

B-6581

最 終 報 告 書

試験名：メチルスチリルケトンのラットを用いた
2週間回復性観察を含む28日間反復経口投与毒性試験

試験番号：B-6581

試験期間：2010年2月3日-2011年6月17日

試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど1284

試験委託者

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞が関1-2-2

株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065 東京都渋谷区大山町36-7

2. 目次

2.	目次	3
4.	要約	10
5.	緒言	11
6.	試験材料及び方法	12
6.1	被験物質及び媒体	12
6.1.1	被験物質	12
6.1.2	媒体	13
6.2	投与液の調製	13
6.2.1	媒体の調製	13
6.2.2	被験液の調製	13
6.2.3	投与液の保存方法	13
6.2.4	媒体中での安定性	13
6.2.5	被験液の濃度・均一性確認	13
6.3	試験動物種及び系統の選択理由	14
6.4	試験動物及び群分け	15
6.5	飼育条件	15
6.6	飼料及び飲料水中の混入物質	15
6.7	動物の識別及びケージへの表示	15
6.8	投与経路、投与期間、投与回数及び回復期間とそれらの選択理由	16
6.9	投与方法	16
6.10	投与量及びその設定根拠並びに群構成	16
6.11	観察及び検査の方法	17

6.11.1	一般状態の観察.....	17
6.11.2	詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量の測定.....	17
6.11.2.1	詳細な一般状態の観察.....	17
6.11.2.2	機能検査.....	17
6.11.2.3	握力測定.....	18
6.11.2.4	自発運動量の測定.....	18
6.11.3	体重測定.....	18
6.11.4	摂餌量測定.....	18
6.11.5	尿検査（摂水量含む）.....	19
6.11.6	血液学検査.....	20
6.11.7	血液化学検査.....	21
6.11.8	病理学検査.....	22
6.11.8.1	剖検.....	22
6.11.8.2	器官重量測定.....	22
6.11.8.3	病理組織学検査.....	22
6.12	統計解析.....	23
7.	試験結果.....	24
7.1	一般状態.....	24
7.2	詳細な一般状態、機能検査、握力及び自発運動量.....	24
7.2.1	詳細な一般状態.....	24
7.2.2	機能検査.....	24
7.2.3	握力.....	24
7.2.4	自発運動量.....	25
7.3	体重.....	25
7.4	摂餌量.....	25
7.5	尿検査（摂水量含む）.....	25
7.6	血液学検査.....	26
7.7	血液化学検査.....	26
7.8	器官重量.....	26
7.9	剖検所見.....	26
7.10	病理組織学検査.....	27
8.	考察.....	30
9.	文献.....	32

図

Fig. 1~4	自発運動量
Fig. 5	体重
Fig. 6	摂餌量

表

Table 1-1~1-3	一般状態
Table 2-1~2-18	詳細な一般状態
Table 2-19、2-20	機能検査
Table 2-21、2-22	握力
Table 2-23、2-24	自発運動量
Table 3-1、3-2	体重
Table 4-1、4-2	摂餌量
Table 5-1~5-8	尿検査（摂水量含む）
Table 6-1~6-6	血液学検査
Table 7-1~7-4	血液化学検査
Table 8-1~8-8	器官重量
Table 9-1、9-2	剖検所見
Table 10-1~10-5	病理組織学検査

4. 要約

メチルスチリルケトンの 28 日間反復経口投与毒性試験を 6 週齢の Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD(SD)、1 群雌雄各 6 又は 12 匹] を用いて実施した。投与量は 0 (0.5 w/v%メチルセルロース水溶液：対照群)、12、60 及び 300 mg/kg とし、対照群と 300 mg/kg の一部の個体 (1 群雌雄各 6 匹) については投与期間終了後 2 週間の休薬期間を設け、毒性変化の可逆性を検討した。

一般状態では被験物質投与による影響は認められなかった。

詳細な一般状態、機能検査、握力及び自発運動量では、投与 1 週のオープンフィールド内観察において 300 mg/kg 投与群の雌で立ち上がり回数の低値がみられた。また、手に持った観察において 300 mg/kg 投与群の雄で軽度の流涎が散見された。

体重及び摂餌量では、被験物質投与の影響は認められなかった。

尿検査 (摂水量を含む) では、被験物質投与の影響は認められなかった。

血液学検査では、被験物質投与の影響は認められなかった。

血液化学検査では、300 mg/kg 投与群の雌で総コレステロールの高値が認められた。

病理学検査では、肝臓において 300 mg/kg 投与群の雌雄で絶対及び相対重量の高値が、組織学的にも 300 mg/kg 投与群の雄で小葉中心性肝細胞肥大が認められた。また、胃において 300 mg/kg 投与群の雌雄で肉眼的に前胃の壁肥厚が、組織学的に前胃及び境界縁の扁平上皮過形成が認められた。

投与期間中あるいは投与期間終了時にみられた変化はいずれも休薬により回復性が認められた。

以上の結果、メチルスチリルケトンの本試験条件下における無影響量は、雌雄とも主な変化として肝臓と胃の病理学組織検査から 60 mg/kg/day と推定された。

B-6581

5. 結言

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、メチルスチリルケトンをラットに 28 日間反復経口投与し、その影響を明らかにするとともに、2 週間休薬し、障害の可逆性を調べたのでその成績を報告する。なお、本試験は株式会社ボゾリサーチセンター動物実験委員会の承認を受けている。

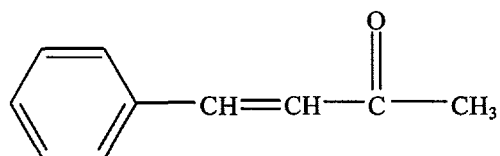
6. 試験材料及び方法

6.1 被験物質及び媒体

6.1.1 被験物質

本試験に使用した被験物質のロット番号、純度等は次の通りである。また、試験成績書を添付資料 1 に示した。

名称	:	メチルスチリルケトン
英名	:	4-phenylbutenone
別名	:	ベンザルアセトン
CAS 番号	:	122-57-6
官報公示整理番号	:	3-1232
分子式	:	C ₁₀ H ₁₀ O
分子量	:	146.19
構造式	:	



純度	:	99.8 %
沸点	:	262 °C
融点	:	40 °C
引火点	:	66 °C
溶解性	:	アルコール、エーテル、ベンゼン、クロロホルムに可溶、水に微溶
入手量	:	575 g (500 g ; 1 本、25 g ; 3 本)
性状	:	うすい黄色、結晶塊
保存方法	:	冷暗所（実測値：2~8 °C）、密栓、遮光
安定性	:	投与終了後、試験受託者で安定であったことが確認された（添付資料 2）。
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室及び第 1 研究棟被験物質調製室
取扱い上の注意	:	マスク、手袋及び保護眼鏡を着用した。 火気や熱源などの着火源から遠ざけ、酸化剤との接触を避けた。
使用後の処理	:	被験物質 1 g を保存試料として保存した。分析用に小分けした被験物質の残量は廃棄した。また、被験物質

の残量は安定性を確認後、すべて廃棄した。

6.1.2 媒体

名称 : 0.5 w/v%メチルセルロース水溶液

なお、本試験に先立って実施した被験液中のメチルスチリルケトンの安定性・均一性試験（試験番号：A-2170）において、0.5 w/v%メチルセルロース水溶液中での被験物質の安定性及び均一性に良好な結果が得られていることから、媒体として 0.5 w/v%メチルセルロース水溶液を選択した。

6.2 投与液の調製

6.2.1 媒体の調製

調製方法 : メチルセルロース（400 cP、和光純薬工業株式会社、ロット番号；EWM1974）を注射用水（株式会社大塚製薬工場、ロット番号；9J79）に溶解し、0.5 w/v%メチルセルロース水溶液とした。

保存方法 : 冷所（冷蔵庫内、実測値；3~6°C）に保存し、調製後 3 日以内に投与液の調製に用いた。

6.2.2 被験液の調製

濃度ごとに必要量の被験物質を正確に採取し、0.5 w/v%メチルセルロース水溶液に懸濁して 2.4 mg/mL 液（低用量群液）、12 mg/mL 液（中用量群液）及び 60 mg/mL 液（高用量群液）を調製した。被験液は週 1 回以上の頻度で調製し、調製後 7 日以内に使用した。

6.2.3 投与液の保存方法

投与液は 1 日必要分ずつ褐色瓶に分注し、使用時まで冷所（冷蔵庫内、実測値：3~6°C）で保存した。

6.2.4 媒体中での安定性

本被験物質の 0.1 及び 200 mg/mL 懸濁液（媒体：0.5 w/v%メチルセルロース水溶液）は、冷所（冷蔵庫内、1~10°C）、遮光で 8 日間、その後室温で 24 時間安定であることが株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で確認されている（試験番号：A-2170、添付資料 3）。

6.2.5 被験液の濃度・均一性確認

投与 1 週と 4 週の投与に用いた各濃度の被験液について、その濃度・均一性を株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で HPLC 法を用いて確認した。その結果、表示値に対する濃度の割合は 94.6~107.7%（許容範囲：表示値に対する割合；100±10%

以内)、均一性は0.0~3.3% (許容値: CV10%以下) であり、いずれも許容範囲内であった (添付資料 4-1 及び 4-2)。分析法の概略を次に示す。

1 濃度当たりの採取本数及び採取量

: 3 本 (上、中及び下層から採取)、1 本につき 10 mL

測定対象物質 : メチルスチリルケトン

HPLC 測定条件

カラム : Cosmosil 5C18-MS-II
(4.6 mm×150 mm、5 µm、ナカライテスク株式会社)

カラム恒温槽設定温度

: 30 °C

移動相 : 精製水／メタノール (4/6、v/v)

流速 : 1.0 mL/min

検出 : UV (測定波長 254 nm)

注入量 : 10 µL

オートサンプラー設定温度

: 10°C

分析時間 : 8 分

注入順序 :

注入順序	注入回数	注入内容
1	3	標準溶液 (システム適合性用)
2	3	標準溶液 (定量用)
3	1	測定実測試料 (2.4 mg/mL-上層)
4	1	測定実測試料 (12 mg/mL-上層)
5	1	測定実測試料 (60 mg/mL-上層)
6	1	測定実測試料 (2.4 mg/mL-中層)
7	1	測定実測試料 (12 mg/mL-中層)
8	1	測定実測試料 (60 mg/mL-中層)
9	1	測定実測試料 (2.4 mg/mL-下層)
10	1	測定実測試料 (12 mg/mL-下層)
11	1	測定実測試料 (60 mg/mL-下層)

標準溶液及び測定実測試料の測定は、注入後 24 時間以内に実施した。なお、バリデーション試験で、オートサンプラー内における 24 時間保存後の安定性が確認されている。

6.3 試験動物種及び系統の選択理由

毒性試験法ガイドラインによりラットを用いた試験が必要とされている。この試験に使用された系統のラットは特性がよく知られ、背景資料が豊富であることから選択した。

6.4 試験動物及び群分け

Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD(SD)、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター] 雌雄各 47 匹^{注)} を 5 週齢で入手し、当所で 8 日間検疫・馴化飼育し、一般状態の観察 (1 回/日)、体重測定 (3 回) 及び詳細な一般状態の観察 (1 回) を行い、体重増加量、一般状態及び詳細な一般状態の観察に異常がみられず健康と思われる雌雄各 36 匹 (主群として雌雄各 24 匹、回復群として雌雄各 12 匹) を選び、6 週齢で試験に供した。投与開始日の体重範囲は、雄で 191~226 g、雌で 158~190 g であった。動物は検疫・馴化期間中の体重増加量により選別後、群分け当日 (投与開始の 2 日前) の体重に基づいて、各群の平均体重ができるだけ均等となるよう各群を構成した。個体の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法及び無作為抽出法の組合せ (ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割当てた。) により行った。また、余剰動物は投与開始日に試験系から除外し、エーテル深麻酔下で安楽死させた。

注) : 試験計画書に従い、注文匹数は雌雄各 45 匹であったが、実際には雌雄各 47 匹が納入された。

6.5 飼育条件

動物は温度 21~25 °C (設定 : 23±3°C)、相対湿度 43~58% (設定 : 50±20%)、換気回数 1 時間 10~15 回、照明 1 日 12 時間 (07:00~19:00) の動物飼育室 (301 号室) で、ブラケット式金属製網ケージ (W 250×D 350×H 200 mm : 日本ケージ株式会社) で個別飼育し、飼育室内の清掃を毎日 1 回実施した。固形飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号 : 091005、091104) はステンレス製給餌器を用いて、また、御殿場市営水道水を給水瓶により自由に摂取させた。

6.6 飼料及び飲料水中の混入物質

飼料中の混入物質に関しては使用ロットについて Eurofins Scientific Analytics で分析を行い、また、飲料水については東芝機械環境センター株式会社に水道法に準拠する水質検査を定期的に (年 4 回) 依頼した。これらの分析成績書を入手し、試験成績に影響がないことを確認した後、写しを保存した。

6.7 動物の識別及びケージへの表示

動物は入荷時に小動物耳標を装着して個体識別した。入荷から群分け前までの間は試験番号、性別及び耳標番号を明記したケージラベルをつけた。群分け後は、性別及び用量ごと (対照群、低、中及び高用量群の順) に 4 桁の番号をつけた。この場合、1000 の位は群、100 の位は性 (0 番を雄、1 番を雌)、10 と 1 の位は個体番号とした。各飼育ケージには、群分け前まで使用したケージラベルの裏に用量 (群) ごとに色分けしたラベルをつけ、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号及び剖検予定日を明記した。ただし、詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量測定中は、観察者に対して投与の情報を制限するため、ケージラベルを裏返して試

験番号、性別及び耳標番号のみを表示した。

6.8 投与経路、投与期間、投与回数及び回復期間とそれらの選択理由

毒性試験法ガイドラインに準じ、投与経路は経口投与を選択し、投与期間は28日間とした。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている1日1回(7回/週)とした。回復期間は障害の可逆性を検討するのに適当と考えられる2週間(14日間)とし、この間投与を行わなかった。

6.9 投与方法

投与容量は5 mL/kg 体重とし、胃ゾンデを用いて強制経口投与した(08:05~11:41の間)。対照群には媒体(0.5 w/v%メチルセルロース水溶液)を同様に投与した。個体ごとの投与液量は最新の体重を基準に算出した。

6.10 投与量及びその設定根拠並びに群構成

メチルスチリルケトンの0(0.5 w/v%メチルセルロース水溶液)、100、300及び1000 mg/kg/dayを1群雌雄各5匹のラットに14日間反復経口投与した結果¹⁾、主な変化として、1000 mg/kg 投与群の雌雄で体重及び摂餌量の変化に加えて血液学検査、器官重量及び剖検などに、300 mg/kg の投与群の雌雄で剖検に毒性を示唆すると考えられる変化が認められた。なお、100 mg/kg 投与群でも剖検に変化が認められたが雄のみであった。これらのことから投与期間を考慮し、本試験における投与量は、300 mg/kg 投与群を高用量とし、公比5で除し、60 mg/kg を中用量に、12 mg/kg を低用量に設定した。群構成表を次の表1に示す。

