

アルカノール(C5～38)

[3, 5, 5-トリメチルヘキサノール-1-オール]

(CAS No. 3452979)

試験番号：SR - 9535

試験名：3, 5, 5-トリメチルヘキサノールのラットにおける反復投与毒性・生殖  
発生毒性併合試験

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                                                                                                                                                                              | 8  |
| 材料および方法                                                                                                                                                                          | 8  |
| 成 績                                                                                                                                                                              | 18 |
| 考 察                                                                                                                                                                              | 24 |
| 参考文献                                                                                                                                                                             | 28 |
| Figures                                                                                                                                                                          | 添付 |
| 1. Body weight changes of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)                           |    |
| 2. Food consumption of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)                              |    |
| 3. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535) |    |
| 4. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535) |    |
| 5. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535) |    |
| 6. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)    |    |
| 7. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)    |    |
| 8. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)    |    |
| 9. Body weight changes of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TMH in rats (SR-9535)                                       |    |

Tables..... 添付

- 1 . Experimental design for the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TMH in rats (SR-9535)
- 2 . General appearance of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- 3 . Body weight changes of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- 4 . Food consumption of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- 5 . Urinary findings of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- 6 . Hematological findings of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- 7 . Biochemical findings of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- 8 . Absolute and relative organ weights of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- 9 . Gross pathological findings of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- 10 . Histopathological findings of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- 11 . General appearance of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- 12 . Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- 13 . Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- 14 . Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- 15 . Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- 16 . Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- 17 . Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

18. Absolute and relative organ weights of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
19. Gross pathological findings of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
20. Histopathological findings of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
21. Influence of TMH on reproductive ability of rats in the combined repeat dose and reproductive /developmental toxicity screening test (SR-9535)
22. Influence of TMH on delivery and maternal behavior in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats (SR-9535)
23. Gross pathological findings of dead pups at birth in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats (SR-9535)
24. Influence of TMH on viability of pups in the combined repeat dose and reproductive /developmental toxicity screening test in rats (SR-9535)
25. General appearance of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TMH in rats (SR-9535)
26. Body weight changes of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TMH in rats (SR-9535)
27. Gross pathological findings of pups which were dead after birth or killed on day 4 of lactation in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TMH in rats (SR-9535)

## 要 約

3,5,5-トリメチルヘキサノール (CAS No.3452-97-9) の 12、60 および 300 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反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を実施し、以下の知見が得られた。

## 1. 雌雄動物の反復投与毒性

## (1) 雄動物に対する影響

- 1) 摂餌量では 300 mg/kg 群で高値が認められ、同群では体重の高値傾向も認められた。
- 2) 尿検査では尿量および飲水量の増加が 300 mg/kg 群で認められた。
- 3) 血液学的検査では赤血球数、ヘマトクリット値および血色素量の軽度の減少が 300 mg/kg 群で認められた。
- 4) 血液化学的検査では尿素窒素およびクロールの軽度の減少が 300 mg/kg 群で認められた。
- 5) 器官重量で、肝臓の重量の増加が 300 mg/kg 群で、体重重量比の増加が 60 および 300 mg/kg 群で、左右の腎臓の重量および体重重量比の増加が 60 および 300 mg/kg 群で認められた。
- 6) 剖検では、腎臓の褪色が 60 および 300 mg/kg 群で、腎臓の腫大が 300 mg/kg 群で認められた。
- 7) 病理学的検査では、肝臓に小葉周辺性の軽度の脂肪化が 60 および 300 mg/kg 群で、腎臓に軽度あるいは中等度の尿細管上皮の再生および顆粒円柱が 60 および 300 mg/kg 群で、甲状腺に軽度の濾胞の不整形、濾胞上皮の円柱化およびコロイドの減少が 300 mg/kg 群で認められた。
- 8) 一般状態観察では投与による影響は認められなかった。

## (2) 雌動物に対する影響

- 1) 300 mg/kg 群で妊娠 21 日に死亡例が 1 例に認められ、衰弱により 3 例を妊娠 14～19 日に屠殺した。死亡例の病理組織学的検査では肝臓の小葉周辺性脂肪化などが認められた。衰弱屠殺例では屠殺前に体重および摂餌量の減少などが認められ、病理組織学的検査では肝臓の小葉周辺性脂肪化、腎臓の尿細管上皮の脂肪変性などが認められた。
- 2) 体重増加抑制が 300 mg/kg 群で認められた。
- 3) 摂餌量の低値が 300 mg/kg 群で認められた。

- 4) 器官重量では、肝臓の重量の増加が 300 mg/kg 群で、体重重量比の増加が 60 および 300 mg/kg 群で、左右の腎臓の体重重量比の増加が 300 mg/kg 群で認められた。
- 5) 剖検では、肝臓の黄白色化が 300 mg/kg 群で認められた。
- 6) 病理組織学的検査では、肝臓の軽度あるいは中等度の小葉周辺性脂肪化および胸腺の萎縮が 300 mg/kg 群で、腎臓の尿細管上皮の脂肪変性が 60 mg/kg 群で認められた。

以上、雄の 60 mg/kg 以上の群の腎臓の重量および体重重量比の増加、軽度の尿細管上皮の再生、雌の 60 mg/kg 以上の群の肝臓の体重重量比の増加および腎臓の軽度の尿細管上皮の脂肪変性から、本試験における 3,5,5-トリメチルキナールの反復投与による無影響量 (NOEL) は雌雄ともに 12 mg/kg/day であると判断された。

## 2. 生殖発生毒性

### (1) 雄動物に対する影響

投与による影響は認められなかった。

### (2) 雌動物に対する影響

- 1) 性周期検査では発情休止期の継続が 300 mg/kg 群で 4 例に認められた。
- 2) 母動物の分娩および母性行動観察では、全哺育児が死亡した例が 300 mg/kg 群で 2 例に認められ、着床率および出産確認時生存児数の減少が 60 mg/kg 群で、着床数、着床率、出産児数および出産確認時生存児数の減少がおよび 300 mg/kg 群で認められた。
- 3) 生殖能検査では、TMH 投与による影響は認められなかった。

### (3) 新生児に対する影響

- 1) 哺育 4 日の新生児生存率の低値が 300 mg/kg 群で認められた。
- 2) 体重推移では、300 mg/kg 群の雌雄で哺育 0 日に低値が認められた。
- 3) 新生児の一般状態観察および剖検では、投与による影響は認められなかった。

以上、雄動物の生殖能に対する影響は 300 mg/kg 群でも認められず、一方、300 mg/kg 群の雌では発情休止期の継続がみられ、死亡例・衰弱による屠殺例および全哺育児死亡例がみられたこと、60 mg/kg 群の着床率の低値ならびにそれに起因すると考えられる出産確認時生存児数の減少が認められたことから、本試験における 3,5,5-トリメチルキナールの親世代の雄動物の生殖に対する無影響量 (NOEL) は 300 mg/kg/day、雌動物の生殖に対する無影響量 (NOEL) は 60 mg/kg/day、次世代の発生に対する無影響量 (NOEL) は 12 mg/kg/day であると判断された。

## 緒 言

OECD 既存化学物質の安全性点検事業の一環として、3,5,5-トリメチルヘキサノール (CAS No.3452-97-9) 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反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を実施したので、その成績を報告する。

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 (Combined Repeat Dose and Reproduction/Developmental 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、3,5,5-トリメチルヘキサノール (3,5,5-Trimethylhexanol、以下 TMH と略す) (CAS No.3452-97-9、Lot 番号： 純度：92.7%) で、特有の臭いを有する無色透明な液体である。被験物質は遮光気密容器に入れ、冷蔵庫内 (-1~11℃) に保存した (Appendix 1~3)。なお、投与終了後の被験物質の安定性を製造業者が分析し、投与期間中の被験物質の安定性が確認された (Appendix 4)。

### 2. 投与量の設定

投与量は、本試験の用量設定試験 (SR-9534、14 日間反復投与試験) の結果を参考に設定した。用量設定試験では、100、300 および 1000 mg/kg/day をそれぞれ雌雄各 5 例に投与したところ、1000 mg/kg 群で死亡あるいは衰弱による屠殺が雄で 5 例中 4 例、雌で 5 例全例にみられ、300 mg/kg 群で体重増加抑制、摂餌量の低値、肝臓の体重重量比の高値が認められ、さらに 300 mg/kg 群の雌では 5 例中 2 例に性周期の異常が認められた。100 mg/kg 群の雌では肝臓の体重重量比の高値が認められた。以上の成績から、本試験では投与期間が用量設定試験の約 3 倍になることを勘案し、高用量は、明らかな毒性徴候がみられる用量として 300 mg/kg 群とした。以下、公比 5 で中間用量 60 mg/kg/day および低用量 12 mg/kg/day を設定し、さらに媒体であるオリブ油を投与する対照群を設け、計 4 群とした (Table 1)。動物数は 1 群当たり雌雄各 12 匹とした。

なお、生殖能検査における交配期間中の膣スメア標本の観察で 12 mg/kg 群の雌 1 例に鏡検ミスが生じ、妊娠期日の判定および投与容量の算定誤りが生じた。そのため、同例では交尾および妊娠の成立までのデータを採用することとし、妊娠期間以降については投与容量が正しくないため、評価から除くこととした。

### 3. 被験物質の調製方法

被験物質を精秤し、0.24、1.2 および 6 w/v% となるようにオリーブ油（日本薬局方：Lot No.508014、509003、510022、511014、601005、ヤクハン製薬株式会社）に溶解し、調製した。財団法人日本食品分析センターにより調製液の冷蔵保存での 7 日後の分析を実施し（Appendix 5）、その結果から調製液の 7 日間の安定性が確認されたため、調製頻度は 7 日に 1 回以上とし、投与に用いるまで遮光気密容器に入れ、冷蔵庫内（2～8℃）に保存した。各濃度の TMH 調製液は規定の濃度であり、かつ均一であることが財団法人日本食品分析センターにより確認された（Appendix 5）。

### 4. 試験動物

生後 8 週齢の Crj:CD (SD) 系の SPF ラット（雄：55 匹、体重範囲 242～268 g、雌：55 匹、体重範囲 164～200 g）を日本チャールス・リバー株式会社から受け入れ、15 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 回実施し、順調な発育を示した動物を試験に用いた。雌については、10 日間の性周期検査を併せて行い、性周期に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、バリアシステム内で温度  $23 \pm 3$  °C、湿度  $RH55 \pm 10\%$ 、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）に設定された飼育室 310 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。雌は妊娠 17 日から金網床のかわりに実験動物用床敷（ホワイトフレーク、日本チャールス・リバー株式会社）を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) を自動給水装置あるいは給水器 (雄の尿検査時の飲水量測定時) 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 (Appendix 6、7) およびオリエンタル酵母工業株式会社 (Appendix 8、9) 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 (Appendix 10、11、12)。

## 6. 群分けおよび個体識別

群分けは馴化 15 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。出生児については油性フェルトペンを用いて背部にケージ内識別を行った。ケージには、親動物の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。

## 7. 投与方法

投与経路は、被験物質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 日間および交配期間を含む 46 日間、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 373.9 g (335~399 g)、雌で 231.5 g (204~260 g) であった。

## 8. 観察、測定および検査項目

## 1) 雄動物について

## (1)一般状態観察

全例について、試験期間中 1 日 1 回以上の頻度で、視診および触診により行動、外観を観察した。発現した症状についてはその種類および持続時間を記録した。

## (2)体重測定

全例について、投与 1 日（当日の投与前）、投与 2、5、7、10 および 14 日、その後は 7 日毎ならびに投与終了日および剖検日に電子天秤を用いて測定した。得られた測定値から、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（当日の投与前）、投与 2、5、7、10 および 14 日、その後は交配期間を除き体重測定日と同じ日に電子天秤を用いて測定した。測定前日に適量の飼料ををケージ毎にセットし、翌日（測定日）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)尿検査

投与期間の最終週（投与 43～44 日）に各群 6 例について、ラット用代謝ケージ（KN-646 B-1 型、夏目製作所）に収容して非絶食下で採尿を行った。約 3 時間の蓄尿の一部を用いて下記①～⑧の項目を検査し、21 時間蓄尿を用いて下記⑨および⑩の項目の検査を行った。また、採尿中の飲水量を測定した。

|                     |                |
|---------------------|----------------|
| ①pH                 | 試験紙法（バイエル・三共）  |
| ②蛋白（Pro）            | 試験紙法（バイエル・三共）  |
| ③糖（Glu）             | 試験紙法（バイエル・三共）  |
| ④ケトン体（Ket）          | 試験紙法（バイエル・三共）  |
| ⑤ウロビリノーゲン（Uro）      | 試験紙法（バイエル・三共）  |
| ⑥ビリルビン（Bil）         | 試験紙法（バイエル・三共）  |
| ⑦潜血反応（Occult blood） | 試験紙法（バイエル・三共）  |
| ⑧沈渣（Sediment）       | 鏡検             |
| ⑨比重（Grav）           | 屈折計法（アタゴ製ユリコン） |
| ⑩尿量（U-Vol）          | 容量測定           |
| ⑪採尿中の飲水量            | 重量測定           |

## (5)血液学的検査

投与 46 日の翌日の剖検時に、前日から約 16 時間絶食した全例について、エーテル麻醉下で大腿静脈から採血した。EDTA・2K で処理した血液を用いて、下記①～⑨および⑬の項目について検査を行った。さらに、⑩の項目は大腿静脈から採血した無処理血液を用いて、⑪、⑫の項目については、腹部大動脈から採血した血液をクエン酸ナトリウムで処理した後、3000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、得られた血漿を用いて検査を行った。

|                             |                                          |
|-----------------------------|------------------------------------------|
| ①赤血球数 (RBC)                 | 電気抵抗法 (コールター原理)<br>(コールターカウンター T660 型)   |
| ②ヘマトクリット値 (Ht)              | RBC, MCV 値より算出<br>(コールターカウンター T660 型)    |
| ③血色素量 (Hb)                  | シアンメトヘモグロビン法(国際法)<br>(コールターカウンター T660 型) |
| ④平均赤血球容積 (MCV)              | 電気抵抗法 (コールター原理)<br>(コールターカウンター T660 型)   |
| ⑤平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)         | RBC, Hb 値より算出<br>(コールターカウンター T660 型)     |
| ⑥平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)       | Ht, Hb 値より算出<br>(コールターカウンター T660 型)      |
| ⑦網赤血球率 (Ret)                | Brecher 法                                |
| ⑧血小板数 (Plat)                | 電気抵抗法 (コールター原理)<br>(コールターカウンター T660 型)   |
| ⑨白血球数 (WBC)                 | 電気抵抗法 (コールター原理)<br>(コールターカウンター T660 型)   |
| ⑩凝固時間 (CT)                  | 流体粘度変化による空気圧測定法<br>(グライナー社製マイクロアグロメーター)  |
| ⑪プロトロンビン時間 (PT)             | トロンボプラスチン法<br>(AMELUNG KC-10A バクスター-KK)  |
| ⑫活性化部分トロンボプラスチン時間<br>(APTT) | エラジン酸法<br>(AMELUNG KC-10A バクスター-KK)      |
| ⑬白血球型別百分率 (Hemogram of WBC) | メイ・ギムザ染色標本鏡検                             |

## (6)血液化学的検査

投与 46 日の翌日の剖検時に、前日から約 16 時間絶食した全例について、エーテル麻醉下で、血液学的検査のための採血後、腹部大動脈から採血し、3000 rpm で 10 分間の遠心分離を行い、得られた血清を用いて次の検査を行った。

|                   |                                                         |
|-------------------|---------------------------------------------------------|
| ①GOT              | IFCC 法 (日立 7150 形自動分析装置)                                |
| ②GPT              | IFCC 法 (日立 7150 形自動分析装置)                                |
| ③ $\gamma$ -GTP   | 包接 L- $\gamma$ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法<br>(日立 7150 形自動分析装置) |
| ④コリンエステラーゼ (ch-E) | ヨウ化ブチリルチオコリン基質法<br>(日立 7150 形自動分析装置)                    |
| ⑤血糖 (Glu)         | ヘキソキナーゼ法<br>(日立 7150 形自動分析装置)                           |
| ⑥総コレステロール (T-Cho) | 酵素法 (日立 7150 形自動分析装置)                                   |
| ⑦トリグリセリド (TG)     | 遊離グリセロール消去法<br>(日立 7150 形自動分析装置)                        |
| ⑧リン脂質 (PL)        | 酵素法 (日立 7150 形自動分析装置)                                   |
| ⑨総ビリルビン (T-Bil)   | アゾビリルビン法<br>(日立 7150 形自動分析装置)                           |
| ⑩尿素窒素 (BUN)       | ウレアーゼ・インドフェノール法<br>(日立 7150 形自動分析装置)                    |
| ⑪クレアチニン (Crea)    | ヤッフエ法 (日立 7150 形自動分析装置)                                 |
| ⑫ナトリウム (Na)       | 炎光法 (コーニング 480 型炎光光度計)                                  |
| ⑬カリウム (K)         | 炎光法 (コーニング 480 型炎光光度計)                                  |
| ⑭クロール (Cl)        | 電量滴定法 (平沼 CL-6M 型クライトカウンター)                             |
| ⑮カルシウム (Ca)       | OCPC 法 (日立 7150 形自動分析装置)                                |
| ⑯無機リン (IP)        | フィスケ・サバロー法<br>(日立 7150 形自動分析装置)                         |
| ⑰総蛋白 (TP)         | ビウレット法 (日立 7150 形自動分析装置)                                |
| ⑱アルブミン (Alb)      | BCG 法 (日立 7150 形自動分析装置)                                 |
| ⑲A/G 比 (A/G)      | TP, Alb 値より算出する。                                        |
| ⑳蛋白分画             | セルロースアセート膜電気泳動法                                         |

## (7)剖検および器官重量測定

投与 46 日の翌日に、前日から約 16 時間絶食した全例について、体外表を観察し、エーテル麻酔下で前述のように採血した後、腹部大動脈から採血後、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。その後、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はデビッドソン液で固定・保存し、精巣および精巣上体はブアン液で固定し、70%エタノールに保存した。

摘出器官のうち、肝臓、腎臓（左右）、胸腺、副腎（左右）、精巣および精巣上体（左右）について固定前の重量を電子天秤を用いて測定した。得られた測定値から、器官体重重量比〔（器官重量／動物体重）×100〕を算出した。

