

試験番号 B10-0103

最終報告書

イソフルラン麻酔を用いた遺伝子発現量解析のための
Bromodichloromethane のラットにおける 28 日間反復経口投与毒性試験

2013 年 2 月

一般財団法人 化学物質評価研究機構

日田事業所

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

2013 年 2 月 28 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	7
14.1 被験物質	7
14.2 媒 体	8
14.3 使用動物	8
14.4 飼育環境	8
15. 試験方法	9
15.1 群構成	9
15.2 投与液	9
15.3 投 与	10
15.4 一般状態観察	10
15.5 詳細な一般状態観察	10
15.6 機能検査	11
15.7 体重測定	11
15.8 摂餌量測定	11
15.9 尿検査	12
15.10 血液検査	12
15.11 病理学的検査	15
15.12 統計学的方法	17
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	17
17. 試験成績	17
17.1 一般状態	17
17.2 詳細な一般状態	17
17.3 機能検査	17
17.4 体 重	18

17.5 摂餌量	18
17.6 尿検査	18
17.7 血液検査	18
17.8 病理学的検査	18
18. 考 察	19
19. 参考文献	20

Figures

1 Body weights.....	21
2 Food consumption	22

Tables

1 Summary of general clinical observations	23
2 Summary of detailed clinical observations.....	24
3 Summary of functional observations.....	28
4 Summary of body weights.....	29
5 Summary of food consumption	30
6 Summary of urinalyses.....	31
7 Summary of hematological examinations	34
8 Summary of blood chemical examinations	35
9 Summary of absolute organ weights	36
10 Summary of relative organ weights.....	37
11 Summary of macroscopic examinations.....	38
12 Summary of histopathological examinations	39

Appendices

1 General clinical observations of individual animals	42
2 Detailed clinical observations of individual animals.....	45
3 Functional observations individual animals	48
4 Body weights of individual animals.....	49
5 Food consumption of individual animals	52
6 Urinalytic data of individual animals	53
7 Hematological data of individual animals.....	59
8 Blood chemical data of individual animals	62
9 Absolute organ weights of individual animals	65
10 Relative organ weights of individual animals	68
11 Pathological findings of individual animals	71

添付資料

理化学試験結果.....	73
--------------	----

1. 表 題

イソフルラン麻酔を用いた遺伝子発現量解析のための Bromodichloromethane 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

遺伝子発現量解析へのイソフルラン麻酔の影響を検討するため、Bromodichloromethane をラットに 28 日間毎日反復経口投与し遺伝子発現量解析のための試料を採取するとともに、被験物質投与による生体の機能及び形態の変化を確認する。

5. 試験法

以下の試験法を参考に実施した。

- 「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) に定める「哺乳類を用いる 28 日間の反復投与毒性試験」
- 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

LABORATORY ANIMAL SCIENCE (1987) by the American Association for Laboratory Animal Science 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指針」に沿って試験を行った。

8. 試験日程

試験開始日	2012年 6月 21日
動物入荷日	2012年 6月 26日
投与開始日	2012年 7月 6日
28日間投与後解剖日	2012年 8月 3日
試験終了日	2013年 2月 28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)

分析責任者 楠 根 裕 司

(被験物質の安定性確認、被験物質液の濃度確認についての理化学試験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

2013年 2月 28日

試験責任者

寶珠山 五月

13. 要 約

イソフルラン麻酔の遺伝子発現量解析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 Bromodichloromethane の 28 日間反復経口投与毒性試験を実施し、CO₂/O₂混合ガス麻酔を用いた試験での結果と比較した。

5 週齢の雄の Crl:CD(SD)ラットにコーン油に溶解させた Bromodichloromethane を 28 日間毎日強制経口投与した。投与用量は 0 (コーン油)、40 及び 200 mg/kg/day とし、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、詳細な一般状態観察、機能検査体重測定及び摂餌量測定を行い、最終投与日の翌日に尿を採取して尿検査を行った後、イソフルラン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。

一般状態観察では、40 及び 200 mg/kg 群で自発運動低下、200 mg/kg 群で呼吸数減少、半眼及び短時間の流涎がみられた。

詳細な一般状態観察では 200 mg/kg 群で投与 2~4 週目に流涎がみられた。

体重では投与期間を通じて 200 mg/kg 群で低値又は低値傾向がみられた。

摂餌量では投与 3 日目に 200 mg/kg 群で低値がみられた。

尿検査では 200 mg/kg 群で尿量の高値がみられた。

血液学的検査では 200 mg/kg 群で網状赤血球数比率の低値がみられた。

血液生化学的検査では、200 mg/kg 群で AST、ALT、γ-GTP、クレアチニン、総ビリルビン及び総胆汁酸の高値、トリグリセリド及び血糖の低値がみられた。

器官重量では 200 mg/kg 群で肝臓、腎臓及び副腎の相対重量の高値がみられた。

剖検では 200 mg/kg 群で肝臓及び腎臓の腫大がみられた。

病理組織学的検査では、200 mg/kg 群で肝臓の小葉中心性肝細胞脂肪変性、単細胞壊死及び小肉芽腫、腎臓の皮質の近位尿細管空胞変性、核濃縮及び再生が認められた。

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 Bromodichloromethane の投与により肝臓及び腎臓に対する毒性影響が認められ、解剖時検査において麻酔法の違い（イソフルラン麻酔又は CO₂/O₂混合ガス麻酔）による影響は認められなかった。

14. 試験材料

14.1 被験物質

a) 名称等

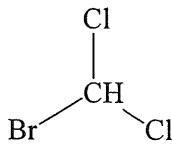
名 称 Bromodichloromethane
CAS 番号 75-27-4

b) 製造元及びロット番号

製造元 Sigma-Aldrich
ロット番号 MKBD4885V

c) 構造式等

構造式



分子式 CHBrCl₂
分子量 163.83

d) 純度等

純 度 98.3%
不純物 水分 0.02%

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 -55°C
沸 点 87°C
常温における性状 無色透明液体
安定性 保管条件下で安定
密 度 1.98 g/cm³ (25°C)

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保管した。

保管温度の実測値 2.5～6.9°C (許容範囲 1～10°C)

保管場所及び期間 保冷庫 005、2012年5月2日～2012年6月11日

 保冷庫 007、2012年6月11日～2012年7月23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

被験物質の同一性については、当試験施設で実施した「Bromodichloromethane 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 X02-0248、非 GLP 試験)において、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から入手したスペクトルと当試験施設において測定したデータを比較することにより確認している。

保管条件下における安定性については、本試験の投与開始前 (X02-0248 において測定した投与期間終了後) 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(添付資料:理化学試験結果参照)。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つたことから、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

被験物質は黄色灯下で取り扱い、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

当試験施設で実施した「遺伝子発現量解析のための Bromodichloromethane のラットにおける 28 日間反復経口投与毒性試験」(試験番号 B10-0092、非 GLP 試験)において、コーン油を媒体として用いたことから、本試験においてもコーン油を媒体とした。

c) 製造元、グレード及びロット番号

製造元	ナカライトスク
グレード	化学用
ロット番号	V2A7661

d) 保管

保管場所	試薬保管室
保管温度	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・リバーワン飼育センターから入手した。

4 週齢の雄ラットを 18 匹入手し、1 ケージあたり 3 又は 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 9 日後まで馴化し、すべての動物に異常がみられなかつたため、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、15 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 147.3～167.1 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。温度及び相対湿度の実測値は、それぞれ 22.5～24.0°C 及び 50.0～62.2% 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。給餌器、ケージ及びラックは、群分け時に交換した。

飼料は固型飼料 MF（ロット番号 120411、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 群構成

当試験施設で実施したB10-0092と同じく、被験物質投与群として2用量群を設ける他、媒体のみを投与する媒体対照群を設定した。以下、媒体対照群は対照群と記載する。

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	0	5	0	5(1 - 5)
被験 物質	低用量	40	5	0.800
	高用量	200	5	4.00
				5(11 - 15)

15.2 投与液

a) 被験物質液の調製及び保管

黄色灯下で被験物質を秤量し、コーン油を加えて混ぜ合わせ溶解させた後、コーン油を加え定容し4.00 w/v%の被験物質液を調製した。さらに、4.00 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、0.800 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ガラス製褐色瓶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2~10°C、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) 被験物質液の安定性

当試験施設で実施したX02-0248で、5.00及び0.0500 w/v%の被験物質液が遮光下における冷所保管で14日間安定性であることを確認している。

c) 投与に用いる被験物質液の濃度確認

初回に調製した 4.00 及び 0.800 w/v% の被験物質液について、当試験施設で調製直後の被験物質濃度を測定した（添付資料：理化学試験結果参照）。

測定した被験物質濃度が設定値に対し 4.00 及び 0.800 w/v% の被験物質液でそれぞれ 97.5% 及び 98.1% 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。

15.3 投与

28 日間毎日 1 回、強制経口投与した。投与は 13:03～14:34 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、5 mL/kg で投与した。

15.4 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。

15.5 詳細な一般状態観察

全例について、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

15.6 機能検査

全例について、投与 4 週目（投与 22 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 (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 (42.6 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

15.7 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
- ・ 解剖日 (飼育室からの搬出前、絶食状態)

15.8 摂餌量測定

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。

15.9 尿検査

a) 採尿

全例について、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 15 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)

15.10 血液検査

a) 採血及び検査試料

全例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）、イソフルラン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。また、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 G9059、シスメックス) で採血した血液
血 漿	ぐえん酸三ナトリウム二水和物 (ロット番号 WEQ6248、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の項目を測定した。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。

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 fosfataze (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	
A/G 比 (A/G ratio)	Albumin T - Protein - Albumin	—
血糖 (Glucose)	Hexokinase・G-6-PDH 法	E
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	
無機リン (IP)	Fiske-Subbarow 法	
カルシウム (Ca)	OCPC 法	F
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)

15.11 病理学的検査

a) 剖 検

全例について最終投与日の翌日の採血後に、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

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。

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。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。

大腿骨は、左側を膝関節から大腿骨頭付近まで採取した。両端を切除し、RPMI1640 (Life Technologies) 5 mL で骨髄を洗い出し、70 μm のメッシュを通してコニカルチューブに回収した。4°C で遠心（1100 rpm、5 分間）後、上清を除いた。残渣を 2 mL の RNA/DNA Stabilization Reagent for Blood/Bone Marrow (Roche Diagnostics) に再浮遊させ、解剖終了直後に-80°C で凍結保存した。右側は膝関節を含むように採取し、10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した。

脾臓は、重量を測定後、中央部から横断で幅 1～2 mm の組織片を 1 枚採取し、RNAlater に浸漬した。残りは約 5 mm 間隔で切り込みを入れた後に 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した。

胸腺は、重量を測定後、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。

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、脾臓は 4°C で 72 時間、その他の組織は 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。

d) 病理組織学的検査

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、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、肝臓及び腎臓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。さらに、高用量群のHE染色標本において、肝臓で肝細胞の空胞変性、腎臓で尿細管上皮細胞の空胞変性がみられ、ともに脂肪の蓄積が疑われたため、対照群の1例（No. 2）及び高用量群の1例（No. 12）について肝臓及び腎臓のオイル赤O染色による検査を行った。

15.12 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及び試験計画書からの逸脱は認められなかった。

17. 試験成績

17.1 一般状態 (Table 1, Appendix 1)

200 mg/kg群で自発運動低下、呼吸数減少及び半眼が5例全例で観察されたほか、投与直後の短時間の流涎が4例でみられた。自発運動低下は投与期間を通して散発的に観察され、呼吸数減少は投与1、2及び11日目、半眼は投与1及び2日目にみられた。流涎は投与9日目以降に継続的又は散発的にみられた。40 mg/kg群では投与1～3日目にかけて自発運動低下が3例で継続的又は単発的にみられた。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)

200 mg/kg群で投与2～4週目に流涎が5例中1例（No. 15）でみられた。40 mg/kg群及び対照群に異常は認められなかった。排糞回数及び排尿回数については被験物質投与群に有意な変動は認められなかった。

