

Table 12-1. --continued Electrophoresis  
---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Albumin (g/dL)	Alpha-1 (g/dL)	Alpha-2 (g/dL)	Beta (g/dL)	Gamma (g/dL)
Male	0	5	2.92 ± 0.17	1.31 ± 0.06	0.46 ± 0.04	0.85 ± 0.04	0.23 ± 0.03
	100	5	2.89 ± 0.18	1.19 ± 0.06	0.47 ± 0.05	0.87 ± 0.09	0.21 ± 0.03
	300	5	2.87 ± 0.08	1.06 ± 0.16*	0.43 ± 0.03	0.84 ± 0.03	0.25 ± 0.02
	1,000	5	2.91 ± 0.08	1.02 ± 0.15**	0.46 ± 0.04	0.85 ± 0.06	0.26 ± 0.04
Female	0	5	3.12 ± 0.12	1.17 ± 0.20	0.44 ± 0.04	0.89 ± 0.02	0.30 ± 0.06
	100	5	3.20 ± 0.26	1.07 ± 0.09	0.46 ± 0.01	0.87 ± 0.07	0.23 ± 0.07
	300	5	3.22 ± 0.10	1.01 ± 0.03	0.52 ± 0.03**	0.91 ± 0.08	0.29 ± 0.06
	1,000	5	3.24 ± 0.23	1.02 ± 0.13	0.48 ± 0.04	0.89 ± 0.05	0.26 ± 0.07

Mean ± S.D.  
Significantly different from control group; \* : P ≤ 0.05 \*\* : P ≤ 0.01 (Dunnett)

Table 12-2. Electrophoresis  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Albumin (%)	Alpha-1 (%)	Alpha-2 (%)	Beta (%)	Gamma (%)	A/G
Male	0	4	48.7 ± 2.9	22.7 ± 3.6	8.0 ± 0.9	16.3 ± 0.9	4.3 ± 0.7	0.95 ± 0.11
	1,000	5	49.7 ± 2.7	21.9 ± 2.1	8.4 ± 1.0	15.9 ± 0.9	4.2 ± 1.3	0.99 ± 0.11
Female	0	5	51.3 ± 1.7	19.8 ± 1.0	7.6 ± 0.3	15.0 ± 0.6	6.3 ± 1.1	1.06 ± 0.07
	1,000	5	51.3 ± 2.4	19.0 ± 1.4	8.3 ± 0.7	15.9 ± 1.0	5.6 ± 1.3	1.05 ± 0.10

Mean ± S.D.

Table 12-2. --continued Electrophoresis  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Albumin (g/dL)	Alpha-1 (g/dL)	Alpha-2 (g/dL)	Beta (g/dL)	Gamma (g/dL)
Male	0	4	2.70 ± 0.14	1.27 ± 0.24	0.45 ± 0.03	0.91 ± 0.04	0.24 ± 0.05
	1,000	5	2.75 ± 0.12	1.21 ± 0.12	0.46 ± 0.06	0.88 ± 0.07	0.23 ± 0.08
Female	0	5	3.00 ± 0.06	1.16 ± 0.09	0.45 ± 0.02	0.88 ± 0.04	0.37 ± 0.07
	1,000	5	3.05 ± 0.18	1.13 ± 0.13	0.49 ± 0.02**	0.95 ± 0.06	0.33 ± 0.08

Mean ± S.D.  
Significantly different from control group; \*\*: P ≤ 0.01 (Dunnett)

- 87 -

Table 13-1. Urinalysis  
---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Volume (mL)	Osmotic pressure (mOsm/kg)	Sodium (mmol/L)	Potassium (mmol/L)	Chloride (mmol/L)
Male	0	10	12.1 ± 4.1	1550 ± 532	122 ± 49	254.8 ± 94.5	170.0 ± 68.7
	100	5	16.8 ± 13.1	1469 ± 477	120 ± 40	233.2 ± 75.5	161.5 ± 57.2
	300	5	17.1 ± 7.5	1321 ± 425	116 ± 40	216.1 ± 70.1	142.1 ± 50.8
	1,000	10	11.1 ± 2.1	1571 ± 355	128 ± 26	252.2 ± 58.0	170.6 ± 41.4
Female	0	10	15.8 ± 7.1	1205 ± 385	99 ± 33	187.5 ± 61.5	127.7 ± 43.3
	100	5	10.9 ± 4.2	1378 ± 515	109 ± 47	214.2 ± 78.4	145.0 ± 59.3
	300	5	10.3 ± 3.9	1692 ± 516	119 ± 41	251.8 ± 67.6	168.6 ± 57.7
	1,000	10	11.2 ± 3.3	1388 ± 347	115 ± 26	212.3 ± 59.0	145.6 ± 35.8

Mean ± S.D.

