## 最 終 報告書

ジブチルフォスフェートの ラットを用いた経口投与による 反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験 (試験番号 92-044)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

# 目 次

要約	1
試験目的	3
試験材料および方法	
1.被験物質	3
2. 供試動物	3
3. 飼育条件	3
4. 試験群の構成および投与量の設定	4
5. 被験物質の調製および投与方法	4
6. 交配方法	5
7. 観察および検査	
1)親動物に関する項目	
(1) 一般状態観察	5
(2) 体重および摂餌量測定	5
(3) 臨床病理学的検査	5
(4)病理学的検査	7
(5) 生殖能に関する指標の算出	7
2)新生児に関する項目	
(1)産児数および性比の観察	8
(2) 外表異常および一般状態の観察	8
(3)体重測定	8
(4)病理学的検査	8
8. 統計処理	8
試験結果	
1. 反復投与毒性	
1)一般状態	9
2) 体重	9
3)摂餌量	9
4)雄の尿所見	1 0
5) 雄の血液学的所見	1 0
6) 雄の血液生化学的所見	1 0

7)病理学的	内所見	•			
(1)剖検	所見			1 0	J
(2) 臓器	重量			1 0	J
(3)病理	組織	学的所見		1 0	)
2. 生殖発生	毒性				
1)親動物は	こ及に	ます影響			
(1)交尾	率お	よび受胎率		1 2	)
(2)黄体	:数、	着床数および	<b>、着床率</b>	1 2	,
(3)出産	率、	妊娠期間およ	:び哺育	1 2	,
2)新生児/	こ及は	ます影響			
(1)一般	状態			1 2	)
(2)出産	児数	、分娩率、生	E存児数、死亡児数、		
出生率、	、性上	七、新生児体:	重および新生児生存率	1 2	)
(3)新生	児の	形態		1 3	;
考察および結論	淪				
1. 反復投	与毒物	生		1 3	,
2. 生殖発生	生毒物	生		1 4	Ĺ
添付資料					
A. 図・群別	]平均	値表			
Figures	1,	2	体重		
Figures	3,	4	摂餌量		
Tables	1,	2	一般状態		
Tables	3,	4	死亡率		
Tables	5,	6	体重		
Tables	7,	8	摂餌量		
Table	9		尿所見		
Table	10		血液学的所見		
Table	11		血液生化学的所見		
Tables	12,	13	剖検所見		
Tables	14~	-17	<b>滕器重量</b>		
Tables	18,	19	病理組織学的所見		
Tahle	20		<b>生殖に及ぼす影響</b>		

Table21新生児に及ぼす影響

Table 22 新生児の外表および内臓所見

# D. 参考資料

投与量設定試験

#### 要約

高生産量既存化学物質ジブチルフォスフェート(DBP)の毒性を検討するため、SD系〔Crj:CD(SD)〕ラットを用いて、反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を実施した。ラットは1群雌雄各10匹とし、DBPの0(溶媒投与の対照)、30、100、300および1000 mg/kg/日用量を、交配開始14日前から、雌は分娩後哺育3日(40~51日間)まで、雄は44日間、毎日強制的に経口投与した。得られた結果は、次のとおりである。

## 反復投与毒性

雄親において、30 mg/kg群ではDBP投与の影響は認められなかった。100 mg/kg以上の用量群では、膀胱粘膜に変性や潰瘍の形成を伴う上皮の過形成、およびそれとの関連性が考えられる赤色尿の排泄、並びに下腹部被毛の尿汚染が認められた。また、摂餌量は、投与開始初期に減少した。300 mg/kg以上の用量群では、胃の前胃部に上皮の角化亢進や過形成による粘膜の肥厚が認められ、腺胃部粘膜や肥厚した前胃部粘膜にはびらんや潰瘍の形成を認める例もあった。さらに、1000 mg/kg群では、上皮の変性を伴った盲腸の拡張が認められ、体重増加は抑制され、死亡も認められた。

一方、雌親についても、100 あるいは 300 mg/kg以上の用量群で、雄親と同様に 膀胱や胃の粘膜に障害が認められ、1000 mg/kg群では死亡も認められたほか、1000 mg/kg群で肝細胞が腫大して肝臓重量は増加した。さらに、100 mg/kg以上の用量群で、分娩時あるいは分娩後に出産児の全例が死亡した雌親が認められた。これらの雌親には、胃粘膜にびらんや潰瘍が共通して認められ、さらに、肝細胞の脂肪化および副腎皮質細胞の空胞化なども認められた。

以上の結果から、親動物に対する主な反復投与毒性は、その投与経路および排泄経路に当たる消化管、特に胃粘膜並びに膀胱粘膜に対する障害であり、肝臓に対する影響も認められ、一般毒性学的影響に関する無影響量は、雄、雌とも 30 mg/kg/日と推定された。

#### 生殖発生毒性

30、100 および 300 mg/kg群では、交配、受胎、妊娠および分娩は順調で、1000 mg/kg群においても、全児が死亡する難産の1匹がみられたものの、生殖毒性を示唆する有意な変化は認められなかった。一方、児動物の発生については、300 mg/kg群以下の用量群では有意な変化は認められなかった。1000 mg/kg群では、分娩時あるいは分娩後に出産児の全例が死亡した雌親が比較的高率に認められたため、出生児数、出生率、哺育4日生存児数および生存率は減少傾向を示し、特に哺育4日生存児数および生存率の減少傾向は明かなもので、哺育4日生存児雌数の減少には統計学的有意差が認められた。しかし、下垂体や生殖器系臓器に異常は認められず、これらの変化は、反復投与毒性の二次的な影響によるものと判断された。

以上の結果から、親動物の生殖に対しては、雄、雌とも 1000 mg/kg用量でも明かな影響は認

められなかった。児動物の発生に対しては、哺育4日生存児数の減少および生存率の低下傾向などが認められ、無影響量は、300 mg/kg/日と推定された。

#### 試験目的

この試験は、OECDにおける高生産量既存化学物質の安全性点検プログラムの一環として 実施したものであり、 ジブチルフォスフェートを雌雄ラットに反復経口投与し、投与期間中に 交配、妊娠および分娩させ、本物質の反復投与毒性並びに生殖発生毒性をスクリーニング的に 検討するために行った。

#### 試験材料および方法

## 1. 被験物質 (Appendices 1,2)

ジプチルフォスフェート (CAS No. 107-66-4、以下DBPと略す) は、

から提供されたもの〔ロット番号 純度 62.6% (不純物としてプチルフォスフェートのモノエステル体18.3%、その他トリエステル体等19.1%)〕を用いた。DBPの詳細は、Appendix 1 に示したとおりである。試験に用いたDBPについては、 において投与開始前および投与終了後に分析し、使用期間中安定であったことを確認した(Appendix 2)。

#### 2. 供試動物

動物は、SD系〔Crj:CD(SD)〕のSPFラットを用いた。ラットは、日本チャールス・リバー株式会社(神奈川県厚木市下古沢795番地)から、雄は8週齢、雌は7週齢で購入(雄62匹, 雌62匹)し、7日間試験環境に馴化させ、その間に検疫を行い、発育が順調で一般健康状態の良好な雌雄各50匹を、雄は9週齢、雌は8週齢で試験に供した。投与開始時の平均体重(体重範囲)は、雄345(331~362)g、雌203(192~215)gであった。

## 3. 飼育条件 (Appendices 3~6)

ラットは、馴化および投与期間を通じて、温度 22 ± 3℃、湿度 55 ± 10 %、換気回数10回以上/時(オールフレッシュエアー方式)、 照明 12 時間(午前6時点灯、午後6時消灯)に設定したバリアーシステム動物室で、個体別にステンレス製金網ケージ〔276 W × 426 D × 200 H (mm)〕に収容し、これをステンレス製5段のラックに配して飼育した。ただし、交尾確認後の雌は、床敷〔日本チャールス・リバー株式会社、ホワイトフレーク(ロット番号4-1-24,4-8-6)、汚染物質の分析結果:Appendix 3)〕を入れたポリカーボネート製ケージ〔265 W × 426 D × 200 H(mm)〕に収容した。飼料(日本クレア株式会社、固型飼料 C E − 2、ロット番号 E-2072-UB、E-2092-S4、汚染物質の分析結果:Appendix 4)と水(神奈川県営水道水を1μmカートリッジフィルター濾過後紫外線照射して使用、汚染物質の分析結果:Appendix 5)は、それぞれ給餌器および自動給水装置または給水瓶(ポリカーボネート製ケー

ジの場合)により自由摂取させた。

ラットの個体識別は、ラックおよびケージへの標識札の貼付と耳介パンチ法により行った。 なお、動物の飼育期間を通じて、試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因の 変化(温度・湿度の測定結果: Appendix 6) は認められなかった。

#### 4. 試験群の構成および投与量の設定(参考資料)

投与量は、投与量設定試験の結果(参考資料)に基づいて設定した。投与量設定試験は、6週齢のSD系〔Crj:CD(SD)〕ラットを1群雌雄各4匹とし、溶媒投与の対照群、並びにDBPの50,100,200.500 および1000 mg/kg/日投与群の6群を設け、14日間の反復経口投与により実施した。

その結果、100 mg/kg以上の用量群で、投与開始初期における一過性の赤色尿排泄、下腹部被毛の尿汚染、肝臓および副腎重量の増加傾向などがみられたが、1000 mg/kg群においても死亡は認められなかった。

以上の結果から、本試験における投与量は、試験法ガイドラインで規定された上限量である 1000 mg/kg/H を最高用量とし、以下 300, 100 および 30 mg/kg/H の 4 用量を設定した。

試験群の構成は、①溶媒投与群(以下、対照群)、②DBP 30 mg/kg/日投与群(30 mg/kg群)、同 100 mg/kg/日投与群(100 mg/kg群)、 ④同 300 mg/kg/日投与群(300 mg/kg 群)、⑤同 1000 mg/kg/日投与群(1000 mg/kg群) の 5 群とした。

各群の動物数は、雌雄各 10 匹とし、各群への動物の割り付けは、投与開始日の体重に基づ く層化無作為抽出法を用いて行った。

## 5. 被験物質の調製 (Appendices 7.8) および投与方法

DBP は、溶媒として局方ゴマ油(宮澤薬品株式会社、ロット番号 LI01)を用い、所定の投与用量になるような濃度(30 mg/kg 群:0.6 w/v %; 100 mg/kg群:2 w/v %; 300 mg/kg群:6w/v %; 1000 mg/kg 群:20 w/v %)の溶液あるいは懸濁液(20 w/v %液)として調製した。投与液量は体重1kg当たり5 mlとし、各個体の投与液量は、至近日に測定した体重を基に算出した。

