

食薬セ研第10-1630号

2000年 8月25日

ピグメントオレンジ16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	10
7. 生化学検査所見	10
8. 病理学検査所見	10
考 察	11
文 献	12
 Figures 1～2	 13
Tables 1～10	16

【要 約】

ピグメントオレンジ16 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群には媒体であるコーン油を、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、被験物質投与群では、投与第2日以降、投与期間終了時まで継続して被験物質と同色のオレンジ色の便が排泄されたが、この他には被験物質投与に起因すると考えられる一般状態の変化はなかった。また、体重、摂餌量、尿検査、血液学検査、生化学検査および器官重量を含む病理学検査では、いずれ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。

以上のように、ピグメントオレンジ16 を 1000 mg/kg の用量で反復投与しても、生体の機能および形態の変化は認められなかった。よって、本試験条件下におけるピグメントオレンジ16 の無影響量は雌雄とも 1000 mg/kg であると考えられる。

【緒 言】

ピグメントオレンジ16 は有機顔料の一つで、ラットにおける単回経口投与時のLD₅₀ は 5000 mg/kg 以上であることが報告されている¹⁾。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、ピグメントオレンジ16 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。

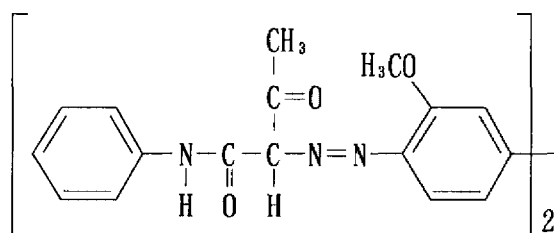
なお、本試験は、「化審法毒性試験法、スクリーニング毒性試験－ほ乳類を用いる28日間の反復投与毒性試験－」（昭和61年12月5日、環保業第700号、薬発第1039号、61基局第1014号）および「化学物質GLP」（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和63年11月18日改正、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に準拠して実施した。

【方 法】

1. 被験物質

被験物質として、ピグメントオレンジ16（以下 P016 と略記）を用いた。本被験物質は、別名をジスアゾオレンジといい、英名は C.I. Pigment Orange 16 であり、CAS No. 6505-28-8、分子量 620.66、分子式 $C_{24}H_{12}N_6O_6$ の橙色粉末である。P016 の構造式を以下に示す。

構造式



本試験には、

より提供された P016（ロット番号：

純度：99 wt%以上）を用いた。提供された被験物質は、不純物として水可溶分（NaCl）0.18%を含有していた。受領物質は、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。

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、筑波飼育センター]（注1）を検疫と馴化を兼ねて9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 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、基準湿度 50~65%、換気回数約15回/時、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

（注1）

動物購入日：1999年4月21日

入荷匹数：雄34匹 雌34匹

入荷時体重：雄79.1~92.2g（平均85.7g） 雌72.4~84.2g（平均78.8g）

（注2）

投与開始日：1999年4月30日

投与開始時体重：雄160.3~187.5g（平均176.6g） 雌135.5~164.4g（平均149.7g）

(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、飼育室の温湿度の実測値は、空調機の定期的管理作業による 1 時間以内の逸脱を除いてはいずれも基準値内にあった（注 3）。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

投与検体は、用量ごとに被験物質を秤量し、所定濃度となるようにコーン油（英名：Corn oil、商品名：トウモロコシ油、ロット番号：V8P7069、ナカライテスク株式会社）を加えて懸濁して調製した。

なお、本被験物質は通常の取り扱いにおいては安定であることを基に、投与検体の調製は投与期間中 1 回とした。また、本被験物質は、いずれの溶媒にも溶解性を示さないため、投与検体の化学分析は不可能と判断し、安定性、含量測定および均一性試験は実施しなかった。

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-98-023、投与量：0、500 および 1000 mg/kg）の結果に基づき決定した。すなわち、P016 を 7 日間反復投与することにより、500 および 1000 mg/kg 投与群の雌雄とも、便および消化管内容物の色調が被験物質と同様になった以外に変化は認められなかった。以上のことから、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、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コーン油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。

（注 3）

動物飼育期間中の温湿度の実測値 温度 23.5～25.5℃ 湿度 54～71%

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。

群	投与量 (mg/kg)	投与容量 (mL/kg)	動物番号	
			雄	雌
対 照 群	0	10	1～10	31～40
低用量群	100	10	11～15	41～45
中用量群	300	10	16～20	46～50
高用量群	1000	10	21～30	51～60

雌雄とも対照群および 1000 mg/kg 投与群では、動物番号の若い方から 5 匹を回復試験に用いた。

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、ラット用胃管を用いて強制投与した。投与容量は 10 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とおり測定した。体重は、投与第 1 週には投与第 1 日の投与直前と投与第 5 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

各群とも生存している全例について、投与第 4 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、4 時間尿あるいは新鮮尿で、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 カビリマン・ビリルビン	視 診 試験紙法 同上	— クリニテック 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-2K 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に用いる血液については、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として用いて採取した。

項 目	測 定 法	使 用 機 器
赤血球数 (RBC)	自動（電気抵抗法）	Coulter Counter Model S-PLUS IV (コールター・エレクトロニクス)
白血球数 (WBC)	同上（ 同上 ）	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（ 同上 ）	同上
ハマトクリット値 (Ht)	計算 ($RBC \times MCV \times 0.001$)	
平均赤血球血色素量 (MCH)	同上 ($Hb \times 1000 / RBC$)	
平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	同上 ($Hb \times 100 / Ht$)	
白血球分類	視算（静脈血塗抹標本 Wright-Giemsa 染色）	光学顕微鏡
網状赤血球比率	Brecher 法	同上
プロトロンビン時間 (PT)	光散乱検出法	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

4) 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

項 目	測 定 法	使 用 機 器
尿素窒素濃度 (BUN)	ウレゼ G ϕ .DH法	遠心方式生化学自動分析装置 COBAS-FARA (ロシ)
クレアチン濃度	Jaffé法 (Rate)	同上
ALP活性	GSCC法	同上
GOT活性	IFCC法	同上
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、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%ホルマリン溶液に固定した。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、対照群および高用量群については、常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色標本作製し、その後、光学顕微鏡を用いて組織学検査を実施した。その他、肉眼的異常（100 mg/kg 投与群の雌1例の投与過誤による変化を除く）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、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において、被験物質投与に起因したと考えられる変化がなかったことから、回復試験群を含む他の群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、摂餌量ならびに定期解剖例の血液学検査、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。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意性について検定（有意水準：5%）を行った。分散が一意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、分散が一意でない場合は、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。但し、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値を求めた後、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。但し、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の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 (Table 1、Appendix 1)

被験物質投与群の雌雄いずれの例においても、投与第2日以降、投与期間終了時まで継続して被験物質と同色のオレンジ色の便が排泄された。一方、回復試験期間中には、この便の着色は回復第1日のみに認められたが、回復第2日以降には消失した。その他、100 mg/kg 投与群の雌1例（動物番号：44）では、投与第23から24日にかけて排便量の減少が認められたが、同例では剖検で胸腔内に投与検体が確認されたことから、この排便量の減少は投与過誤およびこれに伴う摂餌量の減少による症状と考えられる。また、観察期間中に痂皮あるいは脱毛が、対照群の雌1例および1000 mg/kg 投与群の雄1例に観察された。

