

食薬セ研第12-1895号

2002年 7月 8日

4-(1-メチルエテニル)フェノールの
ラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験

厚生労働省医薬局審査管理課 委託

財団法人食品薬品安全センター

薬野研究所

【目 次】

要約	-----	1
緒言	-----	2
方法	-----	3
1. 被験物質	-----	3
2. 使用動物および飼育方法	-----	3
3. 投与検体の調製	-----	4
4. 投与量および投与方法	-----	4
5. 観察および検査	-----	5
6. データ解析法	-----	8
結果	-----	9
1. 親動物	-----	9
2. 生殖能力	-----	11
3. 出生児	-----	11
考察	-----	13
文献	-----	14

Figs. 1~4

Tables 1~18

【要 約】

Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD)IGS, SPF] 雌雄ラットの交配前 2 週間および交配期間ならびに雄では交配期間終了後剖検前日まで、雌では妊娠期間を通して哺育 3 日まで、4-(1-メチルエテニル)フェノール (以下、MEP と略記) の 0、4、15 および 60mg/kg を経口投与し、雌雄ラットに対する生殖毒性について検討した。成績は、以下のように要約される。

1. 親動物所見

いずれの投与群においても死亡動物はみられなかった。雄の 60mg/kg 投与群において、投与直後に一過性の流涎が観察された。体重および摂餌量には MEP 投与の影響は認められなかった。

剖検時に 60mg/kg 投与群の雌雄に前胃粘膜の肥厚がみられ、組織検査では前胃の扁平上皮の瀰漫性の過形成が認められた。また、雌の脾臓について 60mg/kg 投与群で髄外造血の程度が増強された。器官重量では、雌の胸腺の絶対重量および相対重量が低値を示した。

2. 生殖能力所見

性周期、雌雄の交尾および受胎能力、妊娠期間、分娩ならびに哺育状態に MEP 投与の影響は認められなかった。

3. 出生児所見

出生児の形態、生存ならびに体重には、MEP 投与の影響は認められなかった。

4. 無作用量

以上の成績から、本試験条件下における MEP の親動物に対する無作用量は、60mg/kg 投与群において、雄では一過性の流涎および胃の変化が認められ、雌では胃の変化、胸腺重量の低値、脾臓の髄外造血の程度が増強されたことから 15mg/kg/day、親動物の生殖能力および出生児に対する無作用量は、60mg/kg までの用量に MEP 投与の影響は認められなかったことから、いずれも 60mg/kg/day と判断される。

【緒 言】

4-(1-メチルエテニル)フェノール（以下、MEP と略記）は、ビスフェノール A の代謝物である。本化合物の毒性情報については、ほとんど知られていない。本試験では、OECD 既存化学物質の安全性点検に係る毒性調査研究事業の一環として、ラットを用いて MEP の経口投与による簡易生殖毒性試験を行い、本化合物の雌雄動物に及ぼす生殖毒性について検討したので、その結果を報告する。

なお、本試験は、OECD 化学物質試験法ガイドライン 4 2 1 / 生殖発生毒性スクリーニング試験（簡易生殖毒性試験）」（1995 年 7 月 27 日）および「化学物質 GLP」（昭和 59 年 3 月 31 日、環保業第 39 号、薬発第 229 号、59 基局第 85 号、昭和 63 年 11 月 18 日改正、環企研第 233 号、衛生第 38 号、63 基局第 823 号、平成 12 年 3 月 1 日改正、環保安第 41 号、生衛発第 268 号、平成 12・02・14 基局第 1 号）に準拠して実施した。

【方 法】

1. 被験物質

4-(1-メチルエテニル)フェノール（以下、MEP と略記）は、英名は 4-(1-methylethenyl)-phenol であり、CAS No. 4286-23-1、分子量：134.18、分子式：C₉H₁₀O、融点：80～83℃の淡黄色粉体である。

本試験には、より提供された MEP（ロット番号： 純度：99wt%以上）を用いた。受領した被験物質は試験終了時まで被験物質保管用冷凍庫に保管した。なお、試験期間中の被験物質の安定性は提供者が提供前および返却後（試験終了後）の被験物質について品質試験を実施することにより確認した(Appendix A)。

2. 使用動物および飼育方法

7週齢の Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD)IGS、SPF] 雌雄ラットを日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センターから購入し、入荷日を含む 14 日間、飼育環境への馴化と検疫を兼ねて予備飼育した。雌 1 匹が入荷日に赤色尿を呈したため、当日剖検した。その結果、左側腎臓の肥大、腎盂拡張が認められ、腎盂には血液が貯留していた。その他の動物には、予備飼育中、一般状態に異常は認められなかった (Appendix B)。なお、雌は予備飼育中に毎日膈スミアを採取し、観察期間中に 2 回以上性周期が回帰し、また、4 日周期を示した動物を選出した。動物は、雌雄とも投与開始前日の体重を基に体重別層化無作為抽出法により群分けし、雌雄とも各群 13 匹からなる 4 群に分けた。群分け後、各投与群の雌雄は、尾に個体識別番号を示す番号をフェルトペンで記入した。各飼育ケージには、投与群ごとに色彩の異なるカードに試験計画番号および個体識別番号を記入して掛け、個体識別の補助とした。出生児の個体識別は行わなかった。投与開始時の週齢は、雌雄ともに 9 週齢であった。

動物は、照明 12 時間（7 時～19 時点灯）、換気回数約 15 回/時、許容温度 21.0～25.0℃、許容湿度 40.0～75.0%に設定された飼育室で、金属製金網床ケージ（220w×270d×190h mm）に 1 匹ずつ（交配時は 2 匹/ケージ）收容し、固型飼料（CE-2、日本クレア株式会社）および水道水（秦野市水道局給水）を自由に摂取させて飼育した。ただし、交尾が確認された雌については、妊娠 14 日から哺育 4 日まで、紙パルプ製チップ（ペパークリーン、日本エスエルシー株式会社）を入れたラット用プラスチック製繁殖ケージ（350w×400d×180h mm）に收容した。また、飼育期間中、飼育室の温湿度の実測値は、温度 23.0～24.5℃、湿度 48.5～66.5%であっ

た。供給した飼料、水道水および紙パルプ製チップには、試験に支障をきたす可能性のある混入物はなかった。

3. 投与検体の調製

媒体は 0.5% CMC Na 水溶液〔カルボキシメチルセルロースナトリウム（日本薬局方カルメロースナトリウム、製造番号：6Z09、丸石製薬株式会社）および注射用水（製造番号：9912ST、光製薬株式会社）を用いて調製〕を選択した。投与検体は、MEP を各濃度ごとに秤量し、媒体に懸濁して調製した。調製した検体は、冷蔵、気密の条件下で保存し、調製後 1 週間以内に使用した。

投与検体の安定性については、被験物質の 0.08 および 1.2w/v% の調製検体の、冷蔵、気密条件下での 8 日間の安定性を確認した（Appendix C）。各濃度の調製検体について、被験物質の含量測定および均一性試験を実施した結果、攪拌後の投与検体には所定濃度の MEP が均一に含有されていることが確認された（Appendices D, E）。なお、調製検体中の被験物質の濃度の測定は、高速液体クロマトグラフ法により行った（Appendix F）。

4. 投与量および投与方法

投与経路は、OECD 化学物質試験法ガイドラインによりラット用胃管による強制経口投与とした。投与量は先に実施した「4-(1-メチルエチニル)フェノールのラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験（予備試験）」（試験計画番号：R-00-018）の結果をもとに設定した。予備試験では、各群 3 匹の雄に、MEP の 1000、250、60 および 15mg/kg を 10 週齢時に 5 日間、各群 3 匹の雌に、250、125、60 および 15mg/kg を妊娠 19 日から 5 日間投与した。

雄では 1000mg/kg 投与群において投与第 2 日以降に体重減少がみられ、また、腹臥位、筋弛緩、活動性低下、よろめき歩行、流涎、呼吸の明瞭化、呼吸時雑音等の一般状態の悪化が観察され、全例が死亡した。250mg/kg 投与群においても、一時的な体重減少が認められた。剖検では、1000mg/kg 投与群全例に肺の水腫様変化がみられ、1 例に肺の暗色化、脾臓の淡色化、胸腺の小型化が、2 例に前胃粘膜の白濁、肥厚および剥離が認められた。また、250 および 60mg/kg 投与群で全例、15mg/kg 投与群で 1 例に前胃粘膜の白濁および肥厚が観察された。

