

最 終 報 告 書

遺伝子発現量解析のための

Tris(2-Chloroethyl) Phosphate のラットにおける 28 日間反復経口投与毒性試験

2013 年 2 月

一般財団法人化学物質評価研究機構

日田事業所

本文書は正本を正確に転写したものです。

一般財団法人 化学物質評価研究機構 日田事業所

2013 年 2 月 20 日

試験責任者

寶珠山 五月

目 次

	頁
1. 表 題	4
2. 試験委託者	4
3. 試験施設	4
4. 試験目的	4
5. 試験法	4
6. GLP 基準	4
7. 動物愛護	4
8. 試験日程	5
9. 試験責任者	5
10. 試験関係者及び業務分担	5
11. 試資料の保管	5
12. 最終報告書の承認	5
13. 要 約	6
14. 試験材料	7
14.1 被験物質	7
14.2 媒 体	8
14.3 使用動物	8
14.4 飼育環境	9
15. 試験方法	9
15.1 被験物質の設定用量	9
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	19
17.1 一般状態	19
17.2 詳細な一般状態	19
17.3 機能検査	19

17.4 体 重	19
17.5 摂餌量	19
17.6 尿検査	19
17.7 血液検査	19
17.8 病理学的検査	20
18. 考 察	20
19. 参考文献	21

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	39
9 Summary of absolute organ weights	43
10 Summary of relative organ weights.....	47
11 Summary of macroscopic examinations.....	51
12 Summary of histopathological examinations	55

Appendices

1 General clinical observations of individual animals	61
2 Detailed clinical observations of individual animals.....	64
3 Functional observations individual animals	67
4 Body weights of individual animals.....	68
5 Food consumption of individual animals	80
6 Uralytic data of individual animals	81
7 Hematological data of individual animals	87
8 Blood chemical data of individual animals	99
9 Absolute organ weights of individual animals	111
10 Relative organ weights of individual animals	123
11 Pathological findings of individual animals	135

1. 表 題

遺伝子発現量解析のための Tris(2-Chloroethyl) Phosphate 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

Tris(2-Chloroethyl) Phosphate 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、Tris(2-Chloroethyl) Phosphate 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、環企発第 110331009 号) に定める「哺乳類を用いる 28 日間の反復投与毒性試験」
- 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

LABORATORY ANIMAL SCIENCE (1987) by the American Association for Laboratory Animal Science を参考に当試験施設が作成した「日田事業所動物実験に関する指針」の主旨に沿って試験を行った。

8. 試験日程

試験開始日	2012 年 7 月 19 日
動物入荷日	2012 年 7 月 24 日
投与開始日	2012 年 8 月 1 日
1回投与後解剖日	2012 年 8 月 2 日
7日間投与後解剖日	2012 年 8 月 8 日
14日間投与後解剖日	2012 年 8 月 15 日
28日間投与後解剖日	2012 年 8 月 29 日
試験終了日	2013 年 2 月 20 日

9. 試験責任者

寶珠山 五 月 (所属 試験第二課)

10. 試験関係者及び業務分担

試験担当者 古 賀 孝 之

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

病理検査責任者 大 嶋 浩

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

臨床検査責任者 室 井 貴 子

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

11. 試資料の保管

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

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

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

12. 最終報告書の承認

2013 年 2 月 20 日

試験責任者

寶珠山 五 月

13. 要 約

Tris(2-Chloroethyl) Phosphate の生物学的な影響及び遺伝子発現に及ぼす影響について検討する目的で、化審法テストガイドライン及び OECD テストガイドライン 407 を参考に 28 日間反復経口投与毒性試験を実施した。

5 週齢の雄の Crl:CD(SD)ラットにコーン油に溶解させた Tris(2-Chloroethyl) Phosphate を 1 回、7、14 又は 28 日間毎日強制経口投与した。投与用量は 0 (コーン油)、80 及び 400 mg/kg/day とし、1 回、7 及び 14 日間投与後に解剖するサテライト群には 1 群あたり 4 匹、28 日間投与群には 1 群あたり 5 匹を使用した。投与期間中は全例について一般状態観察、体重測定及び摂餌量測定を行い、各投与期間終了後に CO₂/O₂ 混合ガス麻酔下で血液を採取した後解剖して、血液検査、病理学的検査及び遺伝子発現量解析のための試料採取を実施した。加えて、28 日間投与群については、投与期間中に詳細な一般状態観察及び機能検査を行い、最終投与日の翌日に尿を採取して尿検査を行った。

一般状態観察では、400 mg/kg 群で投与直後の短時間の流涎、自発運動低下及び呼吸数減少がみられた。

血液生化学的検査では 400 mg/kg 群で 1 回及び 14 日間投与後に ALT の高値がみられた。

器官重量では 400 mg/kg 群で 14 日間投与後に肝臓の相対重量の高値がみられた。

詳細な一般状態観察、機能検査、体重、摂餌量、尿検査、血液学的検査、剖検及び病理組織学的検査では、被験物質投与による影響はみられなかった。

以上のとおり、本試験条件下において Tris(2-Chloroethyl) Phosphate の投与により、肝臓及び神経系への影響がみられた。

14. 試験材料

14.1 被験物質

a) 名称等

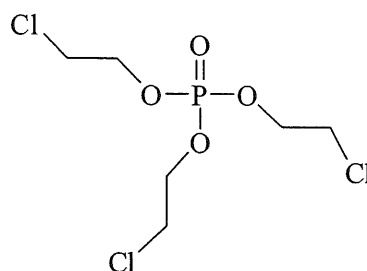
名 称	Tris(2-Chloroethyl) Phosphate
CAS 番号	115-96-8

b) 製造元及びロット番号

製造元	Sigma-Aldrich
ロット番号	07014MSV

c) 構造式等

構造式



分子式	$C_6H_{12}Cl_3O_4P$
分子量	285.4898

d) 純度等

純 度	97.7% (GC)
-----	------------

被験物質は純度 100%として取り扱った。

e) 物理化学的性状

蒸気圧	0.5～20.0 mmHg
対水溶解度（溶解性）	溶解しない
融 点	-20℃
沸 点	210～220℃ (20 mmHg)
常温における性状	無色液体
安定性	低温で安定
比 重	1.428

f) 保管条件

遮光した気密容器に入れ、被験物質保管室の保冷庫にて冷所保管した。

保管温度の実測値 2.0～6.9℃（許容範囲 1～10℃）

保管場所及び期間 保冷庫 005、2012 年 5 月 2 日～2012 年 5 月 15 日

保冷庫 007、2012 年 5 月 15 日～2012 年 8 月 20 日

g) 被験物質の同一性及び保管条件下における安定性の確認

当試験施設で実施した「Tris(2-Chloroethyl) Phosphate の安定性、被験物質液の安定性及び濃度確認試験」（試験番号 X02-0258、非 GLP 試験）において確認した。

被験物質の同一性については、独立行政法人産業技術総合研究所の有機化合物のスペクトルデータベース（Spectral Database for Organic Compounds: SDBS）から入手したス

ペクトルと当試験施設において測定したデータを比較することにより確認した。投与開始前に測定した赤外吸収スペクトルは SDBS から入手したスペクトルと同様であった。

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

h) 取扱い上の注意

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

14.2 媒 体

a) 名 称

コーン油

b) 選択理由

被験物質は水に溶解しないとの情報があることから、被験物質液の調製法はコーン油を用いて検討した。その結果、被験物質はコーン油に 10 w/v% の濃度で溶解した。また、被験物質液は調製後 7 日間で色調の変化等の異常がみられなかったことから、コーン油を媒体として選択した。

c) 製造元、グレード及びロット番号

製造元	ナカライテスク
グレード	化学用
ロット番号	V2H8729

d) 保 管

保管場所	試薬保管室
保管温度	室温

14.3 使用動物

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

4 週齢の雄ラットを 55 匹入手し、1 ケージあたり 5 匹の群飼育で入荷 6 日後まで検疫・馴化を行った。さらに、投与開始 1 日前に相当する入荷 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、51 匹を試験に使用した。群分け後は投与開始まで個別飼育で馴化した。群分けにより外れた動物は試験から除外した。また、受入れから投与開始までは、一般状態及び排泄物を毎日 1 回以上観察した。

動物は、群分け前は尾部へ油性インクを塗布し、群分け後は耳鉾を付けて識別した。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 124.9～151.2 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℃、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 2）に収容した。温度及び相対湿度の実測値は、それぞれ 22.5～23.9℃ 及び 44.7～68.6%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、サテライト群（1、7 及び 14 日間投与群）については解剖室に搬出する際にもラックを交換した。

飼料は固型飼料 MF（ロット番号 120411 及び 120611、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℃、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「Tris(2-Chloroethyl) Phosphate 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 P12-0099、非 GLP 試験）を実施した。用量設定試験ではコーン油で調製した被験物質液を、各群 3 匹の 5 週齢の Crl:CD(SD)雄ラットに 0、20、100、250 及び 500 mg/kg/day の用量で 7 日間毎日投与した。投与期間中は一般状態観察及び体重測定を行い、最終投与 1 日後に剖検及び器官重量測定を行った。その結果、500 mg/kg/day で肝臓相対重量の高値がみられたが、その他の検査では被験物質投与による影響が認められなかった。これらのことから、追加投与群として 7 週齢の Crl:CD(SD)雄ラットに 1000 mg/kg/day の用量で 7 日間反復投与を行った。1000 mg/kg/day では、常同行動とされる洗顔行動の増加や身震い、不穏、ひきずり歩行等の神経症状が認められ、投与期間中に 1 例が死亡し、さらに投与期間終了後の解剖日に 1 例の死亡が発見された。

500 mg/kg 群でみられた肝臓の相対重量高値は軽度であったものの、1000 mg/kg 群で急激な一般状態の悪化及び死亡がみられたことから、500 mg/kg/day を 28 日間反復投与すると瀕死や死亡等の重篤な毒性影響が発現する可能性があると考えた。

したがって、本試験では 400 mg/kg/day を高用量とし、低用量として 80 mg/kg/day を設定した。

15.2 群構成

被験物質投与群として2用量群を設ける他、媒体のみを投与する媒体対照群を設定した。また、媒体対照群及び各用量群に、1回、7及び14日間投与後に解剖するサテライト群を設けた。以下、媒体対照群は対照群と記載する。

