

試験番号

B10-0125

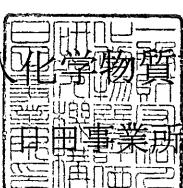
最 終 報 告 書

遺伝子発現量解析のための

4-Hydroxy-*m*-phenylenediammonium dichloride のラットにおける 28 日間反復経口投与毒性試験

2015 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

2015 年 3 月 30 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	5
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	6
12. 最終報告書の承認	6
13. 要 約	7
14. 試験材料	9
14.1 被験物質	9
14.2 媒 体	10
14.3 使用動物	10
14.4 飼育環境	11
15. 試験方法	11
15.1 被験物質の設定用量	11
15.2 群構成	12
15.3 投与液	12
15.4 投 与	13
15.5 一般状態観察	13
15.6 詳細な一般状態観察	13
15.7 機能検査	14
15.8 体重測定	14
15.9 摂餌量測定	14
15.10 尿検査	15
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	22
17. 試験成績	23
17.1 一般状態	23
17.2 詳細な一般状態	23
17.3 機能検査	23

17.4 体 重	23
17.5 摂餌量	23
17.6 尿検査	23
17.7 血液検査	23
17.8 病理学的検査	24
18. 参考文献	28

Figures

1 Body weights	29
2 Food consumption	30

Tables

1 Summary of general clinical observations	31
2 Summary of detailed clinical observations	32
3 Summary of functional observations	36
4 Summary of body weights	37
5 Summary of food consumption	38
6 Summary of urinalyses	39
7 Summary of hematological examinations	42
8 Summary of blood chemical examinations	46
9 Summary of absolute organ weights	50
10 Summary of relative organ weights	54
11 Summary of macroscopic examinations	58
12 Summary of histopathological examinations	62

Appendices

1 General clinical observations of individual animals	68
2 Detailed clinical observations of individual animals	71
3 Functional observations of individual animals	74
4 Body weights of individual animals	75
5 Food consumption of individual animals	87
6 Urinalytic data of individual animals	88
7 Hematological data of individual animals	94
8 Blood chemical data of individual animals	106
9 Absolute organ weights of individual animals	118
10 Relative organ weights of individual animals	130
11 Pathological findings of individual animals	142

1. 表 題

遺伝子発現量解析のための 4-Hydroxy-*m*-phenylenediammonium dichloride 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-Hydroxy-*m*-phenylenediammonium dichloride 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-Hydroxy-*m*-phenylenediammonium dichloride 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 Guidelines 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、平成18年)
- c) 「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、平成18年)
- d) 「農林水産省の所管する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」(農林水産省、平成18年)
- e) 「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、平成18年)
- f) 「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	2014年10月9日
動物入荷日	2014年10月14日
投与開始日	2014年10月23日
1回投与後解剖日	2014年10月24日
7日間投与後解剖日	2014年10月30日
14日間投与後解剖日	2014年11月6日
28日間投与後解剖日	2014年11月20日
試験終了日	2015年3月30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 坪 倉 靖 祐

(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

2015 年 5 月 30 日

試験責任者

寶珠山五月

13. 要 約

4-Hydroxy-*m*-phenylenediammonium dichloride 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懸濁させた 4-Hydroxy-*m*-phenylenediammonium dichloride 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)、20 及び 100 mg/kg/day とし、1、7 及び 14 日間投与後に解剖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解剖して、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、20 及び 100 mg/kg 群で流涎、暗緑色尿及び自発運動低下、100 mg/kg 群で鼻及び口周囲の汚れ、呼吸数減少、半眼、軟便がみられた。

詳細な一般状態観察では、20 及び 100 mg/kg 群で毛の汚れ及び流涎がみられた。

体重では 100 mg/kg 群で投与 3 日目から低値又は低値傾向がみられた。

摂餌量では 100 mg/kg 群で投与 3 日目に低値がみられた。

尿検査では 100 mg/kg 群で尿の暗色化（褐色～黒色）がみられた。

血液学的検査では、100 mg/kg 群で 28 日間投与後に赤血球数、Hb、Ht 及び MCHC の低値、MCV、網状赤血球数比率、白血球数及び単球比率の高値がみられた。

血液生化学的検査では 100 mg/kg 群で 28 日間投与後にカリウムの高値がみられた。

器官重量では、100 mg/kg 群で 7 日間投与後に脾臓の相対重量の高値、28 日間投与後に脾臓の絶対及び相対重量の高値、腎臓の相対重量の高値、並びに肝臓の相対重量の高値傾向がみられた。

剖検では、100 mg/kg 群で 1 回投与後に空腸の粘膜白色化及び腸間膜リンパ節の白色化、7 及び 14 日間投与後に前胃の粘膜隆起部、7 及び 28 日間投与後に前胃の粘膜陥凹部、14 日間投与後から脾臓の黒色化及び腫大、28 日間投与後に肝臓の腫大、腎臓の暗褐色化及び腫大、門脈リンパ節の腫大がみられた。

病理組織学的検査では、20 mg/kg 群で 28 日間投与後に十二指腸の粘膜固有層の褐色色素沈着、100 mg/kg 群で 1 回投与後に腎臓の髓質外帯外層の近位尿細管の細胞質及び核変化、皮髓境界部の近位尿細管の单細胞壊死、空腸の絨毛上皮の空胞化、1 回及び 28 日間投与後に前胃の境界縁の粘膜固有層の水腫及び細胞浸潤、腺胃の噴門領域胃底腺部粘膜壊死、7 日間投与後に腎臓の皮髓境界部の尿細管の再生、1 回、7 及び 28 日間投与後に肝臓の核小体明瞭化及びグリコーゲン蓄積を伴う小葉周辺性肝細胞肥大、7 日間投与後から前胃の限局性扁平上皮過形成、7 及び 28 日間投与後に前胃の粘膜固有層の水腫及び細胞浸潤、潰瘍、14 日間投与後から前胃の境界縁の扁平上皮過形成、肝臓の小葉周辺性クッパー細胞褐色色素沈着、脾臓のうっ血及び赤脾臓の褐色色素沈着、28 日間投与後に十二指腸の粘膜固有層の褐色色素沈着、腎臓の皮質の近位尿細管の褐色色素沈着、髓質外帯外層の近位尿細管の再生、骨髓の赤芽球系細胞過形成、門脈リンパ節の褐色色素沈着及び形質細胞增多症、脾臓の髓外造血亢

進がみられた。

機能検査では被験物質投与による影響は認められなかつた。

以上のとおり、本試験条件下において 4-Hydroxy-*m*-phenylenediammonium dichloride の投与により、血液、造血器、腎臓及び消化管への毒性影響が認められたほか、肝臓への影響もみられた。

14. 試験材料

14.1 被験物質

a) 名称等

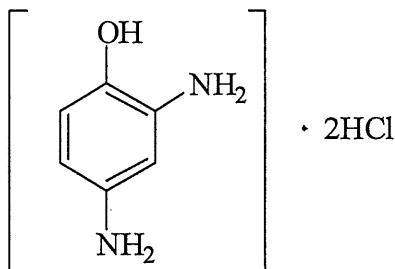
名 称	Amidol
別 名	4-Hydroxy- <i>m</i> -phenylenediammonium dichloride 2,4-Diaminophenol dihydrochloride
CAS 番号	137-09-7

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	FHJ01

c) 構造式等

構造式



分子式	C ₆ H ₈ N ₂ O·2HCl
分子量	197.06

d) 純度等

純 度	100.2% (硝酸銀滴定) 100.7% (N より)
-----	---------------------------------

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)	可溶
融 点	205°C
常温における性状	白色～くすんだ黄赤色の結晶～粉末固体
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)
エーテル	微溶
アルコール	微溶

f) 保管条件

遮光した気密容器に入れ、被験物質保管室の保冷庫にて冷所（許容範囲 1～10°C）で保管した。

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-Hydroxy-*m*-phenylenediammonium dichloride の安定性、被験物質液の均一性、安定性及び濃度確認試験」（試験番号 X02-0289、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 3.0 w/v% の濃度で均一に懸濁した。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 (CP)	V3T2547	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 Cr1:CD(SD)ラット (SPF) を日本チャールス・リバーワイズ・リサーチ・ラボラトリーズ・ジャパン株式会社から入手した。

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だけで、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 143.4～170.0 g であり、全例の体重が全体の平均体重±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。

ケージは、群分け前は W260×D380×H180 mm、群分け後は W165×D300×H150 mm のステンレス製金網床ケージを使用し、採尿時は W150×D200×H263 mm の代謝ケージを使用した。なお、金網床ケージ使用時にはトレイを併用した。

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。なお、暗緑色尿がみられた動物については、尿の観察が出来るように、異常尿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 140715、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）したものとそれぞれ使用した。

飼料は、製造元から混入物の分析データ入手し、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-Hydroxy-*m*-phenylenediammonium dichloride 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 P12-0125、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、50、100 及び 150 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、50 mg/kg 以上の群で流涎及び暗緑色尿、100 mg/kg 以上の群で自発運動低下、前胃の境界縁隆起及び脾臓の黒色化が認められた。150 mg/kg 群では呼吸数減少、半眼、体重低値傾向等がみられ、1 例が死亡したほか、脾臓、肝臓及び腎臓の重量高値、前胃の粘膜粗造化、肝臓及び腎臓の褐色化、脾臓の腫大等が認められた。150 mg/kg 群では死亡動物は 1 例のみであったが、体重低値傾向がみられたことから、150 mg/kg/day の用量で 28 日間反復投与すると瀕死や死亡等の重篤な毒性影響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 100 mg/kg/day を高用量とし、低用量として 20 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。

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った。

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)	20	10	0.200 4(18 - 21)
	低用量 (7日間投与)	20	10	0.200 4(22 - 25)
	低用量 (14日間投与)	20	10	0.200 4(26 - 29)
	低用量 (28日間投与)	20	10	0.200 5(30 - 34)
	高用量 (1回投与)	100	10	1.00 4(35 - 38)
	高用量 (7日間投与)	100	10	1.00 4(39 - 42)
	高用量 (14日間投与)	100	10	1.00 4(43 - 46)
	高用量 (28日間投与)	100	10	1.00 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、コーン油を加えて練り合わせた。その後、コーン油を加えて定容し1.00w/v%の被験物質液（懸濁液）を調製した。さらに、1.00w/v%の被験物質液をマグネチックスターラーで攪拌しながら一部を採取し、コーン油を加えて希釈し、0.200w/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（許容範囲1～10°C）で保管した。被験物質液は調製後10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) 被験物質液の均一性及び安定性の確認

1.00及び0.100w/v%の被験物質液の均一性及び冷所保管での安定性を、当試験施設においてX02-0289で高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により確認した。

均一性については、被験物質液の上、中及び下層の測定した被験物質濃度の変動係数(CV)が1.00及び0.100w/v%の被験物質液でそれぞれ3.5及び1.9%と5%以内であったことから、均一であることが確認された。

$$CV(\%) = \frac{\text{各層の測定濃度の標準偏差}}{\text{各層の測定濃度の平均値}} \times 100$$

安定性については、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 1.00 及び 0.100 w/v% の被験物質液でそれぞれ 99.8 及び 99.7% 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 1.00 及び 0.200 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 X02-0289 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 1.00 及び 0.200 w/v% の被験物質液でそれぞれ 103% 及び 101% 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 9:04～10:27 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。被験物質液はマグネットスターラーで攪拌しながら注射筒に採取した。

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・拳縮・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 23 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 3 cm 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 30 cm 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		握力メータ FGC-2 (メイティス) 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 (42.6 cm×26.5 cm の範囲を縦横 5 cm 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日間投与群について、投与28日目の午後に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認められなかつたため、低用量群については検査を行わなかつた。

項目	方法	機器
尿量 (Urine volume)	メスシリンダーによる計量	—
色調 (Color)	肉眼観察	—
濁り (Turbidity)		
尿浸透圧 (Uosm)	冰点降下法	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 (アークレイ)

