

ニクロム酸ナトリウム・二水和物のラットにおける  
単回投与毒性試験

－ 最終報告書 －

2002年6月13日

試験委託者：厚生労働省医薬局

東京都千代田区霞ヶ関1丁目2番2号 (〒100-8916)

試験施設：株式会社パナファーム・ラボラトリーズ 安全性研究所

熊本県宇土市栗崎町1285番地 (〒869-0425)

## 目次

頁

要約	.....	1
試験目的	.....	2
試験材料および方法	.....	2
試験成績	.....	5
考察	.....	7
Fig. 1	Body weight changes .....	9
Table 1	Mortality and lethal dose .....	10
Table 2	Clinical signs - Male .....	11
Table 3	Clinical signs - Female .....	12
Table 4	Body weights - Male .....	14
Table 5	Body weights - Female .....	15
Table 6	Necropsy findings - Male .....	16
Table 7	Necropsy findings - Female .....	18
Table 8	Histopathological findings - Male .....	20
Table 9	Histopathological findings - Female .....	22

## 要 約

1 群雌雄各 5 匹の Crj:CD(SD)IGS のラットに、ニクロム酸ナトリウム・二水和物を 0 (対照), 100, 130, 180, 240 および 330mg/kg の用量で 1 回経口投与し, その急性期の毒性徴候および概略の致死量について検討し, 以下の結果を得た.

1. 雄では 240 mg/kg 群で 3/5 例, 330 mg/kg 群で 4/5 例が投与後 1 日に死亡した. 雌では 130 および 180 mg/kg 群で各 1/5 例, 240 および 330 mg/kg 群で各 5/5 例が投与後 6 時間から投与後 2 日に死亡した. その結果, LD<sub>50</sub> 値 (95%信頼限界) は雄が 252.4 mg/kg (193.3~339.2 mg/kg), 雌が 181.0 mg/kg (146.1~235.2 mg/kg) であった.
2. 一般状態の観察では, 生存例で投与日に自発運動の低下, 緩徐呼吸, 軟便, 肛門周囲の汚れおよび腹部膨満が認められ, もっとも遅いもので投与後 4 日まで観察された. 死亡例では, 前述の症状に加えて流涙, チアノーゼおよび腹臥位が認められた.
3. 体重では, 対照群と比較し, 全ての被験物質投与群で投与後 1 日に増加抑制が認められた. 100, 130 および 180 mg/kg 群では, 投与後 3 日以降は順調な増加を示した. 240 および 330 mg/kg 群の雄各 1 例では投与後 3 日に体重減少がみられたが, 投与後 5 日以降は順調な増加推移を示した.
4. 剖検および病理学的検査において, 死亡例では, 130 および 180 mg/kg 群の雌, 並びに 240 および 330 mg/kg 群の雌雄で肉眼的に腺胃粘膜の暗赤色化, 組織学的に潰瘍がみられ, 本被験物質の胃粘膜への刺激性が認められた. また, 130 mg/kg 群の雌, 240 mg/kg 群の雌雄および 330 mg/kg 群の雌で肉眼的に肺の暗赤色化, 組織学的に水腫またはうっ血が認められ, さらに肉眼的に気管内の泡沫状液体の貯留および肺の収縮不全を伴っていたことから, 主な死亡原因は肺水腫に因る呼吸不全と考えられた. その他の変化として, 240 mg/kg 群の雌雄および 330 mg/kg 群の雄で肉眼的に胸腺の暗赤色点, 組織学的に出血が認められた. この変化は死亡例においてしばしばみられる非特異的な変化であることから, 死戦期による変化と考えられた. 一方, 生存例では 330 mg/kg 群の雄で肉眼的に胃の境界縁の肥厚, 組織学的に前胃及び腺胃の潰瘍並びに境界縁の扁平上皮細胞の過形成がみられ, 死亡例と同様に本被験物質の刺激性が認められた. 雌ではいずれの器官でも肉眼的変化は認められなかった.

## 試験目的

ニクロム酸ナトリウム・二水和物の安全性に関する毒性試験の一環として、Crj:CD(SD)IGS の雌雄ラットに 1 回経口投与し、その急性期の毒性徴候および概略の致死量について検討したので報告する。

## 試験材料および方法

### 1. 被験物質および媒体

より提供されたニクロム酸ナトリウム・二水和物〔純度 100.07 wt%，ロット番号 〕を被験物質として使用した (添付資料 1)。本被験物質は、橙黄色の結晶性粉末であり、試験期間中の被験物質の安定性については提供者にて分析し、安定であることを確認した (添付資料 2)。媒体には日本薬局方 注射用水 (ロット番号：1F77N，株式会社 大塚製薬工場株式会社) を使用した。なお、被験物質および媒体は被験物質室の保管庫に室温で保存した。

