

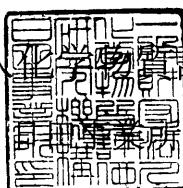
試験番号 B10-0114

## 最 終 報 告 書

遺伝子発現量解析のための  
Cisplatin のラットにおける 28 日間反復経口投与毒性試験

2014 年 3 月

一般財団法人 化学物質評価研究機構



本文書は正本を正確に転写したものです。

一般財団法人 化学物質評価研究機構 日田事業所

2014 年 3 月 27 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 .....	10
15. 試験方法 .....	12
15.1 被験物質の設定用量 .....	12
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 .....	14
15.7 機能検査 .....	14
15.8 体重測定 .....	15
15.9 摂餌量測定 .....	15
15.10 尿検査 .....	15
15.11 血液検査 .....	16
15.12 病理学的検査 .....	19
15.13 統計学的方法 .....	22
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. 考 察 .....	26
19. 参考文献 .....	27

#### Figures

1 Body weights .....	28
2 Food consumption .....	29

#### Tables

1 Summary of general clinical observations .....	30
2 Summary of detailed clinical observations .....	31
3 Summary of functional observations .....	35
4 Summary of body weights .....	36
5 Summary of food consumption .....	37
6 Summary of urinalyses .....	38
7 Summary of hematological examinations .....	41
8 Summary of blood chemical examinations .....	43
9 Summary of absolute organ weights .....	45
10 Summary of relative organ weights .....	47
11 Summary of macroscopic examinations .....	49
12 Summary of histopathological examinations .....	51

#### Appendices

1 General clinical observations of individual animals .....	56
2 Detailed clinical observations of individual animals .....	59
3 Functional observations individual animals .....	62
4 Body weights of individual animals .....	63
5 Food consumption of individual animals .....	69
6 Urinalytic data of individual animals .....	70
7 Hematological data of individual animals .....	76
8 Blood chemical data of individual animals .....	82
9 Absolute organ weights of individual animals .....	88
10 Relative organ weights of individual animals .....	94
11 Pathological findings of individual animals .....	100

## 1. 表 題

遺伝子発現量解析のための Cisplatin 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

Cisplatin 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、Cisplatin の毒性を明らかにすることを目的とする。また、遺伝子発現量解析のための試料を採取する。

## 5. 試験法

以下の試験法を参考に実施した。

- a) 「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 7 号、平成 23・03・29 製局第 5 号、環保企発第 110331009 号、一部改正: 平成 24 年 4 月 2 日、薬食発 0402 第 1 号、平成 24・03・28 製局第 2 号、環保企発第 120402001 号) に定める「哺乳類を用いる 28 日間の反復投与毒性試験」
- b) OECD Guideline for the Testing of Chemicals, No. 407, October 3, 2008, "Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents"

## 6. GLP 基準

適用しなかった。

## 7. 動物愛護

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

- a) 「動物の愛護及び管理に関する法律」(法律第 105 号、昭和 48 年)
- b) 「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(環境省告示第 88 号、平成 18 年)
- c) 「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」(文部科学省告示第 71 号、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	2013 年 10 月 24 日
動物入荷日	2013 年 10 月 29 日
投与開始日	2013 年 11 月 7 日
14 日間投与後解剖日	2013 年 11 月 21 日
28 日間投与後解剖日	2013 年 12 月 5 日
試験終了日	2014 年 3 月 27 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

2014 年 3 月 27 日

試験責任者

寶珠山五月

### 13. 要 約

Cisplatin 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)ラットに生理食塩液に懸濁させた Cisplatin を 14 又は 28 日間毎日強制経口投与した。投与用量は 0 (生理食塩液) 、 0.75 及び 3.75 mg/kg/day とし、 14 日間投与群には 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 CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 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、 3.75 mg/kg 群で糞量減少、自発運動低下、呼吸数減少、被毛粗剛、削瘦、半眼、摂餌不良及びうずくまりがみられ、蒼白及び無便がみられた 1 例が投与 26 日目に瀕死状態となった。

詳細な一般状態観察では 3.75 mg/kg 群で投与 4 週目に被毛粗剛がみられた。

機能検査では 3.75 mg/kg 群で後肢握力及び自発運動量の低値がみられた。

体重では、 3.75 mg/kg 群で投与 7~21 日目に低値がみられ、投与 28 日目には前回測定値からの減少及び低値がみられた。

摂餌量では 3.75 mg/kg 群で投与 3~28 日目に低値がみられた。

尿検査では 3.75 mg/kg 群で尿浸透圧の低値及び尿沈渣中の結晶の消失がみられた。

血液学的検査では、 0.75 mg/kg 群で 28 日間投与後に MCV の低値、 3.75 mg/kg 群で 14 日間投与後から網状赤血球数比率及び白血球数の低値、 28 日間投与後に MCV 及び血小板数の低値がみられた。

血液生化学的検査では、 3.75 mg/kg 群で 14 日間投与後からクレアチニンの高値、 BUN の高値又は高値傾向がみられた。

器官重量では、 3.75 mg/kg 群で 28 日間投与後に腎臓の絶対及び相対重量の高値、前立腺及び精嚢の絶対及び相対重量の低値、脾臓及び胸腺の絶対及び相対重量の低値又は低値傾向がみられた。

剖検では、 3.75 mg/kg 群で 14 日間投与後に腎臓の皮膚境界部の変色、 14 日間投与後から前胃の境界縁隆起、 28 日間投与後に脱水、削瘦、腸管の黒色内容物、腎臓の腫大及び退色、精嚢の小型化、腋窩リンパ節、脾臓及び胸腺の小型化、副腎の腫大がみられた。瀕死動物では、削瘦、腸管の黒色内容物、腎臓の腫大及び退色、脾臓及び胸腺の小型化並びに胸水がみられた。

病理組織学的検査では、 0.75 mg/kg 群で 28 日間投与後に腎臓の皮膚境界部の尿細管の再生及び脾臓の髓外造血低下、 3.75 mg/kg 群で 14 日間投与後から前胃の境界縁の扁平上皮過形成、腎臓の尿細管の変性、皮膚境界部の尿細管の単細胞壊死、再生及び核肥大、骨髄の低形成及び脾臓の髓外造血低下、 28 日間投与後に腺胃の幽門腺部粘膜の潰瘍、十二指腸の限局性粘膜壊死、空腸の粘膜萎縮、腎臓の皮膚境界部の尿細管拡張、髓質内帯の尿細管の単細胞壊死、再生及び核肥大、精嚢の萎縮、腋窩リンパ節、腸間膜リンパ節、脾臓及び胸腺の萎縮、副腎

の皮質肥大、乳腺の萎縮がみられた。瀕死動物では、十二指腸～直腸の粘膜萎縮、腎臓の尿細管の変性、皮髓境界部の尿細管の単細胞壊死、再生、核肥大及び拡張、髓質内帶の尿細管の単細胞壊死、再生及び核肥大、精巣のびまん性精細管変性及び巨細胞、精巣上体の両側性細胞残渣、腹葉前立腺、精嚢、腋窩リンパ節、腸間膜リンパ節、脾臓及び胸腺の萎縮、骨髓の低形成並びに副腎皮質の肥大がみられた。

以上のとおり、本試験条件下において Cisplatin の投与により、腎臓への重篤な毒性影響が認められ、造血器及び胃腸への毒性影響並びに副生殖器及び乳腺への二次的な影響もみられた。

## 14. 試験材料

### 14.1 被験物質

#### a) 名称等

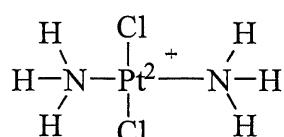
名 称 *cis*-ジアンミンジクロロ白金(II)  
 別 名 シスプラチン  
 CAS 番号 15663-27-1

#### b) 製造元及びロット番号

製造元 和光純薬工業  
 ロット番号 TLN0106

#### c) 構造式等

##### 構造式



分子式  $\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2$   
 分子量 300.05

#### d) 純度等

純 度 99.7% (HPLC)  
 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 0.253 g/100 mL (25°C)  
 常温における性状 黄色、粉末  
 安定性 光、湿気により変質する。

##### 溶媒に対する溶解度（溶解性）

溶 媒	溶解度（溶解性）
エタノール	不溶
アセトン	不溶
トルエン	不溶
ジメチルスルホキシド (DMSO)	可溶 $\geq 100 \text{ mg/mL}$

#### f) 保管条件

遮光した気密容器に入れ、被験物質保管室のキャビネットにて室温保管した。

保管温度の実測値 18.4~23.1°C (許容範囲 10~30°C)

保管場所及び期間 キャビネット 5、2013年4月24日~2013年5月8日

キャビネット 1、2013年5月8日~2013年11月25日

#### g) 被験物質の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「Cisplatin 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 X02-0275、非 GLP 試験）において確認した。

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。また、被験物質は黄色灯下で取り扱った。

### 14.2 媒体

#### a) 名称

生理食塩液

#### b) 選択理由

過去に生理食塩液を媒体とした静脈内投与での毒性試験が実施されていることから、被験物質液の調製法は生理食塩液を用いて検討した。その結果、被験物質は生理食塩液に 0.3 w/v% の濃度で溶解しなかったが均一に懸濁した。また、被験物質液は調製後 7 日間の遮光下での冷所保管で色調の変化等の異常が認められなかったことから、生理食塩液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
生理食塩液	大塚製薬工場	注射用	3C83N	試薬保管室	室温

### 14.3 使用動物

実験動物として確立された動物であり、一般毒性試験に汎用され、当試験施設においても背景データを保有している Crl:CD(SD)ラット (SPF) を日本チャールス・リバ一日野飼育センターから入手した。

4 週齢の雄ラットを 30 匹入手し、1 ケージあたり 5 匹の群飼育で入荷 6 日後まで検疫・馴化を行った。さらに、投与開始 1 日前に相当する入荷 8 日後まで馴化し、すべての動物に異常がみられなかったため、当日測定した体重を用いて体重層別無作為抽出法で群分けし、27 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 137.7～156.9 g であり、全例の体重が全體の平均体重±20% の範囲内であることを確認した。

