



オ-トルエンスルホンアミドの
ラットを用いる反復経口投与毒性・
生殖発生毒性併合試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

【 目 次 】

	頁
要 約	1
I. 反復投与毒性（親動物所見）	1
1. 雄動物	1
2. 雌動物	1
II. 生殖発生毒性	2
1. 生殖関連所見	2
2. 出生児所見	3
III. 評価	3
緒 言	4
試験材料および方法	6
1. 被験物質	6
2. 使用動物および飼育条件	6
3. 群分けおよび個体識別	7
4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法	7
5. 観察方法	8
6. 統計解析	12
結 果	14
I. 反復投与毒性（親動物所見）	14
1. 一般状態	14
2. 体重	16
3. 摂餌量	16
4. 尿検査所見	17
5. 解剖時検査所見	17
II. 生殖発生毒性	26
1. 生殖関連所見	26
2. 出生児所見	26
考 察	28
1. 反復投与毒性	28

2. 生殖発生毒性	31
3. 無影響量	32
文 献	33

Figures (Figure 1 ~ Figure 4)

Tables (Table 1 ~ Table 28)

【 要 約 】

o-トルエンスルホンアミド (TSA と略記) の 0 (媒体対照)、20、100 および 500 mg/kg をSprague-Dawley系 (Crj:CD) ラットの雌雄 (各13匹/群) に、交配前2週間および交配期間2週間経口投与した。さらに、雄では交配期間終了後2週間、雌では妊娠期間を通して分娩後哺育3日まで投与を継続して、TSA の親動物に対する反復投与毒性および生殖発生毒性について検討した。結果は、以下のように、要約される。

I. 反復投与毒性 (親動物所見)

1. 雄動物

100 mg/kg 以上の投与群において、投与開始後から、自発運動減少および腹臥姿勢が認められ、投与期間中期からは流涎が認められた。また、投与初期に体重増加および摂餌量の抑制も認められた。42回投与後に実施した尿検査では、いずれの項目についても、TSA 投与に起因したと考えられる異常は認められなかった。

剖検時に実施した血液学検査では、平均赤血球血色素量がすべての TSA 投与群において、平均赤血球血色素濃度が 100 mg/kg 以上の投与群において、また、血小板数が 500 mg/kg 投与群において、それぞれ増加した。血液生化学検査では、すべての TSA 投与群においてアルカリフォスファターゼ活性が低下し、100 mg/kg 以上の投与群の総コレステロール濃度が増加した。また、500 mg/kg 投与群では、総蛋白濃度が増加し、A/G比、ブドウ糖濃度およびトリグリセライド濃度が低下した。器官重量については、肝臓および腎臓重量が 500 mg/kg 投与群において、それらの比体重値が 100 mg/kg 以上の投与群においてそれぞれ増加し、100 mg/kg 以上の投与群において心臓、副腎および精巣の比体重値も増加した。剖検では、100 mg/kg 以上の投与群の肝臓および腎臓に暗色化あるいは腫大などが認められたが、病理組織学検査では、曇り硝子様を呈する小葉中心性肝細胞肥大が 100 mg/kg 以上の投与群において認められた。また、腎臓では eosinophilic body の頻度および程度が TSA 各投与群で増加した。

2. 雌動物

500 mg/kg 投与群において、自発運動減少および腹臥姿勢が回復しないまま、あるいはそれに加えて、鎮静、紅涙、体温低下、触発反応の喪失、流涎、呼吸困難あるいは褐色尿

などを示した後の投与3～5日に、13例中3例が死亡し、2例を瀕死剖検した。これらの動物の病理学検査から、剖検の数日前から胸腔内諸組織に炎症性的変化が生じたものと推測された。病理組織学検査では、胸腔内諸組織の炎症性変化の他に、腎臓の近位尿細管の脂肪変性、ならびに脾臓における白脾髄および赤脾髄の萎縮も認められた。

生存例では、100 mg/kg 以上の投与群において自発運動減少および腹臥姿勢がみられ、500 mg/kg 投与群では、それらが翌日まで持続する例、四肢の伸展およびよろめき歩行を示す例、また、鎮静、体温低下、紅涙、褐色尿といった途中剖検例にも認められた変化が、投与初期に認められた。これらの一般状態の変化の他、流涎が 100 mg/kg 以上の投与群に認められた。体重増加抑制は、100 mg/kg 投与群の妊娠初期および 500 mg/kg 投与群の投与初期に、また、摂餌量の抑制は、500 mg/kg 投与群の投与初期および妊娠初期に認められた。

哺育4日に測定した器官重量は、100 mg/kg 以上の投与群において肝臓重量比体重値が増加し、500 mg/kg 投与群において脳、腎臓および副腎の比体重値が増加した。剖検では、100 mg/kg 以上の投与群の肝臓に腫大あるいは暗色化が認められ、胸腺には小型化が認められた。また、100 mg/kg 以上の投与群に、肺と肋骨胸膜あるいは横隔膜との癒着、500 mg/kg 投与群では、心外膜と心嚢の癒着、心嚢と肺、胸腺、あるいは肋骨胸膜との癒着、心嚢の白濁、ならびに心嚢の肥厚が観察された。病理組織学検査では、100 mg/kg 以上の投与群に曇り硝子様を呈する小葉中心性肝細胞肥大が認められ、500 mg/kg 投与群では、心外膜の線維化および細胞浸潤、胸腺の萎縮ならびに被膜の線維化および細胞浸潤が認められた。これらの他に、途中剖検例の多くに認められた胸腺被膜の水腫が 100 mg/kg 以上の投与群に、腎臓の近位尿細管の脂肪変性、および脾臓における白脾髄の萎縮が 500 mg/kg 投与群に、また、胸腺被膜上の好中球を含む滲出物が 100 mg/kg 投与群にそれぞれ少数例認められた。

20 mg/kg 投与群では、いずれの検査・観察項目にも、TSA 投与の影響は認められなかった。

II. 生殖発生毒性

1. 生殖関連所見

500 mg/kg までの TSA は、交尾、排卵および受胎に影響を示さなかった。また、TSA 投与に起因する分娩異常および哺育状態の異常も認められなかった。

2. 出生児所見

100 mg/kg 以下の投与群の出生児の生存性、性比および体重に TSA 投与の影響は認められず、TSA 投与に起因した形態異常も観察されなかった。500 mg/kg 投与群においても形態異常は観察されなかったが、哺育0および4日における生存児数、ならびに分娩率が低下傾向を示し、哺育0および4日における雌雄生存児体重に低下が認められた。

Ⅲ. 評価

以上の試験成績から、本試験条件下では、TSA の反復投与毒性に関する無影響量は、雄では、20 mg/kg/day を下回る量であり、雌では、20 mg/kg/day である。生殖発生毒性に関する無影響量は、親動物では雌雄ともに 500 mg/kg/day であり、出生児については 100 mg/kg/day であると結論される。

【 緒 言 】

o-トルエンスルホンアミド (TSA と略記) は、Remsen-Fahlberg 工程で製造された人工甘味料サッカリンの主要な不純物である¹⁾。In utero でサッカリン曝露を受けたラットを、出生後もサッカリンで曝露し続けると、膀胱癌が誘発された^{2, 3)}ことから、食品へのサッカリン添加の禁止が世界保健機構によって勧告された。サッカリンとその不純物に関する多くの実験から、膀胱癌の原因物質が、サッカリンに大量に混入していた TSA であると疑われたが、純粋なサッカリンでラットを曝露しても膀胱癌が誘発されたことから⁴⁾、TSA は尿をアルカリ性にして結石の形成を促進するが⁵⁾、膀胱癌誘発の可能性については乏しいことが明らかにされた。

TSA は、スルホンアミド類に属する化合物である。スルホンアミド類は、細菌の葉酸合成を阻害することから、抗菌剤のサルファ剤として用いられている。スルホンアミドの主要な作用は、脱水素酵素阻害作用であるが、これを利用して、アセタゾールアミドをはじめとする利尿剤が開発された。また、スルホンアミド投与により惹起されるアシドーシスは、癲癇発作を阻止することから、スルホンアミドは、癲癇に対する抗痙攣治療薬としても用いられている⁶⁾。さらに、膵臓の β 細胞に作用してインスリン分泌を促進するスルホンアミド類は、経口血糖降下剤として用いられている⁷⁾。こうした広汎な使用の過程で、スルホンアミド類は薬理作用の他にアルブミンとの高親和性のため、ビリルビンなど血液中ではアルブミンと結合して存在する物質を遊離型にして毒性を発現すること⁸⁾、甲状腺ホルモンの合成を阻害して甲状腺機能低下を惹起し、さらに甲状腺腫を誘発すること⁹⁾、光毒性を有すること¹⁰⁾ など、種々の機序を介する毒性を発現することが報告されている。

TSA の毒性については、膀胱癌誘発性を検討するために長期毒性試験が数多く行われている。また、多世代発癌試験の一環として、生殖に及ぼす影響について若干の報告がある^{4, 5)}。OECD 既存化学物質安全性点検事業では、TSA の類縁化合物である4-メチルベンゼンスルホンアミド (以下MBSAと略記) に関する反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験が既に実施され、MBSAの無影響量は、反復投与毒性については 120 mg/kg/day を下回る量であり、生殖発生毒性については 300 mg/kg/day であることが報告されている¹¹⁾。

今回、我々は、OECDによる既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として TSA の反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、同化合物の雌雄ラットに及

ばす反復投与毒性ならびに生殖・発生毒性について検討したのでその結果を報告する。

【試験材料および方法】

1. 被験物質

o-トルエンスルホンアミド (TSA と略記) [CAS No.: 88-19-7; 分子式: $C_7H_9NO_2S$; 分子量: 171.22; 英名: o-toluenesulfonamide; 融点: 155°C; 沸点: 214°C (1.33 kPa)] は、スルホンアミド類に属する芳香族炭化水素である。

本試験に使用した TSA [Lot No. : ; 純度: 99wt% (不純物: 提供元資料に記載なし) (Annex 1)] は、白色粉末で、使用時まで室温で保管し、0.5 %カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC-Na) 水溶液 [日局カルメロースナトリウム: 丸石製薬(株)、製造番号: 6Z09; 日局注射用水: 光製薬(株)、製造番号: 9707SA] に懸濁して、いずれの用量においても1回の投与液量が5 mL/kg 体重になるように含量を調整した。調製液中の被験物質は、冷蔵遮光条件下で少なくとも8日間安定であることが秦野研究所において実施した「o-トルエンスルホンアミドのラットにおける単回経口投与毒性試験」(試験計画番号: A-97-029、以下、単回投与試験と略記する) で確認されたので (Annex 2)、調製液は冷蔵保管し、調製後7日以内に投与した。本試験に使用した TSA の試験期間中の品質は、試験終了後、において使用した TSA を再度分析して確認した (Annex 3)。また、本試験において調製された投与検体の TSA 含量および均一性は、十分に振盪攪拌した投与検体には所定量の TSA が均一に含有されていたことを秦野研究所において分析し確認した (Annexes 4、5)。

2. 使用動物および飼育条件

試験には、雌雄ともに7週齢で購入(入荷日、雌雄とも1998年1月14日)した日本チャールス・リバー(株)厚木飼育センター生産の Sprague-Dawley 系ラット (Cri:CD(IGS)、SPF) を使用した。購入した動物は、入荷後6日間、馴化と検疫を兼ねて予備飼育し、その間いずれの動物にも一般状態に異常が認められなかったため、これを試験に供した。動物の入荷、検疫ならびに群分け状況を、Annex 6 に示した。

各動物は、基準温湿度各 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、および 50~65%、換気回数約15回/時間、照明12時間(午前7時~午後7時)に制御された飼育室(4号室)で、金属製ケージ(220×270×190 mm)に個別に収容して飼育し、固型飼料(CB-2、日本クレア(株))および飲料水(水道水、秦野市水道局給水)を自由に摂取させた。妊娠14日(精子確認日=妊娠

0 日) 以後の母動物は、ラット用繁殖ケージ (350×400×180 mm) に収容し、床敷として紙パルプ製チップ (ALPHA-dri、加商株) を適宜供給した。

試験期間中、秦野研究所中央コントロール室において測定した飼育室の室温および相対湿度は、それぞれ、23.5～25.8℃、および 52.0～66.5%と許容範囲内であり、使用した飼料、水および床敷には試験に支障を来す可能性の考えられる混入物はなかったことが確認されている。

3. 群分けおよび個体識別

雌雄とも投与開始日 (投与 1 日) の体重をもとに体重別層化無作為抽出法に準じて群分けし、各群に雌雄各13匹を配した。群分け後、すべての雌雄は、尾に油性フェルトペンで群および個体番号を記して個体を識別した。各飼育ケージには、個体識別番号等の必要事項を記入した、群ごとに色の異なるカードを掛けて個体識別の補助とした。出生児は、個体を識別しなかった。

4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

本試験と同系統のラット各群雌雄 5 匹に、TSA の 0 (0.5 %CMC-Na、5 mL/kg)、125、250 および 500 mg/kg を 8 週齢から14日間連日経口投与した予備試験 (試験計画番号: R-97-010、以下、予備試験と略記) において、体重増加および摂餌量抑制、尿検査における潜血陽性反応、肝臓および腎臓重量の増加といった明瞭な影響が雌雄動物に認められた 500 mg/kg を高用量に設定し、これを公比 5 で減じて、中用量には予備試験において自発運動の減少をはじめとする鎮静化傾向が軽度認められた 125 mg/kg の近傍の 100 mg/kg を設定し、低用量には 20 mg/kg を設定した。

以下に群構成を示す。

群番号	被験物質	投与量 (mg/kg)	匹数 (動物番号)	
			雄	雌
1	媒体対照 (0.5%CMC-Na)	0	13 (MX01001-013)	13 (FB01001-013)
2	TSA	20	13 (MX02001-013)	13 (FB02001-013)
3	TSA	100	13 (MX03001-013)	13 (FB03001-013)
4	TSA	500	13 (MX04001-013)	13 (FB04001-013)

各用量の投与検体は、雄に対しては交配前14日間と交配期間14日間および交配期間終了

後14日間の連続42日間、また、雌に対しては交配前14日間と最長14日間の交配期間中（交尾まで）ならびに交尾雌では妊娠期間を通して分娩後の哺育3日（分娩日＝哺育0日）まで毎日1回、調製検体をマグネティックスターラーで絶えず攪拌しながらラット用胃管を用いて経口投与した（投与開始日、雌雄とも1998年1月21日）。交尾後、分娩の認められなかった動物は、妊娠24日相当日まで同様に投与した。毎日の投与は、原則として一定時刻の間（通常9時～12時）に行い、各動物の投与液量（5 mL/kg）は、雄ならびに交配前および交配期間中の雌については週1回の測定体重を基に、また、交尾後の雌については妊娠0日（交尾確認日）の体重を基にそれぞれ算出した。

5. 観察方法

1) 親動物

A. 一般状態の観察

雌雄とも、全例について飼育期間中毎日1回以上観察した。死亡例については発見後直ちに剖検した。また、翌日まで生存の可能性が乏しいと判断された瀕死動物は、試験責任者の判断により、後述の定期解剖動物と同様な方法で剖検した。

B. 体重測定

雌雄とも、全例について体重を試験期間中週1回〔雄：投与1、8、15、22、29、36、42日、雌：投与1、8、15日〕および剖検日に測定した。雄動物と同居中の雌は、投与22日にも体重を測定した。また、交尾した雌では、妊娠0、7、14、20日に、さらに、分娩した雌では、哺育0および4日の体重を測定した。

C. 摂餌量測定

雌雄とも、全例について体重測定日と同日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を算出した。2週間の交配期間中は摂餌量を測定しなかった。交尾した雌では、妊娠0～7、7～14、14～20日の、さらに、分娩した雌では、哺育0～4日の摂餌量を測定した。

D. 尿検査

雄の全例について、投与42日に動物を代謝ケージに収容して、給水、絶食下で約4時間尿を採取して、次頁の項目について検査を行った。

項	目	測 定 法	使 用 機 器
pH・潜血・蛋白質		試験紙法	クリニテック 200+ (バイエル三共)
糖・ウロビリノーゲン		"	"
ケトン体・ビリルビン		"	"

E. 交配

交配は、投与15日の夕方から最長14日間、同群内の雌雄を1対1で同居させて行った。交尾成立の確認は、毎朝、膣栓および膣垢標本中の精子の存在を調べることにより行い、交尾が確認された雌は、その日を妊娠0日と起算して雄から分離し、個別に飼育した。交配結果から、各群について交尾率〔(交尾動物数/交配動物数)×100〕、受胎率〔(妊娠動物数/交尾動物数)×100〕、同居開始日から交尾確認日までの日数およびその間に回帰した発情期の回数を求めた。

F. 分娩・哺育状態の観察

各群とも交尾成立雌は、全例を自然分娩させた。分娩状態の観察は分娩を直接観察できたものについてのみ行った。また、直接観察できなかった例においても分娩後の徴候から分娩状態の良否が判定できるものについては、それを記録した。分娩後は哺育状態を観察し、異常の有無を記録した。

G. 分娩日の規定

分娩の確認は、午前9時～11時に限定し、この時間帯に分娩が完了していることを確認した動物について、その日を分娩日と規定した。午前11時を過ぎて分娩を終了した動物については、翌日を分娩日とした。

分娩を確認した全例について妊娠期間(妊娠0日から分娩日までの日数)を算定し、出産率〔(生児出産雌数/妊娠動物数)×100〕を各群について求めた。

H. 剖検

a) 雄動物

全例について最終投与日に絶食を開始し、その翌日(絶食開始18～24時間後)に以下の検査を行った。

1. 血液学検査

ペントバルビタール麻酔下で腹部後大静脈よりクエン酸ナトリウム(プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間測定用)あるいはEDTA-2K(その他の項目測定用)を抗凝固剤として採血し、次頁の項目について検査した。

項	目	測定法	使用機器
赤血球数 (RBC)		自動 (電気抵抗法)	Coulter Counter Model S-PLUS IV (コルター・エレクトロニクス)
白血球数 (WBC)		" (")	"
血色素量 (Hb)		" (吸光度法)	"
平均赤血球容積 (MCV)		" (電気抵抗法)	"
血小板数		" (")	"
ヘマトクリット値 (Ht)		計算 ($RBC \times MCV \times 0.001$)	
平均赤血球血色素量 (MCH)		" ($Hb \times 1000 / RBC$)	
平均赤血球血色素濃度 (MCHC)		" ($Hb \times 100 / Ht$)	
白血球分類		視算 (静脈血塗抹標本, Wright-Giemsa 染色)	光学顕微鏡
プロトロンビン時間 (PT)		光散乱検出法	CA1000 (東亜医用電子)
活性部分プロトロンボプラスチン時間 (APTT)		"	"

ロ. 血液生化学検査

全例について、血液学検査のための採血に引き続き、ヘパリンを抗凝固剤として採血し、血漿を分離して以下の項目について検査を行った。

項	目	測定法	使用機器
総蛋白濃度		ビウレット法	遠心方式生化学自動分析装置 COBAS-FARA (ロシュ)
アルブミン濃度		BCG 法	"
総コレステロール濃度		COD・DAOS 法	"
トリグリセライド濃度		GPO・DAOS 法	"
ブドウ糖濃度		グルコキナーゼG6PDH 法	"
尿素窒素濃度 (BUN)		ウレアーゼG.DH 法	"
クレアチニン濃度		Jaffé 法	"
アルカリフォスファターゼ活性 (ALP)		GSCC 法	"
GOT 活性		IFCC 法	"
GPT 活性		IFCC 法	"
総ビリルビン濃度		Jendrassik/Grof 法	"
カルシウム濃度		OCP 法	"
ナトリウム濃度		イオン電極法	全自動電解質分析装置 BA05 (A&T)
カリウム濃度		イオン電極法	"
塩素濃度		イオン電極法	"
無機リン濃度 (Inorg. phos.)		モリブデン酸直接法	遠心方式生化学自動分析装置 COBAS-FARA (ロシュ)
γ-GTP 活性		γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリン基質法	"
A/G比		計算	

ハ. 病理学検査

全例について剖検し、器官・組織の肉眼的観察を実施した。その際、脳、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および精巣上体の重量を測定し、併せて比体重値 (相対重