なお、投与液中のDBPは調製7時間以降徐々に分解することが確認された(Appendix 7)ので、 投与液は毎日使用直前に調製した。調製した投与液については、そのうちの各濃度3回分について分析し、所定濃度で調製されていることを確認(Appendix 8)した。

投与方法は、胃ゾンデと注射筒を用いて、上述の投与液を、雌雄とも交配開始 14 日前から、 雄は 44 日間、雌は出産後の哺育 3 日(40~51日間)まで、1 日 1 回、定時(午前 9 時~12時)に、 ラットの胃内に強制的に投与した。対照群には、溶媒を同様に投与した。

#### 6. 交配方法

交配前の投与終了後(投与開始後 14 日の午後)、雄のケージに同一群内の雌を入れて 1 対 1 の組み合わせを作り、交尾が確認されるまで(11日間で全例の交尾を確認)、連続同居させた。

なお、1,000 mg/kg群では、交配前に死亡が認められたが、雌雄同数の死亡であったため、全生存動物において 1 対 1 の組み合わせが可能であった。交尾の確認は毎朝一定時刻(9:30 頃)に行い、膣栓形成あるいは膣垢中に精子が確認された日を妊娠 0 日とした。

#### 7. 観察および検査

## 1) 親動物に関する項目

## (1) 一般状態観察

投与期間中毎日、動物の生死、外観、行動等について観察し、特に、妊娠、出産および哺育の状態については注意深く観察した。分娩の確認は毎朝一定時刻(9:30頃)に行い、 1 腹ごとに全例の出産が確認された日を哺育0日とした。

## (2) 体重および摂餌量測定

体重の測定は、個体ごとに投与開始日(投与開始直前)およびその後は7日間隔で行い、さらに最終投与日と屠殺日並びに死亡発見日にも測定した。ただし、雌の妊娠後は、妊娠0、7、14 および 20日と哺育0日および4日に測定した。摂餌量は、体重測定日に合わせて、ケージごとに翌朝までの 24時間の飼料消費量を測定した。雌の哺育4日の摂餌量は、前日からの 24時間消費量を測定した。これらの測定には、電子上皿天秤(メトラー社製、PL-3000)を用いた。

#### (3) 臨床病理学的検査

雄のみについて、以下の検査を実施した。

- a. 尿検査:投与開始 42 日に、腰背部を圧迫刺激して新鮮尿を採取し、試験紙法(マイルス・三共株式会社、マルティスティックス®)により、pH、潜血、タンパク、糖、ケトン体、ビリルビンおよびウロビリノーゲンを定性的に検査した。
- b. 血液学的検査:供試血液の採取は、切迫屠殺動物については屠殺直前に、計画屠殺動物については投与期間終了翌日(投与開始 45 日)の解剖直前に行った。計画屠殺動物の採血に当たっては、動物を前日の午後5時より除餌し水のみを与えた。採血はエーテル麻酔下で開腹して腹大動脈より行い、その一部をEDTA-2Kで凝固阻止処理し、次の項目を測定した。

項目(略号)	測定法	測定機器
①赤血球数(RBC)	電気抵抗検出方式	)
②血色素量(Hb)	ラウリル硫酸ナトルウム-	
	ヘモグロビン法	
③ヘマトクリット値(Ht)	パルス検出方式	
④平均赤血球容積(MCV)	計算値	多項目自動血球計数
⑤平均赤血球血色素量(MCH)	計算値	▶装置〔E-4000:東亜
⑥平均赤血球血色素濃度(MCHC	)計算値	医用電子(株)]
⑦白血球数(WBC)	電気抵抗検出方式	
⑧血小板数(Plat.)	電気抵抗検出方式	J

なお、網状赤血球数および白血球百分率算定用に血液塗抹標本を作製したが、赤血球関連項目 や白血球数に変化が認められなかったので、観察は実施しなかった。

c. 血液生化学的検査:採取した血液の一部から血清を分離し、次の項目を測定した。

	項目(略号)	測定法	測定機器
1	総タンパク (T. P. )	Biuret 法	<u> </u>
2	アルブミン(Alb.)	BCG 法	
3	A/G比 (A/G)	計算値	
4	血糖 (Glu.)	酵素法 (GK <sup>1)</sup> -G6PDH <sup>2)</sup> -UV 系)	
(5)	トリグリセライド(T. G.)	酵素法 (LPL <sup>3)</sup> -GPO <sup>4)</sup> -POD <sup>5)</sup> 系)	
6	総コレステロール(T-Cho.)	酵素法 (CES <sup>6)</sup> -COD <sup>7)</sup> -POD 系)	
7	総ビリルビン(T-Bil.)	Jendrassik 法	生化学自動分析
8	尿素窒素(BUN)	Urease-UV 法	>装置〔JCA-VX-
9	クレアチニン(Crea.)	Jaffé法	1000 型クリナ
10	GOT (GOT)	SSCC® 法	ライザー:日本
1	GPT (GPT)	SSCC 法	電子(株)]
12	$\gamma$ – G T P ( $\gamma$ –GTP)	SSCC 法	
<b>(13</b> )	ALP (ALP)	GSCC <sup>®</sup> )法	
<b>14</b> )	コリンエステラーゼ(ChE)	BTC¹°)-DTNB¹¹)法	
<b>1</b> 5	カルシウム (Ca)	OCPC 法	
16	無機リン (P)	酵素法 (PNP <sup>12)</sup> -XOD <sup>13)</sup> -POD系)	
17)	ナトリウム(Na)	イオン電極法	<b>~</b> 電解質自動分析
18	カリウム(K)	イオン電極法	〉装置〔NAKL-1:
<u>(19)</u>	塩素 (C1)	イオン電極法	<b>」</b> 東亜電波工業(株))

1) グルコキナーゼ、2) グルコース6リン酸脱水素酵素、3) リポプロテインリパーゼ、4) グリセロリン酸酸化酵素、5) ペルオキシダーゼ、6) コレステロールエステラーゼ、7) コレステロールオキシダーゼ、8) スカンジナビア臨床化学会、9) ドイツ臨床化学会、10) プチリルチオコリン、11) 5.5-ジチオビス-2-ニトロ安息香酸、12) プリンヌクレオシドホスフォリラーゼ、13) キサンチンオキシダーゼ

## (4) 病理学的検査

死亡および頻死動物は発見後速やかに、雄の計画屠殺動物は採血に続いて、また雌の計画 屠殺動物は哺育4日目の観察終了後にエーテル麻酔下で、いずれも放血屠殺し、次の項目を検 査した。分娩異常あるいは分娩後の異常により出産児の全例が死亡した雌は死亡が確認された 日に、分娩予定日を過ぎても分娩が認められない雌については分娩予定の4日後(妊娠25日) にそれぞれ屠殺し、検査に供した。

- a. 剖検:全身臓器を肉眼的に観察した。さらに、雌については、卵巣の黄体数および 子宮の着床痕の数を調べた。
- b. 臓器重量測定:電子上皿天秤(メトラー社、AT 200)を用いて、雌雄の肝臓、腎臓、胸腺並びに雄の精巣、精巣上体を秤量(絶対重量)し、対体重比(相対重量)を算出した。腎臓、精巣および精巣上体は、左右を一括して秤量した。
- c. 病理組織学的検査:次の臓器を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液(精巣および精巣上体のみプアン液)で固定した。

脳、下垂体、眼球、ハーダー腺、甲状腺(上皮小体含む)、唾液腺、胸腺、肺(気管含む)、心臓、舌、食道、胃、腸、肝臓、脾臓、膵臓、副腎、腎臓、膀胱、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、卵巣、子宮、膣、大動脈(胸部)、脊髄(頚膨大部、腰膨大部)、坐骨神経、骨・骨髄(胸骨、大腿骨)、リンパ節(頚部リンパ節、腸間膜リンパ節)、骨格筋(下腿三頭筋)、皮膚(背部)、乳腺(腹部)

病理組織学的検査は、対照群と最高用量 1000 mg/kg群の肝臓、腎臓、心臓、副腎、胸腺、脾臓、肺(気管含む)、胃、腸、膀胱、脳並びに精巣あるいは卵巣について行った。30,100 および 300 mg/kg 群では、最高用量群で変化の認められた雌雄の胃、膀胱、雄の盲腸並びに雌の肝臓、副腎、胸腺、脾臓を検査した。さらに、死亡動物、不妊のつがい、全児が死亡した雌では、対照群および最高用量群で検査した臓器に加えて、下垂体並びに精巣上体、精嚢、前立腺あるいは子宮、膣も検査した。

なお、病理組織標本の作製は、株式会社組織科学研究所(東京都青梅市黒沢2丁目 984-1番地)に委託して実施し、常法に従いパラフィン切片を作製し、H-E 染色を施した。

#### (5) 生殖能に関する指標の算出

生殖能に関する各指標は、次のように算出した。

- a. 交尾率 (%) = (交尾成立動物数/同居動物数) × 1 0 0
- b. 着床率(%)=(着床痕数/黄体数)×100
- c. 受胎率(%)=(受胎雌数/交尾成立雌数)×100
- d. 妊娠期間(日)=妊娠0日から出産が確認された朝の前日までの期間
- e. 出産率(%)=(生児出産雌数/生存妊娠雌数)×100

#### 2) 新生児に関する項目

#### (1) 産児数および性比の観察

分娩完了の確認後各腹の産児数(生存児と死亡児の合計)を調べ、分娩率を算定した。 分娩率(%)=(総出産児数/着床痕数)×100

また、性は肛門と生殖突起の距離の長短により判定し、群ごとの性比を算出した。

#### (2) 外表異常および一般状態の観察

分娩完了後、口腔内を含む外表の異常を観察した。また、毎日一般状態および生死を確認 し、出生率および新生児生存率を求めた。

出生率(%)=(出産確認時生存児数/総出産児数)×100 新生児生存率(%)=(哺育4日生存児数/出産確認時生存児数)×100

#### (3) 体重測定

生存児について哺育 0 日及び 4 日に、雌雄別に各腹ごとの総体重を測定し、1 匹当たりの平均体重を算出した。

#### (4) 病理学的検査

死亡例はその都度、生存例は親ラットの解剖時(哺育4日) にエーテル・クロロホルムで麻酔死させ、胸腹部における主要臓器を肉眼的に観察した。

#### 8. 統計処理

得られた平均値あるいは頻度について、対照群との間の有意差(危険率5%以下)を次の方法で検定した。

体重、摂餌量、血液学的および血液生化学的データ、臓器重量、黄体数、着床痕数、妊娠期間、産児数、生存児数、死亡児数などのパラメトリックデータは、Bartlettの分散検定を行った。分散が一様な場合は一元配置の分散分析を行い、その結果有意差を認めた場合、Dunnett 法またはScheff 6法(群の大きさが異なる場合)により対照群に対する各群の比較検定を行った。分散が一様でない場合は、ノンパラメトリックデータに用いる検定法に従った。

