

最 終 報 告 書

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

2015 年 3 月

一般財団法人化学物質評価研究機構



本文書は正本を正確に転写したものです。

一般財団法人 化学物質評価研究機構 日田事業所

2015 年 3 月 6 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. 試験資料の保管	5
12. 最終報告書の承認	6
13. 要 約	7
14. 試験材料	8
14.1 被験物質	8
14.2 媒 体	9
14.3 使用動物	9
14.4 飼育環境	9
15. 試験方法	10
15.1 被験物質の設定用量	10
15.2 群構成	10
15.3 投与液	10
15.4 投 与	11
15.5 一般状態観察	11
15.6 詳細な一般状態観察	11
15.7 機能検査	12
15.8 体重測定	12
15.9 摂餌量測定	12
15.10 尿検査	13
15.11 血液検査	13
15.12 病理学的検査	16
15.13 統計学的方法	18
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	18
17. 試験成績	18
17.1 一般状態	18
17.2 詳細な一般状態	18
17.3 機能検査	18

17.4	体 重	18
17.5	摄餌量	18
17.6	尿検査	18
17.7	血液検査	19
17.8	病理学的検査	19
18.	考 察	20
Figures		
1	Body weights	22
2	Food consumption	23
Tables		
1	Summary of general clinical observations	24
2	Summary of detailed clinical observations	25
3	Summary of functional observations	29
4	Summary of body weights	30
5	Summary of food consumption	31
6	Summary of urinalyses	32
7	Summary of hematological examinations	35
8	Summary of blood chemical examinations	36
9	Summary of absolute organ weights	37
10	Summary of relative organ weights	38
11	Summary of macroscopic examinations	39
12	Summary of histopathological examinations	40
Appendices		
1	General clinical observations of individual animals	43
2	Detailed clinical observations of individual animals	46
3	Functional observations individual animals	49
4	Body weights of individual animals	50
5	Food consumption of individual animals	53
6	Uralytic data of individual animals	54
7	Hematological data of individual animals	60
8	Blood chemical data of individual animals	63
9	Absolute organ weights of individual animals	66
10	Relative organ weights of individual animals	69
11	Pathological findings of individual animals	72
添付資料		
	理化学試験結果	77

1. 表 題

遺伝子発現量解析のための Potassium bromate 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

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

5. 試験法

以下の試験法を参考に実施した。

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

6. GLP 基準

適用しなかった。

7. 動物愛護

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

- a) 「動物の愛護及び管理に関する法律」(法律第 105 号、昭和 48 年)
- b) 「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(環境省、平成 18 年)
- c) 「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」(厚生労働省、平成 18 年)
- d) 「農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(農林水産省、平成 18 年)
- e) 「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省、平成 18 年)
- f) 「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学会会議、平成 18 年)

8. 試験日程

試験開始日	2014 年 5 月 15 日
動物入荷日	2014 年 5 月 20 日
投与開始日	2014 年 5 月 28 日
28日間投与後解剖日	2014 年 6 月 25 日
試験終了日	2015 年 3 月 6 日

9. 試験責任者

寶珠山 五月 (所属 試験第二課)

10. 試験関係者及び業務分担

試験担当者	坪倉 靖祐 (動物の検疫・馴化及び飼育管理、被験物質液の調製、投与、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、詳細な一般状態観察及び機能検査についての動物試験業務に対して責任を持つ)
病理検査責任者	大嶋 浩 (剖検、組織採取、器官重量測定及び病理組織学的検査についての病理検査業務に対して責任を持つ)
臨床検査責任者	室井 貴子 (尿検査、血液学的検査及び血液生化学的検査についての臨床検査業務に対して責任を持つ)

11. 試資料の保管

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

保管期間は試験終了後 10 年間とする。なお、保管期間中の被験物質の安定性は確認しない。保管期間終了後の処置(継続保管、廃棄又は返却)は、試験委託者と協議の上決定する。

12. 最終報告書の承認

2015年3月6日

試験責任者

寶珠山五月

13. 要 約

Potassium bromate 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 CrI:CD(SD)ラットに精製水に溶解させた Potassium bromate を 28 日間毎日強制経口投与した。投与用量は 0 (精製水)、20 及び 100 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、CO₂/O₂ 混合ガス麻酔下で血液を採取した後解剖して、尿検査、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、100 mg/kg 群で自発運動低下、半眼、呼吸数減少、消瘦及び紅涙がみられた。

機能検査では 100 mg/kg 群で後肢握力の低値がみられた。

体重では 100 mg/kg 群で投与 21 日目以降に減少又は低値がみられた。

摂餌量では 100 mg/kg 群で投与 21 日目以降に低値又は低値傾向がみられた。

尿検査では 100 mg/kg 群で尿沈渣中の白血球数の増加がみられた。

血液学的検査では、100 mg/kg 群で MCV の低値、網状赤血球数比率の高値、好中球比率、好塩基球比率及び単球比率の高値、リンパ球比率の低値がみられた。

血液生化学的検査では、100 mg/kg 群で AST、 γ -GTP、BUN 及び総ビリルビンの高値、K 及び Cl の低値がみられた。

器官重量では、100 mg/kg 群で腎臓の絶対及び相対重量の高値、肝臓及び副腎の相対重量の高値、精巣の絶対重量の低値傾向、胸腺の絶対及び相対重量の低値がみられた。

剖検では、100 mg/kg 群で脱水、前胃の境界縁隆起、腎臓の腫大及び皮髄境界部の変色がみられた。

病理組織学的検査では、100 mg/kg 群で腎臓の髄質外帯の近位尿細管の単細胞壊死、皮質及び髄質外帯の尿細管再生及び髄質外帯の鉍質沈着、前胃の境界縁の扁平上皮過形成、腺胃の胃底腺頸部の有糸分裂像増加、脾臓のうっ血、ヘモジデリン沈着及び髄外造血亢進、甲状腺のびまん性濾胞上皮細胞肥大がみられたほか、顎下腺の腺房細胞肥大、結腸の粘膜萎縮、肝臓の小葉中心性肝細胞萎縮、精巣の精子細胞の基底側停滞及び成熟精子細胞の離出阻害、精細管の変性及び萎縮並びに精母細胞の変性、精巣上体の精細胞残渣及び精子減少、胸腺の萎縮、骨格筋の壊死及び筋食作用、骨の骨端軟骨板の萎縮及び類骨増加がみられた。また、20 及び 100 mg/kg 群で α_{2u} -グロブリンの蓄積による皮質の近位尿細管の硝子滴がみられた。

詳細な一般状態観察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 Potassium bromate の投与により、腎臓、胃及び血液への毒性影響が確認された。

14. 試験材料

14.1 被験物質

a) 名称等

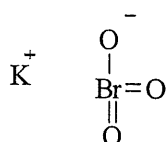
名 称 臭素酸カリウム
CAS 番号 7758-01-2

b) 製造元及びロット番号

製造元 関東化学
ロット番号 402U1647

c) 構造式等

構造式

分子式 KBrO_3

分子量 167.00

d) 純度等

純 度 99.8%

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 7% (20°C)

融 点 分解 (370°C)

沸 点 分解

常温における性状 白色の結晶または結晶性粉末

安定性 加熱すると分解して酸素を放出して支燃性を示す。

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

密 度 3.26 g/mL (20°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 (許容範囲 1~10°C) で保管した。

g) 取扱い上の注意

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

14.2 媒体

a) 名称

精製水

b) 選択理由

当試験施設で先に実施した「遺伝子発現量解析のための Potassium bromate 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 B10-0112、非 GLP 試験）において、精製水を媒体として用いたことから、本試験においても精製水を媒体とした。

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
精製水	高杉製薬	日本薬局方	PC140310	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 CrI:CD(SD)ラット (SPF) を日本チャールス・リバー日野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 7 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、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、群分け後は耳籤を付けて識別した。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 136.4~156.8 g であり、全例の体重が全体の平均体重 \pm 20%の範囲内であることを確認した。

14.4 飼育環境

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

ケージは、群分け前は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 131209 及び 140411、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

当試験施設で実施した B10-0112 において、高用量とした 150 mg/kg/day で投与 17 日目に一般状態の悪化がみられ投与 18 日目に死亡又は瀕死状態となったが、低用量とした 30 mg/kg/day では 28 日間反復投与による明らかな毒性は認められなかった。

したがって、本試験では 100 mg/kg/day を高用量とし、低用量として 20 mg/kg/day を設定した。

15.2 群構成

被験物質投与群として 2 用量群を設けた他、媒体のみを投与する媒体対照群を設定した。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	10	0	4 (1 - 5)
被 験 物 質	低用量	20	10	0.200	4 (6 - 10)
	高用量	100	10	1.00	4 (11 - 15)

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、精製水を加えて攪拌し溶解させた。その後、精製水を加えて定容し 1.00 w/v% の被験物質液を調製した。さらに、1.00 w/v% の被験物質液の一部を採取し、精製水を加えて希釈し、0.200 w/v% の被験物質液を調製した。

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

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

b) 被験物質液の安定性の確認

当試験施設で実施した「Potassium bromate の被験物質液の安定性及び濃度確認試験」（試験番号 X02-0273、非 GLP 試験）において、2.00 及び 0.0200 w/v% の被験物質液が冷所保管で 13 日間安定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 1.00 及び 0.200 w/v% の被験物質液の調製直後の濃度を、当試験施設において確認した。被験物質液の一部を採取して分析試料を調製し、紫外可視分光光度法により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 1.00 及び 0.200 w/v% の被験物質液でそれぞれ 102% 及び 101% 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

28 日間毎日 1 回、強制経口投与した。投与は 9:16～11:09 に行った。

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

15.5 一般状態観察

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

15.6 詳細な一般状態観察

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

15.7 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（メイティス）を用い、前肢及び後肢の握力を2回測定し、平均値で評価	
自発運動量	ラット用運動量測定装置 ACTIMO-10（シンテクノ）を用い、動物の運動量を1時間（10分間隔で6回）測定し、赤外線（42.6 cm×26.5 cmの範囲を縦横5 cm間隔で発生）を横切った回数で評価	

15.8 体重測定

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

- ・ 群分け日
- ・ 投与1、3、7、14、21、23、25、27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。

15.10 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 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。

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

使用機器 A: 自動浸透圧計 OM-6040 (アークレイ)

B: システム生物顕微鏡 BX41 (オリンパス)

15.11 血液検査

a) 採血及び検査試料

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)、CO₂/O₂ 混合ガス (CO₂:O₂ 混合比=4:1) 麻酔下で腹部大動脈から次表のとおり採血し、検査試料を作製した。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、ドライアイスと同封して安全性評価技術研究所に送付した。

検査試料	作製方法
全血	EDTA-2K 添加採血びん SB-41 (ロット番号 G2030、シスメックス) で採血した血液
血漿	くえん酸三ナトリウム二水和物 (ロット番号 WEJ0101、和光純薬工業) の 3.2 w/v% 水溶液を 100 µL 添加したガラス製試験管で採血し、遠心分離 (3000 r.p.m.×10 mins) して得た血漿
血清	ガラス製試験管で採血し遠心分離 (3000 r.p.m.×10 mins) して得た血清

b) 血液学的検査

全血及び血漿を用い次表の項目を測定した。また、すべての項目について機器測定できたため、全血を用いた塗抹標本は作製しなかった。

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

検査試料 Cには全血、Dには血漿を使用

使用機器 C: 総合血液学検査装置 ADVIA 120 (シーメンス)

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

c) 血液生化学的検査

血清を用いて次表の項目を測定した。

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	
アルカリ性フォスファターゼ (ALP)	<i>p</i> -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)	<i>L</i> - γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide 法	
総コレステロール (T-Cho)	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)	$\frac{\text{Albumin}}{\text{T-Protein} - \text{Albumin}}$	—
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)

15.12 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。

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）、 膵臓、肝臓*
心・血管系	心臓*
泌尿器系	腎臓*、膀胱
生殖器系	精巣*、精巣上部*、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	骨髄（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、精巣及び精巣上部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℃ 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℃ 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℃ で保存した。左側は変法デビットソン液で固定した。

