

食薬セ研第10-1637号

2000年 9月 4日

アゾジカルボキサミドの
ラットを用いる経口投与一世代生殖毒性試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター
秦野研究所

【 目 次 】

要 約	1
I. 親動物	1
1. 雄動物所見	1
2. 雌動物所見	1
3. 生殖関連所見	2
4. 病理検査所見	2
II. 出生児	2
1. 生存性および発育に関する所見	2
2. 形態観察所見	2
III. 評価	3
緒 言	4
試験材料および方法	5
1. 被験物質	5
2. 使用動物および飼育条件	5
3. 群分けおよび個体識別	6
4. 投与検体の調製	6
5. 投与量、群構成、投与期間および投与方法	7
6. 観察方法	8
7. 統計解析	13
結 果	14
I. 親動物	14
1. 一般状態	14
2. 体重	15
3. 摂餌量	16
4. 性周期	16

5. 交配成績-----	16
6. 分娩および哺育所見-----	17
7. 病理検査所見-----	17
II. 出生児-----	22
1. 一般状態および生存性-----	22
2. 体重-----	23
3. 形態観察所見-----	24
考 察-----	25
1. 親動物-----	25
2. 出生児-----	26
3. 無作用量-----	27
文 献-----	28

Figures (Figure 1 ~ Figure 4)

Tables (Table A ~ Table D, Table 1 ~ Table 19)

【 要 約 】

アゾジカルボキサミド (ADC と略記) の 0 (媒体対照、コーン油)、100、300 および 1000 mg/kg を Sprague-Dawley 系 (Crj:CD) ラットの雌雄 (各 25 匹/群) に、雄は 5 週齢から 10 週間、また、雌は 10 週齢から 2 週間経口投与し、3 週間を限度として交配させた。雄は、3 週間の交配期間終了後 1 週間を経過した後に剖検した。雌は、交配後、自然分娩させ、哺育 21 日に出生児とともに剖検した。雌雄ともに剖検の前日まで投与を継続し、この間、親動物の一般状態、体重増加、摂餌量の変化などを観察するとともに、親動物の分娩および泌乳を含む繁殖能力、ならびに出生児の離乳までの発育を観察して、これらに対する ADC の影響を検討した。結果は、以下のように要約される。

I. 親動物

1. 雄動物所見

ADC 投与に起因した死亡あるいは瀕死動物は認められなかった。また、ADC 投与による一般状態の変化、体重増加抑制および摂餌量の抑制も認められなかった。

2. 雌動物所見

分娩するまでは、雌動物には死亡および瀕死動物は認められず、ADC 投与に関連した一般状態の変化、体重増加抑制および摂餌量の抑制も認められなかった。

分娩後に、ADC 各投与群で自発運動減少、眼瞼下垂、立毛、消瘦など全身状態の不良が少数例に認められ、300 mg/kg 投与群では 1 例が哺育 4 日に瀕死状態に至り、また、1000 mg/kg 投与群では 3 例が哺育 4、14 あるいは 16 日に死亡した。これらのうち、1000 mg/kg 投与群については、腎臓の病理組織学検査において、腎盂の拡張および腎盂移行上皮の過形成、管腔および間質における好中球の顕著な浸潤が認められ、腎盂腎炎と類似した病変が観察されたことから、ADC 投与による影響が疑われた。これに対し、300 mg/kg 投与群の瀕死例に認められた所見は、腎臓の近位尿細管の壊死および空胞変性であり、1000 mg/kg 投与群にみられた所見とは異なるものであったことから、ADC 投与による影響である可能性は乏

しいものと判断された。これらの動物を含めてその他の動物については、一般状態に異常は認められず、体重増加および摂餌量には ADC 投与の影響は認められなかった。

3. 生殖関連所見

性周期には ADC 投与に関連した異常は観察されなかった。全例が交尾し、同居期間およびその間に回帰した発情の回数にも ADC 投与の影響は認められなかった。不妊例が各群に少数例認められたが、受胎率に、ADC 投与の影響は認められなかった。また、分娩に関連した異常は認められず、出産率および妊娠期間にも ADC 投与の影響は認められなかった。哺育状態については、全身状態の不良を示し、母性行動を示さない動物が少数認められたが、その他の動物に異常は観察されなかった。

4. 病理検査所見

雄では、剖検時に ADC 投与に関連した変化は認められなかった。また、病理組織学検査においても、下垂体、甲状腺、精巣、精巣上体、精囊、凝固腺、前立腺および腎臓のいずれにも ADC 投与に関連した変化は認められなかった。

雌では、瀕死あるいは死亡例以外の動物については、下垂体、甲状腺、卵巣、子宮、頸部、膈および腎臓の病理組織学所見に ADC 投与の影響は認められなかった。

II. 出生児

1. 生存性および発育に関する所見

行動を含む一般状態に ADC 投与の影響は認められなかった。

生存性については、母動物の全身状態が不良であったため同腹の多数あるいは全例が死亡した腹が各群に少数例ずつ認められたが、生存率を示す各種指標には、ADC の用量に依存した変化は認められなかった。また、発育についても ADC 投与の影響は認められなかった。

2. 形態観察所見

対照群を含む各群の死亡児あるいは生存産児の外表あるいは内臓に、変異および奇形を

含む形態変化が散見されたが、ADC の用量に依存した変化は認められなかった。

III. 評価

以上の試験成績から、本試験条件下では、ADC の無作用量は、生殖に関しては影響が認められなかったことから、雄ならびに雌および出生児ともに 1000 mg/kg/day と推定される。生殖以外の一般項目については、雄では 1000 mg/kg/day であり、雌では腎盂腎炎様の病変を伴う瀕死あるいは死亡が認められたことから 300 mg/kg/day と推定される。

【 緒 言 】

アゾジカルボキサミドは、プラスチックの発泡剤として、また、小麦粉の熟成を促進する食品添加物として、広汎に使用されている化学物質である¹⁾。

アゾジカルボキサミドの安全性に関しては、ラットに対する LD₅₀値は、経口投与では 6400 mg/kg であり¹⁾、腹腔内投与では 440 mg/kg であること²⁾が報告されている。アゾジカルボキサミドの粉砕に携わる労働者に喘息発作の発生が認められているが、ラットを 13 週間吸入曝露しても毒性は認められていない³⁾。また、通常添加量の 10 倍のアゾジカルボキサミドを含む小麦粉で製造したパンをラットに 2 年間、3 世代に亘って混餌投与しても、毒性変化は認められなかった⁴⁾。アゾジカルボキサミドを含む小麦粉に水が加えられると、あるいは吸入曝露により生体に取り込まれると、アゾジカルボキサミドは急速に不活性化されてビウレアになること⁵⁾から、ビウレアについても、パンにおける通常の残留量の 1000 倍量を用いて同様の実験が行われたが、ラットでは毒性は認められなかった⁶⁾。また、さらに高濃度(10%)にビウレアを含む餌を 1 年に亘ってイヌあるいはラットに与えても、イヌには腎病変が誘発されるが、ラットではそうした変化は認められなかった⁷⁾。一方、アゾジカルボキサミドの化学構造は、抗甲状腺作用を有するアミノトリアゾールに類似していることから、アゾジカルボキサミドについても類縁作用のあることが疑われた。しかし、アゾジカルボキサミドを 10% 含む餌でラットを 4 週間曝露して初めてヨード取り込み量がやや上昇する程度で、きわめて弱い抗甲状腺活性のある可能性しか明らかにされなかった⁸⁾。

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、OECD 化学物質試験法ガイドライン 415/一世代生殖毒性試験（昭和 58 年 5 月 26 日）、および「化学物質 GLP」（昭和 59 年 3 月 31 日、環保業第 39 号、薬発第 229 号、59 基局第 85 号、昭和 63 年 11 月 18 日改正、環企研第 233 号、衛生第 38 号、63 基局第 823 号）に準拠してアゾジカルボキサミドの一世代生殖毒性試験を行い、同化合物の、親動物の分娩および泌乳を含む繁殖能力、ならびに出生児の離乳までの発育に及ぼす影響について検討したので報告する。

【試験材料および方法】

1. 被験物質

アゾジカルボキサミド (ADC と略記、CAS No.: 123-77-3、分子式: $C_2H_4N_4O_2$ 、構造式: $H_2NCON=NCONH_2$ 、分子量: 116.08、英名: azodicarboxamide、分解点: 195~202°C) は、アゾ化炭化水素である。

本試験には、 から提供された ADC (ロット番号: 純度: 99.5wt%、橙黄色粉末) を使用した。提供された ADC は使用時まで室温保管した。本試験に使用した ADC については、試験終了後に において使用した ADC を再度分析した。その結果、純度に変化は認められず、試験期間中安定であったことが確認された。

2. 使用動物および飼育条件

試験には、日本チャールス・リバー株式会社筑波飼育センター生産の Sprague-Dawley (SD)系 (Crj:CD (SD)IGS,SPF)ラットを使用した。雄は3週齢で、また、雌は6週齢で購入し、入荷後6日間、検疫と馴化を兼ねて飼育し、その間毎日、一般状態を観察して異常が認められなかった動物を使用した。また、再交配用に同系統の8週齢の雌ラットを購入したが、再交配の必要は生じなかったため、試験には使用しなかった。動物の入荷、検疫ならびに群分け状況を、Table Aに示した。

各動物は、基準温湿度各 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、および 50~65%、換気回数約 15 回/時間、照明 12 時間 (7 時~19 時点灯) に制御された飼育室 (15 号室) で、金属製金網床ケージ (220w × 270d × 190h mm) に個別に収容して飼育し、固型飼料 (CE-2、日本クレア株式会社) および飲料水 (水道水、秦野市水道局給水) を自由に摂取させた。妊娠 14 日 (腔栓あるいは精子発見日 = 妊娠 0 日) 以後の母動物は、プラスチック製ラット用繁殖ケージ (350w × 400d × 180h mm) に収容し、剖検日まで紙パルプ製チップ (ALPHA-dri、加商株式会社) を床敷として供給して飼育した。

試験期間中、秦野研究所中央温湿度監視装置により測定した飼育室の温度および相対湿

度は、空調機の洗浄作業時（1999年5月27日、9時45分～10時、湿度76%）を除き、それぞれ、23～25℃および42～74%であった。また、基準値からの逸脱も短時間の内に復し、試験に影響は及ぼさないものと判断された。使用した飼料、水および床敷についても試験に支障を来す可能性の考えられる混入物はなかった。

3. 群分けおよび個体識別

雄は投与開始前日の、雌は性周期観察開始前日の体重を基に体重別層化無作為抽出法に準じて群分けし、各群に雌雄各25匹を配した。群分け後、すべての雌雄は、尾に油性フェルトペンで個体識別番号を示す番号を記して個体を識別した。各飼育ケージには、試験計画番号および個体識別番号を記入した、群ごとに色の異なる動物カードを掛けて個体識別の補助とした。出生児については、生後21日に個体番号を示す番号を尾に記入して個体を識別した。

4. 投与検体の調製

投与検体は、各濃度毎に秤量したADCに、媒体としたコーン油（英名：corn oil、ナカライテスク株式会社、製造番号：V8N6540 および V9F1299）を加えて攪拌することにより懸濁して、いずれの用量においても1回の投与液量が5 mL/kg 体重になるように含量を調製した。

投与検体の安定性については、300～600 nm における吸収スペクトルを、調製検体と同濃度のADC溶液と比較することにより確認した。その結果、20 mg/mL および 200 mg/mL の濃度の調製検体は、冷蔵および遮光条件下において8日間安定であることが確認されたので（Table B）、1週間に1回以上の頻度で投与検体を調製し、冷蔵および遮光保管して調製後7日以内に投与した。また、424 nm における吸光度を測定することにより、試験期間中に被験物質の均一性試験（1回）および含量測定（2回）を実施した結果、十分に攪拌した調製検体には所定量のADCが均一に含まれていることが確認された（Tables C、D）。

5. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

本試験の投与量は、ADC のラットを用いる経口投与一世代生殖毒性試験（投与量決定のための予備試験）（試験計画番号：R-98-012）の結果に基づいて決定した。すなわち、本試験と同系統のラット各群雌雄各5匹に、東京化成工業株式会社から購入した ADC（ロット番号：GF01）をコーン油に懸濁して 0、250、500 あるいは 1000 mg/kg を交配前2週間から反復投与して交配させた。これらの動物のうち、雌は妊娠 14 日に剖検して妊娠黄体数、着床数および胚の生存性を調べ、雄は 28 日反復投与翌日に剖検して精巣および前立腺重量を測定した。その結果、雌雄いずれの投与群にも毒性徴候は認められず、繁殖性にも変化は認められなかった。ラットにおける ADC の経口投与による LD₅₀ 値は 6400 mg/kg¹⁾ と高く、毒性は低いものと考えられたことから、高用量には、1000 mg/kg を設定し、以下公比約 3 で減じて、中用量には 300 mg/kg を、低用量には 100 mg/kg を設定した。

以下に群構成を示す。

群番号	被験物質	投与量 (mg/kg)	匹数（動物番号）	
			雄	雌
1 媒体対照（コーン油）		0	25 (MX01001-025)	25 (FB01001-025)
2	ADC	100	25 (MX02001-025)	25 (FB02001-025)
3	ADC	300	25 (MX03001-025)	25 (FB03001-025)
4	ADC	1000	25 (MX04001-025)	25 (FB04001-025)

各用量の投与検体は、雄に対しては交配前 10 週間から最長 3 週間の交配期間を経て剖検前日に至るまでの連続 98 日間、また、雌に対しては交配前 2 週間、交尾までの交配期間、妊娠期間、哺育 20 日（分娩日＝哺育 0 日）まで毎日 1 回、調製検体をマグネティックスターラーで絶えず攪拌しながらラット用胃管を用いて経口投与した。交尾後、分娩の認められなかった動物は、妊娠 24 日相当日まで同様に投与した。

毎日の投与は、一定時刻の間（9 時～13 時）に行い、各動物の投与液量（5 mL/kg）は、雄および交配前、交配期間中の雌では週 1 回測定される体重を基準とし、交尾後の雌では妊娠 0（膣栓あるいは精子発見日＝妊娠 0 日）、7、14、20 日の体重を、分娩後の雌では哺育 0、4、7、14 日の体重を基準にそれぞれ算出した。

6. 観察方法

1) 親動物

A. 一般状態の観察

雌雄とも、全例について飼育期間中毎日1回以上観察した。投与期間中の動物については、投与前および投与終了後に観察した。死亡例については発見後直ちに剖検した。また、翌日まで生存の可能性が乏しいと判断された瀕死動物は、致死量のペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させ、後述の剖検の項に記載した方法に従って剖検した。

B. 体重測定

雄は全例について、週1回（投与1、8、15、22、29、36、43、50、57、64、71、78、85、92日）および剖検日に測定した。

雌は全例について、交尾を確認するまでは週1回（投与1、8、15、22日）、交尾確認後は、妊娠0、7、14、20日に、分娩後は哺育0、4、7、14、21日に測定した。これらのうち、投与22日については、交尾が確認されていない動物についてのみ測定したので評価の対象から除外した。

C. 摂餌量測定

雄は全例について、投与2～3、9～10、16～17、23～24、30～31、37～38、44～45、51～52、58～59、65～66、71～72、79～80、86～87日に測定した。これらのうち、投与79～80日および86～87日については、交配期間中に当たり、飼育条件が動物により異なったため、評価の対象から除外した。

雌は全例について、交配前期間は投与2～3日および9～10日、交尾確認後は、妊娠0～7、7～14、14～20日に、分娩後は哺育0～4、4～7、7～14、14～21日に測定した。