### 2. 使用動物および飼育条件

5 週齢の Crj:CD(SD)IGS ラット (日本チャールス・リバー株式会社，厚木飼育センター) を雌雄各 33 匹購入し，6 日間の検疫馴化を行った。この間に，全例について一般状態の観察および体重測定を実施し，異常がないことを確認したのち，雌雄各 30 匹を選んで 6 週齢で試験に使用した。投与日の体重は，雄が 161.3~187.9 g，雌が 119.9~137.8 g であった。動物は，温度  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$  (許容範囲  $21\sim 27^{\circ}\text{C}$ )，湿度  $55\pm 10\%$  (許容範囲  $35\sim 75\%$ )，照明 12 時間 (午前 7 時~午後 7 時) および換気回数 13~15 回/時に設定したバリアーシステム A 区域内の飼育室 10 番で床敷 (ホワイトフレーク，日本チャールス・リバー株式会社) を入れたポリカーボネイト製ケージ (W265×H185×D425 mm) に，1 ケージ当たり 2~3 匹ずつ収容して飼育した。なお，温度の実測値は最高  $25^{\circ}\text{C}$ ，最低  $22^{\circ}\text{C}$ ，湿度の実測値は最高 56%，最低 53% であった。飼料は高圧蒸気滅菌処理した固型飼料 (CRF-1，オリエンタル酵母工業株式会社) を，飲水は次亜塩素酸ナトリウムを添加 (約 2 ppm) した井戸水を給水瓶によりそれぞれ自由に摂取させた。飼料については財団法人日本食品分析センターにて，また，飲水については株式会社鶴城 南九科研センターにて分析を行い，いずれも許容基準に適合していることを確認した。床敷および飼育

器材は高圧蒸気滅菌したものを使用し、ケージおよび給水瓶は週2回の頻度で、ケージ蓋およびケージ架台(ラック)は群分け時に1回交換した。また、飼育室は毎日清掃し、消毒薬を浸したモップで清拭した。

### 3. 試験群構成、投与量設定の根拠および群分け

試験群構成を下表に示した。

試験群	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性別	動物数	動物番号
対照群	0	0	10	♂	5	1~5
				♀	5	51~55
100 mg/kg 群	100	10	10	♂	5	6~10
				♀	5	56~60
130 mg/kg 群	130	13	10	♂	5	11~15
				♀	5	61~65
180 mg/kg 群	180	18	10	♂	5	16~20
				♀	5	66~70
240 mg/kg 群	240	24	10	♂	5	21~25
				♀	5	71~75
330 mg/kg 群	330	33	10	♂	5	26~30
				♀	5	76~80

投与量は、ラットを用いた単回投与予備試験 [試験番号 10125 (GLP 非適用), 投与量: 20, 40, 70, 100, 200 および 300 mg/kg, 動物数: 雌雄各 3 匹/群] の結果から設定した。すなわち、当該試験では 300 mg/kg 群の雌雄で自発運動の低下、緩徐呼吸などがみられ、雌雄ともに全例が死亡した。また、200 mg/kg 群の雌雄では自発運動の低下、緩徐呼吸などがみられ、雌雄各 1 例が死亡した。100 mg/kg 以下の群には一般状態および体重ともに異常はみられなかった。したがって、本試験では明らかな毒性が発現すると予想される 330 mg/kg を高用量とし、以下公比約 1.35 で除した 240, 180, 130 および 100 mg/kg を設定した。

試験群は、上記 5 用量に媒体を投与する対照群を加えて計 6 群とし、1 群当たりの動物数は各群とも雌雄各 5 匹とした。

群分けは、投与前日に当日の体重を基に層別連続無作為化法で行い、群分け後の動物には黒い色の油性フェルトペンによる尾の番号付けおよび耳パンチにより個体識別した。また、各ケージには試験番号、動物番号、投与量および性別を表示したラベルを付けて識別した。

また、群分け後の残余動物は、試験から除外した。なお、投与日の投与前に試験に使用する動物の体重変動が平均体重 $\pm 20\%$ 以内であることを確認した。

#### 4. 投与経路および投与方法

投与経路は、OECD 毒性試験ガイドラインで指定されていること、また、予想されるヒトへの曝露経路の一つであることから経口とし、約 18 時間絶食させた動物に胃管を用いて 1 回強制投与した。投与容量は 10 mL/kg とし、各動物の投与液量は投与日の体重を基に算出した。対照群には同容量の媒体を投与した。

#### 5. 被験物質と媒体との混合物調製法

被験物質を各濃度ごとに必要量秤量して注射用水に溶解し、10, 13, 18, 24 および 33 mg/mL 溶液を調製した。調製は投与 6 日前に行い、調製した混合物は低温室または飼育区域内の検体保管室に設置した冷蔵庫に冷蔵、遮光下で保存した。なお、本調製法による 0.02 および 200 mg/mL 液は冷蔵、暗所下で 8 日間安定である (添付資料 3)。また、調製した全ての調製物の濃度を分析し、規定値の $\pm 10\%$ 以内であることを確認した (添付資料 4)。

