

最終報告書

N,N-ジエチル-*m*-トルアミドのラットを用いる
反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

試験番号：6396 (115-167)

平成 15 年 9 月 17 日

試験委託者
厚生労働省 医薬食品局

財団法人
食品農医薬品安全性評価センター

目 次

1. 要約	8
2. 緒言	10
14. 試験材料および方法	14
15. 観察, 測定および検査	17
16. 試験結果	24
17. 考察および結論	30
18. 参考文献	34

Figures		F-1~4
Figure 1	Body weight change of male rats	F-1
Figure 2	Body weight change of female rats	F-2
Figure 3	Food consumption of male rats	F-3
Figure 4	Food consumption of female rats	F-4
Tables		T-01~40
Table 1-1	Clinical observations in male rats	T-01
Table 1-2	Clinical observations in female rats (Before and during mating period)	T-02
Table 1-3	Clinical observations in female rats (Gestation period)	T-03

Table 1-4	Clinical observations in female rats (Lactation period)	T-05
Table 2-1	Body weight change of male rats	T-07
Table 2-2	Body weight change of female rats	T-08
Table 3-1	Food consumption of male rats	T-09
Table 3-2	Food consumption of female rats	T-10
Table 4-1	Hematology of male rats	T-11
Table 4-2	Hematology of female rats	T-12
Table 5-1	Coagulation of male rats	T-13
Table 5-2	Coagulation of female rats	T-14
Table 6-1	Blood chemistry of male rats	T-15
Table 6-2	Blood chemistry of female rats	T-16
Table 7	Urinalysis of male rats	T-17
Table 8-1	Absolute and relative organ weight of male rats	T-20
Table 8-2	Absolute and relative organ weight of female rats	T-21
Table 9-1	Summary of gross findings (sacrificed, male)	T-22
Table 9-2	Summary of gross findings (non-pregnancy, male)	T-23
Table 9-3	Summary of gross findings (sacrificed, female)	T-24
Table 9-4	Summary of gross findings (non-pregnancy, female)	T-25
Table 9-5	Summary of gross findings (all pups died, female)	T-26
Table 10-1	Summary of histological findings (sacrificed, male)	T-27
Table 10-2	Summary of histological findings (non-pregnancy, male)	T-29
Table 10-3	Summary of histological findings (sacrificed, female)	T-30
Table 10-4	Summary of histological findings (non-pregnancy, female)	T-32
Table 10-5	Summary of histological findings (all pups died, female)	T-33
Table 10-6	Cell type and number per Sertoli cell in seminiferous tubules of rats at VII - VIII stage of spermatogenesis during dosing period (successful pregnancy, male)	T-34
Table 11	Copulation and fertility results in rats	T-35
Table 12	Findings of delivery in dams(F0)	T-36
Table 13	External observations on live pups(F1) from rats	T-37
Table 14	Body weight change of pups(F1) from rats	T-38
Table 15-1	Summary of gross findings of pups(F1) from rats (sacrificed, male)	T-39
Table 15-2	Summary of gross findings of pups(F1) from rats (sacrificed, female)	T-40

1. 要約

既存化学物質の毒性学的性質を評価するため、*N,N*-ジエチル-*m*-トルアミドの0(溶媒のコーンオイルのみ投与)、60、200 および 600 mg/kg/day をラットの交配前14日から交配期間、妊娠期間および哺育4日まで連続強制経口投与し、反復投与毒性および生殖・発生に及ぼす影響を検討した。

その結果は次のように要約される。

1) 反復投与毒性

死亡動物は雌雄のいずれの投与群でも認められなかった。一般状態の変化として、雌雄の600 mg/kg 群で投与後に一過性の流涎が観察された。雌の600 mg/kg 群で哺育期間に自発運動低下、筋力低下および眼瞼下垂が観察され被験物質投与による中枢抑制作用が疑われた。体重では、雌の600 mg/kg 群で妊娠期間の後半以降に体重増加抑制が認められた。摂餌量には雌雄とも被験物質投与の影響は認められなかった。血液学検査では被験物質投与に起因した変化は認められなかった。血液生化学検査では雌雄の200 mg/kg 以上の投与群で総コレステロールの高値、雌の600 mg/kg 群で血糖の高値が認められた。雄の尿検査では60 mg/kg 以上の投与群で尿量の増加が認められ、200 mg/kg 以上の投与群で尿pHが弱酸性を示した。病理学検査(剖検および器官重量)では、雄の60 mg/kg 以上および雌の200 mg/kg 以上の投与群で肝臓の肥大、雄の60 mg/kg 以上の投与群で腎臓の肥大が観察された。組織学検査では雌雄とも肝臓の肝細胞肥大が観察され、関連する変化として甲状腺の濾胞上皮細胞増生が観察された。雄で腎臓の近位尿細管に $\alpha_2\mu$ グロブリン沈着による硝子滴沈着の増強が観察された。また、雄の600 mg/kg 群で大腸(盲腸、結腸、直腸)の杯細胞減少が観察され、被験物質投与の影響が示唆された。他には、副腎の球状帯肥大が観察された。

2) 生殖発生毒性

性周期、交尾能および受胎能に被験物質投与の影響は認められなかった。分娩および哺育状態の異常は観察されず、妊娠期間、妊娠黄体数、着床数、出産児数、出生児数、出生率および性比にも被験物質投与の影響は認められなかった。出生児の体重変化および生存率に被験物質投与の影響は認められなかった。新生児の外表検査、死亡児および哺育4日の剖検では、被験物質投与の影響と考えられる異常所見は認められなかった。

以上のことから、*N,N*-ジエチル-*m*-トルアミドの本試験条件下における無影響量は雄では 60 mg/kg/day 未満、雌では 60 mg/kg/day と判断された。

生殖能に及ぼす影響は雌雄ともに認められず無影響量は 600 mg/kg/day と判断された。児動物の発生に及ぼす影響も特に認められず無影響量は 600 mg/kg/day と判断された。

2. 緒言

N,N-ジエチル-*m*-トルアミドは別名 DEET と呼ばれ、蚊、ブヨなどの害虫忌避剤としてヒトあるいは動物に広く用いられている。

本化合物については種々の安全性試験が実施されている¹⁾。急性毒性については、ラットの経口投与による LD₅₀ 値が 2170~3664 mg/kg、ウサギの経皮投与による LD₅₀ 値が 4280 mg/kg と報告されている。また、癌原性および変異原性等を示すデータはなく、一般に安全な化合物と考えられている。

今回、OECD による既存化学物質の安全性点検に係る毒性調査事業の一環として *N,N*-ジエチル-*m*-トルアミドの生殖・発生毒性について検討したのでその結果を報告する。

14. 試験材料および方法

14.1. 被験物質

N,N-ジエチル-*m*-トルアミド (CAS No. 134-62-3, 製造, Lot No. 純度 99.4 wt%, 分子量 191.27) は無色透明の液体であり, 使用時まで被験物質保管庫に保存した. *N,N*-ジエチル-*m*-トルアミドの品質について分析した結果は, Reference data 1 に示した. 被験物質はコーンオイル (ナカライテスク株式会社, Lot No. V2M8974) に溶解し, 調製した. 被験物質のコーンオイルでの安定性は, 5 および 400 mg/mL の濃度について調製後, 7 日間冷蔵 (約 4°C) 保存後室温放置 24 時間は安定であることが当センターにおいて確認されている [試験番号: 6394 (115-165)]. したがって, 投与液は投与まで冷暗所に保存し, 調製後 7 日以内に使用した.

投与液の濃度分析は, 初回および最終調製時に調製した全ての試験群の投与液について行った. その結果, 表示濃度に対し初回調製時で 104.0~104.2%, 最終調製時で 99.7~100.8%であった (Reference data 2). したがって, 投与液にはほぼ所定量の *N,N*-ジエチル-*m*-トルアミドが含有されていることが確認された.

投与終了後に製造元に返却した被験物質について, 製造元で再分析した結果, 純度は 99.4 wt%であり, 被験物質は投与期間中安定であったことが確認された (Reference data 3).

14.2. 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 (厚木飼育センター) から購入した生後 8 週齢の CD(SD)IGS [SPF] 系雌雄ラットを使用した. 購入した動物は 7 日間検疫・馴化飼育した後, 体重推移および一般状態に異常が認められなかったものを選出し予備飼育に移行した.

動物は, 温度 24±3°C (実測値: 22.1~25.8°C), 湿度 55±20% (実測値: 39~75%), 換気回数 15 回/時間, 照度 150~300 lx, 照明時間 12 時間 (午前 7 時点灯, 午後 7 時消灯) に設定されたバリアシステムの 505 号飼育室 (W 5.7×D 10.0×H 2.5 m, 142.5 m³) で飼育した. 株式会社東京技研サービスの自動水洗式飼育機を使用し, アルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ (W 15.8×D 23.8×H 16.0 cm, 飼育ケージ・スペース 6017 cm³) に動物を 1 匹ずつ収容し飼育した. ただし, 雄は交配期間中, アルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ (W 36.8×D 25.0×H 16.0 cm, 飼育ケージ・ス

ペース 14720 cm³) に収容した。妊娠 18 日以降の母動物は哺育 4 日までアルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ (W 36.8 × D 25.0 × H 16.0 cm) に哺育トレーおよび日本チャールス・リバー株式会社製の巣作り材料 (サンフレーク) を入れて飼育した。

飼育ケージは隔週 1 回、給餌器は週 1 回交換した。

飼料は、オリエンタル酵母工業株式会社製造の CRF-1 固型飼料 (放射線滅菌飼料 ; Lot No. 020906, 021105) を使用し、飼育期間中自由に摂取させた。本試験に用いた飼料の汚染物質の分析は、ロット番号毎に財団法人日本食品分析センターで実施した。その結果、日本実験動物飼料協会案の許容基準値内であることを確認した。分析結果は Reference data 4 に示した。

飲水は、水道水を給水ノズルより自由に摂取させた。水道水の水質については、水道法に基づく検査を 3 ヶ月に 1 回、株式会社エコプロ・リサーチで実施した。その結果、SOP に記載されている上水道水質基準 (平成 4 年 12 月 21 日厚生省令第 69 号) の基準値内であることを確認した。検査結果は Reference data 5 に示した。

したがって、飼育期間中、データの信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因の変化はなかった。

14.3. 群分け・個体識別

群分けは雌雄ともに検疫・馴化期間終了後、8 日間予備飼育した後に 10 週齢で行った。ただし、雌は群分け前に 8 日間の性周期観察を行い、正常な性周期を有する動物を群分けに用いた。

群分け時の動物の体重は群分け対象外の動物を含めた平均体重の 20% 以内に収まっており、群分け終了時の体重は、雄で 332~389 g, 雌で 204~250 g の範囲であった。投与開始日の体重を基に無作為抽出法により 1 群当たり雌雄各 12 匹を振り分けた。群分け後の動物の識別は耳介に群番号および群内番号を入墨すると共にケージに動物標識番号 (Animal ID-No.) をつけた。

ただし、群分け前までは仮動物番号により管理した。

余剰動物は炭酸ガスにより安楽死させた。

14.4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

本被験物質のラットを用いた急性経口毒性試験 (試験番号 6394) では、LD₅₀ 値は雌雄ともに 2000 mg/kg 以上と推定された。この試験結果を参考にして、0, 30, 100, 300 および 1000 mg/kg の用量で予備試験「N,N-ジエチル-m-トルアミド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-2週間投与予備試験(試験番号6395)」を実施した。その結果、雌の1000 mg/kg群では投与3日に1/6例が死亡した。一般状態の観察では、雌雄とも主な変化として300 mg/kg以上の投与群で流涎が観察された。体重、摂餌量、血液学および血液凝固能検査には明らかな被験物質投与の影響は認められなかった。血液生化学検査では雌の300 mg/kg以上の投与群で総コレステロールの高値が認められた。さらに、雌の1000 mg/kg群ではトリグリセリド、 γ -GTP およびカルシウムの高値、BUN およびクレアチンの低値が認められた。剖検では1000 mg/kg群の雄で肝臓の暗色化、雌で肝臓の肥大が観察され、器官重量では雌雄の1000 mg/kg群および雌の300 mg/kg群で、肝臓重量の高値が認められた。他にも雌では300 mg/kg以上の投与群で脾臓重量の低値、1000 mg/kg群で腎臓重量の高値が認められた。

以上のことから、本試験では予備試験に比べ投与期間が延長されることを考慮して、600 mg/kgを高用量に設定し、以下公比約3で除し、200および60 mg/kgを中および低用量とした。

投与経路は、OECDガイドライン422で指示されている投与経路に準じて強制経口投与とした。

投与容量は、体重100 g当たり0.5 mLとし、交配前および交配期間中の雌雄では、個体別に測定した最新体重に基づいて算出した。また、妊娠期間および哺育期間中の雌は、妊娠0, 7, 14, 20および哺育0日に測定した個体別体重に基づいて算出した。投与液は、胃ゾンデを用いて1日1回午前8時40分~11時59分に強制経口投与した。対照群にはコーンオイルのみを投与した。

投与期間は、雄は交配前14日間と交配期間14日間および交配期間終了後20日間の連続48日間とした。雌は交配前14日間と交配期間中(最長14日間)および交尾成立雌は妊娠期間を通じて分娩後の哺育4日まで(42~56日間)とした。また、交尾成立後分娩しない雌は妊娠25日の解剖前日まで(40日間)とした。

15. 観察, 測定および検査

15.1. 一般状態の観察

雌雄とも, 飼育ケージ越しに動物の外観, ケージ内での行動, 姿勢を観察するとともに動物の体全体を触診し, 筋の緊張および体表温度の異常を把握した. 全例について試験期間中毎日 2 回以上 (剖検日は 1 回) 行い, 異常および死亡の有無を記録した.

15.2. 体重

雄は投与 1 (投与開始日), 8, 15, 22, 29, 36, 43, 48 および 49 日 (剖検日) に測定し, 投与 1 から 48 日までの体重増加量を算出した.

雌は投与 1 (投与開始日), 8 および 15 日に測定し, 投与 1 から 15 日までの体重増加量を算出した. また, 交尾成立後の雌は, 妊娠 0, 7, 14 および 20 日に, 分娩した雌は哺育 0, 4 および 5 日 (剖検日) に測定し, それぞれ妊娠 0 から 20 日および哺育 0 から 4 日までの体重増加量を算出した. 測定は電子天秤 PG2002-S (メトラー・トレド社) を用いて行い, 記録した.

15.3. 摂餌量

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

また, 交尾が成立した雌は妊娠 0, 7, 14 および 20 日に, 分娩した雌は哺育 0 および 4 日に餌重量を測定し, 測定日から次の測定日までの摂餌量を求め平均 1 日摂餌量を算出するとともに妊娠 0 から 20 日までの累積摂餌量を算出した.

測定は電子天秤 PG2002-S (メトラー・トレド社) を用いて行い, 記録した. なお, 交配期間中の同居動物は摂餌量を測定しなかった.