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。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G2030、シスマックス)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CTR6101、和光純薬工業)の3.2w/v%水溶液を100μL添加したガラス製試験管で採血し、遠心分離(3000r.p.m.×10mins)して得た血漿
血 清	ガラス製試験管で採血し遠心分離(3000r.p.m.×10mins)して得た血清

b) 血液学的検査

全血及び血漿を用い次の項目を測定した。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) 单球 (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	E
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樂死させ、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。

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。また、肉眼的病変部として、高用量群の 1 例 (No. 37) の腸を採取した。

分 類	器官・組織
消化器系	胃、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*

*No. 1 を除く。

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。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。また、肉眼的病変部として、高用量群の4例（No. 47、No. 48、No. 50 及び No. 51）の門脈リンパ節を採取した。

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*
感覚器	眼球
筋・骨格系	骨格筋（大腿部）、骨（大腿骨）
皮膚・付属器	乳腺

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 以内に細切り 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。なお、左右いずれかのみに病変が認められた場合は、病変部を 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定し、反対側を遺伝子発現量解析及び-80°C 凍結保存に供した。

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ソン液で固定した。

精巣上体は、重量を測定後、左右とも変法デビットソン液で固定した。

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。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は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。

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、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% 嘌酸・ホルマリン液による脱灰を行った。また、1 回及び 7 日間投与群では胃、肝臓及び腎臓、14 日間投与群では胃、肝臓及び脾臓に、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当該器官・組織の病理組織学的検査を行った。さらに、肉眼的病変部として 1 回投与群の高用量群の 1 例（No. 37）の空腸について検査を行った。

このほか、1 回投与群の肝臓で高用量群の HE 染色標本において肝細胞の空胞化が認められ、グリコーゲン又は脂肪の蓄積が疑われたことから、対照群及び高用量群の各 1 例（No. 1 及び No. 35）について PAS 反応及びオイル赤 O 染色による検査を行った。

(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% 嘌酸・ホルマリン液による脱灰を行った。また、高用量群で胃、小腸、肝臓、腎臓、骨髓及び脾臓に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当該器官・組織の病理組織学的検査を行った。さらに、肉眼的病変部として高用量群の 4 例（No. 47、No. 48、No. 50 及び No. 51）の門脈リンパ節について検査を行った。

このほか、高用量群の肝臓の HE 染色標本において肝細胞の空胞化及び褐色色素の沈着が認められ、グリコーゲンの蓄積及びヘモジデリンの沈着が疑われたことから、対照群及び高用量群の各 1 例（No. 13 及び No. 50）について PAS 反応及びベルリン青染色による検査を行った。さらに、高用量群の腎臓、脾臓及び十二指腸の HE 染色標本において褐色色素の沈着又は増加が認められ、ヘモジデリンの沈着が疑われたことから、対照群及び高用量群の各 1 例（No. 17 及び No. 50）の腎臓及び脾臓並びに対照群及び高用量群の各 1 例（No. 13 及び No. 51）の十二指腸についてベルリン青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。

投与 26 日目に投与 2~6 時間後の一般状態観察が実施されなかつたが、前後数日間の所見から、当日も同様の症状が発現していたと推察され、試験に及ぼす影響はないと判断した。

28 日間投与後の尿検査時に、高用量群の 2 例 (No. 49 及び 50) で尿の黒色化により尿蛋白及びケトン体が判別不能であったが、同群では他の 3 例の検査結果が得られていることから、評価は可能であり、試験に及ぼす影響はないと判断した。

血液生化学的検査において、高用量群で、7 日間投与後に 2 例 (No. 41 及び No. 42) の総ビリルビン、14 日間投与後に 4 例全例のクレアチニン及び総ビリルビン、さらに、28 日間投与後に 5 例全例のクレアチニン及び 1 例 (No. 47) の総ビリルビンが異常値 (マイナス値又はゼロ) を示した。血中に存在する被験物質又はその代謝物による測定系への干渉が原因と考えられたため、これらについては、低用量群を含めて試験結果の評価から除外した。

17. 試験成績

17.1 一般状態 (Table 1、Appendix 1)

100 mg/kg 群で流涎、暗緑色尿及び自発運動低下が各 13 例、鼻及び口周囲の汚れが 4 例、呼吸数減少及び半眼が各 2 例、軟便が 1 例で観察された。流涎、暗緑色尿及び自発運動低下は投与 2 日目から発現し、いずれも投与期間を通して継続的にみられた。さらに、流涎は投与回数の増加とともに発現時間が延長する傾向が認められ、投与 6 日目以降には投与直前にも散見された。半眼は投与 2 及び 10 日目にそれぞれ 1 例のみの発現であり、呼吸数減少は投与 27 及び 28 日目にみられた。鼻及び口周囲の汚れは投与 15 日目から散発的又は継続的に認められた。軟便は投与 10 日目のみの発現であった。20 mg/kg 群では流涎が 10 例、暗緑色尿が 4 例、自発運動低下が 1 例で認められた。流涎は投与 2 日目から散発的にみられ、投与回数の増加とともに発現時間が延長する傾向が認められた。暗緑色尿は投与 2~12 日目に単発的又は散発的に認められた。自発運動低下は投与 27 日目のみの発現であった。対照群に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った。他の詳細観察項目では、100 mg/kg 群で投与 1 及び 2 週目に流涎が 5 例中各 1 例、投与 3 週目に毛の汚れが 5 例、流涎が 1 例、投与 4 週目に毛の汚れが 1 例、流涎が 2 例にみられた。20 mg/kg 群では投与 3 週目に毛の汚れが 1 例、投与 4 週目に流涎が 1 例にみられた。対照群に異常は認められなかった。

17.3 機能検査 (Table 3、Appendix 3)

100 mg/kg 群で後肢握力の有意な低値がみられた。20 mg/kg 群に有意な変動は認められなかった。また、被験物質投与群で自発運動量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った。

17.4 体重 (Fig. 1、Table 4、Appendix 4)

100 mg/kg 群で投与 3、7、14、21 及び 28 日目に有意な低値又は低値傾向（それぞれ対照群の 95.2%、95.4%、91.9%、93.6% 及び 93.8%）がみられた。20 mg/kg 群に有意な変動は認められなかった。

17.5 摂餌量 (Fig. 2、Table 5、Appendix 5)

100 mg/kg 群で投与 3 日目に有意な低値（対照群の 82.7%）がみられたが、それ以降は有意な変動は認められなかった。20 mg/kg 群に有意な変動は認められなかった。

17.6 尿検査 (Table 6、Appendix 6)

被験物質投与群で尿量及び尿浸透圧に有意な変動は認められなかった。他の検査項目では、100 mg/kg 群で尿の暗色化（褐色が 5 例中 1 例、暗褐色が 2 例、黒色が 2 例）にみられた。20 mg/kg 群及び対照群に異常は認められなかった。

17.7 血液検査

a) 血液学的検査 (Table 7、Appendix 7)

1 回、7 及び 14 日間投与群では被験物質投与群に有意な変動は認められなかった。

28 日間投与群において、100 mg/kg 群で赤血球数、ヘモグロビン濃度 (Hb) 、ヘマトクリット値 (Ht) 、平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC) 及びリンパ球比率の有意な低

値、平均赤血球容積（MCV）、網状赤血球数比率、白血球数及び単球比率の有意な高値がみられた。20 mg/kg 群に有意な変動は認められなかつた。

b) 血液生化学的検査 (Table 8、Appendix 8)

1回投与群において、100 mg/kg 群でクレアチニンの有意な低値がみられたが、その他の項目に有意な変動は認められなかつた。20 mg/kg 群に有意な変動は認められなかつた。

7日間投与群において、100 mg/kg 群でクレアチニン及び総ビリルビンの有意な低値がみられたが、その他の項目に有意な変動は認められなかつた。20 mg/kg 群では尿素窒素（BUN）の有意な低値がみられたが、用量依存性がないことから偶発的変動と考えた。

14 日間投与群において、100 mg/kg 群でアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）の有意な低値がみられ、20 mg/kg 群でも AST の有意な低値が認められたが、用量依存性に乏しいことから、被験物質投与に関連した変化ではないと考えた。なお、100 mg/kg 群ではクレアチニン及び総ビリルビンが異常値（マイナス値又はゼロ）を示した。

28 日間投与群において、100 mg/kg 群で BUN 及び総蛋白の有意な低値、A/G 比、無機リン、カリウム及び塩素の有意な高値がみられたほか、クレアチニンが異常値を示した。20 mg/kg 群ではクレアチニンの有意な低値がみられた。

なお、クレアチニン及び総ビリルビンについては、16.に記載のとおり、被験物質又はその代謝物が測定系に干渉したと考えられたため、評価から除外した。

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、100 mg/kg 群で背側葉前立腺の相対重量の有意な低値がみられた。20 mg/kg 群では下垂体の絶対重量の有意な高値、肝臓の相対重量の有意な低値がみられたが、ともに用量依存性がない変動であった。

7日間投与群において、100 mg/kg 群で脾臓の相対重量の有意な高値（対照群の 125.0%）が認められたほか、精巣の絶対及び相対重量の有意な低値がみられた。20 mg/kg 群では心臓及び下垂体の絶対重量の有意な高値、精巣及び脳の相対重量の有意な低値がみられた。

14 日間投与群では被験物質投与群に有意な変動は認められなかつた。

28 日間投与群において、100 mg/kg 群で脾臓の絶対及び相対重量の有意な高値（対照群の 447.0% 及び 469.0%）、腎臓の相対重量の有意な高値（対照群の 123.5%）及び肝臓の相対重量の高値傾向（対照群の 127.8%）がみられた。20 mg/kg 群に有意な変動は認められなかつた。

b) 剖 檢 (Table 11、Appendix 11)

1回投与群において、100 mg/kg 群で前胃の粘膜上黒色物が 4 例中 2 例に認められたほか、空腸の粘膜白色化及び腸間膜リンパ節の白色化が各 1 例にみられた。20 mg/kg 群及び対照群に異常は認められなかつた。

7日間投与群において、100 mg/kg 群で前胃の粘膜隆起部及び陥凹部が各 1 例に認められた。20 mg/kg 群及び対照群に異常は認められなかつた。

14 日間投与群において、前胃の粘膜隆起部、脾臓の黒色化及び腫大が各 1 例に認められたほか、右側腎臓の腎盂拡張が 1 例にみられた。20 mg/kg 群及び対照群に異常は認めら

れなかった。

28日間投与群において、100 mg/kg 群で脾臓の黒色化及び腫大が 5 例全例、門脈リンパ節の腫大が 4 例、肝臓の腫大が 3 例、両側腎臓の暗褐色化が 2 例、前胃の粘膜陥凹部及び両側腎臓の腫大が各 1 例に認められた。20 mg/kg 群及び対照群に異常は認められなかつた。

c) 病理組織学的検査 (Table 12、Appendix 11)

1回投与群において、100 mg/kg 群で腎臓の髓質外帯外層の近位尿細管の細胞質及び核変化（軽度～重度）並びに皮髓境界部の近位尿細管の単細胞壊死（軽度～中等度）が 4 例全例に認められたほか、前胃の境界縁の粘膜固有層の水腫及び細胞浸潤（軽度）並びに肝臓の核小体明瞭化及びグリコーゲン蓄積を伴う小葉周辺性肝細胞肥大（軽度）が各 3 例に認められた。また、肉眼的に空腸の粘膜白色化がみられた 1 例で空腸の絨毛上皮の空胞化（重度）が認められたほか、腺胃の噴門領域胃底腺部粘膜壊死（軽度）が 1 例にみられた。対照群では、腺胃の限局性幽門腺部粘膜壊死が 1 例にみられた。20 mg/kg 群に異常は認められなかつた。なお、肉眼的に腸間膜リンパ節の白色化がみられた 100 mg/kg 群の 1 例では異常は認められなかつた。

7日間投与群において、100 mg/kg 群で前胃の粘膜固有層の水腫及び細胞浸潤（軽度～中等度）並びに限局性扁平上皮過形成（重度）、肝臓の核小体明瞭化及びグリコーゲン蓄積を伴う小葉周辺性肝細胞肥大（軽度）が 4 例中各 2 例に認められたほか、前胃の潰瘍（軽度）及び腎臓の皮髓境界部の尿細管の再生（ごく軽度）が各 1 例に認められた。20 mg/kg 群及び対照群に異常は認められなかつた。

