

試験番号

B10-0109

最 終 報 告 書

遺伝子発現量解析のための
4,4'-Thiobis(6-*tert*-Butyl-*m*-Cresol)のラットにおける 28 日間反復経口投与毒性試験

2014 年 3 月

一般財団法人 化学物質評価研究機構



本文書は正本を正確に転写したものです。

一般財団法人 化学物質評価研究機構 日田事業所

2014 年 3 月 14 日

試験責任者 寶珠山 五月

目 次

	頁
1. 表 題	4
2. 試験委託者	4
3. 試験施設	4
4. 試験目的	4
5. 試験法	4
6. GLP 基準	4
7. 動物愛護	4
8. 試験日程	5
9. 試験責任者	5
10. 試験関係者及び業務分担	5
11. 試資料の保管	5
12. 最終報告書の承認	5
13. 要 約	6
14. 試験材料	8
14.1 被験物質	8
14.2 媒 体	9
14.3 使用動物	9
14.4 飼育環境	10
15. 試験方法	11
15.1 被験物質の設定用量	11
15.2 群構成	11
15.3 投与液	12
15.4 投 与	12
15.5 一般状態観察	12
15.6 詳細な一般状態観察	13
15.7 機能検査	13
15.8 体重測定	14
15.9 摂餌量測定	14
15.10 尿検査	14
15.11 血液検査	15
15.12 病理学的検査	18
15.13 統計学的方法	21
16. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因及び試験計画書からの逸脱	21
17. 試験成績	22
17.1 一般状態	22
17.2 詳細な一般状態	22
17.3 機能検査	22

17.4 体 重	22
17.5 摂餌量	22
17.6 尿検査	22
17.7 血液検査	22
17.8 病理学的検査	23
18. 考 察	25
19. 参考文献	27

Figures

1 Body weights	28
2 Food consumption	29

Tables

1 Summary of general clinical observations	30
2 Summary of detailed clinical observations	31
3 Summary of functional observations	35
4 Summary of body weights	36
5 Summary of food consumption	37
6 Summary of urinalyses	38
7 Summary of hematological examinations	41
8 Summary of blood chemical examinations	45
9 Summary of absolute organ weights	49
10 Summary of relative organ weights	53
11 Summary of macroscopic examinations	57
12 Summary of histopathological examinations	61

Appendices

1 General clinical observations of individual animals	69
2 Detailed clinical observations of individual animals	72
3 Functional observations of individual animals	75
4 Body weights of individual animals	76
5 Food consumption of individual animals	88
6 Urinalytic data of individual animals	89
7 Hematological data of individual animals	95
8 Blood chemical data of individual animals	107
9 Absolute organ weights of individual animals	119
10 Relative organ weights of individual animals	131
11 Pathological findings of individual animals	143

1. 表 題

遺伝子発現量解析のための 4,4'-Thiobis(6-*tert*-Butyl-*m*-Cresol)のラットにおける 28 日間反復経口投与毒性試験

2. 試験委託者

名 称 一般財団法人化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所 研究第一部
所在地 〒345-0043 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野 1600 番地

3. 試験施設

名 称 一般財団法人化学物質評価研究機構 日田事業所
所在地 〒877-0061 大分県日田市石井町 3 丁目 822 番地

4. 試験目的

4,4'-Thiobis(6-*tert*-Butyl-*m*-Cresol)をラットに 28 日間毎日反復経口投与したときに現れる生体の機能及び形態の変化を観察することにより、4,4'-Thiobis(6-*tert*-Butyl-*m*-Cresol)の毒性を明らかにすることを目的とする。また、遺伝子発現量解析のための試料を採取する。

5. 試験法

以下の試験法を参考に実施した。

- a) 「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、環保企発第 110331009 号、一部改正: 平成 24 年 4 月 2 日、薬食発 0402 第 1 号、平成 24・03・28 製局第 2 号、環保企発第 120402001 号) に定める「哺乳類を用いる 28 日間の反復投与毒性試験」
- b) OECD Guideline for the Testing of Chemicals, No. 407, October 3, 2008, "Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents"

6. GLP 基準

適用しなかった。

7. 動物愛護

以下の法律、指針、基準等を参考に当試験施設が作成した「日田事業所動物実験に関する規程」に従って試験を実施した。

- a) 「動物の愛護及び管理に関する法律」(法律第 105 号、昭和 48 年)
- b) 「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(環境省告示第 88 号、平成 18 年)
- c) 「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省告示第 71 号、平成 18 年)
- d) 「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議、平成 18 年)

8. 試験日程

試験開始日	2013年 7月 25日
動物入荷日	2013年 7月 30日
投与開始日	2013年 8月 8日
1回投与後解剖日	2013年 8月 9日
7日間投与後解剖日	2013年 8月 15日
14日間投与後解剖日	2013年 8月 22日
28日間投与後解剖日	2013年 9月 5日
試験終了日	2014年 3月 14日

9. 試験責任者

寶珠山 五月 (所属 試験第二課)

10. 試験関係者及び業務分担

試験担当者 古賀孝之

(動物の検疫・馴化及び飼育管理、被験物質液の調製、投与、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、詳細な一般状態観察及び機能検査についての動物試験業務に対して責任を持つ)

病理検査責任者 大嶋 浩

(剖検、組織採取、器官重量測定及び病理組織学的検査についての病理検査業務に対して責任を持つ)

臨床検査責任者 室井貴子

(尿検査、血液学的検査及び血液生化学的検査についての臨床検査業務に対して責任を持つ)

11. 試資料の保管

試験計画書（正本）、最終報告書（正本）、生データ、その他の記録、標本及び被験物質は当試験施設に保管する。

保管期間は試験終了後 10 年間とする。なお、保管期間中の被験物質の安定性は確認しない。

保管期間終了後の処置（継続保管、廃棄又は返却）は、試験委託者と協議の上決定する。

12. 最終報告書の承認

2014年 3月 14日

試験責任者

寶珠山五月

13. 要 約

4,4'-Thiobis(6-*tert*-Butyl-*m*-Cresol)の生物学的な影響及び遺伝子発現に及ぼす影響について検討する目的で、化審法テストガイドライン及び OECD テストガイドライン 407 を参考に 28 日間反復経口投与毒性試験を実施した。

5 週齢の雄の Crl:CD(SD)ラットにコーン油に溶解させた 4,4'-Thiobis(6-*tert*-Butyl-*m*-Cresol)を 1、7、14 又は 28 日間毎日強制経口投与した。投与用量は 0(コーン油)、60 及び 300 mg/kg/day とし、1、7 及び 14 日間投与後に剖検するサテライト群には 1 群あたり 4 匹、28 日間投与群には 1 群あたり 5 匹を使用した。投与期間中は全例について一般状態観察、体重測定及び摂餌量測定を行い、各投与期間終了後に CO₂/O₂ 混合ガス麻酔下で血液を採取した後剖検して、血液検査、病理学的検査及び遺伝子発現量解析のための試料採取を実施した。加えて、28 日間投与群については、投与期間中に詳細な一般状態観察及び機能検査を行い、最終投与日の翌日に尿を採取して尿検査を行った。

一般状態観察では、60 及び 300 mg/kg 群で軟便、下痢及び流涎、300 mg/kg 群で鼻・口周囲の汚れ、自発運動低下、呼吸数減少、眼球突出、眼球暗赤色化及び赤色部がみられ、耳鉗装着部からの出血及び蒼白がみられた 1 例が瀕死状態となった。

詳細な一般状態観察では、300 mg/kg 群で投与 3 週目に鼻・口周囲の毛の汚れ、投与 4 週目に眼球突出及び流涎がみられた。

体重では 300 mg/kg 群で投与 3 及び 7 日目に低値がみられた。

摂餌量では 300 mg/kg 群で投与 3 日目に低値がみられた。

尿検査では、300 mg/kg 群で尿量の高値及び尿浸透圧の低値、尿の濁り、尿糖及び尿ケトン体の高値、尿沈渣中の上皮細胞の増加、円柱の出現がみられた。

血液学的検査では、300 mg/kg 群で 14 日間投与後から血小板数の高値、28 日間投与後に白血球数の高値傾向、PT 及び APTT の延長がみられた。

血液生化学的検査では、300 mg/kg 群で 7 日間投与後から ALT の高値又は高値傾向、14 日間投与後から BUN 及びクレアチニンの高値又は高値傾向、28 日間投与後に AST 及び γ -GTP の高値、総胆汁酸の高値傾向、トリグリセリドの低値傾向がみられた。

器官重量では、60 mg/kg 群で 1 回投与後に肝臓の相対重量の高値、300 mg/kg 群で 1 回投与後から肝臓の絶対及び相対重量の高値、7 日間投与後から腎臓の相対重量の高値、28 日間投与後に副腎の絶対及び相対重量の高値がみられた。

剖検では、300 mg/kg 群で 1 回投与後に空腸の粘膜白色化、盲腸の水様内容物、腸間膜リンパ節の白色化、1 回投与後から肝臓の腫大、7 日間投与後に腎臓の皮膚境界部の変色及び腫大、7 日間投与後から盲腸の膨大、14 日間投与後から鼻・口周囲の汚れ、腺胃の粘膜黒色部、28 日間投与後に前胃の壁の水腫部及び赤色部、腎臓の腫大、腸間膜リンパ節の腫大、眼球の腫大及び赤色化がみられた。瀕死動物では肝臓の腫大及び耳介の出血がみられた。

病理組織学的検査では、300 mg/kg 群で 1 回及び 7 日間投与後に十二指腸の限局性粘膜壞死、1 回投与後に空腸の絨毛上皮空胞化、1 回投与後から腸間膜リンパ節の傍皮質肥大、7 日間投与後から肝臓の小葉中心性肝細胞肥大及び小葉周辺性肝細胞小胞性脂肪変性、腎臓の尿細管変性、皮膚境界部の尿細管壞死、皮膚境界部の尿細管再生、皮膚境界部の尿細管單細胞壞死、14 日間投与後から腺胃の限局性胃底腺部粘膜壞死、肝臓の小葉中心性肝細胞くもり硝

子変性、腎臓の皮質及び髓質の尿細管拡張、28日間投与後に前胃の粘膜下層の出血、空腸の乳び腔拡張、回腸の絨毛上皮空胞化、直腸の粘膜過形成、腎臓の細胞性円柱、細胞浸潤、線維化、眼球の前眼房又は硝子体の出血がみられた。瀕死動物では肝臓の小葉中心性肝細胞肥大がみられた。

機能検査では被験物質投与による影響はみられなかった。

以上のとおり、本試験条件下において 4,4'-Thiobis(6-*tert*-Butyl-*m*-Cresol)の投与により、投与期間の初期から肝臓、腎臓及び消化管への毒性影響が認められ、出血傾向もみられた。

14. 試験材料

14.1 被験物質

a) 名称等

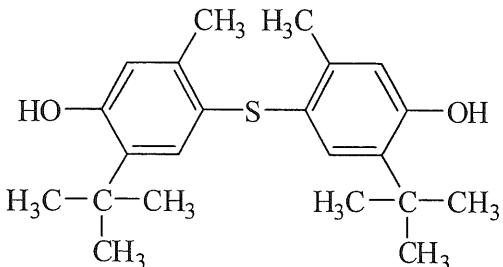
名 称 4,4'-Thiobis(6-*tert*-butyl-*m*-cresol)
 CAS 番号 96-69-5

b) 製造元及びロット番号

製造元 東京化成工業
 ロット番号 MX7XI

c) 構造式等

構造式



分子式 C₂₂H₃₀O₂S

分子量 358.58

d) 純度等

純 度 99.7% (GC)

被験物質は純度 100%として取り扱った。

e) 物理化学的性状

対水溶解度 (溶解性) 不溶

融 点 162.1°C

常温における性状 白色～ほとんど白色の結晶～粉末

安定性 適切な条件下においては安定

溶媒に対する溶解度 (溶解性)

溶 媒	溶解度 (溶解性)
メタノール	易溶
ベンゼン	可溶
トルエン	可溶
アセトン	可溶
クロロホルム	可溶
四塩化炭素	可溶

f) 保管条件

遮光した気密容器に入れ、被験物質保管室のキャビネットにて室温保管した。

保管温度の実測値 19.5～23.1°C (許容範囲 10～30°C)

保管場所及び期間 キャビネット 5、2013年4月15日～2013年4月16日

キャビネット 1、2013年4月16日～2013年8月26日

g) 被験物質の同一性及び保管条件下における安定性の確認

当試験施設で実施した「4,4'-Thiobis(6-*tert*-Butyl-m-Cresol)の安定性、被験物質液の安定性及び濃度確認試験」（試験番号 X02-0270、非 GLP 試験）において確認した。

独立行政法人産業技術総合研究所の有機化合物のスペクトルデータベース (Spectral Database for Organic Compounds: SDBS) から入手した赤外吸収スペクトルと当試験施設において測定したスペクトルを比較することにより、被験物質の同一性を確認した。その結果、投与開始前に測定したスペクトルは SDBS から入手したスペクトルと同様であることが確認された。

また、投与開始前及び投与期間終了後の赤外吸収スペクトルを比較することにより、保管条件下における被験物質の安定性を確認した。投与開始前と比較して投与期間終了後のスペクトルに変化は認められなかったことから、被験物質は保管期間中安定であったと判断した。

h) 取扱い上の注意

皮膚及び目への接触並びに吸入をさけるため、手袋、マスク、帽子、保護めがね及び白衣を着用した。

14.2 媒体

a) 名称

コーン油

b) 選択理由

被験物質は水に不溶との情報があることから、被験物質液の調製法はコーン油を用いて検討した。その結果、被験物質はコーン油に 10 w/v% の濃度で均一に懸濁し、3.50 w/v% の濃度では溶解した。また、被験物質液は調製後 7 日間の冷所保管で色調の変化等の異常がみられなかったことから、コーン油を媒体として選択した。

c) 製造元、グレード、ロット番号及び保管

名称	製造元	グレード	ロット番号	保管場所	保管温度
コーン油	ナカライトスク	化学用	V2H8729	試薬保管室	室温

14.3 使用動物

実験動物として確立された動物であり、一般毒性試験に汎用され、当試験施設においても背景データを保有している Crl:CD(SD)ラット (SPF) を日本チャールス・リバーワイ野飼育センターから入手した。

4 週齢の雄ラットを 55 匹入手し、1 ケージあたり 5 匹の群飼育で入荷 6 日後まで検疫・馴化を行った。さらに、投与開始 1 日前に相当する入荷 8 日後まで馴化し、すべての動物に異常がみられなかったため、当日測定した体重を用いて体重層別無作為抽出法で群分けし、51 匹を試験に使用した。群分け後は投与開始まで個別飼育で馴化した。群分けにより外れた動物は試験から除外した。また、受入れから投与開始までは、一般状態及び排泄物を毎日 1 回以上観察した。

動物は、群分け前は尾部へ油性インクを塗布し、群分け後は耳鉗を付けて識別した。ケージにはラベルを付け、ラックは試験番号を表示してそれぞれ識別した。

投与開始時の動物の週齢は5週齢、体重範囲は142.3～167.0 gであり、全例の体重が全體の平均体重±20%の範囲内であることを確認した。

14.4 飼育環境

動物は、検疫・馴化期間中を含む全飼育期間を通して、温度21～25°C、相対湿度40～70%、換気回数10～15回/時間、明暗サイクル12時間間隔（7時点灯、19時消灯）に設定したバリアーシステムの飼育室（検疫期間中は検疫室1、検疫終了後は飼育室3）に収容した。温度及び相対湿度の実測値は、それぞれ22.4～24.0°C及び49.4～62.2%であった。

ケージは、群分け前はステンレス製金網床ケージ（W260×D380×H180 mm）、群分け後はステンレス製金網床ケージ（W165×D300×H150 mm）を使用した。

トレイは、検疫期間終了時及び群分け時に交換し、群分け後は週2回の頻度で交換した。さらに、動物を飼育室から解剖室に搬出する際にも交換した。また、軟便又は下痢がみられた動物については、糞の観察が出来るように、異常便の確認時にも交換した。給餌器、ケージ及びラックは、群分け時に交換した。また、サテライト群（1、7及び14日間投与群）については解剖室に搬出する際にもラックを交換した。

飼料は固型飼料MF（ロット番号130515及び130612、オリエンタル酵母工業）を、飲料水は日田市上水道水に給水末端での塩素濃度が3～5 ppmとなるように次亜塩素酸ナトリウム（ピューラックス）を添加した水を、それぞれ自由摂取させた。飼料及び飼育用器材はオートクレーブ滅菌（121°C、30分間）したものを使い、それらを用いた。

飼料は、製造元から混入物の分析データを入手し、米国環境保護庁有害物質規制法の「飼料及び媒体の汚染物質限度」（1979）を参考に、当試験施設で定めた基準値内であることを確認したロットを使用した。

飲料水については、厚生労働省の「水質基準に関する省令」（厚生労働省令第101号）に準拠した水質検査を年2回の頻度で実施しており、動物入荷前に入手した検査結果及び最終報告書作成までに入手した検査結果が、同省令の基準を満たしていることを確認した。

