

Fig. 1 Mitotic inhibition of CHL/IU cells treated with 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene

るため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質の CHL/IU 細胞に対する増殖抑制作用は、フラスコあたりの観察細胞(1000細胞)における分裂中期細胞の頻度(分裂指数:Mitotic index)を調べ、2つのフラスコともに 0.5% 以上の分裂指数を示した最も高い濃度(MI max)を指標とした。

その結果、連続処理における MI max は、0.050 mg/ml、短時間処理の S9 mix 非存在下および S9 mix 存在下では、それぞれ 0.050 mg/ml および 0.10 mg/ml であった(Fig. 1)。

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験において、連続処理および短時間処理のすべての処理群で、MI max の2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度を設定した(24時間および48時間連続処理および短時間処理の S9 mix 非存在下:0.0063, 0.013, 0.025, 0.050, 0.10 mg/ml, 短時間処理の S9 mix 存在下:0.013, 0.025, 0.05, 0.10, 0.20 mg/ml)。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC(MC, 協和醗酵工業(株))およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、注射用水(株)大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

染色体異常試験においては1濃度あたり2枚フラスコを用い、染色体標本作製と同時に分裂指数を測定した。

8. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約 0.1 μg/ml になるように培養液に加えた。染色体標本作製は常法に従って行った。スライド標本は各フラスコにつき6枚作製した。作製した標本を 3% ギムザ溶液で染色した。

9. 染色体分析

分裂指数の測定結果から、MI max を観察対象の最高

濃度群とし、観察対象の3濃度群を決定した。その結果(Table 1, 2)、連続処理では 0.050 mg/ml が、短時間処理の S9 mix 非存在下および S9 mix 存在下では、それぞれ 0.050 mg/ml および 0.10 mg/ml が MI max を示したことから、これらの濃度を含む3濃度群を観察対象とした。

作製したスライド標本のうち、1つのフラスコから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験(MMS)研究会²⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

10. 記録と判定

無処理対照、溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、溶媒の背景データと被験物質処理群間でフィッシャーの直接確率法³⁾(多重性を考慮して familywise の有意水準を 5% とした)により、有意差検定を実施した。また、フィッシャーの直接確率法で有意差が認められた場合には、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定⁴⁾($p < 0.05$)を行った。最終的な判定は、統計学および生物学的な評価に基づいて行った。

結果および考察

連続処理による染色体分析の結果を Table 1 に示した。3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンを加えて24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果を Table 2 に示した。3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンを加えて S9 mix 非存在下における短時間処理では、いずれの処理群においても、染色体の構造異常は認められなかった。高濃度群(0.050 mg/ml)では細胞毒性のため、規定の細胞数が観察できなかったが、いずれの処理群においても、倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。S9 mix 存在下では、高濃度群(0.10 mg/ml)において染色体の構造異常(gapを含む)が有意に誘発され、その頻度は 14.5% であった。また、高濃度群(0.10 mg/ml)では細胞毒性のため、規定の細胞数が観察できなかったが、いずれの処理群においても、倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

従って、3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンは、上記の試験条件下で、試験管内の CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, "化学物質による染色体異常アトラス," 朝倉書店, 東京, 1988.
- 2) 吉村 功編, "毒性・薬効データの統計解析, 事例研究によるアプローチ," サイエンティスト社, 東京, 1987.
- 3) 吉村 功, 大橋靖夫編, "毒性試験講座 14, 毒性試験データの統計解析," 地人書館, 東京, 1992, pp.218-223.

連絡先

試験責任者: 田中憲穂
試験担当者: 山影康次, 日下部博一,
中川ゆづき, 水谷正寛, 渡辺美香,
出石由紀, 橋本恵子
(財)食品薬品安全センター秦野研究所
〒257 神奈川県秦野市落合729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)
Kohji Yamakage, Hirokazu Kusakabe,
Yuzuki Nakagawa, Masahiro Mizutani,
Mika Watanabe, Yuki Izushi,
Keiko Hashimoto
Hatano Research Institute, Food and Drug
Safety Center
729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

染色体異常試験

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells(CHL/IU) continuously treated with 3a, 4, 7, 7a-tetrahydro-1H-indene (THI)* without S9 mix

| Group | Concentration (mg/ml) | Time of exposure (h) | No. of cells analysed | No. of structural aberrations | | | | | | | Others ³⁾ | No. of cells | | | Concurrent ⁶⁾ cytotoxicity (%) | | |
|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-------------------|-------|----------------------|------------------|-----------|-----------------------------|---|--------------------------|-------|
| | | | | | | | | | | | | with aberrations | | Polyploid ⁴⁾ (%) | | Trend test ⁵⁾ | |
| | | | | gap | ctb | cte | csb | cse | mul ²⁾ | total | | TAG (%) | TA (%) | | | SA | NA |
| Control | | | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.13 | | | - |
| Solvent ¹⁾ | 0 | 24 | 200 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 (1.0) | 0 (0.0) | 0.25 | | | 100.0 |
| THI | 0.013 | 24 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.25 | | | 155.7 |
| THI | 0.025 | 24 | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 0 (0.0) | 0.38 | NT | NT | 116.4 |
| THI | 0.050 | 24 | 200 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 1 (0.5) | 0.25 | | | 96.7 |
| THI | 0.10** | 24 | - | | | | | | | | | | | | | | - |
| MC | 0.00005 | 24 | 200 | 10 | 42 | 109 | 3 | 0 | 0 | 164 | 0 | 96 (48.0) | 93 (46.5) | 0.25 | | | - |
| Solvent ¹⁾ | 0 | 48 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.38 | | | 100.0 |
| THI | 0.013 | 48 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.13 | | | 146.9 |
| THI | 0.025 | 48 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.25 | NT | NT | 124.5 |
| THI | 0.050 | 48 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.25 | | | 167.3 |
| THI | 0.10** | 48 | - | | | | | | | | | | | | | | - |
| MC | 0.00005 | 48 | 200 | 2 | 25 | 87 | 1 | 1 | 0 | 116 | 3 | 69 (34.5) | 67 (33.5) | 0.38 | | | - |

Abbreviations, gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte: chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange(dicentric and ring), mul:multiple aberrations, TAG:total no. of cells with aberrations, TA:total no. of cells with aberrations except gap, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MC:mitomycin C, NT:not tested.

