

Table 30 Hepatic oxidative stress marker - Group mean values in male rats
After 4 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)	No. of animals examined		Lipid peroxide contents (nmol/g tissue)	8-OHdG (ng/mg DNA)
0	10	Mean	579	1.97
		S.D.	189	0.21
8	10	Mean	566	1.80
		S.D.	188	0.14
40	10	Mean	451	2.09
		S.D.	123	0.30
200/100	6	Mean	311 **	2.39
		S.D.	60	0.48

S.D. : Standard deviation.

Significantly different from the control (Dunnett's test following one-way ANOVA or Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test):*, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

Table 31 Hepatic oxidative stress marker - Group mean values in female rats
After 4 weeks of treatment

Dose (mg/kg/day)	No. of animals examined		Lipid peroxide contents (nmol/g tissue)	8-OHdG (ng/mg DNA)
0	10	Mean	231	1.90
		S.D.	78	0.09
8	10	Mean	248	1.75
		S.D.	113	0.11
40	10	Mean	279	1.95
		S.D.	132	0.16
100	9	Mean	274	2.17 *
		S.D.	92	0.24

S.D. : Standard deviation.

Significantly different from the control (Dunnett's test following one-way ANOVA or Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test):*, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
木材防腐剤として使用される化学物質のリスク評価に関する研究

平成 17 年度分担研究報告書

1.1. 銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）のラットにおける
反復経皮投与毒性試験

分担研究者 原田 孝則 （財）残留農薬研究所 毒性部長
協力研究者 高橋 尚史 （財）残留農薬研究所 毒性部病理研究室研究員
高橋 義博 （株）新日本科学 安全性研究所

研究要旨

銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）の反復経皮投与毒性を明らかにするため、雌雄の SD 系ラットを用い、各群 8 匹の動物の背部皮膚に ACQ を 0、10、100 及び 300 mg/kg の用量で毎日 24 時間適用し、13 週間に亘り反復経皮投与する予定で実験が開始された。しかし、100 および 300 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与 5 日以降に適用部位の皮膚状態が悪化し、投与 3 週時には出血あるいは重度のびらん・潰瘍が観察されたため、倫理上（動物愛護）の観点から 4 週時に投与を中止し、試験を終了した。ACQ には主要成分として塩化ベンザルコニウムが含まれており、今年度に並行して実施した皮膚腐食性試験（ヒト皮膚三次元モデル）の結果から、強い皮膚刺激性および腐食性が示唆されたことから、反復投与試験では 100 mg/kg 以下の低い用量で試験群を設定することが適切であると結論された。

A. 研究目的

平成 17 年度では、CCA に代わって現在使用量が多い代表的な木材防腐剤である銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（ACQ）を対象に、ラットを用い反復経皮投与試験を実施した。なお、投与期間は当初の予定では 13 週間であったが、中・高用量群において被験物質適用部位の皮膚の状態が悪化したため、動物愛護の観点から投与 4 週時に投与を中止し、試験を終了した。

B. 研究方法

試験方法は平成元年 9 月 11 日付け薬審 1 第 24 号厚生省薬務局通知「医薬品毒性試験ガイドライン」および平成 5 年 8 月 10 日付け薬新薬第 88 号厚生省薬務局通知「単回及び反復投与毒性試験ガイドラインの改正について」および農薬の毒性試験ガイドライン「12 農産第 8147 号、平成 12 年 11 月 24 日付け」に従い、以下の条件で実施した。

1. 被験物質

本試験の被験物質として、銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (ACQ-1) を使用した。同被験物質の有効成分である銅およびアルキルアンモニウムの各構成成分の配合比は、酸化銅 (Ⅱ価、純度 99.3%、関東化学 (株)) 55.6% およびアルキルアンモニウム (塩化ベンザルコニウム、純度 50%、和光純薬工業 (株) /Avocado Research Chemicals Ltd) 44.4% とした。