15.4. 交配

交配は交配前 14 日間の性周期観察を行った雌と同群内の雄を 1 対 1 で最長 2 週間毎晩同居させ, 翌朝, 膣栓または膣垢中の精子確認をもって交尾成立とし, その日を妊娠 0 日とした.

性周期観察は交尾成立日まで行い, 発情期から次の発情期までの間の日

数を性周期日数として平均性周期を算出した。また、性周期観察期間中の異常性周期（4または5日以外の性周期）発現率〔(異常性周期を示す雌動物数/観察雌動物数)×100〕を算出した。

交配結果から各群について交尾率〔(交尾成立動物数/同居動物数)×100〕を算出した。

15.5. 自然分娩時および出生児の観察

15.5.1. 母体の観察

妊娠動物は全て自然分娩させた。

自然分娩時に分娩状態の観察を行った。分娩の確認を妊娠 20 から 25 日の午前 8 時 30 分～10 時の間に行い、この時間帯に分娩が完了していることを確認した動物および分娩を開始した動物は分娩完了まで待ち、その日を哺育 0 日とした。午前 10 時を過ぎて分娩を開始した場合は翌日を哺育 0 日とした。また、妊娠期間（哺育 0 日の年月日から妊娠 0 日の年月日減じた日数）、受胎率〔(受胎動物数/交尾成立動物数)×100〕、出産率〔(生児出産雌数/妊娠雌数)×100〕、着床率〔(着床痕数/妊娠黄体数)×100〕、分娩率〔(総出産児数/着床痕数)×100〕、出生率〔(出產生児数/総出産児数)×100〕を算出した。妊娠 25 日の午前 9 時までには分娩のみられない動物は病理解剖し、着床痕の認められない場合（動物番号 2007, 2209）、妊娠不成立と判定した。哺育 5 日に母動物は病理解剖し、黄体数および着床痕数を調べ肉眼的に異常の有無を調べた。

15.5.2. 出生児（F1）の観察

出産後、出産児数（生存児+死亡児）を調べ、出生児の性別を判定し、性比（雄/雌）を算出した。また、外表異常の有無を調べた。また、出生児の体重は、哺育 0 および 4 日に雌雄個別別に電子天秤 PG2002-S（メトラートレド社）を用いて測定し、1 腹の雌雄別平均体重を算出した。

出生児は哺育 4 日に全例をエーテル麻酔下で放血安楽死させ、器官・組織の肉眼観察を行った。また、哺育期間中の死亡児はブアン液に固定し、器官・組織の肉眼観察を実施した。また、出生児の 4 日生存率〔(哺育 4 日生児数/出產生児数)×100〕を算出した。

15.6. 臨床検査

血液学検査、血液凝固能検査および血液生化学検査は雄および自然分娩した雌の剖検時（雄：投与 49 日、雌：哺育 5 日）に各群の全例について実施した。採血するに当たり、動物は約 16 時間絶食させた。

動物をエーテルで麻酔後開腹し、腹部大動脈から採血した。ただし、動物番号 2103 は採血時に過麻酔したため、血液学および血液凝固能検査用サンプルの採取ができず、検査が実施できなかった。

15.6.1. 血液学検査

抗凝固剤 (EDTA-2K) 入り採血管インセパック-E (積水化学工業株式会社) に新鮮血を採取し、総合血液学検査装置 ADVIA120 (バイエル社) を用いて白血球数 (WBC: フローサイトメトリー), 赤血球数 (RBC: 暗視野板法), ヘモグロビン量 (HGB: シアンメトヘモグロビン法), ヘマトクリット値 (HCT: RBC, MCV より算出), 平均赤血球容積 (MCV: 暗視野板法), 平均赤血球色素量 (MCH: HGB, RBC より算出), 平均赤血球色素濃度 (MCHC: HGB, HCT より算出), 血小板数 (PLT: 暗視野板法), 白血球百分率 (フローサイトメトリー) および網赤血球率 (Reticulocyte: RNA 染色法) を測定した。

白血球百分率は前述の機器で測定したが、別途血液塗抹標本を作製し、メイ・グリュンワルド・ギムザ染色して保存した。

15.6.2. 血液凝固能検査

抗凝固剤 (3.13%クエン酸ナトリウム水溶液) 入り採血管ベノジェクトII (テルモ株式会社) に血液を採取した後、3000 r.p.m. で 13 分間遠心分離して得た血漿を検査に用いた。全自動血液凝固線溶測定装置 STA Compact (ロシュ社) を用いてプロトロンビン時間 (PT: 粘度変化検知方式) および活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT: 粘度変化検知方式) を測定した。

15.6.3. 血液生化学検査

採血管インセパック SQ (積水化学工業株式会社) に血液を採取した後、3000 r.p.m. で 7 分間遠心分離して得た血清を検査に用いた。多項目生化学自動分析装置日立 7170 (株式会社日立製作所) を用いて総蛋白 (T. protein: Biuret 法), アルブミン (Albumin: BCG 法), A/G (計算値), 血糖 (Glucose: HK-G-6-PDH 法), 中性脂肪 (Triglyceride: GK-GPO 遊離グリセロール消去法), 総コレステロール (T. cholesterol: コレステロールオキシダーゼ HDAOS 法), 尿素窒素 (BUN: ウレアーゼ GLDH 法), クレアチニン (Creatinine: 酵素法), 総ビリルビン (T. bilirubin: バナジン酸酸化法), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST: 酵素-UV 法), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT: 酵素-UV 法), アルカリホスファターゼ (ALP: P-ニトロフェニルリン酸基質法), γ -グルタミルトランスペプチダーゼ

(Gamma-GTP : L- γ -グルタミル-3-カルボキシ-4-NA 法), カルシウム (Calcium : MXB 法), 無機リン (I. phosphorus : PNP-XDH 法) および総胆汁酸 (T. bile acid : 酵素サイクリング法) を, 電解質測定装置 EA06R (株式会社エイアンドティー) を用いてナトリウム (Sodium : イオン選択電極法), カリウム (Potassium : イオン選択電極法) および塩素 (Chloride : イオン選択電極法) を測定した.

15.6.4. 尿検査

投与期間終了週に, 各群それぞれ 5 例 (動物番号 1001~1005, 1101~1105, 1201~1205, 1301~1305) の雄動物について検査を行った.

給餌・給水の条件下で採尿ケージを用いて 3 時間尿 (午前 10 時から午後 1 時まで, ただし動物番号 1104 は午後 5 時 28 分まで) および 24 時間尿 (午前 10 時から翌日午前 10 時まで) を採取した.

3 時間尿を用いて pH, 潜血, 糖, 蛋白, ケトン体, ビリルビンおよびウロビリノーゲンを検査した. 検査には N-マルティスティックス SG (バイエル メディカル株式会社) を用い, 判定は尿分析装置 CLINITEK500 (バイエル社) で行った.

24 時間尿を用いて尿量 (計量) および色調 (目視) を検査した後, 尿を室温, 1500 r.p.m. で 5 分間遠心し, 上清および残渣に分離した. 上清を用いて Auto&stat OM-6030 (株式会社アークレイファクトリー) で尿浸透圧 (氷点降下法) を測定した.

15.7. 病理学検査

15.7.1. 剖検および器官重量

解剖では動物の外観, 口腔, 鼻孔および頭蓋腔, 骨格, 脳および脊髄の外観と切断面, 胸腔, 腹腔および骨盤腔とその内臓, 頸部の組織および器官を検査した. 生殖器官については, 特に注意を払い検査した. 全ての肉眼的異常について, 部位, 大きさ, 硬さなどを記録した.

器官重量は, 器官重量測定用自動天秤 PE360 (メトラー・トレド社) を用いて測定し, その数値を記録した. 重量を測定した器官については, 器官重量/体重比 (相対重量) を得られた剖検日の体重および器官重量から算出した [(器官重量/剖検日の体重) \times 100].

①雄動物

48 日間投与後, 夕刻から約 16 時間絶食させた後エーテル麻酔下で採血安楽死させた. 器官・組織の肉眼観察を行った後, 脳, 胸腺, 肝臓, 腎臓,

脾臓, 副腎, 精巣および精巣上体重量を測定した. また, 全動物について皮膚, 乳腺, リンパ節, 大腿骨, 胸骨, 骨髄, 胸腺, 気管, 肺 (気管支を含む), 心臓, 舌, 甲状腺, 上皮小体, 食道, 胃, 十二指腸, 小腸, 大腸, 肝臓, 膵臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 膀胱, 精嚢, 前立腺, 脳, 下垂体, 脊髄, 眼球, ハーダー腺, 坐骨神経および肉眼で異常病変が認められた器官・組織を 10 vol% 中性緩衝ホルマリン液に, 精巣および精巣上体をブアン液で前固定した後, 10 vol% 中性緩衝ホルマリン液に固定した.

②自然分娩した雌

哺育4日の投与後, 夕刻から約16時間絶食させた後エーテル麻酔下で採血安楽死させた. 器官・組織の肉眼観察を行った後, 脳, 胸腺, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎および卵巣重量を測定し, 相対重量を算出した. また, 全動物について皮膚, 乳腺, リンパ節, 大腿骨, 胸骨, 骨髄, 胸腺, 気管, 肺 (気管支を含む), 心臓, 舌, 甲状腺, 上皮小体, 食道, 胃, 十二指腸, 小腸, 大腸, 肝臓, 膵臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 膀胱, 卵巣, 子宮, 膣, 脳, 下垂体, 脊髄, 眼球, ハーダー腺, 坐骨神経および肉眼で異常病変が認められた器官・組織を 10 vol% 中性緩衝ホルマリン液に固定した. なお, 剖検時に黄体数および着床痕数を調べた.

③自然分娩の認められない雌 (動物番号 2007, 2209)

妊娠25日に, エーテル麻酔下で放血安楽死させ, 器官・組織の肉眼観察を行った後, ②に示した全ての固定器官を同様に固定した. いずれの動物も子宮内に着床痕が認められなかったため妊娠不成立と判定した.

④全児死亡の認められた雌 (動物番号 2310)

生存児全ての死亡が確認された日 (哺育2日) にエーテル麻酔下で放血安楽死させ, 器官・組織の肉眼観察を行った後, ②に示した全ての固定器官を同様に固定した. なお, 剖検時に黄体数および着床痕数を調べた.

15.7.2. 病理組織学検査

下記に該当する動物について病理組織学検査を実施した.

組織は常法に従ってパラフィン切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン染色した. 鏡検では病変の種類, 程度について記録した.

なお, ②および④の精巣については PAS・ヘマトキシリン染色およびヘマトキシリン・エオジン染色した後, ヘマトキシリン・エオジン染色標本で一般的病変を検査し, PAS・ヘマトキシリン染色標本で精子形成サイクル (VIIまたはVIII) を検査²⁾し, 腎臓については α_{2u} グロブリン免疫染色実施し鏡検した. ①の肝臓および腎臓については空胞の識別を行うためズダンIII

染色を実施し鏡検した。

①全児死亡動物（動物番号 2310）

全固定器官。ただし、上皮小体については組織標本作製時に紛失したため組織学検査が実施できなかった。

②妊娠を成立させた雄

対照群と高用量群の各 5 例（動物番号 1001～1005, 1301～1305）の全固定器官およびそれ以外の異常病変部組織（肺：動物番号 1006, 肝臓：動物番号 1012, 1108, 1109, 1211, 1212, 1306, 1307, 1308, 1309, 1310, 1311, 腎臓：動物番号 1108, 1112, 1206, 1208, 1210, 1211, 1306, 1307, 1308, 1309, 1310, 1311, 脾臓：動物番号 1108, 精巣および精巣上体：動物番号 1308, リンパ節：動物番号 1310）。

③自然分娩した雌

対照群と高用量群の各 5 例（動物番号 2001～2005, 2301～2305）の全固定器官およびそれ以外の異常病変部組織（肝臓：動物番号 2306, 2309, 卵巣：動物番号 2112）。

④妊娠を成立させなかった雄（動物番号 1007, 1209）および妊娠不成立の雌（動物番号 2007, 2209）

雄は精巣, 精巣上体, 精嚢, 前立腺および異常病変部組織（肝臓：動物番号 1209）。雌は膣, 子宮および卵巣。

また、②については高用量群の大腸, 肝臓, 腎臓, 甲状腺および副腎に被験物質投与の影響が疑われたため、これらの器官については低および中用量群も各 5 例ずつ検査を実施した。③については高用量群の肝臓, 甲状腺および副腎, 全児死亡動物の小腸, 大腸および腎臓に被験物質投与の影響が疑われたため、これらの器官については低および中用量群も各 5 例ずつ検査を実施した。

15.8. 統計解析

体重, 体重増加量, 摂餌量, 累積摂餌量, 平均性周期, 黄体数, 着床痕数, 妊娠期間, 出産児数, 死産児数, 性比, 着床率, 出生率, 分娩率, 外表異常発現率, 出生児の 4 日生存率, 血液学検査値, 血液凝固能検査値, 血液生化学検査値, 尿検査値（尿量および尿浸透圧）, 器官重量および相対重量については自動判別方式³⁾に従い、最初に Bartlett の等分散検定⁴⁾を実施した。等分散の場合は Dunnett の多重比較検定⁵⁾で対照群と各投与群間の有意差を検定した。Bartlett の等分散検定で不等分散の場合は Steel の検定⁶⁾

で対照群と各投与群間の有意差を検定した。

出産率、交尾率および受胎率については χ^2 検定を用いた。

異常性周期発現率、剖検所見および病理組織所見の発生率については Fisher の直接確率検定法⁷⁾で検定した。

病理組織所見のうち程度の増強が認められた所見は-を「1」、+1を「2」、+2を「3」、+3を「4」に割り当てて Mann-Whitney の U 検定を実施した。

有意水準は Bartlett の等分散検定については 5%、その他の検定は 5%および 1%の両側検定で実施した。

ただし、供試動物数が 1 群につき 2 例以下の場合、有意差検定は行わなかった。

なお、哺育期間中の出生児に関する成績は 1 母体当たりの平均を 1 標本として集計した。

16. 試験結果

16.1. 親動物 (F0) に及ぼす影響

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

死亡動物は雌雄のいずれの投与群にも認められなかった。

一般状態の変化として、雄では流涎が 200 および 600 mg/kg 群でそれぞれ 1 および 12 例 (全例) に観察された。その他、発現頻度から自然発生性と考えられる所見として、眼分泌物が 60 および 200 mg/kg 群で各 1 例、外傷が 200 mg/kg 群で 1 例に観察された。

雌では投与期間を通じて、流涎が 600 mg/kg 群で 8 例に観察された。ただし、流涎が認められた 8 例中 1 例は交配前期間のみの発現であった。哺育期間では、哺育 4 日 (最終投与後) に 600 mg/kg 群で 1 例に眼瞼下垂および筋力低下、他の 1 例に自発運動低下および筋力低下が認められた。また、全児死亡が 600 mg/kg 群の 1 例で哺育 2 日に認められた。この動物では、哺育 1 または 2 日あるいは両日にかけて自発運動低下、よろめき歩行、眼瞼下垂、泌尿生殖器出血、削瘦、被毛の汚れおよび軟便が認められた。その他、発現頻度から自然発生性と考えられる所見として妊娠期間に流涎が対照群で 1 例、投与期間を通じ結節 (口唇部) が 600 mg/kg 群で 1 例に観察された。