3. 体重 (Fig. 1、Table 2、Appendix 2)

観察期間中、被験物質投与群では、雌雄いずれにおいても対照群との間に体重の有意な差は認められなかった。

4. 摂餌量 (Fig. 2、Table 3、Appendix 3)

100 mg/kg 投与群の雌では、投与第4週の摂餌量が対照群と比較して有意な低値を示した。なお、同群の1例では前述のように、同時期に投与過誤があったため摂餌量が減少したものと考えられる。その他には、投与期間および回復試験期間を通して、被験物質投与群と対照群との間に摂餌量の有意な差は認められなかった。

5. 尿検査所見 (Table 4、Appendix 4)

投与第4週および回復第2週の尿検査では、いずれの検査項目においても、対照群と被験物質投与群の間に著しい差は認められなかった。

6. 血液学検査所見 (Table 5、Appendix 5)

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、被験物質投与群の雌で赤血球数の減少が認められた。

7. 生化学検査所見 (Table 6、Appendix 6)

投与期間終了時の検査では、300 mg/kg 投与群の雄で A/G 比が有意な低値となり、1000 mg/kg 投与群の雌では、カリウム濃度の有意な低下が認められた。回復試験期間終了時の検査では、被験物質投与群の雌で総コレステロール濃度の有意な増加が認められたが、他の検査項目には対照群と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 7, 8、Appendix 7, 8)

投与期間終了時解剖例の 100 mg/kg 投与群では、卵巣の相対重量に有意な増加がみられたが、この他には回復試験期間終了時解剖例の器官重量を含め、いずれも有意な差は認められなかった。

2) 肉眼所見 (Table 9、Appendix 9)

投与期間終了時解剖例のうち、対照群の雌 1 例に脱毛がみられ、300 mg/kg 投与群の雌 1 例に副脾が認められた。なお、100 mg/kg 投与群の雌 1 例では、剖検において胸腔内に投与検体が認められたことから、投与過誤があったものと判断した。この他には回復試験期間終了時解剖例を含め、いずれにも異常所見は観察されなかった。

3) 組織学検査所見 (Table 10、Appendix 10)

投与期間終了時解剖例の対照群および 1000 mg/kg 投与群では、雌雄とも肝臓、腎臓、脾臓に、また雄では心臓に Table 10-1-1 または 10-1-2 に示す所見が観察されたが、いずれの所見も群間でその発生頻度および程度に差は認められなかった。なお、肉眼的に脱毛がみられた対照群の雌 1 例では、これに対応する変化として痂皮がみられ、また、副脾がみられた 300 mg/kg 投与群の雌 1 例の脾臓では、軽微な髄外造血と褐色色素沈着が観察された以外に変化は認められなかった。

【考 察】

P016 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日間の回復期間を設けた。

その結果、被験物質投与群の便の着色以外には、被験物質投与に起因したと考えられる一般状態の変化は認められなかった。また、体重、摂餌量および尿検査には被験物質投与による有意な差は認められず、血液学検査、生化学検査および器官重量で、対照群と被験物質投与群との間に有意な差が認められる項目があったが、他の関連所見がなかったこと、用量依存性のある変化でなかったことなどから、いずれも被験物質投与に起因した変化ではないと考えられた。さらに、組織学検査においても、対照群と高用量群との間に差は認められなかった。

以上のように、P016 を 1000 mg/kg の用量で反復投与しても、生体の機能および形態の変化は認められなかった。よって、本試験条件下における P016 の無影響量は雌雄とも 1000 mg/kg であると考えられる。