D. 性周期

全例について投与開始2週間前から交配開始後、交尾確認日まで、腔スミア標本を作製して観察し、細胞構成から、発情期、発情前期および発情休止期に分類した。さらに、投与開始前2週間および投与開始後2週間の各時期において、発情期を1回しか示さなかった動物を単発情に分類した。それ以外の動物については、発情期（発情期像が連続した場

合は、最終日) から次回発情期を回帰するまでの日数を各動物について数え、平均発情回帰日数を算出するとともに、4 日で発情を回帰した動物の性周期は、4 日周期に、5 日で発情を回帰した動物の性周期は、5 日周期に、4 および 5 日の間隔が混在して認められたものは、4 および 5 日周期に、それ以外は不正性周期に分類した。

E. 交配

交配は、雄は 10 週間投与後(投与 71 日)から、雌は 2 週間投与後 (投与 15 日)から、交尾を確認するまで、3 週間を限度として同群内の雌雄 1 : 1 で連日同居させることによって行った。交尾の確認は、膣スメア中の精子の存在および膣栓の確認により行い、その日を妊娠 0 日と起算して雄から分離し、個別に飼育した。

交配結果から、各群について交尾率 [(交尾動物数/同居動物数) × 100]、受胎率 [(妊娠動物数/交尾動物数) × 100]、同居開始日から交尾確認日までの日数およびその間に回帰した発情期の回数を求めた。なお、交配前期間中の死亡および瀕死剖検により、交配開始時に対照群および 1000 mg/kg 投与群の、それぞれ、1 および 5 例の雄動物が不足したため、これらの動物との交配を予定していた雌動物については、交配開始日を投与 17 日に延期して、同群内の既に交尾が確認されている雄動物と交配させた。

F. 分娩・哺育状態の観察

各群とも、交尾した雌は、全例を自然分娩させて哺育させた。

分娩の確認は、妊娠 20 日から妊娠 25 日までの 9 ~ 11 時に行い、膣からの出血あるいは受胎産物の娩出といった分娩徴候の有無を観察した。分娩の直接観察が可能な例については分娩状態を観察した。直接観察ができなかった例については、分娩完了後の一般状態から分娩困難の有無を判断して記録した。

分娩完了を確認した日を分娩日とし、それを哺育 0 日と規定して、分娩を確認した全例について、妊娠期間 (妊娠 0 日 ~ 分娩日の日数) を算定し、出産率 [(生児出産雌数/妊娠動物数) × 100] を各群について求めた。また、哺育 1 日から毎日、哺育状態を観察した。

G. 剖検

イ. 雄動物

死亡動物は、胸腹部主要器官について異常の有無を肉眼的に確認し、下垂体、甲状腺、精巣、精巣上体、凝固腺、精囊、前立腺を含む胸腹部主要器官を摘出した。摘出した器官・組織のうち、精巣および精巣上体はブアン液で固定し(長期保存は 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液)、その他は 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定して保存した。異常の認められた器官・組織、ならびに下垂体、甲状腺、精巣、精巣上体、凝固腺、精囊および前立腺腹葉については、常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って、病理組織標本を作製し、全例について検査した。

投与 98 日まで生存した動物は、その翌日に全例をペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させて剖検した(定期解剖)。剖検では、胸腹部主要器官の異常の有無を肉眼的に確認し、異常が観察された組織は、0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液で固定して保存した。また、下垂体、甲状腺、精巣、精巣上体、凝固腺、精囊および前立腺、ならびに、雄の剖検日以前に瀕死屠殺した雌において異常の認められた腎臓、胃、脾臓、胸腺および副腎を摘出し、異常の有無を肉眼的に確認した後、精巣および精巣上体はブアン液で固定し(長期保存は 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液)、その他は 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液で固定して保存した。これらのうち、異常の認められた組織については常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って病理組織標本を作製し、検査した。また、全例について下垂体、甲状腺、精巣、精巣上体、精囊、前立腺腹葉および凝固腺の病理組織標本を作製し、対照群および高用量群の全例、ならびに中および低用量群において交尾した雌が妊娠しなかった例について検査した。また、剖検において高用量群の動物に腫大が認められた腎臓についても病理組織標本を作製し、対照群および高用量群の全例について検査した。

ロ. 雌動物

死亡・瀕死動物は、胸腹部主要器官について異常の有無を肉眼的に確認し、下垂体、甲状腺、卵巣、子宮、頸部および腔を含む胸腹部主要器官を摘出した。摘出した器官・組織のうち、卵巣はブアン液で固定し(長期保存は 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液)、子

宮については、着床痕数を数え、その他の組織とともに 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定して保存した。異常の認められた器官・組織、および下垂体、甲状腺、卵巢、子宮、頸部および膣は、常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って、病理組織標本を作製し、全例について検査した。

生存例のうち、分娩した例は哺育 21 日に、交尾したが分娩しなかった例は妊娠 25 日相当日に、致死量のペントバルビタールナトリウム麻酔下で、放血により致死させ、剖検し、胸腹部主要器官の異常の有無を肉眼的に確認した。その際、異常が観察された組織は 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液で固定して保存した。また、子宮を摘出し、着床痕数を肉眼的に数えた後、0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液で固定して保存した。これらの他、下垂体、甲状腺、卵巢、頸部および膣、ならびに死亡および瀕死動物の剖検時に異常の認められた腎臓、心臓、胃、脾臓、胸腺および副腎についても摘出し、異常の有無を肉眼的に確認した後、卵巢はブアン液で固定し（長期保存は 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液）、その他の器官・組織は 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液で固定して保存した。異常が観察された組織は常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って病理組織標本を作製し検査した。また、下垂体、甲状腺、卵巢、子宮、頸部および膣は対照群および高用量群の全例、ならびにその他の投与群において不妊であった例について病理組織標本を作製して検査した。さらに、腎臓については、中用量群の瀕死屠殺例の剖検においても異常が観察されたので、全例について病理組織標本を作製して検査した。

2) 出生児

A. 産児数の算定

母動物の分娩完了を確認した日を生後 0 日とし、直ちに、雌雄別に産児数（生存児＋死亡児）を調べ、生存児について外表奇形の有無を観察した。

B. 一般状態および死亡児数の算定

毎日、死亡児数を数え、死亡児は直ちに剖検した。生存児については、生後 1 日から行動および身体的異常の有無を含む一般状態を毎日観察した。

C. 同腹生児数の調整

生後4日に同腹生児数を8匹（原則として雌雄各4匹）に調整した。同腹生児数が8匹に満たない場合は調整しなかった。

D. 体重測定

生後0、4、7、14 および 21 日に個体別に測定し、各腹ごとに雌雄別の平均値を算出した。

E. 性比および生存率の算定

母動物の剖検時に数えられた着床痕数ならびに分娩観察において数えられた産児数および生存児数（出産生児数）に基づき、分娩率〔（産児数／着床痕数）×100〕、生児出産率〔（出産生児数／着床痕数）×100〕および出生率〔（出産生児数／産児数）×100〕を算定した。また、生後0日における性比〔（雄の生児数／生児数）×100〕を求めた。生後4日の同腹出生児数の調整に際しては、調整前の生児数を基に、新生児の4日の生存率〔（生後4日同腹生児数調整前の生児数／生後0日の生児数）×100〕を算出し、生後4日における性比〔（雄の生児数／生児数）×100〕を求めた。さらに、同腹出生児数の調整後の生児数および生後21日における生児数を基に、離乳率〔（生後21日の生児数／生後4日同腹生児数調整後の生児数）×100〕を算定した。

F. 剖検

死亡児は、外表異常の有無を観察して剖検し、10%ホルマリン溶液に固定して保存した。生後0日の死亡児については肺を摘出して生理食塩液に浮遊させ、浮遊しなかった例を死産と判定した。大きな損傷あるいは、浸軟化が認められた死亡児については、固定および保存のみを行った。

同腹生児数の調整により生じた余剰児は、エーテルを吸入させて致死させた後、剖検し、10%ホルマリン溶液に固定して保存した。

生存児は、全例を生後21日にエーテル吸入により致死させて剖検した。その際、異常が認められた器官は0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定して保存した。

7. 統計解析

性周期の型別頻度、交尾率、受胎率、出生児の形態異常出現頻度については Fisher の直接確率検定⁸⁾を行った。病理組織学検査所見では、グレード分けしたデータは、Mann-Whitney の U 検定⁹⁾により、陽性グレードの合計値は Fisher の直接確率片側検定¹⁰⁾により対照群と ADC 各投与群との間の有意差検定を行った。その他のデータは、個体ごとに得られた値、あるいは litter ごとの平均値を 1 標本として、先ず Bartlett 法¹¹⁾により各群の分散の一様性について検定を行った。分散が一様である場合には、一元配置型の分散分析¹¹⁾を行い、群間に有意性が認められる場合は、Dunnett 法¹²⁾により多重比較を行った。一方、いずれかの群で分散が 0 となる場合および分散が一様でない場合には、Kruskal-Wallis¹³⁾の順位検定を行い、群間に有意性が認められる場合には、Dunnett 型¹²⁾の検定法により多重比較を行った。

【 結 果 】

I. 親動物

1. 一般状態

1) 雄 (Table 1; Appendices 1-1~1-4)

対照群に 1 例 (動物番号: MX01006、投与 47 日死亡) および 1000 mg/kg 投与群に 5 例 (動物番号: MX04001、投与 41 日死亡; 動物番号: MX04003、投与 6 日死亡; 動物番号: MX04004、投与 12 日死亡; 動物番号: MX04007、投与 12 日死亡; 動物番号: MX04023、投与 69 日死亡)、死亡が認められた。これらの動物は、1000 mg/kg 投与群の 1 例 (動物番号: MX04001) に痂皮の形成が観察された他に、死亡まで異常は観察されなかった。剖検において、以下に示す所見が認められたことから、これらの動物は、投与操作の誤りにより死亡したものと判断された。投与操作の誤りとは関連しない所見に関しては評価の対象とした。

動物番号 MX01006: 食道穿孔および油性胸水の貯留。

動物番号 MX04001: 口周囲被毛の黄色汚染、主として肺右葉に被験物質様黄色域、気管内腔に黄色沈着物。

動物番号 MX04003: 食道穿孔および胸腔内に被験物質様黄色半透明胸水の貯留。

動物番号 MX04004: 肺門部付近の食道に出血様暗赤色域、胸腔内に黄色塊散在して胸水が大量に貯留。

動物番号 MX04007: 油性胸水が大量に貯留し、横隔膜前面に黄色物質が付着。

動物番号 MX04023: 食道内に暗赤色物、右肺後葉内に被験物質様黄色物。

生存例では、脱毛、被毛汚染、痂皮形成あるいは皮膚部の潰瘍形成などが対照群を含む各群に散見されたが、ADC の用量に依存した変化は認められなかった。

2) 雌 (Tables 2; Appendices 2-1~2-4)

分娩するまでは、ADC の用量とは無関係に脱毛あるいは痂皮形成が対照群を含む各群に散見されたのみであった。しかし、分娩後に一般状態の異常を示す動物が 100 mg/kg に 2 例、

300 mg/kg に 1 例、1000 mg/kg に 3 例認められた。これらのうち、100 mg/kg の 1 例（動物番号：FB02005）は、哺育 1 日から翌日に全出生児が死亡するまでの間、外陰部/下腹部の被毛汚染および立毛が観察された。他の 1 例（動物番号：FB02019）は、哺育 3 日に半眼状態が観察された。また、この日から、自発運動の減少、耳介の蒼白および消瘦が観察され、翌日には顔面の被毛汚染および体表温低下も認められた。これらのうち、消瘦は、全出生児が死亡した日の前日である哺育 7 日まで観察された。300 mg/kg の 1 例（動物番号：FB03004）は哺育 1 日から 3 日に至るまで赤色尿の排泄および立毛が観察され、哺育 2 日には、全出生児が死亡した。さらに、哺育 4 日には、消瘦、自発運動の減少、外陰部/下腹部の被毛汚染および体表温低下が認められたため、瀕死状態と判断して剖検した。1000 mg/kg 投与群では、哺育 9 日までは脱毛以外に一般状態の変化は観察されなかった 1 例（動物番号：FB04001）が、哺育 10 日から消瘦して哺育 14 日に死亡した。また、1 例（動物番号：FB04014）は、哺育 3 日に立毛が認められ、翌日死亡した。別の 1 例（動物番号：FB04013）には、哺育 4 日に消瘦および自発運動の減少が観察された。自発運動の減少は翌日には一旦回復したが、消瘦は、哺育 16 日に死亡するまで、継続して認められた。この間、哺育 12 日からは自発運動減少が再び観察され、哺育 15 日には、全出生児が死亡した。これらの他に、対照群の 1 例（動物番号：FB01017）の哺育 1 日に全出生児死亡が認められた以外、哺育期間中新たな異常は観察されなかった。

2. 体重

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

300 mg/kg 投与群の投与 92~99 日の増加量が対照群と比較して有意 ($p<0.01$) な高値を示した他に、体重および体重増加のいずれについても対照群と ADC 各投与群との間に有意差は認められなかった。

2) 雌 (Figure 2; Tables 6~8; Appendices 6-1~8-4)

交配前、妊娠期および哺育期のいずれの時期についても、体重および体重増加には対照群と ADC 各投与群との間に有意差は認められなかった。

3. 摂餌量

1) 雄 (Figure 3; Table 9; Appendices 9-1~9-4)

対照群と ADC 各投与群との間に有意差は認められなかった。

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

いずれの時期も、対照群と ADC 各投与群との間に有意差は認められなかった。

4. 性周期 (Table 11; Appendices 11-1~11-4)

投与開始前の2週間に亘る性周期観察では、対照群を含む各群に単発情が1例ずつ認められたが、投与開始後はいずれも性周期を回帰した。投与開始前の性周期を対照群と比較すると、対照群には認められなかった5日周期の動物が100 mg/kg および 1000 mg/kg 投与群に認められ、1000 mg/kg 投与群では平均発情回帰日数が対照群と比較してやや延長した。

投与開始後に性周期が変化した動物の頻度は対照群と ADC 各投与群との間で差は認められなかった。平均発情回帰日数については、いずれの投与群も平均値は変動しなかったが、1000 mg/kg 投与群では対照群との間に有意差 ($p<0.05$) が認められた。

5. 交配成績 (Table 12; Appendices 12-1~12-4)

全例が交尾したが、雌が妊娠しなかったため妊孕性の確認されなかった雌雄が、対照群に各1例 (動物番号: MX01019 および FB01019)、100 mg/kg 投与群に各2例 (動物番号: MX02010、MX02021、FB02010、FB02021)、300 mg/kg 投与群に各3例 (動物番号: MX03003、MX03006、MX03010、FB03003、FB03006、FB03010)、ならびに 1000 mg/kg 投与群に雄1例 (動物番号: MX04009) および雌3例 (動物番号: FB04003、FB04004、FB04009) 認められた。しかし、受胎率、同居開始から交尾までに要した日数およびその間に回帰した発情期の回数には対照群と ADC 各投与群との間で有意差は認められなかった。

6. 分娩および哺育所見 (Tables 2, 17; Appendices 2-1~2-4, 17-1~17-4)

対照群の1例（動物番号：FB01025）が、妊娠25日に至っても分娩しなかったため剖検したところ、片側の子宮角に死亡胎児が着床しているのが認められた。また、生存産児の形態観察（後述）から、100 mg/kg および 1000 mg/kg 投与群の各1例（動物番号：FB02004 および FB04013）は、産児に外傷を与えたものと考えられるが、分娩状態の異常は観察されなかった。これらの他に分娩に関連した異常は観察されなかった。また、出産率および妊娠期間にも対照群と ADC 各投与群の間で有意差は認められなかった。哺育状態については、哺育期間中に一般状態の異常が観察された ADC 各投与群の動物に、児を集めて抱くといった哺育行動の喪失が認められたが、これら以外の動物に異常は観察されなかった。

