

二酸化窒素の C57BL/6J マウスを用いた吸入による
4 週間毒性試験（中期がん原性試験予備試験）報告書

試験番号：0893

CAS No. 10102-44-0

2018年9月12日

独立行政法人 労働者健康安全機構
日本バイオアッセイ研究センター

目次

標題	i
試験目的	i
試験法	i
GLP 対応	i
動物福祉	i
試験委託者	ii
試験施設及び運営管理者	ii
試験日程	ii
試験関係者一覧	ii
試資料の保管	iii
試験責任者（最終報告書作成者）の署名、捺印及び日付	iii
陳述書	iv
信頼性保証証明書	v
本文	vi
TABLES	A~L	2
FIGURES	1~4	
APPENDICES	1-1~3	

標題

二酸化窒素の C57BL/6J マウスを用いた吸入による 4 週間毒性試験（中期がん原性試験予備試験）

試験目的

本試験は、二酸化窒素の発がん性を調査する目的で行う遺伝子改変マウス（p53 ヘテロ欠損 C57BL/6J マウス）を用いた中期がん原性試験の投与濃度を決定するために、二酸化窒素を野生型 C57BL/6J マウスに 4 週間全身暴露（経気道投与）して、その生体影響を検索した。

試験法

本試験は「遺伝子改変動物を用いたがん原性試験による調査の基準」（平成 28 年度第 3 回発がん性評価ワーキンググループ：2017 年 3 月 1 日厚生労働省）及び OECD の化学物質の試験に関するガイドライン 412（亜急性吸入毒性試験：28 日試験 2009 年 9 月 7 日採択）を参考にして実施した。

GLP 対応

本試験は、「労働安全衛生規則第 34 条の 3 第 2 項の規定に基づく試験施設等が具備すべき基準（安衛法 GLP）」（昭和 63 年 9 月 1 日労働省告示第 76 号、最終改正平成 28 年 4 月 18 日 厚生労働省告示第 208 号）に準拠し、OECD GLP（1997 年 11 月 26 日採択）に準じて実施した。

動物福祉

本試験は「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号、最終改正平成 25 年 8 月 30 日環境省告示第 84 号）、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」（平成 18 年 6 月 1 日厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知、最終改正平成 27 年 2 月 20 日厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）及び「日本バイオアッセイ研究センターにおける動物実験等に関する規程」（平成 24 年 4 月 25 日制定、最終改正平成 28 年 4 月 1 日）を遵守した。また、本試験は日本バイオアッセイ研究センターの動物実験委員会で審査された（承認番号 0184）。

試験委託者

厚生労働省労働基準局安全衛生部化学物質対策課
東京都千代田区霞が関 1-2-2

試験施設及び運営管理者

独立行政法人労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター
所長 菅野 純
神奈川県秦野市平沢 2445

試験日程

試験開始日	2017年 9月 8日
動物導入日	2017年 9月 13日
群分け日	2017年 9月 27日
被験物質投与開始日	2017年 9月 28日
被験物質投与終了日	2017年 10月 25日、26日
定期解剖日	2017年 10月 26日、27日
試験終了日	2018年 9月 12日

試験関係者一覧

試験責任者	:	鈴木 正明	(試験管理部)
被験物質の分析・ 投与・管理	:	笠井 辰也 齋藤 新 平井 繁行 西沢 共司 大西 誠	(試験管理部) (試験管理部) (試験管理部) (試験管理部) (試験管理部)
動物管理	:	竹内 哲也 三角 恭兵	(試験管理部) (試験管理部)
病理検査	:	相磯 成敏 梅田 ゆみ 妹尾 英樹 齋藤美佐江 高信 健司 山野 荘太郎 近藤ひとみ	(病理検査部) (病理検査部) (病理検査部) (病理検査部) (病理検査部) (病理検査部) (病理検査部)

二酸化窒素の C57BL/6J マウスを用いた吸入による
4 週間毒性試験（中期がん原性試験予備試験）報告書

試験番号：0893

本文

本文目次

	頁
要約	1
試験材料	2
- 1 被験物質の性状等	2
- 1 - 1 名称等	2
- 1 - 2 構造式及び分子量	2
- 1 - 3 物理化学的性状等	2
- 2 被験物質の使用ロット等	2
- 3 被験物質の特性	3
- 3 - 1 同一性	3
- 3 - 2 安定性	3
- 4 試験動物	3
試験方法	4
- 1 投与	4
- 1 - 1 投与経路	4
- 1 - 2 被験物質の投与方法	4
- 1 - 3 投与期間	4
- 1 - 4 投与濃度	4
- 1 - 5 投与経路、投与期間及び投与濃度の設定理由	4
- 1 - 6 被験物質の発生方法と濃度調整	5
- 1 - 7 被験物質濃度の測定	5
- 2 動物管理	6
- 2 - 1 各群の使用動物数	6
- 2 - 2 群分け方法	6
- 2 - 3 動物の個体識別	6
- 2 - 4 使用飼育室及び他試験・異種動物との区別	6
- 2 - 5 飼育条件	7
(1) 飼育環境	7
(2) 飼料	7
(3) 飲水	7

- 3	観察・検査項目及び方法	8
- 3 - 1	動物の生死及び一般状態の観察	8
- 3 - 2	体重測定	8
- 3 - 3	摂餌量測定	8
- 3 - 4	尿検査	8
- 3 - 5	血液学的検査	8
- 3 - 6	血液生化学的検査	9
- 3 - 7	病理学的検査	9
(1)	肉眼的観察	9
(2)	臓器重量	9
(3)	病理組織学的検査	9
- 4	数値処理と統計方法	10
- 4 - 1	数値の取り扱いと表示	10
- 4 - 2	統計処理	10
	試験成績	11
- 1	生死状況	11
- 2	一般状態	11
- 3	体重	11
- 4	摂餌量	11
- 5	尿検査	12
- 6	血液学的検査	12
- 7	血液生化学的検査	12
- 8	病理学的検査	13
- 8 - 1	肉眼的観察	13
- 8 - 2	臓器重量	13
- 8 - 3	病理組織学的検査	13
	考察及びまとめ	15
- 1	用量 - 反応関係	15
- 2	中期がん原性試験の濃度設定	16

文献 17

予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計
画書に従わなかつたこと 18

要約

二酸化窒素のがん原性を検索する目的で、遺伝子改変マウス (p53 ヘテロ欠損 C57BL/6J マウス) を用いた吸入による中期がん原性試験を実施するに当たり、その投与濃度を決定するための予備試験として、野生型 C57BL/6J マウスを用いて本試験 (4 週間試験) を実施した。

本試験は、被験物質投与群 4 群と対照群 1 群の計 5 群の構成で、各群雌雄とも 10 匹とし、合計 100 匹を用いた。被験物質の投与は、二酸化窒素を 1 日 6 時間、1 週 5 日間で 4 週間、動物に全身暴露することにより行った。投与濃度は、雌雄とも 0 (対照群)、5、10、20 及び 40 ppm (v/v) とした。観察、検査として、一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、解剖時の肉眼的観察、臓器重量測定及び病理組織学的検査を行った。

二酸化窒素の暴露の結果、動物の死亡は認められなかった。一般状態、体重及び摂餌量は 40 ppm 群で影響がみられた。一般状態の観察では、暴露開始日と 2 日目の暴露後の観察で雌雄全匹に自発運動量の減少と不整呼吸がみられた。体重は雄で 1 週目と 4 週目に低値がみられ、摂餌量も 1 週目と 4 週目に低値がみられた。臓器重量では、肺重量の高値が雌の 20 ppm 以上の群と雄の 40 ppm 群にみられた。病理組織学的検査では、鼻腔と肺に影響がみられ、鼻腔では、滲出液が 40 ppm 群の雌雄に、呼吸上皮のエオジン好性変化と固有層にみられる腺の呼吸上皮化生が全ての投与群の雌雄にみられた。肺では、炎症が 40 ppm 群の雌雄にみられた。病理組織学的検査でみられた所見の程度はいずれも軽度であった。

以上のように、C57BL/6J マウスに二酸化窒素を 4 週間吸入暴露した結果、一般状態、体重、摂餌量、肺重量及び病理組織学的検査結果に影響が認められた。しかし、毒性の程度はいずれも重篤なものではなく、40 ppm の濃度で 26 週間に亘って動物に暴露しても、毒性兆候は示されるものの死亡を増加させることはないと考えられた。従って、中期がん原性試験の投与濃度は 4 週間の予備試験と同じく 40 ppm を最高濃度とし、以下 20 ppm 及び 10 ppm を設定した。

試験材料

- 1 被験物質の性状等

- 1 - 1 名称等

名 称 : 二酸化窒素 (Nitrogen dioxide)
別 名 : 過酸化窒素 (Nitrogen peroxide)
CAS No. : 10102-44-0

- 1 - 2 構造式及び分子量 (文献 1)

化 学 式 : NO_2
分 子 量 : 46.0

- 1 - 3 物理化学的性状等 (文献 1)

性 状 : 刺激臭のある帯赤褐色気体または茶色もしくは黄色の液体
相対蒸気密度 : 1.58 (空気=1)
沸 点 : 21.2
蒸 気 圧 : 96 kPa (20)
溶 解 性 : 水と反応して硝酸と一酸化窒素を生じる
保 管 条 件 : 室温、暗所

- 2 被験物質の使用ロット等

製 造 元 : 住友精化株式会社
純 度 : 99.5% 以上 (住友精化(株)検査成績書)
ロ ッ ト 番 号 : JTB 1742564

- 3 被験物質の特性

- 3 - 1 同一性

被験物質の同一性は、被験物質のマスペクトルを質量分析計(アジレントテクノロジー(株) 5973N)にて測定し、文献値と比較することにより確認した。

その結果、被験物質のマスペクトルは文献値(文献2)と同じ分子イオン及びフラグメントピークを示し、二酸化窒素であることを確認した。

それらの結果は APPENDIX 1-1 に示す。

- 3 - 2 安定性

被験物質の安定性は、使用開始前及び使用終了後に、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計((株)島津製作所 IRAffinity-1)を用いて測定し、それぞれのデータを比較することにより確認した。

その結果、使用開始前と使用終了後の測定結果に差はみられず、使用期間中の被験物質は安定であることを確認した。

それらの結果は APPENDIX 1-2 に示す。

- 4 試験動物

動物は、中期がん原性試験で使用する遺伝子改変動物の B6.129S2-Trp53^{tm1Tyj}/J マウス(p53 ヘテロ欠損マウス)の作製に用いる系統である C57BL/6J マウス(野生型)の雌雄を使用した。

雌雄各 52 匹を 6 週齢で導入し、検疫を 7 日間、馴化を 8 日間実施した後、発育順調で一般状態に異常を認めなかった動物、雌雄各 50 匹(群構成時体重範囲、雄: 21.0 ~ 25.5 g、雌: 16.9 ~ 21.5 g)を試験に用いた。

なお、中期がん原性試験に p53 ヘテロ欠損マウスを選択した理由は、中期発がん性検索のための有用性が検証されていることによる(文献3)。

試験方法

- 1 投与

- 1 - 1 投与経路

投与経路は全身暴露による経気道投与とした。

- 1 - 2 被験物質の投与方法

投与は、試験動物を収容した吸入チャンバー内に、設定濃度に調整した被験物質を含む空気を送り込み、動物に全身暴露することにより行った。

- 1 - 3 投与期間

投与期間は、1日6時間、1週5日の暴露で4週間とし、計20回（定期解剖1日目解剖動物）または21回（定期解剖2日目解剖動物）行った。

- 1 - 4 投与濃度

投与濃度は5、10、20及び40 ppm（体積比 v/v）の4段階（公比2）に設定した。なお、対照群は清浄空気による換気のみとした。

- 1 - 5 投与経路、投与期間及び投与濃度の設定理由

投与経路は、被験物質を生産、使用する作業環境における労働者への主な暴露経路に合わせ、全身暴露による経気道投与とした。

投与期間は「遺伝子改変動物を用いたがん原性試験による調査の基準」（文献4）に従い、週5日の暴露で4週間とした。

投与時間はOECD化学品テストガイドライン412（文献5）に従い1日6時間とした。

投与濃度は2週間試験（試験番号4593）の結果をもとに決定した。2週間試験は、主に4週間試験の最高投与濃度を検索する目的で、0（対照群）、5、10、20及び40 ppmの濃度で行った。その結果、暴露による死亡は雌雄いずれの群にも認められなかった。一般状態観察では、暴露開始日の暴露終了後に、40 ppm群の雌雄で不整呼吸（全匹）と眼脂（各1匹）がみられた。暴露開始2日目の終了後には不整呼吸に加えて、自発運動の減少も全匹にみられた。体重は対照群と比較し、40 ppm群の雌雄で、暴露3日目と5日目は低値であ

ったものの、それ以降は回復し、対照群との差はみられなかった。摂餌量は、40 ppm 群の雌雄で 1 週目は低値であった。血液学的検査では、赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の高値がみられ、血液への影響は、雄では 20 ppm 以上、雌では 10 ppm 以上の群でみられた。病理組織学的検査では、40 ppm 群の雌雄で炎症性細胞浸潤（中等度）と肺胞上皮過形成（軽度）、20 ppm 群の雌雄で炎症性細胞浸潤（軽度）と肺胞上皮過形成（軽度）が認められ、雌の 40 ppm 群では肺重量の増加もみられた。

以上のように、二酸化窒素の吸入暴露の影響は主に肺と血液にみられた。最高投与群の 40 ppm の濃度は雌雄のマウスに明確な毒性を示したが、その程度は重篤でなく、一般状態や体重において影響がみられたのは投与開始初期のみであった。このことから、同程度の濃度で 28 日間試験を実施しても動物に重篤な症状を引き起こさないと考えた。

従って、本試験の投与濃度は、2 週間の予備試験と同じく、40 ppm を最高濃度とし、以下、20、10 及び 5 ppm を設定した。

- 1 - 6 被験物質の発生方法と濃度調整

被験物質の入った液化ボンベより得た被験物質蒸気と清浄空気を被験物質供給装置(柴田科学(株)特注)内で希釈混合し、必要な量の混合ガスを流量計及び流量調節バルブを用いて各吸入チャンバー上部のラインミキサーに供給した。

吸入チャンバー内の被験物質濃度は二酸化窒素測定装置(株)島津製作所 NO_x-O₂ 測定装置 NOA-7100)で監視した。

- 1 - 7 被験物質濃度の測定

吸入チャンバー内の被験物質濃度は、自動サンプリング装置付二酸化窒素測定装置により、暴露開始前から暴露終了後まで 20 分毎に測定した。

濃度測定結果を TABLE A に示す。

各投与群の被験物質濃度は、良好に管理された。

- 2 動物管理

- 2 - 1 各群の使用動物数

対照群 1 群、被験物質投与群 4 群の計 5 群を設け、1 群当たり雌雄各 10 匹の動物で構成した。なお、定期解剖 1 日目には各群の動物番号の小さいものから順に 5 匹を搬出し、2 日目には残りの動物を搬出した。

