

食薬セ研第11-1740号

2001年 8月14日

オ-トルエンスルホンアミドの
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	10
1. 死亡例	10
2. 一般状態	10
3. 体重	10
4. 摂餌量	10
5. 尿検査所見	11
6. 血液学検査所見	11
7. 血液生化学検査所見	11
8. 病理学検査所見	11
考 察	13
文 献	15

Figures 1～2

Tables 1～10

【要 約】

o-トルエンスルホンアミド（以下 TSAと略記）の28日間反復経口投与毒性試験（回復14日間）を雌雄の Sprague-Dawley 系ラットを用いて実施した。雌雄とも4群構成とし、1群には媒体である 0.5 % CMC Na 水溶液を、他の3群には被験物質を、それぞれ4、20および 100 mg/kg の用量で28日間にわたり強制経口投与した。動物数は、雌雄とも対照群および 100 mg/kg 投与群では回復試験を行う動物も含め各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。

投与期間および回復試験期間中に死亡例はなく、一般状態の変化としては、100 mg/kg 投与群の雌雄で、投与第2週から投与期間を通して投与後15分以降に流涎が観察され、活動性が低下した。さらに同群の雄1例で腹臥位姿勢も観察された。

病理組織学検査では、投与期間および回復試験期間終了時剖検例ともに、100 mg/kg 投与群の雄で尿細管上皮の eosinophilic bodyが増加する傾向にあったが、これ以外に被験物質投与に起因したと考えられる変化はなかった。

この他、100 mg/kg 投与群では、雄において、回復試験期間終了時の検査で脾臓重量の増加、赤血球数の減少、平均赤血球容積および平均赤血球血色素量の増加が有意な変化となり、雌において、投与期間終了週の尿検査でpHが高い傾向にあったが、被験物質投与に起因した変化であるか否かは明らかではなかった。

以上のことから、TSA を反復投与することにより、100 mg/kg の用量では雌雄で、投与後に流涎および活動性の低下が観察され、同群の雄で尿細管上皮の eosinophilic bodyの増加が認められることが明らかとなった。従って、本試験条件下における TSAの無作用量は、雌雄とも 20 mg/kg/day であると考えられる。

o-トルエンスルホンアミド（以下 TSAと略記）は、人口甘味料であるサッカリンを Remsen-Fahlberg 工程で製造したときに生じる主要な不純物の一つである¹⁾。サッカリンを *in utero* で曝露したラットに、出生後も暴露を続けると膀胱癌が誘発された^{2, 3)} ことから、食品へのサッカリン添加禁止が世界保健機構によって勧告された。TSA はサッカリンに多量に混入していたために膀胱癌の原因物質であることが疑われたが、サッカリンとその不純物に関する多くの実験が行われた結果、ラットに純粋なサッカリンを暴露しても膀胱癌が誘発されることが判明し⁴⁾、また、TSA は尿をアルカリ性にして結石の形成を促進する⁵⁾ ものの膀胱癌を誘発する可能性は低いことが明らかとなった。

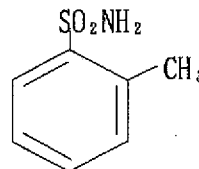
TSA の毒性については、このように膀胱癌誘発性を中心にいくつかの検討がなされてきた²⁻⁵⁾。OECD 既存化学物質安全点検事業の一環としては、「o-トルエンスルホンアミドのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験⁶⁾」が実施されており、TSA の毒性は比較的投与初期に強く表れ、反復投与毒性としての無作用量は、雄で 20 mg/kg/day を下回る量、雌で 20 mg/kg/day であり、生殖発生毒性としての無作用量は親動物で雌雄とも 500 mg/kg/day、出生児では 100 mg/kg/day であったと報告している。さらに、当試験⁶⁾ では 500 mg/kg の投与で、血漿中のブドウ糖濃度、トリグリセライド濃度およびアルカリフォスファターゼ活性の低下ならびに総コレステロール濃度の増加が認められ、これらの変化を被験物質の甲状腺および膵臓に対する影響によるものと考察しており、文献検索の結果から、甲状腺におけるホルモン合成阻害に伴う甲状腺機能低下の可能性が示唆されたとしている。しかし、当試験⁶⁾ の開始時には、このような情報が得られていなかったため、甲状腺や膵臓の病理組織学検査は一部の動物について行われたに過ぎない。そこで今回、TSA の安全性を確認するために、同じ 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、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日改訂、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、*o*-トルエンスルホンアミド（英名 *o*-toluenesulfonamide、以下 TSA と略記）を用いた。本被験物質は、別名を 2-methylbenzenesulfonamide と称し、CAS No. 88-19-7、分子量 171.22、分子式 $C_7H_9NO_2S$ 、融点 $156.7^{\circ}C$ で、比較的安定な物質である。TSA の構造式を以下に示す。



本試験には、より提供された純度 99.95 wt%、ロット番号の白色結晶性粉末を用いた。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。なお、試験期間中の被験物質の安定性は、提供者が、提供前および返却後（試験終了後）の被験物質について、品質試験を実施することにより確認した（Appendix E）。

2. 使用動物および飼育方法

生後 4 週で購入した雌雄の Sprague-Dawley 系ラット [Crj:CD(SD) IGS、SPF、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター]（注 1）を検疫と馴化を兼ねて 8 日間にわたり予備飼育した後、一般状態に異常の認められなかった雌雄各 30 匹を試験に供した（注 2）。動物は、全飼育期間を通じて、基準温度 $22\sim 25^{\circ}C$ 、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（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、基準値を外れることはあったものの、1 時間以内に基準値の範囲内に回復した（注 3）。また、供給した飼料および水

（注 1）

動物購入日：2000 年 2 月 28 日

入荷匹数：雄 34 匹 雌 34 匹

入荷時体重：雄 67.7～76.1 g（平均 71.8 g） 雌 60.2～71.4 g（平均 65.2 g）

（注 2）

投与開始日：2000 年 3 月 7 日

投与開始時体重：雄 135.1～152.9 g（平均 144.1 g） 雌 114.1～136.6 g（平均 124.8 g）

（注 3）

動物飼育期間中の温湿度の実測値 温度 $23.5\sim 24.0^{\circ}C$ 湿度 48.0～83.5 %

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、各濃度毎に秤量した被験物質に、所定濃度となるよう媒体を加えて攪拌し、懸濁することにより調製した。媒体としては、カルボキシメチルセルロースナトリウム（日本薬局方カルメロースナトリウム、製造 丸石製薬株式会社、ロット番号 6Z09、以下、CMC Na と略記）を 0.5 w/v% の濃度となるように、注射用水（製造 光製薬株式会社、製造番号 9707SA ）に溶解したものをを用いた。

なお、秦野研究所で先に実施した試験（試験計画番号 A-97-029 、被験物質ロット番号 GC01）において、0.1 および 20 w/v%の調製検体は、冷蔵気密条件下で 8 日間安定であることが確認されており、0.08 w/v%の調製検体についても本試験にて同条件下での安定性が確認されたため（Appendix A）、調製頻度は週 1 回以上とし、調製後の投与検体は使用時まで気密、冷蔵の条件で保管した。この他、秦野研究所にて、初回に調製した各濃度の投与検体の含量測定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 95.8 ～ 100 %であり、また、均一性も良好であることが確認された（Appendix BおよびC、分析方法についてはAppendix D）。

4. 群および群分け

本試験の投与量は、先に実施された反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験（試験計画番号 R-97-011 、投与量：0、20、100 および 500 mg/kg）⁶⁾の結果に基づき決定した。すなわち、TSA を雄で42日間、雌で交配前 2 週間、妊娠期間および分娩後 3 日間反復投与することにより、雄ではすべての被験物質投与群において、腎臓の eosinophilic body形成が増強され、アルカリフォスファターゼ活性が低下した。雌では、100 mg/kg 以上を投与することにより、自発運動の低下など一般状態の悪化が認められ、体重増加および摂餌量が抑制され、肝臓の相対重量が増加して小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。また、500 mg/kg 投与群では、13例中 5 例が死亡ないし瀕死状態による切迫屠殺となった。以上のことから、明らかな毒性変化が認められた 100 mg/kg を本試験の最高用量とし、20

mg/kg の用量でも変化が認められたため、以下公比 5 で除して 20 および 4 mg/kg を中および低用量とした。また、雌雄とも媒体である 0.5 % CMC Na 水溶液を投与する対照群を設け、回復試験を行う対照群および 100 mg/kg 投与群は各10匹、その他の群は各 5 匹の動物を使用した。

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

	投与物質	投与量 (mg/kg)	被験物質濃度 (w/v%)	投与容量 ⁽¹⁾ (mL/kg)	動物番号		剖検時期
					雄	雌	
対 照 群	0.5%CMC Na 水溶液	0	0	5	1～5	31～35	回復 投与
					6～10	36～40	
低用量群	TSA	4	0.08	5	11～15	41～45	投与
中用量群	TSA	20	0.40	5	16～20	46～50	投与
高用量群	TSA	100	2.00	5	21～25	51～55	回復 投与
					26～30	56～60	

(1)雌雄とも最近時の体重をもとに個体別に投与液量 (mL) を算出した。

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

投与：投与期間終了時に定期解剖を行った。

5. 投与方法

投与経路は、化審法ガイドラインに従い経口とした。投与時刻は 9 時から12時の間とし、1 日 1 回、28日間計28回、ラット用胃管を用いて強制経口投与した。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頻度で測定した。体重は、投与第 1 週には投与第 1 日の投与直前と投与第 4 日、投与第 2 週以降の投与期間および回復試験期間中は 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、以下の項目について検査した。ただし試験紙による検査、沈渣および色調・混濁度は4時間あるいは新鮮尿で、その他の項目は約24時間の蓄尿で検査した。

