

4-ニトロ-*o*-アニシジ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：2777（115-056）

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. 緒 言	3
3. 試 験 題 目	4
4. 試 験 目 的	4
5. 試 験 番 号	4
10. 被 験 物 質	6
11. 試 験 材 料 お よ び 方 法	8
12. 観 察, 測 定 お よ び 検 査	11
13. 試 験 結 果	15
14. 考 察 お よ び 結 論	21
15. 参 考 文 献	24
Figures, Tables and Reference data	26
Figure 1 Survival ratio	27
Table 1 Survival and mortality	28
Table 2 Clinical observation	30
Figure 2 Body weight	42
Table 3 Body weight	43
Figure 3 Food consumption	46
Table 4 Food consumption	47
Table 5 Food efficiency	49
Table 6 Hematology	51
Table 7 Coagulation	57
Table 8 Blood chemistry	59
Table 9 Urinalysis	65
Table 10 Organ weight	75
Table 11 Organ weight per body weight	79
Table 12 Summary of gross findings (sacrificed at 4 week)	83
Table 13 Summary of gross findings with statistical analysis (sacrificed at 4 week)	85

Table 14	Summary of gross findings (dead or moribund)	86
Table 15	Summary of gross findings with statistical analysis (dead or moribund)	87
Table 16	Summary of histological findings (sacrificed at 4, 6 week)	88
Table 17	Summary of histological findings with statistical analysis (sacrificed at 4, 6 week)	92
Table 18	Summary of histological findings (dead or moribund)	94
Table 19	Summary of histological findings with statistical analysis (dead or moribund)	95

## 1. 要 約 :

4-ニトロ-*o*-アニシジンの反復投与毒性を明らかにするため、SD系ラットを用いた強制経口投与による28日間反復投与毒性試験を実施した。

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。

4-ニトロ-*o*-アニシジンは、コーンオイルに溶解し、0, 30, 100 および 300 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、血液凝固能検査、血液生化学検査、尿検査、器官重量測定および病理学検査を実施した。

その結果は、次の通り要約される。

雌の 300 mg/kg群で投与3および4週に各1例死亡したが、その他の試験群では雌雄とも死亡例は認められなかった。

一般状態の観察では、雌雄ともすべての被験物質投与群で投与期間を通じて黄色あるいは黄褐色尿の排泄が観察され、300 mg/kg群の雌雄では口の周囲を濡らす程度の流涎が認められた。また、雌雄の 100 および 300 mg/kg群では自発運動低下、さらに 300 mg/kg群では体温低下が投与初日の投与後1時間に認められた。

雌雄で観察された症状は回復期間には認められず回復を示した。

体重は雌雄とも 300 mg/kg群で増加抑制傾向がみられ、雌では投与3週以降有意であった。摂餌量は、雌雄とも 300 mg/kg群で減少を示した。飼料効率は、雌の 300 mg/kg群で投与3週に低値が認められた。回復期間中は、体重、摂餌量および飼料効率のいずれも雌雄ともに対照群と 300 mg/kg群とで差は認められなかった。

血液学的検査の結果、雌雄の 300 mg/kg群でヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球数が低値、血小板数および網赤血球率が高値を示した。さらに雌の 100 mg/kg群でヘマトクリット値が低値、300 mg/kg群では MCHC が低値を示した。回復期間終了時の検査には、雌雄ともに対照群と 300 mg/kg群との間に差は認められなかった。

血液凝固能検査の結果、雌雄の 300 mg/kg群でフィブリノーゲン量の高値または高値傾向が認められた。回復期間終了時の検査には、対照群と 300 mg/kg群との間に差は認められなかった。

血液生化学検査の結果、雌雄の 300 mg/kg群で総コレステロール、GOT、GPTおよび総ビリルビンが高値を示し、さらに、雄の同群ではカリウムが高値を示した。回復期間終了時の検査には、対照群と 300 mg/kg群との間に差は認められなかった。

尿検査の結果、雌雄とも被験物質投与群の全例に黄色蛍光尿が観察された。また、300 mg/kg群の雌雄では尿量の増加傾向、黄褐色尿、赤褐色尿、グルコースおよびビリルビンの高値、酸性尿が認められ、さらに同群の雄で暗赤色尿およびケトン体の高値、雌で尿比重の低値傾向および潜血が認められた。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 300 mg/kg群で脾臓の実重量および相対重量が高値、肝臓の相対重量が高値および胸腺の実重量が低値傾向を示した。また回復期間終了時、雄の 300 mg/kg群で胸腺の実重量および相対重量が低値を示した。

病理学的検査の結果、肉眼的観察で雌雄の 300 mg/kg群では脾臓の褐色化、腎臓の緑色化、さらに同群の雄で肝臓の褐色化、雌で心臓の肥大、淡色化、心嚢の肥厚、心嚢水の貯留、胸水の貯留が観察された。組織所見では雌雄の 300 mg/kg群で心筋障害、壊死、脾臓の髄外造血、さらに同群の雌で脾臓の色素沈着が対照群に比較し多く認められた。一方、雌の 300 mg/kg群では肝臓で脂肪化が減少していた。

以上の結果、雌雄とも 100 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 30 mg/kg/dayと判断される。

## 2. 緒 言：

4-ニトロ-*o*-アニシジン (4-Nitro-*o*-anisidine) は、化学産業の分野において染料として使用されている化合物である。本化合物の毒性については、経口投与によるラットのLD<sub>50</sub>値が 997 mg/kgと報告されているが、ヒトや実験動物の生体に及ぼす毒性についてはほとんど知られていない。今回、既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として、4-ニトロ-*o*-アニシジンの反復投与毒性について検討したのでその結果を報告する。

3. 試験題目： 4-ニトロ-*o*-アニシジンのラットを用いる28日間の反復投与毒性試験
4. 試験目的： 4-ニトロ-*o*-アニシジン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。
5. 試験番号： 2777（115-056）

10. 被 験 物 質 :

- 1) 被験物質名 4-ニトロ-*o*-アニシジン
- 2) CAS No. 97-52-9
- 3) ロット番号
- 4) 純 度 99.4 wt% (その他, 不純物として5-ニトロ-*o*-アニシジン 0.13%および2-アセトアミド-4-ニトロアニソール 0.13%を含む)
- 5) 製 造 元
- 6) 保 管 条 件 冷暗所, 密封容器
- 7) 保 管 場 所 安評センター被験物質保管庫
- 8) 別 名 2-メトキシ-4-ニトロアニリン
- 9) 化 学 名 4-ニトロ-*o*-アニシジン
- 10) 化 学 構 造
- 
- 11) 分 子 式  $C_7H_8N_2O_3$
- 12) 分 子 量 168.15
- 13) 物質の状態 粉末
- 14) 色 黄色
- 15) 融 点  $138.7 \sim 140.3^\circ\text{C}$
- 16) 溶 解 性 水に不溶, DMSOおよびアセトンに可溶.

- 17) 安定性 水には安定，光により変色の可能性有り  
投与終了後，製造元に返却した被験物質について，製造元で再分析を行い，安定性を確認した。
- 18) 取り扱い上の注意 取り扱い中は適切な保護眼鏡，手袋，マスクを着用し，取扱い後は手洗いおよびうがいを充分行った。
- 19) 被験物質保管および  
残余被験物質の処理 投与終了後，約 2 gを安評センターに保管し，残りは製造元に返却した。

## 11. 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8年1月8日に4週齢で雌雄各40匹，計80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8年1月16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 177~204 g，雌で 125~158 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 123号飼育室 (W 4.1×D 8.9×H 2.5 m, 91.2 m<sup>3</sup>) 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 10152 cm<sup>3</sup>) 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株式会社 エコプロ・リサーチ（静岡県清水市）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, 30, 100 および 300 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*		30		100		300	
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	1001	2001	1101	2101	1201	2201	1301	2301
計画屠殺	∧	∧	∧	∧	∧	∧	∧	∧
動物番号	1005	2005	1105	2105	1205	2205	1305	2305
回復終了時	1006	2006					1306	2306
計画屠殺	∧	∧	-	-	-	-	∧	∧
動物番号	1010	2010					1310	2310

\* コーンオイルのみを投与した。

[用量設定理由]

本試験に先立って実施した2週間反復投与毒性試験（投与量；0, 25, 75, 225 mg/kg）の結果、投与群の雌雄全例に投与期間中、被験物質投与に関連すると思われる黄色尿が観察され、さらに雄の75および225 mg/kg群で肝臓の相対重量が高値、実重量が高値傾向を示した。

文献ではメトヘモグロビン血症の発現が示唆<sup>1)</sup>されていたが2週間反復投与毒性試験の用量ではメトヘモグロビン比率の増加は認められなかった。

本化合物の単回投与毒性試験では2000 mg/kg投与で雄3例中1例、雌3例中2例が死亡し、さらに1000 mg/kg投与の雌で3例中1例が死亡しており、追加的に600 mg/kgを5日間反復投与した試験では、雄3例中2例、雌3例全例が死亡した。

従って、28日間反復投与毒性試験では雌雄とも確実な影響がでることが推察される300 mg/kgを高用量に設定し、以下公比約3で除し中用量を100 mg/kg、低用量を30 mg/kgとした。

5) 投与方法

投与経路は OECDガイドライン「反復投与毒性」で指示されている強制経口投与とした。投与容量は体重 100 gあたり 0.5 mlとし、個体別に測定した体重に基づいて投与量を算出した。

投与回数は1日1回とし、金属製胃ゾンデを用いて胃内に強制経口投与した。対照群にはコーンオイル (Lot No. V5K3987, ナカライテスク株式会社, 京都府京都市) のみを同様に投与した。

6) 投与液の調製

4-ニトロ-*o*-アニシジンは、各用量ごと (30, 100 および 300 mg/kg) に所定量を電子式上皿天秤で秤量し、コーンオイルに懸濁した。

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 300 mg/kg群については14日間の回復試験を実施した。

8) 投与液中の被験物質の安定性分析

投与液の濃度確認のため全試験群について、第1および第4週投与用調製液の濃度分析を行った。なお、投与液の安定性については、予備試験 (試験番号2708) において調製後冷蔵庫保存で1週間安定であることが確認されている。

濃度分析の方法および結果は『Reference data 4』に示した。

12. 観察、測定および検査：

1) 一般状態の観察

全動物を毎日3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

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 PM 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

毎週1回給餌した残量を自動天秤 PM 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-1E (マイルス社, 米国) を用いて行い、下記の項目を測定した (EDTA-3K添加血液)。

ヘマトクリット値	(HCT)	RBC, MCVより算出
ヘモグロビン量	(HGB)	シアンメトヘモグロビン法
赤血球数	(RBC)	暗視野板法
平均赤血球容積	(MCV)	暗視野板法
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
白血球数	(WBC)	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。

メトヘモグロビン比率については松原法による分画測定法を用いて算出した。

網赤血球 (RC) 率算定のため、抗凝固剤 (EDTA-3K) 添加血液をニューメチレンブルーで染色後、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. 血液生化学検査

血液生化学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)	酵素比色法
総コレステロール	(T-Chol)	コレステロールオキシダーゼ法
尿素窒素	(BUN)	ウレアーゼアンモニア指示薬法
クレアチニン*	(Crea)	Jaffé 法
総ビリルビン	(T. Bili)	ジアゾ法
カルシウム	(Ca)	アルセナゾⅢ法
無機リン	(IP)	モリブデン酸青法
グルタミン酸オキザロ酢酸 トランスアミナーゼ*	(GOT)	IFCC法 (PALP添加なし)
グルタミン酸ピルビン酸 トランスアミナーゼ*	(GPT)	IFCC法 (PALP添加なし)
アルカリホスファターゼ*	(ALP)	Bessey-Lowry改良法
γ-グルタミルトランス ペプチダーゼ*	(γ-GTP)	Orłowski法
ナトリウム	(Na)	電極法
カリウム	(K)	電極法
塩素	(Cl)	電極法

\*印の項目は ENCORE II で, 他は EKTACHEM 700N 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（バイエル・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。死亡動物は発見後直ちに解剖した。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，胸腺，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，唾液腺，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。

