



チオフェンのラットを用いる
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	4
試験材料および方法	5
1. 被験物質	5
2. 使用動物および飼育条件	5
3. 群分け法	6
4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法	6
5. 予備試験（投与量の設定）	6
6. 観察方法	10
7. 動物の個体識別法	14
8. 統計解析	14
結 果	15
I. 反復投与毒性（親動物所見）	15
II. 生殖発生毒性	25
1. 生殖学的検査所見	25
2. 出生児所見	26
考 察	28
文 献	32

Figures (Figure 1 ～ Figure 4)

Tables (Table P1 ～ Table P18; Table 1 ～ Table 28)

【要 約】

OECD既存化学物質安全性点検事業の一環として、チオフェン（以下TP）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、TPの0（溶媒対照）、25、100 および 400 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、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。

I. 反復投与毒性（親動物所見）

1. 雄動物

100 mg/kg 以上の投与量のTPは、投与後に、寄り掛かり姿勢など一般状態を変化させ、400 mg/kg 投与により、投与期間初期に一過性に摂餌量および体重増加を抑制した。投与期間末期に摂餌量は高値を示したが、体重増加は軽度に抑制され、投与37日に実施した尿検査では、pHが異常な高値を示した。

42回反復投与後の剖検では、100 mg/kg 以上の投与量により小葉中心性に肝細胞は肥大し、マクロファージが浸潤し、肝臓重量比体重値が増加した。さらに、400 mg/kg 投与により、小葉中心性の肝細胞壊死、小葉中心部の肝細胞細胞質の均質化および小空胞化が認められ、総ビリルビン濃度および総コレステロール濃度ならびに肝臓機能の指標となる各種酵素活性が高値を示し、100 mg/kg 以上の投与量のTPは、肝臓毒性を示した。また、400 mg/kg 投与により、小脳顆粒細胞の核濃縮あるいは壊死が1例に観察され、400 mg/kg の投与量のTPは、小脳に対する軽度な毒性を現した。これらの変化に伴い、100 mg/kg 以上の投与ではブドウ糖濃度およびアルカリフォスファターゼ活性が低下し、無機リン濃度が上昇した。このほか、100 mg/kg 以上の投与群において腎臓重量比体重値が増加し、400 mg/kg 投与により eosinophilic body がやや増加したが、腎機能の異常を示す変化は認められなかった。400 mg/kg 投与群において脾臓重量が低下したが、病理組織学的異常は認められなかった。その他の器官にTPの毒性を示唆する変化は認められず、25 mg/kg の投与量のTPには毒性は認められなかった。

2. 雌動物

100 mg/kg 以上の投与量のTPは、投与後に、寄り掛かり姿勢など一般状態を変化させ、400 mg/kg 投与により投与期間初期の摂餌量および体重増加が一過性に抑制し、運動失調を惹起し、1例は投与8日に瀕死状態となり剖検した。

生存例の剖検では、100 mg/kg 以上の投与により、変化の有無に個体差はあるものの、400 mg/kg 投与により雄の肝臓に惹起されたのと同質の所見が観察され、肝臓重量比体重値も増加した。また、小脳の顆粒細胞壊死および小脳核神経細胞の変性が 100 mg/kg 以上の投与群に観察され、400 mg/kg 投与群では、それに伴って脳室の拡張およびその周囲の浮腫も認められた。これらのことから、100 mg/kg 以上の投与量のTPは、肝臓および小脳に障害を与える毒性量であると考えられる。これらの変化は、瀕死屠殺例にも観察され、投与期間初期から認められた。また、生存例の各所見は雄と比較してより増強されていた。100 mg/kg 以上の投与により尿細管上皮の空胞変性が有意に増加し、400 mg/kg 投与群において腎臓重量比体重値が高値を示した。その他の器官にTPの毒性を示唆する変化は認められず、25 mg/kg の投与量のTPには毒性は認められなかった。

II. 生殖発生毒性

1. 生殖学的検査所見

400 mg/kg までの投与量のTPは、交尾、排卵および受胎に毒性を示さなかった。また、TP投与に起因する分娩異常はいずれの投与群にも認められなかった。しかし、100 mg/kg 以上の投与群の小脳に所見が認められた動物の多くに、哺育行動の廃絶や、泌乳の低下が認められ、100 mg/kg 以上の投与量のTPは、母動物の哺育状態に影響を及ぼす毒性量であると考えられる。

2. 新生児所見

出生日の児の生存性および性比 $\left[(\text{生存雄動物数} / \text{生存動物数}) \times 100 \right]$ には、TP投与の影響は認められなかったが、400 mg/kg 投与群において、出生日および哺育4日の体重、ならびに新生児生存率が低値の傾向を示した。100 mg/kg 以下の投与群にTP投与の影響は認められず、TP投与に起因した形態異常はいずれの投与群にも観察されなかった。

Ⅲ. 評価

以上の試験成績から、本試験条件下では、TPの反復投与毒性に関する無影響量は、雌雄ともに 25 mg/kg/day であり、生殖発生毒性に関する無影響量は、雄では、400 mg/kg/day、雌では、25 mg/kg/day であると結論される。

【緒 言】

TPは、5員環にイオウ1原子を有する、ヘテロ環系化合物で、ベンゼンと同様な溶剤として、また、樹脂の架橋剤や、染料および医薬品などの化学物質の中間体として広く使用されている¹⁾。TPは、また、工業用のみならず、コーヒーなどの食品中にも含有されているとの報告がある²⁾。疫学的調査から、TPは、職業的にこれを使用する労働者に腎毒性を引き起こし、循環系に悪影響を及ぼし、光に対する目の反応性に悪影響を及ぼすことが報告されている³⁾。LD₅₀値は、経口投与において、ラットでは1400 mg/kg、マウスでは420 mg/kgであり⁴⁾、マウスの腹腔内投与では100 mg/kg⁵⁾、ウサギの皮下投与では830 mg/kgである⁶⁾。TPの8000 ppmをラットに1時間吸入暴露すると、暴露されたTPの16.3%は、呼吸器から吸収されることが明らかにされているが⁷⁾、TPの吸入暴露におけるLD₅₀値は、ラットでは、9500 mg/m³/2hrとされている⁴⁾。経口投与されたTPの、約30%はそのまま呼気から排泄されるが、その他は肝臓で代謝され、ごく一部が糞便から排泄され、約70%は尿中から排泄される⁸⁾。TPは、肝臓のチトクロームP450 monooxygenasesにより、求電子性の活性中間体にバイオトランスフォームされ⁹⁾、これが肝臓の壊死を惹起すること¹⁰⁾、および、TPを投与すると、小脳の顆粒細胞が壊死すること¹¹⁻¹³⁾などが報告されている。

長期間の暴露については、ラットに対して毎日4時間ずつ1～9ヵ月吸入暴露した成績があり、肺および気管に炎症が、心筋には軽度のネクロバイオーシスが、また、副腎には脂質の増加がそれぞれ惹起されることが報告されている²⁾。しかし、経口投与による反復投与毒性については評価されていない。生殖発生毒性に関しては、TPが精子形成に影響を及ぼすことが報告されているが¹⁴⁾、生殖機能に及ぼす影響は評価されていない。そこで今回我々は、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、TP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

チオフェン (TPと略記) [CAS No. 110-02-1; 化学式、 C_4H_4S ; 分子量、84.14; 英名、thiophene、融点、 $-38^{\circ}C$; 沸点、 $84^{\circ}C$; 比重、1.062~1.070] は、5員環にイオウ1原子を有する、ヘテロ環系化合物である。

本試験に使用したTP [ロット番号: () 純度: 98% (不純物: 不明) (Annex 1)] は、水には不溶であるが、多くの有機溶媒に溶解する、臭気を有する無色透明の液体である。本被験物質は、使用時まで冷蔵条件下で保管し、コーンオイル [ロット番号: V4K5052 (カキ行功(株))] に溶解して、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。調製液は、室温、遮光条件下で保管し、調製後8日以内に投与した。調製液中の被験物質は、室温、遮光条件下で少なくとも8日間安定であり (Annex 2)、動物飼育室内で30分間開封してもTP濃度は変化せず (Annex 3)、ほぼ所定量のTPが含有されていたことを確認した (Annex 4)。

2. 使用動物および飼育条件

試験には、雌雄とも7週齢にて購入した日本チャールス・リバー(株)日野飼育センター生産の Sprague-Dawley 系ラット (Crj:CD、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、全例の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。なお、群分け時の体重範囲は、Annex 5 に示した。

各動物は、温度 $24 \pm 1^{\circ}C$ 、相対湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数約15回/時間、照明12時間 (午前7時~午後7時) に条件設定された飼育室で、金属製金網床ケージ (22×27×19cm、日本ケージ(株)) に個別に収容して飼育し、固型飼料 (CA-1、日本クレア(株)) および水道水を自由に摂取させた。妊娠18日 (精子観察日=妊娠0日) 以後の母動物には、飼育ケージの床に金属製床板を敷き、床敷として木製チップ (ホワイティフレーク®、日本チャールス・リバー(株)) を適宜供給した。

供給した飼料、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。

3. 群分け法

雌雄とも初回投与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、1群につき各13匹を用意した。

4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

TPの投与量は、次項に示す予備試験の結果を参考に 25、100 および 400 mg/kgとした。対照群のラットには、TPの媒体としたコーンオイルをTP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	溶媒対照 ^a	0	13 (MX01001-013)	13 (FB01001-013)
2	TP	25	13 (MX02001-013)	13 (FB02001-013)
3	TP	100	13 (MX03001-013)	13 (FB03001-013)
4	TP	400	13 (MX04001-013)	13 (FB04001-013)

a : コーンオイル

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）まで毎日1回、ラット用胃管を用いて経口投与した。毎日の投与は、原則として一定時刻の間（通常13時～15時）に行い、各動物の投与液量（5 ml/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回の測定体重をもとに、また、交尾成立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. 予備試験（投与量の設定）

TPの 0（溶媒対照、コーンオイル）、25、100 および 400 mg/kg を7週齢のSprague-Dawley 系（Crj:CD）ラットの雌雄各5匹に1日1回、14日間、連続して、強制的に経口投与し、雌雄ラットに及ぼす反復投与毒性について予備的に検討した。また、経口投与されたTPの一部は、呼気としてそのまま排泄されること⁶⁾、およびTPは吸入により呼吸器から吸収されること⁷⁾が報告されていることから、呼気として排泄されたTPが同一飼育室内で飼育されている対照群に影響を及ぼす可能性の有無を検討するために、雌雄各5匹を別室で飼育し（以下別室対照群と略記）、これに対照群と同様にコーンオイルを投与した。

予備試験における投与量は、反復投与による一般状態の観察および病理組織学的検査が行われている、SHR-SR 系雌ラットに対する筋肉内投与の成績を参考に設定した。すなわち、TPを動物当たり、0.1 ml 投与すると、初回投与後から自発運動の減少がみられ、さらに投与を反復すると、神経症状を現し、小脳に壊死を起こすとされていることから、投与されたTP量を 500 mg/kg ($\approx 0.1 \text{ ml}/200\text{g}$) と試算し、予備試験の最高用量にはこれをやや下回る、400 mg/kg を選定した。

投与期間中は、生死、一般状態を毎日観察し、体重を投与 1 (投与開始日)、7 および 14日に、摂餌量を投与 2～3、8～9 および 13～14日に測定したほか、腎毒性が予測されたため、投与 2 および 9 日に雌雄の全例について尿検査 (検査項目: pH、潜血、蛋白、糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビン) を実施した。

投与を終了した雌雄全例は、最終投与終了後に絶食させ、翌日に体重を測定した後に剖検して、胸腺、肝臓、腎臓、副腎、精巣および卵巣の重量を測定した。また、全例について血液学的検査 (検査項目: 赤血球数、血色素量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度、白血球数、血小板数) および血液生化学的検査 (検査項目: アルブミン濃度、GOT活性、GPT活性、尿素窒素濃度、総コレステロール濃度、総蛋白濃度、アルカリフォスファターゼ活性、LDH活性、ブドウ糖濃度、トリグリセライド濃度) を行った。試験材料および方法は、併合試験法に準じた。

予備試験結果は、次のように要約される。

1) 死亡動物

雌雄ともにいずれの投与群にも死亡は認められなかった。

2) 一般状態

雌雄ともに、100 mg/kg 以上の投与群において、投与期間初期に鎮静、寄り掛かり姿勢などが観察されたが、投与 4 日にはみられなくなった。

3) 体重 (Tables P1～P4; Appendixes P1-1～P4-5)

25 mg/kg 投与群の体重については、雌雄ともに対照群と同様に推移した。100 mg/kg 以上の投与群では、雌雄ともに投与 1～7 日の体重増加量が低値の傾向を示し、雄では 400 mg/kg 投与群の投与 1～7 日の増加量が、また、雌では、400 mg/kg 投与群の投

与7日の体重と投与1～7日の増加量が、それぞれ対照群と比較して有意 ($p < 0.01$) な低値を示した。投与7日以後の体重増加には、いずれの投与群も対照群との間に有意差は認められなかった。別室対照群の体重推移は、雌雄ともに対照群と同様であった。

4) 摂餌量 (Tables P5、P6; Appendixes P5-1～P6-5)

100 mg/kg 以下の投与群の摂餌量は、いずれの時期も雌雄ともに対照群との間に有意差は認められなかった。400 mg/kg 投与群では、雌雄ともに投与2～3日の摂餌量が対照群と比較して有意 ($p < 0.01$) な低値を示したが、それ以後は対照群との間に有意差は認められなかった。また、別室対照群の摂餌量は、いずれの時期も雌雄ともに対照群と同様であった。

5) 尿検査所見 (Tables P7～P10; Appendixes P7～P10)

雌雄ともに、いずれの時期の尿検査においても異常を示す動物は認められなかった。

6) 血液学的検査所見 (Tables P11、P12; Appendixes P11-1～P12-3)

雄では、100 mg/kg 投与群の白血球数が対照群と比較して有意 ($p < 0.05$) な低値を示したが、TPの投与量に依存した変化ではなかった。その他の項目については、いずれのTP投与群も対照群との間に有意差は認められなかった。別室対照群では、白血球数が対照群と比較して有意 ($p < 0.01$) な低値を示したほかに、対照群との間に有意差は認められなかった。

雌では、400 mg/kg 投与群の血色素量および平均赤血球血色素量が有意 ($p < 0.05$) な低値を示した。別室対照群では、いずれの項目にも対照群との間に有意差は認められなかった。

7) 血液生化学的検査所見 (Tables P13、P14; Appendixes P13-1～P14-3)

雄では、400 mg/kg 投与群において、総コレステロール濃度ならびにLDH、GPTおよびGOTの各活性が、対照群と比較して有意 ($p < 0.05$ 、 $p < 0.01$) に増加した。この他、ブドウ糖濃度は、すべてのTP投与群で有意 ($p < 0.05$) な低値を示し、トリグリセライド濃度は、100 mg/kg 投与群を除くTP各投与群において有意 ($p < 0.01$) な低値を示したが、これらはいずれもTPの用量に依存した変化ではなかった。別室対照群では、トリグリセライド

濃度が有意 ($p < 0.01$) な低値を示したほかに、対照群との間に有意差は認められなかった。

雌では、400 mg/kg 投与群において総コレステロール濃度および総蛋白濃度が有意 ($p < 0.05$ 、 $p < 0.01$) な高値を示したほかに、対照群とTP各投与群との間で有意差は認められなかった。

別室対照群では、いずれの項目も対照群との間に有意差は認められなかった。

8) 器官重量 (Tables P15、P16; Appendixes P15-1 ~P16-5)

雌雄ともに 100 mg/kg 以上の投与群において、肝臓重量の増加傾向が認められ、体重値が有意 ($p < 0.05$ 、 $p < 0.01$) な高値を示した。また、雌では、400 mg/kg 投与群において副腎重量が有意 ($p < 0.05$) な低値を示した。

別室対照群では、雌雄ともに対照群との間に有意差の認められる器官はなかった。

9) 剖検所見 (Table P17、P18; Appendixes P17、P18)

雌雄ともに、TPの用量に依存した変化は観察されなかった。また、別室対照群と対照群に観察された所見の間で差は認められなかった。

10) 併合試験における投与量

以上のように、100 mg/kg 以上のTPは、投与開始後一般状態を変化させ、14日間の反復経口投与によって肝臓重量を増加させた。さらに、400 mg/kg のTPは、雌雄の体重増加および摂餌量を一過性に抑制し、雄の肝機能を変化させたことから、400 mg/kg/day は、6週間の反復投与により、何らかの毒性変化の期待される量であると考え、これを併合試験における最高用量に設定した。また、最低用量には、毒性変化を生じないことの期待される 25 mg/kg/day を設定し、中間用量には、等比中項の 100 mg/kg/day を設定した。また、いずれの検査項目についても、対照群には、呼気から排泄されたTPによる暴露の影響を示唆する変化は認められなかったことから、併合試験の対照群は、TP投与群と同室で飼育することとした。

6. 観察方法

1) 親動物

A. 一般状態

雌雄とも、全例について試験期間中毎日観察した。

B. 体重

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。投与22日までに交尾が成立しなかった雌は、投与22日にも体重を測定した。また、交尾成立雌では、妊娠0、7、14、20日に、さらに、分娩した雌では、分娩後0および4日（哺育0および4日）の体重を測定した。

C. 摂餌量

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摂餌量は測定しなかった。交尾成立雌では、妊娠0～7、7～14、14～20日に、さらに、分娩した雌では、哺育0～4日に摂餌量を測定した。なお、哺育途中で出生児の全例が死亡した母動物の摂餌量は、評価の対象から除外した。

D. 尿検査

予備試験では、投与2および9日に尿検査を実施したが、異常は認められなかった。併合試験では、尿の性状の異常の有無を確認するために、投与期間末期の投与37日に、雄の全例について尿検査を実施した。尿は、動物を4時間代謝ケージに収容して蓄尿することにより採取し、pH測定ならびに潜血、蛋白、糖、ケトン体、ウロビリノーゲンおよびビリルビンの含有の程度は試験紙法（マルティスティックス／クリニテック 200（マイルス三共））により判定し、沈渣は鏡検により観察した。

E. 交配

交配は、投与15日（投与開始日＝投与1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。交尾成立の確認は、毎朝、腔内の腔栓および腔垢中の精子の存在を調べるにより行い、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／同居動物数）×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数を求めた。

F. 分娩状態

各群とも交尾成立雌は、全例を自然分娩させた。分娩状態は、直接観察が可能であったものについてのみ行った。

G. 分娩日の算定

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／妊娠雌数）×100〕を各群について求めた。

H. 最終検査

a) 雄動物

I. 剖検、器官重量測定および病理組織学的検査

最終投与日の投与終了後から絶食を開始し、翌日に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、全例について肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、甲状腺、精巣および精巣上体の重量を測定した。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、その他の器官および大脳、小脳、脊髄、心臓、肺、副腎、膀胱ならびに剖検において異常を認めた器官は、10%ホルマリンに固定した（いずれの器官も長期保管には10%ホルマリンを用いた）。これらの器官は高用量群および対照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的検査を行ったが、高用量群に異常が認められた器官は、その他の投与群についても検査を実施した。また、必要に応じて Oil red O 染色を行った。なお、脾臓および甲状腺の重量測定と病理組織学的検査、ならびに小脳、脊髄および肺の病理組織学的検査は、TPの毒性情報として脾臓重量の低下が報告されていること、ならびに予備試験において肝臓重量が増加して、酵素誘導が疑われたことから、脾臓重量と、酵素誘導の指標となる甲状腺重量を測定し、病理組織学的検査を実施することとした。また、TPは、呼吸器から吸収されることから、肺の病理組織学的検査を実施した。さらに、TPは小脳の特定の部位に壊死性の病変を形成することが報告されているので、投与量と病変との関連性を明らかにするために小脳および脊髄の病理組織学的検査を実施した。

II. 血液学的検査

全例について、剖検に先立ち、ペントバルビタール麻酔下で腹部後大静脈よりEDTA

を抗凝固剤として採血し、以下に示す項目について検査した。また各群の5例については、EDTAを抗凝固剤とする採血に先立ち、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採血し、以下に示す方法により血液凝固時間を測定した。

