

3,4-ジメチルアニリンのラットを用いる28日間の反復投与毒性試験

試験番号：2292（115-028）

財 団 法 人
食 品 農 医 薬 品 安 全 性 評 価 セ ン タ ー

目 次

1. 要 約	1 頁
2. 試 験 題 目	3
3. 試 験 目 的	3
9. 被 験 物 質	5
10. 試 験 材 料 お よ び 方 法	7
11. 観 察、測 定 お よ び 検 査	10
12. 試 験 結 果	14
13. 考 察 お よ び 結 論	19
14. 参 考 文 献	22
Figures, Tables and Reference data	24
Figure 1 Survival ratio	25
Table 1 Survival and mortality	26
Table 2 Clinical observation	27
Figure 2 Body weight	29
Table 3 Body weight	30
Figure 3 Food consumption	33
Table 4 Food consumption	34
Table 5 Food efficiency	36
Table 6 Hematology	38
Table 7 Coagulation	44
Table 8 Blood chemistry	46
Table 9 Urinalysis	52
Table 10 Organ weight	62
Table 11 Organ weight per body weight	66
Table 12 Summary of gross findings (sacrificed at 4, 6 Week)	70
Table 13 Summary of histological findings (sacrificed at 4, 6 Week)	74

1. 要 約 :

3, 4-ジメチルアニリンの反復投与による毒性を検索するため、Crj :CD (SD) 系ラットを用いた28日間反復投与試験を実施した。

ラットは1群雌雄各5匹で4試験群、さらに対照群および高用量群には雌雄各5匹の回復群を設け、計60匹を使用した。

3, 4-ジメチルアニリンは、コーンオイルに溶解させ、0、10、50および250 mg/kgを毎日1回、4週間連続経口投与し、一般状態の観察、体重測定、摂餌量測定、血液学的検査、血液凝固検査、血液化学的検査、尿検査、器官重量測定および病理学検査を実施した。なお、回復期間は2週間とし、投与期間中および投与終了時と同様の測定および諸検査を実施した。

その結果は、次のとおり要約される。

投与期間および回復期間を通じて、雌雄いずれの群にも死亡例は認められなかったが、雌雄の250 mg/kg群で流涎が観察され、回復期間に入っても少数例に継続して認められた。

体重は、雄の250 mg/kg群で投与2週から投与終了時まで、雌の250 mg/kg群で回復2週に低値が認められた。

摂餌量は、雄の250 mg/kg群で投与1週のみ低値を示した。また、雌の250 mg/kg群では回復2週に僅かに低値を示した。

血液学的検査の結果、雌雄とも250 mg/kg群でヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球数の低値、血小板数および網赤血球率の高値が、さらに雄で白血球数の高値、雌で好中球比率の低値、リンパ球比率の高値が認められた。回復期間終了時の検査では、回復傾向は認められたものの、雌の250 mg/kg群ではヘマトクリット値が僅かに低値であった。血液凝固検査の結果、被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

血液化学的検査の結果、雌の50 mg/kg群および雌雄の250 mg/kg群で総コレステロールが高値を示し、さらに雌雄の250 mg/kg群でGPTおよび総ビリルビンの高値、雄でアルブミン、A/G比およびカリウムの高値、雌で血糖およびカルシウムの高値、塩素の低値が認められた。回復期間終了時の検査では、投与終了時に認められた変化はすべて回復した。

尿検査の結果、雌雄の250 mg/kg群で尿量の増加、尿の酸性化および沈渣赤血球陽性動物の出現が認められ、雌の同群では尿比重も低値を示した。回復期間終了時の検査では、これらの変化はすべて回復した。

器官重量測定の結果、雌雄の 250 mg/kg群で肝臓および脾臓の実重量および相対重量が高値を示し、さらに雄で精巣相対重量が高値、雌で副腎相対重量が低値を示した。これらの変化は回復期間終了時にはすべて回復し、対照群との間に差は認められなかった。

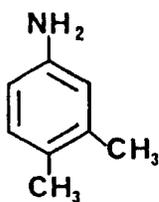
病理学検査の結果、剖検所見では投与終了時解剖動物において、被験物質の影響が示唆される病変として脾臓の黒色化および肥大が雌雄の 250 mg/kg群に、肝臓の肥大が雄の 250 mg/kg 群と雌の 50 および 250 mg/kg群に、黒色化が雄の 250 mg/kg群に観察された。また、回復試験終了時動物においては、被験物質の影響を示唆する病変は観察されなかった。組織所見では、投与終了時解剖動物において、被験物質の影響が示唆される病変として、250 mg/kg 群の雌雄に骨髓の造血亢進、脾臓の充血、造血亢進、色素沈着、肝臓の肝細胞腫脹、単細胞壊死、髄外造血およびクッパー細胞の色素沈着が観察された。また、腎臓の尿細管硝子滴変性は雄の50 mg/kg以上の群で増加する傾向を示した。回復試験動物群においては、骨髓の造血亢進、脾臓の充血、造血亢進、肝臓の肝細胞腫脹、単細胞壊死、髄外造血および腎臓の尿細管硝子滴変性はいずれも発生率が大幅に減少するか、認められなかった。しかし、脾臓の色素沈着については 250 mg/kg群の雌雄の全例で観察され、雌においては程度の増強がみられ、また、肝臓のクッパー細胞の色素沈着も 250 mg/kg群に認められ、特に雌では全例に観察された。

以上の結果、雌雄とも50 mg/kg以上の群では被験物質投与に起因する変化が認められ、無影響量は10 mg/kgと判断される。

2. 試験題目： 3,4-ジメチルアニリンのラットを用いる28日間の反復投与毒性試験
3. 試験目的： 新規化学物質の安全性を評価するため、環保業第700号、薬発第1039号、61基局第1014号（昭和61年12月5日）の「新規化学物質に係る試験の方法について」に従って、ラットを用いる28日間の反復投与毒性試験を行った。
- なお、試験の実施は環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号（昭和63年11月18日）の「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設について」の基準を満たすものとした。

9. 被 験 物 質 :

- 1) 被験物質名 3,4-ジメチルアニリン
- 2) CAS No. 95-64-7
- 3) ロット番号
- 4) 含有量 99.8%
- 5) 提供先
- 6) 保管条件 室温
- 7) 保管場所 安評センター被験物質保管庫
- 8) 化学名 3,4-ジメチルアニリン
- 9) 化学構造



- 10) 分子式 C₈H₁₁N
- 11) 分子量 121.18
- 12) 物質の状態 固体 (常温)
- 13) 色 白色
- 14) 融点/沸点 49-51°C / 226 °C
- 15) 溶解性 アルコール可溶

- 16) 比 重 0.97～0.98 (溶融状態)
- 17) 蒸 気 圧 760 mmHg (226°C)
- 18) 安 定 性 光により変色
- 19) 被験物質保管および 投与終了後、約 2 g を安評センターに保管し、残りは処分した。
残余被験物質の処理

なお、実測した結果は『Reference data 1』に示した。

10. 試験材料および方法：

1) 供試動物

供試したラットCD (SD) 系は日本チャールス・リバー株式会社（神奈川県厚木市）から平成5年10月20日に4週齢で雌雄各50匹、計100匹を購入した。

動物を検収し試験環境に8日間馴化後、平成5年10月28日に6週齢で投与を開始した。動物はあらかじめ体重によって層別化し、無作為抽出法により各試験群を構成するように群分けした。余剰動物は炭酸ガスにより安楽死させた。

動物の耳介に群番号および群内番号を入墨すると共に個別別飼育ケージに動物標識番号 (Animal ID-No.) を付すことにより個体識別した。

投与開始時の体重は雄で125~140 g、雌で109~121 gであった。

2) 動物種および系統選択理由

感染性疾患に対する抵抗性、遺伝的安定性を考慮して選んだ。

3) 飼育管理

a. 飼育環境

動物はバリアシステムの飼育室 (W 4.2 × D 8.2 × H 2.5 m、86.1 m³) で飼育し、環境調節の目標値は温度23±2℃、相対湿度55±10%、換気回数1時間20回、照明150~300 lux 12時間 (午前7時点灯、午後7時消灯) とした。

株式会社 東京技研サービス (東京都府中市) の水洗式飼育機 (W 674.2 × D 48.0 × H 175.5 cm) を使用し、アルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ (W 20.0 × D 28.2 × H 18.0 cm、飼育ケージ・スペース10,152 cm³) に動物を1匹ずつ収容し飼料と水を自由に摂取させた。

飼育ケージは隔週1回、給餌器は週1回取り換えた。

なお、動物の馴化期間を含め、投与および回復期間中、データの信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因の変化はなかった。

b. 飼 料

動物に与えた飼料はオリエンタル酵母工業株式会社 (東京都中央区) 製造の放射線滅菌改良NIH公開ラット、マウス飼料 (Modified NIH Open Formula Rat and Mouse Ration) を使用した。使用した飼料の夾雑物の分析を、オリエンタル酵母工業株式会社が財団法人日本食品分析センター (東京都渋谷区) に依頼し実施した。その結果を『Reference data 2』に示した。

c. 給 水

動物には水道水を自動給水ノズルより自由に摂取させた。

水道法に基づく水道水の分析を財団法人 静岡県生活科学検査センター (静岡県浜松市) に依頼し実施した。その分析結果を『Reference data 3』に示した。

4) 試験群の構成

試験群の構成を下記に示した。

用量は0、10、50および250 mg/kgとし、動物数は1群雌雄各5匹、また、回復試験用として、対照群および高用量群に雌雄各5匹、計60匹を使用した。

試験群	1		2		3		4	
用量 (mg/kg)	0*		10		50		250	
性	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
動物数	10	10	5	5	5	5	10	10
投与終了時 計画屠殺 動物番号	1001 ? 1005	2001 ? 2005	1101 ? 1105	2101 ? 2105	1201 ? 1205	2201 ? 2205	1301 ? 1305	2301 ? 2305
回復終了時 計画屠殺 動物番号	1006 ? 1010	2006 ? 2010	-	-	-	-	1306 ? 1310	2306 ? 2310

* コーンオイルのみを投与した。

[用量設定理由]

本試験に先立って用量設定のための2週間投与試験（投与量：0、60、180 および 540 mg/kg）を実施した。その結果、雌雄とも180 mg/kg以上の群で、肝臓および脾臓に重量または色調変化が認められた。従って、28日間反復投与試験の高用量は、2週間投与試験の中用量の180 mg/kgより少し高い250 mg/kgが適切と考えられ、以下公比5で除し、中用量を50 mg/kg、低用量を10 mg/kgに設定した。

5) 投与方法

被験物質の投与経路は経口とした。被験物質はコーンオイル（ナカライテスク株式会社、京都府京都市）に溶解し、胃ゾンデを用いて強制経口投与した。

投与容量は体重 100 g 当り 0.5 ml とした。

対照群にはコーンオイルのみを投与した。

6) 投与液の調製

3,4-ジメチルアニリンは、各用量ごと（10、50および 250 mg/kg）に所定量を電子式上皿天秤で秤量し、メノウ乳鉢を用いてコーンオイルに溶解した。

調製は週に 1 回行い、調製液は使用時まで冷暗所に保存した。

7) 投与期間

投与期間は28日間とし、投与終了後、0 および 250 mg/kg群については2週間の回復試験を実施した。

8) 被験物質の分析

投与液中の被験物質の安定性および均一性／濃度は下記の如く分析した。

a. 安定性（冷暗所放置）

被験物質のコーンオイル中での安定性を確認するため、投与開始前に10 mg/kgについて、調製直後、冷暗所保存1 および2週後に濃度分析を行った。

b. 均一性／濃度分析

0、10、50および 250 mg/kgの投与液について適切に混合と処方がされているかどうか、投与開始時および最終投与時に新しく混合したバッチから無作為にサンプルを抽出し分析した。

安定性、均一性／濃度分析の方法および結果は『Reference data 4』に示した。

1.1. 観察、測定および検査：

1) 一般状態の観察

全動物を毎日2回観察し、中毒症状の有無、行動異常、死期の迫った動物、死亡動物等を臨床観察所見記録シートに記録した。

2) 体 重

体重は投与開始から回復試験終了まで毎週1回測定した。

測定は自動天秤 PE 3000 (メトラー社、スイス) を用いて行い、フロッピー・ディスクに記録した。

3) 摂 餌 量

摂餌量は毎週1回給餌した残量を自動天秤 PE 3000 (メトラー社、スイス) を用いて測定し、フロッピー・ディスクに記録した。摂餌量 (g/week) および飼料効率 (%) はコンピュータを用いて算出した。