7. 病理検査所見

1) 雄

(1) 剖検所見 (Tables 13, 13-D; Appendices 13-1~13-4)

死亡例 (Table 13-D)

対照群には、投与中の誤操作によると考えられる病変以外に異常は観察されなかった。1000 mg/kg 投与群では、1例（動物番号：MX04001）に精巣の小型化および軟化、ならびに精巣上体の小型化が観察された。また、精囊、前立腺および凝固腺の小型化が1例（動物番号：MX04004）に、精巣、精巣上体、精囊、前立腺および凝固腺の小型化が1例（動物番号：MX04007）に観察された。生殖器官以外では、1例（動物番号：MX04007）の腎臓に腫大が認められた。その他の動物には投与中の誤操作に関連した病変以外に異常は観察されなかった。

定期解剖例 (Table 13)

精巣および精巣上体の小型化が対照群および 1000 mg/kg 投与群に各1例（動物番号：MX01021 および MX04009）、精巣の小型化が 1000 mg/kg 投与群に1例（動物番号：MX04025）観察された。生殖器官以外では、対照群の3例に脱毛が認められ、100 mg/kg 投与群の1例に痂皮が観察された。100 mg/kg 投与群では、腎盂の拡張が1例に認められ、

100 mg/kg および 300 mg/kg 投与群では肺の黒色点が 1 例ずつ認められた。また、1000 mg/kg 投与群では腎臓の腫大、淡色化、表面の粗造化および腎盂の拡張が 1 例に、腫大あるいは淡色化が 1 例に認められた。

(2) 病理組織学所見 (Tables 14、14-D; Appendices 14-1～14-4)

死亡例 (Table 14-D)

対照群の 1 例（動物番号：MX01006）および 1000 mg/kg 投与群の 1 例（動物番号：MX04023）に異常は認められなかった。1000 mg/kg 投与群の他の例については、1 例（動物番号：MX04001）の片側精巣にライディッヒ細胞の瀰漫性過形成を伴う精細管の萎縮が認められた。また、精細管に精子肉芽腫および多核巨細胞も認められた。異常が観察された側の精巣上体の管腔には精子がほとんど観察されず、細胞残屑が認められた。これらの他に、前立腺腹葉の間質にはリンパ球浸潤が認められ、上皮および管腔には好中球の浸潤が認められた。投与初期の性成熟前に死亡した 3 例（動物番号：MX04003、MX04004 および MX04007）の生殖器官については、週齢（5～6 週齢）に応じた所見が認められ、異常は観察されなかった。これらの例は、生殖器官に関する病理組織学所見の評価の対象から除外した。

定期解剖例 (Table 14)

各器官および組織に認められた所見を以下に示す。

(下垂体)

いずれの動物にも異常は観察されなかった。

(精巣および精巣上体)

妊孕性が確認されなかった例については、対照群および 300 mg/kg 投与群に異常は認められなかった。100 mg/kg 投与群では 2 例中 1 例（動物番号：MX02021）の片側に精細管の萎縮が認められたが、他の例に異常は認められなかった。1000 mg/kg 投与群（動物番号：MX04009）では、両側精巣にライディッヒ細胞の瀰漫性過形成を伴う精細管の萎縮が認められた。本例の精巣上体の管腔には精子がほとんど観察されず、細胞残屑が認められた。

妊孕性が確認された例については、対照群および 1000 mg/kg 投与群の各 1 例の精巣に精母細胞の変性が観察された。精巣上体については、1000 mg/kg 投与群の 1 例の管腔内に

細胞残屑が認められた。これらの異常の程度および頻度については対照群と 1000 mg/kg 投与群との間で有意差は認められなかった。

(精囊)

いずれの例にも異常は観察されなかった。

(前立腺腹葉)

妊孕性が確認されなかった例については、300 mg/kg 投与群に異常は認められなかった。対照群（動物番号：MX01019）、100 mg/kg 投与群の 2 例中 1 例（動物番号：MX02021）および 1000 mg/kg 投与群（動物番号：MX04009）の間質にリンパ球浸潤が観察された。同様の所見は、対照群および 1000 mg/kg 投与群の授胎能が確認された例についても認められた。また、これらの投与群には、上皮あるいは管腔内に好中球の浸潤も観察されたが、いずれの所見についても、対照群と 1000 mg/kg 投与群との間で有意差は認められなかった。

(凝固腺)

いずれの例にも異常は観察されなかった。

(甲状腺)

妊孕性が確認されなかった対照群（動物番号：MX01019）および 300 mg/kg 投与群の 3 例中 1 例（動物番号：MX03003）に異所性の胸腺組織が観察された他に異常は認められなかった。

(腎臓)

対照群および 1000 mg/kg 投与群のいずれにも、eosinophilic body、鉍質沈着および皮質における好塩基性尿細管が認められたが、両群間に有意差は認められなかった。また、1000 mg/kg 投与群の 2 例には腎盂の拡張が観察され、それらのうち、剖検時に表面の粗造化を伴う腫大が認められた例には、遠位尿細管の拡張が認められ、皮質の好塩基性尿細管が他の例と比較して多く観察された。

(剖検時異常器官)

異常が観察された 100 mg/kg および 300 mg/kg 投与群の各 1 例の肺については、100 mg/kg 投与群の例に限局性の出血、リンパ球および好中球の浸潤、ならびに泡沫細胞の集簇が観察されたが、300 mg/kg 投与群の例に異常は認められなかった。また、脱毛が観察され

た対照群の皮膚のうち、2例に限局性の毛胞の減少が認められたが、他の1例に異常は観察されなかった。痂皮の観察された100 mg/kg 投与群の皮膚には痂皮が認められ、真皮および皮下織にリンパ球およびマクロファージの著しい浸潤が観察された。

2) 雌

(1)剖検所見 (Tables 15、15-S/D; Appendices 15-1~15-4)

死亡および瀕死屠殺例 (Table 15-S/D)

300 mg/kg 投与群の瀕死屠殺例では、被毛が汚染し、腎臓に淡色化および表面の粗造化が認められた。また、前胃粘膜の陥凹域、脾臓および胸腺の小型化ならびに副腎の腫大が観察された。1000 mg/kg 投与群の死亡例にも腎臓に腫大および淡色化あるいは皮質の淡色点が認められ、これらのうち1例には結石を伴う腎盂の拡張が、他の1例には水腫を伴う表面の粗造化がそれぞれ観察された。また、全例の脾臓に小型化が認められ、2例には淡色化が認められた。これらの所見の他に、2例の胸腺に小型化が、1例には胃粘膜の黒色点および菲薄化ならびに副腎の腫大が、他の1例の胸腔には胸水が認められ、別の1例には肺の退縮不全および心臓における淡色域が観察された。

定期解剖例 (Table 15)

対照群では、1例の肺の右葉に水腫が認められた。100 mg/kg 投与群では、2例の肝臓に横隔膜結節が認められた。300 mg/kg 投与群の腎臓には、1例には右側の欠損を伴う左側の腫大が、別の1例には淡色化が認められた。1000 mg/kg 投与群では、1例の右側腎臓の皮質に嚢胞が認められた。不妊例については、対照群の例に子宮角および頸部に水様性の内容物の貯留を伴う腫大が観察された他に異常は認められなかった。

(2)病理組織学所見 (Table 16、16-S/D; Appendices 16-1~16-4; Photos 1~5)

死亡および瀕死屠殺例 (Table 16-S/D)

300 mg/kg 投与群の瀕死屠殺例の腎臓では、皮質の近位尿細管には壊死および空胞変性が認められ、遠位尿細管および集合管には瀰漫性拡張が認められて、管腔内には細胞残屑が認められた。1000 mg/kg 投与群においても同様の所見が散見されたが、1000 mg/kg 投与群では、拡張した管腔および間質に好中球が著しく浸潤し、髓質に好塩基性尿細管が認

められ、腎盂の拡張、あるいは腎盂移行上皮の過形成といった腎盂腎炎と診断される変化が認められた。さらに、1000 mg/kg 投与群では動脈に鉍質沈着の認められる例もあった。これらの他に、定期解剖例の各群に観察されている皮質あるいは髄質における鉍質沈着が1000 mg/kg 投与群の死亡および瀕死屠殺例にも認められた。また、皮質の好塩基性尿細管も 300 mg/kg および 1000 mg/kg 投与群の死亡および瀕死屠殺例に観察されたが、これらの例では増強して認められた。

1000 mg/kg 投与群の死亡例のうち、剖検時に心臓の異常および肺の退縮不全が観察された例では、心筋の瀰漫性の変性および線維化が認められた他、動脈および心筋、ならびに気管支平滑筋に鉍質沈着が認められた。

300 mg/kg および 1000 mg/kg 投与群の瀕死屠殺例では、剖検時に胃の異常が観察されたが、300 mg/kg 投与群には前胃粘膜に糜爛および扁平上皮の過形成が認められ、1000 mg/kg 投与群には、筋層および漿膜、腺胃粘膜および動脈に鉍質沈着が認められた。これらの例の副腎には皮質細胞の肥大も認められた。

以上の他に、小型化などが認められた脾臓は萎縮を呈しており、褐色色素の沈着は認められるものの、髄外造血の認められない例もあった。また、小型化の認められた胸腺は萎縮していた。

定期解剖例 (Table 16)

各器官および組織に認められた所見を以下に示す。

(下垂体)

いずれの動物にも異常は観察されなかった。

(甲状腺)

いずれの動物にも異常は観察されなかった。

(卵巣)

いずれの動物にも異常は観察されなかった。

(子宮角および頸部)

いずれの動物にも異常は観察されなかった。

(腔)

いずれの動物にも異常は観察されなかった。

(腎臓)

皮質の好塩基性尿細管ならびに皮質および髓質の鉍質沈着が各群に認められた他、腎盂の拡張が 100 mg/kg 投与群を除く各群に認められた。また、100 mg/kg 投与群では、皮質遠位尿細管の限局性の拡張が 1 例に認められた。これらの他に、間質のリンパ球浸潤が 100 mg/kg 投与群に 1 例および 1000 mg/kg 投与群に 4 例認められ、1000 mg/kg 投与群では対照群との間に有意差 ($p < 0.05$) が認められた。これらのうち 1000 mg/kg 投与群の 1 例では、乳頭部の集合管が限局性に嚢胞上に拡張し、腎盂には泡沫細胞が、皮質および髓質には明らかな嚢胞が認められ、皮質には限局性の線維化も認められており、間質のリンパ球浸潤はこれらの病変に随伴した変化であった。一方、その他の例については、リンパ球浸潤を随伴する病変は認められず、また、変化の程度も 100 mg/kg 投与群と同等の軽度なものであった。

(剖検時異常器官)

剖検時に水腫が観察された対照群の肺には、泡沫細胞の集簇と異物巨細胞が認められた。また、横隔膜結節の観察された 100 mg/kg 投与群の 2 例の肝臓には、被膜に限局性の線維化が認められた。

(3) 着床数 (Table 17; Appendices 17-1~17-4)

着床数に対照群と ADC 各投与群の間で有意差は認められなかった。

II. 出生児

1. 一般状態および生存性 (Table 17; Appendices 17-1~17-4)

対照群では、出生日の全産児に体表温の低下が認められ、ミルクスポットが認められなかった 1 腹 (母動物番号: FB01017) が、生後 1 日に全例死亡した。ADC 各投与群では、母動物の一般状態の悪化に伴う哺育状態の不良により、出生児に異常が観察された。すなわち、100 mg/kg 投与群では、1 腹 (母動物番号: FB02005) の生後 1 日に、全例のミルクスポットが認められなくなり、体表温が低下して翌日死亡した。他の 1 腹 (母動物番号:

FB02019) では、生後 3 日に胃内に乳汁が認められなくなり、翌日には体表温も低下し、ミルクスポットも認められなくなった。これらの児は、その後消瘦して生後 7 日までに全例が死亡した。300 mg/kg 投与群では、1 腹（母動物番号：FB03004）の生後 1 日に、ミルクスポットが認められなくなり、体表温も低下して翌日全例が死亡した。1000 mg/kg 投与群の各 1 腹（母動物番号：FB04014 および FB04001）では、生後 3 日あるいは生後 14 日に母動物が死亡した際に、児に消瘦が認められた。前者にはミルクスポットも認められなかった。また、1000 mg/kg 投与群の他の 1 例（母動物番号：FB04013）では、生後 4 日にミルクスポットが認められなくなった。翌日にはこれが不明瞭な程度になり、その翌日には再びミルクスポットが認められるようになったが、生後 12 日に消瘦が認められ、生後 14 日には自発運動の減少も観察されて翌日全例が死亡した。これらの所見の他に、100 mg/kg 投与群の 2 腹（母動物番号：FB02002 および FB02025）ならびに 300 mg/kg 投与群の 1 腹（母動物番号：FB03009）において、一部の出生児の尾に外表奇形が疑われたが、300 mg/kg 投与群の腹については、成長に伴って認められなくなった。その他の動物に異常は観察されなかった。

生存性については、出生日に発見された死亡児は、対照群では 4 例全例が死産であったのに対し、100 mg/kg 投与群では 17 例中 12 例、300 mg/kg 投与群では 15 例中 13 例、1000 mg/kg 投与群では 6 例中 3 例が死産と判定された。これら死産児の頻度には対照群と ADC 各投与群との間で有意差は認められなかった。また、上記のように対照群を含む各群に全出生児死亡が認められたが、産児数、分娩率、出生日ならびに生後 4 および 21 日における生存児数、生児出産率、出生率、新生児の 4 日の生存率には、ADC 各投与群と対照群との間で有意差は認められなかったが、離乳率については、100 mg/kg 投与群においてのみ有意 ($p<0.05$) な低下が認められた。各時期の性比については ADC 各投与群と対照群との間で有意差は認められなかった。

2. 体重 (Table 18; Appendices 18-1~18-4)

いずれの時期も雌雄出生児の体重には対照群と ADC 各投与群との間に有意差は認められなかった。

3. 形態観察所見 (Table 19)

生存産児の形態観察（表には示さず）では、100 mg/kg 投与群の1腹（母動物番号：FB02002）に、短軀、痕跡尾、肛門小孔および内反足の外表奇形が1例に認められ、本例にもミルクスポットが認められなかった。本例の同腹には短尾も6例認められた。また、別の1腹（母動物番号：FB02004）では、1例の吻部に咬傷が認められた。300 mg/kg 投与群では1腹（母動物番号：FB03013）の1例にチアノーゼが認められた。また、1000 mg/kg 投与群では、1腹（母動物番号：FB04002）の1例に無尾および肛門小孔の外表奇形が、また、1腹（母動物番号：FB04013）の1例に外傷による尾端の欠損が観察された。これらの他に、対照群の1腹（母動物番号：FB01017）では、形態異常は認められなかったが、全産児にミルクスポットが認められず、体表温も低下していた。

死亡児、同腹生児数調整における余剰児、ならびに生後21日の剖検では、対照群を含む各群の1～4腹の出生児に変異および奇形を含む形態変化が認められた。これらのうち、外表奇形については、対照群の1腹（母動物番号：FB01018）の1例（生後4日余剰児）に曲尾が認められた。100 mg/kg 投与群では、1腹（母動物番号：FB02002）の1例（死亡児）に短軀、内反足および短尾が、同腹の生後4日余剰児に曲尾および痕跡尾が各1例ならびに短曲尾が2例、生後21日剖検児に短曲尾が1例認められた。また、別の1腹（母動物番号：FB02025）の生後4日余剰児に曲尾が1例認められた。300 mg/kg 投与群に外表奇形は認められなかった。1000 mg/kg 投与群では、1腹（母動物番号：FB04002）の生後4日余剰児に肛門小孔および無尾が1例、曲尾が1例認められ、別の1腹（母動物番号：FB04019）の生後4日余剰児に、曲尾が2例観察された。内臓奇形については、100 mg/kg 投与群で短軀などの外表奇形が認められた死亡児（母動物番号：FB02002）に左右腎臓の部分癒合および心尖の二分が、別の1腹（母動物番号：FB02008）の1例の生後21日剖検児に水腎が観察された。これらの他に、内臓変異のひとつである腎盂の拡張が、対照群を含む各群に観察された。形態変化を認めた出生児の総数を求め、その割合を対照群とADC各投与群との間で比較すると、これらの変化を認めた出生児の割合は、外表に関しては、100 mg/kg 投与群が有意（ $p<0.05$ ）に増加したが、内臓に関しては有意差は認められなかった。