#### 6. 観察および検査

##### 1) 一般状態観察

観察期間は投与後 14 日間とし、投与日 (投与 0 日) は投与後 8 時間まで経時的に、投与後 1 日から 13 日は午前および午後の 1 日 2 回、投与後 14 日は午前中に 1 回、一般状態の観察および生死の確認を行った。

##### 2) 体重測定

投与日の投与前 (投与 0 日)、並びに投与後 1, 3, 5, 7, 10 および 14 日に測定した。

##### 3) 病理学的検査

投与日および観察期間中に死亡した動物は発見後速やかに、また、観察期間終了後の生存動物はエーテル麻酔下に放血致死させたのち剖検した。肉眼的に異常が認められた肺、気管、胃および胸腺は摘出し、10%中性緩衝ホルマリン溶液に固定した。さらに、肺、胃および胸腺については被験物質に起因した変化と判断し、代表例を常法に従ってパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施して光学顕微鏡下で観察した。

## 7. 統計学的処理方法

投与後 14 日間の累積死亡動物数から、LD<sub>50</sub> 値を Probit 法により算出した。体重は、各群ごとに平均値と標準偏差を求めた。なお、有意差検定は行わなかった。

# 試 験 成 績

## 1. 死亡の発生状況および LD<sub>50</sub> 値

死亡の発生状況を Table 1 に示した。

雄では 240 mg/kg 群で 3/5 例、330 mg/kg 群で 4/5 例が投与後 1 日に死亡した。雌では 130 および 180 mg/kg 群で各 1/5 例、240 および 330 mg/kg 群で各 5/5 例が投与後 6 時間から投与後 2 日に死亡した。その結果、LD<sub>50</sub> 値 (95%信頼限界) は雄が 252.4 mg/kg (193.3~339.2 mg/kg)、雌が 181.0 mg/kg (146.1~235.2 mg/kg) であった。

## 2. 一般状態

一般状態の観察結果を Table 2, 3 および Appendix 1, 2 に示した。

### (1) 死亡例

雄において、240 mg/kg 群では投与後 30 分より自発運動の低下、緩徐呼吸、軟便および腹部膨満がみられ、330 mg/kg 群では前述の症状に加えて肛門周囲の汚れ、チアノーゼおよび腹臥位が認められ、いずれも投与後 1 日に死亡した。

雌において、130 mg/kg 群では投与後 6 時間より自発運動の低下が認められ、投与後 1 日に死亡した。180 mg/kg では投与後 30 分より自発運動の低下、緩徐呼吸、軟便、肛門周囲の汚れ、流涙およびチアノーゼが認められ、投与後 8 時間に死亡した。240 mg/kg 群では投与後 30 分より自発運動の低下、緩徐呼吸、軟便および肛門周囲の汚れが認められ、投与後 8 時間に 1 例、投与後 1 日に 3 例、並びに投与後 2 日に 1 例が死亡した。330 mg/kg 群では投与後 15 分より 240 mg/kg 群と同様の症状に加えて腹部膨満がみられ、投与後 6 時間に 1 例、投与後 1 日に 4 例が死亡した。

### (2) 生存例

雄において、100 mg/kg 群の 1 例および 130 mg/kg 群の 2 例で投与後 45 分より 60 分まで軟便が認められた。180 mg/kg 群では全例で何ら異常は認められなかった。240 mg/kg 群の 1 例では投与後 30 分より投与後 8 時間まで自発運動の低下がみられ、投与後 6 時間に

は緩徐呼吸も認められた。投与後1日には自発運動の低下および腹部膨満が認められ、自発運動の低下は投与後3日まで観察された。240 mg/kg 群の他の1例では投与日および観察期間を通して何ら異常は認められなかった。330 mg/kg 群では、投与後30分より投与後8時間まで自発運動の低下および緩徐呼吸がみられ、投与後30分に軟便、投与後45分より投与後2時間まで肛門周囲の汚れが認められた。投与後1日には自発運動の低下および腹部膨満が認められ、自発運動の低下は投与後4日まで観察された。

雌において、100 mg/kg 群では1例で投与後30分に軟便が認められた。130 mg/kg 群では1例で投与後30分に軟便、投与後45分に肛門周囲の汚れがみられ、投与後1日には自発運動の低下が認められたが、投与後2日以降は何ら異常は認められなかった。180 mg/kg 群の1例では投与後1日に自発運動の低下が認められたが、投与後2日以降は何ら異常は認められなかった。また、他の2例では投与後30分または45分に軟便が認められ、このうち1例では肛門周囲の汚れも認められた。