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 社)
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)	〃
ヘマトクリット値 (Ht)	〃 ($0.001 \times \text{RBC} \times \text{MCV}$)	〃
平均赤血球血色素量 (MCH)	〃 ($1000 \times \text{Hb} / \text{RBC}$)	〃
平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	〃 ($100 \times \text{Hb} / \text{Ht}$)	〃
血小板数	〃 (電気抵抗法)	〃
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	CA-3000 (東亜医用電子)
活性部分	光散乱検出法	CA-3000 (東亜医用電子)
トロンボラスフィン 時間 (APTT)		

ハ 血液生化学的検査

全例について、血液学的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、それぞれ血漿を分離して以下に示す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	ウレアーゼG1, DH 法	〃
クレアチニン濃度	Jaffe 法	〃
アルカリフォスファターゼ活性	p-ニトロフェニル酸基質法	遠心方式生化学自動分析装置 COBAS- FARA (ロシュ)
GOT活性	SSCC法	〃
GPT活性	SSCC法	〃
総ビリルビン濃度	ビリルビン反応キット S シリーズ	〃
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 EA05 (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	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-加水分解-4-ニトロアニリド基質法	〃
A/G比	計算	—

b) 雌動物

交尾不成立雌は交配期間終了日に、交尾したが分娩しない雌は妊娠25日相当日に、それぞれ致死量のペントバルビタールを投与後に放血・致死させ、剖検した。また、分娩した雌は哺育4日に、瀕死状態と判断された動物は、そのつど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 Salewski 法¹⁵⁾ を応用して着床痕を染色して着床数を確認した。卵巣はブアン液に固定して保存し、実体顕微鏡下で黄体数を数えた。不妊例および交尾不成立例の卵巣については、病理組織学的検査を行った。また、肝臓、腎臓および胸腺の重量を全例について測定した。これらの器官および大脳、小脳、脊髄、心臓、脾臓、肺、副腎、甲状腺、子宮、膀胱および剖検において異常を認めた器官は10%ホルマリンに固定して保存した（いずれの器官も長期保管には10%ホルマリンを用いた）。これらの器官は高用量群および対照群について常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリンーエオジン染色を行って病理組織学的検査を行ったが、高用量群に異常が認められた器官は、その他の用量群についても検査を実施した。また、必要に応じて Oil red O 染色を行った。なお、脾臓、甲状腺、小脳、脊髄および肺の病理組織学的検査は、雄と同様の理由から実施した。

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 $\left[\frac{\text{産児数}}{\text{着床痕数}} \times 100 \right]$ および生児出産率 $\left[\frac{\text{出產生児数}}{\text{着床痕数}} \times 100 \right]$ を求めた。また、産児の外表異常の有無および性別を調べ、生存児の性比 $\left[\frac{\text{雄の生児数}}{\text{出產生児数}} \times 100 \right]$ 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 $\left[\frac{\text{生児数}}{\text{産児数}} \times 100 \right]$ および新生児生存率 $\left[\frac{\text{哺育4日の生児数}}{\text{哺育0日の生児数}} \times 100 \right]$ を求めた。死亡児は剖検し、胸腔および腹腔内の器官を除去した後、エタノールに固定して保存した。

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、 $\left[\frac{\text{litter 重量}}{\text{測定児数}} \right]$ 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、剖検した。胸腔および腹腔内の器官は、一括して摘出し、一腹ごとに10%ホルマリンに固定して保存した。カーカスは、一腹ごとにエタノールに固定して保存した。

7. 動物の個体識別法

すべての親動物は、尾にフェルトペンで群および個体番号を記して個体識別した。各飼育ケージには、個体番号等の必要事項を記入した、群ごとに色彩の異なるカードを掛けて個体識別の補助とした。なお、出生児は、個体を識別しなかった。

8. 統計解析

交尾率、受胎率および産児の形態異常発現頻度については Yates の補正を含む χ^2 検定¹⁶⁾ を行った。その他のすべてのデータは、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、各群の分散が0より大きい場合は、先ず、Bartlett法¹⁷⁾により各群の分散の一樣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¹⁷⁾を行い、群間に有意性が認められた場合には Dunnett法¹⁸⁾あるいは Scheffé法¹⁹⁾により対照群とTP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²⁰⁾を行い、群間に有意性が認められた場合に、対照群とTP各投与群との差について Dunnett法¹⁸⁾あるいは Scheffé法¹⁹⁾の検定を行った。有意水準は、5%および1%とした。病理組織学的検査結果については、Mann-Whitney のU検定²¹⁾を用いて検定した。

I. 反復投与毒性（親動物所見）

1. 一般状態（Tables 1、2; Appendixes 1-1~2-4）

1) 死亡動物

雌雄ともにいずれの投与群にも死亡は認められなかった。

2) 瀕死屠殺例

雄動物に瀕死屠殺例はなかった。

雌では、400 mg/kg 投与群の1例（動物番号：FB04006）が、投与6日から、失調歩行（ふらつき歩行）を示し、さらに投与8日には後肢が麻痺し削瘦したため、瀕死状態にあると判断して剖検した。

3) 生存例

雄では、100 mg/kg 以上の投与群において、半眼、不整呼吸、自発運動量の低下あるいは腹臥姿勢、寄り掛かり姿勢、軟便ならびに流涎が観察された。さらに、400 mg/kg 投与群では、流涎も観察された。これらの変化は、投与開始後の早い時期に、投与後一過性に観察されたが、流涎は全投与期間にわたって観察された。その他の変化は、TPの投与量とは無関係に観察された。

雌では、400 mg/kg 投与群において、上述の瀕死屠殺例のほかに、1例に失調歩行が観察された。この動物は、不妊であったため剖検したが、剖検時まで回復は認められなかった。また、分娩後の哺育期間中にも3例が失調歩行を示し、このうち1例には、強直性痙攣も観察された。その他、400 mg/kg 投与群では、雄と同様に、半眼、不整呼吸、腹臥姿勢、寄り掛かり姿勢および流涎が観察され、削瘦および背弯姿勢も認められたが、100 mg/kg 投与群にはこれらの変化は認められなかった。また、すべてのTP投与群に流涎が観察された。しかし、流涎は、100 mg/kg 以上の投与群では、比較的多くの動物に、全投与期間にわたって観察されたのに対し、25 mg/kg 投与群では、少数に一時的に観察されたのみであった。その他の変化は、TPの投与量とは無関係に観察された。

2. 体重

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

25 mg/kg 投与群の体重推移には、投与の影響は認められなかった。100 mg/kg 以上の投与群において、投与開始後一過性に体重増加抑制が認められたが、100 mg/kg 投与群については、いずれの時期の体重および増加量にも対照群との間に有意差は認められなかった。400 mg/kg 投与群では、投与1~8日の増加量が対照群と比較して有意 ($p<0.01$) に抑制されたため、体重および累積増加量は、投与全期間にわたり、対照群と比較して有意 ($p<0.05$, $p<0.01$) な低値で推移した。また、400 mg/kg 投与群では、投与36~42日の増加量もやや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。

2) 雌 (Figure 2)

(1) 交配前 (Tables 5、6; Appendixes 5-1~6-4)

100 mg/kg 以下の投与群では、体重および増加量のいずれにも有意な変化は認められなかった。400 mg/kg 投与群では、投与開始後に体重が減少し、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。投与8~15日の増加量には、対照群と差は認められなかったが、投与開始後の各時期の体重および累積増加量ともに対照群と比較して、有意 ($p<0.01$) な低値を示した。

(2) 妊娠期 (Tables 7、8; Appendixes 7-1~8-4)

妊娠期の増加量および累積増加量のいずれにも対照群とTP各投与群との間で有意差は認められなかったが、400 mg/kg 投与群では、交配前の体重が低値であったために、妊娠0~14日の体重が対照群と比較して有意 ($p<0.05$, $p<0.01$) な低値を示した。

100 mg/kg 投与群の1例 (動物番号: FB03013) の体重は、後述のⅡ-1-2) 分娩および哺育状態の項に記載した理由により評価の対象から除外した。

(3) 哺育期 (Tables 9、10; Appendixes 9-1~10-4)

100 mg/kg 以下の投与群の体重は、対照群と同様に推移した。400 mg/kg 投与群では、哺育0~4日の増加量がやや低値の傾向を示したが、体重および増加量ともに対照群との間に有意差は認められなかった。

3. 摂餌量

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

25 mg/kg 投与群の摂餌量には、投与の影響は認められなかった。100 mg/kg 以上の投与群において、投与開始後一過性に摂餌量の低下が認められたが、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。400 mg/kg 投与群では、投与1～8日の摂餌量が対照群と比較して有意 ($p<0.01$) に低下したが、その後は対照群と同様な値で推移し、投与36～42日では、対照群と比較して有意 ($p<0.05$) な高値を示した。

2) 雌 (Figure 4)

(1) 交配前 (Table 12; Appendixes 12-1~12-4)

100 mg/kg 以下の投与群では、いずれの時期の摂餌量も対照群との間で有意差は認められなかった。400 mg/kg 投与群では、投与1～8日の摂餌量が対照群と比較して、有意 ($p<0.01$) な低値を示したが、投与8～15日の摂餌量には、対照群との間に有意差は認められなかった。

(2) 妊娠期 (Table 13; Appendixes 13-1~13-4)

いずれのTP投与群においても対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

100 mg/kg 投与群の1例 (動物番号: FB03013) の摂餌量は、後述のⅡ-1-2) 分娩および哺育状態の項に記載した理由により評価の対象から除外した。

(3) 哺育期 (Table 14; Appendixes 14-1~14-4)

100 mg/kg 以下の投与群の摂餌量は、対照群と同様に推移した。400 mg/kg 投与群では、哺育0～4日の摂餌量がやや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。

4. 尿検査所見 (Table 15; Appendixes 15-1~15-4)

25 mg/kg 投与群の尿検査所見は対照群と同様であった。100 mg/kg 以上の投与群では、pHがアルカリに傾く動物が増加し、400 mg/kg 投与群では、13例中11例が9以上を示した。その他の検査項目は、対照群と同様であった。

5. 解剖時検査所見

A) 雄〔解剖日：投与期間（42回投与）終了翌日〕

(1) 血液学的検査所見 (Table 16; Appendixes 16-1~16-4)

赤血球については、100 mg/kg 以上の投与群において、血色素量および平均赤血球血色素濃度が、軽度ではあるが用量依存的に、有意 ($p<0.05$ 、 $p<0.01$) に低下した。また、400 mg/kg 投与群では、平均赤血球血色素量が有意 ($p<0.01$) に減少した。ヘマトクリット値は、すべてのTP投与群が対照群と比較して有意 ($p<0.05$ 、 $p<0.01$) な低値を示したが、その程度は、生理的変動の範囲内であった。その他の項目については、対照群とTP各投与群との間に有意差は認められなかった。

白血球については、数および百分比のいずれにも、対照群とTP各投与群との間で有意差は認められなかった。

血液凝固に関連した検査項目では、400 mg/kg 投与群において活性部分トロンボプラスチン時間が有意 ($p<0.05$) に短縮したが、プロトロンビン時間については、いずれのTP投与群においても対照群との間に有意差は認められなかった。

(2) 血液生化学的検査所見 (Table 17; Appendixes 17-1~17-4)

対照群と比較して、100 mg/kg 以上の投与群において、ブドウ糖濃度が有意 ($p<0.01$) に減少した。また、無機リン濃度が有意 ($p<0.01$) に増加し、アルカリフォスファターゼ活性が有意 ($p<0.01$) に低下した。さらに、400 mg/kg 投与群では、尿素窒素、総コレステロールおよび総ビリルビンの各濃度、ならびにGPT、GOTおよび γ -GTPの各活性がそれぞれ対照群と比較して有意 ($p<0.05$ 、 $p<0.01$) に上昇した。これらは、いずれもTPの用量依存的に変化した。このほか、ナトリウム濃度がTP各投与群において、また、カリウムおよび塩素濃度が 25 mg/kg 投与群において有意 ($p<0.05$ 、 $p<0.01$) な高値を示したが、いずれも用量に依存した変化ではなかった。総蛋白濃度、アルブミン濃度、A/G比、クレアチニン濃度およびカルシウム濃度については、対照群とTP各投与群との間に有意差は認められなかった。

(3) 剖検所見 (Table 18; Appendixes 18-1~18-4)

肝臓では 400 mg/kg 投与群において2例に暗赤色化が、また、1例に退色がみられた。腫大は、TP各投与群の1例ずつに認められ、黄色化が、対照群の4例、25 mg/kg 投与群の5例、100 mg/kg 投与群の3例および 400 mg/kg 投与群の1例にみられた。このほか、対照群の2例、25 および 100 mg/kg 投与群の各4例、400 mg/kg 投与群の1例に肝小

葉の明瞭化がみられた。

腎臓では、400 mg/kg 投与群に皮質の陥凹および退色が1例みられ、100 mg/kg 投与群に腎乳頭の赤色化が1例みられた。また、25 および 100 mg/kg 投与群の各1例、対照群の3例に腎盂の拡張が認められた。

肺では、対照群、100、および 400 mg/kg 投与群の各1例に暗赤色点、対照群の2例に灰白色域、1例に白色点がみられた。

甲状腺では 100 および 400 mg/kg 投与群の各2例に腫大、25 mg/kg 投与群の1例に萎縮が認められた。

以上のほかに、対照群では胸腺の赤色点、心臓の白色点および精囊の萎縮が各1例にみられ、25 mg/kg 投与群では副腎の腫大が2例に、100 mg/kg 投与群では精巣上体の結節が1例にみられ、400 mg/kg 投与群では、脾臓の萎縮を伴う退色、精巣および精巣上体の萎縮が各1例にみられた。また、100 mg/kg 投与群では、水頭症が観察された。

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

25 mg/kg 投与群では、重量および比体重値ともに対照群との間に有意差の認められる器官はなかった。100 mg/kg 以上の投与群において肝臓および腎臓の比体重値が有意 ($p<0.01$) な高値を示した。また、400 mg/kg 投与群では、脾臓重量が有意 ($p<0.01$) な低値を示した。400 mg/kg 投与群における精巣上体重量は対照群と同様であったが、解剖時体重が対照群と比較して有意 ($p<0.01$) な低値を示したことから、比体重値が対照群と比較して有意 ($p<0.05$) な高値を示した。胸腺、精巣および甲状腺については、重量および比体重値ともに、対照群との間で有意差は認められなかった。

(5) 病理組織学的検査所見 (Table 20; Appendixes 20-1~20-5)

各器官における観察所見を以下に示す。

(小脳)

400 mg/kg 投与群の1例に、ⅢおよびⅥ~Ⅹ葉の顆粒細胞層に局限して、顆粒細胞の核濃縮を伴うごく軽度な壊死が認められたが、白質板および分子層に変化は認められなかった。

(肝臓)

100 mg/kg 投与群において、小葉中心部の肝細胞の肥大が7例、マクロファージの浸潤が4例にみられたが、小葉中心性の肝細胞壊死は認められなかった。400 mg/kg 投与群では、全例に軽度またはごく軽度な小葉中心性の肝細胞壊死と肝細胞の軽度な肥大が認めら

れ、そのうちの11例に肝細胞細胞質の均質化または小空胞化とマクロファージの浸潤が認められた。小葉中心部の肝細胞細胞質の均質化および小空胞化が観察された例のうちの2例（動物番号：MX04004、MX04005）について Oil red O 染色を行ったが、小空胞化した肝細胞には染色性を示す顆粒はほとんど認められなかった。その他、対照群およびTP投与群に小肉芽腫や小葉中心性および周辺性の肝細胞の脂肪化がみられたが、対照群とTP各投与群との間に頻度および程度の差は見られなかった。

（腎臓）

Eosinophilic body が対照群の1例、25 mg/kg 投与群の8例、100 mg/kg 投与群の6例および 400 mg/kg 投与群の5例に認められたが、400 mg/kg 投与群では、他の投与群と比較してより多数の eosinophilic body が認められた。また、対照群では12例、25 および 100 mg/kg 投与群では各10例および 400 mg/kg 投与群では7例に萎縮および再生性の尿細管がみられたが、対照群とTP各投与群との間に頻度および程度の差は認められなかった。その他、腎盂の拡張が、対照群の4例ならびに、25 および 100 mg/kg 投与群の各1例にみられ、間質内のリンパ球の浸潤が、対照群の2例および 25 mg/kg 投与群の1例に認められた。また、対照群では、髄質のごく少数の尿細管内に硝子円柱が2例にみられ、皮髄境界部にごく軽度なカルシウム沈着が1例にみられた。25 mg/kg 投与群では腎盂に移行上皮の限局性の軽度な過形成が1例にみられ、100 mg/kg 投与群では皮質の尿細管のごく軽度な拡張が1例にみられた。

（肺）

対照群の4例および 400 mg/kg 投与群の2例の動脈壁にカルシウム沈着、対照群の9例および 400 mg/kg 投与群の2例に肺胞内の泡沫細胞の集簇がみられ、そのうち対照群の3例ではマクロファージ、好中球およびリンパ球の浸潤を伴う肺肺炎が認められた。

（脾臓）

対照群および 400 mg/kg 投与群の全例に髄外造血および色素沈着がみられた。

（心臓）

対照群の4例および 400 mg/kg 投与群の1例に限局性のごく軽度な心筋壊死がみられた。

（膀胱）

対照群の1例および 400 mg/kg 投与群の2例に粘膜上皮のごく軽度なびまん性の過形成がみられた。

(精巣上体)

対照群の1例および400 mg/kg 投与群の3例にごく軽度なリンパ球の浸潤が、また、対照群の1例に軽度な精子肉芽種がみられたが、400 mg/kg 投与群と対照群との間に程度および頻度の差は認められなかった。

(精巣)

400 mg/kg 投与群の1例の精細管が萎縮し、生殖細胞が減少しており、間質細胞のごく軽度な過形成がみられ、その例の精巣上体では管腔内に壊死および変性した生殖細胞がみられた。

(大脳、胸腺、甲状腺、副腎および脊髄)

いずれの投与群にも変化はみられなかった。

B) 雌〔解剖日：瀕死屠殺日、哺育4日（出生児生存）、哺育4日（全出生児死亡）、妊娠25日相当日（不妊および全胚死亡例）、交配期間終了日（交尾不成立例）〕

(1) 剖検所見 (Table 21; Appendixes 21-1~21-4)

各器官に観察された所見を以下に示すが、解剖時期や解剖時の生理状態に関連した所見は僅かしか認められなかったため、本試験の Table 21 には、全例を総括した成績のみを示した。肝臓では、色調の変化がTP各投与群で観察された。25 および 100 mg/kg 投与群では、暗赤色化が少数に観察されたが、400 mg/kg 投与群では、暗赤色化が4例に観察された他に、灰白色および黄色域が3例に、また、赤色域が2例に観察された。400 mg/kg 投与群の瀕死屠殺例では、前記の赤色域の他に黄色化も観察された。小葉の明瞭化も 400 mg/kg 投与群の瀕死屠殺例を含むTP各投与群に少数例ずつ観察された。このほか、400 mg/kg 投与群では腫大が1例に認められた。また、25 mg/kg 投与群では横隔膜ヘルニアが1例に認められた。

胸腺では、TP各投与群の分娩例および400 mg/kg 投与群の瀕死屠殺例に萎縮が観察された。25 mg/kg 投与群では、2例と少なかったが、100 mg/kg 投与群では4例、400 mg/kg 投与群では6例と用量の増加に伴って増加した。このほか、対照群の1例に赤色点がみられた。

脾臓では 100 mg/kg 投与群の1例、瀕死屠殺例を含む400 mg/kg 投与群の4例に萎縮が認められ、対照群では陥凹部が、また、400 mg/kg 投与群では濾胞の不明瞭化がそれぞれ1例ずつにみられた。