## (8)病理組織学的検査

摘出器官のうち、全例の肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳、下垂体、胸腺、副腎、甲状腺、胃（前胃・腺胃）、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、精巣、精巣上体および前立腺について、パラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本ならびに必要な応じて特殊染色（PAS 染色、PTAH 染色、Oil red O 染色、ベルリン青染色）標本作製し、病理組織学的検査を行った。

## 2) 雌動物について

## (1)一般状態観察

全例について、試験期間中 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および持続時間を記録した。

## (2)体重測定

全例について、投与 1 日（当日の投与前）、投与 2、5、7、10 および 14 日、妊娠 0、1、3、5、7、10、14、17 および 20 日、哺育 0、1 および 4 日に、また、交配期間中（雄と同居中）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。得られた測定値から、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（当日の投与前）、投与 2、5、7、10 および 14 日、妊娠 1、3、5、7、10、14、17 および 20 日、哺育 1 および 4 日に電子天秤を用いて測定した。測定前日に適当量の飼料ををケージ毎にセットし、翌日（測定日）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、それぞれエーテル麻酔下で腹部大動脈から放血致死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。その後、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、脾臓、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）、脊髓（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、子宮および陰を 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。

子宮および卵巣については、固定前に着床痕および妊娠黄体を計数した。

摘出器官のうち、肝臓、腎臓（左右）、胸腺、副腎（左右）および卵巣（左右）については重量を電子天秤を用いて測定し、得られた測定値から器官体重重量比〔（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、全例の肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳、下垂体、胸腺、副腎、甲状腺、胃（前胃・腺胃）、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、卵巣および異常所見部位について、パラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本ならびに必要な応じて特殊染色（PAS 染色、Oil red O 染色、ベルリン青染色、好銀線維染色 [Naumenko & Feigin の渡辺変法]）標本作製し、病理組織学的検査を行った。

### 3) 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（正常または発情休止期継続、不規則発情）を検索した。

#### (2) 雌雄の生殖能検査

投与 14 日の雌雄について、同試験群内で夕方から 1 対 1（無作為組み合わせ）で 14 日間を限度として同居させた。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、交尾率  $\left[ \left( \text{交尾が成立した雌ラット数} / \text{同居ラット数} \right) \times 100 \right]$  および受胎率  $\left[ \left( \text{受胎した雌ラット数} / \text{交尾が成立した雌ラット数} \right) \times 100 \right]$  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。その結果から、妊娠期間  $\left[ \text{妊娠 0 日から哺育 0 日（分娩終了日）までの日数} \right]$ 、出産率  $\left[ \left( \text{生児を出産した雌ラット数} / \text{妊娠雌ラット数} \right) \times 100 \right]$ 、分娩率  $\left[ \left( \text{総出産児数} / \text{着床痕数} \right) \times 100 \right]$ 、出生率  $\left[ \left( \text{出産確認時生存児数} / \text{総出産児数} \right) \times 100 \right]$ 、哺育 4 日時哺育率  $\left[ \left( \text{哺育 4 日時に哺育児の認められる雌ラット数} / \text{正常に分娩した雌ラット数} \right) \times 100 \right]$  および性比  $\left[ \text{雄生児数} / \text{雌生児数} \right]$  を算出した。また、解剖時の計測結果から着床率  $\left[ \left( \text{着床痕数} / \text{妊娠黄体数} \right) \times 100 \right]$  を算出した。

#### (4) 新生児の一般状態観察および生存性

全例について、哺育 0 日から哺育 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。

観察結果から、新生児生存率  $\left[ \left( \text{哺育 4 日生存児数} / \text{出産確認時生存児数} \right) \times 100 \right]$  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1腹毎に雌雄別に1匹あたりの平均値で示した。得られた測定値から、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

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。その他の例については、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。異常所見部位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。

## 9. 統計処理

体重、体重増加量および体重増加率、摂餌量、尿量、採尿中の飲水量、血液学的検査および血液化学的検査の各項目、器官重量、器官体重重量比、妊娠期間、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、哺育4日生存児数および新生児生存率については、Bartlett の検定法を用いて等分散性を検定し、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）で対照群と各 TMH 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、尿検査における pH、蛋白、糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビン、潜血反応、沈渣および比重、ならびに剖検および病理組織学的検査の結果のうち2段階以上の陽性グレードがみられた所見については Kruskal-Wallis 法を用いて解析し、有意な場合（ $p \leq 0.10$ ）、Mann-Whitney の U-検定法で対照群と各 TMH 投与群との比較を行った。

性周期の異常の有無、交尾率、受胎率、出産率および哺育4日時哺育率ならびに病理組織学的検査結果のうち1段階の陽性グレードがみられた所見については次のように検定を行った。すなわち、多試料  $\chi^2$ -検定を行い、その結果、有意な場合（ $p \leq 0.10$ ）は2試料  $\chi^2$ -検定で対照群と各 TMH 投与群との比較を行った。ただし、2試料  $\chi^2$ -検定あるいは多試料  $\chi^2$ -検定に不適合の場合は Fisher の直接確率検定法を用いた。

対照群との検定に際しては、危険率5%以下を統計学的に有意とした。



## 成 績

## 1. 雄動物の反復投与毒性

## (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 に示す。

流涎が 300 mg/kg 群の 3 例で投与 6 日以降、断続的に投与 36 日までみられ、1 日内の発現は投与後 1 分から 40 分の間であった。外尿道口周囲の被毛汚染が 300 mg/kg 群の 4 例で投与 15~18 日に認められた。

## (2) 体重推移

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

いずれの TMH 投与群においても対照群と比較して有意差は認められなかったが、300 mg/kg 群で増加量および増加率の高値傾向が認められた。

## (3) 摂餌量

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

摂餌量の低値が 12 mg/kg 群および 60 mg/kg 群で投与 28 日に、摂餌量の高値が 300 mg/kg 群で投与 10、14、42 および 46 日に認められた。

## (4) 尿検査

尿検査の成績を Table 5、INDIVIDUAL DATA 4-1~4-4 に示す。

尿量の増加が 300 mg/kg 群で認められ、有意差は認められなかったが、飲水量が高値の例がみられた。

## (5) 血液学的検査

血液学的検査の成績を Table 6、INDIVIDUAL DATA 5-1~5-8 に示す。

平均赤血球ヘモグロビン濃度の軽度の減少が 60 mg/kg 群で、ヘマトクリット値および色素量の軽度の減少ならびに好酸球の軽度の増加が 300 mg/kg 群で認められ、同群では赤血球数の減少傾向もみられた。

## (6) 血液化学的検査

血液化学的検査の成績を Table 7、INDIVIDUAL DATA 6-1~6-8 に示す。

尿素窒素およびクロールの減少が 300 mg/kg 群で認められた。

## (7) 器官重量

器官重量および器官体重重量比の成績を Table 8、INDIVIDUAL DATA 7-1~7-8 に示す。

肝臓の体重重量比の増加が 60 mg/kg 群で、肝臓の重量および体重重量比の増加が 300 mg/kg 群で、左右の腎臓の重量および体重重量比の増加が 60 mg/kg 群および 300 mg/kg 群で認められた。

## (8)剖検

剖検の成績を Table 9、INDIVIDUAL DATA 8-1～8-4、29-1-1～29-1-4 に示す。

TMH 投与による影響と考えられる所見として、腎臓の褪色が 60 mg/kg 群で 2 例、300 mg/kg 群で 11 例に認められ、300 mg/kg 群では発現例数に有意差が認められた。また、腎臓の褪色に加えて 300 mg/kg 群の 2 例に腎臓の腫大 (Photo.M-1) が認められた。

他に偶発的と考えられる所見として、肝臓の黄白色斑が対照群および 60 mg/kg 群で各 1 例に、下垂体の嚢胞が 300 mg/kg 群で 1 例に、右の精巣および精巣上体の萎縮が 300 mg/kg 群で 1 例に認められた。

## (9)病理組織学的検査

病理組織学的検査の成績を Table 10、INDIVIDUAL DATA 9-1～9-4、28-1-1～28-1-8、Photo.H-1～H-6 に示す。

TMH 投与による影響と考えられる所見として、腎臓では軽度の近位尿細管上皮の硝子滴沈着が 12 mg/kg 群で 9 例、60 mg/kg 群で 12 例全例、300 mg/kg 群で 10 例に、中等度の近位尿細管上皮の硝子滴沈着 (Photo.H-3、H-4) が 300 mg/kg 群で 2 例に、軽度の近位尿細管上皮の好酸性小体 (Photo.H-4) が 12 mg/kg 群で 9 例に、60 mg/kg 群で 11 例に、300 mg/kg 群で 12 例全例に、軽度の尿細管上皮の再生 (Photo.H-5) が 60 mg/kg 群で 5 例、300 mg/kg 群で 7 例に、中等度の尿細管上皮の再生が 60 mg/kg 群で 1 例に、軽度の顆粒円柱 (Photo.H-5) が 60 mg/kg 群で 2 例、300 mg/kg 群で 5 例に、中等度の顆粒円柱が 60 mg/kg 群および 300 mg/kg 群で各 1 例に認められ、統計学的にも有意な変化であった。60 mg/kg 群では顆粒円柱について有意差はみられなかったが、発現頻度に高値傾向がみられた。また、12 mg/kg 群では 1 例のみであったが、軽度の尿細管上皮の再生が認められた。

また、発現に有意差は認められないものの、高用量群にのみ認められ、TMH 投与との関連が考えられる所見として、300 mg/kg 群で甲状腺に軽度の濾胞の不整形および軽度の濾胞上皮の円柱化 (Photo.H-6、H-7) が各 2 例に、軽度のコロイドの減少が 4 例に、肝臓では軽度の小葉周辺性脂肪化 (Photo.H-1、H-2) が 60 mg/kg 群および 300 mg/kg 群で各 2 例に認められた。

下垂体および副腎、ならびに精巣、精巣上体および前立腺には TMH 投与と関連した変化は認められず、Table 10 に示す他の所見にも被験物質投与との関連は認められなかった。

## 2. 雌動物の反復投与毒性

### (1) 一般状態観察

一般状態観察の成績を Table 11、INDIVIDUAL DATA 10-1～12-4 に示す。

妊娠前投与期間では、流涎が 300 mg/kg 群の 1 例で投与 22 日に、外尿道口周囲の被毛汚染が 300 mg/kg 群の 3 例で投与 6 日以降に認められた。

妊娠期間では、死亡が 300 mg/kg 群の 1 例で妊娠 21 日に認められた。同例では妊娠 8 および 15 日に流涎が認められた他に異常は認められなかった。300 mg/kg 群では衰弱例として 3 例をそれぞれ妊娠 14、18 および 19 日に屠殺した。これらの屠殺例では呼吸緩除および外尿道口周囲の被毛汚染が 3 例全例に、自発運動の減少が 2 例に、膣口からの出血および腹臥が 1 例に、また、散瞳、体温低下がそれぞれ 1 例に認められた。その他の例では、腋窩の皮下腫瘍が 60 mg/kg 群の 1 例に妊娠 14 日以降に認められ、流涎が 300 mg/kg 群の 1 例で妊娠 16 日に認められた。

哺育期間では、哺育 1 日に哺育児全例が死亡したため 300 mg/kg 群の 2 例を屠殺した。また、外尿道口周囲の被毛の汚染が 300 mg/kg 群で 1 例に哺育 0 日に、出血を伴う腋窩の皮下腫瘍が 60 mg/kg 群の 1 例に妊娠期間に引き続き認められた。

### (2) 体重推移

体重推移を Figure 3～5、Table 12～14、INDIVIDUAL DATA 13-1～15-4 に示す。

妊娠前投与期間では、体重増加抑制が 300 mg/kg 群で認められ、投与 5、7 および 10 日の体重、体重増加量および体重増加率の低値が認められた。

妊娠期間でも同様に体重増加抑制が 300 mg/kg 群で認められ、妊娠 0、17 および 20 日の体重ならびに体重増加量の低値が 300 mg/kg 群で認められた。300 mg/kg 群の死亡例および衰弱による屠殺例では、屠殺例 2 例 (No.456、462) で屠殺前に体重の減少が認められた。

哺育期間でも同様に体重増加抑制が 300 mg/kg 群で認められ、体重の低値が哺育 0 および 1 日に認められた。

### (3) 摂餌量

摂餌量の変化を Figure 6～8、Table 15～17、INDIVIDUAL DATA 16-1～18-4 に示す。

妊娠前投与期間では、低値が 300 mg/kg 群で投与 5 および 7 日に、高値が 60 mg/kg 群で投与 2 日に認められた。

妊娠期間では、低値が 12 mg/kg 群で妊娠 10 および 17 日に、60 および 300 mg/kg 群で妊娠 10 日に認められた。300 mg/kg 群の死亡例および衰弱による屠殺例では屠殺例 2 例 (No.456、462) で屠殺前に同群の他の例と比較して摂餌量の減少が認められた。

哺育期間では、いずれの TMH 投与群にも対照群と比較して異常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 18、INDIVIDUAL DATA 19-1～19-4 に示す。

肝臓の重量の増加が 300 mg/kg 群で、肝臓の体重重量比の増加が 60 および 300 mg/kg 群で、左右の腎臓の体重重量比の増加が 300 mg/kg 群で認められた。

## (5)剖検

剖検の成績を Table 19、INDIVIDUAL DATA 20-1～20-4、29-2-1～29-2-4 に示す。

## (5)-1 300 mg/kg 群の死亡および衰弱屠殺例

肝臓の黄白色化が 2 例に、副腎の腫大が 2 例、暗赤色化が 1 例に、胃の内腔拡張および胃内の液状内容物貯留が 1 例に、腺胃粘膜の暗赤色斑が 3 例に、子宮内および腔内血液貯留が 1 例に認められた。なお、これらの母動物はいずれも妊娠が成立しており、子宮内には胎児が確認された。

## (5)-2 計画屠殺例（全哺育児死亡例を含む）

肝臓の黄白色化が 300 mg/kg 群の全哺育児死亡例 1 例、黄白色斑が 60 mg/kg 群で 1 例に、腎臓の白色斑散在が対照群で 1 例に、脾臓の腫大が対照群で 1 例に、腋窩皮下の黄白色腫瘍が 60 mg/kg 群で 1 例に、腔の嚢胞が 300 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 20、INDIVIDUAL DATA 21-1～21-4、28-2-1～28-2-8 に示す。

## (6)-1 300 mg/kg 群の死亡および衰弱屠殺例

TMH 投与による影響と考えられる所見として、肝臓では軽度あるいは中等度の小葉周辺性脂肪化が 4 例全例に、胸腺で軽度あるいは中等度の萎縮が 3 例に認められ、計画屠殺例も含めた発現例数について対照群と比較して有意差が認められた。

他に、腎臓では尿細管上皮の軽度の脂肪変性（Photo.H-8、H-9）が 3 例に認められた。

脾臓では軽度の萎縮が 2 例に、軽度のヘモジデリン沈着が 3 例に認められた。

副腎では束状帯における軽度のリポイド増加が 1 例に、束状帯における軽度の皮質細胞肥大が 2 例に、うっ血が 1 例に認められた。

腺胃では軽度のびらんが 3 例に認められた。

## (6)-2 計画屠殺例（全哺育児死亡例を含む）

TMH 投与による所見として、肝臓では軽度あるいは中等度の小葉周辺性脂肪化が 300 mg/kg 群の 4 例に、腎臓では尿細管上皮の軽度の脂肪変性が 60 mg/kg 群の 3 例、300

mg/kg 群の 2 例に、胸腺では中等度の萎縮が 300 mg/kg 群の全哺育児が死亡した 2 例を含み、3 例に認められた。

脾臓では髄外造血の軽度の亢進が対照群で 1 例に、ヘモジデリン沈着が対照群、12 mg/kg 群および 60 mg/kg 群で各 2 例に、300 mg/kg 群で 4 例に認められ、途中屠殺例も含め、TMH 投与群に多い傾向がみられたが、発現例数に有意差は認められなかった。また、全哺育児が死亡した 300 mg/kg 群の 2 例では、副腎に束状帯における軽度のリポイド増加が認められた。

下垂体、副腎および卵巣には TMH 投与に関連した変化は認められず、Table 20 に示す他の所見にも被験物質投与との関連は認められなかった。

### 3. 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 21、INDIVIDUAL DATA 22-1-1～22-4-2 に示す。

雌の性周期検査では発情休止期の継続が 300 mg/kg 群で 4 例に認められた。これらのうち 3 例では、交尾および妊娠が成立したが、1 例は交尾不成立であった。しかし、対照群と比較して TMH 投与群に交尾までの日数、交尾率および受胎率に有意差は認められなかった。なお、交尾不成立例は 300 mg/kg 群で 1 組、不妊例は対照群および 12 mg/kg 群で各 1 組に認められた。

#### (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 22、23、INDIVIDUAL DATA 23-1-1～23-2 に示す。

着床率、出産確認時生存児数、性比および出産確認時の雄の生存児数の低値が 60 mg/kg 群で、着床数、着床率、出産児数、出産確認時生存児数の低値および出産確認時の雄の生存児数の低値が 300 mg/kg 群で認められた。

哺育異常として、全哺育児死亡例が 300 mg/kg 群で 2 例に認められた。

分娩終了時に死亡児が対照群で雄 1 例、12 mg/kg 群および 60 mg/kg 群で雌各 1 例、300 mg/kg で雄 10 例、雌 1 例に認められたが、いずれの死亡児についても剖検で異常は認められなかった。

### (3)新生児の生存性

新生児の生存性の成績を Table 24、INDIVIDUAL DATA 24-1～24-4 に示す。

哺育 4 日の雌雄を合計した生存児数および雄の生存児数の低値が 60 mg/kg 群で、哺育 4 日の雌雄を合計した生存児数、哺育 4 日までの新生児生存率、哺育 4 日の雌雄の生存児数の低値が 300 mg/kg 群で認められた。

### (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 25、INDIVIDUAL DATA 25-1～25-4 に示す。

死亡あるいは不明例が対照群で雄 1 例および雌 2 例に、12 mg/kg 群で雌 2 例に、60 mg/kg 群で雌雄各 3 例に、300 mg/kg 群で雄 15 例および雌 10 例に認められた。これらの例のうち、痕跡尾が対照群で雌 1 例に認められた。