17.3 機能検査 (Table 3, Appendix 3)

200 mg/kg群で測定0～10分の時間帯に自発運動量の有意な高値がみられたが、一過性の変動であり、その他の時間帯及び総運動量には異常は認められなかったことから偶発的変動と考えた。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った。

17.4 体重 (Fig. 1、Table 4、Appendix 4)

200 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 91.1%、91.5%、92.5%、90.7% 及び 86.9%）が認められた。40 mg/kg 群では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)

200 mg/kg 群で投与 3 日目に有意な低値（対照群の 66.3%）が認められた。40 mg/kg 群では有意な変動は認められなかった。

17.6 尿検査 (Table 6、Appendix 6)

200 mg/kg 群で尿量の有意な高値が認められた。また、200 mg/kg 群の 5 例全例で尿沈渣中に結晶が観察されず、4 例で pH6.0、1 例で pH5.0 を示したが、pH 及び結晶とも当所の背景値と比較して生理的変動の範囲内であった。40 mg/kg 群及び対照群に異常は認められなかった。

当所の Crl:CD(SD) ラットの尿検査背景値

投与期間終了時（9 週齢）

項目	性	例数	平均	Mean-2S.D.	Mean+2S.D.
尿量(mL)	雄	205	8.4	0.0	19.0

項目	性	例数	度数(%)			
			5.0	6.0	6.5	7.0
pH	雄	205	1.5	26.8	57.6	13.2

項目	性	例数	度数(%)			
			-	±	+	++
結晶（尿沈渣）	雄	205	43.9	23.9	18.0	10.7

17.7 血液検査

a) 血液学的検査 (Table 7、Appendix 7)

200 mg/kg 群で赤血球数、Hb、Ht、単球比率及び大型非染色球比率の有意な高値、網状赤血球数比率及びリンパ球比率の有意な低値、APTT の有意な短縮がみられた。40 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)

200 mg/kg 群で AST、ALT、γ-GTP、クレアチニン、総ビリルビン、総胆汁酸、無機リン及び塩素の有意な高値、トリグリセリド及び血糖の有意な低値が認められた。40 mg/kg 群ではカルシウム及び塩素の有意な高値がみられた。

17.8 病理学的検査

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

200 mg/kg 群で肝臓の相対重量の有意な高値（対照群の 122.5%）、腎臓の相対重量の有意な高値（対照群の 117.3%）及び副腎の相対重量の有意な高値（対照群の 126.4%）が認められた。このほか、解剖日体重が有意な低値（対照群の 83.8%）を示し、心臓の

絶対重量の有意な低値、精巣の相対重量の有意な高値、腹葉前立腺の絶対及び相対重量の有意な低値、背側葉前立腺の絶対重量の有意な低値、精嚢の絶対重量の有意な低値、脳の相対重量の有意な高値、下垂体の絶対重量の有意な低値がみられた。40 mg/kg 群では有意な変動は認められなかった。

b) 剖 檢 (Table 11、Appendix 11)

200 mg/kg 群で肝臓の腫大が 5 例全例、腎臓の両側性の腫大が 3 例に認められた。40 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)

200 mg/kg 群で肝臓に小葉中心性肝細胞脂肪変性（軽度～中等度）及び肝細胞単細胞壊死（軽度～中等度）が 5 例全例、小肉芽腫（軽度～中等度）が 3 例で認められた。また、腎臓では皮質の近位尿細管空胞変性（ごく軽度～軽度）及び皮質の近位尿細管核濃縮（軽度）が 4 例、皮質の近位尿細管再生（ごく軽度～中等度）が 5 例全例に認められた。なお、器官重量に変動がみられた副腎、心臓、精巣、前立腺及び精嚢では異常は認められなかった。40 mg/kg 群では検査を行った肝臓及び腎臓に異常は認められなかった。対照群では心臓の限局性心筋炎及び甲状腺の鰓囊遺残が各 1 例にみられた。

なお、対照群及び高用量群の各 1 例について実施したオイル赤 O 染色による検査の結果、高用量群の肝臓では小葉中心性に陽性物質の増加が認められ、肝細胞の空胞変性が脂肪の蓄積によるものであることが確認されたが、腎臓では陽性物質が認められず尿細管上皮細胞の空胞化の原因は特定できなかった。

18. 考 察

CO₂/O₂混合ガス麻酔を用いた「遺伝子発現量解析のための Bromodichloromethane のラットにおける 28 日間反復経口投与毒性試験」（試験番号 B10-0092）において得られた実験結果と同様に、本試験においても被験物質投与により主に肝臓及び腎臓への影響が認められた。

肝臓に対する影響として、200 mg/kg 群で、血液生化学的検査において肝細胞の障害を示す AST 及び ALT の高値、肝細胞障害又は胆汁うつ滞を示す総ビリルビン及び総胆汁酸の高値、並びに慢性肝障害を示すγ-GTP の高値がみられた。病理学的検査においては、肝臓の相対重量の高値及び肉眼的な腫大がみられ、組織学的には小葉中心性肝細胞脂肪変性、肝細胞単細胞壊死及び小肉芽腫が認められた。また、血液生化学的検査において認められたトリグリセリド及び血糖の低値は、肝機能低下を示唆する変化と考えた。

腎臓に対する影響として、200 mg/kg 群で、尿検査において尿細管障害による尿量の高値、血液生化学的検査において腎障害を示すクレアチニンの高値がみられた。病理学的検査においては、腎臓の相対重量の高値及び肉眼的な腫大がみられ、病理組織学的検査では皮質の近位尿細管空胞変性、核濃縮及び再生が認められた。また、血液学的検査において認められた網状赤血球数比率の低値は、腎障害によるエリスロポエチン産生の減少を反映した変化と考えられた。

投与期間中に 200 mg/kg 群でみられた自発運動低下、呼吸数減少、半眼、体重及び摂餌量の低値は、肝臓及び腎臓に対する毒性影響を反映したものと考えられた。自発運動低下は 40 mg/kg 群でも観察されたが、同群では肝臓及び腎臓への毒性影響は明らかでなかった。また、

200 mg/kg 群でみられた副腎重量の高値は被験物質投与によるストレスの影響と考えられたが、器質的変化は認められなかつた。このほか、心臓、腹葉前立腺、背側葉前立腺、精嚢及び下垂体の絶対重量低値、並びに精巣及び脳の相対重量高値がみられたが、解剖日体重が低値であり、病理組織学的検査を行わなかつた脳及び下垂体を除いてこれらの器官に器質的変化が認められなかつたことから、体重低値に関連した変動と考えた。

そのほか、被験物質の投与による影響として、200 mg/kg 群で流涎がみられた。流涎はいずれも投与後 15 分以内に消失しており、刺激性を有する化合物を反復経口投与した場合にしばしば標的器官となる前胃に異常が認められなかつたこと、流涎は投与物質の味などによつても引き起こされる場合がある (Matsuo, 2000) ことから、本試験でみられた流涎は被験物質の味により発現したものであり毒性学的意義は低いと考えた。

投与期間中又は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、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 B10-0092 と同様に、被験物質投与により肝臓及び腎臓に毒性影響が認められ副腎への影響もみられたが、その他の消化器系及び泌尿器系、呼吸器系、心・血管系、生殖器系、神経系、造血器系、感覺器、筋・骨格系、乳腺への影響は検出されなかつた。また、解剖時検査において麻酔法の違い (イソフルラン麻酔又は CO₂/O₂ 混合ガス麻酔) による影響は認められなかつた。

19. 参考文献

- Matsuo R (2000) Role of saliva in the maintenance of taste sensitivity. Crit. Rev. Oral Biol. Med., 11, 216-229.

