

最 終 報 告 書

ジアセトンアルコールのラットを用いる
反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験
(試験番号 95-048)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

目次

要約	1
緒言	2
試験目的	2
試験材料および方法	
1. 被験物質	2
2. 供試動物および飼育条件	3
3. 群分けおよび個体識別	3
4. 投与量の設定、試験群の構成および投与方法	3
5. 観察および検査	
1) 親動物に関する項目	
(1) 一般状態観察	4
(2) 体重および摂餌量測定	4
(3) 交配および分娩状態観察	4
(4) 臨床病理学検査	5
(5) 病理学検査	7
2) 新生児に関する項目	
(1) 産児数および性比の観察	7
(2) 外表異常および一般状態観察	8
(3) 体重測定	8
(4) 病理学検査	8
6. 統計処理	8
試験結果	
1. 反復投与毒性	
1) 死亡動物	8
2) 一般状態	8
3) 体重	9
4) 摂餌量	9
5) 雄の尿所見	9
6) 雄の血液学所見	9
7) 雄の血液生化学所見	9
8) 剖検所見	9
9) 器官重量	10
10) 病理組織学所見	10

2. 生殖発生毒性

1) 親動物に及ぼす影響

(1) 交尾率および受胎率	1 1
(2) 黄体数、着床数および着床率	1 1
(3) 出産率および妊娠期間	1 1
(4) 分娩および哺育状態	1 1

2) 新生児に及ぼす影響

(1) 生存性および体重	1 1
(2) 形態	1 2

考察および結論

1. 反復投与毒性	1 2
2. 生殖発生毒性	1 3

参考文献	1 3
------	-----

添付資料

A. 図・群別平均値表

Figures 1, 2	体重	1
Figures 3, 4	摂餌量	3
Tables 1, 2	死亡率	5
Tables 3, 4	一般状態	7
Tables 5, 6	体重	9
Tables 7, 8	摂餌量	1 1
Table 9	尿所見	1 3
Table 10	血液学所見	1 5
Table 11	血液生化学所見	1 6
Tables 12, 13	剖検所見	1 7
Tables 14, 15	器官重量	1 9
Tables 16, 17	病理組織学所見	2 1
Table 18	生殖に及ぼす影響	2 5
Table 19	新生児に及ぼす影響	2 6
Table 20	新生児の外表所見	2 7
Table 21	新生児の内臓所見	2 8

要約

溶剤および防腐剤などとして工業的に広く用いられている高生産量既存化学物質ジアセトンアルコールについて、反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験をSD系〔Crj:CD(SD)〕ラットを用い、0、30、100、300および1000mg/kg/day用量で実施した。動物は1群雌雄各10匹とし、被験物質は交配開始14日前から雄は44日間、雌は分娩後哺育3日（41～45日間）まで投与した。

1. 反復投与毒性

雄親について、300および1000mg/kg群に自発運動の低下および音や接触刺激に対する反応性の低下が投与期間の初期に認められた。体重、摂餌量および尿検査においては変化は認められなかった。血液学および血液生化学検査では、1000mg/kg群に血小板数、GOT、コリンエステラーゼ、総タンパク、総コレステロール、総ビリルビン、尿素窒素、クレアチニンおよびカルシウムの増加ならびにグルコースの減少が認められた。病理学検査では、300および1000mg/kg群に腎臓重量の増加が、1000mg/kg群に肝臓重量および副腎重量の増加が認められた。組織学的には、腎臓に100mg/kg以上の群で近位尿細管上皮における硝子滴の増加、300および1000mg/kg群で好塩基性尿細管の増加および1000mg/kg群で遠位尿細管の拡張が認められた。また、肝臓に1000mg/kg群で肝細胞の肥大が、副腎に300および1000mg/kg群で皮質束状帯細胞の空胞化が認められた。

一方、雌親については、1000mg/kg群の1匹が分娩中に瀕死状態となったので切迫屠殺した。また、同群の交配前期間中の体重増加量は減少した。さらに、雄親で認められたと同じ用量で同様の一般状態の変化、肝臓および副腎の病理組織学的変化ならびに肝臓重量の増加が認められた。腎臓においては、300および1000mg/kg群で遠位尿細管の拡張および近位尿細管上皮の脂肪変性が認められた。

以上の結果から、ジアセトンアルコールのラットへの反復投与により、肝臓、腎臓、副腎などに対する毒性影響が認められ、無影響量は雄で30mg/kg/day、雌で100mg/kg/dayと推定された。

2. 生殖発生毒性

親動物の生殖能について、受胎率、着床数および着床率の減少傾向、ならびに、前述の分娩中に瀕死状態となった1匹および分娩後出産児の全例を捕食あるいは死亡させた別の1匹が1000mg/kg群に認められた。児動物の発生については、1000mg/kg群で総出産児数、分娩率、新生児数、出生率、哺育4日新生児数および哺育4日生存率の減少傾向が認められた。交尾率、黄体数、出産率、妊娠期間、新生児の体重および形態に変化は認められなかった。したがって、雌雄親動物の生殖能および児動物の発生に対する無影響量は、いずれも300mg/kg/dayと推定された。

緒言

ジアセトンアルコールはメチルイソブチルケトンのモルモットにおける代謝物として発見された物質¹⁾で、アセトン在水酸化バリウム存在下で二量化して製造され、セルロースアセテート、ニトロセルロース、セルロイド、油脂、オイル、ワックス、樹脂等の溶剤や医薬品の防腐剤として工業的に広く用いられている。本物質の毒性については、アセトンよりやや強い麻酔作用²⁾およびアセトンと同程度の局所刺激作用を有し³⁾、ラットにおける急性経口LD₅₀値は4.0g/kg⁴⁾で、2ml/kgの単回経口投与により貧血および肝障害が発現することが報告⁵⁾されている。また、サルモネラ復帰変異試験で陰性、*in vitro*ラット肝細胞染色体異常試験で陽性と報告⁶⁾されている。しかし、ジアセトンアルコールの反復投与毒性および生殖発生毒性については明らかにされていない。この試験はOECDの高生産量既存化学物質の安全性点検事業の一環として実施したものである。

試験目的

ジアセトンアルコールを雌雄ラットに反復経口投与し、投与期間中に交配、妊娠および分娩させ、本物質の反復投与毒性ならびに生殖発生毒性を検討する。

試験材料および方法

1. 被験物質 (Appendices 1~4)

ジアセトンアルコール (CAS No. 123-42-2) は、分子量116.16、融点-47.0℃、沸点167.9℃、比重0.9387(20℃/4℃)の無色の液体で、水に極めて溶けやすく、アルコール、エーテル等の有機溶剤に溶けやすい。試験には のもの (ロット番号 純度 99.8%) を入手し、冷暗所 (4℃) で密栓保管し使用した。本物質の詳細はAppendix 1に示した。用いた被験物質は使用期間中安定であったことを確認した (Appendix 2)。被験物質は、溶媒として局方精製水 (共栄製薬株式会社、ロット番号 180880、180964) を用いて所定の投与用量になるような濃度の溶液に調製して投与液とし、1日の使用量ごとに小分けし、使用時まで冷暗所 (4℃) で密栓保管した。投与液は少なくとも7日間は安定であることが確認された (Appendix 3) ので週1回調製し、調製後7日以内に使用した。また、初回と最後に調製したものについて分析し、所定濃度で調製されていることを確認した (Appendix 4)。なお、被験物質の分析のうち原体の分析は、 に委託して実施した。

2. 供試動物および飼育条件 (Appendices 5~8)

動物はSD系 [Crj:CD(SD)] のSPFラットを用いた。ラットは日本チャールス・リバー株式会社 (茨城県新治郡八郷町大字上林955) から雄は8週齢、雌は7週齢で搬入 (雄 57 匹, 雌 57 匹)

し、6日間試験環境に馴化させ、その間に検疫を行い、発育が順調で一般健康状態の良好な雌雄各50匹を雄は9週齢、雌は8週齢で試験に供した。投与開始時の平均体重（体重範囲）は、雄358（338～385）g、雌211（198～225）gであった。

ラットは、温度 $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 10\%$ （温度・湿度の測定結果：Appendix 5）、換気回数10回以上/時（オールフレッシュエアー方式）、照明12時間（午前6時点灯、午後6時消灯）に設定したバリアーシステム動物室（1室）で、個体別にステンレス製金網ケージ〔276W×426D×200H（mm）〕に収容し、これをステンレス製5段のラックに配して飼育した。ただし、交尾確認後の雌は、巣作り材料〔日本チャールス・リバー株式会社、ホワイトフレーク（ロット番号7.7.31、7.8.1、7.10.6）、汚染物質の分析結果：Appendix 6〕を入れたポリカーボネート製ケージ〔265W×426D×200H（mm）〕に収容した。飼料（日本農産工業株式会社、固型飼料ラボMRストック、ロット番号95.09.63、95.09.78、95.11.57、汚染物質の分析結果：Appendix 7）と水（神奈川県営水道水を $1\mu\text{m}$ カートリッジフィルター濾過後紫外線照射して使用、汚染物質の分析結果：Appendix 8）は、それぞれ給餌器および自動給水装置または給水瓶（ポリカーボネート製ケージの場合）により自由摂取させた。動物室の温度・湿度測定結果、飼料・水・巣作り材料の分析結果などから、動物の飼育期間を通じて、試験成績の信頼性に影響を及ぼすと思われる環境要因の変化はなかったものと判断された。

3. 群分けおよび個体識別

各群の動物数は雌雄各10匹とし、各群への動物の割り付けは、投与開始日（投与前）の体重に基づく層化無作為抽出法を用いて行った。

群分け後の動物の個体識別は耳パンチ法により行い、ラックおよびケージには標識札を貼付した。

4. 投与量の設定（別添資料C）、試験群の構成および投与方法

投与量設定試験として、ラットを1群雌雄各4匹とし、0、10、30、100、300あるいは1000mg/kg用量を14日間反復経口投与した。投与7日の夕方から交配が成立するまで、雌雄各1匹ずつを同居させた。一般状態の観察で、300mg/kg以上の群の雌雄全例に自発運動の低下および腹臥位で刺激に対する反応性の低下した鎮静状態が認められた。体重および摂餌量は、1000mg/kg群の雄で投与開始の翌日に一過性に減少した。血液学および血液生化学検査では、1000mg/kg群の雌にプロトロンビン時間の短縮、グルコースの減少および尿素窒素の増加が認められた。グルコースの減少傾向および尿素窒素の増加傾向は、1000mg/kg群の雄にも認められた。また、同群では肝臓重量が増加したほか、腎臓および副腎重量も増加傾向を示した。尿検査および剖検では、被験物質の投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。また、交尾は各群の全例に成立した。

以上の結果から、本試験における投与量については、明かな一般毒性学的影響の発現が予想される1000mg/kg/dayを最高用量とし、以下300、100および30mg/kg/dayの4用量を設定した。

試験群の構成は、①溶媒投与群(以下、対照群)、②ジアセトンアルコール30mg/kg/day投与群(30 mg/kg群)、③同 100 mg/kg/day投与群(100 mg/kg群)、④同 300 mg/kg/day投与群(300 mg/kg群)、⑤同 1000 mg/kg/day投与群(1000 mg/kg群)の5群とした。

投与方法は、投与液量を体重1 kg当たり5 mlとし、テフロン製胃ゾンデを装着した注射筒を用いてジアセトンアルコールの0.6 w/v%液(30 mg/kg群)、2 w/v%液(100 mg/kg群)、6 w/v%液(300 mg/kg群)あるいは20 w/v%液(1000 mg/kg群)を、雌雄とも交配開始14日前から雄は44日間、雌は分娩後の哺育3日(41~45日間)まで、1日1回(午前中)経口投与した。各個体の投与液量は、至近日の測定体重に基づいて算出した。対照群には、被験物質の溶媒として用いた局方精製水を同様に投与した。

5. 観察および検査

1) 親動物に関する項目

(1) 一般状態観察

投与期間中毎日、動物の生死、外観、行動等について観察した。

(2) 体重および摂餌量測定

体重の測定は個体ごとに投与開始日(投与開始直前)およびその後は7日間隔で行い、さらに最終投与日と屠殺日に測定した。ただし、雌の妊娠後は妊娠0、7、14 および 20日と哺育0 および 4日に測定した。摂餌量は体重測定日に合わせて、翌日までの24時間の飼料消費量を測定した。摂餌量の最終測定は、雄は投与43日、雌は哺育3日に行った。交配期間中は摂餌量を測定しなかった。これらの測定には、電子上皿天秤(メトラー社製、PL3000)を用いた。

(3) 交配および分娩状態観察

投与15日の午後に、雄のケージに同一群内の雌を入れて1対1の組み合わせを作り、交尾が確認されるまで(4日間で全例の交尾を確認)連続同居させた。交尾の確認は毎朝一定時刻(9:30分頃)に行い、膣栓形成あるいは膣垢中に精子が確認された日を妊娠0日とした。分娩状態の観察も同じ時刻に行い、1腹全例の出産が確認された日を哺育0日とした。交配および分娩の観察結果から、各群について同居開始から交尾成立までの期間、交尾率〔(交尾成立動物数/同居動物数)×100〕、受胎率〔(受胎雌数/交尾成立雌数)×100〕および出産率〔(生児出産雌数/妊娠雌数)×100〕ならびに分娩の確認された例について妊娠期間(妊娠0日から分娩が確認された日までの期間)を算定した。

