

ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)

[トリス(2-エチルヘキシル)1,2,4-ベンゼントリカルボン酸]

(CAS No. 3319311)

試験番号 : SR - 9645

試験名 : トリス(2-エチルヘキシル)-1,2,4-ベンゼントリカルボン酸エステル
のラットにおける簡易生殖毒性試験

株式会社 化合物安全性研究所

目 次

| | 頁 |
|---------|----|
| 表題・試験番号 | |
| 要 約 | 6 |
| 緒 言 | 7 |
| 材料および方法 | 7 |
| 成 績 | 16 |
| 考 察 | 20 |
| 参 考 文 献 | 22 |

Figures 添付

1. Body weight changes of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
2. Food consumption of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
3. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
4. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
5. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
6. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
7. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
8. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
9. Body weight changes of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test of TOT in rats (SR-9645)

Tables 添付

1. Experimental design for the preliminary reproduction toxicity screening test of TOT in rats (SR-9645)
2. General appearance of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
3. Body weight changes of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
4. Food consumption of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
5. Absolute and relative organ weights of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
6. Gross pathological findings of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
7. Histopathological findings of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
8. General appearance of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
9. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
10. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
11. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
12. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
13. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
14. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

15. Absolute and relative organ weights of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
16. Gross pathological findings of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
17. Histopathological findings of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
18. Influence of TOT on reproductive ability in the preliminary reproduction toxicity screening test in rats (SR-9645)
19. Influence of TOT on delivery and maternal behavior in the preliminary reproduction toxicity screening test in rats (SR-9645)
20. Gross pathological findings of dead pups at birth in the preliminary reproduction toxicity screening test of TOT in rats (SR-9645)
21. Influence of TOT on viability of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test in rats (SR-9645)
22. General appearance of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test of TOT in rats (SR-9645)
23. Body weight changes of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test of TOT in rats (SR-9645)
24. Gross pathological findings of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test of TOT in rats (SR-9645)
25. Number of cells in seminiferous tubules of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

表 題 トリス(2-エチルヘキシル)-1,2,4-ベンゼントリカルボン酸エステルラットのラットにおける
簡易生殖毒性試験

試験番号 SR-9645

試験施設 株式会社化合物安全性研究所
北海道札幌市豊平区真栄 363 番 24

要 約

トリス(2-エチルヘキシル)-1,2,4-ベンゼントリカルボン酸エステル (CAS No.3319-31-1) の 100、300 および 1000 mg/kg/day を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 46 日間、雌ラットに対しては交配前、交配および妊娠期間、ならびに哺育 3 日までの期間、経口反復投与し、雌雄動物への反復投与による影響、雌雄動物の生殖および次世代の発生に及ぼす影響についてスクリーニング試験を実施し、以下の知見が得られた。

1. 雌雄動物の反復投与毒性

1)雄動物について

(1)精巣の病理組織学的検査で 300 mg/kg 群の 2 例およびの 1000 mg/kg 群の 12 例全例に精母細胞および精子細胞の減少が認められ、1000 mg/kg 群の 1 例ではさらに、多核巨細胞、セルトリ細胞の空胞化が認められた。

(2)一般状態、体重推移、摂餌量、剖検、精巣および精巣上体の重量にはトリス(2-エチルヘキシル)-1,2,4-ベンゼントリカルボン酸エステル投与による影響は認められなかった。

2)雌動物について

一般状態、体重推移、摂餌量、剖検、卵巣の重量および病理組織学的検査にトリス(2-エチルヘキシル)-1,2,4-ベンゼントリカルボン酸エステル投与による影響は認められなかった。

以上のことから、本スクリーニング試験におけるトリス(2-エチルヘキシル)-1,2,4-ベンゼントリカルボン酸エステルの反復投与による無影響量 (NOEL) は、300 および 1000 mg/kg 群で雄動物の精巣の病理組織学的検査で精母細胞および精子細胞の減少が認められ、雌ではいずれの群にも影響は認められなかったことから、雄動物で 100 mg/kg/day、雌動物で 1000 mg/kg/day であると判断された。

2. 雌雄動物の生殖毒性および次世代の発生毒性

(1)前述の雄動物の精巣の病理組織学的変化を除いて、生殖能検査、親動物の生殖器の重量、雌動物の生殖器の病理組織学的検査、分娩観察および母性行動観察に、トリス(2-エチルヘキシル)-1,2,4-ベンゼントリカルボン酸エステル投与による影響は認められなかった。

(2)新生児の生存率、一般状態、体重推移および剖検では、トリス(2-エチルヘキシル)-1,2,4-ベンゼントリカルボン酸エステル投与による影響は認められなかった。

(3)以上より、300 および 1000 mg/kg 群で雄動物の生殖器の病理組織学的検査で精巣に精母細胞および精子細胞の減少が認められたことから、本スクリーニング試験におけるトリス(2-エチルヘキシル)-1,2,4-ベンゼントリカルボン酸エステルの親世代の生殖に対する無影響量 (NOEL) は雄動物で 100 mg/kg/day、雌動物で 1000 mg/kg/day、次世代の発生に対する無影響量 (NOEL) は 1000 mg/kg/day であると判断された。

緒 言

トリス(2-エチルヘキシル)-1,2,4-ベンゼントリカルボン酸エステル (CAS No.3319-31-1) はトリメリット酸系の可塑剤である。今回、OECD 既存化学物質の点検事業の一環として、トリス(2-エチルヘキシル)-1,2,4-ベンゼントリカルボン酸エステルを雄ラットに対しては交配前、交配期間および交配後の計 46 日間、雌ラットに対しては交配前、交配および妊娠期間、ならびに哺育 3 日までの期間、経口反復投与し、雌雄動物への反復投与による影響、雌雄動物の生殖および次世代の発生に及ぼす影響についてスクリーニング試験を実施したので、報告する。

なお、本試験は「OECD 優良試験所指針 C (81) 30 最終別添 2」に従い、試験方法は OECD テストガイドラインおよび OECD 提案ガイドライン (Preliminary Reproduction Toxicity Screening test) に準拠した。

材料および方法

1. 被験物質

被験物質は、 から提供された トリス(2-エチルヘキシル)-1,2,4-ベンゼントリカルボン酸エステル (CAS No.3319-31-1、Tris(ethylhexyl)-1,2,4-benzenetricarboxylate、以下 TOT と略す。Lot 番号： 純度：99.0%) で、淡黄色透明液体である。TOT は気密容器に入れ、遮光、室温で保管した (参考資料、製品安全データシート、品質検査報告書、Appendix 1、2、3)。なお、投与終了後の TOT の純度を製造業者が分析し、TOT は投与期間中安定であったことが確認された (返却物質の試験結果報告、Appendix 4)。

2. 投与量の設定

投与量は、用量設定試験（SR-9644）の結果を参考に設定した。用量設定試験では各5例の雌雄ラットにトウモロコシ油を溶媒として100、300および1000 mg/kg/dayを14日間反復投与した結果、雌の100および1000 mg/kg群で摂餌量の低値傾向、雌の1000 mg/kg群で体重の低値傾向がみられた。したがって、最高用量は親動物に対して毒性を与えるが死亡させない量として、用量設定試験と同じ1000 mg/kg/dayとし、以下、同じく公比約3で、300および100 mg/kg群を設定した。さらに媒体であるトウモロコシ油を投与する対照群を設け、計4群とし、動物数は1群当たり雌雄各12匹とした（Table 1）。

3. 被験物質の調製方法

被験物質（TOT）の調製は、調製液の2および200 mg/ml濃度の室温下での7日間の安定性が確認された（報告書 No.化安-NC-002、Appendix 5）ことから7日間に1回以上とし、以下の方法で調製した。TOTを精秤し、20、60および200 mg/mlの濃度となるようにトウモロコシ油（Lot No.7662、8647、1672、2668、1726、片山化学工業株式会社）に溶解した。調製液は遮光気密容器に入れ、使用時まで室温保存した。この調製方法によるTOT調製液は規定の濃度であることがエヌシー技研株式会社により確認された（報告書 No.化安-NC-002、Appendix 5）。

4. 試験動物

生後8週齢のC_{rl}:CD（SD）系のSPFラット（雄：55匹、体重範囲266～309g、雌：55匹、体重範囲172～201g）を日本チャールス・リバー株式会社から受け入れ、14日間の馴化飼育を行った。検疫並びに馴化期間中、一般状態観察を1日1回、体重測定を期間中3回（馴化1、8および14日）実施した。順調な発育を示した動物を試験に用いた。なお、雌については10日間の性周期検査を行い、前述の一般状態および体重に加え、性周期にも異常の認められない動物を用いた。

5. 飼育環境条件

動物は、温度 22～24℃、湿度 RH46～61%、換気回数 10～15 回/時間および照明時間 12 時間（午前 8 時から午後 8 時まで点灯）に設定されたバリアシステムの飼育室（305 号室）において、ブラケット式金属製金網床ケージ（260W×380D×180H,mm）を用いて飼育した。ただし、妊娠 17 日から金属網床のかわりに実験動物用床敷（ホワイトフレック、日本チャールス・リバー株式会社）を敷いたステンレス製受皿を使用した。ケージ当たりの収容匹数は、群分け前は 2 匹以内、群分け後は 1 匹、交配中は雌雄各 1 匹、妊娠期間中は 1 母動物、哺育期間中は 1 腹とした。ケージの交換は 2 週に 1 回の頻度で行った。

飼育室内の清掃および床の清拭消毒は 1 日 1 回行った。なお、消毒には塩素系消毒薬（ヤクラックス、ヤクハン製薬株式会社）およびヨウ素系消毒薬（ダイヤザン、伊勢化学工業株式会社）を 1 週間単位で交互に使用した。

飼料は固型飼料（CRF-1、オリエンタル酵母工業株式会社）を金属製給餌器を用いて、飲料水は水道水（札幌市水道水）を自動給水装置を用いて、それぞれ自由に摂取させた。給餌器の交換は 2 週に 1 回、自動給水装置の水抜きは週 1 回の頻度で実施した。

飼料の分析および検査は財団法人日本食品分析センター（分析試験成績書：第 49081554-001 号、第 49091694-001 号、第 49101423-001 号、Appendix 6、7、8）およびオリエンタル酵母工業株式会社（微生物検査報告書：No.96G01-009、No.96G01-010、No.96G01-011 の全 3 頁の 3、Appendix 9、10、11）で実施し、各混入物質について当社 SOP の許容範囲内であることを確認した。飲料水の水質検査は日本衛生株式会社（水質検査結果表：No.082223、082694、Appendix 12、13）で実施し、当社 SOP の水質基準の範囲内であることを確認した。

6. 群分けおよび個体識別

群分けは馴化 14 日に、馴化 14 日の体重値をもとに各群の体重が均一になるように体重別層化無作為抽出法を用いて行った。

動物の識別は、受け入れ時に油性フェルトペンを用いて尾部にケージ内識別を行い、群分け時に入墨により動物番号の上 1 桁（群識別）を右耳に、下 2 桁（個体識別）を左耳に記入して行った。ケージには性別毎に色分けしたカードに試験番号、試験群および動物番号を明記して標示した。出生児については油性フェルトペンを用いて背部に雄は青色、雌は紫色で動物番号を記し、ケージ内識別を行った。

7. 投与方法

投与経路は、TOT が人体に経口的に曝露される可能性があることから、経口投与とした。投与は胃ゾンデを用いて強制的に胃内に行った。

投与期間は、雄については交配前 14 日間および交尾成立までの交配期間、さらに交尾成立例については投与 46 日まで、交尾不成立例については交配期間終了まで、雌については交配前 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 日までの期間とした。

投与時刻は、午前 9 時から午後 1 時の間とした。

投与容量は、体重 1 kg 当たり 5 ml として投与日に最も近い日に測定した体重に基づいて算出した。なお、体重測定当日の投与容量はその日の体重に基づいて算出した。

投与は 10 週齢から開始し、投与開始時の平均体重（体重範囲）は雄で 401.2 g（373～435 g）、雌で 237.4 g（217～257 g）であった。

8. 観察、測定および検査項目

(1) 反復投与毒性

1) 雄動物について

①一般状態観察

全例について、投与期間中 1 日 1 回以上の頻度で、視診および触診により行動、外観などを観察した。発現した症状についてはその種類を記録した。

②体重測定

全例について、投与 1 日（投与開始日の投与前）、投与 2、5、7、10、14 日、その後は 7 日毎（投与終了日および剖検日を含む）に電子天秤を用いて測定した。また、体重増加量 [投与 46 日体重－投与 1 日体重] および体重増加率 [（体重増加量／投与 1 日体重）×100] を算出した。

③摂餌量測定

全例について、投与 1 日（投与開始日の投与前）、投与 2、5、7、10、14 日、その後は交配期間を除き体重測定日と同じ日（投与終了日を含む）に電子天秤を用いて測定した。ケージ毎にセットし、翌日に残量を測定し、1 匹当たりの 1 日分の摂餌量を算出した。

④剖検および器官重量測定

交尾成立例は投与 46 日の翌日に、交尾不成立例は交配期間終了の翌日にエーテル麻酔下で放血致死させ、全身の器官および組織を肉眼的に観察した。

また、全例について、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳（大脳・小脳）、下垂体、副腎、甲状腺、上皮小体、胸腺、腸間膜リンパ節、膵臓、舌、下顎リンパ節、顎下腺、舌下腺、耳下腺、乳腺、皮膚、胸骨および大腿骨（骨髄を含む）、脊髄（頸部）、骨格筋（外側広筋）、胸部大動脈、喉頭、気管、気管支、食道、胃（前胃・腺胃）、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、精囊（凝固腺を含む）および前立腺を 10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。また、眼球およびハーダー腺の固定・保存にはデビッドソン液を、精巣および精巣上体の固定にはブアン液を、保存には 70%エタノールを使用した。

