



2, 6-ジクロロトルエンの
ラットを用いる反復経口投与
毒性・生殖発生毒性併合試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦 野 研 究 所

目 次

	頁
要 約	1
緒 言	3
試験材料および方法	4
1. 被験物質	4
2. 使用動物および飼育条件	4
3. 群分けおよび個体識別	5
4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法	5
5. 観察方法	6
6. 統計解析	10
結 果	11
I. 反復投与毒性（親動物所見）	11
1. 一般状態	11
2. 体重	12
3. 摂餌量	13
4. 尿検査所見	13
5. 解剖時検査所見	14
II. 生殖発生毒性	19
1. 生殖学的検査所見	19
2. 産児所見	20
考 察	22
文 献	25

Figures (Fig. 1 ~ Fig. 4)

Tables (Table 1 ~ Table 28)

【 要 約 】

2,6-ジクロロトルエン（以下、2,6-DCT）の 0（溶媒対照）、30、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、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、親動物に対する反復投与毒性および生殖能力ならびに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

I. 反復投与毒性（親動物所見）

1. 雄動物

自発運動減少が 300 mg/kg 投与群に 1 匹、活動性の低下（自発運動減少 9 匹、腹臥位 2 匹）が 1000 mg/kg 投与群で認められ、体重増加が 300 mg/kg 以上の投与群において抑制された。解剖時の検査では、腎臓の比体重値が 300 mg/kg 以上の投与群で、肝臓の比体重値が 1000 mg/kg 投与群でそれぞれ増加した。組織所見として、腎臓では、eosinophilic body の増加が 100 mg/kg 以上の投与群で認められ、肝臓では、小葉中心性の肝細胞の肥大および曇りガラス様変性が 300 mg/kg 以上の投与群で認められた。また、血液生化学的検査では、グルコース濃度が 300 mg/kg 以上の投与群で減少した。摂餌量および血液学的検査には、2,6-DCT 投与の影響は認められなかった。

2. 雌動物

活動性の低下（自発運動減少全例、腹臥位10匹）、半眼（6匹）、摂餌量の低下、体重増加の抑制が 1000 mg/kg 投与群で認められた。解剖時の検査では、腎臓および肝臓の比体重値が 1000 mg/kg 投与群で増加した。組織所見として、近位尿細管内に空胞および脂肪変性、小葉中心性の肝細胞の肥大が 300 mg/kg 以上の投与群で認められた。また、胸腺の比体重値が 300 mg/kg 以上の投与群で低下し、その組織所見では萎縮した例の程度と頻度が増加した。尿検査には、2,6-DCT 投与の影響は認められなかった。

II. 生殖発生毒性

1. 生殖学的検査所見

交尾能力および受胎能力には、2,6-DCT の影響は認められず、分娩状態にも異常は認めら

れなかった。300 mg/kg 以上の投与群において、哺育状態の不良が認められた。

2. 産児所見

300 mg/kg 以上の投与群において死亡児数が増加し、新生児生存率が低下した。また、1000 mg/kg 投与群では、哺育4日の産児の体重が低下傾向を示した。

産児の形態異常はいずれの 2,6-DCT 投与群にも認められなかった。

Ⅲ. 無影響量

以上の試験成績から、本試験条件下では、2,6-DCT の反復投与毒性に関する無影響量は、雄では、30 mg/kg/day、雌では、100 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は、雄では 1000 mg/kg/day、雌では 100 mg/kg/day、産児では 300 mg/kg/day と判断される。

【 緒 言 】

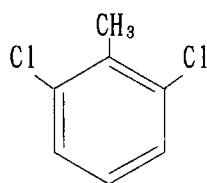
2,6-ジクロロトルエン（以下 2,6-DCT）については、ヒトをはじめ哺乳類の生体に及ぼす毒性についてはほとんど知られていない。一方、2,6-DCT の位置異性体である2,4-ジクロロトルエンの毒性については、経口投与によるラットの LD₅₀ 値が、雌雄ともに 2000 mg/kg 以上であること、また、反復経口投与により、肝臓の小葉中心性の肝細胞腫大、腎臓の尿細管上皮の萎縮および再生、尿細管の拡張などの毒性変化が認められることなどが報告¹⁾ されている。

そこで今回、OECDによる既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として、ラットを用いて本化合物の反復経口投与毒性・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

2,6-ジクロロトルエン [2,6-DCT と略す、別名: 2,6-ジクロロ-1-メチルベンゼン、CAS No.: 118-69-4、英名: 2,6-Dichlorotoluene、分子式: $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_2$ 、分子量: 161.03、比重: 1.253 (20 °C)、融点: 2 °C、沸点: 200 °C] は、benzene の単環メチル化合物の toluene の 2- 位および 6- 位に -Cl を付加した化合物で、水に難溶でアセトンに易溶な無色透明の液体であり下記の構造式を有する。本試験に使用した 2,6-DCT [ロット番号: 純度: 99.2% (wt%)、不純物: 2,3-DCT (0.21%)、2,4-DCT (0.21%)、2,5-DCT (0.27%)、3,4-DCT (0.03%)、3,5-DCT (0.09%)] (Annex 1-1、1-2) は、使用時まで室温、遮光条件下で密封保管した。なお、本被験物質の試験終了後の分析の結果、純度: 99.2% (wt%) [不純物: 2,3-DCT (0.20%)、2,4-DCT (0.21%)、2,5-DCT (0.26%)、3,4-DCT (0.03%)、3,5-DCT (0.07%)] であり、2,6-DCT は、試験期間中安定であったことが確認された (Annex 2-1、2-2)。



投与検体は、コーンオイル [ロット番号: V6H2050 (ナカライテスク(株))] に溶解して、いずれの用量においても1回の投与液量が2 mL/kg になるように濃度を調整した。調製した投与液は、室温、遮光条件下で密封保管し、調製後7日以内に投与した。調製液中の被験物質は、室温、遮光条件下で少なくとも8日間安定であることが確認されており (Annexes 3-1、3-2)、また、試験開始初期に調製した投与検体には、所定量の 2,6-DCT が含有されていたことを確認した (Annex 4)。

2. 使用動物および飼育条件

試験には、雌雄とも7週齢にて購入した日本チャールス・リバー(株)日野飼育センター生産の Sprague-Dawley 系ラット (Crj:CD、SPF) を使用した。購入した動物は、入荷後1週間、馴化と検疫を兼ねて予備飼育し、一般状態に異常が認められなかったものを試験に供した (Annex 5)。

各動物は、基準温度 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、基準湿度50～65%、換気回数約15回/時間、照明12時間（午前7時～午後7時）に制御された飼育室で、雄は金属製ケージ（ $22 \times 27 \times 19\text{cm}$ ）、雌は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（ $35 \times 40 \times 18\text{cm}$ 、日本クレア株）に個別に収容して飼育し、固形飼料（CE-2、日本クレア株）および飲料水として水道水を自由に摂取させた。なお、飼育期間中、Annex 6 に示す飼育環境の異常が認められたが、試験に支障を来す異常ではなかった。また、供給した飼料、飲料水および床敷には試験に支障を来す可能性のある混入物は認められなかった。

3. 群分けおよび個体識別

雌雄とも投与開始日（投与1日）に体重別層化無作為抽出法に準じて群分けし、各群とも雌雄各13匹を配した。投与開始日の体重範囲は、雄 302.5～359.6g（Appendixes 3-1～3-5 参照）、雌 212.5～243.8g（Appendixes 5-1～5-5 参照）であった。

群分け後の雌雄動物には、油性フェルトペンを用いて尾に群および個体番号を記した。また、群ごとに色の異なるカードを各飼育ケージに懸け、これに群および個体番号を記入し、個体識別の補助とした。なお、産児については、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

2,6-DCT の投与量は、投与量設定のための予備試験の結果を参考に決定した。すなわち、2,6-DCT の 0、250、500 および 1000 mg/kg を少数の雌雄ラット（Crj:CD、9 週齢）に14日間連続投与したところ、死亡例は認められず、一般状態の変化として、一過性の流涎が雄では 2,6-DCT 各投与群に、雌では、500 mg/kg 以上の投与群に認められた。また、すべての 2,6-DCT 投与群において軽度ではあるが雌雄ともに肝臓重量が増加し、さらに雄では腎臓重量も増加した。体重、摂餌量、血液学的検査および血液生化学的検査には、毒性変化を示唆する所見は認められなかった。これらのことから、より長期間の投与でも親動物は死亡しないと考えられ、OECD ガイドラインに定められている最高限度の量である 1000 mg/kg を最高用量に選び、以下、公比 3 で除して高用量を 300 mg/kg、中用量を 100 mg/kg、最低用量を 30 mg/kg に設定した。

対照群のラットには、2,6-DCT の媒体としたコーンオイルを 2,6-DCT 投与群と同一条件にて投与した。以下に群構成を示す。

群番号	被験物質	投与量 (mg/kg)	投与液量 (mL/kg)	匹数 (動物番号)	
				雄	雌
1	溶媒対照	0	2	13 (MX01001-013)	13 (FB01001-013)
2	2,6-DCT	30	2	13 (MX02001-013)	13 (FB02001-013)
3	2,6-DCT	100	2	13 (MX03001-013)	13 (FB03001-013)
4	2,6-DCT	300	2	13 (MX04001-013)	13 (FB04001-013)
5	2,6-DCT	1000	2	13 (MX05001-013)	13 (FB05001-013)

各用量の投与検体は、雄に対しては交配前14日間と交配期間14日間および交配期間終了後14日間の連続42日間、また、雌に対しては交配前14日間と最長14日間の交配期間中（交尾成立まで）ならびに交尾成立雌では妊娠期間を通して分娩後の哺育3日（分娩日＝哺育0日）まで毎日1回、ガラス製注射筒およびラット用金属製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（2 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投与日に最も近接した時期の測定体重をもとに、また、交尾成立後の雌については妊娠0日（交尾確認日）の体重をもとにそれぞれ算出した。

5. 観察方法

1) 親動物

A. 一般状態

雌雄とも、全例について飼育期間中毎日観察した。

B. 体重

雄は、全例について投与1、8、15、22、29、36、42日および解剖日に、雌は、全例について投与1、8、15日に測定し、投与22日までに交尾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、交尾成立雌では、妊娠0、7、14、20日に、分娩した雌では、哺育0および4日（解剖日）に体重を測定した。なお、哺育途中で産児の全例が死亡した母動物の体重は、評価の対象から除外した。

C. 摂餌量

雌雄とも全例について、体重測定日と同日に飼料重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を算出した。2週間の交配期間中の摂餌量は測定しなかった。交尾成立雌では、妊娠0～7、7～14、14～20日、さらに、分娩した雌では、哺育0～4日の摂餌量を算出した。なお、哺育途中で産児の全例が死亡した母動物の摂餌量は、評価の対象から除外した。

D. 交配

交配は、投与15日（投与開始日＝投与1日）の夕方から最長2週間、同群内の雌雄を1対1で同居させて行った。交尾成立の確認は、毎朝、膣栓および膣垢中の精子の存在を調べるにより行い、交尾が確認された雌は、その日を妊娠0日と起算して雄から分離し、個別に飼育した。交配結果から、各群について交尾率 $[(\text{交尾確認動物数} / \text{交配動物数}) \times 100]$ 、受胎率 $[(\text{妊娠動物数} / \text{交尾確認動物数}) \times 100]$ 、同居開始日から交尾成立までに要した日数およびその間に回帰した発情期の回数を求めた。なお、100 mg/kg 投与群の1匹（動物番号：FB03011）は、交尾確認日を誤ったため、交尾率、受胎率の算出については、評価の対象としたが、交尾成立までの日数および発情回数については、集計から除外した。

E. 分娩状態

各群とも交尾成立雌は、全例を自然分娩させた。分娩状態の観察は、観察可能なものについて行い、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. 妊娠期間の算定

分娩の確認は、午前9時～11時に限定し、この時間帯に分娩が完了していることを確認した動物について、その日を分娩日と規定した。午前11時を過ぎて分娩した動物については、翌日を分娩日とした。

分娩を確認した動物について妊娠期間（妊娠0日から分娩日までの日数）を算定し、出産率 $[(\text{生児出産雌数} / \text{妊娠動物数}) \times 100]$ を各群について求めた。

G. 尿検査

雌の全例について、妊娠20日および分娩した雌では哺育2日に、pH、潜血、蛋白、糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビンについて試験紙法（マルティスティックス／クリニテック 200、マイルス三共）により尿検査を実施した。なお、排尿せず、尿採取ができなかった例は、尿検査を実施しなかった。

H. 最終検査

a) 雄動物

1. 剖検、器官重量および病理組織学的検査

最終投与日（投与42日）の投与終了後から絶食し、翌日にペントバルビタール投与後に放血・致死させて剖検した。その際、全例について肝臓、腎臓、胸腺、精巣および精巣上体の重量を測定した。また、これらの器官および脳、心臓、脾臓、副腎、膀胱および剖検

において異常を認めた器官（肺、胃）は10%ホルマリンに、精巣および精巣上体はブアン液に固定して保存した。対照群および最高用量群のこれらの器官（肺、胃を除く）は、常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って病理組織学的検査を実施したが、最高用量群に異常が認められた器官（腎臓、肝臓、精巣）は、その他の2,6-DCT 投与群についても検査を実施した。なお、対照群2匹（動物番号：MX01007、MX01008）、30 mg/kg 投与群3匹（動物番号：MX02004、MX02012、MX02013）、100 mg/kg 投与群3匹（動物番号：MX03002、MX03003、MX03005）、300 mg/kg 投与群3匹（動物番号：MX04001、MX04006、MX04010）、1000 mg/kg 投与群3匹（動物番号：MX05002、MX05005、MX05010）の腎臓について、PAS染色を行った。

ロ. 血液学的検査

全例について、剖検に先立ち、ペントバルビタール麻酔下で腹部後大静脈より EDTA を抗凝固剤として採血し、以下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 (コルター・エレクトロニクス社)
白血球数 (WBC)	自動 (電気抵抗法)	"
血色素量 (Hb)	自動 (吸光度法)	"
平均赤血球容積 (MCV)	自動 (電気抵抗法)	"
血小板数	自動 (電気抵抗法)	"
ヘマトクリット値 (Ht)	計算 ($0.001 \times \text{RBC} \times \text{MCV}$)	—
平均赤血球血色素量 (MCH)	計算 ($1000 \times \text{Hb} / \text{RBC}$)	—
平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	計算 ($100 \times \text{Hb} / \text{Ht}$)	—
白血球分類	視算 (静脈血塗抹標本、Wright-Giemsa 染色)	光学顕微鏡

