



ドコサン酸のラットを用いる
反復経口投与毒性・生殖発生毒性
併合試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

【目 次】

	頁
要 約	1
緒 言	3
試験材料および方法	4
1. 被験物質	4
2. 使用動物および飼育条件	4
3. 群分けおよび個体識別	5
4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法	5
5. 観察方法	6
6. 統計解析	9
結 果	10
I. 反復投与毒性（親動物所見）	10
1. 一般状態	10
2. 体重	10
3. 摂餌量	10
4. 解剖時検査所見	11
II. 生殖発生毒性	14
1. 生殖関連所見	14
2. 出生児所見	14
考 察	16
文 献	17

Figures (Figure 1 ~ Figure 4)

Tables (Table 1 ~ Table 24)

【要 約】

ドコサン酸（以下 DA）の 0（媒体対照）、100、300 および 1000 mg/kg を Sprague-Dawley 系（Crj:CD）ラットの雌雄（各13匹／群）に交配前 2 週間および交配期間 2 週間、経口投与した。さらに、雄では交配期間終了後 2 週間、雌では妊娠期間を通して分娩後の哺育 3 日まで投与を継続して、DA の親動物に対する反復投与毒性および生殖能力、ならびに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

結果は以下のように要約される。

I. 反復投与毒性（親動物所見）

1. 雄動物

いずれの DA 投与群においても、死亡例および一般状態の異常は観察されなかった。また、DA 投与の影響を示唆する体重および摂餌量の変化もなかった。42回反復投与後の剖検、病理組織学検査、血液学検査および血液生化学検査でも、DA 投与の影響を示唆する所見または異常値は認められなかった。

2. 雌動物

いずれの DA 投与群においても、死亡例はなかった。また、DA 投与の影響を示唆する一般状態、体重および摂餌量の変化も観察されなかった。分娩後 4 日の剖検および病理組織学検査においても、DA 投与の影響を示唆する所見は認められなかった。

II. 生殖発生毒性

1. 生殖関連所見

1000 mg/kg までの投与量の DA は、交尾率および受胎率に影響を示さなかった。また、母動物の妊娠期間、出産率、分娩状態および哺育状態に DA 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。

2. 出生児所見

出生児の性比、体重および生存性に、DA 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。また、出生児の形態異常はいずれの DA 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、DA の反復投与毒性および生殖発生毒性に関する無影響量は、1000 mg/kg/day であると結論される。

【緒 言】

ドコサン酸（別名ベヘニン酸）は、カラシ油、ナタネ油の構成脂肪酸中に2～3%含まれている高級飽和脂肪酸の混合物である。工業的には主にナタネ油を原料として加水分解した後、蒸留精製されるが、最近化粧品原料としても使用されるようになってきた。ドコサン酸の危険・有害性については、ほとんど報告されておらず、その評価は十分ではない。そこで今回、OECDによる既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査研究事業の一環として、ラットを用いて反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、ドコサン酸の雌雄動物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

ドコサン酸 (DAと略記)〔別名：ベヘニン酸、ベヘン酸、CAS No. : 112-85-6、英名 : docosanoic acid、分子式 : $C_{22}H_{44}O_2$ 、構造式 : $CH_3(CH_2)_{20}COOH$ 、分子量 : 340.59、比重 : 0.822 (100℃)、融点 (凝固点) : 76.5℃、沸点 : 306℃/60 mmHg〕は、水に不溶であるがアルコール、エーテル、クロロホルム、アセトンには易溶な白色粉末であり、
から入手し (ロット番号 : 純度 : 85.9 wt%、不純物 : C_{14} - C_{20} の脂肪酸 : 10.9%、 C_{24} の脂肪酸 : 2.3%)、使用時まで直射日光を避け、室温保管した (Annex 1)。

DA は、コーン油 (Lot No. V6H2050、ナカライテスク株) に懸濁させて調製し、投与検体とした。投与検体は、1週間に1回以上の頻度で調製し、冷蔵、気密の条件下で、各濃度ごとに分注して保管した。調製液中の被験物質は、冷蔵、遮光で9日間安定であることが確認されており (Annex 2)、また試験期間中 (1996年12月4日) に調製した投与検体について、所定量の被験物質が均一に含有されていたことを確認した (Annexes 3、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7日間、検疫と馴化を兼ねて飼育し、その間毎日、一般状態を観察し、入荷日および検疫終了日に体重を測定した (Annex 5)。

各動物は、基準温湿度各 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ および 50~65%、換気回数約 15 回/時間、明暗サイクル 12 時間 (7 時~19 時) 点灯、12 時間 (19 時~7 時) 消灯に制御された飼育室 (8 号室) で、金属製ケージ (220w×270d×190h mm、日本ケージ株) に個別に収容して飼育し、固型飼料 (CB-2、日本クレア株) および飲料水 (水道水、秦野市水道局給水) を自由に摂取させた。ただし、交尾雌については、妊娠 14 日から哺育 4 日まで、床敷として紙パルプ製チップ (ALPHA-dri、加商株) を供給したラット用繁殖ケージ (350w×400d×180h mm、日本クレア株) に収容した。なお、飼育期間中、Annex 6 に示す飼育環境の異常があったが、試験に支障を来す異常ではなかった。また、飼料、飲料水および床敷には、試験に支障を来す可能性のある混入物はなかった。

3. 群分けおよび個体識別

雌雄とも投与開始日（8週齢）の体重をもとに、体重別層化無作為抽出法により群分けし、各群とも雌雄各13匹を配した。これらのすべての雌雄動物には、油性フェルトペンを用いて、尾に個体識別番号を示す番号を記入し、さらに、群ごとに色の異なるラベルに、試験計画番号、性別、群および個体識別番号を記入し、飼育ケージに付けた。なお、出生児については、個体識別を行わなかった。

4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

先に実施した14日間反復経口投与による予備試験（試験計画番号：R-96-005）の結果、OECD化学物質試験法ガイドラインで定められた限界用量の 1000 mg/kg を投与した群においても、毒性兆候が認められなかったことから、本試験では 1000 mg/kg を最高用量に設定し、以下公比約 3 で除して、中間用量は 300 mg/kg、低用量は 100 mg/kg とした。対照群のラットには、DA の媒体を DA 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	投与物質	投与量 (mg/kg)	匹数（動物番号）	
			雄	雌
1	媒体（コーン 油）	0	13 (MX01001～13)	13 (FB01001～13)
2	DA	100	13 (MX02001～13)	13 (FB02001～13)
3	DA	300	13 (MX03001～13)	13 (FB03001～13)
4	DA	1000	13 (MX04001～13)	13 (FB04001～13)

各用量の投与検体は、雄に対しては交配前 2 週間、交配期間および交配期間終了後から剖検前日までの連続42日間、また雌に対しては交配前 2 週間と最長 2 週間の交配期間（交尾まで）ならびに交尾成立雌（交尾雌）では全妊娠期間および分娩後の哺育 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 9 時～12 時の間に行い、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 回測定した体重を基準に、また交尾後の雌については妊娠 0 日（交尾確認日）の体重を基準にそれぞれ算出した。

5. 観察方法

1) 親動物

A. 一般状態の観察

全例について、飼育期間中毎日1回以上観察した。

B. 体重測定

雄は全例について、投与1（投与開始日）、8、15、22、29、36、42日および剖検日、雌は全例について、投与1、8、15日に測定し、投与22日までに交尾が確認されなかった雌は投与22日にも体重を測定した。また、交尾雌は妊娠0、7、14、20日に、分娩した雌は哺育0および4日（剖検日）に、分娩しない雌は妊娠25日（剖検日）に体重を測定した。

C. 摂餌量測定

雌雄とも全例について、体重測定日と同日に餌重量を測定し、摂餌量を算出した。ただし、2週間の交配期間中の摂餌量は測定しなかった。交尾雌では妊娠0～7、7～14、14～20日および分娩した雌では哺育0～4日の摂餌量を測定した。なお、哺育途中で全児が死亡した母動物の哺育0～4日の摂餌量は、評価の対象から除外した。

D. 交配

交配は、投与15日の夕方から最長2週間、同群内の雌雄を1対1で同居させて行った。交尾の確認は、毎朝、膣栓および膣スミア中の精子の存在を調べることにより行い、交尾が確認された雌は、その日を妊娠0日と起算して雄から分離し、個別に飼育した。交配結果からは、各群について交尾率〔（交尾動物数／交配動物数）×100〕、受胎率〔（妊娠動物数／交尾動物数）×100〕、同居開始日から交尾確認日までの日数およびその間に回帰した発情期の回数を求めた。

E. 分娩・哺育状態の観察

各群とも交尾雌は、全例を自然分娩させた。分娩状態の直接観察は観察が可能であったものについて行い、それ以外の動物については、分娩後の徴候から分娩困難や遅延などの分娩障害の有無を判断した。分娩後は、哺育状態を観察した。

