

1, 3-イソベンゾフランジオン, テトラヒドロメチルー  
のラットにおける反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

—最終報告書—

試験実施施設：株式会社パナファーム・ラボラトリーズ 安全性研究所

## 目 次

	頁
要 約 .....	1
緒 言 .....	2
試験材料及び方法 .....	2
試験成績 .....	8
考 察 .....	11
文 献 .....	12
Fig. 1 Mean body weight changes of male rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test .....	13
Fig. 2 Mean body weight changes of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test .....	14
Fig. 3 Mean food consumption of male rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test .....	15
Fig. 4 Mean food consumption of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test .....	16

Table 1	Clinical signs of male rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	17
Table 2	Clinical signs of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	20
Table 3	Body weights of male rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	24
Table 4	Body weights of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	25
Table 5	Food consumption of male rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	26
Table 6	Food consumption of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	27
Table 7	Hematological findings of male rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	28
Table 8	Biochemical findings of male rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	29
Table 9	Necropsy findings of male rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	30
Table 10	Necropsy findings of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	31
Table 11	Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	34
Table 12	Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	35

Table 13A	Histopathological findings of male rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofurandione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	36
Table 13B	Histopathological findings of male rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofurandione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	38
Table 14A	Histopathological findings of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofurandione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	40
Table 14B	Histopathological findings of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofurandione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	43
Table 15	Reproductive performance of rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofurandione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	46
Table 16	Findings of delivery of F <sub>0</sub> dams treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofurandione and observations on their offspring in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test	47

## 要 約

OECD既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査の一環として、1,3-イソベンゾフランジオン、テトラヒドロメチル-0 (溶媒対照)、30、100及び300mg/kg/dayをCrj:CD(SD系)ラットの雌雄(各12匹/群)に交配前14日間、雄ではその後交配期間を含む35日間、雌では交配期間、妊娠期間及び分娩後3日まで通して経口投与し、親動物に対する反復投与毒性及び生殖能力並びに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討し、以下の結果が得られた。

### 1. 反復投与毒性

一般状態では、300mg/kg群の雄で投与後期から投与直後に一過性の流涎が認められた。体重、摂餌量及び血液学的検査では、被験物質投与の影響は認められなかった。血液化学的検査では、300mg/kg群で総コレステロール及び尿素窒素の減少並びにトリグリセライドの増加が認められた。

剖検では、300mg/kg群の雌雄で前胃部粘膜の肥厚が認められた。器官重量では、300mg/kg群の雄で副腎の相対重量の増加が認められた。病理組織学的検査では、100mg/kg群の雄で前胃の扁平上皮の過形成、300mg/kg群の雌雄で前胃の扁平上皮の過形成及び粘膜下組織の肉芽腫性炎症がみられ、このうち300mg/kg群の雄では扁平上皮の空胞化及び扁平上皮から粘膜下組織の浮腫、雌では糜爛も認められた。

### 2. 生殖発生毒性

親動物の生殖機能に関しては、性周期、黄体数、交尾率、着床痕数及び授(受)胎率に被験物質投与の影響は認められなかった。

分娩時及び哺育期検査では、妊娠期間、出産児数、出産率、死産率、出生児数、出生率、性比、分娩時及び生後4日の出生児体重並びに生後4日の生存率に被験物質投与の影響はみられず、外表異常の発現もなかった。

以上のことから、本試験条件下における反復投与毒性に関する無影響量は雄で30mg/kg、雌で100mg/kg、生殖発生毒性に関する無影響量は親動物及び出生児とも300mg/kg以上と推察された。

## 緒 言

1, 3-イソベンゾフランジオン, テトラヒドロメチルーは, 主に電子部品品などの絶縁体の材料となるエポキシ樹脂の硬化剤として使用されている化学物質である。今回, OECD既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査の一環として, 1, 3-イソベンゾフランジオン, テトラヒドロメチルーの反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を実施し, 親動物に対する反復投与毒性及び生殖能力並びに次世代児の発生・発育に及ぼす影響を検討したので報告する。

## 試験材料及び方法

### 1. 被験物質

より提供された1, 3-イソベンゾフランジオン, テトラヒドロメチルー(Lot No. 純度99.97%)を試験に使用した(添付資料1)。本被験物質は, アセトン及びDMSOに溶け易く, 水に溶けにくい淡黄色透明の液体であり, 本試験の投与期間終了後に日立化成工業株式会社で分析した結果, 投与期間中安定であったことが確認された(添付資料2)。媒体は, コーンオイル(ナカライテスク株式会社, Lot No. V5P5831)を使用した。なお, 被験物質及び媒体は被験物質室の保管庫内に室温で保管した。

### 2. 使用動物及び飼育条件

9週齢のCrj:CD(SD系)ラット(日本チャールス・リバー株式会社)を雌雄各55匹購入し, 7日間の検疫馴化を行った。この期間中に一般状態の観察及び体重測定を実施するとともに, 雌雄各3匹について剖検を行い, 異常がないことを確認したのち, 順調な発育を示した動物を10週齢で試験に使用した。なお, 投与開始時の体重は雄で356.3~394.4g, 雌で213.5~252.9gであった。

動物は温度 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (許容範囲 $18 \sim 28^{\circ}\text{C}$ ), 湿度 $55 \pm 10\%$ (許容範囲 $30 \sim 70\%$ ), 照明12時間(午前7時~午後7時)及び換気回数13回/時に設定したバリアーシステムC区域の飼育室(84番)で, ステンレススチール製ケージ(W260×H200×D380mm)に, 検疫馴化期間中は2~3匹(雌雄別), 投与期間中は1匹(雌雄別), 交配期間中は2匹(雌雄各1匹),

妊娠及び哺育期間中は床敷(ホワイトフレーク, 日本チャールス・リバー株式会社製)を入れたポリカーボネイト製ケージ(W265×H185×D425mm)に1匹ずつ(哺育期間中は哺育児を含む)収容し, 飼育した。なお, 温度の実測値は最高25.0℃, 最低22.0℃で, 湿度の実測値は最高58.0%, 最低51.0%であった。飼料は, 固型飼料(MF, オリエンタル酵母工業株式会社製)を, 飲水は次亜塩素酸ナトリウムを添加した井水(約2 ppm)を自動給水装置または給水瓶によりそれぞれ自由に摂取させた。飼料についてはオリエンタル酵母工業株式会社が, 床敷は日本チャールス・リバー株式会社が財団法人 日本食品分析センターにて, 飲水については嵯鶴城 南九科研センターにて分析し, いずれも許容基準に適合していることを確認した。なお, 飼育器材及び飼料は高圧蒸気滅菌したものを使用し, ラックは4週間に1回, ステンレススチール製ケージは2週間に1回, ポリカーボネイト製ケージは週1回, 受皿は週3回(ただし, 交配期間中は毎日)交換するとともに, 飼育室は毎日清掃し, 消毒薬を浸したモップで清拭した。

### 3. 試験群構成, 投与量設定の根拠及び群分け

試験群構成を下表に示した。

試験群	投与量 (mg/kg)	性別	動物数	動物番号
対照群	0	♂	12	701~712
		♀	12	751~762
低用量群	30	♂	12	713~724
		♀	12	763~774
中間用量群	100	♂	12	725~736
		♀	12	775~786
高用量群	300	♂	12	737~748
		♀	12	787~798

投与量は, 先に実施した予備試験の結果より設定した。すなわち, 本被験物質の100, 300及び1000mg/kgを2週間反復経口投与した結果, 1000mg/kg群では雌雄各1例が死亡したほか, 体重増加抑制傾向, 摂餌量の減少, 白血球数の増加, 赤血球の減少, 総蛋白

質及びアルブミンの減少，前胃粘膜の肥厚及び白色点，副腎重量の増加など明らかな毒性徴候が認められた。また，これらのうち前胃粘膜の肥厚は300mg/kg群においても観察された。一方，100mg/kg群では被験物質投与の影響は認められなかった。したがって，本試験の投与量には，死亡を含む明らかな毒性徴候が認められた1000mg/kgの約1/3量で，かつ被験物質投与の影響が出現すると予想される300mg/kgを高用量に設定し，以下公比3で除した100及び30mg/kgをそれぞれ中間用量及び低用量に設定した。

群分けは，投与開始前日に当日の体重を基に層別連続無作為化法により行い，群分け後の動物には動物番号を刻印した耳標を取り付けて個体識別した。また，各ケージには試験番号，動物番号，投与量及び性別を表示したラベルを付けた。なお，残余の動物は試験から除外した。

#### 4. 投与経路，投与方法及び投与期間

投与経路は，OECD試験法ガイドラインで指定されており，また，予想されるヒトへの曝露経路の一つである経口投与とした。雄は交配前14日間及びその後交配期間を含む35日間の合計49日間，雌は交配前14日間，交配期間(最長14日間)，妊娠期間及び哺育3日までの期間，連日1日1回，胃管を用いて投与した。投与容量は5ml/kgとし，動物ごとの投与液量は，雄並びに交配前及び交配期間中の雌については最新の体重を基に，交尾成立後の雌については妊娠0日の体重を基にそれぞれ算出した。対照群にはコーンオイルを同様に投与した。

#### 5. 被験物質と媒体の混合物調製法

1，3-イソベンゾフランジオン，テトラヒドロメチルーをコーンオイルに溶解し，0.6，2.0及び6.0W/V%溶液を調製した。調製は週1回の頻度で行い，被験液は投与時まで冷蔵保存した。本調製法による被験液の安定性試験は当研究所にて実施し，0.1，10及び20W/V%の溶液は低温遮光下で少なくとも8日間，その後室温に戻して6時間安定であることを確認した(添付資料3)。更に，調製した被験液については投与開始週に当研究所にて分析を行い，設定濃度の許容範囲内(±5%以内)であることを確認した(添付資料4)。

## 6. 観察及び検査方法

### 1) 一般状態観察並びに体重及び摂餌量測定

雌雄とも、全例について一般状態の観察及び生死の確認を1日2回以上行った。

体重については、雄は投与期間を通じて週2回測定した。雌は、交配前の投与期間及び交配期間中は週2回、妊娠期間中は妊娠0、4、7、10、14、17及び21日、哺育期間中は哺育0(分娩日)及び4日に測定した。

摂餌量については、雄は交配期間を除く投与期間中、週2回測定した。雌は、交配前の投与期間は週2回、妊娠期間中は妊娠1、4、7、10、14、17及び21日、哺育期間中は哺育1及び4日に測定した。