群番号	群名称	雄 使用動物数(動物番号)	雌 使用動物数(動物番号)
0	対照群	10 匹 (1001 ~ 1010)	10 匹 (2001 ~ 2010)
1	5 ppm群	10 匹 (1101 ~ 1110)	10 匹 (2101 ~ 2110)
2	10 ppm群	10 匹 (1201 ~ 1210)	10 匹 (2201 ~ 2210)
3	20 ppm群	10 匹 (1301 ~ 1310)	10 匹 (2301 ~ 2310)
4	40 ppm群	10 匹 (1401 ~ 1410)	10 匹 (2401 ~ 2410)

- 2 - 2 群分け方法

供試動物の各群への割り当ては、検疫・馴化期間を通して、一般状態及び体重の推移に異常を認めない動物、雌雄各 50 匹を体重の重い順より各群に 1 匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して、小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることにより、群間の体重の偏りを小さくする群分け方法(適正層別方式)により実施した(文献 6)。

- 2 - 3 動物の個体識別

動物の個体識別は、検疫及び馴化期間では尾に油性マーカーによる色素塗布、投与期間では耳パンチにより行った。また、ケージには個体識別番号を記したラベルを付した。

- 2 - 4 使用飼育室及び他試験・異種動物との区別

動物は、検疫期間はバリア区域内の独立した室(518 室)に収容し、室の扉に試験番号、動物種及び動物番号を表示して他試験及び異種動物と区別した。馴化及び投与期間はバリア区域内の吸入試験室(516 室)に設置された吸入チャンバー内に収容し、吸入試験室の扉に

は試験番号及び動物種を表示した。

- 2 - 5 飼育条件

(1) 飼育環境

検疫室、吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境条件及び使用したケージを以下に示した。検疫室、吸入試験室の温度、湿度は実測値（平均値±標準偏差）を< >内に、また、吸入チャンバー内環境の測定結果は APPENDIX 2 に示す。検疫室、吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境には、動物の健康状態に影響を与えるような大きな変化は認められなかった。

温 度	: 検疫室 ; 23 ± 2 < 518 室 ; 22.6 ± 0.1 > 吸入試験室 ; 22 ± 2 < 516 室 ; 22.0 ± 0.2 > 吸入チャンバー内 ; 20 ~ 24
湿 度	: 検疫室 ; $55 \pm 15\%$ < 518 室 ; $54 \pm 1\%$ > 吸入試験室 ; $55 \pm 15\%$ < 516 室 ; $56 \pm 1\%$ > 吸入チャンバー内 ; 30 ~ 70% (ただし、被験物質の湿度センサーへの付着により、正常な測定ができないため、投与群の湿度は暴露中及び暴露終了後 1 時間まで測定しなかった。)
明暗サイクル	: 12 時間点灯(8:00 ~ 20:00) / 12 時間消灯(20:00 ~ 8:00)
換気回数	: 検疫室 ; 15 ~ 17 回 / 時 吸入試験室 ; 7 ~ 9 回 / 時 吸入チャンバー内 ; 12 ± 1 回 / 時
圧 力	: 吸入チャンバー内 ; 0 ~ - 15×10 Pa
ケージへの動物の収容方法	: 個別飼育
ケージの材質・形状・寸法等	: 検疫期間 ; ステンレス製 2 連網ケージ (112(W) × 212(D) × 120(H) mm/匹) 馴化・投与期間 ; ステンレス製 5 連網ケージ (100(W) × 116(D) × 120(H) mm/匹)

(2) 飼料

飼料は、全飼育期間を通して、オリエンタル酵母工業(株)製造の CRF-1 固型 (30kGy-線照射滅菌飼料) を固型飼料給餌器により自由摂取させた。ただし、暴露中及び定期解剖前日 (投与最終日) の夕方からは絶食させた。

試験に使用した飼料中の栄養成分と夾雑物については、オリエンタル酵母工業(株)の分析データを入手し、保管した。

(3) 飲水

飲水は、全飼育期間を通して、市水（神奈川県秦野市水道局供給）をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水ノズルから自由摂取させた。ただし、暴露中は絶水させた。

飲水の水質は、動物試験施設として定期的（年 2 回）に実施している水道水の検査において、水道法に定められている水質基準に適合していることを確認した。

- 3 観察・検査項目及び方法

- 3 - 1 動物の生死及び一般状態の観察

全動物について、暴露日は吸入暴露前後に、非暴露日は 1 日 1 回、生死及び一般状態を観察した。

- 3 - 2 体重測定

週 1 回、全動物について、吸入暴露前の体重を測定した。定期解剖日には絶食後の体重（搬出時体重）を測定した。

- 3 - 3 摂餌量測定

週 1 回、全動物について、給餌量及び残餌量を測定し、1 日当たりの摂餌量を算出した。

- 3 - 4 尿検査

投与 4 週目に生存する動物のうち自然排尿した動物の新鮮尿について、尿試験紙（ウロラプスティックス、シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス社）を用いて、下記の項目について検査を行った。

検査項目：pH、蛋白、グルコース、ケトン体、潜血、ウロビリノーゲン

- 3 - 5 血液学的検査

定期解剖時に生存している全動物について、剖検直前にイソフルラン麻酔下で腹大動脈より EDTA-2 カリウム入り採血管及びヘパリンリチウム入り採血管（下記*印検査項目）に採血した。EDTA-2 カリウム入り採血管の血液は全血を用いて、ヘパリンリチウム入り採血管の血液は遠心分離して得られた赤血球を用いて下記の項目について検査を行った。検査方法は APPENDIX 3 に示す。なお、下記*印検査項目については定期解剖日 1 日目のみ検査を行った。

検査項目：赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、血小板数、網赤血球比、白血球数、白血球分類、*メトヘモグロビン濃度

- 3 - 6 血液生化学的検査

定期解剖日 2 日目に生存している全動物について、剖検直前にイソフルラン麻酔下で腹大動脈よりヘパリンリチウム入り採血管に採血した血液を遠心分離し、得られた血漿を用いて、下記の項目について検査を行った。検査方法は APPENDIX 3 に示す。

検査項目：総蛋白、アルブミン、A/G 比、総ビリルビン、グルコース、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、AST、ALT、LDH、ALP、 γ -GTP、CK、尿素窒素、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン

- 3 - 7 病理学的検査

(1) 肉眼的観察

全動物について肉眼的に観察を行った。なお、定期解剖動物はイソフルラン麻酔下で採血後、腹大動脈を切断、放血することで安楽死させた。

(2) 臓器重量

定期解剖時の生存動物について、下記に示した臓器の湿重量（臓器実重量）を測定した。また、各臓器の湿重量の搬出時体重に対する百分率（臓器重量体重比）を算出した。

測定臓器：胸腺、副腎、精巣、卵巣、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳

(3) 病理組織学的検査

全動物について下記に示した器官、組織を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。固定後、器官、組織を切り出し、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡で病理組織学的に検査した。

皮膚、鼻腔（3箇所を横断）、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髓（大腿骨）、リンパ節（腋窩、鼠径等）、胸腺、脾臓、心臓、舌、唾液腺、食道、胃、小腸（十二指腸を含む）、大腸、肝臓、胆嚢、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺、卵巣、子宮、膣、乳腺、脳、脊髄、末梢神経（坐骨神経）、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨（胸骨、大腿骨）、肉眼的に変化のみられた器官及び組織

- 4 数値処理と統計方法

- 4 - 1 数値の取り扱いと表示

各数値データは測定機器の精度に合わせて表示した。

吸入チャンバー内の被験物質濃度は ppm を単位として、小数点以下第 2 位まで測定し、小数点以下第 2 位を四捨五入して小数点以下第 1 位までを表示した。

体重は g を単位とし、小数点以下第 1 位まで測定し、表示した。

摂餌量は g を単位とし、給餌量及び残餌量を小数点以下第 1 位まで測定し、給餌量値から残餌量値を減じて摂餌量とした。この値を測定期間の日数で除し、1 日当たりの平均摂餌量を算出し、小数点以下第 2 位を四捨五入して小数点以下第 1 位までを表示した。

臓器実重量は g を単位とし、小数点以下第 3 位まで測定し、表示した。臓器重量体重比は臓器実重量値を搬出時体重で除し、パーセント単位で小数点以下第 4 位を四捨五入し、小数点以下第 3 位までを表示した。

血液学的検査、血液生化学的検査は APPENDIX 3 に示した単位と桁数により表示した。

なお、各数値データの平均値及び標準偏差は、上記に示した桁数と同様になるよう四捨五入を行い表示した。

- 4 - 2 統計処理

各群の有効動物数は、供試動物より事故等の理由で外された動物数を減じた動物数とした。

病理組織学的検査は、臓器ごとに検査不能臓器を除いた臓器数、その他の検査及び測定は、実施できた動物数を検査（測定）数とした。

体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査及び臓器重量の測定値は、まず F 検定を行い、等分散の場合は、Student の t 検定を、また、分散の等しくない場合には Aspin-Welch の t 検定を行った。

病理組織学的検査の非腫瘍性病変は、所見のみられなかった動物をグレード 0、所見のみられた動物は、その所見の程度及び範囲などを基準にしてグレード 1~4 に分け、² 検定を行った。また、尿検査についても対照群と各投与群間との² 検定を行った。

各検定は 5% の有意水準で両側検定を行い、検定結果を表示する場合には 5% 及び 1% の有意水準の表示を行った。

試験成績

- 1 生死状況

生死状況を TABLE B 1, 2 に示す。

- 雌雄 -

動物の死亡はみられなかった。

- 2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE C 1, 2 に示す。

- 雄 -

40 ppm 群の全匹に自発運動量減少と不整呼吸が投与開始日と2日目の暴露終了後にみられた。また、不整呼吸は3日目にも2匹にみられた。

- 雌 -

40 ppm 群の全匹に自発運動量減少と不整呼吸が投与開始日と2日目の暴露終了後にみられた。また、眼脂が投与開始日の暴露終了後に3匹にみられ、不整呼吸が3日目の観察時に1匹にみられた。

- 3 体重

体重の推移を TABLE D 1~4 及び FIGURE 1, 2 に示す。

- 雄 -

40 ppm 群は1週目と4週目に体重増加の抑制がみられた。

投与群の最終体重は対照群に対し、5 ppm 群：102 %、10 ppm 群：100 %、20 ppm 群：100 %、40 ppm 群：96 %であった。

- 雌 -

対照群と比較して差はみられなかった。

投与群の最終体重は対照群に対し、5 ppm 群：100 %、10 ppm 群：100 %、20 ppm 群：98 %、40 ppm 群：97 %であった。

- 4 摂餌量

摂餌量を TABLE E 1~4 及び FIGURE 3, 4 に示す。

- 雄 -

40 ppm 群は1週目と4週目は対照群より低値であったが、2週目は高値であった。また、

5 ppm 群でも 1 週目に低値がみられた。

4 週間の平均摂餌量は、対照群：3.7 g、5 ppm 群：3.6 g、10 ppm 群：3.6 g、20 ppm 群：3.6 g、40 ppm 群：3.6 g であった。

- 雌 -

40 ppm 群は対照群と比較して 1 週目は低値、2 週目は高値であった。20 ppm 群は 4 週目に低値がみられた。

4 週間の平均摂餌量は、対照群：3.4 g、5 ppm 群：3.3 g、10 ppm 群：3.4 g、20 ppm 群：3.3 g、40 ppm 群：3.2 g であった。

- 5 尿検査

尿検査の結果を TABLE F 1, 2 に示す。

- 雌雄 -

投与の影響はみられなかった。

- 6 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE G 1, 2 に示す。

- 雄 -

白血球分類で好中球比の低値が 20 ppm 群でみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

- 雌 -

赤血球数の高値が 10 ppm 群と 40 ppm 群で、ヘモグロビン濃度の高値が 20 ppm 以上の群でみられた。

その他、血小板数の高値が 10 ppm 群、白血球分類で単球比の低値が 5 ppm 群でみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

- 7 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE H 1, 2 に示した。

- 雄 -

トリグリセライドの高値が 20 ppm 群でみられた。また、40 ppm 群でも統計的に有意ではなかったが高値を示した。

その他、5 ppm 群で ALP の低値と γ -GTP の高値、10 ppm 群で AST、LDH 及び ALP の高値がみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。また、アルブミンの低値が 20 ppm 群でみられたが僅かな変化であった。

- 雌 -

トリグリセライドの高値が 20 ppm 以上の群でみられた。

その他、総コレステロールの高値が 10 ppm 群にみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

- 8 病理学的検査

- 8 - 1 肉眼的観察

定期解剖時の肉眼的所見を TABLE I 1, 2 に示す。

- 雌雄 -

被験物質の影響と思われる所見はみられなかった。

- 8 - 2 臓器重量

定期解剖時に測定した臓器の実重量と体重比を TABLE J 1, 2 と TABLE K 1, 2 に示す。

- 雄 -

肺の実重量と体重値の高値が 40 ppm 群でみられた。

その他、精巣の実重量の高値が 10 ppm 群、脾臓の体重比の高値が 10 ppm 群でみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。また、精巣の体重比の高値が 40 ppm 群でみられたが、搬出時体重が対照群と比較してやや低値であり、明確な差ではなかった。

- 雌 -

肺の実重量と体重比の高値が 20 ppm 以上の群でみられた。また、脳の実重量の低値が 40 ppm 群でみられた。

- 8 - 3 病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を TABLE L 1, 2 に示す。

- 雄 -

被験物質の影響は鼻腔及び肺にみられた。

[40 ppm 群]

鼻腔では、滲出液（軽度）が 10 匹、呼吸上皮のエオジン好性変化（軽度）が 9 匹、固有層にみられる腺の呼吸上皮化生（軽度）が 4 匹に認められた。

肺では、炎症（軽度）が 7 匹に認められた。

胃では、前胃の過形成（軽度）が 3 匹に認められた。

[20 ppm 群]

鼻腔では、呼吸上皮のエオジン好性変化（軽度）が 9 匹、固有層にみられる腺の呼吸上皮化生（軽度）が 1 匹に認められた。

[10 ppm 群]

鼻腔では、呼吸上皮のエオジン好性変化（軽度）が 2 匹、固有層にみられる腺の呼吸上皮化生（軽度）が 1 匹に認められた。

[5 ppm 群]

鼻腔では、呼吸上皮のエオジン好性変化（軽度）が 2 匹、固有層にみられる腺の呼吸上皮化生（軽度）が 1 匹に認められた。

- 雌 -

被験物質の影響は鼻腔及び肺にみられた。

[40 ppm 群]

鼻腔では、滲出液（軽度）が 10 匹、呼吸上皮のエオジン好性変化（軽度）が 10 匹、固有層にみられる腺の呼吸上皮化生（軽度）が 6 匹、嗅上皮の壊死（軽度）が 1 匹に認められた。

肺では、炎症（軽度）が 9 匹に認められた。

[20 ppm 群]

鼻腔では、呼吸上皮のエオジン好性変化（軽度）が 8 匹、固有層にみられる腺の呼吸上皮化生（軽度）が 2 匹、嗅上皮の壊死（軽度）が 1 匹に認められた。

[10 ppm 群]