F. 分娩日の規定

午前11時までには分娩の完了を確認した動物について、その日を分娩日（哺育0日）と規定し、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、各群について出産率〔（生児出産雌数／妊娠動物数）×100〕を求めた。

G. 剖検

a) 雄動物

1. 血液学検査

全例について、42回投与後に18～24時間絶食させ、剖検に先立ちペントバルビタールナトリウム麻酔下で腹部後大静脈より、抗凝固剤として EDTA-2K を用いて採血し、下記の項目について検査した。

項 目	測 定 法	使 用 機 器
赤血球数 (RBC)	自動 (電気抵抗法)	Coulter Counter Model S-PLUS IV (コールター・エレクトロニクス)
白血球数 (WBC)	" (")	"
血色素量 (Hb)	" (吸光度法)	"
平均赤血球容積 (MCV)	" (電気抵抗法)	"
血小板数	" (")	"
ヘマトクリット 値 (Ht)	計算 ($RBC \times MCV \times 0.001$)	
平均赤血球血色素量 (MCH)	" ($Hb \times 1000 / RBC$)	
平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	" ($Hb \times 100 / Ht$)	
白血球分類	視算 (静脈血塗抹標本 Wright-Giemsa 染色)	光学顕微鏡

2. 血液生化学検査

全例について、血液学検査のための採血に引き続き、腹部後大静脈より抗凝固剤としてヘパリンを用いて採血し、血漿を分離して下記の項目について検査を行った。

項 目	測 定 法	使 用 機 器
総蛋白濃度	ビュレット 法	遠心方式生化学自動分析装置 COBAS-FARA (ロシュ)
アルブミン 濃度	BCG 法	"
総コレステロール 濃度	COD・DAOS法	"
ブドウ糖濃度	グルコキナーゼ G6PDH 法	"
尿素窒素濃度 (BUN)	ウレアーゼ Gl.DH 法	"
クレアチニン濃度	Jaffé 法 (Rate)	"
アルカリフォスファターゼ活性 (ALP)	パラニトロフェニル酸基質法	"
GOT 活性	SSCC法	"
GPT 活性	"	"
LDH 活性	Wröblewski-La Due 法	"
γ-GTP活性	γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法	"
トリグリセリド濃度	GPO・DAOS法	"
無機リン濃度 (Inorg. phos.)	モリブデン 酸直接法	"
総ビリルビン 濃度	ビリルビン「ロシュ」キットSシリーズ	"
カルシウム 濃度	OCPC法	"
A/G 比	計算	
ナトリウム 濃度	イオン 電極法	全自動電解質分析装置 EA05 (A&T)
カリウム濃度	"	"
塩素濃度	"	"

ハ. 病理学検査

全例について、剖検し、器官・組織の肉眼観察を行った。その際、心臓、肝臓、腎臓、胸腺、精巣、精巣上体については器官重量を測定し、併せて比体重値（相対重量）を算出した。また、脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、膀胱、副腎、胸腺および病変部は10%ホルマリン液に、精巣および精巣上体はブアン液（長期保存は10%ホルマリン液）にそれぞれ固定して保存し、高用量群および対照群の全例については、上記器官（病変部を除く）の病理組織学検査を行った。

b) 雌動物

分娩した雌は哺育4日に、交尾をしたが分娩しない雌は妊娠25日相当日に、交尾をしなかった雌は交配期間終了日に、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させ、剖検し、器官・組織の肉眼観察を行った。その際、心臓、肝臓、腎臓、胸腺については器官重量を測定し、併せて比体重値（相対重量）を算出した。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、卵巣は実体顕微鏡下で妊娠黄体数を数え、子宮については着床数を数え、着床率〔（着床数／妊娠黄体数）×100〕を算出した。脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、膀胱、副腎、胸腺、子宮および病変部は10%ホルマリン液に、卵巣はブアン液（長期保存は10%ホルマリン液）にそれぞれ固定して保存し、高用量群および対照群の全例については、上記器官（卵巣、子宮および病変部を除く）の病理組織学検査を行った。ただし、交尾をしたが不妊であった雌および交尾をしなかった雌については、卵巣についても病理組織学検査を行った。

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）を調べて、分娩率〔（産児数／着床痕数）×100〕および生児出産率〔（出產生児数／着床痕数）×100〕を求め、産児の外表奇形の有無および性別を観察し、性比〔（雄の生児数／出產生児数）×100〕を求めた。

B. 死亡児数の算定

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

C. 体重測定

哺育0日および4日に litter 重量を雌雄別に測定し、平均体重 (litter重量/測定児数) を各腹について求めた。

D. 剖検

哺育4日に全例を剖検し、外表および内部器官の肉眼観察を行った。

6. 統計解析

交尾率および受胎率については Yates の補正を含む χ^2 検定を行った。病理組織所見については、グレード分けしたデータは Mann-Whitney U 検定^{1, 2)} を、陽性グレードの合計値は Fisher 直接確率²⁾ の片側検定を行った。その他のデータは、個体ごとに得られた値あるいは litter ごとの平均値を1標本として、先ず Bartlett 法³⁾ 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³⁾ を行い、群間に有意性が認められた場合には、各群の匹数が同一であれば Dunnett 法⁴⁾ を用い、同一で無い場合は Scheffé 法⁵⁾ を用いて対照群と DA 各投与群との平均値の差の検定を行った。分散が一樣でなかった場合または分散が0となる群が存在した場合は、Kruskal-Wallis の順位検定⁶⁾ を行い、群間に有意性が認められた場合に、対照群と DA 各投与群との差について Dunnett 法⁴⁾ あるいは Scheffé 法⁵⁾ の検定を行った。有意水準は、5%および1%とした。

【結 果】

I. 反復投与毒性（親動物所見）

1. 一般状態

雄では、いずれの投与群においても死亡例および一般状態の異常は観察されなかった。雌では、100 mg/kg 投与群の1匹（動物番号：FB02010）に、投与42日（分娩日）から変化（投与42日：立毛、腔口から血様液排出；投与43～44日：被毛汚染）がみられたが、投与45日には回復した。その他の雌では、死亡例および一般状態の異常は観察されなかった。

2. 体重

1) 雄（Figure 1; Tables 1, 2; Appendices 1-1～2-4）

100 mg/kg 投与群において、投与8～15日の体重増加量が対照群と比較して有意（ $p < 0.01$ ）に増加し、投与開始日からの累積増加量についても投与15および29日以降の値が対照群よりも有意（ $p < 0.05$ ）に増加した。しかし、300 mg/kg 以上の投与群においては、いずれの時期の体重および体重増加量についても、対照群との間に有意差は認められなかった。

2) 雌（Figure 2; Tables 3～8; Appendices 3-1～8-4）

交配前、妊娠期および哺育期を通して、体重および体重増加量に対照群と DA 各投与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 9; Appendices 9-1～9-4）

いずれの時期の摂餌量についても、対照群と DA 各投与群の間に有意差は認められなかった。

2) 雌（Figure 4; Tables 10～12; Appendices 10-1～12-4）

交配前および妊娠期の摂餌量については、対照群と DA 各投与群との間に有意差は認められなかった。哺育期には、100 mg/kg 投与群の哺育0～4日の摂餌量が対照群と比較して有意（ $p < 0.01$ ）に減少したが、300 mg/kg 以上の投与群においては、対照群との間に有

意差は認められなかった。

4. 解剖時検査所見

A) 雄

(1) 血液学検査所見 (Table 13; Appendices 13-1~13-4)

300 mg/kg 以上の投与群において平均赤血球血色素濃度 (MCHC) が対照群と比較して有意 ($p < 0.01$) に低下した。その他の検査項目については、対照群と DA 各投与群との間に有意差は認められなかった。

(2) 血液生化学検査所見 (Table 14; Appendices 14-1~14-4)

アルカリフォスファターゼ活性が DA 各投与群において、ブドウ糖濃度が 1000 mg/kg 投与群において、それぞれ対照群と比較して有意 ($p < 0.05$) に低下した。その他、300 mg/kg 投与群において、総蛋白およびカルシウムの各濃度が対照群と比較して有意 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) に低下し、塩素濃度が有意 ($p < 0.05$) に増加したが、用量に依存した変化ではなかった。

(3) 剖検所見 (Table 15; Appendix 15)

DA の投与に起因すると思われる明らかな変化はなかった。

(4) 器官重量 (Table 16; Appendices 16-1~16-4)

100 mg/kg 投与群において、肝臓の実重量および比体重値が対照群と比較して有意 ($p < 0.05$) に増加したが、用量に依存した変化ではなかった。その他の器官については、対照群と DA 各投与群との間に有意差は認められなかった。

(5) 病理組織学検査所見 (Table 17; Appendix 17)