### 2) 血液学的検査

雄全例について、投与期間終了後に、18時間以上絶食させたのち、ペントバルビタール・ナトリウム30mg/kgを腹腔内投与して麻酔し、開腹後、腹部大静脈から採血を行った。採取した血液の一部はEDTA-2K処理(EDTA-2K加血液)して多項目自動血球計数装置(Sysmex CC-780型、東亜医用電子株式会社)を用いて、白血球数(電気抵抗検出方式)、赤血球数(電気抵抗検出方式)、ヘモグロビン量(オキシヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(血球パルス波高値検出方式)及び血小板数(電気抵抗検出方式)を測定し、赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリット値の測定結果を基にWintrobeの赤血球恒数[平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)及び平均赤血球血色素濃度(MCHC)]を算出した。また、血液の一部を塗抹標本とし、May-Grünwald-Giemsa染色(白血球百分比用)及びニューメチレンブルー超生体染色(網状赤血球率検査用)を施して、保管した。

### 3) 血液化学的検査

血液学的検査と同時に採取した雄の血液を室温で約60分間放置後、3000回転/分で10分間遠心分離し、得られた血清を用いて自動分析装置(736-10型、株式会社日立製作所)により、総蛋白質(T.protein、ビウレット法)、アルブミン(BCG法)、A/G比(総蛋白質及びアルブミンより算出)、総ビリルビン(T.bilirubin、アルカリアゾビリルビン法)、GOT(GOT、Karmen法)、GPT(GPT、Wróblewski-La Due法)、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ( $\gamma$ -GTP、 $\gamma$ -グルタミル-DBHA基質法)、アルカリ性フォスファ

ターゼ(ALP, p-ニトロフェニルリン酸基質法), 総コレステロール(T. cholesterol, COD-DAOS法), トリグリセライド(GPO-DAOS法・グリセリン消去法), リン脂質(酵素法・DAOS発色法), グルコース(グルコキナーゼ・G-6-PDH法), 尿素窒素(BUN, ウレアーゼ-G 6PDH法), クレアチニン(Jaffé法), 無機リン(モリブデン酸直接法)及びカルシウム(Ca, OCPC法)を測定した。また, 電解質分析装置(PVA- $\alpha$  III, 株式会社 アナリティカル・インスツルメンツ)によりナトリウム(Na, 電極法), カリウム(K, 電極法)及びクロール(Cl, 電量滴定法)を測定した。

#### 4) 剖検, 器官重量の測定及び病理組織学的検査

雄では投与期間終了後の採血を行ったのちに, 雌では哺育4日にエーテル麻酔下で外側腸骨動脈を切断して放血死させ, 解剖して諸器官及び組織の肉眼的観察を行い, 雌について黄体数及び着床痕数を調べた。剖検後, 脳, 心臓, 肺(気管支を含む), 胸腺, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 精巣, 精巣上体及び卵巣を摘出して器官重量(絶対重量)を測定するとともに, 剖検日の体重を基に体重比器官重量(相対重量)を算出した。重量測定器官に加え, 肉眼的異常部位を採取して10%中性緩衝ホルマリン溶液に固定した。なお, 10%中性緩衝ホルマリン溶液による固定に先だって, 精巣及び精巣上体はブアン液で前固定した。対照群及び300mg/kg群の脳, 心臓, 肺(気管支を含む), 胸腺, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 精巣, 精巣上体及び卵巣については, 常法に従ってパラフィン切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施し, 光学顕微鏡下で観察した。更に, 胃については, 被験物質投与に関連したと考えられる変化がみられたため, 100mg/kg以下の群の胃についても採取し, 同様の検査を行った。また, 一部の動物について肺及び胃の脂肪染色を実施した。なお, 肉眼的異常部位についてはすべて病理組織学的検査を行った。

#### 5) 性周期検査及び生殖能力検査

雌について交配開始日の2週間前(投与開始日)から交尾確認日まで, 毎日午前の一一定時間に膣垢を採取し, 交配前2週間について性周期の検査を行った。

交配は雌雄(12週齢)1対1で一晩同居させる方法で行い, 翌朝膣垢中の精子又は膣栓が確認されたものを交尾成立とし, その日を妊娠0日とした。また, 交配は同一群内で行い, 交配期間は最長2週間とした。なお, 交配相手が死亡した雌については,

同群内の交尾が確認された雄と同居させた。交配期間終了後、交尾所要日数、交尾率 [(交尾動物数/同居動物数)×100] 及び授(受)胎率 [(妊娠動物数/交尾動物数)×100] を算出した。

#### 6) 分娩及び哺育期(哺育4日まで)検査並びに新生児検査

交尾が確認された雌は全例を自然分娩させ、分娩徴候を含め分娩状態及び授乳、営巣などの哺育状態を観察するとともに、妊娠期間、出産率 [(生児出産雌数/妊娠雌数)×100] を算出した。なお、分娩の確認は、午前中に限定し、12時を過ぎて分娩した個体は、翌日の分娩とした。出産児については、分娩時に出産児数、出生児数、死産児数、出生児の性別及び外表異常を検査した。出生児については、出生日及び哺育4日に体重を個体ごとに測定するとともに出生率 [(出生児数/着床痕数)×100] 及び4日生存率 [(生後4日の生児数/出生児数)×100] を算出した。生後4日に出生児の全例をエーテル麻酔下で放血致死させ、器官・組織の肉眼的観察を行った。また、出産児(死産児及び死亡児を含む)については、剖検後一腹単位で純エタノールに固定保存した。

#### 7. 試験途中死亡例、瀕死例及び全児死亡例の処置

試験途中死亡例、瀕死例及び全児死亡例は速やかに剖検し、器官重量測定及び病理組織学的検査を行った。なお、器官重量については参考データにとどめた。

#### 8. 統計学的処理

体重、摂餌量、血液学的検査値、血液化学的検査値、交尾所要日数、性周期検査値(発情回数、発情周期)、器官重量、妊娠期間、黄体数、着床痕数、総出産児数及び出生児数については各群ごとに平均値と標準偏差を求め、対照群と被験物質投与群間でまず分散の均一性をBartlett法により検定した。分散が均一な場合は、Dunnettの多重比較検定を用いて対照群との比較を行い、分散が均一でない場合は、Steelの多重比較検定を用いて対照群との比較を行った。また交尾率、授(受)胎率、出産率及び出生児の性比については $\chi^2$ 検定により、死産率、出生率及び4日生存率についてはWilcoxonの順位和検定により対照群と各投与群間の比較を行った。いずれの場合も有意水準を5%とした。なお、出生児に関する測定値については一腹単位で処理した。

## 試 験 成 績

### 1. 反復投与毒性

#### 1) 一般状態

一般状態をTable 1, 2及びAppendix 1, 2に示した。

300mg/kg群の雄で投与36日から流涎が認められた。この症状は、投与直後に毎回4～9例みられたが、投与後30分までには回復した。そのほか、脱毛が対照群の雌雄各1例及び100mg/kg群の雌1例で認められた。

なお、300mg/kg群の雄1例(No. 737)が投与4日の投与直後に、30mg/kg群の雌1例(No. 764)が投与5日から活動性低下、緩徐呼吸及び体温低下を呈し、投与13日に死亡した。更に、300mg/kg群では雌1例(No. 793)で投与17日以降に活動性低下、緩徐呼吸、皮膚蒼白、腹部膨満及び下腹部の汚れがみられたため、投与20日に途中剖検した。これら死亡例の剖検では、肺の暗赤色化、肺の収縮不全、気管の泡沫状液体の貯留、途中剖検例では食道の黒赤色点がみられ、病理組織学的検査ではいずれも肺胞内に媒体であるコーンオイルと考えられる脂肪滴が認められたことから、死因は投与過誤によるものと判断された。

#### 2) 体重及び摂餌量

体重推移をFig. 1, 2, Table 3, 4及びAppendix 3, 4, 摂餌量をFig. 3, 4, Table 5, 6及びAppendix 5, 6に示した。

体重では、各群の雌雄とも投与期間を通して対照群との間に差は認められなかった。

摂餌量では、30mg/kg群の雄で投与49日に増加がみられたが、100及び300mg/kg群では雌雄とも投与期間を通して対照群との間に差は認められなかった。

#### 3) 血液学的検査

雄の血液学的検査結果をTable 7及びAppendix 7に示した。

各群とも対照群との間に差は認められなかった。

## 4) 血液化学的検査

雄の血液化学的検査結果をTable 8及びAppendix 8に示した。

300mg/kg群で総コレステロール及び尿素窒素の減少並びにトリグリセライドの増加が認められたが、いずれも軽度な変化であった。そのほか、100mg/kg群でA/G比の減少が認められた。

## 5) 剖検

雌雄の剖検所見をTable 9, 10及びAppendix 9, 10に示した。

投与期間終了後の雄の剖検では、前胃部粘膜の肥厚が300mg/kg群の全例に認められた。そのほか、脱毛が対照群の1例に認められた。

哺育4日の雌の剖検では、前胃部粘膜の肥厚が300mg/kg群の8例に認められた。そのほか、脱毛が対照群及び100mg/kg群の各1例に認められた。なお、出生児の全例が死亡したため途中剖検した100mg/kg群の2例では、異常は認められなかった。

## 6) 器官重量

雌雄の測定結果をTable 11, 12及びAppendix 11, 12に示した。

雄では、副腎の絶対重量の増加が100mg/kg群で、相対重量の増加が300mg/kg群で認められた。そのほか、100mg/kg群で腎臓の絶対重量の増加が認められた。

雌では、各群とも変化は認められなかった。

## 6) 病理組織学的検査

雄の検査結果をTable 13A(グレード別出現例数)及び13B(総出現例数)並びにAppendix 13, 雌の検査結果をTable 14A(グレード別出現例数)及び14B(総出現例数)並びにAppendix 14に示した。また、胃の光学顕微鏡写真をPhoto. 1及び2に示した。

雄では、300mg/kg群で前胃の扁平上皮の過形成及び粘膜下組織の肉芽腫性炎症が11例、扁平上皮の空胞化及び扁平上皮から粘膜下組織の浮腫が10例、100mg/kg群で前胃の扁平上皮の過形成が1例に認められた。そのほか、脱毛がみられた対照群の雄1例に皮膚の糜爛が認められた。

雌では、300mg/kg群で前胃の扁平上皮の過形成が9例、粘膜下組織の肉芽腫性炎症が7例、糜爛が2例に認められた。そのほか、胸腺の萎縮が300mg/kg群の1例にみら