ハ. 血液生化学的検査

全例について、血液学的検査のための採血に引き続き、ヘパリンを抗凝固剤として採血し、血漿を分離して次の項目について検査を行った。

項 目	測 定 法	使 用 機 器
総蛋白濃度	ビウレット法	遠心方式生化学自動分析装置 COBAS-FARA (ロシュ)
アルブミン濃度	B C G 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・G.L.DH 法	"
クレアチニン濃度	Jaffe 法	"
アルカリフォスファターゼ活性	パラントロフェリリン酸基質法	"
GOT 活性	S S C C 法	"
GPT 活性	S S C C 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	O C P C 法	"
無機リン濃度	モリブデン酸直接法	"

項 目	測 定 法	使 用 機 器
γ-GTP 活性	γ-グルタミル-3-カルボキシ-4- ニトロニリド 基質法	遠心方式生化学自動分析装置 COBAS- PARA (ロシュ)
ナトリウム濃度	イオン電極法	全自動電解質分析装置 EA05 (A&T)
カリウム濃度	イオン電極法	"
塩素濃度	イオン電極法	"
A/G 比	計算	—

b) 雌動物

交尾したが分娩しない雌は妊娠25日相当日に、分娩した雌は哺育4日に、それぞれペン
トバルビタールを投与して放血・致死させ、剖検した。妊・不妊のいずれの例においても
卵巢および子宮を摘出し、卵巢は実体顕微鏡下で妊娠黄体数を数えた後、ブアン液に固定
して保存した。子宮については Salewski 法²⁾を応用して着床痕を染色して着床数を確認
し、着床率〔(着床数/妊娠黄体数)×100〕を算出した。また、胸腺、肝臓および腎臓
の重量を全例について測定した。これらの器官および脳、心臓、脾臓、副腎、膀胱、子宮
および剖検において異常を認めた器官(肺、胃)は10%ホルマリンに固定して保存した。
対照群および最高用量群のこれらの器官(肺、胃を除く)は、常法に従ってパラフィン切
片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って病理組織学的検査を実施したが、最高用
量群に異常が認められた器官(腎臓、肝臓、脾臓および胸腺)は、その他の 2,6-DCT 投
与群についても検査を実施した。また、不妊例の卵巢については、病理組織学的検査を行
った。なお、対照群1匹(動物番号: FB01001)、30 mg/kg 投与群1匹(動物番号:
FB02001)、100 mg/kg 投与群1匹(動物番号: FB03002)、300 mg/kg 投与群3匹(動物番
号: FB04002、FB04006、FB04013)、1000 mg/kg 投与群4匹(動物番号: FB05001、
FB05003、FB05007、FB05007)の腎臓について、Oil red O 染色を行った。

2) 産児

A. 産児数

哺育0日に産児数(生存児+死亡児)を調べ、分娩率〔(産児数/着床痕数)×100〕お
よび生児出産率〔(出産生児数/着床痕数)×100〕を求めた。また、産児の外表異常の有
無および性別を調べ、生存児の性比〔(雄の生児数/出産生児数)×100〕を算出した。

B. 死亡児数

死亡児数を毎日調べ、出生率〔(出産生児数/産児数)×100〕および新生児生存率
〔(哺育4日の生児数/哺育0日の生児数)×100〕を求めた。死亡児は剖検し、胸腔および

腹腔内の器官を除去した後、エタノールに固定して保存した。

C. 体重

哺育0日および4日に1腹単位で雌雄別に体重（litter重量）を測定し、[litter重量/測定児数]を各腹について求めた。

D. 剖検

哺育4日に全例をエーテル吸入により致死させ、剖検した。胸腔および腹腔内の器官は、一括して摘出し、各腹ごとに10%ホルマリンに固定して保存した。カーカスは、1腹ごとにエタノールに固定して保存した。

6. 統計解析

交尾率、受胎率および出生児の形態異常発現頻度については Yatesの補正を含む χ^2 検定³⁾を行った。病理組織学的検査結果については、Mann-WhitneyのU検定⁴⁾により、また、陽性グレードの合計値は Fisher の直接確率の片側検定により、対照群と 2,6-DCT 投与群の差について検定した。その他のすべてのデータ（尿検査データを除く）は、個体ごとに得られた値あるいは1腹ごとの平均値を1標本として、先ず、Bartlett 法⁵⁾により各群の分散の一様性について検定した。その結果、分散が一様とされた場合には、一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性が認められた場合には Dunnett 法⁶⁾あるいは Scheffé 法⁷⁾を用いて対照群と 2,6-DCT 各投与群との平均値の差の検定を行った。分散が一様でなかった場合は、Kruskal-Wallis の順位検定⁸⁾を行い、群間に有意性が認められた場合に対照群と 2,6-DCT 各投与群との差について Dunnett 型⁶⁾あるいは Scheffé 型⁷⁾の検定を行った。有意水準は、Fisher の直接確率の片側検定は5%とし、その他は、5%および1%とした。

【 結 果 】

使用動物に関する経過の概要を次表に示した。

投与量 (mg/kg)	2, 6-DCT				
	0	30	100	300	1000
使用動物数 (雌雄各)	13	13	13	13	13
交尾不成立動物数	0	0	0	0	0
不妊動物数	2	0	0	4	2
妊娠動物数	11	13	13	9	11
生存母動物数	11	13	12 ^{a)}	9	11
全産児が死亡した母動物数	0	0	0	1	2

^{a)} : 交尾確認日を誤った動物 (動物番号: FB03011) は除外した。

I. 反復投与毒性 (親動物所見)

1. 一般状態 (Tables 1、2; Appendices 1-1~2-5)

1) 死亡動物

雌雄ともに、いずれの投与群にも死亡動物は認められなかった。

2) 生存動物

雄では、300 mg/kg 投与群において投与期間初期に自発運動減少が1匹、1000 mg/kg 投与群では、投与期間を通じて自発運動減少が9匹に、投与期間初期に腹臥位が2匹に、紅涙が1匹に観察された。雌では、1000 mg/kg 投与群において自発運動減少が投与期間を通じて全例に、投与期間初期に腹臥位が10匹、半眼が6匹、立毛が1匹に観察された。これらの症状は、雌雄ともに翌日の投与までには消失した。また、雌雄ともに 300 mg/kg 以上の投与群では、投与期間を通じて投与直後に一過性の流涎が観察され、1000 mg/kg 投与群では、投与直前から流涎を呈す動物も散見された。

分娩後の動物では、消瘦および哺育行動を示さない母動物が 300 および 1000 mg/kg 投与群の各1匹に認められた。

2. 体重

1) 雄 (Figure 1; Tables 3, 4; Appendices 3-1~4-5)

実測値については、30 mg/kg 投与群では投与15日、300 mg/kg 投与群では投与15、22、29および36日、1000 mg/kg 投与群では投与15、22、29、36および42日（最終投与日）に对照群と比較して有意 ($p<0.05$ 、 $p<0.01$) な低値を示した。

増加量については、30 mg/kg 投与群では投与開始日から15日、300 mg/kg 投与群では投与開始日から15、22、29および36日まで、1000 mg/kg 投与群では投与開始日から8、15、22、29、36および42日までの増加量が对照群と比較して有意 ($p<0.05$ 、 $p<0.01$) に抑制された。

100 mg/kg 投与群では、実測値および増加量に統計学的有意差は認められなかった。

2) 雌 (Figure 2)

(1) 交配前 (Tables 5, 6; Appendices 5-1~6-5)

実測値については、30 mg/kg 投与群では投与15日の体重が对照群と比較して有意 ($p<0.05$) な低値を示した。

増加量については、30 および 1000 mg/kg 投与群では投与開始日から15日までの増加量が有意 ($p<0.01$) に抑制された。しかし、30~300 mg/kg 投与群では用量に依存した変化は認められなかった。

100 および 300 mg/kg 投与群では、実測値および増加量に統計学的有意差は認められなかった。

(2) 妊娠期 (Tables 7, 8; Appendices 7-1~8-5)

実測値については、1000 mg/kg 投与群において、妊娠20日の体重が对照群と比較して有意 ($p<0.05$) な低値を示した。

増加量については、30 mg/kg 投与群では妊娠0日から14日まで、1000 mg/kg 投与群では妊娠0日から14および20日までの増加量が对照群と比較して有意 ($p<0.05$ 、 $p<0.01$) に抑制された。しかし、30~300 mg/kg 投与群では用量に依存した変化は認められなかった。

100 および 300 mg/kg 投与群では、実測値および増加量に統計学的有意差は認められなかった。

(3) 哺育期 (Tables 9、10; Appendices 9-1~10-5)

1000 mg/kg 投与群において、哺育 0～4 日の増加量に抑制傾向が認められたが、いずれの投与群においても、体重および体重増加量には対照群との間に統計学的有意差は認められなかった。

3. 摂餌量

1) 雄 (Figure 3; Table 11; Appendices 11-1~11-5)

いずれの投与群においても、摂餌量には対照群との間に統計学的有意差は認められなかった。

2) 雌 (Figure 4)

(1) 交配前 (Table 12; Appendices 12-1~12-5)

30 mg/kg 投与群では投与 8～15日、1000 mg/kg 投与群では投与 1～8 日および 8～15 日の摂餌量が対照群と比較して有意 ($p<0.05$ 、 $p<0.01$) な低値を示した。100 および 300 mg/kg 投与群では、摂餌量には対照群との間に統計学的有意差は認められなかった。

(2) 妊娠期 (Table 13; Appendices 13-1~13-5)

1000 mg/kg 投与群において、妊娠 0～7 日および 7～14日の摂餌量が対照群と比較して有意 ($p<0.05$) な低値を示した。300 mg/kg 以下の投与群では、摂餌量には対照群との間に統計学的有意差は認められなかった。

(3) 哺育期 (Table 14; Appendices 14-1~14-5)

いずれの投与群においても、摂餌量には対照群との間に統計学的有意差は認められなかった。

4. 尿検査所見 (Table 15; Appendices 15-1~15-5)

採尿が可能であった動物では、いずれの投与群においても 2,6-DCT の投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。

5. 解剖時検査所見

A) 雄

(1) 血液学的検査所見 (Table 16; Appendices 16-1~16-5)

赤血球に関しては、平均赤血球血色素濃度が 30 mg/kg 投与群では対照群と比較して有意 ($p<0.01$) に減少し、300 mg/kg 投与群では有意 ($p<0.05$) に上昇した。

白血球に関しては、白血球数が2,6-DCT 各投与群において有意 ($p<0.05$ 、 $p<0.01$) に減少したが、百分比には対照群との間に統計学的に有意差は認められなかった。

血小板数にも対照群と 2,6-DCT各投与群との間に統計学的有意差は認められなかった。

(2) 血液生化学的検査所見 (Table 17; Appendices 17-1~17-5)

アルブミン濃度が 300 mg/kg以上の投与群で上昇し、1000 mg/kg 投与群において対照群との間に有意差 ($p<0.01$) が認められ、A/G 比は、100 および300 mg/kg 投与群において対照群と比較して有意 ($p<0.05$ 、 $p<0.01$) に上昇した。グルコース濃度は、300 mg/kg 以上の投与群において有意 ($p<0.05$ 、 $p<0.01$) に減少した。

カリウム濃度は、30、300 および 1000 mg/kg 投与群において有意 ($p<0.05$ 、 $p<0.01$) に上昇した。無機リン濃度は、30 mg/kg 投与群で有意 ($p<0.05$) に減少し、1000 mg/kg 投与群では有意 ($p<0.01$) に上昇した。

総蛋白濃度、尿素窒素濃度、クレアチニン濃度、総コレステロール濃度、総ビリルビン濃度、ナトリウム濃度、塩素濃度、カルシウム濃度、アルカリフォスファターゼ活性、GPT活性、GOT活性、 γ -GTP活性には、対照群と 2,6-DCT 各投与群との間に統計学的有意差は認められなかった。

(3) 剖検所見 (Table 18; Appendices 18-1~18-5)

肝臓では、腫大および小葉像の明瞭化が 1000 mg/kg 投与群の 1 匹に、黄白色または淡色の斑や領域が対照群および 30 mg/kg 投与群各 3 匹、100 および 300 mg/kg 投与群各 1 匹に認められた。そのほかに、30 mg/kg 投与群では胸腺の暗赤色化が 1 匹、肺の赤色点 が 2 匹に、腺胃粘膜の赤褐色点 が 1 匹に、1000 mg/kg 投与群では肺に褐色域および精巣の小型化が 1 匹に認められた。

(4) 器官重量 (Table 19; Appendices 19-1~19-5)

肝臓の比体重値が 1000 mg/kg 投与群において、腎臓の比体重値が 300 mg/kg 以上の投与群において、それぞれ対照群と比較して有意 ($p<0.05$, $p<0.01$) な高値を示した。また、精巢上体の実重量が 1000 mg/kg 投与群において有意 ($p<0.01$) な低値を示したが、比体重値には、対照群との間に有意差は認められなかった。その他の器官には、対照群と 2,6-DCT 各投与群との間に有意差は認められなかった。

なお、剖検時体重が、1000 mg/kg 投与群において対照群と比較して有意 ($p<0.01$) な低値を示した。

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

各器官における観察所見を以下に示す。

(腎臓)

Eosinophilic body (photos 1、2)が対照群 6 匹、30 mg/kg 投与群 7 匹、100 mg/kg 投与群 11 匹、300 および 1000 mg/kg 投与群各全例に認められ、100 mg/kg 以上の投与群では、その程度および頻度が対照群と比較して有意 ($p<0.05$, $p<0.01$) に増強された。さらに、硝子円柱が対照群、30 および 300 mg/kg 投与群各 1 匹、1000 mg/kg 投与群 2 匹に、顆粒状の円柱が 30 および 100 mg/kg 投与群各 1 匹、1000 mg/kg 投与群 2 匹に認められた。これらのうち、対照群 2 匹、2,6-DCT 投与群各 3 匹について P A S 染色を実施した結果、硝子円柱は陽性反応を示し、eosinophilic body および顆粒状の円柱は陽性反応を示さなかった。また、皮質に好塩基性尿細管が対照群 9 匹、30 mg/kg 投与群 7 匹、100 mg/kg 投与群 9 匹、300 mg/kg 投与群 7 匹、1000 mg/kg 投与群 11 匹に、間質へのリンパ球浸潤が対照群 3 匹、30 mg/kg 投与群 3 匹、300 mg/kg 投与群 7 匹、1000 mg/kg 投与群 1 匹に認められたが、対照群と 2,6-DCT 各投与群との間に程度および頻度の差は認められなかった。そのほかに、髓質に鉍質沈着が 100 mg/kg 投与群 1 匹に、限局性の線維化が対照群 1 匹に認められた。