各器官における観察所見を以下に示す。なお、いずれの病理組織学所見についても対照群と DA 各投与群との間に有意差は認められなかった。

(心臓)

対照群 (動物番号: MX01010) および 1000 mg/kg 投与群 (動物番号: MX04005) の各 1 匹に心筋変性がみられた。

(肝臓)

対照群および 1000 mg/kg 投与群に門脈周囲性の脂肪化がみられたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。その他、巣状壊死が対照群の 1 匹（動物番号：MX01013）にみられた。

(脾臓)

対照群および 1000 mg/kg 投与群に、褐色色素沈着および髓外造血がみられたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。

(腎臓)

対照群および 1000 mg/kg 投与群に、皮質の好塩基性尿細管や eosinophilic body がみられたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。その他、対照群の 1 匹（動物番号：MX01010）に線維化がみられた。

(副腎)

1000 mg/kg 投与群の 1 匹（動物番号：MX04010）に線維化がみられたほかに異常はなかった。

(精巣)

精細管の萎縮が 1000 mg/kg 投与群の 2 匹にみられ、うち 1 匹（動物番号：MX04005）は両側性、他の 1 匹（動物番号：MX04008）は片側性であったが、両者とも限局性で、極めて軽度な変化であった。そのほかに異常はなかった。

(精巣上体)

対照群の 1 匹（動物番号：MX01001）に精子肉芽腫がみられたほかに異常はなかった。

(脳、胸腺、および膀胱)

異常は認められなかった。

B) 雌

(1) 剖検所見 (Table 18; Appendix 18)

DA の投与に起因すると思われる明らかな変化はなかった。

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

100 mg/kg 投与群において、腎臓の実重量が対照群と比較して有意 ($p < 0.05$) に低下したが、用量に依存した変化ではなかった。その他の器官に、対照群と DA 各投与群との間に有意差は認められなかった。

(3) 病理組織学所見 (Table 20; Appendix 20)

(脳)

1000 mg/kg 投与群の 1 匹 (動物番号: FB04006) の視床に鉍質沈着がみられたほかに異常はなかった。

(肝臓)

対照群 (動物番号: FB01009) および 1000 mg/kg 投与群 (動物番号: FB04012) の各 1 匹に巣状壊死がみられ、対照群の他の 1 匹 (動物番号: FB01012) に線維化がみられた。

(脾臓)

対照群および 1000 mg/kg 投与群に、褐色色素沈着および髄外造血がみられたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。

(胸腺)

対照群および 1000 mg/kg 投与群に萎縮が認められ、出血がみられたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。

(腎臓)

対照群および 1000 mg/kg 投与群に皮質の好塩基性尿細管および腎盂の拡張がみられたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。

(副腎)

対照群の 1 匹 (動物番号: FB01010) の皮質に壊死がみられたほかに異常はなかった。

(心臓および膀胱)

異常は認められなかった。

(卵巣)

未交尾例 (動物番号: FB02003) および不妊例 (動物番号: FB03007) の卵巣に異常はなかった。

II. 生殖発生毒性

1. 生殖関連所見

1) 交配成績 (Table 21; Appendices 21-1~21-4)

交尾率、受胎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 DA 各投与群との間で有意差は認められなかった。

2) 分娩および哺育状態

分娩日から一般状態の異常 (10頁、一般状態の項参照) がみられた 100 mg/kg 投与群の 1 匹 (動物番号: FB02010) に、分娩状態の異常 (胎盤を処理しない) および哺育状態の異常 (哺育 0 日: 児を集めない、体表温低下、ミルクスポットなし; 哺育 1 日: 児を温めない、乳頭の突出不良、体表温低下、ミルクスポットなし) が観察され、哺育 2 日には全児が死亡したが、その他の母動物に異常は観察されなかった。

3) 出産率および妊娠期間 (Table 22; Appendices 22-1~22-4)

出産率はすべての投与群とも 100% を示し、妊娠期間についても対照群と DA 各投与群との間で有意差は認められなかった。

4) 黄体数、着床数および着床率 (Table 22; Appendices 22-1~22-4)

妊娠動物の黄体数、着床数および着床率には、対照群と DA 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) 生存性 (Table 22; Appendices 22-1~22-4)

産児数、分娩率、生児出産率、出生率および新生児生存率には、対照群と DA 各投与群との間で有意差は認められなかった。また、性比についても、対照群と DA 各投与群との間で有意差は認められなかった。

2) 体重 (Table 23; Appendices 23-1~23-4)

哺育 0 および 4 日の体重に対照群と DA 各投与群との間で有意差は認められなかった。

3) 形態

出生日の外表観察、死亡児の剖検および哺育4日の剖検 (Table 24) では、形態異常を示した出生児は観察されなかった。

【考 察】

雌雄ラットにドコサン酸 (DA) の 100、300 および 1000 mg/kg を反復経口投与した結果、いずれの投与群においても死亡例は観察されず、一般状態、体重推移および摂餌量についても DA 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。42回投与後の雄の血液検査では、平均赤血球血色素濃度が 300 mg/kg 以上の投与群で、アルカリファスファターゼ活性が DA 各投与群で、ブドウ糖濃度が 1000 mg/kg 投与群でそれぞれ有意に低下した。しかし、いずれの変化も軽度であり、病理学検査を含む他の検査項目においても随伴する変化は認められなかったことから、これらは偶発的な変化で毒性学的意義はないと考えられる。病理組織学検査において、1000 mg/kg 投与群の 2 匹にごく軽度の精細管の萎縮がみられたが、いずれも限局した変化で自然発生的にみられる組織像であった。交尾率および受胎率にも DA の影響はなかった。母動物の妊娠期間、出産率、分娩状態および哺育状態、さらには出生児の生存性、体重、性比および形態に DA 投与の影響は認められなかった。

以上の成績から、本試験条件下では、DA の反復投与毒性および生殖発生毒性に関する無影響量は、1000 mg/kg/day であると考えられる。

【文 献】

- 1) 丹後俊郎：「医学への統計学」（古川俊之 監修），朝倉書店，東京（1985）
- 2) 石居進：「生物統計学入門」，倍風館，東京（1992）
- 3) 佐久間昭：「薬効評価—計画と解析」，東大出版会，東京（1977）
- 4) Dunnett, C. W.: New tables for multiple comparisons with a control.
Biometrics 20 : 482-491 (1964)
- 5) Scheffé, H.: A method for judging all contrasts in the analysis of variance.
Biometrika 40 : 87-104 (1953)
- 6) Kruskal, W. H., W. A. Wallis: Use of ranks in one-criterion variance
analysis. J. Amer. Statist. Assoc. 47 : 583-621 (1952)

