

B-6792

## 最終報告書

試験名：3,6-ジクロロピリダジンのラットを用いた  
2週間回復性観察を含む28日間反復経口投与毒性試験

試験番号：B-6792

試験期間：2010年5月6日-2011年6月16日

### 試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所  
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど1284

### 試験委託者

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室  
〒100-8916 東京都千代田区霞が関1-2-2

株式会社ボゾリサーチセンター  
〒151-0065 東京都渋谷区大山町36-7

## 2. 目次

2.	目次 .....	3
4.	要約 .....	10
5.	緒言 .....	11
6.	試験材料及び方法 .....	12
6.1	被験物質及び媒体 .....	12
6.1.1	被験物質 .....	12
6.1.2	媒体 .....	13
6.2	投与液の調製 .....	13
6.2.1	媒体の調製 .....	13
6.2.2	被験液の調製 .....	13
6.2.3	投与液の保存方法 .....	13
6.2.4	媒体中での安定性 .....	13
6.2.5	被験液の濃度・均一性確認 .....	13
6.3	試験動物種及び系統の選択理由 .....	14
6.4	試験動物及び群分け .....	14
6.5	飼育条件 .....	15
6.6	飼料及び飲料水中の混入物質 .....	15
6.7	動物の識別及びケージへの表示 .....	15
6.8	投与経路、投与期間、投与回数及び回復期間とそれらの選択理由 .....	16
6.9	投与方法 .....	16
6.10	投与量及びその設定根拠並びに群構成 .....	16
6.11	観察及び検査の方法 .....	16
6.11.1	一般状態の観察 .....	17

6.11.2	詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量の測定	17
6.11.2.1	詳細な一般状態の観察	17
6.11.2.2	機能検査	17
6.11.2.3	握力測定	17
6.11.2.4	自発運動量の測定	18
6.11.3	体重測定	18
6.11.4	摂餌量測定	18
6.11.5	尿検査（摂水量測定含む）	19
6.11.6	血液学検査	20
6.11.7	血液化学検査	21
6.11.8	血中ホルモン測定	22
6.11.9	病理学検査	22
6.11.9.1	剖検	22
6.11.9.2	器官重量測定	22
6.11.9.3	病理組織学検査	22
6.11.9.4	腔垢検査	23
6.12	統計解析	24
7.	試験結果	25
7.1	一般状態	25
7.2	詳細な一般状態、機能検査、握力及び自発運動量	25
7.2.1	詳細な一般状態	25
7.2.2	機能検査	25
7.2.3	握力	25
7.2.4	自発運動量	26
7.3	体重	26
7.4	摂餌量	26
7.5	尿検査（摂水量含む）	26
7.6	血液学検査	27
7.7	血液化学検査	27
7.8	血中ホルモン測定	27
7.9	器官重量	27
7.10	剖検所見	28
7.11	病理組織学検査	29
7.12	腔垢検査	31
8.	考察	32
9.	文献	35

図

Fig. 1~4	自発運動量
Fig. 5	体重
Fig. 6	摂餌量

表

Table 1-1~1-3	一般状態
Table 2-1~2-18	詳細な一般状態
Table 2-19、2-20	機能検査
Table 2-21、2-22	握力
Table 2-23、2-24	自発運動量
Table 3-1、3-2	体重
Table 4-1、4-2	摂餌量
Table 5-1~5-8	尿検査（摂水量含む）
Table 6-1~6-6	血液学検査
Table 7-1~7-4	血液化学検査
Table 8-1、8-2	血中ホルモン測定
Table 9-1~9-8	器官重量
Table 10-1、10-2	剖検所見
Table 11-1~11-7	病理組織学検査
Table 12-1~12-6	性周期

#### 4. 要約

3,6-ジクロロピリダジンの28日間反復経口投与毒性試験を6週齢のSprague-Dawley系SPFラット〔CrI:CD(SD)、1群雌雄各6又は12匹〕を用いて実施した。投与量は0(0.5w/v%メチルセルロース水溶液：対照群)、4、20及び100 mg/kgとし、また、対照群と100 mg/kgの一部の個体(1群雌雄各6匹)については投与後2週間の休薬期間を設け、毒性変化の可逆性を検討した。

一般状態、詳細な一般状態、機能検査、握力、自発運動量、血液学検査、血中ホルモン測定及び陰垢検査に被験物質投与の影響は認められなかった。

体重では、投与期間中に低値が100 mg/kg投与群の雄で、投与期間中の体重増加量の低値が100 mg/kg投与群の雌で認められた。

摂餌量では、投与期間中に低値が100 mg/kg投与群の雌雄で認められた。

尿検査では、投与期間中にビリルビン陽性例の増加傾向が100 mg/kg投与群の雄で認められた。

血液化学検査では、投与期間終了時に総たん白質の高値が100 mg/kg投与群の雌雄で、総コレステロール及びリン脂質の高値が100 mg/kg投与群の雄で、グルコースの低値とアルブミンの高値が100 mg/kg投与群の雌で認められた。なお、回復期間終了時にもリン脂質の高値が100 mg/kg投与群の雄で認められた。

病理学検査では、投与期間終了時に肝臓において20 mg/kg以上の投与群の雄で絶対及び相対重量の高値が、100 mg/kg投与群の雌で相対重量の高値がみられ、組織学的にも20 mg/kg以上の投与群の雄と100 mg/kg投与群の雌で小葉中心性肝細胞肥大が認められた。腎臓において100 mg/kg投与群の雌雄で相対重量の高値がみられ、組織学的にも20 mg/kg以上の投与群の雄と100 mg/kg投与群の雌で尿細管上皮細胞の色素沈着が認められた。精巣上体において絶対及び相対重量の低値が100 mg/kg投与群でみられ、組織学的にも精子細胞の減少及び管腔内の細胞残渣が100 mg/kg投与群に認められ、精子形成について詳細に観察した結果、ステージXIIの精細管でパキテン期精母細胞数と伸長精子細胞数に低値が認められた。精巣において組織学的に精子細胞の貯留及び生殖細胞の変性/壊死が100 mg/kg投与群で認められた。更に、甲状腺の相対重量の高値が100 mg/kg投与群の雄で認められた。

上述した変化のうち、回復期間中及び回復期間終了時には、血液化学検査でリン脂質の高値が100 mg/kg投与群の雄でみられたもの、その他の投与期間中あるいは投与期間終了時に認められた変化は軽減あるいは消失し、回復性が示唆された。

以上の結果、3,6-ジクロロピリダジンの本試験条件下における無影響量は雌雄で主として病理学検査における肝臓の小葉中心性肝細胞肥大より、雄で4 mg/kg/day、雌で20 mg/kg/dayと推定された。

B-6792

## 5. 結言

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、3,6-ジクロロピリダジンをラットに 28 日間反復経口投与し、その影響を明らかにするとともに、2 週間休薬し、障害の可逆性を調べたのでその成績を報告する。なお、本試験は株式会社ボゾリサーチセンター動物実験委員会の承認を受けている。

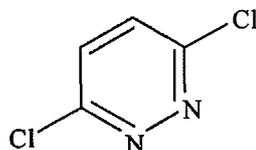
## 6. 試験材料及び方法

## 6.1 被験物質及び媒体

## 6.1.1 被験物質

本試験に使用した被験物質のロット番号及び含量等は次の通りである。また、試験成績書を添付資料1に示した。

名称	:	3,6-ジクロロピリダジン
英名	:	3,6-Dichloropyridazine
CAS 番号	:	141-30-0
分子式	:	C <sub>4</sub> H <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub>
官報公示整理番号	:	(5)-3834
分子量	:	148.98
構造式	:	



含量	:	99.9%
入手量	:	1000 g (500 g を 2 本)
性状	:	白色結晶性粉末
保存方法	:	冷暗所 (冷蔵庫内、許容値: 1~10 °C、実測値: 4~9 °C)、密栓
安定性	:	投与終了後、被験物質について試験受託者で赤外線吸収スペクトルの確認 (ATR 法) を実施し、投与前と比較して同様であることが確認された (添付資料 2)。
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室及び第 1 研究棟被験物質調製室
取扱い上の注意	:	作業場の換気を十分に行い、マスク、保護眼鏡、保護手袋等の適切な保護具を着用し、直接の接触を防ぐ。取り扱い後は、手、顔等を良く洗い、うがいをする。
使用後処理	:	被験物質約 1 g を保存試料として保存した。分析用に小分けした被験物質を含み、安定性を確認後すべて廃棄した。

B-6792

### 6.1.2 媒体

名称	:	メチルセルロース 400cP
選択理由	:	被験物質は水に難溶性のため、均一な懸濁液が調製可能な 0.5w/v%メチルセルロース水溶液を媒体として使用した。
ロット番号	:	EWM1974
製造者	:	和光純薬工業株式会社
保存方法	:	室温
保存場所	:	御殿場研究所 第1研究棟被験物質調製室

## 6.2 投与液の調製

### 6.2.1 媒体の調製

調製方法	:	メチルセルロース 400cP を注射用水（株式会社大塚製薬工場、ロット番号；0A97）に溶解し、0.5w/v%メチルセルロース水溶液とする。
保存方法	:	冷所（冷蔵庫内、実測値 3~5°C）に保存し、1 日以内に調製に用いた。

### 6.2.2 被験液の調製

濃度ごとに必要量の被験物質を正確に採取し、0.5 w/v%メチルセルロース水溶液に懸濁して 0.8 mg/mL 液（低用量群液）、4 mg/mL 液（中用量群液）及び 20 mg/mL 液（高用量群液）を調製した。被験液は週 1 回以上の頻度で調製し、調製後 7 日以内に使用した。

### 6.2.3 投与液の保存方法

投与液は 1 日必要分ずつ褐色瓶に分注し、使用時まで冷所（冷蔵庫内、実測値：3~5°C）で保存した。

### 6.2.4 媒体中での安定性

本被験物質の 0.1 及び 200 mg/mL 懸濁液（媒体：0.5w/v%メチルセルロース水溶液）は、冷所（冷蔵庫内、1~10°C）、遮光で 8 日間、その後室温で 24 時間安定であることが株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で確認されている（試験番号：A-2258、添付資料 3）。

### 6.2.5 被験液の濃度・均一性確認

投与 1 週と 4 週の投与に用いる各濃度の被験液について、その濃度・均一性を株式会社ボゾリサーチセンターで HPLC 法を用いて確認した。その結果、表示値に対する濃度の割合は 99.0~105.0%（許容範囲：表示値に対する割合；100±10%）、均一性は

B-6792

0.1~2.9%（許容範囲：CV10%以内）であり、いずれも許容範囲内であった（添付資料4-1及び4-2）。分析法の概略を次に示す。

1 濃度当たりの採取本数及び採取量

： 3本（上、中及び下層から採取）1本につき10 mL

#### 測定対象標準物質

名称： 3,6-ジクロロピリダジン

ロット番号： DU3PA

保存方法： 冷暗所（冷蔵庫内、許容値：1~10°C、実測値：2~9°C）、密栓

保存場所： 御殿場研究所 被験物質保存室及び生化学部標準物質保存場所

#### HPLC 測定条件

カラム： CAPCELL PAK C18 MGII（4.6 mm I.D. × 150 mm、粒子径 5 μm、株式会社資生堂）

カラム恒温槽設定温度

： 40°C

移動相： 精製水／メタノール／TFA 混液（700/300/1、v/v/v）

流速： 1 mL/min

検出： UV（測定波長 269 nm）

注入量： 20 μL

オートサンプラー内設定温度

： 室温（温度設定しない）

注入順序：

注入順序	注入回数	注入内容
1	3	標準溶液（システム適合性用）
2	3	標準溶液（定量用）
3~11	各1	測定実測試料*

\*測定試料から調製した試料を示す。

標準溶液及び測定実測試料の測定は、測定開始後24時間以内に実施した。

### 6.3 試験動物種及び系統の選択理由

毒性試験法ガイドラインによりラットを用いた試験が必要とされている。この試験に使用された系統のラットは特性がよく知られ、背景資料が豊富であることから選択した。

### 6.4 試験動物及び群分け

Sprague-Dawley系SPFラット〔CrI:CD(SD)、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター〕雌雄各47匹<sup>(注)</sup>を5週齢で入手し、当所で7日間検疫・馴化飼育し、

一般状態の観察（1回/日）、体重測定（3回）及び詳細な一般状態の観察（1回）を行い、体重増加量、一般状態及び詳細な一般状態の観察に異常がみられず健康と思われる雌雄各 36 匹（主群として雌雄各 24 匹、回復群として雌雄各 12 匹）を選び、6 週齢で試験に供した。投与開始日の体重範囲は、雄で 201~230 g、雌で 156~187 g であった。動物は検疫・馴化期間中の体重増加量（検疫初回の体重~群分け時の体重）により選別後、群分け当日（投与開始の 2 日前）の体重に基づいて、各群の平均体重ができるだけ均等となるよう各群を構成した。個体の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法及び無作為抽出法の組合せ（ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割当てた）により行った。また、余剰動物は投与開始日に試験系から除外し、エーテル深麻酔により安楽死した。

注）：試験計画書に従い、注文匹数は雌雄各 45 匹であったが、実際には雌雄各 47 匹が納入された。

### 6.5 飼育条件

動物は温度 21~27°C<sup>注)</sup>（許容範囲:23±3°C）、相対湿度 42~62%（許容範囲:50±20%）、換気回数 1 時間 10~15 回、照明 1 日 12 時間（07:00~19:00）の動物飼育室（303 号室）で、ブラケット式金属製網ケージ（W 250×D 350×H 200 mm：日本ケージ株式会社）で個別飼育し、飼育室内の清掃を毎日 1 回実施した。固形飼料 CRF-1（オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号：091203、100203、100302）は給餌器を用いて、また、御殿場市営水道水を給水瓶により自由に摂取させた。

注）：2010 年 5 月 11 日の 13:00~14:00 に温度が 26°C を上回り、試験計画書の範囲（23±3°C）を逸脱したが、ごく僅かな変動であり、動物についても異常は認められず、試験成績への影響はなかった。

### 6.6 飼料及び飲料水中の混入物質

飼料中の混入物質に関しては使用ロットについて Eurofins Scientific Analytics で分析を行い、また、飲料水については東芝機械環境センター株式会社に水道法に準拠する水質検査を定期的に（年 4 回）依頼した。これらの分析成績書を手し、試験成績に影響がないことを確認した後、写しを保存した。

### 6.7 動物の識別及びケージへの表示

動物は入荷時に小動物耳標を装着して個体識別した。入荷から群分け前までの間は試験番号、性別及び耳標番号を明記したケージラベルをつけた。群分け後は、性別及び用量ごと（対照群、低、中及び高用量群の順）に 4 桁の番号をつけた。この場合、1000 の位は群、100 の位は性（0 番を雄、1 番を雌）、10 と 1 の位は個体番号とした。各飼育ケージには、群分け前まで使用したケージラベルの裏に用量（群）ごとに色分けしたラベルをつけ、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号及び剖検予定日を明記した。ただし、詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量測定中は、観察者に対して投与の情報を制限するため、ケージラベルを裏返して試験番号、性別及び耳標番号のみを表示した。

### 6.8 投与経路、投与期間、投与回数及び回復期間とそれらの選択理由

毒性試験法ガイドラインに準じ、投与経路は経口投与を選択し、投与期間は28日間とした。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている1日1回(7回/週)とした。回復期間は障害の可逆性を検討するのに適当と考えられる2週間(14日間)とし、この間投与を行わなかった。

### 6.9 投与方法

投与容量は5 mL/kg 体重とし、胃ゾンデを用いて強制経口投与した(08:14~11:00の間)。対照群には媒体(0.5w/v%メチルセルロース水溶液)を同様に投与した。個体ごとの投与液量(表示単位:0.1 mL)は最新の体重を基準に算出した。

### 6.10 投与量及びその設定根拠並びに群構成

3,6-ジクロロピリダジンの0(0.5w/v%メチルセルロース水溶液)、100、300及び1000 mg/kg/dayを1群雌雄各5匹のラットに14日間反復経口投与した結果<sup>1)</sup>主な変化として1000 mg/kg投与群の雌雄で全例死亡が、300 mg/kg投与群の雌雄全例で自発運動の減少が、100 mg/kg以上の投与群の雌雄で肝臓及び腎臓の相対重量の高値がみられたことより、本試験における投与量は、100 mg/kg投与群を高用量とし、公比5で除し、20 mg/kgを中用量に、4 mg/kgを低用量に設定した。群構成表を次の表1に示す。

表 1. 群構成表

試験群	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	主 群		回 復 群	
					動物数	動物番号	動物数	動物番号
対照群	0	0	5	雄	6	1001~1006	6	1007~1012
				雌	6	1101~1106	6	1107~1112
低用量群	4	0.8	5	雄	6	2001~2006	-	-
				雌	6	2101~2106	-	-
中用量群	20	4	5	雄	6	3001~3006	-	-
				雌	6	3101~3106	-	-
高用量群	100	20	5	雄	6	4001~4006	6	4007~4012
				雌	6	4101~4106	6	4107~4112

### 6.11 観察及び検査の方法

それぞれ記載された時期に観察及び検査を実施した。試験日の起算に関しては下記の通りとした。

- 投与1日 (day 1 of administration) : 投与開始日
- 投与1週 (week 1 of administration) : 投与1から投与7日
- 回復1日 (day 1 of recovery) : 回復開始日(投与期間終了の翌日)
- 回復1週 (week 1 of recovery) : 回復1から回復7日

### 6.11.1 一般状態の観察

全個体について投与期間中は毎日3回、投与前と投与直後及び約2時間後(ただし、詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量測定を実施する時は投与前と投与直後の2回)、回復期間中は毎日1回、体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物などの一般状態を観察した。

