

B040158  
DRAFT

## 最終報告書（草案）

人工還元水のラットを用いた経口投与による  
26 週間反復投与毒性試験および 13 週間投与後の 4 週間回復試験

（試験番号：B040158）

2004 年##月##日

株式会社三菱化学安全科学研究所

## 1. 陳述書

試験委託者： 株式会社シーテック

表 題： 人工還元水のラットを用いた経口投与による26週間反復投与毒性試験および13週間投与後の4週間回復試験

試験番号： B040158

本試験は、下記の基準に従い実施したものである。

「申請資料の信頼性の基準」

(薬事法施行規則第18条の4の3, 平成9年3月27日)

試験責任者：       年       月       日       \_\_\_\_\_ 印

星野 信人  
株式会社三菱化学安全科学研究所  
鹿島研究所 毒性第1研究部

## 2. 目次

1. 陳述書	2
2. 目次	3
3. 試験実施概要	5
3.1 表題	5
3.2 試験番号	5
3.3 試験目的	5
3.4 適用ガイドライン	5
3.5 適用 GLP	5
3.6 信頼性基準	5
3.7 信頼性保証部門による調査項目	5
3.8 試験委託者	5
3.9 試験受託者	5
3.10 試験施設	5
3.11 試験責任者	6
3.12 分担責任者	6
3.13 試験従事者	6
3.14 試験日程	7
3.15 保存	7
3.16 保存する資料	7
4. 試験責任者署名	8
5. 要約	9
6. 材料および方法	10
6.1 被験物質および媒体	10
6.2 試験動物	10
6.3 動物飼育	12
6.4 投与	13
6.5 投与液の調製	14
6.6 回復期間	15
6.7 群構成	15
6.8 観察・測定項目	15
6.9 統計学的解析	20
6.10 コンピュータシステムの使用	20
7. 結果	22
7.1 一般状態	22
7.2 体重	22
7.3 摂餌量	22

7.4 血液学的検査	23
7.5 血液生化学的検査	23
7.6 尿検査	23
7.7 眼科学的検査	23
7.8 器官重量	23
7.9 剖検所見	23
7.10 病理組織学的所見	24
8. 考察および結論	25
9. 特記事項	27
9.1 予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす 疑いのある事態	27
9.2 試験計画書に従わなかつたこと	27
9.3 標準操作手順書に従わなかつたこと	28
10. 添付資料	29
10.1 摂餌量の背景データ (14W-26W)	29
10.2 血液学的検査の背景データ (26W)	29
10.3 血液生化学的検査の背景データ (13W)	29
10.4 血液生化学的検査の背景データ (26W)	30

最終ページ 30

Figures and Tables (page 1~95)

Appendices (page 1~182)

信頼性保証証明書

### 3. 試験実施概要

#### 3.1 表題

人工還元水のラットを用いた経口投与による 26 週間反復投与毒性試験および 13 週間投与後の 4 週間回復試験

#### 3.2 試験番号

B040158

#### 3.3 試験目的

人工還元水をラットに 26 週間反復経口投与し、毒性変化を惹起するか否かを検討する。また、13 週間投与で認められた変化の回復性も検討する。

#### 3.4 適用ガイドライン

なし

#### 3.5 適用GLP

なし

#### 3.6 信頼性基準

「申請資料の信頼性の基準」

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

#### 3.7 信頼性保証部門による調査項目

試験計画書草案, 試験計画書, 生データ, 最終報告書草案および最終報告書を調査し, 信頼性保証証明書を最終報告書に添付した。

#### 3.8 試験委託者

株式会社シーテック

東京都渋谷区恵比寿南二丁目 20 番 14-201 号

#### 3.9 試験受託者

株式会社三菱化学安全科学研究所

東京都港区芝二丁目 1 番 30 号

#### 3.10 試験施設

株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

茨城県鹿島郡波崎町砂山 14 番地

(病理組織学的検査のうち鏡検業務)  
株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所 大阪分室  
大阪府中央区伏見町四丁目1番1号

### 3.11 試験責任者

星野 信人  
株式会社三菱化学安全科学研究所  
鹿島研究所 毒性第1研究部

### 3.12 分担責任者

(病理検査) 飯田 晶敏  
(臨床検査) 豊田 直人

### 3.13 試験従事者

(動物入荷, 検疫, 馴化, 群分け, 個体識別)  
中村亮介, 塚本友美, 望月美江, 藤代真弓, 平野奏恵, 船越武, 星野信人

(投与液の調製)  
鈴木芙美恵, 中村秀子, 吉成光紀

(投与, 一般状態観察, 体重および摂餌量測定)  
中村亮介, 船越武, 松本和代, 鈴木芙美恵, 岩井真弓, 塚本友美, 遠藤理恵, 木内里美, 島田真己子, 小松美佐子, 大竹律枝, 大塚直美, 伊藤重美, 泉孔美子, 江口桂子, 平野奏恵, 黒崎智晴, 湊健一, 黒田洋子, 相見真紀, 長谷川良美, 藤代真弓, 室伏克樹, 五十嵐佳代, 上島美重, 斎藤哲司, 鈴木絵里, 岩井淳