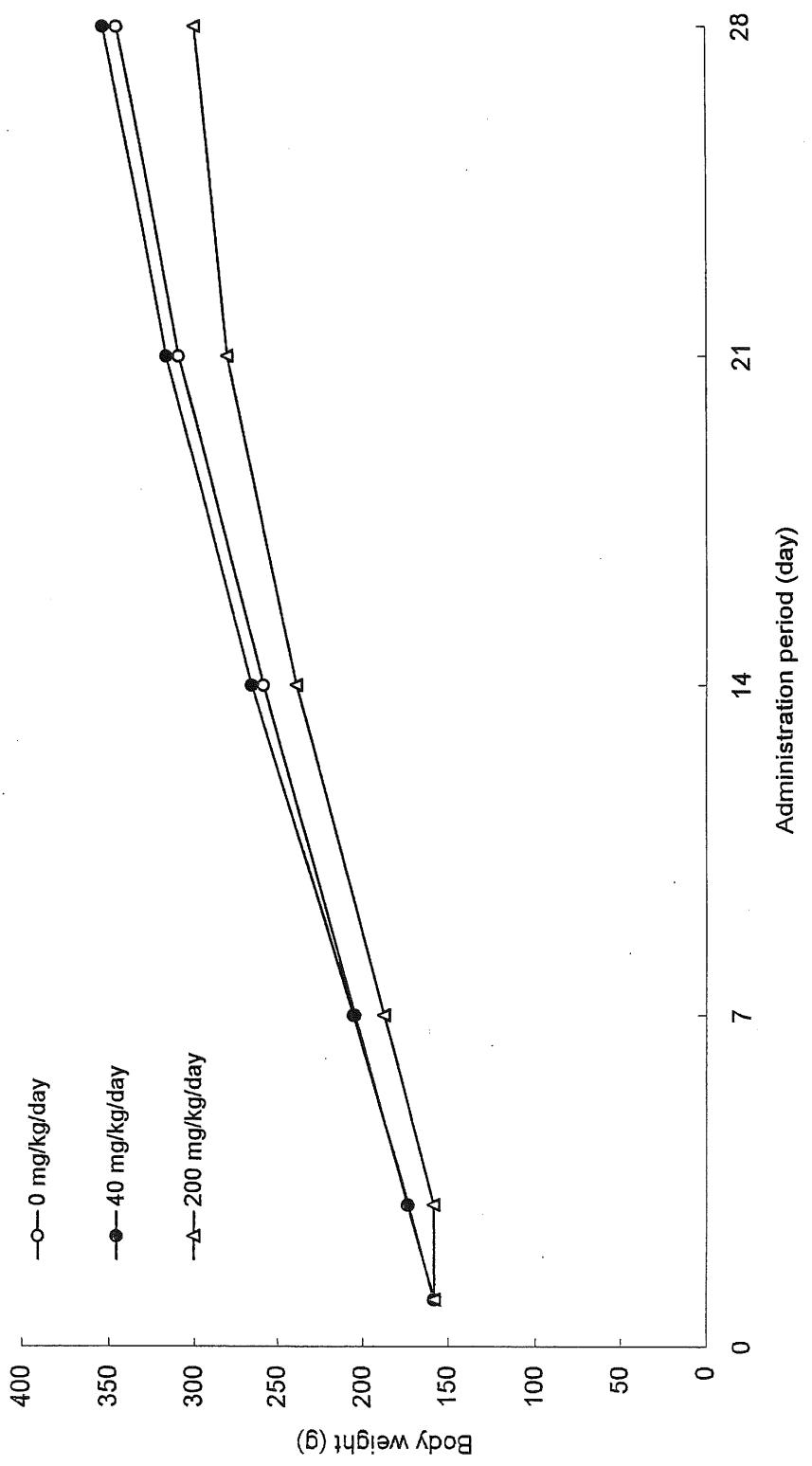


Fig. 1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Body weights: Male

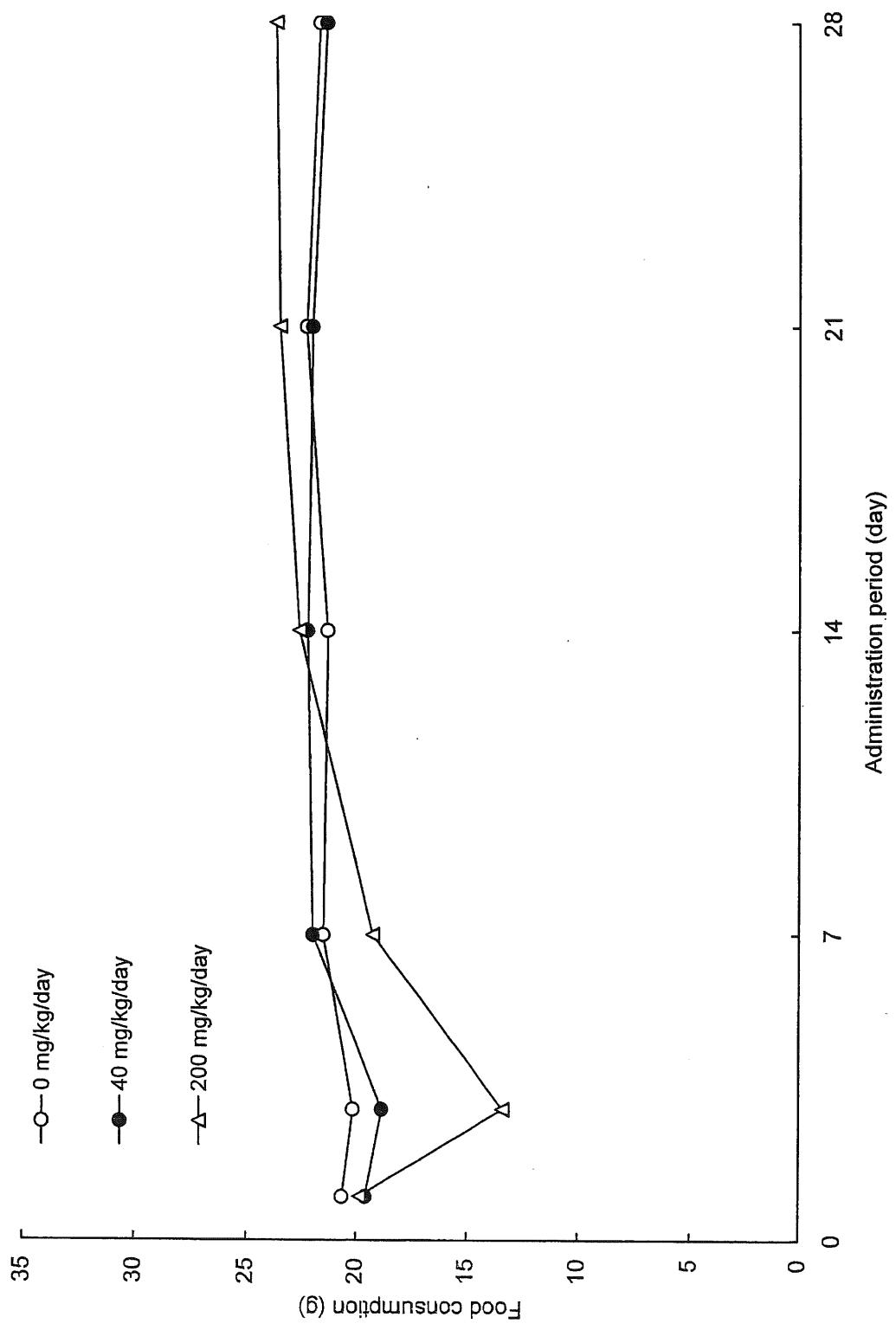


Fig. 2 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Food consumption: Male

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	40	200
Male		ss 5 ^{a)}	ss 5	ss 5	
	No abnormalities detected		5	2	
	Decreased spontaneous locomotion			3	5
	Decreased respiratory rate				5
	Incomplete eyelid opening				5
	Salivation				4

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 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 1 week		
		0	40	200	0	40	200
		Number of animals	5	5	5	5	5
Removal from cage	-2	0	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	1	1	1
	0	5	5	5	4	4	4
	+1	0	0	0	0	0	0
	+2	0	0	0	0	0	0
	0	4	5	5	3	4	5
	+1	1	0	0	2	1	0
	+2	0	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	0	0	0
	0	5	5	5	5	5	5
Handling observation	+1	0	0	0	0	0	0
	-	5	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
	-	5	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
	-	5	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
	-	5	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
	-	5	5	5	5	5	5
Observation in arena	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
	0	5	5	5	5	5	5
Observation in arena	+1	0	0	0	0	0	0
	Salivation	-	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
	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	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
	+3	0	0	0	0	0	0
	Respiration	-	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
	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	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
Defecation ^{a)}	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
Urination ^{a)}	ST	0	0	0	0	0	0
	T	0	0	0	0	0	0
	0.2 ± 0.4	0.6 ± 0.9	0.4 ± 0.5	0.4 ± 0.5	0.6 ± 0.9	0.0 ± 0.0	
	4.6 ± 5.1	1.8 ± 1.8	5.4 ± 6.9	0.8 ± 0.8	0.2 ± 0.4	0.4 ± 0.5	

a): (count/min)

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

Table 2-2 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	40	200	0	40	200
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Removal from cage	-2	0	0	0	0	0
Ease of removal	-1	0	1	0	0	1
	0	5	4	5	5	4
	+1	0	0	0	0	0
	+2	0	0	0	0	0
Vocalization	0	5	5	4	5	4
	+1	0	0	1	0	1
	+2	0	0	0	0	0
Muscle tone	-1	0	0	0	0	0
	0	5	5	5	5	5
	+1	0	0	0	0	0
Subnormal temperature	-	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0
Piloerection	-	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0
Staining hair	-	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0
Unkempt hair	-	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0
Paleness	-	5	5	5	5	5
	+	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
Lacrimation	-	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0
Exophthalmos	-	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0
Pupillary size	-1	0	0	0	0	0
	0	5	5	5	5	5
	+1	0	0	0	0	0
Salivation	-	5	5	4	5	5
	+	0	0	1	0	0
Secretion	-	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0
Posture	0	5	5	5	5	5
	+1	0	0	0	0	0
	+2	0	0	0	0	0
Motor activity	-2	0	0	0	0	0
	-1	0	1	0	0	1
	0	5	3	4	5	4
	+1	0	1	1	0	1
	+2	0	0	0	0	0
Observation in arena	Respiration	0	5	5	5	5
	+1	0	0	0	0	0
	+2	0	0	0	0	0
	+3	0	0	0	0	0
Tremor/twitch/convulsion	Lid closure	-	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0
Stereotypic behavior	Gait	-	5	5	5	5
	S	0	0	0	0	0
	T	0	0	0	0	0
	P	0	0	0	0	0
	GD	0	0	0	0	0
Abnormal behavior	Tremor/	0	5	5	5	5
	twitch/	+1	0	0	0	0
	convulsion	+2	0	0	0	0
	+3	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	0
	G	0	0	0	0	0
	S	0	0	0	0	0
	H	0	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	0
	R	0	0	0	0	0
	W	0	0	0	0	0
	V	0	0	0	0	0
	ST	0	0	0	0	0
	T	0	0	0	0	0
Defecation ^{a)}	0.0 ± 0.0	0.8 ± 1.8	0.4 ± 0.9	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0
Urination ^{a)}	2.0 ± 1.2	1.2 ± 1.8	1.6 ± 2.6	0.6 ± 1.3	1.0 ± 2.2	0.6 ± 1.3

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	40	200
Number of animals		5	5	5
Removal from cage	-2	0	0	0
	-1	0	0	0
	0	5	5	5
	+1	0	0	0
	+2	0	0	0
	0	5	4	3
	+1	0	1	2
	+2	0	0	0
	-1	0	0	0
	0	5	5	5
Handling observation	+1	0	0	0
	-	5	5	5
	+	0	0	0
	-	0	0	0
	+	0	0	0
	-	5	5	5
	+	0	0	0
	-	5	5	5
	+	0	0	0
	-	5	5	5
Observation in arena	Reddening	-	5	5
	Cyanosis	+	0	0
	Lacrimation	-	5	5
	Exophthalmos	+	0	0
	Pupillary size	-1	0	0
	0	5	5	5
	+1	0	0	0
	Salivation	-	5	5
	+	0	0	1
	Secretion	-	5	5
Observation in arena	Posture	+	0	0
	Motor activity	-2	0	0
	-1	0	0	0
	0	5	5	5
	+1	0	0	0
	+2	0	0	0
	Respiration	-	5	5
	Lid closure	+1	0	0
	Gait	+2	0	0
	GD	+3	0	0
Observation in arena	Tremor/twitch/convulsion	-	5	5
	Stereotypic behavior	+1	0	0
	Abnormal behavior	+2	0	0
	Defecation ^{a)}	+3	0	0
	Urination ^{a)}	-	5	5
	C	0	0	0
	G	0	0	0
	S	0	0	0
	B	0	0	0
	R	0	0	0

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	40	200
	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
	Air righting reflex	- +	0 5	0 5
	Forelimb (g)	356 ± 91		
	Hindlimb (g)	460 ± 18		
	0-10 (min) 10-20 (min) 20-30 (min) 30-40 (min) 40-50 (min) 50-60 (min)	109 ± 45 68 ± 56 37 ± 50 7 ± 9 3 ± 3 8 ± 15		
Motor activity [Interval]	Total	435 ± 120 486 ± 115 227 ± 65 ** 92 ± 55 28 ± 22 8 ± 11 8 ± 16 4 ± 3		
		403 ± 80 413 ± 25 109 ± 121 85 ± 59 29 ± 63 7 ± 13 3 ± 3		
		460 ± 255		

*: 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
	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	40	200
Administration period	1	158.06 ±5.43 (5)	158.28 ±7.07 (5)	157.98 ±6.70 (5)
	3	173.90 ±6.04 (5)	173.38 ±10.93 (5)	158.38 * ±9.57 (5)
	7	204.74 ±7.87 (5)	205.92 ±15.44 (5)	187.36 ±14.38 (5)
	14	258.26 ±5.88 (5)	265.24 ±18.03 (5)	238.88 ±19.65 (5)
	21	308.32 ±6.47 (5)	315.68 ±23.05 (5)	279.60 ±29.73 (5)
	28	343.32 ±7.92 (5)	351.32 ±23.61 (5)	298.46 * ±34.35 (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

B10-0103

Summary of food consumption (g/rat/day) : Male

	Dose (mg/kg/day)	0	40	200
Administration period	1	20.64 ± 0.84 (5)	19.58 ± 1.24 (5)	19.84 ± 1.56 (5)
	3	20.15 ± 1.26 (5)	18.82 ± 1.91 (5)	13.36 ** ± 3.13 (5)
	7	21.50 ± 1.58 (5)	21.98 ± 2.71 (5)	19.24 ± 2.83 (5)
	14	21.32 ± 0.82 (5)	22.22 ± 1.72 (5)	22.61 ± 2.93 (5)
	21	22.28 ± 0.85 (5)	21.99 ± 1.12 (5)	23.48 ± 3.43 (5)
	28	21.62 ± 0.75 (5)	21.31 ± 1.11 (5)	23.60 ± 2.57 (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	40	200
Urine volume (mL)		6.4 ±3.4 (5)	8.4 ±7.2 (5)	31.4 * ±15.8 (5)
Uosm (mOsm/L)		1324.8 ±662.5 (5)	1403.2 ±836.2 (5)	390.6 ±276.5 (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

Items	Group	Twenty-eight-day treatment			
		Dose (mg/kg/day)	0	40	200
No. of animals			5	5	5
Color					
SY		1	1	4	
Y		1	1	1	
YB		3	3	0	
Turbidity					
Clear		4	5	5	
Cloudy		1	0	0	
pH					
5.0		0	0	1	
6.0		3	3	4	
6.5		2	1	0	
7.0		0	1	0	
Protein					
-		0	1	3	
±		4	2	2	
2+		1	2	0	
Glucose					
-		5	5	5	
Ketones					
-		1	1	5	
±		2	4	0	
1+		2	0	0	
Occult blood					
-		5	1	1	
±		0	3	3	
1+		0	1	1	

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

B10-0103

Items	Group	Twenty-eight-day treatment			
		Dose (mg/kg/day)	0	40	200
	No. of animals		5	5	5
Urinaly sediment					
Red blood cells ^{a)}	0	5	5	5	
White blood cells ^{a)}	0	5	5	5	
Epithelial cells ^{a)}	0	5	4	5	
	1-5	0	1	0	
Casts ^{b)}	0	5	5	5	
Crystals ^{c)}	-	1	0	5	
	±	2	2	0	
	1+	0	2	0	
	2+	2	1	0	

^{a)}: Number of cells/10views($\times 400$).^{b)}: Number of casts/ $18 \times 18 \text{ mm}^2$.^{c)}: Incidence of crystals/ $18 \times 18 \text{ mm}^2$.