量)を算出した。これらの器官のうち、精巣および精巣上体はブアン液に固定して保存し、その他の器官ならびに骨髄および膀胱は、10%ホルマリン液に固定して保存した。固定器官のうち、肝臓、腎臓および膀胱はすべての投与群について、また、その他の器官は対照群および高用量群について常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って病理組織学検査を行った。一部の動物(動物番号:MX01012、MX02013、MX03006、MX04002、MX04011、MX04013)の腎臓については、periodic acid schiff(PAS)染色も行って病理組織学検査を行った。また、これらの器官以外で剖検時に異常の観察された器官も、10%ホルマリン液に固定して保存し、常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って病理組織学検査を実施した。

b)雌動物

分娩しない雌は妊娠25日相当日にペントバルビタール麻酔下で放血・致死させ、剖検した。また、分娩した雌は哺育4日に同様にして剖検した。妊・不妊のいずれの例においても卵巣および子宮を摘出し、子宮については着床数を数え、着床の認められた動物を妊娠例とした。卵巣は実体顕微鏡下で妊娠黄体数を数え、ブアン液に固定して保存した。不妊例の卵巣については、病理組織学検査を行った。また、脳、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、および副腎重量を、屠殺例全例について測定し、骨髄および膀胱とともに10%ホルマリン液に固定して保存した。他器官との癒着により重量測定が困難であると判断された器官については、測定を行わなかった。固定器官のうち、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、膀胱および胸腺はすべての投与群について、また、その他の器官は対照群および高用量群について常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って病理組織学検査を行った。これらの器官以外で剖検時に異常が観察された器官も、10%ホルマリン液に固定して保存し、常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って病理組織学検査を実施した。一部の動物(動物番号:FB01001、FB04002、FB04005、FB04007、FB04009)の腎臓については、Oil red O 染色を行った。なお、死亡例および瀕死屠殺例のうちの各1例(動物番号:FB04002、FB04009)については、病理組織学検査において、誤投与の可能性が疑われたため、異常器官として採取された肺に付随して保存されていた食道についても病理組織学検査を実施した。また、一部の動物の異常器官あるいは保存器官に付随して保存されていた脾臓(動物番号:FB01004、FB03007)および甲状腺(動物番号:FB03008、FB04002、FB04005、FB04009)についても病理組織学検査を実施した。

2) 出生児

A. 産児数の算定

哺育0日に産児数（生存児＋死亡児）を調べ、分娩率〔（産児数／着床痕数）× 100〕および生児出産率〔（出產生児数／着床痕数）× 100〕を求めた。また、産児の外表奇形の有無および性別を調べ、生存児の性比〔（雄の生児数／出產生児数）× 100〕を算出した。

B. 死亡児数の算定

死亡児数を毎日調べ、出生率〔（出產生児数／産児数）× 100〕、新生児の4日の生存率〔（哺育4日の生児数／哺育0日の生児数）× 100〕および哺育4日における性比〔（雄の生児数／生児数）× 100〕を求めた。死亡児は剖検し、異常の有無、外表および内部器官の肉眼的観察を行った。

C. 体重測定

哺育0日および4日に一腹単位で雌雄別に体重（litter 重量）を測定し、（litter 重量／測定児数）を各腹について求めた。

D. 剖検

哺育4日に全例をエーテル吸入により致死させて剖検し、外表および内部器官の肉眼的観察を実施した。

6. 統計解析

交尾率および受胎率については Yates の補正を含む χ^2 検定を行った。病理組織学所見については、グレード分けしたデータについては Mann-Whitney の U 検定^{12, 13)} を用いて検定し、陽性グレードの合計値については Fisher 直接確率の片側検定¹³⁾ を行った。一般状態、剖検所見および尿検査データについては、統計解析を行わなかった。その他のデータは、個体ごとに得られた値あるいは litter ごとの平均値を1標本として、各群の分散が0より大きい場合は、先ず、Bartlett 法¹⁴⁾ により各群の分散の一様性について検定した。その結果、分散が一樣とされた場合には、一元配置型の分散分析¹⁴⁾ を行い、群間に有意性が認められた場合には、各群の標本数が同一であれば Dunnett 法¹⁵⁾ を用い、異なれば Scheffé 法¹⁶⁾ により対照群と TSA 各投与群との間で平均値の差の検定を行った。分散が一樣でなかった場合、および分散が0となる群が存在するときは、Kruskal-Wallis 順位検定¹⁷⁾ を行い、群間に有意性が認められた場合に、対照群

と TSA 各投与群との差について Dunnett 法¹⁵⁾ あるるいは Scheffé 法¹⁶⁾ の検定を行った。有意水準は、5%および1%とした。

【 結 果 】

I. 反復投与毒性（親動物所見）

1. 一般状態

1) 雄 (Tables 1; Appendices 1-1~1-4)

いずれの投与群にも死亡あるいは瀕死動物は認められなかった。

20 mg/kg 投与群には異常は認められなかった。100 mg/kg 以上の投与群では、投与開始後から自発運動減少および腹臥姿勢が認められ、投与期間の中期から流涎が認められるようになったが、いずれも翌朝までには消失した。この他、対照群および 500 mg/kg 投与群に脱毛が認められたが、いずれも剖検までに回復した。

2) 雌 (Tables 2; Appendices 2-1~2-4)

100 mg/kg 以下の投与群には死亡および瀕死屠殺例はなかったが、500 mg/kg 投与群において、投与期間初期に 3 例が死亡し、2 例を瀕死屠殺した。

各動物の死亡あるいは瀕死屠殺までの経過を以下に示す。

途中死亡例 (Appendix 2-4)

動物番号：FB04003（投与 3 日死亡）

初回投与後に自発運動減少および腹臥姿勢が認められたが、翌日の投与前には症状が回復していた。投与 2 日および投与 3 日も同様の経過を辿ったが、投与 3 日の投与後は症状の回復がなく、夕方に死亡が確認された。

動物番号：FB04004（投与 3 日死亡）

初回投与後に自発運動減少が認められたが、翌日には投与前後いずれの時期にも異常は認められなかった。投与 3 日の投与後、自発運動減少および腹臥姿勢が認められ、それらが回復せず、投与 3 日の夕方死亡が確認された。

動物番号：FB04009（投与 3 日死亡）

初回投与後に自発運動減少および腹臥姿勢が認められたが、翌日の投与前には症状が回復していた。投与 2 日の投与後にも自発運動減少および腹臥姿勢が認められ、投与 3 日の投与前には、鎮静、腹臥姿勢および紅涙が認められた。動物の状態を観察しながら投与 3 日の投与を行い、鎮静、腹臥姿勢および紅涙が継続することを確認したが、同日夕方に死亡が確認された。

瀕死屠殺例 (Appendix 2-4)

動物番号：FB04002（投与5日剖検）

初回投与後に自発運動減少および腹臥姿勢が認められたが、翌日には投与前後いずれの時期にも異常は認められなかった。投与3日の投与後、自発運動減少および腹臥姿勢が認められ、さらに夕方には腹臥姿勢とともに鎮静が認められた。投与4日の投与前には自発運動減少が認められ、投与後も自発運動減少および腹臥姿勢が認められた。翌日の投与5日にも腹臥姿勢、呼吸困難および流涙が認められ、体温も低下し、触発反応も認められなかったもので、瀕死状態と判断して剖検した。

動物番号：FB04007（投与3日剖検）

初回投与後に腹臥姿勢が認められたが、翌日の投与前には症状が回復していた。投与2日の投与後に、自発運動減少および腹臥姿勢が認められ、投与3日の投与前には、鎮静、腹臥姿勢および褐色の着色尿が観察され、触発反応も認められなくなった。動物の状態を観察しながら投与を行ったが、鎮静および腹臥姿勢が継続して認められた。同様な症状の認められた動物（動物番号：FB04009）が同日に死亡したので、夕方まで症状の回復が認められなかった本例は瀕死状態にあると判断して剖検した。

生存例では、100 mg/kg 以上の投与群において、死亡および瀕死屠殺例に観察されたのと同様な投与後の自発運動減少および腹臥姿勢が認められた。100 mg/kg 投与群では腹臥姿勢は、散発的にしか認められず、いずれも翌日までに回復した。しかし、500 mg/kg 投与群では、死亡あるいは瀕死状態の動物が認められた時期に、よろめき歩行あるいは四肢の伸展を示す例、あるいは、鎮静、体温低下、紅涙、褐色尿など死亡あるいは瀕死状態の動物と同様な症状を示す例があった。また、Table および Appendix には示さなかったが、4例（動物番号：FB04005、FB04006、FB04008、FB04010）は、それぞれ、投与3および4日、投与7日、投与3および4日、投与4日に、前日の投与後に認められた自発運動減少および腹臥姿勢が回復しないまま継続して認められた。流涎は、上記のような重篤な症状が500 mg/kg 投与群に認められなくなった時期から、主に投与後一過性に現れ、100 mg/kg 投与群にも認められるようになった。この他、脱毛が対照群および100 mg/kg 投与群に認められたが、100 mg/kg 投与群の脱毛は剖検までに回復した。20 mg/kg 投与群に一般状態の異常は観察されなかった。

2. 体重

1) 雄 (Figure 1; Tables 3, 4; Appendices 3-1~4-4)

体重増加抑制が 100 mg/kg 以上の投与群の投与初期に認められ、投与 1～8 日の増加量が対照群と比較して有意 ($p<0.01$) な低値を示した。そのため、100 mg/kg 投与群では、投与 8～22 日の間の各測定日における体重ならびに投与 36 日までの各測定日までの累積増加量が、また、500 mg/kg 投与群では、投与 8～42 日の間の各測定日における体重ならびに投与 42 日までの各測定日までの累積体重増加量が、それぞれ対照群と比較して有意 ($p<0.01$, $p<0.05$) な低値を示した。20 mg/kg 投与群については、対照群との間に有意差は認められなかった。

2) 雌 (Figure 2)

(1) 交配前 (Tables 5, 6; Appendices 5-1~6-4)

500 mg/kg 投与群において、投与初期に体重増加が抑制され、投与 1～8 日の増加量が対照群と比較して有意 ($p<0.05$) な低値を示した。そのため、投与 8 日の体重、ならびに投与 15 日までの累積増加量が、それぞれ対照群と比較して有意 ($p<0.05$) な低値を示した。100 mg/kg 以下の投与群の体重については、対照群との間に有意差は認められなかった。

(2) 妊娠期 (Tables 7, 8; Appendices 7-1~8-4)

100 mg/kg 投与群の体重増加が抑制を受け、妊娠 7 日の体重および妊娠 0～7 日の体重増加量が対照群と比較して有意 ($p<0.05$) な低値を示した。また、500 mg/kg 投与群の妊娠 7 日の体重も対照群と比較して有意 ($p<0.05$) な低値を示した。20 mg/kg 投与群については、対照群との間に有意差は認められなかった。

(3) 哺育期 (Tables 9, 10; Appendices 9-1~10-4)

100 mg/kg 以上の投与群の哺育 4 日の体重が、対照群と比較して有意 ($p<0.01$, $p<0.05$) な低値を示した。500 mg/kg 投与群の哺育 0～4 日の増加量は低値の傾向を示したが、対照群と比較していずれの TSA 投与群も有意差は認められなかった。20 mg/kg 投与群の体重は対照群と同様に推移した。

3. 摂餌量

1) 雄 (Figure 3; Table 11; Appendices 11-1~11-4)

100 mg/kg 以上の投与群の投与初期に抑制が認められ、100 mg/kg 投与群では、投与 1

～8 および 8～15日の摂餌量が、また、500 mg/kg 投与群では、投与1～8日の摂餌量が、それぞれ対照群と比較して有意 ($p<0.01$ 、 $p<0.05$) な低値を示した。20 mg/kg 投与群については、対照群との間に有意差は認められなかった。

2) 雌 (Figure 4)

(1) 交配前 (Tables 12; Appendices 12-1～12-4)

500 mg/kg 投与群の投与期間初期に抑制が認められ、投与1～8日の摂餌量が対照群と比較して有意 ($p<0.01$) な低値を示した。100 mg/kg 以下の投与群については、対照群との間に有意差は認められなかった。

(2) 妊娠期 (Tables 13; Appendices 13-1～13-4)

500 mg/kg 投与群の妊娠初期に抑制が認められ、妊娠0～7日の摂餌量が対照群と比較して有意 ($p<0.05$) な低値を示した。100 mg/kg 以下の投与群については、対照群との間に有意差は認められなかった。

(3) 哺育期 (Tables 14; Appendices 14-1～14-4)

500 mg/kg 投与群の摂餌量は低値の傾向を示したが、対照群との間に有意差は認められなかった。100 mg/kg 以下の投与群についても、対照群との間に有意差は認められなかった。

4. 尿検査所見 (Tables 15; Appendices 15-1～15-4)

20 および 100 mg/kg 投与群に潜血反応が陽性であった動物が、それぞれ2および1例認められたが、対照群および 500 mg/kg 投与群の動物の潜血反応はいずれも陰性であった。その他の検査項目については、異常値を示す動物はいずれの投与群にも認められなかった。

5. 解剖時検査所見

1) 雄

(1) 血液学検査所見 (Table 16; Appendices 16-1～16-4)

対照群と比較して、すべての TSA 投与群において平均赤血球血色素量が、また、100 mg/kg 以上の投与群の平均赤血球血色素濃度が、それぞれ対照群と比較して有意 ($p<0.05$ 、 $p<0.01$) な高値を示した。また、500 mg/kg 投与群の血小板数が対照群と比較

して有意 ($p < 0.05$) な高値を示した。血液凝固時間については、100 mg/kg 以上の投与群のプロトロンビン時間が対照群と比較して有意 ($p < 0.05$) に短縮したが、活性部分トロンボプラスチン時間については、対照群と TSA 各投与群との間で有意差は認められなかった。その他の検査項目および白血球百分比については、対照群と TSA 各投与群との間で有意差は認められなかった。

(2) 血液生化学検査所見 (Table 17; Appendices 17-1~17-4)

対照群と比較して、すべての TSA 投与群のアルカリフォスファターゼ活性が有意 ($p < 0.01$) な低値を示し、100 mg/kg 以上の投与群の総コレステロール濃度が対照群と比較して有意 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) な高値を示した。また、500 mg/kg 投与群では、対照群と比較して、総蛋白濃度および γ -GTP 活性が僅少差ではあるが有意 ($p < 0.05$) な高値を示し、ブドウ糖濃度、トリグリセライド濃度および A/G 比が有意 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) な低値を示した。その他の測定項目については、対照群と TSA 各投与群との間で有意差は認められなかった。

(3) 剖検所見 (Table 18; Appendix 18)

肝臓では、20 mg/kg 投与群に異常は認められなかったが、100 mg/kg 以上の投与群に暗色化が認められ、500 mg/kg 投与群では腫大が認められた。また、黄色化が対照群および 100 mg/kg 投与群に、小葉構造の明瞭化が 100 mg/kg 投与群に、外側左葉および尾状葉の小型化が対照群にそれぞれ認められた。

腎臓では、腫大、暗色化および左側皮質の淡色域が 100 mg/kg 以上の投与群に認められた。また、淡色化および右側皮質の嚢胞が 100 mg/kg 投与群に、皮質の陥凹部が 20 mg/kg 投与群を除く各投与群に、腎盂の拡張が対照群および 100 mg/kg 投与群に、乳頭部の赤色化が 20 mg/kg 投与群にそれぞれ観察された。

脾臓では、リンパ濾胞不明瞭が 500 mg/kg 投与群で観察された。

胸腺では、すべての TSA 投与群に小型化が認められた。

肺では、暗色点および白色点が対照群および 500 mg/kg 投与群に認められた。

精巣では、小型化が対照群に認められた。

この他、500 mg/kg 投与群の左側眼球内部に暗赤色化が認められた。

(4) 器官重量 (Table 19; Appendices 19-1~19-4)

500 mg/kg 投与群において剖検時の体重が対照群と比較して有意 ($p < 0.01$) に低い値を示した。肝臓重量は 500 mg/kg 投与群において、その比体重値は 100 mg/kg 以上の投与

群において、それぞれ対照群と比較して有意 ($p<0.05$ 、 $p<0.01$) な増加が認められた。腎臓についても同様に、重量は 500 mg/kg 投与群において、その比体重値は 100 mg/kg 以上の投与群において、それぞれ対照群と比較して有意 ($p<0.05$ 、 $p<0.01$) な増加が認められた。この他、心臓、副腎および精巣の比体重値が 100 mg/kg 以上の投与群において、それぞれ対照群と比較して有意 ($p<0.05$ 、 $p<0.01$) に増加した。また、100 mg/kg 投与群の精巣上体比体重値が対照群と比較して有意 ($p<0.05$) に増加した。20 mg/kg 投与群の器官重量および比体重値には対照群との間で有意差は認められなかった。

(5) 病理組織学所見 (Table 20; Appendix 20)

肝臓、腎臓、脾臓、膀胱、精巣および精巣上体ならびに、剖検時に異常の観察された肺および眼球に以下の所見が観察された。脳、胸腺、心臓、副腎および大腿骨骨髓には、異常は認められなかった。

(肝臓)

100 mg/kg 以上の投与群において、小葉中心性の肝細胞肥大が認められ、これらの細胞質は、軽微ではあるが、曇り硝子様を呈していた (Photo 2~4)。この変化の頻度および程度は用量に依存して増強した。門脈周囲性の肝細胞の脂肪化および小肉芽腫は、対照群を含む各投与群に認められたが、100 mg/kg 投与群における小肉芽腫の頻度のみが、対照群と比較して有意 ($p<0.05$) な低値であった。これらの所見の程度については、対照群と TSA 各投与群との間に、差は認められなかった。この他、被膜下に限局性の壊死巣が対照群および 500 mg/kg 投与群に、被膜および被膜下の限局性線維化ならびに壊死および鉍質沈着が対照群に観察されたが、これらの所見の程度および頻度には対照群と TSA 各投与群との間で差は認められなかった。

(腎臓)

対照群を含む各投与群で eosinophilic body が認められたが (Photo 5、6)、対照群と比較すると、TSA 各投与群で頻度および程度が有意 ($p<0.01$) に増加した。Eosinophilic body の認められた 7 例 (動物番号: MX01012、MX02013、MX03006、MX03012、MX04002、MX04011、MX04013) の腎臓について PAS 染色を実施したが、いずれの腎臓にも陽性反応は認められなかった。皮質の好塩基性尿細管も対照群を含む各投与群に認められたが、対照群と TSA 各投与群との間に、程度および頻度の差は認められなかった。この他、腎盂の拡張、間質にリンパ球の浸潤、あるいは限局性線維化が、それぞれ、対照群および 100 mg/kg 投与群に認められ、皮質あるいは乳頭部の鉍質沈着が、20 mg/kg 投与群を

除く各投与群に、尿細管の嚢胞が 20 mg/kg および 500 mg/kg 両投与群に認められた。これらの所見の程度および頻度についても、対照群と TSA 各投与群との間で差は認められなかった。

(膀胱)

各投与群の 2 例の粘膜固有層にリンパ球や好中球の浸潤がみられ、そのうち 500 および 100 mg/kg 投与群の例には、粘膜上皮のびまん性あるいは限局性の過形成も認められたが (Photo 7)、対照群と TSA 各投与群との間に、程度および頻度の明らかな差は認められなかった。

(脾臓)

検査を実施した対照群および 500 mg/kg 投与群の全例に髄外造血および褐色色素の沈着が観察されたが、これらの所見の程度に両投与群間で差は認められなかった。

(精巣および精巣上体)

検査を実施した対照群および 500 mg/kg 投与群に生殖細胞の減少を伴う精細管の萎縮が認められ、そのうちの対照群の 1 例にはライディッヒ細胞のびまん性の過形成が認められた。また、精巣上体では、対照群の間質にリンパ球の浸潤が認められた他、両投与群に精巣上体管腔内の精子の減少あるいは細胞残屑が観察された。これらの所見の頻度および程度については、対照群と 500 mg/kg 投与群との間で差は認められなかった。

(剖検時異常器官)

暗色点が観察された対照群の肺には限局性の出血が、暗色点および白色点の観察された対照群の肺には泡沫細胞の集簇が、暗色点および白色点の観察された 500 mg/kg 投与群の肺には、限局性の出血および泡沫細胞の集簇が観察された。

内部に暗赤色調域の観察された 500 mg/kg 投与群の眼球の硝子体には出血が認められた。

2) 雌

(1) 剖検所見 (Tables 21、21-S/D、21-L; Appendix 21)

途中死亡例 (Table 21-S/D; Appendix 21)

動物番号: FB04003 (投与 3 日死亡)

