0.7	0.5	0.6	1.2	1.9	1.2	1.2	0.8	1.2	1.2
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals.

Table 8 Food consumption - Group mean values in female rats

Dose (mg/kg/day)	Week	(g/rat/day)												Average		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		13	
0	Mean	9.8	10.5	10.7	10.7	10.3	10.2	10.7	10.5	10.2	10.0	10.0	10.0	9.9	9.5	10.2
	S.D.	0.5	0.5	0.5	0.4	0.6	0.5	0.7	0.6	0.8	0.5	0.5	0.5	0.7	0.7	0.7
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
20	Mean	9.6	10.2	10.7	10.6	10.0	10.1	10.6	10.1	10.0	10.0	10.0	9.8	9.0	10.1	
	S.D.	0.5	0.3	0.5	0.6	0.6	0.7	0.8	0.7	0.7	0.9	0.8	0.7	0.5	0.5	
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
100	Mean	9.7	10.5	11.0	11.0	10.4	10.6	10.8	10.5	10.0	10.3	10.2	10.3	9.7	10.4	
	S.D.	0.2	0.5	0.5	0.3	0.4	0.3	0.5	0.5	0.3	0.3	0.5	0.5	0.6	0.6	
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
500	Mean	9.5	10.4	11.0	10.9	10.5	10.7	10.8	10.5	10.0	10.1	10.4	10.4	10.0	10.4	
	S.D.	0.4	0.5	0.2	0.5	0.6	0.4	0.7	0.8	0.8	0.6	0.8	0.7	0.7	0.7	
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals.

Table 9 Ophthalmology - Incidence of findings in male rats

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)		0		20		100		500	
	Week	13	0a	13	0a	13	0a	13	0a	13
No. of animals examined	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5
No abnormalities detected	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5

a: Week before initiation of treatment.

Table 10 Ophthalmology - Incidence of findings in female rats

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)		20		100		500		
	Week	0	0a	13	0a	13	0a	13	
No. of animals examined		10	5	10	5	10	5	10	5
No abnormalities detected		10	5	10	4	10	5	10	5
Cornea: Opacity		0	0	0	1	0	0	0	0

a: Week before initiation of treatment.

Key to Tables 11 and 12
Standard key to urinalysis data

Grades for glucose, bilirubin, ketones, occult blood and protein:

-	Negative
±	Trace
+	Slight
++	Moderate
+++	Severe
++++	Extreme

Appearance:

PY	Pale yellow
Y	Yellow
YB	Yellow brown
B	Brown
PR	Purple red

Urinary sediments:

Abnormal crystals	Crystals of cholesterol, tyrosine, leucine, cystine or test substance, etc.
-	Nil
+	A few in some fields
++	A few in any field
+++	Many in any field

Table 11 - 1

Urinalysis - Summary data in male rats

At 13 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)	No. of animals examined	Appearance				Glucose				Bilirubin				Ketones					
		PY	Y	YB	B	PR	-	±	+	++	+++	++++	-	±	+	++	+++	++++	
0	5	5					5						3	2				3	2
20	5	5					5						5					3	2
100	5	5					5						5					2	3
500	5					5**	5						4	1				1	4

Occult blood	pH				Protein				Urobilinogen (Ehrlich unit/dL)															
	-	±	+	+++	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	+	++	+++	++++	0.1	1.0	2.0	4.0	8.0	
5										2	3					5								
5										2	3				2	3			2	3				
5										1	4			2	3			1	4					
5										3	2			1	4			1	4					

** : Significantly different from the control at 1% level of probability.

Table 11 - 3

Urinalysis - Summary data in male rats
At 13 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)	No. of animals examined	Sodium (mEq/day)	Potassium (mEq/day)	Chloride (mEq/day)
0	5	Mean 1.40	2.27	1.64
		S.D. 0.14	0.19	0.14
20	5	Mean 1.39	2.32	1.61
		S.D. 0.16	0.32	0.23
100	5	Mean 1.46	2.44	1.70
		S.D. 0.29	0.42	0.29
500	5	Mean 1.28	2.23	1.56
		S.D. 0.30	0.35	0.35

S.D. : Standard deviation.

Table 12 - 1
Urinalysis - Summary data in female rats

At 13 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)	No. of animals examined	Appearance				Glucose				Bilirubin				Ketones						
		PY	Y	YB	B	PR	-	±	+	++	+++	++++	-	±	+	++	+++	++++		
0	5						5					3	2						5	
20	5						5					2	3						1	4
100	5						5					5							2	3
500	5					5**	5					4	1						1	4

Occult blood	pH	Protein				Urobilinogen (Ehrlich unit/dL)																
		-	±	+	++	+++	++++	0.1	1.0	2.0	4.0	8.0										
5	1 4						5															
5	1 4						3	2														
5	1 4						1	3	1													
5	3 2						2	3														

** : Significantly different from the control at 1% level of probability.

Table 12 - 3

Urinalysis - Summary data in female rats
At 13 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)	No. of animals examined	Sodium (mEq/day)	Potassium (mEq/day)	Chloride (mEq/day)
0	5	Mean 1.20	2.04	1.37
		S.D. 0.12	0.28	0.21
20	5	Mean 1.11	1.94	1.33
		S.D. 0.15	0.21	0.19
100	5	Mean 1.15	2.07	1.38
		S.D. 0.10	0.14	0.11
500	5	Mean 1.26	2.13	1.46
		S.D. 0.18	0.30	0.27

S.D. : Standard deviation.