受領した被験物質は、被験物質保管所内常温室デシケータ内 (許容温度: 16~24℃) で保管した。

2. 試験動物

日本チャールス・リバー株式会社 (滋賀県) で生産された Sprague-Dawley 系 SPF ラット (Crj: CD (SD) IGS) の雌雄動物を用いた。供試動物は雌雄ともに 5 週齢で購入し、1 週間試験環境に馴化した後、6 週齢にて試験に供試した。馴化期間中毎日一般状態を観察し、この期間中眼科学的検査および詳細な一般状態の観察を実施した。動物は温度 19~25℃、湿度 30~70%、換気回数 15 回/時間 (オールフレッシュエア方式)、照明時間 12 時間/日 (午前 6 時点灯、午後 6 時消灯) に設定された動物飼育室で飼育した。馴化終了後、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雌雄 8 匹ずつ配分し、群分けを実施した。群分け後、各群の動物を 1 匹ずつステンレス鋼製個別ケージ (D 32.5 cm x W 19.5 cm x H 18 cm) に収容した。動物の個体識別は耳パンチ法で行なった。基礎飼料には固形飼料 CE-2 (日本クレア株式会社) を用い、動物に自由に摂取させた。ただし、剖検前日の午後 5 時前後より絶食とした。

飲料水は、水道法水質基準に適合した水を自動給水装置 (Edstrom Industries, Inc.) を用いて自由に摂取させた。

3. 試験群

本試験に先立ち、用量設定のための予備試験を実施した。予備試験では 7 週齢の雌性ラットを用い、0、300 および 1000 mg/kg の 3 用量で、各群 2 匹の動物の背部皮膚に 1 日 24 時間閉鎖貼付し、7 日間に亘り反復経皮投与した。その結果、両投与群では適用部位の皮膚肥厚が認められ、剖検時に 1000 mg/kg 群では胸腺重量の減少と肝・脾の重量増加がみられ、300 mg/kg 群では脾臓の重量が増加した。

上記の予備試験結果を考慮し、本試験の最高用量を 300 mg/kg として設定し、公比 3 倍で中間用量を 100 mg/kg、そして無毒性量としての予想で 10 mg/kg を最低用量として設定した。これらの設定用量群 (0、10、100、および 300 mg/kg の 4 用量) の各用量群につき雌雄とも 8 匹の動物を使用した。

4. 被験物質投与液の調製

各用量 (0、10、100、300 mg/kg) の被験物質投与液を週に 1 回調製した。投与液の調製に際し、成分ごとに純度による調製濃度の換算を実施した。投与容量は 3 mL/kg とした。最初に、所定量の酸化銅 (Ⅱ) および 50% 塩化ベンザルコニウムを秤量し、注射用水 (大塚薬品株式会社) を加え、スターラーで懸濁させた。溶解させた。懸濁後、3.33、33.3 および 100 mg/mL の濃度になるよう注射用水にて定容した。調製はドラフト室にて実施した。各濃度の投与液

は7日間分小分けし、冷蔵・遮光(5℃)条件下にて保存した。投与液は投与直前に室温に戻して使用した。

5. 投与方法および投与期間

投与開始前日に各動物の背部(5 cm x 5 cm)を電気バリカンで剃毛し、適用部位を確保した。投与日には、剃毛部皮膚に各用量群の投与液(対照群は注射用水)を均一に塗布し、塗布部位をパラフィルム及びリント布で覆い、非刺激性テープ(株式会社ジェイ・エム・エス)と粘着性伸縮包帯(ニチバンメディカル株式会社)にて固定し、1日あたり約24時間閉塞適用した。投与は1日1回、週7日間行った。なお、剃毛は原則として週2回行い、その際には塗布部位の皮膚を刺激しないように配慮した。

投与期間は当初13週間を予定していたが、投与3週時に中・高用量群において適用部位の皮膚の状態が潰瘍形成などで悪化したため、投与継続は科学的かつ動物愛護の観点からも不適切と判断され、4週時に投与を中止し、試験を終了した。

