

食薬セ研第11-1742号

2001年 6月18日

1-ナフトール-4-スルホン酸ナトリウムの
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】

	頁
要 約	1
緒 言	2
方 法	3
1. 被験物質	3
2. 使用動物および飼育方法	3
3. 投与検体の調製	4
4. 群および群分け	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	10
8. 病理学検査所見	10
考 察	12

Figures 1~2

Tables 1~9

【要 約】

1-ナフトール-4-スルホン酸ナトリウム（以下 NSS 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群には媒体である注射用水を、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。雌雄とも回復試験に用いる動物を含む対照群および 1000 mg/kg 投与群は各10匹、その他の群は各5匹とした。その結果、死亡例はいずれの群にも認められなかった。また、一般状態、体重、摂餌量、尿検査、血液学検査、血液生化学検査、病理学検査に被験物質投与によると考えられる変化は認められなかった。

以上のように、NSS を28日間反復経口投与した結果、1000 mg/kg/day の用量でも被験物質投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。従って、本試験条件下における NSS の無影響量は、雌雄ともに 1000 mg/kg/day であると考えられた。

【緒 言】

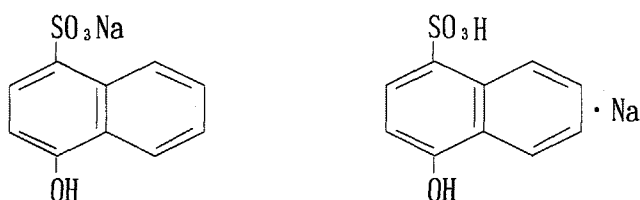
今回、OECD 既存化学物質安全性点検等に係る毒性調査の一環として、1-ナフトール-4-スルホン酸ナトリウムの安全性確認の資料を得るために、ラットにおける28日間反復経口投与毒性試験および14日間回復試験を実施した。

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

【方 法】

1. 被験物質

被験物質として、1-ナフトール-4-スルホン酸ナトリウム（英名 1-Naphthol-4-sulfonic acid sodium salt、以下 NSS と略記）を用いた。本被験物質は、別名を Nevile-Winther's acid sodium salt と称し、CAS No. 6099-57-6、分子量 246.21、分子式 $C_{10}H_7O_4SNa$ の物質である。NSS の構造式を以下に示す。



本試験には、より提供された純度 95.7 wt%（カップリング滴定法）、ロット番号 の白色粉末を用いた。被験物質は、使用時まで被験物質受領保管室において、室温で保管した。試験終了後に返却した被験物質について、提供者が再度品質試験を実施した結果、試験期間中の被験物質の安定性は確認された（Appendix A）。

2. 使用動物および飼育方法

生後 4 週で購入した雌雄の Sprague-Dawley 系ラット [Crj:CD(SD)IGS、SPF、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター]（注 1）を検疫と馴化を兼ねて 7 日間にわたり予備飼育した後、一般状態に異常の認められなかった雌雄各 30 匹を試験に供した（注 2）。動物は、全飼育期間を通じて、基準温度 22～25℃、基準湿度 50～65%、換気回数約 15 回／時間、照明 12 時間（7～19 時点灯）に設定された飼育室内で、金属製金網床ケージ（220W×270D×190H mm）に 1 匹ずつ収容し、固型飼料（CE-2、日本クレア株式会社）および水道水（秦野市水道局給水）を自由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、湿度の実測値は 1 時間以内の逸脱を除いて基

（注 1）

動物購入日：2000 年 3 月 27 日

入荷匹数：雄 34 匹 雌 34 匹

入荷時体重：雄 76.6～85.6 g（平均 80.8 g） 雌 65.0～78.7 g（平均 72.1 g）

（注 2）

投与開始日：2000 年 4 月 3 日

投与開始時体重：雄 140.1～155.6 g（平均 149.6 g） 雌 117.8～137.4 g（平均 127.2 g）

準値の範囲内にあり（注3）、試験に支障を来す温湿度の異常は認められなかった。また、供給した飼料および水には、試験に支障を来す可能性のある混入物はなかった。

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

3. 投与検体の調製

投与検体は、10 w/v%となるように、被験物質を秤量し注射用水を加えて溶解した後、同溶液から所定濃度となるように注射用水を加えて段階希釈することにより調製した。媒体である注射用水は、光製薬株式会社製造（製造番号 9707SA）を用いた。

なお、秦野研究所で先に実施した本被験物質の急性経口投与毒性試験（試験計画番号：A-99-063）において、0.05 および 10 w/v%の調製検体は、冷蔵・遮光条件下で調製後8日間安定であったことが確認されている（Appendix B）。そのため、調製頻度は週1回とし、調製後の投与検体は使用時まで気密容器に入れ、冷蔵・遮光の条件で保管した。また、秦野研究所にて、初回に調製した各濃度の投与検体の含量測定を実施した結果、溶液中の被験物質の平均含量は、所定濃度の 98.9～99.7 %であったことが確認された（Appendix C、分析方法の記載は 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-99-015、投与開始日：2000年2月1日、投与量：0、250、500 および 1000 mg/kg）の結果に基づき決定した。すなわち、NSS を7日間反復経口投与することにより、いずれの群にも被験物質投与の影響は認められなかった。このことから、1000 mg/kg は28日間の反復投与に耐えうる用量であると判断し、本試験の用量は、雌雄とも高用量を 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、媒体である注射用水を投与する対照群を設け、回復試験を行う対照群および 1000 mg/kg 投与群は各10匹、その他の群は各5匹の動物を使用した。

（注3）

動物飼育期間中の温湿度の実測値 温度 22.5～25.0℃ 湿度 47.0～68.5%

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

	投与物質	投与量 (mg/kg)	被験物質濃度 (w/v%)	投与容量 ^{a)} (mL/kg)	動物番号		剖検時期 ^{b)}
					雄	雌	
対照群	注射用水	0	0	10	1～5	31～35	回復
					6～10	36～40	投与
低用量群	NSS	100	1	10	11～15	41～45	投与
中用量群	NSS	300	3	10	16～20	46～50	投与
高用量群	NSS	1000	10	10	21～25	51～55	回復
					26～30	56～60	投与

a) 雌雄とも最近時の体重をもとに個体別に投与液量 (mL) を算出した。

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

5. 投与方法

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

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

6. 検査項目

1) 一般検査

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

2) 尿検査

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

項 目	測 定 法	使 用 機 器
色調・混濁度 pH・潜血・蛋白・糖・ケトン体 カドミウム・ビリルビン	視 診 試験紙法 同 上	クリニック 200+ (パイエル・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）全例を、採血前（屠殺剖検前）に18～24時間絶食させた。その後、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で、腹部後大静脈から抗凝固剤として EDTA-3K を用いて採血し、以下の項目について検査した。ただし、プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間の測定には、上記の採血に先立って、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で、腹部後大静脈から抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムを用いて採取した血液を分離して得た血漿を用いた。

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 (ダイボット)
白血球数 (WBC)	同上（フローサイトメリー・レーザー光散乱法/ 電気抵抗法）	同上
白血球分類	同上（フローサイトメリー・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
ハトクリット値 (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) 白血球分類の検査の補助として静脈血塗抹標本（Wright-Giemsa 染色）を作製したが、その結果は採用しなかった。
b) 採血時に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、同様の麻酔および採血部位の条件下で、全例からヘパリンを抗凝固剤として採取した血液を分離して得た血漿について、以下の項目を検査した。

