6-tert-ブチル-m-クレゾール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

緒　言 …… 3

試験材料および方法 …… 4

1．被験物質 …… 4

2．使用動物および飼育条件 …… 4

3．群分けおよび個体識別 …… 5

4．投与量、群構成、投与期間および投与方法 …… 5

5．観察方法 …… 6

6．統計解析 …… 10

結　果 …… 11

Ⅰ．反復投与毒性（親動物所見） …… 11

1．一般状態 …… 11

2．体重 …… 11

3．摂餌量 …… 11

4．尿検査 …… 12

5．解剖時検査所見 …… 12

Ⅱ．生殖発生毒性 …… 15

1．生殖関連所見 …… 15

2．出生児所見 …… 16

考　察 …… 18

文　献 …… 20

Figures　(Figure 1 ～Figure 4)

Tables　(Table 1～Table 28)

【要　　約】

OECD既存化学物質安全性スクリーニング試験の一環として、6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾール(以下BP) の反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行った。すなわち、BP の0(媒体)、2.5、12.5 および 60 mg/kg を Sprague-Dawley 系 (Crj:CD(SD)IGS)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、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、親動物に対する反復投与毒性および生殖能力ならびに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

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)

死亡動物は、対照群を含むいずれの投与群においても認められなかった。

60 mg/kg のBP投与により、雌では、体重の増加抑制および摂餌量の減少が認められた。また、雌では、肝臓重量の増加が認められた。病理組織学検査の結果、雌雄ともに、小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。さらに、腎臓重量の増加が雌雄ともに認められたが、病理組織学検査ではBP投与の影響と考えられる変化は認められず、雄で実施した尿検査の結果にも異常はなかった。12.5 mg/kg 以下のBP投与では、器官重量、病理組織学検査結果にBP投与の影響と考えられる変化は認められなかった。

雌雄の一般状態、雄の体重推移および摂餌量、雄について実施した血液学検査および血液生化学検査には、BP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

雌雄動物の交尾率、受胎率、分娩および哺育状態には、BP投与の影響は認められなかった。60 mg/kg のBP投与により、妊娠黄体数および着床数の減少傾向が認められた。

2．産児所見

60 mg/kg のBP投与により、生児産児数が減少し、分娩率および生児出生率が減少する傾向がみられ、さらに、産児体重が低値を示した。しかし、産児の性比および形態に、BP投与の影響は認められなかった。

Ⅲ. 評価

以上の試験成績から、本試験条件下では、BP の反復投与毒性に関する無影響量は、雌雄ともに 12.5 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は、雄に対しては 60 mg/kg/day、雌に対しては 12.5 mg/kg/day、産児に対しては 12.5 mg/kg/day であると判断される。

【緒　　言】

6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾール（以下、BP）は、ヒトおよび動物の食物、石鹸、動・植物油あるいはガソリンなどに、抗酸化剤として広く使用されているブチレートハイドロキシトルエン（別名アントラシン）の類似化学物質である[1]。

BPについては、マウスの経口投与によるLD_{50}値は 1080 mg/kg 以上であることが知られている[2]が、反復投与毒性および生殖発生毒性については明らかにされていない。そこで今回、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BPの反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験（以下、併合試験）を行い、同化合物の雌雄ラットに及ぼ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

6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾール（以下、BP）〔CAS No.：88-60-8、分子式：$C_{11}H_{16}O$、分子量：164.24、英名：6-*tert*-butyl-*m*-cresol 、融点:21.3 ℃、沸点:244℃(101.3kPa)、蒸気圧：1.80 kPa(120℃)〕は、淡黄色の液体である。併合試験に使用したBP〔Lot No.：　　純度：99.23 wt%〕(Annex 1) は、使用時まで室温保管した。

被験物質は、コーン油〔ナカライテスク㈱、Lot No.:V7R2020〕にて溶解し、いずれの用量においても1回の投与液量が2 mL/kg 体重になるように濃度を調整した。調製検体は、室温、遮光の条件下で保管し、調製後7日以内に投与した。なお、0.1 および20% (w/v) の濃度の調製液については、室温、遮光条件下で少なくとも8日間安定であることが、併合試験に先立って実施された「6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾールのラットを用いる単回投与毒性試験」において確認されており (Annex 2)、本試験中に調製した投与検体(0.125、0.625、3%) には、所定濃度のBPが含有されていたことを確認した(Annex 3)。

2．使用動物および飼育条件

試験には、雌雄とも7週齢にて購入（入荷日、雌雄ともに1997年1月28日）した日本チャールス・リバー㈱厚木飼育センター生産の Sprague-Dawley 系ラット (Crj:CD (SD)IGS、SPF)を使用した。購入した動物は、入荷後1週間、馴化と検疫を兼ねて予備飼育し、試験に供した。なお、動物の入荷、検疫ならびに群分け時の体重範囲を Annex 4 に示した。

各動物は、基準温度24± 1 ℃および湿度50～65%、換気回数約15回／時、照明12時間（午前7時～午後7時）に制御された飼育室で、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（CE-2、日本クレア㈱）および水道水(秦野市水道局給水）を自由に摂取させた。妊娠14日（交尾確認日＝妊娠0日）以後の雌動物については、ラット用繁殖ケージ（350 ×400 ×180mm ）に収容し、床敷として紙パルプ製チップ(ALPHA-dri、加商㈱）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、23.0～25.5℃、43.0～61.5%と許容範囲であり、供給した飼料、飲料水および床敷には試験に支障を来す可能性のある混入物は認められなかった。

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より群分けし、各群とも雌雄各13匹を配した。

群分け後、これらのすべての雌雄には、油性フェルトペンを用いて尾に個体識別番号を示す番号を記入した。また、個体識別を容易にする目的で、群毎に色の異なるカードを各飼育ケージに掛け、これに試験計画番号および個体識別番号を記入した。なお、産児については、個体の識別を行わなかった。

4．投与量、群構成、投与期間および投与方法

BPの投与量は、予備試験の結果を参考に設定した。予備試験では、BPの０（コーン油）、30、60、120 mg/kg を雌雄ラット(Crj:CD(SD)IGS) に、１日１回、14日間強制的に連続経口投与した。その結果、120 mg/kg の投与により、雌雄で投与期間初期に軟便が観察された。また、投与後に自発運動量の減少および呼吸数の減少が、投与期間中観察された。摂餌量にBP投与の影響は認められなかったが、120 mg/kg の投与により、雌雄とも、体重の増加抑制が認められた。雌では、60 mg/kg の投与においても、自発運動量の減少、体重の増加抑制が認められた。尿検査の結果、雌では30 mg/kg 以上のBP投与により、蛋白濃度の減少傾向およびケトン体の増加傾向がみられた。血液学検査にはBP投与の影響は認められなかったが、血液生化学検査の結果、雌では60 mg/kg 以上の投与により、総蛋白濃度、アルブミン濃度、総コレステロール濃度が減少し、尿素窒素濃度の減少傾向さらにアルカリフォスファターゼ活性およびGOT活性の増加傾向が認められた。雄では、120 mg/kg の投与により、総コレステロール濃度の減少傾向がみられた。また、60 mg/kg 以上の投与により、雌では胸腺重量の減少、肝臓および腎臓重量の増加がみられ、雄では120 mg/kg 投与により、肝臓および腎臓重量の増加傾向がみられた。剖検では、肝臓の黄色あるいは淡色化、小葉構造が明瞭化した動物が全てのBP投与群の雌雄でみられ、さらに雌では、60 mg/kg 以上の投与により、肝臓の腫大がみられた。胸腺の萎縮が、雌では60 mg/kg の投与により、雄では60 mg/kg 以上の投与により観察された。また、前胃粘膜の水腫が、雌では60 mg/kg 以上の投与により、雄では120 mg/kg 投与でみられた。

以上の成績から、14回の反復投与により、一般状態、体重、血液生化学検査、器官重量および内部器官にBP投与の影響が明瞭に認められた60 mg/kg を本試験の高用量に設定し、

以下、公比５で減じて中用量には12.5 mg/kg を、低用量には2.5 mg/kg を設定した。

なお、対照群にはコーン油をBP投与群と同一条件にて投与した。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（コーン油）	0	13 (MX01001 ～MX01013)	13 (FB01001～FB01013)
2	BP	2.5	13 (MX02001 ～MX02013)	13 (FB02001～FB02013)
3	BP	12.5	13 (MX03001 ～MX03013)	13 (FB03001～FB03013)
4	BP	60	13 (MX04001 ～MX04013)	13 (FB04001～FB04013)

各用量の投与検体は、雄に対しては交配前２週間と交配期間（２週間）および交配期間終了後２週間（剖検日前日までの連続42日間）、また、雌に対しては交配前２週間と最長２週間の交配期間中（交尾成立まで）、ならびに交尾成立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、交尾はしたが分娩しなかった雌では剖検日前日（妊娠24日相当日）まで、毎日１回、ラット用胃管を用いて経口投与した（投与開始日、雌雄ともに1997年２月４日）。毎日の投与は午前９時から12時の間に行い、各動物の投与液量（２mL/kg 体重）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回測定した体重をもとに、また、交尾後の雌については妊娠０日の体重をもと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。

B.体重測定

雄は全例について、投与１、８、15、22、29、36、42日および解剖日に、雌は全例について、投与１、８、15日に測定し、投与22日までに交尾しなかった雌は、投与22日にも体重を測定した。また、交尾雌では、妊娠０、７、14、20日に、分娩した雌では哺育０および４日（解剖日）に体重を測定した。交尾は確認されたが分娩しなかった雌は、妊娠25日相当日（解剖日）に体重を測定した。

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週間の交配期間中の餌重量は測定しなかった。交尾雌では、

妊娠０～7、7～14、14～20日に、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、解剖日前日に動物を代謝ケージに収容し、約４時間尿を採取して、pH、潜血、蛋白質、糖、ウロビリノーゲン、ケトン体、ビリルビンについて試験紙法（クリニテック 200＋、バイエル・三共）により尿検査を実施した。

E.交配

交配は、投与15日の夕方から最長２週間、同群内の雌雄を１対１で同居させて行った。交尾の確認は、毎朝、腟栓および腟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。交配の結果から、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]、同居開始から交尾までに要した日数およびその間に回帰した発情期の回数を求めた。

F.分娩および哺育状態の観察

各群とも交尾雌は、全例を自然分娩させた。分娩状態が直接観察できた動物についてはその状態を観察し、直接観察できなかった動物についても、分娩後の徴候から分娩困難や遅延などの分娩障害の有無を判断して記録した。分娩後は哺育状態を毎日観察した。

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終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時を過ぎてから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