### 6.11.2 詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量の測定

詳細な一般状態の観察は、投与期間中は検査当日の投与後に主群及び回復群の全個体を、回復期間中は回復群の全個体について、毎週1回実施した。また、機能検査、握力及び自発運動量の測定は、投与4週(雄を投与25日、雌を投与26日<sup>註)</sup>の投与後)及び回復2週(回復11日)に行った。詳細な一般状態の観察及び機能検査については実測値あるいはスコア化した評点法を用いた。なお、観察及び検査は投与の情報を制限(ブラインド化)し、動物をランダムに配置した状態で行った。

注) : 投与4週の自発運動の測定時に高用量群の雌1例(動物番号:4111)でカウンターとの接続不良が疑われたため、投与27日に再度測定を実施し、その再測定値を採用した。

#### 6.11.2.1 詳細な一般状態の観察

##### 1) ホームケージ内観察

姿勢、痙攣、異常行動

##### 2) 手に持つての観察

ケージからの取り出しやすさ、被毛・皮膚の状態、眼・鼻の分泌物、眼球(眼球突出、眼瞼閉鎖状態)、可視粘膜、自律神経機能(流涙、立毛、瞳孔径、流涎、異常呼吸)、ハンドリングに対する反応

##### 3) オープンフィールド内観察

覚醒状態、痙攣、異常行動、常同行動、歩行、姿勢、身繕い、立ち上がり回数、排泄物(排糞数、排尿)

#### 6.11.2.2 機能検査

聴覚反応、接近反応、接触反応、痛覚反応、瞳孔反射、空中正向反射、着地開脚幅

#### 6.11.2.3 握力測定

CPUゲージMODEL-9502A(アイコーエンジニアリング株式会社)を用いて前肢及び後肢の握力を測定した。

B-6792

#### 6.11.2.4 自発運動量の測定

実験動物用自発運動センサーNS-AS01（株式会社ニューロサイエンス）を用いて自発運動量を測定した。測定は1時間とし、10分間隔及び0~60分の測定値を集計した。

#### 6.11.3 体重測定

全個体について、投与期間中は投与1、4、7、10、14、17、21、24及び28日の投与前に、回復期間中は回復1、3、7、10及び14日に測定した。測定は08:40~09:56の間に行った。剖検日には相対器官重量算出のため、前日から約16時間絶食させた後の体重を測定した（07:58~08:18）。

#### 6.11.4 摂餌量測定

全個体について、投与期間中は投与1、7、14、21及び28日の投与前に、回復期間中は回復7及び14日に測定した。測定は08:53~10:02の間に行った。なお、投与期間中は投与開始日の測定は前日からの1日量を、投与7日は6日間の累積摂取量を、その後は7日ごとに7日間の累積摂取量を測定し、1匹1日量を算出した。回復1週は回復1日から7日までの6日間の累積摂取量を、その後は7日間の累積摂取量を測定し、1匹1日量を算出した。

## 6.11.5 尿検査（摂水量測定含む）

投与4週及び回復2週に行った。

投与4週（投与23日の投与後）は全個体について、回復2週（回復12日）は回復群の全個体について、検査当日にそれぞれ採尿器をセットしたケージに收容し、絶食・自由摂水下で4時間尿を、次いで自由摂食・自由摂水下でその後の20時間尿を採取し、表2に記載した項目及び方法により検査した。また、摂水量は、採尿ケージに收容した状態で前日からの1日当たりの摂水量を、給水瓶を用いて測定した。

表2. 尿検査の項目、測定法及び使用機器など

1) 4時間尿についての検査	
検査項目	測定方法
pH	オーショNSTEICKS-7EA 試験紙 <sup>a)</sup> （アークレイ株式会社）
たん白質	オーショNSTEICKS-7EA 試験紙 <sup>a)</sup> （アークレイ株式会社）
ケトン体	オーショNSTEICKS-7EA 試験紙 <sup>a)</sup> （アークレイ株式会社）
グルコース	オーショNSTEICKS-7EA 試験紙 <sup>a)</sup> （アークレイ株式会社）
潜血	オーショNSTEICKS-7EA 試験紙 <sup>a)</sup> （アークレイ株式会社）
ビリルビン	オーショNSTEICKS-7EA 試験紙 <sup>a)</sup> （アークレイ株式会社）
ウロビリノーゲン	オーショNSTEICKS-7EA 試験紙 <sup>a)</sup> （アークレイ株式会社）
色調	肉眼観察
沈渣	鏡検法
尿量（4時間量） <sup>注)</sup>	目盛付スピッツ管を用いた容量測定（単位：mL）
2) 20時間尿についての検査	
検査項目	測定方法
尿量（20時間量） <sup>注)</sup>	メスシリンダーを用いた容量測定（単位：mL）
浸透圧	氷点降下法 <sup>b)</sup> （単位：mOsm/kg）
使用測定機器	
<sup>a)</sup> ：AUTION™ MINI AM-4290（アークレイ株式会社）	
<sup>b)</sup> ：自動浸透圧測定装置 オートアンドスタット OM-6030（アークレイ株式会社）	

注)：4時間の尿量と20時間の尿量を合計して24時間の尿量（mL/24 h）を算出した。

## 6.11.6 血液学検査

投与期間及び回復期間終了の翌日の計画剖検時に、前日から一夜（16~20 時間）絶食させた全個体について、エーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈から EDTA-2K 加採血瓶（SB-41：シスメックス株式会社）に血液（約 1 mL）を採取した。得られた血液について表 3.1) に記載した項目及び方法により検査した。更に、血液（0.9 mL）を 3.8% クエン酸ナトリウム溶液加試験管（血液 9 容に対し 1 容の割合）に採取し、遠心分離（設定：3,000 rpm、1,580×g、10 分間）により得られた血漿について表 3.2) に記載した項目及び方法により検査した。なお、鏡検による確認に備え、全個体について May-Grünwald-Giemsa 染色法による血液塗抹標本を作製したが、鏡検による確認は不要と判断し、鏡検は実施しなかった。

表 3. 血液学検査の項目、測定法及び使用機器など

1) EDTA-2K 加血液についての検査		
検査項目	測定方法	単位
赤血球数 (RBC)	2 角度レーザーフローサイトメトリー法 <sup>a)</sup>	10 <sup>4</sup> /μL
ヘモグロビン量 (HGB)	シアンメトヘモグロビン変法 <sup>a)</sup>	g/dL
ヘマトクリット値 (HCT)	赤血球数及び平均赤血球容積から算出 <sup>a)</sup>	%
平均赤血球容積 (MCV)	2 角度レーザーフローサイトメトリー法 <sup>a)</sup>	fL
平均赤血球血色素量 (MCH)	赤血球数及びヘモグロビン量から算出 <sup>a)</sup>	pg
平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	ヘモグロビン量及びヘマトクリット値から算出 <sup>a)</sup>	g/dL
網赤血球率 (Retic.)	RNA 染色によるレーザーフローサイトメトリー法 <sup>a)</sup>	%
血小板数 (PLT)	2 角度レーザーフローサイトメトリー法 <sup>a)</sup>	10 <sup>4</sup> /μL
白血球数 (WBC)	2 角度レーザーフローサイトメトリー法 <sup>a)</sup>	10 <sup>2</sup> /μL
白血球百分率 <sup>b)</sup>	ペルオキシダーゼ染色によるフローサイトメトリー法 +2 角度レーザーフローサイトメトリー法 <sup>a)</sup>	% 10 <sup>2</sup> /μL
2) クエン酸ナトリウム加血液から分離した血漿についての検査		
検査項目	測定方法	単位
プロトロンビン時間 (PT)	クロット法 <sup>b)</sup>	s
活性化部分トロンボ プラスチン時間 (APTT)	クロット法 <sup>b)</sup>	s
フィブリノーゲン量 (FIB)	トロンボプラスチン法 <sup>b)</sup>	mg/dL
使用測定機器		
a) : 総合血液学検査装置アドヴィア 120 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., IL, USA)		
b) : 血液凝固自動測定装置 ACL Elite Pro (Instrumentation Laboratory, MA, USA)		

注) : リンパ球 (Lymph)、好中球 (Neut)、好酸球 (Eos)、好塩基球 (Baso)、単球 (Mono) 及び大型非染色球 (LUC)。また、白血球百分率と白血球数から各分画の実数を算出した。

## 6.11.7 血液化学検査

血液学検査用試料と同時に採取した血液（約 6 mL）を凝固促進剤入り試験管（ペノジェクト II-オートセップ：テルモ株式会社）に取り、遠心分離（設定：3,000 rpm、1,580×g、10 分間）し、得られた血清について、表 4.1) に記載した項目及び方法により検査した。また、ヘパリン加試験管（血液 1 mL 当たり約 20 単位のヘパリン）に採取した血液（約 2 mL）を遠心分離（設定：3,000 rpm、1,580×g、10 分間）し、得られた血漿について表 4.2) に記載した項目及び方法により検査した。

表 4. 血液化学検査の項目、測定法及び使用機器など

1) 分離した血清についての検査		
検査項目	測定方法	単位
ALP	Bessey-Lowry 法 <sup>a)</sup>	IU/L
総胆汁酸 (TBA)	3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ <sup>a)</sup>	$\mu$ mol/L
総コレステロール (T-CHO)	CEH-COD-POD 法 <sup>a)</sup>	mg/dL
トリグリセライド (TG)	LPL-GK-GPO-POD 法 <sup>a)</sup>	mg/dL
リン脂質 (PL)	PLD-ChOD-POD 法 <sup>a)</sup>	mg/dL
総ビリルビン (T-BIL)	ビリルビンオキシダーゼ法 <sup>a)</sup>	mg/dL
グルコース (GLU)	グルコースデヒドロゲナーゼ法 <sup>a)</sup>	mg/dL
尿素窒素 (BUN)	Urease-LEDH 法 <sup>a)</sup>	mg/dL
クレアチニン (CRNN)	Creatininase-creatinase-sarcosine oxidase-POD 法 <sup>a)</sup>	mg/dL
ナトリウム (NA)	イオン選択電極法 <sup>a)</sup>	mmol/L
カリウム (K)	イオン選択電極法 <sup>a)</sup>	mmol/L
塩素 (CL)	イオン選択電極法 <sup>a)</sup>	mmol/L
カルシウム (CA)	OCPC 法 <sup>a)</sup>	mg/dL
無機リン (P)	モリブデン酸法 <sup>a)</sup>	mg/dL
総たん白質 (TP)	Biuret 法 <sup>a)</sup>	g/dL
アルブミン (ALB)	BCG 法 <sup>a)</sup>	g/dL
A/G 比 (A/G)	総たん白質及びアルブミンから算出	
2) ヘパリン加血液から分離した血漿についての検査		
検査項目	測定方法	単位
AST	UV-rate 法 <sup>a)</sup>	IU/L
ALT	UV-rate 法 <sup>a)</sup>	IU/L
LDH	UV-rate 法 <sup>a)</sup>	IU/L
$\gamma$ -GTP	L- $\gamma$ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド法 <sup>a)</sup>	IU/L
使用測定機器		
a)：臨床化学自動分析装置 TBA-120FR 形（東芝メディカルシステムズ株式会社）		

### 6.11.8 血中ホルモン測定

6.11.7 で得られた血清について、表 5. に記載の項目及び方法により検査した。可能な限り血清は約 0.5 mL×3 本をサンプルチューブに分注し、測定まで-80°C の冷凍庫（許容範囲：-70°C 以下、実測値-83~72°C）に保存した。なお、雄の主群及び回復群の全例と雌の主群の 1101~1105、2101~2105、3101~3105 及び 4101~4106 については測定中に機器故障が発生したため、再測定を実施し、再測定値を採用した。

表 5. 血中ホルモン測定の商品、測定法及び使用機器など

検査項目	測定方法	単位
T3	CLEIA 法	ng/dL
T4	CLEIA 法	µg/dL
TSH	CLEIA 法	ng/mL
使用測定機器 全自動免疫化学発光測定システム IMMULYZE (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., IL, USA)		

### 6.11.9 病理学検査

#### 6.11.9.1 剖検

全ての動物について、採血後腹大動脈切断により放血致死させ、体外表・頭部・胸部・腹部を含む全身の器官・組織の肉眼による詳細な病理解剖を行い、結果を記録した。

#### 6.11.9.2 器官重量測定

全ての動物について、次に示す器官の重量（絶対重量）を測定するとともに、絶対重量と剖検時の体重から体重 100 g 当たりの相対重量を算出した。

なお、\*印を付した両側性の器官については左右別々に測定し、その合計値で評価した。

脳、甲状腺\*、副腎\*、胸腺、脾臓、心臓、肝臓、腎臓\*、精巣\*、精巣上体\*、前立腺、卵巣\*、子宮

#### 6.11.9.3 病理組織学検査

全ての個体について次に示す器官・組織を採取し、リン酸緩衝 10 v/v%ホルマリン液で固定した。ただし、肺はリン酸緩衝 10 v/v%ホルマリン液を注入後、眼球及び視神経はリン酸緩衝液で調製した 3 v/v%グルタルアルデヒド・2.5 v/v%ホルマリン液で固定後、精巣及び精巣上体はブアン液で固定した後、それぞれ、リン酸緩衝 10 v/v%ホルマリン液で保存し、パラフィン包埋した。その後、切片としてヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、主群の対照群及び高用量群（肉眼的異常部位については全例）について鏡検した。\*で示した両側性器官については両側を摘出したが、鏡検は左側のみ行った。なお、被験物質投与の影響が疑われた雌雄の肝臓及び腎臓と雄の精巣上体及び精巣については低及び中用量群並びに回復群の全個体については鏡検し

た。また、精巣においてはPAS染色標本を用いて精子形成については詳細に観察した。観察方法は、主群の対照群及び高用量群全動物の変性した細胞が多くみられるステージⅧと発育の進んだ伸長精子細胞がみられるステージⅫの精細管5本について、それぞれのセルトリ細胞、精祖細胞、精母細胞及び精子細胞の各細胞数をそれぞれ計数し、セルトリ細胞当たりの細胞数を算出後、対照群と高用量群間の平均値の差を統計解析した。更に、腎臓については尿細管上皮細胞の好酸性小体が認められたことから、代表例(3例、動物番号1004、4001及び4002)について、抗 $\alpha_2\mu$ グロブリン抗体を用いた免疫組織化学染色標本及びPAS染色標本を作製鏡検した。

他に上皮小体の標本作製において低用量群の雄1例(動物番号2004)に欠如がみられたが、少数例であり高用量群において上皮小体に被験物質投与の変化は認められていないことから、試験成績に影響はないと判断した。また、標本作製において雄1例(動物番号4011)の視神経、雄2例と雌1例(動物番号2003、1102及び1011)の上皮小体、雄2例の(動物番号2002及び4007)乳腺について左側組織の欠如であったが右側組織の標本作製が可能であったことから、試験成績には影響はないと判断した。

大脳、小脳(橋を含む)、坐骨神経\*、脊髄(胸部)、眼球\*、下垂体、甲状腺\*、上皮小体\*、副腎\*、胸腺、脾臓、顎下リンパ節、腸間膜リンパ節、心臓、気管、肺(気管支を含む)、胃、十二指腸、空腸、回腸(パイエル板を含む)、盲腸、結腸、直腸、肝臓、腎臓\*、膀胱、精巣\*、精巣上体\*、前立腺、精囊(凝固線含む)、卵巣\*、子宮(片側の子宮角及び頸部を含む)、膣、乳腺(鼠径部)\*、胸骨(骨髄を含む)、大腿骨(骨髄を含む)\*、大腿部骨格筋\*、皮膚(鼠径部)\*及び肉眼的異常部位(肺及び頸部皮膚)

他に、視神経\*(視神経は眼球と分離せず、ヘマトキシリン・エオジン染色標本作製まで実施した。)、ハーダー腺\*、胸大動脈、舌、食道、顎下腺\*、舌下腺\*、膵臓、個体識別部位(耳介)及び喉頭を摘出して保存した。

#### 6.11.9.4 腔垢検査

雌の全個体について剖検前1週間(主群では投与23~28日及び剖検日、回復群では回復9~14日及び剖検日)の毎日午前中に腔垢を採取した。その後鏡検し、性サイクルを観察した。

## 6.12 統計解析

オープンフィールド内観察の定量的項目、機能検査における定量的項目、握力測定、自発運動量の測定、体重（体重増加量を含む）、摂餌量、摂水量、尿検査の定量的項目、血液学検査、血液化学検査、血中ホルモン及び器官重量の計量データについて、対照群と各投与群との間で統計解析を行った。まず、主群については Bartlett 検定により分散性の検定を行った（有意水準：両側 1%）。分散が等しい場合は Dunnett 法を用いて、非等分散の場合は Dunnett 型の mean rank test を用いて、対照群と各投与群との間で検定を行った（有意水準：両側 5 及び 1%）。なお、回復群及び精子ステージについては、F 検定により各群の分散の均一性の検定（有意水準：片側 5%）を行った。その結果、等分散性が認められた場合には対照群と被験物質投与群との平均値の差について Student の t 検定（有意水準：両側 5 及び 1%）を、等分散性が認められなかった場合には Aspin-Welch の t 検定（有意水準：両側 5 及び 1%）を行った<sup>2) ~6)</sup>。

## 7. 試験結果

### 7.1 一般状態

成績を Table 1-1~1-3 及び Appendix 1~10 に示した。

#### 1) 投与期間

表皮剥離が対照群の雄 1/12 例で投与 24 日から認められた。

#### 2) 回復期間

雌雄いずれの動物においても、回復期間を通じて異常は認められなかった。

### 7.2 詳細な一般状態、機能検査、握力及び自発運動量

#### 7.2.1 詳細な一般状態

成績を Table 2-1~2-18 及び Appendix 11~70 に示した。

#### 1) 投与期間

手に持つての観察において、表皮剥離（軽度）が対照群の雄 1/12 例で投与 4 週に認められた。

#### 2) 回復期間

雌雄ともいずれの検査項目においても異常はなく、定量的項目においても対照群と 100 mg/kg 投与群との間に有意差は認められなかった。

#### 7.2.2 機能検査

成績を Table 2-19、2-20 及び Appendix 71~76 に示した。

#### 1) 投与 4 週

雌雄ともいずれの検査項目においても異常はなく、定量的項目においても対照群と各被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