Key to Tables 13 and 14
Standard key to hematology data

Hematology:

Ht	Hematocrit
Hb	Hemoglobin concentration
RBC	Erythrocyte count
MCV	Mean corpuscular volume
MCH	Mean corpuscular hemoglobin
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration
PLT	Platelet count
Retics	Reticulocyte count
WBC	Total leukocyte count
<u>Differential leukocyte count</u>	
L	Lymphocyte
N	Neutrophil
M	Monocyte
E	Eosinophil
B	Basophil
LUC	Large unstained cell

Table 13 - 1

Hematology - Group mean values in male rats
After 13 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)	No. of animals examined	Ht (%)	Hb (g/dl)	RBC ($10^6/\mu\text{l}$)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	PLT ($10^3/\mu\text{l}$)	Retics ($10^9/\text{l}$)
0	10	Mean	15.4	9.20	49.2	16.7	34.1	682	140.2
		S.D.	0.2	0.17	0.6	0.2	0.2	19	16.3
20	10	Mean	15.5	9.24	49.2	16.8	34.2	703	143.9
		S.D.	0.3	0.15	0.5	0.2	0.1	24	15.2
100	10	Mean	15.3	9.18	49.1	16.7	34.1	702	142.4
		S.D.	1.2	0.4	0.5	0.3	0.4	18	16.6
500	10	Mean	15.3	9.05	49.5	16.9	34.1	729 **	144.4
		S.D.	0.8	0.19	0.6	0.2	0.3	34	15.7

S.D. : Standard deviation.

** : Significantly different from the control at 1% level of probability.

Table 13 - 2

Hematology - Group mean values in male rats
After 13 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)	No. of animals examined	WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	Differential leukocyte count ($10^3/\mu\text{l}$)						
			L	N	M	E	B	LUC	
0	10	Mean	4.43	1.59	0.14	0.08	0.02	0.02	0.02
		S.D.	0.59	0.32	0.04	0.02	0.01	0.01	0.01
20	10	Mean	4.89	1.49	0.15	0.07	0.02	0.02	0.02
		S.D.	0.43	0.25	0.03	0.02	0.01	0.01	0.01
100	10	Mean	4.76	1.40	0.12	0.07	0.02	0.02	0.03
		S.D.	0.45	0.23	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01
500	10	Mean	4.47	1.34	0.11	0.06	0.01	0.01	0.02
		S.D.	0.73	0.31	0.03	0.02	0.01	0.01	0.01

S.D. : Standard deviation.

Table 14 - 1
 Hematology - Group mean values in female rats
 After 13 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)	No. of animals examined	Ht (%)	Hb (g/dl)	RBC ($10^6/\mu\text{l}$)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	PLT ($10^3/\mu\text{l}$)	Retics ($10^9/\text{l}$)
0	10	Mean 43.4	15.1	8.40	51.7	18.0	34.9	770	119.9
		S.D. 0.8	0.2	0.16	0.3	0.2	0.4	39	12.8
20	10	Mean 43.6	15.2	8.46	51.6	17.9	34.8	797	127.2
		S.D. 0.9	0.3	0.20	0.5	0.1	0.4	49	18.3
100	10	Mean 43.4	15.1	8.40	51.6	18.0	34.8	801	135.1
		S.D. 1.2	0.4	0.23	0.3	0.2	0.3	50	16.5
500	10	Mean 43.7	15.2	8.45	51.8	18.0	34.8	785	137.4
		S.D. 1.2	0.3	0.23	0.4	0.1	0.4	23	20.3

S.D. : Standard deviation.

Table 14 - 2
Hematology - Group mean values in female rats
After 13 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)	No. of animals examined	WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	Differential leukocyte count ($10^3/\mu\text{l}$)						
			L	N	M	E	B	LUC	
0	10	Mean	3.80	0.89	0.10	0.07	0.01	0.03	
		S.D.	0.43	0.25	0.02	0.01	0.00	0.01	
20	10	Mean	3.55	0.84	0.10	0.06	0.01	0.02	
		S.D.	0.38	0.24	0.02	0.02	0.00	0.01	
100	10	Mean	4.78	0.88	0.08	0.06	0.01	0.02	
		S.D.	0.66	0.22	0.02	0.01	0.00	0.01	
500	10	Mean	4.17 *	0.82	0.07 *	0.05	0.01	0.02	
		S.D.	0.55	0.28	0.02	0.01	0.01	0.01	

S.D. : Standard deviation.

* and ** : Significantly different from the control at 5 and 1% levels of probability, respectively.