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

試験群		投与用量 (mg/kg/day)	投与容量 (mL/kg)	被験物質液 濃度(w/v%)	動物数 (動物番号)
媒体対照 (1回投与)		0	5	0	4 (1 - 4)
媒体対照 (7日間投与)		0	5	0	4 (5 - 8)
媒体対照 (14日間投与)		0	5	0	4 (9 - 12)
媒体対照 (28日間投与)		0	5	0	5 (13 - 17)
被 験 物 質	低用量 (1回投与)	80	5	1.60	4 (18 - 21)
	低用量 (7日間投与)	80	5	1.60	4 (22 - 25)
	低用量 (14日間投与)	80	5	1.60	4 (26 - 29)
	低用量 (28日間投与)	80	5	1.60	5 (30 - 34)
	高用量 (1回投与)	400	5	8.00	4 (35 - 38)
	高用量 (7日間投与)	400	5	8.00	4 (39 - 42)
	高用量 (14日間投与)	400	5	8.00	4 (43 - 46)
	高用量 (28日間投与)	400	5	8.00	5 (47 - 51)

15.3 投与液

a) 被験物質液の調製及び保管

被験物質を秤量し、コーン油を加えて溶解させた。その後、コーン油を加えて定容し8.00 w/v%の被験物質液を調製した。さらに、8.00 w/v%の被験物質液の一部を採取し、コーン油を加えて希釈し、1.60 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（実測値 2～10℃、許容範囲 1～10℃）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

10.0 及び 0.500 w/v%の被験物質液の冷所保管での安定性を、当試験施設において X02-0258 でガスクロマトグラフィー (GC) により確認した。

冷所保管で調製 14 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 10.0 及び 0.500 w/v%の被験物質液でそれぞれ 100%及び 102%と 100±10%以内であったことから、保管条件下で 13 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 8.00 及び 1.60 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 X02-0258 で GC により確認した。

測定した被験物質濃度が設定値に対し 8.00 及び 1.60 w/v% の被験物質液でそれぞれ 99.4% 及び 98.8% と $100 \pm 10\%$ 以内であったため、適切に調製できたと判定して投与に用いた。

15.4 投 与

1 回、7、14 又は 28 日間毎日 1 回、強制経口投与した。投与は 9:06～11:38 に行った。

投与にはネラトンカテーテル（テルモ）を取り付けた注射筒（テルモ）を用い、測定した最新の体重を基に、5 mL/kg で投与した。

15.5 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 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 及び 28 日目
- ・ 各試験群の解剖日（飼育室からの搬出前、絶食状態）

15.9 摂餌量測定

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

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

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

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

15.10 尿検査

a) 採 尿

28 日間投与群について、投与 28 日目の午後に 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認められなかったため、低用量群については検査を行わなかった。

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)	Sternheimer 変法	B
尿沈渣 (Urinary sediment)		

使用機器 A: 自動浸透圧計 OM-6040 (アークレイ)

B: システム生物顕微鏡 BX41 (オリンパス)

15.11 血液検査

a) 採血及び検査試料

各試験群について最終投与日の午後から絶食し、翌日 (絶食開始 16~20 時間後)、CO₂/O₂ 混合ガス麻酔 (CO₂:O₂ 混合比=4:1) 下で腹部大動脈から次表のとおり採血し、検査試料を作製した。なお、サテライト群については血漿の試料作製は行わなかった。また、28 日間投与群については、パクスジーン RNA 採血管 (日本ベクトン・ディッキンソン) を用いて血液を採取し転倒混和し、室温で 2 時間以上静置後、-20℃ で 24 時間保管した。その後、-80℃ 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 G9059、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 WEQ6248、和光純薬工業) の 3.2 w/v% 水溶液を 100 μ L 添加したガラス製試験管で採血し、遠心分離 (3000 r.p.m.×10 mins) して得た血漿
血 清	ガラス製試験管で採血し遠心分離 (3000 r.p.m.×10 mins) して得た血清

b) 血液学的検査

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

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

検査試料 C には全血、D には血漿を使用

使用機器 C: 総合血液学検査装置 ADVIA 120 (シーメンス)

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

c) 血液生化学的検査

血清を用いて次表の項目を測定した。サテライト群についてはアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アルカリ性フォスファターゼ、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った。

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ぺプチダーゼ (γ -GTP)	<i>L</i> - γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide 法	
総コレステロール (T-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)	$\frac{\text{Albumin}}{\text{T-Protein} - \text{Albumin}}$	—
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	
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 検

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。

b) 組織採取及び器官重量測定

(a) サテライト群

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

分 類	器官・組織
消化器系	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	骨髄（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*

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

(b) 28 日間投与群

剖検時に次表の器官・組織を採取した。

分 類	器官・組織
呼吸器系	気管、肺
消化器系	顎下腺、胃、腸（十二指腸から直腸、パイエル板を含む）、 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、髄質内帯、髄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、組織片の半分の *RNAlater* に浸漬した。残りの半分は氷冷後、-80°C で保存した。左側は変法デビットソン液で固定した。

精巣上体は、重量を測定後、左右とも変法デビットソン液で固定した。

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

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

大腿骨は、左側を膝関節から大腿骨頭付近まで採取した。両端を切除し、RPMI1640 (Life Technologies) 5 mL で骨髓を洗い出し、70 µm のメッシュを通してコンカルチュールに回収した。4°C で遠心（1100 rpm、5 分間）後、上清を除いた。残渣を 2 mL の RNA/DNA Stabilization Reagent for Blood/Bone Marrow (Roche Diagnostics) に再浮遊させ、

解剖終了直後に -80°C で凍結保存した。右側は膝関節を含むように採取し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

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

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

下垂体は、重量を測定後、RNAlater に浸漬した。

RNAlater に浸漬した各組織は RNAlater を組織に浸潤させるため、脾臓は 4°C で 72 時間、その他の組織は 4°C で 24 時間放置した後、RNAlater に浸漬させたまま -80°C で凍結し、ドライアイスと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

(a) サテライト群

1 回、7 及び 14 日間投与群の対照群及び高用量群について、肝臓、腎臓、精巣、前立腺、骨髄（大腿骨）、脾臓、胸腺のパラフィン包埋薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色後、光学顕微鏡的に検査した。骨髄（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。

(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。骨及び骨髄（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、肉眼的病変部として対照群の 1 例（No. 14）の右頸部皮膚、低用量群の 1 例（No. 30）の腎臓並びに他の 1 例（No. 34）の腺胃について検査を行った。

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)

400 mg/kg 群で投与直後の短時間の流涎が 9 例、自発運動低下が 6 例、呼吸数減少が 2 例でみられた。流涎は投与 8 日目以降、自発運動低下は投与 9 日目以降に継続的又は散発的に観察され、呼吸数減少は投与 15 日目以降に単発的にみられた。このほか、対照群の 1 例で投与 22 日目以降に頸部及び右上腕部の脱毛、頸部の痂皮形成、頸部及び右上腕部の滲出液がみられた。80 mg/kg 群では異常は認められなかった。

17.2 詳細な一般状態 (Table 2、Appendix 2)

被験物質投与群で排糞回数及び排尿回数に有意な変動は認められず、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)

被験物質投与群で握力及び自発運動量に有意な変動は認められず、反応性検査においても被験物質投与群及び対照群に異常は認められなかった。

17.4 体重 (Fig. 1、Table 4、Appendix 4)

被験物質投与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)

被験物質投与群に有意な変動は認められなかった。

17.6 尿検査 (Table 6、Appendix 6)

被験物質投与群で尿量及び尿浸透圧に有意な変動は認められず、他の検査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。

17.7 血液検査

a) 血液学的検査 (Table 7、Appendix 7)

1 回投与群では被験物質投与群に有意な変動は認められなかった。

7 日間投与群において 400 mg/kg 群で血小板数の有意な高値がみられた。このほか、80 及び 400 mg/kg 群で好塩基球比率の有意な低値がみられたが、用量との関連性が乏しいことから偶発的変動と考えた。

14 日間投与群では被験物質投与群に有意な変動は認められなかった。

28 日間投与群において 400 mg/kg 群で網状赤血球数比率の有意な低値がみられた。80 mg/kg 群では有意な変動は認められなかった。

b) 血液生化学的検査 (Table 8、Appendix 8)

1 回投与群において 400 mg/kg 群で ALT の有意な高値がみられた。80 mg/kg 群では有意な変動は認められなかった。

7 日間投与群では被験物質投与群に有意な変動は認められなかった。

14 日間投与群において 400 mg/kg 群で ALT の有意な高値がみられた。80 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 400 mg/kg 群で総ビリルビンの有意な低値がみられた。80 mg/kg 群ではカルシウムの有意な高値がみられたが、用量との関連性が認められないことから偶発的変動と考えた。

17.8 病理学的検査

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

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

14 日間投与群において、400 mg/kg 群で肝臓の相対重量の有意な高値（対照群の 116.2%）及び腎臓の相対重量の有意な高値（対照群の 110.4%）が認められたほか、精巢上体の絶対重量の有意な低値がみられた。80 mg/kg 群では有意な変動は認められなかった。

28 日間投与群では被験物質投与群に有意な変動は認められなかった。

b) 剖 検 (Table 11、Appendix 11)

1 回投与群において対照群で右側腎臓の腎盂拡張が 4 例中 1 例にみられた。被験物質投与群に異常は認められなかった。

7 日間及び 14 日間投与群で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。

28 日間投与群において、80 mg/kg 群で腺胃の粘膜黒色部が 5 例中 1 例、右側腎臓の腎盂拡張が 1 例でみられた。対照群では右側腋窩リンパ節の腫大及び右頸部皮膚のびらんが 1 例でみられた。400 mg/kg 群では異常は認められなかった。

c) 病理組織学的検査 (Table 12、Appendix 11)

1 回投与群において、対照群で肉眼的に右側腎臓の腎盂拡張がみられた 1 例で組織学的にも腎盂拡張が確認された。

7 日間及び 14 日間投与群では 400 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、400 mg/kg 群で肺の出血が 5 例中 1 例にみられた。80 mg/kg 群では、肉眼的に腺胃の粘膜黒色部がみられた 1 例で限局性胃底腺部粘膜壊死が認められ、右側腎臓の腎盂拡張がみられた 1 例で組織学的にも腎盂拡張が確認された。対照群では、肉眼的に右側腋窩リンパ節の腫大及び右頸部皮膚のびらんがみられた 1 例で腋窩リンパ節の片側性の形質細胞増多症及び皮膚の潰瘍が確認された。

