最終報告書

表 題:SIPEのラットにおける簡易生殖試験

試験番号: SR08214

株式会社 化合物安全性研究所

目 次

		頁
表紙		1
目次		
日伙		5
要約		- 11
緒言		
	および方法	
/ > 4//>		
• , , ,		
参考	資料	-30
Figu	res	
1.	Body weight of male rats dosed orally with SIPE in the	
	reproduction/developmental toxicity screening test (SRO8214)	-31
2	Body weight of female rats dosed orally with SIPE in the	
	reproduction/developmental toxicity screening test (SRO8214)	-32
3.	Food consumption of male rats dosed orally with SIPE in the	
	reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)	-33
4.	Food consumption of female rats dosed orally with SIPE in the	0.4
E	reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)	- 34
5.	Body weight of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of SIPE (SR08214)	- 35
	01 SHE (SR00214)	55
Table	es	
1.	General appearance of male rats dosed orally with SIPE in the	
	reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)	- 36
2.	General appearance of female rats dosed orally with SIPE in the	
	reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)	-37
3.	Body weight of male rats dosed orally with STPE in the	
	reproduction/developmental toxicity screening test (SRO8214)	-40
4.	Body weight on pre-mating period of female rats dosed orally with SIPE in the	
	reproduction/developmental toxicity screening test (SRO8214)	-41

5.	Body weight during gestation period of female rats dosed orally with SIPE in	
	the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)	42
6.	Body weight during lactation period of female rats dosed orally with SIPE in	
	the reproduction/developmental toxicity screening test (SRO8214)	43
7.	Food consumption of male rats dosed orally with SIPE in the	
	reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)	44
8.	Food consumption on pre-mating period of female rats dosed orally with SIPE	
	in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)	45
9.	Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with SIPE	
	in the reproduction/developmental toxicity screening test (SRO8214)	46
10.	Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with SIPE	
	in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)	47
11.	Gross findings of male rats dosed orally with SIPE in the	
	reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)	48
12.	Gross findings of female rats dosed orally with SIPE in the	
	reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)	49
13.	Absolute and relative organ weights of male rats dosed orally with SIPE in the	
	reproduction/developmental toxicity screening test (SRO8214)	50
14.	Histopathological findings of male rats dosed orally with SIPE in the	
	reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)	51
15.	Histopathological findings of female rats dosed orally with SIPE in the	
	reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)	52
16.	Stages of spermatogenesis of male rats dosed orally with SIPE in the	
	reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)	53
17.	Reproduction performance in parental rats dosed orally with SIPE in the	
	reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)	55
18.		
	toxicity screening test (SR08214)	56
19.	General appearance changes of pups in the reproduction/developmental toxicity	
	screening test of SIPE (SR08214)	57
20.	Body weight of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test	
	of SIPE (SR08214)	58
21.	Gross findings of pups in the reproduction/developmental toxicity screening	
	test of SIPE (SR08214)	59

要約

ナトリウム=3,5-ビス[(2-ヒドロキシエトキシ)カルボニル]ベンゼンスルホナートを主成分(50%以上)とする、ナトリウム=3,5-ビス(メトキシカルボニル)ベンゼンスルホナートとエチレン=グリコールの反応生成物(略称:SIPE)の0(対照、精製水)、100、300および1000 mg/kg/dayを、1 群雌雄各12匹のCr1:CD(SD)ラットに、雄ラットに対しては交配前、交配期間および交配後を含む計42日間、雌ラットに対しては交配前、交配および妊娠期間、ならびに分娩後5日までの期間(42~53日間)経口投与し、その性腺機能、交尾行動、受胎および分娩等の生殖に及ぼす毒性を検討し、以下の成績を得た。

1. 反復投与毒性

- (1) 一般状態では、被験物質投与の影響は認められなかった。
- (2) 休重および摂餌量では、被験物質投与の影響は認められなかった。
- (3) 剖検所見では、1000 mg/kg 群の雄で腎臓に腫大、黄褐色化、多巣性の微細黄白色斑、腎盂拡張が認められた。
- (4) 器官重量では、被験物質投与の影響は認められなかった。
- (5) 病理組織学的検査では、雄の腎臓で 300 mg/kg 以上の群に尿細管管腔内や腎盂内に結晶物、皮質および髄質の尿細管拡張、皮質のリンパ球浸潤、1000 mg/kg 群で乳頭部の集合管上皮の再生、髄質および乳頭部のリンパ球浸潤、間質の線維化、腎盂粘膜の過形成等、さらに、皮質および髄質の尿細管上皮の再生に発現例数の増加およびグレードの増悪が認められた。
- (6) 雄の精巣の Stage 分類では、被験物質投与の影響は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

(1) 性周期検査、生殖能検査、妊娠、分娩、哺育状態および新生児生存率、新生児の一般状態、 体重、剖検所見のいずれについても、各投与群の親動物ならびに新生児に被験物質投与に関 連した変化は認められなかった。

以上のことから、SIPE の本試験条件下における無影響量(NOEL)は、反復投与毒性に関しては、300~mg/kg 以上の群の雄で腎臓に被験物質投与の影響が認められたが、雌には何ら影響は認められなかったことから、雄で 100~mg/kg、雌で 1000~mg/kg と考えられた。親動物の生殖能ならびに新生児の発生に関しては、いずれも 1000~mg/kg まで被験物質投与の影響は認められなかったことから、1000~mg/kg と考えられた。

緒言

SIPE の 0 (対照、精製水)、100、300 および 1000 mg/kg/day を、1 群雌雄各 12 匹の Cr1:CD(SD) ラットに、雄ラットに対しては交配前、交配期間および交配後を含む計 42 日間、雌ラットに対しては交配前、交配および妊娠期間、ならびに分娩後 5 日までの期間(42~53 日間)経口投与し、その性腺機能、交尾行動、受胎および分娩等の生殖に及ぼす毒性を検討した。

材料および方法

1. 被験物質

名称:ナトリウム=3,5-ビス[(2-ヒドロキシエトキシ)カルボニル]ベン

ゼンスルホナートを主成分(50%以上)とする、ナトリウム=3,5-

ビス(メトキシカルボニル)ベンゼンスルホナートとエチレン=

グリコールの反応生成物

英名 : (1,3-Benzenedicarboxylic acid, 5-sulfo-, mixed 2-hydroxy

ethyl and Me esters, monosodium salts)

略称 : SIPE 1)

CAS No. : 149289-50-9

化審法官報公示整理番号:(3)-4587

成分(Appendix 1-1および1-2):水分; 0.14%

色数 (APHA) ; 10

ジEGエステル体; 50.3% (HPLC area%)

モノEGエステル体; 34.6% (HPLC area%)

物理化学的性質 2) :形状 ;液状

色 ;淡黄色

臭い ;わずかに特異臭

pII ;約5 (5%水希釈液)

沸点 ; 198℃ (EG)

凝固点;0℃以下

引火点;112℃ (COC)

発火点;398℃ (EG)

爆発限界; 3.2~15.3% (EG)

比重 :約1.11(20℃)

溶媒に対する溶解性;水に可溶

粘度 ; データなし

蒸気密度; 2.14 (EG)

入手量: 1 kg (関連試験と共に一括受入)

安定性2 : 通常の取り扱い条件においては、光、熱、衝撃に対して化学的

に安定。強酸化剤とは反応して危険。

保存条件: 遮光気密容器に入れ、冷蔵保存した。

保存場所 : 被検物質保存室の冷蔵室(実測範囲 2~10℃)

実測範囲確認期間 : 2010年4月30日(受入)~2011年5月27日(返却)

取扱い上の注意 : 眼、皮膚および衣服にふれないように、適切な保護具を着用し

た。

サンプリング : 被験物質サンプルとして、5 g を試験施設の資料保存室に保存

した。

残余被験物質の処置 : 関連試験も含めすべての試験操作終了後、焼却処分するために

産業廃棄物として回収した。

2. 媒体

名称:精製水(日本薬局方精製水)

ロット番号 : 008038、012048

製造者: ヤクハン製薬株式会社

保存条件: 室温

使用期限 : 2013 年 8 月、2013 年 12 月

取扱上の注意 : 特になし。

3. 投与液の調製および化学分析

調製方法 : 被験物質を精秤し、所定の濃度となるように媒体を加え混合し、

均一であることを確認後、投与液とした。

調製頻度 : 11 日間に1回以上。

保存条件: 遮光気密容器に入れ、冷蔵保存。

保存場所 : 被験物質保存室の冷蔵庫

調製上の注意 : 被験物質はドラフト内で取扱い、調製の際にはゴム手袋および

マスクを着用し、吸い込んだり、眼、皮膚および衣類に触れな

いようにした。

残余投与液の処置:残余の投与液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収

した。

投与液の安定性および均一性:1および200 mg/mLの溶液について、冷蔵11日後室温6時

間(調製目を0日として起算)の安定性が確認されている

(Appendix 2-1)

投与液の濃度確認 : 初回および雄動物の最終回の投与に用いた全濃度の被験物質調

製液について、被験物質の濃度を確認した(Appendix 2-2および

 $2-3)_{0}$

濃度分析方法 : Appendix 3 に示す。

4. 試験方法

(1)試験系

種・系統 : ラット、Crl:CD(SD)

