

## 最 終 報 告 書

遺伝子発現量解析のための  
*o*-Anisidine hydrochloride 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



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 19 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 .....	11
15.8 体重測定 .....	12
15.9 摂飢量測定 .....	12
15.10 尿検査 .....	12
15.11 血液検査 .....	13
15.12 病理学的検査 .....	16
15.13 統計学的方法 .....	20
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 .....	20
17. 試験成績 .....	20
17.1 一般状態 .....	20
17.2 詳細な一般状態 .....	20
17.3 機能検査 .....	20

17.4 体 重 .....	20
17.5 摂餌量 .....	20
17.6 尿検査 .....	20
17.7 血液検査 .....	21
17.8 病理学的検査 .....	21
18. 考 察 .....	24
19. 参考文献 .....	26

#### Figures

1 Body weights.....	27
2 Food consumption .....	28

#### Tables

1 Summary of general clinical observations .....	29
2 Summary of detailed clinical observations.....	30
3 Summary of functional observations.....	34
4 Summary of body weights.....	35
5 Summary of food consumption .....	36
6 Summary of urinalyses .....	37
7 Summary of hematological examinations .....	40
8 Summary of blood chemical examinations .....	44
9 Summary of absolute organ weights .....	48
10 Summary of relative organ weights.....	52
11 Summary of macroscopic examinations .....	56
12 Summary of histopathological examinations .....	60

#### Appendices

1 General clinical observations of individual animals .....	66
2 Detailed clinical observations of individual animals.....	69
3 Functional observations individual animals .....	72
4 Body weights of individual animals .....	73
5 Food consumption of individual animals .....	85
6 Uralytic data of individual animals .....	86
7 Hematological data of individual animals .....	92
8 Blood chemical data of individual animals .....	104
9 Absolute organ weights of individual animals .....	116
10 Relative organ weights of individual animals .....	128
11 Pathological findings of individual animals .....	140

## 1. 表 題

遺伝子発現量解析のための *o*-Anisidine hydrochloride 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

*o*-Anisidine hydrochloride 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、*o*-Anisidine hydrochloride 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。

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

## 6. GLP 基準

適用しなかった。

## 7. 動物愛護

LABORATORY ANIMAL SCIENCE (1987) by the American Association for Laboratory Animal Science を参考に当試験施設が作成した「日田事業所動物実験に関する指針」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 6月 28日
動物入荷日	2012年 7月 3日
投与開始日	2012年 7月 12日
1回投与後解剖日	2012年 7月 13日
7日間投与後解剖日	2012年 7月 19日
14日間投与後解剖日	2012年 7月 26日
28日間投与後解剖日	2012年 8月 9日
試験終了日	2013年 2月 19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

2013年 2月 19日

試験責任者

寶珠山 五月

### 13. 要 約

*o*-Anisidine hydrochloride 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)ラットに精製水に溶解させた *o*-Anisidine hydrochloride を 1、7、14 又は 28 日間毎日強制経口投与した。投与用量は 0 (精製水)、140 及び 700 mg/kg/day とし、1、7 及び 14 日間投与後に解剖するサテライト群には 1 群あたり 4 匹、28 日間投与群には 1 群あたり 5 匹を使用した。投与期間中は全例について一般状態観察、体重測定及び摂餌量測定を行い、各投与期間終了後に CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 混合ガス麻酔下で血液を採取した後解剖して、血液検査、病理学的検査及び遺伝子発現量解析のための試料採取を実施した。加えて、28 日間投与群については、投与期間中に詳細な一般状態観察及び機能検査を行い、最終投与日の翌日に尿を採取して尿検査を行った。

一般状態観察では、700 mg/kg 群で自発運動低下、呼吸数減少、半眼、褐色尿、閉瞼、紅涙及び流涎がみられた。

体重では投与 3 日目以降に 700 mg/kg 群で低値又は低値傾向がみられた。

摂餌量では投与 3 日目に 700 mg/kg 群で低値がみられた。

尿検査では 700 mg/kg 群で尿量の高値、尿の色調の淡褐色化、潜血並びに尿沈渣中の赤血球及び白血球の増加がみられた。

血液学的検査では、140 mg/kg 群で 14 日間投与後から網状赤血球数比率の高値、28 日間投与後に MCHC の低値並びにハイツツ小体比率及びメトヘモグロビン比率の高値、700 mg/kg 群で 7 日間投与後から赤血球数及び MCHC の低値並びに網状赤血球数比率の高値、7 及び 28 日間投与後に Hb の低値、7 日間投与後に Ht の低値及び白血球数の高値、14 日間投与後から MCV 及び MCH の高値、28 日間投与後にハイツツ小体比率及びメトヘモグロビン比率の高値がみられた。

血液生化学的検査では、700 mg/kg 群で 1 回投与後から総ビリルビンの高値、1 回及び 28 日間投与後に ALT の高値、7 日間投与後から BUN の高値がみられた。

器官重量では、700 mg/kg 群で 7 日間投与後から脾臓の絶対及び相対重量の高値、7 日間投与後に肝臓の相対重量の高値、14 日間投与後に肝臓の絶対及び相対重量の高値、28 日間投与後に腎臓の相対重量の高値がみられた。

剖検では、140 mg/kg 群で 28 日間投与後に脾臓の黒色化、700 mg/kg 群で 1 回、7 及び 14 日間投与後に肝臓の腫大、7 日間投与後から脾臓の黒色化及び腫大、28 日間投与後に腎臓の暗褐色化、腫大及び白色部がみられた。

病理組織学的検査では、140 mg/kg 群で 7 日間投与後から脾臓のうつ血、28 日間投与後に脾臓のヘモジデリン沈着及び髄外造血亢進、700 mg/kg 群で 1 回投与後から肝臓の小葉中心性肝細胞肥大、1 回投与後に肝臓の小葉中心性肝細胞グリコーゲン蓄積及び腎臓の皮質及び髓質の近位尿細管空胞変性、7 日間投与後から肝臓の髄外造血亢進、腎臓の皮質の遠位尿細管拡張、骨髄の造血亢進並びに脾臓のうつ血及び髄外造血亢進、7 及び 28 日間投与後に腎臓の乳頭管好塩基性変化、14 日間投与後から肝臓の小葉中心性肝細胞くもり硝子変性、腎臓の乳頭壞死及び脾臓のヘモジデリン沈着、28 日間投与後に腎臓の皮質の近位尿細管ヘモジデリ

ン沈着、皮質及び髓質の遠位尿細管拡張、皮質の近位尿細管硝子滴及び皮質の近位尿細管再生、膀胱の尿路上皮の増殖性変化がみられた。

詳細な一般状態観察及び機能検査では被験物質投与による影響はみられなかった。

以上のとおり、本試験条件下において、*o*-Anisidine hydrochloride の投与により肝臓、腎臓、膀胱、血液及び脾臓への影響並びに骨髄での変化が認められた。肝臓、腎臓、血液及び脾臓への影響並びに骨髄での変化は、いずれも投与期間の初期から認められた。

## 14. 試験材料

### 14.1 被験物質

#### a) 名称等

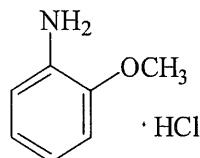
名 称	<i>o</i> -Anisidine hydrochloride
CAS 番号	134-29-2

#### b) 製造元及びロット番号

製造元	東京化成工業
ロット番号	K7PXJ

#### c) 構造式等

##### 構造式



分子式 C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>NO·HCl

分子量 159.6134

#### d) 純度等

純 度 99.6 area% (HPLC 面積百分率)

被験物質は純度 100% として取り扱った。

#### e) 物理化学的性状

水溶状 ほとんど澄明

常温における性状 白色～ごくうすい黄色の結晶～粉末

安定性 適切な条件下においては安定

#### 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 1.3～6.9°C (許容範囲 1～10°C)

保管場所及び期間 保冷庫 005、2012年4月23日～2012年4月24日

保冷庫 007、2012年4月24日～2012年7月30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「*o*-Anisidine hydrochloride 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 X02-0257、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

精製水

#### b) 選択理由

被験物質液の調製法を精製水及び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は 20 w/v% の濃度で均一に懸濁したが、精製水には 20 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、精製水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	精製水
グレード	日本薬局方
ロット番号	PC120313

#### 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・リバ一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 8 日後まで馴化し、すべての動物に異常がみられなかったため、当日測定した体重を用いて体重層別無作為抽出法で群分けし、51 匹を試験に使用した。群分け後は投与開始まで個別飼育で馴化した。群分けにより外れた動物は試験から除外した。また、受入れから投与開始までは、一般状態及び排泄物を毎日 1 回以上観察した。

動物は、群分け前は尾部へ油性インクを塗布し、群分け後は耳鉗を付けて識別した。ケージにはラベルを付け、ラックは試験番号を表示してそれぞれ識別した。

投与開始時の動物の週齢は 5 週齢、体重範囲は 136.6～170.6 g であり、全例の体重が全體の平均体重±20% の範囲内であることを確認した。

#### 14.4 飼育環境

動物は、検疫・馴化期間中を含む全飼育期間を通して、温度 21～25°C、相対湿度 40～70%、換気回数 10～15 回/時間、明暗サイクル 12 時間間隔（7 時点灯、19 時消灯）に設定したバリアーシステムの飼育室（検疫期間中は検疫室 1、検疫終了後は飼育室 3）に収容した。温度及び相対湿度の実測値は、それぞれ 22.5～24.1°C 及び 50.0～62.2% であった。

ケージは、群分け前はステンレス製金網床ケージ（W260×D380×H180 mm）、群分け後はステンレス製金網床ケージ（W165×D300×H150 mm）を使用した。

トレイは、検疫期間終了時及び群分け時に交換し、群分け後は週 2 回の頻度で交換した。さらに、動物を飼育室から解剖室に搬出する際にも交換した。また、褐色尿がみられた動物については、尿の観察が出来るように、異常尿の確認時にも交換した。給餌器、ケージ及びラックは、群分け時に交換した。また、サテライト群（1、7 及び 14 日間投与群）については解剖室に搬出する際にもラックを交換した。

飼料は固型飼料 MF（ロット番号 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°C、30 分間）したものを使い、それら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「*o*-Anisidine hydrochloride 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 P12-0098、非 GLP 試験）を実施した。用量設定試験では精製水で調製した被験物質液を、各群 3 匹の 5 週齢の Crl:CD(SD)雄ラットに 0、50、250、500 及び 1000 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、250 mg/kg/day 以上の用量で自発運動低下及び脾臓の黒色化、500 mg/kg/day 以上の用量で褐色尿、肝臓及び脾臓重量の高値並びに脾臓の腫大、1000 mg/kg/day でチアノーゼ、体重の低値傾向及び腎臓の腫大が認められた。1000 mg/kg 群でみられた体重低値は軽度であったものの、投与期間の後半にチアノーゼの発現がみられ、肝臓及び脾臓重量が著しい高値を示したことから、1000 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 700 mg/kg/day を高用量とし、低用量として 140 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、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)	140	5	2.80
	低用量 (7日間投与)	140	5	2.80
	低用量 (14日間投与)	140	5	2.80
	低用量 (28日間投与)	140	5	2.80
	高用量 (1回投与)	700	5	14.0
	高用量 (7日間投与)	700	5	14.0
	高用量 (14日間投与)	700	5	14.0
	高用量 (28日間投与)	700	5	14.0

## 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、乳鉢内で粉碎した後、精製水を加えて溶解させた。その後、精製水を加えて定容し14.0w/v%の被験物質液を調製した。さらに、14.0w/v%の被験物質液の一部を採取し、精製水を加えて希釈し、2.80w/v%の被験物質液を調製した。

調製した各濃度の被験物質液及び投与に用いる媒体は蓋付きプラスチック容器にそれぞれ小分けし、被験物質調製室の保冷庫7にて冷所（実測値2～10°C、許容範囲1～10°C）で保管した。被験物質液は調製後10日以内に使用した。

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

### b) 被験物質液の均一性及び安定性の確認

20.0及び0.200w/v%の被験物質液の冷所保管での12日間の安定性を、当試験施設においてX02-0257で高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により確認した。

保管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20.0及び0.200w/v%の被験物質液でいずれも100%と100±10%以内であったことから、保管条件下で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14.0及び2.80w/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X02-0257でHPLCにより確認した。

測定した被験物質濃度が設定値に対し、14.0 及び 2.80 w/v%の被験物質液とともに 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

1、7、14 又は 28 日間毎日 1 回、強制経口投与した。投与は 9:35～11:18 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）に次表の項目を検査した。

反応性及び握力は詳細な一般状態観察と同様に試験群が判別できない状態で検査した。

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

### 15.8 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疑われたため、低用量群についても検査を行った。

項目	方 法	機器
尿量 (Urine volume)	メスシリンドラーによる計量	—
色調 (Color)	肉眼観察	—
濁り (Turbidity)	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 (アーカレイ)

B: システム生物顕微鏡 BX41 (オリンパス)

## 15.11 血液検査

### a) 採血及び検査試料

各試験群について最終投与日の午後から絶食し、翌日（絶食開始 16~20 時間後）、CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>混合ガス麻酔（CO<sub>2</sub>:O<sub>2</sub>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。

28 日間投与群については、さらにパクスジーン RNA 採血管（日本ベクトン・ディッシュキンソン）を用いて血液を採取し、転倒混和後、室温で 2 時間以上静置し、-20°C で 24 時間保管した。その後、-80°C で保管し、ドライアイスを同封して安全性評価技術研究所に送付した。