(尿検査)  
中村亮介, 平野奏恵, 湊健一, 遠藤理恵, 木内里美, 花香奈津美, 佐藤涼子, 古賀依子

(眼科学的検査)  
大竹誠司, 湊健一, 室伏克樹, 和田聡

(採血, 血清及び血漿分離, 麻酔)  
岩井淳, 五十嵐佳代, 島田真己子, 松本忍, 青木亘

(血液学的検査)  
大江みどり, 遠藤成子, 佐々木美貴子

(血液生化学的検査)  
小林厚子, 田中美帆

(剖検)

船越武, 中村亮介, 藤代真弓, 佐藤ゆかり, 平野奏恵, 岩井真弓, 芦名美智子,  
大塚直美, 大信阿津子, 長谷川良美, 上島美重, 泉孔美子, 五十嵐佳代,  
飯田晶敏

(器官重量測定)

遠藤理恵, 黒田洋子, 斎藤哲司, 中村亮介

(病理組織標本, 電顕標本作製)

谷口江美子, 伊藤隆芳, 大塚大蔵, 小笹未希, 細谷貴代江, 池田裕樹

(病理組織学的検査)

飯田晶敏

### 3.14 試験日程

試験開始	2004年2月4日
動物入荷	2004年2月4日
投与開始	2004年2月10日
13週間投与終了時解剖	2004年5月11日
回復終了時(13週間投与後の4週間回復)	2004年6月8日
26週間投与終了時解剖	2004年8月10日
試験終了	2004年##月##日

### 3.15 保存

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

### 3.16 保存する資料

- (1) 試験計画書
- (2) 被験物質
- (3) 被験物質に関する資料
- (4) 使用動物に関する資料
- (5) 試験結果に関する資料
- (6) 通信文書等の記録文書
- (7) 標本
- (8) 最終報告書





## 5. 要約

人工還元水をヒト適用濃度の 100 倍に相当する 0.08  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  の用量で雌雄の Crj:CD(SD)IGS ラットに 26 週間反復経口投与し、毒性変化を惹起するか否かを検討した。また、13 週間投与で認められた変化の回復性を検討した。1 群の動物数は雌雄各 18 匹とし、対照群には媒体（日本薬局方注射用水）のみを投与した。

一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、眼科学的検査、病理解剖検査および病理組織学的検査のいずれの検査においても、13 週間および 26 週間投与後動物、ならびに 13 週間投与後回復動物の雌雄全例で、被験物質に起因すると考えられる毒性変化は認められなかった。

以上のように、本試験条件下における人工還元水の無毒性量は雌雄ともに 0.08  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  以上と考えられる。

## 6. 材料および方法

### 6.1 被験物質および媒体

#### 6.1.1 被験物質

(1) 名称

人工還元水（略称：PAA-Pt）

(2) ロット番号

151110

(3) 性状

黒色液体

(4) 白金濃度

1 mmol/L (195 mg /L)

(5) 入手源

東京大学大学院生命棟

(6) 安定性の確認

実施しなかった。

(7) 保存条件

常温・遮光（室温保存：被験物質保管場所(41)，温度実測値 13.5～27.0°C）

(8) 残余被験物質の取扱い

残余被験物質は実験終了後，試験委託者へ返却した。

(9) 取扱上の注意

保護メガネ，マスク，ゴム手袋を着用した。

#### 6.1.2 媒体（対照群投与液）

(1) 名称

日本薬局方注射用水

(2) 試薬（製造元）

株式会社大塚製薬工場（Lot No.3J85, 3L84, 3L92, 4B71, 4B79, 4C71, 4C78, 4C79, 4C98,）

(3) 保存条件

室温

## 6.2 試験動物

### 6.2.1 動物種

ラット

### 6.2.2 系統

Crj:CD(SD)IGS

### 6.2.3 試験系選択理由

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

### 6.2.4 微生物レベル

SPF

### 6.2.5 購入先

日本チャールス・リバー株式会社

### 6.2.6 購入動物数

雌雄各 44 匹（発注動物数，雌雄各 42 匹）

### 6.2.7 検疫・馴化

全例について一般状態を 5 日間 1 日 1 回観察し、健康状態が良好であることを確認するとともに、動物入荷時および検疫終了時に体重を測定した。その結果、いずれの動物も健康状態は良好で、体重増加に異常のないことを確認した。それ以降も馴化は継続し、投与開始日まで 1 日 1 回観察した。

### 6.2.8 投与開始時週齢

6 週齢

### 6.2.9 投与開始時体重

動物の体重範囲は雌雄とも平均体重  $\pm 20\%$ であることを確認した。

雄；199～222 g，雌；152～173 g

### 6.2.10 群分け

投与開始前日に体重層別化無作為抽出法により、各群の体重がほぼ均一になるように群分けした。なお、群分け前に実施した眼科学的検査の結果から、水晶体全面のびまん性混濁、脈絡膜萎縮と思われる反射亢進、あるいは硝子体の出血を示した雄 3 例（検疫・馴化動物番号 19009, 19012, 19030）を群分けから除外した（特記事項 9.2）。