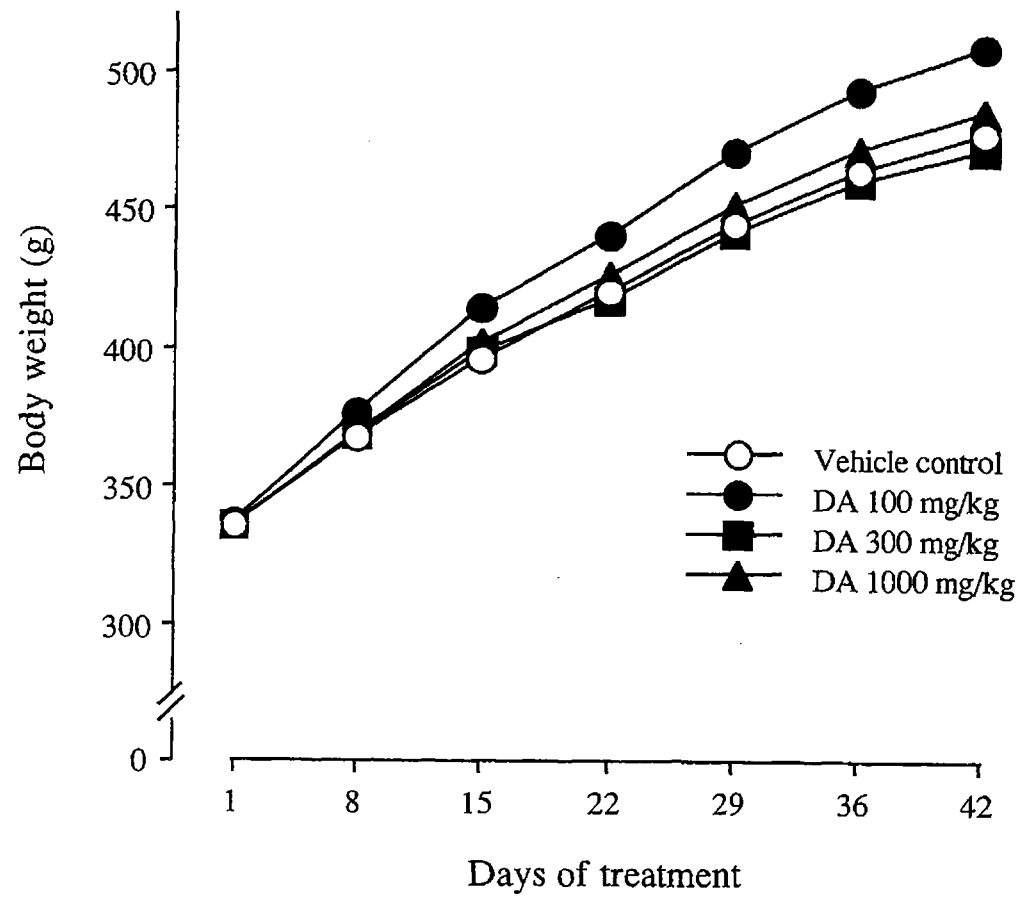


Fig. 1 Mean body weight of Fo males

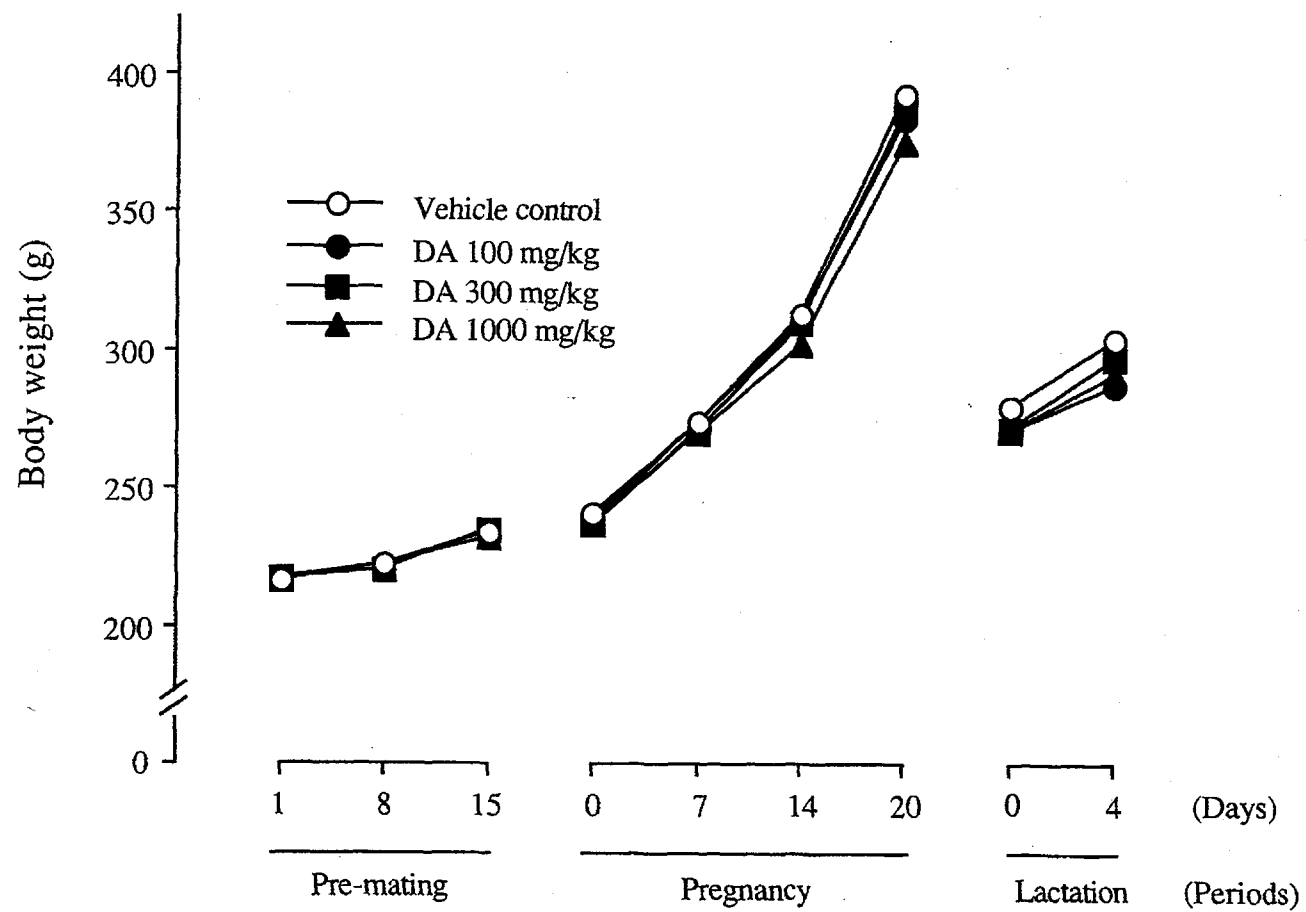


Fig. 2 Mean body weight of Fo females

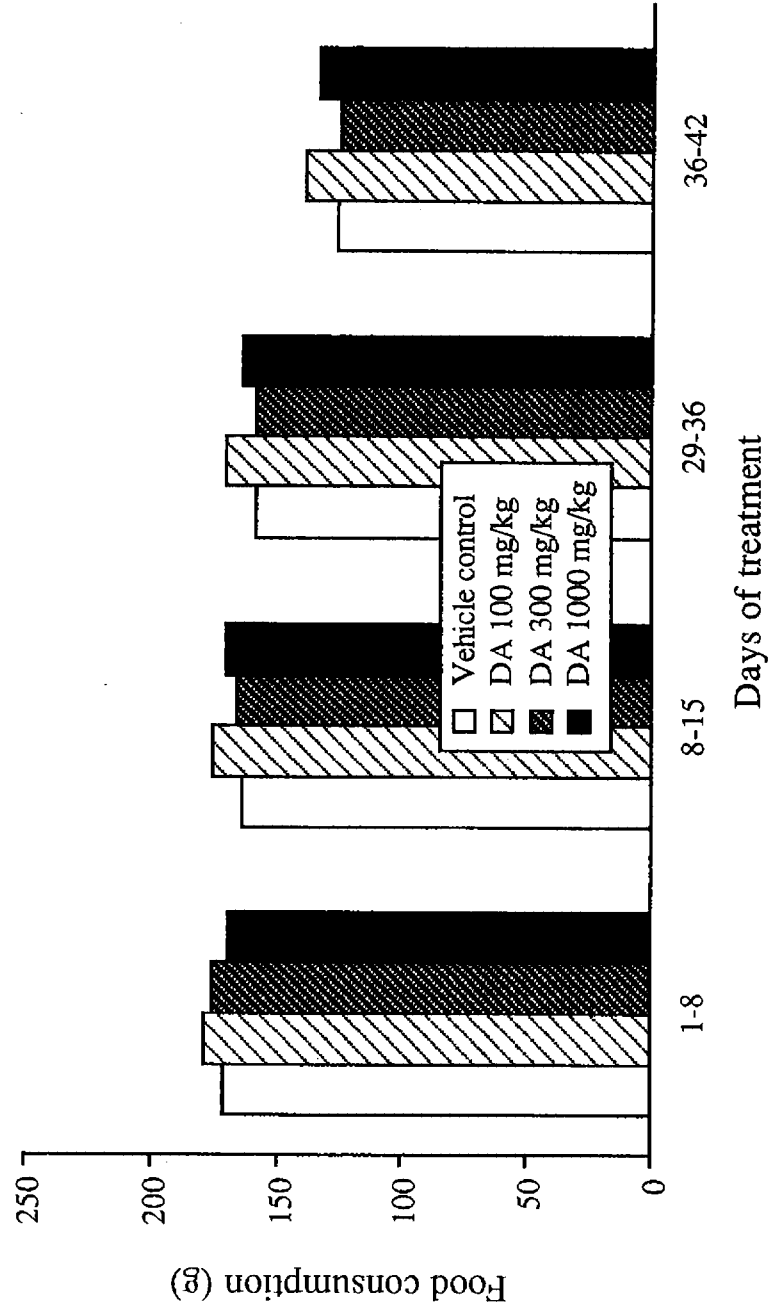


Fig. 3 Mean food consumption of Fo males

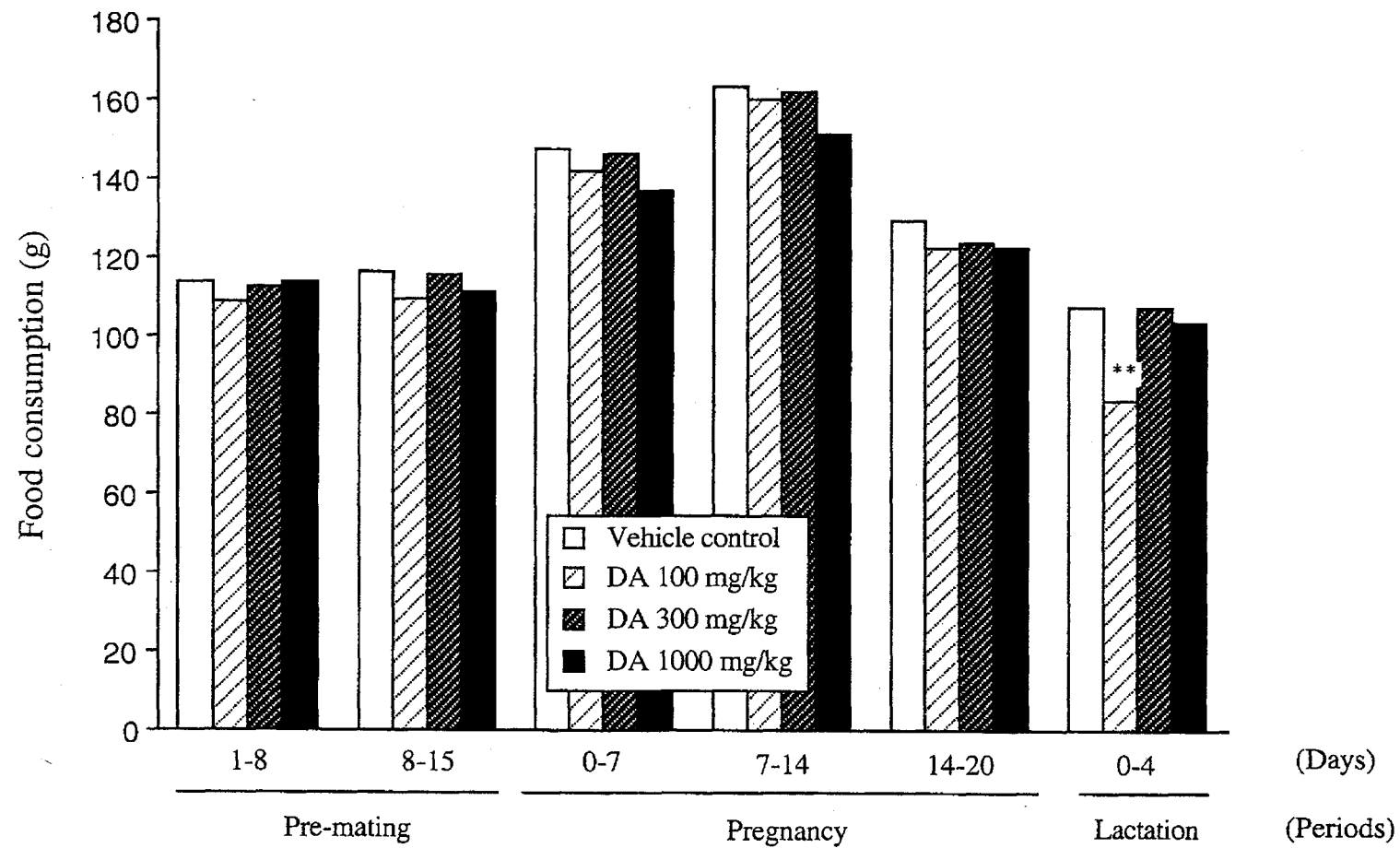


Fig. 4 Mean food consumption of Fo females

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

【TABLE INDEX】

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

TABLE No.	(APPENDIX No.)	TABLE TITLE
1	(1-1 ~ 1-4)	Body weight of F ₀ males
2	(2-1 ~ 2-4)	Body weight gain of F ₀ males
3	(3-1 ~ 3-4)	Body weight of F ₀ females during pre-mating period
4	(4-1 ~ 4-4)	Body weight gain of F ₀ females during pre-mating period
5	(5-1 ~ 5-4)	Body weight of F ₀ females during pregnancy period
6	(6-1 ~ 6-4)	Body weight gain of F ₀ females during pregnancy period
7	(7-1 ~ 7-4)	Body weight of F ₀ females during lactation period
8	(8-1 ~ 8-4)	Body weight gain of F ₀ females during lactation period
9	(9-1 ~ 9-4)	Food consumption of F ₀ males
10	(10-1 ~10-4)	Food consumption of F ₀ females during pre-mating period
11	(11-1 ~11-4)	Food consumption of F ₀ females during pregnancy period
12	(12-1 ~12-4)	Food consumption of F ₀ females during lactation period
13	(13-1 ~13-4)	Hematological findings of F ₀ males after oral administration for 42 days
14	(14-1 ~14-4)	Biochemical findings of F ₀ males after oral administration for 42 days
15	(15)	Summary of macroscopic findings in F ₀ males
16	(16-1 ~16-4)	Absolute and relative organ weights of F ₀ males after oral administration for 42 days
17	(17)	Summary of histopathological findings in F ₀ males
18	(18)	Summary of macroscopic findings in F ₀ females
19	(19-1 ~19-4)	Absolute and relative organ weights of F ₀ females on day 4 of lactation
20	(20)	Summary of histopathological findings in F ₀ females
21	(21-1 ~21-4)	Reproductive performance of F ₀ animals
22	(22-1 ~22-4)	Development of F ₁ pups up to day 4 of lactation
23	(23-1 ~23-4)	Body weight of F ₁ pups up to day 4 of lactation
24		Morphological findings in F ₁ pups on day 4 of lactation

Table 1

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

