

を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理における50%細胞増殖抑制濃度は0.057 mg/mL、S9 mix非存在下および存在下における短時間処理では、それぞれ0.091 mg/mLおよび0.0094 mg/mLであった(Fig. 1, 2)。

8. 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、50%細胞増殖抑制濃度の約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(連続処理:0.0075, 0.015, 0.030, 0.060, 0.12 mg/mL, S9 mix非存在下での短時間処理:0.011, 0.023, 0.045, 0.090, 0.18 mg/mL, S9 mix存在下での短時間処理:0.0011, 0.0023, 0.0045, 0.0090, 0.018 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、局方注射用水(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4枚のディッシュを用い、そのうちの2枚は染色体標本作製し、別の2枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。

9. 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 μ g/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。スライド標本は各ディッシュにつき6枚作製した。作製した標本を3 vol%ギムザ溶液で染色した。

10. 染色体分析

細胞増殖率測定の結果と分裂指数により、20%以上の相対増殖率で、かつ2ディッシュともに0.5%以上の分裂指数を示した最も高い濃度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0.060 mg/mLが、S9 mix非存在下およびS9 mix存在下での短時間処理では0.090 mg/mLおよび0.0090 mg/mLが染色体分析の可能な最高濃度であったことから、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つのディッシュ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・哺乳動物試験研究会(MMS)¹⁾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。

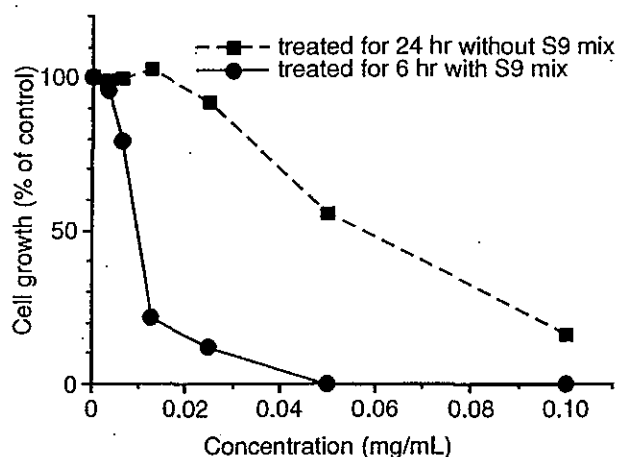


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with methylenediphenol

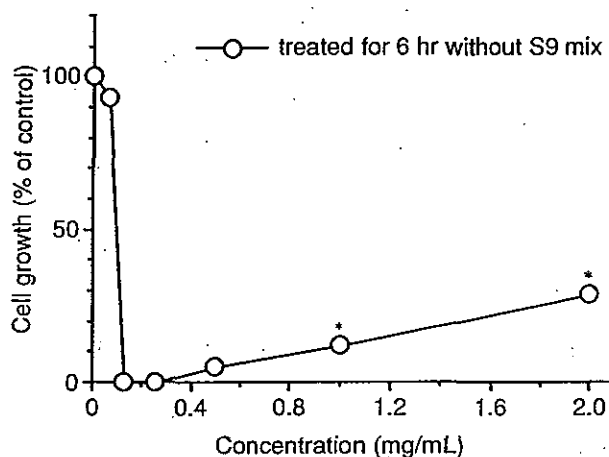


Fig. 2 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with methylenediphenol

*: The increased percentage represents adhesion of test substance onto culture dishes

11. 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、溶媒対照群と被験物質処理群および陽性対照群間でフィッシャーの直接確率法²⁾により、有意差検定を実施した($p < 0.01$)。また、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定³⁾($p < 0.01$)を行った。これらの検定結果を参考とし、生物学的な観点からの判断を加味して染色体異常誘発性の評価を行った。

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。メチレンジフェノールを加えて24時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および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。メチレンジフェノールを加え、S9 mix非存在下で6

時間処理した群では、高濃度群(0.090 mg/mL)において染色体の構造異常が誘発され、その頻度は14.0 % (gapを除く)であった。一方、いずれの処理群においても有意な倍数性細胞の増加は認められなかった。S9 mix存在下で6時間処理した場合は、高濃度群(0.0090 mg/mL)で有意な染色体の構造異常の増加が認められ、その頻度は19.5 % (gapを除く)であった。また、高濃度群(0.0090 mg/mL)で倍数性細胞の出現頻度に有意差が認められ、傾向性検定($p < 0.01$)でも有意差が認められたが、その出現頻度が1.50 %と低いことから、陰性と判定した。

従って、メチレンジフェノールは、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。

メチレンジフェノールの関連物質としては、様々なビスフェノール類があげられる。ビスフェノールAについては、復帰変異試験で陰性の結果が報告されている⁴⁾が、分裂装置である紡錘糸の形成を阻害し、異数性細胞(染色体の数的異常)を誘発することが、CREST染色法(キネトコア抗体を用いる動原体の蛍光抗体染色法)を用いた小核の分析結果から示唆されている⁵⁾。本試験で使用した被験物質中には、異性体としてビス(*p*-ヒドロキシフェニル)メタン(異性体の混合比率:30.2 %)を含んでおり、この物質については異数性細胞を誘発しないことが報告されている⁵⁾。本試験では異数性細胞誘発の指標となる倍数細胞の誘発は認められなかったが、構造異常が増加したことから、他の2種類の異性体によって構造異常が誘発された可能性が考えられる。また、ホルマリン(37 %ホルムアルデヒド溶液)は、0.015 mg/mL以上の濃度でCHL/IU細胞に染色体異常を誘発することが報告されている⁶⁾。しかしながら、被験物質におけるホルムアルデヒド含有量は1 %未満であり、今回誘発された染色体異常は被験物質中のホルムアルデヒドに起因しないものと考えられる。

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, pp. 16-37.
- 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, pp. 76-78.
- 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.
- 4) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課監修, “労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集,” 日本化学物質安全・情報センター編集・発行, 東京, 1996.
- 5) E. Pfeiffer et al., *Mutat. Res.*, **390**, 21 (1997).
- 6) 石舘基監修, “改訂増補染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー, 東京, 1987, p.197.