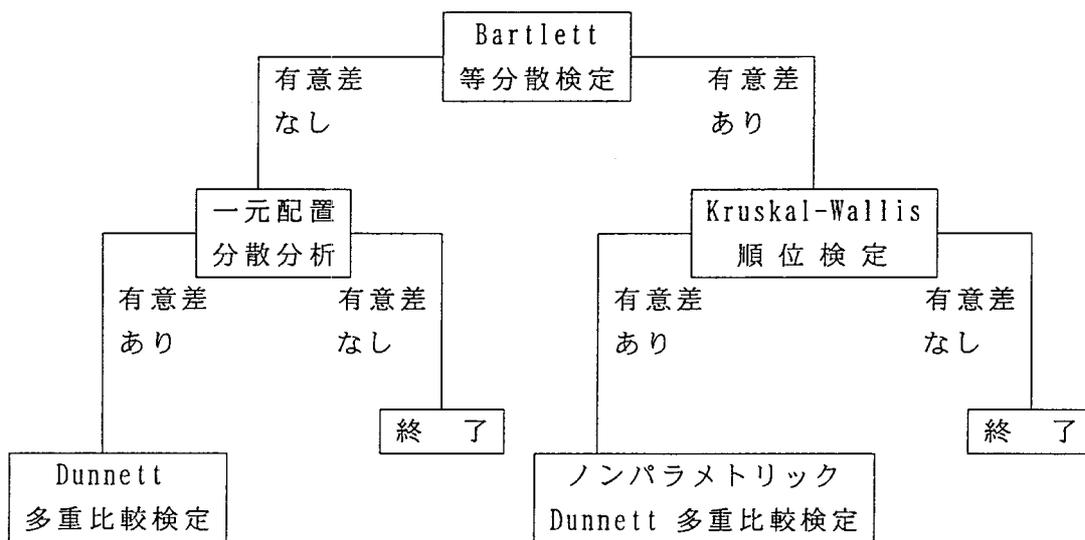
病理組織学的検査は固定した器官・組織のうち，投与終了時に解剖した対照群と高用量群の心臓，肝臓，脾臓，腎臓，副腎，胸腺および骨髓（大腿骨）について検索した。また，低および中用量と回復群の雌雄全例について心臓，肝臓および脾臓を鏡検した。株式会社 組織科学研究所（東京都青梅市）で常法に従って病理組織標本を作製した。標本の染色はヘマトキシリン・エオジン染色とした。鏡検は安評センターで実施し，病変の種類および程度について記録した。

6) データの記録および統計解析

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，統計解析した。

各試験群の体重，摂餌量，飼料効率，血液学的検査値，血液凝固能検査，血液生化学検査値，尿検査値（尿量および比重），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，分散が有意な場合は Dunnett の多重比較検定（佐野<sup>1)</sup>，吉田<sup>2)</sup>）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<sup>2, 3)</sup>で対照群と各投与群間の有意差を検定した。

上記定量値の有意水準は 5 および 1 % の両側検定で実施した。



また，病理学的検査および生存率の検定は Fisher の確率計算法を用いた。

### 13. 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、雄では対照群を含むすべての試験群で死亡例は認められなかった。

雌では、300 mg/kg群で投与3および4週に各1例が死亡したが、その他の試験群では死亡例は認められなかった。

回復期間中には、雌雄とも対照群および300 mg/kg群で死亡例は認められなかった。

#### 2) 一般状態の観察

一般状態の観察を Table 2 および Appendix 1 に示した。

雄では、すべての被験物質投与群で投与期間を通じて黄色あるいは黄褐色尿が全例に観察され、さらに300 mg/kg群では投与16日から投与終了時まで赤褐色尿が2例認められた。また、100 および 300 mg/kg群では投与初日の投与1時間以内にそれぞれ軽度および重度の自発運動低下が全例に、さらに300 mg/kg群では投与初日の投与1時間以内に軽度の体温低下が全例に認められたが、いずれも投与5時間までに消失した。また、300 mg/kg群では口の周囲を濡らす程度の流涎(+)が投与8日で1例、投与16, 17, 19, 20および21日にそれぞれ1, 1, 3, 1および1例加わり投与終了時には8例認められた。その他、顎下部に潰瘍が対照群で投与13日から投与終了時まで1例、30 mg/kg群で投与8および18日から投与終了時までに各1例認められた。

雌では、すべての被験物質投与群で投与期間を通じて黄色あるいは黄褐色尿が観察され、さらに300 mg/kg群では赤褐色尿が投与24日から投与終了時まで1例に認められた。また、100 および 300 mg/kg群では投与初日の投与1時間以内にそれぞれ軽度および重度の自発運動低下が全例に、さらに300 mg/kg群では投与初日の投与1時間以内に軽度の体温低下が全例に認められたが、いずれも投与5時間までに消失した。また、300 mg/kg群では口の周囲を濡らす程度の流涎(+)が投与20日に1例、投与終了時までに死亡の1例を含め計6例に観察された。投与19日に死亡した(動物番号2310)においては、重度の自発運動低下、体温低下、立毛および耳介等の蒼白が認められた。雌雄で観察された症状は投与中止により消失が認められ、回復期間中に異常を示す動物は認められなかった。

#### 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300 mg/kg群で投与3週から低値傾向が認められ、4週間の体重増加量も低値傾向を示した。投与終了時、300 mg/kg群の平均体重は対照群に比較して7.4%減少した。回復期間では300 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、対照群に比較して300 mg/kg群で投与1および2週で低値傾向が認められ、投与3および4週で低値が認められた。4週間の体重増加量にも低値が認められた。投与終了時、300 mg/kg群の平均体重は対照群に比較して12.3%減少した。回復期間では300 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。

#### 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 300 mg/kg群で投与期間を通じて減少傾向を示し、4週間の総摂餌量にも減少傾向が認められた。

雌では、対照群に比較して 300 mg/kg群で投与1および3週で減少を示し、4週間の総摂餌量にも減少が認められた。

回復期間では雌雄ともに対照群と 300 mg/kg群とで差が認められなかった。

#### 5) 飼料効率

飼料効率を Table 5 および Appendix 4 に示した。

雄では、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。

雌では、対照群に比較して 300 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、対照群と 300 mg/kg群と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。

##### 投与終了時の結果

雄では、対照群と比較して 30 および 300 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、さらに 300 mg/kg群で血小板数および網赤血球率が高値を示した。

雌では、対照群と比較して 100 および 300 mg/kg群でヘマトクリット値が低値を示し、さらに 300 mg/kg群ではヘモグロビン量、赤血球数および MCHCが低値、血小板数および網赤血球率が高値を示した。

##### 回復期間終了時の結果

雌雄ともに対照群と 300 mg/kg群とで差は認められなかった。

#### 7) 血液凝固能検査

血液凝固能検査結果を Table 7 および Appendix 6 に示した。

##### 投与終了時の結果

雄では、対照群に比較して 300 mg/kg群でフィブリノーゲン量が高値を示した。

雌では、対照群に比較して 300 mg/kg群でフィブリノーゲン量が高値傾向を示し、特に1例(動物番号 2304)では、異常高値(500 mg/dl)が認められた。

##### 回復期間終了時の結果

雄では、対照群に比較して 300 mg/kg群でプロトロンビン時間に延長が認められたが、背景値(14.4±1.0, n=60)の範囲内の変化であった。

雌では、各検査項目において対照群と 300 mg/kg群との間に差は認められなかった。

## 8) 血液生化学検査

血液生化学検査結果を Table 8 および Appendix 7 に示した。

### 投与終了時の結果

雄では、対照群と比較して 300 mg/kg群で総コレステロール、GOT、GPT、総ビリルビンおよびカリウムが高値または高値傾向を示した。

GOT および GPTは 5 例中 4 例に高値がみられ、特に動物番号1301では異常高値 (GOT:700 u/l, GPT:98 u/l) が認められた。

雌では、対照群と比較して 300 mg/kg群で総コレステロール、GOT、GPT、および総ビリルビンが高値または高値傾向を示した。GOT および GPTは 5 例中 2 例に高値がみられ、特に動物番号2304では異常高値 (GOT:1955 u/l, GPT:217 u/l) が認められた。

### 回復期間終了時の結果

雄では、300 mg/kg群で血糖、総コレステロールおよび GOTが低値を示し、クレアチニンおよびナトリウムが高値を示したが、いずれも背景値の範囲内の値であった。

雌では、対照群と比較して 300 mg/kg群で GPTが高値を示したが、背景値 (15±9, n=60) の範囲内の変化であった。

## 9) 尿検査

尿検査結果を Table 9 および Appendix 8 に示した。

### 投与終了時の結果

雄では、被験物質投与群の全例で黄色蛍光尿が観察された。また、300 mg/kg群では対照群に比較して尿量が増加傾向を示し、黄褐色、赤褐色および暗赤色尿がそれぞれ 3, 1 および 1 例に観察され、さらに pH5.0 および 5.5 の動物が各 1 例、ケトン体 (2+) および (3+) が各 1 例、ビリルビン (2+) および (3+) が各 1 例、グルコース 0.5 g/dl が 1 例に認められた。

雌では、被験物質投与群の全例で黄色蛍光尿が観察された他、300 mg/kg群では対照群に比較して尿量が増加傾向、尿比重が低値傾向を示し、黄褐色および赤褐色尿がそれぞれ 4 および 1 例に観察された。さらに pH5.5、潜血 (3+)、グルコース (0.25 g/dl) の動物がそれぞれ 1 例、ビリルビン (2+) が 1 例に認められた。

### 回復期間終了時の結果

雄では、各検査項目において対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

雌では、対照群と比較して比重が低値を示したが、背景値 (1.065±0.028, n=60) の範囲内の変化であった。

10) 器官重量

器官重量を Table 10 および Appendix 9 に示した。

投与終了時の結果

雄では、対照群に比較して 300 mg/kg群で脾臓重量が高値、胸腺重量が低値傾向を示した。

雌では、対照群に比較して 300 mg/kg群で副腎重量が低値、胸腺重量が低値傾向、肝臓および脾臓重量が高値傾向を示した。

回復期間終了時の結果

雄では、対照群に比較して 300 mg/kg群で胸腺重量が低値を示した。

雌では、対照群に比較して 300 mg/kg群で腎臓重量が低値、卵巣重量が高値を示した。

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

雌雄とも、対照群に比較して 300 mg/kg群で肝臓および脾臓相対重量が高値を示した。

回復期間終了時の結果

雄では、対照群に比較して 300 mg/kg群で胸腺相対重量が低値を示した。

雌では、投与終了時に認められた変化がすべて回復し、対照群と 300 mg/kg群とで差が認められなかった。

12) 病理学的検査

剖検所見を Table 12～15 および Appendix 11, 12 に、組織所見を Table 16～19, および Appendix 13, 14 に示した。

投与終了時に計画解剖（4週）された動物は、対照群、30, 100 および 300 mg/kg群のそれぞれ各群雌雄 5例全例であった。

また回復期間終了時に計画解剖（6週）された動物は、雄の全例と雌の対照群および 300 mg/kg群でそれぞれ 5 および 3 例であった。

試験期間中、死亡した動物は 300 mg/kg群の雌の 2 例であった。

a) 剖検所見

投与終了時解剖動物

肉眼的観察の結果，対照群に比較して投与群で統計的に有意に多く発生した所見として，雌雄で脾臓の褐色化が対照群で0例に対して300 mg/kg群でそれぞれ全例に，雄で肝臓の褐色化が対照群で0例に対して300 mg/kg群で4例に認められた．また，腎臓の緑色化が対照群で観察されなかったのに対して300 mg/kg群の雄で1例，雌で3例に認められた．その他，300 mg/kg群のみに観察された所見として，雌雄で脾臓の肥大が，雄で精巣上体の緑色化が，雌で心臓の白色斑点／区域，心嚢水貯留，腎臓の腎盂拡大および子宮の小型化が認められた．

回復期間終了時解剖動物

肉眼的観察の結果，異常所見は観察されなかった．

死亡動物

観察された所見は，胸水貯留，胸腺の赤色斑点／区域および肺の赤色化が1例に，他の1例には胸水貯留，心臓の肥大，淡色化，心嚢の肥厚，肝臓の肥大および小葉明瞭化が観察された．

b) 組織所見

投与終了時解剖動物

対照群に比較して被験物質投与群で統計学的に有意に多く発生した所見として，雌雄で脾臓の髄外造血が対照群で0例に対して300 mg/kg群でそれぞれ4例に，雌で脾臓の色素沈着が対照群で0例に対して300 mg/kg群で全例（写真9）に観察された．一方，減少した所見として肝臓の脂肪化が雌で対照群全例（写真5）の発生に対し300 mg/kg群では観察されなかった．また，対照群で発生がなく300 mg/kg群で複数例に発生した所見として，心臓に心筋の障害，壊死（写真2），肝細胞の肥大（写真6）が雌雄に，腎臓の硝子円柱および空砲変性が雄に，心臓の細胞浸潤，肝臓の髄外造血が雌に観察され，さらに心筋の壊死や心筋障害に付随する変化として線維化および心外膜炎が雌の1例（写真3）に認められた．なお，300 mg/kg群で上述の心筋の病変が観察された個体は雄2例および雌3例で，その分布は，雄では心筋障害および壊死が左右の心室，細胞浸潤が左右の心房，左右の心室，心尖部，雌では心筋障害が左右の心房，左右の心室，中隔，壊死が左右の心室，細胞浸潤が左右の心房，左右の心室，中隔，心尖部および乳頭筋，線維化が左右の心室であった．また，それぞれの病変の程度は心筋障害は中等度が雌に1例，線維化は中等度が雌に1例，細胞浸潤は中等度が雌に1例，高度が雌雄に各1例でその他は軽度であった．

#### 回復期間終了時解剖動物

対照群で発生がなく 300 mg/kg群で複数例に認められた所見として、雌で脾臓の色素沈着が観察された。その他に単発性ではあるが 300 mg/kgのみに発生した所見として、雄で心臓の心筋障害および線維化、脾臓の色素沈着が、雌で心臓の細胞浸潤が観察された。なお、300 mg/kg群で上述の心筋の病変が観察された個体は雌雄各 1 例で、その分布はすべて心尖部であった。