項 目	測 定 法	使 用 機 器
尿量	計 量	天秤
比重	重量法	天秤
色調・混濁度	視 診	—
pH・潜血・蛋白・糖・ケトン体	試験紙法	クリテック 200+ (バイエル・三共)
ウリノーゲン・ビリルビン	同上	同上
沈渣	鏡 検	光学顕微鏡

3) 血液学検査

投与期間終了時および回復試験期間終了時に解剖を行った動物（以下、定期解剖例と記す）全例を、採血前（屠殺剖検前）に18～24時間絶食させた。その後、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で、腹部後大静脈から抗凝固剤として EDTA-3Kを用いて採血し、以下の項目について検査した。ただし、プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間の測定には、上記の採血に先立って、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で、腹部後大静脈から抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムを用いて採取した血液を遠心分離し、得られた血漿を用いた。

項 目	測 定 法	使 用 機 器
赤血球数 (RBC)	自動（電気抵抗法）	血液自動分析装置 CELL-DYN3500SL (ダイバット)
白血球数 (WBC)	同上（フローサイトメリー・レーザー光散乱法/ 電気抵抗法）	同上
白血球分類	同上（フローサイトメリー・レーザー光散乱法 ^{a)} ）	同上
血色素量 (Hb)	同上（吸光度法）	同上
平均赤血球容積 (MCV)	同上（電気抵抗法）	同上
血小板数	同上（電気抵抗法）	同上
ハマトクリット値 (Ht)	計算 ($RBC \times MCV \times 0.001$)	同上
平均赤血球血色素量 (MCH)	計算 ($Hb \times 1000 / RBC$)	同上
平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	計算 ($Hb \times 100 / Ht$)	同上
網状赤血球比率 ^{b)}	Brecher 法	光学顕微鏡
プロトロンビン時間 (PT)	光散乱検出法	全自動血液凝固測定装置 CA-1000 (東亜医用電子)
活性部分トロンボプラスチン時間 (APTT)	同上	同上

a) 白血球分類の検査の補助として静脈血塗抹標本 (Wright-Giemsa 染色) を作製したが、結果は採用しなかった。

b) 採血時に全例の網状赤血球標本作製したが、赤血球系の検査項目において被験物質投与に起因する可能性のある変化が認められなかったため、検査は実施しなかった。

4) 血液生化学検査

前述の採血に引き続き、同様の麻酔および採血部位の条件下で、ヘパリンを抗凝固剤として全例の血液を採取して遠心分離し、得られた血漿について以下の項目の検査を行った。また、ALP アイソザイムないし血清ホルモン濃度測定用に、この採血に先立ち、定期解剖例全例の腹部後大静脈から無処置乾燥注射筒を用いて採血し、血清を分離して-80℃下で凍結保存したが、ALP 活性において、被験物質投与に起因する可能性のある変化が認められず、また、被験物質投与による変化が甲状腺に生じている可能性も示唆されなかったため、検査は実施しなかった。

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
尿素窒素濃度 (BUN)	ウレアーゼ G.O. DH 法	同上
クレアチニン濃度	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
総ビリルビン濃度	Jendrassik/Grof 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。ただし、甲状腺は 0.1 M リン酸緩衝10%ホルマリン溶液中で24時間固定した後、気管から分離し、重量を測定した。

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、甲状腺、下垂体

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・組織および全例の病変部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*印を付した器官・組織および全例の病変部を組織学的に検査した。なお、本試験では、雌雄の脾臓ならびに投与期間終了時の対照群と高用量群の組織学検査で、被験物質投与との関連が疑われる変化が認められた雄の腎臓について、他の群でも組織学検査を実施した。また、肝臓の組織学検査において、曇り硝子様を呈する小葉中心性の肝細胞肥大が認められる場合には、ペルオキシゾームの特殊染色を施し、観察を行う計画であったが、このような所見が肝臓にみられなかったため、実施しなかった。

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、腔、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、半定量検査を除く尿検査ならびに定期解剖例の血液学検査、血液生化学検査の値および器官重量は、群ごとに平均値および標準偏差を求めた。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様性について検定（有意水準：5%）を行った。分散が一様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、分散が一様でない場合は、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。その他、尿の半定量的検査成績にいつては、 2×2 の分割表を用いる χ^2 検定を行った。ただし、周辺度数が 0 となった場合、検定は不可能であるため実施しなかった。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%）。

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)

100 mg/kg 投与群では、投与後、雄で投与第7日以降9例、雌で投与第9日以降10例全例に流涎が観察され、雄で投与第9日以降9例、雌で10日以降10例で活動性が低下した。これらの所見は、その後投与期間を通して認められたが、発現頻度が1回のみの例から連日認められた例までと個体差が大きかった。流涎は、雌雄とも投与後15分未満の観察時点では認められずに15分以上経過してから発現し、遅い場合でも投与後約2時間半には消失が確認された。活動性の低下は、雄で投与後15分以降、雌で投与後20分以降に現れ始め、いずれも最長でも投与後2時間10分には回復が確認された。さらに、100 mg/kg 投与群では、雄1例で腹臥位姿勢が観察され、この個体では投与第15日以降、投与期間を通して複数回確認され、投与後25分から投与後1時間25分の間に発現した。この他には回復試験期間も含めて各群とも一般状態の変化は観察されなかった。

3. 体重 (Fig. 1、Table 2、Appendix 2)

回復試験第4日の測定から第11日の測定にかけて、100 mg/kg 投与群の雌で、対照群と比較して有意な低値を示した。この他、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 投与群の雌で投与第3週に、雄で回復試験第1週に対照群と比較して有意に減少した。この他、観察期間中、被験物質投与群では、雌雄とも対照群との間に有意差は認められなかった。

5. 尿検査所見 (Table 4、Appendix 4)

投与第4週の検査では、100 mg/kg 投与群の雌でpHが高い傾向にあったが、雄では明瞭ではなかった。回復第2週の検査も含め、いずれの項目にも対照群と被験物質投与群の間

に有意差はなかった。

6. 血液学検査所見 (Table 5、Appendix 5)

投与期間終了時の検査では、いずれの項目においても対照群と被験物質投与群との間に有意な変化はなかった。

回復試験期間終了時の検査では、100 mg/kg 投与群の雄で、赤血球数が有意に減少し、平均赤血球容積および平均赤血球血色素量が有意に増加したが、このほかには雌雄各被験物質投与群とも対照群と比較して有意な変化はなかった。

7. 血液生化学検査所見 (Table 6、Appendix 6)

投与期間終了時の検査では、20 mg/kg 投与群の雄および 100 mg/kg 投与群の雌で尿素窒素濃度が有意に上昇したが、この他には、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差は認められなかった。

回復試験期間終了時の検査では、100 mg/kg 投与群の雄で尿素窒素濃度が有意に上昇し、クレアチニン濃度および GOT 活性が有意に低下した。同群の雌では、アルブミン濃度、総コレステロール濃度、トリグリセライド濃度およびカルシウム濃度が有意に低下した。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。なお、尿素窒素濃度以外の変化は、いずれも投与期間終了時には認められず、関連する検査項目にも変化はみられなかったことから、被験物質投与に起因した変化ではないと判断した。

8. 病理学検査所見

1) 器官重量 (Table 7, 8、Appendix 7, 8)

回復試験期間終了時の剖検で、100 mg/kg 投与群の雄の脾臓の相対重量が有意に増加した以外には、投与期間終了時および回復試験期間終了時剖検とも対照群と被験物質投与群との間に有意差はなかった。

2) 肉眼所見 (Table 9、Appendix 9)

(1) 投与期間終了時解剖例

精巣、精巣上体、精囊および前立腺の小型化が 4 mg/kg 投与群の雄 1 例でみられたが、この他に雌雄各群とも変化は観察されなかった。

(2)回復試験期間終了時解剖例

胸腺の小型化が 100 mg/kg 投与群の雄 1 例に観察された以外に雌雄各群とも変化は観察されなかった。

3) 組織学検査所見 (Table 10、Appendix 10)

(1)投与期間終了時解剖例

100 mg/kg 投与群の雄で尿細管上皮の eosinophilic bodyが増加する傾向にあったが (Photo 1、2)、統計学的な有意差はなかった。この他、いくつかの器官で変化が散見されたが、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ず、被験物質投与に起因した変化ではないと考えられた。なお、肉眼的に精巣等の小型化が観察された 4 mg/kg 投与群の雄 1 例は、精細管で精母細胞および精子細胞の変性がみられ、精巣上体管腔内の精子数が減少し、細胞残屑が認められたが、精嚢および前立腺に変化は見られなかった。今回認められた雄の生殖器および副生殖器の変化は、用量依存性のない変化であり、本被験物質の反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験⁶⁾において 500 mg/kg を42日間反復投与した場合にも同様の変化は表れなかったことから、偶発的な異常であると判断された。

(2)回復試験期間終了時解剖例

投与期間終了時同様、100 mg/kg 投与群の雄で尿細管上皮における eosinophilic bodyの増加傾向を認めたが、以上の他には雌雄ともいずれの所見も群間でその発生頻度および程度に差はみられなかった。なお、肉眼的に小型化がみられた 100 mg/kg 投与群の雄の胸腺は組織学的には変化はなく、投与期間終了時剖検例では同様の変化は認められていないことおよび関連する検査項目に変化がみられなかったことから、偶発的な異常であると判断した。

【考 察】

o-トルエンスルホンアミド（以下 TSAと略記）を、4、20 および 100 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。

100 mg/kg 投与群の雌雄で投与後15分を経過してから流涎および活動性の低下が観察され、雄では1例ではあるが腹臥位姿勢もみられた。流涎や活動性の低下、腹臥位姿勢は本被験物質の反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験⁶⁾においても認められており、被験物質投与に起因する変化であると考えられた。流涎は投与直後には観察されず、刺激性を有する物質を投与した場合にしばしば観察される消化管の変化⁷⁾も観察されなかったことから、被験物質の物理的影響によるものであるとは考え難い。作用発現時間から考察すると、流涎は被験物質による副交感神経刺激作用によるものである可能性も示唆されるが、一般的に副交感神経刺激時に流涎とともに観察されるとされている縮腫等の変化は観察されなかった。