Key to Tables 15 and 16
Standard key to blood biochemistry data

Blood Biochemistry:

ALP	Alkaline phosphatase
GOT	Glutamic oxaloacetic transaminase
GPT	Glutamic pyruvic transaminase
GGTP	γ -Glutamyl transpeptidase
Creat	Creatinine
BUN	Blood urea nitrogen
TP	Total protein
Alb	Albumin
Glob	Globulin
A/G ratio	Albumin/globulin ratio
Gluc	Glucose
T.Chol	Total cholesterol
TG	Triglyceride
T.Bil	Total bilirubin
Ca	Calcium
P	Inorganic phosphorus
Na	Sodium
K	Potassium
Cl	Chloride

Table 15 - 1
Blood biochemistry - Group mean values in male rats
After 13 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)	No. of animals examined	ALP (U/l)	GOT (U/l)	GPT (U/l)	GGTP (U/l)	Creat (mg/dl)	BUN (mg/dl)	TP (g/dl)	Alb (g/dl)	Glob (g/dl)	A/G ratio	Gluc (mg/dl)
0	10	Mean 467	75	49	1	0.35	15.9	6.32	4.24	2.08	2.05	119
		S.D. 30	4	3	0	0.02	0.9	0.14	0.10	0.07	0.07	6
20	10	Mean 470	71	45	1	0.35	16.3	6.33	4.27	2.06	2.07	124
		S.D. 23	4	5	0	0.02	1.0	0.13	0.08	0.06	0.04	8
100	10	Mean 456	72	45	1	0.34	15.3	6.31	4.24	2.07	2.06	122
		S.D. 17	3	5	0	0.02	1.6	0.16	0.10	0.07	0.05	6
500	10	Mean 493	72	44	1	0.31 **	14.8	6.28	4.22	2.06	2.05	119
		S.D. 41	9	4	0	0.02	1.2	0.09	0.05	0.08	0.09	6

S.D. : Standard deviation.

** : Significantly different from the control at 1% level of probability.

Table 15 - 2

Blood biochemistry - Group mean values in male rats
After 13 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)	No. of animals examined	T.Chol (mg/dl)	TG (mg/dl)	T.Bil (mg/dl)	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)
0	10	Mean	48	0.05	10.1	5.6	147.6	3.09	108.7
		S.D.	8	0.00	0.2	0.5	1.6	0.13	1.5
20	10	Mean	52	0.05	10.1	5.6	147.3	3.12	107.9
		S.D.	9	0.00	0.1	0.4	1.5	0.14	1.8
100	10	Mean	49	0.05	10.2	5.5	147.6	3.21	108.2
		S.D.	13	0.01	0.1	0.4	0.9	0.18	1.3
500	10	Mean	46	0.03 **	10.2	5.8	147.7	3.14	107.8
		S.D.	15	0.01	0.1	0.3	1.0	0.09	1.0

S.D. : Standard deviation.

** : Significantly different from the control at 1% level of probability.

Table 16 - 1
Blood biochemistry - Group mean values in female rats
After 13 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)	No. of animals examined	ALP (U/l)	GOT (U/l)	GPT (U/l)	GGTP (U/l)	Creat (mg/dl)	BUN (mg/dl)	TP (g/dl)	Alb (g/dl)	Glob (g/dl)	A/G ratio	Gluc (mg/dl)
0	10 Mean	328	77	45	1	0.38	17.5	5.74	3.82	1.93	1.98	119
	S.D.	24	12	13	1	0.02	2.1	0.20	0.11	0.11	0.09	8
20	10 Mean	322	74	40	1	0.37	17.9	5.87	3.88	2.00	1.95	121
	S.D.	31	4	6	0	0.03	1.4	0.08	0.06	0.07	0.08	7
100	10 Mean	350	75	42	2	0.38	17.5	5.88	3.89	1.99	1.96	118
	S.D.	37	7	7	1	0.03	1.3	0.16	0.10	0.09	0.07	9
500	10 Mean	339	77	43	1	0.34 **	17.0	5.86	3.87	1.99	1.96	119
	S.D.	38	11	11	1	0.02	1.1	0.26	0.13	0.14	0.10	9

S.D. : Standard deviation.

** : Significantly different from the control at 1% level of probability.

Table 16 - 2

Blood biochemistry - Group mean values in female rats
After 13 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)	No. of animals examined	T.Chol (mg/dl)	TG (mg/dl)	T.Bil (mg/dl)	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)
0	10	Mean	71	9	0.05	4.1	148.2	3.04	111.1
		S.D.	8	2	0.01	0.2	1.4	0.20	1.9
20	10	Mean	72	9	0.05	4.3	148.2	3.06	110.3
		S.D.	4	2	0.01	0.4	1.4	0.20	1.6
100	10	Mean	71	8	0.04 *	4.1	148.0	2.99	110.8
		S.D.	7	1	0.00	0.4	1.6	0.14	1.7
500	10	Mean	68	8	0.02 **	4.1	148.2	2.97	110.5
		S.D.	9	2	0.01	0.3	1.4	0.14	1.7

S.D. : Standard deviation.

* and ** : Significantly different from the control at 5 and 1% levels of probability, respectively.