#### 2) 回復 2 週

雌雄ともいずれの検査項目においても異常はなく、定量的項目においても対照群と 100 mg/kg 投与群との間に有意差は認められなかった。

#### 7.2.3 握力

成績を Table 2-21、2-22 及び Appendix 77~82 に示した。

#### 1) 投与 4 週

雌雄とも対照群と各被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

#### 2) 回復 2 週

雌雄とも対照群と 100 mg/kg 投与群との間に有意差は認められなかった。

#### 7.2.4 自発運動量

成績を Fig. 1~4、Table 2-23、2-24 及び Appendix 83~88 に示した。

##### 1) 投与 4 週

雌雄とも対照群と各被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

##### 2) 回復 2 週

雌雄とも対照群と 100 mg/kg 投与群との間に有意差は認められなかった。

#### 7.3 体重

成績を Fig.5、Table 3-1、3-2 及び Appendix 89~94 に示した。

##### 1) 投与期間

有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で投与 4 日にみられた。また、投与期間中の体重増加量に有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。

##### 2) 回復期間

100 mg/kg 投与群の雌雄とも対照群とほぼ同様に推移し有意差は認められなかった。

#### 7.4 摂餌量

成績を Fig.6、Table 4-1、4-2 及び Appendix 95~100 に示した。

##### 1) 投与期間

有意な低値が 4 mg/kg 投与群の雄で投与 1 日と 100 mg/kg 投与群の雌雄で投与 7 日に認められた。

##### 2) 回復期間

100 mg/kg 投与群の雌雄とも対照群とほぼ同様に推移し有意差は認められなかった。

#### 7.5 尿検査（摂水量含む）

成績を Table 5-1~5-8 及び Appendix 101~118 に示した。

##### 1) 投与 4 週

定性的項目においてビリルビン陽性例 (0.5~1.5 mg/dL) が 100 mg/kg 投与群の雄 2/12 例にみられ、ビリルビン陽性例の増加傾向が 100 mg/kg 投与群の雄に認められた。また、定量的項目では、摂水量の有意な高値が 20 mg/kg 投与群の雄に、浸透圧の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌に認められた。

##### 2) 回復 2 週

定性的項目及び定量的項目において雌雄いずれの動物にも異常は認められず、対照群と 100 mg/kg 投与群の間に有意差は認められなかった。

## 7.6 血液学検査

成績を Table 6-1~6-6 及び Appendix 119~136 に示した。

### 1) 投与期間終了時

活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な短縮が 20 mg/kg 投与群の雄で認められた。また、白血球百分率におけるリンパ球比率の有意な高値と好中球比率の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、単球比率の有意な高値が 4 mg/kg 投与群の雄でみられ、白血球分画における大型非染色球数の有意な低値が 4 及び 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。

### 2) 回復期間終了時

活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な短縮、白血球百分率におけるリンパ球比率の有意な低値と好中球比率の有意な高値、更に、白血球分画における実数で好塩基球数の有意な低値がいずれも 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。

## 7.7 血液化学検査

成績を Table 7-1~7-4 及び Appendix 137~148 に示した。

### 1) 投与期間終了時

ALT の有意な低値と総たん白質の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、ALP の有意な低値と総コレステロール及びリン脂質の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雄で、グルコースの有意な低値とアルブミンの有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。

### 2) 回復期間終了時

リン脂質及び尿素窒素の有意な高値とナトリウムの有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、無機リンの有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。

## 7.8 血中ホルモン測定

成績を Table 8-1、8-2 及び Appendix 149~154 に示した。

### 1) 投与期間終了時

雌雄とも対照群と各被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

### 2) 回復期間終了時

雌雄とも対照群と 100 mg/kg 投与群との間に有意差は認められなかった。

## 7.9 器官重量

成績を Table 9-1~9-8 及び Appendix 155~190 に示した。

### 1) 投与期間終了時

- |     |   |   |
|-----|---|---|
| 甲状腺 | : | 相対重量の有意な高値が 20 mg/kg 投与群の雌と 100 mg/kg 投与群の雄で認められた。          |
| 肝臓  | : | 絶対及び相対重量の有意な高値が 20 mg/kg 以上の投与群の雄で、相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与 |

		群の雌で認められた。
脾臓	:	絶対及び相対重量の有意な低値が 4 mg/kg 投与群の雌で認められた。
腎臓	:	相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。
副腎	:	相対重量の有意な低値が 20 mg/kg 投与群の雄で認められた。
精巣	:	絶対及び相対重量の有意な低値が 4 mg/kg 投与群で認められた。
精巣上体	:	絶対及び相対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群で認められた。
2) 回復期間終了時		
脳	:	絶対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。
心臓	:	相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。
肝臓	:	相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。
腎臓	:	相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。
精巣上体	:	絶対及び相対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群で認められた。

### 7.10 剖検所見

成績を Table 10-1、10-2 及び Appendix 191~262 に示した。

- 1) 投与期間終了時
 

体外表	:	表皮剥離が対照群の雄 1/6 例で認められた。
腎臓	:	のう胞が 4 及び 20 mg/kg 投与群の雄各 1/6 例で、腎盂拡張が 4 mg/kg 投与群の雌 1/6 例で認められた。
- 2) 回復期間終了時
 

腎臓	:	のう胞が 100 mg/kg 投与群の雄 1/6 例で認められた。
肺 (気管支を含む)	:	暗赤色巣が対照群の雄 1/6 例で認められた。
精巣	:	小型化が 100 mg/kg 投与群の 1/6 例で認められた。

## 7.11 病理組織学検査

成績を Table 11-1~11-7 及び Appendix 191~266 に示した。

## 1) 投与期間終了時

被験物質投与によると考えられる変化が雌雄の腎臓及び肝臓と雄の精巣上皮及び精巣に認められた。

- |      |   |   |
|------|---|---|
| 腎臓   | : | 軽微あるいは軽度な尿細管上皮細胞の色素沈着が 20 mg/kg 投与群の雄 1/6 例、100 mg/kg 投与群の雌雄全例で認められた。また、軽微あるいは軽度な尿細管上皮細胞の好酸性小体が対照群の雄 1/6 例、4 及び 20 mg/kg 投与群の雄各 2/6 例、100 mg/kg 投与群の雄 4/6 例でみられ、100 mg/kg 投与群の雄で発現頻度の増加傾向及び増強が認められた。なお、好酸性小体については代表例で実施した免疫組織化学染色及び PAS 染色の結果、 $\alpha 2\mu$ グロブリン由来であると判断した。 |
| 肝臓   | : | 軽微な小葉中心性肝細胞肥大が 20 mg/kg 投与群の雄 4/6 例、100 mg/kg 投与群の雄全例と雌 4/6 例で認められた。  |
| 精巣上皮 | : | 軽微な精子細胞の減少が 100 mg/kg 投与群の 2/6 例で、軽微あるいは軽度な管腔内の細胞残渣が 100 mg/kg 投与群の 4/6 例で認められた。  |
| 精巣   | : | 軽微から軽度な精子細胞の貯留と軽微な生殖細胞の変性/壊死が 100 mg/kg 投与群の全例で認められた。また、PAS 染色標本を用いた精子形成の詳細な観察では、ステージ XII の精細管においてパキテン期精母細胞数及び伸長精子細胞数の有意な低値が認められた。  |

投与期間終了時では以下に示す所見が認められたが、その出現状況などからいずれも偶発性の変化と判断した。

- |      |   |   |
|------|---|---|
| 精巣上皮 | : | 軽微な間質の細胞浸潤が対照群の 1/6 例で認められた。  |
| 眼球   | : | 軽微な網膜の異形成が対照群の雄 1/6 例と 100 mg/kg 投与群の雌雄各 1/6 例で、軽度な網膜の萎縮が対照群と 100 mg/kg 投与群の雌各 1/6 例で認められた。   |
| 腎臓   | : | 軽度な尿細管ののう胞性拡張が 100 mg/kg 投与群の雌 1/6 例で、軽微な再生尿細管が対照群の雄 3/6 例、4 mg/kg 投与群の雄 4/6 例と雌 1/6 例、20 mg/kg 投与群の雄 3/6 例と雌 1/6 例、100 mg/kg 投与群の雄 3/6 例と雌 1/6 例で、軽微な乳頭の鈣質沈着が対照群の雌雄各 1/6 例、4 mg/kg 投与群の雌 1/6 例、100 mg/kg 投与群の雄 1/6 例で、軽微な間質の細胞浸潤が対照群の雄 1/6 例で、 |

軽微な皮質の鉍質沈着が対照群及び 20 mg/kg 投与群の雄各 1/6 例、100 mg/kg 投与群の雌 1/6 例で、軽微な髄質の鉍質沈着が対照群の雄 2/6 例で認められた。剖検においてのう胞がみられた 4 及び 20 mg/kg 投与群の雄各 1 例では軽微なう胞が、また、腎盂拡張がみられた 4 mg/kg 投与群の雌 1 例では軽微な腎盂拡張が認められた。

- 肝臓 : 軽微な辺縁帯の肝細胞空胞化が対照群の雄 1/6 例と雌全例、4 mg/kg 投与群の雌雄各 2/6 例、20 mg/kg 投与群の雌 4/6 例、100 mg/kg 投与群の雄 2/6 例と雌 3/6 例で、軽微な微小肉芽腫が対照群の雌雄各 2/6 例、4 mg/kg 投与群の雌雄各 3/6 例、20 mg/kg 投与群の雌雄各 1/6 例、100 mg/kg 投与群の雄 2/6 例と雌 1/6 例で認められた。
- 下垂体 : 軽微なう胞が対照群の雌 1/6 例で認められた。
- 頸部皮膚 : 剖検において表皮剥離がみられた対照群の雄 1 例で軽微な潰瘍が認められた。
- 甲状腺 : 軽微あるいは軽微な異所性胸腺が対照群の雄 2/6 例と雌 1/6 例で、鰓後体の遺残が対照群の雄 3/6 例と雌 2/6 例、100 mg/kg 投与群の雄 2/6 例と雌 3/6 例で認められた。

## 2) 回復期間終了時

被験物質投与によると考えられる変化が雌雄の腎臓と雄の精巣上体及び精巣に認められた。

- 腎臓 : 軽微あるいは軽微な尿細管上皮細胞の色素沈着が 100 mg/kg 投与群の雄 4/6 例と雌 3/6 例で、軽微あるいは軽微な尿細管上皮細胞の好酸性小体が対照群の雄 3/6 例、100 mg/kg 投与群の雄 4/6 例で認められた。
- 精巣上体 : 軽微あるいは軽微な管腔内の細胞残渣が 100 mg/kg 投与群の 4/6 例で認められた。
- 精巣 : 軽微な精子細胞の貯留が 100 mg/kg 投与群の 2/6 例で、軽微な生殖細胞の変性/壊死が 100 mg/kg 投与群の 1/6 例で認められた。

回復期間終了時では以下に示す所見が認められたが、その出現状況などからいずれも偶発性の変化と判断した。

- 腎臓 : 軽微な再生尿細管が対照群の雌 1/6 例、100 mg/kg 投与群の雄 1/6 例で、軽微な乳頭の鉍質沈着が対照群の雄 1/6 例で、軽微な間質の細胞浸潤が 100 mg/kg 投与群の

		雄 1/6 例で、軽微な限局性線維化が 100 mg/kg 投与群の雌 1/6 例で、軽微な髄質の鉍質沈着が対照群の雌雄各 1/6 例で認められた。剖検においてのう胞がみられた 100 mg/kg 投与群の雄 1 例では軽度なう胞が認められた。
精巣上体	:	中等度な精子細胞の減少が 100 mg/kg 投与群の 1/6 例で認められた。
肝臓	:	軽微な辺縁帯の肝細胞空胞化が対照群の雄 3/6 例と雌 2/6 例、100 mg/kg 投与群の雄 3/6 例と雌 1/6 例で、軽微な微小肉芽腫が対照群の雄 2/6 例と雌 4/6 例、100 mg/kg 投与群の雌雄各 1/6 例で認められた。
肺 (気管支を含む)	:	剖検において暗赤色巣がみられた対照群の雄 1 例では軽微な限局性出血が認められた。
精巣	:	軽微な精細管の萎縮が対照群の 1/6 例で認められた。剖検において小型化がみられた 100 mg/kg 投与群の 1 例では高度な精細管の萎縮が認められた。

#### 7.12 膣垢検査

性周期の成績を Table 12-1~12-6 に示した。

##### 1) 投与期間終了時

対照群を含む全ての雌動物では周期的な膣垢を示し、性サイクルは正常であった。

##### 2) 回復期間終了時

対照群及び 100 mg/kg 投与群の雌動物では周期的な膣垢を示し、性サイクルは正常であった。

## 8. 考察

3,6-ジクロロピリダジンの28日間反復経口投与毒性試験を6週齢のSprague-Dawley系SPFラット〔CrI:CD(SD)、1群雌雄各6又は12匹〕を用いて実施した。投与量は0(0.5w/v%メチルセルロース水溶液：対照群)、4、20及び100 mg/kgとし、また、対照群と100 mg/kgの一部の個体(1群雌雄各6匹)については投与後2週間の休薬期間を設け、毒性変化の可逆性を検討した。

一般状態と詳細な一般状態の手に持つての観察では、投与期間中に表皮剥離が対照群の雄1/12例でみられたが、被験物質投与との関連性はなかった。なお、回復期間中には異常は認められなかった。

機能検査、握力及び自発運動量では、異常はなく被験物質投与の影響は認められなかった。

体重では、投与4日に低値が100 mg/kg投与群の雄で、投与期間中の体重増加量の低値が100 mg/kg投与群の雌で認められた。なお、回復期間中は雌雄とも対照群との間に差は認められなかった。

摂餌量では、投与7日に低値が100 mg/kg投与群の雌雄で認められた。その他、投与1日に4 mg/kg投与群の雄で低値がみられたが、投与開始前の変化であり被験物質投与との関連性はなかった。なお、回復期間中は雌雄とも対照群との間に差は認められなかった。

尿検査では、投与期間中にビリルビン陽性例の増加傾向が100 mg/kg投与群の雄で認められた。その他、20 mg/kg投与群の雄で摂水量の高値が、100 mg/kg投与群の雌で浸透圧の低値がみられたが、いずれもごく軽度であり、尿量など関連する検査項目に変化がないことから偶発性と判断した。なお、回復期間中では雌雄ともいずれの検査に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、投与期間終了時に活性化部分トロンボプラスチン時間の短縮が20 mg/kg投与群の雄でみられたが、ごく軽度であり、用量と関連する変化ではないことから偶発性と判断した。また、白血球百分率におけるリンパ球比率の高値と好中球比率の低値が100 mg/kg投与群の雄で、単球比率の高値が4 mg/kg投与群の雄で、白血球分画における大型非染色球数の低値が4及び100 mg/kg投与群の雌でみられたが、いずれもごく軽度であり、白血球数など関連する検査項目に変化がないことから偶発性と判断した。なお、回復期間終了時には活性化部分トロンボプラスチン時間の短縮、白血球百分率におけるリンパ球比率の低値と好中球比率の高値、更に、白血球分画における好塩基球数の低値が100 mg/kg投与群の雌でみられたが、いずれもごく軽度であり、投与期間終了時には認められていないことから偶発性と判断した。

血液化学検査では、投与期間終了時に総たん白質の高値が100 mg/kg投与群の雌雄で、総コレステロール及びリン脂質の高値が100 mg/kg投与群の雄で、グルコースの低値とアルブミンの高値が100 mg/kg投与群の雌で認められた。その他、ALTの低値

が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、ALP の低値が 100 mg/kg 投与群の雄でみられたが、変化は軽度であり、障害を示唆するとされる高値ではないことから、毒性学的には重要ではないと判断した。なお、回復期間終了時でもリン脂質の高値は 100 mg/kg 投与群の雄で認められた。また、尿素窒素の高値とナトリウムの低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、無機リンの低値が 100 mg/kg 投与群の雌でみられたが、いずれも変化はごく軽度であり、投与期間終了時には認められていないことから偶発性と判断した。