15. 試験方法

15.1 被験物質の設定用量

用量設定試験として、当試験施設で「4,4'-Thiobis(6-*tert*-Butyl-m-Cresol)のラットにおける7日間反復経口投与毒性試験」（試験番号 P12-0109、非GLP試験）を実施した。用量設定試験ではコーン油で調製した被験物質液を、各群3匹の5週齢のCrl:CD(SD)雄ラットに0、87.5、175及び350 mg/kg/day の用量で7日間毎日投与した。投与期間中は一般状態観察及び体重測定を行い、最終投与1日後に剖検及び器官重量測定を行った。その結果、175 mg/kg/day 以上で下痢及び軟便、肝臓の腫大及び重量高値、350 mg/kg/day で腎臓の腫大及び重量高値傾向がみられたが、体重においては被験物質投与による影響は認められなかつた。350 mg/kg 群では体重推移に異常はみられなかつたものの、下痢及び軟便が観察され、肝臓及び腎臓への明らかな影響が認められたことから、被験物質を350 mg/kg/day 以上の用量で28日間反復投与すると死亡や瀕死などの重篤な毒性が発現する可能性があると考えた。

したがって、本試験では300 mg/kg/day を高用量とし、低用量として60 mg/kg/day を設定した。

15.2 群構成

被験物質投与群として2用量群を設けた他、媒体のみを投与する媒体対照群を設定した。また、媒体対照群及び各用量群に、1、7及び14日間投与後に解剖するサテライト群を設けた。以下、媒体対照群は対照群と記載する。なお、被験物質は刺激性を有する可能性があるため、投与容量は10 mL/kgとした。

サテライト群の投与期間中の観察及び測定データは、28日間投与群に含めて取り扱つた。

試験群	投与用量 (mg/kg/day)	投与容量 (mL/kg)	被験物質液 濃度(w/v%)	動物数 (動物番号)
媒体対照 (1回投与)	0	10	0	4 (1 - 4)
媒体対照 (7日間投与)	0	10	0	4 (5 - 8)
媒体対照 (14日間投与)	0	10	0	4 (9 - 12)
媒体対照 (28日間投与)	0	10	0	5 (13 - 17)
被 験 物 質	低用量 (1回投与)	60	10	0.600 4 (18 - 21)
	低用量 (7日間投与)	60	10	0.600 4 (22 - 25)
	低用量 (14日間投与)	60	10	0.600 4 (26 - 29)
	低用量 (28日間投与)	60	10	0.600 5 (30 - 34)
	高用量 (1回投与)	300	10	3.00 4 (35 - 38)
	高用量 (7日間投与)	300	10	3.00 4 (39 - 42)
	高用量 (14日間投与)	300	10	3.00 4 (43 - 46)
	高用量 (28日間投与)	300	10	3.00 5 (47 - 51)

15.3 投与液

a) 被験物質液の調製及び保管

被験物質を秤量後、乳鉢内で粉碎しコーン油を加えて練り合わせながら溶解させた。その後、コーン油を加えて定容し 3.00 w/v% の被験物質液を調製した。さらに、3.00 w/v% の被験物質液の一部を採取し、コーン油を加えて希釈し、0.600 w/v% の被験物質液を調製した。

調製した各濃度の被験物質液及び投与に用いる媒体は蓋付きプラスチック容器にそれぞれ小分けし、被験物質調製室の保冷庫 7 にて冷所（実測値 1~10°C、許容範囲 1~10°C）で保管した。被験物質液は調製後 11 日以内に使用した。

小分け保管した各濃度の被験物質液及び媒体は、各投与日に投与に必要な個数を保管場所から取り出し、飼育室まで室温で運搬し投与に用いた。

b) 被験物質液の安定性の確認

3.50 及び 0.175 w/v% の被験物質液の冷所保管での安定性を、当試験施設において X02-0270 で高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により確認した。

冷所保管で調製 13 日後に測定した被験物質濃度が、調製直後の測定濃度に対し 3.50 及び 0.175 w/v% の被験物質液でそれぞれ 101% 及び 99.4% と $100 \pm 10\%$ 以内であったことから、保管条件下で 12 日間安定であることが確認された。

c) 投与に用いる被験物質液の濃度確認

初回に調製した 3.00 及び 0.600 w/v% の被験物質液の調製直後の濃度を、当試験施設において X02-0270 で HPLC により確認した。

測定した被験物質濃度が設定値に対し 3.00 及び 0.600 w/v% の被験物質液でそれぞれ 98.3% 及び 96.3% と $100 \pm 10\%$ 以内であったため、適切に調製できたと判定して投与に用いた。

15.4 投与

1、7、14 又は 28 日間毎日 1 回、強制経口投与した。投与は 9:07~11:14 に行った。

投与にはネラトンカテーテル（テルモ）を取り付けた注射筒（テルモ）を用い、測定した最新の体重を基に、10 mL/kg で投与した。

15.5 一般状態観察

投与期間中は毎日 3 回（投与前、投与直後~1 時間後、投与 2~6 時間後）、生死を含む一般状態を観察した。

15.6 詳細な一般状態観察

28日間投与群について、投与開始前に1回、投与開始後は週1回の頻度で次表の項目を観察した。投与開始後の観察は動物に乱数（検査動物番号）を割付け、動物の並び替えを行った後、試験群が判別できない状態（盲検法）で行った。

ケージから取り出す際の反応	ケージに手を入れてから、動物をケージ外に取り出すまでの反応（出し易さ及び発声）を、スコアリング法で評価
手にとっての詳細な観察	筋緊張及び体温低下の有無、被毛の状態（立毛、毛の汚れ及び被毛粗剛）、皮膚及び粘膜の色（蒼白、発赤及びチアノーゼ）、眼の異常（流涙、眼球突出及び瞳孔径）、流涎及び分泌物の有無を観察
アリーナ内での行動の観察	動物を 90 cm×60 cm の観察台上に 1 分間以上（5 分以内）置き、姿勢、活動性、呼吸、歩行の状態、眼瞼閉鎖、振戦・攣縮・痙攣、常同行動及び異常行動の有無を観察 1 分間の排糞回数（糞の数）及び排尿回数（尿のプール数）を測定

15.7 機能検査

28日間投与群について、投与4週目（投与26日目）に1回、次表の項目を検査した。反応性及び握力は詳細な一般状態観察と同様に試験群が判別できない状態で検査した。

反応性	視覚	顔面前約3cmにボールペンの鞘を近づけ、4秒間保持したときの反応をスコアリング法で評価
	聴覚	頭上で指を鳴らしたときの反応をスコアリング法で評価
	痛覚	洗濯バサミで尾の1/3尾根部側を挟んだときの反応を観察
	瞳孔反射	眼を手で覆った後、瞳孔に光を当てたときの反応の有無を観察
	空中正向反射	約30cmの高さから、動物の腹部を上にした状態で落としたときの異常反応の有無を観察
握力	握力	握力メータ FGC-2（マイティス）を用い、前肢及び後肢の握力を2回測定し、平均値で評価
	自発運動量	ラット用運動量測定装置 ACTIMO-10（シンテクノ）を用い、動物の運動量を1時間（10分間隔で6回）測定し、赤外線（42.6cm×26.5cmの範囲を縦横5cm間隔で発生）を横切った回数で評価

15.8 体重測定

全例について、電子上皿天秤（ザルトリウス）を用い、下記の日に体重を測定した。

- ・群分け日
- ・投与 1、3、7、14、21 及び 28 日目
- ・各試験群の解剖日（飼育室からの搬出前、絶食状態）

15.9 摂餌量測定

7、14 及び 28 日間投与群について、電子上皿天秤（ザルトリウス）を用い、下記の日に餌重量を測定した。

- ・群分け日の給餌量
- ・投与 1、3、7、14、21 及び 28 日目の残餌量

投与 7、14 及び 21 日目には残餌量測定後に餌を補充し、補充後の給餌量を測定した。

測定した給餌量と残餌量から各測定日間での 1 日平均摂餌量を求めた。なお、各測定日に絶食を行う動物については残餌量のみを測定し、餌の補充及び給餌量の測定は行わなかった。

15.10 尿検査

a) 採 尿

28 日間投与群の生存動物について、投与 28 日目の午後に W 150×D 200×H 263 mm の個体別代謝ケージに動物を収容し、自由飲水及び絶食状態で翌日までの約 16 時間の蓄積尿を採取した。

b) 検査項目及び方法

採取した蓄積尿を用い次表の項目を測定した。なお、尿沈渣は対照群及び高用量群を検査した結果、高用量群で被験物質の投与に関連した変化が疑われたため、低用量群についても検査を行った。

項目	方法	機器
尿量 (Urine volume)	メスシリンドによる計量	—
色調 (Color)	肉眼観察	—
濁り (Turbidity)		
尿浸透圧 (Uosm)	氷点降下法	A
pH		
蛋白 (Protein)	試験紙法	
ケトン体 (Ketones)	(試験紙にはラブスティックス(シーメンス)を使用)	—
糖 (Glucose)		
潜血 (Occult blood)		
尿沈渣 (Urinary sediment)	Sternheimer 変法	B

使用機器 A: 自動浸透圧計 OM-6040 (アーカレイ)

B: システム生物顕微鏡 BX41 (オリンパス)

15.11 血液検査

a) 採血及び検査試料

各試験群について最終投与日の午後から絶食し、翌日（絶食開始 16～20 時間後）、CO₂/O₂混合ガス（CO₂:O₂混合比=4:1）麻酔下で腹部大動脈から次表のとおり採血し、検査試料を作製した。高用量群の1例（No. 49）は投与28日目に瀕死状態となつたため、当日、CO₂/O₂混合ガス麻酔下で腹部大動脈から採血し、検査試料を作製した。なお、サテライト群については血漿の試料作製は行わなかつた。また、28日間投与群（瀕死動物を除く）については、パクスジーン RNA 採血管（日本ベクトン・ディッキンソン）を用いて血液を採取し転倒混和し、室温で2時間以上静置後、-20°Cで24時間保管した。その後、-80°Cで保管し、ドライアイスを同封して安全性評価技術研究所に送付した。

検査試料	作製方法
全 血	EDTA-2K 添加採血びん SB-41（ロット番号 G2008、シスメックス）で採血した血液
血 漿	くえん酸三ナトリウム二水和物（ロット番号 WEJ0101、和光純薬工業）の3.2 w/v%水溶液を100 μL 添加したガラス製試験管で採血し、遠心分離（3000 r.p.m.×10 mins）して得た血漿
血 清	ガラス製試験管で採血し遠心分離（3000 r.p.m.×10 mins）して得た血清

b) 血液学的検査

全血及び血漿を用い次表の項目を測定した。サテライト群についてはプロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間の測定は行わなかった。また、すべての項目について機器測定できたため、全血を用いた塗抹標本は作製しなかった。

項目	方法	機器
赤血球数 (RBC)	暗視野板法	C
ヘモグロビン濃度 (Hb)	シアンメトヘモグロビン法	
ヘマトクリット値 (Ht)	$\frac{RBC \times MCV}{10^3}$	
平均赤血球容積 (MCV)	暗視野板法	
平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)	$\frac{Hb}{RBC} \times 10^3$	
平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)	$\frac{Hb}{RBC \times MCV} \times 10^5$	
血小板数 (Platelet)	暗視野板法	
網状赤血球数比率 (Reticulo)	RNA 染色法	
白血球数 (WBC)	フローサイトメトリー法	
白血球百分率 (Differentiation of leukocyte) 好中球 (Neutro) 、 リンパ球 (Lymph) 好酸球 (Eosino) 、 好塩基球 (Baso) 単球 (Mono) 、 大型非染色球 (LUC)	フローサイトメトリー法	
プロトロンビン時間 (PT)	粘度変化感知方式	D
活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)	粘度変化感知方式	

検査試料 C には全血、D には血漿を使用

使用機器 C: 総合血液学検査装置 ADVIA 120 (シーメンス)

D: 全自動血液凝固線溶測定装置 STA Compact (ロシュ・ダイアグノスティックス)

c) 血液生化学的検査

血清を用いて次表の項目を測定した。サテライト群についてはアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アルカリ性 fospha ターゼ、尿素窒素、クレアチニン及び総ビリルビンを測定し、その他の項目は測定しなかつた。

項目	方法	機器
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)	UV 法 JSCC 標準化対応法	E
アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)	UV 法 JSCC 標準化対応法	
アルカリ性 fospha ターゼ (ALP)	p-Nitrophenyl phosphate 法	
コリンエステラーゼ (ChE)	Butyrylthiocholine iodide 法	
γ-グルタミルトランスペプチダーゼ (γ-GTP)	L-γ-glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide 法	
総コレステロール (T-Chol)	COD·ESPAS 法	
トリグリセリド (TG)	GPO·ESPAS グリセロール消去法	
尿素窒素 (BUN)	Urease · GIDH 法	
クレアチニン (Creatinine)	Creatininase · F-DAOS 法	
総蛋白 (T-Protein)	Biuret 法	
アルブミン (Albumin)	Bromocresol green 法	F
A/G 比 (A/G ratio)	Albumin T - Protein – Albumin	
血糖 (Glucose)	Hexokinase · G-6-PDH 法	
総ビリルビン (T-Bil)	酵素法	
総胆汁酸 (TBA)	酵素サイクリング法	F
無機リン (IP)	Fiske-Subbarow 法	
カルシウム (Ca)	OCPC 法	
ナトリウム (Na)	Crown-Ether 膜電極法	
カリウム (K)	Crown-Ether 膜電極法	
塩素 (Cl)	MO 膜法	

使用機器 E: 生化学自動分析装置 7170 形 (日立製作所)

F: 電解質分析装置 PVA-EX II (A&T)

15.12 病理学的検査

a) 剖 檢

各試験群について最終投与日の翌日のいずれも採血後に、動物を腹部大動脈から放血して安楽死させ、体表、開孔部、皮下、頭蓋腔、胸腔、腹腔及び骨盤腔とその内容について肉眼的観察を行った。なお、投与 28 日目に瀕死状態となった高用量群の 1 例 (No. 49) は、当日、採血後に腹部大動脈からの放血により安楽死させ、同様に剖検を行った。

b) 組織採取及び器官重量測定

(a) サテライト群

1、7 及び 14 日間投与群について、剖検時に次表の器官・組織を採取した。

分 類	器官・組織
消化器系	胃、腸（十二指腸から直腸、パインエル板を含む）、肝臓*
心・血管系	心臓*
泌尿器系	腎臓*
生殖器系	精巣*、精巣上体*、腹葉前立腺*、背側葉前立腺*
神経系	脳*（大脳、小脳及び橋を含む）
造血器系	骨髓（大腿骨）、腸間膜リンパ節、脾臓*、胸腺*
内分泌系	下垂体*、甲状腺*（上皮小体を含む）、副腎*

甲状腺以外の「*」を付した器官は、固定液又は保存液に浸漬する前に電子天秤（ザルトリウス）で重量を測定した。腎臓、精巣及び精巣上体は左右を別々に測定し、左右の合計を算出した。副腎は左右をまとめて測定した。背側葉前立腺は尿道の一部を含めて測定した。甲状腺は上皮小体を含めて気管から分離せずに 10% 中性緩衝ホルマリン液に浸漬し、翌日、左右の葉を気管から分離して重量を測定した。重量を測定した器官については、解剖日に測定した体重を基に相対重量も算出した。

(b) 28 日間投与群

剖検時に次表の器官・組織を採取した。

分類	器官・組織
呼吸器系	気管、肺
消化器系	顎下腺、胃、腸（十二指腸から直腸、パイエル板を含む）、 脾臓、肝臓*
心・血管系	心臓*
泌尿器系	腎臓*、膀胱
生殖器系	精巣*、精巣上体*、腹葉前立腺*、背側葉前立腺*、 精嚢*（凝固腺を含む）
神経系	脳*（大脳、小脳及び橋を含む）、脊髄、坐骨神経
造血器系	骨髓（大腿骨）、腋窩リンパ節、腸間膜リンパ節、脾臓*、 胸腺*
内分泌系	下垂体*、甲状腺*（上皮小体を含む）、副腎*
感覺器	眼球
筋・骨格系	骨格筋（大腿部）、骨（大腿骨）
皮膚・付属器	乳腺

また、その他の肉眼的病変部として、高用量群の瀕死動物（No. 49）について頸部リンパ節及び耳介を採取した。

気管、肺及び膀胱は10%中性緩衝ホルマリン液を注入後に採取し、胃及び腸は10%中性緩衝ホルマリン液を注入して同液に浸漬した後、内容物を水洗除去した。

甲状腺以外の「*」を付した器官は、固定液又は保存液に浸漬する前に電子天秤（ザルトリウス）で重量を測定した。腎臓、精巣及び精巣上体は左右を別々に測定し、左右の合計を算出した。副腎は左右をまとめて測定した。背側葉前立腺は尿道の一部を含めて測定した。精嚢は凝固腺を含めて起始部を糸で結紮して採取し、重量を測定した。甲状腺は上皮小体を含めて気管から分離せずに10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬し、翌日、左右の葉を気管から分離して重量を測定した。重量を測定した器官については、解剖日に測定した体重を基に相対重量も算出した。

c) 組織の固定及び保存

採取した器官・組織は、以下のように固定及び保存した。

肝臓は、重量を測定後、外側左葉の中央部から（門脈側とその反対側を結ぶ対角線に沿って）2~3 mm 幅の組織片 4 枚を採取し、遺伝子発現量解析用に供した。2 枚ずつの重量が 1.5 g 以下であることを確認後、それぞれ重量の 5 倍量以上の RNAlater®(Ambion, Inc.) に浸漬させた。1.5 g を超える場合は組織片の両端を切除し調節した。右葉は氷冷後、-80°C で保存した。外側左葉の遺伝子発現量解析用部位の採取後の残り部分及び残りの葉を 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した。