(肝臓)

小葉中心性の肝細胞の肥大 (photos 3、4) が 300 mg/kg 投与群 4 匹、1000 mg/kg 投与群 11 匹に認められ、両投与群では対照群と比較してその発現頻度に有意差 ($p<0.05$) が認められた。これらのうち、300 mg/kg 投与群 1 匹、1000 mg/kg 投与群 5 匹では肥大の程度が強く、1000 mg/kg 投与群では、その程度が有意 ($p<0.01$) に増強された。さら

に、肝細胞が肥大した例のうち、300 mg/kg 投与群 1 匹および 1000 mg/kg 投与群 5 匹に軽度あるいはごく軽度な曇りガラス様変性が認められ、1000 mg/kg 投与群では、対照群と比較してその発現頻度に有意差 ($p < 0.05$) が認められた。また、門脈周囲性の肝細胞の脂肪化および小肉芽腫が全例に認められたが、対照群と 2,6-DCT 各投与群との間に程度および頻度の差は認められなかった。そのほか、限局性壊死が 1000 mg/kg 投与群 1 匹、限局性の肝細胞の脂肪変性が対照群および 300 mg/kg 投与群の各 1 匹に認められた。

(精巣および精巣上体)

限局性の精細管の萎縮が 100 mg/kg 投与群 1 匹、300 mg/kg 投与群 2 匹、1000 mg/kg 投与群 4 匹に認められ、1000 mg/kg 投与群では、対照群と比較してその発現頻度に有意差 ($p < 0.05$) が認められた。これらのうち、1000 mg/kg 投与群の 3 匹に精巣上体の管腔内に細胞残屑が認められた。また、対照群および 1000 mg/kg 投与群各 1 匹の精巣上体に精子肉芽腫および間質へのリンパ球浸潤が認められた。

(脾臓)

髓外造血および褐色色素の沈着が対照群および 1000 mg/kg 投与群の全例に認められたが、両群間に程度および頻度の差は認められなかった。

(心臓)

限局性の心筋変性が対照群および 1000 mg/kg 投与群各 1 匹に、出血が 1000 mg/kg 投与群 1 匹に認められた。

(胸腺)

出血が対照群の 1 匹、1000 mg/kg 投与群の 2 匹に認められた。

(脳、副腎および膀胱)

対照群および 1000 mg/kg 投与群に異常は認められなかった。

B) 雌

(1) 剖検所見 (Table 21; Appendices 21-1~21-5)

肝臓では、暗色化あるいは白色点が 1000 mg/kg 投与群に各 1 匹、黄白色または淡色の斑が 30 mg/kg 投与群 1 匹および 300 mg/kg 投与群 2 匹に認められた。腎臓では、淡色化が 30、300 および 1000 mg/kg 投与群各 1 匹に、髓質の赤色化が 1000 mg/kg 投与群 1 匹に認められた。胸腺では、小型化が 300 mg/kg 投与群 2 匹、1000 mg/kg 投与群 4 匹に、赤色点が対照群および 30 mg/kg 投与群各 2 匹、1000 mg/kg 投与群 1 匹に認められ

た。これらのほかに、1000 mg/kg 投与群では、脾臓の小型化が1匹、肺の暗赤色域および白色点ならびに縦隔リンパ節腫大が1匹、前胃あるいは腺胃の粘膜に暗色点が各1匹に認められた。

(2) 器官重量 (Tables 22-1、22-2; Appendices 22-1~22-5)

肝臓および腎臓の比体重値が 1000 mg/kg 投与群において、それぞれ対照群と比較して有意 ($p<0.05$ 、 $p<0.01$) な高値を示した。また、胸腺の実重量および比体重値が 300 および 1000 mg/kg 投与群において低値を示したが、対照群との間に有意差は認められなかった。

不妊動物および全産児が死亡した母動物では、肝臓の比体重値が 1000 mg/kg 投与群において増加傾向を示した。

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

各器官における観察所見を以下に示す。

(腎臓)

近位尿細管の空胞変性 (photo 5、6) が 300 mg/kg 投与群 1 匹、1000 mg/kg 投与群 3 匹に認められ、300 mg/kg 投与群 1 匹および 1000 mg/kg 投与群 2 匹では、広範囲な領域に空胞変性が認められた。一方、近位尿細管に脂肪変性が 30 mg/kg 投与群 2 匹、100 mg/kg 投与群 1 匹、300 mg/kg 投与群 3 匹、1000 mg/kg 投与群 4 匹に認められ、1000 mg/kg 投与群では、対照群と比較してその発現頻度に有意差 ($p<0.05$) が認められた。これらのうち、300 mg/kg 投与群の 2 匹では、他の群と比較して脂肪滴の数が多かった。空胞変性および脂肪様の変性が認められた例について、oil red O 染色を実施した結果、空胞変性と考えられた尿細管の空胞は陽性反応を示さなかったが、脂肪変性と考えられた空胞は大部分が陽性反応を示した。また、好塩基性尿細管が対照群 5 匹、30 mg/kg 投与群 2 匹、100 mg/kg 投与群 4 匹、300 mg/kg 投与群 5 匹、1000 mg/kg 投与群 3 匹に認められたが、対照群と 2,6-DCT 各投与群との間に程度および頻度の差は認められなかった。これらのほかに、間質へのリンパ球浸潤が対照群 1 匹、300 mg/kg 投与群 2 匹、1000 mg/kg 投与群 1 匹、髄質又は乳頭部に鉍質沈着が対照群および 1000 mg/kg 投与群各 1 匹、限局性の線維化が 30 mg/kg 投与群 1 匹、乳頭部に嚢胞が 100 mg/kg 投与群 1 匹に認められた。

(肝臓)

小葉中心性の肝細胞の肥大が 100 mg/kg 投与群 1 匹、300 mg/kg 投与群 6 匹、1000 mg/kg 投与群全例に認められ、300 mg/kg 以上の投与群では、対照群と比較してその発現頻度に有意差 ($p < 0.05$) が認められた。これらのうち、300 mg/kg 投与群 2 匹、1000 mg/kg 投与群 7 匹では肥大の程度が強く、1000 mg/kg 投与群では、対照群と比較してその程度が有意 ($p < 0.01$) に増強された。また、門脈周囲性の肝細胞の脂肪化が対照群 7 匹、30 mg/kg 投与群 12 匹、100 mg/kg 投与群 11 匹、300 mg/kg 投与群 6 匹、1000 mg/kg 投与群 4 匹に、小肉芽腫が対照群 11 匹、30 mg/kg 投与群 10 匹、100 mg/kg 投与群 6 匹、300 mg/kg 投与群 12 匹、1000 mg/kg 投与群 12 匹に認められ、肝細胞の脂肪化の発現頻度が 30 mg/kg 投与群において有意 ($p < 0.05$) に増加し、小肉芽腫の発現頻度が 100 mg/kg 投与群において有意 ($p < 0.05$) に減少したが、これらの変化は、用量依存的な変化ではなかった。そのほかに、出血を伴った限局性壊死が対照群および 1000 mg/kg 投与群各 1 匹、被膜の限局性の肥厚が対照群 1 匹、限局性の線維化が 1000 mg/kg 投与群 1 匹に認められた。

(脾臓)

髄外造血および褐色色素の沈着が全例に認められた。髄外造血は、対照群と比較して 2, 6-DCT 各投与群に程度の強い例が認められたが、その程度および頻度に明らかな差は認められず、褐色色素の沈着は、1000 mg/kg 投与群で対照群と比較して程度の強い例が多く認められたが、対照群と 300 mg/kg 以下の投与群との間に程度の差は認められなかった。

(胸腺)

萎縮が対照群 1 匹、30 mg/kg 投与群 4 匹、100 mg/kg 投与群 1 匹、300 および 1000 mg/kg 投与群各 5 匹に認められ、300 および 1000 mg/kg 投与群では対照群と比較して程度および頻度が増加する傾向が認められた。そのほかに、出血が対照群 4 匹、30 mg/kg 投与群 3 匹、1000 mg/kg 投与群 5 匹に認められ、100 および 300 mg/kg 投与群では出血が認められなかったことから、その発現頻度に対照群と比較して有意差 ($p < 0.05$) が認められた。出血の程度のやや強い 30 mg/kg 投与群の 1 例では内皮細胞の限局性の過形成が認められた。

(副腎)

束状帯の限局性の壊死が対照群の 1 匹に認められた。

(心臓、膀胱、脳)

対照群および 1000 mg/kg 投与群に異常は認められなかった。

(卵巣)

不妊例(対照群 2 匹、300 mg/kg 投与群 4 匹、1000 mg/kg 投与群 2 匹)の卵巣では、300 mg/kg 投与群 1 匹に閉鎖卵胞の増加が認められた。

II. 生殖発生毒性

1. 生殖学的検査所見

1) 交配成績 (Table 24; Appendices 24-1~24-5)

交尾率は、すべての群で100 %を示した。受胎率は、300 mg/kg 投与群で若干低下したが、用量依存的な変化ではなく、対照群との間に有意差も認められなかった。また、同居開始から交尾成立までに要した日数およびその間に回帰した発情期の回数にも、対照群と 2,6-DCT 各投与群との間に有意差は認められなかった。

2) 分娩および哺育状態

分娩状態の直接観察が可能であった動物(対照群: 1 匹、30 mg/kg 投与群: 2 匹、100 mg/kg 投与群: 3 匹、300 mg/kg 投与群: 2 匹、1000 mg/kg 投与群: 2 匹)に、異常分娩は観察されなかった。また、直接観察ができなかった動物に関しては、1000 mg/kg 投与群の 1 匹(動物番号:FB05012)に分娩終了後の観察時に全産児の死亡が確認された。

哺育状態に関しては、300 mg/kg 投与群の 1 匹(動物番号:FB04006)が哺育 1 日から哺育行動(児の回集、授乳)を示さず、その産児は胃内に乳汁の貯留がなく、また、ケージ内に散乱し、体表温低下が認められ、哺育 3 日までにすべてが死亡した。同群の他の 1 匹(動物番号: FB04013)の産児も哺育 3 日に胃内の乳汁貯留がなく、体表温低下が認められたが、哺育 4 日まで生存した。

1000 mg/kg 投与群では、1 匹(動物番号:FB05009)が哺育 2 および 3 日に哺育行動(児の回集)を示さず、その産児は胃内に乳汁の貯留がなく、また、ケージ内に散乱していたが、哺育 4 日まで生存した。同群の他の 1 匹(動物番号: FB05002)は、哺育 1 日までにすべての産児が死亡した。

100 mg/kg 以下の投与群では、哺育状態に異常は認められなかった。

3) 出産率および妊娠期間 (Table 25; Appendices 25-1~25-5)

出産率は、1000 mg/kg 投与群において若干低値を示したが、対照群との間に有意差は認められず、300 mg/kg 以下の投与群では100 %を示した。

妊娠期間については、1000 mg/kg 投与群の1匹 (動物番号:FB05012) に妊娠期間の延長 (24日間) が認められたが、対照群と 2,6-DCT 各投与群との間に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 25; Appendices 25-1~25-5)

黄体数には、対照群と 2,6-DCT 各投与群との間で有意差は認められなかった。

1000 mg/kg 投与群において、着床数が著しく低下した動物が2匹 (動物番号: FB05002 は着床数2、FB05012 は着床数3) 認められたことにより、群平均の着床数および着床率が低下傾向を示したが、対照群との間に有意差は認められなかった。

2. 産児所見

1) 生存性 (Table 25; Appendices 25-1~25-5)

300 mg/kg 投与群では、哺育4日の生児数、新生児生存率が、1000 mg/kg 投与群では、産児数、分娩率、出産生児数、生児出産率、出生率、哺育4日の生児数および新生児生存率が低下傾向を示したが、対照群との間に統計学的有意差は認められなかった。性比についても対照群との間で有意差は認められなかった。

以下に、哺育4日までの死亡児数を示した。

投与量 (mg/kg)	2,6-DCT				
	0	30	100	300	1000
哺育0日	1 [1]	2 [2]	3 [1]	2 [1]	2 [2]
哺育1日	1 [1]	0 [0]	0 [0]	2 [2]	17 [3]
哺育2日	0 [0]	1 [1]	4 [3]	10 [2]	3 [3]
哺育3日	0 [0]	0 [0]	1 [1]	6 [3]	0 [0]
哺育4日	0 [0]	0 [0]	0 [0]	1 [1]	0 [0]
合計	2 [2]	3 [3]	8 [5]	21 [3]	22 [5]

[]内は、腹数を示す。

2) 体重 (Table 26; Appendices 26-1~26-5)

1000 mg/kg 投与群において、哺育4日の体重が雌雄ともに低下傾向を示したが、対照群との間に有意差は認められなかった。

3) 形態 (Tables 27, 28)

出生日の生存産児に外表奇形は認められず、哺育4日における産児の剖検でも、外表および内臓に異常は認められなかった。また、観察可能であった死亡児にも異常は認められなかった。

【 考 察 】

2,6-DCT の 0、30、100、300 あるいは 1000 mg/kg を Sprague-Dawley 系 (Crj: CD) ラットの雌雄に交配前 2 週間および交配期間 2 週間を通して経口投与し、さらに雄では交配期間終了後 2 週間、雌では妊娠期間を通して分娩後哺育 3 日まで投与を継続して、親動物に対する反復投与毒性およびその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。