4) 臨床検査

臨床検査は投与終了時および回復試験終了時の計2回実施した。

採血に当り、動物は約16時間絶食させた。動物をエーテルで麻酔後開腹し、腹部大動脈から採血した。

なお、抗凝固剤はEDTA-3Kおよびクエン酸ソーダを用いた。

a. 血液学的検査

血液学的検査には初血を用いた。

検査は総合血液学検査装置 THMS H 6000 (テクニコン社、米国) を用いて行い、下記の項目を測定した (EDTA-3K添加血液)。

白 血 球 数	(WBC)	暗視野板法
赤 血 球 数	(RBC)	暗視野板法
ヘモグロビン量	(HGB)	シアンメトヘモグロビン法
ヘマトクリット値	(HCT)	全赤血球の容積より補正
平均赤血球容積	(MCV)	RBC, HCTより算出
平均赤血球血色素量	(MCH)	HGB, RBCより算出
平均赤血球血色素濃度	(MCHC)	HGB, HCTより算出
血 小 板 数	(PLT)	暗視野板法
白血球百分率		フローサイトケミストリー法

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

網赤血球 (RC) 率算定のため血液を網赤血球染色用ガラス毛細管キャピロット (テルモ株式会社、東京都渋谷区) で染色後、血液塗抹標本を作製し鏡検した。

下記の項目は血液凝固測定装置 KC-40 (アメルング社、独国) を用いて測定した。血漿を用いた (クエン酸ソーダ添加血液)。

プロトロンビン時間	(PT)	quick 1 段法
活性化部分トロンボプラスチン時間	(APTT)	クロット法
フィブリノーゲン量	(Fibrinogen)	トロンビン時間法

b. 血液化学的検査

血液化学的検査は多項目生化学自動分析装置 Centrifichem ENCORE II (ベーカー社、米国) および EKTACHEM 700N (コダック社、米国) を用いて下記の項目を測定した。血液をクリーンシール (株式会社ヤトロン、東京都千代田区) に採取し、30分間放置後 3000 r. p. m. で7分間遠心分離して得た血清を用いた。

総蛋白	(TP)	ビューレット法
アルブミン	(Alb)	B. C. G. 法
A/G	(A/G)	計算値
血糖	(Glu)	グルコースオキシダーゼ法
中性脂肪	(TG)	酵素法
総コレステロール	(T-Chol)	酵素法
尿素窒素	(BUN)	ウレアーゼ改良法
クレアチニン*	(Crea)	アルカリ性ピクリン酸比色法
総ビリルビン	(T. Bili)	ジアゾ色素法
カルシウム	(Ca)	アルセナゾ III 色素法
無機リン	(IP)	モリブデン酸アンモニウム法
ナトリウム	(Na)	電極法
カリウム	(K)	電極法
塩素	(Cl)	電極法
グルタミン酸オキザロ酢酸 トランスアミナーゼ*	(GOT)	Karmen改良法
グルタミン酸ピルビン酸 トランスアミナーゼ*	(GPT)	Karmen改良法
γ-グルタミルトランス ペプチダーゼ*	(γ-GTP)	Szasz 改法
アルカリホスファターゼ*	(ALP)	Bessey-Lowry-Brock改良法

* 印の項目は ENCORE II で、他は EKTACHEM で測定した。

c. 尿検査

代謝ケージを用いて24時間（午前10時から翌日午前10時まで）尿を採取した。なお、採尿中も給餌および給水を行った。下記の項目を検査した。

尿 量
色 調
濁 度
尿 比 重
沈 渣

尿比重は尿比重屈折計UR-S（株式会社アタゴ、東京都板橋区）を用いて測定した。沈渣は尿を 1500 r. p. m. で5分間遠心分離した後、染色（ステルンハイマー染色変法）し、鏡検した。

下記の項目の測定にはN-マルティスティックスSG（マイルス・三共株式会社、東京都中央区）を用い、判定は尿分析装置 CLINITEK 200（マイルス社、米国）を用いた。検査には排泄3時間以内の新鮮尿を用いた。

pH
潜 血
ケトン体
糖
蛋 白
ビリルビン
ウロビリノーゲン

5) 病理学的検査

病理解剖は投与終了時および回復試験終了時に動物をエーテル麻酔し、放血致死させ実施した。肉眼的異常を病理解剖所見記録シートに記録した。

器官重量は器官重量測定用自動天秤 PE 160（メトラー社、スイス）を用いて、脳、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および卵巣について測定し、器官重量・体重比を算出した。

上記重量測定器官と下垂体、眼球、甲状腺（上皮小体を含む）、心臓、肺、胃、膀胱、骨髓（大腿骨）および肉眼所見で変化が認められた器官・組織は10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

病理組織学的検査は固定した器官・組織のうち、投与終了時に解剖した対照群と高用量群の心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎および骨髓（大腿骨）について検索した。

株式会社 関東組織形態研究所（埼玉県与野市）で常法に従って病理組織標本を作製した。標本の染色はヘマトキシリン・エオジン染色とした。鏡検は安評センターで実施し、病変の種類および程度について記録した。

6) データの記録および統計分析

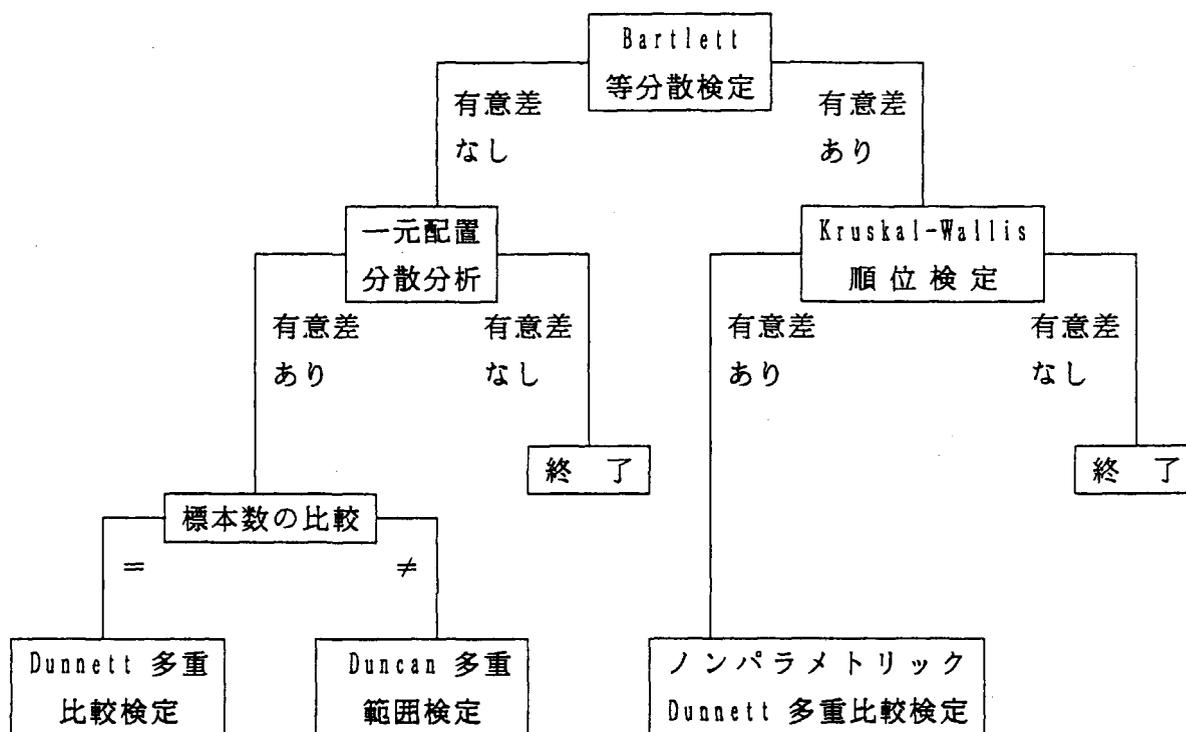
本試験の諸データはコンピュータ・システムを用いて記録し、統計分析した。

各試験群の体重、摂餌量、飼料効率、血液学的検査値、血液化学的検査値、尿検査値（尿量および尿比重のみ）、器官重量および器官重量・体重比は、下記に示した自動判別方式に従い、最初に Bartlett の等分散検定を実施した。等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、分散が有意で各群の標本数が同数の場合は Dunnett の多重比較検定、各群の標本数が異なる場合は Duncan の多重範囲検定で対照群と各投与群間の有意差を検定した。

Bartlett の等分散検定で不等分散の場合は Kruskal-Wallis の順位検定を実施し、有意の場合はノンパラメトリックの Dunnett の多重比較検定で対照群と各投与群間の有意差を検定した。また、病理学的検査結果については Fisher の直接確率検定を実施した。

有意水準は 5 および 1 % の片側検定で実施した。

なお、Bartlett の等分散検定、一元配置の分散分析および Kruskal-Wallis の順位検定の有意水準は 5 % で全群間の有意差を検定した。



12. 試験結果:

1) 死亡率

生存率を Figure 1 に、生存数および死亡率を Table 1 に示した。

投与期間中、雌雄とも対照群を含むすべての群で死亡例は認められなかった。また、回復期間中においても、雌雄の対照群および 125 mg/kg 群で死亡例は認められなかった。

2) 一般状態の観察

一般状態の観察所見を Table 2 および Appendix 1 に示した。

雄では、250 mg/kg 群で流涎が投与2週に1例、投与3週に4例、投与4週に5例に観察された。流涎は回復期間に入っても継続して観察され、回復1週（試験5週）に2例に認められた。その他、250 mg/kg 群で外傷が回復2週（試験6週）に1例観察された。

雌では、250 mg/kg 群で流涎が投与2週に1例、投与3週に3例、投与4週に4例に観察された。流涎は回復期間に入っても回復1週に1例に観察された。

3) 体重

体重を Figure 2、Table 3 および Appendix 2 に示した。

雄では、対照群に比較して 250 mg/kg 群で投与2週から体重増加が抑制され、4週間の体重増加量も低値であった。投与終了時における 250 mg/kg 群の対照群に対する平均体重の減少率は 8.0% であった。回復期間に入ると 250 mg/kg 群の変化は回復し、対照群との間に差は認められなかった。

雌では、投与期間中对照群と投与群で差は認められなかったが、回復期間では回復2週（試験6週）に対照群に比較して 250 mg/kg 群で平均体重が低値を示した。

4) 摂餌量

摂餌量を Figure 3、Table 4 および Appendix 3 に示した。

雄では、対照群に比較して 250 mg/kg 群で投与1週に摂餌量が減少を示した。投与2週以降は対照群と差が認められず、4週間の総摂餌量にも差はなかった。

雌では、投与期間中对照群と投与群とで差は認められなかった。回復期間では、回復2週（試験6週）に対照群に比較して 250 mg/kg 群で摂餌量が減少を示した。

5) 飼料効率

飼料効率を Table 5 および Appendix 4 に示した。

雄では、対照群に比較して 250 mg/kg 群で投与3週に低値を示したが、4週間の平均飼料効率に差は認められなかった。回復期間では、回復1週（試験5週）に対照群に比較して 250 mg/kg 群で低値であった。

雌では、投与期間および回復期間を通じて対照群と投与群で差が認められなかった。

6) 血液学的検査

血液学的検査結果を Table 6および Appendix 5 に示した。

投与終了時の検査結果

雄では、対照群に比較して 250 mg/kg群でヘマトクリット値、ヘモグロビン量および赤血球数が低値を示し、血小板数、白血球数および網赤血球率が高値を示した。その他、10および50 mg/kg群で好中球比率の高値、リンパ球比率の低値が認められたが用量相関性のない変化であった。

雌では、対照群に比較して 250 mg/kg群でヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球数および好中球比率が低値を示し、血小板数、リンパ球比率および網赤血球率が高値を示した。

回復期間終了時の検査結果

雄では、投与終了時に認められた変化はすべて回復し、対照群と 250 mg/kg群で差の認められた検査項目はなかった。

雌では、投与終了時に認められた変化の多くが回復を示したが、ヘマトクリット値は完全には回復せず、対照群に比較して 250 mg/kg群で僅かに低値であった。また、250 mg/kg群では対照群に比較して MCHC が高値、網赤血球率が低値を示した。