検査試料	作製方法
全 血	EDTA-2K 添加採血びん SB-41（ロット番号 G9059、シスメックス）で採血した血液
血 漿	くえん酸三ナトリウム二水和物（ロット番号 STP5940、和光純薬工業）の 3.2 w/v%水溶液を 100 μL 添加したガラス製試験管で採血し、遠心分離（3000 r.p.m.×10 mins）して得た血漿
血 清	ガラス製試験管で採血し遠心分離（3000 r.p.m.×10 mins）して得た血清

b) 血液学的検査

全血及び血漿を用い次の項目を測定した。さらに、28日間投与群については、全血を用いて Van Assendelft 法によるメトヘモグロビン比率 (Met Hb) の測定を行った。メトヘモグロビン比率の測定には紫外可視分光光度計 U-2910 (日立ハイテクノロジーズ) を用いた。サテライト群についてはハインツ小体比率、メトヘモグロビン比率、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、機器による網状赤血球数比率及び白血球百分率の測定ができたため、ハインツ小体比率検査を除いて、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	
ハインツ小体比率 (Hein-B)	ブリリアントグリーン染色	D
白血球数 (WBC)	フローサイトメトリー法	C
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	
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	E

検査試料 C には全血、D には全血を用いた塗抹標本、E 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: 生物顕微鏡 (オリンパス、ニコン)

E: 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fosファターゼ、尿素窒素、クレアチニン及び総ビリルビンを測定し、その他の項目は測定しなかつた。

項目	方 法	機器
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)	UV 法 JSCC 標準化対応法	F
アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)	UV 法 JSCC 標準化対応法	
アルカリ性fosファターゼ (ALP)	p-Nitrophenyl phosphate 法	
コリンエステラーゼ (ChE)	Butyrylthiocholine iodide 法	
γグルタミルトランスペプチダーゼ (γ-GTP)	L-γ-glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide 法	
総コレステロール (T-Chol)	COD·ESPAS 法	
トリグリセリド (TG)	GPO·ESPAS グリセロール消去法	
尿素窒素 (BUN)	Urease · GIDH 法	
クレアチニン (Creatinine)	Creatininase · F-DAOS 法	
総蛋白 (T-Protein)	Biuret 法	
アルブミン (Albumin)	Bromocresol green 法	—
A/G 比 (A/G ratio)	Albumin T - Protein – Albumin	
血糖 (Glucose)	Hexokinase · G-6-PDH 法	
総ビリルビン (T-Bil)	酵素法	
総胆汁酸 (TBA)	酵素サイクリング法	F
無機リン (IP)	Fiske-Subbarow 法	
カルシウム (Ca)	OCPC 法	
ナトリウム (Na)	Crown-Ether 膜電極法	
カリウム (K)	Crown-Ether 膜電極法	G
塩素 (Cl)	MO 膜法	

使用機器 F: 生化学自動分析装置 7170 形 (日立製作所)

G: 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樂死させ、体表、開孔部、皮下、頭蓋腔、胸腔、腹腔及び骨盤腔とその内容について肉眼的観察を行った。

### b) 組織採取及び器官重量測定

#### (a) サテライト群

1、7 及び 14 日間投与群について、剖検時に次表の器官・組織を採取した。また、2 例(No. 5 及び 6)を除く 7 日間投与群の全例及び 14 日間投与群の全例については、胃に 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て採取した。

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	骨髓（大腿骨）、脾臓*、胸腺*
内分泌系	下垂体*、甲状腺*（上皮小体を含む）、副腎*

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）、脾臓、肝臓*
心・血管系	心臓*
泌尿器系	腎臓*、膀胱
生殖器系	精巣*、精巣上体*、腹葉前立腺*、背側葉前立腺*、精嚢*（凝固腺を含む）
神経系	脳*（大脳、小脳及び橋を含む）、脊髄、坐骨神経
造血器系	骨髓（大腿骨）、腋窩リンパ節、腸間膜リンパ節、脾臓*、胸腺*
内分泌系	下垂体*、甲状腺*（上皮小体を含む）、副腎*
感覚器	眼球
筋・骨格系	骨格筋（大腿部）、骨（大腿骨）
皮膚・付属器	乳腺

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

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

### c) 組織の固定及び保存

採取した器官・組織は、以下のように固定及び保存した。

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

腎臓は、左右別々に重量を測定後、右側の中央部から乳頭を含むように横断で 4~5 mm 幅の組織片を採取した。組織片から被膜を取り除いた後、正中で二分した。半分を幅 3 mm 以内に細切り *RNAlater* に浸漬した。残りの半分から乳頭、髓質内帯、髓質外帯及び皮質を分けてサンプリングし、それぞれ *RNAlater* に浸漬した。残りの部分は氷冷後、-80°C で保存した。左側は 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した。なお、左右いずれかのみに病変が認められた場合は、病変部を 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定し、反対側を遺伝子発現量解析及び-80°C 凍結保存に供した。

精巣は、左右別々に重量を測定後、右側を 4 分割し、組織片の半分を *RNAlater* に浸漬した。残りの半分は氷冷後、-80°C で保存した。左側は変法デビットゾン液で固定した。

精巣上体は、重量を測定後、左右とも変法デビットゾン液で固定した。

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

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

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

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

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

下垂体は、重量を測定後、*RNAlater* に浸漬した。

*RNAlater* に浸漬した各組織は *RNAlater* を組織に浸潤させるため、脾臓は 4°C で 72

時間、その他の組織は 4°C で 24 時間放置した後、*RNAlater* に浸漬させたまま -80°C で凍結し、ドライアイスを同封して安全性評価技術研究所に送付した。-80°C 凍結保存した組織についてもドライアイスを同封して安全性評価技術研究所に送付した。

その他の器官・組織は、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

d) 病理組織学的検査

(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、骨髓（大腿骨）、脾臓、胸腺のパラフィン包埋薄切切片を作製し、ヘマトキシリノ・エオジン（HE）染色後、光学顕微鏡的に検査した。また、7 及び 14 日間投与群では胃について同様に検査を行った。骨髓（大腿骨）は切り出し前に 10% 蟻酸・ホルマリン液による脱灰を行った。

さらに、1 回投与群では肝臓及び腎臓、7 日間投与群では胃、肝臓、腎臓、骨髓及び脾臓、14 日間投与群では肝臓、腎臓、骨髓及び脾臓について、高用量群で被験物質の投与に関連した変化が疑われたため、低用量群についても病理組織学的検査を行った。また、肝臓について、1 回投与群の高用量群の HE 染色標本において肝細胞の空胞化がみられ、グリコーゲンの蓄積が疑われたため、対照群の 2 例（No. 1 及び 2）及び高用量群の 2 例（No. 36 及び 37）について PAS 反応による検査を行った。脾臓についても、14 日間投与群の高用量群の HE 染色標本において赤脾髄に褐色色素の増加がみられ、ヘモジデリンの沈着が疑われたため、対照群の 2 例（No. 9 及び 10）及び高用量群の 2 例（No. 43 及び 44）についてベルリン青染色による検査を行った。

(b) 28 日間投与群

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

また、肝臓、腎臓、骨髓及び脾臓については、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。さらに、脾臓について、高用量群の HE 染色標本において赤脾髄に褐色色素の増加がみられ、ヘモジデリンの沈着が疑われたため、対照群の 2 例（No. 13 及び 14）、低用量群の 2 例（No. 33 及び 34）及び高用量群の 2 例（No. 48 及び 51）についてベルリン青染色による検査を行った。腎臓についても、高用量群の HE 染色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ため、対照群の 2 例（No. 16 及び 17）及び高用量群の 2 例（No. 47 及び 50）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。また、膀胱について、アニリン系化合物である被験物質と膀胱がんとの関連性について検討するため、対照群及び高用量群の全例について抗 PCNA 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)

700 mg/kg 群で自発運動低下及び呼吸数減少が 17 例、褐色尿が 13 例、半眼が 10 例、流涎が 2 例、閉瞼及び紅涙が各 1 例にみられた。自発運動低下は投与 1 日目から観察されたが投与 3 週目にはほぼ消失した。呼吸数減少及び半眼は投与 1 日目から観察されたが、投与 5 日目に消失した。褐色尿は投与期間を通して観察された。流涎、閉瞼及び紅涙は単発的な発現であった。140 mg/kg 群及び対照群では異常は認められなかった。

#### 17.2 詳細な一般状態 (Table 2, Appendix 2)

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)

700 mg/kg 群で測定 0～10 分の時間帯に自発運動量の有意な高値がみられたが、一過性の変動であったことから、被験物質投与とは関係のない変化と考えた。握力では被験物質投与群に有意な変動は認められず、反応性検査においても被験物質投与群及び対照群に異常は認められなかった。

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

700 mg/kg 群で投与 3、7、14、21 及び 28 日目に有意な低値又は低値傾向（それぞれ対照群の 91.8%、91.7%、92.2%、86.0%、85.8%）が認められた。140 mg/kg 群では有意な変動は認められなかった。

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

700 mg/kg 群で投与 3 日目に有意な低値（対照群の 81.7%）がみられたが、その後は有意な変動は認められなかった。140 mg/kg 群では有意な変動は認められなかった。

#### 17.6 尿検査 (Table 6, Appendix 6)

700 mg/kg 群で尿量の有意な高値がみられたほか、尿の色調の淡褐色化が 5 例全例、潜血（3+）が 1 例、尿沈渣中の赤血球増加及び白血球増加が各 2 例に認められた。140 mg/kg 群及び対照群では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回投与群において、700 mg/kg 群で好中球比率の有意な高値がみられた。140 mg/kg 群では有意な変動は認められなかった。

7日間投与群において、700 mg/kg 群で赤血球数、Hb、Ht 及び MCHC の有意な低値、網状赤血球数比率及び白血球数の有意な高値が認められたほか、リンパ球比率及び好酸球比率の有意な低値、好中球比率及び単球比率の有意な高値がみられた。140 mg/kg 群では有意な変動は認められなかった。

14 日間投与群において、700 mg/kg 群で赤血球数及び MCHC の有意な低値、MCV、MCH 及び網状赤血球数比率の有意な高値が認められた。140 mg/kg 群では網状赤血球数比率の有意な高値が認められた。

28 日間投与群において、700 mg/kg 群で赤血球数、Hb 及び MCHC の有意な低値、MCV、MCH、網状赤血球数比率、ハイツ小体比率及びメトヘモグロビン比率の有意な高値が認められたほか、好中球比率の有意な高値、リンパ球比率及び好酸球比率の有意な低値、PT 及び APTT の有意な短縮がみられた。140 mg/kg 群では、MCHC の有意な低値、網状赤血球数比率及びハイツ小体比率の高値傾向、メトヘモグロビン比率の有意な高値が認められたほか、好酸球比率の有意な低値、PT 及び APTT の有意な短縮がみられた。

### b) 血液生化学的検査 (Table 8、Appendix 8)

1回投与群において、700 mg/kg 群で ALT 及び総ビリルビンの有意な高値が認められた。140 mg/kg 群では BUN 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。

7 及び 14 日間投与群において、700 mg/kg 群で BUN 及び総ビリルビンの有意な高値が認められた。140 mg/kg 群では有意な変動はみられなかった。

28 日間投与群において、700 mg/kg 群で ALT 及び総ビリルビンの有意な高値、BUN の高値傾向が認められたほか、アルブミン、A/G 比及び無機リンの有意な高値がみられた。140 mg/kg 群では有意な変動は認められなかった。

## 17.8 病理学的検査

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

1回投与群において、700 mg/kg 群で甲状腺の絶対及び相対重量の有意な低値がみられた。140 mg/kg 群では有意な変動は認められなかった。

7日間投与群において、700 mg/kg 群で肝臓の相対重量の有意な高値(対照群の 114.4%)、脾臓の絶対及び相対重量の有意な高値(対照群の 242.5% 及び 263.7%) が認められたほか、胸腺及び副腎の絶対重量の有意な低値がみられた。140 mg/kg 群では有意な変動は認められなかった。

14 日間投与群において、700 mg/kg 群で肝臓の絶対及び相対重量の有意な高値(対照群の 123.2% 及び 125.4%)、脾臓の絶対及び相対重量の有意な高値(対照群の 299.7% 及び 303.5%) が認められたほか、甲状腺の相対重量の有意な高値がみられた。140 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、700 mg/kg 群で腎臓の相対重量の有意な高値(対照群の

116.0%）、脾臓の絶対及び相対重量の有意な高値（対照群の 251.4% 及び 301.0%）が認められたほか、解剖時体重が有意な低値（対照群の 82.9%）を示し、精巣上体、腹葉前立腺及び下垂体の絶対重量の有意な低値、脳の相対重量の有意な高値がみられた。140 mg/kg 群では下垂体の絶対重量の有意な低値がみられた。

b) 剖 檢 (Table 11、Appendix 11)

1 回投与群において、700 mg/kg 群で肝臓の腫大が 4 例中 1 例に認められた。140 mg/kg 群及び対照群では異常はみられなかった。

7 日間投与群において、700 mg/kg 群で肝臓の腫大が 4 例中 1 例、脾臓の黒色化及び腫大が 4 例全例に認められたほか、前胃の粘膜隆起部が 1 例にみられた。140 mg/kg 群及び対照群では異常はみられなかった。

14 日間投与群において、700 mg/kg 群で肝臓の腫大が 4 例中 1 例、脾臓の黒色化及び腫大が 4 例全例に認められた。140 mg/kg 群では右側腎臓の腎盂拡張が 1 例でみられた。対照群では異常は認められなかった。

28 日間投与群において、700 mg/kg 群で腎臓の両側性の暗褐色化が 5 例全例、両側性的腫大及び白色部が各 1 例、脾臓の黒色化及び腫大が 5 例全例に認められた。140 mg/kg 群では脾臓の黒色化が 3 例で認められた。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)