1)Dimethylsulfoxide was used as solvent. 2)More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3)Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4)Eight hundred cells were analysed in each group. 5)Cochran · Armitage's trend test was done(p<0.05)when the incidence of TAG or polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control data(p<0.05)by Fisher's exact test. 6)Relative metaphase frequency to the solvent control, representing cytotoxicity, was calculated. *:Purity of test substance was 99.0 wt%. Butadiene-isoprene-piperylene (0.8 wt%) and dicyclopentadiene(0.1 wt%) were contained as impurities. **:Chromosome analysis was not performed because there were small number of metaphases due to cytotoxicity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells(CHL/IU) treated with 3a, 4, 7, 7a-tetrahydro-1H-indene(THI)** with and without S9 mix

| Group | Concentration (mg/ml) | S9 mix | Time of exposure (h) | No. of cells analysed | No. of structural aberrations | | | | | | | Others ³⁾ | No. of cells | | | Concurrent ⁶⁾ cytotoxicity (%) | | |
|-----------------------|-----------------------|--------|----------------------|-----------------------|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-------------------|-------|----------------------|------------------|-----------|-----------------------------|---|--------------------------|-------|
| | | | | | | | | | | | | | with aberrations | | Polyploid ⁴⁾ (%) | | Trend test ⁵⁾ | |
| | | | | | gap | ctb | cte | csb | cse | mul ²⁾ | total | | TAG (%) | TA (%) | | | SA | NA |
| Control | | | | 200 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 (1.0) | 2 (1.0) | 0.25 | | | - |
| Solvent ¹⁾ | 0 | - | 6-(18) | 200 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 (1.5) | 1 (0.5) | 0.25 | | | 100.0 |
| THI | 0.013 | - | 6-(18) | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.00 | | | 74.7 |
| THI | 0.025 | - | 6-(18) | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 0 (0.0) | 0.25 | NT | NT | 101.9 |
| THI | 0.050 | - | 6-(18) | 156 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 4 | 0 | 3 (1.9) | 3 (1.9) | 0.43 ⁷⁾ | | | 42.6 |
| THI | 0.10*** | - | 6-(18) | - | | | | | | | | | | | | | - | |
| CPA | 0.005 | - | 6-(18) | 200 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 1 (0.5) | 0.13 | | | - |
| Solvent ¹⁾ | 0 | + | 6-(18) | 200 | 2 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 5 | 0 | 4 (2.0) | 2 (1.0) | 0.13 | | | 100.0 |
| THI | 0.025 | + | 6-(18) | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.25 | | | 91.3 |
| THI | 0.050 | + | 6-(18) | 200 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 3 | 1 | 3 (1.5) | 3 (1.5) | 0.38 | + | NT | 57.7 |
| THI | 0.10 | + | 6-(18) | 200 | 4 | 17 | 24 | 0 | 1 | 0 | 46 | 0 | 29*(14.5) | 27 (13.5) | 0.22 ⁸⁾ | | | 38.5 |
| THI | 0.20*** | + | 6-(18) | - | | | | | | | | | | | | | - | |
| CPA | 0.005 | + | 6-(18) | 200 | 3 | 28 | 43 | 2 | 0 | 10 | 86 | 1 | 46 (23.0) | 46 (23.0) | 0.25 | | | - |

Abbreviations, gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte: chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange(dicentric and ring), mul:multiple aberrations, TAG:total no. of cells with aberrations, TA:total no. of cells with aberrations except gap, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, CPA:cyclophosphamide, NT:not tested.

1)Dimethylsulfoxide was used as solvent. 2)More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3)Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4)Eight hundred cells were analysed in each group. 5)Cochran · Armitage's trend test was done(p<0.05). 6)Relative metaphase frequency to the solvent control, representing cytotoxicity, was calculated. 7)Four hundred and sixty eight cells were analysed, 8)Four hundred and fifty nine cells were analysed. *:Significantly different from historical solvent control(p<0.05)by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. **:Purity of test substance was 99.0 wt%. Butadiene-isoprene-piperylene (0.8 wt%) and dicyclopentadiene(0.1 wt%) were contained as impurities. ***:Chromosome analysis was not performed because there were small number of metaphases due to cytotoxicity.

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドのラットを用いる 28日間反復経口投与毒性試験

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of Benzyltrimethylanmonium chloride in Rats

要約

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドは、有機合成反応の触媒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、ほとんど報告がないため、今回、既存化学物質の安全点検に関わる毒性調査事業の一環として、SD系ラットを用いる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、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。

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドは、超純水に溶解し、0, 30, 60および120 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的検査を行った。なお、回復期間は2週間とし、投与終了時と同様な検査を実施した。

その結果は、次のとおりである。

雌の120 mg/kg群で1例が投与4週に死亡した。病理学検査の結果には死因に結びつく変化は認められなかった。

一般状態の観察では、雄の60 mg/kg群で流涎、雌雄の120 mg/kg群で流涎、流涎および被毛の汚れが、さらに雌の120 mg/kg群で立毛が認められた。雌雄の120 mg/kg群で観察された症状は回復試験では観察されず回復を示した。

体重は雄の120 mg/kg群で増加が抑制され、投与3週以降有意であった。摂餌量は、雄の120 mg/kg群で投与期間を通して減少が認められた。飼料効率率は雄の120 mg/kg群で投与4週のみ低値であった。回復期間中は、体重変化を除き回復が認められた。

血液学検査の結果、雄の120 mg/kg群で、ヘモグロビン量、MCVおよびMCHの高値が認められた。回復期間終了時には、被験物質の投与と関連づけられる変化は認められなかった。