精巣上体は、重量を測定後、左右とも変法デビットソン液で固定した。

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

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

下垂体は、重量を測定後、RNAlater に浸漬した。

RNAlater に浸漬した各組織は RNAlater を組織に浸潤させるため、4℃ で 24 時間放置した後、RNAlater に浸漬させたまま -80℃ で凍結し、ドライアイスと同封して安全性評価技術研究所に送付した。-80℃ 凍結保存した組織についてはドライアイスと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、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、顎下腺、胃、大腸、肝臓、心臓、腎臓、精巣、精巣上体、脾臓、胸腺、甲状腺、骨格筋及び大腿骨については、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。

このほか、高用量群の脾臓の HE 染色標本において褐色色素の増加が認められ、ヘモジデリンの沈着が疑われたことから、対照群及び高用量群の各 1 例（No. 3 及び No. 11）についてベルリン青染色による検査を行った。さらに、高用量群の腎臓の HE 染色標本

において硝子滴が認められ、 $\alpha 2u$ -グロブリンとの関連性を検討する必要があったため、対照群及び高用量群の各1例 (No. 3 及び No. 15) について抗 $\alpha 2u$ -グロブリン抗体による免疫組織化学的検査を行った。

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)

100 mg/kg 群で自発運動低下が5例全例、半眼が3例、呼吸数減少及び削瘦が2例、紅涙が1例で観察された。これらの症状は投与23日目以降に散発的又は継続して認められた。20 mg/kg 群及び対照群に異常は認められなかった。

17.2 詳細な一般状態 (Table 2、Appendix 2)

被験物質投与群で排糞回数及び排尿回数に有意な変動は認められず、他の詳細観察項目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。

17.3 機能検査 (Table 3、Appendix 3)

100 mg/kg 群で後肢の握力の有意な低値がみられた。なお、20 mg/kg 群では自発運動量の合計値に有意な高値が認められたが、用量依存性がないことから偶発的変動と考えた。反応性検査においては被験物質投与群及び対照群に異常は認められなかった。

17.4 体重 (Fig. 1、Table 4、Appendix 4)

100 mg/kg 群で投与21、23、25、27 及び 28 日目に有意な低値 (それぞれ対照群の 84.4%、80.3%、75.9%、73.5% 及び 72.7%) がみられ、投与21日目以降には5例中4例で継続的又は単発的に前回測定値からの減少が認められた。20 mg/kg 群に有意な変動は認められなかった。

17.5 摂餌量 (Fig. 2、Table 5、Appendix 5)

100 mg/kg 群で投与21 及び 28 日目に低値傾向又は有意な低値 (それぞれ対照群の 88.6%、及び 72.8%) が見られた。20 mg/kg 群に有意な変動は認められなかった。

17.6 尿検査 (Table 6、Appendix 6)

100 mg/kg 群で5例中3例に尿沈渣中の白血球数の増加が認められた。なお、20 mg/kg 群では尿量の有意な低値及び尿浸透圧の有意な高値がみられたが、用量依存性のない変動であった。対照群に異常は認められなかった。

17.7 血液検査

a) 血液学的検査 (Table 7、Appendix 7)

100 mg/kg 群で平均赤血球容積 (MCV) 及びリンパ球比率の有意な低値、平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)、網状赤血球数比率、好中球比率、好塩基球比率及び単球比率の有意な高値がみられた。MCHC の高値は当試験施設の背景値内の変動であった。20 mg/kg 群に有意な変動は認められなかった。

当試験施設の Crl:CD(SD)ラットの血液学的検査背景値
投与期間終了時 (9 週齢)

項目	性	例数	平均	Mean-2S.D.	Mean+2S.D.
MCHC (g/dL)	雄	65	33.34	31.22	35.46

b) 血液生化学的検査 (Table 8、Appendix 8)

100 mg/kg 群でアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GTP)、尿素窒素 (BUN)、A/G 比及び総ビリルビンの有意な高値、カリウム及び塩素の有意な低値がみられた。20 mg/kg 群に有意な変動は認められなかった。

17.8 病理学的検査

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

100 mg/kg 群で肝臓の相対重量の有意な高値 (対照群の 107.1%)、腎臓の絶対及び相対重量の有意な高値 (対照群の 114.3%及び 170.5%)、精巣の絶対重量の低値傾向 (対照群の 81.1%)、胸腺の絶対及び相対重量の有意な低値 (対照群の 44.2%及び 62.1%)、副腎の相対重量の有意な高値 (対照群の 154.7%) が認められたほか、解剖時体重が有意な低値 (対照群の 69.1%) を示し、肝臓、心臓、腹葉前立腺及び下垂体の絶対の有意な低値、精巣上体及び脳の相対重量の有意な高値がみられた。20 mg/kg 群に有意な変動は認められなかった。

b) 剖 検 (Table 11、Appendix 11)

100 mg/kg 群で前胃の境界縁隆起及び腎臓の両側性の腫大が 5 例全例、脱水及び腎臓の両側性の皮髄境界部の変色が各 2 例に認められたほか、脾臓の被膜上の白色部が 1 例にみられた。20 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)

100 mg/kg 群で腎臓に皮質の近位尿細管の硝子滴 (軽度～中等度)、髓質外帯の近位尿細管の単細胞壊死 (軽度) 並びに皮質及び髓質外帯の尿細管再生 (軽度～中等度) が 5 例全例、髓質外帯の鉍質沈着 (軽度～重度) が 4 例に認められたほか、前胃で境界縁の扁平上皮過形成 (軽度) が 5 例全例、腺胃の胃底腺頸部の有糸分裂像増加 (軽度) が 2 例、脾臓でヘモジデリン沈着 (軽度) が 5 例全例、うっ血 (軽度) が 4 例、髓外造血亢進 (軽度) が 2 例、甲状腺のびまん性濾胞上皮細胞肥大 (軽度) が 1 例に認められた。また、顎下腺の腺房細胞肥大 (軽度～中等度) が 3 例、結腸の粘膜萎縮 (軽度) が 1 例、肝臓の小葉中心性肝細胞萎縮 (軽度) が 3 例、心臓の限局性心筋炎 (軽度) が 1 例、精巣の精子細胞の基底側停滞 (軽度～中等度) 及び成熟精子細胞の離出阻害 (軽度～中等度) が 3 例、精細管の変性及び萎縮 (中等度) 並びに精母細胞の変性 (軽度) が各 1 例、

精巢上体の両側性の精細胞残渣（軽度）及び両側性の精子減少（軽度）が各 1 例、胸腺の萎縮（軽度）が 1 例、骨格筋の壊死及び筋食作用（軽度）が 1 例、骨の骨端軟骨板の萎縮（軽度）及び類骨増加（軽度）が 2 例に認められた。このほか、腎臓の腎盂拡張及び脾臓の被膜炎が各 1 例にみられた。相対重量の高値がみられた副腎に異常は認められなかった。

20 mg/kg 群では腎臓の皮質の近位尿細管の硝子滴（軽度）が 3 例に認められたほか、肝臓の小肉芽腫及び心臓の限局性心筋炎が各 1 例にみられた。

対照群では腎臓の髓質外帯の嚢胞が 1 例にみられた。

なお、対照群及び 100 mg/kg 群の各 1 例（No. 3 及び No. 15）について実施した腎臓の抗 α_{2u} -グロブリン抗体による免疫組織化学的検査では、対照群において皮質の近位尿細管上皮に陽性物質が少量認められたのに対し、100 mg/kg 群ではより多くの陽性物質が認められ、硝子滴が α_{2u} -グロブリンの蓄積によるものであることが確認された。対照群及び 100 mg/kg 群の各 1 例（No. 3 及び No. 11）について実施した脾臓のベルリン青染色では、対照群には青色物質がほとんど認められなかったのに対し、100 mg/kg 群では赤脾髄に青色物質が少量認められ、軽度のヘモジデリン沈着が生じていることが確認された。

18. 考 察

先に当試験施設で実施した「遺伝子発現量解析のための Potassium bromate 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 B10-0112）においては 150 mg/kg/day で投与期間中に動物の死亡がみられたが、本試験においては 100 mg/kg/day で体重の減少又は増加抑制、削瘦がみられたものの、死亡はみられなかった。しかしながら、B10-0112 と同様に腎臓への重篤な毒性影響及び胃粘膜に対する刺激性並びに血液毒性が確認されたほか、肝臓及び甲状腺への影響も示唆された。

腎臓に対する影響として、100 mg/kg 群で絶対及び相対重量の高値、並びに肉眼的な腫大及び皮髓境界部の変色がみられた。病理組織学的検査では、100 mg/kg 群で髓質外帯の近位尿細管の単細胞壊死、皮質及び髓質外帯の尿細管再生及び髓質外帯の鉍質沈着が認められた。尿検査では尿沈渣中の白血球の増加、血液生化学的検査では BUN の高値がみられ、腎障害が示唆された。なお、20 及び 100 mg/kg 群で皮質の近位尿細管に α_{2u} -グロブリンの蓄積による硝子滴が認められたが、当該病変部付近には傷害性変化がみられなかったことから、硝子滴は動物の状態悪化に関与していないと判断した。

胃に対する影響として、100 mg/kg 群で前胃の境界縁隆起がみられ、病理組織学的検査では前胃の境界縁の扁平上皮過形成及び腺胃の胃底腺頸部の有糸分裂像増加が認められた。これらの所見は、被験物質投与により胃粘膜が傷害された後に修復反応が生じたことを示すものと考えられ、被験物質は粘膜刺激性を有すると推測した。

血液に対する影響として、100 mg/kg 群で MCV の低値及び網状赤血球数比率の高値がみられたほか、病理組織学的検査において脾臓のうっ血、ヘモジデリン沈着及び髓外造血亢進、血液生化学的検査において総ビリルビンの高値がみられたことから、軽度の溶血性貧血が生じていたと推測した。なお、貧血の診断基準となる赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマト

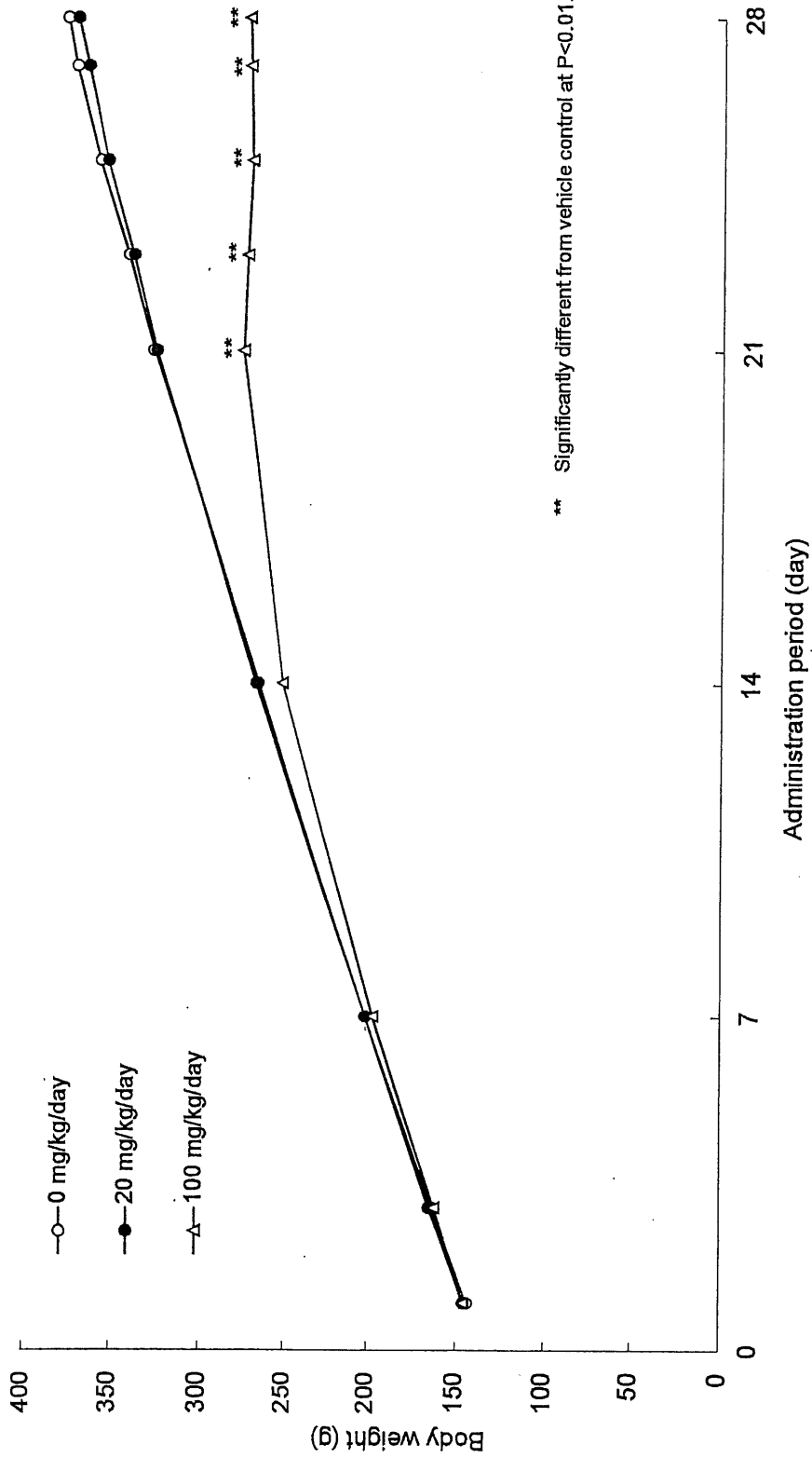
クリット値に有意な差は認められなかったが、剖検時に脱水がみられたことから、血液濃縮により変化が相殺されたものと考えた。

