２，４，６－トリブロモフェノールの
ラットを用いる反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

試験番号：3657（ 115－090 ）

財　団　法　人
食　品　農　医　薬　品　安　全　性　評　価　セ　ン　タ　ー

目　　的

	1~26
1.要　　約	8
2.諸　　言	10
3.試 験 題 目	11
4.試 験 目 的	11
5.試 験 番 号	11
10.試験材料および方法	13
11.試 験 結 果	20
12.考察および結論	23
13.参 考 文 献	25
Figures	F-1~4
Figure 1 Body weight change of male rats	F-1
Figure 2 Body weight change of female rats	F-2
Figure 3 Food consumption of male rats	F-3
Figure 4 Food consumption of female rats	F-4
Tables	T-01~34
Table 1-1 Clinical observations in male rats	T-01
Table 1-2 Clinical observations in female rats (Before and during mating period)	T-02
Table 1-3 Clinical observations in female rats (Gestation period)	T-03
Table 1-4 Clinical observations in female rats (Lactation period)	T-05
Table 2-1 Body weight change of male rats	T-06
Table 2-2 Body weight change of female rats	T-07
Table 3-1 Food consumption of male rats	T-08
Table 3-2 Food consumption of female rats	T-09
Table 4-1 Hematology of male rats	T-10
Table 4-2 Coagulation of male rats	T-11
Table 5 Blood chemistry of male rats	T-12
Table 6-1 Absolute and relative organ weight of male rats	T-13
Table 6-2 Absolute and relative organ weight of female rats	T-14

Table 7-1	Summary of gross findings (sacrificed and not copulation, male)	T-15
Table 7-2	Summary of gross findings (sacrificed, female)	T-16
Table 7-3	Summary of gross findings (not copulation, female)	T-17
Table 8-1	Summary of histological findinds (all pups died)	T-18
Table 8-2-1	Summary of histological findings (sacrificed, male)	T-19
Table 8-2-2	Summary of histological findings (sacrificed, male)	T-21
Table 8-3-1	Summary of histological findings (sacrificed, female)	T-23
Table 8-3-2	Summary of histological findings (sacrificed, female)	T-25
Table 8-4	Summary of histological findings (not copulation, male)	T-27
Table 8-5	Summary of histological findings (not copulation, female)	T-28
Table 9	Copulation and fertility results in rats	T-29
Table 10	Findings of delivery in dams(F0)	T-30
Table 11	External observations on live pups(F1) from rats	T-31
Table 12	Body weight change of pups(F1) from rats	T-32
Table 13-1	Summary of gross findings of pups(F1) from rats (sacrificed, male)	T-33
Table 13-2	Summary of gross findings of pups(F1) from rats (sacrificed, female)	T-34

1. 要　　約：

既存化学物質の毒性学的性質を評価するため，２，４，６－トリブロモフェノールの０（溶媒対照群），100，300 および 1000 mg/kg/dayをラットの交配前14日から交配期間，妊娠期間および哺育３日まで連続経口投与し，反復投与毒性に加えて生殖・発生に及ぼす影響を検討した．

1）反復投与毒性

雌雄いずれの群にも死亡動物は観察されなかった．一般状態の観察で雌雄の 300 mg/kg以上の投与群では被験物質投与後に流涎が認められた．また，雌雄の 1000 mg/kg群で体重増加抑制および摂餌量の低値が認められた．雄の血液学検査および血液凝固能検査には被験物質投与の影響は認められなかった．雄の血液生化学検査では 300 mg/kg以上の投与群でクレアチニンが高値を示し，1000 mg/kg群で総タンパク，アルブミン，A/G，ALPおよび塩素が有意な高値を，BUNが高値傾向を，カリウムが有意な低値を示した．

器官重量では雌雄の 1000 mg/kg群で肝臓および腎臓重量が高値を示し，雄の同群で胸腺重量が低値を示した．

剖検では雄の 1000 mg/kg群で肝臓の肥大が観察され，病理組織学検査では肝細胞肥大の発生率が増加し，肝臓の脂肪化の発生率が減少した．また，雄の同群に腎乳頭壊死，尿細管拡張，リンパ球浸潤，尿細管の好塩基化および硝子円柱が認められた．

2）生殖発生毒性

平均性周期，交尾能および受胎能に被験物質投与の影響は認められなかった．分娩時観察では妊娠動物の全例が正常に分娩し，妊娠期間にも被験物質投与の影響は認められなかった．妊娠黄体数，着床痕数，出産児数，出産生児数，着床率および分娩率に明らかな被験物質投与の影響は認められなかった．1000 mg/kg群で雌雄の新生児の生後０および４日体重，生後４日の生児数および生存率が低値を示し，被験物質投与による出生前後の新生児の発育抑制および生存性に対する影響が示唆された．新生児の外表，死亡児および哺育４日の剖検でも被験物質投与による影響は認められなかった．

以上の結果から，本試験条件下では２，４，６－トリブロモフェノールの反復投与により投与後の一般状態の変化で雌雄の 300 mg/kg以上の投与群で流涎が観察され，雌雄ともに 1000 mg/kg群で体重の増加抑制および摂餌量の低値が認められた．さらに，雄の血液生化学検査で 300 mg/kg以上の投与群でクレアチニンが高値を示し，1000 mg/kg群の病理学検査および血液生化学検査において，被験物質投与による主として肝臓および腎臓に及ぼす影響が示唆される変化が認められた．したがって，雌雄とも無影響量は 100 mg/kg/dayと判断された．

雌雄の生殖に及ぼす影響は 1000 mg/kg/day投与でも認められず，無影響量は 1000 mg/kg/dayと判断された．

児動物の発生・発育に及ぼす影響は 1000 mg/kg/day投与で発育抑制が認められ，生後４日生児数および生存率が低値を示したことから無影響量は 300 mg/kg/dayと判断された．

2. 緒　　言：

２，４，６－トリブロモフェノール（Phenol,2,4,6-tribromo-）は，化学産業の分野において樹脂用軟粘剤の原料として用いられている化合物である．本化合物の毒性については，経口投与によるラットのLD_{50}が 2000 mg/kg以上（Reference data 1）と報告されている．また，本化合物をラットの妊娠１から21日まで毎日全身吸入させた結果，親動物に対する無影響量は 0.3 mg/mL，児動物に対する無影響量が 0.03 mg/mL未満であることが報告されている[1]．しかし，ヒトや経口投与における実験動物の生体に及ぼす毒性，特に生殖発生毒性についてはほとんど知られていない．
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，２，４，６－トリブロモフェノールの反復投与毒性および生殖・発生毒性について検討したのでその結果を報告する．

3. 試　験　題　目：　２，４，６－トリブロモフェノールのラットを用いる反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

4. 試　験　目　的：　既存化学物質の毒性学的性質を評価する一環として行うOECDガイドライン「反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験」（1990年３月22日）に従い，ラットを用いて一般毒性学的影響に加え生殖・発生に及ぼす影響を検討した．
なお，試験の実施は環企研第233号，衛生第38号，63基局第823号（昭和63年11月18日）の「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第４条に規定する試験施設について」の基準を満たすものとした．

5. 試　験　番　号：　３６５７（115－090）

10. 試験材料および方法：

10.1 被験物質

2，4，6－トリブロモフェノール〔Phenol,2,4,6-tribromo-, CAS No.118-79-6, Lot No.　　純度99.8wt%，分子量330.80，融点／沸点87～89℃／119℃(15 mmHg)〕は，白色のフレーク状の粉末であり，使用時まで直射日光を避け，適当な換気のある冷暗所に保管した．2，4，6－トリブロモフェノールを実測した結果は，Reference data 1 に示した．

被験物質は，トウモロコシ油（Lot No.V7P1509, V7R2400, ナカライテスク株式会社製造）に溶解し，20, 60 および 200 mg/mLの濃度になるよう各群の投与液を調製した．調製後は，使用時まで冷暗条件下で密閉保管した．投与液中の被験物質は，20 および 200 mg/mLについて，調製後遮光下冷蔵庫保存で８日目まで安定であることが予備試験において確認されているため，調製後８日以内に使用した．

投与液の濃度確認のため全試験群について，調製開始時に調製した投与液から無作為にサンプルを抽出し，投与液中の被験物質濃度の分析を実施した．その結果，投与液中の平均濃度は 84.5～100%の濃度範囲で調製されていた．100 mg/kg群のサンプルの濃度が規定範囲（設定値に対して±10%）から逸脱していたため投与には使用せず，翌日再調製した 100 mg/kg群の投与液について分析した結果，100%であった（Reference data 2）．したがって，投与液はほぼ所定量の２，４，６－トリブロモフェノールが含有されていることを確認した．

投与終了後に製造元に返却した被験物質について，製造元で再分析した結果，純度は99.8%であり被験物質は投与期間中安定であったことが確認された（Reference data 3）．

10.2 使用動物および飼育条件

試験には，日本チャールス・リバー株式会社（神奈川県厚木市）から購入した生後８週齢の Sprague-Dawley (Crj:CD(SD), SPF) 系雌雄ラットを使用した．購入した動物は７日間検疫・馴化飼育した後，一般状態に異常が認められなかったものを10週齢で群分けして試験に用いた．群分け終了時の体重は，雄で 361～397 g，雌で 233～258 gの範囲であった．

動物は，温度24±2℃，湿度55±10%，換気回数15回／時間，照度 150～300 lux，照明時間12時間（午前７時点灯，午後７時消灯）に設定されたバリアシステムの飼育室（W 5.7×D 10.0×H 2.5 m，142.5 m^3）で飼育した．動物の馴化期間も含め，飼育期間中の実測温度および湿度範囲は，それぞれ 23.7～25.1℃，49～62%であった．株式会社　東京技研サービス（東京都府中市）の自動水洗式飼育機（W 691.0×D 79.0×H 195.0 cm）を使用し，アルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ（W 15.8×D 23.8×H 16.0 cm，飼育ケージ・スペース 6017 cm^3）に動物を１匹ずつ収容し飼育した．但し，交配期間中は，雄をアルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ（W 36.8×D 25.0×H 16.0 cm，飼育ケージ・スペース 14720 cm^3）に１匹ずつ収容し飼育した．妊娠18日以降の母動物は哺育４日までアルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ（W

36.8×D 25.0×H 16.0 cm）に哺育トレーおよび巣作り材料（Care FRESH$_{TM}$）を入れて飼育した．
飼育ケージは隔週１回，給餌器は週１回交換した．
飼料は，オリエンタル酵母工業株式会社（東京都中央区）製造のＮＭＦ固型飼料（放射線滅菌飼料）を使用し，飼育期間中自由に摂取させた．飲水は，水道水を自動給水ノズルより自由に摂取させた．
供給した飼料および水には試験に支障を来す可能性の考えられる夾雑物の混在はなかった（Reference data 4, 5）．
なお，動物の馴化期間を含め，飼育期間中，データの信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因の変化はなかった．

10.3　群分け・個体識別

動物はあらかじめ体重によって層別化し，無作為抽出法により各試験群を構成するように群分けし，１群当たり各12匹を用意した．
群分け後の動物の識別は個体別に入墨をするとともにケージごとに動物標識番号（Animal ID-No.）をつけた．
余剰動物は炭酸ガスにより安楽死させた．

10.4　投与量，群構成，投与期間および投与方法

本被験物質の製品安全データシート（ＭＳＤＳ）に経口投与によるラットのLD_{50}が2000 mg/kg以上であり，2000 mg/kg/dayのラットを用いた14日間経口投与試験で特異的な病理学的所見は認められなかったことが報告されている．この情報に基づき，0, 30, 100, 300 および 1000 mg/kgの用量で予備試験「２，４，６－トリブロモフェノールのラットを用いる反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験－２週間投与予備試験（試験番号3656）」を実施した．その結果，1000 mg/kg群で雄の１例が投与２日に死亡した．一般状態の変化として，流涎が雌雄ともに 300 および 1000 mg/kg群で観察された．また，1000 mg/kg群の雌雄に体重増加抑制傾向が認められ，同群の雌雄で投与１から３日の平均１日摂餌量が低値を示した．
雄の血液学検査では変化は認められなかったが，血液生化学検査では 1000 mg/kg群でアルブミン，A/GおよびGPTが高値を示した．
剖検では，被験物質投与の影響と考えられる所見は認められなかった．
剖検時の器官重量では，1000 mg/kg群で雌雄ともに肝臓の絶対および相対重量が高値を示した．さらに，雄の 1000 mg/kg群で肺および腎臓の相対重量が高値を示した．
以上の結果から，本試験の最高用量を明らかな毒性兆候が現れることが予想される1000 mg/kgに設定し，以下公比約３で除し，300 および 100 mg/kgを設定した．
投与経路は，OECDガイドライン「反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験」[2)]で指示されている投与経路に準じて強制経口投与とした．投与容量は，体重 100 g当り 0.5 mLとし，交配前および交配期間中の雌雄では，個体別に測定した最新体重に基づいて算出を行った．また，妊娠期間および哺育期間中の雌は，妊娠０，７，14，21および哺育０日に測定した個体別体重に基づいて算出を行った．胃ゾンデを用いて毎日１回