#### 死亡動物

心臓の心筋障害、壊死（高度）（写真 4）、細胞浸潤、肝臓の中心性壊死（中等度）（写真 7）がそれぞれ 2 例、心臓の出血（写真 4）、心外膜炎、脾臓の萎縮、色素沈着がそれぞれ 1 例に観察された。なお、300 mg/kg群で上述の心筋の病変が死亡した雌の 2 例で観察されており、その分布は心筋障害および細胞浸潤が心臓全体にび漫性に、壊死が左右の心室、中隔、心尖部、出血が左右の心室に認められた。

#### 14. 考察および結論：

一般状態の観察の結果、雌雄ともすべての被験物質投与群で投与期間を通じて黄色あるいは黄褐色尿が、さらに 300 mg/kg群では投与初日の投与後 1 時間に重度の自発運動低下および軽度の体温低下と口の周囲を濡らす程度の流涎が認められ、被験物質投与による変化と考えられた。尿の黄色化は被験物質投与期間を通じて被験物質投与群の全例に観察され、回復期間に入ってから認められないことから、被験物質の代謝物が尿中に排泄されたものと考えられた。その他、雄の対照群および 30 mg/kg群で観察された顎下部の潰瘍は他の被験物質投与群で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かった。

死亡例は、雌の 300 mg/kg群で投与 3 および 4 週に各 1 例認められ、病理組織学的検査結果から心臓障害が死因の主要因と考えられた。

血液学的検査の結果、雌雄の 300 mg/kg群ではヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球数または MCHC が低値、血小板数および網赤血球率が高値を示し貧血が認められた。さらに、雌の 100 mg/kg群でもヘマトクリット値が低値を示した。

尿検査の結果、雌雄の被験物質投与群で認められた黄色蛍光尿は投与終了とともに消失したことから、被験物質の代謝物が尿中に排泄されたものと考えられた。

器官重量測定の結果、雌雄の 300 mg/kg群で認められた脾臓の実重量および相対重量の高値は被験物質投与による変化と考えられた。さらに同群の雌雄で肝臓の相対重量の高値、胸腺の実重量の低値傾向が認められ、被験物質の影響と考えられた。その他、雌の 300 mg/kg群で認められた副腎実重量の低値は、相対重量に変化がないことから同群の 2 例（動物番号：2301および2304）の体重抑制による影響と考えられた。

また回復期間終了時、雄の 300 mg/kg群で胸腺の実重量および相対重量が低値を示した。雌の 300 mg/kg群では、腎臓の実重量が低値、卵巣の実重量が高値を示したが、卵巣は背景値（ $85 \pm 12$ ,  $n=55$ ）の範囲内の変化であり、またいずれの器官も投与終了時の検査で対照群に比較して差が認められていないことから被験物質の影響とは考えられなかった。

病理学的検査の結果，脾臓および肝臓に被験物質の影響を示唆する病変が多数例に観察された．すなわち肉眼的観察において投与終了時計画解剖で 300 mg/kg群の雌雄の全例に脾臓の褐色化が，雄の 4 例に肝臓の褐色化が観察された，組織学的検査では，300 mg/kg群において脾臓の髓外造血が雌雄で，脾臓の色素沈着が雌で明らかな増加傾向を示し，一方肝臓の脂肪化の減少が認められた．これらの諸所見のうち肝臓の脂肪化の減少は肉眼所見での褐色化に一致するものと考えられた．しかし，肉眼的観察における脾臓の褐色化については，組織学的に必ずしも対応する所見が認められず，少数例に観察された腎臓の緑色化を含め被験物質の代謝物の色に起因する色調の変化と考えられた．脾臓に観察された髓外造血および色素沈着は赤血球の破壊とそれに伴う造血の亢進と考えられ，これはビリルビンの上昇やヘマトクリット値，ヘモグロビン量など赤血球関連項目の低値，網状赤血球および血小板の増加などの血液学的検査結果に一致する．肝臓においては脂肪化の減少の他に 300 mg/kg群の雌雄各 2 例に肝細胞の肥大が観察され，被験物質の影響が示唆された．また，肝臓の脂肪化が減少していたが血清コレステロール値の上昇もあることから脂質代謝に対する影響が示唆された．その他に発生数はやや少ないが肉眼所見および組織所見ともに心臓に対する明らかな被験物質の影響が認められた．すなわち肉眼的観察では単発性ではあるが投与終了時解剖動物で心臓の白色斑点／区域および心嚢水の貯留が雌の各 1 例に観察され，また，投与期間内に死亡した動物では，胸水の貯留が 2 例，心臓の肥大，淡色化および心嚢の肥厚が 1 例に観察された．組織学的には生存例および死亡例を含め心筋の壊死および心筋障害やそれらに随伴する諸所見が観察され，その分布はほとんどが心室壁，心室中隔，心尖部に広く分布し，乳頭筋や心室内腔面に限局することがないことから，被験物質あるいはその代謝物による直接的な障害が示唆された．このような病変は特に死亡動物で広範に認められ，さらに程度も強いことからこれが死因となったと考えられた．この心臓病変の発生には雌雄共に個体差が認められ，さらに雌では雄に比較して病変の発生率および程度が強く投与期間中に心病変が死因と考えられる例が発生していることから性差が認められた．また，死亡動物のみに観察された組織所見として肝臓の小葉中心性肝細胞壊死が広範に認められており，部位に特異性があることから被験物質の影響が示唆される．なお，血液生化学検査において雌雄の 300 mg/kg群で GOT および GPT が高値を示し，これらの個体のうち，著しく高値を示した雌の 1 例では心筋の障害や壊死がみられ，肝臓は肥大のみで肝障害が観察されなかった．また，他の肝障害の指標となる  $\gamma$ -GTP，アルブミンおよび総蛋白の値には異常が認められなかった．従って，GOT および GPTの高値は組織学的にも明らかな肝細胞の障害像がないこと，そして死亡した個体で心筋障害が明らかであることから，心筋障害に由来するものと考えられた．投与終了時に観察された脾臓，肝臓および腎臓の変化は回復期間終了時には観察されず可逆性と考えられた．肉眼所見での精巣上体の緑色化や組織所見での腎臓の硝子円柱については被験物質による影響と考えられるが，例数が少ないこともあり明確ではない．その他，投与終了時解剖動物で認められた雌の腎盂拡大および子宮の小型化はそれぞれ 1 例のみの発生であり，関連する病変もないことから自然発生病変と考えられ，また死亡動物で観察された胸腺の赤色斑点／区域および肺の赤色化は死亡動物に非特異的に見られる病変であり，死後変化と

も考えられる。

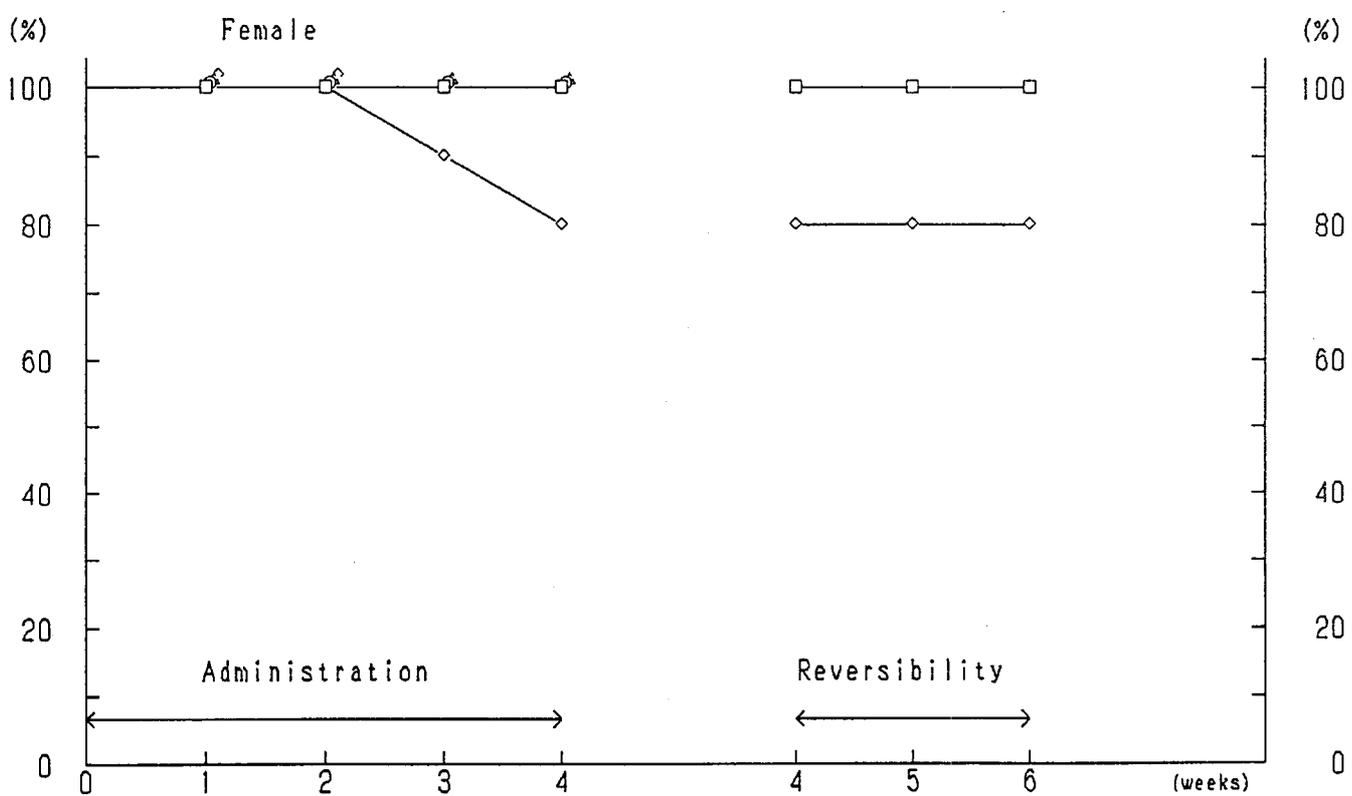
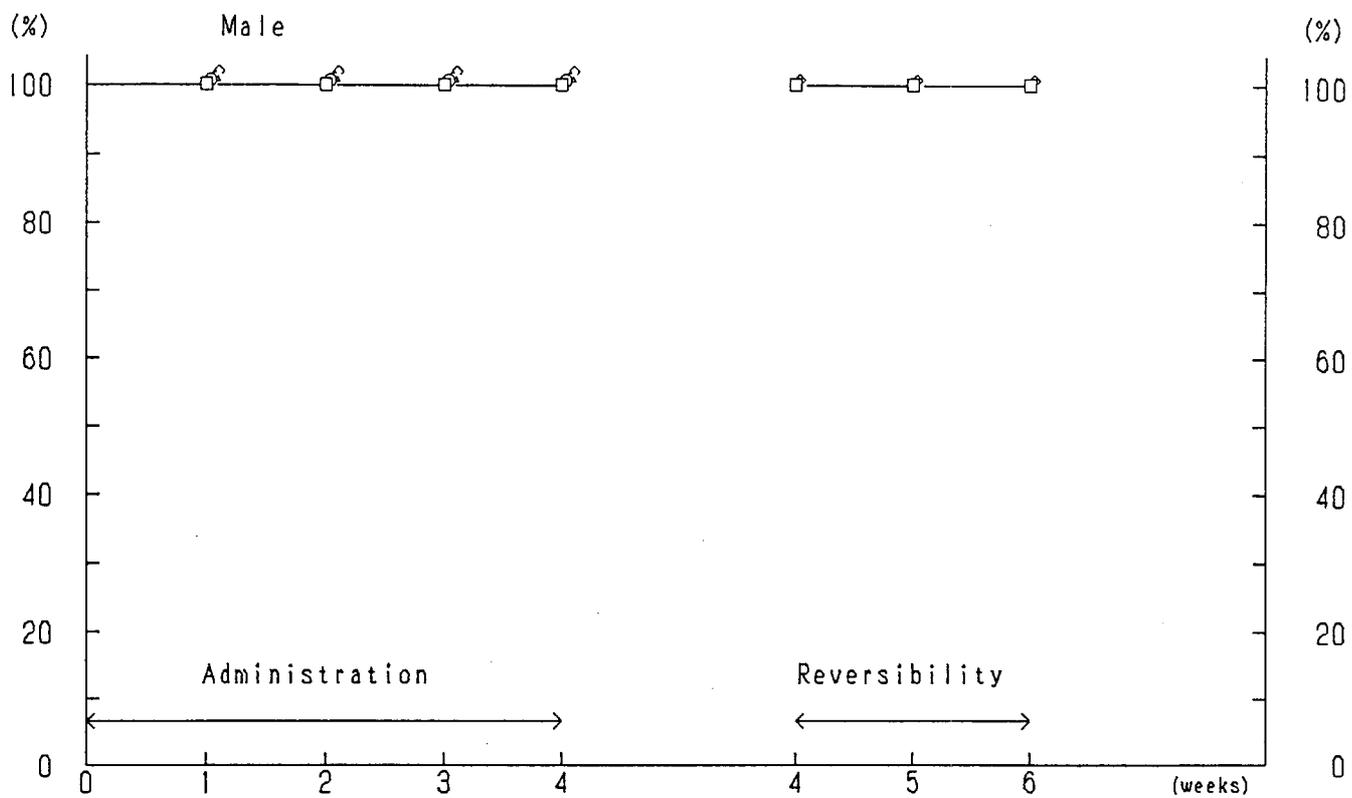
以上の結果，100 mg/kg以上の群で雌雄とも自発運動低下さらに雌ではヘマトクリット値の低値が認められた。300 mg/kg群の雌雄では心臓障害および貧血を主体とする影響が認められ，いずれも影響量と考えられた。

従って，無影響量は雌雄とも 30 mg/kg/dayと判断される。

15. 参 考 文 献 :

- 1) The Sigma-Aldrich Library of Chemical Safety Data Edition II, Vol. 2, 2258
- 2) 佐野正樹, 岡山佳弘 : 医薬安全性研究会会報, No. 32, 21-44 (1990)
- 3) YOSHIDA, M. : J. J. Soc. comp. Stat., 1, 111-122 (1988)

## Figures, Tables



Exp. No. 2777(115-056)

Dose level (mg/kg)

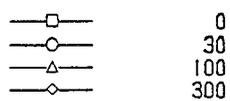


Figure 1. Survival ratio

Table 1. Survival and mortality

Exp. No. 2777 (115-056)

Sex	Dose level (mg/kg)	Weeks of experiment				Mortality (%)
		1	2	3	4	
Male	0	10/10	10/10	10/10	10/10	0.0
	30	5/5	5/5	5/5	5/5	0.0
	100	5/5	5/5	5/5	5/5	0.0
	300	10/10	10/10	10/10	10/10	0.0
Female	0	10/10	10/10	10/10	10/10	0.0
	30	5/5	5/5	5/5	5/5	0.0
	100	5/5	5/5	5/5	5/5	0.0
	300	10/10	10/10	9/10	8/10	20.0

Number surviving / Number per group.