- 88 -



Table 13-1. --continued Urinalysis  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Ketone bodies					Glucose (g/dL)					Protein (mg/dL)						
			-	+/-	1+	2+	3+	-	0.1	0.25	0.5	≥1.0	-	+/-	30	100	≥300		
Male	0	10	7	2	1						9	1				2	4	3	1
	100	5	4		1						5						4		1
	300	5	4		1						5					1	2	2	
	1,000	10	8	1	1						10					1	8		1
Female	0	10	10								10					8		2	
	100	5	5								5					3		2	
	300	5	3	2							4	1				1	2	1	1
	1,000	10	10								10					6	3	1	

Ketone bodies : - (negative), +/- (5 mg/dL), 1+ (15 mg/dL), 2+ (40 mg/dL), 3+ (≥ 80 mg/dL)

- 91 -

Table 13-1. --continued Urinalysis  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Bilirubin				Urobilinogen (E.U./dL)											
			-	1+	2+	3+	0.1	1.0	2.0	4.0	8.0	≥12						
Male	0	10	9	1														
	100	5	5															
	300	5	5															
	1,000	10	10															
Female	0	10	10															
	100	5	5															
	300	5	4	1														
	1,000	10	10															

Bilirubin : - (negative), 1+ (slight), 2+ (moderate), 3+ (marked)

- 92 -

Table 13-1. --continued Urinalysis : Microscopic examination of sediment  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Erythrocytes		Leukocytes		Epithelial cells		Casts		Fat globules		Mucous threads		Crystals	
			-	1+ 2+ 3+	-	1+ 2+ 3+	-	1+ 2+ 3+	-	+	-	+	-	+	-	+
Male	0	10	10		10		10		10		10		10		10	
	100	5	5		5		5		5		5		5		5	
	300	5	5		5		5		5		5		4	1	5	
	1,000	10	10		10		10		10		10		10		4	6
Female	0	10	10		10		10		10		10		10		2	8
	100	5	5		5		4	1	5		5		5		5	
	300	5	5		5		5		5		5		5		5	
	1,000	10	10		10		10		10		10		10		10	

Erythrocytes, Leukocytes and Epithelial cells (cells/ $\mu$ L) : - (0-4), 1+(5-14), 2+(15-29), 3+(30 or more)  
 Casts, Fat globules, Mucous threads and Crystals : - (not observed), +(observed)

- 93 -

Table 13-2. Urinalysis  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Volume (mL)	Osmotic pressure (mOsm/kg)	Sodium (mmol/L)	Potassium (mmol/L)	Chloride (mmol/L)
Male	0	4	10.1 $\pm$ 1.7	2102 $\pm$ 146	179 $\pm$ 5	316.1 $\pm$ 25.0	232.4 $\pm$ 17.4
	1,000	5	13.3 $\pm$ 3.6	1611 $\pm$ 374*	128 $\pm$ 24#	243.1 $\pm$ 48.9*	164.1 $\pm$ 31.0**
Female	0	5	13.8 $\pm$ 5.0	1552 $\pm$ 480	122 $\pm$ 46	221.6 $\pm$ 66.1	151.4 $\pm$ 52.2
	1,000	5	14.2 $\pm$ 6.9	1536 $\pm$ 611	119 $\pm$ 51	223.6 $\pm$ 88.5	155.6 $\pm$ 66.3

Mean  $\pm$  S.D.  
 \* :  $P \leq 0.05$       \*\* :  $P \leq 0.01$  (Dunnnett)  
 # :  $P \leq 0.05$  (Steel)

- 94 -



Table 13-2. -continued Urinalysis  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Ketone bodies					Glucose(g/dL)					Protein(mg/dL)				
			-	+/-	1+	2+	3+	-	0.1	0.25	0.5	≥1.0	-	+/-	30	100	≥300
Male	0	4	1		3				3	1					1	1	2
	1,000	5	1	2	2				5						1	2	2
Female	0	5	1		4				4	1					1	2	2
	1,000	5	1		4				5						1	2	2

Ketone bodies : -(negative), +/- (5 mg/dL), 1+(15 mg/dL), 2+(40 mg/dL), 3+(≥ 80 mg/dL)

-97-

Table 13-2. -continued Urinalysis  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Bilirubin				Urobilinogen(E.U./dL)							
			-	1+	2+	3+	0.1	1.0	2.0	4.0	8.0	≥12		
Male	0	4	4					3	1					
	1,000	5	4	1				3	2					
Female	0	5	5					2	3					
	1,000	5	5					1	4					