腎臓に関する所見として、100 mg/kg 投与群の雄で近位尿細管上皮の eosinophilic body の増加、同群の雌で尿のpHの上昇が認められた。前者は、先の併合試験⁶⁾でも観察されていることから、被験物質投与に起因した変化であると考えられる。しかし、eosinophilic body は、近位尿細管上皮に取り込まれた α_{2u} -グロブリンが、近位尿細管中間部上皮細胞のリソソーム内に好酸性物質として観察される現象であるとされており⁸⁾、 α_{2u} -グロブリンは雄ラット固有の蛋白質であることから、今回の変化がヒトでの障害に直結するものではないと考えられる。100 mg/kg 投与群の雄では、回復試験期間終了時剖検例でも eosinophilic body が増加する傾向にあったことから、投与中止による回復性は明らかなものではなかった。TSA 投与により尿のアシドーシスが生じ、腎臓および膀胱において結石が形成されることが知られており、この結石形成を尿のアシドーシスを緩和する塩化アンモニウム併用により抑制することが報告されている⁹⁾。しかし、100 mg/kg 投与群の雌で認められた尿のpHの変化はアルカリに傾くものであったこと、また、アルカリ傾向の個体差が大きく、同一個体の回復試験終了週と投与期間終了週の結果を比較しても、変化が一定の方向を示さなかったことから、被験物質投与との関連は明らかではなかった。なお、投与期間終了時に 20 mg/kg 投与群の雄および 100 mg/kg 投与群の雌で、回復試験終了時には 100 mg/kg 投与群の雄で、それぞれ尿素窒素濃度が有意に上昇した

が、この変化はより高用量を長期間投与した先の併合試験⁶⁾では認められておらず、雄では用量依存性もなかったことから、被験物質投与に起因した変化ではないと判断した。

体重は 100 mg/kg 投与群の雌で回復期間中に低値を示したが、投与期間中には認められない変化であり、雄の体重には変化が認められないことから被験物質投与による影響とは考えられない。摂餌量は、100 mg/kg 投与群の雌で投与第 3 週に有意に減少したが、同時期の体重には影響はみられなかった。

この他、100 mg/kg 投与群の雄では、回復試験期間終了時の検査で、脾臓重量の増加、赤血球数の減少、平均赤血球容積および平均赤血球血色素量の増加が有意な変化となった。このうち平均赤血球血色素量の増加は、先の併合試験⁶⁾でも認められていることから、被験物質投与による影響であることを懸念し、貧血傾向と被験物質投与の関係について検討するため、本試験の雌雄全例について、脾臓の病理組織学検査を実施した。その結果、全例で髄外造血および褐色色素の沈着がみられたが、所見の程度に各群間で差は認められず、本試験、併合試験のいずれも、赤血球系の他の検査項目には変化がみとめられないことから、被験物質投与による変化ではないと判断した。

本試験の結果から、TSA を反復投与することにより、100 mg/kg の用量の雌雄で、投与後に流涎および活動性の低下が観察され、雄では尿細管上皮の eosinophilic bodyが増加することが明らかとなったことから、無作用量は雌雄とも 20 mg/kg/day であると推察される。

【文 献】

- 1) Stavric, B., Lacombe, R., By, A. W.: Isolation, identification, and quantification of *o*-toluenesulfonamide, a major impurity in commercial saccharins. J. Ass. Offic. Anal. Chem., 57: 678-681(1974)
- 2) Arnold, D. L., Charbonneau, S. M.: Long-term toxicity study with ortho-toluenesulfonamide and saccharin. Toxicol. Appl. Pharmacol., 41: 164(1977)
- 3) Tisdell, M. O., Nees, P. O., Harris, D. L., Derse, P. H.: Long-term feeding of saccharin in rats. Symposium: Sweeteners(G. E. Inglett, ed.), pp. 145-158. Avi Pub., Westport, Conn. (1974)
- 4) Arnold, D. L., Moodie, C. A., Grice, H. C., Charbonneau, S. M., Stavric, B., Collins, B. T., McGuire, P. F., Zawidzka, Z. Z., Munro, I. C.: Long-term toxicity study with orthotoluenesulfonamide and sodium saccharin in the rat. Toxicol. Appl. Pharmacol., 52: 113-152(1980)
- 5) Arnold, D. L., Moodie, C. A., McGuire, P. F., Collins, B. T., Charbonneau, S. M., Munro, I. C.: The effect of orthotoluenesulfonamide and sodium saccharin on the urinary tract of neonatal rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 51: 455-463(1979)
- 6) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修: 「化学物質毒性試験報告書 vol. 7」. 化学物質点検推進連絡協議会, 東京(1999), pp. 134-152
- 7) Glaister, J. R.: 「毒性病理学の基礎」. 高橋 道人 監訳. ソフトサイエンス社. 東京(1992)
- 8) Curtis D. K.: Toxic responses of the kidney in "Casarett and Doull's Toxicology-The basic science of poisons". McGraw Hill. New York(1996). pp. 417-442.