【文 献】

- 1) NPIRI Raw Materials Data Handbook. Vol.4 -Pigments (1983) pp.24

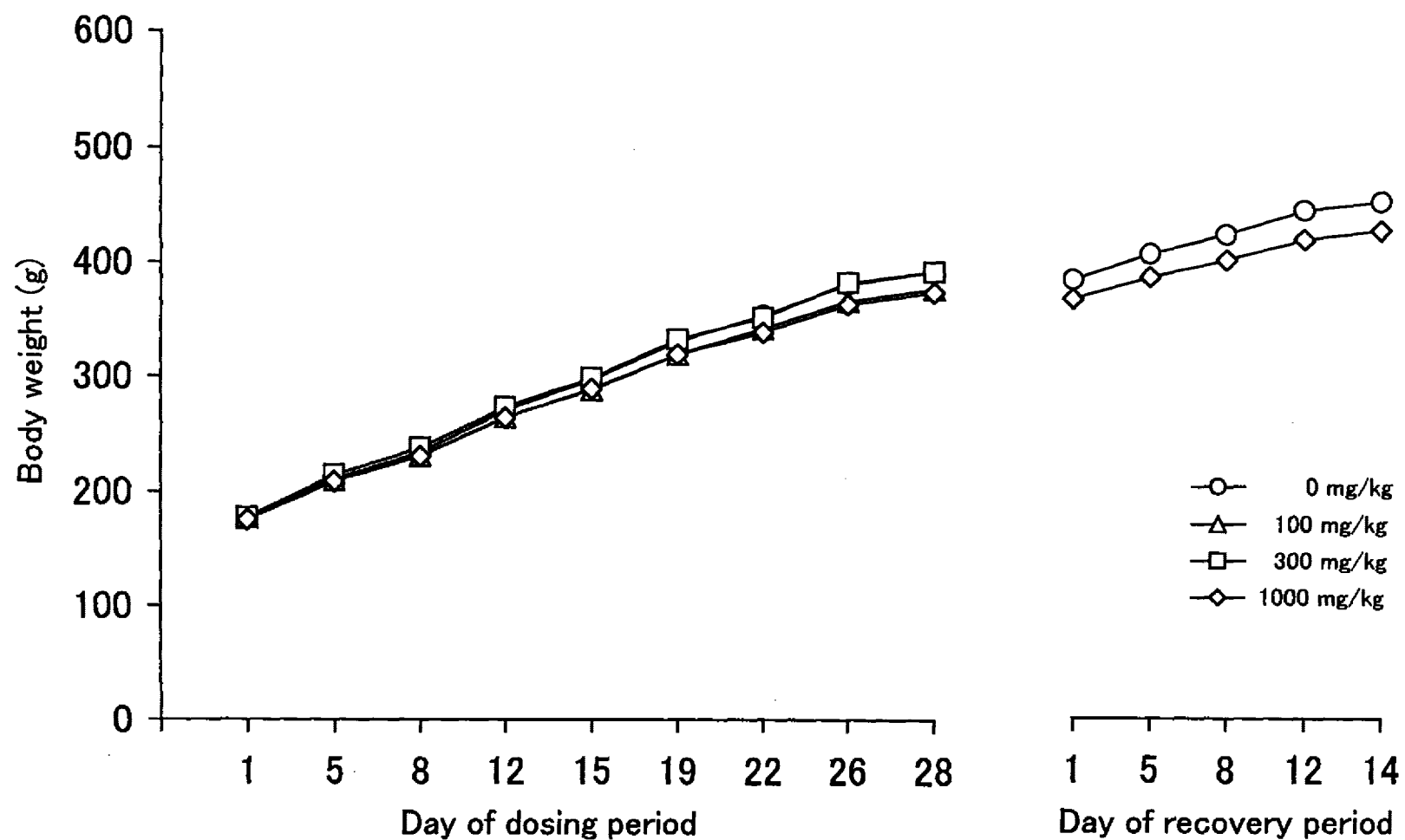


Fig. 1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of PO16 in rats

Body weight changes in males

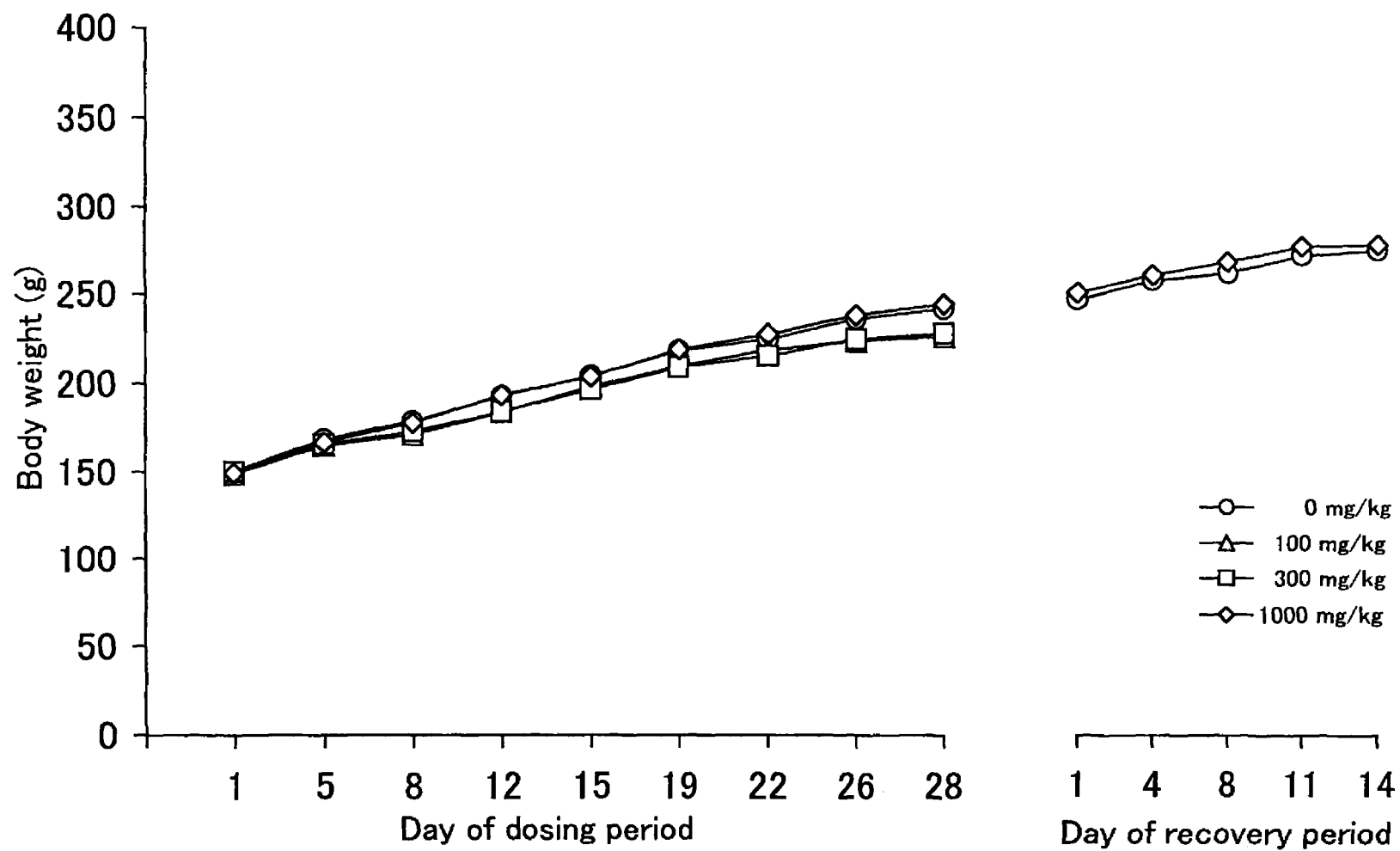


Fig. 1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of PO16 in rats

Body weight changes in females

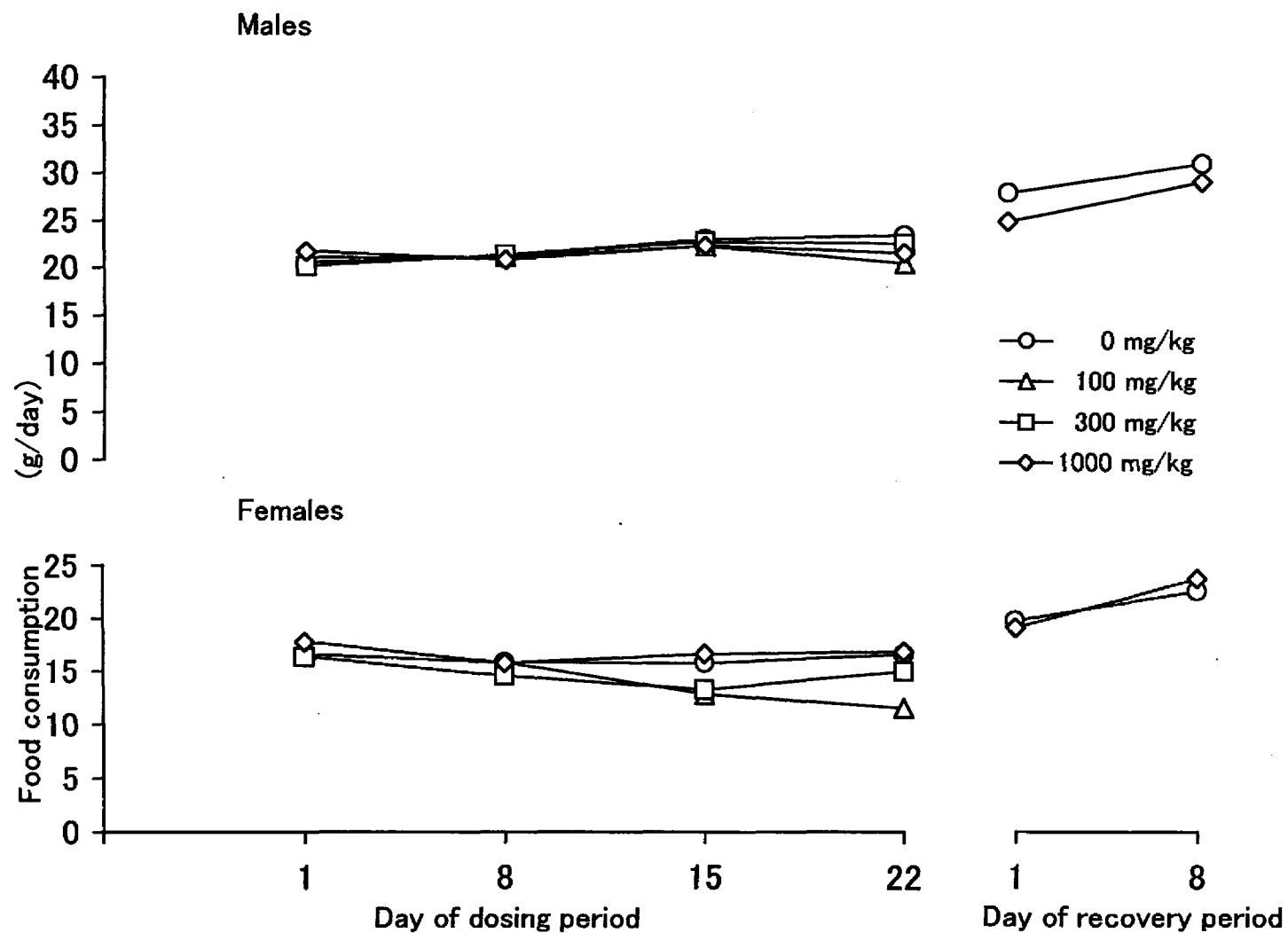


Fig. 2
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of PO16 in rats
Food consumption in males and females

Table 1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of P016 in rats

Clinical signs in males

Clinical signs	Dose (mg/kg)	Initial number of animals	Number of animals with clinical signs																												Day of recovery period ^{a)}		Total
			Day of dosing period																												1	2~14	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28			
Orange colored feces	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	100	5	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	300	5	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	1000	10	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5	-	10
Loss of fur	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	100	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	300	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	1000	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	

a), recovery test was performed in 5 animals of the vehicle control and 1000 mg/kg groups.

-, no animal showed the sign.

Table 1-2
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of PO16 in rats

Clinical signs in females

Clinical signs	Dose (mg/kg)	Initial number of animals	Number of animals with clinical signs																												Day of recovery period ^{a)}		Total
			Day of dosing period																												1	2~14	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28			
Orange colored feces	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	100	5	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	300	5	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	1000	10	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5	-
Crust	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	
	100	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	300	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	1000	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
Loss of fur	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	1	
	100	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	300	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	1000	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
Decreased fecal volume	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	100	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	1	
	300	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	1000	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	

