

食薬セ研第11-1741号

2001年 6月15日

ディスパーズイエロー42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)

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

【 目 次 】

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	4
5. 投与方法	5
6. 検査項目	5
7. データ解析法	8
結 果	9
1. 死亡例	9
2. 一般状態	9
3. 体重	9
4. 摂餌量	9
5. 尿検査所見	9
6. 血液学検査所見	9
7. 血液生化学検査所見	9
8. 病理学検査所見	10
考 察	12
文 献	14
Annex 1	

Figures 1~2

Tables 1~9

【 要 約 】

ディスパーズイエロー42（以下 DY42 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 0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液を、他の3群には被験物質を、それぞれ 100、300 および 1000 mg/kg の用量で28日間にわたり強制経口投与した。動物数は、雌雄とも対照群および 1000 mg/kg 投与群では回復試験に用いる動物を含む各10匹、その他の群は各5匹とした。今回の試験において認められた主な変化を以下に要約する。

投与期間および回復試験期間中に死亡例はなく、一般状態の観察、体重および摂餌量の測定、尿検査、血液学および生化学検査においても異常はみられなかった。病理学検査では 1000 mg/kg 投与群の雌に肝臓相対重量の有意な増加、脾臓の絶対重量および相対重量の有意な増加がみられ、組織学的に 1000 mg/kg 投与群の雄の肝臓に小葉中心性肝細胞肥大が認められた。これらのことから、本試験条件下におけるDY42の無作用量は、雌雄とも 300 mg/kg/day であると考えられる。

【 緒 言 】

OECD既存化学物質安全性点検等に係わる毒性調査の一環として、ディスパーズイエロー42の安全性確認の資料を得るために、ラットを用いる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、「化審法毒性試験法、スクリーニング毒性試験－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）に準拠して実施した。

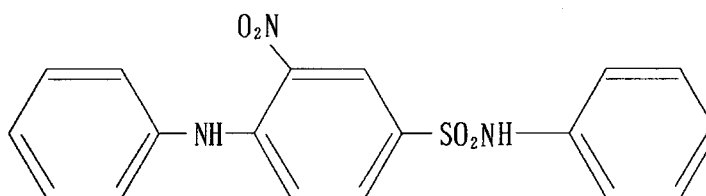
【方 法】

1. 被験物質

被験物質として用いたディスパースイエロー42（以下 DY42 と略記）の性状は下記のとおりである。

化学名	ディスパーズイエロー42
別名	C. I. Disperse Yellow 42
英名	Disperse Yellow 42
CAS No.	5124-25-4
分子量	369.40
分子式	$C_{18}H_{15}O_4N_3S$
物理化学的性質	性状：黄土色の湿潤品 融点：150℃以上

構造式



本試験には、より提供された DY42（ロット番号 、純度68wt
%、不純物、水分：32wt%）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。使用した被験物質は、に返却し、再
度品質試験を実施した。その結果、固形分は80.2%であり、乾燥後の純度は 99.63%であ
った（Annex 1）。固形分の値が試験開始時よりも高値を示したのは、被験物質の自然乾燥
によるものと思われ、乾燥後の純度が十分に高い値を示していることから、試験期間中は
安定であったと判断された。

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て8日間にわたり予備飼育した後、一般状態に異常の見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、基準温度22~25℃、基準湿度50~65%、換気回数約15回／

(注1) 動物購入日：2000年4月10日 入荷時体重：雄；71.0～81.5 g (平均 75.1 g)
 入荷匹数：雄；34匹、雌；34匹 雌；63.9～75.5 g (平均 68.6 g)

(注2) 投与開始日： 2000年4月18日 投与開始時体重：雄；137.9~164.2 g
雌；119.3~140.9 g

時、照明12時間（7時～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）を自由摂取させて飼育した。なお、飼育期間中、飼育室の温度の実測値は、基準値の範囲内にあり、湿度の実測値は、基準値をはずれることはあったものの、1時間以内に基準値の範囲内に回復した（注3）。また、供給した飼料および水には、試験に支障をきた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動物番号を標識し、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

DY42を、0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム（以下 CMC Na と略記）水溶液（日本薬局方カルメロースナトリウム、製造 丸石製薬株式会社、製造番号 6Z09；日本薬局方注射用水：光製薬株式会社、製造番号 9707SA）に懸濁して DY42 として 20 w/v % 懸濁液を調製し、同懸濁液から所定濃度となるように 0.5% CMC Na 水溶液を加えて段階希釈した。調製頻度は週1回とし、投与時まで冷蔵、密封、遮光下で保存した。なお、供給物質中の DY42濃度が 68 wt%であったため、調製時の供給物質濃度を 29.4 w/v %（1000 mg/kg）として調製し、所定含量の投与検体を得た。

本試験に先立ち、被験物質の2および20 w/v%懸濁液について、冷蔵、遮光条件下における調整後8日間の安定性(Appendix A)を確認したため、投与検体は1週に1回の割合で調製し、使用時まで冷蔵、遮光下で保管した。また、秦野研究所にて、初回に調製した各濃度の投与検体中の被験物質の含量(Appendix B)および均一性(Appendix C)を測定した結果、規定範囲内にあることを確認した。（分析方法は Appendix D）

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-99-013、投与量：0、100、300 および 1000 mg/kg）の結果に基づき決定した。すなわち、DY42を7日間反復経口投与することにより、1000 mg/kg 投与群で軽度の黄色調の便が観察されたほかには、一般状態に異常は認められなかった。また、体重はほぼ順調に増加し、剖検においても被

（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 48.5～60.0%

験物質投与に起因したと思われる肉眼的変化はみられなかった。これらのことから、本試験の用量は、高用量を 1000 mg/kg とし、以下公比約 3 で除して 300 および 100 mg/kg を中用量および低用量とした。また、雌雄とも媒体である 0.5% CMC Na 水溶液を投与する対照群を設けた。

雌雄とも投与期間終了後14日間の回復試験を行う対照群および 1000 mg/kg 投与群は各 10匹、その他の群は各 5 匹とした。

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)	供給物質濃度 (w/v %)	DY42濃度 (w/v %)	投与容量 ⁽¹⁾ (mL/kg)	動物番号		剖検時期
						雄	雌	
対照群	0.5%CMC Na 水溶液	0	0	0	5	1~5	31~35	回復
						6~10	36~40	投与
低用量群	DY42	100	2.9	2	5	11~15	41~45	投与
中用量群	DY42	300	8.8	6	5	16~20	46~50	投与
高用量群	DY42	1000	29.4	20	5	21~25	51~55	回復
						26~30	56~60	投与

(1) 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。

回復：投与期間終了後は回復試験を行い、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。投与時刻は 9 時から12時の間とし、1 日 1 回、28日間計28回、ラット用胃管を用いて強制経口投与した。投与容量は 5 mL/kg とし、各投与時の最近時の体重をもとに個体別に算出した。

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 1 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

各群とも全例について、投与期間終了週（投与第23日）および回復試験期間終了週（回復第9日）に動物を代謝ケージに収容し、4時間尿あるいは新鮮尿を採取して、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 pH・潜血・蛋白・糖・ケトン体 ウロビリノーゲン・ビリルビン	視診 試験紙法 同上	— クリテック 200+ (バイエル・三共) 同上

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）は、全例採血前（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。なお、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は、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として用いて採取し、4℃で遠心分離（3000rpm、15分間）した後、血漿を用いた。

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 (ダイバット)
白血球数 (WBC)	同上（フローサイトメトリ・レーザー光散乱法/ 電気抵抗法）	同上
白血球分類	同上（フローサイトメトリ・レーザー光散乱法 ^{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 ^{b)}	Brecher 法	光学顕微鏡
プロトロンビン 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、結果は採用しなかった。
b) 採血時に全例の網状赤血球標本を作製したが、赤血球系の検査項目において被験物質投与に起因する可能性のある変化が認められなかったため、検査は実施しなかった。

4) 血液生化学検査

前述の採血に引き続き、全例からヘパリンを抗凝固剤として採取した血液を4℃で遠心分離(3000rpm、15分間)し、血漿を用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 G.DH 法	同上
クレアチニン濃度	Jaffé 法(Rate)	同上
ALP 活性	GSCC法	同上
GOT(AST)活性	IFCC法	同上
GPT(ALT)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
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、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、心臓、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、精巣、精巣上体、卵巣、