Bilirubin : -(negative), 1+(slight), 2+(moderate), 3+(marked)

-98-

Table 13-2. --continued Urinalysis : Microscopic examination of sediment  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Erythrocytes			Leukocytes			Epithelial cells			Casts		Fat globules		Mucous threads		Crystals	
			-	1+	2+	3+	-	1+	2+	3+	-	1+	2+	3+	-	+	-	+	-
Male	0	4		4			4			4			4			4			4
	1,000	5		5			5			5			5			5			5
Female	0	5		5			5			5			5			5			5
	1,000	5		5			5			5			5			5			5

Erythrocytes, Leukocytes and Epithelial cells (cells/ $\mu$ L) : - (0-4), 1+ (5-14), 2+ (15-29), 3+ (30 or more)  
 Casts, Fat globules, Mucous threads and Crystals : - (not observed), + (observed)

- 66 -

Table 14-1. Organ weight  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (g)	Heart (g)	Liver (g)	Kidneys (g)
Male	0	5	283 $\pm$ 30	2.12 $\pm$ 0.03	1.03 $\pm$ 0.10	8.56 $\pm$ 1.05	2.34 $\pm$ 0.15
	100	5	293 $\pm$ 35	2.08 $\pm$ 0.08	1.07 $\pm$ 0.11	9.48 $\pm$ 1.97	2.40 $\pm$ 0.23
	300	5	306 $\pm$ 23	2.12 $\pm$ 0.08	1.10 $\pm$ 0.07	9.76 $\pm$ 0.80	2.59 $\pm$ 0.11
	1,000	5	272 $\pm$ 22	2.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.11	8.64 $\pm$ 1.30	2.35 $\pm$ 0.32
Female	0	5	189 $\pm$ 8	1.96 $\pm$ 0.06	0.72 $\pm$ 0.04	5.85 $\pm$ 0.29	1.62 $\pm$ 0.15
	100	5	182 $\pm$ 14	1.88 $\pm$ 0.08	0.69 $\pm$ 0.06	5.63 $\pm$ 0.64	1.46 $\pm$ 0.17
	300	5	181 $\pm$ 24	1.90 $\pm$ 0.05	0.70 $\pm$ 0.07	5.75 $\pm$ 0.52	1.58 $\pm$ 0.16
	1,000	5	186 $\pm$ 6	1.88 $\pm$ 0.10	0.73 $\pm$ 0.07	6.42 $\pm$ 0.63	1.57 $\pm$ 0.06

Mean  $\pm$  S.D.

- 100 -



Table 14-1. -continued Organ weight  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Spleen (g)	Adrenals (mg)	Testes (g)	Ovaries (mg)	Thyroid (mg)
Male	0	5	0.53 ± 0.09	47 ± 6	2.79 ± 0.26		20 ± 3
	100	5	0.55 ± 0.10	45 ± 6	3.03 ± 0.19		17 ± 2
	300	5	0.60 ± 0.12	54 ± 7	2.98 ± 0.15		22 ± 5
	1,000	5	0.53 ± 0.09	48 ± 5	2.82 ± 0.20		20 ± 6
Female	0	5	0.46 ± 0.07	60 ± 8		80 ± 4	15 ± 4
	100	5	0.35 ± 0.04*	62 ± 8		64 ± 10**	15 ± 2
	300	5	0.36 ± 0.05*	64 ± 7		79 ± 5	14 ± 2
	1,000	5	0.43 ± 0.06	64 ± 10		73 ± 7	15 ± 4

Mean ± S.D.  
 Significantly different from control group; \*: P ≤ 0.05 \*\*: P ≤ 0.01 (Dunnett)

-101-

Table 14-1. -continued Organ weight  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Pituitary (mg)	Thymus (mg)	Epididymides (mg)	Mandibular gland (mg)
Male	0	5	8 ± 2	513 ± 101	625 ± 80	516 ± 68
	100	5	8 ± 1	484 ± 69	658 ± 39	532 ± 107
	300	5	10 ± 1	540 ± 81	654 ± 35	525 ± 34
	1,000	5	8 ± 3	483 ± 122	603 ± 62	500 ± 29
Female	0	5	12 ± 2	452 ± 85		369 ± 27
	100	5	10 ± 1	463 ± 35		353 ± 39
	300	5	9 ± 2	432 ± 101		370 ± 18
	1,000	5	10 ± 4	406 ± 63		377 ± 43

Mean ± S.D.