その他の影響として、100 mg/kg 群で AST 及び γ -GTP の高値がみられ、肝障害が示唆された。なお、器官重量では相対重量の高値がみられたが、病理組織学的検査においては小葉中心性の肝細胞萎縮がみられた。肝細胞萎縮は動物の状態悪化に伴う変化であり、被験物質投与による直接的影響ではないと考えた。また、100 mg/kg 群で甲状腺のびまん性濾胞上皮細胞肥大が 1 例にみられ、被験物質投与による影響が考えられたが、1 例のみの変化であること及び器官重量に有意な変化が認められなかったことから、毒性学的意義は不明である。

投与期間中に 100 mg/kg 群でみられた体重の減少及び増加抑制、摂餌量の低値、自発運動低下、半眼、呼吸数減少、消瘦、紅涙及び後肢握力の低値は、主に腎臓への毒性影響を反映したものと考えられた。また、100 mg/kg 群において血液生化学的検査でみられたカリウム及び塩素の低値、病理組織学的検査でみられた顎下腺の腺房細胞肥大、結腸の粘膜萎縮、精巣の精子細胞の基底側停滞及び成熟精子細胞の離出阻害、精細管の変性及び萎縮並びに精母細胞の変性、精巣上体の精細胞残渣及び精子減少、胸腺の萎縮、骨格筋の壊死及び筋食作用、骨の骨端軟骨板の萎縮及び類骨増加は、腎障害及びこれに起因する摂餌不良により生じた栄養障害の影響と考えた。そのほか、血液学的検査において 100 mg/kg 群でみられた好中球比率、好塩基球比率及び単球比率の高値、リンパ球比率の低値は腎臓又は前胃の傷害性変化に対する反応と考えられた。

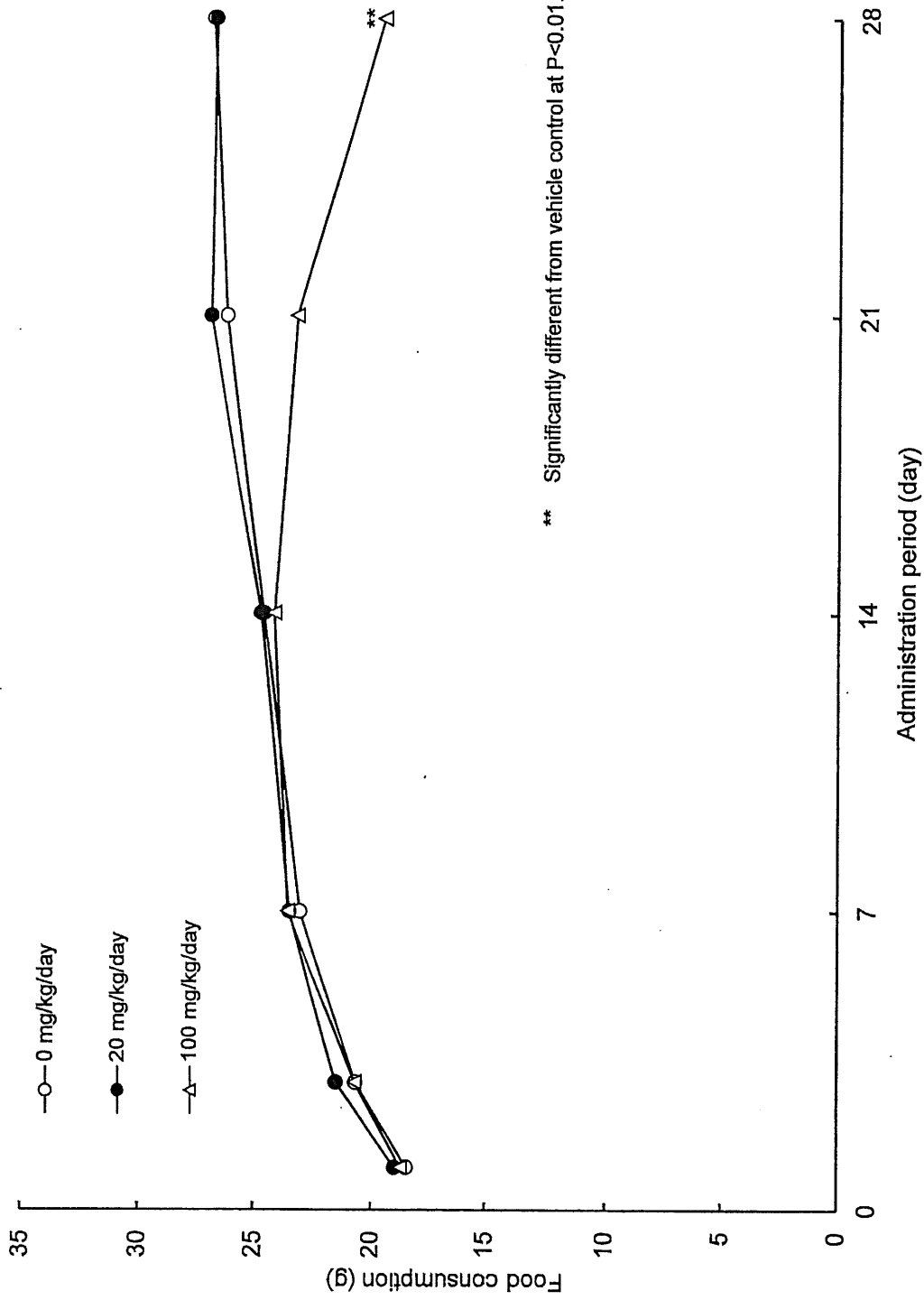
投与期間中又は投与期間終了時にみられたその他の変化は、用量依存性のない変動であること、他に関連する変化が認められないこと、又は自然発生病変として散見される所見であること等から、被験物質投与とは関連のない変化と考えた。

以上のとおり、本試験では B10-0112 と同様に、被験物質投与により腎臓への重篤な毒性影響及び胃粘膜に対する刺激性並びに血液毒性が認められたほか、肝臓及び甲状腺への影響も示唆された。



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

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



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

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

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

Sex	Signs	Administration period		
		mg/kg/day	0	20
Male		ss	ss	ss
		5 ^{a)}	5	5
	No abnormalities detected	5	5	
	Decreased spontaneous locomotion			5
	Reddish tear			1
	Decreased respiratory rate			2
	Incomplete eyelid opening			3
	Emaciation			2

ss, scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals examined.

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

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

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

Male

Dose (mg/kg/day)	Predosing			Dosing week 1			
	0	20	100	0	20	100	
Number of animals	5	5	5	5	5	5	
Removal from cage	-2	0	0	0	0	0	
	Ease of removal	-1	0	0	0	0	
		0	5	5	4	5	
		+1	0	0	1	0	
		+2	0	0	0	0	
		0	5	5	3	4	
	Vocalization	+1	0	0	2	1	
		+2	0	0	0	0	
		-1	0	0	0	0	
		0	5	5	5	5	
Handling observation		+1	0	0	0	0	
	Subnormal temperature	-	5	5	5	5	
		+	0	0	0	0	
	Piloerection	-	5	5	5	5	
		+	0	0	0	0	
	Staining hair	-	5	5	5	5	
		+	0	0	0	0	
	Unkempt hair	-	5	5	5	5	
		+	0	0	0	0	
	Paleness	-	5	5	5	5	
		+	0	0	0	0	
	Reddening	-	5	5	5	5	
		+	0	0	0	0	
	Cyanosis	-	5	5	5	5	
		+	0	0	0	0	
	Lacrimation	-	5	5	5	5	
		+	0	0	0	0	
	Exophthalmos	-	5	5	5	5	
		+	0	0	0	0	
	Pupillary size	-1	0	0	0	0	
		0	5	5	5	5	
		+1	0	0	0	0	
	Salivation	-	5	5	5	5	
		+	0	0	0	0	
	Secretion	-	5	5	5	5	
		+	0	0	0	0	
	Observation in arena	Posture	0	5	5	5	5
			+1	0	0	0	0
			+2	0	0	0	0
		Motor activity	-2	0	0	0	0
			-1	0	0	0	
			0	3	4	4	
			+1	2	1	1	
			+2	0	0	0	
Respiration		0	5	5	5	5	
			+1	0	0	0	
			+2	0	0	0	
Lid closure			+3	0	0	0	
		-	5	5	5	5	
		+	0	0	0	0	
Gait		-	5	5	5	5	
		S	0	0	0		
		T	0	0	0		
		P	0	0	0		
		GD	0	0	0		
Abnormal behavior	Tremor/twitch/convulsion	0	5	5	5		
		+1	0	0	0		
		+2	0	0	0		
		+3	0	0	0		
	Stereotypic behavior	-	5	5	5	5	
			C	0	0	0	
			G	0	0	0	
			S	0	0	0	
		H	0	0	0		
	Abnormal behavior	-	5	5	5	5	
		S	0	0	0		
		B	0	0	0		
		C	0	0	0		
		R	0	0	0		
		W	0	0	0		
		V	0	0	0		
	ST	0	0	0			
	T	0	0	0			
Defecation ^{a)}	0.8 ± 1.1	0.6 ± 0.9	0.6 ± 0.9	1.0 ± 1.2	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	
Urination ^{a)}	3.4 ± 3.2	1.4 ± 2.2	2.6 ± 2.6	3.4 ± 3.8	0.8 ± 0.8	0.4 ± 0.5	

a): (count/min, mean±S.D.)

* : significantly different from vehicle control at p<0.05

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

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

Dose (mg/kg/day)		Dosing week 2			Dosing week 3		
		0	20	100	0	20	100
Number of animals		5	5	5	5	5	5
Removal from cage	-2	0	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	0	0	0
	0	4	5	4	5	5	5
	+1	1	0	1	0	0	0
	+2	0	0	0	0	0	0
	0	3	4	3	3	5	4
Vocalization	+1	2	1	2	2	0	1
	+2	0	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	0	0	0
Muscle tone	0	5	5	5	5	5	5
	+1	0	0	0	0	0	0
	-	5	5	5	5	5	5
Subnormal temperature	+	0	0	0	0	0	0
	-	5	5	5	5	5	5
Piloerection	+	0	0	0	0	0	0
	-	5	5	5	5	5	5
Staining hair	+	0	0	0	0	0	0
	-	5	5	5	5	5	5
Unkempt hair	+	0	0	0	0	0	0
	-	5	5	5	5	5	5
Paleness	+	0	0	0	0	0	0
	-	5	5	5	5	5	5
Handling observation	Reddening	-	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
Cyanosis	-	5	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
Lacrimation	-	5	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
Exophthalmos	-	5	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
Pupillary size	-1	0	0	0	0	0	0
	0	5	5	5	5	5	5
	+1	0	0	0	0	0	0
Salivation	-	5	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
Secretion	-	5	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
Posture	0	5	5	5	5	5	5
	+1	0	0	0	0	0	0
	+2	0	0	0	0	0	0
Motor activity	-2	0	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	0	0	2
	0	4	4	5	5	5	3
	+1	1	1	0	0	0	0
	+2	0	0	0	0	0	0
Respiration	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
Lid closure	-	5	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0
Gait	-	5	5	5	5	5	5
	S	0	0	0	0	0	0
	T	0	0	0	0	0	0
	P	0	0	0	0	0	0
	GD	0	0	0	0	0	0
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	5
	C	0	0	0	0	0	0
	G	0	0	0	0	0	0
	S	0	0	0	0	0	0
Abnormal behavior	H	0	0	0	0	0	0
	-	5	5	5	5	5	5
	S	0	0	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	0	0
	R	0	0	0	0	0	0
	W	0	0	0	0	0	0
	V	0	0	0	0	0	0
ST	0	0	0	0	0	0	
T	0	0	0	0	0	0	
Defecation ^{a)}		0.4 ± 0.9	0.4 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4	0.4 ± 0.9	0.4 ± 0.9
Urination ^{a)}		1.8 ± 3.5	0.4 ± 0.9	0.0 ± 0.0	3.4 ± 3.3	1.0 ± 1.7	1.8 ± 3.5

a): (count/min, mean±S.D.)