表 1. 群構成表

試験群	投与量 (mg/kg)	濃 度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	主 群		回 復 群	
					動物数	動物番号	動物数	動物番号
対照群	0	0	5	雄	6	1001~1006	6	1007~1012
				雌	6	1101~1106	6	1107~1112
低用量群	12	2.4	5	雄	6	2001~2006	-	-
				雌	6	2101~2106	-	-
中用量群	60	12	5	雄	6	3001~3006	-	-
				雌	6	3101~3106	-	-
高用量群	300	60	5	雄	6	4001~4006	6	4007~4012
				雌	6	4101~4106	6	4107~4112

6.11 観察及び検査の方法

それぞれ記載された時期に観察及び検査を実施した。試験日の起算に関しては下記の通りとした。

投与 1 日 (day 1 of administration)	: 投与開始日
投与 1 週 (week 1 of administration)	: 投与 1 から投与 7 日
回復 1 日 (day 1 of recovery)	: 回復開始日 (投与期間終了の翌日)
回復 1 週 (week 1 of recovery)	: 回復 1 から回復 7 日

6.11.1 一般状態の観察

全個体について投与期間中は毎日 3 回、投与前と投与直後及び約 2 時間後(ただし、詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量測定を実施する時は投与前と投与直後の 2 回)、回復期間中は毎日 1 回、体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物などの一般状態を観察した。

6.11.2 詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量の測定

詳細な一般状態の観察は、全個体について、投与開始前に 1 回、投与期間中及び回復期間中は毎週 1 回実施した。また、機能検査、握力及び自発運動量の測定は、投与 4 週(雄を投与 26 日、雌を投与 27 日)及び回復 2 週(回復 12 日)に行った。詳細な一般状態の観察及び機能検査については実測値あるいはスコア化した評点法を用いた。なお、観察及び検査は投与の情報を制限(ブラインド化)し、動物をランダムに配置した状態で行った。

6.11.2.1 詳細な一般状態の観察

1) ホームケージ内観察

姿勢、痙攣、異常行動

2) 手に持った観察

ケージからの取り出しやすさ、被毛・皮膚の状態、眼・鼻の分泌物、眼球(眼球突出、眼瞼閉鎖状態)、可視粘膜、自律神経機能(流涙、立毛、瞳孔径、流涎、異常呼吸)、ハンドリングに対する反応

3) オープンフィールド内観察

覚醒状態、痙攣、異常行動、常同行動、歩行、姿勢、身繕い、立ち上がり回数、排泄物(排糞数、排尿)

6.11.2.2 機能検査

聴覚反応、接近反応、接触反応、痛覚反応、瞳孔反射、空中正向反射、着地開脚幅

6.11.2.3 握力測定

CPU ゲージ MODEL-9502A（アイコーエンジニアリング株式会社）を用いて前肢及び後肢の握力を測定した。

6.11.2.4 自発運動量の測定

実験動物用自発運動センサーNS-AS01（株式会社ニューロサイエンス）を用いて自発運動量を測定した。測定は1時間とし、10分間隔及び0~60分の測定値を集計した。

6.11.3 体重測定

全個体について、投与期間中は投与 1、4、7、10、14、17、21、24 及び 28 日の投与前に、回復期間中は回復 1、3、7、10 及び 14 日に測定した。測定は 08:40~09:50 の間に行った。剖検日には相対器官重量算出のため、前日から約 16 時間絶食させた後の体重を測定した（07:59~08:19）。

6.11.4 摂餌量測定

全個体について、投与期間中は投与 1、7、14、21 及び 28 日の投与前に、回復期間中は回復 7 及び 14 日に測定した。測定は 08:55~09:52 の間に行った。なお、投与期間中は投与開始日の測定は前日からの 1 日量を、投与 7 日は 6 日間の累積摂取量を、その後は 7 日ごとに 7 日間の累積摂取量を測定し、1 匹 1 日量を算出した。回復 1 週は回復 1 日から 7 日までの 6 日間の累積摂取量を、その後は 7 日間の累積摂取量を測定し、1 匹 1 日量を算出した。

6.11.5 尿検査（摂水量含む）

投与4週及び回復2週に行った。

投与4週（投与23日の投与後）は全個体^{注1)}について、回復2週（回復9日）は回復群の全個体について、検査当日にそれぞれ採尿器をセットしたケージに収容し、絶食・自由摂水下で4時間尿を、次いで自由摂食・自由摂水下でその後の20時間尿を採取し、表2に記載した項目及び方法により検査した。また、摂水量は、採尿ケージに収容した状態で前日からの1日当たりの摂水量を、給水瓶を用いて測定した。

注1)：投与4週の検査において、対照群の雄1例（動物番号：1010）で給水瓶不良が疑われたため、投与24日の投与後に再度尿検査を実施し、その再検査値を採用した。

表2. 尿検査の項目、測定法及び使用機器など

1) 4時間尿についての検査	
検査項目	測定方法
pH	オーションスティックス-7EA 試験紙 ^{a)} （アークレイ株式会社）
たん白質	オーションスティックス-7EA 試験紙 ^{a)} （アークレイ株式会社）
ケトン体	オーションスティックス-7EA 試験紙 ^{a)} （アークレイ株式会社）
グルコース	オーションスティックス-7EA 試験紙 ^{a)} （アークレイ株式会社）
潜血	オーションスティックス-7EA 試験紙 ^{a)} （アークレイ株式会社）
ビリルビン	オーションスティックス-7EA 試験紙 ^{a)} （アークレイ株式会社）
ウロビリノーゲン	オーションスティックス-7EA 試験紙 ^{a)} （アークレイ株式会社）
色調	肉眼観察
沈渣	鏡検法
尿量（4時間量） ^{注2)}	目盛付スピッツ管を用いた容量測定（単位：mL）
2) 20時間尿についての検査	
検査項目	測定方法
尿量（20時間量） ^{注2)}	メスシリンダーを用いた容量測定（単位：mL）
浸透圧	氷点降下法 ^{b)} （単位：mOsm/kg）
使用測定機器	
^{a)} ：AUTION™ MINI AM-4290（アークレイ株式会社）	
^{b)} ：自動浸透圧測定装置 オートアンドスタット OM-6030（アークレイ株式会社）	

注2)：4時間の尿量と20時間の尿量を合計して24時間の尿量（mL/24 h）を算出した。

6.11.6 血液学検査

投与期間及び回復期間終了の翌日の計画剖検時に、前日から一夜（約16~20時間）絶食させた全個体について、エーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈からEDTA-2K加採血瓶（SB-41：シスメックス株式会社）に血液（約1 mL）を採取した。得られた血液について表3.1）に記載した項目及び方法により検査した。更に、血液（0.9 mL）を3.8%クエン酸ナトリウム溶液加試験管（血液9容に対し1容の割合）に採取し、遠心分離（設定：3,100 rpm、1,690×g、12分間）により得られた血漿について表3.2）に記載した項目及び方法により検査した。なお、鏡検による確認に備え、全個体についてMay-Grünwald-Giemsa染色法による血液塗抹標本を作製したが、鏡検による確認は不要と判断し、鏡検は実施しなかった。

表3. 血液学検査の項目、測定法及び使用機器など

1) EDTA-2K加血液についての検査		
検査項目	測定方法	単位
赤血球数（RBC）	2角度レーザーフローサイトメトリー法 ^{a)}	10 ⁴ /μL
ヘモグロビン量（HGB）	シアメトヘモグロビン変法 ^{a)}	g/dL
ヘマトクリット値（HCT）	赤血球数及び平均赤血球容積から算出 ^{a)}	%
平均赤血球容積（MCV）	2角度レーザーフローサイトメトリー法 ^{a)}	fL
平均赤血球色素量（MCH）	赤血球数及びヘモグロビン量から算出 ^{a)}	pg
平均赤血球色素濃度（MCHC）	ヘモグロビン量及びヘマトクリット値から算出 ^{a)}	g/dL
網赤血球率（Retic.）	RNA染色によるレーザーフローサイトメトリー法 ^{a)}	%
血小板数（PLT）	2角度レーザーフローサイトメトリー法 ^{a)}	10 ⁴ /μL
白血球数（WBC）	2角度レーザーフローサイトメトリー法 ^{a)}	10 ² /μL
白血球百分率 ^{b)}	ペルオキシダーゼ染色によるフローサイトメトリー法 +2角度レーザーフローサイトメトリー法 ^{a)}	% 10 ² /μL
2) クエン酸ナトリウム加血液から分離した血漿についての検査		
検査項目	測定方法	単位
プロトロンビン時間（PT）	クロット法 ^{b)}	s
活性化部分トロンボ プラスチン時間（APTT）	クロット法 ^{b)}	s
フィブリンノーゲン量（FIB）	トロンボプラスチン法 ^{b)}	mg/dL
使用測定機器		
^{a)} ：総合血液学検査装置アドヴィア 120（Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Illinois, USA）		
^{b)} ：血液凝固自動測定装置 ACL Elite Pro（Instrumentation Laboratory, MA, USA）		

注）：リンパ球（LYMP）、好中球（NEUT）、好酸球（EOS）、好塩基球（BASO）、単球（MONO）及び大型非染色球（LUC）。また、白血球百分率と白血球数から各分画の実数を算出した。

6.11.7 血液化学検査

血液学検査用試料と同時に採取した血液（約 4 mL）を凝固促進剤入り試験管（ベノジェクト II-オートセップ：テルモ株式会社）に採取し、遠心分離（設定：3,100 rpm、1,690×g、12 分間）し、得られた血清について、表 4.1）に記載した項目及び方法により検査した。また、ヘパリン加試験管（血液 1 mL 当たり約 20 単位のヘパリン）に採取した血液（約 2 mL）を遠心分離（設定：3,100 rpm、1,690×g、12 分間）し、得られた血漿について表 4.2）に記載した項目及び方法により検査した。

表 4. 血液化学検査の項目、測定法及び使用機器など

1) 分離した血清についての検査		
検査項目	測定方法	単位
ALP	Bessey-Lowry 法 ^{a)}	IU/L
総コレステロール (T-CHO)	CEH-COD-POD 法 ^{a)}	mg/dL
トリグリセライド (TG)	LPL-GK-GPO-POD 法 ^{a)}	mg/dL
リン脂質 (PL)	PLD-ChOD-POD 法 ^{a)}	mg/dL
総ビリルビン (T-BIL)	ビリルビンオキシダーゼ法 ^{a)}	mg/dL
グルコース (GLU)	グルコースデヒドロゲナーゼ法 ^{a)}	mg/dL
尿素窒素 (BUN)	Urease-LEDH 法 ^{a)}	mg/dL
クレアチニン (CRNN)	Creatininase-creatinase-sarcosine oxidase-POD 法 ^{a)}	mg/dL
ナトリウム (Na)	イオン選択電極法 ^{a)}	mmol/L
カリウム (K)	イオン選択電極法 ^{a)}	mmol/L
塩素 (Cl)	イオン選択電極法 ^{a)}	mmol/L
カルシウム (Ca)	OCPC 法 ^{a)}	mg/dL
無機リン (P)	モリブデン酸法 ^{a)}	mg/dL
総たん白質 (TP)	Biuret 法 ^{a)}	g/dL
アルブミン (ALB)	BCG 法 ^{a)}	g/dL
A/G 比 (A/G)	総たん白質及びアルブミンから算出	
2) ヘパリン加血液から分離した血漿についての検査		
検査項目	測定方法	単位
AST	UV-rate 法 ^{a)}	IU/L
ALT	UV-rate 法 ^{a)}	IU/L
LDH	UV-rate 法 ^{a)}	IU/L
γ-GTP	L-γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド法 ^{a)}	IU/L
使用測定機器		
^{a)} : 臨床化学自動分析装置 TBA-120FR 形 (東芝メディカルシステムズ株式会社)		

6.11.8 病理学検査

6.11.8.1 剖検

全ての動物について、採血後腹大動脈切断により放血致死させ、体外表・頭部・胸部・腹部を含む全身の器官・組織の肉眼による詳細な病理解剖を行い、結果を記録した。

6.11.8.2 器官重量測定

全ての動物について、次に示す器官の重量（絶対重量）を測定するとともに、絶対重量と剖検時の体重から体重 100 g 当たりの相対重量を算出した。

なお、*印を付した両側性の器官については左右別々に測定し、その合計値で評価した。

脳、副腎*、胸腺、脾臓、心臓、肝臓、腎臓*、精巣*、精巣上体*、卵巢*、子宮

6.11.8.3 病理組織学検査

全ての個体について次に示す器官・組織を採取し、リン酸緩衝 10 v/v%ホルマリン液で固定した。ただし、肺はリン酸緩衝 10 v/v%ホルマリン液を注入後、眼球及び視神経はリン酸緩衝液で調製した 3 v/v%グルタルアルデヒド・2.5 v/v%ホルマリン液で固定後、精巣及び精巣上体はブアン液で固定した後、それぞれ、リン酸緩衝 10 v/v%ホルマリン液で保存し、パラフィン包埋した。その後、切片としてヘマトキシリン・エオジン染色標本作製し、主群の対照群及び高用量群（肉眼的異常部位については全例）について鏡検した。*で示した両側性器官については両側を摘出したが、鏡検は左側のみ行った。なお、被験物質投与の影響が疑われた雌雄の胃及び脾臓、雄の腎臓並びに肝臓については低及び中用量群並びに回復群の全個体については鏡検した。更に、雄の腎臓については尿細管上皮細胞の好酸性小体がみられた代表例（3 例、動物番号 1002、4003 及び 4006）の抗 $\alpha 2\mu$ グロブリン抗体を用いた免疫組織化学染色標本及び PAS 染色標本作製、鏡検した。

大脳、小脳、脊髄（胸部）、坐骨神経*、眼球*、下垂体、甲状腺*、上皮小体*、副腎*、胸腺、脾臓、顎下リンパ節、腸間膜リンパ節、心臓、気管、肺（気管支を含む）、胃、十二指腸、空腸、回腸（パイエル板を含む）、盲腸、結腸、直腸、肝臓、腎臓*、膀胱、精巣*、精巣上体*、前立腺、卵巢*、子宮、胸骨（骨髄を含む）、大腿骨（骨髄を含む）*、大腿部骨格筋*及び肉眼的異常部位

他に、視神経*（視神経は眼球と分離せず、ヘマトキシリン・エオジン染色標本作製まで実施した。）、ハーダー腺*、胸大動脈、舌、食道、顎下腺*、舌下腺*、脾臓、膵、精囊、乳腺（鼠径部）*、皮膚（鼠径部）*、個体識別部位（耳介）及び喉頭を摘出して保存した。

6.12 統計解析

オープンフィールド内観察の定量的項目、機能検査における定量的項目、握力測定、自発運動量の測定、体重（体重増加量を含む）、摂餌量、摂水量、尿検査の定量的項目、血液学検査、血液化学検査及び器官重量データについて、対照群と各投与群との間で統計解析を行った。まず、主群については Bartlett 検定により分散性の検定を行った（有意水準：両側 1%）。分散が等しい場合は Dunnett 法を用いて、非等分散の場合は Dunnett 型の mean rank test を用いて、対照群と各投与群との間で検定を行った（有意水準：両側 5 及び 1%）。なお、回復群については、F 検定により各群の分散の均一性の検定（有意水準：片側 5%）を行った。その結果、等分散性が認められた場合には対照群と被験物質投与群との平均値の差について Student の t 検定（有意水準：両側 5 及び 1%）を、等分散性が認められなかった場合には Aspin-Welch の t 検定（有意水準：両側 5 及び 1%）を行った²⁻⁶⁾。