鼻腔では、呼吸上皮のエオジン好性変化（軽度）が 2 匹、固有層にみられる腺の呼吸上皮化生（軽度）が 1 匹、嗅上皮の壊死（軽度）が 1 匹に認められた。

[5 ppm 群]

鼻腔では、呼吸上皮のエオジン好性変化（軽度）が 2 匹、固有層にみられる腺の呼吸上皮化生（軽度）が 1 匹に認められた。

考察及びまとめ

二酸化窒素のがん原性を検索する目的で、遺伝子改変マウス(p53 ヘテロ欠損 C57BL/6J マウス)を用いた吸入による中期がん原性試験を実施するに当たり、その投与濃度を決定するための予備試験として、野生型 C57BL/6J マウスを用いて本試験(4週間試験)を実施した。

本試験は、投与群4群、対照群1群の計5群(各群雌雄各10匹)を設け、二酸化窒素の投与濃度は、雌雄とも0(対照群)、5、10、20及び40 ppm(v/v)とした。投与期間は1日6時間、1週5日間の投与(全身暴露による経気道投与)で4週間とした。投与期間中、生死及び一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、尿検査を行い、投与期間終了後、動物を解剖し、血液学的検査、血液生化学的検査、解剖時の肉眼的観察、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

- 1 用量 - 反応関係

二酸化窒素の暴露の結果、いずれの投与群にも動物の死亡はみられなかった。

40 ppm 群では、一般状態の観察で雌雄に自発運動量減少が暴露開始後2日目まで、不整呼吸が3日目までみられた。体重は、雄でのみ増加の抑制が暴露開始後1週目と4週目に認められ、摂餌量も1週目と4週目は低値であった。雄の最終体重は対照群に対し96%であった。雌の摂餌量は1週目では低値、2週目では高値であったが、動物の体重には影響しなかった。血液学的検査では、雌で赤血球数とヘモグロビン濃度の高値がみられ、造血傾向を示したが、病理組織学的検査では血液への影響を示す変化は認められなかった。血液生化学的検査では、トリグリセライドの高値が雌雄でみられたが、他の脂質関連のパラメーターに変化は認められなかった。臓器重量では、雌雄の肺の実重量と体重比の高値がみられた。また、雌で脳の実重量の低値がみられたが、病理組織学的検査では脳に投与の影響はみられなかった。病理組織学的検査では、鼻腔と肺に変化がみられた。鼻腔では、雌雄とも鼻腔内に滲出液がみられ、エオジン好性変化(呼吸上皮)と腺(固有層)の呼吸上皮化生がみられた。雌では、嗅上皮の壊死が1匹認められた。肺では、雌雄に炎症がみられた。

20 ppm 群では、血液学的検査で雌にヘモグロビン濃度の高値がみられた。血液生化学的検査では、40 ppm 群と同様にトリグリセライドの高値が雌雄でみられた。臓器重量では、雌の肺の実重量と体重比の高値がみられた。病理組織学的検査では、鼻腔に変化がみられ、雌雄ともエオジン好性変化(呼吸上皮)と発生数は減少したものの腺(固有層)の呼吸上皮化生がみられた。雌では、嗅上皮の壊死が1匹認められた。

10 ppm 群では、病理組織学的検査では発生数は少ないが、鼻腔に雌雄ともエオジン好性変化(呼吸上皮)と腺(固有層)の呼吸上皮化生がみられた。雌では、嗅上皮の壊死が

1 匹認められた。

5 ppm 群では、雌の摂餌量は、4 週目は低値であったが、動物の体重には影響しなかった。病理組織学的検査では発生数は少ないが、鼻腔に雌雄ともエオジン好性変化（呼吸上皮）と腺（固有層）の呼吸上皮化生がみられた。

二酸化窒素の暴露により、雌雄の 10 ppm、20 ppm 及び 40 ppm 群には鼻腔及び肺に用量依存的な毒性発現がみられた。また、5 ppm 群でみられた病変も投与による影響と考えたが、その程度は雌雄とも 10 ppm 群と同等であり投与濃度による差は認められなかった。

なお、本試験でみられた病理組織学的検査所見の程度はすべてが軽度であった。

- 2 中期がん原性試験の濃度設定

本試験の結果より、中期がん原性試験の投与濃度を以下のように設定した。

本試験では、動物の死亡は認められなかった。一般状態、体重及び摂餌量は 40 ppm 群で影響がみられた。一般状態の観察では、暴露開始日と 2 日目の暴露後の観察で雌雄全匹に自発運動量の減少と不整呼吸がみられた。体重は雄で 1 週目と 4 週目に低値がみられ、摂餌量も 1 週目と 4 週目に低値がみられた。臓器重量では、肺重量の高値が雌の 20 ppm 以上の群と雄の 40 ppm 群にみられた。病理組織学的検査では、鼻腔と肺に影響がみられ、鼻腔では、滲出液が 40 ppm 群の雌雄に、呼吸上皮のエオジン好性変化と固有層にみられる腺の呼吸上皮化生が全ての投与群の雌雄にみられた。肺では、炎症が 40 ppm 群の雌雄にみられた。病理組織学的検査でみられた所見の程度はいずれも軽度であった。

以上のように、C57BL/6J マウスに二酸化窒素を 4 週間吸入暴露した結果、一般状態、体重、摂餌量、肺重量及び病理組織学的検査結果に影響が認められた。しかし、毒性の程度はいずれも重篤なものではなく、40 ppm の濃度で 26 週間に亘って動物に暴露しても、毒性兆候は示されるものの死亡を増加させることはないと考えられた。従って、中期がん原性試験の投与濃度は 4 週間の予備試験と同じく 40 ppm を最高濃度とし、以下 20 ppm 及び 10 ppm を設定した。

文献

- 1) International Programme on Chemical Safety. 2013. ICSC: 0930. NITROGEN DIOXIDE. International Chemical Safety Cards . Available: <http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0930.htm> [accessed 2017/05/22]
- 2) McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY: John Wiley and Sons.
- 3) Robinson DE, MacDonald JS. 2001. Background and framework for ILSI's collaborative evaluation program on alternative models for carcinogenicity assessment. Toxicol Pathol 29 (Suppl) : 13-19.
- 4) 「遺伝子改変動物を用いたがん原性試験による調査の基準」 2017. 平成 28 年度第 3 回発がん性評価グループ (平成 29 年 3 月 1 日) 資料.
- 5) OECD. 2009. OECD Guidelines for The Testing of Chemicals 412: Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study Paris: Adapted: 7 September 2009. Organisation for Economic Co-operation and Development.
- 6) 阿部正信. 1986. 長期毒性試験に用いるラット、マウスの体重変化の解析による群分けの適正層別方式の確立. 薬理と治療 14: 7285-7302.

予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたこと

予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたことはなかつた。

二酸化窒素の C57BL/6J マウスを用いた吸入による
4 週間毒性試験（中期がん原性試験予備試験）報告書

試験番号：0893

TABLES

TABLES

TABLE A	CONCENTRATIONS OF NITROGEN DIOXIDE IN THE INHALATIONCHAMBER OF THE 4-WEEK INHALATION STUDY
TABLE B 1	SURVIVAL ANIMAL NUMBERS: MALE
TABLE B 2	SURVIVAL ANIMAL NUMBERS: FEMALE
TABLE C 1	CLINICAL OBSERVATION: MALE
TABLE C 2	CLINICAL OBSERVATION: FEMALE
TABLE D 1	BODY WEIGHT CHANGES AND SURVIVAL ANIMAL NUMBERS : MALE
TABLE D 2	BODY WEIGHT CHANGES AND SURVIVAL ANIMAL NUMBERS : FEMALE
TABLE D 3	BODY WEIGHT CHANGES: MALE
TABLE D 4	BODY WEIGHT CHANGES: FEMALE
TABLE E 1	FOOD CONSUMPTION CHANGES AND SURVIVAL ANIMAL NUMBERS: MALE
TABLE E 2	FOOD CONSUMPTION CHANGES AND SURVIVAL ANIMAL NUMBERS: FEMALE
TABLE E 3	FOOD CONSUMPTION CHANGES: MALE
TABLE E 4	FOOD CONSUMPTION CHANGES: FEMALE
TABLE F 1	URINALYSIS: MALE
TABLE F 2	URINALYSIS: FEMALE
TABLE G 1	HEMATOLOGY: MALE
TABLE G 2	HEMATOLOGY: FEMALE

TABLES (CONTINUED)

TABLE H 1 BIOCHEMISTRY: MALE

TABLE H 2 BIOCHEMISTRY: FEMALE

TABLE I 1 GROSS FINDINGS: MALE

TABLE I 2 GROSS FINDINGS: FEMALE

TABLE J 1 ORGAN WEIGHT, ABSOLUTE: MALE

TABLE J 2 ORGAN WEIGHT, ABSOLUTE: FEMALE

TABLE K 1 ORGAN WEIGHT, RELATIVE: MALE

TABLE K 2 ORGAN WEIGHT, RELATIVE: FEMALE

TABLE L 1 HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS
: MALE

TABLE L 2 HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS: NON-NEOPLASTIC LESIONS
: FEMALE

TABLE A

**CONCENTRATIONS OF NITROGEN DIOXIDE
IN THE INHALATION CHAMBER
OF THE 4-WEEK INHALATION STUDY**

CONCENTRATIONS OF NITROGEN DIOXIDE IN THE INHALATION
CHAMBER OF THE 4-WEEK INHALATION STUDY

Group Name	Concentration(ppm) Mean \pm S.D.
Control	0.0 \pm 0.0
5 ppm	5.0 \pm 0.1
10 ppm	10.3 \pm 0.3
20 ppm	20.2 \pm 0.3
40 ppm	40.2 \pm 0.4

TABLE B1

SURVIVAL ANIMAL NUMBERS : MALE

STUDY NO. : 0893
ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
REPORT TYPE : A1 4
SEX : MALE

SURVIVAL ANIMAL NUMBERS

Group Name	Animals At start	Administration (Weeks)				
		0	1	2	3	4
Control	10	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0
5 ppm	10	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0
10 ppm	10	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0
20 ppm	10	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0
40 ppm	10	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0

Number of survival/ Number of effective animals
Survival rate (%)

TABLE B2

SURVIVAL ANIMAL NUMBERS : FEMALE

STUDY NO. : 0893
ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
REPORT TYPE : A1 4
SEX : FEMALE

SURVIVAL ANIMAL NUMBERS

PAGE : 2

Group Name	Animals At start	Administration (Weeks)				
		0	1	2	3	4
Control	10	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0
5 ppm	10	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0
10 ppm	10	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0
20 ppm	10	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0
40 ppm	10	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0	10/10 100.0

Number of survival/ Number of effective animals
Survival rate(%)

(HAN360)

BAIS5

TABLE C1

CLINICAL OBSERVATION : MALE

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 REPORT TYPE : A1 5

CLINICAL OBSERVATION (SUMMARY)
 ALL ANIMALS

SEX : MALE

PAGE : 1

Clinical sign	Group Name	Administration Week-day													
		1-1 1	1-1 2	1-2 1	1-2 2	1-3 1	1-4 1	1-5 1	1-5 2	1-6 1	1-6 2	1-7 1	1-7 2	2-1 1	2-1 2
LOCOMOTOR MOVEMENT DECR	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40 ppm	0	10	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IRREGULAR BREATHING	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40 ppm	0	10	0	10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NON REMARKABLE	Control	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	5 ppm	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	10 ppm	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	20 ppm	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	40 ppm	10	0	10	0	8	10	10	10	10	10	10	10	10	10

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 REPORT TYPE : A1 5

CLINICAL OBSERVATION (SUMMARY)
 ALL ANIMALS

SEX : MALE

PAGE : 2

Clinical sign	Group Name	Administration Week-day													
		2-2 1	2-2 2	2-3 1	2-4 1	2-5 1	2-5 2	2-6 1	2-6 2	2-7 1	2-7 2	3-1 1	3-1 2	3-2 1	3-2 2
LOCOMOTOR MOVEMENT DECR	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IRREGULAR BREATHING	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NON REMARKABLE	Control	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	5 ppm	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	10 ppm	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	20 ppm	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	40 ppm	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 REPORT TYPE : A1 5

CLINICAL OBSERVATION (SUMMARY)
 ALL ANIMALS

SEX : MALE

PAGE : 3

Clinical sign	Group Name	Administration Week-day													
		3-3	3-4	3-5	3-5	3-6	3-6	3-7	3-7	4-1	4-1	4-2	4-2	4-3	4-4
		1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1
LOCOMOTOR MOVEMENT DECR	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IRREGULAR BREATHING	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NON REMARKABLE	Control	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	5 ppm	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	10 ppm	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	20 ppm	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	40 ppm	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 REPORT TYPE : A1 5

CLINICAL OBSERVATION (SUMMARY)
 ALL ANIMALS

SEX : MALE

PAGE : 4

Clinical sign	Group Name	Administration Week-day							
		4-5 1	4-5 2	4-6 1	4-6 2	4-7 1	4-7 2	5-1 1	5-1 2
LOCOMOTOR MOVEMENT DECR	Control	0	0	0	0	0	0	0	0
	5 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0
	40 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0
IRREGULAR BREATHING	Control	0	0	0	0	0	0	0	0
	5 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0
	40 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0
NON REMARKABLE	Control	10	10	10	10	10	10	10	5
	5 ppm	10	10	10	10	10	10	10	5
	10 ppm	10	10	10	10	10	10	10	5
	20 ppm	10	10	10	10	10	10	10	5
	40 ppm	10	10	10	10	10	10	10	5

(HAN190)

BAIS 5

TABLE C2

CLINICAL OBSERVATION : FEMALE

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 REPORT TYPE : A1 5

CLINICAL OBSERVATION (SUMMARY)
 ALL ANIMALS

SEX : FEMALE

PAGE : 5

Clinical sign	Group Name	Administration Week-day													
		1-1 1	1-1 2	1-2 1	1-2 2	1-3 1	1-4 1	1-5 1	1-5 2	1-6 1	1-6 2	1-7 1	1-7 2	2-1 1	2-1 2
LOCOMOTOR MOVEMENT DECR	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40 ppm	0	10	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GUM	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40 ppm	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IRREGULAR BREATHING	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40 ppm	0	10	0	10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NON REMARKABLE	Control	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	5 ppm	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	10 ppm	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	20 ppm	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	40 ppm	10	0	10	0	9	10	10	10	10	10	10	10	10	10

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 REPORT TYPE : A1 5

CLINICAL OBSERVATION (SUMMARY)
 ALL ANIMALS

SEX : FEMALE

PAGE : 6

Clinical sign	Group Name	Administration Week-day													
		2-2 1	2-2 2	2-3 1	2-4 1	2-5 1	2-5 2	2-6 1	2-6 2	2-7 1	2-7 2	3-1 1	3-1 2	3-2 1	3-2 2
LOCOMOTOR MOVEMENT DECR	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GUM	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IRREGULAR BREATHING	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NON REMARKABLE	Control	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	5 ppm	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	10 ppm	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	20 ppm	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	40 ppm	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 REPORT TYPE : A1 5