* : significantly different from vehicle control at p<0.05

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

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

Male		Dosing week 4		
		0	20	100
Dose (mg/kg/day)				
Number of animals		5	5	5
Removal from cage		-2	0	0
		-1	1	2
	Ease of removal	0	4	3
		+1	0	0
		+2	0	0
		0	4	4
	Vocalization	+1	1	1
		+2	0	0
		-1	0	0
		0	5	5
	+1	0	0	
Handling observation	Subnormal temperature	-	5	5
		+	0	0
	Piloerection	-	5	5
		+	0	0
	Staining hair	-	5	5
		+	0	0
	Unkempt hair	-	5	5
		+	0	0
	Paleness	-	5	5
		+	0	0
	Reddening	-	5	5
		+	0	0
	Cyanosis	-	5	5
		+	0	0
	Lacrimation	-	5	5
		+	0	0
	Exophthalmos	-	5	5
		+	0	0
	Pupillary size	-1	0	0
		0	5	5
	+1	0	0	
Salivation	-	5	5	
	+	0	0	
Secretion	-	5	5	
	+	0	0	
Observation in arena	Posture	0	5	5
		+1	0	0
		+2	0	0
		-2	0	0
		-1	0	1
	Motor activity	0	5	5
		+1	0	0
		+2	0	0
		0	5	5
	Respiration	+1	0	0
		+2	0	0
		+3	0	0
	Lid closure	-	5	5
		+	0	0
	Gait		-	5
		S	0	0
		T	0	0
		P	0	0
		GD	0	0
Tremor/ twitch/ convulsion		0	5	5
		+1	0	0
		+2	0	0
		+3	0	0
Stereotypic behavior			-	5
		C	0	0
		G	0	0
		S	0	0
		H	0	0
Abnormal behavior		-	5	5
		S	0	0
		B	0	0
		C	0	0
		R	0	0
		W	0	0
		V	0	0
		ST	0	0
	T	0	0	
Defecation ^{a)}		0.4 ± 0.5	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0
Urination ^{a)}		1.4 ± 1.9	0.6 ± 1.3	0.2 ± 0.4

a): (count/min, mean±S.D.)

* : significantly different from vehicle control at p<0.05

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

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

Male		Dosing week 4			
Dose (mg/kg/day)		0	20	100	
Number of animals		5	5	5	
Sensorimotor function	Approach contact/ touch response	-1	0	0	
		0	5	5	
		+1	0	0	
	Pinna response	-1	0	0	
		0	5	5	
		+1	0	0	
	Pain response (tail pinch)	-1	0	0	
		0	5	5	
		+1	0	0	
	Pupillary reflex	+	5	5	5
		-	0	0	0
	Air righting reflex	+	5	5	5
-		0	0	0	
Grip strength	Forelimb (g)	327 ± 88	300 ± 94	293 ± 107	
	Hindlimb (g)	478 ± 41	425 ± 34	408 ± 38 *	
Motor activity [Interval]	0-10 (min)	135 ± 49	214 ± 64	173 ± 110	
	10-20 (min)	122 ± 30	131 ± 66	142 ± 75	
	20-30 (min)	75 ± 21	68 ± 21	85 ± 32	
	30-40 (min)	34 ± 16	96 ± 54	74 ± 54	
	40-50 (min)	42 ± 26	56 ± 48	7 ± 5	
	50-60 (min)	25 ± 25	21 ± 18	27 ± 28	
	Total	433 ± 21	586 ± 96 *	508 ± 141	

"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		0	20	100
(mg/kg/day)				
Administration period (day)	1	143.66 ±5.59 (5)	145.34 ±5.53 (5)	145.86 ±6.56 (5)
	3	163.60 ±5.87 (5)	165.08 ±8.75 (5)	162.36 ±7.09 (5)
	7	201.46 ±7.44 (5)	201.26 ±12.51 (5)	196.90 ±7.34 (5)
	14	266.26 ±9.32 (5)	267.66 ±15.85 (5)	251.42 ±10.38 (5)
	21	326.64 ±11.86 (5)	325.34 ±14.43 (5)	275.70 ** ±31.93 (5)
	23	340.72 ±13.17 (5)	337.90 ±11.51 (5)	273.68 ** ±40.23 (5)
	25	357.10 ±12.95 (5)	352.72 ±13.39 (5)	271.12 ** ±45.53 (5)
	27	370.36 ±14.54 (5)	363.80 ±10.85 (5)	272.30 ** ±44.43 (5)
	28	375.50 ±14.52 (5)	369.96 ±11.52 (5)	272.82 ** ±45.23 (5)

Values are shown as Mean ± S.D.,

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

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

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

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

B10-0117

	Dose (mg/kg/day)	0	20	100
Administration period (day)	1	18.48 ± 1.56 (5)	18.99 ± 0.76 (5)	18.74 ± 1.33 (5)
	3	20.69 ± 1.60 (5)	21.52 ± 1.96 (5)	20.71 ± 1.96 (5)
	7	23.03 ± 1.42 (5)	23.50 ± 2.05 (5)	23.58 ± 1.34 (5)
	14	24.62 ± 1.52 (5)	24.73 ± 1.92 (5)	24.19 ± 1.68 (5)
	21	26.23 ± 1.83 (5)	26.95 ± 1.68 (5)	23.24 ± 2.65 (5)
	28	26.88 ± 1.44 (5)	26.77 ± 1.17 (5)	19.58 ** ± 3.66 (5)

Values are shown as Mean ± S.D..

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

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

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

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

Items	Dose (mg/kg/day)	Twenty-eight-day treatment		
		0	20	100
Urine volume	(mL)	26.8 ±13.2 (5)	10.6 * ±5.2 (5)	13.2 ±6.8 (5)
Uosm	(mOsm/L)	429.8 ±159.5 (5)	1051.8 ** ±361.2 (5)	661.4 ±101.2 (5)

Values are shown as Mean ± S.D..

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

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

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

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

B10-0117

Items	Group Dose (mg/kg/day)	Twenty-eight-day treatment		
		0	20	100
	No. of animals	5	5	5
Color				
	SY	5	2	3
	Y	0	3	2
Turbidity				
	Clear	4	4	5
	Cloudy	1	1	0
pH				
	6.0	0	0	5
	6.5	3	5	0
	7.0	2	0	0
Protein				
	-	2	0	0
	±	3	0	4
	1+	0	5	1
Glucose				
	-	5	5	5
Ketones				
	-	3	0	5
	±	2	3	0
	1+	0	2	0
Occult blood				
	-	2	5	4
	±	1	0	1
	2+	2	0	0

Color: SY: Slightly yellow, Y: Yellow.

Table 6-3

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

B10-0117

Items	Group	Twenty-eight-day treatment		
	Dose (mg/kg/day)	0	20	100
	No. of animals	5	5	5
Urinary sediment				
Red blood cells ^{a)}				
	0	5	5	5
White blood cells ^{a)}				
	0	5	5	2
	1-5	0	0	3
Epithelial cells ^{a)}				
	0	5	5	5
Casts ^{b)}				
	0	5	5	5
Crystals ^{c)}				
	-	2	0	5
	±	3	5	0