微生物統御 : SPF

生産業者 : 日本チャールス・リバー株式会社 厚木飼育センター

微生物モニタリング :動物生産業者よりデータを人手した。

動物選択理由 :ラットは毒性試験等で通常用いられている動物種であり、繁殖成

績が安定していることと当研究所における背景対照データが利用

できることから、この系統を選定した。

発注動物数 : 雌雄各 50 匹

受入動物数:雌雄各 52 匹

発注動物週齢 : 雌雄とも8週齢

出荷時体重基準 : 雄は 240~330 g、雌は 160~230 g

受人時体重範囲 : 雄は 261~300 g、雌は 190~223 g

投与開始時週齢 : 雌雄とも 10 週齢

群数:雌雄各4群

各群動物数:雌雄各12匹

(2)検疫および馴化

検疫方法 : 一般状態を1日1回観察し、体重を受入時(馴化1日)および馴

化期間終了日(投与開始前々日)を含め約1週に1回の頻度とな

るように計3回測定した。

性周期検査: 雌動物について、投与開始前10日間の性周期検査を膣垢スメア

塗抹法により行った。

期間:雌雄とも、馴化1日(受入日)から馴化13日までの12日間。

検疫および馴化期間中に雌雄とも異常は認められなかった。

(3) 群分け

検疫および馴化期間中に実施した一般状態観察および体重測定ならびに雌の性周期検査の結果を参考にして、動物の使用の適否を決定し、健康な雌雄各 48 匹を選抜し、10 週齢で試験に供した。検疫および馴化期間終了日の体重に基づいて、投与開始2日前に層化無作為抽出法により各群の平均体重が均一になるように群分けを行った。試験に供された動物の体重範囲は、雄で350~400 g、雌で234~272 gであり、平均体重は雄で375.1 g、雌で248.9 gであり全体平均の±20%以内であった。選抜から外れた動物は試験から除外し標準操作手順書に従って適切に取扱った。選抜された動物について、投与開始前日に一般状態に異常がないことを確認した。

(4)動物およびケージの識別

動物 : 群分け前は受入時に油性フェルトペンで尾部に印を付け、個体

識別を行った。

群分け後は耳介に動物番号を入墨し、個体識別を行った。

新生児については、個体識別は行わなかった。

飼育ケージ : 群分け前は性別毎に色分けしたラベルに試験番号および受人時

の動物番号を明記し、各ケージの前面に標示した。

群分け後は性別毎に色分けしたラベルに試験番号、試験群および群分け後の動物番号を明記し、雌動物には妊娠期間中は交尾成立日毎のグループ名および分娩予定日、哺育期間中は分娩終

了日毎のグループ名も明記した。

(5)動物飼育

1) 飼育環境

飼育室番号 : 202 号室

温度·湿度 : 22±3℃, 50±20%(実測範囲 20~23℃、45~52%)

換気回数 : 10~18 回/時間

照明時間 :人工照明 12 時間(8:00~20:00)

2) 飼育器材および飼育方法

ケージの種類 : ブラケット式金属製金網床ケージ (260W×380D×180H, mm)

ただし、交尾成立雌動物については妊娠17日から哺育4日まで 小型受皿と共に実験動物用床敷(ホワイトフレーク、日本チャー

ルス・リバー株式会社)を使用した。

1 ケージあたりの収容動物数:検疫および馴化期間中は雌雄別に2 匹ずつ、群分け後は

1 匹ずつ、交配期間中は雌雄各 1 匹ずつ、妊娠期間中は 1 匹、 分娩後は 1 腹を収容した。

ケージ交換 : 群分け時に1回実施し、その後は2週に1回の頻度で交換した。

ただし、交尾成立雌動物については妊娠0月および14月に実施

した。

受皿交換:週2回洗浄滅菌済みのものと交換した。

小型受皿の交換 : 妊娠 20 日に実施した。

給餌器交換: 群分け時に1回実施し、その後は2週に1回の頻度で交換した。

ただし、交尾成立雌動物については妊娠0日および14日に実施

した。

自動給水装置の水抜き:週1回実施した。

室内の清掃および清拭消毒

:1日1回実施した。清拭消毒に際しては、塩素系消毒薬および

ヨウ素系消毒薬を1週間単位で交互に使用した。

3) 飼料

種類・名称 : 固型飼料、CRF-1

ロット番号 : 101005、101207

製造業者 : オリエンタル酵母工業株式会社

給餌方法: 金属製給餌器を用いて自由に摂取させた。

汚染物質および微生物検査

: 試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質あるいは微生物の有無を、使用した各ロットについて分析した。汚染物質の分析はEurofins Analytics 社(分析報告書: AR-10-JP-001107-01、

AR-10-JP-001322-01)が、微生物検査は飼料製造業者(分析試験

報告書: No. 10603-153、10603-186) がそれぞれ行った。分析項目と許容値は株式会社 化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも許容値を超える値

は認められなかった。

4) 飲料水

種類 : 札幌市水道水

給水方法 : 自動給水装置を用いて自由に摂取させた。

汚染物質検査 : 試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質の有無を、2011年1

月4日および2011年4月1日に当該飼育室と同系統配管の最末端(205号室)から試料を採取して分析した。分析は日本衛生株

式会社(水質検査結果表: No. A224279、A230003)が行った。分析項目と許容値は株式会社 化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも許容値を超える値は認められなかった。

(6) 被験物質の投与

1) 投与量の設定

投与量: 0、100、300 および 1000 mg/kg/day

設定理由 : SIPE のラットにおける簡易生殖試験の予備試験として、100、

300 および 1000 mg/kg を 14 日間反復経口投与した結果、各投与群の雌雄ともに被験物質投与に関連した変化は認められなかった。このことから、本試験では予備試験と同様に高用量に 1000 mg/kg/day を設定し、以下公比約 3 で除した 300 および 100

mg/kg/day を中用量および低用量に設定した。

試験群の構成 :試験群の構成と各群の動物番号は以下の通りとした。

	投与量	濃度	投与容量	動物数(動物番号)
試験群	(mg/kg)	(mg/mL)	(mg/mL)	雄	雌
対照群	0	0	10	12 (101~112)	12 (151~162)
低用量群	100	10	10	12 (201~212)	12 $(251\sim262)$
中用量群	300	30	10	$12 (301 \sim 312)$	12 $(351\sim362)$
高用量群	1000	100	10	12 (401~412)	12 $(451\sim462)$

対照群は他の群と同様の方法で媒体のみを投与した。

2) 投与

投与方法および投与経路:ディスポーザブル胃ゾンデおよびディスポーザブルシリンジ

を用いて強制的に胃内に経口投与した。

投与回数:1日1回、連日投与した。

投与時刻 :9:00~12:00

ただし、上記投与時刻に分娩中の母動物には、分娩終了後に投

与した。

投与期間 :雄;交配開始前14日間およびその後の28日間、計42日間

雌; 交配前 14 日間および交尾成立までの交配期間、さらに交尾成立例は妊娠期間および哺育 3 日までの期間、分娩遅延例は交尾成立後 25 日までの期間(最長 53 日間)、交尾不成立

例は交配期間終了後23日までの期間。

投与容量: 各個体の投与液量は投与日に最も近い測定日の体重に基づいて

算出した。

投与方法、投与経路、投与回数および投与期間の選定理由

: 「試験法ガイドライン」を参考にした。

5. 観察、測定および検査項目

雌雄動物について

投与開始日を投与1日と起算し、さらに、雌は交尾成立日を妊娠0日、分娩終了日を哺育0日と起算した。

1) 一般状態観察

例数:全例

期間:投与1日から剖検日まで。

すなわち、雄は投与42日の翌日、雌は哺育4日まで。

頻度 : 投与前(午前)および投与後(午後)の1日最低2回。

ただし、剖検日は午前中に1回。

観察方法:個々の動物の生死、外観、行動等について観察した。

異常が認められる場合は、その症状ならびに症状の持続期間を

記録した。死亡動物は発見後速やかに剖検した。

2) 体重測定

例数:全例

測定日 :投与開始日を投与1日と起算し、以下の日に測定した。

雄は、投与1、2、5、7、10、14、その後は7日毎の投与前、

投与終了日および剖検日。

雌は、投与1、2、5、7、10、14日の投与前、妊娠0、1、3、5、7、10、14、17および20日の投与前、哺育0および1日の投

与前、ならびに哺育4日の剖検日。

ただし、死亡例は死亡発見時の体重も記録した。

測定方法 :電子式上皿天秤(GX-2000、株式会社エー・アンド・デイ)を用い

て測定し、1g単位で記録した。

体重増加量および体重増加率

: 次式により算出した。

雄:

体重増加量(g) = 投与 42 日体重(g) - 投与 1 日体重(g)

体重増加率(%) = 体重増加量(g) 投与1日体重(g) ×100

雌:

交配前投与期間;

体重增加量(g) = 投与 14 日体重(g) - 投与 1 日体重(g)

体重増加率(%) = 体重増加量(g) 投与1日体重(g) ×100 妊娠期間;

体重増加量(g) = 妊娠 20 日体重(g) -妊娠 0 日体重(g)

体重増加率(%) = 体重増加量(g) 妊娠0日体重(g)

哺育期間;

体重増加量(g) = 哺育4日体重(g) -哺育0日体重(g)

体重増加率(%) = $\frac{$ 体重増加量(g) $}{$ 哺育 0 日体重(g) $}$ ×100

3) 摂餌量測定

例数:全例

測定日 : 雄は剖検日および交配期間を除き、体重測定と同じ日に実施し

た。雌は、妊娠20日は残量、哺育0日は給与量のみを測定した。

測定方法:電子式上皿天秤(GX-2000、株式会社エー・アンド・デイ)を用い

て測定し、1 g 単位で記録した。投与開始前日に適当量を測定 後ケージ毎に給与し、その後は測定日に残量および給与量を測

定した。ただし、最終回の測定は残量のみ測定した。

摂餌量の算出:次式により算出した。

摂餌量(g/day) = 給餌量(g) - 残量(g) 測定日間の日数 (day)

4) 剖検

例数:全例

検査時期 : 死亡例は発見後速やかに、生存例は剖検日に実施した。

すなわち、雄は投与42日の翌日、雌は哺育4日。

検査方法 : 体外表を観察した後、エーテル麻酔下で放血により安楽死させ、

全身の器官・組織を肉眼的に観察した。また、以下の器官・組織を 10%中性緩衝ホルマリンに固定・保存した。 なお、雄の精巣 および精巣上体はブアン液で固定、70%エタノールに保存した。 対の器官は左右とも保存した。雌については妊娠黄体数および着