7. 試験結果

7.1 一般状態

成績を Table 1-1~1-3 及び Appendix 1~10 に示した。

1) 投与期間

対照群の雄 1 例（動物番号；1003）で表皮剥離が投与 28 日に認められた。

2) 回復期間

いずれの動物においても、回復期間を通じて異常は認められなかった。

7.2 詳細な一般状態、機能検査、握力及び自発運動量

7.2.1 詳細な一般状態

成績を Table 2-1~2-18 及び Appendix 11~70 に示した。

1) 投与期間

オープンフィールド内観察において投与 1 週に 300 mg/kg 投与群の雌で立ち上がり回数の有意な低値がみられ、手に持った観察において投与 2 週に 300 mg/kg 投与群の雄 2/12 例で、投与 3 週に 300 mg/kg 投与群の雄 4/12 例で軽度の流涎が認められた。

2) 回復期間

いずれの検査項目においても異常はなく、雌雄とも対照群と 300 mg/kg 投与群との間に有意差は認められなかった。

7.2.2 機能検査

成績を Table 2-19、2-20 及び Appendix 71~76 に示した。

1) 投与 4 週

いずれの検査項目においても異常はなく、雌雄とも対照群と各被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

2) 回復 2 週

いずれの検査項目においても異常はなく、雌雄とも対照群と 300 mg/kg 投与群との間に有意差は認められなかった。

7.2.3 握力

成績を Table 2-21、2-22 及び Appendix 77~82 に示した。

1) 投与 4 週

雌雄とも対照群と各被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

2) 回復 2 週

雌雄とも対照群と 300 mg/kg 投与群との間に有意差は認められなかった。

7.2.4 自発運動量

成績を Fig. 1~4、Table 2-23、2-24 及び Appendix 83~88 に示した。

1) 投与 4 週

雌雄とも対照群と各被験物質投与群の自発運動量はほぼ同様に推移し、有意差は認められなかった。

2) 回復 2 週

雌雄とも対照群と 300 mg/kg 投与群の自発運動量はほぼ同様に推移し、有意差は認められなかった。

7.3 体重

成績を Fig. 5、Table 3-1、3-2 及び Appendix 89~94 に示した。

1) 投与期間

雌雄とも対照群と各被験物質投与群の体重はほぼ同様に推移し、有意差は認められなかった。

2) 回復期間

雌雄とも対照群と 300 mg/kg 投与群の体重はほぼ同様に推移し、有意差は認められなかった。

7.4 摂餌量

成績を Fig. 6、Table 4-1、4-2 及び Appendix 95~100 に示した。

1) 投与期間

雌雄とも対照群と各被験物質投与群の摂餌量はほぼ同様に推移し、有意差は認められなかった。

2) 回復期間

雌雄とも対照群と 300 mg/kg 投与群の摂餌量はほぼ同様に推移し、有意差は認められなかった。

7.5 尿検査（摂水量含む）

成績を Table 5-1~5-8 及び Appendix 101~118 に示した。

1) 投与 4 週

定性項目においてケトン体陽性例（7.6 mg/dL 以上）が対照群の雄 3/12 例、60 mg/kg 投与群の雄 2/6 例、300 mg/kg 投与群の雄全例と雌 11/12 例でみられ、300 mg/kg 投与群の雌雄でケトン体陽性例の増加傾向が認められた。その他の定性項目ではいずれの動物にも異常は認められず、尿量、摂水量及び尿浸透圧にも各被験物質投与群の雌雄とも対照群との間に有意差は認められなかった。

2) 回復 2 週

いずれの動物にも定性的項目に異常は認められず、尿量、摂水量及び尿浸透圧にも 300 mg/kg 投与群の雌雄とも対照群との間に有意差は認められなかった。

7.6 血液学検査

成績を Table 6-1~6-6 及び Appendix 119~136 に示した。

1) 投与期間終了時

白血球数の有意な高値が 12 mg/kg 投与群の雄で、白血球百分率における大型非染色球比率の有意な高値が 12 mg/kg 投与群の雄、有意な低値が 12 mg/kg 投与群の雌で、好酸球比率の有意な高値が 300 mg/kg 投与群の雌でみられ、また、白血球分画におけるリンパ球数、好塩基球及び大型非染色球数の有意な高値が 12 mg/kg 投与群の雄で、好酸球数の有意な高値が 300 mg/kg 投与群の雌で認められた。

2) 回復期間終了時

300 mg/kg 投与群の雌雄では、いずれの検査項目においても対照群との間に有意差は認められなかった。

7.7 血液化学検査

成績を Table 7-1~7-4 及び Appendix 137~148 に示した。

1) 投与期間終了時

総コレステロールの有意な高値が 300 mg/kg 投与群の雌で認められた。

2) 回復期間終了時

グルコースの有意な低値が 300 mg/kg 投与群の雄、有意な高値が 300 mg/kg 投与群の雌で、AST、LDH 及び A/G 比の有意な低値が 300 mg/kg 投与群の雌で認められた。

7.8 器官重量

成績を Table 8-1~8-8 及び Appendix 149~172 に示した。

1) 投与期間終了時

肝臓	:	300 mg/kg 投与群の雌雄で絶対及び相対重量の有意な高値が認められた。
腎臓	:	60 mg/kg 以上の投与群の雄で絶対重量の有意な高値が、300 mg/kg 投与群の雄で相対重量の有意な高値が認められた。

2) 回復期間終了時

精巣上体	:	300 mg/kg 投与群で相対重量の有意な高値が認められた。
------	---	---------------------------------

7.9 剖検所見

成績を Table 9-1、9-2 及び Appendix 173~244 に示した。

1) 投与期間終了時

甲状腺	:	12 mg/kg 投与群の雄 1/6 例で小型化が認められた。
胃	:	300 mg/kg 投与群の雄 2/6 例、雌 5/6 例で前胃の壁肥厚が認められた。

精巢	:	300 mg/kg 投与群の雄 1/6 例で小型化が認められた。
精巢上体	:	300 mg/kg 投与群の雄 1/6 例で小型化が認められた。
その他	:	対照群の雄 1/6 例で表皮剥離が認められた。

2) 回復期間終了時

いずれの動物においても、異常は認められなかった。

7.10 病理組織学検査

成績を Table 10-1~10-5 及び Appendix 173~244 に示した。

1) 投与期間終了時

被験物質投与によると考えられる変化が雌雄の胃、雄の腎臓及び肝臓に、被験物質投与によると疑われる変化が脾臓に認められた。

胃	:	剖検において前胃の壁肥厚がみられた 300 mg/kg 投与群の雄 2/6 例と雌 5/6 例の動物を含み以下の所見が認められた。軽微あるいは軽度な前胃の扁平上皮過形成が 300 mg/kg 投与群の雄 5/6 例と雌全例で、軽微あるいは軽度な境界縁の扁平上皮過形成が 300 mg/kg 投与群の雄 2/6 例と雌 4/6 例で認められた。
腎臓	:	軽微あるいは軽度な尿細管の好酸性小体が対照群の雄 1/6 例、60 mg/kg 投与群の雄 3/6 例、300 mg/kg 投与群の雄全例でみられ、60 mg/kg 以上の投与群の雄で発現頻度の増加傾向あるいは増強が認められた。本変化がみられた動物のうち代表例 (3 例、動物番号 1002、4003 及び 4006) について抗 $\alpha 2\mu$ グロブリン抗体を用いた免疫組織化学染色標本及び PAS 染色標本を作製し鏡検した結果、 $\alpha 2\mu$ グロブリン陽性、PAS 反応陰性を示したことから、好酸性小体は $\alpha 2\mu$ グロブリン由来であると判断した。
肝臓	:	軽微な小葉中心性肝細胞肥大が 300 mg/kg 投与群の雄 4/6 例で認められた。
脾臓	:	軽微な髄外造血が対照群の雌 1/6 例、12 mg/kg 投与群の雄 3/6 例と雌 2/6 例、60 mg/kg 投与群の雌雄各 3/6 例、300 mg/kg 投与群の雄 2/6 例と雌 3/6 例で認められた。

投与期間終了時では以下に示す所見が認められたが、その出現状況などからいずれも偶発性の変化と判断した。

精巢上体	:	剖検において小型化がみられた 300 mg/kg 投与群の 1/6 例では、中等度な精子数減少と軽微な細胞残屑が認められた。
------	---	--

眼球	:	軽微な網膜萎縮と軽微な角膜炎が対照群の雌 1/6 例で認められた。
心臓	:	軽微な限局性の心筋炎が対照群の雄 2/6 例で認められた。
腎臓	:	軽微な再生尿細管が対照群の雌 3/6 例、12 mg/kg 投与群の雄 2/6 例、60 mg/kg 投与群の雄 1/6 例、300 mg/kg 投与群の雄 4/6 例で、軽微な線維化が対照群の雌 1/6 例で認められた。
肝臓	:	軽微あるいは軽度な門脈周囲肝細胞の空胞化が対照群の雌 3/6 例、300 mg/kg 投与群の雌 4/6 例で、軽微な微小肉芽腫が対照群の雌 1/6 例、12 mg/kg 投与群の雄 1/6 例、60 mg/kg 投与群の雄 1/6 例、300 mg/kg 投与群の雄 1/6 例と雌 2/6 例で認められた。
肺（気管支を含む）	:	軽微な泡沫細胞の集簇が対照群の雌 1/6 例、300 mg/kg 投与群の雄 1/6 例で、軽微な限局性肺炎が対照群の雄 1/6 例で認められた。
下垂体	:	軽微なう胞が対照群の雄 1/6 例で認められた。
前立腺	:	軽微な間質性細胞浸潤が 300 mg/kg 投与群の 1/6 例で認められた。
大腿部骨格筋	:	軽微な骨格筋の変性が対照群の雌 2/6 例、300 mg/kg 投与群の雌 1/6 例で認められた。
精巣	:	剖検において小型化がみられた 300 mg/kg 投与群の 1/6 例では、中等度な精細管の萎縮が認められた。
皮膚（頸部）	:	剖検において表皮剥離がみられた対照群の雄 1/6 例では、軽度な潰瘍が認められた。
甲状腺	:	剖検において甲状腺の小型化がみられた 12 mg/kg 投与群の雄 1/6 例では、病理組織学検査に異常は認められなかった。

2) 回復期間終了時

被験物質投与によると考えられる変化が雄の腎臓に認められた。

腎臓	:	軽微な尿細管の好酸性小体が対照群の雄 1/6 例、300 mg/kg 投与群の雄 3/6 例でみられ、300 mg/kg の投与群の雄で発現頻度の増加傾向が認められた。
----	---	--

回復期間終了時では以下に示す所見が認められたが、その出現状況などからいずれも偶発性の変化と判断した。

腎臓	:	軽微な再生尿細管が対照群の雄 5/6 例、300 mg/kg 投与群の雄 3/6 例で、軽微な尿中の硝子円柱が対照群の雄 1/6 例で認められた。
----	---	---

B-6581

- 肝臓 : 軽度な門脈周囲の肝細胞空胞化が対照群の雄 1/6 例で、
軽微な微小肉芽腫が 300 mg/kg 投与群の雄 1/6 例で、
軽微な限局性の肝細胞壊死が対照群の雄 1/6 例で認め
られた。
- 胃 : 軽微な腺胃のびらんが対照群と 300 mg/kg 投与群の雌
各 1/6 例で認められた。
- 脾臓 : 軽微な髄外造血が対照群の雄 2/6 例と雌 1/6 例、300
mg/kg 投与群の雄 2/6 例と雌 1/6 例で認められた。

8. 考察

メチルスチリルケトンの 28 日間反復経口投与毒性試験を 6 週齢の Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD(SD)、1 群雌雄各 6 又は 12 匹] を用いて実施した。投与量は 0 (0.5 w/v%メチルセルロース水溶液：対照群)、12、60 及び 300 mg/kg とし、また、対照群と 300 mg/kg の一部の個体 (1 群雌雄各 6 匹) については投与期間終了後 2 週間の休薬期間を設け、毒性変化の可逆性を検討した。

一般状態では、投与期間中に表皮剥離が対照群の雄 1 例 (動物番号 ; 1003) でみられたが、発現状況から偶発性と考えられた。なお、回復期間中には異常は認められなかった。

詳細な一般状態、機能検査、握力及び自発運動量では、オープンフィールド内観察において投与 1 週に立ち上がり回数の低値が 300 mg/kg 投与群の雌でみられ、中枢及び末梢神経系に病理組織学的変化はみられていないものの被験物質投与の影響が疑われた。また、手に持つての観察において軽度の流涎が投与 2 及び 3 週に 300 mg/kg 投与群の雄で散見された。なお、回復期間中には異常が認められなかった。

体重及び摂餌量では、被験物質投与の影響は認められなかった。

尿検査 (摂水量を含む) では、投与期間中にケトン体陽性例の増加傾向が 300 mg/kg 投与群の雌雄で認められ、他の検査項目で糖質及び脂質代謝への影響はみられていないことから、被験物質の代謝物と考えられた。なお、この変化は休薬により消失し回復性が認められた。

血液学検査では、投与期間終了時に白血球百分率における好酸球比率の高値と白血球分画における好酸球数の高値が 300 mg/kg 投与群の雌でみられたが、白血球数と他の白血球百分率及び白血球分画には変化が認められていないことから偶発性と判断した。また、白血球数の高値が 12 mg/kg 投与群の雄で、白血球百分率における大型非染色球比率の高値が 12 mg/kg 投与群の雄、低値が 12 mg/kg 投与群の雌で、また、白血球分画におけるリンパ球数、好塩基球及び大型非染色球数の高値が 12 mg/kg 投与群の雄でみられたが、いずれも高用量群には同様な変化は認められていないことから偶発性と判断した。

血液化学検査では、投与期間終了時に総コレステロールの高値が 300 mg/kg 投与群の雌で認められた。なお、この変化は休薬により消失し回復性が認められた。その他、回復期間終了時にグルコースの低値が 300 mg/kg 投与群の雄で、AST、LDH 及び A/G 比の低値とグルコースの高値が 300 mg/kg 投与群の雌でみられたが、いずれもごく軽度であり、投与期間終了時には同様な変化は認められていないことから偶発性と判断した。

病理学検査では、肝臓において 300 mg/kg 投与群の雌雄で絶対及び相対重量の高値が、組織学的にも 300 mg/kg 投与群の雄で小葉中心性肝細胞肥大が認められた。また、胃において 300 mg/kg 投与群の雌雄で肉眼的に前胃の壁肥厚が、組織学的にも前胃及

び境界縁の扁平上皮過形成が認められた。なお、いずれの変化も休薬により消失し回復性が認められた。腎臓において 60 mg/kg 以上の投与群の雄で絶対重量の高値と 300 mg/kg 投与群の雄で相対重量の高値が、組織学的にも 60 mg/kg 以上の投与群の雄で尿細管の好酸性小体の発現頻度の増加傾向あるいは増強が認められたが、代表例について抗 $\alpha 2\mu$ グロブリン抗体を用いた免疫組織化学染色標本及びPAS染色標本を作製し鏡検した結果、好酸性小体は $\alpha 2\mu$ グロブリンであると判断した。したがって、 $\alpha 2\mu$ グロブリンは雄ラットの特異的タンパクであることから、腎臓の変化は無影響量には関連しない変化と判断した⁷⁾。更に、回復期間終了時にも、組織学的に尿細管の好酸性小体が 300 mg/kg 投与群の雄でみられたが、投与終了時の同様な変化であることから無影響量には関連しない変化と判断した。脾臓において軽微な髄外造血が対照群の雌と 12 mg/kg 以上の投与群の雌雄でみられたが、血液学検査に髄外造血との関連が疑われる変化は認められず、対照群と同程度の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。その他、回復期間終了時に 300 mg/kg 投与群で精巣上体の相対重量の高値がみられたが、ごく軽度であり、投与期間終了時には同様な変化は認められていないことから偶発性と判断した。また、剖検で投与期間終了時に甲状腺、精巣及び精巣上体の小型化がみられたが、いずれも発現状況などから、偶発性と判断した。

以上の結果、メチルスチリルケトンの本試験条件下における無影響量は、雌雄とも主な変化として肝臓と胃の病理学組織検査から 60 mg/kg/day と推定された。

9. 文献

- 1) メチルスチリルケトンのラットを用いた 14 日間反復経口投与毒性試験
（予備試験）（株式会社ボゾリサーチセンター、試験番号：C-B449、2009 年）
- 2) Snedecor GW, Cochran WG. Statistical methods.8th ed. Ames: Iowa State University Press;1989.
- 3) Dunnett CW. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control.J Am Stat Assoc 1955; 50:1096-121.
- 4) Dunnett CW. New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 1964; 20:482-91.
- 5) 佐久間昭（1977）：薬効評価－計画と解析－I 東京大学出版会, 東京.
- 6) 佐久間昭（1981）：薬効評価－計画と解析－II 東京大学出版会, 東京.
- 7) C.A. Montgomery, Jr., and J.C. Seely : 10. Kidney. In “Pathology of the Fischer Rat”, edited by G.A. Boorman et al., Academic Press, Inc., San Diego, pp.129, 1990.

