

## Ⅱ．分担研究報告書

### (6)原因物質と推定されるプベルル酸等の毒性に関する研究

#### (6-1)ラットを用いたプベルル酸等の毒性試験

研究分担者 平林 容子

## 令和6年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

### 食品を介したダイオキシン類等有害物質摂取量の評価と その手法開発のための研究

#### 分担研究報告書

#### (6)原因物質と推定されるプベルル酸等の毒性に関する研究 (6-1)ラットを用いたプベルル酸等の毒性試験

研究分担者 平林容子 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター

#### 研究要旨

紅麹菌を用いて製造されたいわゆる健康食品による腎障害等の健康被害を起こした事例について、その原因物質および発生機序の解明を目的に、原因物質の一つとされるプベルル酸及び新たに構造解析された2化合物を用いてラットによる毒性試験を実施した。プベルル酸については28日間反復経口投与した結果、腎臓と腺胃に毒性影響が確認された。腎臓では、尿糖増加やクレアチニン値の上昇、組織の壊死や炎症が確認され、一部では線維化に移行する可能性も示唆された。一方、腺胃の変化は回復性を示した。この結果から、本試験条件下におけるラットに対するプベルル酸の無毒性量は1 mg/kg/日と判断された。新たに特定された化合物Y及びZについては、7日間反復経口投与試験を実施したが、これらの化合物による毒性影響は認められなかった。

#### 研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所

出水 庸介、豊田 武士、杉山 圭一、花尻（木倉）瑠理

化合物に関する毒性研究を早期に行うことが求められている。

#### B. 研究方法

##### A. 研究目的

紅麹菌を用いて製造されたいわゆる健康食品によって腎障害等の健康被害が生じた事例について、紅麹菌を用いて製造されたいわゆる健康食品全体に対する不安が募っており、一刻も早い原因物質の特定、発生機序の解明が求められている。また、原因物質の一つとされるプベルル酸及び新たに構造解析された2

##### 1. ラットを用いたプベルル酸の28日間反復経口投与毒性試験

紅麹に由来するいわゆる健康食品による健康被害の原因究明を目的とし、プベルル酸（Puberulic acid; CAS no. 99-23-0）の毒性影響について検討した。6週齢の雌雄CrI:CD(SD)ラットに、0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁したプベルル酸（国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部にて合成; Lot no. 20240707、純度98.5%）を、雄には0, 1, 3及

び 10 mg/kg、雌には 0, 0.3, 1 及び 3 mg/kg の用量で 28 日間強制経口投与した (各群 5 匹)。投与量は、先行して実施された 7 日間反復経口投与毒性試験の結果に基づいて設定した。対照群及び高用量群については、投与終了時剖検群 (主群) に加え、14 日間の回復期間を置く群 (回復群) を設定し、毒性影響の回復性を併せて検討した。一般状態観察、体重及び摂餌量測定、尿検査 (新鮮尿)、血液学的検査、血清生化学検査、肉眼的病理学検査、器官重量測定及び腎臓を含む全身諸臓器の病理組織学的検査を実施した。

## 2. ラットを用いた化合物 Y 及び Z の 7 日間反復経口投与毒性試験

化合物 Y 及び Z (compound 2 and 1, respectively, in J Nat Med. 2024. 78:845-8. doi: 10.1007/s11418-024-01827-w.) の毒性影響について検討するため、6 週齢の雌雄 Crl:CD(SD)ラットに、コーン油に懸濁した化合物 Y (Axcelead Drug Discovery Partners; Lot no. N01414-28-001、純度 99%) 及び Z (同; Lot no. N01414-24-001、純度 96.1%) をそれぞれ 0.17 mg/kg、0.25 mg/kg の用量で 7 日間強制経口投与した (各群 5 匹)。投与量は、健康被害の原因とされる当該健康食品の 1 日当たり摂取量の 100 倍をヒトが摂取した際の、化合物 Y 及び Z の推定摂取量として設定した。一般状態観察、体重及び摂餌量測定、尿検査 (新鮮尿及び蓄尿)、血液学的検査、血清生化学検査、肉眼的病理学検査、器官重量測定及び腎臓を含む全身諸臓器の病理組織学的検査を実施した。

## C. 研究結果及び考察

### 1. ラットを用いたプベルル酸の 28 日間反復経口投与毒性試験

プベルル酸を雌雄の SD ラットに 28 日間反復経口投与した結果、主群において腎臓及び腺胃に毒性影響が認められた。腎臓に対する

毒性影響として、尿検査 (新鮮尿) における尿糖の増加及び血清生化学検査におけるクレアチニンの高値が雄の 10 mg/kg 群に (Tables 1~2)、肉眼的病理学検査における腎臓の退色並びに病理組織学的検査における腎臓の近位尿細管の空胞化、壊死及び再生が雄の 10 mg/kg 群及び雌の 3 mg/kg 群に認められ、さらに雄の 10 mg/kg 群では病理組織学的検査において間質の炎症細胞浸潤がみられた (Tables 3~4; Figure 1)。また腺胃に対する毒性影響として、病理組織学的検査における腺胃粘膜のアポトーシス及び慢性過形成が雄の 3 及び 10 mg/kg 群並びに雌の 3 mg/kg 群に認められた (Tables 4; Figure 2)。以上の結果から、本試験条件下における、ラットに対するプベルル酸の無毒性量は雌雄ともに 1 mg/kg/day と判断した。

回復群では、雄の 10 mg/kg 群の 1 例の腎臓に肉眼的病理学検査において変色巣が認められ、病理組織学的検査においては限局性の間質の線維化、再生尿細管並びに腎乳頭における鉍質沈着及び集合管の拡張が認められた (Table 5)。同個体の腎臓の他の部位に異常は認められず、また同群の他の 4 例及び雌の 3 mg/kg 群の全例の腎臓にも異常は観察されなかった。主群における腎臓の病理所見は、雄の 10 mg/kg 群及び雌の 3 mg/kg 群の全例に認められたことから、プベルル酸の腎毒性は回復性を有するものと総合的には判断されたものの、重篤な障害が生じた場合には線維化を含む慢性病変に移行する可能性も同時に示唆された。腺胃の変化は回復期間終了時には観察されず、回復性を示すと考えられた。

結果の詳細は、資料として添付した資料 1 を参照のこと。

### 2. ラットを用いた化合物 Y 及び Z の 7 日間反復経口投与毒性試験

化合物 Y 及び Z を雌雄の SD ラットに 7 日間反復経口投与した結果、一般状態、体重、摂餌量及び器官重量に被験物質投与による影響

は認められなかった。

尿検査（蓄尿）、血液学的検査及び血清生化学検査では、被験物質投与群において種々のパラメータの有意な変動が認められたが

（Tables 6~8）、尿検査における電解質の変動については、血清中濃度及び腎臓の病理組織学的検査における変化を伴わないことから、毒性学的意義に乏しい偶発的な変動と判断した。血液学的検査における白血球系パラメータの変動については、病理組織学的検査において検索した全ての臓器に炎症性病変はみられず、リンパ系・造血器系器官においても関連する病理学的変化は認められないことから、毒性学的意義に乏しい偶発的な変動と判断した。また、血清生化学検査における複数のパラメータの変動についても、関連する病理組織学的変化を伴わないことから、毒性学的意義に乏しい偶発的な変動と判断した。

病理組織学的検査では、空腸、甲状腺及び下垂体における所見が対照群を含む各群に散発的に認められたが（Table 9）、いずれもラットに自然発生することが知られる変化であり、偶発的な所見と判断した。腎臓を含む他の臓器に、病理組織学的変化は認められなかった。

結果の詳細は、資料として添付した資料2を参照のこと。

## D. 結論

### 1. ラットを用いたプベルル酸の28日間反復経口投与毒性試験

プベルル酸を雌雄SDラットに28日間反復経口投与した結果、腎臓及び腺胃に毒性影響が認められた。本試験条件下における、ラットに対するプベルル酸の無毒性量は雌雄ともに1 mg/kg/day と判断された。

### 2. ラットを用いた化合物 Y 及び Z の7日間反復経口投与毒性試験

化合物 Y 及び Z を雌雄 SD ラットに7日間

反復経口投与した結果、本試験条件下においては、いずれの検査項目にも被験物質投与による毒性影響は認められなかった。

## E. 参考文献

該当無し

## F. 研究業績

### 1. 論文発表

- 1) Matsushita K, Tsuji G, Akane H, Ishii Y, Takasu S, Ogawa K, Ito T, Yokoo H, Sennari G, Iwatsuki M, Hirose T, Hanaki H, Demizu Y, Hirabayashi Y, Saito Y, Honma M, Toyoda T: A 28-day subacute toxicity study of puberulic acid in Crl:CD(SD) rats. J Toxicol Pathol, in press

### 2. 学会発表

- 1) 松下幸平, 辻巖一郎, 赤根弘敏, 石井雄二, 高須伸二, 小川久美子, 伊藤貴仁, 横尾英知, 出水庸介, 平林容子, 齋藤嘉朗, 本間正充, 豊田武士: プベルル酸のラットを用いた28日間反復経口投与毒性試験. 第52回日本毒性学会学術年会(2025.7)

**Table 1. Urinalysis data for male and female Crl:CD(SD) rats treated with puberulic acid**

| Dose (mg/kg/day) |     | 0 | 1   | 3 | 10 |
|------------------|-----|---|-----|---|----|
| Males            |     |   |     |   |    |
| No. of animals   |     | 5 | 5   | 5 | 5  |
| Protein          | -   | 0 | 0   | 0 | 0  |
|                  | ±   | 0 | 0   | 0 | 1  |
|                  | 1+  | 5 | 4   | 5 | 1  |
|                  | 2+  | 0 | 1   | 0 | 3  |
| Glucose          | -   | 5 | 5   | 5 | 4  |
|                  | ±   | 0 | 0   | 0 | 0  |
|                  | 1+  | 0 | 0   | 0 | 1  |
| Occult blood     | -   | 5 | 5   | 5 | 5  |
| Ketone body      | -   | 3 | 3   | 3 | 3  |
|                  | ±   | 2 | 1   | 1 | 1  |
|                  | 1+  | 0 | 1   | 1 | 1  |
| Urobilinogen     | 0.1 | 5 | 4   | 5 | 3  |
|                  | 1+  | 0 | 1   | 0 | 2  |
| Bilirubin        | -   | 5 | 5   | 5 | 5  |
| pH               | 7.5 | 0 | 0   | 0 | 1  |
|                  | 8.0 | 3 | 3   | 3 | 2  |
|                  | 8.5 | 2 | 2   | 2 | 2  |
| Dose (mg/kg/day) |     | 0 | 0.3 | 1 | 3  |
| Females          |     |   |     |   |    |
| No. of animals   |     | 5 | 5   | 5 | 5  |
| Protein          | -   | 0 | 2   | 2 | 2  |
|                  | ±   | 2 | 0   | 1 | 1  |
|                  | 1+  | 1 | 1   | 2 | 2  |
|                  | 2+  | 2 | 2   | 0 | 0  |
| Glucose          | -   | 5 | 5   | 5 | 5  |
| Occult blood     | -   | 5 | 5   | 5 | 5  |
| Ketone body      | -   | 3 | 3   | 5 | 5  |
|                  | ±   | 2 | 2   | 0 | 0  |
| Urobilinogen     | 0.1 | 4 | 3   | 5 | 5  |
|                  | 1+  | 1 | 2   | 0 | 0  |
|                  | 2+  | 0 | 0   | 0 | 0  |
| Bilirubin        | -   | 5 | 5   | 5 | 5  |
| pH               | 6.5 | 0 | 0   | 0 | 0  |
|                  | 7.0 | 0 | 0   | 0 | 0  |
|                  | 7.5 | 0 | 0   | 0 | 0  |
|                  | 8.0 | 2 | 2   | 2 | 4  |
|                  | 8.5 | 3 | 3   | 3 | 1  |

Values are number of animals.

**Table 2. Serum biochemistry data for male and female Crl:CD(SD) rats treated with puberulic acid for 28 days**

| Dose (mg/kg/day) |         | 0            | 1             | 3             | 10            |
|------------------|---------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| Males            |         |              |               |               |               |
| No. of animals   |         | 5            | 5             | 5             | 5             |
| TP               | (g/dL)  | 6.00 ± 0.27  | 5.76 ± 0.26   | 5.76 ± 0.18   | 5.88 ± 0.33   |
| A/G              |         | 2.36 ± 0.30  | 2.56 ± 0.22   | 2.52 ± 0.24   | 2.50 ± 0.26   |
| ALB              | (g/dL)  | 4.20 ± 0.20  | 4.14 ± 0.13   | 4.12 ± 0.15   | 4.20 ± 0.21   |
| T-BIL            | (mg/dL) | 0.06 ± 0.01  | 0.06 ± 0.00   | 0.06 ± 0.01   | 0.05 ± 0.01   |
| GLU              | (mg/dL) | 102.6 ± 10.1 | 116.4 ± 21.1  | 109.8 ± 20.1  | 103.8 ± 17.3  |
| TG               | (mg/dL) | 47.2 ± 11.3  | 51.2 ± 18.3   | 75.6 ± 14.8*  | 57.6 ± 20.2   |
| T-CHO            | (mg/dL) | 61.2 ± 7.6   | 57.6 ± 11.1   | 61.2 ± 6.1    | 64.4 ± 20.5   |
| BUN              | (mg/dL) | 12.1 ± 0.7   | 12.1 ± 1.1    | 11.6 ± 1.4    | 12.9 ± 2.6    |
| CRE              | (mg/dL) | 0.29 ± 0.02  | 0.31 ± 0.04   | 0.29 ± 0.03   | 0.39 ± 0.08** |
| Na               | (mEq/L) | 143.0 ± 0.7  | 142.2 ± 1.1   | 141.4 ± 0.5*  | 141.4 ± 1.1*  |
| Cl               | (mEq/L) | 102.0 ± 2.0  | 103.8 ± 1.3   | 102.8 ± 1.3   | 103.4 ± 1.7   |
| K                | (mEq/L) | 4.94 ± 0.29  | 4.86 ± 0.27   | 4.96 ± 0.17   | 4.72 ± 0.24   |
| Ca               | (mg/dL) | 10.26 ± 0.18 | 10.02 ± 0.30  | 10.12 ± 0.30  | 10.20 ± 0.40  |
| IP               | (mg/dL) | 9.12 ± 0.68  | 8.24 ± 0.26*  | 8.12 ± 0.43*  | 9.04 ± 0.61   |
| AST              | (IU/L)  | 131.2 ± 17.7 | 114.6 ± 20.6  | 107.6 ± 14.5  | 110.0 ± 13.6  |
| ALT              | (IU/L)  | 34.4 ± 5.1   | 33.4 ± 6.8    | 33.0 ± 3.0    | 34.2 ± 3.6    |
| ALP              | (IU/L)  | 205.2 ± 58.9 | 215.6 ± 40.5  | 215.2 ± 54.7  | 244.4 ± 46.2  |
| γ-GTP            | (IU/L)  | <3           | <3            | <3            | <3            |
| Dose (mg/kg/day) |         | 0            | 0.3           | 1             | 3             |
| Females          |         |              |               |               |               |
| No. of animals   |         | 5            | 5             | 5             | 5             |
| TP               | (g/dL)  | 6.28 ± 0.41  | 6.16 ± 0.21   | 6.30 ± 0.37   | 6.40 ± 0.41   |
| A/G              |         | 2.72 ± 0.35  | 3.28 ± 0.19*  | 2.68 ± 0.24   | 2.98 ± 0.28   |
| ALB              | (g/dL)  | 4.58 ± 0.18  | 4.72 ± 0.19   | 4.58 ± 0.33   | 4.78 ± 0.29   |
| T-BIL            | (mg/dL) | 0.09 ± 0.01  | 0.09 ± 0.00   | 0.09 ± 0.02   | 0.08 ± 0.02   |
| GLU              | (mg/dL) | 90.4 ± 21.5  | 95.0 ± 18.4   | 91.4 ± 15.8   | 106.0 ± 18.3  |
| TG               | (mg/dL) | 26.4 ± 19.1  | 31.0 ± 11.6   | 22.4 ± 10.5   | 35.8 ± 19.8   |
| T-CHO            | (mg/dL) | 70.6 ± 2.7   | 84.0 ± 15.7   | 66.8 ± 8.9    | 73.0 ± 7.9    |
| BUN              | (mg/dL) | 15.5 ± 2.3   | 14.7 ± 2.9    | 14.0 ± 1.6    | 15.8 ± 2.9    |
| CRE              | (mg/dL) | 0.35 ± 0.05  | 0.34 ± 0.03   | 0.34 ± 0.01   | 0.43 ± 0.12   |
| Na               | (mEq/L) | 137.4 ± 0.9  | 138.6 ± 1.1   | 138.4 ± 1.1   | 138.6 ± 0.5   |
| Cl               | (mEq/L) | 101.6 ± 0.9  | 104.0 ± 0.7** | 104.0 ± 1.2** | 103.8 ± 1.3*  |
| K                | (mEq/L) | 4.60 ± 0.25  | 4.64 ± 0.26   | 4.62 ± 0.11   | 4.58 ± 0.27   |
| Ca               | (mg/dL) | 10.02 ± 0.15 | 10.08 ± 0.13  | 10.02 ± 0.36  | 10.22 ± 0.25  |
| IP               | (mg/dL) | 7.20 ± 0.73  | 7.00 ± 0.67   | 7.22 ± 0.04   | 7.38 ± 0.44   |
| AST              | (IU/L)  | 111.4 ± 7.2  | 103.6 ± 14.1  | 110.0 ± 12.0  | 99.0 ± 8.8    |
| ALT              | (IU/L)  | 24.8 ± 4.2   | 25.8 ± 3.7    | 26.8 ± 6.6    | 27.4 ± 5.3    |
| ALP              | (IU/L)  | 114.8 ± 31.5 | 135.0 ± 31.0  | 140.4 ± 28.0  | 120.2 ± 33.6  |
| γ-GTP            | (IU/L)  | <3           | <3            | <3            | <3            |

Values are means ± SDs.

\*, \*\*: Significantly different from the corresponding controls at  $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

**Table 3. Macroscopic findings for male and female Crl:CD(SD) rats treated with puberulic acid for 28 days**

|         |                                   | Dose (mg/kg/day) | 0 | 1   | 3 | 10 |
|---------|-----------------------------------|------------------|---|-----|---|----|
| Males   |                                   | No. of animals   | 5 | 5   | 5 | 5  |
| Organs  | Findings                          |                  |   |     |   |    |
| Kidney  | Discoloration, pale, bilateral    |                  | - | -   | - | 2  |
|         | Discolored foci, pale, unilateral |                  | - | -   | - | -  |
| Jejunum | Diverticulum                      |                  | 1 | -   | 1 | -  |
|         |                                   | Dose (mg/kg/day) | 0 | 0.3 | 1 | 3  |
| Females |                                   | No. of animals   | 5 | 5   | 5 | 5  |
| Organs  | Findings                          |                  |   |     |   |    |
| Kidney  | Discoloration, pale, bilateral    |                  | - | -   | - | 1  |

Values are number of animals.

-: Not detected.

**Table 4. Histopathological findings for male and female Crl:CD(SD) rats treated with puberulic acid for 28 days**

|            |                                                     | Males            |   |                |           | Females |   |     |           |   |
|------------|-----------------------------------------------------|------------------|---|----------------|-----------|---------|---|-----|-----------|---|
|            |                                                     | Dose (mg/kg/day) | 0 | 1              | 3         | 10      | 0 | 0.3 | 1         | 3 |
|            |                                                     | No. of animals   | 5 | 5              | 5         | 5       | 5 | 5   | 5         | 5 |
| Organs     | Findings                                            |                  |   |                |           |         |   |     |           |   |
| Kidney     | Vacuolation, tubule, proximal (±/+)                 | -                | - | -              | 5** (3/2) | -       | - | -   | 5** (4/1) |   |
|            | Necrosis, tubule, proximal (±/+)                    | -                | - | -              | 5** (3/2) | -       | - | -   | 5** (4/1) |   |
|            | Regeneration, tubule, proximal (+/++)               | -                | - | -              | 5** (3/2) | -       | - | -   | 5** (4/1) |   |
|            | Infiltration, interstitium (±)                      | -                | - | -              | 1         | -       | - | -   | -         |   |
| Stomach    | Apoptosis, mucosa, glandular stomach (±/+)          | -                | - | 4* (3/1)       | 5** (2/3) | -       | - | -   | 4* (3/1)  |   |
|            | Hyperplasia, diffuse, mucosa, glandular stomach (±) | -                | - | 1              | 4*        | -       | - | -   | 2         |   |
| Jejunum    | Diverticulum (P)                                    | 1                | N | 1 <sup>a</sup> | -         | -       | N | N   | -         |   |
| Lung       | Aggregation, macrophage, alveoli (±)                | -                | N | N              | -         | 1       | N | N   | -         |   |
|            | Inflammation, focal (±)                             | 1                | N | N              | 2         | 1       | N | N   | -         |   |
| Thyroid    | Ectopic tissue, thymus (P)                          | 2                | N | N              | 2         | 1       | N | N   | -         |   |
|            | Ultimobranchial cyst (P)                            | 3                | N | N              | 2         | 2       | N | N   | 2         |   |
| Epididymis | Sperm granuloma (P)                                 | -                | N | N              | 1         | N       | N | N   | N         |   |
| Pituitary  | Aberrant craniopharyngeal structures (P)            | -                | N | N              | -         | 1       | N | N   | -         |   |
| Eye        | Retinal rosettes, unilateral (±)                    | 1                | N | N              | -         | -       | N | N   | -         |   |
| Liver      | Necrosis, hepatocytes, focal (±)                    | 1                | N | N              | 1         | 2       | N | N   | 2         |   |

Values are number of animals.

-: Not detected, ±: Minimal, +: Mild, ++: Moderate, +++: Severe, P: Present, N: Not examined.

\*: \*: Significantly different from the corresponding controls at  $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

<sup>a</sup>: The jejunum of one animal in the male 3 mg/kg group was examined histopathologically since a diverticulum was detected at necropsy.

**Table 5. Histopathological findings for male and female Crl:CD(SD) rats of the recovery group**

|                  |                                                | Males |    | Females |   |
|------------------|------------------------------------------------|-------|----|---------|---|
| Dose (mg/kg/day) |                                                | 0     | 10 | 0       | 3 |
| No. of animals   |                                                | 5     | 5  | 5       | 5 |
| Organs           | Findings                                       |       |    |         |   |
| Kidney           | Fibrosis, interstitial, focal (++)             | -     | 1  | -       | - |
|                  | Regeneration, tubule, proximal (±)             | -     | 1  | -       | - |
|                  | Mineralization, renal papilla (±)              | -     | 1  | -       | - |
|                  | Dilatation, collecting duct, renal papilla (±) | -     | 1  | -       | - |

Values are number of animals.

-: Not detected, ±: Minimal, +: Mild, ++: Moderate, +++: Severe.

**Table 6. Urinalysis data in cumulative urine for male and female Crl:CD(SD) rats treated with compound Y and Z for 7 days**

|                  |                         | Control      | Compound Y    | Compound Z     |
|------------------|-------------------------|--------------|---------------|----------------|
| Male             |                         |              |               |                |
|                  | No. of animals examined | 5            | 5             | 5              |
| Volume           | (mL)                    | 3.58 ± 0.93  | 4.38 ± 1.55   | 6.30 ± 3.53    |
| Specific gravity |                         | 1.09 ± 0.01  | 1.08 ± 0.01   | 1.07 ± 0.03    |
| Na               | (mEq/L)                 | 327.8 ± 59.9 | 264.6 ± 59.1  | 190.6 ± 102.6* |
|                  | (mg/20h)                | 26.6 ± 4.3   | 25.5 ± 5.9    | 21.8 ± 6.2     |
| K                | (mEq/L)                 | 536.0 ± 91.9 | 506.0 ± 102.5 | 374.4 ± 174.2  |
|                  | (mg/20h)                | 71.9 ± 10.7  | 80.8 ± 17.4   | 73.5 ± 19.7    |
| Cl               | (mEq/L)                 | 435.6 ± 68.5 | 375.6 ± 81.0  | 266.8 ± 145.9* |
|                  | (mg/20h)                | 54.3 ± 8.3   | 55.2 ± 9.4    | 48.3 ± 17.1    |
| Female           |                         |              |               |                |
|                  | No. of animals examined | 5            | 5             | 5              |
| Volume           | (mL)                    | 6.52 ± 3.44  | 3.34 ± 1.34   | 3.94 ± 0.81    |
| Specific gravity |                         | 1.07 ± 0.02  | 1.09 ± 0.02   | 1.08 ± 0.02    |
| Na               | (mEq/L)                 | 184.6 ± 67.8 | 225.4 ± 63.6  | 210.4 ± 54.0   |
|                  | (mg/20h)                | 24.5 ± 4.2   | 15.9 ± 1.5**  | 18.6 ± 2.1*    |
| K                | (mEq/L)                 | 324.5 ± 92.0 | 501.0 ± 99.7* | 407.0 ± 102.3  |
|                  | (mg/20h)                | 73.6 ± 20.4  | 60.4 ± 10.8   | 59.3 ± 7.8     |
| Cl               | (mEq/L)                 | 242.0 ± 73.8 | 350.4 ± 94.0  | 291.2 ± 69.9   |
|                  | (mg/20h)                | 50.2 ± 11.1  | 38.2 ± 3.2    | 39.5 ± 4.0     |

Values are means ± SDs.

\*, \*\*: Significantly different from the control at  $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

**Table 7. Hematology data for male and female Crl:CD(SD) rats treated with compound Y and Z for 7 days**

|                               |                               | Control         | Compound Y      | Compound Z        |
|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Male                          |                               |                 |                 |                   |
|                               | No. of animals examined       | 5               | 5               | 5                 |
| WBC                           | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 7.45 $\pm$ 1.07 | 6.24 $\pm$ 1.84 | 7.01 $\pm$ 1.59   |
| RBC                           | ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ) | 6.2 $\pm$ 0.2   | 6.1 $\pm$ 0.3   | 6.3 $\pm$ 0.2     |
| HGB                           | (g/dL)                        | 12.8 $\pm$ 0.4  | 12.9 $\pm$ 0.6  | 13.1 $\pm$ 0.3    |
| HCT                           | (%)                           | 38.8 $\pm$ 0.8  | 39.5 $\pm$ 1.9  | 40.0 $\pm$ 1.0    |
| MCV                           | (fL)                          | 62.4 $\pm$ 0.5  | 64.5 $\pm$ 3.0  | 63.4 $\pm$ 2.3    |
| MCH                           | (pg)                          | 20.6 $\pm$ 0.4  | 21.2 $\pm$ 1.1  | 20.7 $\pm$ 0.6    |
| MCHC                          | (g/dL)                        | 33.0 $\pm$ 0.4  | 32.8 $\pm$ 0.3  | 32.7 $\pm$ 0.5    |
| PLT                           | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 996 $\pm$ 36    | 925 $\pm$ 131   | 1075 $\pm$ 76     |
| RET                           | (%)                           | 8.8 $\pm$ 0.7   | 9.6 $\pm$ 1.4   | 9.8 $\pm$ 0.9     |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 544 $\pm$ 34    | 585 $\pm$ 71    | 615 $\pm$ 42      |
| Differential leukocyte counts |                               |                 |                 |                   |
| Neutrophil                    | (%)                           | 10.6 $\pm$ 3.2  | 11.8 $\pm$ 3.0  | 16.7 $\pm$ 4.4*   |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.78 $\pm$ 0.20 | 0.74 $\pm$ 0.25 | 1.17 $\pm$ 0.47   |
| Eosinophil                    | (%)                           | 0.8 $\pm$ 0.3   | 1.1 $\pm$ 0.4   | 0.9 $\pm$ 0.3     |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.06 $\pm$ 0.03 | 0.07 $\pm$ 0.03 | 0.06 $\pm$ 0.01   |
| Basophil                      | (%)                           | 0.3 $\pm$ 0.1   | 0.4 $\pm$ 0.3   | 0.3 $\pm$ 0.2     |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.02 $\pm$ 0.01 | 0.02 $\pm$ 0.01 | 0.02 $\pm$ 0.01   |
| Lymphocyte                    | (%)                           | 85.6 $\pm$ 3.7  | 82.7 $\pm$ 3.6  | 78.4 $\pm$ 5.3*   |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 6.39 $\pm$ 1.06 | 5.16 $\pm$ 1.56 | 5.50 $\pm$ 1.31   |
| Monocyte                      | (%)                           | 2.6 $\pm$ 0.8   | 4.0 $\pm$ 0.7*  | 3.8 $\pm$ 1.0     |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.19 $\pm$ 0.06 | 0.26 $\pm$ 0.10 | 0.27 $\pm$ 0.10   |
| Female                        |                               |                 |                 |                   |
|                               | No. of animals examined       | 5               | 5               | 5                 |
| WBC                           | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 5.60 $\pm$ 0.73 | 6.52 $\pm$ 2.03 | 8.13 $\pm$ 1.44** |
| RBC                           | ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ) | 6.9 $\pm$ 0.4   | 6.6 $\pm$ 0.1   | 6.9 $\pm$ 0.2     |
| HGB                           | (g/dL)                        | 13.9 $\pm$ 0.9  | 13.4 $\pm$ 0.3  | 13.8 $\pm$ 0.1    |
| HCT                           | (%)                           | 41.6 $\pm$ 3.0  | 39.7 $\pm$ 1.2  | 41.3 $\pm$ 0.3    |
| MCV                           | (fL)                          | 59.9 $\pm$ 2.0  | 60.6 $\pm$ 2.5  | 60.3 $\pm$ 2.5    |
| MCH                           | (pg)                          | 20.1 $\pm$ 0.7  | 20.4 $\pm$ 0.6  | 20.2 $\pm$ 0.7    |
| MCHC                          | (g/dL)                        | 33.6 $\pm$ 0.5  | 33.7 $\pm$ 0.5  | 33.4 $\pm$ 0.4    |
| PLT                           | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 1030 $\pm$ 94   | 1088 $\pm$ 83   | 1063 $\pm$ 24     |
| RET                           | (%)                           | 4.4 $\pm$ 1.4   | 5.3 $\pm$ 0.7   | 4.6 $\pm$ 0.6     |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 299 $\pm$ 78    | 350 $\pm$ 45    | 312 $\pm$ 38      |
| Differential leukocyte counts |                               |                 |                 |                   |
| Neutrophil                    | (%)                           | 6.7 $\pm$ 1.5   | 8.5 $\pm$ 2.5   | 7.9 $\pm$ 1.7     |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.38 $\pm$ 0.11 | 0.52 $\pm$ 0.10 | 0.65 $\pm$ 0.26   |
| Eosinophil                    | (%)                           | 1.6 $\pm$ 0.8   | 1.5 $\pm$ 0.7   | 1.5 $\pm$ 0.3     |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.09 $\pm$ 0.05 | 0.09 $\pm$ 0.03 | 0.12 $\pm$ 0.02   |
| Basophil                      | (%)                           | 0.1 $\pm$ 0.1   | 0.2 $\pm$ 0.1   | 0.2 $\pm$ 0.1     |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.01 $\pm$ 0.01 | 0.01 $\pm$ 0.01 | 0.02 $\pm$ 0.01   |
| Lymphocyte                    | (%)                           | 89.1 $\pm$ 2.7  | 87.0 $\pm$ 3.7  | 86.6 $\pm$ 2.2    |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 4.98 $\pm$ 0.60 | 5.72 $\pm$ 2.00 | 7.04 $\pm$ 1.25*  |
| Monocyte                      | (%)                           | 2.4 $\pm$ 1.0   | 2.9 $\pm$ 1.2   | 3.9 $\pm$ 1.9     |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.13 $\pm$ 0.06 | 0.18 $\pm$ 0.06 | 0.30 $\pm$ 0.11*  |

Values are means  $\pm$  SDs.