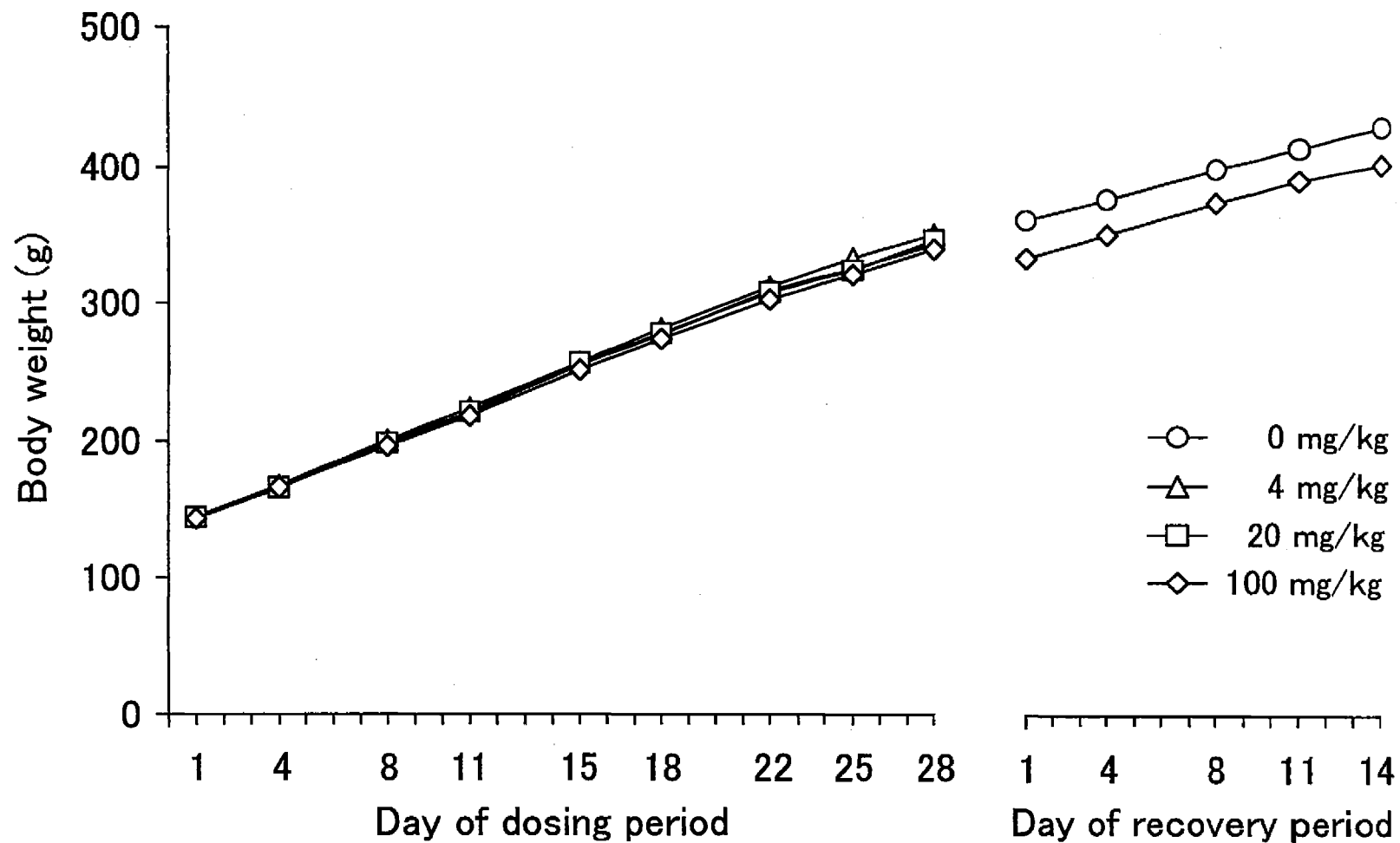


Fig. 1-1

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

Body weight changes in males

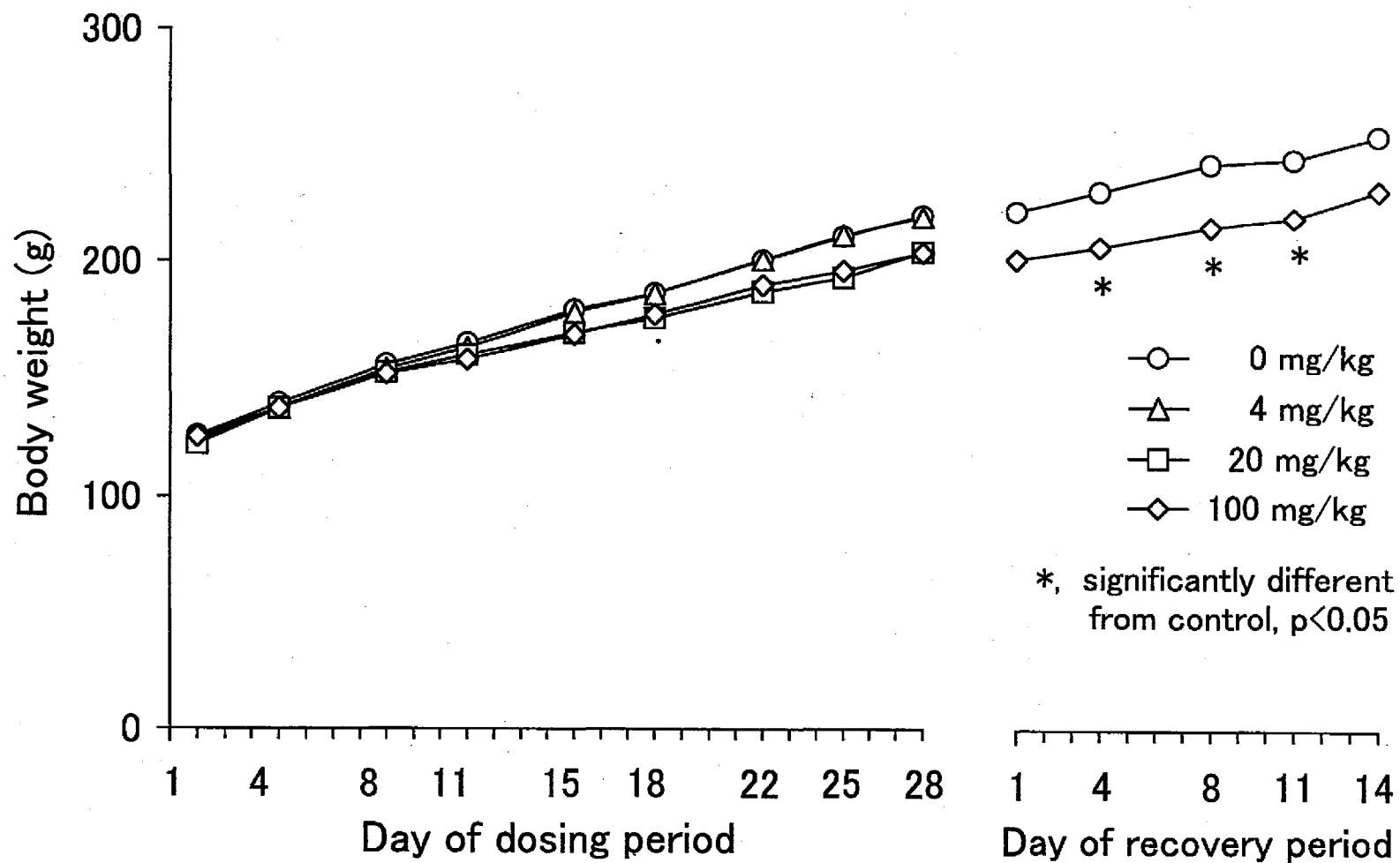


Fig. 1-2

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

Body weight changes in females

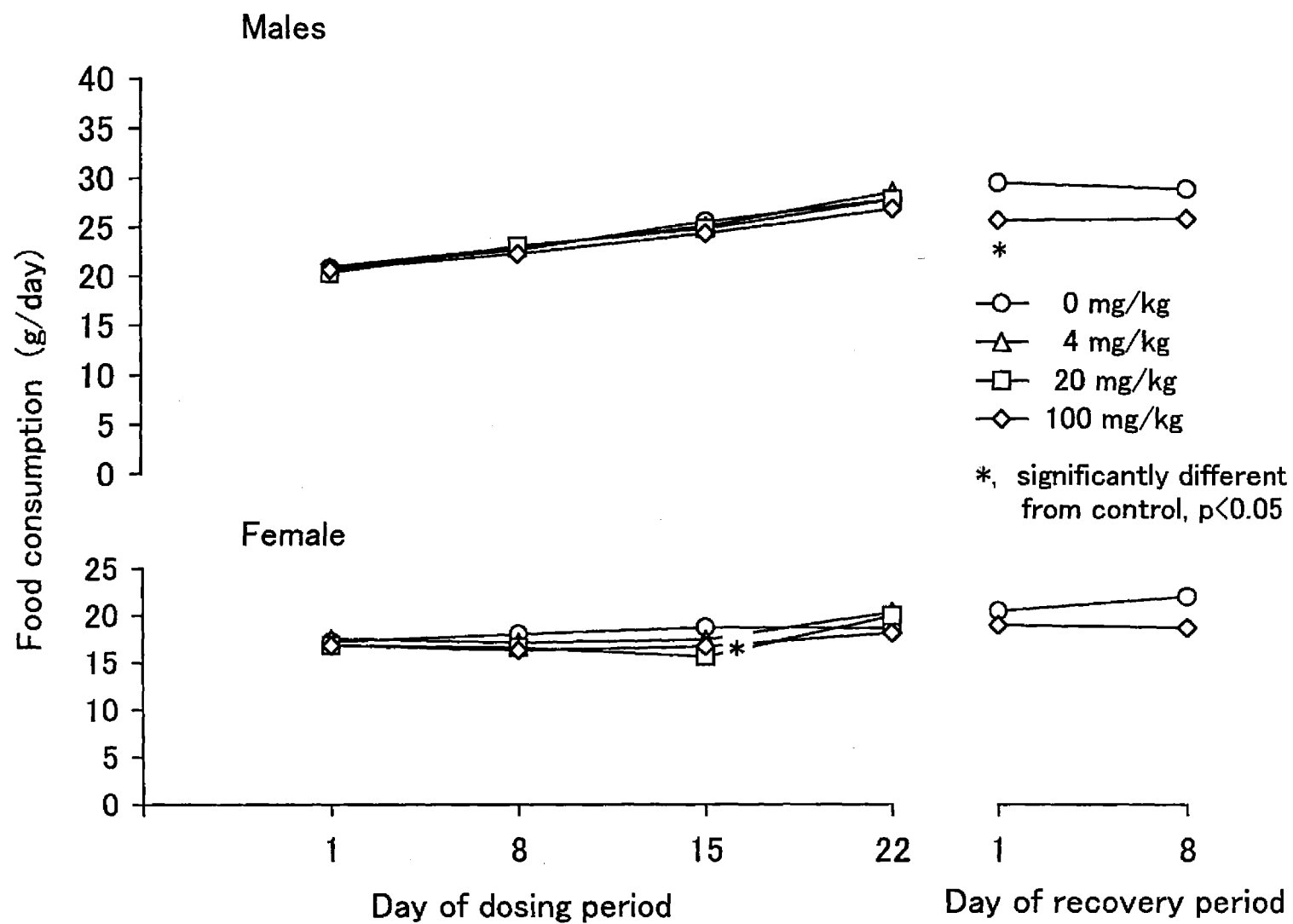


Fig. 2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of TSA 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 TSA 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)} 1 ~ 14	Total
			Day of dosing period																													
			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		
Salivation	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	20	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	100	10	-	-	-	-	-	-	1	1	1	4	7	4	2	1	5	8	7	6	7	5	6	9	6	8	7	7	7	7	-	9
Listless	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	20	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	100	10	-	-	-	-	-	-	-	-	2	7	6	2	2	1	7	7	4	6	3	2	5	5	2	3	2	2	3	1	-	9
Prone position	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	20	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	100	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	-	1	-	1	

Clinical signs in females

Clinical signs	Dose (mg/kg)	Initial number of animals	Number of animals with clinical signs																												-Day of recovery period ^{a)} 1 ~ 14	Total
			Day of dosing period																													
			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		
Salivation	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	20	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	100	10	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5	3	5	4	2	6	9	6	5	9	4	8	10	6	10	7	10	7	10	-	10
Listless	0	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	20	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	100	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	10	3	1	2	3	3	-	1	-	-	1	3	-	-	-	-	1	-	-	10

-, no animal showed the sign

a) recovery test was performed in 5 animals for each of the 0 and 100 mg/kg groups

Table 2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of TSA 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)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	143.9 ±5.4	165.8 ±9.2	197.6 ±12.2	220.2 ±14.0	255.1 ±17.1	277.2 ±18.1	309.3 ±21.3	325.5 ±22.6	342.9 ±25.0	359.5 ±27.2	374.8 ±28.8	396.5 ±32.7	411.7 ±34.3	426.5 ±37.4
4	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)					
	144.9 ±4.7	167.9 ±6.5	200.4 ±10.1	223.8 ±11.6	256.9 ±14.0	281.3 ±15.4	311.9 ±17.5	333.0 ±19.4	350.4 ±20.1					
20	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)					
	144.7 ±6.3	166.1 ±6.9	198.3 ±8.7	221.0 ±11.7	256.1 ±13.3	277.9 ±17.9	307.9 ±22.4	324.2 ±25.0	346.0 ±29.1					
100	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
	143.6 ±5.3	166.7 ±7.5	196.1 ±11.0	218.3 ±13.5	251.4 ±15.0	273.8 ±18.5	302.8 ±22.2	321.0 ±25.6	339.7 ±28.6	331.6 ±32.2	348.8 ±33.6	372.5 ±36.4	388.4 ±41.2	399.9 ±41.4

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 TSA 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) 125.7 ±5.6	(10) 139.3 ±6.2	(10) 155.9 ±7.7	(10) 165.2 ±9.7	(10) 179.3 ±11.9	(10) 186.1 ±11.6	(10) 200.6 ±14.4	(10) 210.9 ±12.9	(10) 220.0 ±12.1	(5) 221.0 ±15.2	(5) 229.6 ±17.4	(5) 241.3 ±19.4	(5) 243.2 ±19.5	(5) 253.2 ±24.8
4	(5) 123.9 ±8.2	(5) 137.7 ±8.7	(5) 153.9 ±9.0	(5) 163.4 ±6.7	(5) 178.1 ±7.2	(5) 186.3 ±8.6	(5) 200.8 ±10.0	(5) 211.2 ±13.6	(5) 219.3 ±14.1					
20	(5) 122.4 ±4.9	(5) 137.5 ±7.9	(5) 152.6 ±11.5	(5) 160.0 ±12.8	(5) 169.7 ±14.9	(5) 175.6 ±16.8	(5) 186.9 ±21.1	(5) 192.9 ±21.3	(5) 204.1 ±26.1					
100	(10) 125.4 ±4.9	(10) 137.4 ±6.4	(10) 152.0 ±7.7	(10) 158.1 ±8.2	(10) 169.0 ±9.9	(10) 177.4 ±12.3	(10) 189.8 ±15.0	(10) 196.0 ±16.1	(10) 203.8 ±17.5	(5) 200.1 ±16.0	(5) 205.6* ±15.4	(5) 214.2* ±16.7	(5) 218.1* ±13.6	(5) 230.0 ±16.0