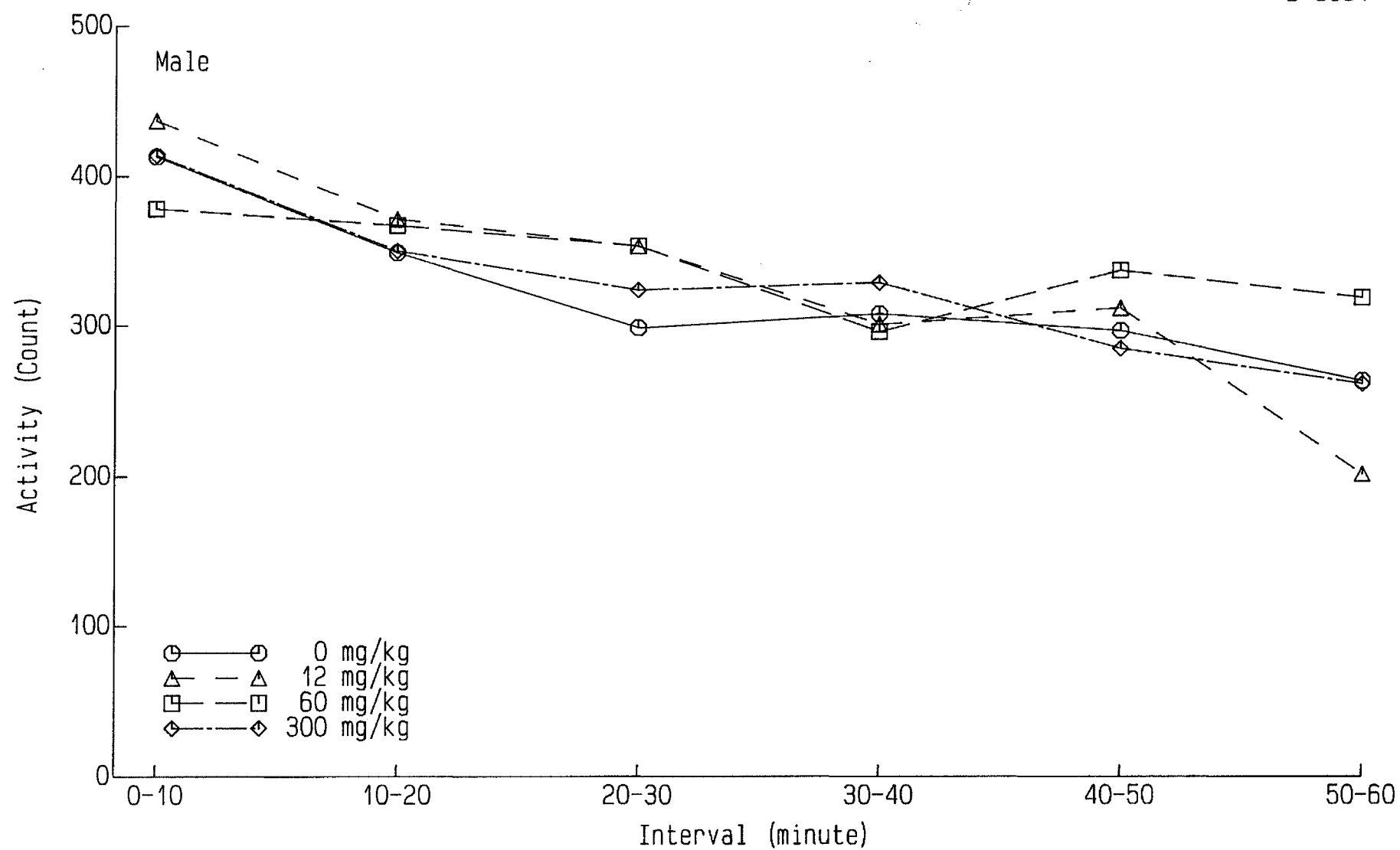


Fig.1 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
—— Motor activity (Week 4 of administration period) ——

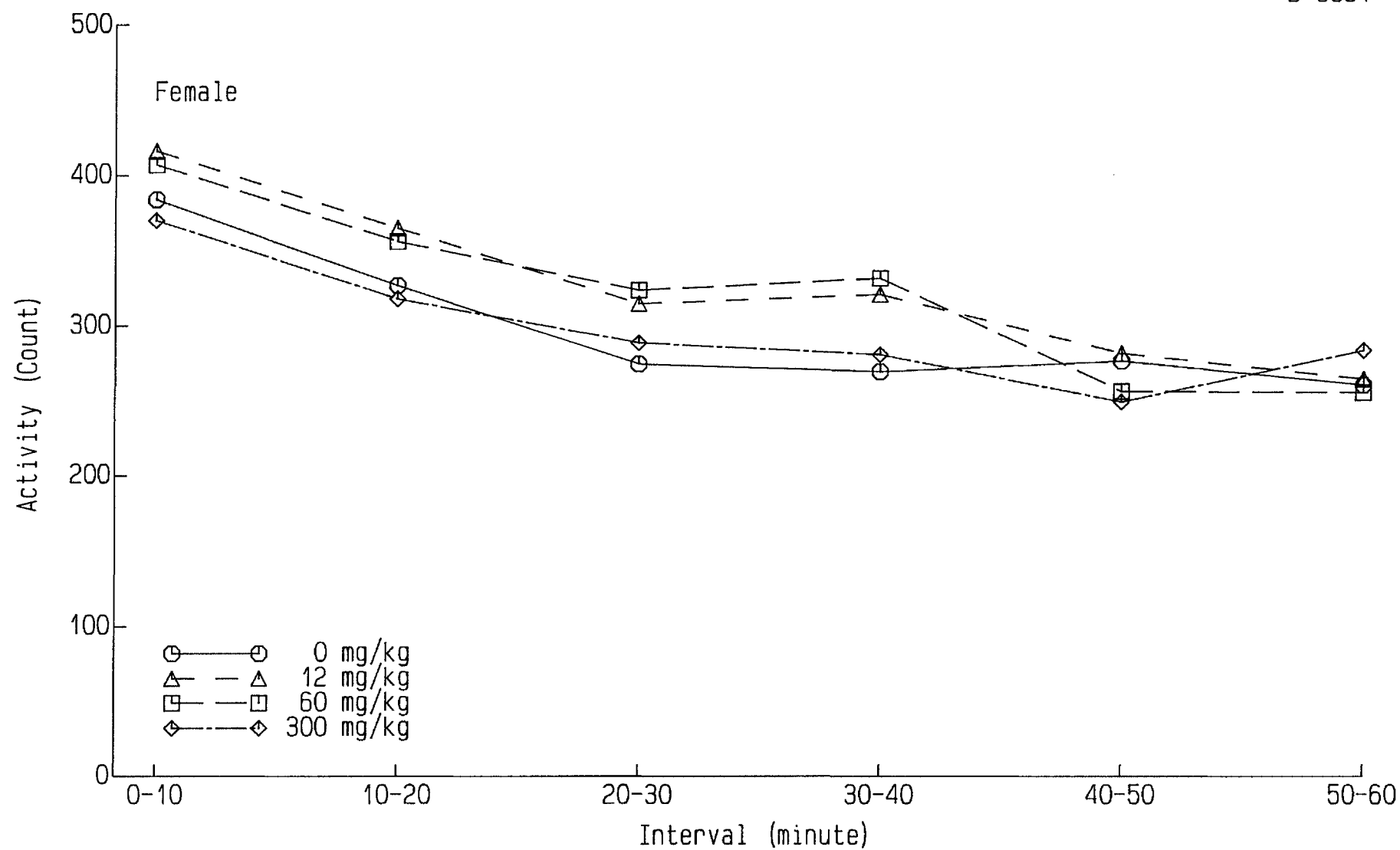


Fig.2 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
—— Motor activity (Week 4 of administration period) ——

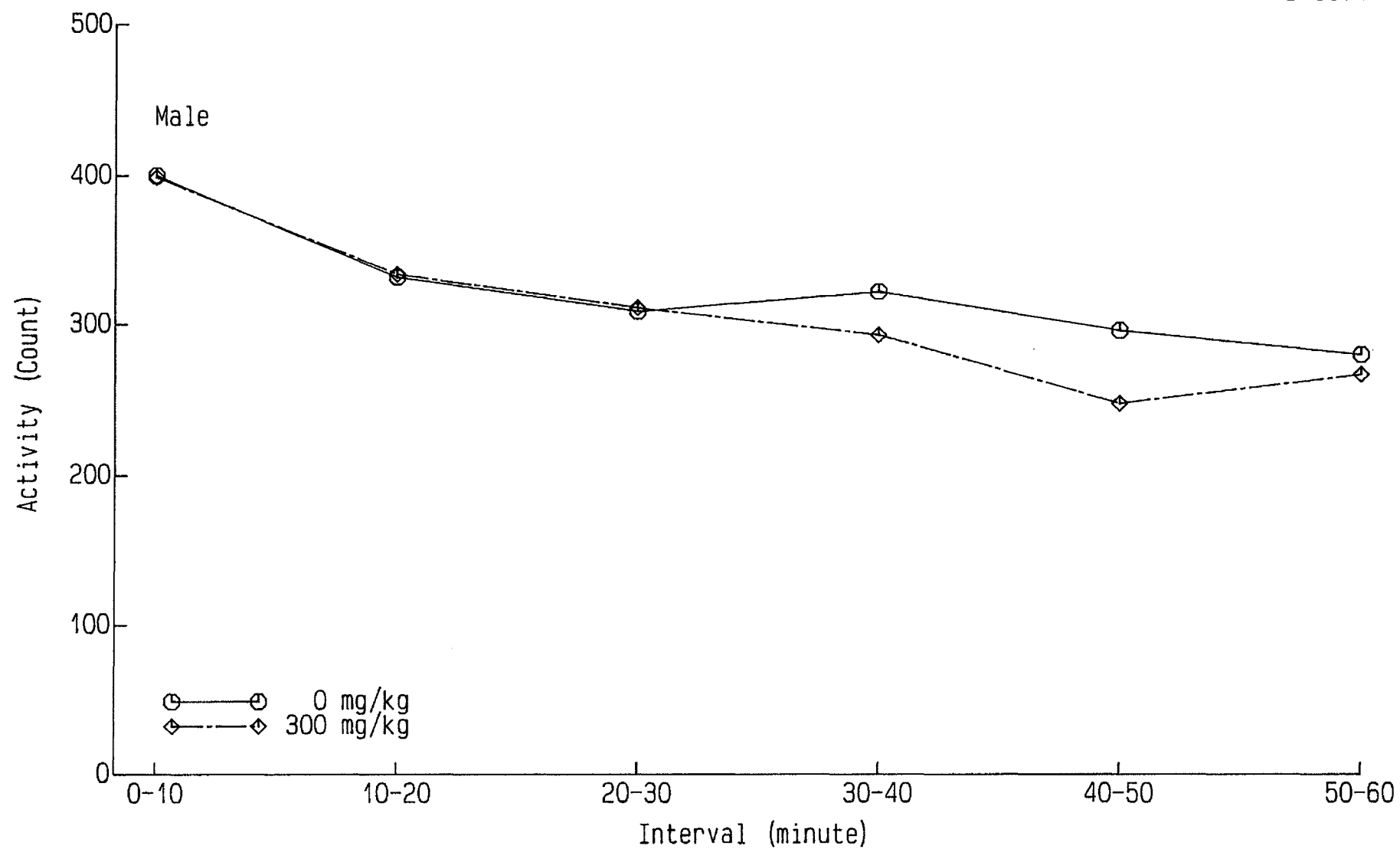


Fig.3 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
—— Motor activity (Week 2 of recovery period) ——

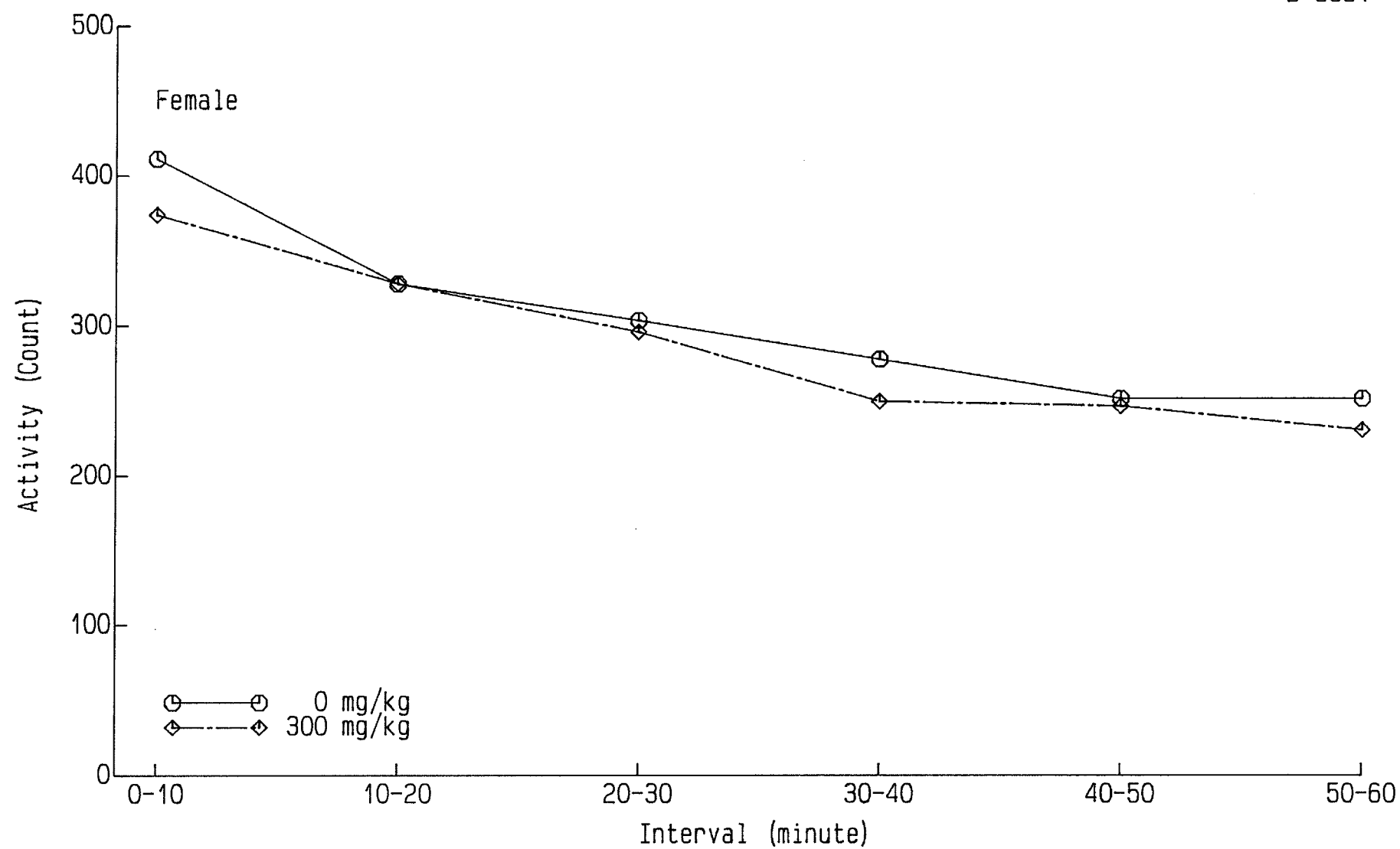


Fig.4 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
—— Motor activity (Week 2 of recovery period) ——

