

N－メチルアニリンのラットを用いる28日間の反復投与毒性試験

試験番号：2291（115－027）

財 団 法 人
食 品 農 医 薬 品 安 全 性 評 価 セ ン タ ー

目 次

1. 要 約	1 頁
2. 試 験 題 目	3
3. 試 験 目 的	3
9. 被 験 物 質	5
10. 試験材料および方法	7
11. 観察、測定および検査	10
12. 試 験 結 果	14
13. 考察および結論	19
14. 参 考 文 献	21
Figures, Tables	23
Figure 1 Survival ratio	24
Table 1 Survival and mortality	25
Table 2 Clinical observation	26
Figure 2 Body weight	28
Table 3 Body weight	29
Figure 3 Food consumption	32
Table 4 Food consumption	33
Table 5 Food efficiency	35
Table 6 Hematology	37
Table 7 Coagulation	43
Table 8 Blood chemistry	45
Table 9 Urinalysis	51
Table 10 Organ weight	61
Table 11 Organ weight per body weight	65
Table 12 Summary of gross findings (sacrificed at 4, 6 Week)	69
Table 13 Summary of histological findings (sacrificed at 4, 6 Week)	73

1. 要 約 :

N-メチルアニリンの反復投与による毒性を検索するため、Crj: CD (SD) 系ラットを用いた28日間反復投与試験を実施した。

ラットは1群雌雄各5匹で4試験群、さらに対照群および高用量群には雌雄各5匹の回復群を設け、計60匹を使用した。

N-メチルアニリンは、コーンオイルに溶解させ、0、5、25および125 mg/kgを毎日1回、4週間連続経口投与し、一般状態の観察、体重測定、摂餌量測定、血液学的検査、血液凝固検査、血液化学的検査、尿検査、器官重量測定および病理学検査を実施した。なお、回復期間は2週間とし、投与期間中および投与終了時と同様の測定および諸検査を実施した。

その結果は、次のとおり要約される。

投与期間および回復期間を通じて、雌雄いずれの群にも死亡例は認められなかったが、雌雄の125 mg/kg群でチアノーゼが観察され、回復期間に入っても継続して認められた例があった。

体重および摂餌量は、投与期間中、雌雄とも群間で明確な差が認められなかったが、回復期間では雄の125 mg/kg群で摂餌量の増加、体重の高値が認められた。

血液学的検査の結果、雌雄とも25および125 mg/kg群でヘマトクリット値、ヘモグロビン量および赤血球数が低値、網赤血球率が高値を示し、さらに25 mg/kg群でMCHCの低値、125 mg/kg群でMCV、MCH、MCHCおよび単球比率の高値が認められた。回復期間終了時の検査では、回復傾向は認められたものの雌雄とも赤血球数が僅かに低値であった。血液凝固検査の結果、雌の125 mg/kg群でプロトロンビン時間に僅かな延長が認められた。血液化学的検査の結果、雌雄の125 mg/kg群で総ビリルビンが高値を示し、さらに雄の同群でGOTの高値、雌の同群でクレアチニンの高値が認められた。これらの変化は回復期間終了時の検査ではすべて回復した。

尿検査の結果、雌雄の125 mg/kg群で黄褐色尿動物が増加し、尿量が増加傾向を示し、雄の25および125 mg/kg群でケトン体1+動物が増加した。回復期間終了時の検査では、雄の125 mg/kg群で尿量の増加、比重の低値が認められ、雌の125 mg/kg群で黄褐色尿動物が1例認められた。

器官重量測定の結果、雄の125 mg/kg群、雌の25および125 mg/kg群で脾臓の実重量および相対重量が高値を示し、さらに雄の25および125 mg/kg群で脳および腎臓相対重量が高値を示した。回復期間終了時の検査では、雌雄の125 mg/kg群では、脾臓の実重量および相対重量が高値を示し、さらに雄の同群で肝臓の実重量および相対重量の高値、脳相対重量の低値が認められた。

病理学検査の結果、投与終了時において対照群に比較して被験物質投与群で多く見られた剖検所見は、脾臓の黒色化および肥大、肝臓および腎臓の黒色化が雌雄で観察された。脾臓の黒色化および肥大は、回復試験終了時においても 125 mg/kg 群の雌雄で観察された。

また、回復試験終了時の 125 mg/kg 群の雄で肝臓の肥大が観察された。

組織所見では、投与終了時において脾臓の充血、造血亢進および色素沈着、骨髄の造血亢進、肝臓の髄外造血および色素沈着、腎臓の近位尿細管の色素沈着が雌雄の被験物質投与群で対照群に比較して多く観察された。硝子滴変性は雄の被験物質投与群で観察され、125 mg/kg 群では程度の増加が認められた。脾臓の充血、肝臓および腎臓の色素沈着は回復試験終了時においても 125 mg/kg 群の雌雄で観察され、腎臓の近位尿細管の硝子滴変性は投与終了時と同程度の変化が回復試験終了時に 125 mg/kg 群の雄で観察された。脾臓の色素沈着は回復試験終了時の 125 mg/kg 群の雌雄においても観察されたが、投与終了時に比べ程度の増加が認められた。また、剖検所見で回復試験終了時に雄の 125 mg/kg 群の 4 例にみられた肝臓の肥大に相当する組織学的所見は観察されなかった。

以上の結果、雌雄とも 5 mg/kg では障害作用は認められなかったものの、病理組織学的にメトヘモグロビン血症の代償作用と考えられる変化が認められ、無影響量は 5 mg/kg 以下と考えられた。

2. 試験題目 : N-メチルアニリンのラットを用いる28日間の反復投与毒性試験

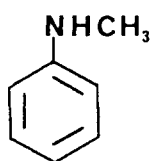
3. 試験目的 : 新規化学物質の安全性を評価するため、環保業第 700号、薬発第1039号、61基局第1014号（昭和61年12月 5 日）の「新規化学物質に係る試験の方法について」に従って、ラットを用いる28日間の反復投与毒性試験を行った。

なお、試験の実施は環企研第 233号、衛生第38号、63基局第 823号（昭和63年11月18日）の「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設について」の基準を満たすものとした。

4. 試験番号 : 2 2 9 1 (115-027)

9. 被 験 物 質 :

- 1) 被験物質名 N-メチルアニリン
- 2) CAS No. 100-61-8
- 3) ロット番号
- 4) 純 度 99.4 wt % (その他、不純物としてN, N-ジメチルアニリン
を 0.5 wt %含む)
- 5) 提 供 先
- 6) 保 管 条 件 冷暗所
- 7) 保 管 場 所 安評センター被験物質保管庫
- 8) 別 名 メチルフェニルアミン
- 9) 化 学 名 N-メチルアニリン
- 10) 化学構造



- 11) 分 子 式 C₆H₅NHCH₃
- 12) 分 子 量 107.16
- 13) 物質の状態 液体
- 14) 色 無色あるいは微黄色
- 15) 臭 刺激性の臭気

- 16) 融 点 -57°C
- 17) 沸 点 $194 \sim 196^{\circ}\text{C}$
- 18) 溶 解 性 アルコール、エーテルに可溶、水にわずかに溶ける。
- 19) 安 定 性 比較的安定
- 20) 分 配 係 数 $\text{Log Pow} = 1.71 (20^{\circ}\text{C})$
(Octanol/Water)
- 21) 比 重 $0.99 (20^{\circ}\text{C})$
- 22) 蒸 気 圧 0.5 mmHg
- 23) 取り扱い上の注意 わずかの加熱により発火する危険性がある。
取り扱い中は適切な保護眼鏡、保護手袋、有毒ガス用防毒マスク
を着用し、取り扱い後は手洗いおよびうがいを充分行った。
- 24) 被験物質保管および 投与終了後、約 2 g を安評センターに保管し、残りは処分した。
残余被験物質の処理

なお、実測した結果は『Reference data 1』に示した。

1 0. 試験材料および方法：

1) 供試動物

供試したラットCD (SD) 系は日本チャールス・リバー株式会社（神奈川県厚木市）から平成5年10月20日に4週齢で雌雄各 50 匹、計 100匹を購入した。

動物を検収し試験環境に8日間馴化後、平成5年10月28日に6週齢で投与を開始した。動物はあらかじめ体重によって層別化し、無作為抽出法により各試験群を構成するように群分けした。余剰動物は炭酸ガスにより安楽死させた。

動物の耳介に群番号および群内番号を入墨すると共に個体別飼育ケージに動物標識番号 (Animal ID-No.) を付すことにより個体識別した。

投与開始時の体重は雄で 129~144 g、雌で 111~122 g であった。

2) 動物種および系統選択理由

感染性疾患に対する抵抗性、遺伝的安定性を考慮して選んだ。

3) 飼育管理

a. 飼育環境

動物はバリアシステムの飼育室 (W 4.2 × D 8.2 × H 2.5 m、86.1 m³) で飼育し、環境調節の目標値は温度23±2℃、相対湿度55±10%、換気回数1時間20回、照明 150~300 lux 12時間（午前7時点灯、午後7時消灯）とした。

株式会社 東京技研サービス（東京都府中市）の水洗式飼育機 (W 674.2 × D 48.0 × H 175.5 cm) を使用し、アルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ (W 20.0 × D 28.2 × H 18.0 cm、飼育ケージ・スペース10,152 cm³) に動物を1匹ずつ収容し飼料と水を自由に摂取させた。

飼育ケージは隔週1回、給餌器は週1回取り換えた。

なお、動物の馴化期間を含め、投与および回復期間中、データの信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因の変化はなかった。

b. 飼 料

動物に与えた飼料はオリエンタル酵母工業株式会社（東京都中央区）製造の放射線滅菌改良NIH公開ラット、マウス飼料 (Modified NIH Open Formula Rat and Mouse Ration) を使用した。使用した飼料の夾雑物の分析を、オリエンタル酵母工業株式会社が財団法人日本食品分析センター（東京都渋谷区）に依頼し実施した。その結果を『Reference data 2』に示した。

c. 給 水

動物には水道水を自動給水ノズルより自由に摂取させた。

水道法に基づく水道水の分析を財団法人 静岡県生活科学検査センター（静岡県浜松市）に依頼し実施した。その分析結果を『Reference data 3』に示した。

4) 試験群の構成

試験群の構成を下記に示した。

用量は 0、5、25 および 125 mg/kg とし、動物数は 1 群雌雄各 5 匹、また、回復試験用として、対照群および高用量群に雌雄各 5 匹、計 60 匹を使用した。

試験群	1		2		3		4	
用量 (mg/kg)	0*		5		25		125	
性	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
動物数	10	10	5	5	5	5	10	10
投与終了時	1001	2001	1101	2101	1201	2201	1301	2301
計画屠殺	?	?	?	?	?	?	?	?
動物番号	1005	2005	1105	2105	1205	2205	1305	2305
回復終了時	1006	2006					1306	2306
計画屠殺	?	?	—	—	—	—	?	?
動物番号	1010	2010					1310	2310

* コーンオイルのみを投与した。

[用量設定理由]

本試験に先立って用量設定のための 2 週間投与試験（投与量：0、10、50、250 および 500 mg/kg）を実施した。その結果、雌雄とも 50 mg/kg 以上の群で、血液学的検査値、脾臓の重量または色調の変化が認められた。従って、28 日間反復投与試験の高用量は、2 週間投与試験の高用量 250 mg/kg の半分量である 125 mg/kg が適切と考えられ、以下公比 5 で除し、中用量を 25 mg/kg、低用量を 5 mg/kg に設定した。

5) 投与方法

被験物質の投与経路は経口とした。被験物質はコーンオイル（ナカライテスク株式会社、京都府京都市）に溶解し、胃ソンドを用いて強制経口投与した。

投与容量は体重 100 g 当り 0.5 ml とした。

対照群にはコーンオイルのみを投与した。

6) 投与液の調製

N-メチルアニリンは、各用量ごと（5、25および 125 mg/kg）に所定量を電子式上皿天秤で秤量し、メノウ乳鉢を用いてコーンオイルに溶解した。

調製は週に 1 回行い、調製液は使用時まで冷暗所に保存した。

7) 投与期間

投与期間は28日間とし、投与終了後、0 および 125 mg/kg群については2週間の回復試験を実施した。

8) 被験物質の分析

投与液中の被験物質の安定性および均一性／濃度は下記の如く分析した。

a. 安定性（冷暗所放置）

被験物質のコーンオイル中での安定性を確認するため、投与開始前に 5 mg/kgについて、調製直後、冷暗所保存 1 および 2 週後に濃度分析を行った。

b. 均一性／濃度分析

0、5、25および 125 mg/kgの投与液について適切に混合と処方がされているかどうか、投与開始時および最終投与時に新しく混合したバッチから無作為にサンプルを抽出し分析した。

安定性、均一性／濃度分析の方法および結果は『Reference data 4』に示した。

1 1. 観察、測定および検査：

1) 一般状態の観察

全動物を毎日2回観察し、中毒症状の有無、行動異常、死期の迫った動物、死亡動物等を臨床観察所見記録シートに記録した。

2) 体 重

体重は投与開始から回復試験終了まで毎週1回測定した。

測定は自動天秤 PE 3000 (メトラー社、スイス) を用いて行い、フロッピー・ディスクに記録した。

3) 摂 餌 量

摂餌量は毎週1回給餌した残量を自動天秤 PE 3000 (メトラー社、スイス) を用いて測定し、フロッピー・ディスクに記録した。摂餌量 (g/week) および飼料効率 (%) はコンピュータを用いて算出した。

