

6-tert-ブチル-2,4-キシレノールのラットを用いた反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

試験番号：2283（115-026）

財 団 法 人  
食 品 農 医 薬 品 安 全 性 評 価 セ ン タ ー

## 目 次

1. 要 約	1 頁
2. 諸 言	3
3. 試 験 題 目	4
4. 試 験 目 的	4
5. 試 験 番 号	4
10. 被 験 物 質	6
11. 試 験 材 料 お よ び 方 法	8
12. 試 験 結 果	17
13. 考 察 お よ び 結 論	22
14. 参 考 文 献	24

### Figures, Tables and Reference data

Figure 1	Body weight change of male rats
Figure 2	Body weight change of female rats
Figure 3	Food consumption of male rats
Figure 4	Food consumption of female rats
Table 1-1	Mortality of rats
Table 1-2	Clinical observations on male rats
Table 1-3	Clinical observations on female rats (Before and during mating period)
Table 1-4	Clinical observations on female rats (Gestation period)
Table 1-5	Clinical observations on female rats (Lactation period)
Table 2-1	Body weight change of male rats
Table 2-2	Body weight change of female rats
Table 3-1	Food consumption of male rats
Table 3-2	Food consumption of female rats
Table 4	Hematology of male rats
Table 5	Blood chemistry of male rats
Table 6-1	Absolute and relative organ weight of male rats
Table 6-2	Absolute and relative organ weight of female rats
Table 7-1	Summary of gross findings (successful pregnancy, male)
Table 7-2	Summary of gross findings (day 4 of lactation, female)
Table 7-3	Summary of gross findings (all pups died)
Table 7-4	Summary of gross findings (dead, female)

Table 8-1 Summary of histological findings (successful pregnancy, male)  
Table 8-2 Summary of histological findings (day 4 of lactation, female)  
Table 8-3 Summary of histological findings (non-pregnancy, male)  
Table 8-4 Summary of histological findings (non-pregnancy, female)  
Table 8-5 Summary of histological findings (all pups died)  
Table 8-6 Summary of histological findings (dead, female)  
Table 9 Copulation and fertility results in rats  
Table 10 Findings of delivery in dams(F0)  
Table 11 Body weight change of pups(F1) from rats  
Table 12-1 Summary of gross findings of pups(F1) from rats (sacrificed, male)  
Table 12-2 Summary of gross findings of pups(F1) from rats (sacrificed, female)

## 1. 要 約:

既存化学物質の毒性学的性質を評価するため、6-tert-ブチル-2,4-キシレノールの0（溶媒対照群）、6、30および150 mg/kg/dayをラットの交配前14日から交配期間、妊娠期間および哺育3日まで連続経口投与し、反復投与毒性に加えて生殖・発生に及ぼす影響を検討した。

### 1) 反復投与毒性

一般状態には被験物質投与の影響は認められなかったが、雌の150 mg/kg群で妊娠末期に2例の死亡（1例は分娩中に死亡）が観察された。雌の150 mg/kg群で妊娠期間中に体重増加抑制が認められたが、雄の体重および雌雄の摂餌量に被験物質投与の影響は認められなかった。

雄の血液学的検査では、150 mg/kg群でヘマトクリット値、ヘモグロビン量および赤血球数が低値、網赤血球比率が高値を示し、軽度ながら貧血傾向が認められた。血液化学的検査では、30および150 mg/kg群でGOTの低値およびγ-GTPの高値が認められた。

器官重量は雄の30 mg/kg以上の投与群および雌の150 mg/kg群で肝臓および腎臓重量が増加または増加傾向を示し、剖検所見では雄の30および150 mg/kg群で肝臓の肥大が、雌の150 mg/kg群で肝臓および腎臓の肥大が認められた。病理組織学所見では、被験物質投与の影響と考えられる所見として、雄の150 mg/kg群で肝臓の小葉中心性肝細胞腫脹が、雌の150 mg/kg群で哺育4日剖検動物に肝臓の小葉中心性肝細胞腫脹、肝細胞変性、小葉中心性細胞壊死および単細胞壊死が、死亡例および全児死亡の認められた動物に舌および食道の錯角化症、肝臓の小葉中心部の肝細胞腫脹や壊死をはじめ種々の変性や単細胞壊死と細胞分裂の増加が認められた。また、雌の同群では、腎臓の近位尿細管の変性や蛋白円柱および腎乳頭部のPAS陽性顆粒の沈着などが観察された。

### 2) 生殖発生毒性

交尾能、受胎能および性周期観察では、被験物質投与の影響は認められなかった。分娩時観察では、150 mg/kg群で1例が分娩中に死亡した。また、同群で哺育期間中に全児死亡の認められた動物が3例観察され、新生児の生後4日生存率が低値傾向を示し、分娩あるいは哺育機能の障害を惹起する可能性が示唆された。なお、妊娠期間および分娩時間に被験物質投与の影響は認められなかった。新生児の外表検査では、外表異常は観察されず、新生児の体重も哺育4日まで順調に増加した。死産児、死亡児および哺育4日の剖検でも被験物質投与によると考えられる異常所見は認められなかった。

以上の結果から、6-tert-ブチル-2,4-キシレノールの反復投与毒性は、雄では 30 mg/kg/day 以上、雌では 150 mg/kg/dayの投与で認められ、無影響量は雄で 6 mg/kg/day、雌で 30 mg/kg/day と推察される。また、雄の生殖に及ぼす影響は 150 mg/kg/day投与によっても認められず、無影響量は 150 mg/kg/dayと推察される。雌の生殖能および児動物の発生・発育に及ぼす影響は 150 mg/kg/day投与で認められ、無影響量は 30 mg/kg/day と推察される。

## 2. 諸 言

6-tert-ブチル-2,4-キシレノール (6-tert-butyl-2,4-xyleneol) は化学産業の分野において合成樹脂や接着剤の原料として使用されている化合物である。本化合物の毒性については、経口投与によるマウスのLD<sub>50</sub>が 530 mg/kg<sup>21)</sup>と報告されているが、ヒトや実験動物の生体に及ぼす毒性についてはほとんど知られていない。一方、本化合物の類似物質である2,4-キシレノール (2,4-ジメチルフェノール) については、経口投与によるラットのLD<sub>50</sub>が 3,200 mg/kg、マウスのLD<sub>50</sub>が 809 mg/kgなどが報告されている<sup>22)</sup>。今回、OECDによる既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として、6-tert-ブチル-2,4-キシレノールの反復投与毒性および生殖・発生毒性について検討したのでその結果を報告する。

3. 試験題目： 6-tert-ブチル-2,4-キシレノールのラットを用いた反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験
4. 試験目的： 既存化学物質の毒性学的性質を評価する一貫として行う OECD ガイドライン「反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験、Etended Steering Group Document No. 3」（1990年3月22日）に従って、ラットを用いて一般毒性学的影響に加えて生殖・発生に及ぼす影響を検討した。なお、試験の実施は環企研第 233号、衛生第38号、63基局第 823号（昭和63年11月18日）の「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設について」の基準を満たすものとした。
5. 試験番号： 2283（115-026）

10. 被 験 物 質 :

- |                           |  |
|---------------------------|--|
| 1) 被験物質名                  | 6-tert-ブチル-2,4-キシレノール  |
| 2) CAS No.                | 1879-09-0  |
| 3) コード番号                  | B0903  |
| 4) ロット番号                  |  |
| 5) 純 度                    | 98.5%  |
| 6) 提 供 先                  |  |
| 7) 保管条件                   | 室温、遮光  |
| 8) 保管場所                   | 安評センター被験物質保管庫  |
| 9) 化 学 名                  | 6-tert-ブチル-2,4-キシレノール  |
| 10) 分 子 式                 | $(\text{CH}_3)_3\text{CC}_6\text{H}_2(\text{CH}_3)_2\text{OH}$ |
| 11) 分 子 量                 | 178.27   |
| 12) 物質の状態                 | 液体   |
| 13) 色                     | ごく薄い黄色透明   |
| 14) 凝 固 点                 | 21.5℃  |
| 15) 溶 解 性                 | 非水溶性   |
| 16) 比 重 ( $d_{20}^{20}$ ) | 0.9612   |
| 17) 屈 折 率 ( $n_D^{20}$ )  | 1.5186   |

- 18) 取り扱い上の注意      取り扱い中は必要に応じて適切な保護メガネ、保護手袋、保護マスクを着用し、取り扱い後は手洗いおよびうがいを充分行う。
- 19) 被験物質保管および  
残余被験物質の処理      投与終了後、約 2 g を安評センターに保管し、残りは廃棄した。

なお、実測した結果を Reference data 2 に示した。

## 1 1. 試験材料および方法 :

### 1) 供試動物

供試したSD系ラット (Crj:CD(SD), SPF) は、日本チャールス・リバー株式会社 (神奈川県厚木市) から生後8週齢の雌雄各70匹を平成5年9月20日に購入し、7日間検疫・馴化飼育した。馴化期間中、一般状態に異常が認められなかった動物を8日間の予備飼育後、10週齢で群分けして雌雄各48匹を試験に用いた。

群分け終了時の体重は、雄で339~400 g、雌で226~265 gであった。

### 2) 種属選択理由

OECDガイドラインにおいてラットの使用が指示されている。系統は、性周期、繁殖性および遺伝的安定性を考慮して選んだ。

### 3) 飼 育

動物は、温度22~26℃、湿度45~65%、換気回数15回/時間、照度150~300 lux、照明時間12時間 (午前7時点灯、午後7時消灯) に設定されたバリアシステムの飼育室 (W 5.7 × D 10.0 × H 2.5 m、142.5 m<sup>3</sup>) で飼育した。

株式会社 東京技研サービス (東京都府中市) の自動水洗式飼育機 (W 691.0 × D 79.0 × H 195.0 cm) を使用し、アルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ (W 15.8 × D 23.8 × H 16.0 cm、飼育ケージ・スペース 6,017 cm<sup>3</sup>) に動物を1匹ずつ収容し飼育した。但し、交配期間中は、雄をアルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ (W 36.8 × D 25.0 × H 16.0 cm、飼育ケージ・スペース 14,720 cm<sup>3</sup>) に収容し飼育した。妊娠18日以降の母動物は哺育4日までアルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ (W 36.8 × D 25.0 × H 16.0 cm) に哺育トレーおよび巣作り材料 (アルファードライ) を入れて飼育した。飼育ケージは隔週1回、給餌器は週1回交換した。

飼料は、オリエンタル酵母工業株式会社 (東京都中央区) 製造のNMF固型飼料 (放射線滅菌飼料) を使用し、飼育期間中自由に摂取させた。本試験に使用した飼料中の汚染物質の分析は、オリエンタル酵母工業株式会社が財団法人 日本食品分析センター (東京都渋谷区) に依頼し実施した。その分析成績書は、Reference data 3 に示した。

飲水は、水道水を自由に摂取させた。水道水の分析は1年に4回、財団法人 静岡県生活科学検査センター (静岡県浜松市) で実施しその水質検査成績書は、Reference data 4 に示した。供給した飼料、水および巣作り材料には試験に支障を来す可能性の考えられる夾雑物の混在はなかった。

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

#### 4) 群分け

動物はあらかじめ体重によって層別化し、無作為抽出法により各試験群を構成するように平成5年10月5日に群分けした。

動物の識別は個体別に耳パンチをするとともに個体別飼育ケージに動物標識番号 (Animal ID-No.) を付すことにより行った。但し、群分け前までは仮番号により管理した。

余剰動物は炭酸ガスにより安楽死させた。

#### 5) 試験群の構成

1 対照群および3 被験物質投与群の計4群とした。

性	試験群	用量 (mg/kg)	動物数	動物番号
雄	1	0 (対照群)*	12	1001 ~ 1012
	2	6	12	1101 ~ 1112
	3	30	12	1201 ~ 1212
	4	150	12	1301 ~ 1312
雌	1	0 (対照群)*	12	2001 ~ 2012
	2	6	12	2101 ~ 2112
	3	30	12	2201 ~ 2212
	4	150	12	2301 ~ 2312

\* コーンオイルのみを投与した。

#### 6) 用量設定理由

本試験の用量は先に実施した「ラットを用いた反復投与毒性/生殖発生毒性併合予備試験 (試験番号2265)」の結果を参考にして決定した。すなわち、0、75、150、300 および 600 mg/kg を雄および雌に14日間連続投与した結果、600 mg/kg 群の雌雄で全例が死亡した。また、300 mg/kg 以上の投与群の雄および 600 mg/kg 群の雌で体重増加抑制がみられ、150 mg/kg 以上の投与群の雄および 300 mg/kg 以上の投与群の雌で摂餌量の低値がみられた。

剖検時の器官重量は、75 mg/kg 以上の投与群の雄および 150 mg/kg 以上の投与群の雌で肝臓の実重量および相対重量がともに高値を示した。

剖検では、150 および 300 mg/kg 群の雄ならびに 300 mg/kg 群の雌で肝臓の肥大がみられた。

以上の結果から、本試験の投与期間が長期間になることを考慮し、最高用量として 150 mg/kg を設定し、以下公比5にて除し 30 および 6 mg/kg 群を設定した。

7) 被験物質の調製および均一性／濃度分析

必要量の被験物質をコーンオイル（ナカライテスク株式会社、京都府京都市）に溶解し、1.2、6 および 30 mg/ml の指定濃度に調製した。調製後は、使用時まで冷蔵庫に保存した。調製液中の被験物質は Reference data 5 に示した如く、調製は1週間に1回以上の頻度で実施し、調製後7日以内に使用した。1.2 mg/ml の場合、冷暗条件下で少なくとも8日間安定であることが確認された。

投与液の均一性／濃度分析は、調製開始時に調製した各群のバッチから無作為にサンプルを抽出し実施した。その結果、Reference data 5に示した如く、各濃度の平均値は設定濃度の99.3～104 %、変動係数は0.8%以下であり、適切に調製されており問題はなかった。

8) 投与方法および投与期間

投与経路は、OECDガイドライン「反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験」で指示されている投与経路に準じて強制経口投与を選択した。

投与容量は、体重100g当り0.5mlとし、個体別に測定した最新体重に基づいて算出した。胃ゾンデを用いて毎日1回（7日／週）強制経口投与した。対照群にはコーンオイルのみを同様に投与した。