着床率、出生率、分娩率、新生児生存率、尿検査の定性的データなどのノンパラメトリックデータは Kruskal-Wallis の順位検定を行い、その結果有意差を認めた場合、Dunnett 法または Scheffé法 (群の大きさが異なる場合)により対照群に対する各群の比較検定を行った。親動物の生存率、交尾率、受胎率、出産率、出産児の性比、病理学的検査等における異常例の出現率などのカテゴリカルデータは、χ²検定を行った。

#### 試験結果

- 1. 反復投与毒性
- 1) 一般状態 (Tables 1, 2, Appendices 9, 10) および死亡 (Tables 3, 4, Appendices 11, 12) 一般状態については、赤色尿の排泄が 100 mg/kg以上の用量群の雄と 100 および 300 mg/kg群の雌に、下腹部被毛の尿汚染および流延が 100 mg/kg以上の用量群の雌と 300 mg/kg以上の用量群の雌に認められた。赤色尿の排泄は、大部分の例においては投与開始翌日にのみ認められる一過性の変化であった。流延は、投与直後あるいは一部は投与のための保定時から数分間発現し、投与液に対する忌避性をうかがわせる症状で、下腹部被毛の尿汚染とともに投与期間を通じて、間欠的に認められた。これらの変化は、いずれも雄で発現率が高く、雌の発現率は 1000 mg/kg群における流延を除いて低かった。特に、雌の赤色尿排泄は、1000 mg/kg群に

これらの一般状態の変化に加えて、雄は 1000 mg/kg群、雌は 100 mg/kg以上の用量群において、投与の反復につれて、あるいは分娩後に削痩し、自発運動低下および深大呼吸を呈する例が認められた。雌ではさらに、紅涙、軟便あるいは毛並み不良となる例も認められた。

なお、DBP投与とは無関係と考えられる所見として、限局性の脱毛が対照群を含む各群に散発的に認められた。

死亡については、1000 mg/kg群で、投与 13日に雄の2匹と雌の1匹が死亡し、さらに雌の1匹は<math>14日に、雄の1匹は28日に瀕死状態となったので、いずれも切迫屠殺した。

さらに、雌では分娩異常あるいは分娩後の異常により各腹の出産児が全例死亡する例が、 100 および 300 mg/kg群に各1匹、1000 mg/kg群に3匹認められたので、これらについては原 因を明らかにするため、全児の死亡が確認された時点で屠殺し、病理学的検査に供した。

2) 体重 (Figures 1, 2, Tables 5, 6, Appendices 13, 14)

は認められず、用量依存性傾向も明かでない散発的な発現であった。

1000 mg/kg群の雄において、対照群に比べ有意な体重増加の抑制が、投与期間を通じて認められた。同様の傾向は 1000mg/kg群の雌にも認められたが、雄に比べて変化は軽度で、統計学的有意差は、投与15日と妊娠7日の測定体重にのみ認められた。

3) 摂餌量 (Figures 3,4, Tabls 7.8, Appendices 15.16)

雄においては、100 および 300 mg/kg群の投与8日の摂餌量と1000 mg/kg群の投与1 および8日の摂餌量が、対照群に比べて有意に減少した。しかし、その後は対照群と著差は認められなかった。雌では、DBP投与各群とも対照群に比べて有意な差は認められなかった。

4) 雄の尿所見 (Table 9, Appendix 17)

DBP投与各群において、いずれの検査項目にも有意な変化は認められなかった。ただし、1000 mg/kg群では尿がやや酸性化する傾向にあり、また 300 および 1000 mg/kg群の各 1 匹で、潜血反応軽度陽性が認められた。

- 5) 雄の血液学的所見 (Table 10, Appendix 18, バックグランドデータ: Appendix 30) 1000mg/kg群で、平均赤血球血色素濃度の有意な増加が認められた。これは、赤血球数およびヘマトクリット値が対照群に比べてやや低値を示したことによるが、これらの変化は統計学的に有意なものではなかった。
- 6) 雄の血液生化学的所見(Table 11, Appendix 19, バックグランドデータ: Appendix 30) DBP投与各群において、各検査項目に、統計学的に有意な変化は認められなかった。

#### 7)病理学的所見

(1) 剖検所見 (Tables 12,13, Appendices 20,21)

認められた主な所見は、消化管における変化であった。すなわち、胃の前胃部において、粘膜の肥厚が 300 mg/kg以上の用量群の雌雄に認められた。特に1000 mg/kg群では、肥厚した粘膜の表面に膜様物の形成が認められ、内腔に剥離した組織塊を認める例もあった。また、1000 mg/kg群では、水分含量の多い内容物を含む盲腸の拡張が雄に認められた。さらに、 1000 mg/kg群における雌雄の死亡・切迫屠殺動物並びに全児死亡の雌には、胃の腺胃部粘膜における黒色点散在並びにガス貯留による胃および腸の拡張が認められた。

これらの消化管における変化に加えて、肝臓の腫大が低い発現率ながら1000 mg/kg群の雌に認められた。また、死亡・切迫屠殺動物および各用量群における全児死亡の雌には胸腺および脾臓の萎縮が、全児死亡の雌には副腎の肥大・退色が、死亡・切迫屠殺動物には肺の暗赤色化、肝臓および腎臓の暗色調化並びに副腎の赤色化が認められた。

なお、不妊のつがいおよび全児死亡の雌においても、生殖器系臓器には特に異常は認められなかった。

- (2) 臟器重量 (Tables 14~17, Appendices 22~25)
- 1000 mg/kg群において、肝臓の絶対および相対重量に共通した有意な増加が雌に認められた。
- (3) 病理組織学的所見(Tables 18,19, Appendices 20,21, Photos 1~21)DBP投与の主な影響は、肝臓、胃および腸並びに膀胱に認められ、さらに副腎、脾臓、胸腺な

どにも変化が認められた。生殖毒性と関連する変化については、特に認められなかった。

- a. 肝臓(雄は対照および 1000 mg/kg群の全例とその他の群の不妊例、雌は全群の全例を検査):小葉中心性の肝細胞腫大が、1000 mg/kg群の雌で認められた。また、小葉中心ないし中間帯における肝細胞の脂肪化が、100 mg/kg以上の用量群の主に全児死亡の雌に認められた。死亡・切迫屠殺動物ではうっ血が認められた。
- b. 胃(雄、雌とも全群の全例を検査):雌雄とも 300 mg/kg以上の用量群で、前胃部に重 層扁平上皮の過形成と角化亢進による粘膜の肥厚が認められた。このような変化は、100 mg/kg以下の用量群では雌で対照群と 100 mg/kg群の各1 匹に認められたのみであった。さらに、 死亡・切迫屠殺動物や全児死亡の雌に共通して、腺胃部粘膜や肥厚した前胃部粘膜にびらんや 潰瘍の形成が認められ、雌では計画屠殺動物においても前胃部粘膜に潰瘍を認める例があった。
- c. 腸(雄、雌とも対照および 1000 mg/kg群の全例とその他の群の不妊例、さらに雄の盲腸についてはその他の群の全例を検査):盲腸において、表層上皮の軽度な変性を示す例が 300 mg/kg以上の用量群の雄で認められた。腸のその他の部位および雌では特に異常は認められなかった。
- d. 膀胱(雄、雌とも全群の全例を検査):多くは表層上皮の変性を伴う膀胱上皮の過形成が100 mg/kg以上の用量群の雌雄に認められ、雌では 300 および 1000 mg/kg群で上皮が壊死し、潰瘍が形成されている例も認められた。
- e. 副腎(雄は対照および 1000 mg/kg群の全例とその他の群の不妊例、雌は全群の全例を検査):副腎皮質の特に束状帯細胞において、脂質含量の増加と考えられる空胞化が 100 mg/kg以上の用量群で認められた。この変化の発現例は、ほとんどが全児死亡の雌であった。また、死亡・切迫屠殺動物にはうっ血が認められた。
- f. 脾臓・胸腺(雄は対照および 1000 mg/kg群の全例とその他の群の不妊例、雌は全群の全例を検査):主に死亡・切迫屠殺動物と全児死亡の雌において、脾臓および胸腺の萎縮が認められた。萎縮した脾臓には、雌雄とも褐色色素の沈着や雌では髄外造血巣の減少などの変化を伴う例がみられた。
- g. 肺(雄、雌とも対照および 1000~mg/kg群の全例とその他の群の不妊例および雌の全児死亡例を検査): <math>1000~mg/kg群における雌雄の死亡例に共通して、肺にうっ血あるいはうっ血性水腫が認められた。
- h. 脳・心臓・腎臓・精巣または卵巣(雄、雌とも対照および 1000 mg/kg群の全例とその他の群の不妊例および雌の全児死亡例を検査):いずれの臓器にも、DBP投与の影響と考えられる異常は認められなかった。
- i. 下垂体と精巣上体、精嚢、前立腺または子宮、膣(雄、雌の不妊例と雌の全児死亡例) : いずれの臓器にも、異常は認められなかった。

以上の所見の他にも、検査した各臓器に変化が認められたが、いずれもDBP投与とは無関係な自然発生病変と考えられる変化であった。

#### 2. 生殖発生毒性

- 1) 親動物に及ぼす影響 (Table 20, Appendix 26)
  - (1)交尾率および受胎率

交尾は、対照群およびDBP投与各群とも全例に成立した。また、受胎率は、対照群並びにDBPの30、100、300 および 1000 mg/kg群でそれぞれ 90、100、80、90 および 100 %であり、交尾能および受胎能に対するDBPの影響は認められなかった。

## (2) 黄体数、着床数および着床率

DBP投与各群の黄体数、着床数および着床率は、対照群と比べて有意な差は認められなかった。

## (3) 出産率、妊娠期間および哺育

各群とも妊娠した雌は全例分娩し、また妊娠期間についても、DBP投与各群は対照群と比べて有意な差は認められなかった。ただし、1000 mg/kg群の1 匹は、分娩予定日の夕方に最初の仔が娩出されつつあったが難産で、翌朝の観察では分娩は終了していたものの全児が死亡していた。そのため、出産率は低下傾向を示した。哺育については、100、300 および 1000 mg/kg群の各1 匹は、分娩後に削痩して自発運動が低下し、ほとんど哺育行動をとらず、哺育1~3日に全児が死亡した。1000 mg/kg群の別の1 匹は、分娩後外部刺激に対して過敏な傾向にあり、哺育1日の投与終了後突然食殺行動を起こし、哺育2日には全児が食殺されていた。