Table 17 - 1

Organ weight - Group mean values in male rats

Absolute weight at terminal kill after 13 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)	Body weight (g)		Pituitary ^a (mg)		Thyroids ^a (mg)		Salivary glands (mg)		Heart (mg)		Lung (mg)		Thymus (mg)		Liver (g)												
	Mean	S.D.	N	Mean	S.D.	N	Mean	S.D.	N	Mean	S.D.	N	Mean	S.D.	N	Mean	S.D.	N									
0	272	16	10	1928	38	10	8.1	0.7	10	16.8	3.0	10	433	21	10	844	40	10	1041	51	10	138	12	10	6.29	0.49	10
	268	16	10	1924	44	10	8.1	0.8	10	16.6	2.3	10	424	30	10	825	66	10	1076	119	10	144	23	10	6.39	0.47	10
	263	16	10	1908	39	10	7.9	0.7	10	17.7	1.0	10	419	26	10	792	64	10	1015	65	10	143	10	10	6.18	0.49	10
100	261	21	10	1920	42	10	7.7	0.5	10	17.3	1.8	10	425	26	10	811	54	10	1030	93	10	150	27	10	6.15	0.57	10
	261	21	10	1920	42	10	7.7	0.5	10	17.3	1.8	10	425	26	10	811	54	10	1030	93	10	150	27	10	6.15	0.57	10
	261	21	10	1920	42	10	7.7	0.5	10	17.3	1.8	10	425	26	10	811	54	10	1030	93	10	150	27	10	6.15	0.57	10

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals.

a: Weighed after fixation.

Table 17 - 2

Organ weight - Group mean values in male rats

Absolute weight at terminal kill after 13 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Adrenals (mg)	Testes (mg)	Epididy- mides (mg)	Seminal vesicle (mg)	Prostate (mg)
0	Mean 1671	552	45.6	3042	901	1102	183
	S.D. 101	38	2.8	78	34	127	49
	N 10	10	10	10	10	10	10
20	Mean 1678	543	43.6	3037	906	1109	163
	S.D. 92	46	4.3	118	34	80	44
	N 10	10	10	10	10	10	10
100	Mean 1663	531	44.7	2989	884	1088	183
	S.D. 112	32	3.0	158	52	172	51
	N 10	10	10	10	10	10	10
500	Mean 1759	520	46.5	2979	886	1041	159
	S.D. 118	36	4.7	242	54	119	31
	N 10	10	10	10	10	10	10

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals.

Table 17 - 3

Organ weight - Group mean values in male rats

Relative weight to body weight(%) at terminal kill after 13 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)		Brain	Pitui- tary ^a	Thyroids ^a	Salivary glands	Heart	Lung	Thymus	Liver
0	Mean	0.71	0.0030	0.0062	0.16	0.31	0.39	0.051	2.31
	S.D.	0.03	0.0002	0.0011	0.01	0.02	0.02	0.005	0.06
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
20	Mean	0.72	0.0030	0.0062	0.16	0.31	0.40	0.054	2.39
	S.D.	0.04	0.0002	0.0008	0.01	0.01	0.06	0.007	0.05
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
100	Mean	0.73	0.0030	0.0068	0.16	0.30	0.39	0.055	2.35
	S.D.	0.05	0.0003	0.0007	0.01	0.01	0.02	0.004	0.07
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
500	Mean	0.74	0.0030	0.0067	0.16	0.31	0.40	0.057	2.36
	S.D.	0.05	0.0002	0.0009	0.01	0.01	0.02	0.008	0.06
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals.

a: Weighed after fixation.

Table 17 - 4

Organ weight - Group mean values in male rats

Relative weight to body weight(%) at terminal kill after 13 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)		Kidneys	Spleen	Adrenals	Testes	Epididy- mides	Seminal vesicles	Prostate
0	Mean	0.61	0.20	0.017	1.12	0.33	0.41	0.07
	S.D.	0.01	0.01	0.001	0.07	0.02	0.05	0.02
	N	10	10	10	10	10	10	10
20	Mean	0.63	0.20	0.017	1.14	0.34	0.42	0.06
	S.D.	0.02	0.01	0.001	0.07	0.03	0.04	0.02
	N	10	10	10	10	10	10	10
100	Mean	0.63	0.20	0.017	1.14	0.34	0.41	0.07
	S.D.	0.02	0.01	0.001	0.04	0.01	0.05	0.02
	N	10	10	10	10	10	10	10
500	Mean	0.68 **	0.20	0.018	1.15	0.34	0.40	0.06
	S.D.	0.02	0.01	0.003	0.12	0.02	0.03	0.01
	N	10	10	10	10	10	10	10

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals.

**: Significantly different from the control at 1% level of probability.

Table 18 - 1

Organ weight - Group mean values in female rats

Absolute weight at terminal kill after 13 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)	Body weight (g)	Pitui- tary ^a		Salivary glands		Heart (mg)	Lung (mg)	Thymus (mg)	Liver (g)
		Brain (mg)	Thyroids ^a (mg)	Thyroids ^a (mg)	glands (mg)				
0	Mean	1796	11.7	15.4	313	559	788	146	3.77
	S.D.	35	0.9	2.1	14	39	52	15	0.23
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
20	Mean	1785	11.0	15.2	311	546	786	134	3.65
	S.D.	27	1.3	2.3	17	29	31	19	0.24
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
100	Mean	1801	12.4	14.7	309	573	823	146	3.82
	S.D.	27	1.7	2.2	15	16	60	13	0.11
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
500	Mean	1797	11.6	15.0	311	560	796	138	3.75
	S.D.	27	1.4	1.8	18	39	51	13	0.27
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals.

a: Weighed after fixation.