摘出器官のうち、固定前の精巣および精巣上体（左右）の重量を電子天秤を用いて測定し、器官体重重量比〔（器官重量／動物体重）×100〕を算出した。

⑤病理組織学的検査

摘出器官のうち、全例の精巣および精巣上体について、パラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本作製した。さらに、精巣のセルトリ細胞を確認するため、ストレプトアビジン・ビメンチン法を用いた免疫酵素抗体染色標本作製し、病理組織学的検査を行った。また、Matsui et al. の方法¹⁾に従い、精細管上皮の減少傾向がみられた例を優先して各群 5 例を選び、精子形成サイクルの 14 ステージのうち、I～VI（Group 1）、VII～VIII（Group 2）、IX～XI（Group 3）、X II～X IV（Group 4）について各グループに属する精細管を 5 本ずつ任意に選択して、精上皮細胞数をカウントし、各グループ毎に 1 精細管あたりの生殖細胞（精子細胞および精母細胞）のセルトリ細胞比（生殖細胞数／セルトリ細胞数）を算出した。

2) 雌動物について

①一般状態観察

全例について、投与期間中1日1回以上の頻度で、視診および触診により行動、外観などを観察した。発現した症状についてはその種類を記録した。

②体重測定

全例について、投与1日（投与開始日の投与前）、投与2、5、7、10、14日、妊娠0、1、3、5、7、10、14、17、20日、哺育0、1および4日に、また、交配期間中（雄と同居中の場合）は相手雄の測定日と同じ日に電子天秤を用いて測定した。体重増加量〔（投与14日体重－投与1日体重）、（妊娠20日体重－妊娠0日体重）および（哺育4日体重－哺育0日体重）〕、およびそれぞれの期間の体重増加量に対応した体重増加率〔（体重増加量／投与1日体重）×100、（体重増加量／妊娠0日体重）×100 および（体重増加量／哺育0日体重）×100〕を算出した。

③摂餌量測定

全例について、投与1日（投与開始日の投与前）、投与2、5、7、10、14日、妊娠1、3、5、7、10、14、17、20日、哺育1および4日に電子天秤を用いて測定した。ケージ毎にセットし、翌日に残量を測定し、1匹当たりの1日分の摂餌量を算出した。

④剖検および器官重量測定

交尾成立例は哺育4日に、妊娠25日まで分娩の認められない例は妊娠26日に、全哺育児死亡例は発見後直ちにエーテル麻酔下で放血致死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。また、子宮の着床痕および卵巣の妊娠黄体を計数した。

また、全例について、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳（大脳・小脳）、下垂体、副腎、甲状腺、上皮小体、胸腺、腸間膜リンパ節、膵臓、舌、下顎リンパ節、顎下腺、舌下腺、耳下腺、乳腺、皮膚、胸骨および大腿骨（骨髄を含む）、脊椎（頸部）、骨格筋（外側広筋）、胸部大動脈、喉頭、気管、気管支、食道、胃（前胃・腺胃）、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、卵巣、子宮および膣を10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。また、眼球およびハ

ーダー腺はデビッドソン液で固定・保存した。

摘出器官のうち、卵巣（左右）の重量を電子天秤を用いて測定し、器官体重重量比 $[(\text{器官重量} / \text{動物体重}) \times 100]$ を算出した。

⑤病理組織学的検査

摘出器官のうち、全例の卵巣について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、病理組織学的検査を行った。

(2) 雌雄動物の生殖および次世代の発生について

①性周期検査

雌全例について、投与前 10 日から交尾成立までの連日、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（発情前期、発情期前期、発情期後期、発情後期および発情休止期）の判定を行い、性周期の異常の有無を検索した。

②生殖能検査

投与 14 日に同試験群内の雌雄を夕方から 1 対 1（無作為組み合わせ）で最長 14 日間同居させた。交尾の成立は雌の膣垢中に精子が確認された場合とし、交尾成立日を妊娠 0 日とした。妊娠の成立は雌の子宮に着床痕が確認された場合とした。交尾率 $[(\text{交尾が成立した雌ラット数} / \text{同居ラット数}) \times 100]$ および受胎率 $[(\text{受胎した雌ラット数} / \text{交尾が成立した雌ラット数}) \times 100]$ を算出した。

③分娩および母性行動観察

交尾した雌全例について、妊娠 21 日から分娩終了日まで毎朝 9 時に分娩状態、母性行動、総出産児数、生存児数および死亡児数、出産児の性別および外表を観察した。また、着床率 $[(\text{着床痕数} / \text{妊娠黄体数}) \times 100]$ 、出産率 $[(\text{生児を出産した雌ラット数} / \text{妊娠雌ラット数}) \times 100]$ 、分娩率 $[(\text{総出産児数} / \text{着床痕数}) \times 100]$ 、出生率 $[(\text{出産確認時生存児数} / \text{総出産児数}) \times 100]$ 、哺育 4 日時哺育率 $[(\text{哺育児の認められる雌ラット数} / \text{正常に分娩した雌ラット数}) \times 100]$ 、性比 $[\text{雄生存児数} / \text{雌生存児数}]$ および妊娠期間 $[\text{妊娠 0 日から哺育 0 日} (\text{分娩終了日}) \text{までの日数}]$ を算出した。

④新生児の一般状態観察および生存率

全例について、分娩終了日から剖検日（哺育4日）まで1日1回、生存および死亡を確認し、一般状態および外表について観察した。なお、哺育日数は分娩終了日を哺育0日として起算した。また、新生児生存率〔（哺育4日生存児数／出産確認時生存児数）×100〕を1腹を単位として算出した。ただし、喰殺を受け死亡あるいは不明例となった新生児は死亡例として扱った。

⑤新生児の体重測定

全例について、哺育0、1および4日に電子天秤を用いて測定した。なお、体重値は雌雄別に1腹を単位とした平均値で示した。また、体重増加量〔哺育4日体重－哺育0日体重〕および体重増加率〔（体重増加量／哺育0日）×100〕を算出した。

⑥新生児の剖検

新生児は哺育4日に体外表（口腔内を含む）を観察し、二酸化炭素吸入法を用いて安楽致死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。異常所見の認められた例については、whole bodyを10%中性緩衝ホルマリン液で固定・保存した。なお、死亡例は発見後直ちに剖検し、whole bodyを10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。

9. 統計処理

体重、体重増加量および体重増加率、摂餌量、器官重量、器官体重重量比、精巣における精細管上皮の細胞数および生殖細胞（精子細胞および精母細胞）のセルトリ細胞比（生殖細胞数／セルトリ細胞数）、妊娠黄体数、着床痕数、着床率、総出産児数、出産確認時生存児数、分娩率、出生率、性比、出産確認時死亡児数、妊娠期間、哺育4日生存児数および新生児生存率については、Bartlettの検定法を用いて分散を検定し、その結果、等分散（ $p > 0.05$ ）を示した項目については一元配置分散分析法で解析し、有意な場合（ $p \leq 0.10$ ）、Dunnettの検定法（各試料の大きさが違う場合は有効反復数を用いた）で対照群とTOT投与群との比較を行った。一方、不等分散（ $p \leq 0.05$ ）を示した項目および病理組織学的検査の所見例数についてはKruskal-Wallis法を用いて解析し、有意な場合（ $p \leq 0.10$ ）、Mann-WhitneyのU-検定法で対照群とTOT投与群との比較を行った。なお、分娩および母性行動観察結果、新生児の生存率および体重については、1腹を単位として検定を行った。

性周期、交尾率、受胎率、出産率、および哺育率については次の流れで検定を行った。すなわち、多試料 χ^2 -検定を行い、その結果、有意な場合（ $p \leq 0.10$ ）は2試料 χ^2 -検定を行った。ただし、2試料 χ^2 -検定あるいは多試料 χ^2 -検定に不適合の場合はFisherの直接確率検定法を用いた。

なお、対照群との検定については、危険率5%以下を統計学的に有意とした。

成 績

1. 反復投与毒性

(1) 雄動物

①一般状態観察

一般状態観察の成績を Table 2、INDIVIDUAL DATA 1-1~1-4 に示した。

いずれの群にも異常は認められなかった。

②体重推移

体重推移を Figure 1、Table 3、INDIVIDUAL DATA 2-1~2-4 に示した。

いずれの TOT 投与群にも対照群と比較して有意差は認められなかった。

③摂餌量

摂餌量の変化を Figure 2、Table 4、INDIVIDUAL DATA 3-1~3-4 に示した。

いずれの TOT 投与群にも対照群と比較して有意差は認められなかった。

④器官重量

器官重量および器官体重重量比の成績を Table 5、INDIVIDUAL DATA 4-1~4-4 に示した。

いずれの TOT 投与群にも、精巣および精巣上体の重量に対照群と比較して有意差は認められなかった。

⑤剖検

剖検の成績を Table 6、INDIVIDUAL DATA 5-1~5-4 に示した。

腎臓に腎盂の拡張が 300 mg/kg 群で 1 例に、嚢胞が 1000 mg/kg 群で 1 例に認められたが、いずれも自然発生でも認められる所見であり当社の背景データ (1987-1995 年 ; 腎盂の拡張、雄 : 0.0%、雌 : 0.9% ; 腎臓の嚢胞、雄 : 1.8%、雌 : 0.9%) でも散見されることから、TOT 投与によるものとは考えられなかった。

他に精巣上体に黄白色斑が 1000 mg/kg 群で 1 例に認められた。

⑥病理組織学的検査

病理組織学的検査の成績を Table 7、25、INDIVIDUAL DATA 6-1~6-4、25-1~25-4、26-1-1~26-4-4、Photo.H-1~H-3 に示した。

精巣では、精母細胞および精子細胞の軽度の減少が 300 mg/kg 群で 2 例、1000 mg/kg 群で 11 例、中等度の同所見が 1000 mg/kg 群で 1 例に認められた。中等度の精母細胞および精子細胞の減少が認められた 1000 mg/kg 群の 1 例では精細管内に多核巨細胞の軽度の出現およびセルトリ細胞の軽度の空胞化も認められ、精巣上体には管腔内に中等度の細胞残屑ならびに精子の中等度の減少が認められた。

また、剖検で精巣上体に黄白色斑が認められた 1000 mg/kg 群の 1 例では、精母細胞および精子細胞の軽度の減少の他に、精巣上体に軽度の精子肉芽腫が認められた。

他に精巣で精細管の軽度の萎縮が対照群の 2 例に認められ、これら 2 例では精巣上体管の内腔に軽度の細胞残屑、1 例で精巣上体管内精子の軽度の減少が認められた。

精巣の精上皮数を計数した結果、Group 1 (I から VI) では 300 mg/kg 群で精子細胞 (round および elongate) の低値、1000 mg/kg 群で精母細胞および精子細胞 (round および elongate) の低値が認められ、Group 2 (VII～VIII) では 1000 mg/kg 群で精子細胞 (round) および精子細胞 (round) のセルトリ細胞比の低値が認められた。Group 3 (IX～XI) では 1000 mg/kg 群で精子細胞 (elongate) および精子細胞の (elongate) のセルトリ細胞比の低値が認められ、Group 4 (XII～XIV) では 1000 mg/kg 群で精母細胞、精子細胞 (elongate) および精子細胞 (elongate) のセルトリ細胞比の低値が認められた。

(2) 雌動物

① 一般状態観察

一般状態観察の成績を Table 8、INDIVIDUAL DATA 7-1～9-4 に示した。

妊娠前期間、妊娠期間および哺育期間を通して、いずれの群にも異常は認められなかった。

② 体重推移

体重推移を Figure 3～5、Table 9～11、INDIVIDUAL DATA 10-1～12-4 に示した。

交配前期間、妊娠期間および哺育期間を通して、いずれの TOT 投与群にも対照群と比較して体重推移に有意差は認められなかった。

③ 摂餌量

摂餌量の変化を Figure 6～8、Table 12～14、INDIVIDUAL DATA 13-1～15-4 に示した。

妊娠 20 日に 1000 mg/kg 群で摂餌量の高値が認められた。

交配前期間および哺育期間では、いずれの TOT 投与群にも対照群と比較して有意差は認められなかった。

④ 器官重量

器官重量および器官体重重量比の成績を Table 15、INDIVIDUAL DATA 16-1～16-4 に示した。

いずれの TOT 投与群にも対照群と比較して卵巣の重量に有意差は認められなかった。

⑤剖検

剖検の成績を Table 16、INDIVIDUAL DATA 17-1～17-4 に示した。

頭頂骨の隆起が 100 mg/kg 群の交尾不成立の 1 例に、空腸の憩室が 300 mg/kg 群の 1 例に認められた。その他の例には異常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 17、INDIVIDUAL DATA 18-1～18-4、25-1～25-4 に示した。

黄体嚢胞が 300 mg/kg 群の 2 例に認められた。その他の例には異常は認められなかった。

2. 雌雄動物の生殖毒性および次世代の発生毒性

①生殖能検査

生殖能検査の成績を Table 18、INDIVIDUAL DATA 19-1-1～19-2-4 に示した。

いずれの群にも交尾成立までの日数、交尾率および受胎率に有意差は認められなかった。

性周期観察では、投与前期間と投与期間の性周期に TOT 投与との関連を示唆する変化は認められなかった。なお、発情休止期の継続が投与期間に 100 mg/kg 群の 1 例で認められ、同例は交尾不成立であった。他に、交尾不成立はみられなかったが、不妊例が対照群および 100 mg/kg 群で各 1 組に認められた。これらの交尾不成立例および不妊例の剖検ならびに病理組織学的検査では、いずれの例にも精巣、精巣上体および卵巣に異常は認められず、高用量の 1000 mg/kg 群では交尾不成立および不妊例は認められていないことから、TOT 投与との関連はないものと考えられた。