7) 血液凝固検査

血液凝固検査結果を Table 7および Appendix 6 に示した。

投与終了時の検査結果

対照群に比較して雄の50 mg/kg群でプロトロンビン時間に短縮が認められたが、軽微かつ用量相関性のない変化であった。その他には、雌雄とも対照群と投与群とで差の認められた検査項目はなかった。

回復期間終了時の検査結果

雄では、検査した3項目とも対照群と 250 mg/kg群とで差は認められなかった。

雌では、対照群に比較して 250 mg/kg群でフィブリノーゲン量が低値を示した。

8) 血液化学的検査

血液化学的検査結果を Table 8および Appendix 7 に示した。

投与終了時の検査結果

雄では、対照群に比較して 250 mg/kg群で総コレステロール、アルブミン、A/G比、GPT、総ビリルビンおよびカリウムが高値、 γ -GTPが低値を示した。

雌では、対照群に比較して 50 および 250 mg/kg群で総コレステロールが高値を示し、さらに 250 mg/kg群で血糖、GPT、総ビリルビンおよびカルシウムの高値、塩素の低値が認められた。

回復期間終了時の検査結果

雄では、対照群に比較して 250 mg/kg群でクレアチニンが低値を示した。

雌では、対照群に比較して 250 mg/kg群で総コレステロールが低値を示した。

9) 尿検査

尿検査結果を Table 9 および Appendix 8 に示した。

投与終了時の検査結果

雄では、対照群に比較して 250 mg/kg群で尿量が増加を示し、pH 6.0 および 5.5 動物が各 2 例、沈渣で赤血球1+動物が 1 例認められた。

雌では、対照群に比較して 50 および 250 mg/kg群で沈渣赤血球1+動物が各 1 例認められ、さらに 250 mg/kg群で尿 pH の低値動物が増加し、pH 6.0 が 2 例、pH 5.5 が 1 例、pH 5.0 が 2 例であった。

回復期間終了時の検査結果

雌雄とも対照群と 250 mg/kg群とで明確な差は認められなかった。

10) 器官重量

器官重量を Table 10 および Appendix 9 に示した。

投与終了時の検査結果

雌雄とも、対照群に比較して 250 mg/kg群で肝臓および脾臓重量が高値を示した。

回復期間終了時の検査結果

雌雄とも重量測定を実施したすべての器官について、対照群と 250 mg/kg群とで差は認められなかった。

11) 器官重量・体重比

器官重量・体重比（相対重量）を Table 11 および Appendix 10 に示した。

投与終了時の結果

雄では、対照群に比較して 250 mg/kg群で肝臓、脾臓および精巣相対重量が高値を示した。

雌では、対照群に比較して 250 mg/kg群で肝臓および脾臓相対重量が高値、副腎相対重量が低値を示した。

回復期間終了時の結果

雄では、投与終了時に認められた変化がすべて回復し、対照群と 250 mg/kg群とで差が認められなかった。

雌では、対照群に比較して肝臓および卵巣相対重量が高値を示した。

12) 病理学的検査

剖検所見を Table 12 および Appendix 11に、組織学的所見は Table 13 および Appendix 12 に示した。

a) 剖検所見

4週の時点を計画屠殺した動物は、対照群、10、50および250 mg/kg群のそれぞれ各群雌雄5例ずつであった。

剖検所見では、対照群に比較して被験物質投与群で多くみられた病変として、脾臓の黒色化が250 mg/kg群の雄に5例、雌に4例、肥大が同群の雄に5例、雌に3例、肝臓の黒色化が250 mg/kg群の雄に3例、肥大が同群の雄に2例、雌の50および250 mg/kg群に1および5例に観察された。その他観察された所見は、対照群および10 mg/kg群で単発性の発生であった。

6週の時点を計画屠殺した動物は、対照群および250 mg/kg群の各群雌雄5例ずつであった。

剖検所見では、対照群に比較して被験物質投与群で多くみられた病変は観察されなかった。観察された所見として、脾臓の黒色化が雄の250 mg/kg群に、肝臓の白色斑/区域が雌の250 mg/kg群に、皮膚の潰瘍が雄の対照群および250 mg/kg群にそれぞれ1例ずつ認められた。

b) 組織所見

投与終了時の対照群および250 mg/kg群についての組織学的検査の結果、骨髄、脾臓、肝臓および腎臓に250 mg/kg群の方に多くみられた所見が観察されたので、10および50 mg/kg群、回復群についても組織学検査を実施した。

投与終了時解剖動物

組織所見では、対照群に比較して被験物質投与群に多い所見として、骨髄の造血亢進、脾臓の充血、色素沈着および肝臓のクッパー細胞の色素沈着が雌雄の250 mg/kg群の全例に、脾臓の造血亢進および肝細胞腫脹が250 mg/kg群の雄の全例および雌の4例に、腎臓の硝子滴変性が雄の対照群、10、50および250 mg/kg群の順にそれぞれ1、2、4および5例に観察された。また、肝臓の単細胞壊死が250 mg/kg群の雄の4例および雌の2例に、髓外造血が250 mg/kg群の雄で2例、雌で3例に観察された。

発生率上、対照群、投与群間に差の示されなかった所見のうち主なものを下記する。

- | | |
|--------|-----------------------------|
| (1) 心臓 | 細胞浸潤：雌に低い発生であった。 |
| (2) 肝臓 | 脂肪化：雌雄ともに観察されたが、雄でより多く発生した。 |
| | 肉芽巣：雌雄ともに観察されたが、雌でより多く発生した。 |

- (3) 腎臓
- 尿細管好塩基化：雌雄ともに観察されたが、雄でより多く発生した。
 - 好酸性小体：雄で少数例に観察された。
 - 尿細管拡張：雌雄の少数例に観察された。

その他観察された所見はごく僅かか単発性の発生にとどまった。

回復試験終了時解剖動物

投与終了時の解剖所見で 250 mg/kg群の動物に多く観察された脾臓の充血、肝臓の肝細胞腫脹、単細胞壊死および腎臓の尿細管硝子滴変性は観察されなかった。また、脾臓および骨髄の造血亢進、肝臓の髓外造血も 250 mg/kg群の雄の 1 例に観察されたのみで、他の個体には観察されなかった。一方、色素沈着は投与終了時に比較し、同群の雄の肝臓で発生数の減少が認められたが、雌雄の脾臓および雌の肝臓では回復期間終了時も発生数に変化はなく、雌の脾臓においては程度の増強が観察された。

発生率上、対照群、投与群間に差の示されなかった所見のうち主なものを下記する。

- (1) 肝臓
- 肉芽巣：雌雄ともに観察されたが、雌でより多く発生した。
 - リンパ球浸潤：雄で少数例に観察された。
- (2) 腎臓
- 尿細管好塩基化：雌雄ともに多数例に認められた。
 - 尿細管拡張：雌雄ともに観察されたが、雄でより多く発生した。

その他観察された所見はごく僅かか単発性の発生にとどまった。

1 3. 考察および結論：

一般状態の観察の結果、雌雄とも 250 mg/kg群で流涎が認められ、被験物質投与による変化と考えられた。その他、雄の 250 mg/kg群で回復2週に外傷が認められたが、掻き傷であった。

死亡例は、雌雄いずれの群にも認められなかった。

体重は、雄の 250 mg/kg群で投与2～4週の間、雌の 250 mg/kg群で回復2週に対照群に比較して低値を示した。雄における変化は被験物質投与による変化と考えられ、投与休止に伴い回復が認められた。雌における変化は、投与終了時における計画屠殺動物の体重が対照群で低値のものが比較的多く、250 mg/kg群で高値のものが比較的多かったためと考えられる。

摂餌量は、雄の 250 mg/kg群で投与1週に減少が認められ、回復2週で対照群に比較して体重が低値を示した雌の 250 mg/kg群でも僅かに減少が認められた。

血液学的検査の結果、雌雄の 250 mg/kg群でヘマトクリット値、ヘモグロビン量および赤血球数の低値、血小板数および網赤血球率の高値が認められ、さらに雄の同群で白血球数の高値が認められた。本被験物質は芳香族アミン化合物でありメトヘモグロビン血症を誘発させる可能性があり、上述の諸変化もメトヘモグロビンによるものと推察されるが、白血球数高値の起因は明確でない。

血液凝固検査の結果、測定した3項目とも変化は認められず、被験物質投与の影響はなかった。

血液化学的検査の結果、雌雄の 250 mg/kg群で認められた総ビリルビンの高値および雄の同群で認められたカリウムの高値はメトヘモグロビン血症に起因した溶血の影響と考えられるが、数値的にみて溶血は軽度と推察される。また、雌の 50 および 250 mg/kg、雄の 250 mg/kg群で総コレステロールの高値、雌の 250 mg/kg群で血糖が高値を示した。両検査項目とも肝臓および腎臓障害、利尿剤投与等で高値を示すことが知られている。本試験では腎障害を示唆する検査項目の変化は認められていないが、GPTの高値、尿量の増加が認められている。また、雌の 250 mg/kg群で認められた塩素の低値は、尿量の増加に関連する変化と考えられる。その他、雄の 250 mg/kg群でアルブミンが高値を示したが、その起因は明らかではなく、雌の 250 mg/kg群で認められたカルシウムの高値は、アルブミンとの結合性から考えアルブミン高値傾向による見かけの高値と推察され、雄の同群でも同様の傾向にあった。その他、雄の 250 mg/kg群で認められた γ -GTPの低値は、特に意義のあるものとは考えられなかった。回復試験終了時の検査では、投与終了時に認められた変化はいずれも回復が認められた。

尿検査の結果、雌雄とも 250 mg/kg群で尿量の増加、尿の酸性化、沈渣での赤血球の出現が認められ、さらに雌の同群では尿比重も低値を示した。尿の酸性化は尿量の増加を考慮してもケトン体の高値が認められないことから、代謝物の可能性が示唆される。沈渣で赤血球が認められたが少数例であった。回復期間終了時の検査ではすべて回復が認められた。

器官重量測定の結果、雌雄の 250 mg/kg群で肝臓および脾臓の実重量および相対重量が高値を示し、被験物質投与の影響と考えられた。その他、雄の 250 mg/kg群で認められた精巣相対重量の高値、雌の 250 mg/kg群で認められた副腎相対重量の低値は対脳重量比でみた場合、対照群と差がなく、前者は体重が低値傾向によるものと考えられ、後者については被験物質投与に起因するものか否か明確でなかった。

病理学検査の結果、肉眼所見では投与終了時解剖動物において脾臓の黒色化、肥大、肝臓の肥大が雌雄の投与群に、肝臓の黒色化が雄の投与群に観察されたが、回復試験終了時解剖動物では減少もしくは消失していた。

組織所見では、投与終了時解剖動物においては骨髄の造血亢進、脾臓の充血、色素沈着、造血亢進、肝臓の肝細胞腫脹、クッパー細胞の色素沈着が雌雄の 250 mg/kg群のほとんどの例で、肝臓の単細胞壊死が 250 mg/kg群の雄のほとんどの例と雌の一部の例で観察され、腎臓の硝子滴変性が雄において用量相関性に増加していた。また、肝臓の髄外造血が雌雄の 250 mg/kgの一部の例で認められた。

肝細胞の腫脹は小葉中心性にみられ、散見された単細胞壊死と共に肝細胞障害による変化と考えられる。腎臓の尿細管硝子滴変性については対照群の動物でも観察される変化であり、発生が雄に限定していることから、自然発生病変が被験物質投与によって増強されたことが想定される。なお、10 mg/kg群において中等度のものを含め2例に発生がみられたが、前述のとおり対照群にも認められ、かつ本病変発現には個体差があることから同群の変化は被験物質の影響ではないと考えられる。肝臓および脾臓に認められた色素沈着は、本被験物質がメトヘモグロビン血症^{1, 2)}を誘発し、³⁾溶血作用も知られているアニリン系の化合物であることから、溶血と脾臓および肝臓の網内皮系細胞による貪食作用によるものと考えられた。また、骨髄および脾臓で観察された造血亢進や肝臓における髄外造血はメトヘモグロビン血症に対する生体の代償性造血亢進と考えられ、血液学検査の結果とも一致していた。