れたが、同様の変化は対照群の1例にも認められた。

出生児の全例が死亡したため途中剖検した100mg/kg群の2例のうち1例では、肺の好中球を主体とした細胞浸潤及び胸腺の萎縮がみられたが、別の1例に異常は認められなかった。

なお、投与過誤による300mg/kg群の死亡例及び途中剖検例では、共通した変化として前胃の扁平上皮から粘膜下組織にかけて浮腫及び好中球、組織球などの浸潤あるいは糜爛がみられたほか、死亡した雄1例では肺の出血及び水腫が、途中剖検した雌1例では食道筋層の出血及び好中球を主体とする細胞浸潤、胸腺の萎縮及び腎皮質の一部に尿細管上皮の壊死が認められた。また、投与過誤により死亡した30mg/kg群の雌1例では肺のうっ血、水腫、泡沫細胞の集簇、好中球、リンパ球などの浸潤及び細気管支内腔に滲出液の貯留並びに胸腺の萎縮が認められた。

## 2. 生殖発生毒性

### 1) 性周期検査及び生殖能力検査

性周期検査及び生殖能力検査の成績をTable 15及びAppendix 15に示した。

性周期検査では、30及び100mg/kg群で発情回数の減少がみられたが、同様の変化は300mg/kg群では認められなかった。

生殖能力検査では、すべてに交尾がみられたが、対照群、100及び300mg/kg群の各1例が不妊であった。したがって、交尾率はいずれも100%、受胎率は対照群、30、100及び300mg/kgでそれぞれ91.67、100、91.67及び90.91%を示し、対照群と各投与群間の差は認められなかった。また、交尾所要日数においても、対照群と各投与群間の差は認められなかった。なお、交尾不妊例の剖検では、100mg/kg群の1例に子宮頸部の嚢胞及び300mg/kg群の1例に胸部皮下の灰白色腫瘍がみられ、組織学的にはそれぞれ子宮頸部の扁平上皮嚢胞及び胸部皮下の乳腺の腺癌が認められたが、いずれも出現例数は少なく、上記の如く受胎率にも変化はないことから、被験物質投与との関連のない自然発生的<sup>1)</sup>なものと考えられた。

### 2) 分娩及び哺育期(哺育4日まで)検査並びに新生児検査

分娩及び哺育期検査の成績をTable 16及びAppendix 16に示した。

分娩時の検査では、30及び100mg/kg群で死産率の増加及びそれに伴う出生率の減少

がみられ、300mg/kg群においてもその傾向が認められた。しかし、各群とも妊娠期間、黄体数、着床痕数、総出産児数、出産率、出生児数、性比及び出生児体重に対照群との間の差はみられず、出生児の外表検査においても各群とも異常例は認められなかった。

哺育期の検査では、出生児の回集、授乳などの哺育行動の低下が100mg/kg群の2母動物にみられ、哺育3日までに出生児の全例が死亡したが、各群とも生後4日の生存率及び体重に対照群との間の差は認められなかった。

## 考 察

OECD既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査の一環として、1,3-イソベンゾフランジオン、テトラヒドロメチル-の反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を実施し、親動物に対する反復投与毒性及び生殖能力並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。

### 1. 反復投与毒性

被験物質投与に起因した死亡の発現はなかった。一般状態では、300mg/kg群の雄で投与後期に流涎がみられたが、投与直後から発現し、投与後30分までには回復する一過性の変化であった。雄の血液化学的検査では、300mg/kg群で総コレステロール及び尿素窒素の減少並びにトリグリセライドの増加がみられたが、腎臓や肝臓には病理学的変化は認められず、いずれの変化も軽度なものであった。病理学的検査では、300mg/kg群の雌雄で肉眼的に前胃部粘膜の肥厚がみられ、組織学的には、扁平上皮の過形成及び空胞化、扁平上皮から粘膜下組織の肉芽腫性炎症、糜爛が認められた。これらの変化は、被験物質の局所刺激性に起因した炎症性変化及び上皮の反応性の増殖<sup>2)</sup>と考えられた。また、100mg/kg群では肉眼的に胃の変化はみられなかったが、組織学的には雄1例で前胃の扁平上皮の過形成が認められた。器官重量では、雄の副腎において、100mg/kg群で絶対重量及び300mg/kg群で相対重量が増加したが、100mg/kg群の絶対重量の変化は、雌にはみられず、更に高用量群にもみられないことから偶発的なものと考えられた。また、300mg/kg群の相対重量の変化は、雌にはみられず、病理組織学的検査でも異常は認められないことから、毒性学的な意義は低いものと考えられた。

以上のことから、本試験条件下における反復投与毒性試験に関する無影響量は雄で30 mg/kg、雌で100mg/kgと推察された。

## 2. 生殖発生毒性

親動物の生殖機能に関しては、30及び100mg/kg群で発情回数の減少がみられたが、300mg/kg群に同様の変化は認められなかったことから、被験物質投与との関連はないものと考えられた。発情周期、黄体数、交尾率、着床痕数及び授(受)胎率に被験物質投与の影響は認められなかった。

分娩時の観察では、30及び100mg/kgで死産率の増加及びそれに伴う出生率の減少がみられ、300mg/kg群においてもその傾向が認められた。しかし、これらはいずれも当研究所の同系統における背景データ(死産率：0～14.84%，出生率：80.98～96.61)の範囲内の変化であり、また、300mg/kg群では1母動物に集中した変化で、統計学的にも有意でなかったことから、被験物質投与に関連した変化とは考えられなかった。妊娠期間、出産児数、出産率、出生児数、性比及び出生児体重に被験物質投与の影響はみられず、外表異常も観察されなかった。

哺育期の観察では、哺育不良による全児死亡が100mg/kg群の2母動物に認められたが、300mg/kg群に全児死亡は観察されなかったことから、被験物質投与との関連はないものと考えられた。各投与群とも生後4日の生存率及び体重に被験物質投与の影響は認められなかった。

以上のことから、本試験条件下における生殖発生毒性に関する無影響量は親動物及び出生児ともに300mg/kg以上と推察された。

## 文 献

- 1) Yuji Oishi, et al. : Spontaneously occurring mammary adenocarcinoma in a 10-wk-old female rat. J. Toxicol. Pathol. 5, 1995, 696-700
- 2) P. Greaves : Stomach, In: Histopathology of preclinical toxicity studies, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1990, 305-308

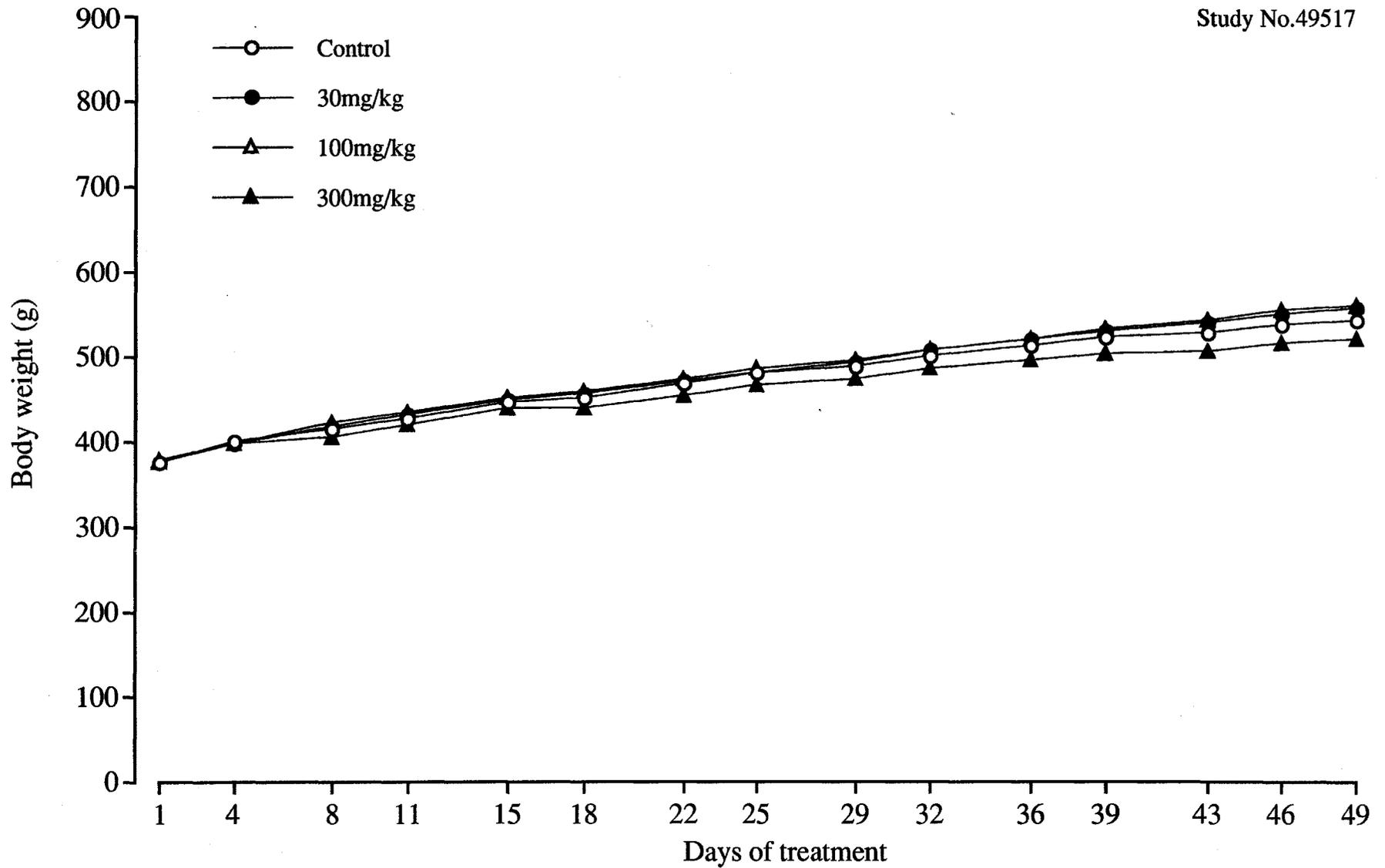


Fig. 1 Mean body weight changes of male rats treated orally with tetrahydromethy1-1, 3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test.