\*, \*\*: Significantly different from the control at  $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

**Table 8. Serum biochemistry data for male and female Crl:CD(SD) rats treated with compound Y and Z for 7 days**

|               |                         | Control      | Compound Y   | Compound Z    |
|---------------|-------------------------|--------------|--------------|---------------|
| <b>Male</b>   |                         |              |              |               |
|               | No. of animals examined | 5            | 5            | 5             |
| TP            | (g/dL)                  | 5.30 ± 0.27  | 5.48 ± 0.28  | 5.48 ± 0.16   |
| A/G           |                         | 4.12 ± 0.62  | 4.02 ± 0.34  | 3.74 ± 0.21   |
| ALB           | (g/dL)                  | 4.24 ± 0.17  | 4.38 ± 0.19  | 4.32 ± 0.08   |
| T-BIL         | (mg/dL)                 | 0.05 ± 0.01  | 0.06 ± 0.01  | 0.06 ± 0.01   |
| GLU           | (mg/dL)                 | 72.8 ± 11.5  | 66.6 ± 7.8   | 70.4 ± 19.8   |
| TG            | (mg/dL)                 | 60.6 ± 24.1  | 52.4 ± 14.1  | 58.8 ± 19.0   |
| T-CHO         | (mg/dL)                 | 85.8 ± 12.4  | 76.4 ± 18.4  | 76.0 ± 6.2    |
| BUN           | (mg/dL)                 | 9.7 ± 1.5    | 10.2 ± 1.9   | 9.8 ± 1.5     |
| CRE           | (mg/dL)                 | 0.23 ± 0.00  | 0.21 ± 0.01  | 0.22 ± 0.02   |
| Na            | (mEQ/L)                 | 141.6 ± 1.1  | 140.8 ± 0.4  | 141.0 ± 1.2   |
| Cl            | (mEQ/L)                 | 103.8 ± 0.8  | 103.0 ± 1.9  | 102.6 ± 1.3   |
| K             | (mEQ/L)                 | 5.08 ± 0.28  | 5.00 ± 0.32  | 4.90 ± 0.23   |
| Ca            | (mg/dL)                 | 10.16 ± 0.09 | 10.26 ± 0.27 | 10.42 ± 0.23* |
| IP            | (mg/dL)                 | 9.12 ± 0.15  | 9.30 ± 0.41  | 9.78 ± 0.33** |
| AST           | (IU/L)                  | 129.0 ± 10.9 | 131.0 ± 25.8 | 136.0 ± 10.1  |
| ALT           | (IU/L)                  | 35.0 ± 4.7   | 39.0 ± 3.0   | 38.6 ± 2.1    |
| ALP           | (IU/L)                  | 352.4 ± 24.0 | 343.2 ± 30.4 | 328.2 ± 53.4  |
| γ-GTP         | (IU/L)                  | <3           | <3           | <3            |
| <b>Female</b> |                         |              |              |               |
|               | No. of animals examined | 5            | 5            | 5             |
| TP            | (g/dL)                  | 5.48 ± 0.18  | 5.54 ± 0.19  | 5.48 ± 0.18   |
| A/G           |                         | 4.40 ± 0.56  | 4.46 ± 0.44  | 4.24 ± 0.50   |
| ALB           | (g/dL)                  | 4.46 ± 0.23  | 4.52 ± 0.13  | 4.42 ± 0.08   |
| T-BIL         | (mg/dL)                 | 0.04 ± 0.01  | 0.05 ± 0.01  | 0.05 ± 0.01   |
| GLU           | (mg/dL)                 | 72.4 ± 6.2   | 78.8 ± 5.2   | 81.4 ± 4.0*   |
| TG            | (mg/dL)                 | 31.2 ± 7.7   | 36.2 ± 11.7  | 22.6 ± 9.4    |
| T-CHO         | (mg/dL)                 | 63.2 ± 4.4   | 73.4 ± 18.3  | 64.6 ± 5.9    |
| BUN           | (mg/dL)                 | 12.1 ± 4.0   | 10.2 ± 1.6   | 11.8 ± 2.3    |
| CRE           | (mg/dL)                 | 0.25 ± 0.02  | 0.27 ± 0.01  | 0.27 ± 0.03   |
| Na            | (mEQ/L)                 | 138.8 ± 0.4  | 138.6 ± 0.5  | 139.4 ± 0.5   |
| Cl            | (mEQ/L)                 | 103.2 ± 1.3  | 103.8 ± 0.8  | 105.0 ± 1.0*  |
| K             | (mEQ/L)                 | 4.86 ± 0.11  | 4.78 ± 0.20  | 4.64 ± 0.17*  |
| Ca            | (mg/dL)                 | 10.22 ± 0.35 | 10.22 ± 0.23 | 10.08 ± 0.22  |
| IP            | (mg/dL)                 | 8.50 ± 0.66  | 8.42 ± 0.47  | 8.22 ± 0.80   |
| AST           | (IU/L)                  | 121.6 ± 15.9 | 104.4 ± 19.5 | 120.0 ± 14.1  |
| ALT           | (IU/L)                  | 33.8 ± 5.5   | 26.0 ± 5.8   | 31.2 ± 2.6    |
| ALP           | (IU/L)                  | 192.0 ± 32.2 | 192.6 ± 47.8 | 232.8 ± 20.8* |
| γ-GTP         | (IU/L)                  | <3           | <3           | <3            |

Values are means ± SDs.

\*, \*\*: Significantly different from the control at  $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

**Table 9. Histopathological findings for male and female Crl:CD(SD) rats treated with compound Y and Z for 7 days**

|           |                                          | Control | Compound Y | Compound Z |
|-----------|------------------------------------------|---------|------------|------------|
| Male      | No. of animals examined                  | 5       | 5          | 5          |
| Organs    | Findings                                 |         |            |            |
| Jejunum   | No abnormalities detected                | 5       | 4          | 5          |
|           | Diverticulum (P)                         | -       | 1          | -          |
| Thyroid   | No abnormalities detected                | 3       | 4          | 5          |
|           | Ectopic tissue, thymus (P)               | 1       | 1          | -          |
|           | Ultimobranchial cyst (P)                 | 1       | -          | -          |
| Pituitary | No abnormalities detected                | 4       | 4          | 4          |
|           | Cyst (P)                                 | 1       | -          | -          |
|           | Aberrant craniopharyngeal structures (P) | -       | 1          | 1          |
| Female    | No. of animals examined                  | 5       | 5          | 5          |
| Organs    | Findings                                 |         |            |            |
| Thyroid   | No abnormalities detected                | 4       | 2          | 1          |
|           | Ectopic tissue, thymus (P)               | 1       | -          | 1          |
|           | Ultimobranchial cyst (P)                 | -       | 3          | 3          |

Values are No. of animals.

P: Present

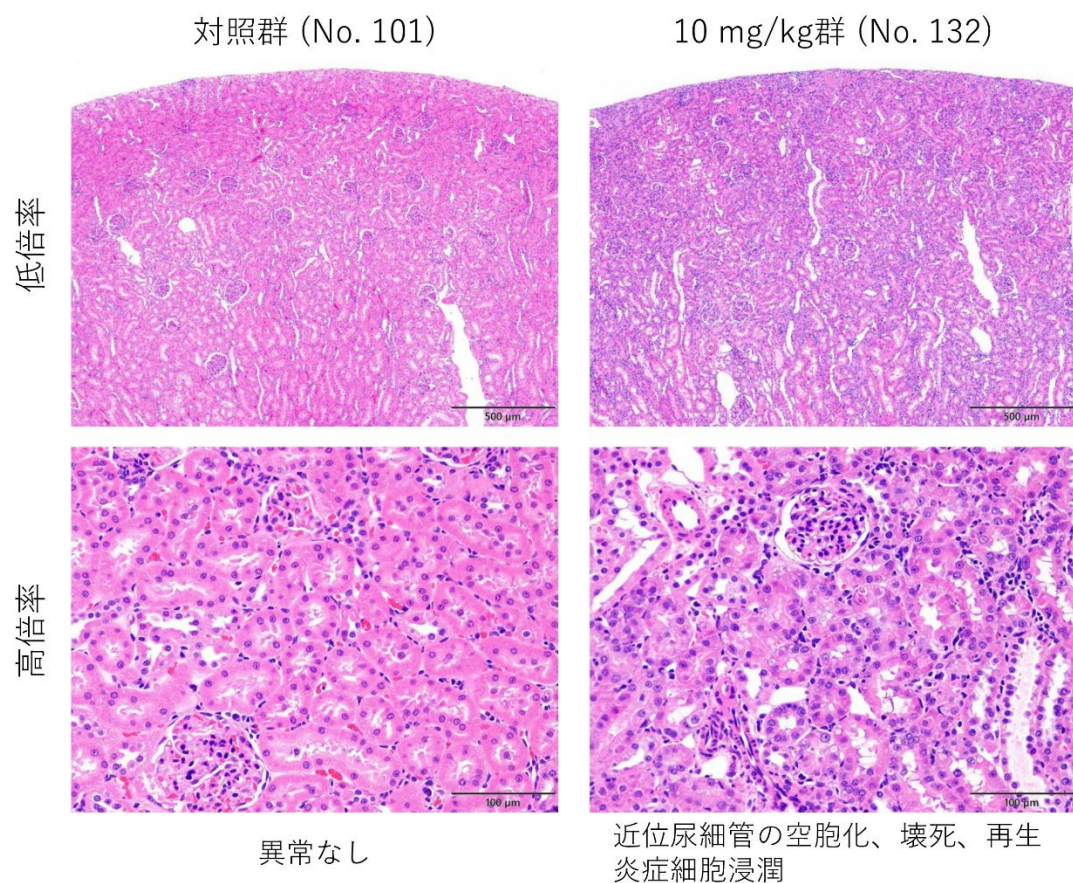


Figure 1. 対照群及びプベルル酸投与群の雄ラット腎臓における病理組織学的所見

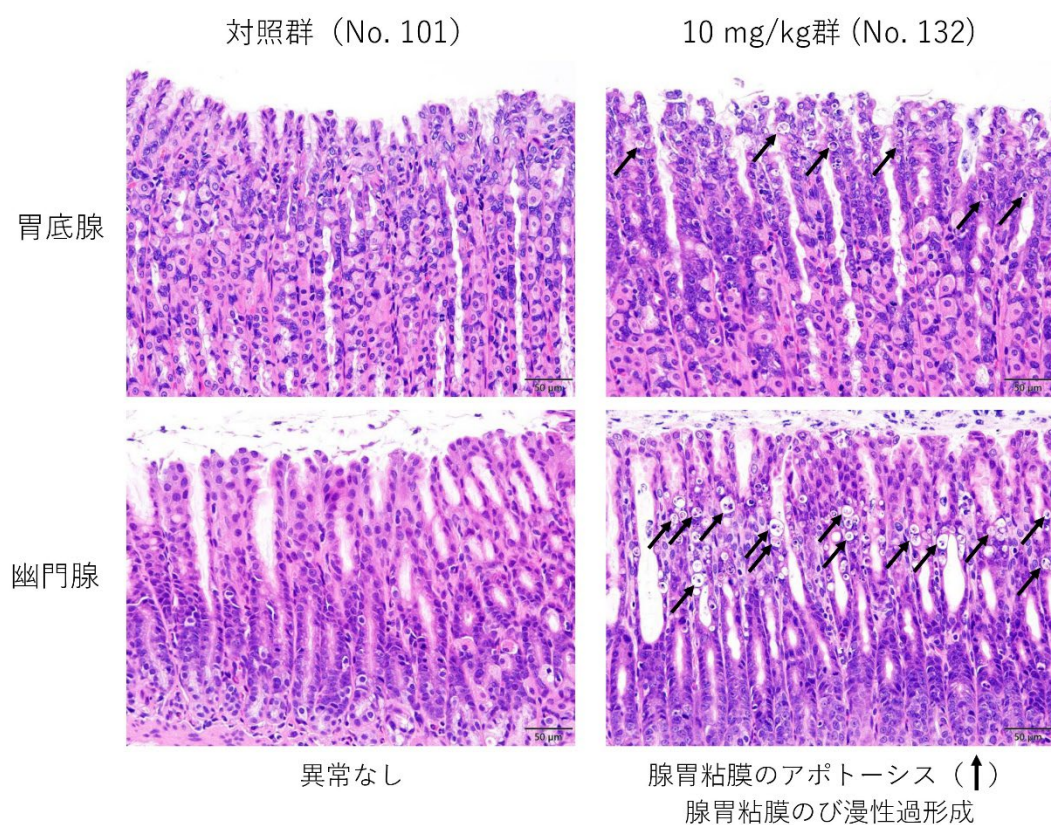


Figure 2. 対照群及びプベルル酸投与群の雄ラット腺胃における病理組織学的所見

## ラットを用いたプベルル酸の 28 日間反復経口投与毒性試験

試験番号：24OM-1

令和 6 年 11 月 29 日

松下 幸平  
石井 雄二  
豊田 武士

国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター 病理部

## 要約

プベールル酸を各群 5 匹の 6 週齢 Crl:CD (SD)ラットに対して、0.5 w/v%メチルセルロース水溶液を溶媒として雄には 0, 1, 3 及び 10 mg/kg、雌には 0, 0.3, 1 及び 3 mg/kg の用量で 28 日間強制経口投与し、反復投与による毒性影響を検討した。また、雌雄の対照群及び高用量群については投与終了後 14 日間の回復期間後に剖検する群を設定し、毒性影響の回復性を併せて検討した。

その結果、プベールル酸の毒性影響は腎臓及び胃（腺胃）に認められた。腎臓に対する毒性影響として、尿検査における尿糖の増加及び血清生化学検査におけるクレアチニン（CRE）の高値が雄の 10 mg/kg 群に、肉眼的病理学検査における腎臓の退色並びに病理組織学的検査における腎臓の近位尿細管の空胞化、壊死及び再生が雄の 10 mg/kg 群及び雌の 3 mg/kg 群に認められ、さらに雄の 10 mg/kg 群では病理組織学的検査において間質の炎症細胞浸潤がみられた。また胃に対する毒性影響として、病理組織学的検査における腺胃粘膜のアポトーシス及び慢性過形成が雄の 3 及び 10 mg/kg 群並びに雌の 3 mg/kg 群に認められた。以上の結果から、本試験条件下におけるプベールル酸の無毒性量は雌雄ともに 1 mg/kg/day と判断した。

回復期間終了時では、雄の 10 mg/kg 群の 1 例の腎臓に肉眼的病理学検査において変色巣が認められ、病理組織学的検査においては限局性の間質の線維化、再生尿細管並びに腎乳頭における鉍質沈着及び集合管の拡張が認められた。同個体の腎臓の他の部位に異常は認められず、また同群の他の 4 例及び雌の 3 mg/kg 群の全例の腎臓にも異常は観察されなかった。投与期間終了時における病理組織学的検査では、腎臓の変化は雄の 10 mg/kg 群及び雌の 3 mg/kg 群の全例に認められたことから、プベールル酸の腎毒性は回復性を有するものと総合的には判断されたものの、重篤な障害が生じた場合には線維化を含む慢性病変に移行する可能性も同時に示唆された。胃の変化は回復期間終了時には観察されず、回復性を示すと考えられた。

## 1 試験概要

### 1.1 試験表題

ラットを用いたプベールル酸の 28 日間反復経口投与毒性試験

### 1.2 試験番号

24OM-1

### 1.3 試験目的

プベールル酸をラットに 28 日間強制経口投与し、反復投与による毒性を明らかにすることを目的とした。

### 1.4 ガイドライン

経済協力開発機構（Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD）毒性試験ガイドライン「げっ歯類における 28 日間反復経口投与毒性試験（TG407）」に可能な限り準じて実施した。

### 1.5 動物愛護

本施設は一般財団法人日本医薬情報センターの評価を受け、厚生労働省の通知「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」（厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知 平成 27 年 2 月 20 日 科発 0220 第 1 号）に適合した施設であると認定されている。本試験は国立医薬品食品衛生研究所「動物実験等の適正な実施に関する規程」に従って計画し、同所の動物実験委員会による審査・承認を経て実施した。

### 1.6 試験実施施設

国立医薬品食品衛生研究所

〒210-9501 神奈川県川崎市川崎区殿町 3 丁目 25 番 26 号

### 1.7 試験管理責任者

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部 部長  
豊田 武士

### 1.8 試験責任者

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部 第三室長  
松下 幸平

試験番号：24OM-1

## 2 被験物質

|          |                                                 |
|----------|-------------------------------------------------|
| 名称       | ： プベルル酸                                         |
| 供給源      | ： 国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部                            |
| CAS No.  | ： 99-23-0                                       |
| 性状       | ： 粉末                                            |
| ロット番号    | ： 20240707                                      |
| 含量       | ： 98.5%                                         |
| 保管条件     | ： 冷暗所                                           |
| 取り扱い上の注意 | ： 使用時には手袋、マスク及び保護メガネ等の適切な保護具を着用し、皮膚及び眼への接触を避けた。 |

## 3 媒体

|       |                       |
|-------|-----------------------|
| 名称    | ： 0.5 w/v%メチルセルロース水溶液 |
| 製造元   | ： 富士フイルム和光純薬株式会社      |
| ロット番号 | ： KSR7024             |
| 保管条件  | ： 冷暗所                 |

## 4 試験系

### 4.1 動物

|              |                            |
|--------------|----------------------------|
| 動物種          | ： ラット                      |
| 系統           | ： Crl:CD (SD) (SPF 動物)     |
| 性            | ： 雌雄                       |
| 入荷時週齢        | ： 5 週齢                     |
| 投与開始時週齢      | ： 6 週齢                     |
| 購入（使用）匹数     | ： 雌雄各 32 匹（30 匹）           |
| 供給源          | ： ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社    |
| 所在地          | ： 〒243-0214 神奈川県厚木市下古沢 795 |
| 検疫・馴化期間      | ： 1 週間                     |
| 群分け後の余剰動物の処置 | ： 余剰動物は試験系から除外した。          |

### 4.2 試験系選択理由

OECD 毒性試験ガイドライン「げっ歯類における 28 日間反復経口投与毒性試験（TG407）」に基づいて齧歯類の 1 種としてラットを選択した。本系統は、微生物学的に統御され、遺伝的に安定であることから決定した。

#### 4.3 飼育条件

適切な生物学的防御がなされた環境の部屋で動物を飼育した。

|         |                              |
|---------|------------------------------|
| 飼育室     | : 223                        |
| 温度      | : $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ |
| 相対湿度    | : $50 \pm 5\%$               |
| 照明時間    | : 12 時間／日 (7:00~19:00)       |
| 換気回数    | : 15 回／時間                    |
| 飼育匹数    | : 2~3 匹／ケージ                  |
| ケージ交換頻度 | : 2 回以上／週                    |
| 給水瓶交換頻度 | : 2 回以上／週                    |

#### 4.4 収容ケージ及び床敷

|      |                                  |
|------|----------------------------------|
| ケージ  | : プラスチック製ケージ (W258×D418×H186 mm) |
| ケージ蓋 | : ステンレス製                         |
| 床敷   | : ソフトチップ (三協ラボサービス株式会社)          |

#### 4.5 飼料及び給餌方法

|      |                               |
|------|-------------------------------|
| 飼料   | : オリエンタル酵母工業株式会社製固形飼料 (CRF-1) |
| 給餌方法 | : ケージ蓋に取り付けられている給餌器に入れて、自由摂取。 |

#### 4.6 飲料水及び給水方法

|      |                  |
|------|------------------|
| 飲料水  | : 調製水            |
| 給水方法 | : 透明な給水瓶を用いて自由摂取 |

#### 4.7 群分け方法

|        |                       |
|--------|-----------------------|
| 群分け方法  | : 群分け実施日の体重に基づき無作為に実施 |
| 群分け実施日 | : 投与開始前日              |

#### 4.8 個体識別法

ケージラベルに試験番号、性別、群名、ケージ番号、被験物質名及び投与濃度、動物番号、試験開始日、剖検日、試験責任者名を明記した。動物の個体識別は、油性インクによる尾部へのマーキングを用いて行った。

### 5 試験方法

#### 5.1 投与期間及び投与方法

被験物質の投与は、毎日 1 回 (週 7 日)、投与期間は 28 日間とした。被験物質投与液はディスポーザブルシリンジ及びプラスチック製ディスポーザブル経口ゾンデを用いて 5 mL/kg の容量で強制経口投与した。対照群には同様の方法で媒体を投与した。投与液量は直近の体重に基づいて個体別に算出した。投与液量がシリンジの目盛りの最大容量を超えないよう、適切な容量のシリ

ンジを選択した。実際の投与液量の有効数字は、使用するシリンジの最小目盛りを下回らないように設定した。被験物質の投与は原則として午前 8:00～12:00 に実施した。

## 5.2 投与量及び群構成

被験物質の投与量、投与液濃度並びに 1 群当たりの匹数及び動物番号は、下表の通りである。

| 投与量<br>(mg/kg/day) | 投与液濃度<br>(mg/mL) | 匹数 (動物番号)     |               |
|--------------------|------------------|---------------|---------------|
|                    |                  | 雄             | 雌             |
| 0                  | 0                | 10* (101~110) | 10* (201~210) |
| 0.3                | 0.06             | -             | 5 (211~215)   |
| 1                  | 0.2              | 5 (111~115)   | 5 (221~225)   |
| 3                  | 0.6              | 5 (121~125)   | 10* (231~240) |
| 10                 | 2                | 10* (131~140) | -             |

\*対照群及び高用量群の動物番号が後ろの各 5 匹を回復群とし、最終投与 15 日後に剖検

## 5.3 被験物質投与量の設定理由

雌雄 CrI:CD (SD)ラットに被験物質を 8.52 mg/kg の用量で 7 日間反復経口投与した毒性試験において、雄では体重に変化は認められなかったものの、病理組織学的検査において腎臓に被験物質の影響と考えられる変化が認められた。一方、雌においては体重減少が認められ、病理組織学的検査では腎臓において雄よりも強い変化がみられた。これらの結果に基づき、本試験における被験物質の投与用量は、雄では 10 mg/kg/day を高用量とし、以下公比 3 で除した 3 mg/kg/day 及び 1 mg/kg/day を中用量及び低用量に設定し、雌では 3 mg/kg/day を高用量とし、以下公比 3 で除した 1 mg/kg/day 及び 0.3 mg/kg/day を中用量及び低用量に設定した。

## 5.4 投与経路及び投与方法の選択理由

投与経路は、被験物質がヒトに曝露される可能性の最も大きい経路である経口投与とした。投与方法は、被験物質の安定性に関する情報が得られていないことから、用時調製による強制経口投与を選択した。

## 5.5 被験物質投与液の調製方法及び調製頻度

電子天秤を用いて被験物質を遠沈管に秤量し、媒体である 0.5 w/v%メチルセルロース水溶液を加えて超音波にて懸濁して 10 mg/kg 群用の溶液 (2 mg/mL) を調製した。さらに同溶液を媒体によって段階的に希釈し、3、1 及び 0.3 mg/kg 群用の溶液 (0.6、0.2 及び 0.06 mg/mL) を調製した。攪拌時は調製液を泡立たせないように注意した。安定性に関する情報が得られていないため、用時調製とした。

## 5.6 観察及び測定項目

投与開始日を投与 1 日 (Day 1) と起算し、投与 1~7 日を投与 1 週、剖検日は投与 28 日の翌日 (Day 29) 及び 14 日間の回復期間後 (最終投与の 15 日後) (Day 43) とした。

### 5.6.1 一般状態

被験物質投与期間中には1日1回以上、全ての動物について一般状態、生死について観察し、個体別に記録した。回復期間中の平日について同様に観察を行った。

### 5.6.2 体重

投与1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25及び28日の投与前に測定した。回復期間中においては、36及び42日に測定した。また、剖検日に各動物の1晩(約16時間)絶食後の体重(剖検日体重)を測定した。各時点において全ての動物を電子天秤に乗せ、個体別に体重を測定した。

### 5.6.3 摂餌量

投与期間中に給餌量を投与1, 8, 15及び22日に、残餌量を投与8, 15, 22及び28日に測定した。回復期間中には給餌量を28及び36日に、残餌量を36及び42日に測定した。各時点において各ケージの給餌量及び残餌量を電子天秤にて測定し、1匹当たりの1日平均摂餌量を算出した。

### 5.6.4 尿検査

全例について剖検前1週( Day 23 及び 37 ) に以下の検査を実施した。

動物は検査当日、採尿ラックに移し蓄尿を開始した。蓄尿中は採尿ラック用の給水瓶及び給餌器を用いて4.5項及び4.6項に記載の飼料及び飲料水を投与した。採尿ラックへの移動は群単位で実施した。約4時間の蓄尿後、尿サンプル(新鮮尿)を回収し、下記項目について試験紙(オーシヨンスティックス 7EA、アークレイ株式会社)及び自動尿分析装置(オーシヨンイレブン AE-4021、アークレイ株式会社)を用いて検査を実施した。

検査項目：潜血、pH、ケトン体、尿糖、蛋白、ウロビリノーゲン、ビリルビン

### 5.6.5 血液学的検査

被験物質投与期間終了時及び回復期間終了時の全生存動物について検査を実施した。検査試料(血液)の採取は、採取前日の夕方から絶食(給水は継続)させた動物を、当日にイソフルラン麻酔下で開腹し、腹部大動脈から行った。動物の採血(屠殺)順は、群ごとに絶食時間が偏らないように設定した。

採取した血液の一部を抗凝固剤(EDTA-2K)入りの試験管(ベネジエクトII 真空採血管、テルモ株式会社)に移し、下記の項目について自動血球計算装置IDEXX プロサイト Dx (アイデックスラボラトリーズ株式会社)を用いて測定した。再測定を実施した場合、再測定を実施した理由並びに採用、不採用としたデータ及びその理由を明確に記録した。最終的に残存した血液はゲノム安全科学部に譲渡した。

検査項目：赤血球数(RBC)、ヘモグロビン濃度(HGB)、ヘマトクリット値(HCT)、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)、白血球数(WBC)、網状赤血球数(RET)、白血球分画(好中球; Neutrophil、好酸球; Eosinophil、好塩基球; Basophil、単球; Monocyte、リンパ球; Lymphocyte)

### 5.6.6 血清生化学検査

被験物質投与期間終了時及び回復期間終了時の全生存動物について検査を実施した。前項で採取した血液の残りを血清分離剤（ポリエステルゲル）及び凝固促進用シリカ微粒子入りの試験管（BD バキュティナ採血管、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）に分注し、遠心分離して血清を得た。血清は-20℃以下で保存した。測定はオリエンタル酵母工業株式会社に委託して実施した。測定項目は以下の通りである。

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ ( $\gamma$ -GTP)、総ビリルビン (T-BIL)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRE)、ブドウ糖 (GLU)、総コレステロール (T-CHO)、トリグリセリド (TG)、総蛋白 (TP)、アルブミン (ALB)、A/G 比 (A/G)、無機リン (IP)、カルシウム (Ca)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、塩素 (Cl)

### 5.6.7 病理学的検査

投与期間終了時及び回復期間終了時に、第 5.6.5 項において採血し、腹部大動脈から放血致死させた動物について、下記の病理学的検査を行った。

#### 5.6.7.1 肉眼的病理学検査

投与期間終了時及び回復期間終了時の全生存動物について、全身の諸器官・組織の肉眼的病理学検査を実施し、下記の器官・組織を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液にて保存した。腎臓及び肝臓については組織の一部を液体窒素にて瞬間凍結し、-80℃で保存してその一部をゲノム安全科学部に譲渡した。また最終投与翌日に解剖した雌雄の対照群及び高用量群のうち、番号が若い各 3 例の腎臓について、4%カルボキシメチルセルロースに包埋して凍結ブロックを作製し、-80℃で保存した。固定液に浸した臓器は振盪器にて一晩以上振盪を行った。眼球はダビッドソン固定液にて固定・保存し、3～5 日以内に切り出しを実施し、残臓器は 10%中性緩衝ホルマリン液に保存した。精巣は改変ダビッドソン固定液にて固定し、翌日～3 日以内に切り出しを実施、切り出し後の残臓器は 10%中性緩衝ホルマリン液に保存した。鼻腔を含む頭蓋、胸骨、大腿骨及び脊椎（頸部、胸部及び腰部横断）は、10%ギ酸及び 10%中性緩衝ホルマリン混合液あるいは K-CX（株式会社ファルマ）を用いて脱灰処理を行った。

心臓、脾臓、リンパ節（頸部、腸間膜）、胸腺、下垂体、甲状腺（上皮小体を含む）、副腎、頭蓋（鼻腔を含む）、気管、肺（気管支を含む）、舌、唾液腺（顎下腺、舌下腺及び耳下腺）、食道、胃（前胃、腺胃）、小腸（十二指腸、空腸、回腸）、大腸（盲腸、結腸、直腸）、肝臓、脾臓、腎臓、膀胱、精巣、精巣上体、前立腺、精囊、卵巣、卵管、子宮、乳腺、膣、脳（大脳、小脳）、脊髓（頸部、胸部及び腰部）、三叉神経、坐骨神経、大動脈（胸部）、眼球、ハーダー腺、皮膚、胸骨及び大腿骨（骨髓を含む）、大腿部骨格筋、その他肉眼病変部

#### 5.6.7.2 器官重量

全生存動物について、下記の器官の重量について電子天秤を用いて測定し、剖検日体重を用いて器官重量体重比を算出した。副腎、精巣及び卵巣については、投与期間終了時剖検群では左右併せて、回復期間終了時剖検群では左右別に測定した。

試験番号：24OM-1

脳、下垂体\*、心臓、肺（気管支を含む）\*\*、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、前立腺\*、精囊\*、卵巣（卵管を含まない）、唾液腺（顎下腺及び舌下腺）\*、胸腺、甲状腺（上皮小体を含む）\*。

\*：固定後測定。\*\*：測定後 10%中性緩衝ホルマリン液を注入。

#### 5.6.7.3 病理組織学的検査

全動物の採材した全臓器についてパラフィン包埋を実施した。雌雄の投与期間終了時剖検動物の対照群及び高用量群の全臓器並びに低及び中用量群の腎臓及び胃について薄切の後、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を施し、鏡検した。また回復期間終了時剖検動物の腎臓及び胃について同様に HE 染色標本を作製し、鏡検した。さらに、投与期間終了時剖検動物の雌雄の対照群及び高用量群の腎臓について過ヨウ素酸シッフ（PAS）染色、回復期間終了時剖検動物の全例の腎臓についてマッソントリクローム染色を施して鏡検した。

### 5.7 統計処理

試験期間中の体重、血液学的・血清生化学検査結果及び器官重量について、投与期間終了時剖検群においては各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は Dunnett の方法、不等分散の場合は Steel の方法により対照群と各被験物質投与群との間で有意差検定を行った。回復期間終了時剖検群においては各群の分散を F 検定により求め、等分散の場合は t 検定、不等分散の場合は Welch 検定により対照群と被験物質投与群との間で有意差検定を行った。病理所見については、発生頻度を Fisher の正確確率検定、グレーディングを Mann-Whitney の U 検定により有意差検定を行った。 $P < 0.05$  の場合を統計学的に有意と判定した。

## 6 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

- ・回復期間終了時剖検群の器官重量測定において、試験計画書では副腎、精巣及び卵巣は左右併せて測定することになっていたが、左右別に測定した。上記の臓器の器官重量については左右の合計値をデータとして用いたため、試験結果に影響はないと判断した。

## 7 試験結果

### 7.1 生存率及び一般状態

試験期間中、雌雄全ての群において死亡はみられなかった。一般状態観察において、雌雄全ての群において異常は認められなかった。

### 7.2 体重

体重測定の結果を Table 1 及び 2 に示す。試験期間中、雌雄ともに被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

### 7.3 摂餌量

試験期間中の各群における 1 匹の 1 日あたりの平均摂餌量を Table 3 及び 4 に示す。雌雄ともに被験物質投与群と対照群との間に明らかな差は認められなかった。

## 7.4 尿検査

尿検査結果を Table 5, 6, 7 及び 8 に示す。

投与期間終了時剖検群では、雄の 10 mg/kg 群の 1 例に尿糖(1+)が認められた。その他の検査項目において、被験物質投与群と対照群との間に明らかな差は認められなかった。

回復期間終了時剖検群では、全ての検査項目において被験物質投与群と対照群との間に明らかな差は認められなかった。

## 7.5 血液学的検査

血液学的検査結果を Table 9, 10, 11 及び 12 に示す。

投与期間終了時では、雄の 10 mg/kg 群における RET（絶対値及び相対値）の有意な低値及び雌の 0.3 mg/kg 群における RET（絶対値及び相対値）の有意な高値が認められた。