Table 7 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	40	200
RBC	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	775.0 ± 37.7 (5)	767.0 ± 32.7 (5)	851.0 ** ± 34.5 (5)
Hb	(g/dL)	14.74 ± 0.27 (5)	14.62 ± 0.67 (5)	15.78 * ± 0.48 (5)
Ht	(%)	43.82 ± 0.48 (5)	43.54 ± 2.15 (5)	47.08 * ± 1.52 (5)
MCV	(fL)	56.64 ± 2.50 (5)	56.78 ± 1.05 (5)	55.30 ± 0.80 (5)
MCH	(pg)	19.04 ± 0.82 (5)	19.04 ± 0.38 (5)	18.56 ± 0.30 (5)
MCHC	(g/dL)	33.58 ± 0.41 (5)	33.56 ± 0.35 (5)	33.54 ± 0.37 (5)
Platelet	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	108.44 ± 9.39 (5)	101.38 ± 11.68 (5)	106.80 ± 13.91 (5)
Reticulo	(%)	2.88 ± 0.54 (5)	3.00 ± 0.54 (5)	2.04 * ± 0.46 (5)
WBC	($\times 10^2/\mu\text{L}$)	84.56 ± 16.99 (5)	107.62 ± 21.99 (5)	105.34 ± 33.71 (5)
Differentiation of leukocyte				
Neutro	(%)	18.78 ± 4.55 (5)	23.98 ± 3.13 (5)	25.08 ± 6.03 (5)
Lymph	(%)	75.94 ± 4.88 (5)	70.16 ± 2.81 (5)	67.44 * ± 5.77 (5)
Eosino	(%)	0.90 ± 0.41 (5)	0.72 ± 0.16 (5)	1.10 ± 0.37 (5)
Baso	(%)	0.60 ± 0.12 (5)	0.68 ± 0.08 (5)	0.78 ± 0.19 (5)
Mono	(%)	2.40 ± 0.65 (5)	3.00 ± 0.42 (5)	3.70 * ± 0.75 (5)
LUC	(%)	1.38 ± 0.36 (5)	1.44 ± 0.09 (5)	1.94 * ± 0.53 (5)
PT	(sec)	17.36 ± 2.16 (5)	15.28 ± 3.40 (5)	15.56 ± 0.77 (5)
APTT	(sec)	24.16 ± 2.34 (5)	21.12 ± 2.43 (5)	19.28 ** ± 1.28 (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 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	40	200
AST	(IU/L)	76.2 ±14.2 (5)	64.8 ±11.5 (5)	115.0 ** ±16.5 (5)
ALT	(IU/L)	19.8 ±1.9 (5)	18.4 ±2.1 (5)	66.8 * ±17.4 (5)
ALP	(IU/L)	566.8 ±144.7 (5)	482.0 ±129.6 (5)	672.4 ±206.0 (5)
ChE	(IU/L)	52.0 ±8.8 (5)	59.6 ±8.7 (5)	65.8 ±9.9 (5)
γ-GTP	(IU/L)	0.60 ±0.27 (5)	0.74 ±0.33 (5)	1.56 ** ±0.33 (5)
T-Cho	(mg/dL)	55.0 ±6.6 (5)	61.2 ±3.3 (5)	56.8 ±17.5 (5)
TG	(mg/dL)	44.2 ±20.5 (5)	39.0 ±8.3 (5)	21.8 * ±6.6 (5)
BUN	(mg/dL)	12.68 ±1.93 (5)	11.64 ±2.07 (5)	13.90 ±2.23 (5)
Creatinine	(mg/dL)	0.228 ±0.019 (5)	0.246 ±0.026 (5)	0.352 ** ±0.048 (5)
T-Protein	(g/dL)	5.32 ±0.15 (5)	5.22 ±0.13 (5)	5.48 ±0.28 (5)
Albumin	(g/dL)	2.46 ±0.11 (5)	2.36 ±0.09 (5)	2.50 ±0.12 (5)
A/G ratio	(-)	0.864 ±0.078 (5)	0.826 ±0.037 (5)	0.840 ±0.037 (5)
Glucose	(mg/dL)	133.4 ±19.3 (5)	128.0 ±21.7 (5)	99.2 * ±15.5 (5)
T-Bil	(mg/dL)	0.044 ±0.009 (5)	0.046 ±0.011 (5)	0.098 ** ±0.027 (5)
TBA	(μmol/L)	19.74 ±10.39 (5)	26.30 ±15.30 (5)	67.24 ** ±31.59 (5)
IP	(mg/dL)	8.34 ±0.28 (5)	8.40 ±0.43 (5)	10.42 ** ±0.49 (5)
Ca	(mg/dL)	9.42 ±0.13 (5)	9.74 ** ±0.15 (5)	9.62 ±0.15 (5)
Na	(mEq/L)	142.6 ±0.9 (5)	141.2 ±0.4 (5)	141.8 ±1.5 (5)
K	(mEq/L)	4.92 ±0.22 (5)	4.98 ±0.26 (5)	4.58 ±0.22 (5)
Cl	(mEq/L)	106.02 ±0.63 (5)	112.84 ** ±1.78 (5)	124.54 ** ±2.10 (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 9 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	40	200
Liver	(g)	9.506 ±0.828 (5)	10.266 ±0.960 (5)	9.758 ±1.229 (5)
Heart	(g)	1.112 ±0.054 (5)	1.092 ±0.148 (5)	0.926 * ±0.078 (5)
Kidney(R)	(g)	1.194 ±0.047 (5)	1.202 ±0.145 (5)	1.168 ±0.126 (5)
Kidney(L)	(g)	1.210 ±0.078 (5)	1.166 ±0.144 (5)	1.184 ±0.132 (5)
Kidneys	(g)	2.404 ±0.120 (5)	2.368 ±0.288 (5)	2.352 ±0.256 (5)
Testis(R)	(g)	1.540 ±0.135 (5)	1.580 ±0.160 (5)	1.472 ±0.084 (5)
Testis(L)	(g)	1.536 ±0.142 (5)	1.562 ±0.179 (5)	1.440 ±0.082 (5)
Testes	(g)	3.076 ±0.276 (5)	3.142 ±0.337 (5)	2.912 ±0.164 (5)
Epididymis(R)	(g)	0.382 ±0.028 (5)	0.394 ±0.018 (5)	0.370 ±0.027 (5)
Epididymis(L)	(g)	0.368 ±0.019 (5)	0.380 ±0.028 (5)	0.350 ±0.012 (5)
Epididymides	(g)	0.750 ±0.045 (5)	0.774 ±0.043 (5)	0.720 ±0.032 (5)
Ventral prostate	(g)	0.444 ±0.083 (5)	0.384 ±0.074 (5)	0.202 ** ±0.038 (5)
Dorsolateral prostate	(g)	0.312 ±0.016 (5)	0.366 ±0.052 (5)	0.218 ** ±0.050 (5)
Seminal vesicle	(g)	0.860 ±0.185 (5)	0.974 ±0.148 (5)	0.538 * ±0.154 (5)
Brain	(g)	1.926 ±0.075 (5)	1.968 ±0.088 (5)	1.914 ±0.069 (5)
Spleen	(g)	0.708 ±0.083 (5)	0.698 ±0.065 (5)	0.568 ±0.129 (5)
Thymus	(mg)	487.82 ±124.46 (5)	491.88 ±154.83 (5)	389.30 ±107.85 (5)
Pituitary gland	(mg)	10.56 ±1.31 (5)	10.30 ±1.48 (5)	8.08 * ±0.77 (5)
Thyroid	(mg)	20.30 ±1.78 (5)	20.34 ±2.33 (5)	18.90 ±2.54 (5)
Adrenals	(mg)	48.46 ±3.72 (5)	59.68 ±9.99 (5)	51.36 ±7.25 (5)
Final body weight	(g)	325.20 ±6.33 (5)	333.30 ±22.57 (5)	272.60 * ±31.24 (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 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	40	200
Liver	(g/100g)	2.920 ±0.210 (5)	3.078 ±0.109 (5)	3.576 ** ±0.097 (5)
Heart	(g/100g)	0.342 ±0.011 (5)	0.326 ±0.038 (5)	0.342 ±0.029 (5)
Kidney(R)	(g/100g)	0.368 ±0.018 (5)	0.362 ±0.029 (5)	0.430 ** ±0.029 (5)
Kidney(L)	(g/100g)	0.372 ±0.029 (5)	0.350 ±0.029 (5)	0.438 * ±0.041 (5)
Kidneys	(g/100g)	0.740 ±0.046 (5)	0.712 ±0.058 (5)	0.868 ** ±0.070 (5)
Testis(R)	(g/100g)	0.474 ±0.037 (5)	0.474 ±0.019 (5)	0.546 * ±0.055 (5)
Testis(L)	(g/100g)	0.470 ±0.039 (5)	0.466 ±0.026 (5)	0.532 ±0.052 (5)
Testes	(g/100g)	0.944 ±0.076 (5)	0.940 ±0.045 (5)	1.078 * ±0.106 (5)
Epididymis(R)	(g/100g)	0.116 ±0.009 (5)	0.120 ±0.007 (5)	0.138 ±0.019 (5)
Epididymis(L)	(g/100g)	0.114 ±0.009 (5)	0.116 ±0.011 (5)	0.130 ±0.019 (5)
Epididymides	(g/100g)	0.230 ±0.016 (5)	0.236 ±0.017 (5)	0.268 ±0.036 (5)
Ventral prostate	(g/100g)	0.138 ±0.028 (5)	0.114 ±0.018 (5)	0.076 ** ±0.011 (5)
Dorsolateral prostate	(g/100g)	0.096 ±0.005 (5)	0.110 ±0.010 (5)	0.080 ±0.016 (5)
Seminal vesicle	(g/100g)	0.264 ±0.058 (5)	0.294 ±0.030 (5)	0.200 ±0.057 (5)
Brain	(g/100g)	0.592 ±0.025 (5)	0.590 ±0.035 (5)	0.708 ** ±0.072 (5)
Spleen	(g/100g)	0.218 ±0.028 (5)	0.210 ±0.014 (5)	0.210 ±0.044 (5)
Thymus	(mg/100g)	150.18 ±38.74 (5)	147.06 ±43.13 (5)	141.34 ±28.45 (5)
Pituitary gland	(mg/100g)	3.26 ±0.42 (5)	3.08 ±0.33 (5)	2.98 ±0.26 (5)
Thyroid	(mg/100g)	6.24 ±0.61 (5)	6.08 ±0.54 (5)	6.98 ±0.92 (5)
Adrenals	(mg/100g)	14.92 ±1.35 (5)	17.88 ±2.45 (5)	18.86 * ±1.76 (5)
Final body weight	(g)	325.20 ±6.33 (5)	333.30 ±22.57 (5)	272.60 * ±31.24 (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 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of macroscopic examinations: Twenty-eight-day treatment

Findings	Male		
	0	40	200 (mg/kg/day)
	ss	ss	ss
5 ^{a)}	5	5	
No abnormalities detected	5	5	0
Liver			
Enlargement	0	0	5
Kidney			
Enlargement, bilateral	0	0	3

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: Twenty-eight-day treatment