②分娩および母性行動観察

分娩および母性行動観察の成績を Table 19、20、INDIVIDUAL DATA 20-1-1～20-2 に示した。

妊娠黄体数、着床痕数、着床率、総出産児数、分娩率、出産確認時生存児数、出生率、出生児の性比、出産確認時死亡児数、妊娠期間、出産率および哺育 4 日時哺育率について、対照群と比較して有意差は認められなかった。なお、1000 mg/kg 群の出生児の性比が他の群と比較して低値であったが、対照群と比較して

有意差は認められなかった。

なお、分娩終了時に死亡児が対照群で雄 1 例および雌 4 例に、100 mg/kg 群で雄 2 例および雌 1 例に、300 mg/kg 群で雄 1 例に、1000 mg/kg 群で雌 1 例に認められたが、これらの例に剖検で異常は認められなかった。

③新生児の生存率

新生児の生存率の成績を Table 21、INDIVIDUAL DATA 21-1～21-4 に示した。

いずれの群にも、対照群と比較して有意差は認められなかった。

④新生児の一般状態観察

新生児の一般状態観察の成績を Table 22、INDIVIDUAL DATA 22-1～22-4 に示した。

いずれの例にも TOT 投与との関連を示唆する症状は認められなかった。

分娩終了時以降に死亡あるいは不明例が対照群および 100 mg/kg 群で雌各 1 例に、300 mg/kg 群および 1000 mg/kg 群でそれぞれ雌雄各 3 例に認められ、このうち 1000 mg/kg 群の雌 1 例の不明例に哺育 0 日に外傷が認められた。

他に生後 4 日までの生存例では、外表所見として無尾が 300 mg/kg 群の雌 1 例に、母動物の咬傷によると考えられる外傷が対照群の雌 1 例、1000 mg/kg 群の雄 2 例および雌 1 例に認められた。

⑤新生児の体重推移

新生児の体重推移を Figure 9、Table 23、INDIVIDUAL DATA 23-1～23-4 に示した。

300 mg/kg 群の雄で生後 4 日体重および生後 4 日までの体重増加量に低値が認められ、同群の雌で生後 1 および 4 日ならびに生後 4 日までの体重増加量に低値が認められた。

⑥新生児の剖検

新生児の剖検の成績を Table 24、INDIVIDUAL DATA 24-1～24-2-4 に示した。

生後 4 日の剖検では外表所見で認められた 300 mg/kg 群の雌 1 例の無尾ならびに対照群の雌 1 例、1000 mg/kg 群の雄 2 例および雌 1 例の外傷の他に異常は認められなかった。なお、死亡例では剖検で異常は認められなかった。

考 察

TOT の 100、300 および 1000 mg/kg/day を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 46 日間、雌ラットに対しては交配前、交配および妊娠期間、ならびに哺育 3 日までの期間、経口反復投与し、雌雄動物への反復投与による影響、雌雄動物の生殖および次世代の発生に及ぼす影響についてスクリーニング試験を実施した。

雄では、精巣の病理組織学的検査で 300 mg/kg 群で 2 例、1000 mg/kg 群で 12 例全例に精母細胞および精子細胞の減少が認められた。精子形成過程の細胞数の比較では精母細胞以降に細胞数の減少が認められ、TOT 投与により精母細胞および精子細胞に影響を及ぼしたと考えられた。精細胞に対する毒性を有する物質として知られる Adriamycin では、ラットに対して 1 週間に 1 回の頻度で 4 週間の投与により精巣重量の減少ならびに精祖細胞の減少が認められるが、生殖能に影響は認められない。しかし、9 週間の投与により精子数の減少および精子の運動性の低下がみられ、精細管内の精細胞が消失し、9 週間投与後の交配で相手雌に着床数および着床率の減少が認められる²⁾。また、本スクリーニング試験と同じく TOT の 100、300 および 1000 mg/kg/day を 28 日間経口反復投与した試験では精細胞に影響は認められていない³⁾。これらのことから、本スクリーニング試験において認められた精細胞への影響は 46 日間の反復投与によって投与期間の後半に発現したと考えられ、Adriamycin と同様、精子形成サイクルの初期に影響を及ぼすものであったことから、交配前 14 日間の投与では生殖能に対する影響はなかったものと推察された。

また、病理組織学的検査では 1000 mg/kg 群の 1 例のみではあるが精母細胞および精子細胞の中等度の減少ならびに多核巨細胞の出現に加えてセルトリ細胞の空胞化がみられ、セルトリ細胞に対する影響が認められた。したがって、他の 1000 mg/kg 群および 300 mg/kg 群の例では光学顕微鏡的にはセルトリ細胞の空胞化は認められないものの、TOT 投与によりセルトリ細胞の機能に影響を及ぼし、それに起因して二次的に精母細胞が影響を受けた可能性も考えられた。

精巣上体では 1000 mg/kg 群の 1 例で精子肉芽腫が認められたが、この所見は自然発生的にも認められ、TOT 投与によるものとは考えられなかった。なお、精巣および精巣上体の重量では TOT 投与による影響は認められなかった。

前述の他に、雌雄の一般状態、摂餌量、剖検および生殖器官の重量ならびに雌で卵

巢の病理組織学的検査においても TOT 投与による影響は認められなかった。

以上より、本スクリーニング試験における TOT 反復投与による無影響量 (NOEL) は、雄の 300 mg/kg 群および 1000 mg/kg 群で精巢の病理組織学的検査で精母細胞および精子細胞の減少が認められたことから 100 mg/kg/day、雌ではいずれの群にも影響は認められなかったことから 1000 mg/kg/day であると判断された。

一方、生殖能検査では交尾率および受胎率などに影響は認められず、300 mg/kg 群および 1000 mg/kg 群の全例で交尾および妊娠が成立した。このことから、前述のように 46 日間の投与で精細胞の減少がみられるものの、本試験における交配前 14 日間の投与では交配時には精巢上体内の精子に影響を及ぼさず、妊娠の成立ならびに着床数および着床率に影響を与えることはないものと考えられた。

なお、100 mg/kg 群で認められた交尾不成立例 1 組では生殖器に交尾不成立の原因を示唆する病理組織学的所見は認められず、発情休止期の継続により交尾不成立となったと考えられ、より高用量の 300 および 1000 mg/kg 群で性周期に異常は認められず、全例で交尾が成立していることから、100 mg/kg 群の交尾不成立例は TOT 投与との関連はないものと考えられた。

新生児の観察では、300 mg/kg 群で新生児の雌雄に体重の低値がみられた。同群の母動物では妊娠期間が 22 日の例が多く、また、1 例 (No.351) で新生児の生存率および体重増加に低値がみられたことによる有意差と考えられ、1000 mg/kg 群では低値は認められないことから、TOT 投与による影響とは考えられなかった。

以上より、雄の 300 mg/kg 群および 1000 mg/kg 群で精巢の病理組織学的検査で精母細胞および精子細胞の減少が認められたことから、本スクリーニング試験における TOT の親世代の生殖に対する無影響量 (NOEL) は雄動物で 100 mg/kg/day、雌動物で 1000 mg/kg/day、次世代の発生に対する無影響量 (NOEL) は 1000 mg/kg/day であると判断された。

参考文献

- 1) H. Matsui, T. Kazuhiro, T. Kawanishi, K. Mitsumori, M. Takahashi, K. Fukuhara and N. Miyata. Advantages of Simplified Quantitative Morphometry Using Stage Grouping Analysis of Spermatogenic Cycle for Evaluation of the Testicular Toxicity of Ethylene-1, 2-Dimethanesulfonate in Rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 9: 285~292, 1996.
- 2) Imahie, H., Adachi, T., Nakagawa Y., Nagasaki, T., Yamamura, T. and Hori M. Effects of Adriamycin, an Anticancer Drug Showing Testicular Toxicity, on Fertility in Male Rats. *J. Toxicol. Sci.*, 20: 183-193, 1995.
- 3) 化学物質点検推進連絡協議会, “化学物質毒性試験報告 Vol. 4,” 1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス (2-エチルヘキシル) エステルのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験, 1996, pp.701-711.

Figures

- Figure 1. Body weight changes of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
- Figure 2. Food consumption of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
- Figure 3. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
- Figure 4. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
- Figure 5. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
- Figure 6. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
- Figure 7. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
- Figure 8. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
- Figure 9. Body weight changes of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test of TOT in rats (SR-9645)

Tables

- Table 1. Experimental design for the preliminary reproduction toxicity screening test of TOT in rats (SR-9645)
- Table 2. General appearance of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
- Table 3. Body weight changes of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
- Table 4. Food consumption of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
- Table 5. Absolute and relative organ weights of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
- Table 6. Gross pathological findings of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
- Table 7. Histopathological findings of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

- Table 8. General appearance of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
- Table 9. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
- Table 10. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
- Table 11. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
- Table 12. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
- Table 13. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
- Table 14. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
- Table 15. Absolute and relative organ weights of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
- Table 16. Gross pathological findings of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
- Table 17. Histopathological findings of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)
- Table 18. Influence of TOT on reproductive ability in the preliminary reproduction toxicity screening test in rats (SR-9645)
- Table 19. Influence of TOT on delivery and maternal behavior in the preliminary reproduction toxicity screening test in rats (SR-9645)
- Table 20. Gross pathological findings of dead pups at birth in the preliminary reproduction toxicity screening test of TOT in rats (SR-9645)
- Table 21. Influence of TOT on viability of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test in rats (SR-9645)
- Table 22. General appearance of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test of TOT in rats (SR-9645)
- Table 23. Body weight changes of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test of TOT in rats (SR-9645)
- Table 24. Gross pathological findings of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test of TOT in rats (SR-9645)
- Table 25. Number of cells in seminiferous tubules of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

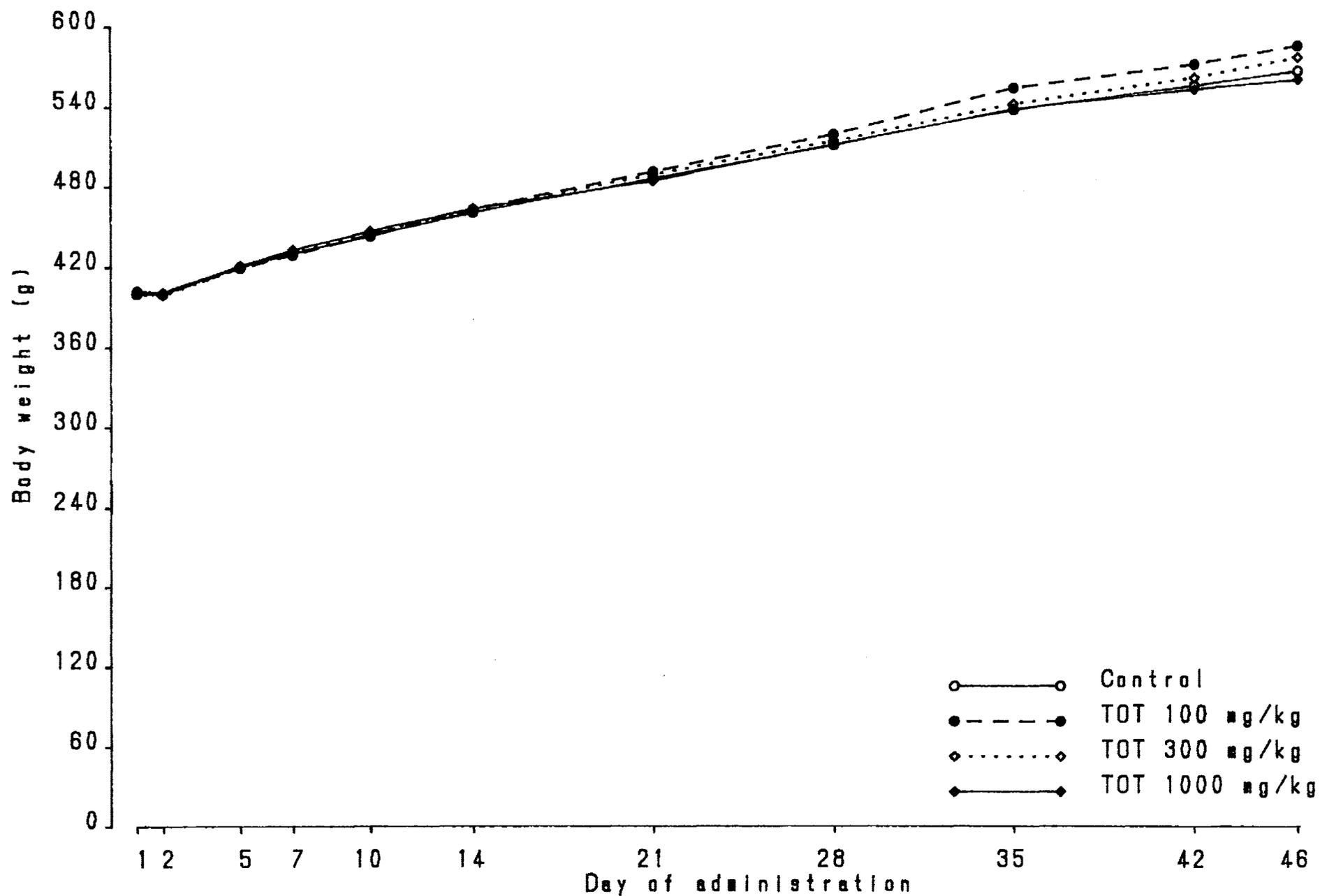


Figure 1. Body weight changes of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