項 目	測 定 法	使 用 機 器
総蛋白濃度	ビレット法	遠心方式生化学自動分析装置 COBAS-FARA (ロシ)
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.O. DH 法	同上
クレアチン濃度	Jaffé 法 (Rate)	同上
ALP 活性	GSCC 法	同上
AST (GOT) 活性	IFCC 法	同上
ALT (GPT) 活性	同上	同上
γ-GTP 活性	γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法	同上
トリグリセリド濃度	GPO・DAOS 法	同上
無機リン濃度 (Inorg. phos.)	モリブデン酸直接法	同上
カルシウム濃度	OCPC 法	同上
A/G 比	計算	
ナトリウム濃度	イオン電極法	全自動電解質分析装置 EA05 (A&T)
カリウム濃度	同上	同上
塩素濃度	同上	同上

5) 病理学検査

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

重 量 測 定 器 官
脳、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に固定し（長期保存は 0.1 M リン酸緩衝10%ホルマリン溶液を使用）、その他の器官・組織は 0.1 M リン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定した。さらに、全例の*印を付した器官・組織および肉眼的観察で変化がみられた対照群の雄1例（動物番号8、以下No.8と略記）の前立腺および精嚢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、投与期間終了時の対照群および高用量群の全例および回復試験期間終了時の肉眼的観察で変化がみられた対照群の雄1例（No.3）の肝臓の組織学検査を実施した。なお、本試験では、投与期間終了時の対照群と高用量群の組織学検査で、被験物質投与に起因したと考えられる変化が認められなかったため、それ以外の動物の組織学検査は実施しなかった。

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、精嚢、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、膵臓、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および器官重量は、群ごとに平均値および標準偏差を求めた。次いで、試験群の構成が対照群を含めて3群以上の場合は、Bartlettの方法により分散の一様性について検定（有意水準：5%）を行った。分散が一様であった場合には一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性（有意水準：5%）が認められた場合は、Dunnett法により多重比較を行った。また、分散が一様でなかった場合は、Kruskal-Wallisの順位検定を行い、群間に有意性（有意水準：5%）が認められた場合には、Dunnett型の検定法で多重比較を行った。ただし、いずれかの群で分散が0となった場合には、Bartlettによる検定は行わずにKruskal-Wallisの順位検定を行い、その結果、群間に有意性が認められた場合には、Dunnett型の検定法により多重比較を行った。一方、試験群が対照群を含め2群の場合には、対照群と被験物質投与群の各平均値の差の検定は、F-検定（有意水準：5%）を行い、等分散の場合にはStudentのt検定法、不等分散の場合にはAspin-Welchのt検定法を用いて有意差検定を行った。ただし、どちらかの群で分散が0となった場合には、t検定は実施しなかった。

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

【結 果】

1. 死亡例

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

2. 一般状態

投与期間および回復試験期間中に、対照群を含むいずれの群にも一般状態の変化は認められなかった。

3. 体重 (Fig. 1、Table 1、Appendix 1)

投与期間中、各被験物質投与群の雌雄で、対照群との間に有意な体重の差は認められなかった。一方、回復試験期間中では、有意な体重増加が 1000 mg/kg 投与群の雌でみられた。しかし、投与期間中の同群の体重に有意差は認められておらず、また用量依存的な変化もみられていないことから、回復試験期間中の体重増加は被験物質投与による影響ではないと考えられた。

4. 摂餌量 (Fig. 2、Table 2、Appendix 2)

投与期間および回復試験期間中、各被験物質投与群の雌雄で、対照群との間に有意な摂餌量の差は認められなかった。

5. 尿検査所見 (Table 3、Appendix 3)

投与期間終了週の検査で、ビリルビン陽性 (+) 尿が 300 mg/kg 投与群の雄 1 例 (No. 16) で、潜血反応陽性 (++) 尿が 1000 mg/kg 投与群の雄 1 例 (No. 24) でみられた。これ以外に、投与期間終了週および回復試験期間終了週に対照群を含む被験物質投与群で、蛋白、ケトン体およびウロビリノーゲンが陽性を示した尿 (±あるいは+) が認められた。

6. 血液学検査所見 (Table 4、Appendix 4)

投与期間終了時の検査では、いずれの検査項目においても、対照群と各被験物質投与群の間に有意な差は認められなかった。一方、回復試験期間終了時の検査では、平均赤血球血色素量および血小板数の有意な増加が 1000 mg/kg 投与群の雌でみられたが、投与期間

終了時の検査では同様の変化は認められておらず、また用量依存的な変化もみられていないことから、これらの変化は被験物質投与による影響ではないと考えられた。

7. 血液生化学検査所見 (Table 5、Appendix 5)

投与期間終了時および回復試験期間終了時ともに、いずれの検査項目においても、対照群と各被験物質投与群の間に有意な差は認められなかった。

8. 病理学検査所見

1) 器官重量 (Table 6～7、Appendix 6～7)

投与期間終了時の解剖では、精巣上体の絶対重量の有意な増加が 100 および 1000 mg/kg 投与群で認められた。また、回復試験期間終了時の解剖では、解剖時体重および脾臓の絶対重量の有意な増加、脳および卵巣（合計値）の相対重量の有意な減少が、それぞれ 1000 mg/kg 投与群の雌で認められた。

2) 肉眼所見 (Table 8、Appendix 8)

(1)投与期間終了時解剖例

片側副腎の小型化、前立腺および精嚢の小型化が対照群の雄各 1 例 (No. 6、8) で観察された。このほかの対照群および被験物質投与群の雌雄ともに変化は認められなかった。

(2)回復試験期間終了時解剖例

肝臓の大型化が対照群の雄 1 例 (No. 3) で観察された。このほかの対照群および 1000 mg/kg 投与群の雌雄ともに変化は認められなかった。

3) 組織学検査所見 (Table 9、Appendix 9)

(1)投与期間終了時解剖例

肉眼的に小型化がみられた対照群の雄 1 例 (No. 6) の片側副腎には、皮質に限局性の鉍質沈着が観察された。また、小型化がみられた同群の雄 1 例 (No. 8) の前立腺および精嚢に変化は認められなかった。

肝臓では門脈周囲性の脂肪化が対照群および 1000 mg/kg 投与群の雌雄でみられた。腎臓では好塩基性尿細管およびリンパ球浸潤が対照群および 1000 mg/kg 投与群の雌雄で、

同群の雄では近位尿細管に好酸性封入体が、同群の雌では皮髄境界部の鉍質沈着が観察された。脾臓では髄外造血が対照群および 1000 mg/kg 投与群の雌雄で、同群の雌では褐色色素沈着も認められた。心臓では軽微な心筋の線維化が対照群および 1000 mg/kg 投与群の雌各 1 例 (No.40、57) で観察された。しかし、これらの所見はいずれも対照群と 1000 mg/kg 投与群の間で発生頻度および程度に有意な差は認められず、1000 mg/kg 投与群の雌雄ともに被験物質投与によると考えられる変化は認められなかった。

(2)回復試験期間終了時解剖例

肉眼的に大型化がみられた対照群の雄 1 例 (No.3) の肝臓では、小葉中心性に軽度の肝細胞の変性、壊死および肥大がみられ、門脈周囲性の軽微な脂肪化が認められた。

【考 察】

1-ナフトール-4-スルホン酸ナトリウム（以下 NSS と略記）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、死亡例はいずれの群にも認められなかった。

尿検査では、投与期間終了週にビリルビン陽性尿あるいは潜血反応陽性尿が雄の被験物質投与群の各1例でみられたが、肝臓、腎臓および膀胱に肉眼的変化はみられず、また血液生化学検査でも溶血、肝細胞障害および腎障害を示唆する所見は認められていない。また、ビリルビンおよび潜血反応陽性尿は少数例でみられた変化であることから、いずれも偶発的变化であると考えられた。