18. 考 察

被験物質は有機リン化合物であり、ラットの 16 週間強制経口投与試験において、雌でコリンエステラーゼ活性阻害による神経症状（運動失調、過度の流涎、喘ぎ呼吸、痙攣）並びに海馬及び視床での神経壊死、雌雄で肝臓及び腎臓重量の増加が報告されている（NTP, 1991）。発がん性については、実験動物を用いた 2 年間の強制経口投与による発がん性試験において、ラットの雌雄で腎臓の尿細管腺腫の発生率が有意に増加したと報告されている（NTP, 1991）が、ヒトでは発がん性に関する疫学的情報がなく、実験動物においても限られた証拠しか得られていないとして国際がん研究機関（International Agency for Research on Cancer, IARC）の発がん性評価ではグループ 3（ヒトに対する発がん性については分類できない）に分類されている（IARC, 1999）。本試験においては、被験物質投与により肝臓への影響が認められ、神経系への影響も示唆された。

肝臓に対する影響として、400 mg/kg 群において、1 回及び 14 日間投与後に肝細胞の障害を示す ALT の高値並びに 14 日間投与後に肝臓の相対重量の高値がみられた。しかしながら、いずれの投与期間終了時の剖検及び病理組織学的検査においても異常が認められなかった。

ことから、ALT の高値及び肝臓の相対重量の高値は毒性学的に意義の低い変化と考えた。

投与期間中に 400 mg/kg 群でみられた自発運動低下及び呼吸数減少は、用量設定試験においても観察されており、神経系への影響である可能性が考えられたが、脳の病理組織学的検査を実施していないため器質的变化の有無は確認できなかった。また、コリンエステラーゼ活性の阻害が認められなかったことから、肝臓への影響を反映したものである可能性も考えられた。なお、流涎は短時間で消失したことから被験物質の味により発現した (Matsuo, 2000) ものであり、毒性学的意義は低いと考えた。

投与期間中又は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ないこと、又は自然発生病変として散見される所見であること等から、被験物質投与とは関連のない変化と考えた。

以上のとおり、本試験では被験物質投与により肝臓及び神経系への影響がみられたが、その他の消化器系、呼吸器系、心・血管系、泌尿器系、生殖器系、造血器系、感覚器、筋・骨格系、乳腺への影響は検出されなかった。

19. 参考文献

- IARC (1999) IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. 71, 1543-1548.
- Matsuo R (2000) Role of saliva in the maintenance of taste sensitivity. Crit. Rev. Oral Biol. Med., 11, 216-229.
- NTP (1991) Toxicology and carcinogenesis studies of tris(2-chloroethyl) phosphate (CAS No. 115-96-8) in F344/N rats and B₆C₃F₁ mice (gavage studies). NTP TR 391.

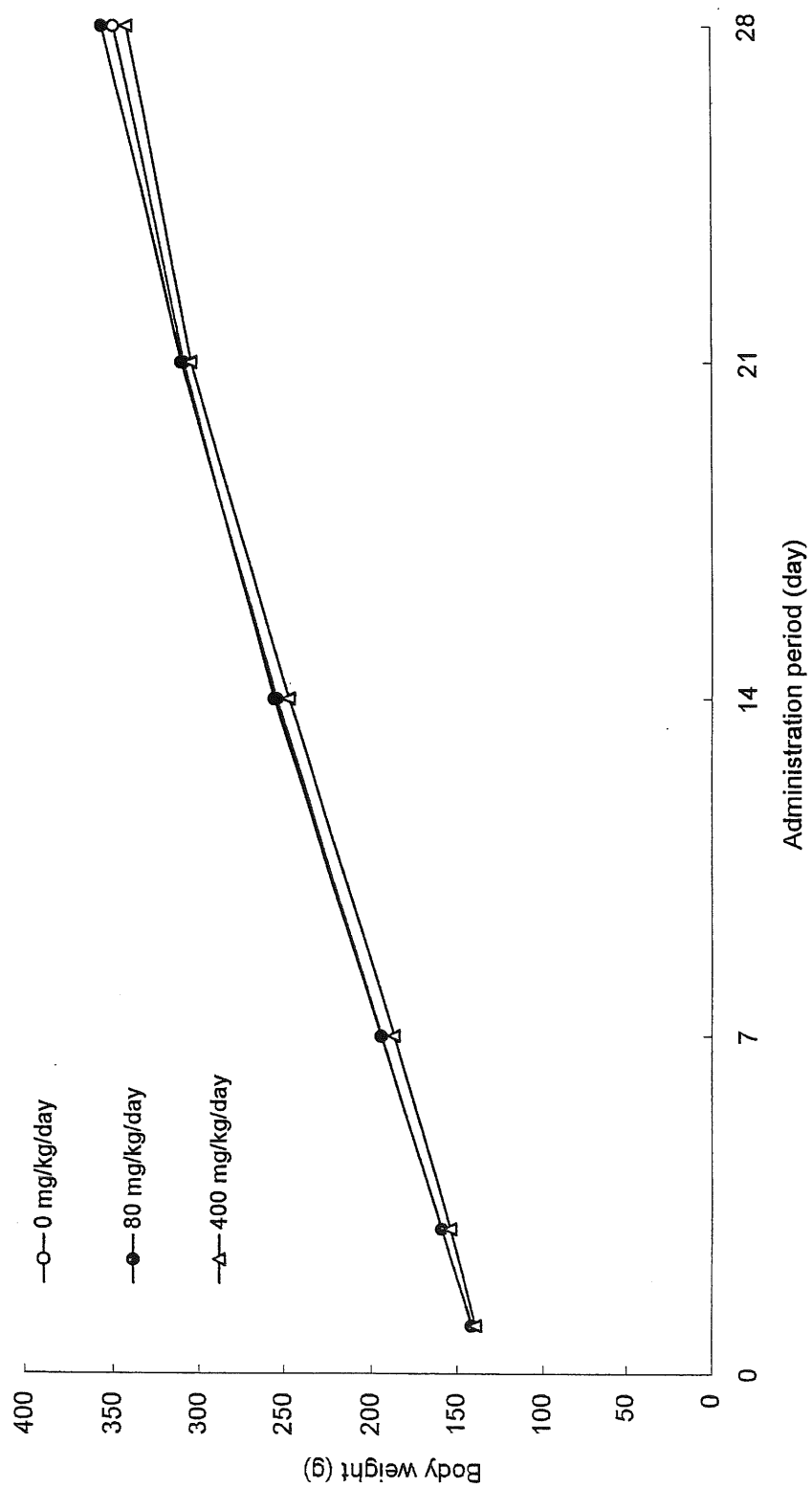


Fig. 1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Body weights: Male

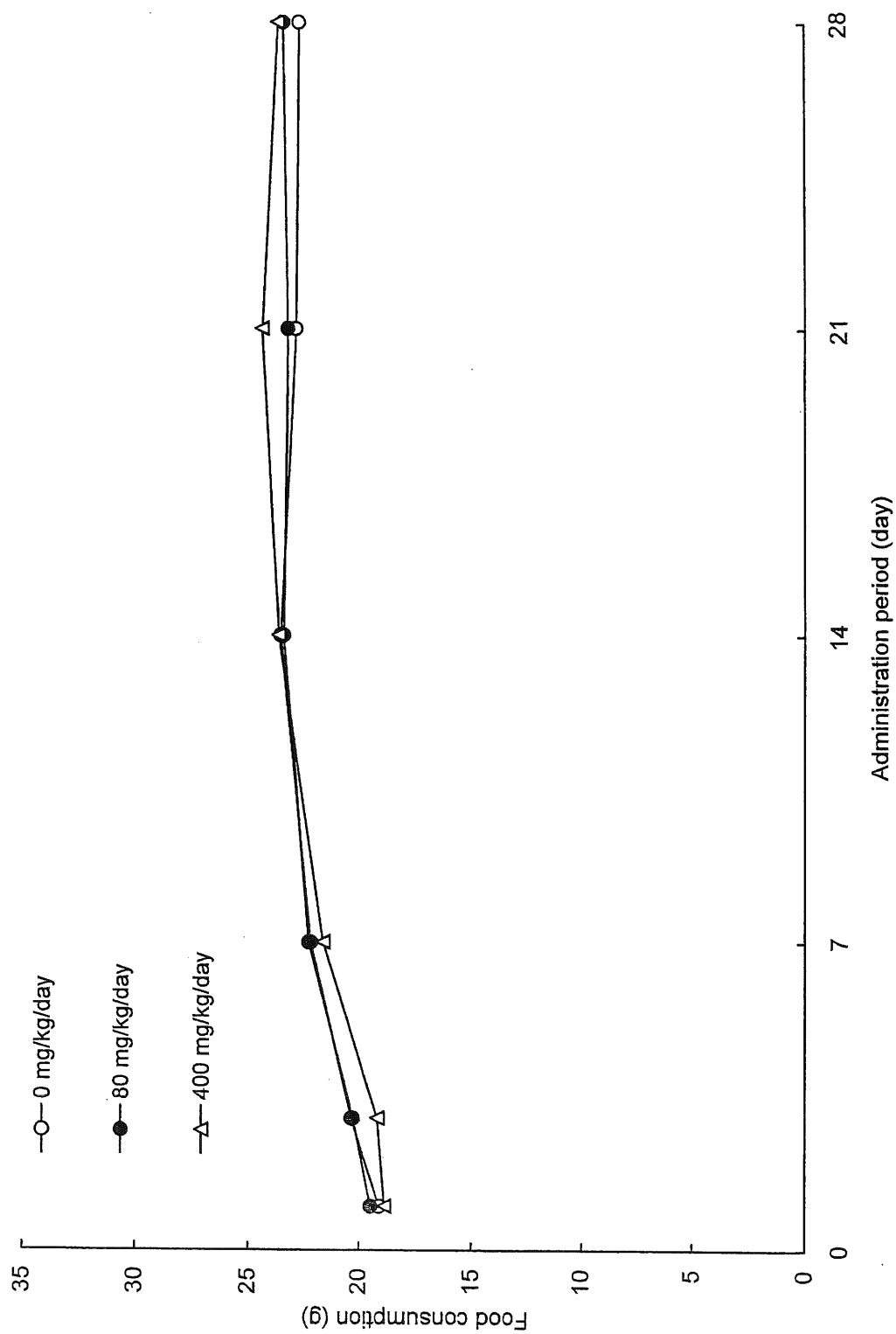


Fig. 2 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Food consumption: Male