### 14.4 飼育環境

動物は、検疫・馴化期間中を含む全飼育期間を通して、温度 21～25°C、相対湿度 40～70%、換気回数 10～15 回/時間、明暗サイクル 12 時間間隔（7 時点灯、19 時消灯）に設定したバリアーシステムの飼育室（検疫期間中は検疫室 1、検疫終了後は飼育室 1）に収容した。温度及び相対湿度の実測値は、それぞれ 22.8～23.4°C 及び 49.9～63.0% 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。また、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 130809、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を入手し、米国環境保護庁有害物質規制法の「飼料及び媒体の汚染物質限度」（1979）を参考に、当試験施設で定めた基準値内であることを確認したロットを使用した。

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

## 15. 試験方法

### 15.1 被験物質の設定用量

用量設定試験として、当試験施設で「Cisplatin 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 P12-0114、非 GLP 試験）を実施した。用量設定試験では生理食塩液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、5、10 及び 15 mg/kg/day の用量で 7 日間毎日投与した。その結果、5 mg/kg 群で腎臓の髓質外帯の近位尿細管の変性及び壊死、10 mg/kg 群で腎臓の相対重量の高値及び皮髓境界部の変色が認められ、腎臓への毒性影響が確認された。また、10 mg/kg 以上の群では、摂餌不良、削瘦、体重の減少、脾臓の退色及び小型化並びに胸腺の小型化がみられたことから、腎臓への毒性影響により動物が衰弱しつつあると考えられた。

5 mg/kg 群では一般状態、器官重量及び剖検では異常が認められなかったものの、体重の低値傾向がみられ、病理組織学的検査において腎臓の近位尿細管の変性及び壊死が認められたことから、被験物質を 5 mg/kg/day 以上の用量で 28 日間反復投与すると死亡や瀕死などの重篤な毒性が発現する可能性があると考えた。

したがって、本試験では 3.75 mg/kg/day を高用量とし、低用量として 0.75 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、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。

14 日間投与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 (14 日間投与)	0	5	0	4 ( 1 - 4 )
媒体対照 (28 日間投与)	0	5	0	5 ( 5 - 9 )
被 験 物 質	低用量 (14 日間投与)	0.75	5	0.0150 4 (10 - 13)
	低用量 (28 日間投与)	0.75	5	0.0150 5 (14 - 18)
	高用量 (14 日間投与)	3.75	5	0.0750 4 (19 - 22)
	高用量 (28 日間投与)	3.75	5	0.0750 5 (23 - 27)

### 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、生理食塩液を加えて超音波処理を行い分散させた。その後、生理食塩液を加えて定容し 0.750 w/v% の被験物質液を調製した。さらに、0.750 w/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、生理食塩液を加えて希釈し、0.0150 w/v% の被験物質液を調製した。

調製した各濃度の被験物質液及び投与に用いる媒体は蓋付きガラス製褐色ビン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) 被験物質液の均一性及び安定性の確認

0.200 及び 0.00200 w/v% の被験物質液の均一性及び遮光下における冷所保管での安定性を、当試験施設において X02-0275 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 0.200 及び 0.00200 w/v% の被験物質液でそれぞれ 1.3 及び 0.5% 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、遮光下冷所保管で調製 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 0.200 及び 0.00200 w/v% の被験物質液でそれぞれ 103% 及び 97.0% と 100±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 0.0750 及び 0.0150 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 X02-0275 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 0.0750 及び 0.0150 w/v% の被験物質液でともに 100% と 100±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

14 又は 28 日間毎日 1 回、強制経口投与した。投与は 9:22～11:20 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。被験物質液はマグネチック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・攣縮・痙攣、常同行動及び異常行動の有無を観察 1分間の排糞回数（糞の数）及び排尿回数（尿のプール数）を測定

### 15.7 機能検査

28日間投与群について、投与4週目（投与27日目）に1回、次表の項目を検査した。反応性及び握力は詳細な一般状態観察と同様に試験群が判別できない状態で検査した。

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

### 15.8 体重測定

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

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

### 15.9 摂餌量測定

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。なお、各測定日に絶食を行う動物については残餌量のみを測定し、餌の補充及び給餌量の測定は行わなかった。

### 15.10 尿検査

#### a) 採 尿

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

#### b) 検査項目及び方法

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

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

使用機器 A: 自動浸透圧計 OM-6040 (アーカレイ)

B: システム生物顕微鏡 BX41 (オリンパス)

## 15.11 血液検査

### a) 採血及び検査試料

各試験群について最終投与日の午後から絶食し、翌日（絶食開始 16~20 時間後）、CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>混合ガス（CO<sub>2</sub>:O<sub>2</sub>混合比=4:1）麻酔下で腹部大動脈から次表のとおり採血し、検査試料を作製した。高用量群の 1 例（No. 27）は投与 26 日目に瀕死状態となつたため、当日、CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>混合ガス麻酔下で腹部大動脈から採血し、検査試料を作製した。なお、14 日間投与群については血漿の試料作製は行わなかつた。また、28 日間投与群（瀕死動物を除く）については、パクスジーン RNA 採血管（日本ベクトン・ディッキンソン）を用いて血液を採取し転倒混和し、室温で 2 時間以上静置後、-20°C で 24 時間保管した。その後、-80°C で保管し、ドライアイスを同封して安全性評価技術研究所に送付した。

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

## b) 血液学的検査

全血及び血漿を用い次表の項目を測定した。14日間投与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)	シアシメントヘモグロビン法	
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。14日間投与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fosファターゼ、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fosファターゼ (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 ( $\gamma$ -GTP)	L- $\gamma$ -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	
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	E
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	F
カリウム (K)	Crown-Ether 膜電極法	
塩素 (Cl)	MO 膜法	

使用機器 E: 生化学自動分析装置 7170 形 (日立製作所)

F: 電解質分析装置 PVA-EX II (A&T)

## 15.12 病理学的検査

### a) 剖 檢

各試験群について最終投与日の翌日のいずれも採血後に、動物を腹部大動脈から放血して安楽死させ、体表、開孔部、皮下、頭蓋腔、胸腔、腹腔及び骨盤腔とその内容について肉眼的観察を行った。なお、投与 26 日目に瀕死状態となった高用量群の 1 例 (No. 27) は、当日、採血後に腹部大動脈からの放血により安楽死させ、同様に剖検を行った。

### b) 組織採取及び器官重量測定

#### (a) 14 日間投与群

剖検時に次表の器官・組織を採取した。

分 類	器官・組織
消化器系	胃 (No. 1 及び No. 2 を除く) 、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) 、脾臓*、胸腺*
内分泌系	下垂体*、甲状腺* (上皮小体を含む) 、副腎*

胃は 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。

分類	器官・組織
呼吸器系	気管、肺
消化器系	頸下腺、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

また、その他の肉眼的病変部として、高用量群の1例（No. 23）について皮膚を採取した。

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

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

c) 組織の固定及び保存

採取した器官・組織は、以下のように固定及び保存した。

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

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

精巣上体は、重量を測定後、左右とも変法デビットソソ液で固定した。

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。なお、瀕死動物については 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、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

(a) 14 日間投与群

対照群及び高用量群について、胃（No. 1 及び No. 2 を除く）、肝臓、腎臓、精巣、前立腺、骨髓（大腿骨）、脾臓、胸腺のパラフィン包埋薄切切片を作製し、ヘマトキシリソ・エオジン（HE）染色後、光学顕微鏡的に検査した。骨髓（大腿骨）は切り出し前に 10% 蟻酸・ホルマリン液による脱灰を行った。

さらに、胃、腎臓、骨髓及び脾臓について、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。

(b) 28 日間投与群

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

また、胃、腸、腎臓、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢（凝固腺を含む）、骨髓、腋窩リンパ節、腸間膜リンパ節、脾臓、胸腺及び乳腺については、高用量群で被験物質の投与に関連した変化が疑われたため、低用量群についても病理組織学的検査を行った。

### 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。

## 17. 試験成績

### 17.1 一般状態 (Table 1、Appendix 1)

3.75 mg/kg 群で糞量減少、自発運動低下、呼吸数減少、被毛粗剛及び削瘦が各 5 例、半眼が 3 例、摂餌不良及びうずくまりが各 2 例、脱毛、蒼白及び無便が各 1 例で観察された。

このうち 1 例 (No. 27) では、投与 24 日目から糞量減少及び自発運動低下がみられ、投与 25 日目に摂餌不良、呼吸数減少及び半眼がみられた。投与 26 日目には削瘦、蒼白、無便及び被毛粗剛が認められ、瀕死状態となったため、当日屠殺した。その他の動物では、糞量減少は投与 24 日目から、自発運動低下は投与 25 日目から、削瘦、被毛粗剛及び脱毛は投与 26 日目から、摂餌不良は投与 27 日目から観察され、半眼及びうずくまりは投与 28 日目に観察された。0.75 mg/kg 群及び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)

3.75 mg/kg 群で投与 1 週目に排糞回数の有意な高値がみられた。また、投与 4 週目に被毛粗剛が 4 例中 4 例にみられた。0.75 mg/kg 群及び対照群では、詳細観察項目に異常は認められなかつた。また、0.75 mg/kg 群の排糞回数及び排尿回数に有意な変動は認められなかつた。

### 17.3 機能検査 (Table 3、Appendix 3)

3.75 mg/kg 群で後肢の握力並びに測定 0~10 分の時間帯及び 60 分間の合計の自発運動量において有意な低値がみられた。0.75 mg/kg 群に有意な変動は認められなかつた。反応性検査では被験物質投与群及び対照群に異常は認められなかつた。

### 17.4 体 重 (Fig. 1、Table 4、Appendix 4)

3.75 mg/kg 群で投与 7、14 及び 21 日目に有意な低値（それぞれ対照群の 88.3%、80.4% 及び 71.4%）がみられ、投与 28 日目には前回測定値からの減少及び有意な低値（対照群の 58.0%）が認められた。0.75 mg/kg 群では有意な変動は認められなかつた。

### 17.5 摂餌量 (Fig. 2、Table 5、Appendix 5)

3.75 mg/kg 群で投与 3、7、14、21 および 28 日目に有意な低値（それぞれ対照群の 88.7%、79.0%、70.3%、56.9% 及び 32.0%）が認められた。0.75 mg/kg 群では有意な変動は認められなかつた。

### 17.6 尿検査 (Table 6、Appendix 6)

3.75 mg/kg 群で尿浸透圧の有意な低値が認められたほか、4 例全例で尿沈渣中の結晶の消失が認められた。0.75 mg/kg 群及び対照群に異常は認められなかつた。

