最終報告書

表　　題：2-メチル-2-プロペンニトリルのラットにおける反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

試験番号：ＳＲ－９８７７

株式会社 化合物安全性研究所

目　次

頁

要約 …… 2
緒言 …… 4
材料および方法 …… 4
成績 …… 16
考察 …… 21
参考文献 …… 23

Figures …… 添付

1. Body weight changes of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)
2. Food consumption of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)
3. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)
4. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)
5. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)
6. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)
7. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)
8. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

9. Body weight changes of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in rats (SR-9877)

Tables ····· 添付

1. Experimental design for the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in rats (SR-9877)
2. General appearance of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)
3. Body weight changes of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)
4. Food consumption of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)
5. Urinary findings of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)
6. Hematological findings of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)
7. Biochemical findings of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)
8. Gross findings of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)
9. Absolute and relative organ weights of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)
10. Histopathological findings of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)
11. General appearance of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)
12. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)
13. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

14. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

15. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

16. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

17. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

18. Hematological findings of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

19. Biochemical findings of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

20. Gross findings of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

21. Absolute and relative organ weights of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

22. Histopathological findings of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

23. Influence of 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) on reproductive ability of rats in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

24. Influence of 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) on delivery and maternal behavior in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats (SR-9877)

25. Influence of 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) on viability of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats (SR-9877)

26. General appearance of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in rats (SR-9877)

27. Body weight changes of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in rats (SR-9877)

28. Gross findings of pups in the combined repeat dose and reproductive/ developmental toxicity screening test of 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in rats (SR-9877)

要　約

2-メチル-2-プロペンニトリルの 0(対照群)、7.5、15 および 30 mg/kg を 1 群雌雄各 12 匹の Crj:CD(SD)IGS ラットに、雄ラットに対しては交配前、交配期間および交配後を含む計 46 日間、雌ラットに対しては交配前、交配および妊娠期間、ならびに哺育 4 日までの期間、反復経口投与し、雌雄動物への反復投与による影響、雌雄動物の生殖および新生児の発生に及ぼす影響について検討し、以下の成績を得た。

１．反復投与毒性

1)雄動物に及ぼす影響

(1)一般状態、体重推移、摂餌量および尿検査では、各投与群とも変化は認められなかった。

(2)血液学的検査では、赤血球数、ヘマトクリット値およびヘモグロビン量の低値が 30 mg/kg 群で認められた。

(3)血液化学的検査では、カリウムの低値が 15 および 30 mg/kg 群で、クレアチニンの高値が 30 mg/kg 群で認められた。

(4)剖検では、腺胃粘膜の暗赤色斑が 30 mg/kg 群の 1 例で認められ、病理組織学的検査でもびらんが認められた。

(5)器官重量では、肝臓の器官体重重量比の高値が 30 mg/kg 群で認められた。

2)雌動物に及ぼす影響

(1)一般状態、体重推移、摂餌量および血液学的検査では、各投与群とも変化は認められなかった。

(2)血液化学的検査では、総ビリルビンおよびグルコースの高値が 30 mg/kg 群で認められた。

(3)剖検では、腺胃粘膜の暗赤色斑が 7.5 および 15 mg/kg 群で各 1 例に、30 mg/kg 群で 2 例に認められ、これらの例の病理組織学的検査ではびらんも認められた。

(4)器官重量では、肝臓の器官重量の高値が 30 mg/kg 群で、肝臓の器官体重重量比の高値が各投与群で、脾臓の器官重量および器官体重重量比の高値が 30 mg/kg 群で、心臓の器官重量の高値が各投与群で、また、心臓の器官体重重量比の高値が 15 および 30 mg/kg 群で認められた。

(5)病理組織学的検査では、脾臓に髄外造血が 15 mg/kg 群で 3 例、30 mg/kg 群で 7 例に認められ、30 mg/kg 群では有意差も認められた。

以上のことから、雄の 15 mg/kg 以上の群においてカリウムの低値、雌の 7.5 mg/kg 以上の群において心臓の器官重量の高値および腺胃粘膜のびらんがそれぞれ認められた。したがって、本試験条件下における 2-メチル-2-プロペンニトリルの無影響量(NOEL)は雄で 7.5 mg/kg/day であ

り、雌では7.5 mg/kg/day未満と考えられた。

2．生殖発生毒性

(1)生殖能検査では、各投与群とも雌雄の交尾率、雌の性周期および受胎率、生殖器(精巣、精巣上体および卵巣)および内分泌器官(副腎)の重量ならびに剖検に変化は認められなかった。また、30 mg/kg群での生殖器の病理組織学的検査でも異常は認められなかった。

(2)母動物の剖検、妊娠期間、着床数、出産率、分娩率、出産児数および出産確認時生存児数および出生率では、各投与群とも変化は認められなかった。

(3)新生児の一般状態、新生児生存率、体重および剖検では、各投与群とも変化は認められなかった。

以上のことから、各投与群とも雌雄の生殖および新生児の発生に影響は認められなかった。したがって、本試験条件下における 2-メチル-2-プロペンニトリルの反復投与による親動物の生殖に対する無影響量(NOEL)ならびに新生児の発生に対する無影響量(NOEL)は 30 mg/kg/day 以上と考えられた。

緒　言

この試験は、OECD 既存化学物質の安全性点検事業の一環として、2-メチル-2-プロペンニトリルの 0(対照群)、7.5、15 および 30 mg/kg を 1 群雌雄各 12 匹の Crj:CD(SD)IGS ラットに反復経口投与して、雌雄動物への反復投与による影響、雌雄動物の生殖および新生児の発生に及ぼす影響を検討する目的で実施した。

材料および方法

1. 被験物質

被験物質は、2-メチル-2-プロペンニトリル(2-methyl-2-propenenitrile、以下 MAN と略す、CAS No.：126-98-7、 ロット番号：　　純度：99wt%、提供者：　　)で、常温において無色透明の液体である(Appendix 1 および 2)。MAN は遮光気密容器に入れ、冷暗所(実測範囲 4～10℃)に保存した。被験物質サンプルとして、上記ロットについて約 1 g を採取し、試験施設の検体保存室に保存した。試験期間中の被験物質の安定性については、残余被験物質を用いて提供者である　　が純度の分析を行い確認した(Appendix 3)。

2. 対照物質

対照物質として日本薬局方オリブ油(ロット番号：811152、812143、810152、808128、ヤクハン製薬株式会社)を室温で保存し、投与に使用した。また、MAN の溶媒として投与液の調製にも使用した。

3. 投与液の調製および化学分析

(1) 投与液の調製

投与量ごとに MAN を精秤し、所定の濃度となるように対照物質であるオリブ油に溶解した。調製の際にはゴム手袋、マスクおよびゴーグルを着用し、作業をドラフト内で行った。調製頻度は 8 日間に 1 回以上の頻度で行い、調製液は調製後速やかに遮光気密容器に入れ、使用時まで冷所保存し、室温に戻してから投与に使用した。残余調製液は焼却処分とした。

(2) 投与液の化学分析

投与に先立って 0.2 mg/mL および 200 mg/mL の濃度の調製液中の MAN の安定性について分析した結果、MAN は調製液中で室温 3 時間、冷暗所(実測範囲 1～3℃)保存条件下で 8 日間安定であることが確認された(Appendix 4)。

投与に用いる初回および最終調製時の各濃度の調製液について MAN の濃度を分析した結果、含有率は所定の濃度の 97.7～103%であり、調製状態は良好であると判断した(Appendix 5 および 6)。

以上の分析は、保土ヶ谷コントラクトラボ株式会社において実施された。

4. 試験方法

(1) 試験系

試験には、日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センター生産の SPF Crj:CD(SD)IGS ラットを用いた。ラットはこの種の試験で通常用いられている動物種であり、当研究所での使用経験が豊富であることからこの系統を選定した。

雌雄各々55 匹を 1999 年 3 月 17 日に 8 週齢で購入した。受入時の動物の体重範囲は、雄で 274～306 g、雌で 167～206 g であった。

(2) 検疫および馴化

受入後、個々の動物について 14 日間、一般状態観察を 1 日 1 回、さらに期間中に体重測定を 3 回実施した。雌については馴化期間中に 10 日間の性周期検査を実施した。検疫および馴化期間中、動物に異常はみられなかった。

(3) 群分け

検疫および馴化期間終了後、健康な動物で、雌については性周期に異常の認められない動物を雌雄各々48 匹選抜して、10 週齢で試験に供した。検疫および馴化期間終了日(投与前々日)の体重に基づいて、層化無作為抽出法により各群の平均体重が均一になるように群分けを行った。群分け時の動物の体重範囲は、雄で 348～422 g、雌で 212～260 g であり、平均体重(雄 387.6 g、雌 234.3 g)の±20%以内であった。選抜から外れた動物は試験から除外した。

(4) 動物およびケージの識別

動物は、群分け前は油性フェルトペンで尾部に印を付け、群分け後は耳介に動物番号を入墨し、個体識別を行った。出生児については油性フェルトペンで背部にケージ内識別番号を記入し、個体識別を行った。飼育ケージは、群分け前は性別毎に色分けしたラベルに試験番号および動物番号を明記し、各ケージの前面に標示した。群分け後は、性別毎に色分けしたラベルに試験番号、試験群および動物番号を明記し、各ケージの前面に標示した。

(5) 動物飼育

1) 飼育環境

動物は温度 23±3℃(実測範囲 21～24℃)、湿度 55±10%(実測範囲 37～62%)、換気回数 10～15 回／時間、照明時間 12 時間(午前 8 時点灯、午後 8 時消灯の人工照明)の動物飼育室(301 号室)で飼育した。動物飼育室の温度および湿度は毎日監視した。

2) 飼育器材および飼育方法

ブラケット式金属製金網床ケージ(260W×380D×180H, mm)に、検疫および馴化期間中は雌雄別に 3 匹以内、群分け後は 1 匹、交配中は雌雄各 1 匹、妊娠期間中は 1 母動物、哺育期間中は 1 腹を収容した。なお、交尾成立雌動物については妊娠 17 日から哺育 4 日まで実験動物用床敷(ホワイトフレーク、日本チャールス・リバー株式会社)を使用した。ケー

よび給餌器は群分け時に１回、その後は２週に１回交換した。受皿は週２回洗浄滅菌済みのものと交換した。自動給水装置の水抜きは週１回実施した。動物飼育室内の清掃および清拭消毒は、１日１回実施した。清拭消毒に際しては、塩素系消毒薬およびヨウ素系消毒薬を１週間単位で交互に使用した。

3) 飼料

オリエンタル酵母工業株式会社製、γ線照射固型飼料 CRF-1 を、金属製給餌器を用いて自由に摂取させた。

試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質あるいは微生物の有無を、使用したロット(990109、990203)の飼料について、汚染物質の分析は財団法人日本食品分析センター、また微生物検査はオリエンタル酵母工業株式会社がそれぞれ行った。分析項目と許容基準値は㈱化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも許容基準値を超える値は認められなかった(Appendix 7～10)。

4) 飲料水

札幌市水道水を、自動給水装置を用いて自由に摂取させた。

試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質あるいは微生物の有無を、1999 年 1 月 12 日および 1999 年 4 月 6 日に試料を採取して、日本衛生株式会社において分析した。分析項目と許容基準値は㈱化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも許容基準値を超える値は認められなかった(Appendix 11 および 12)。

(6) 試験群の構成

試験群の構成と各群の動物番号を Table 1 に示す。

(7) 被験物質の投与

1) 投与量の設定

MAN の投与量は反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験のための予備試験(試験番号ＳＲ－９８７６)[1]および急性経口投与毒性試験のための予備試験(試験番号ＳＲ－９８７４)[2]の結果に基づいて設定した。反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験のための予備試験(ＳＲ－９８７６)では、5、15 および 30 mg/kg の用量で 1 群雌雄各 5 匹の Crj:CD(SD)IGS ラットに１日１回、14 日間投与したところ、30 mg/kg 群の雄で体重増加量の低値、雌で投与 14 日に摂餌量の低値が認められ、その他の検査項目には異常は認められなかった。以上の結果から、反復投与毒性･生殖発生毒性併合試験では、高用量を死亡あるいは衰弱例がみられず、体重推移に影響が予測される用量として 30 mg/kg/day を設定し、以下、公比２で 15 および 7.5 mg/kg/day を雌雄ともに設定し、これに溶媒(オリブ油)のみを同様に投与する対照群を設けた。

2) 投与

MAN がヒトに経口的に暴露される可能性を考慮し、OECD 試験法ガイドライン(OECD

Guideline for Testing of Chemicals；Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction / Developmental Toxicity Screening Test(422), 1996)に従って、1 日 1 回、雄については交配 14 日前より 46 日間、雌については交配前 14 日間および交尾成立までの交配期間、さらに交尾成立例は妊娠期間および哺育 4 日までの期間、交尾不成立例は交配期間終了後 23 日までの期間、午前 9 時から 12 時 30 分の間に胃ゾンデを用いて胃内に強制経口投与した。

投与容量は 5 mL/kg とし、各個体の投与液量は投与日に最も近い測定日の体重に基づいて算出した。

(8) 観察、測定および検査項目

Ⅰ. 雄動物について

1) 一般状態観察

全例について、試験期間中 1 日 1 回の頻度で、視診および触診により行動、外観などを観察した。

2) 体重測定

全例について、投与 1、2、5、7、10 および 14 日、その後は 7 日毎の投与前、投与終了日および剖検日に電子天秤(ザルトリウス 1401 B MP7-2 および 1407 MP8-1、カールツァイス株式会社)を用いて測定した。

体重増加量および体重増加率を以下の計算式により算出した。

体重増加量＝(投与 46 日体重)－(投与 1 日体重)

体重増加率＝(体重増加量／投与 1 日体重)×100

3) 摂餌量測定

全例について、投与 1 日(投与前)、投与 2、5、7、10 および 14 日、その後は交配期間を除き体重測定日と同じ日に、投与終了日も含め測定した。測定前日の給与量から翌日の残量を減じて個々の動物の 1 日分の摂餌量を算出した。測定には電子天秤(ザルトリウス 1401 B MP7-2 または 1407 MP8-1、カールツァイス株式会社)を使用した。

4) 尿検査

投与期間の最終週(投与 43～44 日)に、各群 6 例について非絶食下でラット用代謝ケージ(KN-646 B-1 型、株式会社夏目製作所)を用いて採尿し、約 3 時間の蓄尿で①～⑨を、また、約 21 時間の蓄尿で⑩および⑪の項目の検査を行った。また、採尿中の飲水量を測定した。

検査項目および検査方法：

①pH	試験紙法(ﾏﾙﾃｨｽﾃｨｯｸｽ、ﾊﾞｲｴﾙ・三共)
②蛋白(Pro)	試験紙法(ﾏﾙﾃｨｽﾃｨｯｸｽ、ﾊﾞｲｴﾙ・三共)

③糖(Glu)	試験紙法(ﾏﾙﾃｨｽﾃｨｯｸｽ、ﾊﾞｲｴﾙ・三共)
④ケトン体(Ket)	試験紙法(ﾏﾙﾃｨｽﾃｨｯｸｽ、ﾊﾞｲｴﾙ・三共)
⑤ウロビリノーゲン(Uro)	試験紙法(ﾏﾙﾃｨｽﾃｨｯｸｽ、ﾊﾞｲｴﾙ・三共)
⑥ビリルビン(Bil)	試験紙法(ﾏﾙﾃｨｽﾃｨｯｸｽ、ﾊﾞｲｴﾙ・三共)
⑦潜血反応(Occult blood)	試験紙法(ﾏﾙﾃｨｽﾃｨｯｸｽ、ﾊﾞｲｴﾙ・三共)
⑧沈渣(Urinary Sediments)	鏡検
⑨色調(Color)	肉眼観察
⑩尿量(U-Vol)	容量測定
⑪比重(Specific gravity)	屈折計法(尿比重屈折計ﾕﾘｺﾝ-S、ｱﾀｺﾞ)
⑫採尿中の飲水量(Water consumption)	給水瓶の重量測定による

5) 血液学的検査

全例について、投与 46 日の翌日の剖検時に約 16～22 時間絶食したラットをエーテル麻酔し、腹部大動脈から約 1 mL 採血した。①～⑩については EDTA･2K(ベノジェクトⅡ真空採血管、テルモ株式会社)で処理した血液を用い、⑪および⑫については 3.8%クエン酸ナトリウムで処理し、3000 rpm で 10 分間の遠心分離で得られた血漿を用いた。なお、得られた血液および血漿は検査終了後、廃棄した。