Table 18 - 2

Organ weight - Group mean values in female rats

Absolute weight at terminal kill after 13 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)		Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Adrenals (mg)	Ovaries (mg)	Uterus (mg)
0	Mean	1078	398	48.8	59.0	497
	S.D.	55	30	2.3	7.4	206
	N	10	10	10	10	10
20	Mean	1071	389	47.8	56.1	579
	S.D.	45	22	2.9	5.1	244
	N	10	10	10	10	10
100	Mean	1100	398	48.6	56.4	485
	S.D.	41	15	2.3	5.2	85
	N	10	10	10	10	10
500	Mean	1113	384	48.3	57.6	531
	S.D.	60	32	4.1	7.5	225
	N	10	10	10	10	10

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals.

Table 18 - 3

Organ weight - Group mean values in female rats

Relative weight to body weight(%) at terminal kill after 13 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)		Brain	Pitui- tary ^a	Thyroids ^a	Salivary glands	Heart	Lung	Thymus	Liver
0	Mean	1.10	0.0071	0.0094	0.19	0.34	0.48	0.089	2.30
	S.D.	0.06	0.0005	0.0013	0.01	0.02	0.03	0.009	0.07
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
20	Mean	1.12	0.0069	0.0095	0.20	0.34	0.49	0.083	2.27
	S.D.	0.06	0.0008	0.0013	0.02	0.02	0.03	0.011	0.04
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
100	Mean	1.08	0.0074	0.0088	0.19	0.34	0.50	0.088	2.29
	S.D.	0.03	0.0010	0.0013	0.01	0.01	0.05	0.008	0.06
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
500	Mean	1.11	0.0071	0.0093	0.19	0.34	0.49	0.085	2.31
	S.D.	0.06	0.0009	0.0013	0.02	0.01	0.02	0.006	0.10
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals.

a: Weighed after fixation.

Table 18 - 4

Organ weight - Group mean values in female rats

Relative weight to body weight(%) at terminal kill after 13 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)		Kidneys	Spleen	Adrenals	Ovaries	Uterus
0	Mean	0.66	0.24	0.030	0.036	0.31
	S.D.	0.02	0.01	0.002	0.005	0.13
	N	10	10	10	10	10
20	Mean	0.67	0.24	0.030	0.035	0.36
	S.D.	0.02	0.01	0.002	0.003	0.15
	N	10	10	10	10	10
100	Mean	0.66	0.24	0.029	0.034	0.29
	S.D.	0.03	0.01	0.001	0.003	0.05
	N	10	10	10	10	10
500	Mean	0.69	0.24	0.030	0.035	0.33
	S.D.	0.02	0.01	0.003	0.004	0.14
	N	10	10	10	10	10

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals.

Table 19

Necropsy - Incidence of macroscopic lesions in male rats
Terminal kill after 13 weeks of treatment

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	No. of animals examined			
		0	20	100	500
Lung :	[N=]	10	10	10	10
Spot(s)		0	0	0	1
Large intestine :	[N=]	10	10	10	10
Black contents		0	0	0	10 **
Liver :	[N=]	10	10	10	10
Hepatodiaphragmatic nodule		0	1	0	1
Testis :	[N=]	10	10	10	10
Atrophy		0	0	0	1
Softening		0	0	0	1
Epididymis :	[N=]	10	10	10	10
Atrophy		0	0	0	1
Coagulating gland :	[N=]	10	10	10	10
Small in size		0	0	0	1

[N=]: Number of animals examined at the site.

** : Significantly different from the control at 1% level of probability.

Table 20

Necropsy - Incidence of macroscopic lesions in female rats
Terminal kill after 13 weeks of treatment

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	No. of animals examined			
		0	20	100	500
		10	10	10	10
Lung :	[N=]	10	10	10	10
Spot(s)		0	1	0	0
Edema		0	0	0	1
Large intestine :	[N=]	10	10	10	10
Black contents		0	0	0	10 **
Liver :	[N=]	10	10	10	10
Hepatodiaphragmatic nodule		3	0	0	0
Kidney :	[N=]	10	10	10	10
Spot(s)		0	0	0	1
Ovary :	[N=]	10	10	10	10
Cystic ovarian bursa		1	0	0	0

[N=]: Number of animals examined at the site.