### 17.7 血液検査

#### a) 血液学的検査 (Table 7、Appendix 7)

14 日間投与群において、3.75 mg/kg 群で網状赤血球比率及び白血球数の有意な低値がみられた。0.75 mg/kg 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、3.75 mg/kg 群で平均赤血球容積 (MCV)、血小板数、網状赤血球比率、白血球数及び大型非染色球比率の有意な低値がみられたほか、平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC) の有意な高値、プロトロンビン時間 (PT) 及び活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) の有意な短縮がみられた。0.75 mg/kg 群では MCV の有意な低値がみられた。

b) 血液生化学的検査 (Table 8、Appendix 8)

14 日間投与群において、3.75 mg/kg 群でアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 及びクレアチニンの有意な高値、尿素窒素 (BUN) の高値傾向がみられた。0.75 mg/kg 群では有意な変動は認められなかった。

28 日間投与群において、3.75 mg/kg 群でアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 、コリンエステラーゼ、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ ( $\gamma$ -GTP) 、BUN、クレアチニン、血糖及び無機リンの有意な高値、AST、総コレステロール及びトリグリセリドの高値傾向、アルカリ性フォスファターゼ (ALP) 、カリウム及びナトリウムの有意な低値がみられた。0.75 mg/kg 群では有意な変動は認められなかった。

### 17.8 病理学的検査

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

14 日間投与群において、3.75 mg/kg 群で解剖時体重が有意な低値（対照群の 84.0%）を示し、肝臓、心臓、脾臓及び下垂体の絶対重量の有意な低値、精巣及び脳の相対重量の有意な高値がみられた。0.75 mg/kg 群では肝臓の相対重量の低値がみられたが、用量依存性がないことから偶発的変動と考えた。

28 日間投与群において、3.75 mg/kg 群で腎臓の絶対及び相対重量の有意な高値（対照群の 158.8% 及び 282.8%）、精嚢の絶対及び相対重量の有意な低値（対照群の 21.9% 及び 38.1%）、胸腺の絶対及び相対重量の有意な低値（対照群の 19.1% 及び 33.2%）並びに脾臓の絶対重量の有意な低値及び相対重量の低値傾向（対照群の 43.1% 及び 75.7%）が認められた。また、解剖時体重が有意な低値（対照群の 56.8%）を示し、腹葉前立腺絶対及び相対重量の有意な低値（対照群の 33.8% 及び 58.0%）、背側葉前立腺の絶対及び相対重量の有意な低値（対照群の 38.1% 及び 68.6%）のほか、肝臓、心臓、精巣上体、脳及び下垂体の絶対重量の有意な低値、肝臓、心臓、精巣、精巣上体、脳、甲状腺及び副腎の相対重量の有意な高値がみられた。0.75 mg/kg 群では有意な変動は認められなかった。

b) 剖 検 (Table 11、Appendix 11)

14 日間投与群において、3.75 mg/kg 群で前胃の境界縁隆起が 4 例中 3 例、腎臓の両側性の皮膚境界部の変色が 3 例、片側性の腎孟拡張が 1 例にみられた。0.75 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、3.75 mg/kg 群の生存動物で腎臓の両側性の腫大及び退色が 4 例全例に認められたほか、胸腺の小型化が 3 例、脱水、削瘦、精嚢の小型化が各 2 例、前胃の境界縁隆起、空腸～回腸の黒色内容物、腋窩リンパ節及び脾臓の小型化、副腎の腫大、脱毛が各 1 例でみられた。瀕死動物では、削瘦のほか、空腸～盲腸の黒色内容物、腎臓の両側性の腫大及び退色、脾臓及び胸腺の小型化並びに胸水がみられた。0.75 mg/kg 群に異常はみられなかつたが、対照群で空腸の憩室が 1 例にみられた。

c) 病理組織学的検査 (Table 12、Appendix 11)

14 日間投与群において、3.75 mg/kg 群で腎臓の尿細管の変性（軽度）、皮膚境界部の尿細管の再生（軽度）、皮膚境界部の尿細管の単細胞壊死（ごく軽度又は中等度）、脾臓の髓外造血低下（軽度～中等度）が 4 例全例、前胃の境界縁の扁平上皮過形成（ごく

軽度～軽度)、腎臓の皮髓境界部の尿細管の核肥大(ごく軽度)が各3例、骨髓の低形成(軽度)が1例に認められたほか、腎臓の腎孟拡張が1例にみられた。0.75 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、3.75 mg/kg群の生存動物で、腎臓の尿細管の変性(軽度～中等度)、皮髓境界部の尿細管拡張(中等度～重度)、皮髓境界部の尿細管の核肥大(中等度)、皮髓境界部の尿細管の再生(中等度)、髓質内帯の尿細管の再生(軽度～中等度)及び皮髓境界部の尿細管の単細胞壊死(軽度)が4例全例、髓質内帯の尿細管の核肥大(軽度)及び髓質内帯の尿細管の単細胞壊死(軽度～中等度)が各2例に認められた。造血器系では、骨髓の低形成(軽度～重度)及び胸腺の萎縮(軽度～重度)が4例全例、腋窩リンパ節の萎縮(軽度)が3例、脾臓の萎縮(軽度)、うつ血(軽度～中等度)及び髄外造血低下(軽度)が各2例、腸間膜リンパ節の萎縮(軽度)が1例に認められた。消化器系では、前胃の境界縁の扁平上皮過形成(軽度)、腺胃の幽門腺部粘膜の潰瘍(軽度)、十二指腸の限局性粘膜壊死(軽度)が各1例、空腸の粘膜萎縮(軽度)が2例に認められた。その他の器官・組織では、精嚢の萎縮(軽度～中等度)が4例全例、副腎の皮質肥大(軽度)が2例、乳腺の萎縮(軽度～中等度)が3例に認められ、肉眼的病変部として皮膚の限局性の毛包萎縮が1例にみられた。瀕死動物では、腎臓の尿細管の変性(中等度)、皮髓境界部の尿細管拡張(重度)、皮髓境界部の尿細管の核肥大(中等度)、髓質内帯の尿細管の核肥大(軽度)、皮髓境界部の尿細管の再生(中等度)、髓質内帯の尿細管の再生(中等度)、皮髓境界部の尿細管の単細胞壊死(軽度)及び髓質内帯の尿細管の単細胞壊死(軽度)が認められたほか、十二指腸～直腸の粘膜萎縮(軽度)、精巣のびまん性精細管変性(中等度)及び巨細胞(軽度)、精巣上体の両側性細胞残渣(軽度)、腹葉前立腺、精嚢、腋窩リンパ節、腸間膜リンパ節、脾臓及び胸腺の萎縮(軽度～重度)、骨髓の低形成(重度)並びに副腎皮質の肥大(軽度)がみられた。0.75 mg/kg群では、腎臓の皮髓境界部の尿細管の再生(ごく軽度～軽度)が5例中4例、脾臓の髄外造血低下(軽度)が3例に認められたほか、腹葉前立腺のリンパ球浸潤が1例にみられた。対照群では、空腸の憩室及び腹葉前立腺のリンパ球浸潤が各1例にみられた。

## 18. 考 察

被験物質は抗悪性腫瘍薬であり、ヒトでは催吐作用、腎障害及び聴覚障害を引き起こすことが知られている（佐藤, 2009）。実験動物を用いた毒性試験結果の多くは静脈内投与又は腹腔内投与によるものであり、経口投与での報告はラットの LD50 が 25.8 mg/kg との情報以外にはほとんどない（HSDB, 2013）。本試験では、腎臓に対する重篤な毒性影響が認められたほか、造血器及び胃腸への毒性影響がみられた。

腎臓に対する影響として、3.75 mg/kg 群で 14 日間投与後に皮髓境界部の変色、28 日間投与後に腫大及び退色、絶対及び相対重量の高値がみられた。病理組織学的検査においては、14 日間投与後から尿細管の変性、皮髓境界部の尿細管の単細胞壊死、再生及び核肥大、28 日間投与後に皮髓境界部の尿細管拡張、髓質内帯の尿細管の単細胞壊死、再生及び核肥大が認められ、投与回数の増加に伴い重篤度及び発現頻度の上昇並びに病変領域の拡大がみられた。血液生化学的検査においても、14 日間投与後からクレアチニン及び BUN の高値がみられ、腎障害が示唆された。なお、28 日間投与後に ALT、コリンエステラーゼ、 $\gamma$ -GTP、血糖の高値、AST、総コレステロール及びトリグリセリドの高値傾向がみられ肝機能の異常が疑われたが、剖検において脱水が認められたことから、腎障害により体液が喪失し血液濃縮が生じたものであり、肝機能の異常ではないと判断した。血液学的検査においてみられた PT 及び APTT の短縮も同様と考えられた。無機リンの高値並びにカリウム及びナトリウムの低値、尿浸透圧の低値も腎障害により電解質バランスが乱れたことを示唆するものと考えた。また、血液学的検査において 3.75 mg/kg 群で 14 日間投与後からみられた網状赤血球数比率の低値は、腎障害によりエリスロポエチン産生が低下して赤血球の産生が抑制されたことを示す変化と考えられたが、血液濃縮により、赤血球数やヘマトクリット値の低値など貧血と判断する変化がみられなかつたと推察した。0.75 mg/kg 群においても、28 日間投与後に腎臓の皮髓境界部の尿細管の再生が認められたことから、尿細管の傷害が生じているものと推察した。なお、腎臓での傷害部位は近位尿細管 ( $S_3$ ) 上皮細胞とされている（杉本, 2009）が、本試験においては病変が広範にみとめられ、標的部位を限定することはできなかった。

造血器への影響として、網状赤血球数比率の低値に加えて、3.75 mg/kg 群で 14 日間投与後から白血球数の低値、骨髄の低形成及び脾臓の髓外造血低下、28 日間投与後に MCV 及び血小板数の低値、脾臓及び胸腺の絶対及び相対重量の低値又は低値傾向、腋窩リンパ節、腸間膜リンパ節、脾臓及び胸腺の萎縮が認められた。被験物質は抗腫瘍薬であることから、増殖活性が高い造血器での細胞分裂が強く抑制されたと考えた。また、投与期間の終盤に急激に衰弱に陥ったことに伴い、リンパ球が減少したことも機序のひとつとして考えられた。0.75 mg/kg 群においても 28 日間投与後に MCV の低値及び脾臓の髓外造血低下がみられた。