病理学検査では、投与期間終了時に精巣上体の絶対重量の有意な増加が 100 および 1000 mg/kg 投与群でみられたが、100 mg/kg 投与群では片側のみに有意差が認められた。また、精巣上体重量の変化は用量依存的な変化ではなく、精巣上体の肉眼所見および組織学所見に異常は認められなかったことから、毒性学的意義はないと考えられた。回復試験期間終了時には、1000 mg/kg 投与群の雌で解剖時体重の増加に伴う脳および卵巣の相対重量の有意な減少がみられたほか、脾臓の絶対重量の有意な増加が認められた。しかし、脾臓の相対重量に変化はみられず、投与期間終了時に脾臓の重量変化は認められなかったことから、被験物質投与による影響ではないと考えられた。

一般状態、体重、摂餌量、血液学検査、血液生化学検査、肉眼所見および組織学所見に被験物質投与によると考えられる変化は認められなかった。

以上のように、NSS を28日間反復経口投与した結果、1000 mg/kg/day の用量でも被験物質投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。従って、本試験条件下における NSS の無影響量は、雌雄ともに 1000 mg/kg/day であると考えられた。

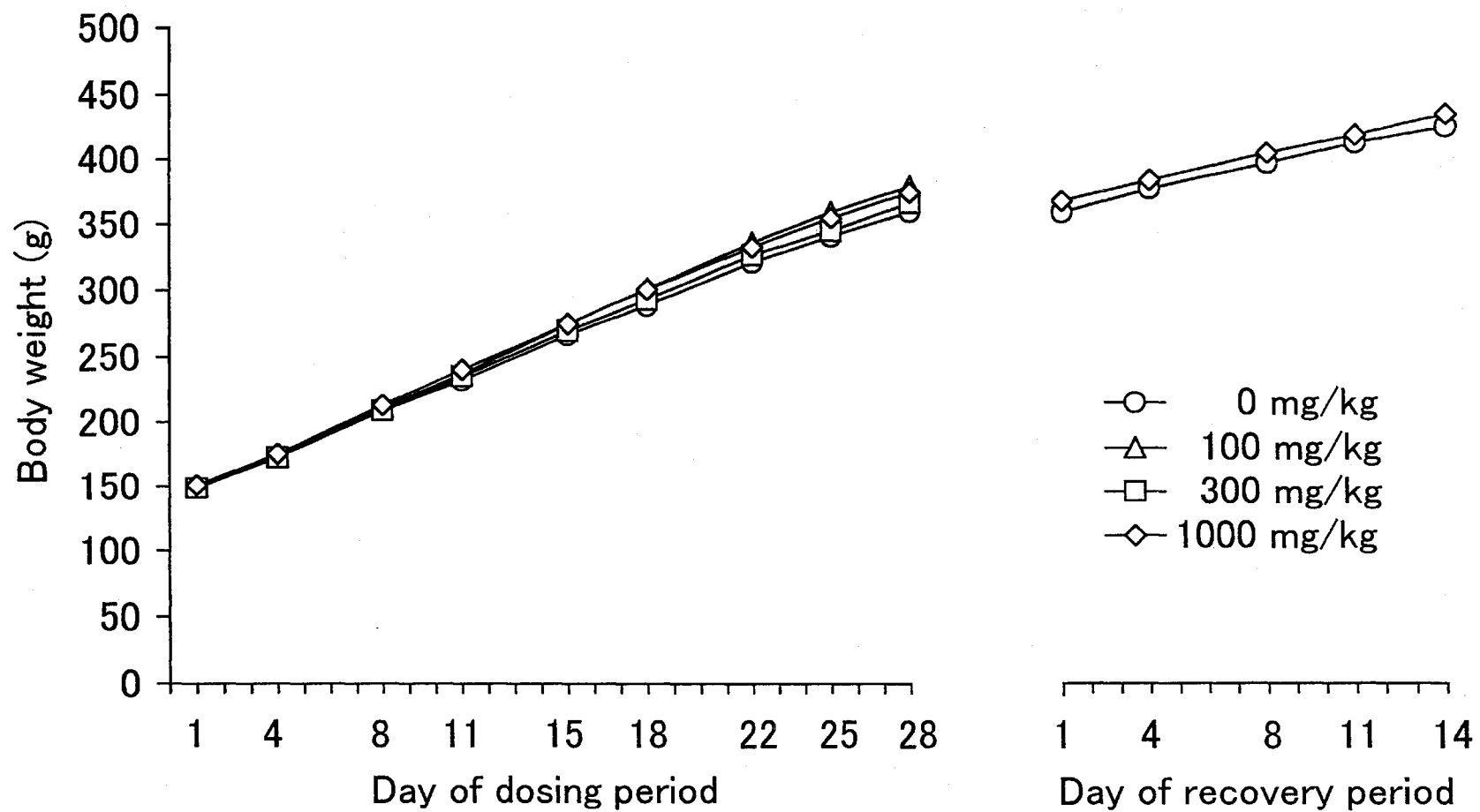


Fig. 1-1

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

Body weight changes in males

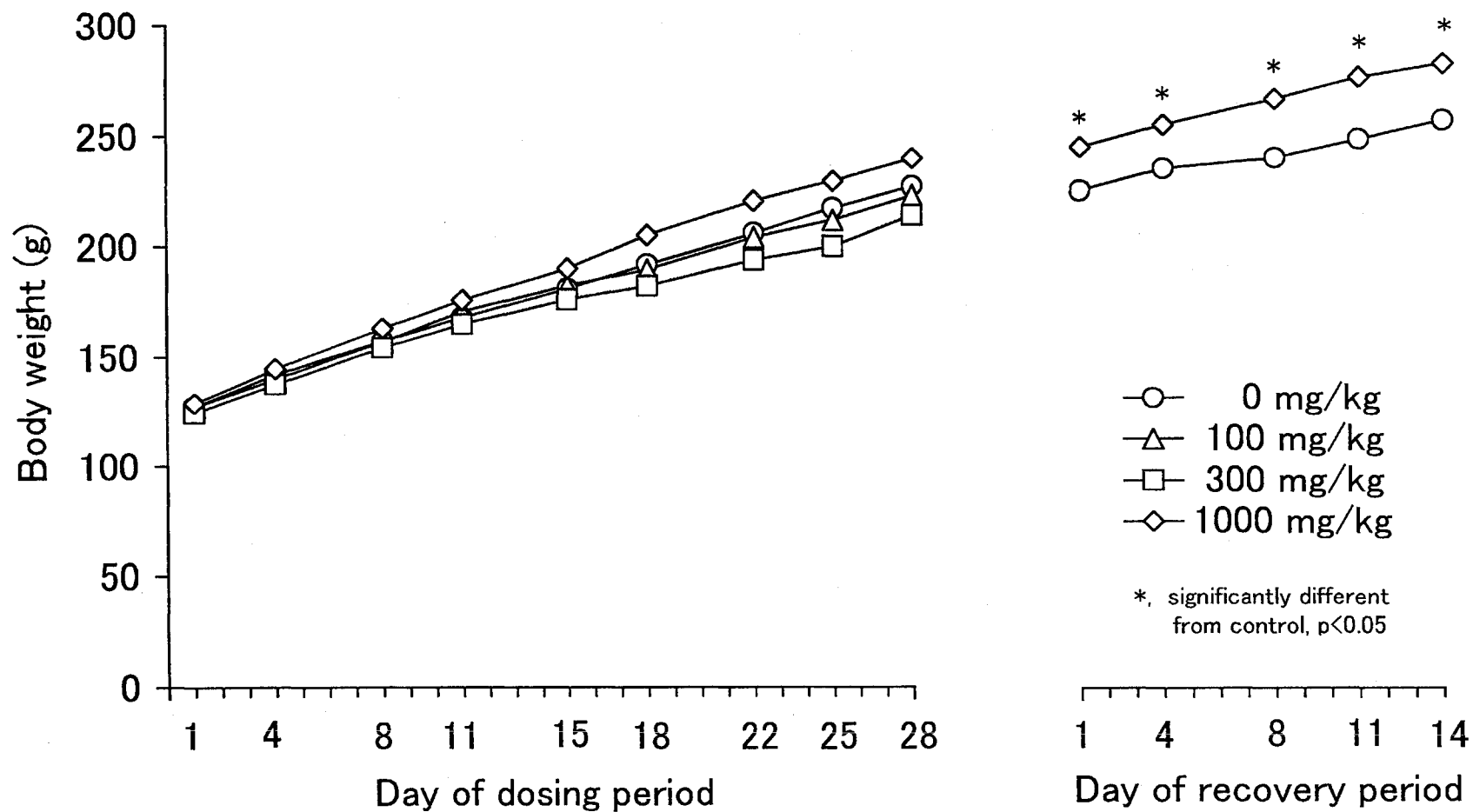


Fig. 1-2

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

Body weight changes in females

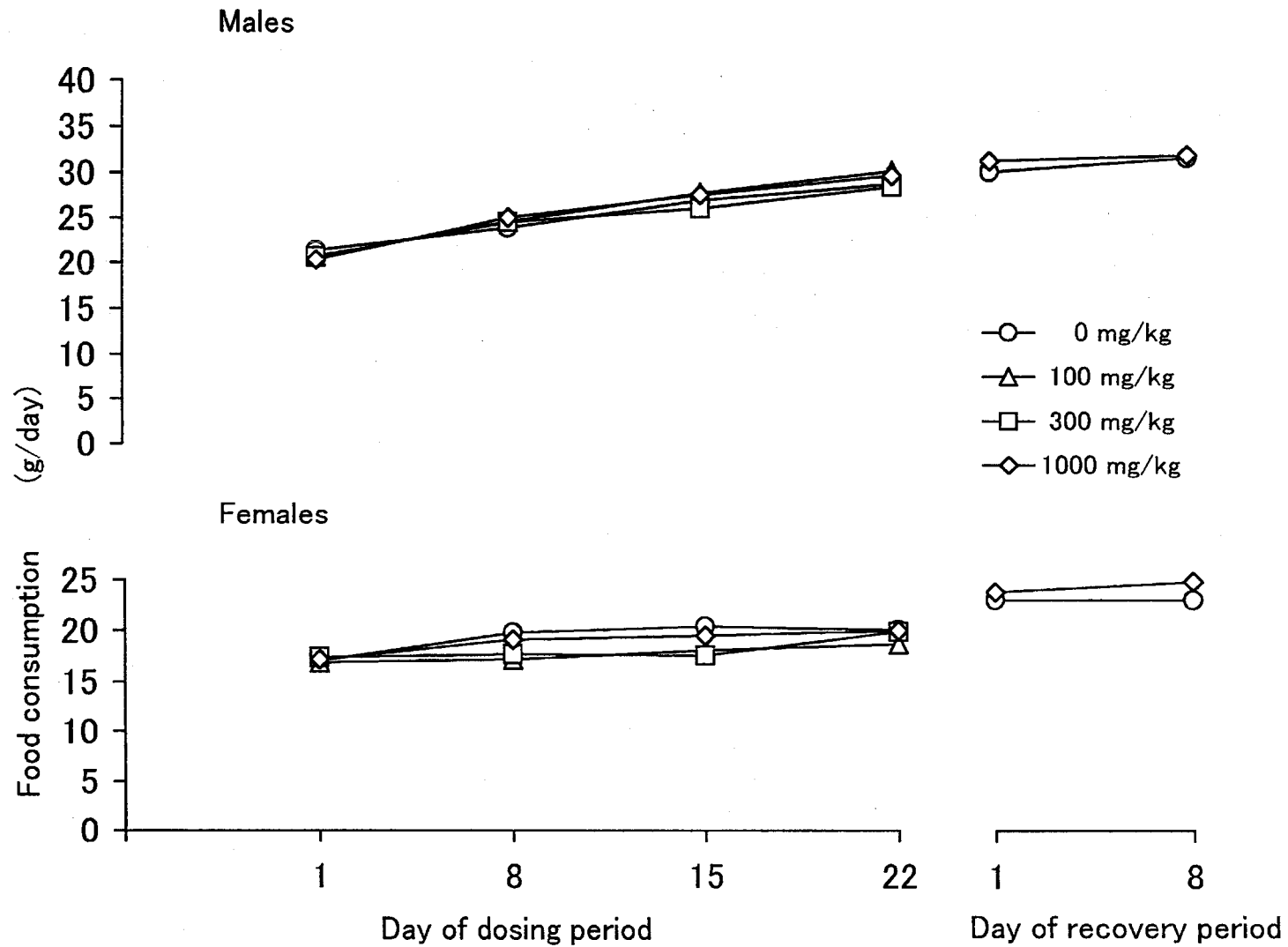