回復期間終了時では、雄の 10 mg/kg 群において RBC の有意な低値並びに PLT 及び Eosinophil（絶対値）の有意な高値が認められた。

## 7.6 血清生化学検査

血清生化学検査結果を Table 13, 14, 15 及び 16 に示す。

投与期間終了時では、雄の 10 mg/kg 群において CRE の有意な高値が認められた。また、Na の有意な低値が雄の 3 及び 10 mg/kg 群、Cl の有意な高値が雌の 0.3 mg/kg 以上の群で認められた。さらに、TG の有意な高値が雄の 3 mg/kg 群、IP の有意な低値が雄の 1 及び 3 mg/kg 群、A/G の有意な高値が雌の 0.3 mg/kg に認められた。

回復期間終了時では、雄の 10 mg/kg 群において GLU 及び TG の有意な低値並びに AST の有意な高値が認められ、雌の 3 mg/kg 群においては A/G の有意な低値及び IP の有意な高値がみられた。

## 7.7 病理学的検査

### 7.7.1 器官重量

剖検時の最終体重及び器官重量を Table 17, 18, 19 及び 20 に示す。

投与期間終了時では、雄の 10 mg/kg 群において心臓の絶対重量の有意な低値が認められた。

回復期間終了時では、雌の 3 mg/kg 群において腎臓の絶対重量の有意な高値が認められた。

### 7.7.2 病理組織学的検査

剖検時にみられた肉眼所見を Table 21, 22 及び 23 に示す。

投与期間終了時では、両側腎臓の退色が雄の 10 mg/kg 群の 2 例及び雌の 3 mg/kg 群の 1 例に認められた。また、雄の対照群の 1 例及び 3 mg/kg 群の 1 例の空腸に憩室が認められた。

回復期間終了時では、腎臓の変色巣（3 か所、いずれも退色）が雄の 10 mg/kg 群の 1 例に認められた。

病理組織学的検索結果を Table 24, 25, 26 及び 27 に示す。

投与期間終了時では、腎臓における近位尿細管の空胞化、壊死及び再生が雄の 10 mg/kg 群及び雌の 3 mg/kg 群の全例に認められた。さらに、雄の 10 mg/kg 群の 1 例では間質における炎症細胞

試験番号：24OM-1

浸潤が認められた。また、胃における腺胃粘膜のアポトーシスが雄の 3 mg/kg 群の 4 例、10 mg/kg 群の全例及び雌の 3 mg/kg 群の 4 例に、腺胃粘膜のび慢性過形成が雄の 3 mg/kg 群の 1 例、10 mg/kg 群の 4 例及び雌の 3 mg/kg 群の 2 例に認められた。雄の対照群及び 3 mg/kg 群の各 1 例で肉眼的にみられた空腸の憩室は、病理組織学的にも憩室であることが確認された。その他、肺における限局性炎症が雄の対照群の 1 例及び 10 mg/kg の 2 例並びに雌の対照群の 1 例、肺胞におけるマクロファージの集簇が雌の対照群の 1 例、甲状腺における異所性胸腺が雄の対照群の 2 例及び 10 mg/kg 群の 2 例並びに雌の対照群の 1 例、鰓後嚢胞が雄の対照群の 3 例及び 10 mg/kg 群の 2 例並びに雌の対照群の 2 例及び 3 mg/kg 群の 2 例、精巣上体における精子肉芽腫が雄の 10 mg/kg 群の 1 例、眼球における片側性の網膜ロゼットが雄の対照群の 1 例、下垂体における頭蓋咽頭管遺残が雌の対照群の 1 例、肝臓における限局性の肝細胞壊死が雄の対照群の 1 例及び 10 mg/kg 群の 1 例並びに雌の対照群の 2 例及び 3 mg/kg 群の 2 例に認められた。

回復期間終了時では、雄の 10 mg/kg 群の 1 例の腎臓において肉眼的にみられた 3 か所の変色巣について、2 か所を病理組織学的に検索した（残りの 1 か所は凍結保存した）。その結果、それぞれ限局性の間質の線維化及び再生尿細管が認められた。同個体では腎乳頭における鉍質沈着及び集合管の拡張が認められたが、その他の部位では異常は認められなかった。また雄の 10 mg/kg 群の他の 4 例及び雌の 3 mg/kg 群の全例の腎臓に異常は認められなかった。回復期間終了時の雄の 10 mg/kg 群及び雌の 3 mg/kg 群の胃に異常はみられなかった。

## 8 考察及び結論

尿検査において投与期間終了時剖検群の雄の 10 mg/kg 群の 1 例にみられた尿糖の増加は、病理組織学的検査でみられた腎臓の所見と関連する変化と考えられた。

血液学的検査では、投与期間終了時の雄の 10 mg/kg 群で RET の低値が認められたが、他の赤血球系パラメータの変動や関連する病理組織学的変化はみられなかったため、毒性学的意義は乏しいと判断した。また、投与期間終了時の雌の 0.3 mg/kg でみられた RET の高値は低用量群のみの変化であるため偶発所見と考えられた。回復期間終了時の雄の投与群で変動のみられた他の項目については、いずれも投与期間終了時には認められていない変化であるため、毒性学的意義は乏しいと判断した。

血清生化学検査では、投与期間終了時の雄の 10 mg/kg 群に CRE の高値が認められ、病理組織学的検査でみられた腎臓の所見と関連する変化と考えられた。雄の 3 及び 10 mg/kg 群でみられた Na の低値については、雄の 10 mg/kg 群で病理組織学的検査においてみられた近位尿細管障害に関連する可能性が疑われたが、腎臓に同程度の病理所見がみられた雌の 3 mg/kg 群において Na に変化はみられていないこと、用量相関性が明らかではないこと、また他の電解質パラメータにも意義のある変動は認められていないことから、毒性学的意義は乏しいと判断した。雌の 0.3 mg/kg 以上の群でみられた Cl の高値は、用量相関性を欠くため毒性学的意義は乏しいと判断した。その他に有意差がみられた項目については、低あるいは中用量群のみの変化であるため偶発所見と考えられた。回復期間終了時の雌雄の被験物質投与群で変動のみられた項目については、いずれも投与期間終了時にはみられていない変化であるため毒性学的意義は乏しいと判断した。

器官重量測定では、投与期間終了時の雄の 10 mg/kg 群において心臓の絶対重量の低値が認められたが、相対重量に変化はなく、関連する病理組織学的変化もみられないため、毒性学的意義は乏しいと判断した。回復期間終了時の雌の 3 mg/kg 群でみられた腎臓の絶対重量の高値は投与期間終了時には認められていない変化であり、関連する病理組織学的変化もみられないため、偶発所見と考えられた。

剖検時の肉眼検査では、投与期間終了時の雄の 10 mg/kg 群及び雌の 3 mg/kg 群に両側腎臓の退色がみられ、病理組織学的検査では同群の全例に近位尿細管の空胞化、壊死及び再生が認められた。さらに、雄の 10 mg/kg 群の 1 例では間質の炎症細胞浸潤が認められ、尿細管障害に関連した変化と考えられた。雄の 10 mg/kg 群及び雌の 3 mg/kg 群においてこれらの所見の程度に明らかな差はなく、雄の 3 mg/kg 群では変化がみられなかったことから、被験物質による腎毒性には性差（雌でより強い）があると考えられ、7 日間反復投与試験の結果と一致していた。

回復期間終了時の腎臓では、雄の 10 mg/kg 群の 1 例において肉眼的に変色巣が 3 か所認められ、そのうち 2 か所について病理組織学的検査を実施した。その結果、一つの変色巣では限局性の間質の線維化が認められた。尿細管障害の程度が重篤な場合には再生が正常に行われず、線維化が進行して慢性病変へ移行することが知られている<sup>1</sup>。よって、本試験の回復期間終了時に線維化がみられた部位では、投与期間終了時点で不可逆的な尿細管障害が生じていたものと考えられた。もう一方の変色巣では再生尿細管が認められ、尿細管障害が回復に向かっているものと考えられた。同個体ではさらに腎乳頭における鉍質沈着及び集合管の拡張が認められた。これら腎乳頭の変化の詳細な発生機序は不明であるが、腎障害の慢性化に伴うものと推察された。上記の変化がみられた個体の腎臓の他の部位において病理組織学的な異常は認められず、また回復期間終了時の雄の 10 mg/kg 群の他の 4 例及び雌の 3 mg/kg の全例においても変化はみられなかった。投与期間終了時には雌雄の高用量群の全例に尿細管障害が生じていたことに鑑みて、本試験でみられた腎障害は回復傾向を示すと総合的に判断した。

投与期間終了時の胃では、腺胃粘膜のアポトーシス及びび慢性過形成が雄の 3 及び 10 mg/kg 群並びに雌の 3 mg/kg 群で認められた。アポトーシスは被験物質の直接曝露により生じた可能性があるが、発生機序の詳細は不明であった。び慢性過形成はアポトーシスに対する再生反応と考えられた。なお、これらの変化の発現頻度及び程度に、腎臓でみられたような雌雄差は認められなかった。回復期間終了時の雄の 10 mg/kg 群及び雌の 3 mg/kg 群では胃に異常は認められず、本変化は回復性を示すものと考えられた。

その他、病理組織学的検査で雌雄の対照群及び高用量群で散発的に認められた変化は、いずれもラットにおいて自然発生性に生じることが知られており<sup>2-6</sup>、発現頻度及び程度に明らかな差も認められなかったことから、これらの変化の毒性学的意義は乏しいと判断した。

以上より、プベルル酸の毒性標的は腎臓及び胃（腺胃）であると考えられた。腎臓に対する毒性影響として、尿検査における尿糖の増加及び血清生化学検査における CRE の高値が雄の 10 mg/kg 群に、肉眼的病理学検査における腎臓の退色並びに病理組織学的検査における腎臓の近位尿細管の空胞化、壊死及び再生が雄の 10 mg/kg 群及び雌の 3 mg/kg 群に認められ、さらに雄の 10

試験番号：24OM-1

mg/kg 群では病理組織学的検査において間質の炎症細胞浸潤が認められた。また胃に対する毒性影響として、病理組織学的検査における腺胃粘膜のアポトーシス及びび慢性過形成が雄の 3 及び 10 mg/kg 群並びに雌の 3 mg/kg 群に認められた。以上の結果から、本試験条件下におけるプベルル酸の無毒性量は雌雄ともに 1 mg/kg/day と判断した。

回復期間終了時では、雄の 10 mg/kg 群の 1 例の腎臓に肉眼的病理学検査において変色巣が認められ、病理組織学的検査においては限局性の間質の線維化、再生尿細管並びに腎乳頭における鉍質沈着及び集合管の拡張が認められた。同個体の腎臓の他の部位に異常は認められず、また同群の他の 4 例及び雌の 3 mg/kg 群の全例の腎臓にも異常は観察されなかった。よって、プベルル酸の腎毒性は回復性を有するものと総合的には判断されたものの、重篤な障害が生じた場合には線維化を含む慢性病変に移行する可能性も同時に示唆された。胃の変化は回復期間終了時には観察されず、回復性を示すと考えられた。

## 9 参考文献

1. Ferenbach DA, Bonventre JV. Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD. *Nat Rev Nephrol.* 2015; 11(5): 264-276.
2. Renne R, Brix A, Harkema J, Herbert R, Kittel B, Lewis D, March T, Nagano K, Pino M, Rittinghausen S, Rosenbruch M, Tellier P, Wohrmann T. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse respiratory tract. *Toxicol Pathol.* 2009; 37(7 Suppl): 5S-73S.
3. Creasy D, Bube A, de Rijk E, Kandori H, Kuwahara M, Masson R, Nolte T, Reams R, Regan K, Rehm S, Rogerson P, Whitney K. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system. *Toxicol Pathol.* 2012; 40(6 Suppl): 40S-121S.
4. Brändli-Baiocco A, Balme E, Bruder M, Chandra S, Hellmann J, Hoenerhoff MJ, Kambara T, Landes C, Lenz B, Mense M, Rittinghausen S, Satoh H, Schorsch F, Seeliger F, Tanaka T, Tsuchitani M, Wojcinski Z, Rosol TJ. Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse endocrine system. *J Toxicol Pathol.* 2018; 31(3 Suppl): 1S-95S.
5. Nolte T, Brander-Weber P, Dangler C, Deschl U, Elwell MR, Greaves P, Hailey R, Leach MW, Pandiri AR, Rogers A, Shackelford CC, Spencer A, Tanaka T, Ward JM. Nonproliferative and proliferative lesions of the gastrointestinal tract, pancreas and salivary glands of the rat and mouse. *J Toxicol Pathol.* 2016; 29(1 Suppl): 1S-125S.
6. Thoolen B, Maronpot RR, Harada T, Nyska A, Rousseaux C, Nolte T, Malarkey DE, Kaufmann W, Küttler K, Deschl U, Nakae D, Gregson R, Vinlove MP, Brix AE, Singh B, Belpoggi F, Ward JM. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. *Toxicol Pathol.* 2010; 38(7 Suppl): 5S-81S.

[illegible][illegible]

[illegible][illegible]

**Table 3. Food intake data for male Crl:CD (SD) rats treated with puberulic acid for 28 days and 14 days of recovery**

| Puberulic acid<br>(mg/kg/day) |                         | Food consumption (g/rat/day) |          |           |           |           |           |
|-------------------------------|-------------------------|------------------------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                               |                         | Day 1-8                      | Day 8-15 | Day 15-22 | Day 22-28 | Day 28-36 | Day 36-42 |
| 0                             | Mean                    | 22.4                         | 25.2     | 26.5      | 26.9      | 27.2      | 27.2      |
|                               | No. of animals examined | 10                           | 10       | 10        | 10        | 5         | 5         |
| 1                             | Mean                    | 22.8                         | 25.3     | 26.8      | 25.4      |           |           |
|                               | No. of animals examined | 5                            | 5        | 5         | 5         |           |           |
| 3                             | Mean                    | 22.1                         | 24.9     | 26.6      | 27.1      |           |           |
|                               | No. of animals examined | 5                            | 5        | 5         | 5         |           |           |
| 10                            | Mean                    | 22.3                         | 25.2     | 25.7      | 25.7      | 28.1      | 28.8      |
|                               | No. of animals examined | 10                           | 10       | 10        | 10        | 5         | 5         |

**Table 4. Food intake data for female Crl:CD (SD) rats treated with puberulic acid for 28 days and 14 days of recovery**

| Puberulic acid<br>(mg/kg/day) |                         | Food consumption (g/rat/day) |          |           |           |           |           |
|-------------------------------|-------------------------|------------------------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                               |                         | Day 1-8                      | Day 8-15 | Day 15-22 | Day 22-28 | Day 28-36 | Day 36-42 |
| 0                             | Mean                    | 16.4                         | 16.6     | 16.3      | 16.6      | 16.5      | 16.3      |
|                               | No. of animals examined | 10                           | 10       | 10        | 10        | 5         | 5         |
| 0.3                           | Mean                    | 16.3                         | 17.5     | 16.8      | 17.4      |           |           |
|                               | No. of animals examined | 5                            | 5        | 5         | 5         |           |           |
| 1                             | Mean                    | 15.9                         | 15.5     | 16.2      | 17.7      |           |           |
|                               | No. of animals examined | 5                            | 5        | 5         | 5         |           |           |
| 3                             | Mean                    | 15.8                         | 15.7     | 15.4      | 16.1      | 16.4      | 16.2      |
|                               | No. of animals examined | 10                           | 10       | 10        | 10        | 5         | 5         |

**Table 5. Urinalysis data for male Crl:CD (SD) rats at day 23**

| Puberulic acid (mg/kg/day) |     | 0 | 1 | 3 | 10 |
|----------------------------|-----|---|---|---|----|
| No. of animals examined    |     | 5 | 5 | 5 | 5  |
| Protein                    | -   | 0 | 0 | 0 | 0  |
|                            | ±   | 0 | 0 | 0 | 1  |
|                            | 1+  | 5 | 4 | 5 | 2  |
|                            | 2+  | 0 | 1 | 0 | 2  |
| Glucose                    | -   | 5 | 5 | 5 | 4  |
|                            | ±   | 0 | 0 | 0 | 0  |
|                            | 1+  | 0 | 0 | 0 | 1  |
| Occult blood               | -   | 5 | 5 | 5 | 5  |
| Ketone body                | -   | 3 | 3 | 3 | 3  |
|                            | ±   | 2 | 1 | 1 | 1  |
|                            | 1+  | 0 | 1 | 1 | 1  |
| Urobilinogen               | 0.1 | 5 | 4 | 5 | 3  |
|                            | 1+  | 0 | 1 | 0 | 2  |
| Bilirubin                  | -   | 5 | 5 | 5 | 5  |
| pH                         | 7.5 | 0 | 0 | 0 | 1  |
|                            | 8.0 | 3 | 3 | 3 | 2  |
|                            | 8.5 | 2 | 2 | 2 | 2  |

Values are No. of animals.

**Table 6. Urinalysis data for female Crl:CD (SD) rats at day 23**

| Puberulic acid (mg/kg/day) |     | 0 | 0.3 | 1 | 3 |
|----------------------------|-----|---|-----|---|---|
| No. of animals examined    |     | 5 | 5   | 5 | 5 |
| Protein                    | -   | 0 | 2   | 2 | 2 |
|                            | ±   | 2 | 0   | 1 | 1 |
|                            | 1+  | 1 | 1   | 2 | 2 |
|                            | 2+  | 2 | 2   | 0 | 0 |
| Glucose                    | -   | 5 | 5   | 5 | 5 |
| Occult blood               | -   | 5 | 5   | 5 | 5 |
| Ketone body                | -   | 3 | 3   | 5 | 5 |
|                            | ±   | 2 | 2   | 0 | 0 |
| Urobilinogen               | 0.1 | 4 | 3   | 5 | 5 |
|                            | 1+  | 1 | 2   | 0 | 0 |
| Bilirubin                  | -   | 5 | 5   | 5 | 5 |
| pH                         | 7.5 | 0 | 0   | 0 | 0 |
|                            | 8.0 | 2 | 2   | 2 | 4 |
|                            | 8.5 | 3 | 3   | 3 | 1 |

Values are No. of animals.

**Table 7. Urinalysis data for male Crl:CD (SD) rats at day 37**

| Puberulic acid (mg/kg/day) |     | 0 | 10 |
|----------------------------|-----|---|----|
| No. of animals examined    |     | 5 | 5  |
| Protein                    | -   | 0 | 0  |
|                            | ±   | 0 | 0  |
|                            | 1+  | 2 | 5  |
|                            | 2+  | 3 | 0  |
| Glucose                    | -   | 5 | 5  |
| Occult blood               | -   | 5 | 5  |
| Ketone body                | -   | 1 | 0  |
|                            | ±   | 0 | 4  |
|                            | 1+  | 4 | 1  |
| Urobilinogen               | 0.1 | 2 | 3  |
|                            | 1+  | 3 | 2  |
| Bilirubin                  | -   | 5 | 5  |
| pH                         | 7.5 | 0 | 0  |
|                            | 8.0 | 3 | 4  |
|                            | 8.5 | 2 | 1  |

Values are No. of animals.

**Table 8. Urinalysis data for female Crl:CD (SD) rats at day 37**

|                            |     |   |   |
|----------------------------|-----|---|---|
| Puberulic acid (mg/kg/day) |     | 0 | 3 |
| No. of animals examined    |     | 5 | 5 |
| Protein                    | -   | 3 | 2 |
|                            | ±   | 0 | 2 |
|                            | 1+  | 1 | 1 |
|                            | 2+  | 1 | 0 |
| Glucose                    | -   | 5 | 5 |
| Occult blood               | -   | 5 | 5 |
| Ketone body                | -   | 4 | 5 |
|                            | ±   | 1 | 0 |
| Urobilinogen               | 0.1 | 4 | 5 |
|                            | 1+  | 0 | 0 |
|                            | 2+  | 1 | 0 |
| Bilirubin                  | -   | 5 | 5 |
| pH                         | 6.5 | 0 | 1 |
|                            | 7.0 | 1 | 0 |
|                            | 7.5 | 0 | 2 |
|                            | 8.0 | 4 | 2 |
|                            | 8.5 | 0 | 0 |

Values are No. of animals.

**Table 9. Hematology data for male Crl:CD (SD) rats treated with puberulic acid for 28 days**

| Puberulic acid (mg/kg/day)    |                               | 0    |            | 1    |            | 3    |            | 10   |             |
|-------------------------------|-------------------------------|------|------------|------|------------|------|------------|------|-------------|
| No. of animals examined       |                               | 5    |            | 5    |            | 5    |            | 5    |             |
| WBC                           | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 8.60 | $\pm$ 2.17 | 6.63 | $\pm$ 0.99 | 6.72 | $\pm$ 0.60 | 6.97 | $\pm$ 2.22  |
| RBC                           | ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ) | 7.56 | $\pm$ 0.46 | 7.40 | $\pm$ 0.29 | 7.54 | $\pm$ 0.21 | 7.35 | $\pm$ 0.38  |
| HGB                           | (g/dL)                        | 14.6 | $\pm$ 0.6  | 14.0 | $\pm$ 0.3  | 14.4 | $\pm$ 0.3  | 13.8 | $\pm$ 0.8   |
| HCT                           | (%)                           | 42.8 | $\pm$ 2.5  | 41.7 | $\pm$ 1.5  | 43.0 | $\pm$ 1.2  | 40.7 | $\pm$ 3.1   |
| MCV                           | (fL)                          | 56.6 | $\pm$ 1.8  | 56.4 | $\pm$ 2.3  | 57.1 | $\pm$ 0.5  | 55.4 | $\pm$ 1.9   |
| MCH                           | (pg)                          | 19.3 | $\pm$ 0.9  | 19.0 | $\pm$ 0.5  | 19.1 | $\pm$ 0.3  | 18.8 | $\pm$ 0.4   |
| MCHC                          | (g/dL)                        | 34.1 | $\pm$ 0.9  | 33.7 | $\pm$ 0.7  | 33.5 | $\pm$ 0.3  | 33.9 | $\pm$ 0.6   |
| PLT                           | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 996  | $\pm$ 98   | 994  | $\pm$ 91   | 938  | $\pm$ 41   | 1061 | $\pm$ 107   |
| RET                           | (%)                           | 4.2  | $\pm$ 0.6  | 3.8  | $\pm$ 0.5  | 4.1  | $\pm$ 0.4  | 3.0  | $\pm$ 0.6** |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 319  | $\pm$ 37   | 280  | $\pm$ 33   | 308  | $\pm$ 31   | 220  | $\pm$ 49**  |
| Differential leukocyte counts |                               |      |            |      |            |      |            |      |             |
| Neutrophil                    | (%)                           | 13.1 | $\pm$ 1.5  | 10.9 | $\pm$ 1.9  | 14.9 | $\pm$ 3.3  | 13.7 | $\pm$ 2.1   |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 1.12 | $\pm$ 0.28 | 0.73 | $\pm$ 0.20 | 1.01 | $\pm$ 0.29 | 0.96 | $\pm$ 0.39  |
| Eosinophil                    | (%)                           | 1.5  | $\pm$ 0.4  | 1.7  | $\pm$ 0.8  | 1.3  | $\pm$ 0.6  | 1.3  | $\pm$ 0.7   |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.13 | $\pm$ 0.05 | 0.11 | $\pm$ 0.05 | 0.09 | $\pm$ 0.04 | 0.09 | $\pm$ 0.07  |
| Basophil                      | (%)                           | 0.2  | $\pm$ 0.1  | 0.4  | $\pm$ 0.2  | 0.2  | $\pm$ 0.1  | 0.2  | $\pm$ 0.1   |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.02 | $\pm$ 0.01 | 0.02 | $\pm$ 0.01 | 0.01 | $\pm$ 0.01 | 0.01 | $\pm$ 0.01  |
| Lymphocyte                    | (%)                           | 81.7 | $\pm$ 1.6  | 83.2 | $\pm$ 4.0  | 80.2 | $\pm$ 3.0  | 80.7 | $\pm$ 3.4   |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 7.04 | $\pm$ 1.84 | 5.52 | $\pm$ 0.90 | 5.38 | $\pm$ 0.37 | 5.62 | $\pm$ 1.73  |
| Monocyte                      | (%)                           | 3.6  | $\pm$ 1.6  | 3.8  | $\pm$ 2.3  | 3.4  | $\pm$ 1.5  | 4.1  | $\pm$ 1.2   |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.29 | $\pm$ 0.12 | 0.25 | $\pm$ 0.15 | 0.23 | $\pm$ 0.11 | 0.29 | $\pm$ 0.14  |

Values are means  $\pm$  SDs.

\*\* : Significantly different from the control at  $p < 0.01$ .

**Table 10. Hematology data for female Crl:CD (SD) rats treated with puberulic acid for 28 days**

| Puberulic acid (mg/kg/day)    |                               | 0               | 0.3             | 1               | 3               |
|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| No. of animals examined       |                               | 5               | 5               | 5               | 5               |
| WBC                           | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 8.04 $\pm$ 1.96 | 7.67 $\pm$ 2.47 | 7.35 $\pm$ 1.35 | 8.74 $\pm$ 3.41 |
| RBC                           | ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ) | 7.47 $\pm$ 0.26 | 7.46 $\pm$ 0.14 | 7.67 $\pm$ 0.52 | 7.82 $\pm$ 0.55 |
| HGB                           | (g/dL)                        | 14.6 $\pm$ 0.5  | 14.4 $\pm$ 0.2  | 14.5 $\pm$ 0.6  | 15.0 $\pm$ 0.8  |
| HCT                           | (%)                           | 42.2 $\pm$ 1.6  | 42.0 $\pm$ 0.7  | 41.7 $\pm$ 2.0  | 43.6 $\pm$ 2.1  |
| MCV                           | (fL)                          | 56.5 $\pm$ 0.6  | 56.3 $\pm$ 0.4  | 54.5 $\pm$ 1.6  | 55.9 $\pm$ 2.4  |
| MCH                           | (pg)                          | 19.6 $\pm$ 0.3  | 19.3 $\pm$ 0.3  | 18.9 $\pm$ 0.6  | 19.2 $\pm$ 0.5  |
| MCHC                          | (g/dL)                        | 34.7 $\pm$ 0.4  | 34.3 $\pm$ 0.4  | 34.7 $\pm$ 0.3  | 34.4 $\pm$ 0.6  |
| PLT                           | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 1039 $\pm$ 172  | 1040 $\pm$ 142  | 954 $\pm$ 109   | 1010 $\pm$ 107  |
| RET                           | (%)                           | 2.8 $\pm$ 0.2   | 3.8 $\pm$ 0.3*  | 2.9 $\pm$ 0.6   | 3.0 $\pm$ 0.6   |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 212 $\pm$ 14    | 282 $\pm$ 29**  | 219 $\pm$ 38    | 236 $\pm$ 38    |
| Differential leukocyte counts |                               |                 |                 |                 |                 |
| Neutrophil                    | (%)                           | 11.7 $\pm$ 4.0  | 9.4 $\pm$ 2.7   | 10.8 $\pm$ 2.5  | 10.7 $\pm$ 5.4  |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.97 $\pm$ 0.46 | 0.70 $\pm$ 0.24 | 0.78 $\pm$ 0.19 | 0.97 $\pm$ 0.58 |
| Eosinophil                    | (%)                           | 1.4 $\pm$ 0.4   | 1.4 $\pm$ 0.4   | 1.4 $\pm$ 0.5   | 1.2 $\pm$ 0.2   |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.11 $\pm$ 0.04 | 0.10 $\pm$ 0.02 | 0.10 $\pm$ 0.03 | 0.10 $\pm$ 0.03 |
| Basophil                      | (%)                           | 0.2 $\pm$ 0.2   | 0.2 $\pm$ 0.2   | 0.3 $\pm$ 0.1   | 0.3 $\pm$ 0.3   |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.02 $\pm$ 0.02 | 0.01 $\pm$ 0.01 | 0.02 $\pm$ 0.01 | 0.02 $\pm$ 0.02 |
| Lymphocyte                    | (%)                           | 83.0 $\pm$ 3.8  | 86.4 $\pm$ 3.2  | 82.3 $\pm$ 3.0  | 84.2 $\pm$ 6.7  |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 6.67 $\pm$ 1.63 | 6.67 $\pm$ 2.27 | 6.05 $\pm$ 1.20 | 7.34 $\pm$ 2.87 |
| Monocyte                      | (%)                           | 3.7 $\pm$ 1.5   | 2.5 $\pm$ 0.6   | 5.3 $\pm$ 1.8   | 3.5 $\pm$ 1.8   |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.28 $\pm$ 0.07 | 0.18 $\pm$ 0.04 | 0.39 $\pm$ 0.16 | 0.31 $\pm$ 0.19 |

Values are means  $\pm$  SDs.

\*, \*\*: Significantly different from the control at  $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

**Table 11. Hematology data for male Crl:CD (SD) rats treated with puberulic acid for 28 days and 14 days of recovery**

| Puberulic acid (mg/kg/day)    |                               | 0    |            | 10   |               |
|-------------------------------|-------------------------------|------|------------|------|---------------|
| No. of animals examined       |                               | 5    |            | 5    |               |
| WBC                           | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 7.12 | $\pm 1.82$ | 9.36 | $\pm 2.00$    |
| RBC                           | ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ) | 8.06 | $\pm 0.26$ | 7.57 | $\pm 0.37^*$  |
| HGB                           | (g/dL)                        | 14.9 | $\pm 0.7$  | 14.1 | $\pm 0.3$     |
| HCT                           | (%)                           | 42.8 | $\pm 1.8$  | 41.1 | $\pm 0.9$     |
| MCV                           | (fL)                          | 53.0 | $\pm 1.0$  | 54.4 | $\pm 1.9$     |
| MCH                           | (pg)                          | 18.5 | $\pm 0.3$  | 18.7 | $\pm 0.6$     |
| MCHC                          | (g/dL)                        | 34.8 | $\pm 0.3$  | 34.3 | $\pm 0.5$     |
| PLT                           | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 926  | $\pm 27$   | 1018 | $\pm 30^{**}$ |
| RET                           | (%)                           | 3.0  | $\pm 0.4$  | 3.7  | $\pm 0.6$     |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 244  | $\pm 29$   | 280  | $\pm 52$      |
| Differential leukocyte counts |                               |      |            |      |               |
| Neutrophil                    | (%)                           | 13.4 | $\pm 5.0$  | 12.7 | $\pm 3.8$     |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.91 | $\pm 0.27$ | 1.16 | $\pm 0.36$    |
| Eosinophil                    | (%)                           | 1.2  | $\pm 0.3$  | 1.4  | $\pm 0.5$     |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.08 | $\pm 0.02$ | 0.12 | $\pm 0.02^*$  |
| Basophil                      | (%)                           | 0.2  | $\pm 0.1$  | 0.2  | $\pm 0.1$     |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.01 | $\pm 0.00$ | 0.02 | $\pm 0.01$    |
| Lymphocyte                    | (%)                           | 81.5 | $\pm 6.7$  | 82.3 | $\pm 5.3$     |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 5.86 | $\pm 1.89$ | 7.75 | $\pm 1.98$    |
| Monocyte                      | (%)                           | 3.7  | $\pm 1.9$  | 3.4  | $\pm 1.7$     |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.25 | $\pm 0.12$ | 0.31 | $\pm 0.16$    |

Values are means  $\pm$  SDs.

\*, \*\*: Significantly different from the control at  $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

**Table 12. Hematology data for female Crl:CD (SD) rats treated with puberulic acid for 28 days and 14 days of recovery**

| Puberulic acid (mg/kg/day)    |                               | 0    |   |      | 3    |   |      |
|-------------------------------|-------------------------------|------|---|------|------|---|------|
| No. of animals examined       |                               | 5    |   |      | 5    |   |      |
| WBC                           | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 6.30 | ± | 0.82 | 6.04 | ± | 1.11 |
| RBC                           | ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ) | 8.04 | ± | 0.33 | 7.93 | ± | 0.36 |
| HGB                           | (g/dL)                        | 15.0 | ± | 0.6  | 14.6 | ± | 0.6  |
| HCT                           | (%)                           | 42.7 | ± | 2.0  | 41.6 | ± | 2.1  |
| MCV                           | (fL)                          | 53.2 | ± | 0.9  | 52.6 | ± | 3.2  |
| MCH                           | (pg)                          | 18.6 | ± | 0.2  | 18.4 | ± | 0.9  |
| MCHC                          | (g/dL)                        | 35.1 | ± | 0.3  | 35.0 | ± | 0.5  |
| PLT                           | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 955  | ± | 79   | 1012 | ± | 156  |
| RET                           | (%)                           | 3.2  | ± | 0.5  | 2.8  | ± | 0.6  |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 255  | ± | 33   | 224  | ± | 41   |
| Differential leukocyte counts |                               |      |   |      |      |   |      |
| Neutrophil                    | (%)                           | 12.2 | ± | 4.9  | 11.1 | ± | 4.2  |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.78 | ± | 0.38 | 0.64 | ± | 0.14 |
| Eosinophil                    | (%)                           | 1.5  | ± | 0.4  | 1.7  | ± | 0.4  |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.09 | ± | 0.03 | 0.10 | ± | 0.03 |
| Basophil                      | (%)                           | 0.2  | ± | 0.1  | 0.3  | ± | 0.1  |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.01 | ± | 0.01 | 0.02 | ± | 0.01 |
| Lymphocyte                    | (%)                           | 84.1 | ± | 5.3  | 84.4 | ± | 4.0  |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 5.28 | ± | 0.65 | 5.13 | ± | 1.12 |
| Monocyte                      | (%)                           | 2.0  | ± | 0.6  | 2.5  | ± | 0.9  |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.13 | ± | 0.04 | 0.15 | ± | 0.06 |

Values are means ± SDs.