14日間投与群において、100 mg/kg 群で肝臓の小葉周辺性クッパー細胞褐色色素沈着（軽度）及び脾臓の赤脾髄の褐色色素沈着（軽度～中等度）が 4 例中各 3 例に認められたほか、脾臓のうつ血（軽度）が 2 例、前胃の限局性扁平上皮過形成（軽度）及び境界縁の扁平上皮過形成（軽度）が各 1 例に認められた。肉眼的に右側腎臓の腎盂拡張がみられた 1 例では組織学的にも腎盂拡張が確認された。また、対照群で肝臓の限局性肝細胞壊死が 1 例にみられた。20 mg/kg 群に異常は認められなかつた。

28日間投与群において、100 mg/kg 群で十二指腸の粘膜固有層の褐色色素沈着（軽度～中等度）、肝臓の小葉周辺性クッパー細胞褐色色素沈着（軽度～中等度）並びに核小体明瞭化及びグリコーゲン蓄積を伴う小葉周辺性肝細胞肥大（ごく軽度～軽度）、脾臓のうつ血（軽度～重度）及び赤脾髄の褐色色素沈着（重度）が 5 例全例、門脈リンパ節の褐色色素沈着が 4 例に認められたほか、前胃の境界縁の扁平上皮過形成（軽度）、腎臓の皮質の近位尿細管の褐色色素沈着（軽度）、骨髄の赤芽球系細胞過形成（軽度～中等度）及び脾臓の髓外造血亢進（中等度～重度）が各 4 例にみられた。また、前胃の粘膜固有層の水腫及び細胞浸潤、境界縁の粘膜固有層の水腫及び細胞浸潤、限局性扁平上皮過形成、潰瘍、腺胃の噴門領域胃底腺部粘膜壊死、腎臓の髓質外帯外層の近位尿細管の再生、門脈リンパ節の形質細胞增多症が各 1 例に認められた。20 mg/kg 群では十二指腸の粘膜固有層の褐色色素沈着（軽度）が 5 例全例に認められたほか、腎臓の皮質の瘢痕が 1 例にみられた。対照群に異常は認められなかつた。

なお、1回投与群の対照群及び 100 mg/kg 群の各 1 例について実施した肝臓の PAS 反

応及びオイル赤O染色による検査の結果、100 mg/kg群で小葉周辺性に肝細胞内にPAS陽性物質が認められたのに対し、オイル赤O染色では肝細胞内に赤色物質がほとんど認められなかつたことから、肝細胞内にグリコーゲンが蓄積していることが確認された。また、28日間投与群の対照群及び100 mg/kg群の各1例について実施した肝臓のPAS反応による検査の結果、対照群では肝細胞内にPAS陽性物質がほとんど認められなかつたのに対し、100 mg/kg群では小葉周辺性に肝細胞内にPAS陽性物質が認められたことから、肝細胞内にグリコーゲンが蓄積していることが確認された。さらに、28日間投与群の対照群及び100 mg/kg群の各1例について実施した脾臓のベルリン青染色による検査の結果、対照群では赤脾髄のマクロファージ内に青色物質がごく少量認められたのに対し、100 mg/kg群では赤脾髄のマクロファージ内に青色物質と褐色物質が多量に混在していたことから、脾臓にはヘモジデリンと他の褐色色素が沈着していることが判明した。同様に、28日間投与群の対照群及び100 mg/kg群の各1例について実施した肝臓、腎臓及び十二指腸のベルリン青染色による検査では、いずれの標本にも青色物質は認められず、これらの組織に沈着していた褐色色素はヘモジデリンではないことが判明した。

18. 考 察

被験物質は写真現像薬として使用されており、ラットを用いた 13 週間強制経口投与毒性試験において、200 mg/kg/day で投与 1 週目から、100 mg/kg/day で投与 10 週目に死亡がみられ、50 mg/kg/day 以上で体重増加抑制がみられたと報告されている（NTP, 1992）。また、12 mg/kg/day 以上で前胃の棘細胞増生及び過角化症、25 mg/kg/day 以上で前胃の過形成及び海綿状化（細胞間水腫）並びに腎臓の尿細管壊死、50 mg/kg/day 以上で前胃の潰瘍がみられたほか、100 mg/kg/day 以上で肝臓のヘモジデリン沈着、骨髄の過形成及び脾臓の髓外造血亢進がみられ、被験物質の溶血作用が示唆されている。なお、12 mg/kg/day 以上で十二指腸の色素沈着、50 mg/kg/day 以上で腎臓の尿細管の色素沈着がみられたが、これらは被験物質由来と考えられている。本試験においても被験物質投与により、血液、造血器、腎臓及び消化管への毒性影響が認められたほか、肝臓への影響もみられた。

血液に対する影響として、100 mg/kg 群において、28 日間投与後に赤血球数、Hb、Ht 及び MCHC の低値又は低値傾向、並びに MCV の高値がみられ、大球性貧血が生じていると考えられた。貧血の発現機序としては、総ビリルビンの変動が評価できなかったものの、14 日間投与後から脾臓の黒色化、うつ血及びヘモジデリンを含む赤脾髄の褐色色素沈着、28 日間投与後にカリウムの高値がみられたことから、脾臓での溶血が亢進したものと考えた。これに対し、100 mg/kg 群において、28 日間投与後に網状赤血球数比率の高値、骨髄の赤芽球系細胞過形成及び脾臓の髓外造血亢進がみられ、反応性の造血が認められた。7 日間投与後からみられた脾臓重量の高値及び 14 日間投与後からみられた脾臓の腫大は、うつ血及び髓外造血亢進を反映した変化と考えられた。

腎臓に対する影響として、100 mg/kg 群において 28 日間投与後に相対重量の高値及び肉眼的腫大がみられた。病理組織学的検査では、1 回投与後に腎臓の髓質外帯外層の近位尿細管の細胞質及び核変化並びに皮髄境界部の近位尿細管の単細胞壊死がみられたが、7 日間投与後にはこれらの変化は消失して皮髄境界部の尿細管の再生がみられ、28 日間投与後には髓質外帯外層の近位尿細管の再生が認められた。なお、血液生化学的検査では、BUN やクレアチニンの高値は確認できなかつたが、投与初期に尿細管上皮が傷害され、急速に修復されたと推察した。被験物質の代謝経路は不明であるが、ラットでのアニリンの代謝物である *p*-アミノフェノールは髓質外帯外層にある近位尿細管の S₃ 領域に障害を起こすとされており（杉本, 2009）、本試験においても同様の現象が生じた可能性があると考えた。

消化管に対する影響として、100 mg/kg 群において、投与期間中に軟便が観察され、剖検では、7 及び 14 日間投与後に前胃の粘膜隆起部、7 及び 28 日間投与後に前胃の粘膜陥凹部がみられた。病理組織学的検査では、100 mg/kg 群において、1 回及び 28 日間投与後に前胃の境界縁の粘膜固有層の水腫及び細胞浸潤、腺胃の噴門領域胃底腺部粘膜壊死、7 及び 28 日間投与後に前胃の粘膜固有層の水腫及び細胞浸潤、潰瘍、7 日間投与後から前胃の限局性扁平上皮過形成、14 日間投与後から前胃の境界縁の扁平上皮過形成が認められた。これらの所見から、被験物質は胃粘膜に対する刺激性を有し、投与期間中に 20 及び 100 mg/kg 群で観察された流涎もこれに関連した症状と考えた。100 mg/kg 群で 28 日間投与後にみられた白血球数及び単球比率の高値は、胃粘膜の傷害に対する炎症反応と考えた。同様に、門脈リンパ節の腫大及び形質細胞增多症は、胃の病変に対する炎症性変化が付近のリンパ節に波及した

ものと考えた。また、1回投与後に 100 mg/kg 群でみられた空腸の粘膜白色化及び絨毛上皮の空胞化並びに腸間膜リンパ節の白色化は、消化管粘膜への刺激性により一時的に胃腸の運動が低下し、消化及び吸収が停滞したことを示す所見と考えた。

肝臓に対する影響として、100 mg/kg 群において、1回、7 及び 28 日間投与後に核小体明瞭化及びグリコーゲン蓄積を伴う小葉周辺性肝細胞肥大、28 日間投与後に相対重量の高値及び肉眼的腫大が認められた。なお、血液生化学的検査では、肝障害を示唆する変化は認められなかった。

被験物質投与によるその他の影響として、投与期間中に 20 及び 100 mg/kg 群で暗緑色尿及び毛の汚れが観察され、20 mg/kg 群で 28 日間投与後に十二指腸の粘膜固有層の褐色色素沈着、100 mg/kg 群で 14 日間投与後から肝臓の小葉周辺性クッパー細胞褐色色素沈着及び脾臓の赤脾髄の褐色色素沈着、28 日間投与後に尿の暗色化（褐色～黒色）、腎臓の暗褐色化及び皮質の近位尿細管の褐色色素沈着、十二指腸の粘膜固有層の褐色色素沈着、門脈リンパ節の腫大及び褐色色素沈着が認められた。各組織に沈着していた褐色色素は、脾臓ではヘモジデリンが含まれていたものの、その他の組織においてはヘモジデリンではないことが確認されたことから、被験物質又はその代謝物が組織に沈着又は尿中に排泄されて暗色を呈したと考えた。

投与期間中に 100 mg/kg 群でみられた自発運動低下、鼻及び口周囲の汚れ、呼吸数減少及び半眼、体重の低値、摂餌量の一過性の低値は、血液、腎臓及び消化管に対する毒性影響を反映したものと考えた。

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、1 例のみでの発現であること、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血液、造血器、腎臓及び消化管への毒性影響が認められたほか、肝臓への影響もみられた。その他の消化器系、呼吸器系、心・血管系、生殖器系、神経系、内分泌系、感覚器、筋・骨格系、乳腺への影響は検出されなかった。

19. 参考文献

- NTP (1992) Toxicology and carcinogenesis studies of 2,4-diaminophenol dihydrochloride (CAS No. 137-09-7) in F344/N rats and B6C3F₁ mice (gavage studies). NTP TR 401.
 杉本哲朗 (2009) 6.14 腎毒性 In 「新版トキシコロジー」（日本トキシコロジー学会教育委員会編），朝倉書店，東京, p. 293-303.