消化器系への影響として、3.75 mg/kg 群で 14 日間投与後から前胃の境界縁隆起及び境界縁の扁平上皮過形成が認められ、被験物質の粘膜刺激性が示唆された。また、28 日間投与後には腺胃の幽門腺部粘膜の潰瘍及び十二指腸の限局性粘膜壊死がみられたが、限局性の病変であることから、副腎の皮質肥大とともに被験物質の毒性影響に伴うストレスによる変化と考えた。腸管の黒色内容物は潰瘍又は壞死部からの出血を示唆するものと推察した。なお、空腸の粘膜萎縮は細胞分裂が抑制された結果生じたものと考えた。

3.75 mg/kg 群で投与期間中にみられた自発運動低下や呼吸数減少等の症状、後肢握力及び

自発運動量の低値、体重及び摂餌量の低値、14 及び 28 日間投与後にみられた前立腺や精嚢等の重量低値、精嚢の萎縮、乳腺の萎縮は、主に腎臓への毒性影響を反映した変化と考えた。また、瀕死動物では精巣のびまん性精細管萎縮及び巨細胞の形成がみられたが、生存動物では認められなかった所見であることから、精子形成過程への直接的な影響ではなく状態悪化に伴う二次的な変化と判断した。

投与期間中又は各投与期間終了時にみられたその他の変化は、用量依存性のない変動であること、他に関連する変化が認められること、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腎臓への重篤な毒性影響が認められ、造血器及び胃腸への毒性影響並びに副生殖器及び乳腺への二次的な影響もみられたが、その他の消化器系、呼吸器系、心・血管系、生殖器系、感覺器、筋・骨格系への直接的影響は検出されなかった。

## 19. 参考文献

- HSDB (2013) Hazardous Substances Data Bank. National Library of Medicine.  
<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~9bHFNS:1:animal>
- 井上忠志, 津田洋幸 (2013) 6.14 腎臓. In 「伊東毒性病理学」 (高橋道人, 福島昭治編), 丸善出版, 東京, p. 273-288.
- 佐藤恵一朗 (2009) 5.1 医薬品 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. 83-115.
- 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.

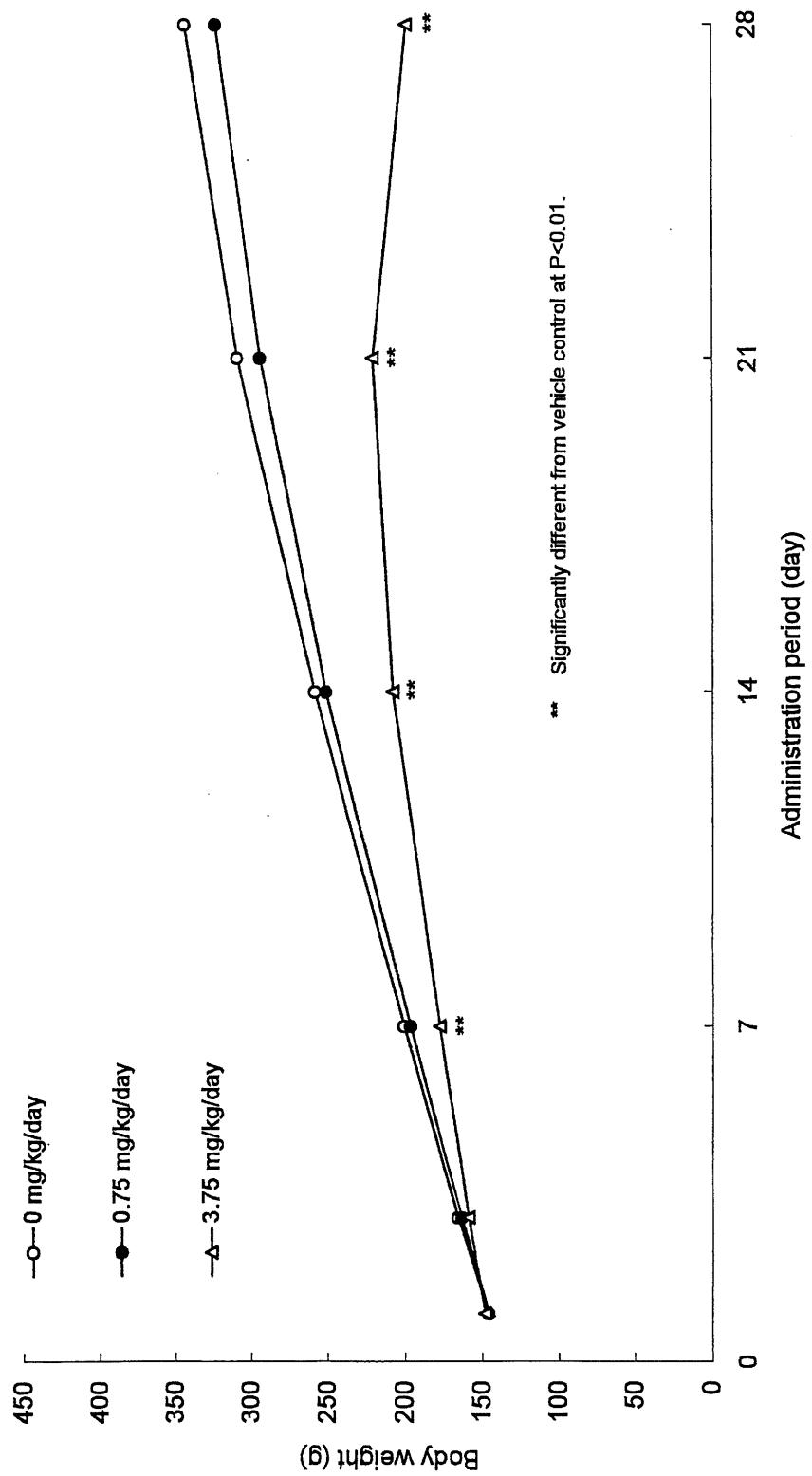


Fig. 1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats  
Body weights: Male

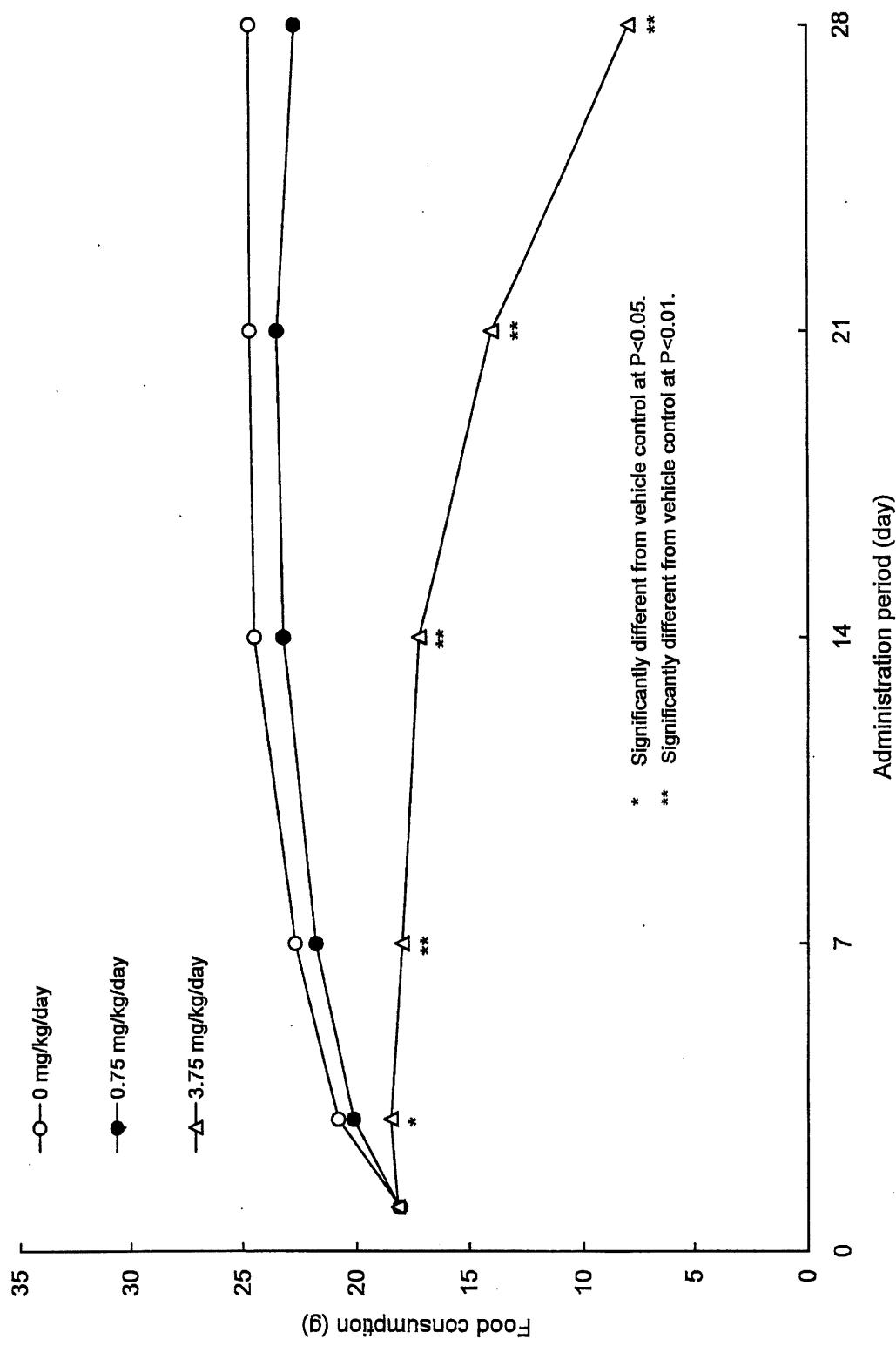


Fig. 2 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats  
Food consumption: Male

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	0.75	3.75
Male		ss g <sup>a)</sup>	ss 9	ss 8	m 1
No abnormalities detected		9	9	4	
Decreased stool volume				4	1
Decreased spontaneous locomotion				4	1
Decreased respiratory rate				4	1
Incomplete eyelid opening				2	1
Anorexia				1	1
Unkempt hair				4	1
Emaciation				4	1
Loss of hair				1	
Paleness					1
No stool					1
Crouching position				2	
Moribund state					1

ss, scheduled sacrifice animal, m, moribund animal during the administration period.