（７日／週）8:50～13:30に強制経口投与した．対照群にはトウモロコシ油のみを同様に投与した．雄の投与期間は，交配前14日間と交配期間14日間および交配期間終了後20日間の連続48日間とした．雌の投与期間は，交配前14日間と交配期間中（最長14日間）ならびに交尾成立雌の妊娠期間を通じて分娩後の哺育３日まで（41～45日間）とした．なお，交尾不成立の雌（動物番号2005）は交配期間終了後20日間の連続48日間とした．

10.5　観察および検査

10.5.1　一般状態

雌雄とも，全例について試験期間中毎日観察し，異常および死亡の有無を記録した．

10.5.2　体　　重

雄では，投与１（投与開始日），８，15，22，29，36，43および49日（剖検日）に測定し，投与１から43日までの体重増加量を算出した．

雌では，投与１（投与開始日），８および15日に測定し，投与１から15日までの体重増加量を算出した．交尾の成立しなかった雌はそれ以降の投与22，29，36，43および49日に測定した．また，交尾成立後の雌は，妊娠０，７，14および21日に，分娩した雌は哺育０および４に測定し，それぞれ妊娠０から21日および哺育０から４日までの体重増加量を算出した．

10.5.3　摂 餌 量

雄では，投与１（投与開始日），８，15，22，29，36，43および48日（剖検前日）に餌重量を測定し，測定日から次の測定日までの摂餌量を求め平均１日摂餌量を算出するとともに投与１から15日および投与22から48日までの累積摂餌量を算出した．

雌では，投与１（投与開始日），８および15日に測定し，測定日から次の測定日までの摂餌量を求め平均１日摂餌量を算出するとともに投与１から15日までの累積摂餌量を算出した．交尾の成立しなかった雌はそれ以降の投与29，36，43および48日に餌重量を測定し，測定日から次の測定日までの摂餌量を求め，平均１日摂餌量を算出した．また，交尾成立の雌は妊娠０，７，14および21日に，分娩した雌は哺育０および４日に餌重量を測定し，測定日から次の測定日までの摂餌量を求め平均１日摂餌量を算出するとともに妊娠０から21日までの累積摂餌量を算出した．

なお，交配期間中の同居動物は摂餌量を測定しなかった．

10.5.4　交　　配

交配前14日間の性周期観察を行った雌を同群内の雄のケージに入れ１対１で最長14日間毎晩同居させた．翌朝，膣栓または膣垢中の精子確認をもって交尾成立とし，その日を妊娠０日とした．

性周期観察は交尾成立日まで行い，発情期から次の発情期までの間の日数を性周期日数として平均性周期を算出した．

交配結果から，各群について交尾率［（交尾成立動物数／同居動物数）×100］を算出した．

10.5.5 自然分娩時および新生児の観察

妊娠動物は全例を自然分娩させた．分娩の確認は午前９～10時に行い，この時間帯に分娩が完了していることを確認した個体および分娩を開始した個体については分娩完了まで待ち，その日を哺育０日とした．午前10時を過ぎて分娩が完了した個体については，翌日を哺育０日とした．分娩を確認した全例について妊娠期間（哺育０日の年月日から妊娠０日の年月日を減じた日数），受胎率［（受胎動物数／交尾成立動物数）×100）］，出産率［（生児出産雌数／妊娠雌数）×100］，着床率［（着床痕数／妊娠黄体数）×100）］，分娩率［（総出産児数／着床痕数）×100］，出生率［（出産生児数／総出産児数）×100）］を算出した．

母動物は哺育４日に病理解剖した．

新生児は哺育０日に出産児数（生存児＋死亡児）を調べ，性別を判定するとともに外表異常の有無を調べた．また，哺育０および４日に雌雄別の同腹児重量を測定し，雌雄別１匹当たりの平均体重を算出した．

哺育４日に新生児全例を解剖し，器官・組織の肉眼的観察を行った．哺育期間中の死亡児も同様に器官・組織の肉眼的観察を行った．また，新生児の４日生存率［（哺育４日生児数／出産生児数）×100］を算出した．

10.5.6 臨床検査

各群の雄全例について剖検時に実施した．動物を約16時間絶食させた後，エーテルで麻酔後開腹し，腹部大動脈から採血した．

10.5.6.1 血液学検査

検査には抗凝固剤（EDTA-2K）を添加した初血について，総合血液学検査装置 THMS H·1E（マイルス社，米国）を用いて白血球数（WBC：暗視野板法），赤血球数（RBC：暗視野板法），ヘマトクリット値（HCT：RBC，MCVより算出），ヘモグロビン量（HGB：シアンメトヘモグロビン法），平均赤血球容積（MCV：暗視野板法），平均赤血球血色素量（MCH：HGB，RBCより算出），平均赤血球血色素濃度（MCHC：HGB，HCTより算出），血小板数（PLT：暗視野板法）および白血球百分率（フローサイトケミストリー法）を測定した．白血球百分率は前述の機器で測定したが，別途血液塗抹標本を作製し，メイ・グリュンワルド・ギムザ染色して保管した．網赤血球（RC）比率の算定については，抗凝固剤（EDTA-2K）添加血液をニューメチレンブルーで染色後，血液塗抹標本を作製した．各群とも貧血傾向が認められなかったため，標本の観察は行わなかった．

10.5.6.2 血液凝固能検査

検査にはクエン酸ソーダ添加血液を 3000 r.p.m.，13分間遠心分離して得た血漿について，血液凝固測定装置 KC-40（アメルング社，独国）を用いてプロトロンビン時間（PT：Quick 1 段法），活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT：クロット法）およびフィブリノーゲン量（Fibrinogen：トロンビン時間法）を測定した．

10.5.6.3 血液生化学検査

検査には採血管に血液を採取し，室温に30分間静置後 3000 r.p.m. 7分間遠心分離して得た血清を用いた．総蛋白（ビューレット法），アルブミン（B.C.G.法），A/G（計算値），血糖（グルコースオキシダーゼ法），中性脂肪（酵素比色法），総コレステロール（コレステロールオキシダーゼ法），尿素窒素（ウレアーゼアンモニウム指示薬法），クレアチニン（Jaffé法），総ビリルビン（ジアゾ法），グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ（IFCC法），グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ（IFCC法），アルカリホスファターゼ（Bessey- Lowry改良法），γ－グルタミルトランスペプチダーゼ（Orlówski法），カルシウム（アルセナゾⅢ法）および無機リン（モリブデン酸青法）は多項目生化学自動分析装置　日立7170（株式会社日立製作所，東京都千代田区）を用い，ナトリウム（電極法），カリウム（電極法）および塩素（電極法）は EKTACHEM 700N（コダック社，米国）を用いて測定した．

10.5.7 病理学検査

10.5.7.1 剖検および器官重量

① 雄 動 物

48日間投与した日の夕方から，約16時間絶食をさせた後エーテル麻酔下で採血し安楽死させた．器官・組織の肉眼的観察を行った後，脳，胸腺，肝臓，腎臓，脾臓，副腎，精巣および精巣上体重量を測定し器官重量・体重比（相対重量）を算出した．また，全動物の重量測定器官に加えて心臓，精嚢，前立腺，下垂体および肉眼所見として変化が認められた器官・組織として腹膜，皮膚および皮下組織を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した．なお，精巣および精巣上体はブアン氏液で固定した．

② 自然分娩した雌

哺育４日にエーテル麻酔下で放血安楽死させた．器官・組織の肉眼的観察を行った後，脳，胸腺，肝臓，腎臓，脾臓，副腎および卵巣重量を測定し器官重量・体重比（相対重量）を算出した．また，全動物の重量測定器官に加えて心臓，下垂体および肉眼所見として変化が認められた器官・組織として肺，皮膚を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した．また，剖検時に黄体数および着床痕数を調べた．

③ 交尾しなかった雌

48日間投与した翌日，エーテル麻酔下で放血安楽死させ，器官・組織の肉眼的観察を行った後，皮膚，乳腺，リンパ節，唾液腺，胸骨，大腿骨（骨髄を含む），胸腺，気管，肺および気管支，心臓，甲状腺および上皮小体，舌，食道，胃，十二指腸，小腸，大腸，肝臓，膵臓，脾臓，腎臓，副腎，膀胱，卵巣，子宮，膣，眼球，ハーダー腺，脳，下垂体および脊髄を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した．

④ 哺育期間中に全児が死亡した母動物（全児死亡動物）
生存児すべての死亡または喰殺が確認された日にエーテル麻酔下で放血安楽死させ，器官・組織の肉眼的観察を行った後，皮膚，乳腺，リンパ節，唾液腺，胸骨，大腿骨（骨髄を含む），胸腺，気管，肺および気管支，心臓，甲状腺および上皮小体，舌，食道，胃，十二指腸，小腸，大腸，肝臓，膵臓，脾臓，腎臓，副腎，膀胱，卵巣，子宮，膣，眼球，ハーダー腺，脳，下垂体および脊髄を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した．なお，剖検時に黄体数および着床痕数を調べた．

10.5.7.2 病理組織学検査
下記に該当する動物の組織について株式会社 組織科学研究所（東京都青梅市）で常法に従ってパラフィン切片を作製し，ヘマトキシリン・エオジン染色した．鏡検は安評センターで実施した．なお，雄では高用量群の胸腺，肝臓および腎臓に，雌では肝臓にそれぞれ被験物質の影響を示唆する変化が認められたため，雄の低および中用量群の胸腺，肝臓および腎臓，雌の低および中用量群の肝臓についても検査を実施した．

① 全児死亡動物
全児死亡動物（雌の 1000 mg/kg群の１例）の皮膚，乳腺，リンパ節，唾液腺，胸骨，大腿骨（骨髄を含む），胸腺，気管，肺および気管支，心臓，甲状腺および上皮小体，舌，食道，胃，十二指腸，小腸，大腸，肝臓，膵臓，脾臓，腎臓，副腎，膀胱，卵巣，子宮，膣，眼球，ハーダー腺，脳，下垂体および脊髄について実施した．

② 妊娠を成立させた雄
対照群と高用量群では脳，胸腺，心臓，肝臓，腎臓，脾臓，副腎，精巣および精巣上体について実施し，加えて，1000 mg/kg群の腹膜（動物番号 1307）および皮下（動物番号 1303）についても実施した．また，低および中用量群では胸腺，肝臓および腎臓について実施した．

③ 自然分娩した雌
対照群と高用量群では脳，胸腺，心臓，肝臓，腎臓，脾臓，副腎および卵巣について実施し，加えて，対照群の皮膚（動物番号 2002），1000 mg/kg群の皮膚（動物番号 2301）および肺（動物番号 2312）についても実施した．また，低および中用量群では肝臓について実施した．

④ 交尾しなかった雄雌
対照群の雌雄各１例の脳，胸腺，心臓，肝臓，腎臓，脾臓，副腎，膣，子宮，卵巣，精巣，精巣上体，精嚢，前立腺，下垂体について実施した．

10.6 統計解析

体重，摂餌量，黄体数，着床痕数，出産児数，死産児数，性比，平均性周期，妊娠期間，着床率，分娩率，出生率，外表異常発現率，新生児の４日生存率，器官重量，器官重量・体重比（相対重量），血液学的および血液生化学検査値については多重比較検定[3]を行った．まず Bartlettの等分散検定を実施し，等分散の場合は一元配置分散分析を行った．分散が有意な場合は Dunnettの多重比較検定[4),5)]で対照群と各投与群間の有意差を検定した．Bartlettの等分散検定で不等分散の場合は Kruskal-Wallisの順位検定を実施し，有意の場合はノンパラメトリックの Dunnettの多重比較検定[4),5)]で対照群と各投与群間の有意差を検定した．出産率，交尾率および受胎率については χ^2検定[6),7)]を用いた．病理学検査の所見の発生率の検定は，Fisherの直接確率検定法[7)]を用いて検定し，グレードのある所見は，－を「１」，＋１を「２」，＋２を「３」および＋３を「４」に割り当てた後，順位和検定である Mann-WhitneyのU検定[7)]を用いて検定した．なお，哺育期間中の新生児に関する成績は１母体当りの平均を１標本とした．有意水準は ＊：P<0.05および＊＊：P<0.01の２段階とした．