雌雄に共通して認められた流涎は、多くは投与後 30~60 分の間にのみ発現が観察された。まれに雌の少数例で投与前から流涎の発現が観察された。

16.1.2. 体重 (Figure 1~2, Table 2-1~2-2, Appendix 2-1~2-2)

雄では、投与期間を通じて、対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

雌では、対照群に比べ 600 mg/kg 群で妊娠期間後半 (妊娠 14 日以降) に低値傾向が認められ、妊娠 0 から 20 日の体重増加量も低値傾向を示した。600 mg/kg 群では妊娠期間に継続して哺育期間でも体重値が対照群に比べ低値傾向を示したが、哺育期間中の体重増加量には差は認められなかった。

16.1.3. 摂餌量 (Figure 3~4, Table 3-1~3-2, Appendix 3-1~3-2)

雌雄ともに、投与期間を通じて対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

16.1.4. 臨床検査

16.1.4.1. 血液学検査 (Table 4-1~4-2, 5-1~5-2, Appendix 4-1~4-2, 5-1~5-2)

雄の血液学検査では、対照群に比べ 200 mg/kg 群で平均赤血球血色素濃度が有意な低値、大型非染色細胞比率が有意な高値を示した。しかし、いずれも用量との関連性が明らかではなく被験物質投与と関連しない変化と考えられた。600 mg/kg 群では血小板数が有意な高値を示したが、軽微な変化であり毒性学的意義はないと判断した。

雌の血液学検査では、いずれの検査項目にも対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

血液凝固能検査では、雌雄ともにいずれの検査項目にも対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

16.1.4.2. 血液生化学検査 (Table 6-1~6-2, Appendix 6-1~6-2)

雄では、総コレステロールが対照群に比べ 200 mg/kg 群で高値傾向、600 mg/kg 群で有意な高値を示した。その他、カルシウムが 200 mg/kg 群で高値を示したが、用量に対応しない軽微な変化であった。

雌では、総コレステロールが対照群に比べ 200 および 600 mg/kg 群で有意な高値、血糖が 600 mg/kg 群で高値を示した。

16.1.4.3. 尿検査 (Table 7, Appendix 7)

24 時間の尿量が対照群に比べ 60 および 200 mg/kg 群で高値傾向、600 mg/kg 群で有意な高値を示した。色調は全ての動物が淡黄色であった。pH は対照群が 8.5 近辺であるのに対し用量の増加に伴い 6.5~7 付近に変化した。尿糖、蛋白、ケトン体、ビリルビンおよびウロビリノーゲンに被験物質投与による変化は認められなかった。尿浸透圧は対照群に比べ被験物質投与群で低値傾向を示した。潜血では 200 mg/kg 群の 1 例が重度 (3+) を示したが、この動物 (動物番号 1202) は採尿日の投与後に前肢の外傷が認められていたため、外傷からの出血が尿中に混入した可能性が考えられた。

16.1.5. 病理学検査

16.1.5.1. 器官重量 (Table 8-1~8-2, Appendix 8-1~8-2)

雄では、対照群に比べ 200 および 600 mg/kg 群で肝臓および腎臓の実重量および相対重量が有意な高値を示した。脾臓については、60 mg/kg 群で相対重量、600 mg/kg 群で実重量および相対重量が高値を示した。

雌では、600 mg/kg 群で胸腺の実重量および相対重量が低値、副腎の実重

量が高値傾向、相対重量が高値を示した。200 および 600 mg/kg 群で肝臓の実重量および相対重量が高値を示した。

16.1.5.2. 剖検所見 (Table 9-1~9-5, Appendix 9-1~9-2)

妊娠を成立させた雄では、肝臓の肥大が 60, 200 および 600 mg/kg 群でそれぞれ 3, 4 および 11 例、腎臓の肥大がそれぞれ 3, 9 および 11 例に観察された。対照群に比べ 200 および 600 mg/kg 群では両所見の発現数が有意な高値を示した。その他、脾臓の変形、リンパ節の肥大、肺の褐色斑/区域、肝臓の萎縮、肝横隔膜結節、精巣の小型化、精巣上体の結節および小型化がいずれも単発性に観察された。

対照群および 200 mg/kg 群の妊娠を成立させなかった雄各 1 例 (動物番号 1007, 1209) では、肝臓の肥大が 200 mg/kg 群で観察された。

哺育 5 日に計画解剖した雌では、肝臓の肥大が 600 mg/kg 群で 4 例に観察され、対照群に比べ発現数が有意な高値を示した。その他、600 mg/kg 群で肝臓の白色斑/区域、子宮の結節および皮膚の結節が各 1 例、60 mg/kg 群で卵巣の嚢胞が 1 例に観察された。いずれも発現頻度から被験物質投与とは関連しない変化と考えた。

対照群および 200 mg/kg 群の妊娠不成立の雌各 1 例 (動物番号 2007, 2209) では、200 mg/kg 群で子宮の内腔拡張が認められた。

全児死亡の認められた 600 mg/kg 群の 1 例 (動物番号 2310) では、肝臓の白色斑/区域、腎臓の赤色斑/区域、膀胱の赤色内容物貯留、子宮の内膜肥厚、腔の赤色内容物貯留および副腎の肥大が観察された。

16.1.5.3. 組織所見 (Table 10-1~10-6, Appendix 10-1~10-3)

妊娠を成立させた雄では、肝臓の肝細胞肥大 (軽度または中等度) (Photo 1, 2) が 60, 200 および 600 mg/kg 群でそれぞれ 5/7, 5/7 および 11/11 例に観察され、対照群に比べ全ての投与群で発現数が有意な高値を示すとともに、程度の増強が認められた。甲状腺の濾胞上皮細胞増生 (Photo 3, 4) が 60, 200 および 600 mg/kg 群でそれぞれ 2/5, 3/5 および 5/5 例、大腸 (盲腸, 結腸, 直腸) の杯細胞減少 (Photo 5, 6) が 600 mg/kg 群で 5/5 例に観察され、いずれも対照群に比べ 600 mg/kg 群で発現数が高値を示した。腎臓の尿細管好塩基化は 200 mg/kg 以上の投与群で中等度、近位尿細管の硝子滴沈着 (Photo 7, 8) は 60 mg/kg 以上の投与群で中等度、200 mg/kg 以上の投与群では高度の病変であった。腎臓の近位尿細管の硝子滴沈着は、対照群に比べ 200 mg/kg 以上の投与群で有意な程度の増強が認められた。また、

副腎の球状帯肥大 (Photo 9, 10) が 600 mg/kg 群で 1 例ではあるが観察された。その他、心臓の小肉芽腫、脾臓の色素沈着および髄外造血亢進、胸腺の嚢胞、肺の泡沫細胞集簇、小肉芽腫および骨化生、胃の腺腔拡張、膵臓外分泌部の小肉芽腫、肝臓の水腫、脂肪化、巣状壊死、単細胞壊死、動脈炎、小肉芽腫、肝横隔膜結節および胆管増生、腎臓の硝子円柱、尿細管拡張およびリンパ球浸潤、膀胱のリンパ球浸潤、精巣上体の精子肉芽腫、前立腺のリンパ球浸潤および炎症が観察された。

自然分娩した雌では、肝臓の肝細胞肥大が 200 mg/kg 群で軽度が 1 例、600 mg/kg 群で軽度が 4 例および中等度が 3 例に観察され、600 mg/kg 群で有意な発現数の高値および程度の増強が認められた。さらに、副腎の球状帯肥大が 600 mg/kg 群で 1 例に観察された。また、600 mg/kg 群で一般状態の異常として 1 例に認められた口唇部の結節は、扁平上皮乳頭腫であった。その他、脾臓の髄外造血亢進、肺の泡沫細胞集簇、炎症および小肉芽腫、胃の小肉芽腫、膵臓外分泌部の小肉芽腫、大腸の細胞浸潤、肝臓の脂肪化、肝細胞壊死、小肉芽腫および髄外造血、腎臓の尿細管好塩基化、嚢胞、尿細管拡張、石灰沈着および線維化、卵巣の嚢胞、下垂体の嚢胞、甲状腺の濾胞上皮細胞増生および鰓後体遺残、副腎の束状帯肥大が観察された。

対照群および 200 mg/kg 群で各 1 組の妊娠を成立させなかった雄および妊娠不成立の雌では、雄の対照群で前立腺の間質細胞浸潤、200 mg/kg 群で肝臓の小肉芽腫および肝細胞肥大、雌の 200 mg/kg 群で子宮および膣の内腔拡張が観察された。しかし、妊娠不成立となる変化は認められなかった。

全児死亡の認められた雌 (動物番号 2310) では、妊娠を成立させた雄あるいは自然分娩した雌で観察された所見と関連する変化として、大腸 (盲腸、結腸、直腸) の上皮細胞好塩基化および杯細胞減少、小腸 (回腸) の上皮細胞好塩基化、小腸 (十二指腸、回腸) の絨毛癒合 (Photo 11)、肝臓の肝細胞肥大 (中等度) が観察された。その他、骨髓の造血低下、胸腺の萎縮、肺の泡沫細胞集簇、胃の腺腔拡張、肝臓の脂肪化 (中等度) および複数葉にわたる肝細胞壊死 (中等度)、腎臓の尿細管上皮の空胞変性 (高度) (Photo 12)、円柱 (中等度)、石灰沈着、尿細管上皮壊死、副腎の束状帯肥大が観察された。なお、腎臓について実施した α_{2u} グロブリン免疫染色およびズダン III 染色の結果はいずれも陽性であった。剖検時に観察された子宮の内膜肥厚の組織像は正常な分娩後の子宮であったが、胎児の遺残が観察された。

対照群および 600 mg/kg 群の妊娠を成立させた雄各 5 例、対照群および

200 mg/kg 群で妊娠を成立させなかった雄（動物番号 1007, 1209）および 600 mg/kg 群で精巣に異常（小型化）が認められた雄（動物番号 1308）の精巣についてステージVII～VIIIの精細管の精上皮細胞数を測定した結果、精祖細胞（type A）、プレプトテン期精母細胞、パキテン期精母細胞、円形精子細胞およびセルトリ細胞数はいずれも対照群と同程度であり、被験物質投与の影響は認められなかった。

16.2. 生殖発生毒性

16.2.1. 交尾および受胎能（Table 11, Appendix 11-1～11-2）

交尾は対照群を含む全ての投与群で全例が成立した。受胎は対照群および 200 mg/kg 群で各 1 例が成立せず受胎率はそれぞれ 91.7%，他の群ではいずれも 100%であった。

性周期観察では、異常性周期を示す動物が対照群、60 および 600 mg/kg 群で各 1 例に認められたが、異常性周期発現率に差は認められず、平均性周期にも対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

16.2.2. 分娩および哺育（Table 12, Appendix 12）

対照群を含むいずれの投与群でも分娩状態に異常は観察されなかった。各群の妊娠期間、黄体数、着床痕数、出産児数および出産生児数はほぼ同様な値を示し、出産率、着床率、分娩率、出生率、性比および生後 4 日生存率に群間差は認められなかった。哺育 0 日に死亡児が対照群および 600 mg/kg 群で観察され、また、喰殺児が 600 mg/kg 群で観察された。

16.2.3. 新生児の形態、体重および剖検所見（Table 13, 14, 15-1～15-2, Appendix 13, 14, 15-1～15-2）

新生児の外表検査では、索状尾が対照群の雄で 1 例、眼部隆起欠損が 60 mg/kg 群の雌で 1 例に認められた。

体重変化では、哺育 0 および 4 日とも対照群と被験物質投与群との間で差は認められなかった。

哺育期間中の死亡児の剖検では、腎盂拡張が 200 および 600 mg/kg 群の雄でそれぞれ 1 および 3 例で認められた（Table, Appendix には示していない）。

哺育 4 日の剖検では、腎盂拡張が対照群、60, 200 および 600 mg/kg 群の雄でそれぞれ 5, 5, 9 および 3 例、雌でそれぞれ 4, 1, 3 および 2 例、尿管拡張が雄で 4, 0, 5 および 6 例、雌で 3, 0, 1 および 0 例に観察された。

しかし、両所見とも発現数に用量関連性がなく、対照群と被験物質投与群

との間に有意差も認められないことから自然発生性の変化と考えられた。
その他、肝臓の結節が 200 mg/kg 群の雌雄で各 1 例、索状尾が対照群の雄
で 1 例、肺の褐色斑／区域が対照群の雌で 1 例、眼球の欠損および皮膚の
痂皮が 60 mg/kg 群の雌で各 1 例に観察された。

17. 考察および結論

17.1. 反復投与毒性

死亡例は試験期間を通じ雌雄いずれの投与群でも認められなかった。

雌雄の 600 mg/kg 群で多数例、雄の 200 mg/kg 群で 1 例に流涎が観察された。流涎は投与後 30～60 分にのみ一過性に発現する程度であったが、2 週間投与予備試験においても 300 mg/kg 以上の投与群で観察されていることから被験物質投与に関連した変化と考えられた。雌の 600 mg/kg 群で少数例ではあるが哺育期間に自発運動低下、筋力低下および眼瞼下垂が観察された。さらに全児死亡の認められた 1 例ではよろめき歩行も観察された。自発運動低下、眼瞼下垂およびよろめき歩行は 2 週間投与予備試験の 1000 mg/kg 群で少数例に観察され、また、妊娠ラットへ経口投与 (750 mg/kg) した場合にも似た症状が認められている¹⁾ことから、本試験での症状変化も少数例での発現ではあるが被験物質投与による中枢抑制作用が疑われた。全児死亡の認められた動物では中枢系以外の変化として泌尿生殖器出血、削瘦、被毛の汚れおよび軟便が観察され全身状態が悪化していたと考えられた。

体重では、雄に対しては被験物質投与の影響は認められなかった。雌に対しては 600 mg/kg 群で妊娠期間の後半以降にわずかではあるが低値傾向が認められ、被験物質投与による体重増加抑制が疑われた。

摂餌量では、雌雄ともに被験物質投与の影響は認められなかった。

臨床検査では、血液学検査において認められた変化はいずれも被験物質投与との関連性はないものと判断し、被験物質投与の影響は認められなかった。血液生化学検査において雌雄の 200 mg/kg 以上の投与群で総コレステロールの高値が認められた。雌の 600 mg/kg 群で認められた血糖の高値については、機序は不明であるが被験物質投与の影響と考えられた。

尿検査では 60 mg/kg 群から用量に関連した尿量の高値が認められ被験物質投与の影響と判断した。また、尿浸透圧については尿量と相関して低値を示しており、尿の濃縮力は正常であると考えられた。なお、200 mg/kg 以上の投与群で認められた尿の pH の変化については被験物質投与の影響が示唆されるものの機序は不明であった。