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
Observation in arena	Cyanosis	-	Absent
		+	Present
	Lacrimation	-	Absent
		+	Present
	Exophthalmos	-	Absent
		+	Present
	Pupillary size	-1	Miosis
		0	Normal
		+1	Mydriasis
	Salivation	-	Absent
		+	Present
Respiration	Secretion	-	Absent
		+	Present
	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
Respiration		+2	Significantly increased
		0	Normal
		+1	Slightly insufficiency
		+2	Moderately insufficiency
Gait		+3	Severely insufficiency
	Lid closure	-	Absent
		+	Present
	Gait	-	Normal
Tremor/twitch/convulsion	S	S	Staggering gait
	T	T	Tip toe gait
	P	P	Shuffling (paralytic) gait
	GD	GD	Gait disturbance
Stereotypic behavior	0	None	
	+1	Tremor	
	+2	Twitch or convulsion	
	+3	Systematic tonic convulsion (opisthotonus or episthenotonus etc.)	
Abnormal behavior	-	None	
	C	Circling	
	G	Grooming	
	S	Sniffing	
	H	Head bobbing	
	-	None	
	S	Self-biting	
	B	Backing	
	C	Circling	
	R	Rolling	
	W	Writhing	
	V	Vocalization	
	ST	Straub tail	
	T	Tail lashing behavior	

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

Male

Dose (mg/kg/day)	Predosing			Dosing week 1		
	0	0.75	3.75	0	0.75	3.75
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Removal from cage	-2	0	0	0	0	0
	-1	0	1	0	0	0
	0	5	4	5	5	5
	+1	0	0	0	0	0
	+2	0	0	0	0	0
	0	4	5	5	4	4
	Vocalization	+1	1	0	0	1
	+2	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	0	0
	Muscle tone	0	5	5	5	5
Handling observation	+1	0	0	0	0	0
	Subnormal temperature	-	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0
	Piloerection	-	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0
	Staining hair	-	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0
	Unkempt hair	-	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0
	Paleness	-	5	5	5	5
Observation in arena	+	0	0	0	0	0
	Reddening	-	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0
	Cyanosis	-	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0
	Lacration	-	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0
	Exophthalmos	-	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0
	Pupillary size	-1	0	0	0	0
Abnormal behavior	0	5	5	5	5	5
	+1	0	0	0	0	0
	+2	0	0	0	0	0
	-2	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	0	0
	Motor activity	0	4	4	5	5
	+1	1	1	1	0	0
	+2	0	0	0	0	0
	0	5	5	5	5	5
	Respiration	+1	0	0	0	0
Observation in arena	+2	0	0	0	0	0
	+3	0	0	0	0	0
	Lid closure	-	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0
	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
	Tremor/twitch/convulsion	0	5	5	5	5
Abnormal behavior	+1	0	0	0	0	0
	+2	0	0	0	0	0
	+3	0	0	0	0	0
	-	5	5	5	5	5
	Stereotypic behavior	C	0	0	0	0
	G	0	0	0	0	0
	S	0	0	0	0	0
	H	0	0	0	0	0
	-	5	5	5	5	5
	Abnormal behavior	S	0	0	0	0
Observation in arena	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 <sup>a)</sup>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	Urination <sup>a)</sup>	0.0 ± 0.0	2.0 ± 3.1	0.6 ± 1.3	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.9
					1.0 ± 1.0 *	2.2 ± 3.3

a): (count/min, mean±S.D.)

\*: significantly different from vehicle control at p&lt;0.05

\*\*: significantly different from vehicle control at p&lt;0.01

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

## Male

	Dose (mg/kg/day)	Dosing week 2			Dosing week 3		
		0	0.75	3.75	0	0.75	3.75
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	-2	0	0	0	0	0	0
Removal from cage	-1	1	1	1	1	2	2
	0	4	4	4	4	3	3
	+1	0	0	0	0	0	0
	+2	0	0	0	0	0	0
	Vocalization	0	5	4	2	4	5
	+1	0	1	3	1	1	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
Handling observation	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
	Reddening	-	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
	Cyanosis	-	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
	Lacration	-	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	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
Observation in arena	Motor activity	-2	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	0	0	0
	0	5	5	4	5	5	5
	+1	0	0	1	0	0	0
	+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
	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
	S	0	0	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	0	0
	R	0	0	0	0	0	0
	W	0	0	0	0	0	0
	V	0	0	0	0	0	0
	ST	0	0	0	0	0	0
	T	0	0	0	0	0	0
	Defecation <sup>a)</sup>	0.6 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4	0.4 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.5
	Urination <sup>a)</sup>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.6 ± 3.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

a): (count/min, mean±S.D.)

\*: significantly different from vehicle control at p&lt;0.05

\*\*: significantly different from vehicle control at p&lt;0.01

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

Male

	Dosing week 4		
Dose (mg/kg/day)	0	0.75	3.75
Number of animals	5	5	4
Removal from cage	-2	0	0
	-1	2	2
	0	3	3
	+1	0	0
	+2	0	0
	0	4	2
	Vocalization	+1	1
		+2	0
	-1	0	0
	Muscle tone	0	5
Handling observation	+1	0	0
	Subnormal temperature	-	5
		+	0
	Piloerection	-	5
		+	0
	Staining hair	-	5
		+	0
	Unkempt hair	-	5
		+	0
	Paleness	-	5
Observation in arena		+	0
	Reddening	-	5
		+	0
	Cyanosis	-	5
		+	0
	Lacration	-	5
		+	0
	Exophthalmos	-	5
		+	0
	-1	0	0
Observation in arena	Pupillary size	0	5
		+1	0
	Salivation	-	5
		+	0
	Secretion	-	5
		+	0
	Posture	0	5
		+1	0
		+2	0
	-2	0	0
Observation in arena	Motor activity	-1	0
		0	5
		+1	0
		+2	0
	Respiration	0	5
		+1	0
		+2	0
		+3	0
	Lid closure	-	5
		+	0
Observation in arena	Gait	-	5
		S	0
	T	0	0
	P	0	0
	GD	0	0
	Tremor/twitch/convulsion	0	5
		+1	0
		+2	0
		+3	0
	Stereotypic behavior	-	5
Observation in arena		C	0
		G	0
		S	0
		H	0
	Abnormal behavior	-	5
		S	0
		B	0
		C	0
		R	0
		W	0
Defecation <sup>a)</sup>	V	0	0
	ST	0	0
	T	0	0
	Urination <sup>a)</sup>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
0.0 ± 0.0			

a): (count/min, mean±S.D.)

\*: significantly different from vehicle control at p&lt;0.05

\*\*: significantly different from vehicle control at p&lt;0.01

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

Male

		Dosing week 4			
	Dose (mg/kg/day)	0	0.75	3.75	
	Number of animals	5	5	4	
	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	4	
		-	0	0	
	Air righting reflex	+	5	4	
		-	0	0	
	Grip strength	Forelimb (g) Hindlimb (g)	323 ± 83 550 ± 41	383 ± 30 522 ± 73	264 ± 74 445 ± 51 *
Motor activity [Interval]	0-10 (min)		227 ± 54	208 ± 56	133 ± 11 *
	10-20 (min)		140 ± 17	114 ± 50	88 ± 34
	20-30 (min)		53 ± 39	56 ± 39	47 ± 15
	30-40 (min)		21 ± 30	35 ± 21	29 ± 26
	40-50 (min)		53 ± 33	24 ± 36	10 ± 9
	50-60 (min)		38 ± 22	12 ± 15	13 ± 19
	Total		531 ± 147	449 ± 91	319 ± 78 *

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

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

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

"Grip strength" and "Motor activity": mean±S.D.

\* : significantly different from vehicle control at p<0.05

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

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

	Dose (mg/kg/day)	0	0.75	3.75
Administration period (day)	1	145.82 ±5.43 (9)	145.97 ±6.56 (9)	147.93 ±5.85 (9)
	3	165.52 ±7.76 (9)	163.38 ±8.08 (9)	158.70 ±7.71 (9)
	7	200.81 ±11.73 (9)	196.30 ±9.75 (9)	177.34 ** ±10.16 (9)
	14	258.57 ±14.09 (9)	251.17 ±12.41 (9)	207.92 ** ±12.22 (9)
	21	309.22 ±8.70 (5)	294.00 ±16.17 (5)	220.66 ** ±14.42 (5)
	28	343.76 ±14.64 (5)	323.42 ±19.56 (5)	199.43 ** ±16.99 (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 5      Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats      B10-0114  
 Summary of food consumption (g/rat/day) : male

Sex	Dose (mg/kg/day)	0	0.75	3.75
Administration period (day)	1	18.04 ± 1.38 (9)	18.09 ± 2.02 (9)	18.15 ± 1.85 (9)
	3	20.83 ± 1.92 (9)	20.14 ± 1.95 (9)	18.48 * ± 1.50 (9)
	7	22.76 ± 2.27 (9)	21.82 ± 1.89 (9)	17.97 ** ± 1.73 (9)
	14	24.53 ± 2.33 (9)	23.29 ± 1.82 (9)	17.25 ** ± 1.90 (9)
	21	24.73 ± 1.68 (5)	23.56 ± 1.90 (5)	14.06 ** ± 1.91 (5)
	28	24.75 ± 1.51 (5)	22.80 ± 1.84 (5)	7.92 ** ± 1.33 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

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

\* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

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

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

Items	Dose (mg/kg/day)	Twenty-eight-day treatment		
		0	0.75	3.75
Urine volume (mL)		6.8 ±2.9 (5)	11.0 ±6.4 (5)	10.8 ±4.7 (4)
Uosm (mOsm/L)		1112.4 ±400.2 (5)	718.6 ±267.5 (5)	516.8 * ±125.9 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

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

\* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

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

Table 6-2

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

B10-0114

Items	Group	Twenty-eight-day treatment			
		Dose (mg/kg/day)	0	0.75	3.75
	No. of animals		5	5	4
<b>Color</b>					
	SY	1	2	4	
	Y	4	3	0	
<b>Turbidity</b>					
	Clear	5	2	2	
	Cloudy	0	3	2	
<b>pH</b>					
	6.0	0	2	1	
	6.5	5	3	3	
<b>Protein</b>					
	-	0	1	1	
	±	2	3	3	
	1+	2	1	0	
	2+	1	0	0	
<b>Glucose</b>					
	-	5	5	4	
<b>Ketones</b>					
	-	3	3	4	
	±	2	2	0	
<b>Occult blood</b>					
	-	5	4	4	
	1+	0	1	0	

Color: SY: Slightly yellow, Y: Yellow.