腎臓は、左右別々に重量を測定後、右側の中央部から乳頭を含むように横断で 4~5 mm 幅の組織片を採取した。組織片から被膜を取り除いた後、正中で二分した。半分を幅 3 mm 以内に細切し RNAlater に浸漬した。残りの半分から乳頭、髓質内帯、髓質外帯及び皮質を分けてサンプリングし、それぞれ RNAlater に浸漬した。残りの部分は氷冷後、-80°C で保存した。左側は 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した。

精巣は、左右別々に重量を測定後、右側を 4 分割し、組織片の半分を RNAlater に浸漬した。残りの半分は氷冷後、-80°C で保存した。左側は変法デビットゾン液で固定した。

精巣上体は、重量を測定後、左右とも変法デビットゾン液で固定した。

腹葉前立腺は、重量測定後、正中で二分し、一方を RNAlater に浸漬した。残りは 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した。

脳は、重量を測定後、氷冷したメタカーン液（メタノール:クロロホルム:酢酸混合比 = 6:3:1）に浸漬した。その後、氷冷下で 5 時間振とうした後、無水エタノールに交換した。さらに氷冷下で振とうしながら、1 時間おきに 2 回、無水エタノールを交換した。氷冷下で一晩振とうした後、無水エタノールを再度交換し 4°C で保存した。保存した試料は保冷剤を同封して東京農工大学に送付した。

下垂体は、重量を測定後、RNAlater に浸漬した。

RNAlater に浸漬した各組織は RNAlater を組織に浸潤させるため、4°C で 24 時間放置した後、RNAlater に浸漬させたまま -80°C で凍結し、ドライアイスを同封して安全性評価技術研究所に送付した。-80°C 凍結保存した組織についてもドライアイスを同封して安全性評価技術研究所に送付した。

その他の器官・組織は、10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した。なお、瀕死動物については遺伝子発現量解析用の試料は採取せず、10% 中性緩衝ホルマリン液又は変法デビットゾン液で固定した。

d) 病理組織学的検査

(a) サテライト群

1、7 及び 14 日間投与群の対照群及び高用量群について、胃、腸、肝臓、腎臓、精巣、前立腺、骨髓（大腿骨）、腸間膜リンパ節、脾臓、胸腺のパラフィン包埋薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色後、光学顕微鏡的に検査した。骨髓（大腿骨）は切り出し前に 10% 蟻酸・ホルマリン液による脱灰を行った。

さらに、1 回投与群では小腸及び腸間膜リンパ節、7 日間投与群では小腸、肝臓、腎臓及び腸間膜リンパ節、14 日間投与群では胃、肝臓、腎臓及び腸間膜リンパ節について、高用量群で被験物質の投与に関連した変化が疑われたため、低用量群についても病理組織学的検査を行った。

(b) 28 日間投与群

対照群及び高用量群について、脳及び下垂体を除いて採取したすべての器官又は組織のパラフィン包埋薄切切片を作製し、HE 染色後、光学顕微鏡的に検査した。骨及び骨髓（大腿骨）は切り出し前に 10% 蟻酸・ホルマリン液による脱灰を行った。

また、胃、腸、肝臓、腎臓、腸間膜リンパ節及び眼球については、高用量群で被験物質の投与に関連した変化が疑われたため、低用量群についても病理組織学的検査を行い、その他の肉眼的病変部として高用量群の瀕死動物（No. 49）の頸部リンパ節について検査を行った。さらに、高用量群の肝臓の HE 染色標本において肝細胞の空胞化がみられ、脂肪の蓄積が疑われたため、対照群の 1 例（No. 15）及び高用量群の 1 例（No. 50）についてオイル赤 O 染色による検査を行った。

15.13 統計学的方法

体重、摂餌量、握力、自発運動量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿量、尿浸透圧及び器官重量の成績については、Bartlett 法による等分散検定を行い、5%有意水準で等分散が認められた場合は、Dunnett 法による検定を行った。等分散が認められない場合はノンパラメトリックの Dunnett 法による検定を行った。排糞回数（糞の数）及び排尿回数（尿のプール数）はノンパラメトリックの Dunnett 法による検定を行った。

16. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因及び試験計画書からの逸脱

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因は認められなかった。

28 日間投与後の採血時に、低用量群の 1 例（No. 30）について、血液生化学的検査用の試験管と間違えて血液凝固用試験管に多量の血液を採取した。これにより多量に血液を採取した試料で凝固が起こり、血漿の採取が出来なかつた。よって、本例の PT と APTT のデータが欠失した。なお、他の動物の検査結果から評価は可能であるため、試験に及ぼす影響はない判断した。

17. 試験成績

17.1 一般状態 (Table 1、Appendix 1)

300 mg/kg 群で軟便が 13 例、下痢が 10 例、投与直前又は投与後 15～30 分以内の流涎が 8 例、鼻・口周囲の汚れが 6 例、自発運動低下が 4 例、呼吸数減少が 1 例で観察された。軟便又は下痢は投与 2 日目から、自発運動低下は投与 19 日目から発現し、いずれも投与期間を通して観察された。呼吸数減少は投与 27 及び 28 日目にみられた。流涎及び鼻・口周囲の汚れはそれぞれ投与 6 及び 7 日目以降に散発的又は継続的にみられた。また、同群の 1 例 (No. 48) で投与 19 日目以降に眼球突出、左眼球暗赤色化、眼球赤色部が認められた。さらに、他の 1 例 (No. 49) では投与 28 日目に蒼白を伴った耳鉗装着部からの出血がみられ、瀕死状態で失血死の可能性があると判断したことから当日屠殺した。60 mg/kg 群では軟便が 9 例、下痢が 3 例、投与直後の短時間の流涎が 4 例でみられた。軟便又は下痢は投与 2 日目から発現した。流涎は投与 10 日目以降に単発的又は散発的にみられた。対照群では異常は認められなかった。

17.2 詳細な一般状態 (Table 2、Appendix 2)

被験物質投与群で排糞回数及び排尿回数に有意な変動は認められなかつた。他の詳細観察項目においては、300 mg/kg 群で投与 3 週目に毛の汚れ（鼻・口周囲）が 5 例中 2 例、投与 4 週目に眼球突出が 1 例、流涎が 3 例にみられた。60 mg/kg 群及び対照群に異常は認められなかつた。

17.3 機能検査 (Table 3、Appendix 3)

300 mg/kg 群で測定 0～20 分の時間帯に自発運動量の有意な高値がみられたが、一過性の変動であったことから、被験物質投与とは関連のない変化と考えた。握力では被験物質投与群に有意な変動は認められず、反応性検査においても被験物質投与群及び対照群に異常は認められなかつた。

17.4 体 重 (Fig. 1、Table 4、Appendix 4)

300 mg/kg 群で投与 3 及び 7 日目に有意な低値（それぞれ対照群の 93.5% 及び 94.9%）が認められた。60 mg/kg 群では有意な変動は認められなかつた。

17.5 摂飢量 (Fig. 2、Table 5、Appendix 5)

300 mg/kg 群で投与 3 日目に有意な低値（対照群の 75.9%）がみられたが、それ以降は有意な変動は認められなかつた。60 mg/kg 群では有意な変動は認められなかつた。

17.6 尿検査 (Table 6、Appendix 6)

300 mg/kg 群で尿量の有意な高値及び尿浸透圧の有意な低値が認められたほか、尿の濁りが 4 例中 3 例、糖 (2+) が 1 例、ケトン体 (1+) が 1 例、尿沈渣中の上皮細胞の増加が 2 例、円柱の出現が 1 例にみられた。対照群では蛋白 (3+) が 5 例中 1 例、潜血 (2+) が 1 例にみられた。60 mg/kg 群に異常は認められなかつた。

17.7 血液検査

a) 血液学的検査 (Table 7、Appendix 7)

1 回投与群において、300 mg/kg 群で平均赤血球ヘモグロビン濃度及び好中球比率の有意な高値がみられた。60 mg/kg 群では有意な変動は認められなかつた。

7 日間投与群において、300 mg/kg 群で平均赤血球容積及びリンパ球比率の有意な低値

がみられた。60 mg/kg 群では有意な変動は認められなかった。

14 日間投与群において、300 mg/kg 群で平均赤血球ヘモグロビン濃度及び血小板数の有意な高値がみられた。60 mg/kg 群では有意な変動は認められなかった。

28 日間投与群において、300 mg/kg 群で血小板数の有意な高値、白血球数の高値傾向、プロトロンビン時間（PT）及び活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）の有意な延長がみられた。60 mg/kg 群では有意な変動は認められなかった。

b) 血液生化学的検査 (Table 8、Appendix 8)

1 回投与群において、300 mg/kg 群で血清の淡黄色～黄色化が 4 例中 3 例にみられ、総ビリルビンが高値傾向を示した。60 mg/kg 群では有意な変動は認められなかった。

7 日間投与群において、300 mg/kg 群で血清の黄色化が 4 例全例にみられ、総ビリルビンが有意な高値を示したほか、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）の高値傾向がみられた。60 mg/kg 群では有意な変動は認められなかった。

14 日間投与群において、300 mg/kg 群で血清の黄色化が 4 例全例にみられ、総ビリルビンが高値傾向を示したほか、ALT 及びクレアチニンの有意な高値、尿素窒素（BUN）の高値傾向がみられた。60 mg/kg 群では有意な変動は認められなかった。

28 日間投与群において、300 mg/kg 群で血清の黄色化が生存動物の 4 例全例にみられ、総ビリルビンが有意な高値を示したほか、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、ALT、BUN、総蛋白及び塩素の有意な高値、A/G 比及び血糖の有意な低値、コリンエステラーゼ、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GTP)、総コレステロール、クレアチニン及び総胆汁酸の高値傾向、トリグリセリドの低値傾向がみられた。60 mg/kg 群では有意な変動は認められなかった。

17.8 病理学的検査

a) 器官重量 (Table 9 及び 10、Appendix 9 及び 10)

1 回投与群において、300 mg/kg 群で肝臓の絶対及び相対重量の有意な高値（对照群の 117.8% 及び 113.3%）が認められたほか、腎臓及び脳の相対重量の有意な低値がみられた。60 mg/kg 群では肝臓の相対重量の有意な高値（对照群の 108.9%）が認められたほか、腎臓の相対重量の有意な低値がみられた。

7 日間投与群において、300 mg/kg 群で肝臓の絶対及び相対重量の有意な高値（对照群の 128.2% 及び 139.6%）、腎臓の絶対及び相対重量の有意な高値（对照群の 113.9% 及び 123.7%）が認められたほか、心臓の絶対及び相対重量の有意な低値がみられた。60 mg/kg 群では心臓の相対重量の有意な低値がみられた。

14 日間投与群において、300 mg/kg 群で肝臓の絶対及び相対重量の有意な高値（对照群の 140.2% 及び 162.0%）、腎臓の相対重量の有意な高値（对照群の 123.4%）が認められたほか、解剖時体重が有意な低値（对照群の 86.6%）を示し、脳の相対重量の有意な高値がみられた。また、心臓の絶対重量の有意な低値がみられた。60 mg/kg 群では有意な変動は認められなかった。

28 日間投与群において、300 mg/kg 群で肝臓の絶対及び相対重量の有意な高値（对照群の 150.9% 及び 165.3%）、副腎の絶対及び相対重量の有意な高値（对照群の 129.6% 及び 141.7%）、腎臓の相対重量の有意な高値（对照群の 129.6%）が認められたほか、解剖

時体重が低値傾向（対照群の 91.2%）を示し、精嚢の絶対及び相対重量の有意な低値、下垂体の絶対重量の有意な低値がみられた。また、心臓の絶対及び相対重量の有意な低値がみられた。60 mg/kg 群では心臓の相対重量の有意な低値がみられた。

b) 剖 檢 (Table 11、Appendix 11)

1 回投与群において、300 mg/kg 群で空腸の粘膜白色化が 4 例中 1 例、盲腸の水様内容物が 2 例、肝臓の腫大が 1 例、腸間膜リンパ節の白色化が 1 例にみられた。60 mg/kg 群及び対照群では異常は認められなかった。

7 日間投与群において、300 mg/kg 群で肝臓の腫大が 4 例全例、盲腸の膨大が 1 例、腎臓の皮髓境界部の変色及び腫大が各 2 例にみられた。60 mg/kg 群及び対照群では異常は認められなかった。

14 日間投与群において、300 mg/kg 群で鼻・口周囲の汚れが 4 例中 1 例、肝臓の腫大が全例、腺胃の粘膜黒色部が 2 例、盲腸の膨大が 1 例にみられたほか、胸腺の暗赤色化が 1 例にみられた。60 mg/kg 群及び対照群では異常は認められなかった。

28 日間投与群において、300 mg/kg 群の生存動物で鼻・口周囲の汚れが 4 例中 2 例、前胃の壁の水腫部及び壁の赤色部が各 1 例、腺胃の粘膜黒色部が 1 例、盲腸の膨大が 3 例、肝臓の腫大が全例、腎臓の腫大が 1 例、腸間膜リンパ節の腫大が全例、眼球の腫大及び赤色化が 1 例にみられたほか、肺の暗赤色化が 1 例、精巣の小型化及び軟化が 1 例にみられた。瀕死動物 (No. 49) では肝臓の腫大、左側頸部リンパ節の腫大、左側耳介の出血が認められた。60 mg/kg 群及び対照群では異常は認められなかった。

c) 病理組織学的検査 (Table 12、Appendix 11)

1 回投与群において、300 mg/kg 群で十二指腸の限局性粘膜壊死（軽度～中等度）が 4 例中 2 例、空腸の絨毛上皮空胞化（軽度）が 1 例、腸間膜リンパ節の傍皮質肥大（軽度）が全例にみられた。対照群では肝臓の限局性肝細胞壊死が 1 例、腎臓の被膜下の囊胞が 1 例にみられた。60 mg/kg 群では異常は認められなかった。

7 日間投与群において、300 mg/kg 群で十二指腸の限局性粘膜壊死（中等度）が 4 例中 1 例、肝臓の小葉中心性肝細胞肥大（中等度）が全例及び小葉周辺性肝細胞小胞性脂肪変性（軽度）が 2 例、腎臓の尿細管変性（軽度）が 2 例、皮髓境界部の尿細管壊死（軽度～中等度）が 2 例、皮髓境界部の尿細管再生（軽度及び重度）が 2 例、皮髓境界部の尿細管単細胞壊死（軽度～中等度）が 3 例、腸間膜リンパ節の傍皮質肥大（軽度）が全例にみられた。60 mg/kg 群では腎臓の皮質の囊胞が 1 例にみられた。対照群では異常は認められなかった。

14 日間投与群において、300 mg/kg 群で腺胃の限局性胃底腺部粘膜壊死（軽度）が 4 例中 2 例、肝臓の小葉中心性肝細胞肥大（重度）が全例、小葉中心性肝細胞くもり硝子変性（中等度）が全例、小葉周辺性肝細胞小胞性脂肪変性（軽度）が 3 例、腎臓の尿細管変性（軽度～中等度）が全例、皮質及び髓質の尿細管拡張（軽度）が 1 例、皮髓境界部の尿細管壊死（軽度）が 2 例、皮髓境界部の尿細管再生（中等度）が 3 例、皮髓境界部の尿細管単細胞壊死（中等度）が 3 例、腸間膜リンパ節の傍皮質肥大（軽度）が全例にみられたほか、腎臓の髓質の囊胞が 1 例、胸腺の出血が 1 例にみられた。対照群では肝臓の限局性肝細胞壊死が 1 例にみられた。60 mg/kg 群では異常は認められなかった。

28日間投与群において、300 mg/kg 群の生存動物で前胃の粘膜下層の出血（軽度）が4例中3例、腺胃の限局性胃底腺部粘膜壊死（軽度）が1例、空腸の乳び腔拡張（軽度）が2例、回腸の絨毛上皮空胞化（軽度）が1例、直腸の粘膜過形成（軽度）が1例、肝臓の小葉中心性肝細胞肥大（中等度～重度）が全例、小葉中心性肝細胞くもり硝子変性（軽度～中等度）が全例、小葉周辺性肝細胞小胞性脂肪変性（軽度）が全例、腎臓の細胞性円柱（軽度）が1例、細胞浸潤（軽度）が1例、尿細管変性（軽度）が3例、皮質及び髓質の尿細管拡張（軽度）が1例、線維化（軽度）が1例、皮髓境界部の尿細管壊死（中等度）が1例、皮髓境界部の尿細管再生（軽度～中等度）が3例、皮髓境界部の尿細管単細胞壊死（軽度～中等度）が全例、腸間膜リンパ節の傍皮質肥大（軽度）が3例、眼球の前眼房内及び硝子体の出血（軽度）が1例、硝子体の出血（軽度）が1例にみられたほか、肺の出血が1例、精巣の精細管のびまん性萎縮及びライディッヒ細胞のびまん性過形成並びに両側精巣上体の精子消失が1例にみられた。瀕死動物（No. 49）では、肝臓の小葉中心性肝細胞肥大（軽度）、頸部リンパ節の片側性の胚中心発達（中等度）及び形質細胞増加（中等度）がみられた。対照群では肺の出血が5例中1例、腎臓の髓質の囊胞が1例にみられた。60 mg/kg 群では異常は認められなかった。