6. 動物の観察

全動物について、投与期間中1日2回(投与前に1回、投与後約2時間に1回)以上と剖検日に1回、瀕死状態ないし死亡の有無および一般状態を観察した。

7. 体重

全生存動物について、投与開始時およびその後毎週1回体重を測定した。また、全動物について殺処分前に最終体重を測定した。

8. 摂餌量

全動物について、毎週1回、個体別摂餌量を測定した。各測定値を測定期間中の延べ日数で除し、用量群毎に1日1匹あたりの摂餌量(群別平均摂餌量)を算出した。

9. 眼科学的検査

馴化期間中に1回雌雄の全馴化動物、投与終了時(4週時)に対照群と300 mg/kg投与群の全生存動物について、眼科学的検査を行った。検査には、肉眼(ペンライト使用)およびスリットランプ(コーワSL-14、有限会社幸田電子)により前眼部および中間透光体を観察し、眼底検査については額带式双眼倒像検眼鏡(ID-10、株式会社トプコン)を用いて行った。

10. 尿検査

予定されていたが、試験の中止に伴い日程的な問題で実施しなかった。

11. 血液学的検査

投与終了時(4週時)に各群の生存動物全例について血液学的検査を実施した。検査動物は採血前に一晩絶食させた。動物をペントバルビタールナトリウム(東京化成工業株式会社)水溶液の腹腔内投与による麻酔下で開腹し、凝固検査用に3.8 w/v%クエン酸ナトリウム水溶液添加の注射筒を、その他の検査用に無処理の注射筒を用いて後大静脈より採血した。

血液学的検査は、EDTA処理した血液試料を用いて、以下の項目について総合血液学検査装置アドヴィア120(Bayer Corporation)で測定した。

測定項目(略号):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 (Plat.)、網赤血球数 (Ret.)、白血球数 (WBC) および白血球のディファレンシャルカウント；好中球 (Neutro.)、リンパ球 (Lymph.)、単球 (Mono.)、好酸球 (Eosino.)、好塩基球 (Baso.)、大型非染色球 (LUC)

血液凝固能については、全自動血液凝固測定装置 (CA-5000、シスメックス株式会社) を用いプロトロンビン時間 (PT) および活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を測定した。

12. 血液生化学的検査

前項の血液学的検査で採取した各群の血液試料の血清を用い、以下の項目を JCA-BM8 自動分析装置 (日本電子株式会社) にて測定した。

測定項目 (略号)：アルカリホスファターゼ (ALP)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ASAT)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALAT)、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (G-GTP)、クレアチニン (Creat.)、尿素窒素 (BUN)、総蛋白 (T.Prot.)、アルブミン (Albumin)、グロブリン (Globlin)、アルブミン/グロブリン比 (A/G)、血糖 (Glucose)、総コレステロール (T.Chol.)、トリグリセライド (TGL)、総ビリルビン (T.Bil.)、カルシウム (Ca)、無機リン (IP)、ナトリウム (Na)、カリウム (K) および塩素 (Cl)

13. 剖検および組織採取

全動物について剖検を実施した。ペントバルビタールナトリウム水溶液の腹腔内投

与による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、眼球及び視神経はホルムアルデヒド・グルタールアルデヒド混合液で、精巣はブアン液で固定した。

採取した臓器及び組織：脳 (大脳、小脳、橋および延髄)、脊髄 (胸部)、坐骨神経 (両側)、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、両側大腿骨)、顎下リンパ節 (両側)、腸間膜リンパ節、心臓、大動脈 (胸部)、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、舌、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、精囊 (両側)、卵巣 (両側)、子宮、膈、涙腺 (両側)、眼球 (視神経を含む、両側)、ハーダー腺 (両側)、大腿四頭筋 (両側)、乳腺および皮膚 (乳頭を含む)、投与部位 (背部皮膚) および肉眼的異常部位

14. 臓器重量

全動物について、剖検後、以下の臓器の固定前の重量 (絶対重量) を測定し、最終体重から比体重値 (相対重量) を算出した。測定臓器：脳、下垂体、胸腺、甲状腺 (上皮小体を含む、両側)、心臓、肺、肝臓、腎臓 (両側)、脾臓、副腎 (両側)、唾液腺 (両側の顎下腺・舌下腺を合わせたもの)、精巣 (両側)、精巣上体 (両側)、前立腺、精囊 (両側)、卵巣 (両側)、子宮

15. 病理組織標本作製

供試動物全例から採取した以下に示す臓器・組織を対象にして病理組織標本作製した。標本は常法に従ってパラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。

