

食薬セ研第10-1628号

2000年 8月25日

2-エチルアントラキノンの
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	3
方 法	4
1. 被験物質	4
2. 使用動物および飼育方法	4
3. 投与検体の調製	5
4. 群および群分け	6
5. 投与方法	6
6. 検査項目	7
7. データ解析法	9
結 果	11
1. 死亡例	11
2. 一般状態	11
3. 体重	11
4. 摂餌量	11
5. 尿検査所見	11
6. 血液学検査所見	12
7. 生化学検査所見	12
8. 病理学検査所見	12
考 察	15
文 献	17
 Figures 1～2	 18
Tables 1～10	21

【要 約】

2-エチルアントラキノンの28日間反復経口投与毒性試験（回復14日間）を雌雄のSprague-Dawley 系ラットを用いて実施した。雌雄とも4群構成とし、1群には媒体である0.1%ポリソルベート80添加0.5% CMC Na 水溶液を、他の3群には被験物質を、それぞれ10、50 および 250 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 250 mg/kg 投与群は各10匹、その他の群は各5匹とした。今回の試験において認められた主な変化を以下に要約する。

一般状態の変化として、250 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与第1日から潜血反応陰性の赤色尿の排泄がみられ、投与第4日以降、回復第1日までは、ほぼ全例に連日観察された。また、50 mg/kg 投与群でも、投与中期を中心に赤色尿の排泄が認められた。

50 mg/kg 以上の投与群の雄および 250 mg/kg 投与群の雌では、投与初期の摂餌量が有意な低値を示したが、体重に差は認められなかった。また、尿検査所見として、投与第4週の検査では、250 mg/kg 投与群において、尿の褐色化のほか、雌1例では、尿沈渣中に無色の針状結晶が認められた。

血液学検査では、50 mg/kg 投与群の雄および 250 mg/kg 投与群の雌雄に、赤血球数およびヘマトクリット値の減少がみられ、赤血球数の減少は 10 mg/kg 投与群の雄でも認められたほか、50 mg/kg 以上の投与群の雄では平均赤血球血色素濃度の上昇、250 mg/kg 投与群の雌雄では網状赤血球比率の増加が認められた。また、250 mg/kg 投与群の雄では、血液凝固時間の延長が認められた。回復試験期間終了時の検査では、投与期間終了時にみられた変化は軽減する傾向にあったが、雄の血色素量およびヘマトクリット値の減少、網状赤血球比率の増加およびプロトロンビン時間の延長には有意な差が認められた。

生化学検査では、250 mg/kg 投与群において、アルブミン濃度の上昇が雌雄に、総蛋白、総コレステロール、トリグリセライドおよび総ビリルビン濃度の上昇が雌にみられ、雄ではトリグリセライド濃度の低下が認められた。また、総ビリルビン濃度の上昇は、50 mg/kg 投与群の雌でも認められた。回復試験期間終了時の検査では、被験物質投与群の雌の A/G 比が有意な低値を示したが、投与期間終了時にみられた変化は認められなかった。

器官重量では、250 mg/kg 投与群の雌雄とも肝臓重量が増加したほか、雌では脾臓、雄

では腎臓重量の増加が認められた。また、回復試験期間終了時の被験物質投与群でも、雌雄とも肝臓の相対重量に有意な増加が認められた。

投与期間終了時の主な剖検所見として、250 mg/kg 投与群では、肝臓の大型化と暗色化が観察された。組織学検査では、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が 50 mg/kg 以上の投与群に認められ、その変化の程度は雌雄とも用量に依存して増強する傾向にあった。また、250 mg/kg 投与群では、肝細胞核の大小不同が認められた。一方、通常みられる肝臓の門脈周囲性の脂肪化は、250 mg/kg 投与群では認められなかった。脾臓では、250 mg/kg 投与群において、ヘモジデリン沈着および髄外造血が、それぞれ対照群と比較して増強する傾向にあった。回復試験期間終了時には、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大および肝細胞核の大小不同は消失あるいは軽減し、門脈周囲性の脂肪化の程度も対照群と著しい差はなかったが、脾臓のヘモジデリン沈着は雌雄で、髄外造血は雄で、それぞれ程度が強い傾向にあった。

以上のように、2-エチルアントラキノンを経口投与することにより、雄では 10 mg/kg 以上、雌では 250 mg/kg の用量で赤血球数の減少がみられ、これに関連する所見として、主に 250 mg/kg 投与群でヘマトクリット値の減少、平均赤血球血色素濃度および網状赤血球比率の増加、総ビリルビン濃度の上昇、脾臓のヘモジデリン沈着および髄外造血の増強などが認められた。また、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が雌雄とも 50 mg/kg 以上の用量でみられたほか、その程度の強い例では肝細胞核の大小不同が認められ、2-エチルアントラキノン投与による肝臓への影響が示唆された。これらのことから、本試験条件下における2-エチルアントラキノンの無影響量は雄では 10 mg/kg 未満、雌では 10 mg/kg であると考えられる。

【緒 言】

2-エチルアントラキノンのラットにおける単回経口投与時の LD_{50} は 2795 mg/kg 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、2-エチルアントラキノン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。

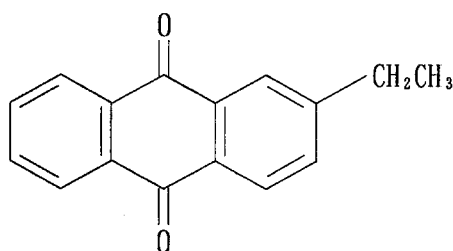
なお、本試験は、「化審法毒性試験法、スクリーニング毒性試験—ほ乳類を用いる28日間の反復投与毒性試験—」（昭和61年12月5日、環保業第700号、薬発第1039号、61基局第1014号）および「化学物質GLP」（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和63年11月18日改正、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に準拠して実施した。

【方 法】

1. 被験物質

被験物質として、2-エチルアントラキノン（以下 EAQ と略記）を用いた。本被験物質は、別名を 2-アルキル(C=2)アントラキノンといい、英名は 2-alkyl(C=2)anthraquinone であり、CAS No. 84-51-5、分子量 236.28、分子式 $C_{18}H_{12}O_2$ 、融点（凝固点）108.9～110.5℃、沸点 245℃ (20 mmHg) の淡黄色フレーク状の固体である。EAQ 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 EAQ（ロット番号： 純度： 99.16 wt%）を用いた。提供された被験物質は、不純物としてアントラキノン 0.01 %、硫黄分 1.4 ppm、塩素分 14.3 ppm 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2月24日

入荷匹数：雄34匹 雌34匹

入荷時体重：雄77.9～87.0g (平均82.7g) 雌73.5～82.2g (平均77.0g)

(注2)

投与開始日：1999年3月5日

投与開始時体重：雄163.8～186.2g (平均174.9g) 雌134.6～157.5g (平均146.1g)

(220w×270d×190h mm) に 1 匹ずつ収容し、固型飼料 (CE-2、日本クレア株式会社) および水道水 (秦野市水道局給水) を自由摂取させて飼育した。なお、飼育期間中、飼育室の温度の実測値は、基準値の範囲内にあり、湿度の実測値は、空調機の管理作業あるいは日常的湿式清掃による 1 時間以内の逸脱を除いて基準値内にあった (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

媒体として、0.1%ポリソルベート80添加 0.5% CMC Na 水溶液を用いた。媒体は、0.5w/v%となるように秤量した CMC Na (カルメロースナトリウム、製造番号: 6Z09、丸石製薬株式会社) を注射用水 (日局注射用水、製造番号: 9707SA、光製薬株式会社) に溶解し、これに 0.1 w/v%の割合でポリソルベート80 [ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオレエート、ロット番号: TPN3571、和光純薬工業株式会社] を加えて調製した。

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媒体を加えて懸濁して調製した。調製頻度は 1 週に 1 回以上の割合で調製した。

なお、秦野研究所にて、初回に調製した各濃度の投与検体について含量測定および均一性試験を実施した結果、懸濁液中の被験物質の平均含量は、所定濃度の 92.3~102%であり (Appendix A)、均一性についても、規定範囲内にあった (Appendix B)。また、本試験に先立ち、秦野研究所で実施した本被験物質のラットにおける急性経口投与毒性試験 (試験計画番号: A-98-029) において、0.2 および 20 w/v%の調製検体の、冷蔵、遮光条件下での 8 日間の安定性を確認した (Appendix C)。調製検体中の被験物質の濃度は、高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法により測定した (Appendix D)。

(注 3)

動物飼育期間中の温湿度の実測値	温度23~25℃	湿度47~69%
-----------------	----------	----------

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-98-006、投与開始：1998年11月9日、投与量：0、250、500 および 1000 mg/kg）の結果に基づき決定した。すなわち、EAQ を7日間反復投与することにより、250 mg/kg 以上の投与群で、投与初期に体重の増加抑制があり、1000 mg/kg 投与群では、投与第5日以降、被毛の汚れ、軟便、立毛、消瘦および排便量の減少などの症状が観察された。また、500 mg/kg 以上の投与群では赤色尿がみられたほか、250 mg/kg 以上の投与群では、尿沈渣中に針状結晶が認められた。さらに、剖検所見では、250 mg/kg 以上の投与群で肝臓の肥大ないし暗色調を示す例が散見され、1000 mg/kg 投与群では胃粘膜に肥厚あるいは暗色点がみられる例もあった。以上のことから、本試験では投与期間を考慮し、高用量を 250 mg/kg とし、以下公比5で除して 50 および 10 mg/kg を中用量および低用量とした。また、雌雄とも媒体である 0.1%ポリソルベート80添加 0.5% CMC Na 水溶液を投与する対照群を設けた。なお、雌雄とも回復試験を行う対照群および 250 mg/kg 投与群は各10匹、その他の群は各5匹とした。