Findings	Grade	Male		
		0	40	200
		ss	ss	(mg/kg/day)
		5 ^{a)}	5	5
Trachea				
No abnormalities detected		5/5 ^{b)}	---	5/5
Lung				
No abnormalities detected		5/5	---	4/5
Inflammation/Focal	+	0/5	---	1/5
Submandibular gland				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Forestomach				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Glandular stomach				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Duodenum				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Jejunum				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Ileum				
No abnormalities detected		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
Liver				
No abnormalities detected		5/5	5/5	0/5
Degeneration, fatty/Hepatocyte/	+	0/5	0/5	4/5
Centrilobular	++	0/5	0/5	1/5
Microgranuloma	+	0/5	0/5	1/5
	++	0/5	0/5	2/5
Single cell necrosis/Hepatocyte	+	0/5	0/5	3/5
	++	0/5	0/5	2/5
Heart				
No abnormalities detected		4/5	---	5/5
Myocarditis/Focal	+	1/5	---	0/5

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: Twenty-eight-day treatment

Findings	Grade	Male		
		0	40	200
		ss	ss	ss
		5 ^{a)}	5	5
Kidney				
No abnormalities detected		5/5 ^{b)}	5/5	0/5
Degeneration, vacuolar/	±	0/5	0/5	1/5
Proximal tubule/Cortex	+	0/5	0/5	3/5
Pyknosis/Proximal tubule/Cortex	+	0/5	0/5	4/5
	±	0/5	0/5	1/5
Regeneration/Proximal tubule/Cortex	+	0/5	0/5	2/5
	++	0/5	0/5	2/5
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
Spinal cord				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Sciatic nerve				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Bone marrow				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Axillar lymph node				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Mesenteric lymph node				
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 12-3 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of histopathological examinations: Twenty-eight-day treatment

Findings	Grade	Male		
		0	40	200
		ss	ss	ss
		5 ^{a)}	5	5
Spleen				
No abnormalities detected		5/5 ^{b)}	---	5/5
Thymus				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Thyroid				
No abnormalities detected		4/5	---	5/5
Ultimobranchial rest	+	1/5	---	0/5
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.

Appendix 1-1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
General clinical observations of individual animals
0 mg/kg/day

Signs	Sex	Administration period			
		1	2	3	4 (week)
No abnormalities detected	Male	1 ^{a)} , 2, 3, 4, 5	1, 2, 3, 4, 5	1, 2, 3, 4, 5	1, 2, 3, 4, 5

a) Animal number.

Appendix 1-2 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
 General clinical observations of individual animals
 40 mg/kg/day

Signs	Sex	Administration period				(week)
		1	2	3	4	
No abnormalities detected	Male	6 ^{a)} , 10	6, 7, 8, 9, 10	6, 7, 8, 9, 10	6, 7, 8, 9, 10	
Decreased spontaneous locomotion	Male		7, 8, 9			

a) Animal number.

Appendix 1-3 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
 General clinical observations of individual animals
 200 mg/kg/day

Signs	Sex	Administration period			
		1	2	3	4 (week)
No abnormalities detected	Male		12, 13		14
Decreased spontaneous locomotion	Male	11 ^{a)} , 12, 13, 14, 15	11, 14	11, 12, 14, 15	11, 12, 13, 15
Decreased respiratory rate	Male	11, 12, 13, 14, 15	14		
Incomplete eyelid opening	Male	11, 12, 13, 14, 15			
Salivation	Male		11, 14, 15	11, 13, 14, 15	11, 13, 15

a) Animal number.

Appendix 2-1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Detailed clinical observations of individual animals

Male

Dose (mg/kg/day)	Predosing															Dosing 1 week														
	0	40	200	0	40	200	0	40	200	0	40	200	0	40	200	0	40	200	0	40	200	0	40	200	0	40	200			
Animal No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Ease of removal from cage	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	-1	
Vocalization	0	0	0	+1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+1	0	+1	0	0	0	+1	0	0	0	0	0	0	
Muscle tone	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Subnormal temperature	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Piloerection	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Staining hair	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Unkempt hair	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Paleness	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Handling observations	Reddening																													
Cyanosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lacration	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Exophthalmos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Pupillary size	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Salivation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Secretion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Posture	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Motor activity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+1	0	0	0	0	0	0	+1	+1	0	0	
Respiration	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Lid closure	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Gait	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Observation in arena	Tremor/twitch/convulsion																													
Stereotypic behavior	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Abnormal behavior	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Defecation (count/min)	0	0	0	0	1	2	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	
Urination (count/min)	13	0	4	5	1	3	4	2	0	0	1	13	0	13	0	1	0	1	2	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	

Appendix 2-2 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Detailed clinical observations of individual animals

Male

Dose (mg/kg/day)	Dosing 2 week															Dosing 3 week														
	0					40					200					0					40					200				
Animal No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Ease of removal from cage	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	
Vocalization	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+1	0	0	0	0	0	0	0	+1	0	0	0	0	+1	0	0	
Muscle tone	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Subnormal temperature	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Piloerection	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Staining hair	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Unkempt hair	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Paleness	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Handling observations																														
Reddening	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cyanosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lacration	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Exophthalmos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Pupillary size	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Salivation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Secretion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Posture	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Motor activity	0	0	0	0	0	0	0	+1	0	-1	0	0	+1	0	0	0	0	0	0	+1	0	0	0	0	0	-1	0	0		
Respiration	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Lid closure	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Observation in arena																														
Gait	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tremor/twitch/convulsion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Stereotypic behavior	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Abnormal behavior	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Defecation (count/min)	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
Urination (count/min)	0	2	3	3	2	0	2	4	0	0	2	0	0	6	0	0	0	3	0	0	0	5	0	0	0	3	0	0	0	

Appendix 2-3 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Detailed clinical observations of individual animals

Male

	Dosing 4 week														
	0					40					200				
Dose (mg/kg/day)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Animal No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Ease of removal from cage	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vocalization	0	0	0	0	0	0	0	+1	0	0	+1	0	0	+1	0
Muscle tone	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subnormal temperature	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piloerection	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Staining hair	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Unkempt hair	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Paleness	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Handling observations															
Reddening	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cyanosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lacrimation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Exophthalmos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pupillary size	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Secretion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Posture	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Motor activity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Respiration	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lid closure	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Observation in arena															
Gait	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tremor/twitch/convulsion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Stereotypic behavior	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Abnormal behavior	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Defecation (count/min)	0	0	0	2	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Urination (count/min)	1	0	0	0	0	0	1	10	0	0	0	0	0	4	0

Appendix 3 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
 Functional observations of individual animals

Male

		Dosing 4 week														
		0					40					200				
Dose (mg/kg/day)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Sensorimotor function	Animal No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	Approach contact/touch response	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Pinna response	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Pain response (tail pinch)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Pupillary reflex	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Grip strength	Air righting reflex	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Forelimb (g)	242	492	328	377	343	572	376	264	448	513	429	344	472	474	296
	Hindlimb (g)	484	450	437	461	468	521	402	559	334	613	419	402	397	455	393
	0-10 (min)	89	162	97	51	146	238	138	135	190	176	317	145	258	221	196
	10-20 (min)	141	88	85	0	27	142	12	91	70	145	205	47	15	271	5
Motor activity [interval]	20-30 (min)	96	0	4	87	0	56	18	44	22	0	77	85	100	165	0
	30-40 (min)	1	2	0	21	12	25	11	0	1	1	0	0	0	142	4
	40-50 (min)	2	5	0	0	8	37	0	0	1	0	0	0	3	30	2
	50-60 (min)	0	35	0	4	0	0	4	2	6	8	0	0	2	5	6
	Total (min)	329	292	186	163	193	498	183	272	290	330	599	277	378	834	213

Appendix 4-1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
 Body weights of individual animals (g) : Male

	Group	Twenty-eight-day treatment				
		Dose (mg/kg/day)	0			
	Animal No.	1	2	3	4	5
Administration period	1	150.3	157.4	158.3	158.7	165.6
	3	165.3	172.0	176.3	174.1	181.8
	7	191.7	207.1	204.9	207.1	212.9
	14	250.5	258.7	254.4	264.3	263.4
	21	304.2	307.9	300.8	317.6	311.1
	28	343.6	347.5	332.1	353.2	340.2

B10-0103

Appendix 4-2 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Body weights of individual animals (g) : Male

Administration period	Animal No.	Twenty-eight-day treatment				
		6	7	8	9	10
	1	147.3	159.0	159.3	158.7	167.1
	3	156.7	177.0	171.1	175.4	186.7
	7	182.6	210.7	198.9	216.3	221.1
	14	240.0	271.9	253.1	280.7	280.5
	21	285.2	324.1	299.2	342.4	327.5
	28	324.5	355.7	333.6	385.0	357.8

B10-0103

Appendix 4-3 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Body weights of individual animals (g) : Male

Group		Twenty-eight-day treatment				
Dose (mg/kg/day)		200				
	Animal No.	11	12	13	14	15
Administration period	1	150.0	153.0	157.8	163.0	166.1
	3	146.4	155.3	153.9	169.3	167.0
	7	180.7	174.3	176.0	203.0	202.8
	14	241.4	220.8	217.1	253.1	262.0
	21	285.7	267.6	238.9	285.4	320.4
	28	310.8	290.2	246.7	303.8	340.8

Appendix 5

Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Food consumption of individual animals (g/rat/day)

B10-0103

Sex	Dose (mg/kg/day)	Animal No.	Administration period				
			1	3	7	14	28 (days)
Male	0	1	19.55	18.50	18.75	20.12	21.61
		2	20.94	21.19	22.78	21.55	21.86
		3	20.55	20.75	22.11	21.51	21.58
		4	20.31	19.13	21.85	22.36	23.50
		5	21.84	21.20	22.02	21.07	22.84
	40	6	17.74	16.19	18.41	20.06	20.54
		7	20.24	19.61	22.24	23.17	22.26
		8	19.54	18.35	20.15	20.68	21.24
		9	19.27	18.53	24.43	23.83	23.39
		10	21.09	21.42	24.65	23.38	22.54
Female	200	11	17.61	9.11	18.20	22.66	22.57
		12	19.89	12.92	16.84	19.81	21.08
		13	19.20	12.34	16.69	19.88	21.34
		14	20.85	17.55	22.83	23.93	22.98
		15	21.66	14.90	21.66	26.78	29.45

Appendix 6-1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
 Urinalytic date of individual animals:Male

Group		Twenty-eight-day treatment				
Dose (mg/kg/day)		0				
Items	Animal No.	1 ss	2 ss	3 ss	4 ss	5 ss
Urine volume (mL)		12	6	5	3	6
Uosm (mOsm/L)		538	1403	1179	2362	1142

ss: scheduled sacrifice animal.

Appendix 6-2 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Urinalytic date of individual animals:Male

Group		Twenty-eight-day treatment				
Dose (mg/kg/day)		40				
Items	Animal No.	6 ss	7 ss	8 ss	9 ss	10 ss
Urine volume (mL)		4	3	20	4	11
Uosm (mOsm/L)		1433	2572	406	1758	847

ss: scheduled sacrifice animal.

Appendix 6-3 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Urinalytic date of individual animals:Male

Group		Twenty-eight-day treatment				
Dose (mg/kg/day)		200				
Items	Animal No.	11 ss	12 ss	13 ss	14 ss	15 ss
Urine volume (mL)		12	20	31	47	47
Uosm (mOsm/L)		840	478	213	216	206

ss: scheduled sacrifice animal.

Appendix 6-4

Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Urinalytic data of individual animals:Male

Group		Twenty-eight-day treatment									
Dose (mg/kg/day)		0									
Items	Animal No.	1	ss	2	ss	3	ss	4	ss	5	ss
Color		SY		YB		YB		YB		Y	
Turbidity		Cloudy		Clear		Clear		Clear		Clear	
pH		6.0		6.5		6.5		6.0		6.0	
Protein		±		±		±		2+		±	
Glucose		-		-		-		-		-	
Ketones		±		1+		1+		-		±	
Occult blood		-		-		-		-		-	
Urinalytic sediment											
Red blood cells ^{a)}		0		0		0		0		0	
White blood cells ^{a)}		0		0		0		0		0	
Epithelial cells ^{a)}		0		0		0		0		0	
Casts ^{b)}		0		0		0		0		0	
Crystals ^{c)}		-		2+		2+		±		±	

ss:scheduled sacrifice animal.