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で固定し(長期保存は、0.1 M リン酸緩衝10%ホルマリン溶液を使用した)、その他の器官・組織は、0.1 M リン酸緩衝10%ホルマリン溶液で固定した。さらに、投与期間終了時の全群の*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・エオジン染色標本作製した。その後、光学顕微鏡を用いて、対照群および高用量群の組織学検査を実施した。また、肉眼的異常が認められた器官・組織の標本作製し、組織学検査を行った。

その結果、投与期間終了時の対照群と高用量群の組織学検査において、雄の肝臓に被験物質投与との関連が疑われる変化が認められたため、雄の他の群でも肝臓の組織学検査を実施した。

固定・保存器官・組織

脳、下垂体、脊髄、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、卵巣*、子宮、膣、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、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、摂餌量および定期解剖例の血液学検査、血液生化学検査の値ならびに器官重量は、群ごとに平均値および標準偏差を求めた。また、試験群の構成が対照群を含めて3群以上あった場合は、Bartlettの方法により分散の一樣性について検定（有意水準：5%）を行った。分散が一樣である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、分散が一樣でない場合は、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法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群となった場合には、対照群と被験物質投与群の各平均値の差の検定は、各群の平均値および標準偏差を求めた後、F-検定（有意水準：5%）を行い、等分散の場合はStudentのt検定法、不等分散の場合はAspin-Welchのt検定法（いずれも両側検定）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。さらに、病理組織所見中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直接確率片側検定法により、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死亡例はなかった。

2. 一般状態

いずれの群にも異常はみられなかった。

3. 体重 (Fig. 1、Table 1、Appendix 1)

いずれの群にも有意な変化はみられなかった。

4. 摂餌量 (Fig. 2、Table 2、Appendix 2)

いずれの群にも有意な変化はみられなかった。

5. 尿検査所見 (Table 3、Appendix 3)

投与期間終了週の尿検査では、1000 mg/kg 投与群の雌雄で黄色調を呈する例が多くみられた。回復試験期間終了週では、1000 mg/kg 投与群の雄1例の尿が黄色調であったが、他の例および雌では対照群と比較して差はなかった。

6. 血液学検査所見 (Table 4、Appendix 4)

投与期間終了時の雄では有意な差はみられなかった。雌では100および1000 mg/kg 投与群でプロトロンビン時間が有意に短縮した。回復試験期間終了時では、雄の赤血球数、血色素量およびヘマトクリット値がいずれも有意な低値を示したが、雌では有意な差はみられなかった。

7. 血液生化学検査所見 (Table 5、Appendix 5)

投与期間終了時では、100 mg/kg 投与群の雄のアルブミン濃度が有意な高値を示した。雌に有意な差はなかった。回復試験期間終了時では雌の無機リン濃度が有意な高値を示したが、雄では有意な差はなかった。

8. 病理学検査所見

1) 器官重量 (Table 6, 7, Appendix 6, 7)

投与期間終了時の雄に有意な変化はみられなかった。雌では 300 および 1000 mg/kg 投与群の脾臓絶対重量が有意な高値を示し、300 mg/kg 投与群の脳の相対重量が有意な低値を、1000 mg/kg 投与群の肝臓および脾臓の相対重量が有意な高値を示した。

回復試験終了時でも雄に有意な変化はなかった。雌では 1000 mg/kg 投与群の胸腺の絶対重量が有意な低値を、腎臓の相対重量が有意な高値を示した。

2) 肉眼的所見 (Table 8, Appendix 8)

(1) 投与期間終了時解剖例

肝臓では、1000 mg/kg 投与群の雌 1 例に腫大がみられ、300 mg/kg 投与群の雄 1 例に淡色域が認められた。また、300 mg/kg 投与群の雄 1 例に下顎リンパ節の腫大がみられたが、この他に変化は観察されなかった。

(2) 回復試験期間終了時解剖例

1000 mg/kg 投与群の雄 1 例の胸腺に小型化が、同群の雌 1 例の腺胃粘膜に淡赤色域が認められたほか、対照群の雄 1 例の胸腺に赤色域が、同群の雌 1 例の卵管に嚢胞がみられた。

3) 病理組織学的所見 (Table 9, Appendix 9)

(1) 投与期間終了時解剖例

肝臓では、1000 mg/kg 投与群の雄 3 例に小葉中心性の肝細胞肥大が認められた (Photo 1, 2)。他の群の雄および 1000 mg/kg 投与群の雌に、同様の変化は確認できなかった。また、各群の雄、観察した対照群および 1000 mg/kg 投与群の雌に門脈周囲性の脂肪化や小肉芽腫がみられたが、対照群と各被験物質投与群との間に頻度および程度の明らかな差は認められなかった。その他、1000 mg/kg 投与群の雌 1 例には、小葉中心部肝細胞の細胞質に空胞化がみられた。剖検時に腫大が観察された 1000 mg/kg 投与群の雌 1 例には、他の例に比較して多数の小肉芽腫が認められたほか、淡色域が観察された 300 mg/kg 投与群の雄 1 例には、被膜下に出血および鉍質沈着を伴う限局性の壊死が認められた。

腎臓では、対照群および 1000 mg/kg 投与群の雌雄の皮質に好塩基性尿細管が、雄には好酸性小体がみられたが、両群間に頻度および程度の明らかな差は認められなかった。そ

の他、対照群の雌に鉍質沈着がみられた。

脾臓では、対照群および 1000 mg/kg 投与群の雌雄全例に髄外造血がみられたが、両群間に程度の差は認められなかった。

副腎、心臓、精巣、精巣上体、卵巣および剖検時に腫大が観察された下顎リンパ節に、異常は認められなかった。

(2)回復試験期間終了時解剖例

雄の肝臓では、1000 mg/kg 投与群の 1 例に小葉中心性の肝細胞肥大がみられた。また、両群に門脈周囲性の脂肪化や小肉芽腫がみられたが、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、1000 mg/kg 投与群の被膜下に限局性の壊死がみられた。

剖検時に嚢胞が観察された対照群の雌の卵管には、腔の嚢胞状拡張が認められた。一方、剖検時に小型化あるいは赤色域が見られた各雄 1 例の胸腺および淡赤色域がみられた雌 1 例の腺胃粘膜に、組織学的な異常はみられなかった。

【考 察】

DY42を 100、300 および 1000 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。その結果、死亡例はなく、一般状態の観察でも異常はみられなかった。体重および摂餌量の推移、また尿検査でも明らかな毒性変化はなく、投与期間終了時の血液学検査および血液生化学検査においても対照群と被験物質投与群との間に顕著な差はみられなかった。病理学的検査では、肝臓に被験物質によると考えられる変化が生じた。すなわち、1000 mg/kg 投与群では雌の肝臓の相対重量が有意な高値を示し、雄では肝重量に有意な差はなかったが組織学的にごく軽度の小葉中心性の肝細胞肥大がみられた。

尿検査で、黄色調の尿が雌雄の 1000 mg/kg 投与群の投与期間終了時屠殺例に認められた。同様の色調変化は急性経口投与毒性試験¹⁾でも認められているが、観察第2日には正常に復し、本試験でも回復試験終了週の尿検査では対照群とほぼ同様の結果であったことから、投与検体の色調に由来するもので、毒性によるものではないと判断した。

血液学検査では、回復試験期間終了時に雄で赤血球数、血色素量およびヘマトクリット値が有意な低値を示したが、投与期間終了時に異常はなく、被験物質投与との関連は明らかではなかった。血液生化学検査における有意差も散発的で、被験物質投与との関連は乏しいと考えられた。