病理学検査では、200 mg/kg 以上の投与群で雌雄の肝臓重量、雄の腎臓重量が高値を示し、剖検所見で雄の肝臓および腎臓については 60 mg/kg 以上の投与群、雌の肝臓については 600 mg/kg 群でいずれも肥大が認められた。

組織学検査ではそれに対応する所見として肝臓の小葉中心性肝細胞肥大と腎臓の近位尿細管の硝子滴沈着が観察された。肝細胞肥大は雄では 60 mg/kg 以上、雌では 200 mg/kg 以上の投与群で観察されたが、組織学検査や血液生化学検査において肝障害を示唆する所見が認められなかったことから薬物代謝酵素誘導を反映した適応化の結果と考えられた。なお、雄の 60 mg/kg 以上の投与群および雌の 600 mg/kg 群で観察された甲状腺の濾胞上皮細胞増生は、肝臓の薬物代謝酵素誘導によって血中の T_3 , T_4 濃度が低下し、ネガティブフィードバックによって TSH 分泌が亢進し甲状腺濾胞上皮が増生したと考えられる。雄で観察された腎臓の近位尿細管における硝子滴沈着は免疫組織化学的に α_{2u} グロブリンが証明されたことから、いわゆる α_{2u} グロブリン腎症であることが確認された。また、200 mg/kg 以上の投与群で中等度の尿細管好塩基化が認められたが、いずれも硝子滴沈着の程度の強い個体で認められることから、多量の α_{2u} グロブリン沈着による尿細管傷害に引き続く再生像と考えられた。雄の 600 mg/kg 群で消化管上皮の杯細胞減少が盲腸以降で観察され、被験物質投与の影響が示唆されたが、機序については不明であった。雌の 600 mg/kg 群で副腎重量が高値を示した。副腎の組織学検査では球状帯の肥大が雌雄の 600 mg/kg 群で観察され、被験物質投与の影響が示唆されたが、機序については不明であった。雌の 600 mg/kg 群で胸腺重量が低値を示した。胸腺の重量低下に関連した形態学的な異常所見は認められなかったが、被験物質投与の影響と考えられた。雄の 60 および 600 mg/kg 群で脾臓重量が高値を示したが、剖検および組織学検査では関連する異常は認められなかった。2 週間投与予備試験でも同様の変化は認められていないことから被験物質投与と関連しない変化と判断した。

以上のことから、*N,N*-ジエチル-*m*-トルアミドの 600 mg/kg/day の投与により雌では体重増加抑制傾向が認められた。血液生化学検査では雌雄とも 200 mg/kg/day 以上で総コレステロールが高値を示した。雄の尿検査では 60 mg/kg/day 以上で尿量が増加した。病理学検査では主な変化として雄の 60 mg/kg/day 以上、雌の 200 mg/kg/day 以上で肝臓に、雄の 60 mg/kg/day 以上で腎臓に影響が認められた。したがって、本試験条件下における *N,N*-ジエチル-*m*-トルアミドの反復投与による無影響量は雄では確認できず 60 mg/kg/day 未満、雌では 60 mg/kg/day と判断された。

17.2. 生殖発生毒性

平均性周期、交尾能および受胎能に被験物質投与の影響は認められなかった。異常性周期が対照群、60 および 600 mg/kg 群で各 1 例に観察された。60 mg/kg 群の 1 例では発情休止期が 12 日間続いており偽妊娠していたと考えられた。600 mg/kg 群の 1 例では異常周期として発情休止期が 5 日続いた 8 日の周期が 1 回認められた。しかし、対照群の 1 例でも異常周期として 6 日の周期が認められており、異常性周期の発現に被験物質投与との関連性はないと判断した。

分娩時観察では、分娩状態の異常はいずれの投与群でも認められなかった。哺育期間では 600 mg/kg 群で 1 例に全児死亡が認められた。全児死亡の認められた雌は剖検および組織学検査で、症状変化で観察された消瘦等の衰弱状態に関連した変化が多く認められた。すなわち、雄および分娩した雌で観察された所見の関連病変として、肝臓の肝細胞肥大、大腸（盲腸、結腸、直腸）の上皮細胞好塩基化および杯細胞減少、小腸（回腸）の上皮細胞好塩基化、小腸（十二指腸、回腸）の絨毛癒合が観察された。小腸の病変はこの動物以外に観察されていないが、被験物質が粘膜刺激性を有することから、動物の衰弱に起因した消化管運動の減退による被験物質の滞留が原因と考えられた。また、肝臓で中等度の複数葉広がる肝細胞壊死が認められたが、肝臓の一部だけであり、他に肝細胞を壊死に至らしめる程度の変性も明らかでないことから、被験物質の影響によるものではなく、衰弱による循環障害が原因と考えられた。さらに肝細胞の中等度の脂肪化が観察されており、栄養障害を含め脂質代謝の異常が示唆された。腎臓では尿細管上皮の空胞変性がみられ、脂肪染色で陽性であったことから脂肪と同定された。尿細管の脂肪化の他に尿細管上皮の壊死、石灰沈着、中等度の円柱が観察されており、機能的・器質的異常が確認されたが、その病理発生については明らかではない。骨髄の造血低下が認められたが、妊娠を成立させた雄および自然分娩をした雌では血液学検査および組織学検査の何れにおいても造血障害を示唆する変化は観察されていないことから、腎障害による二次性造血低下が考えられた。胸腺萎縮については全身状態の悪化に起因するものと考えられた。その他の所見については、妊娠・分娩に関連する生理的変化あるいは自然発生病変と考えられた。しかし、被験物質投与が母動物の哺育行動に影響を及ぼしたとは判断できなかった。

対照群および 200 mg/kg 群で妊娠不成立と判定された雌雄の動物について、病理学検査では原因を示唆する所見は認められなかった。しかし、対

照群でも認められていることから妊娠不成立は被験物質投与と関連のない偶発的な現象と判断した。

新生児の外表面検査では、眼部隆起欠損および索状尾が対照群および 60 mg/kg 群で観察されたが、1 例のみの発現であることから被験物質投与の影響とは考えなかった。出生児の哺育 0 および 4 日の体重値に被験物質投与群で差は認められず、生後 4 日生存率にも影響は認められなかった。

哺育期間中の死亡児および哺育 4 日の生存児の剖検では、被験物質投与に起因すると考えられる異常は認められなかった。

その他、妊娠期間、妊娠黄体数および着床数に被験物質投与の影響は認められず、出産児数、出産生児数、性比および出産率にも影響は認められなかった。

なお、過去に実施された本被験物質の催奇形性試験⁸⁾および生殖発生毒性試験⁹⁾でも胎児に対する影響は認められていない。

以上のことから、*N,N*-ジエチル-*m*-トルアミドの生殖能に及ぼす影響は雌雄ともに認められず無影響量は 600 mg/kg/day と判断された。児動物の発生に及ぼす影響も特に認められず無影響量は 600 mg/kg/day と判断された。

18. 参考文献

- 1) U.S.EPA, Reregistration Eligibility Decision(RED) DEET, 1998.
- 2) 高橋道人, “精巢毒性評価のための精細管アトラス,” ソフトサイエンス社, 東京, 1994, pp. 15-20.
- 3) Kobayashi K. 産業衛生学雑誌, 2000; 42: 125.
- 4) Snedecor GW. Statistical Methods. 8th ed. Iowa State University Press; 1989.
- 5) Yoshida M J. Japanese Soc. Comp. Stat. 1988; 1: 111-22.
- 6) Steel RGD. A multiple comparison rank sum test: Treatments versus control. Biometrics 1959; 15: 560-72.
- 7) Hollander, Wolfe Nonparametric statistical methods Second edition, John Wiley & Sons; 1999.
- 8) GP. Schoenig, Fundamental and Applied Toxicology, 1994; 23: 63.
- 9) DM Wright, Fundamental and Applied Toxicology, 1992; 19: 33.

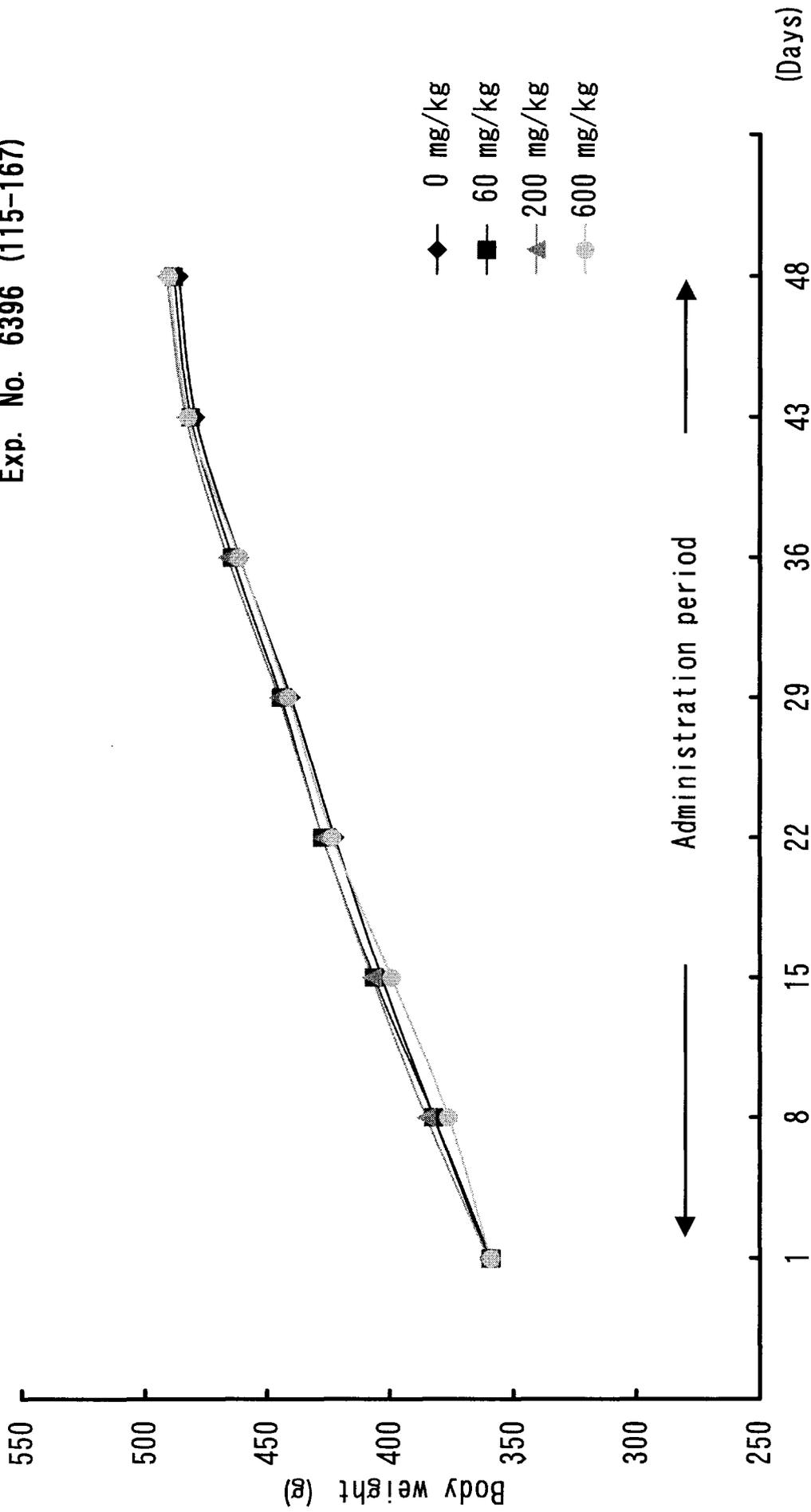


Figure 1 Body weight change of male rats

Exp. No. 6396 (115-167)