-102-

Table 14-2. Organ weight  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (g)	Heart (g)	Liver (g)	Kidneys (g)
Male	0	4	379 ± 30	2.16 ± 0.09	1.28 ± 0.07	11.09 ± 0.86	2.79 ± 0.15
	1,000	5	346 ± 20	2.11 ± 0.08	1.21 ± 0.11	10.02 ± 0.97	2.64 ± 0.18
Female	0	5	225 ± 9	1.99 ± 0.08	0.81 ± 0.04	6.31 ± 0.47	1.71 ± 0.04
	1,000	5	206 ± 14*	1.97 ± 0.10	0.81 ± 0.07	6.26 ± 0.96	1.70 ± 0.27

Mean ± S.D.  
Significantly different from control group; \*; P ≤ 0.05 (Dunnett)

- 103 -

Table 14-2. --continued Organ weight  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Spleen (g)	Adrenals (mg)	Testes (g)	Ovaries (mg)	Thyroid (mg)
Male	0	4	0.66 ± 0.11	56 ± 2	3.37 ± 0.42		19 ± 4
	1,000	5	0.65 ± 0.15	51 ± 8	3.17 ± 0.11		20 ± 4
Female	0	5	0.50 ± 0.07	65 ± 4		75 ± 12	14 ± 1
	1,000	5	0.47 ± 0.14	66 ± 9		86 ± 13	14 ± 1

Mean ± S.D.

- 104 -

Table 14-2. -continued Organ weight  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Pituitary (mg)	Thymus (mg)	Epididymides (mg)	Mandibular gland (mg)
Male	0	4	11 ± 2	397 ± 11	964 ± 54	619 ± 38
	1,000	5	9 ± 2	484 ± 134	944 ± 35	589 ± 37
Female	0	5	13 ± 2	436 ± 66		448 ± 50
	1,000	5	13 ± 4	447 ± 90		409 ± 46

Mean ± S.D.

- 105 -

Table 15-1. Organ weight per body weight  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (%)	Heart (%)	Liver (%)	Kidneys (%)
Male	0	5	283 ± 30	0.754 ± 0.073	0.366 ± 0.010	3.025 ± 0.108	0.831 ± 0.048
	100	5	293 ± 35	0.721 ± 0.112	0.366 ± 0.025	3.215 ± 0.323	0.824 ± 0.071
	300	5	306 ± 23	0.695 ± 0.053	0.360 ± 0.011	3.186 ± 0.079	0.849 ± 0.039
	1,000	5	272 ± 22	0.737 ± 0.040	0.365 ± 0.017	3.161 ± 0.244	0.861 ± 0.073
Female	0	5	189 ± 8	1.037 ± 0.059	0.381 ± 0.018	3.097 ± 0.093	0.855 ± 0.058
	100	5	182 ± 14	1.037 ± 0.087	0.378 ± 0.011	3.081 ± 0.139	0.798 ± 0.054
	300	5	181 ± 24	1.061 ± 0.149	0.389 ± 0.023	3.194 ± 0.265	0.878 ± 0.102
	1,000	5	186 ± 6	1.010 ± 0.064	0.395 ± 0.032	3.446 ± 0.252*	0.843 ± 0.022

Mean ± S.D.  
 Significantly different from control group; \*: P ≤ 0.05 (Dunnett)

- 106 -

Table 15-1. --continued Organ weight per body weight  
---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Spleen (%)	Adrenals (%)	Testes (%)	Ovaries (%)	Thyroid (%)
Male	0	5	0.188 ± 0.024	0.017 ± 0.001	0.998 ± 0.155		0.007 ± 0.001
	100	5	0.187 ± 0.015	0.016 ± 0.002	1.046 ± 0.118		0.006 ± 0.000
	300	5	0.195 ± 0.029	0.018 ± 0.001	0.977 ± 0.065		0.007 ± 0.002
	1,000	5	0.194 ± 0.027	0.018 ± 0.002	1.038 ± 0.073		0.007 ± 0.002
Female	0	5	0.240 ± 0.029	0.032 ± 0.004		0.042 ± 0.002	0.008 ± 0.002
	100	5	0.192 ± 0.007**	0.034 ± 0.004		0.035 ± 0.007	0.008 ± 0.001
	300	5	0.202 ± 0.024*	0.036 ± 0.006		0.044 ± 0.009	0.008 ± 0.002
	1,000	5	0.229 ± 0.023	0.034 ± 0.005		0.039 ± 0.003	0.008 ± 0.002

Mean ± S.D.  
Significantly different from control group; \*: P ≤ 0.05 \*\*: P ≤ 0.01 (Dunnett)