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

^{a)}:Number of cells/10views(×400).^{b)}:Number of casts/18×18 mm².^{c)}:Incidence of crystals/18×18 mm².

Appendix 6-5

Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Urinalytic data of individual animals:Male

Items	Animal No.	Group					Twenty-eight-day treatment					
		Dose (mg/kg/day)		40								
		6	ss	7	ss	8	ss	9	ss	10	ss	
Color		YB		YB		SY		YB		Y		
Turbidity		Clear		Clear		Clear		Clear		Clear		
pH		6.0		6.0		7.0		6.0		6.5		
Protein		±		1+		-		1+		±		
Glucose		-		-		-		-		-		
Ketones		-		±		±		±		±		
Occult blood		-		-		±		2+		-		
Urinalytic sediment												
Red blood cells ^{a)}		0		0		0		0		0		
White blood cells ^{a)}		0		0		0		0		0		
Epithelial cells ^{a)}		0		0		0		0		2		
Casts ^{b)}		0		0		0		0		0		
Crystals ^{c)}		±		1+		±		2+		1+		

ss:scheduled sacrifice animal.

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

^{a)}: Number of cells/10views(×400).^{b)}: Number of casts/18×18 mm².^{c)}: Incidence of crystals/18×18 mm².

Appendix 6-6

Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Urinalytic data of individual animals:Male

Group		Twenty-eight-day treatment									
Dose (mg/kg/day)		200									
Items	Animal No.	11	ss	12	ss	13	ss	14	ss	15	ss
Color		Y		SY		SY		SY		SY	
Turbidity		Clear		Clear		Clear		Clear		Clear	
pH		6.0		6.0		5.0		6.0		6.0	
Protein		±		±		-		-		-	
Glucose		-		-		-		-		-	
Ketones		-		-		-		-		-	
Occult blood		±		-		1+		±		±	
Urinalytic sediment											
Red blood cells ^{a)}		0		0		0		0		0	
White blood cells ^{a)}		0		0		0		0		0	
Epithelial cells ^{a)}		0		0		0		0		0	
Casts ^{b)}		0		0		0		0		0	
Crystals ^{c)}		-		-		-		-		-	

ss:scheduled sacrifice animal.

Color: SY : Slightly yellow, Y : Yellow.

^{a)}:Number of cells/10views(×400).^{b)}:Number of casts/18×18 mm².^{c)}:Incidence of crystals/18×18 mm².

Appendix 7-1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Hematological data of individual animals:Male

Group		Twenty-eight-day treatment				
Dose(mg/kg/day)		0				
Items	Animal No.	1 ss	2 ss	3 ss	4 ss	5 ss
RBC	(x10 ⁴ /μL)	733	735	809	799	799
Hb	(g/dL)	14.5	14.7	15.2	14.6	14.7
Ht	(%)	43.8	43.3	44.6	43.7	43.7
MCV	(fL)	59.8	58.9	55.1	54.6	54.8
MCH	(pg)	19.8	20.0	18.8	18.2	18.4
MCHC	(g/dL)	33.1	34.0	34.0	33.3	33.5
Platelet	(x10 ⁴ /μL)	99.6	100.4	122.8	110.1	109.3
Reticulo	(%)	3.4	2.9	2.0	2.9	3.2
WBC	(x10 ² /μL)	80.7	72.0	77.2	78.5	114.4
Differentiation of leukocyte						
Neutro	(%)	23.9	22.0	12.7	15.8	19.5
Lymph	(%)	69.7	73.3	82.2	79.1	75.4
Eosino	(%)	0.4	0.7	1.0	0.9	1.5
Baso	(%)	0.8	0.6	0.6	0.5	0.5
Mono	(%)	3.3	2.0	2.7	2.4	1.6
LUC	(%)	1.9	1.3	0.9	1.3	1.5
PT	(sec)	16.0	15.8	15.9	18.4	20.7
APTT	(sec)	23.9	23.1	21.0	25.8	27.0

ss: scheduled sacrifice animal.

Appendix 7-2 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Hematological data of individual animals:Male

Group		Twenty-eight-day treatment				
Dose(mg/kg/day)		40				
Items	Animal No.	6 ss	7 ss	8 ss	9 ss	10 ss
RBC	(x10 ⁴ /μL)	760	756	787	723	809
Hb	(g/dL)	14.2	14.5	15.4	13.8	15.2
Ht	(%)	42.2	42.5	45.9	41.3	45.8
MCV	(fL)	55.5	56.3	58.3	57.2	56.6
MCH	(pg)	18.6	19.2	19.6	19.0	18.8
MCHC	(g/dL)	33.6	34.1	33.6	33.3	33.2
Platelet	(x10 ⁴ /μL)	101.8	104.1	84.3	117.0	99.7
Reticulo	(%)	3.1	2.6	2.7	3.9	2.7
WBC	(x10 ² /μL)	121.5	84.2	134.4	111.8	86.2
Differentiation of leukocyte						
Neutro	(%)	27.9	20.0	21.7	24.9	25.4
Lymph	(%)	66.8	73.8	72.2	68.7	69.3
Eosino	(%)	0.7	0.6	0.6	1.0	0.7
Baso	(%)	0.7	0.7	0.8	0.6	0.6
Mono	(%)	2.5	3.4	3.2	3.3	2.6
LUC	(%)	1.4	1.5	1.5	1.5	1.3
PT	(sec)	12.9	14.6	21.2	14.5	13.2
APTT	(sec)	17.5	20.9	24.3	21.2	21.7

ss: scheduled sacrifice animal.

Appendix 7-3 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Hematological date of individual animals:Male

Group		Twenty-eight-day treatment				
Dose(mg/kg/day)		200				
Items	Animal No.	11 ss	12 ss	13 ss	14 ss	15 ss
RBC	(x10 ⁴ /μL)	793	861	872	849	860
Hb	(g/dL)	15.1	16.1	15.9	15.5	16.3
Ht	(%)	44.8	47.3	47.5	46.8	49.0
MCV	(fL)	56.5	54.9	54.4	55.1	55.6
MCH	(pg)	19.0	18.7	18.3	18.3	18.5
MCHC	(g/dL)	33.6	34.1	33.6	33.2	33.2
Platelet	(x10 ⁴ /μL)	99.3	112.9	86.5	121.7	113.6
Reticulo	(%)	2.5	2.3	1.3	2.0	2.1
WBC	(x10 ² /μL)	144.8	79.6	72.1	92.4	137.8
Differentiation of leukocyte						
Neutro	(%)	21.3	31.3	22.5	31.7	18.6
Lymph	(%)	72.4	61.9	69.8	60.6	72.5
Eosino	(%)	0.8	0.8	1.4	0.9	1.6
Baso	(%)	0.9	0.7	1.0	0.5	0.8
Mono	(%)	3.1	3.3	3.6	3.5	5.0
LUC	(%)	1.6	2.1	1.7	2.8	1.5
PT	(sec)	15.2	16.3	16.1	15.8	14.4
APTT	(sec)	18.0	20.9	20.3	19.0	18.2

ss: scheduled sacrifice animal.

Appendix 8-1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Blood chemical date of individual animals:Male

Group		Twenty-eight-day treatment				
Dose(mg/kg/day)		0				
Items	Animal No.	1 ss	2 ss	3 ss	4 ss	5 ss
AST	(IU/L)	76	71	81	57	96
ALT	(IU/L)	19	23	19	18	20
ALP	(IU/L)	802	479	433	597	523
ChE	(IU/L)	54	57	43	63	43
γ -GTP	(IU/L)	0.6	0.7	0.4	0.3	1.0
T-Cho	(mg/dL)	51	54	66	55	49
TG	(mg/dL)	75	47	31	47	21
BUN	(mg/dL)	13.9	15.4	10.6	11.7	11.8
Creatinine	(mg/dL)	0.25	0.24	0.23	0.22	0.20
T-Protein	(g/dL)	5.5	5.4	5.1	5.3	5.3
Albumin	(g/dL)	2.6	2.4	2.5	2.5	2.3
A/G ratio	(-)	0.90	0.80	0.96	0.89	0.77
Glucose	(mg/dL)	134	162	137	125	109
T-Bil	(mg/dL)	0.05	0.05	0.05	0.04	0.03
TBA	(μ mol/L)	30.4	17.2	30.5	13.3	7.3
IP	(mg/dL)	8.2	8.2	8.1	8.8	8.4
Ca	(mg/dL)	9.5	9.4	9.3	9.6	9.3
Na	(mEq/L)	144	142	142	143	142
K	(mEq/L)	5.0	4.6	5.2	4.9	4.9
Cl	(mEq/L)	106.0	105.0	106.7	106.3	106.1

ss: scheduled sacrifice animal.

Appendix 8-2 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Blood chemical data of individual animals:Male

Group		Twenty-eight-day treatment				
Dose(mg/kg/day)		40				
Items	Animal No.	6 ss	7 ss	8 ss	9 ss	10 ss
AST	(IU/L)	82	59	71	55	57
ALT	(IU/L)	21	16	18	17	20
ALP	(IU/L)	710	408	432	460	400
ChE	(IU/L)	61	70	59	46	62
γ-GTP	(IU/L)	0.3	0.6	1.2	0.8	0.8
T-Cho	(mg/dL)	61	57	60	66	62
TG	(mg/dL)	33	38	51	43	30
BUN	(mg/dL)	11.8	10.8	15.1	10.8	9.7
Creatinine	(mg/dL)	0.26	0.22	0.25	0.28	0.22
T-Protein	(g/dL)	5.2	5.1	5.4	5.1	5.3
Albumin	(g/dL)	2.4	2.3	2.5	2.3	2.3
A/G ratio	(-)	0.86	0.82	0.86	0.82	0.77
Glucose	(mg/dL)	103	149	146	107	135
T-Bil	(mg/dL)	0.06	0.05	0.03	0.05	0.04
TBA	(μmol/L)	41.1	27.2	9.8	41.6	11.8
IP	(mg/dL)	8.6	8.1	8.4	9.0	7.9
Ca	(mg/dL)	9.8	9.8	9.5	9.7	9.9
Na	(mEq/L)	141	141	141	142	141
K	(mEq/L)	4.9	5.0	5.4	4.9	4.7
Cl	(mEq/L)	110.0	114.2	114.4	113.2	112.4

ss: scheduled sacrifice animal.

Appendix 8-3 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Blood chemical date of individual animals:Male

Group		Twenty-eight-day treatment				
Dose(mg/kg/day)		200				
Items	Animal No.	11 ss	12 ss	13 ss	14 ss	15 ss
AST	(IU/L)	94	125	110	137	109
ALT	(IU/L)	54	58	66	59	97
ALP	(IU/L)	561	776	704	391	930
ChE	(IU/L)	72	63	66	51	77
γ-GTP	(IU/L)	1.5	2.0	1.5	1.1	1.7
T-Chol	(mg/dL)	81	67	41	40	55
TG	(mg/dL)	25	30	14	16	24
BUN	(mg/dL)	12.6	15.1	10.6	15.5	15.7
Creatinine	(mg/dL)	0.30	0.40	0.31	0.40	0.35
T-Protein	(g/dL)	5.4	5.9	5.2	5.3	5.6
Albumin	(g/dL)	2.4	2.7	2.4	2.5	2.5
A/G ratio	(-)	0.80	0.84	0.86	0.89	0.81
Glucose	(mg/dL)	106	119	82	85	104
T-Bil	(mg/dL)	0.12	0.08	0.12	0.06	0.11
TBA	(μmol/L)	92.8	14.1	89.0	73.6	66.7
IP	(mg/dL)	10.0	10.0	10.5	10.4	11.2
Ca	(mg/dL)	9.6	9.7	9.6	9.4	9.8
Na	(mEq/L)	144	141	142	142	140
K	(mEq/L)	4.4	4.9	4.5	4.7	4.4
Cl	(mEq/L)	123.2	127.5	125.7	124.1	122.2

ss: scheduled sacrifice animal.

