

食薬セ研第12-1891号

2002年 8月20日

2-(1-メチルエトキシ)エタノールの
ラットを用いる28日間
反復経口投与毒性試験
(回復14日間)

厚生労働省医薬局審査管理課 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦 野 研 究 所

【目 次】

	頁
要 約	1
緒 言	2
方 法	3
1. 被験物質	3
2. 使用動物および飼育方法	3
3. 投与検体の調製	4
4. 群および群分け	5
5. 投与方法	5
6. 検査項目	6
7. データ解析法	8
結 果	10
1. 死亡例	10
2. 一般状態	10
3. 体重	10
4. 摂餌量	10
5. 摂水量	10
6. 尿検査所見	10
7. 血液学検査所見	11
8. 血液生化学検査所見	12
9. 病理学検査所見	12
考 察	15
参考文献	18

Figure 1

Tables 1~11

【要 約】

2-(1-メチルエトキシ) エタノール (以下 MEE と略記) の28日間反復経口投与毒性試験 (回復14日間) を雌雄の Sprague-Dawley 系ラットを用いて実施した。雌雄とも4群構成とし1群には媒体である日局注射用水を、他の3群には被験物質を、それぞれ30、125 および 500 mg/kgの用量で28日間にわたり強制経口投与した。雌雄とも回復試験に用いる動物を含む対照群および 500 mg/kg 投与群は各10匹、その他の群は各5匹とした。

その結果、500 mg/kg 投与群においては初回投与後血色素尿がみられ、投与終了時の血液検査の結果、雌雄とも 125 mg/kg 以上の投与群では貧血を呈した。また、肝臓や腎臓ならびに骨髄の病理組織学検査の結果から、造血亢進が起こり、さらに骨髓像検査の結果、骨髄における赤芽球系細胞の増加は 30 mg/kg 投与群においても起きているものと考えられた。また、2週間の回復試験によってこれらの変化は軽減することも明らかとなった。

以上の結果から、MEE の無作用量は雌雄ともに 30 mg/kg/day を下回ると考えられた。

【緒 言】

2-(1-メチルエトキシ)エタノールは、グリコールエーテル類の1種で（別名エチレングリコールイソプロピルエーテル）、その水にも有機溶媒にも溶解しやすい物性から、インクやペンキ、レジン等の媒体や工業用の洗剤あるいは乳化剤等として広く用いられている。

エチレングリコールエーテル類は、過去の検討の結果、実験動物において生殖発生毒性や血液毒性を示す事が明らかになっている。エチレングリコールモノブチルエーテル等においては、一過性の溶血性貧血が起こり^{1, 2)}、その溶血作用の主体は酸化代謝物であることが知られている³⁻⁶⁾。本被験物質においても、単回投与毒性試験や反復投与毒性試験の予備試験において、赤色尿が認められているが⁷⁾、これも溶血作用を示唆する変化と考えられる。

一方、本被験物質の構造類似物であるエチレングリコールモノメチルエーテルやエチレングリコールモノエチルエーテルにおいては、精巣重量の低下やパキーン期精母細胞を中心とした精子形成障害の起こることが報告されている⁸⁾。

今回、OECD 既存化学物質安全性点検等に係る毒性調査の一環として、2-(1-メチルエトキシ)エタノールの安全性確認のための資料を得るためにラットにおける28日間反復経口投与毒性試験および14日間回復試験を実施した。

なお、本試験は、化審法「新規化学物質に係る試験の方法について」の一部改正等について（スクリーニング毒性試験法の制定）－ほ乳類を用いる28日間の反復投与毒性試験－（昭和61年12月5日、環保業第700号、薬発第1039号、61基局第1014号）および「化学物質GLP」（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和63年11月18日改正、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号、平成12年3月1日改正、環保安第41号、生衛発第268号、平成12・02・14基局第1号）に準拠して実施した。

【方 法】

1. 被験物質

被験物質として用いた 2-(1-メチルエトキシ) エタノール (以下 MEE と略記) の性状は下記のとおりである。

化学名	2-(1-メチルエトキシ) エタノール
別名	エチレングリコールイソプロピルエーテル
英名	Ethanol, 2-(1-methylethoxy)-
CAS No.	109-59-1
分子量	104.15
物理化学的性質	性 状 : 透明液体 融 点 : -60℃ 沸 点 : 142.5℃ 蒸気圧 (25℃) : 0.347 kPa 溶解性 : 水 20℃で完全溶解 アセトン 常温で完全溶解
構造式	$(\text{CH}_3)_2\text{CHOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$

本試験には、より提供された MEE (ロット番号 純度 99.5 wt %以上、不純物 水分 0.1 %以下) を用いた。被験物質は受領後、使用時まで被験物質受領保管室において室温で保管した。試験終了後に返却した被験物質について提供者が再度品質試験を実施し、試験期間中の安定性を確認した (Appendix A)。

2. 使用動物および飼育方法

生後 4 週で購入した雌雄の Sprague-Dawley 系ラット [Crj:CD(SD) IGS、SPF、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター] (注 1) を検疫と馴化を兼ね、入荷日も含めて 8 日間にわたり予備飼育した後、一般状態に異常の認められなかった雌雄各 30 匹を試験に供した (注 2)。動物は、全飼育期間を通じて、許容温度 21.0~25.0℃、許容

(注 1)

動物購入日: 2001年6月18日

入荷匹数: 雄 34 匹 雌 34 匹

入荷時体重: 雄 77.1~92.0 g (平均 85.3 g) 雌 62.8~71.4 g (平均 66.7 g)

(注 2)

投与開始日: 2001年6月26日

投与開始時体重: 雄 152.9~180.9 g (平均 165.8 g) 雌 119.7~141.7 g (平均 130.2 g)

湿度40.0～75.0%、換気回数約15回／時間、照明12時間（7～19時点灯）に設定された飼育室内で金属製金網床ケージ（220W×270D×190H mm）に1匹ずつ収容し、固型飼料（CE-2、日本クレア株式会社）および水道水（秦野市水道局給水）を自由に摂取させて飼育した。なお、飼育期間中、飼育室の温湿度の実測値は許容値の範囲内にあり（注3）、試験に支障を来す温湿度の異常は認められなかった。また、供給した飼料および水には試験に支障を来す可能性のある混入物はなかった。

各動物の耳介には耳パンチを用いて一連の個体番号を標識し、また、群ごとに色の異なる動物カードに試験計画番号、性別、群（投与量）、動物番号を記入して飼育ケージに掛け個体識別の補助とした。

3. 投与検体の調製

MEE を日局注射用水（製造番号 9912ST、光製薬株式会社）に溶解して 5.0 w/v% 溶液を調製し、これを希釈して検体とした。検体は投与時まで冷暗所（冷蔵庫内）に保管し、調製後7日以内に使用した。

本試験に先立ち、本被験物質の急性経口投与毒性試験（試験計画番号：A-00-060）において、0.05 および 40 w/v %溶液について冷暗所下（冷蔵庫内）における調製後8日間の安定性を確認している（Appendix B）。また、初回調製検体について投与検体中の被験物質の含量を測定し、規定範囲内にあることを確認した（Appendix C）。なお、本投与検体は溶液であることから均一性試験は実施しなかった。

調製検体中の被験物質濃度の測定は、各調製検体を1 mLずつ採取しメタノールで一定量とした後、メタノールで適宜希釈しガスクロマトグラフ（GC）法により測定した。同時に作成する検量線を用いて濃度を求めた。GC 条件を Appendix D に示す。

（注3）

動物飼育期間中の温湿度の実測値 温度 23.5～24.5℃ 湿度 44.5～51.5%

4. 群および群分け

本試験の投与量は投与量設定のための予備試験（試験計画番号：C-00-007、投与量：0、250、500 および 1000 mg/kg）の結果に基づき決定した。すなわち、MEE を 7 日間反復経口投与することにより 500 mg/kg 以上の投与群では初回投与後に赤色尿が現れ、投与第 1 日から第 2 日の体重増加が有意に抑制された。しかし、投与第 2 日以降には赤色尿は認められず全ての投与群で体重も順調に推移した。7 日間投与後の剖検の結果、1000mg/kg 投与群の雄 1 例で脾臓の腫大が認められた。他の器官には異常はみられなかった。

以上の結果から、MEE を 500 mg/kg 投与すると明確な毒性変化が現れ、且つこの投与量は 28 日間の反復投与に耐えうると判断し、本試験の用量は雌雄とも高用量を 500 mg/kg とし、以下公比約 4 で除して 125 および 30 mg/kg を中用量および低用量とした。また、媒体である注射用水を投与する対照群を設け、回復試験を行う対照群および 500 mg/kg 投与群は各 10 匹、その他の群は各 5 匹の動物を使用した。

群分けは検疫終了時の測定体重をもとに体重別層化無作為抽出法により行った。各群の投与量および動物番号等を以下に示した。

	投与物質	投与量 (mg/kg)	被験物質濃度 (w/v%)	投与容量 ^{a)} (mL/kg)	動物番号		剖検時期 ^{b)}
					雄	雌	
対照群	注射用水	0	0	10	1～5	31～35	回復
					6～10	36～40	投与
低用量群	MEE	30	0.30	10	11～15	41～45	投与
中用量群	MEE	125	1.25	10	16～20	46～50	投与
高用量群	MEE	500	5.00	10	21～25	51～55	回復
					26～30	56～60	投与

a) 雌雄とも最近時の体重をもとに個体別に投与液量 (mL) を算出した。

b) 回復：投与期間終了後は回復試験に用い、回復試験期間終了時に定期解剖を行った。
投与：投与期間終了時に定期解剖を行った。

5. 投与方法

投与経路は化審法ガイドラインに従い経口とした。投与は 9 時から 12 時の間に 1 日 1 回、28 日間計 28 回行い、ラット用胃管を用いて強制経口投与した。投与容量は 10 mL/kg とし、各投与時に得られている最も近い時点の体重をもとに個体別に投与液量を算出した。

なお、投与期間中の日数および週の表記法は、投与開始日および投与開始週をそれぞれ投与第 1 日および投与第 1 週とし、回復試験期間中の日数および週の表記法もこれに準じて回復第 1 日および回復第 1 週とした。

6. 検査項目

1) 一般検査

全例について毎日（投与期間中は投与前および投与後）一般状態の観察を行った。また、全例の体重および摂餌量を以下の頻度で測定した。体重は投与第1週には投与第1日の投与直前と投与第4日、投与第2週以降の投与期間および回復試験期間中は週に2回の頻度で測定した。その他、投与期間終了日、回復試験期間終了日および剖検日にも体重を測定した。摂餌量は投与第1週では投与第1日から2日にかけて1日あたりの摂餌量を測定し、以後回復試験期間終了週まで毎週1回の頻度で測定した。

2) 尿検査

全例について投与第1日、投与期間終了週および回復試験期間終了週に動物を代謝ケージに収容して4時間尿あるいは新鮮尿を採取し、以下の項目について検査した。

項 目	測 定 法	使 用 機 器
色調・混濁度 尿沈渣 pH・潜血・蛋白質・糖・ケトン体 ウビリノーゲン・ビリルビン	視 診 鏡 検 試験紙法 同 上	光学顕微鏡 クリテック 200+ (パエル・三共) 同 上

また、投与期間終了週および回復試験期間終了週には24時間にわたり尿を採取し、尿量ならびに比重を求めるとともに、尿沈渣を観察した。

3) 血液学検査

投与期間終了時および回復試験期間終了時に解剖を行った動物（以下、定期解剖例と記す）全例を採血前（屠殺剖検前）に18～24時間絶食させた。その後、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で腹部後大静脈から抗凝固剤として EDTA-3K を用いて採血し、以下の項目について検査した。ただし、プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間の測定には、上記の採血に先立って、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で、腹部後大静脈から抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムを用いて採取した血液を分離して得た血漿を用いた。

また、片側の大腿骨骨髓を用いて骨髓塗抹標本を作製し、骨髓像の観察を実施した。

項 目	測 定 法	使 用 機 器
赤血球数 (RBC)	自動 (電気抵抗法)	血液自動分析装置 CELL-DYN3500SL (ダイナボット)
白血球数 (WBC)	同上 (フローサイトメトリ・レーザ光散乱法/ 電気抵抗法)	同上
白血球分類	同上 (フローサイトメトリ・レーザ光散乱法 ^{a)})	同上
血色素量 (Hb)	同上 (吸光度法)	同上
平均赤血球容積 (MCV)	同上 (電気抵抗法)	同上
血小板数	同上 (電気抵抗法)	同上
ヘマトクリット値 (Ht)	計算 ($RBC \times MCV \times 0.001$)	
平均赤血球血色素量 (MCH)	計算 ($Hb \times 1000 / RBC$)	
平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	計算 ($Hb \times 100 / Ht$)	
網状赤血球比率	Brecher 法	光学顕微鏡
骨髓像検査	視算 (骨髓塗抹標本)	同上
プロトロン時間 (PT)	光散乱検出法	全自動血液凝固測定装置 CA-1000 (東亜医用電子)
活性部分トロンボプラスチン時間 (APTT)	同上	同上

a) 白血球分類の検査の補助として静脈血塗抹標本 (Wright-Giemsa 染色) を作製したが、その結果は採用しなかった。

4) 血液生化学検査

前述の採血に引き続き、同様の麻酔および採血部位の条件下で全例からヘパリンを抗凝固剤として採取した血液を分離して得た血漿について、以下の項目を検査した。

項 目	測 定 法	使 用 機 器
総蛋白濃度	ビュレット法	遠心方式生化学自動分析装置 COBAS-FARA (ロシュ)
アルブミン濃度	BCG 法	同上
総コレステロール濃度	COD-DAOS 法	同上
ブドウ糖濃度	グルコキナーゼ G6PDH 法	同上
尿素窒素濃度 (BUN)	ウレアーゼ GLODH 法	同上
クレアチニン濃度	Jaffé 法 (Rate)	同上
ALP 活性	GSCC 法	同上
AST (GOT) 活性	IFCC 法	同上
ALT (GPT) 活性	同上	同上
γ-GTP 活性	γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法	同上
トリグリセリド濃度	GPO-DAOS 法	同上
総ビリルビン濃度	Jendrassik/Grof 法	同上
無機リン濃度 (Inorg. phos.)	モリブデン酸直接法	同上
カルシウム濃度	OCPC 法	同上
A/G 比	計算	
ナトリウム濃度	イオン電極法	全自動電解質分析装置 EA05 (A&T)
カリウム濃度	同上	同上
塩素濃度	同上	同上