生存例ではいずれの群においても異常は認められなかった。

### (5)新生児の体重推移

新生児の体重推移を Figure 9、Table 26、INDIVIDUAL DATA 26-1～26-4 に示す。

雄では体重の低値が 300 mg/kg 群で哺育 0 日に、体重増加量および体重増加率の低値が 12 mg/kg 群で認められた。

雌では体重の低値が 300 mg/kg 群で哺育 0 日に認められた。

### (6)新生児の剖検

新生児の剖検の成績を Table 27、INDIVIDUAL DATA 27-1～27-2-4 に示す。

死亡例では一般状態観察でみられた対照群の雌 1 例の痕跡尾に加え、60 mg/kg 群の雄の 1 例に肝臓の褪色、脾臓の黒色腫瘍、血性腹水が認められた。

哺育 4 日に屠殺した新生児ではいずれの動物においても異常は認められなかった。

## 考 察

TMH の 12、60 および 300 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反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を実施した。

### 1. 反復投与毒性

#### (1)雄動物に及ぼす影響

一般状態観察では、流涎が 300 mg/kg 群の 3 例で投与 6 日以降、断続的に投与 36 日までの投与後 1~40 分の間に認められた。しかし、少数例における散発的な所見であり、投与の継続により発現に増強はみられなかったことから、TMH 投与による毒性症状とは断定できなかった。また、剖検および病理組織学的検査でも唾液腺に異常は認められなかった。300 mg/kg 群では投与 15~18 日に 4 例で外尿道口周囲の被毛汚染が認められたが、他に一般状態の悪化などを示唆する異常は認められず、被験物質投与との関連は認められなかった。

摂餌量では 12 mg/kg 群および 60 mg/kg 群で投与 28 日に一過性の低値が認められたが、同日の対照群の摂餌量が多いことによる有意差と考えられ、TMH 投与との関連はないものと考えられた。また、300 mg/kg 群で摂餌量の高値が認められ、同群の体重も有意差は認められないものの対照群より高値で推移しており、摂餌量の高値との関連が考えられた。

血液に及ぼす影響として、300 mg/kg 群でヘマトクリット値および血色素量の減少、赤血球数の減少傾向が認められたが、軽度であった。60 mg/kg 群の平均赤血球ヘモグロビン濃度の減少、300 mg/kg 群の好酸球の増加は生理的変動範囲を超えるものではなかった。

肝臓に対する TMH 投与の影響として、60 mg/kg 群で体重重量比の増加、300 mg/kg 群で重量および体重重量比の増加がみられ、病理組織学的検査では 60 および 300 mg/kg 群で各 2 例に小葉周辺性脂肪化が認められ、同じ所見が同用量群の雌でもみられていることから、TMH 投与に関連した変化と考えられた。

腎臓では、60 および 300 mg/kg 群で重量および体重重量比の増加、剖検では 60 mg/kg 群で腎臓の褪色、300 mg/kg 群では褪色および腫大が認められ、病理組織学的検査では TMH 投与群全群で近位尿細管上皮の硝子滴沈着および好酸性小体、尿細管上皮の再生、60 および 300 mg/kg 群で顆粒円柱がみられた。炭化水素化合物をラットに投与した場合、特に雄では腎臓の近位尿細管に硝子滴が沈着することが知られており、それ自体に毒性学的な意義はないと考えるが、硝子滴の沈着の程度が強い場合には尿細管上皮の障害および再生を引き起こ

すと考えられている<sup>1)</sup>。好酸性小体についても硝子滴と同一物質という報告がある<sup>2)</sup>。したがって、本試験では TMH 投与によって近位尿細管上皮への硝子滴あるいは好酸性小体の出現の増加をみたが、毒性病理学的影響は 60 および 300 mg/kg の TMH 投与による尿細管上皮の再生および顆粒円柱の出現の増加と考えるのが妥当と判断した。12 mg/kg 群でも尿細管上皮の再生が認められたが、1 例のみの自然発生的にもみられる出現であり、同群では重量にも影響はみられないことから、12 mg/kg 群では TMH 投与による毒性病理学的影響はないものと判断した。なお、300 mg/kg 群では血液化学的検査で尿素窒素およびクロールの減少、尿検査で尿量の増加、採尿中の飲水量の増加が認められ、TMH 投与の影響と考えられたが、これらの所見が腎臓の病理組織学的変化と関連しているかどうかについては、明らかではなかった。

他に病理組織学的検査では 300 mg/kg 群で甲状腺に濾胞の不整形、濾胞上皮の円柱化およびコロイドの減少が認められ、TMH 投与による影響と考えられたが、その機序は明らかではなかった。

## (2)雌動物に及ぼす影響

300 mg/kg 群で妊娠 21 日に死亡例が 1 例認められ、妊娠 14～19 日に衰弱により 3 例を屠殺した。これらの例では剖検で肝臓の黄白色化、病理組織学的検査で肝臓に小葉周辺性脂肪化、腎臓に尿細管上皮の脂肪変性、胸腺の萎縮が認められた。その他には、腺胃にびらん、副腎に束状帯におけるリポイド増加および皮質細胞肥大、ならびにうっ血が認められた。その後、哺育期間では死亡あるいは衰弱例はみられなかったことから、TMH は妊娠期間の母動物に特に強い影響を及ぼしたと考えられた。これらの死亡例および衰弱屠殺例ではいずれも子宮内に胎児が確認されたが、妊娠 14 日衰弱屠殺例では妊娠 13 日より腔口からの出血がみられ、剖検で死亡胎児、子宮内および腔内に血液の貯留がみられていることから、胎児の死亡および出血による一般状態の悪化が生じ、胸腺および脾臓の萎縮、副腎の束状帯におけるリポイド増加および皮質細胞肥大ならびにうっ血は衰弱あるいは投与に起因するストレスによる変化と考えられた。

他に、一般状態観察で流涎が 300 mg/kg 群で妊娠前投与期間および妊娠期間に認められたが、少数例で一過性にみられたものであり、雄と同様、TMH 投与による毒性症状とは断定できなかった。

体重推移では、300 mg/kg 群で妊娠前交配期間、妊娠および哺育期間を通して体重増加抑制が、また、摂餌量の低値が交配前の投与期間に認められ、これらは TMH 投与による影響と考えられた。摂餌量では他に妊娠 10 日に TMH 投与群全群で低値が認められたが、一過性



の変化であり、12 および 60 mg/kg 群では体重推移に影響は認められないことから、TMH 投与との関連はないものと考えられた。

哺育 4 日剖検例では、300 mg/kg 群で死亡・屠殺例と同様に肝臓の黄白色化、病理組織学的検査では 300 mg/kg 群で肝臓に小葉周辺性脂肪化、胸腺の萎縮、60 および 300 mg/kg 群で腎臓に尿細管上皮の脂肪変性が認められ、器官重量では 60 mg/kg 群で肝臓の体重重量比の増加、300 mg/kg 群で肝臓の重量および体重重量比ならびに左右の腎臓の体重重量比の増加が認められ、TMH 投与による影響と考えられた。なお、腎臓の病理組織学的検査では、雄と異なり、近位尿細管上皮の硝子滴沈着および好酸性小体、尿細管上皮の再生ならびに顆粒円柱は認められず、雄に認められない尿細管上皮の脂肪変性が認められたが、これは性差によるものと考えられた。

以上、雄の 60 mg/kg 以上の群の腎臓の重量および体重重量比の増加、軽度の尿細管上皮の再生、雌の 60 mg/kg 以上の群の肝臓の体重重量比の増加および腎臓の軽度の尿細管上皮の脂肪変性から、本試験における TMH の反復投与による無影響量 (NOEL) は雌雄ともに 12 mg/kg/day であると判断された。

## 2. 生殖発生毒性

生殖能検査では雌の性周期検査で 300 mg/kg 群の 4 例に 8～14 日間の発情休止期の継続がみられた。予備試験でも 300 mg/kg 群で発情休止期の継続が 5 例中 2 例に認められており、TMH 投与による影響と考えられた。しかし、TMH 投与群で交尾までの日数、交尾率および受胎率に対照群との有意差は認められず、300 mg/kg 群で発情休止期の継続を示した 4 例のうち 3 例では交尾および妊娠が成立し、交尾不成立は 1 例のみであった。また、300 mg/kg 群の交尾不成立例 1 組、対照群および 12 mg/kg 群の不妊例各 1 組の例に剖検および病理組織学的検査で交尾不成立あるいは不妊を示唆する所見は認められなかった。

母動物の剖検では 60 および 300 mg/kg 群で着床率の低値が認められ、それに起因すると考えられる出産確認時生存児数の減少が認められたことから、TMH 投与による着床に及ぼす影響が考えられた。60 および 300 mg/kg 群では出産確認時の雄の生存児数の減少が認められ、60 mg/kg 群では性比 (雄/雌) の低値が認められたが、300 mg/kg 群で性比に影響は認められず、雌雄ともに生存児数が減少していることから、選択的に雄胎児あるいは雄出生児に影響を及ぼしたとは考えられなかった。また、300 mg/kg 群では母動物の死亡あるいは衰弱屠殺のため、出産率の低値傾向がみられた。

哺育異常として全哺育児死亡例が 300 mg/kg 群で 2 例に認められた。これらの例では出産

児数に影響はみられなかったが、新生児では哺育 0 日の体重の低値がみられ、母動物では病理組織学的検査で胸腺の萎縮および副腎に束状帯におけるリポイド増加が認められたことから、TMH 投与による体重増加抑制などの衰弱あるいは投与に起因するストレスによって母動物の哺育行動に対する影響があったものと考えられた。

生殖器（精巣、精巣上体および卵巣）の重量、剖検および病理組織学的検査では TMH 投与による影響は認められなかった。なお、300 mg/kg 群で精巣の精細管の萎縮が 2 例に、うち 1 例に右の精巣上体に管内精子減少ならびに剥離性精子形成細胞の出現が認められたが、いずれも妊孕性が認められており、精細管の萎縮は対照群でも 1 例に認められていることから、自然発生的なものと考えられ、TMH 投与との関連はないものと考えられた。

新生児では、哺育 4 日の新生児生存率の低値が 300 mg/kg 群で認められ、これは同群の全哺育児死亡 2 例による低値であった。他に、60 mg/kg 群でみられた哺育 4 日の生存児数の低値は、前述の出産確認時の生存児数の低値によるものであり、同群では新生児の生存性に対する影響は認められなかった。

新生児の体重推移では 300 mg/kg 群の雌雄で哺育 0 日に低値が認められ、母体内での成長に及ぼす TMH 投与の影響と考えられた。また、哺育 4 日では対照群と比較して有意差は認められず、体重の増加量および増加率の高値傾向がみられることから、全哺育児が死亡した例を除くと、新生児の生後発育に及ぼす影響はないものと考えられた。12 mg/kg 群では体重増加量および増加率の低値が認められたが、低用量群のみの変化であるため、TMH 投与との関連はないものと考えられた。

新生児の剖検では、60 mg/kg 群の出生児の死亡例で肝臓の褪色、脾臓の黒色腫瘍、血性腹水が認められたが、1 例のみの発現であり、TMH 投与によるものとは考えられなかった。

以上のことから、雄動物の生殖能に対する影響は 300 mg/kg 群でも認められず、一方、300 mg/kg 群の雌では発情休止期の継続がみられ、死亡例・衰弱による屠殺例および全哺育児死亡例がみられたこと、60 mg/kg 群の着床率の低値ならびにそれに起因すると考えられる出産確認時生存児数の減少が認められたことから、本試験における TMH の雄動物の生殖に対する無影響量 (NOEL) は 300 mg/kg/day、雌動物の生殖に対する無影響量 (NOEL) は 60 mg/kg/day、次世代の発生に対する無影響量 (NOEL) は 12 mg/kg/day であると判断された。

参考文献

- 1) Greaves, P., *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies: Interpretaton and Relevance in Drug Safety Evaluation.*, p.532-538, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, Netherlands, 1990.
- 2) 海平充代ら、ラット慢性腎症の病理組織学的解析－硝子滴変性について－,  
第8回日本毒性病理学会講演要旨集, p.76, 1992.

## Figures

- Figure 1. Body weight changes of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- Figure 2. Food consumption of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- Figure 3. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- Figure 4. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- Figure 5. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- Figure 6. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- Figure 7. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- Figure 8. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- Figure 9. Body weight changes of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TMH in rats (SR-9535)

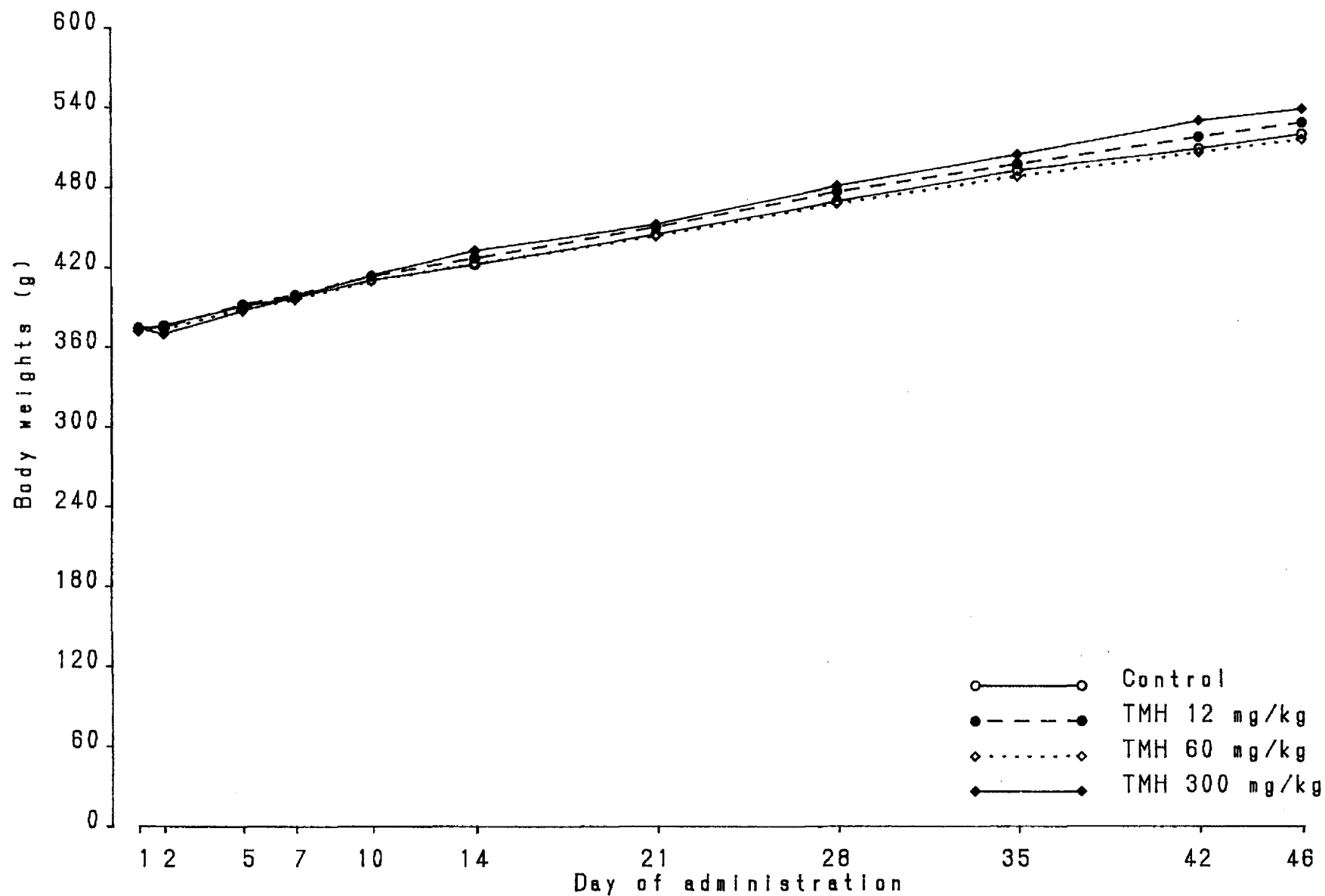


Figure 1. Body weight changes of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

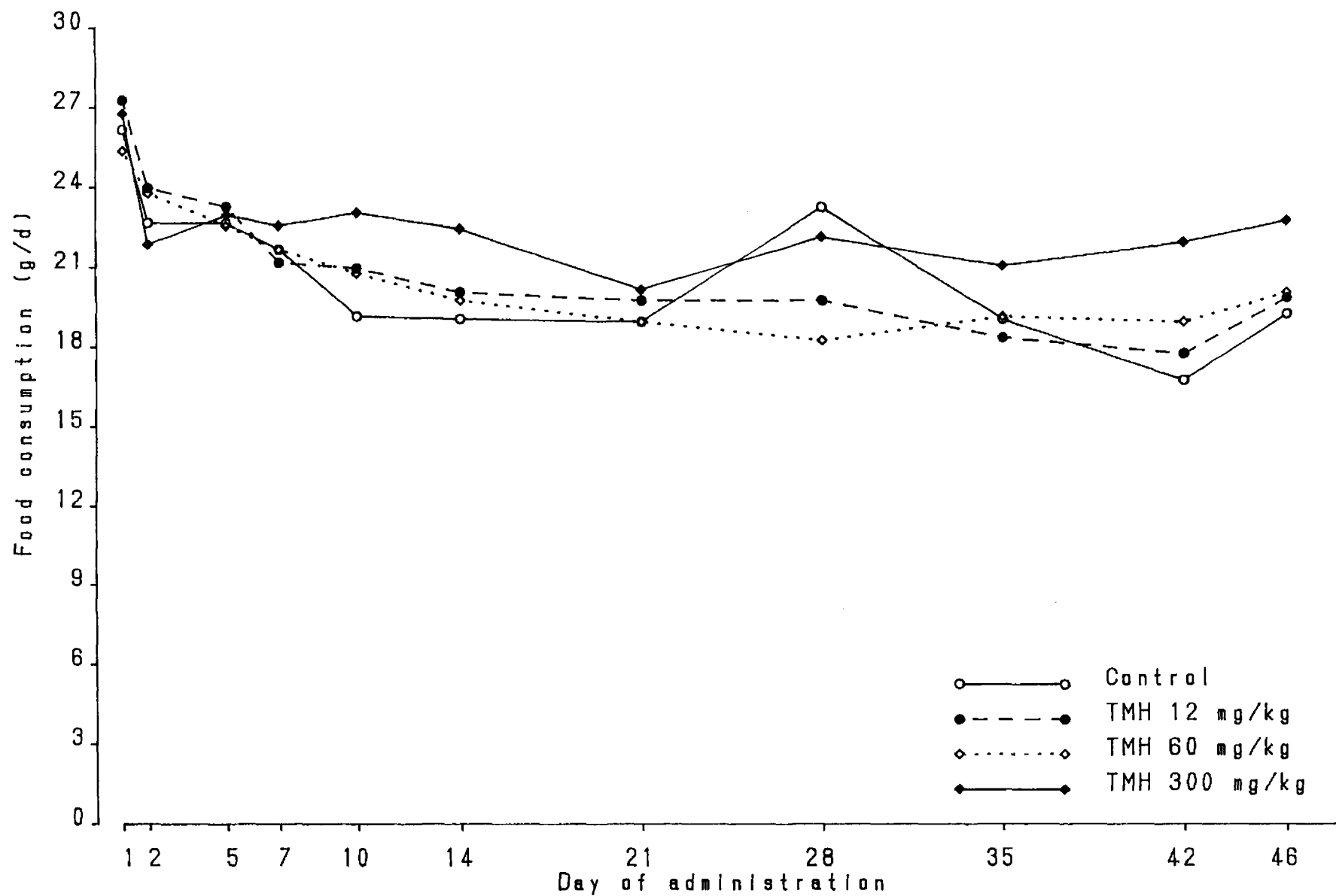


Figure 2. Food consumption of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