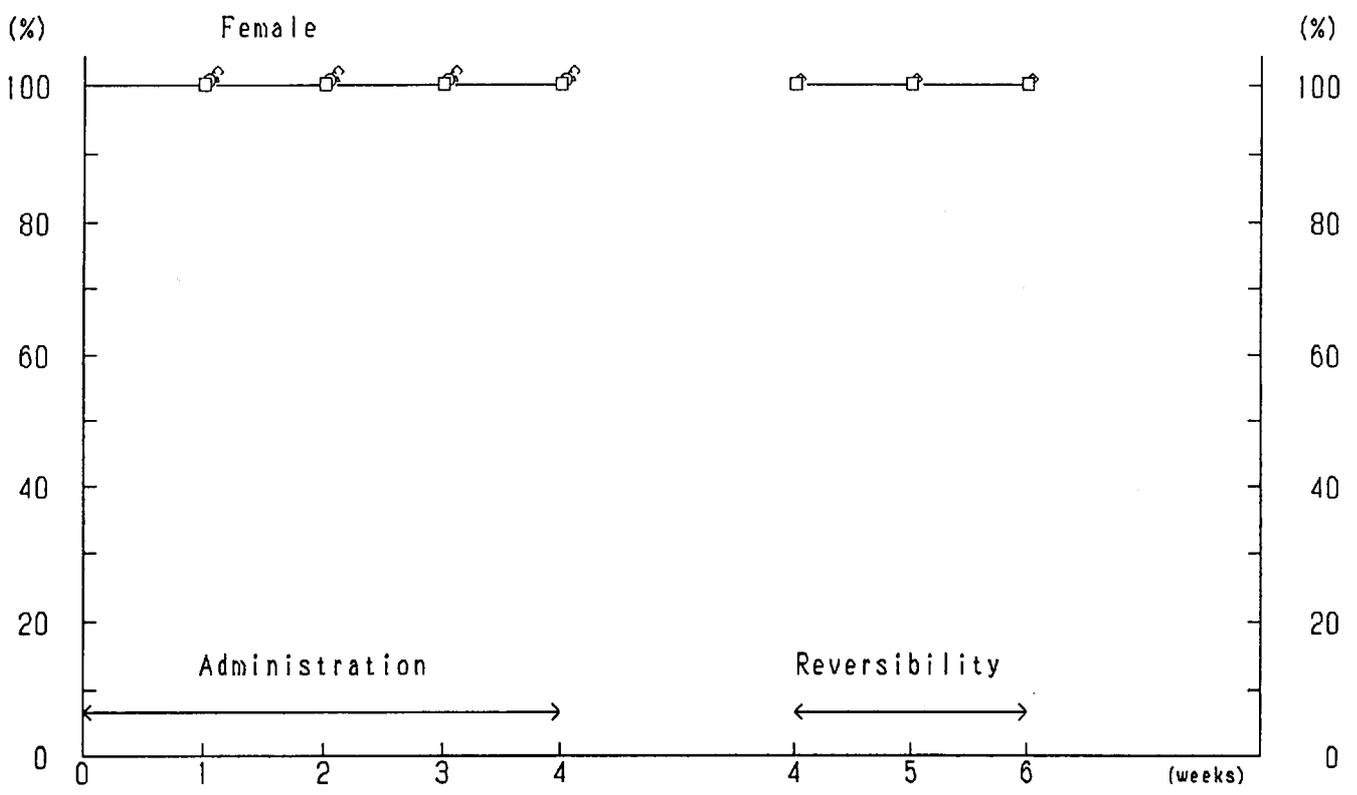
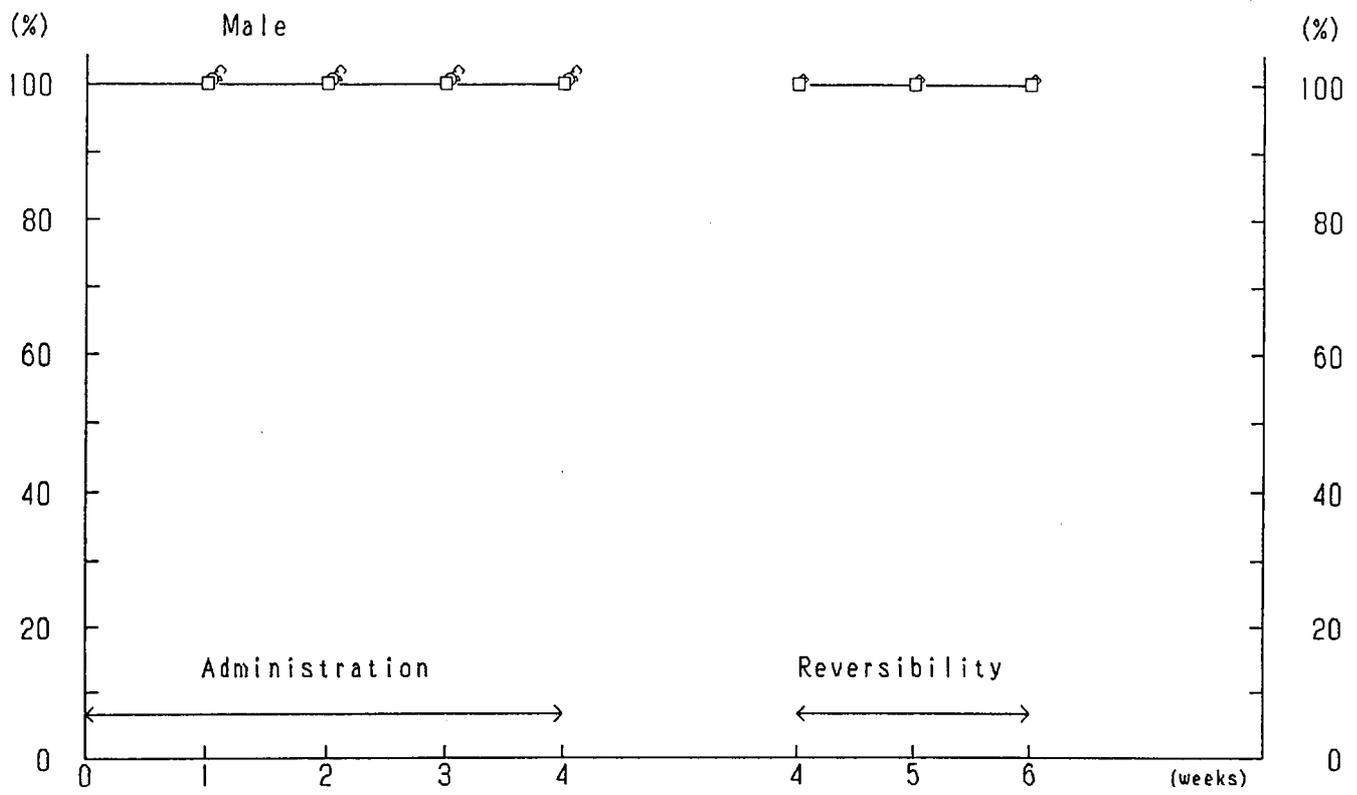
以上の組織所見は肉眼所見を裏付けており、被験物質投与の影響が示唆された。上述の被験物質の 250 mg/kg投与群に観察された病変の内、骨髄の造血亢進、脾臓の充血、造血亢進、肝臓の肝細胞腫脹、単細胞壊死、髄外造血および腎臓の尿細管の硝子滴変性は回復終了時解剖動物では消失あるいは程度の軽減が観察されており可逆性の変化であることが示唆された。また、脾臓で観察された色素沈着は投与終了時解剖動物よりも回復終了時解剖動物で程度が増強していたが、これは投与を終了した後もメトヘモグロビン血症がしばらく継続し、溶血が進行した結果と考えられる。その他観察された所見は発生率および程度に用量相関性は認められず自然発生病変と考えられる。

以上の結果、50 mg/kg群の雄では腎臓の尿細管硝子滴変性の増加が、雌ではコレステロールの高値および肝臓の肥大が認められ、影響量であった。従って、無影響量は雌雄とも 10 mg/kg と判断される。

14. 参 考 文 献 :

- 1) 藤沢繁彦：“薬物投与による動物のメトヘモグロビン血症に関する研究．熊本医学会雑誌，
34, 1750 (1960)
- 2) Smith R.P. and Olson M.V., Drug-induce Methemoglobinemia. Seminars in Hematology,
Vol.10. No.3 (July), 253-268 (1973)
- 3) 谷本義文：“血液学—ヒトと動物の接点—”，清至書院，東京，P695-770

Figures, Tables



Exp. No. 2292(115-028)

Dose level	(mg/kg)
—□—	0
—○—	10
—△—	50
—◇—	250

Figure 1. Survival ratio

Table 1. Survival and mortality

Exp. No. 2292 (115-028)

Sex	Dose level (mg/kg)	Weeks of experiment						Mortality (%)
		1	2	3	4	5	6	
Male	0	10/10	10/10	10/10	10/10	5/5	5/5	0.0
	10	5/5	5/5	5/5	5/5			0.0
	50	5/5	5/5	5/5	5/5			0.0
	250	10/10	10/10	10/10	10/10	5/5	5/5	0.0
Female	0	10/10	10/10	10/10	10/10	5/5	5/5	0.0
	10	5/5	5/5	5/5	5/5			0.0
	50	5/5	5/5	5/5	5/5			0.0
	250	10/10	10/10	10/10	10/10	5/5	5/5	0.0

Number surviving / Number per group.

Table 2. Clinical observation

Exp. No. 2292 (115-028)