雄の投与期間は、交配前14日間と交配期間の14日間を含めて交配期間終了後17日間の連続45日間とした。雌の投与期間は、交配前14日間と交配期間中（交尾成立まで最長14日間）および交尾成立後の妊娠期間を通じて分娩後の哺育3日まで（41～48日間）とした。なお、妊娠不成立の雌は妊娠25日の解剖前日までの44日間とした。

9) 観察、測定および検査

a. 雄動物

(1) 一般状態の観察

全例について、試験期間中1日1回以上の頻度で観察した。

(2) 体重測定

全例について、投与0（投与開始日）、7、14、21、28、35、42および45日（剖検日）に測定した。また、投与期間中の体重増加量を算出した。

(3) 摂餌量の測定

全例について、投与0（投与開始日）、7、14、21、28、35、42および44日（剖検前日）に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出した。また、投与期間中の累積摂餌量を算出した。なお、交配期間における同居中の摂餌量は測定しなかった。

#### (4) 血液学的検査

全例について、投与期間（45日間）終了日の夕方から翌朝まで約16時間絶食させた後、エーテル麻酔下で開腹し、腹部大動脈から採血した。検査には初血を用いた。抗凝固剤（EDTA-3K）を加えたサンプルカップに血液を採取し、総合血液学検査装置 THMS H 6000（テクニコン社、米国）を用いて下記の項目を測定した。

ヘマトクリット値	(HCT)	全赤血球の容積より補正
ヘモグロビン量	(HGB)	シアンメトヘモグロビン法
赤血球数	(RBC)	暗視野板法
平均赤血球容積	(MCV)	RBC, HCTより算出
平均赤血球血色素量	(MCH)	HGB, RBCより算出
平均赤血球血色素濃度	(MCHC)	HGB, HCTより算出
血小板数	(PLT)	暗視野板法
白血球数	(WBC)	暗視野板法
白血球百分率		フローサイトケミストリー法

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

網赤血球（RC）比率の算定については網赤血球染色用ガラス毛细管キャピロット（テルモ株式会社、東京都渋谷区）で染色後、血液塗抹標本を作製し鏡検した。

#### (5) 血液化学的検査

血液学的検査用の血液と同時期に、腹部大動脈から採血した血液をクリーンシール（株式会社ヤトロン、東京都千代田区）に採取した。検査には、30分間放置後 3,000 r. p. m. 7分間遠心分離して得た血清を用いた。多項目生化学自動分析装置 Centrifichem ENCORE II（ベーカー社、米国）および EKTACHEM 700N（コダック社、米国）を用いて下記の項目を測定した。

総蛋白	(T. protein)	ビュレット法
アルブミン	(Albumin)	B. C. G. 法
A/G	(A/G)	計算値
血糖	(Glucose)	グルコースオキシダーゼ法
尿素窒素	(BUN)	ウレアーゼ改良法
クレアチニン*	(Creatinine)	Jaffé 法
総ビリルビン	(T. Bilirubin)	ジアゾ色素法
グルタミン酸オキザロ酢酸 トランスアミナーゼ*	(GOT)	Karmen改良法

グルタミン酸ピルビン酸 トランスアミナーゼ*	(GPT)	Karmen改良法
γ-グルタミルトランス ペプチダーゼ*	(Gamma-GTP)	Szasz 改法
カリウム	(Potassium)	電極法
塩素	(Chloride)	電極法
カルシウム	(Calcium)	アルセナゾⅢ色素法
無機リン	(i. phosphate)	モリブデン酸アンモニウム法

\* 印の項目は ENCORE II で、他は EKTACHEM で測定した。

(6) 剖検および器官重量

剖検時に採血した動物について、放血致死後に器官・組織の肉眼的観察を行い、胸腺、肝臓、腎臓、精巣および精巣上体重量を測定し器官重量・体重比（相対重量）を算出した。また、全動物の胸腺、肝臓、腎臓、脳、心臓、脾臓、副腎、精嚢、前立腺、下垂体および異常病変部組織（肺、腹腔内の塊）を10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、精巣および精巣上体はブアン氏液で固定した。

(7) 病理組織学検査

固定した下記に該当する器官・組織について、株式会社 組織科学研究所（東京都青梅市）でパラフィン切片を作製し、常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色した。また、腎臓については PAS染色も行った。鏡検は安評センターで実施した。

妊娠を成立させた雄：

対照群と 150 mg/kg群の全例の脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および全ての群の異常病変部組織。6 および 30 mg/kg 群の全例の胸腺、肝臓、腎臓および副腎。

妊娠を成立させなかった雄：

脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺および下垂体。

b. 雌動物

(1) 一般状態の観察

全例について、試験期間中1日1回以上の頻度で観察した。

(2) 体重測定

全例について、投与 0（投与開始日）、7、14および21日に測定し、交尾成立後は妊娠 0、7、14および21日に、分娩後は哺育 0 および 4 日に測定した。また、投与期間中の体重増加量を算出した。

### (3) 摂餌量の測定

全例について、投与 0 (投与開始日)、7 および14日に、交尾成立後は妊娠 0、7、14および21日に、分娩後は哺育 0 および4日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出した。また、投与期間中の累積摂餌量を算出した。

### (4) 剖検および器官重量

以下の該当する動物について剖検し、器官・組織の異常の有無を観察した。

#### 死亡例：

発見後直ちに剖検した。皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨（骨髄を含む）、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、腔、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

#### 自然分娩した雌：

哺育4日にエーテル麻酔後放血安楽死させ、主要器官の肉眼的観察を行った後、胸腺、肝臓、腎臓および卵巣重量を測定し器官重量・体重比（相対重量）を算出した。また、全動物の胸腺、肝臓、腎臓、卵巣、脳、心臓、脾臓、副腎、下垂体および異常病変部組織を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

#### 自然分娩の認められなかった雌：

妊娠25日に、エーテル麻酔後放血安楽死させ、主要器官の肉眼的観察を行った後、皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨（骨髄を含む）、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、腔、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。着床痕が認められない動物は妊娠不成立と判定した。

#### 全児死亡の認められた雌：

生存児すべての死亡あるいは喰殺が確認された日または翌日にエーテル麻酔後放血安楽死させ、主要器官の肉眼的観察を行った後、皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨（骨髄を含む）、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、腔、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。剖検時に妊娠黄体数および着床痕数を調べた。

(5) 病理組織学検査

固定した下記に該当する器官・組織について、株式会社 組織科学研究所（東京都青梅市）でパラフィン切片を作製し、常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色した。また、腎臓については PAS染色も行った。鏡検は安評センターで実施した。

死亡例：

皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨（骨髄を含む）、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、腔、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄。

自然分娩した雌：

対照群と 150 mg/kg群の全例の脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、卵巣および全ての群の異常病変部組織。6 および 30 mg/kg 群の全例の胸腺、肝臓、腎臓および副腎。

妊娠不成立の雌：

脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、腔、子宮、卵巣および下垂体。

全児死亡の認められた雌：

皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨（骨髄を含む）、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、腔、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄。

c. 親動物の生殖発生に関する観察、検査

(1) 交配

交配前14日間の性周期観察を行った雌を同群内の雄のケージに入れ1対1で最長2週間毎晩同居させた。翌朝、腔垢中の精子確認をもって交尾成立とし、その日を妊娠0日とした。性周期観察は交尾成立日まで行い、発情期から次の発情期までの間の日数を性周期日数として平均性周期を算出した。

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

(2) 自然分娩時および哺育期間中の観察

分娩の確認を妊娠20から25日の午前9時～10時の間に行い、この時間帯に分娩が完了していることを確認した場合、その日を哺育0日とした。午前10時を過ぎて分娩した場合は翌日を哺育0日とした。また、妊娠期間（哺育0日の年月日から妊娠0日の年月日を減じた日数）、受胎率〔（受胎動物数／交尾成立動物数）×100〕、出産率〔（生児出産雌数／妊娠雌数）×100〕、着床率〔（着床痕数／妊娠黄体数）×100〕、分娩率〔（出産児数／着床痕数）×100〕、出生率〔（出產生児数／出産児数）×100〕を算出した。

妊娠25日の午前9時までには分娩のみられない動物は剖検し、着床痕の認められない場合は不妊と判定した。

自然分娩時に分娩状態を観察し、哺育4日まで哺育状態を観察した。哺育4日の剖検時に妊娠黄体数および着床痕数を調べた。

d. 新生児

出産後、出産児数（生存児＋死亡児）を調べ、性別を判定し性比（雄／雌）を求めるとともに外形異常の有無を調べた。また、哺育0および4日には雌雄別の同腹児重量を測定し、雌雄別1匹当りの平均重量を算出した。

哺育4日に新生児全例を屠殺し、主要器官の肉眼観察を行った。哺育期間中の死亡児も同様に主要器官の肉眼観察を行った。また、新生児の4日生存率〔（哺育4日生児数／出產生児数）×100〕を算出した。

10) データの記録および統計解析

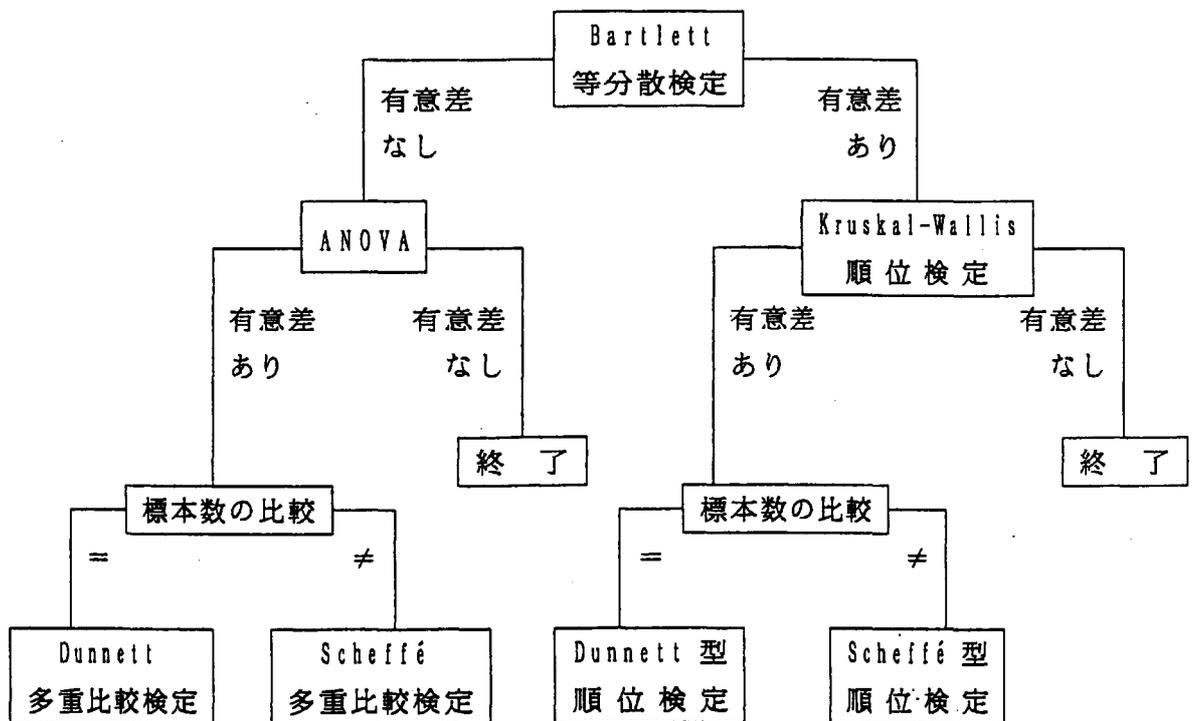
本試験の諸データは、コンピュータ・システムを用いて記録し、試験成績については以下の方法により統計解析を行った。

なお、哺育期間中の新生児に関する成績は1母体当りの平均を1標本とした。有意水準は\* :  $P < 0.05$  および\*\* :  $P < 0.01$  の2段階とした。

体重、摂餌量、妊娠黄体数、着床痕数、出産児数、死産児数、性比、平均性周期、妊娠期間、着床率、分娩率、出生率、外形異常発現率、新生児の4日生存率、器官重量、器官重量・体重比（相対重量）、血液学および血液化学的検査値については多重比較検定<sup>4)</sup>を用いた。

最初に Bartlett の等分散検定を実施した。等分散の場合は一元配置分散分析を行った。分散が有意で各群の標本数が同数の場合は Dunnett の多重比較検定、各群の標本数が異なる場合は Scheffé の多重比較検定で対照群と各投与群間の有意差を検定した。

Bartlett の等分散検定で不等分散の場合は Kruskal-Wallis の順位検定を実施した。有意で各群の標本数が同数の場合は Dunnett の順位検定、各群の標本数が異なる場合は Scheffé の順位検定で対照群と各投与群間の有意差を検定した。



出産率、交尾率および受胎率については  $X^2$  検定<sup>5, 6)</sup>を用いた。

剖検所見で認められた肝臓の肥大および病理組織学検査で認められた肝臓の小葉中心性細胞腫脹については Fisher の直接確率検定法<sup>6)</sup>を用いた。

## 1 2. 試 験 結 果 :

### 1) 反復投与毒性

#### a. 雄動物に及ぼす影響

#### (1) 死亡および一般状態 (Table 1-1 ~ 1-2、Appendix 1-1-1 ~ 1-1-4)

死亡例は投与期間を通じいずれの投与群にも観察されなかった。

一般状態の観察では、脱毛（前肢）が 6 mg/kg群で1例、眼分泌物が 30 mg/kg 群で2例、泌尿生殖器出血が 150 mg/kg群で1例、歯異常（上顎切歯折れ）が対照群、30および 150 mg/kg 群でそれぞれ1、2および1例に観察された。

#### (2) 体 重 (Figure 1、Table 2-1、Appendix 2-1-1 ~ 2-1-4)

投与期間を通じ対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

#### (3) 摂 餌 量 (Figure 3、Table 3-1、Appendix 3-1-1 ~ 3-1-4)

対照群に比べ 150 mg/kg群で投与28から35日の平均1日摂餌量が高値を示したが、累積摂餌量には群間差は認められなかった。6および 30 mg/kg 群では対照群との間に差は認められなかった。

#### (4) 血液学的検査 (Table 4、Appendix 4)

対照群に比べ 150 mg/kg群でヘマトクリット値、ヘモグロビン量および赤血球数が低値、網赤血球比率が高値を、6 mg/kg 群で網赤血球比率が高値を示した。また、150 mg/kg 群でリンパ球比率が低値、好中球比率が高値を示したが、軽微な変化であった。その他、6 mg/kg 群で赤血球数が、30 mg/kg群で白血球数がいずれも高値を示したが用量に関連した変化ではなかった。