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

Table 3-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of TSA 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)
	20.8 ±1.8	22.6 ±2.0	25.5 ±2.6	27.7 ±2.3	29.5 ±2.3	28.8 ±2.6
4	(5)	(5)	(5)	(5)		
	20.9 ±1.3	22.9 ±1.2	25.0 ±2.4	28.5 ±1.0		
20	(5)	(5)	(5)	(5)		
	20.3 ±1.3	23.0 ±1.5	24.8 ±2.4	27.7 ±3.5		
100	(10)	(10)	(10)	(10)	(5)	(5)
	20.6 ±1.6	22.2 ±2.1	24.3 ±2.2	26.8 ±3.1	25.7* ±2.8	25.8 ±3.6

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

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

Table 3-2

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

Food consumption in females

Dose (mg/kg)	Day of dosing period				Day of recovery period	
	1	8	15	22	1	8
0	(10)	(10)	(10)	(10)	(5)	(5)
	17.2	18.0	18.7	18.6	20.4	21.9
	±1.2	±1.7	±0.9	±1.6	±2.6	±2.8
4	(5)	(5)	(5)	(5)		
	17.5	17.1	17.4	20.3		
	±1.5	±1.9	±2.1	±1.8		
20	(5)	(5)	(5)	(5)		
	16.8	16.6	15.6	19.9		
	±1.7	±1.4	±2.8	±3.1		
100	(10)	(10)	(10)	(10)	(5)	(5)
	16.8	16.3	16.7*	18.1	18.9	18.6
	±2.4	±2.9	±2.3	±1.4	±1.5	±2.8

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 TSA in rats

Urinary findings in males and females on day 23 of dosing period

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Urinary volume (mL/24hr)	Specific gravity	Color ly	Turbidity —	pH						Total protein			Glucose		Ketone			Bilirubin	Occult blood	Urobilinogen
							6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	≥9.0	—	±	+	—	—	±	+	—	—	—	±
Male	0	10	17.6 ±8.2	1.045 ±0.015	10	10	0	3	6	1	0	0	1	3	6	10	4	4	2	10	10	10	
	4	5	20.6 ±2.9	1.038 ±0.007	5	5	0	1	3	0	1	0	0	2	3	5	1	4	0	5	5	5	
	20	5	17.2 ±6.3	1.037 ±0.009	5	5	0	1	1	2	1	0	0	3	2	5	1	3	1	5	5	5	
	100	10	17.2 ±3.1	1.042 ±0.011	10	10	0	1	4	2	2	1	0	4	6	10	9	1	0	10	10	10	
Female	0	10	14.3 ±4.2	1.036 ±0.013	10	10	3	2	2	2	1	0	7	2	1	10	10	0	0	10	10	10	
	4	5	13.0 ±1.7	1.037 ±0.011	5	5	1	2	2	0	0	0	5	0	0	5	5	0	0	5	5	5	
	20	5	11.9 ±3.4	1.025 ±0.008	5	5	0	0	3	0	1	1	5	0	0	5	5	0	0	5	5	5	
	100	10	14.6 ±3.5	1.027 ±0.012	10	10	0	0	3	4	1	2	10	0	0	10	10	0	0	10	10	10	

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Microscopic examination of urinary sediment				
			Red blood cells	Crystal	Cast	White blood cells	Epithelial cells
Male	0	10	10	1 9	10	10	10
	4	5	5	1 4	5	5	5
	20	5	5	0 5	5	5	5
	100	10	10	0 10	10	10	10
Female	0	10	10	2 8	10	10	10
	4	5	5	2 3	5	5	5
	20	5	5	0 5	5	5	5
	100	10	10	0 10	10	10	10

Color ly, light yellow

Turbidity -, negative

Total protein -, negative; ±, trace; +, 30 mg/dL

Glucose -, negative

Ketone

Bilirubin

Occult blood

Urobilinogen

-, negative; ±, trace; +, slight

-, negative

-, negative

±, 0.2 EU/dL

Red blood cells

Crystal

Cast

White blood cells

Epithelial cells

-, not observed

-, not observed; ±, a few

-, not observed

-, not observed

-, not observed

Table 4-2

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

Urinary findings in males and females on day 9 of recovery period

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Urinary volume (mL/24hr)	Specific gravity	Color		Turbidity —	pH						Total protein				Glucose —	Ketone					Bilirubin —	Occult blood			Urobilinogen ±
					ly	y		6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	≥9.0	—	±	+	++		—	±	+	++	—		±	+		
Male	0	5	16.0 ±5.0	1.046 ±0.015	4	1	5	1	2	2	0	0	0	0	0	4	1	5	0	1	3	1	5	5	0	0	5	
	100	5	16.6 ±4.8	1.052 ±0.003	5	0	5	0	1	1	1	0	2	0	1	4	0	5	1	3	1	0	5	4	0	1	5	
Female	0	5	22.4 ±5.3	1.030 ±0.004	5	0	5	1	1	3	0	0	0	5	0	0	0	5	5	0	0	0	5	5	0	0	5	
	100	5	14.3 ±6.6	1.044 ±0.020	4	1	5	1	1	1	0	1	1	4	0	1	0	5	5	0	0	0	5	5	0	0	5	

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Microscopic examination of urinary sediment				
			Red blood cells	Crystal	Cast	White blood cells	Epithelial cells
Male	0	5	5	0 5	5	5	5
	100	5	5	0 5	5	5	5
Female	0	5	5	1 4	5	5	5
	100	5	5	1 4	5	5	5

Color ly, light yellow; y, yellow

Turbidity -, negative

Total protein -, negative; ±, trace; +, 30 mg/dL; ++, 100 mg/dL

Glucose -, negative

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

Bilirubin -, negative

Occult blood -, negative; ±, trace; +, slight

Urobilinogen ±, 0.1 EU/dL

Red blood cells

Crystal

Cast

White blood cells

Epithelial cells

-, not observed

-, not observed; ±, a few

-, not observed

-, not observed

-, not observed

Table 5-1-1

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

Hematological findings in males at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	R B C ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	M C V (fL)	M C H (pg)	M C H C (g/dL)	Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	P T (sec)	A P T T (sec)
0	(5) 705 ± 57	(5) 14.3 ± 1.0	(5) 42.7 ± 2.8	(5) 60.6 ± 1.8	(5) 20.3 ± 0.4	(5) 33.6 ± 0.3	(5) 93.5 ± 11.5	(5) 16.0 ± 1.9	(5) 20.2 ± 1.6
4	(5) 732 ± 20	(5) 14.9 ± 0.4	(5) 44.5 ± 1.3	(5) 60.8 ± 0.5	(5) 20.4 ± 0.2	(5) 33.5 ± 0.2	(5) 107.5 ± 7.0	(5) 16.3 ± 2.2	(5) 18.9 ± 1.4
20	(5) 715 ± 40	(5) 14.2 ± 0.5	(5) 42.3 ± 1.5	(5) 59.2 ± 3.0	(5) 19.9 ± 1.1	(5) 33.5 ± 0.3	(5) 96.3 ± 12.1	(5) 16.2 ± 4.1	(5) 19.3 ± 2.9
100	(5) 716 ± 23	(5) 14.4 ± 0.4	(5) 43.0 ± 1.2	(5) 60.2 ± 2.2	(5) 20.1 ± 0.7	(5) 33.4 ± 0.2	(5) 109.0 ± 12.0	(5) 15.4 ± 3.6	(5) 18.3 ± 4.3

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100/\mu\text{L}$)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 52.5 ± 15.1	(5) 12 ± 4	(5) 1 ± 0	(5) 0 ± 0	(5) 4 ± 2	(5) 83 ± 5
4	(5) 67.6 ± 24.0	(5) 9 ± 5	(5) 1 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 6 ± 4	(5) 84 ± 6
20	(5) 59.5 ± 16.8	(5) 8 ± 3	(5) 1 ± 0	(5) 1 ± 2	(5) 8 ± 8	(5) 82 ± 11
100	(5) 58.9 ± 13.9	(5) 11 ± 3	(5) 1 ± 0	(5) 0 ± 0	(5) 3 ± 1	(5) 84 ± 2

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 TSA in rats

Hematological findings in females at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	R B C ($\times 10^4 / \mu\text{L}$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	M C V (fL)	M C H (pg)	M C H C (g/dL)	Platelet ($\times 10^4 / \mu\text{L}$)	P T (sec)	A P T T (sec)
0	(5) 689 ± 60	(5) 14.2 ± 0.8	(5) 41.9 ± 2.7	(5) 60.9 ± 1.8	(5) 20.6 ± 0.7	(5) 33.9 ± 0.1	(5) 102.0 ± 7.5	(5) 12.1 ± 0.4	(5) 15.8 ± 0.6
4	(5) 705 ± 32	(5) 14.2 ± 0.5	(5) 41.8 ± 1.2	(5) 59.4 ± 2.0	(5) 20.1 ± 0.4	(5) 33.9 ± 0.6	(5) 104.2 ± 8.2	(5) 12.7 ± 0.7	(5) 17.2 ± 0.8
20	(5) 737 ± 70	(5) 14.5 ± 1.2	(5) 43.1 ± 3.8	(5) 58.5 ± 1.3	(5) 19.7 ± 0.6	(5) 33.7 ± 0.3	(5) 96.1 ± 12.9	(5) 12.3 ± 0.4	(5) 15.3 ± 1.8
100	(5) 707 ± 66	(5) 14.2 ± 1.3	(5) 42.2 ± 4.0	(5) 59.7 ± 1.3	(5) 20.1 ± 0.4	(5) 33.8 ± 0.2	(5) 98.1 ± 14.3	(5) 12.6 ± 0.5	(5) 16.2 ± 0.9