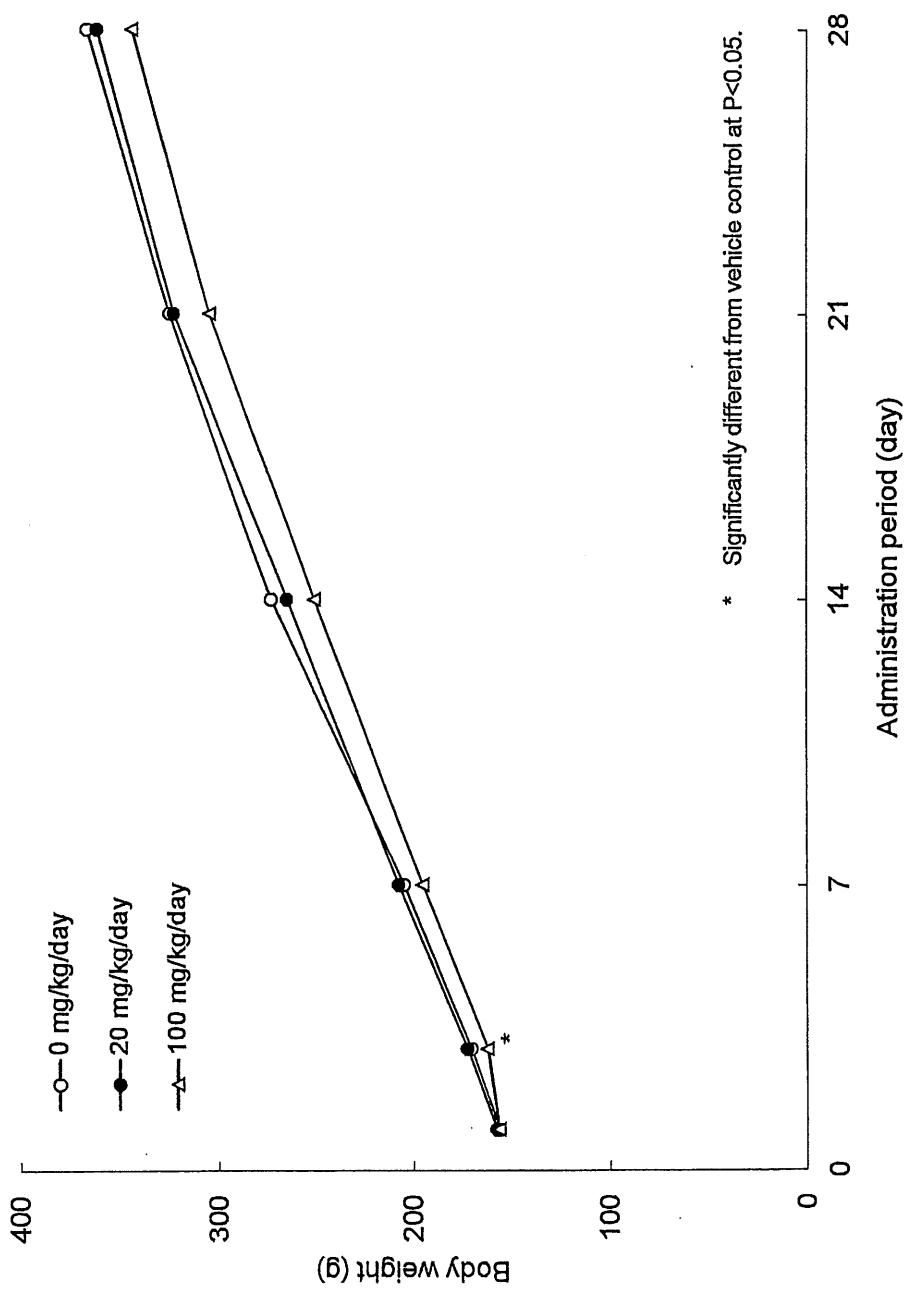


Fig. 1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Body weights: Male

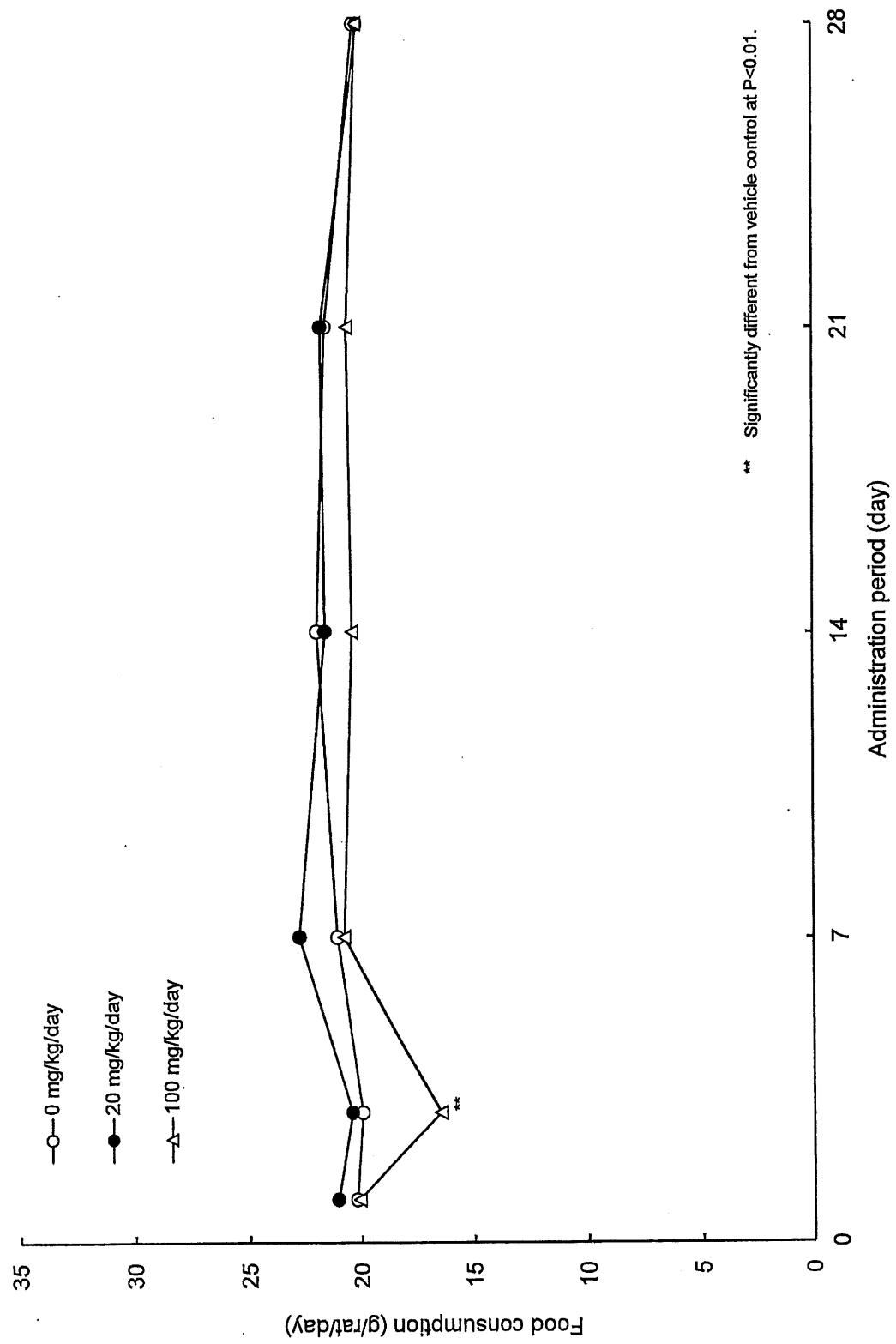


Fig. 2 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Food consumption: Male

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	20	100
Male		ss 17 ^{a)}	ss 17	ss 17	
	No abnormalities detected	17	6	4	
	Salivation		10	13	
	Dark green urine		4	13	
	Decreased spontaneous locomotion		1	13	
	Incomplete eyelid opening			2	
	Soft stool			1	
	Staining around nose and mouth			4	
	Decreased respiratory rate			2	

ss, scheduled sacrifice 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 observations	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
	Lacrimation	-	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 convolution (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	Tall 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 1 week		
	0	20	100	0	20	100
Number of animals	5	5	5	5	5	5
-2	0	0	0	0	0	0
-1	0	0	0	0	0	0
Ease of removal	0	2	4	5	5	5
Removal from cage	+1	3	1	0	0	0
+2	0	0	0	0	0	0
Vocalization	0	3	1	4	3	5
+1	2	4	1	2	2	0
+2	0	0	0	0	0	0
Muscle tone	-1	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
+	0	0	0	0	0	0
Piloerection	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Staining hair	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Unkempt hair	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Paleness	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Handling observation	Reddening	-	5	5	5	5
	+	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
0	5	5	5	5	5	5
+1	0	0	0	0	0	0
Salivation	-	5	5	5	5	4
+	0	0	0	0	0	1
Secretion	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Posture	0	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
-1	0	0	0	0	0	1
0	5	5	5	4	5	3
+1	0	0	0	1	0	1
+2	0	0	0	0	0	0
Respiration	0	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
+	0	0	0	0	0	0
Gait	-	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
Observation in arena	Tremor/ twitch/ convulsion	0	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
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
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)}	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4	0.4 ± 0.5	0.4 ± 0.9	0.8 ± 0.8	0.4 ± 0.5
Urination ^{a)}	2.6 ± 3.8	1.8 ± 2.5	3.6 ± 3.5	2.2 ± 4.9	2.2 ± 2.9	3.0 ± 1.7

a): (count/min)

*: 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 2 week			Dosing 3 week		
		0	20	100	0	20	100
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	-2	0	0	0	0	0	0
	-1	1	0	3	4	2	3
Removal from cage	0	4	4	2	1	2	1
	+1	0	1	0	0	1	1
	+2	0	0	0	0	0	0
		0	4	2	5	4	5
	Vocalization	+1	1	3	0	1	0
	+2	0	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	0	0	0
	Muscle tone	0	5	5	5	5	5
	+1	0	0	0	0	0	0
	Subnormal temperature	-	5	5	5	5	5
	+*	0	0	0	0	0	0
Handling observation	Piloerection	-	5	5	5	5	5
	+*	0	0	0	0	0	0
	Staining hair	-	5	5	5	4	0
	+	0	0	0	0	1	5
	Unkempt hair	-	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
	Paleness	-	5	5	5	5	5
	+	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
Observation in arena	+	0	0	0	0	0	0
	Pupillary size	-1	0	0	0	0	0
	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	0	0	1
	0	5	5	5	5	5	4
	+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
	+	0	0	0	0	0	0
	Gait	S	0	0	0	0	0
	T	0	0	0	0	0	0
Abnormal behavior	P	0	0	0	0	0	0
	GD	0	0	0	0	0	0
	Tremor/ twitch/ convulsion	0	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
	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
		-	5	5	5	5	5
		S	0	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	0	0
Defecation ^{a)}	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
		0.6 ± 0.9	0.8 ± 1.1	0.6 ± 0.5	0.6 ± 1.3	1.0 ± 1.0	0.4 ± 0.9
		0.4 ± 0.5	0.6 ± 1.3	1.0 ± 1.0	0.4 ± 0.5	0.4 ± 0.9	0.6 ± 0.5

a): (count/min)

*: 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 4 week		
Dose (mg/kg/day)	0	20	100
Number of animals	5	5	5
-2	0	0	0
-1	0	0	0
Ease of removal	0	5	5
Removal from cage	+1	0	0
+2	0	0	0
Vocalization	0	3	3
+1	2	2	0
+2	0	0	0
Muscle tone	-1	0	0
0	5	5	5
+1	0	0	0
Subnormal temperature	-	5	5
+	0	0	0
Piloerection	-	5	5
+	0	0	0
Staining hair	-	5	5
+	0	0	1
Unkempt hair	-	5	5
+	0	0	0
Paleness	-	5	5
+	0	0	0
Handling observation	Reddening	-	5
	+	0	0
Cyanosis	-	5	5
+	0	0	0
Lacrimation	-	5	5
+	0	0	0
Exophthalmos	-	5	5
+	0	0	0
Pupillary size	-1	0	0
0	5	5	5
+1	0	0	0
Salivation	-	5	4
+	0	1	2
Secretion	-	5	5
+	0	0	0
Posture	0	5	5
+1	0	0	0
+2	0	0	0
Motor activity	-2	0	0
-1	0	0	0
0	4	5	5
+1	1	0	0
+2	0	0	0
Respiration	0	5	5
+1	0	0	0
+2	0	0	0
+3	0	0	0
Lid closure	-	5	5
+	0	0	0
Gait	-	5	5
S	0	0	0
T	0	0	0
P	0	0	0
GD	0	0	0
Observation in arena	0	5	5
Tremor/ twitch/ convulsion	+1	0	0
+2	0	0	0
+3	0	0	0
Stereotypic behavior	-	5	5
C	0	0	0
G	0	0	0
S	0	0	0
H	0	0	0
Abnormal behavior	-	5	5
S	0	0	0
B	0	0	0
C	0	0	0
R	0	0	0
W	0	0	0
V	0	0	0
ST	0	0	0
T	0	0	0
Defecation ^{a)}	0.0 ± 0.0	1.0 ± 1.4	0.0 ± 0.0
Urination ^{a)}	0.0 ± 0.0	0.8 ± 1.3	0.2 ± 0.4

a): (count/min)