4) 臨床検査

臨床検査は投与終了時および回復試験終了時の計2回実施した。

採血に当り、動物は約16時間絶食させた。動物をエーテルで麻酔後開腹し、腹部大動脈から採血した。

なお、抗凝固剤はEDTA-3Kおよびクエン酸ソーダを用いた。

a. 血液学的検査

血液学的検査には初血を用いた。

検査は総合血液学検査装置 THMS H 6000 (テクニコン社、米国) を用いて行い、下記の項目を測定した (EDTA-3K添加血液)。

白 血 球 数	(WBC)	暗視野板法
赤 血 球 数	(RBC)	暗視野板法
ヘモグロビン量	(HGB)	シアンメトヘモグロビン法
ヘマトクリット値	(HCT)	全赤血球の容積より補正
平均赤血球容積	(MCV)	RBC, HCTより算出
平均赤血球血色素量	(MCH)	HGB, RBCより算出
平均赤血球血色素濃度	(MCHC)	HGB, HCTより算出
血 小 板 数	(PLT)	暗視野板法
白 血 球 百 分 率		フローサイトケミストリー法

白血球百分率は上述の機器で測定したが、別途血液塗抹標本を作製し、メイ・グリュンワルド・ギムザ染色して保管した。

網赤血球（RC）率算定のため血液を網赤血球染色用ガラス毛細管キャピロット（テルモ株式会社、東京都渋谷区）で染色後、血液塗抹標本を作製し鏡検した。

下記の項目は血液凝固測定装置 KC-40（アメルング社、独国）を用いて測定した。血漿を用いた（クエン酸ソーダ添加血液）。

プロトロンビン時間	(PT)	quick 1 段法
活性化部分トロンボプラスチン時間	(APTT)	クロット法
フィブリノーゲン量	(Fibrinogen)	トロンビン時間法

b. 血液化学的検査

血液化学的検査は多項目生化学自動分析装置 CentrifChem ENCORE II（ベーカー社、米国）および EKTACHEM 700N（コダック社、米国）を用いて下記の項目を測定した。血液をクリーンシール（株式会社ヤトロン、東京都千代田区）に採取し、30分間放置後 3000 r. p. m. で7分間遠心分離して得た血清を用いた。

総 蛋 白	(TP)	ビュレット法
ア ル ブ ミ ン	(Alb)	B. C. G. 法
A/G	(A/G)	計算値
血 糖	(Glu)	グルコースオキシダーゼ法
中 性 脂 肪	(TG)	酵素法
総コレステロール	(T-Chol)	酵素法
尿 素 窒 素	(BUN)	ウレアーゼ改良法
クレアチニン*	(Crea)	アルカリ性ピクリン酸比色法
総ビリルビン	(T. Bili)	ジアゾ色素法
カルシウム	(Ca)	アルセナゾⅢ色素法
無 機 リ ン	(IP)	モリブデン酸アンモニウム法
ナ ト リ ウ ム	(Na)	電極法
カ リ ウ ム	(K)	電極法
塩 素	(Cl)	電極法
グルタミン酸オキザロ酢酸 トランスアミナーゼ*	(GOT)	Karmen改良法
グルタミン酸ピルビン酸 トランスアミナーゼ*	(GPT)	Karmen改良法
γ-グルタミルトランス ペプチダーゼ*	(γ-GTP)	Szasz 改法
アルカリホスファターゼ*	(ALP)	Bessey-Lowry-Brock改良法

* 印の項目は ENCORE II で、他は EKTACHEM で測定した。

c. 尿検査

代謝ケージを用いて24時間（午前10時から翌日午前10時まで）尿を採取した。なお、採尿中も給餌および給水を行った。下記の項目を検査した。

尿 量
色 調
濁 度
尿 比 重
沈 渣

尿比重は尿比重屈折計UR-S（株式会社アタゴ、東京都板橋区）を用いて測定した。沈渣は尿を 1500 r. p. m. で5分間遠心分離した後、染色（ステルンハイマー染色変法）し、鏡検した。

下記の項目の測定にはN-マルティスティックスSG（マイルス・三共株式会社、東京都中央区）を用い、判定は尿分析装置 CLINITEK 200（マイルス社、米国）を用いた。検査には排泄3時間以内の新鮮尿を用いた。

pH
潜 血
ケ ト ン 体
糖
蛋 白
ビリルビン
ウロビリノーゲン

5) 病理学的検査

病理解剖は投与終了時および回復試験終了時に動物をエーテル麻酔し、放血致死させ実施した。肉眼的所見を病理解剖所見記録用紙に記録した。

器官重量は器官重量測定用自動天秤 PE 160（メトラー社、スイス）を用いて、脳、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および卵巣について測定し、器官重量・体重比を算出した。

上記重量測定器官と下垂体、眼球、甲状腺（上皮小体を含む）、心臓、肺、胃、膀胱、骨髓（大腿骨）および肉眼所見で変化が認められた器官・組織は10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

株式会社 関東組織形態研究所（埼玉県与野市）で常法に従って病理組織標本を作製した。標本の染色はヘマトキシリン・エオジン染色とした。鏡検は安評センターで実施し、病変の種類および程度について記録した。

病理組織学的検査は固定した器官・組織のうち、投与終了時に解剖した対照群と高用量群の心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎および骨髓（大腿骨）について検索した結果、高用量群の肝臓、脾臓、腎臓および骨髓で、被験物質の影響と考えられる所見が観察されたので、他の用量群および回復群についても実施した。

6) データの記録および統計分析

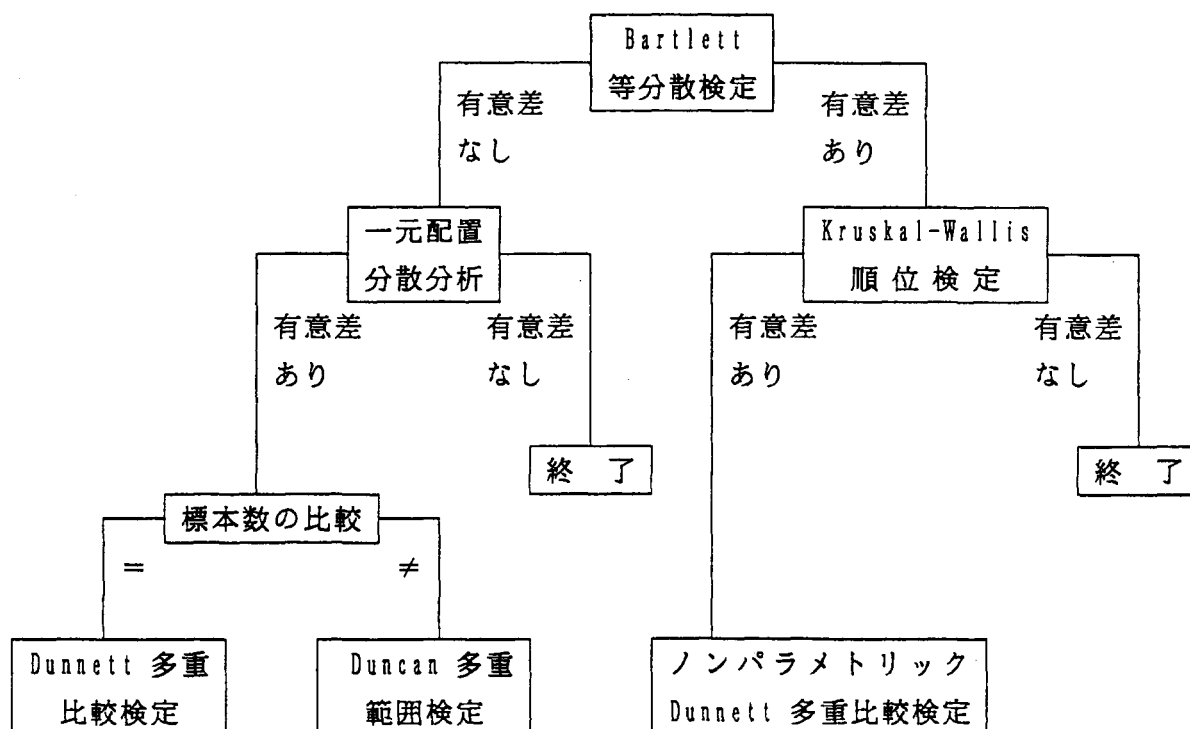
本試験の諸データはコンピュータ・システムを用いて記録し、統計分析した。

各試験群の体重、摂餌量、飼料効率、血液学的検査値、血液化学的検査値、尿検査値（尿量および尿比重のみ）、器官重量および器官重量・体重比は、下記に示した自動判別方式に従い、最初に Bartlett の等分散検定を実施した。等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、分散が有意で各群の標本数が同数の場合は Dunnett の多重比較検定、各群の標本数が異なる場合は Duncan の多重範囲検定で対照群と各投与群間の有意差を検定した。

Bartlett の等分散検定で不等分散の場合は Kruskal-Wallis の順位検定を実施し、有意の場合はノンパラメトリックの Dunnett の多重比較検定で対照群と各投与群間の有意差を検定した。また、病理学的検査結果については Fisher の直接確率検定を実施した。

有意水準は 5 および 1 % の片側検定で実施した。

なお、Bartlett の等分散検定、一元配置の分散分析および Kruskal-Wallis の順位検定の有意水準は 5 % で全群間の有意差を検定した。



12. 試験結果:

1) 死亡率

生存率を Figure 1 に、生存数および死亡率を Table 1 に示した。

投与期間中、雌雄とも対照群を含むすべての群で死亡例は認められなかった。また、回復期間中においても、雌雄の対照群および 125 mg/kg 群で死亡例は認められなかった。

2) 一般状態の観察

一般状態の観察所見を Table 2 および Appendix 1 に示した。

雄では、125 mg/kg 群でチアノーゼが投与3週に3例、投与4週に9例観察された。チアノーゼは回復期間に入っても継続して観察され、回復1週に4例、回復2週に1例に認められた。その他、5 および 125 mg/kg 群で外傷が投与4週に各1例観察された。

雌では、125 mg/kg 群でチアノーゼが投与4週に4例観察された。チアノーゼは回復期間に入っても引続き観察され、回復1週に3例に認められたが、回復2週には消失した。その他、125 mg/kg 群で外傷が回復2週に1例に観察された。

3) 体重

体重を Figure 2、Table 3 および Appendix 2 に示した。

投与期間中は、雌雄いずれの投与群も対照群と差のない増加推移を示した。

回復期間では、雄の 125 mg/kg 群で回復2週に対照群に比較して高値が認められ、雌では対照群と 125 mg/kg 群とで差がなかった。

4) 摂餌量

摂餌量を Figure 3、Table 4 および Appendix 3 に示した。

投与1週に雌の 125 mg/kg 群で対照群に比較して僅かに減少が認められた以外、雌雄の各投与群とも対照群と差が認められなかった。

回復期間では、雄の 125 mg/kg 群で回復1および2週に対照群に比較して増加が認められた。

5) 飼料効率

飼料効率を Figure 4、Table 5 および Appendix 4 に示した。

投与期間中は、雌雄いずれの投与群も対照群との間に差が認められなかった。

回復期間では、雄の 125 mg/kg 群で回復2週に対照群に比較して高値が認められ、雌では対照群と 125 mg/kg 群とで差がなかった。

6) 血液学的検査

血液学的検査結果を Table 6 および Appendix 5 に示した。

投与終了時の検査結果

雄では、対照群に比較して 25 および 125 mg/kg群でヘマトクリット値、ヘモグロビン量および赤血球数が低値、網赤血球率が高値を示し、さらに、25 mg/kg群で MCHC の低値、125 mg/kg 群で MCV、MCH、MCHC および単球比率の高値が認められた。

雌では、対照群に比較してすべての投与群でヘモグロビン量が低値を示し、さらに、25 および 125 mg/kg群でヘマトクリット値および赤血球数の低値、網赤血球率の高値、25 mg/kg 群で MCHC の低値、125 mg/kg 群で MCV、MCH および MCHC の高値が認められた。その他、5 mg/kg 群で MCVおよび MCHの低値がみられたが、軽微かつ用量相関性のない変化であった。

回復期間終了時の検査結果

雄では、対照群に比較して 125 mg/kg群でヘマトクリット値、ヘモグロビン量、MCV、MCH および白血球数が高値を示し、赤血球数が低値を示した。

雌では、対照群に比較して MCV、MCH および MCHC が高値、赤血球数が低値を示した。

7) 血液凝固検査

血液凝固検査結果を Table 7および Appendix 6 に示した。

投与終了時の検査結果

雄では、対照群に比較して 5 mg/kg群で活性化部分トロンボプラスチン時間の短縮が認められたが、軽微かつ用量相関性のない変化であった。

雌では、対照群に比較して 125 mg/kg群でプロトロンビン時間の僅かな延長が認められた。その他、5 mg/kg 群でもプロトロンビン時間の延長が認められたが、軽微かつ用量相関性のない変化であった。