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100 / \mu\text{L}$)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 36.0 ± 2.3	(5) 10 ± 3	(5) 2 ± 1	(5) 0 ± 1	(5) 8 ± 7	(5) 81 ± 9
4	(5) 31.2 ± 7.9	(5) 13 ± 7	(5) 2 ± 1	(5) 0 ± 1	(5) 9 ± 7	(5) 75 ± 13
20	(5) 38.7 ± 14.7	(5) 12 ± 5	(5) 1 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 8 ± 10	(5) 78 ± 14
100	(5) 32.7 ± 9.5	(5) 10 ± 2	(5) 2 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 6 ± 3	(5) 82 ± 3

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 TSA in rats

Hematological findings in males at the end of recovery period

Dose (mg/kg)	R B C ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	M C V (fL)	M C H (pg)	M C H C (g/dL)	Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	P T (sec)	A P T T (sec)
0	(5) 793 ± 32	(5) 15.0 ± 0.6	(5) 44.6 ± 1.9	(5) 56.3 ± 1.2	(5) 19.0 ± 0.4	(5) 33.7 ± 0.2	(5) 105.3 ± 8.7	(5) 17.9 ± 3.5	(5) 20.2 ± 0.8
100	(5) 745* ± 32	(5) 14.7 ± 0.6	(5) 43.4 ± 2.1	(5) 58.3* ± 1.3	(5) 19.7* ± 0.4	(5) 33.8 ± 0.4	(5) 99.2 ± 10.8	(5) 14.0 ± 1.2	(5) 19.6 ± 1.1

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100/\mu\text{L}$)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 73.3 ± 23.1	(5) 11 ± 3	(5) 1 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 4 ± 2	(5) 83 ± 4
100	(5) 60.3 ± 20.9	(5) 14 ± 5	(5) 2 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 4 ± 2	(5) 81 ± 6

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 TSA in rats

Hematological findings in females at the end of recovery period

Dose (mg/kg)	R B C ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	M C V (fL)	M C H (pg)	M C H C (g/dL)	Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	P T (sec)	A P T T (sec)
0	(5) 726 ± 33	(5) 14.2 ± 0.5	(5) 41.7 ± 1.6	(5) 57.5 ± 0.7	(5) 19.5 ± 0.4	(5) 33.9 ± 0.4	(5) 100.5 ± 10.5	(5) 11.7 ± 0.2	(5) 15.7 ± 2.6
100	(5) 726 ± 40	(5) 14.1 ± 0.4	(5) 41.5 ± 1.0	(5) 57.3 ± 1.9	(5) 19.4 ± 0.6	(5) 33.9 ± 0.3	(5) 109.7 ± 17.2	(5) 12.1 ± 0.7	(5) 15.0 ± 1.5

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100/\mu\text{L}$)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(5) 36.9 ± 16.2	(5) 14 ± 5	(5) 2 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 4 ± 1	(5) 80 ± 6
100	(5) 27.5 ± 8.3	(5) 11 ± 3	(5) 2 ± 1	(5) 0 ± 0	(5) 5 ± 2	(5) 81 ± 5

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

Table 6-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of TSA 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) 5.2 ±0.4	(5) 3.2 ±0.3	(5) 1.56 ±0.15	(5) 135 ±24	(5) 35 ±8	(5) 37 ±9	(5) 16 ±2	(5) 0.7 ±0.1	(5) 0.10 ±0.03
4	(5) 5.3 ±0.4	(5) 3.2 ±0.2	(5) 1.60 ±0.16	(5) 118 ±13	(5) 42 ±3	(5) 37 ±12	(5) 17 ±3	(5) 0.6 ±0.0	(5) 0.08 ±0.02
20	(5) 5.1 ±0.2	(5) 3.0 ±0.2	(5) 1.46 ±0.14	(5) 132 ±19	(5) 35 ±3	(5) 31 ±12	(5) 20* ±2	(5) 0.6 ±0.1	(5) 0.08 ±0.02
100	(5) 5.2 ±0.4	(5) 3.1 ±0.3	(5) 1.46 ±0.16	(5) 125 ±8	(5) 37 ±6	(5) 36 ±11	(5) 16 ±2	(5) 0.6 ±0.1	(5) 0.07 ±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) 8.8 ±2.0	(5) 9.0 ±0.3	(5) 146.2 ±1.3	(5) 5.25 ±1.57	(5) 107.1 ±1.9	(5) 474 ±95	(5) 35 ±11	(5) 81 ±26	(5) 0 ±0
4	(5) 9.4 ±1.6	(5) 9.1 ±0.4	(5) 147.5 ±1.3	(5) 5.00 ±2.28	(5) 107.1 ±3.1	(5) 472 ±39	(5) 35 ±8	(5) 81 ±19	(5) 1 ±1
20	(5) 9.5 ±1.5	(5) 9.1 ±0.4	(5) 146.1 ±0.6	(5) 4.87 ±1.53	(5) 106.2 ±1.4	(5) 464 ±74	(5) 31 ±3	(5) 76 ±12	(5) 0 ±1
100	(5) 7.4 ±0.6	(5) 9.3 ±0.2	(5) 147.0 ±0.3	(5) 3.68 ±0.52	(5) 107.4 ±2.0	(5) 447 ±85	(5) 30 ±5	(5) 69 ±8	(5) 1 ±1

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

*, significantly different from control, p<0.05

Table 6-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of TSA 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) 5.2 ±0.2	(5) 3.3 ±0.2	(5) 1.80 ±0.16	(5) 105 ±18	(5) 39 ±8	(5) 26 ±10	(5) 16 ±1	(5) 0.6 ±0.1	(5) 0.08 ±0.02
4	(5) 5.1 ±0.2	(5) 3.1 ±0.3	(5) 1.53 ±0.23	(5) 107 ±8	(5) 42 ±7	(5) 23 ±9	(5) 19 ±2	(5) 0.6 ±0.1	(5) 0.11 ±0.02
20	(5) 5.2 ±0.3	(5) 3.2 ±0.2	(5) 1.62 ±0.11	(5) 105 ±13	(5) 46 ±9	(5) 23 ±11	(5) 20 ±4	(5) 0.6 ±0.3	(5) 0.11 ±0.02
100	(5) 5.1 ±0.5	(5) 3.0 ±0.6	(5) 1.51 ±0.43	(5) 106 ±16	(5) 51 ±4	(5) 26 ±10	(5) 22** ±3	(5) 0.7 ±0.1	(5) 0.10 ±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) 8.0 ±1.9	(5) 8.9 ±0.3	(5) 145.4 ±2.1	(5) 5.61 ±2.84	(5) 108.9 ±2.1	(5) 315 ±62	(5) 25 ±2	(5) 69 ±6	(5) 1 ±1
4	(5) 7.4 ±0.9	(5) 8.8 ±0.3	(5) 146.2 ±0.9	(5) 4.47 ±1.39	(5) 109.3 ±0.7	(5) 288 ±62	(5) 26 ±7	(5) 73 ±9	(5) 1 ±1
20	(5) 9.0 ±0.5	(5) 9.0 ±0.4	(5) 146.1 ±1.4	(5) 4.99 ±2.16	(5) 108.9 ±1.7	(5) 271 ±91	(5) 25 ±9	(5) 73 ±12	(5) 0 ±1
100	(5) 7.9 ±0.3	(5) 9.0 ±0.5	(5) 146.1 ±1.2	(5) 5.02 ±1.67	(5) 109.1 ±2.9	(5) 322 ±51	(5) 28 ±7	(5) 68 ±11	(5) 0 ±1

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

**, 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 TSA 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) 5.4 ±0.0	(5) 3.1 ±0.1	(5) 1.38 ±0.11	(5) 148 ±24	(5) 36 ±5	(5) 44 ±20	(5) 19 ±2	(5) 0.6 ±0.1	(5) 0.08 ±0.03
100	(5) 5.2 ±0.3	(5) 3.0 ±0.2	(5) 1.40 ±0.13	(5) 128 ±18	(5) 43 ±7	(5) 42 ±19	(5) 21* ±1	(5) 0.6* ±0.1	(5) 0.12 ±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) 6.6 ±0.6	(5) 8.5 ±0.2	(5) 146.1 ±1.2	(5) 4.02 ±0.26	(5) 107.7 ±1.1	(5) 260 ±79	(5) 31 ±5	(5) 74 ±8	(5) 0 ±0
100	(5) 6.4 ±0.4	(5) 8.6 ±0.3	(5) 145.9 ±0.8	(5) 3.76 ±0.29	(5) 107.6 ±2.1	(5) 295 ±33	(5) 27 ±2	(5) 63* ±4	(5) 0 ±0

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

*, significantly different from control, p<0.05

Table 6-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of TSA 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) 5.4 ±0.3	(5) 3.4 ±0.3	(5) 1.64 ±0.18	(5) 113 ±10	(5) 48 ±9	(5) 30 ±2	(5) 25 ±3	(5) 0.6 ±0.0	(5) 0.12 ±0.02
100	(5) 5.0 ±0.3	(5) 3.0* ±0.2	(5) 1.47 ±0.18	(5) 120 ±14	(5) 36* ±7	(5) 21** ±2	(5) 21 ±3	(5) 0.5 ±0.1	(5) 0.10 ±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) 5.9 ±0.5	(5) 8.7 ±0.2	(5) 145.1 ±1.0	(5) 4.02 ±0.39	(5) 108.9 ±1.2	(5) 196 ±48	(5) 25 ±4	(5) 63 ±8	(5) 1 ±0
100	(5) 6.4 ±0.5	(5) 8.1* ±0.5	(5) 146.1 ±1.2	(5) 3.87 ±0.34	(5) 110.2 ±0.5	(5) 216 ±26	(5) 24 ±8	(5) 62 ±17	(5) 0 ±0