### 6.2.11 動物の識別

群分け前は尾に油性ペンで標識して個体識別し、ケージには試験番号、検疫・馴化期間動物番号、ケージ番号、動物種、系統および性別を記載したラベルを付けた。群分け後はイヤープンチ法で個体識別し、ケージには試験番号、被験物質名、群名（用量）、性別、動物種、系統および動物番号を記載したラベルを付けた。

### 6.2.12 余剰動物の処理

余剰動物は投与開始日に試験系から除外し、ドライアイスを用いた炭酸ガス吸入法により安楽死させた。

## 6.3 動物飼育

### 6.3.1 飼育室

ラット・マウス飼育室 (4114 室)

### 6.3.2 飼育室

#### (1) 温度

実測値 21.0～24.3°C (許容範囲 19.0～25.0°C)

#### (2) 相対湿度

実測値 47.1～75.7% (許容範囲 35.0～75.0%)

#### (3) 換気

6～20 回/時, オールフレッシュエアー供給

#### (4) 照明時間

12 時間/日 (7:00-19:00) 点灯.

### 6.3.3 飼育器材

#### (1) ケージ

オートクレーブ滅菌したポリカーボネート製ケージ (265W×426D×200H mm, トキワ科学器械株式会社) を使用し, 群分け時および第 8 日に交換し, それ以降は 6 あるいは 7 日に 1 回の頻度で交換した.

#### (2) 給餌器

オートクレーブ滅菌した固型用ステンレス製給餌器 (トキワ科学器械株式会社) を使用し, ケージ交換時に交換した.

#### (3) 給水瓶

オートクレーブ滅菌したポリカーボネート製給水瓶 (700 mL, トキワ科学器械株式会社) を使用し, ケージ交換時に交換した.

#### (4) 架台

ベンザルコニウム系特殊洗浄剤 (マイクロカット, エコラボ株式会社) の希釈液で消毒したスチール製架台 (トキワ科学器械株式会社) を使用した.

### 6.3.4 床敷き

#### (1) 種類

オートクレーブ滅菌した実験動物用床敷 (ベータチップ, 日本チャールス・リバー株式会社) を使用し, ケージ交換時に交換した.

#### (2) 汚染物質の確認

財団法人日本食品分析センターで実施した分析結果を供給者から定期的に入手し, 残留農薬等の汚染物質が, 当研究所の標準操作手順書の基準に適合していることを

確認した。

### 6.3.5 飼料

#### (1) 種類

放射線滅菌した実験動物用固型飼料 (CR-LPF, オリエンタル酵母工業株式会社)

#### (2) 給餌法

尿検査時を除き自由摂取とし, ケージ交換時に交換した。また, 剖検前日の夕方 (16 : 30) から絶食した。

#### (3) 汚染物質の確認

財団法人日本食品分析センターで実施した分析結果を供給者から入手し, 使用したロット (ロット番号 031105, 031211, 040119, 040204, 040317, 040413) の残留農薬等の汚染物質濃度が, 当研究所の標準操作手順書の基準に適合していることを確認した。

### 6.3.6 飲用水

#### (1) 種類

5 μm フィルター濾過後, 紫外線照射した水道水。

#### (2) 給水法

尿検査時を除き自由摂取とし, ケージ交換時に交換した。

#### (3) 分析

株式会社ダイヤ分析センターで水質検査を定期的 to 実施し, 得られた分析値が水道法の基準に適合していることを確認した。

### 6.3.7 収容動物数

検疫・馴化期間は (群分け前) は 1 ケージあたり 4~5 匹 (同性) 以下とし, 群分け以降は 2 匹 (同性) とした。

## 6.4 投与

### 6.4.1 経路・方法

経口 (強制経口投与)。

ラット用胃ゾンデを装着したディスポーザブルシリンジを用いて投与した。

### 6.4.2 経路選択理由

ヒトの適用経路に準ずる。

### 6.4.3 方法選択理由

ラットに確実に経口投与する方法として広く用いられている。

#### 6.4.4 回数・期間

医薬品ガイドラインの反復投与毒性試験で最も長期の投与期間とし、1日1回最大26週間、8:17~16:42の間に投与した。なお、2004年7月26日と8月5日には、試験計画書記載の規定の時刻内（8:00~14:00）に投与することができなかった（特記事項9.2）。

#### 6.4.5 用量および用量選択理由

0.08  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  の一用量とした。この他に、対照として媒体のみを投与する対照群を設けた。

スポーツ飲料として、ヒトへの適用濃度が被験物質原液（1  $\text{mmol}/\text{L}$ ）の10万倍希釈液を想定していることから、動物への投与には十分に高い濃度と考えられる原液の1000倍希釈液（1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、ヒト適用濃度の100倍相当）を設定した。投与経路が強制経口投与であることから、1000倍希釈液に換算した投与用量を以下のように算出した。