Table 6-3

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

B10-0114

Items	Group	Twenty-eight-day treatment		
		Dose (mg/kg/day)	0	0.75
		No. of animals	5	4
<b>Urinaly sediment</b>				
Red blood cells <sup>a)</sup>		0	5	5
White blood cells <sup>a)</sup>		0	5	5
Epithelial cells <sup>a)</sup>		0	5	5
Casts <sup>b)</sup>		0	5	4
Crystals <sup>c)</sup>		-	0	3
		±	4	2
		1+	1	0
				0

<sup>a)</sup>; Number of cells/10 views(x400).<sup>b)</sup>; Number of casts/18×18 mm<sup>2</sup>.<sup>c)</sup>; Incidence of crystals/18×18 mm<sup>2</sup>.

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

Items	Dose (mg/kg/day)	Fourteen-day treatment		
		0	0.75	3.75
RBC	( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	740.5 $\pm 42.5$ (4)	786.3 $\pm 75.7$ (4)	803.0 $\pm 9.8$ (4)
Hb	(g/dL)	15.15 $\pm 1.01$ (4)	16.08 $\pm 1.15$ (4)	16.43 $\pm 0.42$ (4)
Ht	(%)	49.68 $\pm 3.82$ (4)	52.10 $\pm 4.15$ (4)	52.25 $\pm 2.80$ (4)
MCV	(fL)	67.00 $\pm 2.33$ (4)	66.35 $\pm 1.98$ (4)	65.08 $\pm 3.03$ (4)
MCH	(pg)	20.43 $\pm 0.67$ (4)	20.53 $\pm 0.87$ (4)	20.45 $\pm 0.39$ (4)
MCHC	(g/dL)	30.53 $\pm 0.39$ (4)	30.88 $\pm 0.43$ (4)	31.45 $\pm 0.89$ (4)
Platelet	( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	160.40 $\pm 30.71$ (4)	139.80 $\pm 30.59$ (4)	112.73 $\pm 20.30$ (4)
Reticulo	(%)	5.65 $\pm 0.31$ (4)	4.73 $\pm 0.64$ (4)	2.68 ** $\pm 1.31$ (4)
WBC	( $\times 10^2/\mu\text{L}$ )	108.08 $\pm 10.61$ (4)	86.23 $\pm 23.73$ (4)	60.88 ** $\pm 17.45$ (4)
<b>Differentiation of leukocyte</b>				
Neutro	(%)	16.05 $\pm 2.43$ (4)	13.23 $\pm 2.72$ (4)	14.20 $\pm 5.29$ (4)
Lymph	(%)	78.63 $\pm 2.58$ (4)	82.20 $\pm 2.99$ (4)	80.83 $\pm 4.73$ (4)
Eosino	(%)	0.65 $\pm 0.35$ (4)	0.38 $\pm 0.05$ (4)	0.35 $\pm 0.19$ (4)
Baso	(%)	1.25 $\pm 0.42$ (4)	1.00 $\pm 0.32$ (4)	0.85 $\pm 0.40$ (4)
Mono	(%)	1.95 $\pm 0.41$ (4)	1.98 $\pm 0.50$ (4)	2.68 $\pm 0.31$ (4)
LUC	(%)	1.45 $\pm 0.59$ (4)	1.20 $\pm 0.24$ (4)	1.13 $\pm 0.05$ (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)	Twenty-eight-day treatment		
		0	0.75	3.75
RBC	( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	782.6 $\pm 19.0$ (5)	795.2 $\pm 40.3$ (5)	807.3 $\pm 105.0$ (4)
Hb	(g/dL)	15.56 $\pm 0.27$ (5)	15.42 $\pm 0.71$ (5)	15.73 $\pm 2.74$ (4)
Ht	(%)	49.42 $\pm 1.41$ (5)	48.32 $\pm 2.24$ (5)	46.25 $\pm 7.47$ (4)
MCV	(fL)	63.10 $\pm 0.95$ (5)	60.80 * $\pm 0.79$ (5)	57.18 ** $\pm 1.88$ (4)
MCH	(pg)	19.86 $\pm 0.31$ (5)	19.38 $\pm 0.48$ (5)	19.45 $\pm 0.82$ (4)
MCHC	(g/dL)	31.46 $\pm 0.40$ (5)	31.90 $\pm 0.37$ (5)	33.98 ** $\pm 0.59$ (4)
Platelet	( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	123.16 $\pm 12.73$ (5)	126.62 $\pm 22.20$ (5)	79.90 * $\pm 24.54$ (4)
Reticulo	(%)	3.00 $\pm 0.38$ (5)	2.56 $\pm 0.09$ (5)	0.35 ** $\pm 0.44$ (4)
WBC	( $\times 10^2/\mu\text{L}$ )	120.70 $\pm 42.65$ (5)	92.08 $\pm 13.43$ (5)	56.80 * $\pm 13.12$ (4)
<b>Differentiation of leukocyte</b>				
Neutro	(%)	17.94 $\pm 8.53$ (5)	15.84 $\pm 3.48$ (5)	17.83 $\pm 6.16$ (4)
Lymph	(%)	77.12 $\pm 8.91$ (5)	79.54 $\pm 4.29$ (5)	77.90 $\pm 7.46$ (4)
Eosino	(%)	0.72 $\pm 0.22$ (5)	0.58 $\pm 0.38$ (5)	0.33 $\pm 0.10$ (4)
Baso	(%)	0.96 $\pm 0.30$ (5)	0.64 $\pm 0.11$ (5)	0.60 $\pm 0.36$ (4)
Mono	(%)	1.86 $\pm 0.34$ (5)	1.96 $\pm 0.77$ (5)	2.83 $\pm 1.23$ (4)
LUC	(%)	1.40 $\pm 0.51$ (5)	1.44 $\pm 0.64$ (5)	0.50 * $\pm 0.14$ (4)
PT	(sec)	23.86 $\pm 2.95$ (5)	21.70 $\pm 5.59$ (5)	13.80 ** $\pm 1.12$ (4)
APTT	(sec)	21.18 $\pm 2.05$ (5)	22.02 $\pm 4.06$ (5)	10.73 ** $\pm 4.33$ (4)

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

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

\* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

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

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

Items	Dose (mg/kg/day)	Fourteen-day treatment		
		0	0.75	3.75
AST	(IU/L)	73.3 ±4.6 (4)	75.0 ±5.1 (4)	95.5 ** ±7.5 (4)
ALT	(IU/L)	26.0 ±2.8 (4)	26.5 ±2.6 (4)	25.8 ±1.5 (4)
ALP	(IU/L)	747.3 ±124.1 (4)	751.5 ±110.2 (4)	736.3 ±97.2 (4)
BUN	(mg/dL)	12.75 ±3.35 (4)	11.48 ±2.20 (4)	24.90 ±10.42 (4)
Creatinine	(mg/dL)	0.163 ±0.024 (4)	0.183 ±0.013 (4)	0.308 ** ±0.124 (4)
T-Bil	(mg/dL)	0.040 ±0.014 (4)	0.048 ±0.005 (4)	0.040 ±0.008 (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)	Twenty-eight-day treatment		
		0	0.75	3.75
AST	(IU/L)	55.8 ±8.8 (5)	58.2 ±13.5 (5)	71.8 ±7.8 (4)
ALT	(IU/L)	17.8 ±3.3 (5)	18.8 ±4.8 (5)	34.5 * ±16.5 (4)
ALP	(IU/L)	523.8 ±76.3 (5)	496.6 ±102.1 (5)	244.3 ** ±61.0 (4)
ChE	(IU/L)	51.6 ±21.1 (5)	56.8 ±21.9 (5)	251.8 * ±115.8 (4)
γ-GTP	(IU/L)	0.74 ±0.23 (5)	0.74 ±0.17 (5)	3.53 * ±0.88 (4)
T-Chol	(mg/dL)	58.4 ±15.0 (5)	49.4 ±7.2 (5)	115.8 ±36.2 (4)
TG	(mg/dL)	58.6 ±9.9 (5)	41.0 ±9.3 (5)	87.0 ±57.5 (4)
BUN	(mg/dL)	10.96 ±1.88 (5)	13.70 ±1.87 (5)	255.88 ** ±65.99 (4)
Creatinine	(mg/dL)	0.186 ±0.019 (5)	0.198 ±0.033 (5)	2.600 ** ±1.161 (4)
T-Protein	(g/dL)	5.30 ±0.67 (5)	5.46 ±1.19 (5)	5.75 ±0.73 (4)
Albumin	(g/dL)	2.34 ±0.31 (5)	2.38 ±0.50 (5)	2.60 ±0.29 (4)
A/G ratio	(-)	0.794 ±0.069 (5)	0.778 ±0.048 (5)	0.833 ±0.071 (4)
Glucose	(mg/dL)	124.8 ±35.2 (5)	133.0 ±26.6 (5)	260.0 * ±131.5 (4)
T-Bil	(mg/dL)	0.046 ±0.009 (5)	0.044 ±0.015 (5)	0.053 ±0.015 (4)
TBA	(μmol/L)	15.66 ±6.42 (5)	22.16 ±19.90 (5)	9.45 ±3.95 (4)
IP	(mg/dL)	10.32 ±1.35 (5)	10.56 ±1.40 (5)	15.08 * ±4.21 (4)
Ca	(mg/dL)	10.28 ±1.33 (5)	10.32 ±1.68 (5)	10.20 ±1.61 (4)
Na	(mEq/L)	148.8 ±1.8 (5)	148.6 ±0.5 (5)	144.5 ±3.3 (4)
K	(mEq/L)	7.50 ±1.14 (5)	7.00 ±0.62 (5)	5.15 ** ±0.37 (4)
Cl	(mEq/L)	102.72 ±1.90 (5)	102.34 ±0.70 (5)	96.50 ** ±2.59 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