**Table 13. Serum biochemistry data for male Crl:CD (SD) rats treated with puberulic acid for 28 days**

| Puberulic acid (mg/kg/day) |         | 0     |        | 1     |         | 3     |         | 10    |          |
|----------------------------|---------|-------|--------|-------|---------|-------|---------|-------|----------|
| No. of animals examined    |         | 5     |        | 5     |         | 5     |         | 5     |          |
| TP                         | (g/dL)  | 6.00  | ± 0.27 | 5.76  | ± 0.26  | 5.76  | ± 0.18  | 5.88  | ± 0.33   |
| A/G                        |         | 2.36  | ± 0.30 | 2.56  | ± 0.22  | 2.52  | ± 0.24  | 2.50  | ± 0.26   |
| ALB                        | (g/dL)  | 4.20  | ± 0.20 | 4.14  | ± 0.13  | 4.12  | ± 0.15  | 4.20  | ± 0.21   |
| T-BIL                      | (mg/dL) | 0.06  | ± 0.01 | 0.06  | ± 0.00  | 0.06  | ± 0.01  | 0.05  | ± 0.01   |
| GLU                        | (mg/dL) | 102.6 | ± 10.1 | 116.4 | ± 21.1  | 109.8 | ± 20.1  | 103.8 | ± 17.3   |
| TG                         | (mg/dL) | 47.2  | ± 11.3 | 51.2  | ± 18.3  | 75.6  | ± 14.8* | 57.6  | ± 20.2   |
| T-CHO                      | (mg/dL) | 61.2  | ± 7.6  | 57.6  | ± 11.1  | 61.2  | ± 6.1   | 64.4  | ± 20.5   |
| BUN                        | (mg/dL) | 12.1  | ± 0.7  | 12.1  | ± 1.1   | 11.6  | ± 1.4   | 12.9  | ± 2.6    |
| CRE                        | (mg/dL) | 0.29  | ± 0.02 | 0.31  | ± 0.04  | 0.29  | ± 0.03  | 0.39  | ± 0.08** |
| Na                         | (mEq/L) | 143.0 | ± 0.7  | 142.2 | ± 1.1   | 141.4 | ± 0.5*  | 141.4 | ± 1.1*   |
| Cl                         | (mEq/L) | 102.0 | ± 2.0  | 103.8 | ± 1.3   | 102.8 | ± 1.3   | 103.4 | ± 1.7    |
| K                          | (mEq/L) | 4.94  | ± 0.29 | 4.86  | ± 0.27  | 4.96  | ± 0.17  | 4.72  | ± 0.24   |
| Ca                         | (mg/dL) | 10.26 | ± 0.18 | 10.02 | ± 0.30  | 10.12 | ± 0.30  | 10.20 | ± 0.40   |
| IP                         | (mg/dL) | 9.12  | ± 0.68 | 8.24  | ± 0.26* | 8.12  | ± 0.43* | 9.04  | ± 0.61   |
| AST                        | (IU/L)  | 131.2 | ± 17.7 | 114.6 | ± 20.6  | 107.6 | ± 14.5  | 110.0 | ± 13.6   |
| ALT                        | (IU/L)  | 34.4  | ± 5.1  | 33.4  | ± 6.8   | 33.0  | ± 3.0   | 34.2  | ± 3.6    |
| ALP                        | (IU/L)  | 205.2 | ± 58.9 | 215.6 | ± 40.5  | 215.2 | ± 54.7  | 244.4 | ± 46.2   |
| γ-GTP                      | (IU/L)  | <3    |        | <3    |         | <3    |         | <3    |          |

Values are means ± SDs.

\*, \*\*: Significantly different from the control at  $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

Table 14. Serum biochemistry data for female Crl:CD (SD) rats treated with puberulic acid for 28 days

| Puberulic acid (mg/kg/day) |         | 0     |        | 0.3   |         | 1     |         | 3     |        |
|----------------------------|---------|-------|--------|-------|---------|-------|---------|-------|--------|
| No. of animals examined    |         | 5     |        | 5     |         | 5     |         | 5     |        |
| TP                         | (g/dL)  | 6.28  | ± 0.41 | 6.16  | ± 0.21  | 6.30  | ± 0.37  | 6.40  | ± 0.41 |
| A/G                        |         | 2.72  | ± 0.35 | 3.28  | ± 0.19* | 2.68  | ± 0.24  | 2.98  | ± 0.28 |
| ALB                        | (g/dL)  | 4.58  | ± 0.18 | 4.72  | ± 0.19  | 4.58  | ± 0.33  | 4.78  | ± 0.29 |
| T-BIL                      | (mg/dL) | 0.09  | ± 0.01 | 0.09  | ± 0.00  | 0.09  | ± 0.02  | 0.08  | ± 0.02 |
| GLU                        | (mg/dL) | 90.4  | ± 21.5 | 95.0  | ± 18.4  | 91.4  | ± 15.8  | 106.0 | ± 18.3 |
| TG                         | (mg/dL) | 26.4  | ± 19.1 | 31.0  | ± 11.6  | 22.4  | ± 10.5  | 35.8  | ± 19.8 |
| T-CHO                      | (mg/dL) | 70.6  | ± 2.7  | 84.0  | ± 15.7  | 66.8  | ± 8.9   | 73.0  | ± 7.9  |
| BUN                        | (mg/dL) | 15.5  | ± 2.3  | 14.7  | ± 2.9   | 14.0  | ± 1.6   | 15.8  | ± 2.9  |
| CRE                        | (mg/dL) | 0.35  | ± 0.05 | 0.34  | ± 0.03  | 0.34  | ± 0.01  | 0.43  | ± 0.12 |
| Na                         | (mEq/L) | 137.4 | ± 0.9  | 138.6 | ± 1.1   | 138.4 | ± 1.1   | 138.6 | ± 0.5  |
| Cl                         | (mEq/L) | 101.6 | ± 0.9  | 104.0 | ± 0.7** | 104.0 | ± 1.2** | 103.8 | ± 1.3* |
| K                          | (mEq/L) | 4.60  | ± 0.25 | 4.64  | ± 0.26  | 4.62  | ± 0.11  | 4.58  | ± 0.27 |
| Ca                         | (mg/dL) | 10.02 | ± 0.15 | 10.08 | ± 0.13  | 10.02 | ± 0.36  | 10.22 | ± 0.25 |
| IP                         | (mg/dL) | 7.20  | ± 0.73 | 7.00  | ± 0.67  | 7.22  | ± 0.04  | 7.38  | ± 0.44 |
| AST                        | (IU/L)  | 111.4 | ± 7.2  | 103.6 | ± 14.1  | 110.0 | ± 12.0  | 99.0  | ± 8.8  |
| ALT                        | (IU/L)  | 24.8  | ± 4.2  | 25.8  | ± 3.7   | 26.8  | ± 6.6   | 27.4  | ± 5.3  |
| ALP                        | (IU/L)  | 114.8 | ± 31.5 | 135.0 | ± 31.0  | 140.4 | ± 28.0  | 120.2 | ± 33.6 |
| γ-GTP                      | (IU/L)  | <3    |        | <3    |         | <3    |         | <3    |        |

Values are means ± SDs.

\*, \*\*: Significantly different from the control at  $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

**Table 15. Serum biochemistry data for male Crl:CD (SD) rats treated with puberulic acid for 28 days and 14 days of recovery**

| Puberulic acid (mg/kg/day) |         | 0     |        | 10    |         |
|----------------------------|---------|-------|--------|-------|---------|
| No. of animals examined    |         | 5     |        | 5     |         |
| TP                         | (g/dL)  | 6.12  | ± 0.23 | 6.00  | ± 0.20  |
| A/G                        |         | 2.36  | ± 0.17 | 2.56  | ± 0.40  |
| ALB                        | (g/dL)  | 4.28  | ± 0.15 | 4.28  | ± 0.15  |
| T-BIL                      | (mg/dL) | 0.06  | ± 0.00 | 0.07  | ± 0.01  |
| GLU                        | (mg/dL) | 136.0 | ± 5.2  | 110.8 | ± 18.5* |
| TG                         | (mg/dL) | 64.0  | ± 15.3 | 35.2  | ± 6.8** |
| T-CHO                      | (mg/dL) | 60.8  | ± 11.4 | 52.0  | ± 13.6  |
| BUN                        | (mg/dL) | 14.4  | ± 2.8  | 13.9  | ± 0.8   |
| CRE                        | (mg/dL) | 0.29  | ± 0.03 | 0.33  | ± 0.04  |
| Na                         | (mEQ/L) | 142.0 | ± 0.7  | 142.2 | ± 1.5   |
| Cl                         | (mEQ/L) | 102.6 | ± 0.9  | 103.4 | ± 2.3   |
| K                          | (mEQ/L) | 5.20  | ± 0.32 | 5.00  | ± 0.14  |
| Ca                         | (mg/dL) | 10.30 | ± 0.23 | 10.08 | ± 0.08  |
| IP                         | (mg/dL) | 7.26  | ± 0.34 | 7.60  | ± 0.10  |
| AST                        | (IU/L)  | 102.4 | ± 14.0 | 136.4 | ± 22.0* |
| ALT                        | (IU/L)  | 32.6  | ± 3.7  | 32.2  | ± 4.8   |
| ALP                        | (IU/L)  | 172.2 | ± 25.1 | 161.0 | ± 41.1  |
| γ-GTP                      | (IU/L)  | <3    |        | <3    |         |

Values are means ± SDs.

\*, \*\*: Significantly different from the control at  $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

**Table 16. Serum biochemistry data for female Crl:CD (SD) rats treated with puberulic acid for 28 days and 14 days of recovery**

| Puberulic acid (mg/kg/day) |         | 0     |        | 3     |          |
|----------------------------|---------|-------|--------|-------|----------|
| No. of animals examined    |         | 5     |        | 5     |          |
| TP                         | (g/dL)  | 6.44  | ± 0.38 | 6.56  | ± 0.44   |
| A/G                        |         | 3.36  | ± 0.25 | 2.70  | ± 0.25** |
| ALB                        | (g/dL)  | 4.96  | ± 0.33 | 4.78  | ± 0.24   |
| T-BIL                      | (mg/dL) | 0.11  | ± 0.02 | 0.10  | ± 0.01   |
| GLU                        | (mg/dL) | 94.6  | ± 11.1 | 95.4  | ± 10.2   |
| TG                         | (mg/dL) | 12.0  | ± 4.2  | 14.0  | ± 7.6    |
| T-CHO                      | (mg/dL) | 62.6  | ± 11.3 | 65.6  | ± 20.3   |
| BUN                        | (mg/dL) | 17.6  | ± 4.1  | 16.5  | ± 2.0    |
| CRE                        | (mg/dL) | 0.40  | ± 0.08 | 0.37  | ± 0.03   |
| Na                         | (mEQ/L) | 140.8 | ± 0.8  | 139.8 | ± 0.8    |
| Cl                         | (mEQ/L) | 104.8 | ± 1.3  | 103.4 | ± 0.5    |
| K                          | (mEQ/L) | 4.42  | ± 0.13 | 4.54  | ± 0.18   |
| Ca                         | (mg/dL) | 10.00 | ± 0.27 | 10.24 | ± 0.18   |
| IP                         | (mg/dL) | 6.42  | ± 0.24 | 7.26  | ± 0.50** |
| AST                        | (IU/L)  | 126.4 | ± 25.9 | 123.8 | ± 11.9   |
| ALT                        | (IU/L)  | 25.4  | ± 4.3  | 41.6  | ± 21.6   |
| ALP                        | (IU/L)  | 102.6 | ± 28.0 | 87.8  | ± 24.7   |
| γ-GTP                      | (IU/L)  | <3    |        | <3    |          |

Values are means ± SDs.

\*\* : Significantly different from the control at  $p < 0.01$ .

Table 17. Organ weight data for male Crl:CD (SD) rats treated with puberulic acid for 28 days

| Puberulic acid (mg/kg/day) |             | 0             | 1             | 3             | 10            |
|----------------------------|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| No. of animals examined    |             | 5             | 5             | 5             | 5             |
| Body weight                | (g)         | 381.3 ± 6.5   | 375.4 ± 43.1  | 377.0 ± 28.3  | 354.6 ± 39.8  |
| Brain                      | (g)         | 1.99 ± 0.03   | 1.98 ± 0.07   | 2.01 ± 0.08   | 1.97 ± 0.12   |
|                            | (g/100gBW)  | 0.52 ± 0.01   | 0.53 ± 0.05   | 0.53 ± 0.04   | 0.56 ± 0.04   |
| Thymus                     | (g)         | 0.61 ± 0.16   | 0.51 ± 0.09   | 0.62 ± 0.11   | 0.59 ± 0.10   |
|                            | (g/100gBW)  | 0.16 ± 0.04   | 0.14 ± 0.03   | 0.16 ± 0.03   | 0.17 ± 0.03   |
| Heart                      | (g)         | 1.44 ± 0.14   | 1.45 ± 0.16   | 1.36 ± 0.15   | 1.18 ± 0.10*  |
|                            | (g/100gBW)  | 0.38 ± 0.04   | 0.39 ± 0.03   | 0.36 ± 0.03   | 0.33 ± 0.03   |
| Lungs                      | (g)         | 1.48 ± 0.28   | 1.30 ± 0.12   | 1.32 ± 0.09   | 1.25 ± 0.12   |
|                            | (g/100gBW)  | 0.39 ± 0.07   | 0.35 ± 0.02   | 0.35 ± 0.01   | 0.35 ± 0.02   |
| Spleen                     | (g)         | 0.71 ± 0.11   | 0.72 ± 0.14   | 0.67 ± 0.10   | 0.67 ± 0.09   |
|                            | (g/100gBW)  | 0.19 ± 0.03   | 0.19 ± 0.02   | 0.18 ± 0.02   | 0.19 ± 0.03   |
| Liver                      | (g)         | 10.54 ± 0.61  | 10.71 ± 1.67  | 10.84 ± 1.03  | 9.93 ± 1.85   |
|                            | (g/100gBW)  | 2.76 ± 0.12   | 2.84 ± 0.16   | 2.87 ± 0.11   | 2.78 ± 0.23   |
| Adrenals                   | (g)         | 0.057 ± 0.007 | 0.053 ± 0.009 | 0.052 ± 0.010 | 0.052 ± 0.005 |
|                            | (mg/100gBW) | 15.0 ± 1.7    | 14.3 ± 2.8    | 13.7 ± 1.9    | 14.8 ± 1.9    |
| Kidneys                    | (g)         | 2.62 ± 0.25   | 2.54 ± 0.43   | 2.66 ± 0.24   | 2.85 ± 0.30   |
|                            | (g/100gBW)  | 0.69 ± 0.06   | 0.67 ± 0.05   | 0.71 ± 0.04   | 0.81 ± 0.14   |
| Testes                     | (g)         | 3.41 ± 0.40   | 3.11 ± 0.34   | 3.32 ± 0.15   | 3.10 ± 0.15   |
|                            | (g/100gBW)  | 0.90 ± 0.10   | 0.83 ± 0.05   | 0.88 ± 0.06   | 0.88 ± 0.13   |
| Pituitary gland            | (g)         | 0.013 ± 0.001 | 0.012 ± 0.002 | 0.012 ± 0.001 | 0.013 ± 0.001 |
|                            | (mg/100gBW) | 3.44 ± 0.28   | 3.28 ± 0.37   | 3.08 ± 0.28   | 3.60 ± 0.41   |
| Thyroid gland              | (g)         | 0.020 ± 0.003 | 0.017 ± 0.004 | 0.020 ± 0.001 | 0.021 ± 0.004 |
|                            | (mg/100gBW) | 5.29 ± 0.69   | 4.60 ± 1.02   | 5.36 ± 0.22   | 5.99 ± 1.02   |
| Salivary gland             | (g)         | 0.64 ± 0.10   | 0.63 ± 0.10   | 0.61 ± 0.06   | 0.57 ± 0.05   |
|                            | (g/100gBW)  | 0.17 ± 0.02   | 0.17 ± 0.03   | 0.16 ± 0.01   | 0.16 ± 0.02   |
| Seminal vesicle            | (g)         | 1.01 ± 0.08   | 1.04 ± 0.12   | 0.99 ± 0.18   | 1.09 ± 0.11   |
|                            | (g/100gBW)  | 0.27 ± 0.02   | 0.28 ± 0.03   | 0.26 ± 0.05   | 0.31 ± 0.03   |
| Prostate                   | (g)         | 0.80 ± 0.08   | 0.83 ± 0.14   | 0.84 ± 0.10   | 0.77 ± 0.07   |
|                            | (g/100gBW)  | 0.21 ± 0.02   | 0.22 ± 0.04   | 0.22 ± 0.02   | 0.22 ± 0.04   |

Values are means ± SDs.

\*: Significantly different from the control at  $p < 0.05$ .

Table 18. Organ weight data for female Crl:CD (SD) rats treated with puberulic acid for 28 days

| Puberulic acid (mg/kg/day) |             | 0             | 0.3           | 1             | 3             |
|----------------------------|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| No. of animals examined    |             | 5             | 5             | 5             | 5             |
| Body weight                | (g)         | 226.6 ± 22.4  | 231.3 ± 17.4  | 221.9 ± 34.6  | 212.7 ± 23.9  |
| Brain                      | (g)         | 1.79 ± 0.07   | 1.82 ± 0.03   | 1.84 ± 0.07   | 1.87 ± 0.06   |
|                            | (g/100gBW)  | 0.79 ± 0.06   | 0.79 ± 0.06   | 0.84 ± 0.10   | 0.89 ± 0.12   |
| Thymus                     | (g)         | 0.43 ± 0.05   | 0.44 ± 0.02   | 0.45 ± 0.13   | 0.44 ± 0.13   |
|                            | (g/100gBW)  | 0.19 ± 0.01   | 0.19 ± 0.02   | 0.20 ± 0.03   | 0.21 ± 0.04   |
| Heart                      | (g)         | 0.85 ± 0.11   | 0.90 ± 0.10   | 0.87 ± 0.09   | 0.83 ± 0.16   |
|                            | (g/100gBW)  | 0.38 ± 0.04   | 0.39 ± 0.02   | 0.40 ± 0.04   | 0.39 ± 0.04   |
| Lungs                      | (g)         | 1.01 ± 0.04   | 1.01 ± 0.05   | 0.98 ± 0.07   | 0.93 ± 0.08   |
|                            | (g/100gBW)  | 0.45 ± 0.03   | 0.44 ± 0.02   | 0.45 ± 0.05   | 0.44 ± 0.01   |
| Spleen                     | (g)         | 0.44 ± 0.06   | 0.52 ± 0.08   | 0.48 ± 0.02   | 0.44 ± 0.13   |
|                            | (g/100gBW)  | 0.19 ± 0.02   | 0.23 ± 0.03   | 0.22 ± 0.03   | 0.21 ± 0.04   |
| Liver                      | (g)         | 6.00 ± 0.74   | 6.28 ± 0.70   | 5.94 ± 1.00   | 5.98 ± 0.90   |
|                            | (g/100gBW)  | 2.65 ± 0.27   | 2.71 ± 0.19   | 2.68 ± 0.08   | 2.80 ± 0.17   |
| Adrenals                   | (g)         | 0.059 ± 0.007 | 0.064 ± 0.016 | 0.062 ± 0.008 | 0.064 ± 0.009 |
|                            | (mg/100gBW) | 26.1 ± 4.2    | 27.6 ± 6.9    | 28.2 ± 4.0    | 30.0 ± 1.5    |
| Kidneys                    | (g)         | 1.70 ± 0.28   | 1.60 ± 0.20   | 1.59 ± 0.19   | 1.58 ± 0.17   |
|                            | (g/100gBW)  | 0.75 ± 0.07   | 0.69 ± 0.04   | 0.72 ± 0.03   | 0.75 ± 0.06   |
| Ovaries                    | (g)         | 0.077 ± 0.008 | 0.076 ± 0.017 | 0.080 ± 0.014 | 0.091 ± 0.010 |
|                            | (mg/100gBW) | 34.3 ± 4.0    | 33.0 ± 7.4    | 36.6 ± 9.2    | 43.2 ± 4.9    |
| Pituitary gland            | (g)         | 0.013 ± 0.002 | 0.014 ± 0.002 | 0.015 ± 0.001 | 0.014 ± 0.003 |
|                            | (mg/100gBW) | 5.95 ± 1.14   | 5.96 ± 0.93   | 6.73 ± 0.87   | 6.54 ± 1.06   |
| Thyroid gland              | (g)         | 0.015 ± 0.001 | 0.018 ± 0.003 | 0.015 ± 0.002 | 0.015 ± 0.003 |
|                            | (mg/100gBW) | 6.45 ± 0.73   | 7.64 ± 0.99   | 6.96 ± 0.34   | 7.22 ± 0.90   |
| Salivary gland             | (g)         | 0.40 ± 0.03   | 0.40 ± 0.04   | 0.43 ± 0.06   | 0.38 ± 0.05   |
|                            | (g/100gBW)  | 0.18 ± 0.02   | 0.17 ± 0.02   | 0.19 ± 0.01   | 0.18 ± 0.01   |

Values are means ± SDs.

**Table 19. Organ weight data for male Crl:CD (SD) rats treated with puberulic acid for 28 days and 14 days of recovery**

| Puberulic acid (mg/kg/day) |             | 0     |         | 10    |         |
|----------------------------|-------------|-------|---------|-------|---------|
| No. of animals examined    |             | 5     |         | 5     |         |
| Body weight                | (g)         | 454.1 | ± 49.9  | 449.3 | ± 49.9  |
| Brain                      | (g)         | 2.00  | ± 0.07  | 2.09  | ± 0.08  |
|                            | (g/100gBW)  | 0.44  | ± 0.04  | 0.47  | ± 0.04  |
| Thymus                     | (g)         | 0.59  | ± 0.16  | 0.54  | ± 0.17  |
|                            | (g/100gBW)  | 0.13  | ± 0.03  | 0.12  | ± 0.03  |
| Heart                      | (g)         | 1.49  | ± 0.14  | 1.42  | ± 0.17  |
|                            | (g/100gBW)  | 0.33  | ± 0.01  | 0.32  | ± 0.02  |
| Lungs                      | (g)         | 1.44  | ± 0.07  | 1.44  | ± 0.13  |
|                            | (g/100gBW)  | 0.32  | ± 0.02  | 0.32  | ± 0.02  |
| Spleen                     | (g)         | 0.70  | ± 0.13  | 0.77  | ± 0.15  |
|                            | (g/100gBW)  | 0.15  | ± 0.02  | 0.17  | ± 0.03  |
| Liver                      | (g)         | 12.67 | ± 1.95  | 11.80 | ± 1.83  |
|                            | (g/100gBW)  | 2.79  | ± 0.26  | 2.62  | ± 0.20  |
| Adrenals                   | (g)         | 0.050 | ± 0.004 | 0.057 | ± 0.012 |
|                            | (mg/100gBW) | 11.1  | ± 0.6   | 12.6  | ± 1.5   |
| Kidneys                    | (g)         | 2.91  | ± 0.52  | 2.98  | ± 0.47  |
|                            | (g/100gBW)  | 0.64  | ± 0.05  | 0.66  | ± 0.04  |
| Testes                     | (g)         | 3.10  | ± 0.18  | 3.32  | ± 0.39  |
|                            | (g/100gBW)  | 0.69  | ± 0.09  | 0.74  | ± 0.07  |
| Pituitary gland            | (g)         | 0.013 | ± 0.002 | 0.013 | ± 0.001 |
|                            | (mg/100gBW) | 2.84  | ± 0.27  | 3.00  | ± 0.22  |
| Thyroid gland              | (g)         | 0.020 | ± 0.004 | 0.018 | ± 0.001 |
|                            | (mg/100gBW) | 4.49  | ± 0.33  | 4.09  | ± 0.57  |
| Salivary gland             | (g)         | 0.68  | ± 0.11  | 0.73  | ± 0.07  |
|                            | (g/100gBW)  | 0.15  | ± 0.02  | 0.16  | ± 0.01  |
| Seminal vesicle            | (g)         | 1.31  | ± 0.25  | 1.39  | ± 0.27  |
|                            | (g/100gBW)  | 0.29  | ± 0.05  | 0.31  | ± 0.04  |
| Prostate                   | (g)         | 1.05  | ± 0.22  | 1.11  | ± 0.27  |
|                            | (g/100gBW)  | 0.23  | ± 0.04  | 0.24  | ± 0.04  |

Values are means ± SDs.

**Table 20. Organ weight data for female Crl:CD (SD) rats treated with puberulic acid for 28 days and 14 days of recovery**

| Puberulic acid (mg/kg/day) |             | 0     |         | 3     |         |
|----------------------------|-------------|-------|---------|-------|---------|
| No. of animals examined    |             | 5     |         | 5     |         |
| Body weight                | (g)         | 244.0 | ± 23.2  | 237.2 | ± 32.9  |
| Brain                      | (g)         | 1.83  | ± 0.03  | 1.89  | ± 0.12  |
|                            | (g/100gBW)  | 0.75  | ± 0.08  | 0.81  | ± 0.10  |
| Thymus                     | (g)         | 0.41  | ± 0.04  | 0.41  | ± 0.08  |
|                            | (g/100gBW)  | 0.17  | ± 0.02  | 0.17  | ± 0.02  |
| Heart                      | (g)         | 0.90  | ± 0.10  | 0.88  | ± 0.07  |
|                            | (g/100gBW)  | 0.37  | ± 0.03  | 0.37  | ± 0.03  |
| Lungs                      | (g)         | 0.99  | ± 0.05  | 1.01  | ± 0.11  |
|                            | (g/100gBW)  | 0.41  | ± 0.03  | 0.43  | ± 0.05  |
| Spleen                     | (g)         | 0.47  | ± 0.09  | 0.46  | ± 0.08  |
|                            | (g/100gBW)  | 0.19  | ± 0.03  | 0.19  | ± 0.01  |
| Liver                      | (g)         | 5.89  | ± 0.41  | 5.92  | ± 1.06  |
|                            | (g/100gBW)  | 2.42  | ± 0.12  | 2.49  | ± 0.22  |
| Adrenals                   | (g)         | 0.058 | ± 0.004 | 0.062 | ± 0.008 |
|                            | (mg/100gBW) | 24.0  | ± 2.8   | 26.0  | ± 1.0   |
| Kidneys                    | (g)         | 1.60  | ± 0.13  | 1.72  | ± 0.23* |
|                            | (g/100gBW)  | 0.66  | ± 0.03  | 0.73  | ± 0.05  |
| Ovaries                    | (g)         | 0.080 | ± 0.007 | 0.075 | ± 0.014 |
|                            | (mg/100gBW) | 32.9  | ± 0.7   | 31.6  | ± 4.6   |
| Pituitary gland            | (g)         | 0.015 | ± 0.002 | 0.015 | ± 0.002 |
|                            | (mg/100gBW) | 6.26  | ± 0.57  | 6.41  | ± 0.67  |
| Thyroid gland              | (g)         | 0.015 | ± 0.002 | 0.016 | ± 0.003 |
|                            | (mg/100gBW) | 6.27  | ± 0.63  | 6.93  | ± 1.06  |
| Salivary gland             | (g)         | 0.42  | ± 0.03  | 0.42  | ± 0.08  |
|                            | (g/100gBW)  | 0.17  | ± 0.01  | 0.18  | ± 0.03  |

Values are means ± SDs.

\*: Significantly different from the control at  $p < 0.05$ .

**Table 21. Macroscopic findings for male Crl:CD (SD) rats treated with puberulic acid for 28 days**

| Puberulic acid (mg/kg)  |                 | 0 | 1 | 3 | 10 |
|-------------------------|-----------------|---|---|---|----|
| No. of animals examined |                 | 5 | 5 | 5 | 5  |
| Organs                  | Findings        |   |   |   |    |
| Kidney                  | Pale, bilateral | - | - | - | 2  |
| Jejunum                 | Diverticulum    | 1 | - | 1 | -  |

Values are No. of animals.

**Table 22. Macroscopic findings for female Crl:CD (SD) rats treated with puberulic acid for 28 days**

| Puberulic acid (mg/kg)  |                 | 0 | 0.3 | 1 | 3 |
|-------------------------|-----------------|---|-----|---|---|
| No. of animals examined |                 | 5 | 5   | 5 | 5 |
| Organs                  | Findings        |   |     |   |   |
| Kidney                  | Pale, bilateral | - | -   | - | 1 |

Values are No. of animals.

**Table 23. Macroscopic findings for male Crl:CD(SD) rats treated with puberulic acid for 28 days and 14 days of recovery**

| Puberulic acid (mg/kg)  |                        | 0 | 10 |
|-------------------------|------------------------|---|----|
| No. of animals examined |                        | 5 | 5  |
| Organs                  | Findings               |   |    |
| Kidney                  | Discolored foci (pale) | - | 1  |

Values are No. of animals.

**Table 24. Histopathological findings for male Crl:CD (SD) rats treated with puberulic acid for 28 days**

|            |                                                     | Puberulic acid (mg/kg)  | 0 | 1 | 3              | 10        |
|------------|-----------------------------------------------------|-------------------------|---|---|----------------|-----------|
|            |                                                     | No. of animals examined | 5 | 5 | 5              | 5         |
| Organs     | Findings                                            |                         |   |   |                |           |
| Kidney     | No abnormalities detected                           |                         | 5 | 5 | 5              | -         |
|            | Vacuolation, tubule, proximal (±/+)                 |                         | - | - | -              | 5** (3/2) |
|            | Necrosis, tubule, proximal (±/+)                    |                         | - | - | -              | 5** (3/2) |
|            | Regeneration, tubule, proximal (+/++)               |                         | - | - | -              | 5** (3/2) |
|            | Infiltration, interstitium (±)                      |                         | - | - | -              | 1         |
| Stomach    | No abnormalities detected                           |                         | 5 | 5 | 1              | 0         |
|            | Apoptosis, mucosa, glandular stomach (±/+)          |                         | - | - | 4* (3/1)       | 5** (2/3) |
|            | Hyperplasia, diffuse, mucosa, glandular stomach (±) |                         | - | - | 1              | 4*        |
| Jejunum    | No abnormalities detected                           |                         | 4 | N | - <sup>a</sup> | 5         |
|            | Diverticulum (P)                                    |                         | 1 | N | 1 <sup>a</sup> | -         |
| Lung       | No abnormalities detected                           |                         | 4 | N | N              | 3         |
|            | Inflammation, focal (±)                             |                         | 1 | N | N              | 2         |
| Thyroid    | No abnormalities detected                           |                         | 2 | N | N              | 3         |
|            | Ectopic tissue, thymus (P)                          |                         | 2 | N | N              | 2         |
|            | Ultimobranchial cyst (P)                            |                         | 3 | N | N              | 2         |
| Epididymis | No abnormalities detected                           |                         | 5 | N | N              | 4         |
|            | Sperm granuloma (P)                                 |                         | - | N | N              | 1         |
| Eye        | No abnormalities detected                           |                         | 4 | N | N              | 5         |
|            | Retinal rosettes, unilateral (±)                    |                         | 1 | N | N              | -         |
| Liver      | No abnormalities detected                           |                         | 4 | N | N              | 4         |
|            | Necrosis, hepatocytes, focal (±)                    |                         | 1 | N | N              | 1         |

Values are No. of animals.