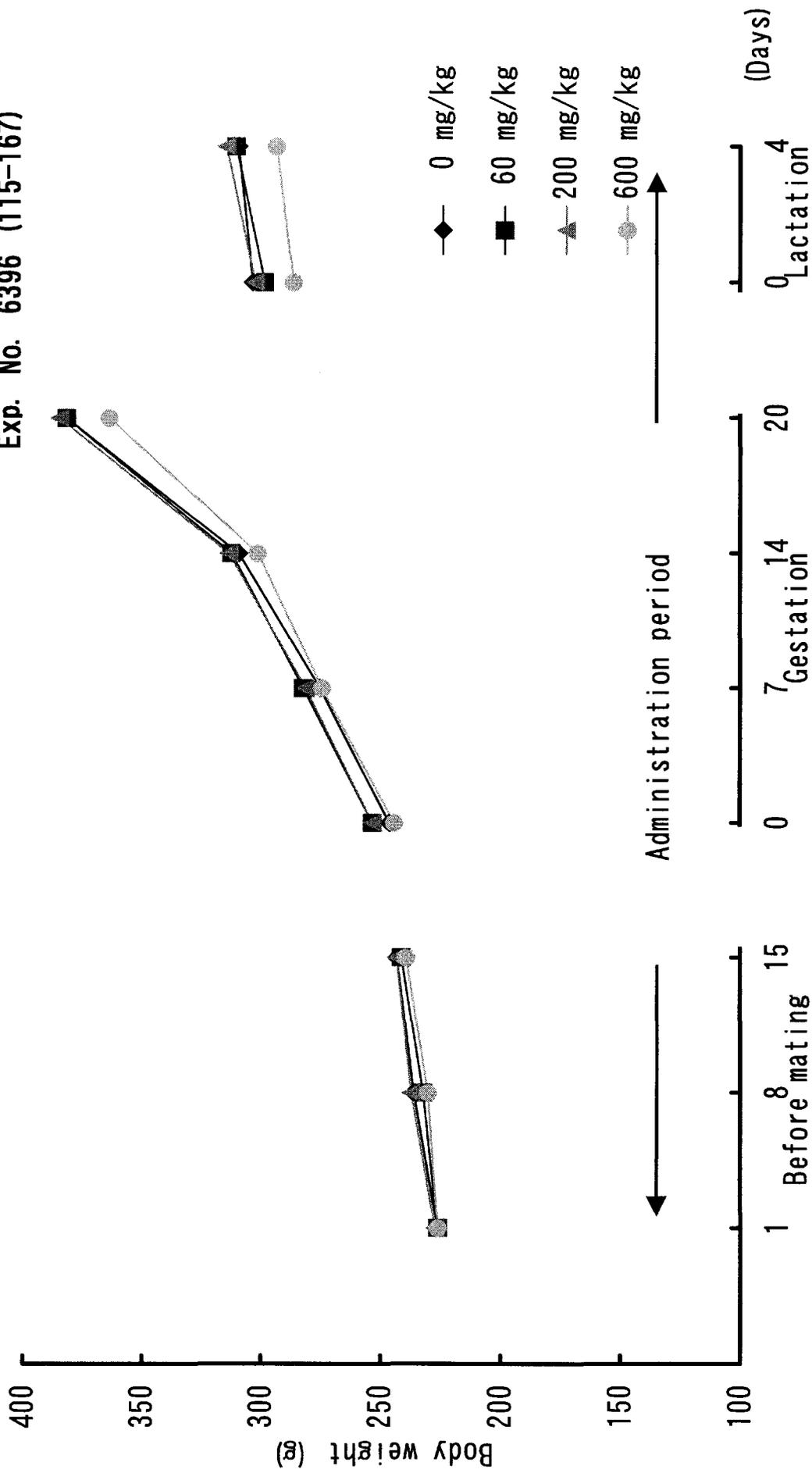


Figure 2 Body weight change of female rats

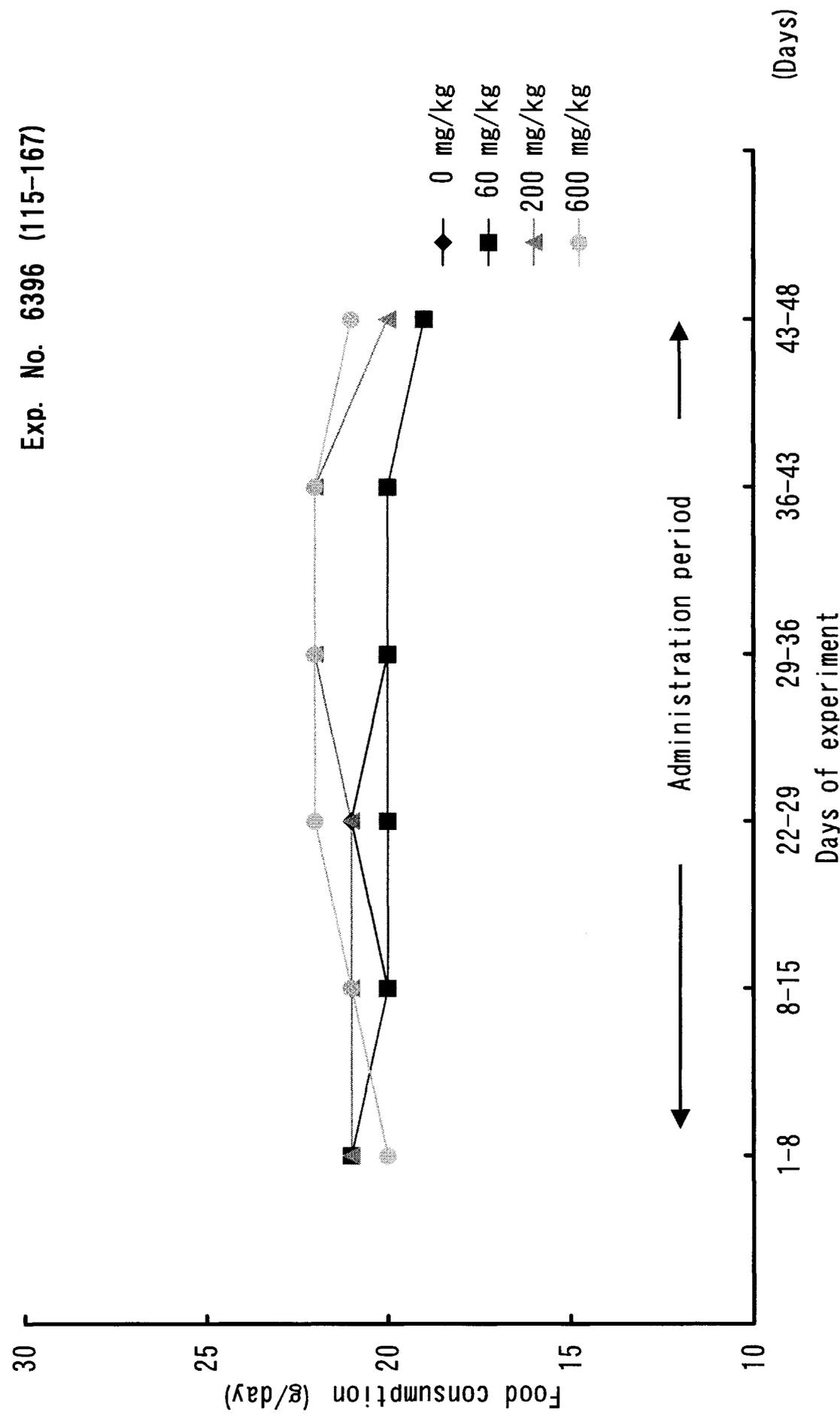


Figure 3 Food consumption of male rats

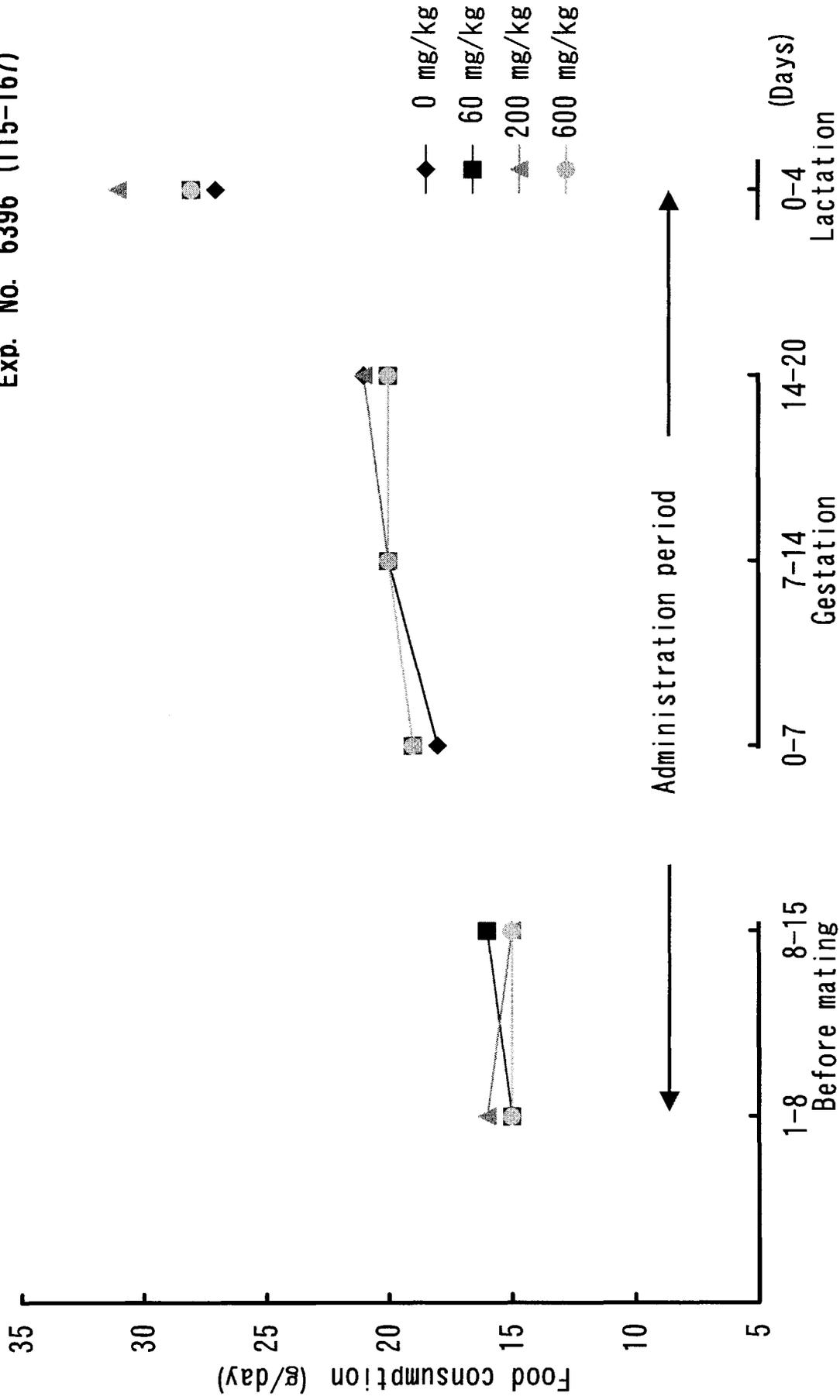


Figure 4 Food consumption of female rats

Table 1-1. Clinical observations in male rats

Exp. No. 6396 (115-167)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of experiment							Total (1-49)
		1-7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42	43-49	
number per group	0	12	12	12	12	12	12	12	
	60	12	12	12	12	12	12	12	
	200	12	12	12	12	12	12	12	
	600	12	12	12	12	12	12	12	
normal	0	12	12	12	12	12	12	12	12
	60	12	12	12	12	12	12	11	11
	200	12	11	12	11	12	11	10	9
	600	9	11	6	12	0	4	1	0
discharge of eye	0	0 a)	0	0	0	0	0	0	0 b)
	60	0	0	0	0	0	0	1	1
	200	0	1	0	0	0	0	0	1
	600	0	0	0	0	0	0	0	0
salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	60	0	0	0	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	1	0	1	1	1
	600	3	1	6	0	12	8	11	12
trauma	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	60	0	0	0	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	1	1
	600	0	0	0	0	0	0	0	0

a) No. of animals with clinical sign in group

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

T-01

Table 1-2. Clinical observations in female rats
(Before and during mating period)

Exp. No. 6396 (115-167)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of experiment				Total (1-29)
		1-7	8-14	15-21	22-29	
number per group	0	12	12	12	1	
	60	12	12	12	1	
	200	12	12	12	0	
	600	12	12	12	0	
normal	0	12	12	12	1	12
	60	12	12	12	1	12
	200	12	12	12	0	12
	600	11	8	10	0	7
nodule	0	0 a)	0	0	0	0 b)
	60	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0
	600	0	0	1	0	1
salivation	0	0	0	0	0	0
	60	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0
	600	1	4	1	0	4

a) No. of animals with clinical sign in group

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

Table 1-3. Clinical observations in female rats
(Gestation period)

Exp. No. 6396 (115-167)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of gestation													
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
number per group	0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	
	60	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	200	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	
	600	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
normal	0	11	10	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	
	60	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	200	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	
	600	8	8	9	9	10	10	11	11	10	10	10	11	10	
nodule	0	0 a)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
lacrimation	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	600	3	3	2	2	1	1	0	0	1	1	1	0	1	

a) No. of animals with clinical sign in group

Table 1-3. -continued Clinical observations in female rats
(Gestation period)

Exp. No. 6396 (115-167)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of gestation											Total (0-23)
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
number per group	0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	4	
	60	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	
	200	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	7	
	600	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	4	
normal	0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	4	10
	60	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	12
	200	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	7	11
	600	9	10	8	7	9	11	11	11	10	11	4	4
nodule	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 a)
	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
lacrimation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	600	2	1	3	4	2	0	0	0	1	0	0	7

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

Table 1-4. Clinical observations in female rats
(Lactation period)

Exp. No. 6396 (115-167)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of lactation						Total (0-5)
		0	1	2	3	4	5	
number per group	0	11	11	11	11	11	11	
	60	12	12	12	12	12	12	
	200	11	11	11	11	11	11	
	600	12	12	12	11	11	11	
normal	0	11	11	11	11	11	11	11
	60	12	12	12	12	12	12	12
	200	11	11	11	11	11	11	11
	600	11	10	10	10	8	10	8
all pups died	0	0	0	0	0	0	0	0
	60	0	0	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0
	600	0	0	1	0	0	0	1
nodule	0	0 a)	0	0	0	0	0	0 b)
	60	0	0	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0
	600	1	1	1	1	1	1	1
ptosis of eyelid	0	0	0	0	0	0	0	0
	60	0	0	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0
	600	0	1	1	0	1	0	2
decrease spon. motor act.	0	0	0	0	0	0	0	0
	60	0	0	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0
	600	0	1	0	0	1	0	2
muscle weakness	0	0	0	0	0	0	0	0
	60	0	0	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0
	600	0	0	0	0	2	0	2
urogenital hemorrhage	0	0	0	0	0	0	0	0
	60	0	0	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0
	600	0	1	0	0	0	0	1

a) No. of animals with clinical sign in group

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

Exp. No. 6396 (115-167)

Table 1-4. -continued Clinical observations in female rats (Lactation period)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of lactation						Total (0- 5)
		0	1	2	3	4	5	
staggering gait	0	0	0	0	0	0	0	0
	60	0	0	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0
dirty hair	0	0	0	0	0	0	0	0
	60	0	0	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0
loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0
	60	0	0	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0
wasting	0	0	0	0	0	0	0	0
	60	0	0	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0
	600	0	1	0	0	0	0	1

Table 2-1. Body weight change of male rats

Exp. No. 6396 (115-167)

Unit : g

Dose level (mg/kg)	0			60			200			600			
No. of animals	12			12			12			12			
	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	Mean	± S.D.	(N)	
Days of experiment	1	360 ± 17	(12)	359 ± 15	(12)	360 ± 15	(12)	359 ± 16	(12)	360 ± 15	(12)	359 ± 16	(12)
	8	382 ± 22	(12)	382 ± 19	(12)	385 ± 22	(12)	376 ± 25	(12)	385 ± 22	(12)	376 ± 25	(12)
	15	403 ± 26	(12)	406 ± 21	(12)	407 ± 26	(12)	399 ± 31	(12)	407 ± 26	(12)	399 ± 31	(12)
	22	422 ± 27	(12)	427 ± 24	(12)	427 ± 29	(12)	423 ± 36	(12)	427 ± 29	(12)	423 ± 36	(12)
	29	440 ± 30	(12)	444 ± 28	(12)	445 ± 34	(12)	441 ± 39	(12)	445 ± 34	(12)	441 ± 39	(12)
	36	461 ± 35	(12)	464 ± 31	(12)	466 ± 39	(12)	461 ± 42	(12)	466 ± 39	(12)	461 ± 42	(12)
	43	479 ± 35	(12)	481 ± 35	(12)	483 ± 42	(12)	482 ± 44	(12)	483 ± 42	(12)	482 ± 44	(12)
	48	486 ± 35	(12)	488 ± 34	(12)	491 ± 41	(12)	490 ± 44	(12)	491 ± 41	(12)	490 ± 44	(12)
	49	463 ± 35	(12)	466 ± 33	(12)	465 ± 40	(12)	463 ± 42	(12)	465 ± 40	(12)	463 ± 42	(12)
Gain 1-48	127 ± 21	(12)	129 ± 23	(12)	131 ± 28	(12)	131 ± 31	(12)	131 ± 28	(12)	131 ± 31	(12)	

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

Table 2-2. Body weight change of female rats

Exp. No. 6396 (115-167)

Unit : g

Dose level (mg/kg)	0			60			200			600		
Before mating period	12			12			12			12		
No. of animals												
		Mean ± S.D.	(N)									
Days of before mating	1	226 ± 13	(12)	226 ± 13	(12)	227 ± 13	(12)	226 ± 14	(12)	226 ± 14	(12)	
	8	236 ± 15	(12)	232 ± 12	(12)	237 ± 14	(12)	230 ± 20	(12)	230 ± 20	(12)	
	15	243 ± 15	(12)	241 ± 15	(12)	243 ± 19	(12)	239 ± 21	(12)	239 ± 21	(12)	
Gain	1-15	17 ± 7	(12)	15 ± 6	(12)	16 ± 9	(12)	13 ± 9	(12)	13 ± 9	(12)	