病理学検査でみられた肝臓重量の増加および小葉中心性肝細胞肥大は用量依存性があり、被験物質投与によると思われる。しかし、その程度は軽度で、雄では肝細胞肥大がみられたものの重量に有意差はなく、雌では相対重量は有意に増加したが、明らかな肝細胞肥大は認められなかった。回復試験例では、変化はほぼ修復していた。また、雌では脾臓の絶対重量が 300 および 1000 mg/kg 投与群で有意な高値を示したが、相対重量は 1000 mg/kg 投与群にのみ有意な高値がみられた。雌 300 mg/kg 投与群の脾臓の相対重量に有意差がみられなかったのは、雌 300 mg/kg 投与群の解剖時体重が他の群より高値であるためと思われた。雄でも有意差はないものの、脾臓重量は増加傾向を示した。しかし、雌雄とも脾臓に組織学的な変化はなかった。器官重量に有意差を示したその他の器官については、被験物質との関連は明らかではなかった。

以上のように、DY42を反復投与することにより、肝臓では 1000 mg/kg 投与群の雄に小葉中心性肝細胞肥大が、雌に相対重量の有意な増加があり、脾臓では 1000 mg/kg 投与群

の雌に絶対重量および相対重量の有意な増加がみられた。これらのことから、本試験条件下におけるDY42の無作用量は、雌雄とも 300 mg/kg/day であると考えられる。

【 文 献 】

- 1) : ディスパーズイエロー42 のラットを用いる急性経口投与毒性試験
財団法人食品薬品安全センター秦野研究所・試験報告書、食薬セ研第11-1738号(2001)

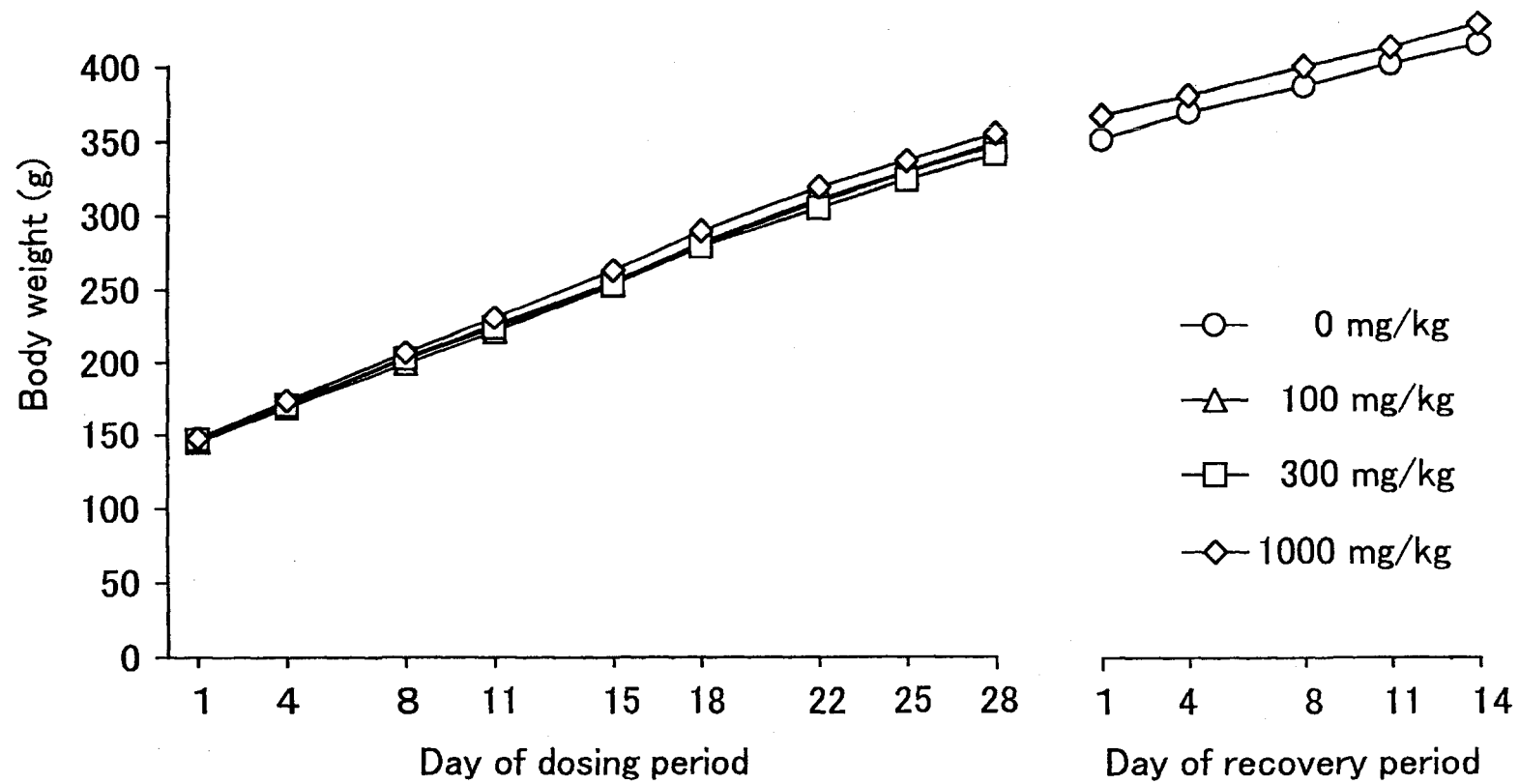


Fig. 1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Body weight changes in males