±: Minimal, +: Mild, ++: Moderate, +++: Severe, P: Present, N: Not examined

\*, \*\*: Significantly different from the control at  $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively

<sup>a</sup>: The jejunum of one animal in the 3 mg/kg group was examined histopathologically since a diverticulum was detected at necropsy.

**Table 25. Histopathological findings for female Crl:CD (SD) rats treated with puberulic acid for 28 days**

|           |                                                     | Puberulic acid (mg/kg)  | 0 | 0.3 | 1 | 3         |
|-----------|-----------------------------------------------------|-------------------------|---|-----|---|-----------|
|           |                                                     | No. of animals examined | 5 | 5   | 5 | 5         |
| Organs    | Findings                                            |                         |   |     |   |           |
| Kidney    | No abnormalities detected                           |                         | 5 | 5   | 5 | -         |
|           | Vacuolation, tubule, proximal (±/+)                 |                         | - | -   | - | 5** (4/1) |
|           | Necrosis, tubule, proximal (±/+)                    |                         | - | -   | - | 5** (4/1) |
|           | Regeneration, tubule, proximal (+/++)               |                         | - | -   | - | 5** (4/1) |
| Stomach   | No abnormalities detected                           |                         | 5 | 5   | 5 | 1         |
|           | Apoptosis, mucosa, glandular stomach (±/+)          |                         | - | -   | - | 4* (3/1)  |
|           | Hyperplasia, diffuse, mucosa, glandular stomach (±) |                         | - | -   | - | 2         |
| Lung      | No abnormalities detected                           |                         | 3 | N   | N | 5         |
|           | Aggregation, macrophage, alveoli (±)                |                         | 1 | N   | N | -         |
|           | Inflammation, focal (±)                             |                         | 1 | N   | N | -         |
| Thyroid   | No abnormalities detected                           |                         | 2 | N   | N | 3         |
|           | Ectopic tissue, thymus (P)                          |                         | 1 | N   | N | -         |
|           | Ultimobranchial cyst (P)                            |                         | 2 | N   | N | 2         |
| Pituitary | No abnormalities detected                           |                         | 4 | N   | N | 5         |
|           | Aberrant craniopharyngeal structures (P)            |                         | 1 | N   | N | -         |
| Liver     | No abnormalities detected                           |                         | 3 | N   | N | 3         |
|           | Necrosis, hepatocytes, focal (±)                    |                         | 2 | N   | N | 2         |

Values are No. of animals.

±: Minimal, +: Mild, ++: Moderate, +++: Severe, P: Present, N: Not examined

\*, \*\*: Significantly different from the control at  $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively

**Table 26. Histopathological findings for male Crl:CD (SD) rats treated with puberulic acid for 28 days and 14 days of recovery**

|         |                                                | Puberulic acid (mg/kg)  | 0 | 10 |
|---------|------------------------------------------------|-------------------------|---|----|
|         |                                                | No. of animals examined | 5 | 5  |
| Organs  | Findings                                       |                         |   |    |
| Kidney  | No abnormalities detected                      |                         | 5 | 4  |
|         | Fibrosis, interstitial, focal (++)             |                         | - | 1  |
|         | Regeneration, tubule, proximal (±)             |                         | - | 1  |
|         | Mineralization, renal papilla (±)              |                         | - | 1  |
|         | Dilatation, collecting duct, renal papilla (±) |                         | - | 1  |
| Stomach | No abnormalities detected                      |                         | 5 | 5  |

Values are No. of animals.

±: Minimal, +: Mild, ++: Moderate, +++: Severe

**Table 27. Histopathological findings for female Crl:CD (SD) rats treated with puberulic acid for 28 days and 14 days of recovery**

|         |                           | Puberulic acid (mg/kg)  | 0 | 3 |
|---------|---------------------------|-------------------------|---|---|
|         |                           | No. of animals examined | 5 | 5 |
| Organs  | Findings                  |                         |   |   |
| Kidney  | No abnormalities detected |                         | 5 | 5 |
| Stomach | No abnormalities detected |                         | 5 | 5 |

Values are No. of animals.

±: Minimal, +: Mild, ++: Moderate, +++: Severe

## ラットを用いたプベルル酸の28日間反復経口投与毒性試験

### 腎臓

## 病理組織学的検査：投与期間終了時剖検群

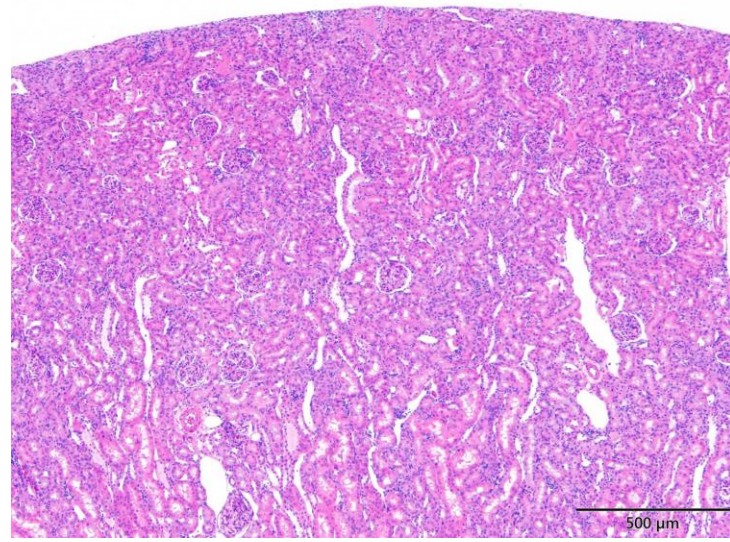
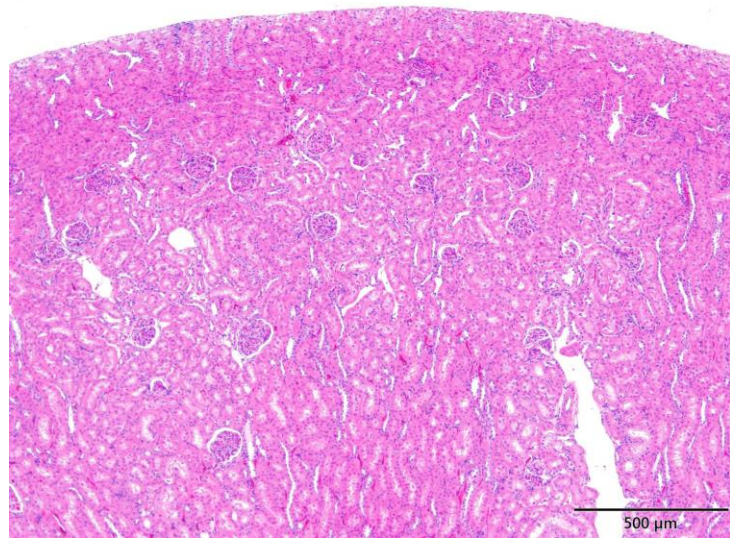
|               |                 | 雄 |   |   |         | 雌 |     |   |         |
|---------------|-----------------|---|---|---|---------|---|-----|---|---------|
| プベルル酸 (mg/kg) |                 | 0 | 1 | 3 | 10      | 0 | 0.3 | 1 | 3       |
| 検査例数          |                 | 5 | 5 | 5 | 5       | 5 | 5   | 5 | 5       |
| 臓器            | 所見              |   |   |   |         |   |     |   |         |
| 腎臓            | 近位尿細管の空胞化 (±/+) | - | - | - | 5 (3/2) | - | -   | - | 5 (4/1) |
|               | 近位尿細管の壊死 (±/+)  | - | - | - | 5 (3/2) | - | -   | - | 5 (4/1) |
|               | 近位尿細管の再生 (+/++) | - | - | - | 5 (3/2) | - | -   | - | 5 (4/1) |
|               | 間質の炎症細胞浸潤 (±)   | - | - | - | 1       | - | -   | - | -       |

±: 極軽度, +: 軽度, ++: 中等度, +++: 重度

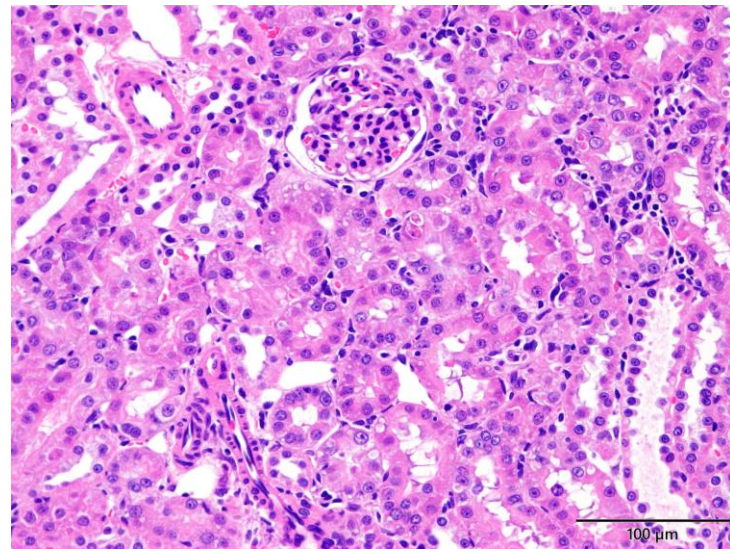
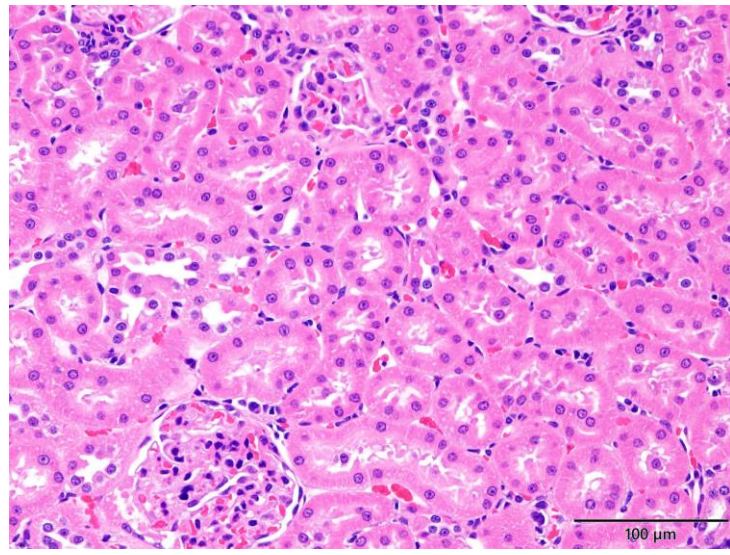
対照群 (No. 101)

10 mg/kg群 (No. 132)

低倍率



高倍率



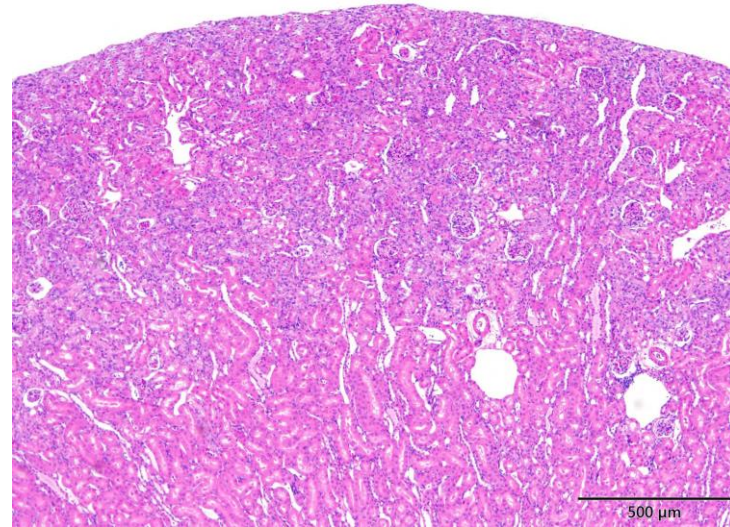
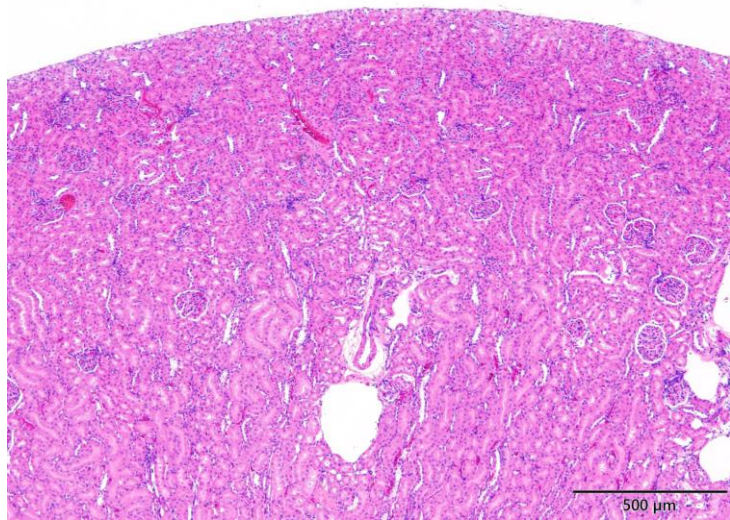
異常なし

近位尿細管の空胞化、壊死、再生  
炎症細胞浸潤

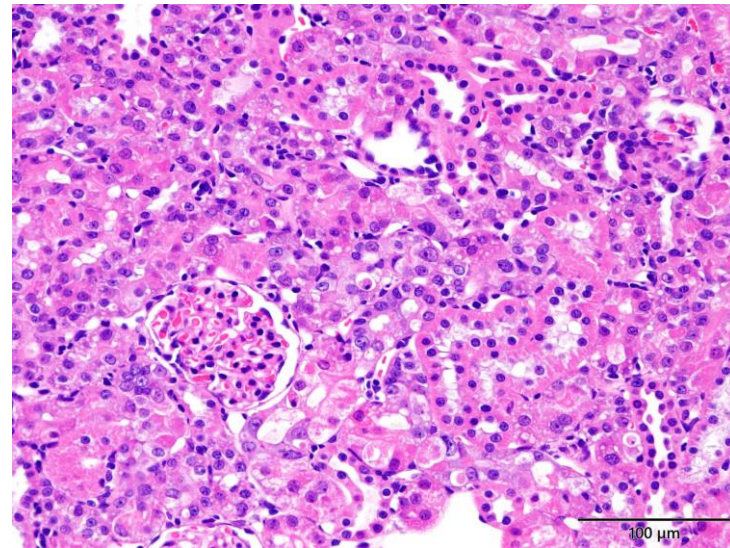
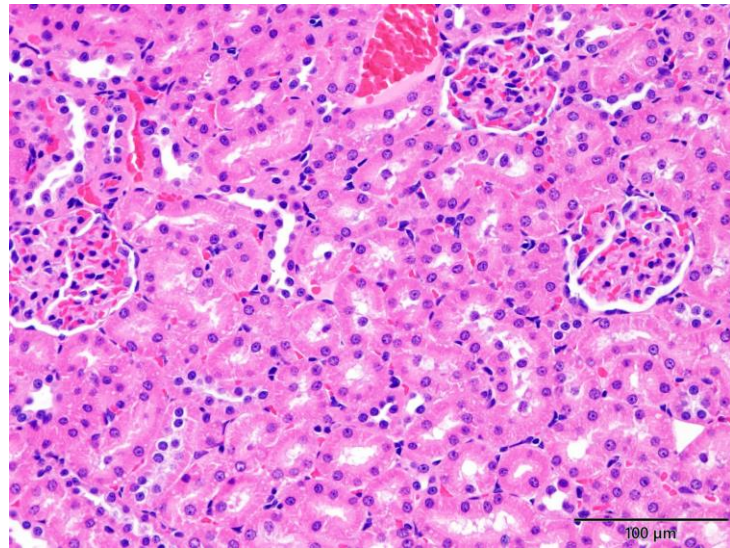
対照群 (No. 201)

3 mg/kg群 (No. 231)

低倍率



高倍率



異常なし

近位尿細管の空胞化、壊死、再生

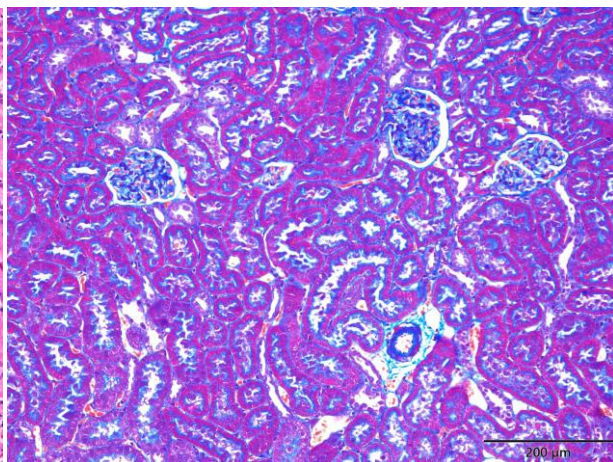
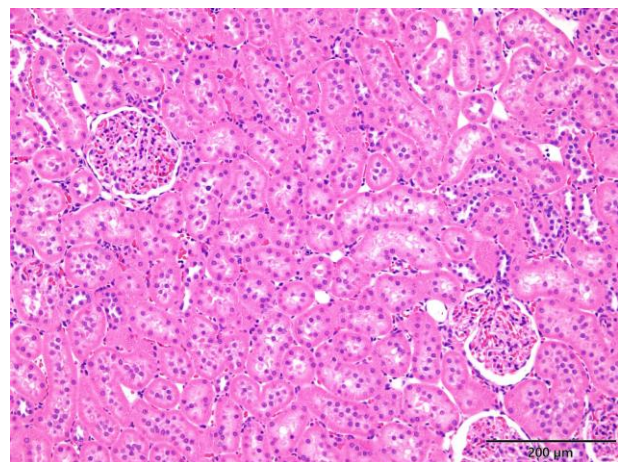
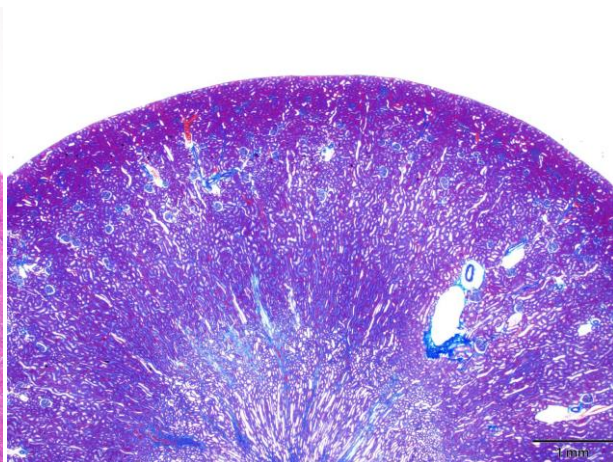
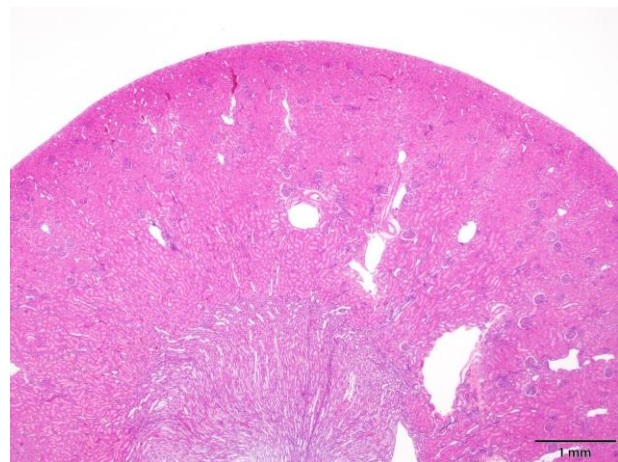
## 病理組織学的検査：回復期間終了時剖検群

|                                 |                   | 雄 |    | 雌 |   |
|---------------------------------|-------------------|---|----|---|---|
| プベルル酸 (mg/kg)                   |                   | 0 | 10 | 0 | 3 |
| 検査例数                            |                   | 5 | 5  | 5 | 5 |
| 臓器                              | 所見                |   |    |   |   |
| 腎臓                              | 限局性の間質の線維化 (++)   | - | 1  | - | - |
|                                 | 近位尿細管の再生 (±)      | - | 1  | - | - |
|                                 | 腎乳頭における鉍質沈着 (±)   | - | 1  | - | - |
|                                 | 腎乳頭における集合管の拡張 (±) | - | 1  | - | - |
| ±: 極軽度, +: 軽度, ++: 中等度, +++: 重度 |                   |   |    |   |   |

対照群 (No. 106)

HE染色

マッソントリクローム染色  
(膠原線維：青)

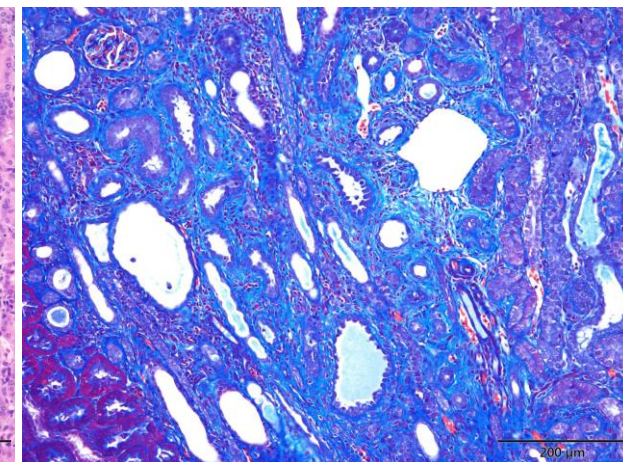
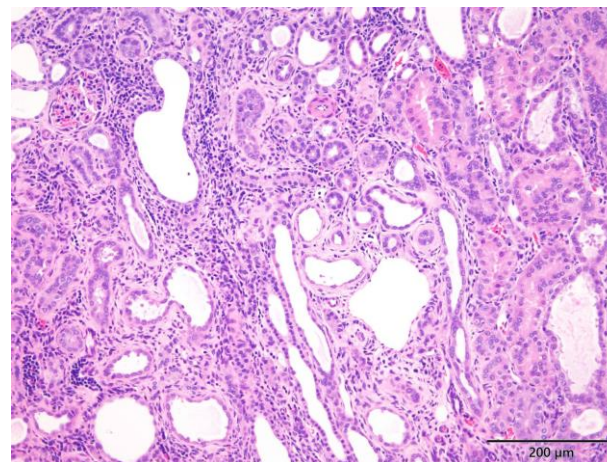
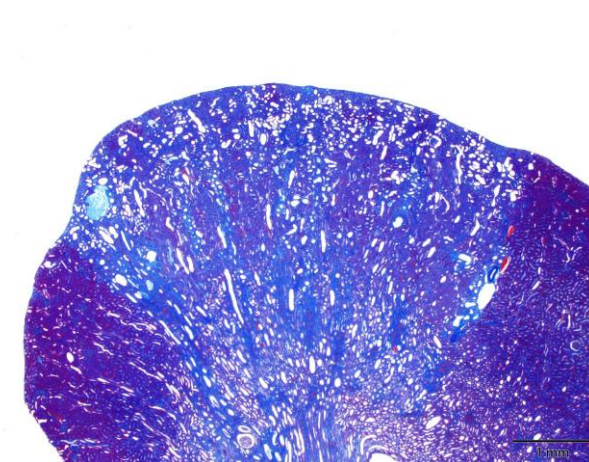
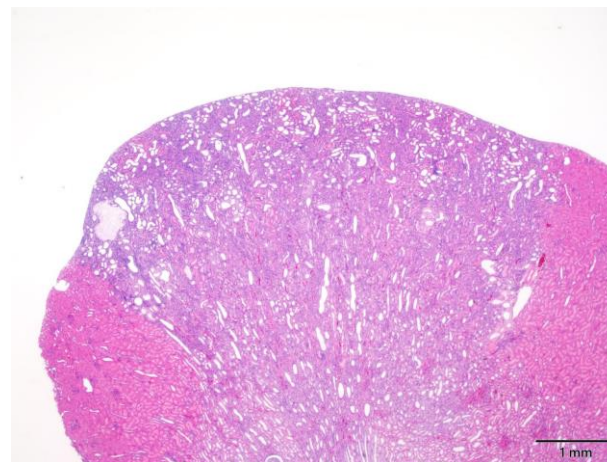


異常なし

10 mg/kg群 (No. 136)

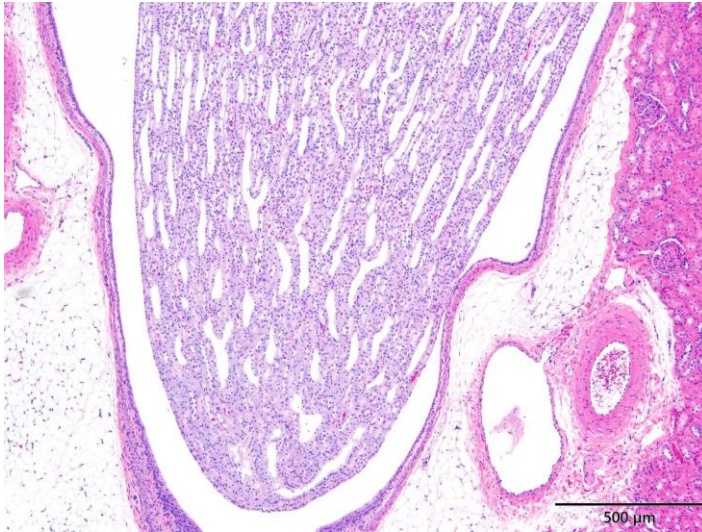
HE染色

マッソントリクローム染色  
(膠原線維：青)



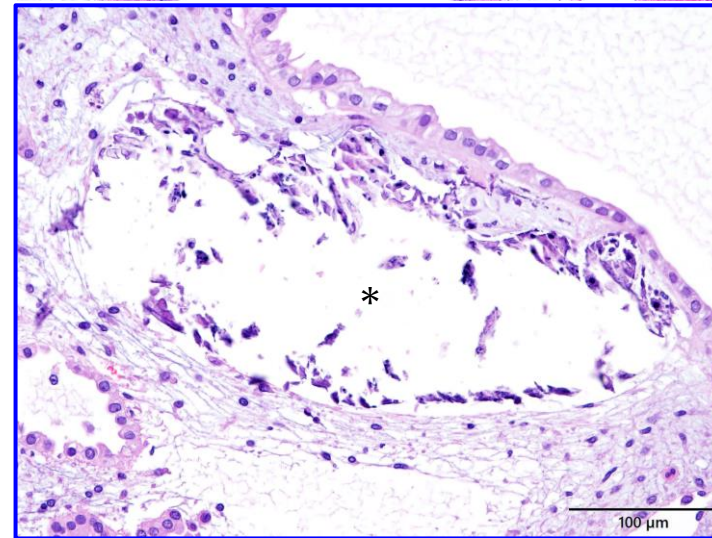
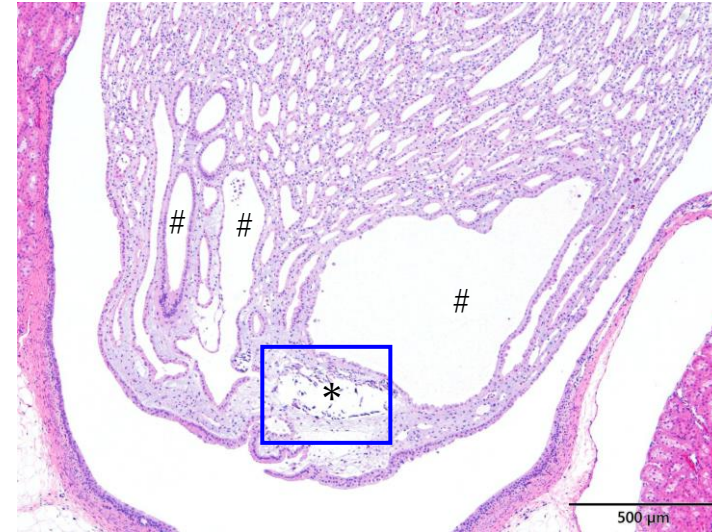
限局性の間質の線維化

対照群 (No. 106)



異常なし

10 mg/kg群 (No. 136)



腎乳頭における鉍質沈着 (\*),  
集合管の拡張(#)

## ラットを用いたプベルル酸の28日間反復経口投与毒性試験

胃

病理組織学的検査：投与期間終了時剖検群

|               |                   | 雄 |   |         |         | 雌 |     |   |         |
|---------------|-------------------|---|---|---------|---------|---|-----|---|---------|
| プベルル酸 (mg/kg) |                   | 0 | 1 | 3       | 10      | 0 | 0.3 | 1 | 3       |
| 検査例数          |                   | 5 | 5 | 5       | 5       | 5 | 5   | 5 | 5       |
| 臓器            | 所見                |   |   |         |         |   |     |   |         |
| 胃             | 腺胃粘膜のアポトーシス (±/+) | - | - | 4 (3/1) | 5 (2/3) | - | -   | - | 4 (3/1) |
|               | 腺胃粘膜のび慢性過形成 (±)   | - | - | 1       | 4       | - | -   | - | 2       |

±: 極軽度, +: 軽度, ++: 中等度, +++: 重度

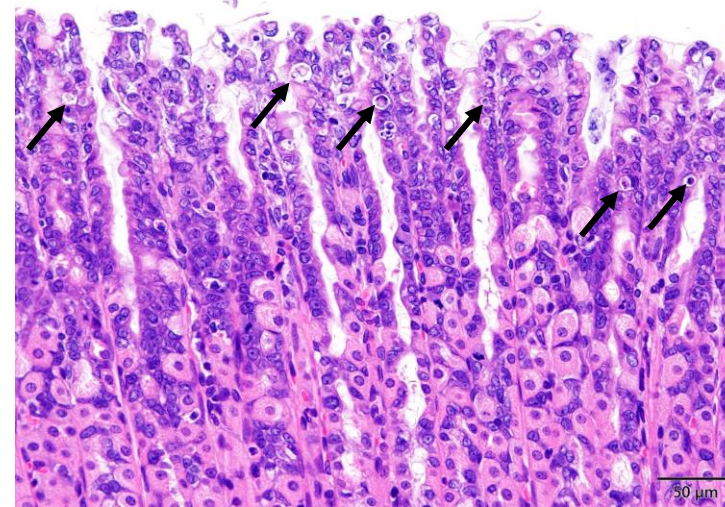
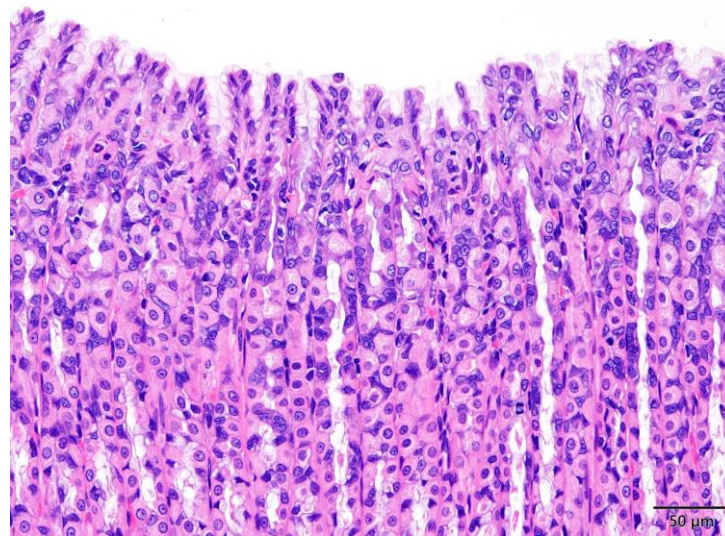
病理組織学的検査：回復期間終了時剖検群

|               |             | 雄 |    | 雌 |   |
|---------------|-------------|---|----|---|---|
| プベルル酸 (mg/kg) |             | 0 | 10 | 0 | 3 |
| 検査例数          |             | 5 | 5  | 5 | 5 |
| 臓器            | 所見          |   |    |   |   |
| 胃             | 腺胃粘膜のアポトーシス | - | -  | - | - |
|               | 腺胃粘膜のび慢性過形成 | - | -  | - | - |