11. 試　験　結　果：

11.1 反復投与毒性

11.1.1 死亡および一般状態（Table 1-1～1-4, Appendix 1-1～1-4）

投与期間を通じて雌雄いずれの群にも死亡例は認められなかったが，全児死亡動物が1000 mg/kg群で哺育４日に１例（動物番号 2306）認められた．

一般状態の観察では，主な投与後の症状として流涎が雌雄の 300 および 1000 mg/kg群で観察された．この症状は投与期間を通じて雄の 300 mg/kg群で複数例に，1000 mg/kg群で全例にほぼ毎日継続して観察され，雌の 300 mg/kg群で複数例に散発的に，1000 mg/kg群で全例にほぼ毎日継続して観察された．症状の発現は，投与後約５分から認められ，30分後には消失した．

その他，雄では脱毛が 100 mg/kg群で１例，被毛の汚れが 1000 mg/kg群で２例，痂皮が対照群で１例，体表面の腫瘤（鼻部）および皮下部の腫瘤（口唇部）が 1000 mg/kg群で各１例，投与前の流涎が対照群で１例，歯異常（上顎切歯折れ）が 300 mg/kg群で１例にそれぞれ観察された．雌では交配前・交配期間中に脱毛が対照群および 1000 mg/kg群で１および２例，痂皮が 300 mg/kg群で１例，妊娠期間中に脱毛が対照群，100 および 1000 mg/kg群で１，１および３例，哺育期間中に脱毛が対照群，100 および 1000 mg/kg群で１，１および２例にそれぞれ観察された．

11.1.2 体　　重（Figure 1～2, Table 2-1～2-2, Appendix 2-1～2-2）

雄では，対照群に比べて 1000 mg/kg群で投与８日以降，統計学的に有意な低値を示し，同群の投与１から43日の体重増加量も有意な低値を示した．

雌では交配前の投与期間には対照群と被験物質投与群の間に有意な差は認められなかったが，妊娠期間において対照群に比べ 1000 mg/kg群で妊娠７日以降有意な低値を示し，同群の妊娠０から21日の体重増加量も有意な低値を示した．また，哺育期間においても対照群に比べて 1000 mg/kg群で哺育４日に有意な低値を示し，哺育０から４日の体重増加量も低値傾向を示した．

11.1.3 摂 餌 量（Figure 3～4, Table 3-1～3-2, Appendix 3-1～3-2）

雄では，対照群に比べて 1000 mg/kg群で投与１から８日の平均１日摂餌量が統計学的に有意な低値を示した．

雌では交配前の投与期間に対照群に比べ 1000 mg/kg群で投与１から８日の平均１日摂餌量が有意な低値を，また，哺育０から４日の平均１日摂餌量が低値傾向を示した．

妊娠期間中は，対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった．

11.1.4 雄の血液学検査（Table 4-1～4-2, Appendix 4-1～4-2）

血液学検査ではいずれの検査項目についても対照群と被験物質投与群の間に統計学的に有意な差は認められなかった．血液凝固能検査では 1000 mg/kg群でプロトロンビン時間が対照群に比べ有意な延長を示したが，軽微な変化であり毒性学的意義の乏しいものと考えられた．

11.1.5 雄の血液生化学検査 (Table 5, Appendix 5)

対照群に比べ 300 および 1000 mg/kg群でクレアチニンが統計学的に有意な高値を示した．また，1000 mg/kg群で総タンパク，アルブミン，A/G，ALPおよび塩素が有意な高値を，BUNが高値傾向を，総ビリルビンおよびカリウムが有意な低値を示した．その他の検査項目では対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった．

11.1.6 器官重量 (Table 6-1～6-2, Appendix 6-1～6-2)

雌雄ともに対照群に比べ 1000 mg/kg群で肝臓の絶対および相対重量，脳，腎臓および副腎の相対重量が統計学的に有意な高値を示した．さらに雄では 1000 mg/kg群で胸腺の絶対重量が有意な低値を，精巣の相対重量が有意な高値を示した．

11.1.7 剖検所見 (Table 7-1～7-3, Appendix 7-1～7-2)

1000 mg/kg群の１例に認められた全児死亡動物（動物番号 2306）には異常所見は認められなかった．

雄では，1000 mg/kg群で胸腺の萎縮が４例，肝臓の肥大が３例観察された．その他，1000 mg/kg群で腎臓の白色斑点および副腎の肥大が各２例に観察され，胸腺の赤色斑点，肝臓の白色斑点，皮下の塊，腹腔の塊，精巣上体の結節および被毛の菲薄化が 300 mg/kg群を除く各群に単発性に観察された．

雌では，胸腺の赤色斑点，肺の褐色斑点，肝臓の肥大，瘢痕および白色斑点，卵巣の嚢胞，子宮の内腔拡張，副腎の肥大および被毛の菲薄化が対照群を含む各群に１ないし少数例に観察された．

交尾しなかった動物は 対照群で雌雄各１例であった．雄では異常所見は認められず，雌では脾臓の表面粗糙および結節，肺の褐色斑点および子宮の内腔拡張が観察された．

11.1.8 病理組織学検査 (Table 8-1～8-5, Appendix 8-1～8-2)

1000 mg/kg群の全児死亡動物では，脾臓の色素沈着，肺の細胞浸潤，肝臓の脂肪化および子宮の小肉芽腫が観察された．

雄では，1000 mg/kg群で胸腺の萎縮が３例，肝細胞肥大（Photo 1）が12例，腎臓の硝子円柱（Photo 2）が８例，尿細管拡張（Photo 2）が７例，腎乳頭壊死（Photo 3）が５例，リンパ球浸潤が６例に発生し，対照群と比べて統計学的に有意な発生率の増加が認められた．また，肝臓の脂肪化（Photo 4,5）が対照群で６例の発生に対し，1000 mg/kg群では認められず有意な減少を示した．さらに腎尿細管の好塩基化が対照群，100, 300 および 1000 mg/kg群でそれぞれ８（全例軽度），９（全例軽度），９（軽度８，中等度１）および12例（軽度８，中等度４）観察され，発生率に有意差は認められなかったが 1000 mg/kg群で程度の増強が認められた．一方，100 mg/kg群で腎臓の好酸性小体（Photo 6）の発生率に有意な高値が認められたが，用量に関連した発現の増加および程度の増強は認められなかった．脾臓の色素沈着，胸腺の出血，肝臓の小肉芽腫および副腎束状帯の空胞変性が対照群を含め比較的多く観察されたが発生率に有意な変化は認められなかった．なお，1000 mg/kgの雄の１例に認められた皮下の塊は，組織学的には膿瘍であった．その他，観察された所見は単発性あるいは少数例の発生であった．

雌で認められた所見はいずれも単発性の変化かあるいは群間の発生率に差がない変化であった.
交尾しなかった動物では，雌雄に共通して脾臓の色素沈着および腎臓のリンパ球浸潤が認められ，その他雄では肝臓のリンパ球浸潤，腎臓の尿細管の好塩基化および副腎の血管拡張ならびに束状帯の空胞変性，雌では脾臓の包膜炎，肺炎，肝臓の小肉芽腫，腎臓の腎盂炎，子宮の内腔拡張および細胞浸潤が観察された.

11.2 生殖発生毒性

11.2.1 交尾および受胎能 (Table 9, Appendix 9-1～9-2)

交尾は対照群を除くすべての被験物質投与群で全例成立した．対照群では１組が交尾不成立であり，交尾率は91.7%であった．受胎はすべての群の交尾成立雌で成立した．性周期観察では，いずれの群もほぼ４～５日の性周期を示し平均性周期に群間差は認められなかった.

11.2.2 分娩および哺育 (Table 10, Appendix 10, 12)

1000 mg/kg群で対照群に比べ妊娠期間が統計学的に有意な低値を示したが，個体別の妊娠期間はすべて22日であり，正常の範囲内であった．また，同群で対照群に比べ哺育４日の生児数が雌雄ともに有意な低値を示し，生後４日生存率も雌雄ともに有意な低値を示した．その他，分娩状態には異常が観察されず，対照群を含む各群の黄体数，着床痕数，出産生児数および死産児数はほぼ同様な値を示し，出産率，着床率，分娩率および出生率に群間差は認められなかった.

11.2.3 新生児の形態，体重および剖検所見 (Table 11～13-2, Appendix 11, 13-1～13-2)

新生児の外表検査では，100 mg/kg群で鎖肛および無尾が同一個体の１例に，300 mg/kg群で鎖肛および痕跡尾が同一個体の１例にそれぞれ観察された.
哺育期間中の体重では，生後０および４日に対照群に比べ 1000 mg/kg群で雌雄とも統計学的に有意な低値を示した．死亡児の剖検では，右鎖骨下動脈起始異常が 100 および 1000 mg/kg群で１および３例観察された．その他，腎盂拡張が 100 mg/kg群の１例，大脳低形成および食道位置異常が 300 mg/kg群の同一個体の１例，小眼球が 1000 mg/kg群の１例にそれぞれ観察された．哺育４日の剖検で，雄では胸腺頸部残留が対照群，100 および 300 mg/kg群でそれぞれ３，２および１例観察された．また，肝臓の白色斑点が対照群および 1000 mg/kg群で各１例に観察された．その他，肝臓の赤色斑点，黒色斑点および淡色が 300 あるいは 1000 mg/kg群で１から２例に観察された.
雌では胸腺頸部残留が対照群，100 および 1000 mg/kg群でそれぞれ２，１および１例に観察された．また，肝臓の白色斑点が 100 および 1000 mg/kg群で１および４例に観察され，対照群に比べて 1000 mg/kg群で有意な発生率の高値を示した．その他，肝臓の赤色斑点，黒色斑点および緑色，鎖肛，眼球の赤色，尾の欠損，痕跡尾および痂皮が被験物質投与群で単発性に散見された.

12. 考察および結論：

12.1 反復投与毒性

死亡例は，投与期間を通じ雌雄いずれの群にも認められなかった．

一般状態の観察では，流涎が投与期間を通じ雌雄ともに 300 mg/kg以上の被験物質投与群で認められた．この症状は用量に対応して発現頻度が増強し，被験物質投与に関連した変化と考えられた．1000 mg/kg群の雄に認められた体表面の腫瘤および皮下部の腫瘤は，それぞれ単発性の発現であり，体表面の腫瘤は剖検日までに消失した．また，皮下部の腫瘤は組織学的には膿瘍であった．これらのことから被験物質投与との関連はないものと考えられた．その他，認められた所見はしばしば対照群でも認められるものであり，被験物質投与の影響とは考えなかった．

体重は，雌雄ともに 1000 mg/kg群で増加抑制が認められ，摂餌量についても雌雄ともに同群で投与開始直後低値を示し，被験物質投与の影響が示唆された．

雄の血液学検査および血液凝固能検査には被験物質投与の影響は認められなかった．

雄において，1000 mg/kg群で肝臓重量が高値を示し，剖検でも肝臓の肥大が観察された．また，病理組織学検査においても肝細胞肥大の発生率は増加を示したのに対し，肝臓の脂肪化は発生率の減少が観察され，肝臓に対する被験物質投与の影響が認められた．また，同群で腎臓重量が高値を示し，病理組織学検査で腎乳頭壊死，尿細管拡張，リンパ球浸潤，尿細管の好塩基化および硝子円柱が認められた．腎乳頭壊死は鎮痛剤および非ステロイド系抗炎症剤の投与により実験的に誘発されることが知られており[8),9)]，本試験においても尿細管の好塩基化や硝子円柱の程度の強いものに腎乳頭壊死および尿細管拡張が観察されていることから，被験物質による尿細管の障害とともに尿濃縮による腎乳頭への障害が考えられた．また，血液生化学検査においても 300 および 1000 mg/kg群でクレアチニンが，また，1000 mg/kg群でBUNの高値が認められ，腎障害が示唆された．その他，血液生化学検査で 1000 mg/kg群に認められた総タンパク，アルブミン，A/G，ALP，塩素およびカリウムの変化も肝臓あるいは腎臓に対する被験物質の影響を反映するものと考えられた．同群で認められた総ビリルビンの減少は毒性学的意義が乏しいものと考えられるため被験物質投与の影響とは判断しなかった．1000 mg/kg群で観察された胸腺の萎縮は，組織学的には皮質および髄質領域の萎縮であり，器官重量にも低値が認められていることから被験物質投与の影響と考えられた．

雌においても 1000 mg/kg群で肝臓および腎臓重量が高値を示し，剖検で肝臓の肥大が観察され，肝臓および腎臓に及ぼす被験物質投与の影響が示唆された．しかし，病理組織学検査では影響を示唆する変化は認められず，雄に比べ雌に対する被験物質投与の影響は軽度なものと考えられた．

その他，雌雄の 1000 mg/kg群で脳，副腎および精巣重量の高値が認められたが，病理組織学検査では相当する所見は認められず，相対重量のみの変化であることから同群の低体重に起因する二次的な変化と考えられた．