5) 病理学検査

採血後、必要に応じて腋窩動脈を切断して放血屠殺した後、全例の器官および組織を肉眼的に観察し各動物の以下に示す器官の重量を測定した。また、各器官重量を剖検日の体重で除してそれぞれの相対重量を算出した。

重 量 測 定 器 官

脳、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、精巣、卵巢、肺、甲状腺

肉眼的観察に引き続き、以下の器官あるいは組織を摘出して保存した。なお、精巣および精巣上体はブアン液に固定し（長期保存は 0.1 M リン酸緩衝10%ホルマリン溶液を使用）、その他の器官・組織は 0.1 M リン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定した。さらに、全例の*印を付した器官・組織をパラフィン包埋して薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製した。その後、光学顕微鏡を用いて投与期間終了時の対照群および高用量群の全例の組織学検査を実施した。また、500 mg/kg 投与群の雌雄の脾臓および骨髓検査に異常所見が認められたため、脾臓および大腿骨骨髓については 125 および 30 mg/kg 投与群の病理組織学検査を行った。さらに、全例の脾臓について特殊染色（ベルリン青染色）を実施し病理組織学検査を行った。また、雌雄の 500 mg/kg 投与群の肝臓において髓外造血像が観察されたため、全例の肝臓についても病理組織学検査を行った。その他、病変部（動物番号：51）に関しても同様に病理組織学検査を行った。

固 定 ・ 保 存 器 官 ・ 組 織

脳*、下垂体、脊髓、眼球、甲状腺*、上皮小体、心臓*、気管、気管支、肺、肝臓*、腎臓*、胸腺、脾臓*、副腎*、胃*、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、精巣*、精巣上体、前立腺、精囊、卵巢*、子宮、膈、乳腺、膀胱*、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、骨格筋（下腿部）、坐骨神経、大腿骨骨髓*、大腿骨、視神経、脾臓、顎下腺、舌下腺、舌、食道、大動脈、ハーダー腺、皮膚、病変部

7. データ解析法

体重、摂餌量および半定量検査を除く尿検査、定期解剖例の血液学検査、血液生化学検査の値および器官重量は、群ごとに平均値および標準偏差を求めた。次いで、試験群の構成が対照群を含めて3群以上の場合は、Bartlettの方法により分散の一意性について検定（有意水準：5%）を行った。分散が一意であった場合には一元配置型の分散分析を

行い、群間に有意性（有意水準：5 %）が認められた場合は Dunnett 法により多重比較を行った。また、分散が一樣でなかった場合は Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意性（有意水準：5 %）が認められた場合には Dunnett 型の検定法で多重比較を行った。ただし、いずれかの群で分散が 0 となった場合には、Bartlett による検定は行わずに Kruskal-Wallis の順位検定を行い、その結果、群間に有意性が認められた場合には Dunnett 型の検定法により多重比較を行った。一方、試験群が対照群を含め 2 群の場合には対照群と被験物質投与群の各平均値の差の検定は F-検定（有意水準：5 %）を行い、等分散の場合には Student の t 検定法、不等分散の場合には Aspin-Welch の t 検定法を用いて有意差検定を行った。ただし、どちらかの群で分散が 0 となった場合には t 検定は実施しなかった。尿の半定量検査成績は、 $m \times n$ の分割表を用いる χ^2 検定を行い、有意性（有意水準：5 %）が認められた場合には Dunnett 型の検定法により多重比較を行った。ただし、周辺度数が 0 になった場合には、検定は実施しなかった。

さらに、病理組織所見でグレード分けしたデータは Mann-Whitney の U 検定（両側検定）法により、また、陽性グレードの合計値は Fisher の直接確率検定（片側検定）法により、対照群と被験物質投与群との間の有意差検定を行った（有意水準：5 %）。

【結 果】

1. 死亡例

投与期間および回復試験期間中に、対照群を含むいずれの群にも死亡例はなかった。

2. 一般状態

第1回投与の後、投与翌日にかけて 500 mg/kg 投与群の雌雄で赤色尿が認められたが、尿検査の結果からこの赤色尿は血色素尿であることが明らかとなった。投与第2日以降、投与期間および回復試験期間中に対照群を含むいずれの群にも一般状態の変化は認められなかった。

3. 体重 (Fig. 1、Table 1、Appendix 1)

投与期間中、雌雄とも被験物質投与群と対照群との間で体重推移に差は認められなかった。一方、回復試験期間中には 500 mg/kg 投与群の雌で期間を通して体重の高値が継続して認められ、回復第14日の測定では有意差が認められた。

4. 摂餌量 (Table 2、Appendix 2)

雌雄とも 500 mg/kg 投与群においては投与第1日の摂餌量に有意な減少が認められ、回復第1日の摂餌量には有意な増加がみられた。一方、雌では投与第8日には 125 mg/kg 投与群で有意な減少が、投与第15日には 30 ならびに 500 mg/kg 投与群で有意な増加が認められた。しかし同時期の体重変化には影響がみられず、また、雄では認められていない変化であることから被験物質の影響ではないものと判断した。

5. 摂水量 (Table 3、Appendix 3)

投与期間終了時ならびに回復期間終了時に測定した摂水量には、いずれも投与群と対照群の間に差は認められなかった。

6. 尿検査所見 (Table 4、Appendix 4)

投与第1日の検査によれば 500 mg/kg 投与群の雄4例、雌2例では暗赤色調尿が認められ、これらを含む雄の8例ならびに雌の7例では尿潜血が強陽性であった。尿潜血

の強陽性例は投与期間終了時の検査では雌雄各1例にみられたが、回復期間終了時には認められなかった。この他、500 mg/kg 投与群の雌雄では黄褐色尿および尿中蛋白質ならびにビリルビンの出現が認められた。

一方、投与期間終了週の検査では雄の 30 mg/kg 投与群で尿比重の減少がみられたが、尿量には変化がなく用量依存性の認められる変化でもなかったことから、偶発的な現象と考えた。また、回復期間終了週の検査では雌の 500 mg/kg 投与群で尿量の増加がみられたが、その程度は軽く尿比重にも差は認められないことから、やはり偶発所見と考えた。

7. 血液学検査所見 (Table 5～6、Appendix 5～6)

投与期間終了時の検査の結果、500 mg/kg 投与群の雌雄において赤血球数、血色素量、ヘマトクリット値および平均赤血球血色素濃度の低下ならびに平均赤血球容積、平均赤血球血色素量および網状赤血球比率の増加が認められ、明らかな貧血状態にあると考えられた。さらに 125 mg/kg 投与群においては変化のあった測定項目のうち雄では網状赤血球比率の増加が、雌では赤血球数、血色素量ならびに平均赤血球血色素濃度の低下がそれぞれ有意差をもってみられ、この用量においても貧血傾向にあると考えられた。一方、500 mg/kg 投与群の雌ではプロトロンビン時間の延長がみられたが、雄にはみられない変化であることから被験物質による影響か否かは明らかではなかった。

回復試験期間終了時の検査では、投与期間終了時の検査で認められた変化のうち平均赤血球容積および平均赤血球血色素量の増加が雌雄で、平均赤血球血色素濃度の低下が雄でそれぞれ認められた。一方、白血球数の増加が 500 mg/kg 投与群の雌でみられたが、投与期間終了時の検査では同様の変化は認められていないこと、雄にはこの傾向がみられないことから被験物質投与による影響ではないと考えた。

骨髓像所見では 500 mg/kg 投与群の雌雄で、赤血球系細胞の発現頻度が有意に増加し顆粒球系細胞の発現頻度は有意に低下した。即ち、雄では多染性赤芽球、雌では好塩基性赤芽球から正染性赤芽球までの赤芽球の発現頻度が有意に増加し、雄では前骨髓球、好中球、好酸球およびリンパ球の、雌では骨髓芽球および好酸性骨髓球の発現頻度が低下した。このため、骨髓球／赤芽球比は雌雄とも有意に低下した。125 mg/kg 以下の投与群では 500 mg/kg 投与群に比較して程度は軽いものの、多くの項目で有意な変化がみられ、30 mg/kg 投与群においてもなお雄では多染性赤芽球の発現頻度の有意な増加ならびに好中球および好酸球の発現頻度の低下により、骨髓球／赤芽球比の低下がみられた。

30mg/kg 投与群の雌においても骨髓芽球の発現頻度の低下は有意であった。一方、2週間の回復期間経過後にはこれらの変化は軽減し、雌において前骨髓球に低下が認められるものの、好中性骨髓球や骨髓球／赤芽球比の有意な増加や赤血球系細胞の発現頻度の有意な低下といった、投与終了時の検査でみられた変化とは逆の方向性を持った変化が認められたのみであった。

8. 血液生化学検査所見 (Table 7、Appendix 7)

投与期間終了時には 500 mg/kg 投与群の雄では無機リンならびにカリウム濃度の有意な増加が、同群の雌ではA/G 比ならびにクレアチニン濃度の有意な増加がそれぞれみられた。一方、回復試験期間終了時には 500 mg/kg 投与群の雌において総コレステロール濃度の増加が認められた。

9. 病理学検査所見

1) 器官重量 (Table 8 ～ 9、Appendix 8 ～ 9)

投与期間終了時の剖検では雌雄とも 500 mg/kg 投与群において、脾臓重量の有意な増加が絶対重量、相対重量ともに認められ、雌での相対重量増加は 125 mg/kg 投与群においても有意であった。その他の器官では肝臓と腎臓の重量増加傾向が 500 mg/kg 投与群においてみられ、肝臓においては雌雄で、腎臓においては雄で、それぞれ相対重量に有意差が認められた。

回復試験期間終了時の剖検では 500 mg/kg 投与群の雌で脾臓重量の有意な増加が絶対重量で認められたほか、肝臓重量の有意な増加も絶対重量ならびに相対重量の両者でみられた。一方、解剖時体重が有意に増加したため腎臓の相対重量には有意な低下がみられた。また、投与期間終了時にはみられなかった甲状腺重量の有意な低下が 500 mg/kg 投与群の雄で絶対重量、相対重量ともに認められたが、変化がみられたのは回復試験期間終了時のみであり被験物質の投与による影響とは考えられなかった。

2) 肉眼所見 (Table 10、Appendix 10)

(1) 投与期間終了時解剖例

脾臓では 500 mg/kg 投与群の雄の全例、雌の 3 例に腫大が、雄の 1 例、雌の 3 例に暗色化が認められた。また、500 mg/kg 投与群の肝臓では雄の 2 例に腫大、雌の 3 例に黄色化がみられたほか、500 mg/kg 投与群の雄 3 例に腎臓の腫大が観察された。

(2) 回復試験期間終了時解剖例

500 mg/kg 投与群の雄の 2 例では脾臓に腫大が認められ、この 2 例には肝臓あるいは腎臓に腫大が観察された。その他、500 mg/kg 投与群の雌の 1 例には肺門部付近の食道に黄色塊の付着がみられた。

3) 組織学検査所見 (Table 11、Appendix 11)

(1) 投与期間終了時剖検例

脾臓では対照群を含む雌雄全例に髄外造血が観察されたが、125 mg/kg 以上の投与群では造血が亢進しており、500 mg/kg 投与群においてはその細胞数が明らかに増加していた (Photo 1~2)。また、褐色色素の沈着は対照群および 30 mg/kg 投与群においては雄には観察されず、雌の両群各 2 例に認められるだけであったが、125 mg/kg 以上の投与群においては雌雄ほぼ全例に観察され、雌では沈着した細胞数が明らかに増加していた。このため、雌雄全例の脾臓切片についてベルリン青染色を施し観察した結果、雌雄の 125 mg/kg 以上の投与群では対照群に比較して陽性顆粒が明らかに増加していたことから (Photo 3~4)、褐色色素の増加はヘモジデリンの沈着によるものと判断した。

骨髄では 30 mg/kg 投与群および対照群の雌各 1 例、125 mg/kg 投与群の雄 2 例、雌全例、500 mg/kg 投与群の雌雄全例に赤芽球系細胞の造血亢進がみられ、500 mg/kg 投与群では 125 mg/kg 投与群と比較して亢進の程度の強い例が多かった (Photo 5~6)。

肝臓では 500 mg/kg 投与群の雄 3 例、雌 2 例に髄外造血が観察されたため、125 および 30 mg/kg 投与群についても鏡検を行ったが、125 mg/kg 以下の投与群には認められなかった。また、雌雄全例に門脈周囲性の脂肪化がみられたが、被験物質投与群と対照群との間に明らかな程度の差は認められなかった。その他、小肉芽腫が少数例に観察された。