1 回投与群において、700 mg/kg 群で肝臓の小葉周辺性肝細胞グリコーゲン蓄積（軽度）が 4 例中 2 例、小葉中心性肝細胞肥大（軽度）が 1 例、腎臓の皮質及び髓質の近位尿細管空胞変性（軽度）が 1 例に認められた。対照群では肝臓の限局性肝細胞壊死（軽度）が 1 例にみられた。140 mg/kg 群では検査を行った肝臓及び腎臓に異常は認められなかった。

7 日間投与群において、700 mg/kg 群で肉眼的に前胃の粘膜隆起部がみられた 1 例に前胃の潰瘍（軽度）及び限局性扁平上皮過形成（中等度）が認められた。また、肝臓では小葉中心性肝細胞肥大（軽度）が 4 例中 2 例、髓外造血亢進（軽度）が 1 例に認められたほか、限局性肝細胞壊死（軽度）が 1 例でみられた。腎臓では乳頭管好塩基性変化（軽度）が 2 例、皮質の遠位尿細管拡張（軽度）が 1 例に認められた。骨髄では造血亢進（軽度）が 2 例に認められ、脾臓でうっ血（中等度）が 4 例全例、髓外造血亢進（軽度）が 3 例認められた。140 mg/kg 群では脾臓のうっ血（軽度）が 1 例認められたほか、腎臓の被膜下囊胞（軽度）が 1 例にみられた。対照群では異常は認められなかった。

14 日間投与群において、700 mg/kg 群で肝臓の小葉中心性肝細胞肥大（軽度）及び小葉中心性肝細胞くもり硝子変性（軽度）が 4 例全例、髓外造血亢進（軽度）が 3 例、腎臓の皮質の遠位尿細管拡張（軽度）及び乳頭壞死（軽度）が各 1 例、骨髄の造血亢進（軽度）が 3 例、脾臓のうっ血（中等度～重度）及びヘモジデリン沈着（軽度）が 4 例全例、髓外造血亢進（軽度）が 3 例に認められた。140 mg/kg 群では脾臓のうっ血（軽度）が 1 例に認められたほか、腎臓の皮質の近位尿細管好塩基性変化（軽度）及び腎盂拡張（軽度）が 1 例にみられた。対照群では腎臓の被膜下囊胞（中等度）が 1 例にみられた。

28 日間投与群において、700 mg/kg 群で肝臓の小葉中心性肝細胞肥大（軽度）及び小葉中心性肝細胞くもり硝子変性（軽度）が 5 例中 4 例、髓外造血亢進（軽度）が 3 例に

認められた。また、腎臓では、乳頭管好塩基性変化（軽度）が 4 例、皮質の近位尿細管ヘモジデリン沈着（ごく軽度）が 5 例全例、皮質の遠位尿細管拡張（軽度）が 2 例、皮質及び髓質の遠位尿細管拡張（軽度）が 2 例、皮質の近位尿細管硝子滴（軽度）が 2 例、乳頭壞死（軽度～中等度）が 2 例、皮質の近位尿細管再生（軽度）が 2 例に認められた。骨髓では造血亢進（軽度）が 4 例に認められ、脾臓でうつ血（中等度～重度）、ヘモジデリン沈着（中等度～重度）及び髓外造血亢進（中等度）が 5 例全例に認められた。140 mg/kg 群では脾臓のうつ血（軽度～中等度）及びヘモジデリン沈着（軽度～中等度）が 5 例全例、髓外造血亢進（軽度～中等度）が 4 例に認められたほか、腎臓の被膜下囊胞（軽度）が 1 例にみられた。対照群では肺の出血（軽度）が 1 例にみられた。

なお、1 回投与群の対照群及び 700 mg/kg 群の各 2 例について実施した肝臓の PAS 反応による検査では、対照群では肝細胞内に陽性物質がごくわずかしか認められなかつたが、高用量群では肝細胞の空胞内又は細胞質内に陽性物質の増加が認められ、肝細胞内にグリコーゲンが蓄積していることが確認された。14 日間投与群の対照群及び 700 mg/kg 群、28 日間投与群の対照群、140 及び 700 mg/kg 群の各 2 例について実施した脾臓のベルリン青染色による検査の結果、対照群では陽性物質が認められなかつた又は赤脾髄にわずかに認められたのみであったが、140 及び 700 mg/kg 群では赤脾髄に陽性物質の増加が認められ、褐色色素がヘモジデリンであることが確認された。また、700 mg/kg 群では、同一標本上にある腎臓においても皮質の近位尿細管上皮細胞内に陽性物質がわずかに認められ、ヘモジデリン沈着が確認された。28 日間投与群の対照群及び 700 mg/kg 群の各 2 例について実施した腎臓の抗  $\alpha$  2u-グロブリン抗体による免疫組織学的検査の結果、対照群では皮質の近位尿細管上皮細胞に陽性物質がわずかに認められたのみであったが、700 mg/kg 群では皮質の近位尿細管上皮細胞に陽性物質が多く認められ、硝子滴が  $\alpha$  2u-グロブリンの沈着によるものであることが確認された。また、28 日間投与群の対照群及び 700 mg/kg 群の全例について実施した膀胱の抗 PCNA 抗体による免疫組織学的検査の結果、700 mg/kg 群で陽性細胞率が高値を示した。

## 18. 考 察

*o-Anisidine* は芳香族アミンの 1 つであり、ヒトでは発がん性の十分な証拠が得られていないが、実験動物では十分な証拠が得られている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 2B (ヒトに対して発がん性がある可能性がある) に分類されている (IARC, 1999)。実験動物を用いた発がん性試験としては、*o-Anisidine* の塩酸塩である被験物質 (*o-Anisidine hydrochloride*) を用いた 2 年間混餌投与試験が行われており、マウス及びラットの雌雄で膀胱の移行上皮がん又は乳頭腫、ラットの雄で腎孟の移行上皮がん及び甲状腺の濾胞細胞腫瘍の誘発が報告されている (NCI, 1978)。本試験においては被験物質投与により腎臓、膀胱、血液、脾臓及び肝臓への影響が認められ、骨髄にも変化がみられた。

泌尿器系への影響として、700 mg/kg 群において、投与 2 日目から褐色尿が観察され、7 日間投与後から腎障害を示す BUN の高値、28 日間投与後に尿量の高値、尿の色調の淡褐色化、尿潜血、尿沈渣中の赤血球及び白血球の増加並びに腎臓の相対重量の高値、腫大及び白色部がみられた。尿の着色は被験物質又はその代謝物の色に起因した変化と考えられたが、その他は、腎臓の病理組織学的検査において組織傷害及び修復性変化 (1 回投与後に皮質及び髓質の近位尿細管空胞変性、7 日間投与後に乳頭管好塩基性変化及び皮質の遠位尿細管拡張、14 日間投与後に乳頭壊死及び皮質の遠位尿細管拡張、28 日間投与後に乳頭管好塩基性変化、皮質又は皮質及び髓質の遠位尿細管拡張並びに乳頭壊死) が認められたことから、尿細管上皮の傷害を反映した変化と考えた。膀胱については、細胞増殖マーカーを用いた免疫組織化学的検査において、700 mg/kg 群で尿路上皮 (移行上皮) の増殖性変化がみられ、腫瘍発生につながる可能性が示唆された。

他の腎臓に対する影響として、700 mg/kg 群において 28 日間投与後に  $\alpha$  2u-グロブリンの蓄積による近位尿細管の硝子滴が確認された。 $\alpha$  2u-グロブリンの蓄積は雄ラット特有の変化であり毒性学的意義は低いと考えられるが、同時に皮質の近位尿細管再生も認められることから、尿細管上皮の傷害と関連している可能性も考えられた。また、同群では 28 日間投与後に腎臓の暗褐色化がみられたが、病理組織学的検査では皮質の近位尿細管へモジデリン沈着が認められたことから、後述する被験物質の溶血作用による変化と考えた。

血液に対する影響として、700 mg/kg 群において、血液学的検査において 7 日間投与後に赤血球数、Hb、Ht 及び MCHC の低値、14 日間投与後に赤血球数及び MCHC の低値、28 日間投与後に赤血球数、Hb 及び MCHC の低値が認められ、14 及び 28 日間投与後には MCV 及び MCH の高値もみられたことから、投与期間の初期から大球性貧血が生じたと考えられた。貧血の発現機序としては、血液生化学的検査及び病理学的検査において、赤血球の破壊亢進を示唆する種々の変化 (1 回投与後以降に総ビリルビンの高値、7 日間投与後以降に脾臓の黒色化及びうっ血、14 日間投与後以降に脾臓のヘモジデリン沈着) がみられ、28 日間投与後にハインツ小体比率及びメトヘモグロビン比率の高値が確認されたことから、メトヘモグロビン形成により脾臓での溶血が亢進したものと考えた。これに対し、700 mg/kg 群で 7 日間投与後以降に認められた網状赤血球数比率の高値、脾臓の髓外造血亢進及び骨髄の造血亢進は、上記の溶血性貧血への反応性変化と考えた。700 mg/kg 群で 7 日間投与後のみられた白血球数の高値も造血亢進に伴った変化と考えた。また、700 mg/kg 群で 7 日間投与後以

降に認められた脾臓の腫大及び重量の高値は、主にうつ血及びヘモジデリン沈着を反映した変化と考えられた。なお、血液への影響は、140 mg/kg 群においても 7 日間投与後から脾臓のうつ血、14 日間投与後から網状赤血球数比率の高値、28 日間投与後に MCHC の低値、ハイエンツ小体比率及びメトヘモグロビン比率の高値、脾臓の黒色化、ヘモジデリン沈着及び髓外造血亢進として認められた。

組織へのヘモジデリン沈着については、構造式中にメタクロロアニリンを有する化合物の 13 週間反復投与実験において回復困難な所見であることが報告されている（藤谷ら, 2004）。より長期の毒性試験では脾臓の線維化も回復困難な所見として認められ、細胞内に過剰に沈着したヘモジデリンによりマクロファージが崩壊し、放出された鉄イオンや毒性物質又はその代謝物が線維化を引き起こすと考えられている（Stefanski et al., 1990）。アニリンについては過剰な鉄イオンと活性酸素の産生が発がん性を含む脾臓毒性に関係していると考えられている（Khan et al., 1993; Ma et al., 2008）が、本試験においては 28 日間投与後にも脾臓の線維化病変は認められておらず、鉄イオンの放出は生じていないと推察した。

肝臓に対する影響として、700 mg/kg 群では、血液生化学的検査において 1 回投与後及び 28 日間投与後に肝細胞の障害を示す ALT の高値がみられた。病理学的検査においては、1 回投与後から 14 日間投与後まで肉眼的な腫大、7 及び 14 日間投与後に肝臓の相対重量の高値がみられ、組織学的には 1 回投与後に小葉中心性肝細胞肥大及び小葉周辺性肝細胞グリコーゲン蓄積、7 日間投与後に小葉中心性肝細胞肥大、14 及び 28 日間投与後に小葉中心性肝細胞肥大及びくもり硝子変性が認められた。肝細胞肥大及びくもり硝子変性は薬物代謝酵素の誘導を示す進行性変化と考えられ（原田ら, 2000）、投与期間の極めて初期に肝細胞障害及び機能低下の発現と考えられる逸脱酵素の上昇及びグリコーゲン蓄積がみられたものの、投与回数が増すにつれて進行性変化へと移行したと考えられた。なお、1 回投与後から 700 mg/kg 群でみられた総ビリルビンの高値は、胆汁うつ滞の指標の 1 つである ALP の高値がみられなかつたことから、前述した赤血球破壊の亢進による変化であり肝障害を示唆するものではないと判断した。

投与期間中に 700 mg/kg 群でみられた自発運動低下、呼吸数減少、半眼、閉瞼、紅涙、体重低値及び一過性の摂餌量低値は、肝臓、腎臓及び血液に対する毒性影響を反映したものと考えられた。また、7 日間投与後に 700 mg/kg 群でみられた前胃の粘膜隆起部は、組織学的に潰瘍及び限局性扁平上皮過形成であることが確認されたが、1 例のみの発現であり、このほかに消化管障害を示唆する変化が認められなかつたことから、当該動物でのストレスに起因した変化と判断した。その他、28 日間投与後に 700 mg/kg 群で精巣上体、腹葉前立腺及び下垂体の絶対重量の低値並びに脳の相対重量の高値がみられたが、解剖日体重が低値であり、病理組織学的検査を行わなかつた下垂体を除いてこれらの器官に器質的変化が認められなかつたことから、体重低値に関連した変動と考えた。同様に、28 日間投与後に 140 mg/kg 群でみられた下垂体の絶対重量の低値についても、相対重量には変動が認められなかつたことから、体重低値に関連した変動と考えた。

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投与期間の初期から肝臓、腎臓、血液及び脾臓への毒性影響が認められ、骨髓の変化もみられた。また、投与期間終了時に膀胱への影響も確認されたが、その他の消化器系、呼吸器系、心・血管系、生殖器系、神経系、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 risk of chemicals to humans. 73, 49-58.
- Khan MF, Kaphalia BS, Boor PJ, Ansari GAS (1993) Subchronic toxicity of aniline hydrochloride in rats. Arch Environ Contam Toxicol, 24, 368-374.
- Ma H, Wang J, Abdel-Rahman SZ, Boor PJ, Khan MF (2008) Oxidative DNA damage and its repair in rat spleen following subchronic exposure to aniline. Toxicol Appl Pharmacol, 233, 247-253.
- NCI (1978) Bioassay of o-anisidine hydrochloride for possible carcinogenicity. NCI CG TR 89.
- Stefanski SA, Elwell MR, Stromberg PC (1990) Spleen, Lymph nodes, and Thymus. In "Pathology of the Fischer Rat", Boorman GA, Eustis SL, Elwell MR, Montgomery CA, Jr, Mackenzie WF (eds.), Academic Press, Inc., San Diego, California, 382-383.
- 原田孝則, 真板敬三 (2000) 各論 5 章 肝／胆嚢, 2. 非腫瘍性病変. In 「毒性病理組織学」, 日本毒性病理学会, 名古屋, 182-183.
- 藤谷知子, 多田幸恵, 矢野範男, 湯澤勝廣, 長澤明道, 小縣昭夫 (2004) 除草剤クロルプロファムによる溶血性貧血と脾臓における病理学的变化の可逆性. 東京健安研セ年報, 55, 319-326.