Sex: Male

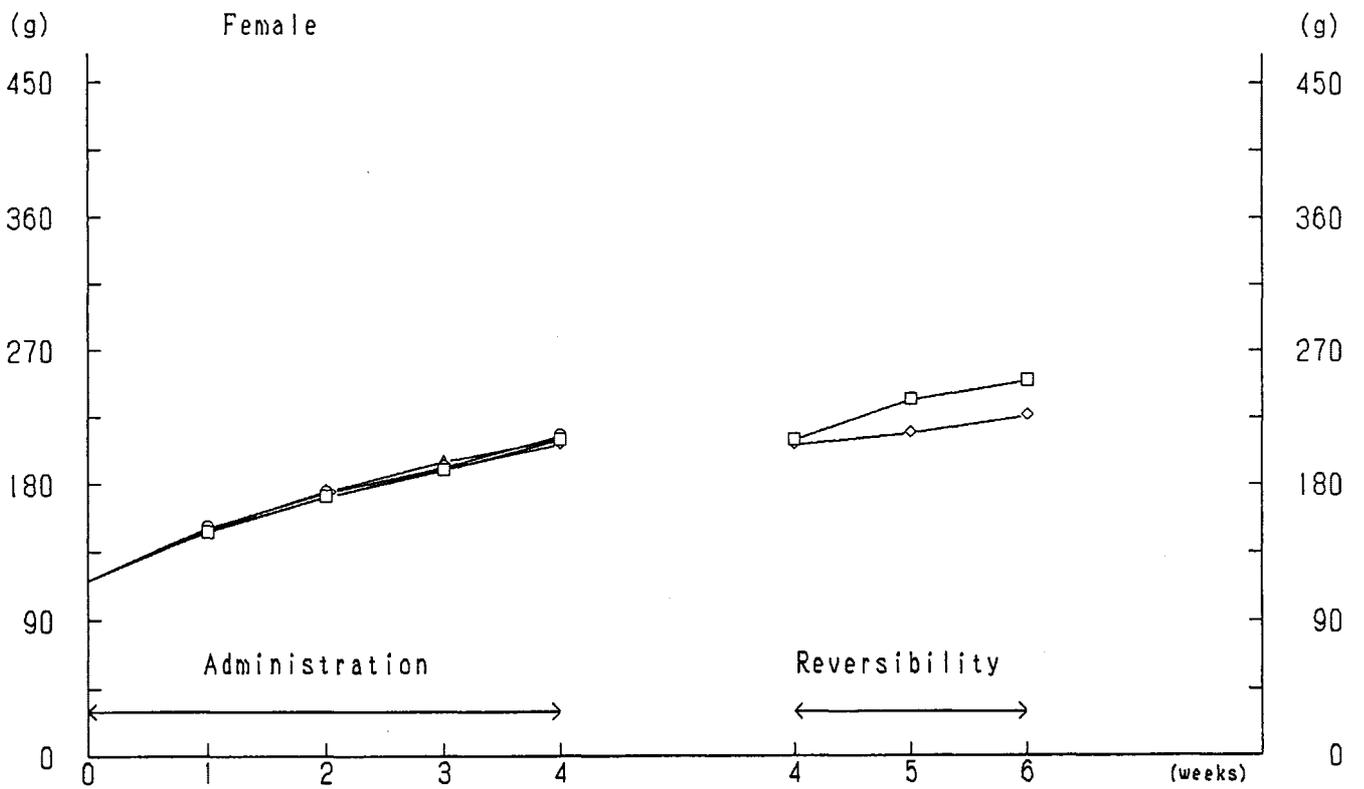
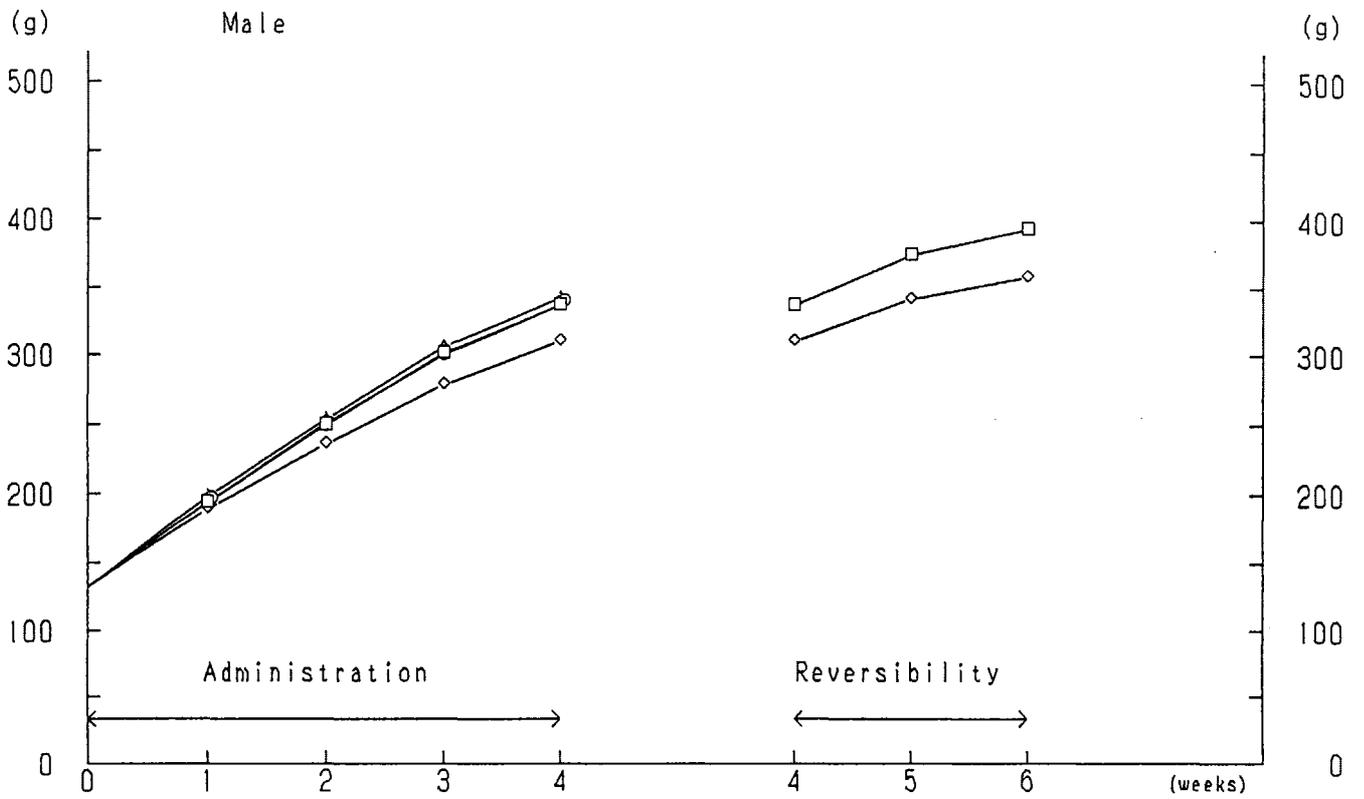
Signs	Dose level (mg/kg)	Weeks of experiment						Total (1 → 6)
		1	2	3	4	5	6	
normal/Number per group	0	10/10	10/10	10/10	10/10	5/5	5/5	10
	10	5/5	5/5	5/5	5/5	0/0	0/0	5
	50	5/5	5/5	5/5	5/5	0/0	0/0	5
	250	10/10	9/10	6/10	5/10	3/5	4/5	5
sacrificed	0	0	0	0	5	0	5	10
	10	0	0	0	5	0	0	5
	50	0	0	0	5	0	0	5
	250	0	0	0	5	0	5	10
trauma	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0
	50	0	0	0	0	0	0	0
	250	0	0	0	0	0	1	1
salivation	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0
	50	0	0	0	0	0	0	0
	250	0	1	4	5	2	0	5

Table 2. -continued Clinical observation

Exp. No. 2292 (115-028)

Sex: Female

Signs	Dose level (mg/kg)	Weeks of experiment						Total (1 → 6)
		1	2	3	4	5	6	
normal/Number per group	0	10/10	10/10	10/10	10/10	5/5	5/5	10
	10	5/5	5/5	5/5	5/5	0/0	0/0	5
	50	5/5	5/5	5/5	5/5	0/0	0/0	5
	250	10/10	9/10	7/10	6/10	4/5	5/5	6
sacrificed	0	0	0	0	5	0	5	10
	10	0	0	0	5	0	0	5
	50	0	0	0	5	0	0	5
	250	0	0	0	5	0	5	10
salivation	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0
	50	0	0	0	0	0	0	0
	250	0	1	3	4	1	0	4



Exp. No. 2292(115-028)

Dose level (mg/kg)

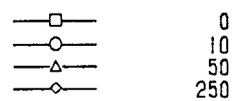


Figure 2. Body weight

Table 3. Body weight

Exp. No. 2292 (115-028)

(unit : g)

Sex	Dose level (mg/kg)	Weeks of experiment				
		0	1	2	3	4
Male	0	133 ± 4	194 ± 7	250 ± 12	302 ± 17	338 ± 18
	10	133 ± 3	194 ± 5	251 ± 8	301 ± 12	338 ± 16
	50	133 ± 3	198 ± 11	254 ± 17	307 ± 24	343 ± 31
	250	133 ± 3	189 ± 8	236 ± 13*	279 ± 23*	311 ± 27*
Female	0	116 ± 3	148 ± 6	171 ± 9	189 ± 12	209 ± 16
	10	116 ± 5	151 ± 6	174 ± 11	191 ± 17	212 ± 18
	50	116 ± 4	150 ± 8	175 ± 13	195 ± 14	210 ± 17
	250	116 ± 4	149 ± 8	171 ± 13	190 ± 15	206 ± 19

Mean ± S. D.

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

Table 3. -continued Body weight

Exp. No. 2292 (115-028)

(unit : g)

Sex	Dose level (mg/kg)	Gain (0 → 4)
Male	0	204 ± 18
	10	205 ± 15
	50	210 ± 31
	250	177 ± 26*
Female	0	92 ± 16
	10	96 ± 16
	50	94 ± 15
	250	90 ± 18

Mean ± S.D.

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

Table 3. -continued Body weight

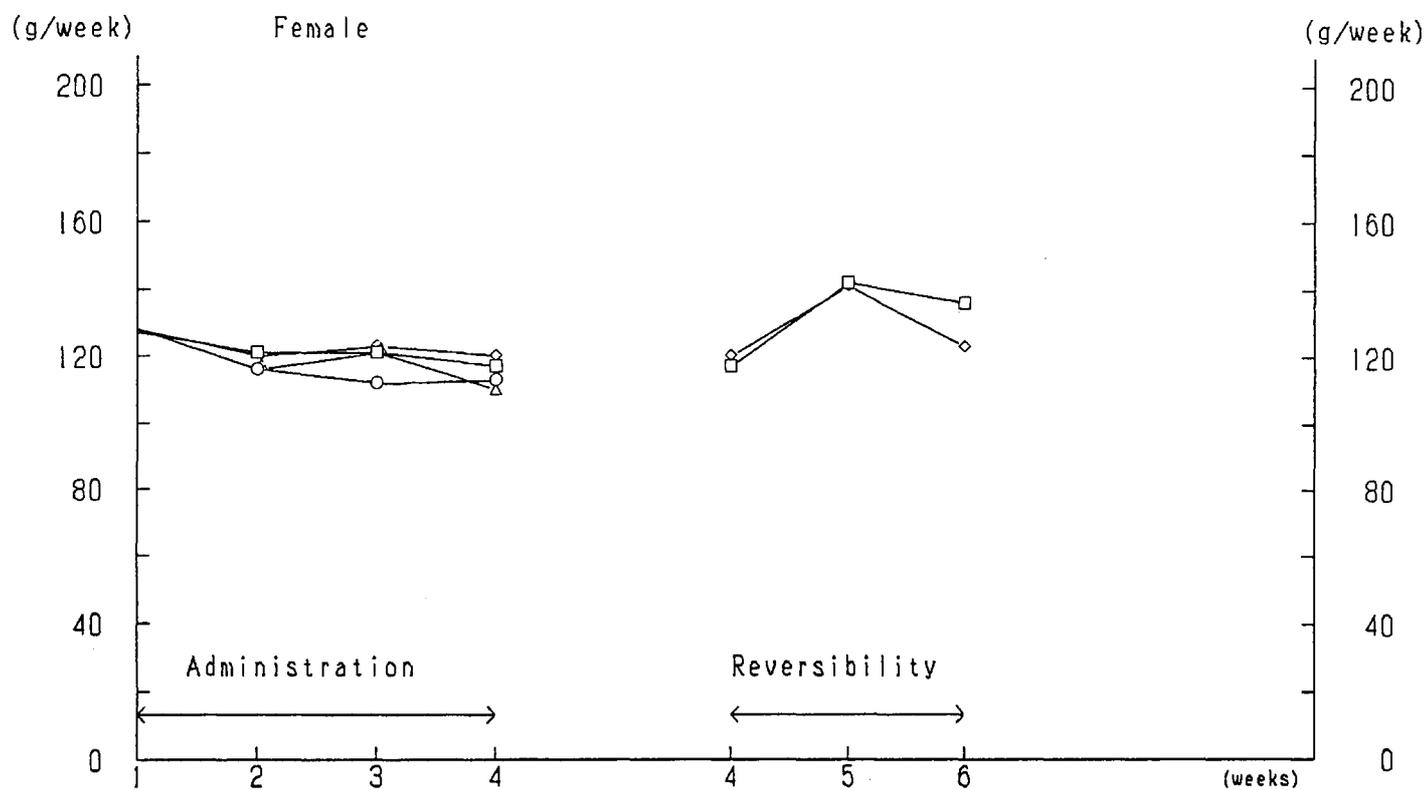
Exp. No. 2292 (115-028)

(unit : g)

Sex	Dose level (mg/kg)	Weeks of experiment		Gain (4 → 6)
		5	6	
Male	0	375 ± 29	394 ± 31	55 ± 11
	250	343 ± 34	359 ± 38	45 ± 22
Female	0	237 ± 14	250 ± 14	30 ± 6
	250	214 ± 21	226 ± 17*	25 ± 9

Mean ± S. D.

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



Exp. No. 2292(115-028)

Dose level (mg/kg)



Figure 3. Food consumption

Table 4. Food consumption

Exp. No. 2292 (115-028)

(unit : g/week)

Sex	Dose level (mg/kg)	Weeks of experiment 1	2	3	4	Total (0 → 4)
Male	0	155 ± 5	169 ± 14	173 ± 13	163 ± 14	661 ± 39
	10	155 ± 9	166 ± 8	173 ± 11	163 ± 10	656 ± 30
	50	152 ± 10	164 ± 21	167 ± 20	157 ± 22	640 ± 69
	250	141 ± 9**	156 ± 13	163 ± 15	156 ± 16	616 ± 44
Female	0	127 ± 5	121 ± 10	121 ± 13	117 ± 12	486 ± 38
	10	128 ± 9	116 ± 8	112 ± 7	113 ± 8	468 ± 27
	50	128 ± 7	116 ± 14	121 ± 8	110 ± 13	474 ± 34
	250	128 ± 6	120 ± 12	123 ± 13	120 ± 12	490 ± 35

Mean ± S. D.