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

Table 1. -continued Survival and mortality

Exp. No. 2777 (115-056)

Sex	Dose level (mg/kg)	Weeks of experiment		Mortality (%)
		5	6	
Male	0	5/5	5/5	0.0
	300	5/5	5/5	0.0
Female	0	5/5	5/5	0.0
	300	3/5	3/5	20.0

Number surviving / Number per group.  
 Significant difference from control group; \*:  $P \leq 0.05$  \*\*:  $P \leq 0.01$

Table 2. Clinical observation

Exp. No. 2777 (115-056)

Sex: Male

Findings of clinical observation	Dose level (mg/kg)	Days of experiment														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
normal/Number per group	0	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	9/10	9/10
	30	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	100	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	300	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
ulcer/submaxilla	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
	30	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
30 subnormal temperature	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	300	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	300	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	

Table 2. -continued Clinical observation

Exp. No. 2777 (115-056)

Sex: Male

Findings of clinical observation	Dose level (mg/kg)	Days of experiment													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
yellowish brown urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	100	0	0	0	2	2	2	2	2	2	3	4	5	5	5
	300	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
reddish brown urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
yellowish urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	100	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	300	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
decrease spontaneous motor activity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Sex: Male

Findings of clinical observation	Dose level (mg/kg)	Days of experiment														Total (1-28)
		15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
normal/Number per group	0	9/10	9/10	9/10	9/10	9/10	9/10	9/10	9/10	9/10	9/10	9/10	9/10	9/10	9/10	9
	30	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0
	100	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0
	300	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0
ulcer/submaxilla	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	30	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
subnormal temperature	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	1	2	3	3	6	7	8	8	8	8	8	8	8	8	8

Table 2. -continued Clinical observation

Exp. No. 2777 (115-056)

Sex: Male

Findings of clinical observation	Dose level (mg/kg)	Days of experiment														Total (1-28)
		15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
yellowish brown urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	3	3	3	3	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	100	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	300	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9
reddish brown urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
yellowish urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	100	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	300	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5
decrease spontaneous motor activity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10

Sex: Male

Findings of clinical observation	Dose level (mg/kg)	Days of experiment														Total (29-42)
		29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	
normal/Number per group	0	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5
	300	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5

Table 2. -continued Clinical observation.

Exp. No. 2777 (115-056)

Sex: Female

Findings of clinical observation	Dose level (mg/kg)	Days of experiment													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
normal/Number per group	0	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	30	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	100	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	300	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
piloerection	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pallor/auricles etc.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Sex: Female

Findings of clinical observation	Dose level (mg/kg)	Days of experiment													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
subnormal temperature	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
yellowish brown urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4
	300	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
reddish brown urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2. -continued Clinical observation

Exp. No. 2777 (115-056)

Sex: Female

Findings of clinical observation	Dose level (mg/kg)	Days of experiment													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
yellowish urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	100	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	300	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
decrease spontaneous motor activity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Table 2. -continued Clinical observation

Exp. No. 2777 (115-056)

Sex: Female

Findings of clinical observation	Dose level (mg/kg)	Days of experiment														Total (1-28)
		15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
subnormal temperature	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	1	2	2	2	5	5	5	5	5	6
yellowish brown urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	100	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	300	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9	9	9	8	8	10
reddish brown urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1

Sex: Female

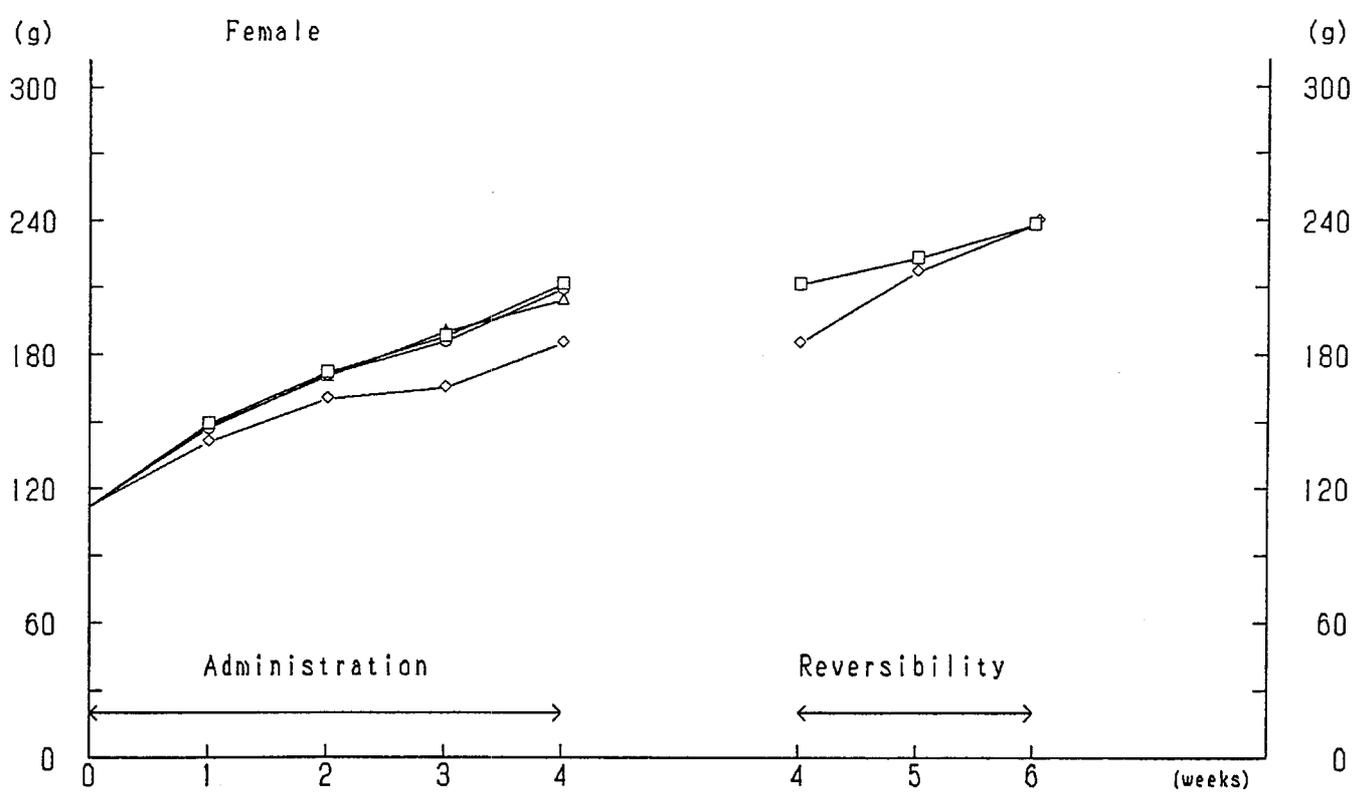
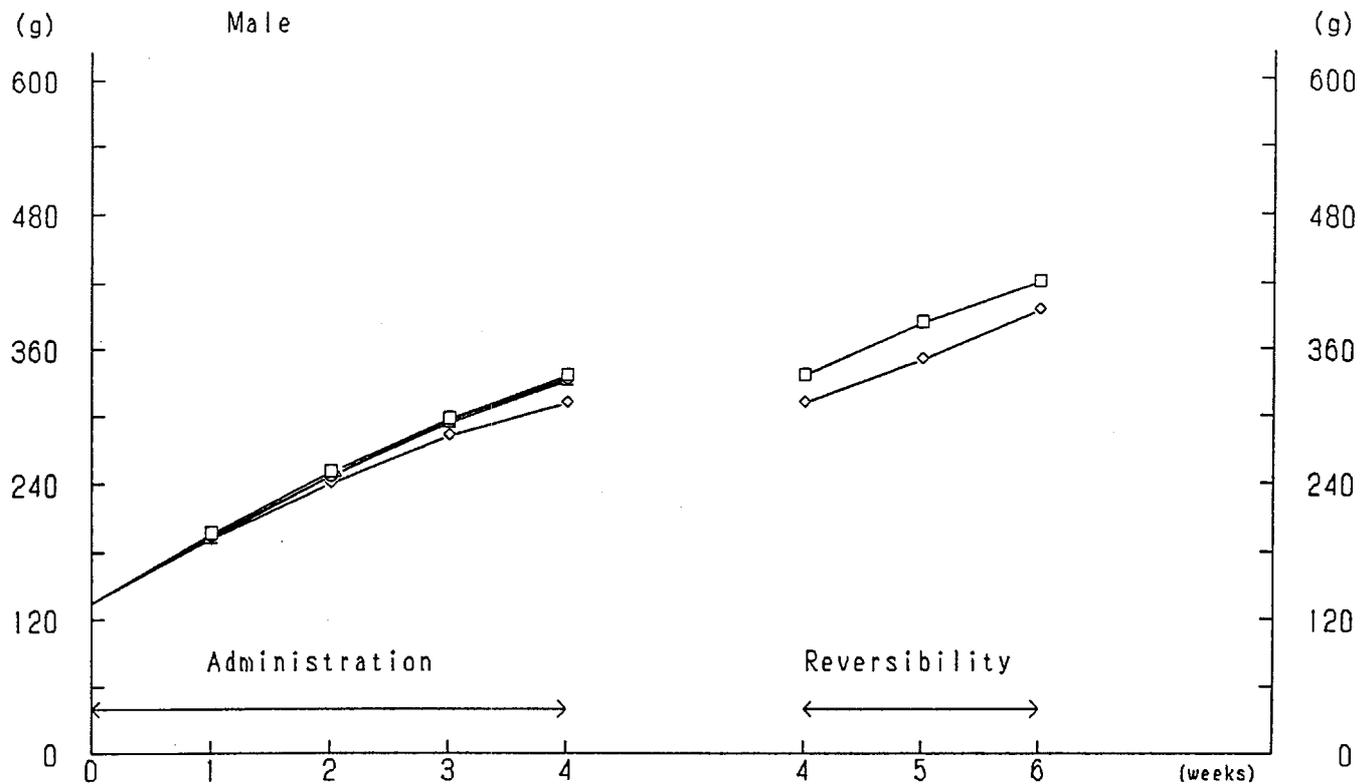
Findings of clinical observation	Dose level (mg/kg)	Days of experiment														Total (1-28)
		15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
yellowish urine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	100	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5
	300	10	10	10	10	9	9	9	9	9	9	9	8	8	3	10
decrease spontaneous motor activity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
	300	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10

Table 2. -continued Clinical observation

Exp. No. 2777 (115-056)

Sex: Female

Findings of clinical observation	Dose level (mg/kg)	Days of experiment														Total (29-42)
		29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	
normal/Number per group	0	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5/ 5	5
	300	3/ 3	3/ 3	3/ 3	3/ 3	3/ 3	3/ 3	3/ 3	3/ 3	3/ 3	3/ 3	3/ 3	3/ 3	3/ 3	3/ 3	3



Exp. No. 2777(115-056)

Dose level (mg/kg)

- 0
- 30
- △— 100
- ◇— 300

Figure 2. Body weight

Table 3. Body weight

Exp. No. 2777 (115-056)

(unit : g)

Sex	Dose level (mg/kg)	Weeks of experiment				
		0	1	2	3	4
Male	0	135 ± 3	196 ± 7	250 ± 13	297 ± 23	336 ± 32
	30	135 ± 4	194 ± 9	246 ± 17	296 ± 20	333 ± 28
	100	135 ± 3	192 ± 8	246 ± 12	293 ± 11	331 ± 16
	300	135 ± 4	191 ± 8	240 ± 17	282 ± 17	311 ± 26
Female	0	112 ± 3	149 ± 6	172 ± 9	188 ± 13	211 ± 18
	30	112 ± 2	147 ± 6	171 ± 12	186 ± 13	209 ± 19
	100	112 ± 2	148 ± 8	170 ± 9	190 ± 14	204 ± 13
	300	112 ± 2	141 ± 10	160 ± 11	165 ± 19*	185 ± 22*

Mean ± S. D.