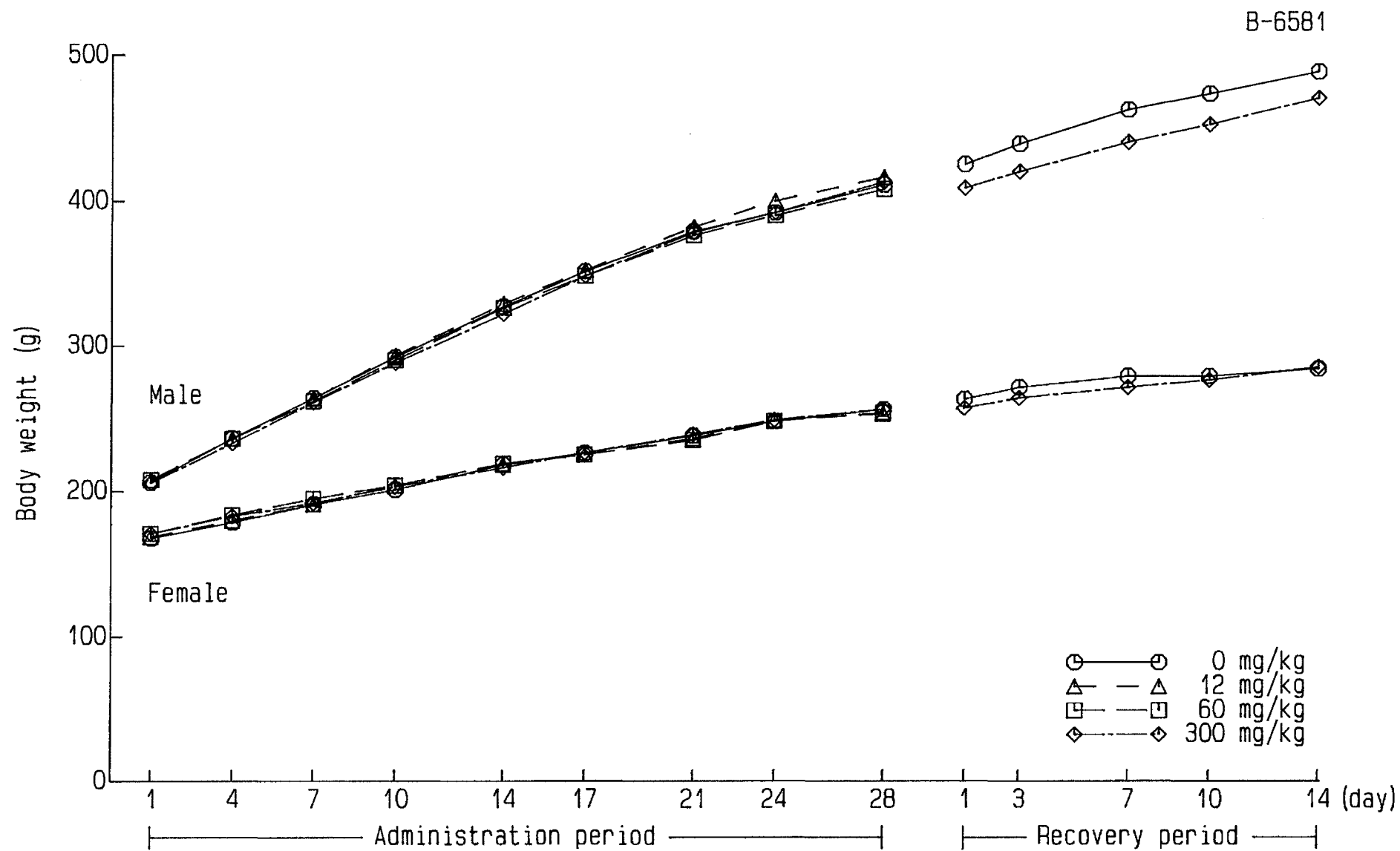


Fig.5 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

— Body weight —

B-6581

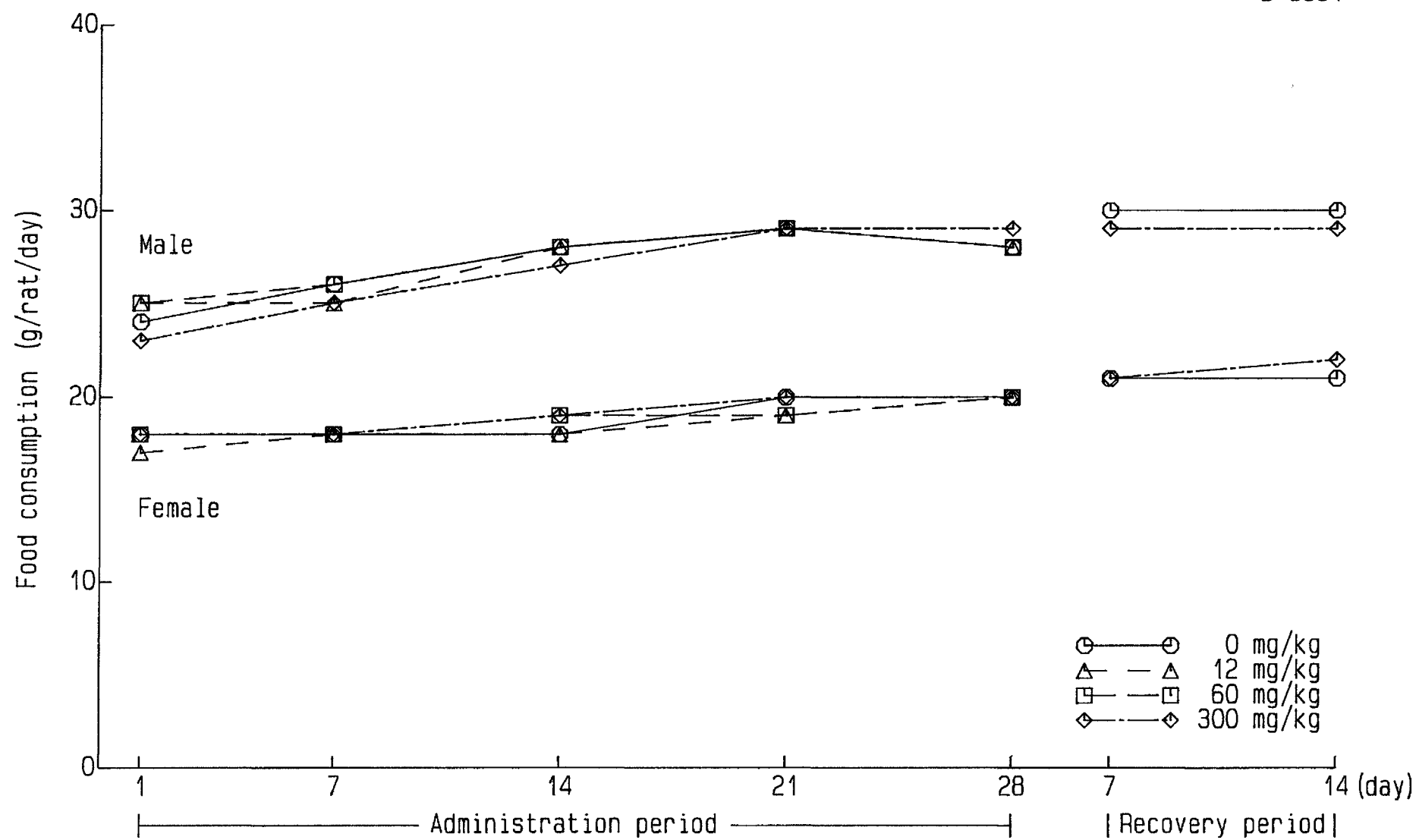


Fig.6 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
 — Food consumption —

Table 1-1

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Clinical signs (Administration period)

[illegible]

Table 1-2

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Clinical signs (Administration period)

[illegible]

[illegible]

Table 2-1

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : home cage observation (Week 1 of administration period)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-2

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : home cage observation (Week 2 of administration period)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-3

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : home cage observation (Week 3 of administration period)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-4

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : home cage observation (Week 4 of administration period)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-5 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : home cage observation (Week 1 of recovery period)

Parameter	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	300	0	300
	No. of animals	6	6	6	6
Posture					
Normal		6	6	6	6
Convulsion					
None		6	6	6	6
Abnormal behavior					
None		6	6	6	6

Table 2-6

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : home cage observation (Week 2 of recovery period)

Parameter	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	300	0	300
	No. of animals	6	6	6	6
Posture					
Normal		6	6	6	6
Convulsion					
None		6	6	6	6
Abnormal behavior					
None		6	6	6	6

Table 2-7

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : in-the-hand observation (Week 1 of administration period)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Ease of removal from cage									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12
Fur condition									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Skin									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Secretions-Eye, Nose									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Exophthalmos									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Palpebral closure									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Mucosal membranes									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Lacrimation									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Piloerection									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupil size									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Salivation									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal respiration									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Reactivity to handling									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-8

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : in-the-hand observation (Week 2 of administration period)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Ease of removal from cage									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12
Fur condition									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Skin									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Secretions-Eye, Nose									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Exophthalmos									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Palpebral closure									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Mucosal membranes									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Lacrimation									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Piloerection									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupil size									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Salivation									
None		12	6	6	10	12	6	6	12
Slight		0	0	0	2	0	0	0	0
Abnormal respiration									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Reactivity to handling									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-9

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : in-the-hand observation (Week 3 of administration period)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Ease of removal from cage									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12
Fur condition									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Skin									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Secretions-Eye, Nose									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Exophthalmos									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Palpebral closure									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Mucosal membranes									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Lacrimation									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Piloerection									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupil size									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Salivation									
None		12	6	6	8	12	6	6	12
Slight		0	0	0	4	0	0	0	0
Abnormal respiration									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Reactivity to handling									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-10

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : in-the-hand observation (Week 4 of administration period)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Ease of removal from cage									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12
Fur condition									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Skin									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Secretions-Eye, Nose									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Exophthalmos									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Palpebral closure									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Mucosal membranes									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Lacrimation									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Piloerection									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupil size									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Salivation									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal respiration									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Reactivity to handling									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-11

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : in-the-hand observation (Week 1 of recovery period)

Parameter	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	300	0	300
	No. of animals	6	6	6	6
Ease of removal from cage					
Easy		6	6	6	6
Fur condition					
Normal		6	6	6	6
Skin					
Normal		6	6	6	6
Secretions-Eye, Nose					
Absent		6	6	6	6
Exophthalmos					
Absent		6	6	6	6
Palpebral closure					
Normal		6	6	6	6
Mucosal membranes					
Normal		6	6	6	6
Lacrimation					
Normal		6	6	6	6
Piloerection					
Absent		6	6	6	6
Pupil size					
Normal		6	6	6	6
Salivation					
None		6	6	6	6
Abnormal respiration					
Absent		6	6	6	6
Reactivity to handling					
Easy		6	6	6	6

Table 2-12

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : in-the-hand observation (Week 2 of recovery period)

Parameter	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	300	0	300
	No. of animals	6	6	6	6
Ease of removal from cage					
Easy		6	6	6	6
Fur condition					
Normal		6	6	6	6
Skin					
Normal		6	6	6	6
Secretions-Eye, Nose					
Absent		6	6	6	6
Exophthalmos					
Absent		6	6	6	6
Palpebral closure					
Normal		6	6	6	6
Mucosal membranes					
Normal		6	6	6	6
Lacrimation					
Normal		6	6	6	6
Piloerection					
Absent		6	6	6	6
Pupil size					
Normal		6	6	6	6
Salivation					
None		6	6	6	6
Abnormal respiration					
Absent		6	6	6	6
Reactivity to handling					
Easy		6	6	6	6

Table 2-13

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : open field observation (Week 1 of administration period)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Arousal									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Stereotypy									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Gait									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Grooming									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Rearing count (Mean±S.D.)		4± 3	4± 4	3± 3	2± 2	9± 3	6± 2	8± 2	6± 2*D
Defecation count (Mean±S.D.)		1± 1	1± 1	0± 0	1± 1	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Urination									
None		7	4	5	5	12	6	6	12
Small amount		5	2	1	7	0	0	0	0

* : p<0.05 (Significant difference from control group)

D : Dunnett's test

Table 2-14

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : open field observation (Week 2 of administration period)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Arousal									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Stereotypy									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Gait									
No/minimal location		1	0	0	1	0	0	0	0
Normal		11	6	6	11	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Grooming									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Rearing count (Mean±S.D.)		3± 3	6± 2	3± 2	3± 2	9± 4	7± 2	6± 3	7± 2
Defecation count (Mean±S.D.)		1± 2	0± 1	0± 0	1± 2	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Urination									
None		9	6	5	7	12	6	6	12
Small amount		3	0	1	5	0	0	0	0

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-15

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : open field observation (Week 3 of administration period)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Arousal									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Stereotypy									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Gait									
No/minimal location		2	0	0	0	0	0	0	0
Normal		10	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Grooming									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Rearing count (Mean±S.D.)		5± 3	6± 2	5± 2	4± 4	10± 4	7± 2	8± 3	9± 1
Defecation count (Mean±S.D.)		0± 1	0± 0	0± 0	1± 1	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Urination									
None		9	6	6	9	12	6	6	12
Small amount		3	0	0	3	0	0	0	0

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-16

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : open field observation (Week 4 of administration period)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Arousal									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Stereotypy									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Gait									
No/minimal location		1	0	0	1	0	0	0	0
Normal		11	6	6	11	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Grooming									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Rearing count (Mean±S.D.)		4± 2	4± 3	4± 2	4± 3	10± 4	10± 2	7± 2	9± 2
Defecation count (Mean±S.D.)		0± 1	0± 0	0± 0	1± 1	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Urination									
None		11	6	6	12	11	6	6	12
Small amount		1	0	0	0	1	0	0	0