a), recovery test was performed in 5 animals of the vehicle control and 1000 mg/kg groups.
-, no animal showed the sign.

Table 2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of P016 in rats

Body weight changes in males

Dose (mg/kg)	Day of dosing period									Day of recovery period				
	1	5	8	12	15	19	22	26	28	1	5	8	12	14
0	(10) 177.0 ±7.7	(10) 210.5 ±12.3	(10) 233.5 ±17.3	(10) 269.8 ±22.0	(10) 296.6 ±27.9	(10) 329.7 ±34.1	(10) 353.2 ±39.5	(10) 380.9 ±47.2	(10) 392.1 ±50.2	(5) 384.4 ±53.6	(5) 407.4 ±58.2	(5) 424.1 ±62.4	(5) 445.9 ±64.2	(5) 453.4 ±62.4
100	(5) 176.9 ±7.5	(5) 209.3 ±11.7	(5) 230.5 ±13.4	(5) 264.0 ±13.8	(5) 287.6 ±16.4	(5) 318.9 ±17.0	(5) 341.3 ±17.9	(5) 365.9 ±20.0	(5) 376.4 ±20.7					
300	(5) 177.7 ±8.4	(5) 213.8 ±11.3	(5) 237.0 ±15.0	(5) 272.6 ±20.7	(5) 297.8 ±25.4	(5) 332.0 ±33.6	(5) 351.3 ±38.4	(5) 382.0 ±44.9	(5) 391.9 ±46.1					
1000	(10) 175.6 ±7.4	(10) 208.4 ±8.4	(10) 230.1 ±9.4	(10) 263.6 ±13.1	(10) 288.7 ±14.7	(10) 318.6 ±16.8	(10) 338.3 ±19.4	(10) 362.8 ±21.7	(10) 373.4 ±23.3	(5) 367.3 ±31.1	(5) 387.1 ±33.5	(5) 401.9 ±33.8	(5) 419.9 ±33.9	(5) 428.3 ±34.7

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 P016 in rats

Body weight changes in females

Dose (mg/kg)	Day of dosing period									Day of recovery period				
	1	5	8	12	15	19	22	26	28	1	5	8	12	14
0	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	150.3 ±8.6	168.5 ±10.2	178.9 ±10.5	192.8 ±12.2	203.8 ±15.0	218.2 ±17.1	224.3 ±19.1	235.8 ±20.7	241.3 ±20.5	246.1 ±29.4	257.0 ±31.2	260.9 ±30.3	271.2 ±29.3	274.0 ±35.7
100	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)					
	148.8 ±4.9	164.9 ±9.0	171.0 ±12.3	183.7 ±16.1	198.0 ±24.5	209.3 ±30.0	218.4 ±39.8	223.3 ±38.8	225.8 ±41.6					
300	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)					
	150.2 ±5.7	165.8 ±7.8	172.8 ±7.5	184.1 ±8.4	196.4 ±12.0	208.7 ±14.9	214.9 ±15.4	224.5 ±16.8	227.6 ±14.9					
1000	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	149.2 ±6.6	166.8 ±7.7	177.9 ±9.9	193.2 ±12.3	203.7 ±14.2	218.8 ±16.0	227.2 ±18.1	238.0 ±18.9	244.1 ±20.6	250.0 ±19.4	260.1 ±22.6	267.4 ±22.8	276.2 ±25.6	277.4 ±24.9

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 P016 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)
	20.5	21.2	23.0	23.4	27.8	30.9
	±2.5	±3.3	±3.6	±4.7	±3.1	±4.8
100	(5)	(5)	(5)	(5)		
	21.0	21.1	22.2	20.4		
	±0.8	±1.0	±1.3	±1.0		
300	(5)	(5)	(5)	(5)		
	20.1	21.3	22.7	22.5		
	±2.1	±2.7	±3.1	±3.4		
1000	(10)	(10)	(10)	(10)	(5)	(5)
	21.7	20.8	22.3	21.5	24.8	29.0
	±1.5	±2.5	±2.6	±3.8	±4.2	±3.3

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

Table 3-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of P016 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)
	16.5 ±1.8	15.8 ±3.0	15.7 ±3.8	16.5 ±2.6	20.1 ±2.9	23.0 ±6.7
100	(5)	(5)	(5)	(5)		
	16.5 ±2.0	15.8 ±3.6	12.8 ±2.3	11.5* ±5.4		
300	(5)	(5)	(5)	(5)		
	16.3 ±1.6	14.5 ±1.5	13.2 ±2.8	14.9 ±2.2		
1000	(10)	(10)	(10)	(10)	(5)	(5)
	17.7 ±2.2	15.7 ±1.9	16.6 ±3.5	16.8 ±3.0	19.4 ±3.8	24.2 ±5.5