以上のことから，２，４，６－トリブロモフェノールの反復投与により投与後の一般状態の変化で雌雄の 300 mg/kg以上の投与群で流涎が観察された．また，雌雄とも1000 mg/kg群で体重の増加抑制および摂餌量の低値が認められた．さらに，雄の血液生化学検査で 300 mg/kg以上の投与群でクレアチニンが高値を示し，1000 mg/kg群の病理学検査および血液生化学検査において，被験物質投与による主として肝臓および腎臓に及ぼす影響が示唆される変化が認められた．したがって，雌雄とも無影響量は100 mg/kg/dayと判断された．

12.2　生殖発生毒性

性周期，交尾能および受胎能に被験物質投与の影響は認められなかった．交尾しなかった動物の病理学検査では生殖器系に特異的な変化は認められなかった．分娩時観察では妊娠動物の全例が正常に分娩し，妊娠期間にも被験物質投与の明らかな影響は認められなかった．1000 mg/kg群で雌雄の新生児の生後０および４日の体重が低値を示し，生後４日の生児数および生存率が低値を示したことから，被験物質投与による出生前後の新生児の発育抑制および生存性に対する影響が示唆された．なお，1000 mg/kg群で全児死亡動物が１例観察されたが，病理学検査の結果からは母動物には被験物質投与の影響と考えられる所見は認められなかった．しかし，前述のごとく新生児の生後４日の生存率が明らかな低値を示していることから，新生児に対する本被験物質の影響に起因したものと考えられた．
その他，出産率，出生率に被験物質投与の影響は認められず，新生児の外表にも被験物質投与の影響は認められなかった．また，死亡児の剖検で 1000 mg/kg群に認められた右鎖骨下動脈起始異常｛Crj:CD(SD)胎児の背景値[10]［12施設分：施設間の変動（施設間内変動）］：0.03～0.63%（0～4.55%）｝は３例中２例が同腹児の発現であり，被験物質投与との関連は明らかではなかった．哺育４日の剖検では雌の 1000 mg/kg群で肝臓の白色斑点の発生率が増加を示したが，母動物２例から各２例の発現であり，雄ではこの所見は対照群でも認められ，発生率の増加も認められないことから被験物質投与の影響とは考えなかった．

以上のことから，２，４，６－トリブロモフェノールの雌雄の生殖に及ぼす影響は1000 mg/kg/day投与でも認められず，無影響量は 1000 mg/kg/dayと判断された．
児動物の発生・発育に及ぼす影響は 1000 mg/kg/day投与で発育抑制が認められ，生後４日生児数および生存率が低値を示したことから無影響量は 300 mg/kg/dayと判断された．

13. 参 考 文 献：

1) Lyubimov AV, Babin VV, Kartashov AI: Developmental neurotoxicity and immuno toxicity of 2,4,6-tribromophenol in Wistar rats. Neurotoxicology Apr; 19(2) :303-312 (1998)

2) OECD guideline for testing of chemicals: Extended Steering Group Document. No. 3(1990).

3) Shayne, C. G. and Carrol, S. W. : Statics and Experimental Design For Toxicologists. Telford Press (1986).

4) 佐野正樹，岡山佳弘：医薬安全性研究会会報，No. 32, p. 21 (1990).

5) YOSHIDA, M. : J. J. Soc. comp. Stat., 1, p. 111 (1988).

6) 佐久間昭：薬効評価Ｉ－計画と解析－，東京大学出版会（1977）.

7) 石居　進：生物統計学入門，培風館（1975）.

8) 高橋道人監訳：標的臓器の病理．毒性病理学の基礎，ソフトサイエンス社 pp. 59-152 (1992) .

9) Gopinath C, Prentice DE and Lewis DJ: Atlas of Experimental Toxicological Pathology, The urinary system, MTP Press Lmited, Lancaster, pp. 77-90 (1987).

10) Nakatsuka, T. et al: Japan pharmaceutical manufacturers association(JPMA) survey on background control data of developmental and reproductive toxicity studies in rats, rabbits and mice. Cong. Anom., 37, 47-138(1997).