イ．血液学検査

全例について、42回投与後に18～24時間絶食させ、剖検に先立ちペントバルビタールナトリウム麻酔下で腹部後大静脈より、抗凝固剤としてEDTA-2K を用いて採血し、以下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 (ｺｰﾙﾀｰｴﾚｸﾄﾛﾆｸｽ)
白血球数 (WBC)	〃 (〃)	〃
血小板数	〃 (〃)	〃
血色素量 (Hb)	〃 (吸光度法)	〃
平均赤血球容積 (MCV)	〃 (電気抵抗法)	〃
ヘマトクリット値 (Ht)	計算 (RBC×MCV×0.001)	
平均赤血球血色素量(MCH)	〃 (Hb×1000／RBC)	
平均赤血球血色素濃度(MCHC)	〃 (Hb×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

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、腹部後大静脈より抗凝固剤としてヘパリンを用いて採血し、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	〃
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Gℓ.DH 法	〃
クレアチニン濃度	Jaffé 法	〃
ｱﾙｶﾘﾌｫｽﾌｧﾀｰｾ活性(ALP)	GSCC法	〃
GOT活性	IFCC 法	〃
GPT活性	〃 法	〃
γ－GTP活性	γ-ｸﾞﾙﾀﾐﾙ-3-ｶﾙﾎﾞｷｼ-4-ﾆﾄﾛｱﾆﾘﾄﾞ基質法	〃
トリグリセライド濃度	GPO・DAOS法	〃
無機リン濃度(Inorg.phos.)	モリブデン酸直接法	〃
総ビリルビン濃度	Jendrassik/Grof 法	〃
カルシウム濃度	OCPC法	〃
A/G比	計算	
ナトリウム濃度	イオン電極法	全自動電解質分析装置 EA05 (A&T)
カリウム濃度	〃	〃
塩素濃度	〃	〃

ハ. 病理学検査

採血後、全例について剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行った。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。精巣および精巣上体はブアン液に固定して保存し、残りの重量測定済み器官および膀胱ならびに剖検時に病変が認められた器官 (肺、脱毛部位) は、10%ホルマリン液に固定して保存した。これらの器官は、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、高用量群および対照群について病理組織学検査

を実施した。

病理組織学検査の結果、高用量群で異常が認められた肝臓は、他の投与群についても病理組織学検査を行った。なお、剖検時に病変が認められた皮膚（脱毛部）および肺については、いずれも発現例数ならびに発現頻度にBPの投与量に依存した傾向がみられなかったことから、BP投与の影響ではないと判断し、病理組織学検査を実施しなかった。

b）雌動物

分娩した動物は哺育4日に、交尾は確認されたが分娩しなかった動物は妊娠25日相当日に、それぞれ、ペントバルビタール麻酔下で放血・致死させて剖検した。その際、卵巣および子宮を摘出し、卵巣は実体顕微鏡下で妊娠黄体数を数えた後、ブアン液に保存した。子宮については着床数を数え、着床率[(着床数／妊娠黄体数)×100]を算出した。また、脳、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓および副腎の重量を測定し、併せて比体重値（相対重量）を算出した。重量測定済み器官および膀胱、子宮ならびに剖検時に異常が認められた器官(肺、脱毛部位）は、10%ホルマリン液に固定して保存した。これらの器官（卵巣および子宮を除く）は、常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリンーエオジン染色を行い、高用量群および対照群について病理組織学検査を行った。不妊例の卵巣についても病理組織学検査を実施した。

病理組織学検査の結果、高用量群で異常が認められた肝臓、副腎および脾臓は、他の投与群についても病理組織学検査を行った。剖検時に病変が認められた皮膚（脱毛部）および肺については、いずれも発現例数ならびに発現頻度にBPの投与量に依存した傾向がみられなかったことから、BP投与による影響ではないと判断し、病理組織学検査を実施しなかった。

2）F_1 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[(出産生児数／着床痕数)×100] を求めた。産児については、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/ 出産生児数)×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[(出産生児数／産児数)×100] および新生児生存率[(哺育4日の生児数／哺育0日の生児数)×100] を求めた。死亡児は剖検した。

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日に全例を剖検した。外表奇形が認められた産児は、10%ホルマリン液に保存した。

6．統計解析

交尾率、受胎率および出生児の形態異常出現頻度については Yates の補正を含むχ^2検定を行った。病理組織所見については、グレード分けしたデータは Mann-Whitney のU検定[3,4]を、陽性グレードの合計値は Fisher 直接確率の片側検定[4]を行った。その他のデータ（尿検査を除く）は、個体ごとに得られた値あるいは一腹ごとの平均値を1標本として、先ず Bartlett 法[5]により各群の分散の一様性について検定した。その結果、分散が一様とされた場合には、一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性が認められた場合には、各群の匹数が同一であれば Dunnett 法[6]を用い、同一でない場合は Scheffé法[7]を用いて対照群とBP各投与群との平均値の差の検定を行った。分散が一様でなかった場合、または分散が0となる群が存在した場合は、Kruskal-Wallis 順位検定[8]を行い、群間に有意性が認められた場合に、対照群とBP各投与群との差について Dunnett 法あるいは Scheffé 法の検定を行った。なお、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（Tables 1、2；Appendices 1-1～2-4）

雌雄ともに、いずれの投与群においても死亡あるいは瀕死動物は認められなかった。

両前肢または臀部の脱毛が、60 mg/kg 投与群の雄1例、雌2例に、投与開始4週以降、剖検時までみられた。

2．体重

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

雄の体重推移には、対照群とBP各投与群との間に有意差は認められなかった。

2）雌（Figure 2; Tables 5～10；Apendices 5-1～10-4）

a)交配前

60 mg/kg の投与群では、体重の増加抑制傾向が認められたが、12.5 および2.5 mg/kg 投与群の体重は、対照群と同様に推移した。

b)妊娠期

実測値では、60 mg/kg 投与群の妊娠14日の体重が、対照群と比較して有意($p<0.01$) に減少し、増加量も低値で推移した。12.5 mg/kg 以下の投与群の体重は、対照群と同様に推移した。

c)哺育期

60 mg/kg 投与群の哺育4日の体重および哺育0～4日の増加量が、対照群と比較して有意（$p<0.01$）に減少した。

3．摂餌量

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

投与期間中の摂餌量には、対照群とBP各投与群との間に有意差は認められなかった。

2）雌（Figure 4; Tables 12～14；Appendices 12-1～14-4）

交配前および妊娠期の摂餌量には、対照群とBP各投与群との間に有意差は認められなか

ったが、哺育期の摂餌量は、60 mg/kg 投与群で有意 ($p<0.01$) に減少した。

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

雄について実施した尿検査の結果では、いずれの検査項目についても、BP投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。

5．解剖時検査所見

A）雄

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

いずれの検査項目についても、BP投与に起因したと考えられる変化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)

いずれの検査項目についても、BP投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。

(3) 剖検所見 (Table 18; Appendix 18)

肺では、肺と胸壁との癒着が、対照群に1例、暗色点あるいは暗色領域が対照群に2例、2.5 mg/ kg および60 mg/kg 投与群に各1例みられた。

心臓では、左室心外膜下に白濁線条が、60 mg/kg 投与群に1例みられた。

肝臓では、腫大が、60 mg/kg 投与群の2例に、黄色化が、対照群の1例、2.5 mg/kg 投与群の1例、12.5 mg/kg 投与群の1例および60 mg/kg 投与群の5例に、小葉の明瞭化が、12.5 mg/kg 投与群の1例および60 mg/kg 投与群の2例にみられた。

腎臓では、腎盂の拡張が、対照群および2.5 mg/kg 投与群の各1例に、腫大および皮質表面に陥凹部が、60 mg/kg 投与群の各1例にみられた。

その他、副脾が対照群の1例、胸腺の暗色領域が対照群の1例、胸腺の小型化が60 mg/kg の1例、膀胱内に白色固型物が2.5 および12.5 mg/kg 投与群に各1例、両前肢の脱毛が60 mg/kg 投与群のI例にみられた。

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

60 mg/kg 投与群の腎臓重量が、対照群と比較して有意($p<0.05$) に増加した。脳、心臓、肝臓、脾臓、胸腺、副腎、精巣および精巣上体の重量および比体重値には、対照群

とBP各投与群との間に有意差は認められなかった。

(5) 病理組織学検査所見 (Table 20; Appendix 20)

各器官の観察所見を以下に示す。

(心臓)

心筋変性あるいは線維化が、対照群の3例および60 mg/kg 投与群の7例にみられたが、両群間に発現頻度および程度の差はなかった。

(肝臓)

小葉中心性の肝細胞肥大が、60 mg/kg 投与群の5例にみられ、細胞質は好酸性を呈していた。60 mg/kg 投与群における肝細胞肥大の発現頻度は有意($p<0.05$)に増加した。

その他、限局性壊死あるいは限局性の線維化がみられたほか、門脈周囲性の脂肪化が、対照群を含む各BP投与群にみられたが、各群間に発現頻度および程度の差は認められなかった。

(胸腺)

ごく軽度な出血が、対照群および60 mg/kg投与群に各1例みられたが、その程度に差はなかった。

(腎臓)

皮質に好塩基性尿細管が、対照群に9例、60 mg/kg 投与群に11例みられたが、両群間に程度の差は認められなかった。

その他、対照群に腎盂拡張、eosinophilic body がそれぞれ1例に、60 mg/kg 投予群に嚢胞が2例、限局性の線維化が1例みられた。しかし、いずれの変化も、発現頻度および程度には両群間に差はなかった。

(脾臓)

褐色色素沈着および髄外造血が、対照群および60 mg/kg 投与群の全例にみられたが、両群間に頻度および程度の差は認められなかった。

(その他)

脳、副腎、膀胱、精巣および精巣上体に異常はみられなかった。

B) 雌

(1) 剖検所見 (Table 21; Appendix 21)

肺では、暗色点あるいは暗色領域が、対照群の2例、2.5 mg/kg 投与群の1例、12.5 mg/kg 投与群の2例にみられ、また、表面の顆粒状化が12.5 mg/kg 投与群の1例にみられた。

肝臓では、 60 mg/kg 投与群で、腫大が5例に、淡色化が3例にみられた。また、横隔膜結節が 60 mg/kg 投与群に1例、微細白色点点在が対照群の1例にみられた。