CLINICAL OBSERVATION (SUMMARY)
 ALL ANIMALS

SEX : FEMALE

PAGE : 7

Clinical sign	Group Name	Administration Week-day													
		3-3 1	3-4 1	3-5 1	3-5 2	3-6 1	3-6 2	3-7 1	3-7 2	4-1 1	4-1 2	4-2 1	4-2 2	4-3 1	4-4 1
LOCOMOTOR MOVEMENT DECR	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GUM	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IRREGULAR BREATHING	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	40 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NON REMARKABLE	Control	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	5 ppm	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	10 ppm	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	20 ppm	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	40 ppm	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 REPORT TYPE : AT 5

CLINICAL OBSERVATION (SUMMARY)
 ALL ANIMALS

SEX : FEMALE

PAGE : 8

Clinical sign	Group Name	Administration Week-day							
		4-5 1	4-5 2	4-6 1	4-6 2	4-7 1	4-7 2	5-1 1	5-1 2
LOCOMOTOR MOVEMENT DECR	Control	0	0	0	0	0	0	0	0
	5 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0
	40 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0
GUM	Control	0	0	0	0	0	0	0	0
	5 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0
	40 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0
IRREGULAR BREATHING	Control	0	0	0	0	0	0	0	0
	5 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0
	40 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0
NON REMARKABLE	Control	10	10	10	10	10	10	10	5
	5 ppm	10	10	10	10	10	10	10	5
	10 ppm	10	10	10	10	10	10	10	5
	20 ppm	10	10	10	10	10	10	10	5
	40 ppm	10	10	10	10	10	10	10	5

TABLE D1

**BODY WEIGHT CHANGES AND SURVIVAL ANIMAL
NUMBERS : MALE**

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 UNIT : g
 REPORT TYPE : A1 4
 SEX : MALE

MEAN BODY WEIGHTS AND SURVIVAL

Week-Day on Study	Control		5 ppm			10 ppm			20 ppm			40 ppm		
	Av. Wt.	No. of Surviv. <10>	Av. Wt.	% of cont. <10>	No. of Surviv.	Av. Wt.	% of cont. <10>	No. of Surviv.	Av. Wt.	% of cont. <10>	No. of Surviv.	Av. Wt.	% of cont. <10>	No. of Surviv.
0-0	23.3 (10)	10/10	23.3 (10)	100	10/10	23.2 (10)	100	10/10	23.2 (10)	100	10/10	23.2 (10)	100	10/10
1-7	24.6 (10)	10/10	24.5 (10)	100	10/10	24.2 (10)	98	10/10	24.1 (10)	98	10/10	23.2 (10)	94	10/10
2-7	24.7 (10)	10/10	25.1 (10)	102	10/10	24.6 (10)	100	10/10	24.9 (10)	101	10/10	24.0 (10)	97	10/10
3-7	25.1 (10)	10/10	25.6 (10)	102	10/10	25.2 (10)	100	10/10	25.4 (10)	101	10/10	24.8 (10)	99	10/10
4-7	26.9 (10)	10/10	27.4 (10)	102	10/10	26.9 (10)	100	10/10	26.9 (10)	100	10/10	25.7 (10)	96	10/10

< >:No. of effective animals, () :No. of measured animals Av. Wt. :g

TABLE D2

**BODY WEIGHT CHANGES AND SURVIVAL ANIMAL
NUMBERS : FEMALE**

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 UNIT : g
 REPORT TYPE : A1 4
 SEX : FEMALE

MEAN BODY WEIGHTS AND SURVIVAL

Week-Day on Study	Control		5 ppm			10 ppm			20 ppm			40 ppm		
	Av. Wt.	No. of Surviv. <10>	Av. Wt.	% of cont. <10>	No. of Surviv.	Av. Wt.	% of cont. <10>	No. of Surviv.	Av. Wt.	% of cont. <10>	No. of Surviv.	Av. Wt.	% of cont. <10>	No. of Surviv.
0-0	19.3 (10)	10/10	19.2 (10)	99	10/10	19.2 (10)	99	10/10	19.3 (10)	100	10/10	19.2 (10)	99	10/10
1-7	20.5 (10)	10/10	20.8 (10)	101	10/10	20.3 (10)	99	10/10	20.5 (10)	100	10/10	19.6 (10)	96	10/10
2-7	20.7 (10)	10/10	21.0 (10)	101	10/10	20.9 (10)	101	10/10	20.7 (10)	100	10/10	20.5 (10)	99	10/10
3-7	21.1 (10)	10/10	21.1 (10)	100	10/10	21.4 (10)	101	10/10	21.0 (10)	100	10/10	20.8 (10)	99	10/10
4-7	22.7 (10)	10/10	22.7 (10)	100	10/10	22.6 (10)	100	10/10	22.2 (10)	98	10/10	22.1 (10)	97	10/10

< >:No. of effective animals. () :No. of measured animals Av. Wt. : g

TABLE D3

BODY WEIGHT CHANGES : MALE

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 UNIT : g
 REPORT TYPE : A1 4
 SEX : MALE

BODY WEIGHT CHANGES (SUMMARY)
 ALL ANIMALS

Group Name	Administration week-day				
	0-0	1-7	2-7	3-7	4-7
Control	23.3± 0.9	24.6± 0.9	24.7± 0.9	25.1± 0.9	26.9± 1.0
5 ppm	23.3± 1.0	24.5± 1.1	25.1± 1.2	25.6± 1.1	27.4± 1.0
10 ppm	23.2± 1.1	24.2± 1.2	24.6± 1.2	25.2± 1.4	26.9± 1.3
20 ppm	23.2± 1.0	24.1± 1.0	24.9± 0.9	25.4± 0.9	26.9± 1.1
40 ppm	23.2± 1.1	23.2± 1.1**	24.0± 1.0	24.8± 1.0	25.7± 0.9**

Significant difference ; * : $P \leq 0.05$ ** : $P \leq 0.01$ Test of t

TABLE D4

BODY WEIGHT CHANGES : FEMALE

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 UNIT : g
 REPORT TYPE : A1 4
 SEX : FEMALE

BODY WEIGHT CHANGES (SUMMARY)
 ALL ANIMALS

Group Name	Administration week-day				
	0-0	1-7	2-7	3-7	4-7
Control	19.3 ± 1.2	20.5 ± 1.4	20.7 ± 1.4	21.1 ± 1.1	22.7 ± 1.5
5 ppm	19.2 ± 1.3	20.8 ± 1.4	21.0 ± 1.4	21.1 ± 1.0	22.7 ± 1.4
10 ppm	19.2 ± 1.2	20.3 ± 0.9	20.9 ± 1.4	21.4 ± 1.2	22.6 ± 1.2
20 ppm	19.3 ± 1.2	20.5 ± 1.2	20.7 ± 1.1	21.0 ± 1.5	22.2 ± 1.4
40 ppm	19.2 ± 1.3	19.6 ± 1.2	20.5 ± 1.4	20.8 ± 1.2	22.1 ± 1.1

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

Test of t

TABLE E1

**FOOD CONSUMPTION CHANGES AND SURVIVAL ANIMAL
NUMBERS : MALE**

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 UNIT : g
 REPORT TYPE : A1 4
 SEX : MALE

MEAN FOOD CONSUMPTION (FC) AND SURVIVAL

Week-Day on Study	Control		5 ppm			10 ppm			20 ppm			40 ppm		
	Av. FC	No. of Surviv. <10>	Av. FC	% of cont. <10>	No. of Surviv.	Av. FC	% of cont. <10>	No. of Surviv.	Av. FC	% of cont. <10>	No. of Surviv.	Av. FC	% of cont. <10>	No. of Surviv.
1-7	3.8 (10)	10/10	3.6 (10)	95	10/10	3.8 (10)	100	10/10	3.7 (10)	97	10/10	3.0 (10)	79	10/10
2-7	3.5 (10)	10/10	3.5 (10)	100	10/10	3.5 (10)	100	10/10	3.6 (10)	103	10/10	4.0 (10)	114	10/10
3-7	3.5 (10)	10/10	3.6 (10)	103	10/10	3.6 (10)	103	10/10	3.6 (10)	103	10/10	3.6 (10)	103	10/10
4-7	3.9 (10)	10/10	3.8 (10)	97	10/10	3.7 (10)	95	10/10	3.7 (10)	95	10/10	3.6 (10)	92	10/10

< >:No. of effective animals, ():No. of measured animals Av. FC : g

TABLE E2

**FOOD CONSUMPTION CHANGES AND SURVIVAL ANIMAL
NUMBERS : FEMALE**

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 UNIT : g
 REPORT TYPE : A1 4
 SEX : FEMALE

MEAN FOOD CONSUMPTION (FC) AND SURVIVAL

Week-Day on Study	Control		5 ppm			10 ppm			20 ppm			40 ppm		
	Av. FC.	No. of Surviv. <10>	Av. FC.	% of cont. <10>	No. of Surviv.	Av. FC.	% of cont. <10>	No. of Surviv.	Av. FC.	% of cont. <10>	No. of Surviv.	Av. FC.	% of cont. <10>	No. of Surviv.
1-7	3.4 (10)	10/10	3.6 (10)	106	10/10	3.5 (10)	103	10/10	3.6 (10)	106	10/10	2.4 (10)	71	10/10
2-7	3.1 (10)	10/10	3.1 (10)	100	10/10	3.3 (10)	106	10/10	3.3 (10)	106	10/10	3.9 (10)	126	10/10
3-7	3.3 (10)	10/10	3.2 (10)	97	10/10	3.3 (10)	100	10/10	3.2 (10)	97	10/10	3.3 (10)	100	10/10
4-7	3.6 (10)	10/10	3.5 (10)	97	10/10	3.4 (10)	94	10/10	3.4 (10)	94	10/10	3.4 (10)	94	10/10

< >:No. of effective animals, ():No. of measured animals Av. FC. : g

TABLE E3

FOOD CONSUMPTION CHANGES : MALE

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 UNIT : g
 REPORT TYPE : A1 4
 SEX : MALE

FOOD CONSUMPTION CHANGES (SUMMARY)
 ALL ANIMALS

Group Name	Administration week-day (effective)			
	1-7 (7)	2-7 (7)	3-7 (7)	4-7 (7)
Control	3.8 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.5 ± 0.1	3.9 ± 0.2
5 ppm	3.6 ± 0.1**	3.5 ± 0.2	3.6 ± 0.2	3.8 ± 0.2
10 ppm	3.8 ± 0.3	3.5 ± 0.3	3.6 ± 0.2	3.7 ± 0.3
20 ppm	3.7 ± 0.2	3.6 ± 0.2	3.6 ± 0.2	3.7 ± 0.2
40 ppm	3.0 ± 0.3**	4.0 ± 0.3**	3.6 ± 0.2	3.6 ± 0.2*

Significant difference ; * : $P \leq 0.05$ ** : $P \leq 0.01$

Test of t

TABLE E4

FOOD CONSUMPTION CHANGES : FEMALE

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 UNIT : g
 REPORT TYPE : A1 4
 SEX : FEMALE

FOOD CONSUMPTION CHANGES (SUMMARY)
 ALL ANIMALS

Group Name	Administration week-day (effective)			
	1-7 (7)	2-7 (7)	3-7 (7)	4-7 (7)
Control	3.4± 0.2	3.1± 0.2	3.3± 0.3	3.6± 0.3
5 ppm	3.6± 0.2	3.1± 0.4	3.2± 0.2	3.5± 0.4
10 ppm	3.5± 0.2	3.3± 0.3	3.3± 0.3	3.4± 0.3
20 ppm	3.6± 0.2	3.3± 0.2	3.2± 0.2	3.4± 0.2*
40 ppm	2.4± 0.1**	3.9± 0.3**	3.3± 0.3	3.4± 0.3

Significant difference : * : $P \leq 0.05$ ** : $P \leq 0.01$ Test of t

TABLE F1

URINALYSIS : MALE

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 MEASURE TIME : 1
 SEX : MALE

URINALYSIS

REPORT TYPE : A1

PAGE : 1

Group Name	NO. of Animals	pH							CHI	Protein					CHI	Glucose					CHI	Ketone body					CHI	Occult blood				CHI					
		5.0	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5		-	±	+	2+	3+		4+	-	±	+	2+		3+	4+	-	±	+		2+	3+	4+	-		±	+	2+	3+	
Control	10	0	0	0	0	0	0	10	0	5	5	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	5	2	0	0	0	10	0	0	0	0
5 ppm	10	0	0	0	0	0	2	8	1	5	4	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	4	0	0	0	10	0	0	0	0	
10 ppm	10	0	0	0	0	0	0	10	1	8	1	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	3	0	0	0	10	0	0	0	0	
20 ppm	10	0	0	0	0	0	1	9	1	5	4	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	4	0	0	0	10	0	0	0	0	
40 ppm	10	0	0	0	0	0	1	9	0	3	7	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	6	1	0	0	10	0	0	0	0	

Significant difference ; * : P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01

Test of CHI SQUARE

(HCL101)

BAIS5

STUDY NO. : 0893
ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
MEASURE TIME : 1
SEX : MALE

URINALYSIS

REPORT TYPE : A1

PAGE : 2

Group Name	NO. of Animals	Urobilinogen				CHI
		±	+	2+	3+	
Control	10	10	0	0	0	0
5 ppm	10	10	0	0	0	0
10 ppm	10	10	0	0	0	0
20 ppm	10	10	0	0	0	0
40 ppm	10	10	0	0	0	0

Significant difference ; * : $P \leq 0.05$ ** : $P \leq 0.01$

Test of CHI SQUARE

(HCL101)

BAIS 5

TABLE F2

URINALYSIS : FEMALE

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 MEASURE TIME : 1
 SEX : FEMALE

URINALYSIS

REPORT TYPE : A1

Group Name	NO. of Animals	pH							CHI	Protein					CHI	Glucose					CHI	Ketone body					CHI	Occult blood					CHI
		5.0	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5		-	±	+	2+	3+		4+	-	±	+	2+		3+	4+	-	±	+		2+	3+	4+	-	±	
Control	9	0	0	1	1	0	3	4	3	5	1	0	0	0	9	0	0	0	0	0	4	5	0	0	0	0	9	0	0	0	0		
5 ppm	10	0	0	1	0	0	3	6	2	4	4	0	0	0	10	0	0	0	0	0	4	5	1	0	0	10	0	0	0	0			
10 ppm	10	0	1	0	2	0	3	4	0	9	1	0	0	0	10	0	0	0	0	0	3	6	1	0	0	10	0	0	0	0			
20 ppm	10	0	0	0	1	1	5	3	0	5	5	0	0	0	10	0	0	0	0	0	2	5	2	1	0	9	1	0	0	0			
40 ppm	7	0	0	1	1	1	0	4	0	6	0	1	0	0	7	0	0	0	0	0	1	5	0	0	1	7	0	0	0	0			

Significant difference : * : P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01

Test of CHI SQUARE

STUDY NO. : 0893
ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
MEASURE TIME : 1
SEX : FEMALE

URINALYSIS

REPORT TYPE : A1

PAGE : 4

Group Name	NO. of Animals	Urobilinogen				CHI
		±	+	2+	3+ 4+	
Control	9	9	0	0	0 0	
5 ppm	10	10	0	0	0 0	
10 ppm	10	10	0	0	0 0	
20 ppm	10	10	0	0	0 0	
40 ppm	7	7	0	0	0 0	