回復期間終了時の検査結果

雄では、対照群に比較して 125 mg/kg群で活性化部分トロンボプラスチン時間の短縮が認められた。

雌では、対照群と 125 mg/kg群で3検査項目とも差が認められなかった。

8) 血液化学的検査

血液化学的検査結果を Table 8および Appendix 7 に示した。

投与終了時の検査結果

雄では、対照群に比較して 125 mg/kg群で A/G、GOT および総ビリルビンが高値を示した。

雌では、対照群に比較してすべての投与群でクレアチニンが高値を示し、さらに、125 mg/kg 群で総ビリルビンが高値を示した。

回復期間終了時の検査結果

雄では、対照群に比較して 125 mg/kg群で総ビリルビンが低値を示した。

雌では、対照群に比較して 125 mg/kg群で GPTが低値、塩素が高値を示した。

9) 尿 検 査

尿検査結果を Table 9および Appendix 8 に示した。

投与終了時の検査結果

雄では、対照群に比較して 25 および 125 mg/kg群でケトン体⁺動物が増加し、さらに 125 mg/kg 群で全例が黄褐色尿を示し、尿量が増加傾向にあった。

雌では、対照群に比較して 125 mg/kg群で黄褐色尿動物が僅かに増加し、尿量が増加傾向にあった。

回復期間終了時の検査結果

雄では、対照群に比較して 125 mg/kg群で尿量の増加、尿比重の低値が認められた。

雌では、125 mg/kg 群で黄褐色尿を示した動物が 1 例認められた。

10) 器官重量

器官重量を Table 10 および Appendix 9 に示した。

投与終了時の結果

雄では、対照群に比較して 125 mg/kg群で脾臓重量が高値を示した。その他、25 mg/kg群で脳重量が高値を示したが、用量相関性のない変化であった。

雌では、対照群に比較して 25 および 125 mg/kg群で脾臓重量が高値を示した。その他、25 mg/kg群で脳重量が低値を示したが、軽微かつ用量相関性のない変化であった。

回復期間終了時の結果

雄では、対照群に比較して 125 mg/kg群で肝臓および脾臓重量が高値を示した。

雌では、対照群に比較して 125 mg/kg群で脳および脾臓重量が高値を示した。

11) 器官重量・体重比

器官重量・体重比（相対重量）を Table 11 および Appendix 10に示した。

投与終了時の結果

雄では、対照群に比較して 25 および 125 mg/kg群で脳および腎臓相対重量が高値を示し、さらに、125 mg/kg 群で脾臓相対重量が高値を示した。

雌では、対照群に比較して 25 および 125 mg/kg群で脾臓相対重量が高値を示した。その他、25 mg/kg群で脳相対重量が低値を示したが、軽微かつ用量相関性のない変化であった。

回復期間終了時の結果

雄では、対照群に比較して 125 mg/kg群で肝臓および脾臓相対重量が高値、脳相対重量が低値を示した。

雌では、対照群に比較して 125 mg/kg群で脾臓相対重量が高値を示した。

12) 病理学的検査

剖検所見を Table 12 および Appendix 11に、組織学的所見は Table 13 および Appendix 12 に示した。

病理学検査の結果、投与終了時において対照群に比較して被験物質投与群で多く見られた剖検所見は、脾臓の黒色化が 25 および 125 mg/kg群の雌雄全例に、肥大が雄の 25 および 125 mg/kg群の全例、雌の 25 および 125 mg/kg群の 3 および全例に観察された。また、肝臓の黒色化が 125 mg/kg群の雌雄全例に観察され、腎臓の黒色化が雄の 125 mg/kg群の 4 例、雌の 125 mg/kg群の全例に観察された。その他の剖検所見は、ごく僅かな発生であった。

組織学的には、脾臓の充血が雄の 5、25および 125 mg/kg群の全例、雌の 25 および 125 mg/kg 群の全例に、造血亢進が 25 および 125 mg/kg群の雌雄全例に、色素沈着が雄の 25および 125 mg/kg群の全例、雌の対照群の 2 例、5、25および 125 mg/kg群の全例に、骨髓の造血亢進が雄の 125 mg/kg群の全例、雌の 25 および 125 mg/kg群の 4 および全例に観察された。また、肝臓の髄外造血が雄の 25 および 125 mg/kg群の 3 および全例、雌の 25 および 125 mg/kg群の 2 および全例に、色素沈着が 25 および 125 mg/kg群の雌雄でそれぞれ 1 および全例に、腎臓の近位尿細管の色素沈着が 125 mg/kg群の雌雄全例に観察された。硝子滴変性は雄の 5、25および 125 mg/kg群の 3、4 および全例に観察され、125 mg/kg 群の全例で程度の増加が認められた。その他の所見として対照群を含め観察されたものを下記に示す。

- | | |
|--------|---|
| (1) 肝臓 | 脂肪化：雌雄ともにやや高い発生率を示した。
肉芽巣：雄では殆どの例に観察されたが、雌では高い発生率を示した。 |
| (2) 腎臓 | 好塩基化：雌では高い発生率を示したが、それに比較して雄にやや多く発生した。
石灰沈着：雌ではやや高い発生率を示したが、それに比較して雄にやや多く発生した。
管腔拡張：雌雄ともに低い発生であった。
細胞巣：雌雄ともに低い発生であった。 |

その他、観察された所見はごく僅かか、単発性の発生に止まった。なお、雌の 25 mg/kg群の 1 例に、自然発生と考えられる腎嚢胞が、胆管拡張を伴って観察された。

回復試験終了時において対照群に比較して被験物質投与群で多く見られた剖検所見は、脾臓の黒色化および肥大が 125 mg/kg 群の雌雄全例に観察された。また、肝臓の肥大が雄の 125 mg/kg 群の 4 例に観察された。その他の剖検所見は、単発性の発生であった。

組織学的には、脾臓の充血、肝臓および腎臓の色素沈着が 125 mg/kg 群の雌雄全例に観察された。腎臓の近位尿細管の硝子滴変性は 125 mg/kg 群の雄の全例で投与終了時と同程度の変化が観察された。脾臓の色素沈着は雄の 125 mg/kg 群の全例、雌の対照群および 125 mg/kg 群の全例で観察されたが、125 mg/kg 群の雌雄全例で投与終了時に比べて程度の増加が認められた。また、剖検所見で回復試験終了時に雄の 125 mg/kg 群の 4 例にみられた肝臓の肥大に相当する組織学的所見は観察されなかった。

その他の所見として対照群を含め観察されたものを下記に示す。

- (1) 肝臓 脂肪化：雌にやや高い発生率を示した。
 肉芽巣：雄では殆どの例に観察されたが、雌では高い発生率を示した。
- (2) 腎臓 好塩基化：雌ではやや高い発生率を示したが、それに比較して雄により多く発生した。
 石灰沈着：雄では高い発生率を示したが、雌ではやや高い発生率を示した。

その他、観察された所見は単発性の発生に止まった。

13. 考察および結論：

一般状態の観察の結果、雌雄とも 125 mg/kg 群でチアノーゼが観察された。芳香族アミノ化合物は、芳香族ニトロ化合物同様メトヘモグロビン血症を誘発させることが知られており^{1, 2, 3)}、本化合物でも予備試験でメトヘモグロビンの増加が認められ、チアノーゼの原因はメトヘモグロビンによるものと推察される。その他、雌雄の少数例で外傷が認められたが、掻き傷であった。

死亡例は、雌雄いずれの群にも認められなかった。

体重および摂餌量は、投与期間中、雌雄とも群間で明確な差が認められなかったが、回復期間では、雄の 125 mg/kg 群で摂餌量が増加し、体重も回復 2 週に高値を示した。

血液学的検査の結果、前述のとおり本被験物質はメトヘモグロビン血症をおこすため、雌雄とも 25 および 125 mg/kg 群で貧血が認められ、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量および赤血球数は低値を示し、赤血球恒数にも変化が認められ、網赤血球率も著しい増加を示した。ヘモグロビン量の低値は、雌の 5 mg/kg 群でも認められたが、同群の値は背景値 (14.2 ± 0.5 mg/dl、 $n = 35$) の範囲内の値であった。回復期間終了時の検査結果では、貧血に回復傾向が認められたが、125 mg/kg 群の赤血球数は対照群に比較して僅かながら低値であり、完全回復には至らなかった。

血液凝固検査の結果、雌の 125 mg/kg 群でプロトロンビン時間の延長が認められたが、軽微な変化で毒性学的意義は乏しいと考えられた。

血液化学的検査の結果、雌雄の 125 mg/kg 群で認められた総ビリルビンの高値、雌の 125 mg/kg 群で認められたクレアチニンの高値は、メトヘモグロビン血症に溶血が伴ったためと考えられるが、尿中ウロビリノーゲンの高値が認められないことから、溶血は軽度と考えられる。雌におけるクレアチニンの高値は 5 および 25 mg/kg 群でも認められたが、対照群の値が低値傾向にあり、これら両群の値は背景値 (0.63 ± 0.06 mg/dl、 $n = 35$) の範囲内の値であった。その他、雄の 125 mg/kg 群で GOT および A/G 比が高値を示したが、GOT は逸脱酵素であるが病理組織学的に対応すると考えられ臓器に障害は認められず、溶血が起因とも考えられる。また、A/G 比の高値は、総蛋白およびアルブミンは対照群と差がないことから、特に意義はないと考えられる。回復期間終了時の検査では、投与終了時に認められた変化はいずれも回復した。

尿検査の結果、雌雄の 125 mg/kg 群で黄褐色尿動物の増加が認められた。血液および血液化学的検査結果などから、メトヘモグロビン尿も考えられるが、尿量が増加傾向にあり、潜血およびウロビリノーゲンの高値は認められず、色調変化も暗赤色ではなく黄褐色であることなどから明確ではなかった。回復期間終了時の検査では、雄の 125 mg/kg 群で尿量の増加（尿比重の低値）、雌の同群で黄褐色尿動物が認められ、完全な回復までには至らなかった。

器官重量測定の結果、雄の 125 mg/kg 群、雌の 25 および 125 mg/kg 群で認められた脾臓の実重量および相対重量の高値が被験物質投与による血液毒性に随伴した変化と考えられた。回復期間終了時の検査では、雌雄の 125 mg/kg 群とも回復傾向が認められたものの完全には回復せず、雄の同群では肝臓の実重量および相対重量の増加が認められた。また、この群で認められた脳相対重量の低値は、体重高値による二次的変化と考えられた。雌の 125 mg/kg 群では脳実重量が高値を示したが、軽微な変化で意義のある変化とは考えられなかった。

病理学検査の結果、投与終了時に観察された剖検所見のうち、脾臓の黒色化と肥大は 25 mg/kg 以上の群の雌雄のほぼ全例で観察され、肝臓と腎臓の黒色化は 125 mg/kg 群の雌雄のほぼ全例に観察されたことから被験物質による変化と考えられた。脾臓の黒色化および肥大は、回復試験終了時においても 125 mg/kg 群の雌雄全例に観察されたことから、2 週間の回復期間においては不可逆性の変化と考えられた。また、回復試験終了時に観察された肝臓の肥大は雄の 125 mg/kg 群のみに 4 例発生したことから被験物質投与による変化であることが示唆された。

組織学的にも、投与終了時において脾臓、骨髓、肝臓、腎臓に被験物質投与によると示唆される変化を示した。すなわち、脾臓の充血が雄の 5 mg/kg 以上、雌の 25 mg/kg 以上の群の全例に、造血亢進が 25 mg/kg 以上の群の雌雄全例に認められた。また、色素沈着は雄の 25 mg/kg 以上の群の全例、雌の対照群の 2 例、5 mg/kg 以上の群の全例と、雄では被験物質投与群のみに観察され、雌でも対照群に比べて被験物質投与群に多く観察された。骨髓の造血亢進は雄の 125 mg/kg 群の全例、雌の 25 および 125 mg/kg 群の 4 および全例に、肝臓の髄外造血は雄の 25 および 125 mg/kg 群の 3 および全例、雌の 25 および 125 mg/kg 群の 2 および全例に、色素沈着は 25 および 125 mg/kg 群の雌雄それぞれ 1 および全例と、被験物質投与群においてはほぼ用量相関的な発生率の増加を示した。また、腎臓の近位尿細管の色素沈着が 125 mg/kg 群の雌雄全例と、被験物質投与群のみに観察され、硝子滴変性が雄の 5、25 および 125 mg/kg 群の 3、4 および全例と、被験物質投与群において用量相関的な発生率の増加を示し、125 mg/kg 群の全例で程度の増加を示した。