血液生化学検査の結果、雌雄とも被験物質投与と関連づけられる変化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と関連づけられる変化は認められなかった。

器官重量測定の結果、雌雄とも被験物質投与と関連づけられる変化は認められなかった。

病理学的検査の結果、計画屠殺動物において剖検所見および組織所見では被験物質の影響が示唆される所見は

認められなかった。投与期間中に、120 mg/kg群の雌で1例死亡動物が観察され、組織学的検査の結果、肝細胞腫脹と好酸性小体の出現が認められた。

以上の結果、無影響量は雄で30 mg/kg/day、雌で60 mg/kg/dayと判断された。

材料および方法

1. 被験物質

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド(CAS No.56-93-9, 和光純薬工業(株)提供)は白色の固体(常温)で、水溶性、分子式 $C_{10}H_{16}ClN$ 、分子量185.70の化合物である。本試験に用いたロットRSL9083の純度は98%であった。

2. 供試動物

供試したラット [Crj:CD(SD)系, SPF] は日本チャールス・リバー(株)(神奈川県)から4週齢で購入した。動物を検収後、試験環境に9日間馴化させた後、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。動物の識別は、個別飼育ケージに動物標識番号(Animal ID-No.)を付すことにより行った。投与開始時の体重は雄で137~156 g、雌で117~131 gであった。

3. 飼育条件

動物はバリアシステムの飼育室で飼育し、環境調節の目標値は温度 $23 \pm 2^\circ C$ 、相対湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数20回/時、照明150~300 lux、12時間(午前7時点灯、午後7時消灯)とした。(株)東京技研サービスの水洗式飼育機を使用し、金属製前面・床網目飼育ケージに動物を1匹ずつ収容し、オリエンタル酵母工業(株)製造の放射線滅菌改良NIH公開ラット・マウス飼料および水道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。

4. 試験群の構成

試験群は0, 30, 60および120 mg/kgの4群とし、1群雌雄各5匹を用い、0および120 mg/kg群に雌雄各5匹の回復群を設け、計60匹を使用した。

28日間反復投与毒性試験

(用量設定理由)

本試験に先立ち、投与量設定のための2週間投与試験を0, 10, 30, 90および180 mg/kgの5用量で実施した。その結果、雌雄とも180 mg/kg群で死亡が認められ、死亡率は雄で60%、雌で80%であった。90 mg/kg群では、雌雄とも器官重量に軽微な変化が認められたのみであった。従って、28日間反復投与毒性試験の最高用量は120 mg/kgとし、以下公比2で除した中用量を60 mg/kg、低用量を30 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。被験物質は超純水に溶解し、胃ゾンデを用いて経口投与した。投与容量は体重100 g当り0.5 mlとした。対照群には溶媒のみ投与した。

6. 投与液の調製、分析

被験物質は、各用量(30, 60および120 mg/kg)ごとに所定量を精秤し、超純水(NANO pureシステム、米国SYBRON社)に溶解した。投与液は調製後、冷蔵庫保存で1週間安定であることが確認されているので、本試験においては毎週1回調製を行い、1日分毎に小分けをし使用時まで冷蔵庫に保管した。投与液の濃度分析をすべての群に関し投与1および4週の調製液について実施した結果、設定濃度の104~107%の範囲であり、適切に調製されていた。

7. 投与期間

投与期間は28日間とし、投与終了後0および120 mg/kg群について2週間の回復試験を実施した。

8. 観察、測定および検査

1) 一般状態の観察

全動物を毎日午前、午後の2回観察し、中毒症状の有無、行動異常、死期の迫った動物および死亡動物の有無等を記録した。

2) 体重

投与開始から回復試験終了時まで、毎週1回測定した。

3) 摂餌量

毎週1回給餌した残量を測定し、飼料摂取量(g/week)を算出した。

4) 臨床検査

投与終了時および回復期間終了時の計2回実施した。採血するに当り、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。

a. 血液学検査

EDTA-3Kを添加した初血を用い、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: RBC, MCVより算出)、平均赤血球容積(MCV: 暗視野板法)、平均赤血球色素量(MCH: HGB, RBCより算出)、平均赤血球色素濃度(MCHC: HGB, HCTより算出)、血小板数(PLT: 暗視野板法)および白血球百分率(フローサイトケミストリー法)を血液自動分析装置THMS H・1E(米国マイルス社)を用いて測定した。

網赤血球(RC)率算定用に、全血をキャピロット(テルモ株式会社)で染色後、血液塗抹標本を作製し鏡検した。

また、クエン酸ソーダ添加血液の血漿について、プロトロンビン時間(Quick 1段法)、活性化部分トロンボプラスチン時間(クロット法)およびフィブリノーゲン量(トロンビン時間法)を血液凝固自動測定装置KC-40(独国Amelung社)を用いて測定した。

b. 血液生化学検査

血清を用いて、総蛋白(ビュレット法)、アルブミン(B.C.G.法)、A/G比(計算値)、血糖(グルコースオキシダーゼ法)、中性脂肪(酵素法)、総コレステロール(酵素法)、尿素窒素(BUN: ウレアーゼ改良法)、総ビリルビン(ジアゾ色素法)、カルシウム(アルセナゾIII色素法)、無機リン(モリブデン酸ブルー法)、ナトリウム(電極法)、カリウム(電極法)および塩素(電極法)をEKTACHEM 700N(米国コダック社)で、クレアチニン(アルカリ性ピクリン酸比色法)、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改良法)およびアルカリホスファターゼ(ALP: Bessey-Lowry-Brock改良法)をCentrifichem ENCORE II(米国ベーカー社)で測定した。

c. 尿検査

血液学検査に先立ち、採尿器を用いて24時間(午前10時から翌日午前10時まで)尿を採取し、尿量、色調および濁度を検査後、尿比重計UR-S(関アタゴ)を用いて尿比重を測定した。また、尿を遠心分離後Sternheimer変法により沈渣を染色し、鏡検した。pH、潜血、ケトン体、糖、蛋白、ビリルビンおよびウロビリノーゲンについて、N-マルティスティックスSG試験紙(マイルス・三共)およびCLINITEK 200(米国マイルス社)を用いて測定した。