連絡先

試験責任者: 日下部博一
 試験担当者: 田中憲穂, 山影康次, 高橋俊孝,
 若栗 忍, 橋本恵子
 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所
 〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Hirokazu Kusakabe (Study director)
 Noriho Tanaka, Kohji Yamakage,
 Toshitaka Takahashi, Shinobu Wakuri,
 Keiko Hashimoto
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
 Center
 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257-8523, Japan
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with methylenediphenol (HPMP)^{a)} without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of aberrations							Others ^{d)}	No. of cells with aberrations		POL ^{e)} (%)	Trend test ^{f)}		Concurrent cytotoxicity ^{g)} (%)	Mitotic index ^{h)} (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁱ⁾	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL		
Solvent ^{b)} 0		24	200	3	1	5	1	0	0	10	0	10 (5.0)	7 (3.5)	0.13			100.0	—
HPMP 0.015		24	200	0	0	0	2	0	0	2	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			103.5	—
HPMP 0.030		24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	-	-	87.5	—
HPMP 0.060		24	200	0	5	1	0	0	0	6	3	5 (2.5)	5 (2.5)	0.00			47.0	3.6, 6.6
HPMP 0.12 ^{b)}		24	—											—			11.5	—
MC 0.05 µg/mL		24	200	4	44	111	5	4	0	168	0	95* (47.5)	93* (46.5)	0.00			—	—

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, POL: polyploid, MC: mitomycin C.

a) Purity was 99.0 %. Phenol, formaldehyde and acids (oxalic acid and formic acid) were contained as impurities. b) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. c) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. d) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. e) Eight hundred cells were analysed in each group. f) Cochran - Armitage's trend test was done at $p < 0.01$. g) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with MonocellaterTM. h) Metaphase frequency, mitotic index, was calculated by counting 500 cells in each dish. i) Chromosome specimens were not made because of severe cytotoxicity.

*: Significantly different from solvent control at $p < 0.01$ by Fisher's exact probability test.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with methylenediphenol (HPMP)^{a)} with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of aberrations							Others ^{d)}	No. of cells with aberrations		POL ^{e)} (%)	Trend test ^{f)}		Concurrent cytotoxicity ^{g)} (%)	Mitotic index ^{h)} (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁱ⁾	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL		
Non-treatment				200	0	1	1	4	0	0	6	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			—	—
Solvent ^{b)} 0		—	6-(18)	200	0	1	0	0	0	10	11	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			100.0	—
HPMP 0.023		—	6-(18)	200	2	1	0	2	0	0	5	0	4 (2.0)	2 (1.0)	0.25			112.0	—
HPMP 0.045		—	6-(18)	200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.38	+	-	112.5	—
HPMP 0.090		—	6-(18)	200	3	15	35	1	0	0	54	0	31* (15.5)	28* (14.0)	0.38			72.0	11.6, 11.6
HPMP 0.18 ^{b)}		—	6-(18)	—											—			0.0	—
MC 0.1 µg/mL		—	6-(18)	200	10	69	150	3	8	20	260	1	121* (60.5)	119* (59.5)	0.13			—	—
Solvent ^{b)} 0		+	6-(18)	200	0	1	0	0	1	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			100.0	—
HPMP 0.0023		+	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			94.5	—
HPMP 0.0045		+	6-(18)	200	0	3	5	0	0	0	8	0	6 (3.0)	6 (3.0)	0.63	+	+	99.5	—
HPMP 0.0090		+	6-(18)	200	4	35	55	1	1	20	116	0	39* (19.5)	39* (19.5)	1.50*			35.5	3.8, 3.4
HPMP 0.018 ^{b)}		+	6-(18)	—											—			28.5	Tox, Tox
CPA 5 µg/mL		+	6-(18)	200	3	17	64	2	3	0	89	0	60* (30.0)	60* (30.0)	0.00			—	—

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, POL: polyploid, MC: mitomycin C, CPA: cyclophosphamide, Tox: cytotoxic.

a) Purity was 99.0 %. Phenol, formaldehyde and acids (oxalic acid and formic acid) were contained as impurities. b) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. c) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. d) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. e) Eight hundred cells were analysed in each group.

f) Cochran - Armitage's trend test was done at $p < 0.01$. g) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a MonocellaterTM.

h) Metaphase frequency, mitotic index, was calculated by counting 500 cells in each dish. i) Chromosome specimens were not made because of severe cytotoxicity. j) Chromosome analysis was not performed because there was small number of metaphase due to cytotoxicity.

*: Significantly different from solvent control at $p < 0.01$ by Fisher's exact probability test.