26週までのラットの平均体重および1日あたりの平均摂水量を背景データから計算し、1日あたりの被験物質摂取量を算出した。

1000倍希釈液（1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ）に換算した投与用量の算出を次に示す。

雄（平均体重 560g、摂水量 35g）、 $0.035\text{kg} \times 1 \mu\text{mol} / 0.56\text{kg} = 0.0625 \mu\text{mol}/\text{kg}$

雌（平均体重 320g、摂水量 30g）、 $0.03\text{kg} \times 1 \mu\text{mol} / 0.32\text{kg} = 0.09375 \mu\text{mol}/\text{kg}$

中央値、 $0.078 \mu\text{mol}/\text{kg} \doteq 0.08 \mu\text{mol}/\text{kg}$ （雌雄とも同用量とした）

#### 6.4.6 投与液量

10  $\text{mL}/\text{kg}$  とし、至近日に測定した体重に基づいて、各個体の液量を算出した。

### 6.5 投与液の調製

#### 6.5.1 方法・頻度

提供された被験物質が白金濃度 1  $\text{mmol}/\text{L}$ （195  $\text{mg}/\text{L}$ ）の溶液であることから、被験物質を媒体で125倍希釈し、白金濃度として0.008  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ の投与液を調製した。希釈に際して1回の最大希釈倍率を10倍とし、以下のように段階希釈で調製した。

(1) 0.1  $\text{mmol}/\text{L}$  溶液の調製：被験物質原液（1  $\text{mmol}/\text{L}$ ）を必要量分取し、媒体で10倍に希釈した。

(2) 0.01  $\text{mmol}/\text{L}$  溶液の調製：0.1  $\text{mmol}/\text{L}$  溶液を媒体で10倍に希釈した。

(3) 0.008  $\text{mmol}/\text{L}$  溶液の調製（0.008  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ）：0.01  $\text{mmol}/\text{L}$  溶液を媒体で1.25倍に希釈した。

調製頻度は4~7日に1回の割合で調製し、投与液は使用するまで冷蔵（温度実

測値：2.5～7.5°C)・遮光条件下で保存した。調製はイエローランプ照明下の調剤室にて実施した。投与に際しては十分攪拌して均質化した。

### 6.5.2 安定性の確認

実施しなかった。

### 6.5.3 濃度・均一性の確認

実施しなかった。

## 6.6 回復期間

対照群および 0.08 μmol/kg 群の雌雄各 6 匹（動物番号末尾 7～12 番）について、13 週間投与終了後に 4 週間の回復期間を設けた。

## 6.7 群構成

群名	濃度 (μmol/mL)	性	13 週間投与後 解剖	13 週間投与後の 回復期間終了後 解剖	26 週間投与後 解剖
対照	0	雄	6 <sup>1)</sup> (10101-10106) <sup>2)</sup>	6 (10107-10112)	6 (10113-10118)
		雌	6 (50101-50106)	6 (50107-50112)	6 (50113-50118)
0.08 μmol/kg	0.008	雄	6 (10201-10206)	6 (10207-10212)	6 (10213-10218)
		雌	6 (50201-50206)	6 (50207-50212)	6 (50213-50218)

1) 動物数 2) 動物番号

## 6.8 観察・測定項目

下記の項目を検査した。なお、日と週の表記は投与開始日を第 1 日、第 1 日から第 7 日を第 1 週とした。

### 6.8.1 一般状態

投与期間は 1 日 2 回（投与前、投与直後）、回復期間および解剖日は 1 回午前中に全例の一般状態を観察した。

### 6.8.2 体重

第 13 週までは全例の動物について第 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85 および 91 日に、13 週間投与後回復動物は第 92, 99, 106, 113, 119 および 120 日に、26 週間投与動物は第 92, 99, 106, 113, 119, 120, 127, 134, 141, 148,

155, 162, 169, 176, 182 および 183 日に測定した。測定には電子天秤 (PB3200-S : メトラー・トレド株式会社) を用いた。

### 6.8.3 摂餌量

摂餌量を体重測定と同じ頻度で測定した。測定には電子天秤 (PB3200-S : メトラー・トレド株式会社) を用い、各ケージ毎の風袋込み重量を測定し、各測定日間の 1 匹あたりの 1 日平均摂餌量を算出した。

### 6.8.4 血液学的検査

13 週間および 26 週間投与解剖動物の最終投与翌日 (第 92 および 183 日), 回復期間終了時の計画解剖日 (第 120 日) に, 前日の夕方から 20 時間以上絶食して, チオペンタールナトリウム (ラボナール, 田辺製薬株式会社) を腹腔内投与して麻酔し, 後大静脈より採血した。

採取した血液を用いて下記の項目を測定した。(9), (10)の測定には, 凝固阻止剤として 3.2 w/v %クエン酸三ナトリウム水溶液を使用し, 遠心分離 (12,000 rpm, 約 12,000g, 3 分間, 4°C) して得られた血漿を用いた。その他の項目の測定には, 凝固阻止剤 EDTA-2K で処理した血液を用いた。なお, 血液および血漿は検査終了後に廃棄した。