#### (5) 血液化学的検査 (Table 5、Appendix 5)

すべての被験物質投与群で対照群に比べ塩素が高値、カルシウムが低値を示した。また、30および 150 mg/kg群で対照群に比べ総蛋白、アルブミンおよび $\gamma$ -GTP活性が高値、GOTが低値を示し、さらに 150 mg/kg群でカリウムが低値を示した。その他、30 mg/kg群で無機リンが高値を示したが用量に関連した変化ではなかった。

#### (6) 器官重量 (Table 6-1、Appendix 6-1-1 ~ 6-2-4)

対照群に比べ 30 mg/kg 群で肝臓の相対重量が高値を示し、150 mg/kg 群で肝臓、腎臓の実重量および相対重量がともに高値を示した。6 mg/kg 群では対照群との間に差は認められなかった。

(7) 剖検所見 (Table 7-1、Appendix 7-1)

妊娠を成立させた雄：

被験物質投与群に多く観察された所見として、肝臓の肥大が 30 および 150 mg/kg群で1 および9例に観察された。その他自然発生性と考えられる所見として、肺の有色斑/区域 (褐色)、肝臓の変形 (分葉異常)、腹腔内の塊 (脂肪壊死)、腎臓の嚢胞および瘢痕、精巣および精巣上体の萎縮が 30 または 150 mg/kg群で単発性に認められ、肝臓の黄色化が対照群で2例に認められた。

妊娠を成立させなかった雄：

対照群で1例認められたが、異常所見は観察されなかった。

(8) 病理組織学検査 (Table 8-1、Appendix 8-1)

妊娠を成立させた雄：

対照群に比較して 150 mg/kg群で明らかに多い発生を示した所見として、小葉中心性肝細胞腫脹 (Photo. 2) が12例中9例に観察された。また、被験物質投与群でやや増加傾向のみられた所見として、副腎の空胞化が認められた。その他認められた所見は、対照群と被験物質投与群との間で発現数に差はなかった。6 および 30 mg/kg 群について胸腺、肝臓、腎臓および副腎を鏡検した結果、肝臓および腎臓には異常所見はなかった。

妊娠を成立させなかった雄：

対照群で1例認められた。脾臓の色素沈着、肝臓の脂肪化、腎臓の好塩基性化および副腎の空胞化が観察された。

b. 雌動物に及ぼす影響

(1) 死亡および一般状態 (Table 1-1、1-3 ~ 1-5、Appendix 1-2-1 ~ 1-2-12)

死亡例は、150 mg/kg 群で妊娠23日に2例観察された。このうち1例 (動物番号2302) は前日 (妊娠22日) に自発運動低下が観察され、翌日死亡していた。他の1例 (動物番号2305) は分娩中に死亡した。その他の投与群では投与期間を通じ死亡例は観察されなかった。

一般状態の観察では、眼分泌物が 30 mg/kg 群で1例、脱毛 (前肢、後肢、頸部) が対照群および 6 mg/kg群で1および2例に観察された。

(2) 体 重 (Figure 2、Table 2-2、Appendix 2-2-1 ~ 2-2-12)

150 mg/kg 群で対照群に比べ妊娠0から21日の間の体重増加量が低値を示した。6 および 30 mg/kg群では対照群との間に差は認められなかった。

(3) 摂餌量 (Figure 4、Table 3-2、Appendix 3-2-1 ~ 3-2-12)

投与期間を通じ対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

(4) 器官重量 (Table 6-2、Appendix 6-3-1 ~ 6-4-4)

150 mg/kg 群で対照群に比べ肝臓および腎臓の相対重量が高値を示し、実重量も高値傾向を示した。6 および 30 mg/kg 群では、対照群との間に差は認められなかった。

(5) 剖検所見 (Table 7-2 ~ 7-4、Appendix 7-2)

死亡例：

死亡例は 150 mg/kg 群で 2 例認められた。肝臓の肥大が 2 例、肺の赤色化、小腸の黄色化、肝臓の白色斑／区域、腎臓および副腎の肥大が各 1 例に観察された。

哺育 4 日の雌：

被験物質投与群に多く観察された所見として、胸腺の萎縮が 6、30 および 150 mg/kg 群でそれぞれ 1、2 および 1 例、肝臓の白色斑／区域および副腎の肥大が 150 mg/kg 群で各 2 例、腎臓の淡明化が 6 および 150 mg/kg 群で各 1 例観察された。その他単発性に発生した所見として、胸腺の赤色斑／区域、小腸の有色斑／区域（黄色）、肝臓の奇形結節（過形成）、淡明化および赤色化、腎臓の腎盂拡大および肥大、被毛の菲薄化が被験物質投与群で単発性に認められた。

妊娠が成立しなかった雌：

対照群で 1 例認められたが、異常所見は観察されなかった。

全児死亡の認められた雌：

哺育 4 日までに全児死亡が認められた雌は 30 および 150 mg/kg 群でそれぞれ 1 および 3 例であった。肝臓の肥大および赤色斑／区域が 150 mg/kg 群でそれぞれ 3 例（全例）および 2 例観察された。その他観察された心臓の癒痕、胸腺の有色斑／区域（褐色）、肺の黒色斑／区域および結節、胃の白色斑／区域、小腸の白色化、肝臓の白色化、腎臓の黒色化、肥大および淡明化、副腎の肥大が単発性に認められた。

(6) 病理組織学検査 (Table 8-2 ~ 8-4、Appendix 8-2)

死亡例：

死亡例は 150 mg/kg 群で 2 例認められた。脾臓の色素沈着、肺の血管中膜肥厚、舌および食道の錯角化症、肝臓の硝子滴変性、小葉中心性壊死、単細胞壊死、小葉中心性肝細胞腫脹、腎臓の硝子滴変性、顆粒状蛋白円柱、乳腺の増生が 2 例ともに観察された。

哺育4日の雌：

対照群に比較して150 mg/kg群で明らかに多い発生を示した所見として、小葉中心性肝細胞腫脹 (Photo. 3) が観察された。また、被験物質投与群でやや増加傾向のみられた所見として、胸腺の萎縮が観察された。対照群に認められず150 mg/kg群のみに複数例の発生を示した所見として、肝臓の小葉中心性細胞壊死 (Photo. 4)、肉芽巣、腎臓の乳頭部PAS陽性顆粒沈着 (Photo. 7)、顆粒状蛋白円柱および近位尿細管の壊死 (Photo. 6) が観察された。その他認められた所見は、対照群と被験物質投与群との間で発現数に差はなかった。

6 および 30 mg/kg 群について胸腺、肝臓、腎臓および副腎を鏡検した結果、肝臓および腎臓の異常所見はなく、胸腺の萎縮が150 mg/kg群と同程度の発生を示した。

妊娠が成立しなかった雌：

対照群で1例認められた。心臓の細胞浸潤、脾臓の色素沈着および肝臓の肉芽巣が観察された。

全児死亡の認められた雌：

30および150 mg/kg群でそれぞれ1および3例認められた。全動物において胸腺の萎縮、脾臓の色素沈着、舌の錯角化症および肝臓の脂肪化が観察され、さらに150 mg/kg群で肺の出血、食道の錯角化症 (Photo. 8)、肝臓の細胞分裂、小葉中心性肝臓細胞壊死、単細胞壊死、肝細胞腫脹、腎臓の蛋白円柱、尿細管好塩基化、細胞分裂、尿細管拡張、近位尿細管の壊死および空胞化がそれぞれ3例中2ないし3例に観察された。

## 2) 生殖発生毒性

### a. 親動物に及ぼす影響

#### (1) 交尾および受胎能 (Table 9、Appendix 9-1-1 ~ 9-2-4)

交尾は、すべての群で全例成立した。

受胎は、対照群で1組が不成立であり、その他の被験物質投与群では全例が成立した。性周期観察では、偽妊娠 (連続した発情休止期像) も観察されず、いずれの群もほぼ4~5日の性周期を示し、平均性周期に群間差は認められなかった。

#### (2) 分娩および哺育 (Table 10、Appendix 10-1 ~ 11-4)

妊娠期間は各群で平均22.5~22.9日の範囲であり、分娩時間の延長も認められなかった。

150 mg/kg 群で9匹の新生児を娩出し分娩中に死亡した動物が1例 (動物番号2305) 観察され、剖検時の子宮内検査において子宮内残留胎児が6匹確認された。また、同群で対照群に比べ着床痕数が減少した。哺育期間中に全児死亡の認められた動物が4例 (動物番号2204、2303、2309、2312) 観察された。その他、150 mg/kg 群で対照群に比べ生後4日の生存率が雌雄とも低値傾向を示したが、統計学的有意差は認められなかった。対照群、6 および 30 mg/kg 群では、分娩状態の異常は観察されず、黄体数、着床痕数、性比、出産率、着床率、分娩率、出生率および新生児の生後4日生存率に群間差は認められなかった。

b. 新生児に及ぼす影響

(1) 外表検査 (Table 10、Appendix 10-1 ~ 10-4)

いずれの群にも外表異常は観察されなかった。

(2) 体 重 (Table 11、Appendix 12-1-1 ~ 12-2-4)

哺育4日までの体重は雌雄ともに群間差は認められなかった。

(3) 剖 検 (Table 12-1 ~ 12-2)

哺育4日までの死亡児の剖検では、胸腺の頸部残留が被験物質投与群で散見されたのみであった。

哺育4日の生存児の剖検では、胸腺の頸部残留、肝臓の白色斑／区域、淡明化および腎盂拡大が対照群、6および30 mg/kg 群で単発性に認められた。

### 13. 考察および結論：

#### 1) 反復投与毒性

死亡例は雌の 150 mg/kg群で妊娠23日に2例（1例は分娩中に死亡）観察された。剖検で肝臓の肥大が、病理組織学検査で肝臓を中心とする異常所見が認められたことから、死因に肝障害が大きく関与したと考えられた。一般状態の観察で認められた異常所見はいずれも単発性または少数例の発生であり、被験物質投与によるものとは考えられなかった。雌の 150 mg/kg群で妊娠期間中に体重増加抑制が認められたが、雄については投与期間を通じ被験物質投与の影響は認められなかった。

摂餌量において、雄の 150 mg/kg群で投与28から35日の平均1日摂餌量が増加したが、軽度で、かつ体重に一致しない変化であり、背景値と比べて差はないことから、被験物質投与による影響ではないと判断された。

雄の血液学的検査では、150 mg/kg群でヘマトクリット値、ヘモグロビン量および赤血球数が低値、網赤血球比率が高値を示し、軽微ながら貧血傾向が認められた。なお、6 mg/kg群で網赤血球比率が高値を示したが、ヘマトクリット値や赤血球数に低値がみられず貧血傾向のないことから、被験物質投与の影響とは考えられなかった。血液化学的検査では、30および 150 mg/kg群で GOTの低値および $\gamma$ -GTPの高値が認められ、このうち $\gamma$ -GTPの高値は肝臓の機能低下を含む被験物質投与の影響が示唆された。GOTの低値についてはその機序は明らかでなかった。なお、すべての被験物質投与群で塩素の高値およびカルシウムの低値が、さらに 150 mg/kg群でカリウムが低値を示したが、当施設の背景値と比べ差はなく被験物質投与の影響ではないと判断された。30および 150 mg/kg群で総蛋白およびアルブミンが高値を示したが、その機序は明らかでなかった。

器官重量では、雄の 30 mg/kg 以上の投与群および雌の 150 mg/kg群で肝臓、腎臓の実重量および相対重量が増加または増加傾向を示し、剖検所見においても雄の 30 および 150 mg/kg群で肝臓の肥大が、雌の 150 mg/kg群で肝臓および腎臓の肥大が認められた。

病理組織学検査の結果、被験物質投与の影響の示唆される病変として、雌雄の 150 mg/kg群で肝臓に小葉中心部の肝細胞腫脹が観察され、さらに雌では肝細胞の壊死性変化、細胞分裂、腎臓の近位尿細管の壊死、顆粒状の蛋白円柱、細胞分裂および腎乳頭部の PAS陽性顆粒の沈着などが観察された。また、全児死亡の認められた動物および死亡動物に共通する所見として舌および食道の錯角化症が認められた。肝臓に観察された肝細胞の腫脹、変性および壊死はすべて小葉中心性に発生する特徴を示した。腎臓に認められた種々の変化についても同様に被験物質の影響と考えられるが、顆粒状の蛋白円柱の由来については、壊死した尿細管で好酸性顆粒状を呈し崩壊していく像が多数観察され、その存在部位が近位尿細管から下位であることなどから、壊死、崩壊した尿細管上皮であると考えられる。雄で明らかに被験物質の影響が認められた器官は肝臓のみであり、発生率も程度も雌に比べて軽度であった。また、雌において胸腺の萎縮が対照群に比較し被験物質投与群で増加傾向を示した。このうち 150 mg/kg群で観察された胸腺の萎縮は腎臓および肝臓の病変の程度と相関性が認められ、被験物質の影響が示唆された。しかし、6 および 30 mg/kg で

観察された萎縮は、他の器官の病変と相関性が見られないことや、対照群においても中等度の例があることから自然発生性のものと考えられた。なお、雄の被験物質投与群で発生率増加がみられた副腎皮質の空胞化は自然発生的に観察される所見であり、対照群で観察された空胞化と形態的な差異も認めなかったことから、被験物質の影響とは考えられない。また、雄の腎臓において器官重量の増加傾向がみられたが、それを裏付けるような明確な形態学的変化は観察されなかった。その他の器官に観察された諸所見については用量に関連して増加する傾向も認められず、自然発生性の病変と考えられる。

以上のことから、6-tert-ブチル-2,4-キシレノールの反復投与により、30および150 mg/kg 群の雄で GOTの低値および $\gamma$ -GTPの高値が、150 mg/kg 群の雌で死亡、体重増加抑制、肝臓、腎臓の重量増加および肥大、雄で貧血傾向、肝臓および腎臓重量の増加、肝臓の肥大が認められた。また、病理組織学検査では、150 mg/kg 群の雌雄で肝臓、さらに雌で腎臓を中心とした異常所見が認められ、本剤における標的器官は肝臓および腎臓と考えられた。従って、無影響量は雄で6 mg/kg/day、雌で30 mg/kg/day と推察される。