胸水が貯留し、肺の赤色化および退縮不全が認められた。また、腎臓の皮髄境界部に白色化が認められ、左側眼球の白濁が認められた。

動物番号：FB04004（投与3日死亡）

胸水が貯留し、肺には水腫および暗赤色の領域が観察された。また、肝臓の腫大が観察され、腺胃粘膜には淡色化が認められた。

動物番号：FB04009（投与3日死亡）

胸水が貯留し、肺の赤色化および横隔膜との癒着が認められた。横隔膜には白色物が付着し、腺胃粘膜には黄色域が認められた。また、脾臓の小型化および淡色化が認められた。病理組織学検査実施後に、異常器官として採取された肺に付随して保存されていた食道を再度観察したところ、微小な穿孔が観察された。

瀕死屠殺例（Appendix 21）

動物番号：FB04002（投与5日剖検）

胸水が貯留し、肺は水腫および赤色化を呈し、肋骨胸膜および横隔膜と癒着していた。また、腎臓の皮髄境界部には赤色化が認められ、胸腺は白濁していた。病理組織学検査実施後に、異常器官として採取された肺に付随して保存されていた食道を再度観察したところ、穿孔および周囲の外膜下に赤色域が観察された。

動物番号：FB04007（投与3日剖検）

胸水が貯留し、肺には水腫および暗赤色の領域が観察された。また、肝臓の淡色化、腎臓の淡色化、脾臓の小型化および淡色化が認められ、腺胃粘膜には黄色域が認められた。

定期解剖例（哺育4日および妊娠25日相当日剖検、Appendix 21）

肝臓では、20 mg/kg 投与群に異常は認められなかったが、100 mg/kg 以上の投与群に腫大が認められ、500 mg/kg 投与群では暗色化が認められた。また、黄色化が対照群に認められた。この他、対照群において同一個体の尾状葉の一側に赤色化を伴う腫大が、その対側に淡色化を伴う小型化が認められ、この例では、胃との癒着も認められた。

腎臓では、対照群および 20 mg/kg 投与群に異常は認められなかったが、100 mg/kg 投与群に淡色化が認められた。

脾臓では、対照群の肝臓の尾状葉に異常が認められた例に脂肪組織との癒着および白色物の付着が観察された。

胸腺では、100 mg/kg 以上の投与群に小型化が観察された。対照群および 20 mg/kg 投与群に異常は認められなかった。

副腎では、20 mg/kg 投与群に異常は認められなかったが、500 mg/kg 投与群に腫大が、また、20 mg/kg 投与群を除く各投与群に淡色化が観察された。

心臓では、500 mg/kg 投与群に、心外膜と心嚢の癒着、心嚢と肺、胸腺、あるいは肋骨胸膜との癒着、心嚢の白濁、ならびに心嚢の肥厚が観察された (Photo 1)。その他の投与群の心臓に異常は観察されなかった。

肺では、対照群および 20 mg/kg 投与群に異常は認められなかったが、100 mg/kg 以上の投与群に肋骨胸膜との癒着および淡色の点あるいは領域が認められ、500 mg/kg 投与群には横隔膜との癒着および暗赤色の点あるいは領域が認められた。また、肋骨胸膜との癒着が認められた 100 mg/kg 投与群の癒着部に、黄白色塊の付着が観察された。

下垂体では、100 mg/kg 以上の投与群に腫大が観察された。

以上の所見の他に、対照群には、脱毛が認められ、また、肝臓の尾状葉に異常が認められた例の横隔膜には脂肪組織との癒着が観察された。20 mg/kg 投与群では、分娩予定日を過ぎても出産しなかったために剖検した例の右側子宮角に胎盤遺残が認められた。また、100 mg/kg 投与群の前胃粘膜には白色点が認められた。

(2) 器官重量

a) 哺育4日剖検例 (Table 22; Appendices 22-1~22-4)

100 mg/kg 以上の投与群の剖検時の体重は対照群と比較して有意 ($p<0.05$ 、 $p<0.01$) に低い値を示した。各測定器官の重量には対照群と TSA 各投与群との間で有意差は認められなかったが、比体重値については、100 mg/kg 以上の投与群の肝臓 ($p<0.01$)、ならびに 500 mg/kg 投与群の脳 ($p<0.05$)、腎臓 ($p<0.05$)、および副腎 ($p<0.01$) が対照群と比較して有意に高い値を示した。

b) 瀕死屠殺例および妊娠25日相当日剖検例 (Appendices 22-1~22-4)

500 mg/kg 投与群において瀕死屠殺した動物は、同群の哺育4日剖検例と比較して、剖検時体重、肝臓および脾臓の重量とそれらの比体重値が低値の傾向を示し、脳比体重値および胸腺重量とその比体重値が高値の傾向を示した。

分娩が認められなかったため、妊娠25日相当日に剖検した動物の剖検時体重および器官の重量とそれらの比体重値については、特に異常な値は認められなかった。

(3) 病理組織学所見 (Tables 23、23-L、23-S/D; Appendix 23)

肝臓、腎臓、脾臓、心臓、胸腺、および膀胱に以下の所見が観察されたが、脳、副腎、大腿骨骨髓、および不妊動物の卵巣に異常は観察されなかった。剖検時に異常が認められた器官についても観察したが、それらのうちの眼球および固定時に紛失した1例 (動物番号: FB03003) 以外の下垂体に異常は観察されなかった。また、病理組織観察後、異

常器官として採取された肺に付随して保存されていた食道を再度肉眼的に観察したところ、穿孔が認められたため、穿孔部周辺の組織（動物番号：FB04002 は、気管、食道、肺および心臓、動物番号：FB04009 は、気管、食道、肺および横隔膜）についてさらに検査を追加するとともに、これらの動物の他に、一部の動物（動物番号：FB03008、FB04007）の標本について再度検査して、食道、心臓、胸腺および肺に新たな所見が追加された。しかし、追加観察した一部の動物の脾臓（動物番号：FB01004、FB03007）および甲状腺（動物番号：FB03008、FB04002、FB04005、FB04009）には異常は観察されなかった。

（肝臓）

100 mg/kg 以上の投与群において、細胞質が軽微な曇り硝子様を呈する小葉中心性の肝細胞肥大が頻度および程度ともに用量に依存して増強した(Photos 8、9)。この所見は、500 mg/kg 投与群では、定期解剖例の全例に認められたもので、途中剖検例（死亡例および瀕死屠殺例）には認められなかった。門脈周囲性の肝細胞の脂肪化は、対照群を含む各投与群に認められ、頻度および程度には、対照群と TSA 各投与群との間に差は認められなかった。この所見は、500 mg/kg 投与群では、途中剖検した全例に認められたが、定期解剖例では1例のみに認められた。小肉芽腫が対照群および 100 mg/kg 投与群に認められ、剖検時に尾状葉に異常が認められた対照群の例には、尾状葉の壊死、出血および線維化、髄外造血、ならびに被膜の線維化および細胞浸潤が認められた。これらの所見の頻度および程度についても、対照群と TSA 各投与群との間に有意差は認められなかった。

（腎臓）

500 mg/kg 投与群において4例（動物番号：FB04002、FB04005、FB04007、FB04009）の近位尿細管に脂肪の沈着によると思われる空胞が観察された。対照群の1例（動物番号：FB01001）を対照として、これらの動物について、Oil red O 染色を行った結果、近位尿細管の脂肪変性であることが確認され、また、その頻度は対照群と比較して有意 ($p < 0.05$) な高値を示した。この変化は、主に、途中解剖例に認められたもので、定期解剖例における頻度および程度を対照群と比較すると、有意差は認められなかった (Table 23-L)。空胞変性が、500 mg/kg 投与群の定期解剖例の1例に認められたが、途中剖検例には観察されなかった。空胞変性の頻度および程度については、対照群との間に有意差は認められなかった。この他、500 mg/kg 投与群の定期解剖例に、乳頭部の管腔の好中球浸潤、腎盂粘膜の固有層の好中球およびリンパ球の浸潤が観察されたが、これらの所見の頻度および程度については対照群との間に有意差は認められなかった。皮質

の好塩基性尿細管は、対照群を含む各投与群に認められたが、頻度および程度には対照群と TSA 各投与群との間で差は認められなかった。また、対照群には限局性の線維化が、20 mg/kg 投与群には間質のリンパ球浸潤、および皮質あるいは乳頭部の鉍質沈着がそれぞれ認められ、対照群および 500 mg/kg 投与群には皮髄境界部の尿細管の嚢胞が認められたが、これらの所見の頻度および程度に対照群と TSA 各投与群との間で有意差は認められなかった。

(脾臓)

500 mg/kg 投与群において、白脾髄および赤脾髄の萎縮が認められ、それらの頻度は対照群と比較して有意 ($p < 0.05$) な高値であった。白脾髄の萎縮は、主に、途中剖検例に認められたものであり、赤脾髄の萎縮は定期解剖例には認められず、途中剖検例すべてに認められた変化である (Table 23-S/D)。従って、定期解剖例における頻度を対照群と比較すると、有意差は認められなくなった (Table 23-L)。髄外造血および褐色色素の沈着は対照群を含む各投与群の全例に観察された。また、被膜の肉芽組織が対照群および 20 mg/kg 投与群に、被膜の線維化が対照群に観察されたが、これらの所見の頻度および程度に対照群と TSA 各投与群との間で有意差は認められなかった。

(心臓)

500 mg/kg 投与群の定期解剖例に、心外膜の線維化および細胞浸潤が認められた。心外膜の細胞浸潤は、追加観察を行った途中剖検例にも認められ、これらの所見の頻度は、定期解剖例のみを対象としても (Table 23-L)、500 mg/kg 投与群の全例を対象としても (Table 23)、対照群と比較して有意 ($p < 0.05$) な高値であった。また、500 mg/kg 投与群の途中剖検例には心外膜下の細胞浸潤が、また、途中剖検例および定期解剖例には心外膜の色素沈着が観察された。これらの所見の頻度および程度については、対照群との間に有意差は認められなかった。

(胸腺)

500 mg/kg 投与群の途中剖検例および定期解剖例に萎縮が観察され、その頻度は、定期解剖例のみを対象としても、500 mg/kg 投与群の全例を対象としても、対照群と比較して有意 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) な高値であった。また、100 mg/kg 以上の投与群において、被膜の線維化、水腫、および細胞浸潤、ならびに被膜上の好中球を含む滲出物が認められた。500 mg/kg 投与群におけるこれらの所見の頻度を対照群と比較すると、全例を対象にすると被膜の水腫および細胞浸潤が有意 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) な高値を示し (Table 23)、定

期解剖例を対象とすると、被膜の線維化および細胞浸潤が有意 ($p < 0.05$) な高値を示した (Table 23-L)。100 mg/kg 投与群については、対照群との間に有意差は認められなかった。この他、100 mg/kg 投与群には、被膜上の異物肉芽腫が観察されたが、その頻度については、対照群との間に有意差は認められなかった。

(膀胱)

500 mg/kg 投与群の1例の粘膜固有層に、リンパ球および好中球の浸潤と鉍質沈着を伴う水腫が認められた (Photo 10) ほか、他の TSA 投与群の粘膜固有層にも、リンパ球の浸潤あるいは水腫が各1例観察されたが、各群間の頻度に差は認められなかった。

(剖検時異常器官)

500 mg/kg 投与群の肺には、途中剖検例および定期解剖例ともに限局性の出血、好中球およびリンパ球の細胞浸潤が認められ、途中剖検例には水腫およびマクロファージの浸潤ならびに胸膜上に好中球を含む滲出物が認められた。この滲出物に異物の混入している例も認められた。また、100 mg/kg 投与群ならびに 500 mg/kg 投与群の定期解剖例には泡沫細胞の集簇および胸膜の線維化が観察され、100 mg/kg 投与群ならびに 500 mg/kg 投与群の途中剖検例には、胸膜の細胞浸潤が観察された。この他、100 mg/kg 投与群では胸膜上に異物肉芽腫が観察された。

追加観察を行った途中剖検例2例の食道については、1例に、穿孔、粘膜および筋層の変性、好中球の浸潤ならびに食道外膜下および胸腔の出血が観察された。他の1例には肉眼観察で微細な穿孔の認められた部位の組織所見に異常は認められなかったが、胸膜上には、好中球を含む滲出物が認められ、異物も観察された。また、横隔膜の胸膜面に細胞浸潤が観察され、好中球を含む滲出物も認められた。脂肪組織との癒着が観察された対照群の横隔膜については、腹膜に肉芽組織、線維化および出血が認められた。

以上の所見の他に、脱毛が認められた対照群の皮膚には毛包の減少が、また、子宮角に胎盤遺残が認められた 20 mg/kg 投与群の子宮内膜には胎盤の遺残体が認められた。

II. 生殖発生毒性

1. 生殖関連所見

1) 交配成績 (Table 24; Appendices 24-1~24-4)

500 mg/kg 投与群では、死亡あるいは瀕死屠殺により交配前に雌動物が減少したため、一部の雄動物を無処置の雌動物と交配させたが、交尾率および同居開始から交尾成立までに要した日数、その間に回帰した発情期の回数、ならびに受胎率には、同群内で交配させたものと無処置動物と交配させたものも同等であった。また、これらの指標に対照群と TSA 各投与群との間で有意差は認められなかった。

2) 分娩および哺育状態

分娩および哺育状態の異常はいずれの投与群の動物にも認められなかった。

3) 出産率および妊娠期間 (Table 25; Appendices 25-1~25-4)

出産率および妊娠期間に対照群と TSA 各投与群の間に有意差は認められなかった。

4) 妊娠黄体数、着床数および着床率 (Table 25; Appendices 25-1~25-4)

妊娠黄体数、着床数および着床率に対照群と TSA 各投与群の間に有意差は認められなかった。

2. 出生児所見

1) 生存性 (Table 25; Appendices 25-1~25-4)

産児数、出生率および新生児の4日の生存率には TSA 各投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。また、性比についても対照群と TSA 各投与群との間に有意差は認められなかった。500 mg/kg 投与群において分娩率、哺育0日の生存児数、および生児出産率がやや低値の傾向を示したが、対照群との間に有意差はなかった。100 mg/kg 以下の投与群については、対照群と同様であった。

2) 体重 (Table 26; Appendices 26-1~26-4)

500 mg/kg 投与群の雌雄出生児の体重は、哺育0日および4日のいずれも対照群と比較して有意 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) な低値を示したが、100 mg/kg 以下の投与群については雌雄

ともに対照群との間に有意差は認められなかった。

3) 形態 (Tables 27、28)

哺育 0 日に実施した産児の外表観察では、いずれの動物にも異常は観察されなかった (表には示さず)。

哺育 4 日における出生児の剖検においても、いずれの投与群の出生児にも異常は認められなかった。

死亡児の剖検でも、異常はいずれの投与群にも認められなかった。

【 考 察 】

TSA の 0、20、100 あるいは 500 mg/kg を、雄には42日間、雌には交配前2週間から、交配期間、妊娠期間および哺育3日まで反復経口投与して、TSA の雌雄動物に対する反復投与毒性および生殖発生毒性を検討した。

1. 反復投与毒性

雄では、100 mg/kg 以上の投与群において、体重増加および摂餌量が投与初期に一過性に抑制された。一般状態については、自発運動量減少および腹臥姿勢が投与開始後から、また、流涎が投与中期から認められたが、いずれも翌日までに回復していた。予備試験では、投与3日に実施した尿検査においてアルカリ尿あるいは潜血反応などが認められた。本試験では投与42日に尿検査を実施したが、潜血反応は、20 および 100 mg/kg 投与群の少数例に認められたのみであった。潜血反応の頻度に TSA の用量に依存した変化は認められなかったこと、および TSA による膀胱結石の原因とされている尿のアルカリ化と無関係にこれらの反応が認められていることから、TSA 投与に起因しない偶発的变化であると判断された。その他の項目には、いずれの投与群も異常値は認められなかった。

42日間投与後の雄動物の血液学検査では、平均赤血球血色素量が TSA 各投与群において、また、平均赤血球血色素濃度が 100 mg/kg 以上の投与群においてそれぞれ増加した。しかし、これらの数値の算出の基礎となった、血色素量および赤血球数あるいはヘマトリット値には TSA の用量に依存した変化は認められなかったことから、これらの数値の変動は、偶発的变化である可能性が高い。この他、500 mg/kg 投与群では血小板数が増加した。増加の程度は僅かであるが、TSA の用量に依存して変化していることから、TSA 投与による影響であると推測される。血液凝固時間については、プロトロンビン時間が 100 mg/kg 以上の投与群で短縮したが、これは、対照群にプロトロンビン時間の比較的長い動物が含まれていたためで、100 mg/kg 以上の投与群の値は、正常値と判断される値であった。活性部分トロンボプラスチン時間については、対照群と TSA 各投与群との間で差は認められなかったことから、TSA 投与は血液凝固時間に影響を及ぼさないものと考えられる。

雄動物の血液生化学検査では、すべての TSA 投与群においてアルカリフォスファターゼ活性が低下し、100 mg/kg 以上の投与群において総コレステロール濃度が増加した。

スルホンアミド類は甲状腺ホルモンの合成を抑制するが⁹⁾、アルカリフォスファターゼ活性の低下および血中コレステロール濃度の上昇は、甲状腺機能低下の際にも認められる変化である¹⁸⁾。また、500 mg/kg 投与群ではブドウ糖濃度およびトリグリセライド濃度が低下したが、スルホンアミド類には、インスリン分泌を促進してブドウ糖濃度を低下させる作用も認められていること⁷⁾から、これらの変化もスルホンアミド類にみられる変化と関連した変化であることが疑われた。しかし、スルホンアミド類であるMBSAについて実施された反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験¹¹⁾では、アルカリフォスファターゼ活性、血中コレステロール濃度およびブドウ糖濃度にMBSAの影響は認められなかった。また、100 mg/kg 以上の投与群の一部の雌動物の甲状腺、ならびに対照群および 100 mg/kg 投与群の各 1 例の脾臓の病理について実施した組織学検査では、TSA 投与の影響を示唆する病変は認められなかった。従って、TSA がスルホンアミドとして甲状腺および脾臓に影響を及ぼす可能性は否定できないが、それは明瞭な形態変化を起こさない軽微な影響であると判断された。この他、グロブリン類の増加によると考えられる総蛋白濃度の増加および γ -GTP 活性の上昇が 500 mg/kg において認められたが、軽微な変化であった。器官重量については、500 mg/kg 投与群において、肝臓重量および腎臓重量が増加し、これらの比体重値が 100 mg/kg 以上の投与群で増加した。病理組織学検査では、これらの投与群に曇り硝子様の肝細胞の小葉中心性肥大が認められていることから、肝臓重量の増加は、肝細胞肥大を反映したものと考えられる。腎臓については、尿細管上皮における eosinophilic body 形成の増強がすべての TSA 投与群において認められた。しかし、腎臓重量比体重値の増加は、eosinophilic body が形成されない 500 mg/kg 投与群の雌においても認められた。この他、100 mg/kg 以上の投与群において副腎重量比体重値が増加した。重量もやや高値を示していること、ならびに 500 mg/kg 投与群の雌においても同様の変化が認められていることから、TSA 投与による影響であると考えられるが、病理組織学検査では、雌雄ともに副腎に異常は観察されなかった。100 mg/kg 以上の投与群において心臓、精巣および精巣上体の各比体重値が増加したが、TSA の用量に依存した変化は認められなかった。以上のように、本試験では、すべての用量の TSA がアルカリフォスファターゼ活性を低下させ、腎臓の尿細管上皮における eosinophilic body の形成を増強させたことから、雄動物に対する TSA の無影響量は求められなかった。

雌についても、100 mg/kg 以上の投与群において、自発運動量減少および腹臥姿勢といった一般状態の異常が投与開始後から認められた。さらに、500 mg/kg 投与群において投

与2日後からこれらの症状が投与翌日に至っても消失しない、あるいはさらに進行して、鎮静、呼吸困難、体温低下、触発反応の消失などの経過を辿り、投与3日後から5日の間に死亡または瀕死状態に至る例が認められた。

死亡あるいは瀕死動物の剖検では、いずれの動物にも胸水の貯留が観察され、病理組織学検査では、肺水腫および胸膜を含む胸腔内諸器官漿膜の細胞浸潤を伴う滲出と水腫、心外膜の色素沈着、肺の水腫、限局性出血ならびに炎症細胞の浸潤などが認められた。さらに、異常器官として保存された肺とともに残存していた2例の食道について検索したところ、出血および炎症細胞の浸潤を伴う穿孔あるいは胸腔内の滲出物中の食餌様物質の混入が認められた。これらのことから、いずれの動物も胸腔内諸組織の炎症により死亡あるいは瀕死状態に至ったものと判断された。一方、単回投与試験では、死亡動物の肉眼解剖所見から、死因は強い中枢抑制であると推測されている。本試験においても、自発運動減少、腹臥姿勢、鎮静など、単回投与試験においてみられたのと類似した変化が、死亡あるいは瀕死動物で特に著しく認められたが、脳の病理組織学検査において明瞭な異常は観察されず、上記の死亡原因に中枢への影響がさらに加わったのかどうかは不明である。