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

Table 4. -continued Food consumption

Exp. No. 2292 (115-028)

(unit : g/week)

Sex	Dose level (mg/kg)	Weeks of experiment 5	6	Total (5 → 6)
Male	0	187 ± 18	170 ± 14	356 ± 31
	250	179 ± 17	167 ± 15	347 ± 32
Female	0	142 ± 8	136 ± 6	278 ± 13
	250	141 ± 12	123 ± 9*	264 ± 20

Mean ± S. D.
 Significant difference from control group; *: P ≤ 0.05 **: P ≤ 0.01

Table 5. Food efficiency

Exp. No. 2292 (115-028)

(unit : %)

Sex	Dose level (mg/kg)	Weeks of experiment	1	2	3	4	Mean (0 → 4)
Male	0	38.7 ± 4.2	33.2 ± 3.0	30.1 ± 3.7	22.0 ± 4.4	31.0 ± 2.2	
	10	39.3 ± 1.8	34.9 ± 3.3	29.0 ± 2.7	22.3 ± 4.3	31.3 ± 2.5	
	50	42.8 ± 6.4	33.7 ± 2.4	31.8 ± 3.6	22.7 ± 6.0	32.7 ± 2.7	
	250	39.6 ± 3.7	30.1 ± 3.9	25.9 ± 4.8*	20.3 ± 3.1	28.7 ± 2.9	
Female	0	24.9 ± 4.2	19.2 ± 5.7	14.9 ± 4.5	16.2 ± 5.3	18.9 ± 2.4	
	10	27.5 ± 3.0	20.2 ± 5.9	14.8 ± 5.5	18.2 ± 2.9	20.4 ± 2.6	
	50	25.9 ± 3.3	21.7 ± 4.9	16.5 ± 3.7	13.6 ± 5.0	19.7 ± 1.8	
	250	25.9 ± 4.1	18.0 ± 5.1	15.9 ± 4.4	12.8 ± 6.2	18.3 ± 2.8	

Mean ± S. D.
 Significant difference from control group; *: P ≤ 0.05 **: P ≤ 0.01

Table 5. -continued Food efficiency

Exp. No. 2292 (115-028)

(unit : %)

Sex	Dose level (mg/kg)	Weeks of experiment		Mean (5 → 6)
		5	6	
Male	0	19.5 ± 2.0	11.2 ± 3.6N	15.5 ± 2.7
	250	16.0 ± 1.7**	9.3 ± 12.2	12.8 ± 6.3
Female	0	12.5 ± 3.0	9.0 ± 4.1	10.8 ± 1.7
	250	8.8 ± 3.9	9.9 ± 4.2	9.4 ± 3.3

Mean ± S. D.
 Significant difference from control group; *: P ≤ 0.05 **: P ≤ 0.01
 N: Non parametric analysis

Table 6. Hematology

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	HCT (%)	HGB (g/dl)	RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	MCV (μm^3)	MCH (pg)	MCHC (%)
Male	0	5	41.8 \pm 0.7	14.1 \pm 0.3N	6.91 \pm 0.32	60.6 \pm 2.1	20.5 \pm 0.7	33.8 \pm 0.2
	10	5	42.6 \pm 1.3	14.4 \pm 0.4	7.13 \pm 0.34	59.9 \pm 2.0	20.3 \pm 0.8	33.9 \pm 0.3
	50	5	41.8 \pm 0.3	14.2 \pm 0.1	6.89 \pm 0.18	60.8 \pm 1.7	20.6 \pm 0.5	33.9 \pm 0.2
	250	5	37.4 \pm 1.2**	12.7 \pm 0.5*	6.20 \pm 0.32**	60.4 \pm 1.9	20.6 \pm 0.5	34.0 \pm 0.4
Female	0	5	43.9 \pm 0.7	14.7 \pm 0.3	7.24 \pm 0.35N	60.8 \pm 2.5	20.3 \pm 0.7	33.5 \pm 0.2
	10	5	44.4 \pm 2.0	14.9 \pm 0.7	7.30 \pm 0.23	60.9 \pm 2.1	20.5 \pm 0.6	33.6 \pm 0.2
	50	5	43.4 \pm 0.8	14.4 \pm 0.2	7.13 \pm 0.35	61.0 \pm 3.1	20.3 \pm 0.9	33.3 \pm 0.3
	250	5	36.9 \pm 0.9**	12.3 \pm 0.2**	6.16 \pm 0.07**	60.0 \pm 1.7	20.0 \pm 0.5	33.4 \pm 0.4

Mean \pm S.D.Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

N: Non parametric analysis

Table 6. -continued Hematology

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	PLT ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Differential leukocyte counts (%)			EOSN	BASO	LUC
					NEUT	LYMPH	MONO			
Male	0	5	1059 \pm 88	11.2 \pm 2.2	11 \pm 2	88 \pm 2	1 \pm 1	1 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
	10	5	1093 \pm 46	8.4 \pm 3.5	17 \pm 5**	81 \pm 4**	1 \pm 0	1 \pm 1	0 \pm 0	0 \pm 0
	50	5	1093 \pm 73	11.9 \pm 3.7	18 \pm 2**	81 \pm 2**	1 \pm 0	1 \pm 1	0 \pm 0	0 \pm 0
	250	5	1427 \pm 98**	16.8 \pm 1.1**	12 \pm 2	87 \pm 2	1 \pm 0	1 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 1
Female	0	5	1037 \pm 82	9.8 \pm 2.7	10 \pm 1N	88 \pm 2N	1 \pm 1	1 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
	10	5	1079 \pm 99	8.3 \pm 3.4	9 \pm 1	90 \pm 1	0 \pm 1	1 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
	50	5	1148 \pm 89	9.9 \pm 3.3	11 \pm 9	87 \pm 9	0 \pm 0	1 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
	250	5	1338 \pm 90**	10.3 \pm 2.0	7 \pm 1**	92 \pm 1**	0 \pm 1	0 \pm 1	0 \pm 0	1 \pm 1

NEUT: Neutrophil LYMPH: Lymphocyte MONO: Monocyte EOSN: Eosinophil BASO: Basophil LUC: Large unstained cells
 Mean \pm S. D.
 Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$
 N: Non parametric analysis

Table 6. -continued Hematology

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Reticulocyte (%)
Male	0	5	26 ± 12
	10	5	30 ± 10
	50	5	33 ± 14
	250	5	128 ± 30**
Female	0	5	20 ± 6N
	10	5	24 ± 4
	50	5	27 ± 11
	250	5	111 ± 32**

Mean ± S. D.

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

N: Non parametric analysis

Table 6. -continued Hematology

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	HCT (%)	HGB (g/dl)	RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	MCV (μm^3)	MCH (pg)	MCHC (%)
Male	0	5	45.0 \pm 1.5	14.6 \pm 0.4	7.78 \pm 0.18	57.8 \pm 1.5	18.8 \pm 0.3	32.5 \pm 0.5
	250	5	42.9 \pm 2.9	14.0 \pm 1.0	7.58 \pm 0.47	56.6 \pm 2.8	18.5 \pm 0.9	32.7 \pm 0.3
Female	0	5	45.8 \pm 1.4	14.5 \pm 0.4	7.59 \pm 0.24	60.4 \pm 1.4	19.1 \pm 0.4	31.7 \pm 0.2
	250	5	43.8 \pm 1.2*	14.2 \pm 0.3	7.28 \pm 0.40	60.3 \pm 2.1	19.5 \pm 0.7	32.2 \pm 0.3**

Mean \pm S. D.
 Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

41

Table 6. -continued Hematology

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	PLT ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Differential leukocyte counts (%)					
					NEUT	LYMPH	MONO	EOSN	BASO	LUC
Male	0	5	1147 \pm 77	9.8 \pm 1.5	14 \pm 6	84 \pm 6	1 \pm 1	1 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
	250	5	1148 \pm 211	11.2 \pm 2.8	17 \pm 9	80 \pm 9	1 \pm 0	1 \pm 1	0 \pm 0	0 \pm 0
Female	0	5	1091 \pm 55	6.7 \pm 2.0	13 \pm 5	85 \pm 5	1 \pm 0	2 \pm 1	0 \pm 0	0 \pm 0
	250	5	1190 \pm 110	6.3 \pm 1.2	14 \pm 9	85 \pm 8	1 \pm 0	1 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0

NEUT: Neutrophil LYMPH: Lymphocyte MONO: Monocyte EOSN: Eosinophil BASO: Basophil LUC: Large unstained cells
 Mean \pm S.D.
 Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

Table 6. -continued Hematology

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Reticulocyte (%)
Male	0	5	36 ± 23
	250	5	39 ± 19
Female	0	5	29 ± 6
	250	5	14 ± 4**

Mean ± S. D.
 Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

Table 7. Coagulation

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	PT (sec.)	APTT (sec.)	Fibrinogen (mg/dl)
Male	0	5	14.6 ± 0.4	27.8 ± 1.7	238 ± 11
	10	5	14.4 ± 0.5	26.4 ± 1.8	251 ± 15
	50	5	14.0 ± 0.3*	25.2 ± 1.7	239 ± 16
	250	5	14.9 ± 0.3	24.8 ± 1.7	234 ± 38
Female	0	5	14.7 ± 0.0N	22.5 ± 1.8	178 ± 10
	10	5	14.7 ± 0.4	22.0 ± 1.1	189 ± 17
	50	5	14.7 ± 0.4	23.1 ± 1.6	198 ± 27
	250	5	14.6 ± 0.4	23.0 ± 1.0	180 ± 21

Mean ± S.D.
 Significant difference from control group: *: P ≤ 0.05 **: P ≤ 0.01
 N: Non parametric analysis

77

Table 7. -continued Coagulation

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	PT (sec.)	APTT (sec.)	Fibrinogen (mg/dl)
Male	0	5	14.1 ± 0.5	25.6 ± 1.6	230 ± 35
	250	5	14.4 ± 0.4	24.7 ± 1.0	249 ± 77
Female	0	5	15.3 ± 0.3	21.8 ± 1.2	200 ± 34
	250	5	15.3 ± 0.4	22.7 ± 1.7	159 ± 17*

Mean ± S.D.
 Significant difference from control group; *: P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01

Table 8. Blood chemistry

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	T. cholesterol (mg/dl)	T. protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	A/G
Male	0	5	11.5 ± 1.9	0.69 ± 0.06	46 ± 5	5.30 ± 0.23	3.10 ± 0.14	1.41 ± 0.06
	10	5	10.8 ± 1.2	0.61 ± 0.07	49 ± 8	5.15 ± 0.19	3.05 ± 0.09	1.46 ± 0.04
	50	5	12.0 ± 2.3	0.65 ± 0.08	58 ± 14	5.30 ± 0.10	3.12 ± 0.09	1.43 ± 0.07
	250	5	15.7 ± 4.7	0.70 ± 0.10	73 ± 15**	5.54 ± 0.23	3.35 ± 0.12**	1.53 ± 0.07**
Female	0	5	16.7 ± 2.7	0.66 ± 0.07	50 ± 14	5.40 ± 0.32	3.35 ± 0.32	1.64 ± 0.16
	10	5	14.3 ± 4.2	0.57 ± 0.04	52 ± 9	5.56 ± 0.24	3.48 ± 0.20	1.67 ± 0.10
	50	5	15.6 ± 2.4	0.63 ± 0.07	70 ± 8*	5.66 ± 0.38	3.57 ± 0.37	1.71 ± 0.20
	250	5	16.6 ± 4.0	0.63 ± 0.05	91 ± 22**	5.93 ± 0.49	3.78 ± 0.43	1.75 ± 0.15

Mean ± S. D.