## 2) 生殖発生毒性

交尾能および受胎能に被験物質投与の影響は認められず、性周期観察についてもすべての投与群ではほぼ4～5日の周期を示し、被験物質投与の影響は認められなかった。妊娠を成立させなかった雄および妊娠が成立しなかった雌は対照群で各1例観察されたが、不成立の原因に関連すると考えられる異常所見は認められなかった。

分娩時観察では、150 mg/kg 群で一部の新生児を娩出した後に死亡した動物が1例観察された。哺育期間中に全児死亡の認められた動物が30 mg/kg 群で1例、150 mg/kg 群で3例観察され、さらに150 mg/kg 群で新生児の生後4日生存率の低値傾向が認められたことから、150 mg/kg 群の投与により分娩あるいは哺育機能の障害を惹起する可能性が示唆された。また、150 mg/kg 群で着床数が減少したが、当施設の背景値14.0～15.3と比べて差はないことから被験物質投与の影響ではないと判断された。なお妊娠期間および分娩時間では被験物質投与の影響は認められなかった。

新生児の外表検査では外表異常は観察されず、新生児の体重も哺育4日まで順調に増加した。また、死産児、死亡児および哺育4日の剖検でも被験物質投与による影響は認められなかった。

以上のことから、6-tert-ブチル-2,4-キシレノールによる雄の生殖に及ぼす影響は、150 mg/kg/day 投与によっても認められず、無影響量は150 mg/kg/day と推察される。雌の生殖に及ぼす影響および児動物の発生・発育に及ぼす影響は、150 mg/kg 群で哺育期間中の全児死亡の母動物数の増加が認められたことから無影響量は30 mg/kg/day と推察される。

1 4. 参 考 文 献 :

- 1) EPA TSCA Test Submission (TSCARTS) Data Base , January 1994.
- 2) 環境化学物質要覧、丸善 (1992) 。
- 3) OECD guideline for testing of chemicals: Extended Steering Group Document, No. 3 (1990).
- 4) Shayne, C. G. and Carrol, S. W. : Statics and Experimental Design For Toxicologists. Telford Press (1986).
- 5) 佐久間昭 : 薬効評価 I - 計画と解析 -、東京大学出版会 (1977) 。
- 6) 石居 進 : 生物統計学入門、培風館 (1975) 。