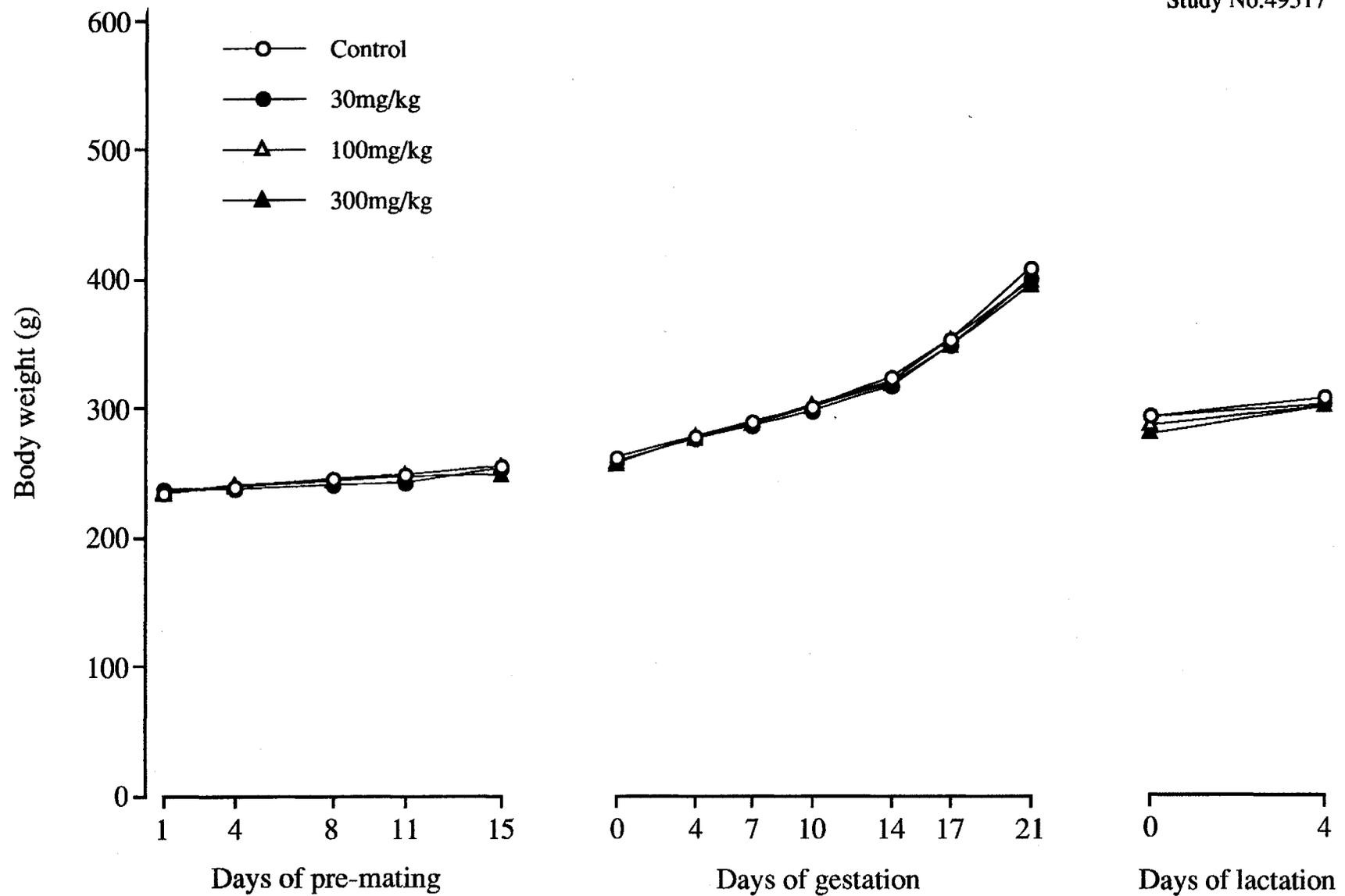


Fig. 2 Mean body weight changes of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1, 3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test.

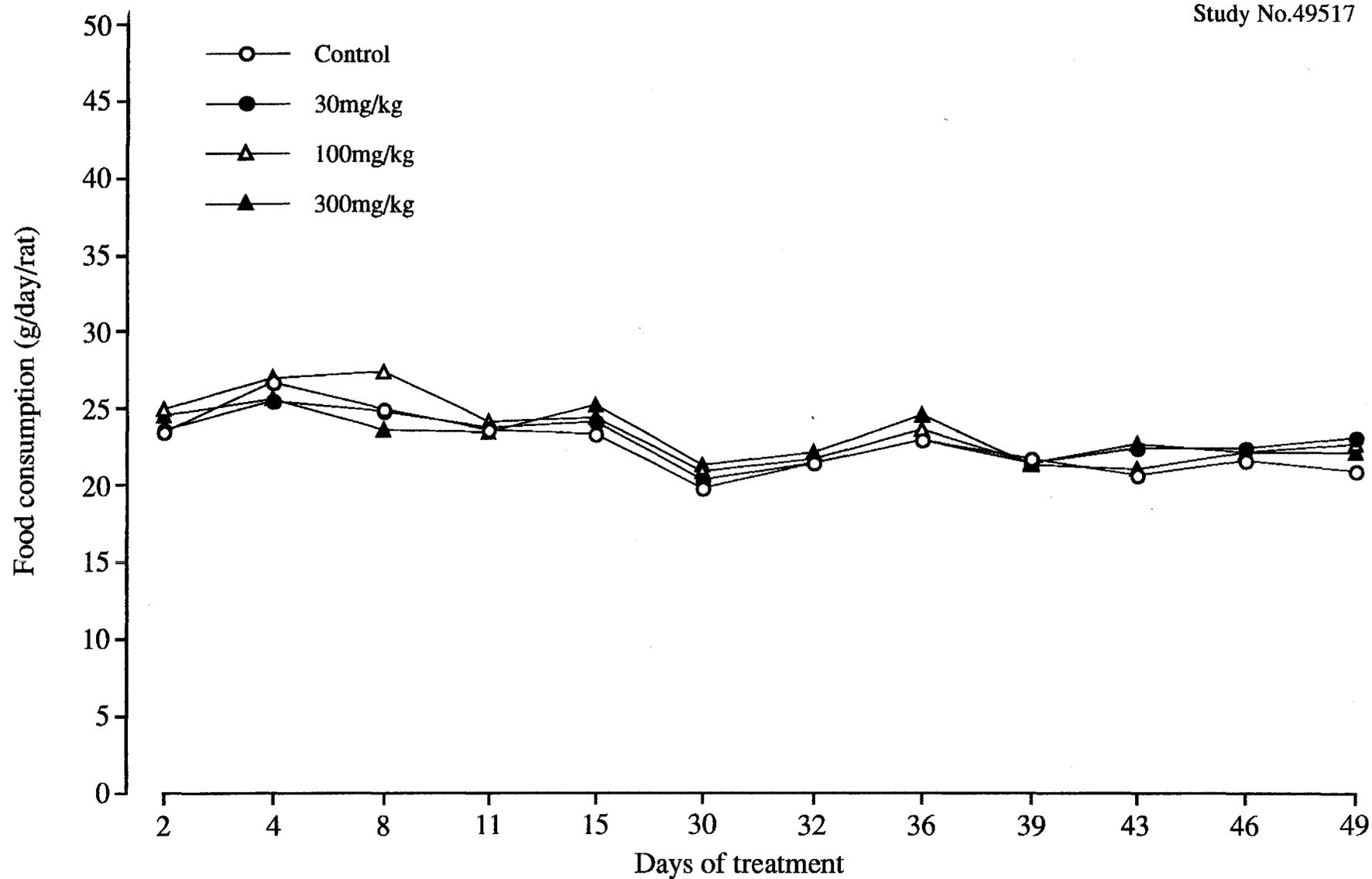


Fig. 3 Mean food consumption of male rats treated orally with tetrahydromethyl-1, 3-isobenzofurandione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test.

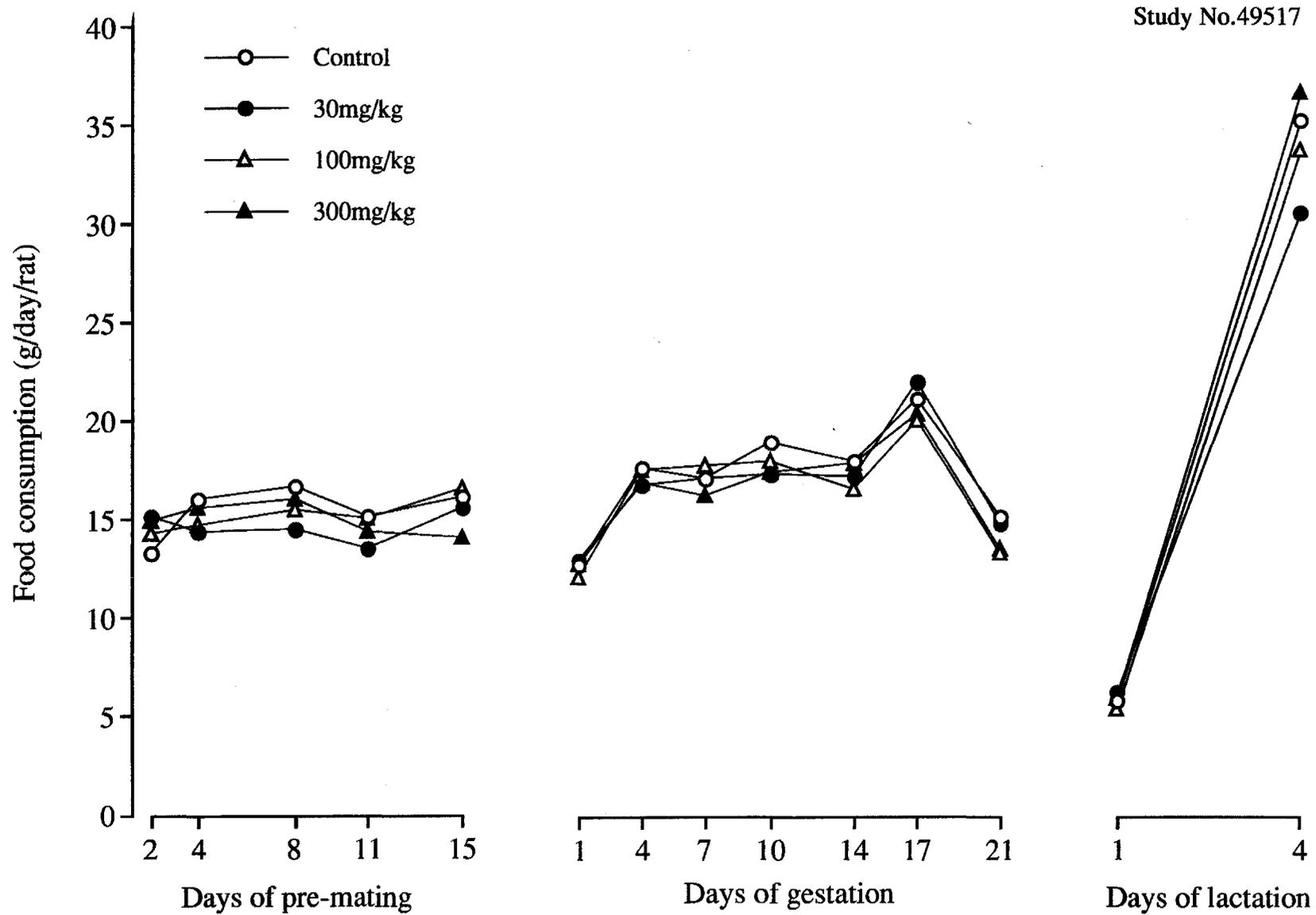


Fig. 4 Mean food consumption of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1, 3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test.