腎臓では、淡色化が、12.5 mg/kg 投与群の1例、60 mg/kg 投与群の5例に、腎盂拡張が60 mg/kg 投与群の1例にみられた。

脾臓では、被膜と卵巣周囲の脂肪の癒着およびその部位の陥凹が、対照群の1例で、副脾が、対照群および2.5 mg/kg 投与群で各1例みられた。

胸腺の小型化が、対照群の4例、2.5 mg/kg 投与群の3例、12.5 mg/kg 投与群の4例および60 mg/kg 投与群の4例にみられたが、発現頻度および程度には各群間に差は認められなかった。また、暗色点が、60 mg/kg 投与群の1例、暗色領域が、2.5 mg/kg 投与群の1例にみられた。

その他、臀部の脱毛が、60 mg/kg 投与群の2例にみられた。

(2) 器官重量(Table 22; Appendices 22-1 ～22-4)

60 mg/kg 投与群の心臓および脾臓の重量が対照群と比較して有意($p<0.01$)に減少し、脳、肝臓および腎臓の比体重値が有意($p<0.01$)に増加した。副腎重量が、2.5 mg/kg 投与群で有意($p<0.05$)に増加したが、用量依存的な変化ではなかった。

(3) 病理組織学的所見 (Table 23; Appendix 23)

各器官の観察所見を以下に示す。

(肝臓)

小葉中心性の肝細胞肥大が、60 mg/kg 投与群の10例にみられ、細胞質は好酸性を示していた。60 mg/kg 投与群における肝細胞肥大の発現頻度および程度は、有意($p<0.01$)に増強した。その他、限局性の壊死あるいは限局性の線維化がみられたほか、全例に門脈周囲性の脂肪化がみられたが、発現頻度および程度には対照群と各BP投与群との間に差は認められなかった。

(胸腺)

萎縮が、対照群の4例および60 mg/kg 投与群の7例にみられたが、両群間に明らかな差はなかった。また、ごく軽度な出血が、60 mg/kg 投与群の1例にみられた。

(腎臓)

皮質に好塩基性の尿細管が、対照群の7例および60 mg/kg 投与群の3例にみられたが、発現頻度および程度には両群間に差はなかった。

その他、近位尿細管の空胞変性が対照群の1例に、近位尿細管の脂肪変性が対照群の3例、60 mg/kg の5例に認められた。また、皮髄境界部の鉱質沈着、腎盂拡張が60 mg/kg 投与群に各1例みられた。

(副腎)

束状帯に脂肪滴の増加が、2.5 mg/kg 投与群の1例および60 mg/kg 投与群の2例にみられた。中程度(＋＋)を示した2.5 mg/kg 投与群および60 mg/kg 投与群の各1例(動物番号：FB02003 およびFB04007)は、いずれも全産児死亡動物であった。

その他、皮質の限局性壊死(片側)が、12.5 mg/kg および60 mg/kg 投与群の各1例にみられた。

(脾臓)

褐色色素沈着および髄外造血が、対照群を含む各BP投与群の全例にみられたが、60 mg/kg 投与群では、髄外造血の程度は有意($p<0.01$)に低下した。また、被膜に炎症が対照群の1例にみられた。

(その他)

脳、心臓、膀胱および不妊例の卵巣には、異常はみられなかった。

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)

全ての動物が交尾した。交尾はしたが不妊であった動物が、対照群に1組(動物番号：MX01001×FB01001)、60 mg/kg 投与群に1組(動物番号：MX04002×FB04002)認められた。しかし、受胎率、同居から交尾までに要した日数およびその間の発情回数には、対照群とBP各投与群との間に有意差は認められなかった。

2）分娩および哺育状態

2.5 mg/kg 投与群の1例（動物番号：FB02003)は、分娩日に産児の回集、哺乳が認められず、下腹の汚れが認められた。産児の体表温も低下していた。この動物は、翌日以降も哺育行動を示さず、哺育2日までに全産児が死亡した。12.5 mg/kg 投与群の1例（動物番号：FB03011)は、妊娠25日に産児1例を出産したが、分娩確認時には産児はすでに死亡していた。また、60 mg/kg 投与群の1例（動物番号：FB04007)は、分娩日に異常は認められなかったが、翌日、全産児が死亡した。

その他の動物には、分娩および哺育状態の異常は観察されなった。

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

12.5 mg/kg 投与群の1例（動物番号：FB03011)が妊娠25日に（既述）、60 mg/kg 投与群の1例（動物番号：FB04009)が妊娠24日に出産した。しかし、妊娠24日に分娩した動物の分娩状態に異常はみられなかった。他の動物は、妊娠22～23日に出産した。出産率および妊娠期間には対照群とBP各投与群と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は、対照群とBP各投与群との間に統計学的有意差は認められなかったが、60 mg/kg 投与群の妊娠黄体数および着床数は減少する傾向を示した。

2．出生児所見

1）生存性（Table 25; Appendices 25-1～25-4)

分娩率、生児出産率および性比には、対照群とBP各投与群との間に統計学的有意差は認められなかったが、60 mg/kg 投与群の分娩率および生児出産率は減少する傾向を示した。

死亡児は、対照群を含む各投与群に認められたが（対照群：4例、2.5 mg/kg 投与群：18例、12.5 mg/kg 投与群：6例、60 mg/kg 投与群：20例）、死亡時期および死亡児数に特定の傾向は認められなかった。60 mg/kg 投与群の生存産児数が対照群と比較して有意($p<0.05$)に減少し、出生率も減少傾向を示した。さらに、生後4日の生存児数が、対照群と比較して有意($p<0.05$)に減少した。しかし、新生児生存率には、対照群と各BP投与群との間に有意差は認められなかった。

2）体重 (Table 26; Appendices 26-1～26-4)

60 mg/kg 投与群の哺育0および4日の体重が、雌雄とも、有意($p<0.05$、$p<0.01$) に減少した。12.5 mg/kg 以下の投与群では、雌雄ともに、対照群と同様な体重推移を示した。

3）形態 (Table 27)

2.5 mg/kg 投与群の雌産児1例 (母動物番号：FB02007)に尾位置異常および左後肢短肢が認められた。この産児は剖検時まで生存した。その他の産児には、外表奇形は認められず、哺育4日の剖検においても内部器官に異常は認められなかった。

また、死亡児の剖検でも異常は観察されなかった。

【考　　察】

一般状態の変化として、脱毛が雌雄ともに認められたが、発現例数が少ないこと、およびIGSラットでは自然発生的に認められる部位であったことから、被験物質の影響ではないと判断した。

雄では体重および摂餌量にBP投与の影響は認められなかったが、雌では 60 mg/kg のBP投与により、体重の増加抑制および摂餌量の減少が認められた。

雌の肝臓の比体重値が、60 mg/kg のBP投与により増加した。雄では肝臓重量にBP投与の影響は認められなかったが、病理学検査では雌雄とも肝臓が腫大し、細胞質の好酸性化を伴った小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。BPの類似化学物質であるブチレートハイドロキシトルエンは肝毒性を有していること[9]、ラットではBP投与により薬物代謝酵素誘導を伴わず肝臓重量が増加すること[9]、さらに本試験に先立って実施した予備試験では雌の 60 mg/kg 以上の投与により血漿中のGOT活性、アルカリフォスファターゼ活性の上昇が認められていることから、本試験で認められた肝細胞の肥大は、BP投与に起因した肝毒性を示唆する変化と考えられる。同群では腎臓重量が増加したが、病理組織学検査では腎臓にBP投与の影響と考えられる形態学的な変化はみられず、雄で実施した尿検査の結果からも、腎機能障害を示唆する所見は認められなかった。雌の 2.5 mg/kg 投与群の1例および 60 mg/kg 投与群の2例で、副腎束状帯に脂肪滴の増加がみられた。この脂肪滴の増加が中程度であった2例は、いずれも全産児死亡動物であり哺育状態が不良であったことから、ストレスによる糖質コルチコイドの分泌の増加を示唆する所見と考えられた。また、雌では 60 mg/kg のBP投与により、脾臓の髄外造血の程度の減弱がみられたが、脾臓重量および血液検査にBP投与の影響はみられず、BP投与との関連は明らかにされなかった。

血液生化学検査結果には、BP投与の影響を示唆する変化は認められなかった。

以上の結果から、雄の一般毒性学的無影響量は、60 mg/kg の反復BP投与により肝毒性が認められたことから 12.5 mg/kg/day 、雌の一般毒性学的無影響量は、60 mg/kg のBPの反復投与により、体重の増加抑制および肝毒性が認められたことから、12.5 mg/kg/dayと考えられた。

雌雄動物の交尾率、受胎率および出産率には、BP投与の影響は認められなかった。12.5 mg/kg 投与群の1例および 60 mg/kg 投与群の1例が、それぞれ、妊娠25日および24日に

出産した。12.5 mg/kg 投与群の1例については、産児1匹（着床数：1）に起因した分娩遅延と考えられた。 60 mg/kg 投与群の1例については、分娩率が40%（産児6匹、着床数：15）と低値を示したが、分娩状態および生後4日までの産児の生存性は良好であったこと、他の動物は全て妊娠22～23日に正常に分娩していることから、この2例にみられた分娩遅延はBP投与の影響ではないと判断した。哺育状態にはBP投与の影響は認められなかった。また、60 mg/kg のBP投与により妊娠黄体数が減少傾向を示したことから、排卵障害が疑われ、さらに、生児出産率が 60 mg/kg のBP投与により減少し、胚の子宮内致死作用が示唆された。外表奇形を示した産児が、2.5 mg/kg 投与群の1匹で認められたが、他の投与群の産児に外表奇形が認められていないことから自然発生奇形と考えられ、BPに催奇形作用はないと判断した。また、同群では産児の発育抑制がみられたが、産児の生存性、性比には、BP投与の影響は見られなかった。

これらのことから、雄の生殖発生毒性学的な無影響量は 60 mg/kg/day、雌の生殖発生毒性学的な無影響量は、60 mg/kg のBP投与により排卵障害が示唆されたことから、12.5 mg/kg/day、また、産児の生殖発生毒性学的な無影響量は、60 mg/kg のBP投与により発育抑制がみられたことから、12.5 mg/kg/day と考えられた。

以上の試験成績から、本試験条件下では、BPの反復投与毒性に関する無影響量は、雌雄ともに 12.5 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は、雄に対しては 60 mg/kg/day、雌に対しては 12.5 mg/kg/day、産児に対しては 12.5 mg/kg/day であると判断される。

【文　　献】

1) The Merck Index. eleventh edition., Susan Budavari et al.(ed) Merck & Co., Inc. Rahway, N.J., U.S.A., : 1547 (1989)

2) Mcomie, W.A., Hamilton, H., Anderson and Estess, F.M. : Comparative toxicity of certain t-butyl substituted cresol and xylenols.
J. Am. Pharm. Assoc., Sientific Edition. 38 : 366-369 (1949)