Significant difference ; * : $P \leq 0.05$ ** : $P \leq 0.01$

Test of CHI SQUARE

(HCL101)

BAIS 5

TABLE G1

HEMATOLOGY : MALE

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 MEASURE TIME : 1
 SEX : MALE

HEMATOLOGY (SUMMARY)
 ALL ANIMALS (5W)

REPORT TYPE : A1

PAGE : 1

Group Name	NO. of Animals	RED BLOOD CELL 10 ⁶ /μl		HEMOGLOBIN g/dl		HEMATOCRIT %		MCV fl		MCH pg		MCHC g/dl		PLATELET 10 ³ /μl	
Control	10	10.25±	0.29	16.0±	0.4	50.5±	1.2	49.3±	0.7	15.6±	0.1	31.6±	0.4	1308±	61
5 ppm	10	10.35±	0.37	16.1±	0.5	50.6±	1.5	48.9±	0.6	15.5±	0.2	31.7±	0.4	1307±	59
10 ppm	9	10.46±	0.18	16.3±	0.3	51.0±	1.0	48.8±	0.6	15.6±	0.2	32.0±	0.3	1268±	66
20 ppm	10	10.46±	0.29	16.3±	0.4	51.2±	1.1	49.0±	0.8	15.6±	0.2	31.8±	0.5	1274±	97
40 ppm	10	10.45±	0.19	16.2±	0.3	51.2±	1.0	49.0±	0.5	15.6±	0.1	31.7±	0.3	1244±	179

Significant difference ; * : P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01

Test of t

(HCL070)

BAIS 5

STUDY NO. : 0893
ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
MEASURE TIME : 1
SEX : MALE

HEMATOLOGY (SUMMARY)
ALL ANIMALS (5W)

REPORT TYPE : A1

PAGE : 2

Group Name	NO. of Animals	RETICULOCYTE %	METHEMOGLOBIN %
Control	10	2.7± 0.3	0.8± 0.2
5 ppm	10	2.7± 0.3	0.9± 0.1
10 ppm	9	2.6± 0.2	0.9± 0.3
20 ppm	10	2.6± 0.2	0.6± 0.2
40 ppm	10	2.6± 0.3	0.8± 0.2

Significant difference ; * : $P \leq 0.05$ ** : $P \leq 0.01$

Test of t

(HCL070)

BAIS 5

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 MEASURE TIME : 1
 SEX : MALE

HEMATOLOGY (SUMMARY)
 ALL ANIMALS (5W)

REPORT TYPE : A1

PAGE : 3

Group Name	NO. of Animals	WBC		Differential		WBC (%)		MONO		EOSINO		BASO		OTHER	
		$10^3/\mu\ell$		NEUTRO		LYMPHO									
Control	10	1.24±	0.75	13.3±	2.4	81.4±	3.7	3.6±	1.3	1.4±	0.9	0.1±	0.2	0.3±	0.3
5 ppm	10	1.44±	1.00	11.9±	3.2	83.0±	4.9	3.3±	2.5	1.2±	0.9	0.2±	0.3	0.5±	1.0
10 ppm	9	0.98±	0.57	12.7±	5.3	81.5±	6.9	3.8±	1.4	1.3±	1.3	0.1±	0.2	0.5±	0.3
20 ppm	10	1.72±	0.96	10.7±	2.3*	83.4±	3.0	4.3±	1.3	1.2±	1.3	0.1±	0.2	0.3±	0.3
40 ppm	10	1.46±	0.83	12.1±	4.5	82.9±	5.8	3.1±	1.7	1.5±	1.7	0.1±	0.2	0.3±	0.3

Significant difference ; * : $P \leq 0.05$

** : $P \leq 0.01$

Test of t

TABLE G2

HEMATOLOGY : FEMALE

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 MEASURE TIME : 1
 SEX : FEMALE

HEMATOLOGY (SUMMARY)
 ALL ANIMALS (5W)

REPORT TYPE : A1

PAGE : 4

Group Name	NO. of Animals	RED BLOOD CELL 10 ⁶ /μl		HEMOGLOBIN g/dl		HEMATOCRIT %		MCV fl		MCH pg		MCHC g/dl		PLATELET 10 ³ /μl	
Control	10	10.32±	0.17	16.2±	0.3	50.9±	1.4	49.3±	0.8	15.7±	0.1	31.9±	0.7	1103±	64
5 ppm	10	10.32±	0.40	16.3±	0.5	50.5±	1.6	49.0±	0.9	15.8±	0.3	32.2±	0.4	1113±	133
10 ppm	10	10.57±	0.30*	16.5±	0.6	51.6±	1.7	48.9±	0.4	15.6±	0.2	32.0±	0.5	1189±	54**
20 ppm	10	10.50±	0.29	16.5±	0.3*	51.7±	1.1	49.2±	1.2	15.7±	0.4	31.9±	0.6	1106±	169
40 ppm	10	10.62±	0.25**	16.7±	0.4**	52.0±	1.6	48.9±	1.0	15.7±	0.3	32.0±	0.6	1118±	114

Significant difference ; * : P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01

Test of t

(HCL070)

BAIS 5

STUDY NO. : 0893
ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
MEASURE TIME : 1
SEX : FEMALE

REPORT TYPE : A1

HEMATOLOGY (SUMMARY)
ALL ANIMALS (5W)

PAGE : 5

Group Name	NO. of Animals	RETICULOCYTE %		METHEMOGLOBIN %	
Control	10	3.2±	0.8	0.7±	0.2
5 ppm	10	3.3±	1.4	0.7±	0.3
10 ppm	10	3.0±	0.4	0.6±	0.3
20 ppm	10	3.2±	0.9	0.6±	0.2
40 ppm	10	3.0±	0.3	0.9±	0.1

Significant difference ; * : $P \leq 0.05$ ** : $P \leq 0.01$

Test of t

(HCL070)

BAIS 5

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 MEASURE TIME : 1
 SEX : FEMALE REPORT TYPE : A1

HEMATOLOGY (SUMMARY)
 ALL ANIMALS (5W)

Group Name	NO. of Animals	WBC		Differential		WBC (%)		MONO		EOSINO		BASO		OTHER	
		$10^9/\mu\ell$		NEUTRO		LYMPHO									
Control	10	1.52±	1.08	12.7±	4.1	79.9±	7.6	6.4±	4.4	0.6±	0.6	0.1±	0.1	0.5±	0.6
5 ppm	10	1.23±	0.77	11.0±	3.8	84.8±	4.5	2.8±	1.6*	1.1±	1.0	0.3±	0.4	0.1±	0.2
10 ppm	10	1.59±	1.20	10.6±	3.7	84.3±	5.7	3.6±	2.6	1.2±	0.9	0.1±	0.2	0.2±	0.2
20 ppm	10	2.47±	1.41	10.3±	2.8	85.0±	4.0	3.5±	1.9	1.0±	0.6	0.1±	0.1	0.2±	0.2
40 ppm	10	1.77±	0.94	11.1±	2.7	83.6±	4.0	3.9±	2.8	1.0±	0.7	0.1±	0.2	0.3±	0.3

Significant difference ; * : $P \leq 0.05$ ** : $P \leq 0.01$

Test of t

TABLE H1

BIOCHEMISTRY : MALE

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 MEASURE TIME : 1
 SEX : MALE

BIOCHEMISTRY (SUMMARY)
 ALL ANIMALS (5W)

REPORT TYPE : A1

PAGE : 1

Group Name	NO. of Animals	TOTAL PROTEIN g/dl		ALBUMIN g/dl		A/G RATIO		T-BILIRUBIN mg/dl		GLUCOSE mg/dl		T-CHOLESTEROL mg/dl		TRIGLYCERIDE mg/dl	
Control	5	5.5±	0.3	3.2±	0.1	1.5±	0.1	0.06±	0.01	246±	53	92±	5	25±	7
5 ppm	5	5.4±	0.1	3.2±	0.1	1.4±	0.1	0.06±	0.01	244±	25	88±	7	26±	8
10 ppm	5	5.7±	0.2	3.4±	0.2	1.4±	0.2	0.06±	0.01	221±	32	91±	4	25±	4
20 ppm	5	5.4±	0.1	3.2±	0.1*	1.4±	0.1	0.05±	0.01	243±	35	88±	5	35±	7*
40 ppm	5	5.4±	0.1	3.2±	0.1	1.5±	0.1	0.05±	0.01	267±	30	89±	5	35±	8

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

Test of t

(HCL074)

BAIS 5

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 MEASURE TIME : 1
 SEX : MALE

BIOCHEMISTRY (SUMMARY)
 ALL ANIMALS (5W)

REPORT TYPE : A1

Group Name	NO. of Animals	PHOSPHOLIPID mg/dl		AST U/L		ALT U/L		LDH U/L		ALP U/L		G-GTP U/L		CK U/L	
Control	5	185±	9	41±	2	16±	2	113±	6	344±	13	0.8±	0.9	55±	3
5 ppm	5	177±	15	40±	6	15±	3	149±	41	322±	15*	3.7±	2.6*	66±	29
10 ppm	5	183±	8	50±	6*	16±	3	195±	58*	390±	17**	2.6±	1.5	107±	64
20 ppm	5	186±	6	39±	5	14±	2	135±	19	335±	5	3.3±	3.5	71±	26
40 ppm	5	186±	8	39±	6	14±	3	132±	33	367±	19	1.6±	1.4	86±	36

Significant difference ; * : $P \leq 0.05$ ** : $P \leq 0.01$

Test of t

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 MEASURE TIME : 1
 SEX : MALE

BIOCHEMISTRY (SUMMARY)
 ALL ANIMALS (5W)

REPORT TYPE : A1

PAGE : 3

Group Name	NO. of Animals	UREA NITROGEN mg/dl		SODIUM mEq/l		POTASSIUM mEq/l		CHLORIDE mEq/l		CALCIUM mg/dl		INORGANIC PHOSPHORUS mg/dl	
Control	5	36.6±	2.9	152±	3	4.0±	0.2	114±	2	9.3±	0.3	7.7±	1.3
5 ppm	5	35.6±	1.4	152±	2	4.1±	0.2	113±	6	8.9±	0.4	7.5±	0.7
10 ppm	5	37.9±	3.7	153±	2	4.0±	0.4	110±	7	9.2±	0.5	8.8±	1.5
20 ppm	5	37.0±	4.0	152±	2	3.9±	0.2	114±	1	9.2±	0.1	7.5±	1.5
40 ppm	5	36.3±	4.6	151±	2	3.8±	0.2	111±	6	9.2±	0.3	7.5±	1.0

Significant difference ; * : $P \leq 0.05$ ** : $P \leq 0.01$

Test of t

(HCL074)

BAIS 5

TABLE H2

BIOCHEMISTRY : FEMALE

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 MEASURE TIME : 1
 SEX : FEMALE

BIOCHEMISTRY (SUMMARY)
 ALL ANIMALS (5W)

REPORT TYPE : A1

Group Name	NO. of Animals	TOTAL PROTEIN g/dl		ALBUMIN g/dl		A/G RATIO		T-BILIRUBIN mg/dl		GLUCOSE mg/dl		T-CHOLESTEROL mg/dl		TRIGLYCERIDE mg/dl	
Control	5	5.2±	0.2	3.3±	0.2	1.7±	0.2	0.07±	0.02	189±	28	68±	7	12±	5
5 ppm	5	5.5±	0.2	3.5±	0.1	1.7±	0.1	0.05±	0.02	203±	35	74±	4	21±	7
10 ppm	5	5.3±	0.3	3.4±	0.2	1.7±	0.1	0.06±	0.02	197±	30	77±	3*	16±	4
20 ppm	5	5.2±	0.2	3.3±	0.2	1.8±	0.2	0.10±	0.03	213±	19	69±	11	28±	12*
40 ppm	5	5.3±	0.2	3.4±	0.1	1.8±	0.1	0.06±	0.01	209±	19	71±	6	27±	7**

Significant difference ; * : $P \leq 0.05$ ** : $P \leq 0.01$

Test of t

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 MEASURE TIME : 1
 SEX : FEMALE

BIOCHEMISTRY (SUMMARY)
 ALL ANIMALS (5W)

REPORT TYPE : A1

PAGE : 5

Group Name	NO. of Animals	PHOSPHOLIPID mg/dl		AST U/L		ALT U/L		LDH U/L		ALP U/L		G-GTP U/L		CK U/L	
Control	5	140±	18	57±	13	16±	2	195±	49	561±	64	2.8±	2.1	98±	61
5 ppm	5	151±	11	56±	9	16±	6	177±	37	599±	118	2.0±	1.7	70±	15
10 ppm	5	153±	10	54±	19	18±	7	182±	34	571±	63	1.5±	2.0	78±	30
20 ppm	5	150±	23	60±	14	16±	5	183±	30	512±	72	1.4±	1.3	76±	22
40 ppm	5	150±	11	47±	6	16±	4	160±	48	542±	55	2.5±	1.9	122±	121

Significant difference ; * : $P \leq 0.05$ ** : $P \leq 0.01$

Test of t

(HCL074)

BAIS 5

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 MEASURE TIME : 1
 SEX : FEMALE

BIOCHEMISTRY (SUMMARY)
 ALL ANIMALS (5W)

REPORT TYPE : A1

PAGE : 6

Group Name	NO. of Animals	UREA NITROGEN mg/dl		SODIUM mEq/l		POTASSIUM mEq/l		CHLORIDE mEq/l		CALCIUM mg/dl		INORGANIC PHOSPHORUS mg/dl	
Control	5	30.2±	3.9	152±	2	3.4±	0.2	111±	7	8.9±	0.3	7.4±	1.0
5 ppm	5	28.8±	1.4	154±	2	3.4±	0.1	111±	7	8.9±	0.4	8.0±	0.9
10 ppm	5	28.5±	5.0	153±	2	3.7±	0.2	114±	4	9.0±	0.2	7.6±	1.5
20 ppm	5	29.2±	5.8	151±	2	3.6±	0.3	110±	5	8.8±	0.3	6.9±	1.5
40 ppm	5	32.4±	5.1	152±	3	3.6±	0.4	111±	5	8.8±	0.1	6.7±	1.1

Significant difference ; * : $P \leq 0.05$ ** : $P \leq 0.01$

Test of t

(HCL074)

BAIS 5

TABLE I 1

GROSS FINDINGS : MALE

STUDY NO. : 0893
ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
REPORT TYPE : A1
SEX : MALE

GROSS FINDINGS (SUMMARY)
ALL ANIMALS (0- 5W)

PAGE : 1

Organ	Findings	Group Name NO. of Animals	Control		5 ppm		10 ppm		20 ppm	
			10	(%)	10	(%)	10	(%)	10	(%)
spleen	black zone		1	(10)	2	(20)	3	(30)	3	(30)
stomach	glandular stomach:ulcer		0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)

(HPT080)

BAIS 5

STUDY NO. : 0893
ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
REPORT TYPE : A1
SEX : MALE

GROSS FINDINGS (SUMMARY)
ALL ANIMALS (0- 5W)