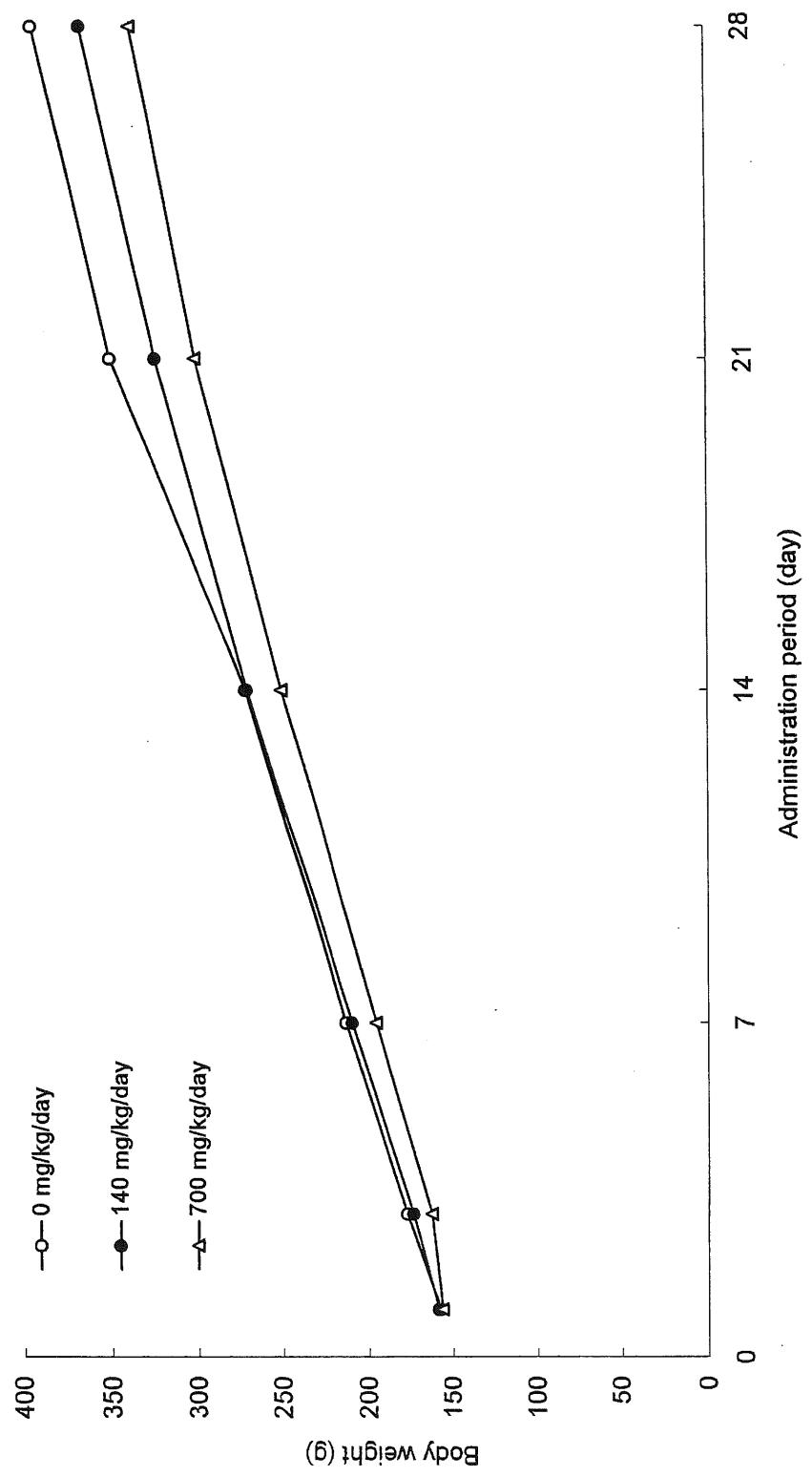


Fig. 1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats  
Body weights: Male

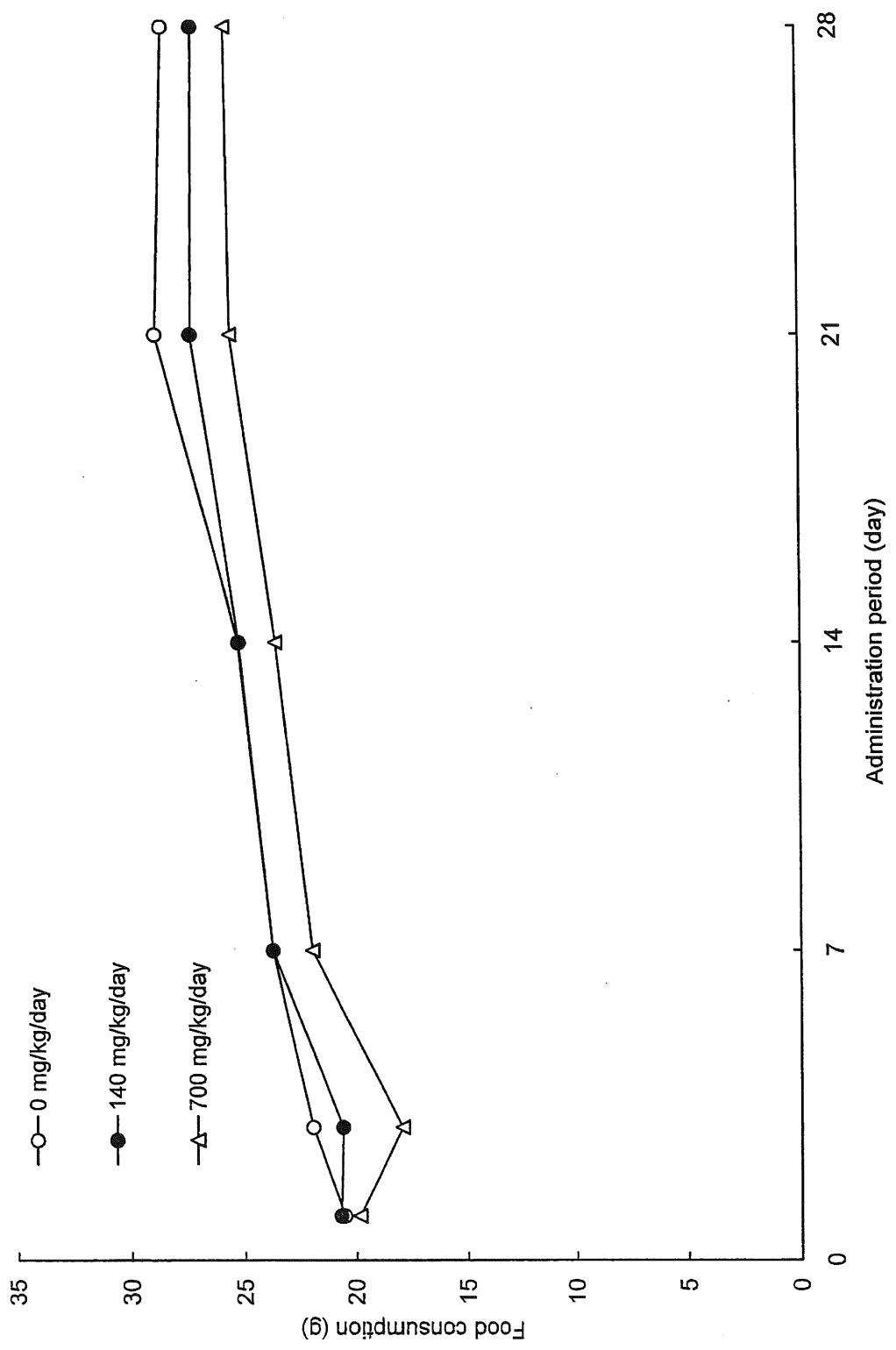


Fig. 2 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats  
Food consumption. Male

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

Sex	Signs	Administration period			
		mg/kg/day	0	140	700
Male			ss 17 <sup>a)</sup>	ss 17	ss 17
	No abnormalities detected		17	17	
	Decreased spontaneous locomotion				17
	Decreased respiratory rate				17
	Incomplete eyelid opening				10
	Eyelid closure				1
	Brown urine				13
	Reddish tear				1
	Salivation				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
	Lacration	- Absent + Present
	Exophthalmos	- Absent + Present
	Pupillary size	-1 Miosis 0 Normal +1 Mydriasis
	Salivation	- Absent + Present
	Secretion	- Absent + Present
Observation in arena	Posture	0 Normal +1 Crouching position or hunchback position +2 Prone position or lateral position
	Motor activity	-2 Significantly decreased -1 Decreased 0 Normal +1 Increased +2 Significantly increased
	Respiration	0 Normal +1 Slightly insufficiency +2 Moderately insufficiency +3 Severely insufficiency
	Lid closure	- Absent + Present
	Gait	- Normal S Staggering gait T Tip toe gait P Shuffling (paralytic) gait GD Gait disturbance
	Tremor/twitch/convulsion	0 None +1 Tremor +2 Twitch or convulsion +3 Systematic tonic convulsion (opisthotonus or episthenotonus etc.)
	Stereotypic behavior	- None C Circling G Grooming S Sniffing H Head bobbing
	Abnormal behavior	- None S Self-biting B Backing C Circling R Rolling W Writthing V Vocalization ST Straub tail T Tail lashing behavior

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

Male

Dose (mg/kg/day)	Predosing			Dosing 1 week		
	0	140	700	0	140	700
Number of animals	5	5	5	5	5	5
-2	0	0	0	0	0	0
-1	0	1	2	0	0	0
0	5	4	3	5	5	5
+1	0	0	0	0	0	0
+2	0	0	0	0	0	0
Vocalization	0	5	4	5	5	5
+1	0	1	0	0	0	0
+2	0	0	0	0	0	0
Muscle tone	0	5	5	5	5	5
+1	0	0	0	0	0	0
Subnormal temperature	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Piloerection	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Staining hair	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Unkempt hair	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Paleness	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Reddening	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Cyanosis	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Lacrimation	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Exophthalmos	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
-1	0	0	0	0	0	0
Pupillary size	0	5	5	5	5	5
+1	0	0	0	0	0	0
Salivation	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Secretion	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Posture	0	5	5	5	5	5
+1	0	0	0	0	0	0
+2	0	0	0	0	0	0
-2	0	0	0	0	0	0
-1	0	0	0	0	0	0
Motor activity	0	3	4	3	5	5
+1	2	1	2	0	0	0
+2	0	0	0	0	0	0
Respiration	0	5	5	5	5	5
+1	0	0	0	0	0	0
+2	0	0	0	0	0	0
+3	0	0	0	0	0	0
Lid closure	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Gait	S	0	0	0	0	0
T	0	0	0	0	0	0
P	0	0	0	0	0	0
GD	0	0	0	0	0	0
Observation in arena	Tremor/twitch/convulsion	0	5	5	5	5
+1	0	0	0	0	0	0
+2	0	0	0	0	0	0
+3	0	0	0	0	0	0
Stereotypic behavior	C	0	0	0	0	0
G	0	0	0	0	0	0
S	0	0	0	0	0	0
H	0	0	0	0	0	0
Abnormal behavior	-	5	5	5	5	5
S	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0
R	0	0	0	0	0	0
W	0	0	0	0	0	0
V	0	0	0	0	0	0
ST	0	0	0	0	0	0
T	0	0	0	0	0	0
Defecation <sup>a)</sup>	0.2 ± 0.4	0.6 ± 0.9	0.4 ± 0.5	0.4 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.9
Urination <sup>a)</sup>	1.6 ± 2.6	2.2 ± 3.9	3.8 ± 4.8	1.8 ± 2.2	1.4 ± 1.5	4.8 ± 2.9

a): (count/min)

\*: significantly different from vehicle control at p&lt;0.05, \*\*: significantly different from vehicle control at p&lt;0.01