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

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

Table 4-1
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of PO16 in rats

Urinalysis in males and females on day 27 of dosing period

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Color ^{a)}		Turbidity ^{b)}		pH								Protein ^{c)}					Glucose ^{d)}		Ketone ^{b)}				Bilirubin ^{b)}		Occult blood ^{b)}				Urobilinogen ^{e)}	
			ly	y	—	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	≥9.0	—	±	+	++	+++	—	—	±	+	—	+	—	±	+	++	±	+				
Male	0	10	10	0	10	0	0	7	1	2	0	0	0	0	8	2	0	10	1	4	5	10	0	9	0	0	1	9	1				
	100	5	5	0	5	0	1	0	1	1	1	1	0	0	3	2	0	5	0	0	5	5	0	5	0	0	0	3	2				
	300	5	5	0	5	0	1	1	1	0	1	1	0	0	2	2	1	5	0	1	4	4	1	4	0	1	0	4	1				
	1000	10	10	0	10	0	2	3	1	1	2	1	0	0	10	0	0	10	0	4	6	10	0	9	0	1	0	7	3				
Female	0	10	9	1	10	1	1	1	4	1	1	1	5	1	3	1	0	10	7	2	1	9	1	10	0	0	0	7	3				
	100	5	5	0	5	2	1	1	0	0	1	0	1	0	4	0	0	5	1	4	0	4	1	5	0	0	0	2	3				
	300	5	5	0	5	1	0	2	0	0	0	2	1	2	2	0	0	5	3	2	0	5	0	5	0	0	0	3	2				
	1000	10	10	0	10	1	2	1	2	1	2	1	3	3	3	1	0	10	5	5	0	9	1	10	0	0	0	5	5				

a) ly, light yellow; y, yellow

b) —, negative; ±, trace; +, slight; ++, moderate

c) —, negative; ±, trace; +, 30 mg/dL; ++, 100 mg/dL; +++, ≥300 mg/dL

d) —, negative

e) ±, 0.1 E.U./dL; +, 1.0 E.U./dL

Table 4-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of PO16 in rats

Urinalysis in males and females on day 13 of recovery period

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Color ^{a)}	Turbidity ^{b)}	pH						Protein ^{c)}				Glucose ^{d)}		Ketone ^{b)}		Bilirubin ^{b)}	Occult blood ^{b)}			Urobilinogen ^{e)}	
			ly	—	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	—	±	+	++	—	—	±	+	—	—	±	+	±	+
Male	0	5	5	5	0	0	2	3	0	0	0	0	4	1	5	0	1	4	5	4	0	1	2	3
	1000	5	5	5	0	0	0	3	2	0	0	0	5	0	5	1	1	3	5	5	0	0	4	1
Female	0	5	5	5	0	2	1	0	1	1	3	0	2	0	5	3	2	0	5	5	0	0	3	2
	1000	5	5	5	1	0	2	0	2	0	5	0	0	0	5	5	0	0	5	5	0	0	5	0

a) ly, light yellow

b) —, negative; ±, trace; +, slight

c) —, negative; ±, trace; +, 30 mg/dL; ++, 100 mg/dL

d) —, negative

e) ±, 0.1 E.U./dL; +, 1.0 E.U./dL

Table 5-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of PO16 in rats

Hematological findings in males at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	R B C ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	M C V (μm^3)	M C H (pg)	M C H C (%)	Reticulocyte (%)	Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	P T (sec)	A P T T (sec)
0	(5) 737 ± 37	(5) 15.0 ± 0.6	(5) 45.0 ± 1.4	(5) 61.2 ± 1.7	(5) 20.3 ± 0.6	(5) 33.2 ± 0.7	(5) 3.2 ± 0.7	(5) 99.5 ± 6.6	(5) 14.0 ± 2.2	(5) 18.8 ± 2.0
100	(5) 714 ± 22	(5) 14.4 ± 0.4	(5) 44.1 ± 1.0	(5) 61.9 ± 2.1	(5) 20.1 ± 0.9	(5) 32.6 ± 0.9	(5) 2.9 ± 0.5	(5) 97.9 ± 5.9	(5) 13.9 ± 1.7	(5) 18.0 ± 2.8
300	(5) 736 ± 37	(5) 15.0 ± 0.7	(5) 44.5 ± 2.2	(5) 60.6 ± 0.4	(5) 20.4 ± 0.3	(5) 33.7 ± 0.4	(5) 2.9 ± 0.8	(5) 101.3 ± 11.0	(5) 15.4 ± 2.3	(5) 19.4 ± 1.6
1000	(5) 731 ± 42	(5) 15.2 ± 0.5	(5) 45.1 ± 1.9	(5) 61.7 ± 2.0	(5) 20.7 ± 0.9	(5) 33.6 ± 0.4	(5) 2.5 ± 1.0	(5) 100.8 ± 6.1	(5) 13.5 ± 1.2	(5) 19.0 ± 1.2

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100/\text{mm}^3$)	Band neutrophil (%)	Segmented neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 117 ± 40	(5) 0 ± 0	(5) 8 ± 4	(5) 0 ± 0	(5) 0 ± 0	(5) 1 ± 1	(5) 90 ± 4
100	(5) 97 ± 24	(5) 0 ± 0	(5) 7 ± 4	(5) 0 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 2 ± 1	(5) 91 ± 2
300	(5) 88 ± 25	(5) 0 ± 0	(5) 5 ± 6	(5) 0 ± 0	(5) 0 ± 0	(5) 3 ± 2	(5) 93 ± 5
1000	(5) 83 ± 13	(5) 0 ± 0	(5) 9 ± 3	(5) 0 ± 1	(5) 0 ± 1	(5) 3 ± 1	(5) 87 ± 4

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

Table 5-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of P016 in rats

Hematological findings in females at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	R B C ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	M C V (μm^3)	M C H (pg)	M C H C (%)	Reticulocyte (%)	Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	P T (sec)	A P T T (sec)
0	(5) 706 ± 30	(5) 14.4 ± 0.6	(5) 41.6 ± 1.8	(5) 59.0 ± 1.1	(5) 20.4 ± 0.2	(5) 34.5 ± 0.6	(5) 1.7 ± 0.2	(5) 97.9 ± 3.0	(5) 11.3 ± 0.6	(5) 16.6 ± 0.8
100	(5) 691 ± 48	(5) 14.3 ± 0.8	(5) 41.2 ± 2.5	(5) 59.7 ± 1.7	(5) 20.7 ± 0.6	(5) 34.7 ± 0.3	(5) 1.0 ± 0.6	(5) 97.9 ± 11.0	(5) 11.0 ± 0.6	(5) 16.5 ± 1.8
300	(5) 691 ± 12	(5) 14.1 ± 0.1	(5) 41.2 ± 0.5	(5) 59.7 ± 1.3	(5) 20.4 ± 0.3	(5) 34.1 ± 0.4	(5) 1.4 ± 0.5	(5) 94.6 ± 9.7	(5) 11.5 ± 0.6	(5) 16.6 ± 1.9
1000	(5) 691 ± 32	(5) 14.1 ± 1.0	(5) 40.3 ± 2.6	(5) 58.3 ± 2.3	(5) 20.4 ± 0.9	(5) 35.0 ± 0.4	(5) 2.3 ± 0.5	(5) 93.7 ± 3.7	(5) 10.6 ± 0.5	(5) 16.9 ± 1.7