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

群	投与量 (mg/kg)	投与容量 (mL/kg)	動物番号	
			雄	雌
対 照 群	0	5	1～10	31～40
低用量群	10	5	11～15	41～45
中用量群	50	5	16～20	46～50
高用量群	250	5	21～30	51～60

雌雄とも対照群および 250 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 5 mL/kg とし、各投与時の最近時の体重をもとに個体別に算出した。

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

て回復第1日および回復第1週とした。

6. 検査項目

1) 一般検査

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

2) 尿検査

各群とも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 沈渣	視 診 半導体方式 試験紙法 鏡 検	— pH BOY-P2（新電元工業） クリニテック 200+（バイエル・三共）

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

項 目	測 定 法	使 用 機 器
ヘマトクリット値(Ht)	計算 (RBC×MCV×0.001)	
平均赤血球血色素量(MCH)	同上 (Hb×1000/RBC)	
平均赤血球血色素濃度(MCHC)	同上 (Hb×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	ビュレット法	遠心方式生化学自動分析装置 COBAS-FARA(ロシュ)
アルブミン濃度	BCG法	同上
総コレステロール濃度	COD-DAOS法	同上
ブドウ糖濃度	グルコキナーゼ G6PDH法	同上
尿素窒素濃度(BUN)	ウリアーゼ G.D. DH法	同上
クレアチニン濃度	クレアチナーゼ・F-DAOS 法	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
総ビリルビン濃度	Jendrassik/Grof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て薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製した。その後、光学顕微鏡を用いて、対照群および高用量群の組織学的検査を実施した。また、全例の脾臓については、ベルリンブルー染色標本を作製した。その他、全例の肉眼的異常が認められた器官・組織の標本作製し、組織学検査を行った。

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

固定・保存器官・組織

脳、下垂体、脊髄、眼球、甲状腺、上皮小体、心臓*、気管、気管支、肺、肝臓*、腎臓*、胸腺、脾臓*、副腎*、胃*、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、精巣*、精巣上体*、前立腺、精囊、卵巣*、子宮、膣、乳腺、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、骨格筋（下腿部）、坐骨神経、大腿骨骨髓、脾臓、顎下腺、舌下腺、舌、食道、大動脈、ハーダー腺、皮膚、病変部

7. データ解析法

体重、摂餌量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)

250 mg/kg 投与群では、雌雄とも投与第1日から赤色尿の排泄がみられ、投与第4日以降、回復第1日までは、ほぼ全例に連日観察された。また、50 mg/kg 投与群の雄全例、雌3例でも、投与第11日から25日の間に1ないし5日の頻度で赤色尿の排泄が認められた。

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)

50 mg/kg 以上の投与群の雄では、投与第1週の摂餌量が対照群と比較して有意な低値を示し、また、250 mg/kg 投与群の雌では、投与第1週および2週の摂餌量が有意な低値を示した。その後の投与期間および回復試験期間中にはいずれの被験物質投与群においても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週の尿検査では、雌雄とも対照群および10 mg/kg 投与群の尿色調が淡黄色であったのに対して、50 mg/kg 以上の投与群の多くの例の尿色調は、黄色から黄褐色であった。また、250 mg/kg 投与群の雌1例（動物番号：51）では、尿沈渣中に通常みられるリン酸アンモニウムマグネシウム結晶のほかに、無色の針状結晶が少数認められた。この他、対照群の雄1例では、潜血反応が陽性で、尿沈渣中には赤血球が観察された。一方、回復第2週の検査では、被験物質投与群の雌1例の尿沈渣中に少量の赤血球が観察された以外、特記すべき所見はなかった。

6. 血液学検査所見 (Table 5、Appendix 5)

1) 投与期間終了時

10 mg/kg 以上の投与群の雄および 250 mg/kg 投与群の雌では、赤血球数の有意な減少がみられ、これに伴って、250 mg/kg 投与群の雌における血色素量の有意な減少、50 mg/kg 以上の投与群の雄と 250 mg/kg 投与群の雌におけるヘマトクリット値の有意な減少、50 mg/kg 以上の投与群の雄における平均赤血球血色素濃度の有意な上昇、250 mg/kg 投与群の雌雄における網状赤血球比率の有意な増加が認められた。また、250 mg/kg 投与群の雄では、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有意な延長が認められた。

2) 回復試験期間終了時

被験物質投与群の雄では、血色素量およびヘマトクリット値の有意な減少と網状赤血球比率の増加がみられたほか、プロトロンビン時間の有意な延長が認められた。また、雌では、白血球数の有意な増加が認められた。

7. 生化学検査所見 (Table 6、Appendix 6)

1) 投与期間終了時

250 mg/kg 投与群では、アルブミン濃度の有意な上昇が雌雄に、総蛋白、総コレステロール、トリグリセライド、総ビリルビンおよびカルシウム濃度の有意な上昇と塩素濃度の有意な低下が雌にみられ、雄ではトリグリセライド濃度の有意な低下が認められた。また、50 mg/kg 投与群の雌でも総ビリルビンおよびカルシウム濃度の有意な上昇が認められた。この他、10 mg/kg 投与群の雄では、総蛋白濃度の有意な低下が認められた。

2) 回復試験期間終了時

被験物質投与群では、雌の A/G 比が有意な低値を示したが、投与期間終了時にみられた項目には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)

(1) 投与期間終了時解剖例

250 mg/kg 投与群では、雌雄とも肝臓の絶対および相対重量に有意な増加がみられたほ

か、雌では脾臓の絶対および相対重量に、また、雄では腎臓の相対重量に、いずれも有意な増加が認められた。

(2)回復試験期間終了時解剖例

被験物質投与群では、雌雄とも肝臓の相対重量に有意な増加が認められた。

2) 肉眼所見 (Table 9、Appendix 9)

(1)投与期間終了時解剖例

肝臓では、大型化が 250 mg/kg 投与群の雌雄全例に、暗色化が 250 mg/kg 投与群の雄 3 例、雌 4 例に観察された。腎臓では、大型化が 250 mg/kg 投与群の雄 1 例に、腎盂の拡張が 50 mg/kg 投与群の雄 1 例に認められた。この他、胃では腺胃粘膜の黒色点が 250 mg/kg 投与群の雌 1 例に観察された。

(2)回復試験期間終了時解剖例

250 mg/kg 投与群の雄では、肝臓の大型化と腎盂の拡張が各 1 例に観察された。

3) 組織学検査所見 (Table 10、Appendix 10)

(1)投与期間終了時解剖例

肝臓では、小葉中心性の肝細胞肥大 (Photo 1) が 250 mg/kg 投与群の雌雄全例、50 mg/kg 投与群の雄全例、雌 3 例に観察され、その変化の程度は雌雄とも用量に依存して増強する傾向にあった。また、250 mg/kg 投与群では、肝細胞核の大小不同が認められた。さらに、通常の飼育条件で対照群に観察される肝臓の門脈周囲性の脂肪化は、250 mg/kg 投与群の雌雄ともに認められなかった。脾臓では、ヘモジデリン沈着および髄外造血が 250 mg/kg 投与群の雌雄とも、それぞれ対照群と比較して有意な増強あるいは増強傾向がみられ、250 mg/kg 投与群の雄 2 例、雌全例、50 mg/kg 投与群の雌 1 例ではうっ血が認められた (Photo 2)。この他、Table 10-1-1 および 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、肉眼的に病変がみられた部位の所見として、腎盂の拡張がみられた 50 mg/kg 投与群の雄 1 例の腎臓では、組織学的にも腎盂の拡張が観察されたが、腺胃粘膜の黒色点がみられた 250 mg/kg 投与群の雌 1 例の胃では、これに対応すると考えられる組織学的変化は認められなかった。

(2)回復試験期間終了時解剖例

肝臓では、軽微あるいは軽度な小葉中心性の肝細胞肥大が、被験物質投与群の雄2例に観察された。脾臓では、被験物質投与群の雄におけるヘモジデリン沈着および髄外造血の程度が増強し、雌においても中程度のヘモジデリン沈着が4例で、対照群と比較してその変化の程度は強い傾向が認められた。さらに、うっ血が被験物質投与群の雄全例、雌3例に観察された。

EAQ を、10、50 および 250 mg/kg の用量で雌雄の Sprague-Dawley 系ラットに28日間
にわたって強制経口投与し、その後14日間の回復試験期間を設けた。