5) 病理学検査

病理解剖は投与終了時および回復期間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。また、脳、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胸腺、精巣および卵巣について重量を測定し、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、骨髄(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。

病理組織学検査は固定した器官・組織のうち、対照群

と高用量群の唾液腺、肝臓、心臓、脾臓、腎臓、副腎および骨髄(大腿骨)について実施した。常法に従って薄切標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色し鏡検した。

6) データの記録および統計分析

各試験群の体重、摂餌量、血液学検査値、血液生化学検査値、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薬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薬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。

試験結果

1. 死亡率

投与4週に、雌の120 mg/kg群で1例(動物番号2309)が死亡した。これを除き投与期間中、雌雄とも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120 mg/kg群で死亡例は認められなかった。

2. 一般状態の観察

雄では、120 mg/kg群で投与2週から流涎が観察され始め、投与2週は6例に、投与3週以降は9例に観察された。流涎は投与後1時間から発現し、3時間程度継続した後消失する繰り返しであり、程度は下顎がかなり濡れる程度であった。また、流涎は60 mg/kg群でも投与4週の5~7日に2例に発現したが、120 mg/kg群と比較し症状の程度は軽度で下顎が濡れる程度であった。その他の変化として、120 mg/kg群では、投与4週に5例に流涙が、また2例に被毛の汚れが認められた。これらはいずれも回復期間に入ると認められなかった。また、被毛の汚れについては、観察された2例がいずれも投与4週の計画屠殺動物であったため、回復性は明らかでなかった。

雌では、120 mg/kg群で投与2週から流涎が全例に、また、流涙および被毛の汚れが8例に、立毛が3例に観察され、投与4週には流涎および被毛の汚れが10例に、立毛が4例に増加し、このうち1例が投与4週に死亡したが、死亡例では流涎、流涙および被毛の汚れが投与2週から観察された以外、特記すべき変化は認められなかった。いずれの症状も回復期間に入ると認められなかった。なお、流涎の程度や発現時間は雄とほぼ同じであった。流涙についても発現時間は流涎と同様であったが、

程度は軽度で眼瞼が濡れる程度であった。

3. 体重(Figure 1)

雄では、120 mg/kg群で投与1週から増加抑制傾向が認められ、投与3および4週で対照群と比較して低値を示した。投与終了時の対照群と120 mg/kg群の体重差は、回復期間終了時でも大差がなかった。

雌では、投与期間中は120 mg/kg群で僅かに体重増加抑制傾向にあったもののいずれの被験物質投与群も対照群と有意な差は認められなかった。回復1週では、対照群と比較して120 mg/kg群で僅かに低値であったが、2週には有意な差は認められなかった。

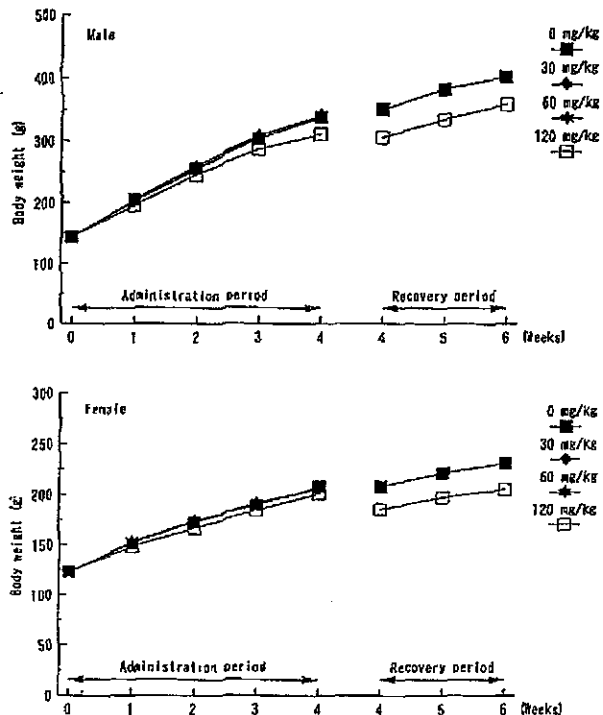


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with benzyltrimethylanmonium chloride in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

4. 摂餌量

雄では、対照群と比較して120 mg/kg群で投与期間を通じて減少が認められた。回復期間に入ると対照群と120 mg/kg群で明確な差は認められなかった。

雌では、投与期間および回復期間を通じて、対照群と被験物質投与群とで差が認められなかった。

5. 血液学検査(Table 1)

(投与終了時の検査結果)

雄では、対照群と比較して120 mg/kg群でヘモグロビン量、MCVおよびMCHの高値が認められた。また、MCVおよびMCHは、30および60 mg/kg群でも高値が認められたが、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量および赤血球数は対照群と差がなく、意義のある変化ではなかった。

Table 1 Hematology of rats treated orally with benzyltrimethylanmonium chloride in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