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100/\text{mm}^3$)	Band neutrophil (%)	Segmented neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 45 ± 13	(5) 0 ± 0	(5) 10 ± 2	(5) 0 ± 0	(5) 0 ± 1	(5) 2 ± 1	(5) 87 ± 2
100	(5) 45 ± 15	(5) 0 ± 0	(5) 9 ± 4	(5) 1 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 3 ± 1	(5) 87 ± 4
300	(5) 48 ± 9	(5) 0 ± 0	(5) 10 ± 5	(5) 0 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 3 ± 3	(5) 87 ± 7
1000	(5) 41 ± 11	(5) 0 ± 0	(5) 12 ± 5	(5) 0 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 3 ± 3	(5) 84 ± 7

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

Table 5-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of P016 in rats

Hematological findings in males at the end of recovery period

Dose (mg/kg)	R B C ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	M C V (μm^3)	M C H (pg)	M C H C (%)	Reticulocyte (%)	Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	P T (sec)	A P T T (sec)
0	(5) 824 ± 27	(5) 15.6 ± 0.5	(5) 46.5 ± 1.3	(5) 56.5 ± 2.2	(5) 18.9 ± 0.7	(5) 33.5 ± 0.8	(5) 2.7 ± 0.5	(5) 106.4 ± 13.2	(5) 16.4 ± 2.7	(5) 21.6 ± 1.8
1000	(5) 812 ± 14	(5) 15.3 ± 0.5	(5) 45.3 ± 1.3	(5) 55.8 ± 1.0	(5) 18.8 ± 0.4	(5) 33.8 ± 0.3	(5) 2.5 ± 0.8	(5) 99.2 ± 4.1	(5) 15.3 ± 1.3	(5) 21.1 ± 1.8

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100/\text{mm}^3$)	Band neutrophil (%)	Segmented neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 97 ± 28	(5) 0 ± 0	(5) 8 ± 5	(5) 0 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 4 ± 3	(5) 87 ± 6
1000	(5) 97 ± 18	(5) 0 ± 0	(5) 8 ± 5	(5) 0 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 2 ± 2	(5) 89 ± 6

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

Table 5-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of PO16 in rats

Hematological findings in females at the end of recovery period

Dose (mg/kg)	R B C ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	M C V (μm^3)	M C H (pg)	M C H C (%)	Reticulocyte (%)	Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	P T (sec)	A P T T (sec)
0	(5) 739 ± 11	(5) 14.7 ± 0.6	(5) 43.2 ± 1.9	(5) 58.5 ± 2.3	(5) 19.9 ± 0.8	(5) 34.0 ± 0.6	(5) 1.7 ± 0.8	(5) 99.6 ± 2.4	(5) 12.0 ± 0.6	(5) 16.7 ± 0.3
1000	(5) 705** ± 19	(5) 14.2 ± 0.4	(5) 41.7 ± 1.1	(5) 59.1 ± 0.9	(5) 20.2 ± 0.1	(5) 34.1 ± 0.5	(5) 2.3 ± 0.4	(5) 96.5 ± 10.2	(5) 11.9 ± 0.5	(5) 16.9 ± 1.2

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100/\text{mm}^3$)	Band neutrophil (%)	Segmented neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 45 ± 18	(5) 0 ± 0	(5) 7 ± 3	(5) 1 ± 2	(5) 1 ± 1	(5) 3 ± 5	(5) 87 ± 9
1000	(5) 45 ± 16	(5) 0 ± 0	(5) 12 ± 7	(5) 1 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 2 ± 2	(5) 84 ± 9

Parameter, mean $\pm$ 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 P016 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)	Inorg. Phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)
0	(5) 5.5 ±0.1	(5) 3.3 ±0.1	(5) 1.57 ±0.12	(5) 174 ±15	(5) 42 ±5	(5) 59 ±30	(5) 11 ±2	(5) 0.7 ±0.1	(5) 7.8 ±0.3	(5) 9.4 ±0.2
100	(5) 5.7 ±0.2	(5) 3.3 ±0.2	(5) 1.42 ±0.10	(5) 197 ±29	(5) 43 ±7	(5) 59 ±30	(5) 11 ±2	(5) 0.7 ±0.1	(5) 8.0 ±0.8	(5) 9.3 ±0.4
300	(5) 5.6 ±0.3	(5) 3.1 ±0.2	(5) 1.31** ±0.16	(5) 175 ±21	(5) 45 ±13	(5) 64 ±27	(5) 10 ±1	(5) 0.7 ±0.1	(5) 7.7 ±0.8	(5) 9.2 ±0.3
1000	(5) 5.4 ±0.3	(5) 3.3 ±0.2	(5) 1.49 ±0.05	(5) 151 ±10	(5) 44 ±5	(5) 49 ±5	(5) 11 ±2	(5) 0.7 ±0.1	(5) 7.8 ±0.4	(5) 8.9 ±0.2

Dose (mg/kg)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ-GTP (U/L)
0	(5) 144.3 ±0.6	(5) 3.98 ±0.30	(5) 103.9 ±1.1	(5) 399 ±77	(5) 32 ±4	(5) 65 ±4	(5) 0 ±0
100	(5) 143.6 ±0.9	(5) 4.31 ±0.38	(5) 103.9 ±1.2	(5) 384 ±116	(5) 30 ±4	(5) 62 ±7	(5) 0 ±0
300	(5) 144.2 ±1.0	(5) 4.03 ±0.19	(5) 104.7 ±1.9	(5) 396 ±73	(5) 31 ±5	(5) 61 ±6	(5) 0 ±0
1000	(5) 144.6 ±0.4	(5) 3.76 ±0.21	(5) 104.8 ±1.4	(5) 401 ±68	(5) 35 ±11	(5) 63 ±5	(5) 0 ±0

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

**, significantly different from control. P<0.01

Table 6-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of P016 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)	Inorg. phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)
0	(5) 5.2 ±0.3	(5) 3.2 ±0.2	(5) 1.64 ±0.13	(5) 141 ±17	(5) 44 ±6	(5) 26 ±4	(5) 14 ±2	(5) 0.6 ±0.1	(5) 5.9 ±0.6	(5) 8.9 ±0.2
100	(5) 5.2 ±0.1	(5) 3.2 ±0.3	(5) 1.59 ±0.30	(5) 127 ±20	(5) 43 ±7	(5) 26 ±3	(5) 11 ±2	(5) 0.6 ±0.1	(5) 7.0 ±1.0	(5) 9.3 ±0.4
300	(5) 5.2 ±0.3	(5) 3.2 ±0.2	(5) 1.61 ±0.13	(5) 128 ±19	(5) 38 ±5	(5) 27 ±6	(5) 16 ±4	(5) 0.6 ±0.0	(5) 6.5 ±1.1	(5) 9.0 ±0.3
1000	(5) 5.3 ±0.3	(5) 3.2 ±0.2	(5) 1.58 ±0.08	(5) 137 ±19	(5) 51 ±11	(5) 33 ±13	(5) 12 ±3	(5) 0.6 ±0.1	(5) 6.5 ±0.4	(5) 9.3 ±0.4