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

測定機器 : (a), ADVIA120 (バイエルメディカル株式会社)

(b), CA-510 (シスメックス株式会社)

(c), MICROX HEG-50, HEG-50VF (オムロン株式会社)



### 6.8.5 血液生化学的検査

計画解剖時に採取した血液の一部を室温・遮光下で約 30 分間放置後、遠心分離 (3,000 rpm, 1,570g あるいは 2,050g, 10 分間, 約 4°C) し、得られた血清を用いて下記の項目を測定した。13 週間および 26 週間投与後解剖動物は採血当日に測定を行ったが、13 週間投与後回復動物は採血翌日に測定し、それまでの間、-80°C (許容範囲: -60°C 以下, 温度実測値: -81~-76°C) のフリーザー内で保存した。残余の血清は試験終了まで -80°C (許容範囲: -60°C 以下) のフリーザー内で保存した。

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

測定機器: (a), TBA-200FR (株式会社東芝)

### 6.8.6 尿検査

13 週間および 26 週間投与後解剖動物の全例について尿検査を行った。

13 週間および 26 週間とも投与最終週 (第 87 および 178 日) の投与前に、餌水を与えない状態で新鮮尿を採取して下記の(1)~(7)および(13)の項目を測定した。さらに餌水を与えながら約 21 時間蓄積尿を採取し、下記の(8)~(12)の項目を検査した。なお、

13 週間投与後回復動物については、13 週間投与期間中の検査で被験物質の影響が疑われる変化が認められなかったため、検査は実施しなかった。

(10)～(12)の検査に用いた残りの尿は試験終了まで-80°C（許容範囲：-60°C 以下）のフリーザー内で保存した。その他の尿は測定終了後廃棄した。

なお、26 週間投与後解剖動物では、新鮮尿採取の際に対照群の雌 1 例が、尿採取開始から 6 時間経過しても尿を採取できなかつたため、給水瓶を装着し尿を採取した（特記事項 9.3）。

項目	方法	測定機器
(1) pH	試験紙法	(a)
(2) 蛋白	試験紙法	(a)
(3) グルコース	試験紙法	(a)
(4) ケトン体	試験紙法	(a)
(5) ビリルビン	試験紙法	(a)
(6) 潜血	試験紙法	(a)
(7) ウロビリノーゲン	試験紙法	(a)
(8) 尿量	メスシリンダーで測定	—
(9) 比重	屈折法	(b)
(10) ナトリウム (Na)	イオン選択電極法	(c)
(11) カリウム (K)	イオン選択電極法	(c)
(12) クロール (Cl)	電量滴定法	(c)
(13) 尿沈渣	Sternheimer-Malbin 染色した標本を鏡検	—

測定機器：(a), クリニテック 100 (バイエル メディカル株式会社)

(b), ユリコン-JE (株式会社アタゴ)

(c), PVA- $\alpha$  III (株式会社エイアンドティー)

### 6.8.7 眼科学的検査

全例の動物について実施した。投与開始前は馴化中（投与開始前日）、投与開始後の動物は 13 週間および 26 週間とも投与最終週（第 91 および 182 日）、回復動物は回復期間最終週（第 119 日）に眼科学的検査を行った。

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

### 6.8.8 病理学的検査

#### (1) 器官重量

全動物の下記の器官重量を電子天秤（AW120：株式会社島津製作所、AG204：メト

ラー・トレド株式会社)を用いて測定した(両側性の器官はまとめて測定した)。甲状腺および下垂体はホルマリン固定後に測定した。また、解剖日に体重を測定し、その体重に基づいて相対重量を算出した。

肝臓、腎臓、胸腺、副腎、甲状腺(上皮小体含む)、下垂体、卵巣、子宮、精巣、前立腺(腹葉)、精囊(凝固腺含む)、脳、唾液腺(顎下、舌下)、肺、心臓、脾臓

## (2) 病理解剖検査

全動物とも採血後、腹大動脈を切断・放血し、安楽死させた後剖検した。

### 6.8.9 病理組織学的検査

全動物の下記器官・組織を採取し、10 vol %中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。ただし、精巣はブアン液で、眼球、ハーダー腺、視神経はダビドソン液でそれぞれ固定後、10 vol %中性リン酸緩衝ホルマリン液で保存した。

心臓、リンパ節(下顎・腸間膜)、胸腺、脾臓、気管、肺(気管支を含む)、舌、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、唾液腺(顎下・舌下・耳下)、肝臓、膵臓、腎臓、膀胱、精巣、精囊、前立腺(腹葉)、精巣上体、下垂体、甲状腺および上皮小体、副腎、大腿骨および骨髄、胸骨および骨髄、皮膚、乳腺、眼球、ハーダー腺、視神経、脳、脊髄、卵巣、子宮、膣、大動脈(胸部)、骨格筋(大腿部、右：鏡検用、左：電顕用)、坐骨神経、その他肉眼的異常部位