腎臓では雄の 500 mg/kg 投与群および対照群の各 1 例に好酸性小体がみられた。

また、雌雄両群には皮質に好塩基性尿細管、髓質あるいは乳頭部に鉍質沈着が観察されたが、両群間に頻度および程度の差は認められなかった。

その他、対照群の雌1例に閉鎖状態に陥る傾向のある卵胞の増加が認められた。その他の病理組織検査を実施した器官に異常所見は認められなかった。

(2)回復試験期間終了時剖検例

脾臓では雌雄全例に髄外造血が観察されたが、両群間に程度の差は認められなかった。また、褐色色素の沈着は対照群の雄3例、雌全例、500 mg/kg 投与群の雌雄全例に観察され、500 mg/kg 投与群では対照群に比較して沈着した細胞数の増加傾向が認められた。ベルリン青染色を実施し病理組織学検査を行った結果においても、雌雄の 500 mg/kg 投与群では対照群に比較して陽性顆粒がやや増加する傾向が認められた。しかし、回復期間終了時屠殺例におけるベルリン青陽性顆粒数は、投与期間終了時屠殺例と比較するとやや軽減する傾向が認められた。

骨髄では対照群の雌1例、500 mg/kg 投与群の雌雄各4例に赤芽球系細胞の造血亢進がみられたが、回復期間終了時屠殺例は投与期間終了時屠殺例と比較して変化の程度の強い例が減少する傾向が認められた。

肝臓では対照群および 500 mg/kg 投与群に髄外造血は観察されなかった。また、雌雄全例に門脈周囲性の脂肪化がみられたが、両群間に明らかな程度の差は認められなかった。その他、小肉芽腫が少数例に観察された。

剖検時、肺門部付近の食道に黄色塊の付着が観察された例について病理組織学検査を行った結果、食道に隣接して食道に類似した構造を持つ嚢胞が観察された。この嚢胞は筋層は欠如していたものの、内腔面は扁平上皮細胞層で構成され、その外周を線維性結合組織が取り巻いていた。また、嚢胞の一部に穿孔がみられ、食道および嚢胞の外膜面には好中球、多核巨細胞、食物残渣を含む異物性炎症が、嚢胞内には食物残渣および好中球が観察された。これより、この嚢胞は先天性の食道憩室であると考えられ、憩室炎を起こし穿孔を伴ったものと判断した。同動物の一般状態には赤血尿以外の所見は認められず、体重の推移も他の動物に比較して差が認められない事も先天性である裏付けと考えられる。

【考 察】

MEE を30、125 および 500 mg/kg の用量で雌雄の Sprague-Dawley 系ラットに28日間にわたって強制経口投与し、その後14日間の回復試験期間を設けた。

血液学検査において投与期間終了時には雄では 500 mg/kg 投与群で、雌では 125 mg/kg 以上の投与群で、用量依存的に赤血球数、血色素量ならびに平均赤血球血色素濃度の低下等の貧血像が認められ、雄の 125 mg/kg 以上の投与群ならびに雌の 500 mg/kg 投与群では網状赤血球比率の増加も認められている。また、一般状態や投与第1日の尿検査の結果、血色素尿が認められ、投与期間終了時の剖検において雄では 500 mg/kg 投与群、雌では 125 mg/kg 以上の投与群で脾臓重量の増加が認められた。以上の変化は組織学検査において 125 mg/kg 以上の投与群の脾臓でヘモジデリンの沈着ならびに髄外造血の亢進が認められたことからの説明が可能で、雌雄とも 125 mg/kg 以上の投与群においては被験物質の投与による貧血、ならびに、その原因としての溶血による血色素尿が関連していると考えられる。肝臓における髄外造血像や、投与期間終了時の剖検で認められた 500 mg/kg 投与群の雌雄における肝臓重量増加も脾臓と同じ機序により発生したものと考えられる。

骨髓においては雌の 125 mg/kg 以上の投与群、雄の 500 mg/kg 投与群で赤芽球系細胞が増加するなど造血亢進がみられ、500 mg/kg 投与群では 125 mg/kg 投与群と比較して亢進の程度の強い例が多いことから、骨髓内の造血も亢進していることは明らかで、溶血性貧血に対する反応性造血亢進の像と判断される。これらの骨髓像所見のうち、多染性赤芽球の発現頻度の有意な増加や好中球および好酸球の発現頻度並びに骨髓球／赤芽球比の低下が雄で、骨髓芽球の発現頻度の低下が雌で、それぞれ 30 mg/kg 投与群においてもみられたことから、本被験物質の28日反復投与時の無作用量は 30 mg/kg を下回ると判断される。

一方、14日間の回復期間によって骨髓像所見では明らかな回復傾向がみられ、雌において前骨髓球に低下が認められるものの、その他の所見は消失するか、むしろ対照群を上回っていた。また、血液学検査においても平均赤血球容積および平均赤血球血色素量の増加が雌雄で、平均赤血球血色素濃度の低下が雄でそれぞれ認められるなど、幾つか項目に変化は残ったものの回復傾向が示唆された。器官重量では雌で脾臓ならびに肝臓の重量増加が認められたものの、雄では重量変化は消失していた。また、病理組織学検査では脾臓に

おけるヘモジデリンの沈着は対照群と高用量群の間にあった差が消失し、褐色色素の沈着も投与期間終了時剖検例と比較すると軽減する傾向が認められている。さらに、骨髓においても投与期間終了時剖検例と比較して変化の程度の強い例が減少する傾向が認められている。以上のことから、本被験物質による貧血とそれに対する骨髓内外の造血は、投与の中止によって回復傾向を示すことが明らかとなった。

血色素尿は本被験物質のラットにおける吸入曝露による毒性試験においても認められており⁹⁾、この試験においては血色素尿の他、血中ビリルビン濃度の増加や脾臓重量の増加、髄外造血像や褐色色素の沈着等、本試験で認められた所見と共通あるいは関連すると考えられる所見が多くみられている。また、本被験物質の構造類似物である2-ブトキシエタノール（別名：エチレングリコールモノブチルエーテル）においても溶血性貧血が認められており^{10, 2)}、2-ブトキシエタノールにおいてはその酸化代謝物であるブトキシ酢酸に溶血作用の主体があることが、*in vivo* あるいは *in vitro* 的手法によって明らかになっている³⁻⁶⁾。一方、Miller らによれば、本被験物質の主要な排泄は尿中に起こり、尿中代謝物は主にイソプロポキシアセテートならびにそのグリシン抱合体であることがあきらかになっていることから¹⁰⁾ 本被験物質である MEE が酸化による代謝をうけ、同様の機序で溶血性貧血を起こす可能性は高いと考えられる。本被験物質による血色素尿は投与第1日のみにみられ、これは本被験物質の簡易生殖毒性試験においても認められている¹¹⁾。貧血以外の 500 mg/kg 投与群でみられた変化では、雌で回復試験期間中の体重が高値を示し、摂餌量も回復第1日に有意な増加がみられたが、この増加の原因はあきらかではなかった。また、投与期間終了時に雄で無機リンならびにカリウム濃度の有意な増加が認められたが、無機リンについては血中カルシウムの、カリウムについては血中ナトリウムの濃度には全く影響が認められないことならびに雌には認められない変化であることから、被験物質投与の影響ではないと判断した。また、雌では回復試験期間終了時には総コレステロール濃度の増加がみられたが、投与終了時には認められない変化であること、雄にはみられない変化であることから偶発的な有意差と考えられた。

一方、500 mg/kg 投与群の雌では投与期間終了時にA/G 比ならびにクレアチニン濃度の有意な増加がそれぞれみられたがこれらの原因は不明である。

腎臓は重量増加が 500 mg/kg 投与群の雌において認められ、本被験物質のマウスの吸入毒性試験では腎臓の間質性腎炎、硝子円柱や血液円柱の出現等がみられたとする報告があるが⁹⁾、病理組織学検査の結果なんら所見は認められないことから重量増加は偶発的

な有意差であると判断した。

一方、本被験物質の構造類似物であるエチレングリコールモノメチルエーテルやエチレングリコールモノエチルエーテル等においては、精巣重量の低下やパキーン期精母細胞を中心とした精子形成障害等の精巣毒性の起こることが報告されており⁸⁾、CD-1マウスで連続交配試験を実施した結果によれば、エチレングリコールモノブチルエーテルやエチレングリコールモノフェニルエーテルにおいても妊娠率の低下がみられ、エチレングリコールモノブチルエーテルでは高用量群で1腹児数の低下が認められている¹²⁾。精巣重量の低下はエチレングリコールやプロピレングリコール、プロピレングリコールモノメチルエーテル、ジエチレングリコールモノエチルエーテルでは認められないことが明らかになっており^{13, 14)}、マウスでの検討によればエチレングリコールモノアルキルエーテルの精巣毒性はアルキル基の種類によって異なり、分子量が大きくなるほど弱くなることが報告されている¹⁵⁾。また、本試験ならびに本被験物質の簡易生殖毒性試験における、精巣重量ならびに精巣の病理組織学所見からは、精巣毒性あるいは生殖毒性を疑わせる所見は認められなかった。

以上の結果からMEEの28日間反復投与によって溶血性貧血と造血亢進が起こり、これらの変化は投与の中止によって回復することが示された。また、無作用量は雌雄ともに30 mg/kg/dayを下回ると考えられた。

【参 考 文 献】

- 1) Carpenter, C.P., Pozzani, U.C., Weil, C.S., et al.: The toxicity of butyl cellosolve solvent. Archives of Industrial Health. 14: 114-131 (1956)
- 2) Ghanayem, B.I., Ward, S.M., Blair, P.C., et al.: Comparison of the hematologic effects of 2-butoxyethanol using two types of hematology analyzers. Toxicology and Applied Pharmacology 106: 341-345 (1990)
- 3) Bartnik, F.G., Reddy, A.K., Klecak, G., et al.: Percutaneous absorption, metabolism, and hemolytic activity of n-butoxyethanol. Fundamental and Applied Toxicology 8: 59-70 (1987)
- 4) Ghanayem, B.I.: Metabolic and cellular basis of 2-butoxyethanol-induced hemolytic anemia in rats and assessment of human risk in vitro. Biochemical Pharmacology 38: 1679-1684 (1989)
- 5) Ghanayem, B.I., Burka, L.T., Matthews, H.B.: Metabolic basis of ethylene glycol monobutyl ether (2-butoxyethanol) toxicity: Role of alcohol and aldehyde dehydrogenases. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 242: 222-231 (1987)
- 6) Ghanayem, B.I., Burka, L.T., Matthews, H.B.: Structure-activity relationships for the in vitro hematotoxicity of N-alkoxyacetic acids, The toxic metabolites of glycol ethers. Chem-Biol. Interactions 70: 339-352 (1989)
- 7) 高島 宏昌, 立花 滋博, 佐藤 昌子他: 2-(1-メチルエトキシ) エタノールのラットを用いる単回経口投与毒性試験

- 8) Foster, P.M.D., Creasy, D.M., Foster, J.R., et al.: Testicular toxicity of ethylene glycol monomethyl and monoethyl ethers in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 69: 385-399 (1983)
- 9) Arts, J.H.E., Reuzel, P.G.J., Woutersen, R.A., et al.: Repeated-dose (28-day) inhalation toxicity of isopropylethylene glycol ether in rats. *Inhalation Toxicology* 4: 43-55 (1992)
- 10) Miller, R.R.: Metabolism and disposition of glycol ethers. *Drug Metabolism Reviews*. 18: 1-22 (1987)
- 11) 高島宏昌, 渡辺千朗, 立花滋博他: 2-(1-メチルエトキシ) エタノールのラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験
- 12) Morrissey, R.E., Lamb IV, J.C., Morris, R.W., et al.: Results and evaluations of 48 continuous breeding reproduction studies conducted in mice. *Fundamental and Applied Toxicology*. 13: 747-777 (1989)
- 13) Morris, H.J., Nelson, A.A., Calvery, H.O.: Observations on the chronic toxicities of propylene glycol, ethylene glycol, diethylene glycol, ethylene glycol mono-ethyl-ether, and diethylene glycol mono-ethyl-ether. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 74: 880-885 (1941)
- 14) Miller, R.R., Ayres, J.A., Calhoun, L.L., et al.: Comparative short-term inhalation toxicity of ethylene glycol monomethyl ether and propylene glycol monomethyl ether in rats and mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 61: 368-377 (1981)
- 15) 長野嘉介, 中山栄基, 小谷野道子ら: エチレングリコールモノアルキルエーテル類によるマウス精巣の萎縮, *産業医学*. 21:29-35(1979)