Gestation period	11			12			11			12		
No. of dams												
		Mean ± S.D.	(N)									
Days of gestation	0	246 ± 18	(11)	253 ± 17	(12)	253 ± 19	(11)	244 ± 23	(12)	244 ± 23	(12)	
	7	275 ± 23	(11)	282 ± 17	(12)	281 ± 23	(11)	274 ± 28	(12)	274 ± 28	(12)	
	14	309 ± 28	(11)	312 ± 19	(12)	313 ± 28	(11)	301 ± 31	(12)	301 ± 31	(12)	
	20	381 ± 36	(11)	381 ± 25	(12)	384 ± 36	(11)	363 ± 38	(12)	363 ± 38	(12)	
Gain	0-20	135 ± 23	(11)	128 ± 17	(12)	130 ± 25	(11)	119 ± 19	(12)	119 ± 19	(12)	

Lactation period	11			12			11			12		
No. of dams												
		Mean ± S.D.	(N)									
Days of lactation	0	303 ± 34	(11)	298 ± 21	(12)	302 ± 32	(11)	286 ± 26	(12)	286 ± 26	(12)	
	4	309 ± 30	(11)	310 ± 14	(12)	314 ± 30	(11)	293 ± 32	(11)	293 ± 32	(11)	
	5	289 ± 27	(11)	290 ± 16	(12)	292 ± 26	(11)	274 ± 30	(11)	274 ± 30	(11)	
Gain	0- 4	6 ± 12	(11)	12 ± 16	(12)	12 ± 13	(11)	7 ± 9	(11)	7 ± 9	(11)	

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

Table 3-1. Food consumption of male rats

Exp. No. 6396 (115-167)

Unit : g/day

Dose level (mg/kg)		0		60		200		600	
No. of animals		12		12		12		12	
		Mean ± S.D. (N)		Mean ± S.D. (N)		Mean ± S.D. (N)		Mean ± S.D. (N)	
Days of experiment	1- 8	21 ± 3	(12)	21 ± 1	(12)	21 ± 2	(12)	20 ± 2	(12)
	8-15	20 ± 2	(12)	20 ± 2	(12)	21 ± 2	(12)	21 ± 2	(12)
	22-29	21 ± 2	(12)	20 ± 2	(11)	21 ± 2	(12)	22 ± 2	(12)
	29-36	20 ± 2	(12)	20 ± 2	(12)	22 ± 2	(12)	22 ± 2	(12)
	36-43	20 ± 2	(12)	20 ± 2	(12)	22 ± 2	(12)	22 ± 2	(12)
	43-48	19 ± 3	(12)	19 ± 3	(12)	20 ± 2	(12)	21 ± 3	(12)
Cumulative consumption (g)	1-15	284 ± 32	(12)	285 ± 19	(12)	291 ± 28	(12)	287 ± 25	(12)
	22-48	524 ± 53	(12)	518 ± 46	(11)	554 ± 51	(12)	570 ± 48	(12)

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

Table 3-2. Food consumption of female rats

Exp. No. 6396 (115-167)

Unit : g/day

Dose level (mg/kg)	0	60	200	600
Before mating period				
No. of animals	12	12	12	12
	Mean ± S.D. (N)			
Days of before mating 1- 8	15 ± 2 (12)	15 ± 1 (12)	16 ± 1 (12)	15 ± 3 (12)
8-15	15 ± 2 (12)	16 ± 2 (12)	15 ± 2 (12)	15 ± 2 (12)
Cumulative consumption (g) 1-15	209 ± 24 (12)	217 ± 21 (12)	217 ± 22 (12)	208 ± 32 (12)
Gestation period				
No. of dams	11	12	11	12
	Mean ± S.D. (N)			
Days of gestation 0- 7	18 ± 3 (11)	19 ± 1 (12)	19 ± 3 (11)	19 ± 3 (12)
7-14	20 ± 3 (11)	20 ± 2 (12)	20 ± 4 (11)	20 ± 3 (12)
14-20	21 ± 3 (11)	20 ± 2 (12)	21 ± 3 (11)	20 ± 3 (12)
Cumulative consumption (g) 0-20	395 ± 59 (11)	389 ± 32 (12)	400 ± 64 (11)	394 ± 47 (12)
Lactation period				
No. of dams	11	12	11	12
	Mean ± S.D. (N)			
Days of lactation 0- 4	27 ± 3 (11)	28 ± 5 (12)	31 ± 7 (11)	28 ± 6 (11)

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

Table 4-1.

Hematology of male rats

Exp. No. 6396 (115-167)

Dose level (mg/kg)	0		60		200		600	
No. of animals	12		12		12		12	
	Mean ± S. D.	(N)	Mean ± S. D.	(N)	Mean ± S. D.	(N)	Mean ± S. D.	(N)
WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	9.2 ± 3.7	(12)	9.1 ± 2.3	(12)	10.5 ± 2.4	(11)	10.9 ± 3.4	(12)
RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	8.83 ± 0.45	(12)	8.76 ± 0.30	(12)	8.80 ± 0.35	(11)	8.80 ± 0.45	(12)
HGB (g/dL)	15.0 ± 0.6	(12)	15.0 ± 0.4	(12)	14.8 ± 0.6	(11)	14.7 ± 0.3	(12)
HCT (%)	44.8 ± 1.8	(12)	45.1 ± 1.5	(12)	44.9 ± 1.5	(11)	44.5 ± 1.4	(12)
MCV (μm^3)	50.7 ± 1.3	(12)	51.5 ± 1.7	(12)	51.0 ± 1.2	(11)	50.7 ± 2.0	(12)
MCH (pg)	17.0 ± 0.5	(12)	17.1 ± 0.4	(12)	16.8 ± 0.4	(11)	16.8 ± 0.7	(12)
MCHC (%)	33.5 ± 0.4	(12)	33.3 ± 0.5	(12)	32.9 ± 0.4*	(11)	33.1 ± 0.8	(12)
PLT ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	1150 ± 136	(12)	1150 ± 90	(12)	1177 ± 60	(11)	1282 ± 115**	(12)
Differential leukocyte counts (%)								
NEUT	15 ± 5	(12)	15 ± 4	(12)	15 ± 7	(11)	21 ± 8	(12)
LYMPH	81 ± 5	(12)	82 ± 4	(12)	80 ± 8	(11)	75 ± 8	(12)
MONO	2 ± 1	(12)	2 ± 1	(12)	2 ± 1	(11)	2 ± 1	(12)
EOSN	2 ± 1	(12)	1 ± 0	(12)	1 ± 1	(11)	1 ± 1	(12)
BASO	0 ± 0	(12)	0 ± 0	(12)	0 ± 0	(11)	0 ± 0	(12)
LUC	0 ± 0	(12)	1 ± 0	(12)	1 ± 0**	(11)	1 ± 0	(12)
Reticulocyte (%)	1.9 ± 0.2	(12)	2.0 ± 0.3	(12)	1.9 ± 0.2	(11)	2.1 ± 0.2	(12)

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

Table 4-2.

Hematology of female rats

Exp. No. 6396 (115-167)

Dose level (mg/kg)	0		60		200		600	
No. of animals	11		12		11		11	
	Mean ± S. D.	(N)	Mean ± S. D.	(N)	Mean ± S. D.	(N)	Mean ± S. D.	(N)
WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	10.7 ± 2.9	(11)	11.5 ± 2.9	(11)	11.3 ± 3.6	(11)	11.0 ± 2.5	(11)
RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	6.66 ± 0.32	(11)	6.69 ± 0.29	(11)	6.54 ± 0.40	(11)	6.77 ± 0.57	(11)
HGB (g/dL)	13.0 ± 0.5	(11)	12.8 ± 0.7	(11)	12.5 ± 0.6	(11)	13.2 ± 0.7	(11)
HCT (%)	38.2 ± 1.1	(11)	37.4 ± 2.1	(11)	37.2 ± 1.4	(11)	38.8 ± 2.2	(11)
MCV (μm^3)	57.4 ± 2.1	(11)	56.0 ± 1.6	(11)	57.0 ± 2.9	(11)	57.6 ± 3.9	(11)
MCH (pg)	19.5 ± 0.8	(11)	19.1 ± 0.6	(11)	19.2 ± 1.0	(11)	19.6 ± 1.2	(11)
MCHC (%)	34.0 ± 0.8	(11)	34.1 ± 0.7	(11)	33.6 ± 0.8	(11)	34.0 ± 0.8	(11)
PLT ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	1326 ± 187	(11)	1423 ± 103	(11)	1494 ± 121	(11)	1563 ± 334	(11)
Differential leukocyte counts (%)								
NEUT	29 ± 7	(11)	36 ± 8	(11)	30 ± 12	(11)	27 ± 11	(11)
LYMPH	67 ± 6	(11)	60 ± 9	(11)	66 ± 12	(11)	68 ± 12	(11)
MONO	3 ± 1	(11)	3 ± 1	(11)	3 ± 1	(11)	3 ± 1	(11)
EOSN	1 ± 1	(11)	1 ± 1	(11)	1 ± 1	(11)	1 ± 1	(11)
BASO	0 ± 0	(11)	0 ± 0	(11)	0 ± 0	(11)	0 ± 0	(11)
LUC	1 ± 1	(11)	1 ± 0	(11)	1 ± 0	(11)	1 ± 1	(11)
Reticulocyte (%)	7.5 ± 2.0	(11)	6.5 ± 1.7	(11)	7.5 ± 2.2	(11)	7.8 ± 5.1	(11)

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

Table 5-1.

Coagulation of male rats

Exp. No. 6396 (115-167)

Dose level (mg/kg)	0	60	200	600
No. of animals	12	12	12	12
	Mean \pm S. D. (N)			
PT(sec.)	20.2 \pm 2.0 (12)	21.6 \pm 3.3 (12)	21.5 \pm 2.3 (11)	21.6 \pm 3.0 (12)
APTT(sec.)	24.1 \pm 2.9 (12)	26.2 \pm 2.4 (12)	23.8 \pm 3.1 (11)	25.5 \pm 1.8 (12)

Significant difference from control group : * : $p \leq 0.05$ ** : $p \leq 0.01$

Table 5-2.

Coagulation of female rats

Exp. No. 6396 (115-167)

Dose level (mg/kg)	0	60	200	600
No. of animals	11	12	11	11
	Mean \pm S. D. (N)			
PT(sec.)	19.2 \pm 1.0 (11)	18.8 \pm 0.8 (11)	18.9 \pm 0.4 (11)	18.6 \pm 0.6 (11)
APTT(sec.)	15.7 \pm 1.4 (11)	16.3 \pm 2.4 (11)	15.6 \pm 1.1 (11)	16.3 \pm 2.5 (11)

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

Table 6-1.

Blood chemistry of male rats

Exp. No. 6396 (115-167)

Dose level (mg/kg)	0	60	200	600
No. of animals	12	12	12	12
	Mean ± S. D. (N)	Mean ± S. D. (N)	Mean ± S. D. (N)	Mean ± S. D. (N)
T. protein (g/dL)	6.10 ± 0.30 (12)	6.09 ± 0.26 (12)	6.07 ± 0.17 (11)	6.08 ± 0.26 (12)
Albumin (g/dL)	3.77 ± 0.24 (12)	3.68 ± 0.23 (12)	3.70 ± 0.17 (11)	3.71 ± 0.18 (12)
A/G	1.63 ± 0.21 (12)	1.53 ± 0.12 (12)	1.57 ± 0.18 (11)	1.58 ± 0.16 (12)
Glucose (mg/dL)	148 ± 23 (12)	144 ± 14 (12)	163 ± 18 (11)	157 ± 18 (12)
Triglyceride (mg/dL)	30.6 ± 13.9 (12)	24.8 ± 11.2 (12)	33.2 ± 12.2 (11)	31.6 ± 14.0 (12)
T. cholesterol (mg/dL)	52 ± 11 (12)	53 ± 12 (12)	64 ± 13 (11)	68 ± 12** (12)
BUN (mg/dL)	12.8 ± 1.7 (12)	12.7 ± 2.3 (12)	12.3 ± 1.9 (11)	12.4 ± 1.5 (12)
Creatinine (mg/dL)	0.30 ± 0.04 (12)	0.29 ± 0.04 (12)	0.29 ± 0.04 (11)	0.30 ± 0.04 (12)
T. bilirubin (mg/dL)	0.04 ± 0.01 (12)	0.04 ± 0.01 (12)	0.03 ± 0.01 (11)	0.03 ± 0.01 (12)
AST (U/L)	71 ± 11 (12)	73 ± 12 (12)	70 ± 9 (11)	66 ± 6 (12)
ALT (U/L)	28 ± 4 (12)	29 ± 6 (12)	29 ± 5 (11)	28 ± 3 (12)
ALP (U/L)	474 ± 103 (12)	446 ± 76 (12)	424 ± 99 (11)	444 ± 63 (12)
G-GTP (U/L)	0.5 ± 0.2 (12)	0.5 ± 0.2 (12)	0.6 ± 0.1 (11)	0.6 ± 0.2 (12)
Calcium (mg/dL)	9.79 ± 0.25 (12)	9.86 ± 0.35 (12)	10.08 ± 0.22* (11)	10.05 ± 0.29 (12)
I. phosphorus (mg/dL)	6.64 ± 0.63 (12)	6.72 ± 0.68 (12)	6.99 ± 0.61 (11)	6.83 ± 0.91 (12)
Sodium (mmol/L)	145.0 ± 1.4 (12)	144.6 ± 1.0 (12)	145.1 ± 1.1 (11)	144.8 ± 2.0 (12)
Potassium (mmol/L)	4.31 ± 0.23 (12)	4.33 ± 0.31 (12)	4.37 ± 0.19 (11)	4.49 ± 0.26 (12)
Chloride (mmol/L)	108.9 ± 1.6 (12)	107.7 ± 1.1 (12)	107.8 ± 1.1 (11)	107.8 ± 1.3 (12)
Total Bile Acid (μmol/L)	19.4 ± 20.8 (12)	35.8 ± 68.7 (12)	16.0 ± 9.3 (11)	11.7 ± 8.5 (12)

Significant difference from control group ;

* : $p \leq 0.05$ ** : $p \leq 0.01$

Table 6-2.