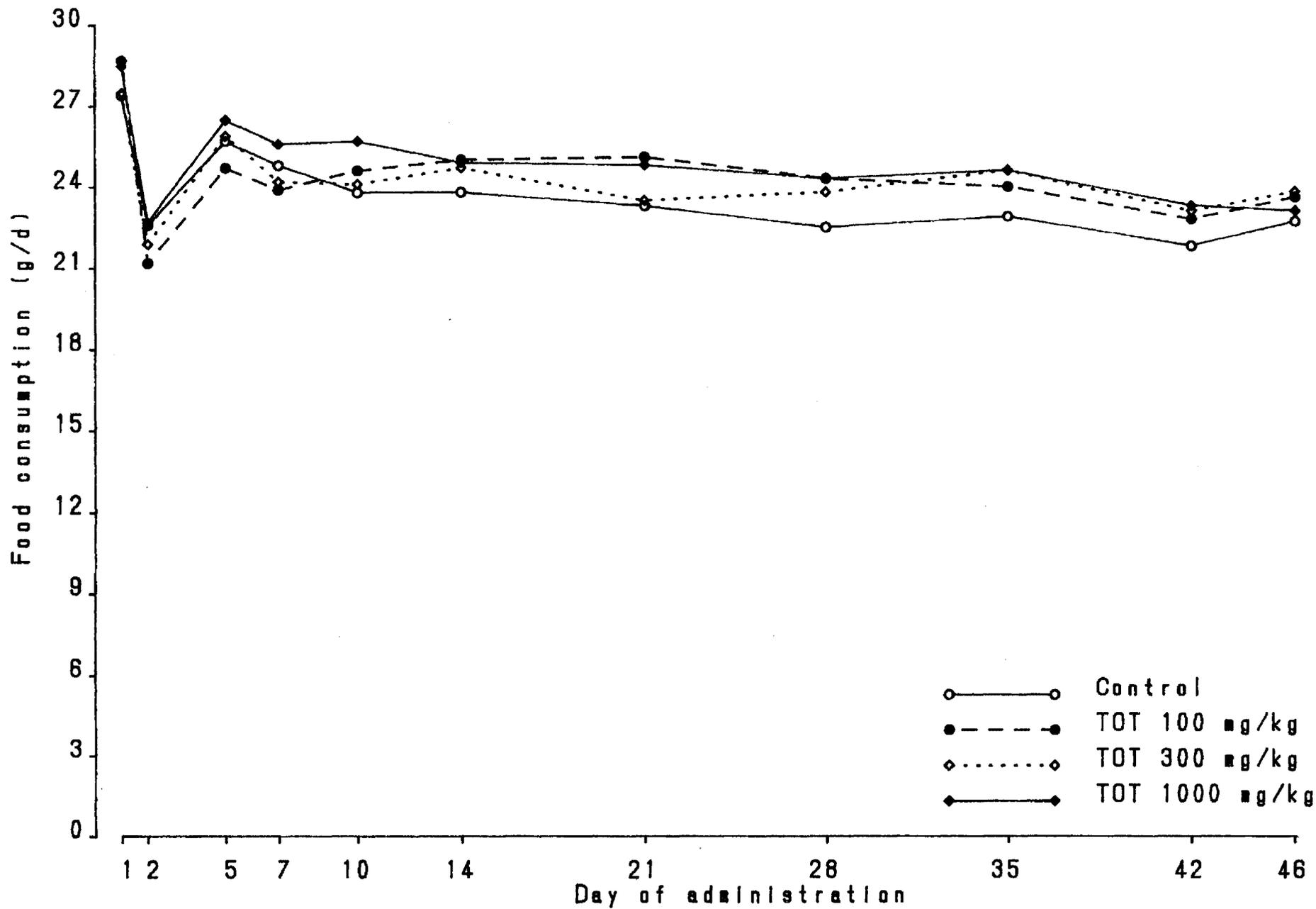


Figure 2. Food consumption of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