3) 丹後俊郎：「医学への統計学（古川俊之　監修)」，朝倉書店．東京（1985)

4) 石居　進：「生物統計学入門」，倍風館．東京（1992)

5) 佐久間昭：「薬効評価－計画と解析」，東京大学出版会．東京（1977)

6) Dunnett, C. W. : New tables for multiple comparisons with a control.
Biometrics 20 : 482-491 (1964)

7) Scheffé, H. : A method for judging all contrasts in the analysis of variance.
Biometrika. 40 : 87-104 (1953)

8) Kruskal, W. H., Wallis, W. A. : Use of ranks in one-criterion variance analysis. J. Amer. Statist. Assoc. 47 : 583-621 (1952)

9) Grasso, P. and Hinton, R.H. : Evidence for and possible mechanisms of non-genotoxic carcinogenesis in rodent liver.
Mutat. Res. 248 : 271-290 (1991)

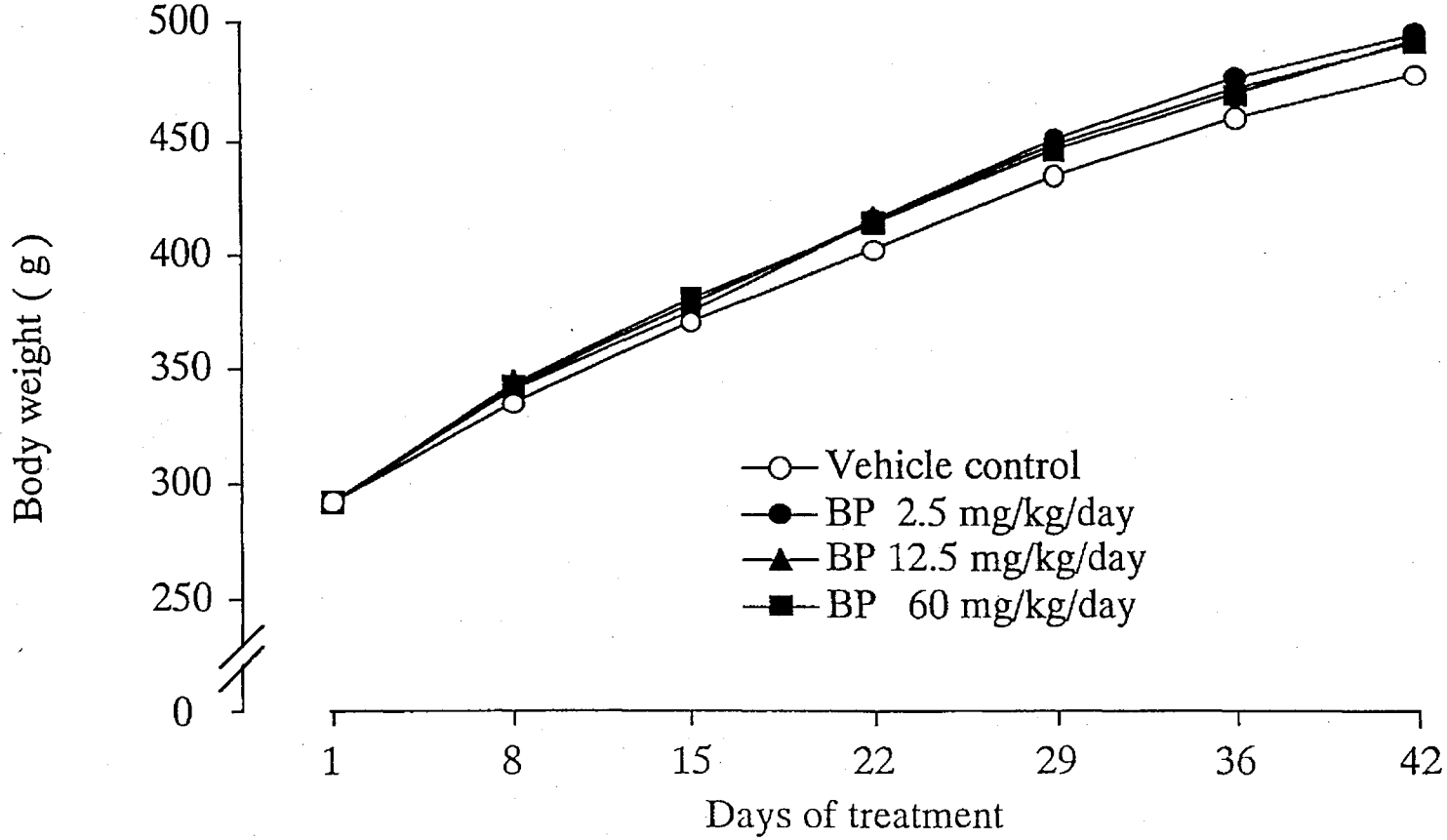

Fig 1. Body weight of males

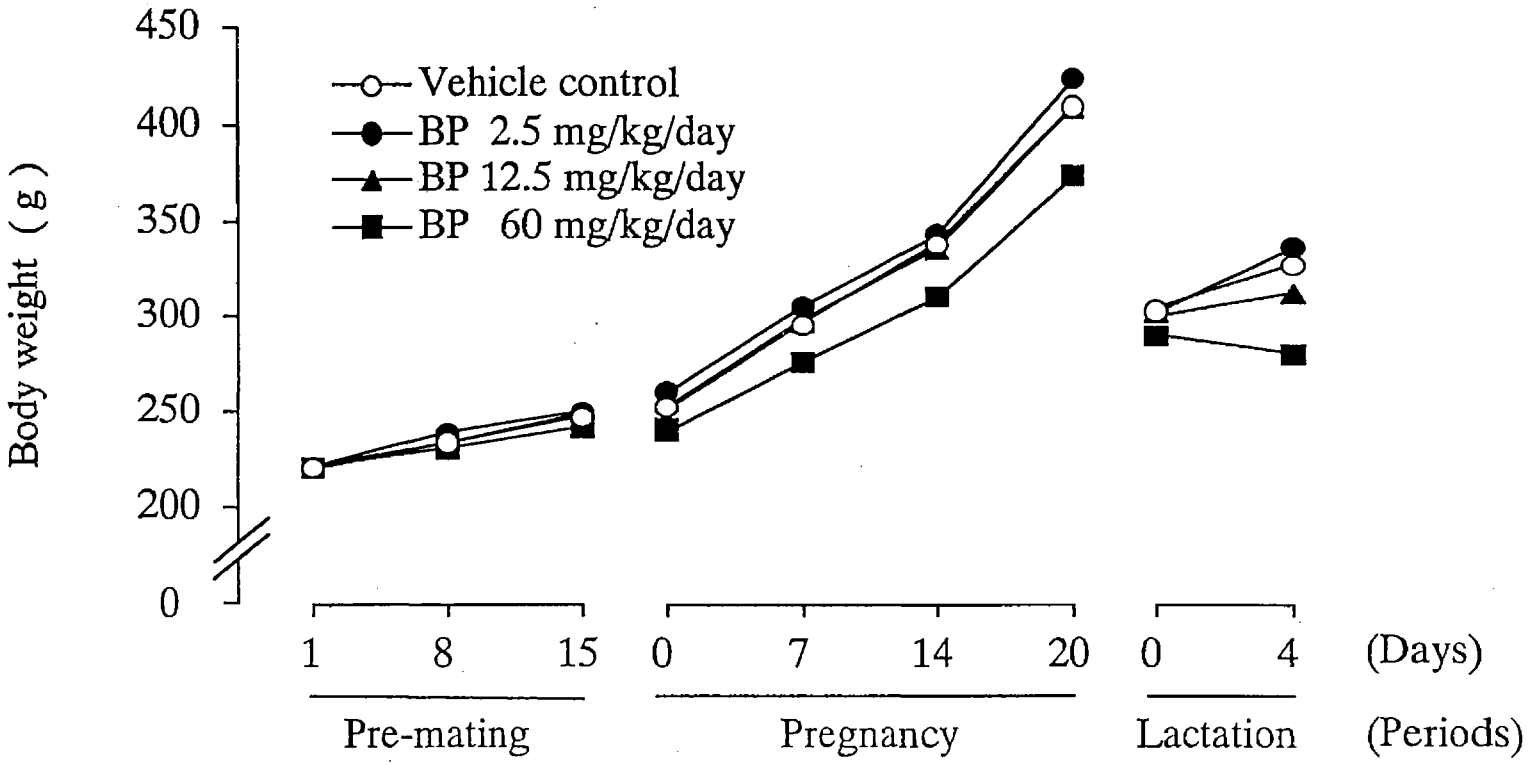

Fig. 2 Body weight of females

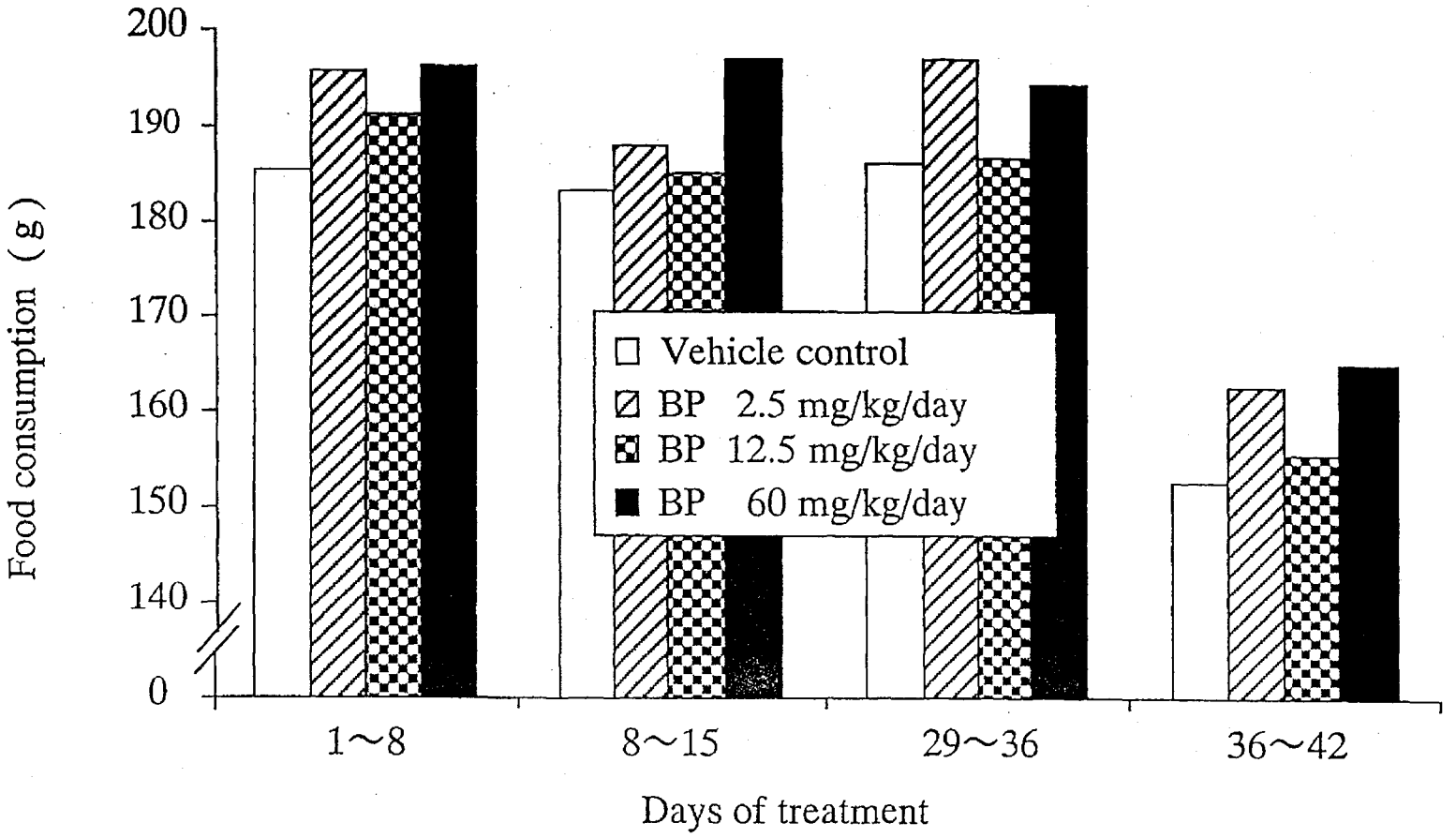

Fig 3. Food consumption of males

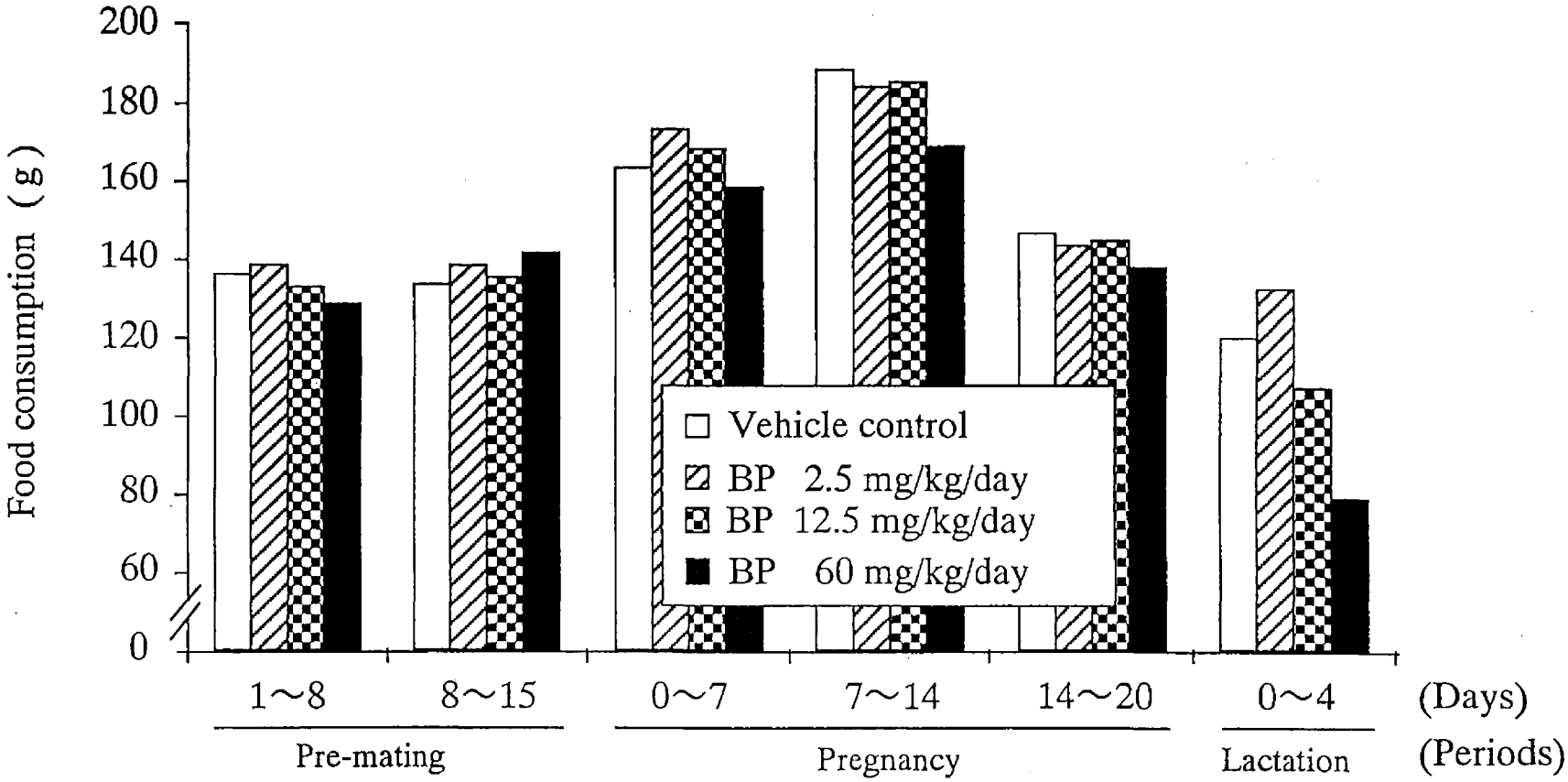

Fig 4. Food consumption of females

【TABLE INDEX 】

BP : 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 premating period
6	(6-1 ～ 6-4)	Body weight gain of F_0 females during premating 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 premating 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)	Summary of macroscopic findings in F_0 males
19	(19-1 ～19-4)	Absolute and relative organ weight of F_0 males after oral administration for 42 days
20	(20)	Summary of histopathological findings in F_0 males
21	(21)	Summary of macroscopic findings in F_0 females
22	(22-1 ～22-4)	Absolute and relative organ weight of F_0 females on day 4 of lactation

23	(23)	Summary of histopathological findings in F_0 females
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		Morphological findings in F_1 pups on day 4 of lactation
28		Morphological findings in F_1 dead pups

Table 1

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

Clinical signs of F_0 males

Clinical signs	Group	No. of animals examined	No. of animals showing clinical signs							
			1～7[a)]	8～14	15～21	22～28	29～35	36～42	43	Total
Loss of hair	0 mg/kg[b)]	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.5 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	12.5 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	60 mg/kg	13	0	0	0	1	1	1	1	1

a): days of treatment
b): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 2

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

Clinical signs of F_0 females