(4) 臨床病理学検査

雄について、以下の検査を実施した。

- a. 尿検査：投与38日あるいは41日に新鮮尿を採取し、試験紙法（マイルス・三共株式会社、マルティスティックス®）によるpH、潜血、タンパク、糖、ケトン体、ビリルビンおよびウロビリノーゲンの定性的検査を行った。また、ラットを代謝ケージに収容（2～3時間）して得た蓄尿について、外観の観察、比重の測定（エルマ光学株式会社、屈折計）ならびに尿沈渣の検査（URI-CELL®液、ケンブリッジケミカルプロダクト社）を行った。
- b. 血液学検査：供試血液の採取は、投与期間終了翌日（投与開始 45 日）の解剖直前に行った。動物は採血前日の午後5時より除餌し、水のみを給与した。採血はエーテル麻酔下で開腹して腹大動脈より行ない、以下の項目について検査した。なお、採取した血液は3分割し、その一部は3.8%クエン酸ナトリウム液で凝固阻止処理して血漿を得、プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間の測定に、一部はEDTA-2K処理してその他の血液検査に供した。

項目（略号）	測定法	測定機器
①赤血球数(RBC)	電気抵抗検出方式	多項目自動血球計数装置〔E-4000：東亜医用電子（株）〕
②血色素量(Hb)	ラウリル硫酸ナトリウム-ヘモグロビン法	
③ヘマトクリット値(Ht)	パルス検出方式	
④平均赤血球容積(MCV)	計算値	
⑤平均赤血球血色素量(MCH)	計算値	
⑥平均赤血球血色素濃度(MCHC)	計算値	
⑦白血球数(WBC)	電気抵抗検出方式	
⑧血小板数(Plat.)	電気抵抗検出方式	
⑨網状赤血球数(Ret.)	Brilliant cresyl blue染色した塗抹標本の鏡検	
⑩プロトロンビン時間(PT)	Quick一段法	血液凝固自動測定装置(KC-10A：米アメルング社)
⑪活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)	エラジン酸活性化法	

なお、白血球百分率算定用に血液塗抹標本を作製したが、白血球数に変化が認められなかったため、観察は実施しなかった。

c. 血液生化学検査：採取した血液の一部から血清を分離し、次の項目を測定した。

項目 (略号)	測定法	測定機器
① 総タンパク (T.P.)	Biuret 法	} 生化学自動分析 装置 [JCA-VX- 1000 型クリナ ライザー：日本 電子(株)]
② アルブミン (Alb.)	BCG 法	
③ A/G 比 (A/G)	計算値	
④ 血糖 (Glu.)	酵素法 (GK ¹⁾ -G6PDH ²⁾ -UV 系)	
⑤ トリグリセライド (T.G.)	酵素法 (LPL ³⁾ -GPO ⁴⁾ -POD ⁵⁾ 系)	
⑥ 総コレステロール (T-Cho.)	酵素法 (CES ⁶⁾ -COD ⁷⁾ -POD 系)	
⑦ 総ビリルビン (T-Bil.)	Jendrassik 法	
⑧ 尿素窒素 (BUN)	Urease-UV 法	
⑨ クレアチニン (Crea.)	Jaffé法	
⑩ GOT (GOT)	SSCC ⁸⁾ 法	
⑪ GPT (GPT)	SSCC 法	
⑫ γ -GTP (γ -GTP)	SSCC 法	
⑬ LDH (LDH)	SSCC法	
⑭ ALP (ALP)	GSCC ⁹⁾ 法	
⑮ コリンエステラーゼ (ChE)	BTC ¹⁰⁾ -DTNB ¹¹⁾ 法	
⑯ カルシウム (Ca)	OCPC 法	
⑰ 無機リン (P)	酵素法 (PNP ¹²⁾ -XOD ¹³⁾ -POD系)	
⑱ ナトリウム (Na)	イオン電極法	} 電解質自動分析 装置 [NAKL-1: 東亜電波工業(株)]
⑲ カリウム (K)	イオン電極法	
⑳ 塩素 (Cl)	イオン電極法	

1) グルコキナーゼ、2) グルコース 6 リン酸脱水素酵素、3) リポプロテイン
リパーゼ、4) グリセロリン酸酸化酵素、5) ペルオキシダーゼ、6) コレステ
ロールエステラーゼ、7) コレステロールオキシダーゼ、8) スカンジナビア臨
床化学会、9) ドイツ臨床化学会、10) ブチリルチオコリン、11) 5,5-ジチオビス
-2-ニトロ安息香酸、12) プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、13) キサンチン
オキシダーゼ

(5) 病理学検査

瀕死動物は発見後速やかに、雄の計画屠殺動物は採血に続いて、雌の計画屠殺動物は哺育4日の観察終了後に、分娩予定日を過ぎても分娩が認められない雌については分娩予定の4日後に、分娩後全児が死亡した雌は死亡が確認された日に、いずれもエーテル麻酔下で放血屠殺し、次の項目を検査した。

- a. 剖検：全身諸器官を肉眼的に観察した。さらに、雌については卵巢の黄体数および子宮の着床数を調べ、着床率〔(着床数/黄体数)×100〕を算定した。
- b. 器官重量測定：電子上皿天秤(メトラー社、AT 200)を用いて、雌雄の脳、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胸腺ならびに雄の精巣、精巣上体を秤量(絶対重量)し、対体重比(相対重量)を算出した。腎臓、副腎、精巣および精巣上体は、左右を一括して秤量した。
- c. 病理組織学検査：次の器官を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液(精巣および精巣上体のみブアン液)で固定した。

脳、下垂体、眼球、ハーダー腺、甲状腺(上皮小体含む)、唾液腺、胸腺、気管、肺(気管支を含む)、心臓、舌、食道、胃、腸、肝臓、脾臓、膵臓、副腎、腎臓、膀胱、精巣、精巣上体、前立腺、精液、卵巣、子宮、膣、大動脈(胸部)、脊髄(頸膨大部、腰膨大部)、坐骨神経、骨・骨髓(胸骨、大腿骨)、リンパ節(頸部リンパ節、腸間膜リンパ節)、骨格筋(下腿三頭筋)、皮膚(背部)、乳腺(腹部)、肉眼的異常部位

病理組織学検査は、対照群および1000mg/kg群の全例ならびに他の群の妊娠の成立しなかった対の脳、下垂体、眼球、甲状腺(上皮小体を含む)、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、胃、小腸(十二指腸・空腸・回腸)、大腸(盲腸・結腸・直腸)、膵臓、膀胱、骨髓、肉眼的異常部位、さらに雄では精巣、精巣上体、前立腺、精液、雌では卵巣、子宮、膣、乳腺について行った。30、100および300mg/kg群の妊娠が成立した対では、1000mg/kg群で毒性影響と考えられる変化の認められた雌雄の肝臓、副腎、雄の腎臓および肉眼的異常部位を検査した。組織標本の作製は、株式会社組織科学研究所(東京都青梅市黒沢2丁目984-1)に委託して実施し、常法に従いパラフィン切片を作製し、H-E染色を施した。また、沈着物を同定するため、一部の例の腎臓および肝臓についてはPAS染色あるいは脂肪染色(ズダンⅢ)も行った。

2) 新生児に関する項目

(1) 産児数および性比の観察

分娩完了の確認後各腹の産児数(生児と死亡児の合計)を調べ、分娩率〔(総出産児数/着床数)×100〕を算定した。また、性別を肛門と生殖突起の距離の長短により判定し、群ごとの性比を算出した。

(2) 外表異常および一般状態観察

分娩完了後、新生児について口腔内を含む外表の異常を観察した。また、毎日一般状態およ

び生死を確認し、出生率〔(出産確認時生児数/総出産児数)×100〕および新生児生存率〔(哺育4日生児数/出産確認時生児数)×100〕を求めた。

(3) 体重測定

新生児について哺育0および4日に雌雄別に各腹ごとの総体重を測定し、1匹当たりの平均体重を算出した。

(4) 病理学検査

死亡例はその都度、生存例は雌親の解剖時(哺育4日)にエーテル・クロロホルムで麻酔死させ、胸腹部における主要器官を肉眼的に観察した。

6. 統計処理

得られた平均値あるいは頻度について、対照群との間の有意差(危険率5%以下)を次の方法で検定した。

体重、摂餌量、血液学および血液生化学データ、器官重量、黄体数、着床数、妊娠期間、産児数などのパラメトリックデータは、Bartlettの分散検定を行った。分散が一様な場合は一元配置の分散分析を行い、その結果有意差を認めた場合、Dunnett法またはScheffé法(群の大きさが異なる場合)により対照群に対する各群の比較検定を行った。分散が一様でない場合ならびに着床率、出生率、分娩率、新生児生存率、尿検査の定性的データなどのノンパラメトリックデータは、Kruskal-Wallisの順位検定を行い、その結果有意差を認めた場合、Dunnett法またはScheffé法(群の大きさが異なる場合)により対照群に対する各群の比較検定を行った。親動物の生存率、交尾率、受胎率、出産率、出産児の性比、一般状態の変化および病理学的異常例の出現率などのカテゴリカルデータは、 χ^2 検定を行った。なお、病理学的異常例が対照群にも認められ、被験物質の影響が変化の程度の分布の差として現れる所見については、データを適宜併合して2つのカテゴリーにし、検定した。

試験結果

1. 反復投与毒性

1) 死亡動物 (Tables 1, 2, Appendices 9, 10)

雄において、死亡は認められなかった。雌において、1000mg/kg群の1匹が分娩中に衰弱し、瀕死状態となったので切迫屠殺した。この1匹以外死亡は認められなかった。

2) 一般状態 (Tables 3, 4, Appendices 11, 12)

雄において、自発運動低下(300mg/kg群の7匹、1000mg/kg群の10匹)およびケージをノックする音や動物への接触などの刺激に対する反応性の低下(300mg/kg群の5匹、1000mg/kg群の10匹)が認められた。300mg/kg群の変化は軽度で、投与1日あるいは1~2日にのみ認められた。

1000mg/kg群では投与1日の投与後において自発運動がほとんど認められず、刺激に対する反応性も明らかに低下し、鎮静状態を呈した。これらの変化は夕方には回復傾向を示し、翌日の投与時には回復していた。また、投与の反復につれて変化は軽減し、7日以降は認められなかった。その他の雄の変化として、1000mg/kg群の1匹に脱毛および痂皮形成が認められた。雌においても、自発運動低下（300mg/kg群の6匹、1000mg/kg群の10匹）および刺激に対する反応性低下（300mg/kg群の5匹、1000mg/kg群の10匹）が雄と同様に認められた。また、切迫屠殺した1000mg/kg群の雌の1匹では、屠殺日に自発運動低下および体温低下が認められた。

3) 体重 (Figures 1, 2, Tables 5, 6, Appendices 13, 14)

雄において、体重および体重増加量に有意な変化は認められなかった。雌においては、1000mg/kg群で交配前期間中における体重増加量が有意に減少した。

4) 摂餌量 (Figures 3, 4, Tables 7, 8, Appendices 15, 16)

被験物質投与各群の雌雄とも、摂餌量に有意な変化は認められなかった。

5) 雄の尿所見 (Table 9, Appendix 17)

被験物質投与各群とも、各検査項目に有意な変化は認められなかった。

6) 雄の血液学所見 (Table 10, Appendix 18, 背景データ: Appendix 30)

1000mg/kg群で、血小板数の有意な増加が認められた。

7) 雄の血液生化学所見 (Table 11, Appendix 19, 背景データ: Appendix 30)

1000mg/kg群で、GOT、コリンエステラーゼ、総タンパク、総コレステロール、総ビリルビン、尿素窒素、クレアチニンおよびカルシウムの有意な増加ならびにグルコースの有意な減少が認められた。また、有意差は認められなかったが、300mg/kg群でコリンエステラーゼおよび総タンパクの増加傾向、1000mg/kg群でGPT、 γ -GTPおよびアルブミンの増加傾向ならびにA/G比およびトリグリセライドの減少傾向が認められた。なお、30および100mg/kg群のアルカリホスファターゼは対照群と比べ有意な低値を示したが、用量依存的な変化ではなかった。

8) 剖検所見 (Tables 12, 13, Appendices 20, 21)

妊娠を成立させた雄において、1000mg/kg群で6匹中1匹に肝臓の腫大が認められた。分娩し哺育も順調であった雌においても、1000mg/kg群で4匹中3匹に肝臓の腫大が認められた。各群に認められた妊娠不成立の対においては、1000mg/kg群の雄の4匹中1匹に副腎の肥大が認めら