【 考 察 】

1. 親動物

雄では、一般状態、体重増加、摂餌量、病理検査のいずれにも ADC の用量に依存した変化は認められなかった。また、生殖能力に関しても ADC 投与の影響は認められなかった。

雌では、分娩するまでは、一般状態、体重増加、摂餌量に ADC 投与の影響は認められなかった。性周期については、1000 mg/kg 投与群の投与開始後の平均発情回帰日数に、対照群との間で有意差が認められたが、投与開始前から同様の傾向が認められていることから、ADC 投与による影響ではないと考えられる。また、交配成績および分娩状態にも投与の影響は認められず、分娩後の体重増加および摂餌量にも ADC 投与の影響は認められなかった。しかし、ADC 各投与群において分娩後に全身状態の悪化を示す動物が認められ、300 mg/kg 以上の投与群では瀕死あるいは死亡例が認められた。これらの例は、腎臓に重篤な病変が認められたことから、腎不全により死亡したものと判断されるが、腎病変の組織像は両投与群の間で異なっていた。すなわち、300 mg/kg 投与群では、近位尿細管上皮の変性および壊死を基調とする病変であったが、1000 mg/kg 投与群では、腎盂の拡張および腎盂移行上皮の過形成、管腔および間質における好中球の顕著な浸潤が認められ、腎盂腎炎と類似した病変が観察された。これらのことから、腎病変の原因は両投与群間で異なる可能性があるものと考えられた。

ADC の生体内分解産物であるピウレアを10%含有する餌をラットあるいはイヌに1年間に亘って与えた実験⁵⁾では、ラットに腎毒性は認められなかったが、イヌでは、難溶性のピウレアが沈着して腎結石および膀胱結石を生じさせ、それによって腎盂腎炎を発症することが報告されている。同実験では、ピウレアを2500 ppm 含有する餌を、妊娠および哺育期間を含む多世代に亘ってラットに与えた成績も報告しているが、腎病変の発生は認められていない。しかし、本試験では、分娩および泌乳という腎機能に大きな負荷の生じる時期に、高濃度の ADC を投与したこと、ならびに、1000 mg/kg 投与群における死亡例の一部には結石を伴う腎盂の拡張も肉眼的に観察されたことから、1000 mg/kg 投与群の雌動物における死亡は ADC 投与による影響である可能性が考えられる。一方、300 mg/kg 投与群における腎病変

は近位尿細管を主体とするものであり、類似した病態は本例以外に全く認められず、ADC の用量依存した変化ではなかった。従って、ADC 投与の影響である可能性は乏しい。

キログラム体重当たり10 mL のコーン油を、繁殖用飼料で飼育している雌ラットに妊娠前から妊娠期および周産期に至るまで経口投与すると、300 mg/kg 投与群の瀕死例にみられたのと類似した腎病変が分娩後のラットに認められることが報告されている¹⁴⁾。本試験では、kg 体重当たり10 mL のコーン油を投与しても腎病変の認められなかった飼料を使用し、kg 体重当たり5 mL のコーン油を投与した。しかし、妊娠中期以降の体重増加は著しく、投与液量も急激に増加した。こうした妊娠期の急激な投与液量の増加も、300 mg/kg 投与群にみられた腎病変の発生に関与している可能性が考えられる。

1000 mg/kg 投与群の雌の腎臓に間質のリンパ球浸潤に有意差が認められた。本所見が観察された例のうち、1例は、皮質および髄質の明らかな囊胞形成ならびに、皮質の限局性線維化に付随して認められた変化であった。その他の例については、いずれも100 mg/kg 投与群にみられた変化と同様の軽度な変化であり、それに付随する病変も認められなかったことから、ADC 投与との関連性は乏しいものと考えられる。また、間質のリンパ球浸潤を伴った囊胞形成ならびに皮質の限局性線維化については、1例のみに観察された病変であり、同系統のラットに自然発生するものであることから、ADC 投与によるものではないと考えられる。

2. 出生児

ミルクスポットが認められず、体表温が低下し、あるいは自発運動が減少して死亡した例がADC 各投与群に散見された。これらの異常は、いずれも母動物の哺育行動の欠如に由来していることから、ADC 投与は出生児の一般状態に影響を及ぼさないと考えられる。生存性についても、死亡児が多く認められた新生児期における生存性の指標にはADC 投与の影響は認められなかった。離乳率についても、100 mg/kg 投与群において若干低下したが、ADC の用量に依存した変化ではなく、ADC 投与は出生児の生存性に影響を及ぼさないと考えられる。発育についてもADC 投与の影響は認められなかった。

変異および奇形を含む出生児の形態変化は対照群を含む各群に認められた。認められた

変化の出現頻度および形態変化を有する出生児の頻度についても ADC の用量に依存した変化は認められなかったことから、ADC 投与は出生児の形態に影響を及ぼさないものと考えられる。

3. 無作用量

以上の試験成績から、本試験条件下では、ADC の無作用量は、生殖に関しては影響が認められなかったことから、雄ならびに雌および出生児ともに 1000 mg/kg/day と推定される。生殖以外の一般項目については、雄では 1000 mg/kg/day であり、雌では腎盂腎炎様の病変を伴う瀕死あるいは死亡が認められたことから 300 mg/kg/day と推定される。

【 文 献 】

- 1) Azodicarbonamide. (932.) In "The Merck Index, an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals, 11th eds. (Budavari, S., O'Neil, M.J., eds)", pp.147, Merck & Co., Inc., Rahway (1989)
- 2) Shopp, G. M., Cheng, Y. S., Gillett, N. A., Bechtold, W. E., Medinsky, M. A., Hobbs, C. H., Birnbaum, L. S., Mauderly, J. L.: Acute inhalation exposure of azodicarbonamide in the guinea pig. *Am. Indust. Hygiene Assoc. J.* 48: 127-132 (1987)
- 3) Bomhard, E., Kimmerle, G., Löser, E., Mihail, F.: Acute Toxicologic Evaluation of Azodicarbonamide. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 15: S66, (1996).
- 4) Medinsky, M.A., Bechtold, W.E., Birnbaum, L.S., Bond, J., Burt, D.G., Y.S. Cheng, Gillett, N.A., Gulati, D.K., Hobbs, C.H., Pickrell, J.A.: Effect of inhaled azodicarbonamide on F344/N rats and B₆C₃F₁ mice with 2-week and 13-week inhalation exposures. *Fund. Appl. Toxicol.* 15: 308-319 (1990)
- 5) Oser, B.L., Oser, M., Morgareidge, K.: Studies of the safety of azodicarbonamide as a flour-maturing agent. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 7: 445-472 (1965).
- 6) Mewhinney, J.A., Ayres, P.H., Bechtold, W.E., Dutcher, J.S., Cheng, Y.S., Bond, J.A., Medinsky, M.A., Henderson, R.F., Birnbaum, L.S.: The fate of inhaled azodicarbonamide in rats. *Fund. Appl. Toxicol.* 8: 372-381 (1987)
- 7) Frank, H., Gofford, H., Sharry, P.M., Pittman, Jr., J.A.: Effect of azodicarbonamide (1,1'-azobisformamide) on thyroid function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 32: 659-662 (1971).
- 8) 吉村 功：毒性・薬効データの統計解析（吉村 功編）、サイエンティスト社、東京（1977）。
- 9) 丹後俊郎：医学への統計学（古川俊之 監修）、朝倉書店、東京（1985）。
- 10) 石居 進：生物統計学入門、培風館、東京（1992）。

- 11) 佐久間昭：薬効評価－計画と解析、東京大学出版会、東京（1977）.
- 12) Dunnett, C. W.: New tables for multiple comparisons with a control.
Biometrics, 20: 482-491 (1964).
- 13) Kruskal, W. H., Wallis, W. A.: Use of ranks in one-criterion variance
analysis. J. Amer. Statist. Assoc., 47: 583-621 (1952).
- 14) Sato, M., Wada, K., Marumo, H., Nagao, T., Imai, K., Ono, H.: Influence of
corn oil and diet on reproduction and the kidney in female Sprague-Dawley
rats. Toxicol. Sci., 56: 156-164 (2000).