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-17

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : open field observation (Week 1 of recovery period)

Parameter	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	300	0	300
	No. of animals	6	6	6	6
Arousal					
Normal		6	6	6	6
Convulsion					
None		6	6	6	6
Abnormal behavior					
None		6	6	6	6
Stereotypy					
None		6	6	6	6
Gait					
Normal		6	6	6	6
Posture					
Normal		6	6	6	6
Grooming					
None		6	6	6	6
Rearing count (Mean±S.D.)		6± 1	4± 3	11± 3	9± 3
Defecation count (Mean±S.D.)		0± 0	1± 2	0± 0	0± 0
Urination					
None		6	6	6	6

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-18

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : open field observation (Week 2 of recovery period)

Parameter	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	300	0	300
	No. of animals	6	6	6	6
Arousal					
Normal		6	6	6	6
Convulsion					
None		6	6	6	6
Abnormal behavior					
None		6	6	6	6
Stereotypy					
None		6	6	6	6
Gait					
Normal		6	6	6	6
Posture					
Normal		6	6	6	6
Grooming					
None		6	6	6	6
Rearing count (Mean±S.D.)		6± 1	3± 3	11± 3	9± 2
Defecation count (Mean±S.D.)		0± 0	0± 1	0± 0	0± 0
Urination					
None		6	5	6	6
Small amount		0	1	0	0

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-19 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
 Manipulative test (Week 4 of administration period)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	12	60	300	0	12	60	300
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Auditory response									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Approach response									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Touch response									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Tail pinch response									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupillary reflex									
Pass, both		12	6	6	12	12	6	6	12
Aerial righting reflex									
(Total score: Mean±S.D.)		0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Landing foot splay (mm: Mean±S.D.)		71±20	66±15	68±12	66±20	54±14	55±10	54±18	49±11

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-20 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
 Manipulative test (Week 2 of recovery period)

Parameter	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	300	0	300
	No. of animals	6	6	6	6
Auditory response					
Normal		6	6	6	6
Approach response					
Normal		6	6	6	6
Touch response					
Normal		6	6	6	6
Tail pinch response					
Normal		6	6	6	6
Pupillary reflex					
Pass, both		6	6	6	6
Aerial righting reflex					
(Total score: Mean±S.D.)		0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Landing foot splay (mm: Mean±S.D.)		84± 9	86±13	43±13	50±15

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-21 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
Grip strength (Week 4 of administration period)

Sex	Dose mg/kg		Fore limb g	Hind limb g
Male	0	No.	12	12
		Mean	1154	482
		S.D.	97	73
	12	No.	6	6
		Mean	1166	540
		S.D.	186	42
	60	No.	6	6
		Mean	1147	527
		S.D.	83	77
	300	No.	12	12
		Mean	1136	490
		S.D.	147	96
Female	0	No.	12	12
		Mean	760	397
		S.D.	118	117
	12	No.	6	6
		Mean	803	400
		S.D.	126	144
	60	No.	6	6
		Mean	780	437
		S.D.	142	98
	300	No.	12	12
		Mean	694	418
		S.D.	151	132

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-22 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
Grip strength (Week 2 of recovery period)

Sex	Dose mg/kg		Fore limb g	Hind limb g
Male	0	No.	6	6
		Mean	1546	645
		S.D.	87	107
	300	No.	6	6
		Mean	1587	628
		S.D.	151	70
Female	0	No.	6	6
		Mean	1035	574
		S.D.	128	68
	300	No.	6	6
		Mean	1060	512
		S.D.	140	71

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-23

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
 Motor activity (Week 4 of administration period)

Sex	Dose mg/kg		Interval (minutes)						Total (0-60)
			0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	
Male	0	No.	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	413	349	299	308	297	264	1930
		S.D.	37	43	79	67	59	98	196
	12	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	437	371	353	301	312	202	1976
		S.D.	46	52	59	73	57	152	322
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	378	367	353	296	337	319	2049
		S.D.	75	35	56	88	47	88	190
	300	No.	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	414	350	324	329	285	262	1963
		S.D.	47	36	61	63	108	97	225
Female	0	No.	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	384	327	275	270	277	261	1793
		S.D.	34	72	55	69	80	58	247
	12	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	416	365	315	321	282	265	1963
		S.D.	15	34	34	33	94	40	134
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	407	356	324	332	257	256	1932
		S.D.	22	42	29	63	73	86	165
	300	No.	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	370	318	289	281	250	284	1791
		S.D.	40	52	69	46	115	108	309

Unit : Count

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-24

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
 Motor activity (Week 2 of recovery period)

Sex	Dose mg/kg		Interval (minutes)						
			0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	Total(0-60)
Male	0	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	400	332	309	322	296	280	1939
		S.D.	27	86	48	33	49	47	230
	300	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	399	334	311	293	248	267	1852
		S.D.	39	21	73	59	149	119	375
Female	0	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	411	328	304	278	252	252	1826
		S.D.	55	50	113	79	124	120	409
	300	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	374	328	296	250	247	231	1726
		S.D.	37	30	61	99	76	70	279

Unit : Count

No significant difference between treated group and control group.

Table 3-1

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Body weight (Administration period)

Sex	Dose mg/kg		Day of administration								Gain 1-28	
			1	4	7	10	14	17	21	24		28
Male	0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	206	236	264	292	327	351	379	392	411	204
		S.D.	9	11	12	13	14	15	16	17	21	22
	12	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	208	236	264	293	329	352	382	400	416	208
		S.D.	10	14	18	20	26	28	36	42	48	40
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	208	236	262	290	326	348	376	390	408	200
		S.D.	11	12	15	18	24	29	31	34	33	28
	300	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	206	233	261	288	322	348	378	392	413	208
		S.D.	7	8	11	13	17	22	25	27	29	26
Female	0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	168	179	191	201	218	226	238	248	256	88
		S.D.	7	7	9	9	11	11	13	18	18	14
	12	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	169	180	191	204	218	225	236	249	253	84
		S.D.	3	4	7	10	10	9	12	9	10	8
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	171	184	195	204	219	225	235	248	254	83
		S.D.	5	4	5	6	7	6	7	9	10	10
	300	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	171	183	192	203	216	226	239	249	256	85
		S.D.	10	10	11	14	14	14	14	15	15	9

Unit : g

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 3-2 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
 Body weight (Recovery period)

Sex	Dose mg/kg		Day of recovery					Gain 1-14
			1	3	7	10	14	
Male	0	No.	6	6	6	6	6	6
		Mean	425	439	462	473	488	64
		S.D.	16	14	16	16	19	9
	300	No.	6	6	6	6	6	6
		Mean	409	420	440	452	470	62
		S.D.	26	30	30	29	31	7
Female	0	No.	6	6	6	6	6	6
		Mean	263	271	279	279	284	21
		S.D.	10	9	9	6	7	10
	300	No.	6	6	6	6	6	6
		Mean	257	264	271	276	285	28
		S.D.	16	15	14	16	18	4

Unit : g

No significant difference between treated group and control group.

Table 4-1 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
Food consumption (Administration period)

Sex	Dose mg/kg		Day of administration				
			1	7	14	21	28
Male	0	No.	12	12	12	12	12
		Mean	24	26	28	29	28
		S.D.	2	2	2	2	2
	12	No.	6	6	6	6	6
		Mean	25	25	28	29	28
		S.D.	3	3	3	3	5
	60	No.	6	6	6	6	6
		Mean	25	26	28	29	28
		S.D.	1	2	2	3	2
	300	No.	12	12	12	12	12
		Mean	23	25	27	29	29
		S.D.	1	1	2	3	3
Female	0	No.	12	12	12	12	12
		Mean	18	18	18	20	20
		S.D.	3	2	1	1	2
	12	No.	6	6	6	6	6
		Mean	17	18	18	19	20
		S.D.	1	1	2	1	1
	60	No.	6	6	6	6	6
		Mean	18	18	19	19	20
		S.D.	3	1	1	2	2
	300	No.	12	12	12	12	12
		Mean	18	18	19	20	20
		S.D.	2	1	2	1	1

Unit : g/rat/day

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 4-2 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
 Food consumption (Recovery period)

Sex	Dose mg/kg		Day of recovery	
			7	14
Male	0	No.	6	6
		Mean	30	30
		S.D.	1	2
	300	No.	6	6
		Mean	29	29
		S.D.	1	2
Female	0	No.	6	6
		Mean	21	21
		S.D.	1	1
	300	No.	6	6
		Mean	21	22
		S.D.	1	2

Unit : g/rat/day

No significant difference between treated group and control group.

Table 5-1

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
Urinalysis (Week 4 of administration period)

Sex	Dose mg/kg	No.	pH										1) Protein						2) Ketone body						3) Glucose					
			5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0		-	+-	+	++	+++	++++	-	+-	+	++	+++	++++	-	+-	+	++	+++	++++
Male	0	12	0	0	0	0	0	1	0	8	3	1	7	4	0	0	0	8	1	3	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0
	12	6	0	0	0	0	0	0	1	4	1	1	4	1	0	0	0	5	1	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0
	60	6	0	0	0	0	0	1	1	4	0	1	3	2	0	0	0	1	3	2	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0
	300	12	0	0	0	0	1	1	1	9	0	0	3	9	0	0	0	0	0	11	1	0	0	12	0	0	0	0	0	0
Female	0	12	0	0	0	0	0	1	1	7	3	8	4	0	0	0	0	8	4	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0
	12	6	0	0	0	0	0	2	2	2	0	3	3	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0
	60	6	0	0	0	1	0	2	1	2	0	5	1	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0
	300	12	0	0	3	4	1	0	3	1	0	4	2	5	1	0	0	1	0	6	5	0	0	12	0	0	0	0	0	0
1)	-	<10 mg/dL	+- : 10 - 25 mg/dL										+ : 26 - 85 mg/dL						++ : 86 - 250 mg/dL						+++ : 251 - 600 mg/dL					
2)	-	<5 mg/dL	+- : 5 - 7.5 mg/dL										+ : 7.6 - 30 mg/dL						++ : 31 - 70 mg/dL						+++ : 71 - 125 mg/dL					
3)	-	<30 mg/dL	+- : 30 - 60 mg/dL										+ : 61 - 125 mg/dL						++ : 126 - 250 mg/dL						+++ : 251 - 750 mg/dL					

Table 5-2

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Urinalysis (Week 4 of administration period)

Sex	Dose mg/kg	No.	4) Occult blood					5) Bilirubin					6) Urobilinogen					7) Color		
			-	+	++	+++	++++	-	+	++	+++	++++	++	+	++	+++	++++	LY	Y	DY
Male	0	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	10	2	0	0	0	0	12	0
	12	6	4	2	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0
	60	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0
	300	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	0
Female	0	12	11	0	1	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	0
	12	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0
	60	6	5	1	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0
	300	12	11	0	0	0	1	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	0

4) - : <0.03 mg/dL +- : 0.03 - 0.05 mg/dL + : 0.06 - 0.15 mg/dL ++ : 0.16 - 0.75 mg/dL +++ : >0.75 mg/dL
 5) - : <0.5 mg/dL + : 0.5 - 1.5 mg/dL ++ : 1.6 - 5.0 mg/dL +++ : 5.1 - 10.0 mg/dL ++++ : >10.0 mg/dL
 6) +- : <2.0 mg/dL + : 2.0 - 3.5 mg/dL ++ : 3.6 - 7.0 mg/dL +++ : 7.1 - 12.0 mg/dL ++++ : >12.0 mg/dL
 7) LY : Light yellow Y : Yellow DY : Dark yellow

Table 5-4 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
 Water intake and urinalysis (Week 4 of administration period)

Sex	Dose mg/kg	No.		Water intake mL/24h	Urine volume mL/24h	Osmolality mOsm/kg
Male	0	12	Mean	35	11.1	1990
			S.D.	12	3.8	477
	12	6	Mean	42	11.8	1946
			S.D.	7	3.6	292
	60	6	Mean	41	16.6	1641
			S.D.	8	8.0	330
	300	12	Mean	39	14.2	1734
			S.D.	6	4.7	317
Female	0	12	Mean	27	8.9	1961
			S.D.	5	3.9	504
	12	6	Mean	32	8.9	1919
			S.D.	3	4.8	411
	60	6	Mean	32	10.1	1829
			S.D.	6	2.3	400
	300	12	Mean	32	7.8	1978
			S.D.	7	3.0	448

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 5-5

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
Urinalysis (Week 2 of recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.	pH									1) Protein						2) Ketone body						3) Glucose					
			5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	-	+-	+	++	+++	++++	-	+-	+	++	+++	++++	-	+-	+	++	+++	++++
Male	0	6	0	0	0	0	0	0	1	4	1	2	1	3	0	0	0	3	1	2	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	300	6	0	0	0	0	0	0	0	4	2	2	1	3	0	0	0	2	2	2	0	0	0	6	0	0	0	0	0
Female	0	6	0	0	0	0	0	0	1	5	0	1	4	1	0	0	0	4	1	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	300	6	0	0	1	0	0	1	1	3	0	4	2	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
1)	- : <10 mg/dL		+- : 10 - 25 mg/dL			+ : 26 - 85 mg/dL			++ : 86 - 250 mg/dL			+++ : 251 - 600 mg/dL			++++ : >600 mg/dL														
2)	- : <5 mg/dL		+- : 5 - 7.5 mg/dL			+ : 7.6 - 30 mg/dL			++ : 31 - 70 mg/dL			+++ : 71 - 125 mg/dL			++++ : >125 mg/dL														
3)	- : <30 mg/dL		+- : 30 - 60 mg/dL			+ : 61 - 125 mg/dL			++ : 126 - 250 mg/dL			+++ : 251 - 750 mg/dL			++++ : >750 mg/dL														

Table 5-6

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Urinalysis (Week 2 of recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.	4) Occult blood					5) Bilirubin					6) Urobilinogen					7) Color		
			-	+-	+	++	+++	-	+	++	+++	++++	+-	+	++	+++	++++	LY	Y	DY
Male	0	6	6	0	0	0	0	5	0	1	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0
	300	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0
Female	0	6	5	1	0	0	0	6	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0	6	0
	300	6	5	0	0	1	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0

4) - : <0.03 mg/dL +- : 0.03 - 0.05 mg/dL + : 0.06 - 0.15 mg/dL ++ : 0.16 - 0.75 mg/dL +++ : >0.75 mg/dL
 5) - : <0.5 mg/dL + : 0.5 - 1.5 mg/dL ++ : 1.6 - 5.0 mg/dL +++ : 5.1 - 10.0 mg/dL ++++ : >10.0 mg/dL
 6) +- : <2.0 mg/dL + : 2.0 - 3.5 mg/dL ++ : 3.6 - 7.0 mg/dL +++ : 7.1 - 12.0 mg/dL ++++ : >12.0 mg/dL
 7) LY : Light yellow Y : Yellow DY : Dark yellow

Table 5-7

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Urinalysis (Week 2 of recovery period)

			URINE SEDIMENT																																
Sex	Dose mg/kg	No.	CRYSTALLIZATION																																
			RBC					WBC					SEC					SREC					Cast			PS					CO				
			-	+-	+	++	+++	-	+-	+	++	+++	-	+-	+	++	+++	-	+-	+	++	+++	-	+-	+	-	+-	+	++	+++					
Male	0	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	6	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	
	300	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	6	0	0	5	1	0	0	0	6	0	0	0	0	
Female	0	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	6	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	
	300	6	5	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	6	0	0	4	2	0	0	0	6	0	0	0	0	
SEC : Squamous Epithelial Cell			-					: Negative																											
SREC : Small Round Epithelial Cell			+-					: Slight																											
PS : Phosphate Salts			+					: Mild																											
CO : Calcium Oxalate			++					: Moderate																											
			+++					: Severe																											

Table 5-8 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
Water intake and urinalysis (Week 2 of recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.		Water intake mL/24h	Urine volume mL/24h	Osmolality mOsm/kg
Male	0	6	Mean	39	13.5	1714
			S.D.	5	4.6	309
	300	6	Mean	36	10.8	1966
			S.D.	7	4.6	311
Female	0	6	Mean	25	8.3	2130
			S.D.	7	4.0	723
	300	6	Mean	31	10.9	2006
			S.D.	8	6.3	566

No significant difference between treated group and control group.