## Figures, Tables

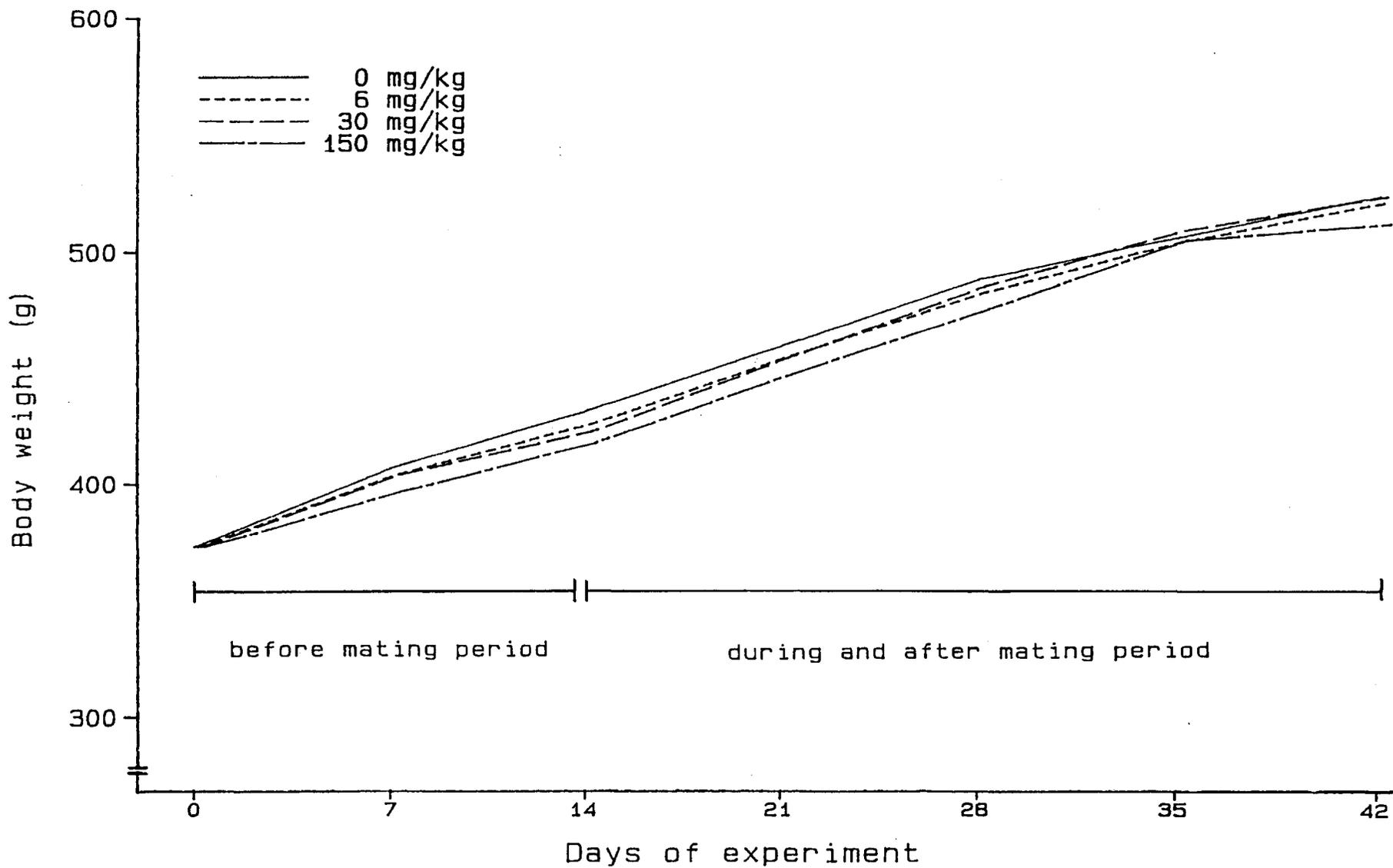


Figure 1  
Body weight change of male rats

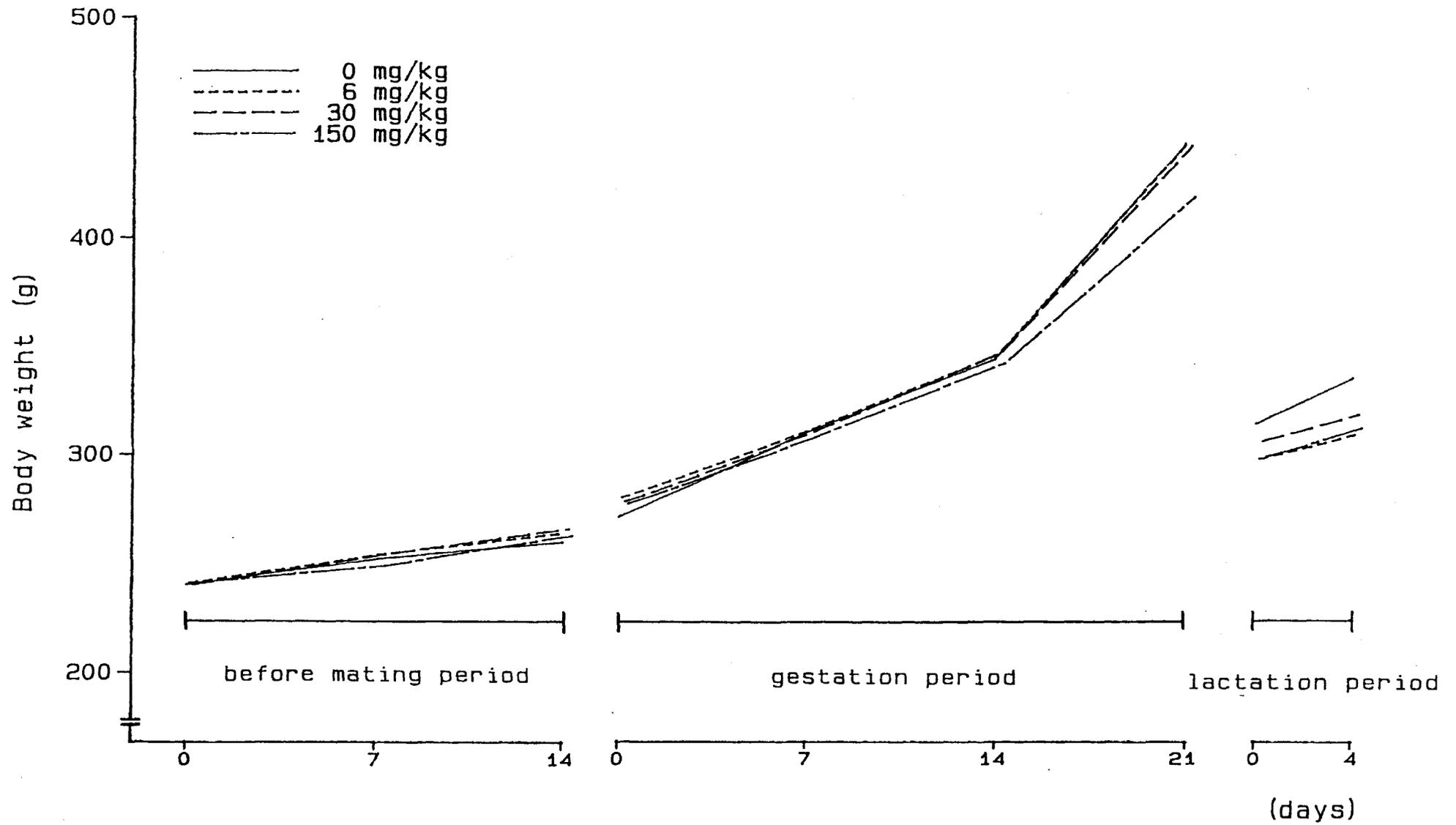


Figure 2  
Body weight change of female rats

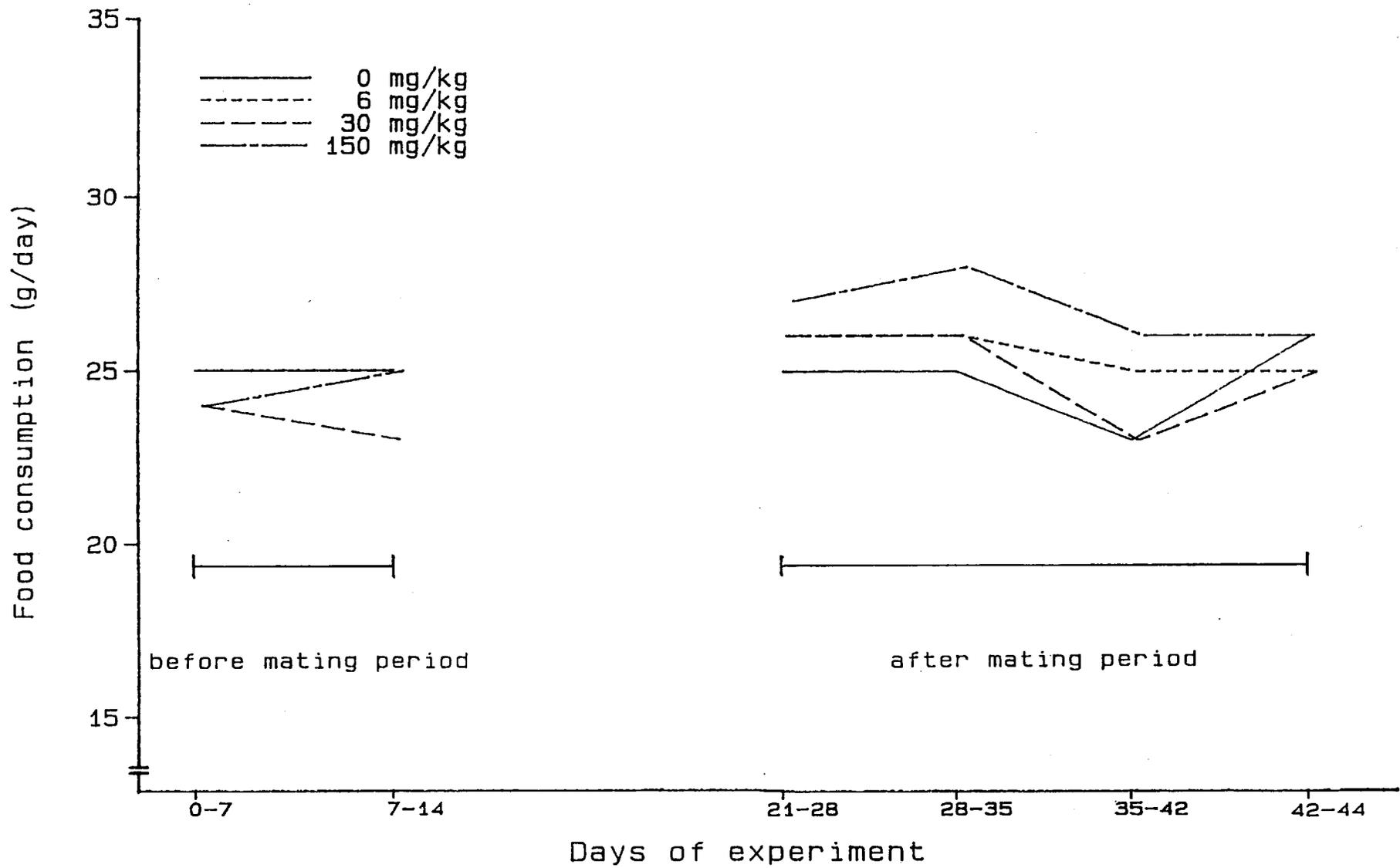


Figure 3  
Food consumption of male rats

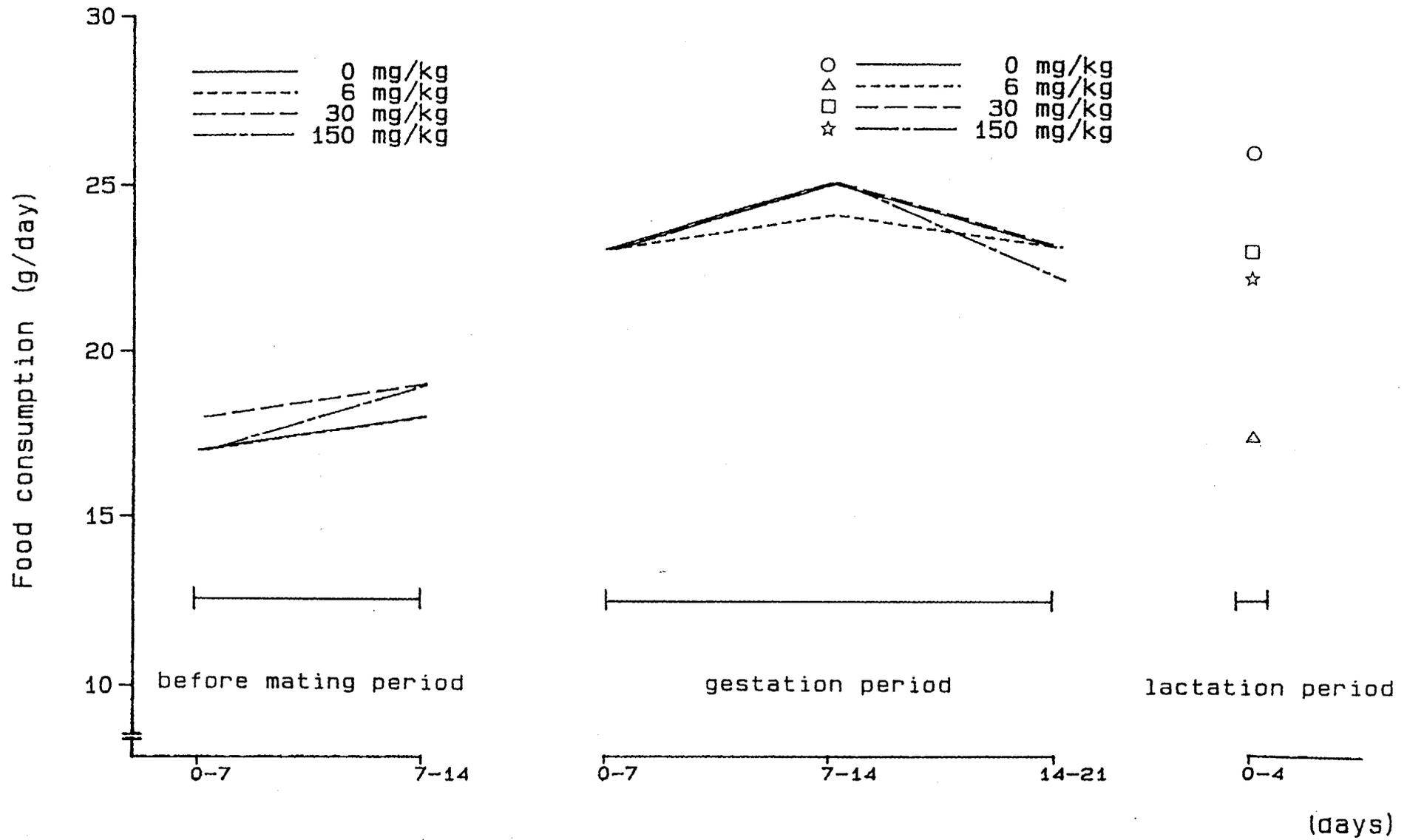


Figure 4  
Food consumption of female rats



Signs	Dose level (mg/kg)	Days of experiment							Total (0-45)
		0- 6	7-13	14-20	21-27	28-34	35-41	42-45	
number per group	0	12	12	12	12	12	12	12	
	6	12	12	12	12	12	12	12	
	30	12	12	12	12	12	12	12	
	150	12	12	12	12	12	12	12	
sacrificed	0	0	0	0	0	0	0	12	12
	6	0	0	0	0	0	0	12	12
	30	0	0	0	0	0	0	12	12
	150	0	0	0	0	0	0	12	12
normal	0	12	12	12	12	12	11	11	11
	6	12	12	12	11	11	11	12	11
	30	12	11	11	11	11	12	11	9
	150	12	12	11	12	12	12	12	11
loss of hair	0	0	0	0	0	0	0	0 a)	0 b)
	6	0	0	0	1	1	1	0	1
	30	0	0	0	0	0	0	0	0
	150	0	0	0	0	0	0	0	0
discharge of eye	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	1	0	0	0	0	1	2
	150	0	0	0	0	0	0	0	0
urogenital hemorrhage	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0
	150	0	0	1	0	0	0	0	1
teeth abnormality	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	1	1	1	0	0	2
	150	0	0	1	0	0	0	0	1