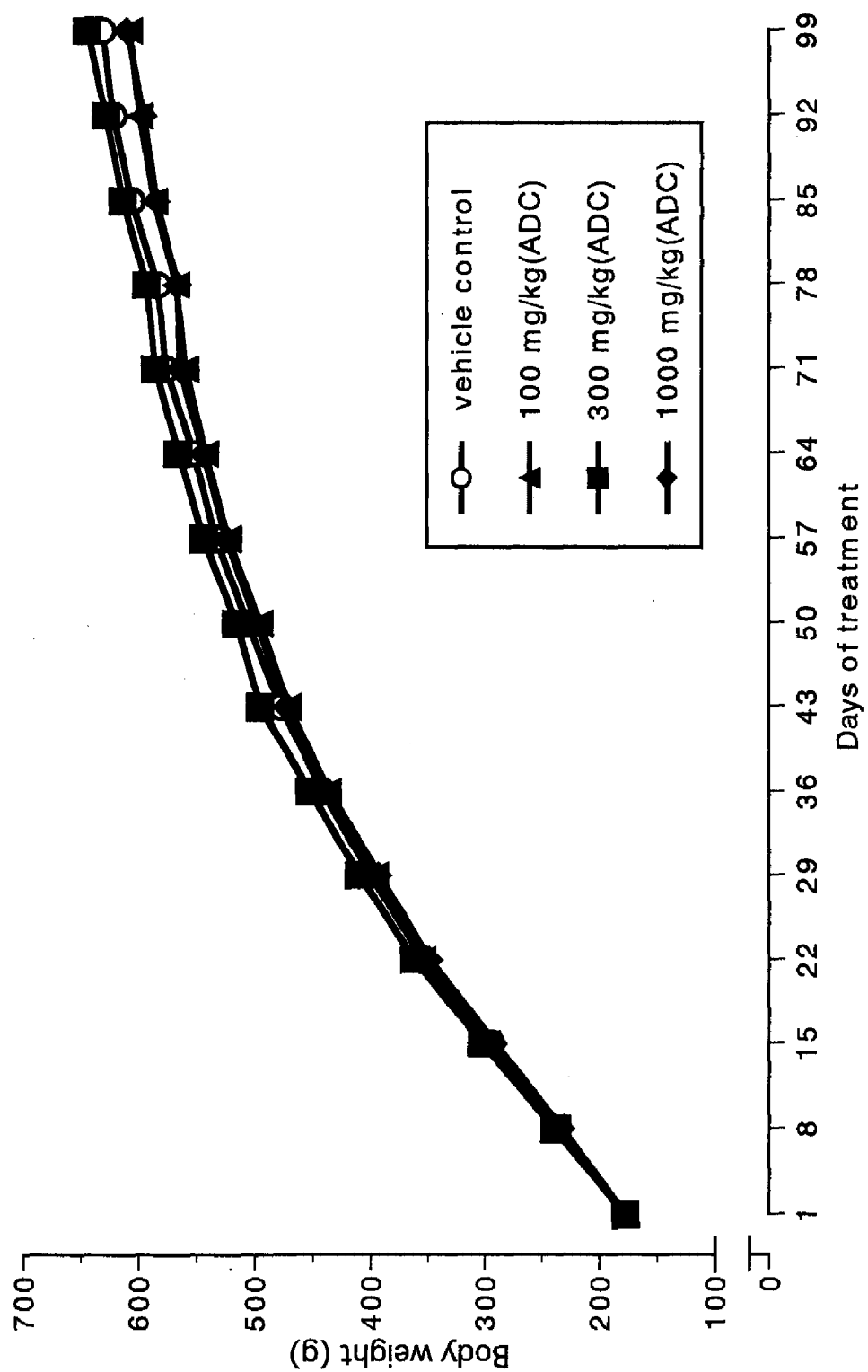


Figure 1 Body weight of males

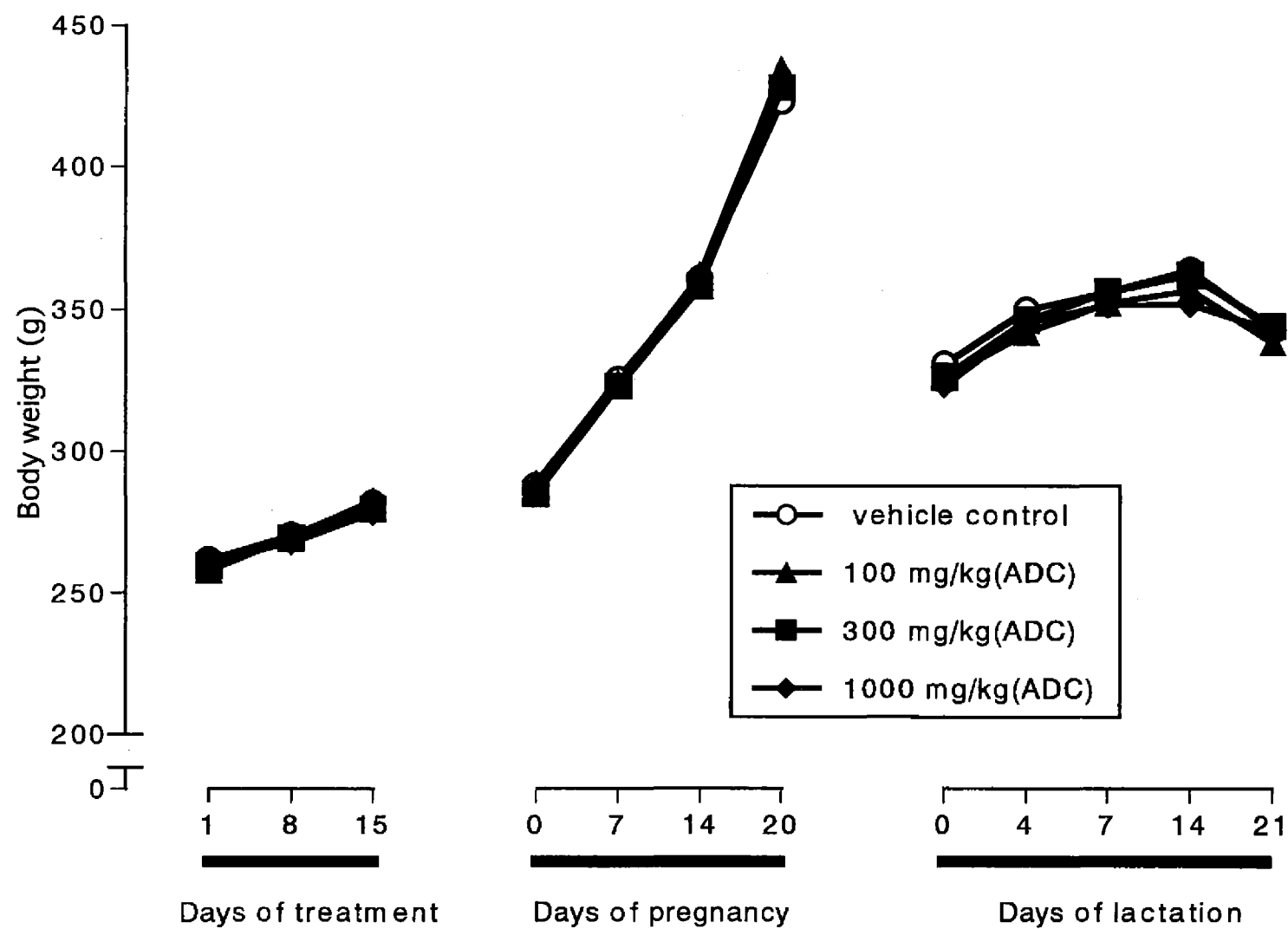


Figure 2 Body weight of females

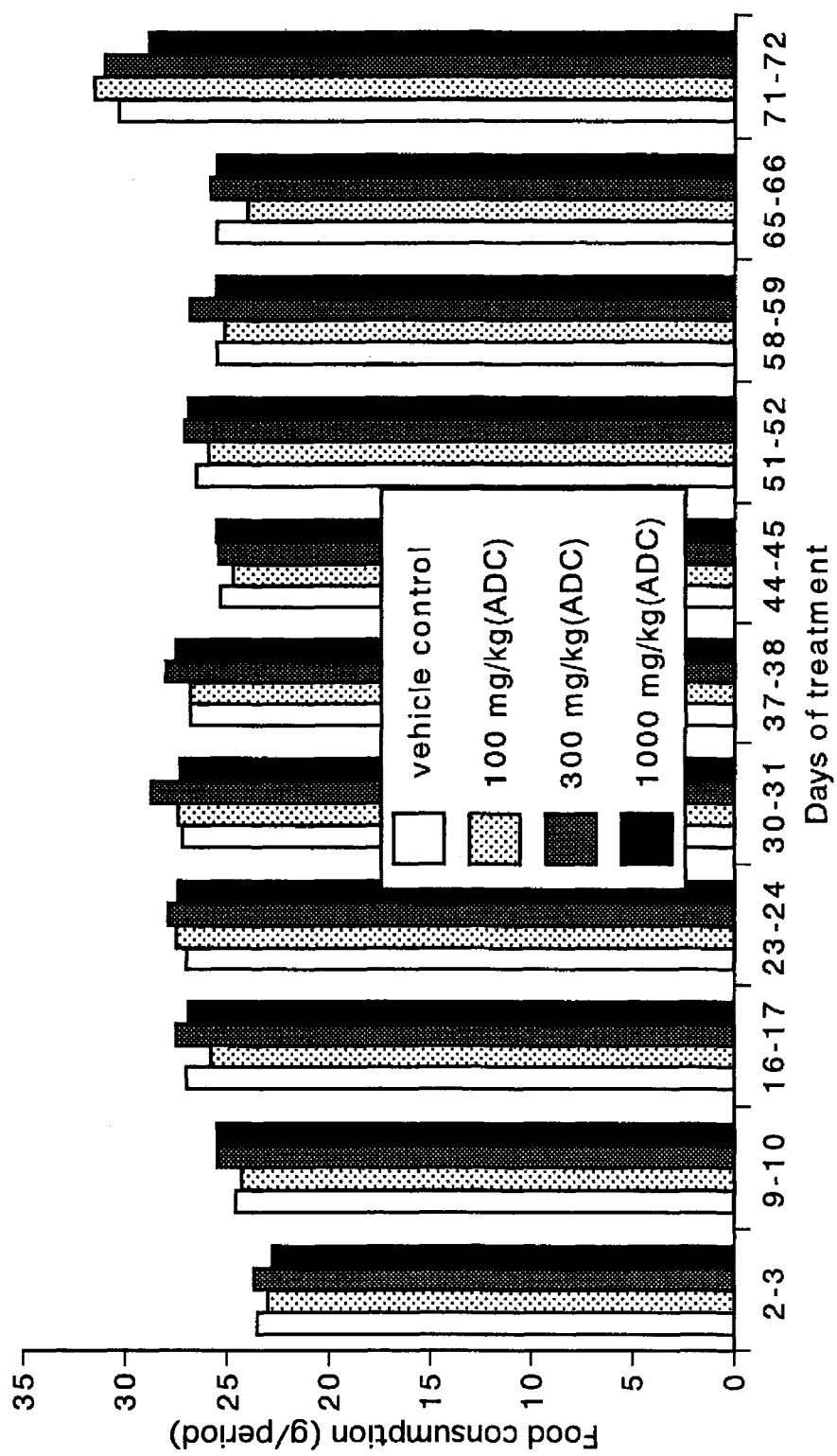


Figure 3 Food consumption of males

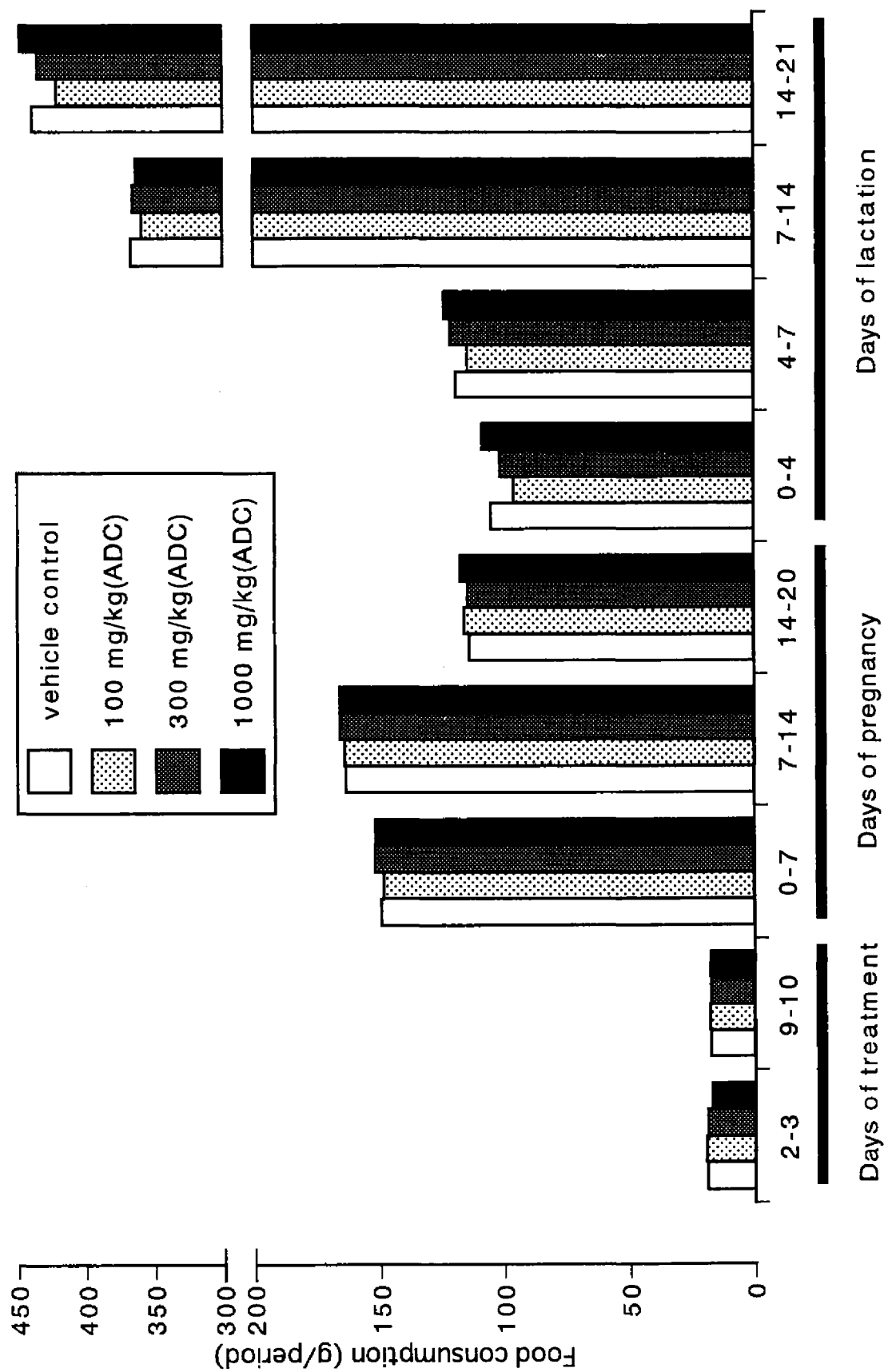


Figure 4 Food consumption of females

【TABLE INDEX】

ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats

TABLE No.	APPENDIX No.	TABLE TITLE
1	1-1 ~ 1-4	Summary of clinical signs of F ₀ males
2	2-1 ~ 2-4	Summary of clinical signs and maternal condition of F ₀ females
3	3-1 ~ 3-4	Body weight of F ₀ males
4	4-1 ~ 4-4	Body weight gain of F ₀ males
5	5-1 ~ 5-4	Cumulative body weight gain of F ₀ males
6	6-1 ~ 6-4	Body weight of F ₀ females
7	7-1 ~ 7-4	Body weight gain of F ₀ females
8	8-1 ~ 8-4	Cumulative body weight gain of F ₀ females
9	9-1 ~ 9-4	Food consumption of F ₀ males
10	10-1 ~ 10-4	Food consumption of F ₀ females
11	11-1 ~ 11-4	Estrous cycle
12	12-1 ~ 12-4	Reproductive performance
13	13-1 ~ 13-4	Summary of macroscopic findings in F ₀ males at the end of the dosing period
13-D		Summary of macroscopic findings in F ₀ males died during the dosing period
14	14-1 ~ 14-4	Summary of histopathological findings in F ₀ males at the end of the dosing period
14-D		Summary of histopathological findings in F ₀ males died during the dosing period
15	15-1 ~ 15-4	Summary of macroscopic findings in F ₀ females at the end of the dosing period
15-S/D		Summary of macroscopic findings in F ₀ females sacrificed in a moribund condition or died
16	16-1 ~ 16-4	Summary of histopathological findings in F ₀ females at the end of the dosing period
16-S/D		Summary of histopathological findings in F ₀ females sacrificed in a moribund condition or died
17	17-1 ~ 17-4	Development of F ₁ pups up to day 21 after birth
18	18-1 ~ 18-4	Body weight of F ₁ pups up to day 21 after birth
19		Morphological findings of F ₁ offspring

Table 1

ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats

Summary of clinical signs of F₀ males

Compound Dose group (mg/kg)	A D C			
	0 ^{a)}	100	300	1000
No. of males examined	25	25	25	25
No. of males with abnormality	5	1	2	1
<u>Category of abnormality; N</u>				
Loss of fur	3	0	1	0
Soiled fur	1	0	0	0
Crust formation	1	1	2	1
Ulcer	1	0	1	0

^{a)} : Vehicle control, Corn oil (5 mL/kg)

Table 2

ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats

Summary of clinical signs and maternal condition of F₀ females

Compound Dose group (mg/kg)	A D C			
	0 ^{a)}	100	300	1000
No. of females examined	25	25	25	25
No. of females with abnormality	2	4	3	4
<u>Category of abnormality; N</u>				
Death or moribundity	0	0	1	3
Total litter loss	1	2	1	1
Failure of maternal behavior	0	2	1	1
Incomplete eyelid opening	0	1	0	0
Decrease in locomotor activity	0	1	1	1
Emaciation	0	1	1	2
Hypothermia	0	1	1	0
pale colored pinna	0	1	0	0
Reddish urine	0	0	1	0
Crust formation	0	1	0	1
Loss of fur	1	1	2	1
Soiled fur	0	2	1	0
Piloerection	0	1	1	1

^{a)} : Vehicle control, Corn oil (5 mL/kg)

Table 3

ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats

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

Compound	ADC			
	a) 0	100	300	1000
Dose (mg/kg)				
Days of treatment				
1	177.4 $\pm$ 10.2 (25)	177.7 $\pm$ 9.2 (25)	177.2 $\pm$ 9.1 (25)	177.2 $\pm$ 8.4 (25)
8	236.3 $\pm$ 15.9 (25)	236.9 $\pm$ 15.7 (25)	239.6 $\pm$ 14.3 (25)	233.2 $\pm$ 13.6 (24)
15	294.1 $\pm$ 28.5 (25)	297.9 $\pm$ 21.9 (25)	302.6 $\pm$ 19.4 (25)	291.8 $\pm$ 18.6 (22)
22	353.8 $\pm$ 31.4 (25)	354.4 $\pm$ 28.1 (25)	361.5 $\pm$ 28.2 (25)	348.4 $\pm$ 26.0 (22)
29	400.5 $\pm$ 39.0 (25)	398.7 $\pm$ 32.8 (25)	409.8 $\pm$ 34.6 (25)	393.0 $\pm$ 35.0 (22)
36	441.6 $\pm$ 42.7 (25)	436.8 $\pm$ 36.8 (25)	452.7 $\pm$ 40.3 (25)	436.3 $\pm$ 41.7 (22)
43	477.5 $\pm$ 47.8 (25)	470.7 $\pm$ 40.2 (25)	490.5 $\pm$ 44.2 (25)	472.1 $\pm$ 48.6 (21)
50	506.1 $\pm$ 51.6 (24)	495.5 $\pm$ 43.5 (25)	515.5 $\pm$ 49.5 (25)	498.1 $\pm$ 55.2 (21)
57	533.0 $\pm$ 52.1 (24)	522.4 $\pm$ 48.1 (25)	543.8 $\pm$ 54.4 (25)	524.2 $\pm$ 60.8 (21)
64	552.4 $\pm$ 55.6 (24)	542.3 $\pm$ 49.4 (25)	565.5 $\pm$ 57.7 (25)	543.7 $\pm$ 67.2 (21)
71	576.2 $\pm$ 59.0 (24)	559.5 $\pm$ 50.0 (25)	585.8 $\pm$ 61.0 (25)	564.2 $\pm$ 71.7 (20)
78	583.2 $\pm$ 59.1 (24)	567.3 $\pm$ 50.1 (25)	593.1 $\pm$ 63.8 (25)	566.1 $\pm$ 73.0 (20)
85	605.8 $\pm$ 60.6 (24)	586.6 $\pm$ 52.6 (25)	613.7 $\pm$ 64.7 (25)	584.2 $\pm$ 72.0 (20)
92	621.5 $\pm$ 63.6 (24)	598.8 $\pm$ 53.1 (25)	628.1 $\pm$ 68.9 (25)	595.5 $\pm$ 73.7 (20)
99	631.1 $\pm$ 63.9 (24)	607.5 $\pm$ 55.0 (25)	644.1 $\pm$ 68.8 (25)	609.7 $\pm$ 75.2 (20)