1. 反復投与毒性

雌雄ともに、1000 mg/kg 投与群において、自発運動減少、腹臥位などの活動性の低下が、さらに雌では半眼も観察された。2,6-DCT の基本骨格であるトルエンは、中枢神経に対する抑制作用を有している⁹⁾ことから、上記の変化は、2,6-DCT の投与に起因した変化と考えられる。さらに、雄の 300 mg/kg 投与群においても、1 匹のみであったが自発運動減少が観察され、1000 mg/kg 投与群に観察された自発運動減少と同様の変化であり、また、100 mg/kg 以下の投与群では自発運動減少は認められていないことから、この変化も、軽度ではあるが 2,6-DCT 投与に起因したものと考えられる。なお、雌雄ともに 300 mg/kg 以上の投与群で流涎が観察されたが、一過性の変化であり、また、投与直前に流涎を示す動物も認められていることから、毒性学的意義は少なく、2,6-DCT の刺激性によるものと考えられる。

体重に関しては、雄では投与開始からの増加量が、300 mg/kg 投与群では投与15日以降36日まで、1000 mg/kg 投与群では投与 8 日以降42日まで、それぞれ継続して有意に抑制された。一方、30 mg/kg 投与群では投与開始から15日の増加量が有意な低値を示したが、一時的な変化であり、100 mg/kg 投与群ではいずれの時期にも有意差は認められていないことから 30 mg/kg 投与群で認められた変化は、偶発的なものと考えられる。雌では、投与期間を通じて明瞭な用量依存の関係は認められなかったが、1000 mg/kg 投与群において、交配前、妊娠期の増加量が有意に抑制された。摂餌量については、雄では明らかな変化は認められなかったが、雌では、体重増加量にほぼ対応して低下傾向を示した。

解剖時検査において、雄では、肝臓の比体重値が 1000 mg/kg 投与群において有意に増加した。肝臓の組織所見では、300 mg/kg 以上の投与群で小葉中心性の肝細胞の肥大の発現頻度が有意に増加し、さらに、同所見がみられた雄では、肝細胞の曇りガラス様変性も

認められた。一般に、曇りガラス様変性は、薬物代謝酵素が誘導された時に観察される変化であり、2,6-DCT 投与により誘導された薬物代謝酵素に起因した変化と考えられる。また、腎臓の比体重値が 300 mg/kg 以上の投与群で有意に増加し、組織所見では、eosinophilic body の程度および頻度が 100 mg/kg 以上の投与群において有意に増加した。雌では、肝臓の比体重値が 1000 mg/kg 投与群において有意に増加し、組織所見では、小葉中心性の肝細胞の肥大の発現頻度が300 mg/kg 以上の投与群で有意に増加した。腎臓の比体重値が 1000 mg/kg 投与群で有意に増加し、組織所見では、近位尿細管に空胞変性が 300 mg/kg 以上の投与群で認められた。これらのほかに、雌の 300 mg/kg 以上の投与群において胸腺重量が低下傾向を示し、組織所見でも萎縮した例の程度および頻度が増加傾向を示した。1000 mg/kg 投与群では、脾臓に褐色色素の沈着の程度の強い例が増加する傾向を示した。なお、1000 mg/kg 投与群の雄において、限局性の精細管の萎縮が認められた例が有意に増加したが、程度に有意差は認められていないこと、この変化は自然発生的にしばしば認められる変化であることから、2,6-DCT 投与に起因した変化ではないと考えられる。

雄の血液生化学的検査では、グルコース濃度の減少が 300 mg/kg 以上の投与群で認められた。300 mg/kg 以上の投与群では、体重の増加抑制、肝障害が認められていることから、2,6-DCT 投与の影響を示唆する変化と考えられる。また、300 mg/kg 以上の投与群ではアルブミン濃度が上昇 (3.1 g/dL) したが、総蛋白濃度には変化は認められず、また、正常値の変動範囲内 (過去 6 併合試験の対照群の平均値: 2.8~3.1 g/dL) にあることから、この変化は偶発的なものと考えられ、毒性学的意義は少ないと考えられる。雄の血液学的検査では、2,6-DCT 各投与群において白血球数が減少 (5700~6400/mm³) したが、百分比には変化は認められず、用量に依存した変化でもなく、さらに、正常値の変動範囲内 (過去 6 併合試験の対照群の平均値: 5700~11600/mm³) にあることから、偶発的变化と考えられる。

以上のことから、雄では、2,6-DCT の 300 mg/kg 以上の投与は、活動性低下などの中枢抑制作用を惹起し、体重増加および肝臓に影響を及ぼすものと考えられ、100 mg/kg 以上の投与で腎臓に影響を及ぼすものと考えられる。一方、雌では、1000 mg/kg の投与で活動性低下などの中枢抑制作用を惹起し、また、体重増加および摂餌量に影響を及ぼし、さらに、300 mg/kg 以上の投与で肝臓、腎臓および胸腺に影響を及ぼすものと考えられる。

2. 生殖発生毒性

交尾能力および受胎能力に 2,6-DCT 投与の影響は認められなかった。300 mg/kg 投与群の 1 匹、1000 mg/kg 投与群の 2 匹の母動物に全産児が死亡した例が認められ、これに起因して、300 mg/kg 以上の投与群では死亡児数が増加し、産児の生存性が低下した。なお、全産児が死亡した例のうち、分娩状態の直接観察ができなかった 1000 mg/kg 投与群の 1 例は妊娠24日に分娩した。しかし、同群の他の動物は妊娠22～23日に正常に分娩していることから、分娩遅延は、この動物の胎児が 1 匹（着床数：3）であることに起因した分娩刺激の減弱によるものと考えられ、2,6-DCT 投与の影響ではないと考えられる。また、1000 mg/kg 投与群では、哺育4日の体重に低下傾向が認められたが、産児の形態異常は、いずれの 2,6-DCT 投与群においても観察されなかった。したがって、2,6-DCT の 300 mg/kg 以上の投与は、母動物の哺育状態の不良に起因して産児の生存性に影響を及ぼし、1000 mg/kg の投与では、催奇形性は認められないものの、産児の発育に軽度な影響を及ぼすものと考えられる。

3. 無影響量

以上の成績から、本試験条件下では、2,6-DCT の反復投与毒性に関する無影響量は、雄に対しては、100 mg/kg 以上の投与群において腎臓に影響が認められたことから、30 mg/kg/day、雌に対しては、300 mg/kg 以上の投与群で肝臓、腎臓および胸腺に影響が認められたことから、100 mg/kg/day と推定される。一方、生殖発生毒性に関する無影響量は、雄に対しては、1000 mg/kg までの投与で異常は認められなかったことから、1000 mg/kg/day、雌に対しては、300 mg/kg 以上の投与群で哺育状態の不良により産児の生存性が低下したことから、100 mg/kg/day、産児に対しては、1000 mg/kg 投与群において発育に影響が認められたことから、300 mg/kg/day と考えられる。

【 文 献 】

- 1) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室：化学物質毒性試験報告、化学物質点検推進委員会、東京（1994）
- 2) Salewski, E.: Färbemethode zum makroskopischen Nachweis von Implantationsstellen am Uterus der Ratte. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 247: 367 (1964)
- 3) 西村秀雄：胎児科学、雄鶏社、東京（1976）pp. 115-117
- 4) 丹後俊郎：医学への統計学（古川俊之 監修）、朝倉書店、東京（1985）
- 5) 佐久間 昭：薬効評価－計画と解析、東大出版会、東京（1977）
- 6) Dunnett, C.W.: New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491 (1964)
- 7) Scheffé, H.: A method for judging all contrasts in the analysis of variance. Biometrika. 40: 87-104 (1953)
- 8) Kruskal, W.H. and Wallis, W.A.: Use of ranks in one-criterion variance analysis. J. Amer. Statist. Assoc. 47: 583-621 (1952)
- 9) 田所作太郎：有機溶剤の中樞作用、浦口健二編「トキシコロジー」、地人書館、東京（1978）pp. 296-306

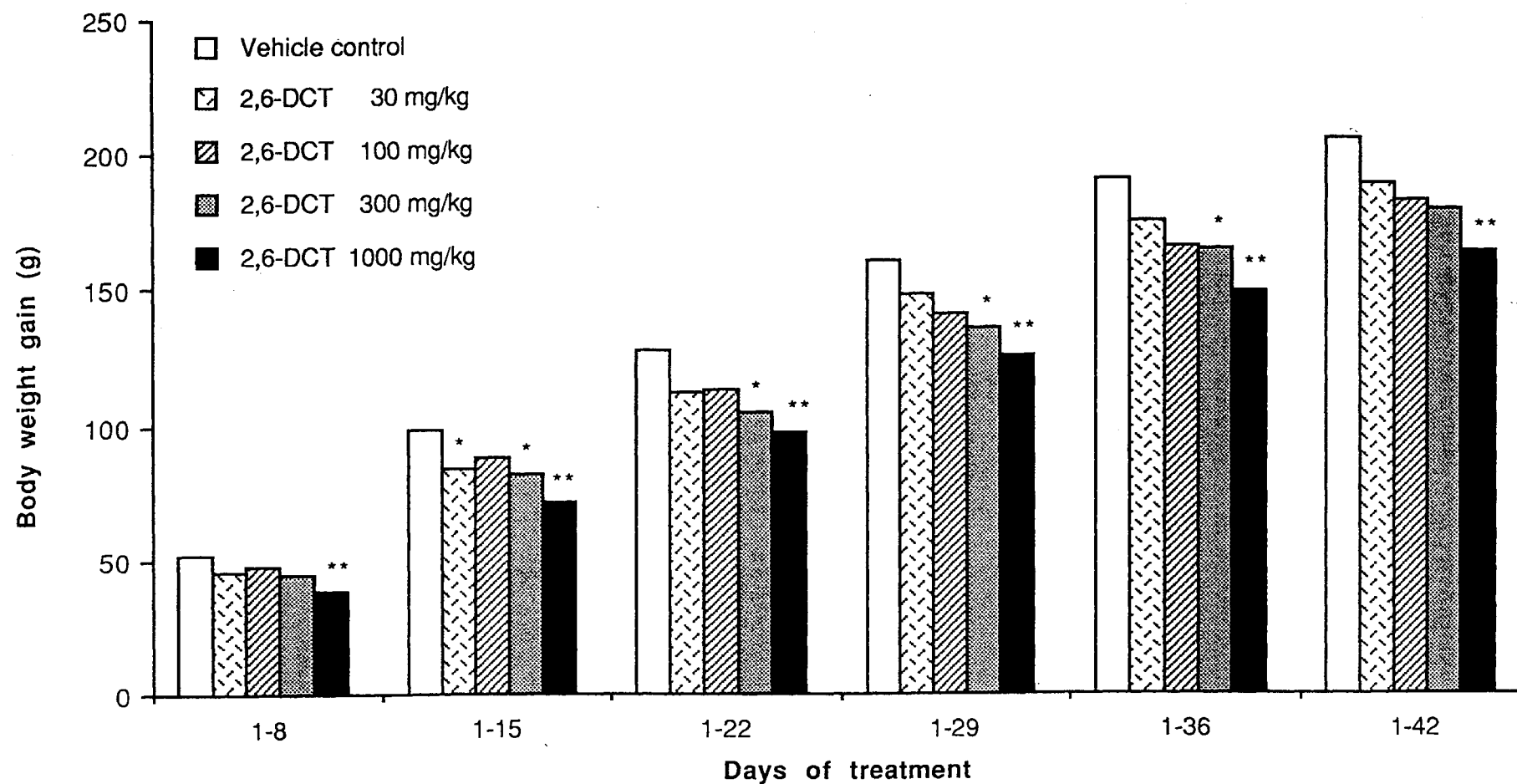


Fig. 1

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats
Body weight gain of Fo males

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

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

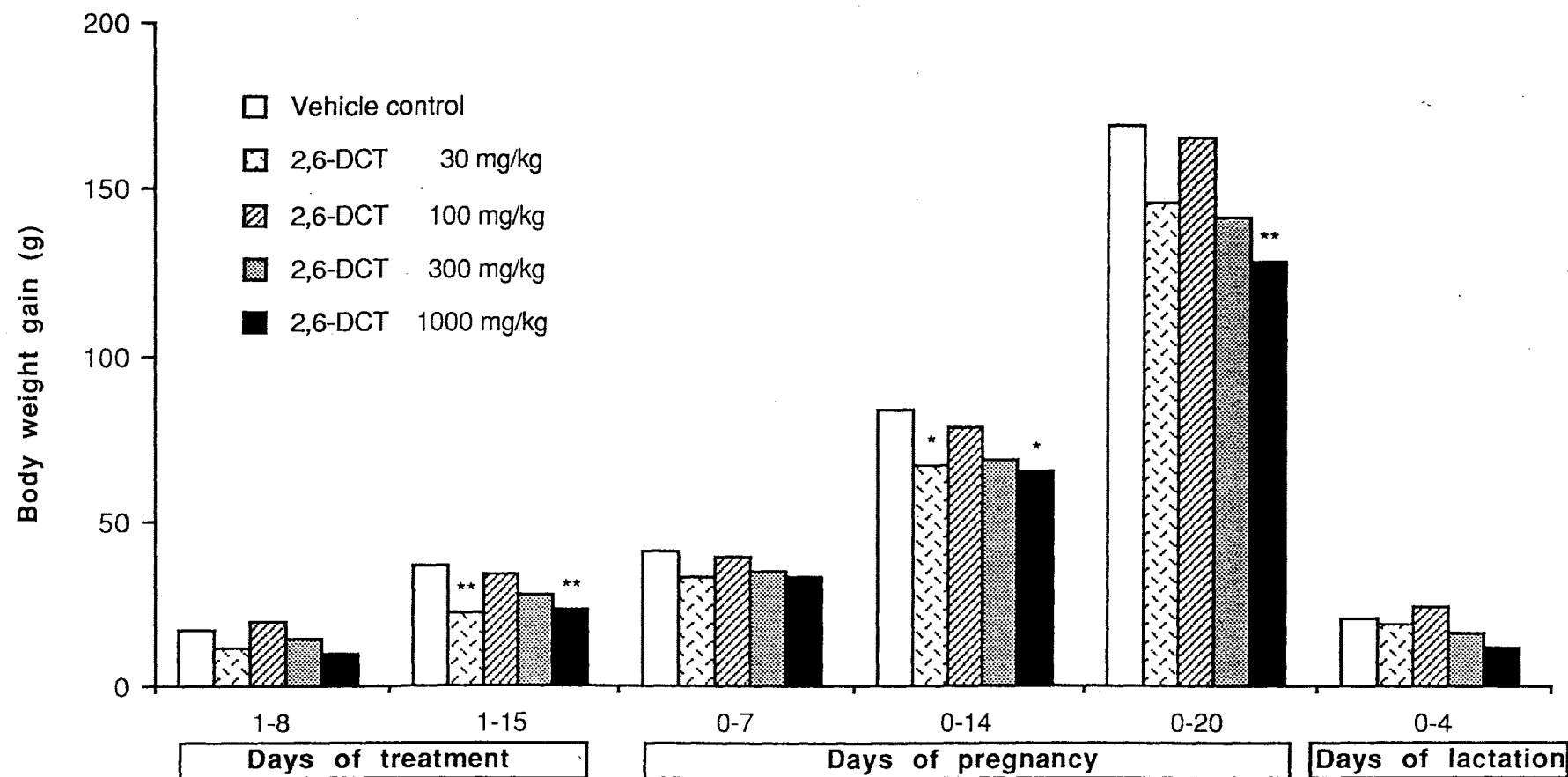


Fig. 2

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats
Body weight gain of Fo females