投与および回復期間終了時に採取した全動物の上記器官・組織と肉眼的異常部位は常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、鏡検した。鏡検は大阪分室で実施した。ヘマトキシリン・エオジン染色標本の鹿島研究所と大阪分室間の移動は当研究所の標準操作手順書に従った。なお、剖検あるいは標本作製の過程で以下に示す動物において、両側あるいは片側の上皮小体が失われ、鏡検することができなかった(特記事項9.2)。

両側の上皮小体：10104

片側の上皮小体：50108, 50109, 50209

### 6.8.10 電子顕微鏡学的検査

下表の動物について電子顕微鏡標本を作製した。

群名	性	動物番号		
		13週間投与	回復動物	26週間投与
対照	雄	3 <sup>1)</sup> (10101-10103) <sup>2)</sup>	3 (10107-10109)	3 (10113-10115)
	雌	3 (50101-50103)	3 (50107-50109)	3 (50113-50115)
0.08 µmol/kg	雄	3 (10201-10203)	3 (10207-10209)	3 (10213-10215)
	雌	3 (50201-50203)	3 (50207-50209)	3 (50213-50215)

1) 動物数 2) 動物番号

13週間および26週間投与解剖動物、回復動物の計画解剖時に肝臓、腎臓、大腿筋(左)の一部を採取し、2.5%グルタルアルデヒド液で前固定、1%四酸化オスミウム液で固定後、エポキシ樹脂ブロックを作製した。標本作製後のブロックは試験委託者(被験物質供給者である東京大学大学院生命棟)へ送付した。

### 6.9 統計学的解析

計量データは、2群間でF検定により分散の均一性を調べ、分散が等しい場合は、Studentのt検定、分散が等しくない場合はWelchの検定により対照群と0.08 µmol/kg群間で平均値の差の検定を行った。計数データは、Wilcoxonの順位和検定で対照群との比較を行った。有意水準はいずれも5%とした。検定は安全性試験システム(MiTOX, 三井造船システム技研株式会社)を用いて実施した。

統計学的解析の対象項目は下記の通りである。一般状態および眼科学的検査、病理解剖検査および病理組織学的検査については、統計学的解析を実施しなかった。

計量データ：体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査(尿量、比重、ナトリウム、カリウム、クロール)、器官重量

計数データ：尿検査(pH、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン、尿沈渣)

### 6.10 コンピュータシステムの使用

以下に示すデータの収集および統計学的解析には安全性試験システム(MiTOX, 三井造船システム技研株式会社)を使用した。当該システムのコンピュータプロトコールにはデータ収集範囲、データ収集の日程等を登録した。コンピュータシステムのプロトコール番号としてB040158\_( \_は空白)を用いた。なお、コンピュータシステムでの被験物質名を“PAA-Pt”とした。

データ収集／解析：体重，群分け，投与液量算出，摂餌量，血液学的検査，血液生  
化学的検査，尿検査，器官重量，病理組織学的検査  
データ集計：一般状態，剖検

## 7. 結果

### 7.1 一般状態 (Table 1, Appendix 1)

被験物質に起因する変化は雌雄とも認められなかった。

被験物質と関連のない変化として、痂皮形成が対照群および 0.08  $\mu\text{mol/kg}$  群の雄で各 2 例、咬創が 0.08  $\mu\text{mol/kg}$  群の雄 1 例に認められた。咬創は同居動物との闘争によるもので、その後痂皮形成を示した。眼球の変色が 0.08  $\mu\text{mol/kg}$  群の雌 1 例で認められた。その他、歯の欠損が対照群の雄 2 例（上切歯片側：右側または左側）および 0.08  $\mu\text{mol/kg}$  群の雄 1 例（上切歯両側）に認められた。このうち対照群の 1 例は欠損した上切歯片側の対の下切歯が異常に発達（過成長）し、不整咬合が認められた。これらの変化は長期試験において散発的に認められ、0.08  $\mu\text{mol/kg}$  群に偏ったものでないことから、被験物質に起因するものではないと判断した。

### 7.2 体重 (Figure 1, Table 2, Appendix 2, 11)

13 週間および 26 週間の投与期間、ならびに回復期間の雌雄とも、0.08  $\mu\text{mol/kg}$  群と対照群との間に有意差は認められなかった。しかし、26 週間投与動物の雄の体重は、対照群と 0.08  $\mu\text{mol/kg}$  群との間に約 40g の差が認められた。この差は、26 週間投与動物に選抜された動物のうち、対照群に体重の重い動物が偶然に偏ったことによるものと考えられた。

なお、0.08  $\mu\text{mol/kg}$  群の 26 週間投与動物では、13 週間以降の体重推移が、13 週間前までの体重推移の延長線上にあるものと推察された。

### 7.3 摂餌量 (Figure 2, Table 3, Appendix 3, 12)

摂餌量の有意な差を伴う低値が、0.08  $\mu\text{mol/kg}$  群の雄で 13 週間投与以降のほぼ毎測定時に認められた。しかし、これは 26 週間投与に選抜された動物の体重差によるものと考えられ、被験物質に起因した変化ではないと判断された。その他、上記期間以外の雄および全期間の雌では、0.08  $\mu\text{mol/kg}$  群と対照群との間に有意差は認められなかった。