a) : No. of appearance

b) : Total of animal observed symptom

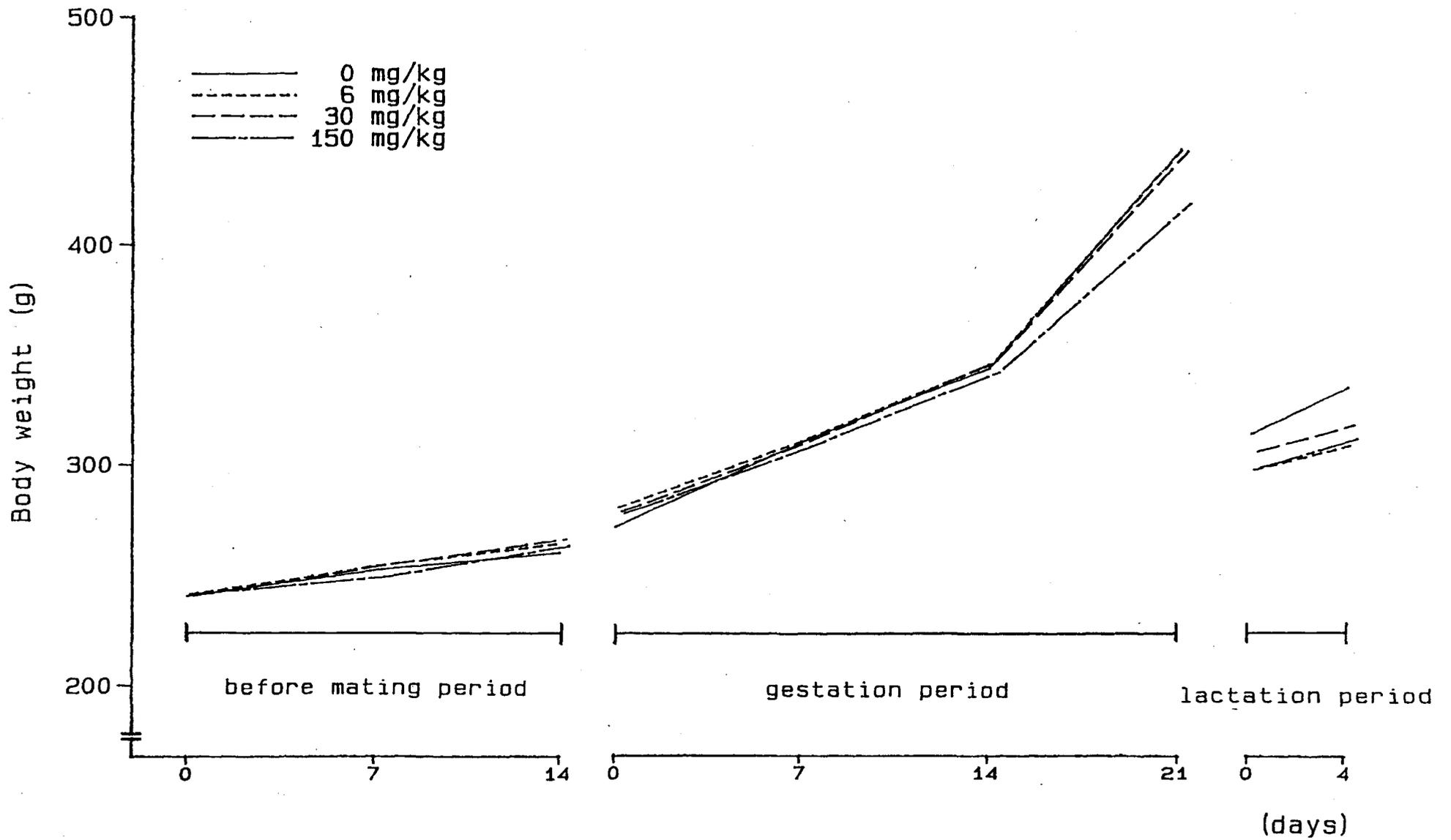


Figure 2  
Body weight change of female rats

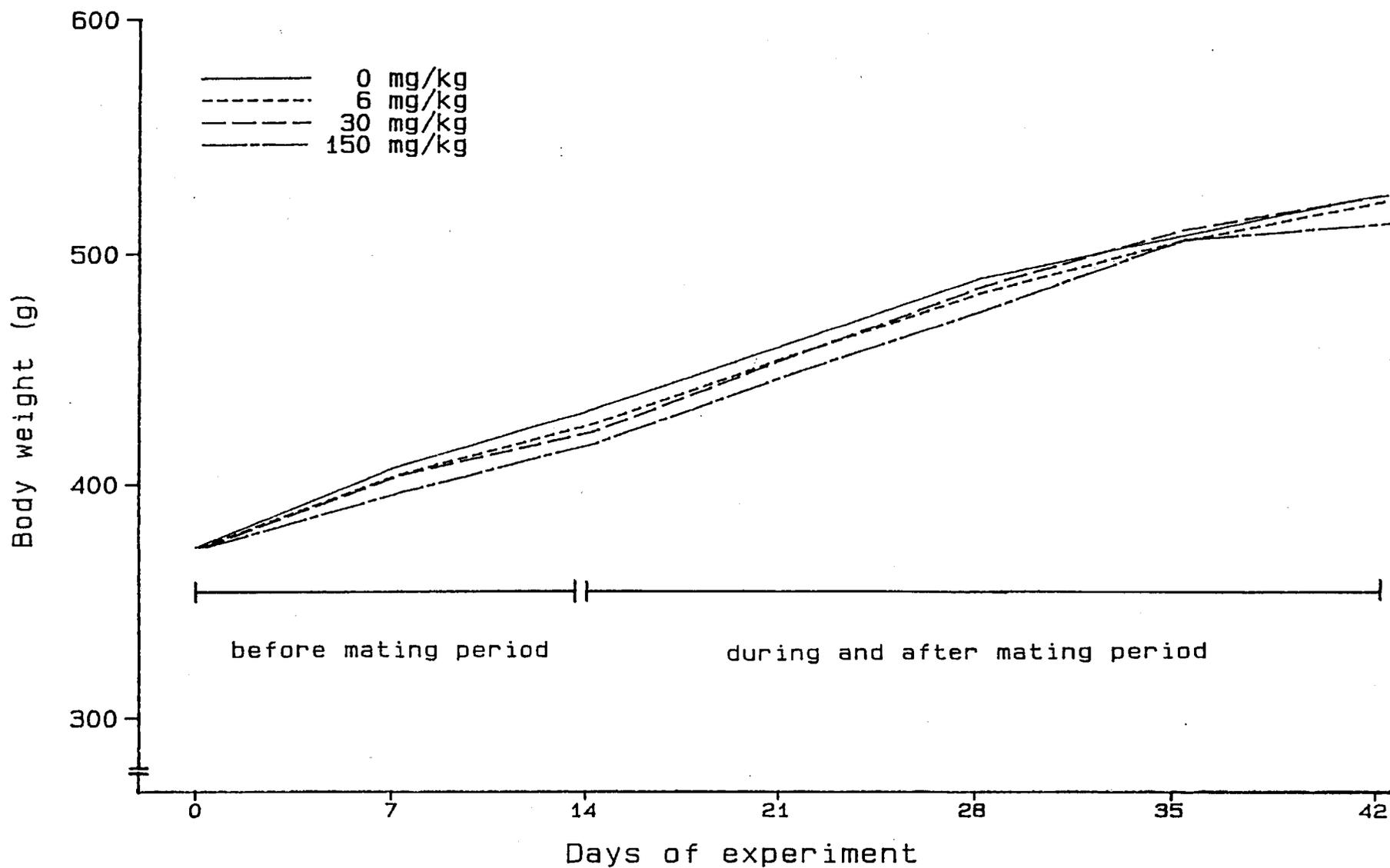


Figure 1  
Body weight change of male rats

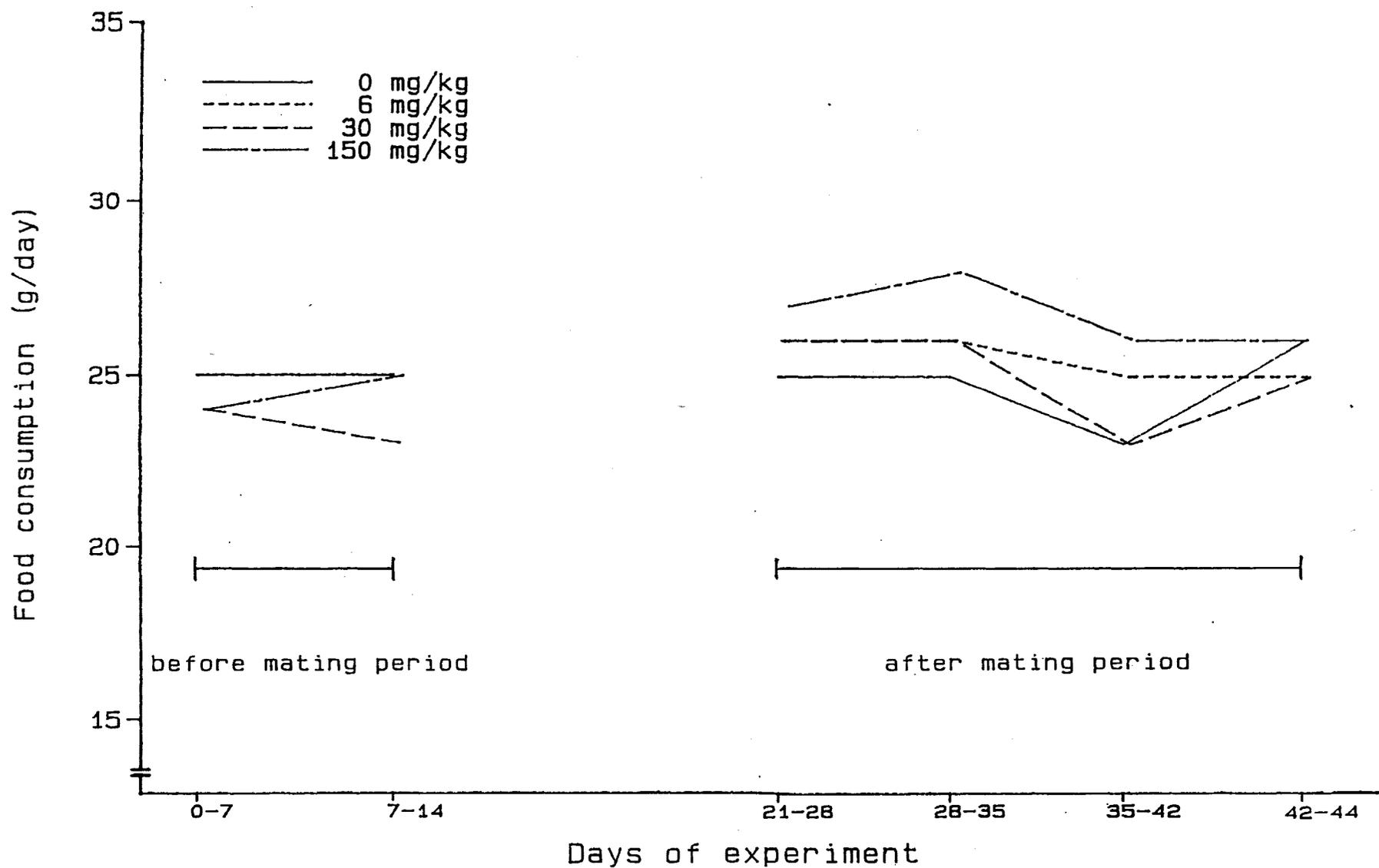


Figure 3  
Food consumption of male rats

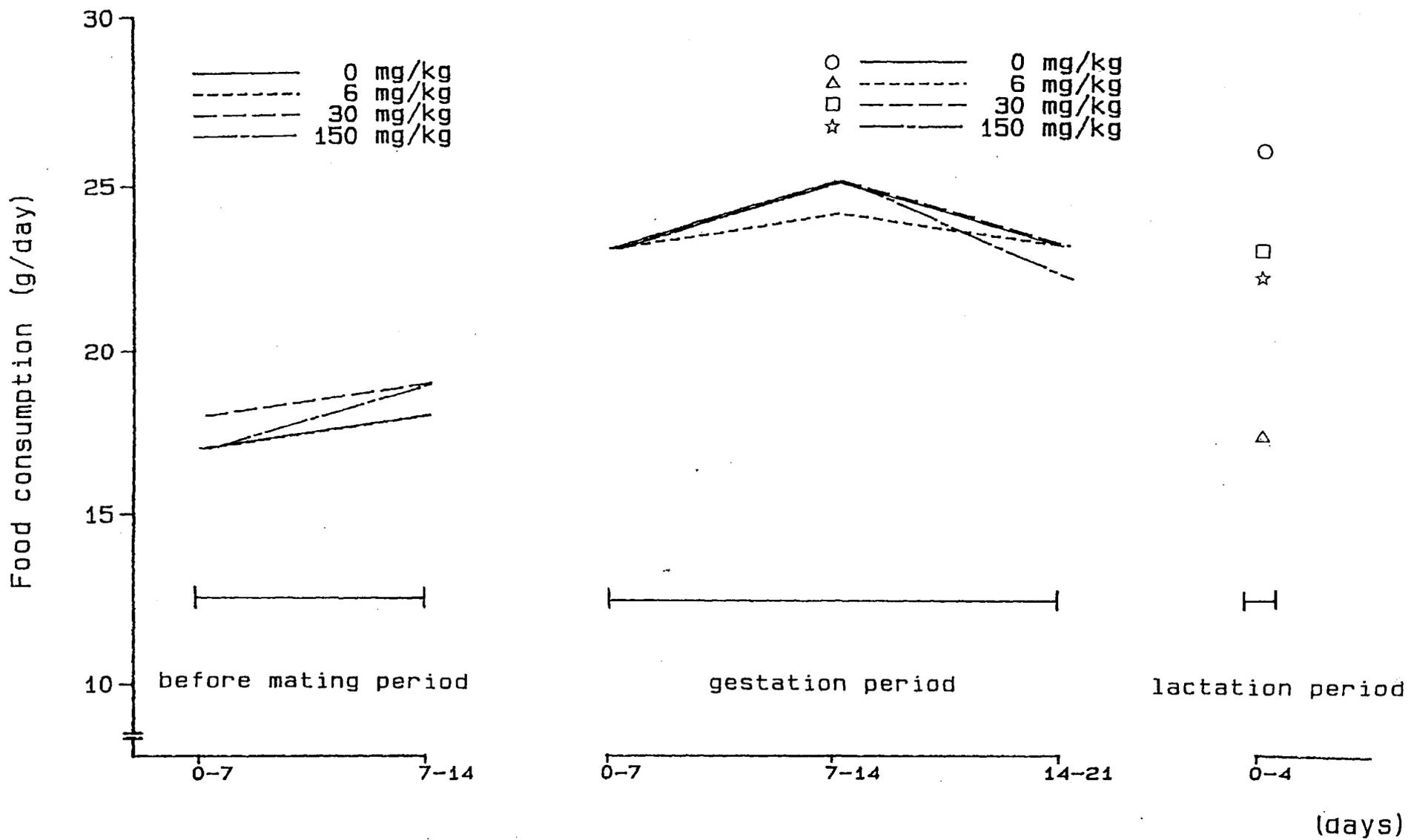


Figure 4  
Food consumption of female rats



Table 1-2

## Clinical observations on male rats

Exp. No. 2283(115-026)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of experiment							Total (0-45)
		0- 6	7-13	14-20	21-27	28-34	35-41	42-45	
number per group	0	12	12	12	12	12	12	12	
	6	12	12	12	12	12	12	12	
	30	12	12	12	12	12	12	12	
	150	12	12	12	12	12	12	12	
sacrificed	0	0	0	0	0	0	0	12	12
	6	0	0	0	0	0	0	12	12
	30	0	0	0	0	0	0	12	12
	150	0	0	0	0	0	0	12	12
normal	0	12	12	12	12	12	11	11	11
	6	12	12	12	11	11	11	12	11
	30	12	11	11	11	11	12	11	9
	150	12	12	11	12	12	12	12	11
loss of hair	0	0	0	0	0	0	0	0 a)	0 b)
	6	0	0	0	1	1	1	0	1
	30	0	0	0	0	0	0	0	0
	150	0	0	0	0	0	0	0	0
discharge of eye	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	1	0	0	0	0	1	2
	150	0	0	0	0	0	0	0	0
urogenital hemorrhage	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0
	150	0	0	1	0	0	0	0	1
teeth abnormality	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	1	1	1	0	0	2
	150	0	0	1	0	0	0	0	1

a) : No. of appearance

b) : Total of animal observed symptom

Table 1-3

Clinical observations on female rats  
(Before and during mating period)

Exp. No. 2283(115-026)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of experiment				Total (0-21)
		0- 6	7-13	14-20	21	
number per group	0	12	12	12	0	
	6	12	12	12	0	
	30	12	12	12	1	
	150	12	12	12	0	
copulation	0	0	0	12	0	12
	6	0	0	12	0	12
	30	0	0	11	1	12
	150	0	0	12	0	12
normal	0	12	12	12	0	12
	6	12	12	12	0	12
	30	12	11	12	1	11
	150	12	12	12	0	12
discharge of eye	0	0	0	0	0 a)	0 b)
	6	0	0	0	0	0
	30	0	1	0	0	1
	150	0	0	0	0	0

a) : No. of appearance

b) : Total of animal observed symptom

Table 1-4

Clinical observations on female rats  
(Gestation period)

Exp. No. 2283(115-026)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of gestation													
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
number per group	0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	6	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	30	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	150	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
delivery	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
normal	0	11	11	11	11	11	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	6	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11
	30	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	150	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
loss of hair	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1 a)	1 b)
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
decrease spon. motor act.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a) : No. of appearance

b) : Total of animal observed symptom

Table 1-4 -Continued

Clinical observations on female rats  
(Gestation period)

Exp. No. 2283(115-026)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of gestation										Total (0-23)
		14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
number per group	0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	6	
	6	12	12	12	12	12	12	12	12	12	9	
	30	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	
	150	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	
dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
delivery	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	6	11
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	3	9	12
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	1	11	12
	150	0	0	0	0	0	0	0	0	1	9	10
normal	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	6	10
	6	11	11	11	11	11	11	11	11	11	9	11
	30	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	12
	150	12	12	12	12	12	12	12	12	11	9	10
loss of hair	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0 a)	1 b)
	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
decrease spon. motor act.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	150	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1

a) : No. of appearance

b) : Total of animal observed symptom

Table 1-5

Clinical observations on female rats  
(Lactation period)

Exp. No. 2283(115-026)

Signs	Dose level (mg/kg)	Days of lactation					Total (0-4)
		0	1	2	3	4	
number per group	0	11	11	11	11	11	
	6	12	12	12	12	12	
	30	12	12	11	11	11	
	150	10	10	7	7	7	
sacrificed	0	0	0	0	0	11	11
	6	0	0	0	0	12	12
	30	0	0	0	0	11	11
	150	0	0	0	0	7	7
sacrificed (all pups died)	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0
	30	0	1	0	0	0	1
	150	0	3	0	0	0	3
normal	0	10	10	10	10	11	10
	6	10	10	10	10	11	10
	30	12	12	11	11	11	12
	150	10	10	7	7	7	10
loss of hair	0	1	1	1	1	0 a)	1 b)
	6	2	2	2	2	1	2
	30	0	0	0	0	0	0
	150	0	0	0	0	0	0

a) : No. of appearance

b) : Total of animal observed symptom

Table 2-1

Body weight change of male rats

Exp. No. 2283(115-026)

Unit : g

Dose level	0 mg/kg	6 mg/kg	30 mg/kg	150 mg/kg
No. of animal	12	12	12	12
Days of experiment	0			
	373 ± 16.5	373 ± 17.5	373 ± 15.7	373 ± 15.0
	7			
	407 ± 16.4	404 ± 23.4	404 ± 21.4	397 ± 21.3
	14			
	432 ± 19.4	426 ± 27.5	423 ± 26.0	418 ± 23.3
	21			
	460 ± 20.6	455 ± 28.6	455 ± 27.8	448 ± 30.3
	28			
	489 ± 22.5	483 ± 30.2	486 ± 30.5	476 ± 35.9
	35			
	507 ± 22.1	505 ± 32.7	510 ± 30.4	506 ± 34.2
	42			
	525 ± 23.4	522 ± 38.9	525 ± 37.0	521 ± 31.6
Gain	0-42			
	152 ± 23.5	149 ± 25.9	152 ± 28.3	148 ± 28.5

Values are expressed as Mean±S.D.

		Unit : g			
Dose level		0 mg/kg	6 mg/kg	30 mg/kg	150 mg/kg
<b>Before mating period</b>					
No. of animals		12	12	12	12
Days of experiment	0	240 ± 8.7	241 ± 9.8	240 ± 9.5	241 ± 9.3
	7	251 ± 10.3	254 ± 12.4	254 ± 12.1	249 ± 11.3
	14	260 ± 8.4	264 ± 12.4	266 ± 16.0	263 ± 14.4
	Gain 0-14	19 ± 7.2	23 ± 9.1	26 ± 11.3	22 ± 7.8
<hr/>					
<b>Gestation period</b>					
No. of dams		11	12	12	12
Days of gestation	0	271 ± 14.5	280 ± 12.2	278 ± 14.9	277 ± 18.8
	7	310 ± 16.5	311 ± 18.1	310 ± 16.7	308 ± 20.7
	14	344 ± 17.8	346 ± 20.5	347 ± 20.9	342 ± 24.0
	21	441 ± 23.5	442 ± 26.8	440 ± 25.1	417 ± 30.8
	Gain 0-21	170 ± 17.3	162 ± 18.7	162 ± 17.2	140 ± 25.0 **
<hr/>					
<b>Lactation period</b>					
No. of dams		11	12	12	9
Days of lactation	0	314 ± 16.5	298 ± 28.4	306 ± 29.9	299 ± 21.3
	4	335 ± 17.0	309 ± 29.2	318 ± 38.1 (11)	312 ± 24.0 (7)
	Gain 0-4	21 ± 11.7N	11 ± 32.1	12 ± 26.5 (11)	6 ± 18.4 (7)

Values are expressed as Mean±S.D.

Values in parentheses are expressed number of animals measured

Significantly different from control group; \*\*: P<0.01

N : Non parametric analysis

Table 3-1

## Food consumption of male rats

Exp. No. 2283(115-026)

Unit : g/day

Dose level	0 mg/kg	6 mg/kg	30 mg/kg	150 mg/kg	
No. of animals	12	12	12	12	
Days of experiment	0- 7	25 ± 1.5	25 ± 2.1	24 ± 2.8	24 ± 2.2
	7-14	25 ± 1.6N	25 ± 1.8	23 ± 5.6	25 ± 2.6
	21-28	25 ± 1.6	26 ± 1.8	26 ± 3.2	27 ± 2.8
	28-35	25 ± 1.5	26 ± 1.5	26 ± 2.3	28 ± 2.0 **
	35-42	23 ± 4.8	25 ± 2.3	23 ± 3.5	26 ± 2.6
	42-44	26 ± 2.0	25 ± 2.2	25 ± 3.7	26 ± 2.5
Cumulative consumption	0-14	347 ± 20.6N	347 ± 23.5	325 ± 46.1	344 ± 26.8
	21-44	564 ± 51.7	586 ± 40.9	575 ± 64.1	612 ± 46.8

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from control group; \*\*: P&lt;0.01

N : Non parametric analysis

Table 3-2

Food consumption of female rats

Exp. No. 2283(115-026)

		Unit : g/day			
Dose level		0 mg/kg	6 mg/kg	30 mg/kg	150 mg/kg
<b>Before mating period</b>					
No. of animals		12	12	12	12
Days of experiment	0- 7	17 ± 1.1	17 ± 1.8	18 ± 1.5	17 ± 2.2
	7-14	18 ± 1.8	18 ± 1.6	19 ± 2.2	19 ± 1.8
Cumulative consumption	0-14	242 ± 18.4	249 ± 22.3	254 ± 23.9	247 ± 25.3
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>					
<b>Gestation period</b>					
No. of dams		11	12	12	12
Days of gestation	0- 7	23 ± 2.4	23 ± 2.1	23 ± 2.2	23 ± 2.0
	7-14	25 ± 2.3	24 ± 3.4	25 ± 2.9	25 ± 2.5
	14-21	23 ± 3.0	23 ± 3.5	23 ± 2.1	22 ± 2.8
Cumulative consumption	0-21	497 ± 47.3	486 ± 55.5	496 ± 40.9	489 ± 40.6
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>					
<b>Lactation period</b>					
No. of dams		11	12	11	7
Days of lactation	0- 4	26 ± 8.1	17 ± 12.5	23 ± 9.9	22 ± 12.8

Values are expressed as Mean±S.D.