生存例の中にも、途中剖検例と同時期に、自発運動減少、腹臥姿勢、鎮静など変化が翌日まで回復しないものが認められた。また、生存例の定期解剖では、100 mg/kg 以上の投与群に、途中剖検例にみられた病変の陳旧性変化と考えられる、胸腔内諸器官漿膜の癒着などが認められ、病理組織学検査では、これらの部位に線維化および細胞浸潤、異物肉芽腫などが認められ、心外膜の線維化および細胞浸潤、ならびに胸腺被膜の線維化および細胞浸潤の頻度が増加した。従って、これらの生存例にも投与期間の比較的早い時期に胸腔内諸組織の炎症があったものと推測される。

雌雄ともに、500 mg/kg 投与群において、摂餌量および体重増加の抑制が投与初期に認められた。とくに雌では、胸腔内組織の炎症を示唆する病変の認められなかった例にも著しい体重減少や、翌日に至っても鎮静などの症状が回復しない例が認められ、TSA 投与の影響が、性差をもって投与初期に認められた。性差は、単回投与試験において推定されたLD₅₀値にも現れている。こうした、毒性発現にみられる性差および時期の特徴については、TSA の代謝排泄が関与している可能性がある。すなわち、経口投与された TSA の排泄を、Wistar 系雌ラットを用いて調べた成績¹⁹⁾では、TSA の大部分は尿中に排泄され、24時間排泄率は TSA の用量増加に伴い低下して、200 mg/kg 投与では43%になる。TSA は、尿中では、主に、2-sulphamoylbenzyl alcohol、あるいは、そのグルクロン

酸または硫酸抱合体として認められることから、TSA から 2-sulphamoylbenzyl alcohol への変換は、 P_{450} 水酸化酵素により行われるものと考えられる。 P_{450} 水酸化酵素の発現については性差が著しく、また、誘導を受けやすいことが知られている²⁰⁾。従って、 P_{450} 水酸化酵素の発現が少ない雌では、TSA の解毒が遅れて毒性が強く現れ、さらに、反復投与により雌雄ともに酵素誘導が生じて、毒性が軽減されたものと推測される。100 mg/kg 以上の投与群の雄動物および生存例の雌動物では、肝臓重量あるいはその比体重値が増加し、病理組織学検査において小葉中心性肝細胞肥大が認められたこと、および、これらの動物の肝細胞細胞質は、軽度ではあるが、曇り硝子様を呈していたことは、酵素誘導があったことを支持する所見であると考ええる。

定期解剖例の病理組織検査では、500 mg/kg 投与群において胸腺の萎縮の頻度が増加した。重量変化を伴うものではなく、また、雄動物には同様の変化は認められなかったが、高用量群のみに観察された変化であることから、TSA 投与による影響であると考えられる。また、哺育4日の剖検において、500 mg/kg 投与群の腎臓および副腎に明らかな構造変化を示さない重量増加が認められた。雄にも同様の変化が認められていることから、TSA 投与による影響であると考えられる。この他、500 mg/kg 投与群では、脳比体重値が増加したが、明瞭な形態変化は認められず、重量には TSA の用量に依存した変化は認められなかった。

20 mg/kg 投与群の雌には、TSA 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。従って、雌に対する TSA の反復投与毒性に関する無影響量は、20 mg/kg/day であると推測される。

2. 生殖発生毒性

生殖毒性については、交尾率、受胎率、交尾までの期間とその間に回帰した発情期の回数、妊娠黄体数ならびに着床数に TSA 投与の影響は認められなかったことから、500 mg/kg までの TSA は雌雄動物の生殖能力に影響を及ぼさないものと考えられる。

出生児については、妊娠初日から母動物を 250 mg/kg/day までの用量の TSA で経口曝露すると、TSA の用量に依存して、生後15日の出生児に尿路結石が認められることが報告されている⁴⁾が、生後4日に剖検した本試験の出生児に形態異常は認められなかった。しかし、哺育0日における生存児数が 500 mg/kg 投与群において減少の傾向を示し、分娩率および生児出産率にも低下の傾向が認められた。さらに哺育0および4日における出

生児体重が低下し、500 mg/kg の TSA は、出生児の生存性および体重に影響を及ぼすことが明らかになった。同様の変化は、交配前あるいは妊娠初日から 250 mg/kg/day の TSA で経口曝露された動物の出生児^{4, 5)}、あるいは MBSA の併合試験¹¹⁾においても認められている。スルホンアミド類によって甲状腺機能低下が誘発される⁹⁾が、胎児期、あるいは生後間もなく甲状腺ホルモンが不足すると成長障害が起こる²¹⁾。TSA の胎盤通過性および乳汁移行性については不明であり、母動物および新生児の甲状腺に肉眼的異常は観察されなかった。また、少数例ではあるが 100 mg/kg および 500 mg/kg 投与群の母動物について実施した甲状腺の病理組織検査では異常は観察されなかった。これらのことから、新生児の生存性および体重増加の抑制は、TSA 投与による影響であると考えられるが、母動物および新生児の甲状腺ホルモン分泌との関連性についてはさらに検討を要するものと考えられる。100 mg/kg 以下の投与群には、TSA 投与の影響は認められなかったことから、TSA の出生児に対する無影響量は、100 mg/kg/day であると推測される。

3. 無影響量

以上の成績から、本試験条件下における TSA の無影響量は、反復投与毒性に関しては、雄では、20 mg/kg/day を下回る量であり、雌については、20 mg/kg/day であると結論される。生殖発生毒性に関しては、雌雄親動物では 500 mg/kg/day であり、出生児については 100 mg/kg/day であると結論される。

文 献

- 1) Stavric, B., Lacombe, R., By, A.W.: Isolation, identification, and quantification of o-toluenesulfonamide, a major impurity in commercial saccharins. J. Ass. Offic. Anal. Chem., 57: 678-681 (1974)
- 2) Arnold, D.L., Charbonneau, S.M.: Long-term toxicity study with orthotoluene-sulfonamide and saccharin. Toxicol. Appl. Pharmacol., 41: 164 (1977)
- 3) Tisdell, M.O., Nees, P.O., Harris, D.L., Derse, P.H.: Long-term feeding of saccharin in rats. Symposium: Sweeteners (G.E. Inglett, ed.), pp. 145-158. Avi Pub., Westport, Conn. (1974)
- 4) Arnold, D.L., Moodie, C.A., Grice, H.C., Charbonneau, S.M., Stavric, B., Collins, B.T., McGuire, P.F., Zawidzka, Z.Z., Munro, I.C.: Long-term toxicity study with orthotoluenesulfonamide and sodium saccharin in the rat. Toxicol. Appl. Pharmacol., 52: 113-152 (1980)
- 5) Arnold, D.L., Moodie, C.A., McGuire, P.F., Collins, B.T., Charbonneau, S.M., Munro, I.C.: The effect of orthotoluenesulfonamide and sodium saccharin on the urinary tract of neonatal rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 51: 455-463 (1979)
- 6) Daniels, T.C., Jorgensen, E.C.: Diuretics. Textbook of Organic Medical and Pharmaceutical Chemistry, 6th ed. (Wilson, C.O., Gisvold, O.G., Doerge, R.F., eds), pp. 599-624, J.B. Lippincott, Co., Philadelphia, U.S.A. (1971)

- 7) Gilman, A.G., Rall, T.W., Nies, A.S., Taylor, P., eds.: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Pergamon, New York, U.S.A. (1990)
- 8) Gregus, Z., Klassen, C.D.: Mechanisms of toxicity.
Casarett & Doull's Toxicology — The Basic Sciences of Poisons, 5th ed. (Klaassen, C.D., ed.), pp. 35-74, McGraw-Hill, New York, U.S.A. (1996).
- 9) Capen, C.C.: Toxic responses of the endocrine system
Casarett & Doull's Toxicology — The Basic Sciences of Poisons, 5th ed. (Klaassen, C.D., ed.), pp. 617-640, McGraw-Hill, New York, U.S.A. (1996).
- 10) Rice, H.R., Cohen, D.E.: Toxic responses of the skin.
Casarett & Doull's Toxicology — The Basic Sciences of Poisons, 5th ed. (Klaassen, C.D., ed.), pp. 529-546, McGraw-Hill, New York, U.S.A. (1996).
- 11) 化学物質点検推進委員会: 4-メチルベンゼンスルホンアミドのラットにおける反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験 (化学物質毒性試験報告書 Vol. 1、編、厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監)、pp. 33-46. (1994)
- 12) 丹後俊郎: 医学への統計学 (古川俊之 監修)、朝倉書店、東京 (1985)
- 13) 石居 進: 生物統計学入門、培風館、東京 (1992)
- 14) 佐久間昭: 薬効評価—計画と解析、東京大学出版会、東京 (1977)
- 15) Dunnett, C. W.: New tables for multiple comparisons with a control.
Biometrics, 20: 482-491 (1964)
- 16) Scheffé, H.: A method for judging all contrasts in the analysis of variance.
Biometrika, 40: 87-104 (1953)

- 17) Kruskal, W. H., W. A. Wallis: Use of ranks in one-criterion variance analysis. J. Amer. Statist. Assoc., 47: 583-621 (1952)
- 18) 谷本 義文: 実験動物の血液・尿生化学、ソフトサイエンス社、東京 (1988)
- 19) Renwick, A.G., Ball, L.M., Corina, D.L., Williams, R.T.: The fate of saccharin impurities: the excretion and metabolism of toluene-2-sulphonamide in man and rat. Xenobiotica, 8: 461-474 (1978)
- 20) Sipes, I.G., Gandolfi, A.J.: Biotransformation of toxicants.
Casarett & Doull's Toxicology — The Basic Sciences of Poisons, 4th ed.
(Amdur, M.O., Doull, J., Klaassen, C.D., eds.), pp. 88-126, McGraw-Hill, New York, U.S.A. (1991).
- 21) 小林 英司: 内分泌現象
基礎生物学選書 5 (本城ら 編)、裳華房、東京 (1976)