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

\* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

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

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

Items	Dose (mg/kg/day)	Fourteen-day treatment		
		0	0.75	3.75
Liver (g)		8.613 ±0.639 (4)	7.938 ±0.201 (4)	7.165 ** ±0.299 (4)
Heart (g)		1.040 ±0.116 (4)	1.000 ±0.074 (4)	0.845 * ±0.068 (4)
Kidney(R) (g)		1.070 ±0.070 (4)	1.058 ±0.021 (4)	0.965 ±0.102 (4)
Kidney(L) (g)		1.093 ±0.095 (4)	1.043 ±0.062 (4)	0.953 * ±0.061 (4)
Kidneys (g)		2.163 ±0.155 (4)	2.100 ±0.081 (4)	1.918 ±0.156 (4)
Testis(R) (g)		1.235 ±0.079 (4)	1.243 ±0.095 (4)	1.243 ±0.083 (4)
Testis(L) (g)		1.240 ±0.068 (4)	1.250 ±0.089 (4)	1.203 ±0.081 (4)
Testes (g)		2.475 ±0.142 (4)	2.493 ±0.183 (4)	2.445 ±0.163 (4)
Epididymis(R) (g)		0.175 ±0.006 (4)	0.183 ±0.029 (4)	0.163 ±0.010 (4)
Epididymis(L) (g)		0.178 ±0.036 (4)	0.190 ±0.022 (4)	0.153 ±0.017 (4)
Epididymides (g)		0.353 ±0.032 (4)	0.373 ±0.049 (4)	0.315 ±0.026 (4)
Ventral prostate (g)		0.203 ±0.019 (4)	0.243 ±0.038 (4)	0.200 ±0.027 (4)
Dorsolateral prostate (g)		0.175 ±0.039 (4)	0.168 ±0.054 (4)	0.138 ±0.015 (4)
Brain (g)		1.880 ±0.018 (4)	1.875 ±0.087 (4)	1.903 ±0.035 (4)
Spleen (g)		0.650 ±0.139 (4)	0.508 ±0.056 (4)	0.460 * ±0.041 (4)
Thymus (mg)		534.58 ±63.11 (4)	498.83 ±125.48 (4)	431.68 ±94.81 (4)
Pituitary gland (mg)		9.13 ±0.89 (4)	8.80 ±0.95 (4)	6.98 * ±0.92 (4)
Thyroid (mg)		18.45 ±1.40 (4)	16.35 ±1.06 (4)	16.08 ±1.91 (4)
Adrenals (mg)		46.20 ±4.46 (4)	43.03 ±5.32 (4)	49.98 ±10.51 (4)
Final body weight (g)		228.98 ±16.62 (4)	230.68 ±3.73 (4)	192.25 ** ±7.15 (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)	Twenty-eight-day treatment		
		0	0.75	3.75
Liver (g)		9.532 ±0.760 (5)	9.194 ±1.009 (5)	7.125 ** ±1.134 (4)
Heart (g)		1.258 ±0.122 (5)	1.102 ±0.100 (5)	0.850 ** ±0.170 (4)
Kidney(R) (g)		1.306 ±0.101 (5)	1.214 ±0.155 (5)	2.060 ±0.414 (4)
Kidney(L) (g)		1.264 ±0.152 (5)	1.208 ±0.124 (5)	2.020 ** ±0.343 (4)
Kidneys (g)		2.570 ±0.251 (5)	2.422 ±0.276 (5)	4.080 ** ±0.757 (4)
Testis(R) (g)		1.514 ±0.114 (5)	1.560 ±0.266 (5)	1.188 ±0.196 (4)
Testis(L) (g)		1.524 ±0.120 (5)	1.566 ±0.223 (5)	1.195 * ±0.220 (4)
Testes (g)		3.038 ±0.229 (5)	3.126 ±0.486 (5)	2.383 ±0.414 (4)
Epididymis(R) (g)		0.360 ±0.025 (5)	0.356 ±0.035 (5)	0.243 ** ±0.034 (4)
Epididymis(L) (g)		0.366 ±0.022 (5)	0.362 ±0.040 (5)	0.235 ** ±0.017 (4)
Epididymides (g)		0.726 ±0.044 (5)	0.718 ±0.075 (5)	0.478 ** ±0.050 (4)
Ventral prostate (g)		0.444 ±0.086 (5)	0.386 ±0.056 (5)	0.150 ** ±0.041 (4)
Dorsolateral prostate (g)		0.328 ±0.024 (5)	0.336 ±0.054 (5)	0.125 ** ±0.041 (4)
Seminal vesicle (g)		0.994 ±0.106 (5)	1.030 ±0.090 (5)	0.218 ** ±0.046 (4)
Brain (g)		1.968 ±0.040 (5)	1.888 ±0.080 (5)	1.798 ** ±0.040 (4)
Spleen (g)		0.650 ±0.119 (5)	0.600 ±0.055 (5)	0.280 ** ±0.106 (4)
Thymus (mg)		493.68 ±124.25 (5)	488.06 ±127.99 (5)	94.25 ** ±29.46 (4)
Pituitary gland (mg)		10.76 ±0.60 (5)	10.06 ±0.80 (5)	5.93 ** ±0.24 (4)
Thyroid (mg)		17.16 ±2.41 (5)	17.86 ±3.10 (5)	16.53 ±1.82 (4)
Adrenals (mg)		51.92 ±5.17 (5)	54.58 ±6.11 (5)	60.23 ±9.19 (4)
Final body weight (g)		320.84 ±15.41 (5)	299.20 ±18.02 (5)	182.23 ** ±20.93 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

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

\* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

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

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

Items	Dose (mg/kg/day)	Fourteen-day treatment		
		0	0.75	3.75
Liver	(g/100g)	3.765 ±0.228 (4)	3.443 * ±0.063 (4)	3.725 ±0.082 (4)
Heart	(g/100g)	0.453 ±0.034 (4)	0.435 ±0.026 (4)	0.440 ±0.036 (4)
Kidney(R)	(g/100g)	0.470 ±0.022 (4)	0.460 ±0.012 (4)	0.503 ±0.067 (4)
Kidney(L)	(g/100g)	0.475 ±0.021 (4)	0.453 ±0.028 (4)	0.495 ±0.039 (4)
Kidneys	(g/100g)	0.945 ±0.034 (4)	0.913 ±0.039 (4)	0.998 ±0.104 (4)
Testis(R)	(g/100g)	0.543 ±0.031 (4)	0.540 ±0.047 (4)	0.648 * ±0.060 (4)
Testis(L)	(g/100g)	0.543 ±0.041 (4)	0.540 ±0.048 (4)	0.628 ±0.062 (4)
Testes	(g/100g)	1.085 ±0.070 (4)	1.080 ±0.095 (4)	1.275 * ±0.122 (4)
Epididymis(R)	(g/100g)	0.078 ±0.005 (4)	0.080 ±0.014 (4)	0.083 ±0.005 (4)
Epididymis(L)	(g/100g)	0.075 ±0.019 (4)	0.083 ±0.010 (4)	0.080 ±0.008 (4)
Epididymides	(g/100g)	0.153 ±0.022 (4)	0.163 ±0.022 (4)	0.163 ±0.013 (4)
Ventral prostate	(g/100g)	0.088 ±0.010 (4)	0.108 ±0.017 (4)	0.103 ±0.013 (4)
Dorsolateral prostate	(g/100g)	0.078 ±0.017 (4)	0.073 ±0.021 (4)	0.073 ±0.013 (4)
Brain	(g/100g)	0.825 ±0.058 (4)	0.813 ±0.050 (4)	0.990 ** ±0.048 (4)
Spleen	(g/100g)	0.288 ±0.071 (4)	0.223 ±0.022 (4)	0.240 ±0.014 (4)
Thymus	(mg/100g)	233.35 ±20.12 (4)	216.68 ±56.22 (4)	223.85 ±44.57 (4)
Pituitary gland	(mg/100g)	3.98 ±0.24 (4)	3.83 ±0.43 (4)	3.63 ±0.43 (4)
Thyroid	(mg/100g)	8.13 ±1.15 (4)	7.10 ±0.54 (4)	8.38 ±0.98 (4)
Adrenals	(mg/100g)	20.30 ±2.82 (4)	18.63 ±2.04 (4)	26.08 ±5.98 (4)
Final body weight	(g)	228.98 ±16.62 (4)	230.68 ±3.73 (4)	192.25 ** ±7.15 (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)	Twenty-eight-day treatment		
		0	0.75	3.75
Liver	(g/100g)	2.966 ±0.106 (5)	3.066 ±0.188 (5)	3.900 ** ±0.228 (4)
Heart	(g/100g)	0.392 ±0.024 (5)	0.368 ±0.022 (5)	0.465 ** ±0.039 (4)
Kidney(R)	(g/100g)	0.408 ±0.025 (5)	0.404 ±0.030 (5)	1.145 * ±0.306 (4)
Kidney(L)	(g/100g)	0.394 ±0.040 (5)	0.406 ±0.025 (5)	1.123 * ±0.268 (4)
Kidneys	(g/100g)	0.802 ±0.065 (5)	0.810 ±0.052 (5)	2.268 * ±0.574 (4)
Testis(R)	(g/100g)	0.474 ±0.036 (5)	0.524 ±0.080 (5)	0.648 ** ±0.045 (4)
Testis(L)	(g/100g)	0.476 ±0.038 (5)	0.524 ±0.069 (5)	0.653 ** ±0.062 (4)
Testes	(g/100g)	0.950 ±0.073 (5)	1.048 ±0.148 (5)	1.300 ** ±0.107 (4)
Epididymis(R)	(g/100g)	0.112 ±0.008 (5)	0.118 ±0.011 (5)	0.133 ** ±0.005 (4)
Epididymis(L)	(g/100g)	0.114 ±0.011 (5)	0.120 ±0.010 (5)	0.130 ±0.008 (4)
Epididymides	(g/100g)	0.226 ±0.018 (5)	0.238 ±0.020 (5)	0.263 * ±0.005 (4)
Ventral prostate	(g/100g)	0.138 ±0.028 (5)	0.130 ±0.012 (5)	0.080 ** ±0.014 (4)
Dorsolateral prostate	(g/100g)	0.102 ±0.008 (5)	0.112 ±0.019 (5)	0.070 * ±0.022 (4)
Seminal vesicle	(g/100g)	0.310 ±0.031 (5)	0.346 ±0.046 (5)	0.118 ** ±0.022 (4)
Brain	(g/100g)	0.614 ±0.030 (5)	0.634 ±0.034 (5)	0.998 ** ±0.091 (4)
Spleen	(g/100g)	0.202 ±0.033 (5)	0.200 ±0.016 (5)	0.153 ±0.051 (4)
Thymus	(mg/100g)	153.98 ±38.26 (5)	162.24 ±35.32 (5)	51.18 ** ±13.78 (4)
Pituitary gland	(mg/100g)	3.38 ±0.24 (5)	3.36 ±0.24 (5)	3.30 ±0.27 (4)
Thyroid	(mg/100g)	5.32 ±0.58 (5)	5.94 ±0.73 (5)	9.20 ** ±1.78 (4)
Adrenals	(mg/100g)	16.18 ±1.18 (5)	18.20 ±1.09 (5)	33.15 ** ±4.39 (4)
Final body weight	(g)	320.84 ±15.41 (5)	299.20 ±18.02 (5)	182.23 ** ±20.93 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