Table 1 Clinical signs of male rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of treatment																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Loss of hair	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
100mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
300mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	No abnormality	12	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dead	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

One animal of 300mg/kg group died from administration error on day 4 of treatment.

Table 1 - continued Clinical signs of male rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of treatment																				
		22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
Control	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	Loss of hair	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
30mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
100mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
300mg/kg	Number of examined	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	
	No abnormality	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	6	5	4	2	7	6	3
	Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	6	7	9	4	5	8
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 1 - continued      Clinical signs of male rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of treatment						
		43	44	45	46	47	48	49
Control	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	11	11
	Loss of hair	0	0	0	0	0	1	1
30mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12
100mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12
300mg/kg	Number of examined	11	11	11	11	11	11	11
	No abnormality	5	7	5	5	5	3	4
	Salivation	6	4	6	6	6	8	7
	Dead	0	0	0	0	0	0	0

Table 2 Clinical signs of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of pre-mating														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Control	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
30mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	11
	No abnormality	12	12	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	Hypoactivity	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
	Bradypnea	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0
	Hypothermia	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
100mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
300mg/kg	Number of examined	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12

One animal of 30mg/kg group died from administration error on day 13 of treatment.

Table 2 - continued      Clinical signs of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of mating												
		16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Control	Number of examined	12	7	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	No abnormality	12	7	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
30mg/kg	Number of examined	8	5	2										
	No abnormality	8	5	2										
	Hypoactivity	0	0	0										
	Bradypnea	0	0	0										
	Hypothermia	0	0	0										
	Dead	0	0	0										
100mg/kg	Number of examined	8	4	2	1	1	1	1	1					
	No abnormality	8	4	2	1	1	1	1	1					
300mg/kg	Number of examined	8	4	4	2	2	1	1						
	No abnormality	8	3	3	1	1	1	1						
	Hypoactivity	0	1	1	1	1	0	0						
	Bradypnea	0	1	1	1	1	0	0						
	Abdominal distension	0	1	1	1	1	0	0						
	Soiled lower abdomen	0	1	1	1	1	0	0						
	Blanching	0	0	0	0	1	0	0						

One animal of 300mg/kg group was imminently sacrificed due to moribund condition on day 20 of treatment.

Table 2 - continued      Clinical signs of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of gestation																					
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	Number of examined	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	No abnormality	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	10
	Loss of hair	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
30mg/kg	Number of examined	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	No abnormality	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
100mg/kg	Number of examined	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	No abnormality	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	Loss of hair	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
300mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	No abnormality	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Table 2 - continued      Clinical signs of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofurandione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Clinical sign	Days of lactation				
		0	1	2	3	4
Control	Number of examined	11	11	11	11	11
	No abnormality	10	10	10	10	10
	Loss of hair	1	1	1	1	1
30mg/kg	Number of examined	11	11	11	11	11
	No abnormality	11	11	11	11	11
100mg/kg	Number of examined	11	11	11	10	9
	No abnormality	10	10	10	9	8
	Loss of hair	1	1	1	1	1
300mg/kg	Number of examined	10	10	10	10	10
	No abnormality	10	10	10	10	10

All newborns from two dams of 100mg/kg group died until day 2 and 3 postpartum, and so these dams were sacrificed immediately.

Table 3 Body weights of male rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	30mg/kg	100mg/kg	300mg/kg
	Body weight(g)			
Days of treatment				
1	375.6±8.7 (12)	376.1±8.2 (12)	376.6±7.7 (12)	376.1±8.2 (12)
4	398.3±10.8(12)	397.6±8.4 (12)	397.8±10.6(12)	396.5±9.4 (12)
8	414.1±12.9(12)	416.4±9.7 (12)	420.7±11.7(12)	405.4±23.3(11)
11	427.3±16.3(12)	430.9±12.2(12)	433.7±13.0(12)	419.8±22.3(11)
15	446.9±20.5(12)	449.1±14.4(12)	451.6±16.6(12)	438.3±24.3(11)
18	451.2±19.7(12)	454.6±12.9(12)	457.0±17.8(12)	437.9±27.3(11)
22	466.8±24.3(12)	469.3±12.0(12)	472.5±20.9(12)	453.5±28.5(11)
25	479.3±24.6(12)	481.0±13.1(12)	484.2±22.3(12)	464.4±30.9(11)
29	486.5±24.0(12)	492.9±14.1(12)	495.0±23.6(12)	471.6±31.3(11)
32	499.9±25.4(12)	506.0±15.4(12)	507.0±23.4(12)	484.7±32.7(11)
36	510.7±27.6(12)	518.8±13.9(12)	520.1±26.3(12)	495.3±34.7(11)
39	520.3±27.6(12)	528.8±16.2(12)	532.2±26.4(12)	500.8±34.7(11)
43	526.1±30.8(12)	537.4±19.7(12)	541.5±26.9(12)	503.8±31.9(11)
46	536.6±31.8(12)	548.1±19.6(12)	552.0±29.6(12)	512.9±35.2(11)
49	542.0±31.4(12)	555.4±19.2(12)	559.2±28.5(12)	518.6±36.3(11)

Values are mean ±S.D. and the values in parentheses represent the number of animals.

One animal of 300mg/kg group died from administration error on day 4 of treatment.

Table 4 Body weights of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	30mg/kg	100mg/kg	300mg/kg
	Body weight(g)			
Days of pre-mating				
1	234.3±9.4 (12)	237.5±8.6 (12)	235.4±8.2 (12)	234.2±10.7(12)
4	239.0±6.6 (12)	236.7±9.5 (12)	239.3±9.6 (12)	239.9±14.0(12)
8	245.0±9.3 (12)	240.6±13.2(12)	244.2±11.3(12)	243.4±11.1(12)
11	248.5±8.0 (12)	241.6±20.1(12)	247.6±12.0(12)	246.1±11.3(12)
15	254.6±9.1 (12)	252.5±14.2(11)	254.5±12.0(12)	248.4±12.9(12)
Days of gestation				
0	261.0±11.9(11)	258.6±13.9(11)	258.8±14.1(11)	257.1±14.1(10)
4	278.4±11.0(11)	275.8±13.7(11)	275.6±12.8(11)	278.4±14.4(10)
7	289.1±11.4(11)	286.1±13.7(11)	288.1±11.2(11)	286.6±15.8(10)
10	301.0±11.9(11)	297.5±15.7(11)	301.3±12.4(11)	300.0±16.2(10)
14	322.5±12.1(11)	316.4±15.7(11)	319.4±14.8(11)	318.1±14.2(10)
17	351.8±20.7(11)	347.0±16.0(11)	351.9±13.9(11)	347.1±19.2(10)
21	408.0±27.4(11)	399.9±22.4(11)	398.7±13.8(11)	394.9±16.2(10)
Days of lactation				
0	292.5±9.5 (11)	291.9±30.9(11)	286.1±16.5(11)	279.3±19.1(10)
4	307.3±12.4(11)	301.8±23.1(11)	300.6±10.1( 9)	301.2±14.2(10)

Values are mean ±S.D. and the values in parentheses represent the number of animals.

One animal of 30mg/kg group died from administration error on day 13 of treatment.

One animal of 300mg/kg group was imminently sacrificed due to moribund condition on day 20 of treatment.

All newborns from two dams of 100mg/kg group died until day 2 and 3 postpartum, and so these dams were sacrificed immediately.

Table 5 Food consumption of male rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	30mg/kg	100mg/kg	300mg/kg
	Food consumption(g/day/rat)			
Days of treatment				
2	23.4±2.5(12)	23.6±2.4 (12)	24.9±1.8(12)	24.5±2.8(12)
4	26.6±2.6(12)	25.4±2.1 (12)	26.9±2.6(12)	25.6±1.9(12)
8	24.9±2.8(12)	24.8±2.3 (12)	27.4±2.8(12)	23.5±7.1(11)
11	23.5±3.1(12)	23.7±2.1 (12)	24.1±2.2(12)	23.4±2.4(11)
15	23.3±2.8(12)	24.1±2.7 (12)	24.4±2.0(12)	25.2±2.6(11)
30	19.7±2.3(12)	20.3±2.6 (12)	20.8±2.4(12)	21.3±2.6(11)
32	21.4±2.4(12)	21.4±2.1 (12)	21.7±2.6(12)	22.1±2.3(11)
36	22.8±2.5(12)	22.9±1.8 (12)	23.6±2.0(12)	24.5±2.9(11)
39	21.6±1.8(12)	21.4±2.2 (12)	21.4±2.6(12)	21.2±2.3(11)
43	20.6±2.1(12)	22.3±2.8 (12)	22.6±2.4(12)	21.0±5.4(11)
46	21.5±2.4(12)	22.3±2.6 (12)	22.1±2.0(12)	22.0±2.0(11)
49	20.8±2.1(12)	23.0±1.8*(12)	22.6±1.9(12)	22.1±2.7(11)

\* : P<0.05(significantly different from control).

Values are mean ±S.D. and the values in parentheses represent the number of animals.

One animal of 300mg/kg group died from administration error on day 4 of treatment.