7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムのラットを用いる 28日間反復経口投与毒性試験

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of Potassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate in Rats

要約

7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムの0(1%カルメロースナトリウム水溶液), 100, 300および1000 mg/kgを1群あたり雌雄各7あるいは14匹のCrj:CD(SD)ラットに28日間反復経口投与して毒性を検討し, さらに0および1000 mg/kg群の雌雄各7匹を用いて14日間の回復性も併せて検討した。その結果, 以下の成績を得た。

一般状態, 体重, 摂餌量, 尿検査, 剖検および病理組織学検査では, 7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム投与に関連した変化は認められなかった。血液学検査では, ヘマトクリット値, ヘモグロビン量および赤血球数の高値あるいは高値傾向ならびに網赤血球率の低値が雌の1000 mg/kg群で認められた。血液生化学検査では, 総コレステロールの低値が雌の300および1000 mg/kg群で認められた。器官重量では, 脾臓の絶対重量および相対重量の低値が雄の1000 mg/kg群で認められた。

以上のことから, 本試験における7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムの無影響量(NOEL)は雄で300 mg/kg/day, 雌で100 mg/kg/dayであると考えられた。

方法

1. 被験物質および投与液の調製

7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム(純度:89.2%, Lot No.:5501, スガイ化学工業(株), 和歌山)は灰色がかった白色固体である。入手後の被験物質は密封容器に入れ, 冷暗所に保存し, 残余被験物質を製造業者が分析し, 投与期間中の安定性を確認した。溶媒は1%カルメロースナトリウム水溶液(日本薬局方カルメロースナトリウム, 丸石製薬(株), および日本薬局方精製水, ヤクハン製薬(株))を用い, これに被験物質を所定の濃度となるように懸濁した。被験物質の調製は用時調製とした。また, これらの調製液について濃度を分析し, 設定値の±10%以内であることを確認した。

2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より受け入れた4週齢のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD(SD)IGS)の雌雄を7日間の検疫・馴化を行った後, 雌雄各42匹を選択して5週齢で試験に供した。投与日の体重範囲は雄が149~168

g, 雌が126~149 gであった。動物は, 温度22~24℃, 湿度41~56%, 換気回数10~15回/時間および照明時間12時間(8:00から20:00まで点灯)に制御されたバリアシステムの飼育室で, プラケット式金属製金網床ケージに群分け前は5匹以内, 群分け後は個別で飼育した。飼料は固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))を金属製給餌器を用いて, 飲料水は札幌市水道水を自動給水装置あるいは給水器を用いて, 自由に摂取させた。

3. 投与量および投与方法

投与量設定試験では1群あたり雌雄各5例のラットに100, 300および1000 mg/kgの7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムを14日間反復経口投与した結果, 雄の1000 mg/kg群で体重, 摂餌量および腎臓の絶対重量の高値傾向, 雌の300および1000 mg/kg群でアルカリフォスファターゼ活性の高値傾向がみられた。

以上のことから, 高用量群には1000 mg/kgを設定し, 以下公比約3で除して, 中用量群には300 mg/kgを, 低用量群には100 mg/kgを, さらに, 媒体のみを投与する対照群も加え, 雌雄各4群を設定した。1群の動物数は雌雄とも7匹とし, 対照群および1000 mg/kg群には2群を割り付け, 投与前々日の体重に基づいて層化無作為抽出法により群分けを行った。

各個体の投与量は投与日に最も近い測定日の体重に基づいて5 mL/kgの容量でラット用胃ゾンデを用いて, 1日1回連続28日間, 強制的に胃内に投与した。

4. 検査項目

1) 一般状態観察

投与期間中および回復期間中に, 全例について1日1回以上の頻度で観察した。

2) 体重測定および摂餌量測定

体重は全例について, 投与1日(投与前), 投与2, 5, 7, 10, 14, 21および28日(投与終了日), 回復1日, 2, 5, 7および14日ならびに剖検日に測定し, 投与1日から28日, 回復1日から14日の体重増加量および体重増加率を算出した。摂餌量は剖検日を除いて体重と同じ日に測定した。

3) 尿検査

投与4週および回復2週に全例を代謝ケージに収容して非絶食下で採尿を行い, 同時に採尿中の飲水量(重量)も測定した。約3時間の蓄尿についてpH, 蛋白, 糖,

ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビンおよび潜血反応(以上、マルティスティックス、バイエル・三共)、色調(肉眼観察)ならびに沈渣(鏡検)を検査し、21時間蓄尿について尿量(容量)、比重(屈折計、アタゴ)、ナトリウムおよびカリウム(以上、炎光光度法、自動炎光光度計480型、コーニング)、クロール(電量滴定法、クロライドカウンターCL-6M、平沼産業)、カルシウム(OCPC法)ならびに無機リン(Fiske-SubbaRow法)(以上、自動分析装置7150形、日立製作所)を測定した。

4) 血液学検査

生存例全例について約16時間絶食した後、エーテル麻酔下で大腿静脈より採血し、EDTA・2Kで処理した血液を用いて、赤血球数、平均赤血球容積、血小板数、白血球数(以上、電気抵抗法)、ヘモグロビン量(シアメトヘモグロビン法)(以上、コールターカウンターT660型、コールター)、ヘマトクリット値(赤血球数、平均赤血球容積より算出)、平均赤血球ヘモグロビン量(赤血球数、ヘモグロビン量より算出)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(ヘマトクリット値、ヘモグロビン量より算出)、網赤血球率(Brecher法)および白血球百分比(May-Grünwald-Giemsa染色)を測定し、大腿静脈から採取した無処理血液を用いて凝固時間(流体粘度変化による空気圧測定法、マイクロコアグロメーター、グライナー)を測定した。さらに、腹部大動脈より採取した血液をクエン酸ナトリウムで処理した後、3000回転/分で10分間遠心分離して得られた血漿を用いて、プロトロンビン時間(トロンボプラスチン法)および活性化部分トロンボプラスチン時間(エラジン酸法)(以上、血液凝固自動測定装置アメルングKC-10A、バクスター)を測定した。