床痕数を計数した。

固定・保存した器官または組織:甲状腺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、精巣上体、前立腺、

精嚢(凝固腺含む)、卵巣、子宮、乳腺および肉眼的異常部位(正

常組織との境界部を含む)。

5) 器官重量測定

例数・時期: 剖検時に雄の全例について実施した。

測定方法:電子式上皿天秤(ER-180A、株式会社エー・アンド・デイ)を用い

て以下の器官の重量を測定した。左右のある器官については、左

右併せて測定した。

検査器官 :精巣、精巣上体、前立腺、精嚢(凝固腺を含む)

相対重量の算出:次式により算出した。

6) 病理組織学的検査

例数 :全例について標本作製を実施し、対照群および高用量群の全例に

ついて鏡検した。

鏡検の結果、被験物質投与の影響と考えられる変化が認められた

腎臓について雌雄全例の鏡検を行った。

検査方法 : パラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を

作製して鏡検した。

雄3例(No. 104、204、301)の腎臓について抗α₂₁-グロブリン抗

体による免疫組織学的染色を実施した。

器官・組織名 : 精巣 (精子形成の Stage 分類を含む)、精巣上体および剖検時に

異常所見のみられた器官・組織。

雌雄動物の生殖および新生児の発生について

1) 性周期検査

例数: 雌の全例

期間 :群分け前10日間および投与開始日から交尾成立日まで。

交尾不成立例については剖検目まで。

方法 : ギムザ染色による膣垢塗抹標本を作製し、光学顕微鏡下で性周

期段階を判定した。

判定 : 性周期の各段階(発情前期、発情期、発情後期および発情休止期)

を4日から6日の間隔で繰り返すものを正常とし、発情期間隔を算出した。発情期あるいは発情休止期が7日以上継続してみ

られるものを連続発情または連続非発情とし、異常と判定した。

2) 生殖能検査

例数 : 雌雄の全例

時期、方法 : 投与 14 日を交配開始日、交配開始日の翌日を交配 1 日とし、交

配開始日の夕刻から主試験群の同試験群内の雌雄1対を交尾が確

認されるまで連続同居させた。

なお、同一例の交配期間は14日を限度とした。

交配組合せ:同一群の動物番号末尾が同一動物を1対とした。

方法 : 同試験群内の雌雄1対を交配開始日の夕刻より交尾が確認される

まで連続同居させる。

交尾成立の確認方法 : 膣内または受皿上に落下した膣栓、あるいは膣垢スメア標本中の

精子を確認した。いずれかが認められた日を妊娠0日とした。

次式から群毎に交尾率を算出した。

受胎能 :妊娠の確認を分娩の有無および剖検時に子宮内の着床痕の計数を

行った。次式から群毎に受胎率を算出した。

受胎率(Fertility index、%) = 受胎動物数 交尾した雌雄の数 ×100

3) 分娩および哺育状態観察

例数:受胎した雌の全例

分娩観察:交尾が確認された雌動物は全例自然分娩させた。

分娩状態を妊娠21日から25日の朝まで、毎日少なくとも3回(9:

00、13:00 および 17:00) 観察した。

分娩終了の確認 :9:00に母動物が児を巣の中に集めて腹の下に抱え込んでいるの

が観察された場合に分娩終了とし、その日を哺育0日(生後0日)

とした。

1匹以上の生存児を出産したものを正常出産とした。

出産児が全て死亡している場合(死産)は異常出産とした。

生存児を川産したものであっても、難産などの分娩異常がみられ

る場合や分娩終了の確認ができない場合にも異常出産とした。

次式から群毎に出産率を算出した。

川産率(Gestation index、%) = 生児出産雌数 妊娠雌数 ×100

出産児の観察:生後0日に正常に出産した腹毎に生存児数と死亡児数とを計数

し、それらの合計を出産児数とした。 次式から腹毎に出生率を算出した。

出生率(Live birth index、%) = 出產時生存児数 出産児数

出産児の性比の算出 :生後0および4日に個々の児動物の性を肛門と生殖突起の間の

長さで判定した。

死亡児も含めた生後0日の全出産児、死亡例を含めない生後0日の生存児ならびに生後4日の生存児を対象として以下を算出した。

哺育 0 日の全出産児の性比(Sex ratio) = 雄出産児数 雄出産児数+雌出産児数

哺育 0 日の生存児の性比(Sex ratio) = 雄生存児数 雄生存児数+雌生存児数

哺育4日の生存児の性比(Sex ratio) = 雄生存児数 雄生存児数+雌生存児数

妊娠期間の算出 :妊娠0日から哺育0日までの期間の日数を計数した。

分娩率の算出 : 剖検時に各雌の子宮内の着床痕を肉眼的に計数した。

次式から腹毎に分娩率を算出した。

分娩率(Delivery index、%) = 出産児数 着床数 ×100

着床率の算出 : 剖検時に各雌の卵巣の妊娠黄体数を計数した。

次式から腹毎に着床率を算出した。

哺育4日の哺育率の算出:次式から群毎に算出した。

哺育率(Nursing index、%) = 哺育4日に生存児を持つ雌数 生児出産雌数

4) 新生児の一般状態観察

例数:全例

頻度 :1回/日

期間:生後0日から生後4日(剖検日)までとした。

観察方法 : 生存または死亡の確認、一般状態および外表について観察した。

なお、死亡例は剖検し、Whole body を 10%中性緩衝ホルマリン

液で固定・保存した。

新生児生存率の算出 :生後 4 日の新生児生存率を次式から算出した。

新生児生存率 (Viability index、%) = 生後4日の生存児数 出産時生存児数 ×100

5) 新生児の体重測定

例数・時期:生存児全例について、生後0、1 および4 日に実施した。

測定方法:電子式上皿大科(GX-2000、株式会社エー・アンド・デイ)を用い

て雌雄別に1腹まとめて測定し、0.1 gまで記録した。

雌雄毎に1腹当たりの平均体重を算出した。

6) 新生児の剖検

時期・例数:生後4月に全例について実施した。

検査方法 : 体外表(口腔内を含む)を観察し、二酸化炭素吸入法により安楽死

させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。異常例については、

Whole body を 10%中性緩衝ホルマリン液に固定・保存した。

6. 統計学的方法

体重、体重増加量および増加率、摂餌量、器官の絶対重量および相対重量、発情期間隔、 黄体数、着床数および着床率、出産児数、出産時の生存児数および死亡児数、分娩率、出 生率、性比、妊娠期間、生後4日の生存児数および新生児生存率の成績について平均値お よび標準偏差を算出し、Bartlettの検定法を行い等分散性を解析した。等分散の場合は一 元配置分散分析法で解析し、不等分散の場合は Kruskal-Wallis の検定法で解析した。一元 配置分散分析の結果、有意差がみられた場合は Dunnett の検定法を用いて対照群との比較 を行った。Kruskal-Wallis 法の解析の結果、有意差がみられた場合は Mann-Whitney の U-検定法を用い対照群との比較を行った。なお、新生児の雌雄別体重は、1 腹を標本単位とし た。

病理組織学的検査のうち2段階以上のグレードが認められた所見については、群毎の傾向を Kruskal-Wallis の検定法で解析し、有意差がみられた場合は Mann-Whitney の U-検定法を用いて対照群との比較を行った。

性周期の異常の発現率、交尾率、受胎率、出産率、哺育4日の哺育率、ならびに病理組織学的検査のうち1段階のグレードが認められた所見については、多試料カイ二乗検定を行い、その結果有意差が認められた場合には2試料カイ二乗検定で対照群との比較を行った。ただし、2試料カイ二乗検定に不適合の場合にはFisherの直接確率検定法を用いた。

対照群との比較検定については、有意水準は5%とした。なお、統計学的方法に関する表示方法を INDIVIDUAL DATA の冒頭に示す。

成績

雌雄動物について

1. 一般状態

一般状態の成績を Table 1 および 2、INDIVIDUAL DATA 1-1-1~1-4-4 に示す。

(1) 雄

対照群(0 mg/kg 群)、300 および 1000 mg/kg 群では、異常は認められなかった。

100 mg/kg 群では、雄1例が投与31日に死亡した。摂餌量に若干の低下が認められたが、体重および剖検所見に異常はなく、死因を特定することは出来なかった。

(2) 雌

交配前期間;

対照群、100 および 300 mg/kg 群では、異常は認められなかった。

1000 mg/kg 群では、1 例で交配期間中に 2 回膣垢採取時にピペット内に血液の混入が認められ、この例は交配期間中に交尾が確認出来ず、また、交配期間終了後の投与期間中にも 2 回同様の血液混入が認められた。他の例には、異常は認められなかった。

妊娠期間:

対照群、100 および300 mg/kg 群では、異常は認められなかった。

1000 mg/kg 群では、1 例の胸部右側に皮下腫瘤が認められた。他の例には、異常は認められなかった。

哺育期間;

対照群、100 および300 mg/kg 群では、異常は認められなかった。

1000 mg/kg 群では、妊娠期間から継続して1例の胸部右側に皮下腫瘤が認められた。他の例には、異常は認められなかった。

2. 体重推移

体重推移を Figure 1 および 2、Table 3~6、INDIVIDUAL DATA 2-1-1~2-4-4 に示す。

(1) 雄

100、300 および 1000 mg/kg 群ともに、対照群と比較して統計学的な有意差は認められなかった。

(2) 雌

交配前、妊娠期間および哺育期間いずれにおいても各投与群ともに統計学的な有意差は認められなかった。

3. 摂餌量

摂餌量を Figure 3 および 4、Table 7~10、INDIVIDUAL DATA 3-1-1~3-4-4 に示す。

(1) 雄

100、300 および 1000 mg/kg 群ともに、対照群と比較して統計学的な有意差は認められなかった。

(2) 雌:主試験群

交配前、妊娠期間および哺育期間いずれにおいても各投与群ともに統計学的な有意差は認め

られなかった。

4. 剖検所見

剖検所見を Table 11 および12、INDIVIDUAL DATA 4-1-1~4-2-4 に示す。

(1) 雄

対照群では、1例で右精嚢の小型が認められた。

100 および 300 mg/kg 群では、異常所見は認められなかった。

1000 mg/kg 群では、腎臓の腫大が両側性で 6 例に認められ、また、腎臓の黄褐色化が両側性で 3 例、腎臓の多巣性の微細黄 门色斑が両側性で 1 例、腎臓の腎盂拡張が片側性で 1 例に認められた。他に、右精巣上体の尾部黄白色斑が 1 例で認められた。