検査項目および検査方法：

①赤血球数(RBC)	電気抵抗法(自動血球計数装置 F-820、ｼｽﾒｯｸｽ)
②ヘマトクリット値(Ht)	電気抵抗法(自動血球計数装置 F-820、ｼｽﾒｯｸｽ)
③ヘモグロビン量(Hb)	シアンメトヘモグロビン法 (自動血球計数装置 F-820、ｼｽﾒｯｸｽ)
④平均赤血球容積(MCV)	RBC, Ht 値より算出 (自動血球計数装置 F-820、ｼｽﾒｯｸｽ)
⑤平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)	RBC, Hb 値より算出 (自動血球計数装置 F-820、ｼｽﾒｯｸｽ)
⑥平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)	Ht, Hb 値より算出 (自動血球計数装置 F-820、ｼｽﾒｯｸｽ)
⑦網赤血球数(Ret)	Brecher 法(鏡検)
⑧血小板数(Plat)	電気抵抗法(自動血球計数装置 F-820、ｼｽﾒｯｸｽ)
⑨白血球数(WBC)	電気抵抗法(自動血球計数装置 F-820、ｼｽﾒｯｸｽ)
⑩白血球百分比(Hemogram of WBC)	May-Grünwald-Giemsa 染色標本鏡検
⑪プロトロンビン時間(PT)	トロンボプラスチン法 (血液凝固自動測定装置ｱﾒﾙﾝｸﾞKC-10A、ﾊﾞｸｽﾀｰ)

⑫活性化部分ﾄﾛﾝﾎﾞﾌﾟﾗｽﾁﾝ時間(APTT)	エラジン酸法 (血液凝固自動測定装置ｱﾒﾙﾝｸﾞKC-10A、ﾊﾞｸｽﾀｰ)

6) 血液化学的検査

全例について、剖検時に約 16～22 時間絶食したラットをエーテル麻酔し、腹部大動脈より採血した。①および⑤については血液 1 mL あたりヘパリンナトリウム(ヘパリンナトリウム注、1000 単位/mL、持田製薬株式会社)約 20 単位で処理後、3000 rpm で 10 分間の遠心分離で得られた血漿を用いて検査した。他の項目については分離剤入り試験管(セパクリーン、栄研器材株式会社)に血液を採取し、3000 rpm で 10 分間の遠心分離で得られた血清を用いて検査した。なお、得られた血漿および血清は検査終了後、-20℃で凍結保存した。

検査項目および検査方法：

① GOT	IFCC 法(自動分析装置 7150 形、日立製作所)
② GPT	IFCC 法(自動分析装置 7150 形、日立製作所)
③アルカリホスファターゼ(ALP)	Bessey-Lowry 法 (自動分析装置 7150 形、日立製作所)
④γ－GTP	包接 L-γ-グルタミル-p-ニトロアニリド基質法 (自動分析装置 7150 形、日立製作所)
⑤グルコース(Glu)	ヘキソキナーゼ法 (自動分析装置 7150 形、日立製作所)
⑥コリンエステラーゼ(Ch-E)	ヨウ化ブチリルチオコリン基質法 (自動分析装置 7150 形、日立製作所)
⑦総コレステロール(T-Cho)	酵素法(自動分析装置 7150 形、日立製作所)
⑧リン脂質(PL)	酵素法(自動分析装置 7150 形、日立製作所)
⑨トリグリセリド(TG)	遊離グリセロール消去法 (自動分析装置 7150 形、日立製作所)
⑩総ビリルビン(T-Bil)	アゾビリルビン法 (自動分析装置 7150 形、日立製作所)
⑪尿素窒素(UN)	ウレアーゼ・インドフェノール法 (自動分析装置 7150 形、日立製作所)
⑫クレアチニン(Crea)	Jaffé法(自動分析装置 7150 形、日立製作所)
⑬ナトリウム(Na)	炎光光度法(自動炎光光度計 480 型、コーニング)
⑭カリウム(K)	炎光光度法(自動炎光光度計 480 型、コーニング)

⑮クロール(Cl)	電量滴定法 (クロライドカウンターCL-6M、平沼産業)
⑯カルシウム(Ca)	OCPC 法(自動分析装置 7150 形、日立製作所)
⑰無機リン(IP)	Fiske-SubbaRow 法 (自動分析装置 7150 形、日立製作所)
⑱総蛋白(TP)	ビウレット法 (自動分析装置 7150 形、日立製作所)
⑲蛋白分画(Protein fraction)	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)
⑳A/G 比(A/G)	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)

7) 剖検

全例について、投与 46 日の翌日に剖検した。体外表を観察し、エーテル麻酔下で採血後、放血致死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。以下の器官・組織を 10%中性緩衝ホルマリン液に固定・保存した。なお、眼球およびハーダー腺は Davidson 液で固定・保存し、精巣および精巣上体はブアン液で固定後 70%エタノールに保存した。

脳(大脳・小脳)、下垂体、胸腺、甲状腺(左右)、上皮小体(左右)、副腎(左右)、脾臓、心臓、胸部大動脈、舌、食道、胃(前胃および腺胃)、肝臓、膵臓、十二指腸、空腸、回腸(パイエル板を含む)、盲腸、結腸、直腸、喉頭、気管、肺(気管支含む)、腎臓(左右)、膀胱、精巣(左右)、精巣上体(左右)、前立腺、精嚢(凝固腺含む、左右)、眼球(左右)、ハーダー腺(左右)、皮膚(右腹部)、胸骨(骨髄含む)、大腿骨(骨髄含む、右)、脊髄(頸部)、骨格筋(右大腿部)、腸間膜リンパ節、下顎リンパ節(左右)、顎下腺(左右)、舌下腺(左右)、耳下腺(左右)および坐骨神経(右)

8) 器官重量測定

全例について、剖検時に電子天秤(ER-180A、エー・アンド・デイ株式会社)を用いて以下の器官について重量を測定した。なお、左右の表示のある器官については、左右別々に測定し、その合計値を算出した。

脳、心臓、肝臓、腎臓(左右)、脾臓、副腎(左右)、胸腺、精巣(左右)および精巣上体(左右)

個々の器官重量と剖検日に測定した動物体重に基づいて、器官体重重量比を以下の計算式により算出した。

器官体重重量比＝(器官重量／動物体重)×100

9) 病理組織学的検査

対照群および高用量群の全例の保存器官・組織ならびに全例の腺胃と下垂体、剖検時に脾臓の嚢胞および精巣の萎縮がみられたNo. 308(15 mg/kg群)の脾臓および精巣(左)をパラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、対照群および30 mg/kg群の脾臓についてはベルリン青染色標本も作製して鏡検した。

Ⅱ．雌動物について

1) 一般状態観察

全例について、試験期間中1日1回の頻度で、視診および触診により行動、外観などを観察した。

2) 体重測定

投与開始日を投与1日、交尾成立日を妊娠0日および分娩終了日を哺育0日と起算し、投与1、2、5、7、10および14日の投与前、さらに交尾成立例については妊娠0、1、3、5、7、10、14、17および20日、哺育0、1および4日の投与前ならびに哺育4日の翌日(剖検日)に、交尾不成立例については投与28、35、42および49日の投与前および51日の翌日(剖検日)に電子天秤(ザルトリウス 1401 B MP7-2 および 1407 MP8-1、カールツァイス株式会社)を用いて測定した。交配期間中(雄との同居中)は投与液量算出のため、相手雄の測定日と同じ日に測定した。

体重増加量および体重増加率を以下の計算式により算出した。

妊娠前投与期間体重増加量＝(投与14日体重)－(投与1日体重)

妊娠期間体重増加量＝(妊娠20日体重)－(妊娠0日体重)

哺育期間体重増加量＝(哺育4日体重)－(哺育0日体重)

体重増加率＝(体重増加量／投与1日体重、妊娠0日あるいは哺育0日体重)×100

3) 摂餌量測定

全例について投与1、2、5、7、10および14日、さらに交尾成立例については妊娠1、3、5、7、10、14、17および20日ならびに哺育1および4日に測定した。測定前日の給与量から翌日の残量を減じて個々の動物の1日分の摂餌量を算出した。測定には電子天秤(ザルトリウス1401 B MP7-2または1407 MP8-1、カールツァイス株式会社)を使用した。

4) 血液学的検査

哺育母動物各群6例について、分娩後5日(哺育4日の翌日)に約16～22時間絶食したラットをエーテル麻酔し、腹部大動脈から約1 mL採血した。①～⑩についてはEDTA・2K(ベノジェクトⅡ真空採血管、テルモ株式会社)で処理した血液を用い、⑪および⑫については3.8%クエン酸ナトリウムで処理し、3000 rpmで10分間の遠心分離で得られた血漿を用いた。なお、得られた血液および血漿は検査終了後、廃棄した。

検査項目および検査方法：

①赤血球数(RBC)	電気抵抗法(自動血球計数装置 F-820、ｼｽﾒｯｸｽ)
②ヘマトクリット値(Ht)	電気抵抗法(自動血球計数装置 F-820、ｼｽﾒｯｸｽ)
③ヘモグロビン量(Hb)	シアンメトヘモグロビン法 (自動血球計数装置 F-820、ｼｽﾒｯｸｽ)
④平均赤血球容積(MCV)	RBC，Ht 値より算出 (自動血球計数装置 F-820、ｼｽﾒｯｸｽ)
⑤平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)	RBC，Hb 値より算出 (自動血球計数装置 F-820、ｼｽﾒｯｸｽ)
⑥平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)	Ht，Hb 値より算出 (自動血球計数装置 F-820、ｼｽﾒｯｸｽ)
⑦網赤血球数(Ret)	Brecher 法(鏡検)
⑧血小板数(Plat)	電気抵抗法(自動血球計数装置 F-820、ｼｽﾒｯｸｽ)
⑨白血球数(WBC)	電気抵抗法(自動血球計数装置 F-820、ｼｽﾒｯｸｽ)
⑩白血球百分比(Hemogram of WBC)	May-Grünwald-Giemsa 染色標本鏡検
⑪プロトロンビン時間(PT)	トロンボプラスチン法 (血液凝固自動測定装置ｱﾒﾙﾝｸﾞ KC-10A、ﾊﾞｸｽﾀｰ)
⑫活性化部分ﾄﾛﾝﾎﾞﾌﾟﾗｽﾁﾝ時間(APTT)	エラジン酸法 (血液凝固自動測定装置ｱﾒﾙﾝｸﾞ KC-10A、ﾊﾞｸｽﾀｰ)

5) 血液化学的検査

哺育母動物各群 6 例について分娩後 5 日(哺育 4 日の翌日)の剖検時に約 16～22 時間絶食したラットをエーテル麻酔し、腹部大動脈より採血した。①および⑤については血液 1 mL あたりヘパリンナトリウム(ヘパリンナトリウム注、1000 単位/mL、持田製薬株式会社)約 20 単位で処理後、3000 rpm で 10 分間の遠心分離で得られた血漿を用いて検査した。他の項目については分離剤入り試験管(セパクリーン、栄研器材株式会社)に血液を採取し、3000 rpm で 10 分間の遠心分離で得られた血清を用いて検査した。なお、得られた血漿および血清は検査終了後、-20℃で凍結保存した。

検査項目および検査方法：

① GOT	IFCC 法(自動分析装置 7150 形、日立製作所)
② GPT	IFCC 法(自動分析装置 7150 形、日立製作所)
③アルカリホスファターゼ(ALP)	Bessey-Lowry 法 (自動分析装置 7150 形、日立製作所)

④γ－GTP	包接L-γ-グルタミル-p-ニトロアニリド基質法 (自動分析装置7150形、日立製作所)
⑤グルコース(Glu)	ヘキソキナーゼ法 (自動分析装置7150形、日立製作所)
⑥コリンエステラーゼ(Ch-E)	ヨウ化ブチリルチオコリン基質法 (自動分析装置7150形、日立製作所)
⑦総コレステロール(T-Cho)	酵素法(自動分析装置7150形、日立製作所)
⑧リン脂質(PL)	酵素法(自動分析装置7150形、日立製作所)
⑨トリグリセリド(TG)	遊離グリセロール消去法 (自動分析装置7150形、日立製作所)
⑩総ビリルビン(T-Bil)	アゾビリルビン法 (自動分析装置7150形、日立製作所)
⑪尿素窒素(UN)	ウレアーゼ・インドフェノール法 (自動分析装置7150形、日立製作所)
⑫クレアチニン(Crea)	Jaffé法(自動分析装置7150形、日立製作所)
⑬ナトリウム(Na)	炎光光度法(自動炎光光度計480型、コーニング)
⑭カリウム(K)	炎光光度法(自動炎光光度計480型、コーニング)
⑮クロール(Cl)	電量滴定法 (クロライドカウンターCL-6M、平沼産業)
⑯カルシウム(Ca)	OCPC法(自動分析装置7150形、日立製作所)
⑰無機リン(IP)	Fiske-SubbaRow法 (自動分析装置7150形、日立製作所)
⑱総蛋白(TP)	ビウレット法 (自動分析装置7150形、日立製作所)
⑲蛋白分画(Protein fraction)	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)
⑳A/G比(A/G)	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)

6) 剖検

分娩例は分娩後5日(哺育4日の翌日)に、交尾不成立例は交配期間終了後24日(投与51日の翌日)に、妊娠25日まで分娩が認められない交尾成立例は妊娠26日に剖検した。体外表を観察し、分娩例のうち血液学的検査および血液化学的検査例については採血後、エーテル麻酔下で放血致死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。以下の器官・組織

を10%中性緩衝ホルマリン液に固定・保存した。なお、眼球およびハーダー腺はDavidson液で固定・保存した。

脳(大脳・小脳)、下垂体、胸腺、甲状腺(左右)、上皮小体(左右)、副腎(左右)、脾臓、心臓、胸部大動脈、舌、食道、胃(前胃および腺胃)、肝臓、膵臓、十二指腸、空腸、回腸(パイエル板を含む)、盲腸、結腸、直腸、喉頭、気管、肺(気管支含む)、腎臓(左右)、膀胱、卵巣(左右)、子宮(角部および頸部)、膣、眼球(左右)、ハーダー腺(左右)、乳腺(右腹部)、皮膚(腹部)、胸骨(骨髄含む)、大腿骨(骨髄含む)、脊髄(頸部)、骨格筋(右大腿部)、腸間膜リンパ節、下顎リンパ節(左右)、顎下腺(左右)、舌下腺(左右)、耳下腺(左右)、坐骨神経(右)および肉眼的異常部位として皮下白色腫瘤のみられたNo.361(15 mg/kg 群)の背部右側皮膚および皮下黄白色腫瘤のみられた No.452(30 mg/kg 群)の胸部右側皮膚

7) 器官重量測定

全例について、剖検時に電子天秤(ER-180A、エー・アンド・デイ株式会社)を用いて以下の器官について重量を測定した。左右の表示のある器官については、左右別々に測定し、その合計値を算出した。なお、分娩後5日に剖検した母動物について統計処理を実施した。

脳、心臓、肝臓、腎臓(左右)、脾臓、副腎(左右)、胸腺および卵巣(左右)

個々の器官重量と剖検日に測定した動物体重に基づいて、器官体重重量比を以下の計算式により算出した。

器官体重重量比＝(器官重量／動物体重)×100

8) 病理組織学的検査

対照群および高用量群の全例の保存器官・組織ならびに全例の腺胃と下垂体、剖検時に皮下白色腫瘤のみられた No.361(15 mg/kg 群)の背部右側皮膚および皮下黄白色腫瘤のみられたNo.452(30 mg/kg 群)の胸部右側皮膚をパラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、脾臓についてベルリン青染色標本も作製して鏡検した。鏡検の結果、MAN 投与の影響と考えられる変化のみられた脾臓については、その他の投与群の全例についてもヘマトキシリン・エオジン染色標本およびベルリン青染色標本を作製して鏡検した。

Ⅲ. 雌雄動物の生殖および新生児の発生について

1) 性周期検査

雌全例について、投与前 10 日から交尾成立までの連日、ギムザ染色による膣垢塗抹標本を作製し、光学顕微鏡下で性周期段階(発情前期、発情期前期、発情期後期、発情後期および発情休止期)の判定を行い、性周期の各段階を4日から6日の間隔で2回以上繰り返すものを正常と判定した。発情休止期あるいは発情期が7日以上継続してみられる場合に

性周期の異常と判定した。

2) 雌雄の生殖能検査

投与14日の雌雄について、同試験群内で夕方から1対1(無作為組合わせ)で 14日間を限度として同居させた。交尾の成立は雌の膣内の膣栓あるいは膣垢スメア標本中に精子が確認された場合とし、交尾成立日を妊娠0日として起算した。妊娠の成立は雌の子宮に着床痕が確認された場合とし、交尾率［(交尾が成立した雌ラット数／同居ラット数)×100］および受胎率［(受胎した雌ラット数／交尾が成立した雌ラット数)×100］を算出した。

