

最 終 報 告 書

コハク酸二ナトリウム六水和物のラットを用いる
反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

試験番号：4803 (115-145)

平成 13 年 6 月 6 日

試験委託者
厚生労働省 医薬局

財団法人
食品農医薬品安全性評価センター

目 次

1. 要約	4
2. 緒言	5
3. 表題	6
4. 試験目的	6

13. 試験材料および方法	9
14. 試験結果	17
15. 考察および結論	21
16. 参考文献	24

Figures	F-1~4
Figure 1 Body weight change of male rats	F-1
Figure 2 Body weight change of female rats	F-2
Figure 3 Food consumption of male rats	F-3
Figure 4 Food consumption of female rats	F-4

Tables	T-01~32
Table 1-1 Clinical observations in male rats	T-01
Table 1-2 Clinical observations in female rats (Before and during mating period)	T-02
Table 1-3 Clinical observations in female rats (Gestation period)	T-03
Table 1-4 Clinical observations in female rats (Lactation period)	T-05
Table 2-1 Body weight change of male rats	T-06
Table 2-2 Body weight change of female rats	T-07

Table 3-1	Food consumption of male rats	T-08
Table 3-2	Food consumption of female rats	T-09
Table 4-1	Hematology of male rats	T-10
Table 4-2	Hematology of female rats	T-11
Table 5-1	Coagulation of male rats	T-12
Table 5-2	Coagulation of female rats	T-13
Table 6-1	Blood chemistry of male rats	T-14
Table 6-2	Blood chemistry of female rats	T-15
Table 7	Urinalysis of male rats	T-16
Table 8-1	Absolute and relative organ weight of male rats	T-18
Table 8-2	Absolute and relative organ weight of female rats	T-19
Table 9-1	Summary of gross findings (sacrificed, male)	T-20
Table 9-2	Summary of gross findings (sacrificed, female)	T-21
Table 10-1	Summary of histological findings (sacrificed, male)	T-22
Table 10-2	Summary of histological findings (sacrificed, female)	T-24
Table 10-3	Cell type and number per Sertoli cell in seminiferous tubules of rats at VII – VIII stage of spermatogenesis during dosing period	T-26
Table 11	Copulation and fertility results in rats	T-27
Table 12	Findings of delivery in dams(F0)	T-28
Table 13	External observations on live pups(F1) from rats	T-29
Table 14	Body weight change of pups(F1) from rats	T-30
Table 15-1	Summary of gross findings of pups(F1) from rats (sacrificed, male)	T-31
Table 15-2	Summary of gross findings of pups(F1) from rats (sacrificed, female)	T-32

1. 要約

既存化学物質の毒性学的性質を評価するため、コハク酸二ナトリウム六水和物の 0 (溶媒対照群), 100, 300 および 1000 mg/kg/day をラットの交配前 14 日から交配期間, 妊娠期間および哺育 4 日まで連続経口投与し, 反復投与毒性に加えて生殖・発生に及ぼす影響を検討した。

1) 反復投与毒性

死亡例は, 投与期間を通じ雌雄いずれの群にも認められなかった。

一般状態の観察では, 軟便が雄の 1000 mg/kg 群で認められた。

体重, 摂餌量, 血液学検査および血液凝固能検査には被験物質投与の影響は認められなかった。

血液生化学検査では, 雌の 1000 mg/kg 群で尿素窒素が高値を示した。雄の尿検査では 300 および 1000 mg/kg 群で蛋白高値, 潜血陽性動物が少数例ながら認められた。

器官重量には被験物質投与の影響は認められず, 病理学検査では剖検所見および組織所見ともに被験物質投与の影響を示唆する病変は認められなかった。また, 1000 mg/kg 群の精子形成サイクルにも異常は観察されなかった。

2) 生殖発生毒性

平均性周期, 交尾能および受胎能に被験物質投与の影響は認められなかった。分娩時観察では妊娠動物の全例が正常に分娩し, 妊娠期間, 妊娠黄体数, 着床痕数, 出産児数, 出產生児数, 性比, 着床率, 出産率, 出生率および分娩率に被験物質投与の影響は認められなかった。

雌雄の新生児の生存性および生後 0 および 4 日の体重推移, 新生児の外表, 死亡児および哺育 4 日の剖検にも被験物質投与による影響は認められなかった。

以上の結果から, 本試験条件下ではコハク酸二ナトリウム六水和物の反復投与により投与後の一般状態の変化で雄の 1000 mg/kg 以上の投与群で軟便が観察された。また, 雌では尿素窒素が 1000 mg/kg 群で高値を示し, 雄の尿検査で 300 および 1000 mg/kg 群において 300 mg/dL 以上の蛋白を示す動物が少数例ながら認められた。したがって, 無影響量は雄で 100 mg/kg/day, 雌で 300 mg/kg/day と判断された。

雌雄の生殖に及ぼす影響および児動物の発生・発育に及ぼす影響はともに 1000 mg/kg/day 投与でも認められず, いずれも無影響量は 1000 mg/kg/day と判断された。

2. 緒言

コハク酸二ナトリウム六水和物は、酸味料、調味料あるいは pH 調整剤の用途で食品添加物として用いられている。本化合物の毒性に関する報告はなく、今回、OECD による既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環としてコハク酸二ナトリウム六水和物の反復投与毒性および生殖・発生毒性を検討したのでその結果を報告する。

3. 表題

コハク酸二ナトリウム六水和物のラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

4. 試験目的

既存化学物質の毒性学的性質を評価する一環として、ラットを用いた反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、一般毒性学的影響に加えて生殖・発生に及ぼす影響を検討した。

13. 試験材料および方法

13.1. 被験物質

コハク酸二ナトリウム六水和物 (Butanedioic acid, disodium salt, hexahydrate, CAS No. 6106-21-4, , Lot No. , 純度 99.9 wt%, 分子量 270.14) は白色結晶性の粉末であり, 使用時まで被験物質保管庫に密閉容器で保管した。

コハク酸二ナトリウム六水和物を実測した結果は, Reference data 1 に示した。

被験物質は注射用水 (光製薬株式会社, Lot No. A005CS) に溶解し, 調製した。被験物質の注射用水中での安定性は, 3 および 200 mg/mL の濃度について室温 (約 25℃) 保存下 24 時間および冷蔵 (約 4℃) 保存下 7 日間安定であることが当センター代謝分析室において確認されている [試験番号: 4799 (115-141)]。投与液の調製は 6 日に 1 回以上行い, 1 日使用分ずつ小分けし, 投与まで冷暗所に保存した。

投与液の濃度分析は, 調製開始時に調製した全ての試験群の投与液について行った。その結果, Reference data 2 に示すように表示濃度に対し 91.9 ~ 98.3% の範囲であった。したがって, 投与液にはほぼ所定量のコハク酸二ナトリウム六水和物が含有されていることを確認した。

投与終了後に製造元に返却した被験物質について, 製造元で再分析した結果, 純度は 99.9% であり, 被験物質は投与期間中安定であったことが確認された (Reference data 3)。

13.2. 使用動物および飼育条件

試験には, 日本チャールス・リバー株式会社から購入した生後 8 週齢の CD(SD)IGS[SPF]系雌雄ラットを使用した。購入した動物は 7 日間検疫・馴化飼育した後, 体重推移および一般状態に異常が認められなかったものを予備飼育に移行した。

動物は, 温度 $24 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (実測値: $21.1 \sim 25.6^{\circ}\text{C}$), 湿度 $55 \pm 20\%$ (実測値: $42 \sim 74\%$), 換気回数 15 回/時間, 照度 150 ~ 300 lux, 照明時間 12 時間 (午前 7 時点灯, 午後 7 時消灯) に設定されたバリアシステムの 504 号飼育室 (W 5.7 × D 10.0 × H 2.5 m, 142.5 m^3) で飼育した。株式会社東京技研サービスの自動水洗式飼育機を使用し, アルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ (W 15.8 × D 23.8 × H 16.0 cm, 飼育ケージ・スペース 6017 cm^3) に動物を 1 匹ずつ収容し飼育した。但し, 雄は交配期間中, アルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ (W 36.8 × D 25.0 × H 16.0 cm, 飼育ケージ・スペース 14720 cm^3) に収容し, 自然分娩母体については, 妊娠 18 日以降

哺育4日までアルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ(W 36.8×D 25.0×H 16.0 cm) に哺育トレイおよび日本チャールス・リバー株式会社製の巣作り材料(サンフレーク)を入れ飼育した。

飼育ケージは隔週1回、給餌器は週1回交換した。

飼料は、オリエンタル酵母工業株式会社製造のNMF固型飼料(放射線滅菌飼料, Lot No. 000712, 000810)を使用し、飼育期間中自由に摂取させた。飲水は、水道水を給水ノズルより自由に摂取させた。供給した飼料および水には試験に支障を来す可能性の考えられる夾雑物の混在はなかった(Reference data 4, 5)。

したがって、動物の馴化期間を含め、飼育期間中、データの信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因の変化はなかった。

13.3. 群分け・個体識別

群分けは雌雄ともに検疫・馴化期間終了後8日間の予備飼育期間の後に10週齢で行った。なお、雌は群分け前に8日間の性周期観察を行い、正常な性周期を有する動物を群分けに用いた。群分け終了時の体重は、雄で343~408 g, 雌で209~247 gの範囲であり、平均体重の20%以内の動物を試験に用いた。

投与開始日の体重をもとに層別化し、無作為抽出法により1群当たり雌雄各6匹を振り分けた。群分け後の動物の識別は耳介に群番号および群内番号を入墨すると共にケージに動物標識番号(Animal ID-No.)をつけた。

但し、群分け前までは仮動物番号により管理した。

余剰動物は炭酸ガスにより安楽死させた。

13.4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

本被験物質のラットを用いた急性経口毒性試験[試験番号 4799 (115-141)]では、LD₅₀値は雌雄ともに2000 mg/kg以上と推定された。この試験結果を参考にして、0, 30, 100, 300 および 1000 mg/kg の用量で予備試験「コハク酸二ナトリウム六水和物のラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験-2週間投与予備試験[試験番号 4802 (115-144)]」を実施した。その結果、最高用量の1000 mg/kg/day 投与によっても死亡例は認められず、雌雄の一般状態、体重、摂餌量、血液学検査、血液凝固能検査および血液生化学検査にも被験物質投与の影響は認められなかった。また、剖検所見および器官重量にも被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。以上のことから、本試験の用量はOECD ガイドライン 422 で上限用量として指定されている1000 mg/kgを高用量とし、以下公比約3で除し、300 および 100 mg/kgを設定した。

投与経路は、OECD ガイドライン「反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験」で指示されている投与経路に準じて強制経口投与とした。

投与容量は、体重 100 g 当たり 0.5 mL とし、交配前および交配期間中の雌雄では個体別に測定した最新体重に基づき算出した。また、妊娠期間および哺育期間中の雌は、妊娠 0, 7, 14, 20 および哺育 0 日に測定した個体別体重に基づいて算出した。投与液は胃ゾンデを用いて毎日 1 回（7 日／週）8:39～11:52 に強制経口投与した。対照群には溶媒である注射用水のみを投与した。

投与期間は、雄は交配前 14 日間と交配期間 14 日間および交配期間終了後 24 日間の連続 52 日間とした。雌は交配前 14 日間と交配期間中（最長 4 日間）および交尾成立雌は妊娠期間を通じて分娩後の哺育 4 日まで（42～46 日間）とした。

13.5. 観察および検査

13.5.1. 一般状態

雌雄とも、一般状態の観察は毎日 2 回以上（剖検日は 1 回）行い、異常および死亡の有無を記録した。

13.5.2. 体重

雄は投与 1（投与開始日）、8, 15, 22, 29, 36, 43, 50 および 53 日（剖検日）に測定し、投与 1 から 50 日までの体重増加量を算出した。

雌は投与 1（投与開始日）、8 および 15 日に測定し、投与 1 から 15 日までの体重増加量を算出した。また、交尾成立後の雌は、妊娠 0, 7, 14 および 20 日に、分娩した雌は哺育 0, 4 および 5 日（剖検日）に測定し、それぞれ妊娠 0 から 20 日および哺育 0 から 4 日までの体重増加量を算出した。測定は電子天秤 PG2002-S（メトラー・トレド社）を用いて行い、記録した。

13.5.3. 摂餌量

雄は投与 1（投与開始日）、8, 15, 22, 29, 36, 43, 50 および 52 日（剖検前日）に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め平均 1 日摂餌量を算出するとともに投与 1 から 15 日および投与 22 から 52 日までの累積摂餌量を算出した。

雌は投与 1（投与開始日）、8 および 15 日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め平均 1 日摂餌量を算出するとともに投与 1 から 15 日までの累積摂餌量を算出した。また、交尾が成立した雌は妊娠

0, 7, 14 および 20 日に、分娩した雌は哺育 0 および 4 日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め平均 1 日摂餌量を算出するとともに妊娠 0 から 20 日までの累積摂餌量を算出した。