### 3. 体重

体重の推移を Fig. 1, Table 4, 5 および Appendix 3, 4 に示した。

対照群と比較して、全ての被験物質投与群で投与後1日に増加抑制が認められた。100, 130 および 180 mg/kg 群では投与後3日以降は順調な増加を示した。240 および 330 mg/kg 群の雄各1例では投与後3日に体重減少がみられたが、投与後5日以降は順調な増加推移を示した。

### 4. 剖検

剖検の結果を Table 6, 7 および Appendix 5, 6 に示した。

#### (1) 死亡例

雌雄全例で腺胃粘膜面の暗赤色化、330 mg/kg 群の雄 4/4 例および雌 3/5 例、240 mg/kg 群の雄 1/3 例および雌 3/5 例に胃の水様液による膨満が認められた。また、330 mg/kg 群の雌 1/5 例、240 mg/kg 群の雄 1/3 例および雌 2/5 例、130 mg/kg 群の雌 1/1 例で肺の暗赤色化が認められた。さらに、330 mg/kg 群の雄 4/4 例および雌 2/5 例、240 mg/kg 群の雄 1/3 例および雌 2/5 例、180 mg/kg 群の雌 1/1、130 mg/kg 群の雌 1/1 例で気管内の泡沫状液体の貯留がみられ、これらのうち 330 mg/kg 群の雄 3/4 例および雌 2/5 例、240 mg/kg 群の雌 2/5 例、180 mg/kg 群の雌 1/1 例に肺の収縮不全が認められた。その他、330 mg/kg 群の雄 2/4 例、240 mg/kg 群の雄 3/3 例および雌 1/5 例に胸腺の暗赤色点が認められた。



## (2) 生存例

330 mg/kg の雄 1/1 例及び 240 mg/kg 群の雄 1/2 例に胃の境界線の肥厚が認められた。雌では、いずれの動物においても変化は認められなかった。

## 5. 病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を Table 8, 9 および Appendix 7, 8 に示した。

## (1) 死亡例

肉眼的に腺胃粘膜面の暗赤色化がみられた 130 および 180 mg/kg 群の雌、並びに 240 および 330 mg/kg 群の雌雄で腺胃に軽度の潰瘍が認められた。また、肉眼的に肺の暗赤色化がみられた 130 mg/kg 群の雌で肺に軽度の水腫がみられ、240 mg/kg 群の雌雄および 330 mg/kg 群の雌で肺に軽度のうっ血が認められた。その他、肉眼的に胸腺に暗赤色点がみられた 240 mg/kg 群の雌雄および 330 mg/kg 群の雄で胸腺に軽度の出血が認められた。

## (2) 生存例

肉眼的に胃の境界線の肥厚がみられた 330 mg/kg 群の雄で胃に重度の前胃及び腺胃の潰瘍、軽度の境界線の扁平上皮細胞の過形成がみられ、240 mg/kg 群の雄で胃に中等度の腺胃の潰瘍、軽度の境界線の扁平上皮細胞の過形成が認められた。

## 考 察

ニクロム酸ナトリウム・二水和物の安全性に関する毒性試験の一環として、Crj:CD(SD)IGS の雌雄ラットに 1 回経口投与し、その急性期の毒性徴候および概略の致死量について検討した。投与量は 0 (対照), 100, 130, 240 および 330 mg/kg とした。

雄では 240 mg/kg 群で 3/5 例, 330 mg/kg 群で 4/5 例が投与後 1 日に死亡した。雌では 130 および 180 mg/kg 群で各 1/5 例, 240 および 330 mg/kg 群で各 5/5 例全例が投与後 6 時間から投与後 2 日に死亡した。したがって、本試験条件下での LD<sub>50</sub> 値 (95%信頼限界) は、雄が 252.4 mg/kg (193.3~339.2 mg/kg), 雌が 181.0 mg/kg (146.1~235.2 mg/kg) と推定された。

死亡例では、一般状態の観察において、雌雄で自発運動の低下、緩徐呼吸、軟便、肛門周囲の汚れ、流涙、チアノーゼ、腹部膨満および腹臥位が認められた。病理学的検査では、130 および 180 mg/kg 群の雌、並びに 240 および 330 mg/kg 群の雌雄の胃で肉眼的に腺胃粘膜の暗赤色化、組織学的に潰瘍がみられ、本被験物質の胃粘膜への刺激性が認められた。また、130 mg/kg 群の雌、

240 mg/kg 群の雌雄および 330 mg/kg 群の雌の肺で肉眼的に暗赤色化，組織学的に水腫またはうっ血が認められ，さらに肉眼的に気管内の泡沫状液体の貯留および肺の収縮不全を伴っていたことから，主な死亡原因は肺水腫に因る呼吸不全と考えられた．その他の変化として，240 mg/kg 群の雌雄および 330 mg/kg 群の雄の胸腺で肉眼的に暗赤色点，組織学的に出血が認められた．この変化は死亡例においてしばしばみられる非特異的な変化であることから，死戦期による変化と考えられた．