なお、28日間投与群の対照群及び300 mg/kg 群の各1例について実施した肝臓のオイル赤O染色による検査では、300 mg/kg 群において小葉周辺部の肝細胞内に微細な陽性物質が認められ、空胞化が脂肪の蓄積によるものであることが確認された。なお、対照群では微細～中型の陽性物質が小葉全体に肝細胞内にみられたが、正常の範囲内であり、HE染色標本では顕著な肝細胞の空胞化が認められなかったことから、脂肪変性とはしなかった。

18. 考 察

被験物質は、ゴム、プラスチック製品の酸化防止剤として使用されており、ラットを用いた15日間又は13週間混餌投与試験で消化管、肝臓及び腎臓への毒性影響が認められているが、2年間混餌投与試験ではラット及びマウスとも発がん性は認められていない（NTP, 1994）。本試験においては被験物質投与により肝臓、腎臓及び消化管への毒性影響が認められた。

肝臓に対する影響として、300 mg/kg 群で1回投与後から絶対及び相対重量の高値並びに肉眼的な腫大がみられた。病理組織学的検査においては、7日間投与後から小葉中心性肝細胞肥大、小葉周辺性肝細胞小胞性脂肪変性、14日間投与後から小葉中心性くもり硝子変性が認められ、投与回数の増加に伴い重篤度及び発現頻度の上昇がみられた。小葉中心性肝細胞肥大及びくもり硝子変性は薬物代謝酵素の誘導による適応性変化と考えられたが、7日間投与後からALTの高値又は高値傾向、28日間投与後にAST及びγ-GTPの高値、総胆汁酸の高値傾向、小葉周辺性肝細胞小胞性脂肪変性がみられたことから、投与期間の初期から肝障害も生じていたと考えた。300 mg/kg 群で1例にみられた尿ケトン体の高値は、絶食により体内に蓄積した脂肪からの遊離脂肪酸の動員が亢進し、ケトン体生成が増加した結果と考えた。

なお、300 mg/kg 群では1回投与後から血清の淡黄色～黄色化がみられ総ビリルビンが異常高値を示したことから、溶血又は重篤な肝障害が疑われた。しかしながら、貧血や組織へのヘモジデリン沈着は認められず溶血があったとは考えられないこと、また、AST や ALT

等の変動から投与期間の初期に重篤な肝障害が生じていたとは考えにくいことから、被験物質の代謝物により血清が着色し、測定系に影響を及ぼした可能性があると考えた。

また、300 mg/kg 群でみられた耳鉗装着部からの出血、PT 及び APTT の延長、前胃の壁の赤色部すなわち粘膜下層の出血、眼球の腫大及び赤色化すなわち前眼房内又は硝子体の出血、血小板数の有意な高値は、肝障害に起因した血液凝固阻害作用により出血傾向となり、二次的に血小板数が増加したものと考えられた。

腎臓に対する影響として、300 mg/kg 群で 7 日間投与後に皮髓境界部の変色及び腫大、14 日間投与後から相対重量の高値、28 日間投与後に腫大がみられた。病理組織学的検査においては、7 日間投与から皮髓境界部を中心とした尿細管の変性、壊死及び再生、14 日間投与後から尿細管拡張、28 日間投与後に細胞性円柱、細胞浸潤、線維化が認められ、肝臓と同様に投与回数の増加に伴う重篤度及び発現頻度の上昇がみられた。また、14 日間投与後から BUN 及びクレアチニンの高値又は高値傾向、28 日間投与後に尿量の高値及び尿浸透圧の低値、尿糖の出現、尿沈渣中の上皮細胞の増加及び円柱の出現がみられ、投与初期から腎障害が生じていることが明らかであった。

消化管に対する影響として、60 及び 300 mg/kg 群において投与期間中に軟便又は下痢が観察され、剖検では 300 mg/kg 群において 1 回投与後に空腸の粘膜白色化及び盲腸の水様内容物、7 日間投与後から盲腸の膨大が認められた。病理組織学的検査では、1 回及び 7 日間投与後に十二指腸の限局性粘膜壊死、28 日間投与後に直腸の粘膜過形成が認められた。大腸の粘膜過形成は炎症や潰瘍性変化の修復過程としてみられる (Gopinath et al., 1987) ことから、当該病変が認められた部位の粘膜には過形成に先行して傷害性変化があったと考えられ、小腸及び大腸でみられたこれらの所見は被験物質の粘膜刺激性に起因したものであると推察した。また、尿検査において 300 mg/kg 群で尿の濁りがみられたが、下痢便の混入によるものと考えた。60 及び 300 mg/kg 群で観察された投与直後の短時間の流涎は、被験物質の粘膜刺激性に関連した症状と考えた。なお、300 mg/kg 群でみられた鼻・口周囲の汚れは流涎に随伴した所見であり、腺胃の粘膜黒色部すなわち限局性胃底腺部粘膜壊死はストレスに起因した変化と考えた。

消化管に対するその他の影響として、300 mg/kg 群で 1 回投与後に空腸の絨毛上皮空胞化、28 日間投与後に空腸の乳び腔拡張、回腸の絨毛上皮空胞化が認められた。乳び腔拡張はリンパ流の停滞により引き起こされると考えられており (Gopinath et al., 1987) 、小腸粘膜上皮での脂質の吸収障害と考えられる絨毛上皮の空胞化と併せて、トリグリセリドの低値に関連した所見と考えた。

投与期間中に 300 mg/kg 群で観察された自発運動低下、呼吸数減少、体重及び摂餌量の低値は、肝臓、腎臓及び消化管に対する毒性影響と関連した所見と考えられた。また、28 日間投与後に 300 mg/kg 群でみられた白血球数の高値傾向は、これらの組織での傷害に対する炎症反応を反映したものと考えた。腸間膜リンパ節の傍皮質肥大も消化管病変と関連した所見と考えられたが、消化管病変より発現頻度が高い理由は不明である。なお、13 週間混餌投与試験においても腸間膜リンパ節でのマクロファージの過形成がみられているが、毒性学的意義は不明である (NTP, 1994) 。28 日間投与後に 300 mg/kg 群でストレスに起因した変化と考えられる副腎の相対重量の高値がみられたが、病理組織学的検査では異常が認められなか

ったことから、毒性学的意義は小さいと判断した。

投与期間中又は各投与期間終了時にみられたその他の変化は、用量依存性のない変動であること、一過性の変動であること、他に関連する変化が認められないこと、又は自然発生病変として散見される所見であること等から、被験物質投与とは関連のない変化と考えた。

以上のとおり、本試験では被験物質投与により投与期間の初期から肝臓、腎臓及び消化管への毒性影響が認められ、出血傾向もみられた。その他の消化器系、呼吸器系、心・血管系、生殖器系、神経系、感覺器、筋・骨格系、乳腺への影響は検出されなかった。

19. 参考文献

Gopinath C, Prentice DE, Lewis DJ (1987) The Alimentary System and Pancreas. In "Atlas of Experimental Toxicological Pathology", Gresham GA (ed.), MTP Press Limited, Lancaster, pp. 65-74.

NTP (1994) Toxicology and carcinogenesis studies of 4,4'-thiobis(6-*t*-butyl-*m*-cresol) (CAS No. 96-69-5) in F344/N rats and B6C3F₁ mice (feed studies). NTP TR 435.

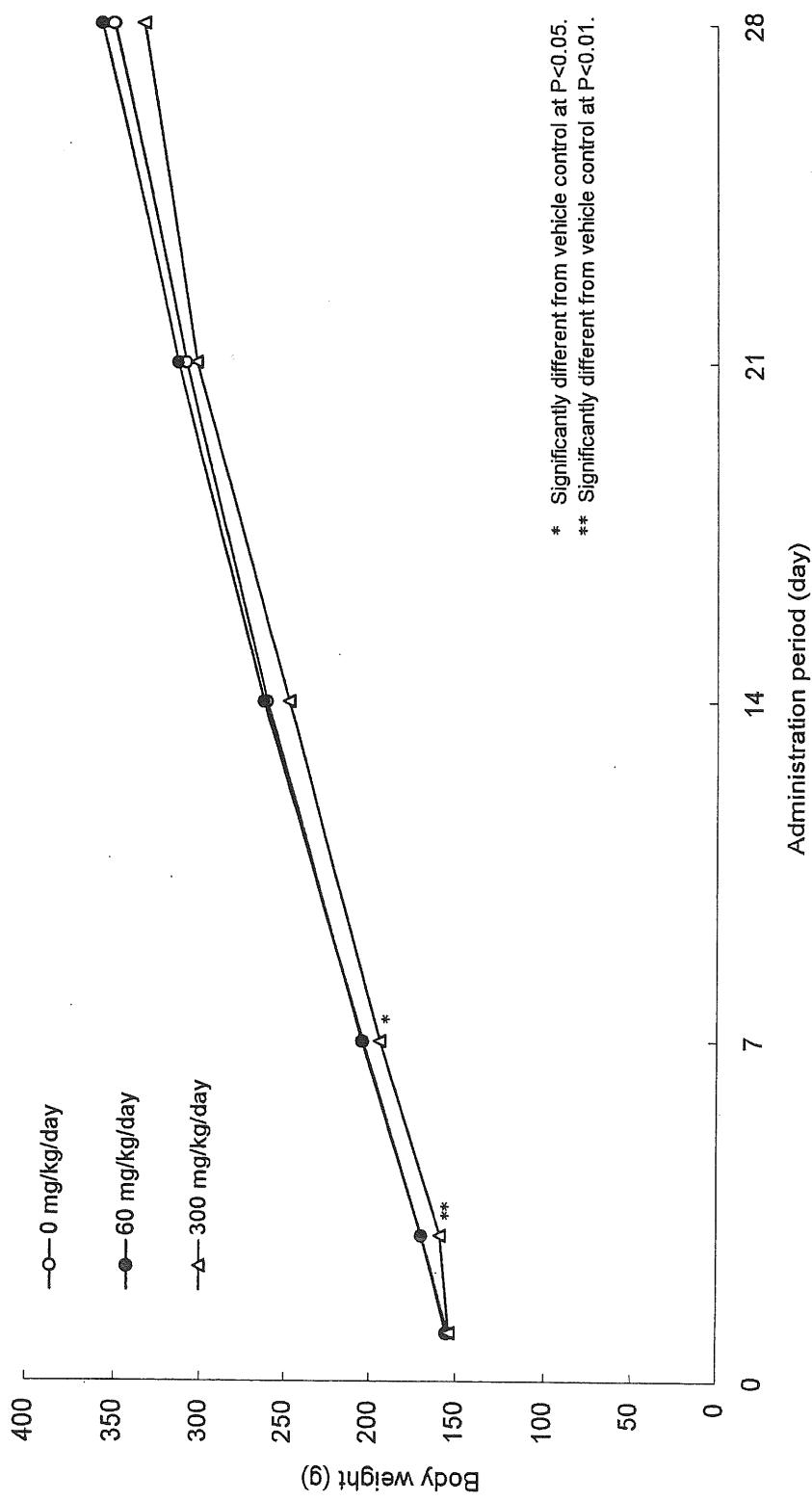


Fig. 1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Body weights: Male

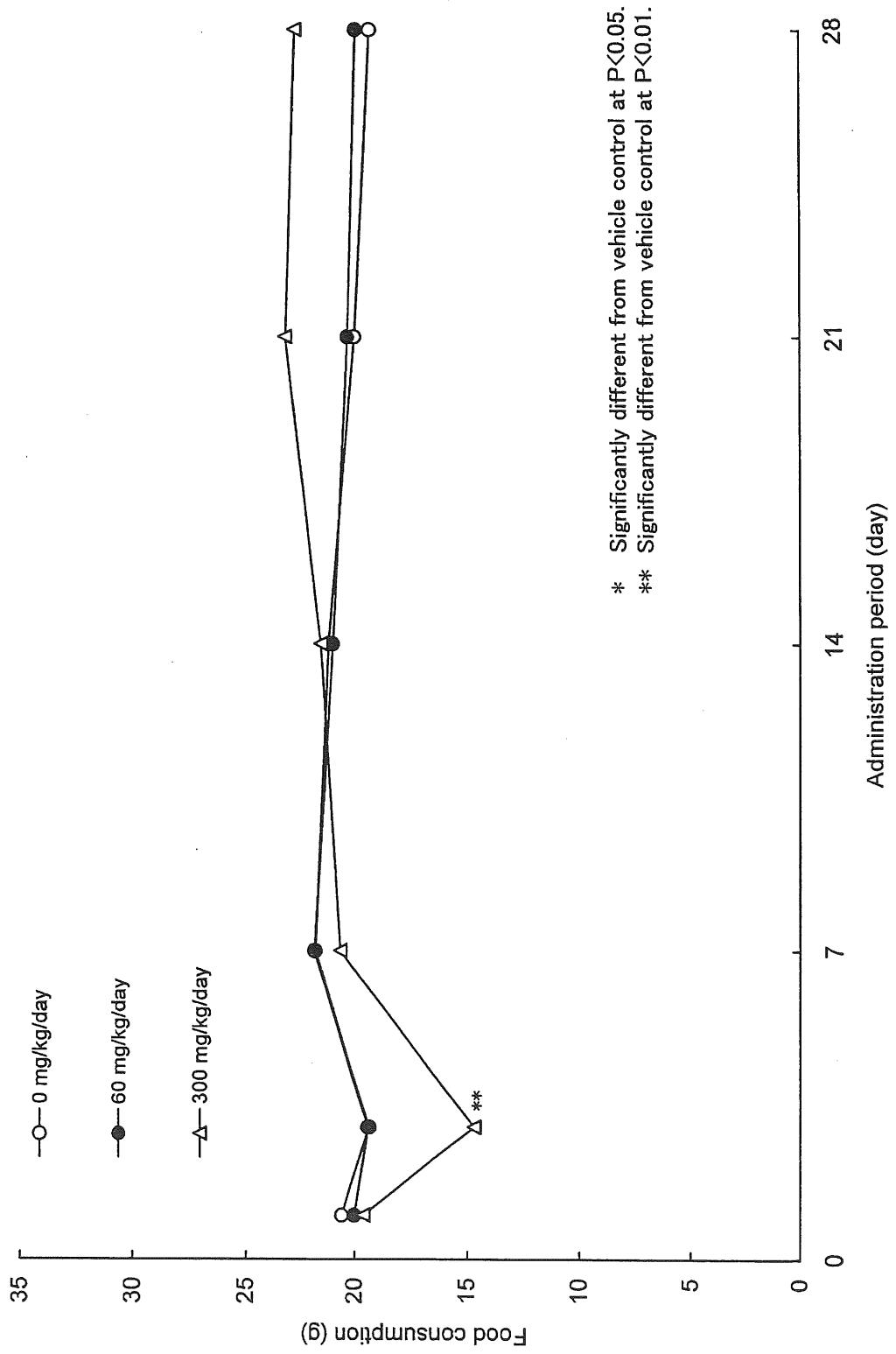


Fig. 2 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Food consumption: Male

Table 1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of general clinical observations

Sex	Signs	Administration period			
		mg/kg/day	0	60	300
Male		ss 17 ^{a)}	ss 17	ss 16	m 1
	No abnormalities detected	17	7	4	
	Soft stool		9	12	1
	Diarrhea		3	10	
	Salivation		4	7	1
	Staining around nose and mouth			5	1
	Decreased spontaneous locomotion			3	1
	Exophthalmos			1	
	Dark reddish change (left eyeball)			1	
	Reddish region (eyeballs)			1	
	Decreased respiratory rate			1	
	Hemorrhage (affixed part of ear tag)				1
	Paleness				1

ss: scheduled sacrifice animal, m: moribund animal.

a) Number of animals examined.