雌では、250mg/kg 投与群において 1 例が死亡したほか、生存例 1 例で妊娠期間の延長等の分娩障害が認められた。125mg/kg 投与群でも 1 例に分娩時間の延長がみられた。また、250mg/kg 投与群において被験物質投与の影響と考えられる体重減少がみられた。125 および 60mg/kg 投

与群では、分娩後の体重が減少した。剖検では、250mg/kg 投与群の死亡例で肺の水腫様変化、前胃粘膜の剥離、脾臓の淡色化と小型化、胸腺の小型化が認められ、同群の生存例においても、前胃粘膜の白濁および肥厚、腺胃粘膜の黒色点および菲薄化、脾臓の淡色化および小型化が認められた。また、125mg/kg 投与群においても前胃粘膜の肥厚が観察された。

以上の結果から、60mg/kg の量を投与した場合、雌では分娩後の体重減少が認められ、雄では胃粘膜の白濁・肥厚が認められたことから、本試験の高用量には、被験物質の影響を明確にできると考えられる 60mg/kg を設定し、以下、公比約 4 で減じて 15 および 4mg/kg を中用量および低用量に設定した。

対照群には、MEP の媒体である 0.5%CMC Na 水溶液を用いた。

投与期間は、雄に対しては交配前 2 週間、交配期間（最長 2 週間）、剖検前日まで（総投与回数 47 回）、雌に対しては交配前 2 週間、交配期間（最長 2 週間）、交尾した雌では、妊娠期間を通して哺育 3 日（分娩日＝哺育 0 日）まで（投与回数 41～54 回）、交尾しなかった雌は剖検前日まで（総投与回数 54 回）とし、1 日 1 回、9 時から 12 時の間に投与した。投与容量は体重 1kg 当たり 5mL とし、雄ならびに交配前、交配期間中の雌および交尾しなかった雌では、週 1 回測定した体重を基に、交尾確認後の雌では、妊娠 0 日（交尾確認日）、7 日、14 日および 20 日の体重を基に算出した。

各群の投与量、投与容量、調製濃度および動物番号は次の通りである。

群	被験物質	投与量 (mg/kg)	投与容量 (mL/kg)	濃度 (w/v%)	動物番号	
					雄	雌
1	0.5%CMC Na 水溶液	0	5	0	MX01001～013	FB01001～013
2	MEP	4	5	0.08	MX02001～013	FB02001～013
3	MEP	15	5	0.3	MX03001～013	FB03001～013
4	MEP	60	5	1.2	MX04001～013	FB04001～013

5. 観察および検査

1) 親動物

(1) 一般状態

飼育期間中、毎日 1 回以上観察した。

(2) 体重測定

投与期間中週 1 回ならびに解剖日に測定した。交尾が確認された雌では妊娠 0、7、14、20 日に、分娩した雌では哺育 0 および 4 日に測定した。

(3) 摂餌量測定

投与期間中（交配期間を除く）週 1 回、給餌量を測定し、その翌日に残餌量を測定し、1 日の摂餌量を算出した。交尾が確認された雌では妊娠 0-1、7-8、14-15、20-21 日および分娩した雌では、哺育 3-4 日の摂餌量を測定した。

(4) 性周期

予備飼育に引き続いて投与開始後、交尾が確認されるまで、毎日午前中に膣スメアを採取し、膣垢塗沫標本を作製して膣垢像により性周期を観察した。膣垢像は発情前期 (P:proestrus)、発情期 (E:estrus)、発情休止期 (D:diestrus) に分類した。性周期の型は、投与前 2 週間および投与開始後 2 週間の各観察期間内に少なくとも 2 回以上の発情期像を示した雌のうち、規則的に 4 日あるいは 5 日ごとに発情が回帰したものを 4 日周期 (4-day) あるいは 5 日周期 (5-day) とし、4 日と 5 日の間隔が混在して発情を回帰した動物は 4/5 日周期 (4/5-day) に、これらに分類されないものは不正性周期 (Irregular) とし、各型の性周期を示す動物の頻度を求めた。各動物につき、観察開始日から交配までの間、発情期から発情期までの平均発情回帰日数、投与開始後に性周期が変化した動物の頻度を求めた。

(5) 交配

交配は、投与 15 日の夕方から最長 2 週間、同群内の雌雄を 1 対 1 の連続同居方式で行った。交尾の確認は、膣スメア中の精子あるいは膣栓の確認により行い、交尾が確認された雌については、その日を妊娠 0 日として起算するとともに、雄から分離して個別に飼育した。交配結果および妊娠の成否により、各投与群における交尾率 [(交尾動物数/交配動物数) × 100、%]、受胎率 [(妊娠動物数/交尾動物数) × 100、%]、同居開始日から交尾確認日までの日数およびその間に回帰した発情期の回数を求めた。

(6) 分娩・哺育状態の観察

交尾が確認された雌は、全例を自然分娩させた。分娩状態の直接観察は観察可能な動物につ

いて行い、分娩状態が直接観察できなかった動物についても、分娩後の徴候から分娩障害の有無を判断して記録した。分娩の確認は、午前 9 時～11 時に行い、分娩が完了していることを確認した動物については、その日を分娩日（哺育 0 日）として妊娠期間（妊娠 0 日～分娩日の日数）を算出した。分娩後は哺育状態を毎日観察した。

(7) 剖検・病理組織学検査

雄動物は、投与 47 日の翌日に、致死量のペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させ、剖検した。その際、胸腺、脾臓、精巣および精巣上体の重量を測定し、胸腺、肺、脾臓、胃、前立腺腹葉、凝固腺を含む精嚢は 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定した。精巣および精巣上体はブアン液に固定し、全例のヘマトキシリン・エオジン標本（H・E 標本）を作製し、対照群および高用量群について病理組織学検査を実施した。胃については、60mg/kg 投与群で剖検時に異常が認められたため、H・E 標本を作製し病理組織学検査を実施した結果、高用量群の前胃には扁平上皮の瀰漫性の過形成が観察されたことから、15 および 4mg/kg 投与群についても病理組織学検査を実施した。その他、剖検時に観察された病変部（肺、脱毛部の皮膚）についても病理組織学検査を実施した。

雌動物のうち、分娩した雌は哺育 4 日に、交尾しなかった雌は投与 54 日の翌日にそれぞれ致死量のペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させ、剖検した。その際、胸腺および脾臓の重量を測定し、卵巣および子宮は摘出して、卵巣については実体顕微鏡下で妊娠黄体数を、子宮については着床数を数え、着床率〔(着床数/妊娠黄体数)×100、%〕を算出した。また、胸腺、脾臓、胃、卵巣、子宮、膣は 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定した。卵巣は、全例の H・E 標本を作製し、対照群および 60mg/kg 投与群について病理組織学検査を実施した。胃については、60mg/kg 投与群で剖検時に異常が認められたため、H・E 標本を作製し病理組織学検査を実施した結果、前胃に扁平上皮の瀰漫性の過形成、前胃粘膜固有層の浮腫、腺胃粘膜の糜爛等の異常が観察されたことから、15 および 4mg/kg 投与群についても病理組織学検査を実施した。胸腺は 60mg/kg 投与群で、脾臓は 4mg/kg 投与群で重量に有意差が認められたため、H・E 標本を作製し、胸腺は対照群および 60mg/kg 投与群について、脾臓は全群について病理組織学検査を実施した。その結果、60mg/kg 投与群において胸腺の萎縮の程度が軽度に増強する傾向がみられたことから、15 および 4mg/kg 投与群についても病理組織学検査を実施した。その他、剖検時に観察された病変部（肝臓、脱毛部の皮膚）についても病理組織学検査を実施した。

2) 出生児

(1) 産児数および死亡児

哺育 0 日に産児数（生存児＋死亡児）を調べて、分娩率〔(産児数／着床痕数)×100、%〕、生児出産率〔(出產生児数／着床痕数)×100、%〕、出生率〔(出產生児数／産児数)×100、%〕および哺育 0 日の性比〔(哺育 0 日雄生児数／哺育 0 日総生児数)×100、%〕を求めた。また、出産率〔(生児出産雌数／妊娠動物数)×100、%〕を算出した。生存児は外表を観察し、性別および外表奇形の有無を検査した。

哺育 1 日以降は死亡児数を毎日調べ、新生児生存率〔(哺育 4 日の生児数／哺育 0 日の生児数)×100、%〕および哺育 4 日の性比〔(哺育 4 日雄生児数／哺育 4 日総生児数)×100、%〕を求めた。観察可能な死亡児は剖検した。