** : Significantly different from the control at 1% level of probability.

Table 21 - 1

Histopathology - Incidence of microscopic lesions in male rats
Terminal kill after 13 weeks of treatment

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	0	20	100	500
	No. of animals examined	10	10	10	10
Lung :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Fibrosis, alveolar		0	-	-	1
Heart :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Myocarditis		1	-	-	1
Submandibular gland :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Atrophy, acinar cell		1	-	-	0
Liver :	[N=]	10	1 a	0 a	10
Hepatodiaphragmatic nodule		0	1	-	1
Microgranuloma		2	0	-	1
Pancreas :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Atrophy, acinar cell		1	-	-	0
Cellular infiltration, mononuclear cell		1	-	-	0
Kidney :	[N=]	10	10	10	10
Deposition, brown pigment, proximal tubular cell		0	0	0	10 **
Cyst(s)		1	0	0	0
Tubular basophilic change		2	3	1	0
Testis :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Atrophy, seminiferous tubule		0	-	-	1
Epididymis :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Sperm granuloma		0	-	-	1
Oligospermia		0	-	-	1
Eye :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Atrophy, retina		1	-	-	0
Harderian gland :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Microgranuloma		0	-	-	2
Skin(lumbo-dorsal) :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Mammary gland :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Bone marrow(sternum) :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Bone marrow(femur) :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Spleen :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Thymus :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Lymph node(cervical) :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Lymph node(mesenteric) :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Bone(sternum) :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Bone(femur) :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Muscle(m. triceps surae) :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Nasal cavity :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Trachea :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Bronchus :	[N=]	10	0 a	0 a	10

<Continued on next page>

[N=]: Number of animals examined at the site.

a: Examined on the animals that showed macroscopic lesions. Not subjected to statistical analysis.

**: Significantly different from the control at 1% level of probability.

Table 21 - 2

[REDACTED]

Histopathology - Incidence of microscopic lesions in male rats
Terminal kill after 13 weeks of treatment

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	0	20	100	500
	No. of animals examined	10	10	10	10
<Continued from previous page>					
Artery(aorta) :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Sublingual gland :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Tongue :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Esophagus :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Forestomach :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Glandular stomach :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Duodenum :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Jejunum :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Ileum :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Cecum :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Colon :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Rectum :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Urinary bladder :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Seminal vesicle :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Coagulating gland :	[N=]	0 a	0 a	0 a	1 a
Prostate :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Pituitary :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Thyroid :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Parathyroid :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Adrenal :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Cerebrum :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Cerebellum :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Pons :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Medulla oblongata :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Spinal cord(cervical) :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Spinal cord(thoracic) :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Spinal cord(lumbar) :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Nerve(sciatic) :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Zymbal's gland :	[N=]	10	0 a	0 a	10

[N=]: Number of animals examined at the site.

a: Examined on the animals that showed macroscopic lesions. Not subjected to statistical analysis.

Table 22 - 1

Histopathology - Incidence of microscopic lesions in female rats
Terminal kill after 13 weeks of treatment

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	0	20	100	500
	No. of animals examined	10	10	10	10
Bone marrow(femur) :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Granuloma		0	-	-	1
Lung :	[N=]	10	1 a	0 a	10
Pneumonia		0	1	-	0
Heart :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Myocarditis		1	-	-	0
Liver :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Hepatodiaphragmatic nodule		3	-	-	0
Microgranuloma		1	-	-	1
Pancreas :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Atrophy, acinar cell		1	-	-	0
Cellular infiltration, mononuclear cell		1	-	-	0
Kidney :	[N=]	10	10	10	10
Deposition, brown pigment, proximal tubular cell		0	0	0	10 **
Ovary :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Luminal dilatation, ovarian bursa		1	-	-	0
Harderian gland :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Microgranuloma		1	-	-	0
Skin(lumbo-dorsal) :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Mammary gland :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Bone marrow(sternum) :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Spleen :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Thymus :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Lymph node(cervical) :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Lymph node(mesenteric) :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Bone(sternum) :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Bone(femur) :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Muscle(m. triceps surae) :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Nasal cavity :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Trachea :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Bronchus :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Artery(aorta) :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Sublingual gland :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Submandibular gland :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Tongue :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Esophagus :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Forestomach :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Glandular stomach :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Duodenum :	[N=]	10	0 a	0 a	10

<Continued on next page>

[N=]: Number of animals examined at the site.

a: Examined on the animals that showed macroscopic lesions. Not subjected to statistical analysis.

**: Significantly different from the control at 1% level of probability.

Table 22 - 2

Histopathology - Incidence of microscopic lesions in female rats
Terminal kill after 13 weeks of treatment

Site & Lesion	Dose (mg/kg/day)	0	20	100	500
	No. of animals examined	10	10	10	10
<Continued from previous page>					
Jejunum :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Ileum :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Cecum :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Colon :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Rectum :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Urinary bladder :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Oviduct :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Vagina :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Uterine horn :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Uterine cervix :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Pituitary :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Thyroid :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Parathyroid :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Adrenal :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Cerebrum :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Cerebellum :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Pons :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Medulla oblongata :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Spinal cord(cervical) :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Spinal cord(thoracic) :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Spinal cord(lumbar) :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Nerve(sciatic) :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Eye :	[N=]	10	0 a	0 a	10
Zymbal's gland :	[N=]	10	0 a	0 a	10