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

Summary of general clinical observations				
Sex	Signs	Administration period		
		mg/kg/day	0	80
Male		ss	ss	ss
		17 ^{a)}	17	17
	No abnormalities detected	16	17	8
	Salivation			9
	Decreased spontaneous locomotion			6
	Decreased respiratory rate			2
	Loss of hair	1		
	Scab formation	1		
	Exudate	1		

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									
			Predosing			Dosing 1 week			
Dose (mg/kg/day)			0	80	400	0	80	400	
Number of animals			5	5	5	5	5	5	
Removal from cage	Ease of removal	-2	0	0	0	0	0	0	
		-1	0	0	0	0	0	0	
		0	5	5	5	4	5	5	
		+1	0	0	0	1	0	0	
		+2	0	0	0	0	0	0	
	Vocalization	0	4	4	4	5	5	5	
		+1	1	1	1	0	0	0	
		+2	0	0	0	0	0	0	
	Handling observation	Muscle tone	-1	0	0	0	0	0	0
			0	5	5	5	5	5	5
+1			0	0	0	0	0	0	
Subnormal temperature		-	5	5	5	5	5	5	
		+	0	0	0	0	0	0	
Piloerection		-	5	5	5	5	5	5	
		+	0	0	0	0	0	0	
Staining hair		-	5	5	5	5	5	5	
		+	0	0	0	0	0	0	
Unkempt hair		-	5	5	5	5	5	5	
		+	0	0	0	0	0	0	
Paleness		-	5	5	5	5	5	5	
		+	0	0	0	0	0	0	
Reddening		-	5	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	
Observation in arena		Posture	0	5	5	5	5	5	5
			+1	0	0	0	0	0	0
	+2		0	0	0	0	0	0	
	Motor activity	-2	0	0	0	0	0	0	
		-1	0	0	0	0	0	0	
		0	5	5	5	2	4	3	
		+1	0	0	0	3	1	2	
		+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	
	Tremor/ twitch/ convulsion	0	5	5	5	5	5	5	
		+1	0	0	0	0	0	0	
		+2	0	0	0	0	0	0	
		+3	0	0	0	0	0	0	
	Stereotypic behavior	-	5	5	5	5	5	5	
		C	0	0	0	0	0	0	
		G	0	0	0	0	0	0	
		S	0	0	0	0	0	0	
	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		
Defecation ^{a)}	ST	0	0	0	0	0	0		
	T	0	0	0	0	0	0		
	Urination ^{a)}	0.4 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.8 ± 1.8	0.4 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.6 ± 1.3		
		2.0 ± 3.4	1.6 ± 1.5	2.0 ± 1.9	0.6 ± 0.9	0.2 ± 0.4	1.8 ± 2.5		

a): (count/min)

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

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

Male									
			Dosing 2 week			Dosing 3 week			
Dose (mg/kg/day)			0	80	400	0	80	400	
Number of animals			5	5	5	5	5	5	
Removal from cage	Ease of removal	-2	0	0	0	0	0	0	
		-1	0	2	1	1	0	1	
		0	5	3	4	3	5	4	
		+1	0	0	0	1	0	0	
		+2	0	0	0	0	0	0	
	Vocalization	0	5	5	3	5	5	5	
		+1	0	0	2	0	0	0	
		+2	0	0	0	0	0	0	
	Handling observation	Muscle tone	-1	0	0	0	0	0	0
			0	5	5	5	5	5	5
+1			0	0	0	0	0	0	
Subnormal temperature		-	5	5	5	5	5	5	
		+	0	0	0	0	0	0	
Piloerection		-	5	5	5	5	5	5	
		+	0	0	0	0	0	0	
Staining hair		-	5	5	5	5	5	5	
		+	0	0	0	0	0	0	
Unkempt hair		-	5	5	5	5	5	5	
		+	0	0	0	0	0	0	
Paleness		-	5	5	5	5	5	5	
		+	0	0	0	0	0	0	
Reddening		-	5	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	
Observation in arena	Posture	0	5	5	5	5	5	5	
		+1	0	0	0	0	0	0	
		+2	0	0	0	0	0	0	
	Motor activity	-2	0	0	0	0	0	0	
		-1	0	0	0	0	0	0	
		0	3	5	3	4	5	3	
		+1	2	0	2	1	0	2	
		+2	0	0	0	0	0	0	
		0	5	5	5	5	5	5	
	Respiration	+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	
	Tremor/ twitch/ convulsion	0	5	5	5	5	5	5	
		+1	0	0	0	0	0	0	
		+2	0	0	0	0	0	0	
		+3	0	0	0	0	0	0	
	Stereotypic behavior	-	5	5	5	5	5	5	
		C	0	0	0	0	0	0	
		G	0	0	0	0	0	0	
		S	0	0	0	0	0	0	
		H	0	0	0	0	0	0	
	Abnormal behavior	-	5	5	5	5	5	5	
		S	0	0	0	0	0	0	
		B	0	0	0	0	0	0	
		C	0	0	0	0	0	0	
		R	0	0	0	0	0	0	
		W	0	0	0	0	0	0	
		V	0	0	0	0	0	0	
		ST	0	0	0	0	0	0	
Defecation ^{a)}		0.0 ± 0.0	0.8 ± 1.3	0.4 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4	0.4 ± 0.5		
Urination ^{a)}		0.8 ± 1.3	1.8 ± 1.5	0.6 ± 0.5	0.6 ± 1.3	1.2 ± 0.8	0.6 ± 0.9		

a): (count/min)

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

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

Male		Dosing 4 week		
Dose (mg/kg/day)		0	80	400
Number of animals		5	5	5
Removal from cage	Ease of removal	-2	0	0
		-1	0	1
		0	5	4
		+1	0	0
		+2	0	0
	Vocalization	0	4	5
		+1	1	0
		+2	0	0
Handling observation	Muscle tone	-1	0	0
		0	5	5
		+1	0	0
	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
	Motor activity	-2	0	0
		-1	0	0
		0	5	5
		+1	0	1
		+2	0	0
	Respiration	0	5	5
		+1	0	0
		+2	0	0
		+3	0	0
	Lid closure	-	5	5
		+	0	0
	Gait	-	5	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	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)}	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.9
	Urination ^{a)}	0.4 ± 0.5	1.4 ± 2.6	1.0 ± 1.7

a): (count/min)

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

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

Male

Dose (mg/kg/day)		Dosing 4 week		
		0	80	400
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
		-	0	0
	Air righting reflex	+	5	5
		-	0	0
	Grip strength			
	Forelimb (g)	429 ± 41	431 ± 29	406 ± 47
	Hindlimb (g)	399 ± 31	382 ± 41	404 ± 50
Motor activity [Interval]	0-10 (min)	104 ± 70	157 ± 45	132 ± 72
	10-20 (min)	69 ± 44	91 ± 56	71 ± 47
	20-30 (min)	32 ± 23	52 ± 34	34 ± 25
	30-40 (min)	27 ± 16	61 ± 41	73 ± 58
	40-50 (min)	7 ± 8	43 ± 55	65 ± 62
	50-60 (min)	7 ± 11	21 ± 28	30 ± 33
	Total	246 ± 133	425 ± 161	406 ± 240

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

Scoring scale for sensorimotor function

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

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

Dose		0	80	400
(mg/kg/day)				
Administration period	1	141.53 ±5.92 (17)	140.95 ±5.87 (17)	139.15 ±6.84 (17)
	3	158.64 ±7.50 (13)	158.89 ±7.49 (13)	153.65 ±10.01 (13)
	7	194.12 ±11.70 (13)	193.76 ±11.62 (13)	186.33 ±14.86 (13)
	14	255.49 ±17.01 (9)	253.68 ±21.88 (9)	246.99 ±24.66 (9)
	21	308.76 ±28.32 (5)	310.10 ±35.03 (5)	304.28 ±37.12 (5)
	28	348.56 ±38.73 (5)	355.46 ±43.25 (5)	341.46 ±42.94 (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

B10-0099

Administration period	Dose (mg/kg/day)	0	80	400
1		19.09	19.47	18.87
		± 1.31 (13)	± 1.74 (13)	± 1.75 (13)
3		20.36	20.28	19.19
		± 1.52 (13)	± 1.64 (13)	± 2.02 (13)
7		22.19	22.28	21.64
		± 1.79 (13)	± 2.49 (13)	± 2.63 (13)
14		23.56	23.42	23.64
		± 2.15 (9)	± 2.78 (9)	± 3.16 (9)
21		22.87	23.23	24.38
		± 2.19 (5)	± 3.27 (5)	± 3.50 (5)
28		22.70	23.40	23.66
		± 3.29 (5)	± 3.28 (5)	± 3.86 (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	80	400
Urine volume	(mL)	12.6 ±7.4 (5)	8.4 ±2.5 (5)	10.4 ±4.6 (5)
Uosm	(mOsm/L)	1014.8 ±716.7 (5)	988.8 ±251.5 (5)	1082.6 ±431.5 (5)

Values are shown as Mean ± S.D..

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

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

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

Table 6-2

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

B10-0099

Items	Group	Twenty-eight-day treatment		
	Dose (mg/kg/day)	0	80	400
	No. of animals	5	5	5
Color				
	SY	2	2	2
	Y	2	3	3
	YB	1	0	0
Turbidity				
	Clear	4	4	5
	Cloudy	1	1	0
pH				
	6.0	2	5	5
	6.5	3	0	0
Protein				
	±	3	4	4
	1+	1	1	1
	2+	1	0	0
Glucose				
	-	5	5	5
Ketones				
	-	1	0	1
	±	3	2	2
	1+	1	3	2
Occult blood				
	-	4	5	5
	2+	1	0	0

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

Table 6-3

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

B10-0099

Items	Group	Twenty-eight-day treatment		
	Dose (mg/kg/day)	0	80	400
	No. of animals	5	0	5
Urinary sediment				
Red blood cells ^{a)}				
	0	5	---	5
White blood cells ^{a)}				
	0	5	---	5
Epithelial cells ^{a)}				
	0	5	---	5
Casts ^{b)}				
	0	5	---	5
Crystals ^{c)}				
	-	1	---	4
	±	2	---	0
	1+	1	---	1
	2+	1	---	0

^{a)}: Number of cells/10views(×400).

^{b)}: Number of casts/18×18 mm².

^{c)}: Incidence of crystals/18×18 mm².

---:Not examined.