3) 分娩および哺育状態観察

交尾した雌全例について、妊娠21日から分娩終了日まで毎朝9時に分娩段階、哺育状態、生存児数および死亡児数、出産児の性別および外表を観察した。朝9時に分娩終了を確認した場合、その日を哺育0日として起算した。その結果から、妊娠期間[妊娠0日から哺育 0 日(分娩終了日)までの日数]、出産率[(生児を出産した雌ラット数／妊娠雌ラット数)× 100]、分娩率[(総出産児数／着床痕数)×100]、出生率[(出産確認時生存児数／総出産児数)×100]、哺育4日時哺育率[(哺育4日時に哺育児の認められる雌ラット数／正常に分娩した雌ラット数)×100]および性比[雄生児数／雌生児数]を算出した。

4) 新生児の一般状態観察および生存率

全例について、哺育0日から哺育4日まで1日1回、生存および死亡を確認し、一般状態および外表について観察した。なお、哺育日数は分娩終了日を哺育0日として起算した。

観察結果から新生児生存率［(哺育4日生存児数／出産確認時生存児数)× 100］を1腹を単位として算出した。ただし、喰殺あるいは不明例となった新生児は死亡例として扱った。

5)新生児の体重測定

全例について、哺育 0、1 および 4 日に電子天秤(ザルトリウス 1401 B MP7-2、カールツァイス株式会社)を用いて個体毎に測定した。なお、統計処理は1腹あたりの生児全例の体重合計値ならびに1腹毎の雌雄別の平均体重について実施した。

6)新生児の剖検

死亡例は直ちに剖検し、whole body を 10%中性緩衝ホルマリン液で固定・保存した。その他の例については、哺育4日に体外表(口腔内を含む)を観察し、二酸化炭素吸入法により安楽死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。

5. 統計学的方法

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、血液学的検査および血液化学的検査の各項目、器官重量、器官体重重量比、妊娠黄体数、着床痕数および着床率、総出産児数、出産確認時生存児数、分娩率、出生率、性比、出産確認時死亡児数、妊娠期間、哺育4日生存児数および新生児生存率については 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で解析し、不等分散の場合は Kruskal-Wallis の検定法で解析した。一元配置分散分析の結果、有意差がみられた場合はDunnett の検定法を用いて対照群との比較を行った。Kruskal-Wallis の検定法の解析の結果、有意差がみられた場合はMann-Whitney のU-検定法を用い対照群との比較を行った。尿検査の定性的項目ならびに病理組織学的検査結果のうち2段階以上の陽性グレードがみられた所見についてはKruskal-Wallisの検定法で解析し、有意差がみられた場合は、Mann-Whitney のU-検定法を用い対照群との比較を行った。性周期の異常の有無、交尾率、受胎率、出産率および哺育4日時哺育率ならびに病理組織学的検査結果のうち1段階の陽性グレードがみられた所見については多試料χ^2-検定を行い、その結果、有意差がみられた場合は2試料χ^2-検定で対照群との比較を行った。ただし、2試料χ^2-検定あるいは多試料χ^2-検定に不適合の場合は Fisherの直接確率検定法を用いた。

なお、新生児の観察および測定において、出生率、性比、新生児生存率および雌雄別体重ならびに雌雄合計体重について、1 腹を標本単位として統計処理を行った。対照群との比較検定については、群平均および標準偏差を用い、危険率5%以下を統計学的に有意とした。

成　績

1．雄動物の反復投与毒性

(1)一般状態

一般状態の成績を Table 2、INDIVIDUAL DATA 1-1～1-4 に示す。

いずれの群にも異常は認められなかった。

(2)体重推移

体重推移を Figure 1、Table 3、INDIVIDUAL DATA 2-1～2-4 に示す。

各 MAN 投与群とも対照群と比較して有意差は認められなかった。

(3)摂餌量

摂餌量を Figure 2、Table 4、INDIVIDUAL DATA 3-1～3-4 に示す。

対照群と比較して摂餌量の低値が 15 mg/kg 群で投与 14 日に認められたが、高用量群ではみられない一過性の変化であり、MAN 投与との関連性はないものと考えられた。

(4)尿検査

尿検査の成績を Table 5、INDIVIDUAL DATA 4-1～4-4 に示す。

各 MAN 投与群とも各検査項目に対照群と比較して有意差は認められなかった。

(5)血液学的検査

血液学的検査の成績を Table 6、INDIVIDUAL DATA 5-1～5-8 に示す。

対照群と比較して 30 mg/kg 群で赤血球数(RBC)、ヘマトクリット値(Ht)およびヘモグロビン量(Hb)の低値ならびにプロトロンビン時間(PT)の短縮が認められた。

その他に対照群と比較して 7.5 mg/kg 群では白血球百分比で分葉核好中球(Seg.)の高値、リンパ球(Lymp.)の低値、15 mg/kg 群で平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)の低値が認められたが、高用量群ではみられない変化であり、MAN 投与との関連性はないものと考えられた。

(6)血液化学的検査

血液化学的検査の成績を Table 7、INDIVIDUAL DATA 6-1～6-8 に示す。

対照群と比較して 15 および 30 mg/kg 群でアルカリホスファターゼ(ALP)およびカリウム(K)の低値、30 mg/kg 群でクレアチニン(Crea)の高値が認められた。アルカリホスファターゼの低値については、毒性学的意義がないと考えられた。

(7)剖検

剖検の成績を Table 8、INDIVIDUAL DATA 7-1～7-4 に示す。

腺胃粘膜の暗赤色斑が 30 mg/kg 群で 1 例に認められた。

その他に、腎盂(両側)の拡張が対照群の 1 例に、精巣(片側)の萎縮および脾臓の嚢胞が 15 mg/kg 群の 1 例に、精巣上体(片側)の尾部に黄色斑が対照群の 1 例に、また、対照群の交配相手雌が不妊であった 1 例で精巣(両側)および精巣上体(両側)の萎縮が認められた。

(8)器官重量

器官重量および器官体重重量比の成績を Table 9、INDIVIDUAL DATA 8-1～8-8 に示す。

対照群と比較して 30 mg/kg 群で肝臓の器官体重重量比に高値が認められた。

(9)病理組織学的検査

病理組織学的検査の成績を Table 10、INDIVIDUAL DATA 9-1-1～9-2-4 に示す。

胃では、剖検で腺胃に暗赤色斑がみられた 30 mg/kg 群で 1 例に軽度のびらんが認められた。

その他に、肺では泡沫細胞の軽度の集簇が対照群で 3 例、30 mg/kg 群で 1 例に、軽度の細気管支あるいは肺胞過形成が 30 mg/kg 群で 1 例に認められた。膵臓では腺房細胞の軽度の萎縮が 30 mg/kg 群で 1 例に認められた。肝臓では軽度の小肉芽腫が対照群で 2 例、30mg/kg 群で 1 例に、限局性の中等度の壊死が 30 mg/kg 群で 1 例に認められた。腎臓では嚢胞が対照群および 30 mg/kg 群で各 1 例に、腎盂の軽度の拡張が対照群で 1 例に、尿細管上皮の軽度の再生が対照群で 1 例に認められた。精巣では精細管の中等度の萎縮が対照群の交配相手雌不妊例 1 例に、軽度の萎縮が対照群で 1 例、15 mg/kg 群で 1 例に認められ、対照群の交配相手雌不妊例ではさらに軽度の間細胞過形成、精巣上体管腔内に中等度の細胞残屑、精子の重度の減少が認められた。精巣上体では他に、剖検で尾部に黄色斑がみられた対照群の 1 例で軽度の精子肉芽腫が認められた。前立腺では軽度のリンパ球浸潤が対照群および 30 mg/kg 群で各 1 例に認めら

れた。脾臓では剖検で嚢胞がみられた 15 mg/kg 群の 1 例で病理組織学的検査でも嚢胞が確認された。下垂体では頭蓋咽頭組織の遺残が 15 mg/kg 群で 1 例、嚢胞が 30 mg/kg 群で前葉に 1 例、中間葉に 1 例に認められた。

以上の変化はいずれもその出現に対照群と比較して有意差は認められなかった。

2．雌動物の反復投与毒性

(1)一般状態

一般状態の成績を Table 11、INDIVIDUAL DATA 10-1～12-4 に示す。

妊娠前投与期間ではいずれの群にも異常は認められなかった。

妊娠期間および哺育期間では皮下腫瘤が 15 mg/kg 群の 1 例で妊娠 21 日以降、30 mg/kg 群の 1 例で妊娠 17 日以降、それぞれ剖検日(分娩後 5 日)まで認められた。

(2)体重推移

体重推移を Figure 3～5、Table 12～14、INDIVIDUAL DATA 13-1～15-4 に示す。

妊娠前投与期間、妊娠期間および哺育期間のいずれの期間にも、各 MAN 投与群とも対照群と比較して有意差は認められなかった。

(3)摂餌量

摂餌量の変化を Figure 6～8、Table 15～17、INDIVIDUAL DATA 16-1～18-4 に示す。

妊娠前投与期間では、投与 2 日に対照群と比較して 15 および 30 mg/kg 群で低値が認められた。

妊娠期間では、妊娠 5 日に 15 mg/kg 群で低値が認められたが、高用量群では認められない一過性の変化であり、MAN 投与との関連性はないものと考えられた。

哺育期間では、各 MAN 投与群とも対照群と比較して有意差は認められなかった。

(4)血液学的検査

血液学的検査の成績を Table 18、INDIVIDUAL DATA 19-1～19-8 に示す。

対照群と比較して、30 mg/kg 群で平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)の低値、7.5 および 15 mg/kg 群では白血球百分比で桿状核好中球(Stab.)の低値が認められたが、関連する他の項目に変化は認められないことから、MAN 投与との関連性はないものと考えられた。

(5)血液化学的検査

血液化学的検査の成績を Table 19、INDIVIDUAL DATA 20-1～20-8 に示す。

対照群と比較して、30 mg/kg 群で総ビリルビン(T-Bil)およびグルコース(Glu)の高値が認められた。他に対照群と比較して 7.5 mg/kg 群で尿素窒素(UN)の高値が認められたが、低用量群のみの変化であり、MAN 投与との関連性はないものと考えられた。

(6)剖検

剖検の成績を Table 20、INDIVIDUAL DATA 21-1～21-4 に示す。

腺胃粘膜の暗赤色斑が 7.5 および 15 mg/kg 群で各 1 例に、30 mg/kg 群で 2 例に認められた。

その他に、肝臓の黄白色化が 7.5 mg/kg 群で 1 例に、白色皮下腫瘤が 15 mg/kg 群で 1 例に、黄白色皮下腫瘤が 30 mg/kg 群で 1 例に認められた。

(7)器官重量

器官重量および器官体重重量比の成績を Table 21、INDIVIDUAL DATA 22-1～22-8 に示す。

対照群と比較して、肝臓では器官重量の高値が 30 mg/kg 群で、器官体重重量比の高値が 7.5、15 および 30 mg/kg 群で認められた。脾臓では器官重量および器官体重重量比の高値が 30 mg/kg 群で認められた。心臓では器官重量の高値が 7.5、15 および 30 mg/kg 群で、器官体重重量比の高値が 15 および 30 mg/kg 群で認められた。

他に副腎で左の副腎の器官体重重量比の高値が 7.5 および 30 mg/kg 群で認められたが、左右の合計値では器官重量および器官体重重量比ともに対照群と比較して有意差は認められなかった。

(8)病理組織学的検査

病理組織学的検査の成績を Table 22、Photo. H-1、H-2、INDIVIDUAL DATA 23-1-1～23-2-8 に示す。

胃では、剖検で腺胃に暗赤色斑がみられた 7.5 および 15 mg/kg 群の各 1 例ならびに 30 mg/kg 群の 2 例に軽度のびらんが認められた。

各群の全例について検査を実施した脾臓では、軽度の髄外造血(Photo. H-2)が対照群で 1 例、15 mg/kg 群で 3 例、30 mg/kg 群で 7 例に認められ、30 mg/kg 群の発現率に対照群と比較して有意差が認められた。

その他に、肺では泡沫細胞の軽度の集簇が対照群で 3 例、30 mg/kg 群で 2 例に、軽度の限局性線維化が対照群および 30 mg/kg 群で各 1 例に認められた。舌では軽度の潰瘍および筋層における軽度の肉芽形成が対照群で 2 例に認められた。食道では筋層における軽度の肉芽形成が 30 mg/kg 群で 1 例に認められた。空腸ではパイエル板における軽度の肉芽腫および軽度の鉱質沈着が対照群の 1 例に認められた。膵臓では腺房細胞の軽度の萎縮が 30 mg/kg 群の 1 例に認められた。肝臓では限局性の軽度の壊死が 30 mg/kg 群の 1 例に、剖検で黄白色化がみられた 7.5 mg/kg 群の 1 例に小葉中心性の重度の壊死が認められた。心臓では軽度の心筋変性が対照群の 1 例に認められた。腎臓では嚢胞が対照群の 1 例に、腎盂粘膜における軽度の鉱質沈着が対照群および 30 mg/kg 群の各 1 例に、尿細管上皮の軽度の再生が対照群の 1 例に認められた。下垂体では嚢胞が 7.5 mg/kg 群で前葉に 2 例、30 mg/kg 群で中間葉に 1 例に認められた。眼球では網膜の軽度の限局性萎縮が 30 mg/kg 群の 1 例に認められた。ハーダー腺では軽度のリンパ球浸潤が対照群の 1 例に認められた。乳腺では軽度の好中球浸潤が 30 mg/kg 群の 1 例に、

剖検で白色あるいは黄白色皮下腫瘤がみられた 15 mg/kg 群および 30 mg/kg 群の各 1 例に腺癌が認められた。

3．雌雄動物の生殖毒性および新生児の発生毒性

(1)生殖能検査

生殖能検査の成績を Table 23、INDIVIDUAL DATA 24-1-1～24-2-4 に示す。

交尾までの日数、交尾率および受胎率には各投与群とも対照群と比較して有意差は認められなかった。交尾不成立が 30 mg/kg 群で 1 組に認められたが、雌の性周期検査および雌雄の剖検および病理組織学的検査で生殖器に異常は認められなかった。不妊例は対照群および 7.5 mg/kg 群で各 1 例、15 mg/kg 群で 2 例に認められた。

性周期検査では交配中に発情休止期の連続が 30 mg/kg 群で 1 例にのみ認められたが、この例では交尾および妊娠が成立した。

(2)分娩および哺育状態観察

分娩および哺育状態観察の成績を Table 24、INDIVIDUAL DATA 25-1～25-4 に示す。

妊娠期間、哺育率、出産率、着床数、出産児数、分娩率、出産確認時生存児数および出生率に、各 MAN 投与群とも対照群と比較して有意差は認められなかった。

なお、分娩終了確認時の死亡児が 7.5 mg/kg 群で雌 1 例、30 mg/kg 群で雄 3 例および雌 7 例に認められた。30 mg/kg 群の死亡児のうち雄 3 例および雌 6 例は 1 腹の児であったが、この母動物(No. 455)は雌雄各 1 例の新生児を哺育し、哺育行動に異常はみられなかった。

(3)新生児の生存率

新生児の生存率の成績を Table 25、INDIVIDUAL DATA 26-1～26-4 に示す。

各 MAN 投与群とも対照群と比較して、新生児生存率に有意差は認められなかった。

(4)新生児の一般状態

新生児の一般状態の成績を Table 26、INDIVIDUAL DATA 27-1～27-4 に示す。

死亡あるいは不明例が対照群で雌 1 例、7.5 mg/kg 群で雌 2 例、15 mg/kg 群で雄 3 例に認められたが、30 mg/kg 群では死亡あるいは不明例はみられず、MAN 投与による影響はないものと考えられた。

生存例では外傷が 30 mg/kg 群で雌 1 例に認められたのみであった。

(5)新生児の体重推移

新生児の体重推移を Figure 9、Table 27、INDIVIDUAL DATA 28-1～28-4 に示す。

各 MAN 投与群とも対照群と比較して有意差は認められなかった。

(6)新生児の剖検

新生児の剖検の成績を Table 28、INDIVIDUAL DATA 29-1～29-3-4 に示す。

死亡例ではいずれの例にも異常は認められなかった。

哺育4日剖検例では肝臓の黄白色斑が7.5 mg/kg群の雄1例、一般状態観察でみられた30 mg/kg群の外傷が雌1例に認められたが、その他に異常は認められなかった。

考　察

MANの0(対照群)、7.5、15および30 mg/kgを1群雌雄各12匹のCrj:CD(SD)IGSラットに、雄ラットに対しては交配前、交配期間および交配後を含む計46日間、雌ラットに対しては交配前、交配および妊娠期間、ならびに哺育4日までの期間、経口反復投与し、雌雄動物への反復投与による影響、雌雄動物の生殖および新生児の発生に及ぼす影響について検討した。

1．反復投与毒性

(1)雄動物に及ぼす影響

一般状態、体重推移、摂餌量および尿検査では、各投与群ともMAN投与による影響は認められなかった。

血液学的検査では、赤血球数、ヘマトクリット値およびヘモグロビン量の低値が30 mg/kg群で認められた。この変化は、MAN投与により赤血球およびヘモグロビンの減少などの溶血性貧血が報告されていること[3]から、MAN投与による影響と考えられた。また、プロトロンビン時間の短縮が30 mg/kg群で認められたが、この変化は比較的軽度の短縮であり、血小板数に変化がみられていないことから、毒性学的意義はないものと考えられた。