5) 血液生化学検査

生存例全例について約16時間絶食した後、エーテル麻酔下で、腹部大動脈より採取した血液を3000回転/分で10分間遠心分離して得られた血清を用いてGOT(IFCC法)、GPT(IFCC法)、アルカリフォスファターゼ(Bessey-Lawry法)、乳酸脱水素酵素(Wróblewski & La Due法)、 γ -GTP(包接L- γ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法)、グルコース(ヘキソキナーゼ法)、総コレステロール(酵素法)、トリグリセリド(遊離グリセロール消去法)、総ビリルビン(アゾビリルビン法)、尿素窒素(ウレアーゼ・インドフェノール法)、クレアチニン(Jaffe法)、カルシウム(OCPC法)、無機リン(Fiske-SubbaRow法)、総蛋白(ビウレット法)およびアルブミン(BCG法)(以上、自動分析装置7150形、日立製作所)、ナトリウムおよびカリウム(以上、炎光光度法、自動炎光光度計480型、コーニング)、クロール(電量滴定法、クロライドカウンターCL-6M、平沼産業)、A/G比(総蛋白、アルブミンより算出)ならびに蛋白分画(セルロースアセテート膜電気泳動法、全自動電気泳動装置CTE-150、常光)を測定した。

6) 剖検および器官重量測定

生存例については投与28日および回復14日の翌日に、衰弱のため屠殺した例については屠殺時に、体外表を観察し、エーテル麻酔下で採血後放血致死させ剖検した。また、脳、下垂体、胸腺、甲状腺(上皮小体含む)、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および卵巣の重量を測定するとともに、絶対重量を剖検当日の体重で除し100を乗じて相対重量を算出した。

7) 病理組織学検査

全例について肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳(大脳・小脳)、下垂体、副腎、甲状腺、上皮小体、胸腺、腸間膜リンパ節、脾臓、舌、下顎リンパ節、顎下腺、舌下腺、耳下腺、乳腺、皮膚、胸骨および大腿骨(骨髄を含む)、脊髄(頸部)、骨格筋(外側広筋)、胸部大動脈、喉頭、気管、気管支、食道、胃(前胃・腺胃)、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、精囊(凝固腺を含む)、前立腺、卵巣、子宮、陰および坐骨神経を10%中性緩衝ホルマリン液で、精巣および精巣上体をブアン液で、眼球およびハーダー腺をデビッドソン液で固定した。これらの摘出器官・組織を常法にしたがってパラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を作製し、鏡検した。

5. 統計解析

体重、体重増加量および体重増加率、摂餌量、尿検査の定量的項目、血液学検査、血液生化学検査、器官の絶対重量および相対重量の結果についてBartlettの検定法を行い、等分散性を解析した。等分散の場合は一元配置分散分析法により解析し、不等分散の場合はKruskal-Wallisの検定法で解析した。Kruskal-Wallis法の解析の結果、有意差が認められた場合には、Mann-WhitneyのU検定法で解析した。

尿比重および尿検査の定性的項目の結果については、Kruskal-Wallisの検定法で解析し、有意差が認められた場合は、Mann-WhitneyのU検定法を用いて解析した。

これら対照群と被験物質投与群との間の検定においては、いずれも有意水準を5%とした。

結果

1. 一般状態

投与期間には、雌雄ともに異常は認められなかった。

回復期間には、雄の対照群の1例で回復13日に衰弱が認められたため、屠殺し、剖検を行ったところ、鼻部に骨折が認められ、採尿に使用した代謝ケージ内での事故による可能性が考えられた。雌では異常は認められなかった。

2. 体重

雌雄ともに対照群との間に差は認められなかった。

3. 摂餌量

投与期間には、雄では対照群との間に差は認められなかった。雌では、1000 mg/kg群で投与2日に摂餌量の高値が認められたが、一過性の変化であり、7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム投与との関連はないものと考えられた。

回復期間には、雌雄ともに対照群との間に差は認められなかった。

4. 尿検査

投与期間最終週には、雄の300, 1000 mg/kg群ならびに雌の1000 mg/kg群でカリウム排泄量の高値が認められた。また、雄の1000 mg/kg群でナトリウム排泄量の低値が認められた。

回復期間最終週には、雌の1000 mg/kg群でカルシウム排泄量の高値および飲水量の高値が認められた。しかし、投与期間終了時に同様な変化が認められていないこと、回復期間終了時の血液生化学検査および病理組織学検査で特記すべき変化は認められなかったことから、偶発的な変化と考えられた。

5. 血液学検査 (Table 1, 2)

投与期間終了時には、雄では、対照群との間に差は認められなかった。雌では、1000 mg/kg群でヘマトクリット値およびヘモグロビン量の高値、赤血球数の高値傾向ならびに網赤血球率の低値が認められた。

回復期間終了時には、雄では対照群との間に差は認められなかった。雌では、1000 mg/kg群に分葉核好中球率の高値が認められた。しかし、変動幅が小さく、炎症性変化などが認められなかったことから、偶発的な変化と考えられた。

6. 血液生化学検査 (Table 3, 4)

投与期間終了時には、雌の300および1000 mg/kg群で総コレステロールの低値が認められた。

回復期間終了時には、雄の1000 mg/kg群で総コレステロールの低値が認められたが、投与期間終了時にこの変化は認められず、7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム投与との関連は明らかではなかった。雌では、対照群との間に差は認められなかった。