Appendix 9-1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Absolute organ weights of individual animals:Male

Dose	(mg/kg/day)	0				
Items	Animal No.	1 ss	2 ss	3 ss	4 ss	5 ss
Liver	(g)	9.07	10.59	9.00	10.18	8.69
Heart	(g)	1.11	1.20	1.06	1.11	1.08
Kidney(R)	(g)	1.21	1.12	1.18	1.22	1.24
Kidney(L)	(g)	1.19	1.13	1.18	1.21	1.34
Kidneys	(g)	2.40	2.25	2.36	2.43	2.58
Testis(R)	(g)	1.33	1.66	1.52	1.66	1.53
Testis(L)	(g)	1.34	1.66	1.50	1.69	1.49
Testes	(g)	2.67	3.32	3.02	3.35	3.02
Epididymis(R)	(g)	0.35	0.38	0.36	0.41	0.41
Epididymis(L)	(g)	0.34	0.36	0.37	0.39	0.38
Epididymides	(g)	0.69	0.74	0.73	0.80	0.79
Ventral prostate	(g)	0.50	0.30	0.47	0.45	0.50
Dorsolateral prostate	(g)	0.33	0.32	0.29	0.32	0.30
Seminal vesicle	(g)	1.04	0.59	0.95	0.97	0.75
Brain	(g)	1.84	1.96	1.86	1.95	2.02
Spleen	(g)	0.74	0.67	0.61	0.69	0.83
Thymus	(mg)	680.3	450.5	507.1	337.6	463.6
Pituitary gland	(mg)	10.1	9.0	10.1	12.5	11.1
Thyroid	(mg)	20.6	21.4	22.5	18.6	18.4
Adrenals	(mg)	49.0	42.0	50.9	49.4	51.0
Final body weight	(g)	326.9	330.9	316.8	330.9	320.5

ss: scheduled sacrifice animal.

Appendix 9-2 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Absolute organ weights of individual animals:Male

Dose	(mg/kg/day)	40				
Items	Animal No.	6 ss	7 ss	8 ss	9 ss	10 ss
Liver	(g)	9.21	10.81	9.29	11.34	10.68
Heart	(g)	0.94	1.32	1.02	1.15	1.03
Kidney(R)	(g)	1.05	1.37	1.05	1.29	1.25
Kidney(L)	(g)	1.03	1.34	1.02	1.28	1.16
Kidneys	(g)	2.08	2.71	2.07	2.57	2.41
Testis(R)	(g)	1.39	1.57	1.50	1.82	1.62
Testis(L)	(g)	1.38	1.48	1.48	1.84	1.63
Testes	(g)	2.77	3.05	2.98	3.66	3.25
Epididymis(R)	(g)	0.39	0.40	0.37	0.39	0.42
Epididymis(L)	(g)	0.37	0.36	0.37	0.37	0.43
Epididymides	(g)	0.76	0.76	0.74	0.76	0.85
Ventral prostate	(g)	0.34	0.38	0.29	0.43	0.48
Dorsolateral prostate	(g)	0.30	0.39	0.35	0.44	0.35
Seminal vesicle	(g)	0.86	0.97	0.80	1.09	1.15
Brain	(g)	1.93	2.07	1.85	1.95	2.04
Spleen	(g)	0.61	0.68	0.68	0.74	0.78
Thymus	(mg)	431.4	378.7	374.9	528.8	745.6
Pituitary gland	(mg)	9.9	11.9	8.0	11.1	10.6
Thyroid	(mg)	17.9	19.4	19.0	21.7	23.7
Adrenals	(mg)	55.6	72.6	45.6	63.6	61.0
Final body weight	(g)	311.4	338.0	312.7	366.3	338.1

ss: scheduled sacrifice animal.

Appendix 9-3 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Absolute organ weights of individual animals:Male

Dose	(mg/kg/day)	200				
Items	Animal No.	11 ss	12 ss	13 ss	14 ss	15 ss
Liver	(g)	10.39	9.61	7.77	9.99	11.03
Heart	(g)	0.99	0.82	0.87	1.00	0.95
Kidney(R)	(g)	1.18	1.16	1.04	1.09	1.37
Kidney(L)	(g)	1.15	1.21	1.08	1.08	1.40
Kidneys	(g)	2.33	2.37	2.12	2.17	2.77
Testis(R)	(g)	1.61	1.40	1.42	1.44	1.49
Testis(L)	(g)	1.56	1.39	1.38	1.38	1.49
Testes	(g)	3.17	2.79	2.80	2.82	2.98
Epididymis(R)	(g)	0.41	0.38	0.37	0.35	0.34
Epididymis(L)	(g)	0.36	0.33	0.36	0.35	0.35
Epididymides	(g)	0.77	0.71	0.73	0.70	0.69
Ventral prostate	(g)	0.25	0.20	0.16	0.23	0.17
Dorsolateral prostate	(g)	0.29	0.19	0.18	0.25	0.18
Seminal vesicle	(g)	0.78	0.41	0.54	0.56	0.40
Brain	(g)	1.98	1.83	1.88	1.89	1.99
Spleen	(g)	0.78	0.43	0.54	0.56	0.53
Thymus	(mg)	471.3	412.7	257.7	298.5	506.3
Pituitary gland	(mg)	9.2	7.3	7.4	8.2	8.3
Thyroid	(mg)	21.3	14.8	18.5	19.3	20.6
Adrenals	(mg)	48.2	46.9	43.6	60.0	58.1
Final body weight	(g)	288.7	259.8	226.6	278.9	309.0

ss: scheduled sacrifice animal.

Appendix 10-1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Relative organ weights of individual animals:Male

Dose	(mg/kg/day)	0				
Items	Animal No.	1 ss	2 ss	3 ss	4 ss	5 ss
Liver	(g/100g)	2.77	3.20	2.84	3.08	2.71
Heart	(g/100g)	0.34	0.36	0.33	0.34	0.34
Kidney(R)	(g/100g)	0.37	0.34	0.37	0.37	0.39
Kidney(L)	(g/100g)	0.36	0.34	0.37	0.37	0.42
Kidneys	(g/100g)	0.73	0.68	0.74	0.74	0.81
Testis(R)	(g/100g)	0.41	0.50	0.48	0.50	0.48
Testis(L)	(g/100g)	0.41	0.50	0.47	0.51	0.46
Testes	(g/100g)	0.82	1.00	0.95	1.01	0.94
Epididymis(R)	(g/100g)	0.11	0.11	0.11	0.12	0.13
Epididymis(L)	(g/100g)	0.10	0.11	0.12	0.12	0.12
Epididymides	(g/100g)	0.21	0.22	0.23	0.24	0.25
Ventral prostate	(g/100g)	0.15	0.09	0.15	0.14	0.16
Dorsolateral prostate	(g/100g)	0.10	0.10	0.09	0.10	0.09
Seminal vesicle	(g/100g)	0.32	0.18	0.30	0.29	0.23
Brain	(g/100g)	0.56	0.59	0.59	0.59	0.63
Spleen	(g/100g)	0.23	0.20	0.19	0.21	0.26
Thymus	(mg/100g)	208.1	136.1	160.1	102.0	144.6
Pituitary gland	(mg/100g)	3.1	2.7	3.2	3.8	3.5
Thyroid	(mg/100g)	6.3	6.5	7.1	5.6	5.7
Adrenals	(mg/100g)	15.0	12.7	16.1	14.9	15.9
Final body weight	(g)	326.9	330.9	316.8	330.9	320.5

ss: scheduled sacrifice animal.

Appendix 10-2 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Relative organ weights of individual animals:Male

Dose	(mg/kg/day)	40				
Items	Animal No.	6 ss	7 ss	8 ss	9 ss	10 ss
Liver	(g/100g)	2.96	3.20	2.97	3.10	3.16
Heart	(g/100g)	0.30	0.39	0.33	0.31	0.30
Kidney(R)	(g/100g)	0.34	0.41	0.34	0.35	0.37
Kidney(L)	(g/100g)	0.33	0.40	0.33	0.35	0.34
Kidneys	(g/100g)	0.67	0.81	0.67	0.70	0.71
Testis(R)	(g/100g)	0.45	0.46	0.48	0.50	0.48
Testis(L)	(g/100g)	0.44	0.44	0.47	0.50	0.48
Testes	(g/100g)	0.89	0.90	0.95	1.00	0.96
Epididymis(R)	(g/100g)	0.13	0.12	0.12	0.11	0.12
Epididymis(L)	(g/100g)	0.12	0.11	0.12	0.10	0.13
Epididymides	(g/100g)	0.25	0.23	0.24	0.21	0.25
Ventral prostate	(g/100g)	0.11	0.11	0.09	0.12	0.14
Dorsolateral prostate	(g/100g)	0.10	0.12	0.11	0.12	0.10
Seminal vesicle	(g/100g)	0.28	0.29	0.26	0.30	0.34
Brain	(g/100g)	0.62	0.61	0.59	0.53	0.60
Spleen	(g/100g)	0.20	0.20	0.22	0.20	0.23
Thymus	(mg/100g)	138.5	112.0	119.9	144.4	220.5
Pituitary gland	(mg/100g)	3.2	3.5	2.6	3.0	3.1
Thyroid	(mg/100g)	5.7	5.7	6.1	5.9	7.0
Adrenals	(mg/100g)	17.9	21.5	14.6	17.4	18.0
Final body weight	(g)	311.4	338.0	312.7	366.3	338.1

ss: scheduled sacrifice animal.

Appendix 10-3 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Relative organ weights of individual animals:Male

Dose	(mg/kg/day)	200				
Items	Animal No.	11 ss	12 ss	13 ss	14 ss	15 ss
Liver	(g/100g)	3.60	3.70	3.43	3.58	3.57
Heart	(g/100g)	0.34	0.32	0.38	0.36	0.31
Kidney(R)	(g/100g)	0.41	0.45	0.46	0.39	0.44
Kidney(L)	(g/100g)	0.40	0.47	0.48	0.39	0.45
Kidneys	(g/100g)	0.81	0.92	0.94	0.78	0.89
Testis(R)	(g/100g)	0.56	0.54	0.63	0.52	0.48
Testis(L)	(g/100g)	0.54	0.54	0.61	0.49	0.48
Testes	(g/100g)	1.10	1.08	1.24	1.01	0.96
Epididymis(R)	(g/100g)	0.14	0.15	0.16	0.13	0.11
Epididymis(L)	(g/100g)	0.12	0.13	0.16	0.13	0.11
Epididymides	(g/100g)	0.26	0.28	0.32	0.26	0.22
Ventral prostate	(g/100g)	0.09	0.08	0.07	0.08	0.06
Dorsolateral prostate	(g/100g)	0.10	0.07	0.08	0.09	0.06
Seminal vesicle	(g/100g)	0.27	0.16	0.24	0.20	0.13
Brain	(g/100g)	0.69	0.70	0.83	0.68	0.64
Spleen	(g/100g)	0.27	0.17	0.24	0.20	0.17
Thymus	(mg/100g)	163.2	158.9	113.7	107.0	163.9
Pituitary gland	(mg/100g)	3.2	2.8	3.3	2.9	2.7
Thyroid	(mg/100g)	7.4	5.7	8.2	6.9	6.7
Adrenals	(mg/100g)	16.7	18.1	19.2	21.5	18.8
Final body weight	(g)	288.7	259.8	226.6	278.9	309.0

ss: scheduled sacrifice animal.