なお、13 週間投与以降の 1 日あたりの平均摂餌量 (Appendix 12) は、対照群 29.9g に対し 0.08  $\mu\text{mol/kg}$  群では 27.3 g であった。当研究所の背景データ (添付資料 10.1) では 14 週～26 週 (Day 99-182) までの 1 日あたりの平均摂餌量が 26.93 g (Min-Max: 25.51-29.60 g) であった。また、この時の平均体重は 648.9 g (Min-Max: 603.2-671.9 g) であり、背景データでも体重の重い動物は摂餌量が多かった。このことから本試験においても、対照群の 26 週間投与動物の摂餌量は、前述の体重差が原因で高値を示していることが明らかとなった。

#### 7.4 血液学的検査 (Table 4, Appendix 4)

13 週間投与後検査では雌雄とも変化は認められなかった。

13 週間投与後の回復終了後検査では、プロトロンビン時間の低値が雌で認められた。

26 週間投与後検査では、平均赤血球容積の低値が雄、活性化部分トロンボプラスチン時間の高値が雌で認められた。

#### 7.5 血液生化学的検査 (Table 5, Appendix 5)

13 週間投与後検査では、トリグリセライドの高値が雌雄、カルシウムの高値が雄、総蛋白の高値に伴う A/G 比の低値が雄で認められた。

13 週間投与後の回復終了後検査では、ASAT (GOT)、クレアチニンの低値が雄、アルブミンおよび無機リンの高値が雌で認められた。

26 週間投与後検査では、総ビリルビンの高値が雄、ALP および尿素窒素の低値、リン脂質、総蛋白およびアルブミンの高値が雌で認められた。

#### 7.6 尿検査 (Table 6, Appendix 6)

13 週間および 26 週間投与動物のいずれにも、被験物質に起因する変化は認められなかった。

#### 7.7 眼科学的検査 (Table 7, Appendix 7)

13 週間および 26 週間投与終了後、ならびに 13 週間投与後の回復終了後検査では、対照群を含む各群にいくつかの変化が観察された。しかし、いずれも投与開始前の検査において観察されている所見で、雌雄とも 0.08  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  群にその発現が偏ることがなかったことから、被験物質と関連のない変化と判断した。また、一般状態で認められた眼球の変色 (動物番号 50206) は硝子体内出血として観察された。

#### 7.8 器官重量 (Tables 8 and 9, Appendices 8 and 9)

13 週間投与後検査では、精囊の絶対重量の高値、肝臓の相対重量の高値が雄、心臓および脾臓の相対重量の低値、副腎の相対重量の高値が雌に認められた。

13 週間投与後の回復終了後検査では、雌雄とも変化は認められなかった。

26 週間投与後検査では、脾臓重量 (絶対および相対) の低値が雌で認められた。

#### 7.9 剖検所見 (Table 10, Appendix 10)

被験物質に起因すると思われる変化は認められなかった。

なお、一般状態で認められた眼球の変色（動物番号 50206）は、剖検時、眼球の暗灰色（片側性）として観察された。

#### 7.10 病理組織学的所見（Table 11, Appendix 10）

26 週間投与後解剖動物の検査で、0.08  $\mu\text{mol/kg}$  群の雌に肺血管の鉍質沈着が 3 例認められた。その他、種々の組織変化が 13 週間投与後解剖、回復終了後解剖および 26 週間投与後解剖動物の対照群を含む各群で認められた。それらはラットでは非特異的に発現する変化であり、その発現状況は各群において散発性であることから、被験物質とは関連のない変化と判断した。

なお、一般状態で認められた眼球の変色（動物番号 50206）は、病理組織学的には硝子体の器質化としてみられ、修復に至る像であった。



## 8. 考察および結論

人工還元水を 0 および 0.08  $\mu\text{mol/kg}$  の用量で雌雄の Crj:CD(SD)IGS ラットに 26 週間反復経口投与し、明らかな毒性変化を惹起するか否かを検討した。また、13 週間投与で認められた変化の回復性についても検討した。

血液学的検査では、26 週間投与後で平均赤血球容積の低値が雄、活性化部分トロンボプラスチン時間の高値が雌で認められた。しかし、その変動の程度が僅かで、当研究所の背景データ内、あるいはその上限を僅かに越える程度であった（添付資料 10.2）ことから、被験物質と関連のない偶発的な変化と考えられる。なお、13 週間投与後の回復終了後の検査では、プロトロンビン時間の低値が雌でみられたが、13 週間投与後の検査では変化がないことから、偶発的な変化と考えられる。

血液生化学的検査では、13 週間投与後でトリグリセライドの高値が雌雄で認められた。0.08  $\mu\text{mol/kg}$  群のトリグリセライドの値は、雌雄とも対照群に対し約 1.5 倍の高値を示し、その後の回復終了後検査では対照群と同等な数値を示していたことから、被験物質投与の影響が示唆された。しかし、当該群のトリグリセライド値は、当研究所の背景データ内（添付資料 10.3）の変動であったこと、26 週間投与後の検査では有意差はなく、雄では対照群に比べ低値を示しており、一定の傾向は認められなかった。また、高値の要因としては肝臓での合成亢進ならびに腎疾患などが考えられるが、関連する他のパラメータは変動せず、病理組織学的変化も認められていないことから、毒性学的意義に乏しい変化と考えられる。