組織標本対象臓器・組織：脳（大脳、小脳、橋および延髄）、脊髄（胸部）、坐骨神経（左側）、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、左側大腿骨）、顎下リンパ節（左側）、腸間膜リンパ節、心臓、大動脈（胸部）、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、舌、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、精嚢（左側）、卵巣（両側）、子宮、膣、涙腺（両側）、眼球（視神経を含む、両側）、ハーダー腺（両側）、大腿四頭筋（左側）、皮膚（左胸部）、乳腺（雌のみ）、投与部位（背部皮膚）および肉眼的異常部位

なお、上記の臓器・組織の病理組織学的検査は今年度中に完了出来なかったため、次年度に報告予定。

16. 肝機能検査のための組織採取

供試動物全例から肝臓の左葉を採取し、超低温フリーザー（-70℃以下）で保管し、将来の検索に備えた。

19. 有意差検定

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、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、先ず Bartlett の等分散検定を行ったその後、等分散の場合には、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、Dunnnett の多重比較法により対照群と各投与群間における有意差の有無を判定した。一方、等分散ではない場合には、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、Dunnnett 型の多重比較法を用いて平均順位の有義差の有無を判定した。これらの検定および計算には MUSCOT 統計解析ソフトウェア(ユックムス株式会社) を使用して行った。一般状態（臨床症状）、眼検査および剖検所見については統計検定を実施しなかった。

C. 研究結果

1. 臨床症状および死亡率（表1、2）

300 および 100 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与5日あるいは6日以降に適用部の皮膚が肥厚し、その状態は日々悪化し、投与3週時には重度のびらん・潰瘍あるいは出血がみられたため、投与の継続が不能と判断し、加えて、倫理的観点（動物愛護）から投与を中止し、投与4週時に試験を終了するに至った。

10 mg/kg 投与群では、投与3週時に雄1例および雌3例の適用部位に軽度の痂皮形成が認められた。

2. 体重変化（表3・6）

300 および 100 mg/kg 投与群では、雄において体重増加抑制が認められ、対照群に比べ

15%前後の低値を示したが、雌では特に異常はなかった。

10 mg/kg 投与群では、雌雄とも対照群と比べ投与期間中の体重変化に差はなかった。

3. その他の検査項目

その他の検査項目については、眼検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、臓器重量、病理組織学的検査を含め、検索中あるいはデータの取りまとめ中につき、次年度の最終評価時に報告する。

D. 考察

木材防腐剤として使用される化学物質のリスク評価を行うことを目的に、平成 17 年度では、CCA に代わり現在使用量が多い、銅・アリキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (ACQ) を対象に、ラットの反復経皮投与毒性試験を実施した。本研究では、ACQ を 0、10、100 および 300 mg/kg の用量で SD 系ラットの雌性動物の背部皮膚に毎日 24 時間、13 週間に亘り反復投与し、臨床症状、死亡率、眼検査、尿検査、血液・生化学検査、病理検査を含む諸検査を実施する予定であった。しかしながら、100 および 300 mg/kg 投与群において適用部位の皮膚の状態が悪化し、投与 3 週時には出血あるいは重度のびらん・潰瘍が観察されたため、科学的かつ倫理的に投与の継続は不可能と判断し、投与 4 週時に投与を中止し、試験を終了した。

以上の結果から、ACQ の反復経皮投与試験では 100 mg/kg 以上の用量は不適切であると判断された。本剤は主要成分として塩化ベンザルコニウムが含まれており、本試験と同時に並行して実施されたヒト皮膚三次元モデルを用いた腐食性試験（本報告書の分担

研究報告 7 を参照）において強い刺激性あるいは腐食性が確認されていることから、経皮経路での反復投与毒性試験には 100 mg/kg 以下の低用量が適切であると結論された。

E. 結論

本実験条件下では、ACQ をラットに反復経皮投与する場合、本剤の皮膚刺激性・腐食性を考慮し、100 mg/kg 以下の用量設定で実施するのが適切であると結論された。

F. 引用文献

- 1) 日本工業規格：木材防腐剤に関する基準 JIS K 1570、2004.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Table 1-1
Progress Clinical signs in male rats (Administration site)