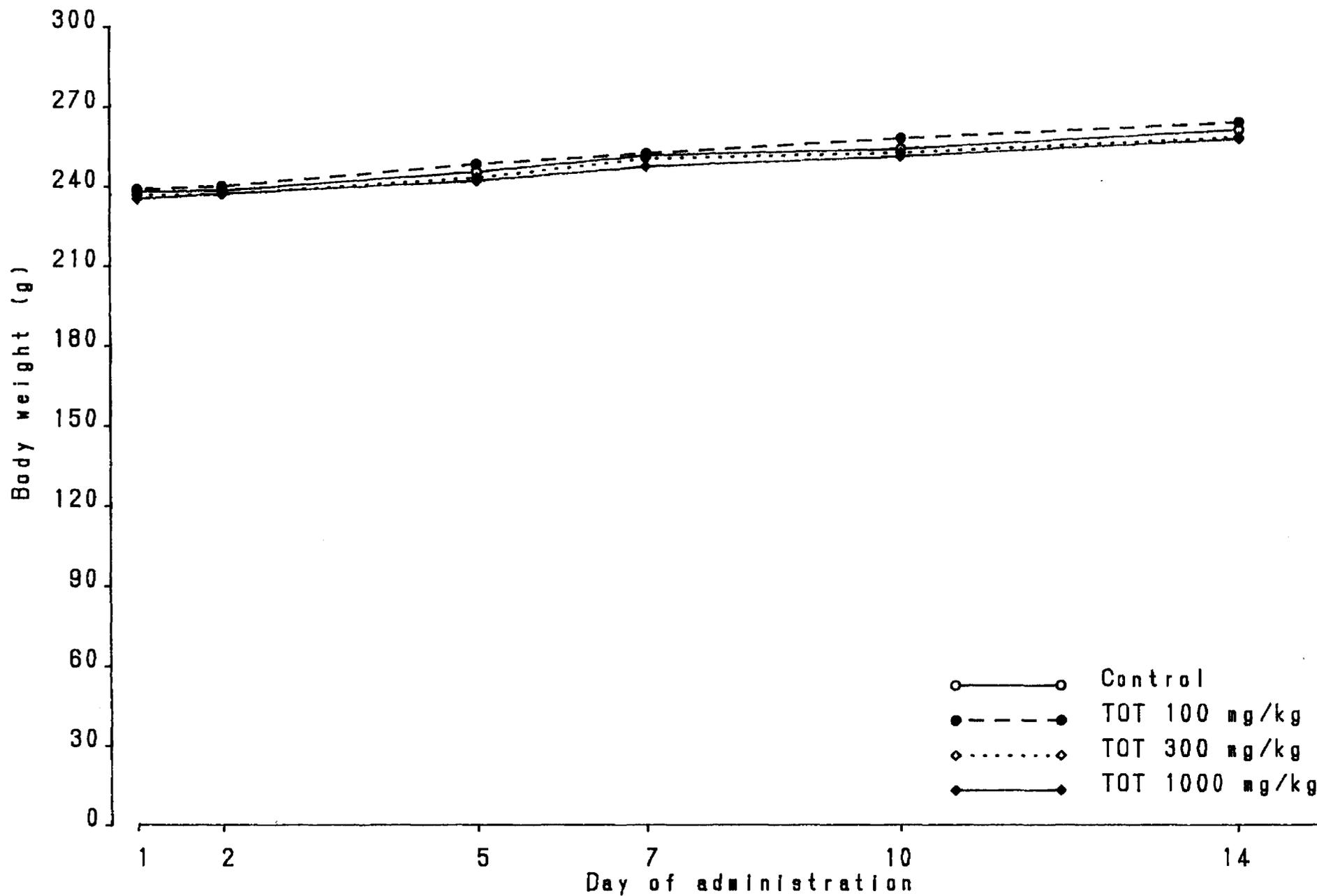


Figure 3. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

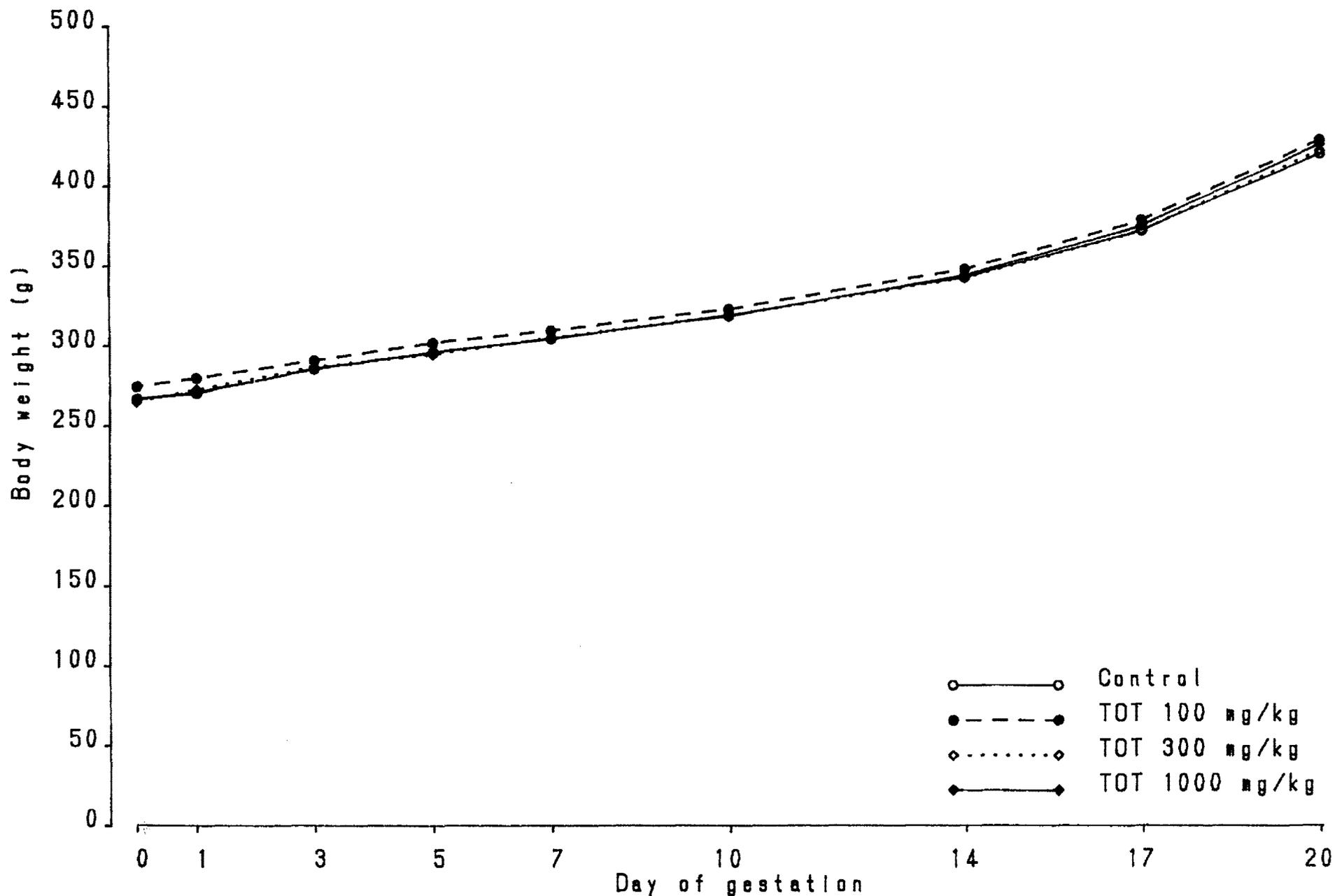


Figure 4. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

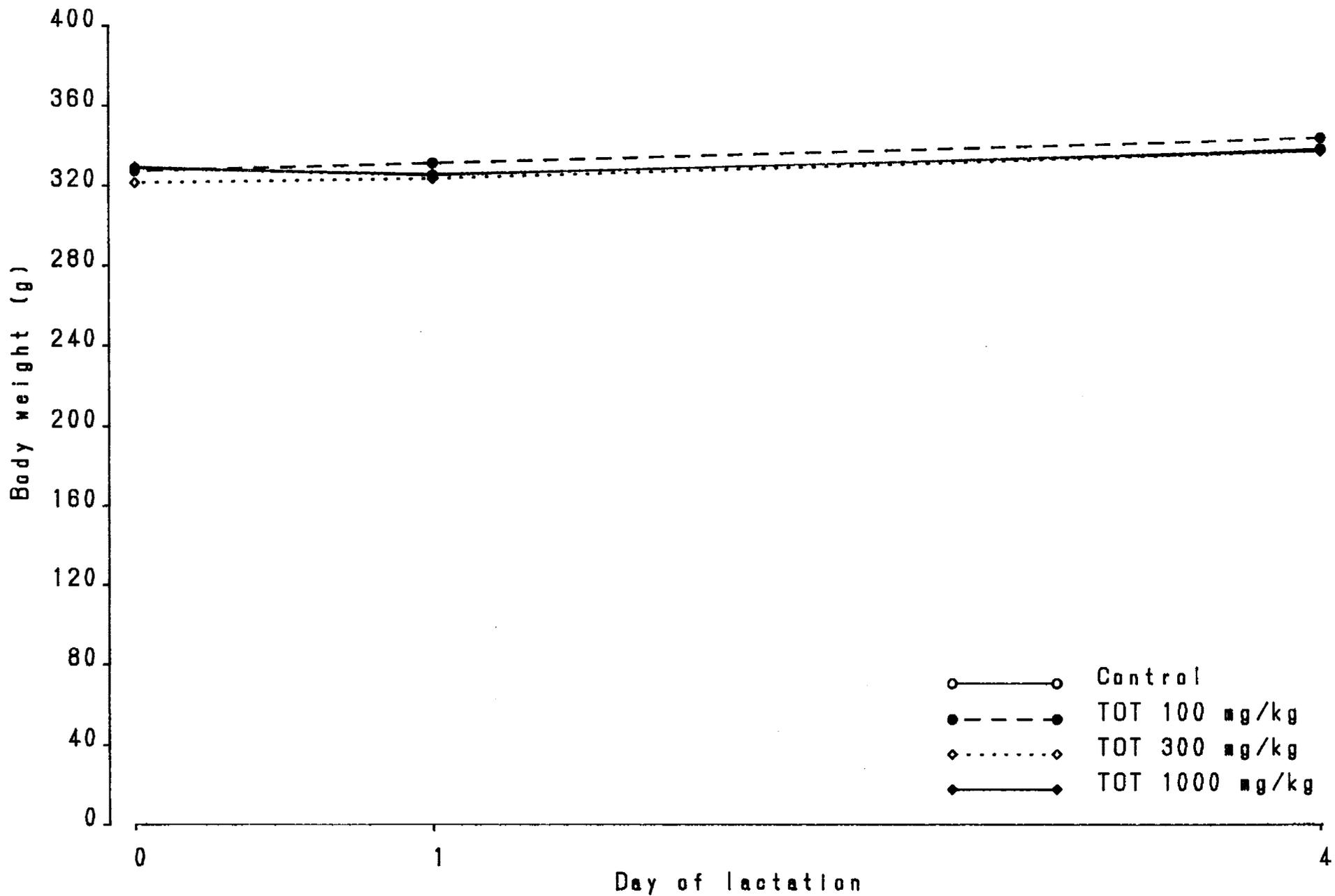


Figure 5. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

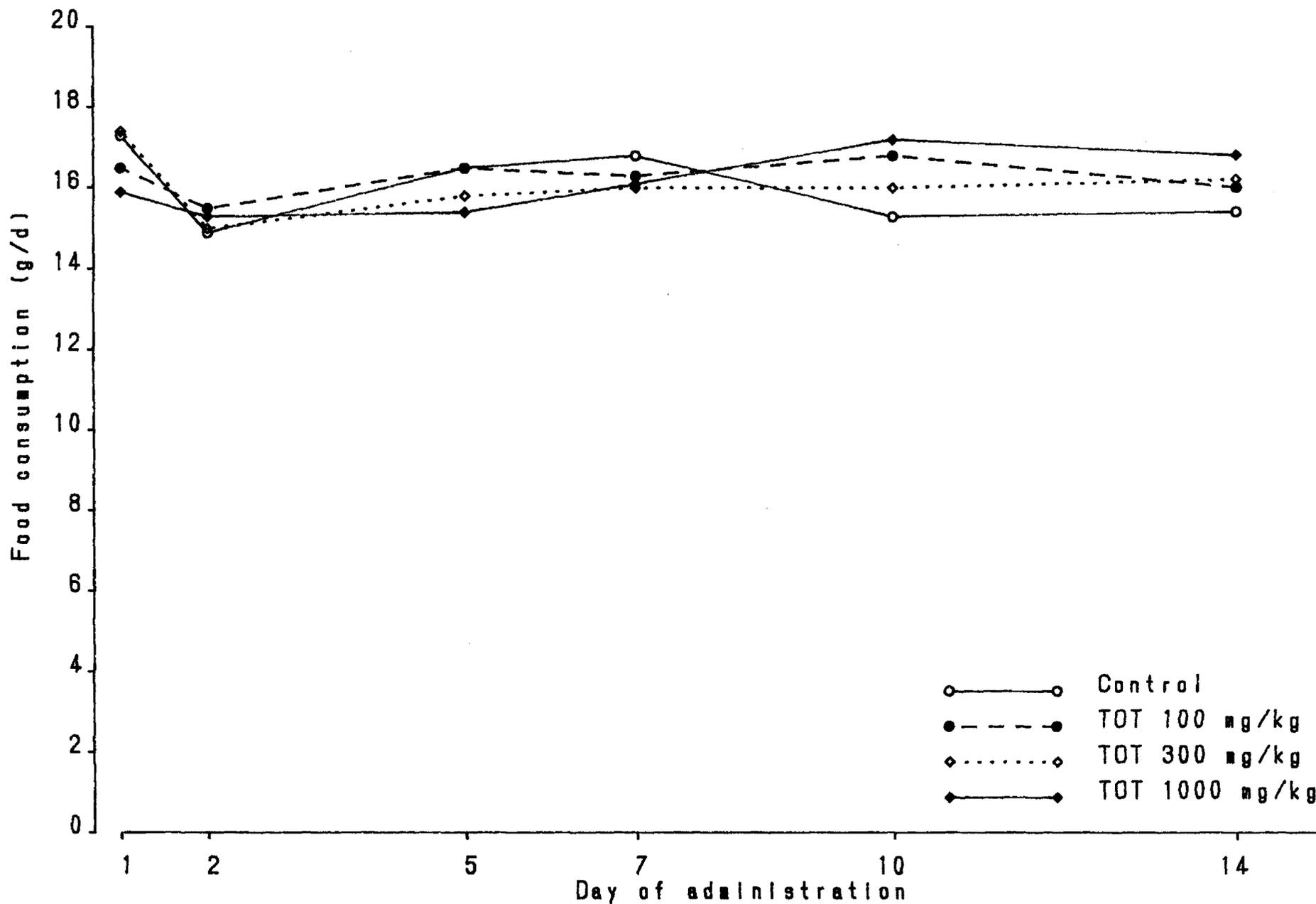


Figure 6. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

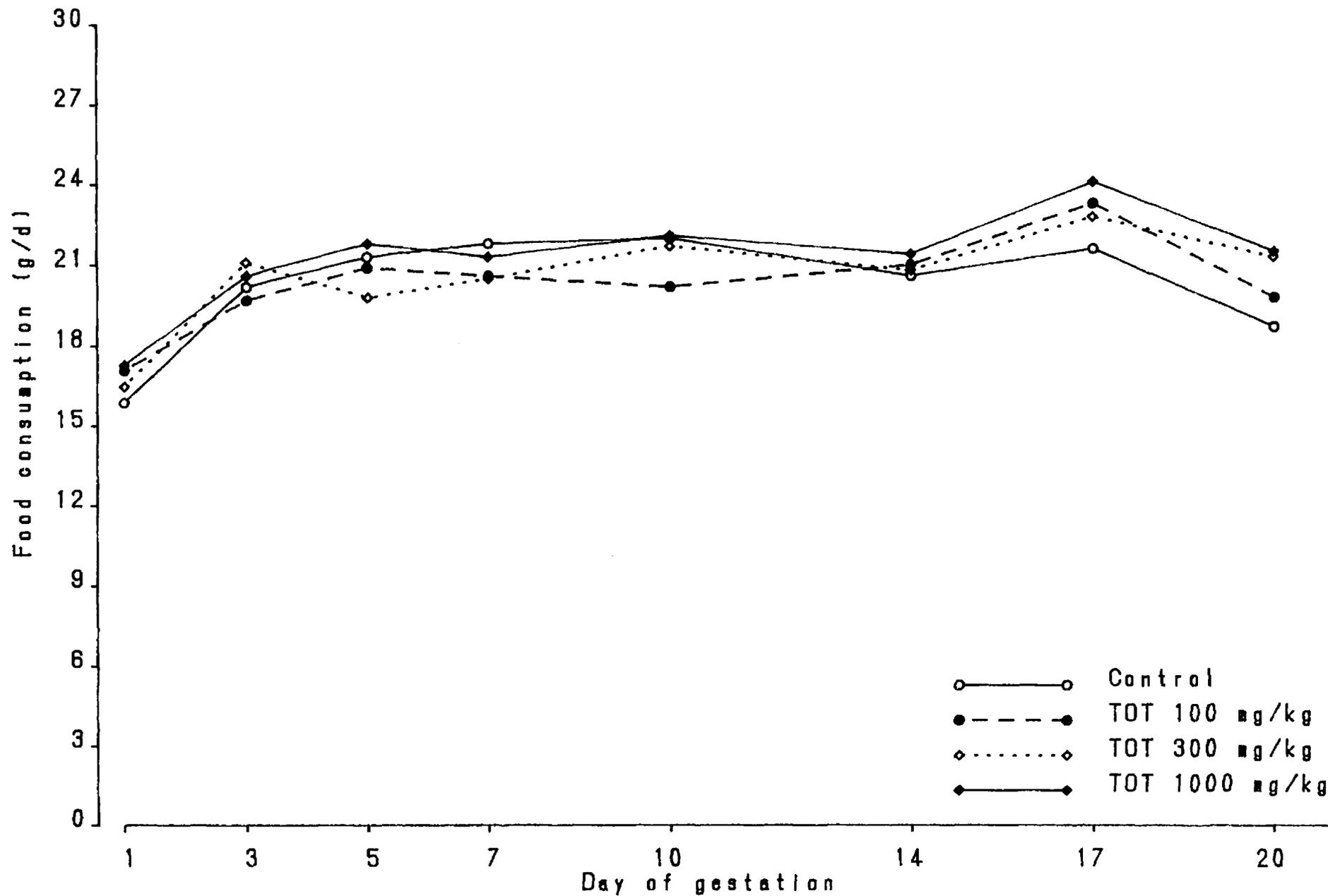


Figure 7. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

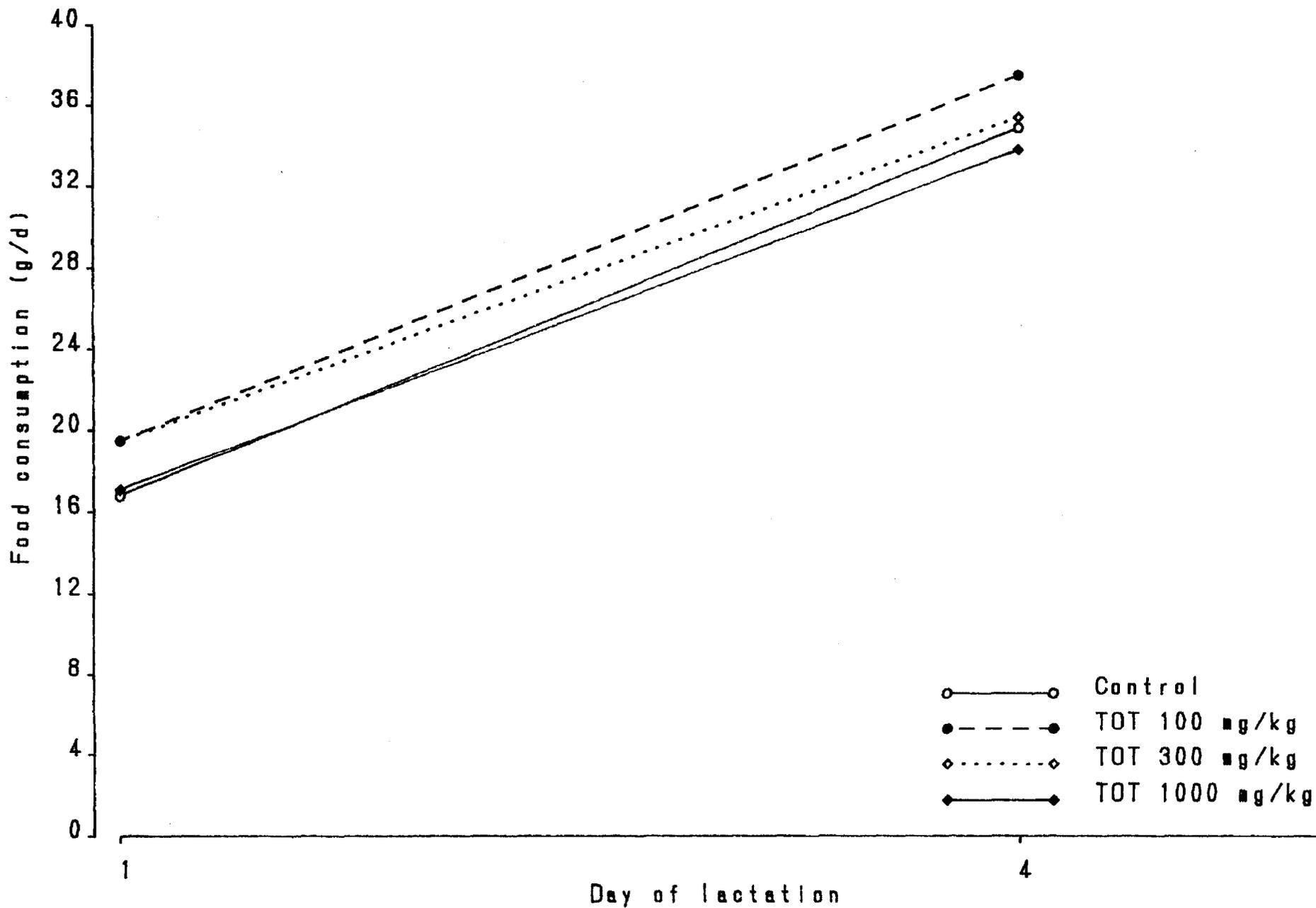


Figure 8. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

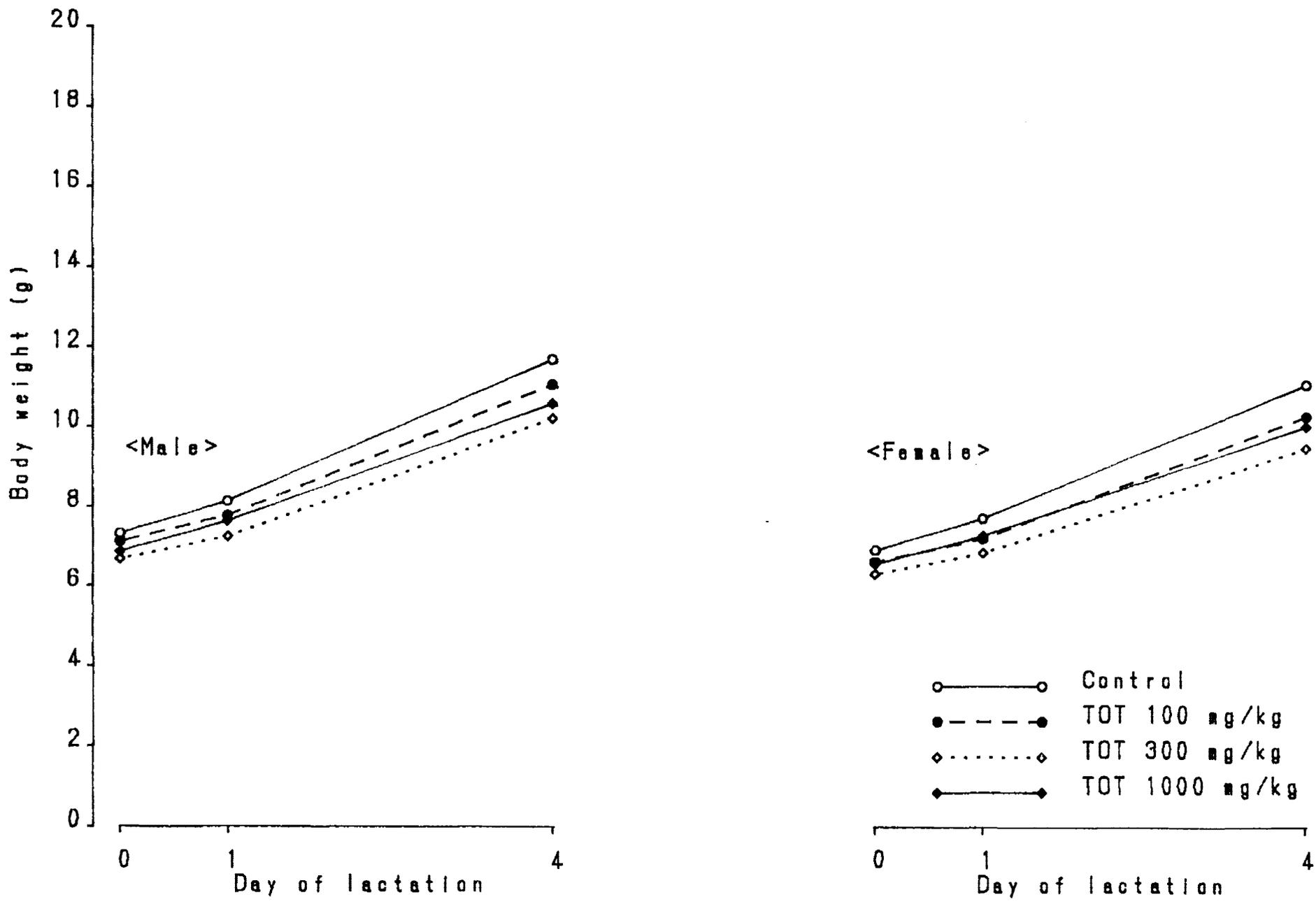


Figure 9. Body weight changes of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test of TOT in rats (SR-9645)

Table 1. Experimental design for the preliminary reproduction toxicity screening test of TOT in rats (SR-9645)

| Group | Concentration of TOT mg/mL | Volume mL/kg | No. of animals ^a | |
|-------------------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------------------|--------|
| | | | Male | Female |
| ^b Control | 0 | 5 | 12 | 12 |
| ^c TOT 100 mg/kg | 20 | 5 | 12 | 12 |
| TOT 300 mg/kg | 60 | 5 | 12 | 12 |
| TOT 1000 mg/kg | 200 | 5 | 12 | 12 |

a: TOT (Tris(ethylhexyl)-1,2,4-benzenetricarboxylate) was dosed orally to males for 46 days before, during and after the mating period, and to females from day 14 before mating to day 3 of lactation.

b: Control was dosed with corn oil.

c: TOT was dissolved in corn oil.

Table 2. General appearance of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

| Item | Control | TOT (mg/kg) | | |
|-------------------------|-------------------|-------------|-----|------|
| | | 100 | 300 | 1000 |
| No. of animals examined | 12 | 12 | 12 | 12 |
| Abnormal findings | ^a 0 | 0 | 0 | 0 |

a: Values are no. of animals with findings.

Table 3. Body weight changes of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

| Group | No. of animals | Day of administration | | | | | | | | | | | Body weight gain | |
|---------------|----------------|-----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-------------------|-----------------|
| | | 1 | 2 | 5 | 7 | 10 | 14 | 21 | 28 | 35 | 42 | 46 | Day 1-46 | % a |
| Control | 12 | b | | | | | | | | | | | | |
| | | 400.3 17.6 | 400.2 16.9 | 420.7 20.8 | 430.4 21.9 | 443.3 23.6 | 461.1 24.3 | 486.3 24.7 | 511.4 27.2 | 537.6 31.2 | 555.8 34.3 | 566.4 33.8 | 166.167 24.524 | 41.518 5.920 |
| TOT 100 mg/kg | 12 | | | | | | | | | (11)c | (11) | (11) | (11) | (11) |
| | | 402.2 16.7 | 400.2 19.1 | 419.8 23.0 | 429.3 23.7 | 444.3 28.4 | 463.5 33.0 | 491.3 38.3 | 519.3 45.2 | 554.0 46.5 | 571.7 50.7 | 585.5 51.1 | 181.455 38.459 | 44.726 8.291 |
| TOT 300 mg/kg | 12 | 400.0 15.1 | 399.5 14.9 | 419.8 18.6 | 430.7 19.4 | 445.8 21.7 | 463.0 23.1 | 489.2 26.9 | 514.1 27.0 | 542.1 28.2 | 561.6 35.3 | 576.6 34.9 | 176.583 26.480 | 44.119 6.217 |
| | | 402.5 14.4 | 401.3 17.5 | 421.3 18.1 | 432.9 20.0 | 446.9 20.6 | 463.7 20.0 | 484.6 21.0 | 511.3 22.5 | 538.2 25.0 | 552.8 27.4 | 560.2 29.0 | 157.667 21.424 | 39.171 5.089 |

a: (Body weight gain / body weight on day 1) x 100.

b: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram.

c: Values in parentheses are no. of animals examined.

Table 4. Food consumption of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

| Group | No. of animals | Day of administration | | | | | | | | | | |
|---------------|----------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | 1 | 2 | 5 | 7 | 10 | 14 | 21 | 28 | 35 | 42 | 46 |
| Control | 12 | a | | | | | | | | | | |
| | | 27.4 2.2 | 22.6 2.5 | 25.7 3.5 | 24.8 3.1 | 23.8 2.8 | 23.8 2.0 | 23.3 1.7 | 22.5 3.0 | 22.9 3.1 | 21.8 2.7 | 22.7 3.2 |
| TOT 100 mg/kg | 12 | | | | | | | (11)b | (11) | (11) | (11) | (11) |
| | | 28.7 2.1 | 21.2 3.2 | 24.7 2.6 | 23.9 2.7 | 24.6 3.4 | 25.0 3.6 | 25.1 2.7 | 24.3 4.1 | 24.0 2.3 | 22.8 3.9 | 23.6 2.5 |
| TOT 300 mg/kg | 12 | 27.5 3.1 | 21.9 2.5 | 25.9 2.9 | 24.2 2.3 | 24.1 2.6 | 24.7 2.3 | 23.5 3.1 | 23.8 1.9 | 24.6 1.9 | 23.1 2.9 | 23.8 3.0 |
| | | 28.5 1.6 | 22.7 2.9 | 26.5 1.7 | 25.6 2.4 | 25.7 2.3 | 24.9 2.6 | 24.8 3.3 | 24.3 2.4 | 24.6 2.6 | 23.3 2.2 | 23.1 2.9 |

a: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram/day.

b: Values in parentheses are no. of animals examined.

Table 5. Absolute and relative organ weights of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

| Group | No. of animals | Body weight g | Testis | | | | Epididymis | | | |
|----------------|----------------|--------------------|--------|-------|-------|-------|------------|-------|-------|-------|