-107-

Table 15-1. --continued Organ weight per body weight  
---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Pituitary (%)	Thymus (%)	Epididymides (%)	Mandibular gland (%)
Male	0	5	0.003 ± 0.001	0.180 ± 0.021	0.224 ± 0.040	0.182 ± 0.011
	100	5	0.003 ± 0.000	0.165 ± 0.014	0.227 ± 0.024	0.181 ± 0.020
	300	5	0.003 ± 0.000	0.177 ± 0.026	0.214 ± 0.014	0.172 ± 0.009
	1,000	5	0.003 ± 0.001	0.177 ± 0.038	0.222 ± 0.021	0.184 ± 0.014
Female	0	5	0.006 ± 0.001	0.239 ± 0.041		0.195 ± 0.011
	100	5	0.006 ± 0.001	0.255 ± 0.030		0.193 ± 0.009
	300	5	0.005 ± 0.001	0.237 ± 0.038		0.206 ± 0.023
	1,000	5	0.006 ± 0.002	0.219 ± 0.039		0.202 ± 0.019

Mean ± S.D.

-108-

Table 15-2. Organ weight per body weight  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (%)	Heart (%)	Liver (%)	Kidneys (%)
Male	0	4	379 ± 30	0.571 ± 0.035	0.338 ± 0.013	2.930 ± 0.111	0.739 ± 0.052
	1,000	5	346 ± 20	0.611 ± 0.029	0.352 ± 0.041	2.898 ± 0.193	0.766 ± 0.073
Female	0	5	225 ± 9	0.889 ± 0.074	0.359 ± 0.018	2.809 ± 0.167	0.761 ± 0.045
	1,000	5	206 ± 14*	0.958 ± 0.057	0.393 ± 0.024*	3.018 ± 0.280	0.823 ± 0.101

Mean ± S.D.  
Significantly different from control group; \*: P ≤ 0.05 (Dunnett)

- 109 -

Table 15-2. --continued Organ weight per body weight  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Spleen (%)	Adrenals (%)	Testes (%)	Ovaries (%)	Thyroid (%)
Male	0	4	0.174 ± 0.026	0.015 ± 0.001	0.888 ± 0.063		0.005 ± 0.001
	1,000	5	0.189 ± 0.038	0.015 ± 0.002	0.921 ± 0.078		0.006 ± 0.001
Female	0	5	0.225 ± 0.036	0.029 ± 0.001		0.034 ± 0.004	0.006 ± 0.000
	1,000	5	0.225 ± 0.054	0.032 ± 0.004		0.042 ± 0.005*	0.007 ± 0.000

Mean ± S.D.  
Significantly different from control group; \*: P ≤ 0.05 (Dunnett)

- 110 -

Table 15-2. -continued Organ weight per body weight  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Pituitary (%)	Thymus (%)	Epididymides (%)	Mandibular gland (%)
Male	0	4	0.003 ± 0.001	0.105 ± 0.008	0.255 ± 0.012	0.164 ± 0.009
	1,000	5	0.003 ± 0.000	0.140 ± 0.041	0.274 ± 0.024	0.171 ± 0.015
Female	0	5	0.006 ± 0.001	0.194 ± 0.030		0.200 ± 0.023
	1,000	5	0.006 ± 0.002	0.215 ± 0.031		0.198 ± 0.014

Mean ± S.D.

- 111 -

Table 16-1. Summary of gross findings with statistical analysis  
 ( sacrificed, administration period )

Exp. No. 9934 (115-213)

Dose level ( mg/kg )	No. of animals necropsied	Male animals				Female animals			
		0	100	300	1,000	0	100	300	1,000
Organ	Findings	5	5	5	5	5	5	5	5
RESPIRATORY SYSTEM									
lung	brown patch/zone	1	0	0	0	0	0	0	0
DIGESTIVE SYSTEM									
stomach	white patch/zone	0	1	0	0	0	0	0	0
liver	hepatodiaphragmatic nodule	0	0	0	0	0	0	1	0
	white patch/zone	0	0	0	1	0	0	0	0
URINARY SYSTEM									
kidney	cyst	0	0	1	0	0	1	0	0
	scarred	1	1	0	0	1	2	1	1
REPRODUCTIVE SYSTEM									
uterus	cyst	-	-	-	-	0	1	0	0
	dilated lumen	-	-	-	-	2	2	0	2
ENDOCRINE SYSTEM									
thyroid gland	nodule	0	0	0	0	0	1	0	0

- 112 -

Table 16-2.

Summary of gross findings with statistical analysis  
( sacrificed, recovery period )

Exp. No. 9934 (115-213)

Dose level ( mg/kg )	No. of animals necropsied	Male animals		Female animals	
		0	1,000	0	1,000
Organ	Findings	4	5	5	5
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>					
liver	adhesion with kidney	0	0	1	0
<b>URINARY SYSTEM</b>					
kidney	cyst	0	1	0	1
	scarred	1	0	0	0
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>					
uterus	dilated lumen	-	-	0	1

- 113 -

Table 17-1.