7. 器官重量 (Table 5, 6)

投与期間終了時には雄の1000 mg/kg群で脾臓の絶対重量および相対重量の低値が認められた。雌では、100 mg/kg群で胸腺の相対重量の低値が認められたが、300および1000 mg/kg群では認められなかった。

回復期間終了時には雄の1000 mg/kg群で脾臓の絶対重量および相対重量の低値が認められた。また、腎臓の相対重量の高値も認められたが、投与期間終了時にこの変化は認められず、7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムの影響とは考えなかった。雌では対照群との間に差は認められなかった。

8. 剖検

投与期間終了時および回復期間終了時には、雌雄ともに7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム投与に関連する所見は認められなかった。

9. 病理組織学検査

雌雄ともに7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム投与に関連する所見は認められなかった。

考察

7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムの0 (1%カルメロースナトリウム水溶液)、100, 300および1000 mg/kgを1群あたり雌雄各7あるいは14匹のCrj:CD (SD) ラットに28日間反復経口投与して毒性を検討し、さらに0および1000 mg/kg群の雌雄各7匹を用いて14日間の回復性も併せて検討した。

一般状態、体重、摂餌量、剖検および病理組織学検査では、7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム投与による変化は認められなかった。

尿検査では、投与4週にカリウム排泄量の高値が雄の300および1000 mg/kg群ならびに雌の1000 mg/kg群で認められた。カリウム排泄量の高値は経口投与された7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム中のカリウムが尿中に排泄されたことに起因した変化であると推察され、毒性的な変化とは考えられなかった。また、血中カリウム濃度に変化は認められなかったことから、カリウムの排泄は速やかであったと考えられた。雄の1000 mg/kg群では投与4週にナトリウム排泄量の低値も認められ、カリウム排泄量の増加に対するナトリウムの再吸収亢進の可能性も考えられた。しかし、カリウム排泄量の高値がみられた雄の300 mg/kg群および雌の1000 mg/kg群ではそのような傾向がみられず、ナトリウム排泄量の変化は生理的な変動範囲内であり、その他の腎機能パラメータあるいは腎臓の病理組織学検査では7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム投与によると考えられる変化は認められなかったことから毒性的な変化とは考えられなかった。

血液学検査では、投与期間終了時に雌の1000 mg/kg群でヘマトクリット値、ヘモグロビン量および赤血球の高値あるいは高値傾向ならびに網赤血球率の低値が認められ、7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム投与の影響と考えられた。しかし、造血器系の病理組織学検査では異常は認められず、その機序は明らかにならなかった。血液生化学検査では、投与期間終了時に雌の300および1000 mg/kg群で総コレステロールの低値が認められ、7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウム投与の影響と考えられた。しかし、肝臓等の病理組織学検査では異常は認められず、その機序は明らかにならなかった。なお、回復期間終了時の血液学検査および血液生化学検査ではこれらの変化は認められず、いずれも可逆的な変化と考えられた。

器官重量では、雄の1000 mg/kg群で投与期間終了時

および回復期間終了時に脾臓の絶対重量および相対重量の低値が認められたが、その機序は明らかにならなかった。

以上のことから、本試験における7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸カリウムの無影響量(NOEL)は、雄で300 mg/kg/day、雌で100 mg/kg/dayであると考えられた。

連絡先

試験責任者：吉村浩幸

試験担当者：茂野 均、長谷淳一、古川正敏、
河村公太郎、武田みよ子

（株）化合物安全性研究所

〒004-0839 札幌市清田区真栄363番24

Tel 011-885-5031 Fax 011-885-5313

Correspondence

Authors: Hiroyuki Yoshimura (Study director)

Hitoshi Shigeno, Junichi Nagaya,

Masatoshi Furukawa, Kotaro

Kawamura, Miyoko Takeda

Safety Research Institute for Chemical

Compounds Co., Ltd.