(2) 雌

分娩例;

対照群では、12例中1例で回腸の憩室が認められた。

- 100 mg/kg 群では、10 例全例で異常所見は認められなかった。
- 300 mg/kg 群では、12 例中 1 例で回腸の憩室が認められた。

1000 mg/kg 群では、11 例中 1 例で胸部右側に灰白色皮下腫瘤が認められた。

不妊例;

100 mg/kg 群の1例に異常は認められなかった。

交尾不成立例;

100 mg/kg 群の1例に異常は認められなかった。

1000 mg/kg 群の1例では、左卵巣の灰白色腫瘤が認められた。

5 器官重量

雄の精巣、精巣上体、前立腺および精嚢の絶対重量および相対重量の成績を Table 13、INDIVIDUAL DATA 5-1~5-4 に示す。

100、300 および 1000 mg/kg 群ともに、対照群と比較して統計学的な有意差は認められなかった。

6. 病理組織学的検査

病理組織学的検査の成績を Table 14 および 15、INDIVIDUAL DATA 6-1-1~6-2-4、精子形成の Stage 分類の成績を Table 16、INDIVIDUAL DATA 7-1~7-8、に示す。

(1) 雄

「腎」蔵

尿細管管腔内の結晶が 1000 mg/kg 群で軽度 5 例、中等度 3 例および重度 1 例に、腎盂内結晶が 300 mg/kg 群で軽度 1 例、1000 mg/kg 群で軽度 4 例および中等度 1 例、皮質および髄質の

尿細管拡張が 300 mg/kg 群で軽度 1 例、1000 mg/kg 群で軽度 8 例および中等度 4 例、皮質および髄質の尿細管上皮の再生が対照群で軽度 2 例、100 mg/kg 群で軽度 3 例、300 mg/kg 群で軽度 4 例、1000 mg/kg 群で軽度 3 例および中等度 9 例、乳頭部の集合管上皮の再生が 1000 mg/kg 群で軽度 6 例、リンパ球浸潤が皮質について 300 mg/kg 群で軽度 1 例、1000 mg/kg 群で軽度 8 例および中等度 4 例、髄質について 1000 mg/kg 群で軽度 5 例、乳頭部について 1000 mg/kg で軽度 1 例、間質の線維化が 1000 mg/kg 群で軽度 4 例、腎盂粘膜の過形成が 1000 mg/kg 群で軽度 3 例に認められた。また、近位尿細管上皮の好酸性小体がいずれも軽度に対照群で 2 例、100 mg/kg 群で 4 例、300 mg/kg 群で 7 例に認められ、代表例 3 例で実施した抗 α 2u ブロブリン抗体による免疫組織学的染色ではいずれも陽性反応が認められた。他に、軽度な皮質の鉱質沈着が 300 mg/kg 群で 1 例、軽度な嚢胞が対照群および 100 mg/kg 群で各 1 例に認められた。

「精巣上体」

1000 mg/kg 群の 1 例で軽度な精子肉芽腫が認められた以外には、各群ともに異常所見は認められなかった。

[精巣の Stage 分類]

1000 mg/kg 群では、Stage VII-VIII でプレレプトテン期精母細胞数ならびにセルトリ細胞 あたりの精祖細胞数、プレレプトテン期精母細胞数およびパキテン期精母細胞数に対照群と比較して統計学的にいずれも有意な高値が認められた。また、Stage IX-XI でパキテン期精母細胞数の統計学的に有意な低値が認められた。他の Stage には統計学的な有意差は認められなかった。

(2) 雌

[回腸]

肉眼的異常部位として、対照群および300 mg/kg 群の各1例について鏡検し、いずれにも軽度な憩室が認められた。

「腎臓〕

軽度な皮髄境界部の鉱質沈着が 100 mg/kg で 1 例、300 mg/kg 群で 2 例、軽度な皮質の尿細管上皮の再生が 100 および 300 mg/kg 群で各 1 例、軽度な腎盂粘膜の炎症性細胞浸潤が 100 mg/kg で 1 例に認められた。

1000 mg/kg 群および対照群では、異常所見は認められなかった。

[卵巣]

1000 mg/kg 群の剖検時に灰白色腫瘤のみられた1例(交尾不成立例)で顆粒膜細胞腫が認められたが、他の例に異常所見は認められなかった。対照群には異常所見は認められなかった。

[乳腺]

1000 mg/kg 群の剖検時に胸部右側で灰白色皮下腫瘤のみられた1例で乳腺腺癌が認められた。

Ⅱ. 生殖発生毒性

(1)性周期検査

性周期検査の成績を Table 17、INDIVIDUAL DATA 8-1~8-4 に示す。

対照群および300 mg/kg 群では、異常性周期を示す雌は認められなかった。

100 mg/kg 群では、交配前の投与期間中に 1 例で連続非発情が認められたが、交配期間の 4 日目に交尾がみられ、妊娠および分娩が確認された。他に、2 例で交配期間中に連続非発情が認められ、1 例は交配期間の最終日に交尾が認められたが非妊娠例、他の 1 例は交配期間中に交尾が認められたが非妊娠例、他の 1 例は交配期間中に交尾が認められなかった。

1000 mg/kg 群では、交配期間の2日目以降に連続非発情が認められ、交尾は確認出来なかった。なお、この例では交配期間最終後の投与36日以降に性周期の回帰が認められた。

(2)生殖能検査

生殖能検査の成績を Table 17、INDIVIDUAL DATA 9-1~9-4 に示す。

100、300 および 1000 mg/kg 群ともに交尾率、受胎率、出産率、妊娠期間および哺育 4日の 哺育率に対照群と比較して統計学的な有意差は認められなかった。

非妊娠例が 100 mg/kg 群で 1 例に認められた。

(3)妊娠、分娩、哺育状態および新生児生存率

妊娠、分娩、哺育状態および新生児生存率の成績を Table 18、INDIVIDUAL DATA 10-1~10-4 に示す。

100、300 および 1000 mg/kg 群ともに黄体数、着床痕数、着床率、分娩率、出産児数、生産児数、出産児および生存児(哺育 0 および 4 日)の性比、出生率ならびに哺育 4 日の生存児数および新生児生存率に対照群と比較して統計学的な有意差は認められなかった。

(4)新生児の一般状態

新生児の一般状態の成績を Table 19、INDIVIDUAL DATA 11-1~11-4 に示す。

分娩終了確認時の死亡児は、300 mg/kg 群で雄2例が認められた。

哺育 4 日までの死亡児あるいは不明児は、対照群で雄 3 例および雌 4 例、100 mg/kg 群で雌 1 例、300 mg/kg 群で雌 1 例が認められたが、1000 mg/kg 群には 1 例も認められなかった。

他に、対照群も含めた各投与群で死亡児および生存児ともミルクバンドの認められない例が 散見された。

(5)新生児の体重

新生児の体重推移を Figure 5、Table 20、INDIVIDUAL DATA 12-1~12-4 に示す。

100 および 300 mg/kg 群では、雌雄ともに哺育期間中に対照群と比較して統計学的に有意な差は認められなかった。

1000 mg/kg 群では、哺育 0 日に雌で統計学的に有意な高値が認められたが、哺育 1 および 4 日には有意差は認められなかった。雄では統計学的な有意差は認められなかった。

(6)新生児の剖検所見

新生児の剖検所見を Table 21、INDIVIDUAL DATA 13~14-4に示す。

生後4日間の死亡児では、対照群の雌で肺の暗赤色化が1例に認められた。他に、自己融解や死体の不明例が散見された。

生後4日間の生存児では、対照群の雌で肝臓の外側左葉の黄白色斑が1例に認められた。他には、異常所見は認められなかった。

考察

SIPE の 0 (対照、精製水)、100、300 および 1000 mg/kg/day を、1 群雌雄各 12 匹の Cr1:CD(SD) ラットに、雄ラットに対しては交配前、交配期間および交配後を含む計 42 日間、雌ラットに対しては交配前、交配および妊娠期間、ならびに分娩後 5 日までの期間(42~53 日間)経口投与し、その性腺機能、交尾行動、受胎および分娩等の生殖に及ぼす毒性を検討した。

1. 反復投与毒性

一般状態では、100 mg/kg 群で投与 31 日に雄 1 例の死亡例が認められた。この例では死亡前の数日間の摂餌量に若干の低下が認められたものの他には異常は認められず、死因を特定することは出来なかったが、より高用量の群には死亡例がないことから被験物質投与に関連した死亡ではないと判断された。

1000 mg/kg 群の交尾が認められなかった雌1例で膣垢採取時のピペット内に血液の混入が4回認められた。この例では、病理組織学的変化で左卵巣に顆粒膜細胞腫が認められ、交尾不成立の原因と推察された。また、同群の妊娠例の1例で妊娠期間中から胸部右側に皮下腫瘤が認められ、病理組織学的検査で腺癌が認められた。いずれも1例のみの発現であり、その発現に関して被験物質投与との関連性はないと推察された。