Significant difference from control group;

\*:  $P \leq 0.05$ \*\*:  $P \leq 0.01$

Table 3. -continued Body weight

Exp. No. 2777 (115-056)

(unit : g)

Sex	Dose level (mg/kg)	Gain (0 → 4)
Male	0	201 ± 30
	30	198 ± 25
	100	196 ± 13
	300	176 ± 26
Female	0	99 ± 16
	30	97 ± 19
	100	92 ± 14
	300	74 ± 21*

Mean ± S. D.

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

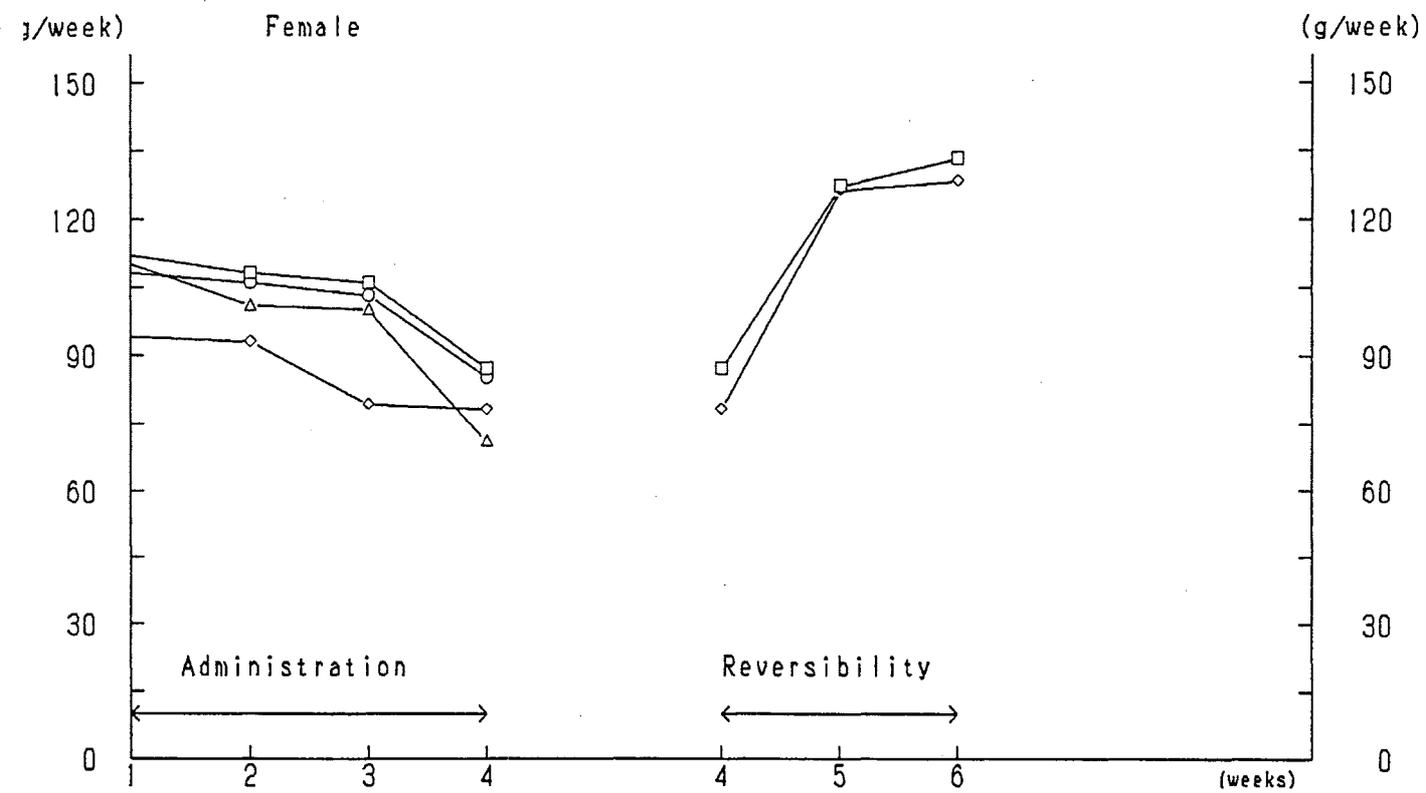
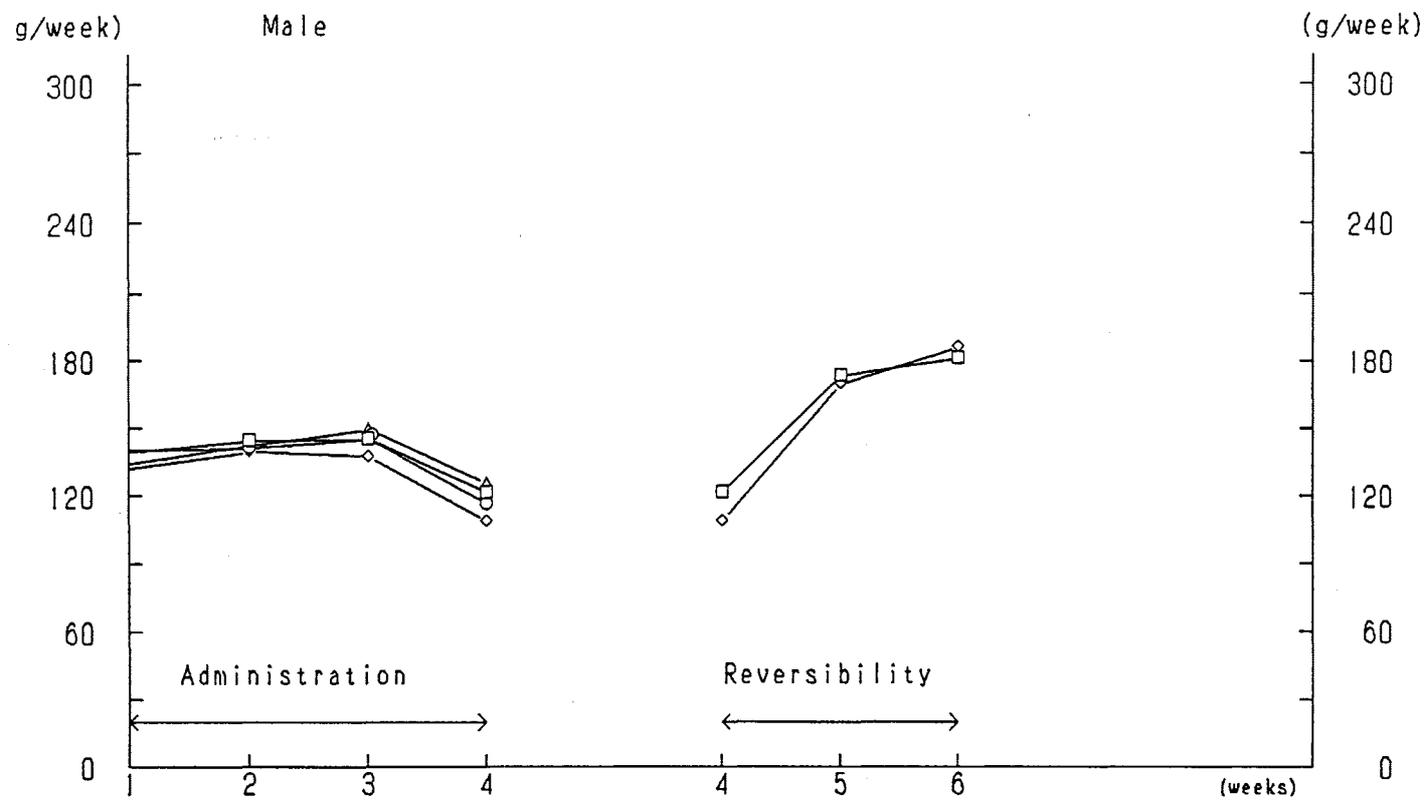
Table 3. -continued Body weight

Exp. No. 2777 (115-056)

(unit : g)

Sex	Dose level (mg/kg)	Weeks of experiment		Gain (4 → 6)
		5	6	
Male	0	384 ± 26	421 ± 28	71 ± 9
	300	350 ± 32	395 ± 38	81 ± 7
Female	0	223 ± 19	238 ± 20	35 ± 9
	300	217 ± 38	238 ± 35	47 ± 4

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



Exp. No. 2777(115-056)

Dose level (mg/kg)



Figure 3. Food consumption

Table 4. Food consumption

Exp. No. 2777 (115-056)

(unit : g/week)

Sex	Dose level (mg/kg)	Weeks of experiment 1	2	3	4	Total (0 → 4)
Male	0	139 ± 5	144 ± 9	145 ± 19	121 ± 20	548 ± 47
	30	140 ± 5	141 ± 9	145 ± 13	116 ± 10	542 ± 34
	100	134 ± 6	142 ± 6	149 ± 6	125 ± 5	550 ± 18
	300	132 ± 10	139 ± 17	137 ± 13	108 ± 22	516 ± 41
Female	0	112 ± 12	108 ± 13	106 ± 12	87 ± 20	413 ± 56
	30	108 ± 11	106 ± 12	103 ± 3	85 ± 12	403 ± 33
	100	110 ± 3	101 ± 9	100 ± 11	71 ± 9	382 ± 27
	300	94 ± 18*	93 ± 14	79 ± 16**	78 ± 17	338 ± 37**

Mean ± S. D.

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

Table 4. -continued Food consumption

Exp. No. 2777 (115-056)

( unit : g/week )

Sex	Dose level (mg/kg)	Weeks of experiment		Total (5 → 6)
		5	6	
Male	0	173 ± 18	181 ± 14	354 ± 31
	300	169 ± 16	186 ± 19	355 ± 34
Female	0	127 ± 11	133 ± 16	259 ± 27
	300	126 ± 29	128 ± 24	254 ± 53

Mean ± S. D.

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

Table 5. Food efficiency

Exp. No. 2777 (115-056)

( unit : % )

Sex	Dose level (mg/kg)	Weeks of experiment	1	2	3	4	Mean (0 → 4)
Male	0	44.5 ± 4.3	37.0 ± 3.1	32.3 ± 6.0	31.7 ± 5.5	36.6 ± 2.8	
	30	42.1 ± 4.0	37.4 ± 4.0	34.0 ± 2.0	31.9 ± 4.7	36.5 ± 2.5	
	100	42.9 ± 3.3	38.0 ± 2.9	31.7 ± 2.0	30.2 ± 6.8	35.7 ± 2.9	
	300	42.1 ± 4.0	34.6 ± 6.9	30.6 ± 5.6	24.8 ± 11.9	33.9 ± 3.2	
Female	0	33.0 ± 4.5	21.6 ± 4.3	15.4 ± 5.1N	25.4 ± 6.5	23.9 ± 3.1	
	30	32.7 ± 5.1	22.2 ± 4.7	14.6 ± 6.6	26.9 ± 8.0	24.1 ± 4.6	
	100	32.6 ± 7.7	21.6 ± 3.4	20.4 ± 4.6	20.0 ± 6.8	24.0 ± 2.3	
	300	30.5 ± 4.0	21.0 ± 6.6	4.4 ± 14.2	27.0 ± 7.2	21.5 ± 4.3	

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

67

Table 5. -continued Food efficiency

Exp. No. 2777 (115-056)

(unit : %)

Sex	Dose level (mg/kg)	Weeks of experiment		Mean (5 → 6)
		5	6	
Male	0	19.4 ± 3.6	20.5 ± 2.2	20.0 ± 2.0
	300	21.5 ± 5.3	24.1 ± 2.9	22.9 ± 2.2
Female	0	15.8 ± 5.3	11.4 ± 3.4	13.6 ± 3.7
	300	20.6 ± 1.8	17.1 ± 5.6	18.9 ± 3.2

Mean ± S. D.