Table 6-1 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
Hematology (After administration period)

Sex	Dose mg/kg	No.		RBC ×10 ⁴ /μL	HGB g/dL	HCT %	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	Retic %	PLT ×10 ⁴ /μL	PT s	APTT s	FIB mg/dL
Male	0	6	Mean	804	15.7	44.3	55.1	19.4	35.3	2.3	129.4	14.0	21.9	325
			S.D.	27	0.9	2.4	2.0	0.6	0.3	0.2	12.7	1.4	2.4	55
	12	6	Mean	774	15.2	43.4	56.0	19.7	35.1	2.3	119.3	14.2	21.8	309
			S.D.	25	0.7	1.7	1.8	0.7	0.3	0.4	10.8	1.1	2.1	30
	60	6	Mean	794	15.5	43.9	55.3	19.5	35.3	2.6	123.1	13.9	21.3	299
			S.D.	28	0.4	1.7	2.6	0.7	0.4	0.4	19.9	1.0	2.0	31
	300	6	Mean	793	15.4	43.9	55.3	19.5	35.2	2.4	122.8	13.9	21.6	317
			S.D.	18	0.3	1.5	1.1	0.4	0.8	0.2	11.0	1.2	2.0	30
Female	0	6	Mean	775	14.8	40.9	52.9	19.1	36.2	2.6	137.6	12.1	17.7	260
			S.D.	43	0.7	2.1	1.4	0.6	0.4	0.7	15.8	0.9	1.6	19
	12	6	Mean	782	15.1	41.7	53.3	19.3	36.3	2.0	148.3	12.0	17.3	255
			S.D.	20	0.3	1.1	1.0	0.4	0.4	0.3	11.1	1.2	2.3	27
	60	6	Mean	773	15.4	42.1	54.5	20.0	36.6	2.7	124.6	11.9	17.4	247
			S.D.	47	0.4	1.4	1.9	0.9	0.5	0.6	7.3	0.4	1.0	17
	300	6	Mean	781	15.2	41.9	53.6	19.5	36.3	2.5	144.2	11.4	16.9	255
			S.D.	17	0.4	1.3	1.1	0.4	0.3	0.4	24.5	0.6	3.2	13

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 6-2 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
Hematology (After administration period)

Sex	Dose mg/kg	No.		WBC	Differential leukocyte counts (%)					
				$\times 10^2/\mu\text{L}$	LYMP	NEUT	EOS	BASO	MONO	LUC
Male	0	6	Mean	84.0	78.7	17.7	0.8	0.2	2.0	0.7
			S.D.	15.5	10.4	10.8	0.4	0.1	0.6	0.3
	12	6	Mean	115.5*	82.6	12.9	1.1	0.3	2.0	1.2*
			S.D.	13.1D	4.9	3.9	0.6	0.1	0.8	0.3D
	60	6	Mean	86.8	77.9	18.1	1.0	0.2	2.0	0.8
			S.D.	20.8	3.3	3.4	0.4	0.1	0.5	0.3
	300	6	Mean	91.6	82.6	13.1	1.0	0.3	2.0	1.0
			S.D.	24.6	4.3	4.0	0.3	0.0	0.6	0.3
	0	6	Mean	70.7	77.2	18.8	0.9	0.3	1.7	1.1
			S.D.	16.5	4.9	5.5	0.4	0.1	0.4	0.3
	12	6	Mean	80.5	75.2	20.8	1.4	0.2	1.6	0.8*
			S.D.	30.7	4.8	4.7	0.5	0.1	0.4	0.2D
Female	60	6	Mean	81.2	76.6	19.8	0.9	0.2	1.6	0.9
			S.D.	22.7	6.8	7.0	0.2	0.0	0.3	0.2
	300	6	Mean	95.5	76.2	19.3	1.6**	0.3	1.6	1.0
			S.D.	27.7	7.7	7.5	0.3D	0.1	0.4	0.2

LUC : Large unstained cells

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

D : Dunnett's test

Table 6-3 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
Hematology (After administration period)

Sex	Dose mg/kg	No.	Differential leukocyte counts (X10 ² /μL)						
			LYMP	NEUT	EOS	BASO	MONO	LUC	
Male	0	6	Mean	65.7	15.2	0.7	0.2	1.6	0.6
			S.D.	13.8	10.3	0.2	0.1	0.7	0.2
	12	6	Mean	95.8**	14.5	1.2	0.4**	2.2	1.4**
			S.D.	16.6D	3.2	0.6	0.1D	0.7	0.3D
	60	6	Mean	67.4	15.9	0.9	0.2	1.8	0.7
			S.D.	15.3	5.2	0.5	0.1	0.7	0.3
	300	6	Mean	75.0	12.6	0.9	0.2	1.9	0.9
			S.D.	17.3	6.7	0.4	0.1	1.0	0.5
Female	0	6	Mean	54.7	13.1	0.7	0.2	1.2	0.8
			S.D.	13.7	4.6	0.3	0.1	0.4	0.3
	12	6	Mean	61.2	16.2	1.1	0.2	1.2	0.6
			S.D.	25.2	6.4	0.5	0.1	0.5	0.3
	60	6	Mean	62.4	15.8	0.8	0.2	1.3	0.8
			S.D.	18.5	6.6	0.3	0.1	0.4	0.3
	300	6	Mean	73.3	17.9	1.5**	0.3	1.6	0.9
			S.D.	23.9	7.2	0.5D	0.2	0.7	0.4

LUC : Large unstained cells

** : p<0.01 (Significant difference from control group)

D : Dunnett's test

Table 6-4 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
Hematology (After recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.		RBC ×10 ⁶ /μL	HGB g/dL	HCT %	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	Retic %	PLT ×10 ⁹ /μL	PT s	APTT s	FIB mg/dL
Male	0	6	Mean	877	15.7	46.4	53.0	17.9	33.8	2.1	115.1	13.7	21.0	290
			S.D.	43	0.3	1.1	2.0	0.7	0.5	0.4	13.2	1.7	3.7	22
	300	6	Mean	879	15.6	46.0	52.3	17.8	34.0	2.2	122.9	14.5	21.0	267
			S.D.	26	0.5	1.4	1.4	0.6	0.3	0.2	12.9	2.2	2.2	17
Female	0	6	Mean	845	15.2	43.7	51.8	18.0	34.7	1.8	143.1	12.1	17.8	195
			S.D.	36	0.4	0.8	1.9	0.6	0.6	0.7	14.6	0.6	1.7	25
	300	6	Mean	832	15.3	44.5	53.7	18.4	34.3	1.9	133.2	12.1	18.1	212
			S.D.	43	0.3	1.6	2.9	0.9	0.6	0.4	9.5	0.6	1.5	18

No significant difference between treated group and control group.

Table 6-5 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
Hematology (After recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.		WBC	Differential leukocyte counts (%)					
				$\times 10^3/\mu\text{L}$	LYMP	NEUT	EOS	BASO	MONO	LUC
Male	0	6	Mean	123.3	77.0	18.9	1.1	0.6	1.8	0.6
			S.D.	31.6	6.2	5.6	0.6	0.1	0.5	0.1
	300	6	Mean	123.6	79.2	16.6	1.1	0.5	1.9	0.7
			S.D.	18.9	4.5	4.8	0.3	0.1	0.5	0.2
Female	0	6	Mean	76.2	76.5	19.4	1.6	0.5	1.5	0.5
			S.D.	18.1	5.9	5.6	0.7	0.2	0.4	0.1
	300	6	Mean	73.3	79.2	16.6	1.4	0.4	1.9	0.6
			S.D.	12.3	1.8	2.3	0.4	0.1	0.6	0.3

LUC : Large unstained cells

No significant difference between treated group and control group.

Table 6-6 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
Hematology (After recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.		Differential leukocyte counts ($\times 10^2/\mu\text{L}$)					
				LYMP	NEUT	EOS	BASO	MONO	LUC
Male	0	6	Mean	96.1	22.3	1.3	0.8	2.2	0.7
			S.D.	29.8	6.1	0.3	0.3	0.5	0.2
	300	6	Mean	97.9	20.7	1.3	0.7	2.3	0.8
			S.D.	15.0	8.0	0.5	0.2	0.3	0.2
Female	0	6	Mean	58.4	14.7	1.1	0.4	1.2	0.4
			S.D.	14.8	5.9	0.3	0.2	0.5	0.1
	300	6	Mean	58.0	12.1	1.0	0.3	1.4	0.4
			S.D.	9.8	2.1	0.5	0.1	0.7	0.2

LUC : Large unstained cells

No significant difference between treated group and control group.

Table 7-1 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
 Blood chemistry (After administration period)

Sex	Dose mg/kg	No.		AST IU/L	ALT IU/L	LDH IU/L	γ -GTP IU/L	ALP IU/L	T-CHO mg/dL	TG mg/dL	PL mg/dL	T-BIL mg/dL	GLU mg/dL
Male	0	6	Mean	61	27	50	0	616	57	52	95	0.1	142
			S.D.	8	3	9	1	94	10	23	12	0.1	20
	12	6	Mean	71	28	51	1	755	60	54	103	0.1	140
			S.D.	10	3	9	1	164	7	24	11	0.1	15
	60	6	Mean	66	27	55	1	635	51	49	88	0.1	141
			S.D.	8	5	10	1	66	7	32	12	0.1	11
	300	6	Mean	61	27	57	0	630	60	41	98	0.1	136
			S.D.	4	2	16	0	155	10	20	10	0.1	17
Female	0	6	Mean	80	30	54	1	404	57	12	105	0.1	104
			S.D.	15	13	14	0	88	6	3	11	0.0	7
	12	6	Mean	71	24	60	1	376	55	11	98	0.1	110
			S.D.	11	3	17	0	63	9	7	13	0.0	18
	60	6	Mean	69	24	56	1	313	72	10	117	0.1	108
			S.D.	8	8	11	1	85	15	3	22	0.0	11
	300	6	Mean	71	22	50	1	379	73*	13	120	0.1	103
			S.D.	8	4	10	0	99	11D	7	21	0.0	7

* : $p < 0.05$ (Significant difference from control group)
 D : Dunnett's test

Table 7-2 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
 Blood chemistry (After administration period)

Sex	Dose mg/kg	No.		BUN mg/dL	CRNN mg/dL	Na mmol/L	K mmol/L	Cl mmol/L	Ca mg/dL	P mg/dL	TP g/dL	ALB g/dL	A/G
Male	0	6	Mean	15	0.24	144	4.8	106	9.8	7.9	6.0	3.1	1.04
			S.D.	2	0.02	2	0.3	2	0.3	0.4	0.3	0.2	0.05
	12	6	Mean	13	0.23	144	4.9	107	10.0	7.9	5.9	3.1	1.08
			S.D.	2	0.02	1	0.2	2	0.3	0.6	0.3	0.1	0.06
	60	6	Mean	13	0.21	144	4.9	108	9.7	7.6	6.0	3.1	1.05
			S.D.	2	0.03	1	0.4	2	0.2	0.4	0.3	0.1	0.05
	300	6	Mean	14	0.21	143	4.9	106	9.7	7.9	6.0	3.1	1.08
			S.D.	2	0.02	1	0.3	1	0.2	0.3	0.2	0.1	0.05
Female	0	6	Mean	17	0.28	143	4.7	109	9.8	7.1	6.3	3.4	1.16
			S.D.	2	0.02	1	0.2	1	0.1	0.6	0.3	0.2	0.10
	12	6	Mean	17	0.29	143	4.5	110	10.0	7.1	6.2	3.3	1.15
			S.D.	3	0.04	1	0.1	1	0.2	0.4	0.3	0.2	0.08
	60	6	Mean	16	0.28	143	4.6	109	9.8	7.3	6.2	3.3	1.14
			S.D.	3	0.04	0	0.3	1	0.1	0.4	0.3	0.1	0.09
	300	6	Mean	15	0.27	143	4.4	108	10.0	7.7	6.3	3.3	1.10
			S.D.	2	0.02	2	0.3	3	0.1	0.7	0.3	0.2	0.09

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 7-3

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
 Blood chemistry (After recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.		AST	ALT	LDH	γ -GTP	ALP	T-CHO	TG	PL	T-BIL	GLU
				IU/L	IU/L	IU/L	IU/L	IU/L	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL
Male	0	6	Mean	60	26	43	1	545	55	67	97	0.1	165
			S.D.	9	2	7	0	121	8	24	16	0.0	15
	300	6	Mean	63	28	46	1	567	55	68	96	0.1	146*
			S.D.	5	6	7	0	59	9	41	15	0.0	10T
Female	0	6	Mean	72	32	56	1	255	64	21	115	0.1	115
			S.D.	10	7	12	1	73	13	9	21	0.0	8
	300	6	Mean	61*	24	42*	2	269	69	23	122	0.1	129*
			S.D.	8T	5	6T	1	74	12	10	23	0.0	10T

* : $p < 0.05$ (Significant difference from control group)

T : Student's t-test

Table 7-4 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
 Blood chemistry (After recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.		BUN mg/dL	CRNN mg/dL	Na mmol/L	K mmol/L	Cl mmol/L	Ca mg/dL	P mg/dL	TP g/dL	ALB g/dL	A/G
Male	0	6	Mean	14	0.26	144	4.2	106	9.9	7.5	6.1	3.3	1.14
			S.D.	1	0.03	2	0.3	3	0.2	0.6	0.2	0.1	0.10
	300	6	Mean	15	0.26	144	4.4	106	9.8	7.7	6.1	3.2	1.10
			S.D.	1	0.02	1	0.4	1	0.2	0.3	0.3	0.1	0.08
Female	0	6	Mean	18	0.29	142	4.5	109	9.8	6.1	6.6	3.7	1.25
			S.D.	2	0.03	1	0.2	2	0.4	0.5	0.5	0.4	0.08
	300	6	Mean	18	0.28	142	4.3	109	9.8	6.1	6.5	3.4	1.13*
			S.D.	1	0.03	1	0.2	2	0.2	0.9	0.3	0.2	0.06T

* : p<0.05 (Significant difference from control group)

T : Student's t-test

Table 8-1

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (After administration period)