血中ホルモン測定では、投与及び回復期間終了時に雌雄とも被験物質投与の影響は認められなかった。

病理学検査では、投与期間終了時に肝臓において 20 mg/kg 以上の投与群の雄で絶対及び相対重量の高値が、100 mg/kg 投与群の雌で相対重量の高値がみられ、組織学的にも 20 mg/kg 以上の投与群の雄と 100 mg/kg 投与群の雌で小葉中心性肝細胞肥大が認められた。腎臓において 100 mg/kg 投与群の雌雄で相対重量の高値がみられ、組織学的にも 20 mg/kg 以上の投与群の雄と 100 mg/kg 投与群の雌で尿細管上皮細胞の色素沈着が認められた。更に、腎臓では 100 mg/kg 投与群の雄で尿細管上皮細胞の好酸性小体の発現頻度の増加傾向がみられたが、 $\alpha_2\mu$  グロブリン由来であり、 $\alpha_2\mu$  グロブリンは雄ラットの特異的タンパクであることから、本変化は毒性学的には重要でないと判断した<sup>7)</sup>。精巣上体において絶対及び相対重量の低値が 100 mg/kg 投与群でみられ、組織学的にも精子細胞の減少及び管腔内の細胞残渣が 100 mg/kg 投与群に認められた。更に、精巣では組織学的に精子細胞の貯留及び生殖細胞の変性/壊死が 100 mg/kg 投与群でみられ、精子形成について詳細に観察した結果、ステージ XII の精細管でパキテン期精母細胞数と伸長精子細胞数に低値が認められた。精巣上体及び精巣でステージ XII の精細管でみられた伸長精子細胞数の低値の変化は被験物質投与による精子細胞の形成及び放出障害による可能性が疑われた。また、ステージ XII の精細管でみられたパキテン期精母細胞数の低値について詳細は明らかではなかった。甲状腺においては相対重量の高値が 100 mg/kg 投与群の雄でみられた。なお、回復期間終了時では、肝臓において相対重量の高値が 100 mg/kg の雌雄でみられた。腎臓において相対重量の高値が 100 mg/kg 投与群の雌でみられ、組織学的にも尿細管上皮細胞の色素沈着が 100 mg/kg 投与群の雌雄でみられた。精巣においては組織学的に精子細胞の貯留及び生殖細胞の変性/壊死が 100 mg/kg 投与群でみられた。肝臓、腎臓及び精巣の変化は発現頻度あるいは程度が軽減していることから休薬による回復性が認められた。また、精巣上体は絶対及び相対重量の低値と管腔内の細胞残渣は投与期間終了とほぼ同程度であったが、組織学的に精子細胞の減少は発現頻度が軽減し、投与期間終了時にみられた精巣の組織学的変化は回復性がみられていることから、休薬による回復性があると判断した。なお、甲状腺の重量の高値は休薬により消失し回復性が認められた。その他、投与期間終了時に器官重量において甲状腺の相対重量の高値が 20 mg/kg 投与群の雌、脾臓の絶対及び相対重量の低値が 4 mg/kg 投与群の雌、副腎の相対重量の低値が 20 mg/kg 投与群の雄、精巣の絶対及び相対重量の低値が 4 mg/kg 投与群に認められたが、いずれの変化もごく軽度な変化であり、用量と関連した変化ではないことから偶発性

の変化と判断した。また、回復期間終了時において、脳の絶対重量の低値と心臓の相対重量の高値が 100 mg/kg 投与群の雌でみられたが、いずれもごく軽度な変化であり、投与期間終了時には認められていないことから偶発性と判断した。また、肉眼的に投与期間終了時に表皮剥離と腎臓ののう胞が、回復終了時に腎臓ののう胞、肺の暗赤色巣と精巣の小型化が認められたが発現状況などから偶発性と判断した。

膣垢検査では、いずれの動物も周期的な膣垢を示し、正常な性サイクルであったことから被験物質投与の影響は認められなかった。

上述した変化のうち、回復期間中及び回復期間終了時には、血液化学検査でリン脂質の高値が 100 mg/kg 投与群の雄でみられたもの、その他の変化は軽減あるいは消失し、回復性が示唆された。

以上の結果、3,6-ジクロロピリダジンの本試験条件下における無影響量は雌雄で主として病理学検査における肝臓の変化より、雄で 4 mg/kg/day、雌では 20 mg/kg/day と推定された。

9. 文献

- 1) 3,6-ジクロロピリダジンのラットを用いた 14 日間反復経口投与毒性試験（予備試験）（株式会社ボゾリサーチセンター、試験番号：C-B513、2010 年）
- 2) Snedecor GW, Cochran WG. Statistical methods.8th ed. Ames: Iowa State University Press;1989.
- 3) Dunnett CW. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control.J Am Stat Assoc 1955; 50:1096-121.
- 4) Dunnett CW. New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 1964; 20:482-91.
- 5) 佐久間昭（1977）：薬効評価－計画と解析－I 東京大学出版会, 東京.
- 6) 佐久間昭（1981）：薬効評価－計画と解析－II 東京大学出版会, 東京.
- 7) C.A. Montgomery, Jr., and J.C. Seely : 10. Kidney. In “Pathology of the Fischer Rat”, edited by G.A. Boorman et al., Academic Press, Inc., San Diego, pp.129, 1990.

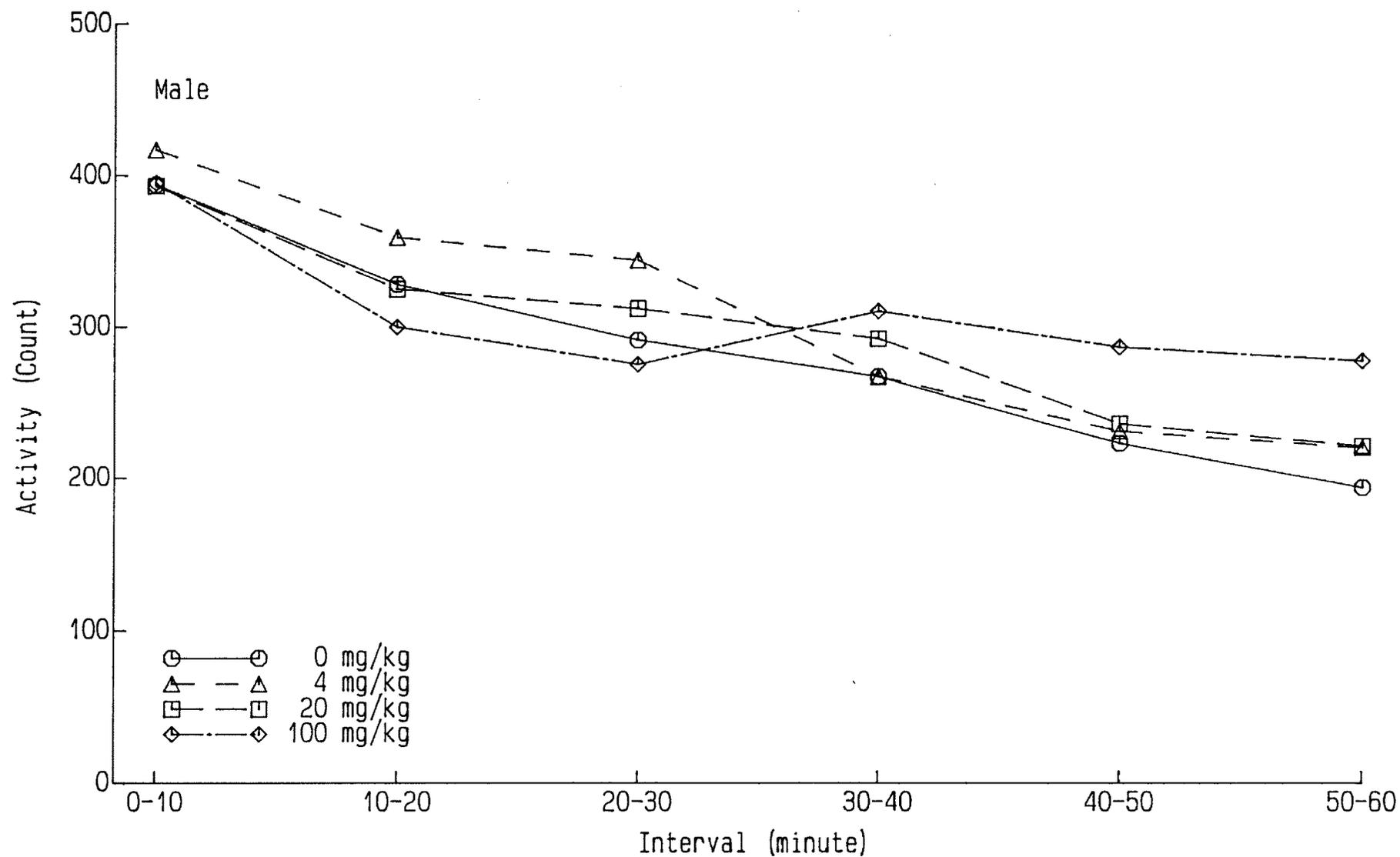


Fig.1 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
—— Motor activity (Week 4 of administration period) ——

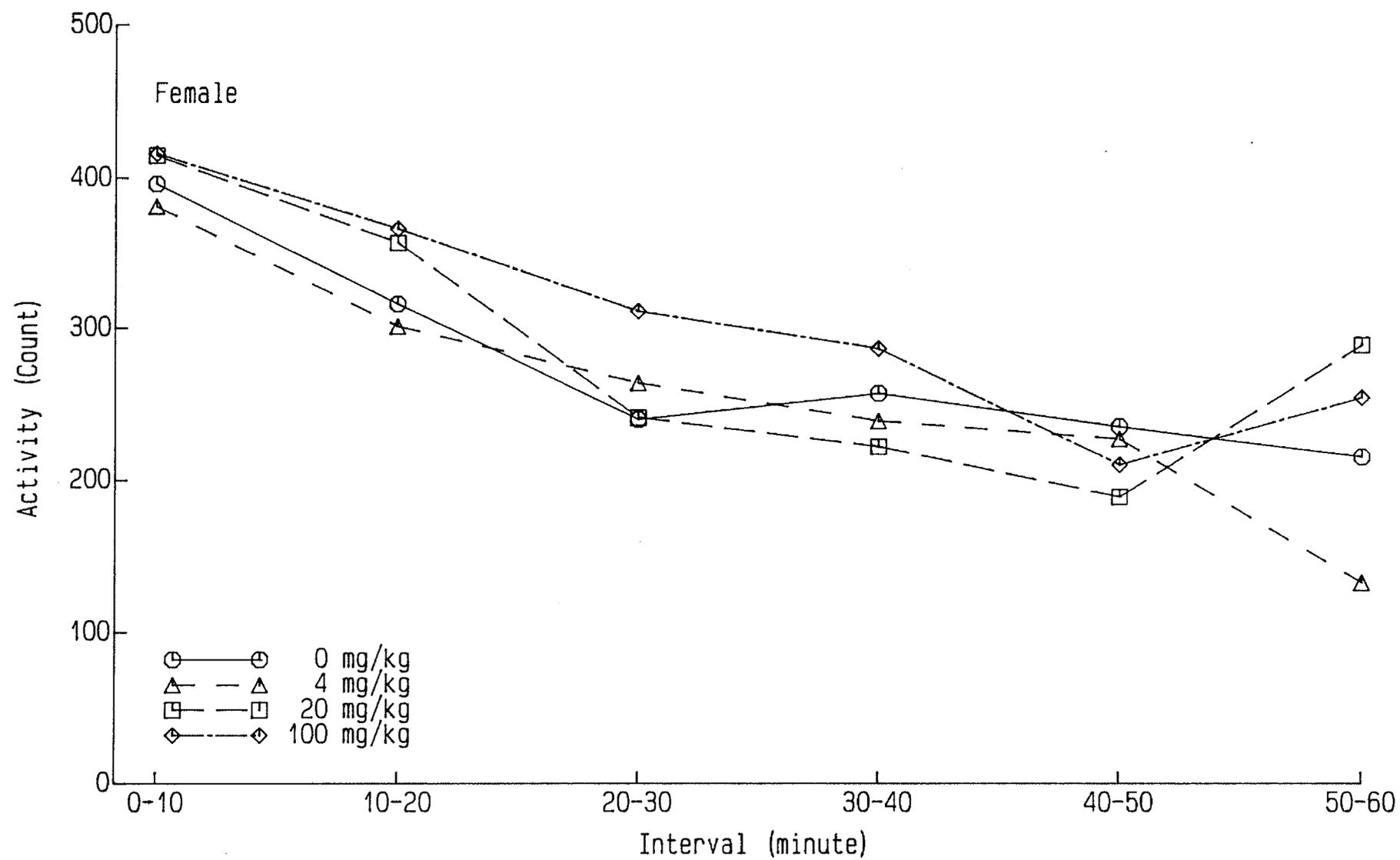


Fig.2 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
—— Motor activity (Week 4 of administration period) ——

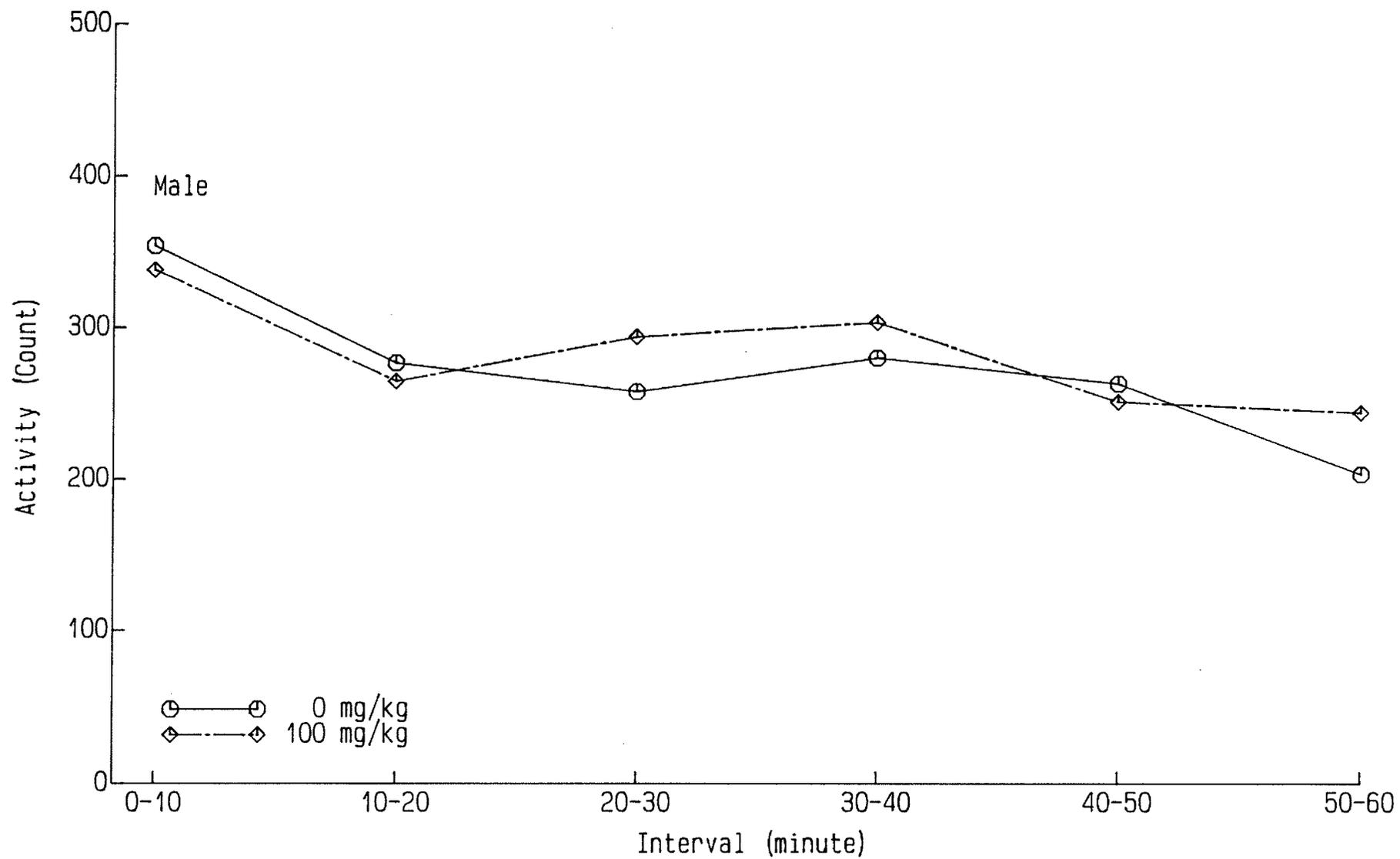


Fig.3 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
—— Motor activity (Week 2 of recovery period) ——

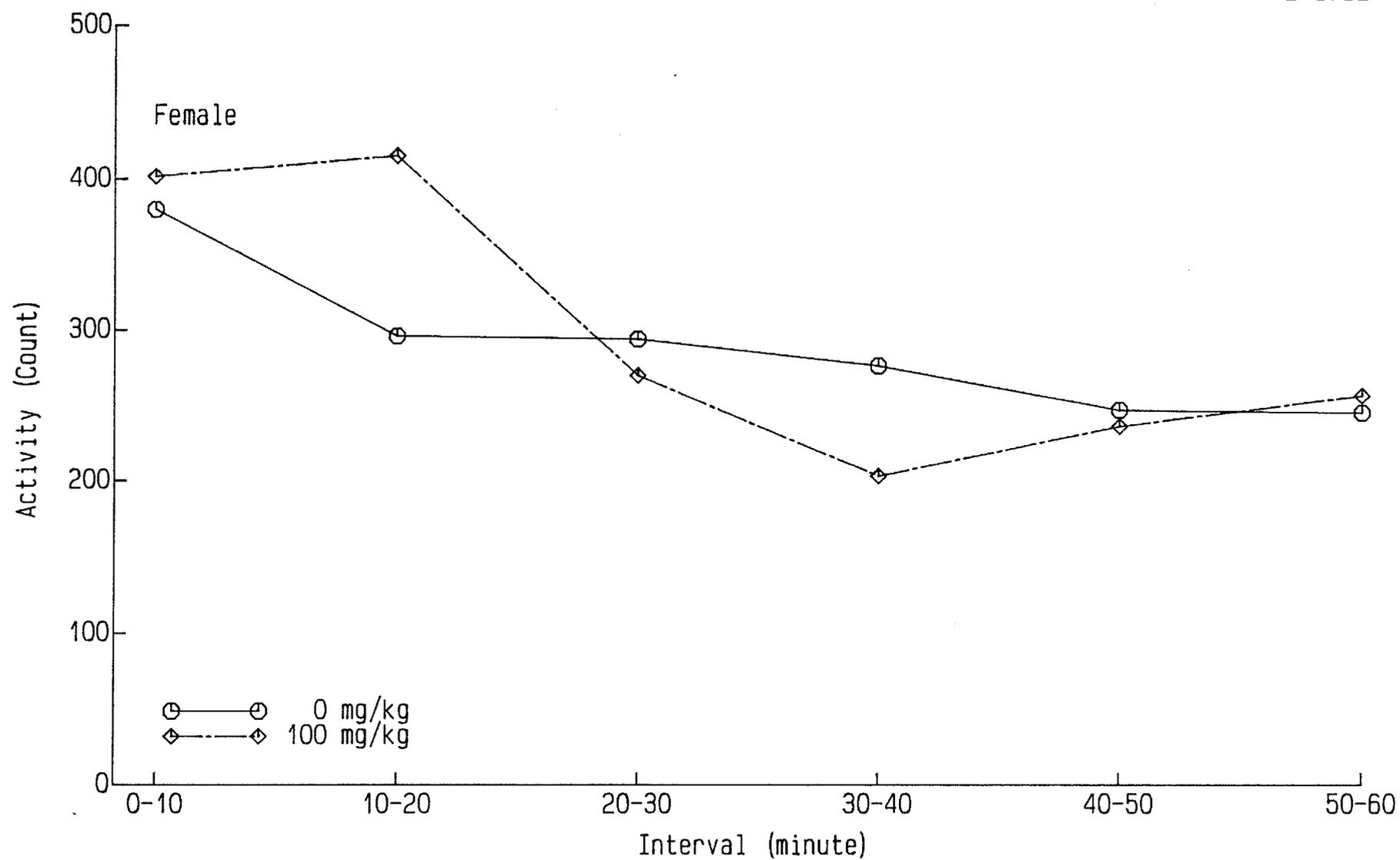


Fig.4 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
—— Motor activity (Week 2 of recovery period) ——