Table 2 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of detailed clinical observations (scoring scale for detailed clinical observations)

Removal from cage	Ease of removal	-2	No reaction
		-1	Very easy
		0	Easy (slight resistance)
		+1	Difficult
		+2	Very difficult
Vocalization		0	None
		+1	Vocalization during handling
		+2	Continuous vocalization
Handling obsevations	Muscle tone	-1	Decreased
		0	Normal
		+1	Increased
	Subnormal temperature	-	Absent
		+	Present
	Piloerection	-	Absent
		+	Present
	Staining hair	-	Absent
		+	Present
	Unkempt hair	-	Absent
		+	Present
	Paleness	-	Absent
		+	Present
	Reddening	-	Absent
		+	Present
	Cyanosis	-	Absent
		+	Present
	Lacration	-	Absent
		+	Present
	Exophthalmos	-	Absent
		+	Present
	Pupillary size	-1	Miosis
		0	Normal
		+1	Mydriasis
	Salivation	-	Absent
		+	Present
	Secretion	-	Absent
		+	Present
Observation in arena	Posture	0	Normal
		+1	Crouching position or hunchback position
		+2	Prone position or lateral position
	Motor activity	-2	Significantly decreased
		-1	Decreased
		0	Normal
		+1	Increased
		+2	Significantly increased
	Respiration	0	Normal
		+1	Slightly insufficiency
		+2	Moderately insufficiency
		+3	Severely insufficiency
	Lid closure	-	Absent
		+	Present
	Gait	-	Normal
		S	Staggering gait
		T	Tip toe gait
		P	Shuffling (paralytic) gait
		GD	Gait disturbance
	Tremor/twitch/convulsion	0	None
		+1	Tremor
		+2	Twitch or convulsion
		+3	Systematic tonic convulsion (opisthotonus or episthenotonus etc.)
	Stereotypic behavior	-	None
		C	Circling
		G	Grooming
		S	Sniffing
		H	Head bobbing
	Abnormal behavior	-	None
		S	Self-biting
		B	Backing
		C	Circling
		R	Rolling
		W	Writhing
		V	Vocalization
		ST	Straub tail
		T	Tail lashing behavior

Table 2-1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of detailed clinical observations

Male

	Dose (mg/kg/day)	Predosing			Dosing week 1		
		0	60	300	0	60	300
Number of animals		5	5	5	5	5	5
Removal from cage	-2	0	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	1	1	1
	0	4	5	5	4	3	4
	+1	1	0	0	0	1	0
	+2	0	0	0	0	0	0
Vocalization	0	5	5	4	5	5	5
	+1	0	0	1	0	0	0
	+2	0	0	0	0	0	0
Muscle tone	-1	0	0	0	0	0	0
	0	5	5	5	5	5	5
	+1	0	0	0	0	0	0
Subnormal temperature	-	5	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
Piloerection	-	5	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
Staining hair	-	5	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
Unkempt hair	-	5	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
Paleness	-	5	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
Handling observation	Reddening	-	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
Cyanosis	-	5	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
Lacrimation	-	5	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
Exophthalmos	-	5	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
Pupillary size	-1	0	0	0	0	0	0
	0	5	5	5	5	5	5
	+1	0	0	0	0	0	0
Salivation	-	5	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
Secretion	-	5	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
Posture	0	5	5	5	5	5	5
	+1	0	0	0	0	0	0
	+2	0	0	0	0	0	0
Motor activity	-2	0	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	0	0	0
	0	4	4	4	5	5	4
	+1	1	1	1	0	0	1
	+2	0	0	0	0	0	0
Observation in arena	Respiration	-	5	5	5	5	5
	+1	0	0	0	0	0	0
	+2	0	0	0	0	0	0
	+3	0	0	0	0	0	0
Lid closure	-	5	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
Gait	S	0	0	0	0	0	0
	T	0	0	0	0	0	0
	P	0	0	0	0	0	0
	GD	0	0	0	0	0	0
Tremor/twitch/convulsion	0	5	5	5	5	5	5
	+1	0	0	0	0	0	0
	+2	0	0	0	0	0	0
	+3	0	0	0	0	0	0
Stereotypic behavior	-	5	5	5	5	5	5
	C	0	0	0	0	0	0
	G	0	0	0	0	0	0
	S	0	0	0	0	0	0
	H	0	0	0	0	0	0
Abnormal behavior	-	5	5	5	5	5	5
	S	0	0	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	0	0
	R	0	0	0	0	0	0
	W	0	0	0	0	0	0
	V	0	0	0	0	0	0
	ST	0	0	0	0	0	0
	T	0	0	0	0	0	0
Defecation ^{a)}		1.0 ± 1.0	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.9	0.6 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Urination ^{b)}		3.0 ± 3.7	1.2 ± 1.1	2.6 ± 2.6	1.0 ± 2.2	0.4 ± 0.9	5.0 ± 8.1

a): (count/min, mean±S.D.)

*: significantly different from vehicle control at p<0.05

**: significantly different from vehicle control at p<0.01

Table 2-2 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of detailed clinical observations

Male

	Dose (mg/kg/day)	Dosing week 2			Dosing week 3		
		0	60	300	0	60	300
		Number of animals	5	5	5	5	5
Removal from cage	-2	0	0	0	0	0	0
	-1	1	1	0	1	1	1
	0	4	4	5	4	4	4
	+1	0	0	0	0	0	0
	+2	0	0	0	0	0	0
	0	5	5	5	4	5	5
	Vocalization	+1	0	0	1	0	0
	+2	0	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	0	0	0
	Muscle tone	0	5	5	5	5	5
Handling observation	+1	0	0	0	0	0	0
	Subnormal temperature	-	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
	Piloerection	-	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
	Staining hair	-	5	5	5	5	3
	+	0	0	0	0	0	2
	Unkempt hair	-	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
	Paleness	-	5	5	5	5	5
Observation in arena	+	0	0	0	0	0	0
	Reddening	-	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
	Cyanosis	-	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
	Lacrimation	-	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
	Exophthalmos	-	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
	Pupillary size	-1	0	0	0	0	0
Observation in arena	0	5	5	5	5	5	5
	+1	0	0	0	0	0	0
	+2	0	0	0	0	0	0
	-2	0	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	1	1	0
	0	4	5	5	4	4	5
	+1	1	0	0	0	0	0
	+2	0	0	0	0	0	0
	0	5	5	5	5	5	5
	Respiration	+1	0	0	0	0	0
Observation in arena	+2	0	0	0	0	0	0
	+3	0	0	0	0	0	0
	Lid closure	-	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
	-	5	5	5	5	5	5
	S	0	0	0	0	0	0
	T	0	0	0	0	0	0
	P	0	0	0	0	0	0
	GD	0	0	0	0	0	0
	Tremor/twitch/convulsion	0	5	5	5	5	5
Observation in arena	+1	0	0	0	0	0	0
	+2	0	0	0	0	0	0
	+3	0	0	0	0	0	0
	-	5	5	5	5	5	5
	Stereotypic behavior	C	0	0	0	0	0
	G	0	0	0	0	0	0
	S	0	0	0	0	0	0
	H	0	0	0	0	0	0
	-	5	5	5	5	5	5
	B	0	0	0	0	0	0
Abnormal behavior	C	0	0	0	0	0	0
	R	0	0	0	0	0	0
	W	0	0	0	0	0	0
	V	0	0	0	0	0	0
	ST	0	0	0	0	0	0
	T	0	0	0	0	0	0
	Defecation ^{a)}	0.6 ± 0.9	1.2 ± 1.3	0.8 ± 1.3	0.6 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Urination ^{a)}		1.2 ± 2.7	4.4 ± 5.2	1.0 ± 1.7	0.6 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.6 ± 1.3

a): (count/min, mean±S.D.)

*: significantly different from vehicle control at p<0.05

**: significantly different from vehicle control at p<0.01

Table 2-3 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of detailed clinical observations

Male

		Dosing week 4		
	Dose (mg/kg/day)	0	60	300
	Number of animals	5	5	5
	-2	0	0	0
Removal from cage	-1	0	0	0
	0	5	5	5
	+1	0	0	0
	+2	0	0	0
	0	5	5	4
Vocalization	+1	0	0	1
	+2	0	0	0
	-1	0	0	0
Muscle tone	0	5	5	5
	+1	0	0	0
	-	5	5	5
Subnormal temperature	+	0	0	0
	-	5	5	5
	+	0	0	0
Piloerection	-	5	5	5
	+	0	0	0
	-	5	5	5
Staining hair	+	0	0	0
	-	5	5	5
	+	0	0	0
Unkempt hair	-	5	5	5
	+	0	0	0
	-	5	5	5
Paleness	+	0	0	0
	-	5	5	5
	+	0	0	0
Handling observation	Reddening	-	5	5
	+	0	0	0
	Cyanosis	-	5	5
Cyanosis	+	0	0	0
	Lacrimation	-	5	5
	+	0	0	0
Exophthalmos	-	5	5	4
	+	0	0	1
	-1	0	0	0
Pupillary size	0	5	5	5
	+1	0	0	0
	-	5	5	2
Salivation	+	0	0	3
	-	5	5	5
	+	0	0	0
Secretion	-	5	5	5
	+	0	0	0
	0	5	5	5
Posture	+1	0	0	0
	+2	0	0	0
	-2	0	0	0
Motor activity	-1	0	0	0
	0	5	5	5
	+1	0	0	0
	+2	0	0	0
Respiration	0	5	5	5
	+1	0	0	0
	+2	0	0	0
	+3	0	0	0
Lid closure	-	5	5	5
	+	0	0	0
	-	5	5	5
Observation in arena	G	0	0	0
	S	0	0	0
	T	0	0	0
	P	0	0	0
Tremor/twitch/convulsion	GD	0	0	0
	0	5	5	5
	+1	0	0	0
	+2	0	0	0
Stereotypic behavior	+3	0	0	0
	-	5	5	5
	C	0	0	0
	G	0	0	0
Abnormal behavior	S	0	0	0
	H	0	0	0
	-	5	5	5
	S	0	0	0
Defecation ^{a)}	B	0	0	0
	C	0	0	0
	R	0	0	0
	W	0	0	0
Urination ^{a)}	V	0	0	0
	ST	0	0	0
	T	0	0	0
	0.6 ± 0.9	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	
	0.2 ± 0.4	0.4 ± 0.9	0.4 ± 0.9	

a): (count/min, mean±S.D.)

*: significantly different from vehicle control at p<0.05

**: significantly different from vehicle control at p<0.01

Table 3 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of functional observations

Male

		Dosing week 4		
	Dose (mg/kg/day)	0	60	300
	Number of animals	5	5	5
	Approach contact/ touch response	-1 0 +1	0 5 0	0 5 0
	Pinna response	-1 0 +1	0 5 0	0 5 0
Sensorimotor function	Pain response (tail pinch)	-1 0 +1	0 5 0	0 5 0
	Pupillary reflex	+	5	5
		-	0	0
	Air righting reflex	+	5	5
		-	0	0
Grip strength	Forelimb (g)	452 ± 33		
	Hindlimb (g)	466 ± 20		
Motor activity [Interval]	0-10 (min)	126 ± 28		
	10-20 (min)	72 ± 35		
	20-30 (min)	62 ± 39		
	30-40 (min)	36 ± 28		
	40-50 (min)	46 ± 21		
	50-60 (min)	28 ± 32		
	Total	370 ± 86		
		512 ± 262		
		608 ± 126		

"Approach contact/touch response", "Pinna response" and "Pain response";

-1: no reaction, 0: normal, +1: hyper reaction

"Pupillary reflex" and "Air righting reflex"; +: normal, -: abnormal reaction

"Grip strength" and "Motor activity": mean \pm S.D.

* : significantly different from vehicle control at p<0.05

**: significantly different from vehicle control at p<0.01

Table 4 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of body weights (g) : Male

	Dose (mg/kg/day)	0	60	300
Administration period (day)		154.16 ±5.84 (17)	155.18 ±6.33 (17)	153.59 ±5.85 (17)
1	169.93 ±6.25 (13)	170.02 ±8.21 (13)	158.92 ** ±6.86 (13)	
3	204.64 ±8.44 (13)	203.91 ±11.72 (13)	194.14 * ±9.38 (13)	
7	261.03 ±12.61 (9)	263.06 ±16.28 (9)	248.17 ±14.43 (9)	
14	309.26 ±9.72 (5)	314.52 ±17.02 (5)	302.96 ±23.64 (5)	
21	350.54 ±13.82 (5)	357.00 ±18.79 (5)	334.32 ±38.73 (5)	
28				

Values are shown as Mean ± S.D..

Figure(s) in parentheses indicate number of animals used for the statistical analysis.

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

** Significantly different from vehicle control at P<0.01.

Table 5 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of food consumption (g/rat/day) : male

Sex	Dose (mg/kg/day)	0	60	300
Administration period (day)	1	20.60	20.02	19.63
		± 1.40 (13)	± 1.89 (13)	± 1.42 (13)
3		19.38	19.42	14.70 **
		± 1.38 (13)	± 2.33 (13)	± 1.43 (13)
7		21.83	21.88	20.67
		± 1.75 (13)	± 2.47 (13)	± 2.22 (13)
14		21.24	21.03	21.59
		± 1.79 (9)	± 2.08 (9)	± 1.78 (9)
21		20.03	20.34	23.21
		± 1.66 (5)	± 1.81 (5)	± 2.74 (5)
28		19.33	19.94	22.74
		± 1.86 (5)	± 1.44 (5)	± 3.73 (5)

Values are shown as Mean ± S.D..

Figure(s) in parentheses indicate number of animals used for the statistical analysis.

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

** Significantly different from vehicle control at P<0.01.

Table 6-1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of urinalyses:Male

Items	Dose (mg/kg/day)	Twenty-eight-day treatment		
		0	60	300
Urine volume (mL)		3.0 ±1.9 (5)	7.4 ±4.1 (5)	33.5 ** ±17.0 (4)
Uosm (mOsm/L)		1943.6 ±963.3 (5)	996.6 ±596.4 (5)	331.5 ** ±190.8 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

Figure(s) in parentheses indicate number of animals used for the statistical analysis.

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

** Significantly different from vehicle control at P<0.01.

Table 6-2 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of urinalyses: Male

Items	Group	Twenty-eight-day treatment			
		Dose (mg/kg/day)	0	60	300
Color	No. of animals		5	5	4
SY		0	3	3	
Y		3	1	0	
YB		2	1	1	
Turbidity					
Clear		5	5	1	
Cloudy		0	0	3	
pH					
6.0		2	3	0	
6.5		3	2	3	
7.0		0	0	1	
Protein					
-		0	0	1	
±		0	1	2	
1+		1	3	0	
2+		3	1	1	
3+		1	0	0	
Glucose					
-		5	5	3	
2+		0	0	1	
Ketones					
-		3	3	3	
±		2	2	0	
1+		0	0	1	
Occult blood					
-		4	4	1	
±		0	1	1	
1+		0	0	2	
2+		1	0	0	

Color: SY: Slightly yellow, Y: Yellow, YB: Yellow-brown.

Table 6-3

Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of urinalyses: Male

B10-0109

Items	Group	Twenty-eight-day treatment			
		Dose (mg/kg/day)	0	60	300
	No. of animals		5	5	4
Urinaly sediment					
Red blood cells ^{a)}					
	0	5	5	4	
White blood cells ^{a)}					
	0	5	5	4	
Epithelial cells ^{a)}					
	0	5	5	2	
	6-20	0	0	1	
	500≤	0	0	1	
Casts ^{b)}					
	0	5	5	3	
	51-499	0	0	1	
Crystals ^{c)}					
	-	0	3	2	
	±	4	0	2	
	1+	1	2	0	

^{a)}:Number of cells/10views(x400).^{b)}:Number of casts/18×18 mm².^{c)}:Incidence of crystals/18×18 mm².

Table 7-1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of hematological examinations:Male

Items	Dose (mg/kg/day)	One-day treatment		
		0	60	300
RBC	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	712.3 ± 51.0 (4)	741.5 ± 47.8 (4)	663.3 ± 12.1 (4)
Hb	(g/dL)	15.00 ± 0.94 (4)	15.35 ± 1.31 (4)	13.90 ± 0.65 (4)
Ht	(%)	49.85 ± 2.88 (4)	51.25 ± 4.51 (4)	45.55 ± 2.07 (4)
MCV	(fL)	70.05 ± 1.50 (4)	69.05 ± 1.93 (4)	68.73 ± 1.96 (4)
MCH	(pg)	21.08 ± 0.50 (4)	20.65 ± 0.61 (4)	20.95 ± 0.60 (4)
MCHC	(g/dL)	30.10 ± 0.14 (4)	29.93 ± 0.26 (4)	30.48 * ± 0.05 (4)
Platelet	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	138.65 ± 21.05 (4)	170.78 ± 26.40 (4)	161.43 ± 12.47 (4)
Reticulo	(%)	12.13 ± 1.01 (4)	11.48 ± 0.86 (4)	11.63 ± 1.01 (4)
WBC	($\times 10^2/\mu\text{L}$)	71.90 ± 15.47 (4)	76.15 ± 18.54 (4)	76.75 ± 11.56 (4)
Differentiation of leukocyte				
Neutro	(%)	15.28 ± 7.09 (4)	10.43 ± 1.34 (4)	24.60 * ± 4.52 (4)
Lymph	(%)	79.15 ± 8.06 (4)	84.38 ± 1.42 (4)	69.60 ± 5.31 (4)
Eosino	(%)	0.70 ± 0.26 (4)	0.33 ± 0.17 (4)	0.60 ± 0.64 (4)
Baso	(%)	1.18 ± 0.26 (4)	1.08 ± 0.39 (4)	0.68 ± 0.25 (4)
Mono	(%)	2.90 ± 1.34 (4)	2.88 ± 0.51 (4)	3.88 ± 1.11 (4)
LUC	(%)	0.83 ± 0.10 (4)	0.95 ± 0.39 (4)	0.65 ± 0.13 (4)

Values are shown as Mean \pm S.D..

Figure(s) in parentheses indicate number of animals used for the statistical analysis.