全児死亡の雌親については、全児の死亡が確認された時点で屠殺し、病理学的検査を実施した結果、前述のように、各臓器に反復投与毒性と考えられる変化は認められたが、生殖毒性を 裏付ける異常は認められなかった。

#### 2)新生児に及ぼす影響(Table 21, Appendices 27)

## (1)一般状態

対照群を含む全ての群において、新生児の生後4日目までの一般状態に異常は認められなかった。

- (2) 出産児数、分娩率、生存児数、死亡児数、出生率、性比、新生児体重および新生児生存 率
  - 30、100 および 300 mg/kg群では、これらの指標に有意な変化は認められなかった。1000

mg/kg群では、出産した8匹の雌親中3匹が、分娩異常や分娩後の異常により全児が死亡したため、新生児数、哺育4日生存児数および生存率は減少あるいは低下傾向を示し、4日生存児雌数には対照群との間に有意差が認められた。

## (3)新生児の形態(Table 22, Appendices 28, 29)

外表異常は、痕跡尾を呈する新生児が対照群と 300 mg/kg群に各 1 例みられた以外、いずれの群にも異常例は観察されなかった。内臓異常は、全ての群の新生児に認められなかった。また、内臓変異についても、胸腺の頸部残留と左臍動脈遺残がDBP投与各群の新生児に散発的に認められたが、発現傾向が用量依存的でなく、DBP投与の影響がうかがわれる変異の発現は認められなかった。

## 考察および結論

#### 1. 反復投与毒性

認められた主な変化は、投与経路である消化管や排泄経路である膀胱の粘膜に対する障害であった。

30 mg/kg群で、毒性影響と考えられる変化は認められなかった。

100 mg/kg以上の用量群では膀胱上皮の過形成が、300 mg/kg以上の用量群では胃の前胃部粘膜の肥厚、下腹部被毛の尿汚染および投与液に対する忌避性によると考えられる流涎が、いずれも雌雄に認められた。また、下腹部被毛の尿汚染および流涎は 100 mg/kg群の雌でもみられたほか、赤色尿の排泄が 100 mg/kg以上の用量群の雄と 100 および 300 mg/kg群の雌に認められた。さらに、100 mg/kg群では投与開始初期に摂餌量の減少が雄に、1000 mg/kg群では粘膜上皮の変性を伴う盲腸の拡張が雄に、体重増加の抑制および死亡が雌雄に認められた。

胃の前胃部粘膜の肥厚は、角化亢進を伴う重層扁平上皮の過形成によるもので、潰瘍形成を認める例があり、胃障害に対する上皮の反応性増殖と判断される変化であった。また、胃の腺胃部粘膜にもびらんや潰瘍を認める例があり、これらは経口投与したDBPの胃粘膜に対する局所障害性を示唆する変化と解せられる。なお、腸については、盲腸粘膜に軽度な上皮の変性が認められたが、その他の部位には明かな変化は認められなかった。

一方、膀胱粘膜における変性や潰瘍の形成を伴った上皮の過形成についても、排泄臓器である腎臓を経て濃縮された尿中のDBPあるいはその代謝物の、膀胱粘膜に対する直接的な影響による変化と考えられる。これらの動物に認められた赤色尿の排泄は、障害された膀胱粘膜からの出血によるものと推察されるが、大部分の例は投与開始翌日に認められ、膀胱の障害が投与初期から発現していることがうかがわれた。なお、腎臓に対しては、特に明かな影響は認められなかった。

以上の消化管や膀胱における変化に加えて、1000 mg/kg群の雌で、肝臓に肝細胞の腫大が認められ、肝臓重量は増加した。さらに、後述のように、一般毒性学的影響が強く発現したためと考えられる全児死亡の雌においては、肝細胞の脂肪化も認められ、雌では肝臓に対する影響がうかがわれた。このような肝臓における病理学的変化は雄では明かでなく、雄の臨床検査においても肝障害を示唆する変化は認められなかった。

死亡は投与13日から28日の間に発現し、これらは削痩、自発運動低下、深大呼吸等の症状を 呈して死亡し、病理学的検査では胃の前胃部や腺胃部粘膜に、びらんや潰瘍が共通して認めら れた。また、胃や腸はガスにより拡張し、内容物はほとんど認められなかった。さらに、各臓 器におけるうっ血性変化に加えて、脾臓および胸腺の萎縮が認められた。

100 mg/kg以上の用量群で、分娩あるいは分娩後の異常により出産児の全例が死亡した雌親が みられたが、これらの動物においても死亡動物と類似した病理学的変化が認められた。さらに、 このような雌親の副腎は腫大・退色し、病理組織学的には皮質細胞、特に束状帯細胞に脂質の 増加を示唆する空胞化も認められ、分娩あるいは授乳期にある動物では、DBPの毒性影響が強く 現れる傾向がうかがわれた。

なお、雄の臨床検査では、1000 mg/kg群で尿が酸性化傾向を示し、平均赤血球血色素濃度が増加した以外、特に変化は認められず、DBPは有機リン化合物ではあるが、血清コリンエステラーゼ活性にも影響は認められなかった。

以上の結果から、DBPの反復投与毒性として、主に消化管、特に胃、および膀胱の粘膜に障害が発現することが明かとなり、雌では肝臓に対する影響も認められた。また、無影響量については、雄、雌とも 30 mg/kg/日と推定された。

#### 2. 生殖発生毒性

雄親および雌親の生殖に対しては、1000 mg/kg群においても観察した各指標とも対照群との間に有意な差は認められなかった。1000 mg/kg群で、全児が死亡した難産の1匹がみられ、そのため出産率はやや低下する傾向にあったが、有意な変化ではなかった。

児動物の発生に対しては、出産児の全例が死亡した雌親が 100 mg/kg以上の用量群で発現し、1000 mg/kg群では3匹と発現率が高かったため、1000 mg/kg群の新生児数、哺育4日生存児数および生存率は減少あるいは低下傾向を示し、統計学的有意差は哺育4日生存児雌数のみに認められたが、雄を含めて哺育4日生存児数の減少および生存率の低下は明かであった。

全児死亡の雌親においては、胃にびらんや潰瘍が共通して認められ、重度な病理学的変化が確認されたが、下垂体や生殖器系臓器には異常は認められなかった。したがって、発生毒性におけるこれら指標の変化は、雌親に対する一般毒性学的影響により二次的に発現したものと判断される。

なお、交尾が確認されたにもかかわらず妊娠しなかったつがいが、投与量とは無関係に各群 に散発したが、病理学的にはこれらの個体に生殖能の異常を示唆する変化は認められず、偶発 的なものと考えられた。

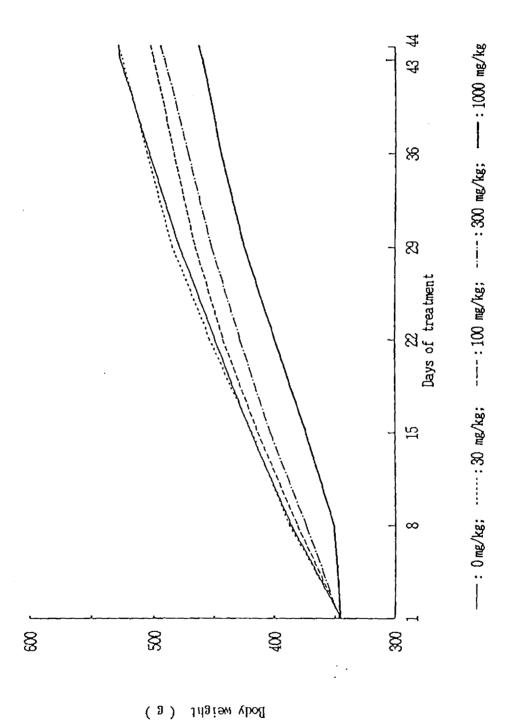
以上の結果から、親動物の生殖に対しては、雄、雌とも、1000 mg/kg群においても対照群に 比べて有意な変化は認められなかった。児動物の発生に対しては、1000 mg/kg群で哺育4日生 存児数の減少および生存率の低下傾向などが認められ、無影響量は 300 mg/kg/日と推定された。 ジ ブ チ ル フ ォ ス フ ェ ー ト の ラットを用いた経口投与による 反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験 (試験番号 92-044)

最終報告書 添付資料A

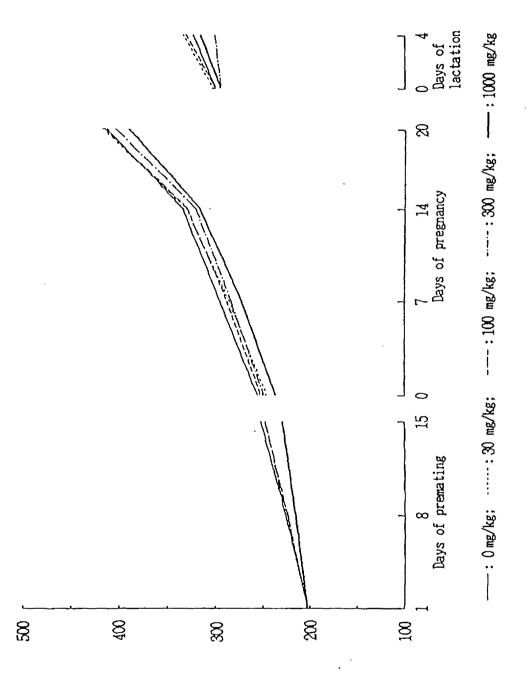
(図・群別平均値表)

平成 5年10月29日

財団法人 畜産生物科学安全研究所

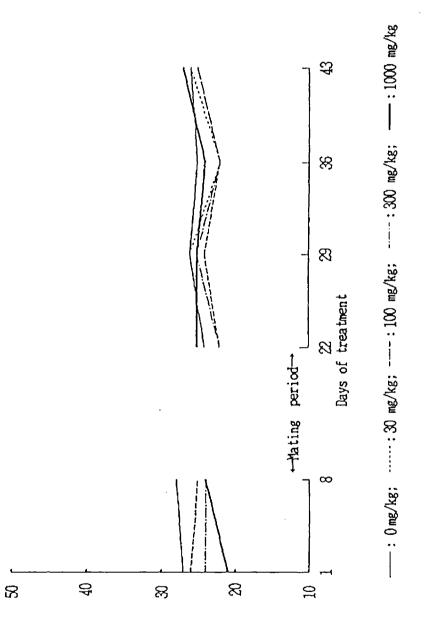


ig 1 Body weight change in parental males



(g) Ingiew (bod)