れた。1000mg/kg群で認められた分娩後全児が死亡した雌においては、異常は認められなかった。1000mg/kg群の雌で切迫屠殺した1匹では、肝臓の腫大/退色、副腎の肥大、腺胃と小腸（主に回腸）の粘膜に黒色点の散在および脾臓の萎縮が認められた。これらの所見以外にも変化が認められたが、散発的で、被験物質の投与との関連性は認められなかった。

9) 器官重量 (Tables 14, 15, Appendices 22~25)

雄において、300mg/kg群で腎臓の絶対および相対重量の有意な増加が認められ、統計学的有意差は認められなかったが1000mg/kg群においても同様に増加傾向が認められた。また、1000mg/kg群で副腎の絶対および相対重量ならびに肝臓の相対重量の有意な増加が認められ、肝臓の絶対重量も増加傾向を示した。雌においては、1000mg/kg群で肝臓の絶対および相対重量の有意な増加が認められた。

10) 病理組織学所見 (Tables 16, 17, Appendices 20, 21, Photos 1~8)

被験物質の投与に起因すると考えられる変化が、肝臓、腎臓および副腎に認められた。

妊娠を成立させた雄において、肝臓に小葉中心性肝細胞肥大が1000mg/kg群の6匹中3匹に認められた。腎臓には近位尿細管上皮における硝子滴の増加が100mg/kg群の8匹中6匹、300mg/kg群の9匹中9匹、1000mg/kg群の5匹に認められ、変化の程度も用量依存的に増強する傾向にあった。また、腎臓で好塩基性尿細管の目立つ例が300mg/kg群の5匹、1000mg/kg群の3匹に、遠位尿細管のびまん性拡張が1000mg/kg群の3匹に認められた。副腎には、皮質束状帯細胞の空胞化が300mg/kg群の1匹、1000mg/kg群の3匹に認められた。分娩し哺育も順調であった雌においては、肝臓に小葉中心性肝細胞肥大が1000mg/kg群の4匹中4匹に認められた。腎臓には、びまん性遠位尿細管拡張および近位尿細管上皮の脂肪変性のいずれの変化も300mg/kg群の9匹中2匹および1000mg/kg群の1匹に認められた。副腎には皮質束状帯細胞の空胞化が300mg/kg群の1匹に認められた。妊娠の成立しなかった雄では小葉中心性肝細胞肥大が1000mg/kg群の4匹中2匹に、腎臓近位尿細管上皮における硝子滴の増加が300mg/kg群の1匹中1匹、1000mg/kg群の4匹中4匹、好塩基性尿細管の目立つ例が300mg/kg群の1匹、1000mg/kg群の3匹、びまん性遠位尿細管拡張が1000mg/kg群の1匹に、副腎皮質束状帯細胞の空胞化が1000mg/kg群の2匹、束状帯の肥大が1匹に認められた。妊娠の成立しなかった雌では小葉中心性肝細胞肥大および腎臓のびまん性遠位尿細管拡張が1000mg/kg群の各1匹、副腎皮質束状帯細胞の空胞化が1000mg/kg群の3匹に認められた。哺育期間中に全児が死亡した1000mg/kg群の雌1匹においては、小葉中心性肝細胞肥大が認められた。しかし、これら妊娠を成立させなかった雌雄や全児が死亡した雌においても、下垂体および生殖器系器官に被験物質の投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。1000mg/kg群の雌で切迫屠殺した1匹においては、生存例の変化に比べて強い腎臓の位尿細管上皮の脂肪変性および遠位尿細管のびまん性拡張が認められたほか、小葉中心性肝細胞壊死、腺胃および回腸粘

膜の壊死、副腎皮質束状帯細胞の肥大、ならびに脾臓および胸腺の萎縮が認められた。以上の所見以外にも検査した各器官に変化が認められたが、散発的あるいは用量依存的な発現傾向のみられない所見であった。

2. 生殖発生毒性

1) 親動物に及ぼす影響 (Table 18, Appendix 26)

(1) 交尾率および受胎率

交尾は同居開始4日以内に、対照群および被験物質投与各群の全例に成立した。交尾に要する日数にも差は認められなかった。受胎率は対照群90%、30mg/kg群100%、100mg/kg群80%、300mg/kg群90%、1000mg/kg群60%で、統計学的には有意な変化でなかったものの1000mg/kg群で低下傾向が認められた。

(2) 黄体数、着床数および着床率

対照群の黄体数17.1、着床数16.6、着床率97.3%に対し、300mg/kg以下の群では黄体数18.3~18.6、着床数17.4~18.1、着床率95.4~98.2%の範囲であり、有意な差は認められなかった。1000mg/kg群においては、黄体数18.2、着床数14.2、着床率79.0%で、統計学的有意差は認められなかったものの、着床数および着床率は減少傾向を示した。

(3) 出産率および妊娠期間

出産率は、対照群および被験物質投与各群とも100%であった。妊娠期間は、対照群の22.4日に対し、被験物質投与各群では22.4~22.9日の範囲であり、有意な変化は認められなかった。

(4) 分娩および哺育状態

1000mg/kg群で切迫屠殺した例は、分娩予定日(妊娠22日)の夕方に膣出血が認められ、翌日に1匹の頭部が膣口まで下降したが、親動物は衰弱していて娩出できなかった。剖検で、膣に下降した1匹の死亡児以外に、子宮内に残留した17匹の死亡児が確認された。また、1000mg/kg群の別の1匹は、分娩予定日の夕方に分娩が認められたが翌朝の分娩の観察時には1匹のみが確認され、残りは捕食されていた。この1匹の新生児も翌日までに死亡した。

2) 新生児に及ぼす影響

(1) 生存性 (Table 19, Appendix 27)

対照群の1腹当たりの総出産児数は15.9匹、分娩率は96.1%であった。また、新生児数は15.7匹、出生率は98.7%、性比は1.07、哺育4日生児数および生存率は15.6匹および99.2%であった。300mg/kg以下の群では、これらの指標は対照群と類似した値を示した。1000mg/kg群では、

総出産児数11.6匹、分娩率78.7%、新生児数10.0匹、出生率88.7%、哺育4日生児数8.0匹、哺育4日生存率69.4%で、対照群と比べ統計学的有意差は認められなかったものの、いずれも減少傾向を示した。

(2) 体重 (Table 19, Appendix 27)

哺育0日における体重は対照群の雄6.8g、雌6.4gに対し、被験物質投与各群は雄6.8~7.1g、雌6.5~6.7gの範囲であった。また哺育4日における体重は対照群の雄10.5g、雌10.0gに対し、被験物質投与各群は雄10.4~11.2g、雌10.1~10.6gの範囲であり、哺育0および4日の体重に有意な変化は認められなかった。

(3) 形態 (Tables 20, 21, Appendices 28, 29)

外表異常については、対照群の1匹で眼瞼開裂および無顎症の重複異常、1000mg/kg群の1匹で痕跡尾が認められたが、被験物質の投与に起因すると考えられる異常は認められなかった。内臓異常は、いずれの児動物にも認められなかった。内臓変異については、胸腺の頸部残留、左臍動脈遺残あるいは腎盂の拡張が、総対照群で7匹(4.7%)、30mg/kg群で5匹(2.7%)、100mg/kg群で3匹(2.1%)、300mg/kg群で11匹(7.3%)、1000mg/kg群で6匹(11.7%)に認められ、1000mg/kg群の発現率は対照群と比べやや高い傾向にあったが、有意な差ではなかった。

考察および結論

1. 反復投与毒性

雄親について、一般状態で自発運動低下および音や接触などの刺激に対する反応性低下が300および1000mg/kg群に認められ、1000mg/kg群では明らかな鎮静状態を呈した。これらの変化は、投与初日に最も強く現れ、7日以降では認められなくなった。ジアセトンアルコールの投与による一般状態の変化はその麻酔作用²⁾によるものと推察される。

病理学検査において、肝臓、腎臓および副腎に変化が認められた。肝臓については、肝細胞の肥大が1000mg/kg群に認められ、同群の肝臓重量は増加した。血液生化学検査で認められたGOT、コリンエステラーゼ、総タンパク、総コレステロールおよび総ビリルビンの増加は、肝機能に対する影響を示唆する変化と考えられる。アセトンは酵素誘導を起こすことが知られている³⁾。一般状態の変化が投与の反復につれて消失したこと、血清総タンパクの増加および肝細胞の肥大が認められたことなどから、ジアセトンアルコールの投与においても、酵素誘導が発現している可能性が考えられる。また、GOTおよび総ビリルビンが増加が認められたことから、ジアセトンアルコールは肝臓に対し、障害的に影響するものと判断される。

腎臓については、腎臓重量の増加が300および1000mg/kg群に認められた。組織学的には、近位尿細管上皮における硝子滴の増加が100mg/kg以上の群に、過剰の硝子滴の沈着による障害後

の再生像と考えられる好塩基性尿細管の増加が300mg/kg以上の群に認められた。また、遠位尿細管の拡張が1000mg/kg群に認められた。遠位尿細管の拡張は、下部尿路に尿の停滞を起こすような変化を伴っていないことから、遠位尿細管における水分の再吸収に対する被験物質の軽度な影響を示唆する変化⁸⁾と推察される。1000mg/kg群では、血液尿素窒素およびクレアチニンが増加し、腎機能の低下がうかがわれた。尿検査では、異常は認められなかった。

副腎については、皮質束状帯細胞の空胞化が300mg/kg以上の群で認められた。1000mg/kg群では束状帯細胞の肥大例も認められ、副腎重量は増加した。

以上の変化に加えて、1000mg/kg群でグルコースの減少ならびに血小板数およびカルシウムの増加が認められた。体重および摂餌量には変化は認められなかった。

一方、雌親においては、交配前期間中の体重増加量が1000mg/kg群で減少したほか、雄親と同様の一般状態の変化が300および1000mg/kg群に認められた。また、肝臓では肝細胞の肥大および肝臓重量の増加が、副腎では皮質束状帯細胞の空胞化が1000mg/kg群に認められた。腎臓においては、近位尿細管上皮の脂肪変性および遠位尿細管の拡張が300および1000mg/kg群に認められた。1000mg/kg群の1匹は分娩中に衰弱し、瀕死状態となったので切迫屠殺した。この例の病理組織学検査では、腎臓の変化は生存例と比べて強く、また副腎皮質束状帯の肥大が認められたほか、生存例には認められなかった肝細胞の小葉中心性壊死および消化管粘膜の壊死が認められた。肝細胞の壊死はジアセトンアルコールが肝臓に対し障害的に影響することを裏付ける変化と判断され、また消化管粘膜の壊死については、ジアセトンアルコールは局所刺激性を有する⁹⁾ことから、被験物質の影響が強く現れたものと推察される。

以上の結果から、ジアセトンアルコールのラットへの反復投与により、肝臓、腎臓、副腎などに対する影響が認められた。無影響量は、雄で30mg/kg/day、雌で100mg/kg/dayと推定された。

2. 生殖発生毒性

親動物の生殖能について、交尾率に変化は認められず、また各群の全ての対で同居後4日以内に交尾が成立し、ジアセトンアルコールの交尾能に対する影響は認められなかった。

受胎率は、1000mg/kg群で低下傾向が認められた。受胎率の低下における雄親の関与について、精巣および精巣上体の重量に変化は認められず、これら器官および下垂体に病理組織学的変化も認められなかった。しかしながら、Dietzら⁹⁾は、アセトンのラットへの飲水投与において、精巣に病理組織学的変化は認められないが精子の運動性の低下および異常精子の増加が認められたことを報告している。したがって、ジアセトンアルコールも雄ラットに対して同様の影響を有する可能性が考えられ、雄親の受胎能に対する影響を完全に否定することはできないものと考えられる。

1000mg/kg群では受胎率の低下傾向に加えて、着床数および着床率の減少傾向が認められ、着床に対する影響も認められた。黄体数、出産率および妊娠期間には、被験物質の投与による影

響は認められなかった。

分娩および哺育状態について、分娩中に瀕死状態となり切迫屠殺した1000mg/kg群の1匹は、1児が膣に下降し、残りは子宮に残留していた。また、1000mg/kg群の別の1匹は、分娩予定の夕方に分娩が認められたが翌朝の分娩観察時までには1匹を残して他は捕食し、1匹の新生児もその翌日までに死亡した。これら分娩あるいは哺育状態に異常の認められた2例のうち、切迫屠殺例は前述の病理学的所見から、重度な一般毒性学的影響により分娩困難となったものと推察される。一方、全児が死亡した例では肝細胞の肥大は観察されたが、生殖能に影響を及ぼすと考えられる一般毒性的变化は認められなかった。

児動物の発生については、1000mg/kg群で総出産児数、分娩率、新生児数、出生率、哺育4日生児数および哺育4日生存率の減少傾向が認められた。新生児の体重および形態には変化は認められなかった。

これら1000mg/kg群で認められた親動物の生殖能および児動物の発生に関する指標の変化は、いずれも統計学的には有意な変化ではなかったが、被験物質の投与による影響が軽度に発現したものと判断される。300mg/kg以下の群では変化は認められなかった。

以上の結果から、ジアセトンアルコールのラットへの投与において、受胎、着床、分娩、哺育および児動物の生存性に対する影響を示唆する変化が認められ、雌雄親動物の生殖能および児動物の発生に対する無影響量は、いずれも300mg/kg/dayと推定された。

参考文献

- 1) G. D. DiVincenzo, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **36(3)**, 511 (1976).
- 2) M. L. Richardson, "The dictionary of substances and their effects", **Vol. 3**, ed. by Royal society of chemicals, England, 1993, pp. 93-95.
- 3) C. C. Carpenter, *Am. J. Ophthalmol.*, **29**, 1363 (1946).
- 4) H. F. Smyth, Jr. and C. P. Carpenter, *J. Ind. Hyg. Toxicol.*, **30(1)**, 63 (1948).
- 5) H. M. Keith, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **13**, 707 (1932).
- 6) T. M. Brooks, A. L. Meyer and D. H. Hutson, *Mutagenesis*, **3(3)**, 227 (1988).
- 7) D. R. Koop, B. L. Crump, G. D. Nordblom and M. J. Coon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82**, 4065 (1985).
- 8) 渡辺満利、"毒性試験講座5-毒性病理学"、前川昭彦、林裕造編、地人書館、東京、1991、pp. 267-293.
- 9) D. D. Dietz, J. R. Leininger, E. J. Rauckman, M. B. Thompson, R. E. Chapin, R. L. Morrissey and B. S. Levine, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **17**, 347 (1991).