PAGE : 2

Organ	Findings	Group Name	NO. of Animals	40 ppm
			10	(%)
spleen	black zone		0	(0)
stomach	glandular stomach:ulcer		1	(10)

(HPT080)

BAIS 5

TABLE I 2

GROSS FINDINGS : FEMALE

STUDY NO. : 0893
ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
REPORT TYPE : A1
SEX : FEMALE

GROSS FINDINGS (SUMMARY)
ALL ANIMALS (0- 5W)

PAGE : 3

Organ	Findings	Group Name NO. of Animals	Control		5 ppm		10 ppm		20 ppm	
			10	(%)	10	(%)	10	(%)	10	(%)
spleen	black zone		3	(30)	2	(20)	5	(50)	2	(20)

(HPT080)

BAIS 5

STUDY NO. : 0893
ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
REPORT TYPE : A1
SEX : FEMALE

GROSS FINDINGS (SUMMARY)
ALL ANIMALS (0- 5W)

PAGE : 4

Organ	Findings	Group Name	40 ppm
		NO. of Animals	10 (%)
spleen	black zone		5 (50)

(HPT080)

BAIS5

TABLE J1

ORGAN WEIGHT, ABSOLUTE : MALE

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 REPORT TYPE : A1
 SEX : MALE
 UNIT: g

ORGAN WEIGHT:ABSOLUTE (SUMMARY)
 SURVIVAL ANIMALS (5W)

PAGE : 1

Group Name	NO. of Animals	Body Weight	THYMUS	ADRENALS	TESTES	HEART	LUNGS
Control	10	22.9± 0.9	0.042± 0.005	0.010± 0.001	0.170± 0.015	0.117± 0.008	0.124± 0.011
5 ppm	10	23.1± 0.8	0.043± 0.006	0.010± 0.002	0.186± 0.028	0.118± 0.008	0.121± 0.005
10 ppm	10	22.7± 1.1	0.045± 0.003	0.010± 0.001	0.182± 0.009*	0.118± 0.007	0.120± 0.008
20 ppm	10	22.8± 0.8	0.041± 0.003	0.011± 0.001	0.175± 0.016	0.119± 0.009	0.127± 0.009
40 ppm	10	22.0± 0.9	0.042± 0.003	0.010± 0.001	0.183± 0.012	0.117± 0.009	0.146± 0.012**

Significant difference ; * : $P \leq 0.05$ ** : $P \leq 0.01$

Test of t

(HCL040)

BAIS 5

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 REPORT TYPE : A1
 SEX : MALE
 UNIT: g

ORGAN WEIGHT: ABSOLUTE (SUMMARY)
 SURVIVAL ANIMALS (5W)

Group Name	NO. of Animals	KIDNEYS		SPLEEN		LIVER		BRAIN	
Control	10	0.295±	0.013	0.041±	0.007	1.008±	0.058	0.440±	0.017
5 ppm	10	0.290±	0.015	0.043±	0.005	1.011±	0.049	0.440±	0.015
10 ppm	10	0.287±	0.018	0.046±	0.005	0.992±	0.061	0.435±	0.011
20 ppm	10	0.285±	0.015	0.043±	0.008	1.004±	0.045	0.435±	0.007
40 ppm	10	0.286±	0.013	0.041±	0.005	0.974±	0.046	0.429±	0.008

Significant difference ; * : $P \leq 0.05$ ** : $P \leq 0.01$

Test of t

TABLE J2

ORGAN WEIGHT, ABSOLUTE : FEMALE

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 REPORT TYPE : A1
 SEX : FEMALE
 UNIT: g

ORGAN WEIGHT: ABSOLUTE (SUMMARY)
 SURVIVAL ANIMALS (5W)

Group Name	NO. of Animals	Body Weight	THYMUS	ADRENALS	OVARIES	HEART	LUNGS
Control	10	18.4 ± 1.2	0.050 ± 0.008	0.011 ± 0.002	0.020 ± 0.004	0.107 ± 0.007	0.116 ± 0.010
5 ppm	10	18.9 ± 1.1	0.055 ± 0.008	0.012 ± 0.002	0.020 ± 0.004	0.106 ± 0.009	0.116 ± 0.008
10 ppm	10	18.8 ± 0.9	0.055 ± 0.007	0.012 ± 0.002	0.020 ± 0.003	0.106 ± 0.009	0.119 ± 0.007
20 ppm	10	18.6 ± 1.2	0.052 ± 0.004	0.013 ± 0.002	0.020 ± 0.005	0.112 ± 0.011	0.132 ± 0.010**
40 ppm	10	18.2 ± 1.0	0.050 ± 0.006	0.012 ± 0.001	0.019 ± 0.003	0.111 ± 0.008	0.145 ± 0.011**

Significant difference ; * : $P \leq 0.05$ ** : $P \leq 0.01$

Test of t

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 REPORT TYPE : A1
 SEX : FEMALE
 UNIT: g

ORGAN WEIGHT:ABSOLUTE (SUMMARY)
 SURVIVAL ANIMALS (5W)

Group Name	NO. of Animals	KIDNEYS		SPLEEN		LIVER		BRAIN	
Control	10	0.248±	0.018	0.054±	0.009	0.816±	0.061	0.441±	0.013
5 ppm	10	0.251±	0.027	0.056±	0.012	0.809±	0.079	0.435±	0.016
10 ppm	10	0.245±	0.020	0.053±	0.007	0.817±	0.058	0.435±	0.015
20 ppm	10	0.249±	0.025	0.054±	0.013	0.791±	0.068	0.433±	0.015
40 ppm	10	0.245±	0.020	0.050±	0.007	0.769±	0.062	0.425±	0.013*

Significant difference ; * : P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01

Test of t

TABLE K1

ORGAN WEIGHT, RELATIVE : MALE

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 REPORT TYPE : A1
 SEX : MALE
 UNIT: %

ORGAN WEIGHT:RELATIVE (SUMMARY)
 SURVIVAL ANIMALS (5W)

Group Name	NO. of Animals	Body Weight (g)	THYMUS	ADRENALS	TESTES	HEART	LUNGS
Control	10	22.9 ± 0.9	0.182 ± 0.024	0.046 ± 0.005	0.747 ± 0.070	0.510 ± 0.028	0.544 ± 0.047
5 ppm	10	23.1 ± 0.8	0.185 ± 0.027	0.044 ± 0.010	0.804 ± 0.124	0.511 ± 0.033	0.522 ± 0.021
10 ppm	10	22.7 ± 1.1	0.196 ± 0.013	0.043 ± 0.005	0.804 ± 0.053	0.519 ± 0.040	0.529 ± 0.016
20 ppm	10	22.8 ± 0.8	0.182 ± 0.016	0.048 ± 0.006	0.771 ± 0.069	0.522 ± 0.029	0.558 ± 0.032
40 ppm	10	22.0 ± 0.9	0.193 ± 0.014	0.043 ± 0.004	0.832 ± 0.073*	0.534 ± 0.049	0.665 ± 0.052**

Significant difference ; * : $P \leq 0.05$ ** : $P \leq 0.01$

Test of t

STUDY NO. : 0893
ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
REPORT TYPE : A1
SEX : MALE
UNIT: %

ORGAN WEIGHT:RELATIVE (SUMMARY)
SURVIVAL ANIMALS (5W)

PAGE : 2

Group Name	NO. of Animals	KIDNEYS	SPLEEN	LIVER	BRAIN
Control	10	1.293 ± 0.046	0.177 ± 0.024	4.412 ± 0.155	1.926 ± 0.067
5 ppm	10	1.257 ± 0.063	0.187 ± 0.019	4.373 ± 0.146	1.904 ± 0.075
10 ppm	10	1.262 ± 0.041	0.202 ± 0.018*	4.371 ± 0.183	1.920 ± 0.081
20 ppm	10	1.253 ± 0.056	0.190 ± 0.032	4.410 ± 0.125	1.914 ± 0.072
40 ppm	10	1.303 ± 0.051	0.187 ± 0.027	4.429 ± 0.179	1.953 ± 0.072

Significant difference ; * : $P \leq 0.05$ ** : $P \leq 0.01$

Test of t

(HCL042)

BAIS5

TABLE K2

ORGAN WEIGHT, RELATIVE : FEMALE

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 REPORT TYPE : A1
 SEX : FEMALE
 UNIT: %

ORGAN WEIGHT:RELATIVE (SUMMARY)
 SURVIVAL ANIMALS (5W)

Group Name	NO. of Animals	Body Weight (g)	THYMUS	ADRENALS	OVARIES	HEART	LUNGS
Control	10	18.4± 1.2	0.273± 0.032	0.061± 0.009	0.110± 0.020	0.582± 0.037	0.630± 0.024
5 ppm	10	18.9± 1.1	0.291± 0.034	0.063± 0.010	0.107± 0.020	0.560± 0.040	0.615± 0.028
10 ppm	10	18.8± 0.9	0.294± 0.048	0.066± 0.012	0.108± 0.015	0.562± 0.037	0.634± 0.033
20 ppm	10	18.6± 1.2	0.282± 0.028	0.069± 0.011	0.105± 0.025	0.599± 0.044	0.709± 0.064**
40 ppm	10	18.2± 1.0	0.275± 0.033	0.066± 0.008	0.105± 0.019	0.613± 0.051	0.798± 0.061**

Significant difference ; * : $P \leq 0.05$ ** : $P \leq 0.01$ Test of t

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 REPORT TYPE : A1
 SEX : FEMALE
 UNIT: %

ORGAN WEIGHT:RELATIVE (SUMMARY)
 SURVIVAL ANIMALS (5W)

Group Name	No. of Animals	KIDNEYS	SPLEEN	LIVER	BRAIN
Control	10	1.351± 0.071	0.295± 0.042	4.444± 0.153	2.407± 0.125
5 ppm	10	1.327± 0.096	0.295± 0.055	4.295± 0.353	2.309± 0.085
10 ppm	10	1.302± 0.080	0.280± 0.034	4.349± 0.214	2.316± 0.084
20 ppm	10	1.338± 0.089	0.288± 0.061	4.253± 0.326	2.332± 0.110
40 ppm	10	1.344± 0.079	0.277± 0.036	4.233± 0.382	2.342± 0.110

Significant difference ; * : $P \leq 0.05$ ** : $P \leq 0.01$ Test of t

TABLE L1

**HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS :
NON-NEOPLASTIC LESIONS : MALE**

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 REPORT TYPE : A1
 SEX : MALE

HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (SUMMARY)
 ALL ANIMALS (0- 5W)

Organ	Findings	Group Name No. of Animals on Study				Control				5 ppm				10 ppm				20 ppm			
		Grade				10				10				10				10			
		1+	2+	3+	4+	1+	2+	3+	4+	1+	2+	3+	4+	1+	2+	3+	4+	1+	2+	3+	4+
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
(Respiratory system)																					
nasal cavit	exudate	<10>				<10>				<10>				<10>							
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
	eosinophilic change:respiratory epithelium	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0 **
		(0)	(0)	(0)	(0)	(20)	(0)	(0)	(0)	(20)	(0)	(0)	(0)	(90)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
	respiratory metaplasia:gland	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
		(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(0)	(0)	(0)	(10)	(0)	(0)	(0)	(10)	(0)	(0)	(0)	(10)	(0)	(0)	(0)
lung	inflammation	<10>				<10>				<10>				<10>							
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
(Hematopoietic system)																					
spleen	deposit of melanin	<10>				<10>				<10>				<10>							
		1	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0
		(10)	(0)	(0)	(0)	(20)	(0)	(0)	(0)	(30)	(0)	(0)	(0)	(30)	(0)	(0)	(0)	(30)	(0)	(0)	(0)
(Digestive system)																					
stomach	hyperplasia:forestomach	<10>				<10>				<10>				<10>							
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)

Grade 1+ : Slight 2+ : Moderate 3+ : Marked 4+ : Severe

< a > a : Number of animals examined at the site

b : Number of animals with lesion

(c) c : b / a * 100

Significant difference ; * : P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01 Test of Chi Square

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 REPORT TYPE : A1
 SEX : MALE

HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (SUMMARY)
 ALL ANIMALS (0- 5W)

Organ	Findings	Group Name No. of Animals on Study			
		1+ Grade (%)	2+ Grade (%)	3+ Grade (%)	4+ Grade (%)
(Respiratory system)					
nasal cavit	exudate	10 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0) **
	eosinophilic change:respiratory epithelium	9 (90)	0 (0)	0 (0)	0 (0) **
	respiratory metaplasia:gland	4 (40)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
lung	inflammation	7 (70)	0 (0)	0 (0)	0 (0) **
	(Hematopoietic system)				
spleen	deposit of melanin	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	(Digestive system)				
stomach	hyperplasia:forestomach	3 (30)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Grade 1+ : Slight 2+ : Moderate 3+ : Marked 4+ : Severe
 < a > a : Number of animals examined at the site
 b : Number of animals with lesion
 (c) c : b / a * 100
 Significant difference ; * : P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01 Test of Chi Square

TABLE L2

**HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS :
NON-NEOPLASTIC LESIONS : FEMALE**

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 REPORT TYPE : A1
 SEX : FEMALE

HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (SUMMARY)
 ALL ANIMALS (0- 5W)

Organ	Findings	Group Name No. of Animals on Study Grade	Control				5 ppm				10 ppm				20 ppm				
			1+ (%)	2+ (%)	3+ (%)	4+ (%)	1+ (%)	2+ (%)	3+ (%)	4+ (%)	1+ (%)	2+ (%)	3+ (%)	4+ (%)	1+ (%)	2+ (%)	3+ (%)	4+ (%)	
(Respiratory system)																			
nasal cavit	exudate		<10>				<10>				<10>				<10>				
			0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	eosinophilic change:olfactory epithelium		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	eosinophilic change:respiratory epithelium		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (80)	0 (0)	0 (0)
	respiratory metaplasia:gland		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (20)	0 (0)	0 (0)	
	necrosis:olfactory epithelium		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (10)	0 (0)	0 (0)		
lung	inflammation		<10>				<10>				<10>				<10>				
			0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
(Hematopoietic system)																			
spleen	deposit of melanin		<10>				<10>				<10>				<10>				
			3 (30)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (30)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

Grade 1+ : Slight 2+ : Moderate 3+ : Marked 4+ : Severe
 < a > a : Number of animals examined at the site
 b : Number of animals with lesion
 (c) c : b / a * 100
 Significant difference ; * : P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01 Test of Chi Square

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 REPORT TYPE : A1
 SEX : FEMALE

HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (SUMMARY)
 ALL ANIMALS (0- 5W)

Organ	Findings	Group Name No. of Animals on Study 40 ppm			
		Grade 1+ (%)	2+ (%)	3+ (%)	4+ (%)
(Respiratory system)					
nasal cavit	exudate	10 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0) **
	eosinophilic change:olfactory epithelium	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	eosinophilic change:respiratory epithelium	10 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0) **
	respiratory metaplasia:gland	6 (60)	0 (0)	0 (0)	0 (0) *
	necrosis:olfactory epithelium	1 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
lung	inflammation	9 (90)	0 (0)	0 (0)	0 (0) **
(Hematopoietic system)					
spleen	deposit of melanin	5 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Grade 1+ : Slight 2+ : Moderate 3+ : Marked 4+ : Severe
 < a > a : Number of animals examined at the site
 b : Number of animals with lesion
 (c) c : b / a * 100
 Significant difference ; * : P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01 Test of Chi Square