生存例では，一般状態の観察において，投与日に雌雄で自発運動の低下，緩徐呼吸，軟便，肛門周囲の汚れおよび腹部膨満が認められ，もっとも遅いもので投与後 4 日まで観察された．また，病理学的検査では，330 mg/kg 群の雄で肉眼的に胃の境界縁の肥厚，組織学的に前胃及び腺胃の潰瘍並びに境界縁の扁平上皮細胞の過形成がみられ，死亡例と同様に本被験物質の刺激性が認められた．雌ではいずれの器官でも肉眼的変化は認められなかった．

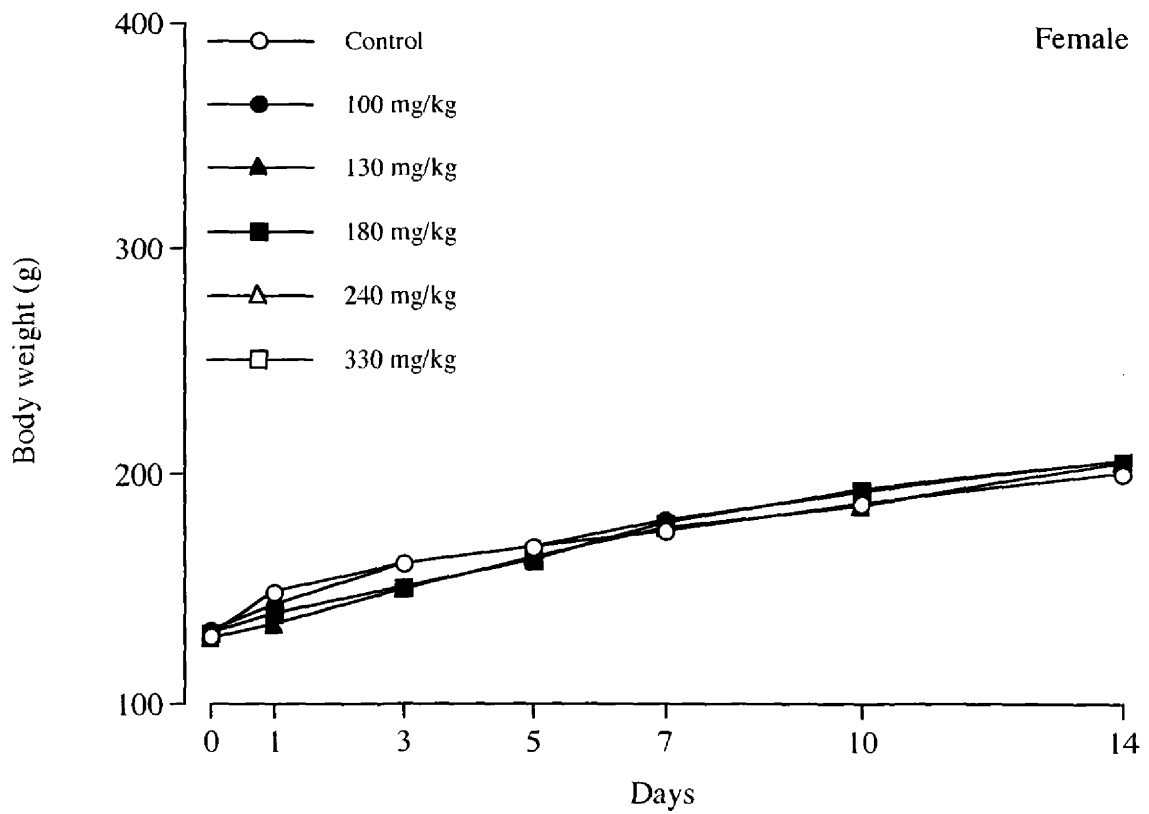
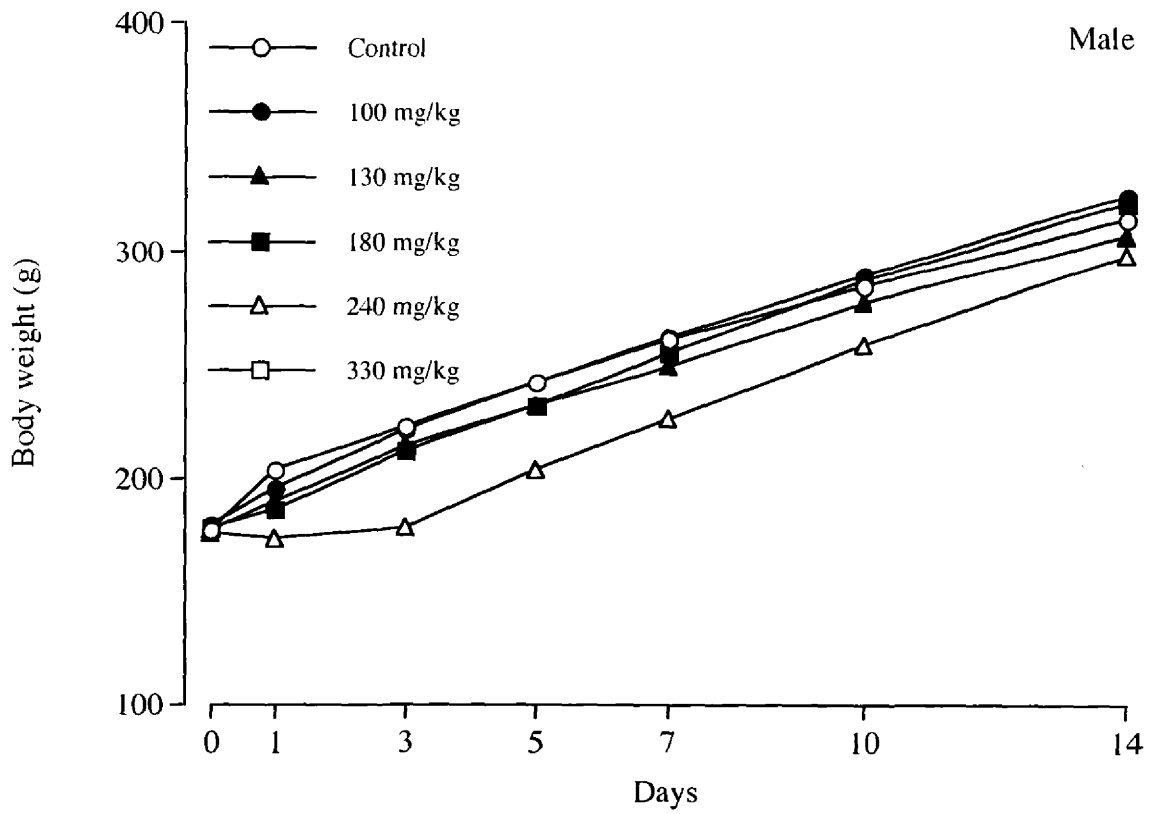