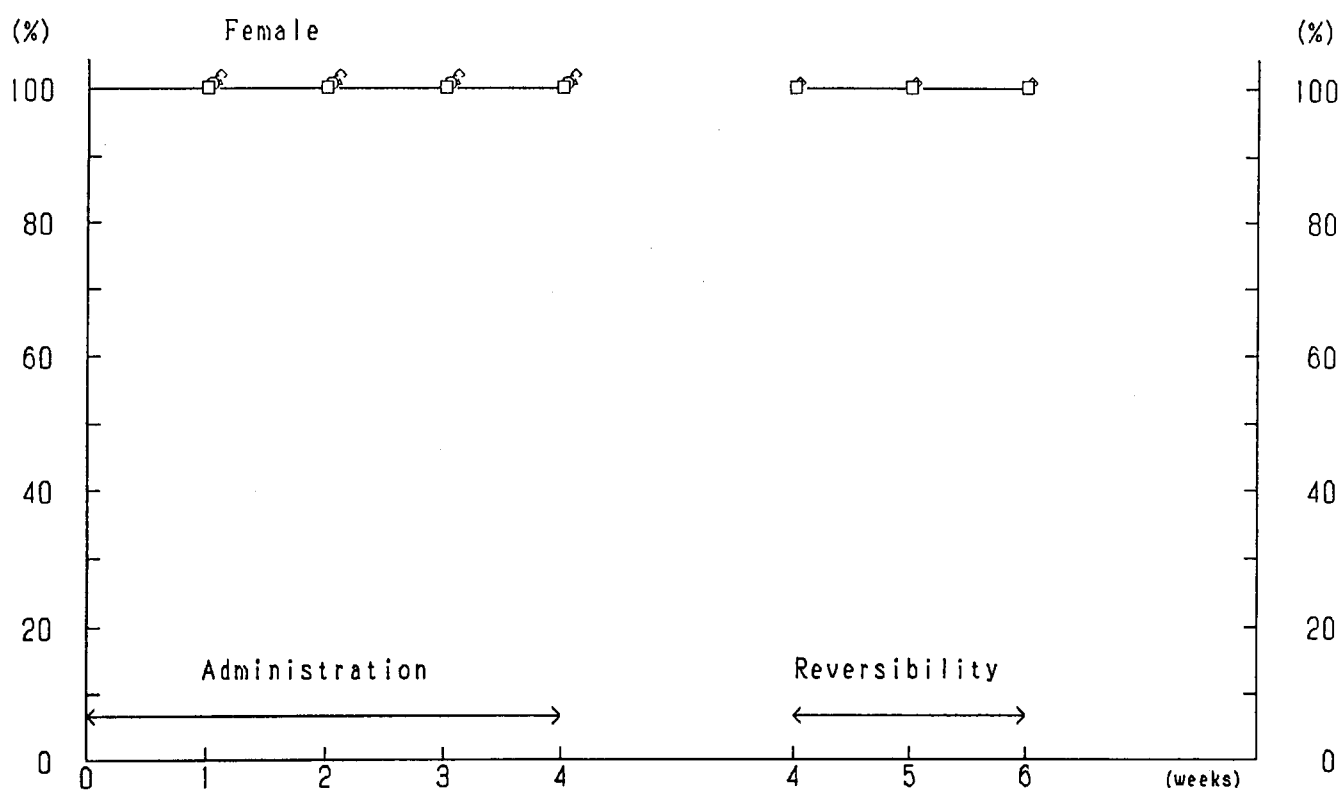
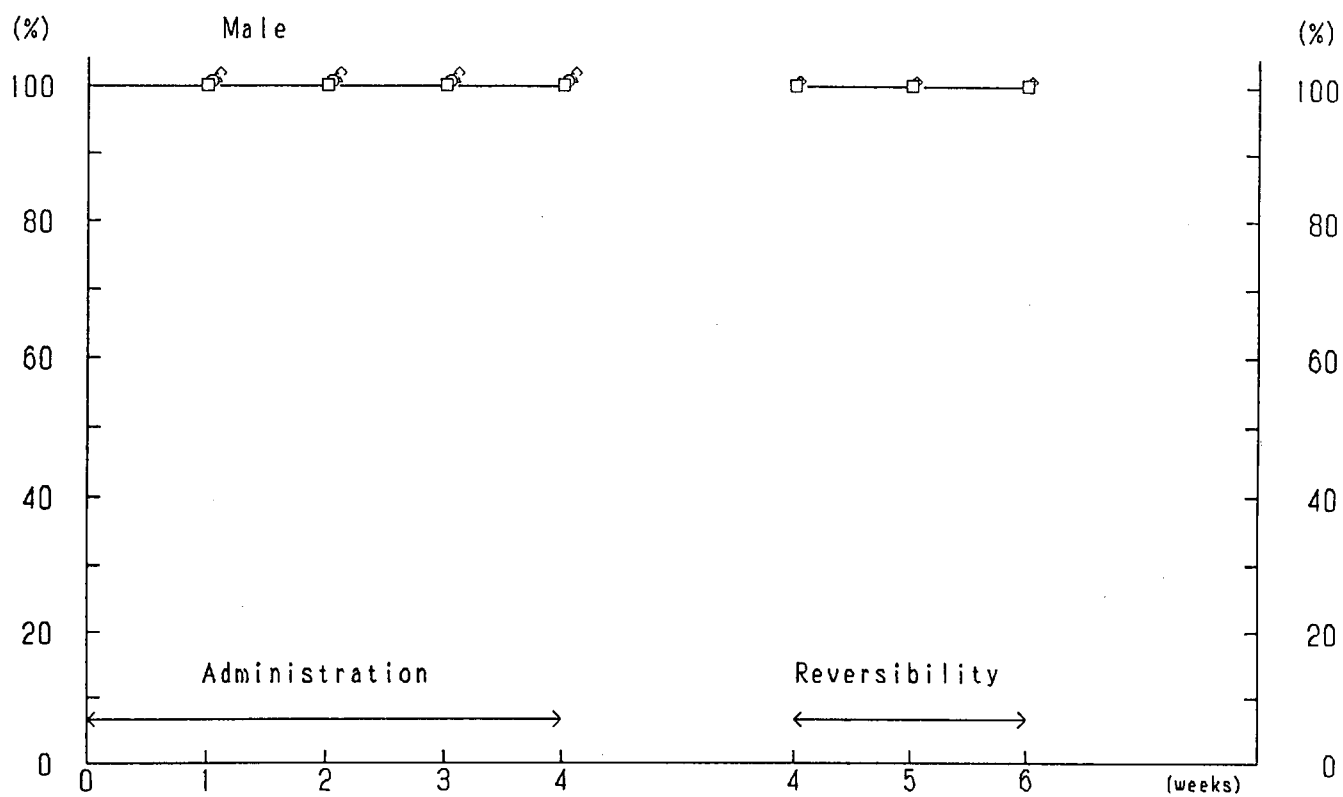
脾臓の充血、肝臓および腎臓の色素沈着は回復試験終了時においても 125 mg/kg 群の雌雄全例に観察され、腎臓の近位尿細管の硝子滴変性は投与終了時と同程度の変化が回復試験終了時に 125 mg/kg 群の雄の全例で観察されたことから、これらは同群では 2 週間の回復期間においては不可逆性の変化と考えられた。脾臓の色素沈着は、回復試験終了時に雄の 125 mg/kg 群の全例、雌の対照群および 125 mg/kg 群の全例に観察されたが、125 mg/kg 群の雌雄全例で投与終了時と比べて程度が増加した。また、剖検所見で回復試験終了時に雄の 125 mg/kg 群の 4 例に肝臓の肥大が観察されたが、相当する組織学的所見は観察されなかった。

以上の結果、雌雄とも 25 mg/kg 以上の群で血液毒性が認められ、5 mg/kg 群でもその代償作用と考えられる変化が組織学的に認められた。無影響量は 5 mg/kg 以下と判断される。

14. 参 考 文 献 :

- 1) Smith R. P. and Olson M. V., Drug-induce Methemoglobinemia. Seminars in Hematology, Vol. 10, No. 3 (July), 253-268 (1973)
- 2) 林 昭 メトヘモグロビン, 中毒研究, 1, 135-141 (1988)
- 3) Markosyan; T. M., Comparative toxicity of monomethylaniline and dimethylaniline in chronic test (Russ.). Gig. Sanit., 34, 7-11 (1969)

Figures, Tables



Exp. No. 2291(115-027)

Dose level (mg/kg)

—□— 0
 —○— 5
 —△— 25
 —◇— 125

Figure 1. Survival ratio

Table 1. Survival and mortality

Exp. No. 2291 (115-027)

Sex	Dose level (mg/kg)	Weeks of experiment						Mortality (%)
		1	2	3	4	5	6	
Male	0	10/10	10/10	10/10	10/10	5/5	5/5	0.0
	5	5/5	5/5	5/5	5/5			0.0
	25	5/5	5/5	5/5	5/5			0.0
	125	10/10	10/10	10/10	10/10	5/5	5/5	0.0
Female	0	10/10	10/10	10/10	10/10	5/5	5/5	0.0
	5	5/5	5/5	5/5	5/5			0.0
	25	5/5	5/5	5/5	5/5			0.0
	125	10/10	10/10	10/10	10/10	5/5	5/5	0.0

Number surviving / Number per group.

Table 2. Clinical observation

Exp. No. 2291 (115-027)

Sex: Male

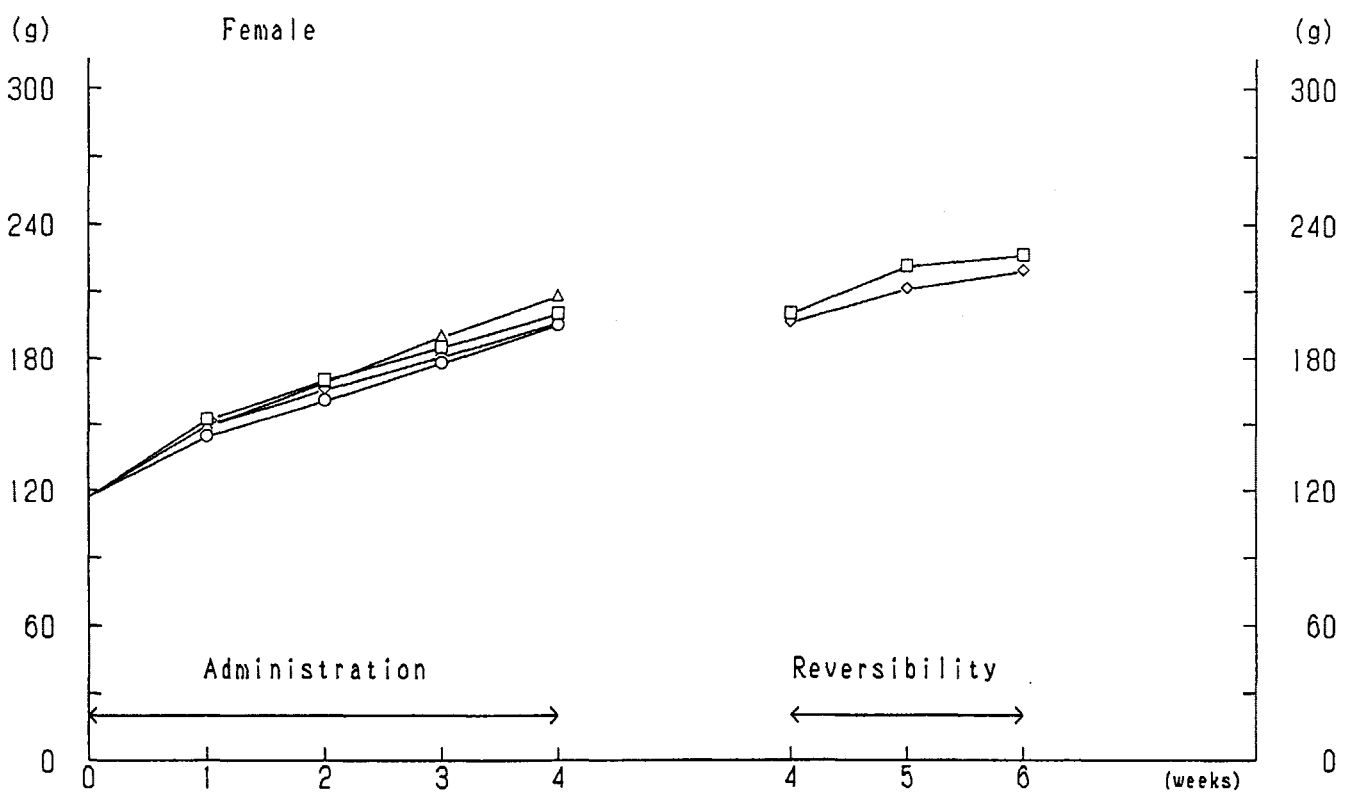
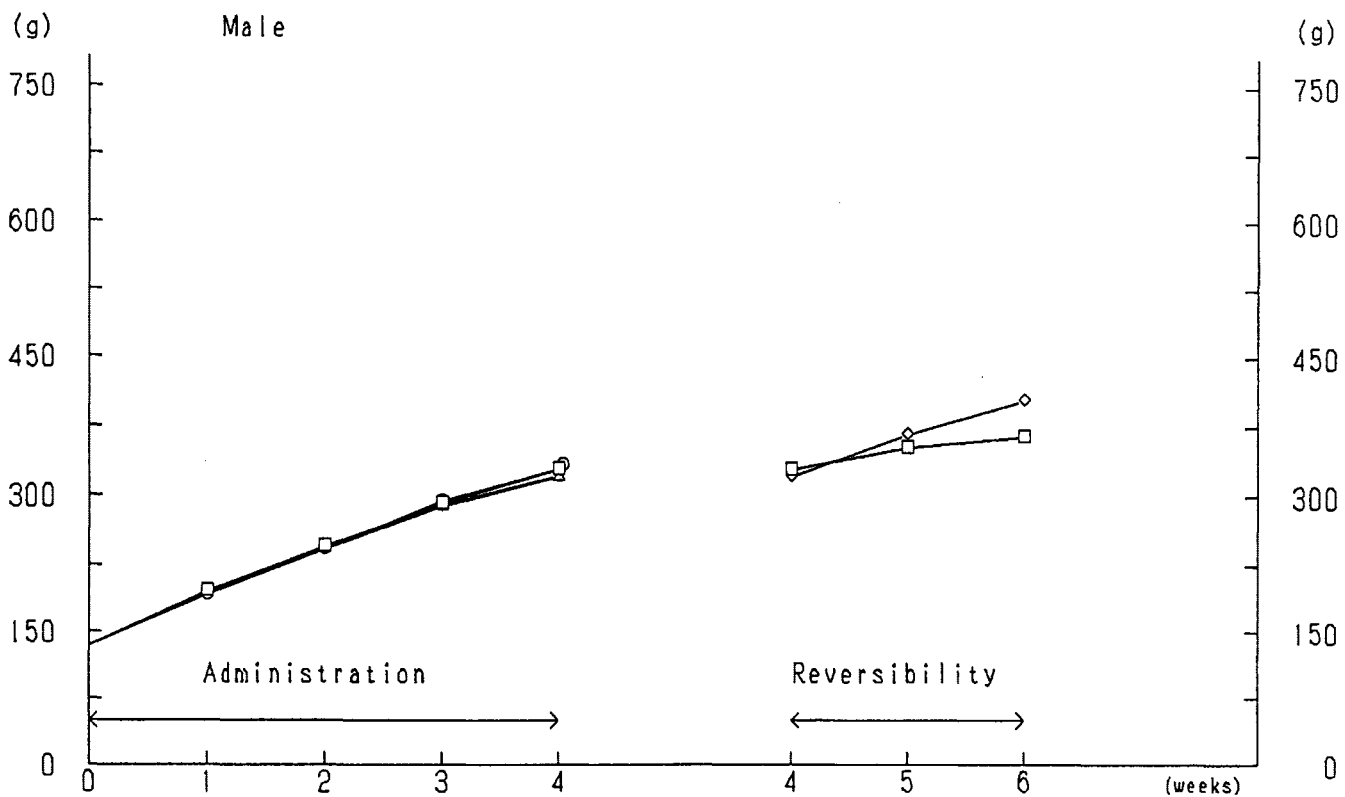
Signs	Dose level (mg/kg)	Weeks of experiment						Total (1 → 6)
		1	2	3	4	5	6	
normal/Number per group	0	10/10	10/10	10/10	10/10	5/5	5/5	10
	5	5/5	5/5	5/5	4/5	0/0	0/0	4
	25	5/5	5/5	5/5	5/5	0/0	0/0	5
	125	10/10	10/10	7/10	1/10	1/5	4/5	1
sacrificed	0	0	0	0	5	0	5	10
	5	0	0	0	5	0	0	5
	25	0	0	0	5	0	0	5
	125	0	0	0	5	0	5	10
trauma	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	1	0	0	1
	25	0	0	0	0	0	0	0
	125	0	0	0	1	0	0	1
cyanosis	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0
	25	0	0	0	0	0	0	0
	125	0	0	3	9	4	1	9