体重および摂餌量では、被験物質投与の影響は認められなかった。

剖検所見では、1000 mg/kg 群の雄で腎臓に腫大、黄褐色化、多巣性の微細黄白色斑、腎盂拡張が認められ被験物質投与に関連した変化と考えられた。類似物質では、主成分の他にエチレン=グリコールを 65%²⁾含有し、エチレン=グリコールの 16 週間混餌投与試験 ³⁾で、シュウ酸塩尿や腎障害が発現し、雌雄差も報告され雄でより顕著な毒性発現が認められている。本被験物質には、エチレン=グリコールは含有されていないが、本試験でも病理組織学的検査で雄の腎臓に尿細管管腔内や腎盂内に結晶物の発現が 300 mg/kg 以上の群で認められ、エチレン=グリコールで報告されている毒性変化 ³⁾と同様の変化と考えられた。

雄の腎臓では、他に 300 mg/kg 以上の群で、皮質および髄質の尿細管拡張、皮質のリンパ球浸

潤が認められ、1000 mg/kg 群で乳頭部の集合管上皮の再生、髄質および乳頭部のリンパ球浸潤、間質の線維化、腎盂粘膜の過形成等、さらに、皮質および髄質の尿細管上皮の再生に発現例数の増加およびグレードの増悪が認められた。これらの変化は、発現した結晶物による刺激等に起因する可能性が考えられた。

他に、妊娠雌では300 mg/kg 群の雌1例で回腸の憩室、1000 mg/kg 群の雌1例で胸部右側に灰白色皮下腫瘤、交尾が認められなかった雌では1000 mg/kg 群の1 例で卵巣の灰白色腫瘤が認められたが、いずれも1例のみの発現であり被験物質投与との関連性はないと判断した。また、1000 mg/kg 群の雄1例で右精巣上体の尾部黄白色斑が認められ、病理組織学的検査で軽度な精子肉芽腫が認められたが、この例では交尾行動および対の雌の妊娠が確認されていることから、1 例のみの発現であり被験物質投与との関連性はないと判断した。

雄の生殖器官の器官重量では、各投与群ともに統計学的な有意差は認められなかった。

病理組織学的検査では、上記の腎臓の変化以外には被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

雄の精巣の Stage 分類では、Stage VII-VIII でプレレプトテン期精母細胞数ならびにセルトリ 細胞あたりの精祖細胞数、プレレプトテン期精母細胞数およびパキテン期精母細胞数に統計学的 な高値、Stage IX-XI でパキテン期精母細胞数の統計学的な低値が認められた。これらの変化は 特定の Stage にのみ認められていること、Stage VII-VIII では高値、Stage IX-XI では低値と一貫していないことから、これらの有意差に関して毒性学的な意義はないと判断した。

2. 生殖発生毒性

性周期検査では、100 mg/kg 群の 3 例および 1000 mg/kg 群の 1 例で連続非発情が認められ、これらの例はいずれも交尾不成立例あるいは非妊娠例であった。異常性周期の発現に関して、統計学的な有意差は認められないこと、また、用量依存的な発現ではないことから、被験物質投与の影響は認められないと判断した。

生殖能検査、妊娠、分娩、哺育状態および新生児生存率ならびに新生児の一般状態、体重、剖 検所見については、いずれも被験物質投与の影響は認められなかった。

以上のように、反復投与毒性に関しては、300 mg/kg 以上の群の雄で腎臓に被験物質投与の影響が認められたが、雌には何ら影響は認められなかった。また、親動物の生殖能ならびに新生児の発生に関しては、いずれも 1000 mg/kg まで被験物質投与の影響は認められなかった。

したがって、SIPE の本試験条件下における無影響量(NOEL)は、反復投与毒性に関しては雄で 100~mg/kg、雌で 1000~mg/kg、親動物の生殖能ならびに新生児の発生に関しては 1000~mg/kg と考えられた。



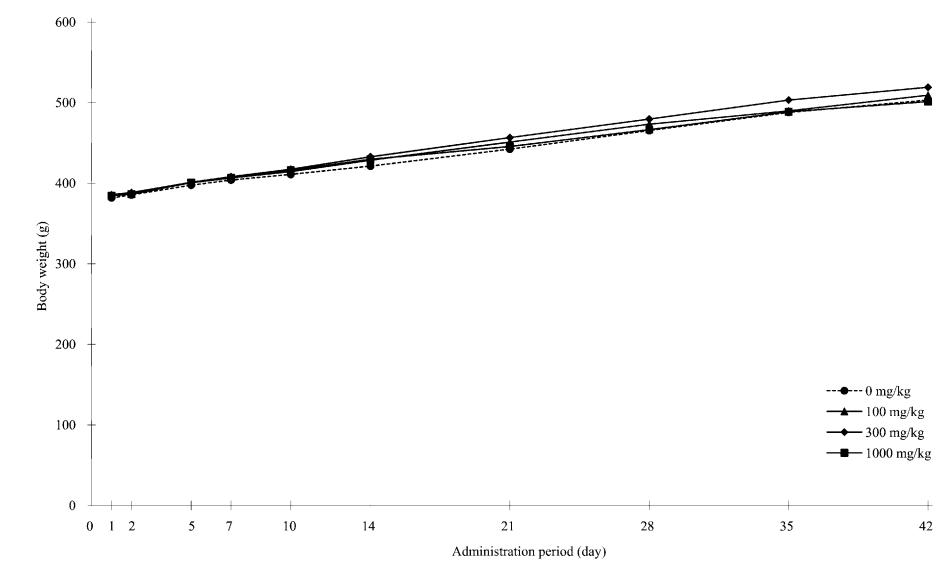


Figure 1 Body weight of male rats dosed orally with SIPE in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)

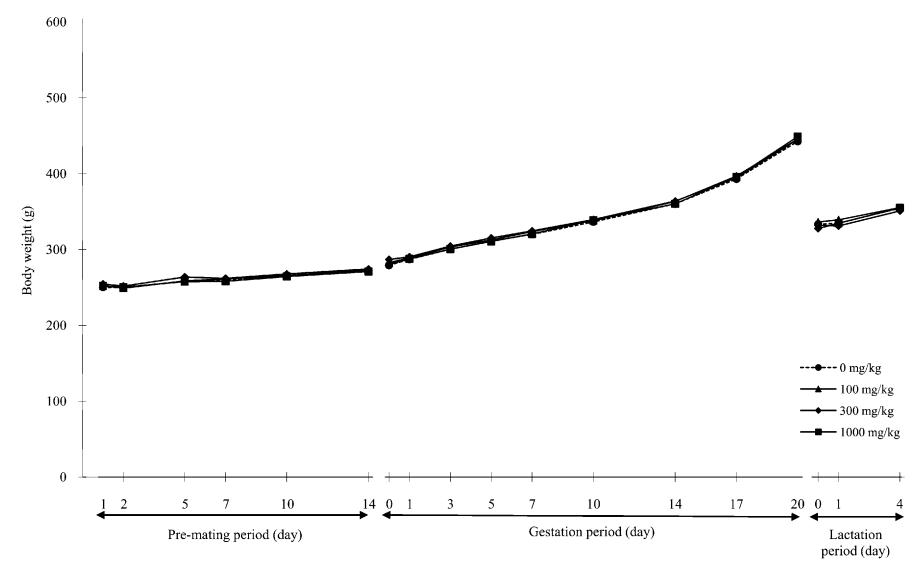


Figure 2 Body weight of female rats dosed orally with SIPE in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)

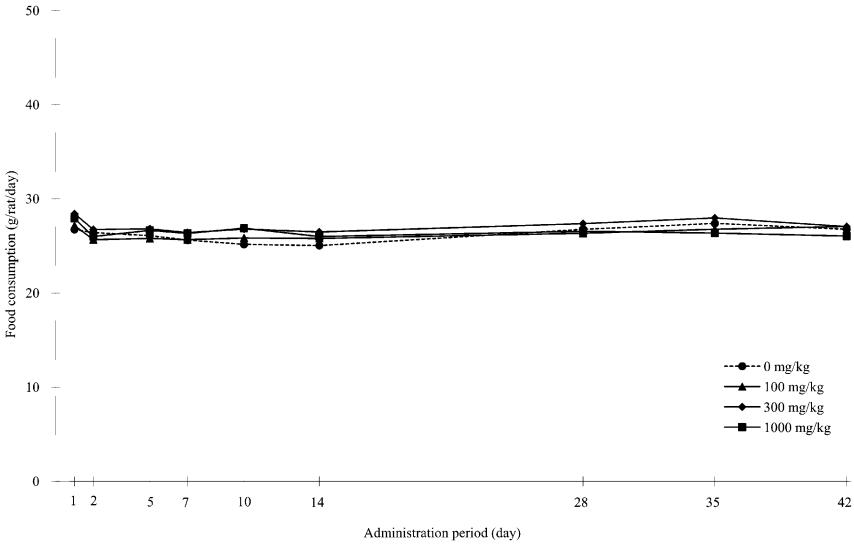


Figure 3 Food consumption of male rats dosed orally with SIPE in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)

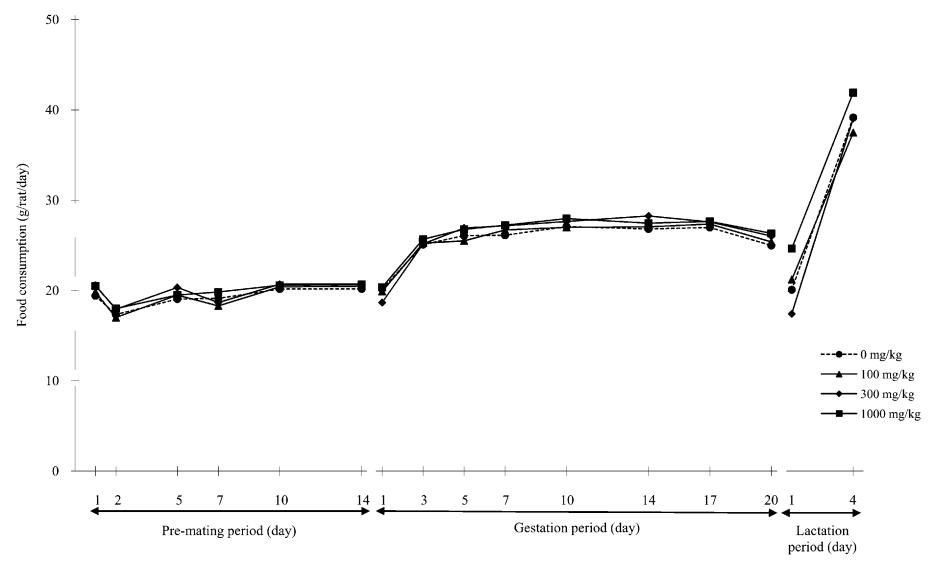


Figure 4 Food consumption of female rats dosed orally with SIPE in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)