Summary of histological findings with statistical analysis  
( sacrificed, administration period )

Exp. No. 9934 (115-213)

Dose level ( mg/kg )	No. of animals necropsied	Male animals				Female animals				
		0	100	300	1,000	0	100	300	1,000	
Organ	Findings	5	5	5	5	5	5	5	5	
<b>RESPIRATORY SYSTEM</b>										
lung	accumulation of foamy cells	3	-	-	2	3	-	-	2	
	bronchopneumonia	1	-	-	0	0	-	-	0	
	osseous metaplasia	1	-	-	0	0	-	-	0	
trachea	dilatation, gland	1	-	-	0	0	-	-	1	
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>										
glandular stomach	dilatation, gland	0	0	-	0	1	-	-	0	
	epidermal cyst	0	1	-	0	0	-	-	0	
exocrine pancreas	degeneration, acinar cell	1	-	-	0	0	-	-	0	
liver	fatty change, hepatocyte	1	1	0	0	3	2	2	2	
	necrosis, hepatocyte, focal	0	0	0	1	0	0	0	0	
	microgranuloma	5	4	5	4	5	4	4	4	
	hepatodiaphragmatic nodule	0	0	0	0	0	0	1	0	
	hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	0	0	3	5**	0	0	1	5**	
<b>URINARY SYSTEM</b>										
kidney	basophilic tubule	3	1	0	1	1	0	0	1	
	cyst	0	0	0	1	1	1	0	1	
	hyaline droplet	1	0	0	1	0	0	0	0	
	mineralization	1	0	0	1	1	0	0	2	
	fibrosis, focal	1	1	1	0	0	0	0	0	
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>										
epididymis	cellular infiltration, lymphocyte	1	-	-	1	-	-	-	-	
prostate	cell debris, lumen	1	-	-	0	-	-	-	-	
	cellular infiltration, lymphocyte	5	-	-	2	-	-	-	-	
uterus	cyst	-	-	-	-	0	1	-	0	

Significantly different from control group; \*\* :  $P \leq 0.01$  (Fisher)

- 114 -

Table 17-1. -continued Summary of histological findings with statistical analysis  
( sacrificed, administration period )

Exp. No. 9934 (115-213)

Dose level ( mg/kg )	No. of animals necropsied	Male animals				Female animals			
		0	100	300	1,000	0	100	300	1,000
Organ	Findings	5	5	5	5	5	5	5	5
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>									
uterus	dilatation, lumen	-	-	-	-	2	1	-	2
vagina	epidermal cyst	-	-	-	-	1	-	-	0
<b>ENDOCRINE SYSTEM</b>									
thyroid gland	ectopic thymus	1	-	-	0	0	0	-	0
	ultimobranchial remnant	2	-	-	0	1	0	-	3

-115-

Table 17-2. Summary of histological findings with statistical analysis  
( sacrificed, recovery period )

Exp. No. 9934 (115-213)

Dose level ( mg/kg )	No. of animals necropsied	Male animals		Female animals	
		0	1,000	0	1,000
Organ	Findings	4	5	5	5
<b>RESPIRATORY SYSTEM</b>					
lung	accumulation of foamy cells	3	2	1	2
trachea	dilatation, gland	1	1	0	0
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>					
exocrine pancreas	degeneration, acinar cell	0	1	1	0
	cellular infiltration, mononuclear	0	0	1	0
	focus, hypertrophic, basophilic	0	0	1	0
cecum	cellular infiltration, mononuclear	1	0	0	0
liver	adhesion with kidney	0	0	1	0
	fatty change, hepatocyte	1	0	3	2
	microgranuloma	4	4	5	5
<b>URINARY SYSTEM</b>					
kidney	basophilic tubule	2	2	1	0
	cyst	0	1	1	1
	hyaline droplet	1	1	0	0
	mineralization	3	1	2	0
	fibrosis, focal	1	2	1	0
	hyperplasia, renal tubule	0	0	1	0
urinary bladder	cellular infiltration, lymphocyte	0	0	1	0
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>					
prostate	cellular infiltration, lymphocyte	3	2	-	-

-116-



Table 17-2. -continued Summary of histological findings with statistical analysis  
( sacrificed, recovery period )

Exp. No. 9934 (115-213)