Dose (mg/kg)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ-GTP (U/L)
0	(5) 143.6 ±0.7	(5) 3.98 ±0.18	(5) 108.1 ±1.5	(5) 240 ±67	(5) 25 ±4	(5) 58 ±7	(5) 0 ±0
100	(5) 144.8 ±0.8	(5) 3.98 ±0.37	(5) 109.0 ±1.2	(5) 191 ±43	(5) 20 ±2	(5) 56 ±7	(5) 0 ±0
300	(5) 143.9 ±1.0	(5) 3.96 ±0.14	(5) 108.3 ±0.7	(5) 249 ±81	(5) 24 ±3	(5) 62 ±6	(5) 1 ±1
1000	(5) 144.0 ±1.1	(5) 3.48* ±0.37	(5) 108.2 ±0.9	(5) 229 ±50	(5) 20 ±2	(5) 53 ±3	(5) 0 ±0

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

*, significantly different from control. p<0.05

Table 6-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of P016 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)	Inorg. phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)
0	(5) 5.7 ±0.3	(5) 3.3 ±0.2	(5) 1.40 ±0.14	(5) 167 ±18	(5) 52 ±10	(5) 60 ±22	(5) 17 ±1	(5) 0.6 ±0.1	(5) 7.0 ±0.6	(5) 9.1 ±0.3
1000	(5) 5.7 ±0.3	(5) 3.2 ±0.1	(5) 1.31 ±0.03	(5) 166 ±16	(5) 43 ±4	(5) 44 ±11	(5) 18 ±1	(5) 0.7 ±0.1	(5) 7.1 ±0.4	(5) 9.0 ±0.2

Dose (mg/kg)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ-GTP (U/L)
0	(5) 143.7 ±0.8	(5) 3.96 ±0.28	(5) 104.7 ±1.4	(5) 281 ±17	(5) 28 ±2	(5) 64 ±6	(5) 0 ±0
1000	(5) 143.9 ±0.6	(5) 4.22 ±0.16	(5) 105.0 ±0.8	(5) 271 ±56	(5) 33 ±5	(5) 63 ±7	(5) 0 ±0

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 P016 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)	Inorg. Phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)
0	(5) 5.7 ±0.4	(5) 3.5 ±0.3	(5) 1.57 ±0.20	(5) 133 ±13	(5) 47 ±5	(5) 30 ±6	(5) 21 ±2	(5) 0.7 ±0.0	(5) 5.7 ±0.6	(5) 9.2 ±0.2
1000	(5) 6.0 ±0.4	(5) 3.7 ±0.3	(5) 1.62 ±0.15	(5) 142 ±7	(5) 58* ±6	(5) 36 ±9	(5) 22 ±1	(5) 0.7 ±0.1	(5) 5.6 ±0.7	(5) 9.2 ±0.2

Dose (mg/kg)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ-GTP (U/L)
0	(5) 143.3 ±0.4	(5) 4.34 ±0.42	(5) 107.0 ±1.4	(5) 152 ±33	(5) 27 ±7	(5) 64 ±14	(5) 0 ±0
1000	(5) 143.1 ±0.8	(5) 4.00 ±0.29	(5) 107.2 ±0.9	(5) 160 ±38	(5) 23 ±2	(5) 57 ±1	(5) 0 ±1

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 PO16 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) 377.8 ±47.2	(5) 1898.7 ±107.4	(5) 587.0 ±150.3	(5) 1220.6 ±54.6	(5) 13048.4 ±2226.0	(5) 2687.2 ±99.3	(5) 705.1 ±164.3	(5) 50.4 ±10.7	(5) 2976.6 ±286.4	(5) 747.4 ±48.5
100	(5) 352.7 ±20.6	(5) 1802.4 ±79.6	(5) 590.5 ±91.6	(5) 1154.8 ±105.2	(5) 12634.0 ±1109.6	(5) 2525.7 ±183.1	(5) 569.2 ±135.0	(5) 52.2 ±5.0	(5) 3104.5 ±356.9	(5) 737.2 ±75.5
300	(5) 367.8 ±47.9	(5) 1889.0 ±58.3	(5) 518.2 ±115.4	(5) 1171.4 ±146.2	(5) 12685.0 ±1378.2	(5) 2745.4 ±301.3	(5) 703.9 ±155.8	(5) 57.4 ±6.7	(5) 2910.6 ±218.5	(5) 774.4 ±44.5
1000	(5) 355.3 ±14.0	(5) 1930.6 ±78.1	(5) 520.1 ±96.0	(5) 1167.6 ±82.0	(5) 11884.2 ±914.0	(5) 2686.4 ±140.1	(5) 632.6 ±96.7	(5) 54.3 ±5.2	(5) 3105.3 ±281.9	(5) 775.4 ±60.3

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 P016 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) 225.0 ±12.9	(5) 1782.7 ±81.9	(5) 404.1 ±46.2	(5) 736.2 ±58.0	(5) 6951.6 ±466.5	(5) 1673.6 ±126.7	(5) 528.8 ±55.2	(5) 61.1 ±4.3	(5) 79.3 ±12.3
100	(5) 214.6 ±38.1	(5) 1739.4 ±95.5	(5) 386.5 ±51.6	(5) 695.7 ±107.0	(5) 6838.7 ±1865.0	(5) 1609.8 ±267.8	(5) 509.5 ±113.5	(5) 67.8 ±17.4	(5) 101.9 ±31.8
300	(5) 214.5 ±14.9	(5) 1749.7 ±79.9	(5) 382.3 ±59.9	(5) 700.7 ±65.1	(5) 6304.4 ±613.4	(5) 1581.8 ±196.4	(5) 427.9 ±63.7	(5) 59.6 ±6.4	(5) 87.2 ±14.2
1000	(5) 226.3 ±20.8	(5) 1781.8 ±70.5	(5) 476.9 ±169.9	(5) 754.0 ±47.9	(5) 7235.3 ±967.1	(5) 1652.8 ±262.8	(5) 475.9 ±68.0	(5) 65.0 ±10.5	(5) 73.1 ±7.1

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 P016 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) 412.8 ±58.0	(5) 1943.2 ±80.7	(5) 485.8 ±111.1	(5) 1296.0 ±228.5	(5) 12969.3 ±2784.1	(5) 2893.5 ±367.0	(5) 746.7 ±163.1	(5) 57.4 ±11.1	(5) 2983.9 ±100.3	(5) 1014.2 ±59.3
1000	(5) 390.3 ±33.3	(5) 1945.3 ±131.0	(5) 431.2 ±37.4	(5) 1201.7 ±124.3	(5) 11739.7 ±1637.7	(5) 2796.6 ±266.9	(5) 640.0 ±39.2	(5) 54.5 ±9.6	(5) 2979.9 ±164.6	(5) 980.6 ±66.1