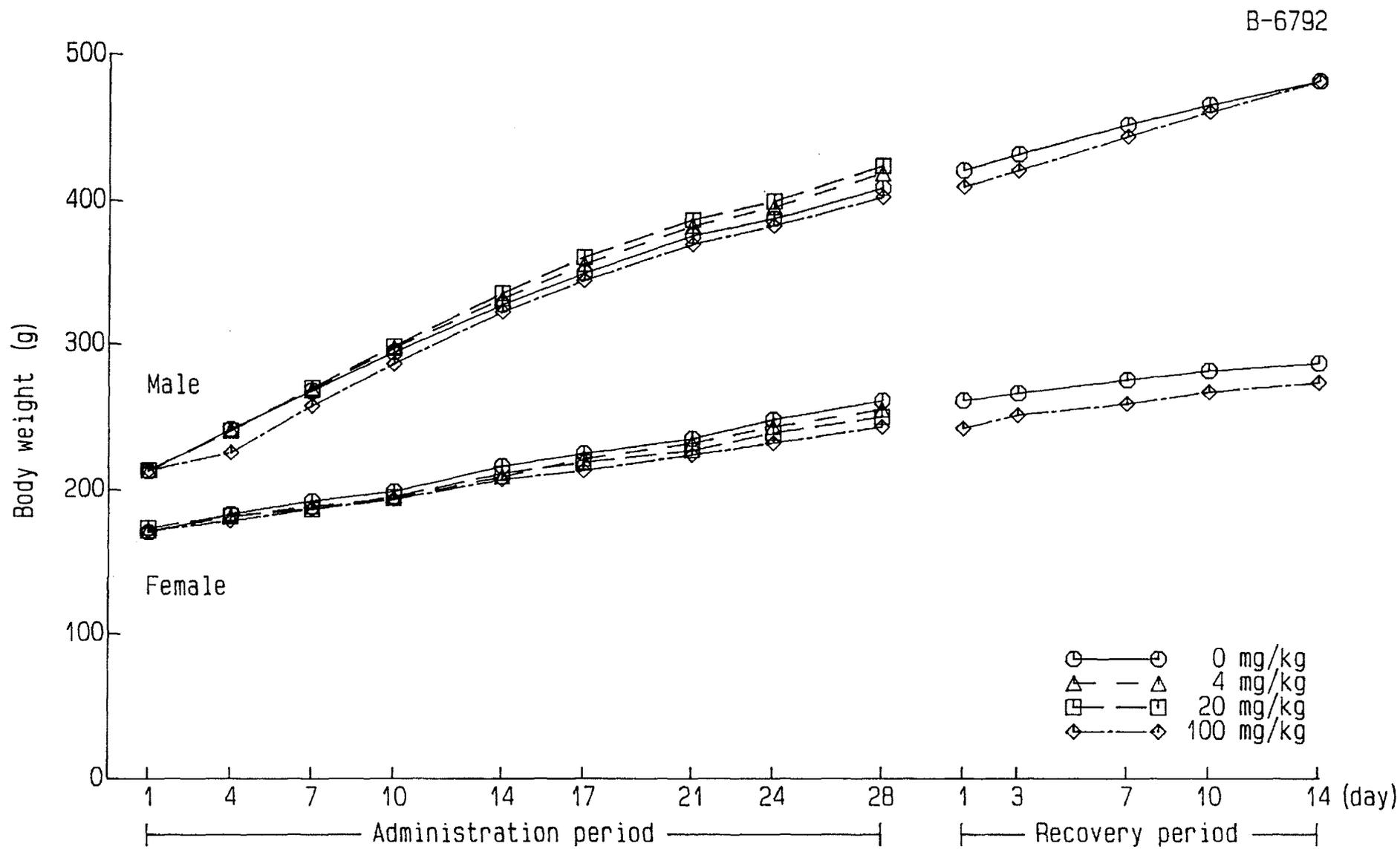


Fig.5 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks

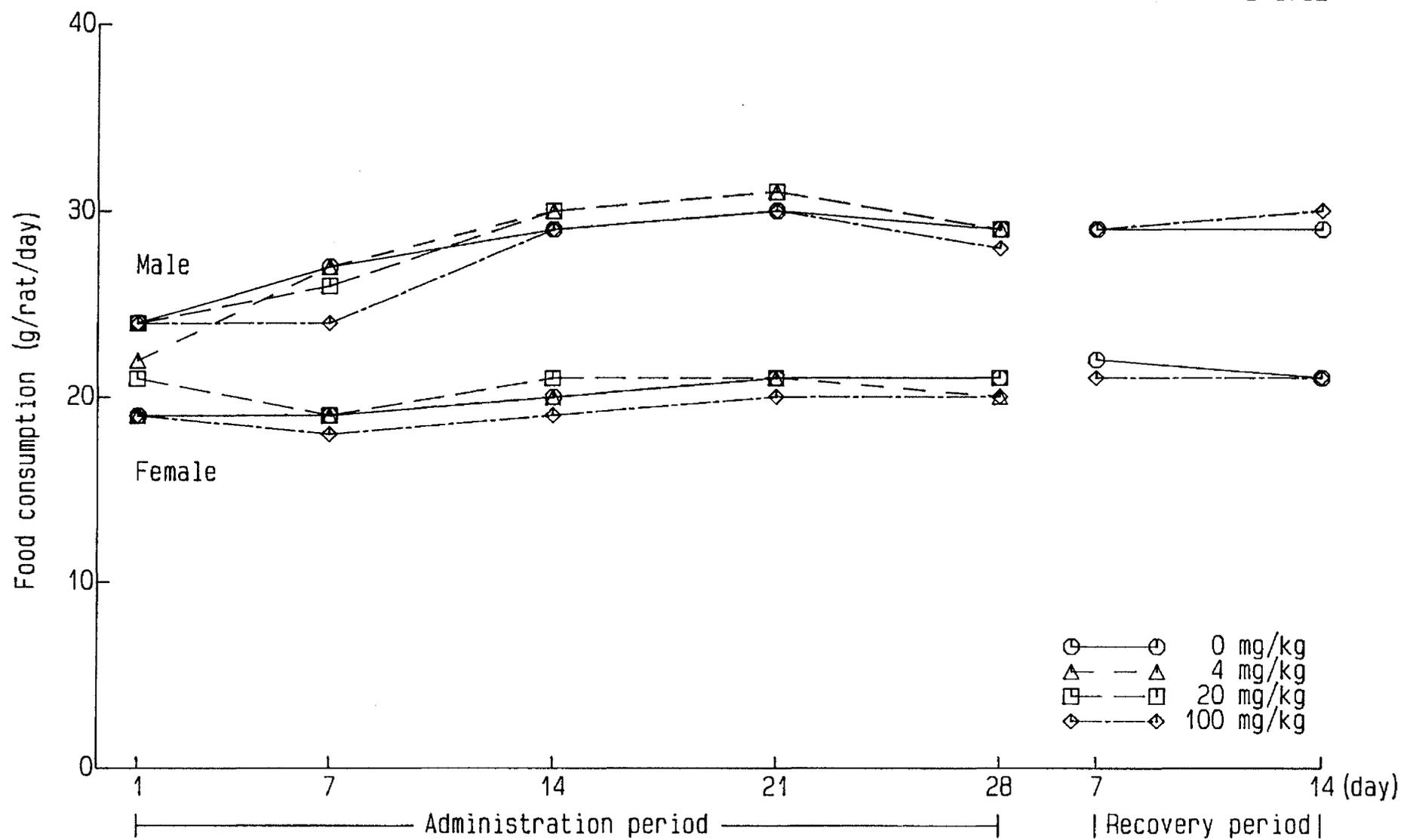


Fig.6 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks

— Food consumption —







Table 2-1

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Detailed clinical signs : home cage observations (Week 1 of administration period)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	4	20	100	0	4	20	100
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-2

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Detailed clinical signs : home cage observations (Week 2 of administration period)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	4	20	100	0	4	20	100
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-3                    A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Detailed clinical signs : home cage observations (Week 3 of administration period)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	4	20	100	0	4	20	100
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-4                      A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Detailed clinical signs : home cage observations (Week 4 of administration period)

Parameter	Sex	Male				Female			
		Dose (mg/kg)	0	4	20	100	0	4	20
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-5

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : home cage observation (Week 1 of recovery period)

Parameter	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	100	0	100
	No. of animals	6	6	6	6
Posture					
Normal		6	6	6	6
Convulsion					
None		6	6	6	6
Abnormal behavior					
None		6	6	6	6

Table 2-6

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Detailed clinical signs : home cage observation (Week 2 of recovery period)

Parameter	Sex Dose (mg/kg) No. of animals	Male		Female	
		0	100	0	100
Posture					
Normal		6	6	6	6
Convulsion					
None		6	6	6	6
Abnormal behavior					
None		6	6	6	6

Table 2-7 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Detailed clinical signs : in-the-hand observations (Week 1 of administration period)

Parameter	Sex Dose (mg/kg) No. of animals	Male				Female			
		0	4	20	100	0	4	20	100
		12	6	6	12	12	6	6	12
Ease of removal from cage									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12
Fur condition									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Skin									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Secretions-Eye, Nose									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Exophthalmos									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Palpebral closure									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Mucosal membranes									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Lacrimation									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Piloerection									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupil size									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Salivation									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal respiration									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Reactivity to handling									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-8 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Detailed clinical signs : in-the-hand observations (Week 2 of administration period)

Parameter	Sex Dose (mg/kg) No. of animals	Male				Female			
		0	4	20	100	0	4	20	100
		12	6	6	12	12	6	6	12
Ease of removal from cage									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12
Fur condition									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Skin									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Secretions-Eye, Nose									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Exophthalmos									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Palpebral closure									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Mucosal membranes									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Lacrimation									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Piloerection									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupil size									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Salivation									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal respiration									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Reactivity to handling									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-9

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : in-the-hand observations (Week 3 of administration period)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	4	20	100	0	4	20	100
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Ease of removal from cage									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12
Fur condition									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Skin									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Secretions-Eye, Nose									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Exophthalmos									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Palpebral closure									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Mucosal membranes									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Lacrimation									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Piloerection									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupil size									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Salivation									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal respiration									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Reactivity to handling									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12

Table 2-10

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : in-the-hand observation (Week 4 of administration period)

Parameter	Sex Dose (mg/kg) No. of animals	Male				Female			
		0	4	20	100	0	4	20	100
		12	6	6	12	12	6	6	12
Ease of removal from cage									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12
Fur condition									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Skin									
Normal		11	6	6	12	12	6	6	12
Slight	a)	0	0	0	0	0	0	0	0
Secretions-Eye, Nose									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Exophthalmos									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Palpebral closure									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Mucosal membranes									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Lacrimation									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Piloerection									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupil size									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Salivation									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal respiration									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Reactivity to handling									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12

a) : Excoriation

Table 2-11

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : in-the-hand observation (Week 1 of recovery period)

Parameter	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	100	0	100
	No. of animals	6	6	6	6
Ease of removal from cage					
Easy		6	6	6	6
Fur condition					
Normal		6	6	6	6
Skin					
Normal		6	6	6	6
Secretions-Eye, Nose					
Absent		6	6	6	6
Exophthalmos					
Absent		6	6	6	6
Palpebral closure					
Normal		6	6	6	6
Mucosal membranes					
Normal		6	6	6	6
Lacrimation					
Normal		6	6	6	6
Piloerection					
Absent		6	6	6	6
Pupil size					
Normal		6	6	6	6
Salivation					
None		6	6	6	6
Abnormal respiration					
Absent		6	6	6	6
Reactivity to handling					
Easy		6	6	6	6

Table 2-12

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : in-the-hand observation (Week 2 of recovery period)

Parameter	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	100	0	100
	No. of animals	6	6	6	6
Ease of removal from cage					
Easy		6	6	6	6
Fur condition					
Normal		6	6	6	6
Skin					
Normal		6	6	6	6
Secretions-Eye, Nose					
Absent		6	6	6	6
Exophthalmos					
Absent		6	6	6	6
Palpebral closure					
Normal		6	6	6	6
Mucosal membranes					
Normal		6	6	6	6
Lacrimation					
Normal		6	6	6	6
Piloerection					
Absent		6	6	6	6
Pupil size					
Normal		6	6	6	6
Salivation					
None		6	6	6	6
Abnormal respiration					
Absent		6	6	6	6
Reactivity to handling					
Easy		6	6	6	6

Table 2-13

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Detailed clinical signs : open field observation (Week 1 of administration period)

Parameter	Sex Dose (mg/kg) No. of animals	Male				Female			
		0	4	20	100	0	4	20	100
		12	6	6	12	12	6	6	12
Arousal									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Stereotypy									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Gait									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Grooming									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Rearing count (Mean±S.D.)		2± 2	4± 2	3± 1	3± 2	7± 3	5± 1	6± 1	6± 2
Defecation count (Mean±S.D.)		1± 1	1± 1	0± 0	1± 1	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Urination									
None		8	5	5	8	12	6	6	12
Small amount		4	0	1	1	0	0	0	0
Moderate amount		0	1	0	3	0	0	0	0

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-14

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Detailed clinical signs : open field observation (Week 2 of administration period)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	4	20	100	0	4	20	100
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Arousal									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Stereotypy									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Gait									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Grooming									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Rearing count (Mean±S.D.)		3± 3	4± 2	3± 2	3± 3	7± 2	5± 3	8± 2	7± 2
Defecation count (Mean±S.D.)		0± 1	0± 1	1± 1	1± 1	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Urination									
None		8	5	6	9	12	6	6	12
Small amount		4	1	0	3	0	0	0	0

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-15

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Detailed clinical signs : open field observation (Week 3 of administration period)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	4	20	100	0	4	20	100
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Arousal									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Stereotypy									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Gait									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Grooming									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Rearing count (Mean±S.D.)		3± 2	4± 2	3± 2	4± 3	8± 2	8± 2	8± 2	8± 2
Defecation count (Mean±S.D.)		0± 1	0± 0	0± 0	1± 1	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Urination									
None		9	5	6	9	12	6	6	12
Small amount		2	1	0	2	0	0	0	0
Moderate amount		1	0	0	1	0	0	0	0

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-16

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : open field observation (Week 4 of administration period)

Parameter	Sex Dose (mg/kg) No. of animals	Male				Female			
		0	4	20	100	0	4	20	100
Arousal									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Stereotypy									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Gait									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Grooming									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Rearing count (Mean±S.D.)		3± 2	4± 2	4± 2	4± 3	9± 3	7± 2	9± 3	8± 2
Defecation count (Mean±S.D.)		0± 1	0± 1	0± 0	1± 1	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Urination									
None		11	4	6	10	12	6	6	12
Small amount		1	2	0	2	0	0	0	0

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-17

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Detailed clinical signs : open field observation (Week 1 of recovery period)

Parameter	Sex Dose (mg/kg) No. of animals	Male		Female	
		0	100	0	100
Arousal					
Normal		6	6	6	6
Convulsion					
None		6	6	6	6
Abnormal behavior					
None		6	6	6	6
Stereotypy					
None		6	6	6	6
Gait					
Normal		6	6	6	6
Posture					
Normal		6	6	6	6
Grooming					
None		6	6	6	6
Rearing count (Mean±S.D.)		4± 3	4± 3	11± 4	10± 2
Defecation count (Mean±S.D.)		0± 1	0± 0	0± 0	0± 0
Urination					
None		5	6	6	6
Small amount		1	0	0	0

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-18

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : open field observation (Week 2 of recovery period)

Parameter	Sex Dose (mg/kg) No. of animals	Male		Female	
		0	100	0	100
Arousal					
Normal		6	6	6	6
Convulsion					
None		6	6	6	6
Abnormal behavior					
None		6	6	6	6
Stereotypy					
None		6	6	6	6
Gait					
Normal		6	6	6	6
Posture					
Normal		6	6	6	6
Grooming					
None		6	6	6	6
Rearing count (Mean±S.D.)		5± 2	4± 2	9± 2	11± 3
Defecation count (Mean±S.D.)		0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Urination					
None		6	6	6	6

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-19 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Manipulative test (Week 4 of administration period)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	4	20	100	0	4	20	100
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Auditory response Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Approach response Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Touch response Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Tail pinch response Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupillary reflex Pass, both		12	6	6	12	12	6	6	12
Aerial righting reflex (Total score: Mean±S.D.)		0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Landing foot splay (mm: Mean±S.D.)		82±19	68±22	67±10	67±19	55±16	72±15	62±17	61±17

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-20

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Manipulative test (Week 2 of recovery period)