Table 2. -continued Clinical observation

Exp. No. 2291 (115-027)

Sex: Female

Signs	Dose level (mg/kg)	Weeks of experiment						Total (1 → 6)
		1	2	3	4	5	6	
normal/Number per group	0	10/10	10/10	10/10	10/10	5/5	5/5	10
	5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/0	0/0	5
	25	5/5	5/5	5/5	5/5	0/0	0/0	5
	125	10/10	10/10	10/10	6/10	2/5	4/5	5
sacrificed	0	0	0	0	5	0	5	10
	5	0	0	0	5	0	0	5
	25	0	0	0	5	0	0	5
	125	0	0	0	5	0	5	10
trauma	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0
	25	0	0	0	0	0	0	0
	125	0	0	0	0	0	1	1
cyanosis	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0
	25	0	0	0	0	0	0	0
	125	0	0	0	4	3	0	4



Exp. No. 2291(115-027)

Dose level (mg/kg)

□ 0
 ○ 5
 △ 25
 ◇ 125

Figure 2. Body weight

Table 3. Body weight

Exp. No. 2291 (115-027)

(unit : g)

Sex	Dose level (mg/kg)	Weeks of experiment 0	1	2	3	4
Male	0	135 ± 4	196 ± 7	245 ± 11	292 ± 16	328 ± 20
	5	135 ± 5	192 ± 14	243 ± 14	294 ± 15	328 ± 13
	25	135 ± 5	194 ± 12	242 ± 14	290 ± 17	321 ± 17
	125	135 ± 4	193 ± 9	244 ± 14	288 ± 14	320 ± 16
Female	0	117 ± 3	152 ± 8	170 ± 11	185 ± 11	200 ± 11
	5	117 ± 3	144 ± 4	161 ± 7	178 ± 14	195 ± 13
	25	117 ± 3	149 ± 11	169 ± 16	190 ± 22	208 ± 22
	125	117 ± 3	149 ± 9	166 ± 11	181 ± 12	196 ± 14

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

Table 3. -continued Body weight

Exp. No. 2291 (115-027)

(unit : g)

Sex	Dose level (mg/kg)	Gain (0 → 4)
Male	0	193 ± 19
	5	192 ± 9
	25	186 ± 20
	125	185 ± 17
Female	0	82 ± 11
	5	77 ± 15
	25	91 ± 24
	125	78 ± 12

Mean ± S. D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

Table 3. -continued Body weight

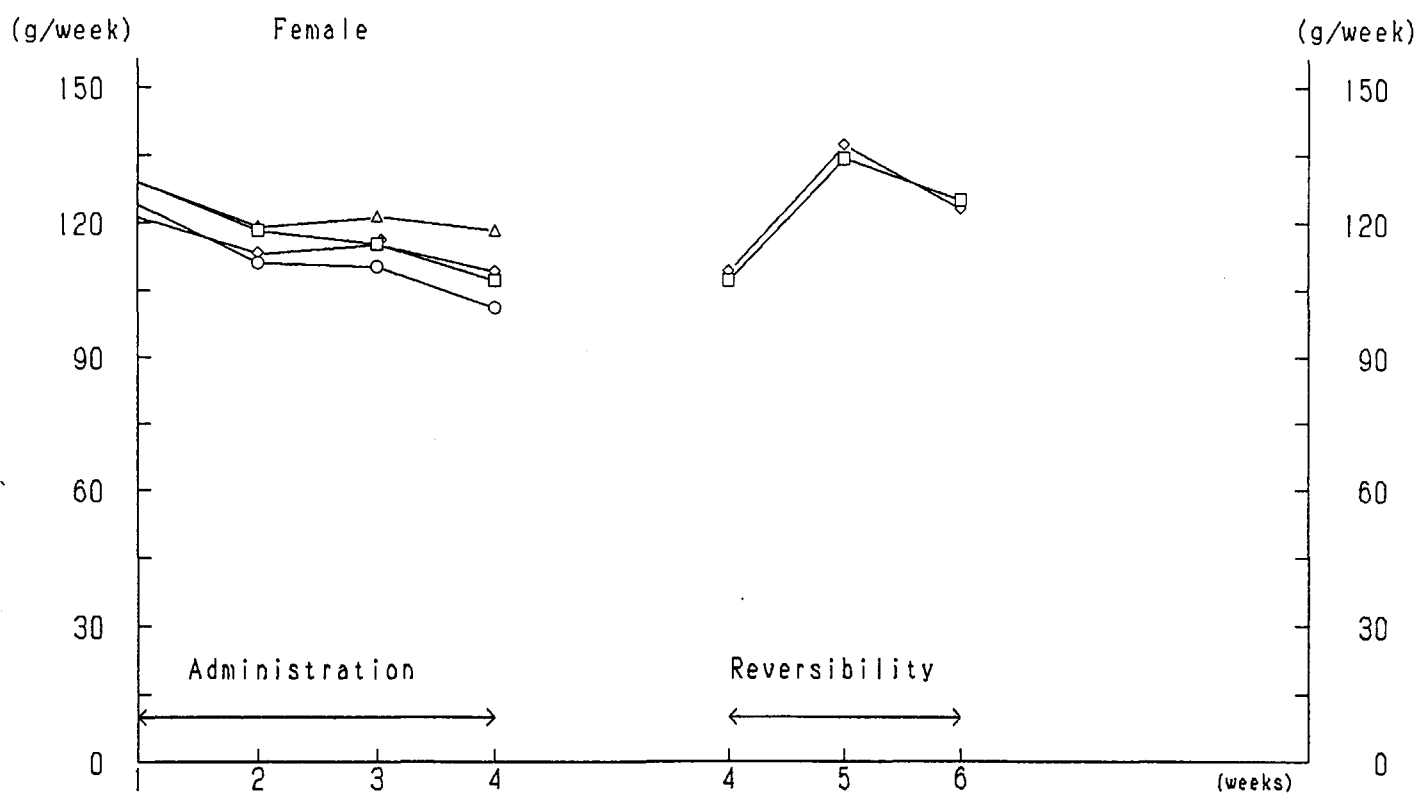
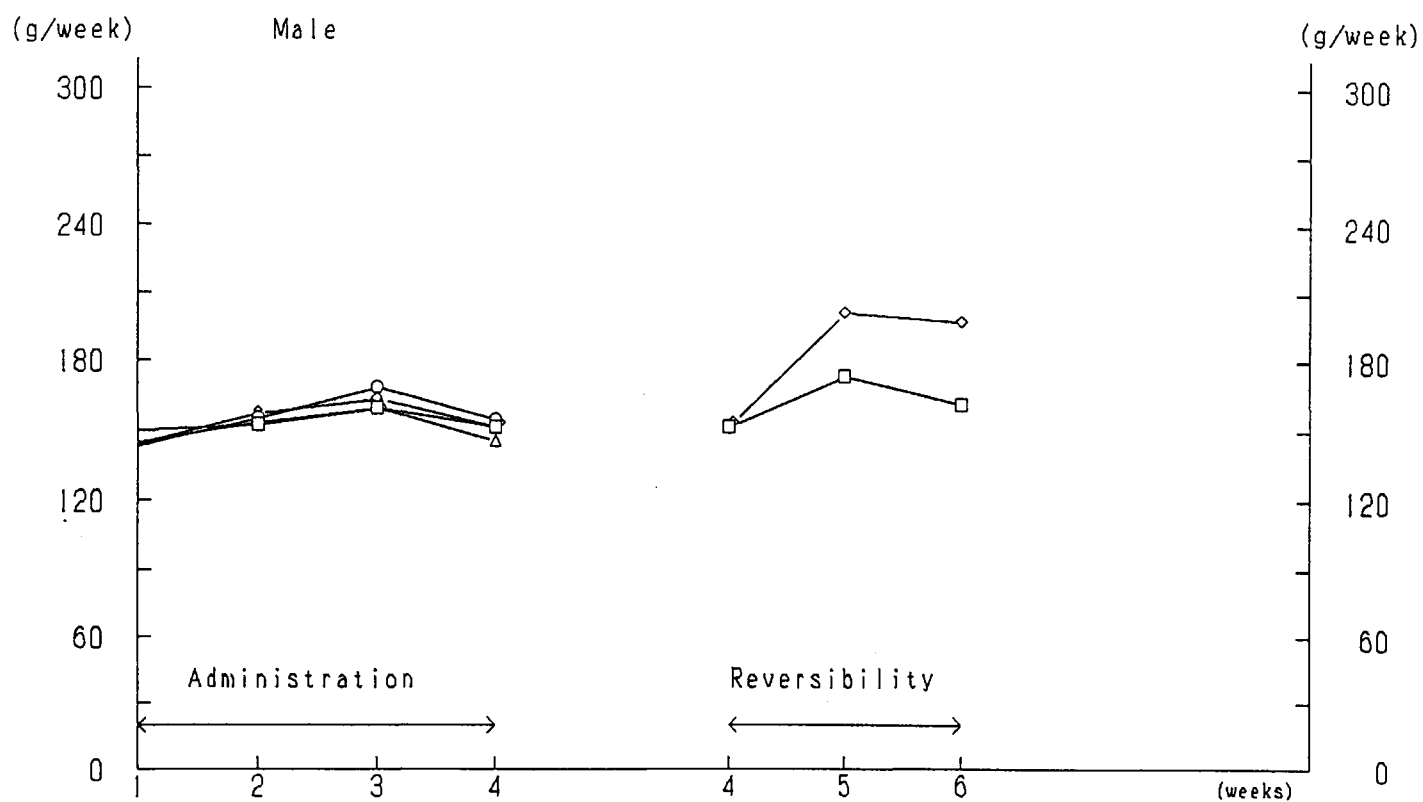
Exp. No. 2291 (115-027)

(unit : g)

Sex	Dose level (mg/kg)	Weeks of experiment 5	6	Gain (4 → 6)
Male	0	352 ± 16	365 ± 16	44 ± 7
	125	367 ± 16	404 ± 25**	73 ± 11**
Female	0	221 ± 22	226 ± 24	22 ± 11
	125	211 ± 20	219 ± 17	27 ± 9