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

Table 4

ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats

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

Compound	ADC			
Dose (mg/kg)	a) 0	100	300	1000
Days of treatment				
1~8	58.8 $\pm$ 7.1 (25)	59.2 $\pm$ 8.2 (25)	62.4 $\pm$ 7.1 (25)	55.4 $\pm$ 7.2 (24)
8~15	57.8 $\pm$ 17.3 (25)	61.0 $\pm$ 7.4 (25)	62.9 $\pm$ 7.9 (25)	58.7 $\pm$ 8.2 (22)
15~22	59.7 $\pm$ 12.6 (25)	56.5 $\pm$ 9.0 (25)	59.0 $\pm$ 10.3 (25)	56.7 $\pm$ 8.8 (22)
22~29	46.7 $\pm$ 9.5 (25)	44.3 $\pm$ 6.5 (25)	48.3 $\pm$ 10.0 (25)	44.6 $\pm$ 12.3 (22)
29~36	41.2 $\pm$ 7.4 (25)	38.2 $\pm$ 7.1 (25)	42.8 $\pm$ 8.1 (25)	43.2 $\pm$ 9.3 (22)
36~43	35.8 $\pm$ 7.0 (25)	33.8 $\pm$ 6.0 (25)	37.8 $\pm$ 6.1 (25)	37.0 $\pm$ 8.5 (21)
43~50	27.0 $\pm$ 6.2 (24)	24.8 $\pm$ 6.1 (25)	25.0 $\pm$ 7.7 (25)	26.0 $\pm$ 8.8 (21)
50~57	26.9 $\pm$ 9.1 (24)	26.9 $\pm$ 6.9 (25)	28.3 $\pm$ 6.8 (25)	26.1 $\pm$ 7.5 (21)
57~64	19.4 $\pm$ 10.2 (24)	20.0 $\pm$ 5.8 (25)	21.7 $\pm$ 6.1 (25)	19.5 $\pm$ 8.1 (21)
64~71	23.9 $\pm$ 13.7 (24)	17.2 $\pm$ 4.6 (25)	20.3 $\pm$ 6.1 (25)	17.6 $\pm$ 7.9 (20)
71~78	7.0 $\pm$ 8.8 (24)	7.7 $\pm$ 5.9 (25)	7.3 $\pm$ 6.3 (25)	1.9 $\pm$ 8.9 (20)
78~85	22.6 $\pm$ 7.1 (24)	19.3 $\pm$ 5.9 (25)	20.6 $\pm$ 6.5 (25)	18.1 $\pm$ 7.8 (20)
85~92	15.7 $\pm$ 5.6 (24)	12.2 $\pm$ 6.1 (25)	14.4 $\pm$ 7.6 (25)	11.3 $\pm$ 5.5 (20)
92~99	9.6 $\pm$ 7.2 (24)	8.7 $\pm$ 6.9 (25)	16.0 $\pm$ 7.9** (25)	14.2 $\pm$ 5.7 (20)

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

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

Table 5

ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats

Cumulative body weight gain of F₀ males (g); Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	ADC			
Dose (mg/kg)	a) 0	100	300	1000
Days of treatment				
1~8	58.8 $\pm$ 7.1 (25)	59.2 $\pm$ 8.2 (25)	62.4 $\pm$ 7.1 (25)	55.4 $\pm$ 7.2 (24)
1~15	116.6 $\pm$ 20.6 (25)	120.2 $\pm$ 14.7 (25)	125.3 $\pm$ 13.8 (25)	114.0 $\pm$ 13.3 (22)
1~22	176.4 $\pm$ 23.1 (25)	176.7 $\pm$ 21.8 (25)	184.3 $\pm$ 23.2 (25)	170.6 $\pm$ 21.0 (22)
1~29	223.0 $\pm$ 31.2 (25)	220.9 $\pm$ 26.7 (25)	232.6 $\pm$ 30.4 (25)	215.2 $\pm$ 30.4 (22)
1~36	264.2 $\pm$ 35.4 (25)	259.1 $\pm$ 31.1 (25)	275.4 $\pm$ 36.4 (25)	258.5 $\pm$ 37.7 (22)
1~43	300.0 $\pm$ 40.5 (25)	293.0 $\pm$ 34.6 (25)	313.3 $\pm$ 40.3 (25)	294.3 $\pm$ 44.7 (21)
1~50	328.2 $\pm$ 44.8 (24)	317.7 $\pm$ 37.9 (25)	338.3 $\pm$ 45.7 (25)	320.3 $\pm$ 51.4 (21)
1~57	355.0 $\pm$ 45.9 (24)	344.7 $\pm$ 42.8 (25)	366.6 $\pm$ 50.9 (25)	346.4 $\pm$ 57.2 (21)
1~64	374.4 $\pm$ 48.9 (24)	364.6 $\pm$ 44.0 (25)	388.3 $\pm$ 54.2 (25)	365.9 $\pm$ 63.9 (21)
1~71	398.3 $\pm$ 53.2 (24)	381.8 $\pm$ 44.6 (25)	408.6 $\pm$ 57.7 (25)	386.1 $\pm$ 68.9 (20)
1~78	405.3 $\pm$ 53.4 (24)	389.6 $\pm$ 44.5 (25)	415.9 $\pm$ 60.5 (25)	388.0 $\pm$ 69.9 (20)
1~85	427.9 $\pm$ 55.1 (24)	408.9 $\pm$ 47.0 (25)	436.5 $\pm$ 61.4 (25)	406.1 $\pm$ 69.1 (20)
1~92	443.6 $\pm$ 58.4 (24)	421.1 $\pm$ 47.0 (25)	450.9 $\pm$ 65.7 (25)	417.3 $\pm$ 70.9 (20)
1~99	453.2 $\pm$ 58.5 (24)	429.8 $\pm$ 48.8 (25)	466.9 $\pm$ 65.1 (25)	431.6 $\pm$ 72.5 (20)

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

Table 6

ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats

Body weight of F₀ females (g); Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	ADC			
	a) 0	100	300	1000
Days of treatment				
1	261.6 $\pm$ 17.2 (25)	257.9 $\pm$ 19.2 (25)	259.4 $\pm$ 16.1 (25)	261.1 $\pm$ 14.6 (25)
8	270.3 $\pm$ 21.1 (25)	269.9 $\pm$ 23.2 (25)	269.2 $\pm$ 17.5 (25)	267.8 $\pm$ 15.7 (25)
15	281.6 $\pm$ 25.5 (25)	282.5 $\pm$ 27.0 (25)	279.5 $\pm$ 19.4 (25)	278.3 $\pm$ 18.7 (25)
Days of pregnancy				
0	287.8 $\pm$ 24.5 (24)	288.5 $\pm$ 27.5 (23)	284.8 $\pm$ 19.3 (22)	287.2 $\pm$ 18.7 (22)
7	325.5 $\pm$ 25.8 (24)	323.9 $\pm$ 30.2 (23)	322.9 $\pm$ 21.9 (22)	323.4 $\pm$ 20.3 (22)
14	360.8 $\pm$ 26.8 (24)	361.9 $\pm$ 34.1 (23)	358.0 $\pm$ 22.7 (22)	359.1 $\pm$ 22.2 (22)
20	423.1 $\pm$ 32.4 (24)	434.5 $\pm$ 35.1 (23)	427.9 $\pm$ 25.0 (22)	428.9 $\pm$ 21.9 (22)
Days of lactation				
0	330.8 $\pm$ 23.3 (23)	325.8 $\pm$ 40.2 (23)	326.3 $\pm$ 32.4 (22)	323.3 $\pm$ 25.3 (22)
4	349.8 $\pm$ 21.7 (22)	341.9 $\pm$ 35.6 (22)	346.1 $\pm$ 25.1 (21)	345.2 $\pm$ 27.7 (21)
7	356.1 $\pm$ 23.9 (22)	352.1 $\pm$ 28.4 (22)	356.0 $\pm$ 19.7 (21)	351.5 $\pm$ 30.8 (21)
14	363.7 $\pm$ 19.6 (22)	356.7 $\pm$ 24.4 (21)	362.0 $\pm$ 21.9 (21)	351.7 $\pm$ 42.7 (20)
21	342.7 $\pm$ 15.6 (22)	338.4 $\pm$ 22.0 (21)	344.0 $\pm$ 21.8 (21)	342.7 $\pm$ 19.8 (19)

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

Table 7

ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats

Body weight gain of F₀ females (g); Mean ± S.D. (N)

Compound	ADC			
	a) 0	100	300	1000
Days of treatment				
1~ 8	8.7 ± 6.8 (25)	12.0 ± 7.6 (25)	9.8 ± 4.7 (25)	6.7 ± 8.1 (25)
8~ 15	11.3 ± 8.5 (25)	12.6 ± 8.2 (25)	10.4 ± 6.7 (25)	10.5 ± 6.9 (25)
Days of pregnancy				
0~ 7	37.8 ± 8.5 (24)	35.4 ± 6.4 (23)	38.1 ± 6.3 (22)	36.2 ± 9.8 (22)
7~ 14	35.3 ± 7.0 (24)	37.9 ± 6.4 (23)	35.1 ± 4.5 (22)	35.7 ± 8.0 (22)
14~ 20	62.3 ± 20.4 (24)	72.7 ± 8.9 (23)	69.9 ± 14.2 (22)	69.8 ± 8.2 (22)
Days of lactation				
0~ 4	19.4 ± 10.0 (22)	16.0 ± 23.2 (22)	18.5 ± 16.3 (21)	20.8 ± 18.7 (21)
4~ 7	6.3 ± 8.3 (22)	10.2 ± 12.2 (22)	9.9 ± 10.0 (21)	6.3 ± 12.9 (21)
7~ 14	7.6 ± 10.8 (22)	1.6 ± 9.8 (21)	6.0 ± 9.5 (21)	0.8 ± 18.9 (20)
14~ 21	-21.0 ± 10.6 (22)	-18.3 ± 10.8 (21)	-18.0 ± 12.3 (21)	-17.2 ± 10.9 (19)

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

Table 8

ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats

Cumulative body weight gain of F₀ females (g); Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	ADC			
	a) 0	100	300	1000
Days of treatment				
1~8	8.7 $\pm$ 6.8 (25)	12.0 $\pm$ 7.6 (25)	9.8 $\pm$ 4.7 (25)	6.7 $\pm$ 8.1 (25)
1~15	20.0 $\pm$ 12.2 (25)	24.6 $\pm$ 14.0 (25)	20.1 $\pm$ 8.2 (25)	17.2 $\pm$ 10.6 (25)
Days of pregnancy				
0~7	37.8 $\pm$ 8.5 (24)	35.4 $\pm$ 6.4 (23)	38.1 $\pm$ 6.3 (22)	36.2 $\pm$ 9.8 (22)
0~14	73.0 $\pm$ 13.4 (24)	73.4 $\pm$ 10.8 (23)	73.2 $\pm$ 8.1 (22)	71.9 $\pm$ 15.0 (22)
0~20	135.3 $\pm$ 26.1 (24)	146.0 $\pm$ 14.1 (23)	143.1 $\pm$ 17.9 (22)	141.7 $\pm$ 16.7 (22)
Days of lactation				
0~4	19.4 $\pm$ 10.0 (22)	16.0 $\pm$ 23.2 (22)	18.5 $\pm$ 16.3 (21)	20.8 $\pm$ 18.7 (21)
0~7	25.8 $\pm$ 11.4 (22)	26.2 $\pm$ 20.2 (22)	28.3 $\pm$ 21.8 (21)	27.1 $\pm$ 27.4 (21)
0~14	33.4 $\pm$ 12.6 (22)	29.2 $\pm$ 21.4 (21)	34.3 $\pm$ 20.3 (21)	27.9 $\pm$ 42.6 (20)
0~21	12.4 $\pm$ 17.1 (22)	10.9 $\pm$ 28.8 (21)	16.3 $\pm$ 26.1 (21)	19.4 $\pm$ 17.9 (19)

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

Table 9

ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats

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

Compound	ADC			
	a) 0	100	300	1000
Days of treatment				
2~3	23.5 $\pm$ 2.1 (25)	23.0 $\pm$ 2.0 (25)	23.7 $\pm$ 1.9 (25)	22.8 $\pm$ 2.2 (25)
9~10	24.6 $\pm$ 2.7 (25)	24.3 $\pm$ 2.2 (25)	25.5 $\pm$ 2.4 (25)	25.5 $\pm$ 1.8 (24)
16~17	27.0 $\pm$ 3.1 (25)	25.8 $\pm$ 2.6 (25)	27.5 $\pm$ 2.3 (25)	26.9 $\pm$ 3.4 (22)
23~24	27.0 $\pm$ 3.2 (25)	27.5 $\pm$ 3.1 (25)	27.9 $\pm$ 2.9 (25)	27.4 $\pm$ 3.1 (22)
30~31	27.2 $\pm$ 3.4 (25)	27.4 $\pm$ 3.2 (25)	28.7 $\pm$ 3.4 (25)	27.3 $\pm$ 3.4 (22)
37~38	26.8 $\pm$ 3.9 (25)	26.8 $\pm$ 2.8 (25)	28.0 $\pm$ 3.8 (25)	27.5 $\pm$ 3.5 (22)
44~45	25.3 $\pm$ 3.3 (25)	24.7 $\pm$ 3.0 (25)	25.4 $\pm$ 2.8 (25)	25.5 $\pm$ 3.5 (21)
51~52	26.5 $\pm$ 4.1 (24)	25.9 $\pm$ 3.3 (25)	27.1 $\pm$ 3.4 (25)	26.9 $\pm$ 4.2 (21)
58~59	25.5 $\pm$ 3.4 (24)	25.1 $\pm$ 3.1 (25)	26.8 $\pm$ 2.9 (25)	25.5 $\pm$ 3.6 (21)
65~66	25.5 $\pm$ 3.7 (24)	24.0 $\pm$ 2.6 (25)	25.8 $\pm$ 3.3 (25)	25.5 $\pm$ 4.1 (21)
71~72 b)	30.3 $\pm$ 4.6 (24)	31.5 $\pm$ 3.9 (25)	31.0 $\pm$ 4.9 (25)	28.8 $\pm$ 4.3 (20)

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

b): consumed with cohabiting female

Table 10

ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats

Food consumption of F₀ females (g); Mean ± S.D. (N)

Compound	ADC			
	a) 0	100	300	1000
Days of treatment				
2 ~ 3	18.9 ± 4.0 (25)	19.4 ± 3.5 (25)	18.8 ± 3.1 (25)	17.3 ± 3.3 (25)
9 ~ 10	17.6 ± 3.5 (25)	17.8 ± 3.7 (25)	17.6 ± 4.4 (25)	17.6 ± 3.3 (25)
Days of pregnancy				
0 ~ 7	149.4 ± 16.0 (24)	148.5 ± 19.3 (23)	152.0 ± 15.5 (22)	151.6 ± 19.2 (22)
7 ~ 14	163.5 ± 18.1 (24)	164.0 ± 24.4 (23)	165.9 ± 17.3 (22)	165.8 ± 19.9 (22)
14 ~ 20	113.7 ± 9.5 (24)	115.8 ± 15.5 (23)	114.2 ± 10.9 (22)	117.4 ± 9.0 (22)
Days of lactation				
0 ~ 4	105.1 ± 11.0 (22)	95.8 ± 27.5 (22)	101.3 ± 22.8 (21)	108.4 ± 30.5 (21)
4 ~ 7	119.0 ± 9.3 (22)	114.2 ± 21.3 (22)	121.3 ± 19.1 (20)	123.8 ± 28.2 (21)
7 ~ 14	366.6 ± 27.7 (22)	358.5 ± 24.6 (21)	365.0 ± 55.8 (20)	362.6 ± 84.8 (20)
14 ~ 21	438.9 ± 37.7 (22)	420.8 ± 36.7 (21)	434.8 ± 70.1 (20)	447.3 ± 30.8 (19)

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

Table 11

ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats

Estrous cycle

Compound	ADC			
	0 ^{a)}	100	300	1000
Number of females examined	25	25	25	25
Mean length of estrous cycle in days				
Pre-treatment period; Mean $\pm$ S.D.	4.0 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.2	4.1 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.4
Treatment period; Mean $\pm$ S.D.	4.0 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.4	4.1 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.3 *
Number of animals showing each type of cycle during pre-treatment period				
4-day cycle	22	22	21	18
5-day cycle	0	1	0	3
4/5-day cycle	2	1	3	3
Monoestrus	1	1	1	1
Changes of estrous cycle after treatment				
Number of animals whose estrous cycle was not changed	19	20	21	18
Number of animals whose estrous cycle was changed	6	5	4	7
[Pre-treatment] [Treatment]				
4-day $\rightarrow$ 5-day	0	0	1	1
4-day $\rightarrow$ 4/5-day	1	0	0	2
4-day $\rightarrow$ irregular	2	1	0	0
4-day $\rightarrow$ monoestrus	0	1	0	0
5-day $\rightarrow$ 4/5-day	0	1	0	2
4/5-day $\rightarrow$ 4-day	2	0	2	1
4/5-day $\rightarrow$ 5-day	0	1	0	0
monoestrus $\rightarrow$ 4-day	1	1	1	0
monoestrus $\rightarrow$ irregular	0	0	0	1
Number of vaginal estrus during mating period				
Mean $\pm$ S.D.	1.1 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.3