測定は電子天秤 PG2002-S (メトラー・トレド社) を用いて行い、記録した。

なお、交配期間中の同居動物は摂餌量を測定しなかった。

13.5.4. 交配

交配は交配前 14 日間の性周期観察を行った雌と同群内の雄を 1 対 1 で最長 4 日間毎晩同居させ、翌朝、膣栓または膣垢中の精子確認をもって交尾成立とし、その日を妊娠 0 日とした。

性周期観察は交尾成立日まで行い、発情期から次の発情期までの間の日数を性周期日数として平均性周期を算出した。また、性周期観察期間中の異常性周期 (4 または 5 日以外の性周期) 発現率 [(異常性周期を示す雌動物数 / 観察雌動物数) $\times 100$] を算出した。

交配結果から各群について交尾率 [(交尾成立動物数 / 同居動物数) $\times 100$] を算出した。

13.5.5. 自然分娩時および出生児の観察

13.5.5.1. 母体の観察

妊娠動物は全て自然分娩させた。

自然分娩時に分娩状態の観察を行った。分娩の確認を妊娠 20 から 25 日の午前 9~10 時の間に行い、この時間帯に分娩が完了していることを確認した動物および分娩を開始した動物は分娩完了まで待ち、その日を哺育 0 日とした。午前 10 時を過ぎて分娩を開始した場合は翌日を哺育 0 日とした。また、妊娠期間 (哺育 0 日の年月日から妊娠 0 日の年月日を減じた日数)、受胎率 [(受胎動物数 / 交尾成立動物数) $\times 100$]、出産率 [(生児出産雌数 / 妊娠雌数) $\times 100$]、着床率 [(着床痕数 / 妊娠黄体数) $\times 100$]、分娩率 [(総出産児数 / 着床痕数) $\times 100$]、出生率 [(出產生児数 / 総出産児数) $\times 100$] を算出した。哺育 5 日に母動物は病理解剖し、黄体数および着床痕数を調べ肉眼的に異常の有無を調べた。

13.5.5.2. 出生児 (F1) の観察

出産後、出産児数 (生存児 + 死亡児) を調べ、出生児の性別を判定し、性比 (雄 / 雌) を算出した。また、外表異常の有無を調べた。また、出生児の体重は、哺育 0 および 4 日に雌雄個体別に電子天秤 PG2002-S (メト

ラー・トレド社)を用いて測定し、1腹の雌雄別平均体重を算出した。
 出生児は哺育4日に全例をエーテル麻酔下で放血安楽死させ、器官・組織の肉眼的観察を行った。また、死産児および哺育期間中の死亡児はブアン氏液に固定し、器官・組織の肉眼的観察を実施した。また、出生児の4日生存率〔(哺育4日生児数/出産生児数)×100〕を算出した。

13.5.6. 臨床検査

血液学検査および血液生化学検査は雄および自然分娩した雌の剖検時(雄:投与53日,雌:哺育5日)に各群の全例について実施した。採血するに当たり、絶食のために前日の午後5時に餌箱を取り除いた。
 動物をエーテルで麻酔後開腹し、腹部大動脈から採血した。

13.5.6.1. 血液学検査

抗凝固剤(EDTA-2K)入り採血管インセパック-E(積水化学工業株式会社)に新鮮血を採取し、総合血液学検査装置 ADVIA120(バイエル社)を用いて白血球数(WBC:フローサイトメトリー法)、赤血球数(RBC:暗視野板法)、ヘモグロビン量(HGB:シアンメトヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(HCT:RBC, MCVより算出)、平均赤血球容積(MCV:暗視野板法)、平均赤血球血色素量(MCH:HGB, RBCより算出)、平均赤血球血色素濃度(MCHC:HGB, HCTより算出)、血小板数(PLT:暗視野板法)、白血球百分率(フローサイトメトリー法)および網赤血球率(Reticulocyte:RNA染色法)を測定した。

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

13.5.6.2. 血液凝固能検査

抗凝固剤(3.13%クエン酸ナトリウム水溶液)入り採血管ベノジェクトII(テルモ株式会社)に血液を採取した後、3000 r.p.m.で13分間遠心分離して得た血漿を検査に用いた。血液凝固測定装置 KC-40(アメルング社)を用いてプロトロンビン時間(PT:Quick 一段法)および活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT:クロット法)を測定した。

13.5.6.3. 血液生化学検査

インセパック-SQ(積水化学工業株式会社)に血液を採取した後、3000 r.p.m.で7分間遠心分離して得た血清を検査に用いた。多項目生化学自動分析装置日立 7170(株式会社日立製作所)を用いて総蛋白(T. protein:Biuret法)、アルブミン(Albumin:BCG法)、A/G(計算値)、血糖(Glucose:HK-G-6-PDH法)、中性脂肪(Triglyceride:GK-GPO遊離グリセロール消

去法), 総コレステロール (T. cholesterol: コレステロールオキシダーゼ・HDAOS 法), 尿素窒素 (BUN: ウレアーゼ・GLDH 法), クレアチニン (Creatinine: 酵素法), 総ビリルビン (T. bilirubin: バナジン酸酸化法), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST: 酵素-UV 法), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT: 酵素-UV 法), アルカリホスファターゼ (ALP: P-ニトロフェニルリン酸基質法), カルシウム (Calcium: MXB 法), 無機リン (I. phosphorus: PNP-XDH 法) および総胆汁酸 (T. bile acid: 酵素サイクリング法) を, 電解質測定装置 EA06R (株式会社エイアンドティー) を用いてナトリウム (Sodium: イオン選択電極法), カリウム (Potassium: イオン選択電極法) および塩素 (Chloride: イオン選択電極法) を測定した。

13.5.6.4. 尿検査

投与期間終了週に, 各群それぞれ 5 例 (動物番号の若い順) の雄動物について検査を行った。

給餌・給水の条件下で採尿ケージを用いて 3 時間尿 (午前 10 時から午後 1 時まで) および 24 時間尿 (午前 10 時から翌日午前 10 時まで) を採取した。

3 時間尿を用いて pH, 潜血, 糖および蛋白を検査した。検査には N-マルティステイックス SG (バイエル・三共株式会社) を用い, 判定は尿分析装置 CLINITEK500 (バイエル社) で行った。

24 時間尿を用いて尿量 (計量) および色調 (目視) を検査した後, 尿を室温, 1500 r.p.m. で 5 分間遠心し, 上清および残渣に分離した。上清を用いて Auto&stat OM-6030 (株式会社アークレイファクトリー) で尿浸透圧 (氷点降下法) を測定した。

13.5.7. 病理学検査

13.5.7.1. 剖検および器官重量

解剖では動物の外観, 口腔, 鼻孔および頭蓋腔, 骨格, 脳および脊髄の外観と切断面, 胸腔, 腹腔および骨盤腔とその内臓, 頸部の組織および器官を検査した。生殖器官については, 特に注意を払い検査した。

全ての肉眼的異常について, 部位, 大きさ, 硬さなどを記録した。

器官重量は, 器官重量測定用自動天秤 PE360 (メトラー・トレド社) を用いて測定し, その数値を記録した。

①雄動物

52 日間投与後, 午後 5 時から絶食させ, 翌日エーテル麻酔下で採血安楽

死させ、器官・組織の肉眼的観察を行った後、脳、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および精巣上体重量を測定し器官重量・体重比を得られた体重および器官重量から算出した。また、全動物について皮膚、乳腺、リンパ節（腸間膜リンパ節、下顎リンパ節）、胸骨、大腿骨、骨髓（胸骨、大腿骨）、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺、上皮小体、舌、食道、胃および十二指腸、小腸（パイエル板を含む）、大腸（パイエル板を含む）、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精囊、前立腺、眼球、ハーダー腺、脳（大脳、小脳、橋を含む）、下垂体、脊髓（頸部、胸部、腰部）、坐骨神経（筋肉近位端を含む）を 10 vol% 中性緩衝ホルマリン液に、精巣および精巣上体をブアン氏液に固定した。

②自然分娩した雌

哺育 4 日の投与後、午後 5 時から絶食させ、翌日エーテル麻酔下で採血安楽死させ、器官・組織の肉眼的観察を行った後、脳、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎および卵巣重量を測定し器官重量・体重比を得られた体重および器官重量から算出した。また、全動物について皮膚、乳腺、リンパ節（腸間膜リンパ節、下顎リンパ節）、胸骨、大腿骨、骨髓（胸骨、大腿骨）、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺、上皮小体、舌、食道、胃および十二指腸、小腸（パイエル板を含む）、大腸（パイエル板を含む）、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、膣、眼球、ハーダー腺、脳（大脳、小脳、橋を含む）、下垂体、脊髓（頸部、胸部、腰部）、坐骨神経（筋肉近位端を含む）を 10 vol% 中性緩衝ホルマリン液に固定した。なお、剖検時に黄体数および着床痕数を調べた。

13.5.7.2. 病理組織学検査

下記に該当する動物について病理組織学検査を実施した。

組織は常法に従って株式会社組織科学研究所でパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色した。鏡検は安評センターで実施し、病変の種類、程度について記録した。

①妊娠を成立させた雄

対照群と高用量群の各 5 例（動物番号の若い順）の全固定器官およびそれ以外の異常病変部組織（精巣上体：動物番号 1310）。

②自然分娩した雌

対照群と高用量群の各 5 例（動物番号の若い順）の全固定器官およびそれ以外の異常病変部組織（脾臓：動物番号 2007、胃：動物番号 2212、下垂体：動物番号 2311）。

なお、妊娠を成立させた雄の 1000 mg/kg 群で精細管の拡張が 1 例、精巣

上体の精子肉芽腫が2例に観察されたこと、また、自然分娩をした1000 mg/kg 群の雌で肝臓の巣状壊死が1例、胃の壊死が1例観察されたことから、精巣、精巣上体、肝臓、胃については他の投与群においても組織学検査を行った。また、精巣についてはPAS・ヘマトキシリン染色およびヘマトキシリン・エオジン染色した後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本で一般的病変を検査し、PAS・ヘマトキシリン染色標本で高橋ら¹⁾の鑑別法に従い精子形成サイクル(VIIまたはVIII)を検査した。

13.5.8. 統計解析

体重、体重増加量、摂餌量、累積摂餌量、平均性周期、黄体数、着床痕数、妊娠期間、出産児数、死産児数、性比、着床率、出生率、分娩率、外表異常発現率、出生児の4日生存率、血液学検査値、血液生化学検査値、尿検査値(尿量および浸透圧)、器官重量および器官重量・体重比については自動判別方式²⁾に従い、最初にBartlettの等分散検定を実施した。等分散の場合はDunnettの多重比較検定³⁾で対照群と各投与群間の有意差を検定した。Bartlettの等分散検定で不等分散の場合はSteelの検定⁴⁾で対照群と各投与群間の有意差を検定した。

出産率、交尾率および受胎率については X^2 検定を用いた。

異常性周期発現率、剖検所見および病理組織所見の発生率についてはFisherの直接確率検定法で検定した。

有意水準はBartlettの等分散検定については5%、その他の検定は5および1%の両側検定で実施した。

なお、哺育期間中の出生児に関する成績は1母体当たりの平均を1標本として集計した。

14. 試験結果

14.1. 反復投与毒性

14.1.1. 死亡および一般状態 (Table 1-1~1-4, Appendix 1-1~1-4)

投与期間を通じて雌雄いずれの群にも死亡例は認められなかった。

一般状態の変化として、軟便が雄では 100 および 1000 mg/kg 群でそれぞれ 1 および 4 例に、雌では 1000 mg/kg 群で 1 例に観察された。この所見は、いずれの群も被毛の汚れを伴わない軽度なものであり、雄の 100 mg/kg 群および雌の 1000 mg/kg 群の各 1 例では 1 日のみの発現であったが、雄の 1000 mg/kg 群では 1 例を除き 3~4 日の発現であった。その他、雄では脱毛が 300 および 1000 mg/kg 群でそれぞれ 2 および 3 例、痂皮が 300 および 1000 mg/kg 群でそれぞれ 1 および 2 例、眼分泌物が 300 および 1000 mg/kg 群で各 1 例、鼻分泌物が 300 および 1000 mg/kg 群で各 2 例、流涎が 1000 mg/kg 群で 1 例に観察され、雌では脱毛が対照群、100、300 および 1000 mg/kg 群でそれぞれ 1、2、3 および 1 例、痂皮が 100 および 1000 mg/kg 群で各 1 例、流涎が 1000 mg/kg 群で 1 例に観察された。

14.1.2. 体重 (Figure 1~2, Table 2-1~2-2, Appendix 2-1~2-2)

雌雄ともに投与期間を通じて、対照群と被験物質投与群との間に統計学的に有意な差は認められなかった。

14.1.3. 摂餌量 (Figure 3~4, Table 3-1~3-2, Appendix 3-1~3-2)

雌雄ともに投与期間を通じて、対照群と被験物質投与群との間に統計学的に有意な差は認められなかった。

14.1.4. 臨床検査

14.1.4.1. 血液学検査 (Table 4-1~5-2, Appendix 4-1~5-2)

血液学検査および血液凝固能検査では、雌雄ともに全ての検査項目について対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

14.1.4.2. 血液生化学検査 (Table 6-1~6-2, Appendix 6-1~6-2)