ジアセトンアルコールのラットを用いる
反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験
(試験番号 95-048)

最終報告書 添付資料 A

(図・群別平均値表)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

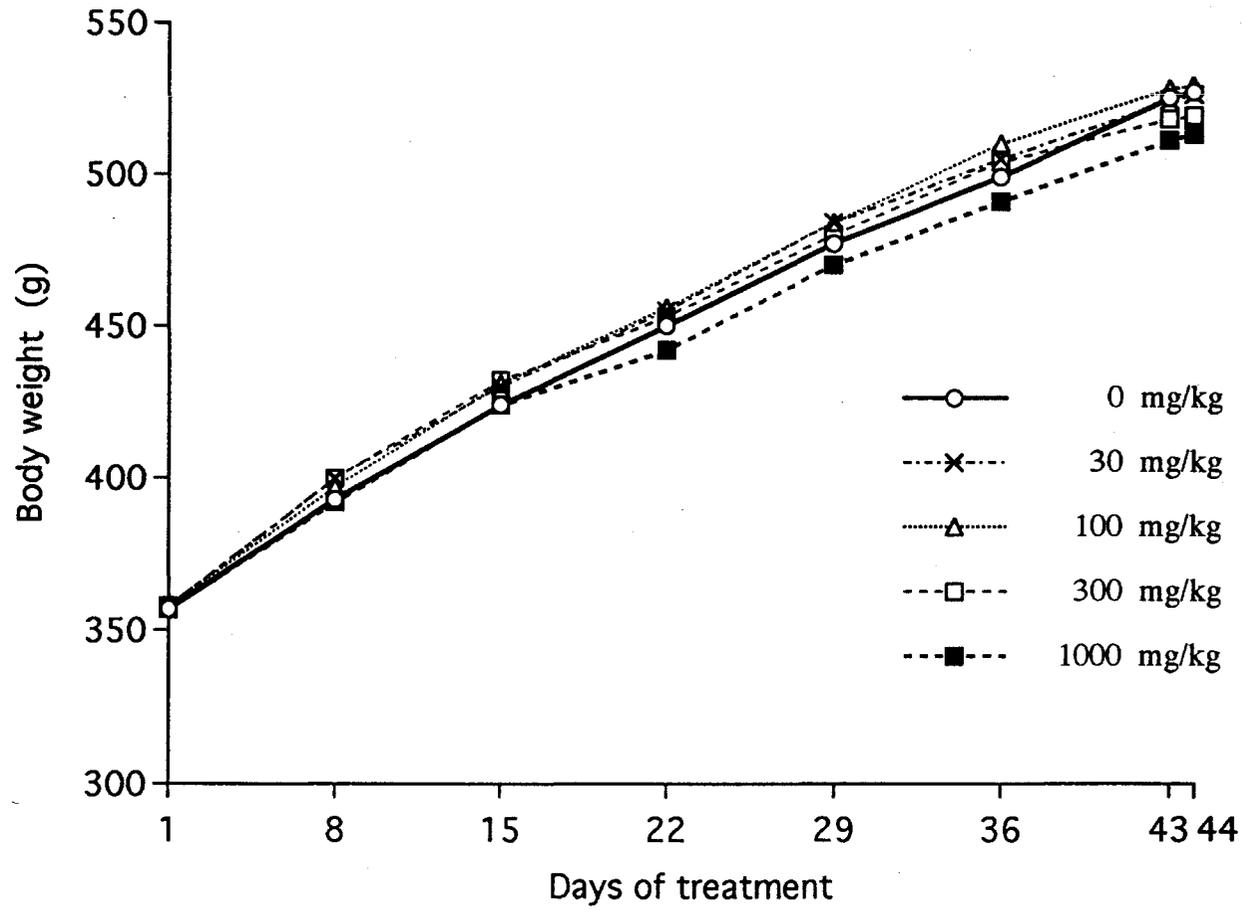


Fig. 1 Body weight change of male rats treated orally with diacetone alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

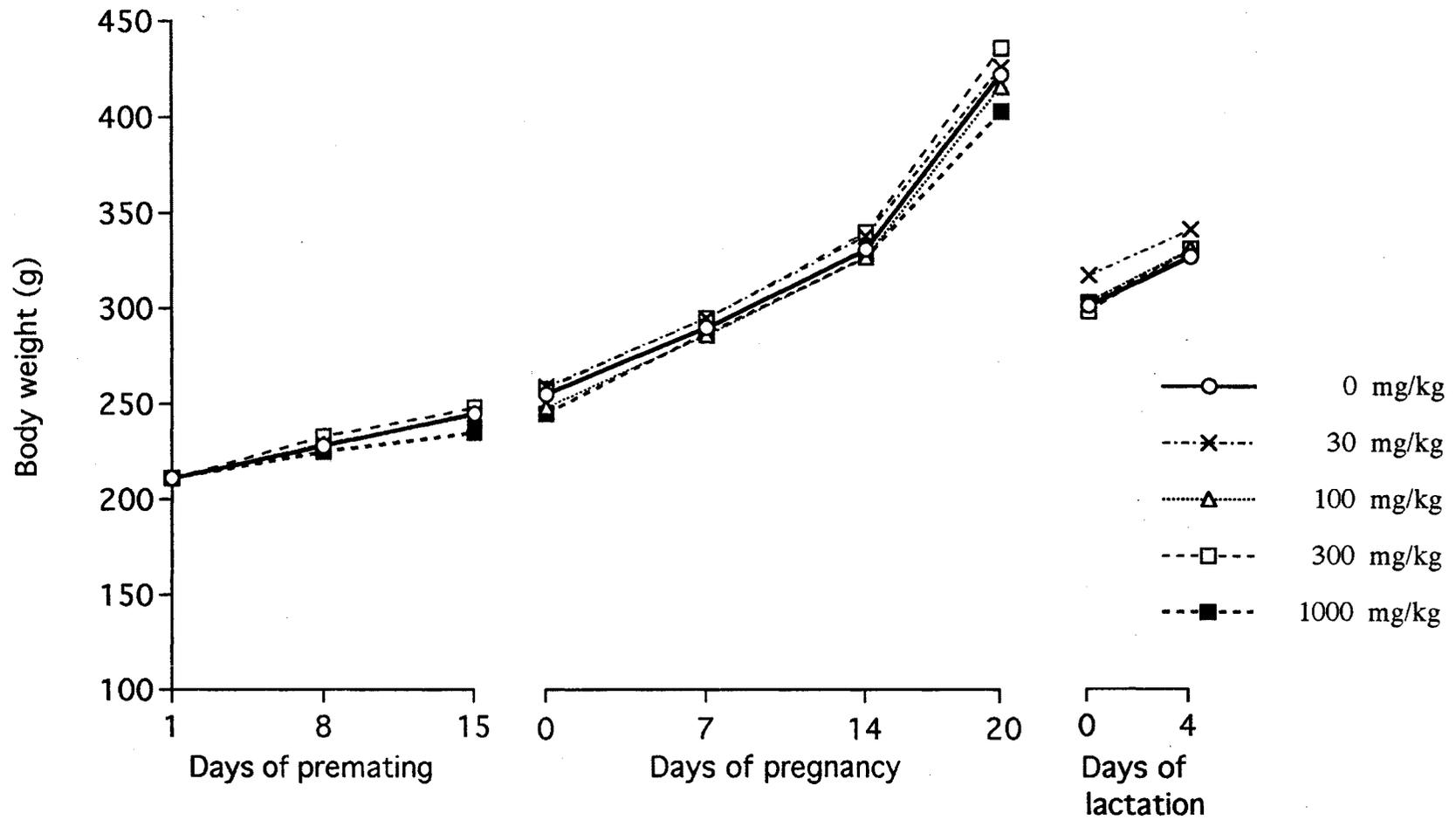


Fig. 2 Body weight change of female rats treated orally with diacetone alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

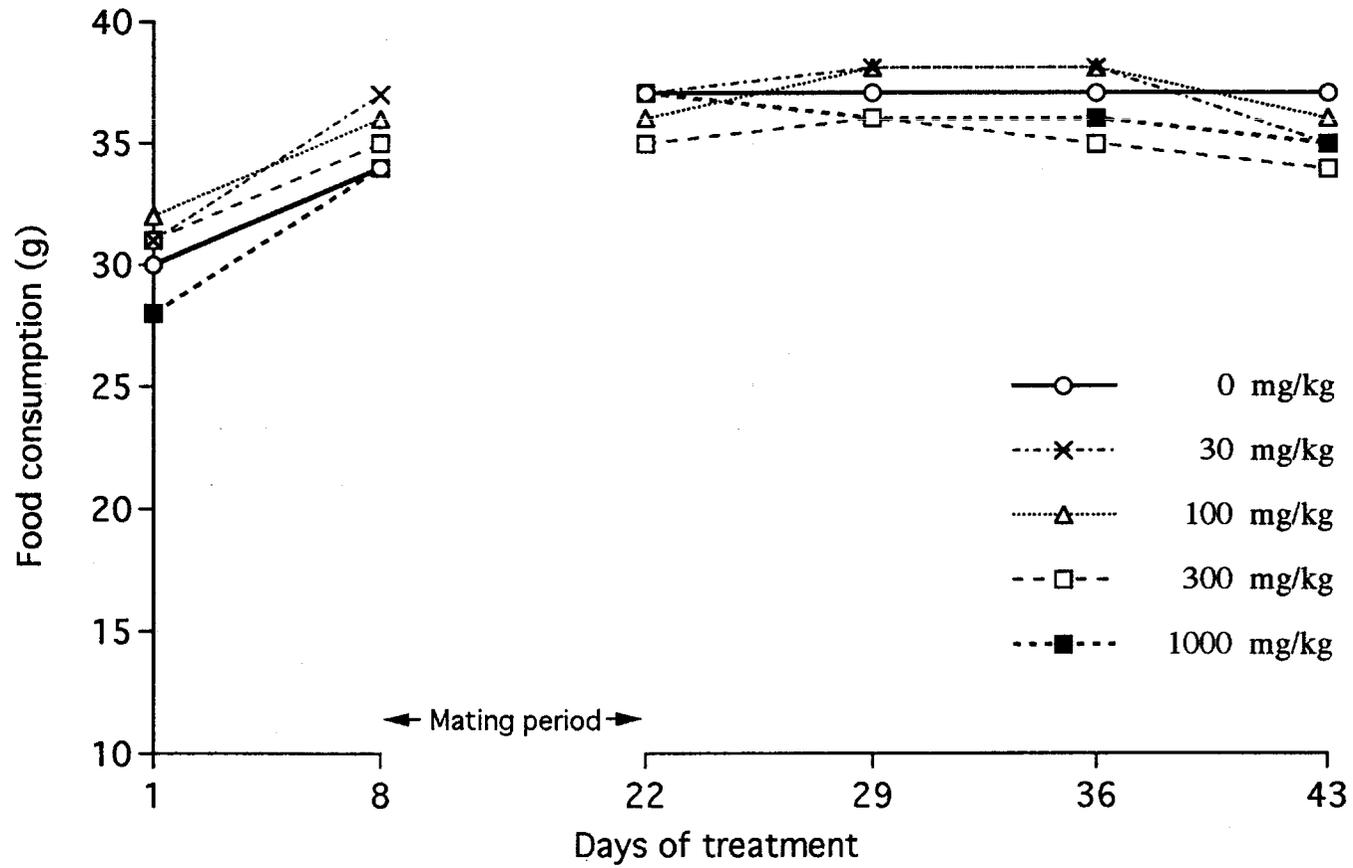


Fig. 3 Food consumption of male rats treated orally with diacetone alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