*: 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 4 week		
	Dose (mg/kg/day)	0	20	100
	Number of animals	5	5	5
Sensorimotor function	Approach contact/touch response	-1 0 +1	0 5 0	0 5 0
	Pinna response	-1 0 +1	0 5 0	0 5 0
	Pain response (tail pinch)	-1 0 +1	0 5 0	0 5 0
	Pupillary reflex	+	5	5
	Air righting reflex	- +	0 5	0 5
Grip strength	Forelimb (g)	343 ± 76	390 ± 95	310 ± 57
	Hindlimb (g)	485 ± 76	439 ± 58	382 ± 44 *
Motor activity [Interval]	0-10 (min)	125 ± 73	154 ± 106	139 ± 58
	10-20 (min)	135 ± 29	90 ± 52	131 ± 35
	20-30 (min)	68 ± 30	85 ± 29	56 ± 21
	30-40 (min)	50 ± 31	69 ± 49	41 ± 28
	40-50 (min)	53 ± 51	42 ± 27	17 ± 23
	50-60 (min)	29 ± 32	62 ± 39	22 ± 16
	Total	459 ± 154	502 ± 175	407 ± 53

*: significantly different from vehicle control at p<0.05, **: significantly different from vehicle control at p<0.01

Scoring scale for sensorimotor function

Sensorimotor function	Approach contact/touch response	-1 0 +1	No reaction Normal Hyper reaction
	Pinna response	-1 0 +1	No reaction Normal Hyper reaction
	Pain response (tail pinch)	-1 0 +1	No reaction Normal Hyper reaction
	Pupillary reflex	+	Normal Abnormal reaction
	Air righting reflex	+	Normal Abnormal reaction

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

	Dose (mg/kg/day)	0	20	100
Administration period (day)	1	156.59 ±7.75 (17)	158.19 ±5.92 (17)	157.05 ±5.31 (17)
	3	171.11 ±8.76 (13)	173.18 ±8.40 (13)	162.89 * ±7.67 (13)
	7	204.87 ±15.90 (13)	207.79 ±11.14 (13)	195.49 ±10.48 (13)
	14	273.44 ±25.18 (9)	265.49 ±16.70 (9)	251.24 ±20.97 (9)
	21	325.66 ±33.36 (5)	323.26 ±24.66 (5)	304.90 ±36.49 (5)
	28	367.92 ±40.18 (5)	362.76 ±27.23 (5)	345.06 ±40.73 (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 5

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

B10-0125

	Dose (mg/kg/day)	0	20	100
Administration period (day)	1	20.22 ± 3.27 (13)	21.09 ± 1.68 (13)	20.09 ± 1.70 (13)
	3	19.95 ± 2.03 (13)	20.42 ± 1.91 (13)	16.50 ** ± 2.08 (13)
	7	21.10 ± 2.66 (13)	22.76 ± 2.05 (13)	20.77 ± 1.84 (13)
	14	21.96 ± 3.12 (9)	21.61 ± 2.32 (9)	20.40 ± 2.49 (9)
	21	21.61 ± 2.62 (5)	21.80 ± 2.69 (5)	20.65 ± 2.64 (5)
	28	20.37 ± 3.15 (5)	20.17 ± 2.22 (5)	20.23 ± 2.71 (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	20	100
Urine volume (mL)		4.4 ±1.7 (5)	5.2 ±3.1 (5)	7.4 ±4.2 (5)
Uosm (mOsm/L)		1475.4 ±485.6 (5)	1621.4 ±944.1 (5)	1275.4 ±852.5 (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 6-2 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of urinalyses: Male

B10-0125

Items	Group	Twenty-eight-day treatment			
		Dose (mg/kg/day)	0	20	100
	No. of animals		5	5	5
Color					
	Y	4	2	0	
	YB	1	3	0	
	B	0	0	1	
	DB	0	0	2	
	BL	0	0	2	
Turbidity					
	Clear	5	5	5	
pH					
	6.0	4	4	5	
	6.5	1	1	0	
Protein					
	±	0	2	2	
	1+	4	1	1	
	2+	1	2	0	
Glucose					
	-	5	5	5	
Ketones					
	-	1	1	0	
	±	4	3	1	
	1+	0	1	2	
Occult blood					
	-	5	3	5	
	±	0	2	0	

Color: Y:Yellow,YB:Yellow-brown,B:Brown,DB:Dark brown, BL:Black.

Table 6-3 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of urinalyses: Male B10-0125

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

^{a)}: Number of cells/10views($\times 400$).

^{b)}: Number of casts/ $18 \times 18 \text{ mm}^2$.

^{c)}: Incidence of crystals/ $18 \times 18 \text{ mm}^2$.

---:Not examined.

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	20	100
RBC	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	687.0 ± 41.5 (4)	706.3 ± 42.1 (4)	709.5 ± 33.5 (4)
Hb	(g/dL)	14.80 ± 0.75 (4)	15.25 ± 1.11 (4)	15.23 ± 0.88 (4)
Ht	(%)	48.98 ± 2.22 (4)	50.00 ± 3.73 (4)	50.40 ± 2.55 (4)
MCV	(fL)	71.33 ± 1.89 (4)	70.75 ± 2.44 (4)	71.03 ± 2.13 (4)
MCH	(pg)	21.53 ± 0.72 (4)	21.60 ± 0.51 (4)	21.48 ± 0.73 (4)
MCHC	(g/dL)	30.18 ± 0.22 (4)	30.55 ± 0.41 (4)	30.25 ± 0.25 (4)
Platelet	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	142.03 ± 25.85 (4)	119.98 ± 12.70 (4)	133.75 ± 19.27 (4)
Reticulo	(%)	9.63 ± 0.64 (4)	10.40 ± 0.70 (4)	10.40 ± 0.28 (4)
WBC	($\times 10^2/\mu\text{L}$)	92.65 ± 12.51 (4)	76.43 ± 21.45 (4)	83.58 ± 12.43 (4)
Differentiation of leukocyte				
Neutro	(%)	15.80 ± 8.82 (4)	13.13 ± 1.72 (4)	15.80 ± 8.88 (4)
Lymph	(%)	78.98 ± 10.95 (4)	82.05 ± 2.29 (4)	79.08 ± 8.16 (4)
Eosino	(%)	0.48 ± 0.21 (4)	0.55 ± 0.26 (4)	0.63 ± 0.15 (4)
Baso	(%)	0.85 ± 0.13 (4)	0.88 ± 0.10 (4)	0.75 ± 0.31 (4)
Mono	(%)	3.30 ± 1.81 (4)	2.50 ± 0.76 (4)	3.10 ± 0.50 (4)
LUC	(%)	0.60 ± 0.22 (4)	0.88 ± 0.13 (4)	0.68 ± 0.22 (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	20	100
RBC	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	716.0 ± 19.6 (4)	735.8 ± 44.9 (4)	680.3 ± 25.9 (4)
Hb	(g/dL)	14.90 ± 0.47 (4)	15.48 ± 1.21 (4)	13.88 ± 0.68 (4)
Ht	(%)	48.50 ± 2.07 (4)	50.73 ± 4.49 (4)	45.83 ± 2.54 (4)
MCV	(fL)	67.70 ± 1.57 (4)	68.83 ± 2.06 (4)	67.33 ± 1.90 (4)
MCH	(pg)	20.83 ± 0.13 (4)	21.00 ± 0.39 (4)	20.35 ± 0.53 (4)
MCHC	(g/dL)	30.80 ± 0.58 (4)	30.55 ± 0.48 (4)	30.25 ± 0.29 (4)
Platelet	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	138.48 ± 7.98 (4)	115.85 ± 19.45 (4)	112.35 ± 14.79 (4)
Reticulo	(%)	6.90 ± 0.58 (4)	7.63 ± 0.95 (4)	8.43 ± 1.21 (4)
WBC	($\times 10^2/\mu\text{L}$)	82.48 ± 19.93 (4)	123.50 ± 41.19 (4)	146.20 ± 58.47 (4)
Differentiation of leukocyte				
Neutro	(%)	11.90 ± 5.61 (4)	14.50 ± 4.29 (4)	15.05 ± 2.64 (4)
Lymph	(%)	83.58 ± 5.84 (4)	79.40 ± 3.38 (4)	79.80 ± 3.78 (4)
Eosino	(%)	0.63 ± 0.17 (4)	0.65 ± 0.19 (4)	0.38 ± 0.10 (4)
Baso	(%)	0.83 ± 0.30 (4)	1.18 ± 0.34 (4)	0.88 ± 0.05 (4)
Mono	(%)	2.40 ± 0.51 (4)	3.38 ± 0.63 (4)	3.15 ± 1.21 (4)
LUC	(%)	0.70 ± 0.08 (4)	0.83 ± 0.15 (4)	0.78 ± 0.10 (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	20	100
RBC	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	782.0 ± 95.4 (4)	734.5 ± 23.2 (4)	701.0 ± 60.6 (4)
Hb	(g/dL)	16.05 ± 1.53 (4)	14.68 ± 0.54 (4)	14.40 ± 1.20 (4)
Ht	(%)	53.43 ± 6.05 (4)	48.65 ± 1.82 (4)	47.80 ± 3.88 (4)
MCV	(fL)	68.43 ± 1.87 (4)	66.25 ± 3.88 (4)	68.23 ± 2.17 (4)
MCH	(pg)	20.58 ± 0.77 (4)	19.95 ± 1.08 (4)	20.55 ± 0.37 (4)
MCHC	(g/dL)	30.05 ± 0.48 (4)	30.13 ± 0.17 (4)	30.10 ± 0.62 (4)
Platelet	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	128.68 ± 28.76 (4)	121.00 ± 14.19 (4)	122.33 ± 13.91 (4)
Reticulo	(%)	5.65 ± 0.54 (4)	5.18 ± 0.42 (4)	7.60 ± 3.14 (4)
WBC	($\times 10^2/\mu\text{L}$)	152.10 ± 35.02 (4)	111.98 ± 10.20 (4)	122.30 ± 17.10 (4)
Differentiation of leukocyte				
Neutro	(%)	14.93 ± 1.06 (4)	18.50 ± 2.52 (4)	16.85 ± 7.14 (4)
Lymph	(%)	80.10 ± 1.86 (4)	77.25 ± 2.80 (4)	77.80 ± 7.93 (4)
Eosino	(%)	0.33 ± 0.05 (4)	0.48 ± 0.15 (4)	0.43 ± 0.21 (4)
Baso	(%)	1.30 ± 0.50 (4)	0.73 ± 0.10 (4)	0.95 ± 0.40 (4)
Mono	(%)	2.50 ± 0.64 (4)	2.30 ± 0.73 (4)	2.98 ± 0.97 (4)
LUC	(%)	0.88 ± 0.28 (4)	0.70 ± 0.08 (4)	1.03 ± 0.25 (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	20	100
RBC	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	797.0 ± 27.9 (5)	815.4 ± 24.0 (5)	529.2 * ± 126.4 (5)
Hb	(g/dL)	15.44 ± 0.34 (5)	15.66 ± 0.35 (5)	12.08 * ± 1.50 (5)
Ht	(%)	50.90 ± 0.98 (5)	51.52 ± 1.77 (5)	42.42 * ± 4.05 (5)
MCV	(fL)	63.92 ± 1.62 (5)	63.18 ± 1.47 (5)	82.16 * ± 11.65 (5)
MCH	(pg)	19.40 ± 0.57 (5)	19.18 ± 0.33 (5)	23.30 ± 2.43 (5)
MCHC	(g/dL)	30.34 ± 0.21 (5)	30.36 ± 0.40 (5)	28.50 * ± 1.27 (5)
Platelet	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	106.48 ± 14.61 (5)	115.28 ± 15.11 (5)	104.02 ± 19.59 (5)
Reticulo	(%)	2.80 ± 0.37 (5)	2.78 ± 0.29 (5)	23.62 * ± 13.10 (5)
WBC	($\times 10^2/\mu\text{L}$)	137.64 ± 20.76 (5)	116.62 ± 30.37 (5)	188.40 * ± 29.53 (5)
Differentiation of leukocyte				
Neutro	(%)	14.56 ± 1.48 (5)	16.16 ± 4.24 (5)	24.12 ± 6.91 (5)
Lymph	(%)	80.40 ± 2.20 (5)	79.50 ± 4.09 (5)	69.82 ** ± 6.85 (5)
Eosino	(%)	0.54 ± 0.13 (5)	0.62 ± 0.15 (5)	0.42 ± 0.11 (5)
Baso	(%)	1.04 ± 0.11 (5)	1.00 ± 0.20 (5)	0.80 ± 0.21 (5)
Mono	(%)	2.38 ± 0.42 (5)	1.92 ± 0.79 (5)	3.54 * ± 0.87 (5)
LUC	(%)	1.06 ± 0.47 (5)	0.74 ± 0.11 (5)	1.30 ± 0.48 (5)
PT	(sec)	16.04 ± 2.02 (5)	19.34 ± 3.39 (5)	16.56 ± 2.23 (5)
APTT	(sec)	16.22 ± 2.80 (5)	15.98 ± 5.29 (5)	17.74 ± 5.01 (5)