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

\* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

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

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

Findings	Male		
	0	0.75	3.75
	ss	ss	ss
4 <sup>a)</sup>	4	4	4
No abnormalities detected	4	4	1
Forestomach			
Elevation of limiting ridge	0	0	3
Kidney			
Discoloration of cortico-medullary junction, bilateral	0	0	2
Pelvic dilatation, unilateral	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: Twenty-eight-day treatment

Findings	Male			
	(mg/kg/day)			
	0	0.75	3.75	
	ss	ss	ss	m
5 <sup>a)</sup>	5	4	1	
No abnormalities detected	4	5	0	0
Dehydration	0	0	2	0
Emaciation	0	0	2	1
Forestomach				
Elevation of limiting ridge	0	0	1	0
Jejunum				
Blackish contents	0	0	1	1
Diverticulum	1	0	0	0
Ileum				
Blackish contents	0	0	1	1
Cecum				
Blackish contents	0	0	0	1
Kidney				
Enlargement, bilateral	0	0	4	1
Pale, bilateral	0	0	4	1
Seminal vesicle				
Small	0	0	2	0
Axillary lymph node				
Small, bilateral	0	0	1	0
Spleen				
Small	0	0	1	1
Thymus				
Small	0	0	3	1
Adrenal				
Enlargement, bilateral	0	0	1	0
Thoracic cavity				
Hydrothorax	0	0	0	1
Skin				
Loss of hair	0	0	1	0

ss: scheduled sacrifice animal, m: moribund animal.

a) Number of animals examined.

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

Findings	Grade	Male		
		0	0.75	3.75
		ss	ss	ss
		4 <sup>a)</sup>	4	4
Forestomach				
No abnormalities detected		2/2 <sup>b)</sup>	4/4	1/4
Hyperplasia/Squamous epithelium/	±	0/2	0/4	2/4
Limiting ridge	+	0/2	0/4	1/4
Glandular stomach				
No abnormalities detected		2/2	4/4	4/4
Liver				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4
Kidney				
No abnormalities detected		4/4	4/4	0/4
Degeneration/Renal tubule	+	0/4	0/4	4/4
Dilatation/Pelvis	++	0/4	0/4	1/4
Karyomegaly/Renal tubule/	±	0/4	0/4	3/4
Cortico-medullary junction				
Regeneration/Renal tubule/	+	0/4	0/4	4/4
Cortico-medullary junction				
Single cell necrosis/Renal tubule/	±	0/4	0/4	1/4
Cortico-medullary junction	++	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	3/4
Hypoplasia	+	0/4	0/4	1/4
Spleen				
No abnormalities detected		4/4	4/4	0/4
Hematopoiesis, extramedullary,	+	0/4	0/4	1/4
decreased	++	0/4	0/4	3/4
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.

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	0.75	3.75	(mg/kg/day)
		ss	ss	ss	m
		5 <sup>a)</sup>	5	4	1
Trachea					
No abnormalities detected		5/5 <sup>b)</sup>	---	4/4	1/1
Lung					
No abnormalities detected		5/5	---	4/4	1/1
Submandibular gland					
No abnormalities detected		5/5	---	4/4	1/1
Forestomach					
No abnormalities detected		5/5	5/5	3/4	1/1
Hyperplasia/Squamous epithelium/ Limiting ridge	+	0/5	0/5	1/4	0/1
Glandular stomach					
No abnormalities detected		5/5	5/5	3/4	1/1
Ulcer/Pyloric mucosa	+	0/5	0/5	1/4	0/1
Duodenum					
No abnormalities detected		5/5	5/5	3/4	0/1
Atrophy/Mucosa	+	0/5	0/5	0/4	1/1
Necrosis/Mucosa/Focal	+	0/5	0/5	1/4	0/1
Jejunum					
No abnormalities detected		4/5	5/5	4/4	0/1
Atrophy/Mucosa	+	0/5	0/5	0/4	1/1
Diverticulum		1/5	0/5	0/4	0/1
Ileum					
No abnormalities detected		5/5	5/5	2/4	0/1
Atrophy/Mucosa	+	0/5	0/5	2/4	1/1
Cecum					
No abnormalities detected		5/5	5/5	4/4	0/1
Atrophy/Mucosa	+	0/5	0/5	0/4	1/1
Colon					
No abnormalities detected		5/5	5/5	4/4	0/1
Atrophy/Mucosa	+	0/5	0/5	0/4	1/1
Rectum					
No abnormalities detected		5/5	5/5	4/4	0/1
Atrophy/Mucosa	+	0/5	0/5	0/4	1/1
Pancreas					
No abnormalities detected		5/5	---	4/4	1/1
Liver					
No abnormalities detected		5/5	---	4/4	1/1
Heart					
No abnormalities detected		5/5	---	4/4	1/1

ss: scheduled sacrifice animal, m: moribund animal.

a) Number of animals autopsied.

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

---: Not examined.

+: slight.

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	0.75	3.75	(mg/kg/day)
		ss	ss	ss	m
		5 <sup>a)</sup>	5	4	1
Kidney					
No abnormalities detected		5/5 <sup>b)</sup>	1/5	0/4	0/1
Degeneration/Renal tubule	+	0/5	0/5	2/4	0/1
	++	0/5	0/5	2/4	1/1
Dilatation/Renal tubule/	++	0/5	0/5	3/4	0/1
Cortico-medullary junction	+++	0/5	0/5	1/4	1/1
Karyomegaly/Renal tubule/	++	0/5	0/5	4/4	1/1
Cortico-medullary junction	+	0/5	0/5	2/4	1/1
Karyomegaly/Renal tubule/	+	0/5	0/5	2/4	1/1
Inner medulla	±	0/5	2/5	0/4	0/1
Regeneration/Renal tubule/	+	0/5	2/5	0/4	0/1
Cortico-medullary junction	++	0/5	0/5	4/4	1/1
Regeneration/Renal tubule/	+	0/5	0/5	2/4	0/1
Inner medulla	++	0/5	0/5	2/4	1/1
Single cell necrosis/Renal tubule/	+	0/5	0/5	4/4	1/1
Cortico-medullary junction	+	0/5	0/5	1/4	1/1
Single cell necrosis/Renal tubule/	+	0/5	0/5	1/4	0/1
Inner medulla	++	0/5	0/5	1/4	0/1
Urinary bladder					
No abnormalities detected		5/5	--	4/4	1/1
Testis					
No abnormalities detected		5/5	5/5	4/4	0/1
Degeneration/Seminiferous tubule/	++	0/5	0/5	0/4	1/1
Diffuse					
Giant cell	+	0/5	0/5	0/4	1/1
Epididymis					
No abnormalities detected		5/5	5/5	4/4	0/1
Cell debris/Bilateral	+	0/5	0/5	0/4	1/1
Ventral prostate					
No abnormalities detected		4/5	4/5	4/4	0/1
Atrophy	+	0/5	0/5	0/4	1/1
Cellular infiltration, lymphocyte	+	1/5	1/5	0/4	0/1
Dorsolateral prostate					
No abnormalities detected		5/5	5/5	4/4	1/1
Coagulating gland					
No abnormalities detected		5/5	5/5	4/4	1/1
Seminal vesicle					
No abnormalities detected		5/5	5/5	0/4	0/1
Atrophy	+	0/5	0/5	3/4	0/1
	++	0/5	0/5	1/4	1/1

ss: scheduled sacrifice animal, m: moribund animal.

a) Number of animals autopsied.

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

--: Not examined.

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

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	0.75	3.75	(mg/kg/day)
		ss	ss	ss	m
		5 <sup>a)</sup>	5	4	1
Spinal cord					
No abnormalities detected		5/5 <sup>b)</sup>	---	4/4	1/1
Sciatic nerve					
No abnormalities detected		5/5	---	4/4	1/1
Bone marrow					
No abnormalities detected		5/5	5/5	0/4	0/1
	+	0/5	0/5	1/4	0/1
Hypoplasia	++	0/5	0/5	2/4	0/1
	+++	0/5	0/5	1/4	1/1
Axillary lymph node					
No abnormalities detected		5/5	5/5	1/4	0/1
	+	0/5	0/5	3/4	0/1
Atrophy	+++	0/5	0/5	0/4	1/1
Mesenteric lymph node					
No abnormalities detected		5/5	5/5	3/4	0/1
	+	0/5	0/5	1/4	0/1
Atrophy	++	0/5	0/5	0/4	1/1
Spleen					
No abnormalities detected		5/5	2/5	0/4	0/1
	+	0/5	0/5	2/4	0/1
Atrophy	++	0/5	0/5	0/4	1/1
	+	0/5	0/5	1/4	0/1
Congestion	++	0/5	0/5	1/4	0/1
	+	0/5	0/5	1/4	0/1
Hematopoiesis, extramedullary, decreased	+	0/5	3/5	2/4	0/1
Thymus					
No abnormalities detected		5/5	5/5	0/4	0/1
	++	0/5	0/5	3/4	0/1
Atrophy	+++	0/5	0/5	1/4	1/1
Thyroid					
No abnormalities detected		5/5	---	4/4	1/1
Parathyroid					
No abnormalities detected		5/5	---	4/4	1/1
Adrenal					
No abnormalities detected		5/5	5/5	2/4	0/1
Hypertrophy/Cortex	+	0/5	0/5	2/4	1/1
Eye ball					
No abnormalities detected		5/5	---	4/4	1/1

ss: scheduled sacrifice animal, m: moribund animal.

a) Number of animals autopsied.

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

---: Not examined.

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

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

Findings	Grade	Male			
		0	0.75	3.75	(mg/kg/day)
		ss	ss	ss	m
Skeletal muscle		5 <sup>a)</sup>	5	4	1
No abnormalities detected		5/5 <sup>b)</sup>	---	4/4	1/1
Bone					
No abnormalities detected		5/5	---	4/4	1/1
Skin					
Atrophy/Hair follicle/Focal	++	---	---	1/1	---
Mammary gland					
No abnormalities detected		5/5	5/5	1/4	1/1
Atrophy	+	0/5	0/5	3/4	0/1

ss: scheduled sacrifice animal, m: moribund animal.

a) Number of animals autopsied.

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

---: Not examined.

+: slight, ++: moderate.