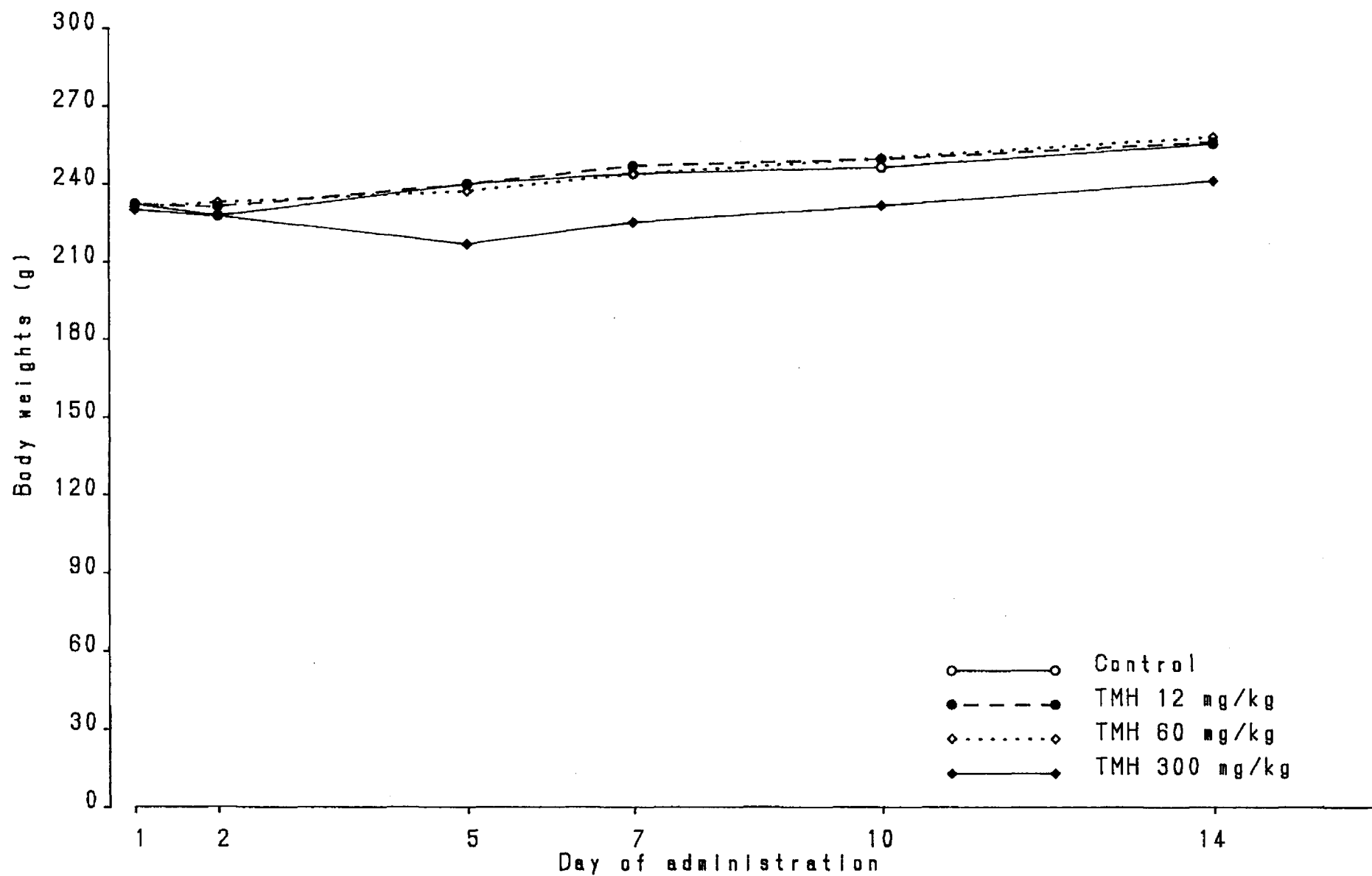


Figure 3. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

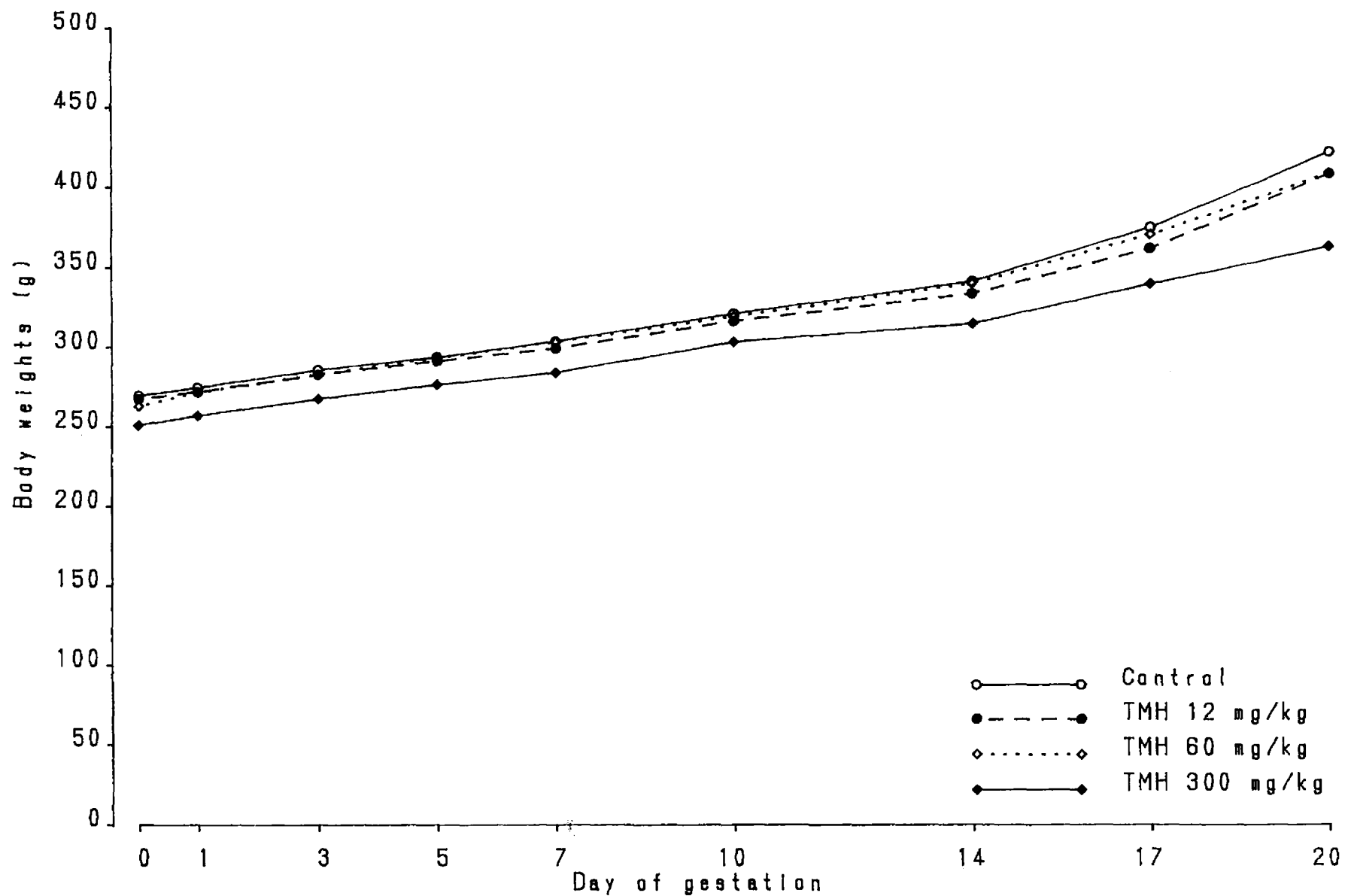


Figure 4. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)