Appendix 11-1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats

Pathological findings of individual animals: Twenty-eight-day treatment

Sex	Dose (mg/kg/day)	Animal No.	Fate	Macroscopic findings	Histopathological findings ^{a)}
Male	0	1	ss	No abnormalities detected	Heart Myocarditis/Focal + Thyroid Ultimobranchial rest +
		2	ss	No abnormalities detected	No abnormalities detected
		3	ss	No abnormalities detected	No abnormalities detected
		4	ss	No abnormalities detected	No abnormalities detected
		5	ss	No abnormalities detected	No abnormalities detected
	40	6	ss	No abnormalities detected	No abnormalities detected
		7	ss	No abnormalities detected	No abnormalities detected
		8	ss	No abnormalities detected	No abnormalities detected
		9	ss	No abnormalities detected	No abnormalities detected
		10	ss	No abnormalities detected	No abnormalities detected
	200	11	ss	Liver Enlargement	Liver Degeneration, fatty/Hepatocyte/ Centrilobular + Microgranuloma + Single cell necrosis/Hepatocyte + Kidney Regeneration/Proximal tubule/ Cortex ±
		12	ss	Liver Enlargement Kidney Enlargement (bilateral)	Liver Degeneration, fatty/Hepatocyte/ Centrilobular ++ Single cell necrosis/Hepatocyte + Kidney Degeneration, vacuolar/ Proximal tubule/Cortex + Pyknosis/Proximal tubule/Cortex + Regeneration/Proximal tubule/ Cortex ++

a) Organs/tissues examined as follows for the 0 and 200 mg/kg/day groups: trachea, lungs, submandibular gland, forestomach, glandular stomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rectum, pancreas, liver, heart, kidney, urinary bladder, testis, epididymides, ventral prostate, dorsolateral prostate, coagulating gland, seminal vesicle, spinal cord, sciatic nerve, bone marrow, axillary lymph node, mesenteric lymph node, spleen, thymus, thyroid, parathyroid, adrenals, eye ball, skeletal muscle, bone and mammary gland.

Organs/tissues examined as follows for the 40 mg/kg/day group: liver and kidney.

ss: scheduled sacrifice animal.

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

Appendix 11-2 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats

Pathological findings of individual animals: Twenty-eight-day treatment

Sex	Dose (mg/kg/day)	Animal No.	Fate	Macroscopic findings	Histopathological findings ^{a)}
		13	ss	Liver Enlargement Kidney Enlargement (bilateral)	Lung Inflammation/Focal + Liver Degeneration, fatty/Hepatocyte/ Centrilobular + Single cell necrosis/Hepatocyte + Kidney Degeneration, vacuolar/ Proximal tubule/Cortex + Pyknosis/Proximal tubule/Cortex + Regeneration/Proximal tubule/ Cortex +
		14	ss	Liver Enlargement	Liver Degeneration, fatty/Hepatocyte/ Centrilobular + Microgranuloma ++ Single cell necrosis/Hepatocyte ++ Kidney Degeneration, vacuolar/ Proximal tubule/Cortex + Pyknosis/Proximal tubule/Cortex + Regeneration/Proximal tubule/ Cortex +
Male	200				
		15	ss	Liver Enlargement Kidney Enlargement (bilateral)	Liver Degeneration, fatty/Hepatocyte/ Centrilobular + Microgranuloma ++ Single cell necrosis/Hepatocyte ++ Kidney Degeneration, vacuolar/ Proximal tubule/Cortex ± Pyknosis/Proximal tubule/Cortex + Regeneration/Proximal tubule/ Cortex ++

a) Organs/tissues examined as follows for the 200 mg/kg/day group: trachea, lungs, submandibular gland, forestomach, glandular stomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rectum, pancreas, liver, heart, kidney, urinary bladder, testis, epididymides, ventral prostate, dorsolateral prostate, coagulating gland, seminal vesicle, spinal cord, sciatic nerve, bone marrow, axillary lymph node, mesenteric lymph node, spleen, thymus, thyroid, parathyroid, adrenals, eye ball, skeletal muscle, bone and mammary gland.

ss: scheduled sacrifice animal.

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

添付資料

理化学試験結果

1. 試験方法

1.1 被験物質の保管条件下における安定性の確認

本試験の投与期間終了後に赤外吸収スペクトルを測定した。

a) 使用機器

赤外分光光度計 FT-720 (堀場製作所)

b) 測定波数

4000 cm⁻¹ ~ 400 cm⁻¹

c) 前処理法

臭化カリウム液膜法

d) 判断基準

本試験の投与開始前（当試験施設で実施した「Bromodichloromethane 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 X02-0248、非 GLP 試験）において測定した投与期間終了後）の赤外吸収スペクトル及び本試験の投与期間終了後に測定した赤外吸収スペクトルに変化が認められないこと。

1.2 投与に用いる被験物質液の濃度確認

初回に調製した 4.00 及び 0.800 w/v% 被験物質液について、ガスクロマトグラフィー質量分析法により被験物質液中の被験物質濃度を 1 回測定した。

a) 分析法の概要

X02-0248 において実施した分析法バリデーションに基づき分析法を決定した。

1) 前処理法

被験物質液からサンプリング（中層 n=1）し、前処理操作を行った。

(1) 4.00 w/v% 被験物質液

被験物質液 0.5 mL をヘキサンで 50 mL に定容した。この液 0.5 mL をヘキサンで 40 mL に定容して分析試料（希釀倍率 8000）とした。

(2) 0.800 w/v% 被験物質液

被験物質液 0.5 mL をヘキサンで 20 mL に定容した。この液 0.5 mL をヘキサンで 20 mL に定容して分析試料（希釀倍率 1600）とした。

2) 標準溶液の調製

被験物質 0.05472 g を量りとり、ヘキサンで 25 mL に定容して 2188.8 µg/mL 標準原液を調製した。標準原液 0.5 mL をヘキサンで 10 mL に定容して 109 µg/mL 標準溶液を調製した。さらにこれより 0.5 mL をヘキサンで 10 mL に定容して 5.45 µg/mL 標準溶液を調製した。

3) 分析条件

(1) 使用機器 (GC/MS)

質量分析計: QP-2010 (島津製作所)

ガスクロマトグラフ: GC-2010 (島津製作所)

オートインジェクター: AOC-20i (島津製作所)

オートサンプラー: AOC-20s (島津製作所)

データ処理装置: GCMSSolution (島津製作所)

(2) 測定条件

カラム:	HP-1MS (F.T. 0.25 μm、 0.25 mm I.D. × 30 m、 アジレント・テクノロジー)
オーブン温度:	40°C
キャリアーガス:	ヘリウム
制御モード:	定線速度
カラム流量:	0.69 mL/min
線速度:	30.0 cm/sec
注入口温度:	200°C
注入方法:	スプリット (スプリット比 20:1)
注入量:	0.5 μL
溶媒溶出時間:	3 min
インターフェース温度:	250°C
イオン源温度:	200°C
イオン化法:	EI (positive)
イオン化エネルギー:	70 eV
検出法:	SIM
検出イオン:	m/z 85

b) データ処理

1) 検出値及び定量分析法

ピーク面積を検出値とした。

X02-0248 における分析法バリデーションの結果、原点を通過する良好な直線性が確認されたため、分析試料の定量分析は 1 点検量で行った。

2) 測定濃度の算出

被験物質液の測定濃度 (C: w/v%) は有効数字 4 術目を四捨五入して有効数字 3 術で表示した。

$$C = \frac{Cs \times A \times D}{As \times 10000}$$

Cs: 標準溶液の濃度 (μg/mL)

As: 標準溶液の検出値

A: 分析試料の検出値

D: 分析試料の希釈倍率

3) 相対比の算出

設定濃度に対する相対比 (R.N.: %) は有効数字 4 術目を四捨五入して有効数字 3 術で表示した

$$R.N. = \frac{\text{測定濃度}}{\text{設定濃度}} \times 100$$

c) 判断基準

R.N.が 100±10% 以内であること。

2. 試験成績

2.1 被験物質の保管条件下における安定性の確認

X02-0248 の投与期間終了後の赤外吸収スペクトル (Figure 1) 及び本試験の投与期間終了後の赤外吸収スペクトル (Figure 2) において変化はみられなかった。

2.2 被験物質液の濃度確認

4.00 及び 0.800 w/v% 被験物質液の R.N. はそれぞれ 97.5 及び 98.1% であり判断基準を満たした (Table 1)。

Table 1 Concentration analysis of the dose formulations

Date of analysis	Nominal conc. (w/v%)	Actual conc. (w/v%)	R.N. (%)
July 3, 2012	4.00	3.90	97.5
	0.800	0.785	98.1

R.N.: Rate to the nominal concentration

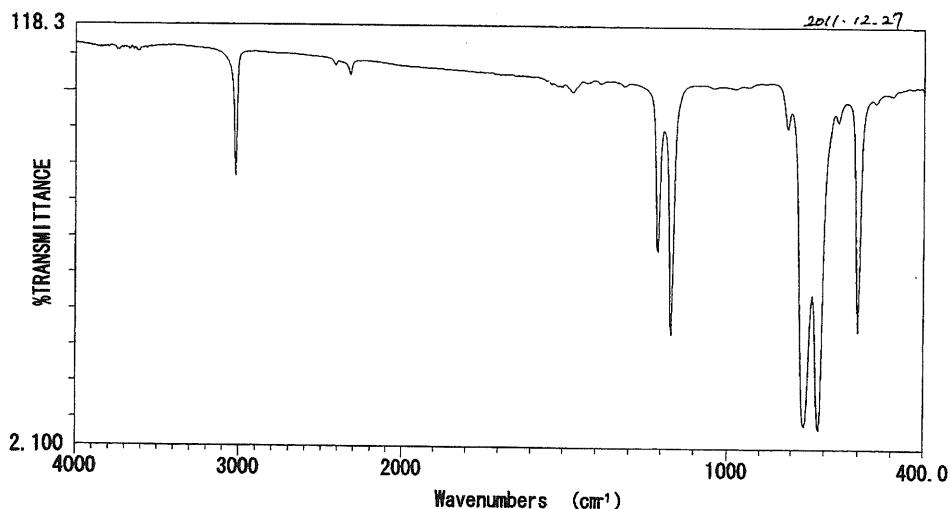


Figure 1 IR spectrum of the test substance measured before the dosing period
(after the end of the dosing period (X02-0248))

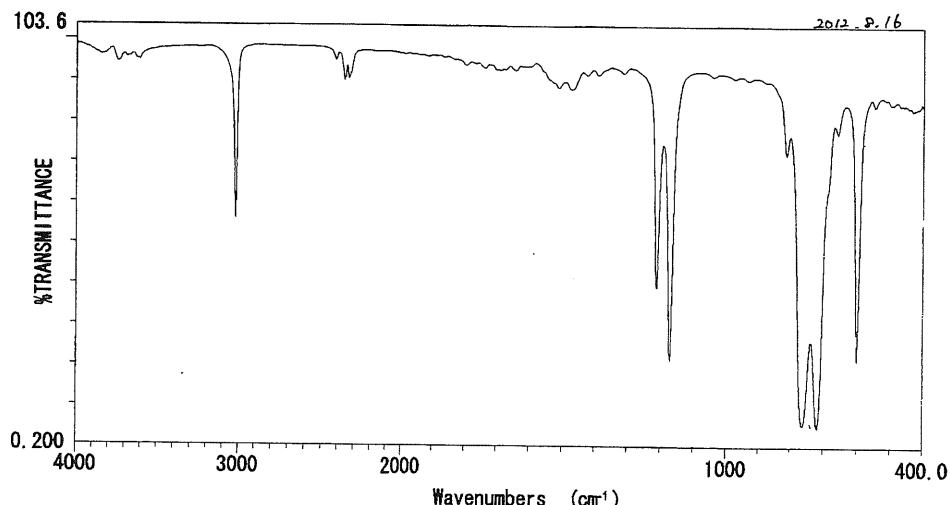


Figure 2 IR spectrum of the test substance measured after the end of the dosing period (B10-0103)