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

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	20	100
RBC	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	751.4 ± 32.7 (5)	749.2 ± 14.1 (5)	850.2 ± 98.3 (5)
Hb	(g/dL)	15.32 ± 0.43 (5)	15.50 ± 0.30 (5)	15.46 ± 1.97 (5)
Ht	(%)	47.78 ± 0.86 (5)	48.02 ± 1.01 (5)	47.12 ± 6.13 (5)
MCV	(fL)	63.66 ± 1.89 (5)	64.12 ± 1.40 (5)	55.54 * ± 4.98 (5)
MCH	(pg)	20.38 ± 0.37 (5)	20.72 ± 0.38 (5)	18.24 ± 1.83 (5)
MCHC	(g/dL)	32.08 ± 0.42 (5)	32.34 ± 0.22 (5)	32.82 * ± 0.51 (5)
Platelet	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	116.68 ± 13.62 (5)	119.72 ± 6.18 (5)	117.80 ± 14.15 (5)
Reticulo	(%)	3.56 ± 0.56 (5)	3.38 ± 0.19 (5)	5.14 * ± 0.90 (5)
WBC	($\times 10^2/\mu\text{L}$)	110.12 ± 38.11 (5)	128.54 ± 22.26 (5)	134.40 ± 66.36 (5)
Differentiation of leukocyte				
Neutro	(%)	18.54 ± 3.16 (5)	15.00 ± 3.88 (5)	38.60 ** ± 6.79 (5)
Lymph	(%)	76.58 ± 2.97 (5)	79.48 ± 3.82 (5)	52.44 ** ± 8.42 (5)
Eosino	(%)	0.50 ± 0.32 (5)	0.56 ± 0.21 (5)	0.26 ± 0.15 (5)
Baso	(%)	0.76 ± 0.11 (5)	0.90 ± 0.07 (5)	1.24 * ± 0.61 (5)
Mono	(%)	2.66 ± 0.46 (5)	2.86 ± 0.38 (5)	6.46 ** ± 2.56 (5)
LUC	(%)	1.00 ± 0.35 (5)	1.24 ± 0.34 (5)	0.96 ± 0.30 (5)
PT	(sec)	17.14 ± 2.38 (5)	18.08 ± 2.60 (5)	20.28 ± 5.43 (5)
APTT	(sec)	17.24 ± 2.33 (5)	20.44 ± 3.99 (5)	24.38 ± 7.43 (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	20	100
AST	(IU/L)	66.6 ±4.3 (5)	68.0 ±7.0 (5)	136.8 * ±39.0 (5)
ALT	(IU/L)	24.2 ±3.7 (5)	27.4 ±7.4 (5)	32.8 ±6.4 (5)
ALP	(IU/L)	628.8 ±107.4 (5)	581.6 ±69.0 (5)	604.0 ±95.9 (5)
ChE	(IU/L)	51.0 ±13.4 (5)	46.0 ±11.1 (5)	49.4 ±11.8 (5)
γ-GTP	(IU/L)	0.74 ±0.21 (5)	1.02 ±0.16 (5)	2.80 ** ±1.21 (5)
T-Chol	(mg/dL)	65.4 ±10.7 (5)	52.0 ±4.5 (5)	78.6 ±9.8 (5)
TG	(mg/dL)	74.8 ±29.8 (5)	72.4 ±17.3 (5)	79.6 ±35.3 (5)
BUN	(mg/dL)	12.96 ±1.58 (5)	13.06 ±1.59 (5)	38.00 * ±15.55 (5)
Creatinine	(mg/dL)	0.234 ±0.021 (5)	0.232 ±0.019 (5)	0.324 ±0.142 (5)
T-Protein	(g/dL)	6.28 ±0.08 (5)	6.14 ±0.05 (5)	6.78 ±1.18 (5)
Albumin	(g/dL)	2.94 ±0.09 (5)	2.94 ±0.05 (5)	3.42 ±0.52 (5)
A/G ratio	(-)	0.882 ±0.052 (5)	0.922 ±0.045 (5)	1.030 * ±0.102 (5)
Glucose	(mg/dL)	140.4 ±26.8 (5)	151.8 ±27.4 (5)	143.0 ±37.2 (5)
T-Bil	(mg/dL)	0.050 ±0.007 (5)	0.052 ±0.008 (5)	0.146 ** ±0.047 (5)
TBA	(μmol/L)	43.08 ±22.78 (5)	60.22 ±25.79 (5)	19.26 ±9.29 (5)
IP	(mg/dL)	12.62 ±1.69 (5)	12.60 ±0.45 (5)	12.14 ±1.78 (5)
Ca	(mg/dL)	12.42 ±0.22 (5)	12.30 ±0.23 (5)	11.88 ±0.90 (5)
Na	(mEq/L)	149.2 ±0.8 (5)	148.8 ±1.3 (5)	141.2 ±6.5 (5)
K	(mEq/L)	7.60 ±0.57 (5)	7.28 ±0.61 (5)	4.60 ** ±0.41 (5)
Cl	(mEq/L)	101.96 ±1.35 (5)	102.66 ±1.17 (5)	84.60 * ±6.68 (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	20	100
Liver	(g)	10.784 ±0.844 (5)	10.732 ±0.335 (5)	7.988 * ±1.727 (5)
Heart	(g)	1.302 ±0.099 (5)	1.242 ±0.090 (5)	0.982 ** ±0.114 (5)
Kidney(R)	(g)	1.378 ±0.128 (5)	1.418 ±0.079 (5)	1.560 * ±0.127 (5)
Kidney(L)	(g)	1.336 ±0.141 (5)	1.390 ±0.090 (5)	1.542 * ±0.124 (5)
Kidneys	(g)	2.714 ±0.269 (5)	2.808 ±0.167 (5)	3.102 * ±0.251 (5)
Testis(R)	(g)	1.514 ±0.127 (5)	1.454 ±0.103 (5)	1.236 ±0.292 (5)
Testis(L)	(g)	1.530 ±0.108 (5)	1.450 ±0.094 (5)	1.234 * ±0.267 (5)
Testes	(g)	3.044 ±0.232 (5)	2.904 ±0.197 (5)	2.470 ±0.556 (5)
Epididymis(R)	(g)	0.350 ±0.019 (5)	0.372 ±0.036 (5)	0.308 ±0.063 (5)
Epididymis(L)	(g)	0.338 ±0.011 (5)	0.380 ±0.033 (5)	0.292 ±0.052 (5)
Epididymides	(g)	0.688 ±0.026 (5)	0.752 ±0.068 (5)	0.600 ±0.114 (5)
Ventral prostate	(g)	0.412 ±0.077 (5)	0.374 ±0.032 (5)	0.252 ** ±0.051 (5)
Dorsolateral prostate	(g)	0.346 ±0.062 (5)	0.324 ±0.091 (5)	0.252 ±0.059 (5)
Seminal vesicle	(g)	0.946 ±0.152 (5)	0.972 ±0.105 (5)	0.770 ±0.180 (5)
Brain	(g)	2.022 ±0.059 (5)	1.968 ±0.072 (5)	1.930 ±0.075 (5)
Spleen	(g)	0.744 ±0.116 (5)	0.750 ±0.113 (5)	0.596 ±0.178 (5)
Thymus	(mg)	633.32 ±133.47 (5)	636.94 ±50.38 (5)	279.78 ** ±139.83 (5)
Pituitary gland	(mg)	11.76 ±0.67 (5)	11.12 ±0.55 (5)	8.38 ** ±0.97 (5)
Thyroid	(mg)	22.56 ±2.48 (5)	19.72 ±4.56 (5)	18.58 ±2.21 (5)
Adrenals	(mg)	52.80 ±6.36 (5)	55.18 ±9.67 (5)	55.06 ±5.53 (5)
Final body weight	(g)	349.18 ±16.23 (5)	343.68 ±10.56 (5)	241.24 ** ±46.44 (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	20	100
Liver	(g/100g)	3.086 ±0.149 (5)	3.124 ±0.093 (5)	3.304 * ±0.138 (5)
Heart	(g/100g)	0.374 ±0.018 (5)	0.362 ±0.023 (5)	0.412 ±0.047 (5)
Kidney(R)	(g/100g)	0.394 ±0.025 (5)	0.414 ±0.017 (5)	0.664 ** ±0.133 (5)
Kidney(L)	(g/100g)	0.380 ±0.028 (5)	0.404 ±0.017 (5)	0.656 ** ±0.136 (5)
Kidneys	(g/100g)	0.774 ±0.053 (5)	0.818 ±0.031 (5)	1.320 ** ±0.269 (5)
Testis(R)	(g/100g)	0.436 ±0.052 (5)	0.422 ±0.032 (5)	0.510 * ±0.051 (5)
Testis(L)	(g/100g)	0.440 ±0.052 (5)	0.424 ±0.030 (5)	0.512 ±0.061 (5)
Testes	(g/100g)	0.876 ±0.104 (5)	0.846 ±0.062 (5)	1.022 ±0.110 (5)
Epididymis(R)	(g/100g)	0.100 ±0.014 (5)	0.108 ±0.008 (5)	0.128 * ±0.019 (5)
Epididymis(L)	(g/100g)	0.098 ±0.008 (5)	0.110 ±0.007 (5)	0.124 * ±0.018 (5)
Epididymides	(g/100g)	0.198 ±0.022 (5)	0.218 ±0.015 (5)	0.252 * ±0.037 (5)
Ventral prostate	(g/100g)	0.116 ±0.023 (5)	0.110 ±0.012 (5)	0.106 ±0.025 (5)
Dorsolateral prostate	(g/100g)	0.098 ±0.018 (5)	0.094 ±0.027 (5)	0.108 ±0.028 (5)
Seminal vesicle	(g/100g)	0.272 ±0.041 (5)	0.280 ±0.029 (5)	0.328 ±0.094 (5)
Brain	(g/100g)	0.582 ±0.041 (5)	0.574 ±0.023 (5)	0.820 * ±0.131 (5)
Spleen	(g/100g)	0.214 ±0.026 (5)	0.218 ±0.027 (5)	0.244 ±0.034 (5)
Thymus	(mg/100g)	180.50 ±32.04 (5)	185.36 ±13.78 (5)	112.04 ** ±36.29 (5)
Pituitary gland	(mg/100g)	3.38 ±0.34 (5)	3.24 ±0.19 (5)	3.52 ±0.45 (5)
Thyroid	(mg/100g)	6.48 ±0.75 (5)	5.72 ±1.20 (5)	7.88 ±1.65 (5)
Adrenals	(mg/100g)	15.22 ±2.39 (5)	16.00 ±2.44 (5)	23.54 ** ±4.84 (5)
Final body weight	(g)	349.18 ±16.23 (5)	343.68 ±10.56 (5)	241.24 ** ±46.44 (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	20	100
	(mg/kg/day)		
	ss	ss	ss
	5 ^{a)}	5	5
No abnormalities detected	5	5	0
Dehydration	0	0	2
Forestomach			
Elevation of limiting ridge	0	0	5
Kidney			
Discoloration of cortico-medullary junction, bilateral	0	0	2
Enlargement, bilateral	0	0	5
Spleen			
Whitish region on capsule	0	0	1

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			(mg/kg/day)
		0	20	100	
		ss 5 ^{a)}	ss 5	ss 5	
Trachea					
No abnormalities detected		5/5 ^{b)}	---	5/5	
Lung					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Submandibular gland					
No abnormalities detected		5/5	5/5	2/5	
Hypertrophy/Acinar cell	+	0/5	0/5	2/5	
	++	0/5	0/5	1/5	
Forestomach					
No abnormalities detected		5/5	5/5	0/5	
Hyperplasia/Squamous epithelium/ Limiting ridge	+	0/5	0/5	5/5	
Glandular stomach					
No abnormalities detected		5/5	5/5	3/5	
Mitosis, increased/Neck of fundic gland	+	0/5	0/5	2/5	
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	5/5	
Colon					
No abnormalities detected		5/5	5/5	4/5	
Atrophy/Mucosa	+	0/5	0/5	1/5	
Rectum					
No abnormalities detected		5/5	5/5	5/5	
Pancreas					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Liver					
No abnormalities detected		5/5	4/5	2/5	
Atrophy/Hepatocyte/Centrilobular	+	0/5	0/5	3/5	
Microgranuloma	+	0/5	1/5	0/5	
Heart					
No abnormalities detected		5/5	4/5	4/5	
Myocarditis/Focal	+	0/5	1/5	1/5	

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	20	100
		(mg/kg/day)		
		ss	ss	ss
	5 ^{a)}	5	5	
Kidney				
No abnormalities detected		4/5 ^{b)}	2/5	0/5
Cyst/Outer medulla	+	1/5	0/5	0/5
Dilatation/Pelvis	+	0/5	0/5	1/5
Hyaline droplet/Proximal tubule/ Cortex	+	0/5	3/5	2/5
	++	0/5	0/5	3/5
	+	0/5	0/5	1/5
Mineralization/Outer medulla	++	0/5	0/5	1/5
	+++	0/5	0/5	2/5
Regeneration/Renal tubule/ Cortex and outer medulla	+	0/5	0/5	1/5
	++	0/5	0/5	4/5
Single cell necrosis/Proximal tubule/ Outer medulla	+	0/5	0/5	5/5
Urinary bladder				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Testis				
No abnormalities detected		5/5	5/5	1/5
Deep retention/Spermatid	+	0/5	0/5	2/5
	++	0/5	0/5	1/5
Degeneration and atrophy/Seminiferous tubule	++	0/5	0/5	1/5
Degeneration/Spermatocyte	+	0/5	0/5	1/5
Spermiation, inhibited	+	0/5	0/5	2/5
	++	0/5	0/5	1/5
Epididymis				
No abnormalities detected		5/5	5/5	3/5
Germ cell debris/Bilateral	+	0/5	0/5	1/5
Spermatozoa, decreased/Bilateral	+	0/5	0/5	1/5
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

ss: scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals autopsied.

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

---: Not examined.

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

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

Findings	Grade	Male			
		0	20	100	
		(mg/kg/day)			
		ss	ss	ss	
		5 ^{a)}	5	5	
Bone marrow					
No abnormalities detected		5/5 ^{b)}	---	5/5	
Axillar lymph node					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Mesenteric lymph node					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Spleen					
No abnormalities detected		5/5	5/5	0/5	
Capsulitis	++	0/5	0/5	1/5	
Congestion	+	0/5	0/5	4/5	
Deposit, hemosiderin	+	0/5	0/5	5/5	
Hematopoiesis, extramedullary, increased	+	0/5	0/5	2/5	
Thymus					
No abnormalities detected		5/5	5/5	4/5	
Atrophy	+	0/5	0/5	1/5	
Thyroid					
No abnormalities detected		5/5	5/5	4/5	
Hypertrophy/Follicular cell/Diffuse	+	0/5	0/5	1/5	
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	4/5	
Necrosis and myophagia	+	0/5	0/5	1/5	
Bone					
No abnormalities detected		5/5	5/5	3/5	
Atrophy/Growth plate, epiphyseal	+	0/5	0/5	2/5	
Osteois, increased	+	0/5	0/5	2/5	
Mammary gland					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	

ss: scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals autopsied.

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

---: Not examined.

+: slight, ++: moderate.

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					(day)
		1	2-7	8-14	15-21	22-28	
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	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
20 mg/kg/day

Signs	Sex	Administration period					(day)
		1	2-7	8-14	15-21	22-28	
No abnormalities detected	Male	6 ^{a)} , 7, 8, 9, 10	6, 7, 8, 9, 10	6, 7, 8, 9, 10	6, 7, 8, 9, 10	6, 7, 8, 9, 10	

a) Animal number.

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

Signs	Sex	Administration period					(day)
		1	2-7	8-14	15-21	22-28	
No abnormalities detected	Male	11 ^{a)} , 12, 13, 14, 15	11, 12, 13, 14, 15	11, 12, 13, 14, 15	11, 12, 13, 14, 15		
Decreased spontaneous locomotion	Male					11, 12, 13, 14, 15	
Reddish tear	Male					13	
Decreased respiratory rate	Male					12, 13	
Incomplete eyelid opening	Male					12, 13, 14	
Emaciation	Male					12, 13	

a) Animal number.