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

** Significantly different from vehicle control at P<0.01.

Table 7-2 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of hematological examinations:Male

Items	Dose (mg/kg/day)	Seven-day treatment		
		0	60	300
RBC	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	752.3 ± 45.1 (4)	724.8 ± 31.9 (4)	736.8 ± 61.8 (4)
Hb	(g/dL)	15.58 ± 0.62 (4)	14.85 ± 0.64 (4)	14.80 ± 1.10 (4)
Ht	(%)	51.78 ± 2.21 (4)	48.65 ± 2.34 (4)	48.25 ± 4.03 (4)
MCV	(fL)	68.90 ± 1.29 (4)	67.08 ± 1.67 (4)	65.48 ** ± 0.84 (4)
MCH	(pg)	20.70 ± 0.61 (4)	20.50 ± 0.71 (4)	20.08 ± 0.33 (4)
MCHC	(g/dL)	30.03 ± 0.40 (4)	30.55 ± 0.51 (4)	30.65 ± 0.37 (4)
Platelet	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	146.48 ± 22.14 (4)	136.85 ± 16.21 (4)	168.03 ± 13.96 (4)
Reticulo	(%)	8.95 ± 0.60 (4)	8.95 ± 0.52 (4)	7.30 ± 1.68 (4)
WBC	($\times 10^2/\mu\text{L}$)	122.70 ± 12.81 (4)	138.33 ± 19.29 (4)	132.75 ± 48.95 (4)
Differentiation of leukocyte				
Neutro	(%)	13.25 ± 1.49 (4)	17.20 ± 2.40 (4)	19.93 ± 5.77 (4)
Lymph	(%)	81.45 ± 1.43 (4)	77.03 ± 2.28 (4)	73.88 * ± 5.31 (4)
Eosino	(%)	0.45 ± 0.06 (4)	0.53 ± 0.10 (4)	0.38 ± 0.10 (4)
Baso	(%)	0.90 ± 0.16 (4)	1.08 ± 0.17 (4)	1.18 ± 0.45 (4)
Mono	(%)	3.03 ± 0.40 (4)	3.15 ± 1.11 (4)	3.75 ± 0.85 (4)
LUC	(%)	0.95 ± 0.13 (4)	1.03 ± 0.39 (4)	0.93 ± 0.26 (4)

Values are shown as Mean \pm S.D..

Figure(s) in parentheses indicate number of animals used for the statistical analysis.

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

** Significantly different from vehicle control at P<0.01.

Table 7-3 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of hematological examinations:Male

Items	Dose (mg/kg/day)	Fourteen-day treatment		
		0	60	300
RBC	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	697.3 ± 42.5 (4)	741.0 ± 61.2 (4)	704.0 ± 50.8 (4)
Hb	(g/dL)	14.20 ± 0.85 (4)	14.65 ± 1.30 (4)	14.50 ± 0.80 (4)
Ht	(%)	46.38 ± 2.94 (4)	48.00 ± 4.21 (4)	46.20 ± 2.57 (4)
MCV	(fL)	66.50 ± 1.50 (4)	64.78 ± 1.60 (4)	65.73 ± 1.58 (4)
MCH	(pg)	20.35 ± 0.45 (4)	19.80 ± 0.67 (4)	20.60 ± 0.47 (4)
MCHC	(g/dL)	30.60 ± 0.22 (4)	30.58 ± 0.29 (4)	31.33 ** ± 0.26 (4)
Platelet	($\times 10^3/\mu\text{L}$)	158.08 ± 15.60 (4)	148.63 ± 15.46 (4)	221.38 ** ± 22.62 (4)
Reticulo	(%)	5.63 ± 1.09 (4)	5.13 ± 0.78 (4)	6.58 ± 1.33 (4)
WBC	($\times 10^3/\mu\text{L}$)	134.28 ± 19.28 (4)	120.10 ± 34.36 (4)	149.88 ± 58.18 (4)
Differentiation of leukocyte				
Neutro	(%)	19.20 ± 4.97 (4)	16.13 ± 3.38 (4)	20.80 ± 5.66 (4)
Lymph	(%)	75.38 ± 5.22 (4)	78.78 ± 2.89 (4)	73.05 ± 5.76 (4)
Eosino	(%)	0.35 ± 0.13 (4)	0.40 ± 0.14 (4)	0.43 ± 0.22 (4)
Baso	(%)	0.93 ± 0.17 (4)	0.90 ± 0.27 (4)	1.20 ± 0.29 (4)
Mono	(%)	3.13 ± 0.65 (4)	2.88 ± 0.68 (4)	3.55 ± 0.88 (4)
LUC	(%)	1.08 ± 0.36 (4)	1.00 ± 0.27 (4)	0.93 ± 0.29 (4)

Values are shown as Mean \pm S.D..

Figure(s) in parentheses indicate number of animals used for the statistical analysis.

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

** Significantly different from vehicle control at P<0.01.

Table 7-4 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of hematological examinations:Male

Items	Dose (mg/kg/day)	Twenty-eight-day treatment		
		0	60	300
RBC	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	809.6 ± 37.2 (5)	774.4 ± 41.7 (5)	775.0 ± 69.8 (4)
Hb	(g/dL)	15.66 ± 0.29 (5)	15.04 ± 0.50 (5)	14.65 ± 1.18 (4)
Ht	(%)	49.56 ± 1.37 (5)	47.78 ± 2.37 (5)	46.75 ± 4.20 (4)
MCV	(fL)	61.30 ± 2.32 (5)	61.72 ± 1.58 (5)	60.33 ± 0.94 (4)
MCH	(pg)	19.36 ± 0.86 (5)	19.44 ± 0.51 (5)	18.90 ± 0.37 (4)
MCHC	(g/dL)	31.58 ± 0.50 (5)	31.50 ± 0.52 (5)	31.38 ± 0.32 (4)
Platelet	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	117.42 ± 12.21 (5)	132.10 ± 6.31 (5)	164.30 ** ± 20.57 (4)
Reticulo	(%)	3.16 ± 0.13 (5)	2.98 ± 0.52 (5)	3.68 ± 0.34 (4)
WBC	($\times 10^2/\mu\text{L}$)	142.42 ± 34.94 (5)	138.94 ± 9.66 (5)	190.80 ± 139.94 (4)
Differentiation of leukocyte				
Neutro	(%)	19.84 ± 4.60 (5)	16.90 ± 6.06 (5)	24.18 ± 7.75 (4)
Lymph	(%)	75.18 ± 4.78 (5)	78.62 ± 6.02 (5)	69.53 ± 9.71 (4)
Eosino	(%)	0.66 ± 0.15 (5)	0.48 ± 0.16 (5)	0.45 ± 0.24 (4)
Baso	(%)	0.92 ± 0.16 (5)	0.84 ± 0.29 (5)	1.28 ± 1.22 (4)
Mono	(%)	2.52 ± 0.44 (5)	2.36 ± 0.53 (5)	3.50 ± 0.86 (4)
LUC	(%)	0.88 ± 0.24 (5)	0.82 ± 0.23 (5)	1.13 ± 0.59 (4)
PT	(sec)	14.56 ± 0.57 (5)	23.88 ± 9.03 (4)	82.78 ** ± 27.36 (4)
APTT	(sec)	18.12 ± 2.31 (5)	24.75 ± 5.34 (4)	73.98 ** ± 18.61 (4)

Values are shown as Mean \pm S.D..

Figure(s) in parentheses indicate number of animals used for the statistical analysis.

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

** Significantly different from vehicle control at P<0.01.

Table 8-1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of blood chemical examinations:Male

Items	Dose (mg/kg/day)	One-day treatment		
		0	60	300
AST	(IU/L)	93.0 ±6.4 (4)	87.0 ±8.3 (4)	82.5 ±11.7 (4)
ALT	(IU/L)	32.8 ±5.9 (4)	36.5 ±4.5 (4)	41.5 ±12.4 (4)
ALP	(IU/L)	1217.0 ±117.2 (4)	1247.3 ±218.2 (4)	1181.5 ±242.7 (4)
BUN	(mg/dL)	10.38 ±1.59 (4)	12.55 ±0.91 (4)	11.45 ±1.28 (4)
Creatinine	(mg/dL)	0.145 ±0.017 (4)	0.153 ±0.005 (4)	0.138 ±0.010 (4)
T-Bil	(mg/dL)	0.078 ±0.022 (4)	0.060 ±0.000 (4)	0.518 ±0.525 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

Figure(s) in parentheses indicate number of animals used for the statistical analysis.

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

** Significantly different from vehicle control at P<0.01.

Table 8-2 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of blood chemical examinations:Male

Items	Dose (mg/kg/day)	Seven-day treatment		
		0	60	300
AST	(IU/L)	82.8 ±8.4 (4)	78.0 ±9.3 (4)	77.5 ±11.8 (4)
ALT	(IU/L)	33.0 ±2.9 (4)	30.8 ±5.3 (4)	57.0 ±18.2 (4)
ALP	(IU/L)	989.3 ±210.8 (4)	865.8 ±162.7 (4)	1009.3 ±190.7 (4)
BUN	(mg/dL)	10.03 ±0.39 (4)	9.58 ±1.97 (4)	12.70 ±3.71 (4)
Creatinine	(mg/dL)	0.203 ±0.015 (4)	0.185 ±0.017 (4)	0.295 ±0.096 (4)
T-Bil	(mg/dL)	0.068 ±0.013 (4)	0.065 ±0.019 (4)	1.205 * ±0.559 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

Figure(s) in parentheses indicate number of animals used for the statistical analysis.

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

** Significantly different from vehicle control at P<0.01.

Table 8-3 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of blood chemical examinations:Male

Items	Dose (mg/kg/day)	Fourteen-day treatment		
		0	60	300
AST	(IU/L)	63.5 ±5.9 (4)	68.5 ±3.9 (4)	70.5 ±7.8 (4)
ALT	(IU/L)	23.8 ±2.6 (4)	24.0 ±3.6 (4)	62.3 * ±25.4 (4)
ALP	(IU/L)	804.0 ±197.9 (4)	1040.0 ±80.7 (4)	1051.3 ±143.7 (4)
BUN	(mg/dL)	6.85 ±1.59 (4)	6.68 ±0.51 (4)	13.05 ±5.84 (4)
Creatinine	(mg/dL)	0.193 ±0.021 (4)	0.203 ±0.022 (4)	0.330 * ±0.067 (4)
T-Bil	(mg/dL)	0.060 ±0.000 (4)	0.050 ±0.008 (4)	1.805 ±0.397 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

Figure(s) in parentheses indicate number of animals used for the statistical analysis.

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

** Significantly different from vehicle control at P<0.01.

Table 8-4 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of blood chemical examinations:Male

Items	Dose (mg/kg/day)	Twenty-eight-day treatment		
		0	60	300
AST	(IU/L)	64.0 ±1.4 (5)	66.0 ±5.3 (5)	75.5 ** ±2.4 (4)
ALT	(IU/L)	26.6 ±2.7 (5)	26.4 ±4.3 (5)	55.3 * ±28.8 (4)
ALP	(IU/L)	698.0 ±112.9 (5)	668.4 ±94.9 (5)	571.8 ±181.6 (4)
ChE	(IU/L)	63.4 ±22.0 (5)	63.4 ±13.9 (5)	91.5 ±28.7 (4)
γ-GTP	(IU/L)	0.80 ±0.31 (5)	0.88 ±0.27 (5)	1.45 ±0.70 (4)
T-Cho	(mg/dL)	72.0 ±8.0 (5)	76.8 ±19.3 (5)	100.8 ±22.2 (4)
TG	(mg/dL)	109.4 ±23.9 (5)	97.6 ±35.9 (5)	59.3 ±34.8 (4)
BUN	(mg/dL)	10.16 ±1.09 (5)	10.46 ±1.31 (5)	18.80 * ±7.06 (4)
Creatinine	(mg/dL)	0.256 ±0.026 (5)	0.242 ±0.020 (5)	0.435 ±0.160 (4)
T-Protein	(g/dL)	5.84 ±0.24 (5)	5.78 ±0.11 (5)	6.30 * ±0.38 (4)
Albumin	(g/dL)	2.74 ±0.05 (5)	2.70 ±0.10 (5)	2.68 ±0.13 (4)
A/G ratio	(-)	0.888 ±0.070 (5)	0.880 ±0.068 (5)	0.740 ** ±0.036 (4)
Glucose	(mg/dL)	172.2 ±29.4 (5)	205.2 ±14.4 (5)	90.0 ** ±14.4 (4)
T-Bil	(mg/dL)	0.050 ±0.016 (5)	0.056 ±0.017 (5)	1.485 * ±0.681 (4)
TBA	(μmol/L)	27.46 ±14.77 (5)	12.42 ±5.74 (5)	53.68 ±33.41 (4)
IP	(mg/dL)	12.06 ±0.44 (5)	12.02 ±1.08 (5)	13.53 ±1.30 (4)
Ca	(mg/dL)	11.74 ±0.13 (5)	11.68 ±0.26 (5)	11.60 ±0.48 (4)
Na	(mEq/L)	146.0 ±1.4 (5)	145.8 ±1.1 (5)	147.8 ±3.9 (4)
K	(mEq/L)	6.84 ±0.30 (5)	6.64 ±0.70 (5)	6.35 ±1.24 (4)
Cl	(mEq/L)	103.32 ±1.81 (5)	104.04 ±1.25 (5)	107.38 * ±2.76 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

Figure(s) in parentheses indicate number of animals used for the statistical analysis.

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

** Significantly different from vehicle control at P<0.01.

Table 9-1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of absolute organ weights:Male

Items	Dose (mg/kg/day)	One-day treatment		
		0	60	300
Liver	(g)	4.605 ±0.312 (4)	5.120 ±0.180 (4)	5.425 * ±0.430 (4)
Heart	(g)	0.660 ±0.037 (4)	0.663 ±0.015 (4)	0.665 ±0.055 (4)
Kidney(R)	(g)	0.728 ±0.042 (4)	0.693 ±0.017 (4)	0.690 ±0.037 (4)
Kidney(L)	(g)	0.703 ±0.063 (4)	0.668 ±0.024 (4)	0.665 ±0.037 (4)
Kidneys	(g)	1.430 ±0.102 (4)	1.360 ±0.022 (4)	1.355 ±0.074 (4)
Testis(R)	(g)	0.680 ±0.064 (4)	0.723 ±0.017 (4)	0.733 ±0.022 (4)
Testis(L)	(g)	0.673 ±0.055 (4)	0.715 ±0.029 (4)	0.718 ±0.039 (4)
Testes	(g)	1.353 ±0.119 (4)	1.438 ±0.042 (4)	1.450 ±0.061 (4)
Epididymis(R)	(g)	0.088 ±0.010 (4)	0.088 ±0.010 (4)	0.090 ±0.000 (4)
Epididymis(L)	(g)	0.088 ±0.005 (4)	0.093 ±0.005 (4)	0.090 ±0.008 (4)
Epididymides	(g)	0.175 ±0.013 (4)	0.180 ±0.014 (4)	0.180 ±0.008 (4)
Ventral prostate	(g)	0.085 ±0.024 (4)	0.085 ±0.017 (4)	0.085 ±0.024 (4)
Dorsolateral prostate	(g)	0.073 ±0.026 (4)	0.065 ±0.013 (4)	0.073 ±0.015 (4)
Brain	(g)	1.778 ±0.100 (4)	1.783 ±0.044 (4)	1.708 ±0.048 (4)
Spleen	(g)	0.410 ±0.014 (4)	0.448 ±0.068 (4)	0.420 ±0.029 (4)
Thymus	(mg)	492.75 ±44.78 (4)	483.40 ±86.30 (4)	482.53 ±88.96 (4)
Pituitary gland	(mg)	5.88 ±0.49 (4)	5.50 ±0.27 (4)	5.73 ±0.70 (4)
Thyroid	(mg)	10.80 ±1.09 (4)	10.18 ±1.90 (4)	10.83 ±0.94 (4)
Adrenals	(mg)	30.18 ±2.39 (4)	29.35 ±1.94 (4)	30.53 ±4.64 (4)
Final body weight	(g)	132.43 ±6.17 (4)	135.33 ±3.87 (4)	137.83 ±5.73 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

Figure(s) in parentheses indicate number of animals used for the statistical analysis.

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

** Significantly different from vehicle control at P<0.01.

Table 9-2 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of absolute organ weights:Male

Items	Dose (mg/kg/day)	Seven-day treatment		
		0	60	300
Liver	(g)	6.543 ±0.660 (4)	6.815 ±0.688 (4)	8.390 ** ±0.330 (4)
Heart	(g)	0.925 ±0.082 (4)	0.828 ±0.085 (4)	0.698 ** ±0.051 (4)
Kidney(R)	(g)	0.813 ±0.038 (4)	0.825 ±0.054 (4)	0.940 * ±0.068 (4)
Kidney(L)	(g)	0.820 ±0.061 (4)	0.835 ±0.054 (4)	0.920 ±0.054 (4)
Kidneys	(g)	1.633 ±0.097 (4)	1.660 ±0.109 (4)	1.860 * ±0.121 (4)
Testis(R)	(g)	0.980 ±0.096 (4)	1.028 ±0.039 (4)	1.013 ±0.046 (4)
Testis(L)	(g)	0.965 ±0.096 (4)	1.035 ±0.065 (4)	1.028 ±0.035 (4)
Testes	(g)	1.945 ±0.189 (4)	2.063 ±0.102 (4)	2.040 ±0.077 (4)
Epididymis(R)	(g)	0.123 ±0.010 (4)	0.120 ±0.016 (4)	0.113 ±0.010 (4)
Epididymis(L)	(g)	0.118 ±0.005 (4)	0.118 ±0.010 (4)	0.110 ±0.008 (4)
Epididymides	(g)	0.240 ±0.008 (4)	0.238 ±0.022 (4)	0.223 ±0.015 (4)
Ventral prostate	(g)	0.123 ±0.035 (4)	0.115 ±0.021 (4)	0.128 ±0.005 (4)
Dorsolateral prostate	(g)	0.118 ±0.025 (4)	0.113 ±0.035 (4)	0.113 ±0.021 (4)
Brain	(g)	1.790 ±0.076 (4)	1.825 ±0.107 (4)	1.783 ±0.074 (4)
Spleen	(g)	0.555 ±0.177 (4)	0.545 ±0.097 (4)	0.453 ±0.145 (4)
Thymus	(mg)	620.23 ±131.48 (4)	546.05 ±121.97 (4)	502.78 ±215.09 (4)
Pituitary gland	(mg)	6.80 ±0.73 (4)	6.63 ±0.33 (4)	6.63 ±0.53 (4)
Thyroid	(mg)	11.88 ±0.79 (4)	11.48 ±1.37 (4)	12.55 ±1.01 (4)
Adrenals	(mg)	35.73 ±4.12 (4)	34.58 ±3.82 (4)	39.00 ±7.12 (4)
Final body weight	(g)	181.60 ±9.34 (4)	181.15 ±11.11 (4)	167.38 ±9.70 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

Figure(s) in parentheses indicate number of animals used for the statistical analysis.