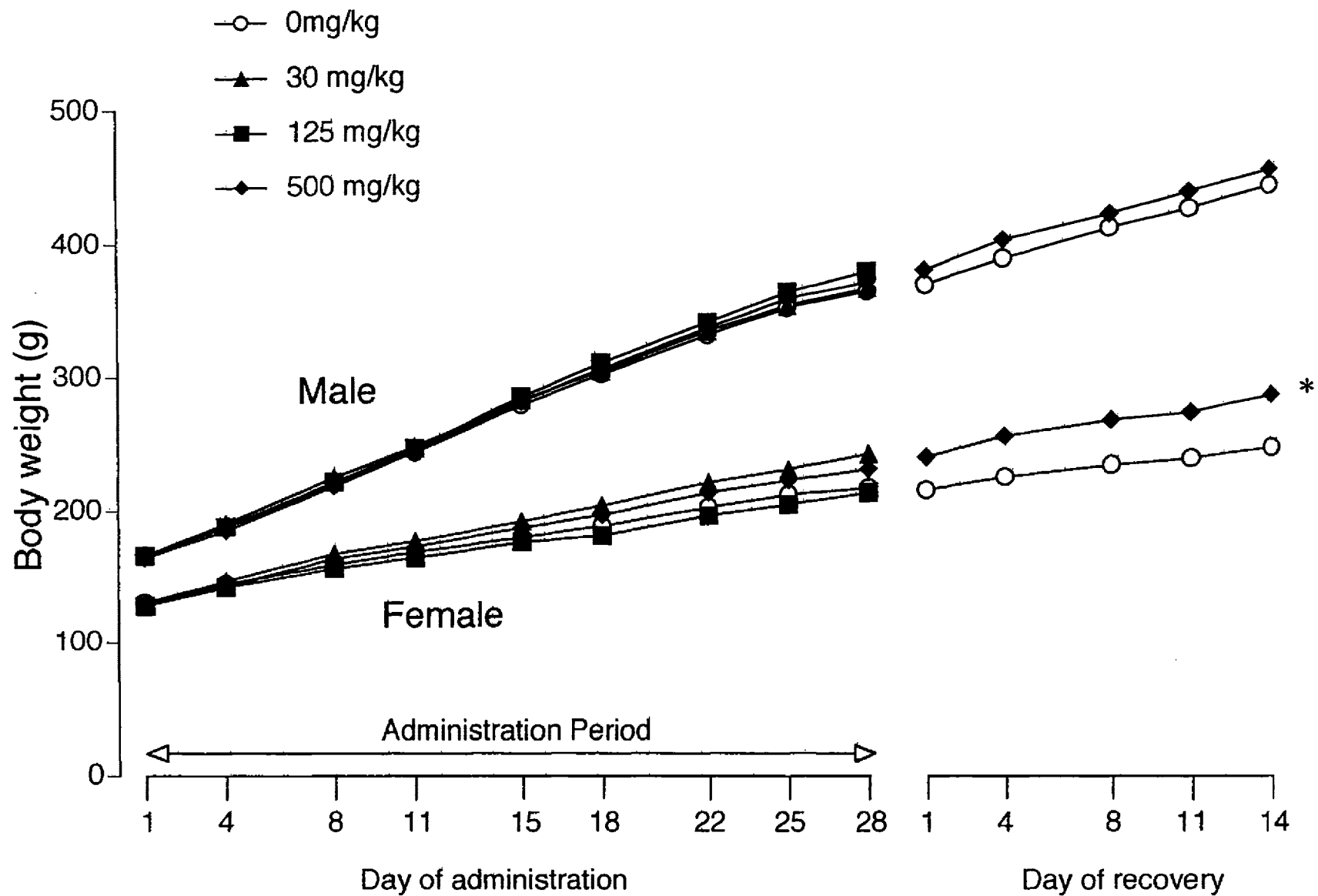


Figure 1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Body weight changes

*, significantly different from control, $p < 0.05$

Table 1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Body weight changes in males

Dose (mg/kg)	Day of dosing period								
	1	4	8	11	15	18	22	25	28
0	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
	166.6	187.9	220.7	243.7	278.8	301.6	330.9	351.1	363.5
	±8.3	±11.0	±14.6	±16.1	±20.2	±22.9	±29.2	±32.0	±32.7
30	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	166.2	190.6	225.2	248.0	282.5	304.0	333.9	352.5	365.8
	±8.7	±9.1	±11.1	±13.4	±14.4	±17.7	±18.8	±19.3	±20.0
125	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	166.2	188.1	221.7	246.6	284.8	310.3	340.2	362.7	378.2
	±9.4	±13.5	±15.8	±18.2	±20.5	±21.7	±23.7	±21.5	±22.7
500	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
	164.6	185.2	218.5	244.4	281.3	305.6	335.9	357.9	370.4
	±8.3	±9.9	±11.7	±14.3	±18.3	±17.7	±21.9	±24.5	±24.8

Dose (mg/kg)	Day of recovery period				
	1	4	8	11	14
0	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	368.1	387.7	410.4	424.7	441.5
	±40.7	±41.1	±43.0	±44.6	±45.0
500	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	379.2	401.6	420.7	436.9	453.5
	±21.2	±22.1	±22.1	±28.2	±30.9

(), number of animals

Parameter, mean(g)±S.D.

Table 1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Body weight changes in females

Dose (mg/kg)	Day of dosing period								
	1	4	8	11	15	18	22	25	28
0	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
	131.1	144.9	159.2	168.9	179.5	188.3	202.1	211.5	216.5
	±5.9	±8.6	±10.2	±13.3	±15.0	±15.6	±18.8	±19.4	±19.5
30	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	130.8	147.0	167.7	176.9	191.8	203.6	220.6	230.4	241.8
	±1.3	±2.8	±6.7	±7.6	±9.3	±8.6	±10.4	±9.4	±16.6
125	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	128.4	142.5	156.4	164.5	176.0	180.9	195.7	204.0	213.0
	±5.9	±9.6	±17.7	±20.8	±24.8	±29.7	±31.0	±34.1	±33.5
500	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
	130.0	143.2	163.8	172.7	187.0	196.3	213.1	222.1	230.5
	±5.7	±6.2	±7.8	±8.7	±9.5	±12.9	±15.2	±15.4	±15.4

Dose (mg/kg)	Day of recovery period				
	1	4	8	11	14
0	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	214.9	224.3	233.1	237.9	246.0
	±25.3	±27.3	±30.7	±30.8	±31.8
500	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	239.4	254.8	266.4	272.0	285.1 *
	±18.5	±15.2	±15.8	±13.7	±15.0

(), number of animals

Parameter, mean(g)±S.D.

*, significantly different from control, p<0.05

Table 2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Food consumption in males

Dose (mg/kg)	Day of dosing period			
	1	8	15	22
0	(10)	(10)	(10)	(10)
	22.9	25.5	28.7	30.2
	± 1.6	± 2.5	± 2.0	± 3.3
30	(5)	(5)	(5)	(5)
	22.5	25.6	26.3	28.7
	± 1.9	± 2.1	± 2.7	± 2.3
125	(5)	(5)	(5)	(5)
	22.3	27.0	29.1	32.0
	± 2.1	± 3.7	± 3.3	± 3.4
500	(10)	(10)	(10)	(10)
	19.1 **	26.1	30.0	30.9
	± 2.2	± 2.2	± 2.2	± 3.0

Dose (mg/kg)	Day of recovery period	
	1	8
0	(5)	(5)
	29.4	29.7
	± 2.8	± 3.7
500	(5)	(5)
	35.1 **	32.9
	± 2.0	± 2.9

(), number of animals

Parameter, mean(g) $\pm$ S.D.**, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Food consumption in females

Dose (mg/kg)	Day of dosing period			
	1	8	15	22
0	(10)	(10)	(10)	(10)
	18.5	19.7	18.9	20.6
	±1.5	±1.5	±1.1	±3.3
30	(5)	(5)	(5)	(5)
	17.9	20.6	22.4 *	19.5
	±1.3	±1.9	±2.3	±3.3
125	(5)	(5)	(5)	(5)
	16.6	17.0 *	19.2	18.3
	±1.5	±2.1	±2.2	±2.1
500	(10)	(10)	(10)	(10)
	16.1 **	19.8	21.6 *	19.6
	±1.5	±1.9	±2.9	±4.0

Dose (mg/kg)	Day of recovery period	
	1	8
0	(5)	(5)
	20.6	21.5
	±3.3	±5.0
500	(5)	(5)
	24.6 *	25.7
	±0.8	±4.5

(), number of animals

Parameter, mean(g)±S.D.

*, significantly different from control, p<0.05

**, significantly different from control, p<0.01

Table 3-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Water intake in males

Dose (mg/kg)	On day 23 of dosing period	On day 9 of recovery period
0	(10) 30.2 ±11.1	(5) 39.8 ±6.9
30	(5) 38.4 ±10.3	
125	(5) 20.7 ±18.9	
500	(10) 36.5 ±5.6	(5) 38.6 ±6.8

(), number of animals
Parameter, mean(g)±S.D.

Table 3-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Water intake in females

Dose (mg/kg)	On day 23 of dosing period	On day 9 of recovery period
	(10)	(5)
0	25.6 ±6.6	25.4 ±5.2
	(5)	
30	29.2 ±6.7	
	(5)	
125	28.5 ±5.5	
	(10)	(5)
500	25.6 ±6.8	32.0 ±4.0

(), number of animals

Parameter, mean(g)±S.D.

Table 4-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Urinalysis in males on day 1 of the dosing period

Dose (mg/kg)	Number of animals	Microscopic examination of urinary sediment								Color				Turbidity				
		Red blood cells		Crystal		Cast	White blood cells		Epithelial cells									
		-		-	±	-	-		-	±	ly	y	yb	db	-	+	++	
0	10	10		0	10	10	10		10	0	9	1	0	0	10	0	0	
30	5	5		1	4	5	5		5	0	5	0	0	0	5	0	0	
125	5	5		0	5	5	5		5	0	5	0	0	0	5	0	0	
500	10	10		1	9	10	10		9	1	1	1	4	4	**	9	0	1

Dose (mg/kg)	Number of Animals	pH					Protein					Glucose		Ketone			Bilirubin			Occult blood					Urobilinogen				
		6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	-	±	+	++	+++	-		-	±	+	-	+	++	-	±	+	++	+++	±	+			
0	10	0	0	6	3	1	5	3	2	0	0	10		7	3	0	10	0	0	10	0	0	0	0	8	2			
30	5	0	0	2	2	1	4	1	0	0	0	5		4	1	0	5	0	0	5	0	0	0	0	5	0			
125	5	0	1	4	0	0	3	0	2	0	0	5		5	0	0	5	0	0	5	0	0	0	0	3	2			
500	10	1	4	3	2	0	1	1	0	5	3	**	10		2	7	1	2	7	1	**	2	0	0	0	8	**	9	1

**, significantly different from control, $p < 0.01$

Red blood cells -, not observed; ±, 1-9/3 visual field; +, 10-99/3 visual field
 Crystal -, not observed; ±, a few; +, abundant
 Cast -, not observed; ±, 1-9/3 visual field; +, 10-99/3 visual field
 White blood cells -, not observed; ±, 1-9/3 visual field; +, 10-99/3 visual field
 Epithelial cells -, not observed; ±, a few; +, abundant

Color ly, light yellow; y, yellow; yb, yellowish brown; db, dark brown
 Turbidity -, negative; ±, trace; +, slight; ++, moderate; +++, marked
 Protein -, negative; ±, trace; +, 30 mg/dL; ++, 100 mg/dL; +++, ≥ 300 mg/dL
 Glucose -, negative; ±, 0.1 g/dL; +, 0.25 g/dL; ++, 0.5 g/dL
 Ketone -, negative; ±, trace; +, slight; ++, moderate; +++, marked
 Bilirubin -, negative; +, slight; ++, moderate; +++, marked
 Occult blood -, negative; ±, trace; +, slight; ++, moderate; +++, marked
 Urobilinogen ±, 0.1 EU/dL; +, 1.0 EU/dL

Table 4-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Urinalysis in females on day 1 of the dosing period

Dose (mg/kg)	Number of Animals	Microscopic examination of urinary sediment										Color				Turbidity		
		Red blood cells		Crystal		Cast	White blood cells		Epithelial cells									
		-		-	±	-	-		-	±	ly	y	yb	db	-	+	++	
0	10	10		2	8	10	10		9	1	10	0	0	0	10	0	0	
30	5	5		0	5	5	5		5	0	5	0	0	0	5	0	0	
125	5	5		1	4	5	5		5	0	5	0	0	0	5	0	0	
500	10	10		0	10	10	10		10	0	3	2	3	2	**	10	0	0

Dose (mg/kg)	Number of Animals	pH					Protein					Glucose		Ketone		Bilirubin			Occult blood					Urobilinogen					
		6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	-	±	+	++	+++	-		-	±	+	-	+	++	-	±	+	++	+++	±	+			
0	10	0	3	5	1	1	8	1	1	0	0	10		8	2	0	10	0	0	10	0	0	0	0	8	2			
30	5	0	0	3	1	1	4	1	0	0	0	5		4	1	0	5	0	0	5	0	0	0	0	5	0			
125	5	0	1	2	2	0	5	0	0	0	0	5		5	0	0	5	0	0	5	0	0	0	0	4	1			
500	10	0	7	2	1	0	3	0	0	4	3	**	10		5	5	0	5	5	0	**	3	0	0	0	7	**	10	0

**, significantly different from control, $p < 0.01$

Red blood cells -, not observed; ±, 1-9/3 visual field; +, 10-99/3 visual field
 Crystal -, not observed; ±, a few; +, abundant
 Cast -, not observed; ±, 1-9/3 visual field; +, 10-99/3 visual field
 White blood cells -, not observed; ±, 1-9/3 visual field; +, 10-99/3 visual field
 Epithelial cells -, not observed; ±, a few; +, abundant

Color ly, light yellow; y, yellow; yb, yellowish brown; db, dark brown
 Turbidity -, negative; ±, trace; +, slight; ++, moderate; +++, marked
 Protein -, negative; ±, trace; +, 30 mg/dL; ++, 100 mg/dL; +++, □300 mg/dL
 Glucose -, negative; ±, 0.1 g/dL; +, 0.25 g/dL; ++, 0.5 g/dL
 Ketone -, negative; ±, trace; +, slight; ++, moderate; +++, marked
 Bilirubin -, negative; +, slight; ++, moderate; +++, marked
 Occult blood -, negative; ±, trace; +, slight; ++, moderate; +++, marked
 Urobilinogen ±, 0.1 EU/dL; +, 1.0 EU/dL

Table 4-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Urinalysis in males on day 23 of the dosing period