363-24 Shin-ei, Kiyota-ku, Sapporo, Hokkaido,

004-0839, Japan

Tel +81-11-885-5031 Fax +81-11-885-5313

Table 1 Hematological findings in male rats treated orally with potassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	End of administration period				End of recovery period	
	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	6	7
RBC($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8.147 $\pm$ 0.460	8.225 $\pm$ 0.357 (6) ^a	8.157 $\pm$ 0.538	8.219 $\pm$ 0.233	8.743 $\pm$ 0.296	8.611 $\pm$ 0.351
Hematocrit(%)	49.74 $\pm$ 2.15	49.43 $\pm$ 1.37 (6)	49.60 $\pm$ 3.24	49.36 $\pm$ 1.71	50.67 $\pm$ 2.51	50.13 $\pm$ 1.57
Hemoglobin(g/dL)	15.81 $\pm$ 0.61	15.60 $\pm$ 0.23 (6)	15.71 $\pm$ 0.77	15.67 $\pm$ 0.66	16.08 $\pm$ 0.57	15.91 $\pm$ 0.52
MCV(fL)	61.10 $\pm$ 1.37	60.15 $\pm$ 1.68 (6)	60.83 $\pm$ 1.17	60.07 $\pm$ 0.85	57.98 $\pm$ 1.97	58.24 $\pm$ 0.87
MCH(pg)	19.44 $\pm$ 0.73	19.00 $\pm$ 0.83 (6)	19.30 $\pm$ 0.57	19.04 $\pm$ 0.41	18.40 $\pm$ 0.32	18.50 $\pm$ 0.29
MCHC(%)	31.80 $\pm$ 1.05	31.60 $\pm$ 0.77 (6)	31.71 $\pm$ 0.61	31.74 $\pm$ 0.40	31.75 $\pm$ 0.81	31.77 $\pm$ 0.36
WBC($\times 10^3/\mu\text{L}$)	11.43 $\pm$ 3.41	13.02 $\pm$ 2.90 (6)	13.11 $\pm$ 2.56	13.30 $\pm$ 2.41	11.42 $\pm$ 3.20	13.71 $\pm$ 5.22
Platelet($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1029.1 $\pm$ 145.3	1152.8 $\pm$ 88.3 (6)	1145.0 $\pm$ 154.9	1051.6 $\pm$ 325.1	1102.0 $\pm$ 113.4	1082.3 $\pm$ 138.4
Reticulocyte(%)	13.9 $\pm$ 2.7	13.7 $\pm$ 4.8 (6)	14.1 $\pm$ 1.6	14.6 $\pm$ 3.8	12.5 $\pm$ 2.8	12.7 $\pm$ 2.4
CT(sec)	206.4 $\pm$ 30.0	184.0 $\pm$ 77.5	226.7 $\pm$ 78.2	242.9 $\pm$ 56.8	286.2 $\pm$ 115.4	234.0 $\pm$ 60.2
PT(sec)	13.51 $\pm$ 2.09	13.56 $\pm$ 1.51	14.07 $\pm$ 2.26	15.39 $\pm$ 1.67	14.17 $\pm$ 1.45	14.36 $\pm$ 1.85
APTT(sec)	27.13 $\pm$ 2.43	26.71 $\pm$ 3.17	28.69 $\pm$ 2.60	28.90 $\pm$ 3.37	28.50 $\pm$ 2.21	29.84 $\pm$ 3.67
Differential leukocyte counts(%)						
Neutrophil						
Stab form	1.3 $\pm$ 0.8	1.0 $\pm$ 0.9 (6)	1.0 $\pm$ 0.8	0.7 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 1.1	0.9 $\pm$ 0.7
Segmented	8.0 $\pm$ 7.2	12.3 $\pm$ 4.3 (6)	8.1 $\pm$ 2.6	11.7 $\pm$ 5.1	9.8 $\pm$ 2.6	9.6 $\pm$ 7.1
Eosinophil	0.4 $\pm$ 0.5	0.5 $\pm$ 0.8 (6)	0.3 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.5	0.3 $\pm$ 0.5	0.7 $\pm$ 0.8
Basophil	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0 (6)	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Monocyte	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0 (6)	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Lymphocyte	90.3 $\pm$ 7.6	86.2 $\pm$ 5.2 (6)	90.6 $\pm$ 2.9	87.0 $\pm$ 5.2	88.8 $\pm$ 3.1	88.9 $\pm$ 7.9

Values are expressed as Mean $\pm$ S.D.

a) Values in parentheses are number of animals examined.

Table 2 Hematological findings in female rats treated orally with potassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	End of administration period				End of recovery period	
	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	7	7
RBC($\times 10^6/\mu\text{L}$)	7.899 $\pm$ 0.255	7.936 $\pm$ 0.365	8.000 $\pm$ 0.492	8.370 $\pm$ 0.286	8.327 $\pm$ 0.198	8.221 $\pm$ 0.310
Hematocrit(%)	47.11 $\pm$ 1.40	47.13 $\pm$ 1.03	46.84 $\pm$ 2.19	50.07 $\pm$ 2.16*	49.13 $\pm$ 1.62	48.37 $\pm$ 1.46
Hemoglobin(g/dL)	15.36 $\pm$ 0.24	15.57 $\pm$ 0.53	15.34 $\pm$ 0.72	16.44 $\pm$ 0.62**	15.76 $\pm$ 0.49	15.43 $\pm$ 0.56
MCV(fL)	59.66 $\pm$ 1.43	59.46 $\pm$ 1.66	58.61 $\pm$ 1.21	59.81 $\pm$ 1.15	59.00 $\pm$ 1.45	58.86 $\pm$ 1.43
MCH(pg)	19.47 $\pm$ 0.62	19.66 $\pm$ 1.00	19.20 $\pm$ 0.81	19.64 $\pm$ 0.40	18.93 $\pm$ 0.57	18.77 $\pm$ 0.34
MCHC(%)	32.63 $\pm$ 0.94	33.04 $\pm$ 1.09	32.77 $\pm$ 0.84	32.89 $\pm$ 0.41	32.09 $\pm$ 0.71	31.89 $\pm$ 0.53
WBC($\times 10^3/\mu\text{L}$)	7.84 $\pm$ 1.04	7.69 $\pm$ 1.77	7.66 $\pm$ 0.85	8.70 $\pm$ 2.55	8.06 $\pm$ 3.21	7.86 $\pm$ 1.50
Platelet($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1149.7 $\pm$ 38.1	1157.3 $\pm$ 71.5	1116.4 $\pm$ 74.3	1173.0 $\pm$ 93.8	1121.9 $\pm$ 109.1	1119.0 $\pm$ 107.8
Reticulocyte(%)	13.4 $\pm$ 2.8	13.4 $\pm$ 2.4	13.3 $\pm$ 2.3	9.7 $\pm$ 1.7*	12.7 $\pm$ 3.9	13.4 $\pm$ 3.5
CT(sec)	186.1 $\pm$ 80.2	156.1 $\pm$ 12.5	164.0 $\pm$ 47.9	195.7 $\pm$ 52.3	220.7 $\pm$ 74.6	212.6 $\pm$ 68.4
PT(sec)	11.68 $\pm$ 0.55 (6) ^a	11.93 $\pm$ 0.39	11.73 $\pm$ 0.52 (6)	11.93 $\pm$ 0.46	12.21 $\pm$ 0.55	12.14 $\pm$ 0.33
APTT(sec)	19.85 $\pm$ 1.00 (6)	21.07 $\pm$ 2.57	19.92 $\pm$ 1.18 (6)	20.87 $\pm$ 2.38	21.89 $\pm$ 1.67	22.81 $\pm$ 1.30
Differential leukocyte counts(%)						
Neutrophil						
Stab form	0.7 $\pm$ 0.8	0.7 $\pm$ 0.8	1.0 $\pm$ 0.8	1.1 $\pm$ 1.2	0.9 $\pm$ 0.9	0.9 $\pm$ 0.4
Segmented	13.7 $\pm$ 4.4	11.4 $\pm$ 2.2	12.6 $\pm$ 6.1	8.3 $\pm$ 3.2	8.6 $\pm$ 2.5	12.6 $\pm$ 3.9*
Eosinophil	0.6 $\pm$ 0.8	0.4 $\pm$ 0.5	0.9 $\pm$ 0.9	0.7 $\pm$ 0.8	0.9 $\pm$ 0.9	0.9 $\pm$ 0.7
Basophil	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Monocyte	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Lymphocyte	85.0 $\pm$ 5.2	87.4 $\pm$ 2.4	85.6 $\pm$ 6.5	89.9 $\pm$ 2.9	89.7 $\pm$ 2.1	85.7 $\pm$ 4.5