Blood chemistry of female rats

Exp. No. 6396 (115-167)

Dose level (mg/kg)	0	60	200	600
No. of animals	11	12	11	11
	Mean ± S. D. (N)			
T. protein (g/dL)	5.89 ± 0.44 (11)	5.85 ± 0.33 (11)	5.85 ± 0.36 (11)	5.94 ± 0.23 (11)
Albumin (g/dL)	3.58 ± 0.36 (11)	3.51 ± 0.33 (11)	3.53 ± 0.27 (11)	3.49 ± 0.19 (11)
A/G	1.55 ± 0.17 (11)	1.51 ± 0.18 (11)	1.53 ± 0.14 (11)	1.43 ± 0.11 (11)
Glucose (mg/dL)	135 ± 13 (11)	140 ± 13 (11)	141 ± 14 (11)	149 ± 14* (11)
Triglyceride (mg/dL)	42.4 ± 17.3 (11)	40.7 ± 26.7 (11)	40.9 ± 20.3 (11)	55.6 ± 24.7 (11)
T. cholesterol (mg/dL)	57 ± 15 (11)	59 ± 11 (11)	77 ± 10** (11)	88 ± 13** (11)
BUN (mg/dL)	16.8 ± 2.6 (11)	17.5 ± 2.9 (11)	19.3 ± 6.9 (11)	16.3 ± 3.0 (11)
Creatinine (mg/dL)	0.35 ± 0.03 (11)	0.37 ± 0.03 (11)	0.35 ± 0.05 (11)	0.32 ± 0.04 (11)
T. bilirubin (mg/dL)	0.04 ± 0.01 (11)	0.04 ± 0.02 (11)	0.03 ± 0.01 (11)	0.05 ± 0.02 (11)
AST (U/L)	83 ± 12 (11)	87 ± 10 (11)	92 ± 13 (11)	74 ± 6 (11)
ALT (U/L)	39 ± 5 (11)	47 ± 8 (11)	46 ± 10 (11)	46 ± 10 (11)
ALP (U/L)	351 ± 100 (11)	358 ± 168 (11)	404 ± 165 (11)	407 ± 218 (11)
G-GTP (U/L)	0.7 ± 0.2 (11)	0.6 ± 0.2 (11)	0.7 ± 0.2 (11)	1.0 ± 0.5 (11)
Calcium (mg/dL)	10.42 ± 0.40 (11)	10.27 ± 0.40 (11)	10.29 ± 0.36 (11)	10.65 ± 0.49 (11)
I. phosphorus (mg/dL)	8.69 ± 1.24 (11)	8.26 ± 1.18 (11)	8.52 ± 1.36 (11)	8.07 ± 0.90 (11)
Sodium (mmol/L)	141.9 ± 1.5 (11)	141.8 ± 1.4 (11)	142.5 ± 1.4 (11)	142.5 ± 1.5 (11)
Potassium (mmol/L)	4.46 ± 0.39 (11)	4.15 ± 0.24 (11)	4.29 ± 0.32 (11)	4.20 ± 0.44 (11)
Chloride (mmol/L)	105.4 ± 2.5 (11)	105.8 ± 2.8 (11)	105.7 ± 2.5 (11)	104.3 ± 2.2 (11)
Total Bile Acid (μmol/L)	21.8 ± 15.8 (11)	29.7 ± 15.8 (11)	22.7 ± 12.6 (11)	39.5 ± 64.1 (11)

Significant difference from control group ;

* : $p \leq 0.05$ ** : $p \leq 0.01$

Table 7.

Urinalysis of male rats

Exp. No. 6396 (115-167)

Dose level (mg/kg)	No. of animals	Volume (mL) Mean \pm S.D.	Color											pH							Occult blood				
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	≥ 9	-	+/-	1+
0	5	19.6 \pm 6.8	5																		3 2				
60	5	22.3 \pm 7.3	5											1 1							5				
200	5	24.5 \pm 4.6	5											1 2							2 2 1				
600	5	36.4 \pm 12.0 *	5											2 2 1							4 1				

Significant difference from control group; *: $p \leq 0.05$ **: $p \leq 0.01$
 Color: 1= Colorless, 2= Slight yellow, 3= Yellow-brown, 4= Red, 5= Red-brown, 6= Dark red, 7= Dark brown, 8= Brown-black,
 9= Milky white, 10= Fluorescent green, 11= Blue.

Table 7. -continued

Urinalysis of male rats

Exp. No. 6396 (115-167)

Dose level (mg/kg)	No. of animals	Glucose (g/dL)					Protein (mg/dL)					Osmotic pressure (mOsm/kg)	
		-	0.1	0.25	0.5	≥1.0	-	+/-	30	100	≥300	Mean ± S.D.	
0	5	5					2 3					681 ± 264	
60	5	5					1 1 3					534 ± 168	
200	5	4 1					3 2					503 ± 189	
600	5	5					2 3					519 ± 155	

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

Table 8-1. Absolute and relative organ weight of male rats

Exp. No. 6396 (115-167)

Dose level (mg/kg)	0		60		200		600	
No. of animal examined	12		12		12		12	
	Mean	± S.D.	Mean	± S.D.	Mean	± S.D.	Mean	± S.D.
Body weight (g)	463	± 35	466	± 33	465	± 40	463	± 42
Brain (g)	2.21	± 0.12	2.24	± 0.10	2.19	± 0.11	2.19	± 0.12
	0.480	± 0.040	0.482	± 0.027	0.474	± 0.036	0.476	± 0.035
Thymus (mg)	331	± 63	368	± 89	310	± 67	317	± 87
	71.280	± 11.996	78.813	± 16.976	66.918	± 15.182	68.074	± 15.325
Liver (g)	11.75	± 1.38	12.02	± 1.34	13.33	± 1.46*	15.25	± 2.04**
	2.532	± 0.159	2.580	± 0.196	2.866	± 0.137**	3.285	± 0.186**
Spleen (g)	0.61	± 0.08	0.69	± 0.09	0.68	± 0.07	0.71	± 0.09*
	0.132	± 0.013	0.149	± 0.022*	0.146	± 0.015	0.153	± 0.017*
Kidneys (g)	2.81	± 0.29	3.12	± 0.35	3.21	± 0.39*	3.27	± 0.28**
	0.609	± 0.063	0.671	± 0.063	0.692	± 0.086*	0.709	± 0.062**
Adrenals (mg)	58.6	± 8.2	54.2	± 5.6	57.1	± 8.9	58.9	± 5.9
	12.724	± 2.047	11.693	± 1.464	12.350	± 2.116	12.818	± 1.582
Testes (g)	3.17	± 0.25	3.26	± 0.19	3.39	± 0.31	3.22	± 0.35
	0.689	± 0.079	0.704	± 0.062	0.734	± 0.086	0.703	± 0.106
Epididymides (mg)	1209	± 95	1254	± 91	1298	± 110	1221	± 166
	262.521	± 28.474	270.231	± 21.821	280.574	± 28.059	265.685	± 40.332

(%) (Organ weight / body weight) x 100

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

Table 8-2. Absolute and relative organ weight of female rats

Exp. No. 6396 (115-167)

Dose level (mg/kg)	0		60		200		600	
No. of dams examined	11		12		11		11	
	Mean	± S.D.						
Body weight (g)	289	± 27	290	± 16	292	± 26	274	± 28
Brain	(g)	2.00 ± 0.10	(g)	2.07 ± 0.09	(g)	2.02 ± 0.10	(g)	2.03 ± 0.05
	(g%)	0.697 ± 0.040	(g%)	0.713 ± 0.036	(g%)	0.697 ± 0.060	(g%)	0.750 ± 0.079
Thymus	(mg)	219 ± 43	(mg)	209 ± 70	(mg)	202 ± 81	(mg)	164 ± 33**
	(mg%)	75.813 ± 11.755	(mg%)	72.459 ± 25.182	(mg%)	69.201 ± 25.856	(mg%)	60.003 ± 11.437*
Liver	(g)	9.60 ± 1.15	(g)	10.28 ± 0.90	(g)	11.00 ± 1.32*	(g)	13.06 ± 1.74**
	(g%)	3.324 ± 0.167	(g%)	3.545 ± 0.285	(g%)	3.767 ± 0.243**	(g%)	4.767 ± 0.261**
Spleen	(g)	0.61 ± 0.06	(g)	0.58 ± 0.08	(g)	0.58 ± 0.09	(g)	0.54 ± 0.12
	(g%)	0.212 ± 0.026	(g%)	0.202 ± 0.031	(g%)	0.199 ± 0.024	(g%)	0.197 ± 0.044
Kidneys	(g)	1.86 ± 0.14	(g)	1.90 ± 0.18	(g)	1.97 ± 0.22	(g)	1.90 ± 0.19
	(g%)	0.646 ± 0.050	(g%)	0.656 ± 0.059	(g%)	0.674 ± 0.046	(g%)	0.697 ± 0.052
Adrenals	(mg)	74.6 ± 8.5	(mg)	73.3 ± 11.0	(mg)	72.5 ± 11.6	(mg)	83.0 ± 13.2
	(mg%)	25.904 ± 2.324	(mg%)	25.211 ± 3.032	(mg%)	24.804 ± 2.944	(mg%)	30.326 ± 3.565**
Ovaries	(mg)	95 ± 14	(mg)	92 ± 10	(mg)	93 ± 19	(mg)	96 ± 13
	(mg%)	33.009 ± 4.470	(mg%)	31.896 ± 3.978	(mg%)	31.829 ± 5.789	(mg%)	35.028 ± 3.490

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

Table 9-1. Summary of gross findings (sacrificed, male)

Exp. No. 6396 (115-167)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	No. of animals necropsied	0	60	200	600
Organ	Findings	11	12	11	12
HEMATOPOIETIC SYSTEM					
spleen	deformed	0	1	0	0
lymph node	enlarged	0	0	0	1
RESPIRATORY SYSTEM					
lung	brown patch/zone	1	0	0	0
DIGESTIVE SYSTEM					
liver	atrophic	1	0	0	0
	enlarged	0	3	4*	11**
	hepatodiaphragmatic nodule	0	0	1	0
URINARY SYSTEM					
kidney	enlarged	0	3	9**	11**
REPRODUCTIVE SYSTEM					
testis	small	0	0	0	1
epididymis	nodule	0	0	0	1
	small	0	0	0	1

Significant difference from control group; * : $P \leq 0.05$ ** : $P \leq 0.01$

Table 9-2. Summary of gross findings (non-pregnancy, male) Exp. No. 6396 (115-167)

Sex: Male			
Dose level (mg/kg)	No. of animals necropsied		
200	1	60	0
600	1	0	0
Organ Findings			
DIGESTIVE SYSTEM			
liver	enlarged	0	1
		-	-

Table 9-3. Summary of gross findings (sacrificed, female)

Exp. No. 6396 (115-167)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0	60	200	600	
No. of animals necropsied	11	12	11	11	
Organ Findings					
DIGESTIVE SYSTEM					
liver	enlarged	0	0	0	4*
	white patch/zone	0	0	0	1
REPRODUCTIVE SYSTEM					
ovary	cyst	0	1	0	0
uterus	nodule	0	0	0	1
INTEGUMENTARY SYSTEM					
skin	nodule	0	0	0	1

Significant difference from control group; * : $P \leq 0.05$ ** : $P \leq 0.01$

Table 9-4. Summary of gross findings (non-pregnancy, female)

Exp. No. 6396 (115-167)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0	60	200	600
No. of animals necropsied	1	0	1	0
Organ_____ Findings_____				
REPRODUCTIVE SYSTEM				
uterus dilated lumen	0	-	1	-

Table 9-5. Summary of gross findings (all pups died)

Exp. No. 6396 (115-167)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)		0	60	200	600
No. of animals necropsied		0	0	0	1
Organ	Findings				
DIGESTIVE SYSTEM					
liver	white patch/zone	-	-	-	1
URINARY SYSTEM					
kidney	red patch/zone	-	-	-	1
urinary bladder	reddish	-	-	-	1
REPRODUCTIVE SYSTEM					
uterus	thick	-	-	-	1
vagina	reddish	-	-	-	1
ENDOCRINE SYSTEM					
adrenal gland	hypertrophic	-	-	-	1

Table 10-1. Summary of histological findings (sacrificed, male)

Exp. No. 6396 (115-167)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0				60				200				600			
	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T
No. of animals initially in study	11				12				11				12			
No. of animals necropsied	11				12				11				12			
No. of animals examined histologically	7				8				10				11			
Organ	Findings															
CARDIOVASCULAR SYSTEM																
heart	(5)				(0)				(0)				(5)			
microgranuloma	2	0	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
HEMATOPOIETIC SYSTEM																
spleen	(5)				(1)				(0)				(5)			
deposit, pigment inc., extramedull. hematopoiesis	0	0	0	0	1	0	0	1	-	-	-	-	0	0	0	0
thymus	(5)				(0)				(0)				(5)			
cyst	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
RESPIRATORY SYSTEM																
lung	(6)				(0)				(0)				(5)			
accumulation of foamy cells	2	0	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0	2
microgranuloma	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
osseous metaplasia	2	0	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
DIGESTIVE SYSTEM																
stomach	(5)				(0)				(0)				(5)			
dilatation, gland	2	0	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
exocrine pancreas	(5)				(0)				(0)				(5)			
microgranuloma	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
large intestine	(5)				(5)				(5)				(5)			
decrease, goblet cell	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0**	5##
liver	(6)				(7)				(7)				(11)			
edema	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
fatty change	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
necrosis, focal	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
single cell necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
arteritis	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0
microgranuloma	5	0	0	5	6	0	0	6	6	0	0	6	11	0	0	11
hepatodiaphragmatic nodule	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
hypertrophy, hepatocyte	0	0	0	0	5	0	0**	5#	3	2	0**	5#	3	8	0**	11##
proliferation, bile duct	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2

1: slight 2: moderate 3: marked T: Total -: Not applicable.

(): No. of animals examined microscopically at this site.

Significant difference from control group; Mann-Whitney *:P ≤ 0.05 **:P ≤ 0.01, Fisher #:P ≤ 0.05 ##:P ≤ 0.01

Table 10-1. -continued Summary of histological findings (sacrificed, male)

Exp. No. 6396 (115-167)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0				60				200				600			
No. of animals initially in study	11				12				11				12			
No. of animals necropsied	11				12				11				12			
No. of animals examined histologically	7				8				10				11			
Organ	Findings				Findings				Findings				Findings			
	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T
URINARY SYSTEM																
Kidney	(5)				(7)				(9)				(11)			
basophilic tubules	4	0	0	4	6	0	0	6	5	4	0	9	7	4	0	11
cast, hyaline	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
dilatation, tubules	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
hyaline droplet	4	0	0	4	4	3	0	7	1	3	5**	9	0	9	2**	11
cellular infiltration, lymphocyte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
urinary bladder	(5)				(0)				(0)				(5)			
cellular infiltration, lymphocyte	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
REPRODUCTIVE SYSTEM																
epididymis	(5)				(0)				(0)				(6)			
spermatic granuloma	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
prostate	(5)				(0)				(0)				(5)			
cellular infiltration, lymphocyte	3	0	0	3	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	0	1
inflammation	2	0	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
ENDOCRINE SYSTEM																
thyroid gland	(5)				(5)				(5)				(5)			
follicular cell hyperplasia	0	0	0	0	2	0	0	2	3	0	0	3	5	0	0**	5##
adrenal gland	(5)				(5)				(5)				(5)			
hypertrophy, zona glomerulosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1

1: slight 2: moderate 3: marked T: Total -: Not applicable.