| Item | 28 days dosing groups (mg/kg) | | | | 14 days recovery groups (mg/kg) | |
|--|-------------------------------|-------------|--------------|--------------|---------------------------------|---------------|
| | 0 | 30 | 60 | 120 | 0 | 120 |
| Male | | | | | | |
| No. of animals | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| HCT (%) | 43.4 ± 1.7 | 43.2 ± 2.0 | 43.5 ± 1.4 | 45.8 ± 1.4 | 44.2 ± 0.4 | 43.1 ± 1.0 |
| HGB (g/dl) | 14.9 ± 0.3 | 15.1 ± 0.5 | 15.0 ± 0.5 | 16.1 ± 0.3** | 15.2 ± 0.3 | 15.1 ± 0.4 |
| RBC (×10 ⁶ /mm ³) | 7.52 ± 0.22 | 7.28 ± 0.38 | 7.27 ± 0.30 | 7.66 ± 0.23 | 7.85 ± 0.10 | 7.47 ± 0.07** |
| MCV (μm ³) | 57.7 ± 1.1 | 59.4 ± 1.1* | 59.8 ± 0.8** | 59.8 ± 0.9** | 56.2 ± 0.7 | 57.7 ± 1.6 |
| MCH (pg) | 19.8 ± 0.3 | 20.7 ± 0.8* | 20.7 ± 0.3* | 21.0 ± 0.6** | 19.4 ± 0.4 | 20.2 ± 0.5* |
| MCHC (%) | 34.2 ± 0.7 | 34.8 ± 1.5 | 34.5 ± 0.5 | 35.1 ± 0.8 | 34.4 ± 0.4 | 35.0 ± 1.0 |
| PLT (×10 ⁹ /mm ³) | 1074 ± 66 | 1161 ± 132 | 1082 ± 98 | 1101 ± 156 | 1014 ± 96 | 1000 ± 121 |
| WBC (×10 ³ /mm ³) | 9.9 ± 1.8 | 13.9 ± 2.2 | 12.6 ± 1.7 | 10.5 ± 3.6 | 11.5 ± 1.5 | 15.0 ± 4.4 |
| Differential leukocyte counts (%) | | | | | | |
| NEUT | 12 ± 3 | 9 ± 3 | 9 ± 3 | 11 ± 3 | 10 ± 1N | 9 ± 4 |
| LYMPH | 85 ± 3 | 87 ± 4 | 89 ± 3 | 86 ± 2 | 85 ± 1N | 88 ± 4 |
| MONO | 1 ± 1 | 2 ± 1 | 1 ± 1 | 2 ± 0 | 2 ± 1 | 1 ± 1 |
| EOSN | 1 ± 0 | 1 ± 1 | 1 ± 0 | 1 ± 0 | 1 ± 0 | 1 ± 0 |
| BASO | 0 ± 0 | 0 ± 1 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 1 |
| LUC | 1 ± 0 | 1 ± 0 | 1 ± 0 | 1 ± 0 | 1 ± 1 | 1 ± 0 |
| Reticulocyte (%) | 30 ± 2 | 29 ± 8 | 31 ± 5 | 30 ± 6 | 21 ± 7 | 29 ± 4 |
| PT (sec.) | 13.8 ± 0.4 | 13.5 ± 0.3 | 13.6 ± 0.2 | 13.7 ± 0.3 | 13.6 ± 0.4 | 13.4 ± 0.3 |
| APTT (sec.) | 25.1 ± 1.5 | 25.4 ± 1.1 | 25.1 ± 1.5 | 25.9 ± 1.9 | 25.9 ± 1.3 | 23.8 ± 2.1 |
| Fibrinogen (mg/dl) | 255 ± 20 | 258 ± 5 | 266 ± 21 | 244 ± 10 | 277 ± 21 | 254 ± 15 |
| Female | | | | | | |
| No. of animals | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 |
| HCT (%) | 43.0 ± 1.3 | 42.2 ± 1.5 | 42.6 ± 1.3 | 42.9 ± 1.3 | 40.7 ± 1.1 | 41.3 ± 1.9 |
| HGB (g/dl) | 15.3 ± 0.5 | 15.2 ± 0.4 | 15.1 ± 0.3 | 15.3 ± 0.3 | 14.6 ± 0.1N | 14.9 ± 0.8 |
| RBC (×10 ⁶ /mm ³) | 7.49 ± 0.33 | 7.46 ± 0.36 | 7.36 ± 0.17 | 7.44 ± 0.19 | 7.32 ± 0.18 | 7.49 ± 0.22 |
| MCV (μm ³) | 57.4 ± 1.1 | 56.7 ± 1.0 | 57.9 ± 1.0 | 57.7 ± 0.9 | 55.6 ± 0.9 | 55.2 ± 1.6 |
| MCH (pg) | 20.4 ± 0.2 | 20.4 ± 0.7 | 20.5 ± 0.5 | 20.6 ± 0.4 | 19.9 ± 0.5 | 19.9 ± 0.8 |
| MCHC (%) | 35.6 ± 0.5 | 36.0 ± 0.7 | 35.4 ± 0.7 | 35.7 ± 0.9 | 35.8 ± 0.9 | 36.0 ± 0.8 |
| PLT (×10 ⁹ /mm ³) | 1114 ± 43 | 1139 ± 57 | 1069 ± 90 | 1065 ± 112 | 994 ± 79 | 1187 ± 107* |
| WBC (×10 ³ /mm ³) | 6.5 ± 2.8 | 5.9 ± 2.2 | 6.3 ± 2.8 | 7.3 ± 2.5 | 5.5 ± 1.9 | 6.4 ± 1.1 |
| Differential leukocyte counts (%) | | | | | | |
| NEUT | 12 ± 2 | 13 ± 4 | 11 ± 2 | 13 ± 5 | 18 ± 5 | 13 ± 2 |
| LYMPH | 84 ± 2 | 83 ± 4 | 84 ± 4 | 82 ± 6 | 79 ± 5 | 83 ± 3 |
| MONO | 1 ± 1 | 2 ± 1 | 2 ± 1 | 2 ± 1 | 2 ± 0 | 2 ± 1 |
| EOSN | 2 ± 1 | 2 ± 0 | 2 ± 2 | 2 ± 1 | 1 ± 1 | 2 ± 1 |
| BASO | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |
| LUC | 1 ± 1 | 1 ± 0 | 1 ± 0 | 1 ± 0 | 1 ± 0 | 1 ± 0 |
| Reticulocyte (%) | 21 ± 7 | 18 ± 6 | 20 ± 3 | 19 ± 6 | 20 ± 5 | 23 ± 8 |
| PT (sec.) | 13.9 ± 0.5 | 13.9 ± 0.6 | 13.8 ± 0.2 | 14.0 ± 0.4 | 13.8 ± 0.5 | 14.1 ± 0.5 |
| APTT (sec.) | 21.0 ± 0.4 | 21.2 ± 1.2 | 21.8 ± 1.4 | 21.1 ± 1.6 | 19.8 ± 0.6 | 19.7 ± 0.8 |
| Fibrinogen (mg/dl) | 233 ± 26 | 214 ± 27 | 207 ± 23 | 213 ± 18 | 195 ± 9 | 204 ± 19 |

NEUT:Neutrophil LYMPH:Lymphocyte MONO:Monocyte EOSN:Eosinophil ASO:Basophil LUC:Large unstained cells

Values are expressed as Mean ± S.D.