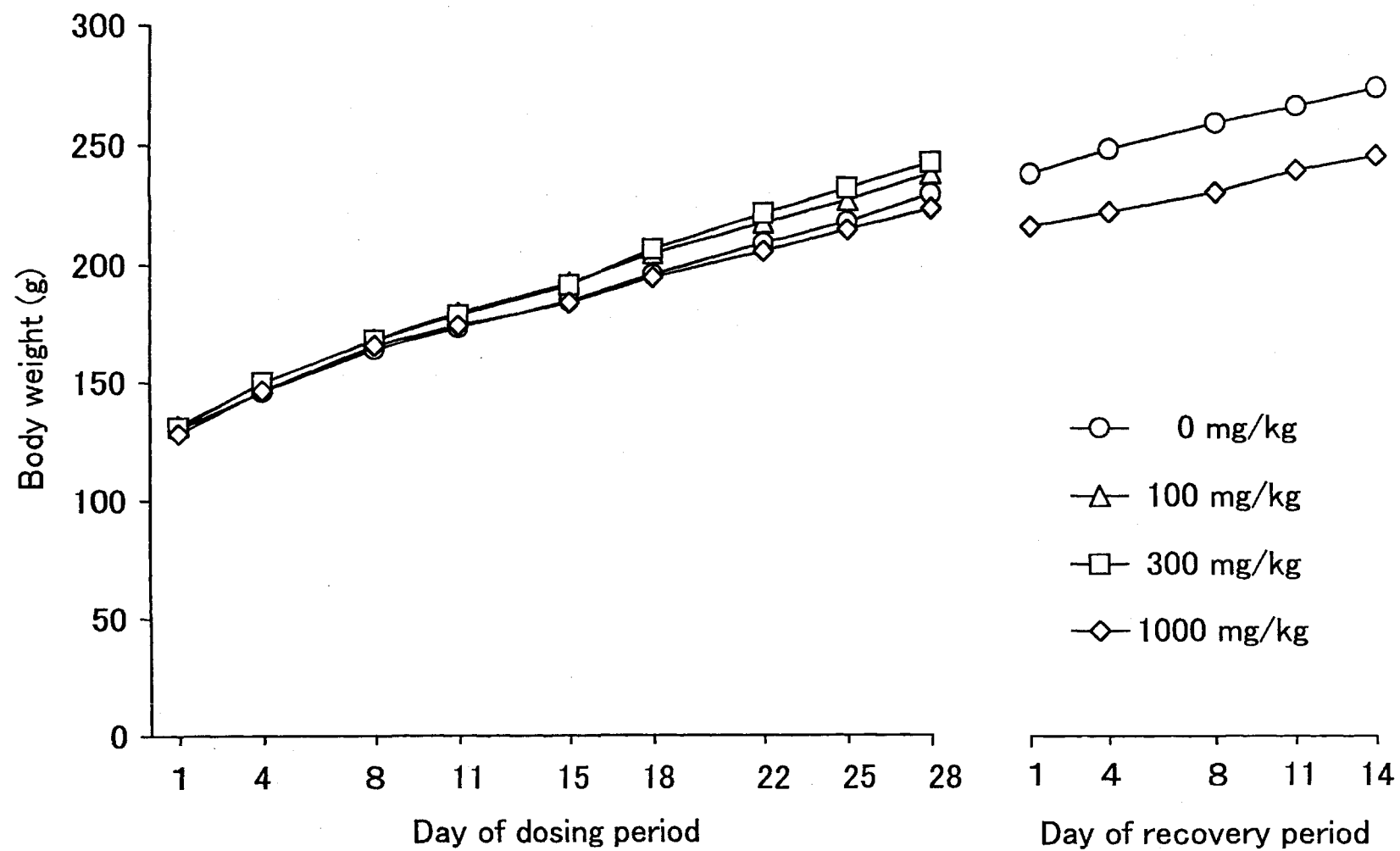


Fig. 1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42

Body weight changes in females

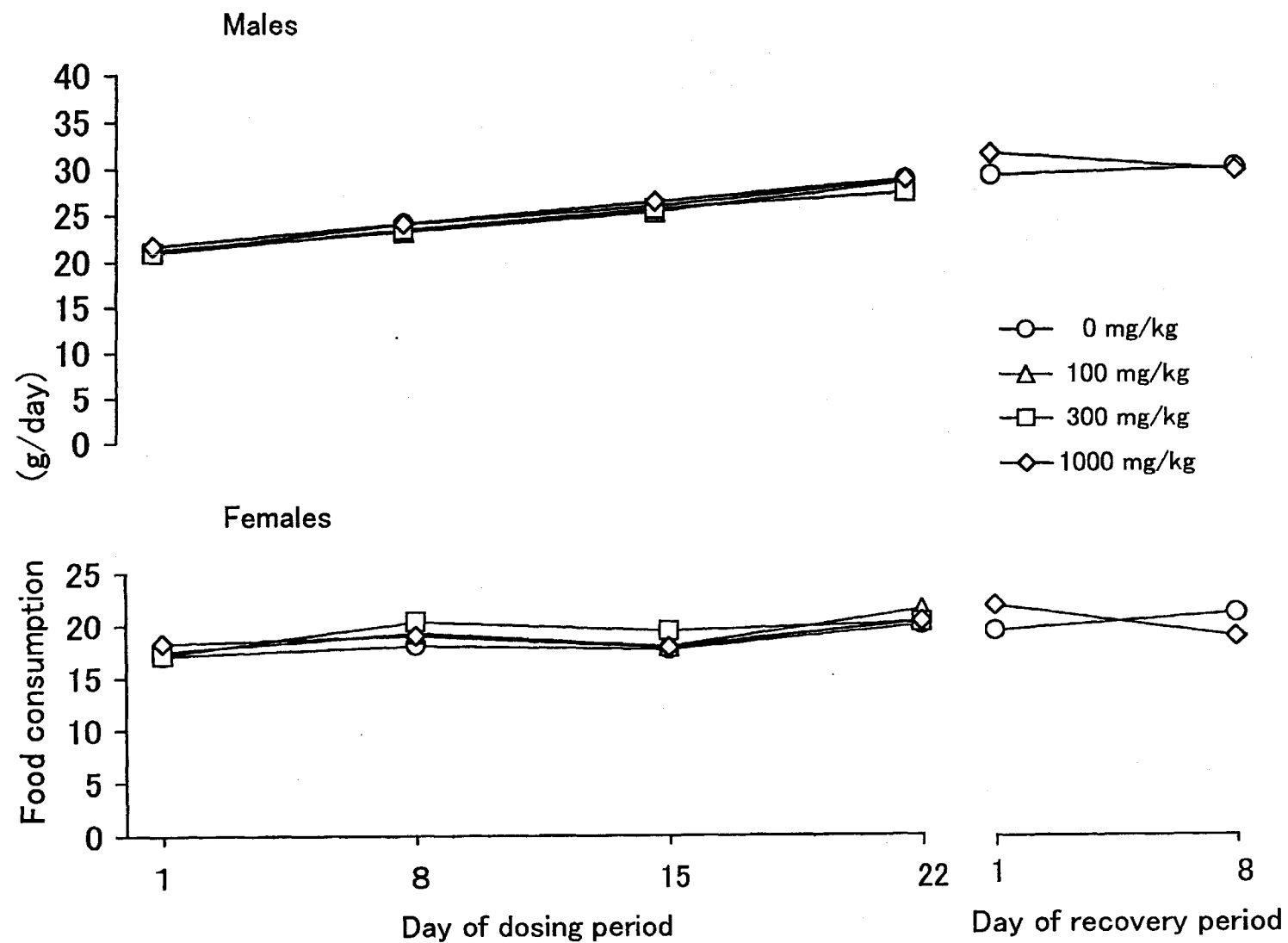


Fig. 2
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Food consumption in males and females

Table 1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Body weight changes in males

Dose (mg/kg)	Day of dosing period									Day of recovery period				
	1	4	8	11	15	18	22	25	28	1	4	8	11	14
0	(10) 147.1 ±8.5	(10) 170.8 ±10.1	(10) 203.8 ±12.9	(10) 225.8 ±14.8	(10) 255.7 ±19.8	(10) 282.8 ±22.2	(10) 311.7 ±24.4	(10) 329.5 ±27.1	(10) 349.1 ±29.8	(5) 349.8 ±18.9	(5) 368.0 ±20.3	(5) 385.2 ±19.2	(5) 400.1 ±20.7	(5) 413.1 ±19.1
100	(5) 149.6 ±4.0	(5) 168.6 ±4.1	(5) 199.5 ±6.1	(5) 221.7 ±6.8	(5) 253.4 ±6.4	(5) 281.7 ±8.5	(5) 309.9 ±11.8	(5) 328.9 ±17.0	(5) 347.2 ±15.2					
300	(5) 146.5 ±6.8	(5) 170.3 ±9.4	(5) 202.7 ±12.7	(5) 224.7 ±15.1	(5) 253.8 ±19.7	(5) 280.2 ±23.3	(5) 305.8 ±27.8	(5) 324.6 ±32.2	(5) 341.5 ±35.0					
1000	(10) 147.6 ±5.9	(10) 173.4 ±7.3	(10) 207.0 ±8.4	(10) 230.7 ±9.2	(10) 263.4 ±12.1	(10) 290.2 ±14.2	(10) 319.9 ±16.9	(10) 337.3 ±17.8	(10) 355.4 ±19.0	(5) 365.8 ±19.5	(5) 379.1 ±19.4	(5) 398.5 ±19.3	(5) 410.9 ±19.2	(5) 426.8 ±18.2

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

Table 1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Body weight changes in females

Dose (mg/kg)	Day of dosing period									Day of recovery period				
	1	4	8	11	15	18	22	25	28	1	4	8	11	14
0	(10) 130.1 ±5.9	(10) 145.9 ±8.6	(10) 163.9 ±11.5	(10) 173.1 ±13.8	(10) 184.4 ±15.3	(10) 195.5 ±16.6	(10) 208.8 ±18.3	(10) 217.7 ±19.2	(10) 229.2 ±19.4	(5) 236.5 ±11.5	(5) 246.6 ±11.4	(5) 257.5 ±12.7	(5) 264.5 ±18.2	(5) 272.2 ±20.7
100	(5) 131.4 ±7.5	(5) 149.3 ±6.1	(5) 168.1 ±9.2	(5) 179.4 ±8.2	(5) 192.2 ±10.1	(5) 204.3 ±11.9	(5) 217.4 ±13.6	(5) 226.7 ±16.4	(5) 237.4 ±14.2					
300	(5) 130.7 ±5.6	(5) 149.8 ±6.7	(5) 167.8 ±7.4	(5) 178.4 ±11.7	(5) 191.1 ±14.1	(5) 206.2 ±12.4	(5) 221.4 ±16.3	(5) 231.5 ±14.4	(5) 242.1 ±16.2					
1000	(10) 128.0 ±5.0	(10) 146.4 ±7.0	(10) 165.5 ±12.1	(10) 174.1 ±12.3	(10) 183.9 ±16.0	(10) 194.4 ±18.6	(10) 205.4 ±20.9	(10) 214.4 ±24.5	(10) 223.1 ±27.1	(5) 214.8 ±29.0	(5) 220.8 ±31.3	(5) 229.0 ±34.1	(5) 237.8 ±33.4	(5) 243.9 ±34.9