その結果、主として赤血球系および肝臓で被験物質投与に起因したと考えられる変化が
生じた。すなわち、雄では 10 mg/kg 以上の投与群、雌では 250 mg/kg 投与群で赤
血球数の減少がみられ、関連する所見として、高用量群を中心に、ヘマトクリット値の減
少、平均赤血球血色素濃度および網状赤血球比率の増加、血漿中総ビリルビン濃度の
上昇、脾臓の重量増加とヘモジデリン沈着および髄外造血の増強ならびにうっ血が認めら
れた。アントラキノン類の一種である 1-amino-2,4-dibromoanthraquinone (ADBAQ) の
ラットおよびマウスにおける13週間混餌投与毒性試験²⁾、ならびに 1-aminoanthra-
quinone の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³⁾においても貧血が
みられ、その所見から溶血性貧血の可能性が示唆されており、今回の試験でみられた所見
からも、赤血球数の減少は溶血によるものと考えられる。一方、回復試験期間終了時に
は、投与期間終了時にみられた赤血球系の変化は軽減したことから、今回認められた溶血
性貧血は、投与中止により回復傾向を示すものと考えられる。

高用量群を中心に赤色尿の排泄と一部の尿沈渣中に無色の針状結晶がみられたが、同様
の変化は、本試験の予備試験でも認められた。すなわち、1000 mg/kg の用量を投与
して採取した尿および血漿は赤色調を呈し、血漿の吸収スペクトルを調べたところ、
326、410、509 nm に被験物質に起因すると考えられる吸収がみられ、尿沈渣には多
量の針状結晶が認められた。1-aminoanthraquinone を投与すると赤色調の尿が排泄
され³⁾、また、1-methylaminoanthraquinone の投与ではグルクロン酸抱合された着色
した代謝物が尿中に排泄されることがそれぞれ報告されている⁴⁾。前述のように、今回の
試験結果から EAQ 投与により溶血が疑われるが、尿の潜血反応はいずれも陰性であっ
たことから赤色尿は被験物質に由来するものと考えられる。また、尿沈渣中の針状結晶の
詳細は不明であるが、予備試験でみられた結晶の形態と同様であることから、これも被験
物質に由来するものと考えられる。なお、尿の色調は尿検査時と一般状態観察時とで、黄
褐色と赤色というように異なるが、これは投与後の時間経過によりその色調が変化したこ
とによる相違と考えられる。

肝臓に関する所見として、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が 50 mg/kg 以上の投与群に
みられ、その程度の強い例では、肝細胞核の大小不同が認められた。類似する所見は、前

述した ADBAQ の13週間混餌投与毒性試験でも観察されている。この他、通常みられる肝臓の門脈周囲性の脂肪化が 250 mg/kg 投与群では認められず、関連する所見として、高用量群を中心に、アルブミン濃度の上昇が雌雄、総コレステロール、トリグリセライド濃度の上昇が雌にみられ、雄ではトリグリセライド濃度の低下が認められたが、その毒性学的意味は不明であった。また、250 mg/kg 投与群の雄では、血液凝固時間の延長がみられたことから、肝臓での血液凝固因子の生成が障害された可能性も考えられるが、著しい形態的变化は認められなかったことから、その詳細は不明である。回復試験期間終了時には、肝臓の変化はいずれも軽減する傾向にあり、被験物質投与群の雌では、グロブリン濃度の上昇に伴うと考えられる A/G 比の減少が認められた。なお、投与期間終了時の 10 mg/kg 投与群の雄にみられた総蛋白濃度の有意な低下は、軽微で用量依存的な変化ではなく、他の関連所見もなかったことから、毒性学的意義は少ないものと考えられる。

その他、被験物質投与によると考えられる変化として、投与初期の摂餌量が用量依存的に低値を示したが、観察期間中の体重には対照群と被験物質投与群との間に差はなく、その影響は軽微なものであった。また、投与期間終了時に、高用量群の雄で腎臓重量の増加がみられたが、組織学検査では関連する変化は認められず、重量増加の成因は、本試験では明らかにすることはできなかった。さらに、雌で用量依存的な血漿中カルシウム濃度の上昇と塩素濃度の低下がみられたが、その毒性学的意味は不明であった。この他、回復試験期間終了時の被験物質投与群の雌に白血球数の有意な増加がみられたが、その個体別の値は 4200~6900/mm³ と生理的変動範囲内（注4）であり、投与期間終了時にも変化がないことから、被験物質投与およびその後続く回復試験期間に関連がない変化と考えられる。

以上のように、EAQ を反復投与することにより、溶血性貧血と考えられる赤血球数の減少が雄では 10 mg/kg 以上、雌では 250 mg/kg の用量で認められた。また、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が雌雄とも 50 mg/kg 以上の用量でみられ、その程度の強い例では肝細胞核の大小不同が認められ、EAQ 投与による肝臓への影響が示唆された。これらのことから、本試験条件下における EAQ の無影響量は雄では 10 mg/kg 未満、雌では 10 mg/kg であると考えられる。

（注4）今年度実施した同種同週齢の対照群の雌動物における白血球数（x100/mm³）

試験A 36~52（平均：45）

試験D 29~74（平均：54）

試験B 25~42（平均：34）

試験E 27~76（平均：45）

試験C 26~37（平均：34）

試験F 39~65（平均：48）

【文 献】

- 1) National Technical Information Service. OTS0534314. (1978)
- 2) Fleischman R.W., Esber H.J., Hagopian M., Lilja H.S., Huff J. : Thirteen-week toxicology studies of 1-amino-2,4-dibromoanthraquinone in Fischer 344/N rats and B6C3F₁ mice. Toxicology and Applied Pharmacology 82: 389-404 (1986)
- 3) 化学物質点検推進連絡協議会化学物質毒性試験報告 vol.3、pp.87-101、東京 (1996)
- 4) Martin B.W., Ivie G.W., Bailey E.M. : The acute toxicity of 1-methylamino-anthraquinone in dogs and rabbits and its metabolism in sheep. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 12: 499-507 (1983)

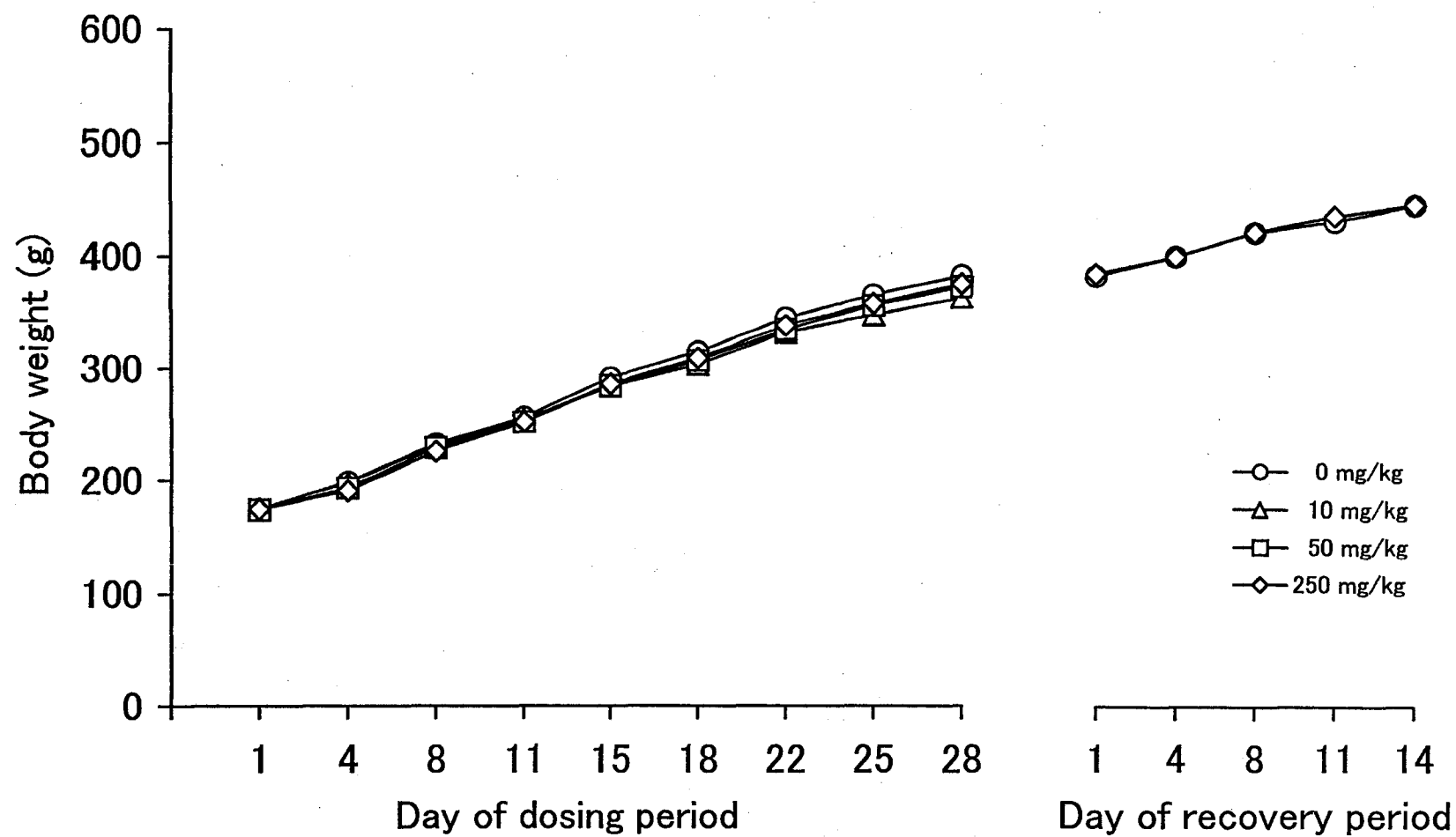


Fig. 1-1
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of EAQ in rats
Body weight changes in males