肺では、25 mg/kg 投与群の2例に暗赤色点が認められた。

副腎では、対照群に暗調の混濁化が、また、100 mg/kg 投与群に腫大がそれぞれ1例に認められた。

腹部および陰部の被毛の汚れは、100 mg/kg 投与群の2例および、瀕死屠殺した400 mg/kg 投与群の1例に認められた。

その他、対照群では、前胃に黄色物沈着が、25 mg/kg 投与群では、脾臓の赤色化が、100 mg/kg 投与群では、腎臓皮質の退色化が、それぞれ1例に認められた。また、100 mg/kg 投与群の全胚死亡例では、子宮の暗赤色化および肥厚、ならびに腔に暗赤色液の貯留が認められた。400 mg/kg 投与群では、甲状腺の腫大が1例に認められた。また、瀕死屠殺した400 mg/kg 投与群の動物には、顎下腺の萎縮、腎臓髓質の赤色化、腺胃にヘマチンの付着、胃および腸管の内容物の著しい減少が認められた。

(2) 器官重量

a) 哺育4日出生児生存例 (Table 22-1; Appendixes 22-1~22-4)

100 mg/kg 以下の投与群には、重量および比体重値ともに対照群と比較して有意差の認められた器官はなかった。400 mg/kg 投与群では、肝臓および腎臓の比体重値が対照群と比較して有意 ($p < 0.01$) な高値を示した。しかし、胸腺重量については対照群との間に有意差は認められなかった。

b) 交尾不成立例、不妊例、全胚死亡例、全出生児死亡例、瀕死屠殺例 (Tables 22-2, 22-3)

瀕死屠殺、交尾不成立および不妊であったため、途中剖検した動物においても400 mg/kg 投与群では、肝臓および腎臓の比体重値が高値の傾向を示した。また、瀕死屠殺例および全出生児死亡例では、TPの用量とは無関係に胸腺重量が低値の傾向を示した。

(3) 病理組織学的所見 (Table 23; Appendix 23-1~23-5)

各器官における観察所見を以下に示す。なお、解剖時期や解剖時の生理状態に関連した所見は僅かしか認められなかったため、本試験の Table 23 には、全例を総括した成績のみを示した。

(小脳)

100 mg/kg 投与群では、1例にごく軽度の顆粒細胞の壊死が認められたが、400 mg/kg 投与群では、核濃縮を伴う顆粒細胞の壊死が、8例に認められた。さらに、400 mg/kg 投与群の顆粒細胞の壊死巣付近では、白質板の壊死が7例に、また、分子層の軽度な空胞化

およびプルキンエ細胞の変性または脱落が各6例にみられ、壊死巢内および周囲では脂肪顆粒細胞の浸潤が4例に、出血が4例に、また、カルシウム沈着が3例にみられた。顆粒細胞、白質板および分子層に強い変化がみられた例の小脳核では、多数の神経細胞の空胞変性が4例に、また、軽度な浮腫が2例に認められた。顆粒細胞が著しい壊死を起こし、白質板にも明らかな壊死が認められた例の病変域はほぼ全葉に及んでおり、特に、Ⅱ～Ⅳ、ⅨまたはⅩ葉の顆粒細胞層では変化が強く、ⅢおよびⅣ葉では分子層およびプルキンエ細胞にも明らかな変化がみられた。一方、小脳の変化が軽度な例では、病変部は顆粒細胞層にほぼ限局しており、主にⅡ、ⅢまたはⅨ葉に変化がみられた。これらの変化は、投与8日に行った瀕死屠殺例や、不妊解剖を行った例など、試験途中で剖検した400 mg/kg投与群の非妊娠動物にも認められた。

(大脳)

400 mg/kg 投与群で小脳に明らかな変化を示した例のうち、瀕死屠殺例を含む4例に脳室の軽度な拡張が、また、3例に脳室周囲のごく軽度な浮腫が認められた。

(肝臓)

400 mg/kg 投与群の瀕死屠殺例を含む5例に小葉中心性の肝細胞壊死がみられ、そのうちの瀕死屠殺例を除く4例では、壊死組織周囲にマクロファージが浸潤しており、瀕死屠殺例を含む2例では好中球の浸潤がみられた。また、小葉中心部では全例に肝細胞の肥大が認められ、瀕死屠殺例を含む4例に肝細胞細胞質の均質化または小空胞化が認められた。また、小葉中心部にもマクロファージの浸潤がみられた。100 mg/kg 投与群の小葉中心部でも11例に肝細胞の肥大が認められ、そのうち3例に肝細胞の壊死が、1例に軽度な肝細胞の均質化または小空胞化、5例にマクロファージの浸潤がみられた。小葉中心性の肝細胞の脂肪化が、対照群に5例、25 mg/kg 投与群に6例、100 mg/kg 投与群に9例、400 mg/kg 投与群に12例みられた。肝臓に小葉中心部の肝細胞細胞質の均質化および小空胞化が観察された例のうちの2例（動物番号：FB04005、FB04006）および対照群1例（動物番号：FB01001）について Oil red O 染色を行った。その結果、小空胞化した肝細胞は瀕死屠殺した1例では小空胞とともに染色性を示す顆粒が認められたが、他の3例では染色性を示す顆粒はほとんど認められなかった。その他、小肉芽腫および小葉周辺性の脂肪化が認められたが、対照群とTP各投与群との間に頻度および程度の差は認められなかった。

(腎臓)

TP各投与群に尿細管上皮細胞の空胞変性が認められ、100 および 400 mg/kg 投与群

では頻度および程度が増強した。対照群の1例（動物番号：FB01001）および尿細管上皮細胞の空胞変性が観察された雌の例のうち1例（動物番号：FB04008）について Oil red O 染色を行った。その結果、空胞変性した尿細管上皮細胞は、まったく染色性を示さなかった。このほか、すべての投与群に萎縮または再生性の尿細管がみられたが、その頻度および程度に対照群とTP各投与群との間で差はなかった。また、対照群の1例および400 mg/kg 投与群の3例に髄質の尿細管の拡張、対照群および25 mg/kg 投与群の各1例、および100 mg/kg 投与群の2例に皮質の限局性の線維化、対照群の1例および100 mg/kg 投与群の2例にごく軽度な間質へのリンパ球の浸潤、対照群の1例および400 mg/kg 投与群の2例に皮髄境界部のごく軽度なカルシウム沈着が認められた。

（胸腺）

対照群の3例にごく軽度な萎縮がみられた。25 mg/kg 投与群ではその程度が、また、100 および 400 mg/kg 投与群では頻度および程度が増強したが、対照群との間には、頻度および程度ともに差は認められなかった。

（脾臓）

25 および 100 mg/kg 投与群の各2例、ならびに瀕死屠殺例を含む、400 mg/kg 投与群の3例にごく軽度な赤脾髄での血液量の減少がみられ、そのうち、瀕死屠殺例では濾胞の萎縮を伴っていた。また、色素沈着は全例でみられたが、25 mg/kg 投与群の2例および400 mg/kg 投与群の5例では程度が強かった。その他、髄外造血は各群のほぼ全例でみられ、程度および頻度についても対照群とTP各投与群との間に差は認められなかった。

（肺）

対照群の10例および400 mg/kg 投与群の7例に肺胞内の泡沫細胞の集簇が、また、対照群および400 mg/kg 投与群の各1例の動脈壁にごく軽度なカルシウム沈着がみられた。

（心臓）

対照群の1例および400 mg/kg 投与群の3例に限局性のごく軽度な心筋壊死がみられた。

（副腎）

400 mg/kg 投与群の1例に束状帯および網状帯の広範な壊死がみられた。

（甲状腺）

対照群の1例に異所性の胸腺組織がみられた。

(胸腺、副腎、脊髄、不妊および未交尾の雌の卵巣)

変化はみられなかった。

II. 生殖発生毒性

1. 生殖学的検査所見

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

交尾率および同居開始から交尾成立までに要した日数ならびにその間に回帰した発情期の回数に対照群とTP各投与群との間で有意差は認められなかった。また、着床の有無を基準に妊娠の成否を判定する限りにおいては、妊娠が成立した雌の数に群間で著しい差はみられず、したがって受胎率にも対照群とTP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 (Tables 2, 25; Appendixes 2-1~2-4, 25-1~25-4)

観察が可能であった動物については、分娩状態の異常は観察されなかった。また、妊娠期間にも対照群とTP各投与群との間で有意差は認められなかった (Table 25; Appendixes 25-1~25-4)。なお、100 mg/kg 投与群の1例 (動物番号: FB03013) は、腔内に腔栓が確認され、交尾成立が確認されてから、20日後に分娩した。しかし、出生児の体重および外表から判断された成熟度は交尾成立後22日に分娩した動物の出生児と差はなく、また、腔内に腔栓が確認された2日前に、精子は確認されなかったが、腔栓の落下が認められていたことから、この動物は交尾成立日が特定されなかったと判断して、妊娠期間ならびに妊娠期の体重および摂餌量を評価の対象から除外した。

哺育状態については、児集めや児の保温を行わず、このため乳頭の突出が不良であった動物が、100 mg/kg 投与群に2例 (動物番号: FB03003、FB03013)、400 mg/kg 投与群に1例 (動物番号: FB04005) 観察された。さらに、400 mg/kg 投与群では、これらの哺育行動は認められるものの、乳頭の突出が不良であった動物が1例 (動物番号: FB04001) 認められた (Table 2; Appendixes 2-1~2-4)。

3) 黄体数、着床数および着床率 (Table 25; Appendixes 25-1~25-4)

妊娠動物の黄体数、着床数および着床率に対照群とTP各投与群との間で有意差は認められなかった。

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

出産率および妊娠期間に对照群とTP各投与群との間で有意差は認められなかった。

2. 出生児所見

1) 一般状態および生存性 (Table 25; Appendixes 25-1~25-4)

对照群の出生児に一般状態の異常は観察されず、全出生児の死亡した腹もなかった。25 mg/kg 投与群では、分娩時に母動物の下腹部に被毛汚染の観察された1腹 (動物番号: FB02011) において、哺育0日に出生児の腹部に乳汁の貯留 (ミルクスポット) が観察されず、哺育1日に全例が死亡した。100 mg/kg 投与群では、哺育0日から、母動物の哺育不良に起因する体表温の低下や、ミルクスポットの認められない出生児が2腹 (動物番号: FB03003、FB03013) に観察され、このうち1腹 (動物番号: FB03003) の出生児は、哺育2日までに全例が死亡した。他の1腹の出生児は、哺育1日には異常は観察されなくなった。400 mg/kg 投与群では、哺育1日から母動物の哺育不良に起因する、出生児の体表温の低下や、ミルクスポットの無形成が1腹 (動物番号: FB04005) の出生児に観察され、哺育4日までに全例が死亡した。また、2腹 (動物番号: FB04001、FB04007) の出生児は、哺育0日に異常は観察されなかったが、1腹 (動物番号: FB04001) は哺育2日から、また、他の1腹は哺育4日に、それぞれ全例の出生児の腹部にミルクスポットが認められなくなり、1腹 (動物番号: FB04001) は哺育4日までに全出生児が死亡した。なお、これら 400 mg/kg 投与群の3腹の母動物には、ふらつき歩行や、振戦などが観察された (Table 2、Appendix 2-4)。

児の生存率については、100 mg/kg 以下の投与群では、いずれの時期も对照群と同様であった。400 mg/kg 投与群では、分娩率、生児出産率および出生率などの出生日の生存性には投与の影響は認められなかったが、生後の死亡がやや増加し、新生児生存率が低値の傾向を示した。しかし、对照群との間に有意差は認められなかった。

性比については对照群とTP各投与群との間で有意差は認められなかった。

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

100 mg/kg 以下の投与群については、对照群との間に有意差は認められなかった。400 mg/kg 投与群では、哺育0および4日の体重が、雌雄ともにやや低値の傾向を示したが、对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日の生児についての外表観察では、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、100 mg/kg 投与群の1腹 (母動物番号: FB03 012) の雌の1例の児に、左側水腎が観察されたほかには、いずれの投与群の新生児にも異常は認められなかった。

死亡児の剖検では、異常はいずれの投与群にも認められなかった。

【考 察】

TPの0、25、100あるいは400 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た結果、雌雄動物の肝臓に毒性変化が惹起された。すなわち、雄では、100 mg/kg以上の投与群において、肝細胞は小葉中心性に肥大し、マクロファージの浸潤が惹起され、さらに、400 mg/kg投与により小葉中心部の肝細胞細胞質が均質化および小空胞化し、小葉中心性に肝細胞が壊死した。また、血液生化学的検査においても、GOTおよびGPT活性が上昇した。雌においても、100 mg/kg以上の投与群において、肝細胞は小葉中心性に肥大し、小葉中心性の肝細胞壊死、小葉中心部の肝細胞細胞質の均質化および小空胞化、ならびにマクロファージの浸潤が観察された。これらの肝臓の毒性変化を反映して、雄では100 mg/kg以上の投与群において、また、雌では400 mg/kg投与群において肝臓重量比体重値が増加した。これらの変化は、投与8日に瀕死屠殺した雌にもすでに観察されていたことから、少なくとも雌では、比較的早期から肝臓は障害を受けていたものと考えられる。

TPによる肝臓障害は、TPの代謝過程で生成された活性中間体による毒性であることが明らかにされている¹⁰⁾。TPは、肝臓のP450 monooxygenasesにより、S-oxidationを受け、その結果、反応性の非常に高いthiophene-S-oxidesに転換されることが*in vitro*²²⁾でも、また、*in vivo*²³⁾でも証明されている。TPの主要な尿中代謝物は、メルカプト尿酸であることから、thiophene-S-oxidesの代謝には、グルタチオン付加が関与しているものと考えられている²³⁾。一方、thiophene-S-oxidesは好電子性であるため、グルタチオンのない条件では、ミクロゾーム蛋白と非可逆的に結合する²²⁾。従って、TPによる肝臓障害には、thiophene-S-oxidesの生成量と、グルタチオン付加などの第2相の代謝活性が関与しているものと考えられる。本試験では雌雄ともに肝臓に同質の病理組織学的所見が観察されているが、雌では、所見の有無に個体差はあるものの、雄と比較すると、より低い投与量から所見が認められ、その程度も雄と比較して増強されており、TPによる肝臓障害には性差があるものと考えられる。一般に、肝臓の薬物代謝酵素活性は雄の方が高いので、thiophene-S-oxidesは雄においてより多く生成されることが考えられるが、雄における肝臓障害の程度がむしろ弱かったのは、第2相の代謝活性や、細胞内の求核性分子の種類あるいは濃度などに相違があったためと推測される。

雌における肝細胞壊死の個体差の成因については、本試験結果からは明らかではないが、

肝細胞壊死が非妊娠動物にも分娩後の動物にも観察されていることから、動物の生理状態よりも活性中間体の第2相の代謝活性などの個体差によるものと推測される。

雌では、400 mg/kg 投与により、投与初期から一部の動物が運動失調を呈した。また、病理組織学的検査では、小脳の顆粒細胞壊死があり、これに伴って小脳核神経細胞の変性が観察された。また、100 mg/kg 投与によっても軽度な変化が1例に観察された。雄では、運動失調を呈する動物は無く、病理組織学的検査においても400 mg/kg 投与群の1例に軽度な所見が観察されたのみで、小脳の変化にも性差が認められた。TPの毒性変化のひとつとして小脳の顆粒細胞壊死および小脳核神経細胞の変性が報告されているが¹¹⁻¹³⁾、小脳に著しい変化の観察された動物には、肝細胞壊死も顕著に観察され、小脳の顆粒細胞壊死および小脳核神経細胞の変性の成因と肝細胞壊死の成因は同一であると推測される。脳においても薬物代謝酵素が合成されていることが、証明されており²⁴⁾、小脳では、P4501A1/2 や、P4502B1 などの活性のあることが明らかにされている²⁵⁾。小脳病変の原因が、肝臓で生成されたTPの活性中間体が脳血管関門を越えて小脳に流入したことにより惹起されたものか、あるいは、TPが脳血管関門を越えて小脳に入り、小脳の薬物代謝酵素で代謝された結果生成された活性中間体により惹起されたものかは、さらに詳細な検討が必要であると考えられる。小脳における変性には部位特異性があり、Ⅱ～ⅣおよびⅨ葉の顆粒細胞に顕著に観察された。これは、既報¹²⁾ともほぼ一致する所見であるが、これらの葉は下小脳動脈の支配領域にあること¹²⁾、また、小脳核神経細胞の分泌機能あるいは細胞間の情報伝達物質系は、小脳核神経細胞の細胞種ごとに異なること²⁶⁾等から、小脳におけるTPの毒性発現には、障害を受ける細胞の解剖学的および生化学的性質が関係しているものと推測される。

職業的にTPを使用している労働者に腎障害が起こることが報告されている³⁾が、本試験では、腎臓重量比体重値は雌雄ともに増加した。病理組織学的検査では、100 mg/kg 以上の投与群の雌において尿細管上皮の空胞変性が有意に増加したが、その程度と、肝臓や小脳の病理組織学的変化の程度や、動物の一般状態、あるいは哺育状態との間に相関性は認められないことから、尿細管上皮の空胞変性は、TP投与による変化であると考えられるが、その成因は、肝臓あるいは小脳病変の成因とは異なるものと推測される。雄の病理組織学的検査では、400 mg/kg 投与群において eosinophilic body の数の軽度な増加が認められたのみであった。血液生化学的検査においても、尿素窒素濃度は増加したが、クレアチニン濃度には異常は認められず、尿検査においても腎臓機能障害を示唆する変化は認め

られなかった。

TPを経口投与すると、尿中にはメルカプト尿酸として排泄されることが報告されている¹³⁾。投与期間末期に行った尿検査では、pHがアルカリを示すものが、用量依存的に増加した。予備試験では、投与2および9日に尿検査を実施したが、pHは弱酸性から弱アルカリ性を呈していたことから、投与を反復することにより、pHが上昇したものと推測される。メルカプト尿酸は、酸性であることから、尿のpHの上昇は、少なくとも尿中に排泄されたメルカプト尿酸に起因するものではないと考えられるが、その原因については、本試験成績からは明らかにならなかった。

脾臓重量が400 mg/kg 投与群の雄で低下した。また、重量測定は行わなかったが、100 mg/kg 投与群の雌で脾臓の萎縮が観察された。しかし、雌雄ともに病理組織学的変化は伴っていなかった。SHR系ラットを用いた実験¹³⁾でも、脾臓重量の低下が報告されているが、組織学的には濾胞の萎縮を伴っており、今回の結果とは異なる。このほか雌の脾臓の病理組織学的検査では、TP各投与群において、赤脾髄の血液量の減少が観察されたが、用量に伴う変化ではなく、雄には認められなかった。

雄の血液学的検査において、100 mg/kg 以上の投与群で血色素量が軽度低下したが、肝臓機能の指標となる酵素活性や器官重量との間に相関性は認められず、また、生理的変動の範囲内であることから、毒性変化であるとは判断されなかった。

血液生化学的検査において、100 mg/kg 以上の投与群の雄に、ブドウ糖濃度の減少、無機リン濃度の増加ならびにアルカリフォスファターゼ活性の低下が認められた。これらは、摂餌に関連して変化するパラメーターであることから、二次的な変化であると考えられる。

交配成績および生殖器の病理組織学的検査から、TPの雌雄動物の生殖能力に対する影響は認められなかった。TPは、精子形成に影響を及ぼす化学物質のひとつに挙げられている¹⁴⁾が、今回の試験結果からは、形態学的にも、機能の面からもTPの影響は認められなかった。

TPの投与量に伴う着床前死亡、胚・胎児死亡および形態異常などの増加は認められないことから、400 mg/kg までの投与量のTPには発生毒性はないものと考えられる。

分娩に対するTP投与の影響は認められなかったが、100 mg/kg 以上の投与群の少数の母動物に、児を集めたり保温したりするといった哺育行動に低下が認められた。また、400 mg/kg 投与群では、母動物の哺育行動にこのような異常は認められないにもかかわらず、腹部に乳汁の貯留が認められない新生児が観察されたことから、泌乳の低下が疑われた。

これらの動物には、100 mg/kg 投与群の1例を除いていずれも、小脳核神経細胞の変性が観察されており、哺育行動の低下、あるいは泌乳状態の不良は、TP投与による二次的变化であると推測される。

有意差は認められなかったものの、400 mg/kg 投与群では新生児生存率が著しく低値を示した。新生児生存率の低下は、母動物の哺育行動あるいは泌乳の低下に起因すると考えられるが、本試験結果からは、活性中間体が乳汁を介して、母動物から新生児へと移行し、それが新生児に毒性を発現した可能性も否定できなかった。

これらのことから本試験条件下では、TPの無影響量は、反復投与毒性に関しては、雌雄いずれに対しても 25 mg/kg/day であり、生殖発生毒性に関しては、雄に対しては 400 mg/kg/day、雌に対しては、25 mg/kg/day であると推察される。

【文 献】

- 1) The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals.
Budavari, S., O'Neil, M. J., Smith, A., Heckelman, P. E. eds., Eleventh edn.,
Merck & Co., Inc., Rahway, N. J., U. S. A. (1989)

- 2) National Toxicology Program: Health and safety program for thiophene.
Research Triangle Park, N. C., U. S. A. : NTP (1986)

- 3) National Toxicology Program: Prechronic design for thiophene. Part of
Toxicology Design Committee package. Research Triangle Park, N. C., U. S. A. :
NTP (1985)

- 4) Михайлец, И. Б. , Михайлец, Г. А. , Лелѣц, Д. Г. ,
Валихметов, А. В. : К Токсикологии тиофеа.
Gigiena Truda i Professional'nye Zabolevaniia, 10 (2): 57-58 (1966)

- 5) National Technical Information Service: AD277-689, Springfield, V. A., U. S. A.