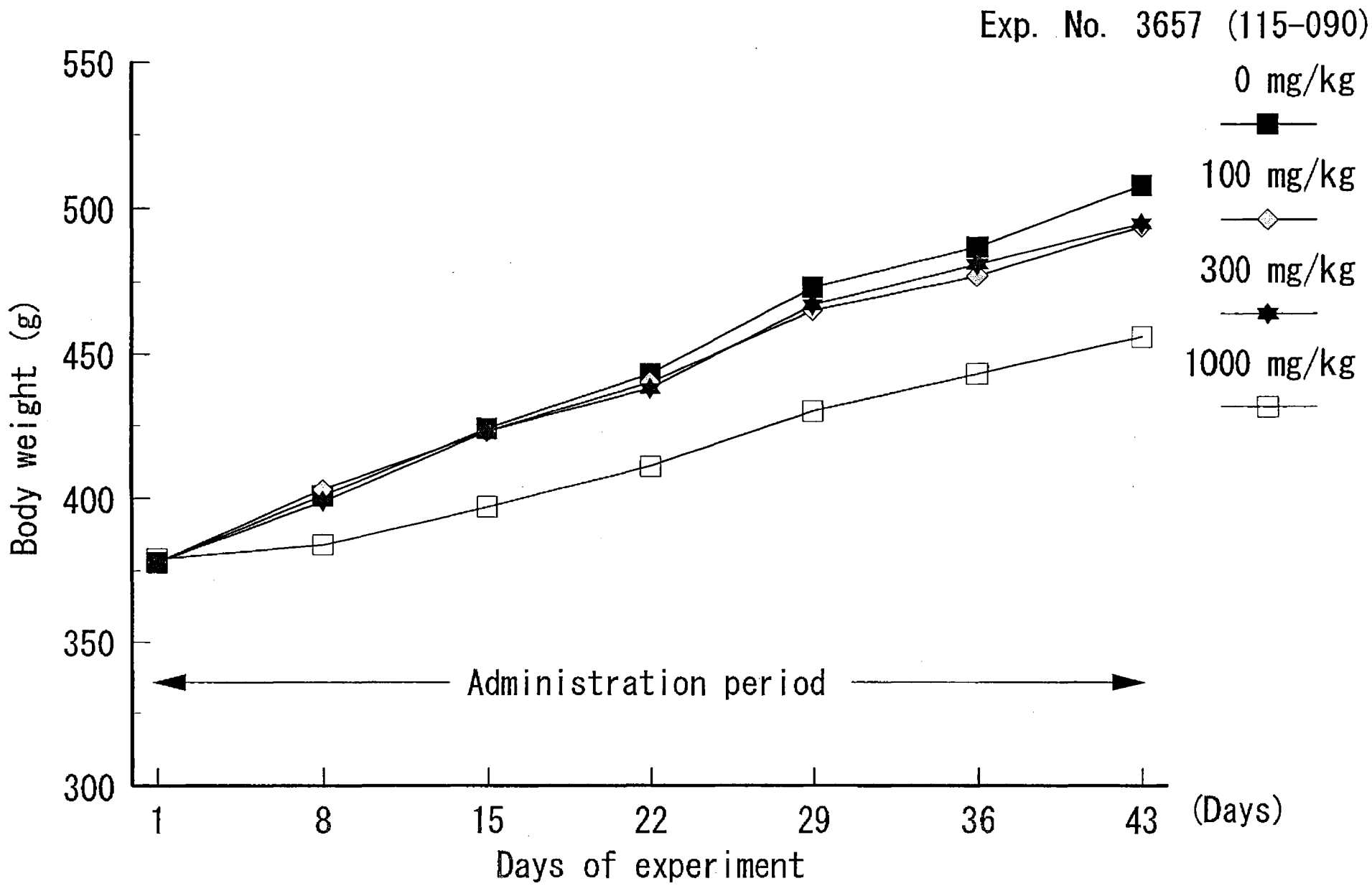

Figure 1 Body weight change of male rats

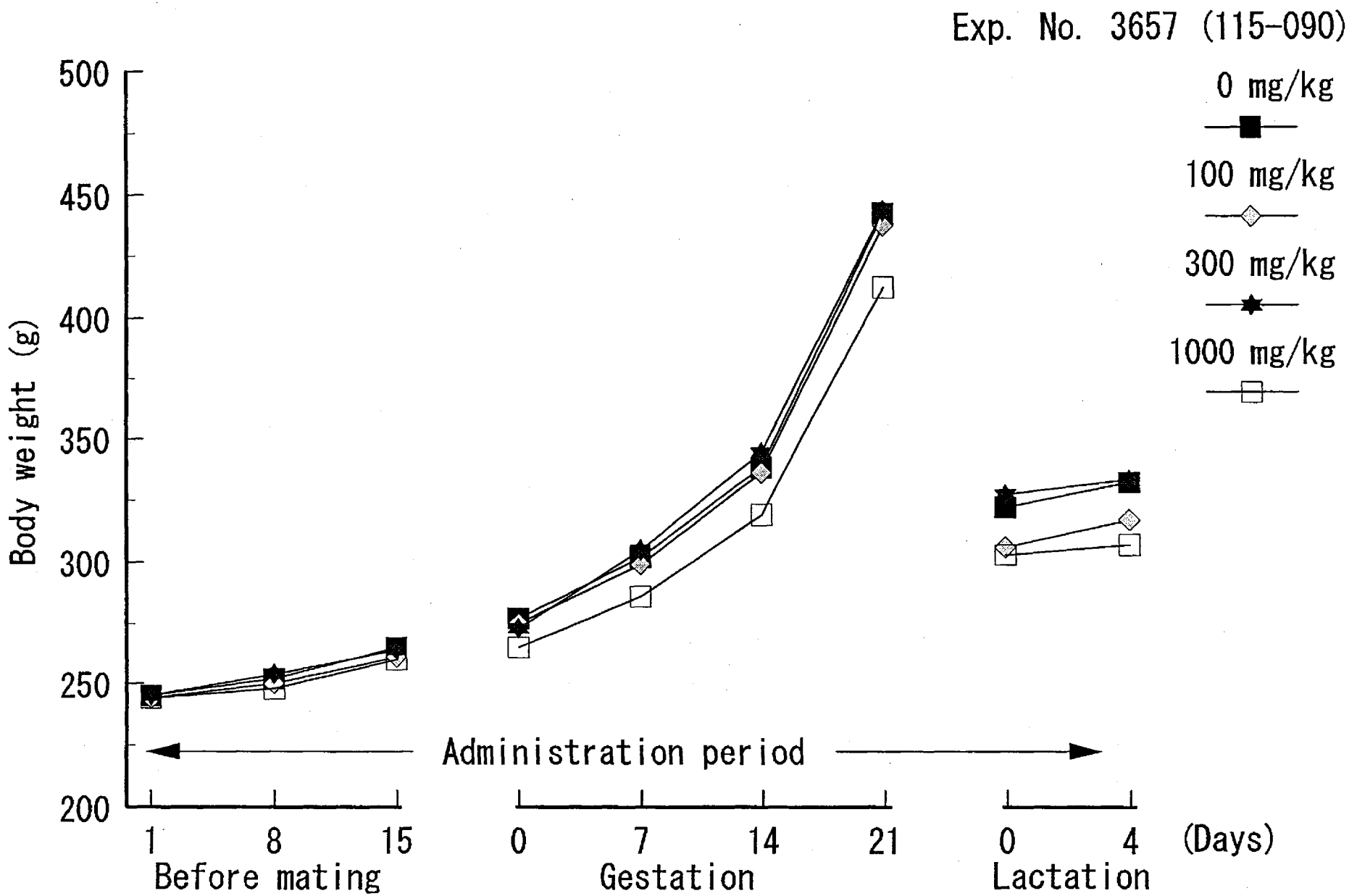

Figure 2 Body weight change of female rats

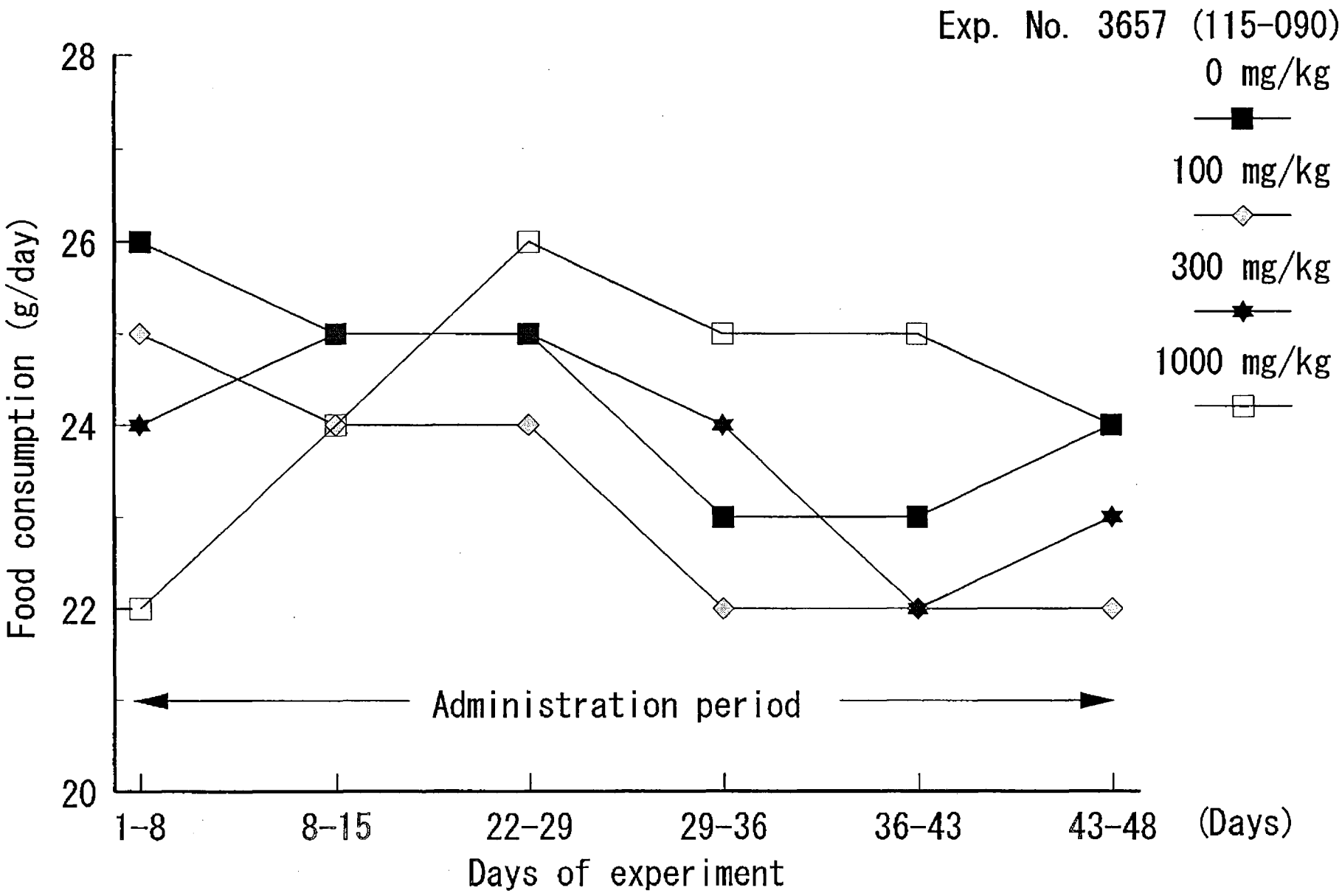

Figure 3 Food consumption of male rats

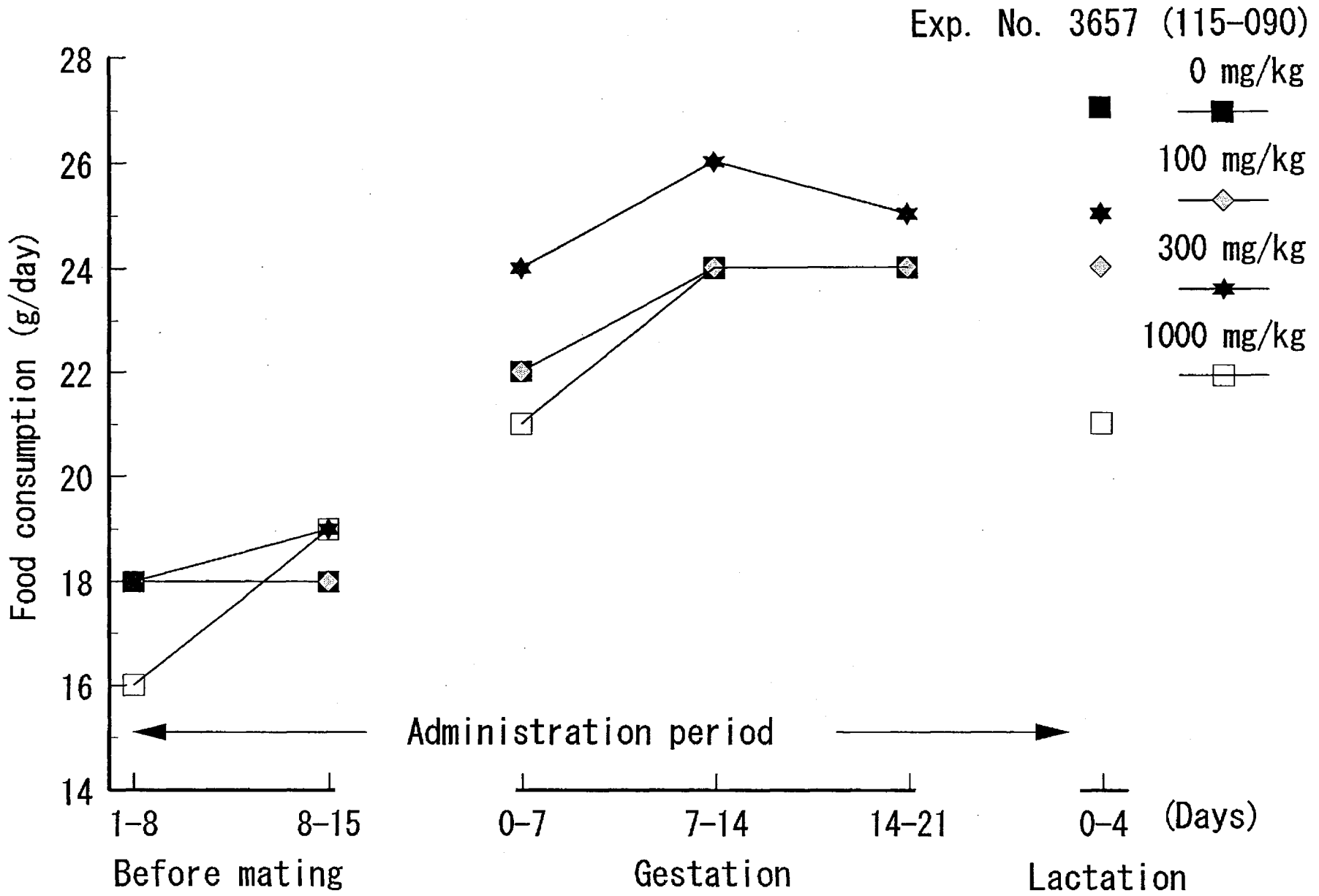

Figure 4 Food consumption of female rats

Table 1-1 Clinical observations in male rats Exp. No. 3657 (115-090)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of experiment 1- 7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42	43-49	Total (1-49)
number per group	0	12	12	12	12	12	12	12	
	100	12	12	12	12	12	12	12	
	300	12	12	12	12	12	12	12	
	1000	12	12	12	12	12	12	12	
normal	0	12	12	12	11	10	12	12	10
	100	12	12	12	12	12	12	11	11
	300	8	3	3	3	4	6	2	0
	1000	0	0	0	0	0	0	0	0
loss of hair	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	1 a)	1 b)
	300	0	0	0	0	0	0	0	0
	1000	0	0	0	0	0	0	0	0
dirty hair	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0
	1000	1	0	0	0	0	0	1	2
crust	0	0	0	0	1	1	0	0	1
	100	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0
	1000	0	0	0	0	0	0	0	0
tissue-mass/surface	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0
	1000	0	0	0	0	0	0	1	1
tissue-mass/subcut. site	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0
	1000	0	0	0	0	0	0	1	1
salivation	0	0	0	0	0	1	0	0	1
	100	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	4	9	9	9	8	6	9	12
	1000	12	12	12	12	12	12	12	12
teeth abnormality	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	1	1
	1000	0	0	0	0	0	0	0	0

a) No. of animals with clinical sign in group
b) Total no. of animals with clinical sign in group

Table 1-2

Clinical observations in female rats
(Before and during mating period)

Exp. No. 3657 (115-090)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of experiment 1- 7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42	43-49	Total (1-49)
number per group	0	12	12	12	1	1	1	1	
	100	12	12	12	0	0	0	0	
	300	12	12	12	0	0	0	0	
	1000	12	12	12	0	0	0	0	
normal	0	12	11	11	1	1	1	1	11
	100	12	12	12	0	0	0	0	12
	300	12	5	10	0	0	0	0	4
	1000	4	0	1	0	0	0	0	0
loss of hair	0	0	1	1 a)	0	0	0	0	1 b)
	100	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0	0	0
	1000	1	1	2	0	0	0	0	2
crust	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	1	0	0	0	0	1
	1000	0	0	0	0	0	0	0	0
salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	0	7	1	0	0	0	0	7
	1000	8	12	10	0	0	0	0	12

a) No. of animals with clinical sign in group
b) Total no. of animals with clinical sign in group

Table 1-3 Clinical observations in female rats (Gestation period) Exp. No. 3657 (115-090)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of gestation												
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
number per group	0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	100	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	300	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	1000	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
normal	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	100	12	12	12	12	12	12	12	12	11	11	11	11	11
	300	11	12	12	11	10	11	9	9	10	7	10	11	7
	1000	0	0	2	1	2	0	0	1	0	3	1	4	2
loss of hair	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1000	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	1	0	0	1	2	1	3	3	2	5	2	1	5
	1000	12	11	10	11	10	12	12	10	11	9	10	7	9

Table 1-3 -continued

Clinical observations in female rats
(Gestation period)

Exp. No. 3657 (115-090)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of gestation												Total (0- 24)
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
number per group	0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	6	0	
	100	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	0	
	300	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5	1	
	1000	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	0	0	
normal	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	7	0	10
	100	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	5	0	11
	300	10	9	7	7	7	9	12	11	10	12	5	1	4
	1000	1	1	0	0	0	3	2	4	2	11	0	0	0
loss of hair	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
	100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1000	2	2	2	2	2	2	2	2	3	1	0	0	3
salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	300	2	3	5	5	5	3	0	1	2	0	0	0	8
	1000	10	11	12	12	11	8	8	7	8	0	0	0	12

Table 1-4

Clinical observations in female rats
(Lactation period)

Exp. No. 3657 (115-090)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of lactation 0	1	2	3	4	Total (0- 4)
number per group	0	11	11	11	11	11	
	100	12	12	12	12	12	
	300	12	12	12	12	12	
	1000	12	12	12	12	12	
all pups died	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0
	1000	0	0	0	0	1	1
normal	0	10	10	10	10	10	10
	100	11	11	11	11	11	11
	300	9	9	10	9	12	6
	1000	9	9	9	7	10	3
loss of hair	0	1	1	1	1	1	1
	100	1	1	1	1	1	1
	300	0	0	0	0	0	0
	1000	1	1	2	2	1	2
salivation	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0
	300	3	3	2	3	0	6
	1000	3	2	2	3	0	8

Table 2-1 Body weight change of male rats Exp. No. 3657 (115-090)

Unit : g

Dose level (mg/kg)		0			100			300			1000		
No. of animals		12			12			12			12		
		Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)
Days of experiment	1	378	± 11	(12)	378	± 11	(12)	378	± 11	(12)	379	± 11	(12)
	8	401	± 19	(12)	403	± 16	(12)	399	± 17	(12)	384	± 12*	(12)
	15	424	± 23	(12)	423	± 21	(12)	423	± 20	(12)	397	± 17**	(12)
	22	443	± 24	(12)	440	± 27	(12)	438	± 23	(12)	411	± 19**	(12)
	29	473	± 27	(12)	465	± 29	(12)	467	± 25	(12)	430	± 22**	(12)
	36	487	± 30	(12)	477	± 29	(12)	481	± 28	(12)	443	± 24**	(12)
	43	508	± 35	(12)	494	± 32	(12)	495	± 41	(12)	456	± 26**	(12)
	49	492	± 34	(12)	478	± 31	(12)	478	± 36	(12)	422	± 25**	(12)
Gain	1-43	129	± 29	(12)	115	± 26	(12)	116	± 42	(12)	77	± 25**	(12)

Significant difference from control group; *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

Table 2-2 Body weight change of female rats Exp. No. 3657 (115-090)