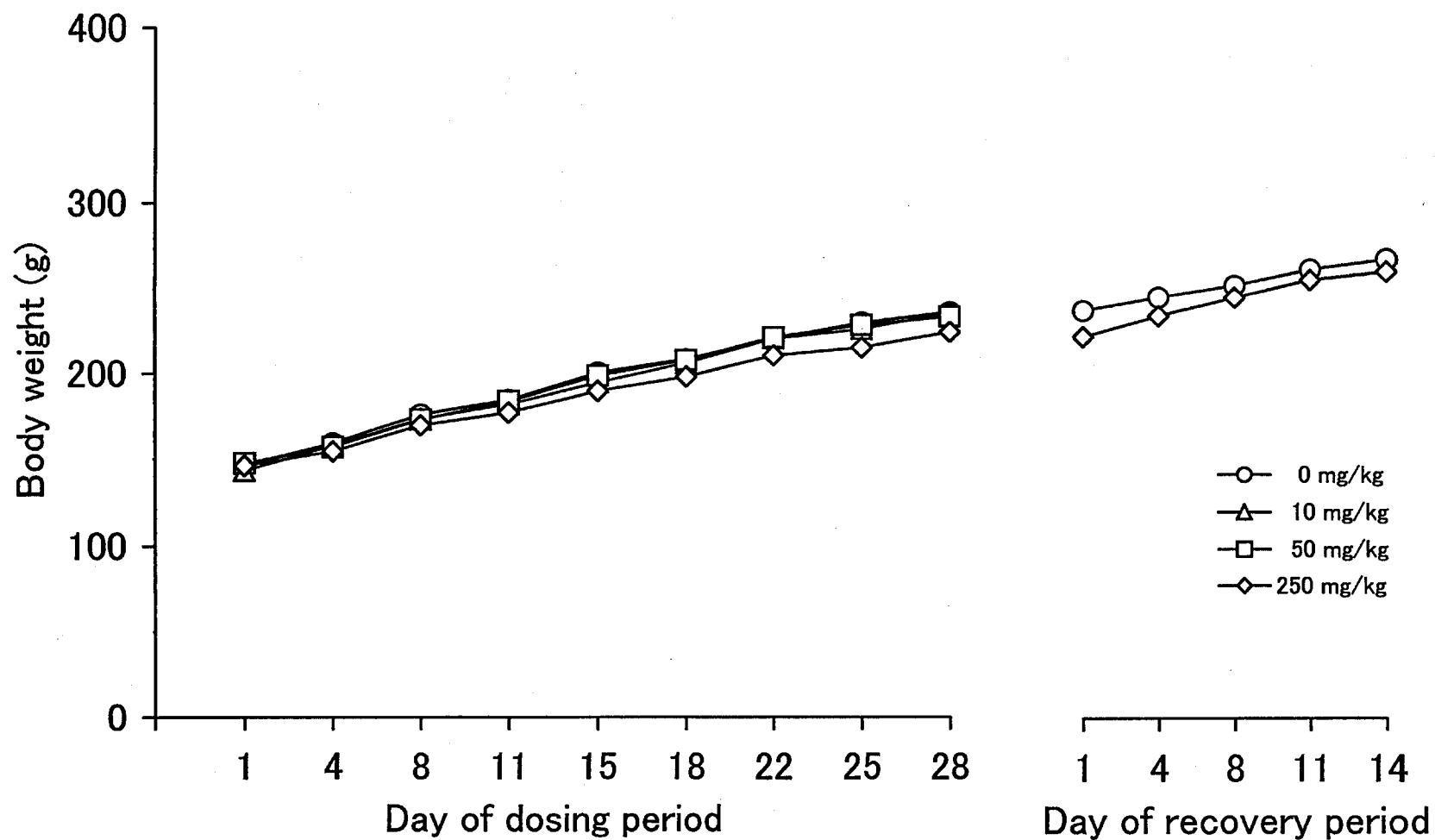


Fig. 1-2

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

Body weight changes in females

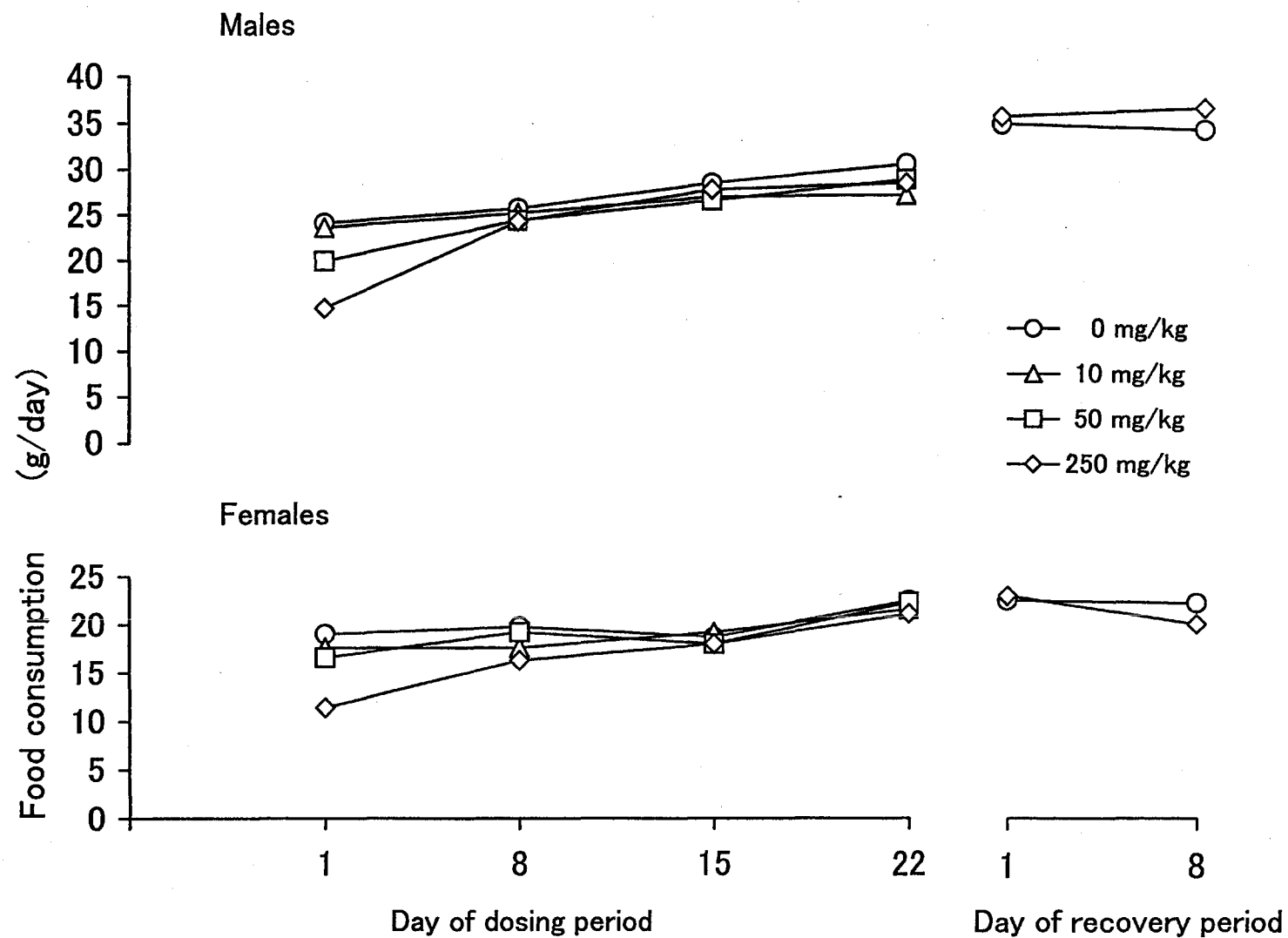


Fig. 2
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of EAQ in rats

Food consumption in males and females

Table 1
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of BAQ 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	
Red urine	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	2	3	1	2	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	5
	250	10	6	4	5	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

Clinical signs in females

Clinical signs	Dose (mg/kg)	Initial number of animals	Number of animals with clinical signs																												Day of		
													Day of dosing period																		- recovery period ^{a)} -		Total
			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	1	2~14	
Red urine	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	10	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	50	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	
	250	10	5	2	3	10	10	10	10	10	9	9	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	10	10	5	-	10	

a), recovery test was performed in 5 animals of the 0-mg/kg and 250-mg/kg group of both sexes.
-, no animal showed the sign.