Fig. 2 Body weight change in parental females



Pood consumption

Fig. 3 Food consumption change in parental males

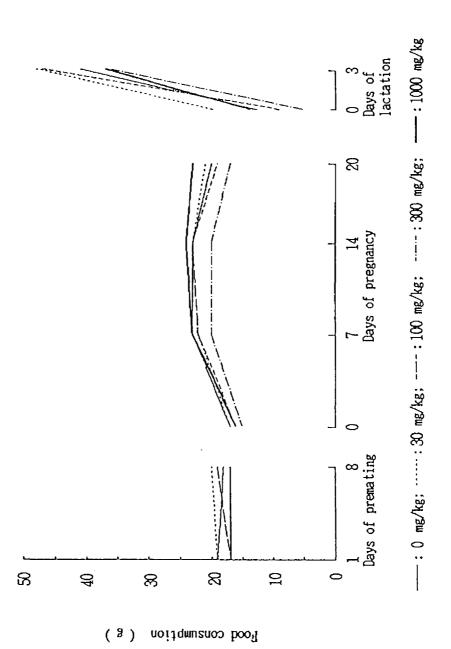


Fig. 4 Food consumption change in parental females

Table 1 Incidence of clinical signs in parental males

Clinical sign	Dose(mg/kg)	0	30	100	300		1000	
	Fa te	TK	TK	TK	TK	TK	FD/KE	(Total)
	Animals examined	10	10	10	10	7	3	(10)
Red urine		() a)	0	4	7 *	5	1	(6)*
Blotted fur in low	er abdomen	0	0	0	5 *	6	3	(9)**
Salivation		0	0	0	4	7	3	(10) **
Emaciation		0	0	0	0	0	1	(1)
Deep and slow resp	piration	0 .	0	0	0	0	2	(2)
Decreased locomoto	r activity	0	0	0	0	0	3	(3)
Hair loss regions		1	0	0	0	0	0	(0)
Rough fur		0	0	0	0	0	1	(1)

a) : No. of animals with sign

TK : Terminal kill

FD/KE: Found dead or killed in extremis

\* : Significantly different from control at 5% level of probability

\*\* : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 2 Incidence of clinical signs in parental females

Clinical sign	Dose(mg/kg)	0		30		100				3	00		1000				
	Fate	TK	NP	(Total)	TK	TK	NP	KL	(Total)	TK	NP	KL	(Total)	TK	KD/KL	FD/KE	(Total)
	Animals examined	9	1	(10)	10	7	2	1	(10)	8	1	1	(10)	5	3	2	(10)
Red urine		() a)	0	(0)	0	1	0	0	(1)	1	0	1	(2)	0	0	0	(0)
Blotted fur in	lower abdomen	0	0	(0)	0	0	0	1	(1)	2	0	1	(3)	1	2	2	(5)
Salivation		0	0	(0)	0	0	0	1	(1)	1	0	0	(1)	5	3	2	(10) **
Emaciation		0	0	(0)	0	0	0	1	(1)	1	0	1	(2)	0	1	1	(2)
Decreased locom	otor activity	0	0	(0)	0	0	0	1	(1)	1	0	1	(2)	0	2	1	(3)
Deep and slow r	espiration	0	0	(0)	. 0	0	0	1	(1)	0	0	0	(0)	0	1	1	(2)
Chromodacryorrh	ea	0	0	(0)	0	0	0	0	(0)	0	0	1	(1)	0	0	1	(1)
Loose stool		0	0	(0)	0	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)	0	2	0	(2)
Rough fur		0	0	(0)	0	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)	0	1	1	(2)
Hair loss regio	n	1	0	(1)	0	1	0	0	(1)	1	0	0	(1)	0	0	0	(0)

a): No. of animals with sign

FD: Found dead

KE: Killed in extremis

KL: Killed because all pups died after delivery

KD: Killed due to delivery disorder

\*\* : Significantly different from control at 1% level of probability

TK: Terminal kill on day 4 of lactation

NP: Non-pregnant(killed on 25 days after copulation)

Table 3 Mortality rate in parental males

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
No. of rats examined	10	10	10	10	10
No. of dead rats <sup>a)</sup>	0	0	0	0	က
Mortality (%)	Ö	0	0. 0 0 0 30	0	30

a) : Total number of rats found dead and killed in extremis

Table 4 Mortality rate in parental females

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
No. of rats examined	10(1) <sup>a)</sup>	10	10(1)	10(1)	10
No. of dead rats by	0	0	0	0	2
No. of rats killed co	0	0	1	1	3
Mortality (%)	0	0	0	0	29

a): (Number of non-pregnant among examined rats), included in calculation

b) : Total number of rats found dead and killed in extremis

c): Total number of rats killed due to delivery disorder and killed after delivery because all pups died, not included in calculating mortality rate

Table 5 Body weights - Group mean values in parental males

								( g )
Dose	Days of	treatment						
(mg/kg)	1	8	15	22	29	36	43	44
0	345	386	419	449	479	504	527	528
	9	13	17	24	30	35	42	44
	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
30	345	388	418	453	485	506	525	528
	8	16	18	23	24	22	25	24
	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
100 .	345	381	413	442	466	484	500	502
	8	12	14	15	19	19	23	24
	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
300	346	374	403	428	452	472	491	494
	9	18	24	25	26	29	29	30
	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
1000	345	351**	374**	399**	425**	445**	460**	463**
	9	11	17	21	30	29	28	30
	(10)	(10)	( 8)	( 8)	( 7)	( 7)	( 7)	( 7)

Each value is expressed as mean, SD. and (number of animals examined).

\*\*\*: Significantly different from control at 1% level of probability

Dose	Days of	prematin	g		Days of	pregnanc	У		Days of	lactation
(mg/kg)	1	8	15	22	0	7	14	20	0	4
0	202 7 (10)	226 13 (10)	251 13 (10)		255 11 ( 9)	295 12 ( 9)	334 9 ( 9)	413 23 ( 9)	300 27 ( 9)	323 21 ( 9)
30	203 7 (10)	224 11 (10)	246 11 (10)	288	250 17 (10)	288 14 (10)	332 18 (10)	421 20 (10)	306 20 (10)	337 16 (10)
100	203 7 (10)	223 9 (10)	247 12 (10)		251 14 (8)	287 16 (8)	329 22 ( 8)	416 24 (8)	300 35 (8)	331 22 ( 7)
300	203 · 7 (10)	226 10 (10)	246 10 (10)		248 12 ( 9)	283 13 ( 9)	320 15 ( 9)	404 30 ( 9)	294 20 ( 9)	301 42 (8)
1000	203 7 (10)	215 11 (10)	228* 18 (8)		236 15 ( 8)	272* 12 ( 8)	316 14 (8)	390 17 ( 8)	286 34 (8)	316 15 ( 5)

Each value is expressed as mean, SD. and (number of animals available).

\* : Significantly different from control at 5% level of probability

Table 7 Food consumption - Group mean values in parental males

Dose Days of treatment (mg/kg) 15 22 29 36 43 8 0 28 24 24 27 26 25 26 3 2 2 2 3 (10)(10)(3) (10) (10)(10) (10) 30 24 27 28 24 26 22 26 2 4 2 (10)(10)(5) (9) (10) (10)(10)26 22 22 22 25 100 25\* 24 3 3 4 3 (10) (10)(3) (10) (10) (10) (10) 300 24 24\*\* 21 22 25 22 25 2 (10) (3) (10) (10)(10) (10) (10) 1000 21\* 24\*\* 22 25 25 24 27 3 6 4 3 (10) (10) (2) (8) (7) (7) (7)

(g/rat/day)

Each value is expressed as mean, SD. and (number of animals examined). \* : Significantly different from control at 5% level of probability

<sup>\*\* :</sup> Significantly different from control at 1% level of probability

Table 8 Food consumption — Group mean values in parental females

(g/rat/day)

Dose Days of premating Days of pregnancy Days of lactation (mg/kg) (10)(9) (9) (9) (10)(9) (9) (9) (10)(10) (10)(10)(10)(10)(10)(10) (10) (8) (10) (8) (8) (8) (8) (7) (10)(10)(9) (9) (9) (9) (9) (8) (10) (10) (8) (8) (8) (8) (7) (5)

Each value is expressed as mean, SD. and (number of animals available).

Table 9 — 1 Urinary findings - Summarized data in parental males

61ucose - + + + ++	10	10	10	10	L
Protein — + + + + + + +++	2 6 2	2 3 5	6 4	3 7	6 1
5.0 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5	7 2	2 4	£	1 2	1
PH 7	H	4	<del></del> 1	က	2
6.5			က	4	$\vdash$
6.0					2
5.0					Н
Animals examined	10	10	10	10	7
Dose (mg/kg)	0	ଞ	100	900	1000

Protein : -(negligible),  $\pm (15 \sim 30 \text{mg/dl})$ , + (30 mg/dl), + (100 mg/dl), + + (300 mg/dl), + + (100 mg/dl)

Table 9-2Urinary findings - Summarized data in parental males

Dose (mg/kg)	Animals examined	 	Ket ±	one body + ++ +++		0cc ±	ult blood + ++ +++	<u>Urobilinoge</u> 0.1 1 2 4	<u>Bilirubin</u> — + ++ +++
0	10	1	7	2	9	1		10	10
30	10	3	6	1	8	2		10	10
100	10	4	4	2	10			10	10
300	10	1	7	2	7	2	1	10	10
1000	7	5	2		6		1	7	7

Ketone body: -(negligible),  $\pm(5\text{mg/dl})$ , +(15mg/dl), ++(40mg/dl), +++(80mg/dl)Occult blood: -(negligible),  $\pm(\text{trace})$ , +(slight), ++(moderate), +++(marked)Urobilinogen: Ehrlich unit/dl

Bilirubin: - (negligible), + (slight), ++ (moderate), +++ (marked)

Table 10 Hematological findings - Group mean values in parental males

Dose (mg/kg)	Animals examined	Animals available	RBC (10 <sup>4</sup> /μ1)	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (%)	WBC (10 <sup>2</sup> / µ 1)	Plat. (10 <sup>4</sup> /μ1)
0	10	10	849 48	15. 5 0. 7	45. 5 2. 0	54 1	18. 3 0. 4	34. 2 0. 4	82 16	151 19
30	10	10	864 21	15.6 0.3	45. 4 0. 7	53 1	18. 1 0. 3	34.3 0.4	78 14	141 20
100	10	10	850 26	15. 4 0. 5	45. 0 1. 3	53 1	18. 1 0. 4	34. 2 0. 5	78 24	146 18
300	10	10	859 34	15. 8 0. 5	45. 7 1. 5	53 1	18. 4 0. 4	34. 5 0. 4	69 17	146 18
1000	8	7@	825 53	15. 4 0. 7	44. 2 2. 1	54 2	18. 7 0. 6	34. 8* 0. 3	80 30	144 20

Each value is expressed as mean and SD.