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

Male		Predosing															Dosing week 1																			
Dose (mg/kg/day)		0					20					100					0					20					100									
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					
Removal from cage	Ease of removal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1
	Vocalization	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+1	+1	0	0	0	0	+1	0	0	0	0	0	0	+1	+1	0	0	0	0					
Handling observation	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	0					
	Subnormal temperature	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
	Piloerection	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
	Staining hair	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
	Unkempt hair	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
	Paleness	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
	Reddening	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
	Cyanosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
	Lacrimation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
	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	0					
	Salivation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
	Secretion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
	Observation in arena	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	0				
		Motor activity	0	0	+1	0	+1	0	0	0	+1	0	+1	0	0	0	0	0	0	+1	0	0	0	+1	0	0	0	0	0	0	+1	+1				
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	0					
Lid closure		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
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	0					
Stereotypic behavior		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
Abnormal behavior		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
Defecation (count/min)		0	0	2	2	0	0	2	0	0	1	2	0	0	0	1	0	1	3	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0					
Urination (count/min)		0	3	8	5	1	5	0	2	0	0	4	3	0	0	6	0	3	10	2	2	2	0	1	0	1	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 week 2															Dosing week 3															
		0					20					100					0					20					100					
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	
Removal from cage	Ease of removal	+1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Vocalization	+1	0	+1	0	0	0	0	0	0	+1	0	+1	+1	0	0	+1	0	+1	0	0	0	0	0	0	0	0	+1	0	0	0	
Handling observation	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	0	
	Subnormal temperature	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Piloerection	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Staining hair	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Unkempt hair	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Paleness	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Reddening	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Cyanosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Lacrimation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	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	0	
	Salivation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Secretion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Observation in arena	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	0
		Motor activity	0	0	+1	0	0	0	0	+1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	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	0	
Lid closure		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
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	0	
Stereotypic behavior		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Abnormal behavior		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Defecation (count/min)	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0		
Urination (count/min)	0	0	1	8	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	6	4	0	1	0	0	4	0	0	8	0	0	1		

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

Male		Dosing week 4															
		0					20					100					
Dose (mg/kg/day)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Removal from cage	Ease of removal	0	-1	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	-1	
	Vocalization	0	0	+1	0	0	0	0	0	0	+1	0	0	+1	0	0	
Handling observation	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	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Reddening	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Cyanosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Lacrimation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Exophthalmos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Pupillary size	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Salivation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Secretion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Observation in arena	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	-1	0	0	0
Respiration		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Lid closure		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
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	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
Urination (count/min)		3	0	4	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	

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

Male

Dose (mg/kg/day)		Dosing week 4														
		0					20					100				
Animal No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Sensorimotor function	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	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Air righting reflex	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Grip strength	Forelimb (g)	353	394	176	384	327	210	232	284	325	447	444	149	322	254	297
	Hindlimb (g)	477	518	409	496	488	398	429	460	454	384	452	407	348	407	424
Motor activity [Interval]	0-10 (min)	118	175	85	98	198	215	118	298	220	219	273	48	167	84	293
	10-20 (min)	134	93	127	165	93	82	163	212	46	151	175	201	93	35	205
	20-30 (min)	43	66	84	90	94	39	57	70	91	84	81	123	35	88	97
	30-40 (min)	48	53	30	18	19	51	187	63	103	78	0	100	60	147	65
	40-50 (min)	41	52	74	3	41	121	0	83	25	50	11	14	7	0	5
	50-60 (min)	53	1	47	22	0	37	12	8	3	44	0	1	40	27	67
	Total (min)	437	440	447	396	445	545	537	734	488	626	540	487	402	381	732

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

Group		Main group				
Dose (mg/kg/day)		0				
Administration period (day)	Animal No.	1	2	3	4	5
1		137.5	140.9	140.7	149.5	149.7
3		160.8	160.9	156.9	168.4	171.0
7		198.7	199.2	191.6	208.3	209.5
14		267.8	264.5	252.0	269.4	277.6
21		331.6	332.4	305.6	329.7	333.9
23		346.9	346.3	317.2	345.7	347.5
25		361.3	361.5	334.3	361.6	366.8
27		376.7	376.6	344.4	378.2	375.9
28		380.8	383.1	349.6	380.9	383.1

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

Group		Main group				
Dose (mg/kg/day)		20				
Administration period (day)	Animal No.	6	7	8	9	10
1		136.4	144.3	146.6	150.6	148.8
3		152.1	160.3	168.5	171.7	172.8
7		181.2	197.7	207.2	213.2	207.0
14		242.4	266.6	269.1	285.3	274.9
21		301.6	323.6	328.6	338.5	334.4
23		319.1	334.9	345.7	347.0	342.8
25		332.6	346.1	359.1	366.1	359.7
27		345.8	361.5	370.0	372.2	369.5
28		352.0	366.8	377.0	382.0	372.0

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

Group		Main group				
Dose (mg/kg/day)		100				
Administration period (day)	Animal No.	11	12	13	14	15
1		140.6	141.0	146.1	144.8	156.8
3		157.4	157.4	162.8	159.8	174.4
7		198.5	189.5	195.3	192.6	208.6
14		253.1	237.4	248.7	251.5	266.4
21		297.1	245.7	236.2	301.0	298.5
23		293.4	234.5	226.0	310.7	303.8
25		286.4	228.3	217.8	319.1	304.0
27		277.2	232.2	222.6	324.5	305.0
28		278.6	230.0	224.4	328.2	302.9

Sex	Dose (mg/kg/day)	Animal No.	Administration period					
			1	3	7	14	21	28 (days)
Male	0	1	16.80	21.28	23.46	24.84	25.53	26.20
		2	17.29	19.43	21.94	24.07	27.27	27.12
		3	18.07	18.77	21.27	22.57	23.36	24.75
		4	20.02	21.21	23.67	24.84	27.09	28.25
		5	20.20	22.76	24.83	26.77	27.92	28.07
	20	6	18.14	19.46	20.43	21.90	25.11	26.22
		7	19.23	19.61	22.61	23.83	25.75	25.51
		8	18.23	21.70	24.29	25.03	26.87	26.76
		9	19.65	23.05	25.76	26.49	27.61	26.70
		10	19.71	23.78	24.41	26.40	29.40	28.65
	100	11	17.45	19.38	23.52	24.33	25.28	18.82
		12	19.43	21.01	23.43	23.11	21.76	18.51
		13	18.71	20.57	23.34	24.25	19.56	14.40
		14	17.50	18.78	21.93	22.41	23.51	23.54
		15	20.59	23.83	25.68	26.83	26.10	22.65

Appendix 6-1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Urinary 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
Urine volume	(mL)	15	19	44	38	18
Uosm	(mOsm/L)	555	541	225	289	539

ss: scheduled sacrifice animal.

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

Group		Twenty-eight-day treatment				
Dose (mg/kg/day)		20				
Items	Animal No.	6 ss	7 ss	8 ss	9 ss	10 ss
Urine volume	(mL)	14	8	7	18	6
Uosm	(mOsm/L)	680	1049	1209	751	1570

ss: scheduled sacrifice animal.

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

Group		Twenty-eight-day treatment				
Dose (mg/kg/day)		100				
Items	Animal No.	11 ss	12 ss	13 ss	14 ss	15 ss
Urine volume	(mL)	12	8	11	25	10
Uosm	(mOsm/L)	607	767	702	513	718

ss: scheduled sacrifice animal.

Appendix 6-4

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

Items	Group		Twenty-eight-day treatment									
	Dose (mg/kg/day)		0									
Animal No.	1	ss	2	ss	3	ss	4	ss	5	ss		
Color	SY		SY		SY		SY		SY			
Turbidity	Cloudy		Clear		Clear		Clear		Clear			
pH	6.5		7.0		6.5		6.5		7.0			
Protein	±		±		-		-		±			
Glucose	-		-		-		-		-			
Ketones	±		±		-		-		-			
Occult blood	2+		-		-		2+		±			
Urinary 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.

^{a)}: Number of cells/10 views (×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
Urinary data of individual animals: Male

Group		Twenty-eight-day treatment									
Dose (mg/kg/day)		20									
Items	Animal No.	6	ss	7	ss	8	ss	9	ss	10	ss
Color		SY		Y		Y		SY		Y	
Turbidity		Clear		Clear		Clear		Cloudy		Clear	
pH		6.5		6.5		6.5		6.5		6.5	
Protein		1+		1+		1+		1+		1+	
Glucose		-		-		-		-		-	
Ketones		1+		1+		±		±		±	
Occult blood		-		-		-		-		-	
Urinary 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 6-6

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

Items	Group		Twenty-eight-day treatment									
	Dose (mg/kg/day)		100									
Animal No.	11	ss	12	ss	13	ss	14	ss	15	ss		
Color	SY		Y		Y		SY		SY			
Turbidity	Clear		Clear		Clear		Clear		Clear			
pH	6.0		6.0		6.0		6.0		6.0			
Protein	±		±		1+		±		±			
Glucose	-		-		-		-		-			
Ketones	-		-		-		-		-			
Occult blood	±		-		-		-		-			
Urinary sediment												
Red blood cells ^{a)}	0		0		0		0		0			
White blood cells ^{a)}	0		1		1		2		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/10 views (×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	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	709	760	778	726	784
Hb	(g/dL)	14.7	15.4	15.8	15.1	15.6
Ht	(%)	46.4	47.6	48.5	47.9	48.5
MCV	(fL)	65.4	62.6	62.4	66.0	61.9
MCH	(pg)	20.7	20.2	20.3	20.8	19.9
MCHC	(g/dL)	31.7	32.3	32.6	31.6	32.2
Platelet	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	129.0	104.1	125.3	99.8	125.2
Reticulo	(%)	4.3	3.3	2.8	3.8	3.6
WBC	($\times 10^2/\mu\text{L}$)	73.2	87.2	89.5	161.7	139.0
Differentiation of leukocyte						
Neutro	(%)	18.1	16.5	17.9	24.0	16.2
Lymph	(%)	76.8	78.8	77.2	71.5	78.6
Eosino	(%)	0.2	0.4	1.0	0.3	0.6
Baso	(%)	0.6	0.8	0.8	0.7	0.9
Mono	(%)	3.4	2.6	2.4	2.7	2.2
LUC	(%)	1.0	0.9	0.7	0.8	1.6
PT	(sec)	20.7	15.9	14.7	16.1	18.3
APTT	(sec)	14.9	16.7	15.5	20.8	18.5

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)		20				
Items	Animal No.	6 ss	7 ss	8 ss	9 ss	10 ss
RBC	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	767	738	759	733	749
Hb	(g/dL)	15.4	15.4	15.8	15.1	15.8
Ht	(%)	47.7	48.1	48.7	48.5	49.1
MCV	(fL)	62.1	65.2	64.2	63.5	65.6
MCH	(pg)	20.1	20.9	20.8	20.7	21.1
MCHC	(g/dL)	32.4	32.0	32.4	32.8	32.3
Platelet	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	109.0	121.1	123.3	124.4	120.8
Reticulo	(%)	3.3	3.5	3.6	3.1	3.4
WBC	($\times 10^2/\mu\text{L}$)	129.6	109.7	110.9	127.7	164.8
Differentiation of leukocyte						
Neutro	(%)	13.9	12.6	21.7	14.7	12.1
Lymph	(%)	81.6	81.1	73.0	79.2	82.5
Eosino	(%)	0.6	0.9	0.4	0.5	0.4
Baso	(%)	0.9	0.9	0.8	1.0	0.9
Mono	(%)	2.3	3.3	2.8	3.1	2.8
LUC	(%)	0.7	1.2	1.4	1.6	1.3
PT	(sec)	19.8	21.4	14.7	17.6	16.9
APTT	(sec)	21.1	24.6	14.7	23.4	18.4

ss; scheduled sacrifice animal.

Appendix 7-3 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)		100				
Items	Animal No.	11 ss	12 ss	13 ss	14 ss	15 ss
RBC	($\times 10^6/\mu\text{L}$)	919	972	803	721	836
Hb	(g/dL)	18.2	15.2	13.8	13.5	16.6
Ht	(%)	55.6	47.3	42.2	40.4	50.1
MCV	(fL)	60.5	48.7	52.6	56.0	59.9
MCH	(pg)	19.8	15.6	17.2	18.7	19.9
MCHC	(g/dL)	32.7	32.1	32.7	33.4	33.2
Platelet	($\times 10^6/\mu\text{L}$)	135.1	130.4	110.1	111.0	102.4
Reticulo	(%)	5.4	3.9	4.9	6.4	5.1
WBC	($\times 10^6/\mu\text{L}$)	87.1	66.4	148.7	237.1	132.7
Differentiation of leukocyte						
Neutro	(%)	48.2	37.3	37.8	29.3	40.4
Lymph	(%)	41.3	50.8	51.8	64.9	53.4
Eosino	(%)	0.5	0.2	0.1	0.3	0.2
Baso	(%)	2.3	1.1	0.7	1.1	1.0
Mono	(%)	6.6	9.2	8.7	3.4	4.4
LUC	(%)	1.0	1.4	0.8	1.0	0.6
PT	(sec)	19.6	14.8	18.8	18.8	29.4
APTT	(sec)	26.8	17.1	18.6	23.7	35.7

ss: scheduled sacrifice animal.