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

N: Non parametric analysis

雌では、いずれの検査項目も対照群と被験物質投与群とで差が認められなかった。

〔回復期間終了時の検査結果〕

雄では、対照群に比較して120 mg/kg群で赤血球数の低値、MCHの高値が認められた。

雌では、対照群に比較して120 mg/kg群で血小板数が高値を示したが、背景値の範囲内の変化であった(背景値 $1103 \pm 124 \times 10^3 / \text{mm}^3$, $n=50$)。

6. 血液凝固検査 (Table 1)

投与終了時および回復試験終了時のいずれにおいても、雌雄ともに対照群と被験物質投与群とで検査を行った3項目に差は認められなかった。

7. 血液生化学検査 (Table 2)

〔投与終了時の検査結果〕

雄では、対照群に比較して30および120 mg/kg群でGOTが高値を示したが、背景値の正常範囲内の値であった。

雌では、すべての検査項目について、対照群と被験物質投与群とで差が認められなかった。

〔回復期間終了時の検査結果〕

雄では、すべての検査項目について、対照群と120 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120 mg/kg群で総蛋白の低値が認められたが、対照群が僅かに高値傾向にあり、120 mg/kg群の値は正常範囲(背景値: $5.66 \pm 0.20 \text{ g/dl}$, $n=50$)内の値であった。

8. 尿検査 (Table 3)

投与終了時および回復試験終了時のいずれにおいても、雌雄ともに対照群と被験物質投与群とですべての検査項目について明らかな差は認められなかった。

9. 器官重量 (Table 4)

〔投与終了時の結果〕

雄では、対照群に比較して30および60 mg/kg群で脳、腎臓および脾臓重量が高値、さらに60 mg/kg群で胸腺重量が高値を示した。

雌では、重量測定を行ったすべての器官について、対照群と被験物質投与群とで差は認められなかった。

〔回復期間終了時の結果〕

雌雄とも重量測定を行ったすべての器官について、対照群と被験物質投与群とで差は認められなかった。

10. 器官重量・体重比(相対重量) (Table 4)

〔投与終了時の結果〕

雄では、対照群に比較して60 mg/kg群で胸腺相対重量の高値が認められた。

雌では、重量測定を実施したすべての器官について、

対照群と被験物質投与群とで差が認められなかった。

〔回復期間終了時の結果〕

雄では、対照群に比較して120 mg/kg群で脳相対重量の高値が認められた。

雌では、重量測定を実施したすべての器官について、対照群と被験物質投与群とで差が認められなかった。

11. 病理学検査

a) 剖検所見 (Table 5)

雌の120 mg/kg群の死亡例については、肉眼的には特筆すべき所見は観察されなかった。

投与終了時の計画屠殺された動物の剖検所見で被験物質による影響と考えられる所見は雌雄いずれの投与群にも認められなかった。

対照群を含め観察された所見としては、肺の赤色斑/区域と有色斑/区域が、それぞれ雌雄で少数例、胸腺の赤色斑/区域は雌で少数例認められた。その他観察された所見はごく僅かか、単発性の発生に止まった。

回復期間終了時の所見は、いずれも単発性の発生に止まり、被験物質による影響と考えられる所見は認められなかった。

b) 組織所見 (Table 6)

雌の120 mg/kg群の死亡例については、肝臓において、好酸性小体の出現と肝細胞腫脹が認められ、また、副腎皮質の増生が認められた。その他、肝臓の肉芽巣、骨髄の血管拡張や自己融解が観察された。

投与終了時の組織学的検査の結果、被験物質による影響と考えられる所見は認められなかった。対照群を含め観察された所見として、肝臓の周辺性脂肪化あるいは脂肪化、肉芽巣、腎臓の尿細管の好塩基化、繊維化や管腔拡張などの変化が認められた。

考察および結論

雌の120 mg/kg群で死亡が1例認められ、この動物では、同群の他の動物でも観察された流涎、流涙および被毛の汚れが死亡の3週間前から観察された。病理学的検査の結果、肝臓に肝細胞腫脹と好酸性小体の出現等が認められたが、死因に結びつけられる変化ではなかった。しかしながら、予備試験での死亡例の状況等から、被験物質投与により死亡したものと考えられた。

一般状態の観察では、雌雄の120 mg/kg群で流涎、流涙および被毛の汚れが、さらに雌の120 mg/kg群で立毛が認められ、これらの症状のうち、流涎については雄の60 mg/kg群の1部の例でも観察された。投与中止により消失が認められいずれも被験物質投与による変化と考えられた。

体重、摂餌量および飼料効率は、雄の120 mg/kg群のみ低値または減少が認められ、摂餌量および飼料効率は投与の中止により回復した。体重については投与終了時の差が縮まらず、回復は認められなかった。