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

Table 6. Hematology

Exp. No. 2777 (115-056)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	HCT (%)	HGB (g/dl)	RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	MCV ( $\mu\text{m}^3$ )	MCH (pg)	MCHC (%)
Male	0	5	42.5 ± 0.9	14.5 ± 0.4	7.36 ± 0.25	57.8 ± 2.3	19.7 ± 0.7	34.1 ± 0.2
	30	5	40.7 ± 1.4*	13.7 ± 0.5*	6.88 ± 0.32*	59.2 ± 1.8	19.9 ± 0.5	33.7 ± 0.4
	100	5	41.8 ± 0.8	14.3 ± 0.4	7.07 ± 0.20	59.2 ± 0.9	20.2 ± 0.3	34.1 ± 0.2
	300	5	40.0 ± 0.6**	13.6 ± 0.3**	6.90 ± 0.25*	58.0 ± 1.5	19.7 ± 0.4	34.0 ± 0.4
Female	0	5	41.2 ± 1.1	14.3 ± 0.4	7.03 ± 0.30	58.6 ± 1.7	20.3 ± 0.7	34.6 ± 0.4
	30	5	40.6 ± 1.5	14.1 ± 0.7	7.16 ± 0.32	56.8 ± 1.5	19.7 ± 0.5	34.7 ± 0.5
	100	5	38.9 ± 1.2*	13.6 ± 0.5	6.87 ± 0.19	56.7 ± 1.4	19.9 ± 0.6	35.1 ± 0.3
	300	5	36.8 ± 1.0**	12.3 ± 0.3**	6.18 ± 0.24**	59.5 ± 2.0	19.9 ± 0.5	33.4 ± 0.4**

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

51

Table 6. -continued Hematology

Exp. No. 2777 (115-056)

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	1157 $\pm$ 133	12.8 $\pm$ 5.0	17 $\pm$ 11	80 $\pm$ 12	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 1
	30	5	1110 $\pm$ 117	14.3 $\pm$ 4.1	21 $\pm$ 16	74 $\pm$ 17	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	2 $\pm$ 1
	100	5	1088 $\pm$ 92	10.2 $\pm$ 1.6	12 $\pm$ 7	85 $\pm$ 7	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0
	300	5	1463 $\pm$ 76**	16.4 $\pm$ 1.7	18 $\pm$ 8	76 $\pm$ 7	2 $\pm$ 2	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	2 $\pm$ 1
Female	0	5	1048 $\pm$ 85	6.2 $\pm$ 1.8	16 $\pm$ 7	80 $\pm$ 8	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0
	30	5	1042 $\pm$ 151	5.9 $\pm$ 2.0	13 $\pm$ 6	83 $\pm$ 7	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0
	100	5	1062 $\pm$ 78	6.4 $\pm$ 1.7	11 $\pm$ 6	86 $\pm$ 7	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0
	300	5	1285 $\pm$ 121*	6.5 $\pm$ 2.5	15 $\pm$ 11	81 $\pm$ 11	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 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. 2777 (115-056)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Reticulocyte (%)	Methemoglobin (%)
Male	0	5	36 ± 9	0.6 ± 0.3
	30	5	40 ± 9	0.6 ± 0.3
	100	5	36 ± 4	0.7 ± 0.1
	300	5	67 ± 19**	1.1 ± 0.4
Female	0	5	23 ± 6N	0.5 ± 0.3N
	30	5	23 ± 7	0.7 ± 0.1
	100	5	27 ± 10	0.7 ± 0.0
	300	5	104 ± 59*	0.9 ± 0.3

Mean ± S. D.

Significant difference from control group;

N: Non parametric analysis

\*:  $P \leq 0.05$ \*\*:  $P \leq 0.01$

Table 6. -continued Hematology

Exp. No. 2777 (115-056)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	HCT (%)	HGB (g/dl)	RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	MCV ( $\mu\text{m}^3$ )	MCH (pg)	MCHC (%)
Male	0	5	42.1 $\pm$ 1.5	14.9 $\pm$ 0.7	7.67 $\pm$ 0.32	55.0 $\pm$ 1.0	19.4 $\pm$ 0.3	35.3 $\pm$ 0.5
	300	5	42.3 $\pm$ 1.5	14.5 $\pm$ 0.3	7.50 $\pm$ 0.42	56.5 $\pm$ 2.5	19.4 $\pm$ 0.7	34.4 $\pm$ 0.8
Female	0	5	39.4 $\pm$ 1.7	14.4 $\pm$ 0.6	7.27 $\pm$ 0.39	54.3 $\pm$ 1.3	19.8 $\pm$ 0.3	36.4 $\pm$ 0.5
	300	3	41.6 $\pm$ 0.3	14.9 $\pm$ 0.3	7.36 $\pm$ 0.30	56.5 $\pm$ 2.0	20.3 $\pm$ 0.4	35.9 $\pm$ 0.5

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

Table 6. -continued Hematology

Exp. No. 2777 (115-056)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	PLT (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	WBC (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Differential leukocyte counts (%)					
					NEUT	LYMPH	MONO	EOSN	BASO	LUC
Male	0	5	1146 ± 108	17.6 ± 6.9	10 ± 2	85 ± 2	2 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	2 ± 0
	300	5	1074 ± 81	12.2 ± 3.9	14 ± 6	82 ± 6	2 ± 1	1 ± 0	0 ± 0	2 ± 0
Female	0	5	994 ± 107	7.9 ± 1.5	10 ± 2	86 ± 3	1 ± 0	1 ± 0	0 ± 0	1 ± 0
	300	3	1058 ± 108	7.2 ± 1.0	11 ± 4	85 ± 6	2 ± 1	2 ± 1	0 ± 0	1 ± 1

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

Table 6. -continued Hematology

Exp. No. 2777 (115-056)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Reticulocyte (%)	Methemoglobin (%)
Male	0	5	32 ± 6	0.5 ± 0.4
	300	5	38 ± 10	0.7 ± 0.2
Female	0	5	26 ± 6	0.6 ± 0.2
	300	3	29 ± 8	0.7 ± 0.2

Mean ± S. D.

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

Table 7. Coagulation

Exp. No. 2777 (115-056)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	PT (sec.)	APTT (sec.)	Fibrinogen (mg/dl)
Male	0	5	13.3 ± 0.4	23.5 ± 1.7	302 ± 27
	30	5	13.6 ± 0.5	20.7 ± 2.0	335 ± 78
	100	5	13.2 ± 0.3	21.8 ± 2.1	277 ± 21
	300	5	13.1 ± 0.2	20.7 ± 1.5	387 ± 52*
Female	0	5	14.0 ± 0.6	18.3 ± 1.8	243 ± 19N
	30	5	13.7 ± 0.5	16.8 ± 1.2	220 ± 31
	100	5	13.9 ± 0.6	16.9 ± 1.3	253 ± 20
	300	5	14.0 ± 0.8	17.2 ± 1.9	321 ± 107

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

57

Table 7. -continued Coagulation

Exp. No. 2777 (115-056)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	PT (sec.)	APTT (sec.)	Fibrinogen (mg/dl)
Male	0	5	12.5 ± 0.2	22.9 ± 1.3	268 ± 21
	300	5	13.0 ± 0.3*	23.4 ± 1.8	259 ± 10
Female	0	5	13.6 ± 0.3	21.3 ± 1.6	209 ± 14
	300	3	13.5 ± 0.2	21.3 ± 0.5	224 ± 10

Mean ± S.D.

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

Table 8. Blood chemistry

Exp. No. 2777 (115-056)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	T. protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	A/G
Male	0	5	8.9 ± 1.7	0.60 ± 0.05	118 ± 6	5.33 ± 0.06	2.95 ± 0.15	1.25 ± 0.13
	30	5	8.9 ± 1.2	0.58 ± 0.03	126 ± 24	5.57 ± 0.14	2.96 ± 0.19	1.14 ± 0.12
	100	5	8.8 ± 1.3	0.62 ± 0.06	136 ± 11	5.36 ± 0.18	3.06 ± 0.13	1.33 ± 0.05
	300	5	10.1 ± 1.4	0.65 ± 0.06	108 ± 9	5.31 ± 0.19	2.99 ± 0.07	1.29 ± 0.06
Female	0	5	13.5 ± 1.2	0.59 ± 0.03	104 ± 14	5.78 ± 0.08	3.35 ± 0.07	1.39 ± 0.05
	30	5	11.8 ± 2.8	0.62 ± 0.04	121 ± 14	5.85 ± 0.27	3.47 ± 0.19	1.46 ± 0.05
	100	5	13.1 ± 2.3	0.68 ± 0.03	116 ± 8	5.83 ± 0.16	3.43 ± 0.11	1.43 ± 0.06
	300	5	11.4 ± 1.1	0.64 ± 0.08	120 ± 7	5.83 ± 0.29	3.45 ± 0.19	1.46 ± 0.10

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

59

Table 8. -continued Blood chemistry

Exp. No. 2777 (115-056)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	T.cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	GOT (U/l)	GPT (U/l)	ALP (U/l)	Gamma-GTP (U/l)
Male	0	5	49 ± 7	67.6 ± 22.6	52 ± 4N	14 ± 2N	177 ± 32	0.9 ± 0.5
	30	5	51 ± 14	61.8 ± 29.1	51 ± 2	15 ± 2	164 ± 27	1.0 ± 0.7
	100	5	55 ± 9	73.5 ± 20.5	44 ± 6	13 ± 1	154 ± 34	0.6 ± 0.2
	300	5	75 ± 21*	74.2 ± 25.1	285 ± 248	43 ± 32*	146 ± 64	0.5 ± 0.3
Female	0	5	52 ± 15	45.9 ± 14.9	53 ± 6N	11 ± 2N	123 ± 28	1.1 ± 0.5
	30	5	47 ± 14	47.3 ± 28.5	50 ± 11	13 ± 2	89 ± 16	0.8 ± 0.4
	100	5	63 ± 8	45.6 ± 11.5	41 ± 6	11 ± 1	151 ± 46	1.1 ± 0.4
	300	5	71 ± 12	49.0 ± 15.1	484 ± 829	58 ± 90	122 ± 34	0.9 ± 0.2

Mean ± S. D.

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

N: Non parametric analysis

Table 8. -continued Blood chemistry

Exp. No. 2777 (115-056)

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	0.37 ± 0.01	144.0 ± 1.0	4.56 ± 0.12	108.4 ± 1.9	9.87 ± 0.24	7.67 ± 0.40
	30	5	0.39 ± 0.03	144.0 ± 1.0	4.76 ± 0.13	107.7 ± 1.5	10.05 ± 0.15	8.03 ± 0.51
	100	5	0.40 ± 0.02	142.6 ± 0.6	4.65 ± 0.21	107.2 ± 0.7	9.99 ± 0.16	7.65 ± 0.26
	300	5	0.46 ± 0.04**	143.5 ± 0.6	4.96 ± 0.17**	107.1 ± 0.7	9.93 ± 0.12	7.94 ± 0.17
Female	0	5	0.39 ± 0.01	143.5 ± 1.1	4.51 ± 0.15	110.7 ± 1.4	10.09 ± 0.13	6.54 ± 0.46
	30	5	0.39 ± 0.03	144.2 ± 1.4	4.51 ± 0.15	111.0 ± 1.0	10.18 ± 0.26	6.04 ± 0.71
	100	5	0.42 ± 0.02	143.6 ± 1.2	4.29 ± 0.19	109.7 ± 0.7	10.07 ± 0.10	6.18 ± 0.40
	300	5	0.47 ± 0.01**	144.2 ± 1.3	4.70 ± 0.28	109.7 ± 2.4	10.19 ± 0.30	7.19 ± 1.07

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

Table 8. -continued Blood chemistry

Exp. No. 2777 (115-056)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	T. protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	A/G
Male	0	5	11.4 ± 0.8	0.56 ± 0.04	155 ± 10	5.89 ± 0.34	3.25 ± 0.15	1.23 ± 0.06
	300	5	11.0 ± 0.9	0.64 ± 0.06*	123 ± 18**	5.84 ± 0.22	3.19 ± 0.08	1.20 ± 0.04
Female	0	5	15.6 ± 1.6	0.60 ± 0.05	112 ± 16	5.85 ± 0.22	3.31 ± 0.13	1.31 ± 0.04
	300	3	13.7 ± 1.6	0.66 ± 0.05	100 ± 10	6.05 ± 0.06	3.42 ± 0.06	1.30 ± 0.06

Mean ± S. D.

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

Table 8. -continued Blood chemistry

Exp. No. 2777 (115-056)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	T. cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	GOT (U/l)	GPT (U/l)	ALP (U/l)	Gamma-GTP (U/l)
Male	0	5	69 ± 7	79.1 ± 17.8	51 ± 5	16 ± 2	123 ± 31	0.4 ± 0.2
	300	5	56 ± 10*	70.7 ± 17.1	40 ± 5**	14 ± 2	108 ± 20	0.4 ± 0.1
Female	0	5	62 ± 20	44.7 ± 14.2	50 ± 8	12 ± 1	93 ± 18	0.6 ± 0.1
	300	3	65 ± 13	55.3 ± 10.8	54 ± 8	16 ± 4*	94 ± 14	0.6 ± 0.3

Mean ± S. D.

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

Table 8. -continued Blood chemistry

Exp. No. 2777 (115-056)

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	0.40 ± 0.01	142.3 ± 1.4	4.56 ± 0.23	106.5 ± 1.2	10.23 ± 0.18	7.67 ± 0.34
	300	5	0.41 ± 0.01	144.4 ± 0.6*	4.84 ± 0.39	108.1 ± 1.9	10.17 ± 0.15	7.64 ± 0.49
Female	0	5	0.43 ± 0.01	143.7 ± 0.8	4.30 ± 0.13	110.3 ± 1.4	9.79 ± 0.26	6.31 ± 0.34
	300	3	0.40 ± 0.00	143.0 ± 1.0	4.80 ± 0.45	111.4 ± 1.9	10.01 ± 0.47	6.60 ± 0.80

Mean ± S.D.