雄では、対照群に比べ 300 および 1000 mg/kg 群でナトリウムが高値を示した。その他、300 mg/kg 群で塩素が高値を示したが軽微で意義のない変化であった。また、総胆汁酸が 1000 mg/kg 群で低値を示したが、対照群のバラツキが大きく、1000 mg/kg 群のほとんどの動物の値が対照群のバラツキの範囲内にあった。

雌では、300 mg/kg 群でクレアチニンが高値を示したが、用量には対応しない変化であった。1000 mg/kg 群で尿素窒素が高値を示した。

14.1.4.3. 尿検査 (Table 7, Appendix 7)

潜血において 300 mg/kg 群で中等度が、1000 mg/kg 群で重度がそれぞれ 5 例中 1 例に認められた。また、300 mg/dL 以上の蛋白を示す動物が 300 mg/kg 群で 5 例中 1 例、1000 mg/kg 群で 5 例中 2 例に認められた。その他、色調が黄褐色を示した動物が 1000 mg/kg 群で 5 例中 2 例に認められたが、変化としては正常の範囲内であった。また、24 時間尿の尿量が異常高値を示す動物が 100 および 300 mg/kg 群で各 1 例 (動物番号 1101 および 1201) に認められたが、これらの動物を除いた尿量および尿浸透圧の集計結果においても群間に差は認められなかった (Reference data 6)。

14.1.5. 病理学検査

14.1.5.1. 器官重量 (Table 8-1~8-2, Appendix 8-1~8-2)

雄では対照群に比べ 1000 mg/kg 群で副腎の絶対重量が統計学的に有意な高値を示した。

雌ではいずれの測定器官にも対照群と被験物質投与群との間に統計学的に有意な差は認められなかった。

14.1.5.2. 剖検所見 (Table 9-1~9-2, Appendix 9-1~9-2)

雄では、肝臓の赤色斑点が 300 mg/kg 群で単発性に、肝臓の白色斑／区域、小腸の憩室、精巣の肥大が 1000 mg/kg 群で単発性に、精巣上体の結節が 1000 mg/kg 群で 2 例に観察された。

雌では、脾臓の癒着が対照群で単発性に、腺胃の黒色斑点が 300 および 1000 mg/kg 群でそれぞれ 2 および 1 例に、肝臓の白色斑点が 300 mg/kg 群で単発性に、肝臓の黄色斑点、下垂体の嚢胞および脱毛が 1000 mg/kg 群でそれぞれ単発性に観察された。

14.1.5.3. 組織所見 (Table 10-1~10-3, Appendix 10-1~10-3)

雌雄ともに対照群と比較し、被験物質投与群で有意な発生数の増加を示す所見は観察されなかった。

雄では、精細管の萎縮が 300 mg/kg 群で 1 例、精細管の拡張は 1000 mg/kg 群で 1 例に認められた。精細管の拡張は片側性であり、精上皮を構成する細胞に異常は観察されなかった。精巣上体の精子肉芽腫は 1000 mg/kg 群で 2 例に観察されたが、他の投与群では観察されなかった。肝臓の壊死が

100 mg/kg 群で 1 例に観察された。胃の所見は対照群を含め観察されなかった。前立腺のリンパ球浸潤が対照群および 1000 mg/kg 群でそれぞれ 4 および 1 例に観察され、前立腺炎が 1000 mg/kg 群で 1 例に観察された。前立腺炎が観察された動物では、腎盂炎やそれに伴う移行上皮の増生などの所見、膀胱においてもリンパ球浸潤や移行上皮の増生の所見が観察された。その他の所見は対照群にも観察されたものか単発性の発生であった。雌では、腺胃の粘膜壊死が 300 mg/kg 群で 2 例および 1000 mg/kg 群で 1 例に、肝臓の巣状壊死が 1000 mg/kg 群で 1 例、壊死が 300 mg/kg 群で 1 例に認められた。また、小腸のリンパ組織増生が対照群および 1000 mg/kg 群でそれぞれ 1 および 4 例に認められた。

その他の所見は対照群を含めて観察されたものか少数例の発生であった。対照群および 1000 mg/kg 群の精巢についてステージⅧの精細管の精上皮細胞数を測定した。その結果、精祖細胞 (type A)、プレプトテン期精母細胞、パキテン期精母細胞、円形精子細胞およびセルトリ細胞数は対照群と比較して差は認められなかった。

14.2. 生殖発生毒性

14.2.1. 交尾および受胎能 (Table 11, Appendix 11-1~11-2)

交尾および受胎は全て成立し、交尾率および受胎率はともに全ての群で 100%であった。

性周期観察では、平均性周期に群間差は認められなかった。異常性周期を示す動物が 100 および 1000 mg/kg 群で各 1 例に認められたが、異常性周期発現率に群間差は認められなかった。

14.2.2. 分娩および哺育 (Table 12, Appendix 12, 14)

100 および 1000 mg/kg 群で対照群に比べ妊娠期間が統計学的に有意な短縮を示した。その他、分娩状態に異常は観察されず、各群の黄体数、着床痕数、出産児数および出產生児数はほぼ同様な値を示し、出産率、着床率、分娩率、出生率、性比および生後 4 日生存率に群間差は認められなかった。

14.2.3. 新生児の形態、体重および剖検所見 (Table 13, 14, 15-1~15-2, Appendix 13, 15-1~15-2)

新生児の外表検査では、300 mg/kg 群で無眼球および多指が各 1 例に認められた。

哺育期間の体重では、対照群に比べ 100 mg/kg 群で雄の哺育 0 および 4 日、雌の哺育 4 日に、300 mg/kg 群で雄の哺育 4 日にそれぞれ統計学的に有意

な低値を示した。

哺育期間中の死亡児の剖検では、腎盂拡張が 100 mg/kg 群で 1 例に認められた (Table, Appendix には示していない)。

哺育 4 日の剖検では、足底の赤色斑点が 100 mg/kg 群で雄の 15 例および雌の 13 例に観察され、雌雄ともに対照群に比べ発生数が統計学的に有意な増加を示した。しかし、雌雄ともに 2 腹の同腹児における発生であった。また、尿管拡張が 100, 300 および 1000 mg/kg 群で雄ではそれぞれ 3, 4 および 3 例、雌ではそれぞれ 5, 1 および 2 例に観察され、雌の 100 mg/kg 群で発生数が有意な増加を示した。しかし、雌の 100 mg/kg 群での尿管拡張は 5 例中 4 例が同腹児に認められたものであった。その他、胸腺頸部残留が雄では対照群, 100, 300 および 1000 mg/kg 群でそれぞれ 3, 1, 2 および 3 例、雌では対照群, 100 および 300 mg/kg 群でそれぞれ 1, 2 および 2 例、肝臓の結節が雌雄の 1000 mg/kg 群で各 1 例、肝臓の白色斑点が雄の 100 mg/kg 群で 1 例、腎臓の腎盂拡張が雄の 100, 300 および 1000 mg/kg 群で各 3 例、雌の 300 および 1000 mg/kg 群でそれぞれ 2 および 1 例、無眼球が雌の 300 mg/kg 群で 1 例、後肢の嚢胞が雌の 100 mg/kg 群で 1 例、後肢の多指が雌の 300 mg/kg 群で 1 例に観察された。

15. 考察および結論

15.1. 反復投与毒性

死亡例は、投与期間を通じ雌雄いずれの群にも認められなかった。

一般状態の観察では、軟便が雄の 1000 mg/kg 群で 12 例中 4 例に認められた。被毛の汚れが伴わない軽度なものであったが、4 例中 3 例が 3～4 日の発現であり被験物質投与に関連した変化と考えられた。雄の 100 mg/kg 群および雌の 1000 mg/kg 群の各 1 例にもこの所見が認められたが、いずれも単発性の発現であり、毒性学的には意義のない変化と考えられた。その他、認められた所見はしばしば対照群でも認められるものであり、被験物質投与の影響とは考えなかった。

体重、摂餌量、血液学検査および血液凝固能検査には被験物質投与の影響は認められなかった。

血液生化学検査では、ナトリウムが雄の 300 および 1000 mg/kg 群で高値を示したが、被験物質がナトリウムを含んでおり、容易にイオン化することから被験物質由来の可能性が示唆され、変化も軽微なことから影響とは考えられなかった。一方、雌の 1000 mg/kg 群では尿素窒素が高値を示した。尿検査では雄の 300 および 1000 mg/kg 群で 300 mg/dL 以上の蛋白を示す動物が少数例ながら認められ、被験物質投与による腎臓への影響が示唆された。しかし、雌雄の 1000 mg/kg 群において被験物質投与の影響を示唆する腎臓の組織学的変化は認められなかったことから毒性的意義は低いものと判断された。また、雄の尿検査において潜血を示す動物が 300 および 1000 mg/kg 群で認められたが、いずれも 1 例のみの変化であり、色調の変化や蛋白高値との関連も乏しく被験物質投与との関連は明らかではなかった。尿量が異常高値を示した動物が 100 および 300 mg/kg 群で各 1 例に認められたが、原因は不明であった。しかし、1000 mg/kg 群では同様の動物が認められず、いずれも単発性の変化であることから、被験物質投与の影響との関連はないものと考えられた。

器官重量では副腎の絶対重量が雄の 1000 mg/kg 群で高値を示したが、相対重量には有意な変化はみられず、個体で特に高値を示した動物（動物番号 1302：81 mg，動物番号 1303：85 mg）の副腎に組織学的変化が認められなかったことから被験物質投与の影響とは判断しなかった。

病理学検査の結果、肉眼所見では妊娠を成立させた雄および自然分娩した雌ともに、被験物質投与の影響と考えられる所見は観察されなかった。観察された所見はいずれも単発性または少数例に観察されたことから自然発生性の所見と考えられた。組織学検査では、妊娠を成立させた雄の 1000

mg/kg 群の 1 例で精細管の拡張が認められ、他の投与群を観察したところ、精細管の萎縮が 300 mg/kg 群で 1 例に観察された。精細管の拡張は、片側性であり、精上皮を構成する細胞にも、精子形成サイクルのカウントの結果からも、異常は観察されなかったことから自然発生性の病変と考えられた。同様に、300 mg/kg 群で観察された精細管の萎縮は 1000 mg/kg 群では認められず、単発性の発生であることから自然発生性の病変と考えられた。自然分娩した雌で腺胃粘膜の壊死が被験物質投与群で観察された。雄では観察されていないこと、壊死周囲に細胞反応が認められないことから、妊娠・分娩による全身性の負荷が一要因として発生した自然発生性病変と考えられた。

雌雄の被験物質投与群に観察された肝臓の壊死もしくは巣状壊死の所見は、自然発生的にも起こり得る所見であること、また用量に関連した発生数の増加は観察されなかったことから、被験物質投与の影響と断定するには至らなかった。

雄の前立腺は、リンパ球浸潤など対照群でも炎症性病変が観察され易い器官であるため、1000 mg/kg 群で観察された前立腺炎とそれに伴う腎臓および膀胱の所見は、単発性の発生でもあり、自然発生性の所見であると考えられた。

以上のことから、コハク酸二ナトリウム六水和物の反復投与により投与後の一般状態の変化で雄の 1000 mg/kg 群で軟便が観察された。また、雌では尿素窒素が 1000 mg/kg 群で高値を示し、雄の尿検査で 300 および 1000 mg/kg 群において 300 mg/dL 以上の蛋白を示す動物が少数例ながら認められ、被験物質投与による腎臓への影響が示唆された。したがって、無影響量は雄で 100 mg/kg/day、雌で 300 mg/kg/day と判断された。

15.2. 生殖発生毒性

性周期、交尾能および受胎能に被験物質投与の影響は認められなかった。100 および 1000 mg/kg 群で妊娠期間の短縮が認められたが、軽微な変化であり、いずれの群も個体別には 22 もしくは 23 日の正常な妊娠期間を示していることから、被験物質投与の影響とは判断しなかった。その他、妊娠黄体数、着床痕数、出産児数、出產生児数、性比、哺育 4 日生児数、出産率、着床率、分娩率、出生率および生後 4 日生存率に被験物質投与の影響は認められなかった。

300 mg/kg 群で認められた新生児の外表異常はいずれも 1 例ずつのみの発現であり、自然発生性の変化であると考えられた。

100 および 300 mg/kg 群で雌雄新生児の哺育 0 および 4 日の体重の低値が散見されたが、用量に関連しない変化であり被験物質投与に起因した変化とは考えなかった。

哺育期間中の死亡児の剖検では、被験物質投与によると考えられる異常所見は観察されなかった。哺育 4 日の剖検では、足底の赤色斑点が 100 mg/kg 群の雌雄で、尿管拡張が同群の雌でそれぞれ発生数の増加を示したが、腹に偏った発生であること、また、用量に応じた発生数の増加がみられないことから被験物質投与の影響とは考えなかった。その他、被験物質投与によると考えられる異常所見は観察されなかった。

以上のことから、コハク酸二ナトリウム六水和物の雌雄の生殖に及ぼす影響および児動物の発生・発育に及ぼす影響はともに 1000 mg/kg/day 投与でも認められず、いずれも無影響量は 1000 mg/kg/day と判断された。

16. 参考文献

- 1) 高橋道人, 三森国敏, 古川文夫, 井上実, 松井元: 精巣毒性評価のための精細管アトラス: ソフトサイエンス社, (1994).
- 2) KOBAYASHI, K *et. al.*: 産業衛生学雑誌, 42 (4): 125-129, (2000).
- 3) YOSHIDA, M.: J. Japanese Soc. Comp. Stat., 1: 111-122, (1988).
- 4) Steel, R. G. D.: Biometrics, 15: 560-572, (1959).