| | | | Right | | Left | | Right | | Left | |
| | | | g | % | g | % | g | % | g | % |
| Control | 12 | 571.8 ^a | 1.706 | 0.299 | 1.714 | 0.300 | 0.668 | 0.117 | 0.670 | 0.117 |
| | | 36.0 | 0.230 | 0.039 | 0.202 | 0.036 | 0.084 | 0.016 | 0.074 | 0.014 |
| TOT 100 mg/kg | 11 | 590.8 | 1.816 | 0.310 | 1.767 | 0.300 | 0.675 | 0.116 | 0.668 | 0.114 |
| | | 50.9 | 0.146 | 0.037 | 0.153 | 0.041 | 0.059 | 0.016 | 0.068 | 0.016 |
| TOT 300 mg/kg | 12 | 581.6 | 1.817 | 0.314 | 1.816 | 0.313 | 0.686 | 0.117 | 0.683 | 0.117 |
| | | 36.2 | 0.155 | 0.024 | 0.150 | 0.029 | 0.063 | 0.012 | 0.045 | 0.013 |
| TOT 1000 mg/kg | 12 | 563.2 | 1.772 | 0.315 | 1.768 | 0.315 | 0.688 | 0.122 | 0.689 | 0.122 |
| | | 29.7 | 0.213 | 0.036 | 0.252 | 0.043 | 0.071 | 0.012 | 0.060 | 0.012 |

a: Values are means and S.D. thereunder.

Table 6. Gross pathological findings of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

| Item | Control | TOT (mg/kg) | | |
|------------------------------------|---------|-------------|-----|------|
| | | 100 | 300 | 1000 |
| No. of animals examined | a 12 | b 12 | 12 | 12 |
| Organ : Findings | | | | |
| Kidney : Dilatation, renal pelvis | c 0 | 0 | 1 | 0 |
| Cyst | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Epididymis : Yellowish white patch | 0 | 0 | 0 | 1 |

a: Includes one animal that had no evidence of pregnancy.

b: Includes one animal that had no evidence of pregnancy and one animal that failed in copulation.

c: Values are no. of animals with findings.

Table 7. Histopathological findings of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

| Item | | TOT (mg/kg) | | | |
|---|-----------------------|-------------|---------|-----|-----------|
| | | Control | 100 | 300 | 1000 |
| No. of animals examined | | a 12 | b 12 | 12 | 12 |
| Organ : Findings | ^c Grade | | | | |
| Testis : Decrease, spermatocyte and spermatid | Total | d 0 | 0 | 2 | 12 |
| | + | 0 | 0 | 2 | [11] ** |
| | ++ | 0 | 0 | 0 | [1] |
| Multinuclear giant cell, seminiferous tubule | + | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Vacuolization, Sertoli cell | + | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Atrophy, seminiferous tubule | + | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Epididymis : Cell debris, lumen | Total | 2 | 0 | 0 | 1 |
| | + | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | ++ | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Decrease, sperm | Total | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | + | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | ++ | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Granuloma, spermatic | + | 0 | 0 | 0 | 1 |

a: Includes one animal that had no evidence of pregnancy.

b: Includes one animal that had no evidence of pregnancy and one animal that failed in copulation.

c: + = slight change and ++ = moderate change.

d: Values are no. of animals with findings.

** : Differs from control, $p \leq 0.01$.

Table 8. General appearance of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

| Item | Control | TOT (mg/kg) | | |
|----------------------------------|--------------------|--------------------|-----|------|
| | | 100 | 300 | 1000 |
| Findings before gestation period | | | | |
| No. of animals examined | 12 | 12 | 12 | 12 |
| Abnormal findings | ^a 0 | 0 | 0 | 0 |
| Findings during gestation period | | | | |
| No. of animals examined | ^b 12 | ^b 11 | 12 | 12 |
| Abnormal findings | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Findings during lactation period | | | | |
| No. of animals examined | 11 | 10 | 12 | 12 |
| Abnormal findings | 0 | 0 | 0 | 0 |

a: Values are no. of animals with findings.

b: Includes one animal that had no evidence of pregnancy.

Table 9. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

| Group | No. of animals | Day of administration | | | | | | Body weight gain | |
|----------------|----------------|-----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|------------------|-----------------|
| | | 1 | 2 | 5 | 7 | 10 | 14 | Day 1-14 | % a |
| Control | 12 | b | | | | | | | |
| | | 238.3 14.0 | 238.6 11.1 | 245.6 15.6 | 251.8 12.5 | 254.3 15.0 | 261.3 18.0 | 22.917 10.396 | 9.632 4.309 |
| TOT 100 mg/kg | 12 | 239.0 9.2 | 240.2 10.8 | 248.7 10.7 | 252.6 11.1 | 258.3 13.6 | 264.1 15.8 | 25.083 10.317 | 10.462 4.160 |
| | | 236.8 11.6 | 237.3 13.7 | 243.5 13.8 | 250.7 12.0 | 252.8 16.2 | 258.5 17.9 | 21.750 10.839 | 9.151 4.553 |
| TOT 1000 mg/kg | 12 | 235.4 11.1 | 237.5 12.5 | 242.3 12.7 | 247.6 12.4 | 251.4 16.7 | 257.8 16.9 | 22.333 8.763 | 9.436 3.601 |

a: (Body weight gain / body weight on day 1) x 100.

b: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram.