Dose (mg/kg)	Number of animals	Microscopic examination of urinary sediment						Urinary volume		Specific gravity	
		Red blood cells	Crystal		Cast	White blood cells		Epithelial cells		(mL/24hr)	
		-	-	±	-	-	-	-	(Mean±S.D.)	(Mean±S.D.)	
0	10	10	0	10	10	10	10	17.3	± 5.8	1.053	± 0.012
30	5	5	0	5	5	5	5	23.3	± 8.8	1.034	± 0.008 *
125	5	5	0	5	5	5	5	18.4	± 5.9	1.051	± 0.014
500	10	10	0	10	10	10	10	19.5	± 4.6	1.047	± 0.012

Dose (mg/kg)	Number of animals	Color	Turbidity	pH							Protein				Glucose	Ketone			Bilirubin	Occult blood					Urobilinogen	
		ly	-	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	≥9.0	-	±	+	++	-	-	±	+	-	-	±	+	++	+++	±	+
0	10	10	10	0	1	3	2	3	1	0	0	3	6	1	10	4	3	3	10	10	0	0	0	0	8	2
30	5	5	5	0	0	2	1	2	0	0	0	4	1	0	5	3	1	1	5	5	0	0	0	0	5	0
125	5	5	5	0	2	3	0	0	0	0	0	0	5	0	5	4	1	0	5	5	0	0	0	0	4	1
500	10	10	10	1	4	4	1	0	0	0	1	4	5	0	10	5	5	0	10	10	0	0	0	0	9	1

*, significantly different from control, p<0.05

Red blood cells -, not observed; ±, 1-9/3 visual field; +, 10-99/3 visual field
 Crystal -, not observed; ±, a few; +, abundant
 Cast -, not observed; ±, 1-9/3 visual field; +, 10-99/3 visual field
 White blood cells -, not observed; ±, 1-9/3 visual field; +, 10-99/3 visual field
 Epithelial cells -, not observed; ±, a few; +, abundant

Color ly, light yellow; y, yellow; yb, yellowish brown; db, dark brown
 Turbidity -, negative; ±, trace; +, slight; ++, moderat; +++, marked
 Protein -, negative; ±, trace; +, 30 mg/dL; ++, 100 mg/dL; +++, ≥300 mg/dL
 Glucose -, negative; ±, 0.1 g/dL; +, 0.25 g/dL; ++, 0.5 g/dL
 Ketone -, negative; ±, trace; +, slight; ++, moderat; +++, marked
 Bilirubin -, negative; +, slight; ++, moderat; +++, marked
 Occult blood -, negative; ±, trace; +, slight; ++, moderat; +++, marked
 Urobilinogen ±, 0.1 EU/dL; +, 1.0 EU/dL

Table 4-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Urinalysis in females on day 23 of the dosing period

Dose (mg/kg)	Number of animals	Microscopic examination of urinary sediment							Urinary volume		Specific gravity			
		Red blood cells		Crystal		Cast	White blood cells		Epithelial cells		(mL/24hr)		(Mean±S.D.)	
		-	- ±	-	-	-	-	-	(Mean±S.D.)	(Mean±S.D.)				
0	10	10	3 7	10	10	10	10	12.9 ± 4.0	1.046 ± 0.015					
30	5	5	1 4	5	5	5	5	14.9 ± 3.6	1.053 ± 0.013					
125	5	5	0 5	5	5	5	5	13.7 ± 4.8	1.047 ± 0.017					
500	10	10	2 8	10	10	10	10	12.7 ± 4.2	1.051 ± 0.008					

Dose (mg/kg)	Number of animals	Color	Turbidity	pH								Protein				Glucose	Ketone				Bilirubin	Occult blood					Urobilinogen	
		ly	-	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	≥9.0	-	±	+	++	-	-	±	+	-	-	±	+	++	+++	±	+		
		ly	-	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	≥9.0	-	±	+	++	-	-	±	+	-	-	±	+	++	+++	±	+		
0	10	10	10	2	1	2	2	2	1	0	8	1	1	0	10	10	0	0	10	10	0	0	0	0	10	0		
30	5	5	5	1	2	0	0	0	0	2	4	1	0	0	5	5	0	0	5	5	0	0	0	0	4	1		
125	5	5	5	0	2	0	2	1	0	0	4	1	0	0	5	3	2	0	5	5	0	0	0	0	4	1		
500	10	10	10	3	3	3	1	0	0	0	5	2	3	0	10	5	4	1	10	9	0	0	0	1	8	2		

Red blood cells -, not observed; ±, 1-9/3 visual field; +, 10-99/3 visual field
 Crystal -, not observed; ±, a few; +, abundant
 Cast -, not observed; ±, 1-9/3 visual field; +, 10-99/3 visual field
 White blood cells -, not observed; ±, 1-9/3 visual field; +, 10-99/3 visual field
 Epithelial cells -, not observed; ±, a few; +, abundant

Color ly, light yellow; y, yellow; yb, yellowish brown; db, dark brown
 Turbidity -, negative; ±, trace; +, slight; ++, moderat; +++, marked
 Protein -, negative; ±, trace; +, 30 mg/dL; ++, 100 mg/dL; +++, □300 mg/dL
 Glucose -, negative; ±, 0.1 g/dL; +, 0.25 g/dL; ++, 0.5 g/dL
 Ketone -, negative; ±, trace; +, slight; ++, moderat; +++, marked
 Bilirubin -, negative; +, slight; ++, moderat; +++, marked
 Occult blood -, negative; ±, trace; +, slight; ++, moderat; +++, marked
 Urobilinogen ±, 0.1 EU/dL; +, 1.0 EU/dL

Table 4-3-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Urinalysis in males on day 9 of the recovery period

Dose (mg/kg)	Number of animals	Microscopic examination of urinary sediment								Urinary volume			Specific gravity			
		Red blood cells			Crystal		Cast	White blood cells		Epithelial cells		(mL/24hr)				
		-	±	+	-	±	-	-	-	-	(Mean±S.D.)	(Mean±S.D.)				
0	5	4	0	1	0	5	5	5	5	5	21.4	±	4.2	1.053	±	0.005
500	5	5	0	0	0	5	5	5	5	5	20.0	±	4.5	1.056	±	0.007

Dose (mg/kg)	Number of animals	Color	Turbidity	pH						Protein				Glucose	Ketone			Bilirubin	Occult blood				Urobilinogen	
		ly	-	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	+	++	-	-	±	+	-	-	±	+	++	±	+
0	5	5	5	0	0	1	2	1	1	0	1	4	0	5	1	2	2	5	4	0	0	1	5	0
500	5	5	5	0	1	2	2	0	0	0	2	3	0	5	1	1	3	5	5	0	0	0	4	1

*, significantly different from control, $p < 0.05$

Red blood cells -, not observed; ±, 1-9/3 visual field; +, 10-99/3 visual field
 Crystal -, not observed; ±, a few; +, abundant
 Cast -, not observed; ±, 1-9/3 visual field; +, 10-99/3 visual field
 White blood cells -, not observed; ±, 1-9/3 visual field; +, 10-99/3 visual field
 Epithelial cells -, not observed; ±, a few; +, abundant

Color ly, light yellow; y, yellow; yb, yellowish brown; db, dark brown
 Turbidity -, negative; ±, trace; +, slight; ++, moderate; +++, marked
 Protein -, negative; ±, trace; +, 30 mg/dL; ++, 100 mg/dL; +++, ≥ 300 mg/dL
 Glucose -, negative; ±, 0.1 g/dL; +, 0.25 g/dL; ++, 0.5 g/dL
 Ketone -, negative; ±, trace; +, slight; ++, moderate; +++, marked
 Bilirubin -, negative; +, slight; ++, moderate; +++, marked
 Occult blood -, negative; ±, trace; +, slight; ++, moderate; +++, marked
 Urobilinogen ±, 0.1 EU/dL; +, 1.0 EU/dL

Table 4-3-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Urinalysis in females on day 9 of the recovery period

Dose (mg/kg)	Number of animals	Microscopic examination of urinary sediment								Urinary volume (mL/24hr)			Specific gravity		
		Red blood cells			Crystal		Cast	White blood cells			Epithelial cells		(Mean±S.D.)	(Mean±S.D.)	
		-	±	+	-	±	-	-	-	-	-	-		-	±
0	5	5	0	0	0	5	5	5	5	5	5	5	11.9 ± 2.8	1.059 ± 0.006	
500	5	5	0	0	1	4	5	5	5	5	5	5	17.5 ± 4.4 *	1.049 ± 0.009	

Dose (mg/kg)	Number of animals	Color	Turbidity	pH						Protein				Glucose	Ketone			Bilirubin	Occult blood				Urobilinogen	
		ly	-	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	+	++	-	-	±	+	-	-	±	+	++	±	+
0	5	5	5	1	1	2	1	0	0	4	1	0	0	5	5	0	0	5	5	0	0	0	3	2
500	5	5	5	1	1	1	1	1	0	3	1	1	0	5	5	0	0	5	5	0	0	0	3	2

*, significantly different from control, p<0.05

Red blood cells -, not observed; ±, 1-9/3 visual field; +, 10-99/3 visual field
 Crystal -, not observed; ±, a few; +, abundant
 Cast -, not observed; ±, 1-9/3 visual field; +, 10-99/3 visual field
 White blood cells -, not observed; ±, 1-9/3 visual field; +, 10-99/3 visual field
 Epithelial cells -, not observed; ±, a few; +, abundant

Color ly, light yellow; y, yellow; yb, yellowish brown; db, dark brown
 Turbidity -, negative; ±, trace; +, slight; ++, moderate; +++, marked
 Protein -, negative; ±, trace; +, 30 mg/dL; ++, 100 mg/dL; +++, ≥300 mg/dL
 Glucose -, negative; ±, 0.1 g/dL; +, 0.25 g/dL; ++, 0.5 g/dL
 Ketone -, negative; ±, trace; +, slight; ++, moderate; +++, marked
 Bilirubin -, negative; +, slight; ++, moderate; +++, marked
 Occult blood -, negative; ±, trace; +, slight; ++, moderate; +++, marked
 Urobilinogen ±, 0.1 EU/dL; +, 1.0 EU/dL

Table 5-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Hematological findings in males at the end of the dosing period

Dose	RBC	Hemoglobin	Hematocrit	MCV	MCH	MCHC	Platelet	Reticulocyte	PT	APTT
(mg/kg)	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	(g/dL)	(%)	(fL)	(pg)	(g/dL)	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	(%)	(sec)	(sec)
0	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	737	14.7	44.3	60.1	19.9	33.2	100.0	3.5	16.5	20.7
	± 29	± 0.5	± 2.0	± 1.9	± 0.7	± 0.3	± 10.6	± 0.8	± 2.2	± 2.6
30	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	720	14.2	43.2	60.0	19.8	33.0	108.4	3.5	17.4	20.6
	± 24	± 0.3	± 1.0	± 1.1	± 0.4	± 0.3	± 5.7	± 0.5	± 3.0	± 1.5
125	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	718	14.4	43.7	60.8	20.0	32.9	98.6	5.3 *	16.2	19.4
	± 31	± 0.4	± 1.8	± 1.7	± 0.6	± 0.4	± 15.7	± 1.4	± 3.7	± 1.9
500	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	571 **	12.6 **	39.1 **	68.6 **	22.1 **	32.2 **	95.6	14.8 **	15.2	18.8
	± 25	± 0.5	± 1.5	± 2.9	± 0.9	± 0.3	± 14.8	± 1.3	± 1.5	± 1.1

Dose	WBC	Neutrophil	Eosinophil	Basophil	Monocyte	Lymphocyte
(mg/kg)	($\times 100/\mu\text{L}$)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	88.6	9	1	0	6	84
	± 35.4	± 3	± 0	± 0	± 1	± 4
30	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	67.8	9	1	0	5	85
	± 20.9	± 5	± 1	± 0	± 0	± 5
125	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	79.7	12	1	0	7	81
	± 25.6	± 8	± 0	± 0	± 2	± 8
500	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	77.2	8	1	0	4	87
	± 32.4	± 3	± 0	± 0	± 2	± 3

(), number of animals

Parameter, mean $\pm$ S.D.*, significantly different from control, $p < 0.05$ **, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 5-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Hematological findings in females at the end of the dosing period

Dose	RBC	Hemoglobin	Hematocrit	MCV	MCH	MCHC	Platelet	Reticulocyte	PT	APTT
(mg/kg)	($\times 10^4 / \mu\text{L}$)	(g/dL)	(%)	(fL)	(pg)	(g/dL)	($\times 10^4 / \mu\text{L}$)	(%)	(sec)	(sec)
0	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	724	14.4	42.6	58.9	19.9	33.7	110.9	2.2	12.4	16.3
	± 31	± 0.5	± 1.4	± 1.3	± 0.5	± 0.2	± 4.1	± 0.6	± 0.2	± 1.2
30	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	672	13.5	40.4	60.2	20.1	33.5	108.6	4.5	12.7	16.4
	± 55	± 0.9	± 2.7	± 2.1	± 0.6	± 0.2	± 15.6	± 4.7	± 0.5	± 0.2
125	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	655 *	13.2 *	39.9	61.0	20.1	33.0 **	104.5	5.8	12.7	16.1
	± 31	± 0.4	± 1.3	± 1.5	± 0.5	± 0.3	± 9.6	± 1.9	± 0.4	± 1.1
500	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	548 **	12.3 **	38.4 **	70.2 **	22.5 **	32.1 **	102.3	15.4 **	13.3 *	16.2
	± 24	± 0.4	± 1.1	± 1.3	± 0.3	± 0.5	± 10.9	± 2.5	± 0.5	± 1.5