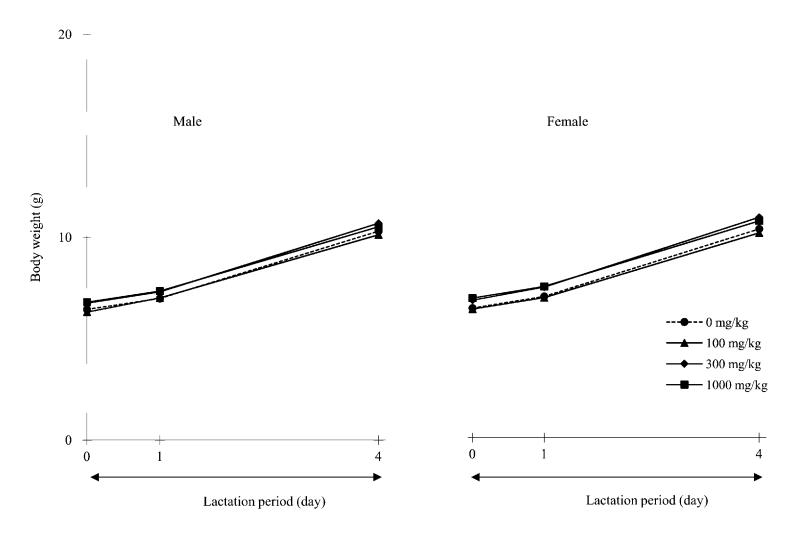


Figure 5 Body weight of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of SIPE (SR08214)

- 36

Table 1 General appearance of male rats dosed orally with SIPE in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)

		Adı	ninistration period (day)	Autopsy
Group	Findings	1-30	31	32-42	day
0 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12
	No abnormal findings	12	12	12	12
100 mg/kg	Number of animals examined	12	12	11	11
	No abnormal findings	12	11	11	11
	Dead	0	1	0	0
300 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12
	No abnormal findings	12	12	12	12
1000 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12
	No abnormal findings	12	12	12	12

Values are number of animals with findings.

Table 2 General appearance of female rats dosed orally with SIPE in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)

		Pre-mating period (day)				Mating p	eriod (day)			
Group	Findings	1-14	15	16	17	18	19-21	22	23-27	28
0 mg/kg	Number of animals examined	12	9	6	4					
o mg/kg	No abnormal findings	12	9	6	4	-	-	-	-	-
100 mg/kg	Number of animals examined	12	10	9	7	2	2	2	2	1
	No abnormal findings	12	10	9	7	2	2	2	2	1
300 mg/kg	Number of animals examined	12	7	5	5	-	-	-	-	-
	No abnormal findings	12	7	5	5	-	-	-	-	-
1000 mg/kg	Number of animals examined	12	10	6	4	1	1	1	1	1
	No abnormal findings	12	10	6	4	0	1	0	1	1
	Bleeding in the liquid of vaginal smear.	0	0	0	0	1	0	1	0	0

Values are number of animal with findings.

(to be continued)

-: Blank.

38

Table 2 General appearance of female rats dosed orally with SIPE in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214) (continued-1)

			Adminis	tration pe	riod (day)		Autopsy
roup	Findings	29	30	31	32-35	36-51	day
mg/kg	Number of animals examined	_	_	_	_	-	-
	No abnormal findings	-	-	-	-	-	-
00 mg/kg	Number of animals examined	1	1	1	1	1	1
	No abnormal findings	1	1	1	1	1	1
00 mg/kg	Number of animals examined	-	-	-	-	-	-
	No abnormal findings	-	-	-	-	-	-
000 mg/kg	Number of animals examined	1	1	1	1	1	1
0 0	No abnormal findings	1	0	1	0	1	1
	Bleeding in the liquid of vaginal smear.	0	1	0	1	0	0

Values are number of animal with findings.

(to be continued)

-: Blank.

Table 2 General appearance of female rats dosed orally with SIPE in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214) (continued-2)

			Gestati	ion period	l (day)		Lactation period (day)
Group	Findings	0-19	20,21	22	23	24-26	0-4
0 mg/kg	Number of animals examined	12	12	2	_	_	12
	No abnormal findings	12	12	2	-	-	12
100 mg/kg	Number of animals examined	11	11	1	1	1	10
	No abnormal findings	11	11	1	1	1	10
00 mg/kg	Number of animals examined	12	12	3	1	-	12
	No abnormal findings	12	12	3	1	-	12
000 mg/kg	Number of animals examined	11	11	4	_	-	11
	No abnormal findings	11	10	4	-	-	10
	Subcutaneous mass, right side of chest region	0	1	0	-	-	1

Values are number of animal with findings.

Day 26 of gestation and Day 4 of lactation: Autopsy day.

^{-:} Blank.

Table 3 Body weight of male rats dosed orally with SIPE in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)

	Number				_									veight gair	
	of				В	ody weigh	t (g) on ad	ministratio	ninistration period (day)					Day 1-42	
Group	animals		1	2	5	7	10	14	21	28	35	42	g	%	
0 mg/kg	12	Mean	381.8	385.4	397.6	403.9	410.9	421.3	442.3	465.3	487.8	503.3	121.4	31.731	
·o		S.D.	12.3	13.5	16.5	17.4	21.1	25.2	27.2	25.9	27.1	30.5	21.7	5.199	
											(11)	(11)	(11)	(11)	
100 mg/kg	12	Mean	385.7	388.5	400.5	406.6	414.4	428.6	451.1	473.3	489.7	509.2	123.7	32.095	
		S.D.	13.2	14.5	15.8	17.4	17.5	20.1	21.5	22.9	21.2	24.5	16.8	4.205	
300 mg/kg	12	Mean	385.3	388.3	401.1	408.0	417.3	432.8	456.6	479.6	503.2	519.1	133.8	34.659	
		S.D.	14.8	15.2	16.3	16.6	18.7	20.3	21.2	23.7	24.3	31.8	22.3	5.291	
1000 mg/kg	; 12	Mean	384.6	386.3	400.7	406.5	416.1	429.7	445.6	466.4	488.6	501.3	116.7	30.308	
		S.D.	14.3	14.1	15.8	16.5	19.2	22.7	23.4	26.3	30.7	29.8	21.5	5.221	

Body weight gain (%) = (body weight gain / body weight on day 1) x 100.

Values in parentheses are the number of animals examined.

Table 4 Body weight on pre-mating period of female rats dosed orally with SIPE in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)

	Number of	•		Body weight gain Day 1-14						
Group	animals	,	1	2	5	7	10	14	g	%
0 mg/kg	12	Mean	250.3	249.8	258.3	260.2	266.1	272.3	21.9	8.747
		S.D.	10.7	11.3	12.0	13.2	14.5	15.1	8.8	3.408
100 mg/kg	12	Mean	252.2	249.1	258.5	261.3	265.5	272.4	20.3	8.063
		S.D.	10.8	10.3	11.1	10.6	11.3	12.6	7.9	3.248
300 mg/kg	12	Mean	254.5	251.8	263.8	261.9	267.8	274.3	19.8	7.716
		S.D.	10.5	12.2	11.1	11.2	14.1	17.2	10.3	3.937
1000 mg/kg	12	Mean	252.0	250.4	257.7	258.1	264.5	271.1	19.1	7.563
		S.D.	10.5	14.2	9.8	10.3	13.1	13.1	5.6	2.193

Body weight gain (%) = (body weight gain / body weight on day 1) x 100.

Table 5 Body weight during gestation period of female rats dosed orally with SIPE in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)

	Number of			Body weight (g) on gestation period (day)									
Group	animals		0	1	3	5	7	10	14	17	20	g	%
0 mg/kg	12	Mean	279.3	287.2	300.3	311.2	319.9	336.4	360.2	393.0	442.6	163.3	58.584
		S.D.	16.3	14.6	13.7	14.4	14.6	16.7	20.2	20.7	26.4	17.6	6.321
100 mg/kg	10	Mean	282.6	288.9	303.4	312.6	323.7	338.1	363.4	396.7	445.6	163.0	57.686
		S.D.	7.0	9.1	12.1	13.3	13.6	13.3	15.9	16.9	17.5	14.7	5.095
300 mg/kg	12	Mean	286.8	290.3	304.4	315.2	324.6	339.4	363.8	394.6	445.2	158.3	55.316
		S.D.	16.0	14.4	14.6	16.7	16.9	19.2	22.0	25.0	30.2	24.2	8.676
1000 mg/kg	11	Mean	280.5	287.6	300.5	310.7	320.5	338.7	360.2	395.5	448.9	168.4	60.103
2 0		S.D.	11.8	11.1	11.3	10.1	10.9	10.6	14.9	16.2	17.8	13.0	5.248

Body weight gain (%) = (body weight gain / body weight on day 0) x 100.