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

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

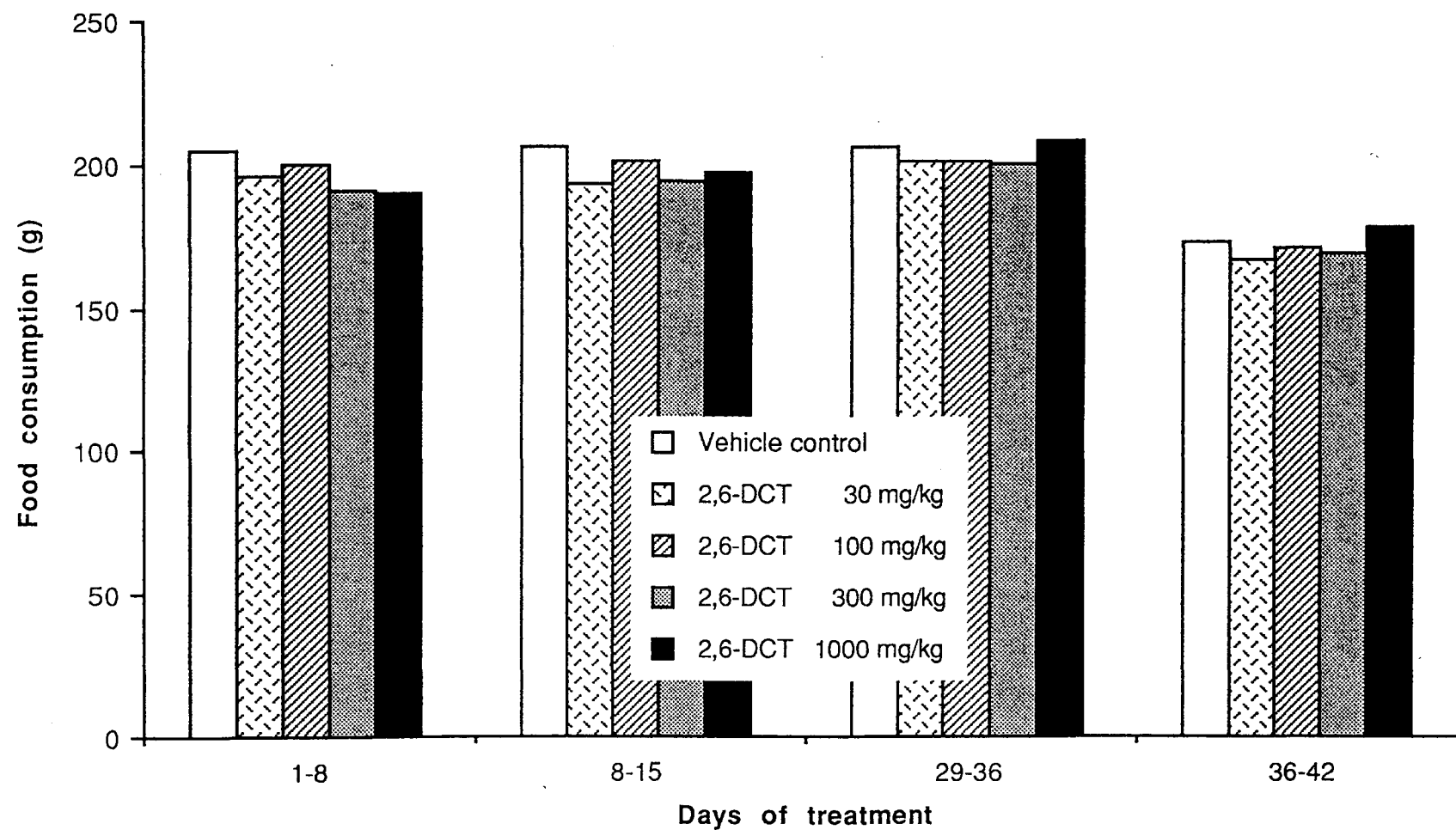


Fig. 3
2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats
Food consumption of Fo males

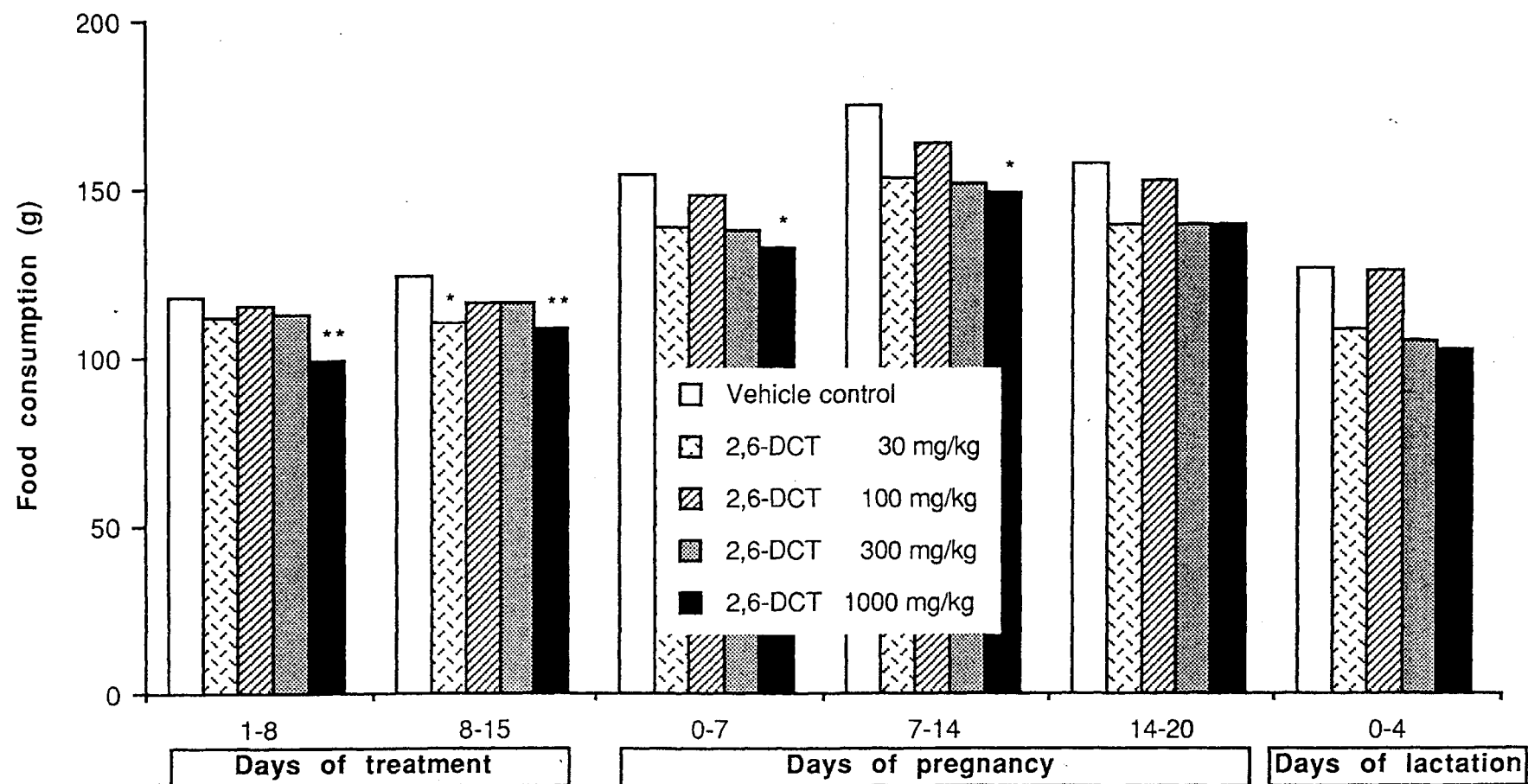


Fig. 4

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats
Food consumption of Fo females

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

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

【TABLE INDEX】

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test
of 2,6-dichlorotoluene in rats

TABLES	(APPENDICES)	TABLE TITLE
1	(1-1~ 1-5)	Clinical signs of F ₀ males
2	(2-1~ 2-5)	Clinical signs of F ₀ females
3	(3-1~ 3-5)	Body weight of F ₀ males
4	(4-1~ 4-5)	Body weight gain of F ₀ males
5	(5-1~ 5-5)	Body weight of F ₀ females during pre mating period
6	(6-1~ 6-5)	Body weight gain of F ₀ females during pre mating period
7	(7-1~ 7-5)	Body weight of F ₀ females during pregnancy period
8	(8-1~ 8-5)	Body weight gain of F ₀ females during pregnancy period
9	(9-1~ 9-5)	Body weight of F ₀ females during lactation period
10	(10-1~10-5)	Body weight gain of F ₀ females during lactation period
11	(11-1~11-5)	Food consumption of F ₀ males
12	(12-1~12-5)	Food consumption of F ₀ females during pre mating period
13	(13-1~13-5)	Food consumption of F ₀ females during pregnancy period
14	(14-1~14-5)	Food consumption of F ₀ females during lactation period
15	(15-1~15-5)	Urinalysis findings of F ₀ females on day 20 of pregnancy and day 2 of lactation
16	(16-1~16-5)	Hematological findings of F ₀ males after oral administration for 42 days
17	(17-1~17-5)	Biochemical findings of F ₀ males after oral administration for 42 days
18	(18-1~18-5)	Summary of macroscopic findings in F ₀ males after oral administration for 42 days
19	(19-1~19-5)	Absolute and relative organ weight of F ₀ males after oral administration for 42 days
20	(20-1~20-5)	Summary of histopathological findings in F ₀ males after oral administration for 42 days
21	(21-1~21-5)	Summary of macroscopic findings in F ₀ females
22-1	(22-1~22-5)	Absolute and relative organ weight of F ₀ females on day 4 of lactation
22-2		Absolute and relative organ weight of F ₀ females; Organ weight of animals sacrificed on the way of test period
23	(23-1~23-5)	Summary of histopathological findings in F ₀ females
24	(24-1~24-5)	Reproductive performance of F ₀ animals
25	(25-1~25-5)	Development of F ₁ pups up to day 4 of lactation
26	(26-1~26-5)	Body weight of F ₁ pups up to day 4 of lactation
27		Morphological findings in F ₁ pups on day 4 of lactation
28		Morphological findings in F ₁ dead pups

Table 1

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Clinical signs of F₁ males

Clinical signs	Group	No. of animals examined	No. of animals showing clinical signs							Total
			1~ 7 ^a	8~ 14	15~ 21	22~ 28	29~ 35	36~ 42	43	
Salivation after dosing	0 mg/kg ^b	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	30 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	100 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg	13	8	12	12	11	13	13	0	13
	1000 mg/kg	13	13	13	13	13	13	13	0	13
Decrease in locomotor activity	0 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	30 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	100 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg	13	1	0	0	0	0	0	0	1
	1000 mg/kg	13	4	6	5	5	5	6	6	9
Prone position	0 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	30 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	100 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	1000 mg/kg	13	2	0	0	0	0	0	0	2
Reddish tear	0 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	30 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	100 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	1000 mg/kg	13	1	0	0	0	0	0	0	1

a: days of treatment

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

Table 2

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Clinical signs of F₁ females

Clinical signs	Group	No. of animals examined	No. of animals showing clinical signs							Total
			1~ 7 ^a	8~ 14	15~ 21	22~ 28	29~ 35	36~ 42	43~	
Salivation after dosing	0 mg/kg ^b	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	30 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	100 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg	13	2	9	7	7	8	8	4	13
	1000 mg/kg	13	13	13	13	13	13	13	9	13
Decrease in locomotor activity	0 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	30 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	100 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	1000 mg/kg	13	13	7	6	7	5	5	1	13
Incomplete eyelid opening	0 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	30 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	100 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	1000 mg/kg	13	6	1	0	0	0	0	0	6
Prone position	0 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	30 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	100 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	1000 mg/kg	13	10	0	0	0	0	0	0	10

a: days of treatment

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

Table 2 (continued)

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Clinical signs of F₁ females

Clinical signs	Group	No. of animals examined	No. of animals showing clinical signs							Total
			1~ 7 ^a	8~ 14	15~ 21	22~ 28	29~ 35	36~ 42	43~	
Piloerection	0 mg/kg ^b	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	30 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	100 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	1000 mg/kg	13	1	0	0	0	0	0	0	1
Emaciation	0 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	30 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	100 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg	13	0	0	0	0	0	1	1	1
	1000 mg/kg	13	0	0	0	0	0	1	0	1
No retrieving of pups	0 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	30 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	100 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	300 mg/kg	13	0	0	0	0	0	1	0	1
	1000 mg/kg	13	0	0	0	0	0	1	0	1

a: days of treatment

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

Table 3

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

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

Compound	2,6-DCT				
	0 ^{a)}	30	100	300	1000
Days of treatment					
1 (Initial weight)	340.0 $\pm$ 12.8 (13)	332.1 $\pm$ 12.5 (13)	335.9 $\pm$ 10.6 (13)	330.6 $\pm$ 11.5 (13)	333.1 $\pm$ 14.9 (13)
8	392.3 $\pm$ 18.2 (13)	377.6 $\pm$ 17.5 (13)	383.2 $\pm$ 18.2 (13)	374.7 $\pm$ 16.6 (13)	371.7 $\pm$ 21.5 (13)
15	439.0 $\pm$ 21.6 (13)	415.7 $\pm$ 22.7* (13)	423.9 $\pm$ 22.8 (13)	412.2 $\pm$ 22.6* (13)	404.4 $\pm$ 27.7** (13)
22	467.1 $\pm$ 26.9 (13)	444.0 $\pm$ 27.3 (13)	448.5 $\pm$ 26.8 (13)	435.0 $\pm$ 24.3* (13)	430.3 $\pm$ 32.0** (13)
29	500.3 $\pm$ 28.8 (13)	480.4 $\pm$ 31.9 (13)	477.0 $\pm$ 31.8 (13)	466.0 $\pm$ 27.7* (13)	458.7 $\pm$ 33.3** (13)
36	530.4 $\pm$ 32.6 (13)	507.7 $\pm$ 34.0 (13)	502.2 $\pm$ 33.9 (13)	495.4 $\pm$ 33.4* (13)	482.8 $\pm$ 38.0** (13)
42	545.2 $\pm$ 34.8 (13)	521.1 $\pm$ 38.4 (13)	518.9 $\pm$ 35.6 (13)	510.4 $\pm$ 36.2 (13)	496.5 $\pm$ 38.8** (13)