その他、血液生化学的検査の 13 週間投与後、13 週間投与後の回復終了後および 26 週間投与後の各検査において、いくつかのパラメータに統計学的な変動が認められた。しかし、いずれも当研究所の背景データ内であるか、背景データの上限あるいは下限を僅かに越える程度であったこと（添付資料 10.3, 10.4）、病理組織学的変化が認められていないことから、被験物質と関連のない偶発的な変動と考えられる。

器官重量では、13 週間投与後で脾臓の相対重量の低値、26 週間投与後で脾臓の絶対および相対重量の低値がいずれも雌で認められた。しかし、病理組織学的検査で、脾臓には何ら異常所見は認められなかったこと、雄の脾臓重量に同様な変化がなかったことから、偶発的な変動と考えられる。なお、13 週間投与後では精囊の絶対重量の高値、肝臓の相対重量の高値が雄、心臓の相対重量の低値、副腎の相対重量の高値が雌で認められた。これらの重量変化は、絶対あるいは相対重量の一方のみの変化であること、26 週間投与後では同様の器官に変動がないことから、被験物質に起因した変化ではないと考えられる。

病理組織学的検査では、26 週間投与後解剖動物で 0.08  $\mu\text{mol/kg}$  群の雌に肺血管の鉍質沈着が 3 例認められた。これは対照群の雌ではみられない変化であった。し

かし、ラットでは自然発生的に認められる変化であること、また、対照群の雄でも認められていることから、被験物質に起因する変化ではないと判断した。

その他、一般状態、体重、摂餌量、尿検査、眼科学的検査および病理解剖検査では、被験物質に起因する変化は認められなかった。

以上のように、ヒト適用濃度 100 倍相当量の  $0.08 \mu\text{mol}/\text{kg}$  を投与した結果、いずれの検査においても被験物質に起因すると考えられる毒性変化は認められなかった。よって、本試験条件下における人工還元水の無毒性量は雌雄ともに  $0.08 \mu\text{mol}/\text{kg}$  以上と考えられる。

## 9. 特記事項

### 9.1 予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態

- (1) 空調機工事，誤操作および定期点検に伴う停電による飼育環境の逸脱，ならびに飼育室湿度の許容範囲からの逸脱が以下の通り認められた．

逸脱日	内容
2004年2月28日	空調機の停止 (16:02～16:31)
2004年3月10日	空調機の停止 (1:10～8:04)
2004年7月3日	空調機の停止 (16:39～16:42) 照明の消灯 (16:50～19:00)
2004年7月6日	湿度上昇 Max 75.2% (14:55-14:57)
2004年7月9日	湿度上昇 Max 75.7% (14:37-14:46)

動物の一般状態に異常が認められなかつたことから，試験の評価に影響を及ぼすものではないと判断した．

- (2) MiTOX システム障害のため，2004年4月20日の体重および摂餌量をオフラインにより測定した．システム復帰後データを入力し，正しく入力されていることを確認した．よって，本操作は試験の評価に支障はない．

### 9.2 試験計画書に従わなかつたこと

- (1) 試験計画書では，群分け動物について一般状態および体重に異常のない動物を対象にすると記載しているが，馴化期間中の眼科学的検査の結果から一部の動物を除外した．しかし，不適切な動物を群分けに供さないことは妥当な処置であり，試験の評価に支障はない．

- (2) 試験計画書では投与を 8:00～14:00 の間に実施すると記載されているが，規定時間での投与ができなかつた．

2004年7月26日：他作業に時間を要し，16:30～16:42に全例投与した．

2004年8月5日：尿検査時，対照群の1例（動物番号50115）で14:15まで新鮮尿を採取することができなかつたため14:24に投与した．

26週間の投与期間中，動物の一般状態に異常がないことから，試験の評価に影響を及ぼすものではないと判断した．

- (3) 両側あるいは片側の上皮小体組織が，以下の動物において剖検あるいは標本作製の過程で失われた．

両側上皮小体：10104

片側上皮小体：50108，50109，50209

しかし、両側検査できなかつた個体は対照群の雄1例だけであり、他は片側の検査が可能であつたこと、評価に必要な例数が確保されていることから、試験の評価に影響を及ぼすものではないと判断した。

### 9.3 標準操作手順書に従わなかつたこと

- (1) 尿検査において、標準操作手順書では新鮮尿を絶水状態で採取することになっていたが、対照群の雌1例（動物番号50115）は採取開始から約6時間経過しても尿を得ることができなかつたため、13:00頃より給水瓶を装着し尿を採取した。しかし、本操作は必要以上の絶水による動物への悪影響を避けるための操作であり、試験の評価に影響を及ぼすものではないと判断した。