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$



Exp. No. 2291(115-027)

Dose level (mg/kg)

—□— 0
 —○— 5
 —△— 25
 —◇— 125

Figure 3. Food consumption

Table 4. Food consumption

Exp. No. 2291 (115-027)

(unit : g/week)

Sex	Dose level (mg/kg)	Weeks of experiment 1	2	3	4	Total (0 → 4)
Male	0	150 ± 6	152 ± 21	159 ± 11	151 ± 12	613 ± 34
	5	143 ± 14	155 ± 12	168 ± 13	154 ± 7	620 ± 44
	25	145 ± 10	153 ± 11	159 ± 12	145 ± 8	602 ± 37
	125	144 ± 13	157 ± 15	163 ± 13	151 ± 13	615 ± 45
Female	0	129 ± 7N	118 ± 9	115 ± 10	107 ± 13	468 ± 31
	5	124 ± 1	111 ± 7	110 ± 13	101 ± 9	447 ± 18
	25	129 ± 6	119 ± 9	121 ± 7	118 ± 8	487 ± 21
	125	121 ± 6*	113 ± 9	115 ± 7	109 ± 7	457 ± 25

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

N: Non parametric analysis

Table 4. -continued Food consumption

Exp. No. 2291 (115-027)

(unit : g/week)

Sex	Dose level (mg/kg)	Weeks of experiment 5	6	Total (5 → 6)
Male	0	173 ± 8	161 ± 15	333 ± 23
	125	201 ± 8**	197 ± 13**	398 ± 21**
Female	0	134 ± 13	125 ± 6	258 ± 19
	125	137 ± 6	123 ± 10	260 ± 14

Mean ± S. D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

Table 5. Food efficiency

Exp. No. 2291 (115-027)

(unit : %)

Sex	Dose level (mg/kg)	Weeks of experiment 1	2	3	4	Mean (0 → 4)
Male	0	40.7 ± 1.6N	33.0 ± 7.8N	29.5 ± 4.5	23.3 ± 3.1	31.5 ± 2.5
	5	39.1 ± 3.7	33.3 ± 3.6	30.7 ± 3.8	21.6 ± 2.5	31.0 ± 1.3
	25	40.0 ± 7.2	31.7 ± 4.1	30.0 ± 2.4	21.5 ± 2.6	30.8 ± 2.1
	125	39.9 ± 3.5	32.6 ± 2.8	27.3 ± 3.6	21.0 ± 3.9	30.1 ± 2.0
Female	0	26.5 ± 4.2	15.8 ± 4.1	12.5 ± 3.4	13.9 ± 3.7	17.6 ± 1.6
	5	21.7 ± 4.5	15.1 ± 3.4	15.2 ± 6.1	15.9 ± 2.7	17.3 ± 3.0
	25	24.3 ± 8.6	17.1 ± 4.7	17.2 ± 6.6	15.5 ± 2.5	18.6 ± 4.3
	125	25.6 ± 5.4	15.7 ± 5.3	12.9 ± 2.5	13.4 ± 6.4	17.1 ± 2.3

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

N: Non parametric analysis

Table 5. -continued Food efficiency

Exp. No. 2291 (115-027)

(unit : %)

Sex	Dose level (mg/kg)	Weeks of experiment 5	6	Mean (5 → 6)
Male	0	18.2 ± 4.0	8.2 ± 2.7	13.3 ± 1.9
	125	17.7 ± 3.6	18.7 ± 4.1**	18.2 ± 2.1**
Female	0	12.5 ± 5.2	3.9 ± 3.4	8.4 ± 3.6
	125	13.4 ± 6.3	7.1 ± 5.9	10.4 ± 3.0

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

Table 6. Hematology

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	HCT (%)	HGB (g/dl)	RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	MCV (μm^3)	MCH (pg)	MCHC (%)
Male	0	5	45.3 $\pm$ 0.7N	15.0 $\pm$ 0.2N	7.30 $\pm$ 0.25	62.1 $\pm$ 1.8	20.6 $\pm$ 0.6	33.1 $\pm$ 0.2
	5	5	44.2 $\pm$ 1.7	14.6 $\pm$ 0.6	7.10 $\pm$ 0.28	62.3 $\pm$ 1.2	20.5 $\pm$ 0.4	32.9 $\pm$ 0.1
	25	5	40.7 $\pm$ 0.8*	13.2 $\pm$ 0.2*	6.37 $\pm$ 0.09**	64.0 $\pm$ 1.2	20.7 $\pm$ 0.4	32.4 $\pm$ 0.4**
	125	5	33.7 $\pm$ 2.6**	11.8 $\pm$ 0.9**	4.37 $\pm$ 0.43**	77.2 $\pm$ 1.5**	27.0 $\pm$ 0.6**	35.0 $\pm$ 0.2**
Female	0	5	44.6 $\pm$ 1.6	14.5 $\pm$ 0.4	7.02 $\pm$ 0.31	63.6 $\pm$ 1.1	20.7 $\pm$ 0.4	32.6 $\pm$ 0.3
	5	5	43.3 $\pm$ 2.0	13.9 $\pm$ 0.6*	7.12 $\pm$ 0.22	60.7 $\pm$ 1.6*	19.5 $\pm$ 0.5*	32.2 $\pm$ 0.4
	25	5	39.9 $\pm$ 1.0**	12.7 $\pm$ 0.3**	6.20 $\pm$ 0.24**	64.4 $\pm$ 1.7	20.4 $\pm$ 0.7	31.7 $\pm$ 0.3**
	125	5	35.6 $\pm$ 0.9**	12.3 $\pm$ 0.3**	4.56 $\pm$ 0.19**	78.1 $\pm$ 2.3**	26.9 $\pm$ 0.9**	34.5 $\pm$ 0.5**

Mean $\pm$ S.D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

N: Non parametric analysis

Table 6. -continued Hematology

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	PLT ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Differential leukocyte counts (%)			EOSN	BASO	LUC
					NEUT	LYMPH	MONO			
Male	0	5	1149 $\pm$ 55	16.7 $\pm$ 2.2N	12 $\pm$ 3	86 $\pm$ 3	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	5	5	1128 $\pm$ 128	15.7 $\pm$ 1.4	15 $\pm$ 7	83 $\pm$ 7	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 1
	25	5	1187 $\pm$ 80	12.5 $\pm$ 2.1	12 $\pm$ 1	86 $\pm$ 2	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	125	5	1092 $\pm$ 121	17.1 $\pm$ 6.8	18 $\pm$ 4	79 $\pm$ 5	2 $\pm$ 1*	0 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 1
Female	0	5	1039 $\pm$ 92	6.0 $\pm$ 1.9	14 $\pm$ 2	84 $\pm$ 2	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	5	5	1092 $\pm$ 122	5.5 $\pm$ 1.2	14 $\pm$ 6	83 $\pm$ 6	0 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	25	5	1202 $\pm$ 167	7.5 $\pm$ 1.9	16 $\pm$ 5	82 $\pm$ 5	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	125	5	1077 $\pm$ 79	6.9 $\pm$ 2.9	18 $\pm$ 4	81 $\pm$ 4	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

NEUT: Neutrophil LYMPH: Lymphocyte MONO: Monocyte EOSN: Eosinophil BASO: Basophil LUC: Large unstained cells
Mean $\pm$ S.D.
Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$
N: Non parametric analysis

Table 6. -continued Hematology

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Reticulocyte (%)
Male	0	5	43 ± 11
	5	5	58 ± 12
	25	5	113 ± 17**
	125	5	943 ± 34**
Female	0	5	26 ± 6N
	5	5	36 ± 10
	25	5	125 ± 41*
	125	5	639 ± 238**

Mean ± S. D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

N: Non parametric analysis

Table 6. -continued Hematology

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	HCT (%)	HGB (g/dl)	RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	MCV (μm^3)	MCH (pg)	MCHC (%)
Male	0	5	44.4 $\pm$ 1.6	14.5 $\pm$ 0.4	7.62 $\pm$ 0.21	58.4 $\pm$ 1.6	19.0 $\pm$ 0.4	32.5 $\pm$ 0.4
	125	5	46.5 $\pm$ 0.6*	15.1 $\pm$ 0.2*	7.07 $\pm$ 0.23**	65.7 $\pm$ 2.7**	21.3 $\pm$ 0.8**	32.4 $\pm$ 0.2
Female	0	5	43.9 $\pm$ 0.6N	13.9 $\pm$ 0.2N	7.38 $\pm$ 0.22	59.6 $\pm$ 1.1	18.9 $\pm$ 0.3	31.7 $\pm$ 0.3
	125	5	45.4 $\pm$ 2.4	14.6 $\pm$ 0.8	6.71 $\pm$ 0.25**	67.7 $\pm$ 2.2**	21.8 $\pm$ 0.8**	32.3 $\pm$ 0.5*

Mean $\pm$ S.D.Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

N: Non parametric analysis

Table 6. -continued Hematology

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	PLT ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Differential leukocyte counts (%)					
					NEUT	LYMPH	MONO	EOSN	BASO	LUC
Male	0	5	1162 $\pm$ 95	11.4 $\pm$ 1.0	13 $\pm$ 4	85 $\pm$ 5	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	125	5	1073 $\pm$ 75	14.9 $\pm$ 3.2*	10 $\pm$ 2	88 $\pm$ 2	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Female	0	5	1091 $\pm$ 87	7.2 $\pm$ 1.2	10 $\pm$ 2N	88 $\pm$ 3N	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	125	5	1039 $\pm$ 72	8.1 $\pm$ 2.7	15 $\pm$ 10	82 $\pm$ 11	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

NEUT: Neutrophil LYMPH: Lymphocyte MONO: Monocyte EOSN: Eosinophil BASO: Basophil LUC: Large unstained cells

Mean $\pm$ S.D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

N: Non parametric analysis

Table 6. -continued Hematology

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Reticulocyte (%)
Male	0	5	27 ± 20
	125	5	32 ± 33
Female	0	5	20 ± 10
	125	5	26 ± 23

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

Table 7. Coagulation

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	PT (sec.)	APTT (sec.)	Fibrinogen (mg/dl)
Male	0	5	13.9 ± 0.2N	25.3 ± 1.3	240 ± 9N
	5	5	13.4 ± 0.3	22.7 ± 1.3*	254 ± 50
	25	5	14.5 ± 0.8	26.3 ± 1.6	226 ± 14
	125	5	14.3 ± 0.7	25.5 ± 1.2	205 ± 52
Female	0	5	14.6 ± 0.5	22.2 ± 2.0	176 ± 14
	5	5	15.3 ± 0.4*	22.7 ± 0.9	177 ± 11
	25	5	15.1 ± 0.2	23.4 ± 0.4	194 ± 37
	125	5	15.4 ± 0.4*	22.8 ± 1.5	171 ± 14

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

N: Non parametric analysis

Table 7. -continued Coagulation

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	PT (sec.)	APTT (sec.)	Fibrinogen (mg/dl)
Male	0	5	14.2 ± 0.6	24.3 ± 0.7	248 ± 97N
	125	5	13.9 ± 0.4	22.7 ± 0.8**	204 ± 14
Female	0	5	15.5 ± 0.5	22.4 ± 0.7	165 ± 17N
	125	5	15.4 ± 0.6	21.6 ± 1.0	186 ± 67

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

N: Non parametric analysis

Table 8. Blood chemistry

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	T.cholesterol (mg/dl)	T.protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	A/G
Male	0	5	9.7 ± 1.0	0.52 ± 0.06	46 ± 9	5.24 ± 0.20	3.13 ± 0.13N	1.48 ± 0.05N
	5	5	9.9 ± 1.3	0.51 ± 0.07	56 ± 16	5.16 ± 0.12	3.00 ± 0.10	1.39 ± 0.09
	25	5	11.2 ± 2.4	0.50 ± 0.05	46 ± 10	5.28 ± 0.31	3.17 ± 0.19	1.50 ± 0.04
	125	5	11.9 ± 1.3	0.53 ± 0.04	32 ± 13	5.28 ± 0.51	3.42 ± 0.42	1.83 ± 0.15*
Female	0	5	16.6 ± 4.1	0.52 ± 0.04	49 ± 17	5.58 ± 0.30	3.52 ± 0.20	1.70 ± 0.07
	5	5	14.5 ± 1.9	0.68 ± 0.07**	44 ± 6	5.66 ± 0.22	3.55 ± 0.17	1.68 ± 0.05
	25	5	16.5 ± 2.4	0.66 ± 0.02**	54 ± 14	5.44 ± 0.15	3.31 ± 0.20	1.56 ± 0.17
	125	5	14.3 ± 2.2	0.71 ± 0.08**	50 ± 14	5.35 ± 0.12	3.46 ± 0.11	1.84 ± 0.10