Fig. 2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of NSS 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 NSS 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) 148.8 ±5.6	(10) 172.8 ±8.4	(10) 209.0 ±12.0	(10) 232.4 ±15.0	(10) 267.2 ±19.2	(10) 289.3 ±21.0	(10) 321.5 ±24.1	(10) 341.4 ±26.0	(10) 360.3 ±27.7	(5) 360.2 ±37.3	(5) 378.8 ±42.9	(5) 398.7 ±47.6	(5) 414.3 ±51.0	(5) 426.7 ±52.5
100	(5) 149.6 ±5.1	(5) 173.0 ±7.9	(5) 210.9 ±11.2	(5) 237.2 ±14.3	(5) 275.4 ±18.8	(5) 301.5 ±22.7	(5) 336.3 ±25.4	(5) 360.5 ±28.3	(5) 380.0 ±32.5					
300	(5) 149.0 ±5.0	(5) 173.2 ±7.6	(5) 209.0 ±11.2	(5) 235.1 ±13.9	(5) 270.5 ±17.4	(5) 293.5 ±18.1	(5) 327.1 ±20.2	(5) 345.8 ±21.7	(5) 367.2 ±23.5					
1000	(10) 150.9 ±4.8	(10) 175.8 ±7.2	(10) 213.4 ±10.2	(10) 240.5 ±13.3	(10) 275.6 ±14.9	(10) 301.2 ±17.0	(10) 333.2 ±19.9	(10) 355.4 ±22.9	(10) 375.6 ±25.3	(5) 369.5 ±25.9	(5) 385.7 ±29.3	(5) 406.4 ±34.6	(5) 420.1 ±35.1	(5) 436.2 ±38.5