Table 10. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

| Group | No. of animals | Day of gestation | | | | | | | | | Body weight gain | |
|----------------|----------------|------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-------------------|-----------------|
| | | 0 | 1 | 3 | 5 | 7 | 10 | 14 | 17 | 20 | Day 0-20 | % a |
| Control | 11 | b | | | | | | | | | | |
| | | 267.0 16.7 | 270.8 17.1 | 285.9 20.0 | 296.2 20.7 | 304.9 21.5 | 319.2 23.2 | 343.1 25.7 | 372.1 24.8 | 420.1 27.9 | 153.091 15.215 | 57.371 4.921 |
| TOT 100 mg/kg | 10 | 274.7 16.5 | 280.1 16.7 | 291.3 17.6 | 302.0 17.0 | 309.9 16.7 | 323.3 18.5 | 348.3 20.0 | 378.4 23.9 | 428.9 27.0 | 154.200 15.462 | 56.194 5.413 |
| | | 265.6 17.4 | 273.3 15.4 | 286.8 17.2 | 295.0 15.3 | 305.0 15.4 | 319.3 16.1 | 342.7 17.8 | 372.3 22.1 | 422.2 28.7 | 156.583 17.753 | 59.053 6.391 |
| TOT 1000 mg/kg | 12 | 266.7 18.4 | 271.5 17.3 | 285.7 18.4 | 296.1 17.7 | 304.9 19.1 | 318.7 21.7 | 344.3 20.6 | 375.2 21.6 | 426.1 22.0 | 159.417 14.933 | 60.096 7.349 |

a: (Body weight gain / body weight on day 0) x 100.

b: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram.

Table 11. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

| Group | No. of animals | Day of Lactation | | | Body weight gain | |
|----------------|----------------|------------------|-------|-------|------------------|-------|
| | | 0 | 1 | 4 | Day 0-4 | % a |
| Control | 11 | b | | | | |
| | | 328.9 | 325.5 | 337.6 | 8.727 | 2.743 |
| | | 28.1 | 25.4 | 26.9 | 10.120 | 3.291 |
| TOT 100 mg/kg | 10 | 327.6 | 331.5 | 343.2 | 15.600 | 4.747 |
| | | 22.3 | 23.3 | 25.5 | 8.058 | 2.448 |
| TOT 300 mg/kg | 12 | 321.6 | 323.8 | 336.8 | 15.250 | 4.774 |
| | | 19.6 | 23.0 | 20.6 | 8.508 | 2.765 |
| TOT 1000 mg/kg | 12 | 329.5 | 326.1 | 336.6 | 7.083 | 2.373 |
| | | 27.6 | 22.0 | 23.5 | 17.814 | 5.302 |

a: (Body weight gain / body weight on day 0) x 100.

b: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram.

Table 12. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

| Group | No. of animals | Day of administration | | | | | |
|----------------|----------------|-----------------------|------|------|------|------|------|
| | | 1 | 2 | 5 | 7 | 10 | 14 |
| Control | 12 | a | | | | | |
| | | 17.3 | 14.9 | 16.5 | 16.8 | 15.3 | 15.4 |
| | | 3.9 | 2.6 | 3.9 | 2.5 | 4.0 | 4.4 |
| TOT 100 mg/kg | 12 | 16.5 | 15.5 | 16.5 | 16.3 | 16.8 | 16.0 |
| | | 2.1 | 3.4 | 1.3 | 2.6 | 2.3 | 2.1 |
| TOT 300 mg/kg | 12 | 17.4 | 15.0 | 15.8 | 16.0 | 16.0 | 16.2 |
| | | 4.0 | 3.5 | 3.7 | 2.1 | 3.0 | 3.0 |
| TOT 1000 mg/kg | 12 | 15.9 | 15.3 | 15.4 | 16.1 | 17.2 | 16.8 |
| | | 3.1 | 2.9 | 2.9 | 2.3 | 3.4 | 3.8 |

a: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram/day.

Table 13. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

| Group | No. of animals | Day of gestation | | | | | | | |
|----------------|----------------|-------------------|------|------|------|------|------|------|--------|
| | | 1 | 3 | 5 | 7 | 10 | 14 | 17 | 20 |
| Control | 11 | ^a 15.9 | 20.2 | 21.3 | 21.8 | 22.0 | 20.6 | 21.6 | 18.7 |
| | | 2.7 | 2.4 | 3.2 | 2.9 | 2.9 | 2.9 | 2.2 | 2.6 |
| TOT 100 mg/kg | 10 | 17.1 | 19.7 | 20.9 | 20.6 | 20.2 | 21.0 | 23.3 | 19.8 |
| | | 1.7 | 2.3 | 2.6 | 2.6 | 2.7 | 2.4 | 2.3 | 3.4 |
| TOT 300 mg/kg | 12 | 16.5 | 21.1 | 19.8 | 20.5 | 21.7 | 20.8 | 22.8 | 21.3 |
| | | 1.5 | 2.7 | 1.8 | 2.2 | 3.6 | 2.5 | 2.9 | 4.3 |
| TOT 1000 mg/kg | 12 | 17.3 | 20.6 | 21.8 | 21.3 | 22.1 | 21.4 | 24.1 | 21.5** |
| | | 2.9 | 2.6 | 2.5 | 3.3 | 3.0 | 1.4 | 2.0 | 1.7 |

a: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram/day.

** : Differs from control, $p \leq 0.01$.

Table 14. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

| Group | No. of animals | <u>Day of Lactation</u> | |
|----------------|----------------|-------------------------|------|
| | | 1 | 4 |
| Control | 11 | a | |
| | | 16.8 | 34.9 |
| TOT 100 mg/kg | 10 | 4.7 | 5.0 |
| | | 19.5 | 37.5 |
| TOT 300 mg/kg | 12 | 2.2 | 3.7 |
| | | 19.5 | 35.4 |
| TOT 1000 mg/kg | 12 | 5.5 | 6.1 |
| | | 17.1 | 33.8 |
| | | 5.2 | 6.0 |

a: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram/day.

Table 15. Absolute and relative organ weights of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

| Group | No. of animals | Body weight g | Ovary | | | |
|----------------|----------------|--------------------|-------|--------------------|------|--------------------|
| | | | Right | | Left | |
| | | | mg | 10 ⁻³ % | mg | 10 ⁻³ % |
| Control | 11 | 337.6 ^a | 56.5 | 16.766 | 51.3 | 15.195 |
| | | 26.9 | 10.6 | 2.979 | 4.8 | 1.053 |
| TOT 100 mg/kg | 10 | 343.2 | 52.8 | 15.472 | 56.4 | 16.445 |
| | | 25.5 | 7.1 | 2.542 | 6.1 | 1.449 |
| TOT 300 mg/kg | 12 | 336.8 | 54.9 | 16.308 | 57.4 | 17.057 |
| | | 20.6 | 9.9 | 2.787 | 8.3 | 2.331 |
| TOT 1000 mg/kg | 12 | 336.6 | 55.8 | 16.667 | 56.3 | 16.783 |
| | | 23.5 | 11.4 | 3.530 | 8.0 | 2.461 |

a: Values are means and S.D. thereunder.

Table 16. Gross pathological findings of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

| Item | Control | TOT (mg/kg) | | |
|---------------------------|---------|-------------|-----|------|
| | | 100 | 300 | 1000 |
| No. of animals examined | a 12 | b 12 | 12 | 12 |
| Organ : Findings | | | | |
| Parietal bone : Elevation | c 0 | 1 | 0 | 0 |
| Ileum : Diverticulum | 0 | 0 | 1 | 0 |

a: Includes one animal that had no evidence of pregnancy.

b: Includes one animal that had no evidence of pregnancy and one animal that failed in copulation.

c: Values are no. of animals with findings.

Table 17. Histopathological findings of female rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

| Item | | TOT (mg/kg) | | | |
|-----------------------------|-----------------------|-------------|---------|-----|------|
| | | Control | 100 | 300 | 1000 |
| No. of animals examined | | a 12 | b 12 | 12 | 12 |
| Organ : Findings | ^c Grade | | | | |
| Ovary : Cyst, corpus luteum | <+> | d 0 | 0 | 2 | 0 |

a: Includes one animal that had no evidence of pregnancy.

b: Includes one animal that had no evidence of pregnancy and one animal that failed in copulation.

c: <+> = detected.

d: Values are no. of animals with findings.

Table 18. Influence of TOT on reproductive ability in the preliminary reproduction toxicity screening test in rats (SR-9645)

| Group | No. of pairs mated | Estrous cycle | | | | | | | | No. of pairs with successful copulation | Days from mating to copulation | Copulation index % ^a | No. of pregnant animals | Fertility index % ^b |
|----------------|--------------------|-----------------------|----------|---------------------|-----------------------|-----------|-------|--------|----------|---|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| | | Before administration | | | Administration period | | | Normal | Abnormal | | | | | |
| | | Normal | Abnormal | | Normal | Abnormal | | | | | | | | |
| | | | Total | Continuous diestrus | | Irregular | Total | | | | | | | |
| Control | 12 | 12 | 0 | - ^c | - | 12 | 0 | - | - | 12 | 2.1±1.2 ^d | 100.0 | 11 | 91.7 |
| TOT 100 mg/kg | 12 | 12 | 0 | - | - | 11 | 1 | 1 | 0 | 11 | 2.3±1.3 | 91.7 | 10 | 90.9 |
| TOT 300 mg/kg | 12 | 12 | 0 | - | - | 12 | 0 | - | - | 12 | 2.7±1.2 | 100.0 | 12 | 100.0 |
| TOT 1000 mg/kg | 12 | 12 | 0 | - | - | 12 | 0 | - | - | 12 | 2.7±1.1 | 100.0 | 12 | 100.0 |

a: (No. of pairs with successful copulation / no. of pairs mated) x 100.

b: (No. of pregnant animals / no. of pairs with successful copulation) x 100.

c: - = blank value.

d: Values are means ± S.D.

Table 19. Influence of TOT on delivery and maternal behavior in the preliminary reproduction toxicity screening test in rats (SR-9645)

| Group | | No. of pregnant females | No. of corpora lutea | No. of implantation sites | Implantation index % ^a | No. of pups born | Delivery index % ^b | Live pups born | | | | Dead pups born | | | Gestation Length day | Gestation index % ^e | Nursing index % ^f | |
|-------------------|-------|-------------------------|----------------------|---------------------------|-----------------------------------|------------------|-------------------------------|----------------|---------------------------------|------------------------|------|----------------|-----|------|----------------------|--------------------------------|------------------------------|--------|
| | | | | | | | | No. | Live birth index % ^c | Sex ratio ^d | Male | Female | No. | Male | | | | Female |
| Control | Total | 11 | 185 | 171 | | 151 | | 146 | | | 71 | 75 | 5 | 1 | 4 | | | |
| | Mean | | 16.8 | 15.5 | 92.535 | 13.7 | 87.621 | 13.3 | 97.140 | 1.094 | 6.5 | 6.8 | 0.5 | 0.1 | 0.4 | 22.7 | 100.0 | 100.0 |
| | S.D. | | 1.5 | 1.7 | 7.187 | 3.1 | 15.358 | 2.9 | 5.630 | 0.690 | 3.0 | 2.3 | 0.9 | 0.3 | 0.7 | 0.5 | | |
| TOT 100 mg/kg | Total | 10 | 173 | 166 | | 150 | | 147 | | | 73 | 74 | 3 | 2 | 1 | | | |
| | Mean | | 17.3 | 16.6 | 96.163 | 15.0 | 90.338 | 14.7 | 97.773 | 1.056 | 7.3 | 7.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 22.7 | 100.0 | 100.0 |
| | S.D. | | 1.3 | 1.3 | 6.633 | 1.7 | 6.791 | 2.0 | 3.621 | 0.496 | 2.6 | 1.5 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.5 | | |
| TOT 300 mg/kg | Total | 12 | 204 | 192 | | 180 | | 179 | | | 87 | 92 | 1 | 1 | 0 | | | |
| | Mean | | 17.0 | 16.0 | 94.476 | 15.0 | 94.104 | 14.9 | 99.243 | 1.167 | 7.3 | 7.7 | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 22.5 | 100.0 | 100.0 |
| | S.D. | | 2.3 | 2.0 | 8.439 | 1.8 | 7.176 | 2.0 | 2.624 | 0.747 | 1.9 | 2.6 | 0.3 | 0.3 | 0.0 | 0.5 | | |
| TOT 1000 mg/kg | Total | 12 | 215 | 196 | | 181 | | 180 | | | 74 | 106 | 1 | 0 | 1 | | | |
| | Mean | | 17.9 | 16.3 | 91.264 | 15.1 | 92.240 | 15.0 | 99.405 | 0.763 | 6.2 | 8.8 | 0.1 | 0.0 | 0.1 | 22.6 | 100.0 | 100.0 |
| | S.D. | | 2.2 | 2.3 | 8.806 | 2.7 | 9.640 | 2.7 | 2.061 | 0.439 | 2.6 | 2.3 | 0.3 | 0.0 | 0.3 | 0.5 | | |

a: (No. of implantation sites / no. of corpora lutea) x 100.

b: (No. of pups born / no. of implantation sites) x 100.