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	20	100
AST	(IU/L)	93.3 ±14.7 (4)	91.3 ±6.6 (4)	94.3 ±12.7 (4)
ALT	(IU/L)	41.3 ±7.3 (4)	33.8 ±3.2 (4)	42.8 ±14.1 (4)
ALP	(IU/L)	1116.3 ±92.8 (4)	1285.3 ±118.8 (4)	1313.3 ±222.3 (4)
BUN	(mg/dL)	11.80 ±2.27 (4)	9.88 ±1.54 (4)	10.53 ±2.22 (4)
Creatinine	(mg/dL)	0.150 ±0.018 (4)	0.140 ±0.014 (4)	0.080 ** ±0.008 (4)
T-Bil	(mg/dL)	0.060 ±0.014 (4)	0.060 ±0.008 (4)	0.048 ±0.017 (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	20	100
AST	(IU/L)	79.0 ±5.0 (4)	85.5 ±6.6 (4)	79.3 ±4.8 (4)
ALT	(IU/L)	29.0 ±2.2 (4)	31.8 ±4.8 (4)	29.8 ±2.4 (4)
ALP	(IU/L)	947.0 ±127.6 (4)	1073.8 ±202.6 (4)	889.3 ±164.6 (4)
BUN	(mg/dL)	9.95 ±1.45 (4)	7.85 * ±0.67 (4)	9.05 ±1.13 (4)
Creatinine	(mg/dL)	0.180 ±0.000 (4)	0.133 ±0.010 (4)	0.055 ** ±0.013 (4)
T-Bil	(mg/dL)	0.058 ±0.010 (4)	0.058 ±0.010 (4)	0.020 ** ±0.014 (2)

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	20	100
AST	(IU/L)	84.0 ±7.7 (4)	67.5 ** ±5.8 (4)	70.0 * ±3.3 (4)
ALT	(IU/L)	29.3 ±5.4 (4)	24.8 ±1.7 (4)	22.8 ±3.6 (4)
ALP	(IU/L)	908.3 ±151.4 (4)	750.3 ±99.4 (4)	772.3 ±91.7 (4)
BUN	(mg/dL)	8.73 ±2.43 (4)	7.18 ±2.93 (4)	6.28 ±2.25 (4)
Creatinine	(mg/dL)	0.188 ±0.005 (4)	0.173 ±0.019 (4)	--- a) --- (0)
T-Bil	(mg/dL)	0.058 ±0.010 (4)	0.045 ±0.013 (4)	--- a) --- (0)

Values are shown as Mean ± S.D..

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

a): Not detected.

* 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	20	100
AST	(IU/L)	64.6 ±5.1 (5)	60.0 ±3.1 (5)	60.6 ±2.3 (5)
ALT	(IU/L)	22.0 ±4.0 (5)	20.6 ±3.8 (5)	19.4 ±3.8 (5)
ALP	(IU/L)	658.4 ±159.2 (5)	639.4 ±176.2 (5)	437.6 ±83.4 (5)
ChE	(IU/L)	59.0 ±10.8 (5)	49.6 ±19.6 (5)	54.4 ±5.5 (5)
γ-GTP	(IU/L)	0.84 ±0.29 (5)	0.76 ±0.35 (5)	1.18 ±0.19 (5)
T-Cho	(mg/dL)	60.2 ±11.8 (5)	58.0 ±13.7 (5)	62.6 ±13.7 (5)
TG	(mg/dL)	91.4 ±21.9 (5)	92.2 ±30.2 (5)	101.4 ±38.8 (5)
BUN	(mg/dL)	9.64 ±0.97 (5)	8.18 ±1.37 (5)	7.24 ** ±0.76 (5)
Creatinine	(mg/dL)	0.242 ±0.019 (5)	0.164 ** ±0.021 (5)	— ^{a)} — (0)
T-Protein	(g/dL)	6.14 ±0.26 (5)	6.10 ±0.12 (5)	5.58 ** ±0.27 (5)
Albumin	(g/dL)	2.94 ±0.23 (5)	2.90 ±0.07 (5)	2.90 ±0.12 (5)
A/G ratio	(-)	0.920 ±0.067 (5)	0.910 ±0.047 (5)	1.084 ** ±0.059 (5)
Glucose	(mg/dL)	198.8 ±12.7 (5)	202.8 ±19.9 (5)	204.4 ±33.0 (5)
T-Bil	(mg/dL)	0.046 ±0.011 (5)	0.034 ±0.011 (5)	0.105 ±0.047 (4)
TBA	(μmol/L)	33.10 ±27.26 (5)	24.08 ±9.76 (5)	22.94 ±15.66 (5)
IP	(mg/dL)	12.62 ±0.76 (5)	12.42 ±0.26 (5)	15.28 * ±1.28 (5)
Ca	(mg/dL)	12.36 ±0.11 (5)	12.46 ±0.33 (5)	11.96 ±0.39 (5)
Na	(mEq/L)	149.4 ±0.5 (5)	148.8 ±1.1 (5)	147.4 ±2.1 (5)
K	(mEq/L)	6.96 ±0.51 (5)	7.10 ±0.44 (5)	8.50 ** ±0.71 (5)
Cl	(mEq/L)	101.22 ±1.52 (5)	102.04 ±1.81 (5)	104.62 ** ±1.32 (5)

Values are shown as Mean ± S.D..

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

a): Not detected.