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

Compound	DA			
	0 ^{a)}	100	300	1000
Dose group (mg/kg)				
Days of treatment				
1 (Initial weight)	335.3 $\pm$ 13.4 (13)	336.5 $\pm$ 14.8 (13)	335.8 $\pm$ 15.0 (13)	335.9 $\pm$ 13.2 (13)
8	367.7 $\pm$ 18.4 (13)	376.5 $\pm$ 22.7 (13)	368.2 $\pm$ 18.3 (13)	368.9 $\pm$ 21.3 (13)
15	395.8 $\pm$ 22.5 (13)	413.8 $\pm$ 30.1 (13)	398.9 $\pm$ 25.6 (13)	401.4 $\pm$ 24.5 (13)
22	420.2 $\pm$ 25.3 (13)	440.8 $\pm$ 35.9 (13)	417.3 $\pm$ 30.3 (13)	425.5 $\pm$ 34.1 (13)
29	444.1 $\pm$ 29.5 (13)	470.3 $\pm$ 39.2 (13)	441.5 $\pm$ 39.3 (13)	450.9 $\pm$ 34.1 (13)
36	463.5 $\pm$ 32.2 (13)	492.6 $\pm$ 44.9 (13)	459.4 $\pm$ 42.7 (13)	471.4 $\pm$ 35.3 (13)
42	477.3 $\pm$ 34.8 (13)	508.8 $\pm$ 50.1 (13)	471.8 $\pm$ 41.0 (13)	484.9 $\pm$ 36.5 (13)

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

Table 2

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

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

Compound	DA			
	0 ^{a)}	100	300	1000
Dose group (mg/kg)				
Days of treatment				
1 ~ 8	32.4 $\pm$ 7.2 (13)	39.9 $\pm$ 10.6 (13)	32.3 $\pm$ 6.5 (13)	33.0 $\pm$ 11.5 (13)
8 ~ 15	28.0 $\pm$ 5.9 (13)	37.3 $\pm$ 8.6** (13)	30.8 $\pm$ 9.8 (13)	32.5 $\pm$ 5.7 (13)
15 ~ 22	24.4 $\pm$ 5.4 (13)	27.0 $\pm$ 9.4 (13)	18.4 $\pm$ 7.3 (13)	24.1 $\pm$ 11.9 (13)
22 ~ 29	23.9 $\pm$ 5.2 (13)	29.5 $\pm$ 5.2 (13)	24.2 $\pm$ 10.0 (13)	25.4 $\pm$ 11.2 (13)
29 ~ 36	19.4 $\pm$ 6.5 (13)	22.4 $\pm$ 7.9 (13)	17.9 $\pm$ 5.9 (13)	20.5 $\pm$ 5.0 (13)
36 ~ 42	13.8 $\pm$ 5.5 (13)	16.2 $\pm$ 7.2 (13)	12.5 $\pm$ 7.4 (13)	13.5 $\pm$ 7.6 (13)

1 ~ 15	60.4 $\pm$ 11.9 (13)	77.2 $\pm$ 18.5* (13)	63.1 $\pm$ 12.8 (13)	65.5 $\pm$ 13.5 (13)
1 ~ 22	84.8 $\pm$ 15.3 (13)	104.2 $\pm$ 24.8 (13)	81.5 $\pm$ 17.5 (13)	89.6 $\pm$ 23.4 (13)
1 ~ 29	108.7 $\pm$ 19.4 (13)	133.7 $\pm$ 28.2* (13)	105.7 $\pm$ 26.8 (13)	115.0 $\pm$ 23.5 (13)
1 ~ 36	128.2 $\pm$ 21.9 (13)	156.1 $\pm$ 33.8* (13)	123.6 $\pm$ 30.2 (13)	135.5 $\pm$ 24.5 (13)
1 ~ 42	141.9 $\pm$ 24.7 (13)	172.3 $\pm$ 38.8* (13)	136.0 $\pm$ 29.0 (13)	149.0 $\pm$ 25.8 (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 3