血液学検査の結果、雄の120 mg/kg群で認められたへ

Table 2 Blood chemistry of rats treated orally with benzytrimethylanmonium chloride in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

| Item | 28 days dosing groups (mg/kg) | | | | 14 days recovery groups (mg/kg) | |
|-----------------------|-------------------------------|-------------|--------------|-------------|---------------------------------|--------------|
| | 0 | 30 | 60 | 120 | 0 | 120 |
| Male | | | | | | |
| No. of animals | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| BUN (mg/dl) | 11.8 ± 3.2 | 11.1 ± 0.7 | 11.7 ± 1.9 | 14.4 ± 2.4 | 10.8 ± 1.6 | 12.7 ± 2.5 |
| Creatinine (mg/dl) | 0.57 ± 0.09 | 0.56 ± 0.07 | 0.57 ± 0.09 | 0.63 ± 0.02 | 0.65 ± 0.10 | 0.63 ± 0.08 |
| T.cholesterol (mg/dl) | 47 ± 10 | 38 ± 11 | 46 ± 13 | 33 ± 12 | 33 ± 11 | 35 ± 13 |
| T.protein (g/dl) | 5.29 ± 0.26N | 5.32 ± 0.16 | 5.20 ± 0.04 | 5.36 ± 0.18 | 5.43 ± 0.21 | 5.44 ± 0.27 |
| Albumin (g/dl) | 3.04 ± 0.15 | 3.04 ± 0.13 | 2.96 ± 0.07 | 3.15 ± 0.11 | 3.05 ± 0.12 | 3.12 ± 0.13 |
| A/G | 1.35 ± 0.03N | 1.33 ± 0.08 | 1.32 ± 0.09 | 1.43 ± 0.02 | 1.29 ± 0.04 | 1.35 ± 0.07 |
| Glucose (mg/dl) | 128 ± 9 | 132 ± 15 | 125 ± 10 | 115 ± 10 | 146 ± 22 | 139 ± 25 |
| Triglyceride (mg/dl) | 42.1 ± 9.6 | 55.9 ± 21.4 | 44.4 ± 11.2 | 40.7 ± 8.8 | 62.5 ± 19.2N | 52.1 ± 4.3 |
| GOT (U/l) | 48 ± 1N | 55 ± 4* | 52 ± 8 | 56 ± 3* | 40 ± 4 | 45 ± 7 |
| GPT (U/l) | 13 ± 2 | 14 ± 2 | 12 ± 2 | 14 ± 2 | 14 ± 3 | 14 ± 2 |
| ALP (U/l) | 163 ± 29 | 166 ± 48 | 138 ± 21 | 166 ± 19 | 136 ± 30 | 138 ± 17 |
| γ-GTP (U/l) | 0.3 ± 0.2 | 0.5 ± 0.4 | 0.5 ± 0.4 | 0.6 ± 0.5 | 0.8 ± 0.4 | 0.9 ± 0.2 |
| T.bilirubin (mg/dl) | 0.11 ± 0.02 | 0.10 ± 0.01 | 0.11 ± 0.02 | 0.11 ± 0.03 | 0.11 ± 0.01 | 0.11 ± 0.02 |
| Sodium (mmol/l) | 144.1 ± 1.0 | 143.5 ± 0.7 | 144.7 ± 1.4 | 143.1 ± 1.4 | 142.5 ± 0.7 | 141.5 ± 1.1 |
| Potassium (mmol/l) | 4.50 ± 0.31 | 4.61 ± 0.25 | 4.48 ± 0.24 | 4.74 ± 0.21 | 4.01 ± 0.13 | 4.22 ± 0.27 |
| Chloride (mmol/l) | 107.2 ± 0.7 | 107.0 ± 1.6 | 107.9 ± 1.5 | 106.3 ± 0.7 | 108.2 ± 1.3 | 107.1 ± 0.6 |
| Calcium (mg/dl) | 9.79 ± 0.35 | 9.82 ± 0.27 | 9.64 ± 0.28 | 9.63 ± 0.15 | 9.70 ± 0.26 | 9.77 ± 0.31 |
| Lphosphate (mg/dl) | 7.81 ± 0.28 | 7.80 ± 0.65 | 7.61 ± 0.25 | 8.12 ± 0.52 | 7.36 ± 0.51 | 7.80 ± 0.50 |
| Female | | | | | | |
| No. of animals | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 |
| BUN (mg/dl) | 13.7 ± 3.2 | 14.3 ± 2.5 | 14.9 ± 2.3 | 13.8 ± 1.3 | 13.6 ± 2.9 | 15.1 ± 2.4 |
| Creatinine (mg/dl) | 0.67 ± 0.06 | 0.58 ± 0.06 | 0.59 ± 0.06 | 0.55 ± 0.07 | 0.65 ± 0.03 | 0.63 ± 0.10 |
| T.cholesterol (mg/dl) | 45 ± 6 | 41 ± 6 | 46 ± 8 | 46 ± 12 | 42 ± 18 | 45 ± 17 |
| T.protein (g/dl) | 5.46 ± 0.06 | 5.34 ± 0.18 | 5.40 ± 0.33 | 5.29 ± 0.22 | 5.83 ± 0.28 | 5.44 ± 0.15* |
| Albumin (g/dl) | 3.26 ± 0.10 | 3.23 ± 0.16 | 3.27 ± 0.27 | 3.19 ± 0.18 | 3.40 ± 0.24 | 3.16 ± 0.18 |
| A/G | 1.48 ± 0.08 | 1.54 ± 0.10 | 1.53 ± 0.08 | 1.52 ± 0.08 | 1.39 ± 0.08 | 1.39 ± 0.12 |
| Glucose (mg/dl) | 105 ± 6 | 106 ± 12 | 105 ± 13 | 103 ± 15 | 114 ± 15 | 103 ± 16 |
| Triglyceride (mg/dl) | 33.3 ± 5.8 | 30.5 ± 4.9 | 33.7 ± 8.2 | 28.2 ± 2.7 | 49.8 ± 20.2 | 33.3 ± 8.8 |
| GOT (U/l) | 57 ± 8 | 59 ± 11 | 53 ± 8 | 56 ± 10 | 46 ± 10 | 47 ± 5 |
| GPT (U/l) | 15 ± 2 | 16 ± 2 | 15 ± 2 | 16 ± 4 | 13 ± 1 | 13 ± 3 |
| ALP (U/l) | 132 ± 38 | 105 ± 34 | 109 ± 23 | 83 ± 22 | 73 ± 27 | 89 ± 24 |
| γ-GTP (U/l) | 0.9 ± 0.2 | 1.1 ± 0.4 | 0.8 ± 0.4 | 0.9 ± 0.2 | 1.1 ± 0.6 | 1.0 ± 0.4 |
| T.bilirubin (mg/dl) | 0.14 ± 0.02 | 0.15 ± 0.02 | 0.16 ± 0.05 | 0.14 ± 0.03 | 0.16 ± 0.05 | 0.15 ± 0.05 |
| Sodium (mmol/l) | 143.6 ± 0.7 | 142.2 ± 1.6 | 142.5 ± 1.4 | 141.4 ± 1.1 | 141.3 ± 1.3 | 140.9 ± 1.1 |
| Potassium (mmol/l) | 4.32 ± 0.25N | 4.50 ± 0.28 | 4.91 ± 1.22 | 4.57 ± 0.37 | 4.00 ± 0.53 | 4.29 ± 0.25 |
| Chloride (mmol/l) | 111.2 ± 1.4 | 109.0 ± 0.7 | 109.2 ± 1.9 | 108.9 ± 1.8 | 107.9 ± 2.7 | 110.4 ± 1.7 |
| Calcium (mg/dl) | 9.74 ± 0.12N | 9.64 ± 0.34 | 10.02 ± 0.49 | 9.77 ± 0.13 | 9.94 ± 0.40 | 9.60 ± 0.31 |
| Lphosphate (mg/dl) | 6.75 ± 0.55 | 6.28 ± 0.48 | 7.34 ± 0.83 | 6.96 ± 0.59 | 6.15 ± 0.80 | 5.94 ± 0.91 |