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

** Significantly different from vehicle control at P<0.01.

Table 9-3 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of absolute organ weights:Male

Items	Dose (mg/kg/day)	Fourteen-day treatment		
		0	60	300
Liver	(g)	8.955 ±0.921 (4)	8.843 ±1.355 (4)	12.558 ** ±1.276 (4)
Heart	(g)	1.035 ±0.152 (4)	0.945 ±0.113 (4)	0.800 * ±0.034 (4)
Kidney(R)	(g)	1.073 ±0.128 (4)	1.020 ±0.159 (4)	1.143 ±0.103 (4)
Kidney(L)	(g)	1.075 ±0.121 (4)	1.018 ±0.163 (4)	1.148 ±0.141 (4)
Kidneys	(g)	2.148 ±0.249 (4)	2.038 ±0.320 (4)	2.290 ±0.243 (4)
Testis(R)	(g)	1.270 ±0.140 (4)	1.215 ±0.048 (4)	1.288 ±0.171 (4)
Testis(L)	(g)	1.288 ±0.108 (4)	1.203 ±0.066 (4)	1.278 ±0.167 (4)
Testes	(g)	2.558 ±0.237 (4)	2.418 ±0.110 (4)	2.565 ±0.338 (4)
Epididymis(R)	(g)	0.180 ±0.037 (4)	0.175 ±0.013 (4)	0.175 ±0.010 (4)
Epididymis(L)	(g)	0.178 ±0.033 (4)	0.183 ±0.021 (4)	0.180 ±0.012 (4)
Epididymides	(g)	0.358 ±0.069 (4)	0.358 ±0.033 (4)	0.355 ±0.019 (4)
Ventral prostate	(g)	0.210 ±0.049 (4)	0.160 ±0.042 (4)	0.165 ±0.070 (4)
Dorsolateral prostate	(g)	0.188 ±0.045 (4)	0.165 ±0.026 (4)	0.158 ±0.049 (4)
Brain	(g)	1.888 ±0.029 (4)	1.825 ±0.066 (4)	1.843 ±0.022 (4)
Spleen	(g)	0.698 ±0.130 (4)	0.595 ±0.106 (4)	0.540 ±0.107 (4)
Thymus	(mg)	580.00 ±94.95 (4)	634.08 ±154.77 (4)	597.20 ±147.61 (4)
Pituitary gland	(mg)	9.03 ±1.15 (4)	8.68 ±1.31 (4)	8.13 ±0.64 (4)
Thyroid	(mg)	16.98 ±3.44 (4)	20.93 ±5.69 (4)	16.70 ±1.64 (4)
Adrenals	(mg)	43.80 ±7.06 (4)	42.68 ±6.53 (4)	38.43 ±7.64 (4)
Final body weight	(g)	244.58 ±17.40 (4)	240.33 ±19.24 (4)	211.83 * ±5.13 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

Figure(s) in parentheses indicate number of animals used for the statistical analysis.

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

** Significantly different from vehicle control at P<0.01.

Table 9-4 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of absolute organ weights:Male

Items	Dose (mg/kg/day)	Twenty-eight-day treatment		
		0	60	300
Liver	(g)	10.506 ±0.482 (5)	11.814 ±1.179 (5)	15.850 ** ±2.128 (4)
Heart	(g)	1.256 ±0.076 (5)	1.156 ±0.074 (5)	1.008 ** ±0.056 (4)
Kidney(R)	(g)	1.218 ±0.144 (5)	1.272 ±0.099 (5)	1.455 ±0.560 (4)
Kidney(L)	(g)	1.178 ±0.107 (5)	1.266 ±0.103 (5)	1.430 ±0.543 (4)
Kidneys	(g)	2.396 ±0.248 (5)	2.538 ±0.198 (5)	2.885 ±1.100 (4)
Testis(R)	(g)	1.538 ±0.091 (5)	1.642 ±0.231 (5)	1.228 ±0.524 (4)
Testis(L)	(g)	1.536 ±0.086 (5)	1.620 ±0.212 (5)	1.223 ±0.503 (4)
Testes	(g)	3.074 ±0.175 (5)	3.262 ±0.442 (5)	2.450 ±1.027 (4)
Epididymis(R)	(g)	0.362 ±0.039 (5)	0.392 ±0.037 (5)	0.308 ±0.068 (4)
Epididymis(L)	(g)	0.356 ±0.015 (5)	0.372 ±0.047 (5)	0.323 ±0.073 (4)
Epididymides	(g)	0.718 ±0.050 (5)	0.764 ±0.080 (5)	0.630 ±0.142 (4)
Ventral prostate	(g)	0.370 ±0.074 (5)	0.432 ±0.100 (5)	0.295 ±0.048 (4)
Dorsolateral prostate	(g)	0.296 ±0.067 (5)	0.346 ±0.115 (5)	0.240 ±0.078 (4)
Seminal vesicle	(g)	1.018 ±0.070 (5)	1.062 ±0.159 (5)	0.715 ** ±0.045 (4)
Brain	(g)	1.996 ±0.083 (5)	1.922 ±0.057 (5)	1.918 ±0.096 (4)
Spleen	(g)	0.610 ±0.089 (5)	0.672 ±0.079 (5)	0.688 ±0.241 (4)
Thymus	(mg)	517.82 ±116.01 (5)	571.32 ±35.43 (5)	396.93 ±121.59 (4)
Pituitary gland	(mg)	11.28 ±0.41 (5)	11.06 ±0.93 (5)	9.95 * ±0.40 (4)
Thyroid	(mg)	17.94 ±3.12 (5)	21.14 ±3.44 (5)	16.83 ±2.09 (4)
Adrenals	(mg)	45.24 ±7.06 (5)	45.90 ±7.72 (5)	58.65 * ±7.42 (4)
Final body weight	(g)	332.24 ±16.62 (5)	341.06 ±20.60 (5)	302.93 ±35.27 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

Figure(s) in parentheses indicate number of animals used for the statistical analysis.

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

** Significantly different from vehicle control at P<0.01.

Table 10-1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of relative organ weights:Male

Items	Dose (mg/kg/day)	One-day treatment		
		0	60	300
Liver	(g/100g)	3.475 ±0.083 (4)	3.785 * ±0.110 (4)	3.938 ** ±0.252 (4)
Heart	(g/100g)	0.498 ±0.029 (4)	0.490 ±0.022 (4)	0.483 ±0.029 (4)
Kidney(R)	(g/100g)	0.550 ±0.024 (4)	0.513 ±0.022 (4)	0.500 * ±0.023 (4)
Kidney(L)	(g/100g)	0.530 ±0.028 (4)	0.493 ±0.010 (4)	0.483 * ±0.021 (4)
Kidneys	(g/100g)	1.080 ±0.045 (4)	1.005 * ±0.025 (4)	0.983 * ±0.043 (4)
Testis(R)	(g/100g)	0.513 ±0.034 (4)	0.533 ±0.019 (4)	0.530 ±0.037 (4)
Testis(L)	(g/100g)	0.510 ±0.029 (4)	0.528 ±0.036 (4)	0.523 ±0.050 (4)
Testes	(g/100g)	1.023 ±0.063 (4)	1.060 ±0.054 (4)	1.053 ±0.087 (4)
Epididymis(R)	(g/100g)	0.065 ±0.006 (4)	0.065 ±0.006 (4)	0.065 ±0.006 (4)
Epididymis(L)	(g/100g)	0.068 ±0.005 (4)	0.068 ±0.005 (4)	0.065 ±0.006 (4)
Epididymides	(g/100g)	0.133 ±0.010 (4)	0.133 ±0.010 (4)	0.130 ±0.008 (4)
Ventral prostate	(g/100g)	0.065 ±0.017 (4)	0.063 ±0.013 (4)	0.063 ±0.017 (4)
Dorsolateral prostate	(g/100g)	0.053 ±0.019 (4)	0.050 ±0.008 (4)	0.050 ±0.012 (4)
Brain	(g/100g)	1.343 ±0.054 (4)	1.320 ±0.036 (4)	1.240 * ±0.042 (4)
Spleen	(g/100g)	0.310 ±0.008 (4)	0.333 ±0.048 (4)	0.305 ±0.030 (4)
Thymus	(mg/100g)	373.78 ±50.68 (4)	357.53 ±64.24 (4)	349.38 ±56.51 (4)
Pituitary gland	(mg/100g)	4.43 ±0.28 (4)	4.08 ±0.17 (4)	4.15 ±0.44 (4)
Thyroid	(mg/100g)	8.18 ±0.68 (4)	7.58 ±1.65 (4)	7.88 ±0.75 (4)
Adrenals	(mg/100g)	22.88 ±2.57 (4)	21.70 ±1.37 (4)	22.13 ±3.07 (4)
Final body weight	(g)	132.43 ±6.17 (4)	135.33 ±3.87 (4)	137.83 ±5.73 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

Figure(s) in parentheses indicate number of animals used for the statistical analysis.

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

** Significantly different from vehicle control at P<0.01.

Table 10-2 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of relative organ weights:Male

Items	Dose (mg/kg/day)	Seven-day treatment		
		0	60	300
Liver	(g/100g)	3.598 ±0.211 (4)	3.755 ±0.170 (4)	5.023 ** ±0.279 (4)
Heart	(g/100g)	0.510 ±0.022 (4)	0.458 * ±0.026 (4)	0.420 ** ±0.016 (4)
Kidney(R)	(g/100g)	0.450 ±0.008 (4)	0.455 ±0.017 (4)	0.563 * ±0.060 (4)
Kidney(L)	(g/100g)	0.450 ±0.014 (4)	0.463 ±0.019 (4)	0.550 ** ±0.049 (4)
Kidneys	(g/100g)	0.900 ±0.016 (4)	0.918 ±0.036 (4)	1.113 * ±0.109 (4)
Testis(R)	(g/100g)	0.538 ±0.031 (4)	0.568 ±0.042 (4)	0.608 ±0.056 (4)
Testis(L)	(g/100g)	0.530 ±0.039 (4)	0.573 ±0.054 (4)	0.615 ±0.054 (4)
Testes	(g/100g)	1.068 ±0.068 (4)	1.140 ±0.096 (4)	1.223 ±0.109 (4)
Epididymis(R)	(g/100g)	0.068 ±0.005 (4)	0.065 ±0.013 (4)	0.068 ±0.005 (4)
Epididymis(L)	(g/100g)	0.065 ±0.006 (4)	0.068 ±0.010 (4)	0.068 ±0.010 (4)
Epididymides	(g/100g)	0.133 ±0.005 (4)	0.133 ±0.021 (4)	0.135 ±0.013 (4)
Ventral prostate	(g/100g)	0.065 ±0.021 (4)	0.063 ±0.013 (4)	0.075 ±0.006 (4)
Dorsolateral prostate	(g/100g)	0.063 ±0.013 (4)	0.065 ±0.024 (4)	0.065 ±0.013 (4)
Brain	(g/100g)	0.988 ±0.041 (4)	1.005 ±0.051 (4)	1.065 ±0.039 (4)
Spleen	(g/100g)	0.305 ±0.090 (4)	0.298 ±0.037 (4)	0.270 ±0.070 (4)
Thymus	(mg/100g)	340.28 ±60.86 (4)	300.38 ±59.40 (4)	298.05 ±115.20 (4)
Pituitary gland	(mg/100g)	3.73 ±0.25 (4)	3.70 ±0.32 (4)	3.98 ±0.13 (4)
Thyroid	(mg/100g)	6.55 ±0.62 (4)	6.35 ±0.78 (4)	7.48 ±0.15 (4)
Adrenals	(mg/100g)	19.65 ±1.38 (4)	19.03 ±1.10 (4)	23.20 ±3.05 (4)
Final body weight	(g)	181.60 ±9.34 (4)	181.15 ±11.11 (4)	167.38 ±9.70 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

Figure(s) in parentheses indicate number of animals used for the statistical analysis.

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

** Significantly different from vehicle control at P<0.01.

Table 10-3 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of relative organ weights:Male

Items	Dose (mg/kg/day)	Fourteen-day treatment		
		0	60	300
Liver	(g/100g)	3.658 ±0.163 (4)	3.665 ±0.331 (4)	5.925 ** ±0.533 (4)
Heart	(g/100g)	0.420 ±0.037 (4)	0.390 ±0.022 (4)	0.378 ±0.010 (4)
Kidney(R)	(g/100g)	0.435 ±0.026 (4)	0.423 ±0.034 (4)	0.538 ** ±0.040 (4)
Kidney(L)	(g/100g)	0.440 ±0.024 (4)	0.420 ±0.037 (4)	0.543 * ±0.054 (4)
Kidneys	(g/100g)	0.875 ±0.049 (4)	0.843 ±0.070 (4)	1.080 ** ±0.094 (4)
Testis(R)	(g/100g)	0.515 ±0.026 (4)	0.505 ±0.039 (4)	0.608 ±0.079 (4)
Testis(L)	(g/100g)	0.528 ±0.035 (4)	0.503 ±0.036 (4)	0.605 ±0.077 (4)
Testes	(g/100g)	1.043 ±0.053 (4)	1.008 ±0.073 (4)	1.213 ±0.156 (4)
Epididymis(R)	(g/100g)	0.075 ±0.013 (4)	0.070 ±0.008 (4)	0.080 ±0.008 (4)
Epididymis(L)	(g/100g)	0.070 ±0.012 (4)	0.073 ±0.010 (4)	0.085 ±0.006 (4)
Epididymides	(g/100g)	0.145 ±0.024 (4)	0.143 ±0.017 (4)	0.165 ±0.010 (4)
Ventral prostate	(g/100g)	0.085 ±0.017 (4)	0.065 ±0.013 (4)	0.078 ±0.032 (4)
Dorsolateral prostate	(g/100g)	0.078 ±0.017 (4)	0.070 ±0.008 (4)	0.073 ±0.025 (4)
Brain	(g/100g)	0.775 ±0.057 (4)	0.765 ±0.054 (4)	0.870 * ±0.029 (4)
Spleen	(g/100g)	0.288 ±0.041 (4)	0.248 ±0.029 (4)	0.253 ±0.045 (4)
Thymus	(mg/100g)	237.00 ±32.52 (4)	262.58 ±52.48 (4)	281.78 ±67.77 (4)
Pituitary gland	(mg/100g)	3.65 ±0.24 (4)	3.58 ±0.31 (4)	3.83 ±0.39 (4)
Thyroid	(mg/100g)	6.95 ±1.31 (4)	8.60 ±1.80 (4)	7.88 ±0.61 (4)
Adrenals	(mg/100g)	17.85 ±1.92 (4)	17.75 ±2.23 (4)	18.13 ±3.39 (4)
Final body weight	(g)	244.58 ±17.40 (4)	240.33 ±19.24 (4)	211.83 * ±5.13 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

Figure(s) in parentheses indicate number of animals used for the statistical analysis.