Table 6 Food consumption of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	30mg/kg	100mg/kg	300mg/kg
Food consumption(g/day/rat)				
Days of pre-mating				
2	13.3±2.7(12)	15.1±2.4(12)	14.3±2.8(12)	14.9±2.9(12)
4	16.0±1.8(12)	14.4±3.7(12)	14.7±3.3(12)	15.6±3.3(12)
8	16.7±2.2(12)	14.5±4.3(12)	15.5±3.2(12)	16.0±2.3(12)
11	15.1±1.7(12)	13.5±4.8(12)	15.0±2.0(12)	14.4±2.2(12)
15	16.1±2.1(12)	15.6±2.0(11)	16.6±1.4(12)	14.1±4.2(12)
Days of gestation				
1	12.8±1.5(11)	13.0±2.9(11)	12.1±2.3(11)	12.8±1.3(10)
4	17.6±2.4(11)	16.8±2.2(11)	17.5±2.7(11)	16.9±1.3(10)
7	17.1±2.3(11)	17.1±2.0(11)	17.7±1.7(11)	16.2±1.9(10)
10	18.9±3.1(11)	17.3±3.3(11)	18.0±1.9(11)	17.4±2.3(10)
14	18.0±1.8(11)	17.2±3.0(11)	16.6±2.0(11)	17.9±2.0(10)
17	21.1±3.6(11)	22.0±2.9(11)	20.0±1.5(11)	20.3±2.1(10)
21	15.1±3.0(11)	14.8±4.4(11)	13.3±5.4(11)	13.5±4.1(10)
Days of lactation				
1	5.8±4.9(11)	6.2±3.7(11)	5.4±5.5(11)	5.9±5.4(10)
4	35.2±4.2(11)	30.6±5.4(11)	33.7±6.3(9)	36.6±4.2(10)

Values are mean ±S.D. and the values in parentheses represent the number of animals.

One animal of 30mg/kg group died from administration error on day 13 of treatment.

One animal of 300mg/kg group was imminently sacrificed due to moribund condition on day 20 of treatment.

All newborns from two dams of 100mg/kg group died until day 2 and 3 postpartum, and so these dams were sacrificed immediately.

Table 7 Hematological findings of male rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	30mg/kg	100mg/kg	300mg/kg
No. of animals	12	12	12	11
Leucocyte ( $10^2/\mu\text{l}$ )	98 $\pm$ 23	96 $\pm$ 16	97 $\pm$ 40	110 $\pm$ 34
Erythrocyte ( $10^4/\mu\text{l}$ )	863 $\pm$ 46	874 $\pm$ 30	864 $\pm$ 30	851 $\pm$ 39
Hemoglobin (g/dl)	14.9 $\pm$ 0.7	15.1 $\pm$ 0.5	15.1 $\pm$ 0.5	14.9 $\pm$ 0.5
Hematocrit (%)	47.5 $\pm$ 2.0	47.9 $\pm$ 1.8	47.4 $\pm$ 1.8	47.1 $\pm$ 1.8
Platelet ( $10^4/\mu\text{l}$ )	103.3 $\pm$ 18.9	97.2 $\pm$ 10.1	93.5 $\pm$ 6.1	94.0 $\pm$ 8.1
MCV (fl)	55 $\pm$ 2	55 $\pm$ 2	55 $\pm$ 1	55 $\pm$ 3
MCH (pg)	17.3 $\pm$ 0.7	17.3 $\pm$ 0.5	17.5 $\pm$ 0.5	17.5 $\pm$ 0.6
MCHC (%)	31.4 $\pm$ 0.6	31.5 $\pm$ 0.6	31.8 $\pm$ 0.5	31.6 $\pm$ 0.7

Values are mean  $\pm$ S.D.

Table 8 Biochemical findings of male rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	30mg/kg	100mg/kg	300mg/kg
No. of animals	12	12	12	11
T.protein (g/dl)	5.5±0.2	5.6±0.2	5.7±0.2	5.4±0.3
Albumin (g/dl)	3.6±0.1	3.7±0.1	3.6±0.1	3.5±0.2
A/G ratio	1.98±0.18	2.02±0.16	1.80±0.17*	1.91±0.12
GOT (IU/l)	102±16	105±19	107±40	96±15
GPT (IU/l)	22±4	21±4	28±30	24±5
γ-GTP (IU/l)	0.4±0.1	0.3±0.2	0.4±0.1	0.4±0.2
ALP (IU/l)	169±37	175±32	165±29	174±45
T.cholesterol (mg/dl)	67±14	60±9	64±9	55±6*
Triglycerides (mg/dl)	47±21	54±16	49±14	73±28*
Phospholipids (mg/dl)	108±15	104±11	109±18	101±13
T.bilirubin (mg/dl)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Glucose (mg/dl)	118±12	124±17	125±17	119±12
BUN (mg/dl)	16.9±2.2	16.6±2.3	16.4±2.3	14.8±1.3*
Creatinine (mg/dl)	0.5±0.1	0.5±0.1	0.5±0.1	0.4±0.0
IP (mg/dl)	6.5±0.8	6.8±0.4	6.4±0.6	6.5±0.5
Ca (mg/dl)	9.5±0.3	9.5±0.2	9.5±0.3	9.3±0.3
Na (mEq/l)	146.8±1.1	146.9±0.9	147.0±1.0	147.3±0.5
K (mEq/l)	4.36±0.32	4.34±0.17	4.23±0.24	4.22±0.13
Cl (mEq/l)	106.0±1.4	105.5±1.5	105.8±1.3	106.5±1.5

\* : P&lt;0.05(significantly different from control).

Values are mean ±S.D.

Table 9 Necropsy findings of male rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose	Control	30mg/kg	100mg/kg	300mg/kg		Total
	Number of animals	<u>Terminal sacrifice</u>	<u>Terminal sacrifice</u>	<u>Terminal sacrifice</u>	<u>Terminal sacrifice</u>	<u>Imminent sacrifice/Dead</u>	
		12	12	12	11	1	12
Digestive system							
Stomach							
Thickening, mucosa, forestomach		0	0	0	11	1	12
Respiratory system							
Trachea							
Foamy fluid		0	0	0	0	1	1
Lung							
Coloration, dark red		0	0	0	0	1	1
Integumentary system							
Integument							
Alopecia		1	0	0	0	0	0

No appreciable changes in all other organs and tissues.

Table 10 Necropsy findings of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	Control	30mg/kg		Total
		Terminal sacrifice	Terminal sacrifice	Imminent sacrifice/Dead	
		12	11	1	12
Digestive system					
Esophagus					
Spot, blackish red		0	0	0	0
Stomach					
Spot, white, mucosa, forestomach		0	0	0	0
Thickening, mucosa, forestomach		0	0	0	0
Retention, gass		0	0	0	0
Small intestine					
Retention, gass		0	0	0	0
Large intestine					
Retention, gass		0	0	0	0
Respiratory system					
Lung					
Coloration, dark red		0	0	1	1
Uncollapse		0	0	1	1
Hematopoietic system					
Thymus					
Atrophy		0	0	1	1
Genital system					
Uterus					
Cyst		0	0	0	0
Integumentary system					
Integument					
Alopecia		1	0	0	0
Subcutis					
Mass, light gray		0	0	0	0

No appreciable changes in all other organs and tissues.

Table 10 - continued Necropsy findings of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	100mg/kg		
		Terminal sacrifice 10	Imminent sacrifice/Dead 2	Total 12
Digestive system				
Esophagus				
Spot, blackish red		0	0	0
Stomach				
Spot, white, mucosa, forestomach		0	0	0
Thickening, mucosa, forestomach		0	0	0
Retention, gass		0	0	0
Small intestine				
Retention, gass		0	0	0
Large intestine				
Retention, gass		0	0	0
Respiratory system				
Lung				
Coloration, dark red		0	0	0
Uncollapse		0	0	0
Hematopoietic system				
Thymus				
Atrophy		0	0	0
Genital system				
Uterus				
Cyst		1	0	1
Integumentary system				
Integument				
Alopecia		1	0	1
Subcutis				
Mass, light gray		0	0	0

No appreciable changes in all other organs and tissues.

Table 10 - continued Necropsy findings of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	300mg/kg		
		Terminal sacrifice	Imminent sacrifice/Dead	Total
		11	1	12
Digestive system				
Esophagus				
Spot, blackish red		0	1	1
Stomach				
Spot, white, mucosa, forestomach		0	1	1
Thickening, mucosa, forestomach		8	0	8
Retention, gass		0	1	1
Small intestine				
Retention, gass		0	1	1
Large intestine				
Retention, gass		0	1	1
Respiratory system				
Lung				
Coloration, dark red		0	0	0
Uncollapse		0	0	0
Hematopoietic system				
Thymus				
Atrophy		1	1	2
Genital system				
Uterus				
Cyst		0	0	0
Integumentary system				
Integument				
Alopecia		0	0	0
Subcutis				
Mass, light gray		1	0	1

No appreciable changes in all other organs and tissues.

Table 11 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	30mg/kg	100mg/kg	300mg/kg
No. of animals	12	12	12	11
Absolute organ weight				
Final Body Weight (g)	516.5±30.2	530.4±18.6	536.9±27.4	492.8±35.0
Brain (g)	2.26±0.08	2.29±0.10	2.26±0.08	2.25±0.09
Heart (g)	1.52±0.14	1.47±0.13	1.46±0.14	1.43±0.15
Lungs (g)	1.45±0.08	1.48±0.11	1.50±0.12	1.46±0.09
Thymus (g)	0.30±0.08	0.32±0.10	0.31±0.08	0.28±0.07
Liver (g)	14.03±1.51	14.12±1.02	14.93±1.34	13.47±1.58
Spleen (g)	0.83±0.09	0.76±0.07	0.78±0.08	0.82±0.11
Kidneys (g)	2.99±0.21	3.00±0.09	3.17±0.24*	3.05±0.27
Adrenals (mg)	53.2±6.2	57.3±4.7	60.8±5.9*	60.3±13.4
Testes (g)	3.17±0.47	3.37±0.30	3.23±0.31	3.27±0.24
Epididymides (g)	1.28±0.16	1.33±0.12	1.27±0.12	1.30±0.08
Relative organ weight				
Brain (g/100g B.W.)	0.44±0.02	0.43±0.02	0.42±0.03	0.46±0.04
Heart (g/100g B.W.)	0.29±0.03	0.28±0.02	0.27±0.02	0.29±0.02
Lungs (g/100g B.W.)	0.28±0.01	0.28±0.03	0.28±0.02	0.30±0.03
Thymus (g/100g B.W.)	0.06±0.02	0.06±0.02	0.06±0.01	0.06±0.01
Liver (g/100g B.W.)	2.71±0.21	2.66±0.13	2.78±0.13	2.73±0.17
Spleen (g/100g B.W.)	0.16±0.02	0.14±0.01	0.14±0.02	0.17±0.02
Kidneys (g/100g B.W.)	0.58±0.03	0.57±0.02	0.59±0.03	0.62±0.05
Adrenals (mg/100g B.W.)	10.3±0.9	10.8±1.1	11.3±1.2	12.2±2.4*
Testes (g/100g B.W.)	0.62±0.09	0.64±0.07	0.60±0.07	0.66±0.04
Epididymides (g/100g B.W.)	0.25±0.03	0.25±0.02	0.24±0.03	0.27±0.02

\*: P&lt;0.05(significantly different from control).