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

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

Compound	DA			
	0 ^{a)}	100	300	1000
Dose group (mg/kg)				
Days of treatment				
1 (Initial weight)	216.2 $\pm$ 6.4 (13)	216.7 $\pm$ 7.0 (13)	216.6 $\pm$ 6.8 (13)	216.3 $\pm$ 6.7 (13)
8	221.4 $\pm$ 7.3 (13)	221.9 $\pm$ 8.4 (13)	219.5 $\pm$ 8.4 (13)	221.4 $\pm$ 5.8 (13)
15	233.7 $\pm$ 9.6 (13)	232.0 $\pm$ 10.6 (13)	234.9 $\pm$ 10.9 (13)	231.2 $\pm$ 8.8 (13)

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

Table 4

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

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

Compound	DA			
	0 ^{a)}	100	300	1000
Dose group (mg/kg)				
Days of treatment				
1 ~ 8	5.2 $\pm$ 6.6 (13)	5.2 $\pm$ 7.7 (13)	2.9 $\pm$ 5.6 (13)	5.1 $\pm$ 7.5 (13)
8 ~15	12.3 $\pm$ 6.5 (13)	10.1 $\pm$ 5.2 (13)	15.4 $\pm$ 5.3 (13)	9.8 $\pm$ 5.3 (13)
1 ~15	17.5 $\pm$ 6.1 (13)	15.3 $\pm$ 8.4 (13)	18.3 $\pm$ 6.8 (13)	14.9 $\pm$ 7.9 (13)

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

Table 5

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

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

Compound	DA			
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}	100	300	1000
Days of pregnancy				
0	240.4 ± 8.8 (13)	238.3 ± 13.1 (12)	236.7 ± 9.2 (12)	238.1 ± 10.4 (13)
7	273.8 ± 15.0 (13)	273.5 ± 12.4 (12)	270.9 ± 11.3 (12)	269.3 ± 12.1 (13)
14	312.2 ± 19.7 (13)	310.4 ± 11.4 (12)	309.1 ± 14.5 (12)	301.9 ± 13.4 (13)
20	391.5 ± 24.0 (13)	383.1 ± 17.3 (12)	386.2 ± 18.2 (12)	374.6 ± 16.1 (13)

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

Table 6

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

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

Compound	DA			
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}	100	300	1000
Days of pregnancy				
0 ~ 7	33.4 ± 11.0 (13)	35.2 ± 6.4 (12)	34.2 ± 8.0 (12)	31.2 ± 9.4 (13)
7 ~ 14	38.5 ± 8.7 (13)	37.0 ± 6.4 (12)	38.2 ± 4.9 (12)	32.5 ± 4.0 (13)
14 ~ 20	79.2 ± 6.9 (13)	72.7 ± 10.9 (12)	77.1 ± 6.2 (12)	72.7 ± 14.7 (13)

0 ~ 14	71.9 ± 17.4 (13)	72.1 ± 8.7 (12)	72.4 ± 11.1 (12)	63.7 ± 10.5 (13)
0 ~ 20	151.1 ± 21.9 (13)	144.8 ± 13.8 (12)	149.5 ± 13.9 (12)	136.4 ± 16.3 (13)

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

Table 7

DA: 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	DA			
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}	100	300	1000
Days of lactation				
0	278.7 ± 16.7 (13)	270.3 ± 21.0 (12)	271.8 ± 20.4 (12)	270.0 ± 24.5 (13)
4	303.2 ± 17.3 (13)	287.3 ± 15.2 (11)	297.0 ± 11.1 (12)	290.7 ± 15.4 (13)

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

Table 8

DA: 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	DA			
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}	100	300	1000
Days of lactation				
0 ~ 4	24.5 $\pm$ 13.1 (13)	14.8 $\pm$ 21.2 (11)	25.2 $\pm$ 13.9 (12)	20.7 $\pm$ 14.9 (13)

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

Table 9

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

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

Compound	DA			
	0 ^{a)}	100	300	1000
Dose group (mg/kg)				
Days of treatment				
1 ~ 8	171.0 $\pm$ 20.9 (13)	178.6 $\pm$ 20.3 (13)	175.7 $\pm$ 15.2 (13)	168.7 $\pm$ 27.3 (13)
8 ~ 15	163.0 $\pm$ 19.0 (13)	175.5 $\pm$ 23.5 (13)	166.1 $\pm$ 16.6 (13)	169.5 $\pm$ 14.3 (13)
29 ~ 36	158.5 $\pm$ 22.0 (13)	170.0 $\pm$ 27.4 (13)	158.0 $\pm$ 16.4 (13)	163.2 $\pm$ 21.9 (13)
36 ~ 42	126.1 $\pm$ 18.9 (13)	138.8 $\pm$ 22.0 (13)	124.9 $\pm$ 12.8 (13)	134.0 $\pm$ 11.8 (13)

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

Table 10

DA: 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	DA			
	0 ^{a)}	100	300	1000
Days of treatment				
1 ~ 8	113.5 $\pm$ 10.8 (13)	108.6 $\pm$ 7.8 (13)	112.2 $\pm$ 7.2 (13)	114.0 $\pm$ 9.1 (13)
8 ~ 15	116.2 $\pm$ 14.9 (13)	109.1 $\pm$ 9.5 (13)	115.8 $\pm$ 10.1 (13)	111.5 $\pm$ 7.8 (13)

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

Table 11

DA: 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	DA			
	0 ^{a)}	100	300	1000
Days of pregnancy				
0 ~ 7	147.6 $\pm$ 20.8 (13)	142.0 $\pm$ 12.2 (12)	146.2 $\pm$ 16.9 (12)	136.9 $\pm$ 11.7 (13)
7 ~ 14	163.4 $\pm$ 26.0 (13)	160.0 $\pm$ 10.3 (12)	161.8 $\pm$ 19.0 (12)	151.3 $\pm$ 14.2 (13)
14 ~ 20	129.3 $\pm$ 11.9 (13)	122.6 $\pm$ 9.0 (12)	123.9 $\pm$ 10.6 (12)	122.7 $\pm$ 13.5 (13)

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

Table 12

DA: 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	DA			
	0 ^{a)}	100	300	1000
Days of lactation				
0 ~ 4	107.7 $\pm$ 15.3 (13)	83.8 $\pm$ 21.8** (11)	107.3 $\pm$ 13.9 (12)	104.0 $\pm$ 17.5 (13)

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

Table 13

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

Hematological findings of Fo males after oral administration for 42 days

DA (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 ($\times 10^4/\text{mm}^3$)
0 a)	(13) 801 ± 41	(13) 15.4 ± 0.8	(13) 44.3 ± 1.7	(13) 55.4 ± 1.1	(13) 19.2 ± 0.4	(13) 34.7 ± 0.5	(13) 98.3 ± 6.7
100	(13) 807 ± 41	(13) 15.5 ± 0.5	(13) 45.2 ± 1.5	(13) 56.1 ± 1.6	(13) 19.3 ± 0.5	(13) 34.4 ± 0.2	(13) 100.0 ± 12.4
300	(13) 803 ± 43	(13) 15.2 ± 0.7	(13) 44.7 ± 2.3	(13) 55.6 ± 1.1	(13) 18.9 ± 0.4	(13) 33.9** ± 0.4	(13) 95.8 ± 11.1
1000	(13) 817 ± 33	(13) 15.6 ± 0.6	(13) 46.0 ± 1.7	(13) 56.3 ± 1.5	(13) 19.1 ± 0.5	(13) 33.9** ± 0.3	(13) 99.2 ± 10.0

DA (mg/kg)	W B C ($\times 100/\text{mm}^3$)	Band neutrophil (%)	Segmented neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0 a)	(13) 97 ± 27	(13) 0 ± 0	(13) 17 ± 5	(13) 1 ± 0	(13) 0 ± 0	(13) 3 ± 3	(13) 79 ± 6
100	(13) 98 ± 34	(13) 0 ± 0	(13) 17 ± 7	(13) 1 ± 1	(13) 0 ± 0	(13) 2 ± 2	(13) 80 ± 7
300	(13) 88 ± 29	(13) 0 ± 0	(13) 16 ± 7	(13) 1 ± 1	(13) 0 ± 0	(13) 2 ± 2	(13) 80 ± 8
1000	(13) 109 ± 38	(13) 0 ± 0	(13) 15 ± 7	(13) 1 ± 1	(13) 0 ± 0	(13) 3 ± 2	(13) 81 ± 8

Parameter, mean $\pm$ S.D.