- 6) Marhold, J. : Prehled Prumyslove Toxikologie, Organické Latky, Avicenum,
Praha, Czechoslovakia (1986) pp.1089

- 7) Nomeir, A. A., Markham, P. M. Chadwick, M: Pulmonary absorption and
disposition of [¹⁴C]thiophene in rats following nose-only inhalation
exposure. J. Toxicol. Environ. Health, 39: 223-236 (1993)

- 8) Bray, H. G., Carpanini, F. M. B., Waters, B. D. : The metabolism of thiophene in
the rabbit and the rat, Xenobiotica, 1: 157-168 (1971)

- 9) Dansette, P. M., Amar, C., Smith, C., Pons, C., Mansuy, D. : Oxidative

activation of the thiophene ring by hepatic enzymes: hydroxylation and formation of electrophilic metabolites during metabolism of tienilic and its isomer by rat liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.*, 39: 911-918 (1990)

- 10) McMurtry, R.J., Mitchell, J.R.: Renal and hepatic necrosis after metabolic activation of 2-substituted furans and thiophenes, including furosemide and cephaloridine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 42: 285-300 (1977)
- 11) Herdon, R.M.: Thiophene induced granule cell necrosis in the rat cerebellum an electron microscopic study. *Exp. Brain Res.*, 6: 49-68 (1968)
- 12) Mori, F., Koya, G., Yoshida, Y., Tamayama, K., Nishioka, T.: Thiophene-induced dose-dependent vascular damage in the rat cerebellum. *J. Toxicol. Pathol.*, 5: 21-28 (1992)
- 13) Mori, F., Koya, G., Yoshida, Y.: Difference in susceptibility to experimental thiophene poisoning between spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 6: 223-232 (1993)
- 14) Nieschlag, E., Schurmeyer, Th.: Approaches to the suppression of testicular function for male fertility control. *Arch. Toxicol., Suppl.*, 7: 146 (1984)
- 15) Salewski, E.: Färbemethode zum makroskopischen Nachweis von Implantationsstellen am Uterus der Ratte. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 247: 367 (1964)
- 16) 西村秀雄: 胎児科学、雄鷄社、東京 (1976) pp.115~177
- 17) 佐久間昭: 薬効評価—計画と解析、東京大学出版会、東京 (1977)

- 18) Dunnett, C. W. : New tables for multiple comparisons with a control.
Biometrics, 20: 482-491 (1964)
- 19) Scheffé, H. : A method for judging all contrasts in the analysis of variance.
Biometrika, 40: 87-104 (1953)
- 20) Kruskal, W. H., Wallis, W. A. : Use of ranks in one-criterion variance
analysis. J. Amer. Statist. Assoc., 47: 583-621 (1952)
- 21) 丹後俊郎 : 医学への統計学 (古川俊之 監修)、朝倉書店、東京 (1985)
- 22) Hodgson, A.V., White, T.B., White, J.W., Strobel, H.W. : Expression analysis
of the mixed function oxidase system in rat brain by the polymerase chain
reaction. Mol. Cell. Biochem., 120: 171-179 (1993)
- 23) Anandatheerthavarada, H. K., Williams, J.F., Wecker, L. : Differential effect
of chronic nicotine administration on brain cytochrome P4501A1/2 and
P4502B1. Biochem. Biophys. Res. Commun., 194: 312-318 (1993)
- 24) 遠山正彌 : 小脳の化学神経回路網. 医学のあゆみ, 170: 576-581 (1994)
- 25) Mansuy, D., Valadon, P., Erdelmeier, I., Lopez-Garcia, P., Amar, C.,
Girault, J.-P., Dansette, P.M. : Thiophene S-oxides as new reactive
metabolites: formation by cytochrome P450 dependent oxidation and reaction
with nucleophiles. J. Am. Chem. Soc., 113: 7825-7826 (1991)
- 26) Dansette, P.M., Thang, D.C., Amri, H.E., Mansuy, D. : Evidence for thiophene-
S-oxide as a primary reactive metabolite of thiophene in vivo: formation of
a dihydrothiophene sulfoxide mercapturic acid. Biochem. Biophys. Res. Commun.,
186: 1624-1630 (1992)

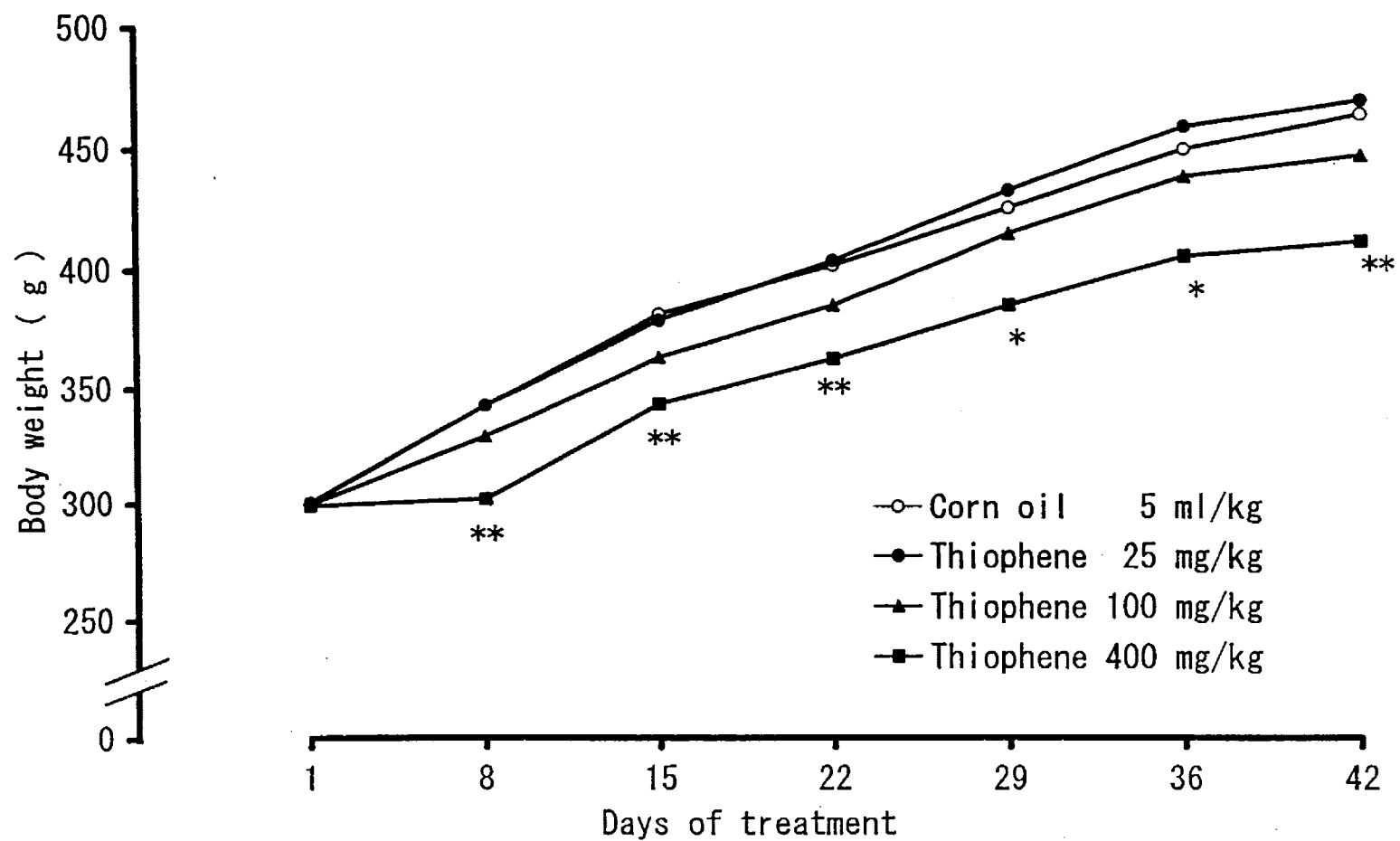


Fig.1 Mean body weight of Fo males

* : Significant difference from control, $p < 0.05$

** : Significant difference from control, $p < 0.01$

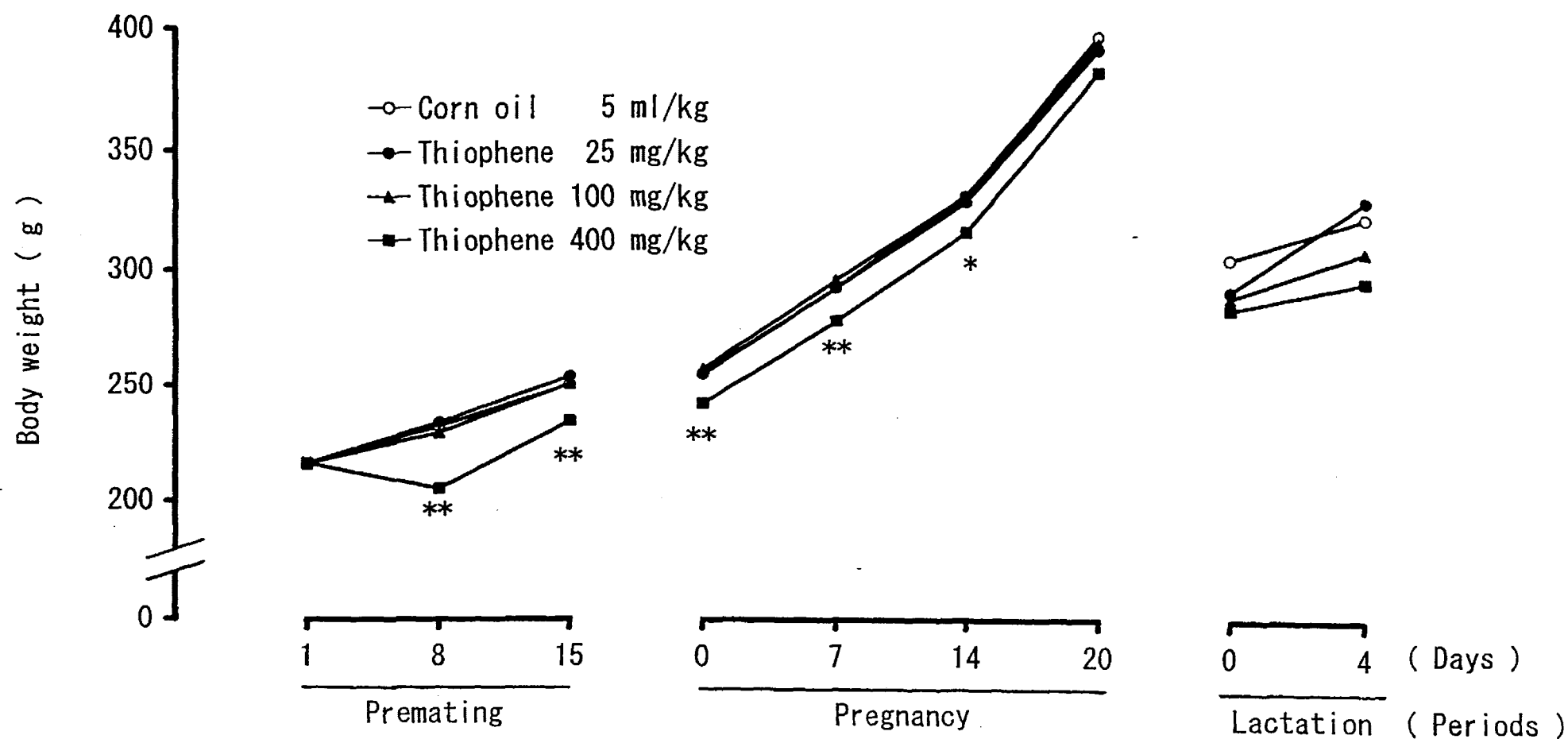


Fig.2 Mean body weight of Fo females

* : Significant difference from control, $p < 0.05$

** : Significant difference from control, $p < 0.01$

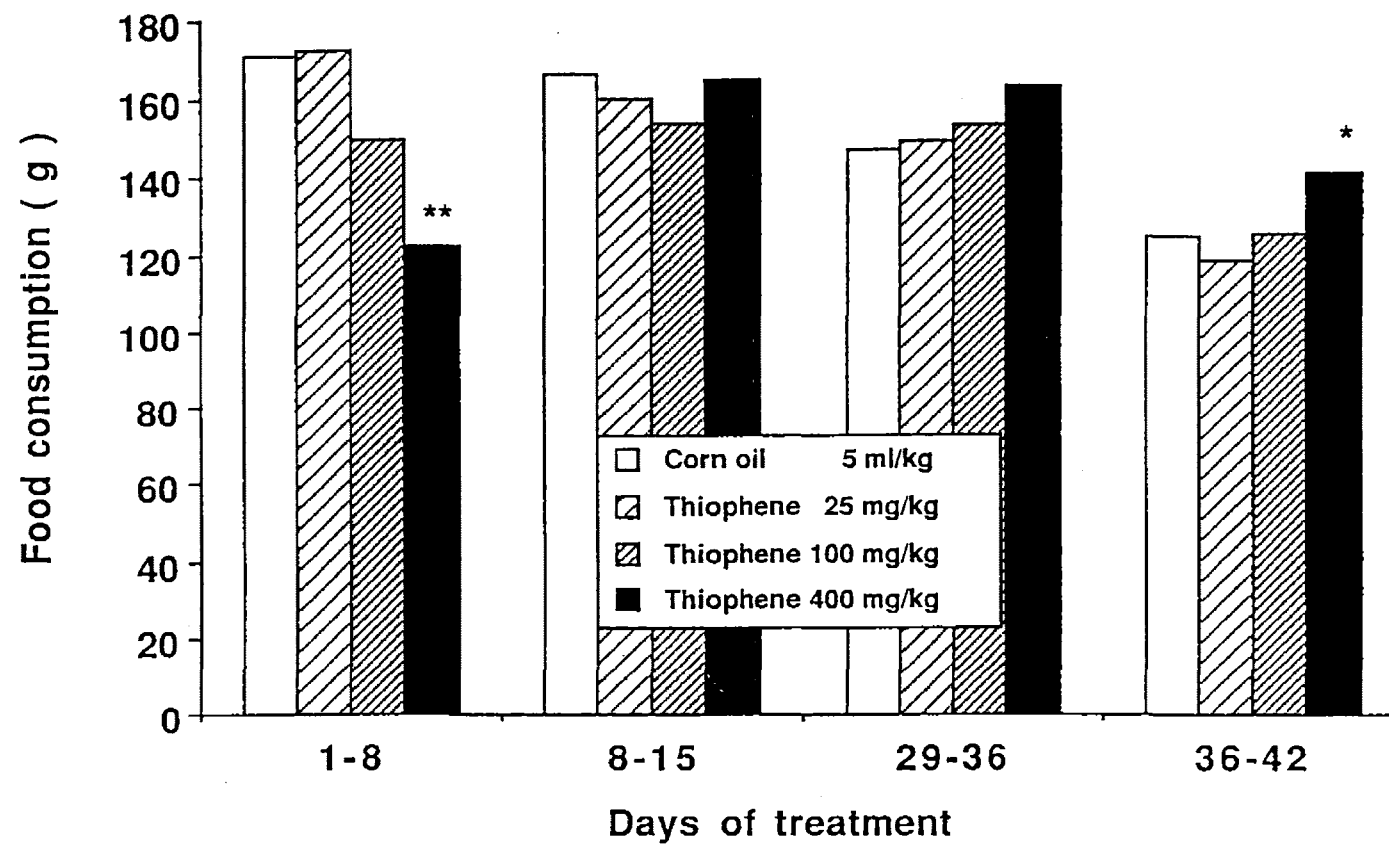


Fig.3 Mean food consumption of Fo males

* : Significant difference from control, $p < 0.05$

** : Significant difference from control, $p < 0.01$

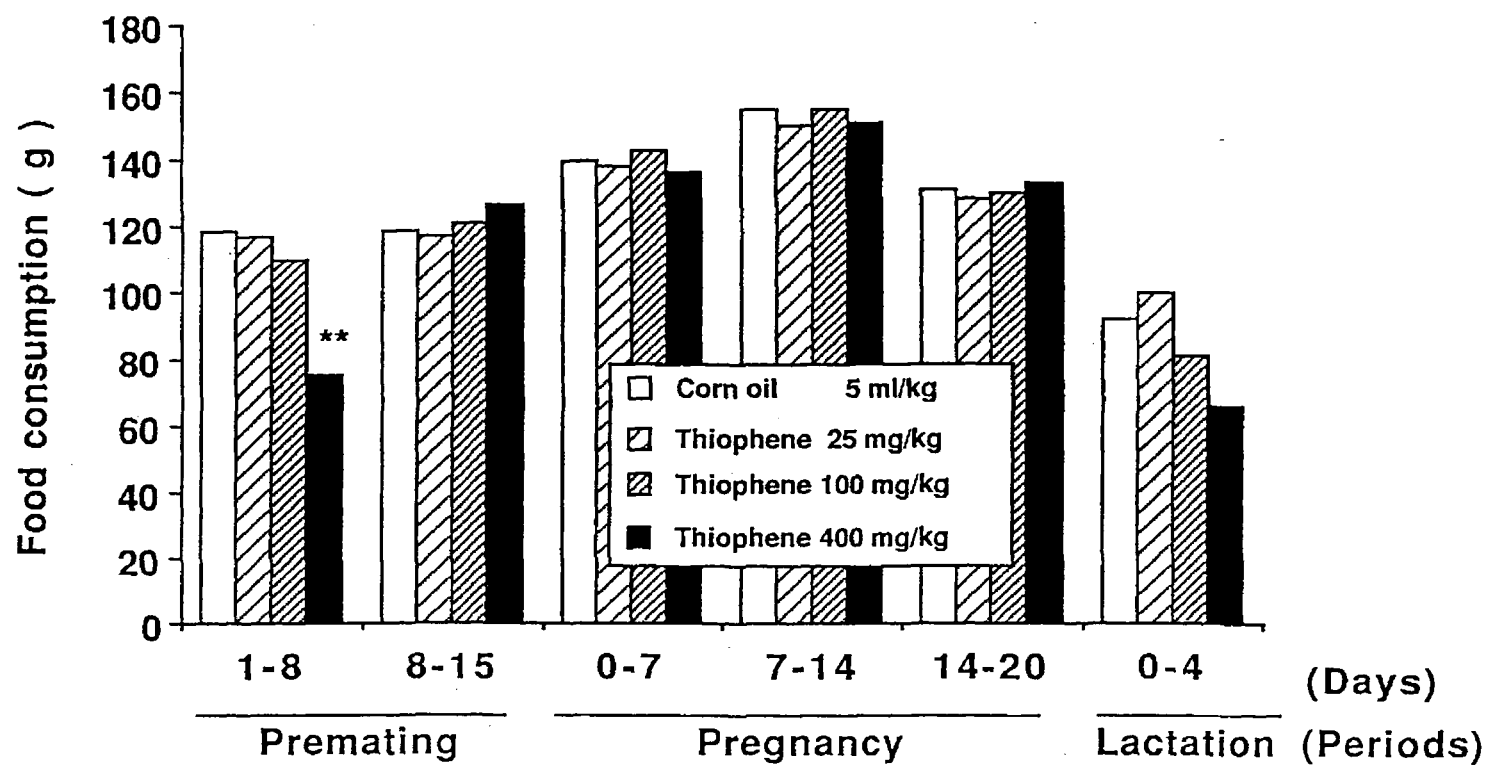


Fig.4 Mean food consumption of Fo females

** : Significant difference from control, $p < 0.01$

【TABLE INDEX】

I. Thiophene: dose range finding study in rats

TABLE No.	(APPENDIX No.)	TABLE TITLE
P 1	(P 1-1 ~ P 1-5)	Body weight of males
P 2	(P 2-1 ~ P 2-5)	Body weight gain of males
P 3	(P 3-1 ~ P 3-5)	Body weight of females
P 4	(P 4-1 ~ P 4-5)	Body weight gain of females
P 5	(P 5-1 ~ P 5-5)	Food consumption of males
P 6	(P 6-1 ~ P 6-5)	Food consumption of females
P 7	(P 7)	Urinalysis findings of males on day 2 of treatment
P 8	(P 8)	Urinalysis findings of males on day 9 of treatment
P 9	(P 9)	Urinalysis findings of females on day 2 of treatment
P10	(P10)	Urinalysis findings of females on day 9 of treatment
P11	(P11-1 ~ P11-3)	Hematological findings of males after oral administration for 14 days
P12	(P12-1 ~ P12-3)	Hematological findings of females after oral administration for 14 days
P13	(P13-1 ~ P13-3)	Biochemical findings of males after oral administration for 14 days
P14	(P14-1 ~ P14-3)	Biochemical findings of females after oral administration for 14 days
P15	(P15-1 ~ P15-5)	Absolute and relative organ weights of males after oral administration for 14 days
P16	(P16-1 ~ P16-5)	Absolute and relative organ weights of females after oral administration for 14 days
P17	(P17)	Macroscopic findings of males after oral administration for 14 days
P18	(P18)	Macroscopic findings of females after oral administration for 14 days