Fig. 1 Body weight changes

Table 1 Mortality and lethal dose  
Male, Female

Sex	Group and dose	Number of animals	Time after administration																Total number of dead animals	LD50 (95% confidence interval) (mg/kg)
			Minute				Hour					Day								
			0	15	30	45	1	2	3	6	8	1	2	3	4	5	6	7		
Male	Control	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	252.4 (193.3~339.2)
	100 mg/kg	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	130 mg/kg	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	180 mg/kg	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	240 mg/kg	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	3	
	330 mg/kg	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	4	
Female	Control	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	181.0 (146.1~235.2)
	100 mg/kg	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	130 mg/kg	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	
	180 mg/kg	5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	
	240 mg/kg	5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1						5	
	330 mg/kg	5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4							5	

Table 2 Clinical signs  
Male

Sex	Group and dose	Clinical signs	Time after administration																
			Minute				Hour					Day							
			0	15	30	45	1	2	3	6	8	1	2	3	4	5	6	7	8~14
Male	Control	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	100 mg/kg	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Loose stool	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	130 mg/kg	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	3	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Loose stool	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	180 mg/kg	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	240 mg/kg	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	2	2	2	2	2	2	2
		No abnormality	5	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
		Hypoactivity	0	0	4	4	4	4	4	4	4	1	1	1	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0
		Loose stool	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soild perineal region	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Abdominal distension	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
		330 mg/kg	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	1	1	1	1	1	1
	No abnormality		5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
	Hypoactivity		0	0	5	5	5	5	5	5	5	1	1	1	1	0	0	0	0
	Bradypnea		0	0	3	3	3	3	3	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	Loose stool		0	0	3	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Soild perineal region		0	0	0	2	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cyanosis	0		0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
prone position	0		0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
Abdominal distension	0		0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
Dead	0		0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	

Table 3 Clinical signs  
Female

Sex	Group and dose	Clinical signs	Time after administration															
			Minute				Hour					Day						
			0	15	30	45	1	2	3	6	8	1	2	3	4	5	6	7
Female	Control	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	100 mg/kg	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Loose stool	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	130 mg/kg	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4
		No abnormality	5	5	4	4	5	5	5	4	4	3	4	4	4	4	4	4
		Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
		Loose stool	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Soild perineal region	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
		180 mg/kg	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4
	No abnormality		5	5	3	3	3	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4
	Hypoactivity		0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	Bradypnea		0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Loose stool		0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Soild perineal region		0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Lacrimation		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cyanosis		0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dead		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	240 mg/kg	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	1					
		No abnormality	5	5	0	0	0	3	3	0	0	0	0					
		Hypoactivity	0	0	5	5	5	2	2	5	4	1	0					
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	2	4	1	0					
Loose stool		0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0						
Soild perineal region		0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0						
Dead		0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1						