(), number of animals

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

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

Table 14

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

Biochemical findings of Fo males after oral administration for 42 days

DA	Total protein	Albumin	A/G	BUN	Creatinine	Glucose	Total cholesterol	Total bilirubin	Tri-glyceride
(mg/kg)	(g/dl)	(g/dl)		(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)
0a)	(13) 5.4 ±0.2	(13) 3.0 ±0.1	(13) 1.23 ±0.10	(13) 16 ±2	(13) 0.7 ±0.1	(13) 152 ±16	(13) 56 ±12	(13) 0.09 ±0.02	(13) 50 ±8
100	(13) 5.4 ±0.2	(13) 2.9 ±0.2	(13) 1.15 ±0.14	(13) 16 ±2	(13) 0.7 ±0.1	(13) 147 ±17	(13) 57 ±14	(13) 0.09 ±0.01	(13) 70 ±26
300	(13) 5.2* ±0.2	(13) 2.9 ±0.2	(13) 1.25 ±0.13	(13) 14 ±2	(13) 0.8 ±0.1	(13) 148 ±13	(13) 48 ±9	(13) 0.08 ±0.03	(13) 49 ±19
1000	(13) 5.5 ±0.2	(13) 2.9 ±0.1	(13) 1.16 ±0.07	(13) 14 ±3	(13) 0.7 ±0.1	(13) 135* ±14	(13) 55 ±11	(13) 0.08 ±0.02	(13) 51 ±18

DA	Na	K	Cl	Ca	Inorg. Phos.	ALP	GPT	GOT	γ-GTP	LDH
(mg/kg)	(mEq/l)	(mEq/l)	(mEq/l)	(mg/dl)	(mg/dl)	(U/l)	(U/l)	(U/l)	(U/l)	(U/l)
0a)	(13) 142.2 ±0.6	(13) 3.76 ±0.11	(13) 105.9 ±1.1	(13) 8.8 ±0.2	(13) 5.6 ±0.5	(13) 237 ±45	(13) 26 ±3	(13) 54 ±6	(13) 0 ±0	(13) 134 ±31
100	(13) 142.3 ±0.7	(13) 3.90 ±0.17	(13) 105.8 ±1.3	(13) 8.7 ±0.3	(13) 5.5 ±0.7	(13) 200* ±35	(13) 22 ±3	(13) 49 ±5	(13) 0 ±0	(13) 125 ±29
300	(13) 142.3 ±0.6	(13) 3.78 ±0.18	(13) 107.0* ±1.0	(13) 8.4** ±0.3	(13) 5.4 ±0.7	(13) 195* ±35	(13) 24 ±3	(13) 54 ±8	(13) 0 ±0	(13) 156 ±69
1000	(13) 142.4 ±0.7	(13) 3.72 ±0.14	(13) 106.6 ±1.1	(13) 8.6 ±0.2	(13) 5.8 ±0.6	(13) 197* ±41	(13) 25 ±5	(13) 53 ±7	(13) 0 ±0	(13) 121 ±56

Parameter, mean S.D.
(), number of animals*, significantly different from control, p<0.05
**, significantly different from control, p<0.01

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

Table 15

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

Summary of macroscopic findings in Fo males

Group Grade	Control		100 mg/kg		300 mg/kg		1000 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Thyroid gland)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Enlargement, right lobe	13	0	13	0	12	1	13	0
Small, right lobe	13	0	13	0	13	0	12	1
(Thymus)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Small	11	2	12	1	12	1	12	1
Enlargement	13	0	13	0	13	0	12	1
(Lung)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Pale	13	0	13	0	12	1	13	0
Area, pale	13	0	13	0	13	0	12	1
(Liver)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Accentuation, lobular pattern	12	1	12	1	13	0	13	0
Yellowish	13	0	11	2	13	0	11	2
Area, pale	13	0	12	1	11	2	13	0
Spot, pale	13	0	13	0	12	1	13	0
(Spleen)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Accessory spleen	13	0	12	1	13	0	13	0

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 16

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

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

Compound	DA			
	0 ^{a)}	100	300	1000
Dose group (mg/kg)				
Terminal body weight (g)	453.2 $\pm$ 31.0 (13)	482.1 $\pm$ 45.9 (13)	449.7 $\pm$ 39.2 (13)	459.8 $\pm$ 35.5 (13)
Heart (g)	1.22 $\pm$ 0.11 ^{b)} (13) 0.27 $\pm$ 0.02 ^{c)}	1.29 $\pm$ 0.15 (13) 0.27 $\pm$ 0.02	1.20 $\pm$ 0.11 (13) 0.27 $\pm$ 0.02	1.21 $\pm$ 0.12 (13) 0.26 $\pm$ 0.02
Liver (g)	12.25 $\pm$ 1.34 (13) 2.70 $\pm$ 0.16	13.75 $\pm$ 2.06* (13) 2.84 $\pm$ 0.18*	11.83 $\pm$ 1.24 (13) 2.63 $\pm$ 0.14	12.08 $\pm$ 1.23 (13) 2.62 $\pm$ 0.09
Kidneys (g)	2.66 $\pm$ 0.23 (13) 0.59 $\pm$ 0.03	2.82 $\pm$ 0.25 (13) 0.59 $\pm$ 0.04	2.71 $\pm$ 0.22 (13) 0.60 $\pm$ 0.04	2.71 $\pm$ 0.19 (13) 0.59 $\pm$ 0.04
Thymus (mg)	280.0 $\pm$ 79.1 (13) 61.4 $\pm$ 14.9	297.4 $\pm$ 98.6 (13) 61.3 $\pm$ 17.9	243.7 $\pm$ 70.1 (13) 53.9 $\pm$ 14.0	279.3 $\pm$ 100.7 (13) 60.8 $\pm$ 23.0
Testes (g)	3.13 $\pm$ 0.31 (13) 0.69 $\pm$ 0.08	3.22 $\pm$ 0.27 (13) 0.67 $\pm$ 0.06	3.18 $\pm$ 0.28 (13) 0.71 $\pm$ 0.07	3.07 $\pm$ 0.27 (13) 0.67 $\pm$ 0.05
Epididymides (g)	1.10 $\pm$ 0.10 (13) 0.24 $\pm$ 0.02	1.18 $\pm$ 0.04 (13) 0.25 $\pm$ 0.02	1.14 $\pm$ 0.11 (13) 0.26 $\pm$ 0.02	1.16 $\pm$ 0.08 (13) 0.25 $\pm$ 0.02

^{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)

Table 17

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

Summary of histopathological findings in Fo males

Group Grade	Control						100 mg/kg						300 mg/kg						1000 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Brain)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Heart)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Myocardial degeneration	12	1	0	0	0	1													12	1	0	0	0	1
(Liver)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Fatty change, periportal	0	1	7	5	0	13													0	0	6	7	0	13
Necrosis, focal	12	1	0	0	0	1													13	0	0	0	0	0
(Spleen)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Deposit, pigment, brown	0	1	12	0	0	13													0	0	13	0	0	13
Hematopoiesis, extramedullary	1	9	3	0	0	12													0	12	1	0	0	13
(Thymus)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Kidney)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Basophilic tubule, cortex	6	7	0	0	0	7													2	11	0	0	0	11
Eosinophilic body	9	2	1	1	0	4													9	0	0	4	0	4
Fibrosis	12	0	1	0	0	1													13	0	0	0	0	0
(Urinary bladder)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Adrenal gland)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Fibrosis	13	0	0	0	0	0													12	0	1	0	0	1
(Testis)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Atrophy, seminiferous tubule, bilateral, focal	13	0	0	0	0	0													12	1	0	0	0	1
Atrophy, seminiferous tubule, unilateral, focal	13	0	0	0	0	0													12	1	0	0	0	1
(Epididymis)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Granuloma, spermatic	12	0	1	0	0	1													13	0	0	0	0	0

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

[], Number of animals examined

Table 18

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

Summary of macroscopic findings in Fo females

Group Grade	Control		100 mg/kg		300 mg/kg		1000 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Thymus)	{13}		{13}		{13}		{13}	
Area, red	12	1	13	0	13	0	13	0
Red	12	1	13	0	13	0	13	0
Small	11	2	11	2	10	3	9	4
(Spleen)	{13}		{13}		{13}		{13}	
Constriction, focal	13	0	13	0	13	0	11	2
(Adrenal gland)	{13}		{13}		{13}		{13}	
Enlargement	13	0	12	1	13	0	13	0
(Kidney)	{13}		{13}		{13}		{13}	
Dilatation, renal pelvis	12	1	13	0	13	0	12	1
Pale	11	2	12	1	13	0	13	0