Group	Anim.no.	Item	Day of administration (Before administration)																				
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Water for injection	1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACQ 10 (mg/kg)	17	Crust	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	18		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	19		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	22		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	23		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACQ 100 (mg/kg)	33	Thickening	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Loss	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Ulcer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	34	Thickening	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	35	Thickening	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Loss	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Ulcer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	36	Thickening	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Loss	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Ulcer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	Thickening	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Loss	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Ulcer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
38	Thickening	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Loss	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Ulcer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
39	Thickening	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Loss	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Ulcer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
40	Thickening	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Loss	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Ulcer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

- : No abnormal signs, + : Non-graded signs

Table 1-2

Progress Clinical signs in male rats (Administration site)

Group	Anim.no.	Item	Day of administration (Before administration)																					
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
ACQ 300 (mg/kg)	49	Thickening	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50		Thickening	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		Loss	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51		Ulcer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Thickening	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
52		Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Thickening	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
53		Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Thickening	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
54		Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Thickening	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
55		Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Thickening	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
56		Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Thickening	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : No abnormal signs, + : Non-graded signs

Table 2-1
 Progress Clinical signs in female rats (Administration site)

Group	Andm.no.	Item	Day of administration (Before administration)																				
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Water for injection	9		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACQ 10 (mg/kg)	16		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	Crust	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	26		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	27	Crust	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	28		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	29		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACQ 10 (mg/kg)	31		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	32	Crust	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

- : No abnormal signs, + : Non-graded signs

Table 2-2
Progress Clinical signs in female rats (Administration site)

Group	Anlm.no.	Item	Day of administration (Before administration)																					
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
ACQ 100 (mg/kg)	41	Thickening	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Loss	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	Ulcer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Thickening	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
43	Loss	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Ulcer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Thickening	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
44	Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Loss	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Ulcer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
45	Thickening	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Loss	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
46	Ulcer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Thickening	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
47	Loss	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Ulcer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Thickening	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
48	Loss	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Ulcer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Thickening	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Loss	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Ulcer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

- : No abnormal signs, + : Non-graded signs

Table 2-3
Progress Clinical signs in female rats (Administration site)

Group	Anim.no.	Item	Day of administration (Before administration)																					
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
ACQ 300 (mg/kg)	57	Thickening	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58		Thickening	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		Loss	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59		Ulcer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Thickening	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60		Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Thickening	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
61		Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Thickening	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
62		Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Loss	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63		Ulcer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Thickening	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
64		Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Thickening	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : No abnormal signs, + : Non-graded signs

Table 3
Progress Body weights (g) in male rats

Group	Animal No.\Day	Pre	6	13	19
Water for injection					
	1	187	207	228	254
	2	196	248	285	309
	3	191	230	279	296
	4	195	232	276	303
	5	191	238	287	311
	6	194	223	250	256
	7	199	241	277	298
	8	197	211	252	269
	Mean	193.8	228.8	266.8	287.0
	±S.D.	3.9	14.3	21.0	23.6
ACQ 10 (mg/kg)					
	17	197	245	277	287
	18	201	227	267	281
	19	191	224	241	259
	20	189	212	243	262
	21	192	221	256	289
	22	196	223	257	279
	23	191	228	259	279
	24	195	234	273	283
	Mean	194.0	226.8	259.1	277.4
	±S.D.	4.0	9.7	13.0	11.0
ACQ 100 (mg/kg)					
	33	189	198	233	235
	34	196	205	232	226
	35	194	208	242	257
	36	198	212	239	246
	37	201	204	231	245
	38	195	190	214	223
	39	191	186	221	230
	40	190	209	237	232
	Mean	194.3	201.5	231.1	236.8
	±S.D.	4.1	9.4	9.4	11.6
ACQ 300 (mg/kg)					
	49	191	201	225	225
	50	188	204	227	242
	51	200	200	235	237
	52	195	212	234	250
	53	198	211	253	264
	54	194	194	230	240
	55	191	197	233	250
	56	195	196	231	235
	Mean	194.0	201.9	233.5	242.9
	±S.D.	3.9	6.7	8.6	11.8