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

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

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

Table 4

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

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

Compound	2,6-DCT				
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}	30	100	300	1000
Days of treatment					
1~ 8	52.3 $\pm$ 6.8 (13)	45.5 $\pm$ 8.6 (13)	47.3 $\pm$ 9.4 (13)	44.1 $\pm$ 8.1 (13)	38.6 $\pm$ 9.1** (13)
1~ 15	99.0 $\pm$ 11.3 (13)	83.6 $\pm$ 14.2* (13)	88.0 $\pm$ 15.7 (13)	81.6 $\pm$ 14.3* (13)	71.3 $\pm$ 17.5** (13)
1~ 22	127.1 $\pm$ 17.3 (13)	111.9 $\pm$ 17.8 (13)	112.6 $\pm$ 20.5 (13)	104.4 $\pm$ 16.4* (13)	97.2 $\pm$ 21.3** (13)
1~ 29	160.3 $\pm$ 20.5 (13)	148.3 $\pm$ 21.7 (13)	141.1 $\pm$ 25.8 (13)	135.4 $\pm$ 19.6* (13)	125.6 $\pm$ 22.0** (13)
1~ 36	190.4 $\pm$ 24.3 (13)	175.6 $\pm$ 24.6 (13)	166.4 $\pm$ 27.9 (13)	164.8 $\pm$ 24.7* (13)	149.7 $\pm$ 27.3** (13)
1~ 42	205.2 $\pm$ 26.2 (13)	189.0 $\pm$ 28.8 (13)	183.0 $\pm$ 29.9 (13)	179.8 $\pm$ 27.6 (13)	163.4 $\pm$ 28.5** (13)

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

* : significant difference from control, $p < 0.05$ (by multiple comparisons)** : significant difference from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)

Table 5

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

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

Compound	2,6-DCT				
	0 ^{a)}	30	100	300	1000
Dose group (mg/kg)					
Days of treatment					
1 (Initial weight)	226.7 $\pm$ 7.7 (13)	226.5 $\pm$ 7.9 (13)	226.9 $\pm$ 8.7 (13)	226.8 $\pm$ 7.5 (13)	226.7 $\pm$ 7.5 (13)
8	243.8 $\pm$ 12.6 (13)	238.1 $\pm$ 12.6 (13)	246.6 $\pm$ 14.3 (13)	241.0 $\pm$ 8.1 (13)	236.1 $\pm$ 10.5 (13)
15	263.4 $\pm$ 16.4 (13)	248.4 $\pm$ 13.3* (13)	261.0 $\pm$ 17.9 (13)	254.7 $\pm$ 10.8 (13)	249.9 $\pm$ 11.5 (13)
22	310.5 (1)	296.5 (2)			282.0 (2)

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

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

Table 6

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

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

Compound	2,6-DCT									
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}		30		100		300		1000	
Days of treatment										
1~ 8	17.1 ± 9.4	(13)	11.5 ± 8.3	(13)	19.8 ± 8.5	(13)	14.3 ± 7.2	(13)	9.4 ± 6.0	(13)
1~ 15	36.7 ± 12.8	(13)	21.9 ± 7.6**	(13)	34.1 ± 10.2	(13)	27.9 ± 6.2	(13)	23.2 ± 6.8**	(13)
1~ 22	80.8	(1)	68.9	(2)					51.4	(2)

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

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

Table 7

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

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

Compound	2,6-DCT				
	0 ^{a)}	30	100	300	1000
Days of pregnancy					
0	268.4 $\pm$ 19.9 (11)	265.1 $\pm$ 19.9 (13)	272.7 $\pm$ 19.1 (12)	258.4 $\pm$ 7.3 (9)	258.4 $\pm$ 14.8 (11)
7	309.0 $\pm$ 20.9 (11)	298.1 $\pm$ 19.5 (13)	311.4 $\pm$ 20.2 (12)	293.2 $\pm$ 10.4 (9)	291.3 $\pm$ 15.2 (11)
14	351.9 $\pm$ 31.1 (11)	331.4 $\pm$ 20.5 (13)	351.4 $\pm$ 22.1 (12)	326.7 $\pm$ 8.7 (9)	323.4 $\pm$ 16.0 (11)
20	437.5 $\pm$ 43.6 (11)	410.8 $\pm$ 27.1 (13)	437.6 $\pm$ 31.0 (12)	400.0 $\pm$ 17.7 (9)	386.4 $\pm$ 29.2* (11)

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

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

Table 8

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

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

Compound	2,6-DCT				
	0 ^{a)}	30	100	300	1000
Days of pregnancy					
0~ 7	40.6 $\pm$ 7.2 (11)	33.0 $\pm$ 8.8 (13)	38.7 $\pm$ 7.1 (12)	34.8 $\pm$ 6.7 (9)	32.9 $\pm$ 7.0 (11)
0~ 14	83.5 $\pm$ 16.8 (11)	66.3 $\pm$ 13.1* (13)	78.6 $\pm$ 12.8 (12)	68.3 $\pm$ 7.5 (9)	65.0 $\pm$ 7.1* (11)
0~ 20	169.1 $\pm$ 28.5 (11)	145.6 $\pm$ 17.8 (13)	164.9 $\pm$ 23.1 (12)	141.6 $\pm$ 20.5 (9)	128.0 $\pm$ 23.4** (11)

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

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

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

Table 9

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

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

Compound	2,6-DCT				
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}	30	100	300	1000
Days of lactation					
0	322.7 ± 39.3 (11)	305.9 ± 24.2 (13)	320.9 ± 31.1 (12)	291.5 ± 30.8 (9)	296.7 ± 21.9 (10)
4	343.4 ± 34.2 (11)	324.3 ± 27.2 (13)	344.5 ± 27.0 (12)	313.1 ± 30.5 (8)	306.8 ± 20.2 (9)

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

Table 10

2,6-DCT: 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	2,6-DCT				
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}	30	100	300	1000
Days of lactation					
0~ 4	20.6 ± 14.6 (11)	18.5 ± 16.8 (13)	23.6 ± 17.0 (12)	16.4 ± 20.0 (8)	11.8 ± 18.1 (9)

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

Table 11

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Food consumption of F₁ males (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	2,6-DCT				
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}	30	100	300	1000
Days of treatment					
1~ 8	204.5 ± 18.0 (13)	195.5 ± 16.1 (13)	199.5 ± 21.0 (13)	190.9 ± 19.9 (13)	189.9 ± 15.5 (13)
8~ 15	205.7 ± 19.5 (13)	192.8 ± 16.0 (13)	201.1 ± 19.7 (13)	193.4 ± 21.1 (13)	197.0 ± 18.6 (13)
29~ 36	206.3 ± 24.6 (13)	200.7 ± 17.9 (13)	200.6 ± 18.7 (13)	199.9 ± 20.9 (13)	208.2 ± 25.1 (13)
36~ 42	173.1 ± 21.5 (13)	166.7 ± 18.1 (13)	170.3 ± 16.2 (13)	168.3 ± 18.2 (13)	177.3 ± 20.1 (13)

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

Table 12

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Food consumption of F₁ females during premating period (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	2,6-DCT				
	0 ^{a)}	30	100	300	1000
Dose group (mg/kg)					
Days of treatment					
1~ 8	118.3 $\pm$ 13.4 (13)	112.3 $\pm$ 9.4 (13)	115.4 $\pm$ 11.2 (13)	112.8 $\pm$ 8.9 (13)	99.3 $\pm$ 8.3** (13)
8~ 15	124.3 $\pm$ 14.8 (13)	110.0 $\pm$ 9.0* (13)	116.1 $\pm$ 14.0 (13)	116.8 $\pm$ 11.6 (13)	109.0 $\pm$ 6.1** (13)

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

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

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

Table 13

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Food consumption of F₁ females during pregnancy period (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	2,6-DCT				
	0 ^{a)}	30	100	300	1000
Days of pregnancy					
0~ 7	154.4 $\pm$ 14.4 (11)	139.1 $\pm$ 14.2 (13)	148.5 $\pm$ 13.1 (12)	137.5 $\pm$ 14.3 (9)	133.1 $\pm$ 10.5* (11)
7~ 14	175.0 $\pm$ 22.1 (11)	153.5 $\pm$ 18.4 (13)	164.2 $\pm$ 14.9 (12)	151.6 $\pm$ 11.9 (9)	149.1 $\pm$ 12.4* (11)
14~ 20	157.8 $\pm$ 23.3 (11)	139.5 $\pm$ 15.3 (13)	153.0 $\pm$ 16.5 (12)	139.9 $\pm$ 12.8 (9)	139.8 $\pm$ 11.7 (11)

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

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

Table 14

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Food consumption of F₁ females during lactation period (g); mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	2,6-DCT				
Dose group (mg/kg)	0 ^{a)}	30	100	300	1000
Days of lactation					
0~ 4	126.3 ± 15.1 (11)	108.6 ± 30.4 (13)	126.1 ± 19.7 (12)	105.5 ± 41.6 (8)	102.4 ± 35.7 (9)

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

Table 15

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats
 Urinalysis findings of F₀ females on day 20 of pregnancy and day 2 of lactation

Compound		2,6-DCT				
Dose group (mg/kg)		0 ^a	30	100	300	1000
Day 20 of pregnancy	No. of animals examined	11	13	12	9	10
	pH					
	6.0	1	1	2	0	1
	6.5	0	0	1	1	0
	7.0	6	3	2	2	3
	7.5	3	3	6	3	3
	8.0	1	5	1	2	2
	8.5	0	1	0	1	1
	Protein					
	—	4	5	5	6	5
	±	5	2	3	2	3
	+	2	6	4	1	2
	Glucose					
	—	11	13	12	9	10
	Ketone					
	—	9	12	11	9	10
	±	2	1	1	0	0
	+	0	0	0	0	0
	Bilirubin					
	—	9	11	12	9	9
	+	2	2	0	0	1
	Occult blood					
	—	11	13	12	9	9
	+	0	0	0	0	1
	Urobilinogen					
	±	2	1	1	5	5
	+	9	12	11	4	5
Day 2 of lactation	No. of animals examined	10	11	11	5	5
	pH					
	6.0	3	0	1	1	1
	6.5	0	2	4	1	1
	7.0	0	2	3	2	0
	7.5	3	2	2	0	0
	8.0	1	1	0	1	0
	8.5	3	4	1	0	3
	Protein					
	—	2	2	2	1	0
	±	1	0	2	3	0
	+	7	9	6	1	5
	++	0	0	1	0	0
	Glucose					
	—	10	11	11	5	5
	Ketone					
	—	1	1	1	1	1
	±	2	0	3	2	1
	+	4	9	7	2	3
	++	3	0	0	0	0
	+++	0	1	0	0	0
	Bilirubin					
	—	7	9	10	5	2
	+	3	2	1	0	3
	Occult blood					
	—	10	11	10	5	5
	++	0	0	1	0	0
	Urobilinogen					
	+	7	10	11	5	5
	++	3	1	0	0	0

Protein —: Negative, ±: trace, +: 30 mg/dl, ++: 100 mg/dl
 Glucose —: Negative
 Ketone —: Negative, ±: 5 mg/dl, +: 15 mg/dl, ++: 40 mg/dl, +++: 80 mg/dl
 Bilirubin —: Negative, +: slight
 Occult blood —: Negative, +: slight, ++: Moderate
 Urobilinogen —: Negative, ±: 0.1 EU/dl, +: 1.0 EU/dl, ++: 2.0 EU/dl

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

Table 16

2.6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Hematological findings of Po males after oral administration for 42 days

Dose (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	(13) 802 ± 40	(13) 15.3 ± 0.7	(13) 46.0 ± 1.9	(13) 57.5 ± 2.2	(13) 19.1 ± 0.8	(13) 33.3 ± 0.4	(13) 106.6 ± 11.0
30	(13) 822 ± 37	(13) 15.5 ± 0.4	(13) 47.4 ± 1.2	(13) 57.7 ± 1.8	(13) 18.8 ± 0.6	(13) 32.7** ± 0.3	(13) 103.4 ± 10.5
100	(13) 819 ± 31	(13) 15.5 ± 0.5	(13) 46.4 ± 1.9	(13) 56.7 ± 1.7	(13) 18.9 ± 0.4	(13) 33.4 ± 0.6	(13) 97.7 ± 11.3
300	(13) 805 ± 25	(13) 15.5 ± 0.3	(13) 46.1 ± 1.1	(13) 57.3 ± 1.2	(13) 19.3 ± 0.4	(13) 33.7* ± 0.3	(13) 101.2 ± 8.2
1000	(13) 809 ± 36	(13) 15.4 ± 0.6	(13) 46.6 ± 1.5	(13) 57.7 ± 1.3	(13) 19.1 ± 0.5	(13) 33.2 ± 0.5	(13) 107.5 ± 10.0