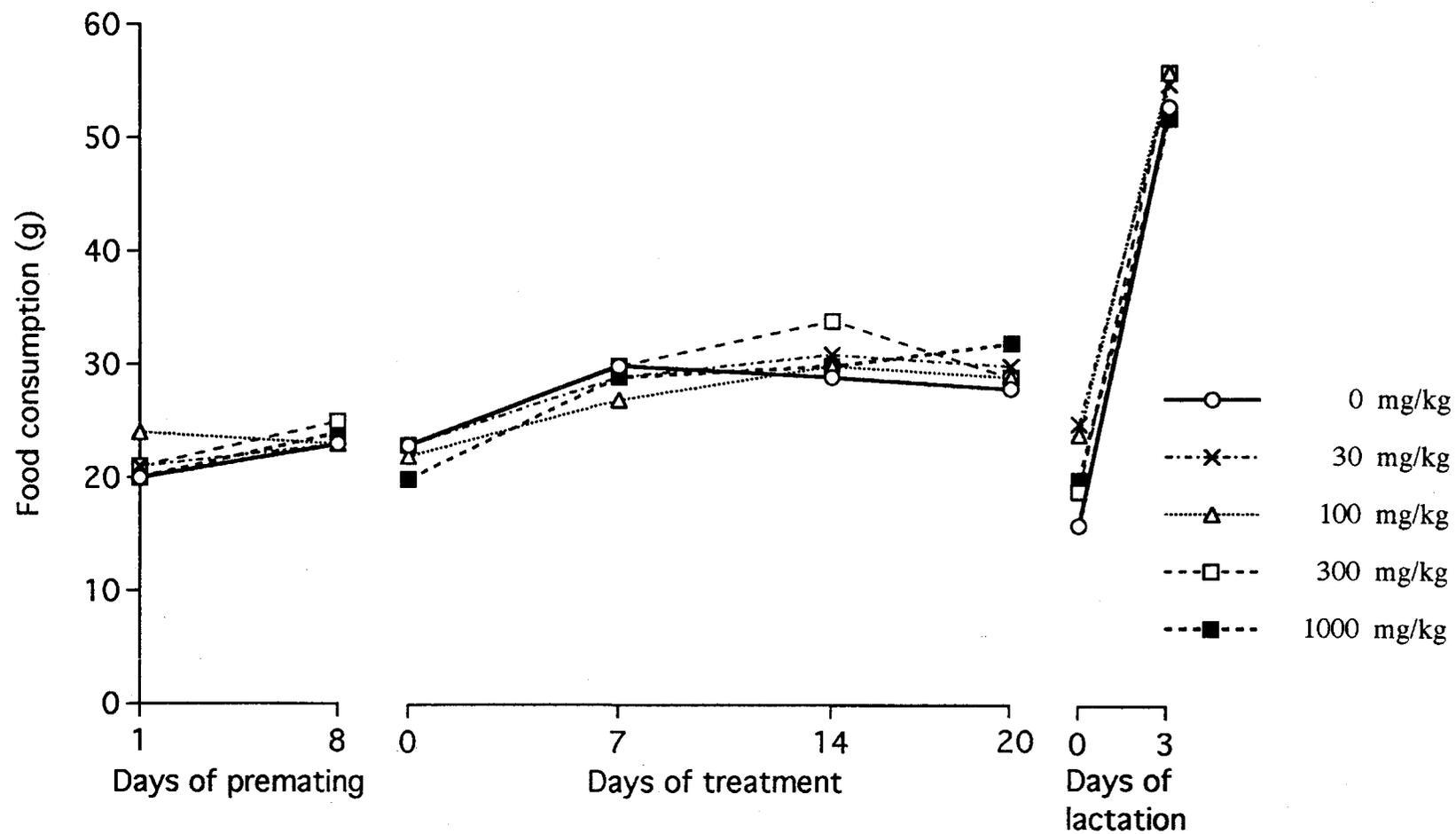


Fig. 4 Food consumption of female rats treated orally with diacetone alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Table 1 Mortality rate of male rats treated orally with diacetone alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
No. of animals	10	10	10	10	10
No. of animals that died	0	0	0	0	0
Mortality (%)	0	0	0	0	0

Table 2 Mortality rate of female rats treated orally with diacetone alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
No. of animals	10	10	10	10	10
No. of animals that died	0	0	0	0	1 ^a
Mortality (%)	0	0	0	0	10

a : Killed in extremis

Table 3 Incidence of clinical signs of male rats treated orally with diacetone alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Clinical sign	Dose(mg/kg)	0			30		100			300			1000		
		Fate		TK	FP (Total)	TK (Total)	TK	FP (Total)	TK	FP (Total)	TK	FP (Total)	TK	FP (Total)	
		No. of animals		9	1 (10)	10 (10)	8	2 (10)	9	1 (10)	6	4 (10)			
Decrease in locomotor activity		0	0 (0)	0 (0)	0	0 (0)	6	1 (7)**	6	4 (10)**					
Decrease of response to stimuli ^a		0	0 (0)	0 (0)	0	0 (0)	4	1 (5)**	6	4 (10)**					
Alopecia/scabbing		0	0 (0)	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	1	0 (1)					

TK : Terminal kill

FP : Failed to cause pregnancy, killed at the termination

** : Significantly different from control at 1 % level of probability

a : knock at the cage and touch an animal

Table 4 Incidence of clinical signs of female rats treated orally with diacetone alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Clinical sign	Dose(mg/kg)	0			30		100			300			1000			
		Fate		TK NP (Total)	TK (Total)	TK NP (Total)	TK NP (Total)	TK NP (Total)	TK NP KE KL (Total)							
		No. of animals		9 1 (10)	10 (10)	8 2 (10)	9 1 (10)	4 4 1 1 (10)								
Decrease in locomotor activity		0 0 (0)	0 (0)	0 0 (0)	5 1 (6)**	4 4 1 1 (10)**										
Decrease of response to stimuli ^a		0 0 (0)	0 (0)	0 0 (0)	4 1 (5)**	4 4 1 1 (10)**										
Hypothermia		0 0 (0)	0 (0)	0 0 (0)	0 0 (0)	0 0 1 0 (1)										

TK : Terminal kill

NP : Non-pregnant, killed on 26 days after copulation

KE : Killed in extremis

KL : Killed because all pups died after delivery

** : Significantly different from control at 1 % level of probability

a : knock at the cage and touch an animal

Table 5

Body weights of male rats treated orally with diacetone alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg)	Days of treatment								Gain 1~44
	1	8	15	22	29	36	43	44	
0	357 ± 9 (10)	393 ± 16 (10)	424 ± 20 (10)	450 ± 27 (10)	477 ± 33 (10)	499 ± 39 (10)	525 ± 41 (10)	527 ± 42 (10)	170 ± 36 (10)
30	358 ± 12 (10)	400 ± 16 (10)	430 ± 24 (10)	455 ± 32 (10)	484 ± 35 (10)	505 ± 40 (10)	524 ± 39 (10)	526 ± 40 (10)	167 ± 32 (10)
100	358 ± 10 (10)	397 ± 14 (10)	431 ± 22 (10)	456 ± 25 (10)	484 ± 29 (10)	510 ± 36 (10)	528 ± 42 (10)	529 ± 44 (10)	171 ± 37 (10)
300	358 ± 12 (10)	400 ± 18 (10)	432 ± 22 (10)	453 ± 27 (10)	480 ± 30 (10)	504 ± 34 (10)	518 ± 39 (10)	519 ± 38 (10)	161 ± 30 (10)
1000	357 ± 11 (10)	392 ± 14 (10)	424 ± 21 (10)	442 ± 23 (10)	470 ± 25 (10)	491 ± 28 (10)	511 ± 29 (10)	513 ± 30 (10)	156 ± 22 (10)

Each value is expressed as mean±S.D. and (number of animals examined).

Table 6

Body weights of female rats treated orally with diacetone alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg)	Days of pre-mating				Days of pregnancy					Days of lactation		
	1	8	15	Gain 1~15	0	7	14	20	Gain 0~20	0	4	Gain 0~4
0	211 ± 6 (10)	228 ± 9 (10)	245 ± 11 (10)	35 ± 8 (10)	255 ± 10 (9)	290 ± 14 (9)	331 ± 17 (9)	422 ± 18 (9)	167 ± 11 (9)	301 ± 28 (9)	327 ± 21 (9)	26 ± 17 (9)
30	211 ± 8 (10)	229 ± 9 (10)	245 ± 12 (10)	35 ± 8 (10)	259 ± 13 (10)	295 ± 20 (10)	338 ± 23 (10)	426 ± 30 (10)	167 ± 22 (10)	317 ± 25 (10)	341 ± 24 (10)	24 ± 13 (10)
100	211 ± 6 (10)	229 ± 9 (10)	244 ± 8 (10)	32 ± 5 (10)	248 ± 13 (8)	286 ± 9 (8)	327 ± 11 (8)	416 ± 23 (8)	168 ± 19 (8)	303 ± 19 (8)	331 ± 18 (8)	29 ± 17 (8)
300	211 ± 7 (10)	233 ± 7 (10)	248 ± 10 (10)	37 ± 8 (10)	258 ± 10 (9)	295 ± 14 (9)	340 ± 18 (9)	436 ± 23 (9)	178 ± 16 (9)	298 ± 25 (9)	331 ± 20 (9)	33 ± 15 (9)
1000	211 ± 8 (10)	225 ± 11 (10)	235 ± 15 (10)	24* ± 12 (10)	245 ± 16 (6)	287 ± 18 (6)	327 ± 22 (6)	403 ± 47 (6)	158 ± 39 (6)	303 ± 19 (5)	330 ± 28 (4)	25 ± 14 (4)

Each value is expressed as mean±S.D. and (number of animals available).

* : Significantly different from control at 5% level of probability

Table 7

Food consumption of male rats treated orally with diacetone alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	Days of treatment					
	1	8	22	29	36	43
0	30 ± 4 (10)	34 ± 2 (10)	36 ± 4 (10)	36 ± 4 (10)	36 ± 4 (10)	36 ± 4 (10)
30	31 ± 3 (10)	37 ± 5 (10)	36 ± 4 (10)	37 ± 5 (10)	37 ± 4 (10)	34 ± 4 (10)
100	32 ± 4 (10)	36 ± 4 (10)	35 ± 3 (10)	37 ± 5 (10)	37 ± 5 (10)	35 ± 5 (10)
300	31 ± 3 (10)	35 ± 2 (10)	34 ± 3 (10)	35 ± 4 (10)	34 ± 3 (10)	33 ± 4 (10)
1000	28 ± 3 (10)	34 ± 4 (10)	36 ± 4 (10)	35 ± 2 (10)	35 ± 3 (10)	34 ± 3 (10)

Each value is expressed as mean±S.D. and (number of animals examined).

Table 8

Food consumption of female rats treated orally with diacetone alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

(g/rat/day)

Dose (mg/kg)	Days of pre mating		Days of pregnancy				Days of lactation	
	1	8	0	7	14	20	0	3
0	20 ± 3 (10)	23 ± 3 (10)	23 ± 3 (9)	30 ± 4 (9)	29 ± 3 (9)	28 ± 5 (9)	16 ± 8 (9)	53 ± 6 (9)
30	21 ± 3 (10)	23 ± 3 (10)	23 ± 3 (10)	29 ± 3 (10)	31 ± 3 (10)	30 ± 2 (10)	25 ± 6 (10)	55 ± 7 (10)
100	24 ± 13 (10)	23 ± 2 (10)	22 ± 2 (8)	27 ± 3 (8)	30 ± 3 (8)	29 ± 2 (8)	24 ± 8 (8)	56 ± 3 (8)
300	21 ± 3 (10)	25 ± 4 (10)	23 ± 1 (9)	30 ± 2 (9)	34 ± 3 (9)	29 ± 3 (9)	19 ± 14 (9)	56 ± 10 (9)
1000	20 ± 2 (10)	24 ± 6 (10)	20 ± 4 (6)	29 ± 3 (6)	30 ± 3 (6)	32 ± 6 (6)	20 ± 5 (5)	52 ± 6 (4)

Each value is expressed as mean ± S.D. and (number of animals available).

Table 9 - 1 Urinary findings of male rats treated orally with diacetone alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	No. of animals	Color				Cloudy		Specific gravity	pH						Protein							
		C	PY	Y	PB	-	+		5.0	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	+	++	+++	++++	
0	10	2	7	1		5	5	1.026 ^{a)} ± 0.015			1	3	1	5			2	8				
30	10	2	8			3	7	1.029 ± 0.017			1	2	4	3			2	6	2			
100	10	3	5	1	1	4	6	1.026 ± 0.016				2	3	5			2	8				
300	10	3	6		1	3	7	1.028 ± 0.013				1	2	7			4	5	1			
1000	10	1	8	1		3	7	1.031 ± 0.020					5	4	1		2	7	1			

Dose (mg/kg)	No. of animals	Glucose					Ketone body					Occult blood					Urobilinogen				Bilirubin			
		-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	0.1	1	2	4	-	+	++	+++
0	10	10					6	1	3		9	1				10					10			
30	10	10					2	4	4		8	1		1	10						10			
100	10	10					1	5	4		10				10						10			
300	10	10					1	7	1	1	9	1			10						10			
1000	10	10					4	6			10				10						10			

a) : Mean ± S.D.