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *P ≤ 0.05

N: Non parametric analysis

Table 3 Urinalysis of rats treated orally with benzyltrimethylanmonium chloride in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

| Item | 28 days dosing groups (mg/kg) | | | | 14 days recovery groups (mg/kg) | |
|------------------------|-------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------------------------|---------------|
| | 0 | 30 | 60 | 120 | 0 | 120 |
| Male | | | | | | |
| No. of animals | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Volume (ml) | 21 ± 10N | 16 ± 3 | 19 ± 8 | 18 ± 3 | 16 ± 4 | 18 ± 6 |
| Specific gravity | 1.042 ± 0.016 | 1.055 ± 0.011 | 1.040 ± 0.017 | 1.043 ± 0.006 | 1.037 ± 0.011 | 1.037 ± 0.021 |
| Color | Slight yellow | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Turbidity | Clear muddy | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| pH | 7 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| | 7.5 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 8.5 | 2 | 1 | 1 | 2 | 0 |
| | ≥9 | 1 | 1 | 3 | 3 | 3 |
| Occult blood | - | 5 | 5 | 5 | 3 | 5 |
| | +/- | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | 2+ | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Ketones | - | 2 | 1 | 2 | 5 | 1 |
| | +/- | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| | 1+ | 2 | 3 | 2 | 0 | 4 |
| Glucose (g/dl) | - | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | +/- | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | 30 (mg/dl) | 2 | 1 | 4 | 4 | 3 |
| | 100 | 1 | 3 | 0 | 0 | 2 |
| Protein (mg/dl) | ≥300 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| | - | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | 0.1 | 2 | 1 | 2 | 5 | 4 |
| Urobilinogen (E.U./dl) | 1.0 | 3 | 4 | 3 | 0 | 1 |
| | - | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Erythrocytes | - | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Leukocytes | - | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Epith. cells | - | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Casts | - | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 |
| | + | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Fat glob. | - | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| M. threads | - | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 |
| | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| others | - | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| | + | 4 | 5 | 4 | 5 | 3 |

Fat glob.: Fat globule, M. threads: Mucous threads, others: Crystals

Values of volume and specific gravity are expressed as Mean ± S.D., other values are expressed as No. of animals

N: Non parametric analysis

Table 3 (continued)

| Item | 28 days dosing groups (mg/kg) | | | | 14 days recovery groups (mg/kg) | |
|------------------------|-------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------------------------|---------------|
| | 0 | 30 | 60 | 120 | 0 | 120 |
| Female | | | | | | |
| No. of animals | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 |
| Volume (ml) | 15 ± 9N | 9 ± 2 | 11 ± 6 | 20 ± 12 | 16 ± 3 | 17 ± 10 |
| Specific gravity | 1.056 ± 0.022 | 1.063 ± 0.007 | 1.070 ± 0.019 | 1.044 ± 0.027 | 1.049 ± 0.014 | 1.041 ± 0.016 |
| Color | Slight yellow | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 |
| Turbidity | Clear muddy | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 |
| pH | 7 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 |
| | 7.5 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 |
| | 8 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| | 8.5 | 2 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| | ≥9 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Occult blood | - | 4 | 5 | 4 | 5 | 4 |
| | 1+ | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Ketones | - | 1 | 2 | 1 | 5 | 0 |
| | +/- | 2 | 3 | 4 | 0 | 4 |
| | 1+ | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Glucose (g/dl) | - | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 |
| Protein (mg/dl) | - | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | 30 | 0 | 4 | 1 | 3 | 3 |
| | 100 | 3 | 1 | 3 | 1 | 2 |
| | ≥300 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Bilirubin | - | 4 | 5 | 4 | 5 | 4 |
| | 1+ | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Urobilinogen (E.U./dl) | 0.1 | 1 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| | 1.0 | 3 | 5 | 5 | 2 | 5 |
| Erythrocytes | - | 4 | 3 | 5 | 5 | 5 |
| | + | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Leukocytes | - | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Epith. cells | - | 4 | 4 | 5 | 4 | 5 |
| | + | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Casts | - | 4 | 4 | 5 | 5 | 5 |
| | + | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Fat glob. | - | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| M. threads | - | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| others | - | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | + | 3 | 5 | 5 | 5 | 5 |

Fat glob.: Fat globule, M. threads: Mucous threads, others: Crystals

Values of volume and specific gravity are expressed as Mean ± S.D., other values are expressed as No. of animals

N: Non parametric analysis