F i g u r e s

Exp. No. 4803 (115-145)

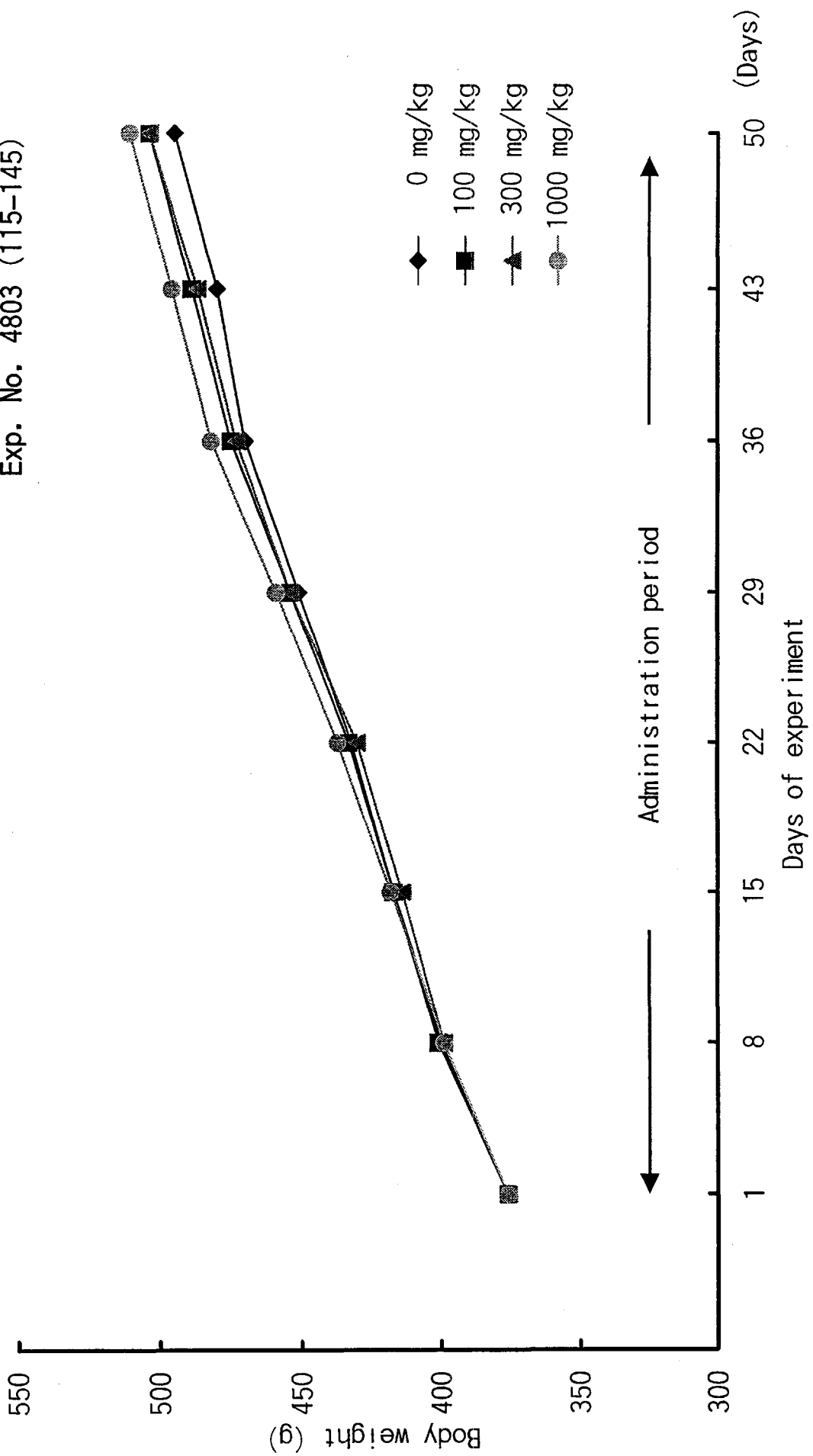


Figure 1 Body weight change of male rats

Exp. No. 4803 (115-145)