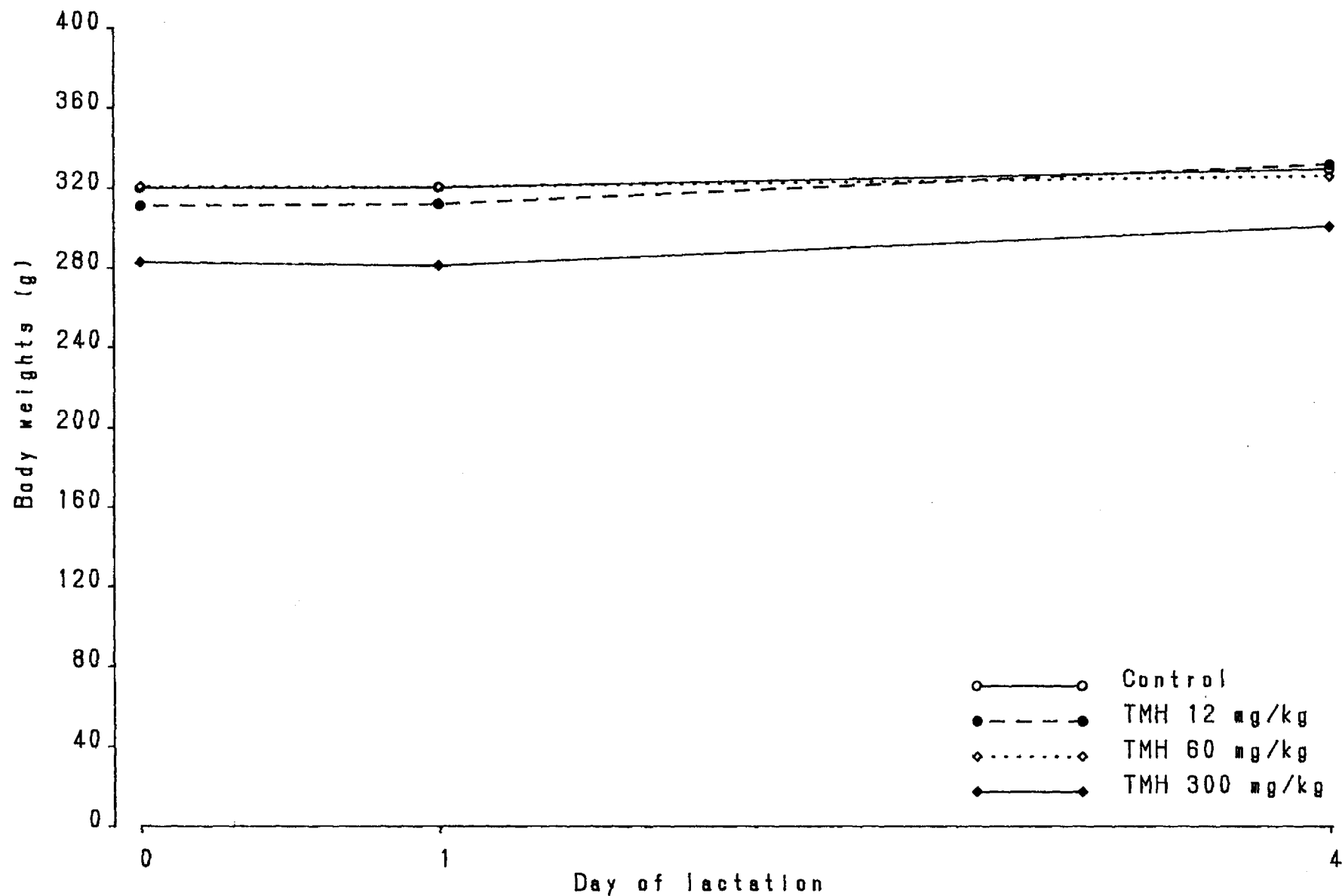


Figure 5. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

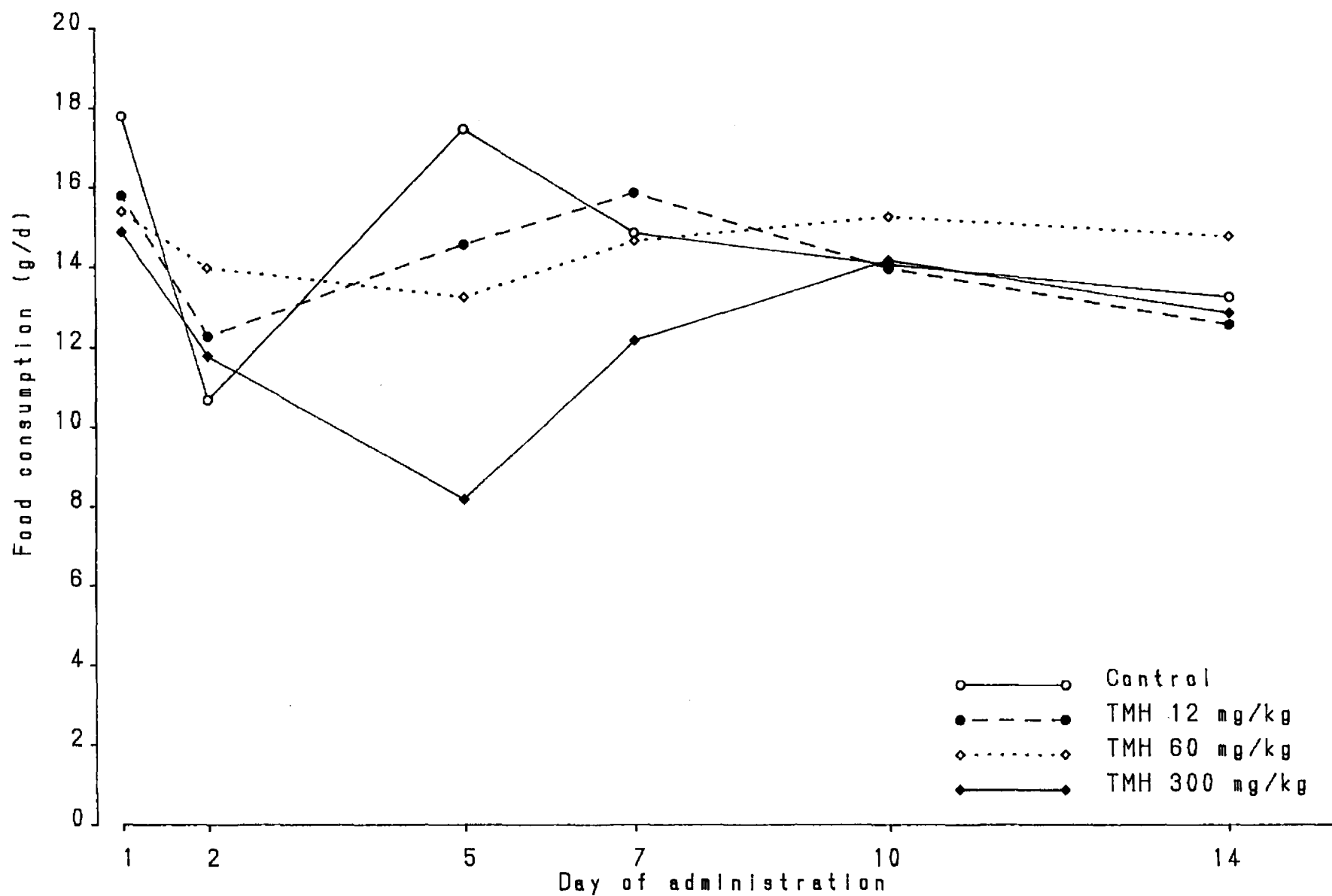


Figure 6. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

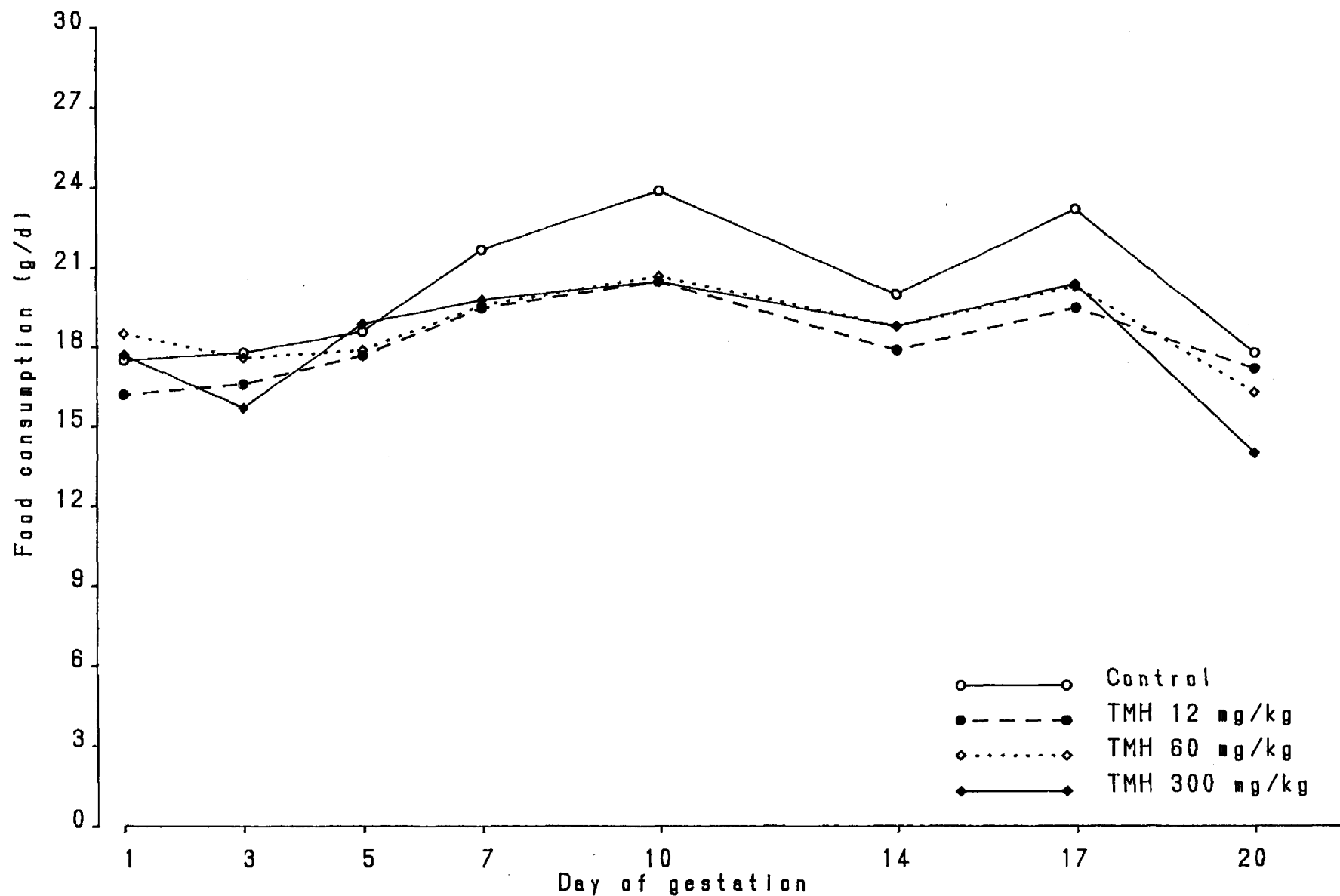


Figure 7. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

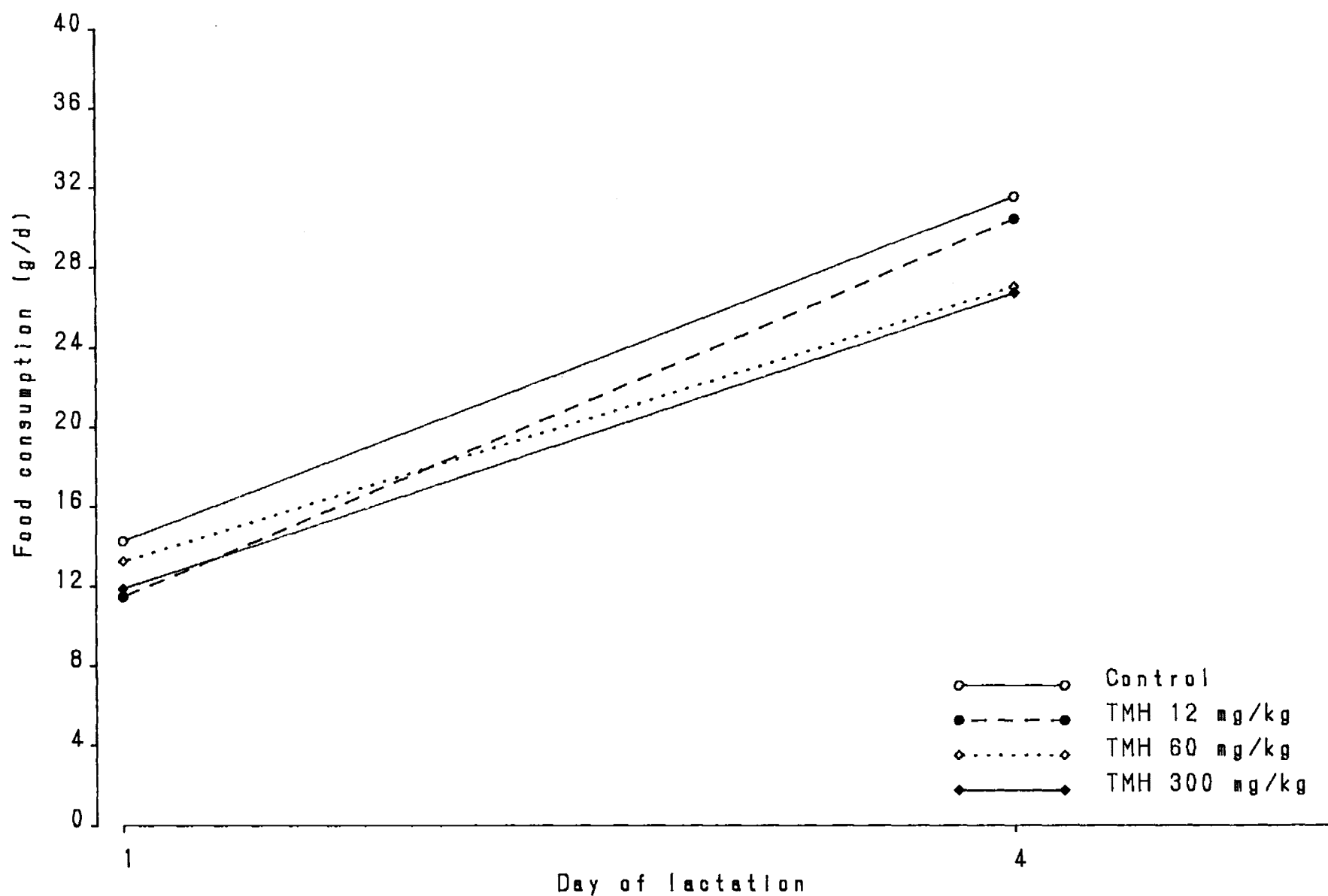


Figure 8. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

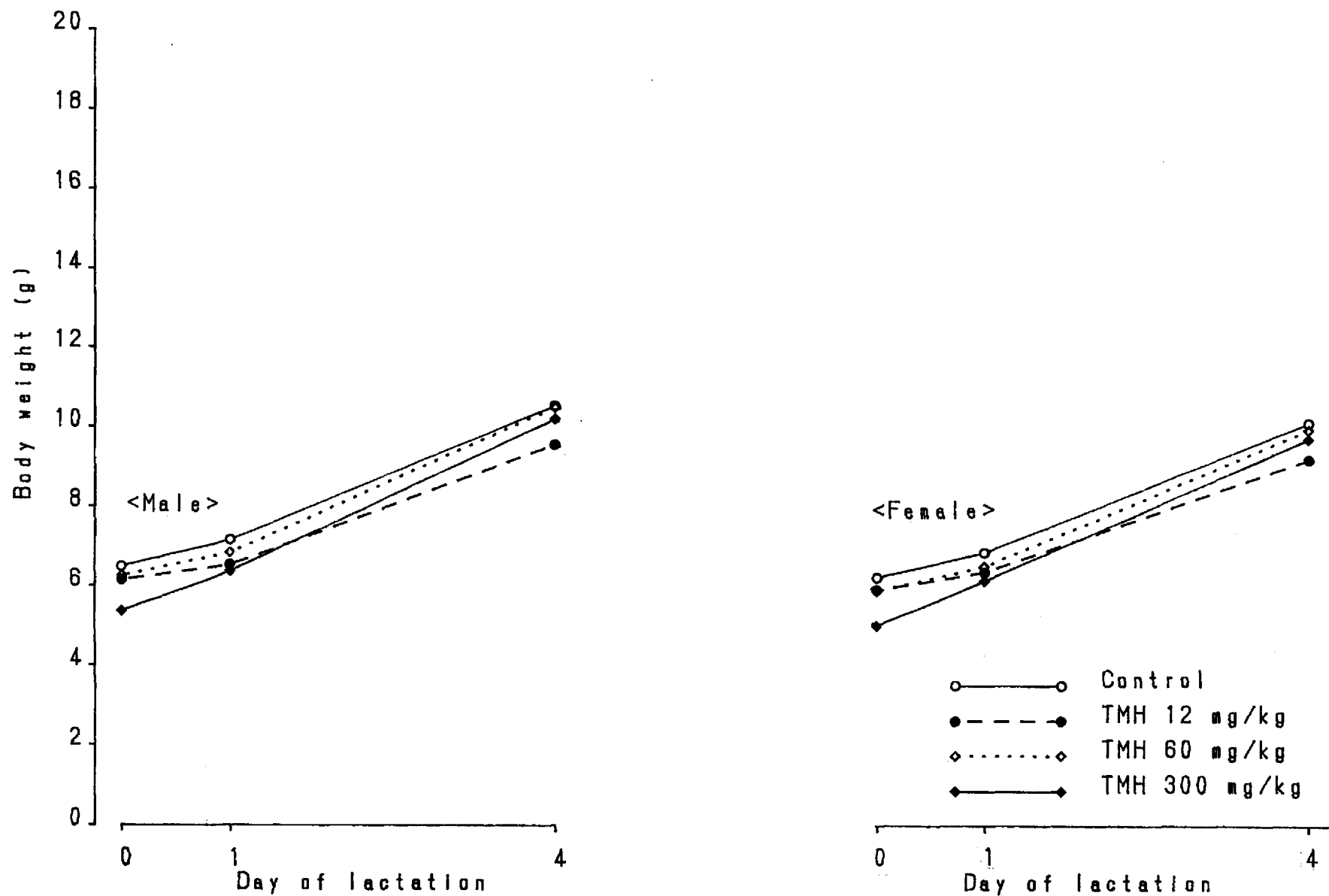


Figure 9. Body weight changes of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TMH in rats (SR-9535)

## Tables

Table 1. Experimental design for the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TMH in rats (SR-9535)

Table 2. General appearance of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

Table 3. Body weight changes of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

Table 4. Food consumption of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

Table 5. Urinary findings of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

Table 6. Hematological findings of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

Table 7. Biochemical findings of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

Table 8. Absolute and relative organ weights of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

Table 9. Gross pathological findings of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

Table 10. Histopathological findings of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

Table 11. General appearance of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

Table 12. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

Table 13. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

Table 14. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

Table 15. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

Table 16. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

Table 17. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

- Table 18. Absolute and relative organ weights of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- Table 19. Gross pathological findings of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- Table 20. Histopathological findings of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- Table 21. Influence of TMH on reproductive ability of rats in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)
- Table 22. Influence of TMH on delivery and maternal behavior in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats (SR-9535)
- Table 23. Gross pathological findings of dead pups at birth in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TMH in rats (SR-9535)
- Table 24. Influence of TMH on viability of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats (SR-9535)
- Table 25. General appearance of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TMH in rats (SR-9535)
- Table 26. Body weight changes of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TMH in rats (SR-9535)
- Table 27. Gross pathological findings of pups which were dead after birth or killed on day 4 of lactation in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TMH in rats (SR-9535)

Table 1. Experimental design for the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TMH in rats (SR-9535)

| Group             | Concentration<br>of TMH<br>(w/v %) | Volume<br>(ml/kg) | a<br>No. of animals |        |
|-------------------|------------------------------------|-------------------|---------------------|--------|
|                   |                                    |                   | Male                | Female |
| b<br>Control      | 0                                  | 5                 | 12                  | 12     |
| c<br>TMH 12 mg/kg | 0.24                               | 5                 | 12                  | 12     |
| TMH 60 mg/kg      | 1.2                                | 5                 | 12                  | 12     |
| TMH 300 mg/kg     | 6                                  | 5                 | 12                  | 12     |

a: TMH (3,5,5-Trimethylhexanol) 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 olive oil.

c: TMH was dissolved in olive oil.



Table 2. General appearance of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

| Item                                            | Control           | TMH (mg/kg) |    |     |
|-------------------------------------------------|-------------------|-------------|----|-----|
|                                                 |                   | 12          | 60 | 300 |
| No. of animals examined                         | 12                | 12          | 12 | 12  |
| Salivation                                      | <sup>a</sup><br>0 | 0           | 0  | 3   |
| Soiled fur around the external urethral orifice | 0                 | 0           | 0  | 4   |

a: Values are no. of animals with findings.

Table 2. (continued) (Number of males showing salivation and soiled fur around the external urethral orifice in TMH 300 mg/kg group)

|                                                                           | Day of administration |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|                                                                           | 1-5                   | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 |
| No. of animals observed                                                   | <sup>a</sup><br>12    | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| No. of animals showing salivation                                         | 0                     | 2  | 1  | 3  | 0  | 0  | 3  | 1  | 2  | 0  | 0  | 1  | 1  | 0  | 2  | 0  | 0  |
| No. of animals showing soiled fur<br>around the external urethral orifice | 0                     | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 3  | 3  | 3  | 2  | 0  | 0  | 0  |

|                                                                           | Day of administration |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------|
|                                                                           | 22                    | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37-46 |
| No. of animals observed                                                   | 12                    | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12    |
| No. of animals showing salivation                                         | 0                     | 1  | 0  | 1  | 1  | 0  | 0  | 0  | 2  | 0  | 1  | 0  | 0  | 0  | 1  | 0     |
| No. of animals showing soiled fur<br>around the external urethral orifice | 0                     | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0     |

a: Total no. of animals observed.

Table 3. Body weight changes of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

| 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    |
| b             |                |                       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |                  |        |
| Control       | 12             | 373.8                 | 376.5 | 391.5 | 397.8 | 410.8 | 422.8 | 445.3 | 470.3 | 493.4 | 509.8 | 520.8 | 147.000          | 39.258 |
|               |                | 15.6                  | 15.5  | 17.0  | 18.5  | 21.2  | 22.5  | 24.3  | 24.3  | 28.0  | 34.4  | 37.5  | 27.379           | 6.644  |
| TMH 12 mg/kg  | 12             | 374.8                 | 375.3 | 392.7 | 399.9 | 414.2 | 427.8 | 450.8 | 477.5 | 498.3 | 518.6 | 529.3 | 154.500          | 41.116 |
|               |                | 11.7                  | 12.9  | 15.7  | 18.4  | 21.0  | 24.4  | 27.6  | 32.2  | 39.8  | 42.5  | 47.7  | 41.164           | 10.397 |
| TMH 60 mg/kg  | 12             | 372.3                 | 373.7 | 389.5 | 396.2 | 410.6 | 423.3 | 444.3 | 468.6 | 488.9 | 506.9 | 516.9 | 144.667          | 38.837 |
|               |                | 17.1                  | 17.6  | 18.4  | 19.4  | 19.6  | 21.8  | 22.1  | 24.5  | 25.5  | 29.5  | 33.1  | 22.260           | 5.572  |
| TMH 300 mg/kg | 12             | 374.7                 | 370.1 | 387.8 | 398.2 | 414.4 | 433.3 | 452.8 | 481.8 | 505.3 | 530.4 | 539.4 | 164.750          | 43.846 |
|               |                | 15.8                  | 15.7  | 19.8  | 22.5  | 25.0  | 28.3  | 28.0  | 32.7  | 37.5  | 41.5  | 45.9  | 34.955           | 8.087  |

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

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

Table 4. Food consumption of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test(SR-9535)

| Group         | No. of animals | Day of administration |      |      |      |       |       |       |        |      |        |        |
|---------------|----------------|-----------------------|------|------|------|-------|-------|-------|--------|------|--------|--------|
|               |                | 1                     | 2    | 5    | 7    | 10    | 14    | 21    | 28     | 35   | 42     | 46     |
| Control       | 12             | a                     |      |      |      |       |       | (11)b |        |      |        |        |
|               |                | 26.2                  | 22.7 | 22.7 | 21.7 | 19.2  | 19.1  | 19.0  | 23.3   | 19.1 | 16.8   | 19.3   |
|               |                | 2.5                   | 2.2  | 2.6  | 2.7  | 3.0   | 2.3   | 2.4   | 1.6    | 3.1  | 2.3    | 1.5    |
| TMH 12 mg/kg  | 12             | 27.3                  | 24.0 | 23.3 | 21.2 | 21.0  | 20.1  | 19.8  | 19.8** | 18.4 | 17.8   | 20.0   |
|               |                | 2.5                   | 2.0  | 2.9  | 2.9  | 4.0   | 3.2   | 3.6   | 3.2    | 3.2  | 2.5    | 2.4    |
| TMH 60 mg/kg  | 12             | 25.4                  | 23.8 | 22.6 | 21.7 | 20.8  | 19.8  | 19.0  | 18.3** | 19.2 | 19.0   | 20.1   |
|               |                | 2.2                   | 2.3  | 1.7  | 2.3  | 1.4   | 2.5   | 1.9   | 2.1    | 1.8  | 2.7    | 2.1    |
| TMH 300 mg/kg | 12             |                       |      |      |      |       |       | (10)  | (10)   |      |        |        |
|               |                | 26.8                  | 21.9 | 23.0 | 22.6 | 23.1* | 22.5* | 20.2  | 22.2   | 21.1 | 22.0** | 22.8** |
|               |                | 3.2                   | 2.9  | 4.1  | 4.4  | 3.2   | 4.1   | 2.3   | 3.3    | 2.5  | 2.6    | 4.1    |

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

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

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

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

Table 5. Urinary findings of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

| Group             | No. of animals | pH  |     |                 |     | Pro   |             | Glu    | Ket              |                 |                 | Uro       | Bil              | Occult blood              |     |
|-------------------|----------------|-----|-----|-----------------|-----|-------|-------------|--------|------------------|-----------------|-----------------|-----------|------------------|---------------------------|-----|
|                   |                | 7.0 | 7.5 | 8.0             | 8.5 | -     | ±           | -      | -                | ±               | +               | 0.1 EU/dl | -                | -                         | +++ |
| a                 |                |     |     |                 |     |       |             |        |                  |                 |                 |           |                  |                           |     |
| Control           | 6              | 0   | 0   | 3               | 3   | 5     | 1           | 6      | 1                | 4               | 1               | 6         | 6                | 5                         | 1   |
| TMH 12 mg/kg      | 6              | 0   | 0   | 4               | 2   | 4     | 2           | 6      | 2                | 1               | 3               | 6         | 6                | 6                         | 0   |
| TMH 60 mg/kg      | 6              | 0   | 2   | 3               | 1   | 6     | 0           | 6      | 3                | 2               | 1               | 6         | 6                | 6                         | 0   |
| TMH 300 mg/kg     | 6              | 1   | 1   | 2               | 2   | 6     | 0           | 6      | 4                | 2               | 0               | 6         | 6                | 6                         | 0   |
| Urinary sediments |                |     |     |                 |     |       |             |        |                  |                 |                 |           |                  |                           |     |
| Group             | No. of animals | RBC | WBC | Epithelial cell |     |       |             |        | Specific gravity |                 |                 |           | U-Vol<br>ml/21hr | Water<br>consumption<br>g |     |
|                   |                |     |     | Squamous        |     | Round | Small round | Others | 1.021-<br>1.030  | 1.031-<br>1.040 | 1.041-<br>1.050 | 1.050<    |                  |                           |     |
|                   |                | -   | -   | -               | ±   | -     | -           | -      |                  |                 |                 |           |                  |                           |     |
| b                 |                |     |     |                 |     |       |             |        |                  |                 |                 |           |                  |                           |     |
| Control           | 6              | 6   | 6   | 6               | 0   | 6     | 6           | 6      | 1                | 0               | 2               | 3         | 8.83<br>4.43     | 12.7<br>6.3               |     |
| TMH 12 mg/kg      | 6              | 6   | 6   | 6               | 0   | 6     | 6           | 6      | 1                | 4               | 0               | 1         | 12.00<br>5.09    | 14.0<br>8.9               |     |
| TMH 60 mg/kg      | 6              | 6   | 6   | 5               | 1   | 6     | 6           | 6      | 0                | 1               | 4               | 1         | 10.67<br>2.68    | 14.5<br>8.4               |     |
| TMH 300 mg/kg     | 6              | 6   | 6   | 5               | 1   | 6     | 6           | 6      | 0                | 3               | 3               | 0         | 16.67*<br>5.58   | 18.0<br>11.2              |     |

a: Values are no. of animals with findings.