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

Items	Dose (mg/kg/day)	One-day treatment		
		0	80	400
RBC	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	739.3 ± 51.7 (4)	783.3 ± 74.1 (4)	821.0 ± 58.8 (4)
Hb	(g/dL)	15.38 ± 0.92 (4)	16.43 ± 1.30 (4)	16.98 ± 1.40 (4)
Ht	(%)	50.70 ± 2.84 (4)	53.23 ± 4.89 (4)	56.10 ± 4.45 (4)
MCV	(fL)	68.65 ± 2.56 (4)	68.00 ± 0.64 (4)	68.35 ± 1.53 (4)
MCH	(pg)	20.83 ± 0.99 (4)	20.98 ± 0.43 (4)	20.68 ± 0.50 (4)
MCHC	(g/dL)	30.35 ± 0.44 (4)	30.85 ± 0.58 (4)	30.25 ± 0.24 (4)
Platelet	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	141.33 ± 16.20 (4)	122.50 ± 26.30 (4)	104.83 ± 20.88 (4)
Reticulo	(%)	11.98 ± 1.27 (4)	11.55 ± 0.58 (4)	12.03 ± 1.03 (4)
WBC	($\times 10^2/\mu\text{L}$)	95.00 ± 18.36 (4)	92.78 ± 48.32 (4)	84.93 ± 13.13 (4)
Differentiation of leukocyte				
Neutro	(%)	15.13 ± 5.28 (4)	9.80 ± 4.91 (4)	17.75 ± 11.85 (4)
Lymph	(%)	78.98 ± 5.18 (4)	83.60 ± 5.86 (4)	75.20 ± 13.98 (4)
Eosino	(%)	0.60 ± 0.18 (4)	0.55 ± 0.24 (4)	0.90 ± 0.54 (4)
Baso	(%)	0.93 ± 0.26 (4)	1.20 ± 0.54 (4)	1.55 ± 0.75 (4)
Mono	(%)	3.08 ± 0.50 (4)	3.18 ± 1.09 (4)	3.33 ± 1.36 (4)
LUC	(%)	1.30 ± 0.45 (4)	1.70 ± 0.39 (4)	1.20 ± 0.20 (4)

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

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

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

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

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

Items	Dose (mg/kg/day)	Seven-day treatment		
		0	80	400
RBC	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	755.0 ± 42.7 (4)	745.3 ± 26.5 (4)	746.8 ± 54.6 (4)
Hb	(g/dL)	15.75 ± 0.93 (4)	15.38 ± 0.74 (4)	15.18 ± 0.76 (4)
Ht	(%)	51.53 ± 3.53 (4)	49.95 ± 2.18 (4)	50.08 ± 2.49 (4)
MCV	(fL)	68.23 ± 2.36 (4)	66.98 ± 1.96 (4)	67.20 ± 2.51 (4)
MCH	(pg)	20.90 ± 0.61 (4)	20.65 ± 0.65 (4)	20.38 ± 0.61 (4)
MCHC	(g/dL)	30.65 ± 0.37 (4)	30.80 ± 0.18 (4)	30.33 ± 0.36 (4)
Platelet	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	117.48 ± 11.40 (4)	128.85 ± 14.70 (4)	142.88 * ± 11.45 (4)
Reticulo	(%)	9.25 ± 1.11 (4)	9.43 ± 0.63 (4)	9.38 ± 0.39 (4)
WBC	($\times 10^2/\mu\text{L}$)	96.85 ± 5.92 (4)	94.68 ± 34.26 (4)	97.83 ± 21.50 (4)
Differentiation of leukocyte				
Neutro	(%)	12.20 ± 5.51 (4)	12.38 ± 1.92 (4)	13.10 ± 3.81 (4)
Lymph	(%)	80.65 ± 5.68 (4)	81.85 ± 2.75 (4)	80.28 ± 4.82 (4)
Eosino	(%)	0.88 ± 0.38 (4)	0.60 ± 0.32 (4)	0.70 ± 0.43 (4)
Baso	(%)	1.58 ± 0.17 (4)	1.05 * ± 0.24 (4)	1.15 * ± 0.26 (4)
Mono	(%)	3.40 ± 0.86 (4)	2.63 ± 0.73 (4)	3.35 ± 0.93 (4)
LUC	(%)	1.33 ± 0.25 (4)	1.48 ± 0.13 (4)	1.43 ± 0.22 (4)

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

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

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

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

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

Items	Dose (mg/kg/day)	Fourteen-day treatment		
		0	80	400
RBC	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	776.3 ± 33.8 (4)	779.3 ± 47.7 (4)	773.5 ± 58.8 (4)
Hb	(g/dL)	15.83 ± 1.00 (4)	16.00 ± 0.97 (4)	15.48 ± 0.79 (4)
Ht	(%)	51.03 ± 2.64 (4)	51.28 ± 2.86 (4)	49.68 ± 2.63 (4)
MCV	(fL)	65.73 ± 1.32 (4)	65.83 ± 2.15 (4)	64.33 ± 1.92 (4)
MCH	(pg)	20.38 ± 0.61 (4)	20.55 ± 0.53 (4)	20.08 ± 0.72 (4)
MCHC	(g/dL)	31.03 ± 0.60 (4)	31.20 ± 0.23 (4)	31.20 ± 0.36 (4)
Platelet	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	122.28 ± 7.77 (4)	126.85 ± 7.15 (4)	137.05 ± 16.19 (4)
Reticulo	(%)	5.83 ± 0.64 (4)	5.38 ± 0.21 (4)	5.80 ± 0.41 (4)
WBC	($\times 10^2/\mu\text{L}$)	108.83 ± 20.95 (4)	136.38 ± 24.45 (4)	139.40 ± 23.13 (4)
Differentiation of leukocyte				
Neutro	(%)	13.83 ± 3.56 (4)	17.18 ± 5.56 (4)	15.43 ± 4.11 (4)
Lymph	(%)	80.30 ± 3.86 (4)	77.90 ± 5.57 (4)	78.80 ± 4.93 (4)
Eosino	(%)	0.70 ± 0.39 (4)	0.43 ± 0.10 (4)	0.45 ± 0.13 (4)
Baso	(%)	1.35 ± 0.13 (4)	1.10 ± 0.24 (4)	1.48 ± 0.28 (4)
Mono	(%)	2.13 ± 0.17 (4)	1.98 ± 0.54 (4)	2.25 ± 0.41 (4)
LUC	(%)	1.70 ± 0.66 (4)	1.40 ± 0.41 (4)	1.55 ± 0.44 (4)

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

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

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

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

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

Items	Dose (mg/kg/day)	Twenty-eight-day treatment		
		0	80	400
RBC	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	791.0 ± 40.9 (4)	843.6 ± 54.5 (5)	817.2 ± 48.9 (5)
Hb	(g/dL)	15.60 ± 0.67 (4)	15.90 ± 0.79 (5)	15.50 ± 0.83 (5)
Ht	(%)	50.93 ± 1.92 (4)	51.50 ± 2.39 (5)	50.10 ± 3.17 (5)
MCV	(fL)	64.43 ± 1.42 (4)	61.10 ± 2.23 (5)	61.32 ± 2.60 (5)
MCH	(pg)	19.73 ± 0.38 (4)	18.88 ± 0.88 (5)	19.00 ± 0.76 (5)
MCHC	(g/dL)	30.58 ± 0.24 (4)	30.90 ± 0.33 (5)	30.98 ± 0.34 (5)
Platelet	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	124.58 ± 15.00 (4)	122.98 ± 8.47 (5)	136.44 ± 15.82 (5)
Reticulo	(%)	4.20 ± 0.94 (4)	3.22 ± 0.38 (5)	3.08 * ± 0.44 (5)
WBC	($\times 10^2/\mu\text{L}$)	158.70 ± 52.35 (4)	111.90 ± 24.40 (5)	147.66 ± 42.01 (5)
Differentiation of leukocyte				
Neutro	(%)	21.33 ± 7.82 (4)	18.22 ± 1.63 (5)	18.18 ± 4.22 (5)
Lymph	(%)	73.70 ± 8.32 (4)	76.36 ± 2.31 (5)	75.98 ± 4.58 (5)
Eosino	(%)	0.65 ± 0.17 (4)	0.74 ± 0.27 (5)	0.62 ± 0.39 (5)
Baso	(%)	1.05 ± 0.13 (4)	1.06 ± 0.18 (5)	1.30 ± 0.64 (5)
Mono	(%)	2.28 ± 0.56 (4)	2.40 ± 0.60 (5)	2.40 ± 0.37 (5)
LUC	(%)	1.00 ± 0.22 (4)	1.32 ± 0.64 (5)	1.54 ± 0.64 (5)
PT	(sec)	15.83 ± 0.91 (4)	17.10 ± 2.20 (5)	19.70 ± 7.05 (5)
APTT	(sec)	25.03 ± 3.76 (4)	19.54 ± 4.04 (5)	22.78 ± 5.12 (5)

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

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

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

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

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

Items	Dose (mg/kg/day)	One-day treatment		
		0	80	400
AST	(IU/L)	90.3 ±10.3 (4)	94.3 ±16.6 (4)	100.0 ±6.2 (4)
ALT	(IU/L)	29.0 ±3.2 (4)	33.0 ±3.8 (4)	38.0 ** ±2.6 (4)
ALP	(IU/L)	822.5 ±126.3 (4)	853.8 ±122.1 (4)	1078.3 ±210.4 (4)
BUN	(mg/dL)	12.33 ±1.44 (4)	13.45 ±1.84 (4)	12.83 ±0.71 (4)
Creatinine	(mg/dL)	0.130 ±0.014 (4)	0.128 ±0.005 (4)	0.118 ±0.015 (4)
T-Bil	(mg/dL)	0.053 ±0.013 (4)	0.068 ±0.010 (4)	0.068 ±0.022 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

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

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

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

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

Items	Dose (mg/kg/day)	Seven-day treatment		
		0	80	400
AST	(IU/L)	90.5 ±15.8 (4)	91.3 ±7.5 (4)	86.8 ±9.4 (4)
ALT	(IU/L)	32.8 ±9.1 (4)	31.5 ±5.6 (4)	33.5 ±4.7 (4)
ALP	(IU/L)	708.5 ±153.1 (4)	916.8 ±232.9 (4)	875.0 ±143.6 (4)
BUN	(mg/dL)	13.50 ±1.48 (4)	13.70 ±0.64 (4)	12.08 ±1.88 (4)
Creatinine	(mg/dL)	0.175 ±0.013 (4)	0.190 ±0.008 (4)	0.178 ±0.017 (4)
T-Bil	(mg/dL)	0.063 ±0.010 (4)	0.055 ±0.010 (4)	0.058 ±0.005 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