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 NSS 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) 127.2 ±5.7	(10) 142.1 ±7.0	(10) 157.3 ±11.7	(10) 168.2 ±12.5	(10) 181.2 ±14.9	(10) 191.9 ±18.3	(10) 205.9 ±22.3	(10) 217.1 ±21.9	(10) 226.7 ±24.5	(5) 225.1 ±12.6	(5) 235.2 ±16.0	(5) 240.1 ±20.6	(5) 248.8 ±18.9	(5) 257.2 ±19.8
100	(5) 126.9 ±6.7	(5) 140.1 ±7.2	(5) 157.2 ±8.1	(5) 170.9 ±8.4	(5) 182.6 ±9.9	(5) 189.7 ±10.1	(5) 204.1 ±14.0	(5) 211.8 ±15.7	(5) 222.7 ±17.0					
300	(5) 124.1 ±5.2	(5) 137.7 ±6.0	(5) 154.3 ±7.5	(5) 165.1 ±8.5	(5) 176.4 ±10.1	(5) 182.4 ±10.4	(5) 194.1 ±9.0	(5) 200.2 ±11.9	(5) 213.7 ±8.8					
1000	(10) 128.8 ±6.1	(10) 144.6 ±7.4	(10) 163.2 ±8.7	(10) 176.0 ±10.4	(10) 190.1 ±11.2	(10) 205.1 ±10.6	(10) 220.2 ±11.9	(10) 229.2 ±11.7	(10) 239.5 ±10.6	(5) 245.1* ±9.9	(5) 255.3* ±7.4	(5) 266.8* ±10.4	(5) 276.8* ±10.0	(5) 282.8* ±10.4

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

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

Table 2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of NSS 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)
	21.4 ±1.4	23.9 ±2.2	26.9 ±2.8	28.7 ±3.8	30.0 ±4.0	31.5 ±2.8
100	(5)	(5)	(5)	(5)		
	20.6 ±1.4	24.6 ±1.6	27.7 ±2.6	30.1 ±3.2		
300	(5)	(5)	(5)	(5)		
	20.7 ±1.5	24.5 ±2.2	26.0 ±2.0	28.4 ±2.7		
1000	(10)	(10)	(10)	(10)	(5)	(5)
	20.3 ±1.5	25.0 ±1.8	27.5 ±3.0	29.6 ±3.3	31.2 ±4.3	31.8 ±4.1

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 NSS 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	19.8	20.4	20.1	22.9	22.9
	±1.6	±1.9	±2.6	±3.0	±2.1	±2.9
100	(5)	(5)	(5)	(5)		
	16.9	17.2	18.1	18.7		
	±0.8	±3.1	±2.2	±2.1		
300	(5)	(5)	(5)	(5)		
	17.4	17.7	17.6	19.9		
	±1.7	±2.2	±2.5	±1.9		
1000	(10)	(10)	(10)	(10)	(5)	(5)
	17.2	19.1	19.5	20.0	23.7	24.7
	±1.1	±1.7	±2.2	±1.8	±2.5	±3.0

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 NSS in rats

Urinary findings in males and females on day 26 of dosing period

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Color	Turbidity	pH									Protein			Glucose	Ketone body				Bilirubin		Occult blood				Urobilinogen
			ly	-	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	≥9.0	-	±	+	-	-	±	+	-	+	-	±	+	++	±	
Male	0	10	10	10	0	0	0	0	1	1	4	3	1	2	7	1	10	8	1	1	10	0	10	0	0	0	10	
	100	5	5	5	0	0	0	0	1	1	2	1	0	2	2	1	5	5	0	0	5	0	5	0	0	0	5	
	300	5	5	5	0	1	0	0	1	0	0	3	0	1	2	2	5	4	1	0	4	1	5	0	0	0	5	
	1000	10	10	10	0	0	0	3	2	2	2	1	0	3	3	4	10	8	2	0	10	0	9	0	0	1	10	
Female	0	10	10	10	0	0	0	2	0	1	3	3	1	10	0	0	10	10	0	0	10	0	10	0	0	0	10	
	100	5	5	5	0	0	1	1	0	1	1	1	0	5	0	0	5	5	0	0	5	0	5	0	0	0	5	
	300	5	5	5	1	0	0	1	3	0	0	0	0	4	1	0	5	5	0	0	5	0	5	0	0	0	5	
	1000	10	10	10	0	3	1	2	2	0	1	1	0	7	2	1	10	10	0	0	10	0	10	0	0	0	10	

Color ly, light yellow
 Turbidity -, negative
 Protein -, negative; ±, trace; +, 30 mg/dL
 Glucose -, negative
 Ketone body -, negative; ±, trace; +, slight
 Bilirubin -, negative; +, slight
 Occult blood -, negative; ±, trace; +, slight; ++, moderate
 Urobilinogen ±, 0.1 EU/dL

Table 3-2

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

Urinary findings in males and females on day 12 of recovery period

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Color	Turbidity	pH										Protein			Glucose	Ketone body				Bilirubin	Occult blood	Urobilinogen	
			ly	-	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	≥9.0	-	±	+	-	-	±	+	-	-	±	+		
Male	0	5	5	5	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0	1	4	5	0	4	1	5	5	5	0		
	1000	5	5	5	0	0	0	0	2	2	0	1	0	0	0	5	5	0	3	2	5	5	5	0		
Female	0	5	5	5	1	0	1	0	1	1	0	0	1	4	1	0	5	5	0	0	5	5	5	0		
	1000	5	5	5	0	0	0	1	3	1	0	0	0	4	0	1	5	5	0	0	5	5	4	1		

Color ly, light yellow

Turbidity -, negative

Protein -, negative; ±, trace; +, 30 mg/dL

Glucose -, negative

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

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 NSS in rats

Hematological findings in males at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	R B C (x10 ⁴ /μL)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	M C V (fL)	M C H (pg)	M C H C (g/dL)	Platelet (x10 ⁴ /μL)	P T (sec)	A P T T (sec)
0	(5) 750 ±44	(5) 15.2 ±1.0	(5) 45.6 ±3.1	(5) 60.7 ±0.9	(5) 20.2 ±0.3	(5) 33.3 ±0.4	(5) 103.6 ±13.6	(5) 16.2 ±2.0	(5) 21.5 ±1.4
100	(5) 738 ±61	(5) 14.7 ±0.8	(5) 43.5 ±2.5	(5) 59.0 ±1.6	(5) 19.9 ±0.7	(5) 33.7 ±0.3	(5) 101.4 ±5.4	(5) 15.1 ±1.7	(5) 19.7 ±2.6
300	(5) 724 ±30	(5) 14.9 ±0.6	(5) 44.2 ±1.4	(5) 61.1 ±1.9	(5) 20.6 ±0.7	(5) 33.7 ±0.4	(5) 101.4 ±9.6	(5) 16.2 ±2.6	(5) 19.7 ±2.4
1000	(5) 712 ±18	(5) 14.5 ±0.5	(5) 43.3 ±1.7	(5) 60.8 ±1.4	(5) 20.4 ±0.4	(5) 33.6 ±0.2	(5) 102.3 ±7.3	(5) 19.2 ±2.0	(5) 22.4 ±0.8

Dose (mg/kg)	W B C (x100/μL)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 88.6 ±20.3	(5) 10 ±3	(5) 1 ±1	(5) 1 ±1	(5) 8 ±5	(5) 81 ±6
100	(5) 101.6 ±35.7	(5) 11 ±5	(5) 1 ±1	(5) 0 ±0	(5) 4 ±1	(5) 83 ±5
300	(5) 90.8 ±16.8	(5) 9 ±5	(5) 1 ±0	(5) 0 ±1	(5) 6 ±6	(5) 83 ±8
1000	(5) 128.4 ±42.9	(5) 7 ±2	(5) 1 ±0	(5) 0 ±0	(5) 3 ±1	(5) 88 ±3