Dose	WBC	Neutrophil	Eosinophil	Basophil	Monocyte	Lymphocyte
(mg/kg)	($\times 100 / \mu\text{L}$)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	43.7	10	2	0	4	85
	± 9.2	± 3	± 1	± 0	± 1	± 4
30	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	31.0	20	3	0	7	70
	± 18.2	± 23	± 2	± 0	± 6	± 30
125	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	40.7	6	1	0	4	89
	± 15.2	± 3	± 0	± 0	± 1	± 3
500	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	39.2	5	1	0	5	89
	± 8.7	± 2	± 0	± 0	± 3	± 4

(), number of animals

Parameter, mean $\pm$ S.D.*, significantly different from control, $p < 0.05$ **, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 5-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Hematological findings in males at the end of the recovery period

Dose	RBC	Hemoglobin	Hematocrit	MCV	MCH	MCHC	Platelet	Reticulocyte	PT	APTT
(mg/kg)	($\times 10^4 / \mu\text{L}$)	(g/dL)	(%)	(fL)	(pg)	(g/dL)	($\times 10^4 / \mu\text{L}$)	(%)	(sec)	(sec)
0	(5) 793 ± 43	(5) 14.8 ± 0.4	(5) 44.1 ± 1.4	(5) 55.6 ± 2.5	(5) 18.7 ± 0.8	(5) 33.6 ± 0.1	(5) 99.4 ± 4.5	(5) 3.1 ± 0.6	(5) 17.4 ± 4.7	(5) 21.1 ± 1.5
500	(5) 751 ± 21	(5) 15.0 ± 0.3	(5) 45.0 ± 1.2	(5) 59.9 * ± 1.6	(5) 20.0 * ± 0.6	(5) 33.4 * ± 0.1	(5) 95.2 ± 10.3	(5) 2.7 ± 0.4	(5) 19.0 ± 4.6	(5) 21.2 ± 1.1

Dose	WBC	Neutrophil	Eosinophil	Basophil	Monocyte	Lymphocyte
(mg/kg)	($\times 100 / \mu\text{L}$)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0	(5) 101.1 ± 36.9	(5) 12 ± 6	(5) 1 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 4 ± 1	(5) 83 ± 8
500	(5) 76.9 ± 10.7	(5) 8 ± 2	(5) 1 ± 0	(5) 0 ± 0	(5) 4 ± 2	(5) 87 ± 3

(), number of animals

Parameter, mean $\pm$ S.D.*, significantly different from control, $p < 0.05$

Table 5-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Hematological findings in females at the end of the recovery period

Dose	RBC	Hemoglobin	Hematocrit	MCV	MCH	MCHC	Platelet	Reticulocyte	PT	APTT
(mg/kg)	($\times 10^4 / \mu\text{L}$)	(g/dL)	(%)	(fL)	(pg)	(g/dL)	($\times 10^4 / \mu\text{L}$)	(%)	(sec)	(sec)
0	(5) 744 ± 28	(5) 14.3 ± 0.8	(5) 42.7 ± 2.4	(5) 57.2 ± 1.3	(5) 19.2 ± 0.3	(5) 33.6 ± 0.4	(5) 102.3 ± 11.7	(5) 3.7 ± 1.6	(5) 12.3 ± 0.7	(5) 15.5 ± 1.8
500	(5) 742 ± 32	(5) 15.3 ± 0.6	(5) 45.6 ± 1.8	(5) 61.5 ** ± 1.2	(5) 20.6 ** ± 0.5	(5) 33.5 ± 0.4	(5) 99.0 ± 4.3	(5) 2.1 ± 0.6	(5) 12.6 ± 0.6	(5) 16.9 ± 1.9

Dose	WBC	Neutrophil	Eosinophil	Basophil	Monocyte	Lymphocyte
(mg/kg)	($\times 100 / \mu\text{L}$)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0	(5) 48.9 ± 5.5	(5) 8 ± 2	(5) 2 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 4 ± 2	(5) 86 ± 4
500	(5) 56.5 * ± 4.0	(5) 8 ± 2	(5) 1 ± 0	(5) 0 ± 0	(5) 4 ± 1	(5) 87 ± 3

(), number of animals

Parameter, mean $\pm$ S.D.*, significantly different from control, $p < 0.05$ **, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 6-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Myelogram in males at the end of the dosing period

Dose (mg/kg)	Myeloblast (%)	Promyelocyte (%)	Neutrophilic myelocyte (%)	Neutrophilic metamyelocyte (%)	Neutrophil (%)	Eosinophilic myelocyte (%)	Eosinophilic metamyelocyte (%)	Eosinophil (%)	Basophil, all types (%)	Total granulocyte (%)
0	(5) 2.2 ±0.9	(5) 2.6 ±0.9	(5) 5.4 ±1.0	(5) 8.4 ±1.9	(5) 25.8 ±1.8	(5) 1.0 ±0.5	(5) 2.4 ±1.1	(5) 1.6 ±0.5	(5) 0.8 ±0.7	(5) 50.3 ±1.5
30	(5) 2.3 ±0.4	(5) 2.8 ±0.4	(5) 6.0 ±0.5	(5) 9.8 ±1.3	(5) 21.7 ** ±2.1	(5) 1.0 ±0.4	(5) 2.3 ±0.7	(5) 0.7 * ±0.3	(5) 0.8 ±0.4	(5) 47.5 ±3.4
125	(5) 2.2 ±0.5	(5) 2.6 ±0.7	(5) 7.2 ±2.4	(5) 8.0 ±2.8	(5) 19.3 ** ±1.7	(5) 1.2 ±0.5	(5) 1.8 ±0.4	(5) 0.8 * ±0.7	(5) 0.5 ±0.2	(5) 43.5 ** ±2.9
500	(5) 1.9 ±1.3	(5) 1.4 * ±0.4	(5) 5.0 ±1.0	(5) 7.5 ±1.1	(5) 16.3 ** ±1.7	(5) 0.9 ±0.6	(5) 1.3 ±0.5	(5) 0.5 ** ±0.3	(5) 0.6 ±0.4	(5) 35.4 ** ±3.2

Dose (mg/kg)	Pro- erythroblast (%)	Basophilic erythroblast (%)	Polychromatic erythroblast (%)	Normoblast (%)	Total erythroblast (%)	Myeroid / Erythroid (%)	Lymphocyte (%)	Histiocyte (%)	Plasma cell (%)	Mega- karyocyte (%)	Mast cell (%)
0	(5) 0.2 ±0.2	(5) 2.8 ±1.1	(5) 11.9 ±2.4	(5) 14.1 ±4.1	(5) 29.0 ±2.5	(5) 1.8 ±0.2	(5) 17.2 ±2.6	(5) 3.1 ±1.1	(5) 0.2 ±0.3	(5) 0.2 ±0.3	(5) 0.0 ±0.1
30	(5) 0.0 ±0.1	(5) 3.7 ±1.1	(5) 15.8 * ±1.0	(5) 13.4 ±2.3	(5) 32.9 ±2.5	(5) 1.4 * ±0.2	(5) 17.0 ±2.9	(5) 2.3 ±1.1	(5) 0.1 ±0.2	(5) 0.1 ±0.1	(5) 0.0 ±0.1
125	(5) 0.4 ±0.4	(5) 3.4 ±1.1	(5) 17.1 ** ±2.8	(5) 14.4 ±4.5	(5) 35.2 * ±5.8	(5) 1.3 ** ±0.3	(5) 17.9 ±4.7	(5) 3.1 ±0.4	(5) 0.2 ±0.3	(5) 0.1 ±0.1	(5) 0.0 ±0.0
500	(5) 0.4 ±0.1	(5) 6.3 ±4.1	(5) 25.2 ** ±2.4	(5) 17.5 ±3.1	(5) 49.4 ** ±3.0	(5) 0.7 ** ±0.1	(5) 11.5 * ±2.6	(5) 3.3 ±0.5	(5) 0.2 ±0.1	(5) 0.3 ±0.3	(5) 0.0 ±0.0

(), number of animals

Parameter, mean ±S.D.

*, significantly different from control, p<0.05

**, significantly different from control, p<0.01

Table 6-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Myelogram in females at the end of the dosing period

Dose (mg/kg)	Myeloblast (%)	Promyelocyte (%)	Neutrophilic myelocyte (%)	Neutrophilic metamyelocyte (%)	Neutrophil (%)	Eosinophilic myelocyte (%)	Eosinophilic metamyelocyte (%)	Eosinophil (%)	Basophil, all types (%)	Total granulocyte (%)
0	(5) 3.8 ±0.9	(5) 2.2 ±1.1	(5) 5.8 ±0.9	(5) 7.6 ±1.0	(5) 19.9 ±5.6	(5) 1.7 ±0.6	(5) 2.2 ±0.5	(5) 1.0 ±0.5	(5) 0.8 ±0.4	(5) 45.0 ±6.8
30	(5) 1.3 ** ±0.8	(5) 2.8 ±0.9	(5) 7.1 ±1.5	(5) 8.4 ±1.2	(5) 18.4 ±2.0	(5) 1.6 ±0.2	(5) 2.8 ±0.8	(5) 1.1 ±0.4	(5) 0.5 ±0.2	(5) 44.0 ±3.9
125	(5) 1.4 ** ±0.3	(5) 2.7 ±0.6	(5) 5.2 ±2.2	(5) 8.9 ±0.6	(5) 18.3 ±4.1	(5) 1.0 * ±0.3	(5) 3.2 ±1.3	(5) 0.8 ±0.4	(5) 0.4 ±0.2	(5) 41.9 ±5.2
500	(5) 1.5 ** ±1.3	(5) 1.4 ±0.8	(5) 5.7 ±2.2	(5) 6.0 ±1.4	(5) 15.7 ±2.8	(5) 0.6 ** ±0.3	(5) 2.1 ±0.6	(5) 0.8 ±0.3	(5) 0.5 ±0.4	(5) 34.4 * ±5.6

Dose (mg/kg)	Pro- erythroblast (%)	Basophilic erythroblast (%)	Polychromatic erythroblast (%)	Normoblast (%)	Total erythroblast (%)	Myeloid / Erythroid	Lymphocyte (%)	Histiocyte (%)	Plasma cell (%)	Mega- karyocyte (%)	Mast cell (%)
0	(5) 0.4 ±0.4	(5) 3.6 ±1.6	(5) 13.2 ±3.8	(5) 11.4 ±3.2	(5) 28.6 ±5.0	(5) 1.6 ±0.5	(5) 22.2 ±5.3	(5) 3.7 ±1.6	(5) 0.3 ±0.2	(5) 0.2 ±0.1	(5) 0.0 ±0.1
30	(5) 0.8 ±0.5	(5) 4.8 ±1.7	(5) 15.2 ±2.7	(5) 13.3 ±3.3	(5) 34.1 ±4.4	(5) 1.3 ±0.2	(5) 18.4 ±4.1	(5) 2.7 ±0.8	(5) 0.3 ±0.3	(5) 0.4 ±0.2	(5) 0.0 ±0.0
125	(5) 0.5 ±0.6	(5) 2.0 ±0.9	(5) 16.8 ±5.3	(5) 16.5 * ±1.8	(5) 35.9 ±7.6	(5) 1.2 ±0.3	(5) 19.0 ±5.0	(5) 2.6 ±1.0	(5) 0.1 ±0.2	(5) 0.5 ±0.5	(5) 0.0 ±0.1
500	(5) 0.3 ±0.3	(5) 6.4 * ±2.2	(5) 21.9 ** ±2.4	(5) 19.6 ** ±2.7	(5) 48.2 ** ±5.1	(5) 0.7 ** ±0.2	(5) 14.3 ±3.3	(5) 2.3 ±0.9	(5) 0.3 ±0.2	(5) 0.4 ±0.4	(5) 0.0 ±0.1

(), number of animals

Parameter, mean ±S.D.

*, significantly different from control, p<0.05

**, significantly different from control, p<0.01

Table 6-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Myelogram in males at the end of the recovery period

Dose (mg/kg)	Myeloblast (%)	Promyelocyte (%)	Neutrophilic myelocyte (%)	Neutrophilic metamyelocyte (%)	Neutrophil (%)	Eosinophilic myelocyte (%)	Eosinophilic metamyelocyte (%)	Eosinophil (%)	Basophil, all types (%)	Total granulocyte (%)
0	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	2.5	3.1	8.2	8.1	22.9	0.6	1.7	0.9	0.6	48.7
	±0.9	±0.8	±1.9	±1.2	±4.9	±0.4	±0.7	±0.6	±0.5	±6.4
500	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	2.3	3.1	6.5	10.0	22.7	0.9	1.5	0.6	0.4	48.1
	±1.0	±1.4	±1.8	±1.6	±5.4	±0.3	±0.8	±0.2	±0.4	±7.5

Dose (mg/kg)	Pro- erythroblast (%)	Basophilic erythroblast (%)	Polychromatic erythroblast (%)	Normoblast (%)	Total erythroblast (%)	Myeloid / Erythroid	Lymphocyte (%)	Histiocyte (%)	Plasma cell (%)	Mega- karyocyte (%)	Mast cell (%)
0	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	0.6	4.5	11.8	13.0	29.9	1.7	18.3	2.5	0.4	0.2	0.0
	±0.4	±1.3	±2.2	±2.2	±4.6	±0.4	±3.5	±1.2	±0.4	±0.1	±0.0
500	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	0.5	4.8	12.7	11.6	29.5	1.8	18.2	3.5	0.5	0.1	0.0
	±0.3	±2.8	±3.0	±3.0	±8.3	±0.8	±4.8	±0.3	±0.2	±0.2	±0.1

(), number of animals
Parameter, mean ±S.D.