- 43

Table 6 Body weight during lactation period of female rats dosed orally with SIPE in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)

	Number of		•	eight (g) or period (da	n lactation y)	Body weight gain Day 0-4		
Group	animals		0	1	4	g	%	
0 mg/kg	12	Mean S.D.	333.3 22.8	334.8 24.2	354.4 20.9	21.1 13.7	6.457 4.232	
100 mg/kg	10	Mean S.D.	336.3 15.8	339.1 16.9	355.3 19.8	19.0 12.8	5.671 3.945	
300 mg/kg	12	Mean S.D.	331.9 24.9	331.1 22.2	350.9 23.0	19.0 7.6	5.818 2.513	
1000 mg/kg	11	Mean S.D.	327.7 9.9	334.7 12.8	354.9 14.8	27.2 10.9	8.296 3.352	

Body weight gain (%) = (body weight gain / body weight on day 0) x 100.

Table 7 Food consumption of male rats dosed orally with SIPE in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)

	Number	•				Food cor	nsumption	(g/rat/day)			
	of					Admini	stration pe	riod (day)	ı			
Group	animals		1	2	5	7	10	14	28	35	42	
0 mg/kg	12	Mean	26.75	26.42	26.09	25.63	25.17	25.04	26.77	27.39	26.78	
8 8		S.D.	1.96	2.81	1.63	1.99	2.06	2.92	1.45	1.81	2.22	
									(10)	(11)	(11)	
100 mg/kg	12	Mean	27.17	25.67	25.79	25.67	25.85	25.80	26.35	26.77	27.07	
		S.D.	1.80	2.06	1.40	1.74	1.33	1.54	1.34	1.56	1.47	
300 mg/kg	12	Mean	28.42	26.75	26.81	26.42	26.79	26.48	27.37	27.98	27.06	
		S.D.	2.15	1.60	1.72	1.70	1.81	1.80	1.88	1.86	2.61	
									(11)			
1000 mg/kg	12	Mean	27.92	26.00	26.66	26.33	26.88	26.00	26.55	26.37	26.05	
		S.D.	2.11	2.26	1.87	1.98	2.07	2.05	2.04	2.62	2.98	

Values in parentheses are the number of animals examined.

Table 8 Food consumption on pre-mating period of female rats dosed orally with SIPE in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)

	Numbe	r		Food consumption (g/rat/day)								
	of		Pre-mating period (day)									
Group	animals	S	1	2	5	7	10	14				
0 mg/kg	12	Mean	19.42	17.33	19.05	19.13	20.17	20.18				
		S.D.	1.98	2.19	2.49	2.18	2.61	1.95				
100 mg/kg	12	Mean	19.83	17.00	19.49	18.29	20.40	20.48				
		S.D.	2.79	2.22	1.44	1.90	1.71	1.24				
300 mg/kg	12	Mean	20.58	17.92	20.33	18.67	20.69	20.70				
		S.D.	1.93	3.00	1.75	2.18	1.73	1.96				
1000 mg/kg	12	Mean	20.50	18.00	19.50	19.83	20.58	20.66				
		S.D.	2.50	3.28	1.58	1.99	1.50	1.30				

Table 9 Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with SIPE in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)

	Number	•			Foo	od consum	ption (g/ra	t/day)		
	of		Gestation period (day)							
Group	animals		1	3	5	7	10	14	17	20
0 mg/kg	12	Mean	20.17	25.08	26.08	26.13	27.08	26.82	26.98	24.99
		S.D.	2.33	1.70	2.12	2.29	2.11	2.29	1.82	2.94
100 mg/kg	10	Mean	19.90	25.25	25.50	26.70	27.00	27.05	27.36	25.38
		S.D.	3.18	2.71	2.22	2.59	1.91	1.87	1.69	1.30
300 mg/kg	12	Mean	18.67	25.17	26.92	27.17	27.64	28.26	27.59	26.03
		S.D.	2.64	1.97	2.78	2.59	3.03	2.93	2.91	2.41
1000 mg/kg	11	Mean	20.36	25.68	26.77	27.23	27.96	27.45	27.65	26.33
		S.D.	2.46	1.40	1.81	1.84	2.06	2.27	1.69	2.11

Table 10 Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with SIPE in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)

	Number of		(g/ra	nsumption nt/day) on period day)
Group	animals		1	4
0 mg/kg	12	Mean S.D.	20.08 6.40	39.16 4.86
100 mg/kg	10	Mean S.D.	21.20 3.68	37.48 3.41
300 mg/kg	12	Mean S.D.	17.42 6.17	39.05 5.90
1000 mg/kg	11	Mean S.D.	24.64 4.43	41.92 4.71

Table 11 Gross findings of male rats dosed orally with SIPE in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)

		Group	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals	examined		12	12	12	12
No abnormal findi	ngs		11	12	12	5
Organ :	Findings					
Kidney:	Swelling, bilateral		0	0	0	6
	Fine yellowish white patch, multifocal, bilateral		0	0	0	1
	Yellowish brown discoloration, bilateral		0	0	0	3
	Dilatation, renal pelvis, unilateral		0	0	0	1
Epididymis:	Yellowish white patch, cauda, unilateral		0	0	0	1
Seminal vesicle:	Small size		1	0	0	0

- 49

Table 12 Gross findings of female rats dosed orally with SIPE in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)

	Group	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals examined		12	12	12	12
Number of pregnant animals		12	10	12	11
No abnormal findings		11	10	11	10
Organ: Findings					
Ileum: Diverticulum		1	0	1	0
Skin of right thoracic region: Subcutaneous grayish white mass	S	0	0	0	1
Number of non-pregnant animals		0	1	0	0
No abnormal findings		-	1	-	-
Number of not copulated animals		0	1	0	1
No abnormal findings		-	1	-	0
Organ: Findings					
Ovary: Grayish white mass		-	0	-	1

^{-:} Blank.

Table 13 Absolute and relative organ weights of male rats dosed orally with SIPE in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)

	Number of		Body weight	To	estis	Epid	idymis	Pr	ostate	Semina	l vesicle
Group	animals		g	g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %	g	%
0 mg/kg	12	Mean	506.3	3.238	0.640	1.345	0.264	810.9	159.173	2.318	0.458
		S.D.	29.8	0.325	0.056	0.097	0.016	222.3	39.752	0.322	0.056
100 mg/kg	11	Mean	514.1	3.206	0.624	1.333	0.258	641.3	125.949	2.313	0.449
		S.D.	25.2	0.347	0.055	0.088	0.017	169.0	37.535	0.293	0.055
300 mg/kg	12	Mean	524.3	3.263	0.625	1.328	0.253	700.7	133.763	2.461	0.471
		S.D.	28.6	0.208	0.051	0.058	0.016	111.0	20.800	0.250	0.053
1000 mg/kg	12	Mean	506.2	3.255	0.645	1.388	0.275	817.5	162.005	2.391	0.474
		S.D.	29.2	0.233	0.037	0.105	0.018	179.1	36.257	0.207	0.050

Table 14 Histopathological findings of male rats dosed orally with SIPE in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)

Item		0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals examined		12	11	12	12
Organ: Findings	Grade				
Kidney: Crystal, tubular lumen	+	0	0	0	5
	++	0	0	0	3 ++
	+++	0	0	0	1 _
Crystal, renal pelvis	+	0	0	1	4
	++	0	0	0	1_
Dilatation, tubule, cortex and medulla	+	0	0	1	87++
	++	0	0	0	4 📗
Regeneration, renal tubular epithelium, cortex and medulla	+	2	3	4	37
	++	0	0	0	9 ++
Regeneration, collecting tubular epithelium, papilla	+	0	0	0	6 \$
Cellular infiltration, lymphocyte, cortex	+	0	0	1	87++
	++	0	0	0	4
Cellular infiltration, lymphocyte, medulla	+	0	0	0	5 - \$
Cellular infiltration, lymphocyte, papilla	+	0	0	0	1
Fibrosis, interstitial	+	0	0	0	4
Hyperplasia, renal pelvic mucosa	+	0	0	0	3
Eosinophilic body, proximal tubular epithelium	+	2	4	7	0
Mineralization, cortex	+	0	0	1	0
Cyst	+	1	1	0	0
Testis: Abnormal findings		0	-	-	0
Epididymis: Granuloma, spermatic	+	0	-	-	1
Seminal vesicle: Abnormal findings		0 (1)	-	-	-

Values in parentheses are number of animals examined.

-: Blank.

Grade; +: slight change, ++: moderate change, +++: severe change.

++ : Significantly different from the 0 mg/kg group at p \leqq 0.01 (Mann-Whitney's U-test).

\$: Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \le 0.05$ (Fisher's Exact Test).

Table 15 Histopathological findings of female rats dosed orally with SIPE in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)

Item		0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals examined		12	12	12	12
Organ: Findings	Grade				
Ileum: Diverticulum	+	1 (1)	-	1 (1)	-
Kidney: Mineralization, cortico-medullary junction	+	0	1	2	0
Regeneration, renal tubular epithelium, cortex	+	0	1	1	0
Cellular infiltration, inflammatory cell, renal pelvic mucosa	+	0	1	0	0
Ovary: Granulosa cell tumor	<+>	0	-	_	1
Mammary gland: Adenocarcinoma	<+>	-	-	-	1 (1)

Values are number of animals with findings. Values in parentheses are number of animals examined.

-: Blank.

Grade; +: slight change, <+>: presence in "presence or not" basis.