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

Table 9. Urinalysis

Exp. No. 2777 (115-056)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Volume (ml)	Specific Gravity
Male	0	5	22 ± 18	1.044 ± 0.028
	30	5	19 ± 8	1.039 ± 0.019
	100	5	26 ± 14	1.028 ± 0.010
	300	5	32 ± 15	1.026 ± 0.015
Female	0	5	19 ± 13	1.038 ± 0.018
	30	5	9 ± 4	1.066 ± 0.029
	100	5	22 ± 15	1.039 ± 0.032
	300	5	29 ± 14	1.018 ± 0.008

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

65

Table 9. -continued Urinalysis

Exp. No. 2777 (115-056)

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												
	30	5	5a													5												
	100	5	5a													5												
	300	5			3a	1a	1a										5		1	1								1
Female	0	5	5													5												
	30	5	5a													5												
	100	5	4a 1a													5												
	300	5			4a	1a										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.  
 a : Fluorescent yellow urine was observed in all animals.

Table 9. -continued Urinalysis

Exp. No. 2777 (115-056)

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	1	3				5				
	30	5	5					2	2	1				4	1			
	100	5	4		1			2	2	1				4	1			
	300	5	4	1				1	2		1	1		3	1		1	
Female	0	5	5					4	1					5				
	30	5	5						1	4				3	2			
	100	5	5					2	1	2				4	1			
	300	5	4			1		1	2	2				3	1	1		

67

Table 9. -continued Urinalysis

Exp. No. 2777 (115-056)

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		1	3	4	1				2	3				
	30	5		2	2	1	4	1				3	2				
	100	5	1	1	2	1	4	1				4	1				
	300	5	3		1	1	3		1	1		3	2				
Female	0	5	4		1		4	1				4	1				
	30	5			2	3	2	3				1	4				
	100	5	4		1		4	1				3	2				
	300	5	4		1		2	2	1			4	1				

Table 9. -continued Urinalysis : Microscopic examination of sediment

Exp. No. 2777 (115-056)

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			5
	30	5	5			5			5			5		5		4	1		5
	100	5	5			5			4	1		5		5		5			1 4
	300	5	5			5			5			5		5		5			1 4
Female	0	5	5			5			5			5		5		5			1 4
	30	5	5			5			5			5		5		5			5
	100	5	5			5			5			5		5		5			3 2
	300	5	5			5			5			5		5		5			5

others : Crystals

69

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Volume (ml)	Specific Gravity
Male	0	5	24 ± 10	1.047 ± 0.020
	300	5	32 ± 7	1.036 ± 0.013
Female	0	5	11 ± 1N	1.071 ± 0.011
	300	3	17 ± 8	1.046 ± 0.012*

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. 2777 (115-056)

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	5					2	3									5
	300	5	4	1				2	3									5
Female	0	5	5					5										5
	300	3	2	1				2	1									3

Table 9. -continued Urinalysis

Exp. No. 2777 (115-056)

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	1	3		5				2	3					
	300	5		4	1		5				4	1					
Female	0	5		1	4		4	1					5				
	300	3	1	1	1		2	1			2	1					

Table 9. -continued Urinalysis : Microscopic examination of sediment

Exp. No. 2777 (115-056)

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		1	4
	300	5	5			5			5			5		5		5		2	3
Female	0	5	5			5			5			5		5		5		1	4
	300	3	3			3			3			3		3		3		1	2

others : Crystals

Table 10. Organ weight

Exp. No. 2777 (115-056)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (g)	Liver (g)	Kidneys (g)	Spleen (g)
Male	0	5	322 ± 36	2.10 ± 0.05	9.32 ± 1.36	2.43 ± 0.31	0.55 ± 0.04
	30	5	333 ± 28	2.04 ± 0.08	10.74 ± 1.17	2.61 ± 0.43	0.59 ± 0.06
	100	5	331 ± 16	2.02 ± 0.11	10.57 ± 0.43	2.40 ± 0.19	0.55 ± 0.03
	300	5	308 ± 23	2.02 ± 0.04	10.67 ± 0.58	2.42 ± 0.15	0.75 ± 0.12**
Female	0	5	218 ± 16	1.95 ± 0.05	6.51 ± 1.08	1.57 ± 0.14	0.39 ± 0.03
	30	5	209 ± 19	1.89 ± 0.07	6.47 ± 0.67	1.64 ± 0.13	0.35 ± 0.09
	100	5	204 ± 13	1.92 ± 0.08	6.47 ± 0.66	1.53 ± 0.08	0.42 ± 0.02
	300	5	182 ± 19*	1.83 ± 0.13	7.14 ± 0.89	1.48 ± 0.03	0.48 ± 0.07

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

75

Table 10. -continued Organ weight

Exp. No. 2777 (115-056)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Adrenals (mg)	Testes (g)	Ovaries (mg)	Thymus (mg)
Male	0	5	51 ± 12N	2.88 ± 0.15		515 ± 88
	30	5	42 ± 12	2.81 ± 0.06		611 ± 40
	100	5	43 ± 3	2.96 ± 0.04		615 ± 62
	300	5	43 ± 3	2.94 ± 0.12		463 ± 85
Female	0	5	57 ± 5		79 ± 16	414 ± 78
	30	5	61 ± 2		72 ± 8	450 ± 62
	100	5	55 ± 6		71 ± 8	452 ± 100
	300	5	45 ± 8*		60 ± 11	344 ± 77

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. 2777 (115-056)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (g)	Liver (g)	Kidneys (g)	Spleen (g)
Male	0	5	421 ± 28	2.12 ± 0.06	13.12 ± 1.62	2.97 ± 0.13	0.75 ± 0.09
	300	5	395 ± 38	2.15 ± 0.07	11.32 ± 1.60	2.74 ± 0.30	0.69 ± 0.07
Female	0	5	238 ± 20	1.93 ± 0.03	6.50 ± 0.99	1.81 ± 0.14	0.46 ± 0.06
	300	3	238 ± 35	1.95 ± 0.09	6.49 ± 1.00	1.55 ± 0.13*	0.48 ± 0.10

Mean ± S. D.

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

77

Table 10. -continued Organ weight

Exp. No. 2777 (115-056)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Adrenals (mg)	Testes (g)	Ovaries (mg)	Thymus (mg)
Male	0	5	53 ± 5	3.12 ± 0.17		609 ± 87
	300	5	52 ± 5	3.24 ± 0.17		478 ± 35*
Female	0	5	68 ± 6		77 ± 4	379 ± 73
	300	3	64 ± 7		96 ± 9**	408 ± 94

Mean ± S.D.

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

Table 11. Organ weight per body weight

Exp. No. 2777 (115-056)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (%)	Liver (%)	Kidneys (%)	Spleen (%)
Male	0	5	322 ± 36	0.659 ± 0.088	2.887 ± 0.131	0.756 ± 0.042	0.174 ± 0.029
	30	5	333 ± 28	0.618 ± 0.071	3.230 ± 0.347	0.785 ± 0.135	0.179 ± 0.018
	100	5	331 ± 16	0.610 ± 0.018	3.202 ± 0.217	0.727 ± 0.066	0.166 ± 0.015
	300	5	308 ± 23	0.659 ± 0.046	3.473 ± 0.184**	0.788 ± 0.040	0.244 ± 0.026**
Female	0	5	218 ± 16	0.898 ± 0.073	2.976 ± 0.277	0.721 ± 0.025	0.180 ± 0.016
	30	5	209 ± 19	0.912 ± 0.100	3.098 ± 0.105	0.787 ± 0.058	0.165 ± 0.034
	100	5	204 ± 13	0.943 ± 0.065	3.164 ± 0.188	0.753 ± 0.062	0.204 ± 0.017
	300	5	182 ± 19*	1.013 ± 0.091	3.922 ± 0.292**	0.817 ± 0.074	0.263 ± 0.018**

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

79

Table 11. -continued Organ weight per body weight

Exp. No. 2777 (115-056)

Week: 4

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Adrenals (%)	Testes (%)	Ovaries (%)	Thymus (%)
Male	0	5	0.016 ± 0.003	0.900 ± 0.078		0.161 ± 0.028
	30	5	0.013 ± 0.003	0.848 ± 0.071		0.184 ± 0.015
	100	5	0.013 ± 0.001	0.898 ± 0.045		0.186 ± 0.018
	300	5	0.014 ± 0.002	0.960 ± 0.072		0.150 ± 0.021
Female	0	5	0.026 ± 0.002		0.036 ± 0.005	0.189 ± 0.024
	30	5	0.029 ± 0.002		0.035 ± 0.004	0.216 ± 0.027
	100	5	0.027 ± 0.004		0.035 ± 0.005	0.221 ± 0.044
	300	5	0.024 ± 0.002		0.033 ± 0.005	0.188 ± 0.029

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. 2777 (115-056)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (%)	Liver (%)	Kidneys (%)	Spleen (%)
Male	0	5	421 ± 28	0.506 ± 0.043	3.114 ± 0.255	0.709 ± 0.045	0.179 ± 0.026
	300	5	395 ± 38	0.548 ± 0.044	2.865 ± 0.239	0.694 ± 0.035	0.176 ± 0.008
Female	0	5	238 ± 20	0.816 ± 0.065	2.716 ± 0.240	0.758 ± 0.016N	0.195 ± 0.024
	300	3	238 ± 35	0.828 ± 0.098	2.727 ± 0.035	0.658 ± 0.093	0.201 ± 0.013

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

Table 11. -continued Organ weight per body weight

Exp. No. 2777 (115-056)

Week: 6

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Adrenals (%)	Testes (%)	Ovaries (%)	Thymus (%)
Male	0	5	0.013 ± 0.001	0.746 ± 0.071		0.145 ± 0.020
	300	5	0.013 ± 0.001	0.825 ± 0.048		0.121 ± 0.005*
Female	0	5	0.029 ± 0.003		0.032 ± 0.003	0.159 ± 0.030
	300	3	0.027 ± 0.005		0.041 ± 0.009	0.171 ± 0.017

Mean ± S. D.

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

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

Exp. No. 2777 (115-056)

Sex: Male

Dose level ( mg/kg )	0	30	100	300	
No. of animals necropsied	5	5	5	5	
Organ Findings					
<b>CARDIOVASCULAR SYSTEM</b>					
heart	white patch/zone	0	1	0	0
<b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>					
spleen	brown	0	0	0	5
	enlarged	0	0	0	1
	nodule	0	0	1	0
<b>RESPIRATORY SYSTEM</b>					
lung	colored patch/zone	0	1	0	0
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>					
liver	brown	0	0	0	4
	granular	0	1	0	0
choledochus	dilated lumen	0	1	0	0
<b>URINARY SYSTEM</b>					
kidney	cyst	0	1	0	0
	green	0	0	0	1
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>					
epididymis	green	0	0	0	2
<b>SPECIAL SENSE SYSTEM</b>					
internal ear	reddish	1	0	0	0
<b>INTEGUMENTARY SYSTEM</b>					
skin	ulcer	1	2	0	0

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

Exp. No. 2777 (115-056)

Sex: Female

Dose level ( mg/kg )	0	30	100	300
No. of animals necropsied	5	5	5	5
Organ Findings				
<b>CARDIOVASCULAR SYSTEM</b>				
heart white patch/zone	0	0	0	1
heart sac hydropericardium	0	0	0	1
<b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>				
spleen brown enlarged	0	0	0	5
	0	0	0	1
<b>URINARY SYSTEM</b>				
kidney dilated pelvis	0	0	0	1
green	0	0	0	3
scarred	0	1	0	0
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>				
uterus dilated lumen	0	1	0	1
small	0	0	0	1
<b>ENDOCRINE SYSTEM</b>				
pituitary gland cyst	1	0	0	0

Table 13. Summary of gross findings with statistical analysis ( sacrificed at 4 week )

Exp. No. 2777 (115-056)

Dose level ( mg/kg ) No. of animals necropsied Organ	Findings	Male animals				Female animals			
		Am 5	Bm 5	Cm 5	Dm 5	Af 5	Bf 5	Cf 5	Df 5
CARDIOVASCULAR SYSTEM									
heart	white patch/zone	0	1	0	0	0	0	0	1
heart sac	hydropericardium	0	0	0	0	0	0	0	1
HEMATOPOIETIC SYSTEM									
spleen	brown	0	0	0	5**	0	0	0	5**
	enlarged	0	0	0	1	0	0	0	1
	nodule	0	0	1	0	0	0	0	0
RESPIRATORY SYSTEM									
lung	colored patch/zone	0	1	0	0	0	0	0	0
DIGESTIVE SYSTEM									
liver	brown	0	0	0	4*	0	0	0	0
	granular	0	1	0	0	0	0	0	0
choledochus	dilated lumen	0	1	0	0	0	0	0	0
URINARY SYSTEM									
kidney	cyst	0	1	0	0	0	0	0	0
	dilated pelvis	0	0	0	0	0	0	0	1
	green	0	0	0	1	0	0	0	3
	scarred	0	0	0	0	0	1	0	0
REPRODUCTIVE SYSTEM									
epididymis	green	0	0	0	2	-	-	-	-
uterus	dilated lumen	-	-	-	-	0	1	0	1
	small	-	-	-	-	0	0	0	1
ENDOCRINE SYSTEM									
pituitary gland	cyst	0	0	0	0	1	0	0	0
SPECIAL SENSE SYSTEM									
internal ear	reddish	1	0	0	0	0	0	0	0
INTEGUMENTARY SYSTEM									
skin	ulcer	1	2	0	0	0	0	0	0

Am: 0

Bm: 30

Cm: 100

Dm: 300

Af: 0

Bf: 30

Cf: 100

Df: 300

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

Table 14. Summary of gross findings ( dead or moribund )

Exp. No. 2777 (115-056)

Sex: Female

Dose level ( mg/kg )	0			30			100			300			
	No. of animals necropsied			No. of animals necropsied			No. of animals necropsied			No. of animals necropsied			
Organ	Findings	D	M	D&M	D	M	D&M	D	M	D&M	D	M	D&M
<b>CARDIOVASCULAR SYSTEM</b>													
heart	hypertrophic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
	pale	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
heart sac	thick	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
<b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>													
spleen	autolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
thymus	red patch/zone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
<b>RESPIRATORY SYSTEM</b>													
lung	reddish	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
thoracic cavity	hydrothorax	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>													
small intestine	autolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2
large intestine	autolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2
liver	enlarged	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
	evident lobule	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>													
uterus	autolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1

-: Not applicable.