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

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

Table 12

ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats

Reproductive performance

Compound	HNA			
	0 ^{a)}	100	300	1000
Number of males examined (A)	24	25	25	20
Number of males copulated (B)	24	25	25	20
Copulation index; males [(B/A)×100,%]	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of fertile males (C)	23	23	22	19
Fertility index; males [(C/B)×100,%]	95.8	92.0	88.0	95.0
Pairing days until copulation; males Mean ± S.D.	3.0 ± 2.1	2.9 ± 1.8	3.1 ± 1.5	2.6 ± 1.1
Number of females examined (D)	25	25	25	25
Number of females copulated (E)	25	25	25	25
Copulation index; females [(E/D)×100,%]	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of fertile females (F)	24	23	22	22
Fertility index; females [(F/E)×100,%]	96.0	92.0	88.0	88.0
Pairing days until copulation; females Mean ± S.D.	3.0 ± 2.1	2.9 ± 1.8	3.1 ± 1.5	2.9 ± 1.3

a): vehicle control; corn oil (5 mL/kg)

Table 13
 ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats
 Summary of macroscopic findings in Fo males at the end of the dosing period

Group Grade	0 mg/kg		100 mg/kg		300 mg/kg		1000 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Testis)	[24]		[25]		[25]		[20]	
Small	23	1	25	0	25	0	18	2
Soft	24	0	25	0	25	0	20	0
(Epididymis)	[24]		[25]		[25]		[20]	
Small	23	1	25	0	25	0	19	1
(Seminal vesicle)	[24]		[25]		[25]		[20]	
Small	24	0	25	0	25	0	20	0
(Prostate)	[24]		[25]		[25]		[20]	
Small	24	0	25	0	25	0	20	0
(Coagulating gland)	[24]		[25]		[25]		[20]	
Small	24	0	25	0	25	0	20	0
(Kidney)	[24]		[25]		[25]		[20]	
Enlargement	24	0	25	0	25	0	19	1
Pale	24	0	25	0	25	0	18	2
Rough surface	24	0	25	0	25	0	19	1
Dilatation, renal pelvis	24	0	24	1	25	0	19	1
(Lung)	[24]		[25]		[25]		[20]	
Spot, black	24	0	24	1	24	1	20	0
(Skin)	[24]		[25]		[25]		[20]	
Alopecia	21	3	25	0	25	0	20	0
Crust	24	0	24	1	25	0	20	0

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

Table 13-D
 ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats
 Summary of macroscopic findings in Fo males died during the dosing period

Group Grade	0 mg/kg		100 mg/kg		300 mg/kg		1000 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Testis)	[1]		[0]		[0]		[5]	
Small		1		0				3
Soft		1		0				4
(Epididymis)	[1]		[0]		[0]		[5]	
Small		1		0				3
(Seminal vesicle)	[1]		[0]		[0]		[5]	
Small		1		0				3
(Prostate)	[1]		[0]		[0]		[5]	
Small		1		0				3
(Coagulating gland)	[1]		[0]		[0]		[5]	
Small		1		0				3
(Kidney)	[1]		[0]		[0]		[5]	
Enlargement		1		0				4
Pale		1		0				5
Rough surface		1		0				5
Dilatation, renal pelvis		1		0				5
(Lung)	[1]		[0]		[0]		[5]	
Spot, black		1		0				5
(Skin)	[1]		[0]		[0]		[5]	
Alopecia		1		0				5
Crust		1		0				5

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

Table 14
ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats
Summary of histopathological findings in Fo males at the end of the dosing period

Group	0 mg/kg						100 mg/kg						300 mg/kg						1000 mg/kg					
Grade	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Pituitary gland)	[24]						[2]						[3]						[20]					
No remarkable change																								
(Testis)	[24]						[2]						[3]						[20]					
Atrophy, seminiferous tubule, unilateral	24	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
Atrophy, seminiferous tubule, bilateral	24	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	19	0	0	0	1	1
Multinucleated giant cell, seminiferous tubule, unilateral	24	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
Degeneration, spermatocyte, seminiferous tubule, bilateral	23	0	1	0	0	1	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	19	0	1	0	0	1
Hyperplasia, Leydig cell, diffuse, unilateral	24	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
Hyperplasia, Leydig cell, diffuse, bilateral	24	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	19	0	0	1	0	1
Spermatic granuloma, unilateral	24	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
(Epididymis)	[24]						[2]						[3]						[20]					
Decrease, sperm, lumen, unilateral	24	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
Decrease, sperm, lumen, bilateral	24	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	19	0	0	0	1	1
Cell debris, lumen, unilateral	24	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
Cell debris, lumen, bilateral	24	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	18	1	0	1	0	2
(Seminal vesicle)	[24]						[2]						[3]						[20]					
No remarkable change																								
(Prostate: ventral lobe)	[24]						[2]						[3]						[20]					
Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	11	3	6	4	0	13	1	1	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	9	5	6	0	0	11
Cellular infiltration, neutrophil, epithelium & lumen	16	6	2	0	0	8	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	15	5	0	0	0	5
(Coagulating gland)	[24]						[2]						[3]						[20]					
No remarkable change																								
(Thyroid gland)	[24]						[2]						[3]						[20]					
Ectopic thymus	23	0	1	0	0	1	2	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	1	20	0	0	0	0	0
(Kidney)	[24]						[0]						[0]						[20]					
Eosinophilic body	17	2	3	2	0	7													17	0	3	0	0	3
Basophilic tubule, cortex	7	16	1	0	0	17													7	11	1	1	0	13
Dilatation, renal pelvis	24	0	0	0	0	0													18	1	0	1	0	2
Dilatation, distal tubule	24	0	0	0	0	0													19	0	0	1	0	1
Mineralization, cortex/medulla	21	3	0	0	0	3													13	7	0	0	0	7
(Lung)	[0]						[1]						[1]						[0]					
Hemorrhage, focal							0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0						
Cellular infiltration, lymphocyte & neutrophil, focal							0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0						
Accumulation, foam cell							0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0						
(Skin)	[3]						[1]						[0]						[0]					
Decrease, hair follicle, focal	1	0	2	0	0	2	1	0	0	0	0	0												
Cellular infiltration, lymphocyte & macrophage, dermis & subcutaneous	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1												
Crust	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1												

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

Table 14-D

ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats

Summary of histopathological findings in Fo males died during the dosing period

Group Grade	0 mg/kg						100 mg/kg						300 mg/kg						1000 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Pituitary gland)	[1]						[0]						[0]						[2]					
No remarkable change																								
(Testis)	[1]						[0]						[0]						[2]					
Atrophy, seminiferous tubule, unilateral	1	0	0	0	0	0													1	0	0	0	1	1
Atrophy, seminiferous tubule, bilateral	1	0	0	0	0	0													2	0	0	0	0	0
Multinucleated giant cell, seminiferous tubule, unilateral	1	0	0	0	0	0													1	0	0	1	0	1
Degeneration, spermatocyte, seminiferous tubule, bilateral	1	0	0	0	0	0													2	0	0	0	0	0
Hyperplasia, Leydig cell, diffuse, unilateral	1	0	0	0	0	0													1	0	1	0	0	1
Hyperplasia, Leydig cell, diffuse, bilateral	1	0	0	0	0	0													2	0	0	0	0	0
Spermatic granuloma, unilateral	1	0	0	0	0	0													1	0	1	0	0	1
(Epididymis)	[1]						[0]						[0]						[2]					
Decrease, sperm, lumen, unilateral	1	0	0	0	0	0													1	0	0	0	1	1
Decrease, sperm, lumen, bilateral	1	0	0	0	0	0													2	0	0	0	0	0
Cell debris, lumen, unilateral	1	0	0	0	0	0													1	0	0	1	0	1
Cell debris, lumen, bilateral	1	0	0	0	0	0													2	0	0	0	0	0
(Seminal vesicle)	[1]						[0]						[0]						[2]					
No remarkable change																								
(Prostate: ventral lobe)	[1]						[0]						[0]						[2]					
Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	1	0	0	0	0	0													1	0	1	0	0	1
Cellular infiltration, neutrophil, epithelium & lumen	1	0	0	0	0	0													1	1	0	0	0	1
(Coagulating gland)	[1]						[0]						[0]						[2]					
No remarkable change																								
(Thyroid gland)	[1]						[0]						[0]						[2]					
Ectopic thymus	1	0	0	0	0	0													2	0	0	0	0	0
(Kidney)	[0]						[0]						[0]						[2]					
Eosinophilic body																			2	0	0	0	0	0
Basophilic tubule, cortex																			1	1	0	0	0	1
Dilatation, renal pelvis																			2	0	0	0	0	0
Dilatation, distal tubule																			2	0	0	0	0	0
Mineralization, cortex/medulla																			2	0	0	0	0	0
(Lung)	[0]						[0]						[0]						[0]					
Hemorrhage, focal																								
Cellular infiltration, lymphocyte & neutrophil, focal																								
Accumulation, foam cell																								
(Skin)	[0]						[0]						[0]						[0]					
Decrease, hair follicle, focal																								
Cellular infiltration, lymphocyte & macrophage, dermis & subcutaneous																								
Crust																								

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

Table 15
 ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats
 Summary of macroscopic findings in F0 females at the end of the dosing period

Group Grade	0 mg/kg		100 mg/kg		300 mg/kg		1000 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Uterus: horn & cervix)	[25]		[25]		[24]		[22]	
Dilatation, lumen	24	1	25	0	24	0	22	0
Retention, watery content, lumen	24	1	25	0	24	0	22	0
(Kidney)	[25]		[25]		[24]		[22]	
Enlargement	25	0	25	0	24	0	22	0
Edema	25	0	25	0	24	0	22	0
Pale	25	0	25	0	23	1	22	0
Spot, pale, cortex	25	0	25	0	24	0	22	0
Rough surface	25	0	25	0	24	0	22	0
Calculus, renal pelvis	25	0	25	0	24	0	22	0
Dilatation, renal pelvis	25	0	25	0	24	0	22	0
Cyst, cortex, right side	25	0	25	0	24	0	21	1
Enlargement, left side, with defect of right side	25	0	25	0	23	1	22	0
(Heart)	[25]		[25]		[24]		[22]	
Area, pale	25	0	25	0	24	0	22	0
(Stomach)	[25]		[25]		[24]		[22]	
Spot, black, mucosa	25	0	25	0	24	0	22	0
Thinning, mucosa	25	0	25	0	24	0	22	0
Recessed area, mucosa, forestomach	25	0	25	0	24	0	22	0
(Spleen)	[25]		[25]		[24]		[22]	
Small	25	0	25	0	24	0	22	0
Pale	25	0	25	0	24	0	22	0
(Thymus)	[25]		[25]		[24]		[22]	
Small	25	0	25	0	24	0	22	0
(Adrenal gland)	[25]		[25]		[24]		[22]	
Enlargement	25	0	25	0	24	0	22	0
(Lung)	[25]		[25]		[24]		[22]	
Edema, right lobe	24	1	25	0	24	0	22	0
Insufficiency, retraction	25	0	25	0	24	0	22	0
(Liver)	[25]		[25]		[24]		[22]	
Diaphragmatic nodule	25	0	23	2	24	0	22	0
(Thoracic cavity)	[25]		[25]		[24]		[22]	
Hydrothorax	25	0	25	0	24	0	22	0
(Skin)	[25]		[25]		[24]		[22]	
Alopecia	24	1	24	1	23	1	22	0
Soiled fur	25	0	25	0	24	0	22	0

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

Table 15-S/D

ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats

Summary of macroscopic findings in Fo females sacrificed in a moribund condition or died

Group Grade	0 mg/kg		100 mg/kg		300 mg/kg		1000 mg/kg	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Uterus: horn & cervix)	[0]		[0]		[1]		[3]	
Dilatation, lumen					1	0	3	0
Retention, watery content, lumen					1	0	3	0
(Kidney)	[0]		[0]		[1]		[3]	
Enlargement					1	0	0	3
Edema					1	0	2	1
Pale					0	1	1	2
Spot, pale, cortex					1	0	2	1
Rough surface					0	1	2	1
Calculus, renal pelvis					1	0	2	1
Dilatation, renal pelvis					1	0	2	1
Cyst, cortex, right side					1	0	3	0
Enlargement, left side, with defect of right side					1	0	3	0
(Heart)	[0]		[0]		[1]		[3]	
Area, pale					1	0	2	1
(Stomach)	[0]		[0]		[1]		[3]	
Spot, black, mucosa					1	0	2	1
Thinning, mucosa					1	0	2	1
Recessed area, mucosa, forestomach					0	1	3	0
(Spleen)	[0]		[0]		[1]		[3]	
Small					0	1	0	3
Pale					1	0	1	2
(Thymus)	[0]		[0]		[1]		[3]	
Small					0	1	1	2
(Adrenal gland)	[0]		[0]		[1]		[3]	
Enlargement					0	1	2	1
(Lung)	[0]		[0]		[1]		[3]	
Edema, right lobe					1	0	3	0
Insufficiency, retraction					1	0	2	1
(Liver)	[0]		[0]		[1]		[3]	
Diaphragmatic nodule					1	0	3	0
(Thoracic cavity)	[0]		[0]		[1]		[3]	
Hydrothorax					1	0	2	1
(Skin)	[0]		[0]		[1]		[3]	
Alopecia					1	0	2	1
Soiled fur					0	1	3	0

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 16

ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats

Summary of histopathological findings in Fo females at the end of the dosing period

Group Grade	0 mg/kg						100 mg/kg						300 mg/kg						1000 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Pituitary gland)	[25]						[2]						[3]						[22]					
No remarkable change																								
(Ovary)	[25]						[2]						[3]						[22]					
No remarkable change																								
(Uterus: horn & cervix)	[25]						[2]						[3]						[22]					
No remarkable change																								
(Vagina)	[25]						[2]						[3]						[22]					
No remarkable change																								
(Thyroid gland)	[25]						[2]						[3]						[22]					
No remarkable change																								
(Kidney)	[25]						[25]						[24]						[22]					
Dilatation, renal pelvis	24	0	1	0	0	1	25	0	0	0	0	0	23	1	0	0	0	1	21	0	1	0	0	1
Dilatation, distal & collecting tubule, diffuse	25	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	22	0	0	0	0	0
Dilatation, distal tubule, cortex, focal	25	0	0	0	0	0	24	1	0	0	0	1	24	0	0	0	0	0	22	0	0	0	0	0
Dilatation, cystic, collecting tubule, papilla	25	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	21	0	0	1	0	1
Degeneration, vacuolar, proximal tubule, cortex	25	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	22	0	0	0	0	0
Necrosis, proximal tubule, cortex	25	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	22	0	0	0	0	0
Basophilic tubule, cortex	19	6	0	0	0	6	14	9	2	0	0	11	13	11	0	0	0	11	17	4	0	1	0	5
Basophilic tubule, medulla	25	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	22	0	0	0	0	0
Mineralization, cortex/medulla	20	5	0	0	0	5	21	4	0	0	0	4	22	2	0	0	0	2	20	2	0	0	0	2
Mineralization, artery	25	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	22	0	0	0	0	0
Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	25	0	0	0	0	0	24	1	0	0	0	1	24	0	0	0	0	0	18	3	1	0	0*	4#
Cellular infiltration, neutrophil, lumen & interstitium	25	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	22	0	0	0	0	0
Cell debris, lumen, distal & collecting tubule	25	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	22	0	0	0	0	0
Cyst, cortex & medulla	25	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	21	0	0	0	1	1
Fibrosis, cortex, focal	25	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	21	0	1	0	0	1
Foam cell, renal pelvis	25	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	21	1	0	0	0	1
Hyperplasia, transitional epithelium, renal pelvis	25	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	22	0	0	0	0	0
(Heart)	[0]						[0]						[0]						[0]					
Degeneration & fibrosis, myocardium, diffuse																								
Mineralization, artery & myocardium																								
(Stomach)	[0]						[0]						[0]						[0]					
Mineralization, mucosa, glandular stomach																								
Mineralization, muscular layer & serosa																								
Mineralization, artery																								
Erosion, mucosa, forestomach																								
Squamous hyperplasia, forestomach																								