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

Absolute organ weights in males at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg)	Pituitary gland (mg)	Thymus (mg)	Heart (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Thyroid gland (mg)	Adrenal glands (mg)	Testes (mg)	Epididymides (mg)
0	(5) 302.7 ±16.1	(5) 1873.9 ±72.7	(5) 8.9 ±1.4	(5) 595.7 ±85.7	(5) 1014.0 ±75.9	(5) 9662.9 ±876.8	(5) 2380.0 ±221.2	(5) 661.5 ±69.6	(5) 12.9 ±2.8	(5) 47.8 ±4.1	(5) 2797.0 ±117.9	(5) 662.6 ±55.2
4	(5) 318.8 ±18.7	(5) 1859.3 ±71.0	(5) 9.5 ±0.8	(5) 473.4 ±64.2	(5) 1114.4 ±89.0	(5) 10330.2 ±1234.0	(5) 2453.1 ±164.8	(5) 684.2 ±52.7	(5) 15.2 ±3.5	(5) 43.5 ±5.8	(5) 2615.2 ±561.3	(5) 624.8 ±104.3
20	(5) 315.8 ±25.2	(5) 1795.8 ±63.8	(5) 9.8 ±0.6	(5) 594.3 ±167.9	(5) 1085.1 ±98.7	(5) 9774.7 ±1273.5	(5) 2451.5 ±161.5	(5) 727.4 ±53.2	(5) 13.9 ±1.6	(5) 48.5 ±6.0	(5) 2776.9 ±168.5	(5) 680.2 ±65.6
100	(5) 318.6 ±20.5	(5) 1873.3 ±57.6	(5) 10.2 ±0.3	(5) 532.7 ±103.1	(5) 1097.9 ±85.9	(5) 10301.8 ±1119.2	(5) 2609.2 ±160.4	(5) 687.1 ±158.3	(5) 16.0 ±5.1	(5) 48.3 ±4.8	(5) 2841.3 ±97.2	(5) 652.9 ±16.4

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 TSA in rats

Absolute organ weights in females at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg)	Pituitary gland (mg)	Thymus (mg)	Heart (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Thyroid gland (mg)	Adrenal glands (mg)	Ovaries (mg)
0	(5) 200.8 ±11.1	(5) 1738.9 ±47.0	(5) 12.5 ±1.9	(5) 495.9 ±103.7	(5) 736.4 ±77.2	(5) 6600.5 ±950.1	(5) 1591.9 ±102.0	(5) 514.5 ±68.9	(5) 14.7 ±2.7	(5) 63.8 ±1.7	(5) 86.7 ±11.0
4	(5) 201.7 ±14.8	(5) 1743.3 ±87.4	(5) 12.1 ±0.5	(5) 481.9 ±82.6	(5) 746.3 ±53.1	(5) 6268.1 ±297.0	(5) 1710.1 ±185.5	(5) 499.6 ±110.9	(5) 12.4 ±2.2	(5) 61.6 ±7.2	(5) 84.0 ±6.8
20	(5) 186.7 ±21.8	(5) 1717.2 ±89.6	(5) 12.1 ±1.2	(5) 439.7 ±106.6	(5) 673.9 ±68.4	(5) 6073.5 ±830.0	(5) 1619.1 ±128.9	(5) 450.6 ±61.1	(5) 12.4 ±1.1	(5) 60.6 ±3.3	(5) 78.1 ±9.2
100	(5) 193.2 ±15.0	(5) 1704.0 ±71.0	(5) 11.8 ±1.6	(5) 404.8 ±107.4	(5) 690.0 ±58.8	(5) 6407.4 ±394.0	(5) 1729.6 ±193.7	(5) 522.1 ±42.7	(5) 12.2 ±3.2	(5) 60.9 ±7.4	(5) 80.4 ±13.6

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 TSA in rats

Absolute organ weights in males at the end of recovery Period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg)	Pituitary gland (mg)	Thymus (mg)	Heart (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)	Thyroid gland (mg)	Adrenal glands (mg)	Testes (mg)	Epididymides (mg)
0	(5) 392.5 ±32.1	(5) 1906.0 ±96.1	(5) 11.2 ±0.7	(5) 599.8 ±104.6	(5) 1280.5 ±135.0	(5) 11803.5 ±1613.7	(5) 2800.1 ±148.5	(5) 692.5 ±110.2	(5) 17.5 ±1.6	(5) 49.3 ±6.6	(5) 2960.9 ±47.7	(5) 922.5 ±47.3
100	(5) 371.2 ±40.2	(5) 1926.4 ±51.1	(5) 10.1 ±2.0	(5) 511.2 ±120.2	(5) 1127.0 ±93.9	(5) 11086.0 ±2337.5	(5) 2545.1 ±336.6	(5) 838.0 ±98.3	(5) 18.9 ±4.6	(5) 53.8 ±8.2	(5) 2936.6 ±75.2	(5) 894.8 ±54.1

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 TSA in rats

Absolute organ weights in females at the end of recovery period

Dose	Body weight	Brain	Pituitary gland	Thymus	Heart	Liver	Kidneys	Spleen	Thyroid gland	Adrenal glands	Ovaries
(mg/kg)	(g)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)
0	(5) 233.6 ±20.6	(5) 1787.6 ±48.9	(5) 13.7 ±1.9	(5) 457.1 ±94.2	(5) 794.1 ±60.0	(5) 6723.6 ±719.0	(5) 1768.3 ±185.5	(5) 765.3 ±404.8	(5) 18.6 ±3.1	(5) 62.7 ±12.7	(5) 81.4 ±22.4
100	(5) 208.3 ±14.8	(5) 1774.3 ±22.1	(5) 13.1 ±1.1	(5) 395.8 ±79.7	(5) 765.0 ±50.2	(5) 6093.4 ±621.2	(5) 1673.3 ±88.4	(5) 426.5 ±54.0	(5) 18.4 ±5.8	(5) 61.8 ±10.4	(5) 81.3 ±16.2

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 TSA in rats

Relative organ weights in males at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg/g)	Pituitary gland (mg/g)	Thymus (mg/g)	Heart (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Spleen (mg/g)	Thyroid gland (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Testes (mg/g)	Epididymides (mg/g)
0	(5) 302.7 ±16.1	(5) 6.212 ±0.524	(5) 0.030 ±0.004	(5) 1.977 ±0.336	(5) 3.350 ±0.184	(5) 31.922 ±2.352	(5) 7.870 ±0.688	(5) 2.185 ±0.193	(5) 0.043 ±0.008	(5) 0.158 ±0.007	(5) 9.256 ±0.516	(5) 2.190 ±0.152
4	(5) 318.8 ±18.7	(5) 5.846 ±0.374	(5) 0.030 ±0.001	(5) 1.484 ±0.167	(5) 3.504 ±0.340	(5) 32.359 ±2.766	(5) 7.694 ±0.228	(5) 2.153 ±0.218	(5) 0.048 ±0.011	(5) 0.136 ±0.013	(5) 8.172 ±1.594	(5) 1.957 ±0.297
20	(5) 315.8 ±25.2	(5) 5.708 ±0.379	(5) 0.031 ±0.002	(5) 1.873 ±0.445	(5) 3.434 ±0.076	(5) 30.862 ±1.707	(5) 7.780 ±0.473	(5) 2.313 ±0.226	(5) 0.044 ±0.006	(5) 0.155 ±0.023	(5) 8.807 ±0.314	(5) 2.152 ±0.054
100	(5) 318.6 ±20.5	(5) 5.891 ±0.233	(5) 0.032 ±0.003	(5) 1.676 ±0.323	(5) 3.452 ±0.265	(5) 32.271 ±1.721	(5) 8.198 ±0.371	(5) 2.159 ±0.492	(5) 0.050 ±0.013	(5) 0.152 ±0.014	(5) 8.958 ±0.785	(5) 2.054 ±0.107

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 TSA in rats

Relative organ weights in females at the end of dosing period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg/g)	Pituitary gland (mg/g)	Thymus (mg/g)	Heart (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Spleen (mg/g)	Thyroid gland (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Ovaries (mg/g)
0	(5) 200.8 ±11.1	(5) 8.680 ±0.545	(5) 0.062 ±0.006	(5) 2.466 ±0.457	(5) 3.667 ±0.322	(5) 32.909 ±4.835	(5) 7.929 ±0.307	(5) 2.568 ±0.373	(5) 0.074 ±0.016	(5) 0.319 ±0.025	(5) 0.434 ±0.071
4	(5) 201.7 ±14.8	(5) 8.670 ±0.614	(5) 0.060 ±0.004	(5) 2.382 ±0.305	(5) 3.705 ±0.225	(5) 31.132 ±1.225	(5) 8.472 ±0.611	(5) 2.464 ±0.444	(5) 0.062 ±0.012	(5) 0.306 ±0.033	(5) 0.419 ±0.051
20	(5) 186.7 ±21.8	(5) 9.275 ±0.913	(5) 0.065 ±0.009	(5) 2.332 ±0.329	(5) 3.627 ±0.336	(5) 32.554 ±2.995	(5) 8.723 ±0.732	(5) 2.410 ±0.085	(5) 0.067 ±0.008	(5) 0.327 ±0.036	(5) 0.421 ±0.057
100	(5) 193.2 ±15.0	(5) 8.851 ±0.554	(5) 0.061 ±0.007	(5) 2.075 ±0.407	(5) 3.574 ±0.181	(5) 33.280 ±2.662	(5) 8.975 ±1.036	(5) 2.716 ±0.300	(5) 0.063 ±0.014	(5) 0.315 ±0.021	(5) 0.420 ±0.087