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 P016 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) 252.2 ±31.7	(5) 1906.1 ±63.0	(5) 389.6 ±159.1	(5) 828.2 ±142.0	(5) 7373.5 ±719.4	(5) 1877.0 ±201.8	(5) 571.6 ±143.8	(5) 61.7 ±5.3	(5) 86.8 ±17.3
1000	(5) 256.5 ±24.1	(5) 1852.6 ±46.2	(5) 441.7 ±79.8	(5) 851.0 ±86.2	(5) 7284.2 ±1188.9	(5) 1796.7 ±252.5	(5) 469.2 ±59.0	(5) 71.6 ±10.1	(5) 83.9 ±9.2

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

Table 8-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of P016 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) 377.8 ±47.2	(5) 5.078 ±0.611	(5) 1.543 ±0.285	(5) 3.259 ±0.307	(5) 34.432 ±2.452	(5) 7.176 ±0.655	(5) 1.850 ±0.229	(5) 0.134 ±0.023	(5) 7.999 ±1.449	(5) 2.001 ±0.260
100	(5) 352.7 ±20.6	(5) 5.118 ±0.246	(5) 1.677 ±0.258	(5) 3.278 ±0.283	(5) 35.815 ±2.385	(5) 7.159 ±0.257	(5) 1.600 ±0.295	(5) 0.148 ±0.017	(5) 8.822 ±1.102	(5) 2.090 ±0.166
300	(5) 367.8 ±47.9	(5) 5.195 ±0.582	(5) 1.407 ±0.239	(5) 3.191 ±0.198	(5) 34.570 ±0.814	(5) 7.492 ±0.511	(5) 1.901 ±0.232	(5) 0.157 ±0.015	(5) 8.024 ±1.209	(5) 2.135 ±0.300
1000	(5) 355.3 ±14.0	(5) 5.444 ±0.368	(5) 1.464 ±0.262	(5) 3.285 ±0.151	(5) 33.421 ±1.644	(5) 7.562 ±0.268	(5) 1.778 ±0.233	(5) 0.153 ±0.014	(5) 8.744 ±0.773	(5) 2.186 ±0.199

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

Table 8-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of P016 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) 225.0 ±12.9	(5) 7.936 ±0.420	(5) 1.791 ±0.125	(5) 3.279 ±0.293	(5) 30.940 ±2.118	(5) 7.440 ±0.413	(5) 2.352 ±0.226	(5) 0.272 ±0.016	(5) 0.352 ±0.049
100	(5) 214.6 ±38.1	(5) 8.284 ±1.323	(5) 1.825 ±0.245	(5) 3.255 ±0.173	(5) 31.480 ±2.968	(5) 7.528 ±0.445	(5) 2.365 ±0.181	(5) 0.314 ±0.033	(5) 0.467** ±0.063
300	(5) 214.5 ±14.9	(5) 8.192 ±0.741	(5) 1.780 ±0.245	(5) 3.266 ±0.198	(5) 29.345 ±0.894	(5) 7.369 ±0.691	(5) 1.999 ±0.306	(5) 0.278 ±0.034	(5) 0.406 ±0.056
1000	(5) 226.3 ±20.8	(5) 7.933 ±0.852	(5) 2.089 ±0.653	(5) 3.346 ±0.258	(5) 31.947 ±2.642	(5) 7.284 ±0.657	(5) 2.112 ±0.314	(5) 0.290 ±0.058	(5) 0.325 ±0.039

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

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

Table 8-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of P016 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) 412.8 ±58.0	(5) 4.781 ±0.671	(5) 1.177 ±0.210	(5) 3.128 ±0.195	(5) 31.200 ±2.753	(5) 7.032 ±0.516	(5) 1.796 ±0.215	(5) 0.139 ±0.012	(5) 7.321 ±0.847	(5) 2.498 ±0.392
1000	(5) 390.3 ±33.3	(5) 5.013 ±0.531	(5) 1.111 ±0.130	(5) 3.082 ±0.241	(5) 29.971 ±2.004	(5) 7.164 ±0.253	(5) 1.644 ±0.088	(5) 0.141 ±0.032	(5) 7.701 ±1.020	(5) 2.533 ±0.336

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

Table 8-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of P016 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) 252.2 ±31.7	(5) 7.629 ±0.728	(5) 1.503 ±0.463	(5) 3.272 ±0.220	(5) 29.340 ±1.569	(5) 7.456 ±0.184	(5) 2.260 ±0.488	(5) 0.247 ±0.032	(5) 0.342 ±0.030
1000	(5) 256.5 ±24.1	(5) 7.278 ±0.788	(5) 1.717 ±0.227	(5) 3.322 ±0.217	(5) 28.344 ±3.038	(5) 6.998 ±0.597	(5) 1.825 ±0.092	(5) 0.279 ±0.033	(5) 0.328 ±0.038

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

Table 9

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of PO16 in rats

Macroscopical findings in females at the end of dosing period

Dose Grade	0 mg/kg		100 mg/kg		300 mg/kg		1000 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Skin)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Alopecia								
	4	1	5	0	5	0	5	0
(Spleen)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Accessory spleen								
	5	0	5	0	4	1	5	0

-, negative; +, positive.

[], number of animals examined.

Table 10-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of PO16 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	0	3	2	0	0	5	0	4	1	0	0	5
(Kidney)	[5]						[5]					
Basophilic tubule	1	4	0	0	0	4	2	3	0	0	0	3
Cellular infiltration, lymphocyte	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5
Mineralization, medulla	4	1	0	0	0	1	4	1	0	0	0	1
Eosinophilic body, proximal tubule	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0
Cyst	5	0	0	0	0	0	4	0	1	0	0	1
(Spleen)	[5]						[5]					
Hematopoiesis, extramedullary	0	2	3	0	0	5	0	1	4	0	0	5
Deposit, pigment, brown	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5
(Heart)	[5]						[5]					
Myocardial degeneration / fibrosis	4	1	0	0	0	1	4	1	0	0	0	1
(Adrenal gland)	[5]						[5]					
No abnormalities												
(Testis)	[5]						[5]					
No abnormalities												
(Epididymis)	[5]						[5]					
No abnormalities												

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

[], number of animals examined.

Table 10-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of PO16 in rats

Histological findings in females at the end of dosing period

Dose Grade	0 mg/kg						300 mg/kg						1000 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Liver)	[5]												[5]					
Fatty change, periportal	0	3	2	0	0	5							0	3	2	0	0	5
(Kidney)	[5]												[5]					
Cellular infiltration, lymphocyte	0	5	0	0	0	5							0	5	0	0	0	5
Basophilic tubule	0	5	0	0	0	5							1	4	0	0	0	4
Fibrosis, focal	5	0	0	0	0	0							4	1	0	0	0	1
(Spleen)	[5]						[1]						[5]					
Hematopoiesis, extramedullary	0	5	0	0	0	5	0	1	0	0	0	1	0	5	0	0	0	5
Deposit, pigment, brown	0	5	0	0	0	5	0	1	0	0	0	1	0	5	0	0	0	5
Accessory spleen	5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	5	0	0	0	0	0
(Heart)	[5]												[5]					
No abnormalities																		
(Adrenal gland)	[5]												[5]					
No abnormalities																		
(Ovary)	[5]												[5]					
No abnormalities																		
(Skin)	[1]																	
Crust	0	0	1	0	0	1												

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

[], number of animals examined.