(2) 体重

哺育 0 および 4 日に個体別に測定し、各腹ごとに雌雄別の平均値を算出した。

(3) 剖検

出生児は哺育 4 日に剖検し、外表および内部器官の異常の有無を観察した。

6. データ解析法

性周期が変化した動物の頻度、交尾率、受胎率および出生児の形態異常出現頻度については Fisher の直接確率検定¹⁾を行った。病理組織学検査所見では、グレード分けしたデータは、Mann-Whitney の U 検定^{1, 2)}により、陽性グレードの合計値は Fisher の直接確率の片側検定により対照群と MEP 投与群の間の有意差検定を行った。その他のデータは、個体ごとに得られた値あるいは各腹ごとの平均値を 1 標本として、先ず Bartlett 法³⁾により各群の分散の一様性について検定を行った。分散が一様である場合には、一元配置型の分散分析³⁾を行い、群間に有意性が認められる場合は、Dunnett 法⁴⁾により多重比較を行った。一方、いずれかの群で分散が 0 となる場合および分散が一様でない場合には、Kruskal-Wallis の順位検定⁵⁾を行い、群間に有意性が認められる場合には、Dunnett 型の検定法により多重比較を行った。有意水準は、5%とした。

【結 果】

1. 親動物

1) 一般状態 (Tables 1, 2; Appendices 1-1~2-4)

雌雄ともに死亡動物はみられなかった。

雄では、投与 21 日以降、6 匹に投与直後に流涎が散見された。流涎は投与 1 時間 20 分後までには回復した。その他の一般状態の変化として、雄では 60mg/kg 投与群 1 匹、雌では対照群 2 匹および 15 mg/kg 投与群 1 匹に四肢あるいは四肢から頸部にかけての脱毛が認められた。

2) 体重 (Figs. 1, 2; Tables 3~6; Appendices 3-1~6-4)

雌雄ともに、体重実測値および増加量のいずれにも MEP 投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

3) 摂餌量 (Figs. 3, 4; Tables 7~8; Appendices 7-1~8-4)

雌雄ともに、いずれの時期の摂餌量にも MEP 投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

4) 剖検所見 (Tables 9, 10; Appendices 9-1~10-4)

雄では、60mg/kg 投与群の 7 匹に前胃粘膜の肥厚が観察された。また、15mg/kg 投与群および対照群の各 1 匹の肺に赤色点が観察されたほか、15mg/kg 投与群の 1 匹の右側精巣上体に淡黄色斑が、60mg/kg 投与群の 1 匹に局所的な脱毛がそれぞれ観察された。4mg/kg 投与群には、異常は観察されなかった。

雌では、60mg/kg 投与群の 7 匹に前胃粘膜の肥厚が、他の 1 匹に前胃粘膜の浮腫および腺胃粘膜に陥凹部を伴う黒色斑が認められた。また、15mg/kg 投与群の 1 匹に肝臓の淡色化および胸腺の小型化が観察されたほか、15mg/kg 投与群の 1 匹、対照群の 2 匹に局所的な脱毛が観察された。

5) 器官重量 (Tables 11, 12; Appendices 11-1~12-4)

雄では、胸腺、脾臓、精巣および精巣上体のいずれにも、絶対重量および相対重量ともに対照群と MEP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

雌では、60mg/kg 投与群において胸腺の絶対重量および相対重量が対照群と比較して有意 ($p < 0.05$) な低値を示した。また、4mg/kg 投与群において脾臓の絶対重量および相対重量が対照群と比較して有意 ($p < 0.05$ 、 $p < 0.01$) な高値を示した。

6) 雄動物の病理組織所見 (Table 13; Appendices 13-1~13-4)

60mg/kg 投与群および対照群の精巣、精巣上体に異常は認められなかった。

胃では、60mg/kg 投与群の全例の前胃に扁平上皮の瀰漫性の過形成が観察され、程度、頻度ともに対照群と比較して有意差 ($p < 0.01$) が認められた。

剖検時に肺に赤色点が観察された動物のうち、対照群の 1 匹には泡沫細胞の集簇および動脈に鉍質沈着が観察された。その他の病変部 (15mg/kg 投与群の肺および精巣上体、60mg/kg 投与群の脱毛部皮膚) には異常は認められなかった。

7) 雌動物の病理組織所見 (Tables 14-1, 14-2; Appendices 14-1~14-4; Photos 1~4)

60mg/kg 投与群および対照群の卵巣に異常は認められなかった。

胃では、60mg/kg 投与群の 10 匹 (交尾不成立例 1 匹を含む) の前胃に扁平上皮の瀰漫性の過形成が観察され、その程度および頻度ともに対照群と比較して有意差 ($p < 0.01$) が認められた (Photos 1, 2)。このうち 2 匹は粘膜固有層に浮腫を伴っていたほか、1 匹には腺胃粘膜に糜爛も観察された。その他、60 および 4mg/kg 投与群の各 1 匹には腺胃の粘膜固有層にリンパ球の浸潤が観察された。

脾臓では、対照群を含む各投与群の全例に髄外造血および褐色色素の沈着が観察され、60mg/kg 投与群では髄外造血の程度が対照群と比較して有意 ($p < 0.05$) に増強され、褐色色素の沈着の程度もやや増強される傾向が認められた (Photos 3, 4)。また、胸腺については対照群を含む各投与群で 2~3 例に萎縮が観察されたが、対照群と MEP 各投与群との間に程度および頻度の明らかな差は認められなかった。

剖検時に淡色化が観察された 15mg/kg 投与群の 1 匹の肝臓では、門脈周囲および中間帯に著しい肝細胞の脂肪化が認められ、脱毛が観察された対照群の 2 匹のうち 1 匹に、表皮上に限局性の痂皮が観察された。

2. 生殖能力

1) 性周期および交配成績 (Tables 15、16; Appendices 15-1~16-4)

性周期には MEP 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。交配の結果、交尾率および受胎率には MEP 投与の影響は認められなかった。また、交尾までの日数およびその間の発情回数に、対照群と MEP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

2) 出産率および妊娠期間 (Table 17; Appendices 17-1~17-4)

出産率および妊娠期間には MEP 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。

3) 黄体数、着床数および着床率 (Table 17; Appendices 17-1~17-4)

黄体数、着床数および着床率に MEP 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。

4) 分娩および哺育状態

分娩には異常は認められなかった。また、60 mg/kg 投与群の 1 腹で哺育 4 日にミルクスポットがない哺育児が認められたが、1 腹のみの発現であり、偶発的な変化と考えられた。そのほかには、哺育状態の異常は、いずれの投与群においても観察されなかった。

3. 出生児

1) 生存 (Table 17; Appendices 17-1~17-4)

出生率、総産児数、分娩率、出生生児数、生児出産率、哺育 4 日の生児数、新生児生存率および性比には、対照群と MEP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

2) 体重 (Table 18; Appendices 18-1~18-4)

哺育 0 および 4 日における出生児の体重には、対照群と MEP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

3) 形態

哺育 0 日の生存児の外表観察において、対照群の雄 1 匹 (母動物番号:FB01007) に尿道下裂が観察されたが、哺育 2 日までに死亡 (不明) した。また、4mg/kg 投与群の雄 1 匹 (母動物番号:FB02008) に曲尾が観察された。

哺育4日の剖検では、曲尾が観察された4mg/kg投与群の雄1匹を除き、いずれの哺育児にも外表および内部器官に異常は認められなかった。

死亡児は、対照群1匹、15mg/kg投与群4匹、60mg/kg投与群10匹に認められたが、観察可能であった死亡児（15mg/kg投与群3匹、60mg/kg投与群9匹）の剖検では異常は認められなかった。

【考 察】

MEP の 4、15 および 60mg/kg を Sprague-Dawley 系ラットに雄には 47 日間、雌には交配前 2 週間および交配期間、妊娠期間を通して哺育 3 日まで経口投与し、MEP の生殖毒性について検討した。

一般状態の変化として、60mg/kg 投与群の雄において、投与後に一過性の流涎が散見された。

剖検では、60mg/kg 投与群の雄雌に前胃粘膜の肥厚が認められた。胃の病理組織学的検査の結果、前胃に扁平上皮の瀰漫性の過形成が認められた。さらに雌では、少数例に粘膜固有層の浮腫、腺胃粘膜の糜爛も観察された。器官重量では、雌の胸腺の絶対重量および相対重量が低値を示した。これらの変化は、より高用量を投与した予備試験においても認められている変化であり、MEP 投与の影響を示唆する変化と考えられる。なお、雌の 4mg/kg 投与群において脾臓重量が有意に高値を示したが、MEP の用量に依存した変化ではないことから、4mg/kg 投与群に認められた脾臓重量の高値は偶発的な変化と考えられた。しかし、60mg/kg 投与群の雌の脾臓の病理組織検査で認められた髓外造血の程度の有意な増強、褐色色素の程度の増強傾向については MEP 投与に起因した変化であると考えられる。