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

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

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

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

Items	Dose (mg/kg/day)	Fourteen-day treatment		
		0	80	400
AST	(IU/L)	71.3 ±5.0 (4)	65.5 ±2.4 (4)	71.5 ±3.0 (4)
ALT	(IU/L)	23.8 ±2.2 (4)	22.8 ±3.0 (4)	30.5 ** ±1.7 (4)
ALP	(IU/L)	781.8 ±40.4 (4)	824.8 ±47.4 (4)	820.5 ±111.1 (4)
BUN	(mg/dL)	13.65 ±3.44 (4)	12.53 ±3.02 (4)	9.45 ±2.92 (4)
Creatinine	(mg/dL)	0.195 ±0.013 (4)	0.183 ±0.015 (4)	0.173 ±0.017 (4)
T-Bil	(mg/dL)	0.060 ±0.008 (4)	0.053 ±0.005 (4)	0.060 ±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 8-4 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of blood chemical examinations:Male

Items	Dose (mg/kg/day)	Twenty-eight-day treatment		
		0	80	400
AST	(IU/L)	67.5 ±6.1 (4)	64.4 ±9.0 (5)	65.2 ±4.8 (5)
ALT	(IU/L)	26.0 ±3.4 (5)	25.4 ±3.2 (5)	31.6 ±5.7 (5)
ALP	(IU/L)	586.2 ±143.5 (5)	707.2 ±80.7 (5)	577.4 ±102.3 (5)
ChE	(IU/L)	51.2 ±8.3 (5)	49.4 ±12.6 (5)	55.6 ±10.8 (5)
γ-GTP	(IU/L)	0.80 ±0.38 (4)	0.80 ±0.20 (5)	0.68 ±0.19 (5)
T-Chol	(mg/dL)	67.3 ±9.3 (4)	72.2 ±14.0 (5)	69.4 ±14.1 (5)
TG	(mg/dL)	65.5 ±25.0 (4)	77.2 ±19.9 (5)	73.2 ±21.1 (5)
BUN	(mg/dL)	11.32 ±1.61 (5)	12.04 ±1.12 (5)	12.98 ±1.59 (5)
Creatinine	(mg/dL)	0.254 ±0.027 (5)	0.246 ±0.017 (5)	0.252 ±0.029 (5)
T-Protein	(g/dL)	6.30 ±0.24 (4)	6.26 ±0.21 (5)	6.24 ±0.40 (5)
Albumin	(g/dL)	2.88 ±0.13 (4)	2.94 ±0.11 (5)	2.82 ±0.08 (5)
A/G ratio	(-)	0.840 ±0.055 (4)	0.890 ±0.076 (5)	0.828 ±0.059 (5)
Glucose	(mg/dL)	153.5 ±28.1 (4)	163.0 ±9.8 (5)	173.2 ±16.7 (5)
T-Bil	(mg/dL)	0.054 ±0.011 (5)	0.044 ±0.005 (5)	0.040 * ±0.007 (5)
TBA	(μmol/L)	23.33 ±2.29 (4)	18.68 ±8.77 (5)	26.08 ±25.43 (5)
IP	(mg/dL)	12.53 ±0.77 (4)	12.62 ±0.70 (5)	12.26 ±0.73 (5)
Ca	(mg/dL)	11.75 ±0.38 (4)	12.36 * ±0.42 (5)	12.24 ±0.15 (5)
Na	(mEq/L)	148.0 ±1.4 (4)	147.4 ±1.5 (5)	147.0 ±0.7 (5)
K	(mEq/L)	7.43 ±1.09 (4)	7.64 ±0.43 (5)	7.54 ±0.59 (5)
Cl	(mEq/L)	103.60 ±1.74 (4)	102.18 ±1.12 (5)	101.74 ±0.78 (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 9-1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats
Summary of absolute organ weights:Male

Items	Dose (mg/kg/day)	One-day treatment		
		0	80	400
Liver	(g)	4.338 ±0.346 (4)	4.270 ±0.275 (4)	4.625 ±0.269 (4)
Heart	(g)	0.625 ±0.052 (4)	0.650 ±0.084 (4)	0.633 ±0.053 (4)
Kidney(R)	(g)	0.635 ±0.044 (4)	0.588 ±0.025 (4)	0.665 ±0.045 (4)
Kidney(L)	(g)	0.603 ±0.052 (4)	0.583 ±0.005 (4)	0.640 ±0.035 (4)
Kidneys	(g)	1.238 ±0.095 (4)	1.170 ±0.029 (4)	1.305 ±0.079 (4)
Testis(R)	(g)	0.670 ±0.029 (4)	0.650 ±0.109 (4)	0.658 ±0.017 (4)
Testis(L)	(g)	0.658 ±0.039 (4)	0.638 ±0.079 (4)	0.643 ±0.015 (4)
Testes	(g)	1.328 ±0.059 (4)	1.288 ±0.188 (4)	1.300 ±0.014 (4)
Epididymis(R)	(g)	0.083 ±0.013 (4)	0.073 ±0.005 (4)	0.078 ±0.013 (4)
Epididymis(L)	(g)	0.083 ±0.015 (4)	0.070 ±0.022 (4)	0.080 ±0.008 (4)
Epididymides	(g)	0.165 ±0.024 (4)	0.143 ±0.021 (4)	0.158 ±0.005 (4)
Ventral prostate	(g)	0.063 ±0.015 (4)	0.075 ±0.024 (4)	0.073 ±0.013 (4)
Dorsolateral prostate	(g)	0.055 ±0.013 (4)	0.050 ±0.027 (4)	0.073 ±0.015 (4)
Brain	(g)	1.785 ±0.073 (4)	1.705 ±0.042 (4)	1.773 ±0.069 (4)
Spleen	(g)	0.368 ±0.069 (4)	0.335 ±0.024 (4)	0.328 ±0.028 (4)
Thymus	(mg)	422.23 ±74.95 (4)	475.73 ±34.76 (4)	431.33 ±81.75 (4)
Pituitary gland	(mg)	5.63 ±0.57 (4)	5.05 ±0.55 (4)	5.45 ±0.45 (4)
Thyroid	(mg)	11.15 ±1.86 (4)	10.93 ±1.34 (4)	11.30 ±0.71 (4)
Adrenals	(mg)	29.28 ±1.97 (4)	29.20 ±1.71 (4)	31.10 ±2.61 (4)
Final body weight	(g)	119.38 ±6.18 (4)	119.25 ±6.53 (4)	121.83 ±5.12 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

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

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

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

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

Items	Dose (mg/kg/day)	Seven-day treatment		
		0	80	400
Liver	(g)	6.135 ±0.803 (4)	5.993 ±0.581 (4)	5.878 ±0.510 (4)
Heart	(g)	0.848 ±0.104 (4)	0.820 ±0.064 (4)	0.733 ±0.036 (4)
Kidney(R)	(g)	0.843 ±0.089 (4)	0.805 ±0.079 (4)	0.815 ±0.062 (4)
Kidney(L)	(g)	0.810 ±0.083 (4)	0.790 ±0.063 (4)	0.785 ±0.075 (4)
Kidneys	(g)	1.653 ±0.172 (4)	1.595 ±0.136 (4)	1.600 ±0.133 (4)
Testis(R)	(g)	0.910 ±0.084 (4)	0.955 ±0.149 (4)	0.853 ±0.085 (4)
Testis(L)	(g)	0.923 ±0.081 (4)	0.923 ±0.105 (4)	0.850 ±0.095 (4)
Testes	(g)	1.833 ±0.164 (4)	1.878 ±0.251 (4)	1.703 ±0.179 (4)
Epididymis(R)	(g)	0.105 ±0.017 (4)	0.118 ±0.021 (4)	0.103 ±0.033 (4)
Epididymis(L)	(g)	0.100 ±0.020 (4)	0.115 ±0.013 (4)	0.098 ±0.021 (4)
Epididymides	(g)	0.205 ±0.037 (4)	0.233 ±0.033 (4)	0.200 ±0.054 (4)
Ventral prostate	(g)	0.110 ±0.008 (4)	0.128 ±0.013 (4)	0.105 ±0.024 (4)
Dorsolateral prostate	(g)	0.063 ±0.010 (4)	0.083 ±0.010 (4)	0.075 ±0.021 (4)
Brain	(g)	1.810 ±0.049 (4)	1.860 ±0.112 (4)	1.763 ±0.050 (4)
Spleen	(g)	0.488 ±0.144 (4)	0.483 ±0.064 (4)	0.450 ±0.082 (4)
Thymus	(mg)	570.95 ±75.54 (4)	586.03 ±143.08 (4)	490.25 ±95.87 (4)
Pituitary gland	(mg)	7.13 ±0.78 (4)	7.10 ±0.55 (4)	7.18 ±1.39 (4)
Thyroid	(mg)	15.28 ±4.07 (4)	14.33 ±1.42 (4)	14.38 ±1.81 (4)
Adrenals	(mg)	35.95 ±3.29 (4)	34.83 ±4.08 (4)	35.33 ±2.28 (4)
Final body weight	(g)	166.15 ±11.64 (4)	169.45 ±10.45 (4)	162.15 ±10.19 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