Parameter	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	100	0	100
	No. of animals	6	6	6	6
Auditory response Normal		6	6	6	6
Approach response Normal		6	6	6	6
Touch response Normal		6	6	6	6
Tail pinch response Normal		6	6	6	6
Pupillary reflex Pass. both		6	6	6	6
Aerial righting reflex (Total score: Mean±S.D.)		0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Landing foot splay (mm: Mean±S.D.)		85±16	70±15	50±18	67±15

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-21 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Grip strength (Week 4 of administration period)

Sex	Dose mg/kg		Fore limb g	Hind limb g
Male	0	No.	12	12
		Mean	1179	609
		S.D.	233	101
	4	No.	6	6
		Mean	1331	667
		S.D.	164	169
	20	No.	6	6
		Mean	1146	603
		S.D.	181	107
	100	No.	12	12
		Mean	1232	595
		S.D.	207	125
Female	0	No.	12	12
		Mean	1000	530
		S.D.	148	151
	4	No.	6	6
		Mean	1090	559
		S.D.	156	101
	20	No.	6	6
		Mean	995	502
		S.D.	139	95
	100	No.	12	12
		Mean	979	536
		S.D.	154	84

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-22                      A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Grip strength (Week 2 of recovery period)

Sex	Dose mg/kg		Fore limb g	Hind limb g
Male	0	No.	6	6
		Mean	1606	880
		S.D.	122	110
	100	No.	6	6
		Mean	1475	751
		S.D.	190	157
Female	0	No.	6	6
		Mean	1031	522
		S.D.	217	130
	100	No.	6	6
		Mean	1153	582
		S.D.	195	119

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-23

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Motor activity (Week 4 of administration period)

Sex	Dose mg/kg		Interval (minutes)						Total(0-60)
			0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	
Male	0	No.	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	394	328	291	267	223	193	1696
		S.D.	37	30	57	55	83	108	225
	4	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	417	359	344	267	231	220	1837
		S.D.	25	40	22	73	99	112	285
	20	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	393	325	312	292	236	221	1779
		S.D.	42	63	37	89	121	110	341
	100	No.	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	395	300	275	310	286	277	1844
		S.D.	38	38	72	43	47	73	234
Female	0	No.	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	396	316	240	257	235	215	1658
		S.D.	47	60	93	103	56	100	319
	4	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	381	301	264	239	227	132	1544
		S.D.	43	70	70	85	92	130	310
	20	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	415	357	241	222	189	288	1712
		S.D.	67	29	105	86	76	67	235
	100	No.	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	416	366	311	286	210	254	1843
		S.D.	24	47	49	71	137	51	242

Unit : Count

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-24

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Motor activity (Week 2 of recovery period)

Sex	Dose mg/kg		Interval (minutes)						
			0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	Total(0-60)
Male	0	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	354	277	258	280	263	203	1635
		S.D.	36	55	61	56	80	107	306
	100	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	338	265	294	303	251	244	1694
		S.D.	21	61	55	41	70	76	208
Female	0	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	380	296	294	276	247	245	1737
		S.D.	38	35	52	65	69	70	88
	100	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	402	415	270	203	236	256	1782
		S.D.	36	135	55	125	146	129	311

Unit : Count

No significant difference between treated group and control group.

Table 3-1 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Body weight (Administration period)

Sex	Dose mg/kg		Day of administration									Gain 1-28
			1	4	7	10	14	17	21	24	28	
Male	0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	213	242	268	294	327	349	375	387	408	196
		S.D.	9	11	14	17	22	26	31	32	38	32
	4	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	214	242	269	297	331	355	382	395	418	203
		S.D.	6	7	11	16	19	21	25	25	30	29
	20	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	214	241	270	298	335	360	386	399	423	209
		S.D.	8	12	14	19	22	22	26	28	27	21
	100	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	214	226**	258	286	322	344	369	382	402	188
		S.D.	7	9D	10	11	11	13	15	16	20	21
Female	0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	170	183	192	199	216	225	235	248	261	91
		S.D.	7	7	8	9	12	13	14	17	17	15
	4	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	171	181	188	194	209	221	232	243	255	84
		S.D.	7	9	12	16	20	19	22	25	24	21
	20	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	173	182	186	195	211	219	227	239	250	76
		S.D.	10	12	10	10	10	15	19	18	19	13
	100	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	171	178	186	193	207	213	224	232	243	72*
		S.D.	10	9	9	11	12	15	17	15	18	13D

Unit : g

\* : p<0.05 ; \*\* : p<0.01 (Significant difference from control group)

D : Dunnett's test

Table 3-2 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Body weight (Recovery period)

Sex	Dose mg/kg		Day of recovery					Gain 1-14
			1	3	7	10	14	
Male	0	No.	6	6	6	6	6	6
		Mean	420	431	451	465	481	61
		S.D.	29	34	35	39	41	13
	100	No.	6	6	6	6	6	6
		Mean	409	420	443	460	481	72
		S.D.	26	29	31	39	38	17
Female	0	No.	6	6	6	6	6	6
		Mean	261	266	275	281	286	26
		S.D.	25	23	23	26	31	7
	100	No.	6	6	6	6	6	6
		Mean	242	251	259	267	273	31
		S.D.	22	21	21	21	24	6

Unit : g

No significant difference between treated group and control group.

Table 4-1 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Food consumption (Administration period)

Sex	Dose mg/kg		Day of administration				
			1	7	14	21	28
Male	0	No.	12	12	12	12	12
		Mean	24	27	29	30	29
		S.D.	1	1	3	3	3
	4	No.	6	6	6	6	6
		Mean	22**	27	30	31	29
		S.D.	1D	2	2	2	2
	20	No.	6	6	6	6	6
		Mean	24	26	30	31	29
		S.D.	2	1	2	2	2
	100	No.	12	12	12	12	12
		Mean	24	24**	29	30	28
		S.D.	1	2D	2	2	2
Female	0	No.	12	12	12	12	12
		Mean	19	19	20	21	21
		S.D.	2	1	2	2	2
	4	No.	6	6	6	6	6
		Mean	19	19	20	21	20
		S.D.	2	2	3	3	3
	20	No.	6	6	6	6	6
		Mean	21	19	21	21	21
		S.D.	3	1	1	2	2
	100	No.	12	12	12	12	12
		Mean	19	18**	19	20	20
		S.D.	2	1D	1	1	1

Unit : g/rat/day

\*\* : p<0.01 (Significant difference from control group)

D : Dunnett's test

Table 4-2                      A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Food consumption (Recovery period)

Sex	Dose mg/kg		Day of recovery	
			7	14
Male	0	No.	6	6
		Mean	29	29
		S.D.	3	3
	100	No.	6	6
		Mean	29	30
		S.D.	2	3
Female	0	No.	6	6
		Mean	22	21
		S.D.	2	2
	100	No.	6	6
		Mean	21	21
		S.D.	1	2

Unit : g/rat/day

No significant difference between treated group and control group.

Table 5-1 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Urinalysis (Week 4 of administration period)

Sex	Dose mg/kg	No.	pH									1) Protein					2) Ketone body					3) Glucose							
			5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	-	+-	+	++	+++	++++	-	+-	+	++	+++	++++	-	+-	+	++	+++	++++
Male	0	12	0	0	0	0	0	0	0	11	1	2	7	3	0	0	0	8	2	2	0	0	0	12	0	0	0	0	0
	4	6	0	0	0	0	0	0	0	5	1	1	3	2	0	0	0	4	1	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	20	6	0	0	0	0	0	0	0	5	1	1	5	0	0	0	0	4	1	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	100	12	0	0	0	0	0	0	1	9	2	0	4	8	0	0	0	3	4	5	0	0	0	12	0	0	0	0	0
Female	0	12	0	0	0	0	1	0	3	6	2	8	3	1	0	0	0	7	3	2	0	0	0	12	0	0	0	0	0
	4	6	0	0	1	0	0	1	0	4	0	4	2	0	0	0	0	3	2	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	20	6	0	0	0	0	1	0	2	3	0	3	2	1	0	0	0	4	1	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	100	12	0	0	0	2	1	1	4	4	0	9	1	1	1	0	0	8	2	2	0	0	0	12	0	0	0	0	0
1)	-	<10 mg/dL	+-	: 10 - 25 mg/dL	+	: 26 - 85 mg/dL	++	: 86 - 250 mg/dL	+++	: 251 - 600 mg/dL	++++	: >600 mg/dL																	
2)	-	<5 mg/dL	+-	: 5 - 7.5 mg/dL	+	: 7.6 - 30 mg/dL	++	: 31 - 70 mg/dL	+++	: 71 - 125 mg/dL	++++	: >125 mg/dL																	
3)	-	<30 mg/dL	+-	: 30 - 60 mg/dL	+	: 61 - 125 mg/dL	++	: 126 - 250 mg/dL	+++	: 251 - 750 mg/dL	++++	: >750 mg/dL																	

Table 5-2

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Urinalysis (Week 4 of administration period)

Sex	Dose mg/kg	No.	4) Occult blood					5) Bilirubin					6) Urobilinogen					7) Color		
			-	+	++	+++	++++	-	+	++	+++	++++	+-	+	++	+++	++++	LY	Y	DY
Male	0	12	11	1	0	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	0
	4	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0	6	0
	20	6	5	1	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0
	100	12	9	3	0	0	0	10	2	0	0	0	10	2	0	0	0	0	12	0
Female	0	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	11	1	0	0	0	0	12	0
	4	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0	6	0
	20	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0
	100	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	10	2	0	0	0	0	12	0

4) - : <0.03 mg/dL    +- : 0.03 - 0.05 mg/dL    + : 0.06 - 0.15 mg/dL    ++ : 0.16 - 0.75 mg/dL    +++ : >0.75 mg/dL  
5) - : <0.5 mg/dL    + : 0.5 - 1.5 mg/dL    ++ : 1.6 - 5.0 mg/dL    +++ : 5.1 - 10.0 mg/dL    ++++ : >10.0 mg/dL  
6) +- : <2.0 mg/dL    + : 2.0 - 3.5 mg/dL    ++ : 3.6 - 7.0 mg/dL    +++ : 7.1 - 12.0 mg/dL    ++++ : >12.0 mg/dL  
7) LY : Light yellow    Y : Yellow    DY : Dark yellow



Table 5-4

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Water intake and urinalysis (Week 4 of administration period)

Sex	Dose mg/kg	No.		Water intake mL/24h	Urine volume mL/24h	Osmolality mOsm/kg
Male	0	12	Mean	36	13.2	1995
			S.D.	5	4.7	590
	4	6	Mean	34	12.6	2197
			S.D.	2	3.5	319
	20	6	Mean	42*	14.8	1565
			S.D.	6D	4.2	271
	100	12	Mean	37	15.2	1638
			S.D.	4	4.2	304
Female	0	12	Mean	30	8.5	2150
			S.D.	4	2.9	467
	4	6	Mean	29	9.4	1959
			S.D.	3	4.6	255
	20	6	Mean	31	6.5	2275
			S.D.	5	2.2	394
	100	12	Mean	33	11.3	1658*
			S.D.	7	6.3	556D

\* : p<0.05 (Significant difference from control group)  
 D : Dunnett's test

Table 5-5 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Urinalysis (Week 2 of recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.	pH									1) Protein					2) Ketone body					3) Glucose							
			5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	-	+-	+	++	+++	++++	-	+-	+	++	+++	++++	-	+-	+	++	+++	++++
Male	0	6	0	0	0	0	0	0	0	5	1	2	2	2	0	0	0	2	3	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	100	6	0	0	0	0	0	0	0	4	2	1	2	2	1	0	0	2	1	3	0	0	0	6	0	0	0	0	0
Female	0	6	0	0	0	1	2	1	0	2	0	1	2	3	0	0	0	2	3	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	100	6	0	0	0	0	0	1	1	4	0	3	3	0	0	0	0	4	2	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
1)	-	<10 mg/dL	+-	: 10 - 25 mg/dL			+	: 26 - 85 mg/dL			++	: 86 - 250 mg/dL			+++	: 251 - 600 mg/dL			++++	: >600 mg/dL									
2)	-	<5 mg/dL	+-	: 5 - 7.5 mg/dL			+	: 7.6 - 30 mg/dL			++	: 31 - 70 mg/dL			+++	: 71 - 125 mg/dL			++++	: >125 mg/dL									
3)	-	<30 mg/dL	+-	: 30 - 60 mg/dL			+	: 61 - 125 mg/dL			++	: 126 - 250 mg/dL			+++	: 251 - 750 mg/dL			++++	: >750 mg/dL									

Table 5-6 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Urinalysis (Week 2 of recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.	4) Occult blood					5) Bilirubin					6) Urobilinogen					7) Color		
			-	+-	+	++	+++	-	+	++	+++	++++	+-	+	++	+++	++++	LY	Y	DY
Male	0	6	5	1	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0
	100	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0	6	0
Female	0	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	4	2	0	0	0	0	6	0
	100	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0

4) - : <0.03 mg/dL    +- : 0.03 - 0.05 mg/dL    + : 0.06 - 0.15 mg/dL    ++ : 0.16 - 0.75 mg/dL    +++ : >0.75 mg/dL  
5) - : <0.5 mg/dL    + : 0.5 - 1.5 mg/dL    ++ : 1.6 - 5.0 mg/dL    +++ : 5.1 - 10.0 mg/dL    ++++ : >10.0 mg/dL  
6) +- : <2.0 mg/dL    + : 2.0 - 3.5 mg/dL    ++ : 3.6 - 7.0 mg/dL    +++ : 7.1 - 12.0 mg/dL    ++++ : >12.0 mg/dL  
7) LY : Light yellow    Y : Yellow    DY : Dark yellow



Table 5-8                      A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Water intake and urinalysis (Week 2 of recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.		Water intake mL/24h	Urine volume mL/24h	Osmolality mOsm/kg
Male	0	6	Mean	35	13.7	1998
			S.D.	6	2.2	127
	100	6	Mean	40	17.9	1738
			S.D.	8	8.8	424
Female	0	6	Mean	26	6.9	2215
			S.D.	5	1.8	277
	100	6	Mean	28	10.9	1830
			S.D.	7	5.6	399

No significant difference between treated group and control group.

Table 6-1 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Hematology (After administration period)

Sex	Dose mg/kg	No.		RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	Retic	PLT	PT	APTT	FIB
				X10 <sup>4</sup> /μL	g/dL	%	fL	pg	g/dL	%	X10 <sup>4</sup> /μL	s	s	mg/dL
Male	0	6	Mean	875	16.1	47.8	54.6	18.5	33.8	2.5	128.9	13.9	23.6	299
			S.D.	29	0.5	1.4	1.9	0.5	0.6	0.7	10.7	2.0	4.6	22
	4	6	Mean	865	16.1	47.6	55.0	18.7	33.9	2.6	125.2	13.7	20.7	302
			S.D.	27	0.5	1.4	0.9	0.5	0.5	0.4	7.9	1.7	2.8	27
	20	6	Mean	860	15.9	46.8	54.5	18.5	34.0	2.9	128.6	12.7	18.9*	298
			S.D.	21	0.2	0.8	1.5	0.3	0.6	0.4	12.8	1.0	2.5D	41
	100	6	Mean	867	15.9	47.5	54.9	18.4	33.4	2.6	132.1	14.3	21.2	337
			S.D.	30	0.5	1.7	1.6	0.4	0.3	0.4	10.2	1.7	1.5	19
Female	0	6	Mean	842	15.6	45.0	53.6	18.5	34.7	2.5	134.0	11.1	16.1	239
			S.D.	36	0.5	1.5	1.4	0.6	0.3	0.4	14.3	0.2	2.3	11
	4	6	Mean	849	15.6	44.7	52.7	18.4	34.8	1.8	135.5	11.4	15.8	228
			S.D.	43	0.5	1.3	1.8	0.6	0.3	0.4	10.3	0.5	1.1	19
	20	6	Mean	859	15.8	45.3	52.9	18.4	34.8	2.2	138.3	11.0	16.3	228
			S.D.	49	0.5	1.6	2.0	0.7	0.5	0.8	11.2	0.5	1.9	24
	100	6	Mean	870	16.0	46.5	53.5	18.4	34.4	2.2	136.3	10.6	17.1	225
			S.D.	45	0.5	1.9	1.1	0.5	0.6	0.5	19.1	0.4	2.2	16

\* : p<0.05 (Significant difference from control group)  
D : Dunnett's test

Table 6-2 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Hematology (After administration period)

Sex	Dose mg/kg	No.		WBC	Differential leukocyte counts (%)					
				X10 <sup>2</sup> /μL	LYMP	NEUT	EOS	BASO	MONO	LUC
Male	0	6	Mean	86.7	75.3	21.9	0.8	0.3	1.3	0.4
			S.D.	24.1	6.4	5.8	0.3	0.1	0.5	0.1
	4	6	Mean	82.7	80.4	15.8	1.0	0.3	2.2*	0.4
			S.D.	12.9	4.8	4.7	0.3	0.1	0.8D	0.2
	20	6	Mean	102.3	80.8	15.8	0.8	0.4	1.7	0.5
			S.D.	12.2	2.5	2.3	0.3	0.1	0.4	0.3
	100	6	Mean	79.3	82.4*	14.6*	1.0	0.3	1.2	0.5
			S.D.	19.2	3.9D	3.5D	0.5	0.1	0.3	0.1
Female	0	6	Mean	85.1	80.1	16.5	1.3	0.3	1.3	0.6
			S.D.	21.0	5.2	5.6	1.0	0.1	0.3	0.2
	4	6	Mean	66.0	76.7	19.9	1.2	0.3	1.5	0.4
			S.D.	10.4	7.5	7.8	0.5	0.1	0.5	0.2
	20	6	Mean	67.7	79.7	17.1	1.2	0.3	1.3	0.5
			S.D.	18.9	8.5	8.4	0.3	0.1	0.4	0.2
	100	6	Mean	62.8	78.6	18.2	1.3	0.2	1.3	0.5
			S.D.	23.0	3.3	3.4	0.8	0.1	0.3	0.1

LUC : Large unstained cells

\* : p<0.05 (Significant difference from control group)