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

Table 2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Food consumption in males

Dose (mg/kg)	Day of dosing period				Day of recovery period	
	1	8	15	22	1	8
0	(10)	(10)	(10)	(10)	(5)	(5)
	20.9 ±1.7	24.0 ±2.4	25.8 ±3.4	28.5 ±3.9	28.6 ±4.7	29.4 ±3.7
100	(5)	(5)	(5)	(5)		
	21.2 ±3.5	23.1 ±1.0	25.2 ±1.0	28.3 ±2.7		
300	(5)	(5)	(5)	(5)		
	20.9 ±1.2	23.3 ±1.3	25.5 ±2.8	27.2 ±3.7		
1000	(10)	(10)	(10)	(10)	(5)	(5)
	21.6 ±0.7	24.0 ±1.3	26.3 ±1.7	28.6 ±2.3	31.0 ±3.5	29.1 ±2.5

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

Table 2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Food consumption in females

Dose (mg/kg)	Day of dosing period				Day of recovery period	
	1	8	15	22	1	8
0	(10)	(10)	(10)	(10)	(5)	(5)
	17.1 ±1.5	18.1 ±1.6	17.7 ±2.4	20.0 ±3.2	19.3 ±3.7	20.9 ±2.2
100	(5)	(5)	(5)	(5)		
	17.5 ±1.2	19.3 ±2.1	18.0 ±2.0	21.5 ±1.8		
300	(5)	(5)	(5)	(5)		
	17.2 ±1.3	20.4 ±2.6	19.5 ±2.3	20.3 ±3.7		
1000	(10)	(10)	(10)	(10)	(5)	(5)
	18.3 ±1.1	19.0 ±2.1	17.9 ±2.8	20.4 ±3.0	21.7 ±2.8	18.7 ±2.3

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

Table 3-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Urinary findings in males and females on day 23 of dosing period

Sex.	Dose (mg/kg)	Number of animals	Color		Turbidity -	pH						Total protein				Glucose		Ketone		Bilirubin	Occult blood	Urobilinogen	
			ly	y		6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	≥9.0	-	±	+	++	-	-	±	+	-	-	±	+
Male	0	10	10	0	10	0	2	4	3	1	0	0	0	10	0	10	2	8	0	10	10	10	0
	100	5	5	0	5	0	1	2	2	0	0	0	0	5	0	5	2	3	0	5	5	4	1
	300	5	5	0	5	0	4	0	1	0	0	0	0	3	2	5	0	3	2	5	5	4	1
	1000	10	4	6	10	0	3	4	2	0	1	0	1	8	1	10	3	3	4	10	10	7	3
Female	0	10	10	0	10	0	0	2	6	2	0	9	1	0	0	10	10	0	0	10	10	10	0
	100	5	4	1	5	2	0	0	2	1	0	4	0	1	0	5	4	1	0	5	5	4	1
	300	5	5	0	5	0	1	2	1	1	0	5	0	0	0	5	5	0	0	5	5	5	0
	1000	10	3	7	10	1	4	4	0	0	1	7	2	1	0	10	8	2	0	10	10	8	2

Color ly, light yellow; y, yellow

Turbidity -, negative

Total protein -, negative; ±, trace; +, 30 mg/dL; ++, 100 mg/dL

Glucose -, negative

Ketone -, negative; ±, trace; +, slight

Bilirubin -, negative

Occult blood -, negative

Urobilinogen ±, 0.1 EU/dL; +, 1.0 EU/dL

Table 3-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Urinary findings in males and females on day 9 of recovery period

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Color		Turbidity -	pH								Total protein				Glucose				Ketone				Bilirubin	Occult blood		Urobilinogen	
			ly	y		6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	≥9.0	-	±	+	++	-	-	±	+	++	-	-	±	+	±	+			
Male	0	5	5	0	5	0	0	1	1	2	1	0	0	0	5	0	5	2	3	0	0	5	5		5	5	5	0		
	1000	5	4	1	5	0	0	0	2	1	2	0	1	1	1	2	5	2	1	1	1	5	5		5	5	3	2		
Female	0	5	5	0	5	0	0	0	1	2	2	0	4	1	0	0	5	5	0	0	0	5	5		5	5	4	1		
	1000	5	5	0	5	1	0	0	2	2	0	0	4	0	0	1	5	4	1	0	0	5	5		5	5	4	1		

Color ly, light yellow; y, yellow

Turbidity -, negative

Total protein -, negative; ±, trace; +, 30 mg/dL; ++, 100 mg/dL

Glucose -, negative

Ketone -, negative; ±, trace; +, slight; ++, moderate

Bilirubin -, negative

Occult blood -, negative

Urobilinogen ±, 0.1 EU/dL; +, 1.0 EU/dL

Table 4-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Hematological findings in males at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	R B C ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	M C V (fL)	M C H (pg)	M C H C (g/dL)	Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	P T (sec)	A P T T (sec)
0	(5) 732 ± 32	(5) 14.6 ± 0.5	(5) 43.8 ± 2.1	(5) 59.9 ± 0.8	(5) 19.9 ± 0.2	(5) 33.3 ± 0.4	(5) 102.2 ± 9.2	(5) 16.0 ± 1.8	(5) 21.1 ± 1.5
100	(5) 748 ± 20	(5) 14.9 ± 0.7	(5) 44.4 ± 2.1	(5) 59.3 ± 1.8	(5) 19.9 ± 0.7	(5) 33.6 ± 0.2	(5) 106.5 ± 17.4	(5) 18.1 ± 3.6	(5) 21.2 ± 2.4
300	(5) 728 ± 18	(5) 14.5 ± 0.6	(5) 43.5 ± 1.7	(5) 59.8 ± 2.8	(5) 20.0 ± 1.0	(5) 33.4 ± 0.4	(5) 102.5 ± 9.5	(5) 18.8 ± 2.3	(5) 22.4 ± 1.0
1000	(5) 732 ± 21	(5) 14.2 ± 0.3	(5) 42.4 ± 0.9	(5) 57.9 ± 0.8	(5) 19.4 ± 0.4	(5) 33.6 ± 0.2	(5) 103.7 ± 9.7	(5) 20.3 ± 2.5	(5) 21.6 ± 1.1

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100/\mu\text{L}$)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 97.5 ± 15.7	(5) 7 ± 2	(5) 1 ± 0	(5) 0 ± 0	(5) 4 ± 3	(5) 88 ± 5
100	(5) 91.3 ± 11.6	(5) 7 ± 2	(5) 1 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 5 ± 4	(5) 88 ± 3
300	(5) 85.6 ± 28.7	(5) 10 ± 2	(5) 1 ± 0	(5) 0 ± 0	(5) 5 ± 3	(5) 84 ± 4
1000	(5) 84.5 ± 13.2	(5) 11 ± 3	(5) 1 ± 0	(5) 0 ± 0	(5) 6 ± 4	(5) 82 ± 7

Parameter, mean $\pm$ S.D.
(), number of animals

Table 4-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Hematological findings in females at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	R B C ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	M C V (fL)	M C H (pg)	M C H C (g/dL)	Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	P T (sec)	A P T T (sec)
0	(5) 721 ± 30	(5) 14.1 ± 0.4	(5) 41.7 ± 1.2	(5) 57.9 ± 1.9	(5) 19.6 ± 0.4	(5) 33.8 ± 0.4	(5) 109.4 ± 6.0	(5) 12.6 ± 0.7	(5) 17.6 ± 2.5
100	(5) 703 ± 31	(5) 13.9 ± 0.5	(5) 41.1 ± 1.2	(5) 58.5 ± 1.6	(5) 19.8 ± 0.5	(5) 33.8 ± 0.2	(5) 106.6 ± 9.7	(5) 11.4** ± 0.5	(5) 15.6 ± 1.6
300	(5) 703 ± 9	(5) 14.1 ± 0.3	(5) 41.6 ± 0.7	(5) 59.1 ± 1.7	(5) 20.1 ± 0.6	(5) 33.9 ± 0.2	(5) 94.0 ± 9.7	(5) 11.9 ± 0.3	(5) 17.5 ± 1.1
1000	(5) 699 ± 21	(5) 14.0 ± 0.5	(5) 41.2 ± 1.5	(5) 59.0 ± 1.7	(5) 19.9 ± 0.6	(5) 33.8 ± 0.3	(5) 101.8 ± 14.2	(5) 11.7* ± 0.5	(5) 17.6 ± 1.0