Appendix 8-1 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)		0				
Items	Animal No.	1 ss	2 ss	3 ss	4 ss	5 ss
AST	(IU/L)	70	70	61	69	63
ALT	(IU/L)	23	24	26	29	19
ALP	(IU/L)	651	596	794	603	500
ChE	(IU/L)	35	45	70	47	58
γ-GTP	(IU/L)	0.4	0.7	0.8	0.9	0.9
T-Cho	(mg/dL)	59	76	59	55	78
TG	(mg/dL)	56	126	55	61	76
BUN	(mg/dL)	14.8	12.3	14.4	11.1	12.2
Creatinine	(mg/dL)	0.25	0.22	0.23	0.26	0.21
T-Protein	(g/dL)	6.3	6.2	6.4	6.3	6.2
Albumin	(g/dL)	2.8	2.9	3.0	3.0	3.0
A/G ratio	(-)	0.80	0.88	0.88	0.91	0.94
Glucose	(mg/dL)	109	176	146	119	152
T-Bil	(mg/dL)	0.06	0.05	0.05	0.05	0.04
TBA	(μmol/L)	54.7	18.9	61.1	62.9	17.8
IP	(mg/dL)	15.2	10.7	12.7	11.6	12.9
Ca	(mg/dL)	12.4	12.5	12.7	12.1	12.4
Na	(mEq/L)	148	150	149	150	149
K	(mEq/L)	8.5	6.9	7.6	7.5	7.5
Cl	(mEq/L)	103.4	101.8	101.8	102.9	99.9

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)		20				
Items	Animal No.	6 ss	7 ss	8 ss	9 ss	10 ss
AST	(IU/L)	64	68	59	72	77
ALT	(IU/L)	28	19	23	38	31
ALP	(IU/L)	603	668	590	477	570
ChE	(IU/L)	49	53	36	59	33
γ-GTP	(IU/L)	0.8	1.2	1.1	1.1	0.9
T-Cho	(mg/dL)	59	51	53	50	47
TG	(mg/dL)	45	75	87	87	68
BUN	(mg/dL)	14.9	12.0	11.4	12.4	14.6
Creatinine	(mg/dL)	0.24	0.26	0.21	0.22	0.23
T-Protein	(g/dL)	6.1	6.2	6.1	6.1	6.2
Albumin	(g/dL)	3.0	2.9	2.9	3.0	2.9
A/G ratio	(-)	0.97	0.88	0.91	0.97	0.88
Glucose	(mg/dL)	159	175	113	135	177
T-Bil	(mg/dL)	0.05	0.04	0.06	0.05	0.06
TBA	(μmol/L)	68.7	23.7	48.0	68.2	92.5
IP	(mg/dL)	12.7	11.9	12.8	13.1	12.5
Ca	(mg/dL)	12.4	11.9	12.5	12.3	12.4
Na	(mEq/L)	149	148	150	150	147
K	(mEq/L)	8.2	6.8	7.6	7.0	6.8
Cl	(mEq/L)	101.6	104.4	103.1	102.6	101.6

ss: scheduled sacrifice animal.

Appendix 8-3 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)		100				
Items	Animal No.	11 ss	12 ss	13 ss	14 ss	15 ss
AST	(IU/L)	117	144	202	113	108
ALT	(IU/L)	33	38	34	37	22
ALP	(IU/L)	629	631	436	677	647
ChE	(IU/L)	46	67	35	46	53
γ-GTP	(IU/L)	2.9	3.6	4.3	1.4	1.8
T-Cho	(mg/dL)	92	82	66	80	73
TG	(mg/dL)	66	60	142	72	58
BUN	(mg/dL)	64.3	39.0	28.0	25.8	32.9
Creatinine	(mg/dL)	0.56	0.35	0.21	0.27	0.23
T-Protein	(g/dL)	8.6	7.1	5.5	6.1	6.6
Albumin	(g/dL)	4.1	3.8	2.9	3.0	3.3
A/G ratio	(-)	0.91	1.15	1.12	0.97	1.00
Glucose	(mg/dL)	155	117	105	200	138
T-Bil	(mg/dL)	0.11	0.15	0.22	0.10	0.15
TBA	(μmol/L)	10.2	26.4	26.9	24.7	8.1
IP	(mg/dL)	15.1	11.0	10.8	12.5	11.3
Ca	(mg/dL)	12.9	11.9	10.5	12.4	11.7
Na	(mEq/L)	150	145	136	134	141
K	(mEq/L)	4.2	5.1	4.2	4.9	4.6
Cl	(mEq/L)	95.4	85.0	78.4	79.8	84.4

ss: scheduled sacrifice animal.

Appendix 9-1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Absolute organ weights 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
Liver	(g)	11.14	10.79	9.59	10.51	11.89
Heart	(g)	1.33	1.45	1.18	1.28	1.27
Kidney(R)	(g)	1.50	1.40	1.20	1.30	1.49
Kidney(L)	(g)	1.46	1.36	1.14	1.25	1.47
Kidneys	(g)	2.96	2.76	2.34	2.55	2.96
Testis(R)	(g)	1.61	1.51	1.67	1.40	1.38
Testis(L)	(g)	1.56	1.51	1.70	1.44	1.44
Testes	(g)	3.17	3.02	3.37	2.84	2.82
Epididymis(R)	(g)	0.33	0.34	0.37	0.37	0.34
Epididymis(L)	(g)	0.34	0.34	0.34	0.35	0.32
Epididymides	(g)	0.67	0.68	0.71	0.72	0.66
Ventral prostate	(g)	0.42	0.34	0.39	0.54	0.37
Dorsolateral prostate	(g)	0.33	0.40	0.35	0.40	0.25
Seminal vesicle	(g)	0.99	1.07	0.91	1.06	0.70
Brain	(g)	2.09	1.98	2.08	1.96	2.00
Spleen	(g)	0.74	0.71	0.57	0.85	0.85
Thymus	(mg)	583.3	697.1	464.7	600.6	820.9
Pituitary gland	(mg)	11.6	11.0	12.6	12.3	11.3
Thyroid	(mg)	24.9	18.8	21.4	24.3	23.4
Adrenals	(mg)	55.1	42.4	59.2	51.9	55.4
Final body weight	(g)	354.2	362.7	321.6	349.0	358.4

ss: scheduled sacrifice animal.

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

Group		Twenty-eight-day treatment				
Dose	(mg/kg/day)	20				
Items	Animal No.	6 ss	7 ss	8 ss	9 ss	10 ss
Liver	(g)	10.31	10.88	10.64	10.62	11.21
Heart	(g)	1.19	1.23	1.40	1.18	1.21
Kidney(R)	(g)	1.31	1.43	1.53	1.43	1.39
Kidney(L)	(g)	1.27	1.36	1.52	1.39	1.41
Kidneys	(g)	2.58	2.79	3.05	2.82	2.80
Testis(R)	(g)	1.42	1.58	1.54	1.33	1.40
Testis(L)	(g)	1.42	1.56	1.53	1.33	1.41
Testes	(g)	2.84	3.14	3.07	2.66	2.81
Epididymis(R)	(g)	0.32	0.38	0.42	0.36	0.38
Epididymis(L)	(g)	0.33	0.39	0.42	0.39	0.37
Epididymides	(g)	0.65	0.77	0.84	0.75	0.75
Ventral prostate	(g)	0.36	0.40	0.41	0.33	0.37
Dorsolateral prostate	(g)	0.31	0.30	0.48	0.24	0.29
Seminal vesicle	(g)	0.94	0.93	1.14	0.86	0.99
Brain	(g)	1.96	1.95	1.99	2.07	1.87
Spleen	(g)	0.65	0.68	0.69	0.81	0.92
Thymus	(mg)	572.1	711.6	619.1	637.6	644.3
Pituitary gland	(mg)	11.3	10.4	10.7	11.7	11.5
Thyroid	(mg)	14.1	17.4	25.2	23.5	18.4
Adrenals	(mg)	40.4	57.6	67.2	57.0	53.7
Final body weight	(g)	326.6	340.7	351.4	352.1	347.6

ss: scheduled sacrifice animal.

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

Group		Twenty-eight-day treatment				
Dose	(mg/kg/day)	100				
Items	Animal No.	11 ss	12 ss	13 ss	14 ss	15 ss
Liver	(g)	7.65	6.31	6.63	10.53	8.82
Heart	(g)	0.91	0.88	0.93	1.16	1.03
Kidney(R)	(g)	1.37	1.52	1.62	1.58	1.71
Kidney(L)	(g)	1.35	1.51	1.61	1.56	1.68
Kidneys	(g)	2.72	3.03	3.23	3.14	3.39
Testis(R)	(g)	1.38	1.05	0.83	1.56	1.36
Testis(L)	(g)	1.42	1.10	0.83	1.47	1.35
Testes	(g)	2.80	2.15	1.66	3.03	2.71
Epididymis(R)	(g)	0.25	0.28	0.26	0.36	0.39
Epididymis(L)	(g)	0.24	0.28	0.25	0.33	0.36
Epididymides	(g)	0.49	0.56	0.51	0.69	0.75
Ventral prostate	(g)	0.22	0.30	0.18	0.29	0.27
Dorsolateral prostate	(g)	0.19	0.29	0.19	0.27	0.32
Seminal vesicle	(g)	0.50	0.92	0.69	0.81	0.93
Brain	(g)	1.88	1.90	1.85	2.01	2.01
Spleen	(g)	0.59	0.37	0.51	0.85	0.66
Thymus	(mg)	274.3	140.3	223.9	513.3	247.1
Pituitary gland	(mg)	9.4	7.0	7.8	8.9	8.8
Thyroid	(mg)	19.1	14.9	20.7	18.5	19.7
Adrenals	(mg)	61.8	48.9	56.4	48.9	58.3
Final body weight	(g)	243.6	198.1	194.6	304.5	265.4

ss: scheduled sacrifice animal.

Appendix 10-1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Relative organ weights 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
Liver	(g/100g)	3.15	2.97	2.98	3.01	3.32
Heart	(g/100g)	0.38	0.40	0.37	0.37	0.35
Kidney(R)	(g/100g)	0.42	0.39	0.37	0.37	0.42
Kidney(L)	(g/100g)	0.41	0.37	0.35	0.36	0.41
Kidneys	(g/100g)	0.83	0.76	0.72	0.73	0.83
Testis(R)	(g/100g)	0.45	0.42	0.52	0.40	0.39
Testis(L)	(g/100g)	0.44	0.42	0.53	0.41	0.40
Testes	(g/100g)	0.89	0.84	1.05	0.81	0.79
Epididymis(R)	(g/100g)	0.09	0.09	0.12	0.11	0.09
Epididymis(L)	(g/100g)	0.10	0.09	0.11	0.10	0.09
Epididymides	(g/100g)	0.19	0.18	0.23	0.21	0.18
Ventral prostate	(g/100g)	0.12	0.09	0.12	0.15	0.10
Dorsolateral prostate	(g/100g)	0.09	0.11	0.11	0.11	0.07
Seminal vesicle	(g/100g)	0.28	0.30	0.28	0.30	0.20
Brain	(g/100g)	0.59	0.55	0.65	0.56	0.56
Spleen	(g/100g)	0.21	0.20	0.18	0.24	0.24
Thymus	(mg/100g)	164.7	192.2	144.5	172.1	229.0
Pituitary gland	(mg/100g)	3.3	3.0	3.9	3.5	3.2
Thyroid	(mg/100g)	7.0	5.2	6.7	7.0	6.5
Adrenals	(mg/100g)	15.6	11.7	18.4	14.9	15.5
Final body weight	(g)	354.2	362.7	321.6	349.0	358.4

ss: scheduled sacrifice animal.