Color : C(colorless), PY(pale yellow), Y(yellow), PB(pale brown)

Cloudy : -(negligible), +(cloudy)

Protein : -(negligible), ±(15~30mg/dl), +(30mg/dl), ++(100mg/dl), +++(300mg/dl), ++++(1000mg/dl)

Glucose : -(negligible), ±(0.1g/dl), +(0.25g/dl), ++(0.5g/dl), +++(1g/dl)

Ketone body : -(negligible), ±(5mg/dl), +(15mg/dl), ++(40mg/dl), +++(80mg/dl)

Occult blood : -(negligible), ±(trace), +(slight), ++(moderate), +++(marked)

Urobilinogen : Ehrlich unit/dl

Bilirubin : -(negligible), +(slight), ++(moderate), +++(marked)

Table 9 - 2 Urinary findings of male rats treated orally with diacetone alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	No. of animals	Erythrocytes				Leukocytes				Crystals											
										Mg				Ca				Ams			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
0	10	10				10				4	3	2	1	10							10
30	10	9	1			9	1			1	3	5	1	10							10
100	10	10				10				5	3	1	1	10							10
300	10	10				8	1	1		3	2	3	2	9	1						10
1000	10	10				8	2			4	1	4	1	10							10

Dose (mg/kg)	No. of animals	Epithelial cells										Casts						Fat globules			
		Sq				R			S			G		H		W					
		-	+	++	+++	-	+	++	-	+	++	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
0	10	10					10				10				10		10				10
30	10	6	4				10				10				10		10				10
100	10	9	1				10				10				10		10				10
300	10	6	3	1			9	1			10				10		10				10
1000	10	10					10				10				10		10				10

- : Not observed; + : A few in some fields; ++ : A few in all fields; +++ : Many in all fields

Crystals: Mg(ammonium magnesium phosphate), Ca(calcium phosphate), Ams(amorphous)
 Epithelial cells: Sq(squamous), R(round), S(spindle)
 Casts: G(granule), H(hyaline), W(waxy)

Table 10

Hematological findings of male rats treated orally with diacetone alcohol
in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	No. of animals	RBC ($10^4/\mu\text{l}$)	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (%)	Ret. (%)	WBC ($10^2/\mu\text{l}$)	Plat. ($10^4/\mu\text{l}$)	PT (sec)	APTT (sec)
0	10	836 ± 45	15.5 ± 0.6	45.6 ± 1.6	55 ± 2	18.6 ± 0.9	34.0 ± 0.3	33 ± 9	76 ± 21	150 ± 17	13.5 ± 0.3	17.6 ± 1.3
30	10	835 ± 30	15.5 ± 0.6	45.6 ± 1.3	55 ± 2	18.6 ± 0.6	34.0 ± 0.6	32 ± 7	64 ± 19	139 ± 13	13.4 ± 0.4	17.9 ± 0.9
100	10	832 ± 34	15.3 ± 0.4	44.8 ± 1.6	54 ± 2	18.4 ± 0.8	34.2 ± 0.6	33 ± 9	78 ± 26	156 ± 19	13.4 ± 0.3	17.7 ± 1.1
300	10	834 ± 44	15.3 ± 0.5	44.9 ± 1.5	54 ± 2	18.4 ± 0.9	34.2 ± 0.6	33 ± 9	72 ± 31	160 ± 23	13.3 ± 0.3	17.6 ± 0.8
1000	10	818 ± 32	15.4 ± 0.3	45.4 ± 1.0	56 ± 2	18.9 ± 0.6	34.0 ± 0.4	37 ± 8	75 ± 33	174* ± 21	13.5 ± 0.3	17.5 ± 1.0

Each value is expressed as mean \pm S.D.

* : Significantly different from control at 5% level of probability

Table 11

Blood biochemical findings of male rats treated orally with diacetone alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	No. of animals	LDH (IU/l)	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	ALP (IU/l)	γ -GTP (IU/l)	ChE (IU/l)	T.P. (g/dl)	Alb. (g/dl)	A/G	T-Cho. (mg/dl)
0	10	229 ± 75	61 ± 5	33 ± 4	254 ± 33	0.30 ± 0.20	52 ± 13	6.20 ± 0.25	3.05 ± 0.23	0.98 ± 0.13	84 ± 23
30	10	240 ± 91	63 ± 6	33 ± 4	204* ± 24	0.34 ± 0.22	60 ± 22	6.22 ± 0.25	2.99 ± 0.14	0.93 ± 0.10	86 ± 16
100	10	257 ± 44	62 ± 7	35 ± 6	190** ± 37	0.45 ± 0.44	69 ± 12	6.31 ± 0.18	3.09 ± 0.16	0.97 ± 0.12	96 ± 17
300	10	238 ± 68	60 ± 8	32 ± 3	232 ± 46	0.23 ± 0.21	81 ± 29	6.41 ± 0.22	3.08 ± 0.13	0.93 ± 0.05	99 ± 21
1000	10	250 ± 103	91* ± 41	42 ± 17	246 ± 36	1.12 ± 1.73	145** ± 42	6.82** ± 0.31	3.15 ± 0.15	0.86 ± 0.09	148** ± 34
Dose (mg/kg)	No. of animals	T.G. (mg/dl)	Glu. (mg/dl)	T-Bil. (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Crea. (mg/dl)	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)
0	10	92 ± 39	150 ± 11	0.30 ± 0.05	17.9 ± 1.1	0.52 ± 0.08	10.3 ± 0.3	7.3 ± 0.5	143 ± 1	4.61 ± 0.25	101 ± 2
30	10	73 ± 31	143 ± 12	0.31 ± 0.04	19.0 ± 2.6	0.53 ± 0.05	10.2 ± 0.3	7.0 ± 0.6	143 ± 1	4.54 ± 0.33	101 ± 1
100	10	72 ± 31	142 ± 13	0.31 ± 0.04	17.4 ± 1.7	0.52 ± 0.07	10.3 ± 0.2	6.7 ± 0.4	142 ± 1	4.63 ± 0.28	101 ± 1
300	10	78 ± 28	141 ± 14	0.31 ± 0.04	19.5 ± 1.8	0.56 ± 0.06	10.5 ± 0.4	7.0 ± 0.8	143 ± 2	4.67 ± 0.28	100 ± 2
1000	10	49 ± 24	115** ± 17	0.40** ± 0.05	21.3** ± 2.0	0.61* ± 0.07	10.9** ± 0.4	7.5 ± 0.8	144 ± 1	4.64 ± 0.30	100 ± 2

Each value is expressed as mean±S.D.

* : Significantly different from control at 5% level of probability

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 12 Incidence of necropsy findings of male rats treated orally with diacetone alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ	Findings	Fate Degree	Dose(mg/kg)			0			30			100			300			1000		
			No. of animals	TK	FP	(T)	TK	(T)	TK	FP	(T)	TK	FP	(T)	TK	FP	(T)	TK	FP	(T)
Liver	Enlargement	-	9	1	(10)	10	(10)	8	2	(10)	9	1	(10)	5	4	(9)				
		+	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	1	0	(1)				
Kidney	Enlargement	-	9	1	(10)	10	(10)	8	2	(10)	8	1	(9)	6	4	(10)				
		+	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	1	0	(1)	0	0	(0)				
Testis	Atrophy	-	8	1	(9)	10	(10)	8	2	(10)	9	1	(10)	6	4	(10)				
		+	1	0	(1)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)				
Epididymis	Elevated area, grayish white, caput	-	9	1	(10)	10	(10)	7	2	(9)	9	1	(10)	6	4	(10)				
		+	0	0	(0)	0	(0)	1	0	(1)	0	0	(0)	0	0	(0)				
Adrenal	Hypertrophy	-	9	1	(10)	10	(10)	8	2	(10)	9	1	(10)	6	3	(9)				
		+	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	0	1	(1)				
Thymus	Red mottle	-	9	1	(10)	9	(9)	7	2	(9)	8	1	(9)	6	4	(10)				
		+	0	0	(0)	1	(1)	1	0	(1)	1	0	(1)	0	0	(0)				

- : Negative; + : Slight; TK : Terminal kill; FP : Failed to cause pregnancy, killed at the termination; T : Total

Table 13 Incidence of necropsy findings of female rats treated orally with diacetone alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ	Findings	Fate Degree No. of animals	Dose(mg/kg) 0		30		100			300			1000					
			TK	NP	(T)	TK	(T)	TK	NP	(T)	TK	NP	(T)	TK	NP	KL	KE	(T)
			9	1	(10)	10	(10)	8	2	(10)	9	1	(10)	4	4	1	1	(10)
Liver	: Enlargement	-	9	1	(10)	10	(10)	8	2	(10)	9	1	(10)	1	4	1	0	(6)
		+	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	3	0	0	1	(4)*
	Decoloration	-	9	1	(10)	10	(10)	8	2	(10)	9	1	(10)	4	4	1	0	(9)
		+	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	0	1	(1)
Stomach	: Black spot, mucosa, glandular stomach	-	9	1	(10)	10	(10)	8	2	(10)	9	1	(10)	4	4	1	0	(9)
		+	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	0	1	(1)
Intestine	: Black mottle, mucosa, mainly ileum	-	9	1	(10)	10	(10)	8	2	(10)	9	1	(10)	4	4	1	0	(9)
		++	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	0	1	(1)
Spleen	: Atrophy	-	9	1	(10)	10	(10)	8	2	(10)	9	1	(10)	4	4	1	0	(9)
		+	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	0	1	(1)
Adrenal	: Hypertrophy	-	9	1	(10)	10	(10)	8	2	(10)	9	1	(10)	4	4	1	0	(9)
		+	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	0	1	(1)

- : Negative; + : Slight; ++ : Moderate; TK : Terminal kill; KE : Killed in extremis; NP : Non-pregnant, killed at 26 days after copulation; KL : Killed because all pups died after delivery; T : Total
 * : Significantly different from control at 5% level of probability

Table 14

Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with diacetone alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

	Dose (mg/kg)	No. of animals	B.W. (g)	Brain (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)	Heart (g)	Thymus (g)	Adrenal (mg)	Testis (g)	Epidid. (g)
Absolute	0	10	492 ± 39	2.12 ± 0.08	13.20 ± 1.84	3.11 ± 0.33	0.82 ± 0.06	1.45 ± 0.13	0.35 ± 0.07	64.4 ± 9.4	3.47 ± 0.49	1.41 ± 0.17
	30	10	493 ± 41	2.06 ± 0.07	13.10 ± 1.73	3.03 ± 0.21	0.84 ± 0.09	1.47 ± 0.13	0.35 ± 0.04	63.9 ± 11.4	3.56 ± 0.30	1.41 ± 0.14
	100	10	501 ± 39	2.13 ± 0.06	13.71 ± 1.59	3.19 ± 0.27	0.86 ± 0.09	1.53 ± 0.15	0.38 ± 0.10	62.8 ± 8.0	3.47 ± 0.34	1.46 ± 0.13
	300	10	489 ± 36	2.11 ± 0.06	13.91 ± 1.42	3.57** ± 0.36	0.82 ± 0.11	1.49 ± 0.11	0.37 ± 0.07	72.4 ± 7.8	3.62 ± 0.23	1.51 ± 0.12
	1000	10	476 ± 30	2.13 ± 0.07	14.95 ± 1.46	3.31 ± 0.32	0.81 ± 0.09	1.46 ± 0.13	0.38 ± 0.12	78.2** ± 11.3	3.55 ± 0.30	1.41 ± 0.14
Relative@	0	10	492 ± 39	0.43 ± 0.02	2.67 ± 0.16	0.63 ± 0.04	0.17 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.07 ± 0.02	13.21 ± 2.46	0.71 ± 0.13	0.29 ± 0.05
	30	10	493 ± 41	0.42 ± 0.03	2.65 ± 0.20	0.62 ± 0.04	0.17 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.07 ± 0.01	12.96 ± 2.13	0.73 ± 0.07	0.29 ± 0.03
	100	10	501 ± 39	0.43 ± 0.03	2.74 ± 0.21	0.64 ± 0.05	0.17 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.08 ± 0.02	12.55 ± 1.44	0.69 ± 0.06	0.29 ± 0.03
	300	10	489 ± 36	0.43 ± 0.02	2.85 ± 0.19	0.73** ± 0.08	0.17 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.08 ± 0.01	14.86 ± 1.74	0.74 ± 0.06	0.31 ± 0.02
	1000	10	476 ± 30	0.45 ± 0.03	3.14** ± 0.22	0.70 ± 0.05	0.17 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.08 ± 0.02	16.46** ± 2.30	0.75 ± 0.08	0.30 ± 0.03

Each value is expressed as mean ± S.D.