II. Thiophene: 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 findings of F ₀ males on day 37 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)	Macroscopic findings of F ₀ males after oral administration for 42 days
19	(19-1 ~19-4)	Absolute and relative organ weights of F ₀ males after oral administration for 42 days
20	(20-1 ~20-4)	Histopathological findings of F ₀ males after oral administration for 42 days
	(20-5)	Histopathological findings of the cerebellum in F ₀ males after oral administration for 42 days
21	(21-1 ~21-4)	Macroscopic findings of F ₀ females
22-1	(22-1 ~22-4)	Absolute and relative organ weights of F ₀ females on day 4 of lactation
22-2		Absolute and relative organ weights of F ₀ females; complete litter loss
22-3		Absolute and relative organ weights of F ₀ females; sacrificed on the way of test period

23	(23-1 ~23-4)	Histopathological findings of F ₀ females
	(23-5)	Histopathological findings of the cerebellum in F ₀ females
24	(24-1 ~24-4)	Reproductive performance of animals
25	(25-1 ~25-4)	Summary of 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 observation of pups
28		Summary of morphological observation of F ₁ dead pups

Table P 1

Thiophene: dose range finding study in rats

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

Compound	Thiophene									
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}		25		100		400		0 ^{b)}	
Days of treatment										
1 (Initial weight)	312.8 ± 13.6	(5)	310.9 ± 13.9	(5)	310.1 ± 13.3	(5)	312.8 ± 13.7	(5)	312.6 ± 7.5	(5)
7	346.8 ± 26.7	(5)	348.7 ± 21.9	(5)	334.4 ± 22.1	(5)	316.8 ± 15.7	(5)	340.4 ± 9.5	(5)
14	373.3 ± 34.5	(5)	380.7 ± 21.6	(5)	366.7 ± 24.7	(5)	357.3 ± 28.1	(5)	367.8 ± 11.9	(5)

^{a)} : vehicle control: corn oil (5 ml/kg)^{b)} : administered 5 ml/kg of corn oil and kept separately in the other room

Table P 2

Thiophene: dose range finding study in rats

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

Compound	Thiophene				
	0 ^{a)}	25	100	400	0 ^{b)}
Days of treatment					
1 ~ 7	34.0 $\pm$ 13.8 (5)	37.7 $\pm$ 9.7 (5)	24.3 $\pm$ 10.8 (5)	4.0 $\pm$ 3.1 ** (5)	27.8 $\pm$ 5.3 (5)
7 ~ 14	26.5 $\pm$ 8.0 (5)	32.0 $\pm$ 4.5 (5)	32.3 $\pm$ 7.0 (5)	40.5 $\pm$ 14.0 (5)	27.4 $\pm$ 3.8 (5)
1 ~ 14	60.5 $\pm$ 21.6 (5)	69.7 $\pm$ 11.3 (5)	56.6 $\pm$ 14.9 (5)	44.5 $\pm$ 14.9 (5)	55.2 $\pm$ 8.3 (5)

^{a)}: vehicle control: corn oil (5 ml/kg)^{b)}: administered 5 ml/kg of corn oil and kept separately in the other room^{**}: significant difference from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table P 3

Thiophene: dose range finding study in rats

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

Compound	Thiophene				
	0 ^{a)}	25	100	400	0 ^{a)}
Dose group (mg/kg)					
Days of treatment					
1 (Initial weight)	228.4 $\pm$ 5.1 (5)	227.4 $\pm$ 8.0 (5)	230.5 $\pm$ 9.2 (5)	229.3 $\pm$ 6.0 (5)	226.7 $\pm$ 6.5 (5)
7	245.4 $\pm$ 10.4 (5)	251.5 $\pm$ 11.4 (5)	243.1 $\pm$ 11.5 (5)	218.9 $\pm$ 15.7 ^{**} (5)	243.4 $\pm$ 10.2 (5)
14	261.7 $\pm$ 18.7 (5)	272.0 $\pm$ 19.1 (5)	262.4 $\pm$ 16.7 (5)	252.3 $\pm$ 22.7 (5)	258.5 $\pm$ 9.0 (5)

^{a)}: vehicle control: corn oil (5 ml/kg)^{b)}: administered 5 ml/kg of corn oil and kept separately in the other room^{**}: significant difference from control. $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table P 4

Thiophene: dose range finding study in rats

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

Compound	Thiophene				
	0 ^{a)}	25	100	400	0 ^{b)}
Days of treatment					
1 ~ 7	17.0 $\pm$ 12.3 (5)	24.1 $\pm$ 3.8 (5)	12.6 $\pm$ 5.1 (5)	-10.4 $\pm$ 12.7 ** (5)	16.7 $\pm$ 4.9 (5)
7 ~14	16.3 $\pm$ 9.1 (5)	20.5 $\pm$ 9.3 (5)	19.3 $\pm$ 8.8 (5)	33.4 $\pm$ 14.5 (5)	15.1 $\pm$ 6.2 (5)
1 ~14	33.3 $\pm$ 20.3 (5)	44.5 $\pm$ 12.2 (5)	31.9 $\pm$ 13.5 (5)	23.0 $\pm$ 19.0 (5)	31.9 $\pm$ 8.0 (5)

^{a)}: vehicle control : corn oil (5 ml/kg)^{b)}: administered 5 ml/kg of corn oil and kept separately in the other room**: significant difference from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table P 5

Thiophene: dose range finding study in rats

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

Compound	Thiophene				
	0 ^{a)}	25	100	400	0 ^{b)}
Dose group (mg/kg)					
Days of treatment					
2 ~ 3	25.1 $\pm$ 3.5 (5)	23.0 $\pm$ 3.0 (5)	20.3 $\pm$ 5.1 (5)	5.0 $\pm$ 3.2 ** (5)	24.0 $\pm$ 1.1 (5)
8 ~ 9	23.4 $\pm$ 3.8 (5)	22.9 $\pm$ 3.5 (5)	21.6 $\pm$ 2.2 (5)	22.7 $\pm$ 2.9 (5)	24.6 $\pm$ 2.9 (5)
13 ~ 14	20.4 $\pm$ 2.7 (5)	21.4 $\pm$ 1.9 (5)	22.4 $\pm$ 3.6 (5)	24.8 $\pm$ 3.1 (5)	22.0 $\pm$ 1.7 (5)

^{a)}: vehicle control: corn oil (5 ml/kg)^{b)}: administered 5 ml/kg of corn oil and kept separately in the other room**: significant difference from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table P 6

Thiophene: dose range finding study in rats

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

Compound	Thiophene				
	0 ^{a)}	25	100	400	0 ^{b)}
Days of treatment					
2 ~ 3	18.4 $\pm$ 2.7 (5)	17.6 $\pm$ 1.0 (5)	15.7 $\pm$ 2.7 (5)	4.4 $\pm$ 0.8 ** (5)	18.0 $\pm$ 2.7 (5)
8 ~ 9	18.2 $\pm$ 1.3 (5)	18.8 $\pm$ 0.6 (5)	17.5 $\pm$ 0.5 (5)	20.4 $\pm$ 2.5 (5)	16.5 $\pm$ 2.5 (5)
13 ~ 14	17.3 $\pm$ 3.5 (5)	16.9 $\pm$ 3.7 (5)	18.5 $\pm$ 4.4 (5)	19.2 $\pm$ 3.2 (5)	16.8 $\pm$ 3.1 (5)

^{a)}: vehicle control : corn oil (5 ml/kg)^{b)}: administered 5 ml/kg of corn oil and kept separately in the other room**: significant difference from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table P7

Thiophene: dose range finding study in rats

Urinalysis findings of males on day 2 of treatment

Thiophene (mg/kg)	Number of animals	pH								Protein ^{c)}				Glucose ^{d)}		Ketone ^{e)}				Bilirubin ^{e)}		Occult blood ^{e)}					Urobilinogen ^{f)}	
		5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	≥9.0	-	±	+	++	-	-	±	+	++	-	+	-	±	+	++	+++	±	+	
0 ^{a)}	5	0	0	0	2	2	1	0	0	0	0	5	0	5	0	4	1	0	5	0	5	0	0	0	0	4	1	
25	5	0	0	0	1	2	1	0	1	0	0	5	0	5	3	0	2	0	5	0	5	0	0	0	0	4	1	
100	5	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	5	0	5	2	1	1	1	4	1	5	0	0	0	0	4	1	
400	5	1	3	0	1	0	0	0	0	2	2	1	0	5	1	4	0	0	5	0	5	0	0	0	0	5	0	
0 ^{b)}	5	0	0	0	4	1	0	0	0	0	0	4	1	5	2	2	1	0	5	0	4	0	0	0	1	5	0	

a) vehicle control: corn oil (5ml/kg)

b) administered 5ml/kg of corn oil and kept separately in the other room

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

d) -: negative

e) -: negative, ±: trace, +: slight, ++: moderate, +++: marked

f) ±: 0.1 EU/dl, +: 1.0 EU/dl

Table P8

Thiophene: dose range finding study in rats

Urinalysis findings of males on day 9 of treatment

Thiophene (mg/kg)	Number of animals	pH					Protein ^{a)}				Glucose ^{b)}		Ketone ^{c)}			Bilirubin ^{c)}		Occult blood ^{c)}		Urobilinogen ^{d)}	
		7.0	7.5	8.0	8.5	≥9.0	-	±	+	++	-	-	±	+	-	+	-	-	±	+	
0 ^{a)}	5	2	2	1	0	0	0	0	4	1	5	0	2	3	5	0	5		4	1	
25	5	1	1	0	3	0	0	2	3	0	5	3	0	2	5	0	5		5	0	
100	5	0	0	3	0	2	0	0	4	1	5	2	2	1	5	0	5		5	0	
400	5	0	0	2	3	0	0	3	2	0	5	4	1	0	5	0	5		5	0	
0 ^{b)}	5	2	1	1	0	1	0	0	3	2	5	1	2	2	4	1	5		4	1	

a) vehicle control: corn oil (5ml/kg)

b) administered 5ml/kg of corn oil and kept separately in the other room

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

d) -: negative

e) -: negative, ±: trace, +: slight

f) ±: 0.1 EU/dl, +: 1.0 EU/dl

Table P9

Thiophene: dose range finding study in rats

Urinalysis findings of females on day 2 of treatment

Thiophene (mg/kg)	Number of animals	pH							Protein ^{a)}			Glucose ^{b)}	Ketone ^{c)}		Bilirubin ^{c)}	Occult blood ^{c)}	Urobilinogen ^{d)}	
		6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	≥9.0	-	±	+	-	-	±	-	-	±	+
0 ^{a)}	5	0	1	3	1	0	0	0	1	2	2	5	5	0	5	5	3	2
25	5	0	0	1	4	0	0	0	2	2	1	5	5	0	5	5	4	1
100	5	0	2	0	1	1	0	1	4	1	0	5	5	0	5	5	5	0
400	5	1	2	2	0	0	0	0	2	0	3	5	0	5	5	5	5	0
0 ^{b)}	5	0	4	0	1	0	0	0	0	3	2	5	4	1	5	5	3	2

a) vehicle control: corn oil (5ml/kg)

b) administered 5ml/kg of corn oil and kept separately in the other room

c) -: negative, ±: trace, +: 30 mg/dl

d) -: negative

e) -: negative, ±: trace

f) ±: 0.1 EU/dl, +: 1.0 EU/dl

Table P10

Thiophene: dose range finding study in rats

Urinalysis findings of females on day 9 of treatment

Thiophene (mg/kg)	Number of animals	pH						Protein ^{a)}			Glucose ^{b)}		Ketone ^{c)}		Bilirubin ^{c)}	Occult blood ^{c)}	Urobilinogen ^{d)}	
		6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	≥9.0	-	±	+	-	-	±	-	-	-	±	+
0 ^{a)}	5	1	0	2	1	1	0	3	1	1	5	4	1	5	5		4	1
25	5	0	1	1	3	0	0	4	1	0	5	5	0	5	5		5	0
100	5	0	1	3	1	0	0	1	2	2	5	5	0	5	5		4	1
400	5	0	1	0	2	0	2	1	2	2	5	5	0	5	5		4	1
0 ^{b)}	5	0	2	2	0	1	0	4	0	1	5	5	0	5	5		5	0

a) vehicle control: corn oil (5ml/kg)

b) administered 5ml/kg of corn oil and kept separately in the other room

c) -: negative, ±: trace, +: 30 mg/dl

d) -: negative

e) -: negative, ±: trace

f) ±: 0.1 EU/dl, +: 1.0 EU/dl

Table P11

Thiophene: dose range finding study in rats

Hematological findings of males after oral administration for 14 days

Thiophene (mg/kg)	R B C ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	M C V (μ^3)	M C H (pg)	M C H C (%)	Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	W B C ($\times 100/\text{mm}^3$)
a)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
0	750 ± 47	14.8 ± 0.6	42.8 ± 2.1	57.1 ± 1.0	19.7 ± 0.6	34.5 ± 0.5	107.7 ± 8.0	123.4 ± 22.4
25	(5) 749 ± 43	(5) 14.2 ± 0.6	(5) 41.8 ± 1.7	(5) 55.9 ± 1.4	(5) 19.0 ± 0.5	(5) 34.0 ± 0.2	(5) 90.4 ± 44.0	(5) 101.4 ± 28.1
100	(5) 740 ± 14	(5) 14.0 ± 0.4	(5) 41.4 ± 1.2	(5) 56.0 ± 1.3	(5) 18.9 ± 0.5	(5) 33.7 ± 0.3	(5) 107.2 ± 11.9	(5) 81.2* ± 7.5
400	(5) 744 ± 43	(5) 14.1 ± 0.7	(5) 41.6 ± 1.6	(5) 56.0 ± 1.9	(5) 18.9 ± 0.7	(5) 33.8 ± 0.7	(5) 122.9 ± 9.7	(5) 92.6 ± 32.8
b)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
0	754 ± 20	14.3 ± 0.4	42.3 ± 0.9	56.1 ± 1.2	18.9 ± 0.5	33.8 ± 0.4	106.2 ± 9.9	73.8** ± 13.6

Parameter: mean $\pm$ S.D.

(): number of animals

a): vehicle control: corn oil (5 ml/kg)

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

b): administered 5 ml/kg of corn oil and kept separately in the other room

Table P12

Thiophene: dose range finding study in rats

Hematological findings of females after oral administration for 14 days

Thiophene (mg/kg)	R B C ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	M C V (μ^3)	M C H (pg)	M C H C (%)	Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	W B C ($\times 100/\text{mm}^3$)
a)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
0	704 ± 22	13.7 ± 0.4	39.9 ± 1.3	56.8 ± 1.4	19.5 ± 0.5	34.4 ± 0.5	115.3 ± 12.5	63.4 ± 19.2
25	(5) 713 ± 25	(5) 13.9 ± 0.2	(5) 40.0 ± 0.8	(5) 56.1 ± 1.0	(5) 19.5 ± 0.4	(5) 34.7 ± 0.3	(5) 125.2 ± 11.9	(5) 71.2 ± 12.8
100	(5) 714 ± 25	(5) 14.0 ± 0.4	(5) 40.8 ± 1.4	(5) 57.2 ± 0.7	(5) 19.6 ± 0.2	(5) 34.3 ± 0.3	(5) 120.1 ± 12.7	(5) 82.8 ± 24.3
400	(5) 696 ± 26	(5) 13.0* ± 0.5	(5) 38.6 ± 1.6	(5) 55.5 ± 0.9	(5) 18.7* ± 0.5	(5) 33.7 ± 0.5	(5) 123.2 ± 10.2	(5) 71.2 ± 12.3
b)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
0	724 ± 19	14.0 ± 0.3	40.9 ± 0.6	56.6 ± 1.6	19.4 ± 0.5	34.3 ± 0.6	120.5 ± 11.5	76.6 ± 8.4

Parameter: mean $\pm$ S.D.

(): number of animals

a): vehicle control: corn oil (5 ml/kg)

*: significantly different from control. $p < 0.05$

b): administered 5 ml/kg of corn oil and kept separately in the other room

Table P13

Thiophene: dose range finding study in rats

Biochemical findings of males after oral administration for 14 days

Thiophene (mg/kg)	Total protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	B U N (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	A L P (U/l)	L D H (U/l)	G P T (U/l)	G O T (U/l)
a) 0	(5) 5.2 ±0.2	(5) 3.1 ±0.1	(5) 11 ±2	(5) 138 ±3	(5) 40 ±7	(5) 42 ±5	(5) 396 ±75	(5) 113 ±20	(5) 30 ±4	(5) 61 ±9
25	(5) 5.2 ±0.1	(5) 3.0 ±0.1	(5) 12 ±2	(5) 121* ±8	(5) 41 ±6	(5) 28** ±6	(5) 389 ±18	(5) 99 ±23	(5) 31 ±5	(5) 60 ±5
100	(5) 5.3 ±0.2	(5) 3.0 ±0.3	(5) 13 ±2	(5) 119* ±11	(5) 40 ±8	(5) 34 ±8	(5) 384 ±38	(5) 153 ±92	(5) 33 ±9	(5) 65 ±12
400	(5) 5.7 ±0.5	(5) 3.4 ±0.3	(5) 14 ±1	(5) 121* ±6	(5) 57** ±11	(5) 27** ±6	(5) 292 ±19	(5) 1505* ±2291	(5) 206* ±272	(5) 326* ±409
b) 0	(5) 5.0 ±0.2	(5) 2.8 ±0.2	(5) 12 ±2	(5) 130 ±14	(5) 28 ±6	(5) 27** ±4	(5) 427 ±11	(5) 141 ±23	(5) 33 ±2	(5) 67 ±4

Parameter: mean±S.D.