Values are mean ±S.D.

Table 12 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	30mg/kg	100mg/kg	300mg/kg
No. of animals	11	11	9	10
Absolute organ weight				
Final Body Weight (g)	307.3±12.4	301.8±23.1	300.6±10.1	301.2±14.2
Brain (g)	2.11±0.12	2.10±0.12	2.08±0.11	2.10±0.09
Heart (g)	0.93±0.07	0.90±0.08	0.90±0.06	0.93±0.07
Lungs (g)	1.06±0.06	1.04±0.11	1.04±0.08	1.08±0.05
Thymus (g)	0.12±0.05	0.12±0.06	0.13±0.05	0.11±0.04
Liver (g)	14.18±1.67	12.87±1.38	13.41±1.04	14.01±1.11
Spleen (g)	0.60±0.07	0.59±0.12	0.59±0.10	0.61±0.08
Kidneys (g)	1.88±0.12	1.78±0.14	1.80±0.15	1.84±0.08
Adrenals (mg)	68.2±10.7	68.7±9.3	71.0±8.0	73.2±5.4
Ovaries (mg)	89.9±11.6	85.9±9.9	95.5±9.9	97.9±7.6
Relative organ weight				
Brain (g/100g B.W.)	0.69±0.05	0.70±0.05	0.69±0.05	0.70±0.04
Heart (g/100g B.W.)	0.30±0.02	0.30±0.03	0.30±0.02	0.31±0.03
Lungs (g/100g B.W.)	0.35±0.01	0.34±0.03	0.34±0.02	0.36±0.02
Thymus (g/100g B.W.)	0.04±0.02	0.04±0.02	0.04±0.02	0.04±0.02
Liver (g/100g B.W.)	4.61±0.52	4.26±0.25	4.47±0.37	4.66±0.39
Spleen (g/100g B.W.)	0.20±0.02	0.20±0.03	0.20±0.03	0.20±0.03
Kidneys (g/100g B.W.)	0.61±0.04	0.59±0.05	0.60±0.05	0.61±0.04
Adrenals (mg/100g B.W.)	22.2±3.3	22.8±2.5	23.6±2.7	24.3±1.6
Ovaries (mg/100g B.W.)	29.3±3.8	28.6±3.7	31.8±3.2	32.6±3.1

Values are mean ±S.D.

Table 13A Histopathological findings of male rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	Control				30mg/kg				100mg/kg			
		Terminal sacrifice				Terminal sacrifice				Terminal sacrifice			
		12				12				12			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Digestive system													
Forestomach (12)													
Squamous hyperplasia		12	0	0	0	12	0	0	0	11	1	0	0
Vacuolar change, epithelium		12	0	0	0	12	0	0	0	12	0	0	0
Inflammation, granulomatous, submucosa		12	0	0	0	12	0	0	0	12	0	0	0
Edema, epithelium to submucosa		12	0	0	0	12	0	0	0	12	0	0	0
Cellular infiltration, epithelium to submucosa		12	0	0	0	12	0	0	0	12	0	0	0
Respiratory system													
Lung (12)													
Fatty droplet, alveoli		12	0	0	0								
Hemorrhage and edema		12	0	0	0								
Integumentary system													
Integument (1)													
Erosion		0	1	0	0								

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.

No remarkable changes were observed in the liver, thymus, spleen, heart, kidney, testis, epididymis, adrenal and brain in control group.

Table 13A - continued      Histopathological findings of male rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	300mg/kg												
		Terminal sacrifice				Imminent sacrifice/Dead				Total				
		11				1				12				
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	
Digestive system														
Forestomach		(11)				( 1)				(12)				
Squamous hyperplasia		0	1	10	0	1	0	0	0	1	1	10	0	
Vacuolar change, epithelium		1	10	0	0	1	0	0	0	2	10	0	0	
Inflammation, granulomatous, submucosa		0	10	1	0	1	0	0	0	1	10	1	0	
Edema, epithelium to submucosa		1	10	0	0	0	0	1	0	1	10	1	0	
Cellular infiltration, epithelium to submucosa		11	0	0	0	0	1	0	0	11	1	0	0	
Respiratory system														
Lung		(11)				( 1)				(12)				
Fatty droplet, alveoli		11	0	0	0	0	1	0	0	11	1	0	0	
Hemorrhage and edema		11	0	0	0	0	0	1	0	11	0	1	0	
Integumentary system														
Integument		( 0)				( 0)				( 0)				
Erosion														

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.

No remarkable changes were observed in the liver, thymus, spleen, heart, kidney, testis, epididymis, adrenal and brain in 300mg/kg group.

Table 13B Histopathological findings of male rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	Control	30mg/kg	100mg/kg
		<u>Terminal sacrifice</u> 12	<u>Terminal sacrifice</u> 12	<u>Terminal sacrifice</u> 12
Digestive system				
Forestomach		(12)	(12)	(12)
Squamous hyperplasia		0	0	1
Vacuolar change, epithelium		0	0	0
Inflammation, granulomatous, submucosa		0	0	0
Edema, epithelium to submucosa		0	0	0
Cellular infiltration, epithelium to submucosa		0	0	0
Respiratory system				
Lung		(12)	( 0)	( 0)
Fatty droplet, alveoli		0		
Hemorrhage and edema		0		
Integumentary system				
Integument		( 1)	( 0)	( 0)
Erosion		1		

Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.

No remarkable changes were observed in the liver, thymus, spleen, heart, kidney, testis, epididymis, adrenal and brain in control group.

Table 13B - continued Histopathological findings of male rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	300mg/kg		
		Terminal sacrifice 11	Imminent sacrifice/Dead 1	Total 12
Digestive system				
Forestomach		(11)	( 1)	(12)
Squamous hyperplasia		11	0	11
Vacuolar change, epithelium		10	0	10
Inflammation, granulomatous, submucosa		11	0	11
Edema, epithelium to submucosa		10	1	11
Cellular infiltration, epithelium to submucosa		0	1	1
Respiratory system				
Lung		(11)	( 1)	(12)
Fatty droplet, alveoli		0	1	1
Hemorrhage and edema		0	1	1
Integumentary system				
Integument		( 0)	( 0)	( 0)
Erosion				

Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.  
 No remarkable changes were observed in the liver, thymus, spleen, heart, kidney, testis, epididymis, adrenal and brain in 300mg/kg group.

Table 14A Histopathological findings of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	Control				30mg/kg				Total								
		Terminal sacrifice				Terminal sacrifice				Imminent sacrifice/Dead				Total				
		-	12		+++	-	11		+++	-	1		+++	-	12		+++	
Digestive system																		
Esophagus			(0)				(0)				(0)				(0)			
Hemorrhage, muscular layer			(0)				(0)				(0)				(0)			
Cellular infiltration, muscular layer			(0)				(0)				(0)				(0)			
Forestomach			(12)				(9)				(0)				(9)			
Squamous hyperplasia		12	0	0	0	9	0	0	0				9	0	0	0		
Inflammation, granulomatous, submucosa		12	0	0	0	9	0	0	0				9	0	0	0		
Erosion		12	0	0	0	9	0	0	0				9	0	0	0		
Respiratory system																		
Lung			(12)				(0)				(1)				(1)			
Fatty droplet alveoli		12	0	0	0					0	1	0	0	0	0	1	0	0
Congestion and edema		12	0	0	0					0	0	1	0	0	0	1	0	0
Accumulation, foam cell		12	0	0	0					0	0	1	0	0	0	1	0	0
Cellular infiltration		12	0	0	0					0	1	0	0	0	0	1	0	0
Exudate, lumen, bronchiole		12	0	0	0					0	1	0	0	0	0	1	0	0
Hematopoietic system																		
Thymus			(12)				(0)				(1)				(1)			
Atrophy		11	1	0	0					0	1	0	0	0	0	1	0	0
Urinary system																		
Kidney			(12)				(0)				(1)				(1)			
Necrosis, tubular epithelium, cortex, local		12	0	0	0					1	0	0	0	0	1	0	0	0
Genital system																		
Uterus			(0)				(0)				(0)				(0)			
Cyst, squamous epithelial, cervix			(0)				(0)				(0)				(0)			
Mammary gland			(0)				(0)				(0)				(0)			
Adenocarcinoma			(0)				(0)				(0)				(0)			

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.

No remarkable changes were observed in the liver, spleen, heart, ovary, adrenal and brain of all animals in control group and one animal in 30mg/kg group, and integument of one animal in control group.

Table 14A - continued Histopathological findings of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	100mg/kg											
		Terminal sacrifice				Imminent sacrifice/Dead				Total			
		10				2				12			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Digestive system													
Esophagus					( 0)				( 0)				( 0)
Hemorrhage, muscular layer													
Cellular infiltration, muscular layer													
Forestomach					( 6)				( 2)				( 8)
Squamous hyperplasia		6	0	0	0	2	0	0	0	8	0	0	0
Inflammation, granulomatous, submucosa		6	0	0	0	2	0	0	0	8	0	0	0
Erosion		6	0	0	0	2	0	0	0	8	0	0	0
Respiratory system													
Lung					( 1)				( 2)				( 3)
Fatty droplet, alveoli		1	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0
Congestion and edema		1	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0
Accumulation, foam cell		1	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0
Cellular infiltration		1	0	0	0	1	1	0	0	2	1	0	0
Exudate, lumen, bronchiole		1	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0
Hematopoietic system													
Thymus					( 1)				( 2)				( 3)
Atrophy		1	0	0	0	1	1	0	0	2	1	0	0
Urinary system													
Kidney					( 1)				( 2)				( 3)
Necrosis, tubular epithelium, cortex, local		1	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0
Genital system													
Uterus					( 1)				( 0)				( 1)
Cyst, squamous epithelial, cervix		0	1	0	0					0	1	0	0
Mammary gland					( 0)				( 0)				( 0)
Adenocarcinoma													

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.