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 REPORT TYPE : A1
 SEX : FEMALE

HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS : NON-NEOPLASTIC LESIONS (SUMMARY)
 ALL ANIMALS (0- 5W)

Organ	Findings	Control				5 ppm				10 ppm				20 ppm			
		No. of Animals on Study				No. of Animals on Study				No. of Animals on Study				No. of Animals on Study			
		Grade				Grade				Grade				Grade			
		1+	2+	3+	4+	1+	2+	3+	4+	1+	2+	3+	4+	1+	2+	3+	4+
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
(Hematopoietic system)																	
spleen	extramedullary hematopoiesis	<10>				<10>				<10>				<10>			
		4	0	0	0	5	0	0	0	4	0	0	0	3	0	0	0
		(40)	(0)	(0)	(0)	(50)	(0)	(0)	(0)	(40)	(0)	(0)	(0)	(30)	(0)	(0)	(0)
(Digestive system)																	
stomach	erosion:forestomach	<10>				<10>				<10>				<10>			
		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
liver	granulation	<10>				<10>				<10>				<10>			
		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)

Grade 1+ : Slight 2+ : Moderate 3+ : Marked 4+ : Severe
 < a > a : Number of animals examined at the site
 b : Number of animals with lesion
 (c) c : b / a * 100
 Significant difference ; * : P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01 Test of Chi Square

STUDY NO. : 0893
 ANIMAL : MOUSE C57BL/6J
 REPORT TYPE : A1
 SEX : FEMALE

HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS :NON-NEOPLASTIC LESIONS (SUMMARY)
 ALL ANIMALS (0- 5W)

Organ	Findings	Group Name			
		40 ppm			
		No. of Animals on Study			
		10			
		1+	2+	3+	4+
		(%)	(%)	(%)	(%)
(Hematopoietic system)					
spleen	extramedullary hematopoiesis	3 (30)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
(Digestive system)					
stomach	erosion:forestomach	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
liver	granulation	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Grade 1+ : Slight 2+ : Moderate 3+ : Marked 4+ : Severe
 < a > a : Number of animals examined at the site
 b : Number of animals with lesion
 (c) c : b / a * 100
 Significant difference ; * : P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01 Test of Chi Square

二酸化窒素の C57BL/6J マウスを用いた吸入による
4 週間毒性試験（中期がん原性試験予備試験）報告書

試験番号：0893

FIGURES

FIGURES

FIGURE 1 BODY WEIGHT CHANGES OF MALE MICE IN THE 4-WEEK INHALATION STUDY OF NITROGEN DIOXIDE

FIGURE 2 BODY WEIGHT CHANGES OF FEMALE MICE IN THE 4-WEEK INHALATION STUDY OF NITROGEN DIOXIDE

FIGURE 3 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF MALE MICE IN THE 4-WEEK INHALATION STUDY OF NITROGEN DIOXIDE

FIGURE 4 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF FEMALE MICE IN THE 4-WEEK INHALATION STUDY OF NITROGEN DIOXIDE

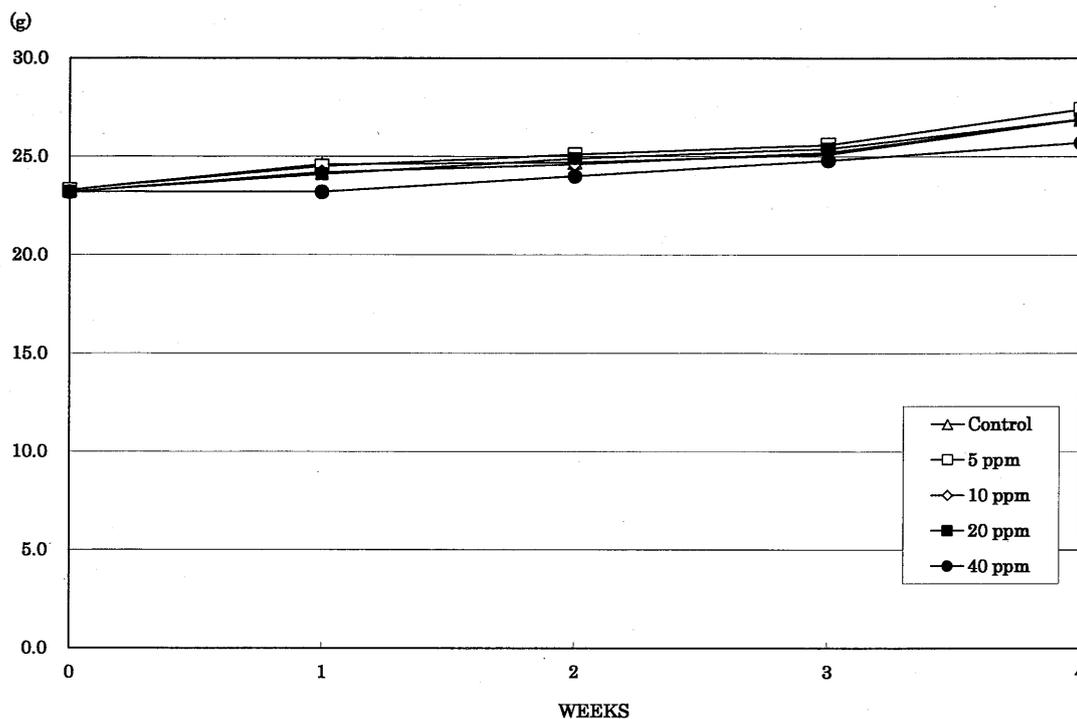


FIGURE 1 BODY WEIGHT CHANGES OF MALE MICE IN THE 4-WEEK INHALATION STUDY OF NITROGEN DIOXIDE

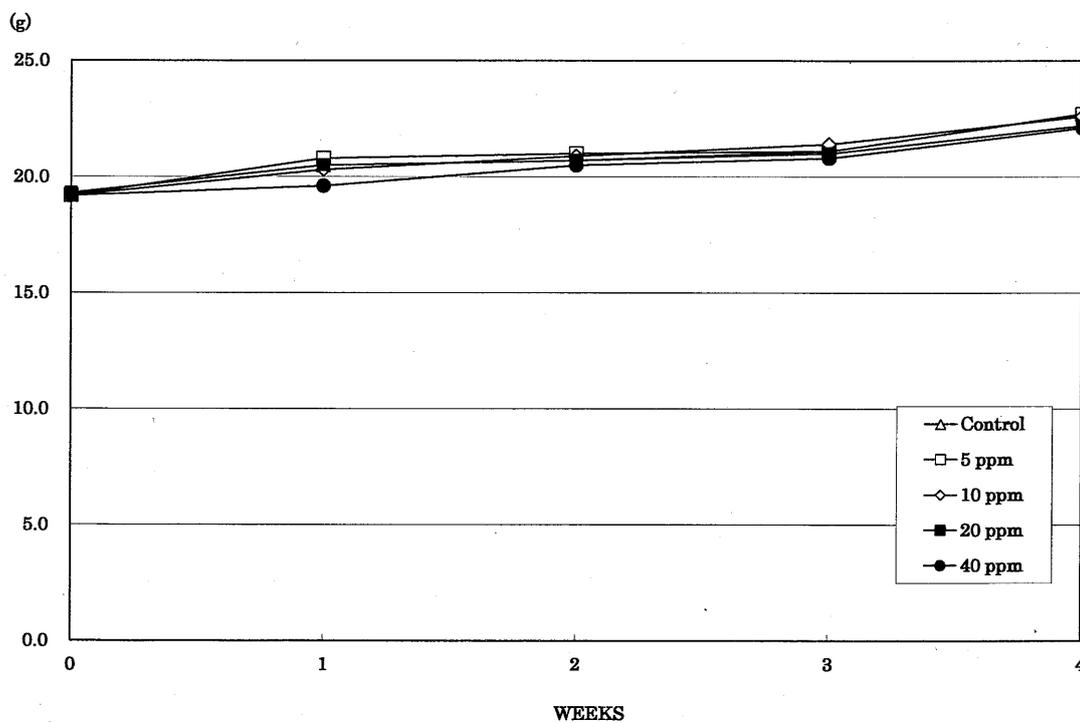


FIGURE 2 BODY WEIGHT CHANGES OF FEMALE MICE IN THE 4-WEEK INHALATION STUDY OF NITROGEN DIOXIDE

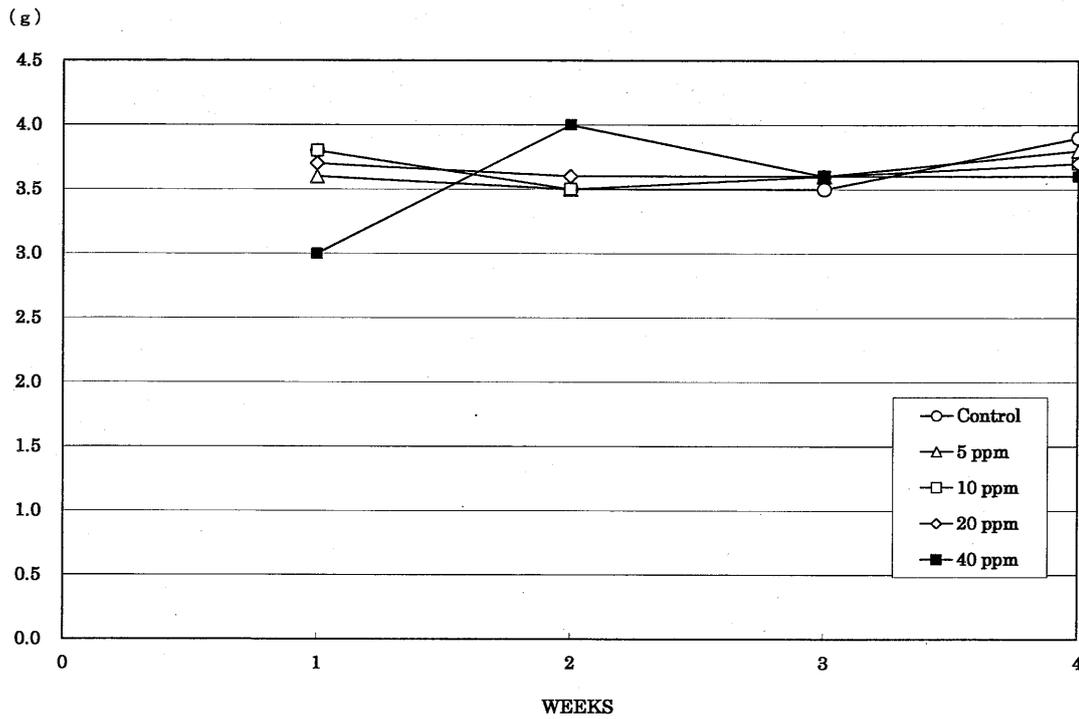


FIGURE 3 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF MALE MICE IN THE 4-WEEK INHALATION STUDY OF NITROGEN DIOXIDE

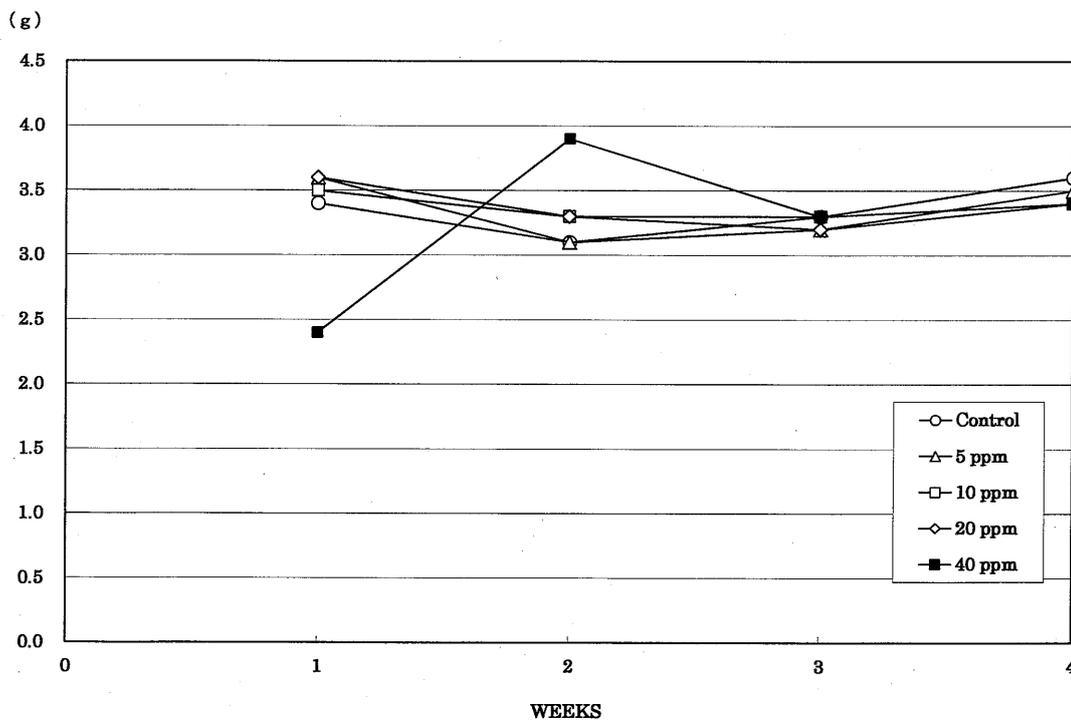


FIGURE 4 FOOD CONSUMPTION CHANGES OF FEMALE MICE IN THE 4-WEEK INHALATION STUDY OF NITROGEN DIOXIDE

二酸化窒素の C57BL/6J マウスを用いた吸入による
4 週間毒性試験（中期がん原性試験予備試験）報告書

試験番号：0893

APPENDICES

APPENDICES

- APPENDIX 1-1 IDENTITY OF NITROGEN DIOXIDE IN THE 4-WEEK
INHALATION STUDY
- APPENDIX 1-2 STABILITY OF NITROGEN DIOXIDE IN THE 4-WEEK
INHALATION STUDY
- APPENDIX 2 ENVIRONMENTAL CONDITIONS OF INHALATION CHAMBER
IN THE 4-WEEK INHALATION STUDY OF NITROGEN DIOXIDE
- APPENDIX 3 METHODS, UNITS AND DECIMAL PLACE FOR HEMATOLOGY
AND BIOCHEMISTRY IN THE 4-WEEK INHALATION STUDY OF
NITROGEN DIOXIDE

APPENDIX 1 1

**IDENTITY OF NITROGEN DIOXIDE IN THE 4-WEEK
INHALATION STUDY**

IDENTITY OF NITROGEN DIOXIDE IN THE 4-WEEK INHALATION STUDY

Test Substance : Nitrogen dioxide (SUMITOMO SEIKA CHEMICALS Co., Ltd.)