Table 4

Hematology of male rats

Exp. No. 2283(115-026)

Day: 45

Dose level	0 mg/kg	6 mg/kg	30 mg/kg	150 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
HCT (%)	45.8 ± 1.3	46.2 ± 1.8	45.2 ± 1.2	43.9 ± 1.3 **
HGB (g/dl)	14.6 ± 0.4	14.8 ± 0.5	14.5 ± 0.4	14.1 ± 0.4 **
RBC (x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	8.04 ± 0.28	8.32 ± 0.27 *	8.15 ± 0.27	7.72 ± 0.20 **
MCV (μm <sup>3</sup> )	56.9 ± 1.9	55.5 ± 2.3	55.5 ± 1.7	57.0 ± 1.8
MCH (pg)	18.2 ± 0.6	17.8 ± 0.6	17.8 ± 0.4	18.3 ± 0.5
MCHC (%)	31.9 ± 0.5	32.1 ± 0.3	32.1 ± 0.5	32.1 ± 0.4
PLT (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	1000 ± 80	1020 ± 78	987 ± 70	1046 ± 73
WBC (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	8.9 ± 2.1	10.1 ± 2.5	10.9 ± 2.5 *	8.1 ± 1.9
Differential leukocyte counts (%)				
NEUT	21 ± 4	24 ± 5	19 ± 4	25 ± 5 *
LYMPH	76 ± 5	74 ± 5	79 ± 5	72 ± 5 *
MONO	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 0
EOSN	2 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	2 ± 1
BASO	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
LUC	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Reticulocyte (‰)	25 ± 15	41 ± 16 *	37 ± 14	42 ± 15 *

NEUT : Neutrophil LYMPH : Lymphocyte MONO : Monocyte EOSN : Eosinophil BASO : Basophil

LUC : Large unstained cells

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from control group; \*: P&lt;0.05 \*\*: P&lt;0.01

Table 5

Blood chemistry of male rats

Exp. No. 2283(115-026)

Day: 45

Dose level	0 mg/kg	6 mg/kg	30 mg/kg	150 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
T. protein(g/dl)	5.88 ± 0.29	5.95 ± 0.19	6.19 ± 0.23 **	6.25 ± 0.21 **
Albumin(g/dl)	3.42 ± 0.17	3.42 ± 0.14	3.61 ± 0.22 *	3.61 ± 0.16 *
A/G	1.39 ± 0.08	1.36 ± 0.08	1.40 ± 0.11	1.36 ± 0.06
Glucose(mg/dl)	168 ± 18	157 ± 15	156 ± 16	150 ± 26
BUN(mg/dl)	13.5 ± 1.9N	12.7 ± 1.8	13.7 ± 3.2	11.8 ± 1.1
Creatinine(mg/dl)	0.57 ± 0.05	0.64 ± 0.10	0.64 ± 0.06	0.61 ± 0.05
T. bilirubin(mg/dl)	0.15 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.14 ± 0.04
GOT(U/l)	44 ± 5	40 ± 6	37 ± 5 **	36 ± 5 **
GPT(U/l)	16 ± 2	16 ± 4	14 ± 2	16 ± 4
Gamma-GTP(U/l)	0.1 ± 0.1N	0.1 ± 0.2	0.3 ± 0.3 *	0.8 ± 0.4 **
Potassium(mmol/l)	4.54 ± 0.14	4.35 ± 0.33	4.33 ± 0.24	4.10 ± 0.30 **
Chloride(mmol/l)	105.8 ± 1.5	107.1 ± 1.1 *	106.9 ± 1.0 *	106.9 ± 1.1 *
Calcium(mg/dl)	10.52 ± 0.31	9.83 ± 0.30 **	10.28 ± 0.21 *	9.96 ± 0.23 **
I. phosphate(mg/dl)	6.42 ± 0.40N	6.34 ± 0.80	7.10 ± 0.34 **	6.07 ± 0.28

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from control group; \*: P&lt;0.05 \*\*: P&lt;0.01

N : Non parametric analysis

Table 6-1

Absolute and relative organ weight of male rats

Exp. No. 2283(115-026)

Dose level		0 mg/kg	6 mg/kg	30 mg/kg	150 mg/kg
No. of animals examined		12	12	12	12
Body weight	(g)	507 ± 22	504 ± 38	508 ± 38	496 ± 33
Absolute organ weight					
Thymus	(mg)	314 ± 90	342 ± 120	315 ± 85	304 ± 94
Liver	(g)	14.89 ± 1.60	15.38 ± 1.77	16.55 ± 2.49	19.22 ± 2.92 **
Kidneys	(g)	3.21 ± 0.24	3.28 ± 0.31	3.32 ± 0.31	3.64 ± 0.24 **
Testes	(g)	3.32 ± 0.26	3.63 ± 0.24	3.62 ± 0.37	3.42 ± 0.40
Epididymides	(g)	1.25 ± 0.11	1.26 ± 0.09	1.24 ± 0.06	1.16 ± 0.13
Relative organ weight					
Thymus	(mg%)	61.532 ± 15.465	68.282 ± 25.990	61.983 ± 15.853	60.682 ± 16.518
Liver	(g%)	2.930 ± 0.233	3.045 ± 0.203	3.251 ± 0.304 *	3.856 ± 0.387 **
Kidneys	(g%)	0.634 ± 0.059	0.650 ± 0.042	0.655 ± 0.047	0.735 ± 0.059 **
Testes	(g%)	0.656 ± 0.072	0.722 ± 0.063	0.717 ± 0.090	0.691 ± 0.087
Epididymides	(g%)	0.247 ± 0.026	0.250 ± 0.025	0.245 ± 0.017	0.235 ± 0.027

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from control group; \*: P&lt;0.05 \*\*: P&lt;0.01

Table 6-2

Absolute and relative organ weight of female rats

Exp. No. 2283(115-026)

Dose level		0 mg/kg	6 mg/kg	30 mg/kg	150 mg/kg
No. of animals examined		11	12	11	7
Body weight	(g)	335 ± 17	309 ± 29	318 ± 38	312 ± 24
Absolute organ weight					
Thymus	(mg)	186 ± 68	102 ± 46	156 ± 96	126 ± 55
Liver	(g)	13.72 ± 1.31	12.35 ± 2.19	13.42 ± 1.96	16.34 ± 2.75
Kidneys	(g)	2.11 ± 0.11N	2.11 ± 0.16	2.14 ± 0.16	2.62 ± 0.75
Ovaries	(mg)	108 ± 23	105 ± 12	106 ± 16	104 ± 11
Relative organ weight					
Thymus	(mg%)	55.164 ± 18.680	32.470 ± 12.210	47.169 ± 26.027	40.129 ± 16.015
Liver	(g%)	4.088 ± 0.274N	3.981 ± 0.507	4.212 ± 0.349	5.264 ± 0.927 **
Kidneys	(g%)	0.630 ± 0.028N	0.686 ± 0.077	0.686 ± 0.118	0.848 ± 0.259 *
Ovaries	(mg%)	32.286 ± 6.341	34.419 ± 5.451	33.936 ± 8.576	33.599 ± 4.545

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from control group; \*: P&lt;0.05 \*\*: P&lt;0.01

N : Non parametric analysis

Table 7-1. Summary of gross findings ( successful pregnancy )

Exp. No. 2283 (115-026)

Sex: Male

Dose level ( mg/kg )	0	6	30	150
No. of animals necropsied	11	12	12	12
Organ Findings				
<b>RESPIRATORY SYSTEM</b>				
lung	0	0	0	1
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>				
liver	0	0	1	0
	0	0	1	9**
	2	0	0	0
abdominal cavity	0	0	1	0
	0	0	1	0
<b>URINARY SYSTEM</b>				
kidney	0	0	1	0
	0	0	1	0
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>				
testis	0	0	0	1
epididymis	0	0	0	1

Significantly different from control group; \*\*: P<0.01  
 Values are expressed number of animals with gross lesion.

Table 7-2. Summary of gross findings ( day 4 of lactation )

Exp. No. 2283 (115-026)

Sex: Female

Dose level ( mg/kg )	0	6	30	150
No. of animals necropsied	11	12	11	7
Organ Findings				
<b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>				
thymus atrophic	0	1	2	1
red patch/zone	0	1	0	0
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>				
small intestine colored patch/zone	0	0	1	0
liver malformative nodule	0	0	1	0
pale	0	1	0	0
reddish	0	0	0	1
white patch/zone	0	0	0	2
<b>URINARY SYSTEM</b>				
kidney dilated pelvis	0	1	0	0
enlarged	0	0	0	1
pale	0	1	0	1
<b>ENDOCRINE SYSTEM</b>				
adrenal gland enlarged	0	0	0	2
<b>INTEGUMENTARY SYSTEM</b>				
hair thin	0	1	0	0

Values are expressed number of animals with gross lesion.

Table 7-3. Summary of gross findings ( all pups died )

Exp. No. 2283 (115-026)

Sex: Female

Dose level ( mg/kg )	0	6	30	150	
No. of animals necropsied	0	0	1	3	
Organ Findings					
<b>CARDIOVASCULAR SYSTEM</b>					
heart	scarred	-	-	1	0
<b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>					
thymus	colored patch/zone	-	-	0	1
<b>RESPIRATORY SYSTEM</b>					
lung	black patch/zone	-	-	0	1
	nodule	-	-	0	1
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>					
stomach	white patch/zone	-	-	1	0
small intestine	white	-	-	1	0
liver	enlarged	-	-	0	3
	red patch/zone	-	-	0	2
	white	-	-	0	1
<b>URINARY SYSTEM</b>					
kidney	black	-	-	0	1
	enlarged	-	-	0	1
	pale	-	-	1	0
<b>ENDOCRINE SYSTEM</b>					
adrenal gland	enlarged	-	-	0	1

Values are expressed number of animals with gross lesion.

Table 7-4. Summary of gross findings ( dead )

Exp. No. 2283 (115-026)

Sex: Female

Dose level ( mg/kg )	0	6	30	150
No. of animals necropsied	0	0	0	2
Organ Findings				
<b>RESPIRATORY SYSTEM</b>				
lung reddish	-	-	-	1
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>				
small intestine				
liver yellowish	-	-	-	1
liver enlarged	-	-	-	2
liver white patch/zone	-	-	-	1
<b>URINARY SYSTEM</b>				
kidney enlarged	-	-	-	1
<b>ENDOCRINE SYSTEM</b>				
adrenal gland enlarged	-	-	-	1

Values are expressed number of animals with gross lesion.

Table 8-1. Summary of histological findings ( successful pregnancy )

Exp. No. 2283 (115-026)

Sex: Male

Dose level ( mg/kg )	0				6				30				150			
No. of animals sacrificed	11				12				12				12			
No. of animals necropsied	11				12				12				12			
No. of animals examined histologically	11				12				12				12			
Organ	Findings				T 1 2 3				T 1 2 3				T 1 2 3			
<b>CARDIOVASCULAR SYSTEM</b>																
heart	(11)				( 0 )				( 0 )				(12)			
infiltration/cellular	-	4	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
<b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>																
spleen	(11)				( 0 )				( 0 )				(12)			
deposit of pigment	-	11	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	0	0
<b>RESPIRATORY SYSTEM</b>																
lung	( 0 )				( 0 )				( 0 )				( 1 )			
accumulation of foamy cells	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
perivascular cell infiltration	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
medial hypertrophy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>																
liver	(11)				(12)				(12)				(12)			
fatty change	-	9	0	0	-	10	0	0	-	10	0	0	-	10	0	0
swelling of liver cells	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	9	0	0**
granulation	-	7	0	0	-	6	0	0	-	8	0	0	-	4	0	0
infiltration/cellular	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0
lymphocytic infiltration	-	1	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0
malformation	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0
peritoneum	( 0 )				( 0 )				( 1 )				( 0 )			
granulation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-
<b>URINARY SYSTEM</b>																
kidney	(11)				(12)				(12)				(12)			
basophilic change	-	10	0	0	-	11	0	0	-	8	0	0	-	9	2	0
cyst	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0
degeneration	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0
eosinophilic body	-	5	1	1	-	4	4	0	-	5	1	0	-	8	1	1
hyaline droplet	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0
protein cast	-	0	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0
tubular dilatation	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0
lymphocytic infiltration	-	1	0	0	-	4	0	0	-	5	0	0	-	2	0	0
scarring	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked

=: benign #: malignant

Values are expressed number of animals with micro lesion.

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

Significantly different from control group; \*\*: P&lt;0.01

-: Not applicable.

Sex: Male

Dose level ( mg/kg )	0			6			30			150						
No. of animals sacrificed	11			12			12			12						
No. of animals necropsied	11			12			12			12						
No. of animals examined histologically	11			12			12			12						
Organ	Findings			T 1 2 3			T 1 2 3			T 1 2 3						
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>																
testis	(11)			( 0 )			( 0 )			(12)						
atrophy	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
focal atrophy	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
granulation	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
interstitial cell hyperplasia	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
epididymis	( 0 )			( 0 )			( 0 )			( 1 )						
atrophy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
<b>ENDOCRINE SYSTEM</b>																
adrenal gland	(11)			(12)			(12)			(12)						
vacuolic change	-	3	0	0	-	6	0	0	-	7	0	0	-	8	0	0
fat infiltration	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0
hypertrophy	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
osseous metaplasia	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked

=: benign #: malignant

Values are expressed number of animals with micro lesion.

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

-: Not applicable.