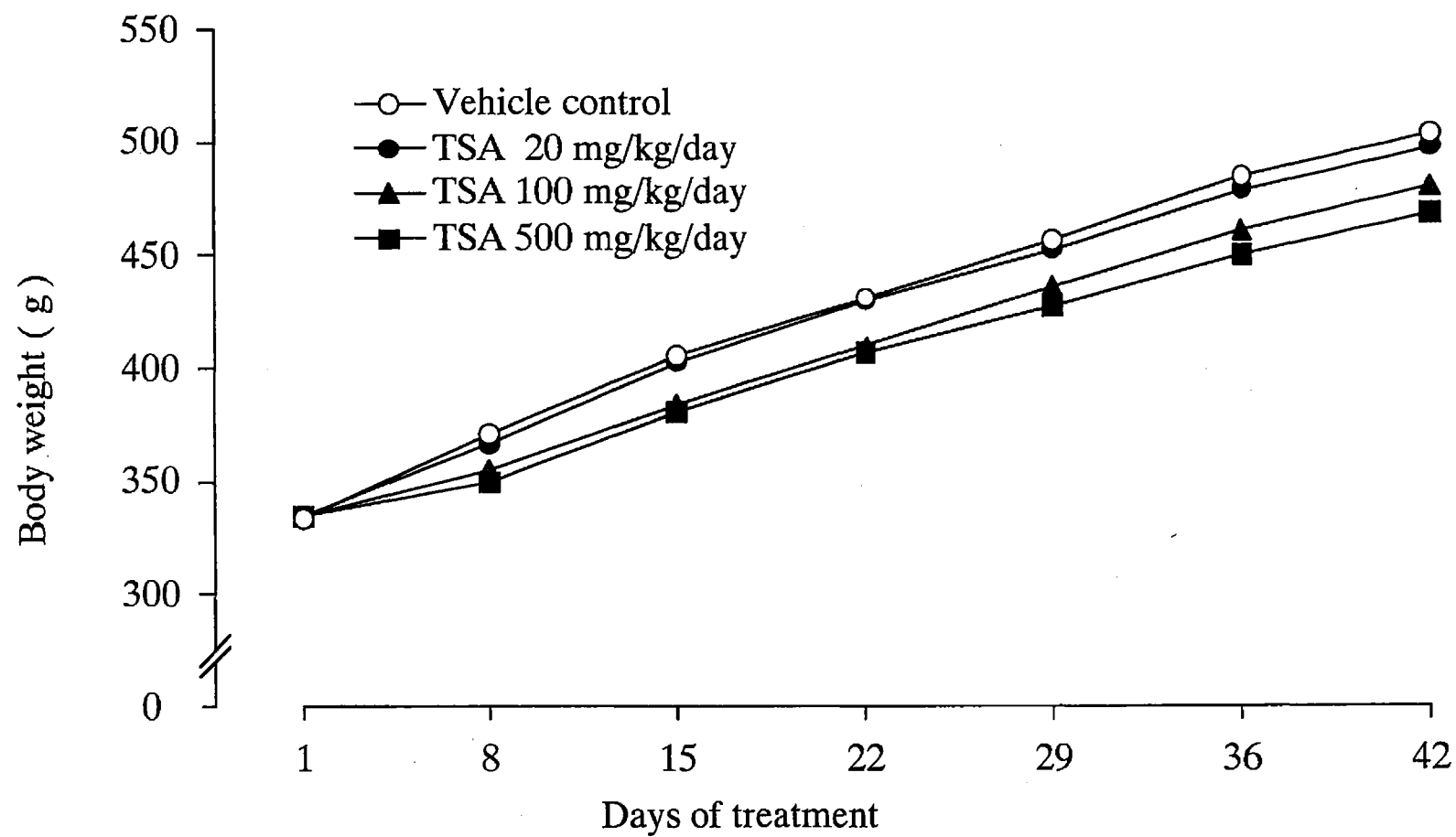


Fig 1. Body weight of males

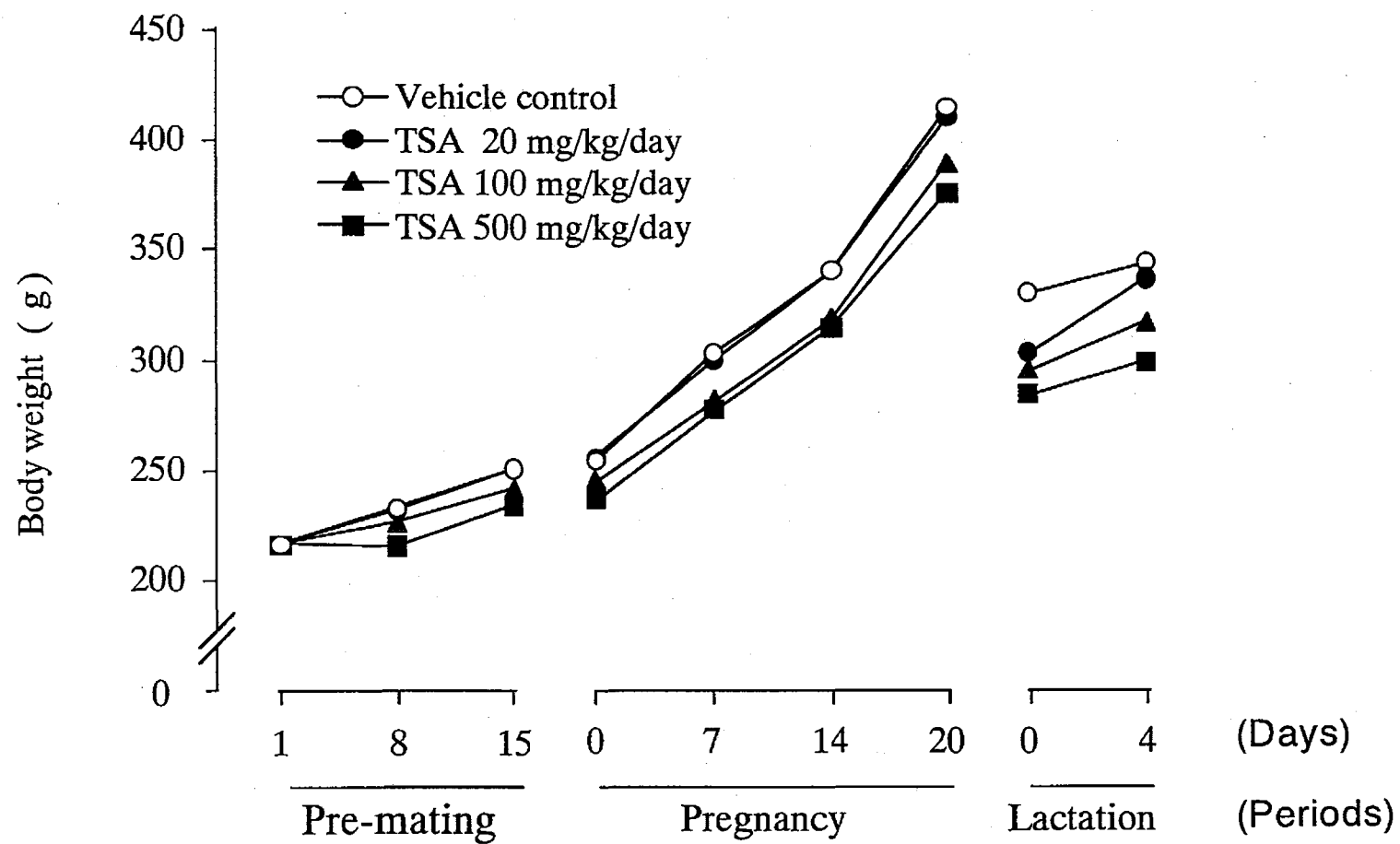


Fig. 2 Body weight of females

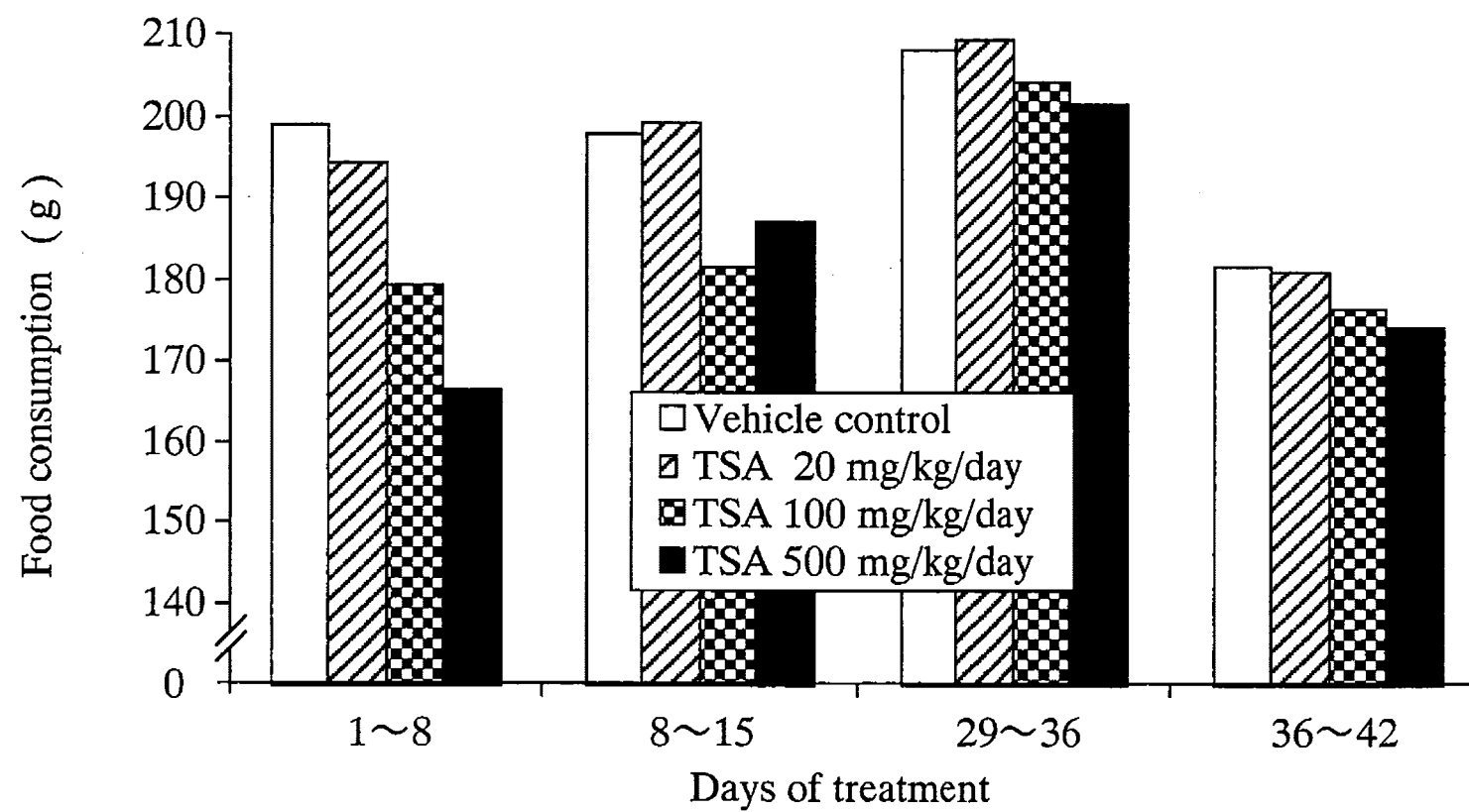


Fig 3. Food consumption of males

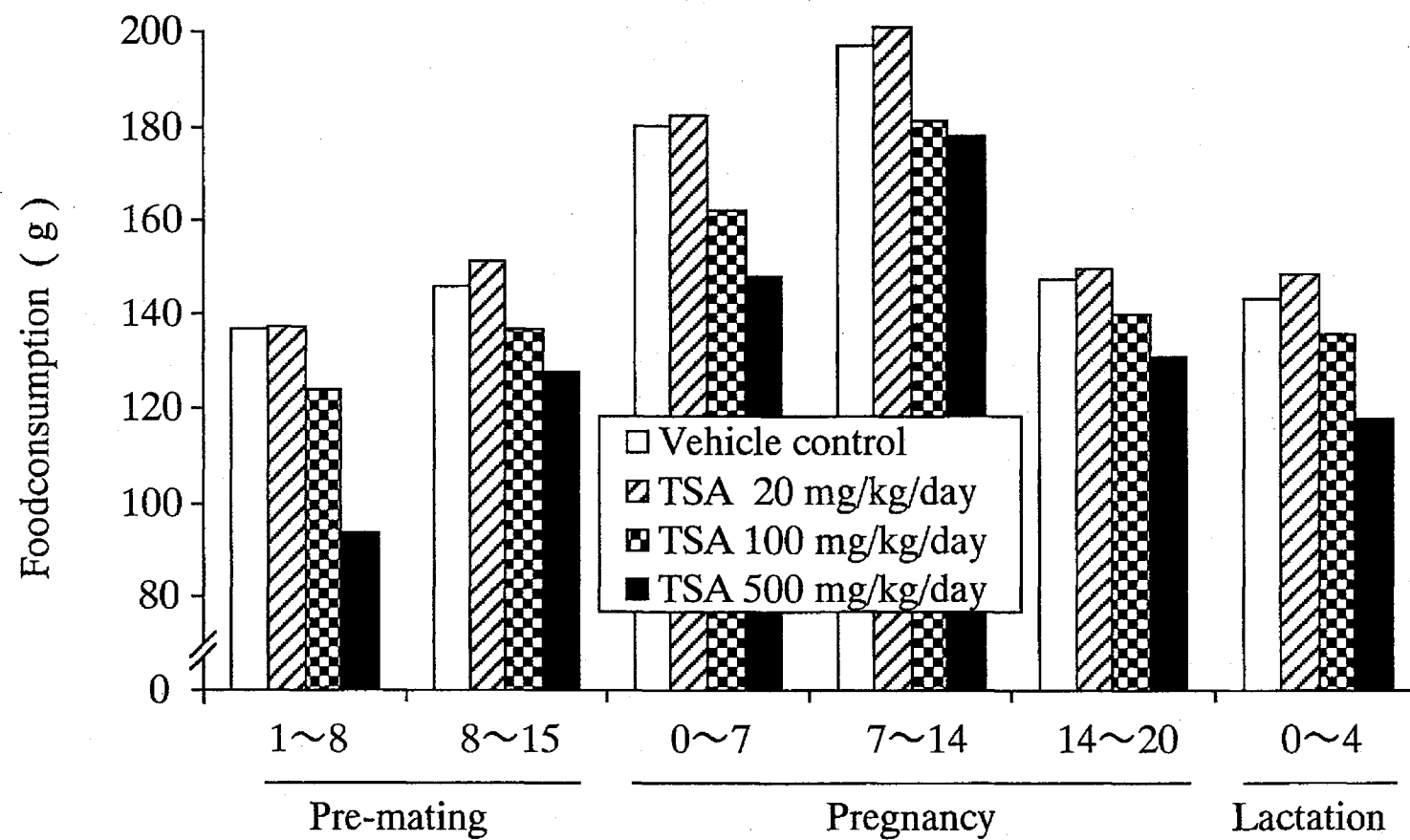


Fig 4. Food consumption of females

【TABLE INDEX】

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Table no. (appendix no.)	Table title
1 (1-1 ~ 1-4)	Clinical signs of F ₀ males
2 (2-1 ~ 2-4)	Clinical signs of F ₀ females
3 (3-1 ~ 3-4)	Body weight of F ₀ males
4 (4-1 ~ 4-4)	Body weight gain of F ₀ males
5 (5-1 ~ 5-4)	Body weight of F ₀ females during pre-mating period
6 (6-1 ~ 6-4)	Body weight gain of F ₀ females during pre-mating period
7 (7-1 ~ 7-4)	Body weight of F ₀ females during pregnancy period
8 (8-1 ~ 8-4)	Body weight gain of F ₀ females during pregnancy period
9 (9-1 ~ 9-4)	Body weight of F ₀ females during lactation period
10 (10-1 ~10-4)	Body weight gain of F ₀ females during lactation period
11 (11-1 ~11-4)	Food consumption of F ₀ males
12 (12-1 ~12-4)	Food consumption of F ₀ females during pre-mating period
13 (13-1 ~13-4)	Food consumption of F ₀ females during pregnancy period
14 (14-1 ~14-4)	Food consumption of F ₀ females during lactation period
15 (15-1 ~15-4)	Urinalysis values in F ₀ males on day 42 of treatment
16 (16-1 ~16-4)	Hematological findings of F ₀ males after oral administration for 42 days
17 (17-1 ~17-4)	Biochemical findings of F ₀ males after oral administration for 42 days
18 (18-1 ~18-4)	Summary of macroscopic findings in F ₀ males
19 (19-1 ~19-4)	Absolute and relative organ weights of F ₀ males after oral administration for 42 days
20 (20-1 ~20-3)	Summary of histopathological findings in F ₀ males
21 (21-1 ~21-4)	Summary of macroscopic findings in F ₀ females
21-S/D	Summary of macroscopic findings in F ₀ females in a moribund condition or died

21-L		Summary of macroscopic findings in F ₀ females at the end of the dosing period
22	(22-1 ~22-4)	Absolute and relative organ weights of F ₀ females on day 4 of lactation
23	(23-1 ~23-4)	Summary of histopathological findings in F ₀ females
23-L		Summary of histopathological findings in F ₀ females at the end of the dosing period
23-S/D		Summary of histopathological findings in F ₀ females in a moribund condition or died
24	(24-1 ~24-4)	Reproductive performance of F ₀ animals
25	(25-1 ~25-4)	Development of F ₁ pups up to day 4 of lactation
26	(26-1 ~26-4)	Body weight of F ₁ pups up to day 4 of lactation
27		Summary of morphological findings in F ₁ pups on day 4 of lactation
28		Summary of morphological findings in F ₁ dead pups

Table 1

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Clinical signs of F₀ males

Clinical signs	TSA (mg/kg)	Initial number of animals	Number of animals with clinical signs						Total
			Dosing period						
			1 ~ 7 ^{a)}	8 ~ 14	15 ~ 21	22 ~ 28	29 ~ 35	36 ~ 42	
Decrease in locomotor activity	0 ^{b)}	13	0	0	0	0	0	0	0
	20	13	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	13	13	13	13	13	13	13
	500	13	13	13	13	13	13	13	13
Prone position	0	13	0	0	0	0	0	0	0
	20	13	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	6	2	6	4	3	1	10
	500	13	10	10	13	11	12	11	13
Temporary salivation	0	13	0	0	0	0	0	0	0
	20	13	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	0	0	2	9	9	10	11
	500	13	0	0	1	11	10	11	12
Loss of fur	0	13	0	0	0	1	1	1	1
	20	13	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	0	0	0	0	1	1	1
	500	13	1	1	1	2	2	2	2

^{a)}: Treatment days^{b)}: Vehicle control, 0.5% CMC-Na (5 ml/kg)

Table 2

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Clinical signs of F₀ females

Clinical signs	TSA (mg/kg)	Initial number of animals	Number of animals with clinical signs Dosing period						Total
			1 ~ 7 ^{a)}	8 ~ 14	15 ~ 21	22 ~ 28	29 ~ 35	36 ~ 48	
Decrease in locomotor activity	0 ^{b)}	13	0	0	0	0	0	0	0
	20	13	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	12	12	13	13	13	12	13
	500	13*	13	8	8	8	8	8	13
Prone position	0	13	0	0	0	0	0	0	0
	20	13	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	4	0	7	2	10	7	13
	500	13	13	8	6	6	8	8	13
Temporary salivation	0	13	0	0	0	0	0	0	0
	20	13	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	0	0	1	6	4	0	7
	500	13	0	1	2	3	3	3	3
Sedation	0	13	0	0	0	0	0	0	0
	20	13	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	0	0	0	0	0	0	0
	500	13	6	1	0	0	0	0	7
No startle reaction	0	13	0	0	0	0	0	0	0
	20	13	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	0	0	0	0	0	0	0
	500	13	2	0	0	0	0	0	2
Loss of fur	0	13	0	0	0	1	1	1	1
	20	13	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	0	0	0	1	1	1	1
	500	13	0	0	0	0	0	0	0
Dyspnea	0	13	0	0	0	0	0	0	0
	20	13	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	0	0	0	0	0	0	0
	500	13	1	0	0	0	0	0	1

^{a)}: Treatment days^{b)}: Vehicle control, 0.5% CMC-Na (5 ml/kg)

*: Died of day 3 of treatment (FB04003, FB04004, FB04009), sacrificed at moribund on day 3, 5 of treatment (FB04002, FB04007)

Table 2 (continued)

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Clinical signs of F₀ females

Clinical signs	TSA (mg/kg)	Initial number of animals	Number of animals with clinical signs						Total
			Dosing period						
			1 ~ 7 ^{a)}	8 ~ 14	15~21	22~28	29~35	36~48	
Subnormal temperature	0 ^{b)}	13	0	0	0	0	0	0	0
	20	13	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	0	0	0	0	0	0	0
	500	13*	2	0	0	0	0	0	2
Reddish tear	0	13	0	0	0	0	0	0	0
	20	13	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	0	0	0	0	0	0	0
	500	13	3	1	0	0	0	0	3
Lacrimation	0	13	0	0	0	0	0	0	0
	20	13	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	0	0	0	0	0	0	0
	500	13	1	0	0	0	0	0	1
Chromaturia	0	13	0	0	0	0	0	0	0
	20	13	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	0	0	0	0	0	0	0
	500	13	2	0	0	0	0	0	2
Ataxic gait	0	13	0	0	0	0	0	0	0
	20	13	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	0	0	0	0	0	0	0
	500	13	3	3	0	0	0	0	6
Extension limbs	0	13	0	0	0	0	0	0	0
	20	13	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	0	0	0	0	0	0	0
	500	13	1	0	0	0	0	0	1

^{a)}: Treatment days^{b)}: Vehicle control, 0.5% CMC-Na (5 ml/kg)

*: Died of day 3 of treatment (FB04003, FB04004, FB04009), sacrificed at moribund on day 3, 5 of treatment (FB04002, FB04007)

Table 3

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight of Fo males (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	TSA			
	0 ^{a)}	20	100	500
Days of treatment				
1 (Initial weight)	333.1 $\pm$ 7.4 (13)	333.7 $\pm$ 8.2 (13)	333.7 $\pm$ 8.3 (13)	333.7 $\pm$ 7.8 (13)
8	370.5 $\pm$ 13.3 (13)	366.1 $\pm$ 11.7 (13)	354.2 $\pm$ 13.8** (13)	348.9 $\pm$ 14.8** (13)
15	405.2 $\pm$ 19.0 (13)	402.3 $\pm$ 16.6 (13)	383.6 $\pm$ 18.3* (13)	380.2 $\pm$ 21.0** (13)
22	430.5 $\pm$ 22.1 (13)	429.4 $\pm$ 19.3 (13)	408.8 $\pm$ 22.0* (13)	405.6 $\pm$ 23.6* (13)
29	456.0 $\pm$ 29.7 (13)	451.9 $\pm$ 21.4 (13)	435.1 $\pm$ 27.7 (13)	426.9 $\pm$ 25.2* (13)
36	483.8 $\pm$ 33.0 (13)	478.1 $\pm$ 24.0 (13)	460.1 $\pm$ 28.8 (13)	449.4 $\pm$ 26.3** (13)
42	503.4 $\pm$ 35.9 (13)	497.1 $\pm$ 25.8 (13)	479.6 $\pm$ 32.4 (13)	467.4 $\pm$ 26.9* (13)

^{a)}: vehicle control, 0.5% CMC-Na (5 ml/kg)*: significant difference from control, $p < 0.05$ (by multiple comparisons)**: significant difference from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table 4

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight gain of F₀ males (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	TSA			
	0 ^{a)}	20	100	500
Dose group (mg/kg)				
Days of treatment				
1 ~ 8	37.4 $\pm$ 7.9 (13)	32.4 $\pm$ 7.0 (13)	20.5 $\pm$ 11.1** (13)	15.2 $\pm$ 12.1** (13)
8 ~ 15	34.7 $\pm$ 7.5 (13)	36.2 $\pm$ 7.2 (13)	29.4 $\pm$ 6.5 (13)	31.4 $\pm$ 9.6 (13)
15 ~ 22	25.3 $\pm$ 6.5 (13)	27.2 $\pm$ 4.0 (13)	25.1 $\pm$ 8.4 (13)	25.4 $\pm$ 6.1 (13)
22 ~ 29	25.4 $\pm$ 9.7 (13)	22.5 $\pm$ 4.8 (13)	26.4 $\pm$ 7.4 (13)	21.3 $\pm$ 6.1 (13)
29 ~ 36	27.8 $\pm$ 5.4 (13)	26.2 $\pm$ 5.6 (13)	24.9 $\pm$ 6.0 (13)	22.5 $\pm$ 5.3 (13)
36 ~ 42	19.7 $\pm$ 5.8 (13)	19.0 $\pm$ 6.9 (13)	19.6 $\pm$ 6.7 (13)	17.9 $\pm$ 4.3 (13)
1 ~ 15	72.1 $\pm$ 13.9 (13)	68.5 $\pm$ 11.8 (13)	49.9 $\pm$ 16.2** (13)	46.5 $\pm$ 16.9** (13)
1 ~ 22	97.4 $\pm$ 16.8 (13)	95.7 $\pm$ 14.2 (13)	75.0 $\pm$ 19.4** (13)	71.9 $\pm$ 18.7** (13)
1 ~ 29	122.9 $\pm$ 23.8 (13)	118.2 $\pm$ 16.1 (13)	101.4 $\pm$ 24.2* (13)	93.2 $\pm$ 20.9** (13)
1 ~ 36	150.7 $\pm$ 27.3 (13)	144.4 $\pm$ 19.1 (13)	126.3 $\pm$ 25.1* (13)	115.7 $\pm$ 22.1** (13)
1 ~ 42	170.4 $\pm$ 30.4 (13)	163.4 $\pm$ 20.6 (13)	145.9 $\pm$ 28.0 (13)	133.7 $\pm$ 23.0** (13)

^{a)}: vehicle control, 0.5% CMC-Na (5 ml/kg)

*: significant difference from control, p<0.05 (by multiple comparisons)

**: significant difference from control, p<0.01 (by multiple comparisons)

Table 5

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight of F₀ females during pre-mating period (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	TSA			
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}	20	100	500
Days of treatment				
1 (Initial weight)	216.3 ± 6.2 (13)	216.4 ± 5.5 (13)	216.3 ± 5.8 (13)	216.1 ± 6.3 (13)
8	232.9 ± 7.9 (13)	232.2 ± 7.7 (13)	226.5 ± 9.1 (13)	215.4 ± 17.1* (8)
15	251.3 ± 15.6 (13)	250.9 ± 12.9 (13)	241.9 ± 8.1 (13)	234.3 ± 17.2 (8)

^{a)}: vehicle control, 0.5% CMC-Na (5 ml/kg)

* : significant difference from control, p<0.05 (by multiple comparisons)

Table 6

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight gain of F₀ females during pre-mating period (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	TSA			
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}	20	100	500
Days of treatment				
1 ~ 8	16.6 ± 7.6 (13)	15.8 ± 5.7 (13)	10.2 ± 7.8 (13)	-0.9 ± 17.2* (8)
8 ~15	18.4 ± 10.6 (13)	18.7 ± 7.5 (13)	15.4 ± 8.6 (13)	18.9 ± 16.4 (8)

1 ~15	35.0 ± 14.5 (13)	34.5 ± 11.4 (13)	25.6 ± 9.2 (13)	18.0 ± 12.9* (8)

^{a)}: vehicle control, 0.5% CMC-Na (5 ml/kg)* : significant difference from control, $p < 0.05$ (by multiple comparisons)

Table 7

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight of F₀ females during pregnancy period (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	TSA			
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}	20	100	500
Days of pregnancy				
0	255.2 ± 15.9 (10)	256.6 ± 13.1 (13)	246.5 ± 9.3 (12)	237.2 ± 16.3 (7)
7	303.6 ± 19.4 (10)	300.6 ± 12.5 (13)	282.2 ± 10.3* (12)	278.4 ± 23.5* (7)
14	341.1 ± 26.3 (10)	340.9 ± 18.2 (13)	319.5 ± 12.1 (12)	315.5 ± 26.2 (7)
20	414.5 ± 35.2 (10)	409.9 ± 35.3 (13)	389.1 ± 18.7 (12)	375.9 ± 40.0 (7)

^{a)}: vehicle control, 0.5% CMC-Na (5 ml/kg)

* : significant difference from control, p<0.05 (by multiple comparisons)

Table 8

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight gain of F₀ females during pregnancy period (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	TSA			
	0 ^{a)}	20	100	500
Days of pregnancy				
0 ~ 7	48.4 $\pm$ 9.6 (10)	44.0 $\pm$ 5.4 (13)	35.7 $\pm$ 5.2* (12)	41.2 $\pm$ 13.5 (7)
7 ~ 14	37.5 $\pm$ 8.6 (10)	40.3 $\pm$ 8.1 (13)	37.2 $\pm$ 4.0 (12)	37.1 $\pm$ 6.4 (7)
14 ~ 20	73.4 $\pm$ 13.9 (10)	69.0 $\pm$ 21.9 (13)	69.7 $\pm$ 12.1 (12)	60.4 $\pm$ 16.3 (7)
0 ~ 14	85.9 $\pm$ 16.8 (10)	84.3 $\pm$ 11.2 (13)	72.9 $\pm$ 6.9 (12)	78.3 $\pm$ 17.4 (7)
0 ~ 20	159.3 $\pm$ 23.5 (10)	153.3 $\pm$ 29.0 (13)	142.6 $\pm$ 15.7 (12)	138.7 $\pm$ 32.9 (7)

^{a)}: vehicle control, 0.5% CMC-Na (5 ml/kg)

*: significant difference from control, p<0.05 (by multiple comparisons)

Table 9

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight of F₀ females during lactation period (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	TSA			
	0 ^{a)}	20	100	500
Days of lactation				
0	313.1 $\pm$ 18.7 (10)	303.7 $\pm$ 21.3 (12)	296.2 $\pm$ 23.2 (12)	284.9 $\pm$ 23.7 (7)
4	344.1 $\pm$ 19.7 (10)	337.0 $\pm$ 19.6 (12)	317.6 $\pm$ 24.8* (12)	299.8 $\pm$ 17.0** (7)

^{a)}: vehicle control, 0.5% CMC-Na (5 ml/kg)*: significant difference from control, $p < 0.05$ (by multiple comparisons)**: significant difference from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table 10

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight gain of F₀ females during lactation period (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	TSA			
	0 ^{a)}	20	100	500
Days of lactation				
0 ~ 4	31.0 $\pm$ 12.3 (10)	33.3 $\pm$ 16.9 (12)	21.4 $\pm$ 15.9 (12)	14.9 $\pm$ 25.1 (7)