Mean ± S. D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

N: Non parametric analysis

Table 8. -continued Blood chemistry

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Glucose (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	GOT (U/l)	GPT (U/l)	ALP (U/l)	Gamma-GTP (U/l)
Male	0	5	125 ± 7	51.2 ± 14.7	54 ± 5	15 ± 3N	174 ± 49	0.2 ± 0.3
	5	5	129 ± 10	53.2 ± 15.3	50 ± 9	15 ± 1	159 ± 41	0.5 ± 0.5
	25	5	137 ± 17	39.4 ± 7.5	46 ± 7	13 ± 1	168 ± 28	0.3 ± 0.3
	125	5	115 ± 12	55.4 ± 11.1	75 ± 14**	19 ± 3	183 ± 19	0.6 ± 0.4
Female	0	5	110 ± 8	31.3 ± 3.6	59 ± 8N	13 ± 1	133 ± 22	0.4 ± 0.3N
	5	5	110 ± 12	38.4 ± 4.0	55 ± 7	11 ± 3	107 ± 32	0.0 ± 0.6
	25	5	117 ± 13	31.6 ± 7.6	71 ± 26	13 ± 5	99 ± 17	0.9 ± 1.5
	125	5	109 ± 9	27.1 ± 5.2	67 ± 5	12 ± 3	113 ± 42	0.5 ± 0.2

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

N: Non parametric analysis

Table 8. -continued Blood chemistry

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	T.bilirubin (mg/dl)	Sodium (mmol/l)	Potassium (mmol/l)	Chloride (mmol/l)	Calcium (mg/dl)	I.phosphate (mg/dl)
Male	0	5	0.11 ± 0.02N	142.1 ± 0.9N	4.54 ± 0.17	105.5 ± 1.2	9.93 ± 0.29	8.40 ± 0.40N
	5	5	0.12 ± 0.03	142.0 ± 0.7	4.78 ± 0.35	106.2 ± 0.5	9.66 ± 0.29	7.85 ± 0.61
	25	5	0.16 ± 0.03	142.0 ± 1.1	4.97 ± 0.27	106.3 ± 1.4	10.00 ± 0.36	7.85 ± 0.53
	125	5	0.77 ± 0.21**	145.1 ± 4.5	5.12 ± 0.57	105.3 ± 0.8	10.01 ± 0.67	9.59 ± 2.09
Female	0	5	0.14 ± 0.02	142.8 ± 1.3	4.38 ± 0.07N	107.8 ± 1.8	9.84 ± 0.13	6.40 ± 0.58
	5	5	0.15 ± 0.04	143.0 ± 0.9	4.64 ± 0.39	107.1 ± 2.0	10.08 ± 0.14	6.93 ± 0.65
	25	5	0.20 ± 0.03	142.3 ± 0.9	4.69 ± 0.40	108.5 ± 1.7	9.84 ± 0.21	6.84 ± 0.68
	125	5	0.44 ± 0.07**	142.3 ± 1.7	4.73 ± 0.80	108.1 ± 1.9	9.92 ± 0.25	7.12 ± 0.56

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

N: Non parametric analysis

Table 8. -continued Blood chemistry

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	T. cholesterol (mg/dl)	T. protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	A/G
Male	0	5	11.1 ± 2.1	0.59 ± 0.04	53 ± 17	5.24 ± 0.12	2.98 ± 0.14	1.32 ± 0.10
	125	5	10.4 ± 0.8	0.56 ± 0.07	57 ± 19	5.24 ± 0.17	3.04 ± 0.13	1.39 ± 0.08
Female	0	5	16.3 ± 4.7N	0.59 ± 0.10	49 ± 9	5.56 ± 0.20	3.39 ± 0.12	1.57 ± 0.04N
	125	5	13.1 ± 1.4	0.60 ± 0.07	52 ± 22	5.53 ± 0.37	3.23 ± 0.34	1.40 ± 0.16

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

N: Non parametric analysis

Table 8. -continued Blood chemistry

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Glucose (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	GOT (U/l)	GPT (U/l)	ALP (U/l)	Gamma-GTP (U/l)
Male	0	5	147 ± 19	43.9 ± 11.7	48 ± 9	16 ± 3	134 ± 37N	1.0 ± 0.3
	125	5	152 ± 12	57.5 ± 14.9	41 ± 3	13 ± 1	123 ± 9	1.1 ± 0.3
Female	0	5	124 ± 14	44.9 ± 8.8	51 ± 6	16 ± 3	84 ± 15	1.4 ± 0.4
	125	5	121 ± 16	36.0 ± 5.3	48 ± 11	10 ± 2**	103 ± 26	1.8 ± 0.4

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

N: Non parametric analysis

Table 8. -continued Blood chemistry

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	T.bilirubin (mg/dl)	Sodium (mmol/l)	Potassium (mmol/l)	Chloride (mmol/l)	Calcium (mg/dl)	I.phosphate (mg/dl)
Male	0	5	0.14 ± 0.02	143.8 ± 0.7	4.19 ± 0.32	106.1 ± 1.1	9.66 ± 0.21	7.26 ± 0.42
	125	5	0.09 ± 0.04*	143.5 ± 0.8	4.32 ± 0.18	106.3 ± 1.2	9.76 ± 0.16	7.62 ± 0.40
Female	0	5	0.18 ± 0.04	143.1 ± 0.9	4.27 ± 0.28	106.5 ± 0.6	9.78 ± 0.31	6.25 ± 0.79
	125	5	0.12 ± 0.04	143.0 ± 0.8	4.18 ± 0.17	108.3 ± 1.4*	9.42 ± 0.19	5.77 ± 0.32

Mean ± S. D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

Table 9. Urinalysis

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Volume (ml)	Specific Gravity
Male	0	5	16 ± 5	1.037 ± 0.020
	5	5	16 ± 6	1.041 ± 0.018
	25	5	18 ± 5	1.033 ± 0.012
	125	5	23 ± 6	1.030 ± 0.011
Female	0	5	11 ± 7	1.049 ± 0.035
	5	5	11 ± 5	1.045 ± 0.026
	25	5	14 ± 10	1.050 ± 0.023
	125	5	19 ± 8	1.031 ± 0.012

Mean ± S. D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

Table 9. -continued Urinalysis

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Color											Turbidity		pH										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Clear	Muddy	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	≥9		
Male	0	5	5											5							1	4				
	5	5	5											5						3		2				
	25	5	5											5							4	1				
	125	5			5									5				1			4					
Female	0	5	5											5				1			3	1				
	5	5	5											5				2		1	1	1				
	25	5	5											5				1		1	3					
	125	5	3	2										5					2	1	2					

Color : 1= Colorless, 2= Slight yellow, 3= Yellow-brown, 4= Red, 5= Red-brown, 6= Dark red, 7= Dark brown,
8= Brown-black 9= Milky white, 10= Fluorescent green, 11= Blue.

Table 9. -continued Urinalysis

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Occult Blood					Ketones						Glucose (g/dl)				
			-	+/-	1+	2+	3+	-	+/-	1+	2+	3+	4+	-	0.1	0.25	0.5	≥1.0
Male	0	5	5					1	3	1				5				
	5	5	4	1				1	2	2				5				
	25	5	5					1	1	3				5				
	125	5	5					2		3				5				
Female	0	5	4		1			3	1	1				5				
	5	5	4	1				1	2	2				5				
	25	5	5					1	2	2				5				
	125	5	5					4	1					5				

Table 9. -continued Urinalysis

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Protein(mg/dl)					Bilirubin				Urobilinogen (E. U. /dl)						
			-	+/-	30	100	≥300	-	1+	2+	3+	0.1	1.0	2.0	4.0	8.0	≥12	
Male	0	5			2	3		4	1			2	3					
	5	5			3	1	1	5				2	3					
	25	5		1	1	3		5				2	3					
	125	5			4	1		3	2			2	3					
Female	0	5	1		2	1	1	3	2			1	4					
	5	5		1	2	1	1	5				1	4					
	25	5	1		2		2	3	2			1	4					
	125	5	2	2	1			3	2			4	1					

Table 9. -continued Urinalysis : Microscopic examination of sediment

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Erythrocytes - 1+ 2+ 3+	Leukocytes - 1+ 2+ 3+	Epith. Cells - 1+ 2+ 3+	Casts - +	Fat glob. - +	M. threads - +	others - +
Male	0	5	5	4 1	5	5	5	5	2 3
	5	5	5	4 1	5	5	5	5	1 4
	25	5	5	5	5	5	5	5	1 4
	125	5	5	5	5	5	5	5	1 4
Female	0	5	5	4 1	5	5	5	5	3 2
	5	5	5	4 1	5	5	5	5	1 4
	25	5	4 1	3 2	5	5	5	5	3 2
	125	5	5	4 1	4 1	5	5	5	2 3

others : Crystals

Table 9. -continued Urinalysis

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Volume (ml)	Specific Gravity
Male	0	5	12 ± 5N	1.044 ± 0.012
	125	5	29 ± 17**	1.027 ± 0.010*
Female	0	5	11 ± 3	1.049 ± 0.021
	125	5	12 ± 5	1.045 ± 0.023

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

N: Non parametric analysis

Table 9. -continued Urinalysis

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Color											Turbidity		pH										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Clear	Muddy	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	≥9		
Male	0	5	5											5		2 3										
	125	5	5											5		1 4										
Female	0	5	5											5		1 1 3										
	125	5	4 1											5		2 2 1										

Color : 1= Colorless, 2= Slight yellow, 3= Yellow-brown, 4= Red, 5= Red-brown, 6= Dark red, 7= Dark brown,
8= Brown-black 9= Milky white, 10= Fluorescent green, 11= Blue.

Table 9. -continued Urinalysis

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Occult Blood					Ketones						Glucose (g/dl)				
			-	+/-	1+	2+	3+	-	+/-	1+	2+	3+	4+	-	0.1	0.25	0.5	≥1.0
Male	0	5	4	1				1	2	1	1			5				
	125	5	5					2	2	1				5				
Female	0	5	4	1				3	2					5				
	125	5	5					3	1	1				5				

Table 9. -continued Urinalysis

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Protein(mg/dl)					Bilirubin				Urobilinogen (E. U. /dl)						
			-	+/-	30	100	≥300	-	1+	2+	3+	0.1	1.0	2.0	4.0	8.0	≥12	
Male	0	5			4	1		5				1	4					
	125	5	1	1	3			5				4	1					
Female	0	5	2	1	1	1		5				3	2					
	125	5	2		1	1	1	4	1			2	3					

Table 9. -continued Urinalysis : Microscopic examination of sediment

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Erythrocytes - 1+ 2+ 3+	Leukocytes - 1+ 2+ 3+	Epith. Cells - 1+ 2+ 3+	Casts - +	Fat glob. - +	M. threads - +	others - +
Male	0	5	5	5	5	5	5	5	1 4
	125	5	5	5	5	5	5	5	3 2
Female	0	5	5	2 2 1	5	5	5	5	2 3
	125	5	5	3 2	5	5	5	5	1 4

others : Crystals

Table 10. Organ weight

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (g)	Liver (g)	Kidneys (g)	Spleen (g)
Male	0	5	335 ± 22	2.01 ± 0.05	10.19 ± 0.41	2.52 ± 0.19	0.64 ± 0.05N
	5	5	328 ± 13	2.05 ± 0.10	10.16 ± 0.41	2.37 ± 0.14	0.56 ± 0.06
	25	5	321 ± 17	2.13 ± 0.06**	9.90 ± 1.06	2.64 ± 0.27	0.84 ± 0.09
	125	5	310 ± 5	2.07 ± 0.04	9.50 ± 0.36	2.56 ± 0.10	3.37 ± 0.38**
Female	0	5	195 ± 5	2.01 ± 0.08	6.07 ± 0.36N	1.61 ± 0.06N	0.36 ± 0.04N
	5	5	195 ± 13	1.91 ± 0.05	6.06 ± 0.17	1.62 ± 0.13	0.39 ± 0.04
	25	5	208 ± 22	1.87 ± 0.09*	7.06 ± 1.47	2.23 ± 1.28	0.67 ± 0.15*
	125	5	199 ± 16	2.00 ± 0.08	6.56 ± 0.59	1.70 ± 0.15	1.60 ± 0.21**

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

N: Non parametric analysis

Table 10. -continued Organ weight

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Adrenals (mg)	Testes (g)	Ovaries (mg)
Male	0	5	49 ± 7	2.88 ± 0.11N	
	5	5	44 ± 6	2.94 ± 0.06	
	25	5	47 ± 5	2.86 ± 0.27	
	125	5	42 ± 9	2.83 ± 0.07	
Female	0	5	60 ± 11N		83 ± 3
	5	5	63 ± 11		82 ± 13
	25	5	63 ± 1		82 ± 7
	125	5	60 ± 7		85 ± 14

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

N: Non parametric analysis

Table 10. -continued Organ weight

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (g)	Liver (g)	Kidneys (g)	Spleen (g)
Male	0	5	365 ± 16	2.10 ± 0.07	9.89 ± 0.86	2.56 ± 0.20	0.61 ± 0.06
	125	5	404 ± 25**	2.10 ± 0.07	12.53 ± 1.95*	2.75 ± 0.34	1.06 ± 0.08**
Female	0	5	226 ± 24	1.88 ± 0.07	6.49 ± 0.80	1.61 ± 0.03N	0.42 ± 0.07
	125	5	219 ± 17	1.97 ± 0.06*	6.50 ± 0.81	1.72 ± 0.20	0.62 ± 0.05**