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

Male

Dose (mg/kg/day)	Dosing 2 week			Dosing 3 week		
	0	140	700	0	140	700
Number of animals	5	5	5	5	5	5
-2	0	0	0	0	0	0
-1	0	0	0	1	0	0
Ease of removal	0	5	5	4	5	5
Removal from cage	+1	0	0	0	0	0
+2	0	0	0	0	0	0
Vocalization	0	5	5	5	5	5
+1	0	0	0	0	0	0
+2	0	0	0	0	0	0
Muscle tone	-1	0	0	0	0	0
0	5	5	5	5	5	5
+1	0	0	0	0	0	0
Subnormal temperature	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Piloerection	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Staining hair	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Unkempt hair	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Paleness	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Handling observation	Reddening	-	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0
Cyanosis	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Lacrimation	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Exophthalmos	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Pupillary size	-1	0	0	0	0	0
0	5	5	5	5	5	5
+1	0	0	0	0	0	0
Salivation	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Secretion	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Posture	0	5	5	5	5	5
+1	0	0	0	0	0	0
+2	0	0	0	0	0	0
Motor activity	-2	0	0	0	0	0
-1	0	0	0	1	0	0
0	5	5	5	4	4	3
+1	0	0	0	0	1	2
+2	0	0	0	0	0	0
Respiration	0	5	5	5	5	5
+1	0	0	0	0	0	0
+2	0	0	0	0	0	0
+3	0	0	0	0	0	0
Lid closure	-	5	5	5	5	5
+	0	0	0	0	0	0
Gait	S	0	0	0	0	0
T	0	0	0	0	0	0
P	0	0	0	0	0	0
Observation in arena	GD	0	0	0	0	0
Tremor/twitch/convulsion	0	5	5	5	5	5
+1	0	0	0	0	0	0
+2	0	0	0	0	0	0
+3	0	0	0	0	0	0
Stereotypic behavior	-	5	5	5	5	5
C	0	0	0	0	0	0
G	0	0	0	0	0	0
S	0	0	0	0	0	0
H	0	0	0	0	0	0
Abnormal behavior	-	5	5	5	5	5
S	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0
R	0	0	0	0	0	0
W	0	0	0	0	0	0
V	0	0	0	0	0	0
ST	0	0	0	0	0	0
T	0	0	0	0	0	0
Defecation <sup>a)</sup>	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.9	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.8 ± 1.3	0.8 ± 1.1
Urination <sup>a)</sup>	0.0 ± 0.0	3.8 ± 5.0	2.0 ± 3.5	2.8 ± 3.3	4.6 ± 6.6	3.0 ± 5.0

a): (count/min)

\*: significantly different from vehicle control at p&lt;0.05, \*\*: significantly different from vehicle control at p&lt;0.01

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

Male

	Dose (mg/kg/day)	Dosing 4 week		
		0	140	700
Number of animals		5	5	5
Removal from cage	-2	0	0	0
	-1	3	1	2
	0	2	4	3
	+1	0	0	0
	+2	0	0	0
Vocalization	0	4	5	5
	+1	1	0	0
	+2	0	0	0
Muscle tone	-1	0	0	0
	0	5	5	5
	+1	0	0	0
Subnormal temperature	-	5	5	5
	+	0	0	0
Piloerection	-	5	5	5
	+	0	0	0
Staining hair	-	5	5	5
	+	0	0	0
Unkempt hair	-	5	5	5
	+	0	0	0
Paleness	-	5	5	5
	+	0	0	0
Reddening	-	5	5	5
	+	0	0	0
Cyanosis	-	5	5	5
	+	0	0	0
Lacrimation	-	5	5	5
	+	0	0	0
Exophthalmos	-	5	5	5
	+	0	0	0
Pupillary size	-1	0	0	0
	0	5	5	5
	+1	0	0	0
Salivation	-	5	5	5
	+	0	0	0
Secretion	-	5	5	5
	+	0	0	0
Posture	0	5	5	5
	+1	0	0	0
	+2	0	0	0
Motor activity	-2	0	0	0
	-1	0	0	0
	0	5	5	4
	+1	0	0	1
	+2	0	0	0
Respiration	0	5	5	5
	+1	0	0	0
	+2	0	0	0
	+3	0	0	0
Lid closure	-	5	5	5
	+	0	0	0
Gait	S	0	0	0
	T	0	0	0
	P	0	0	0
Observation in arena	GD	0	0	0
Tremor/twitch/convulsion	0	5	5	5
	+1	0	0	0
	+2	0	0	0
	+3	0	0	0
Stereotypic behavior	-	5	5	5
	C	0	0	0
	G	0	0	0
	S	0	0	0
	H	0	0	0
Abnormal behavior	-	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 <sup>a)</sup>		0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.9	0.2 ± 0.4
Urination <sup>b)</sup>		0.0 ± 0.0	1.2 ± 1.8	0.8 ± 1.1

a): (count/min)

\*: significantly different from vehicle control at p&lt;0.05, \*\*: significantly different from vehicle control at p&lt;0.01

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

## Male

		Dosing 4 week		
	Dose (mg/kg/day)	0	140	700
	Number of animals	5	5	5
Sensorimotor function	Approach contact/touch response	-1 0 +1	0 5 0	0 5 0
	Pinna response	-1 0 +1	0 5 0	0 5 0
	Pain response (tail pinch)	-1 0 +1	0 5 0	0 5 0
	Pupillary reflex	+	5	5
	Air righting reflex	- +	0 5	0 5
Grip strength	Forelimb (g)	$470 \pm 83$		
	Hindlimb (g)	$499 \pm 42$		
Motor activity [Interval]	0-10 (min)	$120 \pm 36$		
	10-20 (min)	$30 \pm 26$		
	20-30 (min)	$53 \pm 37$		
	30-40 (min)	$18 \pm 18$		
	40-50 (min)	$10 \pm 17$		
	50-60 (min)	$6 \pm 14$		
	Total	$238 \pm 120$		
		$297 \pm 191$		
		$463 \pm 276$		

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

## Scoring scale for sensorimotor function

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

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

	Dose (mg/kg/day)	0	140	700
Administration period	1	157.85 ±8.79 (17)	158.73 ±8.19 (17)	156.34 ±7.32 (17)
	3	177.26 ±10.28 (13)	173.55 ±8.56 (13)	162.75 ** ±8.79 (13)
	7	213.49 ±15.24 (13)	209.67 ±12.16 (13)	195.69 ** ±11.26 (13)
	14	272.02 ±24.47 (9)	270.91 ±23.79 (9)	250.87 ±12.45 (9)
	21	349.50 ±18.82 (5)	323.96 ±30.05 (5)	300.66 * ±29.79 (5)
	28	392.92 ±27.66 (5)	365.80 ±31.63 (5)	337.16 * ±37.34 (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

	Dose (mg/kg/day)	0	140	700
Administration period	1	20.52 ± 1.82 (13)	20.70 ± 2.13 (13)	19.85 ± 1.48 (13)
	3	21.96 ± 2.01 (13)	20.61 ± 1.90 (13)	17.95 ** ± 2.23 (13)
	7	23.74 ± 2.51 (13)	23.74 ± 2.28 (13)	21.97 ± 1.57 (13)
	14	25.25 ± 2.71 (9)	25.21 ± 2.97 (9)	23.60 ± 2.29 (9)
	21	28.85 ± 2.41 (5)	27.30 ± 2.98 (5)	25.54 ± 3.27 (5)
	28	28.47 ± 2.70 (5)	27.15 ± 2.46 (5)	25.69 ± 4.39 (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	140	700
Urine volume (mL)		13.2 ±7.9 (5)	19.0 ±11.9 (5)	37.6 ** ±10.2 (5)
Uosm (mOsm/L)		926.0 ±522.4 (5)	693.0 ±342.0 (5)	398.6 ±81.1 (5)

Values are shown as Mean ± S.D..

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

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

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

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

Items	Group	Twenty-eight-day treatment			
		Dose (mg/kg/day)	0	140	700
	No. of animals		5	5	5
<b>Color</b>					
	SY	1	2	0	
	Y	3	3	0	
	YB	1	0	0	
	PB	0	0	5	
<b>Turbidity</b>					
	Clear	4	5	4	
	Cloudy	1	0	1	
<b>pH</b>					
	6.0	0	0	5	
	6.5	5	5	0	
<b>Protein</b>					
	-	0	3	1	
	±	2	1	3	
	1+	3	1	0	
	2+	0	0	1	
<b>Glucose</b>					
	-	5	5	5	
<b>Ketones</b>					
	-	1	2	5	
	±	3	1	0	
	1+	1	2	0	
<b>Occult blood</b>					
	-	2	4	4	
	±	0	1	0	
	1+	3	0	0	
	3+	0	0	1	

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

Table 6-3

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

B10-0098

Items	Group	Twenty-eight-day treatment			
		Dose (mg/kg/day)	0	140	700
	No. of animals		5	5	5
<b>Urinaly sediment</b>					
Red blood cells a)					
	0	5	5	3	
	21-50	0	0	1	
	500≤	0	0	1	
White blood cells a)					
	0	5	5	2	
	1-5	0	0	1	
	51-499	0	0	1	
	500≤	0	0	1	
Epithelial cells a)					
	0	5	5	5	
Casts b)					
	0	5	5	5	
Crystals c)					
	-	0	1	5	
	±	3	2	0	
	1+	2	2	0	

a): Number of cells/10views(x400).

b): Number of casts/18×18 mm<sup>2</sup>.c): Incidence of crystals/18×18 mm<sup>2</sup>.