雌の性周期、雌雄の交尾および受胎能に MEP 投与の影響は認められなかった。また、妊娠期間、分娩および哺育状態にも MEP 投与の影響は認められなかった。出生児の形態、生存ならびに体重には、MEP 投与の影響は認められなかった。なお、15mg/kg 投与群の出生児に曲尾が観察されたが、1 匹のみであり、MEP の用量に依存した発現ではないことから、自然発生的な変化と考えられる。

以上の成績から、本試験条件下における MEP の親動物に対する無作用量は、60mg/kg 投与群において、雄では一過性の流涎および前胃粘膜肥厚が認められ、雌では前胃粘膜肥厚、胸腺重量の低値、脾臓の髓外造血および褐色色素の沈着の程度が増強されたことから 15mg/kg/day、親動物の生殖能力および出生児に対する無作用量は 60mg/kg までの用量に MEP 投与の影響は認められなかったことから、60mg/kg/day と考えられる。

【文 献】

- 1) 石居進：「生物統計学入門」、培風館、東京（1992）
- 2) 丹後俊郎：「医学への統計学」（古川俊之監修）、朝倉書店、東京（1985）
- 3) 佐久間昭：「薬効評価-計画と解析」、東京大学出版会、東京（1977）
- 4) Dunnett, C.W.: New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491 (1964)
- 5) Kruskal, W.H. and Wallis, W.A.: Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J. Amer. Statist. Assoc.* 47: 583-621 (1952)