Table 8-2. Summary of histological findings ( day 4 of lactation )

Exp. No. 2283 (115-026)

Sex: Female

Dose level ( mg/kg )	0			6			30			150				
No. of animals sacrificed	11			12			11			7				
No. of animals necropsied	11			12			11			7				
No. of animals examined histologically	11			12			11			7				
Organ	Findings	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	
<b>CARDIOVASCULAR SYSTEM</b>														
heart		(11)				( 0 )				( 0 )				( 7 )
	infiltration/cellular fibrosis	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>														
spleen		(11)				( 0 )				( 0 )				( 7 )
	deposit of pigment	-	10	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
thymus		(11)				(12)				(11)				( 7 )
	hemorrhage	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-
	atrophy	-	1	1	0	-	4	2	0	-	3	2	0	-
	hyperplasia, medulla	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>														
liver		(11)				(12)				(11)				( 7 )
	degeneration	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
	fatty change	-	5	0	0	-	2	2	0	-	6	0	0	-
	mitosis	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
	necrosis, central	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
	single cell necrosis	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
	swelling of liver cells	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
	granulation	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
	infiltration/cellular	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
	extramedullary hematopoiesis	-	0	0	0	-	2	0	0	-	1	0	0	-
	hepatodiaphragmatic nodule	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-
	hyperplasia	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
<b>URINARY SYSTEM</b>														
kidney		(11)				(12)				(11)				( 7 )
	PAS positive granules	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
	basophilic change	-	2	0	0	-	2	0	0	-	1	0	0	-
	degeneration	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
	deposit of calcium	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
	eosinophilic change	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
	hyaline droplet	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-
	mitosis	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
	necrosis	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
	protein cast	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
	tubular dilatation	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked

=: benign #: malignant

Values are expressed number of animals with micro lesion.

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

Significantly different from control group; \*\*: P&lt;0.01

-: Not applicable.

Sex: Female

Dose level ( mg/kg )	0				6				30				150			
No. of animals sacrificed	11				12				11				7			
No. of animals necropsied	11				12				11				7			
No. of animals examined histologically	11				12				11				7			
Organ _____ Findings _____	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3

## URINARY SYSTEM

kidney

tubular necrosis	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0
vacuolic change	-	2	0	0	-	4	2	0	-	4	1	0	-	2	1	0
lymphocytic infiltration	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
dilated pelvis	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0

## ENDOCRINE SYSTEM

adrenal gland

vacuolic change	(11)	-	0	0	0	(12)	-	0	0	0	(11)	-	0	0	0	(7)	-	1	0	0
hyperplasia, cortex	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0				
hypertrophy	-	1	0	0	-	2	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0				

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked

=: benign #: malignant

Values are expressed number of animals with micro lesion.

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

-: Not applicable.

Table 8-3. Summary of histological findings ( non-pregnancy )

Exp. No. 2283 (115-026)

Sex: Male

Dose level ( mg/kg )	0			6			30			150					
No. of animals non-pregnancy	1			0			0			0					
No. of animals necropsied	1			0			0			0					
No. of animals examined histologically	1			0			0			0					
Organ	Findings			T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3
<b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>															
spleen	( 1)														
deposit of pigment	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>															
liver	( 1)														
fatty change	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>URINARY SYSTEM</b>															
kidney	( 1)														
basophilic change	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>ENDOCRINE SYSTEM</b>															
adrenal gland	( 1)														
vacuolic change	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

T: tumor    1: slight    2: moderate    3: marked

=: benign    #: malignant

Values are expressed number of animals with micro lesion.

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

-: Not applicable.

Sex: Female

Dose level ( mg/kg )	0				6				30				150			
No. of animals non-pregnancy	1				0				0				0			
No. of animals necropsied	1				0				0				0			
No. of animals examined histologically	1				0				0				0			
Organ	Findings				T 1 2 3				T 1 2 3				T 1 2 3			

## CARDIOVASCULAR SYSTEM

heart	( 1 )												
infiltration/cellular	- 1 0 0	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -								

## HEMATOPOIETIC SYSTEM

spleen	( 1 )												
deposit of pigment	- 1 0 0	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -								

## DIGESTIVE SYSTEM

liver	( 1 )												
granulation	- 1 0 0	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -								

T: tumor    1: slight    2: moderate    3: marked

=: benign    #: malignant

Values are expressed number of animals with micro lesion.

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

-: Not applicable.

Table 8-5. Summary of histological findings ( all pups died )

Exp. No. 2283 (115-026)

Sex: Female

Dose level ( mg/kg )	0			6			30			150			
No. of animals all pups died	0			0			1			3			
No. of animals necropsied	0			0			1			3			
No. of animals examined histologically	0			0			1			3			
Organ	Findings	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3
<b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>													
spleen													
	atrophy									( 1 )			
	deposit of pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
lymph node	deposit of pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	( 1 )			
	plasma cell increase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
thymus	atrophy	-	-	-	-	-	-	-	-	( 1 )			
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
<b>RESPIRATORY SYSTEM</b>													
lung													
	hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	( 1 )			
	bronchiolar cell hyperplasia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>													
tongue													
	parakeratosis	-	-	-	-	-	-	-	-	( 1 )			
esophagus	erosion	-	-	-	-	-	-	-	-	( 1 )			
	hyperkeratosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
	parakeratosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
stomach	edema	-	-	-	-	-	-	-	-	( 1 )			
	deposit of calcium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
	erosion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
	ulcer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
	vacuolic change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
	parakeratosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
exocrine pancreas	atrophy	-	-	-	-	-	-	-	-	( 1 )			
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
small intestine	hyperplasia, lymphoid	-	-	-	-	-	-	-	-	( 1 )			
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
liver	fatty change	-	-	-	-	-	-	-	-	( 1 )			
	mitosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
	necrosis, central	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
	single cell necrosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
	swelling of liver cells	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked

=: benign #: malignant

Values are expressed number of animals with micro lesion.

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

-: Not applicable.

Sex: Female

Dose level ( mg/kg )		0				6				30				150					
No. of animals all pups died		0				0				1				3					
No. of animals necropsied		0				0				1				3					
No. of animals examined histologically		0				0				1				3					
Organ	Findings	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3		
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>																			
salivary gland																			
	atrophy	-	-	-	-	-	-	-	-	( 1 )	-	0	0	0	( 3 )	-	1	0	0
	mitosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	1	0	0		
<b>URINARY SYSTEM</b>																			
kidney																			
	PAS positive granules	-	-	-	-	-	-	-	-	( 1 )	-	0	0	0	( 3 )	-	1	0	0
	basophilic change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	2	0	0		
	degeneration	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	1	0	0		
	deposit of calcium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	1	0	0		
	hyaline droplet	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	-	1	0	0		
	hydropic change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	1	0	0		
	mitosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	2	0	0		
	necrosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	2	0	0		
	protein cast	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	-	3	0	0		
	tubular dilatation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	2	1	0		
	vacuolic change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	1	-	2	0	0		
	infiltration/cellular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	1	0	0		
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>																			
mammary gland																			
	hyperplasia	-	-	-	-	-	-	-	-	( 1 )	-	1	0	0	( 3 )	-	3	0	0

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked  
 =: benign #: malignant  
 Values are expressed number of animals with micro lesion.  
 ( ): No. of animals examined microscopically at this site.

-: Not applicable.

Table 8-6. Summary of histological findings ( dead )

Exp. No. 2283 (115-026)

Sex: Female

Dose level ( mg/kg )	0			6			30			150			
No. of animals dead	0			0			0			2			
No. of animals necropsied	0			0			0			2			
No. of animals examined histologically	0			0			0			2			
Organ	Findings			T 1 2 3			T 1 2 3			T 1 2 3			
<b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>													
spleen										( 2 )			
deposit of pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0
follicular atrophy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
thymus										( 2 )			
atrophy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	0
<b>RESPIRATORY SYSTEM</b>													
lung										( 2 )			
congestion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
medial hypertrophy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>													
tongue										( 2 )			
parakeratosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0
esophagus										( 2 )			
parakeratosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0
stomach										( 2 )			
parakeratosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
exocrine pancreas										( 2 )			
atrophy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
liver										( 2 )			
hyaline degeneration	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0
mitosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
necrosis, central	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0
single cell necrosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0
swelling of liver cells	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0
<b>URINARY SYSTEM</b>													
kidney										( 2 )			
PAS positive granules	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
hyaline droplet	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0
protein cast	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0
vacuolic change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>													
mammary gland										( 2 )			
hyperplasia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked

=: benign #: malignant

Values are expressed number of animals with micro lesion.

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

-: Not applicable.

Sex: Female

Dose level ( mg/kg )	0				6				30				150			
No. of animals dead	0				0				0				2			
No. of animals necropsied	0				0				0				2			
No. of animals examined histologically	0				0				0				2			
Organ _____ Findings _____	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3

ENDOCRINE SYSTEM

adrenal gland													( 2)			
hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
vacuolic change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0

T: tumor    1: slight    2: moderate    3: marked

=: benign    #: malignant

Values are expressed number of animals with micro lesion.

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

-: Not applicable.

Table 9

## Copulation and fertility results in rats

Exp. No. 2283(115-026)

Dose level	0 mg/kg	6 mg/kg	30 mg/kg	150 mg/kg
No. of pairs mated	12	12	12	12
No. of pairs copulated	12	12	12	12
No. of pregnant females	11	12	12	12
Copulation index (%) a)	100	100	100	100
Fertility index (%) b)	91.7	100	100	100
Estrus cycle (days) (Mean±S.D.)	4.3±0.5	4.4±0.4	4.8±0.6	4.3±0.5

a) : (Number of animals with successful copulation / number of animals mated) x 100

b) : (Number of pregnant animals / number of animals with successful copulation) x 100

Dose level	0 mg/kg	6 mg/kg	30 mg/kg	150 mg/kg
No. of dams observed	11	12	12	10
No. of dams delivered live pups	11	12	12	10
Duration of gestation (Mean±S.D.)	22.5±0.5	22.8±0.5	22.9±0.3	22.9±0.3
No. of total corpora lutea (Mean±S.D.)	222(20.2±5.1)	238(19.8±3.7)	228(19.0±5.3)	178(17.8±4.0)
No. of total implants (Mean±S.D.)	191(17.4±1.7)N	199(16.6±1.6)	198(16.5±1.2)	138(13.8±3.4) **
No. of total pups born (Mean±S.D.)	166(15.1±2.0)	192(16.0±1.8)	176(14.7±1.9)	124(12.4±3.1)
No. of total live pups born (Mean±S.D.)	164(14.9±1.8)	187(15.6±1.4)	167(13.9±2.3)	122(12.2±3.0)
Male	72( 6.5±1.2)N	86( 7.2±1.6)	92( 7.7±2.7) f)	57( 6.3±1.0) (9) f)
Female	92( 8.4±2.1)	101( 8.4±1.8) f)	75( 6.3±2.7) f)	59( 6.6±1.8) (9) f)
Sex ratio (Mean±S.D.)	0.84±0.30N	0.92±0.37	1.56±1.00	1.04±0.35 (9)
No. of total live pups on day 4 (Mean±S.D.)				
Male	68( 6.2±1.3)	79( 6.6±2.3)	85( 7.1±3.2)	41( 4.6±2.8) (9)
Female	88( 8.0±2.4)	88( 7.3±2.1)	64( 5.3±3.0)	39( 4.3±3.2) (9)
No. of total dead pups born (Mean±S.D.)	2( 0.2±0.6)N	5( 0.4±1.0)	9( 0.8±2.3)	2( 0.2±0.4)
Gestation index (%) a)	100	100	100	100
Implantation index (% Mean±S.D.) b)	88.9±13.3	85.4±12.7	90.3±14.7	80.6±23.8
Delivery index (% Mean±S.D.) c)	87.1± 9.7	96.5± 4.7	88.9±10.1	90.5± 8.9
Live birth index (% Mean±S.D.) d)	99.0± 3.3N	97.7± 5.5	95.5±13.6	98.5± 3.1
Viability index on day 4 (% Mean±S.D.) e)				
Male	95.5±15.1N	91.1±23.9	89.2±28.4	71.4±42.9 (9)
Female	95.5±15.1N	88.2±19.8	85.8±30.9	69.7±44.0 (9)

a) : (Number of females with live pups / number of pregnant females) x 100

b) : (Number of implants / number of corpora lutea) x 100

c) : (Number of pups born / number of implants) x 100

d) : (Number of live pups born / number of pups born) x 100

e) : (Number of live pups on day 4 after birth / number of live pups born) x 100

f) : Includes live pups died before observations

Values in parentheses are expressed number of litters observed

Significantly different from control group; \*\*: P<0.01

N : Non parametric analysis

Table 11

Body weight change of pups(F1) from rats

Exp. No. 2283(115-026)

Unit : g

Dose level	0 mg/kg	6 mg/kg	30 mg/kg	150 mg/kg
No. of litters	11	12	12	9
Male				
Days after birth	0	6.3 ± 0.5	6.5 ± 0.5 (11)	6.7 ± 0.9
	4	9.1 ± 1.5	8.2 ± 1.6	9.2 ± 1.7 (11)
				9.3 ± 2.1 (7)
Female				
Days after birth	0	6.2 ± 0.5	5.9 ± 0.6	6.1 ± 0.5
	4	8.8 ± 1.3	7.7 ± 1.7	9.0 ± 1.6 (11)
				8.5 ± 2.1 (7)

Values are expressed as Mean±S.D.

Values in parentheses are expressed number of litters measured

Table 12-1 Summary of gross findings of pups(F1) from rats(sacrificed)

Exp. No. 2283(115-026)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0	6	30	150		
No. of pups necropsied	68	79	85	41		
Organ----- Findings-----						
HEMATOPOIETIC SYSTEM						
thymus	thymic remnant in the neck	1	0	0	0	0
DIGESTIVE SYSTEM						
liver	white patch/zone	0	0	1	0	0
URINARY SYSTEM						
kidney	dilated pelvis	1	0	0	0	0

Table 12-2 Summary of gross findings of pups(F1) from rats(sacrificed)

Exp. No. 2283(115-026)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0	6	30	150	
No. of pups necropsied	88	88	64	39	
Organ----- Findings-----					
<b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>					
thymus	thymic remnant in the neck	1	0	0	0
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>					
liver	white patch/zone	0	1	0	0
	pale	0	0	1	0
<b>URINARY SYSTEM</b>					
kidney	dilated pelvis	1	0	0	0