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

Table 8-2-1

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

Relative organ weights in males at the end of recovery period

Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Brain (mg/g)	Pituitary gland (mg/g)	Thymus (mg/g)	Heart (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Spleen (mg/g)	Thyroid gland (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Testes (mg/g)	Epididymides (mg/g)
0	(5) 392.5 ±32.1	(5) 4.874 ±0.343	(5) 0.029 ±0.002	(5) 1.546 ±0.367	(5) 3.261 ±0.190	(5) 29.982 ±1.931	(5) 7.152 ±0.348	(5) 1.773 ±0.305	(5) 0.045 ±0.006	(5) 0.125 ±0.012	(5) 7.589 ±0.691	(5) 2.369 ±0.300
100	(5) 371.2 ±40.2	(5) 5.238 ±0.581	(5) 0.027 ±0.004	(5) 1.372 ±0.274	(5) 3.044 ±0.119	(5) 29.629 ±3.332	(5) 6.858 ±0.566	(5) 2.263* ±0.192	(5) 0.050 ±0.007	(5) 0.147 ±0.030	(5) 7.981 ±0.806	(5) 2.432 ±0.291

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 TSA in rats

Relative organ weights in females at the end of recovery period

Dose	Body weight	Brain	Pituitary gland	Thymus	Heart	Liver	Kidneys	Spleen	Thyroid gland	Adrenal glands	Ovaries
(mg/kg)	(g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)
0	(5) 233.6 ±20.6	(5) 7.701 ±0.736	(5) 0.059 ±0.007	(5) 1.960 ±0.397	(5) 3.409 ±0.271	(5) 28.759 ±1.342	(5) 7.574 ±0.529	(5) 3.253 ±1.598	(5) 0.080 ±0.014	(5) 0.269 ±0.050	(5) 0.345 ±0.074
100	(5) 208.3 ±14.8	(5) 8.548 ±0.510	(5) 0.063 ±0.003	(5) 1.901 ±0.377	(5) 3.680 ±0.236	(5) 29.218 ±1.290	(5) 8.045 ±0.251	(5) 2.047 ±0.201	(5) 0.087 ±0.022	(5) 0.297 ±0.050	(5) 0.389 ±0.060

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

Table 9-1-1

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

Macroscopical findings in males at the end of dosing period

Dose Grade	0 mg/kg			4 mg/kg			20 mg/kg			100 mg/kg		
	-	+		-	+		-	+		-	+	
(Testis)	[5]			[5]			[5]			[5]		
Small		5	0		4	1		5	0		5	0
(Epididymis)	[5]			[5]			[5]			[5]		
Small		5	0		4	1		5	0		5	0
(Seminal vesicle)	[5]			[5]			[5]			[5]		
Small		5	0		4	1		5	0		5	0
(Prostate)	[5]			[5]			[5]			[5]		
Small		5	0		4	1		5	0		5	0

-, 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 TSA in rats

Macroscopical findings in females at the end of dosing period

Dose Grade	0 mg/kg - +	4 mg/kg - +	20 mg/kg - +	100 mg/kg - +
(All organs) No remarkable change	[5]	[5]	[5]	[5]

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

All organs; Brain, Spinal cord, Lung/Bronchus, Submandibular gland, Sublingual gland, Mandibular lymph node, Pancreas, Heart, Liver, Kidney, Spleen, Stomach, Duodenum, Jejunum, Ileum, Cecum, Colon, Rectum, Mesenteric lymph node, Tongue, Thymus, Esophagus, Trachea, Aorta, Pituitary gland, Thyroid gland, Parathyroid gland, Adrenal gland, Ovary, Uterus, Vagina, Urinary bladder, Skin, Mammary gland, Eye ball, Optic nerve, Harderian gland, Sciatic nerve, Skeletal muscle, Sternum, Femur, Bone marrow

Table 9-2-1

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

Macroscopical findings in males at the end of recovery period

Dose Grade	0 mg/kg		100 mg/kg	
	-	+	-	+
(Thymus)	[5]		[5]	
Small	5	0	4	1

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 9-2-2

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

Macroscopical findings in females at the end of recovery period

Dose Grade	0 mg/kg - +	100 mg/kg - +
(All organs) No remarkable change	[5]	[5]

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

All organs; Brain, Spinal cord, Lung/Bronchus, Submandibular gland, Sublingual gland,
Mandibular lymph node, Pancreas, Heart, Liver, Kidney, Spleen, Stomach, Duodenum,
Jejunum, Ileum, Cecum, Colon, Rectum, Mesenteric lymph node, Tongue, Thymus, Esophagus,
Trachea, Aorta, Pituitary gland, Thyroid gland, Parathyroid gland, Adrenal gland,
Ovary, Uterus, Vagina, Urinary bladder, Skin, Mammary gland, Eye ball, Optic nerve,
Harderian gland, Sciatic nerve, Skeletal muscle, Sternum, Femur, Bone marrow

Table 10-1-1

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

Histopathological findings in individual males at the end of dosing period

Dose Grade	0 mg/kg						4 mg/kg						20 mg/kg						100 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Kidney)	[5]						[5]						[5]						[5]					
Eosinophilic body	4	1	0	0	0	1	4	1	0	0	0	1	4	1	0	0	0	1	1	0	3	1	0	4
Basophilic tubule, cortex	2	3	0	0	0	3	4	1	0	0	0	1	2	3	0	0	0	3	1	4	0	0	0	4
(Spleen)	[5]						[5]						[5]						[5]					
Hematopoiesis, extramedullary	0	3	2	0	0	5	0	2	3	0	0	5	0	2	3	0	0	5	0	1	4	0	0	5
(Liver)	[5]						[0]						[0]						[5]					
Fatty change, periportal	0	4	1	0	0	5													1	3	1	0	0	4
Vacuolization, cytoplasmic, hepatocyte, centrilobular	3	1	1	0	0	2													5	0	0	0	0	0
(Lung)	[5]						[0]						[0]						[5]					
Accumulation, foam cell	2	3	0	0	0	3													2	3	0	0	0	3
Hemorrhage, focal	5	0	0	0	0	0													4	1	0	0	0	1
Metaplasia, osseous	4	1	0	0	0	1													5	0	0	0	0	0
Cellular infiltration, eosinophil, around artery/bronchus	3	2	0	0	0	2													4	1	0	0	0	1
(Pancreas)	[5]						[0]						[0]						[5]					
Atrophy, acinar cell, focal	4	1	0	0	0	1													5	0	0	0	0	0
(Testis)	[5]						[1]						[0]						[5]					
Degeneration, spermatocyte & spermatid, seminiferous tubule	5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1							5	0	0	0	0	0
Multinucleated giant cell, seminiferous tubule	5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1							5	0	0	0	0	0
(Epididymis)	[5]						[1]						[0]						[5]					
Decrease, sperm, lumen	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1							5	0	0	0	0	0
Cell debris, lumen	5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1							5	0	0	0	0	0
(Heart)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Thymus)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Urinary bladder)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Pituitary gland)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Thyroid gland)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Adrenal gland)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Bone marrow of Femur)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Prostate)	[0]						[1]						[0]						[0]					
No remarkable change																								
(Seminal vesicle)	[0]						[1]						[0]						[0]					
No remarkable change																								

-, 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 TSA in rats

Histopathological findings in females at the end of dosing period

Dose Grade	0 mg/kg						4 mg/kg						20 mg/kg						100 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Kidney)	[5]						[0]						[0]						[5]					
Basophilic tubule, cortex	1	4	0	0	0	4													2	3	0	0	0	3
Mineralization	2	3	0	0	0	3													1	3	1	0	0	4
Fibrosis, subcapsule, focal	4	1	0	0	0	1													5	0	0	0	0	0
(Spleen)	[5]						[3]						[5]						[5]					
Hematopoiesis, extramedullary	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	3	2	0	0	5
(Liver)	[5]						[0]						[0]						[5]					
Fatty change, periportal	0	2	3	0	0	5													0	4	1	0	0	5
Vacuolization, cytoplasmic, hepatocyte, centrilobular	4	0	1	0	0	1													5	0	0	0	0	0
Microgranuloma	4	1	0	0	0	1													4	1	0	0	0	1
(Lung)	[5]						[0]						[0]						[5]					
Accumulation, foam cell	4	1	0	0	0	1													3	2	0	0	0	2
Metaplasia, osseous	5	0	0	0	0	0													4	1	0	0	0	1
Cellular infiltration, eosinophil, around artery/bronchus	3	2	0	0	0	2													2	3	0	0	0	3
Mineralization, artery	3	2	0	0	0	2													5	0	0	0	0	0
(Pancreas)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Heart)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Thymus)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Ovary)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Urinary bladder)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Pituitary gland)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Thyroid gland)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Adrenal gland)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Bone marrow of Femur)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade

[], Number of animals examined

Table 10-2-1

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

Histopathological findings in males at the end of recovery period

Dose Grade	0 mg/kg						100 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Kidney)	[5]						[5]					
Eosinophilic body	2	2	0	1	0	3	1	1	3	0	0	4
Basophilic tubule, cortex	4	1	0	0	0	1	2	3	0	0	0	3
Cyst, cortico-medullary junction	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1
Cast, hyalin, cortex	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1
Fibrosis, subcapsule, focal	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0
(Spleen)	[5]						[5]					
Hematopoiesis, extramedullary	0	2	3	0	0	5	0	3	2	0	0	5
Deposit, pigment, brown	1	4	0	0	0	4	1	4	0	0	0	4
(Thymus)	[0]						[1]					
No remarkable change												

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade
[], Number of animals examined

Table 10-2-2

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

Histopathological findings in females at the end of recovery period

Dose Grade	0 mg/kg						100 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Spleen)	[5]						[5]					
Hematopoiesis, extramedullary	0	4	1	0	0	5	0	5	0	0	0	5
Deposit, pigment, brown	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade

[], Number of animals examined