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

d: (No. of male pups / no. of female pups).

e: (No. of females with live pups delivered / no. of pregnant females) x 100.

f: (No. of females nursing live pups / no. of females with normal delivery) x 100.

Table 20. Gross pathological findings of dead pups at birth in the preliminary reproduction toxicity screening test of TOT in rats (SR-9645)

| Item | Male | | | | Female | | | |
|-------------------------|-------------------|-------------|-----|-------------------|---------|-------------|-----|------|
| | Control | TOT (mg/kg) | | | Control | TOT (mg/kg) | | |
| | | 100 | 300 | 1000 | | 100 | 300 | 1000 |
| No. of animals examined | 1 | 2 | 1 | 0 | 4 | 1 | 0 | 1 |
| Abnormal findings | ^a 0 | 0 | 0 | ^b - | 0 | 0 | - | 0 |

a: Values are no. of animals with findings.

b: - = blank value.

Table 21. Influence of TOT on viability of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test in rats (SR-9645)

| Item | No. of live pups born (on day 0) | Live pups on day 4 | | | | |
|----------------|----------------------------------|--------------------|--------------------------------|------|--------|------------------------|
| | | No. | Viability index % ^a | Male | Female | Sex ratio ^b |
| Control | 146 | 145 | | 71 | 74 | |
| | 13.3 | 13.2 | 99.465 | 6.5 | 6.7 | 1.148 |
| | 2.9 | 2.8 | 1.773 | 3.0 | 2.4 | 0.816 |
| TOT 100 mg/kg | 147 | 146 | | 73 | 73 | |
| | 14.7 | 14.6 | 99.286 | 7.3 | 7.3 | 1.067 |
| | 2.0 | 2.1 | 2.258 | 2.6 | 1.5 | 0.489 |
| TOT 300 mg/kg | 179 | 173 | | 84 | 89 | |
| | 14.9 | 14.4 | 95.582 | 7.0 | 7.4 | 1.155 |
| | 2.0 | 2.9 | 11.486 | 2.1 | 2.7 | 0.697 |
| TOT 1000 mg/kg | 180 | 174 | | 71 | 103 | |
| | 15.0 | 14.5 | 96.667 | 5.9 | 8.6 | 0.747 |
| | 2.7 | 2.9 | 6.666 | 2.5 | 2.3 | 0.424 |

a: (No. of live pups on day 4 / no. of live pups born) x 100.

b: (No. of male pups / no. of female pups).

Table 22. General appearance of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test of TOT in rats (SR-9645)

| Item | Male | | | | Female | | | |
|-------------------------------|--------------------|-------------|-------------------|------|---------|-------------|-----|------|
| | Control | TOT (mg/kg) | | | Control | TOT (mg/kg) | | |
| | | 100 | 300 | 1000 | | 100 | 300 | 1000 |
| No. of animals examined | ^a 71 | 73 | 87 | 74 | 75 | 74 | 92 | 106 |
| No. of dead / missing animals | 0 | 0 | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 3 |
| Trauma | ^b - | - | ^c 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| No. of surviving animals | 71 | 73 | 84 | 71 | 74 | 73 | 89 | 103 |
| Anury | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Trauma | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 |

a: Values are no. of live animals at birth.

b: - = blank value.

c: Values are no. of animals with findings.

Table 23. Body weight changes of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test of TOT in rats (SR-9645)

| Group | No. of litters | Male | | | | | Female | | | | |
|----------------|----------------|------------------|------|--------|------------------|--------|------------------|-------|-------|------------------|--------|
| | | Day of lactation | | | Body weight gain | | Day of lactation | | | Body weight gain | |
| | | 0 | 1 | 4 | Day 0-4 | % a | 0 | 1 | 4 | Day 0-4 | % |
| Control | 11 | b | | | | | | | | | |
| | | 7.32 | 8.15 | 11.71 | 4.391 | 59.412 | 6.93 | 7.73 | 11.08 | 4.155 | 59.633 |
| | | 0.77 | 1.03 | 1.76 | 1.040 | 8.869 | 0.83 | 1.01 | 1.71 | 0.999 | 10.415 |
| TOT 100 mg/kg | 10 | 7.13 | 7.79 | 11.09 | 3.960 | 55.544 | 6.63 | 7.22 | 10.28 | 3.650 | 55.236 |
| | | 0.52 | 0.67 | 0.93 | 0.532 | 6.161 | 0.64 | 0.72 | 1.01 | 0.562 | 8.066 |
| TOT 300 mg/kg | 12 | 6.69 | 7.26 | 10.23* | 3.542* | 53.192 | 6.33 | 6.86* | 9.48* | 3.142* | 49.953 |
| | | 0.55 | 0.68 | 0.98 | 0.765 | 11.913 | 0.58 | 0.69 | 1.01 | 0.793 | 13.088 |
| TOT 1000 mg/kg | 12 | 6.87 | 7.65 | 10.60 | 3.733 | 54.391 | 6.58 | 7.29 | 10.03 | 3.458 | 52.167 |
| | | 0.84 | 0.90 | 1.47 | 0.800 | 9.504 | 0.62 | 0.75 | 1.46 | 0.959 | 11.104 |

a: (Body weight gain / body weight on day 0) x 100.

b: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram.

*: Differs from control, $p \leq 0.05$.

Table 24. Gross pathological findings of pups in the preliminary reproduction toxicity screening test of TOT in rats (SR-9645)

| Item | Male | | | | Female | | | |
|---|---------|-------------|-----|------|---------|-------------|-----|------|
| | Control | TOT (mg/kg) | | | Control | TOT (mg/kg) | | |
| | | 100 | 300 | 1000 | | 100 | 300 | 1000 |
| Findings of dead pups after birth | | | | | | | | |
| No. of animals examined | 0 | 0 | 3 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Abnormal findings | a | - | b | - | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Findings of pups killed on day 4 of lactation | | | | | | | | |
| No. of animals examined | 71 | 73 | 84 | 71 | 74 | 73 | 89 | 103 |
| Organ : Findings | | | | | | | | |
| External : Anury | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Trauma | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 |

a: - = blank value.

b: Values are no. of animals with findings.

Table 25. Number of cells in seminiferous tubules of male rats dosed orally with TOT in the preliminary reproduction toxicity screening test (SR-9645)

| Group | No. of animals examined | Sertoli cells No. ^a | Group 1 (Stage I - VI) | | | | | | | |
|----------------|-------------------------|--------------------------------|------------------------|--------------------|---------------|-------|------------------|-------|---------------------|-------|
| | | | Spermatogonia | | Spermatocytes | | Round spermatids | | Elongate spermatids | |
| | | | No. | ratio ^b | No. | ratio | No. | ratio | No. | ratio |
| Control | 5 | 20.12 ^c | 16.80 | 0.846 | 50.80 | 2.530 | 138.36 | 6.906 | 130.00 | 6.526 |
| | | 3.18 | 5.65 | 0.294 | 7.44 | 0.134 | 17.20 | 0.353 | 21.71 | 1.147 |
| TOT 100 mg/kg | 5 | 19.08 | 20.52 | 1.084 | 51.80 | 2.720 | 128.00 | 6.754 | 132.32 | 6.976 |
| | | 1.49 | 2.58 | 0.190 | 4.84 | 0.256 | 8.89 | 0.839 | 11.17 | 0.882 |
| TOT 300 mg/kg | 5 | 18.52 | 18.48 | 1.006 | 43.64 | 2.370 | 117.68* | 6.394 | 103.28* | 5.616 |
| | | 1.45 | 3.17 | 0.210 | 2.63 | 0.237 | 5.59 | 0.704 | 12.34 | 0.897 |
| TOT 1000 mg/kg | 5 | 18.08 | 15.76 | 0.870 | 40.84* | 2.252 | 112.60** | 6.258 | 95.36** | 5.304 |
| | | 1.45 | 2.61 | 0.105 | 5.63 | 0.164 | 3.11 | 0.482 | 8.44 | 0.692 |

a: Expressed in no. of cells in a seminiferous tubule.

(continued)

b: Expressed in no. of spermatogenic cells / no. of Sertoli cells in a seminiferous tubule.

c: Values are means and S.D. thereunder.

*: Differs from control, $p < 0.05$.

** : Differs from control, $p < 0.01$.

Table 25. (continued-1)

| Group | No. of animals examined | Sertoli cells No. ^a | Group 2 (Stage VII - VIII) | | | | | | | |
|----------------|-------------------------|--------------------------------|----------------------------|--------------------|---------------|-------|------------------|--------|---------------------|-------|
| | | | Spermatogonia | | Spermatocytes | | Round spermatids | | Elongate spermatids | |
| | | | No. | ratio ^b | No. | ratio | No. | ratio | No. | ratio |
| Control | 5 | 16.96 ^c | 2.92 | 0.176 | 91.68 | 5.452 | 142.08 | 8.446 | 129.24 | 7.782 |
| | | 2.63 | 1.06 | 0.085 | 10.37 | 0.563 | 13.39 | 0.623 | 17.37 | 1.537 |
| TOT 100 mg/kg | 5 | 17.04 | 2.40 | 0.140 | 94.68 | 5.604 | 131.64 | 7.752 | 128.32 | 7.558 |
| | | 2.17 | 0.93 | 0.049 | 6.55 | 0.512 | 13.72 | 0.389 | 16.88 | 0.722 |
| TOT 300 mg/kg | 5 | 16.64 | 2.04 | 0.122 | 84.44 | 5.164 | 123.96 | 7.656 | 114.72 | 7.088 |
| | | 2.73 | 0.68 | 0.028 | 6.99 | 0.792 | 8.23 | 1.664 | 9.80 | 1.622 |
| TOT 1000 mg/kg | 5 | 16.52 | 2.60 | 0.156 | 82.32 | 5.026 | 118.76* | 7.248* | 105.64 | 6.462 |
| | | 2.23 | 1.10 | 0.056 | 6.70 | 0.539 | 8.28 | 0.622 | 13.47 | 1.046 |

a: Expressed in no. of cells in a seminiferous tubule.

b: Expressed in no. of spermatogenic cells / no. of Sertoli cells in a seminiferous tubule.

c: Values are means and S.D. thereunder.

*: Differs from control, $p \leq 0.05$.

(continued)

Table 25. (continued-2)

| Group | No. of animals examined | Group 3 (Stage IX - XI) | | | | | | |
|----------------|-------------------------|-----------------------------------|---------------|--------------------|---------------|-------|---------------------|--------|
| | | Sertoli cells No. ^a | Spermatogonia | | Spermatocytes | | Elongate spermatids | |
| | | | No. | ratio ^b | No. | ratio | No. | ratio |
| Control | 5 | 19.28 ^c | 4.52 | 0.232 | 102.52 | 5.340 | 145.24 | 7.564 |
| | | 1.92 | 1.32 | 0.047 | 10.83 | 0.559 | 11.01 | 0.608 |
| TOT 100 mg/kg | 5 | 20.52 | 4.20 | 0.208 | 99.08 | 4.846 | 130.64 | 6.366 |
| | | 1.55 | 1.50 | 0.082 | 8.42 | 0.496 | 9.90 | 0.228 |
| TOT 300 mg/kg | 5 | 19.20 | 4.92 | 0.264 | 97.56 | 5.100 | 131.68 | 6.876 |
| | | 1.58 | 1.63 | 0.105 | 4.50 | 0.364 | 19.71 | 1.036 |
| TOT 1000 mg/kg | 5 | 19.32 | 3.32 | 0.176 | 89.04 | 4.624 | 119.24* | 6.208* |
| | | 2.18 | 1.02 | 0.054 | 9.00 | 0.323 | 15.90 | 0.827 |

a: Expressed in no. of cells in a seminiferous tubule.

(continued)

b: Expressed in no. of spermatogenic cells / no. of Sertoli cells in a seminiferous tubule.

c: Values are means and S.D. thereunder.

*: Differs from control, $p \leq 0.05$.

Table 25. (continued-3)

| Group | No. of animals examined | Sertoli cells No. ^a | Group 4 (Stage XII - XIV) | | | | | |
|----------------|-------------------------|-----------------------------------|---------------------------|--------------------|---------------|-------|---------------------|---------|
| | | | Spermatogonia | | Spermatocytes | | Elongate spermatids | |
| | | | No. | ratio ^b | No. | ratio | No. | ratio |
| Control | 5 | 19.16 ^c | 4.04 | 0.212 | 109.80 | 5.756 | 159.76 | 8.394 |
| | | 2.81 | 0.89 | 0.045 | 13.15 | 0.292 | 15.91 | 0.630 |
| TOT 100 mg/kg | 5 | 20.92 | 3.72 | 0.178 | 110.36 | 5.276 | 150.28 | 7.188 |
| | | 1.73 | 0.72 | 0.031 | 9.22 | 0.116 | 18.99 | 0.711 |
| TOT 300 mg/kg | 5 | 18.64 | 3.64 | 0.196 | 99.44 | 5.358 | 137.08 | 7.352 |
| | | 1.72 | 0.48 | 0.019 | 4.54 | 0.338 | 17.70 | 0.620 |
| TOT 1000 mg/kg | 5 | 16.72 | 3.64 | 0.220 | 88.76** | 5.324 | 105.16** | 6.328** |
| | | 0.92 | 0.71 | 0.048 | 4.33 | 0.455 | 18.34 | 1.309 |

a: Expressed in no. of cells in a seminiferous tubule.

b: Expressed in no. of spermatogenic cells / no. of Sertoli cells in a seminiferous tubule.

c: Values are means and S.D. thereunder.

*: Differs from control, $p \leq 0.05$.

** : Differs from control, $p \leq 0.01$.