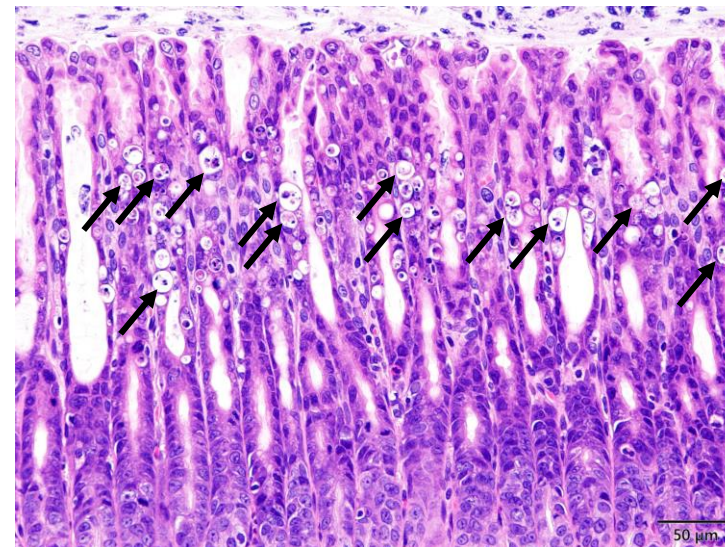
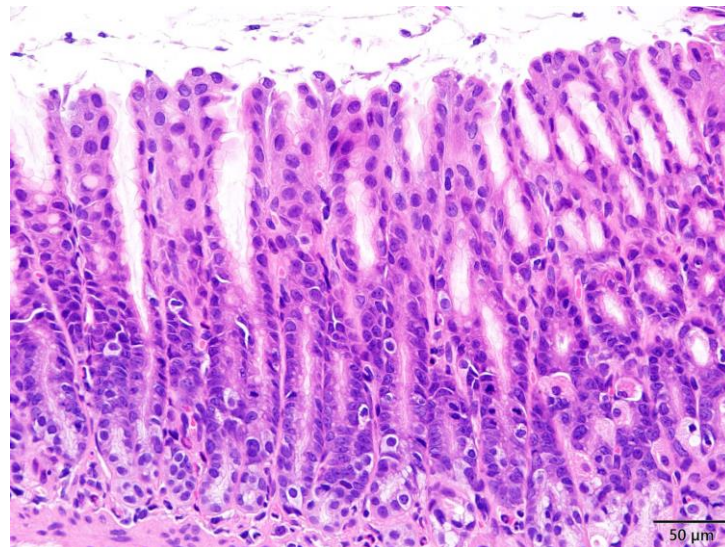
対照群 (No. 101)

10 mg/kg群 (No. 132)

胃底腺



幽門腺



異常なし

腺胃粘膜のアポトーシス (↑)

腺胃粘膜のびまん性過形成

最終報告書

ラットを用いた化合物 Y 及び Z の 7 日間反復経口投与毒性試験

試験番号：24OU

令和 7 年 3 月 12 日

松下 幸平  
高須 伸二  
赤根 弘敏  
石井 雄二  
豊田 武士

国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター 病理部

## 要約

各群 5 匹、6 週齢の雌雄 Crl:CD (SD)ラットに対して、化合物 Y 及び Z をコーン油を媒体としてそれぞれ 0.17 及び 0.25 mg/kg の用量で 7 日間強制経口投与し、一般状態観察、体重及び摂餌量測定、尿検査、血液学的検査、血清生化学検査、器官重量測定及び病理学的検査を実施した。

その結果、雌雄の化合物 Y 及び Z 投与群において、いずれの検査項目にも被験物質投与による毒性影響は認められなかった。

## 1 試験概要

### 1.1 試験表題

ラットを用いた化合物 Y 及び Z の 7 日間反復経口投与毒性試験

### 1.2 試験番号

24OU

### 1.3 試験目的

化合物 Y 及び Z をラットに 7 日間反復投与した際の毒性影響を検討した。

### 1.4 ガイドライン

経済協力開発機構（Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD）毒性試験ガイドライン「げっ歯類における 28 日間反復経口投与毒性試験（TG407）」に可能な限り準じて実施した。

### 1.5 動物愛護

本施設は一般財団法人日本医薬情報センターの評価を受け、厚生労働省の通知「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」（厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知 平成 27 年 2 月 20 日 科発 0220 第 1 号）に適合した施設であると認定されている。本試験は国立医薬品食品衛生研究所「動物実験等の適正な実施に関する規程」に従って計画し、同所の動物実験委員会による審査・承認を経て実施した。

### 1.6 試験実施施設

国立医薬品食品衛生研究所

〒210-9501 神奈川県川崎市川崎区殿町 3 丁目 25 番 26 号

### 1.7 試験管理責任者

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部 部長  
豊田 武士

### 1.8 試験責任者

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部 第三室長  
松下 幸平

## 2 被験物質

|          |                                                                                                               |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 名称       | : 化合物 Y 及び Z (compound 2 and 1, respectively, in J Nat Med. 2024. 78:845-8. doi: 10.1007/s11418-024-01827-w.) |
| 供給源      | : Axcelead Drug Discovery Partners 株式会社                                                                       |
| CAS No.  | : -                                                                                                           |
| 性状       | : 化合物 Y : 固体<br>化合物 Z : 粉末                                                                                    |
| ロット番号    | : 化合物 Y : N01414-28-001<br>化合物 Z : N01414-24-001                                                              |
| 純度       | : 化合物 Y : 99%<br>化合物 Z : 96.1%                                                                                |
| 保管条件     | : 冷凍 (-20°C)                                                                                                  |
| 取り扱い上の注意 | : 使用時には手袋、マスク及び保護メガネ等の適切な保護具を着用し、皮膚及び眼への接触を避けた。                                                               |

## 3 媒体

|       |                  |
|-------|------------------|
| 名称    | : コーン油           |
| 製造元   | : 富士フイルム和光純薬株式会社 |
| ロット番号 | : CKP1056        |
| 保管条件  | : 室温             |

## 4 試験系

### 4.1 動物

|              |                            |
|--------------|----------------------------|
| 動物種          | : ラット                      |
| 系統           | : Crl:CD (SD) (SPF 動物)     |
| 性            | : 雌雄                       |
| 入荷時週齢        | : 5 週齢                     |
| 投与開始時週齢      | : 6 週齢                     |
| 購入 (使用) 匹数   | : 雌雄各 16 匹 (15 匹)          |
| 供給源          | : ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社    |
| 所在地          | : 〒243-0214 神奈川県厚木市下古沢 795 |
| 検疫・馴化期間      | : 1 週間                     |
| 群分け後の余剰動物の処置 | : 余剰動物は試験系から除外した。          |

### 4.2 試験系選択理由

OECD 毒性試験ガイドライン「げっ歯類における 28 日間反復経口投与毒性試験 (TG407)」に基づいて齧歯類の 1 つとしてラットを選択した。本系統は、微生物学的に統御され、遺伝的に安定であることから決定した。

### 4.3 飼育条件

適切な生物学的防御がなされた環境の部屋で動物を飼育した。

|         |                              |
|---------|------------------------------|
| 飼育室     | : 244                        |
| 温度      | : $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ |
| 相対湿度    | : $50 \pm 5\%$               |
| 照明時間    | : 12 時間／日 (7:00~19:00)       |
| 換気回数    | : 15 回／時間                    |
| 飼育匹数    | : 2~3 匹／ケージ                  |
| ケージ交換頻度 | : 2 回以上／週                    |
| 給水瓶交換頻度 | : 2 回以上／週                    |

### 4.4 収容ケージ及び床敷

|      |                                  |
|------|----------------------------------|
| ケージ  | : プラスチック製ケージ (W258×D418×H186 mm) |
| ケージ蓋 | : ステンレス製                         |
| 床敷   | : ソフトチップ (三協ラボサービス株式会社)          |

### 4.5 飼料及び給餌方法

|      |                               |
|------|-------------------------------|
| 飼料   | : オリエンタル酵母工業株式会社製固形飼料 (CRF-1) |
| 給餌方法 | : ケージ蓋に取り付けられている給餌器に入れて、自由摂取  |

### 4.6 飲料水及び給水方法

|      |                  |
|------|------------------|
| 飲料水  | : 調製水            |
| 給水方法 | : 透明な給水瓶を用いて自由摂取 |

### 4.7 群分け方法

|        |                       |
|--------|-----------------------|
| 群分け方法  | : 群分け実施日の体重に基づき無作為に実施 |
| 群分け実施日 | : 投与開始前日              |

### 4.8 個体識別法

ケージラベルに試験番号、性別、群名、ケージ番号、被験物質名及び投与濃度、動物番号、試験開始日、剖検日、試験責任者名を明記した。動物の個体識別は、油性インクによる尾部へのマーキングを用いて行った。

## 5 試験方法

### 5.1 投与期間及び投与方法

被験物質の投与は、毎日 1 回、投与期間は 7 日間とした。被験物質投与液はディスポーザブルシリンジ及びプラスチック製ディスポーザブル経口ゾンデを用いて 5 mL/kg の容量で強制経口投与した。対照群には同様の方法で媒体を投与した。投与液量は直近の体重に基づいて個体別に算出した。投与液量がシリンジの目盛りの最大容量を超えないよう、適切な容量のシリンジを選択

した。実際の投与液量の有効数字は、使用するシリンジの最小目盛りを下回らないように設定した。被験物質の投与は午前 8:00～12:00 に実施した。

## 5.2 投与量及び群構成

被験物質の投与量、投与液濃度並びに 1 群当たりの匹数及び動物番号は、下表の通りである。

| 被験物質：投与量<br>(mg/kg/day) | 投与液濃度<br>(mg/mL) | 匹数（動物番号）    |             |
|-------------------------|------------------|-------------|-------------|
|                         |                  | 雄           | 雌           |
| 0                       | 0                | 5 (101~105) | 5 (201~205) |
| 化合物 Y：0.17              | 0.034            | 5 (111~115) | 5 (211~215) |
| 化合物 Z：0.25              | 0.05             | 5 (121~125) | 5 (221~225) |

## 5.3 被験物質投与量の設定理由

健康被害の原因とされる機能性表示食品（1 日摂取量 600 mg（内、原料 136.4 mg））の 100 倍量をヒト（体重 50 kg 換算）が摂取した際の、化合物 Y 及び Z の推定摂取量を被験物質投与量とした。化合物 Y 及び Z の投与量の計算式を以下に示す。

製品中の化合物 Y の最大濃度：0.014%

原料中の化合物 Z の最大濃度：0.092%

当該機能性表示食品の 1 日摂取量（100 倍量）：1200 mg/kg（= 600 mg/50 kg x 100）

化合物 Y：0.17 mg/kg/日（= 0.014g/100g x 1200 mg/kg）

化合物 Z：0.25 mg/kg/日（= 0.092g/100g x 136.4 mg/600 mg x 1200 mg/kg）

## 5.4 投与経路及び投与方法の選択理由

投与経路は、ヒトへの曝露経路として想定される経口投与とした。投与方法は、被験物質の安定性に関する情報が得られていないことから、用時調製による強制経口投与を選択した。

## 5.5 被験物質投与液の調製方法及び調製頻度

安定性に関する情報が得られていないため、用時調製とした。

電子天秤を用いて化合物 Y 及び化合物 Z をバイアル瓶に秤量し、媒体であるコーン油を加えて超音波にて懸濁し、0.034 mg/mL（化合物 Y）及び 0.05 mg/mL（化合物 Z）の投与液を調製した。投与液の分取はスターラーで撹拌しながら行った。

## 5.6 観察及び測定項目

投与開始日を投与 1 日（Day 1）と起算し、剖検日は投与 7 日の翌日（Day 8）とした。

### 5.6.1 一般状態

被験物質投与期間中は1日1回以上、全ての動物について一般状態、生死について観察し、個体別に記録した。

### 5.6.2 体重

投与1,3及び7日の投与前に測定した。また、剖検日に各動物の1晩（約16時間）絶食後の体重（剖検日体重）を測定した。各時点において全ての動物を電子天秤に乗せ、個体別に体重を測定した。

### 5.6.3 摂餌量

給餌量を投与開始日前日、投与1及び3日に、残餌量を投与1,3及び7日に測定した。各ケージの給餌量及び残餌量を電子天秤にて測定し、1匹当たりの1日平均摂餌量を算出した。

### 5.6.4 尿検査

全例について投与6日に以下の検査を実施した。

動物は検査当日、採尿ラックに移し蓄尿を開始した。蓄尿中は採尿ラック用の給水瓶及び給餌器を用いて4.5項及び4.6項に記載の飼料及び飲料水を投与した。採尿ラックへの移動は群単位で実施した。採尿ラックに収容後、約4時間の時点で採取した蓄尿（新鮮尿）を用いて、以下の項目について試験紙（オーションスティックス 7EA、アークレイ株式会社）及び自動尿分析装置（オーションイレブン AE-4021、アークレイ株式会社）を用いて検査を実施した。

検査項目：潜血、pH、ケトン体、尿糖、蛋白、ウロビリノーゲン、ビリルビン

新鮮尿の回収後、採尿用の容器を付け替えた後、約20時間蓄尿した尿を用いて、以下の検査を実施した。ナトリウム濃度、カリウム濃度及び塩素濃度の測定はオリエンタル酵母工業株式会社に委託して実施し、尿量を用いて総排泄量を算出した。

検査項目：尿量、比重、ナトリウム（Na）、カリウム（K）、塩素（Cl）

### 5.6.5 血液学的検査

被験物質投与期間終了時の全生存動物について検査を実施した。検査試料（血液）の採取は、採取前日の夕方から絶食（給水は継続）させた動物を、当日にイソフルラン麻酔下で開腹し、腹部大動脈から行った。動物の採血（屠殺）順は、群ごとに絶食時間が偏らないよう設定した。

採取した血液の一部を抗凝固剤（EDTA-2K）入りの試験管（ベネジエクト II 真空採血管、テルモ株式会社）に移し、下記の項目について自動血球計算装置 IDEXX プロサイト Dx（アイデックスラボラトリーズ株式会社）を用いて測定した。

検査項目：赤血球数（RBC）、ヘモグロビン濃度（HGB）、ヘマトクリット値（HCT）、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）、白血球数（WBC）、網状赤血球数（RET）、白血球分画（好中球；Neutrophil、好酸球；Eosinophil、好塩基球；Basophil、単球；Monocyte、リンパ球；Lymphocyte）

### 5.6.6 血清生化学検査

被験物質投与期間終了時の全生存動物について検査を実施した。前項で採取した血液の残りを血清分離剤（ポリエステルゲル）及び凝固促進用シリカ微粒子入りの試験管（BD バキュエテナ採血管、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）に分注し、遠心分離して血清を得た。血清は-20℃以下で保存した。測定はオリエンタル酵母工業株式会社に委託して実施した。測定項目は以下の通りである。

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ ( $\gamma$ -GTP)、総ビリルビン (T-BIL)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRE)、ブドウ糖 (GLU)、総コレステロール (T-CHO)、トリグリセリド (TG)、総蛋白 (TP)、アルブミン (ALB)、A/G 比 (A/G)、無機リン (IP)、カルシウム (Ca)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、塩素 (Cl)

### 5.6.7 病理学的検査

投与期間終了時に、第 5.6.5 項において採血し、腹部大動脈から放血致死させた動物について、下記の病理学的検査を行った。

#### 5.6.7.1 肉眼的病理学検査

投与期間終了時に全生存動物について、全身の諸器官・組織の肉眼的病理学検査を実施し、下記の器官・組織を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液にて保存した。固定液に浸した臓器は振盪器にて一晩以上振盪を行った。眼球はダビッドソン固定液にて固定・保存し、3～5 日以内に切り出しを実施し、残臓器は 10%中性緩衝ホルマリン液に保存した。精巣は改変ダビッドソン固定液にて固定し、翌日～3 日以内に切り出しを実施、切り出し後の残臓器は 10%中性緩衝ホルマリン液に保存した。

心臓、脾臓、リンパ節（頸部、腸間膜）、胸腺、下垂体、甲状腺（上皮小体を含む）、副腎、頭蓋（鼻腔を含む）、気管、肺（気管支を含む）、舌、唾液腺（顎下腺、舌下腺及び耳下腺）、食道、胃（前胃、腺胃）、小腸（十二指腸、空腸、回腸）、大腸（盲腸、結腸、直腸）、肝臓、脾臓、腎臓、膀胱、精巣、精巣上体、前立腺、精囊、卵巣、卵管、子宮、乳腺、膣、脳（大脳、小脳）、脊髄（頸部、胸部及び腰部）、三叉神経、坐骨神経、大動脈（胸部）、眼球、ハーダー腺、皮膚、胸骨及び大腿骨（骨髓を含む）、大腿部骨格筋、その他肉眼病変部

#### 5.6.7.2 器官重量

全生存動物について、下記の器官の重量について電子天秤を用いて測定し、剖検日体重を用いて器官重量体重比を算出した。腎臓、副腎、精巣及び卵巣は左右併せて測定した。

脳、下垂体\*、心臓、肺（気管支を含む）\*\*、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、前立腺\*、精囊\*、卵巣（卵管を含まない）、唾液腺（顎下腺及び舌下腺）\*、胸腺、甲状腺（上皮小体を含む）\*。

\*：固定後測定した。\*\*：測定後 10%中性緩衝ホルマリン液を注入した。

### 5.6.7.3 病理組織学的検査

全動物の採材した全臓器についてパラフィン包埋を実施し、薄切の後、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、鏡検した。

## 5.7 統計処理

試験期間中の体重、尿検査結果（定量値）、血液学的・血清生化学検査結果及び器官重量については各群の分散をF検定で検定し、等分散の場合はStudentのt検定、不等分散の場合はAspin-Welchのt検定により対照群と各被験物質投与群との間で有意差検定を行った。病理所見については、発生頻度をFisherの正確確率検定、グレーディングをMann-WhitneyのU検定により有意差検定を行った。 $P < 0.05$ の場合を統計学的に有意と判定した。

## 6 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

- ・5.6.4 項の尿検査において、雄の化合物Z投与群の1例について新鮮尿が採取できなかったため検査例数が1例減少したが、他の個体で評価できているため試験結果に影響はないと判断した。

## 7 試験結果

### 7.1 生存率及び一般状態

試験期間中、雌雄全ての群において死亡及び一般状態観察における異常は認められなかった。

### 7.2 体重

体重測定の結果をTable 1及び2に示す。

試験期間中、雌雄ともに被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

### 7.3 摂餌量

試験期間中の各群における1匹の1日あたりの平均摂餌量をTable 3及び4に示す。

雌雄ともに被験物質投与群と対照群との間に明らかな差は認められなかった。

### 7.4 尿検査

尿検査結果をTable 5, 6, 7及び8に示す。

雄の化合物Z投与群においてNa濃度及びCl濃度の有意な低値が認められた。雌の化合物Y投与群及び化合物Z投与群においてNa総排泄量の有意な低値が認められ、雌の化合物Y投与群ではK濃度の有意な高値も認められた。

### 7.5 血液学的検査

血液学的検査結果をTable 9及び10に示す。

雄の化合物Y投与群においてMonocyte（相対値）の有意な高値が認められ、雄の化合物Z投与群ではNeutrophil（相対値）の有意な高値及びLymphocyte（相対値）の有意な低値が認められた。

雌の化合物 Z 投与群において WBC、Lymphocyte（絶対値）及び Monocyte（絶対値）の有意な高値が認められた。

## 7.6 血清生化学検査

血清生化学検査結果を Table 11 及び 12 に示す。

雄の化合物 Z 投与群において Ca 及び IP の有意な高値が認められた。雌の化合物 Z 投与群において GLU、Cl 及び ALP の有意な高値並びに K の有意な低値が認められた。

## 7.7 病理学的検査

### 7.7.1 器官重量

剖検日体重及び器官重量を Table 13 及び 14 に示す。

雌雄の全ての器官重量において被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

### 7.7.2 病理組織学的検査

剖検時の肉眼的病理学検査において、雄の化合物 Y 投与群の 1 例に空腸の憩室が認められた。病理組織学的検査の結果を Table 15 及び 16 に示す。

雄の化合物 Y 投与群の 1 例において肉眼的に認められた空腸の憩室は、組織学的にも憩室であることが確認された。また甲状腺における異所性胸腺及び鰓後嚢胞並びに下垂体における嚢胞が、雌雄の対照群及び被験物質投与群に散発的に認められた。

雌雄の全群において、他の臓器に病理組織学的所見は認められなかった。

## 8 考察及び結論

尿検査では、雄の化合物 Z 投与群に Na 濃度及び Cl 濃度の低値、雌の化合物 Y 投与群及び化合物 Z 投与群に Na 総排泄量の低値が認められ、雌の化合物 Y 投与群ではさらに K 濃度の高値が認められたが、これらの電解質の血清中濃度に変化はなく、また病理組織学的検査においても腎臓に変化は認められていないことから、毒性学的意義に乏しい偶発的な変動と判断した。

血液学的検査では、雄の化合物 Y 投与群に Monocyte（相対値）の高値、雄の化合物 Z 投与群に Neutrophil（相対値）の高値及び Lymphocyte（相対値）の低値並びに雌の化合物 Z 投与群に WBC、Lymphocyte（絶対値）及び Monocyte（絶対値）の高値が認められた。病理組織学的検査において検索した全ての臓器に炎症性病変はみられておらず、また関連するリンパ組織及び造血器においても病理学的変化は認められていないため、これらの変化の毒性学的意義は乏しいと判断した。

血清生化学検査では、雄の化合物 Z 投与群に Ca 及び IP の高値、雌の化合物 Z 投与群に GLU、Cl 及び ALP の高値並びに K の低値が認められたが、検索した全ての臓器において関連する病理組織学的変化はみられていないため、毒性学的意義は乏しいと判断した。

病理学的検査では、空腸、甲状腺及び下垂体における所見が対照群を含む各群に散発的に認められたが、いずれもラットに自然発生することが知られている変化であり<sup>1,2</sup>、毒性学的意義はないと判断した。

以上より、本試験条件下において化合物 Y 及び Z 投与による毒性影響は認められなかった。

## 9 参考文献

1. Brändli-Baiocco A, Balme E, Bruder M, Chandra S, Hellmann J, Hoenerhoff MJ, Kambara T, Landes C, Lenz B, Mense M, Rittinghausen S, Satoh H, Schorsch F, Seeliger F, Tanaka T, Tsuchitani M, Wojcinski Z, Rosol TJ. Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse endocrine system. *J Toxicol Pathol.* 2018; 31(3 Suppl): 1S-95S.
2. Nolte T, Brander-Weber P, Dangler C, Deschl U, Elwell MR, Greaves P, Hailey R, Leach MW, Pandiri AR, Rogers A, Shackelford CC, Spencer A, Tanaka T, Ward JM. Nonproliferative and proliferative lesions of the gastrointestinal tract, pancreas and salivary glands of the rat and mouse. *J Toxicol Pathol.* 2016; 29(1 Suppl): 1S-125S.

**Table 1. Body weight data for male Crl:CD (SD) rats treated with compound Y and Z for 7 days**

| Group      |                         | Body weight (g) |       |       |
|------------|-------------------------|-----------------|-------|-------|
|            |                         | Day 1           | Day 3 | Day 7 |
| Control    | Mean                    | 178.0           | 193.1 | 217.1 |
|            | SD                      | 4.9             | 7.2   | 7.1   |
|            | No. of animals examined | 5               | 5     | 5     |
| Compound Y | Mean                    | 179.3           | 194.7 | 221.1 |
|            | SD                      | 10.6            | 11.5  | 17.9  |
|            | No. of animals examined | 5               | 5     | 5     |
| Compound Z | Mean                    | 180.9           | 197.9 | 225.2 |
|            | SD                      | 11.3            | 12.0  | 14.5  |
|            | No. of animals examined | 5               | 5     | 5     |

**Table 2. Body weight data for female Crl:CD (SD) rats treated with compound Y and Z for 7 days**

| Group      |                         | Body weight (g) |       |       |
|------------|-------------------------|-----------------|-------|-------|
|            |                         | Day 1           | Day 3 | Day 7 |
| Control    | Mean                    | 170.9           | 174.9 | 189.4 |
|            | SD                      | 9.2             | 9.3   | 13.0  |
|            | No. of animals examined | 5               | 5     | 5     |
| Compound Y | Mean                    | 169.6           | 178.6 | 188.6 |
|            | SD                      | 6.1             | 7.4   | 9.8   |
|            | No. of animals examined | 5               | 5     | 5     |
| Compound Z | Mean                    | 170.8           | 174.6 | 184.7 |
|            | SD                      | 6.4             | 6.0   | 8.4   |
|            | No. of animals examined | 5               | 5     | 5     |

**Table 3. Food intake data for male Crl:CD (SD) rats treated with compound Y and Z for 7 days**

| Group      |                         | Food consumption (g/rat/day) |         |
|------------|-------------------------|------------------------------|---------|
|            |                         | Day 1-3                      | Day 3-7 |
| Control    | Mean                    | 18.5                         | 18.3    |
|            | No. of animals examined | 5                            | 5       |
| Compound Y | Mean                    | 18.8                         | 19.0    |
|            | No. of animals examined | 5                            | 5       |
| Compound Z | Mean                    | 19.2                         | 18.9    |
|            | No. of animals examined | 5                            | 5       |

**Table 4. Food intake data for female Crl:CD (SD) rats treated with compound Y and Z for 7 days**

| Group      |                         | Food consumption (g/rat/day) |         |
|------------|-------------------------|------------------------------|---------|
|            |                         | Day 1-3                      | Day 3-7 |
| Control    | Mean                    | 14.0                         | 14.9    |
|            | No. of animals examined | 5                            | 5       |
| Compound Y | Mean                    | 15.5                         | 14.3    |
|            | No. of animals examined | 5                            | 5       |
| Compound Z | Mean                    | 14.2                         | 14.1    |
|            | No. of animals examined | 5                            | 5       |

**Table 5. Urinalysis data in fresh urine at day 6 for male Crl:CD (SD) rats treated with compound Y and Z for 7 days**

|                         |     | Control | Compound Y | Compound Z     |
|-------------------------|-----|---------|------------|----------------|
| No. of animals examined |     | 5       | 5          | 4 <sup>a</sup> |
| Protein                 | -   | 0       | 0          | 0              |
|                         | ±   | 1       | 2          | 0              |
|                         | 1+  | 2       | 2          | 4              |
|                         | 2+  | 2       | 1          | 0              |
| Glucose                 | -   | 5       | 5          | 4              |
| Occult blood            | -   | 5       | 5          | 4              |
| Ketone body             | -   | 1       | 2          | 0              |
|                         | ±   | 1       | 2          | 3              |
|                         | 1+  | 3       | 1          | 1              |
| Urobilinogen            | 0.1 | 3       | 3          | 3              |
|                         | 1+  | 1       | 1          | 1              |
|                         | 2+  | 1       | 1          | 0              |
| Bilirubin               | -   | 4       | 4          | 4              |
|                         | 1+  | 1       | 1          | 0              |
| pH                      | 7.0 | 2       | 0          | 0              |
|                         | 7.5 | 0       | 1          | 2              |
|                         | 8.0 | 2       | 0          | 0              |
|                         | 8.5 | 1       | 4          | 2              |

Values are No. of animals.

<sup>a</sup>: The number of effective animals was reduced to four due to insufficient samples.**Table 6. Urinalysis data in fresh urine at day 6 for female Crl:CD (SD) rats treated with compound Y and Z for 7 days**

|                         |     | Control | Compound Y | Compound Z |
|-------------------------|-----|---------|------------|------------|
| No. of animals examined |     | 5       | 5          | 5          |
| Protein                 | -   | 1       | 0          | 4          |
|                         | ±   | 1       | 1          | 0          |
|                         | 1+  | 2       | 3          | 1          |
|                         | 2+  | 1       | 1          | 0          |
| Glucose                 | -   | 5       | 5          | 5          |
| Occult blood            | -   | 5       | 5          | 5          |
| Ketone body             | -   | 1       | 1          | 5          |
|                         | ±   | 2       | 2          | 0          |
|                         | 1+  | 2       | 2          | 0          |
| Urobilinogen            | 0.1 | 3       | 3          | 5          |
|                         | 1+  | 2       | 1          | 0          |
|                         | 2+  | 0       | 1          | 0          |
| Bilirubin               | -   | 5       | 5          | 5          |
| pH                      | 6.0 | 1       | 0          | 0          |
|                         | 6.5 | 0       | 0          | 0          |
|                         | 7.0 | 0       | 2          | 1          |
|                         | 7.5 | 0       | 1          | 0          |
|                         | 8.0 | 3       | 0          | 3          |
|                         | 8.5 | 1       | 2          | 1          |

Values are No. of animals.

**Table 7. Urinalysis data in cumulative urine at day 6 for male Crl:CD (SD) rats treated with compound Y and Z for 7 days**

|                         |          | Control      | Compound Y    | Compound Z     |
|-------------------------|----------|--------------|---------------|----------------|
| No. of animals examined |          | 5            | 5             | 5              |
| Volume                  | (mL)     | 3.58 ± 0.93  | 4.38 ± 1.55   | 6.30 ± 3.53    |
| Specific gravity        |          | 1.09 ± 0.01  | 1.08 ± 0.01   | 1.07 ± 0.03    |
| Na                      | (mEq/L)  | 327.8 ± 59.9 | 264.6 ± 59.1  | 190.6 ± 102.6* |
|                         | (mg/20h) | 26.6 ± 4.3   | 25.5 ± 5.9    | 21.8 ± 6.2     |
| K                       | (mEq/L)  | 536.0 ± 91.9 | 506.0 ± 102.5 | 374.4 ± 174.2  |
|                         | (mg/20h) | 71.9 ± 10.7  | 80.8 ± 17.4   | 73.5 ± 19.7    |
| Cl                      | (mEq/L)  | 435.6 ± 68.5 | 375.6 ± 81.0  | 266.8 ± 145.9* |
|                         | (mg/20h) | 54.3 ± 8.3   | 55.2 ± 9.4    | 48.3 ± 17.1    |

Values are means ± SDs.

\*: Significantly different from the control at  $p < 0.05$ .

**Table 8. Urinalysis data in cumulative urine at day 6 for female Crl:CD (SD) rats treated with compound Y and Z for 7 days**

|                         |          | Control      | Compound Y    | Compound Z    |
|-------------------------|----------|--------------|---------------|---------------|
| No. of animals examined |          | 5            | 5             | 5             |
| Volume                  | (mL)     | 6.52 ± 3.44  | 3.34 ± 1.34   | 3.94 ± 0.81   |
| Specific gravity        |          | 1.07 ± 0.02  | 1.09 ± 0.02   | 1.08 ± 0.02   |
| Na                      | (mEq/L)  | 184.6 ± 67.8 | 225.4 ± 63.6  | 210.4 ± 54.0  |
|                         | (mg/20h) | 24.5 ± 4.2   | 15.9 ± 1.5**  | 18.6 ± 2.1*   |
| K                       | (mEq/L)  | 324.5 ± 92.0 | 501.0 ± 99.7* | 407.0 ± 102.3 |
|                         | (mg/20h) | 73.6 ± 20.4  | 60.4 ± 10.8   | 59.3 ± 7.8    |
| Cl                      | (mEq/L)  | 242.0 ± 73.8 | 350.4 ± 94.0  | 291.2 ± 69.9  |
|                         | (mg/20h) | 50.2 ± 11.1  | 38.2 ± 3.2    | 39.5 ± 4.0    |

Values are means ± SDs.