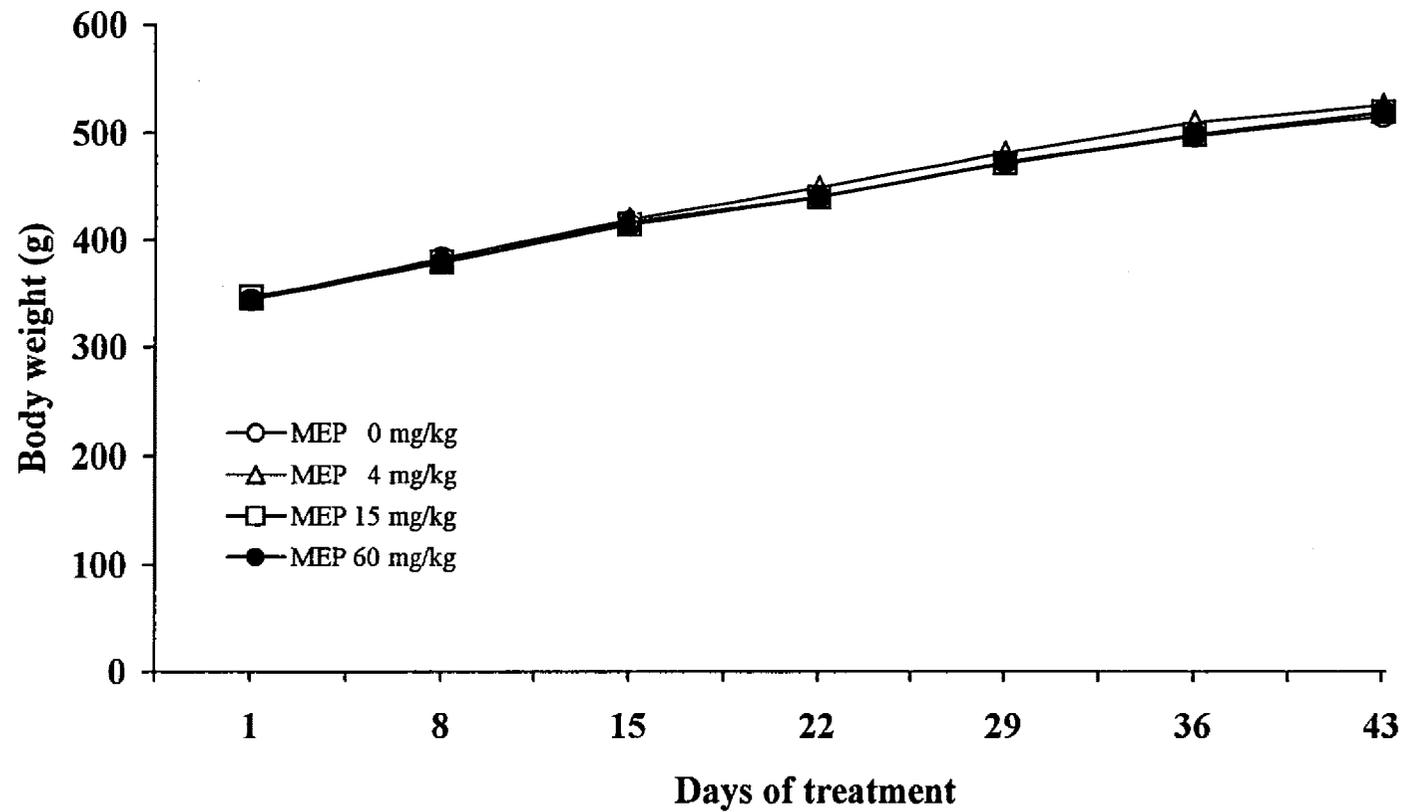


Fig. 1 Body weight of males

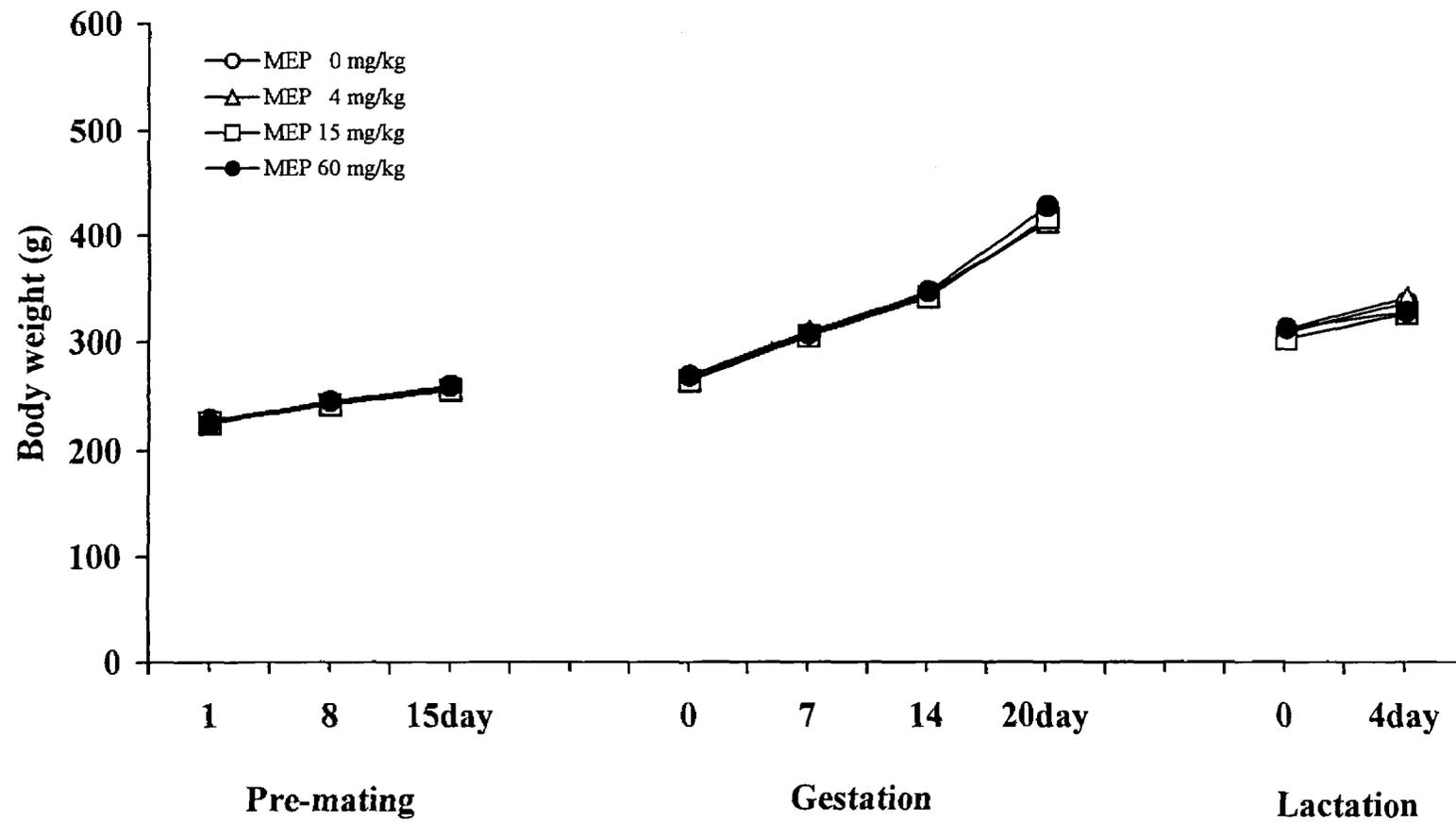


Fig.2 Body weight of females

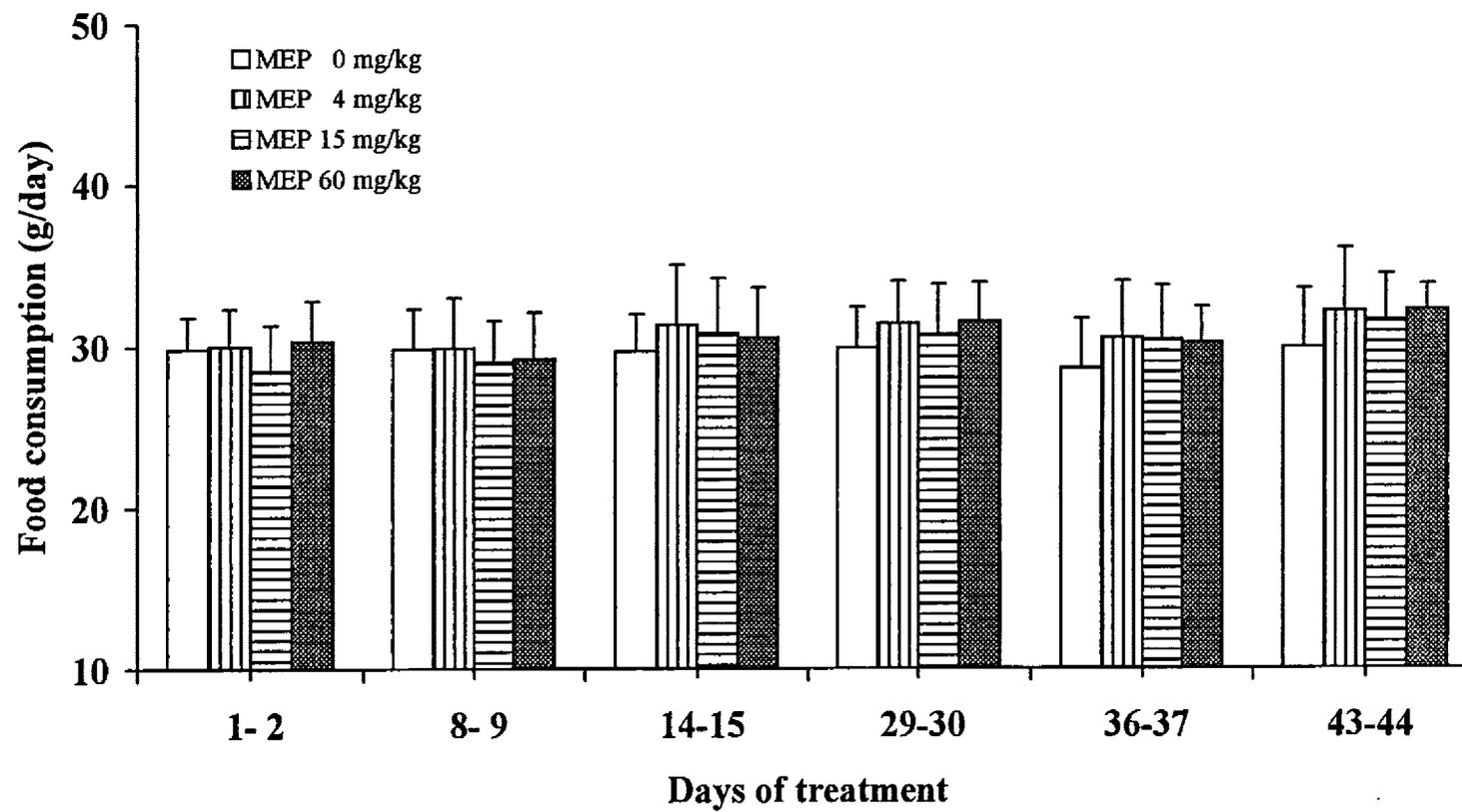


Fig. 3 Food consumption of males

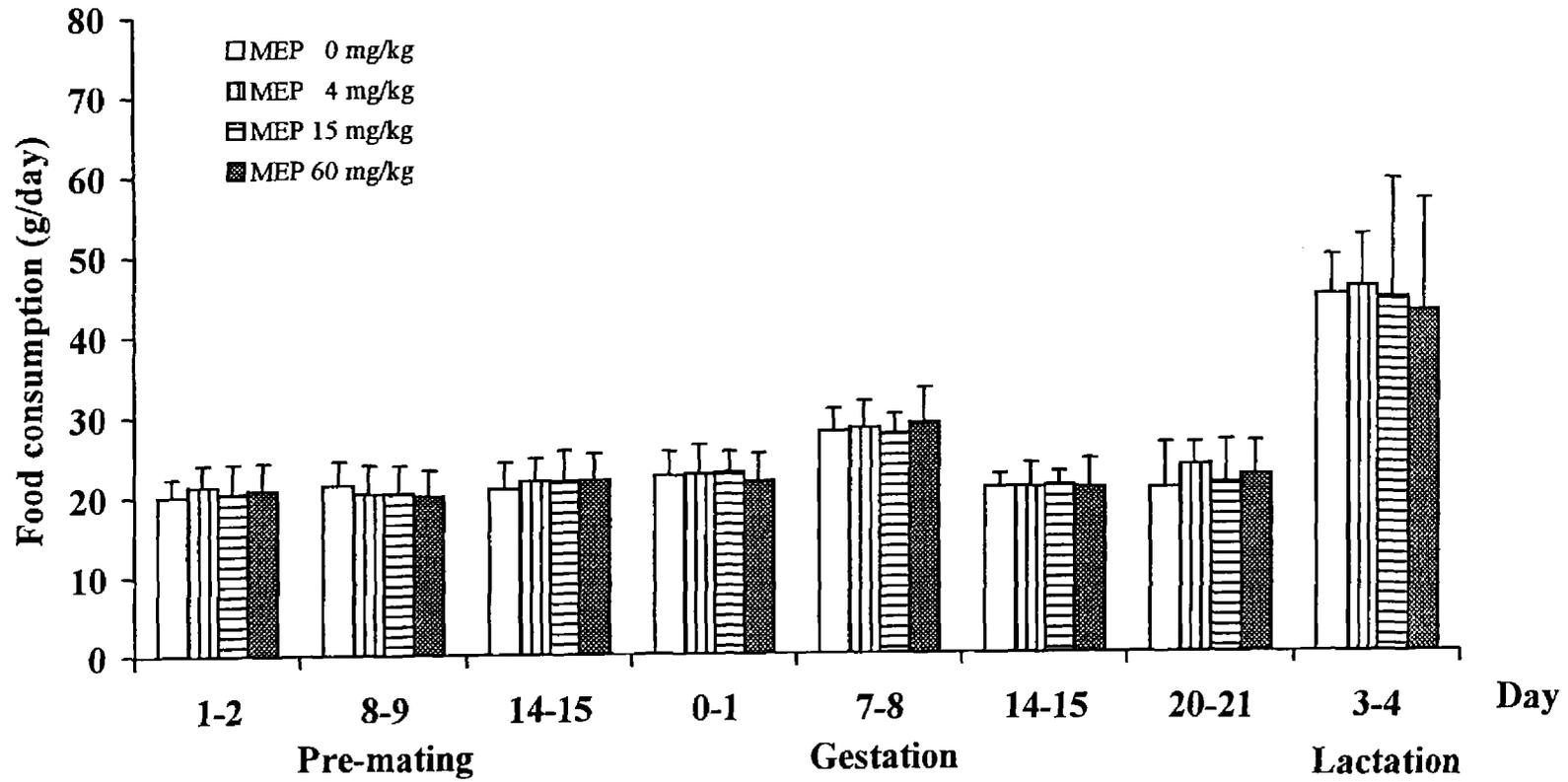


Fig. 4 Food consumption of females

【TABLE INDEX】

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEP by oral administration in rats