Values are expressed as Mean $\pm$ S.D.Significantly different from 0 mg/kg group (* p < 0.05, ** p < 0.01)

a) Values in parentheses are number of animals examined.

Table 3 Blood chemical findings of male rats treated orally with potassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	6	7
Total protein (g/dL)	5.57 ± 0.11	5.66 ± 0.21	5.71 ± 0.24	5.67 ± 0.19	5.80 ± 0.22	5.89 ± 0.21
Albumin (g/dL)	2.23 ± 0.08	2.33 ± 0.10	2.29 ± 0.12	2.27 ± 0.10	2.25 ± 0.10	2.24 ± 0.15
A/G	0.670 ± 0.037	0.703 ± 0.041	0.670 ± 0.040	0.671 ± 0.047	0.638 ± 0.064	0.620 ± 0.068
Protein fraction (%)						
Albumin	53.97 ± 1.43	54.13 ± 1.69	52.07 ± 1.94	53.00 ± 2.84	51.92 ± 2.44	49.46 ± 3.28
α_1 -globulin	23.31 ± 1.65	23.76 ± 1.99	24.99 ± 0.52	24.00 ± 2.22	24.10 ± 3.23	25.79 ± 1.30
α_2 -globulin	5.87 ± 1.00	5.43 ± 0.70	5.41 ± 1.27	5.26 ± 0.89	8.37 ± 3.04	7.13 ± 2.35
β -globulin	15.71 ± 0.81	15.66 ± 1.00	16.57 ± 1.09	16.54 ± 1.37	14.32 ± 3.67	16.13 ± 3.90
γ -globulin	1.13 ± 0.51	1.03 ± 0.36	0.96 ± 0.35	1.20 ± 0.63	1.30 ± 0.52	1.50 ± 0.46
GOT (IU/L)	100.3 ± 7.4	101.9 ± 11.6	102.9 ± 10.9	96.1 ± 14.1	114.8 ± 22.9	109.3 ± 28.4
GPT (IU/L)	27.1 ± 2.9	26.6 ± 3.2	27.7 ± 4.1	25.1 ± 1.5	25.2 ± 3.5	25.7 ± 3.6
ALP (IU/L)	452.1 ± 71.8	503.4 ± 95.4	468.7 ± 83.1	442.9 ± 92.1	359.7 ± 25.9	318.4 ± 49.9
LDH (IU/L)	1870.9 ± 485.5	2072.0 ± 422.5	2126.7 ± 320.0	1838.3 ± 682.9	2378.3 ± 1060.8	2286.6 ± 1059.1
γ -GTP (IU/L)	0.59 ± 0.24	0.70 ± 0.63	0.84 ± 0.33	1.01 ± 1.03	0.63 ± 0.42	0.77 ± 0.27
Total bilirubin (mg/dL)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
Glucose (mg/dL)	142.0 ± 14.6	138.4 ± 18.4	149.0 ± 10.0	146.3 ± 13.9	139.3 ± 6.4	154.0 ± 26.6
Total cholesterol (mg/dL)	54.9 ± 6.5	49.6 ± 5.0	59.0 ± 13.4	47.4 ± 7.8	57.0 ± 5.5	50.6 ± 15.5*
Triglyceride (mg/dL)	46.4 ± 16.0	37.4 ± 10.1	48.9 ± 9.2	35.4 ± 19.2	44.5 ± 19.3	38.6 ± 8.4
Urea nitrogen (mg/dL)	15.50 ± 1.48	14.37 ± 1.63	15.43 ± 0.54	14.77 ± 1.93	17.73 ± 0.64	17.81 ± 1.81
Creatinine (mg/dL)	0.46 ± 0.05	0.46 ± 0.08	0.44 ± 0.05	0.50 ± 0.06	0.47 ± 0.05	0.44 ± 0.05
Sodium (mEq/L)	145.64 ± 0.63	145.00 ± 0.65	145.29 ± 1.19	144.57 ± 1.24	145.42 ± 1.43	144.43 ± 0.98
Potassium (mEq/L)	4.681 ± 0.145	5.023 ± 0.333	4.900 ± 0.280	4.897 ± 0.464	4.852 ± 0.265	4.817 ± 0.219
Chlorine (mEq/L)	107.3 ± 1.4	108.0 ± 2.0	106.7 ± 1.4	109.3 ± 1.1	108.0 ± 1.1	107.3 ± 1.5
Calcium (mg/dL)	9.87 ± 0.21	10.01 ± 0.29	10.04 ± 0.26	9.97 ± 0.24	9.73 ± 0.20	9.63 ± 0.26
Inorganic phosphorous (mg/dL)	8.16 ± 0.43	8.60 ± 0.51	8.73 ± 0.47	8.29 ± 0.65	7.78 ± 0.47	7.80 ± 0.42