Unit : g

Dose level (mg/kg)		0			100			300			1000		
Before mating period													
No. of animals		12			12			12			12		
		Mean ±	S.D.	(N)	Mean ±	S.D.	(N)	Mean ±	S.D.	(N)	Mean ±	S.D.	(N)
Days of before mating	1	245 ±	8	(12)	244 ±	7	(12)	245 ±	8	(12)	244 ±	7	(12)
	8	252 ±	8	(12)	250 ±	11	(12)	254 ±	11	(12)	248 ±	7	(12)
	15	265 ±	10	(12)	261 ±	11	(12)	264 ±	13	(12)	260 ±	8	(12)
Gain	1-15	20 ±	9	(12)	16 ±	5	(12)	19 ±	9	(12)	15 ±	8	(12)
Gestation period													
No. of dams		11			12			12			12		
		Mean ±	S.D.	(N)	Mean ±	S.D.	(N)	Mean ±	S.D.	(N)	Mean ±	S.D.	(N)
Days of gestation	0	277 ±	10	(11)	275 ±	15	(12)	273 ±	13	(12)	265 ±	11	(12)
	7	302 ±	13	(11)	299 ±	11	(12)	305 ±	14	(12)	286 ±	12*	(12)
	14	338 ±	17	(11)	336 ±	14	(12)	344 ±	19	(12)	319 ±	13*	(12)
	21	442 ±	20	(11)	437 ±	19	(12)	443 ±	26	(12)	412 ±	12**	(12)
Gain	0-21	165 ±	14	(11)	162 ±	18	(12)	170 ±	18	(12)	146 ±	8**	(12)
Lactation period													
No. of dams		11			12			12			12		
		Mean ±	S.D.	(N)	Mean ±	S.D.	(N)	Mean ±	S.D.	(N)	Mean ±	S.D.	(N)
	0	322 ±	22	(11)	306 ±	19	(12)	327 ±	27	(12)	303 ±	11	(12)
	4	332 ±	16	(11)	317 ±	27	(12)	333 ±	22	(12)	307 ±	15*	(11)
Gain	0- 4	10 ±	16	(11)	11 ±	26	(12)	7 ±	19	(12)	4 ±	8	(11)

Significant difference from control group; *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

Table 3-1 Food consumption of male rats Exp. No. 3657 (115-090)

Unit : g/day

Dose level (mg/kg)		0			100			300			1000		
No. of animals		12			12			12			12		
		Mean ±	S.D.	(N)	Mean ±	S.D.	(N)	Mean ±	S.D.	(N)	Mean ±	S.D.	(N)
Days of experiment	1- 8	26 ±	3	(12)	25 ±	2	(12)	24 ±	2	(12)	22 ±	2**	(12)
	8-15	25 ±	3	(12)	24 ±	2	(12)	25 ±	2	(12)	24 ±	2	(12)
	22-29	25 ±	2	(11)	24 ±	2	(12)	25 ±	2	(12)	26 ±	3	(12)
	29-36	23 ±	3	(12)	22 ±	2	(12)	24 ±	2	(12)	25 ±	4	(12)
	36-43	23 ±	3	(12)	22 ±	2	(12)	22 ±	7	(12)	25 ±	3	(12)
	43-48	24 ±	3	(12)	22 ±	3	(12)	23 ±	4	(12)	24 ±	5	(12)
Cumulative consumption (g)	1-15	352 ±	36	(12)	344 ±	30	(12)	340 ±	29	(12)	322 ±	27	(12)
	22-48	615 ±	59	(11)	591 ±	46	(12)	614 ±	92	(12)	657 ±	80	(12)

Significant difference from control group; *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

Table 3-2 Food consumption of female rats Exp. No. 3657 (115-090)

Unit : g/day

Dose level (mg/kg)		0			100			300			1000		
Before mating period													
No. of animals		12			12			12			12		
		Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)
Days of before mating	1- 8	18	± 1	(12)	18	± 2	(12)	18	± 2	(12)	16	± 1**	(12)
Cumulative consumption (g)	8-15	18	± 2	(12)	18	± 1	(12)	19	± 2	(12)	19	± 1	(12)
	1-15	253	± 18	(12)	252	± 20	(12)	260	± 22	(12)	244	± 15	(12)
Gestation period													
No. of dams		11			12			12			12		
		Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)
Days of gestation	0- 7	22	± 2	(11)	22	± 1	(12)	24	± 2	(12)	21	± 1	(12)
	7-14	24	± 3	(11)	24	± 1	(12)	26	± 3	(12)	24	± 2	(12)
	14-21	24	± 2	(11)	24	± 2	(12)	25	± 3	(12)	24	± 2	(12)
Cumulative consumption (g)	0-21	498	± 42	(11)	485	± 24	(12)	525	± 52	(12)	486	± 30	(12)
Lactation period													
No. of dams		11			12			12			11		
		Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)
Days of lactation	0- 4	27	± 8	(11)	24	± 12	(12)	25	± 9	(12)	21	± 4	(11)

Significant difference from control group; *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

Table 4-1 Hematology of male rats Exp. No. 3657 (115-090)

Dose level (mg/kg)	0		100		300		1000	
No. of animals	12		12		12		12	
	Mean ± S.D.	(N)	Mean ± S.D.	(N)	Mean ± S.D.	(N)	Mean ± S.D.	(N)
HCT(%)	44.1 ± 1.6	(12)	44.6 ± 1.1	(12)	44.1 ± 1.9	(12)	43.6 ± 1.9	(12)
HGB(g/dl)	15.3 ± 0.4	(12)	15.5 ± 0.4	(12)	15.3 ± 0.6	(12)	15.1 ± 0.7	(12)
RBC ($\times 10^6$/mm^3)	8.23 ± 0.34	(12)	8.35 ± 0.19	(12)	8.23 ± 0.30	(12)	8.16 ± 0.48	(12)
MCV (μm^3)	53.7 ± 1.5	(12)	53.4 ± 1.2	(12)	53.7 ± 1.6	(12)	53.5 ± 1.6	(12)
MCH(pg)	18.6 ± 0.6	(12)	18.6 ± 0.5	(12)	18.6 ± 0.6	(12)	18.5 ± 0.7	(12)
MCHC(%)	34.6 ± 0.6	(12)	34.8 ± 0.6	(12)	34.7 ± 0.3	(12)	34.5 ± 0.5	(12)
PLT ($\times 10^3$/mm^3)	1090 ± 115	(12)	1100 ± 111	(12)	1024 ± 116	(12)	1093 ± 124	(12)
WBC ($\times 10^3$/mm^3)	9.3 ± 3.0	(12)	9.7 ± 3.8	(12)	9.5 ± 3.2	(12)	8.6 ± 2.2	(12)
Differential leukocyte counts(%)								
NEUT	15 ± 4	(12)	16 ± 6	(12)	16 ± 5	(12)	18 ± 6	(12)
LYMPH	80 ± 4	(12)	80 ± 7	(12)	80 ± 5	(12)	78 ± 7	(12)
MONO	3 ± 1	(12)	2 ± 1	(12)	2 ± 1	(12)	3 ± 1	(12)
EOSN	1 ± 0	(12)	1 ± 1	(12)	1 ± 0	(12)	1 ± 0	(12)
BASO	0 ± 0	(12)	0 ± 0	(12)	0 ± 0	(12)	0 ± 0	(12)
LUC	1 ± 0	(12)	1 ± 0	(12)	1 ± 0	(12)	1 ± 1	(12)

NEUT : Neutrophil LYMPH : Lymphocyte MONO : Monocyte EOSN : Eosinophil BASO : Basophil LUC : Large unstained cells
Significant difference from control group; *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

Table 4-2 Coagulation of male rats Exp. No. 3657 (115-090)

Dose level (mg/kg)	0		100		300		1000	
No. of animals	12		12		12		12	
	Mean ± S.D.	(N)	Mean ± S.D.	(N)	Mean ± S.D.	(N)	Mean ± S.D.	(N)
PT(sec.)	14.2 ± 0.7	(12)	14.6 ± 0.5	(12)	15.0 ± 1.1	(12)	15.6 ± 1.2**	(12)
APTT(sec.)	24.8 ± 1.9	(12)	24.5 ± 2.0	(12)	25.3 ± 2.0	(12)	26.7 ± 2.6	(12)
Fibrinogen(mg/dl)	222 ± 16	(12)	208 ± 13	(12)	214 ± 19	(12)	240 ± 35	(12)

Significant difference from control group; *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

Table 5 Blood chemistry of male rats Exp. No. 3657 (115-090)

Dose level (mg/kg)	0		100		300		1000	
No. of animals	12		12		12		12	
	Mean ± S.D.	(N)	Mean ± S.D.	(N)	Mean ± S.D.	(N)	Mean ± S.D.	(N)
T.protein(g/dl)	5.87 ± 0.22	(12)	5.84 ± 0.14	(12)	5.95 ± 0.26	(12)	6.45 ± 0.51**	(12)
Albumin(g/dl)	3.36 ± 0.13	(12)	3.33 ± 0.09	(12)	3.39 ± 0.19	(12)	3.88 ± 0.29**	(12)
A/G	1.34 ± 0.06	(12)	1.33 ± 0.09	(12)	1.33 ± 0.10	(12)	1.51 ± 0.08**	(12)
Glucose(mg/dl)	152 ± 25	(12)	157 ± 21	(12)	157 ± 18	(12)	149 ± 14	(12)
Triglyceride(mg/dl)	49.4 ± 17.9	(12)	47.7 ± 14.6	(12)	55.6 ± 28.8	(12)	62.0 ± 33.7	(12)
T.cholesterol(mg/dl)	61 ± 14	(12)	60 ± 14	(12)	54 ± 15	(12)	57 ± 14	(12)
BUN(mg/dl)	13.3 ± 1.4	(12)	13.6 ± 2.1	(12)	13.2 ± 2.3	(12)	20.9 ±11.4	(12)
Creatinine(mg/dl)	0.27 ± 0.03	(12)	0.30 ± 0.04	(12)	0.33 ± 0.07*	(12)	0.47 ± 0.26**	(12)
T.bilirubin(mg/dl)	0.05 ± 0.01	(12)	0.05 ± 0.01	(12)	0.04 ± 0.01	(12)	0.02 ± 0.01**	(12)
GOT(U/l)	77 ± 10	(12)	77 ± 13	(12)	72 ± 7	(12)	71 ± 8	(12)
GPT(U/l)	32 ± 5	(12)	34 ± 7	(12)	29 ± 4	(12)	38 ± 7	(12)
ALP(U/l)	354 ± 74	(12)	440 ± 162	(12)	342 ± 102	(12)	514 ± 155*	(12)
Gamma-GTP(U/l)	0.5 ± 0.1	(12)	0.6 ± 0.2	(12)	0.5 ± 0.2	(12)	0.5 ± 0.2	(12)
Sodium(mmol/l)	141.3 ± 1.2	(12)	141.5 ± 0.8	(12)	141.5 ± 0.7	(12)	141.9 ± 1.3	(12)
Potassium(mmol/l)	4.46 ± 0.29	(12)	4.40 ± 0.25	(12)	4.38 ± 0.30	(12)	4.03 ± 0.25**	(12)
Chloride(mmol/l)	106.6 ± 1.2	(12)	107.6 ± 1.1	(12)	107.8 ± 1.5	(12)	119.0 ± 3.6**	(12)
Calcium(mg/dl)	9.58 ± 0.51	(12)	9.38 ± 0.23	(12)	9.47 ± 0.27	(12)	9.88 ± 0.34	(12)
I.phosphorus(mg/dl)	6.31 ± 0.64	(12)	5.91 ± 0.52	(12)	5.68 ± 0.58	(12)	7.28 ± 1.24	(12)

Significant difference from control group; *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

Table 6-1 Absolute and relative organ weight of male rats Exp. No. 3657 (115-090)

Dose level (mg/kg)		0		100		300		1000	
No. of animal examined		12		12		12		12	
		Mean ±	S.D.	Mean ±	S.D.	Mean ±	S.D.	Mean ±	S.D.
Body weight (g)		492 ±	34	478 ±	31	478 ±	36	422 ±	25
Brain	(g)	2.25 ±	0.08	2.22 ±	0.08	2.25 ±	0.08	2.20 ±	0.06
	(g%)	0.460 ±	0.042	0.465 ±	0.033	0.473 ±	0.041	0.522 ±	0.032**
Thymus	(mg)	299 ±	81	269 ±	52	269 ±	66	201 ±	57**
	(mg%)	60.382 ±	14.897	56.587 ±	12.134	56.483 ±	13.955	47.291 ±	12.204
Liver	(g)	13.99 ±	1.72	13.18 ±	1.31	14.20 ±	1.99	16.23 ±	2.32*
	(g%)	2.834 ±	0.218	2.751 ±	0.152	2.964 ±	0.285	3.837 ±	0.447**
Spleen	(g)	0.73 ±	0.14	0.69 ±	0.09	0.73 ±	0.09	0.63 ±	0.10
	(g%)	0.149 ±	0.023	0.144 ±	0.016	0.152 ±	0.016	0.149 ±	0.020
Kidneys	(g)	3.34 ±	0.36	3.15 ±	0.17	3.23 ±	0.31	3.47 ±	0.37
	(g%)	0.678 ±	0.054	0.661 ±	0.053	0.679 ±	0.083	0.824 ±	0.101**
Adrenals	(mg)	60 ±	7	56 ±	6	64 ±	7	64 ±	6
	(mg%)	12.257 ±	1.299	11.807 ±	1.277	13.494 ±	1.966	15.304 ±	1.697**
Testes	(g)	3.55 ±	0.32	3.50 ±	0.25	3.47 ±	0.32	3.35 ±	0.25
	(g%)	0.721 ±	0.062	0.733 ±	0.067	0.729 ±	0.080	0.794 ±	0.046*
Epididymides	(mg)	1319 ±	75	1220 ±	124	1341 ±	109	1235 ±	111
	(mg%)	268.582 ±	16.867	256.085 ±	31.810	281.498 ±	26.289	292.996 ±	27.221