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

** Significantly different from vehicle control at P<0.01.

Table 10-4 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of relative organ weights:Male

Items	Dose (mg/kg/day)	Twenty-eight-day treatment		
		0	60	300
Liver	(g/100g)	3.164 ±0.169 (5)	3.458 ±0.160 (5)	5.230 ** ±0.276 (4)
Heart	(g/100g)	0.378 ±0.022 (5)	0.338 * ±0.015 (5)	0.338 * ±0.022 (4)
Kidney(R)	(g/100g)	0.368 ±0.041 (5)	0.372 ±0.015 (5)	0.473 ±0.127 (4)
Kidney(L)	(g/100g)	0.356 ±0.030 (5)	0.372 ±0.015 (5)	0.465 * ±0.125 (4)
Kidneys	(g/100g)	0.724 ±0.069 (5)	0.744 ±0.027 (5)	0.938 * ±0.251 (4)
Testis(R)	(g/100g)	0.466 ±0.034 (5)	0.480 ±0.066 (5)	0.393 ±0.150 (4)
Testis(L)	(g/100g)	0.464 ±0.034 (5)	0.474 ±0.059 (5)	0.393 ±0.144 (4)
Testes	(g/100g)	0.930 ±0.067 (5)	0.954 ±0.125 (5)	0.785 ±0.294 (4)
Epididymis(R)	(g/100g)	0.110 ±0.007 (5)	0.114 ±0.011 (5)	0.098 ±0.013 (4)
Epididymis(L)	(g/100g)	0.106 ±0.005 (5)	0.110 ±0.016 (5)	0.105 ±0.017 (4)
Epididymides	(g/100g)	0.216 ±0.009 (5)	0.224 ±0.025 (5)	0.203 ±0.030 (4)
Ventral prostate	(g/100g)	0.112 ±0.022 (5)	0.128 ±0.033 (5)	0.100 ±0.029 (4)
Dorsolateral prostate	(g/100g)	0.088 ±0.018 (5)	0.100 ±0.035 (5)	0.080 ±0.035 (4)
Seminal vesicle	(g/100g)	0.308 ±0.022 (5)	0.312 ±0.052 (5)	0.240 * ±0.029 (4)
Brain	(g/100g)	0.602 ±0.038 (5)	0.564 ±0.027 (5)	0.640 ±0.088 (4)
Spleen	(g/100g)	0.184 ±0.036 (5)	0.196 ±0.029 (5)	0.225 ±0.058 (4)
Thymus	(mg/100g)	155.80 ±32.49 (5)	167.84 ±12.37 (5)	129.80 ±28.50 (4)
Pituitary gland	(mg/100g)	3.40 ±0.24 (5)	3.22 ±0.15 (5)	3.33 ±0.39 (4)
Thyroid	(mg/100g)	5.38 ±0.71 (5)	6.18 ±0.73 (5)	5.65 ±1.16 (4)
Adrenals	(mg/100g)	13.66 ±2.42 (5)	13.40 ±1.59 (5)	19.35 * ±0.24 (4)
Final body weight	(g)	332.24 ±16.62 (5)	341.06 ±20.60 (5)	302.93 ±35.27 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

Figure(s) in parentheses indicate number of animals used for the statistical analysis.

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

** Significantly different from vehicle control at P<0.01.

Table 11-1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of macroscopic examinations: One-day treatment

Findings	Male		
	0	60	300
	ss	ss	ss
	4 ^{a)}	4	4
No abnormalities detected	4	4	2
Jejunum			
Whitish change of mucosa	0	0	1
Cecum			
Watery contents	0	0	2
Liver			
Enlargement	0	0	1
Mesenteric lymph node			
Whitish change	0	0	1

ss: scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals examined.

Table 11-2 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of macroscopic examinations: Seven-day treatment

Findings	Male			(mg/kg/day)
	0	60	300	
	ss	ss	ss	
4 ^{a)}	4	4		
No abnormalities detected	4	4	0	
Cecum				
Enlargement	0	0	1	
Liver				
Enlargement	0	0	4	
Kidney				
Discoloration of cortico-medullary junction, bilateral	0	0	2	
Enlargement, bilateral	0	0	2	

ss: scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals examined.

Table 11-3 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of macroscopic examinations: Fourteen-day treatment

Findings	Male		
	0	60	300
	ss	ss	ss
	4 ^{a)}	4	4
No abnormalities detected	4	4	0
Staining around nose and mouth	0	0	1
Glandular stomach			
Blackish region of mucosa	0	0	2
Cecum			
Enlargement	0	0	1
Liver			
Enlargement	0	0	4
Thymus			
Dark reddish change	0	0	1

ss: scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals examined.

Table 11-4 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of macroscopic examinations: Twenty-eight-day treatment

Findings	Male			
	0		60	300
	ss	ss	ss	m
	5 ^{a)}	5	4	1
No abnormalities detected	5	5	0	0
Staining around nose and mouth	0	0	2	0
Lung				
Dark reddish change	0	0	1	0
Forestomach				
Edematous region of wall	0	0	1	0
Reddish region of wall	0	0	1	0
Glandular stomach				
Blackish region of mucosa	0	0	1	0
Cecum				
Enlargement	0	0	3	0
Liver				
Enlargement	0	0	4	1
Kidney				
Enlargement, bilateral	0	0	1	0
Testis				
Small, bilateral	0	0	1	0
Softening, bilateral	0	0	1	0
Cervical lymph node				
Enlargement, unilateral	0	0	0	1
Mesenteric lymph node				
Enlargement	0	0	4	0
Eye ball				
Enlargement, bilateral	0	0	1	0
Reddish change, bilateral	0	0	1	0
Auricle				
Hemorrhage, unilateral	0	0	0	1

ss: scheduled sacrifice animal, m: moribund animal.

a) Number of animals examined.

Table 12-1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of histopathological examinations: One-day treatment

Findings	Grade	Male		
		0	60	300
		ss	ss	ss
	4 ^{a)}	4	4	
Forestomach				
No abnormalities detected	4/4 ^{b)}	---	4/4	
Glandular stomach				
No abnormalities detected	4/4	---	4/4	
Duodenum				
No abnormalities detected	4/4	4/4	2/4	
Necrosis/Mucosa/Focal	+ 0/4	0/4	1/4	
	++ 0/4	0/4	1/4	
Jejunum				
No abnormalities detected	4/4	4/4	3/4	
Vacuolization/Villous epithelium	+ 0/4	0/4	1/4	
Ileum				
No abnormalities detected	4/4	4/4	4/4	
Cecum				
No abnormalities detected	4/4	---	4/4	
Colon				
No abnormalities detected	4/4	---	4/4	
Rectum				
No abnormalities detected	4/4	---	4/4	
Liver				
No abnormalities detected	3/4	---	4/4	
Necrosis/Hepatocyte/Focal	+ 1/4	---	0/4	
Kidney				
No abnormalities detected	3/4	---	4/4	
Cyst/Subcapsule	+ 1/4	---	0/4	
Testis				
No abnormalities detected	4/4	---	4/4	
Ventral prostate				
No abnormalities detected	4/4	---	4/4	
Dorsolateral prostate				
No abnormalities detected	4/4	---	4/4	
Bone marrow				
No abnormalities detected	4/4	---	4/4	
Mesenteric lymph node				
No abnormalities detected	4/4	4/4	0/4	
Hypertrophy/Paracortex	+ 0/4	0/4	4/4	
Spleen				
No abnormalities detected	4/4	---	4/4	
Thymus				
No abnormalities detected	4/4	---	4/4	

ss: scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals autopsied.

b) Number of animals affected / Number of animals examined.

---: Not examined.

+: slight, ++: moderate.

Table 12-2 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of histopathological examinations: Seven-day treatment

Findings	Grade	Male		
		0	60	300
		ss	ss	ss
		4 ^{a)}	4	4
Forestomach				
No abnormalities detected		4/4 ^{b)}	---	4/4
Glandular stomach				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4
Duodenum				
No abnormalities detected		4/4	4/4	3/4
Necrosis/Mucosa/Focal	++	0/4	0/4	1/4
Jejunum				
No abnormalities detected		4/4	4/4	4/4
Ileum				
No abnormalities detected		4/4	4/4	4/4
Cecum				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4
Colon				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4
Rectum				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4
Liver				
No abnormalities detected		4/4	4/4	0/4
Degeneration, fatty, microvesicular/ Hepatocyte/Periportal	+	0/4	0/4	2/4
Hypertrophy/Hepatocyte/ Centrilobular	++	0/4	0/4	4/4
Kidney				
No abnormalities detected		4/4	3/4	0/4
Cyst/Cortex	+	0/4	1/4	0/4
Degeneration/Renal tubule	+	0/4	0/4	2/4
Necrosis/Renal tubule/	+	0/4	0/4	1/4
Cortico-medullary junction	++	0/4	0/4	1/4
Regeneration/Renal tubule/	+	0/4	0/4	1/4
Cortico-medullary junction	+++	0/4	0/4	1/4
Single cell necrosis/Renal tubule/	+	0/4	0/4	1/4
Cortico-medullary junction	++	0/4	0/4	2/4

ss: scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals autopsied.

b) Number of animals affected / Number of animals examined.

---: Not examined.

+: slight, ++: moderate, +++: severe.

Table 12-3 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of histopathological examinations: Seven-day treatment

Findings	Grade	Male		
		0	60	300
		ss	ss	ss
		4 ^{a)}	4	4
Testis				
No abnormalities detected		4/4 ^{b)}	---	4/4
Ventral prostate				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4
Dorsolateral prostate				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4
Bone marrow				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4
Mesenteric lymph node				
No abnormalities detected		4/4	4/4	0/4
Hypertrophy/Paracortex	+	0/4	0/4	4/4
Spleen				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4
Thymus				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4

ss: scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals autopsied.

b) Number of animals affected / Number of animals examined.

---: Not examined.

+: slight.

Table 12-4 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of histopathological examinations: Fourteen-day treatment

Findings	Grade	Male		
		0	60	300
		ss	ss	ss
	4 ^{a)}	4	4	
Forestomach				
No abnormalities detected		4/4 ^{b)}	4/4	4/4
Glandular stomach				
No abnormalities detected		4/4	4/4	2/4
Necrosis/Fundic mucosa/Focal	+	0/4	0/4	2/4
Duodenum				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4
Jejunum				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4
Ileum				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4
Cecum				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4
Colon				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4
Rectum				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4
Liver				
No abnormalities detected		3/4	4/4	0/4
Degeneration, fatty, microvesicular/ Hepatocyte/Periportal	+	0/4	0/4	3/4
Ground glass appearance/ Hepatocyte/Centrilobular	++	0/4	0/4	4/4
Hypertrophy/Hepatocyte/ Centrilobular	+++	0/4	0/4	4/4
Necrosis/Hepatocyte/Focal	+	1/4	0/4	0/4
Kidney				
No abnormalities detected		4/4	4/4	0/4
Cyst/Medulla	+	0/4	0/4	1/4
Degeneration/Renal tubule	+	0/4	0/4	3/4
Dilatation/Renal tubule/ Cortex and medulla	+	0/4	0/4	1/4
Necrosis/Renal tubule/ Cortico-medullary junction	+	0/4	0/4	2/4
Regeneration/Renal tubule/ Cortico-medullary junction	++	0/4	0/4	3/4
Single cell necrosis/Renal tubule/ Cortico-medullary junction	++	0/4	0/4	3/4

ss: scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals autopsied.

b) Number of animals affected / Number of animals examined.

---: Not examined.

+: slight, ++: moderate, +++: severe.

Table 12-5 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of histopathological examinations: Fourteen-day treatment

Findings	Grade	Male		
		0	60	300
		ss	ss	ss
	4 ^{a)}	4	4	
Testis				
No abnormalities detected	4/4 ^{b)}	---	4/4	
Ventral prostate				
No abnormalities detected	4/4	---	4/4	
Dorsolateral prostate				
No abnormalities detected	4/4	---	4/4	
Bone marrow				
No abnormalities detected	4/4	---	4/4	
Mesenteric lymph node				
No abnormalities detected	4/4	4/4	0/4	
Hypertrophy/Paracortex	+	0/4	0/4	4/4
Spleen				
No abnormalities detected	4/4	---	4/4	
Thymus				
No abnormalities detected	4/4	---	3/4	
Hemorrhage	+++	0/4	---	1/4

ss: scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals autopsied.

b) Number of animals affected / Number of animals examined.

---: Not examined.

+: slight, +++: severe.

Table 12-6 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of histopathological examinations: Twenty-eight-day treatment

Findings	Grade	Male			
		0	60	300	(mg/kg/day)
		ss	ss	ss	m
		5 ^{a)}	5	4	1
Trachea					
No abnormalities detected		5/5 ^{b)}	---	4/4	1/1
Lung					
No abnormalities detected		4/5	---	3/4	1/1
Hemorrhage	+	1/5	---	1/4	0/1
Submandibular gland					
No abnormalities detected		5/5	---	4/4	1/1
Forestomach					
No abnormalities detected		5/5	5/5	1/4	1/1
Hemorrhage/Submucosa	+	0/5	0/5	3/4	0/1
Glandular stomach					
No abnormalities detected		5/5	5/5	3/4	1/1
Necrosis/Fundic mucosa/Focal	+	0/5	0/5	1/4	0/1
Duodenum					
No abnormalities detected		5/5	5/5	4/4	1/1
Jejunum					
No abnormalities detected		5/5	5/5	2/4	1/1
Lacteal dilatation	+	0/5	0/5	2/4	0/1
Ileum					
No abnormalities detected		5/5	5/5	3/4	1/1
Vacuolization/Villous epithelium	+	0/5	0/5	1/4	0/1
Cecum					
No abnormalities detected		5/5	5/5	4/4	1/1
Colon					
No abnormalities detected		5/5	5/5	4/4	1/1
Rectum					
No abnormalities detected		5/5	5/5	3/4	1/1
Hyperplasia/Mucosa	+	0/5	0/5	1/4	0/1
Pancreas					
No abnormalities detected		5/5	---	4/4	1/1
Liver					
No abnormalities detected		5/5	5/5	0/4	0/1
Degeneration, fatty, microvesicular/ Hepatocyte/Periportal	+	0/5	0/5	4/4	0/1
Ground glass appearance/ Hepatocyte/Centrilobular	++	0/5	0/5	3/4	0/1
Hypertrophy/Hepatocyte/ Centrilobular	++	0/5	0/5	0/4	1/1
	+++	0/5	0/5	2/4	0/1

ss: scheduled sacrifice animal, m: moribund animal.

a) Number of animals autopsied.

b) Number of animals affected / Number of animals examined.

---: Not examined.

+: slight, ++: moderate, +++: severe.

Table 12-7 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of histopathological examinations: Twenty-eight-day treatment

Findings	Grade	Male			
		0	60	300	(mg/kg/day)
		ss	ss	ss	m
	5 ^{a)}	5	4	1	
Heart					
No abnormalities detected	5/5 ^{b)}	---	4/4	1/1	
Kidney					
No abnormalities detected	4/5	5/5	0/4	1/1	
Cast, cellular	+	0/5	0/5	1/4	0/1
Cellular infiltration	+	0/5	0/5	1/4	0/1
Cyst/Medulla	+	1/5	0/5	0/4	0/1
Degeneration/Renal tubule	+	0/5	0/5	3/4	0/1
Dilatation/Renal tubule/ Cortex and medulla	+	0/5	0/5	1/4	0/1
Fibrosis	+	0/5	0/5	1/4	0/1
Necrosis/Renal tubule/ Cortico-medullary junction	++	0/5	0/5	1/4	0/1
Regeneration/Renal tubule/ Cortico-medullary junction	+	0/5	0/5	2/4	0/1
Single cell necrosis/Renal tubule/ Cortico-medullary junction	+	0/5	0/5	1/4	0/1
	++	0/5	0/5	3/4	0/1
Urinary bladder					
No abnormalities detected	5/5	---	4/4	1/1	
Testis					
No abnormalities detected	5/5	---	3/4	1/1	
Atrophy/Seminiferous tubule/Diffuse	+++	0/5	---	1/4	0/1
Hyperplasia/Leydig cell/Diffuse	++	0/5	---	1/4	0/1
Epididymis					
No abnormalities detected	5/5	---	3/4	1/1	
Loss/Sperm/Bilateral	+++	0/5	---	1/4	0/1
Ventral prostate					
No abnormalities detected	5/5	---	4/4	1/1	
Dorsolateral prostate					
No abnormalities detected	5/5	---	4/4	1/1	
Coagulating gland					
No abnormalities detected	5/5	---	4/4	1/1	
Seminal vesicle					
No abnormalities detected	5/5	---	4/4	1/1	
Spinal cord					
No abnormalities detected	5/5	---	4/4	1/1	
Sciatic nerve					
No abnormalities detected	5/5	---	4/4	1/1	

ss: scheduled sacrifice animal, m: moribund animal.

a) Number of animals autopsied.

b) Number of animals affected / Number of animals examined.

---: Not examined.

+: slight, ++: moderate, +++: severe.

Table 12-8 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of histopathological examinations: Twenty-eight-day treatment

Findings	Grade	Male			
		0	60	300	(mg/kg/day)
		ss	ss	ss	m
		5 ^{a)}	5	4	1
Bone marrow					
No abnormalities detected	5/5 ^{b)}	---	4/4	1/1	
Axillar lymph node					
No abnormalities detected	5/5	---	4/4	1/1	
Cervical lymph node					
Germinal center development/Unilateral	++	---	---	---	1/1
Plasmacytosis/Unilateral	++	---	---	---	1/1
Mesenteric lymph node					
No abnormalities detected	5/5	5/5	1/4	1/1	
Hypertrophy/Paracortex	+	0/5	0/5	3/4	0/1
Spleen					
No abnormalities detected	5/5	---	4/4	1/1	
Thymus					
No abnormalities detected	5/5	---	4/4	1/1	
Thyroid					
No abnormalities detected	5/5	---	4/4	1/1	
Parathyroid					
No abnormalities detected	5/5	---	4/4	1/1	
Adrenals					
No abnormalities detected	5/5	---	4/4	1/1	
Eye ball					
No abnormalities detected	5/5	5/5	2/4	1/1	
Hemorrhage/Anterior chamber and vitreous body	+	0/5	0/5	1/4	0/1
Hemorrhage/Vitreous body	+	0/5	0/5	1/4	0/1
Skeletal muscle					
No abnormalities detected	5/5	---	4/4	1/1	
Bone					
No abnormalities detected	5/5	---	4/4	1/1	
Mammary gland					
No abnormalities detected	5/5	---	4/4	1/1	

ss: scheduled sacrifice animal, m: moribund animal.

a) Number of animals autopsied.

b) Number of animals affected / Number of animals examined.

---: Not examined.

+: slight, ++: moderate.