Dose level ( mg/kg )	Male animals		Female animals	
	No. of animals necropsied	Findings	No. of animals necropsied	Findings
0	4	5	0	5
1,000			5	5
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>				
uterus				
dilatation, lumen	-	-	0	1
<b>ENDOCRINE SYSTEM</b>				
pituitary gland				
cyst	0	1	0	0
thyroid gland				
ultimobranchial remnant	1	4	3	2
adrenal gland				
mineralization	0	0	1	0
<b>SPECIAL SENSE SYSTEM</b>				
eye				
dysplasia, retina	0	0	1	0
<b>INTEGUMENTARY SYSTEM</b>				
skin				
cellular infiltration, mononuclear	1	0	1	0

- 117 -

# トリメチルアミンの細菌を用いる復帰変異試験

## Reverse Mutation Test of Trimethylamine on Bacteria

### 要約

トリメチルアミンについて、細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium*(TA100, TA98, TA1535, TA1537)および*Escherichia coli*(WP2 *uvrA*)の5菌株を用いた。試験は2回繰り返して実施し、S9 mix無添加群の各試験菌株およびS9 mix添加群のTA100, TA1535ならびにTA1537で39.1~1250  $\mu\text{g}/\text{plate}$ の6用量、S9 mix添加群のWP2 *uvrA*で156~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ の6用量、同群のTA98で78.1~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ の7用量で試験を実施した。

その結果、S9 mix無添加群および添加群のいずれにおいても、溶媒対照に比べ復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下ではトリメチルアミンは、変異原性を有しない(陰性)と結論した。

### 方法

#### 1. 試験菌株

細菌を用いる復帰変異試験に広く使用されていることから、試験菌株としてヒスチジン要求性の*Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535およびTA1537<sup>1)</sup>ならびにトリプトファン要求性の*Escherichia coli* WP2 *uvrA*<sup>2)</sup>の5種類の菌株を選択した。

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学のB. N. Ames教授から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立衛生試験所(現:国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受けた。平成11年3月31日に菌株の特性検査を実施し、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。

各菌株の菌懸濁液はジメチルスルホキシド(DMSO: MERCK KGaA)を添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mLずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結し、超低温フリーザーに-80°Cで保存した。

#### 2. 培地の調製

##### 1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

オリエンタル酵母工業(株)製のテスメディアAN培地を購入し、試験に用いた。本プレートは、Vogel-Bonnerの最少培地Eを含む水溶液(0.02%硫酸マグネシウム・7水塩, 0.2%クエン酸・1水塩, 1%リン酸二カリウム・無水塩, 0.192%リン酸一アンモニウム, 0.066%水酸化

ナトリウム[いずれも最終濃度])に2%のグルコース(和光純薬工業(株))と1.5%の寒天(OXOID:No.1)を加え、径90 mmのシャーレに1枚当たり30 mLを分注したものである。

##### 2) トップアガー(軟寒天)

塩化ナトリウム0.5%を含む0.6% Bacto-agar(Difco)水溶液10容量に対し、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-ヒスチジン(関東化学(株))-0.5 mmol/L D-ビオチン(関東化学(株))水溶液を1容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-トリプトファン(関東化学(株))水溶液を同じく1容量加え用いた。

#### 3. 前培養条件

内容量200 mLのパッフル付三角フラスコに2.5%ニュートリエントブロス(Oxoid Nutrient Broth No. 2: OXOID)溶液を25 mL分注し、これに融解した菌懸濁液を50  $\mu\text{L}$ 接種した。ウォーターバスシェーカー(MM-10: タイテック(株))を用い、37°Cで8時間振盪(往復振盪: 100回/分)培養し、菌濃度を確認した後試験に使用した。

#### 4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成を以下に示す。

成 分	S9 mix 1 mL中の量
S9	0.1 mL
MgCl <sub>2</sub>	8 $\mu\text{mol}$
KCl	33 $\mu\text{mol}$
G-6-P	5 $\mu\text{mol}$
NADPH	4 $\mu\text{mol}$
NADH	4 $\mu\text{mol}$
Na-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 $\mu\text{mol}$
精製水	残 量

#### 5. 被験物質

トリメチルアミン(ロット番号:MT381012)は純度30.8%(不純物としてジメチルアミン10 ppm以下を含む)の水溶液である。本剤は水に易溶で、水溶液中で安定である。三菱ガス化学(株)(東京)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで冷暗所で保管した。試

試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

## 6. 被験物質液の調製

試験の都度、被験物質を日本薬局方注射用水(株)大塚製薬工場)を用いて希釈して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、速やかに処理を行った。なお、本被験物質情報から揮発性が疑われたため、調製に際しては蓋付きの試験管を用いた。また、原液中での被験物質濃度が30.8%であることを考慮して調製した。