Table 4
 Progress Body weights (g) in female rats

Group	Animal No.\Day	Pre	6	13	19
Water for injection					
	9	159	171	191	209
	10	146	152	174	187
	11	152	153	175	191
	12	140	160	179	184
	13	157	166	164	187
	14	149	171	187	196
	15	143	163	178	196
	16	147	142	154	160
	Mean	149.1	159.8	175.3	188.8
	±S.D.	6.6	10.2	11.9	14.0
ACQ 10 (mg/kg)					
	25	153	170	194	199
	26	146	169	177	189
	27	148	152	184	192
	28	147	166	182	195
	29	141	158	167	185
	30	157	168	194	209
	31	150	163	181	196
	32	159	173	188	197
	Mean	150.1	164.9	183.4	195.3
	±S.D.	6.0	6.9	9.0	7.2
ACQ 100 (mg/kg)					
	41	157	167	179	194
	42	146	142	177	187
	43	147	152	172	186
	44	159	167	184	202
	45	143	136	161	169
	46	148	154	177	193
	47	140	143	162	177
	48	152	154	169	183
	Mean	149.0	151.9	172.6	186.4
	±S.D.	6.6	11.3	8.2	10.3
ACQ 300 (mg/kg)					
	57	145	154	166	177
	58	151	155	177	187
	59	155	170	175	205
	60	147	156	179	203
	61	142	154	179	190
	62	146	151	179	197
	63	151	155	181	200
	64	158	163	180	200
	Mean	149.4	157.3	177.0	194.9
	±S.D.	5.4	6.2	4.8	9.5

Table 5

Progress Body weight gain (g) in male rats

Study No. : SBE101-001-10

Group	Animal No. \ Day	6	13	19
Water for injection l	20	21	26	
	21	27	24	
	22	37	17	
	23	39	44	
	24	37	44	
	25	47	49	
	26	29	27	
	27	42	36	
28	14	41		
Mean	35.0	38.0	20.3	
±S.D.	13.1	10.0	6.9	
ACQ 10 (mg/kg)	17	48	32	10
	18	26	40	14
	19	33	17	18
	20	23	31	19
	21	29	35	33
	22	27	34	22
	23	37	31	20
	24	39	39	10
Mean	32.8	32.4	18.3	
±S.D.	8.3	7.1	7.5	
ACQ 100 (mg/kg)	33	9	35	2
	34	9	27	-6
	35	14	34	15
	36	14	27	7
	37	3	27	14
	38	-5	24	9
	39	-5	35	9
	40	19	28	-5
Mean	7.3	29.6	5.6	
±S.D.	8.9	4.3	8.0	
ACQ 300 (mg/kg)	49	10	24	0
	50	16	23	15
	51	0	35	2
	52	17	22	16
	53	13	42	11
	54	0	36	10
	55	6	36	17
	56	1	35	4
Mean	7.9	31.6	9.4	
±S.D.	7.1	7.5	6.6	

Table 6
Progress Body weight gain (g) in female rats

Group	Animal No.	Day	6	13	19
Water for injection	9	12	20	18	18
	10	6	22	13	13
	11	1	22	16	16
	12	20	19	5	5
	13	9	-2	23	23
	14	22	16	9	9
	15	20	15	18	18
	16	-5	12	6	6
	Mean	10.6	15.5	13.5	
	±S.D.	9.8	7.9	6.4	
ACQ 10 (mg/kg)	25	17	24	5	5
	26	23	8	12	12
	27	4	32	8	8
	28	19	16	13	13
	29	17	9	18	18
	30	11	26	15	15
	31	13	18	15	15
	32	14	15	9	9
	Mean	14.8	18.5	11.9	
	±S.D.	5.7	8.3	4.3	
ACQ 100 (mg/kg)	41	10	12	15	15
	42	-4	35	10	10
	43	5	20	14	14
	44	8	17	18	18
	45	-7	25	8	8
	46	6	23	16	16
	47	3	19	15	15
	48	2	15	14	14
	Mean	2.9	20.8	13.8	
	±S.D.	5.8	7.1	3.2	
ACQ 300 (mg/kg)	57	9	12	11	11
	58	4	22	10	10
	59	15	5	30	30
	60	9	23	24	24
	61	12	25	11	11
	62	5	28	18	18
	63	4	26	19	19
	64	5	17	20	20
	Mean	7.9	19.8	17.9	
	±S.D.	4.1	7.9	7.0	