Clinical signs	Group	No. of animals examined	No. of animals showing clinical signs							
			1～7[a)]	8～14	15～21	22～28	29～35	36～42	43～	Total
Loss of hair	0 mg/kg[b)]	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.5 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	12.5 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	60 mg/kg	13	0	0	0	1	2	2	2	2

a): days of treatment
b): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 3

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

Body weight of F_0 males (g); mean ± S.D. (N)

Compound	BP			
Dose group (mg/kg)	0 [a)]	2.5	12.5	60
Days of treatment				
1 (Initial weight)	291.5 ± 9.0 (13)	291.6 ± 9.0 (13)	291.7 ± 8.7 (13)	291.8 ± 8.1 (13)
8	334.3 ± 20.0 (13)	340.1 ± 15.7 (13)	342.3 ± 19.4 (13)	342.1 ± 11.3 (13)
15	369.6 ± 30.5 (13)	375.2 ± 17.6 (13)	377.6 ± 27.0 (13)	380.4 ± 12.6 (13)
22	401.0 ± 33.1 (13)	414.3 ± 21.7 (13)	414.5 ± 33.1 (13)	413.2 ± 18.1 (13)
29	433.4 ± 40.4 (13)	450.3 ± 27.8 (13)	447.6 ± 38.8 (13)	444.9 ± 23.1 (13)
36	458.4 ± 44.1 (13)	476.1 ± 34.1 (13)	471.7 ± 40.6 (13)	468.0 ± 27.7 (13)
42	477.6 ± 47.0 (13)	495.4 ± 41.5 (13)	491.7 ± 41.9 (13)	492.2 ± 33.4 (13)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 4

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

Body weight gain of F_0 males (g); mean ± S.D. (N)

Compound	BP			
Dose group (mg/kg)	0[a)]	2.5	12.5	60
Days of treatment				
1～ 8	42.8 ± 12.7 (13)	48.5 ± 10.5 (13)	50.5 ± 12.5 (13)	50.3 ± 6.2 (13)
8～15	35.3 ± 11.0 (13)	35.1 ± 6.3 (13)	35.3 ± 9.9 (13)	38.3 ± 5.4 (13)
15～22	31.4 ± 5.0 (13)	39.1 ± 6.9 (13)	36.9 ± 8.5 (13)	32.8 ± 10.7 (13)
22～29	32.4 ± 9.2 (13)	36.0 ± 11.1 (13)	33.1 ± 8.1 (13)	31.7 ± 7.1 (13)
29～36	25.0 ± 6.6 (13)	25.8 ± 9.4 (13)	24.1 ± 7.3 (13)	23.1 ± 7.5 (13)
36～42	19.2 ± 5.6 (13)	19.3 ± 9.6 (13)	20.1 ± 6.3 (13)	24.2 ± 8.0 (13)
1～15	78.1 ± 23.2 (13)	83.5 ± 12.3 (13)	85.9 ± 20.4 (13)	88.6 ± 8.7 (13)
1～22	109.5 ± 25.8 (13)	122.6 ± 17.0 (13)	122.7 ± 26.2 (13)	121.4 ± 15.2 (13)
1～29	141.9 ± 33.1 (13)	158.6 ± 23.6 (13)	155.9 ± 32.1 (13)	153.1 ± 20.2 (13)
1～36	166.9 ± 37.0 (13)	184.5 ± 30.5 (13)	179.9 ± 34.1 (13)	176.2 ± 24.3 (13)
1～42	186.1 ± 39.8 (13)	203.7 ± 37.7 (13)	200.0 ± 35.7 (13)	200.4 ± 30.3 (13)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 5

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

Body weight of F_0 females during premating period (g); mean ± S.D. (N)