血液化学的検査では、カリウムの低値が15および30 mg/kg群で、一方、クレアチニンの高値も30 mg/kg群で認められた。病理組織学的検査からはこの変化を裏付ける腎臓の異常は認められないことから、MAN投与の影響とは考えられたが、その機序については明らかでなかった。

剖検では、腺胃粘膜に暗赤色斑が30 mg/kg群の1例にみられ、病理組織学的検査ではびらんも認められた。この変化は、MANには皮膚腐食性があることが報告されていること[4]、また、MANの急性経口投与毒性試験の予備試験[2]でも腺胃粘膜の暗赤色斑がみられたことから、MAN投与による影響と考えられた。

(2)雌動物に及ぼす影響

一般状態では、15および30 mg/kg群で各1例に皮下腫瘤が認められ、病理組織学的検査で乳腺の腺癌が認められたが、この変化は自然発生的にしばしば認められ、妊娠を契機に発現することが知られていること[5)-7)]から、自然発生腫瘍と判断した。また、体重推移においても、各投与群ともにMAN投与による影響は認められなかった。

摂餌量では、投与2日(初回投与後)に15および30 mg/kg群で摂餌量の低値がみられ、対照群と比較して有意な低値が認められた。しかし、投与2日には対照群でも前日と比較して摂餌量が

低下しており、各投与群ではその後の摂餌量推移および体重推移に異常はみられず、一過性の変化であることから、MAN投与による毒性的な変化とは考えられなかった。

血液学的検査では、被験物質投与の影響は認められなかった。

血液化学的検査では、30 mg/kg群で総ビリルビンおよびグルコースの高値が認められた。また、肝臓の器官重量の高値が 30 mg/kg 群で、器官体重重量比の高値が各投与群で認められた。しかし、雄の反復投与と同様に病理組織学的検査においては肝臓に異常はみられなかった。このことより、雄と同様、血液化学的検査および器官重量にみられた変化は、肝臓の機能亢進によるものと推察された。

剖検では、腺胃粘膜の暗赤色斑が7.5および15 mg/kg群で各1例に、30 mg/kg群で2例に認められ、病理組織学的検査ではびらんも認められた。これらの所見は雄と同様、MAN の皮膚腐食性による影響と考えられた。

器官重量では前述の肝臓の他に、脾臓の器官重量および器官体重重量比の高値が 30 mg/kg 群でみられ、病理組織学的検査では髄外造血が15 mg/kg群で3例、30 mg/kg群で7例に認められた。この変化は、MANによる溶血性貧血が報告されていること[3]から、MAN投与による貧血に対する代償性の変化と考えられた。

また、心臓の器官重量の高値が各投与群で、器官体重重量比の高値が15および30 mg/kg群で認められた。心臓の病理組織学的検査で異常はみられなかったが、げっ歯類では心肥大が心臓重量増加として認められ、組織学的変化は顕著でないと報告されており[8]、心肥大の原因の一つに貧血が挙げられている[8]。一方、MAN の急性経口投与毒性試験の予備試験[2]の死亡例では右心房の拡張および肺の明橙色化がみられ、MAN による溶血との関連が考えられた。したがって、本試験でみられた心臓の器官重量および器官体重重量比の変化もMAN投与による溶血性貧血の影響と考えられた。

以上のことから、雄の 15 mg/kg 以上の投与群においてカリウムの低値、雌の 7.5 mg/kg 以上の投与群において心臓の器官体重重量比の高値および腺胃粘膜のびらんがそれぞれ認められた。したがって、本試験条件下におけるMANの無影響量(NOEL)は雄で7.5 mg/kg/dayであり、雌では7.5 mg/kg/day未満と考えられた。

2．生殖発生毒性

生殖能検査では、各投与群とも雌雄の交尾率、雌の性周期および受胎率、また、生殖器(精巣、精巣上体および卵巣)および内分泌器官(副腎)の重量ならびに剖検に変化は認められなかった。また、30 mg/kg群での生殖器の病理組織学的検査でも異常は認められなかった。

母動物の剖検、妊娠期間、着床数、出産率、分娩率、出産児数、出産確認時生存児数および出生率において、MAN投与による影響は認められなかった。なお、30 mg/kg群の母動物1例(No. 455)

で分娩終了確認時に雄3例および雌6例の死亡児みられたが、この母動物の一般状態および剖検で異常はみられず、同例は雌雄各1例の新生児を哺育し、新生児の発育にも異常はみられなかったことから、死亡児とMAN投与との関連性については明らかではなかった。

新生児の一般状態、新生児生存率、体重および剖検では、各投与群とも影響は認められなかった。

以上のことから、雌雄の生殖および新生児に各投与群ともMAN投与による影響は認められなかった。したがって、本試験条件下におけるMANの反復投与による親動物の生殖に対する無影響量(NOEL)ならびに新生児の発生に対する無影響量(NOEL)は30 mg/kg/day以上と考えられた。

参考文献

1) 2-メチル-2-プロペンニトリルのラットにおける反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験ための予備試験(ＳＲ－９８７６)：最終報告書、株式会社 化合物安全性研究所(1999)

2) 2-メチル-2-プロペンニトリルのラットにおける急性経口投与毒性試験ための予備試験(ＳＲ－９８７４)：最終報告書、株式会社 化合物安全性研究所(1999)

3) Samikkannu, T., Vasanthakumari, V. and Devaraj, S.N. Haematological and erythrocyte membrane changes induced by methacrylonitrile. Toxicol. Letters 92, pp.15-20 (1997)

4) 製品安全データシート：旭化成工業株式会社(1998)

5) 村岡義博　他：SD-JCL系ラットにおける自然発生腫瘍について. Exp. Anim. 26(1), pp.13-22 (1977)

6) 森井外吉　他：マウス,ラットにみられる乳腺腫瘍の病理形態像. Exp. Anim. 33(1), pp.47-59 (1984)

7) 今井　清,吉村愼介：Sprague-Dawley系ラットの自然発生腫瘍について. J. Toxicol. Pathol. 1, pp. 7-12 (1988)

8) 伊東信行　編著：標的器官の毒性病理(2)、 A.心臓、『最新毒性病理学』、株式会社中山書店、東京、pp. 179-187、(1994)

Figures

Figure 1. Body weight changes of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Figure 2. Food consumption of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Figure 3. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Figure 4. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Figure 5. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Figure 6. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Figure 7. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Figure 8. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Figure 9. Body weight changes of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in rats (SR-9877)

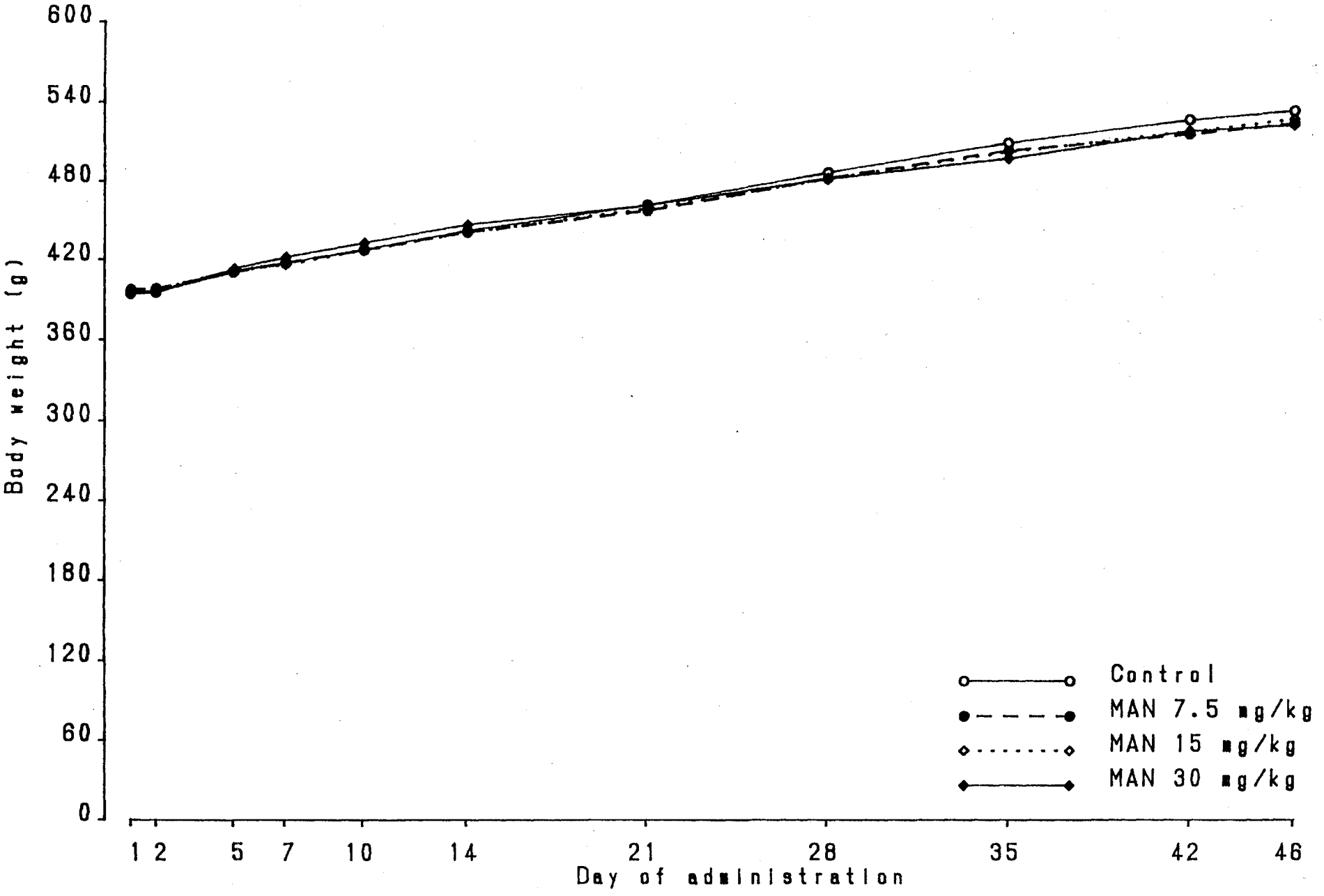

Figure 1. Body weight changes of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

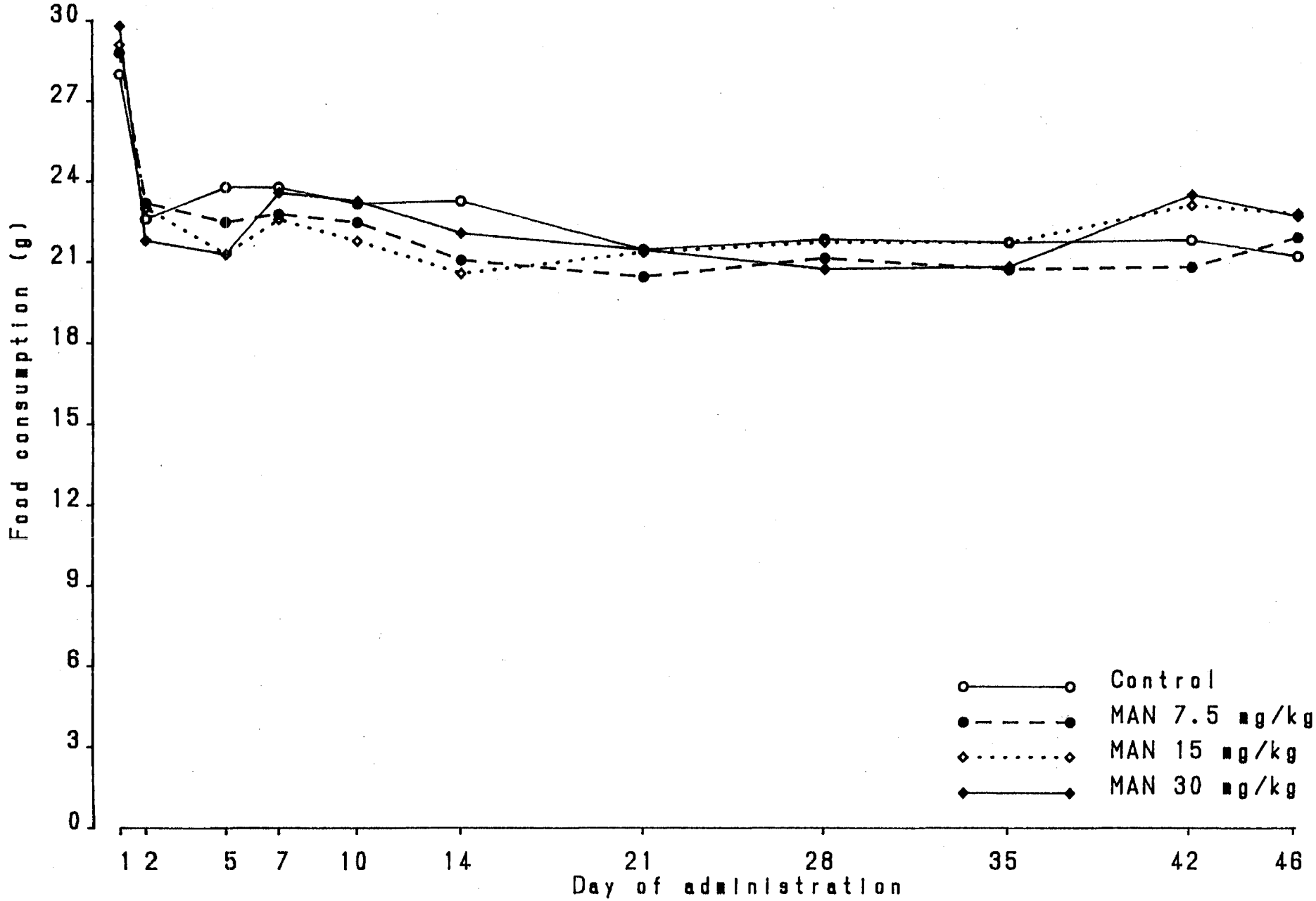

Figure 2. Food consumption of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