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

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

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

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

Items	Dose (mg/kg/day)	Fourteen-day treatment		
		0	80	400
Liver	(g)	8.033 ±0.672 (4)	8.275 ±0.567 (4)	8.765 ±0.749 (4)
Heart	(g)	1.055 ±0.157 (4)	0.998 ±0.084 (4)	0.985 ±0.086 (4)
Kidney(R)	(g)	1.028 ±0.136 (4)	1.025 ±0.078 (4)	1.068 ±0.101 (4)
Kidney(L)	(g)	1.008 ±0.102 (4)	1.033 ±0.079 (4)	1.030 ±0.083 (4)
Kidneys	(g)	2.035 ±0.234 (4)	2.058 ±0.147 (4)	2.098 ±0.184 (4)
Testis(R)	(g)	1.205 ±0.156 (4)	1.213 ±0.151 (4)	1.155 ±0.111 (4)
Testis(L)	(g)	1.235 ±0.117 (4)	1.208 ±0.126 (4)	1.155 ±0.134 (4)
Testes	(g)	2.440 ±0.273 (4)	2.420 ±0.273 (4)	2.310 ±0.244 (4)
Epididymis(R)	(g)	0.188 ±0.013 (4)	0.165 ±0.019 (4)	0.153 * ±0.017 (4)
Epididymis(L)	(g)	0.188 ±0.030 (4)	0.175 ±0.021 (4)	0.143 * ±0.017 (4)
Epididymides	(g)	0.375 ±0.042 (4)	0.340 ±0.039 (4)	0.295 * ±0.034 (4)
Ventral prostate	(g)	0.203 ±0.051 (4)	0.205 ±0.047 (4)	0.168 ±0.022 (4)
Dorsolateral prostate	(g)	0.163 ±0.046 (4)	0.168 ±0.041 (4)	0.180 ±0.042 (4)
Brain	(g)	1.930 ±0.110 (4)	1.858 ±0.089 (4)	1.860 ±0.072 (4)
Spleen	(g)	0.643 ±0.050 (4)	0.593 ±0.102 (4)	0.580 ±0.137 (4)
Thymus	(mg)	632.90 ±101.86 (4)	703.75 ±149.91 (4)	641.48 ±41.95 (4)
Pituitary gland	(mg)	8.93 ±1.04 (4)	8.25 ±0.54 (4)	8.58 ±1.63 (4)
Thyroid	(mg)	14.90 ±3.54 (4)	16.48 ±2.98 (4)	15.10 ±1.10 (4)
Adrenals	(mg)	40.65 ±4.47 (4)	41.88 ±4.10 (4)	40.80 ±2.35 (4)
Final body weight	(g)	228.10 ±16.27 (4)	225.30 ±14.54 (4)	214.13 ±12.84 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

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

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

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

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

Items	Dose (mg/kg/day)	Twenty-eight-day treatment		
		0	80	400
Liver	(g)	10.888 ±1.992 (5)	10.388 ±1.688 (5)	11.496 ±2.035 (5)
Heart	(g)	1.274 ±0.168 (5)	1.248 ±0.188 (5)	1.152 ±0.126 (5)
Kidney(R)	(g)	1.274 ±0.177 (5)	1.340 ±0.151 (5)	1.318 ±0.214 (5)
Kidney(L)	(g)	1.282 ±0.258 (5)	1.316 ±0.133 (5)	1.312 ±0.206 (5)
Kidneys	(g)	2.556 ±0.432 (5)	2.656 ±0.281 (5)	2.630 ±0.419 (5)
Testis(R)	(g)	1.506 ±0.244 (5)	1.606 ±0.097 (5)	1.364 ±0.069 (5)
Testis(L)	(g)	1.500 ±0.239 (5)	1.586 ±0.062 (5)	1.358 ±0.063 (5)
Testes	(g)	3.006 ±0.482 (5)	3.192 ±0.154 (5)	2.722 ±0.130 (5)
Epididymis(R)	(g)	0.350 ±0.048 (5)	0.360 ±0.032 (5)	0.350 ±0.024 (5)
Epididymis(L)	(g)	0.346 ±0.043 (5)	0.354 ±0.044 (5)	0.340 ±0.031 (5)
Epididymides	(g)	0.696 ±0.091 (5)	0.714 ±0.071 (5)	0.690 ±0.055 (5)
Ventral prostate	(g)	0.356 ±0.048 (5)	0.364 ±0.043 (5)	0.408 ±0.079 (5)
Dorsolateral prostate	(g)	0.266 ±0.038 (5)	0.284 ±0.086 (5)	0.334 ±0.036 (5)
Seminal vesicle	(g)	0.842 ±0.120 (5)	0.880 ±0.136 (5)	0.888 ±0.150 (5)
Brain	(g)	1.996 ±0.147 (5)	2.028 ±0.070 (5)	1.916 ±0.015 (5)
Spleen	(g)	0.620 ±0.152 (5)	0.676 ±0.153 (5)	0.630 ±0.153 (5)
Thymus	(mg)	575.74 ±168.07 (5)	675.86 ±193.75 (5)	507.66 ±56.18 (5)
Pituitary gland	(mg)	10.48 ±1.36 (5)	9.94 ±1.10 (5)	11.02 ±1.47 (5)
Thyroid	(mg)	18.70 ±3.55 (5)	19.28 ±1.65 (5)	18.06 ±3.51 (5)
Adrenals	(mg)	46.78 ±4.97 (5)	48.04 ±7.14 (5)	46.98 ±5.34 (5)
Final body weight	(g)	324.40 ±37.38 (5)	331.24 ±38.43 (5)	316.48 ±41.22 (5)

Values are shown as Mean ± S.D..

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

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

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

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

Items	Dose (mg/kg/day)	One-day treatment		
		0	80	400
Liver	(g/100g)	3.630 ±0.114 (4)	3.580 ±0.108 (4)	3.793 ±0.087 (4)
Heart	(g/100g)	0.525 ±0.025 (4)	0.543 ±0.046 (4)	0.518 ±0.031 (4)
Kidney(R)	(g/100g)	0.535 ±0.026 (4)	0.493 * ±0.013 (4)	0.545 ±0.024 (4)
Kidney(L)	(g/100g)	0.505 ±0.030 (4)	0.488 ±0.022 (4)	0.525 ±0.021 (4)
Kidneys	(g/100g)	1.040 ±0.056 (4)	0.980 ±0.034 (4)	1.070 ±0.042 (4)
Testis(R)	(g/100g)	0.563 ±0.028 (4)	0.545 ±0.076 (4)	0.540 ±0.028 (4)
Testis(L)	(g/100g)	0.553 ±0.036 (4)	0.535 ±0.048 (4)	0.528 ±0.028 (4)
Testes	(g/100g)	1.115 ±0.054 (4)	1.080 ±0.124 (4)	1.068 ±0.050 (4)
Epididymis(R)	(g/100g)	0.070 ±0.008 (4)	0.063 ±0.005 (4)	0.065 ±0.013 (4)
Epididymis(L)	(g/100g)	0.068 ±0.010 (4)	0.060 ±0.014 (4)	0.065 ±0.006 (4)
Epididymides	(g/100g)	0.138 ±0.015 (4)	0.123 ±0.013 (4)	0.130 ±0.012 (4)
Ventral prostate	(g/100g)	0.053 ±0.010 (4)	0.065 ±0.017 (4)	0.060 ±0.008 (4)
Dorsolateral prostate	(g/100g)	0.048 ±0.013 (4)	0.043 ±0.025 (4)	0.060 ±0.012 (4)
Brain	(g/100g)	1.498 ±0.026 (4)	1.435 ±0.113 (4)	1.455 ±0.017 (4)
Spleen	(g/100g)	0.305 ±0.050 (4)	0.280 ±0.022 (4)	0.270 ±0.029 (4)
Thymus	(mg/100g)	352.00 ±47.69 (4)	401.03 ±51.95 (4)	353.30 ±58.38 (4)
Pituitary gland	(mg/100g)	4.68 ±0.31 (4)	4.25 ±0.39 (4)	4.48 ±0.26 (4)
Thyroid	(mg/100g)	9.33 ±1.15 (4)	9.20 ±1.32 (4)	9.28 ±0.74 (4)
Adrenals	(mg/100g)	24.63 ±2.75 (4)	24.50 ±1.25 (4)	25.55 ±2.70 (4)
Final body weight	(g)	119.38 ±6.18 (4)	119.25 ±6.53 (4)	121.83 ±5.12 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

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

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

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

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

Items	Dose (mg/kg/day)	Seven-day treatment		
		0	80	400
Liver	(g/100g)	3.685 ±0.311 (4)	3.533 ±0.133 (4)	3.623 ±0.099 (4)
Heart	(g/100g)	0.510 ±0.053 (4)	0.483 ±0.019 (4)	0.450 ±0.014 (4)
Kidney(R)	(g/100g)	0.508 ±0.030 (4)	0.475 ±0.047 (4)	0.505 ±0.017 (4)
Kidney(L)	(g/100g)	0.488 ±0.026 (4)	0.468 ±0.025 (4)	0.485 ±0.034 (4)
Kidneys	(g/100g)	0.995 ±0.056 (4)	0.943 ±0.070 (4)	0.990 ±0.048 (4)
Testis(R)	(g/100g)	0.550 ±0.057 (4)	0.563 ±0.085 (4)	0.528 ±0.031 (4)
Testis(L)	(g/100g)	0.558 ±0.059 (4)	0.545 ±0.058 (4)	0.525 ±0.033 (4)
Testes	(g/100g)	1.108 ±0.116 (4)	1.108 ±0.141 (4)	1.053 ±0.064 (4)
Epididymis(R)	(g/100g)	0.063 ±0.010 (4)	0.068 ±0.010 (4)	0.063 ±0.017 (4)
Epididymis(L)	(g/100g)	0.058 ±0.013 (4)	0.068 ±0.010 (4)	0.060 ±0.008 (4)
Epididymides	(g/100g)	0.120 ±0.022 (4)	0.135 ±0.019 (4)	0.123 ±0.025 (4)
Ventral prostate	(g/100g)	0.065 ±0.006 (4)	0.073 ±0.005 (4)	0.063 ±0.013 (4)
Dorsolateral prostate	(g/100g)	0.040 ±0.008 (4)	0.050 ±0.000 (4)	0.045 ±0.013 (4)
Brain	(g/100g)	1.095 ±0.077 (4)	1.098 ±0.039 (4)	1.090 ±0.080 (4)
Spleen	(g/100g)	0.290 ±0.073 (4)	0.285 ±0.029 (4)	0.278 ±0.040 (4)
Thymus	(mg/100g)	347.28 ±70.09 (4)	345.93 ±79.99 (4)	301.13 ±47.73 (4)
Pituitary gland	(mg/100g)	4.30 ±0.39 (4)	4.18 ±0.17 (4)	4.43 ±0.71 (4)
Thyroid	(mg/100g)	9.25 ±2.63 (4)	8.45 ±0.47 (4)	8.93 ±1.76 (4)
Adrenals	(mg/100g)	21.60 ±0.49 (4)	20.50 ±1.25 (4)	21.85 ±1.68 (4)
Final body weight	(g)	166.15 ±11.64 (4)	169.45 ±10.45 (4)	162.15 ±10.19 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