(%) (Organ weight / body weight) x 100
Significant difference from control group; *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

Table 6-2 Absolute and relative organ weight of female rats Exp. No. 3657 (115-090)

Dose level (mg/kg)		0		100		300		1000	
No. of dams examined		11		12		12		11	
		Mean ±	S.D.	Mean ±	S.D.	Mean ±	S.D.	Mean ±	S.D.
Body weight (g)		332 ±	16	317 ±	27	333 ±	22	307 ±	15
Brain	(g)	2.03 ±	0.06	2.07 ±	0.10	2.00 ±	0.10	2.04 ±	0.05
	(g%)	0.613 ±	0.034	0.657 ±	0.067	0.602 ±	0.038	0.665 ±	0.025*
Thymus	(mg)	157 ±	46	134 ±	48	168 ±	75	137 ±	32
	(mg%)	47.175 ±	13.289	41.733 ±	13.767	49.633 ±	20.449	44.365 ±	9.118
Liver	(g)	13.70 ±	0.80	13.48 ±	2.07	14.39 ±	1.76	15.74 ±	1.28**
	(g%)	4.138 ±	0.287	4.230 ±	0.396	4.312 ±	0.393	5.117 ±	0.265**
Spleen	(g)	0.60 ±	0.09	0.64 ±	0.10	0.61 ±	0.13	0.57 ±	0.09
	(g%)	0.181 ±	0.029	0.201 ±	0.026	0.183 ±	0.031	0.185 ±	0.029
Kidneys	(g)	2.15 ±	0.20	2.18 ±	0.11	2.22 ±	0.19	2.36 ±	0.25
	(g%)	0.649 ±	0.072	0.694 ±	0.078	0.666 ±	0.047	0.772 ±	0.094**
Adrenals	(mg)	77 ±	7	82 ±	11	87 ±	15	84 ±	8
	(mg%)	23.171 ±	1.572	25.991 ±	3.418	25.988 ±	4.091	27.315 ±	3.415**
Ovaries	(mg)	108 ±	30	111 ±	15	98 ±	11	94 ±	12
	(mg%)	32.738 ±	9.135	35.252 ±	6.883	29.454 ±	3.137	30.501 ±	4.301

(%) (Organ weight / body weight) x 100
Significant difference from control group; *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

Table 7-1 Summary of gross findings (sacrificed and not copulation) Exp. No. 3657 (115-090)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)		0	100	300	1000
No. of animals necropsied		12	12	12	12
Organ	Findings				
HEMATOPOIETIC SYSTEM					
thymus	atrophic	0	0	0	4
	red patch/zone	1	1	0	1
DIGESTIVE SYSTEM					
liver	enlarged	0	0	0	3
	white patch/zone	1	0	0	0
abdominal cavity					
	mass	0	0	0	1
URINARY SYSTEM					
kidney	white patch/zone	1	0	0	2
REPRODUCTIVE SYSTEM					
epididymis	nodule	0	1	0	0
ENDOCRINE SYSTEM					
adrenal gland	hypertrophic	0	0	0	2
INTEGUMENTARY SYSTEM					
hair	thin	0	1	0	0
subcutaneous tissue					
	mass	0	0	0	1

Significant difference from control group; * : P < 0.05 ** : P < 0.01

Table 7-2 Summary of gross findings (sacrificed) Exp. No. 3657 (115-090)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)		0	100	300	1000
No. of animals necropsied		11	12	12	11
Organ	Findings				
HEMATOPOIETIC SYSTEM					
thymus	red patch/zone	0	0	0	1
RESPIRATORY SYSTEM					
lung	brown patch/zone	0	1	0	1
DIGESTIVE SYSTEM					
liver	enlarged	0	0	0	2
	scarred	0	0	0	1
	white patch/zone	0	1	0	2
REPRODUCTIVE SYSTEM					
ovary	cyst	0	1	0	0
uterus	dilated lumen	0	0	1	0
ENDOCRINE SYSTEM					
adrenal gland	hypertrophic	0	1	2	1
INTEGUMENTARY SYSTEM					
hair	thin	1	1	0	1

Significant difference from control group; * : P < 0.05 ** : P < 0.01

Table 7-3 Summary of gross findings (not copulation) Exp. No. 3657 (115-090)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)		0	100	300	1000
No. of animals necropsied		1	0	0	0
Organ	Findings				
HEMATOPOIETIC SYSTEM					
spleen	granular	1	-	-	-
	nodule	1	-	-	-
RESPIRATORY SYSTEM					
lung	brown patch/zone	1	-	-	-
REPRODUCTIVE SYSTEM					
uterus	dilated lumen	1	-	-	-

Table 8-1 Summary of histological findings (all pups died) Exp. No. 3657 (115-090)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0				100				300				1000			
No. of animals initially in study	0				0				0				1			
No. of animals necropsied	0				0				0				1			
No. of animals examined histologically	0				0				0				1			
Organ / Findings	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3
HEMATOPOIETIC SYSTEM																
spleen													(1)			
deposit, pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
RESPIRATORY SYSTEM																
lung													(1)			
cellular infiltration	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
DIGESTIVE SYSTEM																
liver													(1)			
fatty change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
REPRODUCTIVE SYSTEM																
uterus													(1)			
microgranuloma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked
=: benign #: malignant
(): No. of animals examined microscopically at this site. -: Not applicable.

Table 8-2-1 Summary of histological findings (sacrificed) Exp. No. 3657 (115-090)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)		0	100	300	1000
No. of animals initially in study		11	12	12	12
No. of animals necropsied		11	12	12	12
No. of animals examined histologically		11	12	12	12
Organ	Findings				
CARDIOVASCULAR SYSTEM					
heart					
	cellular infiltration,lymphocyte	2	-	-	1
	fibrosis	1	-	-	0
HEMATOPOIETIC SYSTEM					
spleen					
	deposit, pigment	11	-	-	12
thymus					
	hemorrhage	2	4	4	4
	atrophy	0	0	0	3
DIGESTIVE SYSTEM					
liver					
	cytological alteration	0	1	0	0
	deposit, pigment	1	0	0	0
	fatty change	6	5	3	0**
	hypertrophy, hepatocyte	0	0	0	12**
	necrosis, focal	0	0	0	1
	accumulation of macrophage	0	0	0	1
	cellular infiltration,lymphocyte	1	2	3	2
	microgranuloma	5	4	4	3
peritoneum					
	fat granuloma	-	-	-	1 (1)
URINARY SYSTEM					
kidney					
	basophilic tubules	8	9	9	12
	cast, hyaline	1	1	0	8**
	dilatation, tubules	0	0	0	7**
	eosinophilic body	5	11*	9	7
	mineralization	1	0	0	1
	papillary necrosis	0	0	0	5*
	cellular infiltration,lymphocyte	1	1	0	6*
	inflammatory infiltration	0	1	0	0
	=lipoma	0	1	0	0

=: benign #: malignant
(): No. of animals examined microscopically at this site. -: Not applicable.
Significant difference from control group; * : P < 0.05 ** : P < 0.01

Table 8-2-1 -continued Summary of histological findings (sacrificed) Exp. No. 3657 (115-090)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)		0	100	300	1000
No. of animals initially in study		11	12	12	12
No. of animals necropsied		11	12	12	12
No. of animals examined histologically		11	12	12	12
Organ	Findings				
REPRODUCTIVE SYSTEM					
testis					
	atrophy, seminiferous tubule	0	-	-	1
	cellular infiltration	1	-	-	0
epididymis					
	cellular infiltration,lymphocyte	1	-	-	1
ENDOCRINE SYSTEM					
adrenal gland					
	angiectasis	1	-	-	1
	degeneration, vacuolar	4	-	-	3
INTEGUMENTARY SYSTEM					
subcutaneous tissue					
	abscess	-	-	-	1 (1)

=: benign #: malignant
(): No. of animals examined microscopically at this site. -: Not applicable.
Significant difference from control group; * : P < 0.05 ** : P < 0.01

Table 8-2-2 Summary of histological findings (sacrificed) Exp. No. 3657 (115-090)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0				100				300				1000			
No. of animals initially in study	11				12				12				12			
No. of animals necropsied	11				12				12				12			
No. of animals examined histologically	11				12				12				12			
Organ / Findings	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3
CARDIOVASCULAR SYSTEM																
heart	(11)				(0)				(0)				(12)			
cellular infiltration,lymphocyte	-	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
fibrosis	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
HEMATOPOIETIC SYSTEM																
spleen	(11)				(0)				(0)				(12)			
deposit, pigment	-	11	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	1	0
thymus	(11)				(12)				(12)				(12)			
hemorrhage	-	2	0	0	-	4	0	0	-	4	0	0	-	4	0	0
atrophy	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	3	0	0
DIGESTIVE SYSTEM																
liver	(11)				(12)				(12)				(12)			
cytological alteration	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
deposit, pigment	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
fatty change	-	5	1	0	-	5	0	0	-	3	0	0	-	0	0	0
hypertrophy, hepatocyte	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	12	0	0
necrosis, focal	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0
accumulation of macrophage	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0
cellular infiltration,lymphocyte	-	1	0	0	-	2	0	0	-	3	0	0	-	2	0	0
microgranuloma	-	5	0	0	-	4	0	0	-	4	0	0	-	3	0	0
peritoneum	(0)				(0)				(0)				(1)			
fat granuloma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
URINARY SYSTEM																
kidney	(11)				(12)				(12)				(12)			
basophilic tubules	-	8	0	0	-	9	0	0	-	8	1	0	-	8	4	0**
cast, hyaline	-	0	1	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	7	1	0**
dilatation, tubules	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	6	1	0**
eosinophilic body	-	4	1	0	-	11	0	0*	-	6	3	0	-	6	1	0
mineralization	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0
papillary necrosis	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	3	2	0**
cellular infiltration,lymphocyte	-	1	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	6	0	0
inflammatory infiltration	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
=lipoma	0	-	-	-	1	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked
=: benign #: malignant
(): No. of animals examined microscopically at this site. -: Not applicable.
Significant difference from control group; * : P < 0.05 ** : P < 0.01

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0				100				300				1000			
No. of animals initially in study	11				12				12				12			
No. of animals necropsied	11				12				12				12			
No. of animals examined histologically	11				12				12				12			
Organ / Findings	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3
REPRODUCTIVE SYSTEM																
testis	(11)				(0)				(0)				(12)			
atrophy, seminiferous tubule	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
cellular infiltration	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
epididymis	(11)				(0)				(0)				(12)			
cellular infiltration, lymphocyte	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
ENDOCRINE SYSTEM																
adrenal gland	(11)				(0)				(0)				(12)			
angiectasis	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
degeneration, vacuolar	-	4	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	0
INTEGUMENTARY SYSTEM																
subcutaneous tissue	(0)				(0)				(0)				(1)			
abscess	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	0

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked
=: benign #: malignant
(): No. of animals examined microscopically at this site. -: Not applicable.