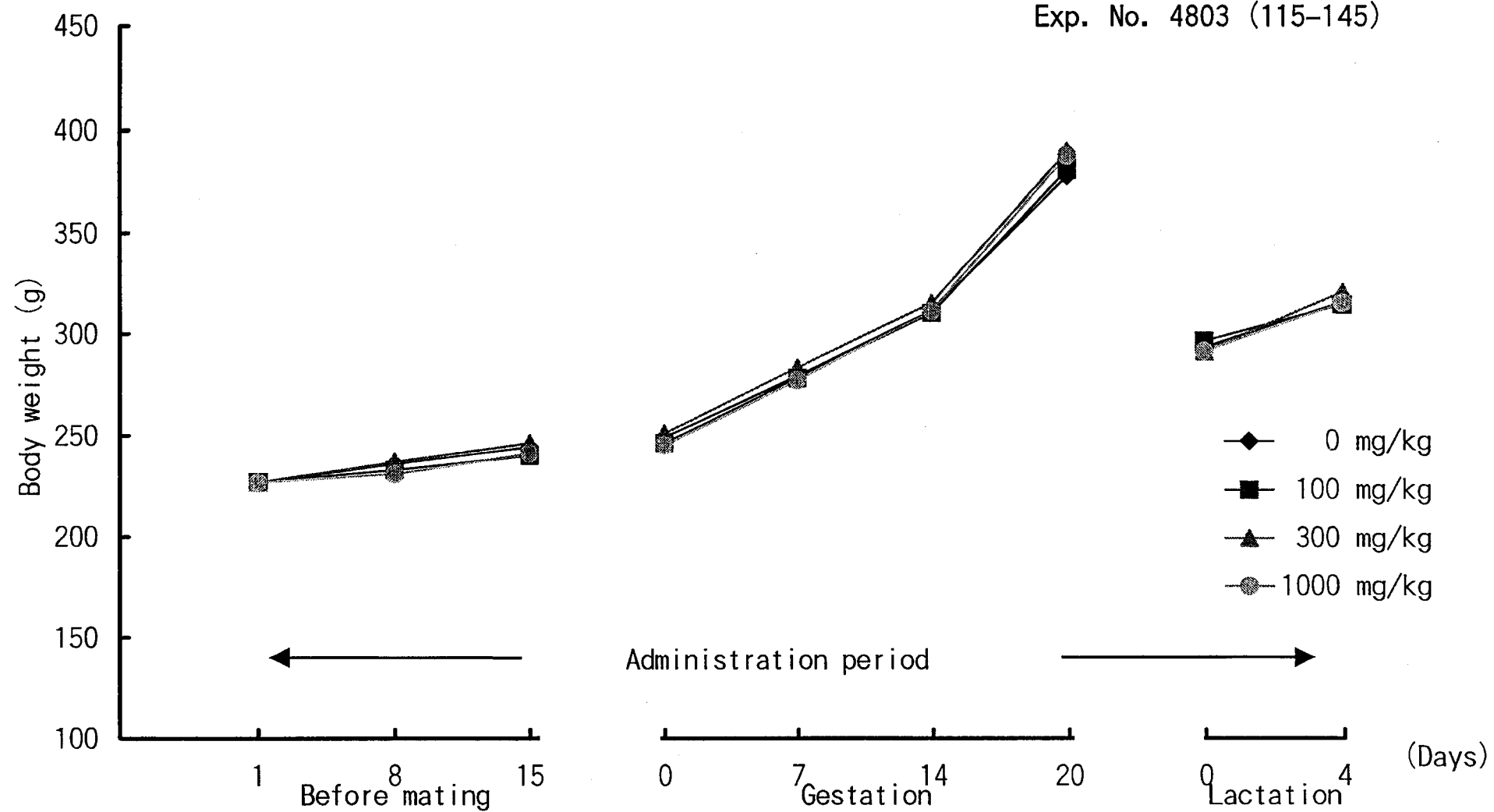


Figure 2 Body weight change of female rats

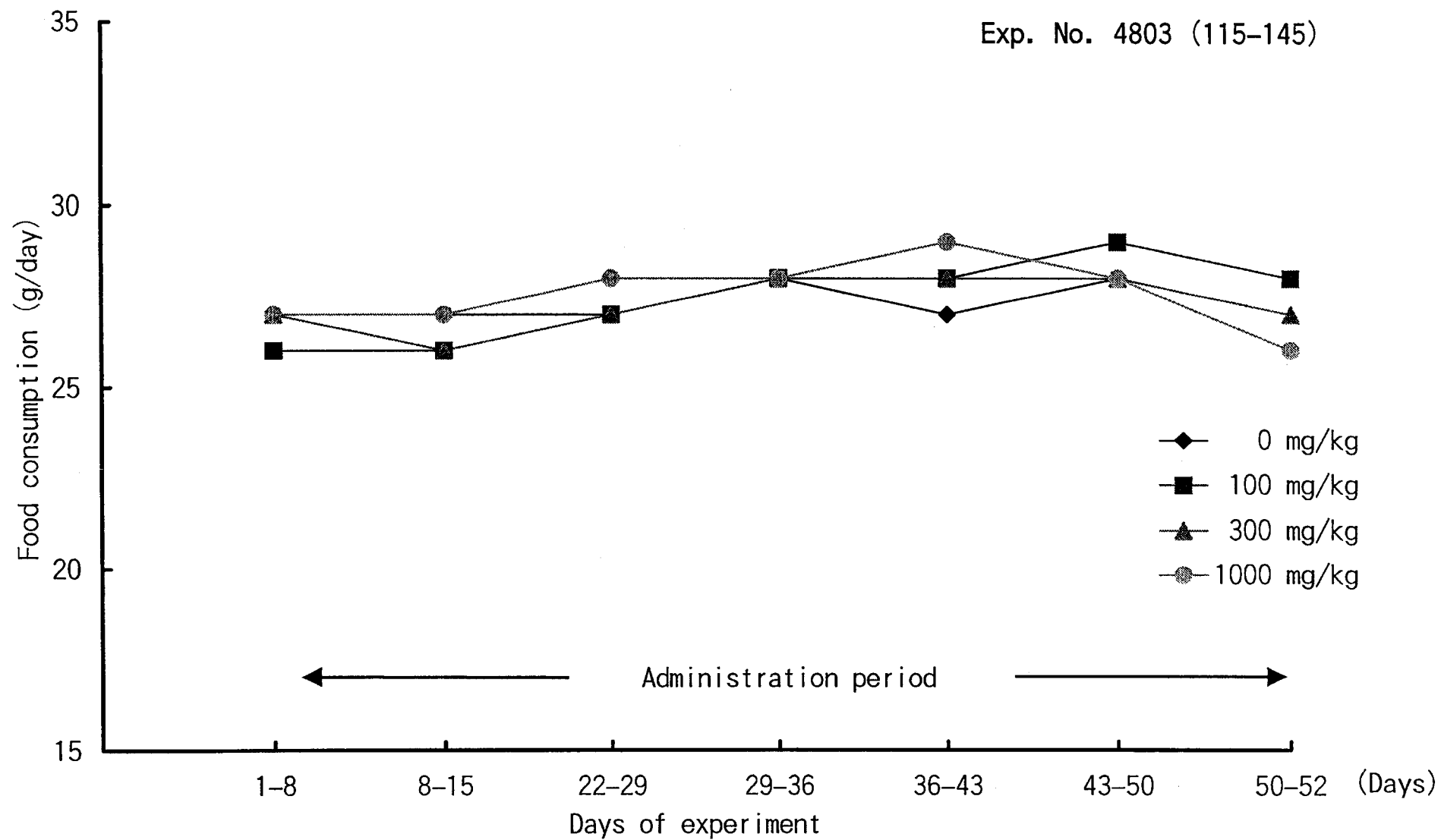


Figure 3 Food consumption of male rats

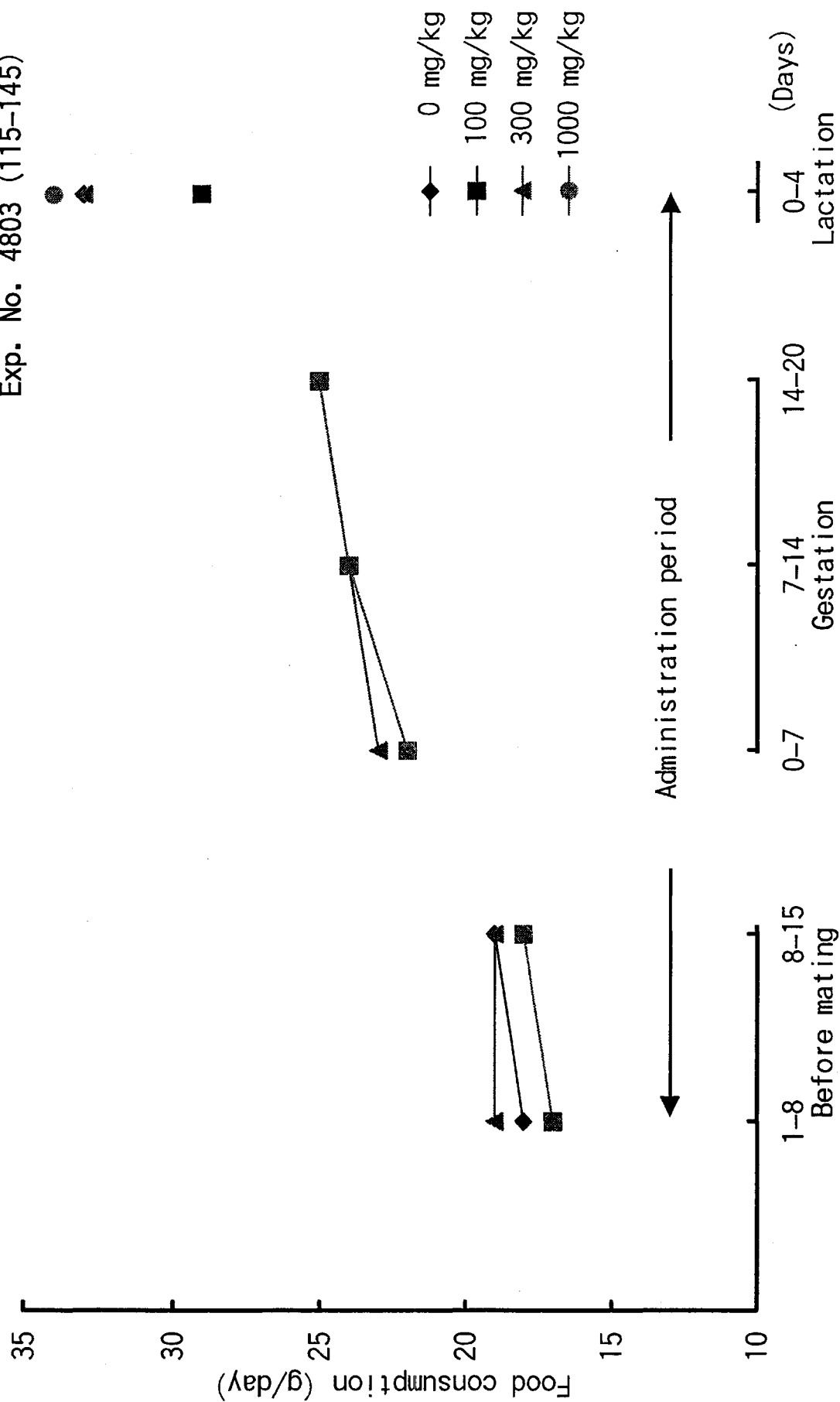


Figure 4 Food consumption of female rats

T a b l e s

Table 1-1

Clinical observations in male rats

Exp. No. 4803 (115-145)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of experiment								Total (1-53)
		1-7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42	43-49	50-53	
number per group	0	12	12	12	12	12	12	12	12	
	100	12	12	12	12	12	12	12	12	
	300	12	12	12	12	12	12	12	12	
	1000	12	12	12	12	12	12	12	12	
normal	0	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	100	12	12	12	12	12	12	11	12	11
	300	11	10	9	10	9	9	8	12	6
	1000	11	7	9	10	9	8	9	10	4
loss of hair	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	1	2	2	2	2	2 a)	0	2 b)
	1000	1	1	2	2	1	1	1	0	3
crust	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	1	1	0	0	1
	1000	0	1	0	1	1	1	0	0	2
discharge of eye	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	1	1	0	0	0	0	0	1
	1000	0	1	0	0	0	0	0	0	1
nasal discharge	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	2	0	2
	1000	0	2	0	0	0	0	0	0	2
salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1000	0	1	0	0	0	0	0	0	1
loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1000	0	1	1	0	2	2	3	2	4

a) No. of animals with clinical sign in group

b) Total no. of animals with clinical sign in group

Table 1-2

Clinical observations in female rats
(Before and during mating period)

Exp. No. 4803 (115-145)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of experiment			Total (1- 19)
		1- 7	8-14	15-19	
number per group	0	12	12	12	
	100	12	12	12	
	300	12	12	12	
	1000	12	12	12	
normal	0	12	11	12	11
	100	12	11	11	11
	300	11	11	11	11
	1000	12	11	11	11
loss of hair	0	0	1 a)	0	1 b)
	100	0	1	1	1
	300	1	1	1	1
	1000	0	1	1	1

a) No. of animals with clinical sign in group

b) Total no. of animals with clinical sign in group

Table 1-3

Clinical observations in female rats
(Gestation period)

Exp. No. 4803 (115-145)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of gestation													
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
number per group	0	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	100	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	300	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	1000	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
normal	0	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	100	11	11	11	11	11	10	10	10	10	11	11	11	11	
	300	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	10	10	
	1000	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12	
loss of hair	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	
	300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	
	1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
crust	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 1-3 -continued

Clinical observations in female rats
(Gestation period)

Exp. No. 4803 (115-145)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of gestation											Total (0-23)
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
number per group	0	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	7	
	100	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	0	
	300	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	4	
	1000	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	2	
normal	0	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	7	12
	100	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	0	10
	300	10	10	11	11	11	11	10	10	10	11	4	9
	1000	12	12	11	12	12	12	12	12	12	12	2	10
loss of hair	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	2
	300	2	2	1	1	1	1	2	2	2	1	0	3
	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
crust	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1000	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1000	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Table 1-4

Clinical observations in female rats
(Lactation period)

Exp. No. 4803 (115-145)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of lactation						Total (0-5)
		0	1	2	3	4	5	
number per group	0	12	12	12	12	12	12	12
	100	12	12	12	12	12	12	12
	300	12	12	12	12	12	12	12
	1000	12	12	12	12	12	12	12
normal	0	12	12	12	12	12	12	12
	100	11	11	11	11	11	11	11
	300	11	11	11	11	11	11	11
	1000	12	11	11	11	11	11	11
loss of hair	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	1	1	1	1	1	1	1
	300	1	1	1	1	1	1	1
	1000	0	1	1	1	1	1	1
crust	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0
	1000	0	1	1	1	1	0	1

Table 2-1

Body weight change of male rats

Exp. No. 4803 (115-145)

Unit : g

Dose level (mg/kg)		0		100		300		1000	
No. of animals		12		12		12		12	
		Mean $\pm$ S.D. (N)		Mean $\pm$ S.D. (N)		Mean $\pm$ S.D. (N)		Mean $\pm$ S.D. (N)	
Days of experiment	1	376 $\pm$ 18	(12)	376 $\pm$ 19	(12)	376 $\pm$ 20	(12)	376 $\pm$ 19	(12)
	8	400 $\pm$ 24	(12)	401 $\pm$ 24	(12)	399 $\pm$ 26	(12)	399 $\pm$ 26	(12)
	15	417 $\pm$ 30	(12)	417 $\pm$ 31	(12)	414 $\pm$ 33	(12)	418 $\pm$ 29	(12)
	22	432 $\pm$ 29	(12)	433 $\pm$ 35	(12)	430 $\pm$ 44	(12)	437 $\pm$ 32	(12)
	29	451 $\pm$ 30	(12)	454 $\pm$ 36	(12)	454 $\pm$ 45	(12)	459 $\pm$ 35	(12)
	36	470 $\pm$ 33	(12)	475 $\pm$ 37	(12)	473 $\pm$ 47	(12)	482 $\pm$ 38	(12)
	43	480 $\pm$ 33	(12)	489 $\pm$ 40	(12)	487 $\pm$ 47	(12)	496 $\pm$ 42	(12)
	50	495 $\pm$ 37	(12)	504 $\pm$ 42	(12)	504 $\pm$ 49	(12)	511 $\pm$ 44	(12)
	53	465 $\pm$ 34	(12)	478 $\pm$ 41	(12)	475 $\pm$ 48	(12)	485 $\pm$ 44	(12)
Gain 1-50		119 $\pm$ 22	(12)	128 $\pm$ 27	(12)	128 $\pm$ 36	(12)	134 $\pm$ 31	(12)

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

Table 2-2

Body weight change of female rats

Exp. No. 4803 (115-145)

Unit : g

Dose level (mg/kg)		0				100				300				1000			
Before mating period																	
No. of animals		12				12				12				12			
		Mean $\pm$ S.D. (N)				Mean $\pm$ S.D. (N)				Mean $\pm$ S.D. (N)				Mean $\pm$ S.D. (N)			
Days of before mating	1	227	$\pm$	10	(12)	227	$\pm$	10	(12)	227	$\pm$	10	(12)	227	$\pm$	9	(12)
	8	236	$\pm$	11	(12)	233	$\pm$	13	(12)	237	$\pm$	11	(12)	231	$\pm$	11	(12)
	15	244	$\pm$	11	(12)	240	$\pm$	12	(12)	246	$\pm$	12	(12)	241	$\pm$	11	(12)
Gain	1-15	17	$\pm$	7	(12)	13	$\pm$	6	(12)	19	$\pm$	6	(12)	14	$\pm$	5	(12)

Gestation period																	
No. of dams		12				12				12				12			
		Mean $\pm$ S.D. (N)				Mean $\pm$ S.D. (N)				Mean $\pm$ S.D. (N)				Mean $\pm$ S.D. (N)			
Days of gestation	0	249	$\pm$	14	(12)	246	$\pm$	11	(12)	251	$\pm$	16	(12)	245	$\pm$	9	(12)
	7	279	$\pm$	15	(12)	278	$\pm$	14	(12)	283	$\pm$	17	(12)	277	$\pm$	12	(12)
	14	311	$\pm$	14	(12)	310	$\pm$	14	(12)	315	$\pm$	20	(12)	311	$\pm$	18	(12)
	20	378	$\pm$	24	(12)	381	$\pm$	24	(12)	390	$\pm$	27	(12)	388	$\pm$	29	(12)
Gain	0-20	129	$\pm$	18	(12)	135	$\pm$	20	(12)	139	$\pm$	13	(12)	143	$\pm$	21	(12)

Lactation period																	
No. of dams		12				12				12				12			
		Mean $\pm$ S.D. (N)				Mean $\pm$ S.D. (N)				Mean $\pm$ S.D. (N)				Mean $\pm$ S.D. (N)			
Days of lactation	0	293	$\pm$	17	(12)	296	$\pm$	13	(12)	291	$\pm$	23	(12)	291	$\pm$	26	(12)
	4	315	$\pm$	16	(12)	314	$\pm$	16	(12)	320	$\pm$	17	(12)	315	$\pm$	20	(12)
	5	284	$\pm$	17	(12)	281	$\pm$	13	(12)	285	$\pm$	18	(12)	281	$\pm$	19	(12)
Gain	0- 4	22	$\pm$	13	(12)	18	$\pm$	12	(12)	28	$\pm$	12	(12)	23	$\pm$	16	(12)

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

Table 3-1

Food consumption of male rats

Exp. No. 4803 (115-145)

Unit : g/day

Dose level (mg/kg)		0			100			300			1000		
No. of animals		12			12			12			12		
		Mean $\pm$ S.D. (N)			Mean $\pm$ S.D. (N)			Mean $\pm$ S.D. (N)			Mean $\pm$ S.D. (N)		
Days of experiment	1-8	27 $\pm$	2	(12)	26 $\pm$	3	(12)	27 $\pm$	2	(12)	27 $\pm$	3	(12)
	8-15	27 $\pm$	3	(12)	26 $\pm$	3	(12)	26 $\pm$	2	(12)	27 $\pm$	3	(12)
	22-29	27 $\pm$	2	(12)	27 $\pm$	2	(12)	27 $\pm$	4	(12)	28 $\pm$	3	(12)
	29-36	28 $\pm$	3	(12)	28 $\pm$	2	(12)	28 $\pm$	3	(12)	28 $\pm$	3	(12)
	36-43	27 $\pm$	2	(12)	28 $\pm$	2	(12)	28 $\pm$	3	(12)	29 $\pm$	3	(12)
	43-50	28 $\pm$	2	(12)	29 $\pm$	2	(12)	28 $\pm$	3	(12)	28 $\pm$	2	(12)
	50-52	26 $\pm$	4	(12)	28 $\pm$	3	(12)	27 $\pm$	5	(12)	26 $\pm$	4	(12)
Cumulative consumption (g)	1-15	375 $\pm$	31	(12)	366 $\pm$	35	(12)	371 $\pm$	29	(12)	377 $\pm$	39	(12)
	22-52	825 $\pm$	65	(12)	835 $\pm$	64	(12)	828 $\pm$	79	(12)	840 $\pm$	81	(12)

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

Table 3-2

Food consumption of female rats

Exp. No. 4803 (115-145)