(): number of animals

a): vehicle control: corn oil (5 ml/kg)

*: significantly different from control, p<0.05

**: significantly different from control, p<0.01

b): administered 5 ml/kg of corn oil and kept separately in the other room

Table P14

Thiophene: dose range finding study in rats

Biochemical findings of females after oral administration for 14 days

Thiophene (mg/kg)	Total protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	B U N (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	A L P (U/l)	L D H (U/l)	G P T (U/l)	G O T (U/l)
a)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
0	5.5 ±0.2	3.2 ±0.3	14 ±2	131 ±12	40 ±10	23 ±6	219 ±28	106 ±10	24 ±3	55 ±6
25	(5) 5.5 ±0.1	(5) 3.4 ±0.3	(5) 12 ±2	(5) 133 ±10	(5) 46 ±7	(5) 23 ±3	(5) 239 ±31	(5) 86 ±15	(5) 20 ±2	(5) 51 ±5
100	(5) 5.7 ±0.2	(5) 3.6 ±0.2	(5) 15 ±2	(5) 116 ±14	(5) 50 ±8	(5) 18 ±3	(5) 201 ±39	(5) 93 ±29	(5) 23 ±4	(5) 54 ±5
400	(5) 5.8* ±0.2	(5) 3.4 ±0.2	(5) 15 ±2	(5) 120 ±16	(5) 71** ±15	(5) 22 ±8	(5) 188 ±20	(5) 80 ±10	(5) 19 ±2	(5) 49 ±7
b)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
0	5.3 ±0.1	3.2 ±0.1	17 ±2	112 ±15	43 ±7	17 ±4	225 ±39	131 ±37	24 ±5	60 ±6

Parameter: mean±S.D.

(): number of animals

a): vehicle control: corn oil (5 ml/kg)

*: significantly different from control. $P < 0.05$ **: significantly different from control. $P < 0.01$

b): administered 5 ml/kg of corn oil and kept separately in the other room

Table P15

Thiophene: dose range finding study in rats

Absolute and relative organ weight of males after oral administration for 14 days; mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	Thiophene														
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}			25			100			400			0 ^{b)}		
Terminal body weight (g)	346.9 ± 29.6	(5)		351.7 ± 19.7	(5)		337.3 ± 20.8	(5)		324.4 ± 25.1	(5)		341.0 ± 10.8	(5)	
Liver (g)	9.80 ± 2.81	1.50 ^{c)} 0.23 ^{d)}	(5)	10.46 ± 2.97	1.23 0.19	(5)	10.73 ± 3.18	0.99 0.14*	(5)	11.89 ± 3.66	1.37 0.26**	(5)	9.52 ± 2.79	0.19 0.05	(5)
Kidneys (g)	2.29 ± 0.66	0.22 0.04	(5)	2.35 ± 0.67	0.15 0.02	(5)	2.37 ± 0.70	0.21 0.03	(5)	2.36 ± 0.73	0.18 0.06	(5)	2.37 ± 0.70	0.09 0.04	(5)
Adrenal glands (mg)	59.1 ± 17.0	8.3 1.8	(5)	61.0 ± 17.3	6.1 1.2	(5)	63.0 ± 18.7	5.2 1.3	(5)	51.3 ± 15.8	7.8 2.0	(5)	64.2 ± 18.9	2.8 1.0	(5)
Thymus (mg)	377.7 ± 107.9	107.9 25.4	(5)	520.8 ± 149.0	73.4 26.2	(5)	357.2 ± 105.2	86.2 21.7	(5)	390.2 ± 120.2	56.8 13.9	(5)	431.0 ± 126.2	149.7 43.3	(5)
Testes (g)	3.26 ± 0.94	0.17 0.07	(5)	2.81 ± 0.79	0.92 0.24	(5)	3.25 ± 0.97	0.17 0.10	(5)	3.17 ± 0.98	0.15 0.06	(5)	3.24 ± 0.95	0.29 0.10	(5)

^{a)}: vehicle control: corn oil (5 ml/kg)^{b)}: administered 5 ml/kg of corn oil and kept separately in the other room^{c)}: absolute weight^{d)}: 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 P16

Thiophene: dose range finding study in rats

Absolute and relative organ weight of females after oral administration for 14 days; mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	Thiophene														
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}			25			100			400			0 ^{b)}		
Terminal body weight (g)	241.3 ± 15.4	(5)		250.5 ± 14.9	(5)		240.8 ± 13.5	(5)		226.6 ± 20.2	(5)		239.1 ± 9.7	(5)	
Liver (g)	7.25 ± 0.59 ^{c)}	(5)		7.75 ± 0.59	(5)		8.18 ± 0.32	(5)		8.71 ± 1.21	(5)		7.02 ± 0.29	(5)	
	3.01 ± 0.22 ^{d)}			3.09 ± 0.09			3.41 ± 0.23 ^{**}			3.83 ± 0.20 ^{**}			2.94 ± 0.06		
Kidneys (g)	1.69 ± 0.21	(5)		1.74 ± 0.20	(5)		1.74 ± 0.03	(5)		1.70 ± 0.14	(5)		1.63 ± 0.08	(5)	
	0.70 ± 0.04			0.69 ± 0.06			0.72 ± 0.03			0.75 ± 0.04			0.68 ± 0.02		
Adrenal glands (mg)	68.6 ± 3.3	(5)		70.2 ± 7.8	(5)		68.1 ± 7.3	(5)		58.0 ± 7.6 [*]	(5)		69.2 ± 3.4	(5)	
	28.5 ± 2.4			28.1 ± 3.4			28.3 ± 2.7			25.6 ± 2.0			29.0 ± 1.3		
Thymus (mg)	471.2 ± 147.1	(5)		502.4 ± 47.5	(5)		461.2 ± 170.2	(5)		398.9 ± 50.3	(5)		462.6 ± 183.5	(5)	
	193.2 ± 52.5			201.4 ± 24.9			189.7 ± 61.9			176.1 ± 17.4			191.5 ± 68.7		
Ovaries (mg)	102.3 ± 19.4	(5)		93.6 ± 14.2	(5)		89.0 ± 20.7	(4)		83.7 ± 15.9	(5)		100.3 ± 8.7	(5)	
	42.2 ± 6.0			37.4 ± 5.5			37.3 ± 7.7			37.0 ± 6.8			42.0 ± 4.0		

^{a)}: vehicle control: corn oil (5 ml/kg)^{b)}: administered 5 ml/kg of corn oil and kept separately in the other room^{c)}: absolute weight^{d)}: 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 P17

Thiophene: dose range finding study in rats

Macroscopic findings of males after oral administration for 14 days

Group Grade	Control		25 mg/kg		100 mg/kg		400 mg/kg		Control a)	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
(Liver)	[5]		[5]		[5]		[5]		[5]	
yellowish	4	1	4	1	5	0	5	0	5	0
dark color	5	0	5	0	5	0	3	2	5	0
accentuated lobular pattern	4	1	4	1	5	0	4	1	5	0
(Kidney)	[5]		[5]		[5]		[5]		[5]	
dark color										
in the medulla/papilla	5	0	5	0	5	0	4	1	5	0
(Seminal vesicle)	[5]		[5]		[5]		[5]		[5]	
small in the right side	5	0	5	0	5	0	4	1	5	0
(Testis)	[5]		[5]		[5]		[5]		[5]	
small	5	0	4	1	5	0	5	0	5	0
(Thymus)	[5]		[5]		[5]		[5]		[5]	
dark colored area	5	0	5	0	5	0	5	0	4	1
(Lung)	[5]		[5]		[5]		[5]		[5]	
dark colored spot	5	0	4	1	5	0	5	0	5	0
translucent area	5	0	4	1	5	0	5	0	5	0
(Epididymis)	[5]		[5]		[5]		[5]		[5]	
dark colored area	5	0	5	0	5	0	4	1	5	0
nodule	4	1	5	0	5	0	4	1	5	0
(Glandular stomach)	[5]		[5]		[5]		[5]		[5]	
dark colored spot	5	0	4	1	5	0	5	0	5	0
dark colored area	5	0	4	1	5	0	5	0	5	0

a) Administered 5 mg/kg of corn oil and kept separately in the other room

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table P18

Thiophene: dose range finding study in rat

Macroscopic findings of females after oral administration for 14 days

Group Grade	Control		25 mg/kg		100 mg/kg		400 mg/kg		0 mg/kg a)	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
(Liver)	[5]		[5]		[5]		[5]		[5]	
yellowish	4	1	4	1	5	0	5	0	5	0
pale colored area	5	0	5	0	5	0	4	1	5	0
dark color	5	0	4	1	4	1	5	0	5	0
accentuated lobular pattern	5	0	5	0	4	1	5	0	5	0
(Forestomach)	[5]		[5]		[5]		[5]		[5]	
yellowish area of the mucosa	5	0	5	0	5	0	4	1	5	0
(Ovary)	[5]		[5]		[5]		[5]		[5]	
enlargement	5	0	5	0	4	1	5	0	5	0
(Thymus)	[5]		[5]		[5]		[5]		[5]	
enlargement	5	0	5	0	4	1	5	0	4	1

a) Administered 5 mg/kg of corn oil and kept separately in the other room

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 1

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

Clinical signs of F₀ males

Clinical signs	Thiophene (mg/kg)	Initial number of animals	Number of animals with clinical signs Day of dosage period						Total
			1~7	8~14	15~21	22~28	29~35	36~44	
Temporary salivation immediately after administration	0	13	0	0	0	0	0	0	0
	25	13	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	1	6	6	5	9	2	11
	400	13	10	12	11	13	13	11	13
Decreased locomotor activity	0	13	0	0	0	0	0	0	0
	25	13	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	1	0	0	0	0	0	1
	400	13	0	0	0	0	0	0	0
Lacrimation	0	13	0	0	0	0	0	0	0
	25	13	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	0	0	0	0	0	0	0
	400	13	4	0	0	0	0	0	4
Incomplete eyelid	0	13	0	0	0	0	0	0	0
	25	13	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	2	0	0	0	0	0	2
	400	13	7	0	0	0	0	0	7
Irregular respiration	0	13	0	0	0	0	0	0	0
	25	13	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	2	0	0	0	0	0	2
	400	13	8	2	0	0	0	0	9
Soft stool	0	13	0	0	0	0	0	0	0
	25	13	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	1	0	0	0	0	0	1
	400	13	6	1	0	0	0	0	6
Leaning	0	13	0	0	0	0	0	0	0
	25	13	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	1	0	0	0	0	0	1
	400	13	8	3	2	0	0	0	8
Prone position	0	13	0	0	0	0	0	0	0
	25	13	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	0	0	0	0	0	0	0
	400	13	5	1	0	0	0	0	5

Table 1 (Continued)

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

Clinical signs of F₀ males

Clinical signs	Thiophene (mg/kg)	Initial number of animals	Number of animals with clinical signs Day of dosage period						Total
			1 ~ 7	8 ~ 14	15 ~ 21	22 ~ 28	29 ~ 35	36 ~ 44	
Loss of fur	0	13	0	0	0	0	0	0	0
	25	13	0	0	0	1	1	1	1
	100	13	0	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	2	2	1	2
Decrease in fecal pellets	0	13	0	0	0	0	1	0	1
	25	13	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	0	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	0	0	0

Table 2

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

Clinical signs of F₀ females

Clinical signs	Thiophene (mg/kg)	Initial number of animals	Number of animals with clinical signs												Total
			Day of dosage period						L ₀	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄		
1~7	8~14	15~21	22~28	29~35	36~44										
Temporary salivation immediately after administration	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	25	13	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
	100	13	0	6	4	5	5	5	0	0	0	0	0	10	
	400	13*	9	11	11	10	11	5	5	4	4	3	0	13	
Decreased locomoter activity	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	25	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	400	13*	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
Emaciation	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	25	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	400	13*	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	
Lacrimation	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	25	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	400	13*	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	
Reddish tear	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	25	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	400	13*	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	
Incomplete eyelid	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	25	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	400	13*	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	
Abnormal respiration	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	25	13	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	100	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	400	13*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

*: One female rat was sacrificed at moribund on day 8 of treatment

Table 2 (Continued)

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

Clinical signs of F₀ females

Clinical signs	Thiophene (mg/kg)	Initial number of animals	Number of animals with clinical signs												Total
			Day of dosage period						L ₀	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄		
1~7	8~14	15~21	22~28	29~35	36~44										
Irregular respiration	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	25	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	400	13*	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	
Soft stool	0	13	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
	25	13	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
	100	13	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	400	13*	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	
Leaning	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	25	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	400	13*	7	2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	7	
Abnormal gait	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	25	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	400	13*	2	2	0	1	1	1	0	0	1	2	3	5	
Prone position	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	25	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	400	13*	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
Tremor	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	25	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	400	13*	1	1	0	1	1	1	0	0	1	2	1	4	
Paralysis hindlegs	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	25	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	400	13*	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	

*: One female rat was sacrificed at moribund on day 8 of treatment

Table 2 (Continued)

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

Clinical signs of F₀ females

Clinical signs	Thiophene (mg/kg)	Initial number of animals	Number of animals with clinical signs												Total
			Day of dosage period						L ₀	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄		
1~7	8~14	15~21	22~28	29~35	36~44										
Stooping position	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	25	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	400	13*	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
Tonic convulsion	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	25	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	400	13*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	
Decrease in fecal pellets	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	25	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	400	13*	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
Loss of fur	0	13	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	
	25	13	0	0	0	1	2	2	1	1	1	1	1	2	
	100	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	400	13*	0	1	1	2	2	0	0	0	0	0	0	2	
Crust	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	25	13	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	
	100	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	400	13*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Soiled fur	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	25	13	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	
	100	13	0	0	0	0	0	0	3	3	3	2	2	3	
	400	13*	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
Exophthalmos	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	25	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	400	13*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	

*: One female rat was sacrificed at moribund on day 8 of treatment

Table 2 (Continued)

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

Clinical signs of F₀ females

Clinical signs	Thiophene (mg/kg)	Initial number of animals	Number of animals with clinical signs											Total
			Day of dosage period											
			1~7	8~14	15~21	22~28	29~35	36~44	L ₀	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	
Vaginal discharge	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	400	13*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Not retrieving her pups	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	2
	400	13*	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
Incomplete projection of the nipples	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	13	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1	1	2
	400	13*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2
Complete litter loss	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	13	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
	100	13	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
	400	13*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2

*: One female rat was sacrificed at moribund on day 8 of treatment

Table 3

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

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

Compound	Thiophene			
	0 ^{a)}	25	100	400
Dose group (mg/kg)				
Days of treatment				
1 (Initial weight)	299.3 $\pm$ 11.6 (13)	299.8 $\pm$ 12.9 (13)	298.9 $\pm$ 11.4 (13)	298.4 $\pm$ 10.1 (13)
8	341.7 $\pm$ 20.4 (13)	341.8 $\pm$ 23.0 (13)	328.2 $\pm$ 30.0 (13)	301.1 $\pm$ 16.2** (13)
15	380.3 $\pm$ 28.6 (13)	377.7 $\pm$ 30.3 (13)	362.2 $\pm$ 35.0 (13)	342.2 $\pm$ 21.8** (13)
22	400.3 $\pm$ 32.0 (13)	402.2 $\pm$ 32.8 (13)	383.7 $\pm$ 34.9 (13)	361.4 $\pm$ 28.1** (13)
29	423.6 $\pm$ 28.0 (13)	430.8 $\pm$ 35.9 (13)	413.1 $\pm$ 38.9 (13)	383.6 $\pm$ 33.2* (13)
36	447.6 $\pm$ 31.2 (13)	457.2 $\pm$ 41.1 (13)	436.4 $\pm$ 43.2 (13)	403.8 $\pm$ 36.9* (13)
42	462.2 $\pm$ 35.0 (13)	467.9 $\pm$ 45.3 (13)	444.8 $\pm$ 43.2 (13)	409.6 $\pm$ 44.6** (13)

^{a)}: vehicle control: corn oil (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

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

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

Compound	Thiophene			
	0 ^{a)}	25	100	400
Dose group (mg/kg)				
Days of treatment				
1 ~ 8	42.4 $\pm$ 10.8 (13)	42.1 $\pm$ 11.2 (13)	29.3 $\pm$ 21.3 (13)	2.7 $\pm$ 11.6 ^{**} (13)
8 ~ 15	38.5 $\pm$ 9.9 (13)	35.9 $\pm$ 8.9 (13)	34.1 $\pm$ 8.5 (13)	41.1 $\pm$ 11.4 (13)
15 ~ 22	20.1 $\pm$ 6.2 (13)	24.4 $\pm$ 5.8 (13)	21.5 $\pm$ 6.4 (13)	19.3 $\pm$ 9.6 (13)
22 ~ 29	23.3 $\pm$ 9.4 (13)	28.7 $\pm$ 5.6 (13)	29.4 $\pm$ 6.1 (13)	22.2 $\pm$ 8.2 (13)
29 ~ 36	24.0 $\pm$ 6.8 (13)	26.3 $\pm$ 7.3 (13)	23.3 $\pm$ 7.3 (13)	20.1 $\pm$ 6.6 (13)
36 ~ 42	14.5 $\pm$ 5.7 (13)	10.7 $\pm$ 6.0 (13)	8.3 $\pm$ 8.1 (13)	5.8 $\pm$ 11.6 (13)

1 ~ 15	81.0 $\pm$ 19.6 (13)	78.0 $\pm$ 19.1 (13)	63.3 $\pm$ 26.8 (13)	43.8 $\pm$ 17.2 ^{**} (13)
1 ~ 22	101.0 $\pm$ 23.0 (13)	102.4 $\pm$ 21.5 (13)	84.8 $\pm$ 27.5 (13)	63.0 $\pm$ 23.9 ^{**} (13)
1 ~ 29	124.3 $\pm$ 19.5 (13)	131.1 $\pm$ 24.9 (13)	114.2 $\pm$ 30.8 (13)	85.2 $\pm$ 29.3 ^{**} (13)
1 ~ 36	148.3 $\pm$ 22.3 (13)	157.4 $\pm$ 30.5 (13)	137.5 $\pm$ 34.6 (13)	105.3 $\pm$ 32.9 ^{**} (13)
1 ~ 42	162.9 $\pm$ 26.0 (13)	168.1 $\pm$ 34.5 (13)	145.9 $\pm$ 34.9 (13)	111.1 $\pm$ 40.1 ^{**} (13)

^{a)}: vehicle control: corn oil (5 ml/kg)^{**}: significant difference from control, p<0.01 (by multiple comparisons)

Table 5

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

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

Compound	Thiophene			
	0 ^{a)}	25	100	400
Days of treatment				
1 (Initial weight)	216.2 $\pm$ 5.2 (13)	216.2 $\pm$ 5.3 (13)	216.1 $\pm$ 5.3 (13)	216.4 $\pm$ 5.0 (13)
8	232.0 $\pm$ 7.7 (13)	233.8 $\pm$ 4.4 (13)	229.3 $\pm$ 6.6 (13)	205.3 $\pm$ 23.9 ^{**} (13)
15	250.2 $\pm$ 11.6 (13)	253.8 $\pm$ 8.5 (13)	250.6 $\pm$ 10.7 (13)	234.3 $\pm$ 11.7 ^{**} (12)

^{a)}: vehicle control: corn oil (5 ml/kg)^{*}: significant difference from control, p<0.05 (by multiple comparisons)^{**}: significant difference from control, p<0.01 (by multiple comparisons)

Table 6

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

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

Compound	Thiophene			
	0 ^{a)}	25	100	400
Dose group (mg/kg)				
Days of treatment				
1 ~ 8	15.8 $\pm$ 4.2 (13)	17.6 $\pm$ 3.7 (13)	13.1 $\pm$ 3.8 (13)	-11.1 $\pm$ 21.6 ^{**} (13)
8 ~15	18.2 $\pm$ 6.4 (13)	19.9 $\pm$ 7.4 (13)	21.3 $\pm$ 6.2 (13)	24.2 $\pm$ 11.6 (12)

1 ~15	34.0 $\pm$ 8.7 (13)	37.5 $\pm$ 8.1 (13)	34.5 $\pm$ 7.3 (13)	17.4 $\pm$ 11.6 ^{**} (12)

^{a)}: vehicle control: corn oil (5 ml/kg)^{**}: significant difference from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table 7