@ : Relative organ weight per 100g body weight

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 15

Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with diacetone alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

	Dose (mg/kg)	No. of animals	B.W. (g)	Brain (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)	Heart (g)	Thymus (g)	Adrenal (mg)
Absolute	0	9	327 ± 21	1.96 ± 0.05	12.15 ± 0.91	1.86 ± 0.05	0.64 ± 0.08	1.02 ± 0.09	0.25 ± 0.11	77.2 ± 10.7
	30	10	341 ± 24	1.98 ± 0.10	12.68 ± 1.33	1.92 ± 0.18	0.70 ± 0.08	1.08 ± 0.10	0.26 ± 0.06	81.7 ± 10.3
	100	8	331 ± 18	1.97 ± 0.09	12.88 ± 1.81	2.01 ± 0.14	0.63 ± 0.06	1.02 ± 0.07	0.26 ± 0.03	81.5 ± 14.2
	300	9	331 ± 20	1.94 ± 0.07	13.46 ± 0.46	2.03 ± 0.14	0.64 ± 0.07	1.02 ± 0.08	0.20 ± 0.07	83.6 ± 10.0
	1000	4	330 ± 28	1.92 ± 0.06	15.33* ± 0.92	2.14 ± 0.19	0.69 ± 0.15	1.07 ± 0.13	0.21 ± 0.06	90.0 ± 7.3
Relative@	0	9	327 ± 21	0.60 ± 0.04	3.72 ± 0.31	0.57 ± 0.04	0.19 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.07 ± 0.03	23.75 ± 4.07
	30	10	341 ± 24	0.58 ± 0.03	3.72 ± 0.27	0.56 ± 0.05	0.20 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.08 ± 0.02	23.97 ± 2.43
	100	8	331 ± 18	0.60 ± 0.02	3.89 ± 0.48	0.61 ± 0.05	0.19 ± 0.02	0.31 ± 0.00	0.08 ± 0.01	24.75 ± 4.80
	300	9	331 ± 20	0.59 ± 0.04	4.08 ± 0.31	0.62 ± 0.06	0.20 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.06 ± 0.02	25.28 ± 2.99
	1000	4	330 ± 28	0.59 ± 0.05	4.66** ± 0.15	0.65 ± 0.07	0.21 ± 0.03	0.33 ± 0.04	0.07 ± 0.01	27.32 ± 0.86

Each value is expressed as mean ± S.D.

@ : Relative organ weight per 100g body weight

* : Significantly different from control at 5% level of probability

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 16 - 1 Incidence of histopathological findings of male rats treated orally with diacetone alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ	Findings	Degree	Dose(mg/kg)														
			Fate No. of animals	0			30		100			300			1000		
			TK	FP	(T)	TK	(T)	TK	FP	(T)	TK	FP	(T)	TK	FP	(T)	
Heart	Myocardial degeneration/fibrosis, focal	-	8	1	(9)	—	—	—	1	(1)	—	1	(1)	4	3	(7)	
		+	1	0	0	—	—	—	0	0	—	0	0	2	1	0	
		++	0	0	(1)	—	—	—	1	(1)	—	0	(0)	0	0	(3)	
	Cellular infiltration, lymphocyte, subendocardium, zonal	-	8	1	(9)	—	—	—	2	(2)	—	1	(1)	6	4	(10)	
		++	1	0	(1)	—	—	—	0	(0)	—	0	(0)	0	0	(0)	
Lung	Accumulation, foam cell	-	8	1	(9)	—	—	—	2	(2)	—	0	(0)	5	4	(9)	
		+	1	0	(1)	—	—	—	0	(0)	—	1	(1)	1	0	(1)	
	Mineralization, artery	-	4	1	(5)	—	—	—	1	(1)	—	1	(1)	2	1	(3)	
		+	5	0	(5)	—	—	—	1	(1)	—	0	(0)	4	3	(7)	
	Hemorrhage	-	9	1	(10)	—	—	—	1	(1)	—	1	(1)	6	4	(10)	
		+	0	0	(0)	—	—	—	1	(1)	—	0	(0)	0	0	(0)	
	Metaplasia, osseous	-	8	1	(9)	—	—	—	2	(2)	—	1	(1)	6	4	(10)	
		+	1	0	(1)	—	—	—	0	(0)	—	0	(0)	0	0	(0)	
Liver	Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	-	9	1	(10)	10	(10)	8	2	(10)	9	1	(10)	3	2	(5)**	
		+	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	3	2	(5)**	
	Microgranuloma	-	6	1	(7)	6	(6)	8	2	(10)	7	1	(8)	5	4	(9)	
		+	3	0	(3)	4	(4)	0	0	(0)	2	0	(2)	1	0	(1)	
	Fatty change, hepatocyte, periportal	-	9	1	(10)	10	(10)	8	1	(9)	9	1	(10)	6	4	(10)	
		+	0	0	(0)	0	(0)	0	1	(1)	0	0	(0)	0	0	(0)	
	Cellular infiltration, lymphocyte, periportal	-	8	1	(9)	10	(10)	8	2	(10)	9	1	(10)	6	2	(8)	
		+	1	0	(1)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	0	2	(2)	
Pancreas	Proliferation, ductule	-	7	1	(8)	—	—	—	2	(2)	—	0	(0)	6	4	(10)	
		+	2	0	(2)	—	—	—	0	(0)	—	1	(1)	0	0	(0)	
	Cellular infiltration, lymphocyte	-	8	1	(9)	—	—	—	2	(2)	—	1	(1)	6	3	(9)	
		+	1	0	(1)	—	—	—	0	(0)	—	0	(0)	0	1	(1)	
	Atrophy, acinar cell	-	8	1	(9)	—	—	—	2	(2)	—	1	(1)	6	4	(10)	
		+	1	0	(1)	—	—	—	0	(0)	—	0	(0)	0	0	(0)	
	Edema, interstitium	-	9	1	(10)	—	—	—	2	(2)	—	1	(1)	5	4	(9)	
		+	0	0	(0)	—	—	—	0	(0)	—	0	(0)	1	0	(1)	
Kidney	Eosinophilic body, proximal tubular epithelium	-	8	1	(9)	7	(7)	6	1	(7)	6	0	(6)	6	4	(10)	
		+	1	0	(1)	3	(3)	2	1	(3)	3	1	(4)	0	0	(0)	
	Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		+	9	1	(10)	10	(10)	2	0	(2)	0	0	(0)	1	0	(1)	
		++	0	0	0	0	0	6	2	0	5	1	2	0	0		
		+++	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(8)**	4	0	(10)**	3	4	(9)**	

— : Not examined; - : Negative; + : Slight; ++ : Moderate; +++ : Marked; TK : Terminal kill; FP : Failed to cause pregnancy, killed at the termination; T : Total

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 16 - 2 Incidence of histopathological findings of male rats treated orally with diacetone alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ : Findings	Degree	Dose (mg/kg)															
		0			30		100			300			1000				
		Fate No. of animals	TK 9	FP 1	(T) (10)	TK 10	(T) (10)	TK 8	FP 2	(T) (10)	TK 9	FP 1	(T) (10)	TK 6	FP 4	(T) (10)	
Kidney : Basophilic tubules, cortex	-		3	1		3		2	0		0	0		2	0		
	+		6	0	(10)	7	(10)	6	2	(10)	4	0	(4)	1	1	(4)	
	++		0	0		0		0	0		3	1		3	2		
	+++		0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	2	0	(6)**	0	1	(6)**	
	Cyst, solitary	-		6	1	(7)	9	(9)	5	2	(7)	7	1	(8)	3	4	(7)
		+		3	0	(3)	1	(1)	3	0	(3)	2	0	(2)	3	0	(3)
	Cellular infiltration, lymphocyte, cortex	-		8	1	(9)	8	(8)	6	2	(8)	6	1	(7)	6	3	(9)
		+		1	0	(1)	2	(2)	2	0	(2)	3	0	(3)	0	1	(1)
	Dilatation, collecting tubule, focal	-		9	1	(10)	9	(9)	8	2	(10)	9	1	(10)	6	4	(10)
		+		0	0	(0)	1	(1)	0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)
Dilatation, distal tubule, diffuse	-		9	1	(10)	10	(10)	8	2	(10)	9	1	(10)	3	3	(6)	
	+		0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	3	1	(4)*	
Fibrosis	-		9	1	(10)	10	(10)	8	2	(10)	8	1	(9)	6	4	(10)	
	+		0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	1	0	(1)	0	0	(0)	
Urinary bladder : Cellular infiltration, lymphocyte, submucosa	-		8	1	(9)	-	-	-	2	(2)	-	1	(1)	6	4	(10)	
	+		1	0	(1)	-	-	-	0	(0)	-	0	(0)	0	0	(0)	
Testis : Atrophy, seminiferous tubule, diffuse	-		8	1	(9)	-	-	-	2	(2)	-	1	(1)	6	4	(10)	
	+		1	0	(1)	-	-	-	0	(0)	-	0	(0)	0	0	(0)	
Hyperplasia, interstitial cell, diffuse	-		8	1	(9)	-	-	-	2	(2)	-	1	(1)	6	4	(10)	
	+		1	0	(1)	-	-	-	0	(0)	-	0	(0)	0	0	(0)	
Epididymis : Decreased, sperm	-		8	1	(9)	-	-	-	2	(2)	-	1	(1)	6	4	(10)	
	+		1	0	(1)	-	-	-	0	(0)	-	0	(0)	0	0	(0)	
Granuloma, spermatic	-		9	1	(10)	-	-	0	2	(2)	-	1	(1)	6	4	(10)	
	++		0	0	(0)	-	-	1*	0	(1)	-	0	(0)	0	0	(0)	
Prostate: Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	-		9	1	(10)	-	-	-	2	(2)	-	1	(1)	5	4	(9)	
	+		0	0	(0)	-	-	-	0	(0)	-	0	(0)	1	0	(1)	
Pituitary : Cyst, anterior lobe	-		9	1	(10)	-	-	-	2	(2)	-	1	(1)	5	4	(9)	
	+		0	0	(0)	-	-	-	0	(0)	-	0	(0)	1	0	(1)	
Adrenal : Vacuolization, zone fasciculata	-		9	1	(10)	10	(10)	8	2	(10)	8	1	(9)	3	2	(5)	
	+		0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	1	0	(1)	3	2	(5)**	
Hypertrophy, zone fasciculata	-		9	1	(10)	10	(10)	8	2	(10)	9	1	(10)	6	3	(9)	
	+		0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	0	1	(1)	
Thymus : Hemorrhage	-		7	1	(8)	0	(0)	0	2	(2)	0	1	(1)	4	4	(8)	
	+		2	0	(2)	1*	(1)	1*	0	(1)	1*	0	(1)	2	0	(2)	
Skin : Ulcer	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	(0)	
	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1*	-	(1)	

- : Not examined; - : Negative; + : Slight; ++ : Moderate; +++ : Marked; TK : Terminal kill; FP : Failed to cause pregnancy, killed at the termination; T : Total * : Examined the animal with macroscopical abnormality in the epididymis, thymus or skin
 * : Significantly different from control at 5% level of probability, ** : Significantly different from control at 1% level of probability
 The organs of the heart, lung, liver, pancreas, stomach, intestine, kidney, urinary bladder, testis, epididymis, seminal vesicle, prostate, pituitary, thyroid, parathyroid, adrenal, thymus, spleen, bone marrow, brain and eye ball were examined from animals of the control and 1000 mg/kg groups, and FP animals.