Table (Appendix)	Table title
1 (1-1 ~ 1-4)	Clinical signs of males
2 (2-1 ~ 2-4)	Clinical signs of females
3 (3-1 ~ 3-4)	Body weight of males
4 (4-1 ~ 4-4)	Body weight gain of males
5 (5-1 ~ 5-4)	Body weight of females
6 (6-1 ~ 6-4)	Body weight gain of females
7 (7-1 ~ 7-4)	Food consumption of males
8 (8-1 ~ 8-4)	Food consumption of females
9 (9-1 ~ 9-4)	Macroscopic findings of males
10 (10-1 ~ 10-4)	Macroscopic findings of females
11 (11-1 ~ 11-4)	Organ weight of males
12 (12-1 ~ 12-4)	Organ weight of females
13 (13-1 ~ 13-4)	Histopathological findings of males
14 (14-1 ~ 14-4)	Histopathological findings of females
15 (15-1 ~ 15-4)	Estrous cycles of females
16 (16-1 ~ 16-4)	Reproductive performance of animals
17 (17-1 ~ 17-4)	Development of pups up to day 4 of lactation
18 (18-1 ~ 18-4)	Body weight of pups up to day 4 of lactation

Table 1

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEP by oral administration in rats

Clinical signs of males

Compound	MEP			
	0 ^a	4	15	60
Dose (mg/kg)				
No. of males examined	13	13	13	13
No. of males with abnormality	0	0	0	7
Category and number of abnormality				
Loss of fur	0	0	0	1
Salivation	0	0	0	6

a: vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

Table 2

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEP by oral administration in rats

Clinical signs of females

Compound	MEP			
	0 ^a	4	15	60
Dose (mg/kg)				
No. of males examined	13	13	13	13
No. of males with abnormality	2	0	1	0
Category and number of abnormality				
Loss of fur	2	0	1	0
Salivation	0	0	0	0

a: vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

Table 3

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEP by oral administration in rats

Body weight of males; Mean±S.D. (N)

Compound	MEP							
	0 ^a		4		15		60	
Dose (mg/kg)								
Days of treatment								
1	345.4 ± 14.3	(13)	345.0 ± 16.7	(13)	346.9 ± 17.6	(13)	344.0 ± 13.3	(13)
8	383.3 ± 18.5	(13)	382.4 ± 23.0	(13)	379.5 ± 27.3	(13)	378.8 ± 19.9	(13)
15	416.8 ± 20.4	(13)	419.3 ± 30.5	(13)	414.7 ± 33.9	(13)	414.3 ± 27.1	(13)
22	440.3 ± 22.8	(13)	448.6 ± 32.3	(13)	439.5 ± 40.2	(13)	439.9 ± 25.5	(13)
29	470.9 ± 22.9	(13)	480.7 ± 36.5	(13)	471.3 ± 43.6	(13)	472.0 ± 27.9	(13)
36	496.3 ± 27.1	(13)	509.1 ± 38.8	(13)	497.7 ± 48.5	(13)	497.4 ± 28.4	(13)
43	514.6 ± 29.7	(13)	524.7 ± 41.9	(13)	518.4 ± 48.8	(13)	518.1 ± 26.5	(13)

a: vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

Table 4

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEP by oral administration in rats

Body weight gain of males; Mean±S.D. (N)

Compound	MEP							
	0 ^a		4		15		60	
Days of treatment								
1- 8	38.0 ± 7.1	(13)	37.4 ± 7.9	(13)	32.6 ± 11.7	(13)	34.8 ± 9.5	(13)
1-15	71.4 ± 11.7	(13)	74.3 ± 15.2	(13)	67.8 ± 18.2	(13)	70.3 ± 15.8	(13)
1-22	95.0 ± 14.5	(13)	103.6 ± 17.3	(13)	92.6 ± 23.8	(13)	95.9 ± 14.8	(13)
1-29	125.5 ± 16.5	(13)	135.7 ± 21.5	(13)	124.3 ± 27.0	(13)	128.0 ± 18.3	(13)
1-36	150.9 ± 20.0	(13)	164.2 ± 23.9	(13)	150.8 ± 31.7	(13)	153.4 ± 20.1	(13)
1-43	169.2 ± 23.8	(13)	179.8 ± 28.2	(13)	171.4 ± 32.3	(13)	174.1 ± 19.5	(13)

a: vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

Table 5

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEP by oral administration in rats

Body weight of females; Mean±S.D. (N)

Compound	MEP							
	0 ^a		4		15		60	
Days of treatment								
1	228.6 ± 8.9	(13)	224.5 ± 7.9	(13)	225.5 ± 5.7	(13)	224.8 ± 11.7	(13)
8	243.8 ± 12.3	(13)	244.3 ± 10.7	(13)	242.3 ± 10.5	(13)	245.6 ± 10.6	(13)
15	258.8 ± 12.0	(13)	258.2 ± 12.6	(13)	256.0 ± 14.1	(13)	260.0 ± 12.7	(13)
22	299.9	(1)			289.7	(2)	312.6	(2)
29	317.6	(1)			313.3	(1)	336.3	(1)
36	313.8	(1)			325.9	(1)	345.9	(1)
43	317.7	(1)			333.9	(1)	338.2	(1)
50	326.2	(1)			331.7	(1)	335.3	(1)
Days of gestation								
0	265.4 ± 14.7	(12)	269.2 ± 11.3	(13)	264.7 ± 13.6	(12)	269.1 ± 20.4	(12)
7	306.1 ± 15.1	(12)	309.6 ± 15.4	(13)	305.0 ± 14.2	(12)	307.3 ± 21.0	(12)
14	343.2 ± 17.9	(12)	345.8 ± 16.7	(13)	341.9 ± 14.7	(12)	346.8 ± 21.5	(12)
20	414.1 ± 20.7	(12)	412.7 ± 25.6	(13)	416.6 ± 12.1	(12)	427.7 ± 25.8	(12)
Days of lactation								
0	309.2 ± 27.1	(12)	312.1 ± 28.2	(13)	303.0 ± 20.9	(12)	312.7 ± 24.9	(12)
4	337.5 ± 19.5	(12)	341.9 ± 23.2	(13)	327.1 ± 29.4	(12)	328.4 ± 31.6	(12)

a: vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

Table 6

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEP by oral administration in rats

Body weight gain of females; Mean±S.D. (N)

Compound	MEP									
	0 ^a		4		15		60			
Days of treatment										
1- 8	15.1 ± 6.2	(13)	19.7 ± 6.7	(13)	16.7 ± 8.1	(13)	20.8 ± 4.6	(13)		
1-15	30.1 ± 7.4	(13)	33.6 ± 8.1	(13)	30.5 ± 11.0	(13)	35.2 ± 9.1	(13)		
1-22	72.4	(1)			61.5	(2)	79.0	(2)		
1-29	90.1	(1)			81.0	(1)	96.6	(1)		
1-36	86.3	(1)			93.6	(1)	106.2	(1)		
1-43	90.2	(1)			101.6	(1)	98.5	(1)		
1-50	98.7	(1)			99.4	(1)	95.6	(1)		
Days of gestation										
0- 7	40.7 ± 7.3	(12)	40.4 ± 8.3	(13)	40.3 ± 7.1	(12)	38.2 ± 6.7	(12)		
0-14	77.7 ± 11.7	(12)	76.6 ± 12.8	(13)	77.2 ± 9.0	(12)	77.7 ± 7.5	(12)		
0-20	148.7 ± 10.7	(12)	143.5 ± 25.3	(13)	151.8 ± 9.8	(12)	158.6 ± 15.1	(12)		
Days of lactation										
0- 4	28.3 ± 15.5	(12)	29.8 ± 12.5	(13)	24.0 ± 27.8	(12)	15.7 ± 27.3	(12)		

a: vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

Table 7

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEP by oral administration in rats
 Food consumption of males; Mean±S.D. (N)