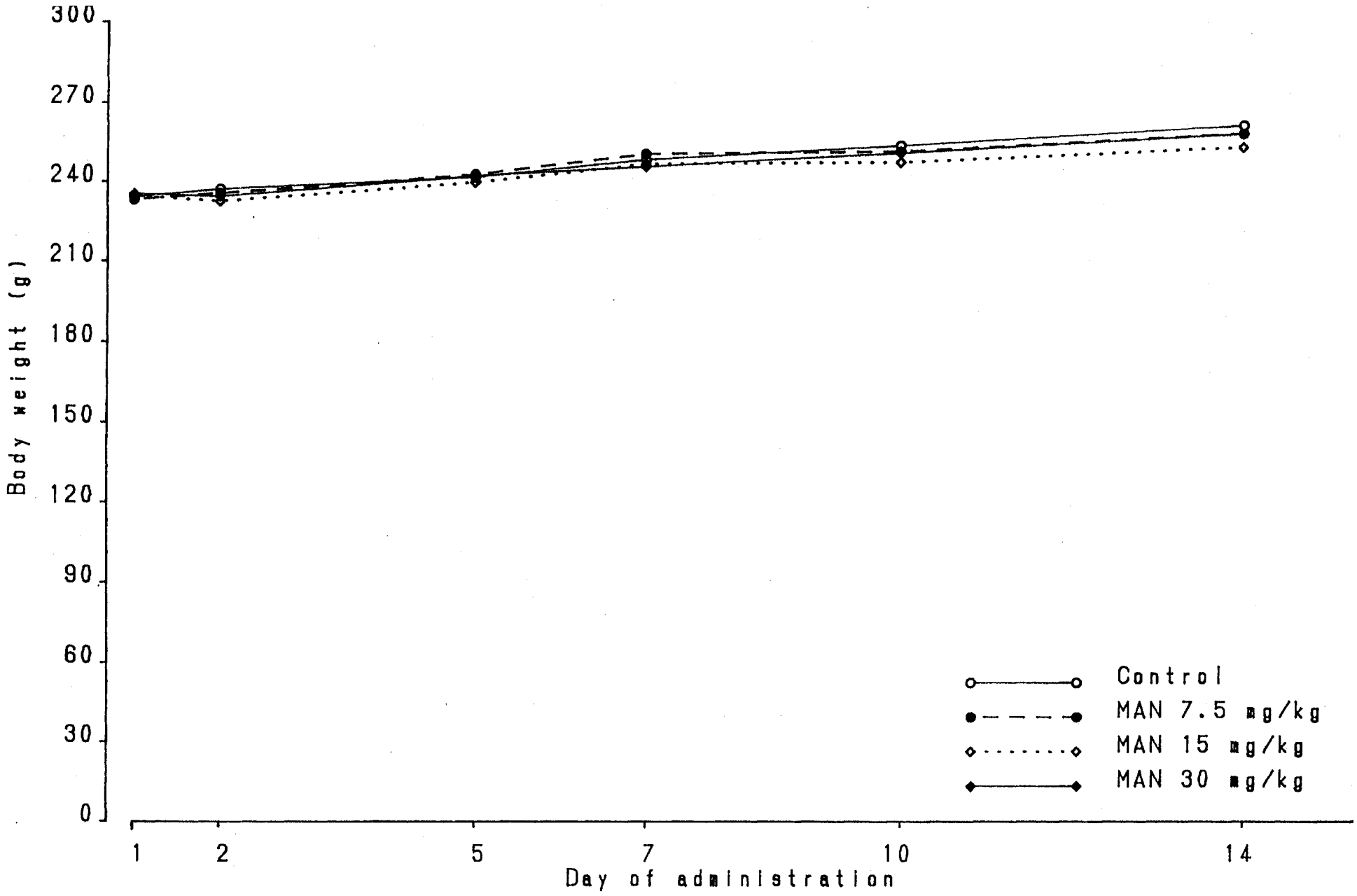

Figure 3. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

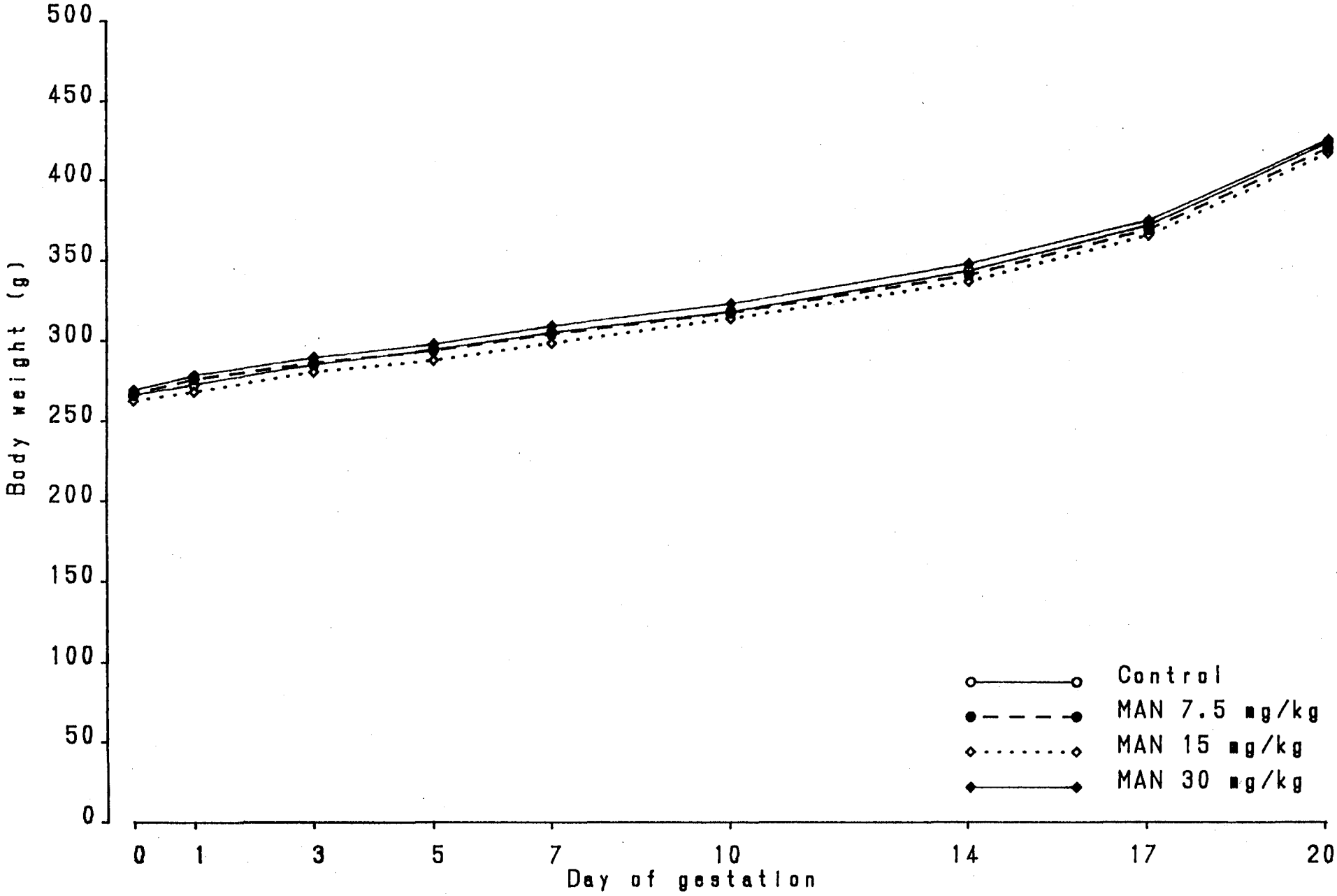

Figure 4. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

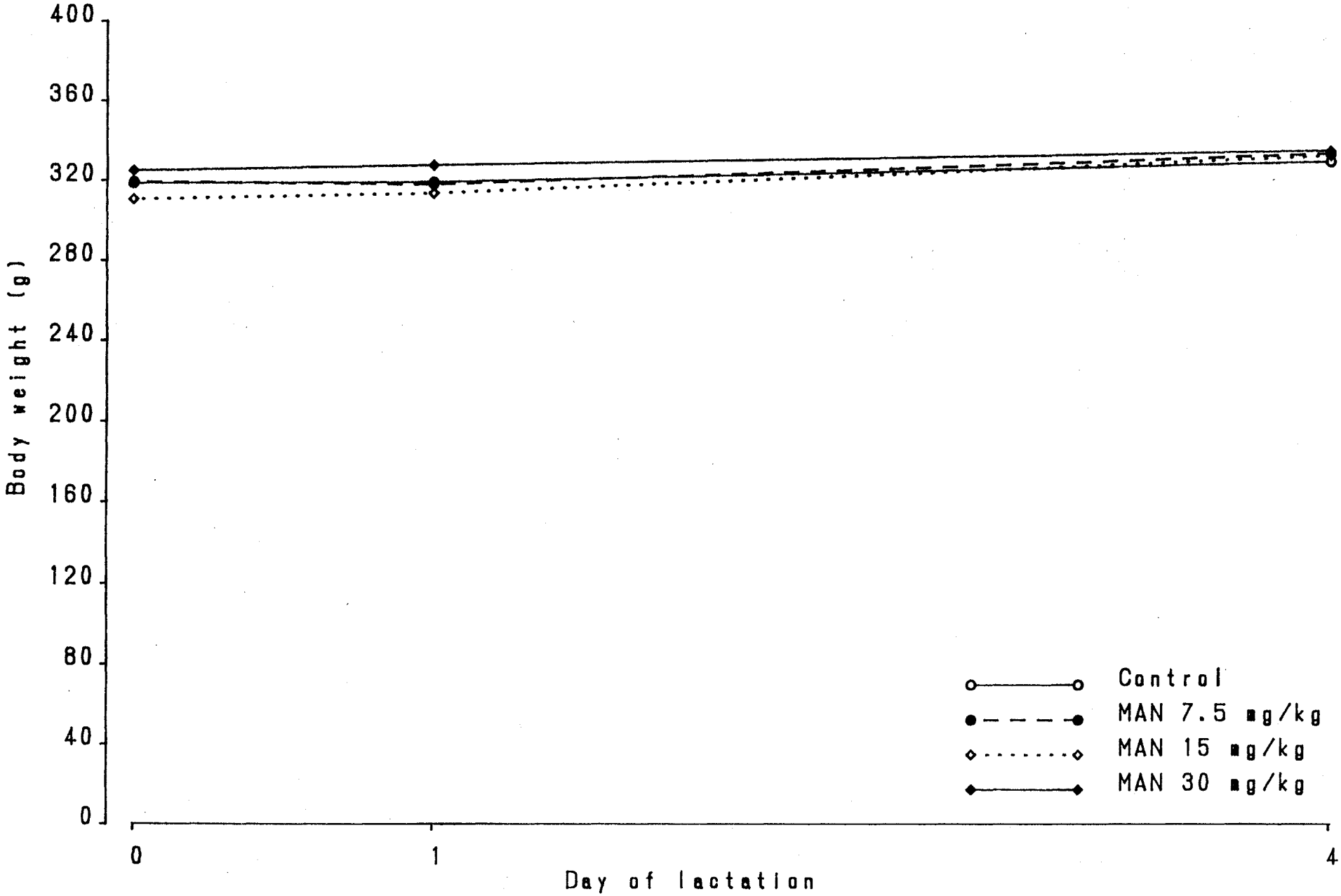

Figure 5. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

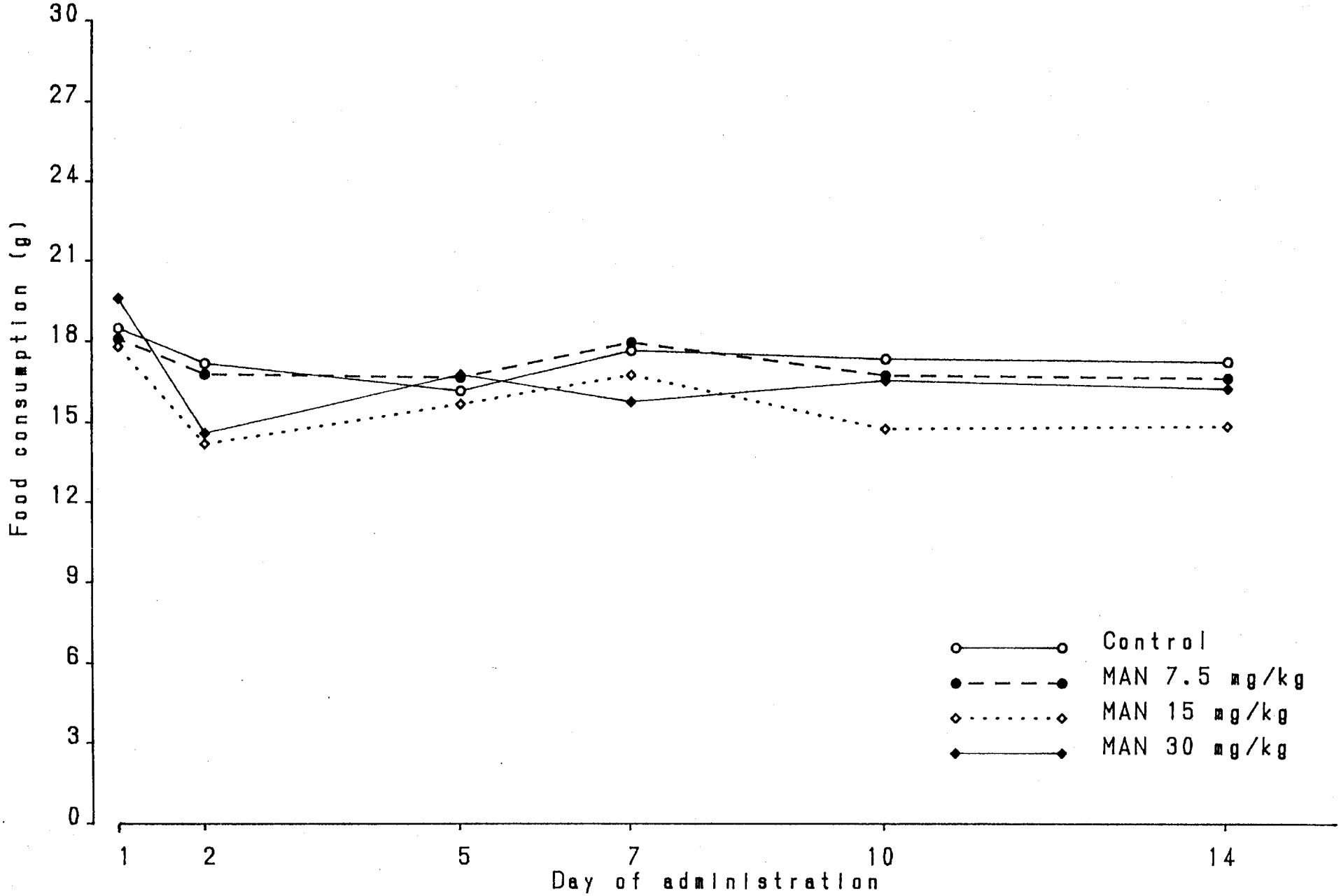

Figure 6. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

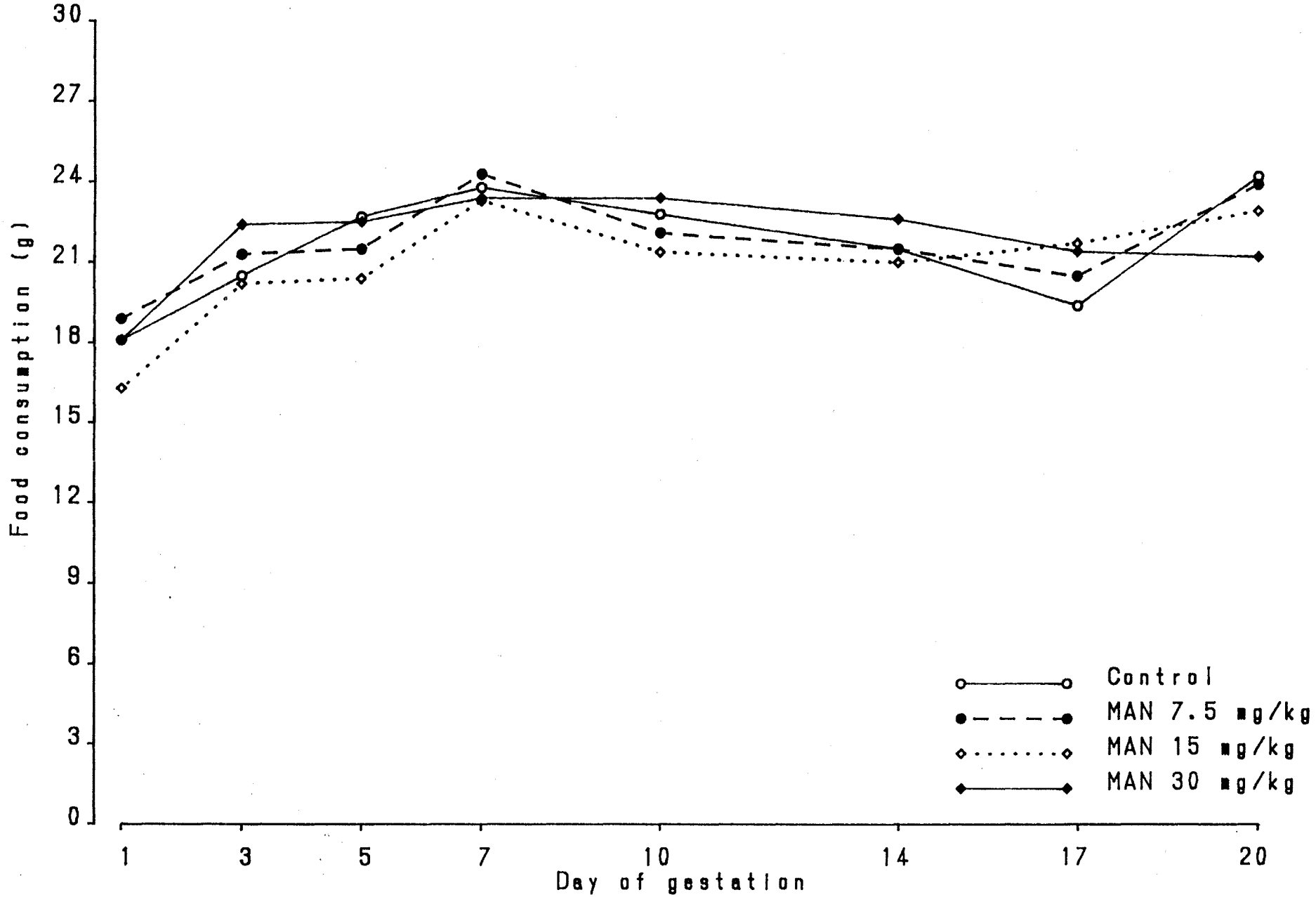

Figure 7. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

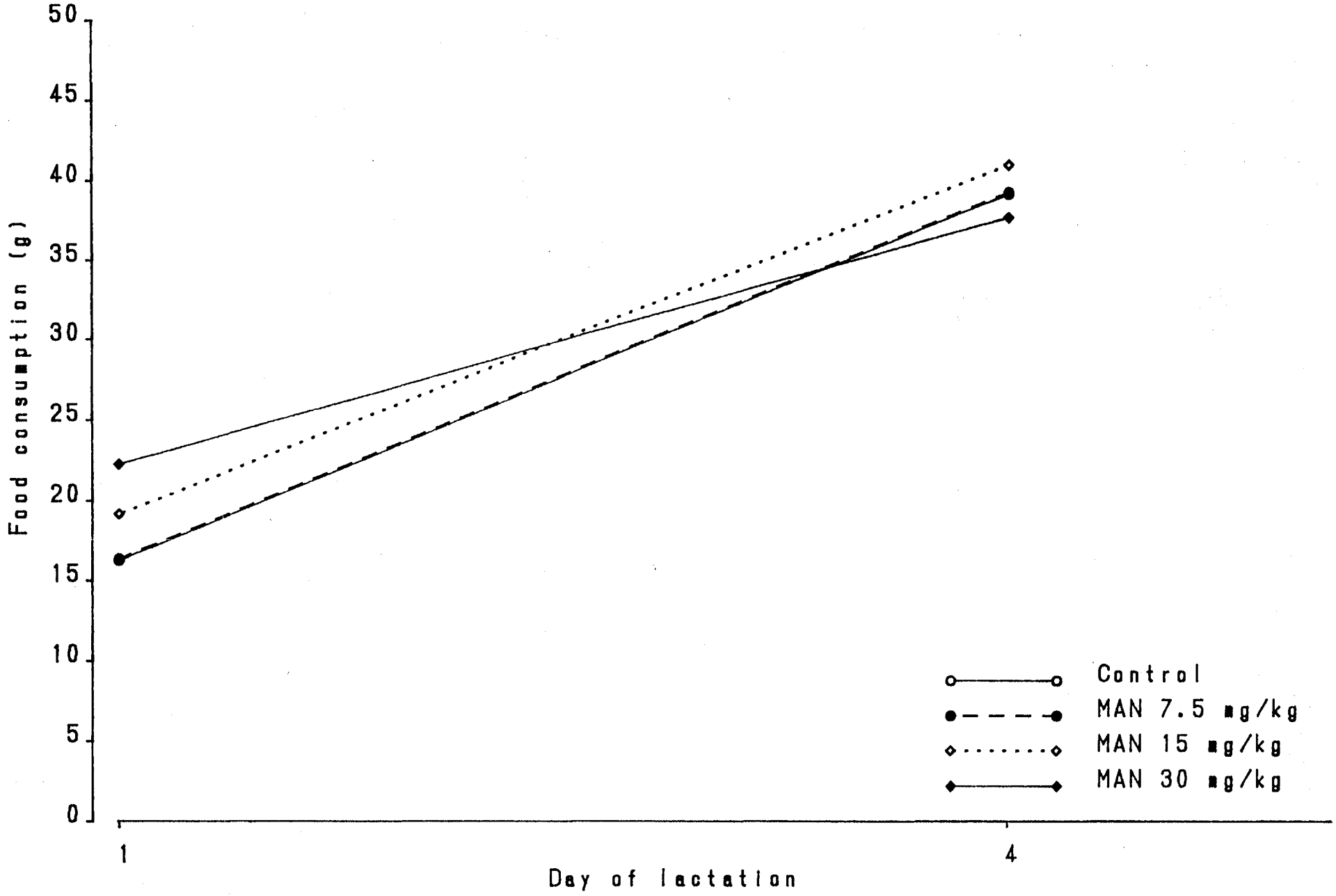

Figure 8. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

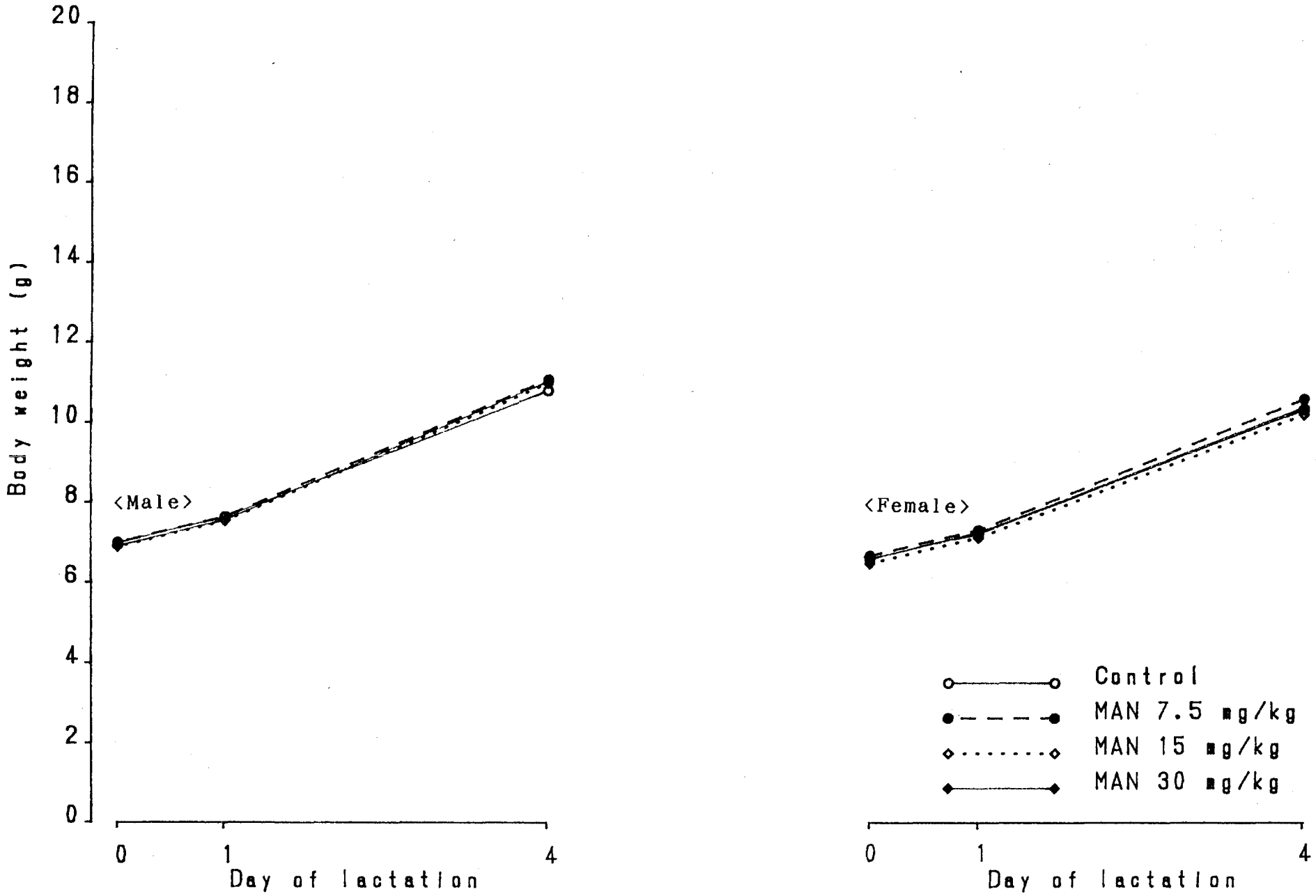

Figure 9. Body weight changes of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in rats (SR-9877)

Tables

Table 1. Experimental design for the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in rats (SR-9877)

Table 2. General appearance of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Table 3. Body weight changes of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Table 4. Food consumption of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Table 5. Urinary findings of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Table 6. Hematological findings of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Table 7. Biochemical findings of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Table 8. Gross findings of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Table 9. Absolute and relative organ weights of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Table 10. Histopathological findings of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Table 11. General appearance of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Table 12. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/ developmental toxicity screening test (SR-9877)

Table 13. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/ developmental toxicity screening test (SR-9877)

Table 14. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/ developmental toxicity screening test (SR-9877)

Table 15. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/ developmental toxicity screening test (SR-9877)

Table 16. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/ developmental toxicity screening test (SR-9877)

Table 17. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/ developmental toxicity screening test (SR-9877)

Table 18. Hematological findings of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Table 19. Biochemical findings of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Table 20. Gross findings of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Table 21. Absolute and relative organ weights of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/ developmental toxicity screening test (SR-9877)

Table 22. Histopathological findings of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Table 23. Influence of 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) on reproductive ability of rats in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Table 24. Influence of 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) on delivery and maternal behavior in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats (SR-9877)

Table 25. Influence of 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) on viability of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats (SR-9877)

Table 26. General appearance of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in rats (SR-9877)

Table 27. Body weight changes of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in rats (SR-9877)

Table 28. Gross findings of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in rats (SR-9877)

Table 1. Experimental design for the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in rats (SR-9877)

Group	Concentration of MAN mg/mL	Volume mL/kg	No. of animals[a] (Animal No.) Male	Female
Control[b]	0	5	12 (101~112)	12 (151~162)
MAN[c] 7.5 mg/kg	1.5	5	12 (201~212)	12 (251~262)
MAN 15 mg/kg	3	5	12 (301~312)	12 (351~362)
MAN 30 mg/kg	6	5	12 (401~412)	12 (451~462)

a: Crj:CD(SD) rats were dosed orally to males from day 14 before the mating period to day 46 through the mating period, and to females from day 14 before mating to day 4 of lactation.
b: Rats in the control were dosed with olive oil.
c: MAN was dissolved in olive oil.