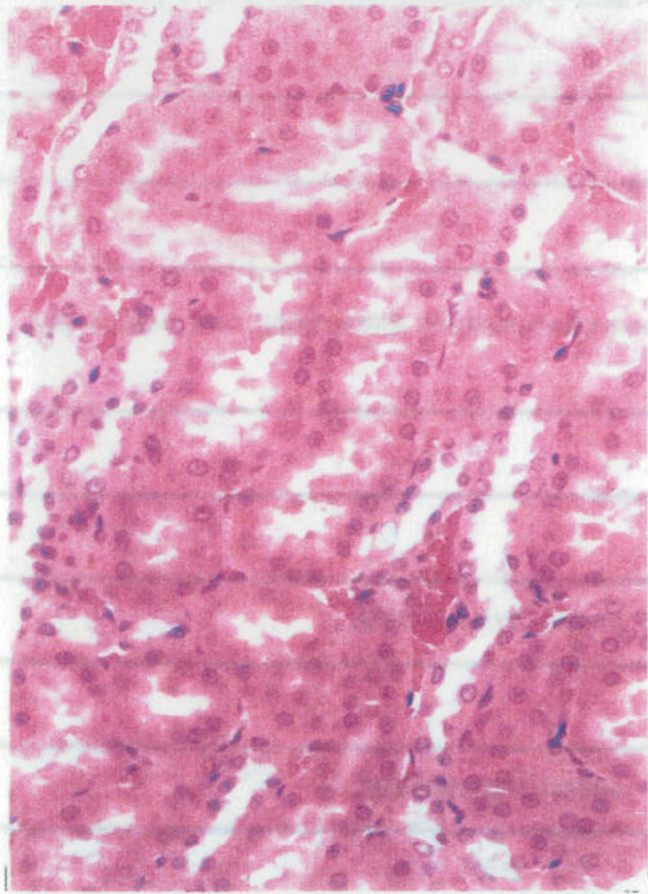
[N=]: Number of animals examined at the site.

a: Examined on the animals that showed macroscopic lesions. Not subjected to statistical analysis.

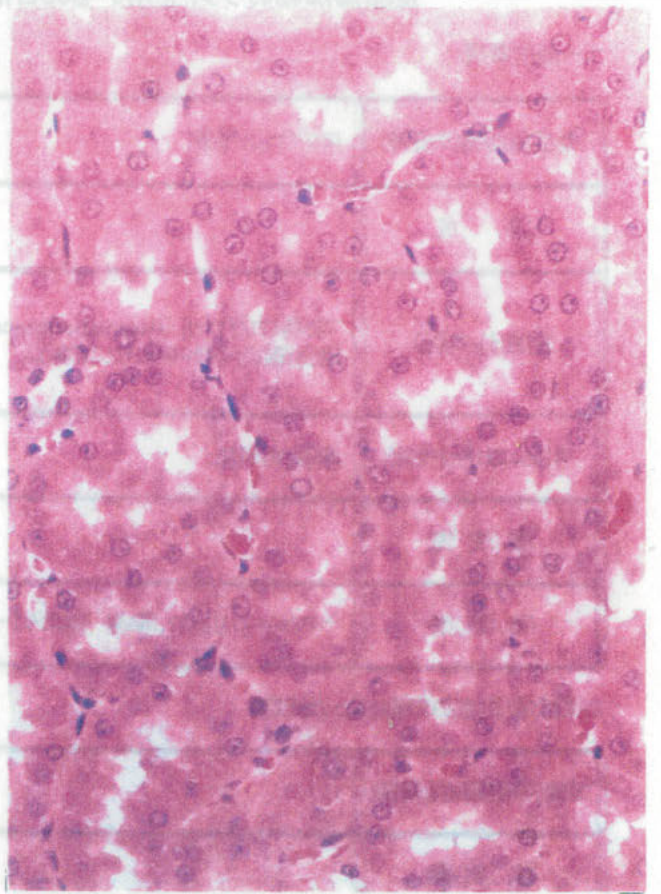
写真説明

本写真図版は、最終計画殺に供された対照群および被験物質投与群雌雄の腎臓の組織写真から成る。写真倍率は370倍である。

- 写真 1. 0 mg/kg/day 群, 雄 (動物番号 201) の腎臓。正常像を示す。ヘマトキシリン・エオジン染色。
- 写真 2. 500 mg/kg/day 群, 雄 (動物番号 231) の腎臓。軽度の近位尿細管上皮褐色色素沈着を示す。ヘマトキシリン・エオジン染色。
- 写真 3. 0 mg/kg/day 群, 雌 (動物番号 241) の腎臓。正常像を示す。シュモール反応。
- 写真 4. 500 mg/kg/day 群, 雌 (動物番号 271) の腎臓。近位尿細管上皮内の褐色色素はシュモール反応に陽性を示す。シュモール反応。