Thiophene: 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	Thiophene			
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}	25	100	400
Days of pregnancy				
0	254.9 ± 11.5 (11)	255.3 ± 4.5 (10)	257.2 ± 8.9 (11)	242.0 ± 10.4 ^{**} (9)
7	292.1 ± 12.0 (11)	292.0 ± 8.1 (10)	295.4 ± 7.8 (11)	277.9 ± 11.6 ^{**} (9)
14	330.4 ± 10.9 (11)	328.1 ± 14.6 (10)	330.7 ± 7.2 (11)	315.3 ± 14.0 [*] (9)
20	396.2 ± 15.1 (11)	390.8 ± 26.5 (10)	393.3 ± 20.6 (11)	381.5 ± 21.7 (9)

^{a)}: vehicle control: corn oil (5 ml/kg)

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

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

Table 8

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

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

Compound	Thiophene			
	0 ^{a)}	25	100	400
Days of pregnancy				
0 ~ 7	37.2 ± 3.6 (11)	36.7 ± 6.4 (10)	38.2 ± 4.0 (11)	35.9 ± 6.1 (9)
7 ~ 14	38.3 ± 4.6 (11)	36.1 ± 7.3 (10)	35.3 ± 5.6 (11)	37.4 ± 5.2 (9)
14 ~ 20	65.8 ± 12.9 (11)	62.7 ± 15.2 (10)	62.6 ± 18.6 (11)	66.2 ± 12.6 (9)
0 ~ 14	75.5 ± 5.7 (11)	72.8 ± 12.4 (10)	73.5 ± 7.7 (11)	73.3 ± 10.2 (9)
0 ~ 20	141.3 ± 17.5 (11)	135.5 ± 23.3 (10)	136.1 ± 23.4 (11)	139.5 ± 16.6 (9)

^{a)}: vehicle control: corn oil (5 ml/kg)

Table 9

Thiophene: 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	Thiophene			
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}	25	100	400
Days of lactation				
0	304.1 ± 26.0 (11)	290.4 ± 30.0 (10)	287.7 ± 25.0 (11)	282.5 ± 19.6 (9)
4	321.4 ± 18.1 (11)	328.5 ± 17.4 (9)	307.2 ± 26.7 (10)	294.6 ± 38.5 (7)

^{a)} : vehicle control: corn oil (5 ml/kg)* : significant difference from control, $p < 0.05$ (by multiple comparisons)

Table 10

Thiophene: 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	Thiophene			
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}	25	100	400
Days of lactation				
0 ~ 4	17.3 $\pm$ 16.0 (11)	31.4 $\pm$ 15.8 (9)	16.1 $\pm$ 14.3 (10)	6.4 $\pm$ 28.6 (7)

^{a)}: vehicle control: corn oil (5 ml/kg)

Table 11

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

Food consumption of F₀ males (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	Thiophene			
	0 ^{a)}	25	100	400
Dose group (mg/kg)				
Days of treatment				
1 ~ 8	170.9 $\pm$ 16.9 (13)	172.5 $\pm$ 17.2 (13)	150.2 $\pm$ 30.4 (13)	122.5 $\pm$ 12.6** (13)
8 ~ 15	166.0 $\pm$ 19.9 (13)	160.1 $\pm$ 23.0 (13)	153.8 $\pm$ 25.6 (13)	165.0 $\pm$ 19.2 (13)
29 ~ 36	147.0 $\pm$ 14.0 (13)	148.9 $\pm$ 14.7 (13)	153.4 $\pm$ 17.8 (13)	163.2 $\pm$ 22.5 (13)
36 ~ 42	124.4 $\pm$ 13.4 (13)	118.4 $\pm$ 14.0 (13)	125.1 $\pm$ 14.1 (13)	141.2 $\pm$ 20.8* (13)

^{a)}: vehicle control: corn oil (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

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

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

Compound	Thiophene			
	0 ^{a)}	25	100	400
Dose group (mg/kg)				
Days of treatment				
1 ~ 8	119.0 $\pm$ 7.6 (13)	116.7 $\pm$ 5.3 (13)	109.7 $\pm$ 12.3 (13)	74.5 $\pm$ 22.9 ^{**} (13)
8 ~ 15	118.9 $\pm$ 8.9 (13)	117.1 $\pm$ 8.5 (13)	121.1 $\pm$ 10.3 (13)	126.7 $\pm$ 8.6 (12)

^{a)}: vehicle control: corn oil (5 ml/kg)^{**}: significant difference from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table 13

Thiophene: 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	Thiophene			
	0 ^{a)}	25	100	400
Days of pregnancy				
0 ~ 7	139.0 $\pm$ 5.5 (11)	137.5 $\pm$ 11.3 (10)	142.9 $\pm$ 10.9 (11)	136.2 $\pm$ 14.0 (9)
7 ~ 14	154.5 $\pm$ 6.8 (11)	150.0 $\pm$ 13.3 (10)	154.2 $\pm$ 11.2 (11)	150.8 $\pm$ 13.0 (9)
14 ~ 20	130.3 $\pm$ 6.5 (11)	128.0 $\pm$ 15.2 (10)	129.8 $\pm$ 10.1 (11)	133.3 $\pm$ 14.8 (9)

^{a)}: vehicle control: corn oil (5 ml/kg)

Table 14

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

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

Compound	Thiophene			
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}	25	100	400
Days of lactation				
0 ~ 4	91.8 ± 14.5 (11)	99.4 ± 16.9 (9)	80.3 ± 31.2 (10)	65.6 ± 35.7 (7)

^{a)}: vehicle control: corn oil (5 ml/kg)

Table 15

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

Urinalysis findings of F₀ males on day 37 of treatment

Thiophene (mg/kg)	Number of 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	2	1	5	2	3	0	2	1	10	0	13	2	5	5	1	13	0	13	0	0			13
25	13	3	3	3	3	0	1	0	0	11	2	13	0	4	8	1	13	0	11	1	1			13
100	13	0	2	2	1	4	4	0	3	9	1	13	0	4	9	0	12	1	12	1	0			13
400	13	0	0	0	1	1	11	2	1	10	0	13	2	3	7	1	13	0	13	0	0			13

a) vehicle control: corn oil (5ml/kg)

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

c) -: negative

d) -: negative, ±: trace, +: slight, ++: moderate +++: marked

e) ±: 0.1 EU/dl

Table 15 (continued)

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

Urinalysis findings of F₀ males on day 37 of treatment

Thiophene (mg/kg)	Red blood cell ^{b)}	Crystal ^{c)}	Cast ^{b)}	White blood cell ^{b)}	Epithelium cell ^{c)}
	—	— ± +	—	—	— ± +
0 ^{a)}	13	1 11 1	13	13	1 12 0
25	13	0 12 1	13	13	0 13 0
100	13	0 12 1	13	13	1 12 0
400	13	1 11 1	13	13	0 12 1

a) vehicle control: corn oil (5ml/kg)

b) —: not observed

c) —: not observed, ±: a few, +: abundant

Table 16

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

Hematological findings of Fo males after oral administration for 42 days

Thiophene (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)	APTT (sec)
0	(13) 804 ± 39	(13) 15.4 ± 1.0	(13) 43.5 ± 2.2	(13) 54.2 ± 1.6	(13) 19.2 ± 0.5	(13) 35.4 ± 0.8	(13) 99.7 ± 13.1	(5) 15.3 ± 1.1	(5) 24.9 ± 1.5
25	(13) 770 ± 42	(13) 14.7 ± 0.5	(13) 41.9* ± 1.6	(13) 54.5 ± 2.3	(13) 19.1 ± 0.9	(13) 35.1 ± 0.6	(13) 98.5 ± 27.2	(5) 16.4 ± 2.4	(5) 23.7 ± 1.6
100	(13) 769 ± 31	(13) 14.3** ± 0.4	(13) 41.5** ± 1.3	(13) 54.1 ± 1.8	(13) 18.6 ± 0.6	(13) 34.5* ± 0.5	(13) 99.0 ± 10.9	(5) 15.4 ± 1.5	(5) 23.9 ± 1.9
400	(13) 788 ± 37	(13) 14.0** ± 0.4	(13) 41.4** ± 1.1	(13) 52.5 ± 2.1	(13) 17.8** ± 0.7	(13) 34.0** ± 0.2	(13) 102.1 ± 11.7	(5) 14.6 ± 1.4	(5) 21.8* ± 0.6

Thiophene (mg/kg)	W B C ($\times 100/\text{mm}^3$)	Band neutrophil (%)	Segmented neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(13) 68 ± 15	(13) 0 ± 0	(13) 15 ± 7	(13) 1 ± 1	(13) 0 ± 0	(13) 3 ± 2	(13) 81 ± 7
25	(13) 56 ± 10	(13) 0 ± 1	(13) 16 ± 7	(13) 1 ± 2	(13) 0 ± 0	(13) 3 ± 2	(13) 79 ± 8
100	(13) 59 ± 15	(13) 0 ± 0	(13) 18 ± 6	(13) 0 ± 1	(13) 0 ± 0	(13) 3 ± 2	(13) 79 ± 7
400	(13) 62 ± 17	(13) 0 ± 0	(13) 11 ± 5	(13) 1 ± 1	(13) 0 ± 0	(13) 3 ± 2	(13) 86 ± 6

Parameter: mean $\pm$ S.D.
(): number of animals*: significantly different from control. $p < 0.05$
**: significantly different from control. $p < 0.01$

Table 17

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

Biochemical findings of Po males after oral administration for 42 days

Thiophene (mg/kg)	Total protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	A/G	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	Total bilirubin (mg/dl)
0	(13) 5.5 ±0.3	(13) 3.1 ±0.1	(13) 1.33 ±0.15	(13) 13 ±2	(13) 0.7 ±0.1	(13) 147 ±12	(13) 39 ±6	(13) 0.08 ±0.03
25	(13) 5.5 ±0.2	(13) 3.1 ±0.1	(13) 1.28 ±0.20	(13) 14 ±2	(13) 0.7 ±0.0	(13) 132 ±9	(13) 35 ±6	(13) 0.08 ±0.02
100	(13) 5.6 ±0.2	(13) 3.1 ±0.1	(13) 1.21 ±0.07	(13) 14 ±2	(13) 0.7 ±0.1	(13) 114** ±8	(13) 45 ±7	(13) 0.09 ±0.01
400	(13) 5.5 ±0.2	(13) 3.1 ±0.1	(13) 1.26 ±0.14	(13) 16** ±3	(13) 0.7 ±0.1	(13) 120** ±18	(13) 51** ±9	(13) 0.17** ±0.05

Thiophene (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	(13) 143.7 ±1.2	(13) 3.90 ±0.17	(13) 108.6 ±1.2	(13) 8.6 ±0.4	(13) 5.5 ±0.5	(13) 273 ±36	(13) 30 ±6	(13) 61 ±11	(13) 0 ±0
25	(13) 145.5** ±0.8	(13) 4.09* ±0.17	(13) 110.4** ±1.1	(13) 8.7 ±0.2	(13) 5.9 ±0.4	(13) 254 ±43	(13) 27 ±5	(13) 56 ±8	(13) 0 ±0
100	(13) 145.7** ±0.8	(13) 3.88 ±0.15	(13) 108.9 ±1.0	(13) 8.8 ±0.2	(13) 6.2** ±0.4	(13) 222** ±41	(13) 30 ±4	(13) 58 ±6	(13) 0 ±1
400	(13) 145.2** ±0.7	(13) 3.98 ±0.20	(13) 108.6 ±0.8	(13) 8.6 ±0.2	(13) 6.5** ±0.4	(13) 200** ±20	(13) 81** ±100	(13) 96* ±69	(13) 1** ±1

Parameter: mean±S.D.
(): number of animals

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

Table 18

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

Macroscopic findings of Fo males after oral administration for 42 days

Group Grade	Control		25 mg/kg		100 mg/kg		400 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Brain)	[13]		[13]		[13]		[13]	
hydrocephalus	13	0	13	0	12	1	13	0
(Liver)	[13]		[13]		[13]		[13]	
dark color	13	0	13	0	13	0	11	2
yellowish	9	4	8	5	10	3	12	1
pale color	13	0	13	0	13	0	12	1
accentuated lobular pattern	11	2	9	4	9	4	12	1
enlargement	13	0	12	1	12	1	12	1
(Kidney)	[13]		[13]		[13]		[13]	
dark color in papilla	13	0	13	0	12	1	13	0
pale color in cortex	13	0	13	0	13	0	12	1
dilatation of renal pelvis	10	3	12	1	12	1	13	0
recessed area	13	0	13	0	13	0	12	1
(Spleen)	[13]		[13]		[13]		[13]	
pale color	13	0	13	0	13	0	12	1
small	13	0	13	0	13	0	12	1
(Thymus)	[13]		[13]		[13]		[13]	
dark colored spot	12	1	13	0	13	0	13	0
(Thyroid gland)	[13]		[13]		[13]		[13]	
enlargement	13	0	13	0	11	2	11	2
small	13	0	12	1	13	0	13	0
(Adrenal gland)	[13]		[13]		[13]		[13]	
enlargement	13	0	11	2	13	0	13	0
(Lung)	[13]		[13]		[13]		[13]	
dark colored spot	12	1	13	0	12	1	12	1
pale colored spot	12	1	13	0	13	0	13	0
pale colored area	11	2	13	0	13	0	13	0
(Heart)	[13]		[13]		[13]		[13]	
pale colored spot	12	1	13	0	13	0	13	0
(Seminal vesicle)	[13]		[13]		[13]		[13]	
small	12	1	13	0	13	0	13	0
(Testis)	[13]		[13]		[13]		[13]	
small	13	0	13	0	13	0	12	1
(Epididymis)	[13]		[13]		[13]		[13]	
small	13	0	13	0	13	0	12	1
nodule	13	0	13	0	12	1	13	0

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 19

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

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

Compound	Thiophene			
	0 ^{a)}	25	100	400
Dose group (mg/kg)				
Terminal body weight (g)	439.7 $\pm$ 33.9 (13)	445.1 $\pm$ 43.7 (13)	419.7 $\pm$ 40.6 (13)	381.4 $\pm$ 41.5** (13)
Liver (g)	12.49 $\pm$ 1.27 ^{b)} (13) 2.84 $\pm$ 0.17 ^{c)}	13.04 $\pm$ 1.84 (13) 2.92 $\pm$ 0.17	13.00 $\pm$ 1.76 (13) 3.09 $\pm$ 0.17**	13.56 $\pm$ 1.61 (13) 3.55 $\pm$ 0.16**
Kidneys (g)	2.65 $\pm$ 0.25 (13) 0.60 $\pm$ 0.04	2.78 $\pm$ 0.30 (13) 0.63 $\pm$ 0.04	2.89 $\pm$ 0.39 (13) 0.69 $\pm$ 0.04**	2.65 $\pm$ 0.33 (13) 0.69 $\pm$ 0.04**
Thymus (mg)	346.7 $\pm$ 92.8 (13) 79.1 $\pm$ 21.1	324.6 $\pm$ 57.0 (13) 72.9 $\pm$ 11.3	305.5 $\pm$ 86.4 (13) 73.1 $\pm$ 21.8	309.7 $\pm$ 53.2 (13) 82.2 $\pm$ 17.5
Testes (g)	3.09 $\pm$ 0.20 (13) 0.71 $\pm$ 0.06	2.96 $\pm$ 0.25 (13) 0.67 $\pm$ 0.08	3.24 $\pm$ 0.18 (13) 0.78 $\pm$ 0.07	2.91 $\pm$ 0.37 (13) 0.77 $\pm$ 0.13
Epididymides (g)	1.09 $\pm$ 0.08 (13) 0.25 $\pm$ 0.02	1.09 $\pm$ 0.12 (13) 0.25 $\pm$ 0.03	1.16 $\pm$ 0.08 (13) 0.28 $\pm$ 0.03	1.06 $\pm$ 0.11 (13) 0.28 $\pm$ 0.04*
Spleen (g)	0.72 $\pm$ 0.12 (13) 0.16 $\pm$ 0.02	0.73 $\pm$ 0.14 (13) 0.16 $\pm$ 0.02	0.68 $\pm$ 0.14 (13) 0.16 $\pm$ 0.03	0.54 $\pm$ 0.09** (13) 0.14 $\pm$ 0.02
Thyroid glands (mg)	15.4 $\pm$ 3.3 (13) 3.5 $\pm$ 0.8	15.5 $\pm$ 4.2 (13) 3.5 $\pm$ 0.8	17.8 $\pm$ 4.9 (13) 4.3 $\pm$ 1.2	14.6 $\pm$ 4.1 (13) 3.8 $\pm$ 1.1

^{a)} : vehicle control: corn oil (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

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

Histopathological findings of Fo males after oral administration for 42 days

Group Grade	Control					25 mg/kg					100 mg/kg					400 mg/kg				
	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
(Cerebrum)	[13]					[13]					[13]					[13]				
abnormality	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0
(Cerebellum)	[13]					[13]					[13]					[13]				
pyknosis/necrosis of granular cells	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	12	1	0	0	0
(Liver)	[13]					[13]					[13]					[13]				
necrosis of hepatocyte in central zone	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	4	9	0	0**
homogenous or vesicule changes of hepatocyte in central zone	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	2	1	5	5	0**
hypertrophy of hepatocyte in central zone	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	6	7	0	0	0*	0	1	9	3	0**
infiltration of macrophages in central zone	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	9	4	0	0	0	2	3	4	4	0**
fatty change of hepatocyte in central zone	0	10	3	0	0	0	11	2	0	0	0	4	9	0	0	0	10	3	0	0
fatty change of hepatocyte in peripheral zone	0	0	5	8	0	0	0	5	8	0	0	0	7	6	0	0	0	6	7	0
microgranuloma	0	7	6	0	0	0	11	2	0	0	0	8	5	0	0	3	10	0	0	0*

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe

[], Number of animals examined

*: Significantly different from control, $p < 0.05$ **: Significantly different from control, $p < 0.01$

Table 20 (Continued)

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

Histopathological findings of Fo males after oral administration for 42 days

Group Grade	Control					25 mg/kg					100 mg/kg					400 mg/kg				
	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
(Kidney)	[13]					[13]					[13]					[13]				
eosinophilic body	12	1	0	0	0	5	7	1	0	0*	7	6	0	0	0	8	0	3	2	0
atrophic/regenerated tubules in cortex	1	11	1	0	0	3	10	0	0	0	3	10	0	0	0	6	6	1	0	0
focal dilatation of lumen in cortex	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	12	1	0	0	0	13	0	0	0	0
dilatation of renal pelvis	9	0	4	0	0	12	0	1	0	0	12	0	1	0	0	13	0	0	0	0
calcification of cortico-medullary junction	12	1	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0
infiltration of lymphocytes in interstitium	11	2	0	0	0	12	1	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0
hyaline cast in medulla	11	2	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0
focal hyperprasia of transitional epithelium in renal pervis	13	0	0	0	0	12	0	1	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0
(Lung)	[13]					[0]					[0]					[13]				
aggregation of foamy cells in alveolus	4	7	2	0	0											11	2	0	0	0*
alveolitis with infiltration of macrophages /neutrophils/lymphocytes	10	0	3	0	0											13	0	0	0	0
calcification in artery	9	4	0	0	0											11	2	0	0	0
(Spleen)	[13]					[0]					[0]					[13]				
extramedullary hematopoiesis	0	13	0	0	0											0	12	1	0	0
deposits of pigment	0	12	1	0	0											0	13	0	0	0
(Heart)	[13]					[0]					[0]					[13]				
focal necrosis of myocardial fiber	9	4	0	0	0											12	1	0	0	0
(Urinary bladder)	[12]					[0]					[0]					[13]				
diffuse hyperplasia of epithelium	11	1	0	0	0											11	2	0	0	0

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe

[], Number of animals examined

*: Significantly different from control, p<0.05

Table 20 (Continued)