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (* $p < 0.05$)

Table 4 Blood chemical findings of female rats treated orally with potassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	7	7
Total protein (g/dL)	5.81 ± 0.22	5.80 ± 0.27	5.77 ± 0.21	5.69 ± 0.25	6.19 ± 0.28	6.11 ± 0.31
Albumin (g/dL)	2.51 ± 0.16	2.50 ± 0.13	2.56 ± 0.14	2.41 ± 0.12	2.64 ± 0.14	2.59 ± 0.18
A/G	0.764 ± 0.050	0.760 ± 0.045	0.796 ± 0.062	0.739 ± 0.037	0.746 ± 0.036	0.731 ± 0.021
Protein fraction (%)						
Albumin	58.79 ± 2.68	58.79 ± 1.54	59.34 ± 1.82	57.64 ± 1.04	59.84 ± 1.80	58.63 ± 0.74
α_1 -globulin	19.49 ± 1.38	19.94 ± 1.90	18.69 ± 1.31	20.80 ± 1.10	19.24 ± 1.44	19.81 ± 1.32
α_2 -globulin	5.27 ± 1.83	4.66 ± 1.24	5.07 ± 1.68	4.50 ± 0.91	7.43 ± 1.65	7.91 ± 1.51
β -globulin	14.69 ± 2.10	15.04 ± 0.97	15.23 ± 1.33	15.50 ± 1.13	11.23 ± 2.44	11.66 ± 2.54
γ -globulin	1.77 ± 0.51	1.57 ± 0.33	1.67 ± 0.58	1.56 ± 0.27	2.26 ± 0.78	1.99 ± 0.82
GOT (IU/L)	119.9 ± 19.8	111.9 ± 16.9	108.4 ± 17.5	114.4 ± 17.5	131.1 ± 25.4	129.6 ± 28.0
GPT (IU/L)	24.0 ± 4.7	23.4 ± 4.5	22.7 ± 3.1	23.7 ± 5.7	25.3 ± 9.4	25.0 ± 8.9
ALP (IU/L)	236.3 ± 52.8	259.9 ± 72.6	286.1 ± 56.8	258.4 ± 56.8	178.0 ± 53.0	178.6 ± 21.3
LDH (IU/L)	2613.4 ± 721.6	2174.6 ± 412.3	2208.4 ± 655.8	2452.9 ± 606.1	3006.6 ± 1051.9	2908.9 ± 923.6
γ -GTP (IU/L)	1.00 ± 0.40	1.26 ± 0.29	1.11 ± 0.47	1.24 ± 0.43	1.00 ± 0.59	0.89 ± 0.35
Total bilirubin (mg/dL)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
Glucose (mg/dL)	123.9 ± 20.3	115.7 ± 15.1	121.9 ± 13.9	111.4 ± 6.7	141.9 ± 14.2	132.0 ± 18.0
Total cholesterol (mg/dL)	67.0 ± 9.9	60.4 ± 11.8	51.9 ± 6.6*	49.6 ± 10.2**	59.7 ± 10.1	61.4 ± 10.3
Triglyceride (mg/dL)	20.3 ± 15.1	11.3 ± 4.2	13.1 ± 2.5	16.3 ± 11.1	13.9 ± 4.8	16.4 ± 7.8
Urea nitrogen (mg/dL)	18.00 ± 1.61	18.49 ± 2.13	16.50 ± 1.19	16.86 ± 2.54	19.23 ± 2.30	20.93 ± 2.23
Creatinine (mg/dL)	0.50 ± 0.06	0.54 ± 0.05	0.46 ± 0.05	0.46 ± 0.05	0.51 ± 0.04	0.57 ± 0.10
Sodium (mEq/L)	143.57 ± 1.06	144.14 ± 0.63	143.14 ± 1.21	142.71 ± 1.32	143.43 ± 0.89	143.50 ± 0.82
Potassium (mEq/L)	4.710 ± 0.183	4.447 ± 0.306	4.743 ± 0.375	4.836 ± 0.286	4.489 ± 0.343	4.651 ± 0.184
Chlorine (mEq/L)	109.4 ± 1.0	109.4 ± 1.3	107.9 ± 2.2	107.7 ± 1.5	108.6 ± 2.1	107.7 ± 1.8
Calcium (mg/dL)	9.80 ± 0.28	9.63 ± 0.31	9.64 ± 0.46	9.79 ± 0.32	9.70 ± 0.28	9.86 ± 0.28
Inorganic phosphorous (mg/dL)	7.44 ± 1.11	7.67 ± 0.84	7.87 ± 1.44	8.16 ± 0.74	6.46 ± 0.63	7.00 ± 0.65

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)