\*, \*\*: Significantly different from the control at  $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

**Table 9. Hematology data for male Crl:CD (SD) rats treated with compound Y and Z for 7 days**

|                               |                               | Control         | Compound Y      | Compound Z      |
|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| No. of animals examined       |                               | 5               | 5               | 5               |
| WBC                           | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 7.45 $\pm$ 1.07 | 6.24 $\pm$ 1.84 | 7.01 $\pm$ 1.59 |
| RBC                           | ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ) | 6.2 $\pm$ 0.2   | 6.1 $\pm$ 0.3   | 6.3 $\pm$ 0.2   |
| HGB                           | (g/dL)                        | 12.8 $\pm$ 0.4  | 12.9 $\pm$ 0.6  | 13.1 $\pm$ 0.3  |
| HCT                           | (%)                           | 38.8 $\pm$ 0.8  | 39.5 $\pm$ 1.9  | 40.0 $\pm$ 1.0  |
| MCV                           | (fL)                          | 62.4 $\pm$ 0.5  | 64.5 $\pm$ 3.0  | 63.4 $\pm$ 2.3  |
| MCH                           | (pg)                          | 20.6 $\pm$ 0.4  | 21.2 $\pm$ 1.1  | 20.7 $\pm$ 0.6  |
| MCHC                          | (g/dL)                        | 33.0 $\pm$ 0.4  | 32.8 $\pm$ 0.3  | 32.7 $\pm$ 0.5  |
| PLT                           | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 996 $\pm$ 36    | 925 $\pm$ 131   | 1075 $\pm$ 76   |
| RET                           | (%)                           | 8.8 $\pm$ 0.7   | 9.6 $\pm$ 1.4   | 9.8 $\pm$ 0.9   |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 544 $\pm$ 34    | 585 $\pm$ 71    | 615 $\pm$ 42    |
| Differential leukocyte counts |                               |                 |                 |                 |
| Neutrophil                    | (%)                           | 10.6 $\pm$ 3.2  | 11.8 $\pm$ 3.0  | 16.7 $\pm$ 4.4* |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.78 $\pm$ 0.20 | 0.74 $\pm$ 0.25 | 1.17 $\pm$ 0.47 |
| Eosinophil                    | (%)                           | 0.8 $\pm$ 0.3   | 1.1 $\pm$ 0.4   | 0.9 $\pm$ 0.3   |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.06 $\pm$ 0.03 | 0.07 $\pm$ 0.03 | 0.06 $\pm$ 0.01 |
| Basophil                      | (%)                           | 0.3 $\pm$ 0.1   | 0.4 $\pm$ 0.3   | 0.3 $\pm$ 0.2   |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.02 $\pm$ 0.01 | 0.02 $\pm$ 0.01 | 0.02 $\pm$ 0.01 |
| Lymphocyte                    | (%)                           | 85.6 $\pm$ 3.7  | 82.7 $\pm$ 3.6  | 78.4 $\pm$ 5.3* |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 6.39 $\pm$ 1.06 | 5.16 $\pm$ 1.56 | 5.50 $\pm$ 1.31 |
| Monocyte                      | (%)                           | 2.6 $\pm$ 0.8   | 4.0 $\pm$ 0.7*  | 3.8 $\pm$ 1.0   |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.19 $\pm$ 0.06 | 0.26 $\pm$ 0.10 | 0.27 $\pm$ 0.10 |

Values are means  $\pm$  SDs.\*: Significantly different from the control at  $p < 0.05$ .

**Table 10. Hematology data for female Crl:CD (SD) rats treated with compound Y and Z for 7 days**

|                               |                               | Control         | Compound Y      | Compound Z        |
|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| No. of animals examined       |                               | 5               | 5               | 5                 |
| WBC                           | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 5.60 $\pm$ 0.73 | 6.52 $\pm$ 2.03 | 8.13 $\pm$ 1.44** |
| RBC                           | ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ) | 6.9 $\pm$ 0.4   | 6.6 $\pm$ 0.1   | 6.9 $\pm$ 0.2     |
| HGB                           | (g/dL)                        | 13.9 $\pm$ 0.9  | 13.4 $\pm$ 0.3  | 13.8 $\pm$ 0.1    |
| HCT                           | (%)                           | 41.6 $\pm$ 3.0  | 39.7 $\pm$ 1.2  | 41.3 $\pm$ 0.3    |
| MCV                           | (fL)                          | 59.9 $\pm$ 2.0  | 60.6 $\pm$ 2.5  | 60.3 $\pm$ 2.5    |
| MCH                           | (pg)                          | 20.1 $\pm$ 0.7  | 20.4 $\pm$ 0.6  | 20.2 $\pm$ 0.7    |
| MCHC                          | (g/dL)                        | 33.6 $\pm$ 0.5  | 33.7 $\pm$ 0.5  | 33.4 $\pm$ 0.4    |
| PLT                           | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 1030 $\pm$ 94   | 1088 $\pm$ 83   | 1063 $\pm$ 24     |
| RET                           | (%)                           | 4.4 $\pm$ 1.4   | 5.3 $\pm$ 0.7   | 4.6 $\pm$ 0.6     |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 299 $\pm$ 78    | 350 $\pm$ 45    | 312 $\pm$ 38      |
| Differential leukocyte counts |                               |                 |                 |                   |
| Neutrophil                    | (%)                           | 6.7 $\pm$ 1.5   | 8.5 $\pm$ 2.5   | 7.9 $\pm$ 1.7     |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.38 $\pm$ 0.11 | 0.52 $\pm$ 0.10 | 0.65 $\pm$ 0.26   |
| Eosinophil                    | (%)                           | 1.6 $\pm$ 0.8   | 1.5 $\pm$ 0.7   | 1.5 $\pm$ 0.3     |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.09 $\pm$ 0.05 | 0.09 $\pm$ 0.03 | 0.12 $\pm$ 0.02   |
| Basophil                      | (%)                           | 0.1 $\pm$ 0.1   | 0.2 $\pm$ 0.1   | 0.2 $\pm$ 0.1     |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.01 $\pm$ 0.01 | 0.01 $\pm$ 0.01 | 0.02 $\pm$ 0.01   |
| Lymphocyte                    | (%)                           | 89.1 $\pm$ 2.7  | 87.0 $\pm$ 3.7  | 86.6 $\pm$ 2.2    |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 4.98 $\pm$ 0.60 | 5.72 $\pm$ 2.00 | 7.04 $\pm$ 1.25*  |
| Monocyte                      | (%)                           | 2.4 $\pm$ 1.0   | 2.9 $\pm$ 1.2   | 3.9 $\pm$ 1.9     |
|                               | ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 0.13 $\pm$ 0.06 | 0.18 $\pm$ 0.06 | 0.30 $\pm$ 0.11*  |

Values are means  $\pm$  SDs.\*, \*\*: Significantly different from the control at  $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

**Table 11. Serum biochemistry data for male Crl:CD (SD) rats treated with compound Y and Z for 7 days**

|                         |         | Control      | Compound Y   | Compound Z    |
|-------------------------|---------|--------------|--------------|---------------|
| No. of animals examined |         | 5            | 5            | 5             |
| TP                      | (g/dL)  | 5.30 ± 0.27  | 5.48 ± 0.28  | 5.48 ± 0.16   |
| A/G                     |         | 4.12 ± 0.62  | 4.02 ± 0.34  | 3.74 ± 0.21   |
| ALB                     | (g/dL)  | 4.24 ± 0.17  | 4.38 ± 0.19  | 4.32 ± 0.08   |
| T-BIL                   | (mg/dL) | 0.05 ± 0.01  | 0.06 ± 0.01  | 0.06 ± 0.01   |
| GLU                     | (mg/dL) | 72.8 ± 11.5  | 66.6 ± 7.8   | 70.4 ± 19.8   |
| TG                      | (mg/dL) | 60.6 ± 24.1  | 52.4 ± 14.1  | 58.8 ± 19.0   |
| T-CHO                   | (mg/dL) | 85.8 ± 12.4  | 76.4 ± 18.4  | 76.0 ± 6.2    |
| BUN                     | (mg/dL) | 9.7 ± 1.5    | 10.2 ± 1.9   | 9.8 ± 1.5     |
| CRE                     | (mg/dL) | 0.23 ± 0.00  | 0.21 ± 0.01  | 0.22 ± 0.02   |
| Na                      | (mEQ/L) | 141.6 ± 1.1  | 140.8 ± 0.4  | 141.0 ± 1.2   |
| Cl                      | (mEQ/L) | 103.8 ± 0.8  | 103.0 ± 1.9  | 102.6 ± 1.3   |
| K                       | (mEQ/L) | 5.08 ± 0.28  | 5.00 ± 0.32  | 4.90 ± 0.23   |
| Ca                      | (mg/dL) | 10.16 ± 0.09 | 10.26 ± 0.27 | 10.42 ± 0.23* |
| IP                      | (mg/dL) | 9.12 ± 0.15  | 9.30 ± 0.41  | 9.78 ± 0.33** |
| AST                     | (IU/L)  | 129.0 ± 10.9 | 131.0 ± 25.8 | 136.0 ± 10.1  |
| ALT                     | (IU/L)  | 35.0 ± 4.7   | 39.0 ± 3.0   | 38.6 ± 2.1    |
| ALP                     | (IU/L)  | 352.4 ± 24.0 | 343.2 ± 30.4 | 328.2 ± 53.4  |
| γ-GTP                   | (IU/L)  | <3           | <3           | <3            |

Values are means ± SDs.

\*, \*\*: Significantly different from the control at  $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

**Table 12. Serum biochemistry data for female Crl:CD (SD) rats treated with compound Y and Z for 7 days**

|                         |         | Control      | Compound Y   | Compound Z    |
|-------------------------|---------|--------------|--------------|---------------|
| No. of animals examined |         | 5            | 5            | 5             |
| TP                      | (g/dL)  | 5.48 ± 0.18  | 5.54 ± 0.19  | 5.48 ± 0.18   |
| A/G                     |         | 4.40 ± 0.56  | 4.46 ± 0.44  | 4.24 ± 0.50   |
| ALB                     | (g/dL)  | 4.46 ± 0.23  | 4.52 ± 0.13  | 4.42 ± 0.08   |
| T-BIL                   | (mg/dL) | 0.04 ± 0.01  | 0.05 ± 0.01  | 0.05 ± 0.01   |
| GLU                     | (mg/dL) | 72.4 ± 6.2   | 78.8 ± 5.2   | 81.4 ± 4.0*   |
| TG                      | (mg/dL) | 31.2 ± 7.7   | 36.2 ± 11.7  | 22.6 ± 9.4    |
| T-CHO                   | (mg/dL) | 63.2 ± 4.4   | 73.4 ± 18.3  | 64.6 ± 5.9    |
| BUN                     | (mg/dL) | 12.1 ± 4.0   | 10.2 ± 1.6   | 11.8 ± 2.3    |
| CRE                     | (mg/dL) | 0.25 ± 0.02  | 0.27 ± 0.01  | 0.27 ± 0.03   |
| Na                      | (mEQ/L) | 138.8 ± 0.4  | 138.6 ± 0.5  | 139.4 ± 0.5   |
| Cl                      | (mEQ/L) | 103.2 ± 1.3  | 103.8 ± 0.8  | 105.0 ± 1.0*  |
| K                       | (mEQ/L) | 4.86 ± 0.11  | 4.78 ± 0.20  | 4.64 ± 0.17*  |
| Ca                      | (mg/dL) | 10.22 ± 0.35 | 10.22 ± 0.23 | 10.08 ± 0.22  |
| IP                      | (mg/dL) | 8.50 ± 0.66  | 8.42 ± 0.47  | 8.22 ± 0.80   |
| AST                     | (IU/L)  | 121.6 ± 15.9 | 104.4 ± 19.5 | 120.0 ± 14.1  |
| ALT                     | (IU/L)  | 33.8 ± 5.5   | 26.0 ± 5.8   | 31.2 ± 2.6    |
| ALP                     | (IU/L)  | 192.0 ± 32.2 | 192.6 ± 47.8 | 232.8 ± 20.8* |
| γ-GTP                   | (IU/L)  | <3           | <3           | <3            |

Values are means ± SDs.

\*: Significantly different from the control at  $p < 0.05$ .

**Table 13. Organ weight data for male Crl:CD (SD) rats treated with compound Y and Z for 7 days**

|                         |             | Control       | Compound Y    | Compound Z    |
|-------------------------|-------------|---------------|---------------|---------------|
| No. of animals examined |             | 5             | 5             | 5             |
| Body weight             | (g)         | 206.5 ± 8.2   | 210.5 ± 12.7  | 213.4 ± 13.2  |
| Liver                   | (g)         | 6.34 ± 0.05   | 6.71 ± 0.67   | 6.52 ± 0.32   |
|                         | (g/100gBW)  | 3.08 ± 0.12   | 3.18 ± 0.17   | 3.06 ± 0.06   |
| Kidneys                 | (g)         | 1.79 ± 0.08   | 1.88 ± 0.32   | 1.84 ± 0.10   |
|                         | (g/100gBW)  | 0.86 ± 0.02   | 0.89 ± 0.11   | 0.86 ± 0.03   |
| Brain                   | (g)         | 1.78 ± 0.03   | 1.87 ± 0.08   | 1.87 ± 0.09   |
|                         | (g/100gBW)  | 0.86 ± 0.04   | 0.89 ± 0.05   | 0.88 ± 0.07   |
| Thymus                  | (g)         | 0.59 ± 0.08   | 0.64 ± 0.14   | 0.66 ± 0.14   |
|                         | (g/100gBW)  | 0.29 ± 0.04   | 0.30 ± 0.05   | 0.31 ± 0.05   |
| Heart                   | (g)         | 0.85 ± 0.03   | 0.87 ± 0.07   | 0.83 ± 0.06   |
|                         | (g/100gBW)  | 0.41 ± 0.03   | 0.41 ± 0.02   | 0.39 ± 0.02   |
| Lungs                   | (g)         | 0.98 ± 0.10   | 1.02 ± 0.09   | 0.99 ± 0.08   |
|                         | (g/100gBW)  | 0.47 ± 0.04   | 0.48 ± 0.03   | 0.47 ± 0.01   |
| Spleen                  | (g)         | 0.62 ± 0.03   | 0.53 ± 0.09   | 0.52 ± 0.10   |
|                         | (g/100gBW)  | 0.30 ± 0.01   | 0.25 ± 0.03   | 0.25 ± 0.05   |
| Adrenals                | (g)         | 0.042 ± 0.005 | 0.040 ± 0.004 | 0.041 ± 0.004 |
|                         | (mg/100gBW) | 20.10 ± 2.01  | 18.80 ± 1.49  | 19.03 ± 1.93  |
| Testes                  | (g)         | 2.15 ± 0.12   | 2.13 ± 0.09   | 2.10 ± 0.28   |
|                         | (g/100gBW)  | 1.04 ± 0.04   | 1.02 ± 0.09   | 0.99 ± 0.14   |
| Pituitary               | (g)         | 0.009 ± 0.001 | 0.009 ± 0.001 | 0.009 ± 0.001 |
|                         | (mg/100gBW) | 4.53 ± 0.62   | 4.25 ± 0.37   | 4.40 ± 0.32   |
| Thyroid                 | (g)         | 0.018 ± 0.002 | 0.017 ± 0.002 | 0.017 ± 0.005 |
|                         | (mg/100gBW) | 8.71 ± 0.85   | 7.84 ± 0.74   | 8.13 ± 2.31   |
| Salivary gland          | (g)         | 0.43 ± 0.04   | 0.46 ± 0.04   | 0.43 ± 0.02   |
|                         | (g/100gBW)  | 0.21 ± 0.02   | 0.22 ± 0.01   | 0.20 ± 0.01   |
| Seminal vesicle         | (g)         | 0.34 ± 0.03   | 0.31 ± 0.06   | 0.33 ± 0.07   |
|                         | (g/100gBW)  | 0.17 ± 0.01   | 0.15 ± 0.03   | 0.16 ± 0.03   |
| Prostate                | (g)         | 0.39 ± 0.05   | 0.35 ± 0.07   | 0.39 ± 0.04   |
|                         | (g/100gBW)  | 0.19 ± 0.02   | 0.16 ± 0.04   | 0.18 ± 0.03   |

Values are means ± SDs.

**Table 14. Organ weight data for female Crl:CD (SD) rats treated with compound Y and Z for 7 days**

|                         |             | Control       | Compound Y    | Compound Z    |
|-------------------------|-------------|---------------|---------------|---------------|
| No. of animals examined |             | 5             | 5             | 5             |
| Body weight             | (g)         | 178.5 ± 13.0  | 180.2 ± 6.2   | 177.8 ± 6.4   |
| Liver                   | (g)         | 5.54 ± 0.65   | 5.95 ± 0.53   | 5.44 ± 0.30   |
|                         | (g/100gBW)  | 3.10 ± 0.21   | 3.30 ± 0.23   | 3.07 ± 0.23   |
| Kidneys                 | (g)         | 1.56 ± 0.14   | 1.52 ± 0.12   | 1.50 ± 0.07   |
|                         | (g/100gBW)  | 0.88 ± 0.05   | 0.84 ± 0.05   | 0.84 ± 0.03   |
| Brain                   | (g)         | 1.76 ± 0.08   | 1.78 ± 0.05   | 1.78 ± 0.08   |
|                         | (g/100gBW)  | 0.99 ± 0.06   | 0.99 ± 0.04   | 1.00 ± 0.08   |
| Thymus                  | (g)         | 0.51 ± 0.05   | 0.53 ± 0.08   | 0.56 ± 0.03   |
|                         | (g/100gBW)  | 0.29 ± 0.04   | 0.30 ± 0.05   | 0.32 ± 0.02   |
| Heart                   | (g)         | 0.72 ± 0.09   | 0.73 ± 0.06   | 0.70 ± 0.03   |
|                         | (g/100gBW)  | 0.40 ± 0.02   | 0.41 ± 0.03   | 0.40 ± 0.02   |
| Lungs                   | (g)         | 0.90 ± 0.09   | 0.87 ± 0.07   | 0.92 ± 0.03   |
|                         | (g/100gBW)  | 0.50 ± 0.02   | 0.49 ± 0.04   | 0.52 ± 0.02   |
| Spleen                  | (g)         | 0.42 ± 0.08   | 0.42 ± 0.06   | 0.43 ± 0.05   |
|                         | (g/100gBW)  | 0.24 ± 0.04   | 0.23 ± 0.03   | 0.24 ± 0.02   |
| Adrenals                | (g)         | 0.048 ± 0.009 | 0.052 ± 0.010 | 0.054 ± 0.006 |
|                         | (mg/100gBW) | 26.97 ± 3.65  | 28.97 ± 4.73  | 30.46 ± 3.60  |
| Ovaries                 | (g)         | 0.069 ± 0.015 | 0.073 ± 0.010 | 0.074 ± 0.006 |
|                         | (mg/100gBW) | 38.44 ± 7.53  | 40.80 ± 5.41  | 41.76 ± 3.14  |
| Pituitary               | (g)         | 0.011 ± 0.001 | 0.012 ± 0.001 | 0.012 ± 0.002 |
|                         | (mg/100gBW) | 6.34 ± 0.40   | 6.70 ± 0.83   | 6.87 ± 0.76   |
| Thyroid                 | (g)         | 0.018 ± 0.001 | 0.019 ± 0.003 | 0.019 ± 0.001 |
|                         | (mg/100gBW) | 10.17 ± 1.06  | 10.64 ± 1.43  | 10.77 ± 0.69  |
| Salivary gland          | (g)         | 0.40 ± 0.04   | 0.36 ± 0.02   | 0.36 ± 0.02   |
|                         | (g/100gBW)  | 0.22 ± 0.02   | 0.20 ± 0.01   | 0.20 ± 0.01   |

Values are means ± SDs.

**Table 15. Histopathological findings for male Crl:CD (SD) rats treated with compound Y and Z for 7 days**

|                         |                                          | Control | Compound Y | Compound Z |
|-------------------------|------------------------------------------|---------|------------|------------|
| No. of animals examined |                                          | 5       | 5          | 5          |
| Organs                  | Findings                                 |         |            |            |
| Jejunum                 | No abnormalities detected                | 5       | 4          | 5          |
|                         | Diverticulum (P)                         | -       | 1          | -          |
| Thyroid                 | No abnormalities detected                | 3       | 4          | 5          |
|                         | Ectopic tissue, thymus (P)               | 1       | 1          | -          |
|                         | Ultimobranchial cyst (P)                 | 1       | -          | -          |
| Pituitary               | No abnormalities detected                | 4       | 4          | 4          |
|                         | Cyst (P)                                 | 1       | -          | -          |
|                         | Aberrant craniopharyngeal structures (P) | -       | 1          | 1          |

Values are No. of animals.

P: Present

**Table 16. Histopathological findings for female Crl:CD (SD) rats treated with compound Y and Z for 7 days**

|                         |                            | Control | Compound Y | Compound Z |
|-------------------------|----------------------------|---------|------------|------------|
| No. of animals examined |                            | 5       | 5          | 5          |
| Organs                  | Findings                   |         |            |            |
| Thyroid                 | No abnormalities detected  | 4       | 2          | 1          |
|                         | Ectopic tissue, thymus (P) | 1       | -          | 1          |
|                         | Ultimobranchial cyst (P)   | -       | 3          | 3          |

Values are No. of animals.

P: Present

## Ⅱ．分担研究報告書

(6) 原因物質と推定されるプベルル酸等の毒性に関する研究

(6-2) プベルル酸の遺伝毒性試験

研究分担者 平林 容子

## 令和 6 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

### 食品を介したダイオキシン類等有害物質摂取量の評価と その手法開発のための研究

#### 分担研究報告書

#### (6) 原因物質と推定されるプベルル酸等の毒性に関する研究 (6-2) プベルル酸の遺伝毒性試験

研究分担者 平林容子 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター

#### 研究要旨

紅麹菌を用いて製造されたいわゆる健康食品による腎障害等の健康被害を起こした事例について、原因物質の一つとされるプベルル酸の突然変異誘発能の有無を明らかにするため、細菌を用いる復帰突然試験（Ames 試験）と遺伝子改変げっ歯類（MutaMouse）を用いた遺伝子突然変異試験（TGR 試験）を実施した。Ames 試験については、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株においても復帰変異コロニー数の増加が認められ、代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* を除く菌株において、陰性対照値の 2 倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められた。

TGR 試験については、既存の試験結果から明確な性差が確認されていることから、本試験においては雌のみを使用した。用量設定試験から最大耐量付近と考えられた 5.00 mg/kg/day を最高用量として、以下、2.50, 1.25 および 0.625 mg/kg/day の計 4 用量を設定した。各群雌 6 匹 (2.50 mg/kg/day 群のみ 8 匹) に 1 日 1 回、28 日間連続強制経口投与した。最終投与後 3 日に全例から腺胃および腎臓を摘出し、lacZ assay により遺伝子突然変異体頻度を算出した。その結果、プベルル酸投与群の腺胃および腎臓のいずれにおいても陰性対照群と比較して遺伝子突然変異体頻度の統計学的に有意な増加は認められなかった。陽性対照の N-エチル-N-ニトロソウレア (ENU, 投与量 100 mg/kg/day, 腹腔内投与, 1 日 1 回 2 日間) 投与群においては、腺胃および腎臓ともに陰性対照群と比較して統計学的に有意な遺伝子突然変異体頻度の増加が認められたことから、当該試験は適切に実施されたと判断した。以上の結果から、当該試験条件下において、プベルル酸は遺伝子改変げっ歯類の腺胃および腎臓に対して遺伝子突然変異誘発性を示さないもの(陰性)と判定された。

#### 研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所

出水 庸介、豊田 武士、杉山 圭一、花尻 (木倉) 瑠理

#### A. 研究目的

紅麹菌を用いて製造されたいわゆる健康食品によって腎障害等の健康被害が生じた事例について、国民の不安が募っている。本研究においては、原因物質の一つとされたプベルル

酸について、遺伝子突然変異誘発能の有無を明らかにするため、細菌を用いる復帰突然試験（Ames 試験）と遺伝子改変げっ歯類（MutaMouse）を用いた遺伝子突然変異試験（TGR 試験）を行う。

## B. 研究方法

### 1. プベールル酸の Ames 試験

プベールル酸（Puberulic acid; CAS no. 99-23-0）の遺伝子突然変異誘発能の有無を明らかにするため、ネズミチフス 菌 *Salmonella typhimurium*（以下、*S. typhimurium* と略す）TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli*（以下、*E. coli* と略す）WP2 *uvrA* を用いて、代謝活性化する場合及び代謝活性化しない場合の条件下で、プレインキュベーション法により実施した。なお、被験物質（国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部にて合成：Lot no. 20240529、純度 98.78%）の溶媒にはジメチルスルホキシド（DMSO）を用いた。参考にしたガイドラインは、

- ・「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成 23 年 3 月 31 日：薬食発 0331 第 7 号、平成 23・03・29 製局第 5 号、環境企発第 110331009 号）

- ・「OECD Guideline for Testing of Chemicals 471: Bacterial Reverse Mutation Test」（OECD：2020 年 6 月 26 日）

である。

なお、Ames 試験は外部委託し、医薬品開発業務受託機関（CRO）が実施した。

### 2. プベールル酸の TGR 試験

プベールル酸の生体における遺伝子突然変異誘発能の有無について検討するため、遺伝子改変げっ歯類（MutaMouse）を用い、標的器官におけるレポーター遺伝子（lacZ）に対する遺伝子突然変異誘発性を検討した。被験物質（国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部に

て合成：Lot no. 20240904、純度 98.5%）の溶媒には 0.5 w/v% メチルセルロース水溶液を用いた。用量設定試験には MutaMouse の親動物である CD2F1 マウスを使用した。本試験の試験用量を設定するため、100 mg/kg/day を最高用量とし、公比約 3 で除した 30.0, 10.0 および 3.00 mg/kg/day の計 4 用量を設定し、CD2F1 マウスの雌雄に、1 日 1 回、14 日間反復強制経口投与した。

用量設定試験結果から顕著な性差は認められなかったものの国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部で実施したラットを用いた 28 日間反復投与試験において、腎毒性に明確な性差が確認されていた。そのため本試験においては雌のみを使用することとし、用量設定試験結果から最大耐量付近と考えられる 5.00 mg/kg/day を最高用量として以下、2.50、1.25 および 0.625 mg/kg/day の計 4 用量を設定した。各群雌 6 匹（2.50 mg/kg/day 群のみ 8 匹）に 1 日 1 回、28 日間連続強制経口投与した。1.25、2.50 および 5.00 mg/kg/day の 3 用量の腺胃および腎臓について、lacZ assay により遺伝子突然変異体頻度を算出した。

本試験の実施においては、下記二つのガイドラインを参考とし、外部委託によって CRO が実施した。

- ・「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」（平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発 0331 第 8 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 6 号経済産業省製造産業局長、環境企発第 110331010 号環境省総合環境政策局長通知）

- ・OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 488 (30 June 2022: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays)

## C. 研究結果及び考察

### 1. プベールル酸の Ames 試験

本試験の試験用量を設定するため 5000、1250、313、78.1、19.5、4.88 及び 1.22 µg/plate で用量設定試験を実施した。用量設定試験の結果、本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。菌に対する生育阻害は、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 及び TA1537 の 1250 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化した場合のすべての菌株の 5000 µg/plate の用量で認められた。本被験物質による復帰変異コロニー数は、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において増加が認められ、代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* を除く菌株において、陰性対照値の 2 倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められた。無菌試験では、最高用量の被験液及び S9 Mix に雑菌の生育は認められなかった。用量設定試験の結果に基づき本試験の用量は、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA 株及び代謝活性化する場合の *E. coli* WP2 *uvrA* においては、復帰変異コロニー数の増加が認められたため、本試験では最大比活性化が得られるよう代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 においては 5000 µg/plate を最高用量として以下公比 2 で除した 2500、1250、625、313、156、78.1 及び 39.1 µg/plate の計 8 用量、代謝活性化しない場合の TA98、TA100 及び代謝活性化する場合のすべての菌株においては 5000 µg/plate を最高用量として以下公比 2 で除した 2500、1250、625、313 及び 156 µg/plate の計 6 用量の被験物質処理用量を設定した。代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* においては、復帰変異コロニー数の増加が認められるものの陰性対照値の 2 倍以上の増加は認められなかったため、生育阻害の認められた最低用

量の 5000 µg/plate を最高用量として以下公比 2 で除した 2500、1250、625、313 及び 156 µg/plate の計 6 用量の被験物質処理用量を設定した（表 1）。

本試験における本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの 用量においても認められなかった。菌に対する生育阻害は、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 及び TA1537 の 1250 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化した場合のすべての菌株の 5000 µg/plate の用量で認められた。本被験物質による復帰変異コロニー数は、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において増加が認められ、代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* を除く菌株において、陰性対照値の 2 倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められた。無菌試験では、最高用量の被験液及び S9 Mix に雑菌の生育は認められなかった（表 2）。

## 2. プベール酸の TGR 試験

### 2-1. 用量設定試験結果および本試験における一般状態

用量設定試験の結果、雌雄の 100 mg/kg/day 群では Day 3 もしくは Day 4、雌雄の 30.0 mg/kg/day 群では、Day 7 もしくは Day 8 に全例の死亡もしくは瀕死が認められた。これらの死亡もしくは瀕死個体では、自発運動低下、腹臥位、呼吸不整、体温低下もしくは顕著な体重減少が認められた。10.0 mg/kg/day 群では、雌性の 1 例において、痩せが認められ、雌雄の全例において、顕著な体重減少が認められた。3.00 mg/kg/day 群では、雌雄ともに一般状態の変化および顕著な体重減少は認められなかった。Day 15 の剖検時、雌雄の 10.0 mg/kg/day 群において、腎臓の腫大、淡色化が認められた。3.00 mg/kg/day 群では、雌雄とも特筆すべき変化は認められな

かった（表 3）。

本試験においては、いずれの被験物質投与群においても一般状態および体重推移に変化は認められなかった（表 4）。剖検時、5.00 mg/kg/day 群の 1/6 例において、腎臓の淡色化が認められた。その他の投与群においては特筆すべき変化は認められなかった。すべての投与群において、評価数 5 匹を確保することができたため、腺胃および腎臓からゲノム DNA を抽出し、1.25、2.50 および 5.00 mg/kg/day の 3 用量について、*lacZ* assay による遺伝子突然変異頻度体評価対象とした。

## 2-2. 腺胃における *lacZ* assay 結果

結果を表 5 に示す。陰性対照群での突然変異体頻度の平均値±SD は、 $26.8 \pm 5.3 (\times 10^{-6})$  であった。プベールル酸投与群での突然変異体頻度の平均値±SD は、1.25、2.50 および 5.00 mg/kg/day 群で、それぞれ  $32.7 \pm 7.6 (\times 10^{-6})$ 、 $32.5 \pm 7.0 (\times 10^{-6})$  および  $35.5 \pm 14.6 (\times 10^{-6})$  であり、陰性対照群と比較し統計学的に有意な差は認められなかった。また陽性対照群における突然変異体頻度の平均値±SD は、 $472.3 \pm 71.8 (\times 10^{-6})$  であり、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。

## 2-3. 腎臓における *lacZ* assay 結果

結果を表 6 に示す。陰性対照群での突然変異体頻度の平均値±SD は、 $30.0 \pm 7.5 (\times 10^{-6})$  であった。プベールル酸投与群での突然変異体頻度の平均値±SD は、1.25、2.50 および 5.00 mg/kg/day 群で、それぞれ  $35.0 \pm 11.8 (\times 10^{-6})$ 、 $48.8 \pm 37.0 (\times 10^{-6})$  および  $38.1 \pm 10.1 (\times 10^{-6})$  であり、陰性対照群と比較し統計学的に有意な差は認められなかった。動物番号 3303 における突然変異体頻度は、 $114.5 \times 10^{-6}$  と高値を示したが、他の動物では突然変異体頻度の増加傾向は認められなかった。陽性対照群における突然変異体頻度の平均値±SD は、 $127.1 \pm 41.3 (\times 10^{-6})$  であり、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められ

た。

## D. 結論

### 1. プベールル酸の Ames 試験

用量設定試験及び本試験共に、本被験物質は、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株においても復帰変異コロニー数の増加が認められ、代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* を除く菌株において、陰性対照群の 2 倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数の増加は認められた。なお、最大比活性値は、用量設定試験の代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100 の 1250 µg/plate における  $2.78 \times 10^2$  (Revertant/mg) であった。一方、陽性対照群では陰性対照群と比較して 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示したことから、使用菌株の復帰突然変異誘発物質に対する反応は適切であったことが確認され、試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の試験結果より、本試験条件下において プベールル酸は、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有する（陽性）と判定した（表 1, 2）。

### 2. プベールル酸の TGR 試験

プベールル酸の生体における遺伝子突然変異誘発能の有無について検討するため、遺伝子改変げっ歯類 (MutaMouse) を用い、標的器官での遺伝子突然変異誘発性を評価した。5.00、2.50 および 1.25 mg/kg/day の 3 用量の腺胃および腎臓について、*lacZ* assay による遺伝子突然変異体頻度を算出した。その結果、プベールル酸投与群の腺胃および腎臓のいずれにおいても陰性対照群と比較して遺伝子突然変異体頻度の統計学的に有意な増加は認められなかった。一方、陽性対照の ENU 投与群では、腺胃および腎臓ともに陰性対照群と比較して統計学的に有意な遺伝子突然変異体