Table 6-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Myelogram in females at the end of the recovery period

Dose (mg/kg)	Myeloblast (%)	Promyelocyte (%)	Neutrophilic myelocyte (%)	Neutrophilic metamyelocyte (%)	Neutrophil (%)	Eosinophilic myelocyte (%)	Eosinophilic metamyelocyte (%)	Eosinophil (%)	Basophil, all types (%)	Total granulocyte (%)
0	(5) 1.7 ±0.9	(5) 3.5 ±0.7	(5) 6.1 ±1.2	(5) 9.2 ±2.5	(5) 20.3 ±4.8	(5) 1.5 ±0.5	(5) 2.4 ±0.8	(5) 1.5 ±0.4	(5) 0.9 ±0.3	(5) 46.9 ±4.5
500	(5) 2.6 ±0.8	(5) 2.5 * ±0.3	(5) 8.0 * ±1.2	(5) 7.8 ±1.7	(5) 23.6 ±1.6	(5) 1.4 ±0.4	(5) 3.0 ±0.6	(5) 1.4 ±0.6	(5) 1.2 ±1.0	(5) 51.5 ±3.4

Dose (mg/kg)	Pro- erythroblast (%)	Basophilic erythroblast (%)	Polychromatic erythroblast (%)	Normoblast (%)	Total erythroblast (%)	Myeroid / Erythroid (%)	Lymphocyte (%)	Histiocyte (%)	Plasma cell (%)	Mega- karyocyte (%)	Mast cell (%)
0	(5) 0.4 ±0.4	(5) 3.3 ±1.7	(5) 13.4 ±1.4	(5) 13.3 ±3.1	(5) 30.4 ±4.2	(5) 1.6 ±0.2	(5) 19.2 ±6.4	(5) 3.0 ±1.4	(5) 0.4 ±0.2	(5) 0.2 ±0.2	(5) 0.0 ±0.0
500	(5) 0.2 ±0.1	(5) 2.8 ±1.0	(5) 10.5 ±3.3	(5) 10.8 ±2.3	(5) 24.3 * ±3.9	(5) 2.2 * ±0.4	(5) 20.8 ±4.5	(5) 2.6 ±0.7	(5) 0.5 ±0.5	(5) 0.3 ±0.3	(5) 0.0 ±0.0

(), number of animals

Parameter, mean ± S.D.

*, significantly different from control, p<0.05

Table 7-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Biochemical findings in males at the end of the dosing period

Dose (mg/kg)	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Tri- glyceride (mg/dL)	Total bilirubin (mg/dL)
0	(5) 5.3 ±0.3	(5) 3.0 ±0.1	(5) 1.32 ±0.14	(5) 13 ±3	(5) 0.6 ±0.0	(5) 135 ±9	(5) 39 ±8	(5) 45 ±12	(5) 0.08 ±0.01
30	(5) 5.2 ±0.2	(5) 2.9 ±0.1	(5) 1.29 ±0.18	(5) 9 ±2	(5) 0.6 ±0.0	(5) 127 ±12	(5) 37 ±2	(5) 41 ±16	(5) 0.07 ±0.02
125	(5) 5.2 ±0.2	(5) 3.0 ±0.1	(5) 1.30 ±0.08	(5) 10 ±3	(5) 0.6 ±0.1	(5) 130 ±14	(5) 37 ±4	(5) 39 ±16	(5) 0.07 ±0.02
500	(5) 4.9 ±0.2	(5) 2.9 ±0.1	(5) 1.40 ±0.06	(5) 11 ±2	(5) 0.6 ±0.0	(5) 117 ±8	(5) 38 ±10	(5) 43 ±13	(5) 0.09 ±0.02

Dose (mg/kg)	Inorg. phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ-GTP (U/L)
0	(5) 7.4 ±0.2	(5) 9.0 ±0.2	(5) 145.0 ±0.8	(5) 3.87 ±0.04	(5) 107.5 ±2.1	(5) 403 ±108	(5) 31 ±2	(5) 71 ±2	(5) 0 ±1
30	(5) 7.7 ±0.8	(5) 9.3 ±0.1	(5) 145.3 ±1.2	(5) 4.08 ±0.22	(5) 107.8 ±1.3	(5) 399 ±95	(5) 30 ±3	(5) 69 ±9	(5) 1 ±1
125	(5) 7.8 ±0.4	(5) 9.3 ±0.3	(5) 144.7 ±0.6	(5) 3.92 ±0.05	(5) 106.6 ±1.7	(5) 434 ±43	(5) 38 ±8	(5) 83 ±14	(5) 0 ±0
500	(5) 8.4 * ±0.4	(5) 8.9 ±0.2	(5) 145.1 ±1.5	(5) 4.37 ** ±0.40	(5) 107.2 ±1.3	(5) 342 ±81	(5) 33 ±13	(5) 77 ±22	(5) 1 ±1

(), number of animals

Parameter, mean ± S.D.

*, significantly different from control, p<0.05

**, significantly different from control, p<0.01

Table 7-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Biochemical findings in females at the end of the dosing period

Dose (mg/kg)	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Tri- glyceride (mg/dL)	Total bilirubin (mg/dL)
0	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	5.0	2.9	1.41	18	0.5	127	47	18	0.05
	±0.2	±0.1	±0.12	±3	±0.1	±10	±11	±4	±0.01
30	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	5.3	3.1	1.40	19	0.6	122	41	22	0.05
	±0.2	±0.2	±0.14	±3	±0.0	±6	±11	±6	±0.01
125	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	5.2	3.1	1.48	19	0.6	121	42	19	0.05
	±0.4	±0.2	±0.21	±3	±0.0	±15	±4	±6	±0.01
500	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	4.8	3.0	1.72 *	16	0.6 *	118	38	21	0.06
	±0.2	±0.3	±0.25	±2	±0.1	±12	±9	±6	±0.02

Dose (mg/kg)	Inorg. phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ-GTP (U/L)
0	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	6.9	8.9	144.5	3.78	108.3	272	25	67	1
	±0.7	±0.3	±1.6	±0.19	±1.0	±79	±4	±4	±1
30	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	7.1	9.2	143.7	4.00	108.5	268	31	72	0
	±0.7	±0.4	±0.6	±0.21	±1.3	±64	±25	±26	±1
125	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	7.5	9.3	144.2	3.97	108.6	241	30	77	1
	±0.7	±0.4	±1.2	±0.16	±1.7	±32	±14	±21	±0
500	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	7.8	9.1	144.3	3.77	106.9	292	25	64	1
	±0.8	±0.2	±1.0	±0.14	±1.1	±69	±4	±5	±0

(), number of animals

Parameter, mean ±S.D.

*, significantly different from control, p<0.05

Table 7-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Biochemical findings in males at the end of the recovery period

Dose (mg/kg)	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Tri- glyceride (mg/dL)	Total bilirubin (mg/dL)
0	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	5.0	3.0	1.58	16	0.6	131	35	37	0.09
	±0.2	±0.1	±0.26	±1	±0.0	±11	±6	±7	±0.01
500	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	4.8	2.9	1.55	18	0.6	136	36	41	0.07
	±0.1	±0.1	±0.14	±2	±0.0	±14	±10	±15	±0.01

Dose (mg/kg)	Inorg. phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ-GTP (U/L)
0	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	6.8	8.5	145.5	3.97	107.3	344	30	71	0
	±0.6	±0.2	±1.2	±0.12	±1.5	±98	±1	±13	±0
500	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	7.1	8.6	145.7	3.83	107.4	273	31	69	0
	±0.4	±0.2	±0.7	±0.10	±0.7	±54	±4	±5	±0

(), number of animals

Parameter, mean ± S.D.

Table 7-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Biochemical findings in females at the end of the recovery period

Dose (mg/kg)	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Tri- glyceride (mg/dL)	Total bilirubin (mg/dL)
0	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	4.8	3.0	1.72	21	0.7	133	40	24	0.08
	±0.3	±0.2	±0.16	±3	±0.1	±15	±7	±3	±0.01
500	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	5.2	3.3	1.70	19	0.7	134	54 *	31	0.08
	±0.4	±0.3	±0.10	±3	±0.1	±15	±9	±12	±0.02

Dose (mg/kg)	Inorg. phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ-GTP (U/L)
0	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	6.8	8.6	144.4	4.00	108.9	184	25	66	0
	±0.8	±0.2	±0.8	±0.25	±0.9	±50	±2	±6	±1
500	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	6.1	8.8	144.6	3.71	108.2	199	26	64	0
	±0.2	±0.2	±0.3	±0.23	±1.0	±39	±7	±15	±1

(), number of animals

Parameter, mean ± S.D.

*, significantly different from control, p<0.05

Table 8-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Absolute organ weights in males at the end of the dosing period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg)	Thymus (mg)	Lung (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)
0	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	334.8	1863.9	458.4	1124.5	10334.1	2560.4	666.7
	±29.5	±96.3	±87.2	±108.4	±1466.1	±443.1	±93.1
30	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	332.8	1876.5	565.7	1130.6	10583.1	2594.2	665.5
	±18.3	±59.4	±54.4	±42.9	±1164.7	±218.2	±97.8
125	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	341.5	1866.3	508.7	1128.4	11189.5	2696.3	798.3
	±19.5	±58.5	±88.2	±36.5	±607.6	±176.5	±119.8
500	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	332.5	1892.0	484.8	1185.8	11535.0	2997.5	1345.8 **
	±30.5	±38.0	±74.3	±89.6	±434.3	±277.6	±308.7

Dose (mg/kg)	Thyroid gland (mg)	Adrenal glands (mg)	Testes (mg)
0	(5)	(5)	(5)
	17.6	52.5	2858.5
	±3.9	±5.7	±158.4
30	(5)	(5)	(5)
	18.0	49.6	3073.3
	±2.4	±6.3	±333.5
125	(5)	(5)	(5)
	18.7	52.2	2859.4
	±3.1	±8.2	±211.3
500	(5)	(5)	(5)
	16.2	51.8	2963.8
	±2.2	±8.0	±269.0

(), number of animals

Parameter, mean ±S.D.

**, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 8-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Absolute organ weights in females at the end of the dosing period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg)	Thymus (mg)	Lung (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)
	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
0	201.9 ±16.4	1743.3 ±86.7	561.0 ±162.5	883.7 ±95.6	5920.5 ±685.7	1656.8 ±146.5	499.2 ±64.4
	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
30	216.8 ±14.1	1730.2 ±83.0	479.4 ±129.2	938.3 ±72.7	6719.5 ±625.0	1801.6 ±55.1	484.4 ±63.5
	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
125	190.1 ±28.9	1758.2 ±48.1	412.0 ±122.1	880.9 ±105.2	5855.5 ±738.7	1571.7 ±185.6	591.5 ±162.6
	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
500	205.2 ±16.0	1767.2 ±37.7	479.8 ±100.4	955.7 ±83.0	6698.3 ±517.5	1735.0 ±120.4	861.7 ** ±91.3

Dose (mg/kg)	Thyroid gland (mg)	Adrenal glands (mg)	Ovaries (mg)
	(5)	(5)	(5)
0	15.2 ±2.2	55.0 ±4.9	80.5 ±14.4
	(5)	(5)	(5)
30	15.6 ±1.8	64.3 ±5.3	90.2 ±16.1
	(5)	(5)	(5)
125	17.9 ±3.1	56.5 ±6.4	70.5 ±16.1
	(5)	(5)	(5)
500	18.4 ±3.6	62.3 ±5.7	80.7 ±8.7

(), number of animals

Parameter, mean ±S.D.

**, significantly different from control, p<0.01

Table 8-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Absolute organ weights in males at the end of the recovery period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg)	Thymus (mg)	Lung (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)
0	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	403.4	1986.1	471.5	1232.5	11786.0	2854.7	807.5
	±40.3	±69.5	±50.1	±108.7	±1074.6	±267.6	±112.8
500	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	415.8	1943.6	490.1	1317.0	12602.1	3122.2	935.9
	±26.4	±72.9	±90.3	±108.3	±1862.4	±137.0	±172.4

Dose (mg/kg)	Thyroid gland (mg)	Adrenal glands (mg)	Testes (mg)
0	(5)	(5)	(5)
	23.0	60.5	3036.2
	±2.3	±11.5	±203.1
500	(5)	(5)	(5)
	17.4 *	62.9	3116.5
	±3.3	±11.7	±157.0

(), number of animals

Parameter, mean ± S.D.

*, significantly different from control, $p < 0.05$

Table 8-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Absolute organ weights in females at the end of the recovery period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg)	Thymus (mg)	Lung (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)
0	(5) 225.1 ±27.9	(5) 1803.2 ±31.2	(5) 384.5 ±36.2	(5) 927.9 ±61.7	(5) 6376.4 ±743.4	(5) 1884.2 ±208.1	(5) 506.6 ±60.1
500	(5) 257.9 * ±12.1	(5) 1831.2 ±77.4	(5) 454.2 ±74.1	(5) 990.9 ±40.8	(5) 7873.3 * ±697.3	(5) 2003.8 ±121.1	(5) 632.3 * ±88.6

Dose (mg/kg)	Thyroid gland (mg)	Adrenal glands (mg)	Ovaries (mg)
0	(5) 18.1 ±3.3	(5) 68.9 ±6.2	(5) 87.2 ±11.9
500	(5) 18.3 ±2.7	(5) 75.6 ±13.9	(5) 91.7 ±5.7

(), number of animals

Parameter, mean ± S.D.