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

N: Non parametric analysis

Table 10. -continued Organ weight

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Adrenals (mg)	Testes (g)	Ovaries (mg)
Male	0	5	49 ± 6	3.05 ± 0.16	
	125	5	52 ± 5	3.18 ± 0.27	
Female	0	5	64 ± 3		89 ± 14
	125	5	63 ± 5		87 ± 12

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

Table 11. Organ weight per body weight

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (%)	Liver (%)	Kidneys (%)	Spleen (%)
Male	0	5	335 ± 22	0.601 ± 0.037	3.055 ± 0.242	0.752 ± 0.046	0.193 ± 0.022N
	5	5	328 ± 13	0.625 ± 0.039	3.104 ± 0.105	0.725 ± 0.046	0.172 ± 0.020
	25	5	321 ± 17	0.666 ± 0.040*	3.078 ± 0.187	0.820 ± 0.043*	0.261 ± 0.016
	125	5	310 ± 5	0.669 ± 0.021*	3.068 ± 0.135	0.828 ± 0.032*	1.088 ± 0.114**
Female	0	5	195 ± 5	1.029 ± 0.052	3.112 ± 0.141N	0.826 ± 0.047N	0.183 ± 0.017N
	5	5	195 ± 13	0.984 ± 0.071	3.127 ± 0.226	0.831 ± 0.031	0.203 ± 0.014
	25	5	208 ± 22	0.901 ± 0.069*	3.383 ± 0.586	1.078 ± 0.626	0.320 ± 0.048*
	125	5	199 ± 16	1.009 ± 0.079	3.297 ± 0.068	0.855 ± 0.058	0.804 ± 0.053**

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

N: Non parametric analysis

Table 11. -continued Organ weight per body weight

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Adrenals (%)	Testes (%)	Ovaries (%)
Male	0	5	0.015 ± 0.002	0.863 ± 0.066	
	5	5	0.013 ± 0.002	0.898 ± 0.048	
	25	5	0.015 ± 0.001	0.892 ± 0.101	
	125	5	0.013 ± 0.003	0.914 ± 0.036	
Female	0	5	0.031 ± 0.005		0.042 ± 0.002
	5	5	0.033 ± 0.008		0.042 ± 0.008
	25	5	0.030 ± 0.003		0.040 ± 0.005
	125	5	0.030 ± 0.003		0.043 ± 0.008

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

Table 11. -continued Organ weight per body weight

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (%)	Liver (%)	Kidneys (%)	Spleen (%)
Male	0	5	365 ± 16	0.576 ± 0.025	2.712 ± 0.186	0.701 ± 0.025	0.169 ± 0.019
	125	5	404 ± 25**	0.521 ± 0.023**	3.093 ± 0.315*	0.679 ± 0.047	0.263 ± 0.023**
Female	0	5	226 ± 24	0.838 ± 0.082	2.867 ± 0.177	0.717 ± 0.078	0.184 ± 0.023
	125	5	219 ± 17	0.903 ± 0.061	2.957 ± 0.153	0.785 ± 0.065	0.282 ± 0.021**

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

Table 11. -continued Organ weight per body weight

Exp. No. 2291 (115-027)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Adrenals (%)	Testes (%)	Ovaries (%)
Male	0	5	0.014 ± 0.002	0.836 ± 0.012N	
	125	5	0.013 ± 0.002	0.788 ± 0.066	
Female	0	5	0.028 ± 0.002		0.039 ± 0.004
	125	5	0.029 ± 0.003		0.040 ± 0.004

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

N: Non parametric analysis

Table 12. Summary of gross findings (sacrificed at 4 week)

Exp. No. 2291 (115-027)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0	5	25	125
No. of animals necropsied	5	5	5	5
Organ Findings				
HEMATOPOIETIC SYSTEM				
spleen black	0	0	5**	5**
enlarged	0	0	5**	5**
DIGESTIVE SYSTEM				
liver black	0	0	0	5**
URINARY SYSTEM				
kidney black	0	0	0	4*
white patch/zone	0	0	0	1
ENDOCRINE SYSTEM				
pituitary gland				
black patch/zone	0	0	0	1
INTEGUMENTARY SYSTEM				
skin ulcer	0	1	0	0

Significantly different from control group: *: $P < 0.05$ **: $P < 0.01$

Table 12. -continued Summary of gross findings (sacrificed at 4 week)

Exp. No. 2291 (115-027)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0	5	25	125
No. of animals necropsied	5	5	5	5
Organ Findings				
HEMATOPOIETIC SYSTEM				
spleen black	0	0	5**	5**
enlarged	0	0	3	5**
RESPIRATORY SYSTEM				
lung colored patch/zone	1	0	0	0
DIGESTIVE SYSTEM				
liver black	0	0	0	5**
enlarged	0	0	1	0
URINARY SYSTEM				
kidney black	0	0	0	5**
cyst	0	0	1	0
enlarged	0	0	1	0
green	0	0	1	0
REPRODUCTIVE SYSTEM				
uterus dilated lumen	0	0	2	0

Significantly different from control group; **: P<0.01

Table 12. -continued Summary of gross findings (sacrificed at 6 week)

Exp. No. 2291 (115-027)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)		0	5	25	125
No. of animals necropsied		5	0	0	5
Organ	Findings				
HEMATOPOIETIC SYSTEM					
spleen	black	0	-	-	5**
	enlarged	0	-	-	5**
DIGESTIVE SYSTEM					
liver	enlarged	0	-	-	4*
MUSCULOSKELETAL SYSTEM					
muscle	hemorrhage	1	-	-	0

Significantly different from control group; *: $P < 0.05$ **: $P < 0.01$

Table 12. -continued Summary of gross findings (sacrificed at 6 week)

Exp. No. 2291 (115-027)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)		0	5	25	125
No. of animals necropsied		5	0	0	5
Organ	Findings				
HEMATOPOIETIC SYSTEM					
spleen	black	0	-	-	5**
	enlarged	0	-	-	5**
	white patch/zone	0	-	-	1
INTEGUMENTARY SYSTEM					
skin	ulcer	0	-	-	1

Significantly different from control group; **: $P < 0.01$

Table 13. Summary of histological findings (sacrificed at 4 week)

Exp. No. 2291 (115-027)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)		0			5			25			125		
No. of animals sacrificed at 4 week		5			5			5			5		
No. of animals necropsied		5			5			5			5		
No. of animals examined histologically		5			5			5			5		
Organ	Findings	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
HEMATOPOIETIC SYSTEM													
bone marrow		(5)			(5)			(5)			(5)		
	hematopoiesis, increased		0	0		0	0		0	0		5	0
spleen		(5)			(5)			(5)			(5)		
	congestion		0	0		5	0		5	0		5	0
	deposit of pigment		0	0		0	0		5	0		5	0
	hematopoiesis, increased		0	0		0	0		5	0		5	0
DIGESTIVE SYSTEM													
liver		(5)			(5)			(5)			(5)		
	deposit of pigment		0	0		0	0		1	0		5	0
	fatty change		2	0		2	0		1	0		1	0
	granulation		5	0		4	0		4	0		5	0
	extramedullary hematopoiesis		0	0		0	0		3	0		5	0
URINARY SYSTEM													
kidney		(5)			(5)			(5)			(5)		
	basophilic change		4	0		5	0		3	0		5	0
	deposit of calcium		3	0		4	0		4	0		4	0
	deposit of pigment		0	0		0	0		0	0		5	0
	eosinophilic body		0	0		1	0		0	0		0	0
	hyaline droplet		0	0		3	0		4	0		0	5
	necrosis		0	0		0	0		0	0		1	0
	protein cast		0	0		0	0		0	0		1	0
	tubular dilatation		1	0		0	0		0	0		2	0
	vacuolic change		0	0		0	0		0	0		1	0
	cell nest		1	0		0	0		0	0		1	0
ENDOCRINE SYSTEM													
adrenal gland		(5)			(0)			(0)			(5)		
	vacuolic change		5	0		-	-		-	-		4	0

1: slight 2: moderate 3: marked

(): No. of animals examined microscopically at this site.

Significantly different from control group; *: P<0.05 **: P<0.01

Table 13. -continued Summary of histological findings (sacrificed at 4 week)

Exp. No. 2291 (115-027)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0	5	25	125
No. of animals sacrificed at 4 week	5	5	5	5
No. of animals necropsied	5	5	5	5
No. of animals examined histologically	5	5	5	5
Organ Findings	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3
HEMATOPOIETIC SYSTEM				
bone marrow	(5)	(5)	(5)	(5)
hematopoiesis, increased	0 0 0	0 0 0	4 0 0*	5 0 0**
spleen	(5)	(5)	(5)	(5)
congestion	0 0 0	0 0 0	5 0 0**	5 0 0**
deposit of pigment	2 0 0	5 0 0	5 0 0	5 0 0
hematopoiesis, increased	0 0 0	0 0 0	5 0 0**	5 0 0**
DIGESTIVE SYSTEM				
liver	(5)	(5)	(5)	(5)
amorphous mass	0 0 0	0 0 0	1 0 0	0 0 0
bile duct dilatation	0 0 0	0 0 0	0 1 0	0 0 0
deposit of pigment	0 0 0	0 0 0	1 0 0	5 0 0**
fatty change	2 0 0	2 0 0	2 0 0	2 0 0
granulation	3 0 0	3 0 0	4 0 0	4 0 0
bile duct hyperplasia	0 0 0	0 0 0	0 1 0	0 0 0
extramedullary hematopoiesis	0 0 0	0 0 0	2 0 0	5 0 0**
fibrosis	0 0 0	0 0 0	1 0 0	0 0 0
URINARY SYSTEM				
kidney	(5)	(5)	(5)	(5)
basophilic change	3 0 0	3 0 0	3 0 0	1 0 0
cyst	0 0 0	0 0 0	0 0 1	0 0 0
deposit of calcium	1 0 0	2 0 0	2 0 0	2 0 0
deposit of pigment	0 0 0	0 0 0	0 0 0	5 0 0**
protein cast	0 0 0	0 0 0	1 0 0	0 0 0
tubular dilatation	1 0 0	0 0 0	0 0 1	1 0 0
vacuolic change	0 0 0	0 0 0	1 0 0	0 0 0
cell nest	0 0 0	0 0 0	1 0 0	1 0 0
infiltration/cellular	0 0 0	0 0 0	1 0 0	0 0 0
fibrosis	0 0 0	0 0 0	1 0 0	0 0 0

1: slight 2: moderate 3: marked
 (): No. of animals examined microscopically at this site.
 Significantly different from control group; *: P<0.05 **: P<0.01

74

Table 13. -continued Summary of histological findings (sacrificed at 6 week)

Exp. No. 2291 (115-027)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0	5	25	125
No. of animals sacrificed at 6 week	5	0	0	5
No. of animals necropsied	5	0	0	5
No. of animals examined histologically	5	0	0	5
Organ Findings	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3
HEMATOPOIETIC SYSTEM				
bone marrow	(5)			(5)
hemorrhage	1 0 0	- - -	- - -	0 0 0
spleen	(5)			(5)
congestion	0 0 0	- - -	- - -	5 0 0**
deposit of pigment	0 0 0	- - -	- - -	0 5 0**
DIGESTIVE SYSTEM				
liver	(5)			(5)
deposit of pigment	0 0 0	- - -	- - -	5 0 0**
granulation	4 0 0	- - -	- - -	5 0 0
URINARY SYSTEM				
kidney	(5)			(5)
basophilic change	4 0 0	- - -	- - -	5 0 0
deposit of calcium	3 0 0	- - -	- - -	4 0 0
deposit of pigment	0 0 0	- - -	- - -	5 0 0**
hyaline droplet	0 0 0	- - -	- - -	0 5 0**
MUSCULOSKELETAL SYSTEM				
femur	(1)			(0)
periostitis	1 0 0	- - -	- - -	- - -
articulatio	(1)			(0)
arthritis	1 0 0	- - -	- - -	- - -

1: slight 2: moderate 3: marked

(): No. of animals examined microscopically at this site.

Significantly different from control group; **: P<0.01

Table 13. -continued Summary of histological findings (sacrificed at 6 week)

Exp. No. 2291 (115-027)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0	5	25	125
No. of animals sacrificed at 6 week	5	0	0	5
No. of animals necropsied	5	0	0	5
No. of animals examined histologically	5	0	0	5
Organ Findings	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3
HEMATOPOIETIC SYSTEM				
spleen	(5)			(5)
congestion	0 0 0	- - -	- - -	5 0 0**
deposit of pigment	5 0 0	- - -	- - -	0 5 0
fibrosis	0 0 0	- - -	- - -	1 0 0
DIGESTIVE SYSTEM				
liver	(5)			(5)
deposit of pigment	0 0 0	- - -	- - -	5 0 0**
fatty change	3 0 0	- - -	- - -	1 0 0
granulation	3 0 0	- - -	- - -	4 0 0
foci/hyperplastic	0 0 0	- - -	- - -	1 0 0
URINARY SYSTEM				
kidney	(5)			(5)
basophilic change	1 0 0	- - -	- - -	2 0 0
deposit of calcium	1 0 0	- - -	- - -	3 0 0
deposit of pigment	0 0 0	- - -	- - -	5 0 0**

1: slight 2: moderate 3: marked
 (): No. of animals examined microscopically at this site.
 Significantly different from control group; **: P<0.01