Table 2. General appearance of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/ developmental toxicity screening test (SR-9877)

Item	Control	MAN (mg/kg)		
		7.5	15	30
No. of animals examined	12	12	12	12
Abnormal findings	0[a]	0	0	0

a: Values are no. of animals with findings.

Table 3. Body weight changes of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Group	No. of animals	Day of administration											Body weight gain	
		1	2	5	7	10	14	21	28	35	42	46	Day 1-46	a %
Control	12	b 394.7	395.6	411.2	417.8	428.3	442.8	463.5	488.0	510.9	528.6	535.5	140.8	35.469
		24.7	22.6	27.0	28.5	29.3	29.7	34.6	39.1	44.3	50.4	51.1	29.0	5.725
MAN 7.5 mg/kg	12	397.6	398.6	411.1	417.7	427.6	441.7	458.8	483.8	504.8	517.8	525.9	128.3	31.983
		22.6	23.2	26.5	27.7	32.0	33.4	38.7	44.1	47.9	52.4	55.4	34.6	7.130
MAN 15 mg/kg	12	396.1	397.3	412.0	416.6	427.7	441.7	460.3	483.3	504.3	519.6	528.8	132.7	33.319
		21.8	25.3	27.0	30.0	32.0	33.5	37.8	40.0	42.2	45.0	47.5	29.6	6.303
MAN 30 mg/kg	12	396.3	396.3	413.4	422.2	433.5	447.6	462.9	483.3	499.0	520.0	524.7	128.4	32.062
		23.4	26.0	28.3	30.3	32.7	36.1	40.6	44.7	48.9	53.8	59.0	37.3	7.626

a: (Body weight gain / body weight on day 1) x 100.
b: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram.

Table 4. Food consumption of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Group	No. of animals	Day of administration 1	2	5	7	10	14	21	28	35	42	46
Control	12	[a] 28.0	22.6	23.8	23.8	23.2	23.3	21.5	21.9	21.8	21.9	21.3
		3.0	2.5	2.2	2.6	3.5	2.0	2.4	2.1	2.8	4.8	3.0
MAN 7.5 mg/kg	12	28.8	23.2	22.5	22.8	22.5	21.1	20.5	21.2	20.8	20.9	22.0
		3.5	4.1	3.7	2.7	3.5	2.8	2.8	2.9	3.0	3.7	2.8
MAN 15 mg/kg	12	29.1	23.0	21.3	22.6	21.8	20.6*	21.4	21.8	21.8	23.2	22.9
		2.9	2.9	2.8	2.6	1.7	2.8	1.6	1.5	2.1	3.1	3.1
								[b] (10)	(10)			
MAN 30 mg/kg	12	29.8	21.8	21.3	23.6	23.3	22.1	21.5	20.8	20.9	23.6	22.8
		2.5	3.5	3.7	3.3	2.7	2.5	2.7	3.6	2.8	3.6	3.3

a: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram/day.
b: Values in parentheses are no. of animals examined.
*: Differs from control, $p \leqq 0.05$.

Table 5. Urinary findings of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Group	No. of animals	pH				Pro			Glu			Ket	Uro	Bil	Occult blood	Color
		7.0	7.5	8.0	8.5	±	+	++	−	±	+++	−	0.1 EU/dL	−	−	A
Control	6	0[a]	1	2	3	3	2	1	6	0	0	6	6	6	6	6
MAN 7.5 mg/kg	6	0	1	0	5	5	1	0	6	0	0	6	6	6	6	6
MAN 15 mg/kg	6	0	0	0	6	3	3	0	6	0	0	6	6	6	6	6
MAN 30 mg/kg	6	1	0	0	5	3	3	0	4	1	1	6	6	6	6	6

Group	No. of animals	Urinary sediments						Specific gravity			U-Vol	Water consumption
		RBC	WBC	Epithelial cell			Cast	1.031-1.040	1.041-1.050	1.050<	mL/21hr	g
		−	−	Squamous −	Round −	Small round −	−					
Control	6	6	6	6	6	6	6	1	2	3	9.83[b]	17.7
											3.60	5.8
MAN 7.5 mg/kg	6	6	6	6	6	6	6	1	5	0	11.08	20.8
											3.09	3.9
MAN 15 mg/kg	6	6	6	6	6	6	6	1	3	2	12.33	23.3
											4.22	9.7
MAN 30 mg/kg	6	6	6	6	6	6	6	1	4	1	11.00	19.2
											3.32	12.3

Color: A = Pale yellow or yellow.
a: Values are no. of animals with findings.
b: Values are means and S.D. thereunder.

Table 6. Hematological findings of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Group	No. of animals	RBC $10^4/\mu L$	Ht %	Hb g/dL	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	WBC $10^2/\mu L$	Plat $10^4/\mu L$
Control	12	904.7[a]	48.68	16.38	53.81	18.11	33.68	107.1	113.95
		39.7	2.65	0.63	1.65	0.55	1.03	27.9	11.09
MAN 7.5 mg/kg	12	915.3	48.39	16.22	52.87	17.71	33.54	113.8	116.83
		29.8	2.42	0.72	1.81	0.48	0.86	24.1	8.70
MAN 15 mg/kg	12	910.5	48.01	15.88	52.73	17.43**	33.07	117.3	109.61
		26.9	2.01	0.52	1.40	0.39	0.77	28.0	13.75
MAN 30 mg/kg	12	856.7**	46.23*	15.52**	53.99	18.12	33.57	114.0	107.32
		38.6	1.61	0.62	1.48	0.56	0.52	23.4	14.73

					Hemogram of WBC						
					Neutro.						
Group	No. of animals	Ret. %	PT sec.	APTT sec.	Stab. %	Seg. %	Eos. %	Bas. %	Mono. %	Lymp. %	Others %
Control	12	21.3	15.75	26.21	1.5	7.8	1.6	0.0	0.4	88.8	0.0
		3.8	1.62	2.24	1.6	2.9	1.2	0.0	0.7	3.9	0.0
MAN 7.5 mg/kg	12	19.8	15.28	25.65	1.9	11.9*	1.1	0.0	1.0	84.1*	0.0
		3.5	1.47	2.60	1.3	5.2	1.2	0.0	1.0	4.4	0.0
MAN 15 mg/kg	12	18.8	15.33	26.01	1.6	9.1	1.1	0.0	0.8	87.4	0.0
		4.0	1.70	2.45	1.8	3.9	1.7	0.0	0.9	6.1	0.0
MAN 30 mg/kg	12	23.3	14.13**	24.66	2.3	10.3	0.8	0.0	0.9	85.7	0.0
		4.6	0.61	2.55	1.2	3.2	0.7	0.0	0.9	3.0	0.0

a: Values are means and S.D. thereunder.
*: Differs from control, $p \leqq 0.05$. **: Differs from control, $p \leqq 0.01$.