D : Dunnett's test

Table 6-3 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Hematology (After administration period)

Sex	Dose mg/kg	No.	Differential leukocyte counts ( $\times 10^2/\mu\text{L}$ )						
			LYMP	NEUT	EOS	BASO	MONO	LUC	
Male	0	6	Mean	65.7	18.7	0.7	0.2	1.2	0.3
			S.D.	21.6	6.4	0.3	0.2	0.6	0.1
	4	6	Mean	66.7	13.0	0.8	0.3	1.8	0.3
			S.D.	12.3	4.0	0.1	0.1	0.5	0.2
	20	6	Mean	82.5	16.3	0.8	0.4	1.7	0.5
			S.D.	8.5	3.9	0.4	0.1	0.4	0.3
	100	6	Mean	65.1	11.8	0.8	0.3	1.0	0.4
			S.D.	14.7	5.1	0.4	0.1	0.3	0.1
Female	0	6	Mean	67.7	14.5	1.1	0.2	1.1	0.5
			S.D.	15.5	7.3	0.9	0.1	0.4	0.2
	4	6	Mean	51.0	12.6	0.9	0.2	1.0	0.3*
			S.D.	12.0	4.0	0.4	0.1	0.4	0.1D
	20	6	Mean	53.5	11.8	0.8	0.2	0.9	0.4
			S.D.	14.9	7.2	0.5	0.1	0.5	0.1
	100	6	Mean	48.9	12.0	0.7	0.2	0.8	0.3*
			S.D.	15.9	6.5	0.4	0.1	0.4	0.1D

LUC : Large unstained cells

\* :  $p < 0.05$  (Significant difference from control group)

D : Dunnett's test

Table 6-4 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Hematology (After recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.		RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	Retic	PLT	PT	APTT	FIB
				X10 <sup>6</sup> /μL	g/dL	%	fL	pg	g/dL	%	X10 <sup>9</sup> /μL	s	s	mg/dL
Male	0	6	Mean	907	15.6	47.4	52.3	17.2	33.0	2.0	113.9	13.3	20.1	283
			S.D.	29	0.5	1.3	0.9	0.2	0.5	0.3	16.8	0.9	2.3	30
	100	6	Mean	900	15.6	46.9	52.1	17.3	33.2	2.5	127.1	12.5	17.9	271
			S.D.	39	0.5	1.4	1.2	0.4	0.5	0.4	5.0	0.6	1.5	12
Female	0	6	Mean	847	15.0	44.2	52.2	17.8	34.0	1.6	130.7	11.2	16.4	215
			S.D.	44	0.5	1.1	1.6	0.4	0.5	0.4	10.5	0.9	0.8	35
	100	6	Mean	858	15.3	45.0	52.5	17.8	33.9	2.0	135.3	11.1	15.0*	240
			S.D.	23	0.3	1.1	0.4	0.2	0.4	0.4	10.1	0.7	0.9T	32

\* : p<0.05 (Significant difference from control group)  
T : Student's t-test

Table 6-5 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Hematology (After recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.		WBC	Differential leukocyte counts (%)					
				X10 <sup>2</sup> /μL	LYMP	NEUT	EOS	BASO	MONO	LUC
Male	0	6	Mean	104.2	79.5	16.3	1.1	0.3	2.2	0.6
			S.D.	18.0	3.1	2.7	0.4	0.1	0.5	0.2
	100	6	Mean	111.8	81.1	14.9	1.3	0.4	1.9	0.5
			S.D.	13.6	3.5	3.4	0.1	0.1	0.4	0.2
Female	0	6	Mean	84.6	82.1	13.8	1.6	0.3	1.8	0.6
			S.D.	22.5	1.5	1.6	0.4	0.1	0.6	0.3
	100	6	Mean	64.7	74.7*	20.9*	2.0	0.2	1.8	0.4
			S.D.	16.3	5.5AT	4.8AT	0.7	0.1	0.5	0.2

LUC : Large unstained cells

\* : p<0.05 (Significant difference from control group)

AT : Aspin-Welch t-test

Table 6-6 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Hematology (After recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.		Differential leukocyte counts (X10 <sup>2</sup> /μL)					
				LYMP	NEUT	EOS	BASO	MONO	LUC
Male	0	6	Mean	82.7	17.1	1.2	0.4	2.3	0.6
			S.D.	13.6	4.4	0.6	0.2	0.8	0.2
	100	6	Mean	90.9	16.4	1.4	0.4	2.1	0.6
			S.D.	14.0	2.6	0.2	0.1	0.5	0.3
Female	0	6	Mean	69.2	11.8	1.3	0.3	1.5	0.5
			S.D.	17.6	4.0	0.6	0.1	0.5	0.3
	100	6	Mean	48.7	13.2	1.3	0.1*	1.1	0.3
			S.D.	14.2	3.2	0.4	0.1T	0.3	0.2

LUC : Large unstained cells

\* : p<0.05 (Significant difference from control group)

T : Student's t-test

Table 7-1 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Blood chemistry (After administration period)

Sex	Dose mg/kg	No.		AST	ALT	LDH	$\gamma$ -GTP	ALP	TBA	T-CHO	TG	PL	T-BIL	GLU
				IU/L	IU/L	IU/L	IU/L	IU/L	$\mu$ mol/L	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL
Male	0	6	Mean	65	28	59	1	790	16.6	52	64	94	0.1	139
			S.D.	6	4	10	0	152	13.9	12	17	11	0.1	16
	4	6	Mean	65	27	58	1	741	17.5	50	65	93	0.1	147
			S.D.	9	5	10	0	164	21.8	11	32	12	0.1	21
	20	6	Mean	57	25	55	1	678	26.5	61	72	106	0.0	162
			S.D.	4	3	12	0	162	25.7	9	30	10	0.1	20
	100	6	Mean	58	20**	62	1	556*	12.6	69*	40	113**	0.1	136
			S.D.	6	2D	12	1	76D	5.5	7D	16	6D	0.1	9
Female	0	6	Mean	68	22	59	1	392	10.5	64	14	113	0.1	129
			S.D.	13	4	8	0	92	3.7	9	4	12	0.1	16
	4	6	Mean	68	20	55	1	442	9.4	53	22	100	0.0	123
			S.D.	15	2	6	0	106	2.0	6	13	11	0.1	14
	20	6	Mean	66	24	61	1	467	14.2	61	14	107	0.1	112
			S.D.	8	4	13	0	129	8.4	10	7	15	0.0	9
	100	6	Mean	59	17*	55	1	360	14.7	73	13	127	0.1	108*
			S.D.	7	3D	10	0	107	4.7	10	4	19	0.0	6D

\* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  (Significant difference from control group)  
D : Dunnett's test

Table 7-2 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Blood chemistry (After administration period)

Sex	Dose mg/kg	No.		BUN	CRNN	Na	K	Cl	Ca	P	TP	ALB	A/G
				mg/dL	mg/dL	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mg/dL	mg/dL	g/dL	g/dL	
Male	0	6	Mean	12	0.23	145	4.7	107	9.9	7.8	6.1	3.3	1.20
			S.D.	1	0.01	1	0.4	1	0.3	0.4	0.1	0.2	0.12
	4	6	Mean	13	0.23	144	4.7	106	9.9	8.2	6.1	3.3	1.20
			S.D.	1	0.02	1	0.5	1	0.1	0.4	0.2	0.1	0.05
	20	6	Mean	13	0.23	145	4.3	106	10.1	8.0	6.3	3.3	1.12
			S.D.	3	0.02	1	0.4	2	0.2	0.5	0.1	0.1	0.08
	100	6	Mean	12	0.20	145	4.6	106	9.9	7.7	6.5**	3.5	1.14
			S.D.	1	0.03	1	0.5	1	0.2	0.4	0.2D	0.1	0.05
Female	0	6	Mean	15	0.27	144	4.4	109	9.9	7.3	6.2	3.5	1.27
			S.D.	3	0.04	1	0.2	1	0.3	0.9	0.3	0.2	0.11
	4	6	Mean	15	0.25	144	4.3	109	9.9	7.5	6.1	3.5	1.31
			S.D.	2	0.02	1	0.3	1	0.2	0.8	0.2	0.2	0.11
	20	6	Mean	16	0.25	144	4.3	109	9.9	7.3	6.2	3.5	1.31
			S.D.	3	0.03	1	0.4	1	0.3	0.4	0.3	0.2	0.07
	100	6	Mean	16	0.25	143	4.1	108	10.0	7.6	6.8**	3.8**	1.31
			S.D.	2	0.03	1	0.2	1	0.3	0.4	0.2D	0.2D	0.12

\*\* : p<0.01 (Significant difference from control group)

D : Dunnett's test

Table 7-3 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Blood chemistry (After recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.		AST	ALT	LDH	$\gamma$ -GTP	ALP	TBA	T-CHO	TG	PL	T-BIL	GLU
				IU/L	IU/L	IU/L	IU/L	IU/L	$\mu$ mol/L	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL
Male	0	6	Mean	66	30	62	1	594	11.1	52	59	90	0.1	142
			S.D.	5	3	9	0	85	5.9	11	19	10	0.0	16
	100	6	Mean	61	29	57	1	487	18.1	66	85	113*	0.1	142
			S.D.	8	5	6	0	117	9.2	13	36	17T	0.0	18
Female	0	6	Mean	66	28	56	1	298	11.0	55	19	104	0.1	121
			S.D.	13	9	15	0	60	2.7	8	7	15	0.0	13
	100	6	Mean	60	24	67	1	280	11.9	62	18	117	0.1	120
			S.D.	9	6	18	0	41	6.1	14	5	23	0.0	22

\* :  $p < 0.05$  (Significant difference from control group)  
T : Student's t-test

Table 7-4 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Blood chemistry (After recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.		BUN	CRNN	Na	K	Cl	Ca	P	TP	ALB	A/G
				mg/dL	mg/dL	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mg/dL	mg/dL	g/dL	g/dL	
Male	0	6	Mean	12	0.25	145	4.8	107	9.7	7.3	6.1	3.4	1.21
			S.D.	1	0.02	0	0.2	2	0.2	0.2	0.3	0.1	0.05
	100	6	Mean	15*	0.26	144*	4.8	106	9.9	7.8	6.2	3.4	1.24
			S.D.	2T	0.03	1T	0.2	2	0.3	0.9	0.3	0.1	0.10
Female	0	6	Mean	17	0.34	143	4.3	109	10.0	6.9	6.5	3.7	1.35
			S.D.	2	0.02	1	0.4	1	0.3	0.4	0.4	0.3	0.15
	100	6	Mean	16	0.30	144	4.2	110	9.9	6.3*	6.7	3.8	1.32
			S.D.	3	0.04	0	0.3	1	0.3	0.3T	0.4	0.3	0.10

\* : p<0.05 (Significant difference from control group)

T : Student's t-test

Table 8-1 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Hormones (After administration period)

Sex	Dose mg/kg	No.		T <sub>3</sub> ng/dL	T <sub>4</sub> μg/dL	TSH ng/mL
Male	0	6	Mean	80.5	6.1	1.36
			S.D.	4.6	1.3	0.75
	4	6	Mean	90.3	6.5	2.35
			S.D.	16.7	1.2	2.81
	20	6	Mean	84.9	6.8	1.77
			S.D.	12.7	0.8	1.27
	100	6	Mean	85.4	5.7	1.18
			S.D.	8.8	0.4	0.59
Female	0	6	Mean	101.6	5.0	1.82
			S.D.	18.8	0.9	1.55
	4	6	Mean	93.6	4.9	1.74
			S.D.	17.0	0.9	0.43
	20	6	Mean	103.3	5.4	1.86
			S.D.	11.3	1.9	0.80
	100	6	Mean	111.3	4.9	1.30
			S.D.	16.8	1.6	0.88

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 8-2                      A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
Hormones (After recovery period)

Sex	Dose mg/kg	No.		T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	TSH
				ng/dL	μg/dL	ng/mL
Male	0	6	Mean	85.3	6.9	1.85
			S.D.	12.4	1.0	1.66
	100	6	Mean	95.3	8.2	3.91
			S.D.	8.6	1.8	2.30
Female	0	6	Mean	85.8	3.6	0.90
			S.D.	15.4	1.2	0.77
	100	6	Mean	87.3	4.2	0.47
			S.D.	12.7	1.1	0.52

No significant difference between treated group and control group.

Table 9-1

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (After administration period)

Male

Dose mg/kg		Body weight	Brain	Thyroid (R+L)	Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney (R+L)	
		g	g(g/100g BW)	mg(mg/100g BW)	mg(mg/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	
Absolute	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean	370	2.01	18.8	582	1.21	10.69	0.63	2.71
		S.D.	43	0.08	2.1	214	0.12	1.67	0.14	0.25
	4	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	386	2.04	20.1	448	1.23	12.00	0.69	2.90
		S.D.	26	0.12	3.4	126	0.06	1.17	0.08	0.35
	20	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	390	1.98	20.0	501	1.30	13.81**	0.69	2.92
		S.D.	25	0.08	3.7	100	0.12	1.40D	0.09	0.26
	100	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	366	2.02	22.8	465	1.28	14.05**	0.68	3.11
		S.D.	9	0.05	2.9	74	0.08	1.49D	0.11	0.23
Relative	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean		0.55	5.1	156	0.33	2.88	0.17	0.74
		S.D.		0.06	0.2	47	0.02	0.18	0.02	0.04
	4	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.53	5.2	116	0.32	3.10	0.18	0.75
		S.D.		0.04	0.8	31	0.01	0.20	0.01	0.05
	20	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.51	5.1	128	0.33	3.53**	0.18	0.75
		S.D.		0.02	0.8	24	0.03	0.21D	0.02	0.04
	100	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.55	6.2*	127	0.35	3.83**	0.18	0.85**
		S.D.		0.01	0.9D	18	0.01	0.39D	0.03	0.07D

Statistical analysis of body weight was not done.

\* : p&lt;0.05 ; \*\* : p&lt;0.01 (Significant difference from control group)

D : Dunnett's test

Table 9-2

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (After administration period)

Male

Dose mg/kg		Adrenal	Testis	Epididymis	Prostate	
		(R+L) mg(mg/100g BW)	(R+L) g(g/100g BW)	(R+L) mg(mg/100g BW)	(R+L) g(g/100g BW)	
Absolute	0	No.	6	6	6	6
		Mean	67	3.38	854	1.93
		S.D.	10	0.17	64	0.25
	4	No.	6	6	6	6
		Mean	64	3.07**	840	2.27
		S.D.	9	0.11D	60	0.33
	20	No.	6	6	6	6
		Mean	57	3.24	830	2.17
		S.D.	4	0.16	50	0.28
	100	No.	6	6	6	6
		Mean	58	3.20	706**	2.22
		S.D.	6	0.17	82D	0.23
Relative	0	No.	6	6	6	6
		Mean	18	0.92	233	0.52
		S.D.	2	0.09	23	0.02
	4	No.	6	6	6	6
		Mean	17	0.80*	219	0.59
		S.D.	2	0.05D	28	0.09
	20	No.	6	6	6	6
		Mean	15*	0.84	214	0.56
		S.D.	1D	0.09	23	0.09
	100	No.	6	6	6	6
		Mean	16	0.87	193*	0.61
		S.D.	1	0.04	24D	0.07

\* : p&lt;0.05 ; \*\* : p&lt;0.01 (Significant difference from control group)

D : Dunnett's test

Table 9-3

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (After administration period)

Female

Dose mg/kg		Body weight	Brain	Thyroid (R+L)	Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney (R+L)	
		g	g(g/100g BW)	mg(mg/100g BW)	mg(mg/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	
Absolute	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean	240	1.89	14.9	488	0.89	7.00	0.50	1.88
		S.D.	8	0.09	1.2	31	0.03	0.40	0.05	0.12
	4	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	236	1.86	15.8	442	0.82	6.73	0.42*	1.81
		S.D.	25	0.08	1.5	101	0.08	1.37	0.06D	0.15
	20	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	232	1.88	18.5	453	0.83	6.86	0.46	1.89
		S.D.	15	0.05	3.9	126	0.10	0.57	0.05	0.13
	100	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	224	1.90	16.8	411	0.82	7.57	0.43	1.88
		S.D.	12	0.07	2.6	67	0.05	0.50	0.05	0.13
Relative	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean		0.79	6.2	203	0.37	2.92	0.21	0.78
		S.D.		0.04	0.5	9	0.01	0.10	0.02	0.03
	4	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.80	6.8	187	0.35	2.84	0.18*	0.77
		S.D.		0.09	0.6	36	0.02	0.25	0.02D	0.02
	20	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.81	8.0*	194	0.36	2.96	0.20	0.81
		S.D.		0.05	1.3D	46	0.03	0.12	0.02	0.03
	100	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.85	7.5	183	0.37	3.38**	0.19	0.84*
		S.D.		0.04	1.0	26	0.02	0.16D	0.02	0.05D

Statistical analysis of body weight was not done.