^{a)}: vehicle control, 0.5% CMC-Na (5 ml/kg)

Table 11

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Food consumption of P₀ males (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	TSA			
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}	20	100	500
Days of treatment				
1 ~ 8	199.0 ± 17.8 (13)	194.3 ± 11.4 (13)	179.4 ± 17.2** (13)	166.5 ± 12.0** (13)
8 ~ 15	198.1 ± 18.0 (13)	199.3 ± 12.6 (13)	181.6 ± 14.6* (13)	187.2 ± 14.1 (13)
29 ~ 36	207.9 ± 22.8 (13)	209.5 ± 13.7 (13)	204.0 ± 15.8 (13)	201.5 ± 14.5 (13)
36 ~ 42	181.8 ± 21.4 (13)	180.9 ± 11.9 (13)	176.4 ± 18.7 (13)	174.0 ± 12.1 (13)

^{a)}: vehicle control, 0.5% CMC-Na (5 ml/kg)^{*}: significant difference from control, p<0.05 (by multiple comparisons)^{**}: significant difference from control, p<0.01 (by multiple comparisons)

Table 12

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Food consumption of Fo females during pre-mating period (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	TSA			
	0 ^{a)}	20	100	500
Dose group (mg/kg)				
Days of treatment				
1 ~ 8	136.9 $\pm$ 11.5 (13)	137.3 $\pm$ 8.9 (13)	123.6 $\pm$ 12.2 (13)	93.9 $\pm$ 20.3** (8)
8 ~ 15	146.1 $\pm$ 13.6 (13)	151.3 $\pm$ 10.8 (13)	136.5 $\pm$ 8.8 (13)	127.8 $\pm$ 23.6 (8)

^{a)}: vehicle control, 0.5% CMC-Na (5 ml/kg)**: significant difference from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table 13

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Food consumption of F₀ females during pregnancy period (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	TSA			
	0 ^{a)}	20	100	500
Days of pregnancy				
0 ~ 7	180.4 $\pm$ 18.8 (10)	182.6 $\pm$ 11.0 (13)	162.2 $\pm$ 10.9 (12)	148.2 $\pm$ 24.9* (7)
7 ~ 14	197.4 $\pm$ 28.5 (10)	201.2 $\pm$ 16.1 (13)	181.3 $\pm$ 13.8 (12)	178.1 $\pm$ 20.6 (7)
14 ~ 20	147.6 $\pm$ 16.0 (10)	149.7 $\pm$ 9.8 (13)	140.3 $\pm$ 13.2 (12)	130.6 $\pm$ 20.3 (7)

^{a)}: vehicle control, 0.5% CMC-Na (5 ml/kg)

* : significant difference from control, p<0.05 (by multiple comparisons)

Table 14

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Food consumption of Fo females during lactation period (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	TSA			
	0 ^{a)}	20	100	500
Days of lactation				
0 ~ 4	143.3 $\pm$ 16.9 (10)	148.5 $\pm$ 25.6 (12)	136.0 $\pm$ 19.4 (12)	117.6 $\pm$ 14.0 (7)

^{a)}: vehicle control, 0.5% CMC-Na (5 ml/kg)

Table 15

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Urinalysis values in F₀ males on day 42 of treatment

Group	Number of (mg/kg) animals	pH						Protein ^{b)}				Glucose ^{c)}		Ketone ^{d)}			Bilirubin ^{d)}		Occult blood ^{d)}			Urobilinogen ^{e)}	
		6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	≥9.0	—	±	+	++	—	—	±	+	—	—	±	+	—	±	+	±
0 ^{a)}	13	1	6	1	0	0	5	0	2	9	2	13	3	5	5	13	13	0	0			13	
20	13	0	5	6	0	0	2	1	0	8	4	13	3	4	6	13	11	0	2			13	
100	13	0	4	5	0	1	3	1	4	6	2	13	3	8	2	13	12	0	1			13	
500	13	0	2	3	5	2	1	1	7	3	2	13	9	3	1	13	13	0	0			13	

a) vehicle control: 0.5 % CMC Na (5 ml/kg)

b) -: negative, ±: trace, +: 30 mg/dl, ++: 100 mg/dl

c) -: negative

d) -: negative, ±: trace, +: slight

e) ±: 0.1 EU/dl

Table 16

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Hematological findings of Fo males after oral administration for 42 days

TSA (mg/kg)	R B C ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	M C V (μm^3)	M C H (pg)	M C H C (%)	Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	P T (sec)	A P T T (sec)
0 ^{a)}	(13) 835 ± 29	(13) 14.9 ± 1.3	(13) 45.4 ± 3.9	(13) 54.3 ± 4.1	(13) 17.9 ± 1.4	(13) 32.9 ± 0.5	(13) 96.5 ± 7.8	(13) 29.9 ± 8.8	(13) 26.9 ± 2.5
20	(13) 830 ± 36	(13) 15.5 ± 0.6	(13) 46.6 ± 1.9	(13) 56.2 ± 1.6	(13) 18.7* ± 0.4	(13) 33.3 ± 0.6	(13) 97.0 ± 7.9	(13) 31.1 ± 7.2	(13) 28.0 ± 3.1
100	(13) 820 ± 31	(13) 15.5 ± 0.5	(13) 45.8 ± 1.6	(13) 55.9 ± 1.3	(13) 18.9** ± 0.4	(13) 33.9** ± 0.7	(13) 99.6 ± 5.9	(13) 22.7* ± 5.2	(13) 24.2 ± 3.3
500	(13) 822 ± 37	(13) 15.5 ± 0.5	(13) 45.1 ± 1.7	(13) 54.9 ± 1.3	(13) 18.9** ± 0.4	(13) 34.4** ± 0.6	(13) 104.7* ± 6.8	(13) 21.6* ± 5.8	(13) 24.6 ± 2.5

TSA (mg/kg)	W B C ($\times 100/\text{mm}^3$)	Band neutrophil (%)	Segmented neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0 ^{a)}	(13) 69 ± 20	(13) 0 ± 0	(13) 12 ± 8	(13) 0 ± 1	(13) 0 ± 0	(13) 1 ± 1	(13) 87 ± 9
20	(13) 57 ± 14	(13) 0 ± 0	(13) 15 ± 7	(13) 1 ± 1	(13) 0 ± 0	(13) 1 ± 1	(13) 83 ± 8
100	(13) 61 ± 18	(13) 0 ± 0	(13) 16 ± 7	(13) 0 ± 1	(13) 0 ± 0	(13) 1 ± 1	(13) 83 ± 7
500	(13) 68 ± 15	(13) 0 ± 0	(13) 16 ± 7	(13) 1 ± 1	(13) 0 ± 0	(13) 1 ± 1	(13) 83 ± 7

Parameter, mean $\pm$ S.D.

(), number of animals

^{a)}: vehicle control, 0.5% CMC-Na (5 ml/kg)*, significantly different from control, $p < 0.05$ **, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 17

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Biochemical findings of Po males after oral administration for 42 days

TSA	Total Protein	Albumin	A/G	BUN	Creatinine	Glucose	Total cholesterol	Tri-glyceride	Total bilirubin
(mg/kg)	(g/dl)	(g/dl)		(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)
0 ^{a)}	(13) 5.4 ±0.2	(13) 3.0 ±0.2	(13) 1.29 ±0.14	(13) 17 ±2	(13) 0.7 ±0.1	(13) 144 ±10	(13) 37 ±6	(13) 45 ±15	(13) 0.08 ±0.03
20	(13) 5.3 ±0.3	(13) 2.9 ±0.2	(13) 1.19 ±0.13	(13) 18 ±4	(13) 0.6 ±0.0	(13) 142 ±13	(13) 39 ±8	(13) 35 ±14	(13) 0.08 ±0.01
100	(13) 5.4 ±0.2	(13) 3.0 ±0.2	(13) 1.26 ±0.13	(13) 19 ±3	(13) 0.7 ±0.1	(13) 135 ±11	(13) 49* ±13	(13) 39 ±13	(13) 0.09 ±0.02
500	(13) 5.6* ±0.2	(13) 3.0 ±0.1	(13) 1.15* ±0.10	(13) 20 ±2	(13) 0.6 ±0.1	(13) 128** ±14	(13) 66** ±16	(13) 27** ±11	(13) 0.10 ±0.02

TSA	Na	K	Cl	Ca	Inorg. phos.	ALP	GPT	GOT	γ-GTP
(mg/kg)	(mEq/l)	(mEq/l)	(mEq/l)	(mg/dl)	(mg/dl)	(U/l)	(U/l)	(U/l)	(U/l)
0 ^{a)}	(13) 145.1 ±0.8	(13) 4.14 ±0.15	(13) 108.4 ±0.8	(13) 8.7 ±0.2	(13) 6.5 ±0.5	(13) 261 ±35	(13) 32 ±7	(13) 69 ±14	(13) 0 ±0
20	(13) 145.1 ±0.7	(13) 4.13 ±0.26	(13) 108.9 ±1.1	(13) 8.6 ±0.1	(13) 6.3 ±0.4	(13) 218** ±40	(13) 32 ±7	(13) 68 ±10	(13) 0 ±0
100	(13) 145.1 ±0.9	(13) 4.04 ±0.16	(13) 108.6 ±1.0	(13) 8.8 ±0.1	(13) 6.0 ±0.6	(13) 216** ±34	(13) 28 ±3	(13) 63 ±7	(13) 0 ±0
500	(13) 145.0 ±1.0	(13) 3.99 ±0.21	(13) 107.6 ±1.1	(13) 8.9 ±0.3	(13) 5.9 ±0.8	(13) 199** ±31	(13) 38 ±15	(13) 71 ±23	(13) 0* ±1

Parameter, mean±S.D.

(), number of animals

^{a)}: vehicle control, 0.5% CMC-Na (5 ml/kg)

*, significantly different from control, p<0.05

**, significantly different from control, p<0.01

Table 18

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening study in rats
Summary of macroscopic findings in Fo males

Group Grade	Control		20 mg/kg		100 mg/kg		500 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Liver)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Enlargement	13	0	13	0	13	0	8	5
Dark	13	0	13	0	11	2	4	9
Yellowish	12	1	13	0	12	1	13	0
Accentuated lobular pattern	13	0	13	0	12	1	13	0
Small, left lateral lobe and caudate lobe	12	1	13	0	13	0	13	0
(Kidney)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Enlargement	13	0	13	0	12	1	7	6
Dark	13	0	13	0	10	3	9	4
Pale	13	0	13	0	12	1	13	0
Recessed area, cortex	12	1	13	0	12	1	12	1
Area, pale, cortex, left side	13	0	13	0	12	1	12	1
Dilatation, renal pelvis	12	1	13	0	12	1	13	0
Red, papilla	13	0	12	1	13	0	13	0
Cyst, cortex, right side	13	0	13	0	12	1	13	0
(Spleen)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Dark	13	0	13	0	13	0	12	1
Indistinct follicle	13	0	13	0	13	0	12	1
(Thymus)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Small	13	0	9	4	10	3	9	4
(Testis)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Small	12	1	13	0	13	0	13	0
(Lung)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Spot, dark	11	2	13	0	13	0	12	1
Spot, white	12	1	13	0	13	0	12	1
(Eye ball)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Dark red, internal, left side	13	0	13	0	13	0	12	1

-. Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 19

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Absolute and relative organ weights of F₀ males after oral administration for 42 days; mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	Dose group (mg/kg)	TSA			
		0 ^{a)}	20	100	500
Terminal body weight (g)		469.6 $\pm$ 33.8 (13)	464.0 $\pm$ 24.8 (13)	443.9 $\pm$ 30.7 (13)	432.7 $\pm$ 26.4** (13)
Liver (g)		12.27 $\pm$ 1.49 ^{b)} (13) 2.61 $\pm$ 0.20 ^{c)}	12.30 $\pm$ 1.15 (13) 2.65 $\pm$ 0.14	12.40 $\pm$ 1.25 (13) 2.79 $\pm$ 0.16*	14.37 $\pm$ 1.18** (13) 3.32 $\pm$ 0.17**
Brain (g)		2.04 $\pm$ 0.06 (13) 0.44 $\pm$ 0.02	2.04 $\pm$ 0.05 (13) 0.44 $\pm$ 0.03	2.00 $\pm$ 0.08 (13) 0.45 $\pm$ 0.04	1.98 $\pm$ 0.09 (13) 0.46 $\pm$ 0.03
Heart (g)		1.33 $\pm$ 0.13 (13) 0.28 $\pm$ 0.02	1.35 $\pm$ 0.13 (13) 0.29 $\pm$ 0.02	1.35 $\pm$ 0.09 (13) 0.31 $\pm$ 0.02*	1.31 $\pm$ 0.12 (13) 0.30 $\pm$ 0.02*
Spleen (g)		0.75 $\pm$ 0.09 (13) 0.16 $\pm$ 0.02	0.79 $\pm$ 0.11 (13) 0.17 $\pm$ 0.02	0.76 $\pm$ 0.10 (13) 0.17 $\pm$ 0.02	0.75 $\pm$ 0.12 (13) 0.17 $\pm$ 0.03
Thymus (mg)		351.3 $\pm$ 86.3 (13) 74.9 $\pm$ 18.3	319.8 $\pm$ 86.5 (13) 68.9 $\pm$ 17.8	311.5 $\pm$ 82.5 (13) 70.7 $\pm$ 20.1	278.6 $\pm$ 56.9 (13) 64.2 $\pm$ 11.8
Kidneys (g)		3.15 $\pm$ 0.24 (13) 0.67 $\pm$ 0.05	3.24 $\pm$ 0.18 (13) 0.70 $\pm$ 0.03	3.27 $\pm$ 0.24 (13) 0.74 $\pm$ 0.07**	3.54 $\pm$ 0.23** (13) 0.82 $\pm$ 0.06**
Adrenal glands (mg)		54.3 $\pm$ 9.1 (13) 11.6 $\pm$ 1.8	58.5 $\pm$ 11.1 (13) 12.6 $\pm$ 2.0	59.4 $\pm$ 8.7 (13) 13.4 $\pm$ 1.6*	62.2 $\pm$ 4.8 (13) 14.4 $\pm$ 1.1**
Testes (g)		3.03 $\pm$ 0.75 (13) 0.65 $\pm$ 0.16	3.40 $\pm$ 0.20 (13) 0.74 $\pm$ 0.06	3.36 $\pm$ 0.26 (13) 0.76 $\pm$ 0.08*	3.35 $\pm$ 0.21 (13) 0.78 $\pm$ 0.05**
Epididymides (g)		1.09 $\pm$ 0.21 (13) 0.23 $\pm$ 0.05	1.22 $\pm$ 0.09 (13) 0.26 $\pm$ 0.02	1.17 $\pm$ 0.09 (13) 0.26 $\pm$ 0.03*	1.04 $\pm$ 0.09 (13) 0.24 $\pm$ 0.03

^{a)}: vehicle control, 0.5% CMC-Na (5 ml/kg)^{b)}: absolute weight^{c)}: relative weight (g or mg per 100g body weight)*: significant difference from control, $p < 0.05$ (by multiple comparisons)**: significant difference from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table 20

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening study in rats
Summary of histopathological findings in Fo males

Group	Control						20 mg/kg						100 mg/kg						500 mg/kg					
Grade	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Liver)	[13]						[13]						[13]						[13]					
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular, ground glass appearance	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	2	8	3	0	0**11##	0	7	6	0	0**13##		
Fatty change, hepatocyte, periportal	0	4	9	0	0	13	0	3	10	0	0	13	0	4	9	0	0	13	0	8	5	0	0	13
Microgranuloma	1	10	2	0	0	12	4	6	3	0	0	9	7	4	2	0	0	6#	0	12	1	0	0	13
Necrosis, focal, subcapsular area	10	1	2	0	0	3	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	11	1	1	0	0	2
Fibrosis, focal, subcapsular area/capsule	12	0	1	0	0	1	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0
Mineralization, necrotic area	12	0	1	0	0	1	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0
(Kidney)	[13]						[13]						[13]						[13]					
Eosinophilic body	10	1	1	1	0	3	2	4	7	0	0*	11##	0	0	5	6	2**13##	0	2	3	6	2**13##		
PAS staining, eosinophilic body	[1]	1	0	0	0	0	[1]	1	0	0	0	0	[2]	2	0	0	0	0	[3]	3	0	0	0	0
Basophilic tubule, cortex	5	8	0	0	0	8	6	7	0	0	0	7	4	2	5	2	0	9	2	9	1	0	1	11
Dilatation, renal pelvis	12	0	1	0	0	1	13	0	0	0	0	0	12	0	1	0	0	1	13	0	0	0	0	0
Mineralization, cortex/papilla	12	1	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0	11	2	0	0	0	2	12	1	0	0	0	1
Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	12	1	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0
Cyst, tubule	13	0	0	0	0	0	12	0	1	0	0	1	13	0	0	0	0	0	11	2	0	0	0	2
Fibrosis, focal	12	1	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0
(Urinary bladder)	[13]						[13]						[13]						[13]					
Hyperplasia, mucosal epithelium, diffuse/focal	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1	11	1	0	1	0	2
Cellular infiltration, lymphocyte, lamina propria	13	0	0	0	0	0	11	2	0	0	0	2	11	2	0	0	0	2	12	1	0	0	0	1
Cellular infiltration, neutrophil, lamina propria	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1
(Spleen)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Hematopoiesis, extramedullary	0	11	2	0	0	13													0	9	4	0	0	13
Deposit, pigment, brown	0	9	4	0	0	13													0	4	9	0	0	13
(Testis)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Atrophy, seminiferous tubule	9	3	0	0	1	4													10	2	1	0	0	3
Decrease, germ cell, seminiferous tubule	9	3	0	0	1	4													10	2	1	0	0	3
Hyperplasia, Leydig cell, diffuse	12	0	1	0	0	1													13	0	0	0	0	0
(Epididymis)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Cell debris, lumen	12	0	1	0	0	1													12	1	0	0	0	1
Decrease, sperm, lumen	12	0	0	0	1	1													12	1	0	0	0	1
Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	11	2	0	0	0	2													13	0	0	0	0	0

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade

[], Number of animals examined

*, Significantly different from control $p < 0.05$ (Two-tailed Mann-Whitney U test)

**, Significantly different from control $p < 0.01$ (Two-tailed Mann-Whitney U test)

#, Significantly different from control $p < 0.05$ (One-tailed Fisher exact test)

##, Significantly different from control $p < 0.01$ (One-tailed Fisher exact test)

(continued)

Table 20(Continued)

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening study in rats
Summary of histopathological findings in Fo males

Group Grade	Control						20 mg/kg						100 mg/kg						500 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Brain)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Thymus)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Heart)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Adrenal gland)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Bone marrow of femur)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Lung)	[2]						[0]						[0]						[1]					
Hemorrhage, focal	1	0	1	0	0	1													0	1	0	0	0	1
Accumulation, foam cell	1	1	0	0	0	1													0	0	1	0	0	1
(Eye ball)	[0]						[0]						[0]						[1]					
Hemorrhage, vitreous body																			0	0	0	1	0	1

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade

[], Number of animals examined

Table 21

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening study in rats
Summary of macroscopic findings in Fo females

Group Grade	Control		20 mg/kg		100 mg/kg		500 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Liver)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Enlargement	13	0	13	0	11	2	10	3
Dark	13	0	13	0	13	0	12	1
Pale	13	0	13	0	13	0	12	1
Yellow	12	1	13	0	13	0	13	0
Small, caudate lobe, unilateral	12	1	13	0	13	0	13	0
Pale, caudate lobe, unilateral	12	1	13	0	13	0	13	0
Enlargement, caudate lobe, unilateral	12	1	13	0	13	0	13	0
Dark red, caudate lobe, unilateral	12	1	13	0	13	0	13	0
Adhesion, with stomach	12	1	13	0	13	0	13	0
(Kidney)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Pale	13	0	13	0	11	2	12	1
Red, cortico-medullary junction	13	0	13	0	13	0	12	1
White, cortico-medullary junction	13	0	13	0	13	0	12	1
(Spleen)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Small	13	0	13	0	13	0	11	2
Pale	13	0	13	0	13	0	11	2
Adhesion, with adipose tissue	12	1	13	0	13	0	13	0
Attachment, clot, white	12	1	13	0	13	0	13	0
(Thymus)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Small	13	0	13	0	11	2	10	3
Whitish cloudy	13	0	13	0	13	0	12	1
(Adrenal gland)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Enlargement	13	0	13	0	13	0	12	1
Pale	12	1	13	0	9	4	10	3
(Heart)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Adhesion, epicardium, with pericardium	13	0	13	0	13	0	10	3
Adhesion, pericardium, with lung/thymus/costal pleura	13	0	13	0	13	0	10	3
Whitish cloudy, pericardium	13	0	13	0	13	0	9	4
Thickening, pericardium	13	0	13	0	13	0	10	3