* 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	20	100
Liver	(g)	4.963 ±0.320 (4)	4.645 ±0.376 (4)	5.248 ±0.229 (4)
Heart	(g)	0.640 ±0.083 (4)	0.683 ±0.054 (4)	0.688 ±0.033 (4)
Kidney(R)	(g)	0.713 ±0.084 (4)	0.758 ±0.078 (4)	0.758 ±0.038 (4)
Kidney(L)	(g)	0.685 ±0.056 (4)	0.740 ±0.096 (4)	0.748 ±0.050 (4)
Kidneys	(g)	1.398 ±0.135 (4)	1.498 ±0.174 (4)	1.505 ±0.087 (4)
Testis(R)	(g)	0.713 ±0.064 (4)	0.818 ±0.089 (4)	0.738 ±0.110 (4)
Testis(L)	(g)	0.690 ±0.047 (4)	0.820 ±0.080 (4)	0.725 ±0.095 (4)
Testes	(g)	1.403 ±0.110 (4)	1.638 ±0.167 (4)	1.463 ±0.205 (4)
Epididymis(R)	(g)	0.090 ±0.012 (4)	0.098 ±0.024 (4)	0.085 ±0.013 (4)
Epididymis(L)	(g)	0.093 ±0.010 (4)	0.090 ±0.014 (4)	0.083 ±0.013 (4)
Epididymides	(g)	0.183 ±0.021 (4)	0.188 ±0.038 (4)	0.168 ±0.025 (4)
Ventral prostate	(g)	0.090 ±0.014 (4)	0.098 ±0.019 (4)	0.070 ±0.014 (4)
Dorsolateral prostate	(g)	0.075 ±0.010 (4)	0.068 ±0.010 (4)	0.065 ±0.010 (4)
Brain	(g)	1.748 ±0.039 (4)	1.803 ±0.024 (4)	1.763 ±0.029 (4)
Spleen	(g)	0.428 ±0.069 (4)	0.440 ±0.110 (4)	0.418 ±0.097 (4)
Thymus	(mg)	514.70 ±52.76 (4)	505.20 ±93.16 (4)	487.63 ±61.76 (4)
Pituitary gland	(mg)	5.38 ±0.32 (4)	6.03 * ±0.26 (4)	5.65 ±0.42 (4)
Thyroid	(mg)	10.93 ±1.24 (4)	10.63 ±0.99 (4)	12.08 ±1.10 (4)
Adrenals	(mg)	30.18 ±3.94 (4)	30.83 ±4.21 (4)	34.05 ±2.32 (4)
Final body weight	(g)	134.38 ±7.18 (4)	137.68 ±5.84 (4)	142.38 ±3.84 (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	20	100
Liver	(g)	6.068 ±0.288 (4)	6.583 ±0.577 (4)	6.558 ±0.469 (4)
Heart	(g)	0.750 ±0.028 (4)	0.830 ** ±0.026 (4)	0.760 ±0.028 (4)
Kidney(R)	(g)	0.818 ±0.038 (4)	0.935 * ±0.086 (4)	0.880 ±0.047 (4)
Kidney(L)	(g)	0.800 ±0.028 (4)	0.873 ±0.093 (4)	0.873 ±0.051 (4)
Kidneys	(g)	1.618 ±0.051 (4)	1.808 ±0.179 (4)	1.753 ±0.095 (4)
Testis(R)	(g)	1.028 ±0.040 (4)	0.935 * ±0.059 (4)	0.910 * ±0.045 (4)
Testis(L)	(g)	1.015 ±0.042 (4)	0.958 ±0.056 (4)	0.905 * ±0.035 (4)
Testes	(g)	2.043 ±0.080 (4)	1.893 ±0.115 (4)	1.815 * ±0.075 (4)
Epididymis(R)	(g)	0.130 ±0.012 (4)	0.138 ±0.013 (4)	0.118 ±0.026 (4)
Epididymis(L)	(g)	0.133 ±0.013 (4)	0.140 ±0.024 (4)	0.118 ±0.026 (4)
Epididymides	(g)	0.263 ±0.022 (4)	0.278 ±0.035 (4)	0.235 ±0.053 (4)
Ventral prostate	(g)	0.133 ±0.026 (4)	0.133 ±0.005 (4)	0.105 ±0.034 (4)
Dorsolateral prostate	(g)	0.120 ±0.033 (4)	0.110 ±0.020 (4)	0.100 ±0.036 (4)
Brain	(g)	1.883 ±0.142 (4)	1.770 ±0.036 (4)	1.823 ±0.070 (4)
Spleen	(g)	0.420 ±0.038 (4)	0.483 ±0.085 (4)	0.543 ±0.074 (4)
Thymus	(mg)	524.55 ±52.29 (4)	531.25 ±80.62 (4)	530.68 ±42.56 (4)
Pituitary gland	(mg)	6.03 ±0.67 (4)	6.85 * ±0.31 (4)	6.58 ±0.22 (4)
Thyroid	(mg)	16.50 ±5.21 (4)	13.10 ±2.16 (4)	11.95 ±1.47 (4)
Adrenals	(mg)	32.38 ±2.40 (4)	32.08 ±3.40 (4)	36.93 ±4.26 (4)
Final body weight	(g)	170.80 ±6.20 (4)	182.73 ±9.21 (4)	174.90 ±6.16 (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	20	100
Liver	(g)	8.823 ±1.269 (4)	8.098 ±0.682 (4)	8.390 ±0.553 (4)
Heart	(g)	1.005 ±0.127 (4)	0.975 ±0.037 (4)	0.970 ±0.037 (4)
Kidney(R)	(g)	1.123 ±0.118 (4)	1.095 ±0.097 (4)	1.098 ±0.085 (4)
Kidney(L)	(g)	1.070 ±0.076 (4)	1.078 ±0.082 (4)	1.085 ±0.113 (4)
Kidneys	(g)	2.193 ±0.194 (4)	2.173 ±0.179 (4)	2.183 ±0.196 (4)
Testis(R)	(g)	1.295 ±0.057 (4)	1.298 ±0.135 (4)	1.125 ±0.175 (4)
Testis(L)	(g)	1.283 ±0.026 (4)	1.325 ±0.193 (4)	1.133 ±0.175 (4)
Testes	(g)	2.578 ±0.078 (4)	2.623 ±0.325 (4)	2.258 ±0.351 (4)
Epididymis(R)	(g)	0.195 ±0.017 (4)	0.188 ±0.021 (4)	0.183 ±0.017 (4)
Epididymis(L)	(g)	0.195 ±0.017 (4)	0.180 ±0.014 (4)	0.180 ±0.022 (4)
Epididymides	(g)	0.390 ±0.034 (4)	0.368 ±0.034 (4)	0.363 ±0.038 (4)
Ventral prostate	(g)	0.230 ±0.032 (4)	0.193 ±0.017 (4)	0.203 ±0.022 (4)
Dorsolateral prostate	(g)	0.188 ±0.030 (4)	0.175 ±0.035 (4)	0.173 ±0.030 (4)
Brain	(g)	1.880 ±0.060 (4)	1.945 ±0.065 (4)	1.793 ±0.081 (4)
Spleen	(g)	0.650 ±0.110 (4)	0.583 ±0.092 (4)	0.755 ±0.271 (4)
Thymus	(mg)	591.35 ±116.99 (4)	578.10 ±87.26 (4)	614.45 ±83.18 (4)
Pituitary gland	(mg)	8.40 ±0.41 (4)	8.45 ±0.68 (4)	7.70 ±0.78 (4)
Thyroid	(mg)	17.43 ±1.90 (4)	16.10 ±2.16 (4)	12.65 ±4.68 (4)
Adrenals	(mg)	45.75 ±6.47 (4)	41.43 ±1.82 (4)	47.65 ±8.12 (4)
Final body weight	(g)	253.90 ±23.66 (4)	241.25 ±12.26 (4)	227.85 ±14.30 (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	20	100
Liver	(g)	11.148 ±1.613 (5)	10.922 ±1.233 (5)	13.324 ±3.260 (5)
Heart	(g)	1.268 ±0.134 (5)	1.308 ±0.077 (5)	1.212 ±0.223 (5)
Kidney(R)	(g)	1.296 ±0.099 (5)	1.358 ±0.143 (5)	1.482 ±0.263 (5)
Kidney(L)	(g)	1.294 ±0.102 (5)	1.348 ±0.149 (5)	1.490 ±0.283 (5)
Kidneys	(g)	2.590 ±0.192 (5)	2.706 ±0.291 (5)	2.972 ±0.544 (5)
Testis(R)	(g)	1.526 ±0.170 (5)	1.562 ±0.280 (5)	1.490 ±0.196 (5)
Testis(L)	(g)	1.518 ±0.154 (5)	1.550 ±0.265 (5)	1.474 ±0.197 (5)
Testes	(g)	3.044 ±0.324 (5)	3.112 ±0.545 (5)	2.964 ±0.389 (5)
Epididymis(R)	(g)	0.364 ±0.019 (5)	0.404 ±0.062 (5)	0.354 ±0.051 (5)
Epididymis(L)	(g)	0.356 ±0.017 (5)	0.396 ±0.072 (5)	0.354 ±0.055 (5)
Epididymides	(g)	0.720 ±0.032 (5)	0.800 ±0.128 (5)	0.708 ±0.106 (5)
Ventral prostate	(g)	0.374 ±0.073 (5)	0.418 ±0.094 (5)	0.400 ±0.099 (5)
Dorsolateral prostate	(g)	0.298 ±0.051 (5)	0.356 ±0.053 (5)	0.318 ±0.095 (5)
Seminal vesicle	(g)	1.012 ±0.121 (5)	1.128 ±0.186 (5)	0.932 ±0.171 (5)
Brain	(g)	2.010 ±0.092 (5)	2.010 ±0.039 (5)	1.950 ±0.116 (5)
Spleen	(g)	0.608 ±0.079 (5)	0.668 ±0.213 (5)	2.718 * ±1.144 (5)
Thymus	(mg)	602.14 ±98.75 (5)	524.80 ±83.49 (5)	543.38 ±72.98 (5)
Pituitary gland	(mg)	10.76 ±0.72 (5)	10.56 ±0.98 (5)	10.08 ±1.11 (5)
Thyroid	(mg)	18.60 ±4.59 (5)	19.50 ±3.58 (5)	17.52 ±2.73 (5)
Adrenals	(mg)	55.12 ±13.07 (5)	49.84 ±9.34 (5)	48.90 ±8.41 (5)
Final body weight	(g)	350.10 ±39.11 (5)	345.16 ±25.53 (5)	324.12 ±37.88 (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 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	20	100
Liver	(g/100g)	3.688 ±0.062 (4)	3.370 ** ±0.152 (4)	3.683 ±0.072 (4)
Heart	(g/100g)	0.475 ±0.047 (4)	0.495 ±0.039 (4)	0.483 ±0.019 (4)
Kidney(R)	(g/100g)	0.528 ±0.038 (4)	0.548 ±0.035 (4)	0.533 ±0.026 (4)
Kidney(L)	(g/100g)	0.510 ±0.022 (4)	0.535 ±0.049 (4)	0.523 ±0.040 (4)
Kidneys	(g/100g)	1.038 ±0.053 (4)	1.083 ±0.084 (4)	1.055 ±0.067 (4)
Testis(R)	(g/100g)	0.530 ±0.065 (4)	0.593 ±0.081 (4)	0.518 ±0.087 (4)
Testis(L)	(g/100g)	0.515 ±0.053 (4)	0.595 ±0.069 (4)	0.510 ±0.078 (4)
Testes	(g/100g)	1.045 ±0.118 (4)	1.188 ±0.149 (4)	1.028 ±0.165 (4)
Epididymis(R)	(g/100g)	0.065 ±0.006 (4)	0.073 ±0.019 (4)	0.060 ±0.008 (4)
Epididymis(L)	(g/100g)	0.068 ±0.005 (4)	0.065 ±0.010 (4)	0.060 ±0.008 (4)
Epididymides	(g/100g)	0.133 ±0.010 (4)	0.138 ±0.029 (4)	0.120 ±0.016 (4)
Ventral prostate	(g/100g)	0.068 ±0.010 (4)	0.073 ±0.015 (4)	0.050 ±0.014 (4)
Dorsolateral prostate	(g/100g)	0.055 ±0.006 (4)	0.050 ±0.008 (4)	0.043 * ±0.005 (4)
Brain	(g/100g)	1.305 ±0.084 (4)	1.310 ±0.045 (4)	1.240 ±0.027 (4)
Spleen	(g/100g)	0.315 ±0.042 (4)	0.318 ±0.066 (4)	0.293 ±0.061 (4)
Thymus	(mg/100g)	382.53 ±26.19 (4)	366.35 ±59.63 (4)	342.10 ±38.22 (4)
Pituitary gland	(mg/100g)	4.03 ±0.33 (4)	4.40 ±0.22 (4)	3.95 ±0.39 (4)
Thyroid	(mg/100g)	8.18 ±1.09 (4)	7.75 ±1.05 (4)	8.50 ±0.87 (4)
Adrenals	(mg/100g)	22.45 ±2.51 (4)	22.40 ±2.84 (4)	23.88 ±1.04 (4)
Final body weight	(g)	134.38 ±7.18 (4)	137.68 ±5.84 (4)	142.38 ±3.84 (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	20	100
Liver	(g/100g)	3.553 ±0.111 (4)	3.600 ±0.215 (4)	3.748 ±0.177 (4)
Heart	(g/100g)	0.440 ±0.018 (4)	0.458 ±0.030 (4)	0.435 ±0.024 (4)
Kidney(R)	(g/100g)	0.480 ±0.014 (4)	0.513 ±0.039 (4)	0.503 ±0.015 (4)
Kidney(L)	(g/100g)	0.470 ±0.014 (4)	0.478 ±0.043 (4)	0.500 ±0.026 (4)
Kidneys	(g/100g)	0.950 ±0.012 (4)	0.990 ±0.082 (4)	1.003 ±0.040 (4)
Testis(R)	(g/100g)	0.603 ±0.005 (4)	0.515 * ±0.038 (4)	0.523 ±0.022 (4)
Testis(L)	(g/100g)	0.598 ±0.013 (4)	0.525 * ±0.038 (4)	0.518 ** ±0.029 (4)
Testes	(g/100g)	1.200 ±0.016 (4)	1.040 ** ±0.076 (4)	1.040 ** ±0.050 (4)
Epididymis(R)	(g/100g)	0.075 ±0.006 (4)	0.078 ±0.010 (4)	0.070 ±0.014 (4)
Epididymis(L)	(g/100g)	0.078 ±0.010 (4)	0.080 ±0.014 (4)	0.070 ±0.014 (4)
Epididymides	(g/100g)	0.153 ±0.013 (4)	0.158 ±0.022 (4)	0.140 ±0.028 (4)
Ventral prostate	(g/100g)	0.078 ±0.015 (4)	0.073 ±0.005 (4)	0.063 ±0.017 (4)
Dorsolateral prostate	(g/100g)	0.070 ±0.016 (4)	0.060 ±0.014 (4)	0.060 ±0.018 (4)
Brain	(g/100g)	1.103 ±0.050 (4)	0.973 * ±0.054 (4)	1.045 ±0.056 (4)
Spleen	(g/100g)	0.248 ±0.025 (4)	0.263 ±0.032 (4)	0.310 * ±0.032 (4)
Thymus	(mg/100g)	306.75 ±22.66 (4)	290.45 ±40.54 (4)	303.60 ±25.45 (4)
Pituitary gland	(mg/100g)	3.53 ±0.28 (4)	3.75 ±0.10 (4)	3.75 ±0.17 (4)
Thyroid	(mg/100g)	9.60 ±2.74 (4)	7.18 ±1.23 (4)	6.88 ±1.07 (4)
Adrenals	(mg/100g)	18.95 ±0.97 (4)	17.55 ±1.40 (4)	21.13 ±2.69 (4)
Final body weight	(g)	170.80 ±6.20 (4)	182.73 ±9.21 (4)	174.90 ±6.16 (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	20	100
Liver	(g/100g)	3.465 ±0.173 (4)	3.353 ±0.121 (4)	3.685 ±0.199 (4)
Heart	(g/100g)	0.395 ±0.044 (4)	0.405 ±0.017 (4)	0.430 ±0.022 (4)
Kidney(R)	(g/100g)	0.443 ±0.010 (4)	0.455 ±0.037 (4)	0.480 ±0.008 (4)
Kidney(L)	(g/100g)	0.423 ±0.010 (4)	0.448 ±0.033 (4)	0.475 * ±0.021 (4)
Kidneys	(g/100g)	0.865 ±0.010 (4)	0.903 ±0.069 (4)	0.955 ±0.026 (4)
Testis(R)	(g/100g)	0.515 ±0.054 (4)	0.538 ±0.035 (4)	0.490 ±0.057 (4)
Testis(L)	(g/100g)	0.510 ±0.054 (4)	0.548 ±0.062 (4)	0.495 ±0.057 (4)
Testes	(g/100g)	1.025 ±0.107 (4)	1.085 ±0.096 (4)	0.985 ±0.114 (4)
Epididymis(R)	(g/100g)	0.080 ±0.000 (4)	0.078 ±0.005 (4)	0.080 ±0.000 (4)
Epididymis(L)	(g/100g)	0.078 ±0.005 (4)	0.075 ±0.006 (4)	0.080 ±0.008 (4)
Epididymides	(g/100g)	0.158 ±0.005 (4)	0.153 ±0.010 (4)	0.160 ±0.008 (4)
Ventral prostate	(g/100g)	0.090 ±0.008 (4)	0.078 ±0.005 (4)	0.090 ±0.008 (4)
Dorsolateral prostate	(g/100g)	0.075 ±0.010 (4)	0.073 ±0.015 (4)	0.078 ±0.015 (4)
Brain	(g/100g)	0.745 ±0.045 (4)	0.808 ±0.036 (4)	0.790 ±0.082 (4)
Spleen	(g/100g)	0.255 ±0.025 (4)	0.240 ±0.039 (4)	0.330 ±0.107 (4)
Thymus	(mg/100g)	232.90 ±40.60 (4)	241.38 ±48.38 (4)	271.18 ±45.64 (4)
Pituitary gland	(mg/100g)	3.33 ±0.22 (4)	3.53 ±0.19 (4)	3.40 ±0.36 (4)
Thyroid	(mg/100g)	6.95 ±1.22 (4)	6.70 ±1.15 (4)	5.53 ±1.87 (4)
Adrenals	(mg/100g)	18.18 ±3.44 (4)	17.18 ±0.56 (4)	20.90 ±3.19 (4)
Final body weight	(g)	253.90 ±23.66 (4)	241.25 ±12.26 (4)	227.85 ±14.30 (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	20	100
Liver	(g/100g)	3.176 ±0.115 (5)	3.160 ±0.210 (5)	4.058 ±0.574 (5)
Heart	(g/100g)	0.362 ±0.025 (5)	0.378 ±0.024 (5)	0.372 ±0.029 (5)
Kidney(R)	(g/100g)	0.372 ±0.028 (5)	0.394 ±0.023 (5)	0.458 ** ±0.052 (5)
Kidney(L)	(g/100g)	0.370 ±0.028 (5)	0.390 ±0.024 (5)	0.458 ** ±0.054 (5)
Kidneys	(g/100g)	0.742 ±0.053 (5)	0.784 ±0.046 (5)	0.916 ** ±0.105 (5)
Testis(R)	(g/100g)	0.442 ±0.061 (5)	0.450 ±0.063 (5)	0.464 ±0.066 (5)
Testis(L)	(g/100g)	0.440 ±0.060 (5)	0.446 ±0.058 (5)	0.460 ±0.075 (5)
Testes	(g/100g)	0.882 ±0.121 (5)	0.896 ±0.120 (5)	0.924 ±0.140 (5)
Epididymis(R)	(g/100g)	0.104 ±0.013 (5)	0.118 ±0.013 (5)	0.110 ±0.024 (5)
Epididymis(L)	(g/100g)	0.102 ±0.008 (5)	0.112 ±0.015 (5)	0.112 ±0.029 (5)
Epididymides	(g/100g)	0.206 ±0.021 (5)	0.230 ±0.026 (5)	0.222 ±0.053 (5)
Ventral prostate	(g/100g)	0.108 ±0.018 (5)	0.120 ±0.022 (5)	0.122 ±0.023 (5)
Dorsolateral prostate	(g/100g)	0.088 ±0.015 (5)	0.102 ±0.013 (5)	0.100 ±0.022 (5)
Seminal vesicle	(g/100g)	0.292 ±0.048 (5)	0.328 ±0.063 (5)	0.288 ±0.039 (5)
Brain	(g/100g)	0.578 ±0.046 (5)	0.584 ±0.034 (5)	0.604 ±0.036 (5)
Spleen	(g/100g)	0.174 ±0.015 (5)	0.190 ±0.051 (5)	0.816 * ±0.284 (5)
Thymus	(mg/100g)	173.60 ±36.22 (5)	151.78 ±18.14 (5)	168.56 ±21.57 (5)
Pituitary gland	(mg/100g)	3.10 ±0.31 (5)	3.06 ±0.38 (5)	3.12 ±0.24 (5)
Thyroid	(mg/100g)	5.28 ±1.05 (5)	5.68 ±1.19 (5)	5.40 ±0.34 (5)
Adrenals	(mg/100g)	15.88 ±4.03 (5)	14.42 ±2.29 (5)	15.24 ±3.12 (5)
Final body weight	(g)	350.10 ±39.11 (5)	345.16 ±25.53 (5)	324.12 ±37.88 (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 11-1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of macroscopic examinations: One-day treatment