Table 2-1

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

Body weight changes in males

Dose (mg/kg)	Day of dosing period									Day of recovery period				
	1	4	8	11	15	18	22	25	28	1	4	8	11	14
0	(10) 174.8 ±5.4	(10) 199.0 ±7.8	(10) 232.9 ±11.2	(10) 256.7 ±14.8	(10) 291.8 ±20.8	(10) 315.0 ±26.5	(10) 344.9 ±32.8	(10) 365.7 ±36.2	(10) 382.8 ±41.6	(5) 381.9 ±37.1	(5) 399.4 ±42.9	(5) 420.3 ±50.2	(5) 430.4 ±49.7	(5) 444.7 ±55.6
10	(5) 175.4 ±7.5	(5) 198.0 ±11.9	(5) 231.7 ±16.0	(5) 254.9 ±20.2	(5) 284.0 ±24.9	(5) 303.5 ±28.2	(5) 332.3 ±33.9	(5) 347.7 ±38.8	(5) 363.1 ±39.0					
50	(5) 174.4 ±7.0	(5) 193.6 ±11.4	(5) 229.5 ±17.2	(5) 252.3 ±20.3	(5) 284.8 ±23.0	(5) 307.1 ±24.1	(5) 334.7 ±25.3	(5) 356.2 ±28.8	(5) 372.8 ±31.0					
250	(10) 174.8 ±6.6	(10) 191.0 ±8.5	(10) 226.2 ±12.1	(10) 252.3 ±13.7	(10) 286.2 ±14.8	(10) 309.3 ±17.9	(10) 338.2 ±19.6	(10) 357.9 ±23.7	(10) 375.5 ±24.9	(5) 383.9 ±33.5	(5) 399.2 ±35.5	(5) 420.6 ±39.4	(5) 435.0 ±39.4	(5) 445.0 ±41.7

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 EAQ in rats

Body weight changes in females

Dose (mg/kg)	Day of dosing period									Day of recovery period				
	1	4	8	11	15	18	22	25	28	1	4	8	11	14
0	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	146.5 ±6.6	159.5 ±7.2	176.2 ±7.5	184.8 ±10.2	200.6 ±11.6	208.6 ±11.9	220.6 ±13.9	230.3 ±15.4	236.4 ±13.9	236.8 ±14.0	244.7 ±16.3	251.5 ±17.5	260.8 ±21.6	266.6 ±19.9
10	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)					
	143.4 ±5.8	158.1 ±7.8	173.7 ±10.0	182.2 ±7.8	194.9 ±9.6	206.3 ±12.7	220.7 ±15.9	226.3 ±22.2	236.2 ±22.8					
50	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)					
	147.7 ±6.5	157.3 ±3.6	173.2 ±4.6	184.0 ±4.7	198.8 ±5.6	208.0 ±6.5	221.6 ±5.1	228.7 ±6.4	233.8 ±8.2					
250	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	146.3 ±4.1	154.7 ±5.4	169.9 ±7.3	177.4 ±8.5	189.8 ±10.2	198.2 ±11.1	210.7 ±11.8	215.5 ±12.9	224.6 ±10.1	221.4 ±14.6	233.7 ±9.2	244.5 ±9.4	254.7 ±11.3	259.5 ±15.3

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

Table 3-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of EAQ 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)
	24.1 ±1.9	25.7 ±2.3	28.5 ±3.7	30.6 ±4.1	31.0 ±3.9	30.4 ±4.0
10	(5)	(5)	(5)	(5)		
	23.6 ±1.8	25.2 ±2.9	27.0 ±4.0	27.2 ±4.2		
50	(5)	(5)	(5)	(5)		
	19.9** ±1.3	24.4 ±2.8	26.6 ±1.9	28.9 ±2.3		
250	(10)	(10)	(10)	(10)	(5)	(5)
	14.7** ±1.9	24.3 ±1.7	27.8 ±2.6	28.5 ±2.5	31.7 ±2.5	32.5 ±2.9

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

**, significantly different from control, p<0.01

Table 3-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of EAQ 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)
	19.0	19.8	18.7	22.5	22.6	22.3
	±2.3	±1.5	±1.9	±3.1	±4.1	±0.7
10	(5)	(5)	(5)	(5)		
	17.6	17.6	19.2	21.6		
	±1.3	±2.2	±2.8	±1.6		
50	(5)	(5)	(5)	(5)		
	16.6	19.2	18.0	22.3		
	±0.8	±2.0	±2.1	±0.5		
250	(10)	(10)	(10)	(10)	(5)	(5)
	11.4**	16.3**	18.0	21.1	23.1	20.1
	±2.0	±2.0	±2.4	±1.5	±1.3	±4.3

Parameter, mean(g)±S.D.

(), number of animals

**, significantly different from control. p<0.01

Table 4-1

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

Urinalysis in males and females on day 25 of dosing period

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Microscopic examination of urinary sediment																								
			Color ^{a)}			Turbidity ^{b)} —	pH			Occult blood ^{b)}					Red blood cell ^{c)}					Crystal ^{d)}			Cast ^{e)} —	White blood cell ^{c)}		Epithelial cell ^{d)}	
			ly	y	yb		6.0~7.0	7.1~8.0	8.1~9.0	—	±	+	++	+++	—	±	+	++	+++	—	±	+		—	—	—	±
Male	0	10	10	0	0	10	2	7	1	9	0	0	0	1	9	0	0	0	1	0	8	2	10	10	8	2	
	10	5	5	0	0	5	1	4	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	3	2	5	5	5	0	
	50	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	2	3	5	5	5	0	
	250	10	0	2	8	10	1	9	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	7	3	10	10	9	1	
Female	0	10	10	0	0	10	2	6	2	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	10	0	10	10	9	1	
	10	5	5	0	0	5	2	3	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	1	3	1	5	5	5	0	
	50	5	1	4	0	5	1	4	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	1	5	5	5	0	
	250	10	4	4	2	10	3	7	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	1	8	1	10	10	6	4	

a) ly, light yellow; y, yellow; yb, yellowish brown

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

c) —, not observed; ±, 1-9/3 visual field; +, 10-99/3 visual field; ++, 100-299/3 visual field; +++, ≥300/3 visual field

d) —, not observed; ±, a few; +, abundant

Table 4-2
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of EAQ in rats
Urinalysis in males and females on day 12 of recovery period

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Color ^{a)} ly	Turbidity ^{b)} —	pH			Occult blood ^{b)} —	Microscopic examination of urinary sediment											
					6.0~7.0	7.1~8.0	8.1~9.0		Red blood cell ^{c)}			Crystal ^{d)}			Cast ^{c)} —	White blood cell ^{c)} —	Epithelial cell ^{d)}			
									—	±	+	—	±	+			—	±		
Male	0	5	5	5	1	4	0	5	5	0	0	0	4	1	5	5	3	2		
	250	5	5	5	2	3	0	5	5	0	0	0	2	3	5	5	3	2		
Female	0	5	5	5	3	2	0	5	5	0	0	0	5	0	5	5	5	0		
	250	5	5	5	2	2	1	5	4	0	1	0	5	0	5	5	5	0		

a) ly, light yellow

b) -, negative

c) -, not observed; ±, 1-9/3 visual field; +, 10-99/3 visual field

d) -, not observed; ±, a few; +, abundant

Table 5-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of EAQ 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) 789 ± 47	(5) 15.9 ± 0.8	(5) 47.1 ± 2.7	(5) 59.7 ± 1.2	(5) 20.2 ± 0.6	(5) 33.8 ± 0.4	(5) 2.5 ± 0.6	(5) 111.6 ± 19.1	(5) 17.9 ± 3.6	(5) 21.5 ± 1.8
10	(5) 734* ± 39	(5) 15.1 ± 0.3	(5) 43.6 ± 1.4	(5) 59.4 ± 2.6	(5) 20.6 ± 1.1	(5) 34.6 ± 0.9	(5) 3.0 ± 0.6	(5) 97.7 ± 12.9	(5) 17.7 ± 3.2	(5) 19.9 ± 2.1
50	(5) 726* ± 14	(5) 15.1 ± 0.2	(5) 43.2* ± 0.4	(5) 59.5 ± 1.6	(5) 20.8 ± 0.2	(5) 35.0* ± 0.6	(5) 3.3 ± 0.4	(5) 104.9 ± 7.5	(5) 16.0 ± 3.3	(5) 20.7 ± 1.6
250	(5) 711** ± 14	(5) 14.8 ± 0.5	(5) 42.2** ± 1.9	(5) 59.4 ± 2.4	(5) 20.8 ± 0.6	(5) 35.1* ± 0.7	(5) 5.2** ± 1.9	(5) 116.5 ± 9.1	(5) 27.9** ± 3.0	(5) 25.2* ± 2.1

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100/\text{mm}^3$)	Band neutrophil (%)	Segmented neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 68 ± 12	(5) 0 ± 0	(5) 8 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 0 ± 0	(5) 1 ± 1	(5) 91 ± 2
10	(5) 65 ± 19	(5) 0 ± 0	(5) 8 ± 3	(5) 1 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 1 ± 1	(5) 90 ± 3
50	(5) 82 ± 23	(5) 0 ± 0	(5) 10 ± 2	(5) 0 ± 0	(5) 0 ± 0	(5) 2 ± 1	(5) 87 ± 3
250	(5) 75 ± 9	(5) 0 ± 0	(5) 8 ± 3	(5) 2 ± 2	(5) 0 ± 0	(5) 3 ± 2	(5) 87 ± 6