Table 16 Stages of spermatogenesis of male rats dosed orally with SIPE in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)

					St	tage I-VI					
				Number of cells							
Number of			Sertoli cells	Sperma	Spermatogonia		Pachytene spermatocytes		und natids		
Group	animals		/ST	/ST	/SC	/ST	/SC	/ST	/SC		
0 mg/kg	12	Mean	21.95	19.57	0.903	48.88	2.238	134.03	6.153		
		S.D.	2.14	2.68	0.162	4.80	0.220	10.13	0.685		
1000 mg/k	į 12	Mean	21.43	21.85	1.021	48.48	2.266	130.48	6.104		
		S.D.	1.36	3.53	0.170	3.72	0.179	6.53	0.403		

						Stag	e VII-VIII				
						Num	ber of cells				
Number of		Sertoli cells	Spermatogonia		Preleptotene spermatocytes		Pachytene spermatocytes		Round spermatids		
Group	animals		/ST	/ST	/SC	/ST	/SC	/ST	/SC	/ST	/SC
0 mg/kg	12	Mean	21.20	1.47	0.070	36.30	1.723	54.25	2.569	125.43	5.973
		S.D.	2.09	0.50	0.025	2.08	0.150	4.39	0.189	5.56	0.700
1000 mg/l	kį 12	Mean	20.43	2.03	0.100*	39.90+	1.963**	55.87	2.741*	122.08	5.998
		S.D.	1.52	0.81	0.042	4.14	0.253	3.81	0.196	4.60	0.409

ST: Seminiferous tubule. (to be continued)

SC: Sertoli cell per seminiferous tubule.

^{* :} Significantly different from the 0 mg/kg group at p $\leqq 0.05$ (Dunnett's test).

^{** :} Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \le 0.01$ (Dunnett's test).

^{+:} Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \le 0.05$ (Mann-Whitney's U-test).

Table 16 Stages of spermatogenesis of male rats dosed orally with SIPE in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214) (continued)

						age IX-XI aber of cells			
	Number of		Sertoli cells	Spermatogonia		Lept	otene itocytes	Pachytene spermatocytes	
Group	animals		/ST	/ST	/SC	/ST	/SC	/ST	/SC
0 mg/kg	12	Mean	21.85	2.80	0.128	44.08	2.023	59.57	2.734
		S.D.	1.17	0.54	0.026	4.80	0.235	3.34	0.209
1000 mg/k	į 12	Mean	22.17	2.98	0.136	43.40	1.963	56.20*	2.545
		S.D.	1.16	0.82	0.041	2.38	0.159	3.39	0.248

			Stage XII-XIV Number of cells								
	Number of		Sertoli cells		togonia	Spermat	ocytes 1	Spermat	cocytes 2		
Group	animals		/ST	/ST	/SC	/ST	/SC	/ST	/SC		
0 mg/kg	12	Mean S.D.	23.22 2.76	3.42 0.94	0.150 0.042	49.25 5.19	2.139 0.266	64.70 5.41	2.808 0.271		
1000 mg/k	į 12	Mean S.D.	22.42 2.57	3.92 1.24	0.176 0.061	47.87 5.50	2.148 0.258	62.72 6.90	2.813 0.310		

ST: Seminiferous tubule.

 $Spermatocytes\ 1: Zygotene\ /\ Pachytene\ spermatocytes.$

SC: Sertoli cell per seminiferous tubule.

Spermatocytes 2 : Pachytene / Diplotene spermatocytes.

^{* :} Significantly different from the 0 mg/kg group at p \leq 0.05 (Dunnett's test).

Table 17 Reproduction performance in parental rats dosed orally with SIPE in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)

	Estr	ous cycle	e	Copulati	on index	Fertility	Gestation			Nursing	
	Abnormality			Male	Female	index	index	_	Gestation	index	
	Incidence	_	Length	Incidence	Incidence	Incidence	Incidence	_	length	Incidence	
Group	(%)	(%)		(%)	(%)	(%)	(%)		(days)	(%)	
0 mg/kg	0/12	Mean	4.06	12/12	12/12	12/12	12/12	Mean	22.2	12/12	
	(0.0)	S.D.	0.20	(100.0)	(100.0)	(100.0)	(100.0)	S.D.	0.4	(100.0)	
100 mg/kg	3/12	Mean	4.19	11/12	11/12	10/11	10/10	Mean	22.0	10/10	
	(25.0)	S.D.	0.38	(91.7)	(91.7)	(90.9)	(100.0)	S.D.	0.0	(100.0)	
300 mg/kg	0/12	Mean	4.00	12/12	12/12	12/12	12/12	Mean	22.3	12/12	
	(0.0)	S.D.	0.00	(100.0)	(100.0)	(100.0)	(100.0)	S.D.	0.7	(100.0)	
1000 mg/kg	1/12	Mean	4.12	11/12	11/12	11/11	11/11	Mean	22.4	11/11	
	(8.3)	S.D.	0.23	(91.7)	(91.7)	(100.0)	(100.0)	S.D.	0.5	(100.0)	

Abnormal estrous cycle = (number of female with abnormal estrous cycle / number of females examined) x 100.

Copulation index = (number of males/females copulated / number of males/females placed in a cage) x 100.

Fertility index = (number of pregnant females / number of pairs with successful copulation) x = 100.

Gestation index = (number of females with live pups / number of pregnant females) $\times 100$.

Nursing index = (number of females nursing live lactation day 4 / number of females with live pups delivery) x 100.

Table 18 Pregnancy and litter data of rats in SIPE in the reproduction/developmental toxicity screening test (SR08214)

	N 1 0		N T 1 (NT 1		f lactation	n period		D 4	C1	
	Number of Pregnant		corpora	Number of implantation	Implantation	Delivery	Number of pups	Number of	Sex	ratio	Live birth	Number of	of lactation Sex ratio	•
Group	animals		lutea	sites	index (%)	index (%)	delivered	live pups	All pups	Live pups	index (%)	live pups	Live pups	index (%)
											Pup data			
0 mg/kg	12	Mean	17.3	17.3	99.444	91.646	15.8	15.8	0.525	0.525	100.000	15.2	0.526	96.433
		S.D.	1.4	1.5	1.925	7.338	1.3	1.3	0.122	0.122	0.000	1.3	0.123	5.375
100 mg/kg	10	Mean	16.8	16.7	99.474	93.500	15.6	15.6	0.471	0.471	100.000	15.5	0.475	99.333
		S.D.	1.8	1.6	1.663	5.110	1.6	1.6	0.082	0.082	0.000	1.6	0.086	2.109
300 mg/kg	12	Mean	16.3	15.8	96.138	96.929	15.3	15.2	0.463	0.457	98.915	15.1	0.460	99.479
		S.D.	2.3	3.1	9.617	4.197	3.3	3.3	0.121	0.119	2.548	3.3	0.123	1.804
1000	11	Mean	17.4	17.0	98.134	94.067	16.0	16.0	0.513	0.513	100.000	16.0	0.513	100.000
mg/kg		S.D.	1.4	1.0	4.154	5.370	1.4	1.4	0.194	0.194	0.000	1.4	0.194	0.000

Implantation index = (Number of implantations / number of corpora lutea) x 100.

Delivery index = (Number of pups delivered / number of implantations) x 100.

 $Sex\ ratio = Number\ of\ male\ pups\ /\ number\ of\ male\ and\ female\ pups.$

Live birth index = (Number of live pups at delivery / number of pups delivered) x 100.

Viability index = (Number of live pups on day 4 after birth / number of live pups at parturition) x = 100.

Table 19 General appearance changes of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of SIPE (SR08214)

		Male Day after birth						Female Day after birth					
Group	Findings	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4		
0 mg/kg	Number of pups examined	99	99	99	98	98	90	90	89	89	88		
	No abnormal findings	99	99	98	97	96	90	89	89	88	86		
	Milk-band negative	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
	Death	0	0	1	0	2	0	1	0	1	2		
	Milk-band negative	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1		
	Milk-band unknown	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
	Lost	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
100 mg/kg	Number of pups examined	73	73	73	73	73	83	83	82	82	82		
	No abnormal findings	72	73	73	73	73	83	81	82	82	81		
	Milk-band negative	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1		
	Death	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0		
	Milk-band negative	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Lost	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0		
300 mg/kg	Number of pups examined	85	83	83	83	83	99	99	99	99	99		
	No abnormal findings	83	83	83	83	83	99	99	99	99	98		
	Milk-band negative	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Death	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
	Milk-band negative	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Milk-band unknown	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Lost	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
1000 mg/kg	Number of pups examined	90	90	90	90	90	86	86	86	86	86		
	No abnormal findings	90	90	90	90	90	86	86	86	86	85		
	Milk-band negative	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		

- 58

Table 20 Body weight of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of SIPE (SR08214)

	Number of			Male ody weigh day after l		Female Body weight (g) on days after birth				
Group	litters		0	1	4	0	1	4		
0 mg/kg	12	Mean	6.44	6.98	10.30	6.02	6.56	9.69		
		S.D.	0.40	0.51	0.69	0.35	0.47	0.80		
100 mg/kg	10	Mean	6.31	7.01	10.12	5.97	6.50	9.51		
		S.D.	0.43	0.41	0.84	0.27	0.25	0.71		
300 mg/kg	12	Mean	6.75	7.31	10.69	6.38	6.99	10.23		
		S.D.	0.62	0.88	1.63	0.75	1.05	1.80		
1000 mg/kg	11	Mean	6.80	7.35	10.52	6.48+	7.02	10.06		
		S.D.	0.62	0.77	1.00	0.59	0.73	1.09		

Values in parentheses are number of pups examined.

^{+ :} Significantly different from the 0 mg/kg group at p \leq 0.05 (Mann-Whitney's U-test).

- 59

Table 21 Gross findings of pups in the reproduction/developmental toxicity screening test of SIPE (SR08214)

			M	ale		Female					
Item	Group	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	100 mg/kg	g 300 mg/kg	1000 mg/kg		
Findings of dead pups during days 0-4 after birth											
Number of pups examined		3	0	2	0	4	1	1	0		
No abnormal findings		2	-	1	-	1	0	0	-		
Lung: Dark red discoloration		0	-	0	-	1	0	0	-		
Intraperitoneum: Autolysis		0	-	1	-	1	0	0	-		
Lost		1	-	0	-	1	1	1	-		
Findings of pups euthanized on day 4 after birth											
Number of pups examined		96	73	83	90	86	82	98	86		
No abnormal findings		96	73	83	90	85	82	98	86		
Liver: Yellowish white patch, lateral	lobe	0	0	0	0	1	0	0	0		

Values are number of pups with findings.

^{-:} Blank.