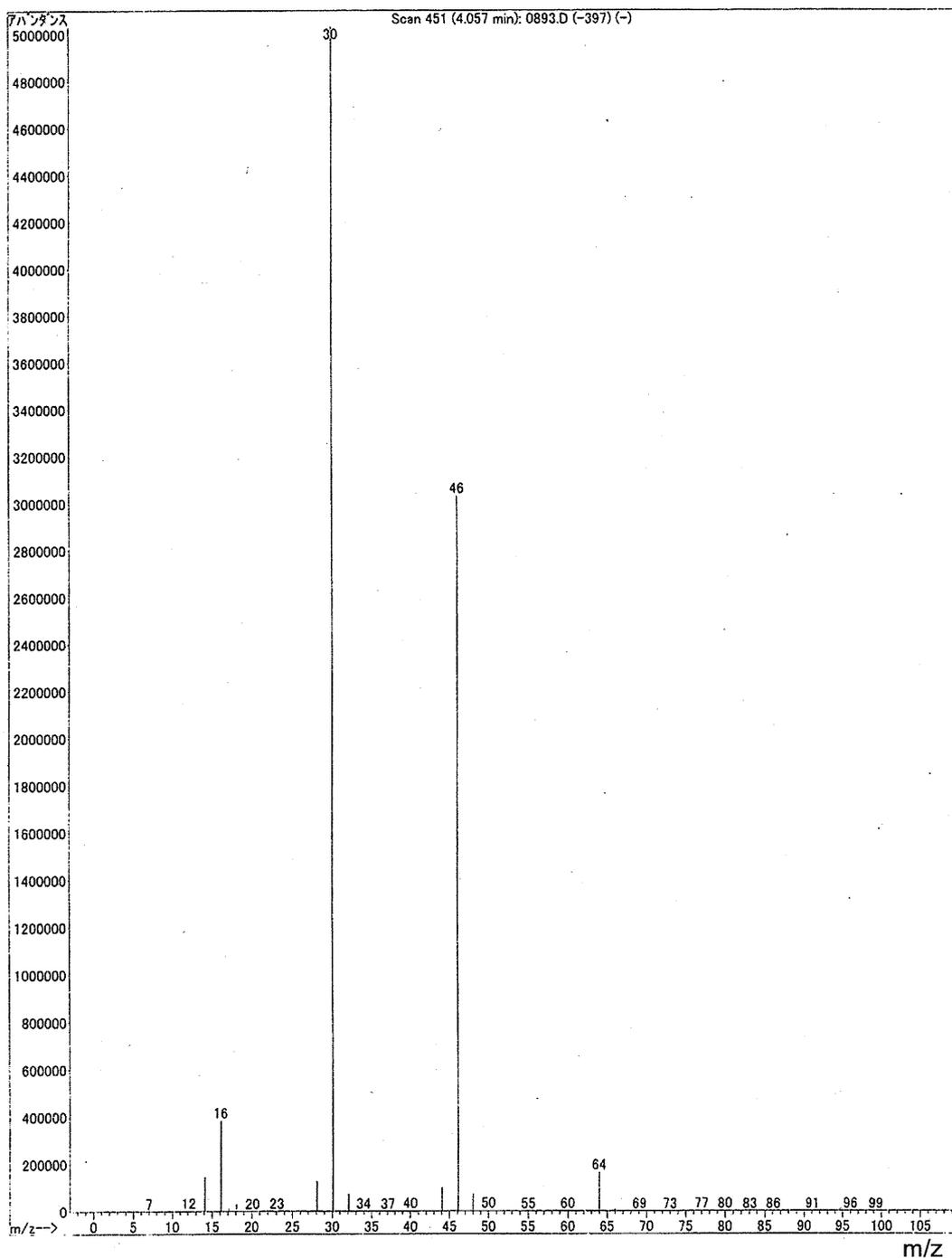
Lot No. : JTB 1742564

1. Mass Spectrometry

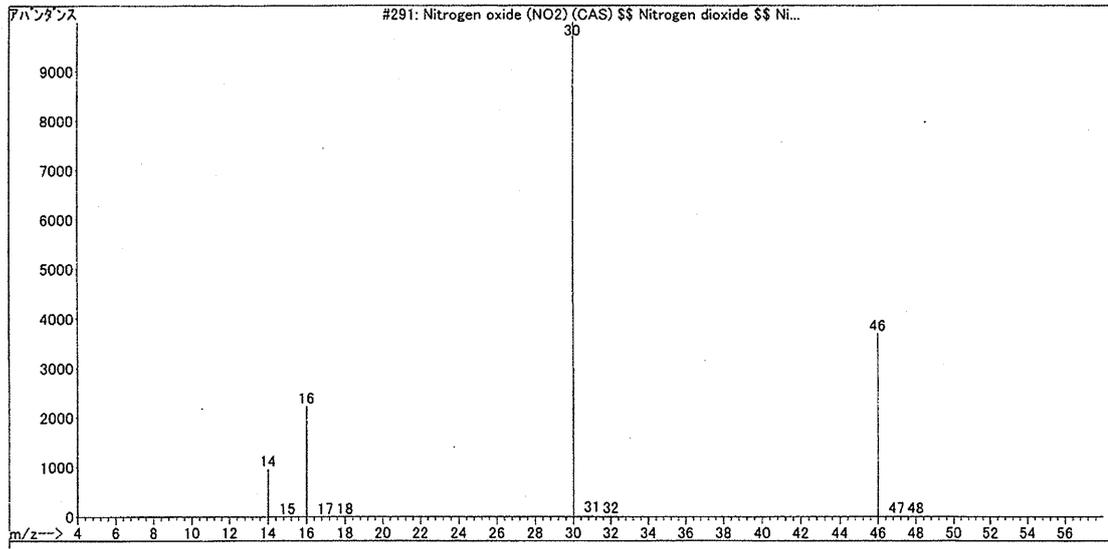
Instrument : Agilent Technologies 5973N Mass Spectrometer

Ionization : EI (Electron Ionization)

Ionization Voltage : 70eV



Mass Spectrum of Test Substance



Mass Spectrum of Literature Data*

Result: The mass spectrum was consistent with literature spectrum.

(*McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY:John Wiley and Sons.)

2. Conclusion: The test substance was identified as nitrogen dioxide by mass spectrum.

APPENDIX 1 2

**STABILITY OF NITROGEN DIOXIDE IN THE 4-WEEK
INHALATION STUDY**

STABILITY OF NITROGEN DIOXIDE IN THE 4-WEEK INHALATION STUDY

Test Substance : Nitrogen dioxide (SUMITOMO SEIKA CHEMICALS Co., Ltd.)

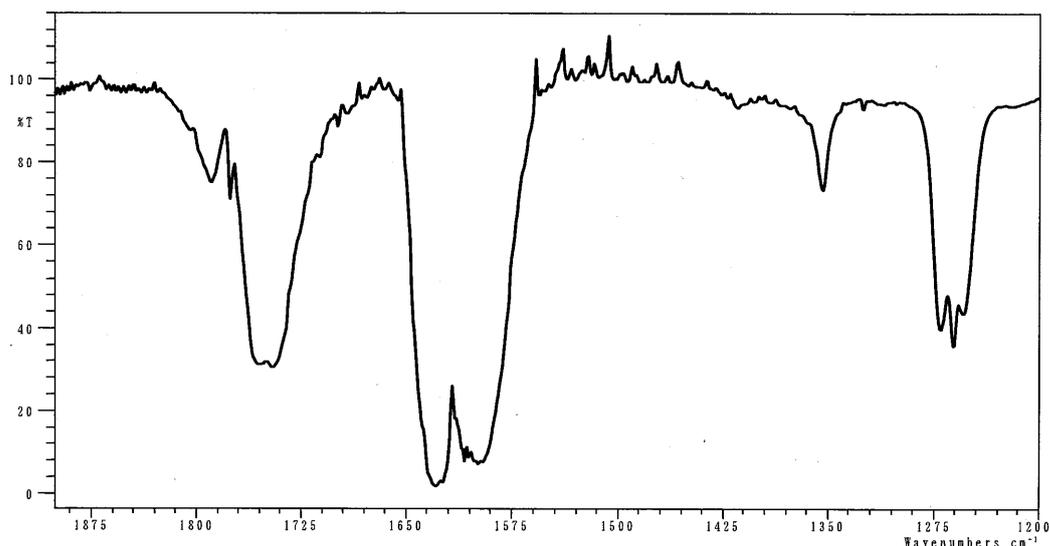
Lot No. : JTB 1742564

1. Infrared Spectrometry

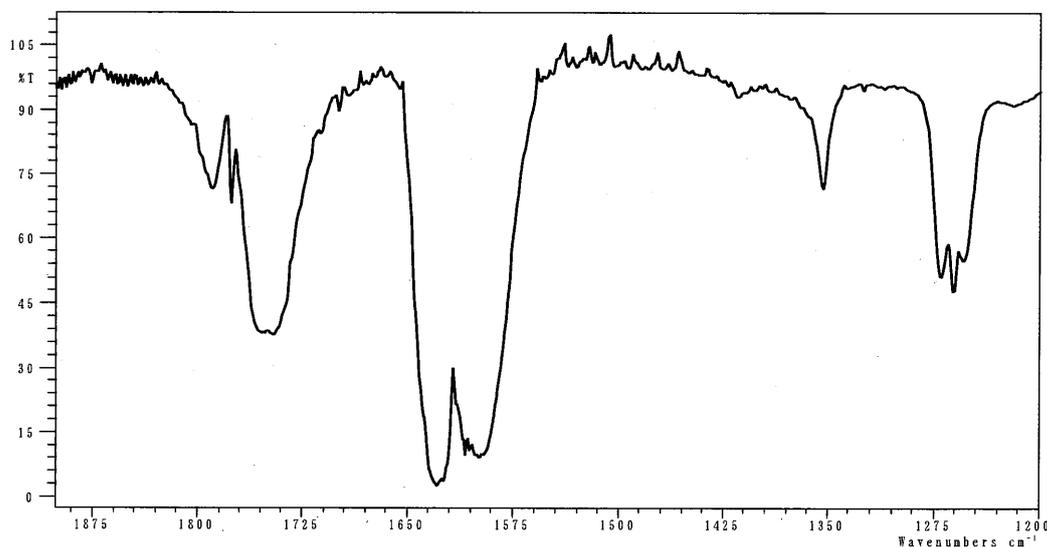
Instrument : Shimadzu IRAffinity-1

Cell : KBr Gas Cell

Resolution : 2 cm^{-1}



Infrared Spectrum of Test Substance (before use)



Infrared Spectrum of Test Substance (after use)

Result: The infrared spectra were not changed before used on 2017.9.27 and after used on 2017.10.30.

2. Conclusion: The test substance was stable for the period that the test substance had been used for the study.

APPENDIX 2

ENVIRONMENTAL CONDITIONS OF INHALATION CHAMBER IN THE 4-WEEK INHALATION STUDY OF NITROGEN DIOXIDE

ENVIRONMENTAL CONDITIONS OF INHALATION CHAMBER
IN THE 4-WEEK INHALATION STUDY OF NITROGEN DIOXIDE

Group Name	Temperature (°C) Mean ± S.D.	Humidity (%) Mean ± S.D.	Ventilation Rate (L/min) Mean ± S.D.	Air Change (time/h) Mean
Control	22.9 ± 0.1	57.3 ± 0.7	224.8 ± 1.4	12.2
5 ppm	22.8 ± 0.1	56.8 ± 0.4	223.2 ± 1.5	12.1
10 ppm	22.9 ± 0.0	57.7 ± 0.5	223.4 ± 1.4	12.1
20 ppm	23.0 ± 0.1	54.7 ± 0.3	222.5 ± 1.6	12.0
40 ppm	22.9 ± 0.1	56.6 ± 0.4	223.2 ± 1.5	12.1

APPENDIX 3

**METHODS, UNITS AND DECIMAL PLACE FOR
HEMATOLOGY AND BIOCHEMISTRY IN THE 4-WEEK
INHALATION STUDY OF NITROGEN DIOXIDE**

METHODS, UNITS AND DECIMAL PLACE FOR HEMATOLOGY AND BIOCHEMISTRY
IN THE 4-WEEK INHALATION STUDY OF NITROGEN DIOXIDE

Item	Method	Unit	Decimal place
Hematology			
Red blood cell (RBC)	Light scattering method ¹⁾	$\times 10^6/\mu\text{L}$	2
Hemoglobin(Hgb)	Cyanmethemoglobin method ¹⁾	g/dL	1
Hematocrit(Hct)	Calculated as $\text{RBC} \times \text{MCV}/10$ ¹⁾	%	1
Mean corpuscular volume(MCV)	Light scattering method ¹⁾	fL	1
Mean corpuscular hemoglobin(MCH)	Calculated as $\text{Hgb}/\text{RBC} \times 10$ ¹⁾	pg	1
Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)	Calculated as $\text{Hgb}/\text{Hct} \times 100$ ¹⁾	g/dL	1
Platelet	Light scattering method ¹⁾	$\times 10^3/\mu\text{L}$	0
Reticulocyte	Light scattering method ¹⁾	%	1
White blood cell(WBC)	Light scattering method ¹⁾	$\times 10^3/\mu\text{L}$	2
Differential WBC	Light scattering method ¹⁾	%	1
Methemoglobin	Van Assendelft method ³⁾	%	1
Biochemistry			
Total protein(TP)	Biuret method ²⁾	g/dL	1
Albumin (Alb)	BCG method ²⁾	g/dL	1
A/G ratio	Calculated as $\text{Alb}/(\text{TP} - \text{Alb})$ ²⁾	—	1
T-bilirubin	BOD method ²⁾	mg/dL	2
Glucose	GlcK·G-6-PDH method ²⁾	mg/dL	0
T-cholesterol	CE·COD·POD method ²⁾	mg/dL	0
Triglyceride	MGLP·GK·GPO·POD method ²⁾	mg/dL	0
Phospholipid	PLD·ChOD·POD method ²⁾	mg/dL	0
Aspartate aminotransferase (AST)	JSCC method ²⁾	U/L	0
Alanine aminotransferase (ALT)	JSCC method ²⁾	U/L	0
Lactate dehydrogenase (LDH)	JSCC method ²⁾	U/L	0
Alkaline phosphatase (ALP)	JSCC method ²⁾	U/L	0
γ -Glutamyl transpeptidase (γ -GTP)	JSCC method ²⁾	U/L	1
Creatine kinase (CK)	JSCC method ²⁾	U/L	0
Urea nitrogen	Urease·GLDH method ²⁾	mg/dL	1
Sodium	Ion selective electrode method ²⁾	mEq/L	0
Potassium	Ion selective electrode method ²⁾	mEq/L	1
Chloride	Ion selective electrode method ²⁾	mEq/L	0
Calcium	OCPC method ²⁾	mg/dL	1
Inorganic phosphorus	PNP·XOD·POD method ²⁾	mg/dL	1

1) Automatic blood cell analyzer (ADVIA120 : Siemens Healthcare Diagnostics Inc.)

2) Automatic analyzer (Hitachi 7080 : Hitachi,Ltd.)

3) Spectrophotometer (UV-1850 : Shimadzu Corporation)