Parameter, mean $\pm$ S.D.
(), number of animals*, significantly different from control, $p < 0.05$
**, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 5-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of EAQ 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) 722 ± 36	(5) 15.0 ± 0.6	(5) 43.7 ± 1.9	(5) 60.6 ± 2.5	(5) 20.8 ± 1.0	(5) 34.4 ± 1.0	(5) 2.7 ± 1.0	(5) 95.3 ± 9.9	(5) 11.9 ± 0.4	(5) 16.2 ± 1.3
10	(5) 753 ± 47	(5) 15.3 ± 1.0	(5) 44.1 ± 3.0	(5) 58.6 ± 2.0	(5) 20.3 ± 0.5	(5) 34.6 ± 0.9	(5) 2.5 ± 0.2	(5) 88.0 ± 5.6	(5) 12.1 ± 0.7	(5) 16.1 ± 2.2
50	(5) 715 ± 38	(5) 15.0 ± 0.4	(5) 42.6 ± 1.7	(5) 59.7 ± 2.2	(5) 21.0 ± 0.6	(5) 35.1 ± 0.6	(5) 2.8 ± 1.1	(5) 89.3 ± 22.9	(5) 11.9 ± 0.6	(5) 18.1 ± 0.5
250	(5) 628** ± 44	(5) 13.5* ± 1.1	(5) 38.3** ± 2.5	(5) 61.0 ± 0.9	(5) 21.4 ± 0.4	(5) 35.2 ± 0.8	(5) 9.8* ± 3.3	(5) 108.9 ± 12.2	(5) 11.6 ± 0.5	(5) 18.2 ± 2.9

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100/\text{mm}^3$)	Band neutrophil (%)	Segmented neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 48 ± 10	(5) 0 ± 0	(5) 6 ± 3	(5) 1 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 3 ± 1	(5) 90 ± 4
10	(5) 35 ± 6	(5) 0 ± 0	(5) 9 ± 2	(5) 1 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 3 ± 1	(5) 88 ± 2
50	(5) 41 ± 11	(5) 0 ± 0	(5) 10 ± 6	(5) 1 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 2 ± 1	(5) 88 ± 6
250	(5) 38 ± 8	(5) 0 ± 0	(5) 7 ± 5	(5) 0 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 2 ± 1	(5) 90 ± 7

Parameter, mean $\pm$ S.D.
(), number of animals*, significantly different from control. $p < 0.05$
**, significantly different from control. $p < 0.01$

Table 5-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of EAQ 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) 796 ± 26	(5) 15.4 ± 0.3	(5) 45.7 ± 1.1	(5) 57.4 ± 1.2	(5) 19.3 ± 0.6	(5) 33.6 ± 0.5	(5) 2.7 ± 0.5	(5) 93.6 ± 13.6	(5) 16.3 ± 1.3	(5) 22.1 ± 1.6
250	(5) 755 ± 36	(5) 14.5* ± 0.6	(5) 42.9* ± 1.7	(5) 56.8 ± 1.1	(5) 19.3 ± 0.5	(5) 33.9 ± 0.4	(5) 4.2* ± 1.1	(5) 100.3 ± 7.6	(5) 19.0* ± 1.7	(5) 23.2 ± 1.3

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100/\text{mm}^3$)	Band neutrophil (%)	Segmented neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 100 ± 17	(5) 0 ± 0	(5) 8 ± 3	(5) 0 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 2 ± 2	(5) 89 ± 5
250	(5) 99 ± 22	(5) 0 ± 0	(5) 10 ± 5	(5) 0 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 2 ± 1	(5) 88 ± 4

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

Table 5-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of EAQ 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) 751 ± 43	(5) 14.9 ± 0.6	(5) 43.8 ± 1.7	(5) 58.3 ± 1.6	(5) 19.9 ± 0.6	(5) 34.1 ± 0.7	(5) 2.0 ± 0.3	(5) 90.8 ± 4.0	(5) 11.5 ± 0.4	(5) 16.7 ± 0.3
250	(5) 737 ± 22	(5) 14.9 ± 0.5	(5) 44.2 ± 1.3	(5) 59.9 ± 1.5	(5) 20.2 ± 0.4	(5) 33.6 ± 0.7	(5) 2.3 ± 0.2	(5) 95.5 ± 4.9	(5) 11.6 ± 0.8	(5) 18.0 ± 1.4

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100/\text{mm}^3$)	Band neutrophil (%)	Segmented neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 38 ± 10	(5) 0 ± 0	(5) 12 ± 6	(5) 0 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 3 ± 1	(5) 84 ± 7
250	(5) 55* ± 11	(5) 0 ± 0	(5) 9 ± 4	(5) 1 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 4 ± 1	(5) 86 ± 4

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

Table 6-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of EAQ 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)	Total bilirubin (mg/dL)
0	(5) 5.3 ±0.3	(5) 3.1 ±0.2	(5) 1.42 ±0.14	(5) 155 ±19	(5) 39 ±12	(5) 55 ±32	(5) 17 ±3	(5) 0.12 ±0.03	(5) 0.09 ±0.03
10	(5) 4.9* ±0.2	(5) 2.9 ±0.2	(5) 1.52 ±0.26	(5) 131 ±15	(5) 39 ±7	(5) 42 ±16	(5) 16 ±3	(5) 0.10 ±0.02	(5) 0.06 ±0.03
50	(5) 5.2 ±0.2	(5) 3.1 ±0.2	(5) 1.49 ±0.16	(5) 150 ±20	(5) 44 ±11	(5) 36 ±3	(5) 15 ±2	(5) 0.15 ±0.06	(5) 0.08 ±0.02
250	(5) 5.4 ±0.1	(5) 3.4* ±0.1	(5) 1.78 ±0.24	(5) 137 ±9	(5) 38 ±6	(5) 29* ±5	(5) 16 ±2	(5) 0.14 ±0.03	(5) 0.09 ±0.03

Dose (mg/kg)	Inorg. phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ-GTP (U/L)
0	(5) 7.7 ±0.3	(5) 8.7 ±0.3	(5) 144.8 ±0.7	(5) 3.97 ±0.27	(5) 104.8 ±1.5	(5) 391 ±103	(5) 35 ±11	(5) 65 ±18	(5) 0 ±0
10	(5) 7.6 ±0.6	(5) 8.6 ±0.2	(5) 145.4 ±1.3	(5) 3.88 ±0.20	(5) 107.1 ±1.5	(5) 352 ±68	(5) 30 ±2	(5) 71 ±8	(5) 0 ±1
50	(5) 7.5 ±0.9	(5) 8.7 ±0.2	(5) 145.4 ±0.9	(5) 3.93 ±0.24	(5) 105.4 ±1.4	(5) 339 ±67	(5) 31 ±5	(5) 73 ±6	(5) 0 ±1
250	(5) 7.6 ±0.2	(5) 8.8 ±0.3	(5) 145.4 ±0.8	(5) 4.15 ±0.31	(5) 105.6 ±0.6	(5) 355 ±39	(5) 32 ±8	(5) 72 ±10	(5) 1 ±0

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

*, significantly different from control, p<0.05

Table 6-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of EAQ 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)	Total bilirubin (mg/dL)
0	(5) 5.0 ±0.2	(5) 3.1 ±0.1	(5) 1.67 ±0.13	(5) 128 ±11	(5) 48 ±5	(5) 25 ±13	(5) 22 ±2	(5) 0.15 ±0.05	(5) 0.07 ±0.02
10	(5) 5.0 ±0.2	(5) 3.3 ±0.1	(5) 1.95 ±0.24	(5) 130 ±22	(5) 52 ±8	(5) 28 ±7	(5) 18 ±2	(5) 0.14 ±0.04	(5) 0.09 ±0.02
50	(5) 5.0 ±0.2	(5) 3.3 ±0.2	(5) 1.92 ±0.22	(5) 120 ±8	(5) 49 ±8	(5) 36 ±8	(5) 19 ±2	(5) 0.19 ±0.05	(5) 0.11* ±0.01
250	(5) 5.6** ±0.4	(5) 3.7** ±0.3	(5) 1.99 ±0.07	(5) 118 ±13	(5) 80* ±20	(5) 47** ±11	(5) 20 ±4	(5) 0.15 ±0.03	(5) 0.12** ±0.02

Dose (mg/kg)	Inorg. Phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ-GTP (U/L)
0	(5) 6.9 ±0.3	(5) 8.2 ±0.2	(5) 145.7 ±0.8	(5) 3.62 ±0.25	(5) 109.4 ±1.2	(5) 233 ±72	(5) 22 ±1	(5) 64 ±3	(5) 0 ±0
10	(5) 7.1 ±0.7	(5) 8.3 ±0.1	(5) 145.4 ±1.2	(5) 3.67 ±0.25	(5) 108.9 ±1.9	(5) 244 ±27	(5) 22 ±2	(5) 68 ±5	(5) 0 ±0
50	(5) 7.5 ±0.6	(5) 8.5* ±0.2	(5) 145.0 ±0.6	(5) 3.84 ±0.33	(5) 108.4 ±1.3	(5) 235 ±41	(5) 21 ±2	(5) 63 ±6	(5) 0 ±0
250	(5) 7.4 ±0.6	(5) 8.7** ±0.2	(5) 145.1 ±1.3	(5) 4.16 ±0.38	(5) 106.0** ±1.3	(5) 602 ±822	(5) 25 ±7	(5) 67 ±26	(5) 1 ±1