Male

	Dose mg/kg		Body weight	Brain	Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney (R+L)	Adrenal (R+L)
			g	g(g/100g BW)	mg(mg/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	374	2.02	496	1.20	10.75	0.60	2.71	66
		S.D.	24	0.06	109	0.09	1.11	0.06	0.10	7
	12	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	388	2.02	558	1.32	11.08	0.73	2.94	66
		S.D.	41	0.09	188	0.11	1.48	0.09	0.32	8
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	376	2.10	536	1.24	11.35	0.72	2.93*	68
		S.D.	31	0.09	138	0.09	1.49	0.10	0.06DT	4
	300	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	392	2.00	514	1.32	12.88*	0.68	3.20**	61
		S.D.	27	0.12	58	0.13	1.45D	0.14	0.22DT	12
Relative	0	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.54	132	0.32	2.87	0.16	0.73	18
		S.D.		0.04	27	0.02	0.14	0.01	0.04	1
	12	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.53	141	0.35	2.85	0.19	0.76	17
		S.D.		0.07	35	0.02	0.11	0.03	0.04	1
	60	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.56	142	0.33	3.01	0.19	0.78	18
		S.D.		0.06	30	0.02	0.20	0.02	0.06	2
	300	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.51	131	0.34	3.28**	0.17	0.82*	16
		S.D.		0.05	14	0.03	0.21D	0.03	0.07D	3

* : p<0.05 ; ** : p<0.01 (Significant difference from control group)

D : Dunnett's test

DT : Dunnett-type rank test

Table 8-2

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (After administration period)

Male

		Testis (R+L) g(g/100g BW)		Epididymis (R+L) mg(mg/100g BW)	
Dose mg/kg					
Absolute	0	No.	6	6	
		Mean	3.25	844	
		S.D.	0.28	65	
	12	No.	6	6	
		Mean	3.05	834	
		S.D.	0.13	63	
	60	No.	6	6	
		Mean	3.04	825	
		S.D.	0.25	61	
	300	No.	6	6	
		Mean	2.92	804	
		S.D.	0.75	119	
Relative	0	No.	6	6	
		Mean	0.87	226	
		S.D.	0.04	9	
	12	No.	6	6	
		Mean	0.80	217	
		S.D.	0.09	27	
	60	No.	6	6	
		Mean	0.81	221	
		S.D.	0.08	25	
	300	No.	6	6	
		Mean	0.75	206	
		S.D.	0.20	32	

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 8-3

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (After administration period)

Female

	Dose mg/kg		Body weight	Brain	Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney (R+L)	Adrenal (R+L)
			g	g(g/100g BW)	mg(mg/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	235	1.89	471	0.82	6.57	0.49	1.82	75
		S.D.	22	0.08	74	0.09	0.55	0.13	0.20	7
	12	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	240	1.90	520	0.82	6.83	0.49	1.78	77
		S.D.	9	0.02	123	0.04	0.62	0.10	0.11	10
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	237	1.90	501	0.81	6.62	0.58	1.81	75
		S.D.	9	0.05	110	0.03	0.39	0.09	0.11	7
	300	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	243	1.89	478	0.85	7.46*	0.53	1.86	72
		S.D.	14	0.10	126	0.08	0.44D	0.08	0.16	10
Relative	0	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.81	200	0.35	2.80	0.21	0.78	32
		S.D.		0.09	22	0.02	0.16	0.04	0.04	3
	12	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.79	217	0.34	2.85	0.21	0.74	32
		S.D.		0.03	50	0.02	0.17	0.04	0.05	4
	60	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.80	213	0.34	2.80	0.24	0.76	32
		S.D.		0.05	53	0.02	0.12	0.04	0.05	3
	300	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.78	196	0.35	3.08**	0.22	0.77	30
		S.D.		0.06	44	0.02	0.08D	0.03	0.06	3

* : p<0.05 ; ** : p<0.01 (Significant difference from control group)

D : Dunnett's test

Table 8-4

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (After administration period)

Female

		Ovary (R+L)		Uterus
Dose mg/kg		mg(mg/100g BW)		mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	6	6
		Mean	86.9	539
		S.D.	16.4	112
	12	No.	6	6
		Mean	92.9	459
		S.D.	17.0	89
	60	No.	6	6
		Mean	96.0	492
		S.D.	8.4	89
	300	No.	6	6
		Mean	94.8	469
		S.D.	13.4	156
Relative	0	No.	6	6
		Mean	37.1	231
		S.D.	7.3	52
	12	No.	6	6
		Mean	38.8	192
		S.D.	7.1	39
	60	No.	6	6
		Mean	40.6	208
		S.D.	3.7	39
	300	No.	6	6
		Mean	38.9	196
		S.D.	3.4	74

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 8-5 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
 Absolute and relative organ weight (After recovery period)
 Male

	Dose mg/kg		Body weight	Brain	Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney (R+L)	Adrenal (R+L)
			g	g(g/100g BW)	mg(mg/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	462	2.09	469	1.37	13.89	0.80	3.07	66
		S.D.	16	0.08	78	0.05	1.26	0.12	0.25	10
	300	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	440	2.09	524	1.34	12.15	0.80	2.95	70
		S.D.	30	0.07	72	0.10	1.55	0.14	0.18	9
Relative	0	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.45	102	0.30	3.01	0.17	0.66	14
		S.D.		0.02	18	0.02	0.19	0.02	0.04	2
	300	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.48	119	0.31	2.76	0.18	0.67	16
		S.D.		0.03	11	0.03	0.23	0.03	0.05	2

No significant difference between treated group and control group.

Table 8-6 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
 Absolute and relative organ weight (After recovery period)
 Male

		Testis (R+L) g(g/100g BW)		Epididymis (R+L) mg(mg/100g BW)	
Dose mg/kg					
Absolute	0	No.	6	6	
		Mean	3.34	1095	
		S.D.	0.26	51	
	300	No.	6	6	
		Mean	3.35	1132	
		S.D.	0.38	76	
Relative	0	No.	6	6	
		Mean	0.72	237	
		S.D.	0.04	10	
	300	No.	6	6	
		Mean	0.76	258*	
		S.D.	0.08	18T	

* : $p < 0.05$ (Significant difference from control group)

T : Student's t-test

Table 8-7

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (After recovery period)

Female

Dose mg/kg	Body weight		Brain	Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney (R+L)	Adrenal (R+L)
	g		g(g/100g BW)	mg(mg/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	269	1.92	385	0.89	7.14	0.57	1.84
		S.D.	9	0.08	59	0.05	0.48	0.10	0.14
	300	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	264	1.90	386	0.88	7.14	0.53	1.97
		S.D.	15	0.06	53	0.08	0.77	0.04	0.22
Relative	0	No.		6	6	6	6	6	6
		Mean		0.71	143	0.33	2.66	0.21	0.69
		S.D.		0.03	22	0.01	0.16	0.04	0.06
	300	No.		6	6	6	6	6	6
		Mean		0.72	147	0.33	2.69	0.20	0.75
		S.D.		0.04	23	0.02	0.15	0.02	0.08

No significant difference between treated group and control group.

Table 8-8 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
 Absolute and relative organ weight (After recovery period)
 Female

		Ovary (R+L)		Uterus
Dose mg/kg		mg(mg/100g BW)		mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	6	6
		Mean	89.5	488
		S.D.	11.3	146
	300	No.	6	6
		Mean	98.4	523
		S.D.	32.1	80
Relative	0	No.	6	6
		Mean	33.4	182
		S.D.	4.2	54
	300	No.	6	6
		Mean	37.0	198
		S.D.	11.0	28

No significant difference between treated group and control group.

Table 9-1

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Gross pathological findings (After administration period)

Organs	Sex:	M	M	M	M	F	F	F	F
Findings	Dose(mg/kg): Number:	0 6	12 6	60 6	300 6	0 6	12 6	60 6	300 6
General descriptions									
Excoriation		1	0	0	0	0	0	0	0
Epididymis									
Small		0	0	0	1	-	-	-	-
Stomach									
Thickening, wall, forestomach		0	0	0	2	0	0	0	5
Testis									
Small		0	0	0	1	-	-	-	-
Thyroid									
Small		0	1	0	0	0	0	0	0

M : Male, F : Female

- : Not applicable

Table 9-2 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
Gross pathological findings (After recovery period)

Organs	Dose(mg/kg):	Sex: Number:	M 0 6	M 300 6	F 0 6	F 300 6
Findings						
All tissues						
Not remarkable			6	6	6	6

M : Male, F : Female

Table 10-1

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Histopathological findings (After administration period)

Organs	Sex:	M	M	M	M	F	F	F	F
Findings	Dose(mg/kg): Number:	0 6	12 6	60 6	300 6	0 6	12 6	60 6	300 6
Adrenal									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Bone+Bone marrow,femoral									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Bone+Bone marrow, sternal									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Cerebellum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Cerebrum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Epididymis									
Number examined		6	0	0	6	-	-	-	-
Not remarkable		6	0	0	5	-	-	-	-
Hypospermia		0	0	0	1	-	-	-	-
moderate		0	0	0	1	-	-	-	-
Cell debris		0	0	0	1	-	-	-	-
minimal		0	0	0	1	-	-	-	-
Eye									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	5	0	0	6
Atrophy,retinal		0	0	0	0	1	0	0	0
minimal		0	0	0	0	1	0	0	0
Keratitis		0	0	0	0	1	0	0	0
minimal		0	0	0	0	1	0	0	0
Heart									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		4	0	0	6	6	0	0	6
Myocarditis,focal		2	0	0	0	0	0	0	0
minimal		2	0	0	0	0	0	0	0
Intestine,duodenum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine,jejunum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine,ileum(Peyer's patch)									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine,cecum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine,colon									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6

M : Male, F : Female

- : Not applicable

Table 10-2 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
Histopathological findings (After administration period)

Organs	Sex:	M	M	M	M	F	F	F	F
Dose(mg/kg):	Number:	0	12	60	300	0	12	60	300
Findings		6	6	6	6	6	6	6	6
Intestine, rectum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Kidney									
Number examined		6	6	6	6	6	0	0	6
Not remarkable		5	4	3	0	3	0	0	6
Regeneration, tubular		0	2	1	4	3	0	0	0
minimal		0	2	1	4	3	0	0	0
Eosinophilic body, tubular cell		1	0	3	6	0	0	0	0
minimal		1	0	3	4	0	0	0	0
mild		0	0	0	2	0	0	0	0
Fibrosis		0	0	0	0	1	0	0	0
minimal		0	0	0	0	1	0	0	0
Kidney(alpha2u globulin)									
Number examined		1	0	0	2	0	0	0	0
Alpha2u globulin, immunohistochemistry		1	0	0	2	0	0	0	0
positive		1	0	0	2	0	0	0	0
Kidney(PAS stain)									
Number examined		1	0	0	2	0	0	0	0
PAS reaction		1	0	0	2	0	0	0	0
negative		1	0	0	2	0	0	0	0
Liver									
Number examined		6	6	6	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	5	5	2	2	0	0	1
Vacuolation, hepatocyte, periportal		0	0	0	0	3	0	0	4
minimal		0	0	0	0	2	0	0	2
mild		0	0	0	0	1	0	0	2
Microgranuloma		0	1	1	1	1	0	0	2
minimal		0	1	1	1	1	0	0	2
Hypertrophy, hepatocytic, central		0	0	0	4	0	0	0	0
minimal		0	0	0	4	0	0	0	0
Lung(bronchus)									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		5	0	0	5	5	0	0	6
Accumulation, foamy cell		0	0	0	1	1	0	0	0
minimal		0	0	0	1	1	0	0	0
Pneumonia, focal		1	0	0	0	0	0	0	0
minimal		1	0	0	0	0	0	0	0
Lymph node, mesenteric									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Lymph node, submandibular									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Ovary									
Number examined		-	-	-	-	6	0	0	6
Not remarkable		-	-	-	-	6	0	0	6
Parathyroid									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Pituitary									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		5	0	0	6	6	0	0	6
Cyst		1	0	0	0	0	0	0	0
minimal		1	0	0	0	0	0	0	0

M : Male, F : Female
- : Not applicable

Table 10-3 A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
Histopathological findings (After administration period)

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	M 0 6	M 12 6	M 60 6	M 300 6	F 0 6	F 12 6	F 60 6	F 300 6
Findings									
Prostate									
Number examined		6	0	0	6	-	-	-	-
Not remarkable		6	0	0	5	-	-	-	-
Cell infiltration, interstitial		0	0	0	1	-	-	-	-
minimal		0	0	0	1	-	-	-	-
Sciatic nerve									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Skeletal muscle, femoral									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	4	0	0	5
Degeneration, muscular		0	0	0	0	2	0	0	1
minimal		0	0	0	0	2	0	0	1
Spinal cord, thoracic									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Spleen									
Number examined		6	6	6	6	6	6	6	6
Not remarkable		6	3	3	4	5	4	3	3
Hematopoiesis, extramedullary		0	3	3	2	1	2	3	3
minimal		0	3	3	2	1	2	3	3
Stomach									
Number examined		6	6	6	6	6	6	6	6
Not remarkable		6	6	6	1	6	6	6	0
Hyperplasia, squamous, forestomach		0	0	0	5	0	0	0	6
minimal		0	0	0	4	0	0	0	6
mild		0	0	0	1	0	0	0	0
Hyperplasia, squamous, limiting ridge		0	0	0	2	0	0	0	4
minimal		0	0	0	1	0	0	0	4
mild		0	0	0	1	0	0	0	0
Testis									
Number examined		6	0	0	6	-	-	-	-
Not remarkable		6	0	0	5	-	-	-	-
Atrophy, seminiferous tubular		0	0	0	1	-	-	-	-
moderate		0	0	0	1	-	-	-	-
Thymus									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Thyroid									
Number examined		6	1	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	1	0	6	6	0	0	6
Trachea									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Urinary bladder									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6

M : Male, F : Female
- : Not applicable

Table 10-4

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks

Histopathological findings (After administration period)

Organs	Sex:	M	M	M	M	F	F	F	F
Findings	Dose(mg/kg): Number:	0 6	12 6	60 6	300 6	0 6	12 6	60 6	300 6
Uterus									
Number examined		-	-	-	-	6	0	0	6
Not remarkable		-	-	-	-	6	0	0	6
Skin, cervical									
Number examined		1	0	0	0	0	0	0	0
Ulcer		1	0	0	0	0	0	0	0
mild		1	0	0	0	0	0	0	0

M : Male, F : Female

- : Not applicable

Table 10-5

A 28-day oral toxicity study of 4-phenylbutenone in rats with a recovery period of 2 weeks
 Histopathological findings (After recovery period)

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	M 0 6	M 300 6	F 0 6	F 300 6
Findings					
Kidney					
Number examined		6	6	0	0
Not remarkable		0	2	0	0
Regeneration, tubular		5	3	0	0
minimal		5	3	0	0
Eosinophilic body, tubular cell		1	3	0	0
minimal		1	3	0	0
Urinary cast, hyaline		1	0	0	0
minimal		1	0	0	0
Liver					
Number examined		6	6	0	0
Not remarkable		4	5	0	0
Vacuolation, hepatocyte, periportal		1	0	0	0
mild		1	0	0	0
Microgranuloma		0	1	0	0
minimal		0	1	0	0
Necrosis, hepatocyte, focal		1	0	0	0
minimal		1	0	0	0
Spleen					
Number examined		6	6	6	6
Not remarkable		4	4	5	5
Hematopoiesis, extramedullary		2	2	1	1
minimal		2	2	1	1
Stomach					
Number examined		6	6	6	6
Not remarkable		6	6	5	5
Erosion, glandular stomach		0	0	1	1
minimal		0	0	1	1

M : Male, F : Female