Significant difference from control group; *: P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01

Table 8. -continued Blood chemistry

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Glucose (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	GOT (U/l)	GPT (U/l)	ALP (U/l)	Gamma-GTP (U/l)
Male	0	5	135 ± 13	57.0 ± 15.6	48 ± 8	12 ± 1N	198 ± 37	0.9 ± 0.1
	10	5	142 ± 13	59.4 ± 19.0	55 ± 16	12 ± 1	169 ± 61	0.7 ± 0.2
	50	5	152 ± 16	65.4 ± 16.0	52 ± 5	10 ± 5	166 ± 33	0.8 ± 0.1
	250	5	129 ± 13	52.9 ± 13.9	58 ± 10	24 ± 7*	137 ± 24	0.5 ± 0.3**
Female	0	5	105 ± 16	29.7 ± 4.6	54 ± 4	11 ± 3	110 ± 24	0.6 ± 0.2
	10	5	110 ± 13	38.9 ± 3.4	52 ± 13	10 ± 4	105 ± 28	0.9 ± 0.3
	50	5	114 ± 11	39.2 ± 10.6	48 ± 6	10 ± 1	102 ± 35	1.0 ± 0.3
	250	5	131 ± 10**	38.4 ± 7.1	47 ± 7	15 ± 1*	90 ± 25	1.1 ± 0.3

Mean ± S. D.
 Significant difference from control group; *: P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01
 N: Non parametric analysis

47

Table 8. -continued Blood chemistry

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	T. bilirubin (mg/dl)	Sodium (mmol/l)	Potassium (mmol/l)	Chloride (mmol/l)	Calcium (mg/dl)	I. phosphate (mg/dl)
Male	0	5	0.10 ± 0.02	142.7 ± 1.1	4.71 ± 0.28	106.2 ± 1.4	9.86 ± 0.22	7.97 ± 0.81
	10	5	0.09 ± 0.02	142.1 ± 1.3	4.70 ± 0.30	107.1 ± 1.9	9.63 ± 0.17	7.75 ± 0.38
	50	5	0.10 ± 0.02	141.7 ± 0.8	4.64 ± 0.31	105.9 ± 1.0	9.82 ± 0.29	7.76 ± 0.65
	250	5	0.22 ± 0.02**	141.3 ± 0.7	5.63 ± 0.34**	104.7 ± 0.9	10.19 ± 0.37	8.26 ± 0.54
Female	0	5	0.12 ± 0.03	143.1 ± 1.5	4.77 ± 0.28	107.9 ± 1.6	10.09 ± 0.17	8.24 ± 0.73
	10	5	0.16 ± 0.03	142.6 ± 2.6	5.18 ± 0.58	106.6 ± 0.8	10.33 ± 0.47	8.25 ± 0.85
	50	5	0.17 ± 0.04	142.1 ± 1.2	4.54 ± 0.32	107.4 ± 0.7	10.24 ± 0.26	7.54 ± 0.38
	250	5	0.25 ± 0.03**	142.4 ± 1.6	4.97 ± 0.23	104.8 ± 1.6**	10.76 ± 0.18**	8.37 ± 0.49

Mean ± S. D.
 Significant difference from control group; *: P ≤ 0.05 **: P ≤ 0.01

Table 8. -continued Blood chemistry

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	T. cholesterol (mg/dl)	T. protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	A/G
Male	0	5	11.6 ± 1.5	0.58 ± 0.02N	61 ± 8	5.37 ± 0.16	3.10 ± 0.14	1.37 ± 0.09
	250	5	12.9 ± 3.6	0.48 ± 0.07**	53 ± 9	5.29 ± 0.29	3.02 ± 0.17	1.36 ± 0.20
Female	0	5	16.3 ± 1.5	0.51 ± 0.06	67 ± 10	5.83 ± 0.40	3.51 ± 0.35	1.51 ± 0.14
	250	5	15.6 ± 3.3	0.53 ± 0.04	54 ± 6*	5.96 ± 0.31	3.67 ± 0.25	1.61 ± 0.11

Mean ± S. D.
 Significant difference from control group; *: P ≤ 0.05 **: P ≤ 0.01
 N: Non parametric analysis

67

Table 8. -continued Blood chemistry

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Glucose (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	GOT (U/l)	GPT (U/l)	ALP (U/l)	Gamma-GTP (U/l)
Male	0	5	163 ± 21	47.9 ± 14.8	44 ± 4	13 ± 2	123 ± 18	0.2 ± 0.2
	250	5	148 ± 14	41.6 ± 8.3	48 ± 7	13 ± 2	124 ± 50	0.5 ± 0.5
Female	0	5	120 ± 21	49.8 ± 21.4	53 ± 8	12 ± 1	64 ± 11	0.8 ± 0.7
	250	5	112 ± 15	44.0 ± 10.3	50 ± 15	13 ± 4	75 ± 24	0.5 ± 0.5

Mean ± S. D.

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

Table 8. -continued Blood chemistry

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	T. bilirubin (mg/dl)	Sodium (mmol/l)	Potassium (mmol/l)	Chloride (mmol/l)	Calcium (mg/dl)	I. phosphate (mg/dl)
Male	0	5	0.13 ± 0.03	143.5 ± 0.6	4.48 ± 0.07	106.9 ± 0.7	9.92 ± 0.32	7.45 ± 0.69
	250	5	0.11 ± 0.03	143.4 ± 1.1	4.40 ± 0.18	107.7 ± 1.1	9.78 ± 0.27	7.24 ± 0.24
Female	0	5	0.18 ± 0.03	142.9 ± 0.8	4.01 ± 0.28	107.2 ± 2.0	9.94 ± 0.36	6.11 ± 0.52
	250	5	0.16 ± 0.03	143.9 ± 1.1	4.11 ± 0.39	108.1 ± 1.6	10.15 ± 0.36	6.37 ± 0.58

Mean ± S. D.

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

Table 9. Urinalysis

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Volume (ml)	Specific Gravity
Male	0	5	16 ± 6	1.039 ± 0.020
	10	5	15 ± 3	1.051 ± 0.015
	50	5	20 ± 8	1.039 ± 0.021
	250	5	33 ± 5**	1.029 ± 0.005
Female	0	5	8 ± 1N	1.062 ± 0.011
	10	5	10 ± 3	1.055 ± 0.017
	50	5	13 ± 6	1.051 ± 0.021
	250	5	26 ± 9**	1.028 ± 0.006**

Mean ± S. D.
 Significant difference from control group; *: P ≤ 0.05 **: P ≤ 0.01
 N: Non parametric analysis

52

Table 9. -continued Urinalysis

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Color											Turbidity		pH										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Clear	Muddy	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	≥9		
Male	0	5	5											5												
	10	5	5											5		1 2 2										
	50	5	5											5		3 2										
	250	5	5											5		1 1 3										
Female	0	5	5											5		2 2 1										
	10	5	5											5		1 1 3										
	50	5	5											5		3 1 1										
	250	5	5											5		1 1 1 1 1										

Color : 1= Colorless, 2= Slight yellow, 3= Yellow-brown, 4= Red, 5= Red-brown, 6= Dark red, 7= Dark brown,
8= Brown-black 9= Milky white, 10= Fluorescent green, 11= Blue.

Table 9. -continued Urinalysis

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Occult Blood					Ketones						Glucose (g/dl)				
			-	+/-	1+	2+	3+	-	+/-	1+	2+	3+	4+	-	0.1	0.25	0.5	≥1.0
Male	0	5	4			1		1	3	1				5				
	10	5	5					1	3	1				5				
	50	5	4	1				1	1	3				5				
	250	5	5					1	4					5				
Female	0	5	4	1					1	4				5				
	10	5	5					1	1	3				5				
	50	5	4		1			2	2	1				5				
	250	5	5					1	4					5				

Table 9. -continued Urinalysis

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Protein(mg/dl)				Bilirubin				Urobilinogen(E. U. /dl)							
			-	+/-	30	100	≥300	-	1+	2+	3+	0.1	1.0	2.0	4.0	8.0	≥12	
Male	0	5		1	2	1	1		4	1			2	3				
	10	5			4		1		4	1			4	1				
	50	5			1	4			4	1			1	4				
	250	5			1	2	2		3	2			1	4				
Female	0	5			1	4			3	2				5				
	10	5		1	2	2			5				1	4				
	50	5		2	1	1	1		5				2	3				
	250	5			1	3	1		4	1			2	3				

55

Table 9. -continued Urinalysis : Microscopic examination of sediment

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Erythrocytes			Leukocytes			Epith. Cells			Casts		Fat glob.		M. threads		others	
			-	1+	2+ 3+	-	1+	2+ 3+	-	1+	2+ 3+	-	+	-	+	-	+	-	+
Male	0	5	5			5			5			5		5		5		2	3
	10	5	5			5			5			5		5		5			5
	50	5	5			5			5			5		5		5		2	3
	250	5	4	1		5			5			5		5		5		2	3
Female	0	5	5			4	1		5			5		5		5			5
	10	5	5			3	2		5			5		5		5		2	3
	50	5	4	1		2	3		5			5		5		5		2	3
	250	5	4	1		5			5			5		5		5			5

others : Crystals

55

Table 9. -continued Urinalysis

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Volume (ml)	Specific Gravity
Male	0	5	23 ± 6	1.025 ± 0.005N
	250	5	24 ± 10	1.031 ± 0.022
Female	0	5	22 ± 9	1.039 ± 0.016
	250	5	13 ± 6	1.043 ± 0.021

Mean ± S. D.

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

N: Non parametric analysis

Table 9. -continued Urinalysis

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Color											Turbidity		pH										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Clear	Muddy	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	≥9		
Male	0	5	5											5		3 2										
	250	5	4 1											5		1 4										
Female	0	5	5											5		1 2 2										
	250	5	5											5		1 3 1										

Color : 1= Colorless, 2= Slight yellow, 3= Yellow-brown, 4= Red, 5= Red-brown, 6= Dark red, 7= Dark brown, 8= Brown-black 9= Milky white, 10= Fluorescent green, 11= Blue.

Table 9. -continued Urinalysis

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Occult Blood					Ketones						Glucose (g/dl)				
			-	+/-	1+	2+	3+	-	+/-	1+	2+	3+	4+	-	0.1	0.25	0.5	≥1.0
Male	0	5	4			1	2	3										5
	250	5	3	1		1	2	2	1									5
Female	0	5	5				3	2										5
	250	5	5				4	1										5

59

Table 9. -continued Urinalysis

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Protein (mg/dl)				Bilirubin				Urobilinogen (E. U. /dl)						
			-	+/-	30	100	≥300	-	1+	2+	3+	0.1	1.0	2.0	4.0	8.0	≥12
Male	0	5	1	4			5					5					
	250	5		4	1		5					4	1				
Female	0	5	2	1	1	1	4	1				3	2				
	250	5	2		1	1	1	5				2	3				

Table 9. -continued Urinalysis : Microscopic examination of sediment

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Erythrocytes			Leukocytes			Epith. Cells			Casts		Fat glob.		M. threads		others	
			-	1+	2+ 3+	-	1+	2+ 3+	-	1+	2+ 3+	-	+	-	+	-	+	-	+
Male	0	5	5			5			5			5		5		5		5	
	250	5	5			4	1		5			5		5		5		2	3
Female	0	5	5			2	3		5			5		5		5			5
	250	5	5			3	2		5			5		5		5			5

others : Crystals

Table 10. Organ weight

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (g)	Liver (g)	Kidneys (g)	Spleen (g)
Male	0	5	336 ± 8	2.08 ± 0.09	10.46 ± 0.85	2.54 ± 0.17N	0.56 ± 0.06
	10	5	338 ± 16	2.07 ± 0.07	10.63 ± 1.05	2.55 ± 0.09	0.51 ± 0.06
	50	5	343 ± 31	2.03 ± 0.08	11.38 ± 1.19	2.59 ± 0.43	0.60 ± 0.13
	250	5	307 ± 26	2.03 ± 0.09	13.55 ± 1.58**	2.57 ± 0.33	0.97 ± 0.11**
Female	0	5	197 ± 13	1.92 ± 0.07N	6.06 ± 0.42	1.62 ± 0.19N	0.37 ± 0.07
	10	5	212 ± 18	1.95 ± 0.01	6.45 ± 0.44	1.77 ± 0.05	0.39 ± 0.04
	50	5	210 ± 17	1.94 ± 0.07	6.99 ± 0.94	1.81 ± 0.13	0.43 ± 0.07
	250	5	210 ± 17	1.87 ± 0.11	9.36 ± 1.44**	1.78 ± 0.25	0.68 ± 0.11**

Mean ± S. D.
 Significant difference from control group; *: P ≤ 0.05 **: P ≤ 0.01
 N: Non parametric analysis

62

Table 10. -continued Organ weight

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Adrenals (mg)	Testes (g)	Ovaries (mg)
Male	0	5	49 ± 5	2.85 ± 0.17	
	10	5	51 ± 7	2.93 ± 0.12	
	50	5	49 ± 4	3.03 ± 0.30	
	250	5	41 ± 6	2.90 ± 0.12	
Female	0	5	65 ± 10		86 ± 14
	10	5	66 ± 4		81 ± 10
	50	5	67 ± 5		78 ± 10
	250	5	57 ± 10		83 ± 13

Mean ± S.D.
 Significant difference from control group; *: P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01

63

Table 10. -continued Organ weight

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (g)	Liver (g)	Kidneys (g)	Spleen (g)
Male	0	5	394 ± 31	2.08 ± 0.08	11.25 ± 1.56	2.78 ± 0.06N	0.59 ± 0.07
	250	5	359 ± 38	2.06 ± 0.08	10.50 ± 1.46	2.60 ± 0.33	0.69 ± 0.13
Female	0	5	250 ± 14	1.99 ± 0.08	6.88 ± 0.59	1.82 ± 0.14	0.43 ± 0.04
	250	5	226 ± 17*	1.93 ± 0.03	7.02 ± 0.88	1.74 ± 0.20	0.46 ± 0.05

Mean ± S. D.