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

Table 4-1-2

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

Hematological findings in females at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	R B C (x10 ⁴ /μL)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	M C V (fL)	M C H (pg)	M C H C (g/dL)	Platelet (x10 ⁴ /μL)	P T (sec)	A P T T (sec)
0	(5) 713 ±28	(5) 14.3 ±0.6	(5) 42.3 ±1.6	(5) 59.3 ±1.4	(5) 20.1 ±0.5	(5) 33.9 ±0.3	(5) 98.2 ±8.5	(5) 12.2 ±0.7	(5) 16.1 ±1.3
100	(5) 729 ±20	(5) 14.6 ±0.4	(5) 43.3 ±1.3	(5) 59.4 ±2.0	(5) 20.1 ±0.6	(5) 33.8 ±0.3	(5) 104.2 ±11.1	(5) 12.4 ±0.6	(5) 17.1 ±1.2
300	(5) 716 ±39	(5) 14.3 ±0.6	(5) 42.1 ±1.9	(5) 58.9 ±1.5	(5) 20.0 ±0.6	(5) 33.9 ±0.2	(5) 101.8 ±5.8	(5) 12.1 ±0.6	(5) 17.6 ±0.7
1000	(5) 709 ±39	(5) 14.5 ±0.5	(5) 42.9 ±1.7	(5) 60.6 ±1.3	(5) 20.4 ±0.5	(5) 33.7 ±0.3	(5) 107.0 ±6.3	(5) 12.0 ±0.5	(5) 17.4 ±1.6

Dose (mg/kg)	W B C (x100/μL)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 53.1 ±11.7	(5) 8 ±5	(5) 1 ±1	(5) 0 ±0	(5) 3 ±1	(5) 87 ±6
100	(5) 49.0 ±10.1	(5) 11 ±3	(5) 2 ±1	(5) 0 ±0	(5) 3 ±1	(5) 85 ±3
300	(5) 53.9 ±16.2	(5) 11 ±3	(5) 1 ±0	(5) 0 ±0	(5) 3 ±1	(5) 84 ±3
1000	(5) 49.5 ±5.8	(5) 11 ±3	(5) 2 ±1	(5) 0 ±0	(5) 4 ±1	(5) 83 ±3

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

Table 4-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of NSS 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) 775 ± 51	(5) 14.8 ± 1.0	(5) 44.1 ± 3.1	(5) 57.0 ± 1.6	(5) 19.1 ± 0.7	(5) 33.6 ± 0.4	(5) 102.4 ± 4.7	(5) 16.4 ± 3.2	(5) 21.7 ± 2.1
1000	(5) 781 ± 18	(5) 15.0 ± 0.3	(5) 44.8 ± 0.9	(5) 57.4 ± 1.0	(5) 19.2 ± 0.2	(5) 33.4 ± 0.4	(5) 101.7 ± 11.1	(5) 14.6 ± 1.3	(5) 19.4 ± 0.9

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100/\mu\text{L}$)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 133.0 ± 66.9	(5) 8 ± 2	(5) 1 ± 0	(5) 0 ± 0	(5) 3 ± 2	(5) 88 ± 4
1000	(5) 122.2 ± 28.7	(5) 8 ± 3	(5) 1 ± 0	(5) 0 ± 0	(5) 3 ± 2	(5) 87 ± 3

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

Table 4-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of NSS 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) 779 ± 36	(5) 15.0 ± 0.6	(5) 44.4 ± 2.2	(5) 57.0 ± 0.7	(5) 19.3 ± 0.2	(5) 33.9 ± 0.4	(5) 100.7 ± 2.4	(5) 12.3 ± 0.6	(5) 16.2 ± 1.0
1000	(5) 758 ± 12	(5) 15.0 ± 0.1	(5) 44.0 ± 0.8	(5) 58.1 ± 1.2	(5) 19.8* ± 0.3	(5) 34.1 ± 0.4	(5) 107.7* ± 5.5	(5) 12.3 ± 0.4	(5) 15.9 ± 1.4

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100/\mu\text{L}$)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 71.6 ± 15.5	(5) 8 ± 2	(5) 1 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 4 ± 3	(5) 86 ± 4
1000	(5) 75.1 ± 21.6	(5) 9 ± 4	(5) 1 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 4 ± 3	(5) 85 ± 7

Parameter, mean $\pm$ S.D.
(), number of animals*, significantly different from control, $p < 0.05$

Table 5-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of NSS 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) 5.2 ±0.4	(5) 3.1 ±0.2	(5) 1.47 ±0.06	(5) 145 ±15	(5) 36 ±4	(5) 41 ±8	(5) 16 ±2	(5) 0.6 ±0.1
100	(5) 5.2 ±0.2	(5) 3.0 ±0.2	(5) 1.36 ±0.12	(5) 144 ±22	(5) 38 ±6	(5) 54 ±13	(5) 16 ±2	(5) 0.6 ±0.0
300	(5) 4.9 ±0.1	(5) 2.9 ±0.1	(5) 1.44 ±0.13	(5) 137 ±21	(5) 36 ±7	(5) 43 ±10	(5) 15 ±2	(5) 0.6 ±0.0
1000	(5) 5.1 ±0.1	(5) 2.9 ±0.2	(5) 1.33 ±0.15	(5) 143 ±20	(5) 32 ±5	(5) 38 ±6	(5) 15 ±2	(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) 7.8 ±0.7	(5) 8.8 ±0.4	(5) 146.7 ±1.1	(5) 3.92 ±0.40	(5) 107.3 ±2.4	(5) 456 ±85	(5) 31 ±6	(5) 67 ±9	(5) 0 ±1
100	(5) 7.6 ±0.2	(5) 9.0 ±0.3	(5) 146.1 ±1.1	(5) 3.79 ±0.23	(5) 106.8 ±1.4	(5) 401 ±75	(5) 31 ±2	(5) 62 ±3	(5) 0 ±1
300	(5) 7.4 ±0.3	(5) 8.9 ±0.2	(5) 145.9 ±0.5	(5) 3.71 ±0.35	(5) 107.8 ±0.8	(5) 483 ±72	(5) 31 ±6	(5) 62 ±8	(5) 1 ±1
1000	(5) 7.9 ±0.3	(5) 8.9 ±0.3	(5) 145.7 ±0.9	(5) 3.64 ±0.17	(5) 107.0 ±0.9	(5) 388 ±88	(5) 27 ±4	(5) 66 ±7	(5) 1 ±1

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

Table 5-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of NSS 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) 5.4 ±0.6	(5) 3.2 ±0.3	(5) 1.54 ±0.14	(5) 117 ±11	(5) 42 ±10	(5) 25 ±7	(5) 15 ±2	(5) 0.6 ±0.1
100	(5) 5.1 ±0.4	(5) 3.0 ±0.3	(5) 1.49 ±0.09	(5) 111 ±15	(5) 38 ±3	(5) 23 ±3	(5) 18 ±1	(5) 0.6 ±0.1
300	(5) 5.0 ±0.2	(5) 3.1 ±0.2	(5) 1.62 ±0.11	(5) 104 ±12	(5) 42 ±7	(5) 28 ±5	(5) 19 ±3	(5) 0.6 ±0.1
1000	(5) 4.9 ±0.3	(5) 3.0 ±0.2	(5) 1.65 ±0.20	(5) 118 ±18	(5) 39 ±6	(5) 22 ±5	(5) 19 ±4	(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) 5.9 ±1.0	(5) 8.7 ±0.5	(5) 146.0 ±1.1	(5) 3.69 ±0.34	(5) 109.6 ±2.0	(5) 281 ±73	(5) 21 ±4	(5) 56 ±6	(5) 0 ±0
100	(5) 6.4 ±0.9	(5) 8.7 ±0.7	(5) 146.3 ±1.6	(5) 3.70 ±0.14	(5) 110.3 ±1.7	(5) 276 ±74	(5) 25 ±8	(5) 60 ±10	(5) 0 ±0
300	(5) 6.5 ±0.6	(5) 8.6 ±0.3	(5) 146.3 ±1.1	(5) 3.66 ±0.42	(5) 111.2 ±0.5	(5) 269 ±47	(5) 22 ±3	(5) 63 ±8	(5) 0 ±0
1000	(5) 6.7 ±0.7	(5) 8.7 ±0.3	(5) 145.8 ±1.4	(5) 3.54 ±0.32	(5) 109.8 ±0.8	(5) 285 ±32	(5) 23 ±2	(5) 58 ±4	(5) 0 ±0