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100/\mu\text{L}$)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 53.2 ± 19.1	(5) 10 ± 5	(5) 1 ± 0	(5) 0 ± 0	(5) 2 ± 1	(5) 87 ± 4
100	(5) 43.2 ± 16.9	(5) 11 ± 5	(5) 1 ± 0	(5) 0 ± 0	(5) 5 ± 5	(5) 83 ± 9
300	(5) 49.6 ± 14.4	(5) 12 ± 6	(5) 1 ± 0	(5) 0 ± 0	(5) 5 ± 3	(5) 82 ± 5
1000	(5) 51.6 ± 18.5	(5) 8 ± 2	(5) 1 ± 0	(5) 0 ± 0	(5) 5 ± 4	(5) 86 ± 6

Parameter, mean $\pm$ S.D.
(), number of animals

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

Table 4-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Hematological findings in males at the end of recovery period

Dose (mg/kg)	R B C ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	M C V (fL)	M C H (pg)	M C H C (g/dL)	Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	P T (sec)	A P T T (sec)
0	(5) 798 ± 24	(5) 15.0 ± 0.2	(5) 44.3 ± 1.0	(5) 55.5 ± 0.8	(5) 18.7 ± 0.4	(5) 33.7 ± 0.5	(5) 105.5 ± 6.7	(5) 15.8 ± 2.1	(5) 21.1 ± 1.9
1000	(5) 720** ± 37	(5) 13.6* ± 0.9	(5) 40.5* ± 2.9	(5) 56.2 ± 1.3	(5) 18.9 ± 0.4	(5) 33.6 ± 0.5	(5) 95.7 ± 19.9	(5) 16.0 ± 3.1	(5) 19.7 ± 1.8

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100/\text{mm}^3$)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 106.6 ± 28.8	(5) 7 ± 2	(5) 1 ± 0	(5) 0 ± 0	(5) 3 ± 2	(5) 88 ± 4
1000	(5) 85.1 ± 35.1	(5) 10 ± 3	(5) 1 ± 0	(5) 0 ± 0	(5) 3 ± 1	(5) 87 ± 4

Parameter, mean $\pm$ S.D.
(), number of animals

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

Table 4-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Hematological findings in females at the end of recovery period

Dose (mg/kg)	R B C ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	M C V (fL)	M C H (pg)	M C H C (g/dL)	Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	P T (sec)	A P T T (sec)
0	(5) 758 ± 45	(5) 14.6 ± 0.6	(5) 43.2 ± 2.0	(5) 57.0 ± 1.6	(5) 19.2 ± 0.5	(5) 33.7 ± 0.2	(5) 103.6 ± 5.9	(5) 12.8 ± 0.3	(5) 16.9 ± 0.2
1000	(5) 734 ± 46	(5) 14.0 ± 0.5	(5) 41.7 ± 1.5	(5) 56.8 ± 1.9	(5) 19.1 ± 0.8	(5) 33.7 ± 0.2	(5) 94.4 ± 13.9	(5) 12.2 ± 0.9	(5) 16.1 ± 0.8

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100/\text{mm}^3$)	neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 60.9 ± 17.2	(5) 12 ± 6	(5) 1 ± 0	(5) 0 ± 0	(5) 2 ± 1	(5) 84 ± 7
1000	(5) 43.1 ± 12.6	(5) 10 ± 3	(5) 1 ± 0	(5) 0 ± 0	(5) 3 ± 2	(5) 85 ± 3

Parameter, mean $\pm$ S.D.
(). number of animals

Table 5-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Biochemical findings in males at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Tri- glyceride (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
0	(5) 5.1 ±0.2	(5) 3.1 ±0.2	(5) 1.51 ±0.15	(5) 127 ±7	(5) 41 ±13	(5) 40 ±8	(5) 13 ±1	(5) 0.6 ±0.0
100	(5) 5.2 ±0.3	(5) 3.3* ±0.1	(5) 1.72 ±0.21	(5) 145 ±25	(5) 42 ±8	(5) 45 ±9	(5) 15 ±2	(5) 0.6 ±0.1
300	(5) 5.1 ±0.2	(5) 3.1 ±0.2	(5) 1.50 ±0.09	(5) 128 ±22	(5) 36 ±2	(5) 48 ±6	(5) 15 ±1	(5) 0.6 ±0.1
1000	(5) 5.3 ±0.2	(5) 3.0 ±0.1	(5) 1.38 ±0.12	(5) 125 ±12	(5) 37 ±6	(5) 33 ±2	(5) 14 ±3	(5) 0.6 ±0.0

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) 7.5 ±0.3	(5) 9.0 ±0.3	(5) 145.7 ±0.6	(5) 3.85 ±0.30	(5) 108.2 ±0.9	(5) 426 ±59	(5) 31 ±5	(5) 67 ±7	(5) 1 ±0
100	(5) 7.1 ±0.6	(5) 9.0 ±0.2	(5) 145.9 ±0.8	(5) 4.01 ±0.43	(5) 108.5 ±2.0	(5) 435 ±125	(5) 32 ±6	(5) 66 ±12	(5) 0 ±1
300	(5) 7.5 ±0.4	(5) 9.1 ±0.1	(5) 145.6 ±0.5	(5) 3.92 ±0.31	(5) 107.6 ±0.8	(5) 419 ±46	(5) 30 ±3	(5) 69 ±2	(5) 0 ±0
1000	(5) 7.4 ±1.1	(5) 9.2 ±0.4	(5) 145.7 ±0.7	(5) 4.10 ±0.13	(5) 108.0 ±1.3	(5) 392 ±103	(5) 28 ±1	(5) 72 ±3	(5) 1 ±1

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

*, significantly different from control, p<0.05

Table 5-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Biochemical findings in females at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Tri- glyceride (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
0	(5) 5.2 ±0.3	(5) 3.4 ±0.2	(5) 1.90 ±0.38	(5) 118 ±8	(5) 42 ±5	(5) 24 ±7	(5) 20 ±1	(5) 0.6 ±0.1
100	(5) 5.1 ±0.3	(5) 3.3 ±0.2	(5) 1.82 ±0.19	(5) 118 ±16	(5) 47 ±12	(5) 28 ±5	(5) 20 ±3	(5) 0.5 ±0.1
300	(5) 5.4 ±0.5	(5) 3.5 ±0.3	(5) 1.81 ±0.18	(5) 108 ±6	(5) 45 ±6	(5) 27 ±7	(5) 19 ±2	(5) 0.6 ±0.1
1000	(5) 5.3 ±0.3	(5) 3.3 ±0.1	(5) 1.68 ±0.09	(5) 110 ±16	(5) 46 ±14	(5) 31 ±11	(5) 19 ±4	(5) 0.6 ±0.1

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) 6.3 ±0.9	(5) 8.9 ±0.1	(5) 145.0 ±1.3	(5) 3.98 ±0.45	(5) 109.7 ±1.0	(5) 299 ±94	(5) 22 ±2	(5) 63 ±5	(5) 1 ±1
100	(5) 6.4 ±0.7	(5) 8.7 ±0.5	(5) 145.2 ±1.3	(5) 3.76 ±0.21	(5) 109.8 ±1.4	(5) 237 ±54	(5) 21 ±5	(5) 66 ±8	(5) 1 ±1
300	(5) 6.3 ±0.7	(5) 9.1 ±0.3	(5) 144.7 ±0.6	(5) 3.88 ±0.18	(5) 109.0 ±0.3	(5) 245 ±66	(5) 22 ±1	(5) 68 ±6	(5) 1 ±1
1000	(5) 6.2 ±0.5	(5) 8.8 ±0.3	(5) 145.4 ±0.6	(5) 3.83 ±0.31	(5) 109.7 ±1.4	(5) 242 ±27	(5) 22 ±3	(5) 69 ±8	(5) 1 ±1