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

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

Table 6. Hematological findings of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

| Group           | No. of animals | RBC<br>10 <sup>6</sup> /μl | Ht.<br>%   | Hb.<br>g/dl | MCV<br>fl    | MCH<br>pg  | MCHC<br>% | WBC<br>10 <sup>3</sup> /μl | Plat<br>10 <sup>3</sup> /μl |            |             |             |
|-----------------|----------------|----------------------------|------------|-------------|--------------|------------|-----------|----------------------------|-----------------------------|------------|-------------|-------------|
| <hr/>           |                |                            |            |             |              |            |           |                            |                             |            |             |             |
| Control         | 12             | 9.390                      | 52.62      | 16.35       | 56.05        | 17.38      | 31.03     | 11.86                      | 1075.8                      |            |             |             |
|                 |                | 0.350                      | 1.89       | 0.63        | 1.61         | 0.79       | 0.79      | 2.35                       | 88.3                        |            |             |             |
| TMH 12 mg/kg    | 12             | 9.584                      | 52.63      | 16.20       | 54.93        | 16.87      | 30.76     | 12.48                      | 1093.1                      |            |             |             |
|                 |                | 0.575                      | 2.90       | 0.68        | 1.71         | 0.72       | 0.72      | 3.78                       | 74.4                        |            |             |             |
| TMH 60 mg/kg    | 12             | 9.435                      | 52.38      | 15.71       | 55.58        | 16.63      | 29.96*    | 14.03                      | 1122.3                      |            |             |             |
|                 |                | 0.535                      | 2.59       | 0.68        | 1.62         | 0.95       | 1.06      | 3.86                       | 77.7                        |            |             |             |
| TMH 300 mg/kg   | 12             | 8.993                      | 49.92*     | 15.25**     | 55.52        | 16.91      | 30.52     | 12.91                      | 1122.5                      |            |             |             |
|                 |                | 0.450                      | 2.25       | 0.68        | 0.94         | 0.42       | 0.80      | 5.57                       | 111.2                       |            |             |             |
| <hr/>           |                |                            |            |             |              |            |           |                            |                             |            |             |             |
| <hr/>           |                |                            |            |             |              |            |           |                            |                             |            |             |             |
| Hemogram of WBC |                |                            |            |             |              |            |           |                            |                             |            |             |             |
| Group           | No. of animals | Ret.<br>%                  | CT<br>sec. | PT<br>sec.  | APTT<br>sec. | Neutro.    |           | Eos.<br>%                  | Bas.<br>%                   | Mono.<br>% | Lymph.<br>% | Others<br>% |
|                 |                |                            |            |             |              | Stab.<br>% | Seg.<br>% |                            |                             |            |             |             |
| Control         | 12             | 12.1                       | 312.3      | 12.84       | 30.02        | 0.5        | 15.6      | 0.6                        | 0.0                         | 0.0        | 83.3        | 0.0         |
|                 |                | 2.8                        | 104.0      | 1.09        | 4.54         | 0.8        | 5.7       | 0.7                        | 0.0                         | 0.0        | 5.9         | 0.0         |
| TMH 12 mg/kg    | 12             | 10.9                       | 301.2      | 12.97       | 30.28        | 0.4        | 16.5      | 1.1                        | 0.0                         | 0.0        | 82.0        | 0.0         |
|                 |                | 2.2                        | 78.7       | 0.84        | 1.93         | 0.7        | 7.5       | 1.0                        | 0.0                         | 0.0        | 7.6         | 0.0         |
| TMH 60 mg/kg    | 12             | (11)b                      |            |             |              |            |           |                            |                             |            |             |             |
|                 |                | 11.0                       | 295.1      | 13.48       | 31.23        | 0.8        | 11.6      | 0.8                        | 0.0                         | 0.0        | 86.8        | 0.0         |
|                 |                | 2.0                        | 88.4       | 1.55        | 3.74         | 0.6        | 3.5       | 0.9                        | 0.0                         | 0.0        | 4.0         | 0.0         |
| TMH 300 mg/kg   | 12             | 12.2                       | 345.0      | 13.88       | 32.18        | 0.5        | 14.0      | 1.5*                       | 0.0                         | 0.0        | 84.0        | 0.0         |
|                 |                | 2.4                        | 105.5      | 1.85        | 3.57         | 0.7        | 4.4       | 0.9                        | 0.0                         | 0.0        | 4.6         | 0.0         |

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

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

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

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

Table 7. Biochemical findings of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

| Group         | No. of animals | TP<br>g/dl        | Alb<br>g/dl | A/G   | Protein fractions (%) |            |            |         |          | GOT<br>IU/l | GPT<br>IU/l | CHE<br>IU/l | $\gamma$ -GTP<br>IU/l | T-Bil<br>mg/dl | Glu<br>mg/dl |
|---------------|----------------|-------------------|-------------|-------|-----------------------|------------|------------|---------|----------|-------------|-------------|-------------|-----------------------|----------------|--------------|
|               |                |                   |             |       | Alb                   | Globulin   |            |         |          |             |             |             |                       |                |              |
|               |                |                   |             |       |                       | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ |             |             |             |                       |                |              |
| Control       | 12             | 6.11 <sup>a</sup> | 2.42        | 0.653 | 45.48                 | 22.18      | 9.70       | 16.69   | 5.95     | 100.8       | 26.7        | 67.8        | 1.55                  | 0.10           | 145.0        |
|               |                | 0.21              | 0.08        | 0.056 | 2.56                  | 1.98       | 0.86       | 1.54    | 1.70     | 24.2        | 3.7         | 19.9        | 0.49                  | 0.00           | 13.4         |
| TMH 12 mg/kg  | 12             | 6.08              | 2.45        | 0.670 | 47.29                 | 22.07      | 9.24       | 16.48   | 4.93     | 96.9        | 26.4        | 88.0        | 1.59                  | 0.10           | 144.4        |
|               |                | 0.26              | 0.11        | 0.047 | 2.11                  | 2.21       | 1.04       | 1.40    | 2.14     | 18.1        | 3.2         | 44.7        | 0.28                  | 0.00           | 15.4         |
| TMH 60 mg/kg  | 12             | 6.16              | 2.39        | 0.631 | 44.63                 | 23.98      | 9.62       | 16.31   | 5.47     | 103.8       | 28.6        | 84.8        | 1.74                  | 0.10           | 146.9        |
|               |                | 0.18              | 0.08        | 0.035 | 3.26                  | 2.05       | 1.42       | 0.80    | 1.48     | 30.7        | 12.8        | 35.1        | 0.50                  | 0.00           | 13.1         |
| TMH 300 mg/kg | 12             | 6.08              | 2.41        | 0.654 | 46.57                 | 22.62      | 9.11       | 17.08   | 4.63     | 101.3       | 26.9        | 71.9        | 1.67                  | 0.10           | 137.1        |
|               |                | 0.18              | 0.12        | 0.046 | 2.32                  | 3.08       | 1.06       | 1.38    | 0.91     | 21.2        | 6.8         | 22.6        | 0.67                  | 0.00           | 17.9         |

| Group         | No. of animals | T-Chol<br>mg/dl | TG<br>mg/dl | PL<br>mg/dl | BUN<br>mg/dl | Crea<br>mg/dl | Na<br>mEq/l | K<br>mEq/l | Cl<br>mEq/l | Ca<br>mg/dl | IP<br>mg/dl |
|---------------|----------------|-----------------|-------------|-------------|--------------|---------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| Control       | 12             | 56.5            | 37.8        | 95.9        | 15.67        | 0.53          | 143.00      | 4.887      | 107.3       | 9.93        | 7.45        |
|               |                | 8.6             | 20.5        | 12.6        | 1.87         | 0.05          | 1.85        | 0.330      | 1.3         | 0.35        | 0.56        |
| TMH 12 mg/kg  | 12             | 64.1            | 45.3        | 109.8       | 15.63        | 0.57          | 143.08      | 4.878      | 106.5       | 10.06       | 7.49        |
|               |                | 12.9            | 22.5        | 22.8        | 1.45         | 0.07          | 1.87        | 0.257      | 2.4         | 0.37        | 0.59        |
| TMH 60 mg/kg  | 12             | 62.3            | 38.9        | 101.3       | 16.22        | 0.58          | 142.63      | 5.005      | 106.2       | 10.08       | 7.76        |
|               |                | 14.0            | 12.0        | 16.4        | 1.66         | 0.06          | 1.63        | 0.422      | 1.6         | 0.51        | 0.76        |
| TMH 300 mg/kg | 12             | 63.1            | 35.3        | 107.7       | 13.87*       | 0.56          | 142.96      | 4.941      | 104.8**     | 10.17       | 7.68        |
|               |                | 11.2            | 25.7        | 23.9        | 1.89         | 0.05          | 1.23        | 0.294      | 0.6         | 0.44        | 0.55        |

a: Values are means and S.D. thereunder. \*: Differs from control,  $p \leq 0.05$ . \*\*: Differs from control,  $p \leq 0.01$ .

Table 8. Absolute and relative organ weights of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

| Group         | No. of animals | Body weight<br>g   | Liver    |         | Kidney  |         |         |         | Thymus |                    | Adrenal |                    |      |                    |
|---------------|----------------|--------------------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|--------------------|---------|--------------------|------|--------------------|
|               |                |                    |          |         | Right   |         | Left    |         |        |                    | Right   |                    | Left |                    |
|               |                |                    | g        | %       | g       | %       | g       | %       | mg     | 10 <sup>-3</sup> % | mg      | 10 <sup>-3</sup> % | mg   | 10 <sup>-3</sup> % |
| Control       | 12             | 497.3 <sup>a</sup> | 12.120   | 2.431   | 1.570   | 0.316   | 1.540   | 0.310   | 309.1  | 62.104             | 29.3    | 5.890              | 31.5 | 6.344              |
|               |                | 34.6               | 1.468    | 0.162   | 0.120   | 0.018   | 0.092   | 0.018   | 103.7  | 19.942             | 3.2     | 0.612              | 2.6  | 0.481              |
| TMH 12 mg/kg  | 12             | 503.2              | 12.953   | 2.559   | 1.602   | 0.318   | 1.584   | 0.317   | 296.2  | 58.614             | 28.5    | 5.742              | 29.5 | 5.947              |
|               |                | 44.4               | 2.178    | 0.227   | 0.166   | 0.022   | 0.184   | 0.031   | 68.3   | 11.279             | 5.3     | 1.346              | 5.4  | 1.430              |
| TMH 60 mg/kg  | 12             | 491.8              | 13.676   | 2.780** | 1.771*  | 0.362** | 1.744** | 0.357** | 266.1  | 53.947             | 30.4    | 6.203              | 32.5 | 6.633              |
|               |                | 32.1               | 1.136    | 0.126   | 0.196   | 0.043   | 0.188   | 0.043   | 63.2   | 11.297             | 3.0     | 0.691              | 3.5  | 0.856              |
| TMH 300 mg/kg | 12             | 510.4              | 17.815** | 3.493** | 1.918** | 0.378** | 1.906** | 0.375** | 277.4  | 54.190             | 27.3    | 5.383              | 29.8 | 5.866              |
|               |                | 43.3               | 1.723    | 0.207   | 0.205   | 0.043   | 0.232   | 0.053   | 51.5   | 7.609              | 3.1     | 0.697              | 4.8  | 1.046              |

| Group         | No. of animals | Testis |       |       |       | Epididymis |       |       |       |
|---------------|----------------|--------|-------|-------|-------|------------|-------|-------|-------|
|               |                | Right  |       | Left  |       | Right      |       | Left  |       |
|               |                | g      | %     | g     | %     | g          | %     | g     | %     |
| Control       | 12             | 1.783  | 0.361 | 1.767 | 0.358 | 0.707      | 0.141 | 0.693 | 0.140 |
|               |                | 0.179  | 0.040 | 0.181 | 0.038 | 0.041      | 0.010 | 0.060 | 0.010 |
| TMH 12 mg/kg  | 12             | 1.727  | 0.346 | 1.728 | 0.347 | 0.682      | 0.137 | 0.690 | 0.137 |
|               |                | 0.123  | 0.040 | 0.122 | 0.043 | 0.059      | 0.018 | 0.049 | 0.018 |
| TMH 60 mg/kg  | 12             | 1.810  | 0.367 | 1.808 | 0.370 | 0.690      | 0.140 | 0.684 | 0.138 |
|               |                | 0.168  | 0.037 | 0.160 | 0.038 | 0.051      | 0.010 | 0.053 | 0.014 |
| TMH 300 mg/kg | 12             | 1.644  | 0.326 | 1.733 | 0.341 | 0.640      | 0.127 | 0.680 | 0.133 |
|               |                | 0.265  | 0.057 | 0.151 | 0.038 | 0.128      | 0.025 | 0.048 | 0.015 |

a: Values are means and S.D. thereunder. \*: Differs from control,  $p \leq 0.05$ . \*\*: Differs from control,  $p \leq 0.01$ .



Table 9. Gross pathological findings of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

| Item                          | Control | TMH (mg/kg) |    |          |
|-------------------------------|---------|-------------|----|----------|
|                               |         | 12          | 60 | 300      |
| No. of animals examined       | 12      | 12          | 12 | 12       |
| Organ : Findings              |         |             |    |          |
|                               | a       |             |    |          |
| Liver : Yellowish white patch | 1       | 0           | 1  | 0        |
| Kidney : Pale discoloration   | 0       | 0           | 2  | [ 11 ]** |
| Swelling                      | 0       | 0           | 0  | 2        |
| Pituitary gland : Cyst        | 0       | 0           | 0  | 1        |
| Testis : Atrophy              | 0       | 0           | 0  | 1        |
| Epididymis : Atrophy          | 0       | 0           | 0  | 1        |

a: Values are no. of animals with findings.

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

Table 10. Histopathological findings of male rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

| Item                                                       |   |       | Control | TMH (mg/kg) |          |          |
|------------------------------------------------------------|---|-------|---------|-------------|----------|----------|
|                                                            |   |       |         | 12          | 60       | 300      |
| No. of animals examined                                    |   |       | 12      | 12          | 12       | 12       |
| Organ : Findings                                           | a | b     |         |             |          |          |
|                                                            |   | Grade | c       |             |          |          |
| Liver : Fatty change, periportal                           |   | +     | 0       | 0           | 2        | 2        |
| Fatty change, focal                                        |   | +     | 1       | 0           | 0        | 0        |
| Necrosis, massive                                          |   | +     | 0       | 0           | 1        | 0        |
| Microgranuloma                                             |   | ++    | 0       | 0           | 1        | 0        |
| Kidney : Hyaline droplet, proximal tubular epithelium      |   | Total | 1       | 9           | 12       | 12       |
|                                                            |   | +     | 1       | [ 9 ]**     | [ 12 ]** | [ 10 ]** |
|                                                            |   | ++    | 0       | [ 0 ]       | [ 0 ]    | [ 2 ]    |
| Eosinophilic body, proximal tubular epithelium             |   | +     | 0       | [ 9 ]**     | [ 11 ]** | [ 12 ]** |
| Regeneration, tubular epithelium                           |   | Total | 0       | 1           | 6        | 7        |
|                                                            |   | +     | 0       | 1           | [ 5 ]*   | [ 7 ]*   |
|                                                            |   | ++    | 0       | 0           | [ 1 ]    | [ 0 ]    |
| Cast, granular                                             |   | Total | 0       | 0           | 3        | 6        |
|                                                            |   | +     | 0       | 0           | 2        | [ 5 ]*   |
|                                                            |   | ++    | 0       | 0           | 1        | [ 1 ]    |
| Cast, hyaline                                              |   | +     | 0       | 3           | 1        | 0        |
| Cellular infiltration, lymphocyte, focal                   |   | +     | 0       | 1           | 0        | 0        |
| Cyst                                                       |   | <+>   | 0       | 0           | 1        | 0        |
| Spleen : Deposit, hemosiderin                              |   | +     | 2       | 1           | 2        | 1        |
| Heart : Cellular infiltration, histiocyte, focal           |   | +     | 1       | 3           | 0        | 0        |
| Pituitary gland : Cyst                                     |   | <+>   | 0       | 0           | 0        | 1        |
| Rest, tubular structure                                    |   | <+>   | 0       | 0           | 0        | 1        |
| Thyroid : Irregular shape, follicle                        |   | +     | 0       | 0           | 0        | 2        |
| Columnar change, follicular epithelium                     |   | +     | 0       | 0           | 0        | 2        |
| Decrease, colloid                                          |   | +     | 0       | 0           | 0        | 4        |
| Testis : Atrophy, tubule                                   |   | Total | 1       | 0           | 0        | 2        |
|                                                            |   | +     | 1       | 0           | 0        | 1        |
|                                                            |   | ++    | 0       | 0           | 0        | 1        |
| Epididymis : Decrease, sperm, intraductal                  |   | +++   | 0       | 0           | 0        | 1        |
| Appearance, desquamative spermatogenic cell                |   | +     | 0       | 0           | 0        | 1        |
| Prostate : Cellular infiltration, lymphocyte, interstitial |   | +     | 0       | 1           | 1        | 0        |

a: There were no abnormal findings in the lung, cerebrum, cerebellum, thymus, adrenal, forestomach, glandular stomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon or rectum.

b: + = slight, ++ = moderate, +++ = severe change and &lt;+&gt; = detected. c: Values are no. of animals with findings.