<sup>@ :</sup> Data for one animal killed in extremis, not included in statistics.

<sup>\* :</sup> Significantly different from control at 5% level of probability

Table 11 - 1 Biochemical findings - Group mean values in parental males

Dose (mg/kg)	Animals examined	Animals available	GOT (IU/1)	GPT (IU/1)	ALP (IU/1)	γ-GTP (IU/1)	ChE (IU/1)	T. P. (g/dl)	Alb. (g/dl)	A/G
0	10	10	55 7	28 4	223 66	0. 22 0. 20	40 15	6. 64 0. 21	3. 21 0. 20	0. 94 0. 11
30	10	10	53 11	28 5	285 <b>53</b>	0. 28 0. 26	42 14	6. 68 0. 17	3. 12 0. 15	0. 88 0. 06
100	10	10	53 6	27 4	279 56	0.30 0.11	33 7	6. 58 0. 15	3. 16 0. 10	0.93 0.07
300	10	10	52 7	26 4	237 65	0. 26 0. 22	35 15	6. 58 0. 24	3. 12 0. 17	0. 90 0. 07
1000	8	7@	50 6	25 3	218 58	0. 84 0. 61	37 13	6. 43 0. 20	3. 25 0. 11	1.03 0.11

Each value is expressed as mean and SD.

<sup>@ :</sup> Data for one animal killed in extremis, not included in statistics.

Table 11 - 2 Biochemical findings - Group mean values in parental males

Dose (mg/kg)	Animals examined	Animals available	T-Cho. (mg/dl)	T. G. (mg/dl)	Glu. (mg/dl)	T-Bil. (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Crea. (mg/dl)	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)
0	10	10	75 16	90 48	148 12	0. 30 0. 03	14.7 1.1	0. 57 0. 07	10. 1 0. 2	6. 9 0. 5
30	10	10	70 9	96 37	164 9	0.30 0.05	15. 1 1. 9	0.57 0.03	10.0 0.2	7. 0 0. 6
100	10	10	74 17	<b>74</b> 30	149 11	0. 33 0. 05	14.6 1.0	0. 58 0. 05	10.0 0.3	6. 6 0. 4
300	10	10	65 12	68 30	150 10	0. 32 0. 04	13. 7 1. 1	0. 58 0. 06	9.8 0.4	6. 7 0. 4
1000	8	7@	58 8	54 30	130 18	0. 28 0. 03	13. 9 0. 8	0.54 0.04	10.0 0.2	6. 9 0. 5

<sup>@ :</sup> Data for one animal killed in extremis, not included in statistics.

Table 11 - 3 Biochemical findings - Group mean values in parental males

Dose (mg/kg)	Animals examined	Animals available	Na (mEq/l)	K (mEq/1)	Cl (mEq/l)
0	10	10	142	4. 29 0. 28	104
30	10	10	141	4.19 0.17	103
100	10	10	142 1	4. 18 0. 15	104 1
300	10	10	142 1	4. 14 0. 23	104 1
1000	8	7@	142 1	4. 06 0. 20	104 1

<sup>@ :</sup> Data for one animal killed in extremis, not included in statistics.

Incidence of necropsy findings in parental males Table 12 - 1

		Dose (mg/kg)		0		30		100			300			1000	
Organs	: Findings	Animals examined	TK 9	FP 1	(T) (10)	TK 10	TK 7	FP 2	(T) (10)	TK 9	FP 1	(T) (10)	TK 7		E (T) (10)
Lung	: Dark red in color	† †† Total	0 * <sup>3</sup> 0 0	0 0 0	(0) (0) (0)	0 0 0	0 0 0	0 0 0	(0) (0) (0)	0 0 0	0 0 0	(0) (0) (0)	0 0 0	1 1 2	(1) (1) (2)
Liver	: Dark in color	+	0	0	(0)	0	0	0	(0)	0	0	(0)	0	3	(3)
Stomach	: Thickened mucosa of non-glandular portion	† †† ††† Total	0 0 0 0	0 0 0 0	(0) (0) (0) (0)	0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	(0) (0) (0) (0)	5 0 0 5	0 0 0	(5) (0) (0) (5)**	2 5 0 7	0 2 1 3	(2) (7) (1) (10)**
	Black spots in glandular	portion	0 0 0	0 0 0	(0) (0) (0)	0 0 0	0 0 0	0 0 0	(0) (0) (0)	0 0 0	0 0 0	(0) (0) (0)	0 0 0	1 2 3	(1) (2) (3)
	Distended with gas	++ +++ Total	0 0 0	0 0 0	(0) (0) (0)	0 0 0	0 0 0	0 0 0	(0) (0) (0)	0 0 0	0 0 0	(0) (0) (0)	0 0 0	1 1 2	(1) (1) (2)
Intestine	: Distended with gas	++ +++ Total	0 0 0	0 0 0	(0) (0) (0)	0 0 0	0 0 0	0 0 0	(0) (0) (0)	0 0 0	0 0 0	(0) (0) (0)	0 0 0	1 1 2	(1) (1) (2)
	Distended cecum with wate	ery contents +	0	0	(0)	0	0	0	(0)	0	0	(0)	5	0	(5)**
Kidney	: Dark in color	ŧ	0	0	(0)	0	0	0	(0)	0	0	(0)	0	3	(3)

a) : No. of animals with abnormality

<sup>+:</sup> Slight; ++: Moderate; +++: Marked
TK: Terminal kill; FP: Failed to cause pregnancy; FD/KE: Found dead or killed in extremis; T: Total
\*\*: Significantly different from control at 1% level of probability

Table 12 - 2 Incidence of necropsy findings in parental males

	Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
Organs : Findings	Animals examined	TK FP (T) 9 1 (10)	TK 10	TK FP (T) 8 2 (10)	TK FP (T) 9 1 (10)	TK FD/KE (T) 7 3 (10)
Adrenal : Reddish color	+	0., 0 (0)	0	0 0 (0)	0 0 (0)	0 2 (2)
Thymus : Atrophy	++	0 0 (0)	0	0 0 (0)	0 0 (0)	0 1 (1)
Spleen : Atrophy		0 0 (0)	0	0 0 (0)	0 0 (0)	0 2 (2)
Skin : Hair loss regions	+	1 0 (1)	0	0 0 (0)	0 0 (0)	0 0 (0)

a) : No. of animals with abnormality

<sup>+ :</sup> Slight; ++ : Moderate

TK: Terminal kill; FP: Failed to cause pregnancy; FD/KE: Found dead or killed in extremis; T: Total

Incidence of necropsy findings in parental females

Ta	h1	Α .	12	- 1
10	.,.	C.	1.1	

		Dose (mg/kg)		0		30		10	0			300				100	0	
Organs	: Findings	Animals examined	TK 9	NP 1	(T) (10)	TK 10	TK 7	NP 2	KL 1	(T) (10)	TK 8	NP 1	KL 1	(T) (10)	TK 5	KD/KL 3	FD/KE 2	(T) (10)
Lung	: Dark red in colo	or +	0*	, 0	(0)	0	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)	0	0	1	(1)
Liver	: Enlargement	†	0	0	(0)	0	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)	2	0	0	(2)
	Dark in color	ŧ	0	0	(0)	0	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)	0	0	1	(1)
	White necrotic s	spots ++	0	0	(0)	0	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)	0	1	0	(1)
Stomach	: Thickened mucosa non-gland	of + dular portion ++ Total	0 0 0	0 0 0	(0) (0) (0)	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	(0) (0) (0)	2 1 3	0 0 0	1 0 1	(3) (1) (4)*	2 3 5	0 3 3	0 2 2	(2) (8) (10)**
	Black spots in g	glandular portion +	0	0	(0)	0	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)	0	1	2	(3)
	Distended with g	ras + ++ Total	0 0 0	0 0 0	(0) (0)	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	(0) (0) (0)	0 0 0	0 0 0	0 0 0	(0) (0) (0)	0 0 0	0 0 0	1 1 2	(1) (1) (2)
Intestine	: Distended with g	ras + +++ Total	0 0 0 0	0 0 0 0	(0) (0) (0)	0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	(0) (0) (0) (0)	1 0 0 1	0 0 0 0	0 0 0 0	(1) (0) (0) (1)	0 0 0	1 0 0 1	0 1 1 2	(1) (1) (1) (3)
Kidney	: Dark in color	+	0	0	(0)	0	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)	0	0	1	(1)
	Enlargement and	decoloration ++	0	0	(0)	0	0	0	0	(0)	0	0	1	(1)	0	0	0	(0)

a): No. of animals with abnormality

Table 13 - 2 Incidence of necropsy findings in parental females

-	Dose (mg/kg)		0		30		10	0			300	)			100	0	
Organs : Findings	Animals examined	TK 9	NP 1	(T) (10)	TK 10	TK 7	NP 2	KL 1	(T) (10)	TK 8	NP 1	KL 1	(T) (10)	TK 5	KD/KL 3		E (T) (10)
Adrenal : Hypertrophy and/or	decoloration +	0.	· 0	(0)	0	0	0	1	(1)	1	0	1	(2)	0	2	0	(2)
Reddish color	+	0	0	(0)	0	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)	0	0	2	(2)
Chymus : Atrophy	+	0	0	(0)	0	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)
	++	0	0	107	0	0	0	i	(1)	l	0	1	(2)	0	1	1	(2)
	Total	0	0	(0)	0	0	0	1	(1)	1	0	1	(2)	0	1	1	(2)
Spleen : Atrophy	+	0	0	(0)	0	0	0	1	(1)	I	0	1	(2)	0	1	2	(3)
Skin : Hair loss regions	+	0	0	(0)	0	1	0	0	(1)	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)

a): No. of animals with abnormality

<sup>+ :</sup> Slight; ++ : Moderate

TK: Terminal kill; NP: Non-pregnant; FD/KE: Found dead or killed in extremis; KD/KL: Killed due to delivery disorder or killed because all pups died after delivery; T: Total