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

Group		Twenty-eight-day treatment				
Dose	(mg/kg/day)	20				
Items	Animal No.	6 ss	7 ss	8 ss	9 ss	10 ss
Liver	(g/100g)	3.16	3.19	3.03	3.02	3.22
Heart	(g/100g)	0.36	0.36	0.40	0.34	0.35
Kidney(R)	(g/100g)	0.40	0.42	0.44	0.41	0.40
Kidney(L)	(g/100g)	0.39	0.40	0.43	0.39	0.41
Kidneys	(g/100g)	0.79	0.82	0.87	0.80	0.81
Testis(R)	(g/100g)	0.43	0.46	0.44	0.38	0.40
Testis(L)	(g/100g)	0.43	0.46	0.44	0.38	0.41
Testes	(g/100g)	0.86	0.92	0.88	0.76	0.81
Epididymis(R)	(g/100g)	0.10	0.11	0.12	0.10	0.11
Epididymis(L)	(g/100g)	0.10	0.11	0.12	0.11	0.11
Epididymides	(g/100g)	0.20	0.22	0.24	0.21	0.22
Ventral prostate	(g/100g)	0.11	0.12	0.12	0.09	0.11
Dorsolateral prostate	(g/100g)	0.09	0.09	0.14	0.07	0.08
Seminal vesicle	(g/100g)	0.29	0.27	0.32	0.24	0.28
Brain	(g/100g)	0.60	0.57	0.57	0.59	0.54
Spleen	(g/100g)	0.20	0.20	0.20	0.23	0.26
Thymus	(mg/100g)	175.2	208.9	176.2	181.1	185.4
Pituitary gland	(mg/100g)	3.5	3.1	3.0	3.3	3.3
Thyroid	(mg/100g)	4.3	5.1	7.2	6.7	5.3
Adrenals	(mg/100g)	12.4	16.9	19.1	16.2	15.4
Final body weight	(g)	326.6	340.7	351.4	352.1	347.6

ss: scheduled sacrifice animal.

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

Group		Twenty-eight-day treatment				
Dose	(mg/kg/day)	100				
Items	Animal No.	11 ss	12 ss	13 ss	14 ss	15 ss
Liver	(g/100g)	3.14	3.19	3.41	3.46	3.32
Heart	(g/100g)	0.37	0.44	0.48	0.38	0.39
Kidney(R)	(g/100g)	0.56	0.77	0.83	0.52	0.64
Kidney(L)	(g/100g)	0.55	0.76	0.83	0.51	0.63
Kidneys	(g/100g)	1.11	1.53	1.66	1.03	1.27
Testis(R)	(g/100g)	0.57	0.53	0.43	0.51	0.51
Testis(L)	(g/100g)	0.58	0.56	0.43	0.48	0.51
Testes	(g/100g)	1.15	1.09	0.86	0.99	1.02
Epididymis(R)	(g/100g)	0.10	0.14	0.13	0.12	0.15
Epididymis(L)	(g/100g)	0.10	0.14	0.13	0.11	0.14
Epididymides	(g/100g)	0.20	0.28	0.26	0.23	0.29
Ventral prostate	(g/100g)	0.09	0.15	0.09	0.10	0.10
Dorsolateral prostate	(g/100g)	0.08	0.15	0.10	0.09	0.12
Seminal vesicle	(g/100g)	0.21	0.46	0.35	0.27	0.35
Brain	(g/100g)	0.77	0.96	0.95	0.66	0.76
Spleen	(g/100g)	0.24	0.19	0.26	0.28	0.25
Thymus	(mg/100g)	112.6	70.8	115.1	168.6	93.1
Pituitary gland	(mg/100g)	3.9	3.5	4.0	2.9	3.3
Thyroid	(mg/100g)	7.8	7.5	10.6	6.1	7.4
Adrenals	(mg/100g)	25.4	25.2	29.0	16.1	22.0
Final body weight	(g)	243.6	198.1	194.6	304.5	265.4

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	No abnormalities detected	
		2	ss	No abnormalities detected	No abnormalities detected	
		3	ss	No abnormalities detected	No abnormalities detected	
		4	ss	No abnormalities detected	Kidney Cyst/Outer medulla +	
		5	ss	No abnormalities detected	No abnormalities detected	
		6	ss	No abnormalities detected	Kidney Hyaline droplet/Proximal tubule/ Cortex +	
	20		7	ss	No abnormalities detected	No abnormalities detected
			8	ss	No abnormalities detected	Kidney Hyaline droplet/Proximal tubule/ Cortex +
			9	ss	No abnormalities detected	Liver Microgranuloma + Kidney Hyaline droplet/Proximal tubule/ Cortex +
			10	ss	No abnormalities detected	Heart Myocarditis/Focal +

a) Organs/tissues examined as follows for the 0 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, axillar lymph node, mesenteric lymph node, spleen, thymus, thyroid, parathyroid, adrenals, eye ball, skeletal muscle, bone and mammary gland.

a) Organs/tissues examined as follows for the 20 mg/kg/day group: submandibular gland, forestomach, glandular stomach, cecum, colon, rectum, liver, heart, kidney, testis, epididymides, spleen, thymus, thyroid, skeletal muscle and bone.

ss: scheduled sacrifice animal.

+: slight.

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)}
Male	100	11	ss	Forestomach Elevation of limiting ridge Kidney Enlargement (bilateral) Spleen Whitish region on capsule (8×11 mm)	Submandibular gland Hypertrophy/Acinar cell ++ Forestomach Hyperplasia/Squamous epithelium/ Limiting ridge + Glandular stomach Mitosis, increased/Neck of fundic gland + Kidney Hyaline droplet/Proximal tubule/ Cortex ++ Mineralization/Outer medulla ++ Regeneration/Renal tubule/ Cortex and outer medulla ++ Single cell necrosis/Proximal tubule/ Outer medulla + Testis Deep retention/Spermatid + Spermiation, inhibited + Spleen Capsulitis ++ Congestion + Deposit, hemosiderin + Bone Atrophy/Growth plate, epiphyseal + Osteoid, increased +

a) Organs/tissues examined as follows for the 100 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, axillar lymph node, mesenteric lymph node, spleen, thymus, thyroid, parathyroid, adrenals, eye ball, skeletal muscle, bone and mammary gland.

ss: scheduled sacrifice animal.

+: slight, ++: moderate.

Appendix 11-3 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)}
		12	ss	Dehydration Forestomach Elevation of limiting ridge Kidney Discoloration of cortico- medullary junction (bilateral) Enlargement (bilateral)	Submandibular gland Hypertrophy/Acinar cell + Forestomach Hyperplasia/Squamous epithelium/ Limiting ridge + Liver Atrophy/Hepatocyte/Centrilobular + Kidney Dilatation/Pelvis + Hyaline droplet/Proximal tubule/ Cortex ++ Mineralization/Outer medulla +++ Regeneration/Renal tubule/ Cortex and outer medulla ++ Single cell necrosis/Proximal tubule/ Outer medulla + Testis Deep retention/Spermatid ++ Degeneration/Spermatocyte + Spermiation, inhibited ++ Epididymis Germ cell debris/Bilateral + Spleen Deposit, hemosiderin + Thymus Atrophy + Bone Atrophy/Growth plate, epiphyseal + Osteoid, increased +
Male	100				

a) Organs/tissues examined as follows for the 100 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, axillar lymph node, mesenteric lymph node, spleen, thymus, thyroid, parathyroid, adrenals, eye ball, skeletal muscle, bone and mammary gland.

ss: scheduled sacrifice animal.

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

Appendix 11-4 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	Dehydration Forestomach Elevation of limiting ridge Kidney Discoloration of cortico- medullary junction (bilateral) Enlargement (bilateral)	Forestomach Hyperplasia/Squamous epithelium/ Limiting ridge + Glandular stomach Mitosis, increased/Neck of fundic gland + Colon Atrophy/Mucosa + Liver Atrophy/Hepatocyte/Centrilobular + Kidney Hyaline droplet/Proximal tubule/ Cortex + Mineralization/Outer medulla +++ Regeneration/Renal tubule/ Cortex and outer medulla ++ Single cell necrosis/Proximal tubule/ Outer medulla + Testis Degeneration and atrophy/ Seminiferous tubule ++ Epididymis Spermatozoa, decreased/Bilateral + Spleen Congestion + Deposit, hemosiderin + Skeletal muscle Necrosis and myophagia +
Male	100				

a) Organs/tissues examined as follows for the 100 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, axillar lymph node, mesenteric lymph node, spleen, thymus, thyroid, parathyroid, adrenals, eye ball, skeletal muscle, bone and mammary gland.

ss: scheduled sacrifice animal.

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

Appendix 11-5 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)}
		14	ss	Forestomach Elevation of limiting ridge Kidney Enlargement (bilateral)	Forestomach Hyperplasia/Squamous epithelium/ Limiting ridge + Kidney Hyaline droplet/Proximal tubule/ Cortex + Mineralization/Outer medulla + Regeneration/Renal tubule/ Cortex and outer medulla ++ Single cell necrosis/Proximal tubule/ Outer medulla + Spleen Congestion + Deposit, hemosiderin + Hematopoiesis, extramedullary, increased +
Male	100	15	ss	Forestomach Elevation of limiting ridge Kidney Enlargement (bilateral)	Submandibular gland Hypertrophy/Acinar cell + Forestomach Hyperplasia/Squamous epithelium/ Limiting ridge + Liver Atrophy/Hepatocyte/Centrilobular + Heart Myocarditis/Focal + Kidney Hyaline droplet/Proximal tubule/ Cortex ++ Regeneration/Renal tubule/ Cortex and outer medulla + Single cell necrosis/Proximal tubule/ Outer medulla + Testis Deep retention/Spermatid + Spermiation, inhibited + Spleen Congestion + Deposit, hemosiderin + Hematopoiesis, extramedullary, increased + Thyroid Hypertrophy/Follicular cell/Diffuse +

a) Organs/tissues examined as follows for the 100 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, axillar lymph node, mesenteric lymph node, spleen, thymus, thyroid, parathyroid, adrenals, eye ball, skeletal muscle, bone and mammary gland.

ss: scheduled sacrifice animal.

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

添付資料

理化学試験結果

1. 試験方法

1.1 投与に用いる被験物質液の濃度確認

初回に調製した 1.00 及び 0.200 w/v% 被験物質液について、紫外可視分光光度法により被験物質液濃度を 1 回測定した。

a) 分析法

当試験施設において実施した「Potassium bromate の被験物質液の安定性及び濃度確認試験」（試験番号 X02-0273、非 GLP 試験）における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) 1.00 w/v% 被験物質液

被験物質液 0.5 mL を精製水で 25 mL に定容した。この液 0.5 mL を精製水で 5 mL に定容して分析試料（希釈倍率 500）とした。

(2) 0.200 w/v% 被験物質液

被験物質液 0.5 mL を精製水で 50 mL に定容して分析試料（希釈倍率 100）とした。

2) 標準溶液の調製

被験物質 0.10049 g を量りとり、精製水で 100 mL に定容して 1004.9 µg/mL 標準原液を調製した。標準原液を精製水で以下のとおり希釈して 10.0、20.1 及び 30.1 µg/mL 標準溶液を調製した。

標準原液 (µg/mL)	調製法		標準溶液濃度 (µg/mL)
	採取量 (mL)	定容量 (mL)	
1004.9	0.5	50	10.0
	0.5	25	20.1
	1.5	50	30.1

3) 分析条件

(1) 使用機器

紫外可視分光光度計: U-3300 (日立製作所)

(2) 測定条件

測定波長: 440 nm (測定範囲 340~540 nm)

(3) 測定法

標準溶液又は分析試料 0.5 mL を試験管に分取し、0.5 mol/L 塩酸 10 mL 及び 0.1 w/v% o-トリジン溶液 0.5 mL を加え攪拌した後、室温で 15~25 分間放置したものを測定試料とした。

b) データ処理

1) 検出値及び定量分析法

吸光度を検出値とした。

X02-0273 における分析法バリデーションの結果、良好な直線性が確認されたが、

原点を通過しなかったため、分析試料の定量分析は3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 桁目を四捨五入して有効数字 3 桁で表示した。

$$C = \frac{(A - b) \times D}{a \times 10000}$$

a: 検量線の回帰式 $Y = aX + b$ の傾き

b: 検量線の回帰式 $Y = aX + b$ の Y 軸切片

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 桁目を四捨五入して有効数字 3 桁で表示した

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

c) 判断基準

R.N.が 100±10%以内であること。

2. 試験成績

2.1 被験物質液の濃度確認

1.00 及び 0.200 w/v%被験物質液の R.N.はそれぞれ 102 及び 101%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 concentration (w/v%)	Actual concentration (w/v%)	R.N. (%)
May 26, 2014	1.00	1.02	102
	0.200	0.202	101

R.N.: Rate to the nominal concentration