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

Items	Dose (mg/kg/day)	One-day treatment		
		0	140	700
RBC	( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	761.3 $\pm 26.1$ (4)	774.8 $\pm 77.5$ (4)	730.8 $\pm 35.5$ (4)
Hb	(g/dL)	15.93 $\pm 0.29$ (4)	15.60 $\pm 1.08$ (4)	14.95 $\pm 0.75$ (4)
Ht	(%)	52.75 $\pm 0.86$ (4)	52.23 $\pm 3.62$ (4)	50.18 $\pm 2.83$ (4)
MCV	(fL)	69.38 $\pm 2.02$ (4)	67.60 $\pm 3.24$ (4)	68.73 $\pm 0.75$ (4)
MCH	(pg)	20.90 $\pm 0.63$ (4)	20.18 $\pm 0.95$ (4)	20.48 $\pm 0.33$ (4)
MCHC	(g/dL)	30.15 $\pm 0.42$ (4)	29.90 $\pm 0.08$ (4)	29.80 $\pm 0.28$ (4)
Platelet	( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	131.35 $\pm 3.64$ (4)	151.68 $\pm 20.69$ (4)	145.80 $\pm 26.26$ (4)
Reticulo	(%)	10.88 $\pm 1.85$ (4)	11.45 $\pm 1.42$ (4)	11.60 $\pm 0.73$ (4)
WBC	( $\times 10^2/\mu\text{L}$ )	89.33 $\pm 12.72$ (4)	100.50 $\pm 43.54$ (4)	86.63 $\pm 19.55$ (4)
Differentiation of leukocyte				
Neutro	(%)	9.20 $\pm 1.55$ (4)	10.65 $\pm 3.37$ (4)	13.83 * $\pm 1.97$ (4)
Lymph	(%)	85.43 $\pm 1.44$ (4)	84.80 $\pm 4.25$ (4)	80.63 $\pm 3.89$ (4)
Eosino	(%)	0.50 $\pm 0.08$ (4)	0.43 $\pm 0.21$ (4)	0.50 $\pm 0.08$ (4)
Baso	(%)	0.90 $\pm 0.12$ (4)	0.75 $\pm 0.13$ (4)	0.73 $\pm 0.13$ (4)
Mono	(%)	2.65 $\pm 0.77$ (4)	2.03 $\pm 0.53$ (4)	2.98 $\pm 1.38$ (4)
LUC	(%)	1.33 $\pm 0.32$ (4)	1.43 $\pm 0.26$ (4)	1.35 $\pm 0.90$ (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	140	700
RBC	( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	754.5 $\pm 44.4$ (4)	772.5 $\pm 31.0$ (4)	613.5 ** $\pm 42.3$ (4)
Hb	(g/dL)	16.00 $\pm 1.00$ (4)	16.28 $\pm 1.17$ (4)	12.53 ** $\pm 0.26$ (4)
Ht	(%)	52.68 $\pm 3.45$ (4)	53.90 $\pm 4.40$ (4)	44.18 * $\pm 1.33$ (4)
MCV	(fL)	69.83 $\pm 0.71$ (4)	69.73 $\pm 3.55$ (4)	72.20 $\pm 3.36$ (4)
MCH	(pg)	21.23 $\pm 0.15$ (4)	21.00 $\pm 0.91$ (4)	20.50 $\pm 0.98$ (4)
MCHC	(g/dL)	30.43 $\pm 0.10$ (4)	30.15 $\pm 0.37$ (4)	28.38 ** $\pm 0.33$ (4)
Platelet	( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	119.53 $\pm 27.71$ (4)	123.85 $\pm 21.43$ (4)	128.35 $\pm 11.52$ (4)
Reticulo	(%)	8.18 $\pm 1.58$ (4)	9.03 $\pm 1.18$ (4)	17.78 ** $\pm 2.61$ (4)
WBC	( $\times 10^2/\mu\text{L}$ )	100.13 $\pm 7.28$ (4)	108.20 $\pm 18.03$ (4)	186.53 * $\pm 52.36$ (4)
<b>Differentiation of leukocyte</b>				
Neutro	(%)	10.03 $\pm 3.69$ (4)	11.83 $\pm 2.02$ (4)	27.53 ** $\pm 8.20$ (4)
Lymph	(%)	84.70 $\pm 4.40$ (4)	83.05 $\pm 2.91$ (4)	66.75 ** $\pm 7.70$ (4)
Eosino	(%)	0.68 $\pm 0.15$ (4)	0.63 $\pm 0.19$ (4)	0.30 * $\pm 0.08$ (4)
Baso	(%)	0.90 $\pm 0.18$ (4)	0.90 $\pm 0.14$ (4)	0.60 $\pm 0.16$ (4)
Mono	(%)	2.25 $\pm 0.54$ (4)	2.30 $\pm 0.71$ (4)	3.58 * $\pm 0.33$ (4)
LUC	(%)	1.43 $\pm 0.62$ (4)	1.30 $\pm 0.24$ (4)	1.25 $\pm 0.13$ (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	140	700
RBC	( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	737.3 $\pm 48.0$ (4)	794.0 $\pm 56.5$ (4)	595.0 ** $\pm 34.3$ (4)
Hb	(g/dL)	15.05 $\pm 0.91$ (4)	16.10 $\pm 1.28$ (4)	14.25 $\pm 0.69$ (4)
Ht	(%)	49.58 $\pm 3.20$ (4)	53.10 $\pm 3.93$ (4)	49.90 $\pm 2.04$ (4)
MCV	(fL)	67.25 $\pm 2.44$ (4)	66.88 $\pm 1.55$ (4)	83.98 ** $\pm 1.79$ (4)
MCH	(pg)	20.43 $\pm 0.94$ (4)	20.28 $\pm 0.62$ (4)	23.95 ** $\pm 0.53$ (4)
MCHC	(g/dL)	30.38 $\pm 0.50$ (4)	30.30 $\pm 0.23$ (4)	28.55 ** $\pm 0.33$ (4)
Platelet	( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	131.65 $\pm 19.54$ (4)	121.13 $\pm 10.57$ (4)	136.55 $\pm 18.10$ (4)
Reticulo	(%)	5.55 $\pm 0.70$ (4)	7.43 * $\pm 0.33$ (4)	18.90 ** $\pm 1.28$ (4)
WBC	( $\times 10^2/\mu\text{L}$ )	126.23 $\pm 80.12$ (4)	152.78 $\pm 24.74$ (4)	167.13 $\pm 32.45$ (4)
<b>Differentiation of leukocyte</b>				
Neutro	(%)	16.13 $\pm 6.69$ (4)	19.20 $\pm 2.17$ (4)	19.85 $\pm 4.16$ (4)
Lymph	(%)	79.38 $\pm 6.50$ (4)	75.55 $\pm 3.16$ (4)	74.98 $\pm 4.64$ (4)
Eosino	(%)	0.55 $\pm 0.31$ (4)	0.55 $\pm 0.13$ (4)	0.48 $\pm 0.24$ (4)
Baso	(%)	0.68 $\pm 0.36$ (4)	0.93 $\pm 0.39$ (4)	0.95 $\pm 0.31$ (4)
Mono	(%)	1.95 $\pm 0.21$ (4)	2.23 $\pm 0.75$ (4)	2.35 $\pm 0.52$ (4)
LUC	(%)	1.30 $\pm 0.24$ (4)	1.60 $\pm 0.74$ (4)	1.48 $\pm 0.44$ (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	140	700
RBC	( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	780.8 $\pm 17.8$ (4)	749.8 $\pm 17.2$ (5)	626.4 ** $\pm 28.4$ (5)
Hb	(g/dL)	15.25 $\pm 0.47$ (4)	14.84 $\pm 0.19$ (5)	13.92 ** $\pm 0.30$ (5)
Ht	(%)	47.80 $\pm 1.59$ (4)	47.62 $\pm 0.69$ (5)	46.44 $\pm 1.00$ (5)
MCV	(fL)	61.23 $\pm 1.63$ (4)	63.52 $\pm 0.75$ (5)	74.20 ** $\pm 2.24$ (5)
MCH	(pg)	19.53 $\pm 0.63$ (4)	19.82 $\pm 0.24$ (5)	22.30 ** $\pm 0.77$ (5)
MCHC	(g/dL)	31.93 $\pm 0.62$ (4)	31.20 * $\pm 0.16$ (5)	30.04 ** $\pm 0.39$ (5)
Platelet	( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	105.25 $\pm 12.91$ (4)	107.90 $\pm 16.99$ (5)	128.60 $\pm 12.02$ (5)
Reticulo	(%)	3.08 $\pm 0.41$ (5)	6.06 $\pm 0.50$ (5)	14.74 ** $\pm 1.87$ (5)
Hein-B	(%)	0.00 $\pm 0.00$ (5)	0.06 $\pm 0.09$ (5)	1.78 ** $\pm 0.95$ (5)
Met Hb	(%)	0.95 $\pm 0.13$ (4)	1.78 ** $\pm 0.19$ (5)	4.30 ** $\pm 0.28$ (5)
WBC	( $\times 10^2/\mu\text{L}$ )	99.78 $\pm 19.41$ (4)	144.20 $\pm 37.07$ (5)	147.64 $\pm 42.85$ (5)
<b>Differentiation of leukocyte</b>				
Neutro	(%)	16.90 $\pm 4.25$ (5)	18.56 $\pm 4.15$ (5)	28.70 ** $\pm 4.88$ (5)
Lymph	(%)	77.06 $\pm 4.57$ (5)	75.80 $\pm 3.46$ (5)	66.36 ** $\pm 6.14$ (5)
Eosino	(%)	0.88 $\pm 0.26$ (5)	0.50 * $\pm 0.07$ (5)	0.46 ** $\pm 0.18$ (5)
Baso	(%)	0.90 $\pm 0.16$ (5)	1.12 $\pm 0.27$ (5)	0.88 $\pm 0.24$ (5)
Mono	(%)	2.80 $\pm 0.63$ (5)	2.14 $\pm 0.52$ (5)	2.50 $\pm 0.98$ (5)
LUC	(%)	1.46 $\pm 0.59$ (5)	1.84 $\pm 0.97$ (5)	1.10 $\pm 0.22$ (5)
PT	(sec)	19.13 $\pm 2.73$ (4)	15.94 * $\pm 1.43$ (5)	14.48 ** $\pm 0.75$ (5)
APTT	(sec)	25.08 $\pm 1.92$ (4)	18.58 ** $\pm 1.97$ (5)	18.06 ** $\pm 3.17$ (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	140	700
AST	(IU/L)	93.5 ±5.9 (4)	91.0 ±6.6 (4)	95.3 ±4.9 (4)
ALT	(IU/L)	30.8 ±1.7 (4)	32.3 ±6.9 (4)	45.0 * ±7.1 (4)
ALP	(IU/L)	775.5 ±154.4 (4)	930.3 ±114.2 (4)	863.8 ±75.1 (4)
BUN	(mg/dL)	11.03 ±1.63 (4)	14.28 * ±0.81 (4)	11.98 ±1.79 (4)
Creatinine	(mg/dL)	0.155 ±0.006 (4)	0.158 ±0.013 (4)	0.148 ±0.010 (4)
T-Bil	(mg/dL)	0.045 ±0.006 (4)	0.063 ±0.017 (4)	0.075 * ±0.021 (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	140	700
AST	(IU/L)	88.3 ±4.7 (4)	77.0 ±9.6 (4)	88.0 ±14.0 (4)
ALT	(IU/L)	32.8 ±5.5 (4)	30.8 ±7.3 (4)	43.5 ±12.8 (4)
ALP	(IU/L)	827.5 ±242.7 (4)	846.3 ±63.0 (4)	809.8 ±205.3 (4)
BUN	(mg/dL)	12.00 ±1.35 (4)	13.45 ±1.18 (4)	16.95 * ±3.04 (4)
Creatinine	(mg/dL)	0.140 ±0.008 (4)	0.143 ±0.022 (4)	0.150 ±0.020 (4)
T-Bil	(mg/dL)	0.088 ±0.010 (4)	0.080 ±0.014 (4)	0.185 ** ±0.017 (4)

Values are shown as Mean ± S.D..