Table 17 - 1 Incidence of histopathological findings of female rats treated orally with diacetone alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ	Findings	Degree	Dose (mg/kg)																
			0			30		100			300			1000					
			Fate No. of animals	TK	NP	(T)	TK	(T)	TK	NP	(T)	TK	NP	(T)	TK	NP	KL	KE	(T)
			9	1	(10)	10	(10)	8	2	(10)	9	1	(10)	4	4	1	1	(10)	
Heart	Proliferation, capillary, focal	-	9	1	(10)	—	—	—	1	(1)	—	1	(1)	4	4	1	1	(10)	
		+	0	0	(0)	—	—	—	1	(1)	—	0	(0)	0	0	0	0	(0)	
Lung	Accumulation, foam cell	-	9	1	(10)	—	—	—	2	(2)	—	1	(1)	3	3	1	1	(8)	
		+	0	0	(0)	—	—	—	0	(0)	—	0	(0)	1	1	0	0	(2)	
	Mineralization, artery	-	5	1	(6)	—	—	—	2	(2)	—	1	(1)	2	3	0	0	(5)	
		+	4	0	(4)	—	—	—	0	(0)	—	0	(0)	2	1	1	1	(5)	
	Metaplasia, osseous	-	8	1	(9)	—	—	—	2	(2)	—	1	(1)	4	4	1	1	(10)	
		+	1	0	(1)	—	—	—	0	(0)	—	0	(0)	0	0	0	0	(0)	
Liver	Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	-	9	1	(10)	10	(10)	8	2	(10)	9	1	(10)	0	3	0	1	(4)	
		+	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	4	1	1	0	(6)**	
	Microgranuloma	-	8	1	(9)	8	(8)	8	1	(9)	8	0	(8)	4	4	0	1	(9)	
		+	1	0	(1)	2	(2)	0	1	(1)	1	1	(2)	0	0	1	0	(1)	
	Necrosis, focal	-	9	1	(10)	9	(9)	8	2	(10)	8	1	(9)	4	4	1	1	(10)	
		+	0	0	(0)	1	(1)	0	0	(0)	1	0	(1)	0	0	0	0	(0)	
	Necrosis, centrilobular	-	9	1	(10)	10	(10)	8	2	(10)	9	1	(10)	4	4	1	0	(9)	
		+	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	0	1	(1)	
	Inclusion, hepatocyte, intracytoplasmic, eosinophilic, focal	-	9	1	(10)	10	(10)	7	2	(9)	9	1	(10)	4	4	1	1	(10)	
		+	0	0	(0)	0	(0)	1	0	(1)	0	0	(0)	0	0	0	0	(0)	
Stomach	Hyperplasia, squamous, forestomach	-	8	1	(9)	—	—	—	2	(2)	—	1	(1)	4	4	1	1	(10)	
		+	1	0	(1)	—	—	—	0	(0)	—	0	(0)	0	0	0	0	(0)	
	Necrosis, mucosa, glandular stomach	-	9	1	(10)	—	—	—	2	(2)	—	1	(1)	4	4	1	0	(9)	
		+	0	0	(0)	—	—	—	0	(0)	—	0	(0)	0	0	0	1	(1)	
Intestine	Erosion, duodenum	-	8	1	(9)	—	—	—	2	(2)	—	1	(1)	4	4	1	1	(10)	
		+	1	0	(1)	—	—	—	0	(0)	—	0	(0)	0	0	0	0	(0)	
	Necrosis, mucosa, ileum	-	9	1	(10)	—	—	—	2	(2)	—	1	(1)	4	4	1	0	(9)	
		+	0	0	(0)	—	—	—	0	(0)	—	0	(0)	0	0	0	1	(1)	
Pancreas	Atrophy, acinar cell	-	9	1	(10)	—	—	—	2	(2)	—	1	(1)	3	4	1	1	(9)	
		+	0	0	(0)	—	—	—	0	(0)	—	0	(0)	1	0	0	0	(1)	
	Proliferation, ductule	-	9	1	(10)	—	—	—	2	(2)	—	1	(1)	4	3	1	1	(9)	
		+	0	0	(0)	—	—	—	0	(0)	—	0	(0)	0	1	0	0	(1)	
	Cellular infiltration, lymphocyte	-	9	0	(9)	—	—	—	2	(2)	—	1	(1)	4	4	1	1	(10)	
		+	0	1	(1)	—	—	—	0	(0)	—	0	(0)	0	0	0	0	(0)	

— : Not examined; - : Negative; + : Slight; TK : Terminal kill; KE : Killed in extremis; NP : Non-pregnant;

KL : Killed because all pups died after delivery; T : Total

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 17 - 2 Incidence of histopathological findings of female rats treated orally with diacetone alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ	Findings	Degree	Dose (mg/kg)																
			0			30		100			300			1000					
			Fate No. of animals	TK	NP	(T)	TK	(T)	TK	NP	(T)	TK	NP	(T)	TK	NP	KL	KE	(T)
				9	1	(10)	10	(10)	8	2	(10)	9	1	(10)	4	4	1	1	(10)
Kidney	Basophilic tubules, cortex	-	6	1	(7)	7	(7)	5	2	(7)	7	0	(7)	4	3	1	1	(9)	
		+	3	0	(3)	3	(3)	3	0	(3)	2	1	(3)	0	1	0	0	(1)	
	Cyst, solitary	-	8	1	(9)	8	(8)	6	2	(8)	8	1	(9)	4	4	1	1	(10)	
		+	1	0	(1)	2	(2)	2	0	(2)	1	0	(1)	0	0	0	0	(0)	
	Cellular infiltration, lymphocyte, cortex	-	7	1	(8)	9	(9)	7	1	(8)	8	1	(9)	3	3	1	1	(8)	
		+	2	0	(2)	1	(1)	1	1	(2)	1	0	(1)	1	1	0	0	(2)	
	Degeneration, fatty, proximal tubular epithelium	-	9	1	(10)	10	(10)	8	2	(10)	7	1	(8)	4	4	1	0	(9)	
		+	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	0	0	(0)	
	Degeneration, vacuolar, proximal tubular epithelium	-	8	1	(9)	10	(10)	8	2	(10)	6	1	(7)	4	4	1	1	(10)	
		+	1	0	(1)	0	(0)	0	0	(0)	2	0	(0)	0	0	0	0	(0)	
	Dilatation, distal tubule, diffuse	-	9	1	(10)	10	(10)	8	2	(10)	7	1	(8)	3	3	1	0	(7)	
		+	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	2	0	(0)	1	1	0	0	(0)	
Spleen : Fibrosis, capsule	-	8	1	(9)	-	-	-	2	(2)	-	1	(1)	4	4	1	1	(10)		
	+	1	0	(1)	-	-	-	0	(0)	-	0	(0)	0	0	0	0	(0)		
Atrophy	-	9	1	(10)	-	-	-	2	(2)	-	1	(1)	4	4	1	0	(9)		
	+	0	0	(0)	-	-	-	0	(0)	-	0	(0)	0	0	0	1	(1)		
Pituitary : Cyst, anterior lobe	-	8	1	(9)	-	-	-	1	(1)	-	1	(1)	4	3	1	1	(9)		
	+	1	0	(1)	-	-	-	1	(1)	-	0	(0)	0	1	0	0	(1)		
Thyroid : Dilatation, follicle	-	9	1	(10)	-	-	-	2	(2)	-	1	(1)	3	4	1	1	(9)		
	+	0	0	(0)	-	-	-	0	(0)	-	0	(0)	1	0	0	0	(1)		
Adrenal : Vacuolization, zone fasciculata	-	9	1	(10)	10	(10)	8	2	(10)	8	1	(9)	4	1	1	1	(7)		
	+	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	1	0	(1)	0	3	0	0	(3)		
Hypertrophy, zone fasciculata	-	9	1	(10)	10	(10)	8	2	(10)	9	1	(10)	4	4	1	0	(9)		
	+	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	0	1	(1)		
Necrosis, zone fasciculata	-	8	1	(9)	9	(9)	8	2	(10)	9	1	(10)	4	4	1	1	(10)		
	+	0	0	(0)	1	(1)	0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	0	0	(0)		
Hemorrhage, zone fasciculata	-	9	1	(10)	10	(10)	8	2	(10)	9	1	(10)	3	4	1	1	(9)		
	+	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	1	0	0	0	(1)		
Thymus : Hemorrhage	-	8	1	(9)	-	-	-	1	(1)	-	1	(1)	4	4	0	1	(9)		
	+	1	0	(1)	-	-	-	1	(1)	-	0	(0)	0	0	1	0	(1)		
Atrophy, cortical	-	8	1	(9)	-	-	-	2	(2)	-	1	(1)	4	4	1	0	(9)		
	+	1	0	(1)	-	-	-	0	(0)	-	0	(0)	0	0	0	1	(1)		

- : Not examined; - : Negative; + : Slight; ++ : Moderate; TK : Terminal kill; KE : Killed in extremis; NP : Non-pregnant; KL : Killed because all pups died after delivery; T : Total

The organs of the heart, lung, liver, pancreas, stomach, intestine, kidney, urinary bladder, ovary, uterus, vagina, mammary gland, pituitary, thyroid, parathyroid, adrenal, thymus, spleen, bone marrow, brain and eye ball were examined from animals of the control and 1000 mg/kg groups, and NP animals.

Table 1 8 Reproduction results of rats treated orally with diacetone alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

	Dose (mg/kg)				
	0	30	100	300	1000
No. of pairs mated	10	10	10	10	10
No. of pairs with successful copulation	10	10	10	10	10
Copulation index (%)	100	100	100	100	100
Pairing days until copulation (days, Mean \pm S.D.)	2.3 \pm 1.3	2.9 \pm 1.0	2.5 \pm 1.2	2.9 \pm 0.7	2.5 \pm 1.4
No. of pregnant females	9	10	8	9	6
Fertility index (%)	90	100	80	90	60
No. of corpora lutea (Mean \pm S.D.)	17.1 \pm 2.2	18.3 \pm 1.8	18.5 \pm 2.9	18.4 \pm 1.4	18.2 \pm 2.4
No. of implantation sites (Mean \pm S.D.)	16.6 \pm 1.3	17.4 \pm 1.3	17.8 \pm 1.5	18.1 \pm 1.5	14.2 \pm 6.1
Implantation index (% , Mean \pm S.D.)	97.3 \pm 6.1	95.4 \pm 5.8	96.3 \pm 8.4	98.2 \pm 3.8	79.0 \pm 32.4
No. of living pregnant females	9	10	8	9	5
No. of pregnant females with parturition	9	10	8	9	5
Gestation length (days, Mean \pm S.D.)	22.4 \pm 0.5	22.4 \pm 0.5	22.5 \pm 0.5	22.9 \pm 0.3	22.6 \pm 0.5
No. of pregnant females with live pups	9	10	8	9	5
Gestation index (%)	100	100	100	100	100
No. of pregnancies killed ^a	0	0	0	0	1
No. of pregnant females with live pups on day 4	9	10	8	9	4

Copulation index = (No. of pairs with successful copulation/No. of pairs mated) \times 100
 Fertility index = (No. of pregnant animals/No. of pairs with successful copulation) \times 100
 Gestation index = (No. of females with live pups/No. of living pregnant females) \times 100
^a : All pups died after delivery; killed during the study for pathological examination

Table 19

Litter results of female rats treated orally with diacetone alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
No. of pups born	15.9± 1.1	16.4± 1.9	16.5± 1.6	16.9± 1.6	11.6± 6.3
Delivery index (%)	96.1± 4.0	94.1± 5.7	93.0± 4.9	93.2± 3.9	78.7± 26.7
No. of pups alive on day 0 of lactation					
Total	15.7± 0.9	16.2± 1.9	16.3± 1.5	16.4± 1.7	10.0± 6.2
Male	8.1± 1.5	8.5± 2.5	7.5± 2.6	8.2± 2.5	4.4± 3.4
Female	7.6± 1.2	7.7± 1.9	8.8± 3.1	8.2± 2.4	5.6± 3.5
Live birth index (%)	98.7± 2.6	98.8± 2.6	98.6± 2.7	97.4± 4.3	88.7± 21.8
Sex ratio (Male/Female)	1.07	1.13	0.89	1.03	0.78
No. of pups alive on day 4 of lactation					
Total	15.6± 1.1	15.8± 2.1	16.0± 1.2	15.4± 1.7	8.0± 5.2
Male	8.1± 1.5	8.4± 2.5	7.4± 2.5	7.8± 1.7	4.5± 1.3
Female	7.4± 1.3	7.4± 1.8	8.6± 2.9	7.7± 3.0	4.4± 3.6
Viability index (%)	99.2± 2.4	97.5± 4.3	98.6± 2.6	94.5± 10.6	69.4± 45.1
Body weight of live pups (g)					
on day 0					
Male	6.8± 0.4	6.9± 0.6	6.8± 0.3	6.9± 0.6	7.1± 0.5
Female	6.4± 0.4	6.6± 0.6	6.5± 0.4	6.6± 0.6	6.7± 0.3
on day 4					
Male	10.5± 1.2	11.0± 0.9	10.6± 0.7	10.4± 1.9	11.2± 0.9
Female	10.0± 1.1	10.5± 0.7	10.1± 0.7	10.3± 1.8	10.6± 1.0

Delivery index = (No. of pups born / No. of implantation sites) x 100

Live birth index = (No. of live pups on day 0 / No. of pups born) x 100

Viability index = (No. of live pups on day 4 / No. of live pups on day 0) x 100

Sex ratio = Total No. of male pups / Total No. of female pups

Each value is expressed as Mean ± SD., except sex ratio

Table 20 Incidence of external findings of rats treated orally with diacetone alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Findings	Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
External	No. of pups examined	142	164	132	152	57
	No. of pups with external anomalies ^a	1 (0.7±2.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.8±4.1)
External anomalies ^a						
	Multiple anomaly	1 ^b (0.7±2.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Vestigial tail	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.8±4.1)

a : No. of pups (Mean ± S.D. of individual litter percentages)

b : Pup with open eyelids and agnathia

Table 2 J Incidence of visceral findings of rats treated orally with diazotome alcohol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Pituitary	Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
Visceral	No. of pups examined	143	162	132	146	50
	No. of pups with visceral anomalies ^a	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	No. of pups with visceral variations ^a	7 (4.7±5.7)	5 (2.7±6.7)	3 (3.1±4.0)	11 (7.3±7.6)	6 (11.7±9.2)
	Visceral variations ^a					
	Thymic remnant in neck	5 (3.4±4.4)	2 (1.1±3.3)	3 (2.1±4.0)	9 (6.0±6.6)	4 (7.9±5.6)
	Persistent left umbilical artery	1 (0.7±2.0)	2 (1.1±3.3)	0 (0)	2 (1.3±2.6)	2 (3.9±7.7)
	Dilatation of renal pelvis	1 (0.7±2.0)	1 (0.6±2.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

^a ; No. of pups (Mean ± S.D. of individual litter percentages)