Table 14 Absolute organ weights - Group mean values in parental males

Dose (mg/kg)	Animals examined	Animals @ available	B. W. (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Thymus (g)	Testis (g)	Epidid (g)
0	10	10	502 42	15. 72 2. 34	3. 22 0. 22	0. 36 0. 08	3. 39 0. 28	1.40 0.10
30	10	10	503 23	16. 68 1. 37	3. 23 0. 17	0.38 0.05	3. 40 0. 23	1.33 0.07
100	10	10	478 23	15. 73 1. 40	3. 14 0. 17	0.33 0.06	3. 27 0. 30	1.33 0.16
300	10	10	462 28	15. 39 1. 78	3. 17 0. 27	0.31 0.09	3. 37 0. 27	1.38 0.11
1000	10	7	431** 31	15. 15 1. 73	3.06 0.10	0. 28 0. 09	3. 23 0. 20	1.31 0.07

@ : Data for animals found dead or killed in extremis, not included in statistics

Table 15 Absolute organ weights - Group mean values in parental females

Dose (mg/kg)		Animals @ available	B. W. (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Thymus (g)
0	10	9	323 21	14.06 0.67	2. 06 0. 25	0. 21 0. 06
30	10	10	337 16	15.35 0.99	1.97 0.10	0. 26 0. 04
100	10	7	331 22	15. 17 0. 75	2. 02 0. 16	0. 21 0. 09
300	10	8	301 42	13. 62 1. 99	2.06 0.30	0.14 0.06
1000	10	5	316 <sup>-</sup> 15	17. 14 <b>**</b> 1. 00	2. 15 0. 15	0.18 0.05

© : Data for animals not impregnated, found dead, killed in extremis, killed due to delivery disorder or killed because all pups died after delivery, not included in statistics.

Table 16 Relative organ weights - Group mean values in parental males

Dose (mg/kg)	Animals examined	Animals @ available	B. W. (g)	Liver (%)	Kidney (%)	Thymus (%)	Testis (%)	Epidid (%)
0	10	10	502 42	3. 12 0. 26	0. 65 0. 06	0. 07 0. 02	0. 68 0. 09	0. 28 0. 03
30	10	10	503 23	3. 32 0. 20	0.64 0.02	0. 08 0. 01	0. 68 0. 04	0. 27 0. 02
100	10	10	478 23	3. 29 0. 22	0.66 0.04	0. 07 0. 01	0.69 0.06	0. 28 0. 03
300	10	10	462 28	3. 33 0. 32	0.69 0.07	0.07 0.02	0.73 0.08	0.30 0.04
1000	10	7	431** 31	3. 5 <u>1</u> 0. 24	0. 71 0. 05	0. 07 0. 02	0.76 0.09	0.30 0.03

@ : Data for animals found dead or killed in extremis, not included in statistics

Table 17 Relative organ weights - Group mean values in parental females

Dose (mg/kg)	Animals examined	Animals @ available	B. W.	Liver (%)	Kidney (%)	Thymus (%)
0	10	9	323 21	4.37 0.19	0. 64 0. 05	0.07 0.02
30	10	10	337 16	4.56 0.29	0.59 0.03	0.08 0.01
100	10	7	331 22	4.60 0.31	0.61 0.03	0.06 0.02
300	10	8	301 42	4.53 0.30	0.71 0.22	0.04 0.02
1000	10	5	316 15	5. 42** 0. 32	0.68 0.03	0.06 0.01

② : Data for animals not impregnated, found dead, killed in extremis, killed due to delivery disorder or killed because all pups died after delivery, not included in statistics.

Table 18 - 1 Incidence of histopathological findings in parental males

		Dose (mg/kg)		0		30		100			300			1000	
Organ	: Findings	Animals examined	TK 9	FP 1	(T) (10)	TK 10	T K 8	FP 2	(T) (10)	T K	FP 1	(T) (10)	TK 7	FD/KI	E (T)
Lung	: Congestive edema	† †† Total	0 ° ° ° ° ° ° ° ° ° ° ° ° ° ° ° ° ° ° °	0 0 0	(0) (0) (0)	- - -	 	0 0 0	(0) (0) (0)	_ _ _	0 0 0	(0) (0) (0)	0 0 0	1 1 2	(1) (1) (2)
Heart	: Myocardial fibrosis	ŧ	2	0	(2)	_	~	l	(1)	_	0	(0)	0	0	(0)
Liver	: Microgranuloma	+	1	0	(1)	-		0	(0)	_	0	(0)	0	1	(1)
	Congestion	+ ++ Total	0 0 0	0 0 0	(0) (0) (0)	 _ _	- - -	0 0 0	(0) (0) (0)	_ _ _	0 0 0	(0) (0) (0)	0 0 0	2 1 3	(2) (1) (3)
Stomach	: Erosion in glandular portion	+ ++ +++ Total	0 0 0 0	0 0 0 0	(0) (0) (0) (0)	0 0 0	0 0 0 0	0 0 0	(0) (0) (0) (0)	0 0 0	0 0 0	(0) (0) (0) (0)	0 0 0 0	1 1 1 3	(1) (1) (1) (3)
	Acanthosis with hyperkeratos in non-glandular porti		0 0 0 0	0 0 0 0	(0) (0) (0)	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	(0) (0) (0) (0)	7 2 0 9	1 0 0 1	(8) (2) (0) (10)**	0 1 6 7	0 2 1 3	(0) (3) (7) (10)*
	Erosion in non-glandular por	tion +	0	0	(0)	0	0	0	(0)	3	0	(3)	0	0	(0)
	Ulcer in non-glandular porti	on +++	0	0	(0)	0	0	0	(0)	0	0	(0)	0	1	(1)
Cecum	: Epithelial degeneration	†	0	0	(0)	0	0	0	(0)	1	1	(2)	3	2	(5)*

a): No. of animals with abnormality

<sup>+ :</sup> Slight; ++ : Moderate; +++ : Marked

TK: Terminal kill; FP: Failed to cause pregnancy; FD/KE: Found dead or killed in extremis; T: Total; -: Not examined

<sup>\*\* :</sup> Significantly different from control at 1% level of probability

Table 18 - 2 Incidence of histopathological findings in parental males

		Dose (mg/kg	g)		0		30		100			300			1000	
Organ	: Findings	Animals exa	amined	TK 9	FP 1	(T) (10)	TK 10	TK 8	FP 2	(T) (10)	TK 9	FP 1	(T) (10)	TK 7		(T) (10)
Kidney	: Eosinophilic bodies in prox	imal tubule	+ ++ Total	3 * <sup>2</sup> 1 4	1 0 1	(4) (1) (5)	- - -	<del>-</del> -	0 0 0	(0) (0) (0)	- - -	0 0 0	(0) (0) (0)	3 0 3	1 0 I	(4) (0) (4)
	Focal tubular basophilic ch	ange	+	5	1	(6)			1	(1)	_	0	(0)	4	2	(6)
	Congestion		+	0	0	(0)	_	_	0	(0)	_	0	(0)	0	3	(3)
Urinary	bladder : Epithelial degenera	tion	+	0	0	(0)	0	5	0	(5)**	3	0	(3)	5	1	(6)**
	Epithelial hyperpla	sia <sub>.</sub>	+ ++ Total	0 0 0	0 0 0	(0) (0) (0)	0 0 0	5 0 5	0 0 0	(5) (0) (5)**	7 1 8	0 1 1	(7) (2) (9)**	2 5 7	2 1 3	(4) (6) (10)**
	Protenous plag		+	1	0	(1)	0	0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)
drenal	: Congestion		. +	0	0	(0)	_		0	(0)	_	0	(0)	0	2	(2)
Chymus	: Atrophy		++	0	0	(0)	_	_	0	(0)	_	0	(0)	0	1	(1)
Spleen	: Atrophy		+ ++ Total	0 0 0	0 0 0	(0) (0) (0)	<del></del> 	- - -	0 0 0	(0) (0) (0)	- - -	0 0 0	(0) (0) (0)	0 0 0	1 1 2	(1) (1) (2)
	Brown pigmentation		+	0	0	(0)	_	_	0	(0)	_	0	(0)	0	1	(1)

a): No. of animals with abnormality

<sup>+ :</sup> Slight; ++ : Moderate

TK: Terminal kill; FP: Failed to cause pregnancy; FD/KE: Found dead or killed in extremis; T: Total; - : Not examined

<sup>\*\* :</sup> Significantly different from control at 1% level of probability

Incidence of histopathological findings in parental females Table 19 - 1

		Dose(mg/kg)		0		30		10	0			30	0			10	00	
Organ :	Findings	Animals examined	TK 9	NP 1	(T) (10)	TK 10	TK 7	NP 2	KL 1	(T) (10)	TK 8	NP 1	KL I	(T) (10)	TK 5	KD/KL 3	FD/K 2	E (T) (10)
Lung :	Congestion	+	0 * 2	, 0	(0)	-	-	0	0	(0)	_	0	0	(0)	0	0	1	(1)
Heart :	Myocardial fibrosis	+	1	0	(1)	_	_	0	0	(0)		0	0	(0)	0	2	0	(2)
Liver :	Focal necrosis	† †++ Tota	1 0 1 1	0 0 0	(1) (0) (1)	1 0 1	0 0 0	0 0 0	0 0 0	(0) (0)	0 0 0	0 0 0	0 0 0	(0) (0) (0)	1 0 1	0 1 1	0 0 0	(1) (1) (2)
	Hepatocellular fatty change	+	0	0	(0)	0	0	0	1	(1)	1	0	1	(2)	0	2	0	(2)
	Hepatocellular swelling	+	0	0	(0)	0	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)	3	1	0	(4)*
	Congestion	+.	0	0	(0)	0	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)	0	0	1	(1)
Stomach:	Erosion in glandular portion	t .	0	0	(0)	0	0	0	1	(1)	0	0	0	(0)	0	0	2	(2)
	Ulcer in glandular portion	+++	0	0	(0)	0	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)	0	1	0	(1)
	Acanthosis with hyperkerator in non-glandular port	sis	1 0 0 .1 1	0 0 0 0	(1) (0) (0) (1)	0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 0 0 1	(1) (0) (0) (1)	6 2 0 8	1 0 0 1	1 0 0 1	(8) (2) (0) (10)**	1 2 2 5	0 3 0 3	1 1 0 2	(2) (6) (2) (10)*
	Ulcer in non-glandular port	ion + ++ ++ Tota	0 0 0 1	0 0 0 0	(0) (0) (0)	0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	(0) (0) (0)	0 1 1 2	0 0 0	0 0 1 1	(0) (1) (2) (3)	1 0 0 1	0 2 0 2	0 0 0	(1) (2) (0) (3)

a) : No. of animals with abnormality

<sup>+:</sup> Slight; ++: Moderate; +++: Marked
TK: Terminal kill; NP: Non-pregnant; FD/KE: Found dead or killed in extremis; KD/KL: Killed due to delivery disorder or killed because all pups died after delivery; T: Total; -: Not examined
\*: Significantly different from control at 5% level of probability
\*\*: Significantly different from control at 1% level of probability