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 NSS 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 ±0.2	(5) 3.2 ±0.1	(5) 1.42 ±0.14	(5) 171 ±12	(5) 37 ±8	(5) 50 ±20	(5) 15 ±3	(5) 0.6 ±0.0
1000	(5) 5.5 ±0.3	(5) 3.3 ±0.2	(5) 1.49 ±0.08	(5) 155 ±20	(5) 37 ±4	(5) 44 ±15	(5) 16 ±1	(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) 7.4 ±0.6	(5) 9.0 ±0.2	(5) 144.3 ±1.5	(5) 4.02 ±0.37	(5) 105.6 ±0.8	(5) 338 ±93	(5) 53 ±54	(5) 91 ±61	(5) 0 ±1
1000	(5) 7.5 ±0.6	(5) 9.1 ±0.4	(5) 144.5 ±1.0	(5) 3.86 ±0.21	(5) 105.6 ±1.6	(5) 409 ±50	(5) 30 ±4	(5) 67 ±9	(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 NSS 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) 5.3 ±0.2	(5) 3.3 ±0.1	(5) 1.70 ±0.12	(5) 123 ±4	(5) 38 ±6	(5) 24 ±5	(5) 19 ±1	(5) 0.7 ±0.1
1000	(5) 5.4 ±0.3	(5) 3.3 ±0.2	(5) 1.59 ±0.24	(5) 130 ±11	(5) 48 ±9	(5) 30 ±8	(5) 19 ±2	(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) 8.7 ±0.2	(5) 144.4 ±1.3	(5) 3.99 ±0.12	(5) 109.7 ±1.0	(5) 257 ±28	(5) 21 ±3	(5) 62 ±7	(5) 0 ±1
1000	(5) 5.7 ±0.4	(5) 8.9 ±0.3	(5) 143.7 ±0.7	(5) 3.85 ±0.30	(5) 108.4 ±0.9	(5) 236 ±56	(5) 22 ±4	(5) 56 ±5	(5) 1 ±0

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

Table 6-1-1

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

Absolute organ weights in males at the end of dosing period

Dose	Body weight	Brain	Thymus	Heart	Liver	Kidneys	Spleen	Adrenal glands	Testes	Epididymides
(mg/kg)	(g)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)
0	(5) 327.4 ±11.8	(5) 1929.9 ±54.0	(5) 514.5 ±68.3	(5) 1120.7 ±152.0	(5) 10502.2 ±860.4	(5) 2594.6 ±178.5	(5) 734.6 ±155.2	(5) 55.5 ±3.5	(5) 2870.2 ±207.0	(5) 610.1 ±56.8
100	(5) 343.7 ±25.3	(5) 1869.7 ±57.1	(5) 563.3 ±20.1	(5) 1177.2 ±133.8	(5) 11823.0 ±1735.7	(5) 2782.2 ±414.8	(5) 756.4 ±142.5	(5) 54.8 ±12.4	(5) 2988.7 ±226.3	(5) 683.2 ±35.2
300	(5) 332.4 ±24.5	(5) 1922.1 ±60.4	(5) 583.5 ±114.8	(5) 1082.6 ±59.9	(5) 10440.3 ±1387.1	(5) 2626.7 ±267.6	(5) 695.3 ±95.2	(5) 49.9 ±4.8	(5) 2969.5 ±195.5	(5) 671.8 ±47.0
1000	(5) 348.8 ±18.2	(5) 1887.7 ±85.9	(5) 551.8 ±75.5	(5) 1123.6 ±89.8	(5) 10898.7 ±918.6	(5) 2735.6 ±119.8	(5) 790.0 ±134.2	(5) 52.4 ±6.8	(5) 3035.0 ±264.0	(5) 705.8* ±49.1

Parameter, mean±S.D.
(), number of animals*, significantly different from control, $p < 0.05$

Table 6-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of NSS 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) 209.9 ±28.5	(5) 1708.6 ±83.7	(5) 392.0 ±56.4	(5) 726.5 ±118.2	(5) 6457.8 ±1133.8	(5) 1665.8 ±174.2	(5) 525.1 ±73.7	(5) 61.2 ±6.2	(5) 77.5 ±10.9
100	(5) 203.4 ±15.5	(5) 1727.4 ±26.7	(5) 488.5 ±122.3	(5) 744.4 ±54.1	(5) 6284.9 ±510.4	(5) 1646.4 ±147.2	(5) 461.4 ±90.5	(5) 58.3 ±6.6	(5) 83.3 ±7.7
300	(5) 194.1 ±10.2	(5) 1720.0 ±60.6	(5) 411.0 ±43.9	(5) 671.3 ±30.9	(5) 5855.3 ±462.9	(5) 1592.2 ±124.0	(5) 514.4 ±87.3	(5) 57.2 ±5.4	(5) 76.1 ±11.1
1000	(5) 216.4 ±12.0	(5) 1748.4 ±52.6	(5) 453.3 ±28.3	(5) 763.5 ±38.5	(5) 6446.6 ±546.3	(5) 1666.4 ±168.0	(5) 528.3 ±45.3	(5) 53.2 ±5.4	(5) 81.8 ±6.3

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

Table 6-2-1

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

Absolute organ weights in males at the end of recovery period

Dose	Body weight	Brain	Thymus	Heart	Liver	Kidneys	Spleen	Adrenal glands	Testes	Epididymides
(mg/kg)	(g)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)
0	(5) 389.9 ±47.5	(5) 1904.3 ±46.9	(5) 532.0 ±133.6	(5) 1228.7 ±234.5	(5) 13015.2 ±3097.2	(5) 2980.6 ±476.3	(5) 771.3 ±138.4	(5) 60.6 ±12.5	(5) 2984.6 ±283.7	(5) 916.5 ±78.6
1000	(5) 397.9 ±32.9	(5) 1920.7 ±36.9	(5) 579.6 ±53.8	(5) 1255.9 ±172.5	(5) 12206.3 ±1755.5	(5) 2837.6 ±264.2	(5) 782.4 ±119.7	(5) 55.8 ±11.4	(5) 3123.3 ±154.1	(5) 906.6 ±33.9

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 NSS 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) 233.9 ±17.7	(5) 1756.3 ±90.7	(5) 418.1 ±100.6	(5) 821.7 ±100.9	(5) 6952.4 ±929.7	(5) 1908.9 ±181.6	(5) 500.8 ±76.6	(5) 69.2 ±11.7	(5) 82.0 ±10.8
1000	(5) 259.6* ±8.3	(5) 1809.0 ±58.9	(5) 457.0 ±98.0	(5) 876.1 ±59.5	(5) 7573.0 ±311.0	(5) 2014.4 ±157.6	(5) 599.1* ±42.3	(5) 65.9 ±6.7	(5) 78.7 ±6.4