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

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

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

Table 8-3 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	140	700
AST	(IU/L)	79.5 ±6.9 (4)	85.8 ±5.8 (4)	77.5 ±8.2 (4)
ALT	(IU/L)	30.0 ±4.0 (4)	39.8 ±7.8 (4)	32.5 ±4.4 (4)
ALP	(IU/L)	617.3 ±89.3 (4)	663.0 ±144.3 (4)	634.0 ±202.2 (4)
BUN	(mg/dL)	13.63 ±1.80 (4)	14.08 ±0.80 (4)	18.50 ** ±2.62 (4)
Creatinine	(mg/dL)	0.190 ±0.024 (4)	0.185 ±0.013 (4)	0.195 ±0.019 (4)
T-Bil	(mg/dL)	0.108 ±0.015 (4)	0.175 ±0.048 (4)	0.253 * ±0.105 (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	140	700
AST	(IU/L)	72.0 ±2.0 (5)	68.2 ±4.2 (5)	77.0 ±4.4 (5)
ALT	(IU/L)	26.4 ±2.9 (5)	27.2 ±3.6 (5)	35.8 ** ±5.8 (5)
ALP	(IU/L)	570.2 ±104.2 (5)	580.2 ±55.7 (5)	523.6 ±78.3 (5)
ChE	(IU/L)	55.2 ±19.6 (5)	52.2 ±15.2 (5)	53.8 ±8.0 (5)
γ-GTP	(IU/L)	0.54 ±0.27 (5)	0.76 ±0.47 (5)	0.84 ±0.32 (5)
T-Chol	(mg/dL)	62.8 ±18.0 (5)	61.0 ±9.2 (5)	58.8 ±9.6 (5)
TG	(mg/dL)	63.4 ±28.2 (5)	66.8 ±14.7 (5)	86.8 ±35.5 (5)
BUN	(mg/dL)	14.06 ±0.55 (5)	14.32 ±1.98 (5)	19.14 ±4.81 (5)
Creatinine	(mg/dL)	0.240 ±0.020 (5)	0.222 ±0.023 (5)	0.250 ±0.027 (5)
T-Protein	(g/dL)	6.10 ±0.23 (5)	6.18 ±0.26 (5)	6.20 ±0.16 (5)
Albumin	(g/dL)	2.76 ±0.09 (5)	2.82 ±0.08 (5)	2.96 * ±0.13 (5)
A/G ratio	(-)	0.826 ±0.019 (5)	0.842 ±0.036 (5)	0.916 ** ±0.049 (5)
Glucose	(mg/dL)	129.8 ±29.2 (5)	162.6 ±25.8 (5)	167.0 ±19.8 (5)
T-Bil	(mg/dL)	0.050 ±0.007 (5)	0.068 ±0.008 (5)	0.118 ** ±0.016 (5)
TBA	(μmol/L)	34.82 ±32.35 (5)	37.46 ±16.05 (5)	24.34 ±9.77 (5)
IP	(mg/dL)	12.00 ±0.21 (5)	12.64 ±0.29 (5)	13.96 ** ±0.67 (5)
Ca	(mg/dL)	11.82 ±0.44 (5)	12.12 ±0.45 (5)	12.12 ±0.36 (5)
Na	(mEq/L)	147.6 ±0.5 (5)	147.4 ±1.5 (5)	146.4 ±1.1 (5)
K	(mEq/L)	6.68 ±1.11 (5)	7.68 ±0.63 (5)	7.68 ±0.93 (5)
Cl	(mEq/L)	104.52 ±3.54 (5)	104.48 ±2.23 (5)	103.94 ±1.63 (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	140	700
Liver (g)		4.715 ±0.221 (4)	4.783 ±0.408 (4)	5.280 ±0.586 (4)
Heart (g)		0.690 ±0.059 (4)	0.695 ±0.071 (4)	0.665 ±0.064 (4)
Kidney(R) (g)		0.658 ±0.039 (4)	0.678 ±0.046 (4)	0.658 ±0.053 (4)
Kidney(L) (g)		0.668 ±0.066 (4)	0.655 ±0.066 (4)	0.660 ±0.042 (4)
Kidneys (g)		1.325 ±0.103 (4)	1.333 ±0.110 (4)	1.318 ±0.081 (4)
Testis(R) (g)		0.730 ±0.090 (4)	0.723 ±0.028 (4)	0.755 ±0.065 (4)
Testis(L) (g)		0.730 ±0.108 (4)	0.713 ±0.044 (4)	0.760 ±0.075 (4)
Testes (g)		1.460 ±0.197 (4)	1.435 ±0.070 (4)	1.515 ±0.140 (4)
Epididymis(R) (g)		0.093 ±0.005 (4)	0.075 ±0.013 (4)	0.085 ±0.024 (4)
Epididymis(L) (g)		0.090 ±0.014 (4)	0.078 ±0.010 (4)	0.088 ±0.022 (4)
Epididymides (g)		0.183 ±0.019 (4)	0.153 ±0.021 (4)	0.173 ±0.046 (4)
Ventral prostate (g)		0.083 ±0.015 (4)	0.090 ±0.016 (4)	0.083 ±0.034 (4)
Dorsolateral prostate (g)		0.065 ±0.013 (4)	0.068 ±0.017 (4)	0.065 ±0.017 (4)
Brain (g)		1.793 ±0.034 (4)	1.720 ±0.132 (4)	1.738 ±0.063 (4)
Spleen (g)		0.400 ±0.072 (4)	0.363 ±0.084 (4)	0.378 ±0.022 (4)
Thymus (mg)		481.23 ±75.21 (4)	440.48 ±77.02 (4)	407.23 ±48.65 (4)
Pituitary gland (mg)		5.10 ±1.08 (4)	5.58 ±0.86 (4)	5.35 ±0.29 (4)
Thyroid (mg)		12.78 ±1.64 (4)	11.05 ±1.64 (4)	9.85 * ±1.06 (4)
Adrenals (mg)		33.65 ±1.92 (4)	33.68 ±0.97 (4)	31.68 ±5.22 (4)
Final body weight (g)		132.95 ±8.91 (4)	135.68 ±7.77 (4)	134.40 ±7.49 (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	140	700
Liver	(g)	6.493 ±0.553 (4)	6.443 ±0.320 (4)	6.793 ±0.988 (4)
Heart	(g)	0.890 ±0.075 (4)	0.890 ±0.096 (4)	0.815 ±0.076 (4)
Kidney(R)	(g)	0.933 ±0.045 (4)	0.850 ±0.056 (4)	0.850 ±0.114 (4)
Kidney(L)	(g)	0.938 ±0.068 (4)	0.815 ±0.068 (4)	0.848 ±0.123 (4)
Kidneys	(g)	1.870 ±0.109 (4)	1.665 ±0.122 (4)	1.698 ±0.230 (4)
Testis(R)	(g)	0.945 ±0.053 (4)	0.968 ±0.083 (4)	0.955 ±0.085 (4)
Testis(L)	(g)	0.950 ±0.083 (4)	0.960 ±0.052 (4)	0.938 ±0.101 (4)
Testes	(g)	1.895 ±0.134 (4)	1.928 ±0.134 (4)	1.893 ±0.186 (4)
Epididymis(R)	(g)	0.115 ±0.006 (4)	0.120 ±0.008 (4)	0.110 ±0.022 (4)
Epididymis(L)	(g)	0.120 ±0.008 (4)	0.123 ±0.017 (4)	0.110 ±0.014 (4)
Epididymides	(g)	0.235 ±0.010 (4)	0.243 ±0.025 (4)	0.220 ±0.036 (4)
Ventral prostate	(g)	0.153 ±0.048 (4)	0.130 ±0.034 (4)	0.108 ±0.039 (4)
Dorsolateral prostate	(g)	0.098 ±0.013 (4)	0.090 ±0.026 (4)	0.083 ±0.022 (4)
Brain	(g)	1.815 ±0.074 (4)	1.805 ±0.086 (4)	1.763 ±0.087 (4)
Spleen	(g)	0.503 ±0.062 (4)	0.510 ±0.018 (4)	1.220 * ±0.179 (4)
Thymus	(mg)	648.35 ±59.75 (4)	557.78 ±64.69 (4)	502.55 * ±58.40 (4)
Pituitary gland	(mg)	7.08 ±0.59 (4)	6.45 ±0.49 (4)	6.15 ±0.72 (4)
Thyroid	(mg)	16.05 ±1.21 (4)	13.98 ±1.83 (4)	18.15 ±2.22 (4)
Adrenals	(mg)	41.55 ±3.74 (4)	38.75 ±3.33 (4)	32.05 ** ±2.90 (4)
Final body weight	(g)	185.18 ±13.97 (4)	181.40 ±6.76 (4)	168.78 ±12.70 (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	140	700
Liver	(g)	7.840 ±0.833 (4)	9.070 ±1.220 (4)	9.660 * ±0.724 (4)
Heart	(g)	1.015 ±0.074 (4)	1.128 ±0.091 (4)	0.933 ±0.096 (4)
Kidney(R)	(g)	1.028 ±0.146 (4)	1.120 ±0.136 (4)	1.005 ±0.119 (4)
Kidney(L)	(g)	1.013 ±0.137 (4)	1.120 ±0.144 (4)	0.995 ±0.078 (4)
Kidneys	(g)	2.040 ±0.281 (4)	2.240 ±0.275 (4)	2.000 ±0.197 (4)
Testis(R)	(g)	1.283 ±0.067 (4)	1.373 ±0.166 (4)	1.290 ±0.052 (4)
Testis(L)	(g)	1.290 ±0.090 (4)	1.340 ±0.132 (4)	1.248 ±0.044 (4)
Testes	(g)	2.573 ±0.156 (4)	2.713 ±0.296 (4)	2.538 ±0.096 (4)
Epididymis(R)	(g)	0.178 ±0.005 (4)	0.215 ** ±0.017 (4)	0.175 ±0.013 (4)
Epididymis(L)	(g)	0.180 ±0.000 (4)	0.198 ±0.022 (4)	0.173 ±0.005 (4)
Epididymides	(g)	0.358 ±0.005 (4)	0.413 ±0.039 (4)	0.348 ±0.013 (4)
Ventral prostate	(g)	0.230 ±0.076 (4)	0.273 ±0.025 (4)	0.210 ±0.022 (4)
Dorsolateral prostate	(g)	0.185 ±0.066 (4)	0.153 ±0.013 (4)	0.170 ±0.051 (4)
Brain	(g)	1.855 ±0.083 (4)	1.895 ±0.072 (4)	1.840 ±0.039 (4)
Spleen	(g)	0.580 ±0.055 (4)	0.725 ±0.106 (4)	1.738 ** ±0.100 (4)
Thymus	(mg)	612.20 ±124.29 (4)	602.15 ±133.10 (4)	555.40 ±75.69 (4)
Pituitary gland	(mg)	9.15 ±2.59 (4)	9.20 ±1.05 (4)	8.15 ±1.17 (4)
Thyroid	(mg)	14.15 ±1.49 (4)	16.35 ±1.72 (4)	18.03 ±2.94 (4)
Adrenals	(mg)	39.65 ±7.34 (4)	47.53 ±8.07 (4)	41.45 ±4.56 (4)
Final body weight	(g)	226.93 ±22.90 (4)	246.23 ±18.94 (4)	222.58 ±7.17 (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	140	700
Liver	(g)	12.384 ±1.765 (5)	10.882 ±1.271 (5)	11.568 ±1.368 (5)
Heart	(g)	1.470 ±0.092 (5)	1.320 ±0.170 (5)	1.298 ±0.236 (5)
Kidney(R)	(g)	1.462 ±0.086 (5)	1.362 ±0.145 (5)	1.450 ±0.210 (5)
Kidney(L)	(g)	1.490 ±0.052 (5)	1.388 ±0.203 (5)	1.384 ±0.174 (5)
Kidneys	(g)	2.952 ±0.137 (5)	2.750 ±0.346 (5)	2.834 ±0.376 (5)
Testis(R)	(g)	1.690 ±0.144 (5)	1.590 ±0.074 (5)	1.574 ±0.094 (5)
Testis(L)	(g)	1.716 ±0.151 (5)	1.598 ±0.089 (5)	1.596 ±0.108 (5)
Testes	(g)	3.406 ±0.291 (5)	3.188 ±0.153 (5)	3.170 ±0.199 (5)
Epididymis(R)	(g)	0.412 ±0.027 (5)	0.382 ±0.043 (5)	0.352 * ±0.027 (5)
Epididymis(L)	(g)	0.394 ±0.027 (5)	0.388 ±0.048 (5)	0.346 ±0.019 (5)
Epididymides	(g)	0.806 ±0.053 (5)	0.770 ±0.087 (5)	0.698 * ±0.041 (5)
Ventral prostate	(g)	0.452 ±0.092 (5)	0.430 ±0.080 (5)	0.310 * ±0.035 (5)
Dorsolateral prostate	(g)	0.366 ±0.038 (5)	0.360 ±0.040 (5)	0.304 ±0.053 (5)
Seminal vesicle	(g)	1.112 ±0.208 (5)	1.042 ±0.166 (5)	0.868 ±0.173 (5)
Brain	(g)	2.012 ±0.123 (5)	2.004 ±0.081 (5)	1.958 ±0.055 (5)
Spleen	(g)	0.736 ±0.038 (5)	0.978 ±0.189 (5)	1.850 ** ±0.284 (5)
Thymus	(mg)	598.50 ±84.20 (5)	635.96 ±155.73 (5)	500.62 ±138.51 (5)
Pituitary gland	(mg)	12.72 ±1.06 (5)	10.64 * ±1.81 (5)	9.50 ** ±0.61 (5)
Thyroid	(mg)	21.10 ±2.53 (5)	21.94 ±2.73 (5)	19.16 ±3.96 (5)
Adrenals	(mg)	58.20 ±13.00 (5)	50.04 ±4.35 (5)	50.14 ±10.98 (5)
Final body weight	(g)	367.50 ±23.98 (5)	339.36 ±29.61 (5)	304.72 ** ±27.79 (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	140	700
Liver	(g/100g)	3.553 ±0.120 (4)	3.523 ±0.128 (4)	3.923 ±0.311 (4)
Heart	(g/100g)	0.520 ±0.014 (4)	0.513 ±0.051 (4)	0.495 ±0.025 (4)
Kidney(R)	(g/100g)	0.493 ±0.010 (4)	0.498 ±0.019 (4)	0.490 ±0.041 (4)
Kidney(L)	(g/100g)	0.503 ±0.015 (4)	0.480 ±0.022 (4)	0.493 ±0.017 (4)
Kidneys	(g/100g)	0.995 ±0.013 (4)	0.978 ±0.032 (4)	0.983 ±0.048 (4)
Testis(R)	(g/100g)	0.553 ±0.071 (4)	0.533 ±0.033 (4)	0.560 ±0.035 (4)
Testis(L)	(g/100g)	0.550 ±0.085 (4)	0.525 ±0.031 (4)	0.563 ±0.039 (4)
Testes	(g/100g)	1.103 ±0.156 (4)	1.058 ±0.061 (4)	1.123 ±0.073 (4)
Epididymis(R)	(g/100g)	0.070 ±0.008 (4)	0.055 ±0.006 (4)	0.065 ±0.017 (4)
Epididymis(L)	(g/100g)	0.070 ±0.012 (4)	0.058 ±0.005 (4)	0.065 ±0.017 (4)
Epididymides	(g/100g)	0.140 ±0.018 (4)	0.113 ±0.010 (4)	0.130 ±0.035 (4)
Ventral prostate	(g/100g)	0.065 ±0.017 (4)	0.065 ±0.010 (4)	0.060 ±0.024 (4)
Dorsolateral prostate	(g/100g)	0.050 ±0.008 (4)	0.050 ±0.008 (4)	0.050 ±0.014 (4)
Brain	(g/100g)	1.353 ±0.098 (4)	1.270 ±0.122 (4)	1.293 ±0.045 (4)
Spleen	(g/100g)	0.303 ±0.041 (4)	0.268 ±0.049 (4)	0.283 ±0.030 (4)
Thymus	(mg/100g)	361.18 ±43.34 (4)	323.35 ±42.38 (4)	304.43 ±47.52 (4)
Pituitary gland	(mg/100g)	3.83 ±0.63 (4)	4.10 ±0.50 (4)	3.98 ±0.17 (4)
Thyroid	(mg/100g)	9.60 ±0.77 (4)	8.15 ±1.21 (4)	7.33 * ±0.83 (4)
Adrenals	(mg/100g)	25.33 ±1.15 (4)	24.93 ±2.27 (4)	23.53 ±3.34 (4)
Final body weight	(g)	132.95 ±8.91 (4)	135.68 ±7.77 (4)	134.40 ±7.49 (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	140	700
Liver	(g/100g)	3.505 ±0.114 (4)	3.553 ±0.089 (4)	4.010 ** ±0.302 (4)
Heart	(g/100g)	0.480 ±0.029 (4)	0.490 ±0.038 (4)	0.483 ±0.013 (4)
Kidney(R)	(g/100g)	0.505 ±0.030 (4)	0.468 ±0.029 (4)	0.503 ±0.031 (4)
Kidney(L)	(g/100g)	0.508 ±0.028 (4)	0.450 ±0.035 (4)	0.500 ±0.047 (4)
Kidneys	(g/100g)	1.013 ±0.054 (4)	0.918 ±0.062 (4)	1.003 ±0.071 (4)
Testis(R)	(g/100g)	0.513 ±0.064 (4)	0.538 ±0.057 (4)	0.568 ±0.017 (4)
Testis(L)	(g/100g)	0.515 ±0.080 (4)	0.530 ±0.041 (4)	0.555 ±0.026 (4)
Testes	(g/100g)	1.028 ±0.143 (4)	1.068 ±0.097 (4)	1.123 ±0.043 (4)
Epididymis(R)	(g/100g)	0.063 ±0.005 (4)	0.068 ±0.005 (4)	0.065 ±0.013 (4)
Epididymis(L)	(g/100g)	0.068 ±0.010 (4)	0.068 ±0.013 (4)	0.065 ±0.006 (4)
Epididymides	(g/100g)	0.130 ±0.012 (4)	0.135 ±0.017 (4)	0.130 ±0.018 (4)
Ventral prostate	(g/100g)	0.080 ±0.022 (4)	0.075 ±0.021 (4)	0.063 ±0.022 (4)
Dorsolateral prostate	(g/100g)	0.055 ±0.006 (4)	0.050 ±0.018 (4)	0.050 ±0.014 (4)
Brain	(g/100g)	0.988 ±0.105 (4)	0.995 ±0.039 (4)	1.045 ±0.040 (4)
Spleen	(g/100g)	0.273 ±0.015 (4)	0.280 ±0.008 (4)	0.720 ** ±0.067 (4)
Thymus	(mg/100g)	352.08 ±45.12 (4)	307.00 ±26.87 (4)	297.35 ±19.37 (4)
Pituitary gland	(mg/100g)	3.85 ±0.52 (4)	3.55 ±0.35 (4)	3.63 ±0.38 (4)
Thyroid	(mg/100g)	8.70 ±0.08 (4)	7.70 ±0.69 (4)	10.78 ±1.21 (4)
Adrenals	(mg/100g)	22.53 ±2.66 (4)	21.45 ±2.47 (4)	18.98 ±0.42 (4)
Final body weight	(g)	185.18 ±13.97 (4)	181.40 ±6.76 (4)	168.78 ±12.70 (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	140	700
Liver	(g/100g)	3.458 ±0.192 (4)	3.673 ±0.221 (4)	4.338 ** ±0.186 (4)
Heart	(g/100g)	0.445 ±0.013 (4)	0.460 ±0.018 (4)	0.418 ±0.040 (4)
Kidney(R)	(g/100g)	0.450 ±0.033 (4)	0.455 ±0.029 (4)	0.450 ±0.041 (4)
Kidney(L)	(g/100g)	0.443 ±0.022 (4)	0.455 ±0.037 (4)	0.445 ±0.024 (4)
Kidneys	(g/100g)	0.893 ±0.054 (4)	0.910 ±0.062 (4)	0.895 ±0.064 (4)
Testis(R)	(g/100g)	0.570 ±0.057 (4)	0.555 ±0.026 (4)	0.580 ±0.036 (4)
Testis(L)	(g/100g)	0.573 ±0.060 (4)	0.543 ±0.022 (4)	0.563 ±0.031 (4)
Testes	(g/100g)	1.143 ±0.116 (4)	1.098 ±0.045 (4)	1.143 ±0.067 (4)
Epididymis(R)	(g/100g)	0.080 ±0.008 (4)	0.090 ±0.000 (4)	0.080 ±0.008 (4)
Epididymis(L)	(g/100g)	0.080 ±0.008 (4)	0.078 ±0.005 (4)	0.078 ±0.005 (4)
Epididymides	(g/100g)	0.160 ±0.016 (4)	0.168 ±0.005 (4)	0.158 ±0.010 (4)
Ventral prostate	(g/100g)	0.100 ±0.029 (4)	0.110 ±0.008 (4)	0.095 ±0.010 (4)
Dorsolateral prostate	(g/100g)	0.080 ±0.022 (4)	0.063 ±0.005 (4)	0.078 ±0.025 (4)
Brain	(g/100g)	0.825 ±0.056 (4)	0.773 ±0.052 (4)	0.830 ±0.041 (4)
Spleen	(g/100g)	0.258 ±0.033 (4)	0.293 ±0.025 (4)	0.783 ** ±0.060 (4)
Thymus	(mg/100g)	269.63 ±49.99 (4)	243.58 ±46.11 (4)	249.70 ±34.60 (4)
Pituitary gland	(mg/100g)	4.00 ±0.80 (4)	3.73 ±0.17 (4)	3.65 ±0.51 (4)
Thyroid	(mg/100g)	6.28 ±0.57 (4)	6.68 ±0.76 (4)	8.13 * ±1.38 (4)
Adrenals	(mg/100g)	17.40 ±1.47 (4)	19.23 ±2.21 (4)	18.60 ±1.98 (4)
Final body weight	(g)	226.93 ±22.90 (4)	246.23 ±18.94 (4)	222.58 ±7.17 (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	140	700
Liver	(g/100g)	3.374 ±0.477 (5)	3.200 ±0.107 (5)	3.792 ±0.133 (5)
Heart	(g/100g)	0.400 ±0.025 (5)	0.386 ±0.029 (5)	0.422 ±0.038 (5)
Kidney(R)	(g/100g)	0.398 ±0.028 (5)	0.402 ±0.018 (5)	0.476 * ±0.056 (5)
Kidney(L)	(g/100g)	0.404 ±0.021 (5)	0.408 ±0.039 (5)	0.454 ±0.049 (5)
Kidneys	(g/100g)	0.802 ±0.048 (5)	0.810 ±0.056 (5)	0.930 * ±0.101 (5)
Testis(R)	(g/100g)	0.458 ±0.035 (5)	0.472 ±0.052 (5)	0.518 ±0.043 (5)
Testis(L)	(g/100g)	0.466 ±0.032 (5)	0.474 ±0.052 (5)	0.524 ±0.040 (5)
Testes	(g/100g)	0.924 ±0.066 (5)	0.946 ±0.102 (5)	1.042 ±0.082 (5)
Epididymis(R)	(g/100g)	0.110 ±0.007 (5)	0.116 ±0.021 (5)	0.114 ±0.005 (5)
Epididymis(L)	(g/100g)	0.108 ±0.004 (5)	0.114 ±0.022 (5)	0.114 ±0.011 (5)
Epididymides	(g/100g)	0.218 ±0.011 (5)	0.230 ±0.042 (5)	0.228 ±0.013 (5)
Ventral prostate	(g/100g)	0.124 ±0.034 (5)	0.128 ±0.022 (5)	0.100 ±0.007 (5)
Dorsolateral prostate	(g/100g)	0.100 ±0.014 (5)	0.106 ±0.009 (5)	0.100 ±0.019 (5)
Seminal vesicle	(g/100g)	0.308 ±0.077 (5)	0.310 ±0.060 (5)	0.288 ±0.065 (5)
Brain	(g/100g)	0.548 ±0.023 (5)	0.594 ±0.062 (5)	0.646 * ±0.053 (5)
Spleen	(g/100g)	0.202 ±0.018 (5)	0.286 ±0.043 (5)	0.608 ** ±0.082 (5)
Thymus	(mg/100g)	162.62 ±17.76 (5)	187.56 ±42.13 (5)	164.48 ±42.35 (5)
Pituitary gland	(mg/100g)	3.46 ±0.15 (5)	3.12 ±0.41 (5)	3.16 ±0.32 (5)
Thyroid	(mg/100g)	5.74 ±0.36 (5)	6.54 ±1.27 (5)	6.24 ±0.72 (5)
Adrenals	(mg/100g)	16.02 ±4.49 (5)	14.88 ±2.25 (5)	16.46 ±3.38 (5)
Final body weight	(g)	367.50 ±23.98 (5)	339.36 ±29.61 (5)	304.72 ** ±27.79 (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	140	700
	ss	ss	ss
	4 <sup>a)</sup>	4	4
No abnormalities detected	4	4	3
Liver			
Enlargement	0	0	1