Parameter, mean±S.D.
(), number of animals*, significantly different from control, p<0.05
**, significantly different from control, p<0.01

Table 6-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of EAQ 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)	Total bilirubin (mg/dL)
0	(5) 5.3 ±0.2	(5) 3.1 ±0.1	(5) 1.39 ±0.15	(5) 176 ±24	(5) 39 ±12	(5) 46 ±19	(5) 18 ±2	(5) 0.12 ±0.01	(5) 0.08 ±0.02
250	(5) 5.7 ±0.2	(5) 3.2 ±0.1	(5) 1.27 ±0.05	(5) 174 ±24	(5) 45 ±3	(5) 58 ±31	(5) 17 ±1	(5) 0.15 ±0.04	(5) 0.10 ±0.02

Dose (mg/kg)	Inorg. phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ-GTP (U/L)
0	(5) 7.1 ±0.4	(5) 8.6 ±0.4	(5) 144.2 ±0.7	(5) 3.72 ±0.19	(5) 104.6 ±1.4	(5) 316 ±32	(5) 33 ±2	(5) 70 ±10	(5) 1 ±1
250	(5) 7.1 ±0.3	(5) 8.7 ±0.2	(5) 144.2 ±1.3	(5) 3.79 ±0.25	(5) 104.5 ±2.1	(5) 318 ±19	(5) 33 ±3	(5) 68 ±5	(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 EAQ 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)	Total bilirubin (mg/dL)
0	(5) 5.6 ±0.3	(5) 3.4 ±0.1	(5) 1.59 ±0.12	(5) 147 ±9	(5) 52 ±10	(5) 32 ±5	(5) 19 ±3	(5) 0.17 ±0.10	(5) 0.11 ±0.03
250	(5) 5.8 ±0.4	(5) 3.3 ±0.2	(5) 1.32** ±0.08	(5) 134 ±14	(5) 59 ±10	(5) 35 ±17	(5) 19 ±2	(5) 0.11 ±0.02	(5) 0.08 ±0.02

Dose (mg/kg)	Inorg. phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ-GTP (U/L)
0	(5) 5.3 ±0.6	(5) 8.7 ±0.2	(5) 144.2 ±0.8	(5) 3.76 ±0.12	(5) 109.4 ±1.0	(5) 165 ±26	(5) 26 ±6	(5) 65 ±4	(5) 1 ±1
250	(5) 5.7 ±0.4	(5) 8.5 ±0.2	(5) 145.0 ±1.3	(5) 3.56 ±0.17	(5) 108.1 ±1.7	(5) 168 ±35	(5) 27 ±5	(5) 59 ±9	(5) 0 ±1

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

**, significantly different from control, p<0.01

Table 7-1-1

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

Absolute organ weights in males at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg)	Thymus (mg)	Heart (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Adrenal glands (mg)	Testes (mg)	Epididymides (mg)
0	351.6 ±47.5 (5)	1855.2 ±64.9 (5)	478.6 ±74.7 (5)	1087.9 ±80.0 (5)	11050.2 ±1999.7 (5)	2583.1 ±227.0 (5)	739.0 ±187.7 (5)	52.8 ±6.0 (5)	2846.3 ±357.7 (5)	735.0 ±86.4 (5)
10	329.9 ±39.0 (5)	1894.2 ±78.7 (5)	537.5 ±65.9 (5)	1048.4 ±136.7 (5)	10297.4 ±1575.5 (5)	2580.4 ±323.6 (5)	742.7 ±108.3 (5)	53.3 ±8.9 (5)	3047.1 ±169.1 (5)	762.7 ±57.1 (5)
50	338.0 ±29.5 (5)	1905.8 ±35.3 (5)	576.5 ±43.9 (5)	1126.8 ±57.7 (5)	11911.9 ±1670.1 (5)	2601.0 ±405.2 (5)	825.3 ±231.4 (5)	51.0 ±11.9 (5)	3183.1 ±180.9 (5)	728.9 ±44.5 (5)
250	336.9 ±15.6 (5)	1951.5 ±121.0 (5)	539.9 ±112.0 (5)	1141.3 ±84.7 (5)	16708.6** ±1770.6 (5)	2937.3 ±324.6 (5)	805.7 ±198.9 (5)	50.7 ±3.7 (5)	3077.5 ±191.3 (5)	704.6 ±48.1 (5)

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

**, significantly different from control, p<0.01

Table 7-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of EAQ 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) 217.1 ±14.0	(5) 1762.7 ±70.4	(5) 526.7 ±94.4	(5) 727.3 ±54.5	(5) 6501.7 ±350.0	(5) 1662.8 ±125.6	(5) 522.3 ±49.4	(5) 64.7 ±7.4	(5) 88.1 ±6.0
10	(5) 215.4 ±18.0	(5) 1780.1 ±77.4	(5) 399.6 ±43.7	(5) 721.7 ±61.5	(5) 6556.2 ±561.2	(5) 1686.5 ±180.5	(5) 495.8 ±87.9	(5) 64.7 ±7.2	(5) 85.5 ±17.2
50	(5) 214.1 ±6.9	(5) 1803.3 ±31.4	(5) 455.0 ±101.2	(5) 739.6 ±12.5	(5) 6941.5 ±376.1	(5) 1701.5 ±107.6	(5) 530.0 ±66.2	(5) 57.0 ±6.8	(5) 81.6 ±9.6
250	(5) 203.6 ±10.0	(5) 1741.7 ±38.6	(5) 414.4 ±71.9	(5) 747.6 ±46.4	(5) 10784.4** ±735.5	(5) 1712.9 ±102.0	(5) 656.9* ±94.8	(5) 60.9 ±7.7	(5) 78.6 ±9.8

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

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

Table 7-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of EAQ 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) 408.6 ±50.1	(5) 1965.3 ±71.6	(5) 479.9 ±70.4	(5) 1226.7 ±99.7	(5) 11956.0 ±1816.9	(5) 2968.3 ±243.9	(5) 781.1 ±112.1	(5) 56.1 ±8.3	(5) 3220.0 ±318.3	(5) 1016.4 ±116.2
250	(5) 410.2 ±40.7	(5) 1936.8 ±94.3	(5) 507.0 ±52.9	(5) 1267.6 ±78.9	(5) 14297.5 ±2865.2	(5) 3021.1 ±275.9	(5) 932.5 ±124.1	(5) 54.1 ±4.9	(5) 3291.9 ±206.5	(5) 1007.2 ±64.8

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 EA2 in rats

Absolute organ weights in females 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)	Ovaries (mg)
0	(5) 241.8 ±16.9	(5) 1779.6 ±45.4	(5) 385.1 ±120.1	(5) 781.6 ±68.7	(5) 6770.3 ±454.4	(5) 1774.0 ±90.4	(5) 526.1 ±69.0	(5) 68.2 ±8.0	(5) 95.4 ±32.8
250	(5) 235.4 ±12.5	(5) 1816.9 ±66.1	(5) 401.7 ±87.7	(5) 786.6 ±46.6	(5) 7509.1 ±806.2	(5) 1824.1 ±89.9	(5) 598.4 ±84.1	(5) 58.3 ±5.5	(5) 101.8 ±17.7

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 EAQ 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) 351.6 ±47.5	(5) 5.371 ±0.917	(5) 1.360 ±0.074	(5) 3.125 ±0.332	(5) 31.437 ±3.690	(5) 7.399 ±0.607	(5) 2.081 ±0.317	(5) 0.152 ±0.026	(5) 8.148 ±0.951	(5) 2.107 ±0.258
10	(5) 329.9 ±39.0	(5) 5.787 ±0.492	(5) 1.640 ±0.211	(5) 3.175 ±0.080	(5) 31.149 ±1.702	(5) 7.818 ±0.097	(5) 2.258 ±0.268	(5) 0.161 ±0.019	(5) 9.300 ±0.720	(5) 2.334 ±0.280
50	(5) 338.0 ±29.5	(5) 5.673 ±0.505	(5) 1.719 ±0.223	(5) 3.346 ±0.218	(5) 35.145 ±2.300	(5) 7.664 ±0.593	(5) 2.422 ±0.510	(5) 0.150 ±0.026	(5) 9.461 ±0.784	(5) 2.164 ±0.139
250	(5) 336.9 ±15.6	(5) 5.792 ±0.238	(5) 1.601 ±0.312	(5) 3.384 ±0.119	(5) 49.482** ±2.999	(5) 8.706** ±0.695	(5) 2.384 ±0.525	(5) 0.151 ±0.013	(5) 9.136 ±0.455	(5) 2.091 ±0.103