Table 7. Biochemical findings of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Group	No. of animals	TP g/dL	A/G	Protein fraction (%) Alb	Globulin α_1	Globulin α_2	Globulin β	Globulin γ	GOT IU/L	GPT IU/L	ALP IU/L	Ch-E IU/L	γ-GTP IU/L	T-Bil mg/dL	Glu mg/dL
Control	12	5.88[a]	1.092	52.23	21.89	9.17	13.93	2.78	59.3	24.3	273.9	61.8	0.37	0.059	172.6
		0.24	0.089	2.03	2.41	0.62	0.82	0.87	6.0	5.8	59.8	28.6	0.13	0.010	19.2
MAN 7.5 mg/kg	12	6.00	1.063	51.63	22.96	8.99	13.85	2.58	72.5	34.0	235.2	69.7	0.48	0.068	176.6
		0.24	0.067	1.56	1.36	0.64	0.99	0.87	19.6	17.3	41.0	28.3	0.24	0.022	48.2
MAN 15 mg/kg	12	6.03	1.107	52.53	22.23	8.74	14.03	2.47	62.0	25.6	217.6*	60.3	0.40	0.062	182.3
		0.18	0.100	2.23	2.45	0.52	0.68	0.54	14.7	5.5	63.4	15.7	0.14	0.006	18.6
MAN 30 mg/kg	12	5.93	1.076	51.87	22.14	9.35	13.98	2.66	73.8	30.3	198.8**	55.2	0.43	0.070	184.3
		0.34	0.097	2.20	2.28	0.89	1.24	0.56	35.5	15.7	41.8	14.0	0.17	0.015	32.5

Group	No. of animals	T-Cho mg/dL	TG mg/dL	PL mg/dL	UN mg/dL	Crea mg/dL	Na mEq/L	K mEq/L	Cl mEq/L	Ca mg/dL	IP mg/dL
Control	12	60.4	51.1	101.9	15.38	0.458	141.42	4.861	105.6	9.65	7.13
		13.8	20.1	19.3	1.40	0.033	0.87	0.253	1.6	0.33	0.43
MAN 7.5 mg/kg	12	62.5	43.8	104.9	14.90	0.475	141.67	4.709	105.9	9.54	6.93
		12.9	24.8	17.1	1.30	0.068	1.30	0.212	1.2	0.33	0.46
MAN 15 mg/kg	12	60.8	66.6	109.4	15.27	0.492	141.29	4.522**	105.8	9.58	6.73
		8.5	37.1	14.2	1.56	0.042	1.37	0.178	1.3	0.15	0.44
MAN 30 mg/kg	12	59.6	61.8	106.3	14.67	0.513**	141.04	4.613*	105.4	9.56	7.07
		9.3	38.1	19.8	2.42	0.084	1.03	0.208	1.2	0.26	0.55

a: Values are means and S.D. thereunder.
*: Differs from control, $p \leqq 0.05$.
**: Differs from control, $p \leqq 0.01$.

Table 8. Gross findings of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/ developmental toxicity screening test (SR-9877)

Item	Control	MAN (mg/kg) 7.5	15	30
No. of animals examined	12[a]	12[a]	12[b]	12[c]
Organ : Findings				
Glandular stomach : Dark red patch, mucosa	0[d]	0	0	1
Kidney : Dilatation, renal pelvis, bilateral	1	0	0	0
Testis : Atrophy, bilateral	1[e]	0	0	0
Atrophy, unilateral	0	0	1	0
Epididymis : Atrophy, bilateral	1[e]	0	0	0
Yellow patch, cauda, unilateral	1	0	0	0
Spleen : Cyst	0	0	1	0

a: Includes one animal whose mate had no evidence of pregnancy.
b: Includes two animals whose mate had no evidence of pregnancy.
c: Includes one animal that failed in copulation.
d: Values are no. of animals with findings.
e: Animal whose mate had no evidence of pregnancy.

Table 9. Absolute and relative organ weights of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Group	No. of animals	Body weight g	Liver		Kidney						Spleen		Heart		Brain	
					Right		Left		Total							
			g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%
Control	12	511.8[a]	13.891	2.698	1.677	0.328	1.653	0.324	3.329	0.651	0.748	0.147	1.504	0.293	2.200	0.433
		50.2	2.222	0.199	0.192	0.026	0.171	0.024	0.358	0.049	0.104	0.019	0.173	0.021	0.066	0.043
MAN 7.5 mg/kg	12	501.9	13.664	2.717	1.607	0.323	1.609	0.323	3.216	0.643	0.715	0.142	1.464	0.292	2.240	0.450
		51.9	1.896	0.181	0.159	0.023	0.159	0.031	0.313	0.053	0.082	0.016	0.196	0.019	0.070	0.046
MAN 15 mg/kg	12	502.4	14.575	2.889	1.560	0.309	1.524	0.303	3.084	0.612	0.703	0.139	1.433	0.286	2.193	0.438
		46.0	2.256	0.244	0.242	0.025	0.209	0.018	0.446	0.041	0.123	0.020	0.115	0.018	0.078	0.033
MAN 30 mg/kg	12	500.2	15.398	3.063**	1.593	0.319	1.576	0.317	3.168	0.635	0.790	0.158	1.403	0.283	2.235	0.452
		58.0	2.655	0.230	0.169	0.024	0.122	0.020	0.280	0.038	0.128	0.019	0.119	0.018	0.081	0.042

Group	No. of animals	Thymus		Adrenal						Testis					
				Right		Left		Total		Right		Left		Total	
		mg	10^{-3}%	mg	10^{-3}%	mg	10^{-3}%	mg	10^{-3}%	g	%	g	%	g	%
Control	12	299.8	59.102	28.3	5.528	29.6	5.792	57.8	11.320	1.610	0.318	1.624	0.322	3.234	0.639
		52.6	12.036	3.2	0.475	3.4	0.502	6.2	0.859	0.296	0.072	0.263	0.060	0.550	0.131
MAN 7.5 mg/kg	12	276.1	54.784	29.4	5.866	30.8	6.143	60.3	12.008	1.637	0.328	1.643	0.329	3.280	0.658
		65.4	10.731	5.0	0.847	5.1	0.784	10.0	1.597	0.126	0.033	0.117	0.032	0.236	0.063
MAN 15 mg/kg	12	271.7	54.043	29.8	5.917	30.6	6.082	60.3	11.998	1.606	0.321	1.585	0.317	3.191	0.638
		53.2	9.930	4.5	0.697	4.3	0.661	8.6	1.305	0.137	0.038	0.179	0.047	0.308	0.083
MAN 30 mg/kg	12	282.2	56.000	30.3	6.078	32.1	6.433	62.4	12.512	1.727	0.349	1.715	0.348	3.442	0.696
		100.2	16.133	3.6	0.501	4.0	0.585	7.4	1.032	0.125	0.041	0.122	0.039	0.245	0.079

(continued)

Table 9. (continued)

Group	No. of animals	Epididymis					
		Right		Left		Total	
		g	%	g	%	g	%
Control	12	0.625	0.124	0.608	0.119	1.233	0.245
		0.111	0.028	0.099	0.026	0.205	0.054
MAN 7.5 mg/kg	12	0.635	0.128	0.608	0.123	1.243	0.250
		0.030	0.015	0.036	0.015	0.061	0.030
MAN 15 mg/kg	12	0.649	0.130	0.622	0.123	1.271	0.254
		0.058	0.016	0.065	0.012	0.120	0.027
MAN 30 mg/kg	12	0.668	0.135	0.633	0.128	1.301	0.262
		0.055	0.013	0.047	0.015	0.098	0.027

a: Values are means and S.D. thereunder.
**: Differs from control, $p \leqq 0.01$.

Table 10. Histopathological findings of male rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/ developmental toxicity screening test (SR-9877)

Item		MAN (mg/kg)			
		Control	7.5	15	30
No. of animals examined		12[a]	12[a]	12[b]	12[c]
Organ : Findings[d]	Grade[e]				
Lung : Accumulation, foam cell	+	3[f]	-[g]	-	1
Hyperplasia, bronchiolo-alveolar	+	0	-	-	1
Glandular stomach : Erosion	+	0	0	0	1
Pancreas : Atrophy, acinar cell	+	0	-	-	1
Liver : Microgranuloma	+	2	-	-	1
Necrosis, focal	++	0	-	-	1
Kidney : Cyst	<+>	1	-	-	1
Dilatation, renal pelvis	+	1	-	-	0
Regeneration, tubular epithelium	+	1	-	-	0
Testis : Atrophy, seminiferous tubule	Total	2	-	1(1)[h]	0
	+	1	-	1(1)	0
	++	1[i]	-	0(1)	0
Hyperplasia, interstitial cell	+	1[i]	-	0(1)	0
Epididymis : Cell debris, lumen	++	1[i]	-	-	0
Decrease, sperm	+++	1[i]	-	-	0
Granuloma, spermatic	+	1	-	-	0
Prostate : Cellular infiltration, lymphocyte	+	1	-	-	1
Spleen : Cyst	<+>	0	-	1(1)	0
Pituitary gland : Cyst, pars distalis	<+>	0	0	0	1
Cyst, pars intermedia	<+>	0	0	0	1
Aberrant, craniopharyngeal tissue	<+>	0	0	1	0

a: Includes one animal whose mate had no evidence of pregnancy.
b: Includes two animals whose mate had no evidence of pregnancy.
c: Includes one animal that failed in copulation.
d: There were no abnormal findings in the trachea, larynx, tongue, parotid gland, submandibular gland, sublingual gland, esophagus, forestomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rectum, heart, thoracic aorta, urinary bladder, seminal vesicle, coagulating gland, cerebrum, cerebellum, spinal cord, sciatic nerve, thymus, bone marrow, submandibular lymph node, mesenteric lymph node, thyroid, parathyroid, adrenal, eyeball, Harderian gland, skeletal muscle, sternum, femur or skin.
e: + = slight change, ++ = moderate change, +++ = severe change and <+> = presence in "presence or not" basis.
f: Values are no. of animals with findings.
g: - = blank value.
h: Values in parentheses are no. of animals examined.
i: Animal whose mate had no evidence of pregnancy.

Table 11. General appearance of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/ developmental toxicity screening test (SR-9877)

Item	Control	MAN (mg/kg) 7.5	15	30
Findings before gestation period				
No. of animals examined	12	12	12	12[a]
Abnormal findings	0[b]	0	0	0
Findings during gestation period				
No. of animals examined	12[c]	12[c]	12[d]	11
Subcutaneous mass	0	0	1	1
Findings during lactation period				
No. of animals examined	11	11	10	11
Subcutaneous mass	0	0	1	1

a: Includes one animal that failed in copulation.
b: Values are no. of animals with findings.
c: Includes one animal that had no evidence of pregnancy.
d: Includes two animals that had no evidence of pregnancy.

Table 12. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Group	No. of animals	Day of administration 1	2	5	7	10	14	Body weight gain Day 1-14	a %
		b							
Control	12	234.2	237.3	242.1	248.6	254.0	261.8	27.7	11.751
		12.8	14.4	16.1	16.8	18.1	17.9	6.7	2.497
MAN 7.5 mg/kg	12	233.3	235.7	243.1	250.8	251.9	258.9	25.7	11.071
		11.7	10.9	13.2	10.5	11.0	12.0	7.3	3.245
MAN 15 mg/kg	12	234.7	232.6	240.0	247.1	247.8	253.6	18.9	8.135
		14.4	14.2	13.5	14.3	15.8	15.9	9.9	4.216
MAN 30 mg/kg	12	235.4	234.4	242.5	246.1	251.3	258.7	23.3	9.798
		14.3	16.3	14.8	17.6	18.3	22.0	11.8	4.868

a: (Body weight gain / body weight on day 1) x 100.
b: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram.

Table 13. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Group	No. of animals	Day of gestation									Body weight gain	
		0	1	3	5	7	10	14	17	20	Day 0-20	[a] %
		[b]										
Control	11	266.4	273.0	285.5	294.9	305.4	318.6	344.2	372.4	423.7	157.4	59.062
		14.6	13.2	15.5	19.6	17.2	21.1	21.7	22.7	28.3	17.9	5.777
MAN 7.5 mg/kg	11	267.3	276.4	286.5	294.3	304.4	317.9	341.5	369.7	420.2	152.9	57.178
		12.3	14.0	15.4	15.4	15.2	16.1	19.7	24.0	27.5	19.7	6.687
MAN 15 mg/kg	10	262.7	268.4	280.8	288.3	298.9	314.2	337.4	366.2	417.3	154.6	58.960
		13.5	14.9	17.1	17.5	16.0	17.6	17.9	19.8	18.0	9.9	4.417
MAN 30 mg/kg	11	269.4	278.8	289.9	298.2	309.4	323.5	348.5	375.6	425.6	156.3	58.497
		23.5	25.1	23.3	22.0	20.0	20.2	21.8	22.4	24.4	15.7	7.943

a: (Body weight gain / body weight on day 0) x 100.
b: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram.

Table 14. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Group	No. of animals	Day of lactation 0	1	4	Body weight gain Day 0-4	a %
		b				
Control	11	318.7	319.5	330.8	12.1	4.005
		27.3	21.6	21.3	12.0	3.866
MAN 7.5 mg/kg	11	319.5	318.4	334.9	15.5	4.859
		20.8	24.1	25.2	14.1	4.472
MAN 15 mg/kg	10	310.9	314.1	333.6	22.7	7.318
		15.3	18.3	19.5	12.4	4.090
MAN 30 mg/kg	11	325.1	328.0	336.5	11.4	3.484
		21.3	22.3	23.8	7.0	2.153

a: (Body weight gain / body weight on day 0) x 100.
b: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram.

Table 15. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Group	No. of animals	Day of administration 1	2	5	7	10	14
Control	12	18.5[a]	17.2	16.2	17.7	17.4	17.3
		3.0	2.4	2.6	2.2	2.5	2.7
MAN 7.5 mg/kg	12	18.1	16.8	16.7	18.0	16.8	16.7
		3.0	2.5	3.7	2.7	2.3	2.1
MAN 15 mg/kg	12	17.8	14.2*	15.7	16.8	14.8	14.9
		2.9	2.4	3.5	3.5	2.8	2.6
MAN 30 mg/kg	12	19.6	14.6*	16.8	15.8	16.6	16.3
		3.4	2.7	2.0	3.5	3.1	4.5

a: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram/day.
*: Differs from control, $p \leqq 0.05$.

Table 16. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Group	No. of animals	Day of gestation 1	3	5	7	10	14	17	20
Control	11	18.1[a]	20.5	22.7	23.8	22.8	21.5	19.4	24.2
		3.3	3.8	2.2	2.7	2.9	2.3	2.1	2.0
MAN 7.5 mg/kg	11	18.9	21.3	21.5	24.3	22.1	21.5	20.5	23.9
		2.2	2.6	1.8	2.6	3.4	2.3	3.0	3.7
MAN 15 mg/kg	10	16.3	20.2	20.4*	23.3	21.4	21.0	21.7	22.9
		1.6	2.2	2.4	2.4	2.5	1.9	2.8	3.5
MAN 30 mg/kg	11	18.1	22.4	22.5	23.4	23.4	22.6	21.4	21.2
		2.8	3.2	2.3	2.9	2.8	2.5	2.5	3.2

a: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram/day.
*: Differs from control, $p \leqq 0.05$.

Table 17. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Group	No. of animals	Day of lactation 1	Day of lactation 4
		[a]	
Control	11	16.3	39.3
		5.2	5.1
			[b]
			(10)
MAN 7.5 mg/kg	11	16.4	39.4
		4.1	4.8
MAN 15 mg/kg	10	19.2	41.1
		5.9	5.4
MAN 30 mg/kg	11	22.3	37.8
		8.5	7.7

a: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram/day.
b: Values in parentheses are no. of animals examined.

Table 18. Hematological findings of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Group	No. of animals	RBC $10^4/\mu L$	Ht %	Hb g/dL	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	WBC $10^2/\mu L$	Plat $10^4/\mu L$
Control	6	682.8[a]	41.05	13.57	60.28	19.92	33.05	122.7	114.18
		51.9	1.52	0.67	3.02	0.82	0.73	25.3	9.81
MAN 7.5 mg/kg	6	688.0	41.28	13.55	60.02	19.72	32.87	139.7	113.38
		28.7	2.34	0.43	2.73	0.80	1.23	26.8	16.29
MAN 15 mg/kg	6	651.8	40.62	13.27	62.27	20.37	32.70	128.2	122.58
		31.0	2.73	0.80	2.10	0.73	0.64	15.9	16.71
MAN 30 mg/kg	6	678.2	42.53	13.50	62.77	19.90	31.77*	123.2	123.28
		32.1	1.53	0.56	1.65	0.46	0.57	31.4	9.72

					Hemogram of WBC						
					Neutro.						
Group	No. of animals	Ret. %	PT sec.	APTT sec.	Stab. %	Seg. %	Eos. %	Bas. %	Mono. %	Lymp. %	Others %
Control	6	57.5	13.85	19.38	4.0	26.5	0.7	0.0	1.2	67.7	0.0
		21.5	0.27	1.10	2.4	9.9	0.8	0.0	1.5	11.4	0.0
MAN 7.5 mg/kg	6	44.3	13.90	18.38	1.3*	22.8	1.0	0.0	0.7	74.2	0.0
		17.5	0.27	1.25	1.2	7.3	1.3	0.0	0.8	8.0	0.0
MAN 15 mg/kg	6	71.3	14.13	19.42	0.7**	25.0	0.0	0.0	0.2	74.2	0.0
		17.6	0.43	1.15	0.8	8.7	0.0	0.0	0.4	8.3	0.0
MAN 30 mg/kg	6	68.7	14.07	19.13	2.3	23.7	0.5	0.0	1.0	72.5	0.0
		20.6	0.18	0.94	1.5	7.9	1.2	0.0	0.6	7.5	0.0

a: Values are means and S.D. thereunder.
*: Differs from control, $p \leqq 0.05$. **: Differs from control, $p \leqq 0.01$.