\*: Differs from control,  $p \leq 0.05$ . \*\*: Differs from control,  $p \leq 0.01$ .

Table 11. General appearance of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

| Item                                                     | Control      | TMH (mg/kg)  |    |              |
|----------------------------------------------------------|--------------|--------------|----|--------------|
|                                                          |              | 12           | 60 | 300          |
| Findings before gestation period                         |              |              |    | <sup>a</sup> |
| No. of animals examined                                  | 12           | 12           | 12 | 12           |
|                                                          | <sup>b</sup> |              |    |              |
| Salivation                                               | 0            | 0            | 0  | 1            |
| Soiled fur around the external urethral orifice          | 0            | 0            | 0  | 3            |
| Findings during gestation period                         | <sup>c</sup> | <sup>d</sup> |    |              |
| No. of animals examined                                  | 12           | 11           | 12 | 11           |
| Dead                                                     | 0            | 0            | 0  | 1            |
| Killed                                                   | 0            | 0            | 0  | 3            |
| Salivation                                               | 0            | 0            | 0  | 2            |
| Soiled fur around the external urethral orifice          | 0            | 0            | 0  | 3            |
| Hemorrhage of vaginal orifice                            | 0            | 0            | 0  | 1            |
| Decrease in spontaneous activity                         | 0            | 0            | 0  | 2            |
| Prone position                                           | 0            | 0            | 0  | 1            |
| Bradypnea                                                | 0            | 0            | 0  | 3            |
| Low temperature                                          | 0            | 0            | 0  | 1            |
| Mydriasis                                                | 0            | 0            | 0  | 1            |
| Subcutaneous mass of right axillary region with bleeding | 0            | 0            | 1  | 0            |
| Findings during lactation period                         |              |              |    |              |
| No. of animals examined                                  | 11           | 11           | 12 | 7            |
| Soiled fur around the external urethral orifice          | 0            | 0            | 0  | 1            |
| Subcutaneous mass of right axillary region with bleeding | 0            | 0            | 1  | 0            |

a: Includes one animal that failed in copulation.

b: Values are no. of animals with findings.

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

d: Excludes one animal because confirming successful copulation was failed.

Table 11. (continued) &lt;Number of females showing salivation and soiled fur around the external urethral orifice in TMH 300 mg/kg group

&lt;Before gestation&gt;

|                                                                        | Day of administration (before gestation) |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |
|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------|----|
|                                                                        | 1-5                                      | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23-28 | 29 |
| No. of animals observed                                                | 12 <sup>a</sup>                          | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 11 | 11 | 6  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2     | 1  |
| No. of animals showing salivation                                      | 0                                        | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  | 0     | 0  |
| No. of animals showing soiled fur around the external urethral orifice | 0                                        | 1  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  | 1  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0     | 0  |

&lt;Gestation&gt;

|                                                                           | Day of gestation |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|---------------------------------------------------------------------------|------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|                                                                           | 1                | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 |
| No. of animals observed                                                   | 11               | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 10 | 10 | 10 | 10 | 9  | 8  | 8  | 7  | 1  |
| No. of animals showing salivation                                         | 0                | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| No. of animals showing soiled fur<br>around the external urethral orifice | 0                | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  | 1  | 1  | 0  | 0  | 0  | 1  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  |

&lt;Lactation&gt;

|                                                                           | Day of lactation |   |   |   |   |
|---------------------------------------------------------------------------|------------------|---|---|---|---|
|                                                                           | 0                | 1 | 2 | 3 | 4 |
| No. of animals observed                                                   | 7                | 7 | 5 | 5 | 5 |
| No. of animals showing salivation                                         | 1                | 0 | 0 | 0 | 0 |
| No. of animals showing soiled fur<br>around the external urethral orifice | 0                | 0 | 0 | 0 | 0 |

a: Total no. of animals observed.

Table 12. Body weight changes before gestation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

| Group         | No. of animals | Day of administration |       |         |         |        |       | Body weight gain |         |
|---------------|----------------|-----------------------|-------|---------|---------|--------|-------|------------------|---------|
|               |                | 1                     | 2     | 5       | 7       | 10     | 14    | Day 1-14         | % a     |
| Control       | 12             | b                     |       |         |         |        |       |                  |         |
|               |                | 232.4                 | 227.9 | 240.3   | 244.3   | 246.6  | 255.6 | 23.167           | 9.958   |
|               |                | 10.2                  | 11.3  | 10.1    | 12.6    | 12.9   | 13.3  | 6.394            | 2.603   |
| TMH 12 mg/kg  | 12             | 232.2                 | 231.4 | 240.1   | 247.3   | 249.9  | 256.2 | 24.000           | 10.330  |
|               |                | 9.0                   | 10.7  | 9.7     | 11.5    | 13.4   | 13.7  | 8.995            | 3.783   |
| TMH 60 mg/kg  | 12             | 231.3                 | 233.1 | 237.5   | 244.1   | 250.3  | 258.3 | 27.000           | 11.758  |
|               |                | 16.4                  | 15.1  | 17.1    | 15.6    | 15.5   | 17.4  | 7.909            | 3.589   |
| TMH 300 mg/kg | 12             | 230.0                 | 227.8 | 217.0** | 225.5** | 231.9* | 241.3 | 11.333**         | 4.972** |
|               |                | 13.8                  | 11.9  | 16.8    | 13.7    | 14.0   | 14.3  | 6.387            | 2.982   |

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

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

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

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

Table 13. Body weight changes during gestation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

| 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                |               |               |               |               |               |               |                  |                |                   |                 |
|               |                | 269.7<br>14.6    | 274.8<br>15.4 | 286.0<br>16.0 | 294.2<br>18.3 | 304.2<br>20.3 | 321.6<br>20.3 | 341.7<br>24.0 | 375.3<br>24.0    | 422.3<br>27.1  | 152.545<br>23.905 | 56.727<br>9.511 |
| TMH 12 mg/kg  | 11             | 267.8<br>7.7     | 272.3<br>9.1  | 283.3<br>11.5 | 291.8<br>12.2 | 299.8<br>11.2 | 316.7<br>12.2 | 334.1<br>13.2 | 362.0<br>13.1    | 408.4<br>13.9  | 140.545<br>13.201 | 52.544<br>5.390 |
|               |                | 263.3<br>16.5    | 271.7<br>17.0 | 283.0<br>19.4 | 293.8<br>19.5 | 303.7<br>20.5 | 319.8<br>23.7 | 340.5<br>23.6 | 370.8<br>27.1    | 408.8<br>26.9  | 145.500<br>15.991 | 55.317<br>5.663 |
| TMH 300 mg/kg | 11             | 251.1*<br>24.8   | 257.2<br>24.3 | 267.8<br>22.2 | 276.7<br>21.5 | 284.5<br>27.1 | 303.9<br>27.5 | 315.1<br>38.7 | (10)c<br>340.0** | (8)<br>363.1** | (8)<br>114.375**  | (8)<br>47.030   |
|               |                |                  |               |               |               |               |               |               |                  |                |                   |                 |

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

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

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

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

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

Table 14. Body weight changes during lactation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

| Group         | No. of animals | Day of lactation |         |       | Body weight gain |       |
|---------------|----------------|------------------|---------|-------|------------------|-------|
|               |                | 0                | 1       | 4     | Day 0-4          | % a   |
| <hr/>         |                |                  |         |       |                  |       |
|               |                | b                |         |       |                  |       |
| Control       | 11             | 320.5            | 320.7   | 329.7 | 9.273            | 2.951 |
|               |                | 23.5             | 24.8    | 24.6  | 12.142           | 3.915 |
| TMH 12 mg/kg  | 11             | 311.4            | 312.4   | 332.0 | 20.636           | 6.587 |
|               |                | 14.1             | 16.1    | 20.0  | 9.490            | 2.937 |
| TMH 60 mg/kg  | 12             | 320.8            | 320.9   | 326.3 | 5.500            | 1.889 |
|               |                | 23.3             | 21.6    | 20.6  | 16.412           | 5.129 |
| TMH 300 mg/kg | 7              |                  |         | (5)c  | (5)              | (5)   |
|               |                | 283.0**          | 281.4** | 301.2 | 9.000            | 3.200 |
|               |                | 27.4             | 24.3    | 21.7  | 7.714            | 2.890 |

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

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

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

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

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

Table 15. Food consumption before gestation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

| Group         | No. of animals | Day of administration |       |       |       |      |      |
|---------------|----------------|-----------------------|-------|-------|-------|------|------|
|               |                | 1                     | 2     | 5     | 7     | 10   | 14   |
| Control       | 12             | <sup>a</sup><br>17.8  | 10.7  | 17.5  | 14.9  | 14.1 | 13.3 |
|               |                | 4.4                   | 2.8   | 6.3   | 1.7   | 2.2  | 3.0  |
| TMH 12 mg/kg  | 12             | 15.8                  | 12.3  | 14.6  | 15.9  | 14.0 | 12.6 |
|               |                | 2.0                   | 3.3   | 1.9   | 2.0   | 3.5  | 3.6  |
| TMH 60 mg/kg  | 12             | 15.4                  | 14.0* | 13.3  | 14.7  | 15.3 | 14.8 |
|               |                | 4.3                   | 2.7   | 3.5   | 3.2   | 2.8  | 2.3  |
| TMH 300 mg/kg | 12             | 14.9                  | 11.8  | 8.2** | 12.2* | 14.2 | 12.9 |
|               |                | 4.3                   | 3.4   | 5.1   | 3.1   | 5.3  | 4.8  |

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

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

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



Table 16. Food consumption during gestation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

| Group         | No. of animals | Day of gestation |      |      |       |       |      |       |      |
|---------------|----------------|------------------|------|------|-------|-------|------|-------|------|
|               |                | 1                | 3    | 5    | 7     | 10    | 14   | 17    | 20   |
| Control       | 11             | a                |      |      | (10)b |       | (10) |       |      |
|               |                | 17.5             | 17.8 | 18.6 | 21.7  | 23.9  | 20.0 | 23.2  | 17.8 |
|               |                | 2.2              | 3.1  | 4.3  | 4.4   | 2.6   | 4.1  | 3.1   | 2.9  |
| TMH 12 mg/kg  | 11             | 16.2             | 16.6 | 17.7 | 19.5  | 20.5* | 17.9 | 19.5* | 17.2 |
|               |                | 2.2              | 2.5  | 1.7  | 1.6   | 1.9   | 2.5  | 3.3   | 1.8  |
| TMH 60 mg/kg  | 12             | 18.5             | 17.6 | 17.9 | 19.6  | 20.7* | 18.8 | 20.3  | 16.3 |
|               |                | 3.1              | 2.9  | 2.7  | 2.5   | 3.7   | 3.0  | 2.8   | 3.1  |
| TMH 300 mg/kg | 11             |                  |      |      |       | (10)  |      | (10)  | (8)  |
|               |                | 17.7             | 15.7 | 18.9 | 19.8  | 20.5* | 18.8 | 20.4  | 14.0 |
|               |                | 4.8              | 2.3  | 3.4  | 3.7   | 3.4   | 5.4  | 3.5   | 5.4  |

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

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

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

Table 17. Food consumption during lactation period of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

| Group         | No. of animals | <u>Day of lactation</u> |      |
|---------------|----------------|-------------------------|------|
|               |                | 1                       | 4    |
| Control       | 11             | a                       |      |
|               |                | 14.3                    | 31.6 |
| TMH 12 mg/kg  | 11             | 2.9                     | 5.9  |
|               |                | 11.5                    | 30.5 |
| TMH 60 mg/kg  | 12             | 3.0                     | 6.0  |
|               |                | 13.3                    | 27.1 |
| TMH 300 mg/kg | 7              | 4.3                     | 8.4  |
|               |                |                         | (5)b |
|               |                | 11.9                    | 26.8 |
|               |                | 3.9                     | 4.7  |

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

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

Table 18. Absolute and relative organ weights of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

| Group            | No. of animals | Body weight<br>g   | Liver    |         | Kidney |        |       |        | Thymus |                    | Adrenal |                    |      |                    | Ovary |                    |      |                    |
|------------------|----------------|--------------------|----------|---------|--------|--------|-------|--------|--------|--------------------|---------|--------------------|------|--------------------|-------|--------------------|------|--------------------|
|                  |                |                    | g        | %       | Right  |        | Left  |        | mg     | 10 <sup>-3</sup> % | Right   |                    | Left |                    | Right |                    | Left |                    |
|                  |                |                    |          |         | g      | %      | g     | %      |        |                    | mg      | 10 <sup>-3</sup> % | mg   | 10 <sup>-3</sup> % | mg    | 10 <sup>-3</sup> % | mg   | 10 <sup>-3</sup> % |
| Control          | 11             | 329.7 <sup>a</sup> | 13.222   | 4.011   | 0.986  | 0.299  | 0.967 | 0.295  | 172.5  | 52.178             | 36.0    | 10.952             | 38.5 | 11.717             | 57.1  | 17.495             | 54.9 | 16.681             |
|                  |                | 24.6               | 1.105    | 0.191   | 0.124  | 0.050  | 0.133 | 0.052  | 63.4   | 19.290             | 5.3     | 1.784              | 4.5  | 1.658              | 7.4   | 3.250              | 8.3  | 2.391              |
| TMH<br>12 mg/kg  | 11             | 332.0              | 13.470   | 4.056   | 0.993  | 0.299  | 0.959 | 0.289  | 214.6  | 64.463             | 35.5    | 10.717             | 36.8 | 11.104             | 59.1  | 17.791             | 53.1 | 16.033             |
|                  |                | 20.0               | 1.142    | 0.219   | 0.077  | 0.016  | 0.071 | 0.019  | 37.5   | 9.416              | 4.4     | 1.505              | 5.1  | 1.502              | 7.9   | 2.070              | 9.0  | 2.815              |
| TMH<br>60 mg/kg  | 12             | 326.3              | 14.384   | 4.408*  | 0.961  | 0.295  | 0.948 | 0.291  | 200.3  | 61.007             | 34.9    | 10.695             | 37.9 | 11.619             | 67.0  | 20.468             | 55.3 | 17.092             |
|                  |                | 20.6               | 1.673    | 0.425   | 0.101  | 0.022  | 0.097 | 0.025  | 57.4   | 15.291             | 4.6     | 1.229              | 4.4  | 1.192              | 16.9  | 4.537              | 8.2  | 3.265              |
| TMH<br>300 mg/kg | 5              | 301.2              | 16.032** | 5.330** | 0.994  | 0.330* | 0.984 | 0.328* | 131.8  | 43.758             | 35.8    | 11.884             | 38.8 | 12.880             | 50.0  | 16.644             | 49.6 | 16.642             |
|                  |                | 21.7               | 1.340    | 0.390   | 0.080  | 0.030  | 0.099 | 0.036  | 53.2   | 16.980             | 3.5     | 0.851              | 3.3  | 0.583              | 6.5   | 2.367              | 7.6  | 3.437              |

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

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

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

Table 19. Gross pathological findings of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

| Item                                                           | Control | TMH (mg/kg) |    |     |
|----------------------------------------------------------------|---------|-------------|----|-----|
|                                                                |         | 12          | 60 | 300 |
| Total no. of animals examined                                  | 12      | 11          | 12 | 12  |
| No. of dead or killed animals examined                         | 0       | 0           | 0  | 4   |
| Organ : Findings                                               |         |             |    |     |
|                                                                | a       |             |    | b   |
| Liver : Yellowish white discoloration                          | -       | -           | -  | 2   |
| Adrenal : Swelling                                             | -       | -           | -  | 2   |
| Dark red discoloration                                         | -       | -           | -  | 1   |
| Stomach : Dilatation of lumen                                  | -       | -           | -  | 1   |
| Watery content                                                 | -       | -           | -  | 1   |
| Glandular stomach : Dark red patch/patches scattered on mucosa | -       | -           | -  | 3   |
| Uterus : Retention of blood                                    | -       | -           | -  | 1   |
| Vagina : Retention of blood                                    | -       | -           | -  | 1   |
|                                                                | c       | d           |    | e   |
| No. of surviving animals examined                              | 12      | 11          | 12 | 8   |
| Organ : Findings                                               |         |             |    |     |
| Liver : Yellowish white discoloration                          | 0       | 0           | 0  | 1   |
| Yellowish white patch                                          | 0       | 0           | 1  | 0   |
| Kidney : White patches scattered                               | 1       | 0           | 0  | 0   |
| Spleen : Swelling                                              | 1       | 0           | 0  | 0   |
| Skin : Subcutaneous yellowish white mass                       | 0       | 0           | 1  | 0   |
| Vagina : Cyst                                                  | 0       | 0           | 0  | 1   |

a: - = blank value.

b: Values are no. of animals with findings.

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

d: Excludes one animal because confirming successful copulation was failed.

e: Includes one animal that failed in copulation and two animals killed because of all the litter's death.