Dose (mg/kg)	W B C ($\times 100/\text{mm}^3$)	Band neutrophil (%)	Segmented neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)
0	(13) 81 ± 18	(13) 0 ± 0	(13) 21 ± 10	(13) 1 ± 1	(13) 0 ± 0	(13) 2 ± 2	(13) 76 ± 11
30	(13) 60** ± 15	(13) 0 ± 0	(13) 23 ± 8	(13) 2 ± 1	(13) 0 ± 0	(13) 2 ± 1	(13) 73 ± 7
100	(13) 64* ± 15	(13) 0 ± 1	(13) 23 ± 9	(13) 1 ± 3	(13) 0 ± 0	(13) 1 ± 1	(13) 74 ± 8
300	(13) 61** ± 13	(13) 0 ± 0	(13) 25 ± 9	(13) 1 ± 1	(13) 0 ± 0	(13) 2 ± 2	(13) 72 ± 10
1000	(13) 57** ± 16	(13) 0 ± 0	(13) 23 ± 11	(13) 1 ± 1	(13) 0 ± 0	(13) 1 ± 1	(13) 75 ± 10

Parameter, mean $\pm$ S.D.
(), number of animals

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

Table 17

2.6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Biochemical findings of Fo males after oral administration for 42 days

Dose (mg/kg)	Total protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	A/G	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	Total bilirubin (mg/dl)
0	(13) 5.8 ±0.3	(13) 2.9 ±0.1	(13) 1.02 ±0.11	(13) 17 ±2	(13) 0.7 ±0.1	(13) 145 ±18	(13) 53 ±13	(13) 0.08 ±0.01
30	(13) 5.8 ±0.2	(13) 2.9 ±0.1	(13) 1.00 ±0.08	(13) 16 ±2	(13) 0.8 ±0.1	(13) 142 ±16	(13) 45 ±8	(13) 0.08 ±0.02
100	(13) 5.7 ±0.2	(13) 3.0 ±0.1	(13) 1.15* ±0.15	(13) 19 ±8	(13) 0.7 ±0.1	(13) 131 ±12	(13) 47 ±9	(13) 0.08 ±0.03
300	(13) 5.7 ±0.3	(13) 3.1 ±0.2	(13) 1.17** ±0.06	(13) 16 ±3	(13) 0.6 ±0.1	(13) 130* ±13	(13) 52 ±8	(13) 0.08 ±0.02
1000	(13) 5.9 ±0.3	(13) 3.1** ±0.2	(13) 1.13 ±0.10	(13) 17 ±2	(13) 0.7 ±0.1	(13) 125** ±18	(13) 50 ±8	(13) 0.08 ±0.02

Dose (mg/kg)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)	Ca (mg/dl)	Inorg. phos. (mg/dl)	ALP (U/l)	GPT (U/l)	GOT (U/l)	γ-GTP (U/l)
0	(13) 145.7 ±1.0	(13) 3.79 ±0.17	(13) 107.4 ±1.2	(13) 8.7 ±0.3	(13) 5.2 ±0.5	(13) 209 ±41	(13) 25 ±4	(13) 63 ±10	(13) 0 ±0
30	(13) 144.9 ±0.7	(13) 4.08** ±0.12	(13) 107.9 ±1.4	(13) 8.5 ±0.2	(13) 4.7* ±0.5	(13) 200 ±28	(13) 29 ±4	(13) 63 ±6	(13) 0 ±0
100	(13) 145.7 ±1.1	(13) 3.91 ±0.12	(13) 108.4 ±1.7	(13) 8.6 ±0.2	(13) 5.0 ±0.4	(13) 226 ±53	(13) 27 ±4	(13) 59 ±9	(13) 0 ±0
300	(13) 145.6 ±0.8	(13) 4.15** ±0.18	(13) 108.2 ±1.4	(13) 8.6 ±0.3	(13) 5.3 ±0.6	(13) 176 ±40	(13) 24 ±4	(13) 58 ±8	(13) 0 ±0
1000	(13) 145.1 ±0.9	(13) 3.97* ±0.19	(13) 106.8 ±1.4	(13) 8.7 ±0.1	(13) 5.9** ±0.4	(13) 192 ±39	(13) 24 ±5	(13) 63 ±14	(13) 0 ±0

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

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

Table 18

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of macroscopic findings in Fo males after oral administration for 42 days

Group	Control		30 mg/kg		100 mg/kg		300 mg/kg		1000 mg/kg	
Grade	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
(Liver)	[13]		[13]		[13]		[13]		[13]	
Enlargement	13	0	13	0	13	0	13	0	12	1
Accentuated lobular pattern	13	0	13	0	13	0	13	0	12	1
Spot/area, yellowish white /pale color	10	3	10	3	12	1	12	1	13	0
(Thymus)	[13]		[13]		[13]		[13]		[13]	
Dark red color	13	0	12	1	13	0	13	0	13	0
(Lung)	[13]		[13]		[13]		[13]		[13]	
Spot, red	13	0	11	2	13	0	13	0	13	0
Area, brown	13	0	13	0	13	0	13	0	12	1
(Glandular stomach)	[13]		[13]		[13]		[13]		[13]	
Spot, reddish brown, mucosa	13	0	12	1	13	0	13	0	13	0
(Testis)	[13]		[13]		[13]		[13]		[13]	
Small	13	0	13	0	13	0	13	0	12	1

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

Table 19

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Absolute and relative organ weight of F₁ males after oral administration for 42 days

Compound		2,6-DCT				
Dose group (mg/kg)		0 ^{a)}	30	100	300	1000
Terminal body weight	(g)	515.2 ± 33.0 (13)	494.8 ± 37.5 (13)	490.6 ± 33.8 (13)	482.0 ± 34.5 (13)	462.0 ± 37.3** (13)
Liver	(g)	14.85 ± 1.59 ^{b)} 2.88 ± 0.20 ^{c)} (13)	13.68 ± 1.76 (13) 2.76 ± 0.20	13.88 ± 1.16 (13) 2.83 ± 0.18	14.47 ± 1.46 (13) 3.00 ± 0.16	15.71 ± 2.03 (13) 3.39 ± 0.24**
Kidneys	(g)	3.21 ± 0.29 (13) 0.62 ± 0.04	2.99 ± 0.24 (13) 0.61 ± 0.04	3.07 ± 0.17 (13) 0.63 ± 0.04	3.24 ± 0.27 (13) 0.67 ± 0.04*	3.50 ± 0.42 (13) 0.76 ± 0.06**
Thymus	(mg)	342.5 ± 78.6 (13) 66.3 ± 13.9	320.5 ± 66.3 (13) 65.2 ± 15.1	334.5 ± 65.7 (13) 68.3 ± 13.4	327.1 ± 49.5 (13) 67.9 ± 9.0	345.5 ± 79.5 (13) 75.1 ± 18.5
Testes	(g)	3.41 ± 0.25 (13) 0.66 ± 0.05	3.26 ± 0.23 (13) 0.66 ± 0.04	3.21 ± 0.25 (13) 0.65 ± 0.05	3.24 ± 0.42 (13) 0.67 ± 0.08	3.17 ± 0.35 (13) 0.69 ± 0.09
Epididymides	(g)	1.25 ± 0.11 (13) 0.24 ± 0.03	1.17 ± 0.08 (13) 0.24 ± 0.02	1.19 ± 0.08 (13) 0.25 ± 0.02	1.18 ± 0.11 (13) 0.24 ± 0.02	1.10 ± 0.11** (13) 0.24 ± 0.03

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

b): absolute weight

c): relative weight (g or mg per 100 g body weight)

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

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

Table 20

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of histopathological findings in Fo males after oral administration for 42 days

Group	Control						30 mg/kg						100 mg/kg						300 mg/kg						1000 mg/kg					
Grade	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Kidney)	[13]						[13]						[13]						[13]						[13]					
Eosinophilic body	7	2	1	3	0	6	6	4	2	1	0	7	2	0	4	7	0*	11#	0	1	5	7	0**13#	0	0	1	2	9	1**13#	
Basophilic tubule, cortex	4	7	2	0	0	9	6	7	0	0	0	7	4	5	3	1	0	9	6	7	0	0	0	7	2	6	4	1	0	11
Cast, hyalin	12	0	1	0	0	1	12	1	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1	11	2	0	0	0	2
Cast, granular	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1	12	1	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0	11	2	0	0	0	2
Cellular infiltration,																														
lymphocyte, interstitium	10	2	1	0	0	3	10	2	1	0	0	3	13	0	0	0	0	0	6	7	0	0	0	7	12	1	0	0	0	1
Mineralization, medulla	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0
Fibrosis, focal	12	1	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0
(Liver)	[13]						[13]						[13]						[13]						[13]					
Hypertrophy, hepatocyte,																														
centrilobular	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	9	3	1	0	0	4#	2	6	5	0	0**11#	
Ground glass appearance,																														
hepatocyte, centrilobular	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1	8	3	2	0	0	5#
Fatty change, hepatocyte,																														
periportal	0	0	11	2	0	13	0	0	9	4	0	13	0	0	9	4	0	13	0	0	12	1	0	13	0	3	9	1	0	13
Microgranuloma	0	10	3	0	0	13	0	13	0	0	0	13	0	10	3	0	0	13	0	12	1	0	0	13	0	12	1	0	0	13
Necrosis, focal	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1
Degeneration, fatty,																														
hepatocyte, focal	12	0	1	0	0	1	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0
(Testis)	[13]						[13]						[13]						[13]						[13]					
Atrophy, seminiferous tubule,																														
focal	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1	11	1	1	0	0	2	9	1	2	1	0	4#
(Epididymis)	[13]						[0]						[0]						[0]						[13]					
Cell debris, tubular lumen	13	0	0	0	0	0																			10	2	1	0	0	3
Cellular infiltration,																														
lymphocyte, interstitium	12	1	0	0	0	1																			12	0	1	0	0	1
Spermatic granuloma	12	0	1	0	0	1																			12	0	1	0	0	1
(Spleen)	[13]						[0]						[0]						[0]						[13]					
Hematopoiesis, extramedullary	0	2	11	0	0	13																			0	3	9	1	0	13
Deposit, pigment	0	6	7	0	0	13																			0	0	13	0	0	13
(Heart)	[13]						[0]						[0]						[0]						[13]					
Degeneration,																														
myocardium, focal	12	1	0	0	0	1																			12	0	1	0	0	1
Hemorrhage	13	0	0	0	0	0																			12	1	0	0	0	1
(Thymus)	[13]						[0]						[0]						[0]						[13]					
Hemorrhage	12	1	0	0	0	1																			11	2	0	0	0	2
(Brain)	[13]						[0]						[0]						[0]						[13]					
Abnormality	13	0	0	0	0	0																			13	0	0	0	0	0
(Adrenal gland)	[13]						[0]						[0]						[0]						[13]					
Abnormality	13	0	0	0	0	0																			13	0	0	0	0	0
(Urinary bladder)	[13]						[0]						[0]						[0]						[13]					
Abnormality	13	0	0	0	0	0																			13	0	0	0	0	0

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

[], Number of animals examined

*, Significantly different from control p<0.05 (Mann-Whitney U test)

**, Significantly different from control p<0.01 (Mann-Whitney U test)

#, Significantly different from control p<0.05 (Fisher exact test)

Table 21

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of macroscopic findings in Fo females

Group	Control		30 mg/kg		100 mg/kg		300 mg/kg		1000 mg/kg	
Grade	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
(Liver)	[13]		[13]		[13]		[13]		[13]	
Dark color	13	0	13	0	13	0	13	0	12	1
Spot, yellowish white										
/pale color	13	0	12	1	13	0	11	2	13	0
Spot, white	13	0	13	0	13	0	13	0	12	1
(Kidney)	[13]		[13]		[13]		[13]		[13]	
Pale color	13	0	12	1	12	1	13	0	12	1
Red color, medulla	13	0	13	0	13	0	13	0	12	1
(Thymus)	[13]		[13]		[13]		[13]		[13]	
Spot, red	11	2	11	2	13	0	13	0	12	1
Small	13	0	13	0	13	0	11	2	9	4
(Spleen)	[13]		[13]		[13]		[13]		[13]	
Small	13	0	13	0	13	0	13	0	12	1
(Mediastinal lymph node)	[13]		[13]		[13]		[13]		[13]	
Enlargement	13	0	13	0	13	0	13	0	12	1
(Lung)	[13]		[13]		[13]		[13]		[13]	
Area, dark red	13	0	13	0	13	0	13	0	12	1
Spot, white	13	0	13	0	13	0	13	0	12	1
(Forestomach)	[13]		[13]		[13]		[13]		[13]	
Spot, dark color, mucosa	13	0	13	0	13	0	13	0	12	1
(Glandular stomach)	[13]		[13]		[13]		[13]		[13]	
Spot, dark color, mucosa	13	0	13	0	13	0	13	0	12	1

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 22 - 1

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Absolute and relative organ weight of F₀ females on day 4 of lactation

Compound		2,6-DCT				
Dose group (mg/kg)		0 ^{a)}	30	100	300	1000
Terminal body weight	(g)	343.4 ± 34.2 (11)	324.3 ± 27.2 (13)	344.5 ± 27.0 (12)	313.1 ± 30.5 (8)	306.8 ± 20.2 (9)
Liver	(g)	14.51 ± 2.03 ^{b)} (11) 4.23 ± 0.48 ^{c)}	13.55 ± 1.53 (13) 4.18 ± 0.33	14.51 ± 1.76 (12) 4.21 ± 0.42	14.45 ± 1.05 (8) 4.65 ± 0.52	16.30 ± 2.64 (9) 5.31 ± 0.71 ^{**}
Kidneys	(g)	2.03 ± 0.22 (11) 0.59 ± 0.05	1.94 ± 0.21 (13) 0.60 ± 0.06	2.03 ± 0.27 (12) 0.59 ± 0.08	1.93 ± 0.12 (8) 0.62 ± 0.09	2.12 ± 0.27 (9) 0.69 ± 0.07 [*]
Thymus	(mg)	214.1 ± 75.4 (11) 61.2 ± 17.3	177.1 ± 68.4 (13) 54.2 ± 19.0	179.4 ± 41.3 (12) 51.7 ± 9.4	128.2 ± 72.9 (8) 39.6 ± 19.9	123.0 ± 68.7 (9) 39.7 ± 21.4

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

b): absolute weight

c): relative weight (g or mg per 100 g body weight)

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

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

Table 22 - 2

2.6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Absolute and relative organ weight of F₀ females; Organ weight of animals sacrificed on the way of test period