## 7. 試験用量の設定

19.5, 78.1, 313および1250  $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量を用いて予備的な試験を実施した。S9 mix無添加群の各試験菌株ならびにS9 mix添加群のTA100, TA1535およびTA1537で1250  $\mu\text{g}/\text{plate}$ において試験菌株に対する生育阻害作用が観察された。

従って、本試験においてはS9 mix無添加群の各試験菌株ならびにS9 mix添加群のTA100, TA1535およびTA1537で1250  $\mu\text{g}/\text{plate}$ , S9 mix添加群のWP2 *uvrA*ならびにTA98で5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ を最高用量とし、それぞれ6~7用量(公比2)を設定した。

## 8. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記に示した物質を使用した。これらの陽性対照物質は、DMSOを用いて溶解し、少量ずつ分注した後凍結保存(-20°C)した。

2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド  
(AF-2:和光純薬工業(株))

アジ化ナトリウム( $\text{NaN}_3$ :和光純薬工業(株))

9-アミノアクリジン塩酸塩(9-AA:Aldrich社)

2-アミノアントラセン(2-AA:和光純薬工業(株))

## 9. 試験方法

Amesらの原法<sup>1)</sup>の改良法であるプレインキュベーション法に準じて、S9 mix無添加群および添加群それぞれについて試験を実施した。蓋付き試験管に、使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を100  $\mu\text{L}$ 、次いでS9 mix無添加群の場合、0.1 mol/Lナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500  $\mu\text{L}$ 、S9 mix添加群の場合、S9 mixを500  $\mu\text{L}$ 添加し、さらに試験菌液100  $\mu\text{L}$ を加え、37°Cで20分間振盪培養(プレインキュベーション)した。培養終了後、あらかじめ45°Cに保温したトップアガーを2 mL添加し、混合液をプレート上に重層した。各プレートをビニールテープで密封して、37°Cの条件で48時間各プレートを培養した後、被験物質の試験菌株に対する生育阻害作用を確認するため、実体顕微鏡( $\times 60$ )を用いてプレート上の試験菌株の生育状態を観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニーを計数した。計測に際してはコロニーアナライザー(CA-11:システムサイエンス(株))を用いた。なお、本試験1回目においては、S9 mix添加群のWP2 *uvrA*で5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ において強い

生育阻害作用の影響により、背景菌が目視できるほどのコロニーを形成していたため、コロニーアナライザーの使用は不適切と判断し、目視でコロニー数を計数した。各濃度につき3枚のプレートを使用した。また、独立して試験を2回実施した。

## 10. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が溶媒対照のほぼ2倍以上に増加し、かつ、再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に、陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

## 結果および考察

1回目の試験結果をTable 1~2に、2回目の試験結果をTable 3~4に示した。S9 mix無添加群ならびに添加群ともすべての試験菌株の高用量群において、トリメチルアミン処理による生育阻害作用が観察された。しかしながら、復帰突然変異コロニー数については、S9 mix無添加群、S9 mix添加群とも溶媒対照と同等の値であり、明確な増加傾向は認められなかった。一方、陽性対照物質はそれぞれの試験菌株において、溶媒対照群の2倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した。なお、コロニー計数時、析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。

以上の試験結果から、本試験条件下において、トリメチルアミンの微生物に対する遺伝子突然変異に関し、陰性と判定した。

なお、本被験物質の変異原性に関する報告はなかったが、類縁体であるdimethylamineについてはAmes試験で疑陽性<sup>3)</sup>、dimethylamine hydrochlorideでは染色体異常試験で陰性<sup>4)</sup>、methylamineではマウスリンフォーム試験で陽性<sup>5)</sup>との報告があった。

## 文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 2) M. H. L. Green and W. J. Muriel, *Mutat. Res.*, **38**, 3 (1976).
- 3) N. R. Green and J. R. Savage, *Mutat. Res.*, **57**, 115 (1978).
- 4) M. Ishidate Jr. and S. Odashima, *Mutat. Res.*, **48**, 337(1977).
- 5) W. J. Caspary and B. Myhr, *Mutat. Res.*, **174** (4), 285 (1986).

連絡先

試験責任者：中嶋 圓  
試験担当者：益森勝志，北澤倫世，板倉真由実  
(財)食品農医薬品安全性評価センター  
〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田582-2  
Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study Director)  
Shoji Masumori, Michiyo Kitazawa,  
Mayumi Itakura  
Biosafety Research Center, Foods, Drugs and  
Pesticides (An-pyo Center)  
582-2 Shiohinden, Fukude-cho, Iwata-gun,  
Shizuoka, 437-1213, Japan  
Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393