ss: scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals examined.

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

Findings	Male		
	0	140	700
	ss	ss	ss
	4 <sup>a)</sup>	4	4
No abnormalities detected	4	4	0
Forestomach			
Elevated region of mucosa	0	0	1
Liver			
Enlargement	0	0	1
Spleen			
Blackish change	0	0	4
Enlargement	0	0	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	140	700 (mg/kg/day)
	ss	ss	ss
	4 <sup>a)</sup>	4	4
No abnormalities detected	4	3	0
Liver			
Enlargement	0	0	1
Kidney			
Pelvic dilatation, unilateral	0	1	0
Spleen			
Blackish change	0	0	4
Enlargement	0	0	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	140	700
	ss	ss	ss
	5 <sup>a)</sup>	5	5
No abnormalities detected	5	2	0
Kidney			
Dark brownish change, bilateral	0	0	5
Enlargement, bilateral	0	0	1
Whitish region	0	0	1
Spleen			
Blackish change	0	3	5
Enlargement	0	0	5

ss: scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals examined.

Table 12-1 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats

Summary of histopathological examinations: One-day treatment

Findings	Grade	Male		
		0	140	700
		ss	ss	ss
		4 <sup>a)</sup>	4	4
<b>Liver</b>				
No abnormalities detected		3/4 <sup>b)</sup>	4/4	1/4
Deposit, glycogen/Hepatocyte/ Periportal	+	0/4	0/4	2/4
Hypertrophy/Hepatocyte/ Centrilobular	+	0/4	0/4	1/4
Necrosis/Hepatocyte/Focal	+	1/4	0/4	0/4
<b>Kidney</b>				
No abnormalities detected		4/4	4/4	3/4
Degeneration, vacuolar/Proximal tubule/Cortex and medulla	+	0/4	0/4	1/4
<b>Testis</b>				
No abnormalities detected		4/4	—	4/4
<b>Ventral prostate</b>				
No abnormalities detected		4/4	—	4/4
<b>Dorsolateral prostate</b>				
No abnormalities detected		4/4	—	4/4
<b>Bone marrow</b>				
No abnormalities detected		4/4	—	4/4
<b>Spleen</b>				
No abnormalities detected		4/4	—	4/4
<b>Thymus</b>				
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	140	700
		ss	ss	ss
		4 <sup>a)</sup>	4	4
Forestomach				
No abnormalities detected		2/2 <sup>b)</sup>	4/4	3/4
Hyperplasia/Squamous cell/Focal	++	0/2	0/4	1/4
Ulcer	+	0/2	0/4	1/4
Glandular stomach				
No abnormalities detected		2/2	4/4	4/4
Liver				
No abnormalities detected		4/4	4/4	1/4
Hematopoiesis, extramedullary, increased	+	0/4	0/4	1/4
Hypertrophy/Hepatocyte/ Centrilobular	+	0/4	0/4	2/4
Necrosis/Hepatocyte/Focal	+	0/4	0/4	1/4
Kidney				
No abnormalities detected		4/4	3/4	2/4
Change, basophilic/Papillary duct	+	0/4	0/4	2/4
Cyst/Subcapsule	+	0/4	1/4	0/4
Dilatation/Distal tubule/Cortex	+	0/4	0/4	1/4
Testis				
No abnormalities detected		4/4	—	4/4
Ventral prostate				
No abnormalities detected		4/4	—	4/4
Dorsolateral prostate				
No abnormalities detected		4/4	—	4/4
Bone marrow				
No abnormalities detected		4/4	4/4	2/4
Hematopoiesis, increased	+	0/4	0/4	2/4
Spleen				
No abnormalities detected		4/4	3/4	0/4
Congestion	+	0/4	1/4	0/4
++	0/4	0/4	4/4	
Hematopoiesis, extramedullary, increased	+	0/4	0/4	3/4
Thymus				
No abnormalities detected		4/4	—	4/4

ss: scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals autopsied.

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

—: Not examined.

+: slight, ++: moderate.

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

Findings	Grade	Male		
		0	140	700
		(mg/kg/day)	ss	ss
		4 <sup>a)</sup>	4	4
Forestomach				
No abnormalities detected		4/4 <sup>b)</sup>	---	4/4
Glandular stomach				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4
Liver				
No abnormalities detected		4/4	4/4	0/4
Ground glass appearance/ Hepatocyte/Centrilobular	+	0/4	0/4	4/4
Hematopoiesis, extramedullary, increased	+	0/4	0/4	3/4
Hypertrophy/Hepatocyte/ Centrilobular	+	0/4	0/4	4/4
Kidney				
No abnormalities detected		3/4	3/4	2/4
Change, basophilic/Proximal tubule/Cortex	+	0/4	1/4	0/4
Cyst/Subcapsule	++	1/4	0/4	0/4
Dilatation/Distal tubule/Cortex	+	0/4	0/4	1/4
Dilatation/Pelvis	+	0/4	1/4	0/4
Necrosis/Papilla	+	0/4	0/4	1/4
Testis				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4
Ventral prostate				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4
Dorsolateral prostate				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4
Bone marrow				
No abnormalities detected		4/4	4/4	1/4
Hematopoiesis, increased	+	0/4	0/4	3/4
Spleen				
No abnormalities detected		4/4	3/4	0/4
	+	0/4	1/4	0/4
Congestion	++	0/4	0/4	2/4
	+++	0/4	0/4	2/4
Deposit, hemosiderin	+	0/4	0/4	4/4
Hematopoiesis, extramedullary, increased	+	0/4	0/4	3/4
Thymus				
No abnormalities detected		4/4	---	4/4

ss: scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals autopsied.

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

---: Not examined.

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

Table 12-4 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats

Summary of histopathological examinations: Twenty-eight-day treatment

Findings	Grade	Male		
		0	140	700
		ss	ss	ss
		5 <sup>a)</sup>	5	5
Trachea				
No abnormalities detected		5/5 <sup>b)</sup>	---	5/5
Lung				
No abnormalities detected		4/5	---	5/5
Hemorrhage	+	1/5	---	0/5
Submandibular gland				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Forestomach				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Glandular stomach				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Duodenum				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Jejunum				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Ileum				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Cecum				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Colon				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Rectum				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Pancreas				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Liver				
No abnormalities detected		5/5	5/5	0/5
Ground glass appearance/ Hepatocyte/Centrilobular	+	0/5	0/5	4/5
Hematopoiesis, extramedullary, increased	+	0/5	0/5	3/5
Hypertrophy/Hepatocyte/ Centrilobular	+	0/5	0/5	4/5
Heart				
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.

Table 12-6 Twenty-eight-day repeated-dose oral toxicity study in rats

Summary of histopathological examinations: Twenty-eight-day treatment

Findings	Grade	Male		
		0	140	700
		ss	ss	ss
	5 <sup>a)</sup>	5	5	
Bone marrow				
No abnormalities detected		5/5 <sup>b)</sup>	5/5	1/5
Hematopoiesis, increased	+	0/5	0/5	4/5
Axillary 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	0/5	0/5
	+	0/5	4/5	0/5
Congestion	++	0/5	1/5	2/5
	+++	0/5	0/5	3/5
	+	0/5	1/5	0/5
Deposit, hemosiderin	++	0/5	4/5	2/5
	+++	0/5	0/5	3/5
Hematopoiesis, extramedullary, increased	+	0/5	3/5	0/5
	++	0/5	1/5	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
Bone				
No abnormalities detected		5/5	—	5/5
Mammary gland				
No abnormalities detected		5/5	—	5/5

ss: scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals autopsied.

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

—: Not examined.

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

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

Findings	Grade	Male		
		0	140	700
		(mg/kg/day)	ss	ss
		5 <sup>a)</sup>	5	5
Kidney				
No abnormalities detected		5/5 <sup>b)</sup>	4/5	0/5
Change, basophilic/Papillary duct	+	0/5	0/5	4/5
Cyst/Subcapsule	+	0/5	1/5	0/5
Deposit, hemosiderin/Proximal tubule/Cortex	±	0/5	0/5	5/5
Dilatation/Distal tubule/Cortex	+	0/5	0/5	2/5
Dilatation/Distal tubule/Cortex and medulla	+	0/5	0/5	2/5
Hyaline droplet/Proximal tubule/Cortex	+	0/5	0/5	2/5
Necrosis/Papilla	+	0/5	0/5	1/5
	++	0/5	0/5	1/5
Regeneration/Proximal tubule/Cortex	+	0/5	0/5	2/5
Urinary bladder				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Testis				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Epididymis				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Ventral prostate				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Dorsolateral prostate				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Coagulating gland				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Seminal vesicle				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Spinal cord				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5
Sciatic nerve				
No abnormalities detected		5/5	---	5/5

ss: scheduled sacrifice animal.

a) Number of animals autopsied.

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

---: Not examined.

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