Compound	BP			
Dose group (mg/kg)	0[a)]	2.5	12.5	60
Days of treatment				
1 (Initial weight)	220.1 ± 7.0 (13)	220.1 ± 7.5 (13)	219.9 ± 6.7 (13)	220.2 ± 7.2 (13)
8	233.2 ± 10.5 (13)	238.4 ± 8.4 (13)	233.7 ± 9.7 (13)	230.5 ± 8.3 (13)
15	246.8 ± 12.6 (13)	249.3 ± 13.6 (13)	248.8 ± 12.4 (13)	241.2 ± 16.4 (13)
22				266.1 (1)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 6

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

Body weight gain of F_0 females during premating period (g); mean ± S.D. (N)

Compound	BP			
Dose group (mg/kg)	0[a)]	2.5	12.5	60
Days of treatment				
1～ 8	13.1 ± 5.7 (13)	18.2 ± 5.9 (13)	13.8 ± 6.6 (13)	10.3 ± 5.9 (13)
8～15	13.6 ± 8.3 (13)	10.9 ± 6.2 (13)	15.0 ± 6.2 (13)	10.7 ± 12.8 (13)
15～22				5.5 (1)
1～15	26.7 ± 10.6 (13)	29.1 ± 11.2 (13)	28.8 ± 10.4 (13)	20.9 ± 14.5 (13)
1～22				35.8 (1)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 7

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

Body weight of F_0 females during pregnancy period (g); mean ± S.D. (N)

Compound	BP			
Dose group (mg/kg)	0[a)]	2.5	12.5	60
Days of pregnancy				
0	251.9 ± 13.2 (12)	259.8 ± 8.7 (13)	254.6 ± 16.4 (13)	240.2 ± 16.5 (12)
7	295.4 ± 12.0 (12)	304.7 ± 9.8 (13)	297.0 ± 20.8 (13)	275.3 ± 23.2 (12)
14	338.7 ± 15.1 (12)	343.8 ± 13.5 (13)	335.7 ± 26.7 (13)	310.1 ± 24.9** (12)
20	410.1 ± 16.9 (12)	424.4 ± 21.2 (13)	409.8 ± 43.2 (13)	374.5 ± 40.2 (12)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)
**: significant difference from control, $p<0.01$ (by multiple comparisons)

Table 8

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

Body weight gain of F_0 females during pregnancy period (g); mean ± S.D. (N)

Compound	BP			
Dose group (mg/kg)	0 [a)]	2.5	12.5	60
Days of pregnancy				
0～ 7	43.5 ± 5.6 (12)	44.9 ± 4.9 (13)	42.4 ± 9.2 (13)	35.1 ± 17.6 (12)
7～14	43.3 ± 8.9 (12)	39.1 ± 7.6 (13)	38.6 ± 9.3 (13)	34.8 ± 10.8 (12)
14～20	71.4 ± 10.5 (12)	80.6 ± 11.4 (13)	74.1 ± 19.2 (13)	64.4 ± 22.4 (12)
0～14	86.8 ± 11.7 (12)	84.0 ± 9.9 (13)	81.0 ± 15.4 (13)	69.8 ± 22.2 (12)
0～20	158.2 ± 16.7 (12)	164.6 ± 15.8 (13)	155.2 ± 31.5 (13)	134.3 ± 34.9 (12)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 9

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

Body weight of F_0 females during lactation period (g); mean ± S.D. (N)

Compound	BP			
Dose group (mg/kg)	0[a)]	2.5	12.5	60
Days of lactation				
0	302.6 ± 24.9 (12)	301.7 ± 21.0 (13)	301.9 ± 24.2 (13)	290.0 ± 35.4 (12)
4	327.4 ± 20.9 (12)	336.5 ± 19.9 (13)	311.8 ± 23.9 (13)	280.1 ± 29.8** (12)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)
**: significant difference from control, $p<0.01$ (by multiple comparisons)

Table 10

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

Body weight gain of F_0 females during lactation period (g); mean ± S.D. (N)

Compound	BP			
Dose group (mg/kg)	0 [a)]	2.5	12.5	60
Days of lactation				
0～ 4	24.8 ± 17.3 (12)	34.9 ± 12.3 (13)	9.9 ± 10.9 (13)	-9.9 ± 22.1** (12)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)
**: significant difference from control, $p<0.01$ (by multiple comparisons)

Table 11

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

Food consumption of F_0 males (g); mean ± S.D. (N)

Compound	BP			
Dose group (mg/kg)	0[a)]	2.5	12.5	60
Days of treatment				
1～ 8	185.6 ± 17.5 (13)	195.8 ± 12.6 (13)	191.4 ± 19.1 (13)	196.2 ± 14.5 (13)
8～15	183.3 ± 21.0 (13)	188.1 ± 15.9 (13)	185.1 ± 21.2 (13)	197.0 ± 10.7 (13)
29～36	186.3 ± 19.1 (13)	197.0 ± 24.6 (13)	186.7 ± 21.1 (13)	194.6 ± 16.1 (13)
36～42	152.5 ± 15.7 (13)	162.6 ± 20.2 (13)	155.6 ± 19.9 (13)	164.8 ± 14.9 (13)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 12

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

Food consumption of F_0 females during premating period (g); mean ± S.D. (N)

Compound	BP			
Dose group (mg/kg)	0[a)]	2.5	12.5	60
Days of treatment				
1～ 8	136.1 ± 17.3 (13)	138.7 ± 7.7 (13)	132.9 ± 12.8 (13)	128.5 ± 14.0 (13)
8～15	133.8 ± 10.4 (13)	138.5 ± 9.6 (13)	135.7 ± 12.9 (13)	141.9 ± 15.7 (13)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 13

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

Food consumption of F_0 females during pregnancy period (g); mean ± S.D. (N)

Compound	BP			
Dose group (mg/kg)	0[a)]	2.5	12.5	60
Days of pregnancy				
0～ 7	163.3 ± 16.9 (12)	173.7 ± 10.7 (13)	168.5 ± 22.6 (13)	158.8 ± 27.3 (12)
7～14	188.8 ± 15.4 (12)	184.5 ± 16.2 (13)	185.6 ± 22.4 (13)	169.2 ± 30.2 (12)
14～20	146.4 ± 21.5 (12)	143.6 ± 17.4 (13)	144.8 ± 17.0 (13)	137.7 ± 27.6 (12)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 14

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

Food consumption of F_0 females during lactation period (g); mean ± S.D. (N)

Compound	BP			
Dose group (mg/kg)	0 [a)]	2.5	12.5	60
Days of lactation				
0～ 4	120.0 ± 17.8 (12)	132.0 ± 31.9 (13)	106.9 ± 26.7 (13)	78.9 ± 28.7** (12)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)
**: significant difference from control, $p<0.01$ (by multiple comparisons)

Table 15
BP: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats
Urinalysis values in F_0 males on day 42 of treatment

Group (mg/kg)	Number of animals	pH							Protein[b]				Glucose[c]	Ketone[d]				Bilirubin[d]		Occult blood[d]					Urobilinogen[e]	
		6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	≥9.0	−	±	+	++	−	−	±	+	++	−	+	−	±	+	++	+++	±	+
0 [a]	13	0	0	0	0	3	4	6	0	1	6	6	13	0	5	7	1	13	0	13	0	0	0	0	13	0
2.5	13	0	1	2	1	5	3	1	0	0	6	7	13	0	4	9	0	12	1	11	1	0	0	1	12	1
12.5	13	1	0	0	3	4	2	3	1	0	9	3	13	1	3	9	0	13	0	12	1	0	0	0	13	0
60.0	13	0	2	2	3	0	4	2	0	0	8	5	13	0	4	9	0	13	0	12	0	1	0	0	13	0

a) vehicle control: corn oil (2 ml/kg)
b) −: negative, ±: trace, +: 30 mg/dl, ++: 100 mg/dl
c) −: negative
d) −: negative, ±: trace, +: slight, ++: moderate, +++: marked
e) ±: 0.1 EU/dl, +: 1.0 EU/dl

Table 16

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

Hematological findings of Fo males after oral administration for 42 days

BP (mg/kg)	R B C (x10⁴/mm³)	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	M C V (μm³)	M C H (pg)	M C H C (%)	Platelet (x10⁴/mm³)
0 [a)]	(13) 814 ±34	(13) 15.4 ±0.6	(13) 45.7 ±1.6	(13) 56.2 ±1.3	(13) 19.0 ±0.4	(13) 33.8 ±0.4	(13) 93.3 ±10.5
2.5	(13) 821 ±38	(13) 15.4 ±0.6	(13) 45.2 ±1.8	(13) 55.0 ±1.4	(13) 18.8 ±0.6	(13) 34.2 ±0.5	(13) 94.4 ±5.7
12.5	(13) 800 ±34	(13) 15.5 ±0.5	(13) 45.4 ±1.6	(13) 56.8 ±1.6	(13) 19.4 ±0.7	(13) 34.1 ±0.5	(13) 93.7 ±6.6
60	(13) 808 ±32	(13) 15.2 ±0.5	(13) 44.9 ±1.4	(13) 55.6 ±1.2	(13) 18.8 ±0.4	(13) 33.8 ±0.4	(13) 92.4 ±22.2

BP (mg/kg)	W B C (x100/mm³)	Band neutrophil (%)	Segmented neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0 [a)]	(13) 56 ±14	(13) 0 ±0	(13) 20 ±11	(13) 1 ±1	(13) 0 ±0	(13) 1 ±1	(13) 78 ±11
2.5	(13) 64 ±17	(13) 0 ±0	(13) 13 ±6	(13) 1 ±1	(13) 0 ±0	(13) 1 ±1	(13) 86 ±6
12.5	(13) 74 ±14	(13) 0 ±0	(13) 12 ±6	(13) 0 ±1	(13) 0 ±0	(13) 1 ±1	(13) 86 ±7
60	(13) 64 ±23	(13) 0 ±0	(13) 14 ±7	(13) 1 ±1	(13) 0 ±0	(13) 1 ±1	(13) 85 ±7

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)
Parameter, mean±S.D.
( ), number of animals

*, significantly different from control, $p<0.05$
**, significantly different from control, $p<0.01$