-, Negative; +, Positive
[], Number of animals examined

(continued)

Table 21(Continued)

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening study in rats
Summary of macroscopic findings in Fo females

Group Grade	Control		20 mg/kg		100 mg/kg		500 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Thoracic cavity)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Hydrothorax	13	0	13	0	13	0	8	5
(Lung)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Edema	13	0	13	0	13	0	10	3
Red	13	0	13	0	13	0	10	3
Insufficiency, retraction	13	0	13	0	13	0	12	1
Adhesion, with costal pleura	13	0	13	0	12	1	11	2
Adhesion, with diaphragm	13	0	13	0	13	0	9	4
Attachment, clot, yellowish white, adhesional area	13	0	13	0	12	1	13	0
Spot/area, dark red	13	0	13	0	13	0	9	4
Spot/area, pale	13	0	13	0	12	1	12	1
(Esophagus)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Perforation	13	0	13	0	13	0	11	2
Area, red, subadventitia	13	0	13	0	13	0	12	1
(Diaphragm)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Adhesion, with adipose tissue	12	1	13	0	13	0	13	0
Attachment, clot, white	13	0	13	0	13	0	12	1
(Forestomach)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Spot, white, mucosa	13	0	13	0	12	1	13	0
(Glandular stomach)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Pale, mucosa	13	0	13	0	13	0	12	1
Area, yellow, mucosa	13	0	13	0	13	0	11	2
(Uterus)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Rest, placenta, right side	13	0	12	1	13	0	13	0
(Pituitary gland)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Enlargement	13	0	13	0	11	2	12	1
(Eye ball)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Whitish cloudy, left side	13	0	13	0	13	0	12	1
(Skin)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Alopecia	12	1	13	0	13	0	13	0

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 21-L

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening study in rats
Summary of macroscopic findings in Fo females at the end of the dosing period

Group Grade	Control		20 mg/kg		100 mg/kg		500 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Liver)	[13]		[13]		[13]		[8]	
Enlargement	13	0	13	0	11	2	6	2
Dark	13	0	13	0	13	0	7	1
Pale	13	0	13	0	13	0	8	0
Yellow	12	1	13	0	13	0	8	0
Small, caudate lobe, unilateral	12	1	13	0	13	0	8	0
Pale, caudate lobe, unilateral	12	1	13	0	13	0	8	0
Enlargement, caudate lobe, unilateral	12	1	13	0	13	0	8	0
Dark red, caudate lobe, unilateral	12	1	13	0	13	0	8	0
Adhesion, with stomach	12	1	13	0	13	0	8	0
(Kidney)	[13]		[13]		[13]		[8]	
Pale	13	0	13	0	11	2	8	0
Red, cortico-medullary junction	13	0	13	0	13	0	8	0
White, cortico-medullary junction	13	0	13	0	13	0	8	0
(Spleen)	[13]		[13]		[13]		[8]	
Small	13	0	13	0	13	0	8	0
Pale	13	0	13	0	13	0	8	0
Adhesion, with adipose tissue	12	1	13	0	13	0	8	0
Attachment, clot, white	12	1	13	0	13	0	8	0
(Thymus)	[13]		[13]		[13]		[8]	
Small	13	0	13	0	11	2	5	3
Whitish cloudy	13	0	13	0	13	0	8	0
(Adrenal gland)	[13]		[13]		[13]		[8]	
Enlargement	13	0	13	0	13	0	7	1
Pale	12	1	13	0	9	4	5	3
(Heart)	[13]		[13]		[13]		[8]	
Adhesion, epicardium, with pericardium	13	0	13	0	13	0	5	3
Adhesion, pericardium, with lung/thymus/costal pleura	13	0	13	0	13	0	5	3
Whitish cloudy, pericardium	13	0	13	0	13	0	4	4
Thickening, pericardium	13	0	13	0	13	0	5	3

-, Negative; +, Positive
[], Number of animals examined

(continued)

Table 21-L(Continued)

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening study in rats
Summary of macroscopic findings in Fo females at the end of the dosing period

Group	Control		20 mg/kg		100 mg/kg		500 mg/kg	
Grade	-	+	-	+	-	+	-	+
(Thoracic cavity)	[13]		[13]		[13]		[8]	
Hydrothorax	13	0	13	0	13	0	8	0
(Lung)	[13]		[13]		[13]		[8]	
Edema	13	0	13	0	13	0	8	0
Red	13	0	13	0	13	0	8	0
Insufficiency, retraction	13	0	13	0	13	0	8	0
Adhesion, with costal pleura	13	0	13	0	12	1	7	1
Adhesion, with diaphragm	13	0	13	0	13	0	6	2
Attachment, clot, yellowish white, adhesional area	13	0	13	0	12	1	8	0
Spot/area, dark red	13	0	13	0	13	0	6	2
Spot/area, pale	13	0	13	0	12	1	7	1
(Esophagus)	[13]		[13]		[13]		[8]	
Perforation	13	0	13	0	13	0	8	0
Area, red, subadventitia	13	0	13	0	13	0	8	0
(Diaphragm)	[13]		[13]		[13]		[8]	
Adhesion, with adipose tissue	12	1	13	0	13	0	8	0
Attachment, clot, white	13	0	13	0	13	0	8	0
(Forestomach)	[13]		[13]		[13]		[8]	
Spot, white, mucosa	13	0	13	0	12	1	8	0
(Glandular stomach)	[13]		[13]		[13]		[8]	
Pale, mucosa	13	0	13	0	13	0	8	0
Area, yellow, mucosa	13	0	13	0	13	0	8	0
(Uterus)	[13]		[13]		[13]		[8]	
Rest, placenta, right side	13	0	12	1	13	0	8	0
(Pituitary gland)	[13]		[13]		[13]		[8]	
Enlargement	13	0	13	0	11	2	7	1
(Eye ball)	[13]		[13]		[13]		[8]	
Whitish cloudy, left side	13	0	13	0	13	0	8	0
(Skin)	[13]		[13]		[13]		[8]	
Alopecia	12	1	13	0	13	0	8	0

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 21-S/D

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening study in rats

Summary of macroscopic findings in Fo females sacrificed in a moribund condition or died

Group Grade	Control		20 mg/kg		100 mg/kg		500 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Liver)	[0]		[0]		[0]		[5]	
Enlargement							4	1
Dark							5	0
Pale							4	1
Yellow							5	0
Small, caudate lobe,								
unilateral							5	0
Pale, caudate lobe,								
unilateral							5	0
Enlargement, caudate lobe,								
unilateral							5	0
Dark red, caudate lobe,								
unilateral							5	0
Adhesion, with stomach							5	0
(Kidney)	[0]		[0]		[0]		[5]	
Pale							4	1
Red,								
cortico-medullary junction							4	1
White,								
cortico-medullary junction							4	1
(Spleen)	[0]		[0]		[0]		[5]	
Small							3	2
Pale							3	2
Adhesion, with adipose tissue							5	0
Attachment, clot, white							5	0
(Thymus)	[0]		[0]		[0]		[5]	
Small							5	0
Whitish cloudy							4	1
(Adrenal gland)	[0]		[0]		[0]		[5]	
Enlargement							5	0
Pale							5	0
(Heart)	[0]		[0]		[0]		[5]	
Adhesion, epicardium,								
with pericardium							5	0
Adhesion, pericardium, with								
lung/thymus/costal pleura							5	0
Whitish cloudy, pericardium							5	0
Thickening, pericardium							5	0

- , Negative; + , Positive
[], Number of animals examined

(continued)

Table 21-S/D(Continued)

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening study in rats
Summary of macroscopic findings in Fo females sacrificed in a moribund condition or died

Group Grade	Control		20 mg/kg		100 mg/kg		500 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Thoracic cavity)	[0]		[0]		[0]		[5]	
Hydrothorax							0	5
(Lung)	[0]		[0]		[0]		[5]	
Edema							2	3
Red							2	3
Insufficiency, retraction							4	1
Adhesion, with costal pleura							5	1
Adhesion, with diaphragm							3	2
Attachment, clot, yellowish white, adhesional area							5	0
Spot/area, dark red							3	2
Spot/area, pale							5	0
(Esophagus)	[0]		[0]		[0]		[5]	
Perforation							3	2
Area, red, subadventitia							4	1
(Diaphragm)	[0]		[0]		[0]		[5]	
Adhesion, with adipose tissue							5	0
Attachment, clot, white							4	1
(Forestomach)	[0]		[0]		[0]		[5]	
Spot, white, mucosa							5	0
(Glandular stomach)	[0]		[0]		[0]		[5]	
Pale, mucosa							4	1
Area, yellow, mucosa							3	2
(Uterus)	[0]		[0]		[0]		[5]	
Rest, placenta, right side							5	0
(Pituitary gland)	[0]		[0]		[0]		[5]	
Enlargement							5	0
(Eye ball)	[0]		[0]		[0]		[5]	
Whitish cloudy, left side							4	1
(Skin)	[0]		[0]		[0]		[5]	
Alopecia							5	0

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 22

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Absolute and relative organ weights of F₀ females on day 4 of lactation; mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	Dose group (mg/kg)	TSA			
		0 ^{a)}	20	100	500
Terminal body weight (g)		344.1 $\pm$ 19.7 (10)	337.0 $\pm$ 19.6 (12)	317.6 $\pm$ 24.8* (12)	299.8 $\pm$ 17.0** (7)
Liver (g)		13.57 $\pm$ 0.99 ^{b)} (10) 3.95 $\pm$ 0.30 ^{c)}	13.96 $\pm$ 1.39 (12) 4.14 $\pm$ 0.31	14.20 $\pm$ 1.71 (12) 4.46 $\pm$ 0.34**	15.12 $\pm$ 1.54 (7) 5.05 $\pm$ 0.40**
Brain (g)		1.94 $\pm$ 0.08 (10) 0.56 $\pm$ 0.03	1.84 $\pm$ 0.07 (12) 0.55 $\pm$ 0.03	1.87 $\pm$ 0.07 (12) 0.59 $\pm$ 0.05	1.86 $\pm$ 0.10 (7) 0.62 $\pm$ 0.04*
Heart (g)		0.98 $\pm$ 0.07 (10) 0.28 $\pm$ 0.02	0.95 $\pm$ 0.07 (12) 0.28 $\pm$ 0.02	0.97 $\pm$ 0.10 (12) 0.31 $\pm$ 0.02	0.93 $\pm$ 0.12 (5) 0.31 $\pm$ 0.04
Spleen (g)		0.70 $\pm$ 0.15 (10) 0.20 $\pm$ 0.04	0.66 $\pm$ 0.06 (12) 0.20 $\pm$ 0.01	0.70 $\pm$ 0.13 (12) 0.22 $\pm$ 0.03	0.65 $\pm$ 0.10 (7) 0.21 $\pm$ 0.04
Thymus (mg)		276.4 $\pm$ 51.0 (10) 80.3 $\pm$ 13.7	219.3 $\pm$ 60.5 (12) 65.3 $\pm$ 18.3	217.0 $\pm$ 97.4 (12) 67.8 $\pm$ 28.6	188.8 $\pm$ 68.5 (6) 62.1 $\pm$ 21.3
Kidneys (g)		2.10 $\pm$ 0.20 (10) 0.61 $\pm$ 0.06	2.08 $\pm$ 0.23 (12) 0.62 $\pm$ 0.05	2.19 $\pm$ 0.15 (12) 0.70 $\pm$ 0.10	2.19 $\pm$ 0.28 (7) 0.73 $\pm$ 0.08*
Adrenal glands (mg)		74.6 $\pm$ 10.8 (10) 21.7 $\pm$ 3.1	79.6 $\pm$ 9.3 (12) 23.7 $\pm$ 3.5	75.2 $\pm$ 8.0 (12) 23.8 $\pm$ 3.0	85.5 $\pm$ 16.4 (7) 28.6 $\pm$ 5.7**

^{a)}: vehicle control, 0.5% CMC-Na (5 ml/kg)^{b)}: absolute weight^{c)}: relative weight (g or mg per 100g body weight)*: significant difference from control, $p < 0.05$ (by multiple comparisons)**: significant difference from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table 23

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening study in rats
Summary of histopathological findings in Fo females

Group	Control						20 mg/kg						100 mg/kg						500 mg/kg					
Grade	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Liver)	[13]						[13]						[13]						[13]					
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular,	[13]						[13]						[13]						[13]					
ground glass appearance	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	3	8	2	0	0**10##		5	0	8	0	0** 8##	
Fatty change, periportal	6	6	1	0	0	7	6	7	0	0	0	7	10	3	0	0	0	3	7	4	2	0	0	6
Microgranuloma	10	3	0	0	0	3	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0
Necrosis, focal	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1	11	2	0	0	0	2	13	0	0	0	0	0
Necrosis and hemorrhage,																								
caudate lobe	12	0	0	0	1	1	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0
Fibrosis, caudate lobe	12	0	0	1	0	1	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0
Hematopoiesis, extramedullary	12	0	0	1	0	1	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0
Fibrosis and cellular infiltration,																								
capsule	12	0	0	1	0	1	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0
(Kidney)	[13]						[13]						[13]						[13]					
Basophilic tubule, cortex	10	3	0	0	0	3	7	5	1	0	0	6	8	5	0	0	0	5	9	4	0	0	0	4
Degeneration, fatty,																								
proximal tubule	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	9	1	1	2	0	4#
Degeneration vacuolar,																								
proximal tubule	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1
Cellular infiltration,																								
lymphocyte, interstitium	13	0	0	0	0	0	12	0	1	0	0	1	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0
Cyst, tubule,																								
cortico-medullary junction	12	1	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	11	2	0	0	0	2
Mineralization,																								
cortex/papilla	13	0	0	0	0	0	11	2	0	0	0	2	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0
Fibrosis, focal	12	1	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0
Cellular infiltration,																								
neutrophil, lumen, papilla	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1
Cellular infiltration, neutrophil and lymphocyte,																								
lamina propria, pelvis	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1
(Spleen)	[13]						[13]						[13]						[13]					
Hematopoiesis, extramedullary	0	5	7	1	0	13	0	4	8	1	0	13	0	6	7	0	0	13	0	9	4	0	0	13
Deposit, pigment, brown	0	4	9	0	0	13	0	3	9	1	0	13	0	1	12	0	0	13	0	4	9	0	0	13
Atrophy, white pulp	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	8	1	2	2	0	5#
Atrophy, red pulp	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	8	1	4	0	0	5#
Granulation tissue, capsule	12	0	1	0	0	1	12	1	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0
Fibrosis, capsule	12	0	1	0	0	1	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0
(Heart)	[13]						[13]						[13]						[13]					
Fibrosis, epicardium	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	9	0	1	3	0	4#
Cellular infiltration,																								
epicardium	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	8	1	4	0	0	5#
Cellular infiltration,																								
subepicardial area	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	11	0	2	0	0	2
Deposit, pigment, brown,																								
epicardium	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	11	0	2	0	0	2

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade

[], Number of animals examined

**, Significantly different from control $p < 0.01$ (Two-tailed Mann-Whitney U test)

#, Significantly different from control $p < 0.05$ (One-tailed Fisher exact test)

##, Significantly different from control $p < 0.01$ (One-tailed Fisher exact test)

(continued)

Table 23(Continued)

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening study in rats

Summary of histopathological findings in Fo females

Group	Control						20 mg/kg						100 mg/kg						500 mg/kg					
Grade	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Thymus)	[13]						[13]						[13]						[13]					
Atrophy	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	7	1	1	3	1	6##
Fibrosis, capsule	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	0	1	0	0	1	10	1	2	0	0	3
Edema, capsule	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	0	1	0	0	1	9	0	3	1	0	4#
Exudate, with neutrophil, on capsule	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	0	1	0	0	1	10	2	0	1	0	3
Cellular infiltration, capsule	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	0	1	0	0	1	7	5	1	0	0	6##
Foreign body granuloma, on capsule	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	0	1	0	0	1	13	0	0	0	0	0
(Urinary bladder)	[13]						[13]						[13]						[13]					
Edema, lamina propria	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0	12	0	0	1	0	1
Cellular infiltration, lymphocyte, lamina propria	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1	12	0	1	0	0	1
Cellular infiltration, neutrophil, lamina propria	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	0	1	0	0	1
Mineralization, lamina propria	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1
(Brain)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Adrenal gland)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Bone marrow of femur)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Lung)	[0]						[0]						[2]						[8]					
Hemorrhage, focal													2	0	0	0	0	0	1	4	3	0	0	7
Edema													2	0	0	0	0	0	5	1	2	0	0	3
Cellular infiltration, macrophage													2	0	0	0	0	0	7	0	0	1	0	1
Cellular infiltration, neutrophil													2	0	0	0	0	0	5	1	2	0	0	3
Cellular infiltration, lymphocyte													2	0	0	0	0	0	6	0	2	0	0	2
Accumulation, foam cell													0	2	0	0	0	2	5	1	2	0	0	3
Fibrosis, pleura													0	0	1	1	0	2	5	0	1	2	0	3
Foreign body granuloma, on pleura													0	0	0	2	0	2	8	0	0	0	0	0
Exudate, with neutrophil, on pleura													2	0	0	0	0	0	5	0	1	2	0	3
Foreign body, in exudate													2	0	0	0	0	0	7	0	1	0	0	1
Cellular infiltration, pleura													0	0	1	1	0	2	6	1	0	1	0	2

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade

(continued)

[], Number of animals examined

#, Significantly different from control p<0.05 (One-tailed Fisher exact test)

##, Significantly different from control p<0.01 (One-tailed Fisher exact test)

Table 23(Continued)

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening study in rats
Summary of histopathological findings in Fo females

Group	Control						20 mg/kg						100 mg/kg						500 mg/kg					
Grade	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Esophagus)	[0]						[0]						[0]						[2]					
Perforation																			1 0 1 0 0 1					
Degeneration, mucosa and muscular layer																			1 0 1 0 0 1					
Cellular infiltration, neutrophil																			1 0 1 0 0 1					
Hemorrhage, subadventitia and in thoracic cavity																			1 0 0 1 0 1					
(Diaphragm)	[1]						[0]						[0]						[1]					
Granulation tissue, peritoneum	0 0 0 1 0 1																		1 0 0 0 0 0					
Fibrosis and hemorrhage, peritoneum	0 0 0 1 0 1																		1 0 0 0 0 0					
Exudate, with neutrophil, on pleura	1 0 0 0 0 0																		0 0 1 0 0 1					
Cellular infiltration, pleura	1 0 0 0 0 0																		0 0 1 0 0 1					
(Uterus)	[0]						[1]						[0]						[0]					
Rest, placenta, endometrium							0 0 1 0 0 1																	
(Skin)	[1]						[0]						[0]						[0]					
Decrease, hair follicle	0 0 1 0 0 1																							
(Forestomach)	[0]						[0]						[1]						[0]					
No remarkable change																								
(Glandular stomach)	[0]						[0]						[0]						[3]					
No remarkable change																								
(Pancreas)	[1]						[0]						[1]						[0]					
No remarkable change																								
(Thyroid gland)	[0]						[0]						[1]						[3]					
No remarkable change																								
(Pituitary gland)	[0]						[0]						[1]						[1]					
No remarkable change																								
(Eye ball)	[0]						[0]						[0]						[1]					
No remarkable change																								
(Ovary)	[3]						[0]						[1]						[1]					
No remarkable change																								

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade

[], Number of animals examined

Table 23-L

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening study in rats
Summary of histopathological findings in Fo females at the end of the dosing period