\* : p&lt;0.05 ; \*\* : p&lt;0.01 (Significant difference from control group)

D : Dunnett's test

Table 9-4

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (After administration period)

Female

Dose mg/kg		Adrenal	Ovary	Uterus	
		(R+L) mg(mg/100g BW)	(R+L) mg(mg/100g BW)	mg(mg/100g BW)	
Absolute	0	No.	6	6	6
		Mean	71	91.0	555
		S.D.	13	11.4	65
	4	No.	6	6	6
		Mean	62	87.1	533
		S.D.	8	13.0	105
	20	No.	6	6	6
		Mean	71	87.1	508
		S.D.	8	12.1	137
	100	No.	6	6	6
		Mean	69	95.4	426
		S.D.	5	19.5	67
Relative	0	No.	6	6	6
		Mean	30	37.9	231
		S.D.	6	4.2	28
	4	No.	6	6	6
		Mean	26	37.2	229
		S.D.	4	5.6	56
	20	No.	6	6	6
		Mean	31	37.7	218
		S.D.	4	5.7	51
	100	No.	6	6	6
		Mean	31	42.7	191
		S.D.	3	9.7	37

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 9-5

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (After recovery period)

Male

Dose mg/kg	Body weight	g	Brain	Thyroid (R+L)	Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney (R+L)	
			g(g/100g BW)	mg(mg/100g BW)	mg(mg/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	
Absolute	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean	451	2.11	22.1	481	1.37	12.39	0.74	3.15
		S.D.	39	0.11	3.2	77	0.13	1.87	0.18	0.23
	100	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	449	2.10	21.0	517	1.36	14.19	0.77	3.23
		S.D.	37	0.07	2.2	113	0.20	2.03	0.11	0.24
Relative	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean	0.47	4.9	107	0.30	2.74	0.16	0.70	
		S.D.	0.03	0.6	13	0.02	0.22	0.03	0.03	
	100	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean	0.47	4.7	115	0.30	3.15*	0.17	0.72	
		S.D.	0.05	0.8	23	0.03	0.32T	0.01	0.07	

Statistical analysis of body weight was not done.

\* : p&lt;0.05 (Significant difference from control group)

T : Student's t-test

Table 9-6                      A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Absolute and relative organ weight (After recovery period)  
 Male

Dose			Adrenal (R+L)	Testis (R+L)	Epididymis (R+L)	Prostate
mg/kg			mg(mg/100g BW)	g(g/100g BW)	mg(mg/100g BW)	g(g/100g BW)
Absolute	0	No.	6	6	6	6
		Mean	68	3.23	1055	2.76
		S.D.	7	0.19	54	0.29
	100	No.	6	6	6	6
		Mean	65	3.22	844*	2.71
		S.D.	5	0.84	166AT	0.37
Relative	0	No.	6	6	6	6
		Mean	15	0.72	236	0.61
		S.D.	1	0.08	22	0.06
	100	No.	6	6	6	6
		Mean	15	0.72	189*	0.61
		S.D.	2	0.19	40T	0.08

\* : p<0.05 (Significant difference from control group)  
 T : Student's t-test  
 AT : Aspin-Weich t-test

Table 9-7

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (After recovery period)

Female

Dose mg/kg	Body weight	g	Brain	Thyroid (R+L)	Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney (R+L)	
			g(g/100g BW)	mg(mg/100g BW)	mg(mg/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	
Absolute	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean	269	1.96	16.4	447	0.88	7.08	0.54	1.85
		S.D.	28	0.05	3.0	98	0.07	0.72	0.11	0.23
	100	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	255	1.89*	15.0	405	0.91	7.54	0.50	1.92
		S.D.	21	0.05T	3.7	70	0.09	1.10	0.03	0.14
Relative	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean	0.74	6.2	168	0.33	2.64	0.20	0.69	
		S.D.	0.07	1.2	42	0.02	0.13	0.04	0.05	
	100	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean	0.75	5.9	160	0.36*	2.95*	0.19	0.75*	
		S.D.	0.08	1.1	32	0.02T	0.20T	0.02	0.03T	

Statistical analysis of body weight was not done.

\* : p&lt;0.05 (Significant difference from control group)

T : Student's t-test

Table 9-8

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (After recovery period)

Female

Dose mg/kg		Adrenal	Ovary	Uterus	
		(R+L) mg(mg/100g BW)	(R+L) mg(mg/100g BW)	mg(mg/100g BW)	
Absolute	0	No.	6	6	6
		Mean	71	94.8	455
		S.D.	11	13.6	131
	100	No.	6	6	6
		Mean	72	87.9	479
		S.D.	9	14.0	108
Relative	0	No.	6	6	6
		Mean	27	35.4	167
		S.D.	6	3.9	30
	100	No.	6	6	6
		Mean	28	34.7	187
		S.D.	3	6.7	34

No significant difference between treated group and control group.

Table 10-1

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats  
with a recovery period of 2 weeks

Gross pathological findings (After administration period)

Organs	Sex:	M	M	M	M	F	F	F	F
Findings	Dose(mg/kg): Number:	0 6	4 6	20 6	100 6	0 6	4 6	20 6	100 6
General descriptions									
Excoriation		1	0	0	0	0	0	0	0
Kidney									
Cyst		0	1	1	0	0	0	0	0
Dilatation, pelvic		0	0	0	0	0	1	0	0

M : Male, F : Female

Table 10-2

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats  
with a recovery period of 2 weeks

Gross pathological findings (After recovery period)

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	M 0 6	M 100 6	F 0 6	F 100 6
Kidney					
Cyst		0	1	0	0
Lung(bronchus)					
Focus, dark red		1	0	0	0
Testis					
Small		0	1	-	-

M : Male. F : Female  
- : Not applicable

Table 11-1

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats  
with a recovery period of 2 weeks

Histopathological findings (After administration period)

Organs	Sex:	M	M	M	M	F	F	F	F
Findings	Dose(mg/kg):	0	4	20	100	0	4	20	100
	Number:	6	6	6	6	6	6	6	6
Adrenal									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Bone+Bone marrow, femoral									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Bone+Bone marrow, sternal									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Cerebellum(pons)									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Cerebrum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Epididymis									
Number examined		6	6	6	6	-	-	-	-
Not remarkable		5	6	6	2	-	-	-	-
Cell infiltration, interstitial		1	0	0	0	-	-	-	-
minimal		1	0	0	0	-	-	-	-
Hypospermia		0	0	0	2	-	-	-	-
minimal		0	0	0	2	-	-	-	-
Cell debris, luminal		0	0	0	4	-	-	-	-
minimal		0	0	0	3	-	-	-	-
mild		0	0	0	1	-	-	-	-
Eye									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		5	0	0	5	5	0	0	4
Dysplasia, retinal		1	0	0	1	0	0	0	1
minimal		1	0	0	1	0	0	0	1
Atrophy, retinal		0	0	0	0	1	0	0	1
mild		0	0	0	0	1	0	0	1
Heart									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine, duodenum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine, jejunum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine, ileum(Peyer's patch)									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine, cecum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine, colon									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6

M : Male, F : Female  
- : Not applicable

Table 11-2

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats  
with a recovery period of 2 weeks

Histopathological findings (After administration period)

Organs	Sex:	M	M	M	M	F	F	F	F
Findings	Dose(mg/kg):	0	4	20	100	0	4	20	100
	Number:	6	6	6	6	6	6	6	6
Intestine,rectum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Kidney									
Number examined		6	6	6	6	6	6	6	6
Not remarkable		1	1	1	0	5	4	5	0
Cyst		0	1	1	0	0	0	0	0
mild		0	1	1	0	0	0	0	0
Dilatation,pelvic		0	0	0	0	0	1	0	0
mild		0	0	0	0	0	1	0	0
Dilatation,tubular,cystic		0	0	0	0	0	0	0	1
mild		0	0	0	0	0	0	0	1
Regeneration,tubular		3	4	3	3	0	1	1	1
minimal		3	4	3	3	0	1	1	1
Eosinophilic body,tubular cell		1	2	2	4	0	0	0	0
minimal		1	2	2	2	0	0	0	0
mild		0	0	0	2	0	0	0	0
Pigmentation,tubular cell		0	0	1	6	0	0	0	6
minimal		0	0	1	5	0	0	0	5
mild		0	0	0	1	0	0	0	1
Mineralization,papillary		1	0	0	1	1	1	0	0
minimal		1	0	0	1	1	1	0	0
Cell infiltration,interstitial		1	0	0	0	0	0	0	0
minimal		1	0	0	0	0	0	0	0
Mineralization,cortical		1	0	1	0	0	0	0	1
minimal		1	0	1	0	0	0	0	1
Mineralization,medullary		2	0	0	0	0	0	0	0
minimal		2	0	0	0	0	0	0	0
Kidney(PAS stain)									
Number examined		1	0	0	2	0	0	0	0
PAS reaction									
negative		1	0	0	2	0	0	0	0
Kidney(alpha2u globulin)									
Number examined		1	0	0	2	0	0	0	0
Alpha2u globulin,									
immunohistochemistry		1	0	0	2	0	0	0	0
positive		1	0	0	2	0	0	0	0
Liver									
Number examined		6	6	6	6	6	6	6	6
Not remarkable		4	2	2	0	0	1	2	0
Vacuolation,hepatocyte,periportal		1	2	0	2	6	2	4	3
minimal		1	2	0	2	6	2	4	3
Microgranuloma		2	3	1	2	2	3	1	1
minimal		2	3	1	2	2	3	1	1
Hypertrophy,hepatocytic,central		0	0	4	6	0	0	0	4
minimal		0	0	4	6	0	0	0	4
Lung(bronchus)									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Lymph node,mesenteric									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Lymph node,submandibular									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6

M : Male, F : Female

Table 11-3

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats  
with a recovery period of 2 weeks

Histopathological findings (After administration period)

Organs	Sex:	M	M	M	M	F	F	F	F
Findings	Dose (mg/kg): Number:	0 6	4 6	20 6	100 6	0 6	4 6	20 6	100 6
Mammary gland, inguinal									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Ovary									
Number examined		-	-	-	-	6	0	0	6
Not remarkable		-	-	-	-	6	0	0	6
Parathyroid									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Pituitary									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	5	0	0	6
Cyst		0	0	0	0	1	0	0	0
minimal		0	0	0	0	1	0	0	0
Prostate									
Number examined		6	0	0	6	-	-	-	-
Not remarkable		6	0	0	6	-	-	-	-
Sciatic nerve									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Seminal vesicle (Coagulating gland)									
Number examined		6	0	0	6	-	-	-	-
Not remarkable		6	0	0	6	-	-	-	-
Skeletal muscle, femoral									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Skin, cervical									
Number examined		1	0	0	0	0	0	0	0
Ulcer		1	0	0	0	0	0	0	0
mild		1	0	0	0	0	0	0	0
Skin, inguinal									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Spinal cord, thoracic									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Spleen									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Stomach									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Testis									
Number examined		6	6	6	6	-	-	-	-
Not remarkable		6	6	6	6	-	-	-	-
Spermatid, retained		0	0	0	6	-	-	-	-
minimal		0	0	0	5	-	-	-	-
mild		0	0	0	1	-	-	-	-
Degeneration/necrosis germ cell		0	0	0	6	-	-	-	-
minimal		0	0	0	6	-	-	-	-

M : Male, F : Female  
- : Not applicable

Table 11-4

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats  
with a recovery period of 2 weeks

Histopathological findings (After administration period)

Organs	Sex:	M	M	M	M	F	F	F	F
Findings	Dose(mg/kg): Number:	0 6	4 6	20 6	100 6	0 6	4 6	20 6	100 6
Thymus									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Thyroid									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		2	0	0	4	3	0	0	3
Ectopic thymus		2	0	0	0	1	0	0	0
minimal		1	0	0	0	1	0	0	0
mild		1	0	0	0	0	0	0	0
Remnant, ultimobranchial body		3	0	0	2	2	0	0	3
minimal		3	0	0	2	2	0	0	3
Trachea									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Urinary bladder									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Uterus(cervix,horn)									
Number examined		-	-	-	-	6	0	0	6
Not remarkable		-	-	-	-	6	0	0	6
Vagina									
Number examined		-	-	-	-	6	0	0	6
Not remarkable		-	-	-	-	6	0	0	6

M : Male, F : Female  
- : Not applicable

Table 11-5

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats  
with a recovery period of 2 weeks

Histopathological findings (After recovery period)

Organs Findings	Sex: Dose(mg/kg): Number:	M	M	F	F
		0 6	100 6	0 6	100 6
Epididymis					
Number examined		6	6	-	-
Not remarkable		6	2	-	-
Hypospermla		0	1	-	-
moderate		0	1	-	-
Cell debris, luminal		0	4	-	-
minimal		0	2	-	-
mild		0	2	-	-
Kidney					
Number examined		6	6	6	6
Not remarkable		3	0	4	2
Cyst		0	1	0	0
mild		0	1	0	0
Regeneration, tubular		0	1	1	0
minimal		0	1	1	0
Eosinophilic body, tubular cell		3	4	0	0
minimal		2	3	0	0
mild		1	1	0	0
Pigmentation, tubular cell		0	4	0	3
minimal		0	3	0	3
mild		0	1	0	0
Mineralization, papillary		1	0	0	0
minimal		1	0	0	0
Cell infiltration, interstitial		0	1	0	0
minimal		0	1	0	0
Fibrosis, focal		0	0	0	1
minimal		0	0	0	1
Mineralization, medullary		1	0	1	0
minimal		1	0	1	0
Liver					
Number examined		6	6	6	6
Not remarkable		2	2	2	5
Vacuolation, hepatocyte, periportal		3	3	2	1
minimal		3	3	2	1
Microgranuloma		2	1	4	1
minimal		2	1	4	1
Lung(bronchus)					
Number examined		1	0	0	0
Hemorrhage, focal		1	0	0	0
minimal		1	0	0	0
Testis					
Number examined		6	6	-	-
Not remarkable		5	3	-	-
Atrophy, seminiferous tubular		1	1	-	-
minimal		1	0	-	-
severe		0	1	-	-
Spermatid, retained		0	2	-	-
minimal		0	2	-	-
Degeneration/necrosis germ cell		0	1	-	-
minimal		0	1	-	-

M : Male, F : Female  
- : Not applicable

Table 11-6 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats  
with a recovery period of 2 weeks

Number of germ cells per Sertoli cell in stage VIII (After administration period)

Dose mg/kg		Spermatogonia /Sertoli cell	Preleptotene spermatocyte /Sertoli cell	Pachytene spermatocyte /Sertoli cell	Round spermatid /Sertoli cell
0	No.	6	6	6	6
	Mean	0.15	2.36	3.48	8.95
	S.D.	0.05	0.29	0.36	1.02
100	No.	6	6	6	6
	Mean	0.14	2.45	3.52	8.89
	S.D.	0.03	0.21	0.43	0.82

No significant difference between control group and 100 mg/kg group.

Table 11-7 A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats  
with a recovery period of 2 weeks  
Number of germ cells per Sertoli cell in stage XII (After administration period)

Dose mg/kg		Spermatogonia /Sertoli cell	Zygotene spermatocyte /Sertoli cell	Pachytene spermatocyte /Sertoli cell	Elongate spermatid /Sertoli cell
0	No.	6	6	6	6
	Mean	0.24	2.51	3.46	8.44
	S.D.	0.05	0.23	0.24	0.65
100	No.	6	6	6	6
	Mean	0.26	2.27	2.90**	5.52**
	S.D.	0.05	0.18	0.26T	1.21T

\*\* :  $p < 0.01$  (Significant difference between control group and 100 mg/kg group)  
T: Student's t-test

Table 12-1

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks

Individual estrous cycle in female rats (Administration period)

Dose (mg/kg) : 0

Animal number	1	2	3	4	5	6	7a)
1101	D	P	E	M	D	P	E
1102	D	P	E	M	D	P	E
1103	M	D	P	E	M	D	P
1104	M	D	P	E	M	D	P
1105	D	P	E	M	D	P	E
1106	D	P	E	M	D	P	E

P : Proestrus      E : Estrus      M : Metestrus      D : Diestrus  
a): Day of sampling

Table 12-2

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks

Individual estrous cycle in female rats (Administration period)

Dose (mg/kg) : 4

Animal number	1	2	3	4	5	6	7a)
2101	M	D	P	E	M	D	P
2102	D	P	E	M	D	P	E
2103	D	P	E	M	D	P	E
2104	M	D	P	E	M	D	P
2105	E	M	D	P	E	M	D
2106	M	D	P	E	M	D	D

P : Proestrus      E : Estrus      M : Metestrus      D : Diestrus

a): Day of sampling

Table 12-3

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks

Individual estrous cycle in female rats (Administration period)

Dose (mg/kg) : 20

Animal number	1	2	3	4	5	6	7a)
3101	M	D	P	E	M	D	P
3102	P	E	M	D	P	E	M
3103	M	D	P	E	M	D	P
3104	M	D	P	E	M	D	P
3105	M	D	D	P	E	M	D
3106	D	P	E	M	D	P	E

P : Proestrus      E : Estrus      M : Metestrus      D : Diestrus

a): Day of sampling

Table 12-4

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks

Individual estrous cycle in female rats (Administration period)

Dose (mg/kg) : 100

Animal number	1	2	3	4	5	6	7a)
4101	D	P	E	M	D	P	E
4102	E	M	D	P	E	M	D
4103	D	P	E	M	D	P	E
4104	D	P	E	M	D	P	E
4105	P	E	M	D	P	E	M
4106	M	D	P	E	M	D	D

P : Proestrus      E : Estrus      M : Metestrus      D : Diestrus

a): Day of sampling

Table 12-5

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks

Individual estrous cycle in female rats (Recovery period)

Dose (mg/kg) : 0

Animal number	1	2	3	4	5	6	7a)
1107	P	E	M	D	P	E	M
1108	M	D	D	P	E	M	D
1109	E	M	D	P	E	M	D
1110	P	E	M	D	P	E	M
1111	M	D	P	E	M	D	P
1112	E	M	D	P	E	M	D

P : Proestrus      E : Estrus      M : Metestrus      D : Diestrus  
a): Day of sampling

Table 12-6

A 28-day oral toxicity study of 3,6-Dichloropyridazine in rats with a recovery period of 2 weeks

Individual estrous cycle in female rats (Recovery period)

Dose (mg/kg) : 100

Animal number	1	2	3	4	5	6	7a)
4107	E	M	D	P	E	M	D
4108	D	P	E	M	D	P	E
4109	E	M	D	P	E	M	D
4110	P	E	M	D	P	E	E
4111	P	E	M	D	P	E	M
4112	E	M	D	P	E	M	D

P : Proestrus      E : Estrus      M : Metestrus      D : Diestrus  
a): Day of sampling