Table 17

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

Biochemical findings of Fo males after oral administration for 42 days

BP (mg/kg)	Total protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	A/G	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	Tri-glyceride (mg/dl)	Total bilirubin (mg/dl)
0 a)	(13) 5.3 ±0.2	(13) 3.0 ±0.1	(13) 1.28 ±0.13	(13) 16 ±3	(13) 0.6 ±0.1	(13) 134 ±9	(13) 36 ±9	(13) 39 ±12	(13) 0.08 ±0.01
2.5	(13) 5.5 ±0.4	(13) 3.0 ±0.2	(13) 1.21 ±0.16	(13) 16 ±3	(13) 0.6 ±0.1	(13) 133 ±15	(13) 40 ±9	(13) 40 ±12	(13) 0.08 ±0.02
12.5	(13) 5.4 ±0.2	(13) 3.0 ±0.1	(13) 1.24 ±0.14	(13) 17 ±2	(13) 0.6 ±0.1	(13) 135 ±8	(13) 41 ±8	(13) 43 ±18	(13) 0.08 ±0.02
60	(13) 5.3 ±0.3	(13) 2.9 ±0.1	(13) 1.24 ±0.19	(13) 17 ±2	(13) 0.6 ±0.1	(13) 143 ±14	(13) 36 ±6	(13) 34 ±13	(13) 0.09 ±0.03

BP (mg/kg)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)	Ca (mg/dl)	Inorg. phos. (mg/dl)	ALP (U/l)	GPT (U/l)	GOT (U/l)	γ-GTP (U/l)
0 a)	(13) 145.7 ±0.6	(13) 4.13 ±0.26	(13) 109.5 ±1.2	(13) 8.8 ±0.3	(13) 6.4 ±0.9	(13) 261 ±57	(13) 30 ±3	(13) 71 ±10	(13) 0 ±0
2.5	(13) 145.5 ±1.4	(13) 4.17 ±0.49	(13) 108.2 ±1.2	(13) 8.9 ±0.3	(13) 6.6 ±0.5	(13) 248 ±37	(13) 31 ±5	(13) 67 ±7	(13) 0 ±0
12.5	(13) 145.4 ±0.7	(13) 4.02 ±0.24	(13) 108.6 ±1.1	(13) 8.9 ±0.2	(13) 6.5 ±0.6	(13) 261 ±65	(13) 34 ±12	(13) 67 ±10	(13) 0 ±0
60	(13) 145.6 ±1.1	(13) 3.94 ±0.22	(13) 108.6 ±1.3	(13) 8.8 ±0.3	(13) 6.4 ±0.3	(13) 263 ±67	(13) 30 ±4	(13) 71 ±11	(13) 0 ±0

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)
'Parameter, mean±S.D.
( ), number of animals

*, significantly different from control, $p<0.05$
**, significantly different from control, $p<0.01$

Table 18
BP: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening study in rats

Summary of macroscopic findings in Fo males

Group	Control		2.5 mg/kg		12.5 mg/kg		60 mg/kg	
Grade	−	+	−	+	−	+	−	+
(Lung/Bronchus)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Adhesion	12	1	13	0	13	0	13	0
Spot, dark	11	2	13	0	13	0	12	1
Area, dark	13	0	12	1	13	0	13	0
(Heart)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Area, linear, pale	13	0	13	0	13	0	12	1
(Liver)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Enlargement	13	0	13	0	13	0	11	2
Yellowish	12	1	12	1	12	1	8	5
Accentuation, lobular pattern	13	0	13	0	12	1	11	2
(Kidney)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Dilatation, renal pelvis	12	1	12	1	13	0	13	0
Enlargement	13	0	13	0	13	0	12	1
Area, recessed	13	0	13	0	13	0	12	1
(Spleen)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Accessory spleen	12	1	13	0	13	0	13	0
(Thymus)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Area, dark	12	1	13	0	13	0	13	0
Small	13	0	13	0	13	0	12	1
(Urinary bladder)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Coagulum	13	0	12	1	12	1	13	0
(Skin)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Alopecia	13	0	13	0	13	0	12	1

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

Table 19

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

Absolute and relative organ weight of F_0 males after oral administration for 42 days; mean ± S.D. (N)

Compound		BP			
Dose group (mg/kg)		0[a)]	2.5	12.5	60
Terminal body weight	(g)	448.6 ± 45.7 (13)	468.4 ± 35.6 (13)	460.9 ± 39.8 (13)	458.7 ± 26.9 (13)
Brain	(g)	2.02 ± 0.09[b)] (13)	2.08 ± 0.08 (13)	2.07 ± 0.06 (13)	2.05 ± 0.09 (13)
		0.45 ± 0.03[c)]	0.44 ± 0.04	0.45 ± 0.04	0.45 ± 0.04
Heart	(g)	1.31 ± 0.10 (13)	1.36 ± 0.13 (13)	1.34 ± 0.15 (13)	1.34 ± 0.12 (13)
		0.30 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.02
Liver	(mg)	12.28 ± 1.49 (13)	12.91 ± 1.72 (13)	11.94 ± 1.23 (13)	13.35 ± 1.52 (13)
		2.73 ± 0.09	2.75 ± 0.21	2.59 ± 0.10	2.90 ± 0.23
Spleen	(g)	0.78 ± 0.11 (13)	0.80 ± 0.13 (13)	0.81 ± 0.07 (13)	0.80 ± 0.08 (13)
		0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.17 ± 0.02
Thymus	(mg)	399.6 ± 89.0 (13)	368.2 ± 94.1 (13)	406.8 ± 61.8 (13)	409.4 ±136.3 (13)
		88.8 ± 17.1	78.4 ± 18.0	88.5 ± 13.2	89.6 ± 31.1
Kidneys	(g)	3.03 ± 0.31 (13)	3.01 ± 0.19 (13)	3.01 ± 0.22 (13)	3.26 ± 0.20* (13)
		0.68 ± 0.05	0.64 ± 0.04	0.66 ± 0.05	0.71 ± 0.06
Adrenal glands	(mg)	55.8 ± 7.2 (13)	63.0 ± 9.6 (12)	61.0 ± 5.7 (13)	59.1 ± 13.9 (13)
		12.5 ± 1.6	13.3 ± 1.8	13.3 ± 1.0	12.9 ± 3.2
Testes	(g)	3.19 ± 0.23 (13)	3.22 ± 0.15 (13)	3.25 ± 0.21 (13)	3.30 ± 0.31 (13)
		0.72 ± 0.07	0.69 ± 0.06	0.71 ± 0.08	0.72 ± 0.09
Epididymides	(g)	1.15 ± 0.07 (13)	1.14 ± 0.07 (13)	1.17 ± 0.08 (13)	1.17 ± 0.09 (13)
		0.26 ± 0.03	0.24 ± 0.02	0.26 ± 0.03	0.26 ± 0.03

a): vehicle control, corn oil (2 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)

Table 20

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

Summary of histopathological findings in Fo males

Group / Grade	Control −	±	+	++	+++	Pos.	2.5 mg/kg −	±	+	++	+++	Pos.	12.5 mg/kg −	±	+	++	+++	Pos.	60 mg/kg −	±	+	++	+++	Pos.
(Brain)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Heart)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Myocardial degeneration / fibrosis	10	1	2	0	0	3													6	3	4	0	0	7
(Liver)	[13]						[13]						[13]						[13]					
Hypertrophy, eosinophilic, hepatocyte, centrilobular	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	8	3	2	0	0	5#
Necrosis, focal	11	2	0	0	0	2	12	1	0	0	0	1	12	0	1	0	0	1	12	0	1	0	0	1
Fibrosis, focal	12	0	1	0	0	1	13	0	0	0	0	0	12	0	1	0	0	1	13	0	0	0	0	0
Fatty change, periportal	0	0	6	7	0	13	0	0	11	2	0	13	0	0	9	4	0	13	0	0	8	5	0	13
(Thymus)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Hemorrhage	12	1	0	0	0	1													12	1	0	0	0	1
(Kidney)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Basophilic tubule, cortex	4	9	0	0	0	9													2	11	0	0	0	11
Dilatation, renal pelvis	12	0	1	0	0	1													13	0	0	0	0	0
Eosinophilic body	12	0	1	0	0	1													13	0	0	0	0	0
Cyst	13	0	0	0	0	0													11	0	2	0	0	2
Fibrosis, focal	13	0	0	0	0	0													12	1	0	0	0	1
(Adrenal gland)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Spleen)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Deposit, pigment, brown	0	3	10	0	0	13													0	1	12	0	0	13
Hematopoiesis, extramedullary	0	7	6	0	0	13													0	4	9	0	0	13
(Urinary bladder)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Testis)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Epididymis)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								

−, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade
[ ], Number of animals examined
#, Significantly different from control $p<0.05$ (One-tailed Fisher exact test)

Table 21

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

Summary of macroscopic findings in Fo females

Group	Control		2.5 mg/kg		12.5 mg/kg		60 mg/kg	
Grade	−	+	−	+	−	+	−	+
(Lung/Bronchus)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Spot, dark	11	2	12	1	12	1	13	0
Area, dark	13	0	13	0	12	1	13	0
Granular surface	13	0	13	0	12	1	13	0
(Liver)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Enlargement	13	0	13	0	13	0	8	5
Pale	13	0	13	0	13	0	10	3
Spot, white	12	1	13	0	13	0	13	0
Diaphragmatic nodule	13	0	13	0	13	0	12	1
(Kidney)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Pale	13	0	13	0	12	1	8	5
Dilatation, renal pelvis	13	0	13	0	13	0	12	1
(Spleen)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Adhesion	12	1	13	0	13	0	13	0
Area, recessed	12	1	13	0	13	0	13	0
Accessory spleen	12	1	12	1	13	0	13	0
(Thymus)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Small	9	4	10	3	9	4	9	4
Spot, dark	13	0	13	0	13	0	12	1
Area, dark	13	0	12	1	13	0	13	0
(Skin)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Alopecia	13	0	13	0	13	0	11	2

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

Table 22

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

Absolute and relative organ weight of F_0 females on day 4 of lactation; mean ± S.D. (N)