Table 20. Histopathological findings of female rats dosed orally with TMH in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

| Item                                                      |                    | TMH (mg/kg)     |                 |    |                |
|-----------------------------------------------------------|--------------------|-----------------|-----------------|----|----------------|
|                                                           |                    | Control         | 12              | 60 | 300            |
| Total no. of animals examined                             |                    | 12              | 12              | 12 | 12             |
| No. of dead or killed animals examined                    |                    | 0               | 0               | 0  | 4              |
| <sup>a</sup> Organ : Findings                             | <sup>b</sup> Grade | <sup>c</sup>    |                 |    | <sup>d</sup>   |
| Liver : Fatty change, periportal                          | Total              | -               | -               | -  | 4              |
|                                                           | +                  | -               | -               | -  | 1              |
|                                                           | ++                 | -               | -               | -  | 3              |
| Kidney : Degeneration, fatty, proximal tubular epithelium | +                  | -               | -               | -  | 3              |
| Spleen : Atrophy                                          | +                  | -               | -               | -  | 2              |
| Deposit, hemosiderin                                      | +                  | -               | -               | -  | 3              |
| Thymus : Atrophy                                          | Total              | -               | -               | -  | 3              |
|                                                           | +                  | -               | -               | -  | 1              |
|                                                           | ++                 | -               | -               | -  | 2              |
| Adrenal : Increase, lipoid, zona fasciculata              | +                  | -               | -               | -  | 1              |
| Hypertrophy, cortical cell, zona fasciculata              | +                  | -               | -               | -  | 2              |
| Congestion                                                | +                  | -               | -               | -  | 1              |
| Glandular stomach : Erosion                               | +                  | -               | -               | -  | 3              |
| No. of surviving animals examined                         |                    | <sup>e</sup> 12 | <sup>e</sup> 11 | 12 | <sup>f</sup> 8 |
| <sup>g</sup> Organ : Findings                             |                    |                 |                 |    |                |
| Liver : Fatty change, periportal                          | Total              | 0               | 0               | 0  | 4              |
|                                                           | +                  | 0               | 0               | 0  | [ 3 ]**h       |
|                                                           | ++                 | 0               | 0               | 0  | [ 1 ]          |
| Fibrosis, focal                                           | +                  | 0               | 0               | 1  | 0              |
| Hematopoiesis, extramedullary                             | +                  | 1               | 0               | 0  | 0              |
| Kidney : Degeneration, fatty, proximal tubular epithelium | +                  | 0               | 0               | 3  | [ 2 ]*         |
| Pyelonephritis                                            | +                  | 1               | 0               | 0  | 0              |
| Spleen : Hematopoiesis, extramedullary                    | +                  | 1               | 0               | 0  | 0              |
| Deposit, hemosiderin                                      | +                  | 2               | 2               | 2  | 4              |

(continued)

Table 20. (continued)

| Item                                         |       | Control | TMH (mg/kg) |      |                   |
|----------------------------------------------|-------|---------|-------------|------|-------------------|
|                                              |       |         | 12          | 60   | 300               |
| Total no. of animals examined                |       | 12      | 12          | 12   | 12                |
| No. of surviving animals examined            |       | 12      | 11          | 12   | 8                 |
| g<br>Organ : Findings                        |       |         |             |      |                   |
|                                              | Grade |         |             |      |                   |
| Thymus : Atrophy                             | ++    | 0       | 0           | 0    | [ 3 ]*h           |
| Adrenal : Increase, lipoid, zona fasciculata | +     | 0       | 0           | 0    | 2                 |
| Necrosis, zona fasciculata, focal            | +     | 0       | 0           | 1    | 0                 |
| Forestomach : Squamous hyperplasia           | +     | 0       | 1           | 0    | 0                 |
| Ovary : Cyst, corpus luteum                  | <+>   | 0       | 0           | 1    | 0                 |
| Vagina : Cyst                                | <+>   | -       | -           | -    | 1(1) <sup>i</sup> |
| Mammary gland : Adenocarcinoma, tubular      | <+>   | -       | -           | 1(1) | -                 |

a: There were no abnormal findings in the heart, lung, cerebrum, cerebellum, pituitary gland, thyroid, forestomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rectum, ovary, uterus (No.456) or vagina (No.456).

b: + = slight, ++ = moderate change and <+> = detected.

c: - = blank value.

d: Values are no. of animals with findings.

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

f: Includes one animal that failed in copulation and two animals whose litter all died.

g: There were no abnormal findings in the heart, lung, cerebrum, cerebellum, pituitary gland, thyroid, glandular stomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon or rectum.

h: Includes dead or killed animals for weakness in statistical analysis.

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

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

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

Table 21. Influence of TMH on reproductive ability of rats in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (SR-9535)

| Estrous cycle |                    |                       |          |                     |                       |           |       |                                         |                                |                                 |                         |                                |                     |           |
|---------------|--------------------|-----------------------|----------|---------------------|-----------------------|-----------|-------|-----------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------|-----------|
| Group         | No. of pairs mated | Before administration |          |                     | Administration period |           |       | No. of pairs with successful copulation | Days from mating to copulation | Copulation index % <sup>a</sup> | No. of pregnant animals | Fertility index % <sup>b</sup> |                     |           |
|               |                    | Normal                | Abnormal |                     | Normal                | Abnormal  |       |                                         |                                |                                 |                         |                                |                     |           |
|               |                    |                       | Total    | Continuous diestrus |                       | Irregular | Total |                                         |                                |                                 |                         |                                | Continuous diestrus | Irregular |
|               |                    |                       |          |                     |                       |           |       |                                         |                                |                                 |                         |                                |                     |           |
| Control       | 12                 | 12                    | 0        | - <sup>c</sup>      | -                     | 12        | 0     | -                                       | -                              | 12                              | 3.4±1.6 <sup>d</sup>    | 100.0                          | 11                  | 91.7      |
| TMH 12 mg/kg  | 12                 | 12                    | 0        | -                   | -                     | 12        | 0     | -                                       | -                              | 12                              | 3.3±0.9                 | 100.0                          | 11                  | 91.7      |
| TMH 60 mg/kg  | 12                 | 12                    | 0        | -                   | -                     | 12        | 0     | -                                       | -                              | 12                              | 2.6±0.9                 | 100.0                          | 12                  | 100.0     |
| TMH 300 mg/kg | 12                 | 12                    | 0        | -                   | -                     | 8         | 4     | 4                                       | -                              | 11                              | 4.2±3.4                 | 91.7                           | 11                  | 100.0     |

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

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

c: - = blank value.

d: Values are means ± S.D.

Table 22. Influence of TMH on delivery and maternal behavior in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats (SR-9535)

| Group            |       | No. of pregnant females | No. of corpora lutea | No. of implan-<br>tation sites | Implan-<br>tation<br>index<br>% | No. of<br>pups<br>born | Delivery<br>index<br>% | Live pups born |                             |              |       |        | Dead pups born |      |        | Gestation<br>length<br>day | Gestation<br>index<br>% | Nursing<br>index<br>% |   |  |   |
|------------------|-------|-------------------------|----------------------|--------------------------------|---------------------------------|------------------------|------------------------|----------------|-----------------------------|--------------|-------|--------|----------------|------|--------|----------------------------|-------------------------|-----------------------|---|--|---|
|                  |       |                         |                      |                                |                                 |                        |                        | No.            | Live<br>birth<br>index<br>% | Sex<br>ratio | Male  | Female | No.            | Male | Female |                            |                         |                       |   |  |   |
|                  |       |                         |                      |                                |                                 |                        |                        |                |                             |              |       |        |                |      |        |                            |                         |                       | c |  | d |
|                  |       |                         |                      |                                |                                 |                        |                        |                |                             |              |       |        |                |      |        |                            |                         |                       |   |  |   |
| Control          | Total | 11                      | 179                  | 174                            |                                 | 164                    |                        | 163            |                             |              | 89    | 74     | 1              | 1    | 0      |                            |                         |                       |   |  |   |
|                  | Mean  |                         | 16.3                 | 15.8                           | 97.428                          | 14.9                   | 94.099                 | 14.8           | 99.432                      | 1.289        | 8.1   | 6.7    | 0.1            | 0.1  | 0.0    | 22.3                       | 100.0                   |                       |   |  |   |
|                  | S.D.  |                         | 1.7                  | 1.3                            | 3.794                           | 1.8                    | 5.366                  | 1.7            | 1.884                       | 0.475        | 1.8   | 1.6    | 0.3            | 0.3  | 0.0    | 0.5                        |                         |                       |   |  |   |
| TMH<br>12 mg/kg  | Total | 11                      | 180                  | 165                            |                                 | 157                    |                        | 156            |                             |              | 75    | 81     | 1              | 0    | 1      |                            |                         |                       |   |  |   |
|                  | Mean  |                         | 16.4                 | 15.0                           | 91.502                          | 14.3                   | 95.256                 | 14.2           | 99.495                      | 1.118        | 6.8   | 7.4    | 0.1            | 0.0  | 0.1    | 22.1                       | 100.0                   |                       |   |  |   |
|                  | S.D.  |                         | 1.5                  | 2.2                            | 9.826                           | 2.1                    | 4.178                  | 2.0            | 1.676                       | 0.693        | 2.4   | 2.5    | 0.3            | 0.0  | 0.3    | 0.3                        |                         |                       |   |  |   |
| TMH<br>60 mg/kg  | Total | 12                      | 197                  | 172                            |                                 | 151                    |                        | 150            |                             |              | 63    | 87     | 1              | 0    | 1      |                            |                         |                       |   |  |   |
|                  | Mean  |                         | 16.4                 | 14.3                           | 88.233*                         | 12.6                   | 88.083                 | 12.5*          | 99.243                      | 0.808**      | 5.3** | 7.3    | 0.1            | 0.0  | 0.1    | 22.3                       | 100.0                   |                       |   |  |   |
|                  | S.D.  |                         | 2.5                  | 1.8                            | 12.010                          | 2.3                    | 13.199                 | 2.4            | 2.624                       | 0.365        | 1.1   | 2.2    | 0.3            | 0.0  | 0.3    | 0.7                        |                         |                       |   |  |   |
| TMH<br>300 mg/kg | Total | 11                      | 113                  | 94                             |                                 | 82                     |                        | 71             |                             |              | 39    | 32     | 11             | 10   | 1      |                            |                         |                       |   |  |   |
|                  | Mean  |                         | 16.1                 | 13.4*                          | 84.966*                         | 11.7*                  | 87.473                 | 10.1**         | 88.911                      | 1.530        | 5.6*  | 4.6    | 1.6            | 1.4  | 0.1    | 22.1                       | 63.6                    |                       |   |  |   |
|                  | S.D.  |                         | 3.6                  | 2.1                            | 14.502                          | 3.3                    | 19.073                 | 2.7            | 18.354                      | 0.925        | 2.2   | 2.0    | 2.9            | 2.6  | 0.4    | 0.4                        |                         |                       |   |  |   |

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.

g: Values in parentheses are no. of pregnant females examined.

\*: Differs from control,  $p \leq 0.05$ .\*\*: Differs from control,  $p \leq 0.01$ .



Table 23. Gross pathological findings of dead pups at birth in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TMH in rats (SR-9535)

| Item                         | Male    |             |    |     | Female  |             |    |     |
|------------------------------|---------|-------------|----|-----|---------|-------------|----|-----|
|                              | Control | TMH (mg/kg) |    |     | Control | TMH (mg/kg) |    |     |
|                              |         | 12          | 60 | 300 |         | 12          | 60 | 300 |
| No. of dead animals examined | 1       | 0           | 0  | 10  | 0       | 1           | 1  | 1   |
| Organ : Findings             |         |             |    |     |         |             |    |     |
| Abnormal findings            | a<br>0  | b<br>-      | -  | 0   | -       | 0           | 0  | 0   |

a: Values are no. of animals with findings.

b: - = blank value.

Table 24. Influence of TMH on viability of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats (SR-9535)

|               |       |             | Live pups on day 4                     |       |                         |       |        |
|---------------|-------|-------------|----------------------------------------|-------|-------------------------|-------|--------|
|               |       |             | a                                      |       |                         |       |        |
| Item          |       | No. of dams | No. of Live<br>pups born<br>(on day 0) | No.   | Viability<br>index<br>% | Male  | Female |
| Control       | Total | 11          | 163                                    | 160   |                         | 88    | 72     |
|               | Mean  |             | 14.8                                   | 14.5  | 98.034                  | 8.0   | 6.5    |
|               | S.D.  |             | 1.7                                    | 1.9   | 3.388                   | 1.7   | 1.6    |
| TMH 12 mg/kg  | Total | 11          | 156                                    | 154   |                         | 75    | 79     |
|               | Mean  |             | 14.2                                   | 14.0  | 98.816                  | 6.8   | 7.2    |
|               | S.D.  |             | 2.0                                    | 1.9   | 2.648                   | 2.4   | 2.4    |
| TMH 60 mg/kg  | Total | 12          | 150                                    | 144   |                         | 60    | 84     |
|               | Mean  |             | 12.5*                                  | 12.0* | 96.306                  | 5.0** | 7.0    |
|               | S.D.  |             | 2.4                                    | 2.4   | 8.419                   | 1.5   | 2.0    |
| TMH 300 mg/kg | Total | 7           | 71                                     | 46    |                         | 24    | 22     |
|               | Mean  |             | 10.1**                                 | 6.6** | 64.933**                | 3.4** | 3.1**  |
|               | S.D.  |             | 2.7                                    | 5.1   | 44.633                  | 3.0   | 2.5    |

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

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

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

Table 25. General appearance of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TMH in rats (SR-9535)

| Item                        | Male               |                   |    |     | Female  |             |    |     |
|-----------------------------|--------------------|-------------------|----|-----|---------|-------------|----|-----|
|                             | Control            | TMH (mg/kg)       |    |     | Control | TMH (mg/kg) |    |     |
|                             |                    | 12                | 60 | 300 |         | 12          | 60 | 300 |
| No. of animals examined     | <sup>a</sup><br>89 | 75                | 63 | 39  | 74      | 81          | 87 | 32  |
| No. of dead/missing animals | 1                  | 0                 | 3  | 15  | 2       | 2           | 3  | 10  |
| Dead animals                | <sup>b</sup><br>1  | 0                 | 1  | 4   | 2       | 0           | 0  | 2   |
| Missing animals             | 0                  | 0                 | 2  | 11  | 0       | 2           | 3  | 8   |
| Rudimentary tail            | 0                  | <sup>c</sup><br>- | 0  | 0   | 1       | 0           | 0  | 0   |
| No. of surviving animals    | 88                 | 75                | 60 | 24  | 72      | 79          | 84 | 22  |
| Abnormal findings           | 0                  | 0                 | 0  | 0   | 0       | 0           | 0  | 0   |

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

b: Values are no. of animals with findings.

c: - = blank value.

Table 26. Body weight changes of pups in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TMH in rats (SR-9535)

| 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          | %      |
| <hr/>         |                |                  |      |       |                  |          |                  |      |       |                  |        |
| Control       | 11             | b                |      |       |                  |          |                  |      |       |                  |        |
|               |                | 6.49             | 7.16 | 10.55 | 4.064            | 62.630   | 6.25             | 6.87 | 10.14 | 3.891            | 61.972 |
|               |                | 0.61             | 0.74 | 1.02  | 0.495            | 5.596    | 0.74             | 0.89 | 1.42  | 0.702            | 5.411  |
| TMH 12 mg/kg  | 11             | 6.15             | 6.54 | 9.58  | 3.427**          | 55.741** | 5.94             | 6.38 | 9.22  | 3.282            | 55.355 |
|               |                | 0.41             | 0.53 | 0.68  | 0.393            | 6.024    | 0.47             | 0.54 | 0.88  | 0.618            | 9.634  |
|               |                |                  |      |       |                  |          |                  |      |       |                  |        |
| TMH 60 mg/kg  | 12             | 6.26             | 6.84 | 10.51 | 4.250            | 67.554   | 5.91             | 6.53 | 9.96  | 4.050            | 68.079 |
|               |                | 0.72             | 0.97 | 1.60  | 1.030            | 13.399   | 0.63             | 0.88 | 1.50  | 0.980            | 12.644 |
|               |                |                  |      |       |                  |          |                  |      |       |                  |        |
| TMH 300 mg/kg | 7              |                  | (5)c | (5)   | (5)              | (5)      |                  | (5)  | (5)   | (5)              | (5)    |
|               |                | 5.36*            | 6.38 | 10.22 | 4.280            | 71.592   | 5.03**           | 6.16 | 9.74  | 4.140            | 73.224 |
|               |                | 1.21             | 1.20 | 1.75  | 0.968            | 8.500    | 1.21             | 0.99 | 1.89  | 1.085            | 9.894  |

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

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

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

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

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

Table 27. Gross pathological findings of pups which were dead after birth or killed on day 4 of lactation in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of TMH in rats (SR-9535)

| Item                                          | Male    |             |    |     | Female  |             |    |     |
|-----------------------------------------------|---------|-------------|----|-----|---------|-------------|----|-----|
|                                               | Control | TMH (mg/kg) |    |     | Control | TMH (mg/kg) |    |     |
|                                               |         | 12          | 60 | 300 |         | 12          | 60 | 300 |
| Findings of pups dead after birth             |         |             |    |     |         |             |    |     |
| No. of animals examined                       | 1       | 0           | 1  | 4   | 2       | 0           | 0  | 2   |
| Organ : Findings                              |         |             |    |     |         |             |    |     |
|                                               | a       | b           |    |     |         |             |    |     |
| Liver : Pale discoloration                    | 0       | -           | 1  | 0   | 0       | -           | -  | 0   |
| Spleen : Black mass                           | 0       | -           | 1  | 0   | 0       | -           | -  | 0   |
| Abdominal cavity : Hemorrhagic ascites        | 0       | -           | 1  | 0   | 0       | -           | -  | 0   |
| External : Rudimentary tail                   | 0       | -           | 0  | 0   | 1       | -           | -  | 0   |
| Findings of pups killed on day 4 of lactation |         |             |    |     |         |             |    |     |
| No. of animals examined                       | 88      | 75          | 60 | 24  | 72      | 79          | 84 | 22  |
| Organ : Findings                              |         |             |    |     |         |             |    |     |
| Abnormal findings                             | 0       | 0           | 0  | 0   | 0       | 0           | 0  | 0   |

a: Values are no. of animals with findings.

b: - = blank value.