Table 3 - continued Clinical signs Female

Sex	Group and dose	Clinical signs	Time after administration																	
			Minute				Hour					Day								
			0	15	30	45	1	2	3	6	8	1	2	3	4	5	6	7	8~14	
Female	330 mg/kg	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4								
		No abnormality	5	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
		Hypoactivity	0	1	5	5	5	5	5	4	4	1								
		Bradypnea	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1								
		Loose stool	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0								
		Soild perineal region	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0								
		Abdominal distension	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1								
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4								

Table 4 Body weights  
Male

Sex	Group and dose		Body weight(g) on day						
			0	1	3	5	7	10	14
Male	Control	N	5	5	5	5	5	5	5
		Mean	175.8	202.7	222.3	241.3	260.9	284.4	314.1
		S. D.	±9.5	±11.2	±11.2	±10.9	±11.5	±13.9	±14.0
	100 mg/kg	N	5	5	5	5	5	5	5
		Mean	178.4	195.1	220.4	241.4	262.3	288.3	323.9
		S. D.	±8.9	±13.2	±14.7	±15.4	±13.8	±12.5	±18.6
	130 mg/kg	N	5	5	5	5	5	5	5
		Mean	175.5	188.6	213.7	230.8	248.6	277.6	307.0
		S. D.	±8.7	±13.8	±15.6	±16.5	±14.9	±17.1	±19.9
	180 mg/kg	N	5	5	5	5	5	5	5
		Mean	176.8	185.9	211.2	231.8	254.5	286.0	320.8
		S. D.	±8.8	±9.0	±8.9	±9.3	±13.0	±14.0	±12.3
	240 mg/kg	N	5	2	2	2	2	2	2
		Mean	175.1	172.0	176.7	202.7	225.2	257.8	298.5
		S. D.	±8.4	-	-	-	-	-	-
	330 mg/kg	N	5	1	1	1	1	1	1
		Mean	177.4	-	-	-	-	-	-
		S. D.	±7.0	-	-	-	-	-	-



Table 5 Body weights  
Female

Sex	Group and dose		Body weight (g) on day						
			0	1	3	5	7	10	14
Female	Control	N	5	5	5	5	5	5	5
		Mean	129.2	147.6	160.9	167.3	175.1	186.3	199.9
		S. D.	±4.2	±5.6	±4.9	±4.0	±5.3	±7.5	±8.0
	100 mg/kg	N	5	5	5	5	5	5	5
		Mean	131.4	141.7	161.1	167.4	179.1	191.3	205.7
		S. D.	±5.1	±9.6	±7.6	±8.4	±8.3	±12.6	±14.9
	130 mg/kg	N	5	4	4	4	4	4	4
		Mean	128.1	134.0	149.0	162.7	176.2	185.8	203.7
		S. D.	±3.4	±9.0	±16.1	±8.1	±9.2	±11.7	±11.0
	180 mg/kg	N	5	4	4	4	4	4	4
		Mean	130.1	138.9	150.2	161.8	178.8	192.0	205.4
		S. D.	±1.9	±5.6	±8.9	±4.3	±6.8	±12.5	±12.9
	240 mg/kg	N	5	1					
		Mean	129.7	-					
		S. D.	±6.6	-					
	330 mg/kg	N	5	1					
		Mean	130.3	-					
		S. D.	±6.1	-					

Table 6 Necropsy findings  
Male

Organs and findings	Sex	Male								
	Group and dose	Control			100 mg/kg			130 mg/kg		
	Necropsy timing	Scheduled	Dead	Total	Scheduled	Dead	Total	Scheduled	Dead	Total
	Number of animals	5	0	5	5	0	5	5	0	5
Digestive system										
Stomach										
	Coloration, mucosa, glandular stomach, dark red	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Thickening, limiting ridge	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Distention, fluid, watery	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Respiratory system										
Trachea										
	Retention, fluid, frothy	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lung										
	Coloration, dark red	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Uncollapse	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hematopoietic system										
Thymus										
	Spot, dark red	0	0	0	0	0	0	0	0	0

No appreciable changes in all other organs and tissues.