Parameter, mean±S.D.
(), number of animals**, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 8-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of EAQ 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) 217.1 ±14.0	(5) 8.137 ±0.455	(5) 2.414 ±0.299	(5) 3.351 ±0.172	(5) 29.985 ±1.372	(5) 7.669 ±0.533	(5) 2.411 ±0.244	(5) 0.299 ±0.033	(5) 0.407 ±0.031
10	(5) 215.4 ±18.0	(5) 8.301 ±0.636	(5) 1.854 ±0.117	(5) 3.361 ±0.321	(5) 30.508 ±2.430	(5) 7.822 ±0.333	(5) 2.297 ±0.324	(5) 0.303 ±0.049	(5) 0.395 ±0.051
50	(5) 214.1 ±6.9	(5) 8.429 ±0.215	(5) 2.131 ±0.499	(5) 3.459 ±0.144	(5) 32.428 ±1.389	(5) 7.944 ±0.309	(5) 2.473 ±0.266	(5) 0.266 ±0.030	(5) 0.381 ±0.039
250	(5) 203.6 ±10.0	(5) 8.568 ±0.433	(5) 2.028 ±0.297	(5) 3.673 ±0.200	(5) 53.079** ±4.834	(5) 8.416 ±0.411	(5) 3.222** ±0.401	(5) 0.301 ±0.051	(5) 0.386 ±0.042

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 EAQ in rats

Relative organ weights in males at the end of recovery period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg/g)	Thymus (mg/g)	Heart (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Spleen (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Testes (mg/g)	Epididymides (mg/g)
0	(5) 408.6 ±50.1	(5) 4.884 ±0.758	(5) 1.203 ±0.308	(5) 3.021 ±0.251	(5) 29.197 ±1.608	(5) 7.310 ±0.606	(5) 1.931 ±0.319	(5) 0.137 ±0.014	(5) 7.910 ±0.460	(5) 2.507 ±0.315
250	(5) 410.2 ±40.7	(5) 4.743 ±0.318	(5) 1.238 ±0.093	(5) 3.104 ±0.245	(5) 34.607* ±3.438	(5) 7.385 ±0.583	(5) 2.281 ±0.303	(5) 0.133 ±0.020	(5) 8.063 ±0.664	(5) 2.470 ±0.244

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

*, significantly different from control, p<0.05

Table 8-2-2

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

Relative organ weights in females at the end of recovery period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg/g)	Thymus (mg/g)	Heart (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Spleen (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Ovaries (mg/g)
0	(5) 241.8 ±16.9	(5) 7.384 ±0.453	(5) 1.574 ±0.412	(5) 3.229 ±0.079	(5) 28.017 ±0.910	(5) 7.352 ±0.386	(5) 2.169 ±0.152	(5) 0.284 ±0.042	(5) 0.395 ±0.133
250	(5) 235.4 ±12.5	(5) 7.723 ±0.151	(5) 1.697 ±0.308	(5) 3.344 ±0.173	(5) 31.857* ±2.373	(5) 7.758 ±0.409	(5) 2.545 ±0.347	(5) 0.249 ±0.033	(5) 0.436 ±0.099

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

Table 9-1-1

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

Macroscopical findings in males at the end of dosing period

Dose	0 mg/kg		10 mg/kg		50 mg/kg		250 mg/kg	
Grade	-	+	-	+	-	+	-	+
(Liver)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Enlargement	5	0	5	0	5	0	0	5
Dark color	5	0	5	0	5	0	2	3
(Kidney)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Dilatation, pelvis, unilateral	5	0	5	0	4	1	5	0
Enlargement	5	0	5	0	5	0	4	1

-, negative; +, positive.

[], number of animals examined.

Table 9-1-2

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

Macroscopical findings in females at the end of dosing period

Dose Grade	0 mg/kg		10 mg/kg		50 mg/kg		250 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Liver)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Enlargement	5	0	5	0	5	0	0	5
Dark color	5	0	5	0	5	0	1	4
(Stomach)	[5]		[5]		[5]		[5]	
Spot, black, mucosa, glandular stomach	5	0	5	0	5	0	4	1

-, negative; +, positive.

[], number of animals examined.

Table 9-2-1

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

Macroscopical findings in males at the end of recovery period

Dose Grade	0 mg/kg		250 mg/kg	
	-	+	-	+
(Liver)	[5]		[5]	
Enlargement	5	0	4	1
(Kidney)	[5]		[5]	
Dilatation, pelvis, unilateral	5	0	4	1

-, 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 EAQ in rats

Histological findings in males at the end of dosing period

Dose	0 mg/kg						10 mg/kg						50 mg/kg						250 mg/kg						
Grade	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	
(Liver)	[5]						[5]						[5]						[5]						
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5 ##
Fatty change, periportal	1	3	1	0	0	4	0	4	1	0	0	5	3	2	0	0	0	2	5	0	0	0	0	0	0 #
Anisonucleosis, hepatocyte	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5 ##
(Spleen)	[5]						[5]						[5]						[5]						
Deposit, hemosiderin	4	1	0	0	0	1	1	4	0	0	0	4	2	2	1	0	0	3	0	0	3	2	0	0	5 #
Hematopoiesis, extramedullary	0	1	3	1	0	5	0	2	3	0	0	5	0	0	2	3	0	5	0	0	0	5	0	0	5
Congestion	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	2
(Kidney)	[5]												[1]						[5]						
Eosinophilic body, proximal tubule	3	2	0	0	0	2							1	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	0	1
Cyst, cortex	5	0	0	0	0	0							1	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	0	1
Basophilic tubule	0	5	0	0	0	5							0	1	0	0	0	1	0	5	0	0	0	0	5
Cast, proteinous	4	1	0	0	0	1							1	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0	3
Cellular infiltration, lymphocyte	1	3	1	0	0	4							0	1	0	0	0	1	0	5	0	0	0	0	5
Dilatation, renal pelvis	5	0	0	0	0	0							0	0	1	0	0	1	5	0	0	0	0	0	0
(Heart)	[5]																		[5]						
Myocardial degeneration / fibrosis	4	1	0	0	0	1													4	1	0	0	0	0	1
(Stomach)	[5]																		[5]						
No abnormalities																									
(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.

**, significantly different from control, $p < 0.01$ (Two-tailed Mann-Whitney U test).##, significantly different from control, $p < 0.01$ (One-tailed Fisher exact test).#, significantly different from control, $p < 0.05$ (One-tailed Fisher exact test).

Table 10-1-2

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

Histological findings in females at the end of dosing period

Dose	0 mg/kg						10 mg/kg						50 mg/kg						250 mg/kg					
Grade	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Liver)	[5]						[5]						[5]						[5]					
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	3	0	0	2	3	0	** 5 ##
Fatty change, periportal	0	4	1	0	0	5	0	4	1	0	0	5	0	5	0	0	0	5	5	0	0	0	0	0** 0 ##
Anisonucleosis	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	3
(Spleen)	[5]						[5]						[5]						[5]					
Deposit, hemosiderin	0	0	5	0	0	5	0	1	4	0	0	5	0	0	4	1	0	5	0	0	0	5	0	** 5
Hematopoiesis, extramedullary	0	5	0	0	0	5	0	3	2	0	0	5	0	3	2	0	0	5	0	0	0	5	0	** 5
Congestion	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	0	0	5	0	0	** 5 ##
(Kidney)	[5]																		[5]					
Basophilic tubule	3	2	0	0	0	2													3	2	0	0	0	2
Cast, proteinous	5	0	0	0	0	0													4	1	0	0	0	1
Cellular infiltration, lymphocyte	3	2	0	0	0	2													3	2	0	0	0	2
Mineralization, cortico-medullary junction	5	0	0	0	0	0													4	1	0	0	0	1
(Adrenal gland)	[5]																		[5]					
No abnormalities																								
(Stomach)	[5]																		[5]					
No abnormalities																								
(Heart)	[5]																		[5]					
No abnormalities																								
(Ovary)	[5]																		[5]					
No abnormalities																								

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

[], number of animals examined.

**, significantly different from control, $p < 0.01$ (Two-tailed Mann-Whitney U test).##, significantly different from control, $p < 0.01$ (One-tailed Fisher exact test).

Table 10-2-1

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

Histological findings in males at the end of recovery period

Dose	0 mg/kg							250 mg/kg						
Grade	-	±	+	++	+++	Pos.		-	±	+	++	+++	Pos.	
(Liver)	[5]							[5]						
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	5	0	0	0	0	0		3	1	1	0	0	2	
Fatty change, periportal	0	5	0	0	0	5		0	5	0	0	0	5	
(Spleen)	[5]							[5]						
Deposit, hemosiderin	0	1	4	0	0	5		0	0	0	5	0 **	5	
Hematopoiesis, extramedullary	0	1	4	0	0	5		0	0	0	5	0 **	5	
Congestion	5	0	0	0	0	0		0	5	0	0	0 **	5 ##	

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

[], number of animals examined.

**, significantly different from control, $p < 0.01$ (Two-tailed Mann-Whitney U test).##, significantly different from control, $p < 0.01$ (One-tailed Fisher exact test).

Table 10-2-2

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

Histological findings in females at the end of recovery period

Dose Grade	0 mg/kg						250 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Liver)	[5]						[5]					
Fatty change, periportal	0	5	0	0	0	5	0	3	2	0	0	5
(Spleen)	[5]						[5]					
Deposit, hemosiderin	0	0	5	0	0	5	0	0	1	4	0	5
Hematopoiesis, extramedullary	0	5	0	0	0	5	0	3	2	0	0	5
Congestion	5	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	3

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

[], number of animals examined.