(): No. of animals examined microscopically at this site.

Significant difference from control group; Mann-Whitney *:P ≤ 0.05 **:P ≤ 0.01, Fisher #:P ≤ 0.05 ##:P ≤ 0.01

Table 10-2. Summary of histological findings (non-pregnancy, male)

Exp. No. 6396 (115-167)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0				60				200				600			
No. of animals initially in study	1				0				1				0			
No. of animals necropsied	1				0				1				0			
No. of animals examined histologically	1				0				1				0			
Organ_____ Findings_____	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T
DIGESTIVE SYSTEM																
liver	(0)								(1)							
microgranuloma	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1	-	-	-	-
hypertrophy, hepatocyte	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1	-	-	-	-
REPRODUCTIVE SYSTEM																
prostate	(1)								(1)							
cellular infiltration	1	0	0	1	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-

1: slight 2: moderate 3: marked T: Total -: Not applicable.
 (): No. of animals examined microscopically at this site.

Table 10-3. Summary of histological findings (sacrificed, female) Exp. No. 6396 (115-167)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0				60				200				600			
No. of animals initially in study	11				12				11				11			
No. of animals necropsied	11				12				11				11			
No. of animals examined histologically	5				6				5				7			
Organ	Findings															
	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T
HEMATOPOIETIC SYSTEM																
spleen	(5)				(0)				(0)				(5)			
inc., extramedull. hematopoiesis	3	0	0	3	-	-	-	-	-	-	-	-	3	1	0	4
RESPIRATORY SYSTEM																
lung	(5)				(0)				(0)				(5)			
accumulation of foamy cells	2	0	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0	2
inflammation	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
microgranuloma	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
DIGESTIVE SYSTEM																
stomach	(5)				(0)				(0)				(5)			
microgranuloma	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
exocrine pancreas	(5)				(0)				(0)				(5)			
microgranuloma	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
large intestine	(5)				(5)				(5)				(5)			
cellular infiltration	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
liver	(5)				(5)				(5)				(7)			
fatty change	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
microgranuloma	3	0	0	3	3	0	0	3	5	0	0	5	5	0	0	5
extramedullary hematopiesis	2	0	0	2	1	0	0	1	1	0	0	1	4	0	0	4
hypertrophy, hepatocyte	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	4	3	0**	7##
URINARY SYSTEM																
kidney	(5)				(5)				(5)				(5)			
basophilic tubules	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0	3
cyst	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
dilatation, tubules	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
mineralization	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
fibrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
REPRODUCTIVE SYSTEM																
ovary	(5)				(1)				(0)				(5)			
cyst	0	0	0	0	1	0	0	1	-	-	-	-	0	0	0	0

1: slight 2: moderate 3: marked T: Total -: Not applicable.

(): No. of animals examined microscopically at this site.

Significant difference from control group; Mann-Whitney *:P ≤ 0.05 **:P ≤ 0.01, Fisher #:P ≤ 0.05 ##:P ≤ 0.01

T-30

Table 10-3. -continued Summary of histological findings (sacrificed, female)

Exp. No. 6396 (115-167)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0				60				200				600			
No. of animals initially in study	11				12				11				11			
No. of animals necropsied	11				12				11				11			
No. of animals examined histologically	5				6				5				7			
Organ	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T
ENDOCRINE SYSTEM																
pituitary gland	(5)				(0)				(0)				(5)			
cyst	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
thyroid gland	(5)				(5)				(5)				(5)			
follicular cell hyperplasia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
ultimobranchial remnant	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
adrenal gland	(5)				(5)				(5)				(5)			
hypertrophy, zona fasciculata	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	2	0	0	2
hypertrophy, zona glomerulosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
INTEGUMENTARY SYSTEM																
skin	(5)				(0)				(0)				(5)			
squamous cell papilloma	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1\$

1: slight 2: moderate 3: marked T: Total \$: benign -: Not applicable.

(): No. of animals examined microscopically at this site.

Significant difference from control group; Mann-Whitney *:P ≤ 0.05 **:P ≤ 0.01, Fisher #:P ≤ 0.05 ##:P ≤ 0.01

Table 10-4. Summary of histological findings (non-pregnancy, female)

Exp. No. 6396 (115-167)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0				60				200				600					
No. of animals initially in study	1				0				1				0					
No. of animals necropsied	1				0				1				0					
No. of animals examined histologically	1				0				1				0					
Organ Findings	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T		
REPRODUCTIVE SYSTEM																		
uterus	(1)								(1)									
dilatation, lumen	(1)	0	0	0	0	-	-	-	-	(1)	1	0	0	1	-	-	-	-
vagina	(1)								(1)									
dilatation, lumen	(1)	0	0	0	0	-	-	-	-	(1)	1	0	0	1	-	-	-	-

1: slight 2: moderate 3: marked T: Total -: Not applicable.
 (): No. of animals examined microscopically at this site.

Table 10-5. Summary of histological findings (all pups died)

Exp. No. 6396 (115-167)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0	60			200			600					
No. of animals initially in study	0	0			0			1					
No. of animals necropsied	0	0			0			1					
No. of animals examined histologically	0	0			0			1					
Organ Findings	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	
HEMATOPOIETIC SYSTEM													
bone marrow									(1)				
hematopoiesis, decreased	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
thymus									(1)				
atrophy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
RESPIRATORY SYSTEM													
lung									(1)				
accumulation of foamy cells	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
DIGESTIVE SYSTEM													
stomach									(1)				
dilatation, gland	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
small intestine									(1)				
basophilic change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
fusion, villi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
duodenum									(1)				
fusion, villi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
large intestine									(1)				
basophilic change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
decrease, goblet cell	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
liver									(1)				
fatty change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	0	1
necrosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	0	1
hypertrophy, hepatocyte	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	0	1
URINARY SYSTEM													
kidney									(1)				
cast	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	0	1
degeneration, vacuolar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	1	1
mineralization	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
necrosis, tubular epithelium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
ENDOCRINE SYSTEM													
adrenal gland									(1)				
hypertrophy, zona fasciculata	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1

1: slight 2: moderate 3: marked T: Total -: Not applicable.
 (): No. of animals examined microscopically at this site.

Table 10-6. Cell type and number per Sertoli cell in seminiferous tubules of rats at VII - VIII stage of spermatogenesis during dosing period (successful pregnancy, male)

Exp. No. 6396 (115-167)

Dose level (mg/kg)	0	600
No. of animals examined histologically	5	5
Spermatogonia type A	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.03
Preleptotene spermatocyte	3.05 ± 0.12	3.06 ± 0.54
Pachytene spermatocyte	4.80 ± 0.35	4.60 ± 0.43
Round spermatid	9.21 ± 0.78	9.25 ± 0.67

Mean ± S.D.

Table 11. Copulation and fertility results in rats

Exp. No. 6396 (115-167)

Dose level (mg/kg)	0	60	200	600
No. of pairs mated	12	12	12	12
No. of pairs copulated	12	12	12	12
No. of pregnant females	11	12	11	12
Copulation index (%) 1)	100.0	100.0	100.0	100.0
Fertility index (%) 2)	91.7	100.0	91.7	100.0
Estrous cycle				
No. of animals examined	12	12	12	12
	Mean±S.D. (N)	Mean±S.D. (N)	Mean±S.D. (N)	Mean±S.D. (N)
Mean estrous cycle	4.4± 0.5 (12)	4.2± 0.3 (11)	4.1± 0.1 (12)	4.6± 0.7 (12)
Irregular cycle a) (%) 3)	1 (8.3)	1 (8.3)	0 (0.0)	1 (8.3)

- 1) (No. of animals with successful copulation / no. of animals mated) x 100
 2) (No. of pregnant animals / no. of animals with successful copulation) x 100
 3) (No. of animals having irregular estrous cycle / no. of animals examined) x 100
 a) No. of animals having irregular estrous cycle
 Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$ **: $P \leq 0.01$

Table 12. Findings of delivery in dams(F0)

Exp. No. 6396 (115-167)

Dose level (mg/kg)	0	60	200	600
No. of dams observed	11	12	11	12
No. of dams delivered live pups	11	12	11	12
Duration of gestation (Mean \pm S.D.)	22.4 \pm 0.5	22.5 \pm 0.5	22.6 \pm 0.5	22.3 \pm 0.5
No. of total corpora lutea (Mean \pm S.D.)	184(16.7 \pm 3.0)	204(17.0 \pm 3.6)	217(19.7 \pm 4.8)	224(18.7 \pm 4.6)
No. of total implantations (Mean \pm S.D.)	156(14.2 \pm 1.9)	165(13.8 \pm 2.6)	164(14.9 \pm 1.9)	171(14.3 \pm 3.0)
No. of total pups born (Mean \pm S.D.)	143(13.0 \pm 2.4)	158(13.2 \pm 2.6)	152(13.8 \pm 2.6)	158(13.2 \pm 3.1)
No. of total live pups born (Mean \pm S.D.)	141(12.8 \pm 2.6)	158(13.2 \pm 2.6)	152(13.8 \pm 2.6)	140(11.7 \pm 3.9)
Male	72(6.5 \pm 2.7)	78(6.5 \pm 2.0)	67(6.1 \pm 2.0)	65(5.4 \pm 3.1)
Female	69(6.3 \pm 2.4)	80(6.7 \pm 2.9)	85(7.7 \pm 1.3)	75(6.3 \pm 2.2)
Sex ratio (Mean \pm S.D.)	1.31 \pm 0.85	1.43 \pm 1.45	0.81 \pm 0.29	1.00 \pm 0.74
No. of total live pups on day 4 (Mean \pm S.D.)	140(12.7 \pm 2.6)	157(13.1 \pm 2.6)	151(13.7 \pm 2.5)	129(10.8 \pm 5.2)
Male	72(6.5 \pm 2.7)	77(6.4 \pm 2.0)	66(6.0 \pm 1.8)	62(5.2 \pm 3.3)
Female	68(6.2 \pm 2.3)	80(6.7 \pm 2.9)	85(7.7 \pm 1.3)	67(5.6 \pm 3.1)
No. of total dead pups (Mean \pm S.D.)	2(0.2 \pm 0.4) a)	0(0.0 \pm 0.0) a)	0(0.0 \pm 0.0) a)	14(1.2 \pm 2.5) a)
No. of total cannibalism (Mean \pm S.D.)	0(0.0 \pm 0.0) a)	0(0.0 \pm 0.0) b)	0(0.0 \pm 0.0) b)	4(0.3 \pm 0.9) a)
Gestation index (%) 1)	100.0	100.0	100.0	100.0
Implantation index (% Mean \pm S.D.) 2)	86.4 \pm 12.9	83.9 \pm 21.0	77.5 \pm 10.7	78.9 \pm 17.6
Delivery index (% Mean \pm S.D.) 3)	91.5 \pm 10.5	95.9 \pm 7.8	92.5 \pm 10.4	92.6 \pm 8.7
Live birth index (% Mean \pm S.D.) 4)	98.5 \pm 3.4 a)	100.0 \pm 0.0 a)	100.0 \pm 0.0 a)	88.2 \pm 21.2 a)
Viability index of total live pups on day 4 (% Mean \pm S.D.) 5)	99.2 \pm 2.5	99.4 \pm 2.2	99.4 \pm 1.9	86.2 \pm 30.7
Male	100.0 \pm 0.0 a)	98.6 \pm 4.8 a)	99.0 \pm 3.4 a)	90.6 \pm 28.8 a)
Female	99.0 \pm 3.4 a)	100.0 \pm 0.0 a)	100.0 \pm 0.0 a)	82.3 \pm 38.6 a)

1) (No. of females with live pups / no. of pregnant females) x 100

2) (No. of implantations / no. of corpora lutea) x 100

3) (No. of pups born / no. of implantations) x 100

4) (No. of live pups born / no. of pups born) x 100

5) (No. of live pups on day 4 after birth / no. of live pups born) x 100

a) It could not be analyzed by Bartlett's test

b) It could not be analyzed statistically

Significant difference from control group; *: P \leq 0.05 **: P \leq 0.01

Table 13. External observations on live pups(F1) from rats

Exp. No. 6396 (115-167)

Dose level (mg/kg)	0	60	200	600
No. of litters	11	12	11	12
No. of live newborns examined	141	158	152	140
No. of live newborns with external anomalies (% Mean \pm S.D.) a)	0.5 \pm ¹ 1.8	0.6 \pm ¹ 1.9	0.0 \pm ⁰ 0.0	0.0 \pm ⁰ 0.0
Type and incidence of external anomalies (%) 1)				
absent eye bulge	0 (0.0) a)	1 (0.6) a)	0 (0.0) b)	0 (0.0) b)
thread-like tail a)	1 (0.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

1) (No. of live newborns with external anomalies / no. of live newborns examined) x 100

a) It could not be analyzed by Bartlett's test

b) It could not be analyzed statistically

Significant difference from control group; *: p \leq 0.05 **: p \leq 0.01

Table 14. Body weight change of pups(F1) from rats

Exp. No. 6396 (115-167)

Unit : g

Dose level (mg/kg)	0		60		200		600		
No. of litters	11		12		11		12		
	Mean ± S.D.	(N)	Mean ± S.D.	(N)	Mean ± S.D.	(N)	Mean ± S.D.	(N)	
Male									
Days after birth	0	6.8 ± 0.6	(11)	6.9 ± 0.5	(12)	7.2 ± 0.6	(11)	6.5 ± 0.8	(12)
	4	10.0 ± 1.2	(11)	10.7 ± 1.3	(12)	10.4 ± 1.1	(11)	9.6 ± 1.3	(11)
Female									
Days after birth	0	6.4 ± 0.6	(11)	6.5 ± 0.5	(12)	6.7 ± 0.5	(11)	6.3 ± 0.7	(12)
	4	9.6 ± 1.4	(11)	10.0 ± 1.1	(12)	9.8 ± 0.8	(11)	9.2 ± 1.3	(10)

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

Table 15-1.

Summary of gross findings of pups(F1) from rats (sacrificed, male)

Exp. No. 6396 (115-167)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)		0	60	200	600
No. of pups necropsied		72	77	66	62
Organ	Findings				
DIGESTIVE SYSTEM					
liver	nodule	0	0	1	0
URINARY SYSTEM					
kidney	dilated pelvis	5	5	9	3
ureter	dilated lumen	4	0	5	6
INTEGUMENTARY SYSTEM					
tail	thread like tail	1	0	0	0

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

Table 15-2.

Summary of gross findings of pups(F1) from rats (sacrificed, female)

Exp. No. 6396 (115-167)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0	60	200	600
No. of pups necropsied	68	80	85	67
Organ_____ Findings_____				
RESPIRATORY SYSTEM				
lung brown patch/zone	1	0	0	0
DIGESTIVE SYSTEM				
liver nodule	0	0	1	0
URINARY SYSTEM				
kidney dilated pelvis	4	1	3	2
ureter dilated lumen	3	0	1	0
SPECIAL SENSE SYSTEM				
eye absence	0	1	0	0
INTEGUMENTARY SYSTEM				
skin scab	0	1	0	0

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