Unit : g/day

Dose level (mg/kg)		0			100			300			1000		
Before mating period		12			12			12			12		
No. of animals		Mean $\pm$ S.D. (N)			Mean $\pm$ S.D. (N)			Mean $\pm$ S.D. (N)			Mean $\pm$ S.D. (N)		
Days of before mating	1- 8	18 $\pm$	1	(12)	17 $\pm$	2	(12)	19 $\pm$	2	(12)	17 $\pm$	1	(12)
	8-15	19 $\pm$	1	(12)	18 $\pm$	1	(12)	19 $\pm$	1	(12)	18 $\pm$	1	(12)
	1-15	257 $\pm$	18	(12)	247 $\pm$	20	(12)	263 $\pm$	21	(12)	244 $\pm$	17	(12)
Cumulative consumption (g)													
Gestation period		12			12			12			12		
No. of dams		Mean $\pm$ S.D. (N)			Mean $\pm$ S.D. (N)			Mean $\pm$ S.D. (N)			Mean $\pm$ S.D. (N)		
Days of gestation	0- 7	22 $\pm$	2	(12)	22 $\pm$	1	(12)	23 $\pm$	2	(12)	22 $\pm$	2	(12)
	7-14	24 $\pm$	2	(12)	24 $\pm$	1	(12)	24 $\pm$	2	(12)	24 $\pm$	3	(12)
	14-20	25 $\pm$	2	(12)	25 $\pm$	2	(12)	25 $\pm$	2	(12)	25 $\pm$	3	(12)
Cumulative consumption (g)													
	0-20	473 $\pm$	33	(12)	472 $\pm$	21	(12)	477 $\pm$	40	(12)	470 $\pm$	44	(12)
Lactation period		12			12			12			12		
No. of dams		Mean $\pm$ S.D. (N)			Mean $\pm$ S.D. (N)			Mean $\pm$ S.D. (N)			Mean $\pm$ S.D. (N)		
Days of lactation	0- 4	33 $\pm$	5	(12)	29 $\pm$	5	(12)	33 $\pm$	4	(12)	34 $\pm$	5	(12)

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

Table 4-1

Hematology of male rats

Exp. No. 4803 (115-145)

Dose level (mg/kg)	0		100		300		1000	
No. of animals	12		12		12		12	
	Mean $\pm$ S.D.	(N)	Mean $\pm$ S.D.	(N)	Mean $\pm$ S.D.	(N)	Mean $\pm$ S.D.	(N)
WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	9.8 $\pm$ 2.8	(12)	8.6 $\pm$ 1.7	(12)	9.9 $\pm$ 2.1	(12)	9.4 $\pm$ 4.9	(12)
RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	9.11 $\pm$ 0.43	(12)	9.00 $\pm$ 0.33	(12)	9.07 $\pm$ 0.44	(12)	9.03 $\pm$ 0.27	(12)
HGB (g/dL)	15.6 $\pm$ 0.5	(12)	15.8 $\pm$ 0.4	(12)	15.7 $\pm$ 0.5	(12)	15.8 $\pm$ 0.6	(12)
HCT (%)	46.7 $\pm$ 1.5	(12)	47.2 $\pm$ 1.5	(12)	46.7 $\pm$ 1.6	(12)	47.2 $\pm$ 2.0	(12)
MCV (μm^3)	51.4 $\pm$ 1.7	(12)	52.5 $\pm$ 2.2	(12)	51.6 $\pm$ 1.8	(12)	52.3 $\pm$ 2.2	(12)
MCH (pg)	17.2 $\pm$ 0.6	(12)	17.5 $\pm$ 0.7	(12)	17.3 $\pm$ 0.5	(12)	17.5 $\pm$ 0.7	(12)
MCHC (%)	33.5 $\pm$ 0.2	(12)	33.4 $\pm$ 0.4	(12)	33.5 $\pm$ 0.5	(12)	33.5 $\pm$ 0.5	(12)
PLT ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	1247 $\pm$ 103	(12)	1248 $\pm$ 82	(12)	1244 $\pm$ 117	(12)	1252 $\pm$ 163	(12)
Differential leukocyte counts (%)								
NEUT	14 $\pm$ 2	(12)	14 $\pm$ 3	(12)	14 $\pm$ 4	(12)	14 $\pm$ 3	(12)
LYMPH	82 $\pm$ 2	(12)	81 $\pm$ 4	(12)	82 $\pm$ 4	(12)	83 $\pm$ 4	(12)
MONO	2 $\pm$ 1	(12)	2 $\pm$ 1	(12)	2 $\pm$ 1	(12)	2 $\pm$ 1	(12)
EOSN	2 $\pm$ 1	(12)	2 $\pm$ 1	(12)	2 $\pm$ 1	(12)	2 $\pm$ 1	(12)
BASO	0 $\pm$ 0	(12)	0 $\pm$ 0	(12)	0 $\pm$ 0	(12)	0 $\pm$ 0	(12)
LUC	0 $\pm$ 1	(12)	0 $\pm$ 0	(12)	1 $\pm$ 1	(12)	0 $\pm$ 0	(12)
Reticulocyte (%)	2.0 $\pm$ 0.3	(12)	2.1 $\pm$ 0.2	(12)	2.2 $\pm$ 0.3	(12)	2.0 $\pm$ 0.4	(12)

NEUT : Neutrophil LYMPH : Lymphocyte MONO : Monocyte EOSN : Eosinophil BASO : Basophil LUC : Large unstained cells
 Significant difference from control group; *: $p \leq 0.05$ **: $p \leq 0.01$

Table 4-2

Hematology of female rats

Exp. No. 4803 (115-145)

Dose level (mg/kg)	0			100			300			1000		
No. of animals	12			12			12			12		
	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)
WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	9.2	± 3.3	(12)	8.5	± 1.9	(12)	12.1	± 3.5	(12)	10.0	± 2.7	(12)
RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	7.10	± 0.47	(12)	7.18	± 0.40	(12)	7.27	± 0.41	(12)	7.27	± 0.49	(12)
HGB (g/dL)	13.8	± 0.8	(12)	13.9	± 0.7	(12)	13.9	± 0.5	(12)	13.9	± 0.8	(12)
HCT (%)	41.9	± 2.4	(12)	41.8	± 2.3	(12)	42.1	± 2.1	(12)	42.0	± 2.2	(12)
MCV (μm^3)	59.0	± 2.1	(12)	58.3	± 1.9	(12)	58.0	± 2.2	(12)	57.8	± 2.5	(12)
MCH (pg)	19.4	± 0.6	(12)	19.4	± 0.7	(12)	19.2	± 0.7	(12)	19.1	± 0.8	(12)
MCHC (%)	33.0	± 1.2	(12)	33.2	± 0.5	(12)	33.0	± 0.6	(12)	33.1	± 0.8	(12)
PLT ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	1367	± 130	(12)	1403	± 290	(12)	1364	± 159	(12)	1348	± 137	(12)
Differential leukocyte counts (%)												
NEUT	28	± 7	(12)	28	± 8	(12)	28	± 7	(12)	28	± 9	(12)
LYMPH	68	± 7	(12)	69	± 8	(12)	69	± 7	(12)	68	± 9	(12)
MONO	2	± 1	(12)	2	± 1	(12)	2	± 1	(12)	2	± 1	(12)
EOSN	2	± 2	(12)	1	± 0	(12)	1	± 0	(12)	1	± 1	(12)
BASO	0	± 0	(12)	0	± 0	(12)	0	± 0	(12)	0	± 0	(12)
LUC	0	± 0	(12)	0	± 0	(12)	0	± 0	(12)	0	± 1	(12)
Reticulocyte (%)	7.2	± 1.9	(12)	7.1	± 1.8	(12)	6.4	± 1.5	(12)	6.9	± 1.7	(12)

NEUT : Neutrophil LYMPH : Lymphocyte MONO : Monocyte EOSN : Eosinophil BASO : Basophil LUC : Large unstained cells
 Significant difference from control group; *: $p \leq 0.05$ **: $p \leq 0.01$

Table 5-1

Coagulation of male rats

Exp. No. 4803 (115-145)

Dose level (mg/kg)	0	100	300	1000
No. of animals	12	12	12	12
	Mean $\pm$ S.D. (N)	Mean $\pm$ S.D. (N)	Mean $\pm$ S.D. (N)	Mean $\pm$ S.D. (N)
PT(sec.)	16.2 $\pm$ 1.3 (12)	16.9 $\pm$ 1.8 (12)	17.1 $\pm$ 1.5 (12)	16.7 $\pm$ 1.4 (12)
APTT(sec.)	20.5 $\pm$ 1.8 (12)	21.7 $\pm$ 2.6 (12)	21.8 $\pm$ 1.6 (12)	20.0 $\pm$ 1.9 (12)

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

Table 5-2

Coagulation of female rats

Exp. No. 4803 (115-145)

Dose level (mg/kg)	0	100	300	1000
No. of animals	12	12	12	12
	Mean $\pm$ S.D. (N)	Mean $\pm$ S.D. (N)	Mean $\pm$ S.D. (N)	Mean $\pm$ S.D. (N)
PT(sec.)	15.5 $\pm$ 0.3 (12)	15.6 $\pm$ 0.5 (12)	15.9 $\pm$ 0.4 (12)	15.7 $\pm$ 0.5 (12)
APTT(sec.)	16.3 $\pm$ 1.3 (12)	16.6 $\pm$ 1.6 (12)	15.9 $\pm$ 1.4 (12)	15.6 $\pm$ 1.1 (12)

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

Table 6-1

Blood chemistry of male rats

Exp. No. 4803 (115-145)

Dose level (mg/kg)	0		100		300		1000	
No. of animals	12		12		12		12	
	Mean $\pm$ S.D.	(N)	Mean $\pm$ S.D.	(N)	Mean $\pm$ S.D.	(N)	Mean $\pm$ S.D.	(N)
T.protein(g/dL)	5.98 $\pm$ 0.13	(12)	6.06 $\pm$ 0.24	(12)	6.04 $\pm$ 0.29	(12)	6.03 $\pm$ 0.21	(12)
Albumin(g/dL)	3.55 $\pm$ 0.10	(12)	3.60 $\pm$ 0.12	(12)	3.58 $\pm$ 0.20	(12)	3.55 $\pm$ 0.21	(12)
A/G	1.46 $\pm$ 0.08	(12)	1.47 $\pm$ 0.11	(12)	1.48 $\pm$ 0.22	(12)	1.43 $\pm$ 0.15	(12)
Glucose(mg/dL)	147 $\pm$ 10	(12)	154 $\pm$ 19	(12)	152 $\pm$ 17	(12)	147 $\pm$ 19	(12)
Triglyceride(mg/dL)	31.5 $\pm$ 18.5	(12)	34.8 $\pm$ 11.8	(12)	34.6 $\pm$ 14.0	(12)	35.3 $\pm$ 12.1	(12)
T.cholesterol (mg/dL)	45 $\pm$ 7	(12)	45 $\pm$ 12	(12)	48 $\pm$ 11	(12)	44 $\pm$ 8	(12)
BUN(mg/dL)	16.7 $\pm$ 2.3	(12)	17.2 $\pm$ 1.8	(12)	16.4 $\pm$ 2.2	(12)	16.9 $\pm$ 2.4	(12)
Creatinine(mg/dL)	0.27 $\pm$ 0.04	(12)	0.25 $\pm$ 0.03	(12)	0.25 $\pm$ 0.04	(12)	0.26 $\pm$ 0.04	(12)
T.bilirubin(mg/dL)	0.04 $\pm$ 0.02	(12)	0.04 $\pm$ 0.01	(12)	0.04 $\pm$ 0.01	(12)	0.03 $\pm$ 0.01	(12)
AST(U/L)	80 $\pm$ 9	(12)	81 $\pm$ 11	(12)	79 $\pm$ 11	(12)	74 $\pm$ 10	(12)
ALT(U/L)	33 $\pm$ 6	(12)	33 $\pm$ 7	(12)	33 $\pm$ 9	(12)	31 $\pm$ 5	(12)
ALP(U/L)	361 $\pm$ 60	(12)	398 $\pm$ 79	(12)	368 $\pm$ 70	(12)	344 $\pm$ 69	(12)
Calcium(mg/dL)	9.66 $\pm$ 0.26	(12)	9.76 $\pm$ 0.28	(12)	9.78 $\pm$ 0.28	(12)	9.76 $\pm$ 0.30	(12)
I.phosphorus(mg/dL)	6.40 $\pm$ 0.51	(12)	6.45 $\pm$ 0.51	(12)	6.16 $\pm$ 0.48	(12)	6.87 $\pm$ 0.91	(12)
Sodium(mmol/L)	143.6 $\pm$ 0.8	(12)	144.1 $\pm$ 1.0	(12)	144.9 $\pm$ 0.9**	(12)	145.0 $\pm$ 1.1**	(12)
Potassium(mmol/L)	4.37 $\pm$ 0.30	(12)	4.50 $\pm$ 0.25	(12)	4.50 $\pm$ 0.27	(12)	4.27 $\pm$ 0.26	(12)
Chloride(mmol/L)	107.4 $\pm$ 1.3	(12)	108.6 $\pm$ 1.2	(12)	109.6 $\pm$ 1.3**	(12)	108.8 $\pm$ 2.4	(12)
Total Bile Acid(μ mol/L)	25.8 $\pm$ 23.5	(12)	27.8 $\pm$ 35.4	(12)	12.7 $\pm$ 6.1	(12)	10.0 $\pm$ 4.4*	(12)