No remarkable changes were observed in the liver, spleen, heart, ovary, adrenal and brain of three animals, and integument of one animal in 100mg/kg group.

Table 14A - continued Histopathological findings of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	300mg/kg											
		Terminal sacrifice				Imminent sacrifice/Dead				Total			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Digestive system													
Esophagus				( 0)				( 1)					( 1)
Hemorrhage, muscular layer					0	1	0	0	0	1	0	0	0
Cellular infiltration, muscular layer					0	1	0	0	0	1	0	0	0
Forestomach				(10)				( 1)					(11)
Squamous hyperplasia		1	9	0	0	1	0	0	0	2	9	0	0
Inflammation, granulomatous, submucosa		3	7	0	0	1	0	0	0	4	7	0	0
Erosion		8	2	0	0	0	1	0	0	8	3	0	0
Respiratory system													
Lung				(11)				( 1)					(12)
Fatty droplet, alveoli		11	0	0	0	0	1	0	0	11	1	0	0
Congestion and edema		11	0	0	0	1	0	0	0	12	0	0	0
Accumulation, foam cell		11	0	0	0	1	0	0	0	12	0	0	0
Cellular infiltration		11	0	0	0	1	0	0	0	12	0	0	0
Exudate, lumen, bronchiole		11	0	0	0	1	0	0	0	12	0	0	0
Hematopoietic system													
Thymus				(11)				( 1)					(12)
Atrophy		10	1	0	0	0	1	0	0	10	2	0	0
Urinary system													
Kidney				(11)				( 1)					(12)
Necrosis, tubular epithelium, cortex, local		11	0	0	0	0	1	0	0	11	1	0	0
Genital system													
Uterus				( 0)				( 0)					( 0)
Cyst, squamous epithelial, cervix													
Mammary gland				( 1)				( 0)					( 1)
Adenocarcinoma		0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.

No remarkable changes were observed in the liver, spleen, heart, ovary, adrenal and brain of all animals, and small intestine and large intestine of one animal in 300mg/kg group.

Table 14B Histopathological findings of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	Control	30mg/kg		Total
		Terminal sacrifice 12	Terminal sacrifice 11	Imminent sacrifice/Dead 1	
Digestive system					
Esophagus		( 0)	( 0)	( 0)	( 0)
Hemorrhage, muscular layer					
Cellular infiltration, muscular layer					
Forestomach		(12)	( 9)	( 0)	( 9)
Squamous hyperplasia		0	0		0
Inflammation, granulomatous, submucosa		0	0		0
Erosion		0	0		0
Respiratory system					
Lung		(12)	( 0)	( 1)	( 1)
Fatty droplet alveoli		0		1	1
Congestion and edema		0		1	1
Accumulation, foam cell		0		1	1
Cellular infiltration		0		1	1
Exudate, lumen, bronchiole		0		1	1
Hematopoietic system					
Thymus		(12)	( 0)	( 1)	( 1)
Atrophy		1		1	1
Urinary system					
Kidney		(12)	( 0)	( 1)	( 1)
Necrosis, tubular epithelium, cortex, local		0		0	0
Genital system					
Uterus		( 0)	( 0)	( 0)	( 0)
Cyst, squamous epithelial, cervix					
Mammary gland		( 0)	( 0)	( 0)	( 0)
Adenocarcinoma					

Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.

No remarkable changes were observed in the liver, spleen, heart, ovary, adrenal and brain of all animals in control group and one animal in 30mg/kg group, and integument of one animal in control group.

Table 14B - continued      Histopathological findings of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	100mg/kg		
		Terminal sacrifice	Imminent sacrifice/Dead	Total
		10	2	12
Digestive system				
Esophagus		( 0)	( 0)	( 0)
Hemorrhage, muscular layer				
Cellular infiltration, muscular layer				
Forestomach		( 6)	( 2)	( 8)
Squamous hyperplasia		0	0	0
Inflammation, granulomatous, submucosa		0	0	0
Erosion		0	0	0
Respiratory system				
Lung		( 1)	( 2)	( 3)
Fatty droplet, alveoli		0	0	0
Congestion and edema		0	0	0
Accumulation, foam cell		0	0	0
Cellular infiltration		0	1	1
Exudate, lumen, bronchiole		0	0	0
Hematopoietic system				
Thymus		( 1)	( 2)	( 3)
Atrophy		0	1	1
Urinary system				
Kidney		( 1)	( 2)	( 3)
Necrosis, tubular epithelium, cortex, local		0	0	0
Genital system				
Uterus		( 1)	( 0)	( 1)
Cyst, squamous epithelial, cervix		1		1
Mammary gland		( 0)	( 0)	( 0)
Adenocarcinoma				

Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.  
No remarkable changes were observed in the liver, spleen, heart, ovary, adrenal and brain of three animals, and integument of one animal in 100mg/kg group.

Table 14B - continued      Histopathological findings of female rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs and findings	Group and dose Number of animals	300mg/kg		
		Terminal sacrifice 11	Imminent sacrifice/Dead 1	Total 12
Digestive system				
Esophagus		( 0)	( 1)	( 1)
Hemorrhage, muscular layer			1	1
Cellular infiltration, muscular layer			1	1
Forestomach	(10)	( 1)	( 1)	(11)
Squamous hyperplasia	9	0	0	9
Inflammation, granulomatous, submucosa	7	0	0	7
Erosion	2	2	1	3
Respiratory system				
Lung	(11)	( 1)	( 1)	(12)
Fatty droplet, alveoli	0	0	1	1
Congestion and edema	0	0	0	0
Accumulation, foam cell	0	0	0	0
Cellular infiltration	0	0	0	0
Exudate, lumen, bronchiole	0	0	0	0
Hematopoietic system				
Thymus	(11)	( 1)	( 1)	(12)
Atrophy	1	1	1	2
Urinary system				
Kidney	(11)	( 1)	( 1)	(12)
Necrosis, tubular epithelium, cortex, local	0	0	1	1
Genital system				
Uterus	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)
Cyst, squamous epithelial, cervix				
Mammary gland	( 1)	( 0)	( 0)	( 1)
Adenocarcinoma	1	1	1	1

Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.

No remarkable changes were observed in the liver, spleen, heart, ovary, adrenal and brain of all animals, and small intestine and large intestine of one animal in 300mg/kg group.

Table 15 Reproductive performance of rats treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	30mg/kg	100mg/kg	300mg/kg
No. of females examined	12	11 <sup>e)</sup>	12	12
Count of estrus <sup>a)</sup>	3.92±0.29	3.45±0.52 <sup>*e)</sup>	3.17±0.72*	3.50±0.52
Estrous cycle <sup>b)</sup>	4.07±0.17	4.14±0.32 <sup>e)</sup>	4.58±1.14	4.18±0.84
No. of mated				
Male	12	11	12	10 <sup>f)</sup>
Female	12	11	12	11
No. of copulated <sup>c)</sup>				
Male	12(100)	11(100)	12(100)	10(100)
Female	12(100)	11(100)	12(100)	11(100)
No. of impregnated <sup>d)</sup>	11(91.67)	11(100)	11(91.67)	10(100)
No. of pregnant <sup>d)</sup>	11(91.67)	11(100)	11(91.67)	10(90.91)
Duration of mating <sup>b)</sup>	3.58±3.34	2.36±1.12	2.58±2.23	2.45±2.16

\* : P<0.05(significantly different from control).

a) Values are mean ±S.D.

b) Values are mean ±S.D.(day).

c) Values in parentheses represent percentages to the number of mated.

d) Values in parentheses represent percentages to the number of copulated.

e) One female rat died from administration error on day 13 of treatment, datum of this animal were excluded.

f) One male rat became impossibility to do mating, since the paired female rat was imminently sacrifice during mating period.

Table 16 Findings of delivery of F<sub>0</sub> dams treated orally with tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione and observations on their offspring in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Group and dose	Control	30mg/kg	100mg/kg	300mg/kg
No. of dams	11	11	11	10
Gestational days <sup>a)</sup>	22.18±0.40	22.27±0.47	22.09±0.30	22.30±0.48
No. of corpora lutea <sup>b)</sup>	183(16.64±1.63)	188(17.09±1.30)	188(17.09±0.94)	162(16.20±1.03)
No. of implantations <sup>b)</sup>	171(15.55±2.58)	178(16.18±1.25)	181(16.45±0.69)	154(15.40±1.65)
No. of litter <sup>b)</sup>	162(14.73±2.65)	158(14.36±1.86)	169(15.36±0.67)	148(14.80±1.93)
Gestation index <sup>c)</sup>	100	100	100	100
No. of stillborns <sup>d)</sup>				
Male	0	4	3	4
Female	0	4	6	6
Total	0	8(5.06)*	9(5.33)*	10(6.76)
No. of live newborns <sup>b)</sup>	162(14.73±2.65)	150(13.64±1.43)	160(14.55±0.82)	138(13.80±2.53)
Birth index <sup>e)</sup>	94.74	84.27*	88.40*	89.61
Sex ratio of live newborns <sup>f)</sup>	0.98(80/82)	0.90(71/79)	1.08(83/77)	0.86(64/74)
Body weight of live newborns(g) <sup>g)</sup>				
Male On day 0	6.2±0.5	6.1±0.4	6.0±0.4	6.3±0.5
4	9.4±1.2	9.5±1.1	9.1±0.7	9.9±0.9
Female On day 0	6.0±0.4	5.9±0.4	5.8±0.3	6.0±0.5
4	9.0±1.3	9.2±1.1	8.8±0.5	9.5±1.0
Viability index <sup>h)</sup>	98.15	94.00	81.88	93.48
No. of external anomalies	0	0	0	0

\* : P<0.05(significantly different from control).

a) Values are mean ±S.D.(day).

b) Values in parentheses represent mean ±S.D.

c) Gestation index=(Number of females with live newborns/Number of pregnant females)×100.

d) Values in parentheses represent percentages to the number of litters.

e) Birth index=(Number of live newborns/Number of implantations)×100.

f) Values in parentheses represent the number of male/female live newborns.

g) Values are mean ±S.D.

h) Viability index=(Number of live newborns on day 4 after birth/Number of live newborns)×100.