Table 6 - continued Necropsy findings  
Male

Organs and findings	Sex	Male								
	Group and dose	180 mg/kg			240 mg/kg			330 mg/kg		
	Necropsy timing	Scheduled	Dead	Total	Scheduled	Dead	Total	Scheduled	Dead	Total
	Number of animals	5	0	5	2	3	5	1	4	5
Digestive system										
Stomach										
Coloration, mucosa, glandular stomach, dark red	0	0	0	0	3	3	0	4	4	
Thickening, limiting ridge	0	0	0	1	0	1	1	0	1	
Distention, fluid, watery	0	0	0	0	1	1	0	4	4	
Respiratory system										
Trachea										
Retention, fluid, frothy	0	0	0	0	1	1	0	4	4	
Lung										
Coloration, dark red	0	0	0	0	1	1	0	0	0	
Uncollapse	0	0	0	0	0	0	0	3	3	
Hematopoietic system										
Thymus										
Spot, dark red	0	0	0	0	3	3	0	2	2	

Table 7 Necropsy findings  
Female

Organs and findings \	Sex	Female											
	Group and dose	Control			100 mg/kg			130 mg/kg			180 mg/kg		
	Necropsy timing	Scheduled	Dead	Total	Scheduled	Dead	Total	Scheduled	Dead	Total	Scheduled	Dead	Total
	Number of animals	5	0	5	5	0	5	4	1	5	4	1	5
Digestive system													
Stomach													
Coloration, mucosa, glandular stomach, dark red	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	
Distention, fluid, watery	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Respiratory system													
Trachea													
Retention, fluid, frothy	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	
Lung													
Coloration, dark red	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	
Uncollapse	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
Hematopoietic system													
Thymus													
Spot, dark red	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 7 - continued

Necropsy findings  
Female

Organs and findings	Sex	Female					
	Group and dose	240 mg/kg			330 mg/kg		
	Necropsy timing	Scheduled	Dead	Total	Scheduled	Dead	Total
	Number of animals	0	5	5	0	5	5
<b>Digestive system</b>							
Stomach							
Coloration, mucosa, glandular stomach, dark red	0	5	5	0	5	5	
Distention, fluid, watery	0	3	3	0	3	3	
<b>Respiratory system</b>							
Trachea							
Retention, fluid, frothy	0	2	2	0	2	2	
Lung							
Coloration, dark red	0	2	2	0	1	1	
Uncollapse	0	2	2	0	2	2	
<b>Hematopoietic system</b>							
Thymus							
Spot, dark red	0	1	1	0	0	0	

Table 8 Histopathological findings  
Male

Organs and findings	Sex	Male								
	Group and dose	Control			100 mg/kg			130 mg/kg		
	Necropsy timing	Scheduled	Dead	Total	Scheduled	Dead	Total	Scheduled	Dead	Total
	Number of animals	5	0	5	5	0	5	5	0	5
Digestive system										
Stomach										
Hyperplasia, squamous cell, limiting ridge	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Ulcer, forestomach	0		0							
Ulcer, glandular stomach	0		0							
Respiratory system										
Lung										
Congestion	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Hematopoietic system										
Thymus										
Hemorrhage	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)

Figure in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

Table 8 - continued      Histopathological findings  
Male

Organs and findings	Sex	Male								
	Group and dose	180 mg/kg			240 mg/kg			330 mg/kg		
	Necropsy timing	Scheduled	Dead	Total	Scheduled	Dead	Total	Scheduled	Dead	Total
	Number of animals	5	0	5	2	3	5	1	4	5
Digestive system										
Stomach	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	(2)	(1)	(1)	(2)	
Hyperplasia, squamous cell, limiting ridge				1	0	1	1	0	1	
Ulcer, forestomach				0	0	0	1	0	1	
Ulcer, glandular stomach				1	1	2	1	1	2	
Respiratory system										
Lung	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	(0)	(2)	(2)	
Congestion					1	1	0	0		
Hematopoietic system										
Thymus	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	(0)	(1)	(1)	
Hemorrhage					1	1	1	1	1	

Figure in parentheses are number of animals with tissues examined histopathologically.

Table 9 Histopathological findings  
Female

Organs and findings	Sex	Female											
	Group and dose	Control			100 mg/kg			130 mg/kg			180 mg/kg		
	Necropsy timing	Scheduled	Dead	Total	Scheduled	Dead	Total	Scheduled	Dead	Total	Scheduled	Dead	Total
	Number of animals	5	0	5	5	0	5	4	1	5	4	1	5
Digestive system													
Stomach		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	(0)	(1)	(1)
Ulcer, glandular stomach									1	1		1	1
Respiratory system													
Lung		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	(0)	(1)	(1)
Congestion									0	0		0	0
Edema									1	1		0	0
Hematopoietic system													
Thymus		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Hemorrhage													



Table 9 - continued      Histopathological findings  
Female

Organs and findings	Sex	Female					
	Group and dose	240 mg/kg			330 mg/kg		
	Necropsy timing	Scheduled	Dead	Total	Scheduled	Dead	Total
	Number of animals	0	5	5	0	5	5
Digestive system							
Stomach	(0)	(1)	(1)	(0)	(1)	(1)	
Ulcer, glandular stomach		1	1		1	1	
Respiratory system							
Lung	(0)	(2)	(2)	(0)	(4)	(4)	
Congestion		1	1		1	1	
Edema		0	0		0	0	
Hematopoietic system							
Thymus	(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	
Hemorrhage		1	1				