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

Table 6-2

Blood chemistry of female rats

Exp. No. 4803 (115-145)

Dose level (mg/kg)	0			100			300			1000		
No. of animals	12			12			12			12		
	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)
T.protein(g/dL)	5.96	± 0.34	(12)	5.86	± 0.28	(12)	5.81	± 0.18	(12)	5.89	± 0.23	(12)
Albumin(g/dL)	3.62	± 0.27	(12)	3.58	± 0.12	(12)	3.56	± 0.17	(12)	3.61	± 0.24	(12)
A/G	1.56	± 0.16	(12)	1.59	± 0.15	(12)	1.59	± 0.13	(12)	1.59	± 0.17	(12)
Glucose(mg/dL)	140	± 17	(12)	132	± 9	(12)	136	± 17	(12)	133	± 11	(12)
Triglyceride(mg/dL)	47.8	± 17.0	(12)	41.8	± 24.4	(12)	38.7	± 17.3	(12)	43.9	± 18.7	(12)
T.cholesterol (mg/dL)	53	± 12	(12)	54	± 9	(12)	51	± 9	(12)	53	± 8	(12)
BUN(mg/dL)	17.2	± 2.0	(12)	17.4	± 2.7	(12)	18.1	± 3.0	(12)	20.0	± 3.2*	(12)
Creatinine(mg/dL)	0.27	± 0.05	(12)	0.28	± 0.03	(12)	0.33	± 0.06**	(12)	0.31	± 0.04	(12)
T.bilirubin(mg/dL)	0.05	± 0.02	(12)	0.05	± 0.02	(12)	0.05	± 0.03	(12)	0.05	± 0.02	(12)
AST(U/L)	92	± 20	(12)	96	± 14	(12)	87	± 16	(12)	98	± 26	(12)
ALT(U/L)	59	± 14	(12)	55	± 11	(12)	52	± 10	(12)	59	± 25	(12)
ALP(U/L)	251	± 95	(12)	242	± 65	(12)	239	± 65	(12)	268	± 93	(12)
Calcium(mg/dL)	10.04	± 0.28	(12)	9.85	± 0.30	(12)	9.98	± 0.40	(12)	9.95	± 0.34	(12)
I.phosphorus(mg/dL)	7.14	± 0.91	(12)	6.82	± 0.87	(12)	7.40	± 0.91	(12)	7.17	± 0.90	(12)
Sodium(mmol/L)	141.4	± 1.5	(12)	140.5	± 1.7	(12)	141.7	± 1.3	(12)	141.1	± 1.6	(12)
Potassium(mmol/L)	4.63	± 0.51	(12)	4.65	± 0.48	(12)	4.58	± 0.30	(12)	4.62	± 0.21	(12)
Chloride(mmol/L)	107.9	± 2.0	(12)	108.1	± 2.9	(12)	108.5	± 2.1	(12)	108.1	± 2.3	(12)
Total Bile Acid(μmol/L)	18.7	± 7.9	(12)	28.3	± 16.6	(12)	37.5	± 22.8	(12)	29.7	± 21.5	(12)

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

Table 7

Urinalysis of male rats

Exp. No. 4803 (115-145)

Dose level (mg/kg)	No. of animals	Volume (mL) Mean $\pm$ S.D.	Color											pH									Occult blood				
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	≥ 9	-	+/-	1+	2+	3+
0	5	19.7 $\pm$ 5.7		5																1	4		3	2			
100	5	29.9 $\pm$ 28.3		5																1	4		3	2			
300	5	31.0 $\pm$ 16.8		5																	5		4			1	
1000	5	25.4 $\pm$ 2.6		3	2																5		4				1

Significant difference from control group; *: $p \leq 0.05$ **: $p \leq 0.01$ Color: 1= Colorless, 2= Slight yellow, 3= Yellow-brown, 4= Red, 5= Red-brown, 6= Dark red, 7= Dark brown, 8= Brown-black,
9= Milky white, 10= Fluorescent green, 11= Blue.

Table 7 -continued

Urinalysis of male rats

Exp. No. 4803 (115-145)

Dose level (mg/kg)	No. of animals	Glucose (g/dL)				Protein (mg/dL)					Osmotic pressure (mOsm/kg)	
		-	0.1	0.25	0.5	≥1.0	-	+/-	30	100	≥300	Mean ± S.D.
0	5	5					1	1	2	1		1612 ± 528
100	5	5							3	2		1571 ± 645
300	5	5							3	1	1	1366 ± 535
1000	5	5								3	2	1384 ± 308

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

Table 8-1

Absolute and relative organ weight of male rats

Exp. No. 4803 (115-145)

Dose level (mg/kg)		0		100		300		1000	
No. of animal examined		12		12		12		12	
		Mean $\pm$ S.D.		Mean $\pm$ S.D.		Mean $\pm$ S.D.		Mean $\pm$ S.D.	
Body weight (g)		465 $\pm$ 34		478 $\pm$ 41		475 $\pm$ 48		485 $\pm$ 44	
Brain	(g)	2.26 $\pm$ 0.09		2.26 $\pm$ 0.09		2.25 $\pm$ 0.11		2.25 $\pm$ 0.11	
	(g%)	0.488 $\pm$ 0.038		0.477 $\pm$ 0.046		0.480 $\pm$ 0.057		0.467 $\pm$ 0.034	
Thymus	(mg)	274 $\pm$ 83		277 $\pm$ 50		310 $\pm$ 45		290 $\pm$ 75	
	(mg%)	58.523 $\pm$ 15.695		57.980 $\pm$ 9.366		66.209 $\pm$ 13.385		60.066 $\pm$ 15.068	
Liver	(g)	11.88 $\pm$ 1.39		12.38 $\pm$ 1.67		12.13 $\pm$ 1.61		13.21 $\pm$ 1.97	
	(g%)	2.552 $\pm$ 0.176		2.584 $\pm$ 0.171		2.551 $\pm$ 0.150		2.716 $\pm$ 0.206	
Spleen	(g)	0.76 $\pm$ 0.11		0.73 $\pm$ 0.11		0.77 $\pm$ 0.12		0.75 $\pm$ 0.12	
	(g%)	0.165 $\pm$ 0.027		0.154 $\pm$ 0.021		0.164 $\pm$ 0.027		0.155 $\pm$ 0.028	
Kidneys	(g)	3.11 $\pm$ 0.25		3.19 $\pm$ 0.36		3.19 $\pm$ 0.32		3.37 $\pm$ 0.27	
	(g%)	0.672 $\pm$ 0.063		0.668 $\pm$ 0.047		0.674 $\pm$ 0.039		0.697 $\pm$ 0.044	
Adrenals	(mg)	56 $\pm$ 9		60 $\pm$ 10		58 $\pm$ 10		67 $\pm$ 9*	
	(mg%)	12.164 $\pm$ 2.035		12.501 $\pm$ 1.741		12.338 $\pm$ 1.920		13.919 $\pm$ 2.283	
Testes	(g)	3.21 $\pm$ 0.34		3.47 $\pm$ 0.31		3.28 $\pm$ 0.26		3.46 $\pm$ 0.58	
	(g%)	0.694 $\pm$ 0.091		0.728 $\pm$ 0.065		0.696 $\pm$ 0.081		0.717 $\pm$ 0.135	
Epididymides	(mg)	1266 $\pm$ 123		1317 $\pm$ 156		1323 $\pm$ 103		1317 $\pm$ 180	
	(mg%)	273.009 $\pm$ 27.734		278.048 $\pm$ 44.477		282.351 $\pm$ 44.544		272.677 $\pm$ 36.246	

(%) (Organ weight / body weight) $\times$ 100Significant difference from control group; *: $p \leq 0.05$ **: $p \leq 0.01$

Table 8-2

Absolute and relative organ weight of female rats

Exp. No. 4803 (115-145)

Dose level (mg/kg)		0	100	300	1000
No. of dams examined		12	12	12	12
		Mean $\pm$ S.D.	Mean $\pm$ S.D.	Mean $\pm$ S.D.	Mean $\pm$ S.D.
Body weight (g)		284 $\pm$ 17	281 $\pm$ 13	285 $\pm$ 18	281 $\pm$ 19
Brain	(g)	2.09 $\pm$ 0.11	2.06 $\pm$ 0.07	2.09 $\pm$ 0.08	2.08 $\pm$ 0.08
	(g%)	0.738 $\pm$ 0.061	0.735 $\pm$ 0.028	0.738 $\pm$ 0.042	0.744 $\pm$ 0.038
Thymus	(mg)	245 $\pm$ 63	223 $\pm$ 55	260 $\pm$ 57	199 $\pm$ 61
	(mg%)	86.971 $\pm$ 24.484	79.361 $\pm$ 19.026	91.003 $\pm$ 18.210	70.704 $\pm$ 20.738
Liver	(g)	10.03 $\pm$ 1.07	9.33 $\pm$ 0.75	9.73 $\pm$ 0.81	9.51 $\pm$ 0.89
	(g%)	3.539 $\pm$ 0.381	3.325 $\pm$ 0.232	3.419 $\pm$ 0.199	3.386 $\pm$ 0.211
Spleen	(g)	0.69 $\pm$ 0.17	0.61 $\pm$ 0.06	0.65 $\pm$ 0.11	0.67 $\pm$ 0.12
	(g%)	0.245 $\pm$ 0.071	0.218 $\pm$ 0.027	0.228 $\pm$ 0.039	0.238 $\pm$ 0.042
Kidneys	(g)	2.12 $\pm$ 0.25	2.05 $\pm$ 0.13	2.08 $\pm$ 0.26	2.04 $\pm$ 0.22
	(g%)	0.748 $\pm$ 0.098	0.731 $\pm$ 0.057	0.730 $\pm$ 0.079	0.723 $\pm$ 0.044
Adrenals	(mg)	81 $\pm$ 8	78 $\pm$ 9	81 $\pm$ 12	80 $\pm$ 14
	(mg%)	28.648 $\pm$ 3.742	27.755 $\pm$ 4.024	28.354 $\pm$ 4.206	28.401 $\pm$ 3.667
Ovaries	(mg)	104 $\pm$ 22	100 $\pm$ 14	96 $\pm$ 18	102 $\pm$ 14
	(mg%)	36.977 $\pm$ 8.179	35.884 $\pm$ 6.370	33.739 $\pm$ 6.324	36.304 $\pm$ 4.048

(%) (Organ weight / body weight) $\times$ 100

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

Table 9-1

Summary of gross findings (sacrificed)

Exp. No. 4803 (115-145)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)		0	100	300	1000
No. of animals necropsied		12	12	12	12
Organ	Findings				
DIGESTIVE SYSTEM					
small intestine					
liver	diverticulum	0	0	0	1
	red patch/zone	0	0	1	0
	white patch/zone	0	0	0	1
REPRODUCTIVE SYSTEM					
testis	enlarged	0	0	0	1
epididymis	nodule	0	0	0	2

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

Table 9-2

Summary of gross findings (sacrificed)

Exp. No. 4803 (115-145)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)		0	100	300	1000
No. of animals necropsied		12	12	12	12
Organ	Findings				
HEMATOPOIETIC SYSTEM					
spleen	adhesion	1	0	0	0
DIGESTIVE SYSTEM					
stomach	black patch/zone	0	0	2	1
liver	white patch/zone	0	0	1	0
	yellow patch/zone	0	0	0	1
ENDOCRINE SYSTEM					
pituitary gland					
	cyst	0	0	0	1
INTEGUMENTARY SYSTEM					
hair	thin	0	0	0	1

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

Table 10-1

Summary of histological findings (sacrificed)

Exp. No. 4803 (115-145)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0	100	300	1000
No. of animals necropsied	12	12	12	12
No. of animals examined histologically	5	5	5	6
Organ Findings				
CARDIOVASCULAR SYSTEM				
heart				(5)
cellular infiltration, lymphocyte	0	-	-	1
microgranuloma	3	-	-	3
HEMATOPOIETIC SYSTEM				
spleen				(5)
deposit, pigment	1	-	-	2
RESPIRATORY SYSTEM				
lung				(5)
accumulation of foamy cells	1	-	-	0
microgranuloma	0	-	-	1
hypertrophy, media, artery	3	-	-	3
osseous metaplasia	2	-	-	0
DIGESTIVE SYSTEM				
exocrine pancreas				(5)
proliferation, duct	1	-	-	0
small intestine				(5)
diverticula	0	-	-	1
hyperplasia, lymphoid tissue	2	-	-	1
large intestine				(5)
hyperplasia, lymphoid tissue	4	-	-	4
liver				(5)
necrosis	0	1	0	0
microgranuloma	4	2	4	3
URINARY SYSTEM				
kidney				(5)
basophilic tubules	2	-	-	3
cast, hyaline	0	-	-	1
dilatation, tubules	1	-	-	2
eosinophilic body	1	-	-	1
pyelitis	0	-	-	1
transitional cell hyperplasia	0	-	-	1

Significant difference from control group: * : $P \leq 0.05$
 (): No. of animals examined microscopically at this site