Table 8-3-1 Summary of histological findings (sacrificed) Exp. No. 3657 (115-090)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0	100	300	1000
No. of animals initially in study	11	12	12	11
No. of animals necropsied	11	12	12	11
No. of animals examined histologically	11	12	12	11
Organ Findings				
HEMATOPOIETIC SYSTEM				
spleen				
deposit, pigment	11	-	-	11
hematopoiesis, extramedullary	3	-	-	3
thymus				
hemorrhage	0	-	-	1
deposit, pigment	0	-	-	1
RESPIRATORY SYSTEM				
lung				
hemorrhage	-	-	-	1 (1)
cellular infiltration	-	-	-	1 (1)
DIGESTIVE SYSTEM				
liver				
fatty change	2	1	0	0
necrosis, focal	0	3	0	2
accumulation of macrophage	0	0	0	2
microgranuloma	0	0	1	0
hematopoiesis, extramedullary	3	2	2	3
URINARY SYSTEM				
kidney				
basophilic tubules	2	-	-	3
cast, hyaline	1	-	-	0
mineralization	3	-	-	1
REPRODUCTIVE SYSTEM				
ovary				
deposit, pigment	1	-	-	1
mineralization	0	-	-	1
ENDOCRINE SYSTEM				
adrenal gland				
angiectasis	1	-	-	0
accumulation of foamy cells	0	-	-	1

=: benign #: malignant
(): No. of animals examined microscopically at this site. -: Not applicable.
Significant difference from control group; * : P < 0.05 ** : P < 0.01

Table 8-3-1 -continued Summary of histological findings (sacrificed) Exp. No. 3657 (115-090)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0	100	300	1000
No. of animals initially in study	11	12	12	11
No. of animals necropsied	11	12	12	11
No. of animals examined histologically	11	12	12	11
Organ Findings				
NERVOUS SYSTEM				
brain				
dilatation, ventricle	1	-	-	0
INTEGUMENTARY SYSTEM				
skin				
hair follicle atrophy	1 (1)	-	-	1 (1)

=: benign #: malignant
(): No. of animals examined microscopically at this site. -: Not applicable.
Significant difference from control group; * : P < 0.05 ** : P < 0.01

Table 8-3-2 Summary of histological findings (sacrificed) Exp. No. 3657 (115-090)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)		0				100				300				1000			
No. of animals initially in study		11				12				12				11			
No. of animals necropsied		11				12				12				11			
No. of animals examined histologically		11				12				12				11			
Organ	Findings	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3
HEMATOPOIETIC SYSTEM																	
spleen		(11)				(0)				(0)				(11)			
	deposit, pigment	-	11	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	0	0
	hematopoiesis, extramedullary	-	3	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	0
thymus		(11)				(0)				(0)				(11)			
	hemorrhage	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	0
	deposit, pigment	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
RESPIRATORY SYSTEM																	
lung		(0)				(0)				(0)				(1)			
	hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
	cellular infiltration	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
DIGESTIVE SYSTEM																	
liver		(11)				(12)				(12)				(11)			
	fatty change	-	2	0	0	-	0	1	0	-	0	0	0	-	0	0	0
	necrosis, focal	-	0	0	0	-	3	0	0	-	0	0	0	-	2	0	0
	accumulation of macrophage	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	2	0	0
	microgranuloma	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0
	hematopoiesis, extramedullary	-	3	0	0	-	2	0	0	-	2	0	0	-	3	0	0
URINARY SYSTEM																	
kidney		(11)				(0)				(0)				(11)			
	basophilic tubules	-	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	0
	cast, hyaline	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
	mineralization	-	3	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
REPRODUCTIVE SYSTEM																	
ovary		(11)				(0)				(0)				(11)			
	deposit, pigment	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
	mineralization	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
ENDOCRINE SYSTEM																	
adrenal gland		(11)				(0)				(0)				(11)			
	angiectasis	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
	accumulation of foamy cells	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked
=: benign #: malignant
(): No. of animals examined microscopically at this site. -: Not applicable.

Table 8-3-2 -continued Summary of histological findings (sacrificed) Exp. No. 3657 (115-090)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0				100				300				1000			
No. of animals initially in study	11				12				12				11			
No. of animals necropsied	11				12				12				11			
No. of animals examined histologically	11				12				12				11			
Organ / Findings	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3
NERVOUS SYSTEM																
brain	(11)				(0)				(0)				(11)			
dilatation, ventricle	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
INTEGUMENTARY SYSTEM																
skin	(1)				(0)				(0)				(1)			
hair follicle atrophy	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked
=: benign #: malignant
(): No. of animals examined microscopically at this site. -: Not applicable.

Table 8-4 Summary of histological findings (not copulation) Exp. No. 3657 (115-090)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)		0				100				300				1000			
No. of animals initially in study		1				0				0				0			
No. of animals necropsied		1				0				0				0			
No. of animals examined histologically		1				0				0				0			
Organ	Findings	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3
HEMATOPOIETIC SYSTEM																	
spleen		(1)															
	deposit, pigment	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DIGESTIVE SYSTEM																	
liver		(1)															
	cellular infiltration,lymphocyte	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URINARY SYSTEM																	
kidney		(1)															
	basophilic tubules	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	cellular infiltration,lymphocyte	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENDOCRINE SYSTEM																	
adrenal gland		(1)															
	angiectasis	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	degeneration, vacuolar	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked
=: benign #: malignant
(): No. of animals examined microscopically at this site. -: Not applicable.

Table 8-5 Summary of histological findings (not copulation) Exp. No. 3657 (115-090)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)		0				100				300				1000			
No. of animals initially in study		1				0				0				0			
No. of animals necropsied		1				0				0				0			
No. of animals examined histologically		1				0				0				0			
Organ	Findings	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3
HEMATOPOIETIC SYSTEM																	
spleen	(1)																
	deposit, pigment	-	0	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	capsulitis	-	0	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RESPIRATORY SYSTEM																	
lung	(1)																
	pneumonia	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DIGESTIVE SYSTEM																	
liver	(1)																
	microgranuloma	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URINARY SYSTEM																	
kidney	(1)																
	cellular infiltration,lymphocyte	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	pyelitis	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
REPRODUCTIVE SYSTEM																	
uterus	(1)																
	dilatation, lumen	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	cellular infiltration	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked
=: benign #: malignant
(): No. of animals examined microscopically at this site. -: Not applicable.

Table 9 Copulation and fertility results in rats Exp. No. 3657 (115-090)

Dose level (mg/kg)	0	100	300	1000
No. of pairs mated	12	12	12	12
No. of pairs copulated	11	12	12	12
No. of pregnant females	11	12	12	12
Copulation index (%) 1)	91.7	100.0	100.0	100.0
Fertility index (%) 2)	100.0	100.0	100.0	100.0
Estrus cycle (days) (Mean±S.D.)	4.2± 0.3 (12)	4.2± 0.3 (12)	4.3± 0.5 (12)	4.2± 0.3 (11)

1) (No. of animals with successful copulation / no. of animals mated) x 100
2) (No. of pregnant animals / no. of animals with successful copulation) x 100
Values in parentheses are expressed no. of animals observed
Significant difference from control group; *: $P < 0.05$ **: $P < 0.01$

Table 10 Findings of delivery in dams(F0) Exp. No. 3657 (115-090)

Dose level (mg/kg)	0	100	300	1000
No. of dams observed	11	12	12	12
No. of dams delivered live pups	11	12	12	12
Duration of gestation (Mean ±S.D.)	22.5 ± 0.5	22.5 ± 0.5	22.5 ± 0.7	22.0 ± 0.0*
No. of total corpora lutea (Mean ±S.D.)	209(19.0± 3.9)	231(19.3± 3.7)	209(17.4± 1.8)	200(16.7± 2.0)
No. of total implants (Mean ±S.D.)	175(15.9± 2.0)	204(17.0± 2.3)	195(16.3± 1.9)	189(15.8± 1.4)
No. of total pups born (Mean ±S.D.)	161(14.6± 2.0)	188(15.7± 1.9)	175(14.8± 3.2)	174(14.5± 1.9)
No. of total live pups born (Mean ±S.D.)	161(14.6± 2.0)	187(15.6± 1.9)	174(14.5± 2.6)	174(14.5± 1.9)
Male	87(7.9± 1.4) a)	97(8.1± 2.3) a)	89(7.4± 2.5)	79(6.6± 2.1) a)
Female	74(6.7± 1.9) a)	90(7.5± 1.8) a)	85(7.1± 1.0) a) b)	95(7.9± 1.2) a)
Sex ratio (Mean ±S.D.)	1.29± 0.54	1.17± 0.50	1.07± 0.42	0.88± 0.42
No. of total live pups on day 4 (Mean ±S.D.)				
Male	83(7.5± 1.2)	87(7.3± 2.8)	86(7.2± 2.3)	42(3.5± 2.4)**
Female	72(6.5± 1.9)	84(7.0± 2.2)	80(6.7± 1.2)	49(4.1± 2.9)*
No. of total dead pups born (Mean ±S.D.)	0(0.0±0.0)	1(0.1±0.3)	1(0.1±0.3)	0(0.0±0.0)
stillbirth	0(0.0±0.0)	0(0.0±0.0)	1(0.1±0.3)	0(0.0±0.0)
cannibalism	0(0.0±0.0)	1(0.1±0.3)	0(0.0±0.0)	0(0.0±0.0)
Gestation index (%) 1)	100.0	100.0	100.0	100.0
Implantation index (%,Mean±S.D.) 2)	85.3± 11.7	90.1± 13.2	93.3± 6.9	94.9± 5.9
Delivery index (%,Mean±S.D.) 3)	92.1± 5.8	92.5± 6.6	89.3± 9.4	91.9± 7.0
Live birth index (%,Mean±S.D.) 4)	100.0± 0.0	99.5± 1.8	99.5± 1.7	100.0± 0.0
Viability index on day 4 (%,Mean±S.D.) 5)				
Male	96.2± 8.6	88.6± 23.7	97.4± 6.3	53.3± 34.2**
Female	97.6± 5.4	92.7± 15.5	94.0± 9.6	50.4± 35.1**

1) (No. of females with live pups / no. of pregnant females) x 100
2) (No. of implants / no. of corpora lutea) x 100
3) (No. of pups born / no. of implants) x 100
4) (No. of live pups born / no. of pups born) x 100
5) (No. of live pups on day 4 after birth / no. of live pups born) x 100
a) Includes live pups died before observations
b) Includes a pup retained on day 1 after birth
Significant difference from control group; *: P < 0.05 **: P < 0.01

Table 11 External observations on live pups(F1) from rats Exp. No. 3657 (115-090)

Dose level (mg/kg)	0	100	300	1000
No. of litters	11	12	12	12
No. of live pups examined a) b)	156	180	172	165
No. of live pups with external anomalies (%,Mean±S.D.)	0 -	1 0.6 ± 1.9	1 0.9 ± 3.2	0 -
Type and incidence of external anomalies (%) 1)				
Imperforate anus	0 (0.0)	1 (0.6)	1 (0.6)	0 (0.0)
absence tail	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)
rudiment tail	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)

1) (No. of live pups with external anomalies / no. of live pups examined) x 100
a) Excludes live pups died before observations
b) Excludes a pup retained on day 1 after birth
Significant difference from control group; *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

Table 12 Body weight change of pups(F1) from rats Exp. No. 3657 (115-090)

Unit : g

Dose level (mg/kg)		0			100			300			1000		
No. of litters		11			12			12			12		
		Mean ±	S.D.	(N)	Mean ±	S.D.	(N)	Mean ±	S.D.	(N)	Mean ±	S.D.	(N)
Male													
Days after birth	0	6.6 ±	0.6 a)	(11)	6.5 ±	0.5 a)	(12)	6.4 ±	0.7	(12)	5.5 ±	0.2** a)	(12)
	4	9.6 ±	1.3	(11)	9.2 ±	1.5	(12)	9.4 ±	1.9	(12)	7.8 ±	1.1*	(10)
Female													
Days after birth	0	6.3 ±	0.6 a)	(11)	6.2 ±	0.4 a)	(12)	6.1 ±	0.6 a) b)	(12)	5.1 ±	0.2** a)	(12)
	4	9.3 ±	1.2	(11)	8.8 ±	1.4	(12)	9.1 ±	1.9	(12)	7.0 ±	1.2**	(11)

a) Excludes live pups died before observations
b) Excludes a pup retained on day 1 after birth
Significant difference from control group; *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

Table 13-1 Summary of gross findings of pups(F1) from rats(sacrificed) Exp. No. 3657 (115-090)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)		0	100	300	1000
No. of pups necropsied		83	87	86	42
Organ	Findings				
HEMATOPOIETIC SYSTEM					
thymus	thymic remnant in the neck	3	2	1	0
DIGESTIVE SYSTEM					
liver	white patch/zone	1	0	0	1
	red patch/zone	0	0	0	1
	black patch/zone	0	0	0	2
	pale	0	0	1	0

Significant difference from control group; *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

Table 13-2 Summary of gross findings of pups(F1) from rats(sacrificed) Exp. No. 3657 (115-090)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)		0	100	300	1000
No. of pups necropsied		72	84	80	49
Organ	Findings				
HEMATOPOIETIC SYSTEM					
thymus	thymic remnant in the neck	2	1	0	1
DIGESTIVE SYSTEM					
liver	white patch/zone	0	1	0	4*
	red patch/zone	0	1	0	0
	black patch/zone	0	0	0	1
	green	0	0	0	1
anus	imperforate anus	0	1	1	0
SPECIAL SENSE SYSTEM					
eye	red	0	0	1	0
INTEGUMENTARY SYSTEM					
tail	absence tail	0	1	0	0
	rudiment tail	0	0	1	0
	scab	0	0	0	1

Significant difference from control group; *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$