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

N: Non parametric analysis

Table 10. -continued Organ weight

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Adrenals (mg)	Testes (g)	Ovaries (mg)
Male	0	5	48 ± 4N	3.01 ± 0.18	
	250	5	52 ± 12	3.14 ± 0.22	
Female	0	5	68 ± 10		90 ± 12
	250	5	58 ± 7		96 ± 13

Mean ± S. D.
 Significant difference from control group; *: P ≤ 0.05 **: P ≤ 0.01
 N: Non parametric analysis

Table 11. Organ weight per body weight

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (%)	Liver (%)	Kidneys (%)	Spleen (%)
Male	0	5	336 ± 8	0.620 ± 0.020	3.111 ± 0.215	0.756 ± 0.060	0.167 ± 0.019
	10	5	338 ± 16	0.613 ± 0.038	3.145 ± 0.184	0.756 ± 0.032	0.152 ± 0.018
	50	5	343 ± 31	0.595 ± 0.041	3.317 ± 0.084	0.752 ± 0.064	0.176 ± 0.037
	250	5	307 ± 26	0.662 ± 0.026	4.407 ± 0.249**	0.840 ± 0.131	0.316 ± 0.031**
Female	0	5	197 ± 13	0.976 ± 0.108	3.069 ± 0.085N	0.822 ± 0.061	0.185 ± 0.032N
	10	5	212 ± 18	0.924 ± 0.072	3.053 ± 0.100	0.841 ± 0.048	0.185 ± 0.005
	50	5	210 ± 17	0.926 ± 0.076	3.317 ± 0.257	0.863 ± 0.059	0.203 ± 0.024
	250	5	210 ± 17	0.891 ± 0.034	4.431 ± 0.373**	0.843 ± 0.063	0.324 ± 0.029**

Mean ± S.D.

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

N: Non parametric analysis

Table 11. -continued Organ weight per body weight

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Adrenals (%)	Testes (%)	Ovaries (%)
Male	0	5	0.015 ± 0.002	0.847 ± 0.037	
	10	5	0.015 ± 0.002	0.869 ± 0.059	
	50	5	0.014 ± 0.002	0.883 ± 0.033	
	250	5	0.014 ± 0.002	0.948 ± 0.066**	
Female	0	5	0.033 ± 0.005		0.044 ± 0.007
	10	5	0.031 ± 0.002		0.038 ± 0.002
	50	5	0.032 ± 0.001		0.037 ± 0.003
	250	5	0.027 ± 0.003**		0.039 ± 0.004

Mean ± S. D.
 Significant difference from control group; *: P ≤ 0.05 **: P ≤ 0.01

67

Table 11. -continued Organ weight per body weight

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (%)	Liver (%)	Kidneys (%)	Spleen (%)
Male	0	5	394 ± 31	0.530 ± 0.039	2.842 ± 0.172	0.708 ± 0.055	0.150 ± 0.024
	250	5	359 ± 38	0.578 ± 0.054	2.919 ± 0.171	0.724 ± 0.052	0.192 ± 0.034
Female	0	5	250 ± 14	0.799 ± 0.028	2.752 ± 0.135	0.729 ± 0.046	0.174 ± 0.020
	250	5	226 ± 17*	0.857 ± 0.062	3.098 ± 0.262*	0.771 ± 0.103	0.204 ± 0.022

Mean ± S. D.

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

Table 11. -continued Organ weight per body weight

Exp. No. 2292 (115-028)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Adrenals (%)	Testes (%)	Ovaries (%)
Male	0	5	0.012 ± 0.001N	0.769 ± 0.100	
	250	5	0.015 ± 0.004	0.880 ± 0.064	
Female	0	5	0.028 ± 0.006		0.036 ± 0.005
	250	5	0.026 ± 0.004		0.042 ± 0.004*

Mean ± S.D.
 Significant difference from control group; *: P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01
 N: Non parametric analysis

69

Table 12. Summary of gross findings (sacrificed at 4 week)

Exp. No. 2292 (115-028)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0	10	50	250
No. of animals necropsied	5	5	5	5
Organ Findings				
HEMATOPOIETIC SYSTEM				
spleen black	0	0	0	5**
enlarged	0	0	0	5**
DIGESTIVE SYSTEM				
liver black	0	0	0	3
enlarged	0	0	0	2
white patch/zone	1	0	0	0

Significantly different from control group; **: P<0.01

Table 12. -continued Summary of gross findings (sacrificed at 4 week)

Exp. No. 2292 (115-028)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0	10	50	250
No. of animals necropsied	5	5	5	5
Organ Findings				
HEMATOPOIETIC SYSTEM				
spleen black	0	0	0	4*
enlarged	0	0	0	3
DIGESTIVE SYSTEM				
liver enlarged	0	0	1	5**
REPRODUCTIVE SYSTEM				
uterus red patch/zone	0	1	0	0

Significantly different from control group; *: P<0.05 **: P<0.01

Table 12. -continued Summary of gross findings (sacrificed at 6 week)

Exp. No. 2292 (115-028)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0	10	50	250
No. of animals necropsied	5	0	0	5
Organ Findings				
HEMATOPOIETIC SYSTEM				
spleen black	0	-	-	1
INTEGUMENTARY SYSTEM				
skin ulcer	1	-	-	1

Table 12. -continued Summary of gross findings (sacrificed at 6 week)

Exp. No. 2292 (115-028)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0	10	50	250
No. of animals necropsied	5	0	0	5
Organ Findings				
DIGESTIVE SYSTEM				
liver white patch/zone	0	-	-	1

Table 13. Summary of histological findings (sacrificed at 4 week)

Exp. No. 2292 (115-028)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0			10			50			250		
No. of animals sacrificed at 4 week	5			5			5			5		
No. of animals necropsied	5			5			5			5		
No. of animals examined histologically	5			5			5			5		
Organ _____ Findings _____	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
HEMATOPOIETIC SYSTEM												
bone marrow	(5)			(5)			(5)			(5)		
hematopoiesis, increased	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0**
spleen	(5)			(5)			(5)			(5)		
congestion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0**
deposit of pigment	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0**
hematopoiesis, increased	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0**
DIGESTIVE SYSTEM												
liver	(5)			(5)			(5)			(5)		
deposit of pigment	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0**
fatty change	4	0	0	4	0	0	2	0	0	3	0	0
single cell necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0*
swelling of liver cells	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0**
granulation	1	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0
extramedullary hematopoiesis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
URINARY SYSTEM												
kidney	(5)			(5)			(5)			(5)		
basophilic change	5	0	0	4	0	0	3	0	0	3	0	0
cyst	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
eosinophilic body	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
hyaline droplet	1	0	0	1	1	0	4	0	0	1	4	0*
tubular dilatation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
tubular cell hyperplasia	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
ENDOCRINE SYSTEM												
adrenal gland	(5)			(0)			(0)			(5)		
vacuolic change	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0

1: slight 2: moderate 3: marked

(): No. of animals examined microscopically at this site.

Significantly different from control group; *: P<0.05 **: P<0.01

Table 13. -continued Summary of histological findings (sacrificed at 4 week)

Exp. No. 2292 (115-028)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0			10			50			250		
No. of animals sacrificed at 4 week	5			5			5			5		
No. of animals necropsied	5			5			5			5		
No. of animals examined histologically	5			5			5			5		
Organ	Findings			Findings			Findings			Findings		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
CARDIOVASCULAR SYSTEM												
heart	(5)			(0)	-	-	(0)	-	-	(5)		
infiltration/cellular		1	0								1	0
HEMATOPOIETIC SYSTEM												
bone marrow	(5)			(5)			(5)			(5)		
hematopoiesis, increased		0	0		0	0		0	0		5	0
spleen	(5)			(5)			(5)			(5)		
congestion		0	0		0	0		0	0		5	0
deposit of pigment		0	0		1	0		1	0		5	0
hematopoiesis, increased		0	0		0	0		0	0		4	0
DIGESTIVE SYSTEM												
liver	(5)			(5)			(5)			(5)		
deposit of pigment		0	0		0	0		0	0		5	0
fatty change		2	0		2	0		1	0		2	0
mitosis		0	0		0	0		0	0		1	0
single cell necrosis		0	0		0	0		0	0		2	0
swelling of liver cells		0	0		0	0		0	0		4	0
granulation		2	0		4	0		3	0		1	0
lymphocytic infiltration		0	0		0	0		0	0		1	0
extramedullary hematopoiesis		0	0		0	0		0	0		3	0
URINARY SYSTEM												
kidney	(5)			(5)			(5)			(5)		
basophilic change		1	0		3	0		2	0		2	0
deposit of calcium		0	0		0	0		1	0		0	0
tubular dilatation		0	0		1	0		0	0		1	0
lymphocytic infiltration		1	0		0	0		0	0		0	0
fibrosis		0	0		1	0		0	0		0	0

1: slight 2: moderate 3: marked
 (): No. of animals examined microscopically at this site.
 Significantly different from control group; *: P<0.05 **: P<0.01

75

Table 13. -continued Summary of histological findings (sacrificed at 6 week)

Exp. No. 2292 (115-028)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0	10	50	250
No. of animals sacrificed at 6 week	5	0	0	5
No. of animals necropsied	5	0	0	5
No. of animals examined histologically	5	0	0	5
Organ Findings	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3
HEMATOPOIETIC SYSTEM				
bone marrow	(5)			(5)
infarct	0 0 0	- - -	- - -	1 0 0
hematopoiesis, increased	0 0 0	- - -	- - -	1 0 0
spleen	(5)			(5)
deposit of pigment	0 0 0	- - -	- - -	5 0 0**
hematopoiesis, increased	0 0 0	- - -	- - -	1 0 0
DIGESTIVE SYSTEM				
liver	(5)			(5)
deposit of pigment	0 0 0	- - -	- - -	2 0 0
granulation	2 0 0	- - -	- - -	1 0 0
lymphocytic infiltration	1 0 0	- - -	- - -	1 0 0
extramedullary hematopoiesis	0 0 0	- - -	- - -	1 0 0
URINARY SYSTEM				
kidney	(5)			(5)
basophilic change	1 0 0	- - -	- - -	3 0 0
tubular dilatation	1 0 0	- - -	- - -	2 0 0
lymphocytic infiltration	0 0 0	- - -	- - -	1 0 0

1: slight 2: moderate 3: marked
 (): No. of animals examined microscopically at this site.
 Significantly different from control group; **: P<0.01

Table 13. -continued Summary of histological findings (sacrificed at 6 week)

Exp. No. 2292 (115-028)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0			10			50			250		
No. of animals sacrificed at 6 week	5			0			0			5		
No. of animals necropsied	5			0			0			5		
No. of animals examined histologically	5			0			0			5		
Organ Findings	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
HEMATOPOIETIC SYSTEM												
spleen	(5)									(5)		
deposit of pigment	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	5	0**
DIGESTIVE SYSTEM												
liver	(5)									(5)		
deposit of pigment	0	0	0	-	-	-	-	-	-	5	0	0**
granulation	4	0	0	-	-	-	-	-	-	4	0	0
URINARY SYSTEM												
kidney	(5)									(5)		
basophilic change	2	0	0	-	-	-	-	-	-	2	0	0
protein cast	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
tubular dilatation	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
lymphocytic infiltration	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0

1: slight 2: moderate 3: marked
 (): No. of animals examined microscopically at this site.
 Significantly different from control group; **: P<0.01

77