Table 19. Biochemical findings of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Group	No. of animals	TP g/dL	A/G	Protein fraction (%) Alb	Globulin α_1	Globulin α_2	Globulin β	Globulin γ	GOT IU/L	GPT IU/L	ALP IU/L	Ch-E IU/L	γ -GTP IU/L	T-Bil mg/dL	Glu mg/dL
Control	6	5.60[a]	1.180	54.17	21.13	8.45	13.83	2.42	80.2	38.5	127.5	246.0	0.77	0.058	126.7
		0.44	0.114	2.46	1.85	1.33	1.15	0.89	19.0	9.8	64.4	36.7	0.33	0.012	8.2
MAN 7.5 mg/kg	6	5.53	1.152	53.57	20.08	10.00	14.17	2.18	87.5	33.3	147.2	211.8	0.83	0.055	128.3
		0.21	0.059	1.29	1.54	1.55	0.73	0.66	15.2	4.7	30.1	40.4	0.36	0.015	14.4
MAN 15 mg/kg	6	5.55	1.120	52.92	21.65	9.62	14.02	1.80	83.8	38.5	117.2	226.2	0.55	0.078	134.0
		0.15	0.038	0.84	1.78	0.88	1.11	0.46	15.0	7.6	21.3	45.6	0.19	0.019	16.4
MAN 30 mg/kg	6	5.48	1.175	54.07	21.37	8.87	13.52	2.18	73.2	28.0	151.8	213.2	0.75	0.080*	148.0*
		0.26	0.046	0.97	2.87	1.80	1.36	0.67	11.7	7.2	57.4	53.4	0.18	0.011	13.9

Group	No. of animals	T-Cho mg/dL	TG mg/dL	PL mg/dL	UN mg/dL	Crea mg/dL	Na mEq/L	K mEq/L	Cl mEq/L	Ca mg/dL	IP mg/dL
Control	6	58.2	33.8	113.8	16.03	0.532	140.92	4.670	109.0	9.85	8.53
		3.5	8.2	6.7	1.34	0.034	1.24	0.280	1.1	0.50	1.25
MAN 7.5 mg/kg	6	57.5	41.7	111.3	19.62**	0.560	141.25	4.657	108.7	9.78	8.90
		12.6	40.1	21.5	0.96	0.040	1.64	0.309	1.8	0.25	0.92
MAN 15 mg/kg	6	66.7	46.5	128.3	16.83	0.568	140.67	4.710	108.3	9.65	8.02
		9.3	19.6	13.0	2.77	0.041	1.03	0.374	1.0	0.39	0.41
MAN 30 mg/kg	6	54.0	62.3	108.8	17.47	0.557	140.42	4.790	108.5	9.70	8.30
		9.0	43.1	15.1	3.58	0.061	1.39	0.152	1.4	0.40	0.39

a: Values are means and S.D. thereunder.
*: Differs from control, $p \leqq 0.05$.
**: Differs from control, $p \leqq 0.01$.

Table 20. Gross findings of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/ developmental toxicity screening test (SR-9877)

Item	Control	MAN (mg/kg) 7.5	15	30
No. of animals examined	12[a]	12[a]	12[b]	12[c]
Organ : Findings				
Glandular stomach : Dark red patch, mucosa	0[d]	1	1	2
Liver : Yellowish white discoloration	0	1	0	0
Skin : Subcutaneous white mass	0	0	1	0
Subcutaneous yellowish white mass	0	0	0	1

a: Includes one animal that had no evidence of pregnancy.
b: Includes two animals that had no evidence of pregnancy.
c: Includes one animal that failed in copulation.
d: Values are no. of animals with findings.

Table 21. Absolute and relative organ weights of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Group	No. of animals	Body weight g	Liver		Kidney						Spleen		Heart		Brain	
					Right		Left		Total							
			g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%
Control	11	309.1[a]	9.694	3.140	1.003	0.324	0.965	0.313	1.968	0.637	0.613	0.196	0.922	0.298	2.051	0.666
		19.9	0.746	0.213	0.073	0.021	0.068	0.025	0.134	0.043	0.098	0.024	0.042	0.017	0.107	0.053
MAN 7.5 mg/kg	11	311.5	10.659	3.420**	1.025	0.330	0.996	0.321	2.022	0.652	0.625	0.200	1.005*	0.324	2.029	0.653
		21.5	1.004	0.166	0.070	0.022	0.092	0.034	0.154	0.053	0.110	0.024	0.132	0.040	0.053	0.041
MAN 15 mg/kg	10	306.9	10.478	3.413**	1.018	0.332	0.992	0.324	2.010	0.655	0.673	0.220	0.980*	0.319*	2.051	0.671
		18.2	0.929	0.215	0.077	0.021	0.070	0.021	0.145	0.043	0.103	0.038	0.051	0.018	0.062	0.034
MAN 30 mg/kg	11	308.7	10.724*	3.465**	1.021	0.331	0.994	0.321	2.015	0.655	0.838**	0.274**	1.024*	0.330*	2.013	0.655
		21.6	1.210	0.206	0.092	0.024	0.089	0.017	0.178	0.042	0.119	0.038	0.135	0.036	0.066	0.053

Group	No. of animals	Thymus		Adrenal						Ovary					
				Right		Left		Total		Right		Left		Total	
		mg	10^{-3}%	mg	10^{-3}%	mg	10^{-3}%	mg	10^{-3}%	mg	10^{-3}%	mg	10^{-3}%	mg	10^{-3}%
Control	11	219.6	70.383	34.8	11.270	37.0	11.981	71.8	23.252	53.2	17.189	53.1	17.292	106.3	34.480
		71.3	19.754	4.1	1.129	4.8	1.470	8.3	2.416	7.7	2.061	6.6	2.814	7.3	2.896
MAN 7.5 mg/kg	11	223.1	71.106	38.4	12.285	42.1	13.495*	80.5	25.780	55.8	17.957	50.2	16.197	106.0	34.155
		77.3	22.416	5.8	1.356	6.4	1.628	11.7	2.796	4.5	1.358	5.6	2.278	7.2	2.995
MAN 15 mg/kg	10	196.8	64.247	34.8	11.333	36.5	11.892	71.3	23.226	54.3	17.692	52.5	17.108	106.8	34.797
		60.7	20.346	3.6	0.904	3.6	0.920	7.0	1.744	7.7	2.231	8.6	2.605	12.7	3.513
MAN 30 mg/kg	11	200.3	65.323	37.6	12.165	41.4	13.397*	79.0	25.562	52.6	17.095	56.9	18.506	109.5	35.598
		54.6	18.878	6.1	1.530	5.0	1.268	10.8	2.662	6.1	1.984	7.3	2.493	10.1	3.475

a: Values are means and S.D. thereunder.
*: Differs from control, $p \leq 0.05$.
**: Differs from control, $p \leq 0.01$.

Table 22. Histopathological findings of female rats dosed orally with 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in the combined repeat dose and reproductive/ developmental toxicity screening test (SR-9877)

Item		Control	MAN (mg/kg) 7.5	15	30
No. of animals examined		12[a]	12[a]	12[b]	12[c]
Organ : Findings[d]	Grade[e]				
Lung : Accumulation, foam cell	+	3[f]	-[g]	-	2
Fibrosis, focal	+	1	-	-	1
Tongue : Ulcer	+	2	-	-	0
Granulation, muscular layer	+	2	-	-	0
Esophagus : Granulation, muscular layer	+	0	-	-	1
Glandular stomach : Erosion	+	0	1	1	2
Jejunum : Granuloma, Peyer's patch	+	1	-	-	0
Mineralization, Peyer's patch	+	1	-	-	0
Pancreas : Atrophy, acinar cell	+	0	-	-	1
Liver : Necrosis, focal	+	0	0(1)[h]	-	1
Necrosis, centrilobular	+++	0	1(1)	-	0
Heart : Myocardial degeneration	+	1	-	-	0
Kidney : Cyst	<+>	1	-	-	0
Mineralization, pelvic mucosa	+	1	-	-	1
Regeneration, tubular epithelium	+	1	-	-	0
Spleen : Hematopoiesis, extramedullary	+	1	0	3	[7]*
Pituitary gland : Cyst, pars distalis	<+>	0	2	0	0
Cyst, pars intermedia	<+>	0	0	0	1
Eyeball : Atrophy, retina, focal	+	0	-	-	1
Harderian gland : Cellular infiltration, lymphocyte	+	1	-	-	0
Mammary gland : Adenocarcinoma	<+>	0	-	1(1)	1
Cellular infiltration, neutrophil	+	0	-	0(1)	1

a: Includes one animal that had no evidence of pregnancy.
b: Includes two animals that had no evidence of pregnancy.
c: Includes one animal that failed in copulation.
d: There were no abnormal findings in the trachea, larynx, parotid gland, submandibular gland, sublingual gland, forestomach, duodenum, ileum, cecum, colon, rectum, thoracic aorta, urinary bladder, ovary, uterus, vagina, cerebrum, cerebellum, spinal cord, sciatic nerve, thymus, bone marrow, submandibular lymph node, mesenteric lymph node, thyroid, parathyroid, adrenal, skeletal muscle, sternum, femur or skin.
e: + = slight change, +++ = severe change and <+> = presence in "presence or not" basis.
f: Values are no. of animals with findings.
g: - = blank value.
h: Values in parentheses are no. of animals examined.
*: Differs from control, $p \leqq 0.05$.

Table 23. Influence of 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) on reproductive ability of rats in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9877)

Group	No. of pairs mated	Estrous cycle								No. of pairs with successful copulation	Days from mating to copulation	Copulation index % [a]	No. of pregnant animals	Fertility index % [b]
		Before administration				Administration period								
		Normal	Abnormal			Normal	Abnormal							
			Total	Continuous diestrus	Irregular		Total	Continuous diestrus	Irregular					
Control	12	12	0	-[c]	-	12	0	-	-	12	2.3 ± 0.8[d]	100.0	11	91.7
MAN 7.5 mg/kg	12	12	0	-	-	12	0	-	-	12	2.9 ± 0.9	100.0	11	91.7
MAN 15 mg/kg	12	12	0	-	-	12	0	-	-	12	2.9 ± 1.1	100.0	10	83.3
MAN 30 mg/kg	12	12	0	-	-	11	1	1	-	11	3.5 ± 3.6	91.7	11	100.0

a: (No. of pairs with successful copulation / no. of pairs mated) x 100.
b: (No. of pregnant animals / no. of pairs with successful copulation) x 100.
c: - = blank value.
d: Values are means ± S.D.

Table 24. Influence of 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) on delivery and maternal behavior in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats (SR-9877)

Group		No. of pregnant females	No. of implantation sites	No. of pups born	a Delivery index %	Live pups born					Dead pups born			Gestation length day	d Gestation index %	e Nursing index %
						No.	b Live birth index %	c Sex ratio	Male	Female	No.	Male	Female			
Control	Total	11	167	160		160			83	77	0	0	0			
	Mean		15.2	14.5	96.021	14.5	100.000	1.212	7.5	7.0	0.0	0.0	0.0	22.5	100.0	100.0
	S.D.		1.7	1.7	7.195	1.7	0.000	0.616	2.0	1.8	0.0	0.0	0.0	0.5		
MAN 7.5 mg/kg	Total	11	173	158		157			69	88	1	0	1			
	Mean		15.7	14.4	91.523	14.3	99.465	0.831	6.3	8.0	0.1	0.0	0.1	22.6	100.0	100.0
	S.D.		1.3	2.2	12.750	2.1	1.773	0.298	1.6	1.8	0.3	0.0	0.3	0.5		
MAN 15 mg/kg	Total	10	158	150		150			74	76	0	0	0			
	Mean		15.8	15.0	94.869	15.0	100.000	1.090	7.4	7.6	0.0	0.0	0.0	22.8	100.0	100.0
	S.D.		1.1	1.6	6.490	1.6	0.000	0.437	1.4	2.4	0.0	0.0	0.0	0.4		
MAN 30 mg/kg	Total	11	176	160		150			71	79	10	3	7			
	Mean		16.0	14.5	91.193	13.6	92.027	1.002	6.5	7.2	0.9	0.3	0.6	22.6	100.0	100.0
	S.D.		2.0	2.3	10.588	4.3	24.556	0.608	2.6	2.6	2.7	0.9	1.8	0.5		

a: (No. of pups born / no. of implantation sites) x 100.
b: (No. of live pups born / no. of pups born) x 100.
c: No. of male pups / no. of female pups.
d: (No. of females with live pups delivery / no. of pregnant females) x 100.
e: (No. of females nursing live pups / no. of females with normal delivery) x 100.

Table 25. Influence of 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) on viability of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats (SR-9877)

Group		No. of dams	No. of live pups born (on day 0)	Live pups on day 4			
				No.	Viability[a] index %	Male	Female
Control	Total	11	160	159		83	76
	Mean		14.5	14.5	99.465	7.5	6.9
	S.D.		1.7	1.6	1.773	2.0	1.8
MAN 7.5 mg/kg	Total	11	157	155		69	86
	Mean		14.3	14.1	98.864	6.3	7.8
	S.D.		2.1	2.0	2.528	1.6	1.7
MAN 15 mg/kg	Total	10	150	147		71	76
	Mean		15.0	14.7	98.110	7.1	7.6
	S.D.		1.6	1.5	3.062	1.4	2.4
MAN 30 mg/kg	Total	11	150	150		71	79
	Mean		13.6	13.6	100.000	6.5	7.2
	S.D.		4.3	4.3	0.000	2.6	2.6

a: (No. of live pups on day 4 / no. of live pups born) x 100.

Table 26. General appearance of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in rats (SR-9877)

Item	Male				Female			
		MAN (mg/kg)				MAN (mg/kg)		
	Control	7.5	15	30	Control	7.5	15	30
No. of animals examined	83[a]	69	74	71	77	88	76	79
No. of dead/missing animals	0	0	3	0	1	2	0	0
Dead animals	-[b]	-	1[c]	-	1	2	-	-
Missing animals	-	-	2	-	0	0	-	-
No. of surviving animals	83	69	71	71	76	86	76	79
Trauma	0	0	0	0	0	0	0	1

a: Values are no. of live animals at birth.
b: - = blank value.
c: Values are no. of animals with findings.

Table 27. Body weight changes of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in rats (SR-9877)

Group	No. of litters	Male: Day of lactation 0	1	4	Male: Body weight gain Day 0-4	Male: Body weight gain % [a]	Female: Day of lactation 0	1	4	Female: Body weight gain Day 0-4	Female: Body weight gain %	Litter weight: Day of lactation 0	1	4
Control	11	6.99 [b]	7.64	10.80	3.81	54.364	6.60	7.23	10.34	3.74	56.535	98.14	107.27	151.44
		0.68	0.85	1.25	0.66	7.038	0.63	0.74	1.12	0.59	6.929	9.61	11.26	13.34
MAN 7.5 mg/kg	11	7.00	7.66	11.09	4.09	57.968	6.68	7.32	10.61	3.93	58.377	96.65	104.83	150.61
		0.53	0.82	1.46	0.98	10.237	0.57	0.78	1.31	0.79	7.973	11.61	12.08	15.98
MAN 15 mg/kg	10	6.90	7.55	10.99	4.09	59.213	6.50	7.14	10.22	3.72	56.921	99.51	109.18	154.09
		0.63	0.76	1.24	0.74	8.494	0.53	0.73	1.25	0.80	8.807	8.17	8.54	13.99
MAN 30 mg/kg	11	6.91	7.58	11.05	4.14	59.614	6.60	7.27	10.40	3.80	57.318	91.38	100.35	143.23
		0.55	0.79	1.31	0.89	11.004	0.53	0.68	1.17	0.73	8.421	27.56	30.07	42.32

a: (Body weight gain / body weight on day 0) x 100.
b: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram.

Table 28. Gross findings of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-methyl-2-propenenitrile (MAN) in rats (SR-9877)

Item	Male				Female			
		MAN (mg/kg)				MAN (mg/kg)		
	Control	7.5	15	30	Control	7.5	15	30
Findings of dead pups at birth								
No. of animals examined	0	0	0	3	0	1	0	7
Organ : Findings								
External : Trauma	-[a]	-	-	1[b]	-	0	-	2
Findings of dead pups after birth								
No. of animals examined	0	0	1	0	1	2	0	0
Organ : Findings[c]								
Findings of pups killed on day 4 of lactation								
No. of animals examined	83	69	71	71	76	86	76	79
Organ : Findings								
Liver : Yellowish white patch	0	1	0	0	0	0	0	0
External : Trauma	0	0	0	0	0	0	0	1

a: - = blank value.
b: Values are no. of animals with findings.
c: There were no abnormal findings in all the organs and tissue.