** : $P \leq 0.01$

Table 10-1 -continued

Summary of histological findings (sacrificed)

Exp. No. 4803 (115-145)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)		0	100	300	1000
No. of animals necropsied		12	12	12	12
No. of animals examined histologically		5	5	5	6
Organ	Findings				
URINARY SYSTEM					
urinary bladder					(5)
	cellular infiltration, lymphocyte	0	-	-	1
	transitional cell hyperplasia	0	-	-	1
REPRODUCTIVE SYSTEM					
testis					(5)
	atrophy, seminiferous tubule	0	0	1	0
	dilatation, seminiferous tubule	0	0	0	1
epididymis					
	cell debris, lumen	1	1	1	0
	spermatic granuloma	0	0	0	2
prostate					(5)
	cell debris, lumen	0	-	-	1
	cellular infiltration, lymphocyte	4	-	-	1
	prostatitis	0	-	-	1
	fibrosis	0	-	-	1
ENDOCRINE SYSTEM					
pituitary gland					(5)
	cyst	1	-	-	0
thyroid gland					(5)
	ultimobranchial remnant	1	-	-	0
adrenal gland					(5)
	degeneration, vacuolar	1	-	-	1
SPECIAL SENSE SYSTEM					
Harderian gland					(5)
	cellular infiltration, lymphocyte	0	-	-	1

Significant difference from control group; * : $P \leq 0.05$
 (): No. of animals examined microscopically at this site

** : $P \leq 0.01$

Table 10-2

Summary of histological findings (sacrificed)

Exp. No. 4803 (115-145)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0	100	300	1000
No. of animals necropsied	12	12	12	12
No. of animals examined histologically	6	5	6	6
Organ Findings				
HEMATOPOIETIC SYSTEM				
spleen				(5)
adhesion	1	-	-	0
deposit, pigment	1	-	-	0
hematopoiesis, extramedullary	4	-	-	4
lymph node	(5)			(5)
sinus-histiocytosis	1	-	-	0
RESPIRATORY SYSTEM				
lung	(5)			(5)
accumulation of foamy cells	0	-	-	2
hypertrophy, media, artery	5	-	-	3
osseous metaplasia	0	-	-	1
DIGESTIVE SYSTEM				
stomach	(5)			(5)
necrosis	0	0	2	1
cellular infiltration	0	1	0	0
small intestine	(5)			(5)
mineralization	1	-	-	0
hyperplasia, lymphoid tissue	1	-	-	4
large intestine	(5)			(5)
hyperplasia, lymphoid tissue	2	-	-	3
liver	(5)		(5)	(5)
fatty change	1	0	0	0
necrosis	0	0	1	0
necrosis, focal	0	0	0	1
microgranuloma	0	0	0	2
hematopoiesis, extramedullary	3	4	3	3
URINARY SYSTEM				
kidney	(5)			(5)
mineralization	1	-	-	0
REPRODUCTIVE SYSTEM				
mammary gland	(5)			(5)
hyperplasia	5	-	-	5

Significant difference from control group: * : $P \leq 0.05$ ** : $P \leq 0.01$
 () : No. of animals examined microscopically at this site

Table 10-2 -continued

Summary of histological findings (sacrificed)

Exp. No. 4803 (115-145)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0	100	300	1000
No. of animals necropsied	12	12	12	12
No. of animals examined histologically	6	5	6	6
Organ Findings				
REPRODUCTIVE SYSTEM				
uterus	(5)			(5)
post delivery lesion	2	-	-	1
ENDOCRINE SYSTEM				
pituitary gland	(5)			
cyst	0	-	-	1
thyroid gland	(5)			(5)
ultimobranchial remnant	0	-	-	2
SPECIAL SENSE SYSTEM				
Harderian gland	(5)			(5)
cellular infiltration, lymphocyte	0	-	-	1
INTEGUMENTARY SYSTEM				
skin	(5)			(5)
hair follicle atrophy	0	-	-	1

Significant difference from control group; * : $P \leq 0.05$ ** : $P \leq 0.01$
 (): No. of animals examined microscopically at this site

Table 10-3

Cell type and number per Sertoli cell in seminiferous tubules of rats at VII - VIII
stage of spermatogenesis during dosing period

Exp. No. 4803 (115-145)

Dose level (mg/kg)	0			1000		
No. of animals examined histologically	5			5		
	Mean	±	S.D.	Mean	±	S.D.
Spermatogonia type A	0.21	±	0.03	0.22	±	0.03
Preleptotene spermatocyte	2.56	±	0.32	2.66	±	0.41
Pachytene spermatocyte	3.77	±	0.39	3.77	±	0.34
Round spermatid	8.05	±	0.84	8.29	±	0.93

Table 11

Copulation and fertility results in rats

Exp. No. 4803 (115-145)

Dose level (mg/kg)	0	100	300	1000
First				
No. of pairs mated	12	12	12	12
No. of pairs copulated	12	12	12	12
No. of pregnant females	12	12	12	12
Copulation index (%) 1)	100.0	100.0	100.0	100.0
Fertility index (%) 2)	100.0	100.0	100.0	100.0
Estrous cycle				
No. of animals examined	12	12	12	12
Mean estrous cycle (days, Mean $\pm$ S.D)	4.2 $\pm$ 0.3	4.1 $\pm$ 0.3	4.2 $\pm$ 0.3	4.1 $\pm$ 0.2
Irregular cycle a) (%) 3)	0 (0.0)	1 (8.3)	0 (0.0)	1 (8.3)

- 1) (No. of animals with successful copulation / no. of animals mated) x 100
 2) (No. of pregnant animals / no. of animals with successful copulation) x 100
 3) (No. of animals having irregular estrous cycle / no. of animals examined) x 100
 a) No. of animals having irregular estrous cycle
 Values in parentheses are expressed no. of animals observed
 Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

Table 12

Findings of delivery in dams(F0)

Exp. No. 4803 (115-145)

Dose level (mg/kg)	0	100	300	1000
No. of dams observed	12	12	12	12
No. of dams delivered live pups	12	12	12	12
Duration of gestation (Mean $\pm$ S.D.)	22.6 $\pm$ 0.5	22.0 $\pm$ 0.0**	22.3 $\pm$ 0.5	22.2 $\pm$ 0.4*
No. of total corpora lutea (Mean $\pm$ S.D.)	267(22.3 $\pm$ 4.1)	272(22.7 $\pm$ 7.0)	248(20.7 $\pm$ 4.8)	264(22.0 $\pm$ 6.4)
No. of total implants (Mean $\pm$ S.D.)	156(13.0 $\pm$ 3.3)	171(14.3 $\pm$ 3.1)	172(14.3 $\pm$ 1.5)	181(15.1 $\pm$ 1.8)
No. of total pups born (Mean $\pm$ S.D.)	146(12.2 $\pm$ 2.9)	161(13.4 $\pm$ 3.1)	161(13.4 $\pm$ 2.4)	165(13.8 $\pm$ 1.9)
No. of total live pups born (Mean $\pm$ S.D.)	144(12.0 $\pm$ 2.8)	157(13.1 $\pm$ 2.8)	157(13.1 $\pm$ 3.2)	162(13.5 $\pm$ 1.7)
Male	71(5.9 $\pm$ 2.0)	80(6.7 $\pm$ 2.7)	71(5.9 $\pm$ 3.0)	74(6.2 $\pm$ 2.3)
Female	73(6.1 $\pm$ 1.4)	77(6.4 $\pm$ 1.8)	86(7.2 $\pm$ 2.2)	88(7.3 $\pm$ 2.5)
Sex ratio (Mean $\pm$ S.D.)	1.00 $\pm$ 0.45	1.16 $\pm$ 0.68	0.91 $\pm$ 0.59	1.17 $\pm$ 1.16
No. of total live pups on day 4 (Mean $\pm$ S.D.)				
Male	71(5.9 $\pm$ 2.0)	78(6.5 $\pm$ 2.5)	70(5.8 $\pm$ 3.0)	74(6.2 $\pm$ 2.3)
Female	73(6.1 $\pm$ 1.4)	77(6.4 $\pm$ 1.8)	86(7.2 $\pm$ 2.2)	88(7.3 $\pm$ 2.5)
No. of total dead pups (Mean $\pm$ S.D.)	2(0.2 $\pm$ 0.6)	4(0.3 $\pm$ 0.8)	3(0.3 $\pm$ 0.6)	3(0.3 $\pm$ 0.5)
No. of total cannibalism (Mean $\pm$ S.D.)	0(0.0 $\pm$ 0.0) a)	0(0.0 $\pm$ 0.0) a)	1(0.1 $\pm$ 0.3) a)	0(0.0 $\pm$ 0.0) a)
Gestation index (%) 1)	100.0	100.0	100.0	100.0
Implantation index (% Mean $\pm$ S.D.) 2)	60.7 $\pm$ 19.3	67.5 $\pm$ 20.5	72.7 $\pm$ 17.1	72.5 $\pm$ 16.9
Delivery index (% Mean $\pm$ S.D.) 3)	94.3 $\pm$ 6.4	93.9 $\pm$ 6.1	93.9 $\pm$ 15.2	91.2 $\pm$ 6.9
Live birth index (% Mean $\pm$ S.D.) 4)	98.9 $\pm$ 3.8	98.0 $\pm$ 4.6	95.7 $\pm$ 12.4	98.4 $\pm$ 2.9
Viability index on day 4 (% Mean $\pm$ S.D.) 5)				
Male	100.0 $\pm$ 0.0 a)	98.3 $\pm$ 4.0 a)	98.8 $\pm$ 4.1 a)	100.0 $\pm$ 0.0 a)
Female	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0

1) (No. of females with live pups / no. of pregnant females) x 100

2) (No. of implants / no. of corpora lutea) x 100

3) (No. of pups born / no. of implants) x 100

4) (No. of live pups born / no. of pups born) x 100

5) (No. of live pups on day 4 after birth / no. of live pups born) x 100

a) Bartlett's test can not be calculate

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

Table 13

External observations on live pups(F1) from rats

Exp. No. 4803 (115-145)

Dose level (mg/kg)	0	100	300	1000
No. of litters	12	12	12	12
No. of live pups examined	144	157	157	162
No. of live pups with external anomalies (% Mean $\pm$ S.D.)	0 -	0 -	2 1.2 $\pm$ 2.7	0 -
Type and incidence of external anomalies (%) 1)				
anophthalmia	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)
polydactyly	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)

1) (No. of live pups with external anomalies / no. of live pups examined) x 100
 Significant difference from control group; *: $p \leq 0.05$ **: $p \leq 0.01$

Table 14

Body weight change of pups(F1) from rats

Exp. No. 4803 (115-145)

Unit : g										
Dose level (mg/kg)		0		100		300		1000		
No. of litters		12		12		12		12		
		Mean $\pm$ S.D.		(N)	Mean $\pm$ S.D.		(N)	Mean $\pm$ S.D.		(N)
Male										
Days after birth	0	7.0 $\pm$ 0.6	(12)	6.4 $\pm$ 0.4*	(12)	6.6 $\pm$ 0.5	(12)	6.6 $\pm$ 0.6	(12)	
	4	10.7 $\pm$ 0.9	(12)	9.3 $\pm$ 1.3**	(12)	9.6 $\pm$ 0.9*	(12)	9.9 $\pm$ 0.9	(12)	
Female										
Days after birth	0	6.7 $\pm$ 0.6	(12)	6.1 $\pm$ 0.5	(12)	6.5 $\pm$ 0.8	(12)	6.2 $\pm$ 0.6	(12)	
	4	10.2 $\pm$ 0.9	(12)	8.9 $\pm$ 1.3**	(12)	9.6 $\pm$ 1.1	(12)	9.4 $\pm$ 0.9	(12)	

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

Table 15-1

Summary of gross findings of pups(F1) from rats(sacrificed)

Exp. No. 4803 (115-145)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0	100	300	1000
No. of pups necropsied	71	78	70	74
Organ Findings				
HEMATOPOIETIC SYSTEM				
thymus thymic remnant in the neck	3	1	2	3
DIGESTIVE SYSTEM				
liver white patch/zone	0	1	0	0
nodule	0	0	0	1
URINARY SYSTEM				
kidney dilated pelvis	0	3	3	3
ureter dilated lumen	0	3	4	3
INTEGUMENTARY SYSTEM				
planta red patch/zone	0	15**	0	0

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

Table 15-2

Summary of gross findings of pups(F1) from rats(sacrificed)

Exp. No. 4803 (115-145)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0	100	300	1000
No. of pups necropsied	73	77	86	88
Organ Findings				
HEMATOPOIETIC SYSTEM				
thymus thymic remnant in the neck	1	2	2	0
DIGESTIVE SYSTEM				
liver nodule	0	0	0	1
URINARY SYSTEM				
kidney dilated pelvis	0	0	2	1
ureter dilated lumen	0	5*	1	2
SPECIAL SENSE SYSTEM				
eye anophthalmia	0	0	1	0
INTEGUMENTARY SYSTEM				
planta red patch/zone	0	13**	0	0
hindlimb cyst	0	1	0	0
hindlimb polydactyly	0	0	1	0

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