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

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

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

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

Items	Dose (mg/kg/day)	Fourteen-day treatment		
		0	80	400
Liver	(g/100g)	3.518 ±0.097 (4)	3.673 ±0.107 (4)	4.088 ** ±0.163 (4)
Heart	(g/100g)	0.460 ±0.036 (4)	0.443 ±0.017 (4)	0.460 ±0.014 (4)
Kidney(R)	(g/100g)	0.450 ±0.033 (4)	0.458 ±0.033 (4)	0.500 ±0.028 (4)
Kidney(L)	(g/100g)	0.440 ±0.018 (4)	0.455 ±0.019 (4)	0.483 * ±0.022 (4)
Kidneys	(g/100g)	0.890 ±0.047 (4)	0.913 ±0.049 (4)	0.983 * ±0.050 (4)
Testis(R)	(g/100g)	0.528 ±0.038 (4)	0.535 ±0.047 (4)	0.543 ±0.053 (4)
Testis(L)	(g/100g)	0.540 ±0.026 (4)	0.535 ±0.048 (4)	0.540 ±0.064 (4)
Testes	(g/100g)	1.068 ±0.061 (4)	1.070 ±0.092 (4)	1.083 ±0.116 (4)
Epididymis(R)	(g/100g)	0.083 ±0.005 (4)	0.075 ±0.010 (4)	0.075 ±0.010 (4)
Epididymis(L)	(g/100g)	0.083 ±0.010 (4)	0.080 ±0.008 (4)	0.065 * ±0.010 (4)
Epididymides	(g/100g)	0.165 ±0.010 (4)	0.155 ±0.017 (4)	0.140 ±0.020 (4)
Ventral prostate	(g/100g)	0.088 ±0.015 (4)	0.093 ±0.015 (4)	0.078 ±0.013 (4)
Dorsolateral prostate	(g/100g)	0.070 ±0.016 (4)	0.075 ±0.021 (4)	0.085 ±0.017 (4)
Brain	(g/100g)	0.850 ±0.032 (4)	0.828 ±0.074 (4)	0.870 ±0.024 (4)
Spleen	(g/100g)	0.285 ±0.021 (4)	0.265 ±0.047 (4)	0.270 ±0.048 (4)
Thymus	(mg/100g)	279.55 ±58.29 (4)	314.30 ±76.61 (4)	301.10 ±35.51 (4)
Pituitary gland	(mg/100g)	3.90 ±0.22 (4)	3.70 ±0.29 (4)	3.98 ±0.63 (4)
Thyroid	(mg/100g)	6.50 ±1.16 (4)	7.30 ±1.27 (4)	7.10 ±0.80 (4)
Adrenals	(mg/100g)	17.98 ±2.99 (4)	18.55 ±1.01 (4)	19.10 ±1.43 (4)
Final body weight	(g)	228.10 ±16.27 (4)	225.30 ±14.54 (4)	214.13 ±12.84 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

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

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

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

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

Items	Dose (mg/kg/day)	Twenty-eight-day treatment		
		0	80	400
Liver	(g/100g)	3.338 ±0.310 (5)	3.126 ±0.182 (5)	3.612 ±0.227 (5)
Heart	(g/100g)	0.394 ±0.036 (5)	0.376 ±0.017 (5)	0.362 ±0.011 (5)
Kidney(R)	(g/100g)	0.392 ±0.026 (5)	0.404 ±0.018 (5)	0.414 ±0.026 (5)
Kidney(L)	(g/100g)	0.394 ±0.052 (5)	0.396 ±0.009 (5)	0.416 ±0.025 (5)
Kidneys	(g/100g)	0.786 ±0.077 (5)	0.800 ±0.025 (5)	0.830 ±0.048 (5)
Testis(R)	(g/100g)	0.462 ±0.042 (5)	0.488 ±0.042 (5)	0.436 ±0.068 (5)
Testis(L)	(g/100g)	0.460 ±0.037 (5)	0.482 ±0.040 (5)	0.434 ±0.063 (5)
Testes	(g/100g)	0.922 ±0.079 (5)	0.970 ±0.080 (5)	0.870 ±0.131 (5)
Epididymis(R)	(g/100g)	0.108 ±0.016 (5)	0.110 ±0.016 (5)	0.112 ±0.023 (5)
Epididymis(L)	(g/100g)	0.104 ±0.011 (5)	0.106 ±0.011 (5)	0.108 ±0.019 (5)
Epididymides	(g/100g)	0.212 ±0.028 (5)	0.216 ±0.026 (5)	0.220 ±0.042 (5)
Ventral prostate	(g/100g)	0.112 ±0.008 (5)	0.112 ±0.013 (5)	0.130 ±0.019 (5)
Dorsolateral prostate	(g/100g)	0.082 ±0.016 (5)	0.084 ±0.018 (5)	0.108 ±0.019 (5)
Seminal vesicle	(g/100g)	0.260 ±0.029 (5)	0.266 ±0.021 (5)	0.282 ±0.051 (5)
Brain	(g/100g)	0.616 ±0.029 (5)	0.620 ±0.080 (5)	0.614 ±0.090 (5)
Spleen	(g/100g)	0.190 ±0.031 (5)	0.204 ±0.031 (5)	0.196 ±0.023 (5)
Thymus	(mg/100g)	176.78 ±44.85 (5)	203.18 ±49.60 (5)	162.50 ±26.20 (5)
Pituitary gland	(mg/100g)	3.24 ±0.27 (5)	3.00 ±0.16 (5)	3.46 ±0.15 (5)
Thyroid	(mg/100g)	5.74 ±0.68 (5)	5.90 ±1.01 (5)	5.68 ±0.45 (5)
Adrenals	(mg/100g)	14.46 ±0.71 (5)	14.50 ±0.98 (5)	14.94 ±1.59 (5)
Final body weight	(g)	324.40 ±37.38 (5)	331.24 ±38.43 (5)	316.48 ±41.22 (5)

Values are shown as Mean ± S.D..

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

* Significantly different from vehicle control at P<0.05.

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

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

Findings	Male		
	0	80	400
	(mg/kg/day)		
	ss	ss	ss
	4 ^{a)}	4	4
No abnormalities detected	3	4	4
Kidney			
Pelvic dilatation, unilateral	1	0	0

ss: scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals examined.

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

Findings	Male		
	0	80	400
	(mg/kg/day)		
	ss	ss	ss
	4 ^{a)}	4	4
No abnormalities detected	4	4	4

ss: scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals examined.

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

Findings	Male		
	0	80	400
	(mg/kg/day)		
	ss	ss	ss
	4 ^{a)}	4	4
No abnormalities detected	4	4	4

ss: scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals examined.

Table 11-4 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats

Summary of macroscopic examinations: Twenty-eight-day treatment

Findings	Male		
	0	80	400
	(mg/kg/day)		
	ss	ss	ss
	5 ^{a)}	5	5
No abnormalities detected	4	3	5
Glandular stomach			
Blackish region of mucosa	0	1	0
Kidney			
Pelvic dilatation, unilateral	0	1	0
Axillar lymph node			
Enlargement, unilateral	1	0	0
Skin			
Erosion	1	0	0

ss: scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals examined.

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

Findings	Grade	Male		
		0	80	400
		(mg/kg/day)		
		ss	ss	ss
		4 ^{a)}	4	4
Liver				
No abnormalities detected		4/4 ^{b)}	---	4/4
Kidney				
No abnormalities detected		3/4	---	4/4
Dilatation/Pelvis	+	1/4	---	0/4
Testis				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4
Ventral prostate				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4
Dorsolateral prostate				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4
Bone marrow				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4
Spleen				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4
Thymus				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4

ss: scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals autopsied.

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

---: Not examined.

+: slight.

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

Findings	Grade	Male		
		0	80	400
		(mg/kg/day)		
		SS	SS	SS
		4 ^{a)}	4	4
Liver				
No abnormalities detected		4/4 ^{b)}	---	4/4
Kidney				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4
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
Spleen				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4
Thymus				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4

ss: scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals autopsied.

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

---: Not examined.

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

Findings	Grade	Male			(mg/kg/day)
		0	80	400	
		SS	SS	SS	
		4 ^{a)}	4	4	
Liver					
No abnormalities detected		4/4 ^{b)}	---	4/4	
Kidney					
No abnormalities detected		4/4	---	4/4	
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	
Spleen					
No abnormalities detected		4/4	---	4/4	
Thymus					
No abnormalities detected		4/4	---	4/4	

ss: scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals autopsied.

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

---: Not examined.

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

Summary of histopathological examinations. Twenty-eight-day treatment					
Findings	Grade	Male			(mg/kg/day)
		0	80	400	
		ss	ss	ss	
		5 ^{a)}	5	5	
Trachea					
No abnormalities detected		5/5 ^{b)}	---	5/5	
Lung					
No abnormalities detected		5/5	---	4/5	
Hemorrhage	+	0/5	---	1/5	
Submandibular gland					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Forestomach					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Glandular stomach					
No abnormalities detected		5/5	0/1	5/5	
Necrosis/Fundic mucosa/Focal	+	0/5	1/1	0/5	
Duodenum					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Jejunum					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Ileum					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Cecum					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Colon					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Rectum					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Pancreas					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Liver					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Heart					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Kidney					
No abnormalities detected		5/5	0/1	5/5	
Dilatation/Pelvis	++	0/5	1/1	0/5	
Urinary bladder					
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.

Table 12-5 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	80	400	
		ss	ss	ss	
		5 ^{a)}	5	5	
Testis					
No abnormalities detected		5/5 ^{b)}	---	5/5	
Epididymis					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Ventral prostate					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Dorsolateral prostate					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Coagulating gland					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Seminal vesicle					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Spinal cord					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Sciatic nerve					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Bone marrow					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Axillar lymph node					
No abnormalities detected		4/5	---	5/5	
Plasmacytosis/Unilateral	++	1/5	---	0/5	
Mesenteric lymph node					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Spleen					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Thymus					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Thyroid					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Parathyroid					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Adrenal					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Eye ball					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	
Skeletal muscle					
No abnormalities detected		5/5	---	5/5	

ss: scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals autopsied.

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

---: Not examined.

++: moderate.

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

Summary of histopathological examinations. Twenty-eight-day treatment					
Findings	Grade	Male			(mg/kg/day)
		0	80	400	
		ss	ss	ss	
		5 ^{a)}	5	5	
		Bone			
No abnormalities detected		5/5 ^{b)}	---	5/5	
Skin					
Ulcer	++	1/1	---	---	
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.

++: moderate.