Compound	MEP							
	0 ^a		4		15		60	
Days of treatment								
1- 2	29.8 ± 2.0	(13)	30.0 ± 2.3	(13)	28.5 ± 2.8	(13)	30.3 ± 2.5	(13)
8- 9	29.8 ± 2.5	(13)	29.9 ± 3.1	(13)	29.0 ± 2.6	(13)	29.2 ± 2.9	(13)
14-15	29.7 ± 2.3	(13)	31.3 ± 3.7	(13)	30.8 ± 3.4	(13)	30.5 ± 3.1	(13)
29-30	29.9 ± 2.5	(13)	31.4 ± 2.6	(13)	30.7 ± 3.1	(13)	31.5 ± 2.4	(13)
36-37	28.6 ± 3.1	(13)	30.5 ± 3.5	(13)	30.4 ± 3.3	(13)	30.2 ± 2.2	(13)
43-44	29.9 ± 3.6	(13)	32.1 ± 3.9	(13)	31.6 ± 2.8	(13)	32.2 ± 1.6	(13)

a: vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

Table 8

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEP by oral administration in rats
 Food consumption of females; Mean±S.D. (N)

Compound	MEP											
	0 ^a			4			15			60		
Days of treatment												
1- 2	20.1 ±	2.2	(13)	21.4 ±	2.7	(13)	20.5 ±	3.7	(13)	20.9 ±	3.4	(13)
8- 9	21.5 ±	3.0	(13)	20.4 ±	3.6	(13)	20.5 ±	3.4	(13)	20.1 ±	3.3	(13)
14-15	21.0 ±	3.3	(13)	21.9 ±	2.9	(13)	21.9 ±	3.9	(13)	22.0 ±	3.4	(13)
Days of gestation												
0- 1	22.6 ±	3.0	(12)	22.7 ±	3.7	(13)	22.9 ±	2.6	(12)	21.8 ±	3.5	(12)
7- 8	28.0 ±	2.8	(12)	28.4 ±	3.4	(13)	27.7 ±	2.4	(12)	29.0 ±	4.4	(12)
14-15	20.9 ±	1.7	(12)	20.9 ±	3.0	(13)	21.1 ±	1.7	(12)	20.8 ±	3.6	(12)
20-21	20.7 ±	5.7	(12)	23.6 ±	2.8	(13)	21.4 ±	5.3	(12)	22.3 ±	4.2	(12)
Days of lactation												
3- 4	44.8 ±	5.0	(12)	45.8 ±	6.5	(13)	44.4 ±	14.9	(12)	42.7 ±	14.0	(12)

a: vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

Table 9

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEP by oral administration in rats
 Macroscopic findings of males

Dose (mg/kg)	0 ^a		4		15		60	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Stomach)	[13] ^b		[13]		[13]		[13]	
Thickening, mucosa, forestomach	13	0	13	0	13	0	6	7
(Lung)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Spot, red	12	1	13	0	12	1	13	0
(Epididymis)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Area, pale yellow, right side	13	0	13	0	12	1	13	0
(Skin)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Alopecia, local	13	0	13	0	13	0	12	1
(Others)	[13]		[13]		[13]		[13]	
Abnormality	13	0	13	0	13	0	13	0

a: vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

b: number of males examined

-: negative

+: positive

Table 10

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEP by oral administration in rats
 Macroscopic findings of females (copulated)

Dose (mg/kg)	0 ^a		4		15		60	
	-	+	-	+	-	+	-	+
(Stomach)	[12] ^b		[13]		[12]		[12]	
Thickening, mucosa, forestomach	12	0	13	0	12	0	5	7
Edema, mucosa, forestomach	12	0	13	0	12	0	11	1
Spot, black, with recessed area, glandular stomach	12	0	13	0	12	0	11	1
(Liver)	[12]		[13]		[12]		[12]	
Pale	12	0	13	0	11	1	12	0
(Thymus)	[12]		[13]		[12]		[12]	
Small	12	0	13	0	11	1	12	0
(Skin)	[12]		[13]		[12]		[12]	
Alopecia, local	10	2	13	0	11	1	12	0
(Others)	[12]		[13]		[12]		[12]	
Abnormality	12	0	13	0	12	0	12	0

a: vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

b: number of females examined

-: negative

+: positive

Table 11

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEP by oral administration in rats

Organ weight of males; Mean \pm S.D. (N)

Compound		MEP							
		0 ^a		4		15		60	
Terminal body weight	(g)	531.3 \pm 30.1	(13)	541.8 \pm 48.8	(13)	531.3 \pm 50.9	(13)	533.6 \pm 26.9	(13)
Thymus	(mg)	339.9 \pm 60.3 ^b	(13)	358.8 \pm 65.8	(13)	380.6 \pm 88.0	(13)	353.6 \pm 107.3	(13)
		64.1 \pm 11.6 ^c	(13)	66.5 \pm 12.5	(13)	72.4 \pm 19.6	(13)	66.4 \pm 20.2	(13)
Spleen	(g)	0.94 \pm 0.12	(13)	0.97 \pm 0.22	(13)	0.92 \pm 0.12	(13)	1.03 \pm 0.14	(13)
		0.18 \pm 0.02	(13)	0.18 \pm 0.03	(13)	0.17 \pm 0.01	(13)	0.19 \pm 0.02	(13)
Testes	(g)	3.52 \pm 0.33	(13)	3.28 \pm 0.31	(13)	3.43 \pm 0.27	(13)	3.41 \pm 0.42	(13)
		0.67 \pm 0.08	(13)	0.61 \pm 0.08	(13)	0.65 \pm 0.07	(13)	0.64 \pm 0.07	(13)
Epididymides	(g)	1.28 \pm 0.07	(13)	1.25 \pm 0.11	(13)	1.29 \pm 0.08	(13)	1.24 \pm 0.10	(13)
		0.24 \pm 0.02	(13)	0.23 \pm 0.03	(13)	0.24 \pm 0.02	(13)	0.23 \pm 0.02	(13)

a: vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

b: absolute weight

c: relative weight (g or mg per 100g body weight)

Table 12

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEP by oral administration in rats

Organ weight of females; Mean \pm S.D. (N)

Compound	Dose (mg/kg)	MEP			
		0 ^a	4	15	60
Terminal body weight	(g)	337.5 \pm 19.5 (12)	341.9 \pm 23.2 (13)	327.1 \pm 29.4 (12)	328.4 \pm 31.6 (12)
Thymus	(mg)	209.4 \pm 86.4 ^b (12)	211.0 \pm 73.5 (13)	190.1 \pm 72.2 (12)	136.1 \pm 49.0 * (12)
		61.4 \pm 23.5 ^c (12)	60.9 \pm 19.4 (13)	57.1 \pm 20.3 (12)	41.2 \pm 13.6 * (12)
Spleen	(g)	0.63 \pm 0.12 (12)	0.80 \pm 0.15 * (13)	0.67 \pm 0.16 (12)	0.68 \pm 0.12 (12)
		0.19 \pm 0.03 (12)	0.23 \pm 0.04 ** (13)	0.20 \pm 0.04 (12)	0.21 \pm 0.02 (12)

a: vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

b: absolute weight

c: relative weight (g or mg per 100g body weight)

*: significant difference from control, p<0.05

**: significant difference from control, p<0.01

Table 13

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEP by oral administration in rats

Histopathological findings of males

Dose (mg/kg)	0 ^a					4					15					60									
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	
(Testis)	[13]					[0]					[0]					[13]									
Abnormality	13	0	0	0	0	0														13	0	0	0	0	0
(Epididymis)	[13]					[0]					[1]					[13]									
Abnormality	13	0	0	0	0	0							1	0	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0
(Stomach)	[13]					[12]					[13]					[13]									
Squamous, hyperplasia, diffuse, forestomach	13	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	3	10	0	0	** 13 ##
(Lung)	[1]					[0]					[1]					[0]									
Mineralization, artery	0	1	0	0	0	1							1	0	0	0	0	0							
Accumulation, foam cell	0	1	0	0	0	1							1	0	0	0	0	0							
(Skin)	[0]					[0]					[0]					[1]									
Abnormality																				1	0	0	0	0	0

a: vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

-, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; Pos., total of positive grade

[], number of males examined.