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

[], Number of animals examined

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

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

(continued)

Table 16(continued)

ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats

Summary of histopathological findings in F0 females at the end of the dosing period

Group Grade	0 mg/kg						100 mg/kg						300 mg/kg						1000 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Spleen)	[0]						[0]						[0]						[0]					
Atrophy																								
Hematopoiesis, extramedullary																								
Deposit, pigment, brown																								
(Adrenal gland)	[0]						[0]						[0]						[0]					
Hypertrophy, cortical cell																								
(Thymus)	[0]						[0]						[0]						[0]					
Atrophy																								
(Liver)	[0]						[2]						[0]						[0]					
Fibrosis, capsule, focal							0 1 1 0 0 2																	
(Lung)	[1]						[0]						[0]						[0]					
Mineralization, smooth muscle,																								
bronchus	1 0 0 0 0 0																							
Accumulation, foam cell	0 0 1 0 0 1																							
Foreign body giant cell	0 0 1 0 0 1																							
(Skin)	[1]						[1]						[1]						[0]					
Decrease, hair follicle,																								
focal	0 0 1 0 0 1						1 0 0 0 0 0						1 0 0 0 0 0											

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

[], Number of animals examined

Table 1G-S/D

ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats

Summary of histopathological findings in Fo females sacrificed in a moribund condition or died during the dosing period

Group Grade	0 mg/kg						100 mg/kg						300 mg/kg						1000 mg/kg					
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Pituitary gland)	[0]						[0]						[0]						[3]					
No remarkable change																								
(Ovary)	[0]						[0]						[0]						[3]					
No remarkable change																								
(Uterus: horn & cervix)	[0]						[0]						[0]						[3]					
No remarkable change																								
(Vagina)	[0]						[0]						[0]						[3]					
No remarkable change																								
(Thyroid gland)	[0]						[0]						[0]						[3]					
No remarkable change																								
(Kidney)	[0]						[0]						[1]						[3]					
Dilatation, renal pelvis													1	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	2
Dilatation, distal & collecting tubule, diffuse													0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	1	3
Dilatation, distal tubule, cortex, focal													1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
Dilatation, cystic, collecting tubule, papilla													1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
Degeneration, vacuolar, proximal tubule, cortex													0	0	0	1	0	1	0	0	1	2	0	3
Necrosis, proximal tubule, cortex													0	0	1	0	0	1	0	0	3	0	0	3
Basophilic tubule, cortex													0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	1	3
Basophilic tubule, medulla													1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3
Mineralization, cortex/medulla													1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	3
Mineralization, artery													1	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	2
Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium													1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
Cellular infiltration, neutrophil, lumen & interstitium													1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	3
Cell debris, lumen, distal & collecting tubule													0	0	1	0	0	1	0	0	2	1	0	3
Cyst, cortex & medulla													1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
Fibrosis, cortex, focal													1	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	1
Foam cell, renal pelvis													1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
Hyperplasia, transitional epithelium, renal pelvis													1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	2
(Heart)	[0]						[0]						[0]						[1]					
Degeneration & fibrosis, myocardium, diffuse																			0	0	0	1	0	1
Mineralization, artery & myocardium																			0	0	0	1	0	1
(Stomach)	[0]						[0]						[1]						[1]					
Mineralization, mucosa, glandular stomach													1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Mineralization, muscular layer & serosa													1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Mineralization, artery													1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Erosion, mucosa, forestomach													0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Squamous hyperplasia, forestomach													0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0

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

[], Number of animals examined

(continued)

Table 16-S/D(contonued)

ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats

Summary of histopathological findings in F0 females sacrificed in a moribund condition or died during the dosing period

Group	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
Grade	- ± + ++ +++ Pos.	- ± + ++ +++ Pos.	- ± + ++ +++ Pos.	- ± + ++ +++ Pos.
(Spleen)	[0]	[0]	[0]	[3]
Atrophy				0 0 0 3 0 3
Hematopoiesis, extramedullary				1 2 0 0 0 2
Deposit, pigment, brown				0 2 1 0 0 3
(Adrenal gland)	[0]	[0]	[1]	[1]
Hypertrophy, cortical cell			0 0 0 1 0 1	0 0 0 1 0 1
(Thymus)	[0]	[0]	[0]	[2]
Atrophy				0 0 0 0 2 2
(Liver)	[0]	[0]	[0]	[0]
Fibrosis, capsule, focal				
(Lung)	[0]	[0]	[0]	[1]
Mineralization, smooth muscle, bronchus				0 0 0 1 0 1
Accumulation, foam cell				1 0 0 0 0 0
Foreign body giant cell				1 0 0 0 0 0
(Skin)	[0]	[0]	[0]	[1]
Decrease, hair follicle, focal				1 0 0 0 0 0

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

[], Number of animals examined

Table 17

ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats

Development of F₁ pups up to day 21 after birth; Mean $\pm$ S.D. (N)

Compound	ADC			
	a) 0	100	300	1000
Number of pregnant females	24	23	22	22
Number of pregnant females with live newborns	23	23	22	22
Gestation index	95.8	100.0	100.0	100.0
Gestation length in days	22.5 $\pm$ 0.5 (23)	22.4 $\pm$ 0.5 (23)	22.4 $\pm$ 0.6 (22)	22.6 $\pm$ 0.5 (22)
Number of implantations	13.0 $\pm$ 4.7 (24)	15.4 $\pm$ 1.6 (23)	14.6 $\pm$ 3.1 (22)	14.7 $\pm$ 1.5 (22)
Day 0 of lactation				
Number of newborns	11.8 $\pm$ 4.7 (24)	14.0 $\pm$ 1.7 (23)	13.4 $\pm$ 3.4 (22)	13.6 $\pm$ 1.9 (22)
Delivery index	86.6 $\pm$ 22.3 (24)	91.2 $\pm$ 8.8 (23)	90.2 $\pm$ 11.0 (22)	92.1 $\pm$ 7.8 (22)
Number of live newborns	12.1 $\pm$ 4.1 (23)	13.3 $\pm$ 1.9 (23)	12.7 $\pm$ 2.9 (22)	13.3 $\pm$ 1.8 (22)
Birth index	88.7 $\pm$ 15.3 (23)	86.2 $\pm$ 11.6 (23)	86.4 $\pm$ 12.1 (22)	90.5 $\pm$ 9.0 (22)
Live birth index	98.1 $\pm$ 8.9 (23)	94.6 $\pm$ 9.8 (23)	96.0 $\pm$ 8.5 (22)	98.1 $\pm$ 4.1 (22)
Sex ratio on day 0	52.2 $\pm$ 14.6 (23)	51.1 $\pm$ 12.8 (23)	43.7 $\pm$ 17.0 (22)	53.2 $\pm$ 15.8 (22)
Day 4 of lactation				
Number of live pups				
before adjustment of litter size	11.8 $\pm$ 4.3 (23)	12.7 $\pm$ 3.4 (23)	11.5 $\pm$ 4.1 (22)	13.2 $\pm$ 1.8 (21)
Viability index	94.5 $\pm$ 20.8 (23)	95.3 $\pm$ 20.9 (23)	91.6 $\pm$ 24.6 (22)	100.0 $\pm$ 0.0 (21)
Sex ratio on day 4	51.7 $\pm$ 14.9 (22)	50.6 $\pm$ 12.6 (22)	43.3 $\pm$ 17.5 (21)	52.9 $\pm$ 16.2 (21)
Number of live pups				
after adjustment of litter size	7.7 $\pm$ 0.7 (22)	8.0 $\pm$ 0.0 (22)	7.6 $\pm$ 1.2 (21)	8.0 $\pm$ 0.0 (21)
Day 21 of lactation				
Number of live pups	7.7 $\pm$ 0.7 (22)	7.5 $\pm$ 1.7 (22)	7.6 $\pm$ 1.2 (21)	7.6 $\pm$ 1.8 (20)
Weaning index	100.0 $\pm$ 0.0 (22)	93.8 $\pm$ 21.4 (22)*	100.0 $\pm$ 0.0 (21)	95.0 $\pm$ 22.4 (20)

Gestation index = (number of pregnant females with live newborns/number of pregnant females) $\times$ 100, %Delivery index = (number of newborns/number of implantations) $\times$ 100, %Birth index = (number of live newborns/number of implantations) $\times$ 100, %Live birth index = (number of live newborns/number of newborns) $\times$ 100, %Sex ratio on day 0 = (number of male live newborns/number of live newborn) $\times$ 100, %Viability index = (number of live pups on day 4 before adjustment of litter size/number of live newborns) $\times$ 100, %Sex ratio on day 4 = (number of male live pups on day 4 before adjustment of litter size/number of live pups on day 4 before adjustment of litter size) $\times$ 100, %Weaning index = (number of live pups on day 21 of lactation/number of live pups on day 4 after adjustment of litter size) $\times$ 100, %

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

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

Table 18

ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats

Body weight of F₁ pups up to day 21 after birth; Mean $\pm$ S.D. (N)

Compounds	ADC							
Dose (mg/kg)	0 ^{a)}		100		300		1000	
Day 0 (At birth)								
No. of live newborns	12.1 ± 4.1	(23)	13.3 ± 1.9	(23)	12.7 ± 2.9	(22)	13.3 ± 1.8	(22)
Male	6.2 ± 2.8		6.7 ± 1.7		5.8 ± 2.6		7.0 ± 2.2	
Female	5.9 ± 2.9		6.6 ± 2.3		6.9 ± 2.2		6.3 ± 2.5	
Weight of newborns in grams								
Male	7.2 ± 1.0		6.7 ± 0.6		6.8 ± 0.7		7.0 ± 0.8	
Female	6.7 ± 1.0		6.4 ± 0.6		6.5 ± 0.9		6.7 ± 0.7	
Day 4								
No. of live pups ^{b)}	7.7 ± 0.7	(22)	8.0 ± 0.0	(22)	7.6 ± 1.2	(21)	8.0 ± 0.0	(21)
Male	3.8 ± 0.6		4.1 ± 0.4		3.5 ± 1.0		4.2 ± 0.8	
Female	3.9 ± 0.6		3.9 ± 0.4		4.1 ± 0.6		3.8 ± 0.8	
Weight of pup in grams								
Male	12.5 ± 2.3		11.1 ± 1.7		11.7 ± 1.5		11.6 ± 1.7	
Female	11.9 ± 2.2		10.7 ± 1.6		11.4 ± 1.7		11.3 ± 1.7	
Day 7								
No. of live pups	7.7 ± 0.7	(22)	8.0 ± 0.0	(21)	7.6 ± 1.2	(21)	8.0 ± 0.0	(21)
Male	3.8 ± 0.6		4.1 ± 0.4		3.5 ± 1.0		4.2 ± 0.8	
Female	3.9 ± 0.6		3.9 ± 0.4		4.1 ± 0.6		3.8 ± 0.8	
Weight of pup in grams								
Male	19.7 ± 2.5		18.4 ± 1.8		19.0 ± 1.8		18.8 ± 2.6	
Female	18.9 ± 2.4		17.8 ± 1.8		18.3 ± 1.9		18.3 ± 2.5	

Parentheses indicate the number of litters evaluated

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

Table 18 (continued)

ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats

Body weight of F₁ pups up to day 21 after birth; Mean $\pm$ S.D. (N)

Compounds	ADC			
	a) 0	100	300	1000
Day 14				
No. of live pups	7.7 $\pm$ 0.7 (22)	7.9 $\pm$ 0.4 (21)	7.6 $\pm$ 1.2 (21)	7.8 $\pm$ 0.9 (20)
Male	3.8 $\pm$ 0.6	4.0 $\pm$ 0.5	3.5 $\pm$ 1.0	4.2 $\pm$ 0.9
Female	3.9 $\pm$ 0.6	3.9 $\pm$ 0.7	4.1 $\pm$ 0.6	3.7 $\pm$ 0.9
Weight of pup in grams				
Male	39.1 $\pm$ 3.3	37.7 $\pm$ 2.7	38.1 $\pm$ 1.7	36.4 $\pm$ 6.9
Female	37.7 $\pm$ 3.2	36.5 $\pm$ 2.5	37.2 $\pm$ 3.2	35.7 $\pm$ 6.8
Day 21				
No. of live pups	7.7 $\pm$ 0.8 (22)	7.9 $\pm$ 0.4 (21)	7.6 $\pm$ 1.2 (21)	7.9 $\pm$ 0.3 (19)
Male	3.8 $\pm$ 0.5	4.0 $\pm$ 0.5	3.5 $\pm$ 1.0	4.2 $\pm$ 0.9
Female	3.9 $\pm$ 0.6	3.9 $\pm$ 0.7	4.1 $\pm$ 0.6	3.7 $\pm$ 0.8
Weight of pup in grams				
Male	63.9 $\pm$ 5.3	61.2 $\pm$ 4.7	62.4 $\pm$ 3.4	61.6 $\pm$ 5.7
Female	61.1 $\pm$ 5.0	58.8 $\pm$ 4.2	60.3 $\pm$ 4.9	59.9 $\pm$ 4.2

Parentheses indicate the number of litters evaluated

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

Table 19

ADC: One-generation reproduction toxicity study in rats

Morphological findings of F₁ offspring

Compound	ADC			
	0 ^{a)}	100	300	1000
Dead pups				
Number of dead pups examined :				
External observation	6	31	31	14
Visceral observation	2	15	12	6
<u>External changes</u>				
Number of pups	0	1	0	0
Types and number				
Short trunk	0	1 b)	0	0
Club foot	0	1 b)	0	0
Brachyury	0	1 b)	0	0
<u>Visceral changes</u>				
Number of pups	0	2	0	0
Types and number				
Bifid apex	0	1 b)	0	0
Horseshoe kidney	0	1 b)	0	0
Dilatation of the renal pelvis	0	1 c)	0	0
Day 4 (eliminated pups to adjust litter size)				
Number of live pups examined	101	116	94	110
<u>External changes</u>				
Number of pups	1	5	0	4
Types and number				
Anal atresia and anury	0	0	0	1 f)
Brachyury and kinked tail	0	2 b)	0	0
Kinked tail	1 d)	2 b,e)	0	3 f,g)
Rudimentary tail	0	1 b)	0	0
<u>Visceral changes</u>				
Number of pups	1	0	1	1
Types and number				
Dilatation of the renal pelvis	1 h)	0	1 i)	1 j)
Day 21 (at weaning)				
Number of live weanlings examined	170	165	160	152
<u>External changes</u>				
Number of weanlings	0	1	0	0
Types and number				
Brachyury and kinked tail	0	1 b)	0	0
<u>Visceral changes</u>				
Number of weanlings	0	1	0	0
Types and number				
Hydronephrosis	0	1 k)	0	0
Total number :				
External observation	277	312	285	276
External changes	1 d)	7*b,e)	0	4 f,g)
Visceral observation	273	296	266	268
Visceral changes	1 h)	3 b,c,k)	1 i)	1 j)

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

b): FB02002 (Dam no.)

f): FB04002 (Dam no.)

j): FB04005 (Dam no.)

c): FB02020 (Dam no.)

g): FB04019 (Dam no.)

k): FB02008 (Dam no.)

d): FB01018 (Dam no.)

h): FB01022 (Dam no.)

e): FB02025 (Dam no.)

i): FB03007 (Dam no.)

* : significant difference from control, p<0.05