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

Table 5-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Biochemical findings in males at the end of recovery period

Dose (mg/kg)	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Tri- glyceride (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
0	(5) 5.4 ±0.3	(5) 3.1 ±0.2	(5) 1.30 ±0.20	(5) 139 ±13	(5) 37 ±8	(5) 57 ±19	(5) 16 ±2	(5) 0.64 ±0.05
1000	(5) 5.2 ±0.2	(5) 3.1 ±0.2	(5) 1.50 ±0.21	(5) 130 ±16	(5) 34 ±10	(5) 43 ±17	(5) 17 ±3	(5) 0.60 ±0.00

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) 6.3 ±0.2	(5) 8.8 ±0.3	(5) 145.2 ±0.7	(5) 3.77 ±0.18	(5) 107.3 ±1.0	(5) 407 ±66	(5) 32 ±10	(5) 65 ±2	(5) 0 ±0
1000	(5) 7.0 ±0.8	(5) 8.8 ±0.3	(5) 145.2 ±0.7	(5) 4.24 ±0.70	(5) 108.0 ±0.6	(5) 351 ±116	(5) 33 ±5	(5) 70 ±8	(5) 0 ±0

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

Table 5-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Biochemical findings in females at the end of recovery period

Dose (mg/kg)	Total Protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Tri- glyceride (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
0	(5) 5.2 ±0.2	(5) 3.3 ±0.3	(5) 1.71 ±0.24	(5) 124 ±16	(5) 41 ±7	(5) 29 ±11	(5) 21 ±3	(5) 0.70 ±0.07
1000	(5) 5.3 ±0.5	(5) 3.5 ±0.3	(5) 1.91 ±0.16	(5) 108 ±19	(5) 38 ±7	(5) 24 ±7	(5) 20 ±2	(5) 0.70 ±0.12

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) 4.9 ±0.4	(5) 8.5 ±0.3	(5) 145.1 ±1.2	(5) 3.66 ±0.20	(5) 109.1 ±0.7	(5) 179 ±60	(5) 23 ±2	(5) 60 ±5	(5) 1 ±1
1000	(5) 5.8** ±0.5	(5) 8.5 ±0.5	(5) 145.8 ±1.5	(5) 3.74 ±0.34	(5) 110.3 ±2.3	(5) 161 ±29	(5) 26 ±4	(5) 65 ±6	(5) 1 ±1

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

**, 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 DY42 in rats

Absolute organ weights in males at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg)	Thymus (mg)	Heart (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Adrenal glands (mg)	Testes (mg)	Epididymides (mg)
0	(5) 317.3 ±35.2	(5) 1816.9 ±91.8	(5) 525.3 ±175.2	(5) 1060.1 ±142.4	(5) 10144.3 ±1860.5	(5) 2407.8 ±241.1	(5) 688.1 ±63.2	(5) 49.4 ±9.2	(5) 2867.8 ±299.3	(5) 639.9 ±47.9
100	(5) 313.9 ±15.0	(5) 1817.0 ±36.0	(5) 537.3 ±68.5	(5) 1042.4 ±48.8	(5) 10258.4 ±841.3	(5) 2234.2 ±84.4	(5) 704.5 ±45.8	(5) 51.0 ±5.2	(5) 2839.1 ±240.4	(5) 637.4 ±28.7
300	(5) 312.1 ±33.4	(5) 1860.0 ±50.2	(5) 485.4 ±126.8	(5) 1044.0 ±66.9	(5) 10556.0 ±945.4	(5) 2349.7 ±178.9	(5) 697.3 ±136.5	(5) 48.2 ±4.3	(5) 2974.2 ±393.0	(5) 639.7 ±52.7
1000	(5) 318.9 ±18.2	(5) 1859.8 ±31.9	(5) 462.2 ±81.3	(5) 1087.8 ±71.0	(5) 11355.2 ±806.9	(5) 2560.3 ±246.9	(5) 762.4 ±80.3	(5) 50.9 ±6.3	(5) 2808.7 ±199.0	(5) 630.8 ±47.8

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

Table 6-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Absolute organ weights in females at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg)	Thymus (mg)	Heart (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Adrenal glands (mg)	Ovaries (mg)
0	(5) 202.2 ±22.7	(5) 1823.0 ±57.6	(5) 395.3 ±33.5	(5) 718.0 ±78.2	(5) 6247.3 ±679.5	(5) 1685.6 ±100.8	(5) 407.5 ±52.9	(5) 63.1 ±10.3	(5) 83.1 ±13.9
100	(5) 217.0 ±14.7	(5) 1798.5 ±99.4	(5) 465.5 ±70.8	(5) 757.6 ±61.7	(5) 6967.1 ±441.5	(5) 1828.9 ±136.5	(5) 478.6 ±28.3	(5) 64.3 ±7.2	(5) 88.2 ±12.1
300	(5) 219.6 ±13.3	(5) 1747.1 ±63.4	(5) 416.9 ±82.1	(5) 793.0 ±34.2	(5) 6988.7 ±303.5	(5) 1779.4 ±110.8	(5) 520.1* ±49.6	(5) 70.9 ±8.5	(5) 81.5 ±14.3
1000	(5) 212.6 ±16.7	(5) 1798.6 ±52.1	(5) 380.4 ±99.3	(5) 734.7 ±35.7	(5) 7314.9 ±721.6	(5) 1722.5 ±143.1	(5) 549.7** ±79.8	(5) 64.9 ±6.1	(5) 80.5 ±6.0

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

*, 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 DY42 in rats

Absolute organ weights in males at the end of recovery period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg)	Thymus (mg)	Heart (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Adrenal glands (mg)	Testes (mg)	Epididymides (mg)
0	(5) 379.1 ±18.5	(5) 1951.0 ±46.6	(5) 481.0 ±63.1	(5) 1220.9 ±91.7	(5) 11660.3 ±1679.7	(5) 2717.3 ±179.1	(5) 710.9 ±69.7	(5) 48.5 ±5.2	(5) 3050.6 ±279.0	(5) 890.8 ±72.3
1000	(5) 389.5 ±18.8	(5) 1876.9 ±58.1	(5) 441.9 ±117.3	(5) 1229.6 ±121.5	(5) 12781.0 ±560.6	(5) 2840.1 ±130.5	(5) 788.2 ±130.7	(5) 56.0 ±10.1	(5) 2989.1 ±266.5	(5) 911.5 ±45.8

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

Table 6-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Absolute organ weights in females at the end of recovery period

Dose	Body weight	Brain	Thymus	Heart	Liver	Kidneys	Spleen	Adrenal glands	Ovaries
(mg/kg)	(g)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)
0	(5) 247.8 ±15.5	(5) 1779.4 ±10.7	(5) 425.2 ±81.4	(5) 867.7 ±132.6	(5) 6941.1 ±525.7	(5) 1753.4 ±32.8	(5) 523.0 ±79.1	(5) 64.0 ±5.2	(5) 90.5 ±13.4
1000	(5) 224.5 ±31.6	(5) 1758.6 ±62.1	(5) 318.0* ±42.0	(5) 742.3 ±82.4	(5) 6477.0 ±904.2	(5) 1748.7 ±174.2	(5) 472.8 ±58.9	(5) 61.2 ±6.1	(5) 79.3 ±9.9

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

*, 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 DY42 in rats

Relative organ weights in males at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg/g)	Thymus (mg/g)	Heart (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Spleen (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Testes (mg/g)	Epididymides (mg/g)
0	(5) 317.3 ±35.2	(5) 5.760 ±0.414	(5) 1.630 ±0.384	(5) 3.336 ±0.175	(5) 31.789 ±2.656	(5) 7.603 ±0.369	(5) 2.178 ±0.171	(5) 0.155 ±0.018	(5) 9.061 ±0.634	(5) 2.026 ±0.135
100	(5) 313.9 ±15.0	(5) 5.797 ±0.209	(5) 1.720 ±0.268	(5) 3.324 ±0.141	(5) 32.682 ±2.160	(5) 7.137 ±0.524	(5) 2.254 ±0.233	(5) 0.163 ±0.012	(5) 9.038 ±0.475	(5) 2.034 ±0.133
300	(5) 312.1 ±33.4	(5) 6.018 ±0.713	(5) 1.556 ±0.351	(5) 3.362 ±0.245	(5) 33.900 ±1.437	(5) 7.567 ±0.639	(5) 2.228 ±0.303	(5) 0.155 ±0.014	(5) 9.595 ±1.405	(5) 2.056 ±0.110
1000	(5) 318.9 ±18.2	(5) 5.851 ±0.400	(5) 1.459 ±0.312	(5) 3.412 ±0.121	(5) 35.631 ±1.967	(5) 8.031 ±0.644	(5) 2.398 ±0.295	(5) 0.161 ±0.027	(5) 8.826 ±0.731	(5) 1.988 ±0.249