Table 15. Summary of gross findings with statistical analysis ( dead or moribund )

Exp. No. 2777 (115-056)

Dose level ( mg/kg )	No. of animals necropsied	Male animals				Female animals			
		Am	Bm	Cm	Dm	Af	Bf	Cf	Df
Organ	Findings	0	0	0	0	0	0	0	2
<b>CARDIOVASCULAR SYSTEM</b>									
heart	hypertrophic	0	0	0	0	0	0	0	1
	pale	0	0	0	0	0	0	0	1
heart sac	thick	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>									
spleen	autolysis	0	0	0	0	0	0	0	1
thymus	red patch/zone	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>RESPIRATORY SYSTEM</b>									
lung	reddish	0	0	0	0	0	0	0	1
thoracic cavity	hydrothorax	0	0	0	0	0	0	0	2
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>									
small intestine	autolysis	0	0	0	0	0	0	0	2
large intestine	autolysis	0	0	0	0	0	0	0	2
liver	enlarged	0	0	0	0	0	0	0	1
	evident lobule	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>									
uterus	autolysis	-	-	-	-	0	0	0	1

Am: 0            Bm: 30            Cm: 100            Dm: 300  
Af: 0            Bf: 30            Cf: 100            Df: 300  
Significant difference from control group: \* : P ≤ 0.05    \*\* : P ≤ 0.01

Table 16.

Summary of histological findings ( sacrificed at 4 Week )

Exp. No. 2777 (115-056)

Sex: Male

Dose level ( mg/kg )	0				30				100				300			
No. of animals initially in study	5				5				5				5			
No. of animals necropsied	5				5				5				5			
No. of animals examined histologically	5				5				5				5			
Organ	Findings				T 1 2 3				T 1 2 3				T 1 2 3			
<b>CARDIOVASCULAR SYSTEM</b>																
heart	( 5 )				( 5 )				( 5 )				( 5 )			
myocardial damage	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	2	0	0
necrosis	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0
cellular infiltration	-	3	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	1
<b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>																
spleen	( 5 )				( 5 )				( 5 )				( 5 )			
deposit, pigment	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0
capsulitis	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0
hematopoiesis, extramedullary	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	4	0	0
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>																
liver	( 5 )				( 5 )				( 5 )				( 5 )			
bile duct dilatation	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
fatty change	-	4	0	0	-	4	0	0	-	4	0	0	-	2	0	0
cellular infiltration	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
microgranuloma	-	3	0	0	-	4	0	0	-	3	0	0	-	3	0	0
hematopoiesis, extramedullary	-	1	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0
hypertrophy	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	2	0	0
proliferation, bile duct	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
<b>URINARY SYSTEM</b>																
kidney	( 5 )				( 5 )				( 5 )				( 5 )			
basophilic change	-	4	0	0	-	3	1	0	-	4	0	0	-	3	0	0
cast, hyaline	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	2	0	0
degeneration, vacuolar	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	2	0	0
dilatation, tubules	-	1	0	0	-	0	1	0	-	0	0	0	-	0	0	0
hyaline droplet	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0
cellular infiltration, lymphocyte	-	3	0	0	-	3	0	0	-	3	0	0	-	1	0	0
fibrosis	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
<b>ENDOCRINE SYSTEM</b>																
adrenal gland	( 5 )				( 4 )				( 5 )				( 5 )			
degeneration, vacuolar	-	4	0	0	-	4	0	0	-	5	0	0	-	3	2	0

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked

=: benign #: malignant

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

-: Not applicable.

Table 16. -continued Summary of histological findings ( sacrificed at 4 Week )

Exp. No. 2777 (115-056)

Sex: Female

Dose level ( mg/kg )	0				30				100				300			
No. of animals initially in study	5				5				5				5			
No. of animals necropsied	5				5				5				5			
No. of animals examined histologically	5				5				5				5			
Organ_____ Findings_____	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3
<b>CARDIOVASCULAR SYSTEM</b>																
heart	( 5 )				( 5 )				( 5 )				( 5 )			
myocardial damage	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	2	1	0
necrosis	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	2	0	0
cellular infiltration	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	1	1
pericarditis	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0
fibrosis, ventricle	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	1	0
<b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>																
spleen	( 5 )				( 5 )				( 5 )				( 5 )			
deposit, pigment	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	5	0	0
hematopoiesis, extramedullary	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	4	0	0
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>																
liver	( 5 )				( 5 )				( 5 )				( 5 )			
deposit, pigment	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0
fatty change	-	5	0	0	-	5	0	0	-	5	0	0	-	0	0	0
microgranuloma	-	5	0	0	-	4	0	0	-	5	0	0	-	3	0	0
hematopoiesis, extramedullary	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	3	0	0
hypertrophy	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	2	0	0
<b>URINARY SYSTEM</b>																
kidney	( 5 )				( 0 )				( 0 )				( 5 )			
basophilic change	-	4	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	1	0
dilatation, tubules	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
hydronephrosis	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
<b>ENDOCRINE SYSTEM</b>																
adrenal gland	( 5 )				( 5 )				( 5 )				( 5 )			
degeneration, vacuolar	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked

=: benign #: malignant

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

-: Not applicable.

Table 16. -continued Summary of histological findings ( sacrificed at 6 Week )

Exp. No. 2777 (115-056)

Sex: Male

Dose level ( mg/kg )	0				30				100				300							
No. of animals initially in study	5				0				0				5							
No. of animals necropsied	5				0				0				5							
No. of animals examined histologically	5				0				0				5							
Organ	Findings				T 1 2 3				T 1 2 3				T 1 2 3				T 1 2 3			
<b>CARDIOVASCULAR SYSTEM</b>																				
heart	( 5)												( 5)							
myocardial damage	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
cellular infiltration	-	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0
fibrosis, apex cordis	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	0
<b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>																				
spleen	( 5)												( 5)							
deposit, pigment	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>																				
liver	( 5)												( 5)							
fatty change	-	3	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	0	0
microgranuloma	-	5	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	0	0

T: tumor    1: slight    2: moderate    3: marked  
 =: benign    #: malignant  
 ( ): No. of animals examined microscopically at this site.    -: Not applicable.

06

Table 16. -continued Summary of histological findings ( sacrificed at 6 Week )

Exp. No. 2777 (115-056)

Sex: Female

Dose level ( mg/kg )	0				30				100				300				
No. of animals initially in study	5				0				0				3				
No. of animals necropsied	5				0				0				3				
No. of animals examined histologically	5				0				0				3				
Organ_____ Findings_____	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	
<b>CARDIOVASCULAR SYSTEM</b>																	
heart	( 5)												( 3)				
cellular infiltration	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
<b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>																	
spleen	( 5)												( 3)				
deposit, pigment	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	0
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>																	
liver	( 5)												( 3)				
fatty change	-	4	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	0
microgranuloma	-	5	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	0

T: tumor    1: slight    2: moderate    3: marked  
 =: benign    #: malignant  
 ( ): No. of animals examined microscopically at this site.    -: Not applicable.

Table 17.

Summary of histological findings with statistical analysis  
(sacrificed at 4 Week)

Exp. No. 2777 (115-056)

Dose level (mg/kg)	No. of animals necropsied	Organ	Findings	Male animals				Female animals			
				Am 5	Bm 5	Cm 5	Dm 5	Af 5	Bf 5	Cf 5	Df 5
<b>CARDIOVASCULAR SYSTEM</b>											
heart											
			myocardial damage	0	0	0	2	0	0	0	3
			necrosis	0	0	0	1	0	0	0	2
			cellular infiltration	0	3	0	1	0	0	0	3
			pericarditis	0	0	0	0	0	0	0	1
			fibrosis, ventricle	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>											
spleen											
			deposit, pigment	0	0	0	1	0	0	0	5**
			capsulitis	0	0	1	0	0	0	0	0
			hematopoiesis, extramedullary	0	0	0	4*	0	0	0	4*
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>											
liver											
			bile duct dilatation	1	0	0	0	0	0	0	0
			deposit, pigment	0	0	0	0	0	0	0	1
			fatty change	4	4	4	2	5	5	5	0**
			cellular infiltration	0	1	0	0	0	0	0	0
			microgranuloma	4	3	3	3	4	5	5	3
			hematopoiesis, extramedullary	0	1	1	0	0	0	0	3
			hypertrophy	0	0	0	2	0	0	0	2
			proliferation, bile duct	1	0	0	0	0	0	0	0
<b>URINARY SYSTEM</b>											
kidney											
			basophilic change	4	4	4	3	-	4*	-	4*
			cast, hyaline	1	0	0	2	-	0	-	0
			degeneration, vacuolar	1	0	0	2	-	0	-	0
			dilatation, tubules	1	1	0	0	-	0	-	1
			hyaline droplet	0	0	1	1	-	0	-	0
			hydronephrosis	0	0	0	0	-	0	-	1
			cellular infiltration, lymphocyte	3	3	3	1	-	0	-	0
			fibrosis	0	1	0	0	-	0	-	0
<b>ENDOCRINE SYSTEM</b>											
adrenal gland											
			degeneration, vacuolar	4	4	5	5	1	0	0	1

Am: 30

Bm: 0

Cm: 100

Dm: 300

Af: 30

Bf: 0

Cf: 100

Df: 300

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

Table 17. -continued Summary of histological findings with statistical analysis  
( sacrificed at 6 Week )

Exp. No. 2777 (115-056)

Dose level ( mg/kg ) No. of animals necropsied Organ Findings	Male animals				Female animals			
	Am 0	Bm 5	Cm 0	Dm 5	Af 0	Bf 5	Cf 0	Df 3
<b>CARDIOVASCULAR SYSTEM</b>								
heart								
myocardial damage	-	0	-	1	-	0	-	0
cellular infiltration	-	2	-	2	-	0	-	1
fibrosis, apex cordis	-	0	-	1	-	0	-	0
<b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>								
spleen								
deposit, pigment	-	0	-	1	-	0	-	3
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>								
liver								
fatty change	-	3	-	4	-	4	-	3
microgranuloma	-	5	-	5	-	5	-	3

Am: 30

Bm: 0

Cm: 100

Dm: 300

Af: 30

Bf: 0

Cf: 100

Df: 300

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

86

Sex: Female

Dose level ( mg/kg )	0				30				100				300			
No. of animals initially in study	0				0				0				2			
No. of animals necropsied	0				0				0				2			
No. of animals examined histologically	0				0				0				2			
Organ _____ Findings _____	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3
<b>CARDIOVASCULAR SYSTEM</b>																
heart																( 2)
hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
myocardial damage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	1
necrosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	2
cellular infiltration	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	1
pericarditis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
<b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>																
spleen																( 2)
atrophy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
deposit, pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>																
liver																( 2)
necrosis, centrilobular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	1

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked

=: benign #: malignant

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

-: Not applicable.

Table 19.

Summary of histological findings with statistical analysis  
( dead or moribund )

Exp. No. 2777 (115-056)

Dose level ( mg/kg ) No. of animals necropsied Organ Findings	Male animals				Female animals			
	Am 0	Bm 0	Cm 0	Dm 0	Af 0	Bf 0	Cf 0	Df 2
<b>CARDIOVASCULAR SYSTEM</b>								
heart								
hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	1
myocardial damage	-	-	-	-	-	-	-	2
necrosis	-	-	-	-	-	-	-	2
cellular infiltration	-	-	-	-	-	-	-	2
pericarditis	-	-	-	-	-	-	-	1
<b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>								
spleen								
atrophy	-	-	-	-	-	-	-	1
deposit, pigment	-	-	-	-	-	-	-	1
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>								
liver								
necrosis, centrilobular	-	-	-	-	-	-	-	2

Am: 30

Bm: 0

Cm: 100

Dm: 300

Af: 30

Bf: 0

Cf: 100

Df: 300

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

95