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 NSS 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) 327.4 ±11.8	(5) 5.901 ±0.262	(5) 1.575 ±0.232	(5) 3.431 ±0.514	(5) 32.047 ±1.704	(5) 7.920 ±0.320	(5) 2.246 ±0.480	(5) 0.169 ±0.005	(5) 8.789 ±0.902	(5) 1.864 ±0.159
100	(5) 343.7 ±25.3	(5) 5.462 ±0.402	(5) 1.650 ±0.182	(5) 3.417 ±0.142	(5) 34.249 ±2.765	(5) 8.059 ±0.713	(5) 2.191 ±0.298	(5) 0.159 ±0.028	(5) 8.720 ±0.736	(5) 1.998 ±0.200
300	(5) 332.4 ±24.5	(5) 5.800 ±0.330	(5) 1.752 ±0.318	(5) 3.264 ±0.175	(5) 31.324 ±2.270	(5) 7.896 ±0.453	(5) 2.088 ±0.199	(5) 0.151 ±0.020	(5) 8.954 ±0.615	(5) 2.028 ±0.185
1000	(5) 348.8 ±18.2	(5) 5.416 ±0.148	(5) 1.590 ±0.266	(5) 3.223 ±0.216	(5) 31.224 ±1.408	(5) 7.856 ±0.425	(5) 2.255 ±0.265	(5) 0.150 ±0.017	(5) 8.712 ±0.790	(5) 2.025 ±0.120

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 NSS 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) 209.9 ±28.5	(5) 8.229 ±0.889	(5) 1.880 ±0.265	(5) 3.450 ±0.178	(5) 30.689 ±3.006	(5) 7.985 ±0.683	(5) 2.517 ±0.321	(5) 0.294 ±0.035	(5) 0.371 ±0.045
100	(5) 203.4 ±15.5	(5) 8.529 ±0.569	(5) 2.384 ±0.466	(5) 3.663 ±0.133	(5) 30.912 ±1.084	(5) 8.092 ±0.237	(5) 2.259 ±0.326	(5) 0.287 ±0.030	(5) 0.411 ±0.035
300	(5) 194.1 ±10.2	(5) 8.876 ±0.384	(5) 2.130 ±0.328	(5) 3.461 ±0.084	(5) 30.142 ±0.997	(5) 8.201 ±0.373	(5) 2.649 ±0.406	(5) 0.296 ±0.037	(5) 0.394 ±0.065
1000	(5) 216.4 ±12.0	(5) 8.101 ±0.538	(5) 2.096 ±0.108	(5) 3.530 ±0.083	(5) 29.767 ±1.391	(5) 7.686 ±0.358	(5) 2.452 ±0.303	(5) 0.245 ±0.017	(5) 0.378 ±0.034

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

Table 7-2-1

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

Relative organ weights in males at the end of recovery period

Dose	Body weight	Brain	Thymus	Heart	Liver	Kidneys	Spleen	Adrenal glands	Testes	Epididymides
(mg/kg)	(g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)
0	(5) 389.9 ±47.5	(5) 4.928 ±0.456	(5) 1.362 ±0.289	(5) 3.142 ±0.391	(5) 33.082 ±3.919	(5) 7.632 ±0.600	(5) 1.971 ±0.166	(5) 0.155 ±0.028	(5) 7.738 ±1.131	(5) 2.364 ±0.217
1000	(5) 397.9 ±32.9	(5) 4.849 ±0.331	(5) 1.459 ±0.107	(5) 3.162 ±0.405	(5) 30.569 ±2.177	(5) 7.136 ±0.390	(5) 1.965 ±0.229	(5) 0.140 ±0.023	(5) 7.881 ±0.590	(5) 2.287 ±0.152

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 NSS in rats

Relative 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/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)
0	(5) 233.9 ±17.7	(5) 7.528 ±0.450	(5) 1.779 ±0.343	(5) 3.504 ±0.195	(5) 29.664 ±2.515	(5) 8.160 ±0.468	(5) 2.133 ±0.174	(5) 0.295 ±0.042	(5) 0.350 ±0.028
1000	(5) 259.6* ±8.3	(5) 6.971* ±0.221	(5) 1.756 ±0.354	(5) 3.374 ±0.179	(5) 29.173 ±0.799	(5) 7.756 ±0.479	(5) 2.310 ±0.184	(5) 0.254 ±0.020	(5) 0.304* ±0.030

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

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

Table 8-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of NSS 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	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Adrenal gland)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Small, unilateral	4	1	5	0	5	0	5	0
(Prostate)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Small	4	1	5	0	5	0	5	0
(Seminal vesicle)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Small	4	1	5	0	5	0	5	0

-, negative; +, positive.

[], number of animals examined.

Table 8-2

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

Macroscopical findings in males at the end of recovery period

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

-, negative; +, positive.

[], number of animals examined.

Table 9-1

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

Histological findings in males at the end of dosing period

Dose Grade	0 mg/kg						1000 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Liver)	[5]						[5]					
Fatty change, periportal	1	4	0	0	0	4	0	5	0	0	0	5
(Kidney)	[5]						[5]					
Inclusion body, intracytoplasmic, eosinophilic, proximal tubule	2	3	0	0	0	3	2	2	1	0	0	3
Basophilic tubule	1	4	0	0	0	4	2	3	0	0	0	3
Cellular infiltration, lymphocyte	1	4	0	0	0	4	1	4	0	0	0	4
(Spleen)	[5]						[5]					
Hematopoiesis, extramedullary	0	0	3	2	0	5	0	0	3	2	0	5
(Adrenal gland)	[5]						[5]					
Mineralization, cortex, focal	4	0	0	1	0	1	5	0	0	0	0	0
(Heart)	[5]						[5]					
No abnormalities												
(Testis)	[5]						[5]					
No abnormalities												
(Epididymis)	[5]						[5]					
No abnormalities												
(Prostate)	[1]											
No abnormalities												
(Seminal vesicle)	[1]											
No abnormalities												

-, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; Pos., total of positive grade.

[], number of animals examined.

Table 9-2

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

Histological findings in females at the end of dosing period

Dose Grade	0 mg/kg							1000 mg/kg						
		-	±	+	++	+++	Pos.		-	±	+	++	+++	Pos.
(Liver)	[5]							[5]						
Fatty change, periportal		0	5	0	0	0	5		0	5	0	0	0	5
(Kidney)	[5]							[5]						
Basophilic tubule		0	5	0	0	0	5		0	5	0	0	0	5
Cellular infiltration, lymphocyte		3	2	0	0	0	2		3	2	0	0	0	2
Mineralization, cortico-medullary junction		1	4	0	0	0	4		1	4	0	0	0	4
(Spleen)	[5]							[5]						
Deposit, pigment, brown		0	3	2	0	0	5		0	3	2	0	0	5
Hematopoiesis, extramedullary		0	4	1	0	0	5		0	4	1	0	0	5
(Heart)	[5]							[5]						
Myocardial fibrosis		4	1	0	0	0	1		4	1	0	0	0	1
(Adrenal gland)	[5]							[5]						
No abnormalities														
(Ovary)	[5]							[5]						
No abnormalities														

-, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; Pos., total of positive grade.

[], number of animals examined.

Table 9-3

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

Histological findings in males at the end of recovery period

Dose		0 mg/kg					
Grade		-	±	+	++	+++	Pos.
(Liver)	[1]						
Degeneration/necrosis, hepatocyte, centrilobular		0	0	1	0	0	1
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular		0	0	1	0	0	1
Fatty change, periportal		0	1	0	0	0	1

-, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; Pos., total of positive grade.

[], number of animals examined.