Findings	Male		
	0	20	100 (mg/kg/day)
	ss	ss	ss
	4 ^{a)}	4	4
No abnormalities detected	4	4	2
Forestomach			
Blackish substance on mucosa	0	0	2
Jejunum			
Whitish change of mucosa	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		
	0	20	100
	ss	ss	ss
	4 ^{a)}	4	4
No abnormalities detected	4	4	2
Forestomach			
Elevated region of mucosa	0	0	1
Recessed region of mucosa	0	0	1

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	20	100 (mg/kg/day)
	ss	ss	ss
4 ^{a)}	4	4	4
No abnormalities detected	4	4	1
Forestomach			
Elevated region of mucosa	0	0	1
Kidney			
Pelvic dilatation, unilateral	0	0	1
Spleen			
Blackish change	0	0	1
Enlargement	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	20	100 (mg/kg/day)
	ss	ss	ss
	5 ^{a)}	5	5
No abnormalities detected	5	5	0
Forestomach			
Recessed region of mucosa	0	0	1
Liver			
Enlargement	0	0	3
Kidney			
Dark brownish change, bilateral	0	0	2
Enlargement, bilateral	0	0	1
Portal lymph node			
Enlargement	0	0	4
Spleen			
Blackish change	0	0	5
Enlargement	0	0	5

ss: scheduled sacrifice 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			(mg/kg/day)
		0	20	100	
		ss	ss	ss	
		4 ^{a)}	4	4	
Forestomach					
No abnormalities detected		4/4 ^{b)}	4/4	1/4	
Edema and cellular infiltration/ Lamina propria/Limiting ridge	+	0/4	0/4	3/4	
Glandular stomach					
No abnormalities detected		4/4	4/4	3/4	
Necrosis/Fundic mucosa/ Cardiac portion	+	0/4	0/4	1/4	
Necrosis/Pyloric mucosa/Focal	+	1/4	0/4	0/4	
Jejunum					
Vacuolation/Villous epithelium	+++	---	---	1/1	
Liver					
No abnormalities detected		4/4	4/4	1/4	
Hypertrophy with prominent nucleoli and glycogen accumulation/ Hepatocyte/Periportal	+	0/4	0/4	3/4	
Kidney					
No abnormalities detected		4/4	4/4	0/4	
Alteration, cytoplasmic and nuclear/	+	0/4	0/4	2/4	
Proximal tubule/Outer stripe of outer medulla	++	0/4	0/4	1/4	
Single cell necrosis/Proximal tubule/Cortico-medullary junction	+	0/4	0/4	1/4	
+++	0/4	0/4	3/4		
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		3/3	---	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, +++: severe.

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

Findings	Grade	Male			(mg/kg/day)
		0	20	100	
		ss	ss	ss	
		4 ^{a)}	4	4	
Forestomach					
No abnormalities detected		4/4 ^{b)}	4/4	2/4	
Edema and cellular infiltration/	+	0/4	0/4	1/4	
Lamina propria	++	0/4	0/4	1/4	
Hyperplasia/Squamous epithelium/					
Focal	+++	0/4	0/4	2/4	
Ulcer	+	0/4	0/4	1/4	
Glandular stomach					
No abnormalities detected		4/4	4/4	4/4	
Liver					
No abnormalities detected		4/4	4/4	2/4	
Hypertrophy with prominent nucleoli and glycogen accumulation/	+	0/4	0/4	2/4	
Hepatocyte/Periportal					
Kidney					
No abnormalities detected		4/4	4/4	3/4	
Regeneration/Proximal tubule/					
Cortico-medullary junction	±	0/4	0/4	1/4	
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	
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.

±: very slight, +: slight, ++: moderate, +++: severe.

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

Findings	Grade	Male			(mg/kg/day)
		0	20	100	
		ss	ss	ss	
		4 ^{a)}	4	4	
Forestomach					
No abnormalities detected		4/4 ^{b)}	4/4	2/4	
Hyperplasia/Squamous epithelium/ Focal	+	0/4	0/4	1/4	
Hyperplasia/Squamous epithelium/ Limiting ridge	+	0/4	0/4	1/4	
Glandular stomach					
No abnormalities detected		4/4	4/4	4/4	
Liver					
No abnormalities detected		3/4	4/4	1/4	
Deposit, brown pigment/ Kupffer cell/Periportal	+	0/4	0/4	3/4	
Necrosis/Hepatocyte/Focal	+	1/4	0/4	0/4	
Kidney					
No abnormalities detected		4/4	---	3/4	
Dilatation/Pelvis	+	0/4	---	1/4	
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	
Spleen					
No abnormalities detected		4/4	4/4	1/4	
Congestion	+	0/4	0/4	2/4	
Deposit, brown pigment/	+	0/4	0/4	2/4	
Red pulp	++	0/4	0/4	1/4	
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 12-4 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of histopathological examinations: Twenty-eight-day treatment

Findings	Grade	Male		
		0	20	100
		ss	ss	ss
	5 ^{a)}	5	5	
Trachea				
No abnormalities detected		5/5 ^{b)}	---	5/5
Lung				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Submandibular gland				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Forestomach				
No abnormalities detected		5/5	5/5	0/5
Edema and cellular infiltration/ Lamina propria	+	0/5	0/5	1/5
Edema and cellular infiltration/ Lamina propria/Limiting ridge	+	0/5	0/5	1/5
Hyperplasia/Squamous epithelium/ Focal	+++	0/5	0/5	1/5
Hyperplasia/Squamous epithelium/ Limiting ridge	+	0/5	0/5	4/5
Ulcer	+	0/5	0/5	1/5
Glandular stomach				
No abnormalities detected		5/5	5/5	4/5
Necrosis/Fundic mucosa/ Cardiac portion	+	0/5	0/5	1/5
Duodenum				
No abnormalities detected		5/5	0/5	0/5
Deposit, brown pigment/ Lamina propria	+	0/5	5/5	1/5
Jejunum				
No abnormalities detected		5/5	5/5	5/5
Ileum				
No abnormalities detected		5/5	5/5	5/5
Cecum				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Colon				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Rectum				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Pancreas				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5

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: Twenty-eight-day treatment

Findings	Grade	Male		
		0	20	100
		ss	ss	ss
		5 ^{a)}	5	5
Liver				
No abnormalities detected		5/5 ^{b)}	5/5	0/5
Deposit, brown pigment/ Kupffer cell/Periportal	+	0/5	0/5	1/5
Hypertrophy with prominent nucleoli and glycogen accumulation/ Hepatocyte/Periportal	++	0/5	0/5	4/5
	±	0/5	0/5	2/5
	+	0/5	0/5	3/5
Heart				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Kidney				
No abnormalities detected		5/5	4/5	1/5
Deposit, brown pigment/ Proximal tubule/Cortex	+	0/5	0/5	4/5
Regeneration/Proximal tubule/ Outer stripe of outer medulla	±	0/5	0/5	1/5
Scar/Cortex	++	0/5	1/5	0/5
Urinary bladder				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Testis				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Epididymis				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Ventral prostate				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Dorsolateral prostate				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Coagulating gland				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Seminal vesicle				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5

ss: scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals autopsied.

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

---: Not examined.

±: very slight, +: slight, ++: moderate.

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

Findings	Grade	Male			(mg/kg/day)
		0	20	100	
		ss	ss	ss	
		5 ^{a)}	5	5	
Spinal cord					
No abnormalities detected		5/5 ^{b)}	---	5/5	
Sciatic nerve					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Bone marrow					
No abnormalities detected		5/5	5/5	1/5	
Erythroid hyperplasia	+	0/5	0/5	3/5	
	++	0/5	0/5	1/5	
Axillary lymph node					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Portal lymph node					
Deposit, brown pigment	+	---	---	1/4	
	++	---	---	3/4	
Plasmacytosis	+	---	---	1/4	
Mesenteric lymph node					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Spleen					
No abnormalities detected		5/5	5/5	0/5	
	+	0/5	0/5	1/5	
Congestion	++	0/5	0/5	1/5	
	+++	0/5	0/5	3/5	
Deposit, brown pigment/Red pulp	+++	0/5	0/5	5/5	
Hematopoiesis, extramedullary, increased	++	0/5	0/5	1/5	
	+++	0/5	0/5	3/5	
Thymus					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Thyroid					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Parathyroid					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Adrenal					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Eye ball					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Skeletal muscle					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Bone					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Mammary gland					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	

ss: scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals autopsied.

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

---: Not examined.

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