Group	Control						20 mg/kg						100 mg/kg						500 mg/kg					
Grade	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Liver)	[13]						[13]						[13]						[8]					
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular,	13						13						13						0					
ground glass appearance	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	3	8	2	0	0**10##		0	0	8	0	0**	8##
Fatty change, periportal	6	6	1	0	0	7	6	7	0	0	0	7	10	3	0	0	0	3	7	1	0	0	0	1
Microgranuloma	10	3	0	0	0	3	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1	8	0	0	0	0	0
Necrosis, focal	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1	11	2	0	0	0	2	8	0	0	0	0	0
Necrosis and hemorrhage,																								
caudate lobe	12	0	0	0	1	1	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0
Fibrosis, caudate lobe	12	0	0	1	0	1	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0
Hematopoiesis, extramedullary	12	0	0	1	0	1	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0
Fibrosis and cellular infiltration,																								
capsule	12	0	0	1	0	1	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0
(Kidney)	[13]						[13]						[13]						[8]					
Basophilic tubule, cortex	10	3	0	0	0	3	7	5	1	0	0	6	8	5	0	0	0	5	6	2	0	0	0	2
Degeneration, fatty,																								
proximal tubule	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	7	1	0	0	0	1
Degeneration, vacuolar,																								
proximal tubule	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	7	1	0	0	0	1
Cellular infiltration,																								
lymphocyte, interstitium	13	0	0	0	0	0	12	0	1	0	0	1	13	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0
Cyst, tubule,																								
cortico-medullary junction	12	1	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	6	2	0	0	0	2
Mineralization,																								
cortex/papilla	13	0	0	0	0	0	11	2	0	0	0	2	13	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0
Fibrosis, focal	12	1	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0
Cellular infiltration,																								
neutrophil, lumen, papilla	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	7	1	0	0	0	1
Cellular infiltration, neutrophil and lymphocyte,																								
lamina propria, pelvis	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	7	1	0	0	0	1
(Spleen)	[13]						[13]						[13]						[8]					
Hematopoiesis, extramedullary	0	5	7	1	0	13	0	4	8	1	0	13	0	6	7	0	0	13	0	4	4	0	0	8
Deposit, pigment, brown	0	4	9	0	0	13	0	3	9	1	0	13	0	1	12	0	0	13	0	1	7	0	0	8
Atrophy, white pulp	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	7	0	1	0	0	1
Atrophy, red pulp	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0
Granulation tissue, capsule	12	0	1	0	0	1	12	1	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0
Fibrosis, capsule	12	0	1	0	0	1	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0
(Heart)	[13]						[13]						[13]						[8]					
Fibrosis, epicardium	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	4	0	1	3	0	4#
Cellular infiltration,																								
epicardium	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	4	1	3	0	0	4#
Cellular infiltration,																								
subepicardial area	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0
Deposit, pigment, brown,																								
epicardium	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	7	0	1	0	0	1

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade

(continued)

[], Number of animals examined

**, Significantly different from control $p < 0.01$ (Two-tailed Mann-Whitney U test)

#, Significantly different from control $p < 0.05$ (One-tailed Fisher exact test)

##, Significantly different from control $p < 0.01$ (One-tailed Fisher exact test)

Table 23-L(Continued)

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening study in rats
Summary of histopathological findings in Fo females at the end of the dosing period

Group Grade	Control - ± + ++ +++ Pos.						20 mg/kg - ± + ++ +++ Pos.						100 mg/kg - ± + ++ +++ Pos.						500 mg/kg - ± + ++ +++ Pos.					
(Thymus)	[13]						[13]						[13]						[8]					
Atrophy	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	5	1	1	1	0	3#
Fibrosis, capsule	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	0	1	0	0	1	5	1	2	0	0	3#
Edema, capsule	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	0	1	0	0	1	7	0	1	0	0	1
Exudate, with neutrophil, on capsule	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	0	1	0	0	1	8	0	0	0	0	0
Cellular infiltration, capsule	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	0	1	0	0	1	5	3	0	0	0	3#
Foreign body granuloma, on capsule	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	0	1	0	0	1	8	0	0	0	0	0
(Urinary bladder)	[13]						[13]						[13]						[8]					
Edema, lamina propria	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0	7	0	0	1	0	1
Cellular infiltration, lymphocyte, lamina propria	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	0	7	0	1	0	0	1
Cellular infiltration, neutrophil, lamina propria	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	7	0	1	0	0	1
Mineralization, lamina propria	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	7	1	0	0	0	1
(Brain)	[13]						[0]						[0]						[8]					
No remarkable change																								
(Adrenal gland)	[13]						[0]						[0]						[8]					
No remarkable change																								
(Bone marrow of femur)	[13]						[0]						[0]						[8]					
No remarkable change																								
(Lung)	[0]						[0]						[2]						[3]					
Hemorrhage, focal													2	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	2
Edema													2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
Cellular infiltration, macrophage													2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
Cellular infiltration, neutrophil													2	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	1
Cellular infiltration, lymphocyte													2	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	1
Accumulation, foam cell													0	2	0	0	0	2	0	1	2	0	0	3
Fibrosis, pleura													0	0	1	1	0	2	0	0	1	2	0	3
Foreign body granuloma, on pleura													0	0	0	2	0	2	3	0	0	0	0	0
Exudate, with neutrophil, on pleura													2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
Foreign body, in exudate													2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
Cellular infiltration, pleura													0	0	1	1	0	2	3	0	0	0	0	0

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade

(continued)

[], Number of animals examined

#. Significantly different from control p<0.05 (One-tailed Fisher exact test)

Table 23-L(Continued)

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening study in rats

Summary of histopathological findings in Fo females at the end of the dosing period

Group Grade	Control						20 mg/kg						100 mg/kg						500 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Esophagus)	[0]						[0]						[0]						[0]					
Perforation																								
Degeneration, mucosa and muscular layer																								
Cellular infiltration, neutrophil																								
Hemorrhage, subadventitia and in thoracic cavity																								
(Diaphragm)	[1]						[0]						[0]						[0]					
Granulation tissue, peritoneum		0	0	0	1	0																		
Fibrosis and hemorrhage, peritoneum		0	0	0	1	0																		
Exudate, with neutrophil, on pleura		1	0	0	0	0																		
Cellular infiltration, pleura		1	0	0	0	0																		
(Uterus)	[0]						[1]						[0]						[0]					
Rest, placenta, endometrium							0	0	1	0	0	1												
(Skin)	[1]						[0]						[0]						[0]					
Decrease, hair follicle		0	0	1	0	0																		
(Forestomach)	[0]						[0]						[1]						[0]					
No remarkable change																								
(Glandular stomach)	[0]						[0]						[0]						[0]					
No remarkable change																								
(Pancreas)	[1]						[0]						[1]						[0]					
No remarkable change																								
(Thyroid gland)	[0]						[0]						[1]						[1]					
No remarkable change																								
(Pituitary gland)	[0]						[0]						[1]						[1]					
No remarkable change																								
(Eye ball)	[0]						[0]						[0]						[0]					
No remarkable change																								
(Ovary)	[3]						[0]						[1]						[1]					
No remarkable change																								

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade

[], Number of animals examined

Table 23-S/D

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening study in rats

Summary of histopathological findings in Fo females sacrificed in a moribund condition or died

Group	Control	20 mg/kg	100 mg/kg	500 mg/kg
Grade	- ± + ++ +++ Pos.	- ± + ++ +++ Pos.	- ± + ++ +++ Pos.	- ± + ++ +++ Pos.
(Liver)	[0]	[0]	[0]	[5]
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular, ground glass appearance				5 0 0 0 0 0
Fatty change, periportal				0 3 2 0 0 5
Microgranuloma				5 0 0 0 0 0
Necrosis, focal				5 0 0 0 0 0
Necrosis and hemorrhage, caudate lobe				5 0 0 0 0 0
Fibrosis, caudate lobe				5 0 0 0 0 0
Hematopoiesis, extramedullary				5 0 0 0 0 0
Fibrosis and cellular infiltration, capsule				5 0 0 0 0 0
(Kidney)	[0]	[0]	[0]	[5]
Basophilic tubule, cortex				3 2 0 0 0 2
Degeneration, fatty, proximal tubule				2 0 1 2 0 3
Degeneration, vacuolar, proximal tubule				5 0 0 0 0 0
Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium				5 0 0 0 0 0
Cyst, tubule, cortico-medullary junction				5 0 0 0 0 0
Mineralization, cortex/papilla				5 0 0 0 0 0
Fibrosis, focal				5 0 0 0 0 0
Cellular infiltration, neutrophil, lumen, papilla				5 0 0 0 0 0
Cellular infiltration, neutrophil and lymphocyte, lamina propria, pelvis				5 0 0 0 0 0
(Spleen)	[0]	[0]	[0]	[5]
Hematopoiesis, extramedullary				0 5 0 0 0 5
Deposit, pigment, brown				0 3 2 0 0 5
Atrophy, white pulp				1 1 1 2 0 4
Atrophy, red pulp				0 1 4 0 0 5
Granulation tissue, capsule				5 0 0 0 0 0
Fibrosis, capsule				5 0 0 0 0 0
(Heart)	[0]	[0]	[0]	[5]
Fibrosis, epicardium				5 0 0 0 0 0
Cellular infiltration, epicardium				4 0 1 0 0 1
Cellular infiltration, subepicardial area				3 0 2 0 0 2
Deposit, pigment, brown, epicardium				4 0 1 0 0 1

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade
[], Number of animals examined

(continued)

Table 23-S/D(Continued)

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening study in rats
Summary of histopathological findings in Fo females sacrificed in a moribund condition or died

Group	Control	20 mg/kg	100 mg/kg	500 mg/kg
Grade	- ± + ++ +++ Pos.	- ± + ++ +++ Pos.	- ± + ++ +++ Pos.	- ± + ++ +++ Pos.
(Thymus)	[0]	[0]	[0]	[5]
Atrophy				2 0 0 2 1 3
Fibrosis, capsule				5 0 0 0 0 0
Edema, capsule				2 0 2 1 0 3
Exudate, with neutrophil, on capsule				2 2 0 1 0 3
Cellular infiltration, capsule				2 2 1 0 0 3
Foreign body granuloma, on capsule				5 0 0 0 0 0
(Urinary bladder)	[0]	[0]	[0]	[5]
Edema, lamina propria				5 0 0 0 0 0
Cellular infiltration, lymphocyte, lamina propria				5 0 0 0 0 0
Cellular infiltration, neutrophil, lamina propria				5 0 0 0 0 0
Mineralization, lamina propria				5 0 0 0 0 0
(Brain)	[0]	[0]	[0]	[5]
No remarkable change				
(Adrenal gland)	[0]	[0]	[0]	[5]
No remarkable change				
(Bone marrow of femur)	[0]	[0]	[0]	[5]
No remarkable change				
(Lung)	[0]	[0]	[0]	[5]
Hemorrhage, focal				0 3 2 0 0 5
Edema				2 1 2 0 0 3
Cellular infiltration, macrophage				4 0 0 1 0 1
Cellular infiltration, neutrophil				3 1 1 0 0 2
Cellular infiltration, lymphocyte				4 0 1 0 0 1
Accumulation, foam cell				5 0 0 0 0 0
Fibrosis, pleura				5 0 0 0 0 0
Foreign body granuloma, on pleura				5 0 0 0 0 0
Exudate, with neutrophil, on pleura				2 0 1 2 0 3
Foreign body, in exudate				4 0 1 0 0 1
Cellular infiltration, pleura				3 1 0 1 0 2

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade
[], Number of animals examined

(continued)

Table 23-S/D(Continued)

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening study in rats

Summary of histopathological findings in Fo females sacrificed in a moribund condition or died

Group Grade	Control						20 mg/kg						100 mg/kg						500 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Esophagus)	[0]						[0]						[0]						[2]					
Perforation																			1	0	1	0	0	1
Degeneration, mucosa and muscular layer																			1	0	1	0	0	1
Cellular infiltration, neutrophil																			1	0	1	0	0	1
Hemorrhage, subadventitia and in thoracic cavity																			1	0	0	1	0	1
(Diaphragm)	[0]						[0]						[0]						[1]					
Granulation tissue, peritoneum																			1	0	0	0	0	0
Fibrosis and hemorrhage, peritoneum																			1	0	0	0	0	0
Exudate, with neutrophil, on pleura																			0	0	1	0	0	1
Cellular infiltration, pleura																			0	0	1	0	0	1
(Uterus)	[0]						[0]						[0]						[0]					
Rest, placenta, endometrium																								
(Skin)	[0]						[0]						[0]						[0]					
Decrease, hair follicle																								
(Forestomach)	[0]						[0]						[0]						[0]					
No remarkable change																								
(Glandular stomach)	[0]						[0]						[0]						[3]					
No remarkable change																								
(Pancreas)	[0]						[0]						[0]						[0]					
No remarkable change																								
(Thyroid gland)	[0]						[0]						[0]						[2]					
No remarkable change																								
(Pituitary gland)	[0]						[0]						[0]						[0]					
No remarkable change																								
(Eye ball)	[0]						[0]						[0]						[1]					
No remarkable change																								
(Ovary)	[0]						[0]						[0]						[0]					
No remarkable change																								

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade

[], Number of animals examined

Table 24

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Reproductive performance of F₀ animals

Compound	TSA				
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}	20	100	500 ^{b)}	500 ^{c)}
Number of mated pairs	13	13	13	8	5
Number of copulated pairs	13	13	13	8	5
Copulation index	100	100	100	100	100
Number of pregnant animals	10	13	12	7	5
Fertility index	76.9	100.0	92.3	87.5	100
Pairing days until copulation Mean $\pm$ S.D. (N)	2.5 $\pm$ 1.3(13)	2.9 $\pm$ 1.8(13)	2.7 $\pm$ 1.8(13)	3.0 $\pm$ 2.2(8)	2.0 $\pm$ 0.7(5)
Frequency of vaginal estrus Mean $\pm$ S.D. (N)	1.1 $\pm$ 0.3(13)	1.1 $\pm$ 0.3(13)	1.0 $\pm$ 0.0(13)	1.0 $\pm$ 0.0(8)	1.0 $\pm$ 0.0(5)

^{a)}: vehicle control, 0.5% CMC-Na (5 ml/kg)^{b)}: dosed males $\times$ dosed females^{c)}: dosed males $\times$ untreated femalesCopulation index = (number of copulated pairs / number of mated pairs) $\times$ 100, %Fertility index = (number of pregnant animals / number of copulated pairs) $\times$ 100, %

Table 25

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Development of F₁ pups up to day 4 of lactation; mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	TSA			
	0 a)	20	100	500
Number of pregnant females	10	12	12	7
Number of pregnant females with pups alive	10	12	12	7
Gestation index	100	100.0	100	100
Gestation length in days	22.6 $\pm$ 0.5 (10)	22.6 $\pm$ 0.5 (12)	22.6 $\pm$ 0.5 (12)	23.0 $\pm$ 0.0 (7)
Number of corpora lutea	16.7 $\pm$ 3.4 (10)	17.3 $\pm$ 1.1 (12)	17.8 $\pm$ 2.9 (12)	17.9 $\pm$ 4.4 (7)
Number of implantation sites	15.0 $\pm$ 2.7 (10)	15.0 $\pm$ 4.4 (13)	15.3 $\pm$ 2.9 (12)	15.6 $\pm$ 3.4 (7)
Implantation index	90.8 $\pm$ 10.5 (10)	93.4 $\pm$ 6.2 (12)	86.8 $\pm$ 12.4 (12)	87.7 $\pm$ 5.0 (7)
Day 0 of lactation				
Number of pups born	13.6 $\pm$ 2.1 (10)	13.7 $\pm$ 4.3 (13)	14.0 $\pm$ 3.3 (12)	12.4 $\pm$ 4.8 (7)
Delivery index	91.2 $\pm$ 7.9 (10)	84.9 $\pm$ 26.7 (13)	91.5 $\pm$ 13.0 (12)	78.4 $\pm$ 20.6 (7)
Number of live pups	13.5 $\pm$ 2.1 (10)	13.6 $\pm$ 4.3 (13)	13.9 $\pm$ 3.3 (12)	11.4 $\pm$ 4.0 (7)
Birth index	90.5 $\pm$ 7.9 (10)	84.5 $\pm$ 26.9 (13)	91.0 $\pm$ 13.0 (12)	73.0 $\pm$ 18.7 (7)
Live birth index	99.3 $\pm$ 2.1 (10)	99.4 $\pm$ 2.0 (12)	99.4 $\pm$ 1.9 (12)	93.8 $\pm$ 8.6 (7)
Sex ratio	44.4 $\pm$ 13.8 (10)	52.8 $\pm$ 16.2 (12)	49.8 $\pm$ 11.5 (12)	50.9 $\pm$ 17.6 (7)
Day 4 of lactation				
Number of live pups	13.3 $\pm$ 1.9 (10)	14.8 $\pm$ 1.4 (12)	13.5 $\pm$ 3.0 (12)	11.1 $\pm$ 3.8 (7)
Viability index	98.8 $\pm$ 4.0 (10)	100.0 $\pm$ 0.0 (12)	97.5 $\pm$ 4.0 (12)	97.6 $\pm$ 4.4 (7)
Sex ratio	45.1 $\pm$ 14.3 (10)	52.8 $\pm$ 16.2 (12)	49.4 $\pm$ 11.9 (12)	50.6 $\pm$ 17.8 (7)

a): vehicle control, 0.5% CMC-Na (5 ml/kg)

Gestation index = (number of pregnant females with live pups / number of pregnant females) $\times$ 100, %Implantation index = (number of implantation sites / number of corpora lutea) $\times$ 100, %Delivery index = (number of pups born / number of implantation sites) $\times$ 100, %Birth index = (number of live pups on day 0 / number of implantation sites) $\times$ 100, %Live birth index = (number of live pups on day 0 / number of pups born) $\times$ 100, %Sex ratio = (number of male live pups on day 0 / number of live pups on day 0) $\times$ 100, %Viability index = (number of live pups on day 4 / number of live pups on day 0) $\times$ 100, %Sex ratio = (number of male live pups on day 4 / number of live pups on day 4) $\times$ 100, %

Table 26

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Body weight of F₁ pups up to day 4 of lactation; mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	TSA			
	0 a)	20	100	500
Day 0 of lactation				
Number of live pups	13.5 $\pm$ 2.1 (10)	14.8 $\pm$ 1.4 (12)	13.9 $\pm$ 3.3 (12)	11.4 $\pm$ 4.0 (7)
Male	6.1 $\pm$ 2.3	7.9 $\pm$ 2.9	6.8 $\pm$ 1.7	6.1 $\pm$ 3.7
Female	7.4 $\pm$ 1.6	6.8 $\pm$ 2.0	7.1 $\pm$ 2.3	5.3 $\pm$ 2.1
Weight of pup (g)				
Male	7.4 $\pm$ 1.0 (10)	7.1 $\pm$ 0.7 (12)	6.8 $\pm$ 0.8 (12)	6.2 $\pm$ 0.7 * (7)
Female	7.0 $\pm$ 0.7 (10)	6.7 $\pm$ 0.7 (12)	6.4 $\pm$ 0.6 (12)	5.8 $\pm$ 0.7 ** (7)
Day 4 of lactation				
Number of live pups	13.3 $\pm$ 1.9 (10)	14.8 $\pm$ 1.4 (12)	13.5 $\pm$ 3.0 (12)	11.1 $\pm$ 3.8 (7)
Male	6.1 $\pm$ 2.3	7.9 $\pm$ 2.9	6.6 $\pm$ 1.6	6.0 $\pm$ 3.8
Female	7.2 $\pm$ 1.6	6.8 $\pm$ 2.0	6.9 $\pm$ 2.2	5.1 $\pm$ 2.0
Weight of pup (g)				
Male	12.0 $\pm$ 1.3 (10)	11.5 $\pm$ 0.9 (12)	11.0 $\pm$ 1.5 (12)	9.4 $\pm$ 2.4 * (7)
Female	11.6 $\pm$ 1.1 (10)	10.9 $\pm$ 1.0 (12)	10.4 $\pm$ 1.4 (12)	8.7 $\pm$ 2.4 ** (7)

a): vehicle control, 0.5% CMC-Na (5 ml/kg)

* : significant difference from control, $p < 0.05$ (by multiple comparisons)** : significant difference from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table 27

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of morphological findings in F₁ pups on day 4 of lactation

Compound Dose group (mg/kg)	TSA			
	0 ^{a)}	20	100	500
Number of pups examined				
External observation	133	177	162	78
Visceral observation	133	177	162	78
Number of pups showing abnormalities				
External malformations	0	0	0	0
Visceral malformations	0	0	0	0

^{a)}: vehicle control, 0.5% CMC-Na (5 ml/kg)

Table 28

TSA: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of morphological findings in F₁ dead pups

Compound Dose group (mg/kg)	TSA			
	0 ^{a)}	20	100	500
No. of dead pups examined				
<u>External observation</u>	2	0	3	7
<u>Visceral observation</u>	2	0	3	7
No. of dead pups showing abnormalities				
<u>External abnormalities</u>	0	0	0	0
<u>Visceral abnormalities</u>				
Major abnormalities	0	0	0	0
Minor abnormalities	0	0	0	0

^{a)}: vehicle control: 0.5% CMC-Na (5 ml/kg)