Incidence of histopathological findings in parental females Table 19 - 2

		Dose(mg/kg)		0		30		100				300				100	0	
Organ	: Findings	Animals examined	TK 9	NP 1	(T) (10)	TK 10	TK 7	NP 2	KL 1	(T) (10)	TK 8	NP 1	KL 1	(T) (10)	TK 5	KD/KL 3	FD/K	E (T) (10)
Kidney	: Vacuolization of proximal tubular epithelium	† †† Tota	2* 0 1 2	) 0 0	(2) (0) (2)		- - -	0 0 0	1 0 1	(1) (0) (1)	<del></del> 	0 0 0	0 1 1	(0) (1) (1)	0 0 0	1 0 1	0 0 0	(1) (0) (1)
	Focal tubular basophilic ch	ange +	1	0	(1)	_	_	0	0	(0)	_	0	0	(0)	0	0	0	(0)
	Tubular dilatation	<del>+</del> +	0	0	(0)	_	_	0	0	(0)	_	0	1	(1)	0	0	0	(0)
	Congestion	+	0	0	(0)	-	-	0	0	(0)	_	0	0	(0)	0	0	1	(1)
Urinary	bladder : Epithelial hyperpla	sia + †† Tota	0 0 1 0	0 0 0	(0) (0) (0)	0 0 0	3 0 3	2 0 2	1 0 1	(6) (0) (6)**	8 0 8	1 0 1	1 0 1	(10) (0) (10)**	3 2 5	0 3 3	1 1 2	(4) (6) (10)*
	Epithelial degenera	tion +	0	0	(0)	0	0	0	0	(0)	2	0	0	(2)	4	2	2	(8)*
	Ulcer	++ +++ Tota	0 0 1 0	0 0 0	(0) (0) (0)	0 0 0	0 0 0	0	0 0 0	(0) (0) (0)	1 0 1	0 0 0	0 0 0	(1) (0) (1)	1 1 2	0 0 0	0 0 0	(1) (1) (2)
0vary	: Congestion	+	0	0	(0)	_	_	0	0	(0)	_	0	0	(0)	0	0	1	(1)

a): No. of animals with abnormality

<sup>+:</sup> Slight; ++: Moderate; +++: Marked
TK: Terminal kill; NP: Non-pregnant; FD/KE: Found dead or killed in extremis; KD/KL: Killed due to delivery disorder or killed because all pups died after delivery; T: Total; -: Not examined
\*\* : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 19 - 3 Incidence of histopathological findings in parental females

		Dose(mg/	'kg)		0		30	•	10	0			30	0			10	00	
Organ :	: Findings	Animals	examined	TK 9	NP 1	(T) (10)	TK 10	TK 7	KL 1	NP 2	(T) (10)	TK 8	KL 1	NP 1	(T) (10)	TK :	KD/KL 3		E (T)
Adrenal	: Cortical cell vacuolization		+ ++ Total	0*3	0 0	(0) (0) (0)	0 0 0	0 0 0	0 1 1	0 0 0	(0) (1) (1)	1 0 1	0	0 0 0	(1) (1) (2)	0 1	1 2 3	0 0 0	(1) (3) (4)
	Congestion		+	0	0	(0)	0	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)	0	0	1	(1)
Thymus :	: Atrophy		+ ++ +++ Total	0 0 0	0 0 0	(0) (0) (0) (0)	0 0 0	1 0 0 1	0 1 0	0 0 0	(1) (1) (0) (2)	1 1 0 2	0 0 1	0 0 0 0	(1) (1) (1)	0 0 0	0 1 1	0 1 0	(0) (2) (1)
Spleen :	: Atrophy		10ta1 +	0	0	(0)	0	0	1	0	(1)	1	1	0	(3) (2)	0	2	2	(3) (3)
	Brown pigmentation  Decreased extramedullary her	natopoies	is + ++	0 0 1	0 0 0	(0)	0 0 0	0 0 1	0 0	0 0	(0)	1 0 2	0	0 0	(2) (0) (3)	0 0	1 1 2	0 0 2	(1) (1) (4)
	Decreased extramedullary her	natopoies		1		(0) (1) (1)	0 0 0	0 1 1	0 0 0	0 0 0	(0) (1) (1)	0 2 2	0 1 1	0	(0) (3) (3)	0 0 0	1 2 3	0 2 2	

a) : No. of animals with abnormality

<sup>+ :</sup> Slight; ++ : Moderate; +++ : Marked

TK : Terminal kill; NP : Non-pregnant; FD/KE : Found dead or killed in extremis; KD/KL : Killed due to delivery disorder or killed because all pups died after delivery; T : Total

Table 20 Reproduction results — Summarized data

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
No. of pairs mated	10	10	10	10	8
No. of pairs with successful copulation	10	10	10	10	8
Copulation index (%)	100	100	100	100	100
No. of pregnant females	9	10	8	9	8
Fertility index (%)	90.0	100	80.0	90.0	100
No. of corpora lutea (Mean±S.D.)	$18.4 \pm 1.8$	17.5±1.9	$18.3 \pm 0.9$	17.4±1.9	$18.0 \pm 3.0$
do. of implantation sites (Mean±S.D.)	$17.7 \pm 1.2$	$16.5 \pm 1.3$	17.4±1.2	$16.7 \pm 2.4$	16.3±1.6
mplantation index (%, Mean±S.D.)	$96.1 \pm 4.2$	$94.8 \pm 7.1$	95.3±6.6	$95.4 \pm 7.5$	$91.4 \pm 9.1$
o. of pregnant females with parturition	9	10	8	9	8
estation length (days, Mean±S.D.)	$21.3 \pm 0.5$	21.5±0.5	$21.3 \pm 0.5$	$21.3 \pm 0.5$	$21.1 \pm 0.4$
o. of pregnant females with live pups	9	10	8	9	7
Gestation index (%)	100	100	100	100	87.5
o. of pregnant killed <sup>a</sup>	0	0	1	1	3
No. of pregnant females survived	9	10	7	8	5

Copulation index = (No. of pairs with successful copulation/No. of pairs mated)  $\times 100$ 

Fertility index = (No. of pregnant animals/No. of pairs with successful copulation) ×100

Gestation index = (No. of females with live pups/No. of pregnant females)  $\times 100$ 

a: Abnormal pregnants, delivery disorder or all pups died after delivery, killed during the study for pathological examination.

Table 21 Litter results - Summarized data

Dose(mg/kg)	0	30	100	300	1000
No. of pups born	16.3± 1.6	15.6± 1.3	16.3± 1.3	15.7± 2.9	15.3± 2.1
Delivery index (%)	92.4± 4.7	94.6± 4.4	93.6± 6.2	93.5± 6.9	94.0± 9.9
No. of pups alive on da					
Total	15.9 $\pm$ 2.1	15. $2\pm 1.1$	14.4 $\pm$ 2.5	15. $1\pm 2.8$	11.9± 5.4
	$7.3 \pm 1.7$				5.6± 2.8
Female	8.6± 2.9	7. $1\pm$ 2. 5	8. $1 \pm 3.0$	6.8± 1.9	$6.3\pm 3.4$
Live birth index (%)	97.0± 4.8	97.6± 3.2	89.3±18.1	96.8± 7.8	79.9±34.2
Sex ratio (Male/Female)	0.81	1.17	0.78	1. 17	0.91
No. of pups alive on da	y 4 of lactatio	n			
	15.7± 2.0		$12.9 \pm 5.6$	13. $2\pm$ 5. 7	7.1 $\pm$ 7.2
	7.2 $\pm$ 1.7				
Female			7. $1 \pm 4.2$		
Viability index (%)	98.7± 2.6	100 ± 0	86.7±35.1	86.0±32.6	58.0±50.8
Body weight of live pup on day 0	s (g)				
	6.2± 0.6	7.0± 0.5	$6.4 \pm 0.4$	6.5± 0.6	5.3 $\pm$ 2.2
Female			6.0± 0.5		
on day 4	<del>•</del> ·- <del>-</del> -	. — - •			
Male	9.8± 1.0	11.5± 0.7	10.3± 1.7	9.5± 2.2	8.7± 2.4
Female	9. 3± 1.0		9.9± 1.6	<del>_</del>	$8.2\pm\ 2.0$

Delivery index = (No. of pups born / No. of implantation sites)x100 Live birth index = (No. of live pups on day 0 / No. of pups born)x100 Viability index = (No. of live pups on day 4 / No. of live pups on day 0)x100 Sex ratio = Total No. of male pups / Total No. of female pups Each value is expressed as Mean  $\pm$  SD., except sex ratio

<sup>\* :</sup> Significantly different from control at 5% level of probability

Table 2 2 External and visceral findings — Summarized data in pups

Findings	Dose (mg/	'kg) 0	30	100	300	1000
External	No. of pups examined	146	156	130	141	104
	No. of pups with	1	0	0	1	0
	external anomalies <sup>a</sup> External anomaly <sup>a</sup>	$(0.7\pm2.2)$	(0)	(0)	$(0.6\pm1.7)$	(0)
	Vestigial tail	1	0	0	1	0
	,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	$(0.7\pm2.2)$	(0)	(0)	$(0.6\pm1.7)$	(0)
Visceral	No. of pups examined	144	156	129	135	72
	No. of pups with	, O	0	0	0	0
	visceral anomalies <sup>a</sup>	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
	No. of pups with	0	4	3	8	2
	visceral variations <sup>a</sup> Visceral variations <sup>a</sup>	(0)	$(2.6 \pm 4.6)$	$(2.2\pm3.1)$	$(6.9\pm12.2)$	$(2.2\pm3.8)$
	Thymic remnant in	0	4	1	5	1
	neck	(0)	$(2.6 \pm 4.6)$	$(0.7 \pm 2.1)$	$(4.5 \pm 11.1)$	$(1.0 \pm 2.7)$
	Persistent left	0	0	2	3	1
	umbilical artery	(0)	(0)	$(1.5\pm 2.8)$	$(2.4\pm7.1)$	$(1.2\pm3.1)$

a : No. of pups (Mean  $\pm$  S.D. of individual litter percentages)