**, significantly different from control, p<0.01 (Two-tailed Mann-Whitney U test)

##, significantly different from control, p<0.01 (One-tailed Fisher exact test)

Table 14-1

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEP by oral administration in rats

Histopathological findings of females (copulated)

Dose (mg/kg)	0 ^a					4					15					60										
	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.		
(Ovary)	[12]					[0]					[0]					[12]										
Abnormality	12	0	0	0	0	0														12	0	0	0	0	0	
(Stomach)	[12]					[13]					[12]					[12]										
Squamous, hyperplasia, diffuse, forestomach	12	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0	3	6	3	0	0	**	9 ##
Edema, lamina propria, forestomach	12	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0	10	1	0	1	0	2	
Erosion, mucosa, glandular stomach	12	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0	11	1	0	0	0	1	
Cellular infiltration, lymphocyte, lamina propria, glandular stomach	12	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1	12	0	0	0	0	0	0	11	1	0	0	0	1	
(Spleen)	[12]					[13]					[12]					[12]										
Hematopoiesis, extramedullary	0	0	8	4	0	12	0	0	5	8	0	13	0	1	6	5	0	12	0	0	1	11	0	*	12	
Deposit, pigment, brown	0	1	5	6	0	12	0	1	6	6	0	13	0	2	7	3	0	12	0	0	2	10	0	12		
(Thymus)	[12]					[13]					[12]					[12]										
Atrophy	10	2	0	0	0	2	11	1	1	0	0	2	10	1	0	1	0	2	9	0	2	1	0	3		
(Liver)	[0]					[0]					[1]					[0]										
Fatty change, hepatocyte, periportal area and midzone													0	0	0	0	1	1								
(Skin)	[2]					[0]					[1]					[0]										
Crust, focal, on surface	1	1	0	0	0	1							1	0	0	0	0	0								

a: vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

-, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; Pos., total of positive grade

[], number of females examined.

*, significantly different from control, $p < 0.05$ (Two-tailed Mann-Whitney U test)**, significantly different from control, $p < 0.01$ (Two-tailed Mann-Whitney U test)##, significantly different from control, $p < 0.01$ (One-tailed Fisher exact test)

Table 14-2

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEP by oral administration in rats

Histopathological findings of females (not copulated)

Dose (mg/kg)	0 ^a					4					15					60														
	Grade	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.					
(Ovary)	[1]						[0]						[0]						[1]											
Abnormality		1	0	0	0	0	0																		1	0	0	0	0	0
(Stomach)	[1]						[0]						[1]						[1]											
Squamous, hyperplasia, diffuse, forestomach		1	0	0	0	0	0							1	0	0	0	0	0						0	0	1	0	0	1
Edema, lamina propria, forestomach		1	0	0	0	0	0							1	0	0	0	0	0						1	0	0	0	0	0
Erosion, mucosa, glandular stomach		1	0	0	0	0	0							1	0	0	0	0	0						1	0	0	0	0	0
Cellular infiltration, lymphocyte, lamina propria, glandular stomach		1	0	0	0	0	0							1	0	0	0	0	0						1	0	0	0	0	0
(Spleen)	[1]						[0]						[1]						[1]											
Hematopoiesis, extramedullary		0	1	0	0	0	1							0	1	0	0	0	1						0	0	1	0	0	1
Deposit, pigment, brown		0	0	1	0	0	1							0	0	0	1	0	1						0	0	0	0	1	1
(Thymus)	[1]						[0]						[1]						[1]											
Atrophy		1	0	0	0	0	0							1	0	0	0	0	0						1	0	0	0	0	0

a: vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

-, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; Pos., total of positive grade

[], number of females examined.

Table 15

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEP by oral administration in rats

Estrous cycles of females

Compound	MEP			
	0 ^a	4	15	60
Dose (mg/kg)				
Number of females examined	13	13	13	13
Mean length of estrous cycle in days				
Pre-treatment period; Mean ± S.D	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0
Treatment period; Mean ± S.D.	4.0 ± 0.0	4.1 ± 0.2	4.0 ± 0.1	4.0 ± 0.0
Number of animals showing each type of cycle during pre-treatment period				
4-day cycle	13	13	13	13
Changes of estrous cycle after treatment				
Number of animals whose estrous cycle was not changed	13	12	12	13
Number of animals whose estrous cycle was changed (pre-treatment period) (treatment period)				
4-day → 4/5-day	0	1	1	0
Mean times of vaginal estrus during mating period				
Mean ± S.D. (N)	1.0 ± 0.0 (12)	1.1 ± 0.3 (13)	1.1 ± 0.3 (12)	1.0 ± 0.0 (12)

a): Vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

Table 16

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEP by oral administration in rats

Reproductive performance of animals

Compound	MEP			
	0 ^a	4	15	60
Dose (mg/kg)				
Number of mated pairs	13	13	13	13
Number of copulated pairs	12	13	12	12
Copulation index	92.3	100.0	92.3	92.3
Number of pregnant animals	12	13	12	12
Fertility index	100.0	100.0	100.0	100.0
Pairing days until copulation Mean ± S.D.	2.6 ± 1.2	3.0 ± 1.5	3.5 ± 3.5	3.3 ± 3.2

a: Vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

Copulation index = (number of copulated pairs / number of mated pairs) × 100, %

Fertility index = (number of pregnant animals / number of copulated pairs) × 100, %

Table 17

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEP by oral administration in rats
Development of pups up to day 4 of lactation; Mean±S.D. (N)

Compound	MEP			
	0 ^a	4	15	60
Dose (mg/kg)				
No. of pregnant females	12	13	12	12
No. of pregnant females with pups alive	12	13	12	12
Gestation index	100	100	100	100
Gestation length in days	22.3 ± 0.5	22.7 ± 0.5	22.6 ± 0.5	22.3 ± 0.5
No. of corpora lutea	17.0 ± 1.1	15.7 ± 2.4	16.8 ± 1.1	16.7 ± 2.1
No. of implantations	15.4 ± 2.1	13.5 ± 4.1	16.2 ± 1.0	15.7 ± 2.3
Implantation index	90.6 ± 9.4	84.7 ± 19.9	96.7 ± 5.6	94.2 ± 8.9
Day 0				
No. of pups born	14.2 ± 2.4	12.5 ± 3.8	14.6 ± 1.3	14.8 ± 2.2
Delivery index	91.8 ± 7.8	92.8 ± 7.5	90.4 ± 8.6	94.8 ± 5.2
No. of live pups	14.2 ± 2.4	12.5 ± 3.8	14.5 ± 1.3	14.3 ± 2.7
Birth index	91.8 ± 7.8	92.8 ± 7.5	90.0 ± 8.9	91.7 ± 11.3
Live birth index	100	100	99.4 ± 1.9	96.6 ± 9.6
Sex ratio	42.5 ± 10.1	48.4 ± 11.4	50.9 ± 12.2	53.0 ± 12.6
Day 4				
No. of live pups	14.1 ± 2.5	12.5 ± 3.8	14.3 ± 1.4	14.0 ± 2.3
Viability index	99.2 ± 2.6	100	98.3 ± 4.3	98.2 ± 6.1
Sex ratio	42.0 ± 10.1	48.4 ± 11.4	50.7 ± 12.2	51.8 ± 13.8

a: vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)

Gestation index = (no. of pregnant females with pups alive / no. of pregnant females) x 100, %

Implantation index = (no. of implantations / no. of corpora lutea) x 100, %

Delivery index = (no. of pups born / no. of implantations) x 100, %

Birth index = (no. of live pups / no. of implantations) x 100, %

Live birth index = (no. of live pups on day 0 / no. of pups born) x 100, %

Sex ratio = (no. of male live pups / no. of live pups) x 100, %

Viability index = (no. of live pups on day 4 / no. of live pups on day 0) x 100, %

Table 18

Preliminary reproduction toxicity screening test of MEP by oral administration in rats

Body weight of pups up to day 4 of lactation

Compound	MEP			
	0 ^a	4	15	60
Day 0				
No. of live pups				
Male	6.0 ± 1.8 (12)	6.2 ± 2.5 (13)	7.3 ± 1.7 (12)	7.6 ± 2.2 (12)
Female	8.2 ± 1.9 (12)	6.2 ± 1.9 (13)	7.2 ± 2.0 (12)	6.8 ± 2.0 (12)
Body weight (g)				
Male	6.9 ± 0.4 (12)	7.4 ± 1.0 (13)	6.9 ± 0.5 (12)	6.8 ± 0.5 (12)
Female	6.4 ± 0.5 (12)	7.0 ± 1.0 (13)	6.5 ± 0.4 (12)	6.5 ± 0.4 (12)
Day 4				
No. of live pups				
Male	5.9 ± 1.8 (12)	6.2 ± 2.5 (13)	7.2 ± 1.6 (12)	7.3 ± 2.3 (12)
Female	8.2 ± 1.9 (12)	6.2 ± 1.9 (13)	7.1 ± 2.1 (12)	6.8 ± 2.0 (12)
Body weight (g)				
Male	11.1 ± 1.4 (12)	12.2 ± 2.6 (13)	10.7 ± 1.4 (12)	10.8 ± 1.9 (12)
Female	10.6 ± 1.4 (12)	11.7 ± 2.8 (13)	10.3 ± 1.6 (12)	10.4 ± 1.8 (12)

a: vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)