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

Table 7-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Relative organ weights in females at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg/g)	Thymus (mg/g)	Heart (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Spleen (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Ovaries (mg/g)
0	(5) 202.2 ±22.7	(5) 9.093 ±0.891	(5) 1.963 ±0.143	(5) 3.561 ±0.316	(5) 30.914 ±0.915	(5) 8.388 ±0.712	(5) 2.031 ±0.324	(5) 0.312 ±0.032	(5) 0.414 ±0.078
100	(5) 217.0 ±14.7	(5) 8.295 ±0.181	(5) 2.143 ±0.280	(5) 3.495 ±0.241	(5) 32.181 ±2.342	(5) 8.431 ±0.334	(5) 2.208 ±0.103	(5) 0.296 ±0.023	(5) 0.406 ±0.043
300	(5) 219.6 ±13.3	(5) 7.975* ±0.478	(5) 1.891 ±0.312	(5) 3.619 ±0.213	(5) 31.874 ±1.451	(5) 8.133 ±0.779	(5) 2.368 ±0.148	(5) 0.325 ±0.051	(5) 0.375 ±0.084
1000	(5) 212.6 ±16.7	(5) 8.494 ±0.554	(5) 1.775 ±0.394	(5) 3.465 ±0.160	(5) 34.397* ±1.550	(5) 8.134 ±0.799	(5) 2.575** ±0.183	(5) 0.307 ±0.039	(5) 0.380 ±0.031

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

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

Table 7-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Relative organ weights in males at the end of recovery period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg/g)	Thymus (mg/g)	Heart (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Spleen (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Testes (mg/g)	Epididymides (mg/g)
0	(5) 379.1 ±18.5	(5) 5.156 ±0.268	(5) 1.276 ±0.217	(5) 3.219 ±0.160	(5) 30.680 ±3.186	(5) 7.167 ±0.272	(5) 1.877 ±0.186	(5) 0.128 ±0.009	(5) 8.038 ±0.433	(5) 2.349 ±0.136
1000	(5) 389.5 ±18.8	(5) 4.822 ±0.093	(5) 1.131 ±0.282	(5) 3.155 ±0.243	(5) 32.837 ±1.206	(5) 7.304 ±0.460	(5) 2.018 ±0.276	(5) 0.143 ±0.019	(5) 7.679 ±0.653	(5) 2.348 ±0.217

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

Table 7-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Relative organ weights in females at the end of recovery period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg/g)	Thymus (mg/g)	Heart (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Spleen (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Ovaries (mg/g)
0	(5) 247.8 ±15.5	(5) 7.202 ±0.424	(5) 1.709 ±0.252	(5) 3.500 ±0.458	(5) 28.011 ±1.159	(5) 7.095 ±0.416	(5) 2.106 ±0.256	(5) 0.259 ±0.024	(5) 0.364 ±0.038
1000	(5) 224.5 ±31.6	(5) 7.943 ±0.998	(5) 1.426 ±0.173	(5) 3.318 ±0.131	(5) 28.873 ±1.420	(5) 7.829* ±0.474	(5) 2.136 ±0.356	(5) 0.277 ±0.052	(5) 0.355 ±0.032

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

*, 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 DY42 in rats

Macroscopical findings in males at the end of dosing period

Dose Grade	0 mg/kg			100 mg/kg			300 mg/kg			1000 mg/kg		
	-		+	-		+	-		+	-		+
(Liver)	[5]			[5]			[5]			[5]		
Area, pale	5		0	5		0	4		1	5		0
(Mandibular lymph node)	[5]			[5]			[5]			[5]		
Enlargement	5		0	5		0	4		1	5		0

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 8-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Macroscopical findings in females at the end of dosing period

Dose	0 mg/kg		100 mg/kg		300 mg/kg		1000 mg/kg	
Grade	-	+	-	+	-	+	-	+
(Liver)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Enlargement	5	0	5	0	5	0	4	1

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 8-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Macroscopical findings in males at the end of recovery period

Dose Grade	0 mg/kg		1000 mg/kg	
	-	+	-	+
(Thymus)	[5]		[5]	
Small	5	0	4	1
Area, red, left lobe	4	1	5	0

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 8-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Macroscopical findings in females at the end of recovery period

Dose Grade	0 mg/kg		1000 mg/kg	
	-	+	-	+
(Stomach)	[5]		[5]	
Area, pale red, on mucosa, glandular stomach	5	0	4	1
(Oviduct)	[5]		[5]	
Cyst, right side	4	1	5	0

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 9-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Histopathological findings in males at the end of dosing period

Dose Grade	0 mg/kg						100 mg/kg						300 mg/kg						1000 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Liver)	[5]						[5]						[5]						[5]					
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	3
Fatty change, periportal	0	4	1	0	0	5	0	4	1	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	4	1	0	0	5
Microgranuloma	3	2	0	0	0	2	3	2	0	0	0	2	2	2	1	0	0	3	3	1	1	0	0	2
Necrosis, focal, with hemorrhage & mineralization, subcapsule	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	0	1	0	0	1	5	0	0	0	0	0
(Kidney)	[5]						[0]						[0]						[5]					
Eosinophilic body	0	5	0	0	0	5													2	1	2	0	0	3
Basophilic tubule, cortex	1	4	0	0	0	4													2	3	0	0	0	3
(Spleen)	[5]						[0]						[0]						[5]					
Hematopoiesis, extramedullary	0	2	3	0	0	5													0	1	4	0	0	5
(Adrenal gland)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Heart)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Testis)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Epididymis)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Mandibular lymph node)	[0]						[0]						[1]						[0]					
No remarkable change																								

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

[], Number of animals examined

Table 9-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Histopathological findings in females at the end of dosing period

Dose Grade	0 mg/kg						100 mg/kg						300 mg/kg						1000 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Liver)	[5]						[0]						[0]						[5]					
Fatty change, periportal	0	2	3	0	0	5													0	5	0	0	0	5
Vacuolization, cytoplasmic, hepatocyte, centrilobular	5	0	0	0	0	0													4	1	0	0	0	1
Microgranuloma	1	2	2	0	0	4													0	3	1	1	0	5
(Kidney)	[5]						[0]						[0]						[5]					
Basophilic tubule, cortex	1	3	1	0	0	4													1	3	1	0	0	4
Mineralization	3	1	1	0	0	2													5	0	0	0	0	0
(Spleen)	[5]						[0]						[0]						[5]					
Hematopoiesis, extramedullary	0	5	0	0	0	5													0	4	1	0	0	5
(Heart)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Ovary)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Adrenal gland)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Mandibular lymph node)	[0]						[0]						[0]						[1]					
No remarkable change																								

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

[], Number of animals examined

Table 9-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Histopathological findings in males at the end of recovery period

Dose Grade	0 mg/kg						1000 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Liver)	[5]						[5]					
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1
Fatty change, periportal	0	2	3	0	0	5	0	1	4	0	0	5
Microgranuloma	4	1	0	0	0	1	3	2	0	0	0	2
Necrosis, focal, subcapsule	5	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	2
(Thymus)	[1]						[1]					
No remarkable change												

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

[], Number of animals examined

Table 9-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of DY42 in rats

Histopathological findings in females at the end of recovery period

Dose Grade	0 mg/kg						1000 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Stomach)	[0]						[1]					
No remarkable change												
(Oviduct)	[1]						[0]					
Dilatation, cystic, lumen	0	0	0	1	0	1						

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade
[], Number of animals examined