Compound		BP			
Dose group (mg/kg)		0 a)	2.5	12.5	60
Terminal body weight	(g)	327.4 ± 20.9 (12)	336.5 ± 19.9 (13)	311.8 ± 23.9 (13)	280.1 ± 29.8** (12)
Brain	(g)	1.89 ± 0.08 b) (12)	1.88 ± 0.06 (13)	1.91 ± 0.08 (13)	1.86 ± 0.06 (12)
		0.58 ± 0.04 c)	0.56 ± 0.04	0.62 ± 0.04	0.67 ± 0.06**
Heart	(g)	0.96 ± 0.05 (12)	0.97 ± 0.08 (13)	0.89 ± 0.10 (13)	0.81 ± 0.10** (12)
		0.30 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.02
Liver	(mg)	13.81 ± 1.29 (12)	14.24 ± 1.44 (13)	13.04 ± 1.44 (13)	14.13 ± 2.23 (12)
		4.21 ± 0.18	4.23 ± 0.28	4.19 ± 0.37	5.06 ± 0.72**
Spleen	(g)	0.69 ± 0.10 (12)	0.68 ± 0.11 (13)	0.60 ± 0.12 (13)	0.53 ± 0.12** (12)
		0.21 ± 0.03	0.20 ± 0.03	0.19 ± 0.03	0.19 ± 0.05
Thymus	(mg)	182.7 ± 63.1 (12)	208.6 ± 77.1 (13)	213.4 ±112.2 (13)	153.2 ± 81.8 (12)
		55.4 ± 17.2	61.5 ± 21.6	67.9 ± 34.5	53.8 ± 26.3
Kidneys	(g)	2.06 ± 0.24 (12)	2.14 ± 0.20 (13)	2.00 ± 0.17 (13)	2.01 ± 0.28 (12)
		0.63 ± 0.08	0.64 ± 0.05	0.64 ± 0.04	0.72 ± 0.08**
Adrenal glands	(mg)	71.9 ± 6.2 (12)	83.6 ± 7.1* (13)	75.8 ± 10.8 (13)	66.5 ± 13.2 (12)
		22.1 ± 2.9	24.9 ± 2.2	24.3 ± 3.2	24.0 ± 5.3

a): vehicle control, corn oil (2 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

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

Summary of histopathological findings in Fo females

Group / Grade	Control −	±	+	++	+++	Pos.	2.5 mg/kg −	±	+	++	+++	Pos.	12.5 mg/kg −	±	+	++	+++	Pos.	60 mg/kg −	±	+	++	+++	Pos.
(Brain)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Heart)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Liver)	[13]						[13]						[13]						[13]					
Hypertrophy, eosinophilic, hepatocyte, centrilobular	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	3	6	4	0	0**	10##
Necrosis, focal	9	2	2	0	0	4	11	0	2	0	0	2	12	1	0	0	0	1	7	3	3	0	0	6
Fibrosis, focal	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	0	1	0	0	1	12	1	0	0	0	1
Fatty change, periportal	10	3	0	0	0	3	12	1	0	0	0	1	11	2	0	0	0	2	6	4	2	1	0	7
(Thymus)	[12]						[0]						[0]						[13]					
Atrophy	8	3	0	1	0	4													6	4	1	2	0	7
Hemorrhage	12	0	0	0	0	0													12	1	0	0	0	1
(Kidney)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Basophilic tubule, cortex	6	7	0	0	0	7													10	3	0	0	0	3
Degeneration, vacuolar, proximal tubule	12	0	1	0	0	1													13	0	0	0	0	0
Mineralization, cortico-medullary junction	13	0	0	0	0	0													12	1	0	0	0	1
Dilatation, renal pelvis	13	0	0	0	0	0													12	0	1	0	0	1
Degeneration, fatty, proximal tubule	10	3	0	0	0	3													8	3	2	0	0	5
(Adrenal gland)	[13]						[13]						[13]						[13]					
Lipid droplet, increased, zona fasciculata	13	0	0	0	0	0	12	0	0	1	0	1	13	0	0	0	0	0	11	0	1	1	0	2
Necrosis, focal, cortex, unilateral	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	0	1	0	0	1	12	0	1	0	0	1
(Spleen)	[13]						[13]						[13]						[13]					
Deposit, pigment, brown	0	0	13	0	0	13	0	1	12	0	0	13	0	0	13	0	0	13	0	1	12	0	0	13
Hematopoiesis, extramedullary	0	3	8	2	0	13	0	0	10	3	0	13	0	6	5	2	0	13	0	12	1	0	0**	13
Inflammation, 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
(Urinary bladder)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Ovary)	[1]						[0]						[0]						[1]					
No remarkable change																								

−, 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<0.01 (One-tailed Fisher exact test)

Table 24

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

Reproductive performance of F_0 animals

Compound	BP			
Dose group (mg/kg)	0[a)]	2.5	12.5	60
Number of mated pairs	13	13	13	13
Number of copulated pairs	13	13	13	13
Copulation index	100	100	100	100
Number of pregnant animals	12	13	13	12
Fertility index	92.3	100	100	92.3
Pairing days until copulation Mean ± S.D. (N)	2.4 ± 1.3 (13)	3.3 ± 0.9 (13)	2.6 ± 1.5 (13)	3.5 ± 3.2 (13)
Frequency of vaginal estrus Mean ± S.D. (N)	1.0 ± 0.0 (13)	1.0 ± 0.0 (13)	1.1 ± 0.3 (13)	1.0 ± 0.0 (13)

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)
Copulation index = (number of copulated pairs / number of mated pairs) × 100, %
Fertility index = (number of pregnant animals / number of copulated pairs) × 100, %

Table 25

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

Development of F_1 pups up to day 4 of lactation; Mean ±S.D.

Compound	BP			
Dose group (mg/kg)	0 a)	2.5	12.5	60
Number of pregnant females	12	13	13	12
Number of females with live pups	12	13	12	12
Gestation index	100.0	100.0	92.3	100.0
Gestation length in days	22.6 ± 0.5 (12)	22.5 ± 0.5 (13)	22.6 ± 0.9 (13)	22.5 ± 0.7 (12)
Number of corpora lutea	16.4 ± 1.8 (12)	17.0 ± 1.7 (13)	16.5 ± 4.6 (13)	14.7 ± 2.4 (12)
Number of implantation sites	14.8 ± 3.2 (12)	16.2 ± 1.5 (13)	15.0 ± 4.6 (13)	12.8 ± 3.2 (12)
Implantation index	89.8 ± 15.4 (12)	95.7 ± 4.9 (13)	87.9 ± 17.8 (13)	87.9 ± 17.6 (12)
Day 0 of lactation				
Number of pups born	13.8 ± 3.0 (12)	15.5 ± 1.6 (13)	13.8 ± 4.3 (13)	10.5 ± 3.1 (12)
Delivery index	93.5 ± 6.2 (12)	95.2 ± 4.2 (13)	92.4 ± 7.4 (13)	83.3 ± 17.9 (12)
Number of live pups	13.8 ± 3.0 (12)	15.3 ± 1.6 (13)	13.5 ± 4.4 (13)	10.3 ± 2.9 * (12)
Birth index	93.5 ± 6.2 (12)	94.4 ± 6.3 (13)	83.5 ± 26.3 (13)	81.6 ± 17.5 (12)
Live birth index	100.0 ± 0.0 (12)	99.0 ± 3.5 (13)	91.0 ± 27.8 (13)	98.1 ± 3.5 (12)
Sex ratio on day 0	53.9 ± 14.1 (12)	55.9 ± 10.9 (13)	49.0 ± 13.1 (12)	44.9 ± 18.0 (12)
Day 4 of lactation				
Number of live pups	13.5 ± 2.8 (12)	14.1 ± 4.5 (13)	14.4 ± 1.7 (12)	8.8 ± 3.7 * (12)
Viability index	97.9 ± 3.1 (12)	91.3 ± 27.5 (13)	99.0 ± 3.4 (12)	90.1 ± 28.6 (12)
Sex ratio on day 4	53.5 ± 13.6 (12)	56.0 ± 11.1 (12)	49.0 ± 13.2 (12)	45.2 ± 18.3 (11)

a): vehicle control: corn oil (2 ml/kg)
* : Significant difference from control, $p<0.05$ (by multiple comparisons)
Gestation index = (number of females with live pups / number of pregnant females) × 100, %
Implantation index = (number of implantation sites / number of corpora lutea) × 100, %
Delivery index = (number of pups born / number of implantation sites) × 100, %
Birth index = (number of live pups on day 0 / number of implantation sites) × 100, %
Live birth index = (number of live pups on day 0 / number of pups born) × 100, %
Sex ratio on day 0 = (number of male live pups on day 0 / number of live pups on day 0) × 100, %
Viability index = (number of live pups on day 4 / number of live pups on day 0) × 100, %
Sex ratio on day 4 = (number of male live pups on day 4 / number of live pups on day 4) × 100, %

Table 26

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

Body weight of F_1 pups up to day 4 of lactation; mean ± S.D. (N)

Compound	BP			
Dose group (mg/kg)	0 a)	2.5	12.5	60
Day 0 of lactation				
Number of live pups	13.8 ± 3.0 (12)	15.3 ± 1.6 (13)	14.6 ± 1.8 (12)	10.3 ± 2.9 **(12)
Male	7.5 ± 2.8	8.5 ± 1.8	7.2 ± 2.2	4.4 ± 1.9
Female	6.3 ± 2.4	6.8 ± 1.9	7.4 ± 2.1	5.8 ± 2.9
Weight of pup (g)				
Male	7.0 ± 0.7 (12)	6.6 ± 0.4 (13)	6.8 ± 0.8 (12)	5.8 ± 1.2 **(12)
Female	6.7 ± 0.6 (12)	6.8 ± 1.4 (13)	6.3 ± 0.7 (12)	5.6 ± 1.3 **(12)
Day 4 of lactation				
Number of live pups	13.5 ± 2.8 (12)	15.3 ± 1.7 (12)	14.4 ± 1.7 (12)	9.6 ± 2.5 **(11)
Male	7.3 ± 2.6	8.5 ± 1.8	7.1 ± 2.1	4.2 ± 1.8
Female	6.3 ± 2.3	6.8 ± 2.0	7.3 ± 2.1	5.5 ± 2.8
Weight of pup (g)				
Male	11.3 ± 1.5 (12)	10.9 ± 1.0 (12)	10.2 ± 1.5 (12)	9.6 ± 2.5 * (11)
Female	11.0 ± 1.6 (12)	10.4 ± 1.0 (12)	9.5 ± 1.2 (12)	8.8 ± 2.9 **(11)

a): vehicle control: corn oil (2ml/kg)
* : Significant difference from control, $p<0.05$ (by multiple comparisons)
**: Significant difference from control, $p<0.01$ (by multiple comparisons)

Table 27

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

Morphological findings in F_1 pups on day 4 of lactation

Compound	BP			
Dose group (mg/kg)	0[a)]	2.5	12.5	60
Number of pups examined				
External observation	162	183	173	106
Visceral observation	162	183	173	106
Number of pups with				
external malformations	0	1	0	0
visceral malformations	0	0	0	0
Types and number				
External malformations				
Malposition of tail		1		
Brachymelia of hindlimb		1		

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)

Table 28

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

Morphological findings in F_1 dead pups

Compound	BP			
Dose group (mg/kg)	0[a)]	2.5	12.5	60
No. of dead pups examined				
External observation	1	13	3	3
Visceral observation	1	13	3	3
No. of dead pups showing abnormalities				
External malformations	0	0	0	0
Visceral malformations	0	0	0	0
Visceral variations	0	0	0	0

a): vehicle control, corn oil (2 ml/kg)