頻度の増加が認められたことから、当該試験は適切に実施されたと判断した。

以上の結果から、当該試験条件下において、プベルル酸はトランスジェニックマウスの腺胃および腎臓に対して遺伝子突然変異誘発性を示さないもの（陰性）と判定された。

#### **E. 参考文献**

該当無し

#### **F. 研究業績**

##### **1. 論文発表**

なし

##### **2. 学会発表**

なし

表 1 Ames 用量設定試験結果

被験物質の名称: プベール酸 (CAS RN 99-23-0)

| 代謝活性<br>化系の<br>有無 | 被験物質<br>の用量<br>( $\mu$ g/プレート) | 復帰変異数 (コロニー数/プレート)     |                     |                    |                        |                       |
|-------------------|--------------------------------|------------------------|---------------------|--------------------|------------------------|-----------------------|
|                   |                                | 塩基対置換型                 |                     |                    | フレームシフト型               |                       |
|                   |                                | TA100                  | TA1535              | WP2uvrA            | TA98                   | TA1537                |
| S9Mix<br>(-)      | 陰性対照<br>(DMSO)                 | 118<br>117 ( 118 )     | 7<br>7 ( 7 )        | 30<br>28 ( 29 )    | 19<br>22 ( 21 )        | 10<br>7 ( 9 )         |
|                   | 1.22                           | 130<br>110 ( 120 )     | 10<br>3 ( 7 )       | 28<br>32 ( 30 )    | 22<br>19 ( 21 )        | 8<br>5 ( 7 )          |
|                   | 4.88                           | 102<br>105 ( 104 )     | 9<br>8 ( 9 )        | 36<br>34 ( 35 )    | 22<br>24 ( 23 )        | 5<br>13 ( 9 )         |
|                   | 19.5                           | 106<br>127 ( 117 )     | 11<br>7 ( 9 )       | 32<br>31 ( 32 )    | 15<br>18 ( 17 )        | 6<br>6 ( 6 )          |
|                   | 78.1                           | 128<br>119 ( 124 )     | 15<br>10 ( 13 )     | 27<br>30 ( 29 )    | 36<br>35 ( 36 )        | 15<br>8 ( 12 )        |
|                   | 313                            | 196<br>179 ( 188 )     | 28<br>22 ( 25 )     | 32<br>27 ( 30 )    | 52<br>26 ( 39 )        | 13<br>17 ( 15 )       |
|                   | 1250                           | 453<br>479 ( 466 )     | 60 *<br>49 * ( 55 ) | 50<br>48 ( 49 )    | 63<br>79 ( 71 )        | 35 *<br>26 * ( 31 )   |
|                   | 5000                           | 462 *<br>549 * ( 506 ) | 10 *<br>21 * ( 16 ) | 5 *<br>2 * ( 4 )   | 202 *<br>233 * ( 218 ) | 50 *<br>41 * ( 46 )   |
| S9Mix<br>(+)      | 陰性対照<br>(DMSO)                 | 122<br>129 ( 126 )     | 9<br>14 ( 12 )      | 23<br>27 ( 25 )    | 26<br>31 ( 29 )        | 13<br>6 ( 10 )        |
|                   | 1.22                           | 150<br>142 ( 146 )     | 7<br>5 ( 6 )        | 25<br>28 ( 27 )    | 24<br>32 ( 28 )        | 10<br>13 ( 12 )       |
|                   | 4.88                           | 152<br>129 ( 141 )     | 5<br>5 ( 5 )        | 39<br>20 ( 30 )    | 24<br>34 ( 29 )        | 7<br>5 ( 6 )          |
|                   | 19.5                           | 134<br>149 ( 142 )     | 10<br>13 ( 12 )     | 27<br>26 ( 27 )    | 20<br>35 ( 28 )        | 5<br>6 ( 6 )          |
|                   | 78.1                           | 153<br>163 ( 158 )     | 14<br>11 ( 13 )     | 33<br>24 ( 29 )    | 35<br>33 ( 34 )        | 14<br>9 ( 12 )        |
|                   | 313                            | 187<br>175 ( 181 )     | 19<br>16 ( 18 )     | 27<br>33 ( 30 )    | 28<br>33 ( 31 )        | 13<br>9 ( 11 )        |
|                   | 1250                           | 294<br>329 ( 312 )     | 56<br>78 ( 67 )     | 43<br>58 ( 51 )    | 30<br>30 ( 30 )        | 11<br>8 ( 10 )        |
|                   | 5000                           | 548 *<br>453 * ( 501 ) | 27 *<br>19 * ( 23 ) | 8 *<br>7 * ( 8 )   | 121 *<br>109 * ( 115 ) | 55 *<br>42 * ( 49 )   |
| 陽性<br>対照          | 名 称                            | AF-2                   | SAZ                 | AF-2               | AF-2                   | ICR-191               |
|                   | 用量<br>( $\mu$ g/プレート)          | 0.01                   | 0.5                 | 0.01               | 0.1                    | 1.0                   |
|                   | コロニー数/プレート                     | 710<br>693 ( 702 )     | 211<br>206 ( 209 )  | 101<br>133 ( 117 ) | 479<br>500 ( 490 )     | 1417<br>1444 ( 1431 ) |
|                   | 名 称                            | B[a]P                  | 2AA                 | 2AA                | B[a]P                  | B[a]P                 |
|                   | 用量<br>( $\mu$ g/プレート)          | 5.0                    | 2.0                 | 10.0               | 5.0                    | 5.0                   |
|                   | コロニー数/プレート                     | 1171<br>1231 ( 1201 )  | 245<br>233 ( 239 )  | 710<br>667 ( 689 ) | 293<br>290 ( 292 )     | 96<br>67 ( 82 )       |

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SAZ : アジ化ナトリウム

ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

2AA : 2-アミノアントラセン

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

\*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

( )内は、2枚のプレートの平均値を示す。

表 2 Ames 本試験結果

被験物質の名称：プベール酸 (CAS RN 99-23-0)

| 代謝活性<br>化系の<br>有無 | 被験物質<br>の用量<br>( $\mu$ g/プレート) | 復帰変異数 (コロニー数/プレート)     |                       |                    |                        |                     |
|-------------------|--------------------------------|------------------------|-----------------------|--------------------|------------------------|---------------------|
|                   |                                | 塩基対置換型                 |                       |                    | フレームシフト型               |                     |
|                   |                                | TA100                  | TA1535                | WP2uvrA            | TA98                   | TA1537              |
| S9Mix<br>(-)      | 陰性対照<br>(DMSO)                 | 139<br>152 ( 146 )     | 9<br>10 ( 10 )        | 27<br>29 ( 28 )    | 16<br>24 ( 20 )        | 10<br>8 ( 9 )       |
|                   | 39.1                           | NT                     | 10<br>9 ( 10 )        | NT                 | NT                     | 14<br>10 ( 12 )     |
|                   | 78.1                           | NT                     | 17<br>14 ( 16 )       | NT                 | NT                     | 5<br>10 ( 8 )       |
|                   | 156                            | 180<br>202 ( 191 )     | 13<br>22 ( 18 )       | 21<br>23 ( 22 )    | 23<br>27 ( 25 )        | 6<br>8 ( 7 )        |
|                   | 313                            | 202<br>216 ( 209 )     | 34<br>20 ( 27 )       | 39<br>27 ( 33 )    | 28<br>40 ( 34 )        | 9<br>11 ( 10 )      |
|                   | 625                            | 269<br>305 ( 287 )     | 39<br>42 ( 41 )       | 27<br>32 ( 30 )    | 43<br>54 ( 49 )        | 8<br>13 ( 11 )      |
|                   | 1250                           | 456<br>452 ( 454 )     | 59 *<br>66 * ( 63 )   | 34<br>28 ( 31 )    | 78<br>67 ( 73 )        | 34 *<br>32 * ( 33 ) |
|                   | 2500                           | 643<br>698 ( 671 )     | 75 *<br>91 * ( 83 )   | 54<br>37 ( 46 )    | 120<br>126 ( 123 )     | 51 *<br>41 * ( 46 ) |
|                   | 5000                           | 370 *<br>578 * ( 474 ) | 18 *<br>6 * ( 12 )    | 6 *<br>1 * ( 4 )   | 245 *<br>238 * ( 242 ) | 50 *<br>51 * ( 51 ) |
| S9Mix<br>(+)      | 陰性対照<br>(DMSO)                 | 162<br>147 ( 155 )     | 9<br>12 ( 11 )        | 31<br>29 ( 30 )    | 28<br>31 ( 30 )        | 12<br>13 ( 13 )     |
|                   | 156                            | 176<br>179 ( 178 )     | 18<br>22 ( 20 )       | 35<br>36 ( 36 )    | 33<br>32 ( 33 )        | 8<br>8 ( 8 )        |
|                   | 313                            | 169<br>160 ( 165 )     | 34<br>42 ( 38 )       | 42<br>42 ( 42 )    | 28<br>32 ( 30 )        | 4<br>9 ( 7 )        |
|                   | 625                            | 216<br>223 ( 220 )     | 43<br>51 ( 47 )       | 42<br>38 ( 40 )    | 25<br>42 ( 34 )        | 11<br>8 ( 10 )      |
|                   | 1250                           | 299<br>344 ( 322 )     | 76<br>91 ( 84 )       | 53<br>67 ( 60 )    | 31<br>43 ( 37 )        | 11<br>17 ( 14 )     |
|                   | 2500                           | 457<br>524 ( 491 )     | 96<br>116 ( 106 )     | 53<br>54 ( 54 )    | 63<br>64 ( 64 )        | 22<br>25 ( 24 )     |
|                   | 5000                           | 447 *<br>498 * ( 473 ) | 101 *<br>68 * ( 85 )  | 5 *<br>0 * ( 3 )   | 119 *<br>146 * ( 133 ) | 54 *<br>44 * ( 49 ) |
| 陽性<br>対照          | S9Mix<br>を必要<br>としな<br>いもの     | 名 称                    | AF-2                  | SAZ                | AF-2                   | ICR-191             |
|                   |                                | 用量<br>( $\mu$ g/プレート)  | 0.01                  | 0.5                | 0.01                   | 0.1                 |
|                   |                                | コロニー数/プレート             | 576<br>557 ( 567 )    | 267<br>295 ( 281 ) | 86<br>98 ( 92 )        | 461<br>461 ( 461 )  |
|                   | S9Mix<br>を必要<br>とする<br>もの      | 名 称                    | B[a]P                 | 2AA                | 2AA                    | B[a]P               |
|                   |                                | 用量<br>( $\mu$ g/プレート)  | 5.0                   | 2.0                | 10.0                   | 5.0                 |
|                   |                                | コロニー数/プレート             | 1048<br>1245 ( 1147 ) | 222<br>207 ( 215 ) | 736<br>779 ( 758 )     | 300<br>300 ( 300 )  |

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド  
 SAZ : アジ化ナトリウム  
 ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl  
 2AA : 2-アミノアントラセン  
 B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

\* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

NT : 試験せず。

( )内は、2枚のプレートの平均値を示す。

表 3 MutaMouse を用いた遺伝子突然変異試験のための用量設定試験における臨床症状

| Sex: Male      | Observation Type: All Types    | Day(s) Relative to Start Date |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |          |          |
|----------------|--------------------------------|-------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|
|                |                                | 1<br>BF                       | 1<br>AF | 2<br>BF | 2<br>AF | 3<br>BF | 3<br>AF | 4<br>BF | 4<br>AF | 5<br>BF | 5<br>AF | 6<br>BF | 6<br>AF | 7<br>BF | 7<br>AF | 8<br>BF | 8<br>AF | 9<br>BF | 9<br>AF | 10<br>BF | 10<br>AF |
| 3.00 mg/kg/day | Animals Examined               | 3                             | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3        | 3        |
|                | Normal                         | 3                             | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3        | 3        |
|                | Sacrificed                     | -                             | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -        | -        |
| 10.0 mg/kg/day | Animals Examined               | 3                             | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3        | 3        |
|                | Normal                         | 3                             | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3        | 3        |
|                | Sacrificed                     | -                             | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -        | -        |
| 30.0 mg/kg/day | Animals Examined               | 3                             | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | -       | -       | -       | -        | -        |
|                | Normal                         | 3                             | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | -       | -       | -       | -       | -        | -        |
|                | Prone position                 | -                             | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | 1       | -       | -       | -       | -        | -        |
|                | Decrease in locomotor activity | -                             | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | 1       | -       | -       | -       | -        | -        |
|                | Irregular respiration          | -                             | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | 1       | -       | -       | -       | -        | -        |
|                | Dead                           | -                             | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | 1       | -       | -       | -       | -        | -        |
|                | Moribund                       | -                             | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | 2       | -       | -       | -       | -        | -        |
| 100 mg/kg/day  | Animals Examined               | 3                             | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -        | -        |
|                | Normal                         | 3                             | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -        | -        |
|                | Decrease in locomotor activity | -                             | -       | -       | -       | -       | -       | 2       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -        | -        |
|                | Irregular respiration          | -                             | -       | -       | -       | -       | -       | 1       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -        | -        |
|                | Hypothermia                    | -                             | -       | -       | -       | -       | -       | 1       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -        | -        |
|                | Dead                           | -                             | -       | -       | -       | -       | -       | 1       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -        | -        |
|                | Moribund                       | -                             | -       | -       | -       | -       | -       | 2       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -        | -        |

| Sex: Male      | Observation Type: All Types    | Day(s) Relative to Start Date |          |          |          |          |          |          |          |          |  |  |  |  |  |  |
|----------------|--------------------------------|-------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|--|--|--|--|--|--|
|                |                                | 11<br>BF                      | 11<br>AF | 12<br>BF | 12<br>AF | 13<br>BF | 13<br>AF | 14<br>BF | 14<br>AF | 15<br>BC |  |  |  |  |  |  |
| 3.00 mg/kg/day | Animals Examined               | 3                             | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        |  |  |  |  |  |  |
|                | Normal                         | 3                             | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        |  |  |  |  |  |  |
|                | Sacrificed                     | -                             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | 3        |  |  |  |  |  |  |
| 10.0 mg/kg/day | Animals Examined               | 3                             | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        |  |  |  |  |  |  |
|                | Normal                         | 3                             | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        |  |  |  |  |  |  |
|                | Sacrificed                     | -                             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | 3        |  |  |  |  |  |  |
| 30.0 mg/kg/day | Animals Examined               | -                             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |  |  |  |  |  |  |
|                | Normal                         | -                             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |  |  |  |  |  |  |
|                | Prone position                 | -                             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |  |  |  |  |  |  |
|                | Decrease in locomotor activity | -                             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |  |  |  |  |  |  |
|                | Irregular respiration          | -                             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |  |  |  |  |  |  |
|                | Dead                           | -                             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |  |  |  |  |  |  |
|                | Moribund                       | -                             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |  |  |  |  |  |  |
| 100 mg/kg/day  | Animals Examined               | -                             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |  |  |  |  |  |  |
|                | Normal                         | -                             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |  |  |  |  |  |  |
|                | Decrease in locomotor activity | -                             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |  |  |  |  |  |  |
|                | Irregular respiration          | -                             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |  |  |  |  |  |  |
|                | Hypothermia                    | -                             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |  |  |  |  |  |  |
|                | Dead                           | -                             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |  |  |  |  |  |  |
|                | Moribund                       | -                             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |  |  |  |  |  |  |

Values = Specific Number of Animals Affected

.-=Not Present

BF: Before administration

AF: After administration

BC: Before carrying out

| Sex: Female    | Observation Type: All Types    | Day(s) Relative to Start Date |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |          |          |
|----------------|--------------------------------|-------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|
|                |                                | 1<br>BF                       | 1<br>AF | 2<br>BF | 2<br>AF | 3<br>BF | 3<br>AF | 4<br>BF | 4<br>AF | 5<br>BF | 5<br>AF | 6<br>BF | 6<br>AF | 7<br>BF | 7<br>AF | 8<br>BF | 8<br>AF | 9<br>BF | 9<br>AF | 10<br>BF | 10<br>AF |
| 3.00 mg/kg/day | Animals Examined               | 3                             | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3        | 3        |
|                | Normal                         | 3                             | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3        | 3        |
|                | Sacrificed                     | .                             | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .        | .        |
| 10.0 mg/kg/day | Animals Examined               | 3                             | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3        | 3        |
|                | Normal                         | 3                             | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3        | 3        |
|                | Emaciation                     | .                             | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .        | .        |
| 30.0 mg/kg/day | Animals Examined               | 3                             | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | .       | .       | .       | .       | .        | .        |
|                | Normal                         | 3                             | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | 3       | .       | .       | .       | .       | .       | .        | .        |
|                | Prone position                 | .                             | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | 2       | .       | .       | .       | .       | .       | .        | .        |
|                | Decrease in locomotor activity | .                             | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | 2       | .       | .       | .       | .       | .       | .        | .        |
|                | Irregular respiration          | .                             | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | 2       | .       | .       | .       | .       | .       | .        | .        |
|                | Dead                           | .                             | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | 1       | .       | .       | .       | .       | .       | .        | .        |
|                | Moribund                       | .                             | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | 2       | .       | .       | .       | .       | .       | .        | .        |
| 100 mg/kg/day  | Animals Examined               | 3                             | 3       | 3       | 3       | 3       | 2       | 2       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .        | .        |
|                | Normal                         | 3                             | 3       | 3       | 3       | 2       | 2       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .        | .        |
|                | Prone position                 | .                             | .       | .       | .       | 1       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .        | .        |
|                | Decrease in locomotor activity | .                             | .       | .       | .       | .       | .       | 1       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .        | .        |
|                | Irregular respiration          | .                             | .       | .       | .       | 1       | .       | 1       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .        | .        |
|                | Dead                           | .                             | .       | .       | .       | .       | .       | 1       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .        | .        |
|                | Moribund                       | .                             | .       | .       | .       | 1       | .       | 1       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .       | .        | .        |

| Sex: Female    | Observation Type: All Types    | Day(s) Relative to Start Date |          |          |          |          |          |          |          |          |  |  |  |  |  |  |
|----------------|--------------------------------|-------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|--|--|--|--|--|--|
|                |                                | 11<br>BF                      | 11<br>AF | 12<br>BF | 12<br>AF | 13<br>BF | 13<br>AF | 14<br>BF | 14<br>AF | 15<br>BC |  |  |  |  |  |  |
| 3.00 mg/kg/day | Animals Examined               | 3                             | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        |  |  |  |  |  |  |
|                | Normal                         | 3                             | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        |  |  |  |  |  |  |
|                | Sacrificed                     | .                             | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        | 3        |  |  |  |  |  |  |
| 10.0 mg/kg/day | Animals Examined               | 3                             | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        |  |  |  |  |  |  |
|                | Normal                         | 3                             | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 2        | 2        | 2        |  |  |  |  |  |  |
|                | Emaciation                     | .                             | .        | .        | .        | .        | .        | 1        | 1        | 1        |  |  |  |  |  |  |
| 30.0 mg/kg/day | Animals Examined               | .                             | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        |  |  |  |  |  |  |
|                | Normal                         | .                             | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        |  |  |  |  |  |  |
|                | Prone position                 | .                             | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        |  |  |  |  |  |  |
|                | Decrease in locomotor activity | .                             | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        |  |  |  |  |  |  |
|                | Irregular respiration          | .                             | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        |  |  |  |  |  |  |
|                | Dead                           | .                             | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        |  |  |  |  |  |  |
|                | Moribund                       | .                             | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        |  |  |  |  |  |  |
| 100 mg/kg/day  | Animals Examined               | .                             | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        |  |  |  |  |  |  |
|                | Normal                         | .                             | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        |  |  |  |  |  |  |
|                | Prone position                 | .                             | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        |  |  |  |  |  |  |
|                | Decrease in locomotor activity | .                             | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        |  |  |  |  |  |  |
|                | Irregular respiration          | .                             | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        |  |  |  |  |  |  |
|                | Dead                           | .                             | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        |  |  |  |  |  |  |
|                | Moribund                       | .                             | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        | .        |  |  |  |  |  |  |

Values = Specific Number of Animals Affected

.=Not Present

BF: Before administration

AF: After administration

BC: Before carrying out

表 4 MutaMouse を用いた遺伝子突然変異試験の本試験における臨床症状

| Sex: Female     | Observation Type: All Types | Day(s) Relative to Start Date |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |          |          |
|-----------------|-----------------------------|-------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|
|                 |                             | 1<br>BF                       | 1<br>AF | 2<br>BF | 2<br>AF | 3<br>BF | 3<br>AF | 4<br>BF | 4<br>AF | 5<br>BF | 5<br>AF | 6<br>BF | 6<br>AF | 7<br>BF | 7<br>AF | 8<br>BF | 8<br>AF | 9<br>BF | 9<br>AF | 10<br>BF | 10<br>AF |
| NC 0 mg/kg/day  | Animals Examined            | 6                             | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6        | 6        |
|                 | Normal                      | 6                             | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6        | 6        |
|                 | Sacrificed                  | -                             | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -        | -        |
| 0.625 mg/kg/day | Animals Examined            | 6                             | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6        | 6        |
|                 | Normal                      | 6                             | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6        | 6        |
|                 | Sacrificed                  | -                             | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -        | -        |
| 1.25 mg/kg/day  | Animals Examined            | 6                             | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6        | 6        |
|                 | Normal                      | 6                             | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6        | 6        |
|                 | Sacrificed                  | -                             | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -        | -        |
| 2.50 mg/kg/day  | Animals Examined            | 8                             | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8        | 8        |
|                 | Normal                      | 8                             | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8       | 8        | 8        |
|                 | Sacrificed                  | -                             | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -        | -        |
| 5.00 mg/kg /day | Animals Examined            | 6                             | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6        | 6        |
|                 | Normal                      | 6                             | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6        | 6        |
|                 | Sacrificed                  | -                             | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -        | -        |

| Sex: Female     | Observation Type: All Types | Day(s) Relative to Start Date |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
|-----------------|-----------------------------|-------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|                 |                             | 11<br>BF                      | 11<br>AF | 12<br>BF | 12<br>AF | 13<br>BF | 13<br>AF | 14<br>BF | 14<br>AF | 15<br>BF | 15<br>AF | 16<br>BF | 16<br>AF | 17<br>BF | 17<br>AF | 18<br>BF | 18<br>AF | 19<br>BF | 19<br>AF | 20<br>BF | 20<br>AF |
| NC 0 mg/kg/day  | Animals Examined            | 6                             | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        |
|                 | Normal                      | 6                             | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        |
|                 | Sacrificed                  | -                             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |
| 0.625 mg/kg/day | Animals Examined            | 6                             | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        |
|                 | Normal                      | 6                             | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        |
|                 | Sacrificed                  | -                             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |
| 1.25 mg/kg/day  | Animals Examined            | 6                             | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        |
|                 | Normal                      | 6                             | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        |
|                 | Sacrificed                  | -                             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |
| 2.50 mg/kg/day  | Animals Examined            | 8                             | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        |
|                 | Normal                      | 8                             | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        |
|                 | Sacrificed                  | -                             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |
| 5.00 mg/kg /day | Animals Examined            | 6                             | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        |
|                 | Normal                      | 6                             | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        |
|                 | Sacrificed                  | -                             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |

| Sex: Female     | Observation Type: All Types | Day(s) Relative to Start Date |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |  |
|-----------------|-----------------------------|-------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|--|
|                 |                             | 21<br>BF                      | 21<br>AF | 22<br>BF | 22<br>AF | 23<br>BF | 23<br>AF | 24<br>BF | 24<br>AF | 25<br>BF | 25<br>AF | 26<br>BF | 26<br>AF | 27<br>BF | 27<br>AF | 28<br>BF | 28<br>AF | 29<br>MP | 30<br>MP | 31<br>MP |  |
| NC 0 mg/kg/day  | Animals Examined            | 6                             | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        |  |
|                 | Normal                      | 6                             | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        |  |
|                 | Sacrificed                  | -                             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | 6        |  |
| 0.625 mg/kg/day | Animals Examined            | 6                             | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        |  |
|                 | Normal                      | 6                             | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        |  |
|                 | Sacrificed                  | -                             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | 6        |  |
| 1.25 mg/kg/day  | Animals Examined            | 6                             | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        |  |
|                 | Normal                      | 6                             | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        |  |
|                 | Sacrificed                  | -                             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | 6        |  |
| 2.50 mg/kg/day  | Animals Examined            | 8                             | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        |  |
|                 | Normal                      | 8                             | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        | 8        |  |
|                 | Sacrificed                  | -                             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | 8        |  |
| 5.00 mg/kg /day | Animals Examined            | 6                             | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        |  |
|                 | Normal                      | 6                             | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        | 6        |  |
|                 | Sacrificed                  | -                             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | 6        |  |

| Sex: Female      | Observation Type: All Types | Day(s) Relative to Start Date |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |          |          |
|------------------|-----------------------------|-------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|
|                  |                             | 1<br>BF                       | 2<br>BF | 2<br>AF | 3<br>BF | 3<br>AF | 4<br>MP | 5<br>MP | 6<br>MP | 7<br>MP | 8<br>MP | 9<br>MP | 10<br>MP | 11<br>MP |
| PC 100 mg/kg/day | Animals Examined            | 6                             | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6        | 6        |
|                  | Normal                      | 6                             | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6       | 6        | 6        |
|                  | Sacrificed                  | -                             | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -        | 6        |

Values = Specific Number of Animals Affected

.=Not Present

PC: Positive Control

BF: Before administration

AF: After administration

MP: Manifestation period

表 5 MutaMouse を用いた遺伝子突然変異試験の腺胃における *lacZ assay* 結果

| Substance      | Dose<br>(mg/kg/day, p.o.) | Animal<br>ID No. | Number of<br>plaque<br>forming units | Number<br>of<br>packagings | Number<br>of<br>mutants | Mutant<br>frequency<br>( $\times 10^{-6}$ ) | Group<br>Mean $\pm$ S.D.<br>( $\times 10^{-6}$ ) |
|----------------|---------------------------|------------------|--------------------------------------|----------------------------|-------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 0.5% MC        | 0                         | 3001             | 330,300                              | 1                          | 7                       | 21.2                                        | 26.8 $\pm$ 5.3                                   |
|                |                           | 3002             | 591,300                              | 1                          | 18                      | 30.4                                        |                                                  |
|                |                           | 3003             | 807,300                              | 1                          | 18                      | 22.3                                        |                                                  |
|                |                           | 3004             | 607,500                              | 1                          | 16                      | 26.3                                        |                                                  |
|                |                           | 3005             | 856,800                              | 1                          | 29                      | 33.8                                        |                                                  |
| Puberulic acid | 1.25                      | 3201             | 728,100                              | 1                          | 24                      | 33.0                                        | 32.7 $\pm$ 7.6                                   |
|                |                           | 3202             | 1,125,000                            | 1                          | 44                      | 39.1                                        |                                                  |
|                |                           | 3203             | 655,200                              | 1                          | 16                      | 24.4                                        |                                                  |
|                |                           | 3204             | 1,124,100                            | 1                          | 29                      | 25.8                                        |                                                  |
|                |                           | 3205             | 1,280,700                            | 1                          | 53                      | 41.4                                        |                                                  |
|                | 2.50                      | 3301             | 1,297,800                            | 1                          | 47                      | 36.2                                        | 32.5 $\pm$ 7.0                                   |
|                |                           | 3302             | 634,500                              | 1                          | 15                      | 23.6                                        |                                                  |
|                |                           | 3303             | 710,100                              | 1                          | 19                      | 26.8                                        |                                                  |
|                |                           | 3304             | 544,500                              | 1                          | 22                      | 40.4                                        |                                                  |
|                |                           | 3305             | 706,500                              | 1                          | 25                      | 35.4                                        |                                                  |
|                | 5.00                      | 3401             | 1,743,300                            | 1                          | 52                      | 29.8                                        | 35.5 $\pm$ 14.6                                  |
|                |                           | 3402             | 1,804,500                            | 1                          | 103                     | 57.1                                        |                                                  |
|                |                           | 3403             | 856,800                              | 1                          | 32                      | 37.3                                        |                                                  |
|                |                           | 3404             | 657,900                              | 1                          | 11                      | 16.7                                        |                                                  |
|                |                           | 3405             | 899,100                              | 1                          | 33                      | 36.7                                        |                                                  |
| ENU            | 100                       | 3501             | 1,057,500                            | 1                          | 463                     | 437.8                                       | 472.3 $\pm$ 71.8 *(AW)                           |
|                |                           | 3502             | 1,262,700                            | 1                          | 694                     | 549.6                                       |                                                  |
|                |                           | 3503             | 1,284,300                            | 1                          | 662                     | 515.5                                       |                                                  |
|                |                           | 3504             | 353,700                              | 1                          | 174                     | 491.9                                       |                                                  |
|                |                           | 3505             | 608,400                              | 1                          | 223                     | 366.5                                       |                                                  |

0.5% MC: Negative control (0.5 w/v% Methylcellulose solution, 10 mL/kg)

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

\*: Significant difference from negative control ( $p \leq 0.05$ )

(AW): Aspin-Welch's *t* test

表 6 MutaMouse を用いた遺伝子突然変異試験の腎臓における *lacZ assay* 結果

| Substance      | Dose<br>(mg/kg/day, p.o.) | Animal<br>ID No. | Number of<br>plaque<br>forming units | Number<br>of<br>packagings | Number<br>of<br>mutants | Mutant<br>frequency<br>( $\times 10^{-6}$ ) | Group<br>Mean $\pm$ S.D.<br>( $\times 10^{-6}$ ) |
|----------------|---------------------------|------------------|--------------------------------------|----------------------------|-------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 0.5% MC        | 0                         | 3001             | 784,800                              | 1                          | 15                      | 19.1                                        | 30.0 $\pm$ 7.5                                   |
|                |                           | 3002             | 1,080,900                            | 1                          | 35                      | 32.4                                        |                                                  |
|                |                           | 3003             | 1,199,700                            | 1                          | 46                      | 38.3                                        |                                                  |
|                |                           | 3004             | 994,500                              | 1                          | 34                      | 34.2                                        |                                                  |
|                |                           | 3005             | 954,900                              | 1                          | 25                      | 26.2                                        |                                                  |
| Puberulic acid | 1.25                      | 3201             | 1,162,800                            | 1                          | 24                      | 20.6                                        | 35.0 $\pm$ 11.8                                  |
|                |                           | 3202             | 1,493,100                            | 1                          | 49                      | 32.8                                        |                                                  |
|                |                           | 3203             | 1,147,500                            | 1                          | 46                      | 40.1                                        |                                                  |
|                |                           | 3204             | 2,002,500                            | 1                          | 59                      | 29.5                                        |                                                  |
|                |                           | 3205             | 1,540,800                            | 1                          | 80                      | 51.9                                        |                                                  |
|                | 2.50                      | 3301             | 1,746,000                            | 1                          | 67                      | 38.4                                        | 48.8 $\pm$ 37.0                                  |
|                |                           | 3302             | 1,369,800                            | 1                          | 47                      | 34.3                                        |                                                  |
|                |                           | 3303             | 1,292,400                            | 1                          | 148                     | 114.5                                       |                                                  |
|                |                           | 3304             | 681,300                              | 1                          | 18                      | 26.4                                        |                                                  |
|                |                           | 3305             | 1,113,300                            | 1                          | 34                      | 30.5                                        |                                                  |
|                | 5.00                      | 3401             | 906,300                              | 1                          | 24                      | 26.5                                        | 38.1 $\pm$ 10.1                                  |
|                |                           | 3402             | 1,187,100                            | 1                          | 40                      | 33.7                                        |                                                  |
|                |                           | 3403             | 1,076,400                            | 1                          | 57                      | 53.0                                        |                                                  |
|                |                           | 3404             | 963,000                              | 1                          | 41                      | 42.6                                        |                                                  |
|                |                           | 3405             | 1,345,500                            | 1                          | 47                      | 34.9                                        |                                                  |
| ENU            | 100                       | 3501             | 1,100,700                            | 1                          | 136                     | 123.6                                       | 127.1 $\pm$ 41.3 *(AW)                           |
|                |                           | 3502             | 1,359,000                            | 1                          | 267                     | 196.5                                       |                                                  |
|                |                           | 3503             | 1,426,500                            | 1                          | 159                     | 111.5                                       |                                                  |
|                |                           | 3504             | 1,111,500                            | 1                          | 131                     | 117.9                                       |                                                  |
|                |                           | 3505             | 730,800                              | 1                          | 63                      | 86.2                                        |                                                  |

0.5% MC: Negative control (0.5 w/v% Methylcellulose solution, 10 mL/kg)

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

\*: Significant difference from negative control ( $p \leq 0.05$ )

(AW): Aspin-Welch's *t* test