*, significantly different from control, $p < 0.05$

Table 9-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Relative organ weights in males at the end of the dosing period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg/g)	Thymus (mg/g)	Lung (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Spleen (mg/g)
0	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	334.8	5.586	1.371	3.370	30.771	7.623	1.991
	±29.5	±0.342	±0.254	±0.339	±2.153	±0.946	±0.217
30	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	332.8	5.651	1.700	3.402	31.731	7.797	1.995
	±18.3	±0.364	±0.133	±0.173	±1.962	±0.548	±0.212
125	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	341.5	5.479	1.500	3.310	32.820	7.899	2.344
	±19.5	±0.358	±0.310	±0.159	±2.060	±0.398	±0.383
500	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	332.5	5.721	1.478	3.572	34.827 *	9.034 *	4.078 **
	±30.5	±0.447	±0.316	±0.155	±2.059	±0.735	±1.048

Dose (mg/kg)	Thyroid gland (mg)	Adrenal glands (mg/g)	Testes (mg/g)
0	(5)	(5)	(5)
	0.053	0.156	8.598
	±0.012	±0.009	±0.939
30	(5)	(5)	(5)
	0.054	0.149	9.239
	±0.005	±0.018	±0.938
125	(5)	(5)	(5)
	0.055	0.153	8.388
	±0.009	±0.022	±0.695
500	(5)	(5)	(5)
	0.049	0.156	8.919
	±0.008	±0.022	±0.412

(), number of animals

Parameter, mean ± S.D.

*, significantly different from control, $p < 0.05$ **, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 9-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Relative organ weights in females at the end of the dosing period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg/g)	Thymus (mg/g)	Lung (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Spleen (mg/g)
0	(5) 201.9 ±16.4	(5) 8.659 ±0.439	(5) 2.754 ±0.667	(5) 4.389 ±0.480	(5) 29.265 ±1.226	(5) 8.205 ±0.219	(5) 2.470 ±0.221
30	(5) 216.8 ±14.1	(5) 7.995 ±0.400	(5) 2.206 ±0.570	(5) 4.329 ±0.197	(5) 30.972 ±1.634	(5) 8.327 ±0.323	(5) 2.234 ±0.259
125	(5) 190.1 ±28.9	(5) 9.406 ±1.299	(5) 2.167 ±0.572	(5) 4.661 ±0.336	(5) 30.962 ±2.306	(5) 8.308 ±0.387	(5) 3.070 * ±0.455
500	(5) 205.2 ±16.0	(5) 8.655 ±0.704	(5) 2.344 ±0.477	(5) 4.661 ±0.253	(5) 32.646 * ±0.342	(5) 8.466 ±0.356	(5) 4.193 ** ±0.190

Dose (mg/kg)	Thyroid gland (mg)	Adrenal glands (mg/g)	Ovaries (mg/g)
0	(5) 0.076 ±0.012	(5) 0.273 ±0.009	(5) 0.398 ±0.058
30	(5) 0.072 ±0.011	(5) 0.297 ±0.026	(5) 0.416 ±0.068
125	(5) 0.095 ±0.017	(5) 0.300 ±0.038	(5) 0.371 ±0.054
500	(5) 0.089 ±0.013	(5) 0.305 ±0.029	(5) 0.393 ±0.033

(), number of animals

Parameter, mean ± S.D.

*, significantly different from control, $p < 0.05$ **, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 9-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Relative organ weights in males at the end of the recovery period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg/g)	Thymus (mg/g)	Lung (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Spleen (mg/g)
0	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	403.4	4.952	1.171	3.059	29.236	7.092	2.006
	±40.3	±0.378	±0.098	±0.113	±0.479	±0.437	±0.235
500	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	415.8	4.682	1.175	3.168	30.225	7.533	2.240
	±26.4	±0.181	±0.181	±0.178	±3.139	±0.585	±0.316

Dose (mg/kg)	Thyroid gland (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Testes (mg/g)
0	(5)	(5)	(5)
	0.057	0.149	7.547
	±0.007	±0.018	±0.295
500	(5)	(5)	(5)
	0.042 *	0.151	7.501
	±0.009	±0.027	±0.226

(), number of animals

Parameter, mean ±S.D.

*, significantly different from control, $p < 0.05$

Table 9-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Relative organ weights in females at the end of the recovery period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg/g)	Thymus (mg/g)	Lung (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Spleen (mg/g)
0	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	225.1	8.131	1.737	4.151	28.360	8.387	2.253
	± 27.9	± 1.229	± 0.322	± 0.313	± 0.732	± 0.300	± 0.097
500	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	257.9 *	7.106	1.768	3.845	30.505 *	7.776 *	2.451
	± 12.1	± 0.236	± 0.331	± 0.132	± 1.646	± 0.457	± 0.306

Dose (mg/kg)	Thyroid gland (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Ovaries (mg/g)
0	(5)	(5)	(5)
	0.081	0.308	0.388
	± 0.016	± 0.030	± 0.034
500	(5)	(5)	(5)
	0.071	0.292	0.356
	± 0.009	± 0.040	± 0.030

(), number of animals

Parameter, mean $\pm$ S.D.*, significantly different from control, $p < 0.05$

Table 10-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Macroscopical findings in males at the end of the dosing period

Group Grade	0 mg/kg		30 mg/kg		125 mg/kg		500 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Spleen)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Enlargement	5	0	5	0	5	0	0	5
Dark	5	0	5	0	5	0	4	1
(Kidney)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Enlargement	5	0	5	0	5	0	2	3
(Liver)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Enlargement	5	0	5	0	5	0	3	2

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 10-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Macroscopical findings in females at the end of the dosing period

Group Grade	0 mg/kg		30 mg/kg		125 mg/kg		500 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Spleen)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Enlargement	5	0	5	0	5	0	2	3
Dark	5	0	5	0	5	0	2	3
(Liver)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Yellowish	5	0	5	0	5	0	2	3

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 10-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Macroscopical findings in males at the end of the recovery period

Group Grade		0 mg/kg			500 mg/kg	
		-	+		-	+
(Spleen)	[5]			[5]		
Enlargement		5	0		3	2
(Kidney)	[5]			[5]		
Enlargement		5	0		4	1
(Liver)	[5]			[5]		
Enlargement		5	0		4	1

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 10-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Macroscopical findings in females at the end of the recovery period

Group Grade	0 mg/kg		500 mg/kg	
	-	+	-	+
(Esophagus)	[5]		[5]	
Attachment, yellow clot, on the area of Hilus pulmonis	5	0	4	1

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 11-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Histological findings in males at the end of the dosing period

Group Grade	0 mg/kg						30 mg/kg						125 mg/kg						500 mg/kg					
	-	+/-	+	++	+++	Pos.	-	+/-	+	++	+++	Pos.	-	+/-	+	++	+++	Pos.	-	+/-	+	++	+++	Pos.
(Spleen)	[5]						[5]						[5]						[5]					
Hematopoiesis, extramedullary	0	3	2	0	0	5	0	3	2	0	0	5	0	0	2	3	0 *	5	0	0	0	5	0 **	5
Deposit, pigment, brown	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	1	4	0	0	0	4 #	0	3	2	0	0 **	5 ##
[Berlin Blue Stain:																								
Positive granules]	2	3	0	0	0	3	3	2	0	0	0	2	0	0	4	1	0 **	5	0	0	1	4	0 **	5
(Bone marrow of Femur)	[5]						[5]						[5]						[5]					
Hematopoiesis, increased, erythrocyte	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	2	0	0	1	4	0 **	5 ##
(Liver)	[5]						[5]						[5]						[5]					
Fatty change, periportal	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5
Microgranuloma	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	4	1	0	0	0	1	3	2	0	0	0	2
Hematopoiesis, extramedullary	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	3
(Kidney)	[5]						[0]						[0]						[5]					
Eosinophilic body	4	0	1	0	0	1													4	1	0	0	0	1
Basophilic tubule, cortex	3	2	0	0	0	2													2	3	0	0	0	3
Mineralization, medulla/papilla	4	1	0	0	0	1													4	1	0	0	0	1
(Brain)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Heart)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Stomach)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Thyroid gland)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Adrenal gland)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Testis)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Urinary bladder)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								

-, Negative; +/-, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade

[], Number of animals examined

**, significantly different from control $p < 0.01$ (Two-tailed Mann-Whitney U test)*, significantly different from control $p < 0.05$ (Two-tailed Mann-Whitney U test)##, significantly different from control $p < 0.01$ (One-tailed Fisher exact test)#, significantly different from control $p < 0.05$ (One-tailed Fisher exact test)

Table 11-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Histological findings in females at the end of the dosing period

Group	0 mg/kg						30 mg/kg						125 mg/kg						500 mg/kg									
Grade	-	+/-	+	++	+++	Pos.	-	+/-	+	++	+++	Pos.	-	+/-	+	++	+++	Pos.	-	+/-	+	++	+++	Pos.				
(Spleen)	[5]						[5]						[5]						[5]									
Hematopoiesis, extramedullary	0	5	0	0	0	5	0	4	0	1	0	5	0	1	3	1	0	5	0	0	1	4	0	**	5			
Deposit, pigment, brown	3	2	0	0	0	2	3	2	0	0	0	2	0	0	5	0	0	**	5	0	0	5	0	0	**	5		
[Berlin Blue Stain: Positive granules]	0	4	1	0	0	5	0	4	1	0	0	5	0	0	0	5	0	**	5	0	0	0	5	0	**	5		
(Bone marrow of Femur)	[5]						[5]						[5]						[5]									
Hematopoiesis, increased, erythrocyte	4	1	0	0	0	1	4	0	1	0	0	1	0	3	2	0	0	*	5	#	0	1	2	2	0	*	5	#
(Liver)	[5]						[5]						[5]						[5]									
Fatty change, periportal	0	4	1	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	3	2	0	0	5	0	2	3	0	0	0	5			
Microgranuloma	3	2	0	0	0	2	4	1	0	0	0	1	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	0			
Hematopoiesis, extramedullary	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	2			
(Kidney)	[5]						[0]						[0]						[5]									
Basophilic tubule, cortex	3	2	0	0	0	2													3	2	0	0	0	0	2			
Mineralization, medulla	4	1	0	0	0	1													4	1	0	0	0	0	1			
(Ovary)	[5]						[0]						[0]						[5]									
Increase, atresia, follicle	4	1	0	0	0	1													5	0	0	0	0	0	0			
(Brain)	[5]						[0]						[0]						[5]									
No remarkable change	[5]						[0]						[0]						[5]									
(Heart)	[5]						[0]						[0]						[5]									
No remarkable change	[5]						[0]						[0]						[5]									
(Stomach)	[5]						[0]						[0]						[5]									
No remarkable change	[5]						[0]						[0]						[5]									
(Thyroid gland)	[5]						[0]						[0]						[5]									
No remarkable change	[5]						[0]						[0]						[5]									
(Adrenal gland)	[5]						[0]						[0]						[5]									
No remarkable change	[5]						[0]						[0]						[5]									
(Urinary bladder)	[5]						[0]						[0]						[5]									
No remarkable change	[5]						[0]						[0]						[5]									

-, Negative; +/-, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade

[], Number of animals examined

**, significantly different from control $p < 0.01$ (Two-tailed Mann-Whitney U test)*, significantly different from control $p < 0.05$ (Two-tailed Mann-Whitney U test)#, significantly different from control $p < 0.05$ (One-tailed Fisher exact test)

Table 11-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Histological findings in males at the end of the recovery period

Group Grade	0 mg/kg						500 mg/kg					
	-	+/-	+	++	+++	Pos.	-	+/-	+	++	+++	Pos.
(Spleen)	[5]						[5]					
Hematopoiesis, extramedullary	0	4	1	0	0	5	0	5	0	0	0	5
Deposit, pigment, brown	2	3	0	0	0	3	0	1	4	0	0	5 *
[Berlin Blue Stain: Positive granules]	0	1	4	0	0	5	0	0	4	1	0	5
(Bone marrow of Femur)	[5]						[5]					
Hematopoiesis, increased, erythrocyte	5	0	0	0	0	0	1	2	2	0	0	4 #
(Liver)	[5]						[5]					
Fatty change, periportal	0	2	3	0	0	5	0	3	2	0	0	5
Microgranuloma	2	3	0	0	0	3	3	2	0	0	0	2
(Kidney)	[0]						[1]					
No remarkable change												

-, Negative; +/-, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade

[], Number of animals examined

*, significantly different from control $p < 0.05$ (Two-tailed Mann-Whitney U test)#, significantly different from control $p < 0.05$ (One-tailed Fisher exact test)

Table 11-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of MEE in rats

Histological findings in females at the end of the recovery period

Group Grade	0 mg/kg						Pos.	500 mg/kg						Pos.
	-	+/-	+	++	+++			-	+/-	+	++	+++		
(Spleen)	[5]							[5]						
Hematopoiesis, extramedullary	0	5	0	0	0		5	0	5	0	0	0		5
Deposit, pigment, brown	0	4	1	0	0		5	0	0	2	3	0	*	5
[Berlin Blue Stain: Positive granules]	0	0	2	3	0		5	0	0	1	4	0		5
(Bone marrow of Femur)	[5]							[5]						
Hematopoiesis, increased, erythrocyte	4	1	0	0	0		1	1	2	2	0	0		4
(Liver)	[5]							[5]						
Fatty change, periportal	0	5	0	0	0		5	0	5	0	0	0		5
Microgranuloma	5	0	0	0	0		0	4	1	0	0	0		1
(Esophagus) a) b)	[0]							[1]						
Inflammation, foreign body, on serosa, around esophagus & diverticulum								0	0	0	1	0		1
Perforation, focal, diverticulum								0	0	1	0	0		1
Cellular infiltration neutrophil & food debris, in lumen, diverticulum								0	0	1	0	0		1

a) Inflammation of foreign body contained neutrophils, foreign body giant cell and food debris.

b) Diverticulum consisted of squamous cell layer inner wall and covered with fibrous connective tissue, but defected muscular layer.

-, Negative; +/-, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade

[], Number of animals examined

*, significantly different from control $p < 0.05$ (Two-tailed Mann-Whitney U test)