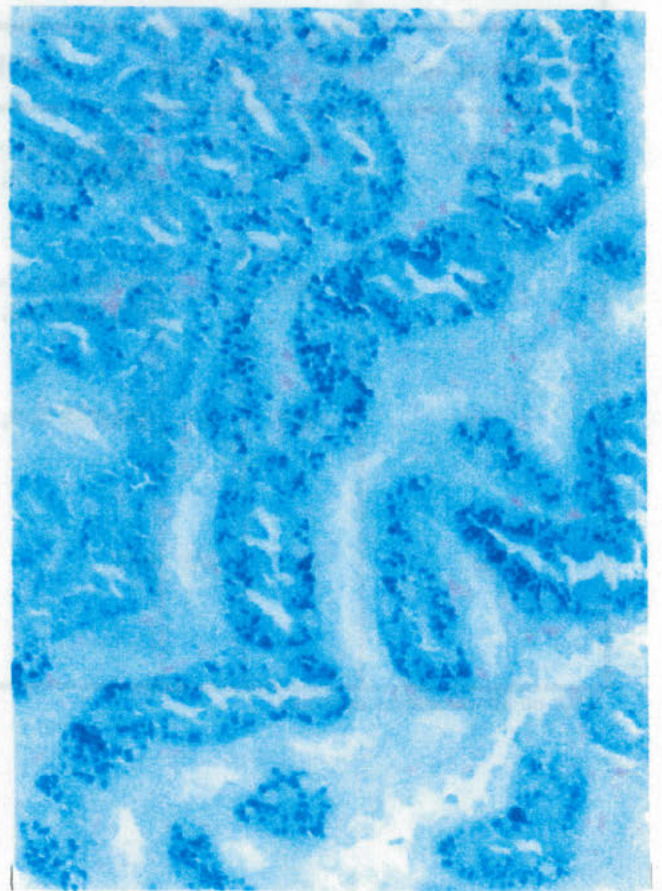
1



2



3



4

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	ログウッド色素
別名	
主成分/成分	マメ科ログウッド (Haematoxylon campechianum) の心材より, 熱時水で抽出して得られたものである。主色素はヘマトキシリンである。
常温における性状	赤紫色粉末
安定性	
溶解性	ヘマトキシリンは, 熱湯, 熱エタノール, アルカリ, グリセリンに可溶。

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日間反復投与毒性試験					
動物種		ラット					
投与経路		強制経口					
投与用量(mg/kg/day)	1群あたりの動物数	死亡率	一般状態	体重	臓器重量	剖検	組織学的検査
1000	雄 3	0/3	黒色糞 (3/3, 1-15日) 赤紫色尿 (3/3, 1-15日)	対照群と 差はなし	腎臓重量増加 (2/3)	肝臓: 肝横隔膜 結節(1/3)	腎臓: 近位尿細管 腔拡張 (2/3)
300	雄 3	0/3	黒色糞 (3/3, 1-15日) 赤紫色尿 (3/3, 1-15日)	対照群と 差はなし	対照群と 差はなし	NAD	検査なし
100	雄 3	0/3	赤紫色尿 (3/3, 8-15日)	対照群と 差はなし	腎臓重量増加 (1/3)	NAD	腎臓: 近位尿細管 腔拡張 (1/1)
30	雄 3	0/3	NAD	対照群と 差はなし	対照群と 差はなし	NAD	検査なし

NAD: no abnormalities detected

3-2. 90日間反復投与毒性試験 (ログウッド色素)

群	投与用量 (mg/kg/day)	対照		低用量		中用量		高用量	
		0		20		100		500	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
腎臓	検査例数	10	10	10	10	10	10	10	10
	近位尿細管上皮褐色色素沈着 (+)	-	-	-	-	-	-	10	10
	陽性例数の検定							▲	▲
	尿細管好塩基性化のう胞 (+)	2	-	3	-	1	-	-	-
	(+)	1	-	-	-	-	-	-	-
精巣	検査例数	10		0		0		10	
	精細管萎縮 (++)	-		*		*		1	
精巣上体	検査例数	10		0		0		10	
	精子肉芽腫 (++)	-		*		*		1	
	乏精子症 (++)	-		*		*		1	
卵巣	検査例数		10		0		0		10
	卵巣囊腔拡張 (+)		1		*		*		-
眼球	検査例数	10	10	0	0	0	0	10	10
	網膜萎縮 (+)	1	-	*	*	*	*	-	-
ハーダー腺	検査例数	10	10	0	0	0	0	10	10
	小肉芽腫 (+)	-	1	*	*	*	*	2	-
NOAEL(mg/kg/day)		雄: 100 mg/kg/day				雌: 100 mg/kg/day			
NOAELの推定根拠とした変化		500 mg/kg/day群の雄で、対照群より軽度により低い体重値がみられ、腎臓の相対重量が有意に増加した。同群の雌では、有意な尿量増加および尿比重の低下ならびにリンパ球数および単球数の減少を伴う白血球数の有意な減少が認められた。また、500 mg/kg/day群の雌雄において、腎臓の近位尿細管上皮褐色色素沈着の発生頻度が有意に増加した。							

△, 対照群に比べ有意な増加 (p<0.05) ▽, 対照群に比べ有意な減少 (p<0.05)
 ▲, 対照群に比べ有意な増加 (p<0.01) ▼, 対照群に比べ有意な減少 (p<0.01)
 ↑, 対照群に比べて増加傾向 ↓, 対照群に比べて減少傾向
 -, 変化なし +~+++, 陽性 *, 試験せず 数値, 例数 空欄, 該当なし
 注) 例数を記載した項目については「↑」および「↓」の記号を省略する

4. その他

反復投与毒性試験 実施機関	名称	[Redacted]
	所在地	
試験責任者	職氏名	[Redacted]
試験実施年度	平成15年度	