-, Negative; +, Positive

{ }, Number of animals examined

Table 19

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

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

Compound	Dose group (mg/kg)	DA			
		0 ^{a)}	100	300	1000
Terminal body weight (g)		303.2 $\pm$ 17.3 (13)	287.3 $\pm$ 15.2 (11)	297.0 $\pm$ 11.1 (12)	290.7 $\pm$ 15.4 (13)
Heart (g)		0.84 $\pm$ 0.07 ^{b)} (13)	0.80 $\pm$ 0.11 (11)	0.84 $\pm$ 0.06 (12)	0.85 $\pm$ 0.06 (13)
		0.28 $\pm$ 0.01 ^{c)}	0.28 $\pm$ 0.03	0.28 $\pm$ 0.01	0.29 $\pm$ 0.02
Liver (g)		13.27 $\pm$ 1.45 (13)	12.24 $\pm$ 1.37 (11)	12.51 $\pm$ 0.89 (12)	12.27 $\pm$ 1.12 (13)
		4.37 $\pm$ 0.33	4.26 $\pm$ 0.44	4.21 $\pm$ 0.26	4.23 $\pm$ 0.44
Kidneys (g)		1.83 $\pm$ 0.14 (13)	1.69 $\pm$ 0.13* (11)	1.77 $\pm$ 0.10 (12)	1.82 $\pm$ 0.13 (13)
		0.61 $\pm$ 0.04	0.59 $\pm$ 0.05	0.60 $\pm$ 0.04	0.63 $\pm$ 0.06
Thymus (mg)		122.5 $\pm$ 39.6 (13)	115.4 $\pm$ 53.0 (11)	118.7 $\pm$ 26.8 (12)	153.1 $\pm$ 74.0 (13)
		40.6 $\pm$ 13.4	40.1 $\pm$ 18.1	40.0 $\pm$ 8.9	52.2 $\pm$ 23.7

^{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)

Table 20

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

Summary of histopathological findings in Fo females

Group Grade	Control						100 mg/kg						300 mg/kg						1000 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Brain)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Mineralization, thalamus	13	0	0	0	0	0													12	0	1	0	0	1
(Heart)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Liver)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Necrosis, focal	12	1	0	0	0	1													12	1	0	0	0	1
Fibrosis	12	1	0	0	0	1													13	0	0	0	0	0
(Spleen)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Deposit, pigment, brown	0	0	13	0	0	13													0	0	13	0	0	13
Hematopoiesis, extramedullary	0	0	13	0	0	13													0	0	13	0	0	13
(Thymus)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Atrophy	4	7	2	0	0	9													7	5	1	0	0	6
Hemorrhage	11	2	0	0	0	2													12	1	0	0	0	1
(Kidney)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Basophilic tubule, cortex	9	4	0	0	0	4													9	4	0	0	0	4
Dilatation, renal pelvis	12	0	1	0	0	1													12	0	1	0	0	1
(Urinary bladder)	[13]						[0]						[0]						[13]					
No remarkable change																								
(Adrenal gland)	[13]						[0]						[0]						[13]					
Necrosis, cortex	12	0	0	1	0	1													13	0	0	0	0	0
(Ovary)	[0]						[1]						[1]						[0]					
No remarkable change																								

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

Table 21

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

Reproductive performance of F₀ animals

Compound Dose group (mg/kg)	DA			
	0 a)	100	300	1000
Number of mated pairs	13	13	13	13
Number of copulated pairs	13	12	13	13
Copulation index	100	92.3	100	100
Number of pregnant animals	13	12	12	13
Fertility index	100	100	92.3	100
Pairing days until copulation				
Mean ± S.D. (N)	1.5 ± 1.0 (13)	2.3 ± 1.2 (12)	2.6 ± 3.8 (13)	2.5 ± 2.4 (13)
Frequency of vaginal estrus				
Mean ± S.D. (N)	1.0 ± 0.0 (13)	1.0 ± 0.0 (12)	1.1 ± 0.3 (13)	1.1 ± 0.3 (13)

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

Copulation index = (number of copulated pairs / number of mated pairs) × 100, %

Fertility index = (number of pregnant animals / number of copulated pairs) × 100, %

Table 22

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

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

Compound	DA			
	0 a)	100	300	1000
Dose group (mg/kg)				
Number of pregnant females	13	12	12	13
Number of pregnant females with live pups	13	12	12	13
Gestation index	100	100	100	100
Gestation length in days	22.2 $\pm$ 0.4 (13)	22.4 $\pm$ 0.5 (12)	22.3 $\pm$ 0.5 (12)	22.2 $\pm$ 0.4 (13)
Number of corpora lutea	16.6 $\pm$ 1.6 (13)	16.7 $\pm$ 1.8 (12)	16.8 $\pm$ 2.3 (12)	16.2 $\pm$ 1.5 (13)
Number of implantation sites	16.1 $\pm$ 1.5 (13)	15.8 $\pm$ 2.1 (12)	16.0 $\pm$ 1.5 (12)	15.2 $\pm$ 3.1 (13)
Implantation index	96.9 $\pm$ 5.1 (13)	94.8 $\pm$ 7.1 (12)	96.1 $\pm$ 6.0 (12)	93.1 $\pm$ 15.2 (13)
Day 0 of lactation				
Number of pups born	15.2 $\pm$ 1.6 (13)	14.8 $\pm$ 2.2 (12)	15.2 $\pm$ 1.5 (12)	14.3 $\pm$ 2.7 (13)
Delivery index	94.5 $\pm$ 8.0 (13)	93.5 $\pm$ 3.9 (12)	94.9 $\pm$ 4.3 (12)	94.9 $\pm$ 6.2 (13)
Number of live pups	14.9 $\pm$ 1.6 (13)	14.3 $\pm$ 2.2 (12)	15.1 $\pm$ 1.6 (12)	14.1 $\pm$ 2.7 (13)
Birth index	93.1 $\pm$ 8.8 (13)	90.7 $\pm$ 8.7 (12)	94.3 $\pm$ 5.1 (12)	93.5 $\pm$ 7.2 (13)
Live birth index	98.5 $\pm$ 2.8 (13)	97.0 $\pm$ 8.5 (12)	99.4 $\pm$ 2.2 (12)	98.5 $\pm$ 4.0 (13)
Sex ratio on day 0	50.0 $\pm$ 11.3 (13)	46.7 $\pm$ 9.8 (12)	54.8 $\pm$ 12.3 (12)	48.9 $\pm$ 13.4 (13)
Day 4 of lactation				
Number of live pups	14.7 $\pm$ 1.4 (13)	13.0 $\pm$ 4.7 (12)	15.1 $\pm$ 1.6 (12)	14.1 $\pm$ 2.7 (13)
Viability index	98.6 $\pm$ 2.7 (13)	89.4 $\pm$ 28.8 (12)	100.0 $\pm$ 0.0 (12)	100.0 $\pm$ 0.0 (13)
Sex ratio on day 4	49.8 $\pm$ 11.5 (13)	46.3 $\pm$ 10.3 (11)	54.8 $\pm$ 12.3 (12)	48.9 $\pm$ 13.4 (13)

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

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

Table 23

DA: 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	DA							
Dose group (mg/kg)	0 a)		100		300		1000	
Day 0 of lactation								
Number of live pups	14.9 ± 1.6	(13)	14.3 ± 2.2	(12)	15.1 ± 1.6	(12)	14.1 ± 2.7	(13)
Male	7.5 ± 1.9		6.8 ± 1.9		8.2 ± 1.7		6.7 ± 1.7	
Female	7.5 ± 1.8		7.6 ± 1.7		6.9 ± 2.4		7.4 ± 2.2	
Weight of pup (g)								
Male	6.1 ± 0.3	(13)	6.3 ± 0.4	(12)	6.2 ± 0.5	(12)	6.2 ± 0.5	(13)
Female	5.9 ± 0.3	(13)	5.9 ± 0.5	(12)	5.9 ± 0.4	(12)	5.9 ± 0.5	(13)
Day 4 of lactation								
Number of live pups	14.7 ± 1.4	(13)	13.0 ± 4.7	(12)	15.1 ± 1.6	(12)	14.1 ± 2.7	(13)
Male	7.3 ± 1.8		6.1 ± 2.7		8.2 ± 1.7		6.7 ± 1.7	
Female	7.4 ± 1.9		6.9 ± 2.7		6.9 ± 2.4		7.4 ± 2.2	
Weight of pup (g)								
Male	9.6 ± 0.7	(13)	9.6 ± 1.5	(11)	9.9 ± 0.9	(12)	9.7 ± 1.1	(13)
Female	9.4 ± 0.6	(13)	9.1 ± 1.3	(11)	9.5 ± 0.8	(12)	9.4 ± 1.1	(13)

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

Table 24

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

Morphological findings in F₁ pups on day 4 of lactation

Compound	DA			
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}	100	300	1000
Number of pups examined				
External observation	191	156	181	183
Visceral observation	191	156	181	183
Number of pups showing with				
external malformations	0	0	0	0
visceral malformations	0	0	0	0

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