Origin of dissection	Dose groups (mg/kg)	Animal no.	Terminal body weight (g)	Liver		Kidneys		Thymus	
				Absolute (g)	Relative	Absolute (g)	Relative	Absolute (mg)	Relative
Non-pregnant	0	FB01003	335.3	11.46	3.42	2.00	0.60	192.1	57.3
	0	FB01010	321.6	11.71	3.64	1.67	0.52	324.0	100.7
	300	FB04003	320.6	10.86	3.39	1.98	0.62	272.8	85.1
	300	FB04005	314.1	10.90	3.47	1.19	0.38	319.6	101.8
	300	FB04009	245.6	8.66	3.53	1.95	0.79	154.9	63.1
	300	FB04010	315.3	12.34	3.91	1.85	0.59	352.2	111.7
	1000	FB05004	312.6	13.51	4.32	1.80	0.58	476.7	152.5
	1000	FB05008	278.7	11.28	4.05	1.86	0.67	286.3	102.7
	300	FB04006	246.3	9.81	3.98	1.99	0.81	66.5	27.0
	1000	FB05002	288.5	12.12	4.20	1.99	0.69	254.7	88.3
	1000	FB05012	288.8	13.95	4.83	2.14	0.74	265.0	91.8
	100	FB03011	317.3	12.83	4.04	2.08	0.66	386.7	121.9

Relative: g or mg per 100 g body weight

Table 23

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Summary of histopathological findings in Fo females

Group Grade	Control - ± + ++ +++ Pos.	30 mg/kg - ± + ++ +++ Pos.	100 mg/kg - ± + ++ +++ Pos.	300 mg/kg - ± + ++ +++ Pos.	1000 mg/kg - ± + ++ +++ Pos.
(Kidney)	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Degeneration, vacuolar, proximal tubule	13 0 0 0 0 0	13 0 0 0 0 0	13 0 0 0 0 0	12 0 0 1 0 1	10 0 1 1 1 3
Degeneration, fatty, proximal tubule	13 0 0 0 0 0	11 1 1 0 0 2	12 1 0 0 0 1	10 0 1 2 0 3	9 3 1 0 0 4#
Basophilic tubule, cortex	8 4 1 0 0 5	11 2 0 0 0 2	9 3 1 0 0 4	8 3 1 1 0 5	10 3 0 0 0 3
Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	12 1 0 0 0 1	13 0 0 0 0 0	13 0 0 0 0 0	11 2 0 0 0 2	12 1 0 0 0 1
Mineralization, medulla or papilla	12 1 0 0 0 1	13 0 0 0 0 0	13 0 0 0 0 0	13 0 0 0 0 0	12 1 0 0 0 1
Fibrosis, focal	13 0 0 0 0 0	12 1 0 0 0 1	13 0 0 0 0 0	13 0 0 0 0 0	13 0 0 0 0 0
Cyst, papilla	13 0 0 0 0 0	13 0 0 0 0 0	12 1 0 0 0 1	13 0 0 0 0 0	13 0 0 0 0 0
(Liver)	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	13 0 0 0 0 0	13 0 0 0 0 0	12 1 0 0 0 1	7 4 2 0 0 6#	0 6 7 0 0**13#
Fatty change, hepatocyte, periportal	6 7 0 0 0 7	1 11 1 0 0 12#	2 11 0 0 0 11	7 3 2 1 0 6	9 3 1 0 0 4
Microgranuloma	2 11 0 0 0 11	3 10 0 0 0 10	7 6 0 0 0 6#	1 10 2 0 0 12	1 12 0 0 0 12
Necrosis, focal	12 1 0 0 0 1	13 0 0 0 0 0	13 0 0 0 0 0	13 0 0 0 0 0	12 0 1 0 0 1
Hemorrhage	12 1 0 0 0 1	13 0 0 0 0 0	13 0 0 0 0 0	13 0 0 0 0 0	12 1 0 0 0 1
Thickening, capsule, focal	12 1 0 0 0 1	13 0 0 0 0 0	13 0 0 0 0 0	13 0 0 0 0 0	13 0 0 0 0 0
Fibrosis, focal	13 0 0 0 0 0	13 0 0 0 0 0	13 0 0 0 0 0	13 0 0 0 0 0	12 0 1 0 0 1
(Spleen)	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Hematopoiesis, extramedullary	0 5 6 2 0 13	0 3 8 1 1 13	0 2 5 4 2 13	0 5 6 1 1 13	0 5 1 5 2 13
Deposit, pigment, brown	0 3 7 3 0 13	0 4 6 3 0 13	0 1 8 4 0 13	0 1 8 4 0 13	0 0 6 7 0 13
(Thymus)	[13]	[12]	[13]	[13]	[13]
Atrophy	12 1 0 0 0 1	8 3 0 1 0 4	12 0 1 0 0 1	8 2 0 1 2 5	8 1 2 2 0 5
Hemorrhage	9 4 0 0 0 4	9 2 1 0 0 3	13 0 0 0 0 0#	13 0 0 0 0 0#	8 5 0 0 0 5
Hyperplasia, endothelial cell, focal	13 0 0 0 0 0	11 0 1 0 0 1	13 0 0 0 0 0	13 0 0 0 0 0	13 0 0 0 0 0
(Adrenal gland)	[12]	[0]	[0]	[0]	[13]
Necrosis, zona fasciculata, focal	11 1 0 0 0 1	[0]	[0]	[0]	13 0 0 0 0 0
(Heart)	[13]	[0]	[0]	[0]	[13]
Abnormality	13 0 0 0 0 0	[0]	[0]	[0]	13 0 0 0 0 0
(Urinary bladder)	[13]	[0]	[0]	[0]	[13]
Abnormality	13 0 0 0 0 0	[0]	[0]	[0]	13 0 0 0 0 0
(Brain)	[13]	[0]	[0]	[0]	[13]
Abnormality	13 0 0 0 0 0	[0]	[0]	[0]	13 0 0 0 0 0
(Ovary)	[2]	[0]	[0]	[4]	[2]
Atretic follicle, increased	2 0 0 0 0 0	[0]	[0]	3 0 1 0 0 1	2 0 0 0 0 0

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

[], Number of animals examined

**, Significantly different from control p<0.01 (Mann-Whitney U test)

#, Significantly different from control p<0.05 (Fisher exact test)

Table 24

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Reproductive performance of F₁ animals

Compound	2,6-DCT				
	0 ^{a)}	30	100	300	1000
Dose group (mg/kg)					
No. of mated pairs	13	13	13	13	13
No. of copulated pairs	13	13	13	13	13
Copulation index (%) A)	100	100	100	100	100
No. of pregnant animals	11	13	13	9	11
Fertility index (%) B)	84.6	100	100	69.2	84.6
Pairing days until copulation Mean ± S.D. (N)	2.8 ± 3.4 (13)	3.7 ± 4.3 (13)	2.9 ± 1.1 (12)	2.6 ± 1.6 (13)	3.2 ± 2.7 (13)
Frequency of vaginal estrus Mean ± S.D. (N)	1.0 ± 0.0 (13)	1.1 ± 0.3 (13)	1.0 ± 0.0 (12)	1.1 ± 0.3 (13)	1.2 ± 0.6 (13)

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

A): copulation index = (no. of copulated pairs / no. of mated pairs) × 100

B): fertility index = (no. of pregnant animals / no. of copulated pairs) × 100

Table 25

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/development toxicity screening test in rats

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

Compound		2,6-DCT				
Dose group (mg/kg)		0 a)	30	100	300	1000
No. of pregnant females		11	13	12	9	11
No. of females with live pups		11	13	12	9	10
Gestation index (%) A)		100	100	100	100	90.9
Gestation length in days		22.1 $\pm$ 0.3 (11)	22.2 $\pm$ 0.4 (13)	22.5 $\pm$ 0.5 (12)	22.6 $\pm$ 0.5 (9)	22.5 $\pm$ 0.7 (11)
No. of corpora lutea		17.9 $\pm$ 2.7 (11)	18.2 $\pm$ 2.9 (13)	18.8 $\pm$ 2.8 (12)	17.6 $\pm$ 3.3 (9)	16.5 $\pm$ 2.0 (11)
No. of implantation scars		16.3 $\pm$ 2.9 (11)	15.9 $\pm$ 3.1 (13)	17.3 $\pm$ 2.6 (12)	15.8 $\pm$ 3.7 (9)	13.7 $\pm$ 5.8 (11)
Implantation index (%) B)		90.7 $\pm$ 11.8 (11)	87.9 $\pm$ 13.4 (13)	91.9 $\pm$ 10.4 (12)	90.0 $\pm$ 17.4 (9)	81.2 $\pm$ 31.9 (11)
Day 0 of lactation						
No. of pups		15.6 $\pm$ 2.8 (11)	14.8 $\pm$ 3.1 (13)	15.8 $\pm$ 3.1 (12)	14.4 $\pm$ 4.1 (9)	13.1 $\pm$ 6.2 (11)
Delivery index (%) C)		96.3 $\pm$ 4.7 (11)	92.7 $\pm$ 6.6 (13)	91.4 $\pm$ 7.5 (12)	90.9 $\pm$ 10.0 (9)	87.1 $\pm$ 23.0 (11)
No. of live pups		15.5 $\pm$ 2.7 (11)	14.6 $\pm$ 3.0 (13)	15.6 $\pm$ 3.1 (12)	14.2 $\pm$ 4.1 (9)	12.9 $\pm$ 6.3 (11)
Birth index (%) D)		95.8 $\pm$ 5.1 (11)	91.8 $\pm$ 6.8 (13)	90.0 $\pm$ 8.4 (12)	89.5 $\pm$ 9.4 (9)	83.6 $\pm$ 31.2 (11)
Live birth index (%) E)		99.5 $\pm$ 1.7 (11)	99.0 $\pm$ 2.4 (13)	98.5 $\pm$ 5.1 (12)	98.6 $\pm$ 4.2 (9)	90.5 $\pm$ 30.0 (11)
Sex ratio (%) F)		52.2 $\pm$ 9.2 (11)	47.6 $\pm$ 20.8 (13)	47.3 $\pm$ 11.6 (12)	59.4 $\pm$ 14.5 (9)	48.4 $\pm$ 18.9 (10)
Day 4 of lactation						
No. of live pups		15.5 $\pm$ 2.8 (11)	14.5 $\pm$ 3.0 (13)	15.2 $\pm$ 2.8 (12)	12.1 $\pm$ 5.8 (9)	12.2 $\pm$ 5.3 (10)
Viability index (%) G)		99.4 $\pm$ 2.1 (11)	99.5 $\pm$ 1.6 (13)	97.7 $\pm$ 3.6 (12)	85.9 $\pm$ 32.8 (9)	79.7 $\pm$ 36.3 (10)

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

A): gestation index = (no. of females with live pups / no. of pregnant females) $\times$ 100B): implantation index = (no. of implantation scars / no. of corpora lutea) $\times$ 100C): delivery index = (no. of pups / no. of implantation scars) $\times$ 100D): birth index = (no. of live pups on day 0 / no. of implantation scars) $\times$ 100E): live birth index = (no. of live pups on day 0 / no. of pups) $\times$ 100F): sex ratio = (no. of male live pups on day 0 / no. of live pups on day 0) $\times$ 100G): viability index = (no. of live pups on day 4 / no. of live pups on day 0) $\times$ 100

Table 26

2,6-DCT: 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.

Compound	2,6-DCT				
	0 a)	30	100	300	1000
Day 0 of lactation					
No. of live pups	15.5 $\pm$ 2.7 (11)	14.6 $\pm$ 3.0 (13)	15.6 $\pm$ 3.1 (12)	14.2 $\pm$ 4.1 (9)	14.2 $\pm$ 4.9 (10)
Male	8.2 $\pm$ 2.3	7.0 $\pm$ 3.2	7.3 $\pm$ 1.9	8.2 $\pm$ 2.6	7.5 $\pm$ 2.8
Female	7.4 $\pm$ 1.7	7.6 $\pm$ 3.3	8.3 $\pm$ 3.0	6.0 $\pm$ 3.2	6.7 $\pm$ 2.8
Weight of pup in grams					
Male	6.3 $\pm$ 0.5	6.3 $\pm$ 0.7	6.6 $\pm$ 0.9	6.4 $\pm$ 0.9	6.0 $\pm$ 0.6
Female	6.0 $\pm$ 0.5	6.0 $\pm$ 0.9	6.3 $\pm$ 0.8	5.9 $\pm$ 0.8	5.8 $\pm$ 0.8
Day 4 of lactation					
No. of live pups	15.5 $\pm$ 2.8 (11)	14.5 $\pm$ 3.0 (13)	15.2 $\pm$ 2.8 (12)	13.6 $\pm$ 3.8 (8)	13.6 $\pm$ 3.4 (9)
Male	8.1 $\pm$ 2.5	7.0 $\pm$ 3.2	7.2 $\pm$ 1.9	7.6 $\pm$ 2.4	7.1 $\pm$ 2.7
Female	7.4 $\pm$ 1.7	7.5 $\pm$ 3.3	8.0 $\pm$ 2.8	6.0 $\pm$ 2.7	6.4 $\pm$ 1.7
Weight of pup in grams					
Male	10.2 $\pm$ 0.9	10.1 $\pm$ 1.9	10.4 $\pm$ 2.0	10.1 $\pm$ 2.2	8.8 $\pm$ 1.4
Female	9.8 $\pm$ 1.0	9.8 $\pm$ 2.0	10.1 $\pm$ 1.9	9.5 $\pm$ 2.1	8.4 $\pm$ 1.3

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

Parentheses indicate the number of litters evaluated.

Table 27

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Morphological findings in F₁ pups on day 4 of lactation

Compound	2,6-DCT				
	0 ^{a)}	30	100	300	1000
<u>No. of pups examined</u>					
External observation	170	189	182	109	122
Visceral observation	170	189	182	109	122
<u>No. of pups showing abnormalities</u>					
External malformations	0	0	0	0	0
Visceral malformations	0	0	0	0	0
Visceral variations	0	0	0	0	0

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

Table 28

2,6-DCT: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats

Morphological findings in F₁ dead pups

Compound	2,6-DCT				
	0 ^{a)}	30	100	300	1000
<u>No. of dead pups examined</u>					
External observation	1	2	6	15	18
Visceral observation	1	2	6	15	18
<u>No. of dead pups showing abnormalities</u>					
External malformations	0	0	0	0	0
Visceral malformations	0	0	0	0	0
Visceral variations	0	0	0	0	0

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