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

Histopathological findings of Fo males after oral administration for 42 days

Group Grade	Control					25 mg/kg					100 mg/kg					400 mg/kg				
	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
(Testis)	[13]					[0]					[0]					[13]				
focal atrophy																				
of seminiferous tubules	13	0	0	0	0											12	0	0	1	0
decreased number of germ cells																				
of seminiferous tubules	13	0	0	0	0											12	0	0	1	0
diffuse hyperplasia																				
of Leydig's cells	13	0	0	0	0											12	1	0	0	0
(Epididymides)	[13]					[0]					[0]					[13]				
spermatic granuloma	12	0	1	0	0											13	0	0	0	0
necrotic/degenerated																				
germ cells in lumen	13	0	0	0	0											12	0	1	0	0
infiltration of lymphocytes																				
in interstitium	12	1	0	0	0											10	3	0	0	0
(Thymus)	[13]					[0]					[0]					[13]				
abnormality	13	0	0	0	0											13	0	0	0	0
(Thyroid gland)	[13]					[0]					[0]					[13]				
abnormality	13	0	0	0	0											13	0	0	0	0
(Adrenal gland)	[13]					[0]					[0]					[13]				
abnormality	13	0	0	0	0											13	0	0	0	0
(Spinal cord)	[13]					[0]					[0]					[13]				
abnormality	13	0	0	0	0											13	0	0	0	0

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe

[], Number of animals examined

Table 21

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

Macroscopic findings of Fo females

Group	Control		25 mg/kg		100 mg/kg		400 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Liver)	[13]		[13]		[13]		[13]	
dark colored area	13	0	13	0	13	0	11	2
dark color	13	0	11	2	10	3	9	4
pale colored area	13	0	13	0	13	0	10	3
yellowish	13	0	13	0	13	0	12	1
accentuated lobular pattern	13	0	11	2	12	1	10	3
enlargement	13	0	13	0	13	0	12	1
hernia	13	0	12	1	13	0	13	0
(Thymus)	[13]		[13]		[13]		[13]	
dark colored spot	12	1	13	0	13	0	13	0
small	13	0	11	2	9	4	7	6
(Spleen)	[13]		[13]		[13]		[13]	
small	13	0	13	0	12	1	9	4
recessed area	12	1	13	0	13	0	13	0
indistinct follicle	13	0	13	0	13	0	12	1
(Lung)	[13]		[13]		[13]		[13]	
dark colored spot	13	0	11	2	13	0	13	0
(Adrenal gland)	[13]		[13]		[13]		[13]	
dark cloudy	12	1	13	0	13	0	13	0
enlargement	13	0	13	0	12	1	13	0
(Uterus)	[13]		[13]		[13]		[13]	
dark color	13	0	13	0	12	1	13	0
thickening	13	0	13	0	12	1	13	0
(Vagina)	[13]		[13]		[13]		[13]	
accumulation of								
dark reddish mucous	13	0	13	0	12	1	13	0

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 21 (Continued)

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

Macroscopic findings of Fo females

Group Grade	Control		25 mg/kg		100 mg/kg		400 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Thyroid gland)	[13]		[13]		[13]		[13]	
enlargement	13	0	13	0	13	0	12	1
(Submandibular gland)	[13]		[13]		[13]		[13]	
small	13	0	13	0	13	0	12	1
(Kidney)	[13]		[13]		[13]		[13]	
pale color in cortex	13	0	13	0	12	1	13	0
dark color in medulla	13	0	13	0	13	0	12	1
(Pancreas)	[13]		[13]		[13]		[13]	
dark color	13	0	12	1	13	0	13	0
(Stomach/Intestin)	[13]		[13]		[13]		[13]	
few of content	13	0	13	0	13	0	12	1
(Forestomach)	[13]		[13]		[13]		[13]	
yellowish material on mucosa	12	1	13	0	13	0	13	0
(Glandular stomach)	[13]		[13]		[13]		[13]	
hematin	13	0	13	0	13	0	12	1
(Skin)	[13]		[13]		[13]		[13]	
soiled ventral fur /around the vulva	13	0	13	0	11	2	12	1

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 22 - 1

Thiophene: 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	Thiophene			
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}	25	100	400
Terminal body weight (g)	321.4 ± 18.1 (11)	328.5 ± 17.4 (9)	307.2 ± 26.7 (10)	294.6 ± 38.5 (7)
Liver (g)	12.53 ± 0.79 ^{b)} (11) 3.90 ± 0.25 ^{c)}	13.21 ± 0.77 (9) 4.03 ± 0.19	13.01 ± 1.02 (10) 4.26 ± 0.44	13.89 ± 1.60 (7) 4.77 ± 0.74 ^{**}
Kidneys (g)	1.94 ± 0.13 (11) 0.60 ± 0.04	1.88 ± 0.12 (9) 0.57 ± 0.04	1.95 ± 0.12 (10) 0.64 ± 0.05	2.10 ± 0.21 (7) 0.71 ± 0.03 ^{**}
Thymus (mg)	245.2 ±114.3 (11) 75.5 ± 32.6	204.0 ± 81.7 (9) 61.4 ± 22.3	188.4 ±102.8 (10) 59.6 ± 28.2	170.8 ±109.8 (7) 55.1 ± 31.3

^{a)}: vehicle control: corn oil (5 ml/kg)^{b)}: absolute weight^{c)}: relative weight (g or mg per 100g body weight)^{**}: significant difference from control, p<0.01 (by multiple comparisons)

Table 22 - 2

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

Absolute and relative organ weights of F₀ females; complete litter loss

Animal no.	Terminal body weight (g)	Liver		Kidneys		Thymus	
		Absolute (g)	Relative	Absolute (g)	Relative	Absolute (mg)	Relative
FB02011	276.1	11.63	4.21	1.78	0.64	75.3	27.3

FB03003	235.4	9.82	4.17	1.72	0.73	51.8	22.0

FB04001	242.8	10.84	4.46	1.78	0.73	70.2	28.9
FB04005	222.7	11.22	5.04	1.74	0.78	65.5	29.4

Relative: g or mg per 100g body weight

Table 22 - 3

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

Absolute and relative organ weights of F₀ females; sacrificed on the way of test period

Animal no.	Terminal body weight (g)	Liver		Kidneys		Thymus	
		Absolute (g)	Relative	Absolute (g)	Relative	Absolute (mg)	Relative
Sacrificed on day 8 of treatment							
FB04006	147.6	9.36	6.34	1.59	1.08	80.8	54.7
Complete implantation loss							
FB03005	334.8	15.15	4.53	2.00	0.60	373.9	111.7
Non pregnant							
FB01004	309.6	11.35	3.67	2.08	0.67	576.4	186.2
FB02002	322.4	11.62	3.60	1.74	0.54	410.4	127.3
FB02003	305.8	12.11	3.96	1.82	0.60	379.3	124.0
FB02009	310.1	11.76	3.79	1.71	0.55	327.2	105.5
FB03006	302.4	13.21	4.37	2.00	0.66	415.7	137.5
FB04002	271.6	11.85	4.36	2.24	0.82	336.9	124.0
FB04004	299.0	15.16	5.07	2.02	0.68	391.9	131.1
Not copulated							
FB01006	307.8	11.53	3.75	1.82	0.59	450.6	146.4
FB04013	294.7	13.58	4.61	1.93	0.65	501.6	170.2

Relative: g or mg per 100g body weight

Table 23

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

Histopathological findings of Fo females

Group Grade	Control					25 mg/kg					100 mg/kg					400 mg/kg				
	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
(Cerebrum)	[13]					[13]					[13]					[13]				
dilatation of ventricle	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	9	0	4	0	0
edema around ventricle	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	10	2	1	0	0
(Cerebellum)	[13]					[13]					[13]					[13]				
pyknosis/necrosis of granular cells	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	12	1	0	0	0	5	0	3	2	3**
vacuolation in molecular layer	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	7	2	4	0	0
necrosis in laminae albae	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	6	3	0	4	0*
hemorrhage in necrotic foci	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	9	2	2	0	0
degeneration/loss of Purkinje cells	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	7	1	3	2	0
infiltration of fat granule cells around the necrosis	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	9	1	0	2	1
calcification in necrotic foci	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	10	1	2	0	0
vacuolar degeneration of neurons in cerebellar nuclei	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	9	0	0	3	1
edema in cerebellar nuclei	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	11	0	2	0	0

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe

[], Number of animals examined

*: Significantly different from control, $p < 0.05$ **: Significantly different from control, $p < 0.01$

Table 23 (Continued)

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

Histopathological findings of Fo females

Group	Control					25 mg/kg					100 mg/kg					400 mg/kg				
Grade	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
(Liver)	[13]					[13]					[13]					[13]				
necrosis of hepatocyte																				
in central zone	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	10	2	1	0	0	8	0	0	3	2
homogenous or vesicula changes of																				
hepatocyte in central zone	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	12	0	1	0	0	9	0	2	2	0
hypertrophy of hepatocyte																				
in central zone	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	2	10	1	0	0**	0	4	6	3	0**
infiltration of macrophages																				
in central zone	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	8	3	1	1	0	9	2	2	0	0
infiltration of macrophages																				
around necrotic area	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	9	0	2	2	0
infiltration of neutrophil																				
in necrotic area	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	11	0	1	1	0
hemorrhage	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	10	0	3	0	0
increased number of																				
mitosis of hepatocyte	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	12	0	1	0	0
fatty change of hepatocyte																				
in central zone	8	5	0	0	0	7	6	0	0	0	4	8	1	0	0	1	11	1	0	0*
fatty change of hepatocyte																				
in peripheral zone	0	6	6	1	0	0	8	4	1	0	0	7	5	1	0	0	9	3	1	0
microgranuloma	0	12	1	0	0	4	9	0	0	0	1	10	2	0	0	3	9	1	0	0
infiltration of lymphocytes	12	1	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0
(Kidney)	[13]					[13]					[13]					[13]				
atrophic/regenerated tubules																				
in cortex	5	8	0	0	0	3	10	0	0	0	6	7	0	0	0	9	3	1	0	0
vacuolar degeneration																				
of tubular epithelium	13	0	0	0	0	10	3	0	0	0	2	4	3	4	0**	5	4	3	1	0**
focal dilatation of																				
tubular lumen in medulla	12	1	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	10	3	0	0	0
focal fibrosis in cortex	12	1	0	0	0	12	1	0	0	0	11	2	0	0	0	13	0	0	0	0
calcification of																				
cortico-medullary junction	12	1	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	11	2	0	0	0
infiltration of lymphocytes																				
in interstitium	12	1	0	0	0	13	0	0	0	0	11	2	0	0	0	13	0	0	0	0

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe

[], Number of animals examined

*: Significantly different from control, p<0.05

**: Significantly different from control, p<0.01

Table 23 (Continued)

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

Histopathological findings of Fo females

Group Grade	Control					25 mg/kg					100 mg/kg					400 mg/kg				
	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
(Thymus)	[13]					[13]					[13]					[13]				
atrophy	10	3	0	0	0	10	1	1	1	0	7	1	3	1	1	7	1	3	2	0
(Spleen)	[13]					[13]					[13]					[13]				
decrease of blood content																				
in red pulp	13	0	0	0	0	11	2	0	0	0	11	2	0	0	0	10	2	1	0	0
atrophy of follicle	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13	0	0	0	0	12	0	1	0	0
extramedullary hematopoiesis	0	1	9	3	0	0	2	7	4	0	1	5	6	1	0	1	5	6	1	0
deposits of pigment	0	0	13	0	0	0	1	10	2	0	0	3	10	0	0	0	0	8	5	0
(Lung)	[13]					[0]					[0]					[13]				
aggregation of foamy cells																				
in alveolus	3	8	2	0	0											6	7	0	0	0
calcification in artery	12	1	0	0	0											12	1	0	0	0
(Heart)	[13]					[0]					[0]					[13]				
focal necrosis																				
of myocardial fiber	12	1	0	0	0											10	3	0	0	0
(Adrenal gland)	[13]					[0]					[0]					[13]				
necrosis of fascicular																				
and reticular zone	13	0	0	0	0											12	0	0	0	1
(Thyroid gland)	[12]					[0]					[0]					[13]				
ectopic thymus	11	0	1	0	0											13	0	0	0	0
(Urinary bladder)	[12]					[0]					[0]					[13]				
abnormality	12	0	0	0	0											13	0	0	0	0
(Spinal cord)	[13]					[0]					[0]					[13]				
abnormality	13	0	0	0	0											13	0	0	0	0
(Ovary)	[2]					[3]					[1]					[3]				
abnormality	2	0	0	0	0	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0	0	0

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe

[], Number of animals examined

Table 24

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

Reproductive performance of animals

Compound	Thiophene			
	0 ^{a)}	25	100	400
Dose group (mg/kg)				
Number of mated pairs	13	13	13	12
Number of copulated pairs	12	13	13	11
Copulation index A)	92.3	100.0	100.0	91.7
Number of pregnant animals	11	10	12	9
Fertility index B)	91.7	76.9	92.3	81.8
Pairing days until copulation Mean $\pm$ S.D. (N)	2.7 $\pm$ 1.2(12)	3.2 $\pm$ 1.6(13)	3.0 $\pm$ 1.0(12)	4.4 $\pm$ 3.2(11)
Frequency of vaginal estrus Mean $\pm$ S.D. (N)	1.0 $\pm$ 0.0(12)	1.1 $\pm$ 0.3(13)	1.0 $\pm$ 0.0(12)	1.1 $\pm$ 0.3(11)

^{a)}: vehicle control: corn oil (5 ml/kg)A): copulation index = (number of copulated pairs / number of mated pairs) $\times$ 100; %B): fertility index = (number of pregnant animals / number of copulated pairs) $\times$ 100; %

Table 25

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

Summary of development of F₁ pups up to day 4 of lactation; Mean $\pm$ S.D.

Compound	Thiophene			
	0 ^{a)}	25	100	400
Dose group (mg/kg)				
Number of pregnant females	11	10	12	9
Number of pregnant females with pups alive	11	10	11	9
Gestation index A)	100.0	100.0	91.7	100.0
Gestation length in days	22.2 $\pm$ 0.4 (11)	22.3 $\pm$ 0.5 (10)	22.4 $\pm$ 0.5 (10)	22.0 $\pm$ 0.0 (9)
Number of corpora lutea	14.9 $\pm$ 3.4 (11)	15.2 $\pm$ 1.7 (10)	15.0 $\pm$ 3.4 (12)	14.7 $\pm$ 1.1 (9)
Number of implantation sites	13.3 $\pm$ 3.8 (11)	13.8 $\pm$ 4.0 (10)	13.4 $\pm$ 4.9 (12)	12.9 $\pm$ 3.3 (9)
Implantation index B)	87.2 $\pm$ 15.0 (11)	89.5 $\pm$ 23.4 (10)	85.2 $\pm$ 26.5 (12)	87.1 $\pm$ 19.5 (9)
Day 0 of lactation				
Number of pups born	12.6 $\pm$ 3.7 (11)	12.9 $\pm$ 3.8 (10)	12.6 $\pm$ 4.9 (12)	12.7 $\pm$ 3.3 (9)
Delivery index C)	95.5 $\pm$ 4.6 (11)	94.1 $\pm$ 8.1 (10)	86.8 $\pm$ 27.9 (12)	98.4 $\pm$ 3.3 (9)
Number of live pups	11.9 $\pm$ 3.3 (11)	11.9 $\pm$ 4.4 (10)	12.4 $\pm$ 4.8 (12)	12.2 $\pm$ 3.1 (9)
Birth index D)	91.1 $\pm$ 10.6 (11)	87.7 $\pm$ 20.3 (10)	85.7 $\pm$ 27.4 (12)	95.3 $\pm$ 5.0 (9)
Live birth index E)	95.5 $\pm$ 10.6 (11)	92.6 $\pm$ 17.8 (10)	98.8 $\pm$ 2.6 (11)	96.9 $\pm$ 3.7 (9)
Sex ratio F)	34.6 $\pm$ 16.5 (11)	40.5 $\pm$ 13.9 (10)	50.9 $\pm$ 17.6 (11)	47.0 $\pm$ 10.7 (9)
Day 4 of lactation				
Number of live pups	11.7 $\pm$ 3.3 (11)	11.2 $\pm$ 5.5 (10)	10.6 $\pm$ 5.6 (11)	7.4 $\pm$ 5.7 (9)
Viability index G)	98.4 $\pm$ 3.5 (11)	89.3 $\pm$ 31.5 (10)	79.6 $\pm$ 36.5 (11)	63.5 $\pm$ 43.4 (9)
Sex ratio H)	34.2 $\pm$ 17.1 (11)	42.8 $\pm$ 11.3 (9)	51.1 $\pm$ 17.6 (10)	45.6 $\pm$ 23.4 (7)

: vehicle control: corn oil (5 ml/kg)

A): gestation index = (number of pregnant females with live pups / number of pregnant females) $\times$ 100; %B): implantation index = (number of implantation sites / number of corpora lutea) $\times$ 100; %C): delivery index = (number of pups born / number of implantation sites) $\times$ 100; %D): birth index = (number of live pups on Day 0 / number of implantation sites) $\times$ 100; %E): live birth index = (number of live pups on Day 0 / number of pups born) $\times$ 100; %F): sex ratio = (number of male live pups on Day 0 / number of live pups on Day 0) $\times$ 100; %G): viability index = (number of live pups on Day 4 / number of live pups on Day 0) $\times$ 100; %H): sex ratio = (number of male live pups on Day 4 / number of live pups on Day 4) $\times$ 100; %

Parenthesis indicates the number of litters evaluated

Table 26

Thiophene: 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	Thiophene			
	0 ^{a)}	25	100	400
Day 0 (At birth)				
No. of live pups	11.9 $\pm$ 3.3 (11)	11.9 $\pm$ 4.4 (10)	13.5 $\pm$ 2.9 (11)	12.2 $\pm$ 3.1 (9)
Male	4.2 $\pm$ 2.4	5.2 $\pm$ 3.2	6.7 $\pm$ 2.5	5.7 $\pm$ 1.9
Female	7.7 $\pm$ 2.8	6.7 $\pm$ 2.2	6.8 $\pm$ 3.1	6.6 $\pm$ 2.1
Weight of pup in grams				
Male	6.6 $\pm$ 0.8	6.5 $\pm$ 0.7	6.2 $\pm$ 0.7	5.8 $\pm$ 0.6
Female	6.1 $\pm$ 0.8	6.1 $\pm$ 0.7	5.8 $\pm$ 0.8	5.5 $\pm$ 0.5
Day 4 after birth				
No. of live pups	11.7 $\pm$ 3.3 (11)	11.2 $\pm$ 5.5 (10)	10.6 $\pm$ 5.6 (11)	7.4 $\pm$ 5.7 (9)
Male	4.1 $\pm$ 2.5	5.0 $\pm$ 3.2	4.9 $\pm$ 2.3	3.7 $\pm$ 3.2
Female	7.6 $\pm$ 2.8	6.2 $\pm$ 3.0	5.7 $\pm$ 4.0	3.8 $\pm$ 3.1
Weight of pup in grams				
Male	11.0 $\pm$ 1.9	10.6 $\pm$ 1.3	9.5 $\pm$ 1.8	8.5 $\pm$ 2.0
Female	10.2 $\pm$ 2.1	10.1 $\pm$ 1.5	9.0 $\pm$ 2.0	7.6 $\pm$ 2.1

^{a)} : vehicle control: corn oil (5ml/kg)

Parenthesis indicates the number of litters evaluated

Table 27

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

Summary of morphological observation of pups

Compounds	Thiophene			
	0 ^{a)}	25	100	400
Dose groups (mg/kg)				
No. of pups examined				
<u>External observation</u>	129	112	117	67
<u>Visceral observation</u>	129	112	117	67
No. of pups showing abnormalities				
<u>External abnormalities</u>	0	0	0	0
<u>Visceral abnormalities</u>				
Major abnormalities	0	0	1	0
Minor abnormalities	0	0	0	0
Types and frequencies (%)				
<u>Visceral abnormalities</u>				
Hydronephrosis			0.9	

^{a)} : vehicle control: Corn oil (5 ml/kg)

Table 28

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

Summary of morphological observation of F₁ dead pups

Compounds Dose groups (mg/kg)	Thiophene			
	0 ^{a)}	25	100	400
No. of dead pups examined				
<u>External observation</u>	9	3	25	35
<u>Visceral observation</u>	9	3	25	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: Corn oil (5 ml/kg)